

急性髓系白血病人 CDH13 基因甲基化状态检测及其临床意义

袁媛, 张凤

[摘要] **目的:**检测急性髓系白血病(AML)病人 CDH13 基因甲基化状态,探讨其与病人临床特征及预后的相关性。**方法:**用甲基化特异性 PCR 法分别检测 34 例 AML 病人(AML 组)和 22 例非恶性肿瘤的缺铁性贫血病人(对照组)骨髓标本中 CDH13 基因启动子甲基化状态,用半定量反转录 PCR 法检测 2 组标本中 CDH13 mRNA 相对含量。AML 组病人随访 2 年,统计总体生存时间。**结果:**AML 组标本 CDH13 基因甲基化阳性率为 61.76%,高于对照组的 27.27% ($P < 0.05$);AML 组 CDH13 mRNA 相对含量为 0.355 ± 0.109 ,明显低于对照组的 0.745 ± 0.271 ($P < 0.01$)。不同性别、年龄以及临床分型 AML 病人的 CDH13 基因甲基化差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。Kaplan-Meier 生存曲线分析显示,CDH13 基因甲基化阳性的 AML 病人总体生存时间为 (12.4 ± 3.3) 个月,明显短于甲基化阴性病人的 (18.6 ± 4.1) 个月 ($P < 0.01$)。**结论:**AML 病人中存在 CDH13 基因甲基化现象,检测 CDH13 基因表达水平有助于判断 AML 病人预后。

[关键词] 急性髓系白血病;CDH13 基因;甲基化;总体生存时间

[中图分类号] R 733.71 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.10.014

The methylation detection of CDH13 gene in patients with acute myeloid leukemia, and its clinical significance

YUAN Yuan, ZHANG Feng

(Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:**To detect the methylation of CDH13 gene in patients with acute myeloid leukemia (AML), and explore the relationships with clinical features and prognosis of AML patients. **Methods:**The methylation status of CDH13 promoter gene in bone marrow from 34 patients with AML (AML group) and 22 nonmalignant tumor patients with iron deficiency anemia (control group) were detected using the methylation specific polymerase chain reaction (PCR). The expressions of CDH13 mRNA in two groups were detected using semi-quantitative reverse transcription PCR. All patients were followed-up for 2 years, and the overall survival time of patients were calculated. **Results:**The CDH13 gene methylation positive rate of AML group (61.76%) was higher than that of control group (27.27%) ($P < 0.05$). The relative content of CDH13 mRNA in AML group (0.355 ± 0.109) was significantly lower than that in control group (0.745 ± 0.271) ($P < 0.01$). The differences of the methylation status of CDH13 gene in AML patients of indifferent gender, age and clinical typing were not statistically significant ($P > 0.05$). Kaplan-Meier survival curve analysis showed that the overall survival time in AML patients with positive methylation of CDH13 gene [(12.4 ± 3.3) months] was significantly shorter than that in AML patients with negative methylation of CDH13 gene [(18.6 ± 4.1) months] ($P < 0.01$). **Conclusions:**The methylation phenomenon of CDH13 gene can be found in patients with AML, and detecting the CDH13 gene expression can help to judge the prognosis of patients.

[Key words] acute myeloid leukemia; CDH13 gene; methylation; overall survival time

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是我国常见的成人血液系统恶性肿瘤性疾病。从分子生物学角度研究 AML 的发生、发展机制,人们发现它与基因表达调控失常、信号转导通路异常激活等多种因素有关,其中抑癌基因表达缺失亦发挥不可缺少的作用。CDH13 基因是 cadherin 家族中的一员,作为一种抑癌基因参与细胞间黏附和相互识别^[1]。研究^[2-3]发现,CDH13 基因在肺癌、结肠

癌、前列腺癌等多种实体肿瘤中表达水平下降,表现为甲基化表观遗传学修饰下基因转录、翻译受阻,基因表达抑制。但当前对于 CDH13 基因在白血病,尤其是 AML 病人中表达情况的研究仍较为少见。因此,本研究通过检测 AML 病人 CDH13 基因甲基化状态,探讨其与临床特征及预后的相关性。现作报道。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2013 年 2 月至 2014 年 4 月我科收治的 AML 病人 34 例 (AML 组),均为首次确诊 AML 病人,且未接受相关化疗。其中男 18 例,女 16 例;年龄 25 ~ 69 岁,中位年龄 50 岁;M1 型 3 例,

M2 型 8 例, M3 型 11 例, M4 型 7 例, M5 型 4 例, M6 型 1 例。排除标准:慢性粒细胞性白血病急性期者;合并其他系统恶性肿瘤性疾病者;既往接受白血病相关化疗药物治疗者;无法进行定期随访者。选取同期排除恶性疾病的缺铁性贫血病人 22 例作为对照组,其中男 7 例,女 15 例;年龄 21~63 岁,中位年龄 47 岁。2 组病人的性别、年龄均具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 标本制备 治疗前抽取 AML 组和对照组病人骨髓液 4 mL,置于 EDTA 抗凝管中,加入红细胞裂解液将标本内红细胞完全裂解,进一步分离出未被破坏的单核细胞,制备单核细胞标本。

1.2.2 甲基化特异性 PCR 按照 DNA 提取试剂盒(上海生工)操作方法提取骨髓单核细胞标本中总 DNA,紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度,留取 A260/A280 比值 1.7~2.0 间的标本,使用甲基化检测试剂盒(zymo research)对 DNA 进行修饰。引物设计:甲基化上游引物 5'-TCG CGG GGT TCG TTT TTC GC-3',下游引物 5'-GAC GTT TTC ATT CAT ACA CGC G-3';非甲基化上游引物 5'-TTG TGG GGT TGT TTT TTG T-3',下游引物 5'-AAC TTT TCA TTC ATA CAC ACA-3'。反应条件:95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 35 s,52 °C 退火 35 s,72 °C 延伸 35 s,共 35 个循环;72 °C 孵育 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min 后,在 UVP 凝胶成像仪下观察并拍照。

1.2.3 半定量反转录 PCR 用 AMV 反转录试剂盒合成 cDNA,然后行 PCR 扩增。引物序列:CDH13 S(sense),5'-TTC AGC AGA AAG TGT TCC ATA T-3',CDH13 AS(anti-sense),5'-GTG CAT GGA CGA ACA GAG T-3'。β-actin(F)5'-GAG CTA CGA GCT GCC TGA CG-3',(R)5'-CCT AGA AGC ATT TGC GG TGG -3'。反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 60 s,58 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 90 s,25 个循环后,72 °C 再延伸 10 min。取产物 10 μL,2% 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统中分析。

1.2.4 随访 AML 组病人随访 2 年,主要方式为门诊随访和电话随访,每月 1 次。以 2 年期满或死亡为随访终点。

1.3 统计学方法 采用 t' 检验、 χ^2 检验、四格表确切概率法,生存分析采用 Kaplan-Meier 法和 Log Rank 检验。

2 结果

2.1 2 组病人 CDH13 基因甲基化情况比较 AML

组病人骨髓标本 CDH13 基因甲基化阳性率为 61.76% (21/34),高于对照组的 27.27% (6/22) ($\chi^2 = 6.36, P < 0.05$)。半定量反转录 PCR 结果显示,AML 组病人 CDH13 mRNA 相对含量为 0.355 ± 0.109 ,明显低于对照组的 0.745 ± 0.271 ($t' = 6.42, P < 0.01$)。

2.2 AML 组中 CDH13 基因甲基化阳性和阴性病人的 CDH13 mRNA 相对含量比较 半定量反转录 PCR 结果显示,AML 组病人中,CDH13 基因甲基化阳性者 CDH13 mRNA 相对含量为 0.189 ± 0.055 ,明显低于阴性组的 0.623 ± 0.106 ($t' = 13.67, P < 0.01$)。

2.3 不同临床资料 AML 病人的 CDH13 基因甲基化情况比较 不同性别、年龄以及临床分型 AML 病人的 CDH13 基因甲基化差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 1)。

表 1 不同临床资料 AML 病人的 CDH13 基因甲基化情况比较 (n)

临床资料	n	CDH13 基因甲基化		χ^2	P
		阳性	阴性		
性别					
男	18	13	5	—	>0.05*
女	16	8	8		
年龄/岁					
≥60	11	5	6	—	>0.05*
<60	23	16	7		
临床分型					
M1	3	2	1		
M2	8	4	4		
M3	11	7	4	1.49	>0.05
M4	7	4	3		
M5	4	3	1		
M6	1	1	0		

* 示四格表确切概率法

2.4 AML 组病人的生存时间分析 AML 组病人中共 32 例完成随访,2 例失访,随访完成率 94.12%,其中 2 例失访者均为 CDH13 基因甲基化阳性病人。Kaplan-Meier 生存曲线分析显示,19 例完成随访的 CDH13 基因甲基化阳性病人总体生存时间为 (12.4 ± 3.6) 个月,而 13 例甲基化阴性的病人总体生存时间为 (18.6 ± 5.6) 个月,经 Log Rank 检验,二者差异有统计学意义 ($\chi^2 = 9.27, P < 0.01$) (见图 1)。

3 讨论

AML 是我国最常见的白血病类型,占成人白血

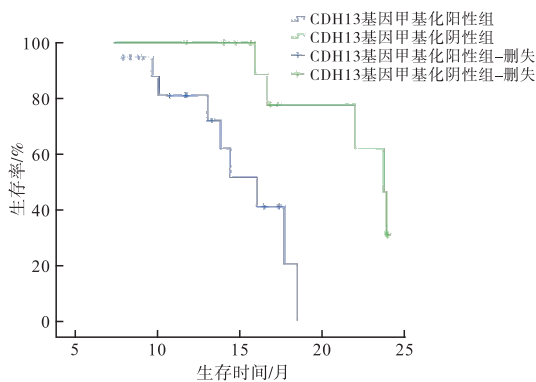


图1 AML组病人生存曲线

病的60%左右。在死亡率方面,AML是所有男性癌症死因的第六位,女性的第八位^[4]。AML的发生、进展过程涉及原癌基因、抑癌基因失衡和细胞信号转导通路异常等多种复杂过程,导致细胞增殖、分化、存活异常等改变。此过程中,抑癌基因表达缺失将导致细胞信号转导异常激活,而抑癌基因往往因甲基化、磷酸化等表观遗传学修饰而失活,这些发生了表观遗传学修饰的抑癌基因无法正常表达,从而失去对信号通路的抑制作用。

cadherin参与组织细胞生长过程中相互识别和黏附,有助于维持细胞间的选择性和组织形态稳定性,它们在发挥作用过程中需要钙离子辅助,故又称为钙黏蛋白。cadherin还同时通过多种机制发挥肿瘤细胞生长抑制和阻止浸润、转移作用。CDH13是cadherin家族中的一员,定位于人类染色体16q24上,它属于非典型的cadherin,不具有跨膜区域,而是通过甘油磷酸肌醇位点锚定在细胞膜的外表面,利用CDH13相关的信号蛋白来调控细胞分子行为^[5]。研究^[6-8]表明,CDH13基因在多数实体肿瘤,如肺癌、结肠癌、肝癌等细胞中表达均明显下调。CDH13基因表达抑制的机制很多,常见的包括基因突变、CpG岛甲基化以及杂合性缺失等,其中最常见的是表观遗传学修饰甲基化。

多种恶性肿瘤组织中可检测到CDH13基因高甲基化,进而引起CDH13基因表达下调。有学者^[9]研究发现,随着肿瘤进展,CDH13甲基化发生率呈逐步增长趋势,CDH13甲基化可能参与子宫内膜癌早期演变和进展。ZHONG等^[10]综合分析17项肺癌与CDH13基因甲基化相关性的研究发现,CDH13基因甲基化阳性是肺癌发生的危险因素。提示甲基化导致CDH13表达下调可能参与恶性肿瘤的发生、发展。此外,还有研究^[11]认为,CDH13基因甲基化与组织学分期和淋巴结转移有关,进而指出CDH13基因甲基化可作为评估、判断乳腺癌浸润性导管癌

预后的指标之一;CDH13基因甲基化也影响肿瘤细胞的生物学特性^[12]。

当前对于CDH13基因表达的研究多数集中在实体肿瘤,国内外对于白血病细胞中CDH13基因研究的报道仍较为少见,CDH13基因与白血病病人预后的关系也尚不得知。本研究结果显示,AML组病人的CDH13基因甲基化阳性率高达61.76%,高于对照组的27.27%;而基因启动子甲基化导致基因表达抑制,mRNA水平下降,半定量反转录PCR结果显示,AML组病人CDH13 mRNA相对含量明显低于对照组。提示AML病人存在CDH13基因高甲基化状态,启动子甲基化导致CDH13基因表达下调,对肿瘤生长、增殖的抑制作用下降。在此基础上,我们对AML组病人进行为期2年的随访,随访完成率94.12%,其中CDH13基因甲基化阳性病人总体生存时间为(12.4±3.6)个月,甲基化阴性的病人总体生存时间为(18.6±5.6)个月,二者差异有统计学意义。提示CDH13基因甲基化阳性病人的总体生存时间相对更低,预后不良。

综上,AML病人中存在CDH13基因甲基化现象,检测CDH13基因表达水平有助于判断AML病人总体预后。去甲基化药物可能是治疗AML和改善预后的潜在方向,仍待进一步的临床大样本对照研究证实。

[参 考 文 献]

- [1] UETANI E, TABARA Y, KAWAMOTO R, *et al.* CDH13 genotype-dependent association of high-molecular weight adiponectin with all-cause mortality: the J-SHIP study [J]. *Diabetes Care*, 2014, 37 (2):396.
- [2] OZDEMIR F, ALTINISIK J, KARATEKE A, *et al.* Methylation of tumor suppressor genes in ovarian cancer [J]. *Exp Ther Med*, 2012, 4(6):1092.
- [3] 王晓娟, 李娟, 傅冰洁, 等. 慢性髓系白血病病人 CD34⁺、CD38⁺ 细胞水平 JunB 和 CDH13 基因启动子区域甲基化状态研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(6):1405.
- [4] YANG L, FUJIMOTO J. Childhood cancer mortality in Japan, 1980-2013 [J]. *BMC Cancer*, 2015, 1(15):446.
- [5] TENG MS, WU S, HSU LA, *et al.* Differential associations between CDH13 genotypes, adiponectin levels, and circulating levels of cellular adhesive molecules [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 635751.
- [6] 王丽, 汪竹, 袁昕, 等. 结直肠癌中 CDH13 基因甲基化及其临床意义 [J]. *江苏医药*, 2012, 38(2):199.
- [7] ZHAI X, LI SJ. Methylation of RASSF1A and CDH13 genes in individualized chemotherapy for patients with non-small cell lung cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(12):4925.
- [8] TAHARA T, MAEGAWA S, CHUNG W, *et al.* Examination of whole blood DNA methylation as a potential risk marker for gastric cancer [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2013, 6(10):1093.

FMNL2、RAC1 在结直肠癌组织中的表达及意义

郭婉薇, 杨海云, 李 博, 黎丽旋, 许 鸣

[摘要] **目的:** 检测 FMNL2 及 RAC1 在结直肠癌组织及相应癌旁组织中的表达情况及与临床病理学参数之间的相关性。 **方法:** 采用 RT-qPCR 及免疫组织化学 SABC 法, 分别检测 FMNL2 及 RAC1 mRNA 及蛋白在结直肠癌及癌旁组织中的表达。 **结果:** 结直肠癌中 FMNL2 及 RAC1 mRNA 表达均高于相对应的癌旁组织 ($P < 0.01$); FMNL2 和 RAC1 蛋白表达在结直肠癌组织中的阳性率分别为 61.7%、68.3%, 高于对应的癌旁组织中 20.8% 和 31.7% ($P < 0.01$)。FMNL2 及 RAC1 蛋白表达均与结直肠癌细胞淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期密切相关 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 而与病人年龄、性别、肿瘤大小、分化及浸润深度无明显相关关系 ($P > 0.05$)。FMNL2 的表达与 RAC1 的表达呈正相关关系 ($r = 0.495, P < 0.05$)。 **结论:** FMNL2 与 RAC1 在结直肠癌组织中高表达, 且与肿瘤恶性生物学行为特别是转移密切相关, 联合检测二者的表达对预测肿瘤转移、判断预后具有重要意义。

[关键词] 结直肠肿瘤; FMNL2; RAC1; 转移

[中图分类号] R 735.3 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.10.015

Expression and significance of FMNL2 and RAC1 in colorectal cancer

GUO Wan-wei, YANG Hai-yun, LI Bo, LI Li-xuan, XU Ming

(Department of Gastroenterology, The Second People's Hospital of Guangdong, Guangzhou Guangdong 510317, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expressions of FMNL2 and RAC1 in colorectal cancer (CRC) tissues and corresponding precancerous lesions, and correlation of the expressions with clinical pathological parameters. **Methods:** The mRNA and protein expressions of FMNL2 and RAC1 in CRC tissues and corresponding precancerous lesions were detected by real-time PCR and immunohistochemistry (IHC) method. **Results:** The mRNA expressions of FMNL2 and RAC1 in CRC tissues were higher than those in corresponding precancerous lesions ($P < 0.01$). The positive rates of FMNL2 and RAC1 in CRC tissues (61.7% and 68.3%) were higher than those in corresponding precancerous lesions (20.8% and 31.7%), respectively ($P < 0.05$). The expressions of FMNL2 and RAC1 were closely related to the tumor metastasis, lymph node metastasis and TNM staging ($P < 0.05$ to $P < 0.01$), but which was not related to the gender and age of patients, and size, differentiation and invasion of tumor ($P > 0.05$). The expression of FMNL2 was positively correlated with RAC1 ($r = 0.495, P < 0.05$). **Conclusions:** The expressions of FMNL2 and RAC1 in CRC tissues are high, which is closely related to the tumor metastasis. The combined detection of FMNL2 and RAC1 have important significances in predicting tumor metastasis and prognosis of tumor.

[Key words] colorectal neoplasms; FMNL2; RAC1; metastasis

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是一种常见

严重威胁人类生命健康的恶性肿瘤, 转移是导致 CRC 病人死亡的重要原因^[1]。近年来, 虽然有大量文献^[2-4]报道各种因子与 CRC 转移密切相关, 但临床上仍然缺少特异性和敏感性较强的判断病人转移及预后的指标。本文采用 RT-qPCR 及免疫组织化学 SABC 法, 检测 CRC 组织及相应癌旁组织中

[收稿日期] 2016-04-05

[作者单位] 广东省第二人民医院 消化内科, 广东 广州 510317

[作者简介] 郭婉薇 (1979 -), 女, 主治医师。

[通信作者] 许 鸣, 硕士研究生导师, 主任医师。E-mail: 177xm@163.com

[9] SHENG Y, WANG H, LIU D, *et al.* Methylation of tumor suppressor gene CDH13 and SHP1 promoters and their epigenetic regulation by the UHRF1/PRMT5 complex in endometrial carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 140(1): 145.

[10] ZHONG YH, PENG H, CHENG HZ, *et al.* Quantitative assessment of the diagnostic role of CDH13 promoter methylation in lung cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(3): 1139.

[11] SHAKERI H, GHARESOURAN J, FAKHRJOU A, *et al.* DNA

methylation assessment as a prognostic factor in invasive breast cancer using methylation-specific multiplex ligation dependent probe amplification [J]. *EXCLI J*, 2016, 15: 11.

[12] KUPHAL S, MARTYN AC, PEDLEY J. H-cadherin expression reduces invasion of malignant melanoma [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2009, 22(3): 296.

(本文编辑 卢玉清)