

ID4、ZO-1 基因甲基化定量检测 在急性白血病诊断中的意义

康慧媛^{1,2} 王新荣² 高丽² 李绵洋¹ 王成彬¹ 于力²

基金项目:973 国家重点基础研究专项经费项目(2005CB522400);国家自然科学基金重大研究计划(90919044);

首都医学发展科研基金重点项目(2007-2040)

作者单位:100853 北京市,中国人民解放军总医院临床检验科¹,血液科²

通讯作者:于力,E-mail:chunhuiyu@yahoo.com

【摘要】 目的 探讨 ID4、ZO-1 基因甲基化定量检测作为基因标志在急性白血病(acute leukemia, AL) 中的意义。方法 采用硫化测序 PCR (bisulfite sequencing PCR, BSP) 法及甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 法检测 AL 中 NB4 细胞和健康供者骨髓(normal bone marrow, NBM) 细胞的 ID4、ZO-1 基因的甲基化状况并进行分析。结果 BSP 法检测 ID4 基因在 AL NB4 细胞中甲基化阳性率为 86.0%,显著高于 NBM 细胞甲基化阳性率(4.8%),差异有统计学意义($P < 0.05$);ZO-1 基因在 AL NB4 细胞系中甲基化阳性率为 88.4%,显著高于 NBM 细胞甲基化阳性率(1.9%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。采用 MSP 法检测 9 种 AL 细胞系, ID4、ZO-1 基因甲基化水平在淋系来源的细胞系高于髓系来源的细胞系。结论 ID4、ZO-1 基因甲基化水平检测可作为新的 AL 基因标志物。

【关键词】 甲基化;定量检测;急性白血病;ID4;ZO-1;硫化测序 PCR;甲基化特异性 PCR

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2012.04.006

Diagnostic significance of ID4 and ZO-1 genes quantity methylation detection in acute leukemia

KANG Hui-yuan¹, WANG Xin-rong², GAO Li², et al. ¹Department of Clinical Tests, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China ²Department of Hematology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 **Objective** To analyse the gene marker significance of ID4 and ZO-1 genes quantity methylation level in acute leukemia (AL). **Methods** The methylated situations of ID4 and ZO-1 genes in AL and normal bone marrow(NBM) cells were detected by bisulfite sequencing PCR(BSP) and methylation specific PCR (MSP), and the data were analysed. **Results** In BSP method, the methylation positive rates of ID4 and ZO-1 genes in AL NB4 cell(86.0% and 88.4%) were all higher than in NBM cells(4.8% and 1.9%), and the differences all had statistical significance ($P < 0.05$). In MSP method, acute lymphocytic leukemia cell lines had higher methylation levels of ID4 and ZO-1 genes than acute myeloblastic leukemia cell lines. **Conclusion** ID4 and ZO-1 genes may be a new gene marker to evaluate AL prognosis.

【Key words】 Methylation; Quantification; Acute leukemia; ID4; ZO-1; Bisulfite sequencing PCR; Methylation specific PCR

急性白血病(acute leukemia, AL)是一种恶性血液系统疾病。目前认为白血病的发生是复杂的、多步骤的,涉及与细胞增殖、分化等有关的原癌基因、抑癌基因和其他重要基因。白血病的发生是抑癌基因和原癌基因在遗传学和表观遗传学方面共同变异的结果^[1]。以 DNA 异常甲基化为代表的表观遗传修饰是研究最为深入的表观遗传学调控机制之一,也是肿瘤细胞中经常发生的改变。同一基因在不同细胞类型的白血病中存在不同的甲基化改变^[2]。之前的研究^[3-6]证明 ID4 基因、ZO-1 基因在正常骨髓中呈

完全非甲基化,而在许多血液系统恶性疾病中呈异常高甲基化且表达受抑。提示 ID4、ZO-1 基因与血液系统恶性疾病的发生发展密切相关。为进一步探讨 ZO-1、ID4 基因启动子区在 AL 中的甲基化状况,本文研究采用硫化测序 PCR (bisulfite sequencing PCR, BSP)及甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP)技术,对 AL 细胞系、健康供者骨髓(normal bone marrow, NBM)进行甲基化定量分析。以明确 ZO-1、ID4 基因与 AL 的关系,为寻找 AL 的基因标志物提供新的理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 用于 BSP 法的 AL 细胞系 NB4 为我室保存的细胞株。NBM 来自我院 1 例健康献血员。用于 MSP 法的 AL 细胞系 Jurkat、Raj1、molt4、KG-1、THP-1、NB4、Kasumi-1、U937 和 K-562 为我室保存的细胞株。其中 Jurkat、Raj1 和 molt4 为淋系来源的细胞株, KG-1、THP-1、NB4、Kasumi-1、U937 和 K-562 为髓系来源的细胞株。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 各种细胞系培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件的 CO₂ 培养箱中培养, 于细胞对数增殖期直接收集细胞提取基因组 DNA。

1.2.2 人类基因组 DNA 的提取 采用北京 Promega 公司的基因组 DNA 纯化试剂盒 (Promega Genomic DNA Purification Kit), 按试剂盒说明进行实验操作, 提取骨髓标本中的基因组 DNA。全骨髓细胞 400 μl 中加入细胞裂解液 900 μl, 混匀, 静置 15 min; 以离心半径 8.4 cm, 13 000 rpm 离心 15 min, 去上清; 加入 300 μl 到 600 μl 核裂解液, 混匀, 静置 10 min; 加入蛋白裂解液 200~150 μl, 混匀; 以离心半径 8.4 cm, 13 000 rpm 离心 15 min; 加入 700 μl 异丙醇于上清, 混匀; 以离心半径 8.4 cm, 13 000 rpm 离心 15 min, 弃上清; 加入 70% 乙醇 700 μl, 以离心半径 8.4 cm, 13 000 rpm 离心 10 min; 弃上清, 室温干燥 5~10 min, 加入 DNA 溶解液 50~100 μl; 4 °C 保存。

1.2.3 DNA 碱基修饰 采用 Qiagen 公司的表观技术硫化试剂盒 (Qiagen EpiTec bisulfit kit), 实验操作严格按照试剂盒说明书进行。加 30 ml 乙醇 (96%~100%) 入 BW, 室温贮存 (15~25 °C); 加 27 ml 乙醇 (96%~100%) 入 BD, 室温贮存; 每个 aliquot 中加入 800 μl RNase-free 水; 振荡 5 min; 将 DNA (1 ng~2 μg)、RNase-free 水 20 μl、Mix85 μl、DNA protect buffer 35 μl 配成硫化体系, 混匀, 室温静置。反应条件: 99 °C 5 min, 60 °C 25 min, 99 °C 5 min, 60 °C 85 min, 99 °C 5 min, 60 °C 175 min。硫化基因组 DNA, -20 °C 保存备用。

1.2.4 BSP 引物 PCR 所用引物均由英国 Invitrogen 生命技术有限公司合成, 反应条件: ID4 基因: 95 °C 15 min; 94 °C 50 s, 53 °C 45 s, 72 °C 60 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min; ZO-1 基因: 95 °C 15 min; 94 °C 50 s, 56 °C 45 s; 72 °C 60 s, 共 35 个循环; 72 °C 7 min。

1.2.5 MSP 引物 PCR 所用引物均由英国 Invitrogen 生命技术有限公司合成。反应条件: 95 °C 10 min, 94 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共 48 个循环。

1.2.6 MSP 法检测结果判定 目的基因与内参均有扩增峰值, 判定为阳性; 目的基因无扩增曲线, 内参有扩增峰值, 判定为阴性。计算目的基因的相对甲基化水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。样本间率的比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BSP 法检测测序结果

2.1.1 ZO-1 基因

2.1.1.1 NB4 细胞系克隆 1

```
GGAAATGTTTTTAAAGTTATTTGGTTATTCGGTTTTTTTTTCGCGTTGGGGTCGGG
1 2 3 4
ATTTCGGTCGTTTCGTTTCGTTTTTTTTTCGTCGGGTTTCGTTTTTTTTTCGTTTCGTTT
5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
CGTTTCGTTTCGTTTAGTTTCGTTTTTCGTTTCGGTCGGGTATGTTTAGTGGGTCGGGTCG
15 16 17 18 19 20 21 22 23
GTAGGTTTCGCGTGGTGTGAGTTGTGCGCGTCGGTTGAGTTAGCGGACGTCGCGTTT
24 25 26 27 28 29 30 31 32
TTTGGCGGTTCGCGTTTTTCGGGAAGTTACGTGGCGAAGTCGGTTTTTCGAGGAGACGT
33 34 35 36 37 38 39 40 41
CGGGAGGTTACGGGTGTTGTTGA
42 43
```

NB4 细胞系的 10 个克隆中, 克隆 1 只有第 20 位点未发生甲基化, 其甲基化阳性率为 97.7% (42/43); 克隆 2~10 的甲基化阳性率分别为 90.7% (39/43)、88.4% (38/43)、86.0% (37/43)、83.7% (36/43)、83.7% (36/43)、88.4% (38/43)、88.4% (38/43)、83.7% (36/43)、93.0% (40/43)。NB4 细胞系 10 个克隆的甲基化位点总阳性率为 88.4%。

2.1.1.2 NBM 克隆 1

```
GGAAATGTTTTTAAAGTTATTTGGTTATTTGGTTTTTTTTTTTGTGTTTGGGGTGGG
1 2 3 4
AITTTGGTTGTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTGGTTGTTGTTTTTTTTTTTGTGTTTTTTGTTT
5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
TGTTTGTGTTTGTGTTAGTTTGTTTTTTGTGTTGGGTTGGGTATGTTTAGTGGGTTGGGTTG
15 16 17 18 19 20 21 22 23
GTAGGTTGTTGTTGGTTGTTGAGTTGTTGTTGTTGGTTGAGTTAGTGGATGTTGTTGTTT
24 25 26 27 28 29 30 31 32
TTTGGTGGTTGTTGGTTTTTGGGAAGTTATGTTGTTGAAAGTTGGTTTTTGGAGGAGATGT
33 34 35 36 37 38 39 40 41
TGGGAGGTTATGGGTTGTTGTTGA
42 43
```

NBM 的 10 个克隆中, 克隆 1 的所有位点均未发生甲基化, 其甲基化阳性率为 0.0% (0/43); 克隆 2~10 的甲基化阳性率分别为 0.0% (0/43)、2.3% (1/43)、9.3% (4/43)、6.97% (3/43)、0.0% (0/43)、0.0% (0/43)、0.0% (0/43)、0.0% (0/43)、0.0% (0/43)。NBM 10 个克隆的甲基化总阳性率为 1.9%。

2.1.2 ID4 基因

2.1.2.1 NB4 细胞系克隆 1

```

TTTGATTGGTTGGTTATTTTAGATTTTTTCGTTATTTTTTATTCCGGGTAG
          1           2
TCGGATTTTTCGTTTTTAGTATCGTTTCGAGTTCGTTTTGTTTTTTTTT
          3           4           5           6           7           8
TCGCGTTTTTCGTTTCGCGCGTTTAGCGGGTTTCGTTTCGGTTCGCGTTGCGATT
          9 10          11 12 13 14          15          16 17          18 19 20
CGGTTTCGCGCGTTGTTGTTTCGTTTTTCGGGGCGTACGGTTTTATAAATAGTT
21  22 23 24          25  26  27  28
GC GCGCGCGGGTTCGGGCGAGAGCGTAGTGGAGGAGGCGCGGTTGTGAGTA
29 30 31  32  33  34          35 36
GTATCGGGAGTGGGGTGATTTTCGGGTTAGGGGAGCGCGGGCGGTCGGATCGG
37          38          39 40 41 42 43 44
GGTTTTAGTCGGAGTTTCGAAGGGAGTGATTAGGATATTCGGGTGGGTTATTT
          45          46          47
TTTTTTTCGGTG
          48
    
```

NB4 细胞系的 10 个克隆中,克隆 1 只有第 6,8 位点未发生甲基化,其甲基化阳性率为 93.8%(46/48);克隆 2~10 的甲基化阳性率分别为 91.7%(44/48),91.7%(44/48),97.9%(47/48),97.9%(47/48),87.5%(42/48),93.8%(45/48),89.6%(43/48),37.5%(18/48),77.1%(37/48);NB4 细胞系 10 个克隆的甲基化总阳性率为 86.0%。

2.1.2.2 NBM 克隆 1

```

TTTGATTGGTTGGTTATTTTAGATTTTTTCGTTATTTTTTATTCCGGGTAG
          1           2
TTGGATTTTTGTTTTTAGTATTGTTTCGGAGTTTTGTTTTGTTTTTTTTT
          3           4           5           6           7           8
TTGTGTTTTGTTTTGTGTGTTTAGTGGGTTTTGTTTGGTTTGTGTTGTGATT
          9 10          11 12 13 14          15          16 17          18 19 20
TG GTTTGTGTGTTGGTTTTGTTTTTCGGGGTGATGGTTTTATAAATAGTT
21  22 23 24          25  26  27  28
GTGTGGTGGGTTGGGTGAGAGTGTAGTGGAGGAGGTGTGTTGTGAGTA
29 30 31  32  33  34          35 36
GTATTCGGAGTGGGGTGATTTTCGGGTTAGGGGAGTGTGGTGGTTGTGATTG
37          38          39 40 41 42 43 44
GGTTTTAGTTGGAGTTTTGAAGGGAGTGATTAGGATATTTTCGGGTGGGTTATTT
          45          46          47
TTTTTTTGGTG
          48
    
```

NBM 的 10 个克隆中,克隆 1 的所有位点均未发生甲基化,其甲基化阳性率为 0.0%(0/48);克隆 2~10 的甲基化阳性率分别为 2.1%(1/48),12.5%(6/48),18.8%(9/48),2.1%(1/48),0.0%(0/48),2.1%(1/48),4.2%(2/48),4.2%(2/48),2.1%(1/48);NBM10 个克隆的甲基化总阳性率为 4.8%。

2.1.2.3 ID4、ZO-1 基因在 NB4 细胞系和 NBM 中的甲基化情况 BSP 法检测 ID4、ZO-1 基因在 NB4 细胞系中的甲基化阳性率均明显高于 NBM 中的甲基化阳性率 ($\chi^2=639.120, \chi^2=649.846, P$ 均 < 0.05)。见表 1。

2.2 MSP 法检测结果 分别检测 AL9 个细胞系中 ID4、ZO-1 基因及内参基因的相对甲基化水平,结果

显示, ID4 基因在 AL9 个细胞系中均为甲基化阳性,且甲基化水平都很高。其中淋系来源的细胞系甲基化水平 (Jurkat:218%, Raj1:823%, molt4:768%) 远高于髓系来源的细胞系甲基化水平 (KG-1:334%、THP-1:106%、NB4:148%、Kasumi-1:181%、U937:291%、K-562:193%)。ZO-1 基因在 Jurkat、Raj1、molt4、KG-1、NB4、Kasumi-1 和 U937 细胞系中为甲基化阳性,但在 THP-1 和 K-562 细胞系中为甲基化阴性;ZO-1 基因甲基化水平在淋系来源的细胞系 (Jurkat:263%, Raj1:893%, molt4:708%) 高于髓系来源的细胞系 (KG-1:413%、THP-1:0%、NB4:134%、Kasumi-1:107%、U937:121%、K-562:0%)。见表 2。

表 1 BSP 法检测 ID4、ZO-1 基因在 NB4 细胞系及 NBM 中的甲基化状况 (%)

基因	NB4 甲基化阳性率	NBM 甲基化阳性率	χ^2 值	P 值
ID4 基因	86.0	4.8	639.120	0.000
ZO-1 基因	88.4	1.9	649.846	0.000

表 2 MSP 法检测 ID4、ZO-1 基因在髓系及淋系细胞系中的甲基化水平 (中位数, %)

基因	髓系来源甲基化水平	淋系来源甲基化水平
ID4 基因	209	603
ZO-1 基因	129	621

3 讨论

DNA 甲基化是表观遗传学中非常重要的机制之一,由甲基转移酶 DNMT 将甲基转移到 DNA5C-胞嘧啶上,而基因启动子区往往存在富含 CpG 区域的 CpG 岛,其异常高甲基化导致基因表达沉默^[7]。抑癌基因启动子区异常甲基化发生于肿瘤早期且持续存在,导致肿瘤发生、发展^[8]。特别是白血病中多种与细胞生长、增殖调控密切相关的抑癌基因启动子区频发高甲基化致基因失表达^[9]。

ZO-1 基因属于膜结合鸟苷酸家族成员,涉及细胞黏附、细胞周期、分化、增殖调控,并在乳腺癌、胃肠癌、胰腺癌、上皮癌、黑色素瘤及血液系统恶性疾病中起重要作用^[10,11]。ID4 基因是 b-HLH 转录因子家族成员,与细胞分化、增殖调控及肿瘤进程有密切关系^[12-14]。Yu 等^[15]发现 ID4 基因是潜在的白血病相关基因。

甲基化研究中,BSP 是由 Frommer^[16]提出的研究 DNA 甲基化的方法。可以检测给定区域内每个 CpG 位点的甲基化状态,是一种最精确的甲基化检

测方法。MSP 法是由 Eads 等^[17]于 2000 年首先报道, 可得到特定基因甲基化定量水平。

本文研究中, 首先采用 BSP 方法检测 ZO-1 和 ID4 甲基化状态, 结果表明 AL 细胞系 NB4 中 ID4 基因启动子区呈异常高甲基化状态, CpG 位点的阳性率(86.0%)明显高于 NBM(4.8%); ZO-1 基因启动子区也呈异常高甲基化状态, CpG 位点的阳性率(88.4%)明显高于 NBM(1.9%)。同时, 笔者推测 ID4 和 ZO-1 基因启动子区在 AL 中异常高甲基化, 导致其表达沉默, 可能影响了细胞分化与增殖调控过程, 而成为 AL 发生发展的一个推进因素。

应用 MethyLight 方法对 9 个 AL 细胞系 Jurkat、Raj1、molt4、KG-1、THP-1、NB4、Kasumi-1、U937 和 K-562 进行 ID4、ZO-1 基因甲基化水平检测结果发现, ID4 基因在细胞系中均为甲基化阳性, 且淋系来源的细胞系甲基化水平远高于髓系来源的细胞系。ZO-1 基因在 9 个细胞系中有 7 个细胞系为甲基化阳性, 且 ZO-1 基因甲基化水平在淋系来源的细胞系高于髓系来源的细胞系。ID4、ZO-1 基因在 AL 细胞系中普遍发生了异常高甲基化, 那么 ID4、ZO-1 基因甲基化状况可能是白血病基因标志物, 若其能够应用于白血病诊断、预后及微残检测, 其覆盖率将大大高于遗传学标志物。在成人 AL 中, 急性淋巴细胞白血病相对于急性髓系细胞白血病危险度高, 预后差。而本文研究中淋系来源的细胞系甲基化水平较髓系来源的细胞系甲基化水平更高, ID4、ZO-1 基因异常甲基化可能预示疾病的不良预后, 其甲基化水平检测可能在 AL 预后中起重要作用。

ID4、ZO-1 基因异常甲基化与 AL 的发生密切相关, 由于其泛白血病性及预后相关可能性, 使得其有条件成为 AL 诊断、靶向治疗及预后的分子标志。我们将继续从定性、定量两方面在大量 AL 患者中研究 ID4、ZO-1 基因甲基化状况, 探讨其在 AL 中的意义, 并应用于临床。

4 参考文献

- 1 Bernasconi P. Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: relationships and distinctions—a review. *Br J Haematol*, 2008, 142: 695–708.
- 2 Melki JR, Clark SJ. DNA methylation changes in leukaemia. *Semin Cancer Biol*, 2002, 12: 347–357.
- 3 赵瑜, 于力, 王全顺, 等. DNA 结合抑制因子 4 基因甲基化状态检测在急性白血病中的意义. *中华内科杂志*, 2006, 45: 576–578.
- 4 Laing JG, Koval M, Steinberg TH. Association with ZO-1 correlates

with plasma membrane partitioning in truncated connexin45 mutants. *J Membr Biol*, 2006, 207: 45–53.

- 5 康慧媛, 于力, 王畅, 等. 骨髓增生异常综合征患者 ZO-1 基因甲基化状态检测的临床意义. *中国实验血液学杂志*, 2008, 16: 70–73.
- 6 王畅, 于力, 王冠军, 等. 急性白血病 ZO-1 基因表达与甲基化调控关系的研究. *山东医药*, 2007, 47: 1–3.
- 7 Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 2003, 349: 2042–2054.
- 8 Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 2004, 429: 457–463.
- 9 Aggerholm A, Holm MS, Cullberg P, et al. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur J Haematol*, 2006, 76: 23–32.
- 10 Smalley KSM, Brafford P, Nikolas K, et al. Up-Regulated Expression of Zonula Occludens Protein-1 in human melanoma associates with N-adherin and contributed to invasion and adhesion. *American Journal of Pathology*, 2005, 166: 1541–1554.
- 11 Resnick MB, Gavilanez M, Newton E. Claudin expression of gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation. *Hum Pathol*, 2005, 36: 886–892.
- 12 Bedford L, Walker R, Kondo T, et al. ID4 is required for the correct timing of neural differentiation. *Dev Biol*, 2005, 280: 386–395.
- 13 Samanta J, Kessler JA. Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation. Published by The Company of Biologists, 2004, 131: 4131–4142.
- 14 Marin-Husstege M, He Y, Li J, et al. Multiple roles of ID4 in developmental myelination: predicted outcomes and unexpected findings. *Glia*, 2006, 54: 285–296.
- 15 Yu L, Liu C, Vandusen J, et al. Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies ID4 as a putative tumor suppressor gene in human leukemia. *Nat Genet*, 2005, 3: 265–274.
- 16 Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 1827–1831.
- 17 Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 32.

(收稿日期: 2012-08-20)

(本文编辑: 陈淑莲)