

论著·临床研究

## T系和B系急性淋巴细胞白血病 ID4 甲基化状态分析

胡洪玻 胡群

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科,湖北 武汉 430030)

**[摘要]** 目的 探讨DNA结合抑制因子4(ID4)基因甲基化与T系、B系及T/B双表达儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)的关系。方法 采用甲基化特异性聚合酶链式反应(MS-PCR)对18例初发ALL患儿进行ID4基因启动子区甲基化状况分析。18例ALL患儿中T系(T-ALL)2例,B系(B-ALL)13例,T/B双表达(T/B-ALL)3例。以34例同期住院的非肿瘤性疾病患儿为对照组。结果 ID4基因启动子区在初发ALL患儿中的完全甲基化率(15/18,83%)显著高于部分甲基化率(3/18,17%), $P < 0.05$ 。T-ALL、B-ALL和T/B-ALL患儿的完全甲基化率分别为50%、85%、100%,显著高于对照组(18%; $P < 0.05$ ),部分甲基化率和非甲基化率低于对照组( $P < 0.05$ )。T-ALL、B-ALL及T/B-ALL患儿之间ID4启动子区甲基化状态差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 ID4基因的甲基化可能与儿童ALL发病有关,T-ALL、B-ALL及T/B-ALL之间的ID4甲基化状态一致。

[中国当代儿科杂志,2010,12(12):940-942]

**[关键词]** 白血病;甲基化;DNA结合抑制因子4;儿童

**[中图分类号]** R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)12-0940-03

### ID4 methylation patterns in childhood T line and B line lymphocytic leukemia

HU Hong-Bo, HU Qun. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Hu Q, Email: qunhu0464@yahoo.com.cn)

**Abstract: Objective** To study the relationship of methylation of inhibitor of DNA binding 4 (ID4) gene core promoter region with childhood T line, B line and T/B acute lymphocytic leukemia (ALL). **Methods** Methylation-specific polymerase chain reaction (MS-PCR) was used to detect the methylation status of ID4 promoter region in 18 children with newly-diagnosed ALL (2 cases of T-ALL, 13 cases of B-ALL and 3 cases of T/B-ALL). Thirty-four hospitalized children with non-tumor disease served as the control group. **Results** The complete methylation rate of ID4 gene promoter region (15/18, 83%) was significantly higher than the partial methylation rate (3/18, 17%) in the 18 ALL children ( $P < 0.05$ ). The complete methylation rate of ID4 gene promoter region in children with T-ALL, B-ALL and T/B-ALL (50%, 85% and 100% respectively) was significantly higher than that in the control group (18%;  $P < 0.05$ ). In contrast, the partial methylation rate and non-methylation rate in the three ALL groups were significantly lower than those in the control group ( $P < 0.05$ ). There were no statistically significant differences in the methylation patterns among the B-ALL, T-ALL and T/B-ALL cases. **Conclusions** The methylation of ID4 promoter region may be related to the pathogenesis of childhood ALL. The methylation patterns of ID4 promoter region are identical in B-ALL, T-ALL and T/B-ALL. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (12):940-942]

**Key words:** Leukemia; Methylation; Inhibitor of DNA binding 4; Child

近年来人们逐渐认识到抑癌基因的甲基化和致癌基因的去甲基化与肿瘤的发生、发展密切相关。在许多肿瘤中,肿瘤抑制基因启动子区的甲基化是导致基因沉默的因素<sup>[1-2]</sup>。甲基化是指在CpG二核苷酸中胞嘧啶的5位碳原子上加上一个甲基基团,形成5-甲基胞嘧啶(5mC)。甲基化DNA结合抑制

因子4(inhibitor of DNA binding 4, ID4)属于显性负相螺旋-环-螺旋(dominant negative helix-loop-helix protein, dnHLH)转录因子亚家族,又称为分化抑制因子4,是碱性HLH(bHLH)转录因子的负性调控因子。研究发现ID4基因甲基化与白血病的发生有关<sup>[2]</sup>,为此本研究探讨不同类型急性淋巴细胞

[收稿日期]2010-04-05;[修回日期]2010-06-08

[作者简介]胡洪玻,硕士,医师。现工作单位:广西中医附属瑞康医院儿科,广西南宁530011。

[通信作者]胡群,教授。

白血病(ALL)患儿的 ID4 基因启动子区甲基化,进一步了解 ID4 基因甲基化与不同类型 ALL 的关系。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

病例组为华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科 2007 年 6 月至 2008 年 6 月初诊未治的 ALL 患儿 18 例,男 10 例,女 8 例;年龄 2 岁 6 个月至 14 岁(中位年龄 5.7 岁)。其中 T 系 ALL (T-ALL) 2 例, B 系 (B-ALL) 13 例, T/B 双表达 (T/B-ALL) 3 例。所有病例均符合中华医学会儿科分会血液学组 2006 年制定的诊断标准<sup>[3]</sup>。对照组为同期住院的非肿瘤性疾病 34 例,包括营养性贫血 10 例、特发性血小板减少性紫癜 10 例,感染性疾病 14 例;其中男性 27 例,女性 7 例;年龄 6 个月至 13 岁,中位年龄 3.0 岁。

### 1.2 方法

1.2.1 骨髓及外周血单个核细胞提取 取 ALL 患儿抗凝骨髓液或对照组外周血 2 mL,与 Hank's 液 1:1 混匀后,加于 1 mL 细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司)之液面上,以 1 500 转/min 离心 15 min。收集离心后的第二层细胞,并反复洗 2 次即得所需细胞。计数后取约 10<sup>6-7</sup> 细胞,加 200 μL 缓冲液 GA,振荡至彻底悬浮。

### 1.2.2 甲基化特异性聚合酶链式反应 (MS-PCR)

采用 DNA 提取试剂盒(天根公司)提取单个核细胞的 DNA,分光光度计鉴定 DNA 纯度及浓度。

DNA 重亚硫酸化修饰:取 DNA 标本 3 ~ 4 μg (溶于 50 μL 双蒸水中),经注射器反复抽吸,-20℃ 冻存等步骤物理剪切后,在 DNA 溶液中加入 250 μL 变性溶液,在 55℃ 温浴中 20 min 之后加入新鲜配置的重亚硫酸盐溶液(含亚硫酸氢钠,对苯二酚及氢氧化钠),55℃ 孵育 16 h,去硫酸化后纯化并收获 DNA,溶于双蒸水中,-20℃ 保存备用。

上游引物包含 3 个 CpG 位点,覆盖 TATA-box 和 E-box,下游引物包含 2 个 CpG 位点。PCR 产物覆盖 ID4 核心启动子区(-48 ~ +32)<sup>[4]</sup>。ID4 甲基化特异性引物上游为 ID4-MF,下游为 ID4-MR,扩增片段为 155 bp;非甲基化特异性引物上游为 ID4-UMF,下游为 ID4-UMR,扩增片段为 155 bp。引物序列: ID4-MF: 5-TTTTATAAATATAGTTGCGCGGC-3, ID4-MR: 5-GAATATCCTAATCACTCCCTTCGA-3; ID4-UMF: 5-TTTTATAAATATAGTTGTGTGGTGG-3, ID4-UMR: 5-AAATATCCTAATCACTCCCTTCAAA-3。

MS-PCR 反应体系 25 μL,包括 Master Mix 12.5 μL(天根公司),引物(上下游各 10 pmol) 2 μL,模板 2 μL,补充水至 25 μL。95℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min 完成产物扩增反应。每次实验以去离子水作为阴性对照。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,紫外透射分析仪观察结果,GDS 8000 凝胶成像系统摄取图像。

结果判定:仅 155 bp 甲基化引物扩增产物条带的标本定为 ID4 基因完全甲基化;仅 155 bp 非甲基化引物扩增产物定为 ID4 基因完全非甲基化;表达以上 2 种扩增产物的定为 ID4 基因部分甲基化。

### 1.3 统计学分析

采用 SAS 软件,进行 Fisher 确切概率法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

ID4 基因启动子区在 18 例初发 ALL 患儿的完全甲基化例数为 15 例(83%),部分甲基化例数为 3 例(17%),完全甲基化率显著高于部分甲基化率( $P < 0.05$ )。T-ALL、B-ALL 和 T/B-ALL 的完全甲基化率显著高于对照组( $P < 0.05$ ),部分甲基化率和非甲基化率低于对照组( $P < 0.05$ )。T-ALL、B-ALL 及 T/B-ALL 之间 ID4 启动子区甲基化状态一致( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 各类型 ALL ID4 甲基化状态 [例(%)]

组别	例数	完全甲基化	部分甲基化	非甲基化
对照组	34	6(18)	24(71)	4(12)
T-ALL 组	2	1(50) <sup>a</sup>	1(50) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>
B-ALL 组	13	11(85) <sup>a</sup>	2(15) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>
T/B-ALL 组	3	3(100) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>

a:与对照组比较, $P < 0.05$

## 3 讨论

哺乳动物基因中的启动子约含有 40% 的 CpG 岛(人类约 70%)。一般 CpG 岛的长度约 300 ~ 3 000 个碱基对(bp)。CpG 岛是指一个至少含有 200 bp 的区域,其中 GC 所占比例超过 50%,且 CpG 的观察值/预测值比例必须高于 0.6。ID4 启动子区富含 CpG 岛,其核心启动子区位于 -42 至 +32,此部位包含了 E 盒,Sp1 和 Sp3 基序<sup>[1]</sup>。ID4 基因甲基化与肿瘤发生、发展的关系近年来引起了人们的

关注。ID4 基因核心启动子区的完全甲基化可使基因表达沉默, ID4 蛋白表达缺失<sup>[2]</sup>, 多数学者认为 ID4 基因属于抑癌基因, 也有学者持相反意见。在胆管癌、结肠癌、食管鳞状细胞癌、乳腺癌<sup>[5-9]</sup>的研究中均支持 ID4 作为抑癌基因而发生作用, 在前列腺癌的研究中则两种结果均有<sup>[10-12]</sup>。Yu 等<sup>[13]</sup>提出 ID4 在白血病中是一种抑癌基因。Hagiwara 等<sup>[14]</sup>通过基因测序发现 ID4 基因在恶性淋巴瘤中频繁甲基化, 并没有检测到突变, 提示 ID4 基因甲基化导致基因功能丧失, ID4 在淋巴瘤中可能是一个抑癌基因。赵瑜等<sup>[15]</sup>发现成人白血病的 ID4 呈 80% 的甲基化, 而在急性淋巴及非淋巴细胞白血病的甲基化状态一致, 但急性白血病的甲基化率高于慢性白血病<sup>[16]</sup>。本研究中儿童 ALL 甲基化率为 83%, 与成人白血病 ID4 甲基化状态基本一致。对照组中部分甲基化及未甲基化率明显高于各类型 ALL 患儿, 甲基化率则明显低于 ALL 患儿, 提示儿童 ALL ID4 基因启动子区甲基化率较高, 可能与白血病的发生有关。另外本研究还发现 T-ALL、B-ALL 及 T/B-ALL 甲基化状态一致, 但因儿童 T-ALL 发病率相对较低, 本研究中 T-ALL 病例较少, 还需进一步扩大样本方有说服力。

### [参 考 文 献]

[1] Li Y, Nagai H, Ohno T, Yuge M, Hatano S, Ito E, et al. Aberrant DNA methylation of p57 (KIP2) gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype[J]. *Blood*, 2002, 100(7): 2572-2577.

[2] 胡洪波, 胡群, 刘爱国, 张耀东, 王冠玲. 白血病 ID4 基因核心启动子区甲基化及其表达[J]. *肿瘤*, 2009, 29(9): 874-878.

[3] 中华医学会儿科分会血液学组. 儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第三次修订草案)[J]. *中华儿科杂志*, 2006, 44(5): 392-395.

[4] Pagliuca A, Cannada-Bartoli P, Lania L. A role for Sp and helix-loop-helix transcription factors in the regulation of the human Id4 gene promoter activity[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(13): 7668-

7674.

[5] Uhm KO, Lee ES, Lee YM, Kim HS, Park YN, Park SH. Aberrant promoter CpG islands methylation of tumor suppressor genes in cholangiocarcinoma[J]. *Oncol Res*, 2008, 17(4): 151-157.

[6] Borinstein SC, Conerly M, Dzieciatkowski S, Biswas S, Washington MK, Trobridge P, et al. Aberrant DNA methylation occurs in colon neoplasms arising in the azoxymethane colon cancer model[J]. *Mol Carcinog*, 2010, 49(1): 94-103.

[7] Tsunoda S, Smith E, De Young NJ, Wang X, Tian ZQ, Liu JF, et al. Methylation of CLDN6, FBN2, RBP1, RBP4, TFPI2, and TMEFF2 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(4): 1067-1073.

[8] Roldán G, Delgado L, Musé LM. Tumoral expression of BRCA1, estrogen receptor alpha and ID4 protein in patients with sporadic breast cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(5): 505-510.

[9] Noetzel E, Vecek J, Niederacher D, Galm O, Horn F, Hartmann A, et al. Promoter methylation-associated loss of ID4 expression is a marker of tumour recurrence in human breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 154.

[10] Yuen HF, Chua CW, Chan YP, Wong YC, Wang X, Chan KW. Id proteins expression in prostate cancer: high-level expression of Id-4 in primary prostate cancer is associated with development of metastases[J]. *Mod Pathol*, 2006, 19(7): 931-941.

[11] Asirvatham AJ, Schmidt MA, Chaudhary J. Non-redundant inhibitor of differentiation (Id) gene expression and function in human prostate epithelial cells[J]. *Prostate*, 2006, 66(9): 921-935.

[12] Carey JP, Asirvatham AJ, Galm O, Ghogomu TA, Chaudhary J. Inhibitor of differentiation 4 (Id4) is a potential tumor suppressor in prostate cancer[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9:173.

[13] Yu L, Liu C, Vandeusen J, Becknell B, Dai Z, Wu YZ, et al. Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies ID4 as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia[J]. *Nat Genet*, 2005, 37(3): 265-274.

[14] Hagiwara K, Nagai H, Li Y, Ohashi H, Hotta T, Saito H. Frequent DNA methylation but not mutation of the ID4 gene in malignant lymphoma[J]. *J Clin Exp Hematop*, 2007, 47(1): 15-18.

[15] 赵瑜, 于力, 王全顺, 李红华, 薄剑, 窦丽萍. DNA 结合抑制因子 4 基因甲基化状态检验在急性白血病中的意义[J]. *中华内科杂志*, 2006, 45(7): 576-578.

[16] Uhm KO, Lee ES, Lee YM, Park JS, Kim SJ, Kim BS, et al. Differential methylation pattern of ID4, SFRP1, and SHP1 between acute myeloid leukemia and chronic myeloid leukemia[J]. *J Korean Med Sci*, 2009, 24(3): 493-497.

(本文编辑:俞 燕)