

DNA 甲基化与儿童白血病的临床研究进展

李玉华 综述 文飞球 审校

(暨南大学附属第二临床学院深圳市人民医院儿科, 广东 深圳 518020)

[中图分类号] R733.7 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2011)02-0174-04

DNA 甲基化是研究最广泛的哺乳动物表观遗传学修饰,它提供了一种稳定的可遗传的基因沉默机制,与组蛋白修饰和其他的染色质相关蛋白一起,在调节基因表达和染色体结构方面起重要作用。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT)的作用下,以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,将甲基转移到 5'-CG-3'序列(CpG)的胞嘧啶 5 位 C 上,生成 5 甲基胞嘧啶。CpG 二核苷酸不是均匀分布于人类基因组,CpG 比较聚集的区域,被称之为 CpG 岛,CpG 岛优先位于基因的 5'末端,占人类基因启动子的 60%^[1]。在发育期间及分化的组织,大多数 CpG 岛保持非甲基化状态,而基因组大多数 CpG 位点保持高甲基化状态^[2]。肿瘤的发生、发展与肿瘤细胞中存在的甲基化异常关系密切,同样与白血病的发病关系密切,DNA 甲基化研究对儿童白血病诊断、分型、预后和治疗均有重要意义,本文就近年甲基化与儿童白血病关系研究进展综述如下。

1 DNA 甲基化与儿童白血病发病

遗传学突变与白血病发病关系明确,如急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)的 *t*(12;21)(p13;q22)/*EVT6/RUNX1* 及超二倍体(51-67 染色体)等,但有充分证据表明,尽管遗传学改变可能是最重要的白血病发病机制,仍不足以完全解释白血病的发病^[3],如对 *EVT6/RUNX1* 和超二倍体的研究,这些改变发生在出生前,但没有引起明显的发病,需要另外的机制才能导致 ALL 发生。对于 *EVT6/RUNX1*,另外的发病机制有 *EBF1*、*EVT6* 和 *PAX5* 基因的丢失和获得染色体 21 和染色体臂 Xq,超二倍体 ALL 需要染色体 1q 重复,*CDKN2A* 和

PAX5 缺失,及 *FLT3*、*NRAS*、*KRAS* 和 *PTPN11* 突变。许多这些次级变化是基因组失衡和畸变,影响了基因含量和导致了异常表达谱^[4]。因此,表观遗传学异常引起的基因失调可能是白血病发病的另外机制。表观遗传异常常见的有:异常的 DNA 甲基化,核小体定位,组蛋白修饰,非编码 RNAs,其中 DNA 甲基化是研究最深入的机制之一。异常的 DNA 甲基化表现为,全基因组范围低甲基化和启动子区特异性位点 CpG 岛高甲基化。引起这种改变的机制还不清楚,但最近研究表明,甲基化异常发生在肿瘤的早期阶段可能促进了肿瘤的发生^[5]。

Roman-Gomez 等^[6]提出,在淋巴细胞白血病发病机制中,启动子高甲基化与整体基因组低甲基化各自独立起作用,并且引起相反的临床结果。白血病细胞中 CpG 岛高甲基化非常常见,最新的一项研究提供了充分的证据,一组 ALL 儿童,包含 *EVT6/RUNX1* 和超二倍体两个亚型,研究 28226 个 CpG 岛发现 8 662 个基因启动子区 CpG 岛出现甲基化,占总基因的 30%;超二倍体 ALL 高甲基化基因大于 *EVT6/RUNX1* 型 ALL,30 个基因显示了最高的甲基化分值,其中 6 个基因为两个亚组共有;高甲基化基因低表达或表达沉默^[7]。

某些抑癌基因与白血病发病关系密切,对他们的研究也表明异常的甲基化与白血病发病有关。*AKAP12* 是抑癌基因,参与细胞分化,研究发现 *AKAP12* 高甲基化与儿童髓样白血病发病有关^[8]。分析 *MLL* 基因重排型儿童 ALL 基因表达谱发现,抑癌基因 *FHIT* 表达减少,进一步研究发现,100% 的 *MLL* 重排儿童 ALL 病例 *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛发生甲基化,导致明显的转录抑制和表达沉默,而携带有 *MLL* 基因的儿童 ALL 和非儿童 ALL 病例, *FHIT* 基因甲基化发生率仅为 60%,并且白血病细

[收稿日期]2010-09-21;[修回日期]2010-11-01
[作者简介]李玉华,女,硕士研究生,副主任医师。

胞被 *MLL* 重排基因转染后出现死亡。表明 *FHIT* 基因甲基化与 *MLL* 基因重排型儿童 ALL 发病有关,为白血病发病机制提供了新视角和治疗的新靶点^[9]。最近研究发现,*MLL* 重排儿童 ALL 病例具有独特的基因表达谱。Stumpel 等^[10] 研究 *MLL* 重排儿童 ALL 病例 DNA 甲基化谱与基因表达谱之间关系,证实启动子高甲基化导致基因沉默。这个研究也表明 DNA 甲基化与 *MLL* 基因重排型儿童 ALL 发病密切相关。

Sato 等^[11] 对 65 例成人 T 细胞白血病/淋巴瘤进行了研究,通过甲基化特异性 PCR,分析 *SHPI*、*p15*、*p16*、*p73*、*HCAD*、*DAPK*、*hMLH-1* 和 *MGMT* 的甲基化谱,发现随着疾病进程,CpG 岛发生甲基化的基因数量增多。这一研究表明,抑癌基因甲基化不仅促进了白血病发生,并且在白血病演化过程中呈动态变化。

2 DNA 甲基化与儿童白血病诊断分型及预后

人类肿瘤中 CpG 岛发生甲基化并不是随机事件,而具有肿瘤特异性,每种肿瘤都有自己的基因甲基化谱,如血液肿瘤与实体瘤不同,即使同为血液肿瘤,白血病的甲基化图谱与淋巴瘤不同。DNA 甲基化的高度特异性使其成为可能的诊断和预后指标。

2.1 DNA 甲基化与儿童白血病诊断分型

在早期研究中,研究人员利用个别的候选基因 CpG 位点高甲基化作为生物学标志,为 ALL 儿童进行亚型分类和预后^[12-13],最近,应用大规模甲基化分析技术所得到的甲基化谱,已经能够区别 ALL 细胞和正常细胞^[14-15],ALL 细胞和 AML 细胞^[16],区别 ALL 和 CLL、MCL 细胞^[17]。此外,一个单个基因 *DDX51* 甲基化状态,被发现可以区别 B 细胞系和 T 细胞系 ALL 病人^[15]。

最近 Milani 等^[18] 对 401 名北欧 ALL 儿童的 416 个基因的 1320 个 CpG 位点进行甲基化分析,根据 1320 个 CpG 位点甲基化分析结果,选取 300 个 CpG 位点甲基化谱做进一步的非监督等级聚类分析,树枝状图证明,这个分析能清楚区分 T 系 ALL 病人样本和前 B 细胞 (BCP) ALL 病人样本,CpG 位点甲基化谱也能区分 BCP ALL 的主要亚型 HeH、*t*(12;21)、11q23 和 *t*(1;19)。研究人员特别设计基因分类器进一步筛选了 40 个基因的 60 个 CpG 位点进行等级两路聚类,结果显示 BCP ALL 的 4 个亚型之间有明显的甲基化差异。筛选了 9 个 CpG 位点进行等级两路聚类,T 系 ALL 样本 9 个 CpG 位点

一致显示甲基化水平高于 BCP ALL。

Stumpel 等^[10] 对 57 例新诊断的儿童 ALL 病例进行研究,57 例 ALL 中 44 例携带 *MLL* 易位,13 例隐匿了非易位的(野生型) *MLL* 基因。*MLL* 易位病例中 21 例是 *t*(4;11),17 例是 *t*(11;19),6 例是 *t*(9;11)。应用差异甲基化杂交技术,获得这些病例 DNA 甲基化谱,对此进行非监督聚类分析,可以将所有病例区分成 2 个主要亚型,携带 *t*(9;11) 或野生型 *MLL* 基因的儿童 ALL 样本和正常骨髓样本集簇到一起,携带 *t*(4;11) 或 *t*(11;19) 儿童 ALL 样本紧密地集簇到一起。尽管第一个集落包含 *t*(9;11) 样本,携带野生型 *MLL* 基因的儿童 ALL 样本和正常骨髓样本显示更多的异质性,可以考虑将这个集落分成 3 个不同的亚型。

这些研究都表明 DNA 甲基化谱系分析可以用于临床诊断分型。尽管目前基因组范围的表达谱可以进行准确的 ALL 亚型分类^[19],但分析对象是 RNA,分子结构不稳定,应用于临床偏差很大,甲基化分析研究对象是 DNA,临床应用前景更大。

2.2 DNA 甲基化与微小残留病检测

DNA 甲基化能否作为微小残留病 (minimal residual disease, MRD) 的生物学标志,最重要的问题是白血病复发期甲基化模式是否稳定,如果稳定,表明这些甲基化改变是恶性克隆关键的分子元件 (molecular component),发现残留水平的甲基化表示在形态学缓解期存在残留的白血病。有研究发现,一组病例治疗前 5 个基因 (*ER*、*MDR1*、*P73*、*P15* 和 *P16*) 甲基化谱对比形态学复发期这 5 个基因甲基化谱,70% 病例甲基化谱是稳定的,*P73* 是 92%,*ER* 是 88%,*MDR1* 是 72%,而 *P15* 仅为 60%,此外,伴随 *P15* 甲基化 *P16* 甲基化会增加,甲基化的获得提示 ALL 复发和难治^[20]。总之,这个研究表明,在大范围的 ALL 病人中,甲基化模式是稳定的,利用异常 DNA 甲基化可以分析 MRD。有 30% 病人在复发期甲基化出现改变,原因尚不清楚,可能出现新的克隆或在原始克隆基础上出现新的表观遗传学改变,这些有助于我们理解复发的动态性和耐药模式。

2.3 DNA 甲基化与儿童白血病预后

早期研究多限于分析个别基因高甲基化的预后价值,如 *P15* 基因甲基化提示化疗效果不理想,临床缓解率低,临床缓解时间短,无病生存率 (disease free survival, DFS) 下降,并且已经提议,*P15* 基因可以作为预后的生物学标志,用于预测 ALL 复发。*P16* 基因甲基化失活同样提示预后不良。最近也有类似研究,对 *Id4* (潜在的抑癌基因) 的研究发现,在

骨髓增生异常综合症 (myelodysplastic syndrome, MDS)病人, *Id4* 甲基化病人生存期更短, 多变量分析表明, *Id4* 甲基化状态是独立的影响因素, 影响无白血病存活期, *Id4* 甲基化病人病情进展更快, 更容易转变成 AML^[21]。

随着甲基化研究技术的进步和对白血病发病机制与甲基化关系的深入研究, 研究人员开始分析多个基因的甲基化状态的预后价值。Roman-Gomez等^[22]对 54 名 *t*(12;21) *ETV6/RUNX1* ALL 儿童进行甲基化分析, 针对涉及细胞分化、增殖的 38 个基因甲基化研究表明, 阴性甲基表型 (CIMP⁻, 少于 3 个甲基化基因) 与阳性甲基表型 (CIMP⁺, 多于 2 个甲基化基因) 相比, 有更长的无病生存期和总生存期; 潜在预后因素的多变量分析表明, 甲基化谱是一个独立的预后因素, 预测无病生存期和总生存期。

Milani 等^[18]对北欧 401 名 ALL 儿童进行甲基化分析的同时也对其预后进行了评估, 他们对 300 个 CpG 位点甲基化谱作进一步的分层集簇, 把 T-ALL、*t*(12;21)、HeH 各分成两组, 评估患儿临床信息, 发现 *t*(12;21) 和 HeH 再分的两组复发率明显不同, 但 T-ALL 再分的两个亚组复发率没有不同, 研究人员对 20 个基因的 22CpG 位点进行了单一变量回归分析, 分析甲基化水平与临床复发风险之间的关系, 发现 8 个基因的高甲基化水平提示预后不良。Stumpel 等^[10]研究也发现, 携带 *t*(4;11) 或 *t*(11;19) 的儿童 ALL 病例中, 启动子高甲基化的程度影响无复发生存率, 高甲基化提示高复发风险。

以上研究均表明甲基化谱系分析可以作为一个独立的预后指标, 并且白血病相关基因发生甲基化的数量越多, 甲基化的程度越重, 预后越差。

3 DNA 甲基化与白血病治疗

白血病的发生与表观遗传学改变关系密切, 与遗传学改变不同, 表观遗传学改变是可逆的, 这就为白血病的靶向治疗提供了可能, 如针对抑癌基因高甲基化现象的去甲基化治疗, 可以恢复抑癌基因的表达, 抑制肿瘤细胞生长, 达到治疗目的。目前, 已经发现许多表观遗传学药物可以逆转异常的 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化^[23]。DNA 甲基化抑制剂是首先被提议用于肿瘤治疗的表观遗传学药物, 如 5-氮杂胞苷 (5-azacytidine, 5-aza-CR) 和 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-CdR) 最初被开发为细胞毒类药物, 1980 年左右发现该化合物是一种 DNA 甲基化抑制剂。它们是胞嘧啶核苷类似物,

能参与快速增长的肿瘤细胞的 DNA 合成, 通过占有、消耗 DNA 甲基转移酶 (DNMTs) 特异性地抑制 DNA 甲基化^[24]。阿扎胞苷 (5-aza-CR) 和地西他滨 (5-aza-CdR), 已经被 FDA 批准用于治疗骨髓增生异常综合征, 并且对于其他血液系统恶性肿瘤也有效, 如急性髓性白血病和慢性髓性白血病^[25]。目前处于研发阶段的新的甲基化抑制剂还有折布拉林 (zebularine)^[26]。

甲基化抑制剂能够被整合进 DNA, 使人们担心它们对正常细胞潜在的毒性作用。然而, 由于这些药物仅仅作用于分裂细胞, 所以, 理论上应该主要靶向快速分裂的肿瘤细胞, 对于缓慢分裂的正常细胞仅有微小的作用。已经有研究支持这个论点, Yang 等^[27]研究发现, 使用 DNA 甲基化抑制剂长期治疗仅有微小的副作用。目前也在研发非核苷化合物, 这类化合物能有效抑制 DNA 甲基化, 并且不会被整合进 DNA, 如 SGI-1027, 邻苯二甲酰色氨酸衍生物 RG108 和反义寡核苷酸类 MC98^[28-29]。这些分子通过封闭 DNMTs 催化/辅因子结合位点, 或者靶向 DNMTs 的调节信使 RNA 序列, 达到抑制作用, 但抑制效果较弱。

4 结语

甲基化研究技术的快速发展, 使得甲基化谱系分析应用于临床成为可能, 目前已经确认启动子 CpG 岛甲基化导致基因沉默, 与肿瘤发生关系密切, 但对于启动子非 CpG 岛甲基化的作用了解得还很少。已有研究显示^[30-31], DNA 甲基化对于启动子非 CpG 岛的调节也很重要, 例如, MASPIN 的组织特异性表达, MASPIN 启动子不包含 CpG 岛, 但受 DNA 甲基化调节; 同样, Oct-4 启动子非 CpG 岛甲基化, 强烈影响 Oct-4 表达水平。因为 CpG 岛仅仅占人类基因启动子的 60%, 因此探讨非 CpG 岛甲基化的作用, 有助于全面理解 DNA 甲基化在白血病发病中的总体作用。

[参 考 文 献]

- [1] Wang Y, Leung FC. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers[J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(7): 1170-1177.
- [2] Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics[J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(6): 465-476.
- [3] Greaves M. In utero origins of childhood leukaemia[J]. *Early Hum Dev*, 2005, 81(1): 123-129.

- [4] Conrad B, Antonarakis SE. Gene duplication: A drive for phenotypic diversity and cause of human disease[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2007, 8: 17-35.
- [5] Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer[J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(1): 21-33.
- [6] Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Garate L, et al. Promoter hypermethylation and global hypomethylation are independent epigenetic events in lymphoid leukemogenesis with opposing effects on clinical outcome [J]. *Leukemia*, 2006, 20(8): 1445-1448.
- [7] Davidsson J, Lilljebjorn H, Andersson A, Veerla S, Heldrup J, Behrendtz M, et al. The DNA methylome of pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(21): 4054-4065.
- [8] Flotho C, Paulun A, Batz C, Niemeyer CM. AKAP12, a gene with tumour suppressor properties, is a target of promoter DNA methylation in childhood myeloid malignancies [J]. *Br J Haematol*, 2007, 138(5): 644-650.
- [9] Stam RW, den Boer ML, Passier M, Janka-Schaub GE, Sallan SE, Armstrong SA, et al. Silencing of the tumor suppressor gene FHIT is highly characteristic for MLL gene rearranged infant acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2006, 20(2): 264-271.
- [10] Stumpel DJ, Schneider P, van Roon EH, Boer JM, de Lorenzo P, Valsecchi MG, et al. Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options[J]. *Blood*, 2009, 114(27): 5490-5498.
- [11] Sato H, Oka T, Shinnou Y, Kondo T, Washio K, Takano M, et al. Multi-step aberrant CpG island hyper-methylation is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(1): 402-415.
- [12] Gutierrez MI, Siraj AK, Bhargava M, Ozbek U, Banavali S, Chaudhary MA, et al. Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup[J]. *Leukemia*, 2003, 17(9): 1845-1850.
- [13] Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Castillejo JA, Agirre X, Barrios M, Navarro G, et al. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2004, 104(8): 2492-2498.
- [14] Kuang SQ, Tong WG, Yang H, Lin W, Lee MK, Fang ZH, et al. Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia[J]. *Leukemia*, 2008, 22(8): 1529-1538.
- [15] Taylor KH, Pena-Hernandez KE, Davis JW, Arthur GL, Duff DJ, Shi HD, et al. Large-scale CpG methylation analysis identifies novel candidate genes and reveals methylation hotspots in acute lymphoblastic leukemia[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(6): 2617-2625.
- [16] Figueroa ME, Reimers M, Thompson RF, Ye K, Li Y, Selzer RR, et al. An integrative genomic and epigenomic approach for the study of transcriptional regulation [J]. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1882.
- [17] Taylor KH, Kramer RS, Davis JW, Guo J, Duff DJ, Xu D, et al. Ultra-deep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8511-8518.
- [18] Milani L, Lundmark A, Kiiialainen A, Nordlund J, Flaegstad T, Forestier E, et al. DNA methylation for subtype classification and prediction of treatment outcome in patients with childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 2010, 115(6): 1214-1225.
- [19] Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JGCAM, Peters STCJM, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(2): 125-134.
- [20] Garcia-Manero G, Bueso-Ramos C, Daniel J, Williamson J, Kantarjian HM, Issa JJP. DNA methylation patterns at relapse in adult acute lymphocytic leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(6): 1897-1903.
- [21] Wang H, Wang XQ, Xu XP, Lin GW. ID4 methylation predicts high risk of leukemic transformation in patients with myelodysplastic syndrome[J]. *Leuk Res*, 2010, 34(5): 598-604.
- [22] Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Calasanz MJ, et al. CpG island methylator phenotype redefines the prognostic effect of t(12;21) in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(16): 4845-4850.
- [23] Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(1): e37-50.
- [24] Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy [J]. *Nature*, 2004, 429(6990): 457-463.
- [25] Plimack ER, Kantarjian HM, Issa JP. Decitabine and its role in the treatment of hematopoietic malignancies [J]. *Leuk Lymphoma*, 2007, 48(8): 1472-1481.
- [26] Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, et al. Preferential response of cancer cells to zebularine [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(2): 151-158.
- [27] Yang AS, Estecio MR, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Issa JP. Comment on "Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation" and "Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation" [J]. *Science*, 2003, 302(5648): 1153.
- [28] Cortez CC, Jones PA. Chromatin, cancer and drug therapies [J]. *Mutat Res*, 2008, 647(1-2): 44-51.
- [29] Datta J, Ghoshal K, Denny WA, Gamage SA, Brooke DG, Phiasivongsa P, et al. A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(10): 4277-4285.
- [30] Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, Holtan N, Hanigan CL, Duan H, et al. Role for DNA methylation in the control of cell type-specific maspin expression [J]. *Nat Genet*, 2002, 31(2): 175-179.
- [31] Hattori N, Nishino K, Ko YG, Hattori N, Ohgane J, Tanaka S, et al. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(17): 17063-17069.

(本文编辑:邓芳明)