

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.06.012

论著·临床研究

儿童非霍奇金淋巴瘤 ZO-1 基因 甲基化状态分析及临床意义

刁玉巧 曲凡 杨明娟 孟建辉 朱秀丽 陈健

(河北医科大学第四医院儿科, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的** 探讨紧密连接蛋白(ZO-1)基因启动子区甲基化状态在儿童非霍奇金淋巴瘤(NHL)IV期检测中的临床意义,以进一步寻找病因及早期诊断方法。**方法** 将55例确诊为NHL IV期(T细胞型40例, B细胞型15例)患儿的骨髓标本作为病例组,20例非血液肿瘤患儿骨髓标本作为对照组。采用甲基化特异性PCR法(MS-PCR)检测病例组与对照组骨髓中ZO-1基因启动子区甲基化状态,并检测光密度积分值(IOD)。逆转录PCR法(RT-PCR)检测病例组与对照组ZO-1基因mRNA的表达情况。**结果** MS-PCR检测结果显示病例组治疗前39例出现ZO-1基因甲基化条带,阳性率为70.9%(39/55),对照组20例均呈非甲基化状态;治疗过程中,行动态观察NHL患儿47例,其中T细胞型32例, B细胞型15例,治疗前ZO-1基因甲基化阳性率分别为72%和67%,两者差异无统计学意义($P>0.05$)。T细胞型与B细胞型NHL患儿治疗前与化疗早期、中期比较差异均无统计学意义($P>0.05$),而与化疗后期比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。RT-PCR检测结果显示病例组中ZO-1甲基化阳性病例均无mRNA表达,对照组患儿均表达ZO-1 mRNA。外周血白细胞总数与ZO-1基因IOD值无直线相关关系($r=0.093, P=0.575$);骨髓中恶性肿瘤细胞数与ZO-1基因IOD值呈正相关关系($r=0.669, P<0.001$)。**结论** ZO-1基因在儿童NHL中呈特异性高甲基化状态,其程度与骨髓中恶性肿瘤细胞数呈正相关。ZO-1基因可能成为新的分子标志,为临床早期诊断、疗效判断、预后评价、微小残留检测提供新的指标。
[中国当代儿科杂志, 2014, 16(6): 619-623]

[关键词] ZO-1基因;甲基化;非霍奇金淋巴瘤;儿童

ZO-1 gene methylation status and its clinical significance in children with non-Hodgkin lymphoma

DIAO Yu-Qiao, QU Fan, YANG Ming-Juan, MENG Jian-Hui, ZHU Xiu-Li, CHEN Jian. Department of Pediatrics, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China (Qu F, Email: qfincn@aliyun.com)

Abstract: Objective To investigate the methylation status of zonula occludens-1 (ZO-1) gene promoter and its clinical significance in children with stage IV non-Hodgkin lymphoma (NHL) and to provide a basis for further etiological study and early diagnosis of this disease. **Methods** Fifty-five children with a confirmed diagnosis of stage IV NHL (40 cases of T-NHL and 15 cases of B-NHL) were selected as the case group, and 20 children with diseases other than hematologic malignancies were selected as the control group. Bone marrow samples were collected from these subjects. Methylation-specific PCR (MS-PCR) was applied to evaluate the methylation status of ZO-1 gene promoter, and the integrated optical density (IOD) was determined. RT-PCR was used to measure the mRNA expression of ZO-1. **Results** MS-PCR showed that the methylated bands of ZO-1 gene promoter were found in 39 (70.9%) of 55 patients in the case group before treatment, while no ZO-1 gene promoter methylation was detected in the control group. With close tracking of 47 cases in the study group, consisting of 32 cases of T-NHL and 15 cases of B-NHL, the rates of ZO-1 gene promoter methylation prior to treatment were 72% and 67%, respectively, ($P>0.572$). The cases of T-NHL and B-NHL showed no significant changes in methylation rate in the early and middle phases of chemotherapy ($P>0.05$), but they showed significant changes in methylation rate in the late phase of chemotherapy ($P<0.05$). RT-PCR showed that the

[收稿日期] 2013-11-02; [接受日期] 2014-02-01

[基金项目] 河北省科技支撑计划项目(12277753)。

[作者简介] 刁玉巧,女,硕士,副主任医师。

[通信作者] 曲凡,女,教授,主任医师。

NHL cases carrying methylated ZO-1 gene had no mRNA expression of ZO-1, while all children in the control group had mRNA expression of ZO-1. There was no linear relationship between the total number of peripheral blood leukocytes and ZO-1 gene IOD ($r=0.093, P=0.575$); a positive correlation was found between the number of malignant cells in bone marrow and ZO-1 gene IOD ($r=0.669, P<0.001$). **Conclusions** ZO-1 gene shows a hypermethylation status in children with NHL, and the methylation level is positively correlated with the number of malignant cells in bone marrow. ZO-1 may be used as a novel molecular marker in early diagnosis, outcome assessment, prognostic evaluation, and detection of minimal residual disease. [Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(6): 619-623]

Key words: ZO-1 gene; Methylation; Non-Hodgkin Lymphoma; Child

非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL) 是一组高度异质性的淋巴组织恶性增殖性肿瘤, 在小儿多为弥漫性、高度恶性病变, 确切病因不明。紧密连接蛋白 (zonula occludens, ZO-1) 属于膜结合鸟苷酸激酶家族成员, 是一个血液肿瘤相关抑癌基因, 表达于多种细胞表面, 参与细胞增殖、分化、免疫调节, 与肿瘤转移、进展密切相关^[1-2]。目前有关 NHL ZO-1 基因启动子区甲基化状态的研究罕见报道。因此为了探索 NHL 的病因及早期诊断的标记物, 本研究对 NHL 患儿进行了 ZO-1 基因甲基化的检测。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2006 年 1 月至 2012 年 9 月于我院儿科确诊为 NHL (IV 期) 骨髓转移患儿 55 例为研究对象。所有患儿根据组织病理学、免疫表型、细胞遗传学和分子病因学的检测确诊; 根据影像学检查及脑脊液、骨髓等检查按 St.Jude 分期系统确定分期。另选取我院同期非血液肿瘤患儿 20 例为对照。55 例 NHL 患儿中, 男 30 例, 女 25 例, 年龄 1~14 岁。T 细胞型 40 例, B 细胞型 15 例。具体诊断、治疗方案参照文献^[3], 整个化疗过程分为治疗前、化疗早、中、后期、临床完全缓解及复发不同阶段进行动态观察。化疗早期定为诱导期结束 (化疗诱导治疗后期, 约为治疗第 6~8 周); 化疗中期为巩固治疗后期; 化疗后期为疗程基本结束或维持治疗前; 临床完全缓解即骨髓中恶性肿瘤细胞数小于 5%, 脑脊液无异常, 外周血缓解, 原有肿瘤负荷消失, 持续 1 个月以上; 复发: 初治化疗 6~8 周后缓解, 在后续治疗及停药观察过程中, 出现原发部位或其他部位结内结外新发肿块, 再次病理证实和 / 或骨髓中淋巴瘤细胞 $\geq 5\%$ 。在化疗过程中, 5 例放弃治疗, 3 例死亡, 最终有 47 例进

行连续动态观察, 其中临床完全缓解 29 例, 复发 2 例, 长期无病生存 16 例。对照组 20 例患儿中, 男 11 例, 女 9 例, 年龄 1~14 岁。其中自身免疫性溶血性贫血 2 例, 坏死性淋巴结炎 2 例, 特发性血小板减少性紫癜 5 例, 再生障碍性贫血 4 例, 传染性单核细胞增多综合征 6 例, 斑疹伤寒 1 例。

1.2 骨髓标本的获取

留取所有患儿骨髓标本 1~2 mL, 涂片后送至本院骨髓室检测骨髓中恶性肿瘤细胞百分数; 剩余放入密封枸橼酸钠抗凝管中, 提取 mRNA 后, -20°C 冰箱保存。

1.3 MS-PCR 法检测骨髓细胞中 ZO-1 基因甲基化程度

1.3.1 基因组 DNA 提取 用 Wizard DNA Clean-Up System (美国 Promega 公司) 提取骨髓细胞 DNA, 分光光度计鉴定 DNA 提取质量, A260/A280 为 1.8~1.9, 根据所测浓度计算 DNA 的量。

1.3.2 DNA 碱基修饰 取 DNA 标本 4 μg , 注射器抽吸剪切, 取 1 μg 剪切后的 DNA 加 ddH₂O 至终体积 50 μL ; 加入 5 μL 新配制的 3 mol/L NaOH, 37°C 孵育 25 min; 取新鲜配置的 10 mol/L 氢醌 30 μL 、3 mol/L 亚硫酸氢钠 520 μL 及 10 mol/L NaOH 220 μL 迅速加入 DNA 中, $50\sim 55^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h。

1.3.3 DNA 纯化 用 V-Gene DNA 纯化试剂盒纯化 DNA, 加入 50 μL 的 DNA 洗脱溶液 (Eluent) 洗脱 DNA; 加入 3 mol/L 的 NaOH 5 μL , 室温孵育 20 min; 加入 3 倍体积的无水乙醇, 12000 g 离心 10 min; 室温干燥后的 DNA 溶解于 30 μL 水中, -20°C 保存。

1.3.4 引物设计 由上海捷瑞生物技术有限公司设计并合成。甲基化引物上游为 ZO-1-MSF: 5'-AAAATAAATAGGAAGATTCGTACGG-3', 下游为 ZO-1-MSR: 5'-GAAACTAAACGAAACGAAACGAA-3', 扩增片段 171 bp; 非甲基化引物上游为

ZO-1-UMF: 5'-GGATAAAAATAAATAGGAAGATTTGTATG-3', 下游为 ZO-1-UMR: 5'-AACAAAACAAACAAAACAAAACAA-3', 扩增片段为 179 bp。

1.3.5 MS-PCR 以硫化修饰、纯化后的基因组 DNA 为模板, 分别用 ZO-1 基因的甲基化及非甲基化引物对进行扩增, PCR 产物应用 2% 琼脂糖凝胶电泳及紫外透射分析仪观察结果。每次实验均以去离子水作为阴性对照。

1.3.6 PCR 产物鉴定 只有 171 bp 甲基化特异性扩增产物条带的标本, 定为 ZO-1 基因呈完全甲基化状态; 只有 179 bp 非甲基化特异性扩增产物条带的标本, 定为 ZO-1 基因呈完全非甲基化状态; 171 bp 甲基化特异性扩增产物条带和 179 bp 非甲基化特异性扩增产物条带都有的标本, 定为 ZO-1 基因呈部分甲基化状态。由于正常细胞为完全非甲基化, 故 ZO-1 基因部分甲基化的可视为甲基化。同时用凝胶成像系统半定量分析甲基化 DNA 光密度积分值 (IOD 值)。

1.4 RT-PCR 法检测骨髓细胞中 ZO-1 基因表达情况

采用 MMLV RT-PCR Kit 试剂盒 (美国 Promega 公司) 提取骨髓 RNA, 置于 -80 °C 冻存或直接用于反转录。引物由上海捷瑞生物技术有限公司设计并合成。ZO-1 基因上游引物 P1: 5'-GCGCTGGAGAGACAAGAT-3', 下游引物 P2: 5'-ATTGACGTTCCCCACTCTG-3', 扩增片段长度为 179 bp。内参照引物 β -actin 上游引物: 5'-GCCCTGGCGTCTGTATTAGT-3', 下游引物: 5'-TGTAATCCAGCAGGTCAGCAAAG-3', 扩增片段长度为 231 bp。反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 25 个循环。最后 72 °C 再延伸 5 min。将扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下摄影, 以目的基因 / 内参基因 (OD 值) 表示 ZO-1 mRNA 水平。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计学分析。计数资料用百分率表示, 组间比较采用卡方检验或 Fisher 确切概率法 (当 $n < 40$ 或理论频数 < 1 时)。两因素之间的相关性采用直线相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MS-PCR 检测结果

55 例 NHL 患儿治疗前 39 例出现 ZO-1 基因完全性和部分甲基化条带, 甲基化阳性率为 71%; 对照组均呈非甲基化状态 (图 1)。两组间甲基化阳性率比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 29.55$, $P < 0.001$)。

进行连续动态观察的 47 例患儿中, T 细胞型 32 例, 治疗前 ZO-1 基因甲基化阳性率为 72% (23/32), 化疗早期为 66% (21/32), 化疗中期为 56% (18/32), 化疗后期为 41% (13/32); 临床完全缓解 14 例 (44%), 仍有 2 例可检出 ZO-1 基因甲基化阳性; 复发 2 例 (6%), 甲基化状态由部分甲基化条带转变为完全甲基化条带 (图 2)。治疗前与化疗早期、中期 ZO-1 基因甲基化阳性率比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 与化疗后期比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.349$, $P = 0.012$)。B 细胞型 15 例, 治疗前 ZO-1 基因甲基化阳性率为 67% (10/15), 化疗早期为 60% (9/15), 化疗中期为 53% (8/15), 化疗后期为 27% (4/15); 临床完全缓解 15 例 (100%), 均未检出 ZO-1 基因甲基化阳性。治疗前与化疗早期、中期 ZO-1 基因甲基化阳性率比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 与化疗后期比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.98$, $P = 0.03$)。T 细胞型 (72%) 与 B 细胞型 (67%) 治疗前 ZO-1 基因甲基化阳性率比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.771$, $P = 0.572$)。

2.2 RT-PCR 检测结果

病例组 ZO-1 基因甲基化阳性者均无 ZO-1 基因 mRNA 表达, 对照组均有 ZO-1 基因 mRNA 表达。表明 ZO-1 基因甲基化阳性 NHL 病例治疗前 ZO-1 基因表达沉默。随着化疗进行, NHL 患儿 ZO-1 基因甲基化程度减弱, ZO-1 基因重新表达。见图 3。

2.3 外周血白细胞、骨髓淋巴瘤细胞与 ZO-1 基因甲基化程度相关分析

外周血白细胞总数与 ZO-1 基因 IOD 值无直线相关性 ($r = 0.093$, $P = 0.575$); 骨髓中恶性肿瘤细胞数与 ZO-1 基因 IOD 值呈正相关关系 ($r = 0.669$, $P < 0.001$)。提示 ZO-1 基因甲基化程度与外周血白细胞总数无相关, 而与恶性肿瘤细胞数密切相关。

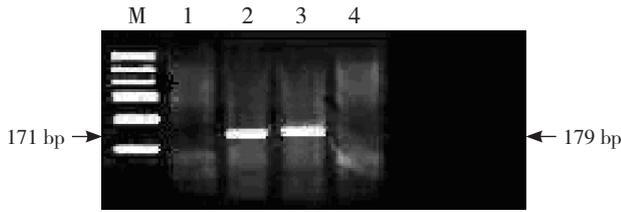


图1 两组ZO-1基因甲基化状态 M: Marker(600 bp); 1~2: 病例组; 3~4 对照组。病例组部分患儿治疗前ZO-1基因呈甲基化状态, 对照组呈非甲基化状态。

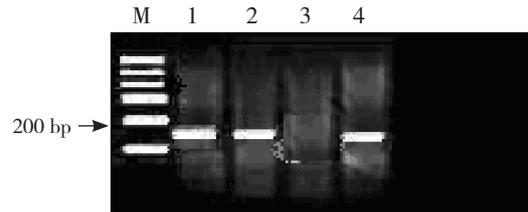


图2 1例复发患儿甲基化状态变化 M: Marker(600 bp); 1~2: 复发前部分甲基化; 3~4: 复发后完全甲基化。ZO-1基因甲基化存在该患儿治疗前后。

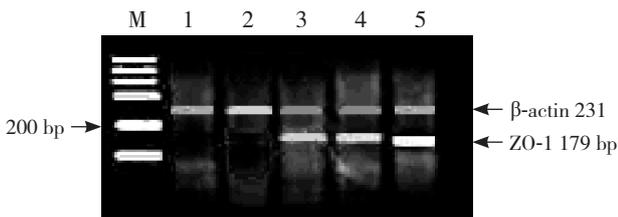


图3 动态观察NHL患儿化疗过程中ZO-1 mRNA表达变化 M: Marker(600 bp); 1: 治疗前; 2: 化疗早期; 3: 化疗中期; 4: 化疗后期; 5: 对照组。随着化疗的进行, ZO-1基因甲基化程度减弱, ZO-1基因表达增多。

3 讨论

近年研究发现, 肿瘤发生、发展的分子生物学本质是细胞内遗传调控和表观遗传调控的紊乱^[4]。表观遗传因素对抑癌基因表达调控的影响越来越引起人们的重视, 其中DNA甲基化是导致抑癌基因沉默的一种表观遗传修饰方式^[5]。DNA甲基化是指在DNA甲基化转移酶的作用下, 以S-腺苷甲硫氨酸作为供体将一活化的甲基基团引入DNA链, 在基因组CpG二核苷酸的胞嘧啶5'碳位共价结合一甲基基团, 形成5-甲基胞嘧啶^[6-7]。其生物学功能主要表现为基因组整体甲基化水平降低, 局部基因启动子区(CpG岛)甲基化程度异常增高, 后者可导致抑癌基因表达沉默进而导致肿瘤发生。目前的研究表明, 抑癌基因启动子区域异常甲基化可能成为肿瘤早期诊断、预后判断和干预治疗的新靶点^[5,8]。

ZO-1是1986年Stevenson等人应用特异性单克隆抗体从小鼠肝细胞紧密连接结构中鉴定出来的, 它的表达产物是第一个被发现的紧密连接蛋

白, 并被认为是一种重要的紧密连接骨架结构^[9-10]。ZO-1基因位于人15号染色体长臂1区3带, 大小为122 kb左右。其编码蛋白位于细胞浆膜表面, 在维持细胞结构完整及细胞极性上起重要作用; 由于其含有SH3(Srchomology3)结构域, 这种结构在许多骨架蛋白和信号传递蛋白质中均存在, 因此预示ZO-1参与细胞间通过紧密连接进行的信号转导; ZO-1基因在正常组织与癌症组织中的表达水平有显著差异, 正常组织的上皮紧密连接处该基因高密度表达, 在肿瘤组织中下降69%, 且分化越差的肿瘤组织中, 该基因表达水平越低, 表明ZO-1的表达状况与肿瘤分化与癌演进密切相关^[10]。

恶性淋巴瘤是起源于淋巴造血组织的实体瘤, 近年来发病率呈逐年上升趋势, 分为霍奇金淋巴瘤和NHL^[11]。NHL是儿童时期常见的恶性肿瘤之一, 其发病率仅次于白血病和脑瘤, 目前认为它是一种全身性的疾病。因儿童NHL分化程度低、恶性程度高, 常常在起病时即可呈广泛性、多灶性分布, 可累及中枢神经系统或骨髓^[12]。儿童NHL临床表现差异很大, 呈现高度侵袭性过程, 几乎可以累及全身所有器官, 多数患儿初诊时已为Ⅲ期和Ⅳ期, 因此早期诊断尤为重要。已有研究表明ZO-1基因与白血病、乳腺癌、胃肠癌、胰腺癌等多种肿瘤发生发展密切相关^[13], ZO-1基因启动子区在各种类型急性白血病中呈特异性高甲基化状态, 对ZO-1进行检测可作为AL早期诊断、复发预测和指导个体化治疗的有效手段^[14]。杜瑜等^[1]研究证实ZO-1基因启动子区甲基化与成人NHL分期及缓解明显相关, 可以作为判断NHL进

展和评价预后的辅助指标,并以此指导临床治疗。本研究显示,NHL患儿骨髓中ZO-1基因呈高甲基化状态,甲基化阳性率为71%,基因表达沉默,提示儿童NHL ZO-1基因启动子区域呈高甲基化且ZO-1基因失表达,甲基化对ZO-1基因表达的抑制作用可能是一个独立因素,ZO-1基因高甲基化状态在NHL中具有较高的特异性,与NHL发生发展密切相关,可作为一种新的NHL分子标志物。T细胞型与B细胞型比较,ZO-1基因甲基化阳性率无显著性差别,提示该检测可适用于NHL不同类型,涵盖率较高。达到临床完全缓解的患儿仍有部分可检出ZO-1基因甲基化状态,提示预后不良或有可能复发,说明ZO-1基因可能作为微小残留病的监测指标。

进一步动态观察发现,实验组患儿随着化疗的进行,ZO-1基因高甲基化状态逐渐减少,基因表达逐渐增多,临床缓解时甲基化状态消失,其基因重新表达,而复发病例又重新出现ZO-1基因高甲基化状态,提示ZO-1基因可动态评价临床疗效,也进一步说明ZO-1基因的表达受其启动子区甲基化状态调控,且甲基化对基因表达的抑制作用是一个可逆的过程。在后基因组学的表观遗传学时代,从表观遗传学角度防治疾病是当前的主要方向。经去甲基化药物处理后被高甲基化抑制的基因可以重新得到表达,因而去甲基化治疗成为血液肿瘤治疗关注的热点。目前已有DNA甲基转移酶抑制剂用于治疗MDS、慢性粒细胞白血病、难治性皮肤恶性T细胞淋巴瘤等血液肿瘤疾病,并取得一定疗效^[15-16]。ZO-1基因甲基化能否成为儿童NHL治疗的靶点值得进一步研究。

综上所述,ZO-1基因可能作为儿童NHL早期发现、疗效判断、微小残留检测、预告化疗缓解后肿瘤复发的有效指标,并以此指导临床治疗。有望成为NHL去甲基化治疗的靶点,对提高儿童NHL生存率、改善预后有着重要意义。本研究仅作了ZO-1基因甲基化状态与儿童NHL关系的初

步研究,尚有待于扩大样本量进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 杜瑜,王畅,康慧媛,等. ZO-1基因甲基化状态在非霍奇金淋巴瘤骨髓检测中的临床意义[J]. 山东医药, 2010, 50(8): 26-28.
- [2] 王畅,于力,谭亚辉,等. 慢性粒细胞白血病ZO-1基因启动子区甲基化状态分析及临床意义探讨[J]. 山东医药, 2011, 51(32): 33-35.
- [3] 陈树宝. 小儿内科疾病临床治疗与合理用药[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2007: 402-406.
- [4] Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics[J]. Trends Genet, 2000, 16(4): 168-174.
- [5] 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): 199-201.
- [6] Jeltsch A. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases[J]. ChemBiochem, 2002, 3(5): 274-293.
- [7] Cheng X, Roberts RJ. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(18): 3784-3795.
- [8] 董丽钧,顾晓怡,姜藻. 结直肠癌患者血清SFRP1基因甲基化的检测及临床意义[J]. 江苏医药, 2010, 36(18): 2153-2155.
- [9] Costello JF, Plass C. Methylation matters[J]. J Med Genet, 2001, 38(5): 285-303.
- [10] Fanning AS, Ma TY, Anderson JM. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1[J]. FASEB J, 2002, 16(13): 1835.
- [11] 刘毅. 46例恶性淋巴瘤临床病理特征和预后分析[J]. 中国医学创新, 2013, 10(9): 104-106.
- [12] 潘慈,汤静燕,薛惠良,等. 儿童非霍奇金淋巴瘤肾脏浸润的临床观察[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(4): 345-347.
- [13] 康慧媛,于力,王莉莉. 闭锁小带蛋白1研究进展[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(4): 576-578.
- [14] 王畅,王冠军,谭业辉,等. 急性白血病ZO-1基因启动子区甲基化状态分析及临床意义[J]. 中华内科杂志, 2008, 47(2): 111-113.
- [15] 张玲,盛树力,秦川. 表观遗传学药物的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(3): 297-300.
- [16] Bradner JE, West N, Grachan ML, et al. Chemical phylogenetics of histone deacetylases[J]. Nature Chem Biol, 2010, 6(3): 238.

(本文编辑: 万静)