

儿童急性淋巴细胞白血病中E-钙黏蛋白 甲基化对预后的影响

齐凤旗 韩伟 颜静 辛聪 李艳 郭雷 王文鹏 高吉照

(徐州医科大学附属医院儿科血液与肿瘤病区, 江苏徐州 221002)

[摘要] **目的** 检测儿童急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 患儿骨髓单个核细胞中E-钙黏蛋白 (E-cadherin) mRNA及蛋白水平表达和基因甲基化状态, 探讨E-cadherin在儿童ALL的意义及甲基化状态与预后的关系。**方法** 采集42例初次确诊的ALL患儿确诊时 (治疗前组) 及诱导化疗第33天 (治疗后组) 的骨髓血5 mL, 应用RT-qPCR、Western blot及甲基化特异性PCR法检测骨髓单个核细胞中E-cadherin mRNA及蛋白表达和E-cadherin基因甲基化水平, 并比较治疗前后各指标的变化。**结果** 治疗后组E-cadherin mRNA及蛋白的表达水平均高于治疗前组 ($P<0.05$); 治疗后组E-cadherin基因甲基化阳性率较治疗前组下降 ($P<0.05$); 至试验终点时, 甲基化阴性者总生存率和无事件生存率均高于甲基化阳性者 ($P<0.05$)。**结论** E-cadherin表达与儿童ALL发展相关, 表达降低及甲基化水平增高可能提示预后不良。

[中国当代儿科杂志, 2023, 25 (1): 46-50]

[关键词] 急性淋巴细胞白血病; E-钙黏蛋白; 甲基化; 预后; 儿童

Influence of E-cadherin methylation on prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia

QI Feng-Qi, HAN Wei, YAN Jing, XIN Cong, LI Yan, GUO Lei, WANG Wen-Peng, GAO Ji-Zhao. Department of Pediatric Hematology and Oncology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002, China (Gao J-Z, Email: xz3765595@163.com)

Abstract: Objective To study the significance of E-cadherin and the association between E-cadherin methylation status and prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) by examining the mRNA and protein expression of E-cadherin and its gene methylation status in bone marrow mononuclear cells of children with ALL. **Methods** The samples of 5 mL bone marrow blood were collected from 42 children with ALL who were diagnosed for the first time at diagnosis (pre-treatment group) and on day 33 of induction chemotherapy (post-treatment group). RT-qPCR, Western blot, and methylation-specific PCR were used to measure the mRNA and protein expression of E-cadherin and the methylation level of the E-cadherin gene. The changes in each index after induction chemotherapy were compared. **Results** The mRNA and protein expression levels of E-cadherin in the post-treatment group were significantly higher than those in the pre-treatment group ($P<0.05$), while the positive rate of E-cadherin gene methylation in the post-treatment group was significantly lower than that in the pre-treatment group ($P<0.05$). At the end of the test, the children with negative methylation had significantly higher overall survival rate and event-free survival rate than those with positive methylation ($P<0.05$). **Conclusions** E-cadherin expression is associated with the development of ALL in children, and its decreased expression and increased methylation level may indicate a poor prognosis.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2023, 25(1): 46-50]

Key words: Acute lymphoblastic leukemia; E-cadherin; Methylation; Prognosis; Child

[收稿日期] 2022-08-03; [接受日期] 2022-10-01

[作者简介] 齐凤旗, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 高吉照, 男, 主任医师, 副教授。Email: xz3765595@163.com

急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 是儿童最常见的恶性肿瘤, 近年来发病率呈逐步上升趋势^[1]。ALL的发生是多基因、多阶段变异累积形成的病理过程, 抑癌基因功能失活是关键机制之一^[2]; 细胞间黏附分子的丢失和/或功能缺失则导致肿瘤转移^[3]。抑癌基因和细胞间黏附分子功能可通过多种途径失活, 如基因突变、丢失及DNA甲基化修饰等^[2-3]。E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 是一种钙依赖性细胞间黏附分子和肿瘤抑制蛋白, 与多种恶性肿瘤如乳腺癌、甲状腺癌、结直肠癌等的发生发展密切相关^[4-6], *E-cadherin* 基因在儿童 ALL 中存在高度甲基化^[7], 但其甲基化状态对儿童 ALL 预后的影响未见报道。本研究旨在探讨 *E-cadherin* 表达及其基因甲基化状态对儿童 ALL 预后的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取徐州医科大学附属医院儿科血液与肿瘤病区 2018 年 5 月—2022 年 1 月首次确诊的 ALL 患儿作为研究对象。纳入标准: (1) 根据《儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议 (第四次修订)》^[8] 的 ALL 诊断、治疗和疗效评判标准首次确诊的 ALL, 年龄 0~16 岁; (2) 第 33 天患儿骨髓均达完全缓解; (3) 正规治疗至随访结束者。排除标准: (1) 伴有其他恶性疾病及自身免疫病; (2) 确诊前使用激素及其他免疫抑制剂; (3) 至随访终止前放弃治疗、转外院及失访者; (4) 不同意入组者。入组患儿根据确诊时及诱导化疗第 33 天分为治疗前组和治疗后组。本研究获徐州医科大学附属医院伦理委员会批准, 批准号: XYFY2022-KL089。

1.2 治疗方案

采用《儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议 (第四次修订)》^[8] 方案即中国儿童白血病协作组 (Chinese Children's Leukemia Group, CCLG) 急性淋巴细胞白血病 2008 (CCLG-ALL-2008) 方案化疗, VDLP 方案诱导缓解治疗: V 为长春地辛; D 为柔红霉素; L 为培门冬酶替代左旋门冬酰胺酶; P-地塞米松代替醋酸泼尼松。

1.3 主要试剂与仪器

淋巴细胞分离液 (MP Biomedicals 公司, 美国), 红细胞裂解液 (上海碧云天生物科技有限公

司, 中国) TRIzol (Invitrogen 公司, 美国), cDNA 第一链合成试剂盒、SYBR Green、18-T Vector (TaKaRa 公司, 日本), 亚硫酸氢盐处理试剂盒 (Promega 公司, 美国), PCR 引物、BCA 蛋白含量检测试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、Rabbit Anti-GAPDH、Rabbit Anti-E-cadherin、羊抗兔 IgG-HRP、全蛋白提取试剂盒、Western Blotting 检测试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司, 中国), PCR 纯化试剂盒、细胞基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司, 中国]。普通梯度 PCR 仪、荧光定量 PCR 循环仪 (ABI 公司, 美国), 移液器 (Eppendorf 公司, 德国), 电泳仪、Trans-Blot Turbo 全能型蛋白转印系统、凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司, 美国)。

1.4 标本制备

采集化疗前及诱导化疗第 33 天患儿骨髓血 5 mL, EDTA 抗凝, 密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞, PBS 液洗涤 3 次, 将单个核细胞移至 EP 管, -80℃ 冰箱冻存。

1.5 RT-qPCR 检测 *E-cadherin* mRNA 的表达

按照 TRIzol 说明书提取单个核细胞总 RNA; 参照 cDNA 第一链合成试剂盒说明书合成 cDNA; *E-cadherin* 上游引物: 5'-TACCCTGGTGGTTCAAGCTG-3', 下游引物 5'-CAAAATCCAAGCCCGTGGTG-3', 片段长度 128 bp, GAPDH 上游引物 5'-AGATCATCAGCAATGCCTCCT-3', 下游引物 5'-TGAGTCCTTCCACGATACCAA-3', 片段长度 90 bp, 将 2×Realtime PCR Master Mix (SYBR Green) 10 μL、1 μL 模板 (cDNA 稀释 10 倍)、2 μL 引物 (上下游引物各为 10 μmol/L)、7 μL 0.1%DEPC 水和 20 μL Total volume 依次加入 0.1 ml PCR 管, 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 40 s, 共 40 个循环; 95℃ 变性 15 s, 骤冷至 60℃。制作溶解曲线, 采用相对定量法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 对结果进行比较分析。

1.6 Western blot 检测 *E-cadherin* 蛋白表达

PBS 液洗涤 2 次骨髓单个核细胞, 加入 Lysis Buffer 裂解液, 冰上裂解 20 min, 4℃ 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 取 200 μg 行 10% SDS-PAGE 电泳, 电泳条件: 电压 60 V, 蛋白进入分离胶后, 提高到 90 V; 转膜, TBST 洗膜 5 min×3 次; 置入含一抗 (1:10 000 稀释) 平皿中, 4℃ 摇床振荡孵育过夜, 次日室温振荡 30 min, 弃一抗, TBST 洗

膜 10 min × 3 次，加二抗（1 : 10 000 稀释），室温摇床振荡反应 2 h，弃二抗，TBST 洗膜 5 min × 3 次。ChemiDoc MP Imaging System 成像，Gel-Pro32 软件灰度分析，蛋白相对表达量采取灰度值/内参获得。

1.7 甲基化特异性 PCR 法检测 *E-cadherin* 基因甲基化

按照 DNA 提取试剂盒提取 DNA；纯化，乙醇沉淀和重悬。PCR 扩增体系 30 μ L：上下游引物（10 μ mol/L）各 1 μ L，DNA 2 μ L，dNTP 1 μ L，10 × PCR reaction buffer 3 μ L，Taq 酶 1 μ L，H₂O 21 μ L。*E-cadherin* 基因甲基化特异性上游引物 5'-GGGTTATCGCGTTTATGC-3'，下游引物 5'-CCCCGTACCGCTAATTAAC-3'，扩增产物 120 bp；非甲基化特异性上游引物 5'-AGAGGGTTATTGTGTTTATGT-3'，下游引物 5'-CCCCCATACCACTAATTAAC-3'，扩增产物 120 bp。扩增条件：95℃ 预变性 10 min；94℃ 变性 30 s，55℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 40 s，循环 40 次；72℃ 延伸 5 min；1% 琼脂糖凝胶电泳。电泳条件：电压 100 V，时间 25 min；凝胶成像系统拍照保存。甲基化判定：甲基化特异性引物扩增阳性，即为甲基化阳性；若甲基化特异性引物扩增阴性，需非甲基化特异性引物同时扩增阳性才可判断为甲基化阴性。

1.8 随访

入组患儿随访至 2022 年 6 月 30 日，随访内容：微小残留、骨髓细胞形态学、初诊时异常分子/遗传学结果、骨髓/髓外复发及处理、死亡。

1.9 统计学分析

使用 IBM SPSS 26.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料呈正态分布以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，治疗前与治疗后比较采用配对 *t* 检验；计数资料比较使用 χ^2 检验；生存分析采用 Kaplan-Meier 法，组间总生存（overall survival, OS）率和无事件生存（event-free survival, EFS）率比较采用 log-rank 检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 一般资料

共纳入 ALL 患儿 42 例，其中男性 23 例，女性 19 例，年龄 8.6 个月至 13 岁，中位年龄 5.54 岁。42 例患儿中骨髓幼稚细胞最高 95%，最低 31%，平均 76%，B 原始淋巴细胞的白血病 38 例（90%），T 淋

巴细胞白血病 4 例（10%），染色体核型异常 14 例（33%），正常 25 例（60%），未见分裂相 3 例（7%），融合基因阳性 24 例（57%），基因突变 10 例（24%）。

2.2 两组 *E-cadherin* mRNA 和蛋白的表达

治疗后组 *E-cadherin* mRNA 和蛋白的相对表达高于治疗前组，差异均有统计学意义（ $P<0.05$ ），见表 1、图 1。

表 1 两组 *E-cadherin* mRNA 和蛋白的相对表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	<i>E-cadherin</i> mRNA	<i>E-cadherin</i> 蛋白
治疗前	42	0.53 ± 0.30	0.34 ± 0.15
治疗后	42	0.71 ± 0.42	0.43 ± 0.21
<i>t</i> 值		-2.544	-2.382
<i>P</i> 值		0.015	0.022

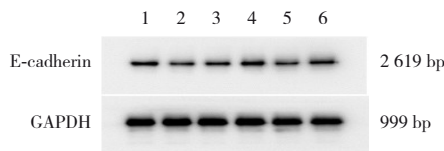


图 1 治疗前和治疗后组 *E-cadherin* 蛋白表达电泳 1~3 为治疗前组；4~6 为治疗后组。

2.3 两组 *E-cadherin* 基因甲基化状态

治疗后 13 例 *E-cadherin* 基因甲基化阳性患儿转阴，治疗后组 *E-cadherin* 基因甲基化状态阳性率较治疗前组下降，两组比较差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），见表 2、图 2。

表 2 两组 *E-cadherin* 基因甲基化阳性率

组别	例数	阳性 (例)	阳性率 (%)
治疗前	42	28	67
治疗后	42	15	36
χ^2 值			8.052
<i>P</i> 值			0.005

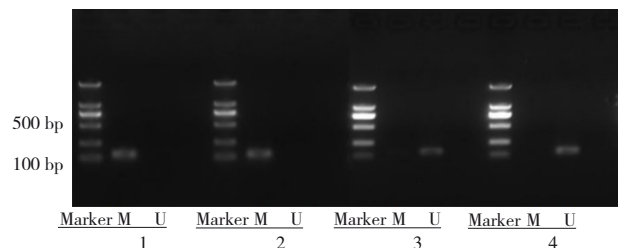


图 2 治疗前和治疗后组 *E-cadherin* 基因甲基化图 1~2 为治疗前组；3~4 为治疗后组；M 示甲基化阳性，U 示甲基化阴性。

2.4 随访结果

随访至 2022 年 6 月 30 日或死亡发生时间。42 例患儿中复发 3 例，其中 2 例为骨髓复发，1 例为髓外复发（中枢神经系统白血病）；死亡 4 例，均为甲基化阳性者。甲基化阴性者 OS 率和 EFS 率均高于甲基化阳性者，差异有统计学意义（ $\chi^2=3.927$ ， $P=0.0475$ ； $\chi^2=4.013$ ， $P=0.045$ ），见图 3~4。

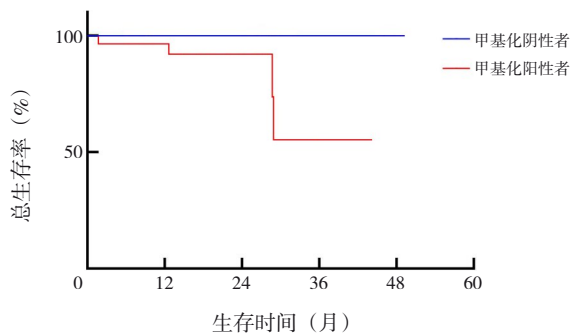


图 3 甲基化阴性者总体生存率高于甲基化阳性者

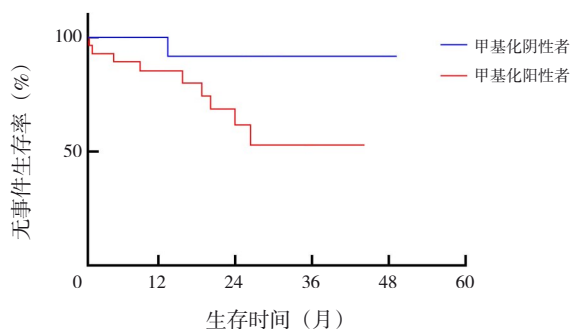


图 4 甲基化阴性者无事件生存率高于甲基化阳性者

3 讨论

E-cadherin 是胞外域、跨膜域和胞内域构成的跨膜糖蛋白，由 *CDH1* 基因编码，是钙黏蛋白家族中的一员，属于 I 类经典钙黏蛋白^[9]。E-cadherin 与 β -catenin 形成复合物，锚定于肌动蛋白细胞骨架上，使细胞稳定连接^[3]，维持细胞黏附和上皮结构完整，成为调节上皮-间充质的关键标志物^[10]。在结直肠癌、胃癌、甲状腺癌、乳腺癌等疾病中 E-cadherin 可通过影响上皮间充质的转化发挥抑制肿瘤细胞的作用^[4-6, 11]，且与肿瘤的 TNM 分期、淋巴结转移、囊外浸润等相关^[10]。本研究显示，治疗后 E-cadherin mRNA 和蛋白表达水平高于治疗前，我们考虑化疗可抑制 E-cadherin 基因甲基化，使其正常表达，抑制白血病细胞的迁移和浸润。本试验前期研究已验证 E-cadherin 的表达与外周血

白细胞计数的多少、骨髓及外周血原幼稚细胞比例无明显相关性^[12]，不排除分子生物学方面影响 E-cadherin 的表达，影响儿童 ALL 的预后。同时，E-cadherin 的低表达使 E-cadherin/ β -catenin 复合物减少，大量 β -catenin 积累在细胞质并进入细胞核，激活信号通路^[13-14]，参与儿童 ALL 的发展。

DNA 甲基化是影响基因转录和表达的主要表观遗传修饰，肿瘤抑制基因启动子和增强子区域中胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸 (cytidine phosphate guanosine, CpG) 的高甲基化是肿瘤发生、癌细胞存活及侵袭性增强的重要机制^[15]。一些癌相关基因启动子的甲基化与基因失活有关如 E-cadherin、*P16* 等，是许多肿瘤发生早期事件的关键因素^[16]。DNA 甲基化可致基因突变、染色体异常等，影响肿瘤进展和预后^[17]。本实验发现诱导治疗后 13 例 E-cadherin 基因甲基化阳性患儿转阴，我们认为诱导化疗后达到完全缓解，一方面白血病细胞被大量杀灭，高甲基化细胞大量减少；另一方面，不排除诱导方案中有能使 E-cadherin 基因去甲基化的药物。有研究^[18]报道柔红霉素联合地西他滨比单用地西他滨使 DNA 去甲基化效果好，故诱导治疗后，部分患儿 E-cadherin 基因甲基化由阳性转为阴性。

生存分析显示 E-cadherin 基因甲基化阴性患儿 OS 率和 EFS 率高于甲基化阳性患儿，DNA 甲基化导致 E-cadherin 沉默，功能丧失，使白血病细胞增殖、增加侵袭力^[19]，致使化疗效果不理想导致复发甚至死亡。因此我们认为，E-cadherin 基因甲基化状态是影响儿童 ALL 治疗效果及预后的因素之一。治疗前或对治疗效果不佳的患儿，检测其 E-cadherin 基因甲基化状态或水平，对预测 ALL 患儿预后有一定意义。如果能找到理想的甲基化抑制剂，可能会使存在 E-cadherin 基因甲基化的患儿获益。

[参 考 文 献]

- [1] Chang JH, Poppe MM, Hua CH, et al. Acute lymphoblastic leukemia[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2021, 68 Suppl 2: e28371. PMID: 33818880. DOI: 10.1002/pbc.28371.
- [2] Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, et al. Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: a review[J]. *Anticancer Res*, 2020, 40(11): 6009-6015. PMID: 33109539. DOI: 10.21873/anticancer.14622.
- [3] Loh CY, Chai JY, Tang TF, et al. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling,

- therapeutic implications, and challenges[J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1118. PMID: 31547193. PMCID: PMC6830116. DOI: 10.3390/cells8101118.
- [4] Corso G, Figueiredo J, De Angelis SP, et al. E-cadherin deregulation in breast cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(11): 5930-5936. PMID: 32301282. PMCID: PMC7294130. DOI: 10.1111/jcmm.15140.
- [5] Zhou C, Yang C, Chong D. E-cadherin expression is associated with susceptibility and clinicopathological characteristics of thyroid cancer: a PRISMA-compliant meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(30): e16187. PMID: 31348230. PMCID: PMC6709073. DOI: 10.1097/MD.00000000000016187.
- [6] Ye CC, Wang J. *E-cadherin (CDH1)* gene -160C/A polymorphism and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis involving 17,291 subjects[J]. *J Gene Med*, 2021, 23(10): e3370. PMID: 34097324. DOI: 10.1002/jgm.3370.
- [7] Abdullah M, Choo CW, Alias H, et al. *ADAMTSL5* and *CDH11*: putative epigenetic markers for therapeutic resistance in acute lymphoblastic leukemia[J]. *Hematology*, 2017, 22(7): 386-391. PMID: 28292214. DOI: 10.1080/10245332.2017.1299417.
- [8] 中华医学会儿科学分会血液学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第四次修订)[J]. *中华儿科杂志*, 2014, 52(9): 641-644. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2014.09.001.
- [9] Bure IV, Nemtsova MV, Zaletaev DV. Roles of E-cadherin and noncoding RNAs in the epithelial-mesenchymal transition and progression in gastric cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 2870. PMID: 31212809. PMCID: PMC6627057. DOI: 10.3390/ijms20122870.
- [10] Zhu X, Wang X, Gong Y, et al. E-cadherin on epithelial-mesenchymal transition in thyroid cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 695. PMID: 34930256. PMCID: PMC8690896. DOI: 10.1186/s12935-021-02344-6.
- [11] Zhao H, Hu H, Chen B, et al. Overview on the role of E-cadherin in gastric cancer: dysregulation and clinical implications [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 689139. PMID: 34422902. PMCID: PMC8371966. DOI: 10.3389/fmolb.2021.689139.
- [12] 高吉照, 谭英, 赵继鸥, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病 E-cadherin 表达及与临床指标相关性分析[J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2018, 23(2): 74-78. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5323.2018.02.004.
- [13] Katoh M. Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/ β -catenin signaling activation (review)[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(2): 713-725. PMID: 29786110. PMCID: PMC6034925. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3689.
- [14] Nguyen VHL, Hough R, Bernaudo S, et al. Wnt/ β -catenin signalling in ovarian cancer: insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis[J]. *J Ovarian Res*, 2019, 12(1): 122. PMID: 31829231. PMCID: PMC6905042. DOI: 10.1186/s13048-019-0596-z.
- [15] Wong KK. *DNMT1* as a therapeutic target in pancreatic cancer: mechanisms and clinical implications[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2020, 43(5): 779-792. PMID: 32504382. DOI: 10.1007/s13402-020-00526-4.
- [16] McCormick TM, Canedo NH, Furtado YL, et al. Association between human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA and gene promoter methylation of *RB1* and *CDH1* in the cervical lesions: a transversal study[J]. *Diagn Pathol*, 2015, 10: 59. PMID: 26032781. PMCID: PMC4450846. DOI: 10.1186/s13000-015-0283-3.
- [17] Skvortsova K, Stirzaker C, Taberlay P. The DNA methylation landscape in cancer[J]. *Essays Biochem*, 2019, 63(6): 797-811. PMID: 31845735. PMCID: PMC6923322. DOI: 10.1042/EBC20190037.
- [18] 罗静, 马梁明, 侯翠芳, 等. 地西他滨联合柔红霉素对 HL-60 细胞增殖及 *PTEN* 基因表达的影响[J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(6): 486-488. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2012.06.015.
- [19] Wong SHM, Fang CM, Chuah LH, et al. E-cadherin: its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, 121: 11-22. PMID: 29279096. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.11.010.

(本文编辑: 李惠清)