

# AML 和 ALL 患者骨髓 DNMT1, SFRP1 基因甲基化及其与临床病理特征和预后相关性研究

陈莉<sup>a</sup>, 张丛丛<sup>a</sup>, 李青山<sup>b</sup>, 索晓慧<sup>a</sup>, 吉慧娟<sup>a</sup>, 刘洪峰<sup>a</sup>

(邯郸市中心医院 a. 血液内科; b. 骨科, 河北邯郸 056001)

**摘要:** 目的 检测急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 和急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 患者骨髓中 DNA 甲基化转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1)、分泌型卷曲相关蛋白 1 (secreted frizzled related protein 1, SFRP1) 基因甲基化及 mRNA 表达水平, 探讨其与临床病理特征和预后的关系。方法 根据 FBA (French-American-British classification systems; 法-美-英分型系统) 标准选取 2019 年 11 月~2020 年 11 月于邯郸市中心医院新诊断的急性白血病患者 70 例, 其中 AML 50 例和 ALL 20 例; 另选取 65 例非恶性血液病患者作为正常对照组。用甲基化特异性聚合酶链式反应 (methylation-specific PCR, MSP) 检测所有研究对象骨髓标本中 DNMT1 和 SFRP1 基因甲基化状态, 并分析两基因甲基化与 AML 和 ALL 患者临床参数之间的关系; 用实时定量 PCR 检测所有研究对象化疗前和化疗缓解后骨髓标本中 DNMT1, SFRP1 和  $\beta$ -catenin mRNA 表达; Pearson 相关分析明确 DNMT1, SFRP1 和  $\beta$ -catenin mRNA 水平之间的相关性; 对所有患者进行随访, 比较 DNMT1 和 SFRP1 基因甲基化与预后的关系。结果 AML 和 ALL 患者中 DNMT1 基因甲基化发生率分别为 26.0% 和 25.0%, 较对照组 (73.8%) 显著下降 ( $\chi^2=47.683$ ,  $P<0.001$ ); SFRP1 基因甲基化发生率分别为 78.0% 和 85.0%, 较正常对照组 (18.5%) 显著增加 ( $\chi^2=55.265$ ,  $P<0.001$ ), 差异均有统计学意义。AML 组 DNMT1 基因甲基化与 WBC 水平、遗传学预后分组有明显相关性 ( $\chi^2=6.524$ , 5.732, 均  $P<0.001$ ); SFRP1 基因甲基化与 WBC 水平、BM 水平和遗传学预后分组有明显相关性 ( $\chi^2=8.115$ , 5.395, 5.060, 均  $P<0.05$ )。ALL 组 DNMT1 基因甲基化只与遗传学预后分组有关 ( $\chi^2=4.802$ ,  $P<0.05$ ); SFRP1 基因甲基化与 WBC 水平、遗传学预后分组有明显相关性 ( $\chi^2=4.920$ , 5.115, 均  $P<0.05$ )。与对照组相比, AML 和 ALL 患者化疗前 DNMT1 和  $\beta$ -catenin mRNA 表达均显著升高 ( $t=4.807 \sim 10.456$ , 均  $P<0.05$ ), SFRP1 表达显著下降 ( $t=24.791$ , 12.069, 均  $P<0.05$ )。与化疗前相比, AML 和 ALL 患者化疗后 DNMT1 和  $\beta$ -catenin mRNA 表达显著下降 ( $t=3.461 \sim 6.374$ , 均  $P<0.05$ ), SFRP1 表达显著上升 ( $t=17.076$ , 7.454,  $P<0.05$ )。两组患者 DNMT1 与 SFRP1 表达呈明显负相关 ( $r=-0.328$ ,  $-0.315$ , 均  $P<0.05$ ); SFRP1 与  $\beta$ -catenin 表达呈明显正相关 ( $r=0.682$ , 0.728, 均  $P<0.05$ ); 两组患者 DNMT1 与  $\beta$ -catenin 表达均无明显相关性。两组患者 DNMT1 基因甲基化生存率高于其未甲基化生存率 ( $\chi^2=3.862$ , 3.679, 均  $P<0.05$ ); SFRP1 基因甲基化生存率低于其未甲基化生存率 ( $\chi^2=2.927$ , 3.155, 均  $P<0.05$ )。结论 DNMT1 和 SFRP1 基因甲基化与恶性血液病患者临床病理及预后相关, 究其原因可能与 DNMT1 和 SFRP1 基因甲基化异常激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路有关。

**关键词:** 恶性血液病; DNA 甲基化转移酶 1(DNMT1); 分泌型卷曲相关蛋白 1 (SFRP1); 基因甲基化

**中图分类号:** R557; R446, 11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 06-007-07

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2022.06.002

## Methylation of DNMT1 and SFRP1 Gene in Bone Marrow and Its Correlation with Clinicopathological Features and Prognosis in Patients with AML and ALL

CHEN Li<sup>a</sup>, ZHANG Cong-cong<sup>a</sup>, LI Qing-shan<sup>b</sup>, SUO Xiao-hui<sup>a</sup>, JI Hui-juan<sup>a</sup>, LIU Hong-feng<sup>a</sup>

(a. Department of Hematology; b. Department of Orthopedics, Handan Central Hospital, Hebei Handan 056001, China)

**Abstract: Objective** To detect the levels of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) secretory frizzled related protein 1 (SFRP1) gene methylation and mRNA expression in bone marrow of patients with acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL), and explore their relationship with clinicopathological characteristics and prognosis. **Methods** From November 2019 to November 2020, 70 patients with newly diagnosed acute leukemia in Handan Central

**基金项目:** 河北省医学科学研究科研项目 (1723021282)。

**作者简介:** 陈莉 (1987-), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 血液病诊治, E-mail: UR11888@163.com。

**通讯作者:** 索晓慧 (1974-), 男, 医学硕士, 主任医师, 血液内科, E-mail: linsuo@163.com。

Hospital were selected according to FBA (French-American-British classification systems) criteria, including 50 patients with AML and 20 patients with ALL. Another 65 patients with non-malignant hematologic diseases were selected as normal control group. Methylation-specific PCR (MSP) was used to detect the methylation status of DNMT1 and SFRP1 genes in bone marrow samples of ALL subjects, and the relationship between methylation of DNMT1 and SFRP1 genes and clinical parameters of AML and ALL patients was analyzed. Real time quantitative PCR was used to detect DNMT1, SFRP1 and  $\beta$ -catenin mRNA expression in all subjects before chemotherapy and after chemotherapy. Pearson correlation analysis identifies correlations between DNMT1, SFRP1 and  $\beta$ -catenin mRNA levels. All patients were followed up to compare the relationship between DNMT1 and SFRP1 methylation and prognosis. **Results** The incidence of DNMT1 gene methylation in AML and ALL patients were 26.0% and 25.0%, respectively, which was significantly lower than that in the control group (73.8%) ( $\chi^2=47.683$ ,  $P < 0.001$ ). The methylation rates of SFRP1 gene were 78.0% and 85.0%, respectively, which were significantly higher than those of normal control group (18.5%) ( $\chi^2=55.265$ ,  $P < 0.001$ ), and the differences were statistically significant, respectively. There was significant correlation between DNMT1 methylation and WBC level in AML group and genetic prognosis group ( $\chi^2=6.524$ , 5.732, all  $P < 0.001$ ). The methylation of SFRP1 was significantly correlated with WBC level, BM level and genetic prognosis group ( $\chi^2=8.115$ , 5.395, 5.060, all  $P < 0.05$ ). DNMT1 gene methylation was only associated with genetic prognostic grouping in ALL group ( $\chi^2=4.802$ ,  $P < 0.05$ ). The methylation of SFRP1 gene was significantly correlated with WBC level and genetic prognosis ( $\chi^2=4.920$ , 5.115, all  $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the mRNA expressions of DNMT1 and  $\beta$ -catenin in AML and ALL patients were significantly increased before chemotherapy ( $t=4.807 \sim 10.456$ , all  $P < 0.05$ ), while the expression of SFRP1 was significantly decreased ( $t=24.791$ , 12.069, all  $P < 0.05$ ). Compared with before chemotherapy, the mRNA expressions of DNMT1 and  $\beta$ -catenin in AML and ALL patients after chemotherapy were significantly decreased ( $t=3.461 \sim 6.374$ , all  $P < 0.05$ ), and the expression of SFRP1 was significantly increased ( $t=17.076$ , 7.454, all  $P < 0.05$ ). There was a significant negative correlation between DNMT1 and SFRP1 expression in two groups ( $r=-0.328$ ,  $-0.315$ , all  $P < 0.05$ ). SFRP1 was positively correlated with  $\beta$ -catenin expression ( $r=0.682$ , 0.728, all  $P < 0.05$ ). There was no significant correlation between DNMT1 and  $\beta$ -catenin expression in two groups. The methylated survival rate of DNMT1 in the two groups was higher than that in the non-methylated survival rate ( $\chi^2=3.862$ , 3.679, all  $P < 0.05$ ). The methylated survival rate of SFRP1 was lower than that of its unmethylated survival rate ( $\chi^2=2.927$ , 3.155, all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The methylation of DNMT1 and SFRP1 was related to the clinicopathology and prognosis of patients with hematological malignancies, and the reason may be related to the abnormal activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway by DNMT1 and SFRP1 gene methylation.

**Keywords:** hematological malignancies, DNA methyltransferase 1 (DNMT1); secreted frizzled related protein 1 (SFRP1); gene methylation

近年来,随着现代工业的快速发展,化学因素、物理因素、生物因素、环境污染等均成为诱发恶性血液病的直接原因,导致其发病率逐年增高,严重威胁着人类的生命,其中急性白血病情发展迅速,患者预后生存率较低<sup>[1]</sup>。若能在早期及时诊断发现,并进行适当治疗,对延长患者生存周期、提高患者生存质量具有十分重要的意义。研究发现,白血病的发生发展可能与基因的异常变化有关,其中DNA甲基化在恶性血液病中的研究是现代医学研究的热点<sup>[2-3]</sup>。DNA甲基化转移酶1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)在DNA甲基化修饰过程中起关键作用,其异常的高甲基化可以引起抑癌基因的失活,导致慢性白血病向急性转化<sup>[4]</sup>。分泌型卷曲相关蛋白1(secreted frizzled related protein 1, SFRP1)作为Wnt信号通路的拮抗剂,可以通过其启动子区甲基化导致其表达水平下调,促进Wnt通路靶基因过度表达,引起肿瘤细胞过度增殖、促进其迁移和侵袭,诱导凋亡<sup>[5]</sup>。目前,已有

研究报道DNMT1和SFRP1基因甲基化状态可能在多种恶性肿瘤的发生发展中发挥作用<sup>[6-7]</sup>,但在急性白血病患者中该基因的报道还较少,故本研究检测探究了骨髓标本中DNMT1和SFRP1基因甲基化状态及其mRNA表达水平与急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)和急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)患者临床病理及预后的关系,报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取2019年11月~2020年11月于邯郸市中心医院新诊断的急性白血病患者70例,其中AML患者50例,男性26例,女性24例,年龄15~66( $41.62 \pm 10.12$ )岁,临床分型包括:M1 5例, M2 25例, M3 5例, M4 6例, M5 9例; ALL患者20例,男性12例,女性8例,年龄15~64( $45.10 \pm 8.64$ )岁。纳入标准:①所有急性白血病患者均经细胞形态学和流式细胞免疫分型等检查确诊;②所有患者符合法-美-英分型系统(French-

American-British classification systems, FAB) 分型标准; ③随访资料完整; ④本研究经医院伦理委员会批准, 所有患者均知情并同意。排除标准: ①存在心、肺、肾等重要器官功能障碍; ②并发其它恶性肿瘤影响本研究。另选取同时期诊断为非恶性血液病患者 65 例作为对照 (包括贫血 29 例、原发性血小板减少 36 例), 其中男性 39 例, 女性 26 例, 年龄 15~62 (39.10 ± 9.53) 岁。三组患者在性别、年龄比较中差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性。

1.2 仪器与试剂 DNA 提取试剂盒、反转录试剂盒 (美国 Sigma 公司); 紫外分光光度计 (北京卓立汉光仪器有限公司); PCR 仪 (南京贝登医疗股份有限公司); PCR 引物 (武汉博士德生物工程有限公司); 酶标仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 治疗方案: AML 患者治疗方案及细胞遗传学预后分组参照《中国急性髓系白血病诊疗指南 2017 版》, 非 M3 型 AML 患者的化疗方案以蒽环类药物 + 阿糖胞苷为基础; M3 型 AML 患者采用以维甲酸联合砷剂的诱导巩固方案; ALL 患者的治疗方案及细胞遗传学预后分组参照中国《成人急性淋巴细胞白血病诊疗规范 2018 版》, 化疗方案均以柔红霉素 + 长春新碱 + 左旋门冬酰胺酶 + 泼尼松为基础。化疗后疗效诊断参照血液病诊断及疗效标准<sup>[8]</sup>, 完全缓解是指临床、血象及骨髓细胞学缓解。

1.3.2 骨髓标本单个核细胞分离: 所有患者入院后均予以常规骨髓检查, 采用肝素抗凝管于髂后上棘取患者化疗前骨髓 3 ~ 5 ml, 加入淋巴细胞分离液, 梯度离心获得骨髓单个核细胞沉淀, -80 °C 冻存备用。

1.3.3 MSP 检测 DNMT1 和 SFRP1 基因甲基化状态: 根据 DNA 试剂盒提取骨髓标本中的总 DNA, 紫外分光光度计检测其纯度,  $A_{260nm}/A_{280nm}$  比值一般在 1.8 ~ 2.0 之间即为提取成功, 根据甲基化检测试剂盒对 DNA 进行修饰。反应体系为 25  $\mu$ l, 反应条件为 95 °C 3 min (预变性), 95 °C 30 s (变性), 60 °C 30 s (退火), 72 °C 45 s (延伸), 共 35 个循环。PCR 产物在 2g/dl 琼脂糖凝胶电泳 30 min 后凝胶成像仪下观察并拍照。基因甲基化特异性 PCR 引物设计见表 1。

1.3.4 PCR 检测 DNMT1, SFRP1 和  $\beta$ -catenin mRNA 表达水平: 首先提取骨髓标本中总 RNA, 使用反转录试剂盒合成 cDNA, 并以此作为模板进行 RT-PCR 扩增, 扩增体系为 25  $\mu$ l, 实时 PCR 条件: 94 °C 5 min (预变性), 94 °C 40 s (变性), 40 °C 40 s (退火), 72 °C 1 min (延伸), 循环 35 次。

采用荧光定量 PCR 仪进行检测, 以 GAPDH 为内参, 采用相对定量  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因相对表达水平。引物序列见表 2。

表 1 DNMT1 和 SFRP1 基因甲基化特异性 PCR 引物

基因名称	甲基化状态	引物序列 (5'-3')
DNMT1	甲基化	F: ACGGGTTATTTTTTTTCG
		R: TAAATATACGCCCTCCACG
	非甲基化	F: TGATTGTTGTTGTAGTATC
		R: CAACAATTTAATAACACACA
SFRP1	甲基化	F: ATTTAGGTTTACGTGCGTTC
		R: CGACTCAAAAACGAAATCG
	非甲基化	F: TAGTATTAGTATTTAGGTTTATGCTGTTT
		R: AACACAATCCAACCTCAAAAACAAAATGA

表 2 PCR 引物序列

基因名称	引物序列 (5'-3')
DNMT1	F: TGTTTCACGCCCCTGTTCTG
	R: GCTGCCTTTGATGTAGTCGGAGTATTT
SFRP1	F: AGATGCTTAAGTGTGACAAGTTCC
	R: TCAGATTCAACTCGTTGTACACAG
$\beta$ -catenin	F: TGAGGACAAGCCACAAGATTAC
	R: TCCACCAGAGTGAAGAAGACG
GAPDH	F: CGGGAACTGTGGCGTGA
	R: CAAAGCTGGAGGAGTGGG

1.3.5 随访: 对所有 AML 和 ALL 患者采用门诊复查及电话的方式进行随访, 随访内容包括: 患者一般情况、是否生存、有无复发等, 时间截止到 2021 年 11 月, 观察患者术后生存情况, 观察终点为患者死亡或随访时间截止。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, 骨髓标本中 DNMT1, SFRP1 和  $\beta$ -catenin 相对表达水平等计量资料符合正态分布的以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用独立样本  $t$  检验; 多组间比较采用 One Way ANOVA 分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。DNMT1, SFRP1 基因甲基化状态等计数资料以 ( $n\%$ ) 表示, 组间比较采用卡方检验。相关性分析用 Pearson 法, 生存情况采用 Kaplan-Meier 法进行 Log-rank 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性白血病患者 DNMT1 和 SFRP1 基因甲基化状态 AML 组和 ALL 组患者中, DNMT1 基因甲基化发生率 (26.0%, 25.0%) 均低于正常对照组 (73.8%), 差异有统计学意义 ( $\chi^2=47.683, P < 0.05$ );

SFRP1 基因甲基化发生率 (78.0%, 85.0%) 均高于正常对照组 (18.5%), 差异有统计学意义 ( $\chi^2=55.265$ ,  $P < 0.05$ )。

2.2 急性白血病患者骨髓中 DNMT1, SFRP1 和  $\beta$ -catenin mRNA 表达水平 见表3。与对照组相比, AML 组和 ALL 组患者化疗前 DNMT1 和  $\beta$ -catenin mRNA 表达均显著升高 ( $t=8.361, 10.456; 4.807, 9.202$ ), SFRP1 表达水平显著下降 ( $t=24.791, 12.069$ ), 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。与化疗前相比, AML 组和 ALL 组患者化疗后 DNMT1 和  $\beta$ -catenin mRNA 表达水平均显著下降 ( $t=6.374, 5.097; 3.461, 4.008$ ), SFRP1 表达水平显著上升 ( $t=17.076, 7.454$ ), 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。

2.3 DNMT1 和 SFRP1 基因甲基化与 AML, ALL 患者临床病理参数的关系 见表4和表5。AML 患

表4

AML 患者 DNMT1 和 SFRP1 基因甲基化与临床病理参数的关系

类 别	DNMT1				SFRP1			
	甲基化 (n=13)	非甲基化 (n=37)	$\chi^2$ 值	P 值	甲基化 (n=39)	非甲基化 (n=11)	$\chi^2$ 值	P 值
年龄 (岁)								
≤ 35	9	25	0.252	0.648	29	7	0.179	0.590
> 35	4	12			10	4		
性别								
男	6	20	0.195	0.802	22	4	0.225	0.7186
女	5	19			17	7		
WBC ( $\times 10^9/L$ )								
≤ 50	9	10	6.524	0.018	8	9	8.115	0.012
> 50	4	27			31	2		
PLT ( $\times 10^9/L$ )								
≤ 100	8	30	3.542	0.082	25	6	1.920	0.147
> 100	5	7			14	5		
Hb (g/L)								
≤ 90	5	18	1.126	0.208	21	7	1.420	0.175
> 90	8	19			18	4		
BM (%)								
≤ 40	7	12	1.850	0.172	20	5	5.395	0.025
> 40	6	25			19	6		
FAB 分型								
M1	2	3	4.370	0.071	2	3	4.529	0.063
M2	7	18			13	12		
M3	2	3			3	2		
M4	1	5			3	3		
M5	1	8			5	4		
遗传学预后分组								
良好	2	10	5.732	0.021	10	2	5.060	0.032
中等	9	19			20	8		
不良	2	8			9	1		
化疗后效果								
完全缓解	11	31	0.815	0.292	32	10	0.822	0.287
未完全缓解	2	6			7	1		

2.4 DNMT1, SFRP1 和  $\beta$ -catenin mRNA 表达水平的相关性分析 Pearson 相关性分析显示, AML 患者 DNMT1 与 SFRP1 表达呈明显负相关 ( $r=-0.328$ ,  $P < 0.05$ ), SFRP1 与  $\beta$ -catenin 表达呈明显正相关 ( $r=0.682$ ,  $P < 0.05$ )。ALL 患者 DNMT1 与 SFRP1 表达呈明显负相关 ( $r=-0.315$ ,  $P < 0.05$ ), SFRP1 与  $\beta$ -catenin 表达呈明显正相关

者骨髓中 DNMT1 基因甲基化与 WBC 水平、遗传学预后分组有明显相关性 ( $P < 0.05$ ); SFRP1 基因甲基化与 WBC 水平、BM 水平及遗传学预后分组有明显相关性 ( $P < 0.05$ )。ALL 患者骨髓中 DNMT1 基因甲基化与遗传学预后分组有明显相关性 ( $P < 0.05$ ); SFRP1 基因甲基化与 WBC 水平、遗传学预后分组有明显相关性 ( $P < 0.05$ )。

表3 三组患者骨髓中 DNMT1, SFRP1 和  $\beta$ -catenin mRNA 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

项 目	对照组	AML		ALL	
		化疗前	化疗后	化疗前	化疗后
DNMT1	1.00 ± 0.11	1.18 ± 0.12	1.05 ± 0.08	1.13 ± 0.09	1.02 ± 0.11
SFRP1	1.00 ± 0.08	0.68 ± 0.05	0.95 ± 0.10	0.72 ± 0.12	0.97 ± 0.09
$\beta$ -catenin	1.00 ± 0.08	1.25 ± 0.17	1.10 ± 0.12	1.20 ± 0.10	1.06 ± 0.12

( $r=0.728$ ,  $P < 0.05$ )。两组患者 DNMT1 与  $\beta$ -catenin 表达均无明显相关性 ( $P > 0.05$ )。

2.5 DNMT1 和 SFRP1 基因甲基化对患者预后的影响 见图1和图2。截止2021年11月, 随访时间1~24个月, 中位随访时间11个月。AML 组和 ALL 组发生 DNMT1 基因甲基化患者生存率分别为 61.15% 和 63.55%, 均高于其未发生甲基化患



者的生存率(43.24%, 46.66%), 差异有统计学意义( $\chi^2=3.862$ , 3.679,  $P < 0.05$ )。AML组和ALL组发生SFRP1基因甲基化的患者生存率分别

为38.46%和43.50%, 均低于其未发生甲基化患者的生存率(63.64%, 66.67%), 差异亦有统计学意义( $\chi^2=2.927$ 和3.155,  $P < 0.05$ )。

表5 ALL患者DNMT1和SFRP1基因甲基化与临床病理参数的关系

类别		DNMT1				SFRP1			
		甲基化(n=5)	非甲基化(n=15)	$\chi^2$ 值	P值	甲基化(n=17)	非甲基化(n=3)	$\chi^2$ 值	P值
年龄(岁)	≤35	4	10	0.208	0.439	14	3	0.412	0.306
	>35	1	5			3	0		
性别	男	3	9	1.095	0.295	10	2	1.325	0.279
	女	2	6			7	1		
WBC( $\times 10^9/L$ )	≤50	3	6	1.524	0.219	5	2	4.920	0.041
	>50	2	9			12	1		
PLT( $\times 10^9/L$ )	≤100	1	8	2.139	0.127	11	2	3.014	0.102
	>100	4	7			6	1		
Hb(g/L)	≤90	2	10	0.926	0.308	10	1	3.843	0.075
	>90	3	5			7	2		
BM(%)	≤40	1	9	2.579	0.172	9	2	1.395	0.236
	>40	4	6			8	1		
遗传学预后分组	良好	0	1	4.802	0.044	1	0	5.115	0.031
	中等	2	8			8	2		
	不良	3	6			8	1		
化疗后效果	完全缓解	3	15	2.115	0.190	15	3	3.822	0.081
	未完全缓解	2	0			2	0		

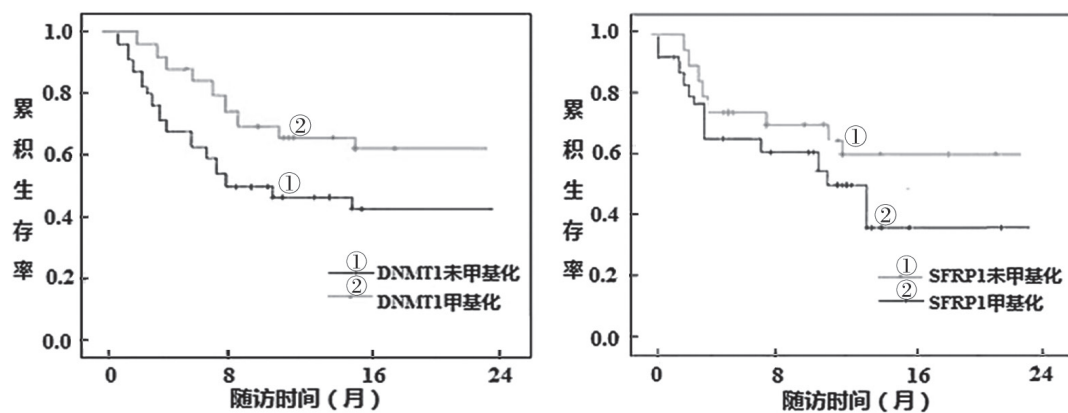


图1 AML患者DNMT1和SFRP1基因甲基化生存曲线

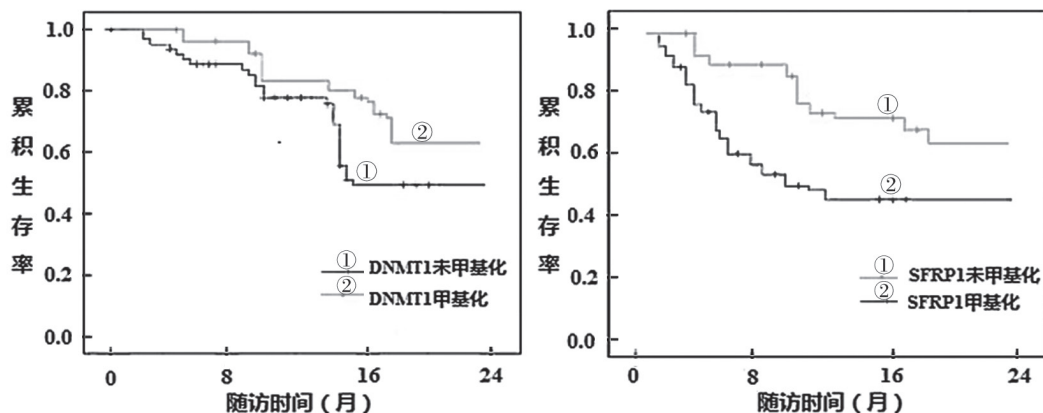


图2 ALL患者DNMT1和SFRP1基因甲基化生存曲线

### 3 讨论

由于恶性血液病起病缓急程度不一样,早期症状不易被重视,导致患者错失最佳治疗时机,且治疗效果不佳,很难彻底治愈,因此探究恶性血液病肿瘤发生发展的分子遗传学机制对早期诊断及预后具有指导性作用。表观遗传学包括组蛋白修饰、DNA甲基化和非编码RNA调控,近年研究表明,表观遗传学异常调控在恶性血液病发展进程中至关重要,以DNA甲基化为重要形式,是调控真核细胞发育过程中基因表达的关键信号,其失调在髓系肿瘤中普遍发生<sup>[9,2]</sup>。CpG局部甲基化的异常升高及基因整体甲基化的降低是诱发癌症的重要原因<sup>[10]</sup>。且有文献报道,DNA甲基化异常是AML发生的关键事件,对基因甲基化的鉴定可作为AML治疗及预后评估的依据<sup>[11]</sup>。抑癌基因启动子甲基化可造成基因沉默,是慢性髓系白血病发生的重要分子机制<sup>[12]</sup>。故进一步了解DNA甲基化可为恶性血液病的临床治疗提供依据和伦理基础。

DNMT1是DNA进行复制修复并维持其正常甲基化的关键酶,具有调节细胞周期和调控肿瘤抑制基因表达的能力,在肿瘤的形成、进展、转移及不良预后等方面发挥重要作用<sup>[4]</sup>。既往VAZ等<sup>[13]</sup>采用小鼠模型探究了表观遗传改变对体内形成腺鳞状细胞肺癌的影响,结果显示,在正常肺上皮细胞中上调DNMT1基因,可诱导正常细胞朝向肿瘤细胞甲基化模式发生变化,推测DNMT1诱导的表观遗传异常可能促使癌基因由衰老转变为参与肺癌起始的单个关键癌基因。吴圣豪等<sup>[14]</sup>研究表明,AML患者中DNMT1基因表达升高,与WBC计数、外周血幼稚细胞比例呈正相关,提示DNMT1能够促使白血病细胞从骨髓释放到外周血,迁移至髓外形成浸润病灶,并发现其高表达患者预后较差,可作为判断AML预后指标。另据研究报道,SFRPs家族可以与Fzd受体竞争性结合Wnt蛋白,导致Wnt信号通路受阻,抑制肿瘤细胞增殖,促进凋亡<sup>[15]</sup>。SFRP1基因缺失涉及表观遗传学改变及基因调控,DNA甲基化是SFRP1沉默的主要机制<sup>[16]</sup>。徐成波等<sup>[17]</sup>研究发现,SFRP1基因在ALL细胞株中呈完全甲基化状态,当SFRP1基因高甲基化状态逆转时,SFRP1基因表达恢复。LIU等<sup>[18]</sup>探索发现,SFRP1基因在结直肠癌肿瘤组织中经常被高甲基化,且SFRP1的启动子高甲基化可能被认为是结直肠癌患者术后生存优势的独立预后预测因子。

本研究通过MSP法检测发现,AML和ALL患者骨髓中DNMT1基因甲基化发生率较低,SFRP1基因甲基化发生率较高。与前期文献相比,虽然其甲基化检出率存在一定的差异,但多数研究指出,

急性白血病患者至少有一种以上的Wnt信号通路拮抗因子发生甲基化<sup>[19]</sup>,结合本研究结果,进一步证实了AML和ALL患者中存在有SFRP1基因启动子甲基化,这一机制在急性白血病的发生过程中意义重大。此外,本研究还发现,AML和ALL患者化疗前DNMT1相对表达显著升高,SFRP1相对表达显著下降,化疗缓解后其表达水平反之,推测基因启动子甲基化导致基因转录障碍,mRNA和蛋白表达水平则随之下降,与JEZIORSKA等<sup>[20]</sup>报道基因启动子区发生甲基化后,mRNA表达水平则降低,进而抑制肿瘤发生增殖和迁移相吻合。

$\beta$ -catenin是经典Wnt通路的关键因子,它由胞浆向胞核的转移被认为是Wnt通路激活后行使功能的标志<sup>[21]</sup>。本研究中AML和ALL患者骨髓中 $\beta$ -catenin表达显著升高,说明Wnt通路参与了血液系统恶性肿瘤的发生发展。相关分析显示, $\beta$ -catenin与SFRP1表达呈正相关,而SFRP1表达受DNMT1的负向调控,进一步推断DNMTs家族的表达增高,可使SFRP1基因启动子甲基化程度降低,SFRP1表达升高,进而阻止Wnt通路的持续激活。这与LI等<sup>[22]</sup>报道的阻断Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径可以抑制肿瘤细胞增殖和侵袭,促进凋亡相一致。另发现,AML和ALL发生DNMT1基因甲基化的患者生存率较高,SFRP1基因甲基化患者生存率较低,提示DNMT1和SFRP1基因甲基化状态可以作为判断急性白血病患者预后的分子标志物。但本研究还存在一定的局限性,纳入的样本数较少,后期可扩大样本量,通过更多的数据进一步研究论证;另Wnt通路参与血液系统恶性肿瘤发生发展的机制也仍需进一步探究阐明。

综上所述,DNMT1和SFRP1基因甲基化与恶性血液病患者临床病理及预后相关,究其原因可能与DNMT1和SFRP1基因甲基化异常激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路有关。

#### 参考文献:

- [1] 郑源海,林元峰,许瑞元,等.急性髓系白血病免疫表型特征与预后相关性分析[J].现代检验医学杂志,2018,33(4):90-94.  
ZHENG Yuanhai, LIN Yuanfeng, XU Ruiyuan, et al. Correlative analysis of immunophenotypic characteristics and prognosis in acute myeloid leukemia[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(4): 90-94.
- [2] 王玉姣,张蕊,李艳.急性髓系白血病中DNA甲基化异常及相关调控基因的研究进展[J].现代肿瘤医学,2021,29(19):3491-3494.  
WANG Yujiao, ZHANG Rui, LI Yan. Advances in abnormal DNA methylation and related regulatory genes in AML[J]. Journal of Modern Oncology, 2021,

- 29(19):3491-3494.
- [3] BEHZAD M M, SHAHRABI S, JASEB K, et al. Aberrant DNA methylation in chronic myeloid leukemia: cell fate control, prognosis, and therapeutic response[J]. *Biochemical Genetics*, 2018, 56(3): 149-175.
- [4] 黄滔, 周兴路, 毛曦轲, 等. DNA 甲基化基因 DNMT1 的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27 (14): 2595-2600.
- HUANG Tao, ZHOU Xinglu, MAO Xike, et al. Advances in research on DNA methylation gene DNMT1[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2019, 27(14):2595-2600.
- [5] YU Jun, XIE Yang, LI Mengying, et al. Association between SFRP promoter hypermethylation and different types of cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. *Oncology Letters*, 2019, 18(4): 3481-3492.
- [6] BINISZKIEWICZ D, GRIBNAU J, RAMSAHOYE B, et al. Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(7): 2124-2135.
- [7] 黄一波, 王国平, 王奕, 等. 胃癌患者 SFRP1, SFRP2, SDC-2 甲基化与病理特征的相关性分析 [J]. *中华全科医学*, 2021, 19(12): 2008-2011.
- HUANG Yibo, WANG Guoping, WANG Yi, et al. Correlation analysis of SFRP1, SFRP2 and SDC-2 methylation and pathological features in patients with gastric cancer [J]. *Chinese Journal of General Practice*, 2021, 19(12): 2008-2011.
- [8] 沈梯, 赵永强, 周道斌, 等. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2018: 91-96.
- SHEN Ti, ZHAO Yongqiang, ZHOU Daobin, et al. Criteria for diagnosis and efficacy of hematological diseases [M]. 4th Edition. Beijing: Science Press, 2018:91-96.
- [9] BAI Yi, WEI Chunlian, ZHONG Yuxin, et al. Development and validation of a prognostic nomogram for gastric cancer based on DNA methylation driven differentially expressed genes[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2020, 16(7): 1153-1165.
- [10] 刘文静, 王舒婕, 张巧, 等. DNA 去甲基化在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. *生命的化学*, 2020, 40(11): 2035-2042.
- LIU Wenjing, WANG Shujie, ZHANG Qiao, et al. Research progress of DNA demethylation in malignant tumors [J]. *Chemistry of Life*, 2020, 40(11):2035-2042.
- [11] ZHANG Rui, ZHANG Yan, LU Xianglan, et al. SPRED1 is downregulated and a prognostic biomarker in adult acute myeloid leukemia [J]. *Front Oncol*, 2020, 10:204.
- [12] 刘晓, 刘珊, 李英华. 慢性髓性白血病患者外周血细胞中 SHP-1, DNMTs 水平变化及其与疾病进展的关系 [J]. *山东医药*, 2018, 58(45): 84-86.
- LIU Xiao, LIU Shan, LI Yinghua. Changes of SHP-1 and DNMTs levels in peripheral blood cells of patients with chronic myeloid leukemia and their relationship with disease progression [J]. *Shandong Medical Journal*, 2018, 58(45): 84-86.
- [13] VAZ M, HWANG S Y, KAGIAMPAKIS I, et al. Chronic cigarette smoke-induced epigenomic changes precede sensitization of bronchial epithelial cells to single-step transformation by KRAS mutations[J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(3): 360-376, e6.
- [14] 吴圣豪, 陈松燕, 石岳坚, 等. DNA 甲基转移酶 DNMT1 与 EZH2 在急性髓系白血病中的表达及相关性研究 [J]. *医学研究杂志*, 2016, 45(4): 94-97.
- WU Shenghao, CHEN Songyan, SHI Yuejian, et al. Relationship between DNMT1 and EZH2 gene expression and clinical significance in patients with acute myeloid leukemia [J]. *Journal of Medical Research*, 2016, 45(4):94-97.
- [15] PENG Yaojun, WU Qiyan, WANG Lingxiong, et al. A DNA methylation signature to improve survival prediction of gastric cancer[J]. *Clinical Epigenetics*, 2020, 12(1): 15.
- [16] 周碧, 高吉照. 儿童急性淋巴细胞白血病中 sFRP1 基因的表达与预后 [J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2022, 27(1): 45-48.
- ZHOU Bi, GAO Jizhao. The prognostic value of sFRP1 mRNA expression for acute lymphoblastic leukemia of childhood [J]. *Journal of China Pediatric Blood and Cancer*, 2022, 27(1):45-48.
- [17] 徐成波, 冯敏, 廖斌, 等. 急性白血病患者细胞系中 SFRP 基因启动子甲基化及去甲基化诱导表达的研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(8): 1447-1451.
- XU Chengbo, FENG Min, LIAO Bin, et al. Promoter methylation status and demethylation-induced expression of SFRP genes in human acute leukemia cell lines [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2013, 29:1447-1451.
- [18] LIU Xinyan, FU Jinming, BI Haoran, et al. DNA methylation of SFRP1, SFRP2, and WIF1 and prognosis of postoperative colorectal cancer patients[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 1212.
- [19] 林娜, 富威, 李艳, 等. 急性淋巴细胞白血病中 DNA 甲基转移酶 3A 剪切体的表达 [J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(20): 3180-3183.
- LIN Na, FU Wei, LI Yan, et al. Expression of DNMT3A transcripts in acute lymphoblastic leukemia [J]. *Journal of Modern Oncology*, 2018, 26(20):3180-3183.
- [20] JEZIORSKA D M, MURRAY R, DE GOBBI M, et al. DNA methylation of intragenic CpG islands depends on their transcriptional activity during differentiation and disease[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(36): E7526-E7535.
- [21] CHATTERJEE A, PAUL S, BISHT B, et al. Advances in targeting the WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway in cancer[J]. *Drug Discovery Today*, 2022, 27(1): 82-101.
- [22] LI Yandong, LÜ Zhen, ZHU Weifang. RBBP4 promotes colon cancer malignant progression via regulating Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2020, 26(35): 5328-5342.

收稿日期: 2022-04-14

修回日期: 2022-09-01