

## B细胞淋巴瘤 SHP-1 基因甲基化状态及其意义

汪清铭, 吴祥元, 王东宁, 林 曲, 董 敏, 温景芸

(中山大学附属第三医院肿瘤内科, 广东 广州 510630)

**摘 要:** 【目的】探讨 JAK/STAT 信号转导途径负调控子 SHP-1 基因启动子区域 CpG 岛异常甲基化在 B 细胞淋巴瘤中的意义。【方法】收集存档石蜡包埋组织标本 61 例(52 例 B 细胞非霍奇金淋巴瘤标本, 9 例良性增生淋巴结标本), 健康人外周血单个核细胞 DNA 标本 15 例, 用甲基化特异性 PCR(methylation-specific PCR, MSP) 和非甲基化特异性 PCR(unmethylation-specific PCR, un-MSP) 检测 SHP-1 启动子区域 CpG 岛甲基化状态, MSP、un-MSP 和 RT-PCR 方法分别检测接受或未接受去甲基化处理的 Burkitt 淋巴瘤细胞系 Raji 的甲基化状态及 mRNA 的表达, MTT 法检测接受去甲基化干预后细胞生长受抑情况。【结果】SHP-1 基因启动子区域在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤甲基化频率分别为 94% 及 97%, 对照组 9 例淋巴结良性增生标本和 15 例正常人外周血单个核细胞标本中 SHP-1 基因启动子区域甲基化频率为 0。经去甲基化干预后, Raji 细胞 SHP-1 基因启动子区域呈去甲基化状态, 基因恢复表达, 细胞生长受到抑制。【结论】SHP-1 基因启动子区域启动子区域 CpG 岛在 B 细胞淋巴瘤中存在高度甲基化, 由其所致的 SHP-1 基因沉默可能是 B 细胞淋巴瘤发生的一个重要因素, SHP-1 基因的甲基化可作为一个良好的分子诊断标记及可能的治疗靶点。

关键词: 淋巴瘤; SHP-1; 甲基化

中图分类号: R733.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)01-0092-05

### Significance of Methylation State in SHP-1 Gene in B-cell Lymphoma

WANG Qing-ming, WU Xiang-yuan, WANG Dong-ning, LIN Qu, DONG Ming, WEN Jing-yun

(Department of Oncology, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the methylation state of CpG island in the SHP-1 gene promoter which is one of the negative regulators of JAK/STAT signaling pathway and to evaluate its significance in B-cell lymphoma. 【Methods】Sixty-one paraffin specimens including 52 specimens of B-cell non-Hodgkin lymphoma and 9 specimens of benign lymphnodes proliferation and 15 specimens of blood mononuclear cells from health individuals were studied, methylation state of CpG island in SHP-1 gene in the specimens and Raji cell line were detected by methylation specific PCR(MSP) and unmethylation-specific PCR(un-MSP). The expression level of SHP-1 in Raji cells with or without 5-aza-2'-deoxyytidine treatment were detected by reverse transcriptase PCR (RT-PCR). The inhibitory ratio of Raji cells were measured by MTT assay. 【Results】The frequency of methylation in SHP-1 gene promoter in large B-cell lymphoma(DLBCL) and follicular lymphoma(FL) were 94% and 97%, respectively. In control group, however, 9 specimens of benign lymphnodes proliferation and 15 specimens of blood mononuclear cells from health individuals showed no methylation in CpG island of SHP-1 gene promoter ( $P < 0.0001$ ). The expression of SHP-1 was recovered and the cell growth was inhibited when the cell exposed to the demethylating reagent. 【Conclusion】SHP-1 gene silencing with aberrant CpG methylation is probably one of the critical events to the onset of B-cell lymphoma as well as important implications for the diagnostic markers and the target of gene therapy.

Key words: lymphoma; SHP-1; methylation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1): 92-96]

收稿日期: 2006-04-30

作者简介: 汪清铭(1975-)男, 江西乐平人, 硕士, 住院医师; 吴祥元, 主任医师, 硕士生导师, 通讯作者. E-mail: wxy307@yahoo.com.cn

SHP-1 是一种天然存在于胞浆内的酪氨酸磷酸酶, 其通过催化受体相关酪氨酸激酶 (Janus Kinase, JAKs) 去磷酸化导致 JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) 信号转导途径活性下调, 是 JAK/STAT 途径主要负调控子之一, 可对抗蛋白酪氨酸激酶的潜在促生长和致癌活性, 因此, 近年来有学者认为其可能是候选的抑癌基因<sup>[1]</sup>。研究表明, 基因启动子区域异常甲基化可导致基因沉默, 抑癌基因的甲基化及由其所导致的抑癌基因失表达促进肿瘤的发生发展。本研究检测 B 细胞恶性淋巴瘤中 SHP-1 基因的甲基化状态, 并对 Raji 细胞系进行去甲基化干预, 观察肿瘤细胞 SHP-1 基因表达情况及其生长状态的改变, 探讨 SHP-1 基因甲基化在 B 细胞淋巴瘤发生发展中的意义, 为 B 细胞淋巴瘤的诊断和治疗提供新的方向。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞系与病例

Burkitt 淋巴瘤细胞系 Raji 由中山大学肿瘤防治中心馈赠。52 例 B 细胞非霍奇金淋巴瘤标本为本院 1999 年-2005 年间存档石蜡标本, 所有标本均经病理组织形态学及免疫组化确诊。滤泡性淋巴瘤 (follicular lymphoma, FL) 35 例, 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 17 例, 男 33 例, 女 19 例, 年龄 18~72 岁, 平均 45.6 岁。9 例良性非特异性慢性淋巴结炎石蜡包埋组织标本和 15 例健康人外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 标本作为对照组。

### 1.2 试剂

UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒、Trizol 购自上海生工生物工程公司, TaKaRa Genome-DNA Extraction Kit 为日本 TaKaRa 公司产品, Wizard DNA Clean-up system, MMLV 逆转录酶为美国 Promega 公司产品, MSP 阳性对照 CpGenome Universal Methylated DNA 购自美国 Chemicon 公司。

### 1.3 DNA 的提取

用 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒提取石蜡组织 DNA, TaKaRa Genome-DNA

Extraction Kit 用于细胞系基因组 DNA 的提取, 紫外分光光度计确定 DNA 含量及纯度。

### 1.4 甲基化特异性 PCR 和非甲基化特异性 PCR 分析

1.4.1 亚硫酸氢钠修饰 DNA DNA 1.5  $\mu\text{g}$ , 三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液调整体积至 50  $\mu\text{L}$ , 加新鲜配制的 3 mol/L NaOH (终浓度 0.3 mol/L) 37  $^{\circ}\text{C}$  15 min 使 DNA 变性, 向已变性的 DNA 中加入 520  $\mu\text{L}$  3.6 mol/L 亚硫酸氢钠和 30  $\mu\text{L}$  10 mmol/L 氢醌, 55  $^{\circ}\text{C}$  避光水浴 16 h。然后用 Wizard DNA Clean-up system 纯化 DNA, 最后用 3 mol/L NaOH, 3 mol/L 醋酸氨进行亚硫酸氢钠后处理, 乙醇沉淀 DNA, 溶解于 50  $\mu\text{L}$  三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液中, -20  $^{\circ}\text{C}$  避光保存备用。

1.4.2 PCR 扩增 SHP-1 基因甲基化引物: 上游: 5'-GAA CGT TAT TAT AGT ATA GCG TTC-3' (nt:6857-6880); 下游: 5'-TCA CGC ATA CGA ACC CAA ACG-3' (nt:7015-6995); 扩增产物长度: 159 bp。扩增条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 12 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火, 35 个循环。SHP-1 基因非甲基化引物: 上游: 5'-GTG AAT GTT ATT ATA GTA TAG TGT TTG G-3' (nt:6855-6882); 下游: 5'-TTC ACA CAT ACA AAC CCA AAC AAT-3' (nt:7016-6993); 扩增产物长度: 162 bp。扩增条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 12 min, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火, 35 个循环。20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外光凝胶成像系统观察结果。

### 1.5 去甲基化干预

用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基常规培养 Raji 细胞, 细胞按  $5 \times 10^4$  /mL 起始浓度培养于去甲基化试剂 5-aza-2'-deoxyytidine 终浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$  的培养液中, 每天更换培养液及去甲基化试剂, 以未加去甲基化试剂的细胞为对照, 培养第 3 天后提取 DNA, 第 3、5 天后提取 RNA, 观察基因甲基化状态及表达。

### 1.6 RT-PCR

Trizol 提取 Raji 细胞总 RNA, 用随机引物、MMLV 逆转录酶等合成 cDNA, 按试剂说明书进行操作。SHP-1 引物: 上游: 5'-GAC TGT GAC ATT GAC ATC CAG-3'; 下游: 5'-CTT CCT CTT GAG GGA ACC CTT-3', 产物长度: 350 bp;  $\beta$ -actin 引物: 上游: 5'-CAC TGT GTT GGC GTA CAG GT-3', 下游: 5'-TCA TCA CCA TTG GCA ATG AG-

3; 产物长度: 154 bp, 扩增条件: 94 预变性 4 min, 94 45 s, 58 45 s, 72 1 min, 32 个循环, 72 延伸 7 min, 以  $\beta$ -actin 为内参照。20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外光凝胶成像系统观察结果。

### 1.7 细胞生长抑制率的测定

用噻唑蓝还原法检测, 取已被 5-aza-2-deoxythymine (1  $\mu$ mol/l) 作用 2 d 并处于对数生长期的 Raji 细胞, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^4$  /mL, 接种细胞于 96 孔板, 每孔加入细胞悬液 200  $\mu$ L (细胞  $10^4$  /孔), 加去甲基化试剂 5-aza-2-deoxythymine, 终浓度分别为 0、1、2、4  $\mu$ mol/L, 每种药物浓度为 1 组, 每组设 6 个平行孔, 并设空白对照组。细胞培养 20、32、44、56 h 后加噻唑蓝 (5 mg/mL) 20  $\mu$ L, 继续培养 4 h, 离心去上清后每孔加 DMSO 150  $\mu$ L, 以 570 nm 为测试波长, 630 nm 为参考波长, 读取吸光度 A 值, 取各复孔吸光度均值, 实验重复 3 次, 细胞生长抑制率 = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / 对照组 A 值  $\times 100\%$ 。

### 1.8 统计学分析

用 SAS V8 软件行卡方检验。

## 2 结果

### 2.1 SHP-1 基因启动子区域甲基化检测结果

17 例弥漫性大 B 细胞淋巴瘤标本 16 例存在 SHP-1 基因启动子区域甲基化, 甲基化频率为 94%; 35 例滤泡性淋巴瘤标本 34 例存在该区域甲基化, 甲基化频率为 97%; 而对照组标本均为非甲基化状态,  $\chi^2$  分别为 37.045 及 55.022,  $P < 0.0001$ 。电泳图 (图 1) MSP 呈阳性条带, unMSP 呈阴性条带提示该标本基因启动子区域呈甲基化状态; 如 unMSP 呈阳性条带 MSP 呈阴性条带, 则说明该标本基因启动子区域呈非甲基化状态。电泳结果均经测序证实, MSP 阳性条带测序示 CpG 岛 CpG 二核苷酸中的碱基 C 被亚硫酸氢钠修饰后仍旧为 C, 证实该位点为甲基化状态; unMSP 阳性条带测序示 CpG 岛 CpG 二核苷酸中的碱基 C 被亚硫酸氢钠修饰再经 PCR 扩增后变为 T, 证实该位点呈非甲基化状态。

### 2.2 去甲基化干预致 Raji 细胞 SHP-1 基因甲基

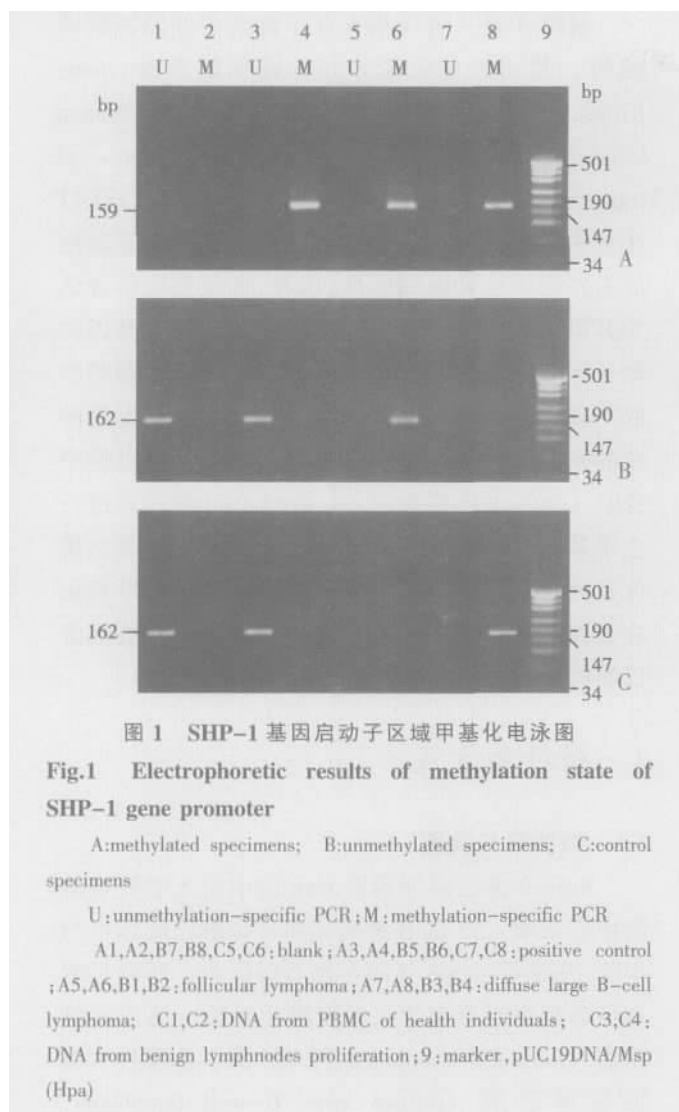


图 1 SHP-1 基因启动子区域甲基化电泳图

Fig.1 Electrophoretic results of methylation state of SHP-1 gene promoter

A: methylated specimens; B: unmethylated specimens; C: control specimens

U: unmethylation-specific PCR; M: methylation-specific PCR

A1, A2, B7, B8, C5, C6: blank; A3, A4, B5, B6, C7, C8: positive control; A5, A6, B1, B2: follicular lymphoma; A7, A8, B3, B4: diffuse large B-cell lymphoma; C1, C2: DNA from PBMC of health individuals; C3, C4: DNA from benign lymphnodes proliferation; 9: marker, pUC19DNA/Msp (Hpa)

### 化状态改变

未接受去甲基化干预的 Raji 细胞 SHP-1 基因启动子区域呈甲基化状态, MSP 呈阳性条带, 而 UN-MSP 呈阴性条带; 干预后分析显示该区域呈非甲基化状态, MSP 呈阴性条带, 而 UN-MSP 呈阳性条带 (图 2)。

### 2.3 去甲基化干预致 Raji 细胞 SHP-1 基因表达水平改变

未接受去甲基化干预的 Raji 细胞 SHP-1 基因失表达, 干预后恢复表达, 目的条带 350 bp, 以  $\beta$ -actin 为内对照 (图 3)。

### 2.4 去甲基化干预致 Raji 细胞生长受抑

Raji 细胞经去甲基化药物处理后生长明显受抑制 (图 4)。

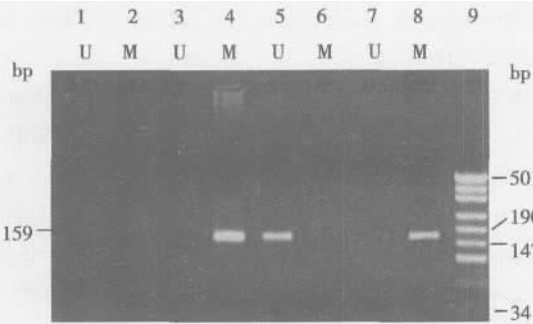


图 2 干预前后 Raji 细胞 SHP-1 基因甲基化电泳图  
Fig.2 Electrophoretic results of methylation state in SHP-1 gene in Raji cells with or without demethylating reagent treatment

U:un-MSP; M:MSP

1,2:blank;3,4:positive control;5,6:DNA from Raji cells with demethylating reagent treatment;7,8:DNA from Raji cells without demethylating reagent treatment;9:marker,pUC19DNA/Msp(Hpa)

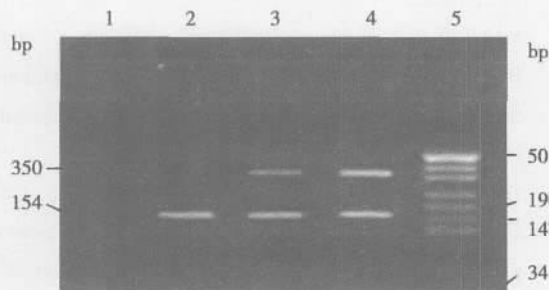


图 3 干预前后 Raji 细胞 SHP-1 基因表达电泳图

Fig.3 Electrophoretic results of SHP-1 gene expression in Raji cells with or without demethylating reagent treatment

1:blank; 2: RNA from Raji cells without demethylating reagent treatment; 3: RNA from Raji cells after demethylating reagent treatment for 3 days; 4: RNA from Raji cells after demethylating reagent treatment for 5 days; 5:Marker,pUC19DNA/Msp(Hpa)

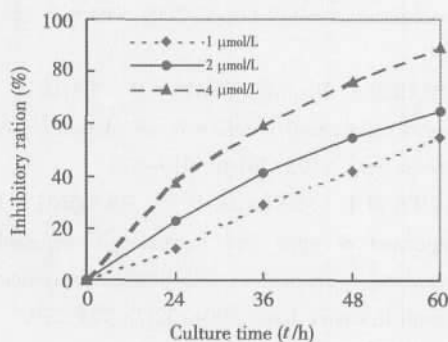


图 4 不同浓度去甲基化药物干预 Raji 细胞后生长抑制率测定

Fig.4 Inhibitory ratios of Raji cells at different demethylating reagent concentration

### 3 讨论

DNA 甲基化是哺乳动物遗传外修饰的重要调控方式,在基因表达调控,基因结构的稳定等方面有着重要的作用。研究表明,DNA 甲基化模式改变与肿瘤形成有着密切的关系<sup>[2]</sup>。肿瘤细胞与正常细胞相比,DNA 甲基化模式显著不同,表现为整个基因组的低甲基化与某些特异性位点如启动子 CpG 岛高甲基化并存。肿瘤形成最基本的遗传性模式是原癌基因过度扩增与抑癌基因的沉默,细胞增殖平衡受到破坏而导致细胞的恶性状态,抑癌基因沉默与其启动子区域高甲基化有关。现已发现多个基因的启动子区域甲基化与肿瘤的发生有关,如 DAP- K、P15、P16、P73、MTS1 基因等<sup>[3,4]</sup>。

JAK/STAT 信号转导途径参与细胞增殖、分化、胚胎发育及机体免疫等生物学作用的相关调控。研究发现,该途径异常激活与淋巴瘤发生发展关系密切,但其异常激活的具体机制尚未完全明确<sup>[5]</sup>。SHP- 1 基因为存在于胞浆中的一种酪氨酸磷酸酶,是 JAK/STAT 信号转导途径负调控子之一。SHP- 1 基因沉默可以导致相关信号转导分子活性增强,从而促进肿瘤发生。

Oka 等<sup>[6]</sup>通过表达谱芯片及组织微阵列技术证实 SHP- 1 基因在恶性淋巴瘤中表达明显下降。本研究初步结果显示 SHP- 1 基因启动子区域甲基化在 B 细胞淋巴瘤中发生频率高,这是否与 SHP- 1 基因表达下调从而导致 JAK/STAT 信号转导途径失调有关,需进一步研究。

恶性淋巴瘤的病理诊断难度较大,主观性强,尤其是细胞、组织结构异型性尚不明显时,良、恶性增生往往难以鉴别,甲基化检测方法 MSP 灵敏度高,对甲基化等位基因的检测灵敏度能够达到  $10^{-3}$ ~ $10^{-5}$ <sup>[7]</sup>。本研究 52 例 B 细胞淋巴瘤组织中 50 例存在 SHP- 1 基因启动子区域高甲基化,而在 9 例良性增生淋巴结组织及 15 例正常人 PBMC 标本中,该基因相应区域均为非甲基化状态,可见,SHP- 1 基因异常甲基化在 B 细胞恶性淋巴瘤的发生过程中是一个普遍事件,SHP- 1 基因启动子区域甲基化检测可以作为 B 细胞淋巴瘤的一种有希望的辅助诊断手段。

FL 是一种常见的低度恶性非霍奇金淋巴瘤

(NHL),有约 60%最终转化为 DLBCL,DLBCL 目前治疗主要方法为化疗,常规化疗疗效欠佳,自体干细胞移植支持下的大剂量化疗 (HDT-AHSCT) 已取得良好疗效,但耗资较大,且仍有部分病例复发,所以探索新的治疗方法显得尤为重要,去甲基化治疗作为一种新的治疗手段,在急、慢性髓系白血病以及骨髓增生异常综合征(MDS)的治疗中取得了成功<sup>[8-10]</sup>,本研究对 Raji 细胞系进行去甲基化干预试验,干预后细胞 SHP-1 基因恢复表达,细胞生长明显受抑,提示 SHP-1 是一个有前景的候选基因治疗靶点。初步结果提示针对 SHP-1 基因的去甲基化治疗有可能成为治疗 B 细胞淋巴瘤有希望的手段之一。

#### 参考文献:

- [1] WU C,Guan Q,Wang Y, et al. SHP-1 suppresses cancer cell growth by promoting degradation of JAK kinases. [J].*J Cell Biochem*,2003,90(5):1026- 1037.
- [2] BAYLIN S B. DNA methylation and gene silencing in cancer[J].*Nat Clin Pract Oncol*, 2005, Suppl 1:S4- 11.
- [3] LEHMANN U, BRAKENSIEK K, KREIPE H. Role of epigenetic changes in hematological malignancies [J]. *Ann Hematol*,2004,83(3):137- 152.
- [4] 全欣鑫,黄志明,周晓东,等.胃癌中 MTS1 基因异常甲基化的研究[J].*中山医科大学学报*, 2000, 21(4S): 109- 111.
- [5] VALENTINO L, PIERRE J. JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(6):713- 721.
- [6] OKA T, YOSHINO T, HAYASHI K, et al. Reduction of hematopoietic cell- specific tyrosine phosphatase SHP- 1 gene expression in natural killer cell lymphoma and various types of lymphomas/leukemias combination analysis with cDNA expression array and tissue microarray[J].*Am J Pathol*, 2001, 159(4):1495- 1505.
- [7] CHIM C S, LIANG R, TAM C Y,et al. Methylation of p15 and p16 genes in acute promyelocytic leukemia: potential diagnostic and prognostic significance[J].*J Clin Oncol*,2001,19(7):2033- 2040.
- [8] STEUBER C P, KRISCHER J, HOLBROOK T,et al. Therapy of refractory or recurrent childhood acute myeloid leukemia using amsacrine and etoposide with or without azacitidine: a Pediatric Oncology Group randomized phase study [J].*J Clin Oncol*,1996,14(5): 1521- 1525.
- [9] KANTARJIAN H M, O BRIEN S, CORTES J, et al. Results of decitabine (5 - a z a - 2 deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia[J].*Cancer*,2003,98(3):522- 528.
- [10] DASKALAKIS M, NGUYEN T T, NGUYEN C, et al. Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5- Aza- 2 - deoxycytidine (decitabine) treatment [J].*Blood*,2002,100 (8):2957- 2964.

(编辑 黄小延)

(上接第 91 页 from page 91)

- [5] BARAKA A, SIDDIK S, ALAMEDDINE M. Remifentanyl for modulation of hemodynamics in a patient undergoing laparoscopic resection of pheochromocytoma[J]. *Middle East J Anesthesiol*, 2004, 17(4): 585- 592.
- [6] SOOD J, JAYARAMAN L, KUMRA V P, et al. Laparoscopic approach to pheochromocytoma: is a lower intraabdominal pressure helpful? [J]. *Anesth Analg*, 2006, 102(2): 637- 641.
- [7] 李仲宜,龙惠民,殷民,等.腹腔镜与开放性肾上腺嗜铬细胞瘤切除术对呼吸与循环功能影响的比较[J].*临床泌尿外科杂志*, 2001, 16(5): 217- 219.
- [8] SALOMON L, RABII R, SOULIE M, et al. Experience with retroperitoneal laparoscopic adrenalectomy for pheochromocytoma[J]. *J Urol*, 2001, 165(6 Pt 1): 1871- 1874.
- [9] KERCHER K W, NOVITSKY Y W, PARK A, et al. Laparoscopic curative resection of pheochromocytomas [J]. *Ann Surg*, 2005, 241(6): 919- 926.
- [10] DAVIES M J, McGLADE D P, BANTING S W. A comparison of open and laparoscopic approaches to adrenalectomy in patients with phaeochromocytoma [J]. *Anaesth Intensive Care*, 2004, 32(2): 224- 229.

(编辑 张敏瑞)