

· 简 报 ·

骨髓增生异常综合征降钙素基因甲基化的检测

王顺清^① 洪文德 彭爱华 罗绍凯 戴木水 戴丽君

(中山医科大学附属第一医院血液内科; 广州, 510080)

主题词 骨髓发育不良综合征; 钙素; 基因; 甲基化

中图分类号 R 551.3

骨髓增生异常综合征(MDS)是一种起源于造血干细胞的克隆性疾病, 如果不因血细胞减少引起的合并症而死亡, 大多数将转变为白血病, 其发生、发展的机制仍不明。我们利用限制性内切酶和聚合酶链反应(PCR)技术检测 MDS 患者降钙素基因(CT 基因)甲基化状况, 以探索 CT 基因甲基化与 MDS 的关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象

所有标本取自本院住院患者。MDS 10 例, 其中男 8 例, 女 2 例, 年龄 31 ~ 70 岁, 中位年龄 56 岁, 按 FAB 分型^[1], RA 4 例, RAEB 1 例, RAEB-t 3 例, CMML 2 例; 阴性对照 10 例, 其中 5 例为非恶性疾病手术切除的肋骨中挤出的骨髓, 另 5 例为非恶性血液病性贫血患者。取骨髓 3 mL, EDTA 抗凝, 淋巴细胞分离液分离出单个核细胞。阳性对照为白血病细胞系 K562 和 HL60。

1.2 DNA 提取、定量和酶切

用常规的酚/氯仿法抽提上述单个核细胞的大分子 DNA, 紫外分光光度计测定 DNA 浓度及纯度。取 DNA 1 μ g, 加内切酶 *Hpa* II (Gibco 公司) 10 U, 37 $^{\circ}$ C 水浴 16 h 过量消化。

1.3 PCR 扩增及结果观察

参照文献[2]设计跨越第 4 个 CCGG 这一甲基化位点 (M_4) 的一对引物, 有义链为 5'-CCTCT-GATCCAAGCCACCTG-3', 反义链为 5'-CGCCT-GCTGGCACCTCAGT-3'。内切酶 *Hpa* II 能特异

性地切断 CCGG 位点, 当 CCGG 位点发生甲基化变为 CCmGG 时, *Hpa* II 就不能将其切断。将细胞基因组 DNA 进行酶切, 如果 M_4 位点已甲基化 (CCmGG), *Hpa* II 不能将这一点切断, 用上述引物就能扩增出一个 566 bp 的特异性片段; 相反, 如果 M_4 位点未甲基化而被 *Hpa* II 切断, 则不能扩增出这一特异性片段。按文献[2]建立 PCR 反应体系, 循环条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性, 55 $^{\circ}$ C 退火, 72 $^{\circ}$ C 延伸各 1 min, 总共 35 个循环, 末次延伸 10 min。将扩增产物 15 μ L 于 2% 琼脂糖凝胶中电泳, EB 染色, 紫外线透射反射仪下观察、照相, 用 λ DNA-*Eco*R I / *Hind* III 作为 Marker。

1.4 PCR 产物半定量分析

参考文献[2], 引用竞争性 PCR 的概念, 将所扩增出的一条 639 bp 非特异性带看作内对照, 对扩增产物作半定量处理: 照相后负片用密度仪扫描, 分别测定所扩增出的 566 bp 特异性带和 639 bp 非特异性带的吸光度 A, 计算出这两条带的吸光度比值 (A_{566} 和 A_{639}), 将比值大于或等于 1 者定为阳性, 即有 CT 基因高度甲基化, 小于 1 者定为阴性, 即无 CT 基因高度甲基化。

2 结 果

2.1 CT 基因甲基化检测

所有标本均扩增出 566 bp 和 639 bp 2 条带, 按上述判定标准, 10 例阴性对照 A_{566}/A_{639} 全都小于 1, 均为 CT 基因高度甲基化阴性。多次检测 2 个阳性对照, 每次都呈明显的阳性。10 例 MDS 患者中 6

① 第一作者, 1966 年出生, 男, 硕士, 主治医师, 现在广州市第一人民医院血液内科工作(广州, 510180)

例 A_{566}/A_{639} 大于 1, 有 CT 基因高度甲基化, 其余 4 例为阴性。图 1 显示部分实验结果。

2.2 疗效观察

复习病史及追踪观察发现, 4 例阴性患者除 1 例 RAEB-t 者经积极治疗, 贫血进行性加重, 血小板逐渐减少, 很快死亡外, 其余 3 例治疗后病情一直稳定, 其中 1 例 RA 型病史已达 7 年, 另 1 例 RA 型观察 15 个月, 两者都保持 RA 型不变, 而且血色素和血小板均能稳定在接近正常的水平, 1 例 CMML 患者化疗后一直处于缓解状态已达 1 年以上; 相反, 6 例阳性患者疗效差, 1 例 CMML 患者治疗 3 个月无好转而自动出院, 另 5 例在 3~6 个月内, 外周血及骨髓中幼稚细胞进行性增多, 由 RA 向 RAEB、RAEB-t 及白血病方向进展, 其中 3 例转变成白血病后很快死亡。



图 1 部分 MDS 患者 PCR 结果

M 为 Marker; λ DNA-*EcoR* I / *Hind* III; 1 为阳性对照, 9 为阴性对照; 3, 4, 8 为阴性; 2, 5, 6, 7 为阳性

3 讨论

已经知道 CT 基因的高度甲基化可见于人类小细胞性肺癌、结肠癌及白血病等^[3~6]多种恶性疾病, 被认为是不少恶性细胞克隆的一个共同的分子标志, 而且有实验证明 CT 基因高度甲基化出现在细胞恶性转化之前或开始向恶性转化的早期^[5,7], 因此 CT 基因高度甲基化与恶性细胞的发生、发展密切相关, 但它们之间真正的机制不清, 有人认为是 11 号染色体短臂上的 CT 基因甲基化影响到同一区域上的抑癌基因的表达^[4], 从而促进恶性细胞的发展。

生和发展。

我们的实验发现, 10 例 MDS 患者 6 例(60%) 出现 CT 基因甲基化这一恶性细胞克隆的分子标志, 提示 MDS 为一种恶性克隆性疾病。4 例阴性的 MDS 患者除 1 例治疗反应差并很快死亡, 其余 3 例疗效满意, 病情稳定, 而 6 例阳性的患者治疗效果差, 很快往前发展或死亡。这一现象提示 CT 基因高度甲基化与 MDS 的恶性转化及预后可能有一定关系, 可能是无 CT 基因高度甲基化的 MDS 患者克隆性增生的细胞尚未真正地恶变, 或恶变的细胞极少, 因此病情稳定, 当 CT 基因出现高度甲基化, 则促进细胞迅速恶变, 很快发展到白血病。由于检测的病例较少, 观察时间较短, CT 基因甲基化及其临床意义有待更进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 张之南主编. 血液病诊断及疗效标准. 天津: 天津科学技术出版社, 1991. 227
- 2 Fukuhara T, Hooper W C, Baylin S B, *et al*. Use of the polymerase chain reaction to detect hypemethylation in the calcitonin gene. A new, sensitive approach to monitor tumor cells in acute myelogenous leukemia. *Leuk Res*, 1992, 16(10):1031
- 3 Baylin S B, Hoppener J W M, deBustros A, *et al*. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res*, 1986, 46:2917
- 4 Silverman A L, Park J G, Hamilton S R, *et al*. Abnormal methylation of the calcitonin gene in human colonic neoplasms. *Cancer Res*, 1989, 49(13):3468
- 5 Baylin S B, Fearon E R, Vogelstein B, *et al*. Hypemethylation of the 5' region of the calcitonin gene is a property of human lymphoid and acute myeloid malignancies. *Blood*, 1987, 70(2):412
- 6 Nelkin B D, Przepiora D, Burke P J, *et al*. Abnormal methylation of the calcitonin gene marks progression of chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1991, 77(11):2431
- 7 Debustros A, Nelkin B D, Silverman A, *et al*. The short arm of chromosome 11 is a "hot spot" for hypermethylation in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85:5693

(1996-09-24 收稿 1997-06-16 修回)