论著

文章编号:1000-5404(2007)10-0932-03

白血病细胞雄激素受体基因启动子甲基化状态的研究

王 刚[1],刘 利[1],陈 杰[1],辛海明[1],张晓兵[1],蔡 云[1],侯 露[1],郭乔楠[2],刘泽军[1] (第三军医大学西南医院:[1]国际合作实验室,[2]病理研究所,重庆 400038)

提 要:目的 检测白血病细胞雄激素受体基因启动子区CpG岛甲基化状态情况,初步探讨雄激素受体基因启动子区甲基化与白血病发病机制的可能联系。**方法** 应用甲基化特异性PCR技术(methylation specific PCR, MSP)检测3种白血病细胞株及15例患者骨髓标本雄激素受体基因甲基化状态。**结果** 白血病细胞株均出现甲基化和非甲基化带,呈部分甲基化状态,而作为对照的正常人白细胞均只出现非甲基化带。15例白血病患者全部检出甲基化状态。**结论** 白血病细胞的雄激素受体基因启动子区存在高甲基化现象,可能为白血病的致病机制分析提供了一个新的方向,提示AR基因启动子CPG岛的甲基化有可能成为白血病的新的参考标记物。

关键词: 白血病; 雄激素受体基因;DNA甲基化;甲基化特异性PCR

中图法分类号: R329.24;R730.23;R733.7 **文献标识码:** A

Promoter methylation profile of androgen receptor gene in leukemic cells

WANG Gang[1], LIU Li[1], CHEN Jie[1], XIN Hai-ming[1], ZHANG Xiao-bing[1], CAI Yun[1], HOU Lu[1], GUO Qiao-nan[2], LIU Ze-jun[1] ([1]Laboratory of International Cooperation, [2]Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the methylation status of CpG islands of the androgen receptor (AR) gene promoter in leukemic cells, and try to find the possible relationship between AR methylation and pathogenic mechanism of leukemia. **Methods** The methylation status of CpG island of AR gene promoter in 3 leukemic cell lines and 15 leukemic bone marrow cells was detected by methylation specific PCR(MSP). **Results** The cell lines showed both methylation bands and unmethylation bands, whereas normal white blood cells only showed unmethylation bands. The methylation band of AR promoter was observed in 15 leukemic bone marrow cells. **Conclusion** The CpG islands of AR promoters are hypermethylated in 3 leukemia lines and leukemic bone marrow samples researched. This study may provide a new direction to study the pathogenic mechanism of leukemia, and indicates that AR promoter methylation could be a potential reference marker for leukemia diagnosis.

Key words: leukemia; androgen receptor; DNA methylation; methylation specific PCR

目前有关白血病的病因还未完全清楚,随着肿瘤表观遗传学的发展,特别是分子生物学技术的广泛应用,检测白血病患者的基因变化情况,发现白血病的基因改变、基因重组及融合基因的形成与白血病的发病机制、治疗及预后等关系极为密切。我们前期的实验结果表明了孕酮受体在白血病细胞中的高甲基化现象[1]。由于孕酮受体属于性激素受体,我们推测其他性激素受体成员也可能存在甲基化状态的改变,因此,本实验用甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)技术对性激素受体中的雄激素受体(androgen receptor, AR)基因启动子区甲基化状态进行了分析,以探讨AR基因表观遗传信号的改变与白血病发病机制的可能联系。

1 材料与方法

1.1 对象

1.1.1 细胞株及培养 白血病细胞株HL-60、MOLT-4、Jurkat,培养条件为含体积分数为10%的小牛血清(56 ℃灭活30 min)的RPMI1640培养液,于37℃、体积分数为5%的CO_2培养箱培养,取旺盛生长的细胞离心收集备用。正常对照为3名经体检合格的健康献血员外周血白细胞。

基金项目: 第三军医大学科研基金(20040011)
Supported by the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (20040011)

作者简介: 王 刚(1971-),男,重庆市铜梁县人,硕士研究生,主治医师,主要从事DNA甲基化方面的研究。电话:(023)68765945

通讯作者: 刘泽军,电话:(023)65424208,E-mail: zejunliu@hotmail.com

收稿日期: 2006-07-27;**修回日期:** 2006-11-09

1.1.2　15 例白血病骨髓标本　　取自本院 2005 年 11 月至 2006 年 1 月收治的白血病患者，均经诊断证实符合白血病 FAB 国际诊断标准，包括 ALL 患者 4 例，ANL-M1 患者 2 例，ANL-M2 患者 2 例，ANL-M3 患者 3 例，ANL-M5 患者 3 例，ANL-M6 患者 1 例。其中男性 9 例，女性 6 例，年龄 12～60 岁。采集肝素抗凝骨髓 1～2 ml/份。收集骨髓单个核细胞，于 -80℃保存。

1.2　基因组 DNA 提取

DNA 的提取使用试剂盒 Tiangen DNA Mini Kit(Tiangen，北京天为时代)；按产品说明书提供的方法提取细胞和骨髓标本 DNA，并溶于 30 μl 无菌双蒸水中。用核酸蛋白仪监测其浓度及纯度。

1.3　亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA

取每份基因组 DNA 样品约 1 μg，按修饰试剂盒 Zymo DNA Methylation Kit(ZYMO，美国)说明书进行修饰，主要步骤：加含氢氧化钠的稀释缓冲液使 DNA 变性，使其保持单链状态，再在含亚硫酸氢钠的修饰试剂 50 ℃水浴 16 h，使用试剂盒中纯化试剂进行 DNA 脱硫，清洗回收，最后溶于 10 μl TE 缓冲液(pH 8.0)中，将搜集的修饰 DNA 于 -20 ℃保存或立即进行 MSP 反应。

1.4　甲基化特异性 PCR(MSP)

1.4.1　引物设计　　实验中使用甲基化 PCR 引物设计软件 MethPrimer 设计 2 对引物 M、U，扩增目的片段位于雄激素受体基因启动子 5′端 360～518 序列，引物 M、U 的设计均用于经修饰试剂处理后的 DNA 模板扩增，其中 M 引物用于扩增甲基化 DNA，引物 U 用于扩增未甲基化 DNA，野生型引物 W 以设计 M、U 引物的相应位点设计，用于未经修饰试剂处理的 DNA 序列的扩增，以检测 AR 基因启动子序列是否发生改变或突变。引物相关数据见表 1。引物核苷酸由北京赛百盛公司合成。

表 1　AR 基因 MSP 引物序列

引物名称	序列	退火温度
AR-Wf	5′- AGCAAGCCCACAGGCAGAGGAGGC -3′	65 ℃
AR-Wr	5′- CGGGCGGCGGCTTCGAAGC -3′	
AR-Uf	5′-AGTAAGTTTATAGGTAGAGGAGGTG-3′	56 ℃
AR-Ur	5′-CAAACAACAACTTCAAAACCACCAC-3	
AR-Mf	5′-AGTAAGTTTATAGGTAGAGGAGGCG-3′	58 ℃
AR-Mr	5′-CGAACGACGACTTCGAAACCG-3′	

1.4.2　甲基特异性 PCR(MSP)　　在 25 μl MSP 反应体系中，含 1 μl 亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA 模板，10×缓冲液 2.5 μl，上、下游引物各 10 pmol，250 μmol/L 的 4 种 dNTP 2.5 μl，1 U *Taq* HS DNA 聚合酶。于 PCR 仪上扩增，反应循环条件为：95 ℃ 预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，相应退火温度退火 40 s，72 ℃ 延伸 60 s，扩增 40 个循环，然后 72 ℃延伸 5 min。反应结束后取上述 PCR 产物 6 μl 经 2.0% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳 40 min，凝胶图像分析系统记录图像。

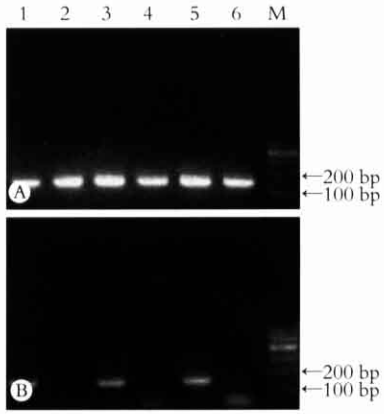
1.5　测序

为验证 MSP 检测结果，将上述 PCR 扩增的产物直接送重庆医科大学分子感染实验室测序。并将结果与 GenBank 序列进行对比分析。

2　结果

2.1　白血病细胞 AR 基因启动子甲基化状态分析

分析结果显示，白血病细胞株均出现甲基化和未甲基化带，而作为对照的正常人白细胞均只出现未甲基化带，见图 1。

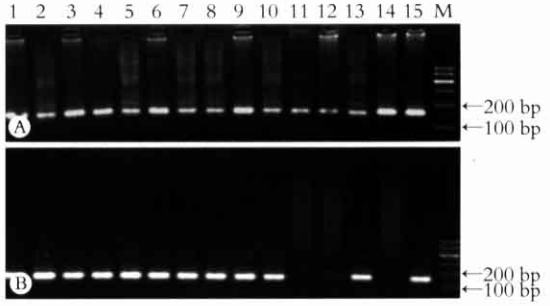


A：白血病细胞株　1,2：HL-60；3,4：MLOT-4；5,6：Jurkat
B：正常白细胞　1,3,5：未甲基化引物扩增结果；2,4,6：甲基化引物扩增结果；M：DNA 标准

图 1　白血病细胞与正常细胞 AR 基因启动子 MSP 分析结果

2.2　白血病患者中 AR 基因启动子区甲基化分析结果

在 15 例白血病标本中，均检出 AR 基因启动子区发生甲基化，其中有 12 例标本检测出甲基化带和未甲基化带同时存在，即呈部分甲基化状态，3 例标本只出现了甲基化带，见图 2。



A：白血病细胞　1－15：甲基化引物扩增结果；M：DNA 标准
B：正常细胞 1－15：未甲基化引物扩增结果；M：DNA 标准

图 2　白血病患者骨髓标本与正常细胞 AR 基因启动子甲基化状态分析

2.3　测序结果

MSP 反应中 M、U 引物扩增的 PCR 产物部分测序，经与 GenBank 中 AR 基因启动子基因相应序列对比可看出，亚硫酸氢钠修饰后的 DNA 中，用甲基化 M 引物扩增阳性产物中 CPG 的胞嘧啶(5m-C)保持不变，而用未甲基化引物 U 扩增阳性产物测序结果的 CpG 的胞嘧啶(C)却经脱氨基作用，转化为胸腺嘧啶(T)。其余非 CG 序列的胞嘧啶(C)均转化成为胸腺嘧啶(T)。

3 讨论

性激素受体超家族由雌激素受体、孕酮激素受体、雄激素受体组成[2]。以往研究认为,性激素受体变化主要与性相关肿瘤相关。如乳腺肿瘤、膀胱癌、前列腺癌、子宫内膜癌等,研究表明,在这些肿瘤中,性激素受体基因启动子区的主要的表观遗传信号甲基化状态发生了改变[3-5]。而且这种改变在肿瘤的早期阶段即可发生。因此启动子区的甲基化测定可能作为这些肿瘤的早期分子诊断指标。近年来一些研究表明某些非性激素靶组织的肿瘤,如肝癌、食管癌等也存在一定的性激素受体基因表达的改变[6,7]。

在基因甲基化模式的转化和维持中,甲基转移酶(DNA methyltransferase,DNMT)起着重要的作用。其中 DNMT1 介导甲基与 CpG 岛上的胞嘧啶以共价键结合,使其获得甲基化[8],在白血病中,DNMT1 出现表达增高。急性白血病的 DNMT1 比正常要增加 4.2 倍[9]。同样,在慢性淋巴细胞性白血病中,DNMT(包括 DNMT1、2、3A 和 3B)表达均出现升高[10],DNMT 的增加可能介导启动子 CpG 岛的高甲基化。本实验室在研究基因启动子甲基化过程中,发现了白血病细胞中性激素受体甲基化状态改变的现象,并证实孕酮激素受体基因异常高甲基化是白血病中的一种分子改变[1]。因此推测性激素受体超家族基因的启动子甲基化状态异常可能与白血病的发生有关。

AR 属于配体依赖的转录因子超家族,人 AR 由 917 个氨基酸组成[11,12]。整个分子可分为 3 个功能区:具有转录活性的 N 端区(NTD),与靶基因上雄激素反应元件特异结合的 DNA 结合域(DBD)以及 C 末端的配体结合域(LBD)。AR 基因位于 Xq11-12,总长度大于 90 kb,包括 8 个外显子和 7 个内含子。起始部第一外显子编码受体 N 端区,第二、三外显子编码 DBD,其余 5 个外显子编码 LBD。

AR 通过与雄性激素结合形成复合物,再与核中特定 DNA 序列结合,调节靶基因的表达并发挥其生理作用。Kinoshita 等[13]认为 AR 启动子区存在一个 CpG 甲基化的热点,它是基因沉默的标志,Sasaki 等[14]在研究 AR 基因 CpG 岛甲基化时发现 79%(70/89)子宫内膜癌组织 AR 表达阴性,72%(64/89)子宫内膜癌组织 AR 基因发生甲基化,用去甲基化试剂 5′-AzaDC 处理子宫内膜癌细胞株,使 AR 基因在所有细胞中重新表达,因此推测 AR 基因失活的机制可能是通过 AR 基因 CpG 岛的甲基化来实现的。

本研究在通过运用 MSP 技术分析白血病 AR 基因启动子 CPG 岛甲基化时发现,在白血病细胞株 HL60、Jurkat、MOLT-4 中为甲基化和未甲基化状态共存状态,而正常人白细胞中却未检出甲基化带,这种差异也许提示作为性激素受体家族的 AR 的甲基化改变可能与白血病的发生、发展存在一定的联系,通过对 15 例白血病患者骨髓标本的分析,AR 基因启动子 CpG 岛部分甲基化 12 例,完全甲基化标本 3 例,显示出白血病细胞中出现 AR 启动子 CG 岛高甲基化现象,这些都为白血病的致病机制分析提供了一个新的方向,同时提示 AR 启动子 CG 岛的异常甲基化有可能成为白血病的参考标记物,为临床诊断检测白血病提供了一个新的分子生物学上的标记。

参考文献:

[1] Liu Z J, Zhang X B, Zhang Y, *et al*. Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells[J]. FEBS lett, 2004, 567(2-3): 327-332.

[2] Evans R M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily[J]. Science, 1988, 240(4854): 889-895.

[3] Yan L, Yang X, Davidson N E. Role of DNA methylation and histone acetylation in steroid receptor expression in breast cancer[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2001, 6(2): 183-192.

[4] Sasaki M, Tanaka Y, Perinchery G, *et al*. Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(5): 384-390.

[5] Sasaki M, Kotcherguina L, Dharia A, *et al*. Cytosine-phosphoguanine methylation of estrogen receptors in endometrial cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(8): 3262-3266.

[6] 舒 青, 张素珍, 魏亚宁, 等. 雄激素受体基因甲基化与食管癌的分级[J]. 肿瘤防治研究, 2004, 31(11): 688-690.

[7] 蔡秀军,洪玉才,王先法. 人肝细胞性肝癌性激素受体的表达[J]. 肝胆外科杂志, 2002, 10(5): 331-333.

[8] Paulsen M, Ferguson-Smith A C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease[J]. J Pathol, 2001, 195(1): 97-110.

[9] Melki J R, Warnecke P, Vincent P C, *et al*. Increased DNA methyltransferase expression in leukaemia[J]. Leukemia, 1998, 12(3): 311-316.

[10] Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, *et al*. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia[J]. Blood, 2001, 97(5): 1172-1179.

[11] Gelmann E P. Molecular biology of the androgen receptor[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(13): 3001-3015.

[12] Heinlein C A, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview[J]. Endocr Rev, 2002, 23(2): 175-200.

[13] Kinoshita H, Shi Y, Sandefur C, *et al*. Methylation of the androgen receptor minimal promoter silences transcription in human prostate cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(13): 3623-3630.

[14] Sasaki M, Oh B R, Dharia A, *et al*. Inactivation of the human androgen receptor gene is associated with CpG hypermethylation in uterine endometrial cancer[J]. Mol Carcinog, 2000, 29(2): 59-66.

(编辑 王小寒)