

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.04.016

## DNA 甲基化异常与白血病微小残留病\*

孙炜炜 综述 邵泽伟 审校  
(济宁医学院法医学与医学检验学院, 济宁 272067)

**摘要** 微小残留病(minimal residual disease, MRD)是白血病患者复发的主要根源,严重影响患者的生存质量。DNA 甲基化是一种重要的表观遗传学调控机制,与白血病的发生发展关系密切。肿瘤相关基因 DNA 甲基化的异常改变可作为一种分子标志物用于监测白血病 MRD,预测疾病复发、指导临床治疗和判断预后。本文就近年来相关基因 DNA 甲基化异常与白血病 MRD 之间的研究作一简要综述。

**关键词** DNA 甲基化;白血病;微小残留病

中图分类号:R55 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2017)08-301-04

### Abnormal DNA methylation and minimal residual disease in leukemia

SUN Weiwei, SHAO Zewei  
(School of Forensic and Laboratory Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

**Abstract:** Minimal residual disease (MRD) in leukemia is the main cause of recurrence, which seriously affects the patients' quality of life. DNA methylation is an important epigenetic regulation mechanism, which is closely related to the occurrence and development of leukemia. The abnormal DNA methylation changes of tumor related genes can be used as a molecular marker for monitoring MRD, which could predict disease recurrence, guide clinical treatment and judge prognosis. The research of abnormal DNA methylation of related genes and MRD in leukemia are summarized in this paper.

**Keywords:** DNA methylation; Leukemia; Minimal residual disease

白血病是一种起源于造血组织的恶性克隆性疾病,是儿童和青年中最常见的恶性肿瘤,数据显示每年至少新增 3~4 万的白血病患者,严重危害人类的健康和生命安全。随着对白血病发病机制的深入研究及临床化疗、靶向治疗、造血干细胞移植等治疗手段不断改进,白血病的治疗效果日益改善,完全缓解率(complete remission rate, CR)明显提高。但是 CR 后复发仍是目前治愈白血病的一项难题,而复发的主要根源是由于患者体内残存有微量的白血病细胞,即白血病微小残留病(minimal residual disease, MRD)<sup>[1]</sup>。随着对白血病表观遗传学机制的深入探索,研究发现许多抑癌基因的分子生物学异常改变往往导致白血病的发生。DNA 甲

基化作为表观遗传学研究的一项重要内容,参与白血病的发生发展,在病情预测、诊断治疗及监测 MRD 等方面都具有非常重要的价值<sup>[2-3]</sup>。国内外多项研究表明, P15、ID4、ZO-1 等肿瘤相关基因 DNA 甲基化的异常改变可作为监测 MRD 的分子标志物,提早发现患者的微小残留病变,预测 CR 后复发,更好地指导临床治疗和判断预后。本文就 DNA 甲基化异常与白血病 MRD 之间的研究综述如下。

#### 1 白血病微小残留病

白血病 MRD, 又称微量残留白血病(minimal residual leukemia, MRL), 是指白血病患者经过诱导化疗或者骨髓移植治疗达到临床和血液学完全缓解后, 患者体内仍残存微量白血病细胞的状态。在此状态下, 估计患者机体内仍然存在  $10^6 \sim$

\* [基金项目] 济宁医学院青年教师科研扶持基金(JY2016 KJ022Y); 济宁市科技发展计划项目(2016-56-82); 济宁医学院大学生创新训练计划项目(cx2016007)

$10^8$  个白血病细胞,这些微量残留的白血病细胞的增殖与侵袭即成为白血病复发的根源,是影响患者长期存活的重要因素<sup>[4]</sup>。因此,对白血病患者进行 MRD 的监测在临床治疗方案的选择、疗效评估、预后判断和白血病复发早期的预测等方面具有非常重要的作用。

一般认为,白血病患者症状出现时,体内白血病细胞数量约有  $10^{12} \sim 10^{13}$  个,经治疗达到完全缓解后可能仍残留有  $10^6 \sim 10^8$  个白血病细胞。若采用传统形态学方法难以检测到白血病细胞的存在,必须采用灵敏度高、特异性强、结果稳定可靠及临床应用方便的实验方法进行检测。目前临床上已建立起流式细胞术(flow cytometry, FCM)、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、染色体核型分析、荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)等多种方法用于检测白血病相关的免疫表型、染色体核型演变、白血病特异性融合基因、变异基因、免疫球蛋白和 T 细胞受体重排基因等标志物<sup>[5-6]</sup>,从而实现 MRD 的监测。

## 2 DNA 甲基化

DNA 甲基化是一种重要的表观遗传学调控机制,是指在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的催化作用下,由 S-腺苷蛋氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)提供甲基,在胞嘧啶的第 5 位碳上添加 1 个甲基基团,使之转变成 5-甲基胞嘧啶(5-mC)的化学修饰过程<sup>[7]</sup>。DNA 甲基化主要发生在基因组中 CpG 位点的富含区域,即 CpG 岛,CpG 岛通常位于基因的启动子区与第 1 外显子区。基因启动子区 CpG 岛的甲基化程度一般与其表达呈负相关,即高甲基化会引起基因失活,如某些重要的抑癌基因(P16、P53)与 DNA 修复基因(mlH1)等,而低甲基化则会导致基因的过表达<sup>[8]</sup>。大量研究证实,DNA 甲基化在不改变基因序列的情况下,参与基因的表达调控、基因组稳定性、细胞的分化与胚胎发育等诸多生物学过程,与抑癌基因的失活关系密切,影响肿瘤的发生发展<sup>[9]</sup>。研究表明,白血病中存在某些特定基因 CpG 岛甲基化状态的改变,致使基因的表达调控失衡,进而影响疾病的进程,在白血病的诊断、治疗、检测 MRD 等方面具有重要价值。

## 3 DNA 甲基化异常与 MRD

### 3.1 P15 基因甲基化异常与 MRD

P15 基因是位于染色体 9p21 的一种肿瘤抑制基因,能够特异性地抑制细胞周期素依赖激酶 4/6,阻止细胞由 G1 期进入 S 期,进而影响肿瘤的发生发展。研究发现,P15 基因启动子区 5'-CpG 岛高度甲基化是其在白血病中基因失活的主要方式,且发生率较高。Mai H 等<sup>[10]</sup>研究显示 P15 基因启动子区 CpG 岛在儿童急性淋巴细胞白血病中呈高甲基化状态,可能是患者预后不良的一种标志。Baba SM 等<sup>[11]</sup>研究发现 P15 基因在急性早幼粒细胞白血病患者中呈现不同程度的甲基化状态,使得其 mRNA 表达降低或缺失,导致患者 5 年无病生存期显著降低。结果提示 P15 基因启动子区甲基化程度可作为患者一种潜在的预后判断指标和可靠的临床辅助评估指标,因此运用有效的甲基化检测方法测定 P15 基因甲基化状态对于监测 MRD 具有重要意义。

### 3.2 ID4、ZO-1 基因甲基化异常与 MRD

ID4 基因是 bHLH 转录因子家族的成员,有抑癌作用;ZO-1 基因是膜结合鸟苷酸家族的一员,与血液系统恶性肿瘤的发生发展密切相关。研究证实<sup>[12-13]</sup>,ID4 与 ZO-1 基因在健康人中均处于低甲基化状态,但在急性白血病患者中均处于异常甲基化状态,且在完全缓解期时仍然存在高甲基化的恶性克隆增殖,与已知遗传学标记改变趋势相一致,可作为白血病检测的分子指标。采用甲基化特异性 PCR 法定量检测 ID4 与 ZO-1 基因甲基化,MRD 阳性患者白血病复发率明显高于阴性者。可通过动态检测患者标本 ID4 与 ZO-1 基因甲基化水平变化,分析其在初治、复发以及完全缓解期与患者临床病情发展的关系。尤其在完全缓解期检测基因甲基化可提早发现微小残留病变,预测疾病复发。

### 3.3 P73 基因甲基化异常与 MRD

P73 基因是 P53 基因家族中的一员,其编码的蛋白与 P53 蛋白有类似的结构和功能,可抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡,与肿瘤的发生发展联系紧密。Yang H 等<sup>[14]</sup>在对 199 例处于完全缓解期且费城染色体与混合谱系白血病(mixed lineage leukemia, mL)基因均阴性的患者标本检测,结果显示 P73 基因超甲基化与首次完全缓解期持续时间缩短和总生存期缩短显著相关,可作为监测 MRD 的标志,为患者选择更积极的早期治疗。

### 3.4 ER- $\alpha$ 基因甲基化异常与 MRD

ER- $\alpha$  为甾体激素核受体家族成员,定位于染

染色体 6q25.1, ER- $\alpha$  基因启动子区富含 CpG 岛, 在多种组织细胞的增殖、分化和发育过程中扮演重要角色。Agrawal S 等<sup>[15]</sup> 检测结果显示 ER- $\alpha$  基因在 63% 的急性髓细胞白血病患者临床缓解期标本中呈高甲基化修饰状态, 而健康对照组与非恶性血液病患者标本未检出。研究表明在临床缓解期 ER- $\alpha$  基因高甲基化水平与患者白血病复发高度相关, 可作为检测 MRD 的分子标志, 为目前缺乏足够标志的白血病患者提供监测 MRD 的可能性。

### 3.5 WT1 基因甲基化异常与 MRD

WT1 基因是一种肿瘤抑制基因, 其主要作用是识别并结合靶基因, 通过不同机制调控基因转录, 在肿瘤的发生发展进程中发挥重要作用。研究表明 WT1 基因在多种白血病细胞中广泛表达, 并随着患者病情进展而变化, 经实时荧光定量 PCR 检测 WT1 基因 mRNA 表达水平与其启动子区甲基化程度呈负相关<sup>[16]</sup>, 可作为监测 MRD 的一项指标, 更好地指导白血病的治疗和判断预后。

### 3.6 IGSF4 基因甲基化异常与 MRD

IGSF4 是免疫球蛋白超家族中的一员, 最早由 Comyo 等发现, 主要介导同种分子间的细胞间黏附。李明等<sup>[17]</sup> 检测正常骨髓细胞中 IGSF4 基因启动子区并无甲基化发生, 但在检测不同白血病细胞系及患者标本中 IGSF4 基因甲基化情况结果显示, 各种白血病细胞中均存在 IGSF4 基因甲基化, 且有较高发生率, 可作为监测 MRD 的一个理想候选标志物。

### 3.7 PRAME 基因甲基化异常与 MRD

PRAME 基因是从黑色素瘤中分离而来的肿瘤相关抗原, 在多种肿瘤细胞中高表达, 但其诱发肿瘤的机制仍未清楚。研究发现, PRAME 基因随着白血病患者病情的缓解表达下降, 若再次升高提示病情复发, 表达呈动态性, 可作为 MRD 的理想检测靶标。Qin YZ 等<sup>[18]</sup> 和 Roman-Gomez 等<sup>[19]</sup> 研究显示急性髓细胞白血病与慢性髓细胞白血病患者中 PRAME 基因呈低甲基化状态, 且基因 CpG 岛的甲基化程度与其表达呈负相关, 低甲基化可诱导基因的表达, 影响肿瘤的进展。

## 4 小结与展望

MRD 是白血病患者复发的根源所在, 严重影响患者的生存质量, 选择合适的指标监测 MRD 是目前临床面临的实际问题。尽管细胞遗传学标记

和免疫学标记的异常变化在白血病的检测中尤为重要, 但是大多患者并无特异的遗传标记和免疫学标记用于 MRD 的早期检测和评估。因此, 想要突破现有的白血病 MRD 检测指标的局限性, 就需要积极寻找特异性高与通用度好的分子标志物。DNA 甲基化作为表观遗传学研究领域的一项重要内容, 已成为近年来研究的热点。越来越多的研究表明在白血病发生发展过程中存在一些特定基因启动子区甲基化状态的改变, 并在疾病进展中扮演着重要角色, 且在癌前病变或者癌变早期就能够检测到甲基化的发生, 这为 MRD 在分子水平上的检测拓展了新思路新方向。尽管目前报道的用于检测 MRD 的肿瘤相关基因甲基化有限, 相信随着对 DNA 甲基化研究的不断深入, 将会为临床检测 MRD 提供更多更理想的分子标志物, 进而更有效地指导临床个体化治疗, 降低白血病患者复发率, 提高患者生存质量。

## 参考文献:

- [1] Del PMI, Buccisano F, Maurillo L, et al. Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia of Adults: Determination, Prognostic Impact and Clinical Applications [J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2016, 8 (1): e2016052. DOI:10.4084/MJHID.2016.052.
- [2] Hale V, Hale GA, Brown PA, et al. A Review of DNA Methylation and microRNA Expression in Recurrent Pediatric Acute Leukemia [J]. *Oncology*, 2017, 92(2): 61-67. DOI:10.1159/000452091.
- [3] Wahlberg P, Lundmark A, Nordlund J, et al. DNA methylome analysis of acute lymphoblastic leukemia cells reveals stochastic de novo DNA methylation in CpG islands [J]. *Epigenomics*, 2016, 8 (10): 1367-1387. DOI:10.2217/epi-2016-0052.
- [4] Zhao XS, Qin YZ, Liu YR, et al. The impact of minimal residual disease prior to unmanipulated haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia in complete remission [J]. *Leuk Lymphoma*, 2017, 58 (5): 1135-1143. DOI: 10.1080/10428194.2016.1239264.
- [5] Kusenda J, Fajtova M, Kovarikova A. Monitoring of minimal residual disease in acute leukemia by multiparametric flow cytometry. *Neoplasma*, 2014, 61 (2): 119-127. DOI:10.4149/neo\_2014\_017.
- [6] Issa GC, Kantarjian HM, Yin CC, et al. Prognostic impact of pretreatment cytogenetics in adult Philadelphia

- chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in the era of minimal residual disease [J]. *Cancer*, 2017, 123 (3) :459-467. DOI:10. 1002/cncr. 30376.
- [7] Timms JA, Relton CL, Rankin J, et al. DNA methylation as a potential mediator of environmental risks in the development of childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Epigenomics*, 2016, 8 (4) : 519-536. DOI: 10. 2217/epi-2015-0011.
- [8] Celik H, Kramer A, Challen GA. DNA methylation in normal and malignant hematopoiesis [J]. *Int J Hematol*, 2016, 103 (6) : 617-626. DOI: 10. 1007/s12185-016-1957-7.
- [9] Amabile G, Di RA, Müller F, et al. Dissecting the role of aberrant DNA methylation in human leukaemia [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:7091. DOI:10. 1038/ncomms8091.
- [10] Mai H, Liu X, Chen Y, et al. Hypermethylation of p15 gene associated with an inferior poor long-term outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142 (2) :497-504. DOI:10. 1007/s00432-015-2063-6.
- [11] Baba SM, Azad NA, Shah ZA, et al. p15ink4b Loss of Expression by Promoter Hypermethylation Adds to Leukemogenesis and Confers a Poor Prognosis in Acute Promyelocytic Leukemia Patients [J]. *Cancer Res Treat*, 2016, DOI:10. 4143/crt. 2016. 108.
- [12] Kang HY, Wang XR, Gao L, et al. Clinical Implications on ZO-1 Gene Methylation in Myelodysplastic Syndrome Progression [J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2015, 23 (3) : 746-749. DOI: 10. 7534/j. issn. 1009-2137. 2015. 03. 029.
- [13] Liu Y, Zhong WW, Kang HY, et al. Clinical significance of ID4 methylation detection by quantitative methylation-specific PCR in acute leukemia [J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2014, 22 (3) : 675-680. DOI: 10. 7534/j. issn. 1009-2137. 2014. 03. 019.
- [14] Yang H, Kadia T, Xiao L, et al. Residual DNA methylation at remission is prognostic in adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2009, 113 (9) : 1892-1898. DOI: 10. 1182/blood-2008-02-141002.
- [15] Agrawal S, Unterberg M, Koschmieder S, et al. DNA methylation of tumor suppressor genes in clinical remission predicts the relapse risk in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (3) : 1370-1377. DOI: 10. 1158/0008-5472. CAN-06-1681.
- [16] Guillaumet-Adkins A, Richter J, Odero MD, et al. Hypermethylation of the alternative AWT1 promoter in hematological malignancies is a highly specific marker for acute myeloid leukemias despite high expression levels [J]. *J Hematol Oncol*, 2014, 7:4. DOI:10. 1186/1756-8722-7-4.
- [17] 李明, 楼方定, 卢学春, 等. 急性白血病患者 IGSF4 基因启动子甲基化的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2004, 12 (2) : 125-127. DOI: 10. 3969/j. issn. 1009-2137. 2004. 02. 001.
- [18] Qin YZ, Zhang YH, Qin XY, et al. Methylation pattern of preferentially expressed antigen of melanoma in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13 (4) : 2823-2830. DOI: 10. 3892/ol. 2017. 5790.
- [19] Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, et al. Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia [J]. *Leuk Res*, 2007, 31 (11) : 1521-1528. DOI:10. 1016/j. leukres. 2007. 02. 016.

(收稿日期 2017-04-13)

(本文编辑:林琳)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 本刊对作者署名的要求

论著作者署名一般不超过 6 人。署中每位作者应该是论文学术内容的构思者或设计者;实验数据的采集并能给予解释者;能对编辑部提出的审改意见进行修改者;能在学术界就论文内容进行答辩者。综述作者署名不超过 2 人。作者单位、邮政编码不同者应分别列出并予标识,作者单位之间用“;”隔开。不够署名条件但对研究成果有所贡献者可放在“志谢”项中。论文如属课题或基金项目,须在文章首页脚注中注明“基金项目和编号”。

本刊编辑部