

肿 瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001822

DACT1 基因羟甲基化在儿童 *WT1*、*IDH1/2*、*TET2* 基因突变的急性髓细胞白血病中的特征及临床意义闭军琴¹, 包黎明¹, 王兴娟¹, 豆 虎², 杨珍珍¹, 于 洁³, 陈 希¹

(重庆医科大学附属儿童医院 1. 临床分子医学中心; 2. 临检中心; 3. 血液科, 重庆 400014)

【摘要】目的:研究 dapper, β -连环蛋白拮抗剂, 非洲爪蟾同系物 1 (dapper, antagonist of β -catenin, homolog 1 *Xenopus laevis*, *DACT1*) 在儿童急性髓细胞白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 中的羟甲基化特征及其与预后的关系, 寻找 AML 新的危险分层分子标志物。**方法:**测序分析本院血液科初发 AML 188 例, 根据是否存在 Wilms 肿瘤因子 1 (Wilms tumor 1, *WT1*)、异柠檬酸脱氢酶 1/2 (isocitrate dehydrogenase 1/2, *IDH1/2*) 或 TET 蛋白 2 (ten-eleven translocation, *TET2*) 基因突变, 将病例分为 WIT-AML 组 (30 例) 和非 WIT-AML 组 (158 例); 用糖基化 qPCR 及 qPCR 方法检测 WIT-AML (16 例)、非 WIT-AML (14 例) 和非 AML 患儿 (14 例) 的 *DACT1* 基因羟甲基化水平 (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC) 和表达水平, 并用 Spearman 法研究羟甲基化与表达的相关性; 随访患儿的缓解、复发及生存情况, 采用 COX 回归分析 *DACT1* 羟甲基化对 AML 患儿总生存率 (overall survival, OS) 及无病生存率 (event free survival, EFS) 的影响。**结果:**WIT-AML 组的 *DACT1* a、b 区域 (*DACT1* a/b) 甲基岛 (CpG) 羟甲基化 (5hmC) 水平较非 WIT-AML 组低 ($U_a=48.00, P_a=0.008; U_b=19.00, P_b=0.000$), 且其基因表达明显减低 ($U_{exp}=0.00, P_{exp}=0.000$); *DACT1* a/b 甲基岛 5hmC 与 *DACT1* 的表达水平呈正相关 ($r_a=0.812, P_a=0.000; r_b=0.789, P_b=0.000$); *DACT1* a 5hmC 水平减低是 EFS 的危险因素 ($HR=3.896, 95\%CI=1.161\sim13.073, P=0.028$), 同样也是 OS 的危险因素 ($HR=4.109, 95\%CI=1.226\sim13.771, P=0.022$)。 **结论:**在 WIT-AML 中, *DACT1* 5hmC 水平和表达水平明显降低, *DACT1* a 区 5hmC 水平降低可增加儿童 AML 生存风险, 可作为 AML 一个新的独立预后不良指标。

【关键词】儿童; 急性髓细胞白血病; dapper, β -连环蛋白拮抗剂, 非洲爪蟾同系物 1; 羟甲基化; 预后**【中图分类号】**R733.7**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-04-11Characteristics and clinical significance of *DACT1* hydroxymethylation in childhood acute myeloid leukemia with mutant *WT1*, *IDH1/2*, or *TET2*Bi Junqin¹, Bao Liming¹, Wang Xingjuan¹, Dou Hu², Yang Zhenzhen¹, Yu Jie³, Chen Xi¹

(1. Center for Clinical Molecular Medicine; 2. Department of Clinical Laboratory;

3. Department of Hematology, The Children's Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study the characteristics of hydroxymethylation of dapper, antagonist of β -catenin, homolog 1 (*Xenopus laevis*) (*DACT1*) in childhood acute myeloid leukemia (AML) and its relationship with prognosis, and to identify the new molecular marker for the risk classification of AML. **Methods:** This study included 188 newly diagnosed AML cases in Department of Hematology, The Children's Hospital of Chongqing Medical University. Sanger sequencing was employed to analyze the mutation in Wilms' tumor 1 (*WT1*), isocitrate dehydrogenase 1/2 (*IDH1/2*), or ten-eleven translocation (*TET2*). These cases were assigned to either WIT-AML group ($n=30$) or non-WIT-AML group ($n=158$) according to the presence or absence of mutation in any of the above genes. The hydroxymethylation (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC) level of the *DACT1* gene and the expression of *DACT1* were assessed using glycosylation qPCR and qPCR for 16 WIT-AML cases, 14 non-WIT-AML cases, and 14 non-AML cases. The correlation between the

hydroxymethylation and expression of *DACT1* was investigated by Spearman analysis. Data on the remission, relapse, and survival of children were acquired by follow-up. Cox regression analysis was employed to assess the effect of *DACT1* hydroxymethylation on the overall survival (OS) and event-free survival (EFS) rates of children with AML. **Results:** Compared with the non-WIT-AML group, the WIT-AML group had a significantly lower 5hmC level at the CpG island of *DACT1* a/b ($U_a=48.00, P_a=0.008; U_b=19.00, P_b=0.000$), as well as significantly reduced

作者介绍: 闭军琴, Email: 1144517027@qq.com,

研究方向: 白血病基因改变与预后关系研究。

通信作者: 陈 希, Email: 7216672@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81802092); 重庆市科委基础科学与前沿技术研究资助项目 (编号: cstc2016jcy-jA1053); 重庆市卫计委医学科研计划资助项目 (编号: 2017MSXM040)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180930.1031.004.html>
(2018-09-30)

DACT1 expression ($U_{\text{exp}}=0.00, P_{\text{exp}}=0.000$). Moreover, *DACT1* a/b 5hmC level was positively correlated with *DACT1* expression ($r_a=0.812, P_a=0.000; r_b=0.789, P_b=0.000$). Reduced *DACT1*a 5hmC was associated with shorter survival (EFS: hazard ratio [HR]=3.896, 95% confidence interval [CI]=1.161–13.073, $P=0.028$; OS: HR=4.109, 95% CI=1.226–13.771, $P=0.022$). **Conclusion:** In WIT-AML, *DACT1* 5hmC level and *DACT1* expression are significantly decreased. Reduced *DACT1*a 5hmC is associated with shorter survival in children with AML, so it can be used as an independent unfavorable prognostic biomarker for childhood AML.

【Key words】child; acute myeloid leukemia; dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 1 *Xenopus laevis*; hydroxymethylation; prognosis

随着对白血病发病机制的深入研究,人们认识到表观遗传学异常在白血病发病机制中起着十分重要的作用。近期基础研究提示 WIT-AML 可能作为急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)新的分类亚型,该类型以 Wilms 肿瘤因子 1 (Wilms tumor 1, *WT1*)、异柠檬酸脱氢酶 1/2 (isocitrate dehydrogenase 1/2, *IDH1/2*)、TET 蛋白 2 (ten-eleven translocation, *TET2*) 突变归类。由于这 3 个基因突变导致 *TET2* 催化区域与 *WT1* 不能有效结合或产生对 TET 酶毒性的 2-羟基戊二酸(α -hydroxyglutaric acid, 2HG), 最终使得 *TET2* 催化 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC) 成为 5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC) 的能力减弱或消失, 可能是导致这一类 AML 发生的发病途径^[1-3]。迄今为止, WIT-AML 所导致的基因羟甲基化改变的研究不多, Wang 等^[4]发现 *WT1* 可以招募 *TET2*, 调控 *WT1* 下游基因表达, 导致 Wnt 通路相关基因高表达, 其中包括 β -转导子重复序列基因(β -transducin repeat containing, *BTRC*)、*DACT1*、淋巴增强因子 1 (lymphoid enhance-binding factor, *LEF1*) 基因等, 其中以 *DACT1* 差异最显著。*DACT1* 属于 DAPPER 家族成员之一, *DACT1* 在肝癌和肺癌组织中的表达水平低于其正常组织, 其表达水平降低的肺癌患者预后相对较差。同时研究发现 DNA 启动子甲基化是导致 *DACT1* 表达下调的原因之一^[4-6]。这些发现都提示 *DACT1* 作为一个新的候选抑癌基因参与肿瘤的发生发展。但 *DACT1* 在 AML 中的作用尚不清楚, *DACT1* 基因羟甲基化在 WIT-AML 的改变及其临床意义尚待进一步揭示。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 研究对象 研究收集 2007 至 2015 年重庆医科大学

附属儿童医院收治的新发儿童 AML 病例 188 例, 其中男 104 例, 女 84 例, 中位年龄 6.4 (0.3~16) 岁。按 FAB 分型, 1 例 M0, 13 例 M1, 63 例 M2, 33 例 M3, 6 例 M4, 47 例 M5, 5 例 M6, 6 例 M7, 14 例分型不明确。诊断标准参考张之南著的《血液病诊断与疗效标准》^[7]。纳入标准: 化疗前、骨髓原始粒细胞比例大于 20%, 排除标准: 年龄大于 18 周岁、继发性 AML、伴随唐氏综合征的 AML 等。根据“2006 儿童急性髓细胞白血病诊疗建议”^[8]进行治疗后随访患儿的缓解、复发及生存情况, 统计总生存率(overall survival, OS)及无病生存率(event free survival, EFS)。完全缓解: 骨髓象原始和幼稚淋巴细胞比例 $\leq 5\%$; 外周血分型中无白血病细胞且血红蛋白 ≥ 100 g/L (男性) 或 ≥ 90 g/L (女性); 无白血病浸润导致的临床症状和体征者; 复发: 达完全缓解后, 复查骨髓原始和幼稚淋巴细胞比例 $> 5\%$ 且 $< 20\%$ 者或经过有效抗白血病治疗一个疗程仍未达到骨髓完全缓解者; 骨髓原始和幼稚淋巴细胞比例 $> 20\%$ 者和骨髓外白血病细胞浸润者。OS 是从确诊到死亡或随访终止期间内患儿的存活率, EFS 为完全缓解到复发、死亡或研究终止期间内患儿的存活率。随访从 2007 至 2018 年, 中位随访时间 27 (2~105) 个月, 现存活患者随访时间均大于 3 年。本研究通过重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会的评审。

1.1.2 分组标准

根据 *WT1*、*IDH1/2*、*TET2* 基因是否突变将儿童急性髓细胞白血病患者分为 WIT-AML 组和非 WIT-AML 组。其中 WIT-AML 组 30 例, 占儿童 AML 的 16% (30/188), 非 WIT-AML 组 158 例; 选取同时具有 DNA、RNA 样本且经过标准治疗后有完整预后资料的病例作为研究对象。纳入 *DACT1* 羟甲基化分析的 WIT-AML 16 例, 其中男 9 例, 女 7 例, 中位年龄 8.5 (2~13) 岁, 按照 FAB 分型, 8 例 M2, 2 例 M3, 4 例 M5, M4 和 M6 各 1 例。非 WIT-AML 14 例, 其中男 8 例, 女 6 例, 中位年龄 10 (2~13) 岁, 按照 FAB 分型, 2 例 M1, 2 例 M2, 4 例 M3, 3 例 M5, 未分类 3 例。危险分级根据欧洲白血病协作组的标准分为高、中、低危^[9]。

按照同标本类型、同性别比例、年龄 ± 1 岁的要求, 以 1:1 个体匹配方式, 选取同时期在本医院就诊或住院治疗、排除恶性血液系统疾病及其他恶性肿瘤疾病的原则, 纳入 9 例特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)、2 例三系减低和 3 例完全缓解的 AML 患儿骨髓标本作为对照组(非 AML 组, 共 14 例)。

1.1.3 实验仪器及试剂 DNA/RNA 浓度测定仪购自美国 Thermo 公司,定性 PCR 及定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司,凝胶成像系统购自美国 BIO-RAD 公司。DNA 提取试剂盒购自天根公司, RNA 逆转录试剂盒、Taq 酶及高 GC SYBR premix 购自 Takara 公司,高保真 KOD 酶购自 TOYOBO 公司, Epi-Mark 试剂盒购自 New England Biolabs 公司。引物由华大公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 和 RNA 提取及逆转录 提取骨髓基因组 DNA,用紫外分光光度计检测 DNA 纯度和浓度, DNA 的 $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值为 1.8~2.0, 浓度稀释至 20~30 ng/ μL 后放入 -80 °C 冰箱备用。用 Trizol 法提取总 RNA, 测定其浓度和纯度, 将 $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值 >1.6 的 RNA 按照 Takara 逆转录试剂盒合成 cDNA 后存 -80 °C 备用。

1.2.2 基因突变检测 用 KOD 酶扩增 *WT1* 基因 (NM_024426) 7、9 外显子, PCR 循环条件为: 95 °C 3 min; 98 °C 10 s, 退火 30 s, 68 °C 45 s, 共 35 个循环; 68 °C 5 min; 用 Taq 酶扩增 *TET2* (NM_001127208) 第 11 号外显子、*IDH1* (NM_005896.3) 和 *IDH2* (NM_002168.3) 第 4 号外显子, 循环条件为: 95 °C 4 min; 95 °C 10 s, 退火 20 s, 72 °C 40 s, 共 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物经 2% 琼脂凝胶电泳鉴定后送至北京华大公司进行测序。DNAMAN 软件比对测序结果的文本序列与 NCBI 数据库参考序列碱基有不一致或 Chromas 软件所读测序峰图出现同一轴线套峰时判读为 DNA 序列改变, 有改变的病例反向测序验证。基因引物用 Primer 5.0 软件设计, 由北京华大基因公司合成, PCR 序列见表 1。

表 1 PCR 扩增引物及条件

基因	引物序列(5'-3')	产物片段(bp)	退火温度(°C)
WT1(exon7)	F:TTTATAGTCTGCACCTGCCACC R:CCACTCTGCTCTGCCTTTCTG	500	59
WT1(exon9)	F:TGCAGACATTCGAGGCATGGCAGG R:GCACTATTCTCTCTCTAAGTACG	349	59
IDH1(exon 4)	F:AGCTCTATATGCCATCACTGCG R:AACATGCAAAATCAGATTATGCG	411	52
IDH2(exon 4)	F:CCACTATTATCTCTGCTCCTC R:GCTAGCGGAGGAGCTCCACT	250	52
TET2(exon 11)	F:TACCACCAATCTGAGCAATCC R:CATCGTTGCTCTGCAACGAG	315	59
<i>DACT1a</i>	F:GAGCGCGGGAGGGCGAGGAG R:GGCTTCCCTCTCTGTCAGG	94	62
<i>DACT1b</i>	F:CCTGACAGAGGAGGGAAGCC R:CGCTACGTACGCGCGGCGG	109	62
<i>DACT1</i>	F:GACGAGCAGAGCAATTACACC R:ACCGTTTGAATGGGCAGA	158	60
β -actin	F:CCTGTGGCATCCACGAAACT R:GAAGCAATTTGCGGTGACGAT	314	60

1.2.3 糖基化 qRT-PCR 测定 *DACT1* 基因羟甲基化水平 糖基化 qRT-PCR 检测基因 CCGG 位点单碱基的羟甲基化状态。由于 *DACT1* 基因羟甲基化常发生于启动子区 CpG 岛, 而启动子区往往有多个 CpG 岛, 因此本研究选取 *DACT1* 基因启动子区的 2 个区域 a (NG_032025.1:8702~8795)、b (NG_032025.1:8775~8883) 进行羟甲基化检测^[10-11]。用 EpiMark 试剂盒处理基因组 DNA, 反应完成后用高 GC SYBR Premix 进行荧光定量 PCR 扩增, 测定 *DACT1* 基因 a、b 区域的羟甲基化状态。反应条件为: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 10 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环; 然后进行熔解曲线分析, 由 60 °C 开始以 0.1 °C/s 上升至 90 °C。 *DACT1* a、b 的引物序列见表 1。 *DACT1* 基因的羟甲基化水平以 5hmC% 表示。

1.2.4 qRT-PCR 检测 *DACT1* 基因表达 荧光定量 PCR 反应以 β -actin 为内参基因, 扩增体系同上。反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火、延伸 45 s, 40 个循环; 然后进行熔解曲线分析, 由 60 °C 开始以 0.1 °C/s 上升至 90 °C。引物序列见表 1。 *DACT1* 基因相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示, $\Delta\Delta CT = (C_{TDACT1-WIT-AML} - C_{T内参}) - (C_{TDACT1-对照组} - C_{T内参})$ ^[12]。其中 CT 值表示每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数。

1.3 统计方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件分析。因本研究中计量资料不符合正态分布, 所以比较用 Mann-Whitney 中位数检验, 数据以中位数 (四分位数) $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示, 率的比较用卡方检验或 Fisher 确切概率法。采用 Spearman 相关分析研究 *DACT1* 羟甲基化与表达水平的相关性, 采用 COX 回归分析 *DACT1* 羟甲基化对 AML 患儿 OS 及 EFS 的影响。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 WIT-AML 和非-WIT-AML 的临床特征

统计分析总体样本中 WIT-AML (30 例) 和非-WIT-AML (158 例) 的年龄、白细胞计数、骨髓原始细胞比例等临床特征, 发现 WIT-AML 组较非-WIT-AML 组的临床特征等均无统计学差异; 总的 OS 和 EFS 也没有统计学差异, 但经进一步危险分级后发现在中危组中, WIT-AML 较非 WIT-AML 有预后差的趋势 (OS: 22.5% vs. 45.2%, $\chi^2=2.741$, $P=0.098$; EFS: 24.0% vs. 46.2%, $\chi^2=2.696$, $P=0.101$)。比较分析 *DACT1* 羟甲基化病例与总体样本的临床特征未发现明显的统计学差异, 可以判定抽样没有较大偏差 (表 2)。

2.2 WIT-AML 和非 WIT-AML 的基因特征

测序结果显示 WIT 基因的改变以 *WT1* 移码突变为主, 共 13 例, 3 例为 *WT1* 9 号外显子突变, 9 例为 *WT1* 7 号外显子突变, M29 同时存在 7 号和 9 号外显子变异; *IDH1/2* 点突变 2 例, 分别导致 4 号外显子单核苷酸位点 c.689 C>T, p.R132C 和 c.690 G>A, p.R132H 变异; *TET2* 点突变 1 例, 致

表 2 WIT-AML 和非 WIT-AML 的临床特征

临床特征	WIT-AML			非 WIT-AML			P值 ^c
	$n_{\text{总}}=30$	$n_{\text{测}}=16$	P值 ^a	$n_{\text{总}}=158$	$n_{\text{测}}=14$	P值 ^b	
中位年龄[岁, $M(P_{25}, P_{75})$]	6.2(0.3~15.0)	8.5(2.0~13.0)	0.366	6.5(0.3~16.0)	10.0(2.0~13.0)	0.260	0.388
男性($n, \%$)	17(56.70)	9(56.25)	1.000	87(55.10)	8(57.14)	0.881	0.871
WBC[$\times 10^9$ 个/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	8.97(0.99~390)	14.2(1.55~390)	0.917	15.51(0.21~723)	10.87(1.06~140)	0.262	0.495
PLT[$\times 10^9$ 个/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	35.0(2~199)	41.0(5~199)	0.720	40.0(5~558)	44.5(12~170)	0.488	0.779
Hb[g/dL, $M(P_{25}, P_{75})$]	67.0(26~120)	73.5(40~96)	0.799	71.0(26~122)	69.5(45~96)	0.468	0.469
骨髓原始细胞比例[% , $M(P_{25}, P_{75})$]	71.25(23.5~95)	70.30(29.5~93)	0.881	71.50(20.5~97)	76.50(41.4~95)	0.281	0.401
FAB 亚型($n, \%$)							
M0	0(0.00)	0(0.00)	NA	1(0.63)	0(0.00)	1.000	1.000
M1	2(6.67)	1(6.25)	1.000	11(6.96)	2(14.29)	0.641	1.000
M2	11(36.67)	7(43.8)	0.531	55(34.81)	2(14.29)	0.205	0.845
M3	7(23.33)	2(12.5)	0.230	24(15.19)	4(28.57)	0.356	0.405
M4	2(6.67)	0(0.00)	0.536	6(3.80)	0(0.00)	1.000	0.826
M5	6(20.00)	5(31.25)	0.477	43(27.22)	3(21.43)	0.878	0.409
M6	1(3.33)	1(6.25)	1.000	4(2.53)	0(0.00)	1.000	0.585
M7	1(3.33)	0(0.00)	1.000	4(2.53)	0(0.00)	1.000	0.585
未知	0(0.00)	1(6.25)	0.348	10(6.33)	3(21.43)	0.128	0.331
预后							
总完全缓解($n, \%$)	13(52.17)	8(50.00)	0.760	57(55.88)	8(57.14)	0.119	0.451
总复发/死亡($n, \%$)	9(47.83)	8(50.00)	0.213	45(44.12)	6(42.86)	0.410	0.866
总 OS[$M(P_{25}, P_{75})$]	12.0(1~78)	12.0(1~78)	0.663	22.0(1~107)	26.5(2~96)	0.515	0.783
总 EFS[$M(P_{25}, P_{75})$]	10.0(0~77)	10.0(0~77)	0.872	16.0(0~105)	24.5(0~95)	0.883	0.725
核型危险分级 ^d							
低危($n, \%$)	13(43.33)	6(31.25)	0.762	53(33.54)	5(35.71)	1.000	0.303
低危组完全缓解($n, \%$)	8(88.89)	5(83.33)	1.000	31(67.39)	3(66.67)	0.237	0.584
低危组复发/死亡($n, \%$)	1(11.11)	1(16.67)	1.000	15(32.61)	2(33.33)	0.722	0.348
低危 OS[$M(P_{25}, P_{75})$]	12(4~78)	20(4~78)	0.762	44(1~107)	47(23~67)	0.848	0.580
低危 EFS[$M(P_{25}, P_{75})$]	10(0~77)	18.5(0~77)	1.000	40(0~105)	46(22~66)	0.568	0.594
中危($n, \%$)	12(40.00)	7(43.75)	1.000	58(36.71)	8(57.14)	0.132	0.732
中危组完全缓解($n, \%$)	5(41.67)	3(33.33)	1.000	22(56.41)	5(62.50)	0.158	1.000
中危组复发/死亡($n, \%$)	7(58.33)	6(66.67)	0.742	17(43.59)	3(37.50)	0.475	0.182
中危 OS[$M(P_{25}, P_{75})$]	10.0(1~32)	6.0(1~32)	0.683	21.0(1~100)	26.5(11~96)	0.489	0.094
中危 EFS[$M(P_{25}, P_{75})$]	6.0(0~31)	3.0(0~31)	0.656	16.0(0~99)	24.5(7~95)	0.563	0.101
高危($n, \%$)	3(10.00)	3(18.75)	0.405	27(17.09)	1(7.14)	0.556	0.484
高危组完全缓解($n, \%$)	0(0.00)	0(0.00)	NA	4(23.53)	0(0.00)	1.000	1.000
高危组复发/死亡($n, \%$)	1(100.00)	1(100.00)	1.000	13(76.47)	1(100.00)	0.868	0.465
高危 OS[$M(P_{25}, P_{75})$]	12(12~18)	15(12~18)	1.000	2(1~62)	2	NA	0.736
高危 EFS[$M(P_{25}, P_{75})$]	10(8~14)	12(10~14)	1.000	0(0~61)	0	NA	0.878

注:a,样本 WIT-AML 和总体 WIT-AML 比较;b:样本非 WIT-AM 和总体非 WIT-AM 比较;c:总体 WIT-AML 与总体非 WIT-AML 比较;d:核型危险分级根据欧洲白血病协作组的标准^[9]

11号外显子单核苷酸位点 c.5162T>G, p.I1721W 变异;其核型和基因特征见表 3。

2.3 WIT-AML 和非 WIT-AML 中 *DACT1* 羟甲基及表达水平比较

WIT-AML 病例(16 例)*DACT1* 基因的羟甲基化及表达水平分析以非 WIT-AML 组(14 例)和非 AML 组(14 例)作

为平行对照。*DACT1* a/b 的 5hmC 水平如图 1 所示。WIT-AML 组 *DACT1* a/b 的 5hmC%水平均明显低于非 WIT-AML 组和非 AML 组(WIT-AML vs.非 WIT-AML: $U_a=48.00, P_a=0.008; U_b=19.00, P_b=0.000$; WIT-AML vs.非 AML: $U_a=45.00, P_a=0.006; U_b=35.50, P_b=0.002$),详见图 1A、B。非 AML 组与非 WIT-AML 组 *DACT1*a 的 5hmC 水平无明显差异,但 *DACT1*b

的 5hmC 高于正常对照组($U=49.50, P=0.027$)。通过分析 *DACT1* 的表达水平,发现 WIT-AML 组的 *DACT1* 表达水平明显低于非 WIT-AML 组和非 AML 组(WIT-AML vs. 非 WIT-AML; $U=0.00, P=0.000$; WIT-AML vs. 非 AML; $U=0.00, P=0.000$)。此外,非 WIT-AML 组的 *DACT1* 表达水平也低于非 AML 组($U=2.00, P=0.000$),如图 1C 所示。

2.4 *DACT1* 羟甲基化与表达的相关性分析

Spearman 相关分析显示,在 WIT-AML 中 *DACT1* a/b 的羟甲基化均与 *DACT1* 的表达水平呈正性相关($r=0.812, P=0.000; r=0.789, P=0.000$);而在非 WIT-AML 组中,只有 *DACT1*b 的羟甲基化与 *DACT1* 的表达水平相关($r=0.785, P=0.001$),详见表 4。

表 3 WIT-AML 病例的核型和基因特征

GA 编号	性别	年龄 (岁)	FAB 分型	染色体核型	WIT 基因改变	氨基酸序列改变
AML-M13	女	2	M2a	47,XX,t(1;10)(p36.3;q22),add(9)(p22)*2, +11,der(11;14)(q10;q10),+20,der(20;22) (q10;q10),+21c[15]/47,XX,+21c[5]	<i>WT1</i> E9:c.1150C>A	p.Q384K
AML-M29	男	7	M5b	47,XY,t(15;17)(q22;q22),+21[11]/46,XY[9]	<i>WT1</i> E9:c.1046_1228del <i>WT1</i> E9:c.1136_1228del <i>WT1</i> E7:c.895_1045del	p.E350_S410del p.V380_S410del p.D299fs*32
AML-M30	男	11	M2a	46,XY[20]	<i>WT1</i> E7:c.1096C>T	p.R366C
AML-M47	男	7	M5	46,XY[49]	<i>WT1</i> E7:c.933_934insTGTGGTTA TGAAC	p.R312fs*9
AML-M61	男	6	M2a	46,XY[20]	<i>IDH1</i> E4:c.689 C>T <i>WT1</i> E7:c.1050_1127delinsAAAGCCC	p.R132C p.Y353_R376>24
AML-M71	女	6	M2a	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22)[14]/46,XX[6]	TTCAGCTGTCGGTGGCCAAGTTGTC AGAAAAAGTTTGCCCGGTCAGATG AATTAGTCCGCCATCACAAACAT	
AML-M77	女	9	M2a	46,XX,del(9)(q22q34)[19]/46,XX[1]	<i>WT1</i> E7:c.895_1045del	p.D299fs*32
AML-M79	男	11	M6	46,XY,t(2;5)(q33;q33)[18]/46,XY[2]	<i>WT1</i> E9:c.1138_1232del	p.V380fs*19
AML-M81	女	5.2	M1	50,XX,+3,+8,+9,+18[16]/46,XX[4]	<i>WT1</i> E9:c.1139_1217delinsAAAAGC CCTTCAGCTGTCGGTGGCCAAGTT GTCAGAAAAAGTTTGCCCGGTCAG ATGAATTAGTCCGCCATCACAAACAT	p.V380_T406>27
AML-M83	男	6	M5	46,XY[20]	<i>WT1</i> E7:c.895_1045del	p.D299fs*32
AML-M111	男	12	M2a	46,XY[20]	<i>IDH1</i> E4:c.690G>A	p.R132H
AML-M151	女	12	M2a	46,XX[20]	<i>WT1</i> E7:c.1100_1250del	p.D367fs*32
AML-M162	男	9	M2a	46,XY,i(13)(q10)[19]/46,XY[1]	<i>WT1</i> E7:c.1103delinsGG	p.V368fs*16
AML-M165	女	13	M5b	46,XX,inv(16)(p13.1q22)[20]	<i>WT1</i> E7:c.1109delinsCC	p.R370fs*15
AML-M263	男	8	M3a	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[8]	<i>WT1</i> E7:c.1384C>T	p.R462W
AML-M264	女	9	M5b	47,XY,+8,inv(16)(p13;q22)[20]	<i>TET2</i> E11:c.5162T>G	p.I1721W

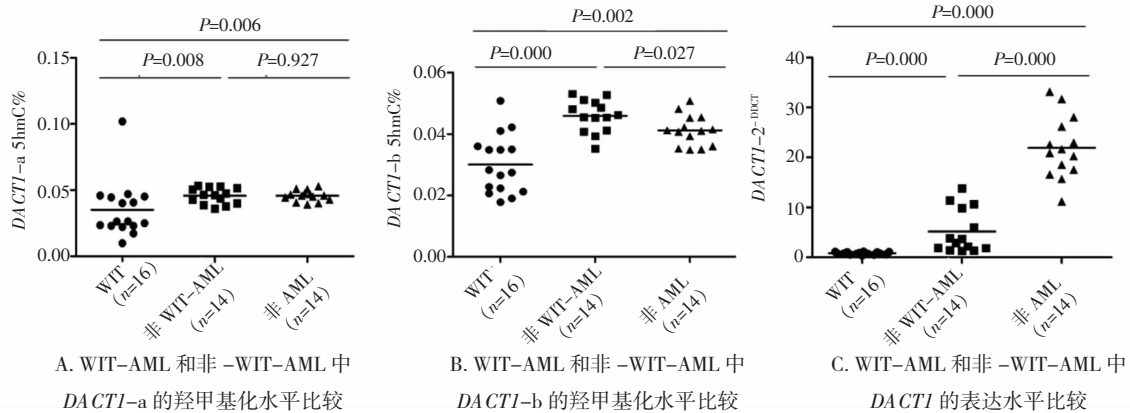


图 1 *DACT1* 羟甲基化及表达在各组间的分布情况

表 4 AML 病例中 DACT1 羟甲基化与表达相关性分析

DACT1 2-DDCT	WIT-AML (n=16)		非 WIT-AML (n=14)	
	r 值	P 值	r 值	P 值
DACT1 a (5hmC%)	0.812	0.000 ^a	-0.073	0.805
DACT1 b (5hmC%)	0.789	0.000 ^a	0.785	0.001

注:a: $P < 0.001$

表 5 AML 的 EFS 单因素和多因素分析

因素	单因素分析			多因素分析		
	B	P 值	HR(95%CI)	B	P 值	HR(95%CI)
性别(男 vs.女)	-0.525	0.349	0.592(0.197~1.774)	NA	NA	NA
年龄(<10 岁 vs. ≥10 岁)	-0.623	0.269	0.536(0.177~1.621)	-0.408	0.480	0.665(0.214~2.066)
WBC(≤20×10 ⁹ 个/L vs. >20×10 ⁹ 个/L)	0.268	0.622	1.307(0.452~3.780)	0.454	0.414	1.575(0.529~4.684)
WITmut vs. WITwt	0.646	0.245	1.907(0.642~5.666)	NA	NA	NA
DACT1 表达	-0.022	0.783	0.978(0.834~1.147)	NA	NA	NA
DACT1a-5hmC%(≥中位数 vs.<中位数)	1.372	0.023 ^a	3.943(1.205~12.904)	1.360	0.028 ^a	3.896(1.161~13.073)
DACT1b-5hmC%(≥中位数 vs.<中位数)	0.350	0.518	1.419(0.492~4.097)	0.187	0.737	1.206(0.404~3.601)

注:a: $P < 0.05$

表 6 AML 的 OS 单因素和多因素分析

因素	单因素分析			多因素分析		
	B	P 值	HR(95%CI)	B	P 值	HR(95%CI)
性别(男 vs.女)	-0.558	0.318	0.572(0.191~1.713)	NA	NA	NA
年龄(<10 岁 vs. ≥10 岁)	-0.660	0.243	0.517(0.171~1.564)	-0.284	0.654	0.753(0.217~2.607)
WBC(≤20×10 ⁹ 个/L vs. >20×10 ⁹ 个/L)	0.229	0.673	1.257(0.435~3.638)	0.151	0.783	1.163(0.396~3.418)
WITmut vs. WITwt	0.636	0.250	1.890(0.639~5.584)	NA	NA	NA
DACT1 表达	-0.030	0.711	0.970(0.826~1.140)	NA	NA	NA
DACT1a-5hmC%(≥中位数 vs.<中位数)	1.434	0.018 ^a	4.195(1.280~13.755)	1.413	0.022 ^a	4.109(1.226~13.771)
DACT1b-5hmC%(≥中位数 vs.<中位数)	0.342	0.526	1.408(0.489~4.052)	0.168	0.764	1.183(0.396~3.536)

注:a: $P < 0.05$

2.5 DACT1 基因羟甲基化对 AML 预后的影响

为研究 DACT1 基因羟甲基化对预后的影响,采用 COX 回归风险模型对 AML 的 OS、EFS 进行了单因素和多因素分析,纳入分析的因素包括年龄、性别、白细胞计数、WIT 的改变、DACT1 羟甲基化和表达(表 5)。单因素分析中 DACT1a 5hmC 水平减低是 EFS 的危险因素($HR=3.943$, $95\%CI=1.205\sim12.904$, $P=0.023$);同样也是 OS 的危险因素($HR=4.195$, $95\%CI=1.280\sim13.755$, $P=0.018$),见表 6。DACT1b 5hmC 降低对 EFS 及 OS 的影响没有统计学差异($P_{EFS}=0.518$, $P_{OS}=0.526$)。多因素分析时将 DACT1 a/b 羟甲基化高度相关的 DACT1 表达 WIT 分类因素排除,将年龄、白细胞计数、DACT1 a/b 羟甲基化纳入多因素分析,研究发现 DACT1a 5hmC 水平降低是 EFS 危险因素($HR=3.896$, $95\%CI=1.161\sim13.073$, $P=0.028$),同样也是 OS 的危险因素($HR=4.109$, $95\%CI=1.226\sim13.771$, $P=0.022$),DACT1b 5hmC 降低对 EFS 及 OS 的影响没有统计学差异($P_{EFS}=0.737$, $P_{OS}=0.764$),即 DACT1a 羟甲基化降低是 AML 预后不良的独立影响因素。

3 讨论

分析癌症中导致 DNA 甲基化异常的基因改变是一个复杂且具有挑战性的问题。WT1、IDH1/2、TET2 通过相同的途径调节表观遗传,相互协调作用维持 TET2 催化 5mC 为 5hmC,其中任一个基因发生突变,均可抑制 5mC 生成 5hmC,有人提出将此类基因改变的 AML 归纳为新的 AML 型^[1],但其临床特征及病例预后研究尚未见报道。我们的研究发现 WIT-AML 占 16%(30/188),在儿童 AML 突变频率较高。WIT-AML 较非 WIT-AML 临床特征如年龄、性别、WBC、HB、PLT、危险分级频次等均无差别,OS 及 EFS 没有统计学差异,进一步危险分级后发现在中危组 WIT-AML 较非 WIT-AML 有预后差的趋势,能否成为 AML 新的预后风险亚型需要进一

步加大样本量及延长随访时间研究。

5hmC 由 TET 家族酶催化氧化 5mC 产生,被称为高等生物基因组的“第六碱基”,是另一个重要的表观遗传学标记。除了参与 DNA 的主动脱甲基化过程,它还对基因的表达与 5mC 具有负调控作用^[13]。基因启动子羟甲基化水平降低,可导致该基因表达水平降低而促进白血病的发生发展,肿瘤抑制基因的低羟甲基化是血液系统恶性肿瘤患者诊断和预后标志^[14]。

DACT1 是一个抑癌基因,其对 Wnt 信号通路的经典途径具有明显的抑制作用,研究指出 *DACT1* 可以同蓬乱蛋白 1 结合并促进其降解从而抑制 Wnt/ β -catenin, *DACT1* 甲基化可使处于胞浆中的 β -catenin 蛋白去磷酸化和积聚,并转移至细胞核内激活 Wnt 通路^[15-16]。已有研究表明 *DACT1* 在多种消化道肿瘤如肝癌、结肠癌、胃癌等中,基因甲基化增高进而导致表达降低^[6,17-18]。Wnt 信号通路失调与 AML 发生发展有关,但是 *DACT1* 在白血病中的作用及其机制很大程度上是未知的。

本研究结果发现 WIT-AML 中 *DACT1* 的羟甲基化水平降低,其表达在 WIT-AML 组较非 WIT-AML 组及非 AML 组低,该结果证实 *WT1*、*IDH1/2*、*TET2* 基因的突变均可导致 *DACT1* 羟甲基化水平降低从而降低 *DACT1* 基因表达,且 *DACT1* 羟甲基化水平与基因表达呈正相关($r=0.812/0.789$),*DACT1* 羟甲基化与 OS 及 EFS 呈正相关($r=0.585/0.685$)。在多因素分析中 *DACT1a* 羟甲基化水平降低增加 AML 生存风险,是影响预后的独立影响因素,提示 *DACT1a* 羟甲基化降低可以作为 AML 危险分级的指标。

参 考 文 献

- [1] Wang Y, Xiao M, Chen X, et al. WT1 recruits TET2 to regulate its target gene expression and suppress leukemia cell proliferation[J]. Mol Cell, 2015, 57(4): 662-673.
- [2] Rampal R, Alkalini A, Madzo J, et al. DNA hydroxymethylation profiling reveals that WT1 mutations result in loss of TET2 function in acute myeloid leukemia[J]. Cell Rep, 2014, 9(5): 1841-1855.
- [3] Lyu Y, Lou J, Yang Y, et al. Dysfunction of the WT1-MEG3 signaling promotes AML leukemogenesis via p53-dependent and -independent pathways[J]. Leukemia, 2017, 31(6): 2543-2551.
- [4] Wang S, Kang W, Go MY, et al. Dapper homolog 1 is a novel tumor suppressor in gastric cancer through inhibiting the nuclear factor-kappaB signaling pathway[J]. Mol Med, 2012, 18(4): 1402-1411.
- [5] Yang ZQ, Zhao Y, Liu Y, et al. Downregulation of hdpr1 is associated with poor prognosis and affects expression levels of p120-catenin and beta-catenin in nonsmall cell lung cancer[J]. Mol Carcinog, 2010, 49(5): 508-519.
- [6] Yau TO, Chan CY, Chan KL, et al. HDPR1, a novel inhibitor of the WNT/beta-catenin signaling, is frequently downregulated in hepatocellular carcinoma; involvement of methylation-mediated gene silencing[J]. Oncogene, 2005, 24(9): 1607-1614.
- [7] 张之南, 沈 悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 106-116.
- [8] 中华医学会儿科学分会血液学组. 儿童急性髓细胞白血病诊疗建议[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(11): 877-878.
- [9] Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults; recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia[J]. Blood, 2010, 115(3): 453-474.
- [10] Xu Y, Xu C, Kato A, et al. Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for Xenopus eye and neural development[J]. Cell, 2012, 151(6): 1200-1213.
- [11] Kinney SM, Chin HG, Vaisvila R, et al. Tissue-specific distribution and dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in mammalian genomes[J]. J Biol Chem, 2011, 286(28): 24685-24693.
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) methods[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] Sun Z, Terragni J, Borgaro JG, et al. High-resolution enzymatic mapping of genomic 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cell[J]. Cell Rep, 2013, 3(2): 567-576.
- [14] Yao H, Duan H, Lin L, et al. TET2 and MEG3 promoter methylation is associated with acute myeloid leukemia in a Hainan population[J]. Oncotarget, 2017, 8(11): 18337-18347.
- [15] Zhang L, Gao X, Wen J, et al. Dapper 1 antagonizes wnt signaling by promoting dishevelled degradation[J]. J Biol Chem, 2006, 281(13): 8607-8612.
- [16] Cheyette BN, Waxman JS, Miller JR, et al. Dapper, a dishevelled-associated antagonist of beta-catenin and jnk signaling, is required for notochord formation[J]. Dev Cell, 2002, 2(4): 449-461.
- [17] Wang S, Kang W, Go MY, et al. Dapper homolog 1 is a novel tumor suppressor in gastric cancer through inhibiting the nuclear factor-kappaB signaling pathway[J]. Mol Med, 2012, 18(4): 1402-1411.
- [18] Yang ZQ, Zhao Y, Liu Y, et al. Downregulation of HDPR1 is associated with poor prognosis and affects expression levels of p120-catenin and beta-catenin in nonsmall cell lung cancer[J]. Mol Carcinog, 2010, 49(5): 508-519.

(责任编辑: 冉明会)