

# 急性髓细胞白血病中 DNMT3A 亚型 1、2 的表达及其临床意义\*

林娜<sup>1</sup> 王蕾<sup>1</sup> 李艳<sup>1</sup> 颜晓菁<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:检测急性髓细胞白血病(AML)患者骨髓标本中 DNA 甲基转移酶 3A(DNMT3A)亚型 1、2 的表达情况,分析其临床意义。方法:应用 SYBR Green real-time PCR 方法检测 DNMT3A1、DNMT3A2 在成人初诊原发 AML 患者和非血液病患者(对照组)骨髓有核细胞中的表达情况,并分析其与 AML 分型、年龄、性别、白细胞计数、危险分层等临床参数的关系。结果:DNMT3A1 及 DNMT3A2 在 AML 患者中表达水平较对照组无明显差异。但亚型分析显示,DNMT3A2 在伴有 RUNX1-RUNXT1、伴有 NPM1 突变及伴有 CEBPa 双突变的 AML 患者中,表达较对照组显著升高(均  $P < 0.05$ );但在非特指(NOS-M5)患者中,表达较对照组显著下降( $P < 0.05$ )。DNMT3A2 及 DNMT3A2 与 DNMT3A1 比值,在非急性早幼粒细胞白血病的低危组患者中显著升高( $P < 0.01$ )。DNMT3A2 表达水平与血小板及巨核细胞数呈显著负相关(均  $P < 0.05$ )。结论:DNMT3A2 在部分 AML 患者中,尤其是低危患者中表达显著升高,而在非特指型急性单核细胞白血病中表达显著下降,这种差异性的表达在 AML 发病及治疗选择中可能有一定的价值。

**[关键词]** DNA 甲基转移酶 3A;急性髓细胞白血病;实时定量 PCR

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2018.07.011

**[中图分类号]** R733.71 **[文献标志码]** A

## Expression levels and clinical significance of DNMT3A isoform 1,2 in patients with acute myeloid leukemia

LIN Na WANG Lei LI Yan YAN Xiaojing

(Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, 110001, China)

Corresponding author: YAN Xiaojing, E-mail: yanxiaojing\_pp@hotmail.com

**Abstract Objective:** To detect the expressions of DNA methyltransferase 3A isoform 1 and 2 in bone marrow cells of adult patients with de novo acute myeloid leukemia (AML) and analyze its clinical significance. **Method:** The expression of DNMT3A1 and DNMT3A2 in adult patients with newly diagnosed de novo AML or non-hematological diseases (as the control group) was detected by SYBR Green real-time PCR method, and we analyzed its relationships with clinical data such as AML subtype, age, sex, white blood cell count, and risk stratification. **Result:** There was no significant difference of DNMT3A1 and DNMT3A2 detected between patients with AML and control group. Subtype analysis showed that DNMT3A2 was significantly increased in AML patients with RUNX1-RUNXT1, NPM1 mutation and CEBPa double mutation (all  $P < 0.05$ ), while decreased in AML not otherwise specified (NOS) with maturation ( $P < 0.05$ ). DNMT3A2 and the ratio of DNMT3A2 to DNMT3A1 significantly increased in low risk group of non-APL patients. The expression of DNMT3A2 was negatively correlated with platelet count and megakaryocyte count (both  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** DNMT3A2 is significantly increased in partial AML patients, especially the low risk group of non-APL patients, but decreased in AML NOS with maturation. This differential expression indicates that alteration of DNMT3A isoforms expression might play roles in the pathogenesis of AML, which might be a potential biomarker for AML prognosis or treatment.

**Key words** DNA methyltransferase 3A; acute myeloid leukemia; RQ-PCR

急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一组异质性的疾病,表现为骨髓内原始、幼稚细胞的显著增多及正常造血的抑制<sup>[1]</sup>。染色体异常、基因突变、癌基因与抑癌基因的异常表达,

细胞周期、增殖及凋亡等信号通路的异常及表观遗传调控的异常等均参与疾病的发生,其中表观遗传调控由于其可逆的特点而备受关注。研究发现 AML 细胞中 DNA 甲基化水平尤其是 CpG 岛的甲基化水平发生了显著的改变<sup>[2]</sup>。DNA 甲基转移酶抑制剂在 AML 患者中的有效应用,也进一步证实了异常 DNA 甲基化在 AML 发病及治疗中的重要作用<sup>[3-4]</sup>。DNA 甲基转移酶 3A(DNMT3A)是一种 DNA 从头甲基化转移酶,在细胞 DNA 甲基化

\* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No:81170519);霍英东教育基金(No:141031)

<sup>1</sup> 中国医科大学附属第一医院血液科(沈阳,110001)

通信作者:颜晓菁, E-mail: yanxiaojing\_pp@hotmail.com

谱的建立中发挥重要作用。DNMT3A 突变是 AML 中最常见的突变之一,突变频率 20%~25%,且与不良预后相关<sup>[2,5-7]</sup>。DNMT3A 基因内差异性甲基化区域 2 的异常甲基化(也被称作表观突变)被认为与 DNMT3A 突变类似,与不良预后相关<sup>[8-9]</sup>。关于 AML 中 DNMT3A 表达尤其是不同亚型表达的研究还很有限,且结论并不一致<sup>[10-11]</sup>。故本研究旨在检测 DNMT3A 亚型 1 和 2(DNMT3A1 及 DNMT3A2)的表达水平,并分析其与临床相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

收集 2012-03-2015-10 在我院血液科确诊的初诊成人原发 AML(61 例)及非血液病(25 例)对照患者骨髓标本。61 例 AML 患者中,男 28 例,女 33 例;年龄 50(16~73)岁;按 2016 WHO 分型标准,急性早幼粒细胞白血病(APL)伴 PML-RAR $\alpha$  11 例,AML 伴 RUNX1-RUNX1T1 4 例,AML 伴 CBFB-MYH11 1 例,AML 伴 NPM1 突变 7 例,AML 伴 CEBP $\alpha$  双突变 5 例,非特指型(NOS)-M2 3 例,NOS-M4 1 例,NOS-M5 9 例,另外 20 例 AML 患者由于缺少分子遗传学数据,不能准确分类,故将其列为“其他”组。25 例对照者中,男 8 例,女 17 例;年龄 49(17~85)岁;贫血 10 例,血小板减少 9 例,中性粒细胞减少 3 例,正常血象 3 例。2 组性别、年龄比较差异无统计学意义,具有可比性。本研究在中国医科大学附属第一医院伦理委员会的监督指导下进行(No. AF-SOP-07-1. 0-01;2016-8-2)。

### 1.2 RNA 提取及逆转录

裂解液法提取骨髓有核细胞,TRIzol 法提取总 RNA,紫外分光光度仪测定 RNA 浓度及纯度, $A_{260/280}$  均在 1.8~2.0。取 1~2  $\mu$ g 总 RNA 按试剂盒说明书逆转录为 cDNA,-20℃ 保存备用。

### 1.3 RQ-PCR 检测 DNMT3A1 和 DNMT3A2 表达水平

以 Abl 基因为内参,每份标本至少设 2 个平行对照,同时检测 DNMT3A1、DNMT3A2 及 Abl,反应体系为 20  $\mu$ l(具体同说明书),反应条件为:95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,62℃ 退火、延伸 34 s,共 40 个循环。扩增完毕后进行溶解曲线分析,随机抽取 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳确认产物单一性和特异性,并随机抽取扩增产物送测序,测序结果为目的片段。引物如下:DNMT3A1:正向 5'-GGTGACACGCCAAAGGA-3';反向 5'-AACGCACTGCAAAACGAG-3';DNMT3A2 正向:5'-CTTATGGGGATCCTGGAGCG-3';反向:5'-GTAGCCACAGTGGGGGATG-3';Abl 正向 5'-TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAG

GT-3';反向 5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCC A-3'。

### 1.4 基因的表达定量分析

采用比较阈值法,根据每个样本的阈值循环数(Ct)计算。计算每个样本的 Ct 值与内参 Abl Ct 值的差值,即  $\Delta$ Ct,以平行孔  $\Delta$ Ct 的均值代表该样本目的基因的相对表达量,采用  $2^{\Delta\Delta Ct}$  转为倍数关系进行数据分析。

### 1.5 统计学处理

使用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析。对于正态分布数据,两独立样本均数比较采用 *t* 检验,对于非正态分布数据,两样本间比较采用 Mann-Whitney U 检验。DNMT3A 各亚型与其他临床资料的相关性分析采用 Spearman 相关检测。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DNMT3A1 及 DNMT3A2 在 AML 患者中的表达情况

检测 61 例初诊 AML 患者及 25 例对照者 DNMT3A1 及 DNMT3A2 的相对表达水平,结果显示 DNMT3A1 及 DNMT3A2 在 AML 患者中表达水平较对照组无明显差异。但进一步进行亚型分析显示,DNMT3A1 在伴有 PML-RAR $\alpha$  的 APL 患者中表达显著低于对照组( $P < 0.01$ ),但在其他亚型中均与对照组无明显差异;DNMT3A2 在伴有 RUNX1-RUNX1T1、伴有 NPM1 突变及伴有 CEBP $\alpha$  双突变的 AML 患者中,表达较对照组显著升高(均  $P < 0.05$ ),但在非特指(NOS-M5)患者中,表达较对照组显著下降( $P < 0.05$ )。我们进一步分析了 DNMT3A2 与 DNMT3A1 比值在 AML 患者各亚型中的变化,发现 DNMT3A2/DNMT3A1 比值在伴有 PML-RAR $\alpha$ 、伴有 RUNX1-RUNX1T1 及伴有 CEBP $\alpha$  双突变的 AML 患者中,较对照组显著升高( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ );在 NOS-M5 患者中,表达较对照组显著下降( $P < 0.01$ )。详见表 1 [数据均以中位值(最小值~最大值)方式表示]。

### 2.2 DNMT3A1 及 DNMT3A2 在 AML 患者不同危险分层中的表达情况

对临床资料完整的 21 例除 APL 外的 AML 患者,按照 NCCN 2016 标准进行预后危险分层,结果低危组 9 例,中危组 7 例,高危组 5 例,分析不同危险分层患者 DNMT3A1 及 DNMT3A2 的表达情况。发现 DNMT3A1 在低、中、高危组表达水平较对照组均无明显差异;DNMT3A2 及 DNMT3A2 与 DNMT3A1 比值,低危组患者显著高于对照组( $P < 0.01$ ),中、高危组较对照组降低,但无统计学差异( $P > 0.05$ )。详见表 2 [数据均以中位值(最小值~最大值)方式表示]。

表 1 AML 组不同亚型和对照组 DNMT3A1 及 DNMT3A2 表达

组别	DNMT3A1	DNMT3A2	DNMT3A2/DNMT3A1
AML 组(61 例)	0.064(0.002~0.271)	0.020(0.001~0.146)	0.426(0.033~2.522)
PML-RARa	0.026(0.002~0.078) <sup>2)</sup>	0.013(0.001~0.074)	0.443(0.148~1.516) <sup>1)</sup>
RUNX1-RUNX1T1	0.058(0.029~0.076)	0.102(0.028~0.146) <sup>1)</sup>	1.614(0.948~2.267) <sup>2)</sup>
CBFB-MYH11	0.271(0.271~0.271)	0.144(0.144~0.144)	0.532(0.532~0.532)
NPM1 突变	0.106(0.063~0.136)	0.077(0.008~0.112) <sup>1)</sup>	0.563(0.086~1.420)
CEBPα 双突变	0.052(0.012~0.075)	0.059(0.014~0.072) <sup>1)</sup>	1.130(0.571~1.519) <sup>2)</sup>
NOS-M2	0.063(0.021~0.075)	0.008(0.004~0.033)	0.165(0.133~0.438)
NOS-M4	0.028(0.028~0.028)	0.017(0.017~0.017)	0.612(0.612~0.612)
NOS-M5	0.094(0.039~0.165)	0.012(0.001~0.045) <sup>1)</sup>	0.079(0.033~0.278) <sup>2)</sup>
其他	0.070(0.003~0.172)	0.020(0.002~0.107)	0.369(0.047~2.522)
对照组(25 例)	0.095(0.010~0.451)	0.027(0.002~0.056)	0.284(0.041~0.884)

与对照组比较,<sup>1)</sup>  $P<0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P<0.01$ 。

表 2 AML 组不同危险分层和对照组 DNMT3A1 及 DNMT3A2 表达

组别	DNMT3A1	DNMT3A2	DNMT3A2/DNMT3A1
AML 组(21 例)	0.075(0.029~0.271)	0.033(0.003~0.144)	0.484(0.052~2.267)
低危	0.063(0.029~0.106)	0.072(0.008~0.124) <sup>1)</sup>	1.130(0.086~2.267) <sup>1)</sup>
中危	0.111(0.040~0.271)	0.012(0.003~0.143)	0.187(0.052~0.532)
高危	0.094(0.064~0.151)	0.020(0.012~0.065)	0.176(0.079~1.007)
对照组(25 例)	0.095(0.010~0.451)	0.027(0.002~0.056)	0.284(0.041~0.884)

与对照组比较,<sup>1)</sup>  $P<0.01$ 。

2.3 DNMT3A1 及 DNMT3A2 与临床特点的相关性研究

进一步分析 DNMT3A1、DNMT3A2 与年龄、血常规、骨髓白血病细胞数及骨髓巨核细胞数等临床资料的相关性,发现在 AML 患者中,DNMT3A2 表达水平与血小板及巨核细胞数呈显著负相关(均  $P<0.05$ )。

3 讨论

尽管关于 DNMT3A 在造血系统肿瘤中作用的研究是近年的研究热点,但研究大多集中在 DNMT3A1 突变与白血病发病及预后的关系上,关于 DNMT3A 不同亚型表达的研究较少。本研究应用 real-time PCR 方法在 mRNA 水平上检测了 AML 患者 DNMT3A1 及 DNMT3A2 的表达情况,尽管 DNMT3A2 在 AML 患者中表达水平较对照组无明显差异,但亚型分析显示其在伴有 RUNX1/RUNX1T1 的 AML、伴有 NPM1 及伴有 CEBPα 双突变的患者中表达增高,而在 NOS-M5 患者中表达显著下降。Stewart 等<sup>[10]</sup>对应用探针法实时定量 PCR 检测 13 例初诊 AML 患者及 12 例正常对照者 DNMT3A1 及 DNMT3A2 的表达,发现 AML 患者 DNMT3A2 表达显著下降。造成结果显著差异的原因,考虑与 Stewart 等研究中 AML 患者病例数较少,选择性偏倚有关。

DNMT3A 突变常常与 NPM1 突变或 CEBPα 突变同时存在<sup>[12-14]</sup>,本研究发现 DNMT3A2 在伴

有 NPM1 突变及伴有 CEBPα 双突变的 AML 患者中表达显著增加,因此有必要进一步研究 DNMT3A2 与 NPM1 突变及 CEBPα 突变的关系。RUNX1/RUNX1T1 能够与 DNMT3A 相互作用结合成复合物<sup>[15]</sup>,本研究发现在伴有 RUNX1/RUNX1T1 的 AML 患者中,DNMT3A2 表达显著增高,因此推测 DNMT3A2 与 RUNX1/RUNX1T1 的相互作用可能更加显著。有报道在 DNMT3A 突变的患者中,DNMT3A2 表达下降<sup>[9]</sup>,本组患者中 DNMT3A 突变患者仅 2 例,由于病例数较少,因此 DNMT3A 突变与 DNMT3A2 表达的关系有待进一步研究。

本研究中,按照 NCCN 2016 预后评估系统将 AML 患者分为低危、中危及高危组,发现 DNMT3A2 表达和 DNMT3A2/DNMT3A1 比值在低危患者中最高,显著高于对照组,与骨髓增生异常综合征中 DNMT3A 表达研究结果<sup>[16]</sup>及 Zare-Abdollahi 等<sup>[11]</sup>在 AML 中的研究结果类似。最近研究发现 AML 中 DNMT3A 依赖的 CpG 高甲基化可能是白血病细胞快速增殖的继发反应,而非诱发因素<sup>[17]</sup>,因此推测低危 AML 患者中 DNMT3A2 的高表达可能是细胞的一种保护性代偿性反应。

在造血干细胞向巨核系正常分化的过程中,DNMT3A 表达升高<sup>[16]</sup>。本研究发现在 AML 患者中,DNMT3A2 表达水平与巨核细胞数及血小板数呈显著负相关,具体机制不清,猜测不排除与 AML

中巨核分化障碍, DNMT3A2 代偿性增高相关。

总之, 本研究检测了 AML 患者骨髓标本中 DNMT3A1 和 DNMT3A2 表达情况, 发现 DNMT3A2 在部分 AML 患者, 尤其是低危患者中表达显著升高, 而在 NOS-M5 患者中表达显著下降, 这种差异性的表达在 AML 发病及治疗选择中可能有一定的价值, 有待深入研究。

#### 参考文献

- [1] Estey EH. Acute myeloid leukemia; 2013 update on risk-stratification and management[J]. Am J Hematol, 2013, 88: 318—327.
- [2] Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2010, 363: 2424—2433.
- [3] 陆小云, 徐瑞琴. 地西他滨联合 CAG 方案治疗老年急性髓系白血病的临床效果分析[J]. 临床血液学杂志, 2017, 30(9): 697—700.
- [4] 杨懿春, 石林, 王建渝, 等. 含地西他滨方案治疗老年急性髓系白血病 26 例疗效分析[J]. 临床血液学杂志, 2018, 31(5): 373—375, 378.
- [5] Yan XJ, Xu J, Gu ZH, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia[J]. Nat Genet, 2011, 43: 309—315.
- [6] Ribeiro AF, Pratzcorona M, Erpelinck-Verschueren C, et al. Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2012, 119: 5824—5831.
- [7] Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, et al. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies[J]. Leukemia, 2014, 28: 1774—1783.
- [8] Zhang YY, Yao DM, Zhu XW, et al. DNMT3A intra-genic hypomethylation is associated with adverse prognosis in acute myeloid leukemia[J]. Leuk Res, 2015, 39: 1041—1047.
- [9] Jost E, Lin Q, Weidner CI, et al. Epimutations mimic genomic mutations of DNMT3A in acute myeloid leukemia[J]. Leukemia, 2014, 28: 1227—1234.
- [10] Stewart HJ, Shalit E, Halliday L, et al. Acute myeloid leukemia cells exhibit selective down-regulation of DNMT3A isoform 2[J]. Leuk Lymphoma, 2015, 56: 3445—3448.
- [11] Zare-Abdollahi D, Safari S, Movafagh A, et al. A mutational and expressional analysis of DNMT3A in acute myeloid leukemia cytogenetic subgroups[J]. Hematology, 2015, 20: 397—404.
- [12] Ley TJ, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2013, 368: 2059—2074.
- [13] Renneville A, Boissel N, Nibourel O, et al. Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association[J]. Leukemia, 2012, 26: 1247—1254.
- [14] Wang B, Liu Y, Hou G, et al. Mutational spectrum and risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia patients based on next-generation sequencing[J]. Oncotarget, 2016, 7: 32065—32078.
- [15] Li Y, Gao L, Luo X, et al. Epigenetic silencing of microRNA-193a contributes to leukemogenesis in t(8; 21) acute myeloid leukemia by activating the PTEN/PI3K signal pathway[J]. Blood, 2013, 121: 499—509.
- [16] Hopfer O, Komor M, Koehler IS, et al. Aberrant promoter methylation in MDS hematopoietic cells during in vitro lineage specific differentiation is differently associated with DNMT isoforms[J]. Leuk Res, 2009, 33: 434—442.
- [17] Spencer DH, Russler-Germain DA, Ketkar S, et al. CpG island hypermethylation mediated by DNMT3A is a consequence of AML progression[J]. Cell, 2017, 168: 801—816.

(收稿日期: 2018-04-27)