

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.014

· 临床研究 ·

淋巴瘤中 *RAS* 相关区域家族 5A 基因启动子区甲基化状态及其 mRNA 表达与患者临床表现的关系

王连静, 郭伟, 刘丽宏(河北医科大学第四附属医院 血液内科, 河北 石家庄 050000)

[摘要] **目的:** 探讨 *RAS* 相关区域家族 5A (Ras-association domain family 5A, *RASSF5A*) 基因在淋巴瘤患者及正常人外周血中 DNA 甲基化和 mRNA 表达状态, 并研究其与患者临床表现的关系。 **方法:** 应用甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP) 及 RT-PCR 方法检测河北医科大学第四附属医院 2013 年 10 月至 2015 年 3 月收治的弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者 74 例、T 细胞淋巴瘤患者 42 例及健康志愿者 42 人的外周血中 *RASSF5A* 基因甲基化及 mRNA 表达状态。分析其与临床表现之间的关系。 **结果:** *RASSF5A* 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和 T 细胞淋巴瘤中的甲基化率分别为 64.9% (48/74) 和 73.8% (31/42), 明显高于正常人的 7.1% (3/42) ($P < 0.05$); 而其 mRNA 表达量分别为 0.54 ± 0.17 和 0.52 ± 0.18 , 均低于正常人的 0.86 ± 0.10 ($P < 0.05$)。弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中 *RASSF5A* 基因启动子甲基化阳性的 mRNA 相对表达量 (0.51 ± 0.18) 低于甲基化阴性的 mRNA 表达量 (0.60 ± 0.17) ($P < 0.05$)。T 细胞淋巴瘤中 *RASSF5A* 基因启动子甲基化阳性的 mRNA 相对表达量 (0.50 ± 0.15) 低于甲基化阴性的 mRNA 表达量 (0.63 ± 0.12) ($P < 0.05$)。 *RASSF5A* 基因在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的甲基化率与患者的 LDH、IPI 评分及 Ki67 相关 ($P < 0.05$); *RASSF5A* 基因在 T 细胞淋巴瘤中的甲基化率与患者的临床分期、结外累及及 Ki-67 相关 ($P < 0.05$)。 *RASSF5A* 基因在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中 mRNA 的表达量与患者的 IPI 评分及结外累及相关 ($P < 0.05$); *RASSF5A* 基因在 T 细胞淋巴瘤中 mRNA 的表达量与患者的临床分期和结外累及相关 ($P < 0.05$)。 **结论:** *RASSF5A* 基因启动子甲基化可能是弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和 T 细胞淋巴瘤发生的机制之一, mRNA 表达沉默可能是表观遗传学机制之一。 *RASSF5A* 基因在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和 T 细胞淋巴瘤中主要可能起抑癌基因的作用, 与淋巴瘤的侵袭性、恶性进程及预后有关。

[关键词] 淋巴瘤; *RAS* 相关区域家族 5A 基因; 基因表达; 甲基化

[中图分类号] R733.4; R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)04-0537-08

Relationship of promoter methylation and mRNA expression of *RAS*-related domain family 5A gene in peripheral blood of lymphoma patients with clinical manifestations of the patients

WANG Lianjing, GUO Wei, LIU Lihong (Department of Hematology, Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the promoter methylation status of Ras-association domain family 5A (*RASSF5A*) gene and its mRNA expression level in the peripheral blood of patients with lymphoma and normal people as well as its correlation to clinical manifestations. **Methods:** Methylation-specific PCR (MSP) and Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) method were used to examine the methylation status and the mRNA expression of *RASSF5A* gene in peripheral blood of patients with diffused large B cell lymphoma or T cell lymphoma and healthy participants. The relationship between *RASSF5A* gene methylation and clinical data was further analyzed. **Results:** The methylation frequencies of *RASSF5A* in diffused large B cell lymphoma and T cell lymphoma (64.9% [48/74] and 73.8% [31/42]) were significantly higher than that of healthy participants (7.1% [3/42], all $P < 0.05$). The mRNA expressions of *RASSF5A* gene in diffused large B cell lymphoma and peripheral T cell lymphoma were (0.54 ± 0.17) and (0.52 ± 0.18), respectively, which were significantly lower than that of healthy participants (0.86 ± 0.10) ($P < 0.05$). The mRNA expression of *RASSF5A*

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81472335)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81472335)

[作者简介] 王连静 (1985 -), 女, 河北省宁晋县人, 住院医师, 主要从事血液病治疗研究, E-mail: 105116659@qq.com

[通信作者] 刘丽宏 (LIU Lihong, corresponding author), E-mail: 13831177920@163.com

gene with positive promoter methylation ($[0.51 \pm 0.18]$; $[0.50 \pm 0.15]$) was significantly lower than that of the gene with negative methylation ($[0.60 \pm 0.17]$; $[0.63 \pm 0.12]$) (all $P < 0.05$) in both diffused large B cell lymphoma and T cell lymphoma. Methylation frequency of *RASSF5A* gene was associated with LDH, IPI, and Ki-67 ($P < 0.05$) in diffused large B cell lymphoma, and associated with clinical stage, extranodal involvement and Ki-67 ($P < 0.05$) in T cell lymphoma. The mRNA expression of *RASSF5A* gene was correlated with IPI score, extranodal involvement ($P < 0.05$) in diffused large B cell lymphoma, and correlated with clinical stage and extranodal involvement ($P < 0.05$) in T cell lymphoma. **Conclusion:** The methylation of *RASSF5A* gene may be associated with the occurrence of diffused large B cell lymphoma and T cell lymphoma, and mRNA expression silencing might be one of the mechanisms of epigenetics. *RASSF5A* gene may act as a tumor suppressor gene in diffused large B cell lymphoma and T cell lymphoma, which may be associated with tumor invasiveness, tumor malignant process and tumor prognosis.

[**Key words**] lymphoma; RAS-association domain family 5A (*RASSF5A*) gene; gene expression; methylation

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(4): 537-544. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.014]

RAS 相关区域家族 5A (Ras-association domain family 5A, *RASSF5A*) 基因也称 *NORE1* 或 *RAPL*, 是 RAS 相关区域家族成员之一。1998 年在小鼠中首次发现, 位于染色体 1q32.1。 *RASSF5* 涉及多个重要细胞生物学过程, 包括增殖, 生长周期调控和凋亡。由于选择性剪切和启动子的不同, *RASSF5* 可分为 *RASSF5A*、*RASSF5B* 和 *RASSF5C* 三种不同的转录本。 *RASSF5A* 和 *RASSF5C* 也被叫做 *NORE1A* 和 *NORE1B* (或 *RAPL*), 两者的区别是 *RASSF5A* 的 N-末端携带 *RASSF5C* 没有的 C1 结构域, 但两者共享 RA 和 SARAH 域^[1]。 *RASSF5A* 在很多正常组织中有表达, 在肿瘤组织及其细胞株中均有不同程度的下调^[2-3]。 *RASSF5A* 在肺癌、乳腺癌及肾癌等肿瘤中均有相关基因启动子甲基化而导致表观遗传失活^[4-5], 而且在神经系统中也起重要作用^[6]。最新的研究^[7]也表明 *RASSF5A* 在食管鳞状细胞癌中表达失活, 并发生异常高甲基化, 说明 *RASSF5A* 可能是食管癌的抑癌基因。但 *RASSF5A* 在淋巴瘤中的表达及表观遗传学失活机制的研究在国内外尚未见报道。因此, 本研究采用甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 和 RT-PCR 方法检测淋巴瘤患者外周血中 *RASSF5A* 甲基化状态和 mRNA 的表达情况, 并分析其分别与临床特征的关系, 探讨 *RASSF5A* 基因在两种不同细胞来源的淋巴瘤发生发展中的作用, 为淋巴瘤的防治提供表观遗传学及靶向治疗依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集河北医科大学第四附属医院 2013 年 10 月至 2015 年 3 月期间收治的病理科确诊为初治弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者 74 例、T 细胞淋巴瘤患者 42

例, 其中, 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者男性 38 例、女性 36 例, 年龄 24 ~ 77 岁, 中位年龄 59.5 岁。T 细胞淋巴瘤患者男性 26 例、女性 16 例, 年龄 23 ~ 83 岁, 中位年龄 47.3 岁。另外从体检人员中挑选健康志愿者 42 人作为对照组, 其性别、年龄和上述患者均衡一致。本研究获得了患者的知情同意以及河北医科大学第四医院医学伦理委员会的批准。

1.2 主要试剂

TRIzol 购自美国 SBS 公司, 反转录试剂盒购自加拿大 Fermentas 公司, 总 RNA 提取试剂、RT-PCR 试剂盒、qRT-PCR 试剂盒、Wizard DNA 纯化试剂盒均购自美国 Promega 公司, PCR 引物购自北京赛百盛基因技术有限公司, 蛋白酶 K 购自美国 Sigma 公司, DNA Marker 购自北京 Solarbio 科学技术有限公司。

1.3 MSP 检测弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和 T 细胞淋巴瘤患者外周血 *RASSF5A* 基因启动子区甲基化状态

取 2 ~ 3 ml 淋巴瘤患者外周血提取 DNA, 紫外分光光度仪检测 DNA 浓度, 按照 DNA 亚硫酸氢盐转化试剂盒步骤纯化 DNA, 而后判定甲基化修饰的完整性。依据亚硫酸氢盐修饰原理设计 *RASSF5A* 基因特异性甲基化引物或非甲基化引物 (表 1), MSP 反应体系为 20 μ l, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 45 s, 95 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s; 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 7 min。反应产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像, 图像分析系统分析。Sss I 甲基化酶处理的正常人外周血 DNA 作为阳性对照; 未经处理的正常人外周血 DNA 作为阴性对照; 灭菌双蒸水作为空白对照。

甲基化结果判定标准为 (1) 完全甲基化: 甲基化特异引物 (M) 扩增出目的条带, 而非甲基化特异引物 (U) 无目的条带扩出; (2) 非甲基化: U 引物扩增出目的条带, 而 M 引物无目的条带扩出; (3) 不完

全甲基化: 两对引物均有目的条带扩出, 记录为甲基化(图 1)。

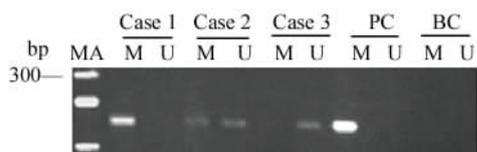


图 1 在淋巴瘤患者及正常人外周血中 RASSF5A 基因的甲基化状态

Fig. 1 Methylation status of RASSF5A gene in peripheral bloods of the patients with lymphoma and normal persons

Case 1: Methylated; Case 2: Hemi-Methylated;
Case 3: Unmethylated; PC: Positive control;
BC: Blank control; M: Methylated;
U: Unmethylated; MA: 100 bp DNA marker

1.4 RT-PCR 检测弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和 T 细胞淋

巴瘤患者外周血 RASSF5A 基因 mRNA 相对表达量

2~3 ml 淋巴瘤患者外周血提取总 RNA, 测定 RNA 纯度, 选取 OD260/280 ≥ 1.8 者作为实验对象, 鉴定 RNA 的完整性。按反转录试剂盒说明书操作步骤将 RNA 反转录成 cDNA, 进行 PCR 扩增 (GAPDH 作为内参照)。RASSF5A 基因 RT-PCR 引物见表 1, PCR 反应体系为 20 μl, 反应条件为 94 °C 10 min, 94 °C 45 s, 4 °C 45 S, 72 °C 1 min, 35 个循环后 72 °C 7 min。反应产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪扫描电泳条带, Gel Pro Analyzizer 3.1 软件测定灰度值。mRNA 相对表达水平 = 目的基因条带灰度值/GAPDH 条带灰度值。

1.5 统计学处理

用 SPSS 19.0 软件, 计数资料用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法, 计量资料采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 RT-PCR 和甲基化特异性 PCR 引物

Tab. 1 Primer sequences for RT-PCR and methylation-specific PCR (MSP)

Type	Primer sequence(5' → 3')	Annealing temperature(<i>t</i> /°C)	Product size/bp
RT-PCR			
RASSF5A	6F: AACTCTCCATTGCTGACCGC 6R: CAAAGCTGAGGACCTCCGTG	56	72
GAPDH	F: AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG R: AGGGGTCATTGATGGCAACA	57	104
MSP			
Methylation	F: ATTTACGGGATAAAGCGCGTTGCG R: TAAACGTCGGCTCGCCACTCTCCCG	54	169
Unmethylation	F: ATTTATGGGATAAAGTGTGTTGTG R: TAAACATCCACTCACCCTCTCCCA	58	168

RASSF5A: Ras-association domain family 5A; F: Forward; R: Reverse; 6F: Forward primers designed according to exon 6, 6R: Reverse primers designed according to exon 6

2 结果

2.1 B 细胞淋巴瘤患者外周血 RASSF5A 启动子甲基化高于正常人, 而 mRNA 表达低于正常人

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者外周血 RASSF5A 基因启动子甲基化及其 mRNA 表达见图 2 和图 4。弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者外周血 RASSF5A 基因甲基化率为 64.9% (48/74), 明显高于正常人外周血的甲基化率 7.1% (3/42), 两者的差异有统计学

意义 ($P < 0.05$)。

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 IPI 评分高危组患者 RASSF5A 基因启动子甲基化率明显高于低危组患者 ($P < 0.05$); 高 LDH 组患者甲基化率高于正常 LDH 组患者 ($P < 0.05$); Ki67 阳性率 ≥ 60% 组患者甲基化率明显高于 Ki67 阳性率 < 60% 组患者 ($P < 0.05$); 但是 RASSF5A 基因启动子甲基化率与患者的性别、年龄、骨髓与结外累及与否、A/B 症状、临床分期、生发中心或非生发中心和 $\beta 2$ 微球蛋白均

无关(均 $P > 0.05$) (表 2)。

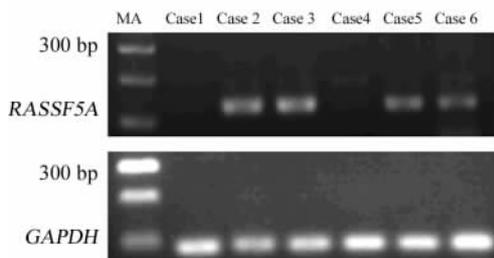


图 2 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤外周血中 RASSF5A 基因甲基化状态

Fig. 2 Methylation status of RASSF5A gene in peripheral bloods of the patients with diffuse large B cell lymphoma

MA:100bp DNA Marker; GAPDH:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

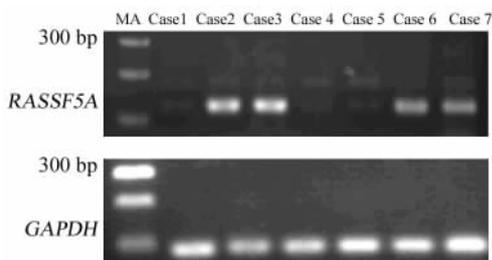


图 3 T 细胞淋巴瘤外周血中 RASSF5A 基因甲基化状态
Fig. 3 Methylation status of RASSF5A gene in peripheral bloods of the patients with T cell lymphoma



图 4 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者外周血 RASSF5A 基因 mRNA 的表达状态

Fig. 4 Expressions of RASSF5A mRNA in peripheral bloods of the patients with diffuse large B cell lymphoma

RASSF5A 基因 mRNA 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者外周血表达量为 0.54 ± 0.17 , 低于正常人外周血表达量 0.86 ± 0.10 , 两者的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 RASSF5A 基因 mRNA 表达量与患者的 IPI 评分和结外累及有关 ($P < 0.05$); 但与患者的性别、年龄、骨髓累及与否、A/B

症状、临床分期、生发中心或非生发中心、LDH、 $\beta 2$ 微球蛋白和 Ki67 表达均无关(均 $P > 0.05$) (表 2)。

RASSF5A 基因启动子甲基化阳性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者的 mRNA 相对表达量平均为 0.51 ± 0.18 , 甲基化阴性患者的 mRNA 相对表达量平均为 0.60 ± 0.17 , 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。
2.2 T 细胞淋巴瘤患者外周血 RASSF5A 启动子甲基化高于正常人, 而 mRNA 表达量低于正常人

T 细胞淋巴瘤患者外周血 RASSF5A 基因启动子甲基化及其 mRNA 表达状态见图 3 和图 5。T 细胞型淋巴瘤患者外周血 RASSF5A 基因甲基化率为 73.8% (31/42), 明显高于正常人外周血的 7.1% (3/42), 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

T 细胞型淋巴瘤临床分期 III + IV 期患者的 RASSF5A 基因甲基化率明显高于临床分期 I + II 期患者, 两者有显著性差异 ($P < 0.05$); 有结外累及患者的甲基化率明显高于无结外累及患者, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Ki-67 阳性率 $\geq 50\%$ 的甲基化率明显高于 Ki67 阳性率 $< 50\%$ 的甲基化率 ($P < 0.05$); 但甲基化率与患者的性别、年龄、骨髓累及与否、A/B 症状、LDH 和 $\beta 2$ 微球蛋白均无关 ($P > 0.05$) (表 3)。

T 细胞淋巴瘤 RASSF5A 基因 mRNA 表达量为 0.52 ± 0.18 , 低于正常人 RASSF5A 基因 mRNA 表达量 (0.86 ± 0.10), 两者有显著性差异 ($P < 0.05$)。

RASSF5A 基因在 T 细胞淋巴瘤中 mRNA 的表达量与患者的临床分期、结外累及有关 ($P < 0.05$); 但与患者的性别、年龄、骨髓累及与否、A/B 症状、Ki67 及 $\beta 2$ 微球蛋白表达均无关 ($P > 0.05$) (表 3)。

RASSF5A 基因启动子甲基化阳性 T 细胞淋巴瘤患者的 RASSF5A 基因启动子 mRNA 相对表达量平均为 0.50 ± 0.15 , 甲基化阴性 T 细胞淋巴瘤患者的相对表达量平均为 0.63 ± 0.12 , 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

恶性肿瘤是严重危害人类生命的疾病, 随着对肿瘤研究的不断深入, 发现肿瘤的发生发展不仅与细胞内基因突变和缺失导致的遗传调控紊乱有关, 也与表观遗传调控异常有关^[8]。DNA 甲基化在表观遗传修饰中起重要作用, DNA 甲基化通过维持基因组和染色体稳定, 调控基因印记、基因沉默, 参与肿瘤发生发展过程^[9]。DNA 甲基化在哺乳动物中广泛存在, 一般位于基因启动子区和第一外显子区的 CpG 岛, 正常状态启动子区域 CpG 岛一般不发生

表 2 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者外周血 RASSF5A 基因甲基化及其 mRNA 表达与患者临床病理资料之间的关系
Tab.2 Relationship of methylation of RASSF5A and expression of its mRNA in peripheral bloods of patients with diffuse large B cell lymphoma, with clinical pathologic data

Characteristic	Group	Methylation of RASSF5A		Expression of RASSF5A mRNA	
		<i>n</i> (%)	<i>P</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>P</i>
Age(t/a)					
<60	38	25(65.8)	0.864	0.56 ± 0.19	0.142
≥60	36	23(63.9)		0.61 ± 0.13	
Gender					
Male	38	21(55.3)	0.075	0.55 ± 0.18	0.075
Female	36	27(75.0)		0.57 ± 0.18	
Bone marrow					
Positive	21	13(61.9)	0.737	0.58 ± 0.16	0.812
Negative	53	35(66.0)		0.59 ± 0.17	
Extranodal involment					
Positive	23	17(73.9)	0.162	0.50 ± 0.15	0.010
Negative	51	29(56.8)		0.62 ± 0.14	
A/B symptom					
A symptom	50	30(60.0)	0.206	0.58 ± 0.15	0.864
B symptom	24	18(75.0)		0.59 ± 0.20	
GCB/Non-GCB					
GCB	39	28(71.8)	0.187	0.57 ± 0.16	0.657
Non-GCB	35	20(51.7)		0.59 ± 0.17	
Clinical stage					
I + II	30	19(57.9)	0.820	0.58 ± 0.18	0.820
III + IV	44	29(65.9)		0.51 ± 0.11	
IPI					
Low-risk	45	25(55.6)	0.037	0.63 ± 0.19	0.037
High-risk	29	23(79.3)		0.50 ± 0.12	
Ki-67					
<60%	15	6(40.0)	0.024	0.53 ± 0.20	0.207
≥60%	59	42(71.2)		0.60 ± 0.14	
LDH					
High	36	29(80.6)	0.024	0.55 ± 0.19	0.144
Normal	38	19(50.0)		0.59 ± 0.17	
β2-microglobulin					
Positive	33	24(72.7)	0.204	0.58 ± 0.16	0.204
Negative	41	24(58.5)		0.59 ± 0.18	

表3 T细胞淋巴瘤患者外周血中 RASSF5A 基因甲基化及其 mRNA 表达与患者临床病理资料间的关系
Tab.3 Relationship of methylation of RASSF5A and expression of its mRNA in peripheral bloods of patients with T cell lymphoma, with clinical pathologic data

Characteristic	N	Methylation of RASSF5A		Expression of RASSF5A mRNA	
		n (%)	P	$\bar{x} \pm s$	P
Age(t/a)					
<60	28	22(78.6)	0.535	0.56 ± 0.13	0.100
≥60	14	9(64.2)		0.60 ± 0.07	
Gender					
Male	26	19(73.0)	1.000	0.56 ± 0.17	0.317
Female	16	12(75.0)		0.61 ± 0.18	
Bone marrow					
Positive	17	15(88.2)	0.163	0.56 ± 0.15	0.483
Negative	25	16(64.0)		0.59 ± 0.14	
Extranodal involment					
Positive	23	21(91.3)	0.013	0.48 ± 0.15	0.034
Negative	19	10(52.6)		0.59 ± 0.19	
A/B symptom					
A symptom	10	8(80.0)	0.922	0.54 ± 0.20	0.388
B symptom	32	23(71.8)		0.59 ± 0.13	
Clinical stage					
I + II	15	7(46.7)	0.009	0.58 ± 0.18	0.017
III + IV	27	24(88.9)		0.45 ± 0.12	
Ki-67					
<50%	25	15(60.0)	0.035	0.55 ± 0.18	0.451
≥50%	17	16(94.1)		0.59 ± 0.18	
LDH					
High	19	13(68.4)	0.712	0.54 ± 0.12	0.172
Normal	23	18(78.3)		0.60 ± 0.15	
β2-microglobulin					
Positive	27	21(77.8)	0.676	0.56 ± 0.16	0.908
Negative	15	10(66.7)		0.58 ± 0.14	



图5 T细胞淋巴瘤患者外周血 RASSF5A 基因 mRNA 的表达状态

Fig.5 Expressions of RASSF5A mRNA in peripheral bloods of the patients with T cell lymphoma

甲基化,而其他 CpG 位点则处于甲基化状态,如果启动子区域 CpG 岛发生甲基化则导致基因转录沉默,使抑癌基因、DNA 修复基因和凋亡基因等重要基因表达极度减低或不发生,基因功能丧失,促进肿瘤形成^[10]。近年来,发现肿瘤中多种基因异常高甲基化,如肺癌和乳腺癌均可出现 APC 和 RASSF1 基因异常高表达。相关研究还发现这些基因启动子异常甲基化是细胞癌变过程中一个早期频发事件,有望成为肿瘤的敏感生物学检测指标。以往 DNA 甲基化标本较多来源于肿瘤组织,随着对 DNA 甲基化

越来越重视, MSP 技术发展也越加进步。现在临床可通过血浆、唾液、痰液, 甚至粪便等微量样本提取 DNA, 且血浆、血清中提取 DNA 进行甲基化检测在多种肿瘤试验中已获得成功。RASSF 家族(RAS 相关区域家族) 包括 10 个成员, 其中很多是肿瘤抑制蛋白, 相应的基因发生启动子甲基化, 表达缺失, 导致多种肿瘤发生, 如白血病、黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌、颈部相关肿瘤、肺癌、神经系统肿瘤、结肠癌和肾癌等, 且与肿瘤的严重程度和不良预后相关^[11]。除了肿瘤抑制功能, 有些 RASSF 基因可作为微管稳定支架, 调节细胞分裂和凋亡、控制细胞迁移和黏附, 调节炎症的持续时间等, 发挥许多重要生理作用^[11]。RASSF5 是 RASSF 家族的一员, 是鼠类 Ras 受体 Nore1 的人类同系物, 有 3 个转录本: RASSF5A, RASSF5B 和 RASSF5C, 其中 RASSF5A 在多种肿瘤中有表达, 在肺癌、乳腺癌、肾癌, 大肠癌, 肝细胞癌, 白血病, 黑色素瘤和神经母细胞瘤细胞中发生异常甲基化和表达沉默^[1]。但有关 RASSF5A 在淋巴瘤中的研究国内外尚未见报道。

本实验用 MSP 方法检测弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤和正常人外周血 RASSF5A 基因甲基化状态, 发现 RASSF5A 基因在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和 T 细胞淋巴瘤的甲基化率明显增高。此结果与 SHP-1 基因在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤标本中的甲基化率均高于正常人^[12]的研究结果一致。进一步用 RT-PCR 技术分析其 mRNA 相对表达量, RASSF5A 基因 mRNA 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和 T 细胞淋巴瘤中的表达显著减低。这些结果与 Tommasi 等和 Chen 等^[5,13]在其他人类肿瘤细胞株和肿瘤中发现 RASSF5A 表达下调或缺失的研究结果一致。最新研究还发现 RASSF5A 在食管癌的表达亦下降^[7]。所以 RASSF5A 基因 mRNA 在弥漫性大 B 细胞和 T 细胞淋巴瘤表达降低提示 RASSF5A 基因可能在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和 T 细胞淋巴瘤中起抑癌基因作用。RASSF5A 基因在弥漫性大 B 细胞和 T 细胞淋巴瘤启动子区高甲基化和 mRNA 表达降低, 与结肠肿瘤、食管癌和贲门癌的结果一致, 推测弥漫性大 B 细胞和 T 细胞淋巴瘤 RASSF5A 基因启动子区甲基化可能是导致其基因表达沉默的表观遗传学机制之一。Lee 等^[3]在结肠肿瘤中发现 RASSF5A 启动子异常甲基化导致的基因沉默, 与肿瘤分期和分级有关, 可能参与结肠肿瘤的恶性进程。同样近期研究^[7]发现, 食管癌 RASSF5A 启动子异常甲基化与淋巴结转移和组织分化程度密切相关, 可能与食管癌的恶性有关。本

研究比较分析弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和 T 细胞淋巴瘤 RASSF5A 基因甲基化与临床资料的关系, 发现弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者外周血 RASSF5A 基因启动子异常甲基化与患者的 IPI、LDH 和 Ki-67 水平有关($P < 0.05$), 与患者的性别、年龄、骨髓及结外有无累及, A/B 症状, 临床分期、生发或非生发中心、 $\beta 2$ 微球蛋白等无明显关系($P > 0.05$); T 细胞淋巴瘤中外周血 RASSF5A 基因启动子异常甲基化与患者的临床分期、结外累及以及 Ki67 水平有关($P < 0.05$), 与患者的性别、年龄、骨髓有无累及、A/B 症状、LDH 和 $\beta 2$ 微球蛋白等无明显关系($P > 0.05$)。而且, 发现弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者外周血中 RASSF5A 基因 mRNA 表达降低与患者的 IPI 评分及结外累及相关($P < 0.05$), T 细胞淋巴瘤患者外周血 RASSF5A 基因 mRNA 表达降低与患者的临床分期和结外累及相关($P < 0.05$)。这些结果与 Calvisi 等^[3]和 Lee 等^[3]在肝癌和结肠癌中的发现一致, 提示 RASSF5A 基因甲基化及其 mRNA 表达降低可能与这两种淋巴瘤的侵袭性、恶性进展及预后相关。

DNA 甲基化在恶性血液病广泛存在, 且具有可逆性, 应用去甲基化药物可使沉默的基因重新表达^[14], 在白血病应用起到一定抗肿瘤作用^[15], 甚至已成为骨髓增生异常综合征推荐的一线药物^[16], 提示 DNA 异常甲基化是血液系统肿瘤发生的一个重要分子机制。探讨 RASSF5 在淋巴瘤中的机制, 有望可为淋巴瘤的早期诊断、临床病情监测、预后判断及靶向治疗提供新的指标或技术。

[参 考 文 献]

- [1] CHAN J J, KATAN M. PLCvarepsilon and the RASSF family in tumour suppression and other functions [J]. *Adv Biol Regul*, 2013, 53(3): 258-279. DOI: 10.1016/j.jbior.2013.07.008.
- [2] CALVISI D F, DONNINGER H, VOS M D, et al. NORE1A tumor suppressor candidate modulates p21CIP1 via p53 [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(11): 4629-4637. DOI: 10.1158/0008-5472.can-08-3672.
- [3] LEE C K, LEE J H, LEE M G, et al. Epigenetic inactivation of the NORE1 gene correlates with malignant progression of colorectal tumors [J/OL]. *BMC Cancer*, 2010, 10(1): 577 [2015-12-06]. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-577>. DOI: 10.1186/1471-2407-10-577.
- [4] HESSON L, DALLOL A, MINNA J D, et al. RASSF5A, a homologue of RASSF1A tumour suppressor gene is inactivated in human cancers [J]. *Oncogene*, 2003, 22(6): 947-954. DOI: 10.1038/sj.onc.1206191.
- [5] CHEN J, LUI W O, VOS M D, et al. The t(1;3) breakpoint-spanning genes LSAMP and RASSFS are involved in clear cell re-

- nal cell carcinomas [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(5): 405-413. DOI: 10.1016/s1535-6108(03)00269-1.
- [6] NAKAMURA T, YASUDA S, NAGAI H, et al. Longest neurite-specific activation of Rap1B in hippocampal neurons contributes to polarity formation through RalA and Nore1A in addition to PI3-kinase [J]. *Genes Cells*, 2013, 18(11): 1020-1031. DOI: 10.1111/gtc.12097.
- [7] GUO W, WANG C, GUO Y, et al. RASSF5A, a candidate tumor suppressor, is epigenetically inactivated in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2015, 32(1): 83-98. DOI:10.1007/s10585-015-9693-6.
- [8] BAYLIN S B, HERMAN J G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics [J]. *Trends Genet*, 2000, 16(4): 168-174. DOI: 10.1016/s0168-9525(99)01971-x.
- [9] LAIRD P W, JAENISCH R. The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics [J]. *Annu Rev Genet*, 1996, 30(1): 441-464. DOI: 10.1146/annurev.genet.30.1.441.
- [10] 程焕臣, 马军. 表观遗传修饰与肿瘤 [J]. *内科理论与实践*, 2009, 4(1): 72-75.
- [11] VOLODKO N, GORDON M, SALLA M, et al. RASSF tumor suppressor gene family: biological functions and regulation [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(16): 2671-2684. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.02.041.
- [12] 汪清铭, 吴祥元, 王东宁, 等. B 细胞淋巴瘤 SHP-1 基因甲基化状态及其意义 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2007, 28(1): 92-96.
- [13] TOMMASI S, DAMMANN R, JIN S G, et al. RASSF3 and RASSF5: identification and cloning of two human homologues of the putative tumor suppressor gene RASSF1 [J]. *Oncogene*, 2002, 21(17): 2713-2720. DOI: 10.1038/sj.onc.1205365.
- [14] YOO C B, JONES P A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(1): 37-50. DOI: 10.1038/nrd1930.
- [15] MOMPALER R L. Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) [J]. *Semin Oncol*, 2005, 32(5): 443-451. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2005.07.008.
- [16] YANG X, LAY F, HAN H, et al. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2010, 31(11): 536-546. DOI: 10.1016/j.tips.2010.08.001.
- [收稿日期] 2015 - 12 - 14 [修回日期] 2016 - 04 - 05
[本文编辑] 宋关鸿

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》征稿和征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》是由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的高级学术刊物,为中国精品科技期刊、RCCSE 中国权威学术刊物、中国中文核心期刊、中国科学引文数据库核心源期刊、中国科技核心期刊、中国抗癌协会优秀期刊、中国人民解放军优秀医学期刊,为同行专家评审期刊;获 2015 - 2017 年度中国科协精品科技期刊工程项目资助。本刊主要报道肿瘤生物治疗领域基础研究和临床应用的新成果、新理论、新技术和新经验,常设有述评、院士论坛、专家论坛、研究快报、青年学者论坛、基础研究、临床研究、转化医学、技术方法、短篇论著、学术争鸣、文献综述、个案报告等栏目,以从事肿瘤防治的中高级临床和科研工作者、医药院校师生及相关学科科技人员为读者对象。双月刊(2017 年始改为月刊),每双月 20 日出版,国内外公开发行。

本刊主编为中国医学科学院院长、中国免疫学会理事长曹雪涛院士,编委会由包括 15 名院士和 9 名外籍专家的众多名家大师组成。本刊已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、荷兰《医学文摘》(EMbase)等 10 个国际著名检索系统收录。本刊在国内肿瘤学领域的学术地位和影响力名列前茅,在国际学术界的显示度日益广泛和增强。

本刊使用网络远程投稿、审稿系统和编校管理系统进行编辑出版工作,工作效率高,编校质量好,论文发表周期短。另设“快速发表通道”,将有较高创新性的论文以 2 ~ 3 个月的速度快速发表。

热忱欢迎广大肿瘤防治工作者通过本刊网站投稿系统、电子信箱踊跃投稿。

《中国肿瘤生物治疗杂志》每册定价 15.00 元,全年定价 90.00 元(2017 年全年定价 180.00 元)。邮发代号: 4 - 576,请通过当地邮局订阅。若错过,可从本刊编辑部补订,请将 90.00 元(2017 年 180.00 元,优惠免邮资)寄编辑部,并注明详细通讯地址及邮政编码,编辑部负责将每期杂志准时寄给您。

联系地址:上海市翔殷路 800 号;第二军医大学免疫楼《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部(邮编 200433)

联系人:韩丹 黄静怡

联系电话:021 - 55620605 × 22, 021 - 81871002 × 22

传真:021 - 81871007; 网址: www.biother.org; 电子邮箱: cjcb@biother.org