

多发性骨髓瘤中细胞因子信号转导抑制因子 1 (SOCS1) 基因异常甲基化的研究

贺振新¹⁾, 杨凌¹⁾, 刘琳²⁾, 杨昭庆³⁾, 何勤²⁾, 曾云¹⁾

(1) 昆明医科大学第一附属医院血液科, 云南昆明 650032; 2) 昆明医科大学第二附属医院血液科, 云南昆明 650101; 3) 中国医学科学院北京协和医学院医学生物研究所医学遗传室, 云南昆明 650118)

[摘要] **目的** 研究多发性骨髓瘤 (MM) 患者的 SOCS1 基因甲基化状态及其 mRNA 表达情况. **方法** 收集 2009 年 1 月至 2011 年 6 月在昆明医科大学第一附属医院和第二附属医院就诊的 54 例 MM 患者骨髓标本, 采用甲基化特异性 PCR 法研究 SOCS1 基因启动子区甲基化情况; 利用自动测序技术对扩增产物测序分析其碱基甲基化位点; 运用荧光实时定量反转录 PCR 检测其 mRNA 表达水平. **结果** 54 例多发性骨髓瘤患者中, 存在 SOCS1 基因启动子区甲基化, 与对照组比较具差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 测序结果也证实甲基化的存在; mRNA 表达与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$). **结论** SOCS1 异常甲基化在 MM 的发病机制中具有一定作用, 但其表达可能受到标本数量、临床治疗方案和其他免疫相关细胞因子等多因素影响.

[关键词] SOCS1; 多发性骨髓瘤; 甲基化

[中图分类号] R733.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 03 - 0058 - 05

Abnormal Methylation of Suppressor of Cytokine Signaling 1 in Multiple Myeloma

HE Zhen - xin¹⁾, YANG Ling¹⁾, LIU Lin²⁾, YANG Zhao - qing³⁾, HE Qin²⁾, ZENG Yun¹⁾

(1) Dept. of hematology, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 2) Dept. of Hematology 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 3) Dept. of Medical Genetics, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the promoter hypermethylation and transcription of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) gene, and explore the relationship between abnormal hypermethylation of SOCS1 and etiology of multiple myeloma (MM). **Methods** From January 2009 to June 2011, 54 bone marrow samples from MM patients presented at First and Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University were enrolled in the study. All bone marrow aspirates were investigated by MSP and RT-qPCR, and the MSP products were confirmed by auto DNA sequencing. **Results** SOCS1 hypermethylation was detected in all samples, and there was a significant difference between MM patients and the control group ($P < 0.05$). The sequencing results have provided evidence of methylation, but the relative expression of SOCS1 mRNA have no statistical differences in the study. **Conclusion** Abnormal methylation of SOCS1 might have an important role in pathogenesis of MM. However, the expression of SOCS1 might be affected by number of specimen, clinical treatment and some immunomodulatory cytokines.

[Key words] Suppressor of cytokine signaling 1; Multiple myeloma; Methylation

[基金项目] 云南省应用基础研究面上基金资助项目 (2009CD172)

[作者简介] 贺振新 (1985~), 男, 云南永胜县人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事血流内科临床工作.

[通讯作者] 刘琳. E-mail: lxweiwei916@yahoo.com.cn

细胞因子信号转导抑制因子1 (suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1) 是 SOCS 家族研究较为清楚的成员之一, 人类 SOCS1 基因定位在 16p13.13, 含有一个外显子, 基因全长 1776bp (人类基因组编号 HGNC 19383), mRNA 全长 1226bp, 编码 211 个氨基酸. 主要通过负向调控 JAK/STAT 通路调节白细胞介素 6 (IL-6), 干扰素 (IFN) 等细胞因子发挥其生物学作用^[1]. 在探索多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 中细胞因子转导网络、免疫异常分子机制及靶向治疗途径中, SOCS1 常作为研究的一项指标, 但其异常甲基化与表达的关系, 影响因素及在 MM 中的作用目前仍不清楚, 笔者对 MM 中 SOCS1 甲基化及其表达进行了研究, 现报道如下.

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2009 年 1 月至 2011 年 6 月在昆明医科大学第一附属医院和第二附属医院就诊的 54 例 MM 患者骨髓标本, 男性 35 例, 女性 19 例, 性别比: 1.84: 1, 年龄 38 ~ 79 岁, 平均 (63.44 ± 8.94)

岁, 包初诊患者 27 例 (男 17 例, 女 10 例), 复发患者 27 例 (男 18 例, 女 9 例). Durie-Salmon 分期: I 期 A 组 2 例, II 期 A 组 16 例, II 期 B 组 16 例, III 期 A 组 19 例, III 期 B 组 13 例. 所有患者均参照张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》进行诊断^[2]. 对照组为非血液肿瘤患者骨髓标本, 共 40 例, 男性: 15 例, 女性 25 例, 男女之比为: 0.60: 1, 年龄 19 ~ 68 岁, 平均 (43.23 ± 12.78) 岁. 根据知情同意原则, 已向所有实验组和对照组研究对象告知实验目的等相关事项, 并经所有研究对象同意, 签知情同意书.

1.2 研究方法

1.2.1 甲基化分析 使用人淋巴细胞分离液 (北京 Solarbio 科技有限公司) 分离标本单个核细胞, 基因组 DNA 小量制备试剂盒 (杭州 Axygen Biosciences 公司) 提取 DNA, EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (美国 ZYMO Research 公司) 修饰, Zymo Taq PreMix™ Kit (美国 ZYMO Research 公司) 进行 PCR 反应, CpG 甲基转移酶 (SssI, 美国 New England Biolabs 公司) 修饰阳性对照标本. 引物信息, 见表 1.

表 1 MSP 及 q-PCR 引物表
Tab. 1 MSP and q-PCR primer

引物名称	正向引物 5'→3'	反向引物 5'→3'	Tm (°C)	产物 (bp)
SOCS1 M-MSP	TTCGCGTGTATTTTTAGGTCGGTC	CGACACAACCTCTACAACGACCG	60	159
SOCS1 U-MSP	TTATGAGTATTTGTGTATTTTTAG-GTTGGTT	CACTAACAACACAACCTCTACAA-CAACCA	60	174
Socs1 mRNA	TATTACTTGCCT GGAACCATGTG	TCAAGAGGTGAGAAGGGGTCT	60	127
GAPDH mRNA	AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT T	AACCATGTAGTTGAGGTCAATGAG	60	112

1.2.2 MSP 产物测序 将 MSP 扩增产物 50 μL 冰盒保存, 送上海 Invitrogen 公司行全自动测序技术测序, 测序结果运用 DNASTAR 软件进行拼接, BiQ Analyzer 软件进行比对分析.

1.2.3 mRNA 表达分析 使用 TRIzol Reagent (美国 Invitrogen 公司) 提取单个核细胞总 RNA, RNase-Free DNase Kit (美国 Sigma 公司) 处理总 RNA, RNA 小量制备试剂盒分离柱 (杭州 Axygen Biosciences 公司) 纯化 RNA, Easy Script First-Strand cDNA Synthesis SuperMix Kit (北京 Transgen 公司) 合成 cDNA, Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG Kit (美国 Invitrogen 公司) 进

行定量 PCR, 引物信息, 见表 1. 计算样本 3 个平行管的平均 Ct, 然后按照相对表达量公式: 基因表达量 $\Delta Ct = \text{目的基因 Ct 值} - \text{内标基因 Ct 值}$, $\Delta \Delta Ct = \text{检测基因表达量} - \text{内参基因表达量}$, 相对表达量 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 表示.

1.3 统计学处理

利用 SPSS 统计软件包对所得数据进行统计分析. 甲基化情况分析采用四格表 χ^2 检验, 当 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义; 基因表达分析首先进行正态性检验, 如果符合正态分布以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行 t 检验; 如果计量资料不符合正态分布, 则以中位数 ± 四分位数间距进行描述,

采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲基化情况

MM 患者 SOCS1 基因启动子区甲基化状态的研究结果显示: 在 54 例 MM 患者中检出 SOCS1 基因启动子区甲基化阳性率为 16.67% (9/54); 40 例对照组甲基化阳性率为 0.00% (0/40), MM 组启动子区甲基化与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。根据性别、年龄、分期分组, 是否初诊, 是否分泌免疫球蛋白等因素对研究对象分组并进行统计学分析, SOCS1 基因启动子区甲基化, 与上述因素差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。甲基化电泳图见图 1

2.2 MSP 产物测序结果

实验结果证实甲基化的存在, 在 SOCS1 基因启动子区 MSP 产物理论上将会检出 19 处碱基发生 C→T 转换, 但具体碱基甲基化情况在标本之间有一定区别, 碱基位点发生甲基化频率由于阳性标本数量较少无法做出全面评估 (图 2、3)。

2.3 mRNA 表达结果

MM 患者 SCOS1mRNA 表达情况 (图 4、5) 实验数据显示: MM 组: (12.39 ± 18.32) Fold, 对照组: (13.51 ± 26.38) Fold, MM 组与对照组之间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 甲基化组: (17.00 ± 16.52) Fold, 非甲基化组: (16.45 ± 17.97) Fold; 组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 初诊组: (11.47 ± 23.15) Fold, 复发组: (18.93 ± 17.59) Fold, 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

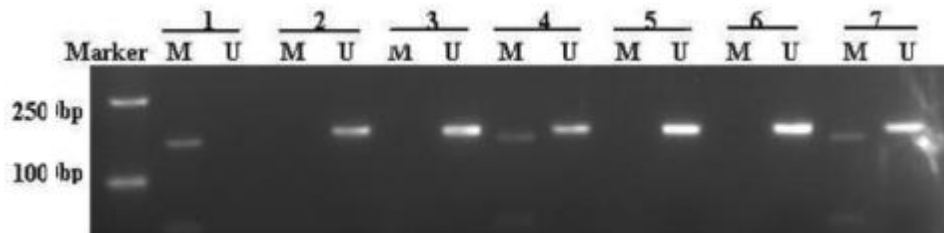


图 1 SOCS1 启动子区甲基化 MSP 扩增产物与非甲基化产物对比图

Fig. 1 Comparison of MSP amplified products and unmethylated products of SOCS1 promoter region

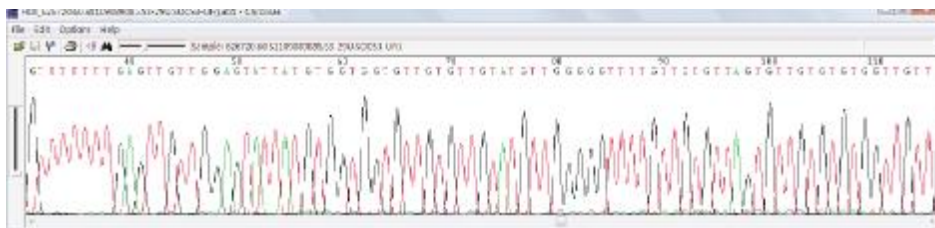


图 2 SOCS1 启动子区未甲基化产物部分测序图

Fig. 2 Sequencing of unmethylated SOCS1 promoter region

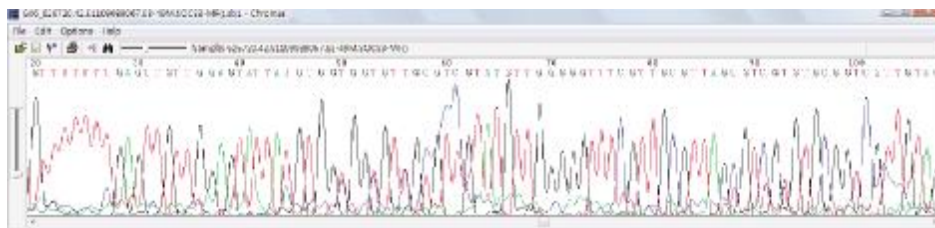


图 3 SOCS1 启动子区甲基化产物部分测序图

Fig. 3 Sequencing of methylated SOCS1 promoter region

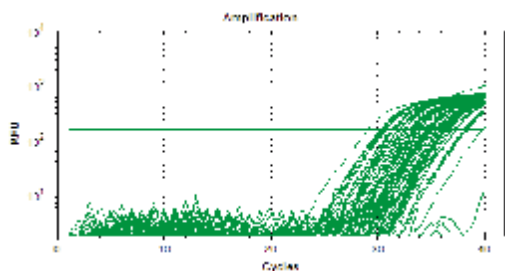


图4 SOCS1 qPCR 反应曲线

Fig. 4 SOCS1 q-PCR amplification

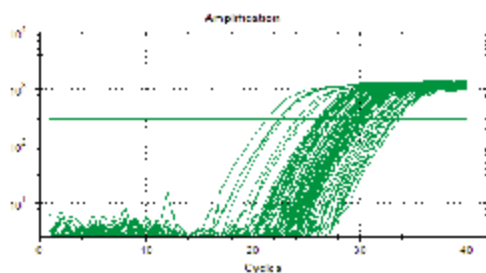


图5 GAPDH qPCR 反应曲线

Fig. 5 GAPDH q-PCR amplification

3 讨论

MM 中 SOCS1 基因异常甲基化的报道最早于 2003 年由 Galm^[3] 等利用 MSP 技术, 引用 Yoshikawa^[4] 设计的引物, 对 35 例骨髓瘤患者及 U266 和 XG1 骨髓瘤细胞系的研究证实: SOCS1 启动子区甲基化阳性率为 65.71% (23/35), SOCS1 基因异常甲基化能导致该基因沉默。随后, 他们对 56 例恶性浆细胞疾病患者进行 SOCS1、p16、p73、p15、MGMT(O6-methylguanine DNA methyltransferase)、TIMP-3 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-3) 等 11 对抑癌基因异常甲基化分析, 其中 46.4% 样本 SOCS1 基因甲基化^[5]。Yamamoto 等利用转染增强型腺病毒载体诱导 SOCS1 的表达, 发现能够抑制 IL-6 依赖型骨髓瘤细胞的增殖^[6]。以上的研究都说明 SOCS1 基因的异常甲基化分析可能对今后 MM 的诊断、临床治疗及预后判断都有重要意义。但 Melzner 等^[7] 采用 Galm 等提供的引物却没有得到预期结果; Depil 等^[8] 也认为 MM 中 SOCS1 存在异常甲基化对预后判断没有明显价值; Chim 等^[9] 利用 MSP 方法对 34 例 MM 患者 SOCS1 进行分析, 发现 SOCS1 基因启动子区 3' 端引物缺乏特异性, 5' 端引物特异但患者实验组未甲基化。

本研究的研究数据显示: 在 54 例多发性骨髓瘤患者中, SOCS1 基因启动子区甲基化阳性率为 16.67% (9/54); 在 40 例对照组中甲基化阳性率为 0.00% (0/40)。但阳性率低于 Galm 等报道的

65.71%, 其原因可能为: 本实验研究对象有二分之一 (27/54) 为复发病例, 初诊患者中 SOCS1 启动子区甲基化阳性率: 22.22% (6/27), 复诊患者为 11.11% (3/27), 接受治疗后导致 SOCS1 去甲基化可能是导致阳性率低于国外报道的主要原因, 这也提示其异常甲基化在 MM 的发病机制中可能起着重要作用。

彭小春等研究 54 例胃癌患者病理组织标本 SOCS1 时发现, SOCS1 异常甲基化与胃癌分化程度、淋巴结转移 TNM 分期相关^[10]。这提示: SOCS1 异常甲基化在肿瘤疾病诊断中具有一定的指导作用。本研究统计病例资料, 按照 Durie-Salmon 分期标准, 分别根据患者性别, 年龄, 分期, 分组, 初诊与复发, 异常球蛋白分泌情况等因素进行分组分析, 结果发现: SOCS1 启动子甲基化阳性率与上述因素未呈现明显相关性。这有待今后扩大样本量进一步分析, 为今后系统诊断及全面评估多发性骨髓瘤提供一定的依据。

MSP 产物测序结果显示: 在 SOCS1 启动子区理论上将检测出 19 处碱基位点发生甲基化。不同标本之间甲基化位点频率有一定差距, 这表明 SOCS1 启动子区异常甲基化是存在的, 并且呈现多位点发甲基化现象, 但碱基位点甲基化频率需要进一步扩大样本量对其进行分析。在 MM 疾病进展过程中可能存在 SOCS1 启动子区引物序列甲基化不完全, 或者是因为甲基化检测试剂修饰效率不同, 而导致 MSP 结果有一定差异; 同时, 本实验所检出的甲基化阳性标本均为甲基化与非甲基化共同表达, 这也提示可能在不同细胞中甲基化程度不一致或者同种细胞中同时存在甲基化与非甲基化的情况。

国内王鸣明等^[11] 采用甲基化特异性 PCR 技术探讨三氧化二砷 (As₂O₃) 对人多发性骨髓瘤细胞株 U266、RPM 18226 细胞内 SOCS1 基因甲基化状态的影响, 结果表明 As₂O₃ 可诱导 SOCS1 基因甲基化状态的改变, 使基因表达上调, 恢复其活性。我们采用 RT-qPCR 技术对 54 例患者标本进行 SOCS1 mRNA 表达检测, 总体结果与王明鸣等报道在未接受 As₂O₃ 治疗前 U266 细胞株相接近, 实验数据显示: MM 组 (12.39 ± 18.32) Fold 与对照组 (13.51 ± 26.38) Fold、甲基化组 (17.00 ± 16.52) Fold 与非甲基化组 (16.45 ± 17.97) Fold; 组间比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05); 初诊组 (11.47 ± 23.15) Fold 明显低于复发组 (18.93 ± 17.59) Fold, 虽然统计分析差异无明显统计学意义, 但并不能完全否定其生物学意义, 这可能与

临床治疗路径相关。目前常用的抗骨髓瘤靶向治疗药物中,以沙利度胺和雷利度胺为代表的免疫调节药物主要通过上调白介素 2 (IL-2) 和干扰素 γ (INF- γ) 等细胞因子的表达,增加细胞毒性 T 细胞活性,减少免疫抑制反应,加强机体对骨髓瘤细胞的杀伤作用,从而达到抗肿瘤目的^[12,13]。而 SOCS1 负反馈调节上述细胞因子,其表达可能会受到这些药物影响。今后扩大样本量及控制样本前后比较分析可能使得我们的这一推断更明确。

[参考文献]

- [1] YOSHIMURA A, NAKA T, KUBO M. SOCS proteins, cytokine signaling and immune regulation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7 (6): 454 - 465.
- [2] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准(3版)[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 232 - 235.
- [3] GAOLM O, YOSHIKAWA H, ESTELLER M, et al. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2003, 101(7): 2 784 - 2 788.
- [4] YOSHIKAWA H, MATSUBARA K, QIAN G S, et al. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity [J]. *Nat Genet*, 2001, 28(1): 29 - 35.
- [5] GALM O, WILOP S, REICHELT J, et al. DNA methylation changes in multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2004, 18(10): 1 687 - 1 692.
- [6] YAMAMOTO M, NISHIMOTO N, DAVYDOVA J, et al. S-uppressor of cytokine signaling-1 expression by infectivity-enhanced adenoviral vector inhibits IL-6-dependent proliferation of multiple myeloma cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(2): 194 - 202.
- [7] MELZNER I, PETER M. To the editor: silencing of the SOCS-1 gene by CpG methylation [J]. *Blood*, 2003, 102(4): 1 554 - 1 556.
- [8] DEPIL S, SAUDEMONT A, QUESNEL B. SOCS-1 gene methylation is frequent but does not appear to have prognostic value in patients with multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2003, 178(): 1 678 - 1 679.
- [9] CHIM C S, FUNG T K, CHEUNG W C, et al. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the JAK/STAT pathway [J]. *Blood*, 2004, 103(12): 4 630 - 4 635.
- [10] 彭小春, 马红莺, 王程强. 胃癌 SOCS1 异常甲基化及意义 [J]. *长江大学学报*, 2008, (5): 5 - 8.
- [11] 王鸣明, 朱琦, 任志宏, 等. 砷剂诱导多发性骨髓瘤细胞 SOCS1 基因去甲基化作用的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2008, 16(5): 1 064 - 1 068.
- [12] ANDERSON K C. New insights into therapeutic targets in myeloma [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011, 11(10): 184 - 190.
- [13] GORGUN G, CALABRESE E, SOYDAN E, et al. Immunomodulatory effects of lenalidomide and pomalidomide on interaction of tumor and bone marrow accessory cells in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2010, 116(17): 3227 - 3 237.

(2013-01-03 收稿)