

# BHMT 在急性髓系白血病治疗前后表达变化及机制研究

卢停 姜丽波<sup>(通讯作者)</sup> 王毓蕾 史超君 郭丽影 赵锴

齐齐哈尔医学院附属第二医院血液科, 黑龙江齐齐哈尔, 161000;

**摘要:** 目的: 探索在急性髓系白血病(AML)治疗前及缓解后 BHMT 基因的表达变化及机制研究。方法: 通过使用实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 BHMT 基因在 40 例初诊急性髓系白血病(AML)患者治疗前及完全缓解后及正常人 30 例骨髓中的表达情况。结果: BHMT 在初诊急性髓系白血病(AML)患者骨髓中相对表达量低于治疗后缓解组中的表达水平 ( $P < 0.05$ )。结论: BHMT 基因在急性髓系白血病中的表达水平较缓解后表达水平低, 考虑 BHMT 基因可能参与了急性髓系白血病的发生发展。

**关键词:** BHMT; RT-PCR; 急性髓系白血病 AML

**DOI:** 10. 64216/3104-9656. 25. 01. 015

AML 是因分化障碍和凋亡异常导致造血干细胞停滞在细胞分化的较早期阶段<sup>[1]</sup>。目前急性髓系白血病的发病机制尚不明确, 已了解的病因比较少见。随着科学技术的发展, 检测手段不断地更新, 现已了解染色体异常、基因突变和基因异常表达调控在白血病发病中起到关键作用<sup>[2-3]</sup>。因此, 发现更多的致病基因突变已成为目前的热点研究。有相关研究探索 BHMT (rs3733890) 与急性淋巴细胞白血病(ALL)的相关性。通过对 BHMT 基因变异的表征, 得出结果: BHMT (rs3733890) 与南印度人群 ALL 的相关性不显著。目前血液系统多种疾病与甲基化反应相关, 如急性髓系白血病及骨髓增生异常综合征等。目前尚无研究表明与血液系统疾病明确相关, 临床上已有部分药物为去甲基化治疗, 若因甲基化反应引起血液系统疾病, 是否可以通过甲基转移治疗血液系统疾病是我们需要思考的。因此为了进一步证明其相关性, 现在本研究将进一步检测 BHMT 治疗前后的表达变化, 从而更进一步探讨 BHMT 在急性髓系白血病发病过程中的具体机制, 为治疗急性髓系白血病提供新的治疗思路及新的诊疗依据。

## 1 研究对象

于 2016 年 1 月至 2022 年 1 月在齐齐哈尔医学院附属第二医院血液科初诊的 40 例 AML 患者, 同时留取患者完全缓解后骨髓标本。30 例正常人用于正常对照组。所有参与者均知情同意。

### 1.1 研究方法

#### 1.1.1 引物设计

PCR 引物是由华大基因有限公司合成。

BHMT-1: 5'-YGGTGGTTGGGAGGTTTT-3' & 5'-AAAACCTC  
ACCTTCTTAACCTTTTTACC-3'

BHMT-2: 5'-GYGYGTTTAGAATAGGGAGGAGTG-3' & 5'-TC  
TTACAACCACTCTACCCATTTT-3'

GAPDH: 5'-TTCGTCATGGGTGTGAAC-3' & 5'-CTGTGGTCA  
TGAGTCCTT-3'

#### 1.1.2 主要试剂及仪器

淋巴细胞分离液、Trizol Reagent(ambion)、FastKing gDNA Dispelling RTSuperMix (TIANGEN)、Talent qPCR PreMix (SYBR Green TIANGEN), PCR 仪器: Aria MX Real-Time PCR System (Agilent)。

#### 1.1.3 分离骨髓单个核细胞

取骨髓 2-4ml 注入含有 EDTA 抗凝管内。根据说明书加入淋巴细胞分离液, 按照相应步骤分离及收集骨髓的单个核细胞。

#### 1.1.4 总 RNA 提取

按照 Trizol Reagent(ambion)说明书进行提取 RNA, 提取 RNA 的 A260 /A280 在 1.8-2.0 之间。

#### 1.1.5 cDNA 逆转录

根据测定浓度将 RNA 均稀释至 200ng/ul, 根据 FastKing gDNA Dispelling RTSuperMix (TIANGEN) 的说明书进行 cDNA 的合成, 将合成的 cDNA 放置于 -20 °C 冰箱内保存。

#### 1.1.6 实时荧光定量 RT-PCR 反应

使用 Talent qPCR PreMix 配制 20 μL 体系: 2×

PreMix 10  $\mu$ L, ROX 0.4  $\mu$ L, 上下游引物 (10  $\mu$ M) 各 0.6  $\mu$ L, 稀释 cDNA 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 3min; 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 15s, 40 循环。设 2 复孔, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析数据,  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参}}) - \Delta Ct_{\text{正常人}}$ 。

## 1.2 统计学分析

结果用 GraphPad prism 9、SPSS 25 分析, 以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

PCR 结束后由 PCR 仪记录目的基因和内参的熔解曲线、扩增曲线及 CT 值等。熔解曲线表示 PCR 产物是否单一。扩增曲线表示各个标本是否有扩增, 表示标本均有明显扩增, 扩增率较高。反应结束后, 从计算机中读取 Ct 值, 每个样本 2 个复孔取平均 CT 值后, 计算  $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因值}}$ ,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{\text{正常人}}$ 。计算  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行相对定量。用 SPSS-23 软件进行分析。结果提示 BHMT 在初诊急性髓系白血病 (AML) 患者骨髓中相对表达量低于治疗后缓解组中的表达水平 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

对于急性白血病来说, 很多研究均表明, 疾病的发生、发展受多种因素的调控, 同时我们也发现很多种基因的表达式的高或低表达参与急性髓系白血病发生及发展, 很多基因的改变与白血病患者的预后相关<sup>[4-6]</sup>。同型半胱氨酸的再甲基化是由 B12 依赖性蛋氨酸合成酶 (MTR) 催化的肝脏和肾脏细胞中的 B12 非依赖性甜菜碱同型半胱氨酸甲基转移酶 (BHMT)。许多病因在癌症中, 一个未被探索的领域是与甲基化反应有关的基因变异。目前很多去甲基化相关基因可引起急性髓系白血病的发生, 目前阿扎胞苷及地西他滨广泛应用于临床上<sup>[7-9]</sup>。但 BHMT 的去甲基反应仍处于未知状态, 需要我们进一步研究。我们通过对于急性髓系白血病前后 BHMT 的表达量的不同, BHMT 在初诊急性髓系白血病 (AML) 患者骨髓中相对表达量低于治疗后缓解组中的表达水平 ( $P < 0.05$ )。考虑 BHMT 参与了急性髓系白血病的发生。总之, BHMT 基因在 AML 中存在异常表达, BHMT 在初诊急性髓系白血病 (AML) 患者骨髓中相对表达量低于治疗

后缓解组中的表达水平 ( $P < 0.05$ )。因此考虑其异常表达可能与急性髓系白血病的发生发展, 同时也为急性髓系白血病发病机制和临床研究提供了一定线索<sup>[10-11]</sup>。

胡莘研究<sup>[12]</sup>通过回顾性分析 170 例 T2DM 患者 (其中 DN 组 34 例, 占 20.00%) 发现, DN 组血清 BHMT 水平 ( $57.74 \pm 9.18$  pg/mL) 显著低于非 DN 组 ( $78.74 \pm 11.53$  pg/mL), 且与内脏脂肪面积 (VAF: DN 组  $113.62 \pm 18.74$  cm<sup>2</sup> vs 非 DN 组  $92.61 \pm 14.17$  cm<sup>2</sup>) 及肾功能指标 (Scr、BUN、UAER) 均呈负相关 ( $r < 0$ ,  $P < 0.05$ )。多元回归分析显示, 低水平 BHMT 是 DN 发生的独立保护因素 ( $OR < 1$ ,  $P < 0.05$ ), 其与 VAF 联合预测 DN 的 AUC 高于单一指标, 具有良好预测价值。BHMT 作为同型半胱氨酸再甲基化的关键酶, 其作用不仅限于代谢疾病。对于急性白血病而言, 疾病的发生发展与多种基因的表达调控密切相关。研究发现, BHMT 在初诊 AML 患者骨髓中的表达量显著低于治疗后缓解组, 提示其异常表达可能参与了 AML 的发病过程。

张艳秋<sup>[13]</sup>研究比较了 CAG 方案与维奈克拉联合阿扎胞苷治疗急性髓系白血病 (AML) 的疗效。结果显示, 联合组总缓解率显著高于 CAG 组 ( $86.67\%$  vs  $40.00\%$ ,  $P = 0.023$ ), 血小板输注量更少 ( $5.38 \pm 0.80$  U vs  $6.60 \pm 0.95$  U,  $P = 0.001$ ), 血小板及中性粒细胞恢复时间更短 ( $P < 0.05$ )。两组不良反应发生率无显著差异。研究表明, 维奈克拉联合阿扎胞苷在 AML 治疗中优于 CAG 方案。此外, 基因表达调控在 AML 发生发展中起关键作用, BHMT 作为一个与甲基化相关的重要基因, 在初诊 AML 患者中表达显著低于缓解组 ( $P < 0.05$ ), 提示其可能参与疾病进程, 为 AML 发病机制及治疗策略提供了新的研究方向。鉴于以上研究结果, 我们会进一步研究 BHMT 在急性髓系白血病中扮演的角色, 为急性髓系白血病的发病机制提供更多的线索。

## 参考文献

- [1] 陈灏珠, 钟南山, 陆再英. 内科学. 8 版. 北京: 人民卫生出版社. 2013: 578-579.
- [2] Mcrcer CA, Kaliappan A, Dennis PB. Macroautophagy-dependent, intralysosomal cleavage of a betaine homocystcine methyltransferase fusion protein requires stable multimerization[J]. Autoph

agy, 2008, 4(2): 185-194

[3]Pezzini A, Del zotto E, Archetti S, et al. Plasma homocysteine concentration, C677T MTHFR genotype, and 844ins68bp CBS genotype in young adults with spontaneous cervical artery dissection and atherothrombotic stroke [J]. Stroke, 2002, 33(3): 664-669.

[4]Collinsova M, Jiracek J, et al. Inhibition of betaine-homocysteine S-methyltransferase causes hyperhomocysteinemia mice[J]. J Nutr, 2006, 136(6): 1493-1497.

[5]Zou CG, Gao SY, Zhao YS, et al. Homocysteine enhances cell proliferation in hepatic myofibroblastic stellate cells[J]. J Mol Med (Berl), 2009, 87(1): 75-84.

[6]Biagini MR, Tozzi A, Marcucci R, et al. Hyperhomocysteinemia and hypercoagulability in primary biliary cirrhosis[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(10): 1607-1612.

[7]Ebrahimkhani MR, Sadeghipour H, Dehghani M, et al. Homocysteine alterations in experimental cholestasis and its subsequent cirrhosis[J]. Life Sci, 2005, 76(21): 2497-2512.

[8]Chen YM, Shiu JY, Tzeng SJ, et al. Characterization of glycine-N-methyltransferase-gene expression

in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 1998, 75(5): 787-793.

[9]Avila MA, Berasain C, Torres L, et al. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2000, 33(6): 907-914.

[10]Sun W, Xing B, Sun Y, et al. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis: novel protein markers in hepatocellular carcinoma tissues[J]. Mol Cell Proteomics, 2007, 6(10): 1798-1808.

[11]冷雪, 王剑波, 果修, 等. 人甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶 (BHMT) 表达及抗体制备[J]. 军事医学, 2011, 35(1): 35-38.

[12]胡苹, 代燕, 李富元, 葛明芹. 血清 BHMT 水平与 2 型糖尿病患者内脏脂肪面积的关系及其对糖尿病肾病的预测价值[J]. 中华内分泌外科杂志, 2024(4): 554-558.

[13]张艳秋. 比较急性髓系白血病治疗中 CAG 方案与维奈克拉联合阿扎胞苷的效果[J]. 中文科技期刊数据库 (文摘版) 医药卫生, 2024(002): 000.

项目名称: BHMT 在急性髓系白血病治疗前后表达变化及机制研究, 项目编号: LSF GG-2023075。