

网络出版时间: 2020-5-8 15:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200507.0934.028.html>

SOCS3 基因甲基化状态与儿童急性淋巴细胞白血病治疗反应及预后的相关性

江傲霜 王宁玲 刘亢亢 吴正玉 储金华 杨林海

摘要 目的 研究儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)中细胞因子信号转导抑制因子3(SOCS3)的DNA甲基化水平,探讨其与儿童ALL治疗反应及预后的相关性。方法 收集83例入组ALL患儿及21例健康儿童(健康对照组)骨髓标本,分别采用逆转录定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)和甲基化特异性PCR技术对ALL初诊组、完全缓解组、复发组及正常儿童骨髓单个核细胞中SOCS3 mRNA表达水平和SOCS3基因甲基化水平进行检测,采用SPSS 17.0软件进行统计分析,分析SOCS3 mRNA表达水平和SOCS3基因甲基化水平之间的关系、SOCS3基因甲基化水平与ALL患儿治疗反应的关系;并采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,比较SOCS3甲基化状态与累积复发率(CIR)和总生存率(OS)的相关性。结果 ① ALL患儿初诊组、复发组SOCS3 mRNA的表达水平明显低于健康对照组儿童SOCS3 mRNA的表达水平($P < 0.05$),完全缓解组患儿SOCS3 mRNA的表达水平基本恢复正常;② 初诊组、复发组、完全缓解组ALL患儿的SOCS3基因甲基化水平明显高于健康对照组($P < 0.05$);初诊组及复发组ALL患儿的SOCS3基因甲基化水平明显高于完全缓解组($P < 0.05$);③ 运用中位数方法将ALL患儿SOCS3基因甲基化水平分为高水平组和低水平组,42个月随访结果显示SOCS3甲基化高水平组CIR明显高于低表达水平组($P < 0.05$),但两组的OS比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 SOCS3基因甲基化导致SOCS3的低表达,监测SOCS3甲基化水平可有助于了解儿童ALL的治疗反应及预后,通过去甲基化调节SOCS3 mRNA的表达可能成为儿童ALL靶向治疗的新方向。

关键词 儿童;急性淋巴细胞白血病;细胞因子信号转导抑制因子-3;甲基化;治疗反应;预后

中图分类号 R 725.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)05-0795-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.05.028

2020-01-09 接收

基金项目 安徽省卫生和计划生育委员会科研项目(编号:13FR026);安徽医科大学2016-2017年度校科研基金(编号:2017xkj035);安徽医科大学第二附属医院“火花计划”科研项目(编号:2015hhjh09)

作者单位 安徽医科大学第二附属医院儿科,合肥 230601

作者简介 江傲霜,女,硕士研究生;

王宁玲,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: zwnl126@126.com

儿童急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)是儿童恶性肿瘤中最常见类型^[1],其发病机制极其复杂,研究表明白血病的发生可能与Janus 蛋白质酪氨酸激酶(janus protein tyrosine, JAK)/信号转导因子和转录激活子3(singal transducer and activator of transcription 3, STAT3)信号通路的异常持续活化有关^[2],细胞因子信号转导抑制因子3(cytokine signaling 3, SOCS3)作为一种可能的抑癌基因,是JAK/STAT3信号转导通路的重要抑制因子,在多种恶性肿瘤中可发现SOCS3启动子区域的胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤位点(CpG位点)高甲基化,从而引起SOCS3基因的表达下调或缺失^[3]。这些已经成为国内外针对恶性肿瘤发病机制及特异性靶向治疗的研究热点,但国内外针对SOCS3基因甲基化及转录水平与儿童ALL病程和预后的相关性研究少有报道。该研究通过检测儿童ALL疾病不同阶段的SOCS3甲基化及mRNA表达水平,并与正常儿童进行对照研究,以探讨其与儿童ALL的治疗反应及预后的关系,从而为SOCS3是否能作为儿童ALL特异性靶向治疗点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择2015年1月~2016年11月就诊于安徽医科大学第二附属医院儿科血液病区的新诊断的ALL患儿作为研究对象,纳入及排除标准参照文献^[4],共83例ALL患儿纳入研究,随访时间截止至2018年6月,同时选择21例健康儿童作为正常对照组。入组ALL患儿均完善骨髓细胞学、免疫分型、染色体核型分析及融合基因检测(TEL-AML基因、E2A-PBX基因、BCR-ABL基因、MLL基因重排等),根据初诊时临床及生物学特点,危险度分为低危(low risk, LR)、中危(moderate risk, MR)、高危(high risk, HR)3组。根据治疗第19天和第46天骨髓微小病变残留水平(minimal residual disease, MRD)调整危险度,按照CCCG-ALL-2015方案进行序贯化疗,总疗程2.5年。该研究已经获得安徽医科大学第二附属医院医学伦理委员会的批准(NO.

201501) 根据赫尔基宣言,所有入组患儿监护人均签署临床研究知情同意书、化疗知情同意书、废弃标本用于科研同意书,对照组健康儿童在入组前由监护人签署废弃标本用于科研同意书。

1.2 骨髓单个核细胞提取 用无菌 EDTA 抗凝管留取 ALL 患儿和正常儿童骨髓血 2 ml,加入 Ficoll 分离液(天津生物科技有限公司),参照说明书提取骨髓单个核细胞。

1.3 RNA 提取和逆转录定量聚合酶链式反应(reverse transcriptional quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 用 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司)从骨髓标本中提取 RNA。用 QuantiTect (德国 Qiagen GmbH 公司)逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因为参照基因,用 qRT-PCR 进行 cDNA 定量检测。SOCS3 mRNA 前引物序列: 5'-CAGCTCCAAGAGCGAGACCA-3'; SOCS3 mRNA 后引物序列: 5'-AGAAGCCGCTCTCCTGCAG-3'; 内参基因 GAPDH 前引物序列: 5'-AATGGAAAT CCCATCACCATCT-3'; GAPDH 后引物序列: 5'-CGCCCACTTGATTTTGG-3'。根据数据结果运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算 mRNA 相对表达量。

1.4 细胞 DNA 提取及甲基化特异性 PCR 反应 参照 DNA 提取试剂盒说明书提取细胞 DNA 后,用紫外分光光度计测定 DNA 的纯度和浓度,取 0.5 μ g DNA 样品(A260 nm/280 nm 比值在 1.7~2.0)进行亚硫酸盐修饰,按照 MethylCode™ Bisulfite 转化试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明书对 cDNA 进行处理,使抽提到的 DNA 中未发生甲基化的胞嘧啶通过亚硫酸氢盐处理后全部转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶不变。SOCS3 甲基化水平检测以亚硫酸氢钠修饰 DNA 为模板,采用亚硫酸氢钠测序法检测 SOCS3 基因甲基化水平。用上海 Invitrogen 公司设计和合成的巢式亚硫酸氢钠测序 PCR 引物对 CpG 岛进行扩增。第一轮引物序列,上游为 5'-TTGATTYGTAGGTGAT-3',下游为 5'-ACCTTTATATATATATATATATACACATACTC-3'(扩增片段 555 bp); 第二轮引物序列,上游为 5'-GAGTATATAAGAAGGT-3',下游为 5'-TCCTATATATACCC-3'(扩增片段 408 bp)。用 1.5% 琼脂糖凝胶把 PCR 产物电泳后,用凝胶回收试剂盒进行回收纯化,然后用氨苄西林耐药的 TA 克隆进行连接反应。从每个平板中筛选出 10 个克隆,接种于 2 ml LB 培养基中,37 °C 培养过夜。最后送上海 Invitrogen 公司进行测序,分析测

序结果中,○代表未发生甲基化的 CG 位点,●代表发生甲基化的 CG 位点。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,GraphPad 6.0 作为制图软件。计数资料采用百分数进行卡方检验及 Fisher 确切概率处理数据;计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示并用方差分析处理数据。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 SOCS3 mRNA 水平;采用秩和检验法分析 SOCS3 基因甲基化水平与临床特点及治疗反应的关系;采用 Kaplan-Meier 曲线绘制总生存率(overall survival, OS)和累积复发率(cumulative incidence of relapse, CIR)曲线,单因素预后分析采用对数秩 Log-Rank 卡方检验法,以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般结果 83 例 ALL 患儿纳入研究,男 43 例,女 40 例,中位年龄 6.2 岁(7 月~14 岁),21 例健康儿童作为健康对照组,男 13 例,女 8 例,中位年龄 6.3 岁(10 月龄~14 岁)。ALL 患儿组与健康对照组在性别比率及年龄构成比之间差异无统计学意义($P < 0.05$)。ALL 患儿与健康对照组儿童一般临床资料见表 1。

2.2 儿童 ALL 化疗前后 SOCS3 mRNA 表达水平

83 例 ALL 患儿按照 CCG-ALL-2015 方案按序规范化治疗后,9 例复发,74 例完全缓解。测定 83 例患儿初诊时和健康对照组儿童的 SOCS3 mRNA 表达水平显示,初诊(1.024 ± 0.584)及复发组(0.796 ± 0.384)患儿 SOCS3 mRNA 的表达水平明显低于健康对照组(3.459 ± 1.118)。儿童 SOCS3 mRNA 的表达水平($P < 0.05$);完全缓解组患儿 SOCS3 mRNA 的表达水平基本恢复正常,与初诊组 SOCS3 mRNA 的表达水平差异具有统计学意义(3.021 ± 0.549 vs 1.024 ± 0.584 ; $P < 0.05$),而与健康对照组儿童 SOCS3 mRNA 的表达水平比较差异无统计学意义(3.021 ± 0.549 vs 3.459 ± 1.118 ; $P > 0.05$)。

2.3 SOCS3 基因甲基化状态与治疗反应的相关性

运用甲基化特异性 PCR 检测初诊组、复发组、完全缓解组及健康对照组儿童的 SOCS3 基因甲基化水平,结果显示:初诊组、复发组、完全缓解组患儿的 SOCS3 基因甲基化水平检测阳性率不等,而健康对照组儿童 SOCS3 基因甲基化均未检出。初诊组、复发组、完全缓解组 ALL 患儿的 SOCS3 基因甲基化水平明显高于健康对照组($P < 0.05$);初诊组及复发组 ALL 患儿的 SOCS3 基因甲基化水平明显高于完全

缓解组($Z=4.539, 3.044; P<0.05$) ,见表 2、图 1。

表 1 ALL 及健康对照组儿童一般临床资料

特性	健康对照组 ($n=21$ 例)	ALL 患儿 ($n=83$ 例)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)	6.3(10月~14岁)	6.2(7月~14岁)	4.874	0.303
≤1	3	2	5.285	0.071
1~10	14	66		
>10	4	15		
性别(男/女)	13/8	43/40	0.688	0.407
白细胞中位值 ($\times 10^9/L$)	5.45(3.5~9.5)	16.72(0.86~704.06)	1.706	0.790
≤50	21	53		
>50	0	30		
危险度分组				
LR	-	30		
MR	-	48		
HR	-	5		
骨髓原始幼稚细 胞中位值(%)	-	82.5(35.0~96.4)		
免疫分型				
B 细胞型 ALL	-	73		
T 细胞型 ALL	-	10		
染色体核型				
未见核分裂相	-	6		
正常核型	-	16		
异常核型	-	61		
融合基因				
TEL-AML	-	13		
E2A-PBX	-	2		
BCR-ABL	-	5		
MLL 重排	-	2		
治疗反应				
复发	-	9		
完全缓解	-	74		

复发: 定义为骨髓幼稚细胞 $\geq 20\%$ 或髓外有白血病细胞浸润证据; 完全缓解: 定义为外周血中性粒细胞计数 $\geq 1.0 \times 10^9/L$ 、血小板计数 $\geq 100 \times 10^9/L$ 及血红蛋白浓度 $\geq 90 g/L$,骨髓幼稚细胞 $\leq 5\%$,且无髓外白血病细胞浸润的任何证据。

表 2 ALL 组和对照组患者 SOCS3 基因甲基化的表达水平

组别	阳性率(%)	甲基化密度(中位数, %)
初诊	29.0	25.32(8.22~48.52)*#
复发	37.0	29.21(14.30~42.32)*#
完全缓解	14.0	4.43(2.22~15.25)*
健康对照	0	0

与健康对照组比较: * $P<0.05$; 与缓解组比较: # $P<0.05$

2.4 ALL 患儿初诊时 SOCS3 基因甲基化高水平组和低水平组临床特点比较 按照中位数法将初诊组 83 例患儿 SOCS3 基因甲基化水平分为高水平组和低水平组 ,高水平组中位甲基化密度为 31.14%(25.32%~48.52%) ,低水平组中位甲基化密度为 15.22%(0~25.19%) ,比较 SOCS3 基因甲基化高

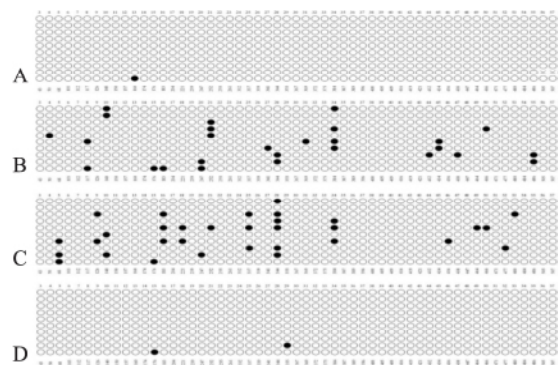


图 1 ALL 患儿化疗前后 SOCS3 基因甲基化水平

A: 健康对照组; B: 初诊组; C: 复发组; D: 完全缓解组; ○代表未发生甲基化的 CG 位点; ●代表发生甲基化的 CG 位点

水平组和低水平组 ALL 患儿在年龄、性别、初诊外周血白细胞计数及骨髓原始幼稚细胞、危险度分组、免疫分型、细胞遗传学改变、治疗反应中的差异。结果显示 ,初诊 SOCS3 甲基化高水平组有更高的外周血白细胞计数 ,与低水平组之间的差异有统计学意义($P<0.05$)。SOCS3 甲基化高水平组有更多的中高危险度病例 ,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。此外 ,SOCS3 甲基化高水平组的复发病例高于 SOCS3 甲基化低水平组 ,差异有统计学意义($P<0.05$) ,而化疗后 SOCS3 甲基化高水平组与低水平组比较 ,其治疗完全缓解率差异无统计学意义($P>0.05$) ,见表 3。

将包括初诊年龄、外周血白细胞计数、危险度分组、SOCS3 基因甲基化分组纳入 Cox 比例风险模型进行多因素分析 ,结果表明: 初诊外周血白细胞计数 $> 50 \times 10^9/L$ 、SOCS3 基因甲基化高水平组患儿复发率高 ,差异具有统计学意义($P<0.05$) ,相对危险度及 95% 置信区间分别为 2.348(1.331~4.142)、0.397(0.209~0.751)。

2.5 SOCS3 基因甲基化水平与预后的相关性 基于 SOCS3 基因甲基化水平的 42 个月总生存率(overall survival, OS)和累积复发率(cumulative incidence of relapse, CIR)的 Kaplan-Meier 曲线见图 3 ,SOCS3 基因甲基化高水平组 CIR 明显高于低水平组($P<0.05$) ;而 SOCS3 基因甲基化高、低水平组总生存率之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

SOCS3 作为负性调节 JAK/STAT 信号转导通路的重要抑制蛋白之一 ,在胰腺癌、乳腺癌、肝癌等多种实体肿瘤中发现肿瘤细胞中均有 SOCS3 的表达

表3 初诊组 ALL 患儿 SOCS3 基因甲基化高水平组和低水平组临床特点比较

临床特点	SOCS3 甲基化密度		单因素分析		多因素分析	
	Q1-Q2 高水平组(n = 41)	Q3-Q4 低水平组(n = 42)	χ^2 值	P 值	HR(95% CI)	P 值
中位年龄(岁)	4.3(3 ~ 12)	4.5(0.58 ~ 14)	0.325	0.608		
性别[n(%)]			6.724	0.358		
男	25(61.0)	20(47.6)				
女	16(39.0)	22(52.4)				
白细胞数中位值($\times 10^9$ /L)	82.35(0.86 ~ 704.06)	14.20(2.03 ~ 119.28)	8.325	0.004	2.35(1.33 ~ 4.41)	0.035
危险度[n(%)]			26.312	0.017	0.9(0.7 ~ 1.1)	0.491
LR	11(26.8)	19(45.2)				
MR	28(68.3)	20(47.6)				
HR	2(4.9)	3(7.1)				
髓原始幼稚细胞中位值(%)	90.2(42.3 ~ 93.3)	89.7(35.0 ~ 96.4)	10.088	0.825		
免疫分型(%)			4.475	0.067		
B-ALL	38(92.7)	35(83.3)				
T-ALL	3(7.3)	7(16.7)				
细胞遗传学[n(%)]			10.160	0.802		
正常	7(17.1)	9(21.4)				
异常	34(82.9)	33(78.6)				
复发	6(14.6)	3(7.1)	9.561	0.012	0.40(0.21 ~ 0.75)	0.036
完全缓解	35(85.4)	39(92.9)	0.087	0.739		

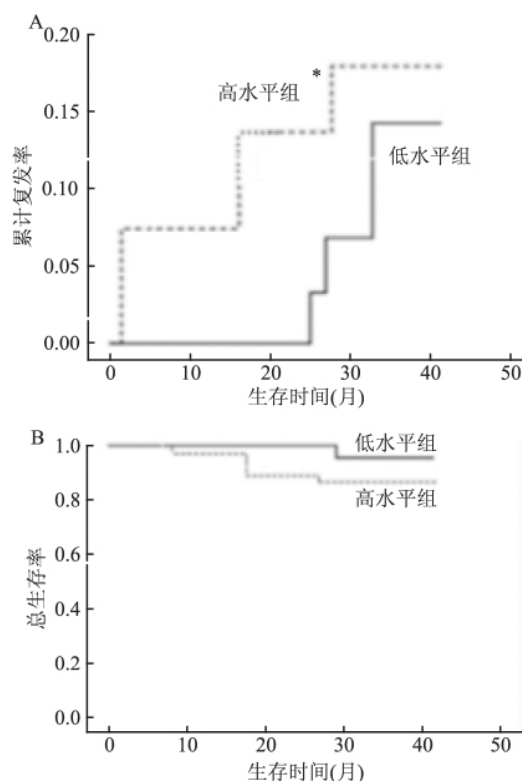


图3 ALL 患儿 SOCS3 基因甲基化高、低水平组的生存分析

A: 累积复发率比较; B: 总生存率比较; 与低水平组比较: * $P < 0.05$

下调^[5-7]。为探讨 SOCS3 在儿童 ALL 不同病程中的变化,本研究采用 qRT-PCR 技术检测了 ALL 患儿不同病程 SOCS3 mRNA 的表达水平,结果显示,初诊及复发阶段 SOCS3 mRNA 的表达水平明显低于健康对照组儿童,完全缓解阶段 SOCS3 mRNA 的表达水平基本恢复正常。以上结果证实 SOCS3 也参

与了儿童 ALL 的发生和发展,其表达水平与儿童 ALL 治疗反应密切相关。SOCS3 在复发状态的再次减低提示 SOCS3 mRNA 的表达水平在病程中的再次减低可能作为评估体内残留肿瘤细胞水平升高的指标,但其特异性有待进一步研究。

针对 SOCS3 在恶性肿瘤中的低表达分子机制引起众多学者的关注和兴趣,本课题组前期研究结果表明小儿 ALL 初诊阶段 SOCS3 的表达水平与 STAT3 的水平呈负相关,SOCS3 在 ALL 儿童中的低表达可以导致 ALL 中 STAT3 的异常持续活化^[4],然而 SOCS3 基因表达下降的原因尚不清楚。在基因表达调控的研究中表明,最常见的基因修饰是 DNA 甲基化,在多种恶性肿瘤中均存在基因启动子启动子区域甲基化改变^[8],且研究表明 SOCS3 的异常甲基化有助于 JAK/STAT 信号转导通路的异常激活,从而影响肿瘤的发生、发展及侵袭过程^[2]。本研究组运用甲基化特异性 PCR 检测初诊组、复发组、完全缓解组即代表儿童 ALL 不同病程阶段的 SOCS3 基因启动子区域甲基化水平,探讨 SOCS3 基因表达降低的可能机制。结果显示 ALL 患儿不同病程的 SOCS3 基因甲基化水平明显高于健康对照组,提示 SOCS3 甲基化引起的 SOCS3 基因表达下调对儿童 ALL 的发生和发展具有重要意义。

有关学者在针对肝细胞癌的研究中发现,SOCS3 表达与肿瘤分化程度、血管浸润及复发有关,SOCS3 甲基化在肿瘤组织中的频率和强度都有所增加,SOCS3 甲基化与肝细胞癌患者不良的临床结局

显著相关,SOCS3 表达水平及 SOCS 3 甲基化水平可作为评估肝癌预后的相关指标^[7]。在本课题组前期研究中发现 SOCS3 高表达组具有更高的外周血白细胞计数、乳酸脱氢酶水平及更多的预后不良基因病例^[9]。为进一步讨论 SOCS3 甲基化对 SOCS3 表达及 ALL 患儿治疗反应及预后的影响,本研究针对 SOCS3 甲基化水平与治疗反应及预后的相关性作出分析,结果显示 SOCS3 甲基化水平的差异与儿童 ALL 初诊外周血白细胞计数、疾病危险度相关。SOCS3 甲基化低水平组患儿具有更高的外周血白细胞计数,且具有更多的中危组和高危组病例。

本研究中患儿初诊时 SOCS3 甲基化水平升高,完全缓解后较前减低,复发后再次升高,提示 SOCS3 甲基化水平可反映白血病负荷程度。结合 42 个月随访结果显示 SOCS3 甲基化高水平组复发率明显高于低表达水平组,提示 SOCS3 甲基化水平与复发明显相关,多因素分析提示 SOCS3 甲基化水平是影响复发率的重要危险因素之一。相关研究表明 SOCS3 通过调控 STAT3 参与肿瘤的发生及演进,SOCS3 高度甲基化从而促使 SOCS3 基因沉默,无法负性调节 JAK2/STAT3 通路,从而促使 STAT3 的过度激活,诱发慢性炎症有关的细胞因子,如 IL-6、M-CSF、COX2 等,这些因子又通过相关受体激活间质细胞中的 STAT3,STAT3 在肿瘤细胞和肿瘤基质细胞之间形成反馈环,促进炎症肿瘤微环境的形成,从而增强肿瘤的侵袭和转移^[10-11]。该研究证实了这一过程,提示 SOCS3 高度甲基化参与儿童 ALL 复发过程,SOCS3 甲基化水平能否作为监测复发后患儿治疗疗效的指标也是本课题组进一步的研究方向。但 SOCS3 甲基化高水平组和低水平组的总生存率之间差异无统计学意义,分析原因可能是与完成整个 CCG-ALL-2015 方案疗程停药的患者较少、随访时间较短相关。SOCS3 甲基化水平是否能作为评估儿童 ALL 的远期预后指标有待继续跟踪随访观察。

该研究表明 SOCS3 基因高度甲基化导致 SOCS3 基因表达下调,与儿童 ALL 的发生、发展、复

发密切相关,这一结果启发我们应用去甲基化试剂恢复体内 SOCS3 表达功能,从而重新实现对 JAK/STAT 信号转导通路的负性调节作用,抑制肿瘤细胞增殖,促进凋亡,可能有助于控制儿童 ALL 的恶化趋势。SOCS3 基因能否作为治疗儿童 ALL 的新靶点有待研究组进一步探究。

参考文献

- [1] Gabriel A S, Lafta F M, Schwalbe E C, et al. Epigenetic landscape correlates with genetic subtype but does not predict outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Epigenetics*, 2015, 10(8): 717-26.
- [2] Roncero A M, López-Nieva P, Cobos-Fernández, et al. Contribution of JAK2 mutations to T-cell lymphoblastic lymphoma development [J]. *Leukemia*, 2016, 30(1): 94-103.
- [3] Boosani C S, Agrawal D K. Methylation and microRNA-mediated epigenetic regulation of SOCS3 [J]. *Mol Biol Rep*, 2015, 42(4): 853-72.
- [4] 黄玲玲,王宁玲,吴正玉,等. 儿童急性淋巴细胞白血病中 SOCS3 通过 STAT3 信号通路调节 Treg 细胞表达 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(3): 458-61.
- [5] Wang J, Zhou H, Han Y, et al. SOCS3 methylation in synergy with Reg3A overexpression promotes cell growth in pancreatic cancer [J]. *J Mol Med*, 2014, 92(12): 1257-69.
- [6] Wenwen Z, Mengmeng J, Jieying C, et al. SOCS3 suppression promoted the recruitment of CD11b + Gr-1-F4/80-MHCII- early-stage myeloid-derived suppressor cells and accelerated interleukin-6-related tumor invasion via affecting myeloid Differentiation in Breast Cancer [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1699-719.
- [7] Wei L, Huang Y, Zhao R, et al. Detection of promoter methylation status of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in tissue and plasma from Chinese patients with different hepatic diseases [J]. *Clin Exp Med*, 2018, 18: 79-87.
- [8] 刘玲,陈艳,李卉,等. 食管癌细胞株 Eca109 中 cdc42 基因启动子区 CpG 岛甲基化调控报告基因的表达 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(5): 691-5.
- [9] 吴正玉,王宁玲,刘亢亢,等. 儿童急性淋巴细胞白血病 SOCS3 mRNA 的表达水平与临床特点、早期治疗反应的相关性 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2017, 25(5): 1367-72.
- [10] 蒋树龙,花宝金. JAK2/STAT3/SOCS3 信号通路与肿瘤转移 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21(6): 698-702.
- [11] Torun D, Nevruz O, Akyol M, et al. Methylation of SOCS3 in myeloproliferative neoplasms and secondary erythrocytosis/thrombocythemia [J]. *Turk J Hematol*, 2013, 30(1): 13-8.

Correlations of SOCS3 methylation status with treatment outcome and prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia

Jiang Aoshuang, Wang Ningling, Liu Kangkang, et al

(Dept of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the promoter methylation level of the cytokine signaling 3 (SOCS3) in
(下转第 803 页)

of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(28): 25481–9.

of short-chain fatty acids and their G-protein-coupled receptors in autoimmune neuroinflammation [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 8837.

[10] Park J, Wang Q, Wu Q, et al. Bidirectional regulatory potentials

Construction of RAW264.7 cell line with *gpr41* gene knockout based on CRISPR-Cas9 technology

Su Cong¹, Xu Fangming², Wu Ting², et al

(¹Dept of Infectious Diseases, The Chaohu Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 238000;

²Dept of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract To construct RAW264.7 cell line with G-protein-coupled receptor 41 (*gpr41*) gene knockout by CRISPR-Cas9 gene editing technique. Lentivirus was used to transfect Cas9 protein into macrophages. gRNA targeting *gpr41* gene was designed to target the functional region of *gpr41* gene, and pLenticrisprV2 recombinant plasmid transformed DH5 α competent cells were constructed to screen out recombinant sequencing to verify the effectiveness of gRNA. The pLenticrisprV2-*gpr41*-gRNA recombinant plasmid was transfected with the macrophage line RAW264.7 using transfection reagent. The expression of *gpr41* gene was detected by Western blot. Sequencing results confirmed the successful construction of pLenticrisprv2-*gpr41*-gRNA recombinant plasmid. Western blot selection of recombinant plasmid pLenticrisprv2-*gpr41*-gRNA 3 transfected RAW264.7 cell No. 13 monoclonal strain showed no expression of GPR41 protein. CRISPR-Cas9 gene editing technique was used to successfully construct a macrophage line with *gpr41* gene knockout, which laid the foundation for studying the mechanism of *gpr41* gene in RAW264.7 cells.

Key words CRISPR-Cas9 technology; *gpr41*; macrophages; gene knockout

(上接第 799 页)

children with acute lymphoblastic leukemia(ALL), and to explore its correlation with the treatment outcome and prognosis for ALL children. **Methods** The SOCS3 mRNA and methylation levels in bone marrow mononuclear cells were detected in 83 cases of newly diagnosed ALL at initial diagnosis, completely remission, relapse and 21 healthy control children through reverse transcription quantitative polymerase chain reaction(qRT-PCR) and methylation-specific PCR, respectively. SPSS 17.0 software was employed for statistical analysis to analyze the relationship between the level of SOCS3 mRNA expression and the methylation level of SOCS3 gene, the relationship between the methylation level of SOCS3 and the treatment outcome of the children with ALL. Meanwhile, The methylation level of SOCS3 gene in children with ALL was classified into high or low level group by the median method. The correlations of SOCS3 methylation status with the cumulative incidence of relapse rate(CIR) and overall survival rate(OS) were compared. **Results** The SOCS3 mRNA expression levels in initial diagnosis group and relapse group were remarkably lower than that in healthy control group($P < 0.05$). The methylation level of SOCS3 in ALL children was evidently higher than that in healthy control group($P < 0.05$). The results of 42 months follow-up showed that the CIR in high level group was dramatically higher than that in low level group($P < 0.05$), but there was no significant difference in the OS between these two groups($P > 0.05$). **Conclusion** SOCS3 methylation leads to low expression of SOCS3, and monitoring the SOCS3 methylation level can help to understand the treatment outcome and prognosis for ALL children.

Key words children; acute lymphoblastic leukemia; cytokine signaling 3; methylation; therapeutic response; prognosis