

锌指蛋白 ZFX 在儿童 B 系急性淋巴细胞性白血病中的表达及意义

王卓 梁欢欢 李本尚 黄小航 张婧 王翔 丁丽霞 江华

(上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心血液肿瘤科,上海 200127)

[摘要] 目的 研究儿童 B 系急性淋巴细胞性白血病(B-ALL)患者骨髓单个核细胞中 X 染色体耦联锌指蛋白(ZFX)的表达及其与白血病预后的关系。方法 通过 Western blot 方法检测白血病细胞株(REH、HL-60、NB4、K562)中 ZFX 蛋白的表达;利用 PCR 方法扩增获得全长 ZFX,并测序验证;通过实时定量 PCR 检测 82 例初发 B-ALL 儿童骨髓样本,24 例 B-ALL 缓解期样本,以及 64 例骨折或先天性心脏病手术患儿样本(对照组)ZFX 的表达;并根据治疗 3 年内有无骨髓或中枢神经系统复发分为预后好组和预后差组,比较两组患儿初发时骨髓中 ZFX mRNA 的表达水平。结果 ZFX 蛋白在白血病细胞株 REH、HL-60、NB₄ 和 K562 中均有表达。初发 ALL 组骨髓中 ZFX mRNA 表达高于对照组($P<0.01$);ALL 缓解组 ZFX mRNA 表达明显低于 ALL 初发组($P<0.01$);预后差的 ALL 患儿初发骨髓中 ZFX mRNA 的表达高于预后好的患儿($P<0.05$)。结论 ZFX 在儿童 B-ALL 中高表达,且预后差组表达相对较高,提示它可能在 B-ALL 预后判断中有重要意义。 [中国当代儿科杂志,2013,15(7):509-513]

[关键词] X 染色体耦联锌指蛋白;淋巴细胞性白血病;儿童

Expression of zinc finger protein X-linked in childhood B lineage acute lymphoblastic leukemia

WANG Zhuo, LIANG Huan-Huan, LI Ben-Shang, HUANG Xiao-Hang, ZHANG Jing, WANG Xiang, DING Li-Xia, JIANG Hua. Department of Hematology and Oncology, Shanghai Children's Medical Center Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China (Jiang H, Email: jiang_hua18@sina.cn)

Abstract: Objective To study the expression of zinc finger protein X-linked (ZFX) in bone marrow mononuclear cells (BMMCs) of children with B lineage acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) and its relationship with prognosis. **Methods** The expression of ZFX in human leukemia cell lines (REH, HL-60, NB₄ and K562) was measured by Western blot. ZFX gene was cloned by PCR from one patient and DNA sequencing technology was used to confirm it. Real-time PCR was used for detecting ZFX mRNA expression in the BMMCs of 82 children with newly-diagnosed B-ALL, 24 children with complete remission (CR) after induction therapy and 64 control children (fracture or congenital heart disease patients). According to the presence of bone marrow or central nervous system relapse during a follow-up of 3 years, the patients were identified as having a good or poor prognosis. Their ZFX mRNA levels in BMMCs at diagnosis were compared. **Results** ZFX protein was expressed in human leukemia cell lines REH, HL-60, NB₄ and K562. ZFX mRNA expression was significantly higher in the newly-diagnosed ALL group than in the control group ($P<0.01$). ZFX mRNA expression in the ALL CR group was significantly reduced compared with the newly-diagnosed ALL group ($P<0.01$). Children with a poor prognosis had significantly higher ZFX mRNA levels at diagnosis than those with a good prognosis ($P<0.05$). **Conclusions** ZFX is over-expressed in children with B-ALL and its levels are higher in those with a poor prognosis than those with a good prognosis, which suggests that ZFX is important in the prognosis evaluation of B-ALL.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(7):509-513]

Key words: Zinc finger protein X-linked; Lymphoblastic leukemia; Child

急性淋巴细胞性白血病(ALL)是儿童时期最常见的血液系统肿瘤。随着近年来各种治疗手段和检测技术的应用,其疗效显著提高,但仍有部分患者疗效差。因此,选择合适的判断预后指标并根据其调整治疗方案和手段,以期达到提高患者无病生存率,是目前国内外研究的热点之一^[1]。

[收稿日期]2013-01-20;[修回日期]2013-02-27
[基金项目]国家自然科学基金(30973217);上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金(ZZjbox12122)。
[作者简介]王卓,男,博士,医师。
[通信作者]江华,副主任医师。

ZFX 蛋白是锌指蛋白超家族中的一员。ZFX 基因定位于哺乳动物的 X 染色体上,其表达具有高度保守性,其结构包含一个酸性转录激活区、一个核定位序列及一个含有 13 个 C2H2 的锌指结构 DNA 结合位点^[2]。2007 年有报道首次显示 ZFX 具有调控胚胎干细胞和造血干细胞自我更新作用^[3],此后国际上对其功能进行了许多研究。目前研究发现 ZFX 基因在多种类型的干细胞和肿瘤细胞中均有高表达,并与肿瘤恶性程度密切相关^[4-8]。其在白血病中的研究尚无报道。因此,本研究拟通过检测 ZFX 在儿童 B 系 ALL 中的表达,探讨其与 ALL 预后的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

研究对象为 2005 年 5 月至 2006 年 12 月在上海儿童医学中心确诊为 B-ALL 的初治患者 82 例。随访截止日期为 2012 年 5 月。根据研究目的将患儿分为:(1)初治组:男 48 例,女 34 例,中位年龄 7 岁(7 个月至 13 岁);(2)缓解组:82 例患儿均在诱导治疗后达到完全缓解,从中随机选择 24 例,其中男 13 例,女 11 例,中位年龄 6.2 岁(8 个月至 12 岁);(3)预后差组:82 例患儿中治疗 3 年内出现骨髓或中枢神经系统复发的患儿初治时骨髓,共 20 例,其中男 13 例,女 7 例,中位年龄 4.4 岁;(4)预后好组:自 82 例患儿中随机选择 20 例在治疗 3 年内无骨髓或髓外复发等事件发生的患儿初治时骨髓,其中男 10 例,女 10 例,中位年龄 4.3 岁。对照组 64 例,取自我院骨折或先天性心脏病手术患儿,男 34 例,女 30 例,中位年龄为 5.2 岁(6 个月至 14 岁)。所有标本收取均在家长知情同意后进行。

1.2 主要试剂及仪器

Trizol 试剂(Invitrogen)、人淋巴细胞分离液(中国瀚洋生物公司);SYBR Green Real-time PCR Master(TaKaRa)、ZFX 抗体(Cell signaling);RT-PCR 仪器(ABI PRISM7900)。

1.3 实验方法

1.3.1 骨髓单个核细胞分离 取骨髓 2 mL 或静脉血 5 mL 抗凝管保存,用生理盐水 1:1.5 稀释,然后按淋巴细胞分离液说明书操作进行单个核细胞的分离(1500 rpm 30 min)。

1.3.2 RNA 提取及 cDNA 链合成 按照 Trizol 试剂盒要求进行总 RNA 的抽提,紫外分光光度计测定抽提质量并定量。按逆转录试剂盒操作步骤逆转录合成 cDNA,储存于 -20℃ 冰箱备用。

1.3.3 引物设计及合成 引物如下:ZFX-F:5'-GTGAGCCTGAGAATGATCATGGAG-3', ZFX-R:5'-GTTGCTGAAATCGCTGACGAAGT-3',扩增目的片段长度:145 bp;采用 GAPDH 基因作为内参照,其引物序列为:GAPDH-F:5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3', GAPDH-R:5'-TAGCCCAGGATGCCCTTGAG-3',扩增目的片段长度 99 bp。ZFX 基因全长 2418 bp,针对其编码序列设计上下游引物,分别带有 EcoRI 和 XhoI 酶切位点。上游引物为:5'-CGTGAATTCATGGATGAAGATGGGCTTG-3';下游引物为:5'-TCACTCGAGTTAGGGCAGGCCAACTTCT-3'。引物由上海生工合成。

1.3.4 实时定量 PCR 分析 利用 SYBR Green 染料在 ABI PRISM7900 PCR 仪上检测基因的表达。反应体系:上下游引物各 1 μL, cDNA 2 μL, H₂O 6 μL, SYBR Green Real-time PCR Master 10 μL, 总反应体系 20 μL。反应条件:95℃ 预变性 30 s, 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 45 s 扩增 45 个循环。反应完成后,软件将自动进行数据分析计算出 Threshold cycle (Ct 值)。每份标本扩增 3 复管,取其均值计算其表达水平并计算患儿和正常儿童表达差异值。 $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{GAPDH})$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{患儿}) - \Delta Ct(\text{对照})$ 。 $2 - \Delta\Delta Ct$ 即基因相对表达量^[9]。

1.3.5 蛋白提取和 Western blot 分析 用 2 × SDS 加样缓冲液裂解细胞,收集蛋白质,采用考马斯亮兰法进行定量。经 10% SDS-PAGE 电泳分离、转膜和封闭后,依次加入一抗(4℃ 过夜);加入二抗(室温孵育 1 h),洗膜后 ECL 化学发光剂显色, X 线胶片曝光后显影。以 β-actin 作为内参^[10]。

1.3.6 细胞培养 人胚肾细胞株 293T、人白血病细胞株 REH、HL-60、NB4 和 K562 细胞均购自中科院上海细胞库。细胞株在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640(Invitrogen 公司)培养基 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养^[11]。

1.4 质粒构建及鉴定

利用 PCR 扩增 ZFX 基因。反应条件为:94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 58℃ 45 s, 72℃ 3 min, 36 个循环;72℃ 终延伸 5 min。琼脂糖凝胶电泳鉴定。胶回收试剂盒回收 PCR 产物。PCR 产物与质粒均用 EcoRI 和 XhoI 双酶切,琼脂糖凝胶电泳切胶回收目的基因与质粒,经 T4DNA 连接酶过夜连接,并转化感受态细胞。18 h 后挑选单克隆细菌进行菌落 PCR 和培养扩增后进行质粒抽提和 DNA 测序验证。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 14.0 软件包进行统计学分析,组间

比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZFX 基因的克隆

ZFX 基因全长 2418 bp,设计针对全长序列的上下游引物进行 PCR,引物两端分别带上了合适的酶切位点。在一份 ALL 患儿的骨髓标本(1669 号)中获得了 ZFX 基因的全长序列(图 1A)。ZFX 全长片段经酶切后与载体连接和转化,次日进行菌落 PCR 阳性克隆和测序验证(图 1B~D)。

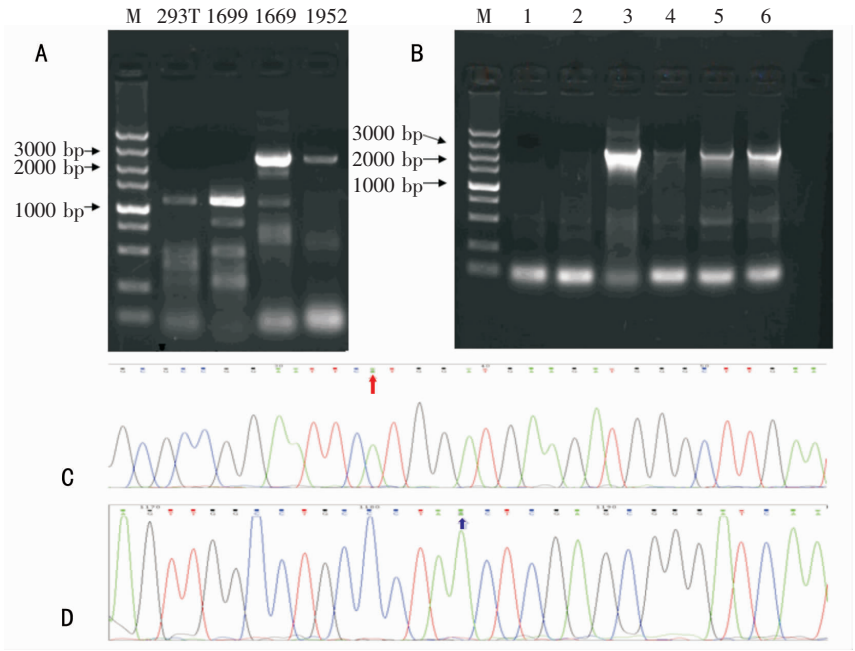


图1 ZFX 基因克隆 A:ZFX 基因克隆凝胶电泳图(从 1669 号标本获得 ZFX 全长序列);B:ZFX 基因的菌落 PCR 凝胶电泳图;3,5,6 泳道可见阳性克隆;C:ZFX 克隆测序结果-N 端插入序列(图中箭头处为 ZFX 基因起始密码子 ATG,前面为克隆酶切位点 GAATTC);D:ZFX 克隆测序结果-C 端插入序列(图中箭头处为 ZFX 基因终止密码子 TAA,后面为克隆酶切位点 CTCGAG)。

2.2 各种白血病细胞株中 ZFX 蛋白的表达

Western blot 检测显示,白血病细胞株 REH、HL-60、NB4 和 K562 均有 ZFX 蛋白表达(图 2),提示 ZFX 基因在多种白血病细胞株中广泛表达。

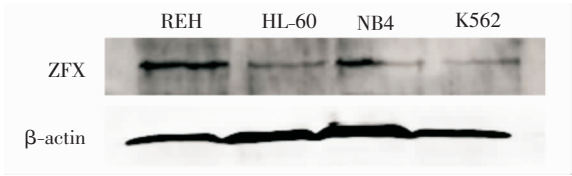


图2 各种白血病细胞株中 ZFX 蛋白表达

2.3 实时定量 PCR 引物筛选、扩增曲线及溶解曲线

以克隆 ZFX 基因的全长序列为阳性对照,进行引物和反应条件优化,筛选出 ZFX 基因实时定量 PCR 引物(图 3)。目的产物扩增良好,无引物二聚体。大多数标本在循环数内达到平台期,溶解曲线为单峰,说明产物扩增特异性好,没有非特异性扩增。

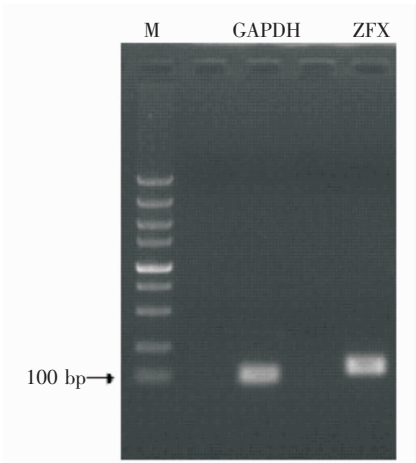


图3 ZFX 基因实时定量 PCR 引物筛选 内参照 GAPDH 扩增大小为 99 bp;ZFX 扩增大小为 145 bp。

2.4 儿童 ALL 中 ZFX mRNA 的表达

实时定量 PCR 检测 82 份初发 ALL 患儿的骨髓、24 份缓解后的骨髓标本、预后好组 20 例、预后差组 20 例以及 64 份对照儿童骨髓样本中 ZFX mRNA 表

达水平。结果显示,将对照组表达定为1,则初发 ALL 患儿骨髓中 ZFX mRNA 相对表达量为 2.68 ± 0.87 , 显著高于对照组 ($P < 0.01$); 骨髓缓解后患儿的 ZFX mRNA 相对表达量为 0.05 ± 0.02 , 显著低于初发 ALL 组 ($P < 0.01$)。见图 4。

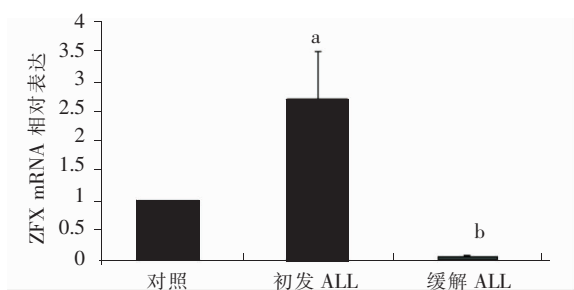


图 4 各组 ZFX 的表达水平 a: 与对照组相比, $P < 0.01$; b: 与初发 ALL 组相比, $P < 0.01$ 。

为进一步检测 ZFX 基因是否与儿童 ALL 的预后相关,本研究选择了 20 份预后好的骨髓样本和 20 份预后差(后期复发)的初发时骨髓样本进行了 ZFX 基因的实时定量 PCR 检测,结果显示,将预后好组表达定为 1,预后差组患儿初发骨髓中 ZFX 基因的相对表达量为 19.07 ± 1.16 , 显著高于预后组的患儿 ($P < 0.05$), 见图 5。

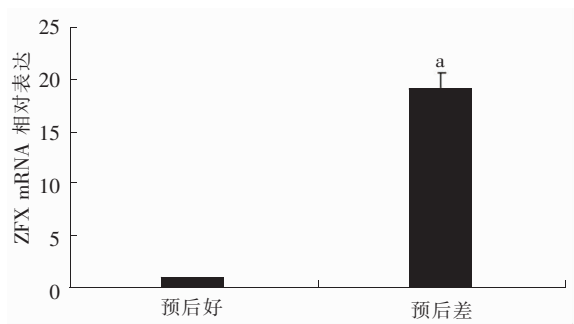


图 5 ZFX 在预后好与预后差组中的表达 a: 与预后好组相比, $P < 0.05$ 。

3 讨论

ZFX 蛋白是含有短的稳定的能与锌离子结合并自我折叠形成“手指”结构的一类蛋白质。由于其结构特点,锌指蛋白可选择性地结合特异的靶结构,在多种生理过程中发挥重要作用,包括基因的表达调控、细胞分化、胚胎发育等生理过程^[12-13]。ZFX 是一重要的转录调控因子,其主要参与调控细胞周期、细胞死亡及肿瘤相关基因的转录^[14]。

研究报道 ZFX 基因主要参与哺乳动物的性别

决定^[15]。但后来研究发现,ZFX 蛋白是胚胎干细胞和造血干细胞的共同转录因子,也是维持胚胎干细胞和成体造血干细胞自我更新的重要基因,还是干细胞自我更新的共同分子基础^[3]。ZFX 在胚胎干细胞自我更新是通过抗凋亡作用实现,但在造血干细胞的自我更新中是否也是通过抗凋亡作用还有待研究^[16]。目前研究发现在胚胎干细胞中,ZFX 通过直接激活干细胞中共有靶基因和调控干细胞特异性基因,包括 Tbx3 和 Tc11,实现胚胎干细胞的调控自我保持和促进自我更新的作用^[17-18]。

肿瘤细胞同样具有自我更新能力,可以通过增殖和分化作用重新构成肿瘤细胞,是促进肿瘤发生发展、增殖和转移的关键^[19-20]。ZFX 在干细胞中发挥重要作用,提示其在肿瘤细胞中的作用很可能与其在胚胎干细胞和成体造血干细胞中的作用类似。

目前有研究报道 ZFX 基因在多种类型肿瘤细胞中表达增高,现已发现 ZFX 在前列腺癌、喉癌、脑胶质细胞瘤、胃癌、淋巴瘤等常见肿瘤中均表达异常。在前列腺癌组织中 ZFX 表达显著高于正常毗邻组织及良性前列腺增生的组织;在前列腺癌细胞株研究中,ZFX 低表达可抑制细胞增殖和克隆形成,并最终诱导癌细胞凋亡^[4]。喉癌的研究中发现 ZFX 的高表达与喉癌的侵袭性正相关,抑制 ZFX 表达促进细胞凋亡可阻止肿瘤细胞生长^[5]。ZFX 在脑胶质细胞瘤组织和细胞株中均高表达,抑制 ZFX 表达后细胞增殖受抑制,凋亡增加,细胞周期停滞在 S 期,提示其在脑胶质细胞瘤的细胞增殖、细胞周期以及凋亡过程中起到关键作用^[6]。在胃癌的研究中,研究人员发现 ZFX 基因表达与肿瘤类型和分期密切相关^[7]。关于淋巴瘤的研究,报道显示与反应性淋巴结增生相比,滤泡状淋巴瘤中 ZFX 表达上调;淋巴瘤细胞 ZFX 表达较反应性淋巴结增生明显增高^[8]。

本研究首次报道了 ZFX 在儿童 B-ALL 中的临床研究。本研究发现多种白血病细胞株 ZFX 蛋白均有不同程度表达,提示 ZFX 在白血病细胞中存在广泛表达;与对照组相比,初治 B-ALL 组患儿 ZFX 表达显著增高,并在治疗缓解后表达显著下降;而在长期随访病人中,预后差组初诊时骨髓单核细胞中的 ZFX 表达较预后好者显著高表达,提示 ZFX 可能在 B-ALL 预后判断中具有重要的意义。由于本研究病例数较少,与预后相关的合适的 ZFX 表达水平范围还有待于大样本病例的进一步研究。由于白血病细胞具有不同程度 CD34 阳性这一造血干细胞特征性标记的表达,因此提示 ZFX 在白血病细胞的自

我更新中可能也起着重要的作用,它能否起到抗凋亡、恶性增殖作用,以及其在白血病中的调控机制有待于深入研究。

[参 考 文 献]

[1] Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukemia [J]. *Lancet*, 2008, 371(9617): 1030-1043.

[2] Schneider GA, Beer RP, Brown LG. Putative transcription activator with alternative isoforms encoded by human ZFX gene[J]. *Nature*, 1989, 342(6250): 708-711.

[3] Galan-Cardad JM, Harel S, Arenzana TL, Esther Hou Z, Doetsch FK, Mirny LA, et al. Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells[J]. *Cell*, 2007, 129(2): 345-357.

[4] Jiang H, Zhang L, Liu J, Chen Z, Na R, Ding G, et al. Knock-down of zinc finger protein X-linked inhibits prostate cancer cell proliferation and induces apoptosis by activating caspase-3 and caspase-9[J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(10): 684-689.

[5] Fang J, Yu Z, Lian M, Ma H, Tai J, Zhang L, et al. Knockdown of zinc finger protein, X-linked (ZFX) inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 360(1-2): 301-307.

[6] Zhou Y, Su Z, Huang Y, Sun T, Chen S, Wu T, et al. The Zfx gene is expressed in human gliomas and is important in the proliferation and apoptosis of the human malignant glioma cell line U251[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30: 114. doi: 10.1186/1756-9966-30-114.

[7] Nikpour P, Emadi-Baygi M, Mohammad-Hashem F, Maracy MR, Haghighjooy-Javanmard S. Differential expression of ZFX gene in gastric cancer[J]. *J Biosci*, 2012, 37(1): 85-90.

[8] Sakhinia E, Glennie C, Hoyland JA, Menasce LP, Brady G, Miller C, et al. Clinical quantitation of diagnostic and predictive gene expression levels in follicular and diffuse large B-cell lymphoma by RT-PCR gene expression profiling[J]. *Blood*, 2007, 109(9): 3922-3928.

[9] Saha MN, Jiang H, Mukai A, Chang H. RITA inhibits multiple myeloma cell growth through induction of p53-mediated caspase-dependent apoptosis and synergistically enhances nutlin-induced cytotoxic responses[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(11): 3041-3051.

[10] Wang Z, Cao L, Kang R, Yang M, Liu L, Zhao Y, et al. Autophagy regulates myeloid cell differentiation by p62/SQSTM1-mediated degradation of PML-RAR α oncoprotein [J]. *Autophagy*, 2011, 7(4): 401-411.

[11] 王卓,胡婷,曹励之,康睿,赵明一,俞燕,等. 儿童急性淋巴细胞白血病及阿霉素所致 Jurkat 细胞凋亡时 WAVE1 的表达研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(5): 620-624.

[12] Chandrasekharan S, Kumar S, Valley CM, Rai A. Proprietary science, open science and the role of patent disclosure: the case of zinc-finger proteins [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(2): 140-144.

[13] Schnidar H, Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, Kasper M, Hauser-Kronberqer C, et al. Epidermal growth factor receptor signaling synergizes with Hedgehog/GLI in oncogenic transformation via activation of the MEK/ERK/JUN pathway[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(4): 1284-1292.

[14] Hu G, Kim J, Xu Q, Leng Y, Orkin SH, Elledge SJ. A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(7): 837-848.

[15] Schneider-Gadicke A, Beer-Romero P, Brown LG, Nussbaum R, Page DC. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation [J]. *Cell*, 1989, 57(7): 1247-1258.

[16] Cellot S, Sauvageau G. Zfx: at the crossroads of survival and self-renewal[J]. *Cell*, 2007, 129(2): 239-241.

[17] Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference [J]. *Nature*, 2006, 442(7102): 533-538.

[18] Matoba R, Niwa H, Masui S, Ohtsuka S, Carter MG, Sharov AA, et al. Dissecting Oct3/4-regulated gene networks in embryonic stem cells by expression profiling[J]. *PLoS ONE*, 2006, 20(1): e26.

[19] Arenzana TL, Smith-Raska MR, Reizis B. Transcription factor Zfx controls BCR-induced proliferation and survival of B lymphocytes [J]. *Blood*, 2009, 113(23): 5857-5867.

[20] Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. Cancer stem cells in nervous system tumors[J]. *Oncogene*, 2004, 23(43): 7267-7273.

(本文编辑:邓芳明)