

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.09.008

论著·临床研究

急性 B 淋巴细胞白血病患儿的 IKZF1 编码蛋白 IKAROS 异常表达研究

黄小航 陈静 李本尚

(上海儿童医学中心血液肿瘤科, 上海 200127)

[摘要] 目的 分析急性 B 淋巴细胞白血病 (B-ALL) 患儿的骨髓标本 IKAROS (IK) 亚型, 探讨异常 IK 亚型的发生频率与预后的关系, 并初步研究其相关机制。方法 选择初发 B-ALL 患儿 137 例, 利用巢式 PCR、Sanger 测序等分子生物学方法对其进行 IK 亚型的表达分析, 并采用生存曲线探讨异常 IK 亚型发生频率与预后的关系。结果 137 例初发 B-ALL 患儿中, 仅表达 IK1 和 / 或 IK2 (a) 正常亚型的患儿 105 例, 32 例具有异常 IK 亚型表达, 其中 16 例表达 IK6, 14 例表达 IK4, 2 例表达 IK7, 且表达正常 IK 亚型与表达异常 IK 亚型组间 2.5 年无事件生存率差异有统计学意义 ($P=0.01$)。生存曲线分析结果显示, 将 IK6 亚型剔除出异常 IK 亚型组后, IK4+IK7 组与正常 IK 亚型组间生存率差异无统计学意义 ($P=0.527$), 而 IK6 组生存率仍明显低于正常 IK 亚型组 ($P=0.001$)。本研究亦从 21 例复发患儿中, 获取 10 对初-复发成对样本进行 IK 亚型分析, 发现其中 8 对存在 IK 亚型表达从初发状态到复发状态不连续情况; 且 21 例复发患儿的复发样本中 IK6 亚型检出率高达 62%, 明显高于 137 例初发患儿 IK6 亚型检出率 (12%)。结论 IK6 亚型的表达可作为 B-ALL 不良预后的标志, 且其于复发样本中的高发生率表明, IK6 亚型的表达与 B-ALL 复发密切相关。

[中国当代儿科杂志, 2013, 15(9): 743-747]

[关键词] IKZF1; 急性 B 淋巴细胞白血病; 预后; 儿童

The abnormal expression of IKZF1 encoded protein-IKAROS in B-ALL children

HUANG Xiao-Hang, CHEN Jing, LI Ben-Shang. Hematology and Oncology, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai 200127, China (CHEN J, Email: chenjingcmcc@hotmail.com)

Abstract: Objective To analyze the isoforms of IKAROS in the bone marrow samples from children with acute B-lineage lymphoblastic leukemia (B-ALL) and to investigate the relationship between frequency of dominant-negative (DN) IKAROS isoforms and prognosis of B-ALL, and to preliminarily study the relevant mechanism. **Methods** A total of 137 children with newly diagnosed B-ALL, who sequentially entered the Department of Hematology and Oncology, Shanghai Children's Medical Center between January 2005 and September 2010, were included in the study. Nest-PCR, Sanger sequencing, and TA cloning were used to analyze the expression of IKAROS isoforms in these children. The relationship between frequency of DN IKAROS isoforms and prognosis of B-ALL was investigated. **Results** Of the 137 children with newly diagnosed B-ALL, 16 had expression of IK6, 14 had expression of IK4, and 2 had expression of IK7. There was significant difference in 2.5-year event-free survival between the cohorts of DN IKAROS and non-DN IKAROS ($P=0.01$). Analysis of the 10 paired of diagnosis/relapse samples from 10 patients with recurrence showed that 8 of 10 paired diagnosis and relapse samples had inconsistent expression of IKAROS isoforms. The rate of IK6 expression in relapse samples from 21 relapse ALL patients was significantly higher than in the 137 children with newly diagnosed ALL (62% vs 12%, $P<0.01$). **Conclusions** Expression of DN IKAROS isoforms can be a poor prognostic factor in B-ALL and is closely associated with recurrence of B-ALL.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(9): 743-747]

Key words: IKZF1; Acute B-lineage lymphoblastic leukemia; Prognosis; Child

人类 IKZF1 基因定位于 7p12^[1-2], DNA 序列全长 125 kb, 共有 8 个外显子, 其编码蛋白 IKAROS

[收稿日期] 2012-08-07; [修回日期] 2012-10-08

[作者简介] 黄小航, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 陈静, 教授。

是一种极为重要的造血转录调控因子,属锌指蛋白家族成员,尤其在淋巴系造血方面发挥着关键性调控作用^[2-3]。IKAROS蛋白具有两个功能域,一为邻近N端由4个锌指结构域组成的DNA结合区(由4、5、6号外显子编码),具有DNA结合能力与转录活性;另一为邻近C端由2个锌指结构域组成的二聚体形成区(由8号外显子编码),参与IKAROS蛋白二聚体的形成。由于IKZF1基因外显子的可变剪接,目前已发现IKZF1具有13种不同的转录本,其相应的蛋白亚型分别为:IK1、2、2a、3、3a、4、4a、5、6、7、8、9、10。各种蛋白亚型之间差异主要在于N端DNA结合区中锌指结构不同程度的缺失,从而影响DNA结合能力和转录活性。IKAROS蛋白必须具有3个及以上的N端锌指结构才具有正常的DNA结合能力,如IK1、2、2a、3、3a,称为长型IK,能发挥转录调节作用;而少于3个N端锌指结构域的IKAROS蛋白,如IK4、4a、5、6、7、8、9、10,称为短型IK,其DNA结合能力下降或丧失。但无论是长型IK还是短型IK,相互间仍能通过C端二聚体形成区形成纯(或杂)二聚体。当短型IK与长型IK形成二聚体时,该杂合二聚体的DNA结合和转录调节能力较长型纯二聚体能力降低,称为显性负相型(dominant negative isoform, DN型)二聚体,影响淋巴系造血调控。据国外报道, DN型IKAROS在急性B淋巴细胞白血病(acute B-lineage lymphoblastic leukemia, B-ALL)患儿中的表达率为10%~20%,其在具有融合基因BCR-ABL⁺的ALL中表达率较高,可达80%^[4-7]。且表达DN型IKAROS的患者通常具有高复发率和低生存率的特点^[8-10]。本研究通过对137例B-ALL患儿的IKAROS亚型分析,探讨DN型IKAROS的发生频率与预后的关系。

1 资料与方法

1.1 研究样本

137例初发B-ALL患儿于2005年1月至2010年9月序贯进入上海儿童医学中心接受正规治疗,最小年龄为7个月,最大为15岁,中位年龄为4.8岁,其中男85例,女52例;21例临床证实复发的B-ALL患儿亦于上海儿童医学中心接受治疗,最小年龄为4个月,最大为13岁,中位年龄为8.0岁。以上样本均经临床症状及实验室检查MICM分型确定白血病亚型。样本收集均获得患儿家属知情同意及医院伦理委员会的批准。

1.2 样本制备

1.2.1 基因组DNA抽提 取患儿骨髓1.5 mL,经枸橼酸钠抗凝,使用QIAGEN血液基因组DNA试剂盒提取基因组DNA,操作按试剂盒说明进行,提取的DNA于-20℃冰箱保存。

1.2.2 总RNA抽提及反转录 采集患儿骨髓1.5 mL,经EDTA抗凝,使用TRIzol法提取细胞总RNA。再用PCR仪行RNA反转录,条件为70℃ 10 min, 4℃适当时间, 20℃ 10 min, 6℃ 60 min, 95℃ 5 min, 4℃ ∞。反转录所得cDNA于-20℃冰箱保存。

1.3 PCR扩增

对IKZF1基因cDNA片段采用巢式PCR进行目的片段扩增,PCR反应按TaKaRa公司试剂盒说明书进行。反应体系25 μL: 10× buffer 2.5 μL; dNTP (10 mM) 2 μL; Extag HS 酶 0.2 μL; cDNA 1 μL; 上下游引物各 1 μL; ddH₂O 17.3 μL。扩增条件: 95℃预变性 2 min; 95℃变性 30 s, 退火(外围片段为62℃,内围片段为64℃) 30 s, 72℃延伸 90 s, 循环 38/28次(外围片段为38个循环,内围片段为28个循环); 72℃充分延伸 5 min。对IKZF1基因组DNA采用普通PCR方式对3、4、5、6号外显子进行扩增,反应体系同巢式PCR。扩增条件: 95℃预变性 2 min; 95℃变性 30 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 90 s, 循环 30次; 72℃充分延伸 5 min。引物序列见表1。

表1 引物序列及片段大小

引物序列（5'→3'）		产物大小 （bp）
巢式-PCR		
外围	正向：CATGTCCCAAGTTTCAGGGAA	1222
	反向：GGTCAGGTAGATGAGACCGCT	
内围	正向：TCCAAGAGTGACAGAGTCGT	814
	反向：CGTTGTTGATGGCTTGTCAT	
PCR		
外显子3	正向：TATGCATCCCAGCAGAGAAGC	405
	反向：ATCCTGCTGATCTTTGTGCC	
外显子4	正向：TTGCAATGACACTGAGTGGC	371
	反向：ATGCTTTCTCCTTCAAACCC	
外显子5	正向：ATTGACCCAGCCAGTGAAGC	442
	反向：TTAGCCAGCAAGGACACAATCC	
外显子6	正向：ATTCCCCTTACACAGAAGGC	450
	反向：TATCCTAGGAGTTTCTCCC	

1.4 cDNA序列分析结果

所有PCR产物均经割胶回收纯化(AXYGEN生物公司产品)后使用ABI3730测序仪进行测序分析。

1.5 融合基因分析

利用多色 RT-PCR 仪对儿童常见融合基因进行检测, 包括: BCR-ABL、AML1/ETO、CBFB-MYH11、PML/RAR α 、MLL-AF4、TEL-AML1 和 E2A-PBX1。

1.6 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计学软件对数据进行统计学分析, 非正态分布计量资料以中位数 (四分位间距) [$M(QR)$] 表示, 两组独立样本间比较采用 Wilcoxon 秩和检验; 计数资料用百分率 (%) 表示, 组间比较采用卡方检验; 生存曲线采用 Kaplan-Meier 生存函数绘制, 生存率以生存百分率 (标准误) [% (SE)] 表示, 组间比较采用 log-rank 差异比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IKAROS 亚型在初发患儿中的筛查结果

从初发 B-ALL 的 137 例患儿中随机选取经治疗后达到完全缓解状态的 30 例患儿的 cDNA 标本作为阴性对照 (图 1), 其中有 2 例仅表达 IK1, 其余均共同表达 IK1 和 IK2。对 137 例初发 ALL 患儿进行分析, 观察到以下几种 IKAROS 亚型: IK1、IK2、IK2a、IK4、IK6 和 IK7, 以上亚型均经测序分析鉴定, 其中 IK1 在 124 例患儿中有表达, IK2 (a) 在 126 例患儿中有表达, IK4 在 14 例患儿中有表达, IK6 在 16 例患儿中有表达, IK7 在 2 例患儿中有表达, 其余亚型未发现, 且 IK6 亚型与 BCR-ABL⁺ 高频伴发 (50%)。

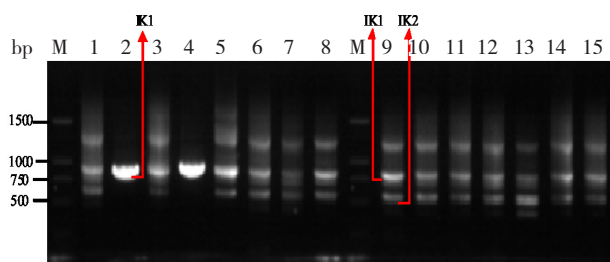


图 1 完全缓解 B-ALL 患儿 cDNA 标本 PCR 结果 从 30 例患儿中截取 15 例患儿标本的电泳图, 其中有 2 例仅表达 IK1, 其余均共同表达 IK1、IK2。M: marker; 1~15: 患儿标本。

2.2 初-复发成对样本中 IK 亚型的表达与分布

21 例临床证实复发的患儿中, 共收集到 10 例初-复发成对样本进行 IK 亚型分析, 其中 9 例具有异常 IK 亚型表达 (均表达 IK6); 且在 10 对成

对样本中发现 8 对存在 IK 亚型表达从初发状态到复发状态不连续情况。见表 2。

表 2 初-复发成对样本的 IKAROS 亚型

病例编号	IKAROS 亚型		正常与否
	初发	复发	
1	IK1、IK2	IK1、IK2、IK6	否
2	IK1、IK2	IK1、IK2、IK6	否
3	IK2	IK1、IK2、IK6	否
4	IK1、IK2	IK1、IK2	是
5	IK1、IK2	IK1、IK2、IK6	否
6	IK2	IK1、IK2、IK6	否
7	IK1、IK2、IK6	IK1、IK2、IK6	否
8	IK1、IK2	IK1、IK2、IK6	否
9	IK1、IK2	IK1、IK2、IK6	否
10	IK1、IK2、IK6	IK1、IK2	否

2.3 异常 IK 亚型的初发患儿预后

137 例初发 B-ALL 患儿中, 低危 + 中危患儿 2.5 年无事件生存率 (EFS) 高于高危 + 超高危患儿 ($P = 0.01$); 具有 E2A-PBX1 融合基因的患儿 2.5 年 EFS 高达 100%, 明显高于具有其他融合基因或不具有融合基因的患儿 ($P = 0.005$)。见表 3。

表 3 137 例 B-ALL 患儿的临床特征及治疗结果

特征	病例数 (%)	2.5 年 EFS [% (SE)]	χ^2 值	P 值
年龄 (岁)				
<1	4(2.9)	35.0(10.07)		
1~	109(79.5)	68.6(2.834)	8.733	0.013
≥ 10	24(17.5)	36.9(4.060)		
性别				
女	52(37.9)	45.3(2.218)	0.006	0.939
男	85(62.0)	65.2(3.400)		
WBC 计数 ($\times 10^9/L$)				
<50	113(82.4)	66.7(2.883)		
50~	14(10.2)	43.5(4.496)	2.808	0.253
≥ 100	10(7.4)	34.8(6.387)		
危险程度分级				
低危 + 中危	103(75.1)	68.7(2.782)	6.725	0.010
高危 + 超高危	34(24.8)	38.0(3.379)		
融合基因				
E2A-PBX1	9(6.6)	100(0)		
TEL-AML1	25(18.2)	86.0(0.13)	40.565	0.005
BCR-ABL	7(5.1)	7.0(0.09)		
无	96(70.0)	60.0(0.08)		
IKAROS 亚型				
正常	105(76.6)	67.7(2.916)	10.319	0.010
异常	32(23.4)	40.4(3.170)		
治疗结果				
存活	112(81.8)	—		
死亡	15(10.9)	—	—	—
放弃治疗	10(7.3)	—		

注: EFS 为无事件生存率

将初发 B-ALL 患儿依据 IK 亚型进行分组,发现表达异常 IK 亚型组(有表达 IK4、IK6、IK7 亚型)较正常 IK 亚型组[仅表达 IK1 和/或 IK2(a)亚型]具有更低的 2.5 年 EFS ($P=0.01$)。并对该 137 例初发 B-ALL 患儿进行生存函数分析发现两组间亦具有明显差异 ($P=0.001$)。但若将异常 IK 亚型组详分为 IK4+IK7 组及 IK6 组则发现,IK4 组与正常 IK 亚型组之间生存率并无太大差别 ($P=0.527$),而 IK6 组与正常 IK 亚型组之间的差距由于 IK4 和 IK7 的剔除则更加显著 ($P=0.001$),可见在所有异常 IK 亚型中 IK6 的表达对预后及生存的影响最大。见表 3,图 2。

2.4 IK6 亚型患儿分析

137 例初发 B-ALL 患儿中,16 例具有 IK6 亚型的患儿发病年龄[5.8 (8.7) 岁]和初诊外周血白细胞计数[$19.8 (88.2) \times 10^9/L$]均明显高于不具有

IK6 亚型患儿[4.6 (4.7) 岁; $8.2 (19.3) \times 10^9/L$],差异均有统计学意义(分别 $Z=2.048$ 、 2.906 ,均 $P<0.05$)。另选取 21 例复发患儿的复发样本进行 IKAROS 亚型鉴定,结果发现 13 例(62%)患儿具有 IK6 亚型,明显高于 137 例初发患儿 IK6 亚型发生率(12%),差异有统计学意义($\chi^2=30.652$, $P<0.01$)。

2.5 IKAROS 亚型表达异常的可能原因

在该 137 例 ALL 患儿进行 cDNA 分析的同时,本研究对其 DNA 水平亦进行探索。发现具有 DN 型 IKAROS (IK4 或 IK6) 表达的患儿其 DNA 序列完整准确,并不存在外显子缺失和基因组序列中异常碱基的插入或缺失。因此异常 IK 亚型的表达可能是选择性剪接过程异常导致了其 cDNA,即 mRNA 水平与 DNA 水平不一致的情况。见图 3。

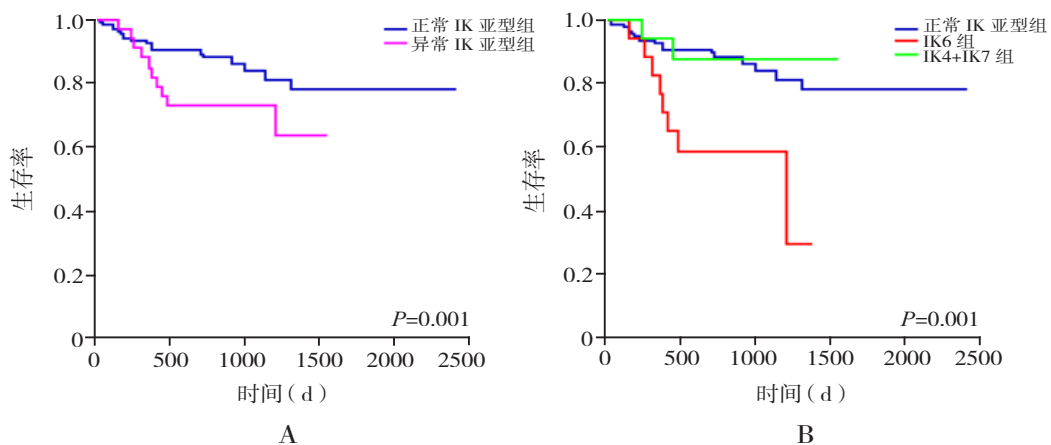


图2 137例 B-ALL 患儿不同 IKAROS 亚型的生存分析 A: 以 IKAROS 亚型是否正常分组,可见异常 IK 亚型组具有更低的生存效率; B: 将异常 IK 亚型组细分为 IK4+IK7 组及 IK6 组,可见 IK6 组较正常 IK 亚型组具有更低的生存效率。

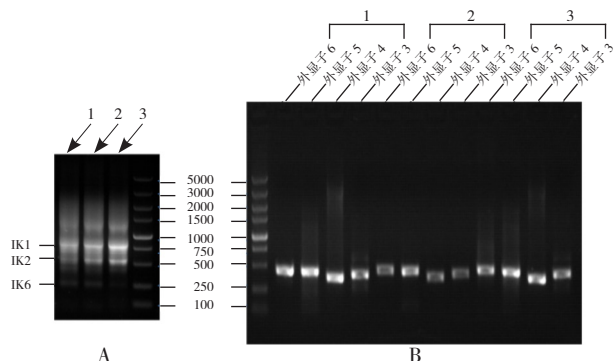


图3 同时具有 IK1、IK2 和 IK6 表达的 3 例患儿 IKAROS 的 PCR 结果 A: cDNA 水平 PCR 产物电泳图; B: DNA 水平 PCR 产物电泳图,所有外显子在 DNA 水平均有表达,提示不存在 DNA 水平的外显子缺失。

3 讨论

白血病是造成我国儿童因病致死不可忽视的原因。在儿童白血病中,ALL 最为常见,约占 75%~80%。近年来,随着规范化诊疗手段的提高和支持治疗的加强,儿童 ALL 预后已得到很大改观,长期 EFS 和总生存率 (overall survival, OS) 已达到 70% 与 80% 以上^[11-12],日趋成为一种可治愈性疾病。尽管如此,仍有大约 20% 的儿童 ALL 患者出现治疗失败或复发^[13],且部分复发患儿初诊时危险程度往往不高(低危或中危)。因此,寻找更多临床可用的危险因子能为临床危险程度分级提供更有力指导。

IKAROS 亚型异常即为一个较为显著的不良预后因素, DN 型 IKAROS 在复发患者中极为常见, 且存在 DN 型 IKAROS 的非高危患者的复发率较 IK 亚型正常的非高危患者高 12 倍^[8]。在本研究中, 16 例 B-ALL 患儿具有 IK6, 该 16 例患儿中有 8 例为低危或中危, 其中 3 例发生复发或死亡。已有报道发现 DN 型 IKAROS 特别是 IK6 的存在与发病年龄、性别、外周血白细胞计数及危险程度分级等临床因素之间无显著联系, 仅与 BCR-ABL⁺ 高度伴发^[14]。然而本研究显示, IK6 患儿的发病年龄较 IK 正常者大, 其初诊时外周血白细胞计数亦较正常者高, 且与 BCR-ABL⁺ 高度伴发。不仅如此, 本研究亦从生存曲线中分析发现 IK6 组生存率低于正常 IK 亚型组, 而 IK4+IK7 组与正常 IK 亚型组之间则无太大差异。即 IK4 和 IK7 亚型的存在对患儿整体生存率可能无太大影响, 但也可能与样本量太少有关。此外, 与 Kuiper 等^[8] 的研究不一致的是, 本研究在对 10 例初-复发成对样本分析中发现 IK6 的表达呈初-复发不连续状态, 提示 IK6 可能是复发根源。

鉴于如今对 IKAROS 亚型的研究大部分均使用 cDNA 进行 PCR 及测序检测, 本研究对具有 DN 型 IKAROS 的患者样本基因组 DNA 亦进行相同分析却发现其 DNA 水平并不存在外显子缺失情况, 且其 DNA 序列亦未出现 Mullighan 等^[15] 研究中提出的数个异常碱基的插入。因此, DN 型 IKAROS 的出现可能与异常选择性剪接过程相关, 但其具体机制仍需进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Nietfeld W, Meyerhans A. Cloning and sequencing of Hik-1, a cDNA encoding a human homologue of mouse IKAROS/LyF-1[J]. Immunol Lett, 1996, 49(1-2):139-141.
- [2] Molnar A, Wu P, Largespada DA, Vortkamp A, Scherer S, Copeland NG, et al. The IKAROS gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved on human and mouse[J]. J Immun, 1996, 156(2):585-592.
- [3] Georgopoulos K, Moore DD, Derfler B. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment[J]. Science, 1992, 258(5083): 808-812.
- [4] NaKase K, Ishimaru F, Avitahl N, Dansako H, Matsuo K, Fujii K, et al. Dominant negative isoform of the IKAROS gene in patients with adult B-ALL acute lymphoblastic leukemia[J]. Cancer Res, 2000, 60(15): 4062-4065.
- [5] Sun L, Crotty ML, Sensel M, Sather H, Navara C, Nachman J, et al. Expression of dominant-negative isoforms in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Cancer Res, 1999, 5(8): 2112-2120.
- [6] Yagi T, Hibi S, Takanshi M, Kano G, Tabata Y, Imamura T, et al. High frequency of IKAROS isoform 6 expression in acute myelomonocytic and monocytic leukemia: implications for upregulation of the antiapoptotic protein BCR-XL in leukemogenesis[J]. 2002, 99(4): 1350-1355.
- [7] Iacobucci I, Storlazzi CT, Cilloni D, Lonetti A, Ottaviani E, Soverini S, et al. Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients[J]. Blood, 2009, 114(10): 2159-2167.
- [8] Kuiper RP, Waanders E, van der Velden VH, van Reijmersdal SV, Venkatachalam R, Scheijen B, et al. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL[J]. Leukemia, 2010, 24(7): 1258-1264.
- [9] Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JG, Peters ST, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(2): 125-134.
- [10] Trevino LR, Yang W, French D, Hunger SP, Carroll WL, Devidas M, et al. Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Nat Genet, 2009, 41(9): 1001-1005.
- [11] Silverman LB, Steven KE, O'Brien JE, Asselin BL, Barr RD, Clavell L, et al. Long-term results of Dana-Farber Cancer Institute ALL consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1985-2000)[J]. Leukemia, 2010, 24(2): 320-334.
- [12] Gaynon PS, Angiolilli AL, Carroll WL, Nachman JB, Trigg ME, Sather HN, et al. Long-term results of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983-2002: a children's Oncology group report[J]. Leukemia, 2010, 24(2): 285-297.
- [13] Yang JJ, Bhojwani D, Yang W, Cai X, Stocco G, Crews K, et al. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2008, 112(10): 4178-4183.
- [14] Zhou F, Mei H, Jin R, Li X, Chen X. Expression of Ikaros isoform 6 in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2011, 33(6): 429-432.
- [15] Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, et al. BCR-ABL lymphoblastic leukemia is characterized by the deletion of ikaros[J]. Nature, 2008, 453(7191): 110-114.

(本文编辑: 周勇)