

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.01.016

实时定量 PCR 检测成人 ALL 患者 ZAP70 基因的表达及意义

陈国枢, 徐兵, 宋小燕, 李洁, 郭绪涛, 周淑芸

Expression and Clinical Significance of ZAP70 in Adult Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia Evaluated by Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction

CHEN Guo-shu, XU Bing, SONG Xiao-yan, LI Jie, GUO Xu-tao, ZHOU Shu-yun

Department of Hematology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding Author: XU Bing, E-mail: xbjzj@fimmu.com

Abstract: Objective To investigate the expressions and clinical significance of zeta-associated protein 70 (ZAP70) gene in adult patients with acute lymphoblastic leukemia(ALL). **Methods** Expressions of ZAP70 were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) in 73 *de novo* adult ALL patients to analysis the relationship between its expressions and clinical effectiveness. **Results** The correlation co-efficiencies were over 0.998 for standard curves of RQ-PCR method. ZAP70 expressions were detected in 69.8% ALL patients. There were no statistical differences of ZAP70 gene expression levels in FAB subgroups. However, ZAP70 gene expression levels of T-ALL patients were significantly higher than that of B-ALL and biphenotypic ALL ($P < 0.01$) in immunophenotyping groups. The expressions level of ZAP70 gene were not correlated to peripheral white blood cell (WBC) counts, hemoglobin level, platelet counts and percentage of bone marrow blast cell at presentation. Statistical analyses showed that the difference of complete remission (CR) rates between high and low ZAP70 expressions in *de novo* ALL patients was not significant ($P > 0.05$). In common B-ALL subgroup, the CR in the group with high expression level of ZAP70 (52.6%) was significantly lower than that in the group with low expression level of ZAP70 (85%) ($P = 0.041$). Patients with high expression levels of ZAP70 (48.3% vs. 21.7%, $P = 0.048$). **Conclusion** High expression of ZAP70 might be regarded as an important risk factor in ALL, which predicts a poor prognosis.

Key words: ZAP70; Acute lymphoblastic leukemia; Polymerase chain reaction (PCR); Prognosis

摘要:目的 探讨成人急性淋巴细胞白血病(ALL)患者中 Zeta 链相关蛋白-70 (ZAP70)基因的表达及其意义。**方法** 构建实时荧光定量检测 ZAP70 基因表达的 PCR 技术,定量检测 73 例初治成人 ALL 患者 ZAP70 基因的表达水平。**结果** 建立的实时定量 PCR 方法的标准曲线相关系数 $r > 0.998$ 。51 例(69.8%)初治 ALL 患者可检出 ZAP70 基因表达。FAB 各亚型中 ZAP70 基因表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),ZAP70 基因表达水平的高低与初治 ALL 患者的免疫表型差异有统计学意义,T-ALL 患者 ZAP70 基因表达水平显著高于 B-ALL 和 T、B 双表型 ALL($P < 0.01$)。ZAP70 基因表达水平的高低与 ALL 发病时外周血白细胞计数、血红蛋白浓度、血小板计数及骨髓白血病细胞比例无相关关系(P 均 > 0.05)。初治 ALL 中 ZAP70 基因高低表达与患者化疗的完全缓解(CR)率差异无统计学意义,但在普通 B-ALL 组中,ZAP70 高表达组的 CR 率(52.6%)显著低于 ZAP70 低表达组(85%) ($P = 0.041$)。初治 ALL 中 ZAP70 基因高表达患者复发率明显高于低表达组($P = 0.048$)。**结论** ZAP70 基因高表达可能是 ALL 一个重要的预后不良因素。

关键词: ZAP70; 急性淋巴细胞白血病; PCR; 预后

中图分类号: R733.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)01-0055-04

收稿日期:2009-11-13;修回日期:2010-01-26

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(5004737)

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院血液科

通信作者:徐兵,E-mail: xbjzj@fimmu.com

作者简介:陈国枢(1982-),男,硕士在读,住院医师,主

要从事白血病研究

0 引言

急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)具有高度的异质性,不同患者的疗效和预后具有较大的不同。目前已发现许多基因异常与成人 ALL 的预后存在密切关系,如伴 BCR-ABL

融合基因、MLL 基因重排及 E2A-PBX1 融合基因的 ALL 预后差,BCR-ABL 融合基因在成人 ALL 中仅占 20%~30%,而 MLL 基因重排及 E2A-PBX1 融合基因在成人 ALL 中不到 5%,寻找新的与成人 ALL 预后相关的基因异常对于指导临床分层治疗有重要意义^[1]。以往研究显示 Zeta 链相关蛋白-70(zeta associated protein 70, ZAP70)表达增加是慢性淋巴细胞白血病(CLL)重要预后因素,为进一步研究成人 ALL 患者 ZAP70 基因表达情况及与预后的关系,我们建立了实时荧光定量 PCR 技术检测 73 例初治 ALL 患者 ZAP70 基因表达水平并分析其临床意义。

1 资料和方法

1.1 临床资料

经细胞形态学、组织化学染色及流式细胞术免疫学分型确诊的 73 例 ALL 患者,其中男 40 例,女 33 例,中位年龄 23 岁(13~73 岁),免疫分型中 B 细胞性 ALL(B-ALL) 52 例, T 细胞性 ALL(T-ALL) 16 例, T、B 双表型 ALL(BAL) 5 例, 17 例经 FISH 检测伴有 Ph+ ALL, 诊断参照 FAB 和 WHO 制定标准。以 Molt4 细胞株为阳性对照(暨南大学李扬秋教授惠赠), Raji 细胞株为阴性对照, 16 名健康体检者外周血作为健康对照组。ALL 患者诱导化疗方案为 VDLP 或 VTLP 方案(长春新碱,柔红霉素或吡柔比星,左旋门冬酰胺酶,强的松)。巩固方案包括 Hyper-CVAD、中剂量 Ara-C、大剂量 MTX 等,随访期间共 8 例患者进行异基因造血干细胞移植。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA 抽提

收集培养的 10^7 个 Molt4 细胞作为阳性对照、Raji 细胞作为阴性对照、患者临床骨髓或外周血标本及正常对照标本,采用 Trizol (Invitrogen 产品)提取总 RNA,经紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 比值,鉴定 RNA 纯度及定量后, -80°C 冰箱冻存备用。

1.2.2 引物及探针的设计

目的基因和内对照的引物和探针序列见参考文献^[2-3]。ZAP70 引物和探针为:Primer forward(F) 5'-CGC TGC ACA AGT TCC TGG T-3', reverse (R) 5'-GAC ACC TGG TGC AGC AGC T-3', 扩增产物为 76bp, probe 5'-FAM-CAT TGC TCA CAG GGA TCT CCT CCC TCT-TAMRA-3'。内对照 GAPDH 为:Primer forward (F) 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3', reverse (R) 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3', 扩增产物为

226bp, probe 5'-FAM-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC-TAMRA-3'。引物和探针均由上海 invitrogen 公司合成。

1.2.3 荧光定量 PCR 标准模板的构建

从培养的 Molt4 细胞提取 RNA 进行反转录并用 ZAP70 基因特异性引物进行扩增,PCR 扩增产物经纯化试剂盒 (Promega 产品) 纯化后与 pMD18T 载体 (Takara 产品) 连接,转化到 DH-5 α 感受态细菌,培养挑取阳性克隆并提取质粒,测序及荧光定量 PCR 鉴定纯化后 -80°C 保存备用。

1.2.4 反转录及荧光定量 PCR 反应

反转录反应体系 20 μl : 5 \times 反转录 buffer 2 μl , 10 pmol/ μl 引物各 0.5 μl , 25 mM dNTPs 0.5 μl , 10 u/ μl MMLV 1 μl , DEEP 水 10 μl , RNA 模板 4 μl 。反应条件为 37°C 100 min, 87°C 5 min。荧光定量 PCR 反应体系 50 μl : 5 \times 定量 buffer 25 μl , 10 pmol/ μl 各引物 2 μl , 0.5 pmol/ μl 探针 1 μl , cDNA 4 μl , ddH₂O 16 μl 。反应条件为: 95°C 1 min, 然后 95°C 15 s, 60°C 1 min, 共 40 循环。逆转录在 MJ 9700PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)进行, 荧光定量 PCR 反应在 Stratagene (Mx3005P) 全自动荧光定量 PCR 仪(美国 Agilent 公司)进行。每个样本均平行重复检测 3 次, 反应结束后, 由电脑自动分析并计算结果。考虑到各个样本总 RNA 浓度可能存在差异, 最终计算结果由(目的基因拷贝数)/(内参拷贝数) $\times 10000$ 获得。

1.3 统计学方法

ZAP70 基因表达水平表现为正偏态分布, 经 Lg 对数转换后基本呈正态分布。采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理。由于 ALL 患者相对于正常人群 ZAP70 基因普遍高表达, 本研究中采用 ALL 患者 ZAP70 基因表达水平的中位数为区分 ZAP70 基因表达水平高低的界点。两样本中位数比较采用 Mann-Whitney 检验, 多样本间的比较采用 Kruskal-Wallis 检验, 多变量间相关关系采用 Spearman 相关分析, 率的比较采用 χ^2 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实时荧光定量 PCR 方法的可信性分析

取冻存的阳性标准品重组质粒, 提取 RNA 及反转录成 cDNA, 浓度为 1×10^6 copies/ μl , 10 倍稀释成浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μg cDNA 之间, 分别进行定量 PCR 扩增, 在 6 个数量级检测范围, 其对数与相应的 CT 值之间具有良好的线性关系, 相关系数 $r = 0.998$, 见图 1。

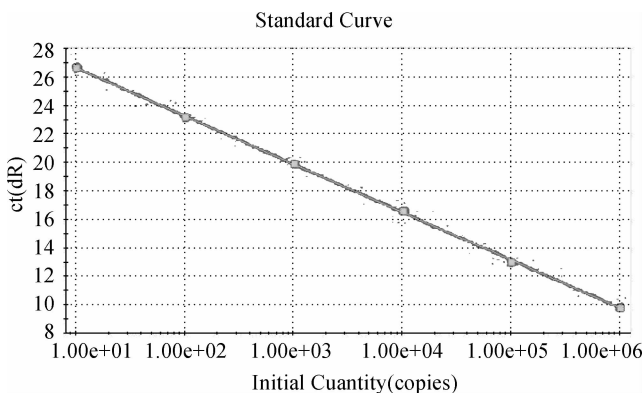


图 1 线性回归标准曲线图

Figure 1 Standard curve of linear regression

2.2 初治成人 ALL 患者 ZAP70 基因表达水平与 FAB 分型、免疫表型及 Ph 染色体的关系

73 例初治 ALL 患者经荧光定量 PCR 扩增后 51 例 (69.8%) 患者检测出有 ZAP70 基因表达, ZAP70 基因表达水平与 GAPDH 表达水平之比为 56.5~5374, 中位数为 633, 16 例健康对照组仅 1 例检测出有 ZAP70 基因表达, 中位数为 18.49, ALL 患者 ZAP70 基因表达水平显著高于健康对照组 ($P < 0.01$)。FAB 分型 L1、L2、L3 各亚型中 ZAP70 基因表达的中位数分别为 700、668、902, 统计学分析显示 FAB 分组中 ZAP70 表达水平差异无统计学意义。B-ALL、T-ALL 和 BAL 患者 ZAP70 基因表达的中位数分别为 658、882 和 769, T-ALL 患者的 ZAP70 表达水平显著高于其他两组 ($\chi^2 = 6.689, P < 0.01$)。Ph + ALL 和 Ph-ALL 患者 ZAP70 表达的中位数分别为 714、666, 两组患者 ZAP70 基因表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 ZAP70 基因的表达水平与初治时外周血象及骨髓白血病细胞比例的关系

37 例 ZAP70 基因高表达 ALL 组发病时白细胞计数为 $(74.6 \pm 15.4) \times 10^9/L$ 、血红蛋白测定为 $(87.1 \pm 23.5)g/L$ 、血小板计数为 $(72.9 \pm 64.5) \times 10^9/L$ 、骨髓白血病细胞比例为 $(83.5 \pm 31.6)\%$ 。而 36 例 ZAP70 基因低表达组发病时白细胞计数为 $(63.4 \pm 17.5) \times 10^9/L$ 、血红蛋白测定为 $(91.3 \pm 19.2)g/L$ 、血小板计数为 $(85.2 \pm 46.8) \times 10^9/L$ 、骨髓白血病细胞比例为 $(54.3 \pm 16.3)\%$ 。统计学分析显示, ZAP70 基因高表达 ALL 组的白细胞计数、血红蛋白水平、血小板计数及骨髓白血病细胞比例同低表达组相比差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。

2.4 ALL 患者 ZAP70 基因的表达高低与临床疗效的关系

73 例 ALL 患者 5 例确诊后放弃治疗, 68 例患

者经 2 个标准疗程诱导化疗的完全缓解率 (CR) 为 76.5%, 其中 ZAP70 基因高表达组 CR 率为 72.5%, ZAP70 基因低表达组 CR 率为 69.7%, 尽管 ZAP70 基因高表达组 ALL 的 CR 率高于低表达组, 但两组差异无统计学意义; 但在普通 B-ALL 组中, ZAP70 高表达组的 CR 率为 52.6%, 显著低于 ZAP70 低表达组 85% ($\chi^2 = 4.792, P = 0.041$); 在 T-ALL 组 ZAP70 表达高低与 CR 率无统计学意义 ($P > 0.05$), BAL 组由于例数较少, 未行统计学分析。42 例患者中位随访 10 月 (3~20 月) 发现, ZAP70 基因低表达组复发率为 21.7%, 而 ZAP70 基因高表达为 48.3%, 两者差异有统计学意义 ($\chi^2 = 3.895, P = 0.048$)。

3 讨论

ZAP70 基因定位于染色体 2q12, 大小为 70 kD, 是一种与 TCR ζ 相联系的蛋白酪氨酸激酶 (PTK), 从属于 Syk 酪氨酸激酶家族, 在多个下游靶基因信号转导的起始、激活和磷酸化过程中起重要作用^[4-5]。正常情况下, ZAP70 广泛表达在 T 细胞和 NK 细胞中, B 细胞缺乏 ZAP70 的表达, 最近研究发现, ZAP70 在 B 细胞表面也有表达并参与 B 细胞的早期发育, 在 Syk 激酶缺失时, ZAP70 可代替 Syk 激酶活性重构 BCR 信号转导通路, 从而高表达 ZAP70^[5-6]。

目前, ZAP70 的研究多限于 CLL, ZAP70 和 CD38 分子被认为是继免疫球蛋白重链可变区 (IgH-V) 重排后用来判断 CLL 患者预后的独立指标, 高表达 ZAP70 的 CLL 患者预后要差^[7]。为进一步了解 ZAP70 在 ALL 中的作用, 我们构建了实时定量 PCR 检测 ZAP70 基因表达技术, 该技术通过实时测定 PCR 过程中荧光信号的变化直接获得绝对定量, 同时具有 DNA 扩增的高效性、DNA 探针技术的高特异性和光谱技术的高敏感度, 是目前定量检测基因表达相对最准确的方法^[8]。并采用内参照 GAPDH 基因进行归一化消除标本处理、反转录反应和 PCR 反应过程中的差异, 以目的基因表达水平与内对照表达水平之比值来判断 ZAP70 基因表达水平高低。

我们的结果显示, 69.8% 初治 ALL 患者存在 ZAP70 基因的表达, 中位数为 633, 而健康对照组仅 1 例检测出表达, 但表达量极低仅为 18.49, 而病例组表达量超过对照组的 30 倍以上, 说明健康对照组中 T 细胞、NK 细胞的表达不影响检测结果, 提示 ZAP70 可能与 ALL 发生存在一定的关系。我们结果还显示 ZAP70 基因表达水平与外周血 WBC、Hb

水平、PLT 计数及骨髓白血病细胞比例无明显相关性,提示 ZAP70 表达可能与 ALL 患者白血病细胞增殖的关系不大。我们结果表明 T-ALL 患者 ZAP70 表达水平显著高于 B-ALL 患者,与国外报道一致^[5],可能与 ZAP70 是 T 细胞信号转导通路有关。Chiaretti 等^[5]报道,前 B-ALL 患者也高表达 ZAP70,E2A-PBX1 基因重排阳性者 ZAP70 表达水平要高于 MLL-AF4、BCR-ABL 阳性的 ALL 患者,提示 ZAP70 的高表达与某些基因重排发生有关。在我们研究中 Ph + ALL 患者 ZAP70 表达水平与 Ph - ALL 比较差异不显著,提示 ZAP70 表达水平与 Ph 染色体无关。

我们观察了初治成人 ALL 中,高表达 ZAP70 基因病例的 CR 率要高于低表达病例组,但统计学差异不显著,而对于普通 B-ALL 患者 ZAP70 基因高表达组 CR 率显著低于 ZAP70 基因低表达组。随访显示 ZAP70 基因高表达组复发率要显著高于 ZAP70 基因低表达组,提示 ZAP70 基因高表达对于 ALL 患者可能同样是一个预后不良的指标。Chiaretti 等^[5]检测 43 例 ALL 患者 ZAP70 表达量,结果显示在可评估长期疗效的 38 例患者中,12 例 ZAP70 低表达患者中位持续 CR 时间长达 61 月,而 26 例 ZAP70 高表达者中位随访 12 月都经历了复发或死亡,多变量分析也表明 ZAP70 基因水平高表达是 ALL 一个独立的预后因素,ZAP70 表达越高,预后越差,不仅 CR 持续时间短,无病生存率和总体存活率都显著降低。

我们研究提示,ZAP70 可能是成人 ALL 患者一个重要的预后不良因素,尚有待进一步扩大病例及随访生存情况,以得出更明确的结果。在 ZAP70 研究中,还有许多问题亟待解决,如 ZAP70 基因导

致 ALL 预后不佳的分子机制及信号转导的途径、与其他基因之间的关系等均有待进一步探索。

致谢:感谢暨南大学医学院血液病学研究所李扬秋教授、陈少华老师、南方医科大学公共卫生与热带医学学院病毒研究所赵卫副教授等在实验过程中所给予的无私帮助。

参考文献:

[1] Gökbuget N, Hoelzer D. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia[J]. Semin Hematol, 2009,46(1):64-75.

[2] Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile[J]. Blood,2003,101(12): 4944-4451.

[3] Yokota H, Tsuno NH, Tanaka Y, et al. Quantification of minimal residual disease in patients with e1a2 BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia using a real-time RT-PCR assay[J]. Leukemia,2002,16(6):1167-1175.

[4] Chan AC, Iwashima M, Turck CW, et al. ZAP-70; a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain [J]. Cell,1992,71(4): 649-662.

[5] Chiaretti S, Guarini A, De Propriis MS, et al. ZAP-70 expression in acute lymphoblastic leukemia: association with the E2A/PBX1 rearrangement and the pre-B stage of differentiation and prognostic implications[J]. Blood,2006,107(1):197-204.

[6] Schweighoffer E, Vanes L, Mathiot A, et al. Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion [J]. Immunity,2003,18(4): 523-533.

[7] Amin S, Parker A, Mann J. ZAP70 in chronic lymphocytic leukaemia[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(9): 1654-1658.

[8] 徐兵, 宋小燕, 唐家宏, 等. 荧光定量 PCR 检测急性髓细胞白血病患者 BAALC 基因及临床意义[J]. 中华检验医学杂志, 2007,30(10):1123-1126.

[编辑:杨 卉;校对:刘红武]