

# IKZF1 基因多态性与中国儿童急性淋巴细胞白血病的关联性

董敖 吴圆圆 饶月丽 李伟 陶然 严杰

**Association of IKZF1 gene polymorphism with acute lymphoblastic leukemia in Chinese children** Dong Ao, Wu Yuanyuan, Rao Yueli, Li Wei, Tao Ran, Yan Jie

Corresponding author: Yan Jie, Department of Medical Microbiology and Parasitology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China. Email: Med\_bp@zju.edu.cn

急性淋巴细胞白血病(ALL)是儿童发病率最高的白血病类型,好发于2~5岁<sup>[1]</sup>。目前ALL的发病机制仍未明确,但以往研究大多认为其受遗传因子及环境影响<sup>[1-2]</sup>。IKZF1(Ikaros family zinc finger 1)基因位于染色体7p12.2,其编码蛋白IKAROS是和淋系发育相关的重要转录因子<sup>[3-4]</sup>。全基因组关联研究(GWAS)显示IKZF1基因单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphisms, SNP)位点rs11978267与ALL存在明显相关性<sup>[5-6]</sup>。Linabery等<sup>[7]</sup>报道IKZF1基因多态性位点rs11978267与北美地区儿童ALL患者间具有明显相关性,但尚无中国儿童ALL患者相关报道。本研究旨在探讨IKZF1基因rs11978267多态性与中国儿童ALL的关联性。

## 对象与方法

1. 研究对象:2015年5月至12月我院收治的190例ALL患者及270例对照纳入研究,ALL患者均经过骨髓细胞形态学、细胞化学、免疫分型及分子生物学检查,其诊断符合急性白血病FAB诊断标准<sup>[8]</sup>。收集其外周血标本保存于-80℃备用。对照组来自于诊断为呼吸系统感染性疾病并排除造血系统疾病、肿瘤疾病、遗传性疾病者。本研究获患儿家长知情同意,并符合医学伦理原则。

2. 主要试剂及仪器:全基因组抽提试剂盒为上海获硕贝肯生物科技有限公司产品,HotStarTaq DNA聚合酶为德国Qiagen公司产品,iPLEX™ Reagent Kit、树脂、MassARRAY Compact System均为美国SEQUENOM公司产品,dNTP Mixture为日本TaKaRa公司产品,D-37520台式离心机为美国Thermo公司产品,PCR仪(GeneAmp PCR

System 9700)为美国Applied Biosystems公司产品。

3. 基因组抽提:取200 μl ALL患儿及对照儿童全血,按照全血基因组抽提试剂盒操作说明抽提基因组。

4. PCR扩增IKZF1基因SNP位点rs11978267:正向及反向引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,正向引物:5'-ACGTTGGATGAGCAGCAGACAGCTACTAGG-3',反向引物:5'-ACGTTGGATGCCCTTGTCTTCGTGGATTTC-3'。反应体系:10×缓冲液(含15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>)0.625 μl,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 0.325 μl,2.5 mmol/L dNTP1 μl,引物1 μl,5 U/μl HotStarTaq DNA聚合酶0.1 μl,DNA模板1 μl,双蒸水0.95 μl。反应条件:94℃预变性15 min;94℃变性20 s,56℃退火30 s,72℃延伸1 min,共45个循环;72℃延伸3 min。

5. 虾碱基磷酸酶(SAP)处理:为除去PCR中多余的dNTP,将2 μl的SAP反应体系(10×SAP缓冲液0.17 μl,SAP 0.3 μl,双蒸水1.53 μl)加入PCR体系中。反应条件:37℃40 min;85℃5 min,4℃保存。

6. iPLEX单碱基延伸反应:反应体系:10×iPLEX缓冲液0.2 μl,iPLEX Termination mix 0.2 μl,引物0.804 μl,iPLEX酶0.041 μl,双蒸水0.755 μl,单碱基延伸引物序列:5'-AGGGTAGGTAGAAGTTTATG-3'。反应条件:94℃30 s;94℃5 s;52℃5 s,80℃5 s,共5个循环;72℃3 min;共40个循环;12℃12 min。其中5个小循环包含在40个大循环中,共200个循环。

7. 树脂脱盐与MassARRAY Analyzer Compac质谱分析:将6 mg树脂在384孔树脂刮板上,均匀覆盖,刮去多余的树脂,放置20 min后,1000 r/min离心1 min(离心半径12.4 cm)。每孔加入25 μl去离子水,倒置在树脂板上面,然后反置将树脂板扣在384孔板上,封膜。翻转384孔板20 min,3500 r/min离心5 min后,转移到表面覆盖基质的SpectroCHIP芯片,MassARRAY Analyzer Compac质谱检测。采用Typer Analyzer Application version 4.0 Sequenom进行软件分型。

8. 统计学处理:采用SPSS 18.0以及shesis在线软件进行统计学分析。各组间的基因型频率分布检测采用Hardy-Weinberg平衡定律。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用百分率(%)表示,组间比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。Pearson's卡方检验或Fisher's精确检验用于病例组和对照组的等位基因频率的比较以及基因型频率的比较。优势比(OR)和95%置信区间(95% CI)由Logistic回归分析得到。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.09.020

作者单位:310003 杭州,浙江大学医学院附属儿童医院血液肿瘤实验室(董敖、吴圆圆),实验检验中心(李伟、陶然);解放军第一一七医院输血科(饶月丽);浙江大学医学院病原微生物系(严杰)  
通信作者:严杰,Email:Med\_bp@zju.edu.cn

### 结 果

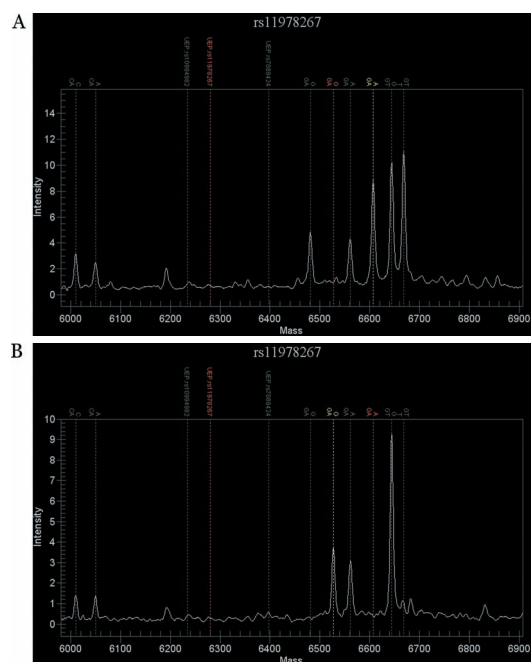
1. 患儿基本情况: ALL 组患儿 190 例, 年龄(70.36±43.10)个月, 72个月以上为73例(38.4%);男119例(62.6%), 女71例(37.4%)。对照组患儿年龄(51.95±43.39)个月, 72个月以上为81例(30.0%);男177例(65.6%), 女93例(34.4%)。ALL组与对照组患儿间年龄和性别差异均无统计学意义( $P$ 值均>0.05)。

2. IKZF1 基因多态性位点 rs11978267 基因分型结果: 190 例 ALL 患儿及 270 例对照组患儿的 DNA 模板, 经 MassARRAY Analyzer Compac 质谱基因分型均取得了良好的结果, 结果见图1。

3. ALL 组及对照组 IKZF1 基因多态性位点 rs11978267 等位基因和基因型频率差异性分析: ALL 组和对对照组两组人群的基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律( $P$ 值均>0.05)。多态性位点 rs11978267 等位基因和基因型频率分布结果显示, ALL 组与对照组两组间 GG、AG、AA 基因型频率的差异无统计学意义( $Chi^2=0.514, P$ 值>0.05), 风险等位基因 A 出现的频率差异无统计学意义( $Chi^2=0.045, OR=1.042, 95\%CI 0.715\sim 1.518, P>0.05$ )(表1)。

4. IKZF1 基因多态性位点 rs11978267 基因型与 ALL 患儿免疫分型、染色体及融合基因的关系: 从 OR 值和 95% CI 可以得出, IKZF1 基因多态性位点 rs11978267 基因型 GG、AG 和 AA 分布与 ALL 的免疫分型无明显相关, 与染色体异

常与否及有无融合基因亦并无明显相关性(表2)。



A:rs11978267 基因型 AA;B:rs11978267 基因型 GG  
图1 IKZF1 基因多态性位点 rs11978267 基因分型结果

### 讨 论

ALL 是一种起源于造血干细胞的恶性克隆性疾病, 是儿

表1 急性淋巴细胞白血病(ALL)组及对照组患者 IKZF1 基因多态性位点 rs11978267 等位基因和基因型差异性分析

组别	例数	rs11978267 G>A 基因型[例(%)]			A 等位基因
		GG	AG	AA	
ALL 组	190	4(2.1)	45(23.7)	141(74.2)	327(86.1)
对照组	270	4(1.5)	70(25.9)	196(72.6)	462(85.6)
$Chi^2$ 值			0.514		0.045
$P$ 值			0.774		0.832
OR 值		1.000	0.643	0.719	1.042
95% CI			0.153~2.701	0.177~2.925	0.715~1.518

表2 IKZF1 基因多态性位点 rs11978267 基因型与急性淋巴细胞白血病(ALL)免疫分型、染色体及融合基因的关系

组别	例数	基因型[例(%)]			$P$ 值
		GG	AG	AA	
免疫分型					0.973
B-ALL	175	4(2.3)	41(23.4)	130(74.3)	
OR 值(95% CI)		1.000	0.586(0.139~2.468)	0.663(0.163~2.699)	
T-ALL	15	0	4(26.7)	11(73.3)	
OR 值(95% CI)			1.000	0.982(0.303~3.185)	
染色体					0.757
正常	95	2(2.1)	25(26.3)	68(71.6)	
异常	85	2(2.4)	18(21.2)	65(76.5)	
OR 值(95% CI)		1.000	0.720(0.093~5.601)	0.956(0.131~6.987)	
融合基因					0.878
阴性	71	1(1.5)	17(23.9)	53(74.6)	
阳性	119	3(2.5)	28(23.5)	88(73.9)	
OR 值(95% CI)		1.000	1.821(0.175~18.947)	1.807(0.183~17.819)	

童最常见的白血病类型,年发病率为3.0/10万~4.5/10万,约占儿童恶性肿瘤的30%<sup>[9]</sup>。ALL的发病机制目前尚无定论,根据以往的研究,其可能是多种遗传因素及环境共同作用的结果,而其中遗传因素的影响越来越引起重视,基因变异可增加儿童罹患ALL的风险<sup>[1-2]</sup>。尽管目前ALL的治疗已经较为成熟,大部分的ALL患者可以得到缓解,但仍有约25%的患儿会复发,其存活率不到30%<sup>[10]</sup>。

近期两项GWAS研究表明,位于染色体7p12.2的IKZF1基因与ALL存在着明显相关性<sup>[5-6]</sup>。IKZF1基因DNA序列全长125 kb,其编码的蛋白IKAROS属锌指蛋白家族成员,是一个肿瘤抑制因子,在淋巴系统造血方面发挥着关键性调控作用<sup>[11]</sup>。IKZF1基因变异可显著降低其mRNA的表达水平,阻滞T、B细胞的发育,导致肿瘤形成<sup>[12]</sup>。同时在对B-ALL患儿的研究中发现IKZF1基因的变异还可影响患儿的预后<sup>[13]</sup>。Virely等<sup>[14]</sup>的研究结果提示由于BCR-ABL<sup>1+0</sup>杂合子小鼠体内IKZF1基因表达显著降低,使得B淋巴细胞分化无法正常进行,阻滞于原始阶段,从而形成ALL。Payne和Dovat<sup>[15]</sup>的研究结果显示ALL患者IKZF1基因有不同程度的突变和缺失,导致单倍剂量不足。

根据以往实验结果,IKZF1基因SNP位点rs4132601、rs11978267的突变可能是ALL发生的风险因素之一<sup>[5,16]</sup>,而其中对于rs11978267的研究却报道不一。Linabery等<sup>[7]</sup>研究发现,多态性位点rs11978267与北美地区儿童ALL患者间具有明显相关性。Bahari等<sup>[17]</sup>的研究报告显示,多态性位点rs11978267与伊朗地区儿童ALL患者间不存在关联性。目前对于IKZF1基因的研究结果都来自于国外,国内还未见报道。本研究结果显示,ALL组与对照组相比多态性位点rs11978267的基因型频率的差异无统计学意义( $Chi^2=0.514$ ,  $P=0.774$ ),风险等位基因A出现的频率差异无统计学意义( $Chi^2=0.045$ ,  $OR=1.042$ ,  $95\%CI:0.715\sim1.518$ ,  $P=0.832$ ),基因型分布与ALL组的免疫分型无明显相关性,与染色体异常与否及有无融合基因亦无明显相关。上述研究结果提示IKZF1基因多态性位点rs11978267与中国儿童ALL患者并无明显关联性。此不一致性提示种族、研究样本大小等因素可能对结果存在一定程度的影响。

综上所述,IKZF1基因多态性位点rs11978267与中国ALL患儿间无明显关联性,可能不是ALL的危险因素。

### 参考文献

[1] Eden T, Pieters R, Richards S. Systematic review of the addition of vincristine plus steroid pulses in maintenance treatment for childhood acute lymphoblastic leukaemia - an individual patient data meta-analysis involving 5,659 children [J]. Br J Haematol, 2010, 149(5):722-733. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08148.x.

[2] Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review [J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(1):138-145.

[3] Harker N, Naito T, Cortes M, et al. The CD8alpha gene locus is regulated by the Ikaros family of proteins [J]. Mol Cell, 2002, 10

(6):1403-1415.

- [4] Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, et al. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages [J]. Cell, 1994, 79(1):143-156.
- [5] Treviño LR, Yang W, French D, et al. Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Nat Genet, 2009, 41(9):1001-1005. doi: 10.1038/ng.432.
- [6] Prasad RB, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, et al. Verification of the susceptibility loci on 7p12.2, 10q21.2, and 14q11.2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia of childhood [J]. Blood, 2010, 115(9):1765-1767. doi: 10.1182/blood-2009-09-241513.
- [7] Linabery AM, Blommer CN, Spector LG, et al. ARID5B and IKZF1 variants, selected demographic factors, and childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group [J]. Leuk Res, 2013, 37(8):936-942.
- [8] Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukemias [J]. Br J Haematol, 1976, 33(45): 1-8.
- [9] Karathanasis NV, Choumerianou DM, Kalmanti M. Gene polymorphisms in childhood ALL [J]. Pediatr Blood Cancer, 2009, 52(3):318-323. doi: 10.1002/pbc.21825.
- [10] Malempati S, Gaynon PS, Sather H, et al. Outcome after relapse among children with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study CCG-1952 [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(36):5800-5807. doi: 10.1200/JCO.2007.10.7508.
- [11] Dovat S, Payne KJ. Tumor suppression in T cell leukemia--the role of Ikaros [J]. Leuk Res, 2010, 34(4):416-417. doi: 10.1016/j.leukres.2009.10.010.
- [12] Molnár A, Wu P, Largespada DA, et al. The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse [J]. J Immunol, 1996, 156(2):585-592.
- [13] Kuiper RP, Waanders E, van der Velden VH, et al. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL [J]. Leukemia, 2010, 24(7):1258-1264. doi: 10.1038/leu.2010.87.
- [14] Virely C, Moulin S, Cobaleda C, et al. Haploinsufficiency of the IKZF1 (IKAROS) tumor suppressor gene cooperates with BCR-ABL in a transgenic model of acute lymphoblastic leukemia [J]. Leukemia, 2010, 24(6):1200-1204. doi: 10.1038/leu.2010.63.
- [15] Payne KJ, Dovat S. Ikaros and tumor suppression in acute lymphoblastic leukemia [J]. Crit Rev Oncog, 2011, 16(1-2):3-12.
- [16] Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, et al. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Nat Genet, 2009, 41(9): 1006-1010. doi: 10.1038/ng.430.
- [17] Bahari G, Hashemi M, Naderi M, et al. IKZF1 gene polymorphisms increased the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in an Iranian population [J]. Tumour Biol, 2016, 37(7):9579-9586. doi: 10.1007/s13277-016-4853-0.

(收稿日期:2016-05-11)

(本文编辑:王叶青)