Wnt 通路中卷曲蛋白 4 和分泌型卷曲相关蛋白 1 在儿童急性淋巴细胞白血病中的表达

周　碧　王文鹏　周　敏　李　宣　高吉照

摘　要　目的　研究 Wnt 通路中卷曲蛋白 4(Fz4)和分泌型卷曲相关蛋白 1(sFRP1)在急性淋巴细胞白血病(ALL)患儿的表达及作用。**方法**　随机选取 50 例初发且经诱导治疗第 33 天骨髓达完全缓解的 ALL 患儿,分别留取化学药物治疗(简称化疗)治疗前骨髓和治疗第 33 天完全缓解骨髓,作为初发组和缓解组,收集 20 例免疫性血小板减少症患儿骨髓作为对照组,依照危险度分层将初发组 50 例 ALL 患儿划分高危组($n=12$)、中危组($n=11$)和低危组($n=27$)。Real - time PCR 法检测骨髓单个核细胞中 Fz4 mRNA 和 sFRP1 mRNA 表达,Western blot 法检测骨髓单个核细胞中 Fz4 和 sFRP1 蛋白表达。**结果**　初发组 Fz4 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于缓解组和对照组($P<0.05$)、sFRP1 mRNA 和蛋白相对表达量明显低于缓解组和对照组($P<0.05$)。初发组中 Fz4 与 sFRP1 的 mRNA 表达、蛋白表达均呈负相关($P<0.05$)。高、中危组 Fz4 mRNA 和蛋白相对表达量均高于低危组($P<0.05$),高、中危组 sFRP1 表达均低于低危组($P<0.05$)。**结论**　Fz4 表达升高和(或)sFRP1 表达降低可能参与儿童 ALL 的发病,其表达异常程度可能与预后相关。

关键词　急性淋巴细胞白血病　Wnt 通路　卷曲蛋白 4　分泌型卷曲相关蛋白 1

中图分类号　R72　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2020.05.032

Expression of Fz4 and sFRP1 in the Wnt pathway in Acute Lymphoblastic Leukemia of Childhood. *Zhou Bi, Wang Wenpeng, Zhou Min, et al. Department of Pediatric Hematology and Oncology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Jiangsu 221000, China*

Abstract　Objective　To investigate the expression of frizzled 4(Fz4) and secreted frizzled - related protein 1(sFRP1) in children with acute lymphoblastic leukemia in Wnt pathway and the impact on prognosis. **Methods**　Totally 50 children with ALL newly diagnosed and achieving complete remission on the 33rd day after induction therapy was selected randomly. The bone marrow of these children with pre - treatment and CR were taken as the initial group and the remission group respectively. The bone marrow of 20 children with ITP was collected as the control group. According to risk stratification, 50 children with ALL in the initial group were divided into high risk group ($n=12$) and intermediate risk group($n=11$) and low risk group($n=27$). Real - time PCR was used to measure the expression of Fz4 and sFRP1 mRNA, Western blot was used to detect the expression of Fz4 and sFRP1 protein. **Results**　The expression of Fz4 mRNA and protein in the initial group was significantly higher than that in the remission group and the control group ($P<0.05$). The expression of sFRP1 mRNA and protein in the initial group was significantly lower than that in the remission group and the control group ($P<0.05$). There was a negative correlation between the expression of Fz4 and sFRP1 in the initial group($P<0.05$). The expression of Fz4 mRNA and protein in the HR group and IR group was higher than that in the LR group($P<0.05$). The expression of sFRP1 mRNA and protein in the HR group and IR group was lower than that in the LR group($P<0.05$). **Conclusion**　Increased expression of Fz4 and(or) decreased expression of sFRP1 may be involved in the pathogenesis of ALL of childhood, and the degree of abnormality of two factor′sexpression may be related to prognosis.

Key words　Acute lymphoblastic leukemia; Wnt pathway; Fz4; sFRP1

急性淋巴细胞白血病(acute lymphoplastic leukemia, ALL)是儿童时期最常见肿瘤性疾病,占 15 岁以下肿瘤患者总数的 25%,近 20 年来发生率不断增加,其发病可能与免疫、感染、辐射和遗传等因素相关,具体机制尚不明确[1,2]。目前临床以长程化学药物治疗为主,病程中不可避免合并脏器损伤、血流感染等,且部分患儿化疗后不缓解、缓解后或骨髓移植后或嵌合抗原受体 T 细胞免疫治疗后复发,问题的解决需要新型治疗方案。Wnt 通路尤其是 Wnt/β - catenin 信号通路与多种肿瘤的发生、进展关系密切[3]。笔者前期已对通路因子 β - catenin、Wif - 1 和 DVL 的表达进行研究,证明 Wnt/β - catenin 通路参与了儿童 ALL 的发生[4~6]。本研究通过分析骨髓单

作者单位:221000　徐州医科大学附属医院

通讯作者:高吉照,主任医师,副教授,电子信箱:xz3765595@163.com

核细胞中 Fz4 和 sFRP1 的表达，进一步探索 Wnt 通路与儿童 ALL 的关系，寻求新的治疗靶点。

资料与方法

1. 研究资料：留取徐州医科大学附属医院儿科血液与肿瘤病区与徐州医科大学附属儿童医院血液与肿瘤科就诊的免疫性血小板减少（immune thrombocytopenia，ITP）患儿和 ALL 患儿骨髓，ITP 诊断依据《儿童原发性免疫性血小板减少症诊疗建议》[7]，ALL 患儿入组条件：①骨髓细胞形态学初诊 ALL；②依据《儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议（第四次修订）》[8]评估及治疗且第 33 天骨髓达完全缓解；③确诊前未使用激素及其他免疫抑制剂；④排除其他恶性疾病。实验设计及操作流程获徐州医科大学附属医院医学伦理学委员会批准及患儿监护人书面知情同意。

2. 实验分组：随机选取符合条件 ALL 患儿 50 例，分别留取治疗前及治疗后第 33 天患儿骨髓作为初发组和缓解组，收集 20 例 ITP 患儿骨髓作为对照组。将初发组 50 例 ALL 患儿按危险度分为高危（high risk，HR）组、中危（intermediate risk，IR）组和低危（low risk，LR）组。

3. 主要试剂与设备：TRIzol（美国 Invitrogen 公司），cDNA 第一链合成试剂盒（日本 TaKaRa 公司），rabbit anti－GAPDH（中国江苏凯基生物技术股份有限公司），羊抗兔 IgG－HRP，兔抗－SFRP1（英国 Abcam 公司），兔抗－Frizzled 4（中国博奥森生物科技有限公司），Western blot 法检测试剂盒（KGP1201，中国凯基生物技术股份有限公司），One Step TB Green™ PrimeScript™ real－time PCR Kit Ⅱ（SYBR Green，日本 TaKaRa 公司），荧光定量 PCR 循环仪（美国 ABI 公司），Trans－Blot Turbo 全能型蛋白转印系统（美国 Bio－Rad 公司），凝胶成像系统（G：BOXChemiXR5，英国 Syngeni 公司）。

4. 留取患儿骨髓 2.5ml，肝素抗凝，密度梯度离心法分离单个核细胞，－80℃冰箱冻存待用。

5. Real－time PCR 法检测骨髓单个核细胞中 Fz4 和 sFRP1 mRNA 的表达：参照 TRIzol 说明书提取总 RNA，取已提取 RNA 样本至 495μl，1×TE Buffer 中，测定 260nm 和 280nm 处吸光度（*A*）值；*A*260/*A*280 结果在 1.8～2.1，抽提的 RNA 纯度符合实验要求。依据 cDNA 第一链合成试剂盒说明书行反转录合成 cDNA。Fz4 上游引物 5′－CGTGACCAAGATGCCCAACCT－3′，下游引物 5′－CGTACTGGATGAGCGGTGTGAA－3′，89bp；sFRP1 上游引物 5′－AGCTTGTGCTGTACCTGAAGAATGG－3′，下游引物 5′－CATGATGAGGAAGTGGTGGCTGAG－3′，80bp；GAPDH 上游引物 5′－AGATCATCAGCAATGCCTCCT－3′，下游引物 5′－TGAGTCCTTCCACGATACCAA－3′，90bp。PCR 扩增反应体系：2×real－time PCR Master Mix 10μl，模板（cDNA 稀释 10 倍）1μl，上下游引物（10μmol/L）各 1μl，0.1% DEPC 水 7μl。反应条件：95℃预变性 5min；95℃变性 15s，60℃退火 20s，72℃延伸 40s，共 40 个循环；95℃变性 15s，骤冷至 60℃，制作熔解曲线。使用 ABI 7500 System SDS Software 软件，比较 Ct 值分析相对定量结果，mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

6. Western blot 法检测骨髓单个核细胞中 Fz4 和 sFRP1 蛋白的表达：取分离所得骨髓血单个核细胞约 1×10^7 个，加入约 100μl RIPA 裂解液冰上裂解 30min，4℃ 12000r/min 离心 5min，收集上清液，采用 BCA 法测定各样品中蛋白的浓度。取等量（200μg）各样品行 10% SDS－PAGE 电泳，电泳结束后将目的条带半干转至 NC 膜上，转膜结束后，取出 NC 膜并作好标记，用 TBST 洗膜 10min×3 次。将膜放入含一抗（用 Western 一抗稀释液稀释）的平皿中，4℃摇床振荡孵育过夜；第 2 天取出，室温振荡 30min，吸弃一抗，TBST 洗 10min×3 次；用 5% 脱脂奶粉封闭液稀释二抗，室温摇床振荡反应 1～2h；二抗反应结束后，回收二抗。用 TBST 洗膜 5～10min×3 显色，使用 G：BOX chemiXR5 成像，使用 Gel－Pro32 软件对结果进行灰度分析。

7. 统计学方法：使用 SPSS 23.0 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，*K－S* 检验数据正态性；Fz4 和 sFRP1 在初发组和缓解组表达的比较均采用配对样本 *t* 检验，初发组、缓解组与对照组比较均采用独立样本 *t* 检验；皮尔逊（*Pearson*）积差相关分析初发组 Fz4 和 sFRP1 表达的相关性；不同危险组比较采用单因素方差（*One－Way ANOVA*）分析，其中方差齐时使用 *LSD* 检验，方差不齐时使用 *Dunnett's T3* 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 基本资料：50 例 ALL 患儿，年龄 6 个月～13 岁，患儿中位年龄 4 岁，其中男性 26 例、女性 24 例；20 例 ITP 患儿，年龄 5 个月～14 岁，患儿中位年龄 3 岁，其中男性 9 例、女性 11 例。各组年龄和性别构成

比比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。初发组包括 HR 患儿 12 例、IR 患儿 11 例和 LR 患儿 27 例。

2. 初发组、缓解组和对照组中 Fz4、sFRP1 mRNA 和蛋白的表达结果:初发组 Fz4 mRNA 和蛋白相对表达量均明显高于缓解组和对照组($P<0.05$),sFRP1 mRNA 和蛋白相对表达量均明显低于缓解组和对照组($P<0.05$);缓解组、对照组中 Fz4 和 sFRP1 mRNA、蛋白表达比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表 1、图 1。

表 1　各组 Fz4 和 sFRP1 mRNA 和蛋白的相对表达量($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Fz4 表达		sFRP1 表达	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
初发组	50	3.218 ±0.563	0.489 ±0.102	0.343 ±0.134	0.145 ±0.058
缓解组	50	0.426 ±0.087 *	0.107 ±0.025 *	2.624 ±0.801 *	0.263 ±0.084 *
对照组	20	0.395 ±0.080 *	0.097 ±0.018 *	2.402 ±0.338 *	0.290 ±0.050 *

与初发组比较,* $P<0.05$

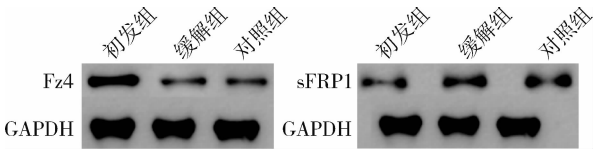

图 1　各组两因子蛋白表达

3. 初发组 Fz4 和 sFRP1 mRNA 和蛋白表达的相关性分析:初发组中,Fz4、sFRP1 mRNA 和蛋白相对表达量呈负相关($P<0.05$),详见表 2。

表 2　Fz4 和 sFRP1 表达的相关性分析

初发组	r	P
mRNA	-0.609	<0.05
蛋白	-0.474	<0.05

4. 不同危险度分组中 Fz4 和 sFRP1 的表达水平:初发组中,高、中危组 Fz4 mRNA 和蛋白相对表达量均高于低危组($P<0.05$),高、中危组 sFRP1 mRNA 和蛋白相对表达量均低于低危组($P<0.05$),详见表 3,图 2。

表 3　各危险度分组中 Fz4 和 sFRP1 mRNA 和蛋白的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	Fz4		sFRP1	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
高危组	3.771 ±0.412	0.575 ±0.102	0.221 ±0.055	0.093 ±0.029
中危组	3.509 ±0.536	0.532 ±0.106	0.237 ±0.069	0.106 ±0.029
低危组	2.854 ±0.318 *	0.432 ±0.056 *	0.444 ±0.088 *	0.188 ±0.038 *
F	26.011	14.750	49.991	44.954
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

与高危组比较,* $P<0.05$;与中危组比较,# $P<0.05$

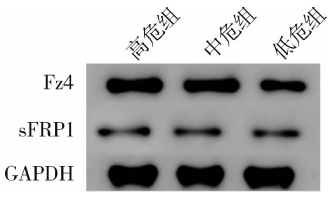

图 2　不同危险度分组两因子蛋白表达

讨　　论

Wnt 通路是重要细胞信号转导通路之一,在多细胞真核生物中广泛存在,Wnt 信号传递涉及多因子、多环节、多种调控,目前已知 Wnt 通路有 4 条,分别是经典 Wnt 通路(canonical Wnt/β - catenin pathway)、平面细胞极性通路、Wnt/Ca^{2+} 通路、调节纺锤体的方向和非对称细胞分裂的胞内通路[9]。Wnt/β - catenin 通路的研究较为广泛,其异常激活与多种肿瘤的发生、发展、转移和预后有关[3]。

Wnt 通路成分复杂,进化保守,信号级联传递,Fz 是 Wnt 配体的核心受体,在胞膜水平,Wnt 配体与 Fz 的半胱氨酸富集区(cysteine rich domain,CRD)特异性结合并激活通路,发挥"开关"的作用[10,11]。sFRP 位于胞外,其 30% ~50% 的 CRD 与 Fz 同源,但较 Fz 缺少跨膜域和胞质域,故 sFRP 可竞争性结合 Wnt 配体或与 Fz 结合形成 CRD 二聚体,阻止 Wnt 信号进一步转导,是通路的天然抑制剂[12]。

本研究发现,初发患儿中 sFRP1 mRNA 和蛋白表达均低于缓解和 ITP 患儿,Fz4 mRNA 和蛋白均高于缓解和 ITP 患儿,两因子在 ALL 缓解和 ITP 患儿表达差异无统计学意义;初发组患儿 Fz4 和 sFRP1 mRNA、蛋白表达均呈负相关。研究表明,正常人骨髓单个核细胞不能扩增出 sFRP1 的甲基化特异性引物,而 ALL 细胞株 Molt - 4 和 Jurkat 中 sFRP1 呈完全甲基化状态,且去甲基化药物能够恢复 sFRP1 表达,并逆转疾病进展[13]。本研究发现,ALL 儿童中 sFRP1

因启动子异常甲基化而失活，sFRP1 表达降低，不能与 Fz4 结合形成 CRD 二聚体或竞争性结合 Wnt 配体，Fz4 表达增加，Wnt 信号活性增强，进一步激活下游肿瘤靶基因如 Cyclin D1、c－Myc、Axin2、Msl1 的转录，最终导致儿童 ALL 的发生[14~16]；诱导化疗通过去甲基化恢复了 sFRP1 的表达，故完全缓解 ALL 患儿和 ITP 患儿，sFRP1 和 Fz4 的表达差异无统计学意义。

危险度分层是儿童 ALL 预后独立危险因素，不同危险度分层患儿接受化学药物治疗的强度亦不同[17]。本研究发现初发高危、中危 ALL 患儿 sFRP1 mRNA 和蛋白表达均低于低危患儿，初发高危、中危 ALL 患儿 Fz4 mRNA 和蛋白表达均高于低危患儿，初发高危、中危 ALL 患儿两因子表达差异无统计学意义，可能因为不同危险程度 ALL 患儿 sFRP1 基因 CpG 岛甲基化倾向性不同，低危组患儿 sFRP1 基因具有更高的表达活性，具体机制尚需进一步研究[18]。

综上所述，研究认为，Wnt 通路中 Fz4 表达升高、sFRP1 表达降低参与了儿童 ALL 的发病，两因子的表达定量对疾病的评估和治疗有重要临床指导意义。

参考文献

1 Steliarova－Foucher E, Colombet M, Ries LAG, *et al*. International incidence of childhood cancer, 2001－10: a population－based registry study[J]. Lancet Oncol, 2017, 18(6): 719－731

2 Pulte D, Gondos A, Brenner H. Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st century[J]. Blood, 2009, 113(7): 1408－1411

3 Nusse R. Wnt/β－catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169(6): 985－999

4 高吉照，赵继鸥，谭英. Wnt 通路中 Wif－1 和 β－catenin 在儿童急性淋巴细胞白血病中的表达[J]. 中国当代儿科杂志，2016，18(9): 835－839

5 谭英，高吉照，赵继鸥. 儿童急性淋巴细胞白血病患者骨髓细胞中 Wnt/β－catenin 基因表达水平的研究[J]. 吉林医学，2016，37(10): 2441－2443

6 王文鹏，郭雷，李艳，等. Wnt 通路中散乱蛋白在儿童急性淋巴细胞白血病中的表达及意义[J]. 中国当代儿科杂志，2019，21(5): 411－414

7 中华医学会儿科学分会血液学组，《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童原发性免疫性血小板减少症诊疗建议[J]. 中华儿科杂志，2013，51(5): 382－384

8 中华医学会儿科学分会血液学组，《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第四次修订)[J]. 中华儿科杂志，2014，52(9): 641－644

9 Niehrs, Christof. The complex world of WNT receptor signalling[J]. Nature reviews. Mol Cell Biol, 2012, 13(12): 767－779

10 Janda CY, Waghray D, Levin AM, *et al*. Structural basis of Wnt recognition by frizzled[J]. Science(NewYork, N. Y.), 2012, 337(6090): 59－64

11 Cai H, Chen Y, Yang X, *et al*. Let7b modulates the Wnt/β－catenin pathway in liver cancer cells via downregulated frizzled4[J]. Tumour Biol, 2017, 39(7): 1010428317716076

12 Lavergne E, Hendaoui I, Coulouarn C, *et al*. Blocking Wnt signaling by SFRP－like molecules inhibits in vivo cell proliferation and tumor growth in cells carrying active |[beta]|－catenin[J]. Oncogene, 2011, 30(4): 423

13 徐成波，沈建箴，沈松菲，等. 分泌型卷曲相关蛋白基因启动子甲基化状态检测在急性白血病中的意义[J]. 中华内科杂志，2010，49(9): 769－771

14 Zhang Y, Tan Y, Wang H, *et al*. Long non－coding RNA plasmacytoma variant translocation 1 (PVT1) enhances proliferation, migration, and epithelial－mesenchymal transition (EMT) of pituitary adenoma cells by activating β－catenin, c－myc, and cyclin D1 expression[J]. Med Sci Moni, 2019, 25: 7652－7659

15 Jho EH, Zhang T, Domon C, *et al*. Wnt/beta－catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(4): 1172－1183

16 Spears E. Novel double－negative feedback loop between adenomatous polyposis coli and Musashi1 in colon epithelia[J]. J Biol Chem, 2011, 286(7): 4946－4950

17 陆海燕. 儿童急性淋巴细胞白血病的长期随访和预后分析[J]. 中国实用医刊，2018，45(11): 43－46

18 Fan SC, Zou JX, Xu HB, *et al*. Predicted methylation landscape of all CpG islands on the human genome[J]. Chin Sci Bull, 2010, 55(22): 2353－2358

(收稿日期：2019－10－10)
(修回日期：2019－11－24)

(上接第 112 页)

21 Bussolati B, Grange C, Tei L, *et al*. Targeting of human renal tumor－derived endothelial cells with peptides obtained by phage display[J]. J Mol Med, 2007, 85(8): 897－906

22 Arap W, Haedicke W, Bernasconi M. Targeting the prostate for destruction through a vascular address[J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(3): 1527－1531

23 Sharma S, Mann AP, Mölder T, *et al*. Vascular changes in tumors resistant to a vascular disrupting nanoparticle treatment[J]. J Control Release, 2017, 268(3): 49－56

24 管明强，史占军，姜勇，等. 体内筛选骨肉瘤血管内皮特异性结合肽[J]. 中华实验外科杂志，2009，26(12): 1763

(收稿日期：2019－11－12)
(修回日期：2019－11－27)