

渝东北地区 441 例白血病患者融合基因表达特点分析

孟凡萍¹, 郝 坡²

(1. 重庆三峡中心医院, 重庆 404000; 2. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 400020)

摘要: 目的 探讨渝东北地区白血病患者融合基因表达特点。方法选取 2017 年 1 月~2019 年 9 月期间于重庆三峡中心医院就诊的白血病患者 441 例, 用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(FQ-RT-PCR)法检测其 43 种白血病融合基因的表达情况。结果 441 例患者中, 检出 193 例患者有融合基因表达, 其中 BCR/ABL 为 75.13% (145/193), AML-ETO 为 8.29% (16/193), PML-RAR α 为 6.22% (12/193), MLL-AF9 为 4.15% (8/193), CBF β -MYH11 为 2.59% (5/193), MLL-AF4, WT1 和 E2A-PBX1 均为 0.52% (1/193); MLL-AF6, MLL-AF10, ELL, ENL 联合阳性率为 1.55% (3/193), WT1 和 PML-RAR α 联合阳性率 0.52% (1/193), 其余基因未检出。结论 融合基因的表达在白血病的诊断和疗效评估中起重要作用。

关键词: 白血病; 融合基因; 实时荧光定量逆转录 PCR; 白血病微小残留病变; BCR-ABL

中图分类号: R557; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 02-015-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.02.005

Analysis of Expression Characteristics of Fusion Gene in 441 Patients with Leukemia in Northeastern Chongqing

MENG Fan-ping¹, HAO Po²

(1. Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China; 2. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404020, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression characteristics of fusion gene in leukemia patients in northeastern Chongqing. **Methods** 441 leukemia patients were selected from January 2017 to September 2019 in Chongqing Three Gorges Central Hospital, and the expression of 43 leukemia fusion genes was detected by FQ-RT-PCR method. **Results** Of the 441 patients, 193 patients were detected with fusion gene expression, of which BCR/ABL expression was the most common, accounting for 75.13% (145/193), AML-ETO was 8.29% (16/193) for second, PML-RAR α was 6.22% (12/193) for third, MLL-AF9 was 4.15% (8/193) and CBF β -MYH11 was 2.59% (5/193). MLL-AF4, WT1 and E2A-PBX1 were all 0.52% (1/193). The positive rates of MLL-AF6, MLL-AF10, ELL and ENL were 1.55% (3/193). WT1 and PML-RAR α were 0.52% (1/193), and the remaining genes were not detected. **Conclusion** The expression of fusion gene plays an important role in the diagnosis and evaluation of leukemia.

Keywords: leukemia; fusion genes; FQ-RT-PCR; MRD; BCR-ABL

白血病(leukemia)属于造血系统的恶性肿瘤,是一组高度异质性的恶性血液病,其特点为白血病细胞呈现异常增生伴分化成熟障碍。我国白血病发病率在 3/10 万~5/10 万之间。世界卫生组织在 2008 年就对造血组织肿瘤进行了新的分类,依据是基因表达分析和新一代测序,作为鉴定骨髓肿瘤和急性白血病的新方法,这些分析和测序可以显著改善诊断标准和预后指征^[1]。本研究采用实时荧光定量逆转录 PCR(flurogenic quantitative reverse transcription-PCR, FQ-RT-PCR)对白血病 43 种融合基因(BCR-ABL, SIL-TAL1, E2A-HLF, TEL-AML1, MLL-AF4, E2A-PBX1, AML1-ETO, MLL-

AF9, PML-RAR α , PLZF-RAR α , STAT5b-RAR α , MLL-AF6, MLL-AF10, MLL-ELL, MLL-ENL, NPM-MLF1, TEL-PDGFRB, FIP1L1-PDGFR α , AML1-MDS1/EVI1, AML1-MTG16, CBF β -MYH11, DEK-CAN, TEL-ABL, ETV6-PDGFR α , NUP98-HoxA13, NUP98-HoxC11, NUP98-HoxD13, NUP98-HoxA9, NUP98-HoxA11, NUP98-PMX1, TEL-JAK2, MLL-AF17, MLL-AF1q, MLL-AF1p, MLL-AFX, MLL-SEPT6, NPM-RAR α , FIP1L1-RAR α , PRKAR1A-RAR α , NUMA1-RAR α , NPM-ALK, SET-CAN, TLS-ERG)的筛查,数量庞大,几乎覆盖了白血病基因病变的 50% 以上,能很好地

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目(重庆市科技局, cstc2019jcyj-msxmX0122)。

作者简介: 孟凡萍(1980-),女,医学博士,副主任检验师,研究方向:脂代谢和胰岛素抵抗, E-mail: 63405353@qq.com。

通讯作者: 郝坡(1979-),男,医学硕士,副教授,研究方向:肿瘤分子生物学检验, E-mail: hpo1979@126.com。

对渝东北地区白血病融合基因的表达特点进行筛查,有助于实现白血病早期诊断,指导临床医师选择治疗方案,并更好诊断微量残留白血病。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2017年1月~2019年9月于本院就诊的白血病患者441例,所有病例均经病理证实,临床资料完整,排除其他肿瘤,以及对本研究所涉及疾病有影响的其他疾病。

1.2 试剂和仪器 核酸提取试剂、RNA质量检测试剂、人类白血病43种融合基因检测试剂盒(Fa-RT-PCR法)为上海源奇生物医药科技公司产品,紫外分光光度计购自美国Life公司,荧光定量PCR仪COBAS Z480为德国Cbas公司产品。

1.3 方法

1.3.1 标本收集: 髂后(髂前)上棘抽取骨髓2ml,用EDTA-K2抗凝,保存于Trizol中,低温运输送检。

1.3.2 RT-PCR

1.3.2.1 样本处理: Trizol法提取RNA(按说明书操作)。

1.3.2.2 样本浓度确定: 将RNA逆转录为cDNA,用人体组织RNA质量检测试剂盒进行浓度确定,内参检测 $C_t < 30$ 时,方可进入下一步扩增实验。

1.3.2.3 cDNA扩增: 43种融合基因引物分9份加入反应管,再加入荧光探针、Taq酶、UNG酶以及PCR反应所需的其他试剂,在CobasZ480荧光定量PCR仪上进行扩增。扩增体系为: 预变性42℃ 5min, 94℃ 3min; PCR循环: 94℃ 15s, 60℃ 60s, 40个循环,在60℃时收集荧光信号。检测通道为FAM, CY5, VIC。

2 结果

2.1 441例患者43种融合基因的表达情况 通过对441例白血病患者的骨髓进行43种融合基因的检测,了解其融合基因的表达情况。检测发现,其中193例患者有融合基因的表达,表达率为43.76%(193/441)。在193例有融合基因表达的患者中,融合基因BCR/ABL, AML-ETO, PML-RARa, MLL-AF9, CBF β -MYH11的表达率分别为75.13%(145/193), 8.29%(16/193), 6.22%(12/193), 4.15%(8/193)和2.59%(5/193),融合基因MLL-AF4, WT1和E2A-PBX1的表达率均为0.52%(1/193),同时有MLL-AF6, MLL-AF10, ELL和ENL四种融合基因同时表达的表达率为1.55%(3/193), WT1和PML-RARa两种融合基因同时表达的表达率为0.52%(1/193), 248例患者未检出融合基因。

2.2 BCR/ABL亚型的表达情况 在BCR/ABL亚

型中,表达P210的患者有139例,占95.86%,表达P190的患者仅有4例,占2.76%,而表达P230的患者只有2例,仅占1.38%。从以上亚型表达来看,在BCR/ABL亚型中以P210的表达最重要,故BCR-ABL-P210成为BCL/ABL融合基因检测中的常用检测指标。

3 讨论

白血病是国内十大高发恶性肿瘤之一。研究表明,大部分白血病和淋巴瘤都存在染色体的突变,如染色体的易位、缺失和插入等。染色体的易位大部分情况下会生成融合基因。世界卫生组织2008年发布的白血病和淋巴瘤诊断标准已将染色体易位后融合基因检测作为诊断白血病和淋巴瘤的最重要的检测指标之一,对融合基因的检测分析有利于白血病和淋巴瘤治疗方案的确定和预后判断^[1]。

融合基因是白血病的分子生物学特异性标志。通过检测白血病融合基因,为急性髓细胞白血病(AML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性粒细胞性白血病(CML)、慢性粒单核细胞性白血病(CMML)、骨髓增生异常综合征等白血病类型的分子分型提供临床参考,并对预后评估和个体化用药提供指导。如BCR-ABL融合基因,可在95%以上的慢性粒细胞白血病(CML)患者血液中检出。PML-RARa(t(15;17)(q21;q22))融合基因为急性早幼粒细胞白血病(APL)所特有^[2],PML-RARa强阳性预示着有复发的可能,故患者的预后与融合基因的种类有重要关系。目前治疗APL的方案是通过全反式维甲酸(ATRA)诱导早幼粒细胞向成熟细胞分化,并且联合应用砷剂进一步诱导这些异常细胞凋亡,这种治疗方法预后非常好,复发率低,其他类型白血病或其他融合基因如MLL相关融合基因等则对于全反式维甲酸的治疗不敏感、预后差,死亡率高^[3-4]。

近年来,白血病融合基因的研究成为白血病发病机制和抗白血病研究的热点,取得了一定成绩,尤其是染色体易位后形成的融合基因已作为诊断不同类型白血病的分子标志物和唯一确诊依据,如急性髓细胞白血病AML-M4Eo: CBF β /MYH11,inv(16)(p13;q22);急性早幼粒细胞白血病APL: PML/RARa, t(15;17)(q21;q22);慢性粒细胞白血病CML或部分急性淋巴细胞白血病ALL: BCR/ABL, t(9;22)(q34;q11);AML-M4/M5: 11q23MLL;ALL-L3: MYC/IgH, t(8;14)(q24;q32);AML-M2: AML1/ETO, t(8;21)(q22;q22)。

白血病微小残留病变(minimal residual disease, MRD)是导致急性白血病复发的根源,是导致白血病病人治疗后无法长期生存的关键。融合

基因的检测对MRD的监测有重要意义^[5]。目前有三种方法广泛用于MRD的研究,分别是逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)扩增融合基因、多参数流式细胞术和PCR扩增免疫球蛋白抗原受体重排或T细胞受体重排。RT-PCR技术比传统的细胞学方法更灵敏,灵敏度可达 $10^3 \sim 10^5$ ($10^3 \sim 10^5$ 细胞中有1个肿瘤细胞)以上,且可在临床症状出现前5~8个月就能检测到,故RT-PCR技术成为最常用的融合基因检测技术^[6-8]。张坤龙等^[9]采用的多重RT-PCR同时检测儿童急性白血病29种常见的融合基因,可很好的进行白血病的MICM分型和指导临床个体化治疗,具有覆盖面广、检出率高、假阴性低等优点。目前用于RT-PCR检测的靶基因主要是白血病特异性染色体的易位产生的融合基因^[10],白血病患者体内融合基因转录的拷贝数随病情进展而逐渐升高,随病情好转而逐渐下降,并且早于细胞遗传学染色体核型分析。由此得出白血病融合基因的检测对白血病的急性程度、克隆特性及分型、指导科学治疗具有重要价值。定期检测白血病微小残留病很有必要。临床上通过检测微小残留病融合基因表达水平,指导白血病的临床治疗,决定是否继续化疗,是否存在耐药,并依此指导临床更换治疗方案,也可评价造血干细胞移植的净化效果^[11-12]。

本研究采用的FQ-RT-PCR技术具有高特异度、高准确度和高灵敏度的特点。对渝东北地区441例白血病患者骨髓标本中的白血病相关融合基因的表达分析,结果有193例患者有融合基因表达,阳性率为43.76%,表达占前三位的融合基因分别是BCR/ABL,AML-ETO和PML-RARa,表达率分别为75.13%,8.29%和6.22%,而在BCR/ABL亚型中,P210阳性者最多,占95.71%。

本研究结果可在更大程度上更准确地辅助渝东北地区白血病的临床诊断并指导相关临床用药。白血病融合基因的检测可早期诊断和治疗白血病,不仅可以更多挽救患者生命,改善生存状态,减轻患者家庭经济负担具有重要意义。

参考文献:

- [1] ARBER D A, ORAZI A, HASSERJIAN R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. Blood, 2016, 127(20): 2391-2405.
- [2] DE BRAEKELEER E, DOUET-GUILBERT N, DE BRAEKELEER M. RARA fusion genes in acute promyelocytic leukemia: a review[J]. Expert Review of Hematology, 2014, 7(3): 347-357.
- [3] WANG Xinrui, FAN Huiyong, XU Congling, et al. KDM3B suppresses APL progression by restricting chromatin accessibility and facilitating the ATRA-mediated degradation of PML/RAR α [J]. Cancer Cell International, 2019, 19(1): 256.
- [4] YE Jing, ZHA Jie, SHI Yuanfei, et al. Co-inhibition of HDAC and MLL-menin interaction targets MLL-rearranged acute myeloid leukemia cells via disruption of DNA damage checkpoint and DNA repair[J]. Clinical Epigenetics, 2019, 11(1): 137.
- [5] TOMLINSON B, LAZARUS H M. Enhancing acute myeloid leukemia therapy - monitoring response using residual disease testing as a guide to therapeutic decision-making[J]. Expert Review of Hematology, 2017, 10(6): 563-574.
- [6] TONG Yongqing, ZHAO Zhijun, LIU Bei, et al. New rapid method to detect BCR-ABL fusion genes with multiplex RT-qPCR in one-tube at a time[J]. Leukemia Research, 2018, 69: 47-53.
- [7] WANG Ziwei, GUO Mengqiao, ZHANG Yuesheng, et al. The applicability of multiparameter flow cytometry for the detection of minimal residual disease using different-from-normal panels to predict relapse in patients with acute myeloid leukemia after allogeneic transplantation[J]. International Journal of Laboratory Hematology, 2019, 41(5): 607-614.
- [8] HRABOVSKY S, FOLBER F, HORACEK J M, et al. Comparison of real-time quantitative polymerase chain reaction and eight-color flow cytometry in assessment of minimal residual disease in adult acute lymphoblastic leukemia[J]. Clinical Lymphoma Myeloma & Leukemia, 2018, 18(11): 743-748.
- [9] 张坤龙, 王宁玲, 徐修才, 等. 多重 RT-PCR 检测儿童急性淋巴细胞白血病融合基因的临床研究 [J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2014, 19 (5): 233-237.
ZHANG Kunlong, WANG Ningling, XU Xiucan, et al. The clinical study on fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia by multiplex RT-PCR [J]. Journal of China Pediatric Blood and Cancer, 2014, 19 (5): 233-237.
- [10] L VVIK JUUL-DAM K, GULDBORG NYVOLD C, VALERHAUGEN H, et al. Measurable residual disease monitoring using Wilms tumor gene 1 expression in childhood acute myeloid leukemia based on child-specific reference values[J]. Pediatr Blood Cancer, 2019, 66(6): e27671.
- [11] SELIM A G, MOORE A S. Molecular minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia challenges and future directions[J]. Journal of Molecular Diagnostics, 2018, 20(4): 389-397.
- [12] SINGH M, BHATIA P, TREHAN A, et al. High frequency of intermediate and poor risk copy number abnormalities in pediatric cohort of B-ALL correlate with high MRD post induction. [J]. Leuk Res, 2018, 66: 79-84.

收稿日期: 2019-10-13

修回日期: 2019-11-29