

59 例慢性淋巴细胞白血病分子遗传学异常的 FISH 检测^{*}

傅 蓓, 林晓岚, 陈万紫, 陈加弟, 黄慧芳[△] (福建医科大学附属协和医院福建省血液病研究所/福建省血液病学重点实验室, 福州 350001)

【摘要】 目的 探讨间期荧光原位杂交(FISH)技术检测慢性淋巴细胞白血病(CLL)常见分子遗传学异常的意义。**方法** 采用 CSF12(12p11.1~12q11.1)、D13S25(13q14.3)、RB1(13q14)、ATM(11q22.3)及 p53(17p13.1)等 5 种探针对 59 例初诊 CLL 患者的骨髓细胞进行间期 FISH 检测, 分析上述分子遗传学异常与患者的临床 Binet 分期、Rai 分期及相关实验室检查, 包括初诊时外周血淋巴细胞绝对值计数、血红蛋白(Hb)水平、血小板计数(PLT)、血清乳酸脱氢酶(LDH)、 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)、CD38 和 ZAP70 水平的相关性。**结果** 59 例 CLL 初诊患者中, 存在 1 种及 1 种以上分子遗传学异常的有 49 例, 占 83.1%。其中, del(13q) 34 例(69.4%), 12 号染色体三体(+12)和 p53 基因缺失各 11 例(22.4%), ATM 基因缺失 5 例(10.2%)。各分子遗传学异常与患者临床分期、外周血淋巴细胞计数绝对值、Hb、PLT、LDH、 β_2 -MG、CD38 和 ZAP70 表达水平之间均无明显相关性($P>0.05$)。 ≥ 60 岁患者 del(13q)异常率(67.6%)显著高于 <60 岁患者(40.9%), 女性患者 p53 基因缺失的异常率(35.2%)显著高于男性患者(11.9%), 差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** FISH 技术是检测 CLL 患者分子遗传学异常快速、准确、敏感的方法, 分子遗传学异常与患者初诊时临床表现之间无明显相关性。

【关键词】 慢性淋巴细胞白血病; 荧光原位杂交; 分子遗传学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.20.009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)20-2991-03

Fluorescence in situ hybridization detection of molecular cytogenetic aberrations in 59 patients with chronic lymphocytic leukemia^{*} FU Qiang, LIN Xiao-lan, CHEN Wan-zi, CHEN Jia-di, HUANG Hui-fang[△] (Fujian Institute of Hematology/Fujian Provincial Key Laboratory on Hematology, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou, Fujian 350001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the significance of interphase fluorescence in situ hybridization(FISH) technology for detecting common molecular cytogenetic abnormalities in the patients with chronic lymphocytic leukemia(CLL). **Methods** The bone marrow cells from 59 patients with newly diagnosed CLL were performed the interphase FISH detection by 5 probes, including CSF12(12p11.1-12q11.1), D13S25(13q14.3), RB1(13q14), ATM(11q22.3) and p53(17p13.1). Then the correlation between the molecular cytogenetic abnormalities and the clinical Binet staging, Rai staging and the related laboratory examinations including peripheral blood lymphocyte absolute count, Hb, PLT, LDH, β_2 -MG, ZAP70 and CD38 levels were analyzed. **Results** Among 59 cases of newly diagnosed CLL, 49 cases(83.1%) had one and more than one kind of molecular cytogenetic aberrations, in which del(13q) was 34 cases(69.4%), each of +12 and del(p53) was 11 cases(22.4%) and del(ATM) was 5 cases(10.2%). The molecular cytogenetic abnormalities had no obvious correlation with the Binet staging, Rai staging, peripheral lymphocyte absolute count, Hb, PLT, serum levels of LDH, β_2 -MG, ZAP70 and CD38($P>0.05$). The abnormality rate of del(13q) in the over 60 years old group was significantly higher than that in the less than 60 years old group($P=0.03$), and the abnormality rate of p53 deletion in female was higher than that in male, the differences were statistically significant($P<0.05$). **Conclusion** The FISH technology is a rapid, accurate and sensitive method in detecting molecular cytogenetic abnormalities in CLL patients, and there is no significant correlation between molecular cytogenetic abnormalities and clinical manifestations in first visiting hospital.

【Key words】 chronic lymphocytic leukemia; FISH; molecular genetics

慢性淋巴细胞白血病(CLL)是一种低度恶性的 B 淋巴细胞克隆性增殖疾病, 预后个体差异很大, 染色体异常是影响 CLL 预后和进展的重要因素, 同时也是指导临床治疗的重要参考。但是由于 CLL 细胞有丝分裂指数低下, 仅有 20% 左右的 CLL 患者能够通过常规染色体显带技术(CC)检测到克隆性染色体异常。间期荧光原位杂交(FISH)技术不受分裂象的限制, 能够通过特定探针特异性地检测间期细胞的遗传学异

常, 大大提高了其细胞遗传学的异常检出率。本研究应用 FISH 技术, 采用 5 种探针检测 59 例初诊 CLL 患者常见的遗传学异常, 并结合患者初诊时的临床资料, 探讨各种遗传学异常在临床诊断和预后判断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1 月至 2014 年 12 月福建医科大学附属协和医院血液科收治的初诊 CLL 患者 59 例, 其中男

^{*} 基金项目: 国家临床重点专科建设项目(财社[2011]170 号); 福建省临床重点专科建设项目(闽卫科教[2012]149 号)。

作者简介: 傅蓓, 女, 本科, 检验技师, 主要从事临床检验研究。 [△] 通讯作者, E-mail: huanghui@126.com。

42 例,女 17 例,年龄 33~85 岁,中位年龄 62 岁,所有病例诊断标准参照《中国慢性淋巴细胞白血病诊断与治疗专家共识》^[1]。
1.2 仪器与试剂 固定液(甲醇:冰醋酸=3:1),2×枸橼酸盐(SSC)缓冲液,100%乙醇,85%乙醇,70%乙醇,北京金菩嘉公司的 CSF12(12p11.1~12q11.1)、D13S25(13q14.3)、RB1(13q14)、ATM(11q22.3)及 p53(17p13.1)5 种探针(浓度为 0.1%),NP-40/2×SSC 缓冲液,烤片机,水浴箱,Thermobrite 杂交仪,Olympus BX51 荧光显微镜。

1.3 方法 取-20℃保存的骨髓细胞固定悬液,用新鲜固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)调至合适浓度滴片后,按照试剂盒提供的 FISH 操作说明书操作,Olympus BX51 荧光显微镜下观察杂交信号,每份标本分析 300 个细胞,不计数重叠细胞。采用 10 例异基因骨髓移植供者的骨髓标本作为正常对照建立各探针检测阈值,以大于正常对照组 $\bar{x} \pm 3s$ 作为判断阳性的阈值。回顾性分析 59 例患者的临床资料,包括 CLL 的临床 Binet 分期和 Rai 分期及相关实验室检查,包括初诊时外周血淋巴细胞绝对值计数、血红蛋白(Hb)水平、血小板计数(PLT)、血清乳酸脱氢酶(LDH)、 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)、CD38 和信号转导分子 ζ 链相关蛋白-70(ZAP-70)结果。LDH 活性采用速率法测定, ≥ 245 U/L 为异常; β_2 -MG 采用放射免疫学方法检测, $\geq 3.0 \mu\text{g/L}$ 为异常;流式细胞术检测 CD38 和 ZAP70,分别以 $\geq 30\%$ 和 $\geq 20\%$ 判断为高表达。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件包进行统计学处理,率的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 FISH 检测结果 59 例 CLL 初诊患者中,存在 1 种及 1 种以上分子遗传学异常的有 49 例,占 83.1%。检出 del(13q) 34 例,占 69.4%(34/49)。del(13q)有 3 种模式,其中单纯 RB1 基因(13q14)缺失 1 例,占 2.9%(1/34);单纯 D13S25(13q14.3)缺失 11 例,占 32.4%(11/34);以上二者共同缺失 22 例,占 64.7%(22/34)。12 号染色体三体(+12)和 p53 基因缺失均为 11 例,各占 22.4%(11/49)。ATM 基因缺失 5 例,占 10.2%(5/49)。11 例检出 2 种及 2 种以上异常,占 18.6%;均存在 del(13q)。其中,del(13q)伴+12 和 del(13q)伴 p53 基因缺失者均有 4 例,各占 36.4%(4/11);del(13q)伴 ATM 基因缺失仅有 1 例,占 9.1%(1/11);有 2 例同时存在 del(13q)、ATM 缺失和 P53 缺失。

2.2 分子遗传学异常与相关预后因素之间的关系 59 例病例,根据 Rai 分期,0 期 16 例,I 期 18 例,II 期 13 例,III 期 4 例,IV 期 8 例;根据 Binet 分期,A 期 28 例,B 期 19 例,C 期 12 例。患者性别、年龄、临床分期、外周血淋巴细胞绝对值计数、Hb、PLT、LDH、 β_2 -MG、CD38 和 ZAP70 表达的不同分组中检出的分子遗传学异常率,见表 1。各遗传学异常与患者临床分期、外周血淋巴细胞计数绝对值、Hb、PLT、LDH、 β_2 -MG、CD38 和 ZAP70 表达水平之间差异无统计学意义($P>0.05$);60 岁以上患者 del(13q)异常率(67.6%)显著高于 60 岁以下患者(40.9%),差异有统计学意义($P=0.03$);女性患者 p53 基因缺失的异常率(35.2%)显著高于男性患者(11.9%),差异有统计学意义($P=0.04$)。

表 1 不同临床资料患者分子遗传学的异常检出率[n(%)]					
临床资料	n	del(13q)	ATM 缺失	+12	p53 缺失
性别					
男	42	26(61.9)	4(9.5)	8(19.0)	5(11.9)
女	17	8(47.1)	1(5.9)	4(23.5)	6(35.2)*

续表 1 不同临床资料患者分子遗传学的异常检出率[n(%)]

临床资料	n	del(13q)	ATM 缺失	+12	p53 缺失
年龄					
≥60 岁	37	25(67.6)	2(5.4)	7(18.9)	6(16.2)
<60 岁	22	9(40.9)*	3(13.6)	5(22.7)	5(22.7)
Binet 分期					
A	28	16(57.1)	4(14.3)	8(28.6)	6(21.4)
B	19	11(57.9)	1(5.3)	3(15.8)	3(15.8)
C	12	7(58.3)	0(0.0)	1(8.3)	2(16.7)
Bai 分期					
0	16	9(56.3)	0(0.0)	3(18.8)	3(18.8)
I	18	10(55.6)	3(16.7)	3(16.7)	3(16.7)
II	13	8(61.5)	1(7.7)	5(38.5)	3(23.1)
III	4	2(50.0)	1(7.7)	1(25.0)	1(25.0)
IV	8	5(62.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(12.5)
外周血淋巴细胞计数					
≥50×10 ⁹ /L	10	7(70.0)	0(0.0)	2(20.0)	1(10.0)
<50×10 ⁹ /L	49	27(55.1)	5(10.2)	10(20.4)	10(20.4)
Hb					
≥110 g/L	48	26(54.2)	5(10.9)	10(21.7)	11(22.9)
<110 g/L	9	8(77.8)	0(0.0)	0(0.0)	1(9.1)
PLT					
≥100×10 ⁹ /L	49	29(59.2)	4(8.2)	11(22.4)	9(18.4)
<100×10 ⁹ /L	8	5(62.5)	1(12.5)	0(0.0)	2(25.0)
LDH					
≥245 U/L	9	6(66.7)	1(11.1)	3(33.3)	3(33.3)
<245 U/L	47	28(59.6)	3(6.4)	9(19.1)	8(17.0)
β_2 -MG					
≥3 $\mu\text{g/mL}$	9	6(66.7)	2(22.2)	2(22.2)	2(22.2)
<3 $\mu\text{g/mL}$	21	11(52.4)	1(4.8)	3(14.3)	2(9.5)
CD38					
≥30%	5	2(40.0)	0(0.0)	1(20.0)	2(40.0)
<30%	43	25(58.1)	3(7.0)	11(25.6)	7(16.3)
ZAP70					
≥20%	3	1(33.3)	0(0.0)	1(33.3)	1(33.3)
<20%	45	26(57.8)	3(6.7)	11(24.4)	8(17.8)

注:与男性比较,* $P<0.05$;与 ≥ 60 岁患者比较,* $P<0.05$ 。

3 讨 论

CLL 是西方国家成人最常见的一种白血病,但在我国发病率较低,它是一种低度恶性的小淋巴细胞克隆性疾病,多见于老年人。CLL 患者的预后差异显著,染色体异常是影响 CLL 预后和进展的一个重要因素;但是由于 CLL 细胞大多处于间期,增殖能力低下,北京大学血液病研究所的 1 项多中心研究表明,常规染色体显带技术仅有 19.6%能够检测到克隆性染色体异常,且最常见的染色体异常为+12^[2]。FISH 技术利用碱基互补配对原则,用核酸探针来检测染色体上相应碱基片段的改变,可以同时分析中期和间期细胞的染色体异常,且 FISH 技术具有更高的灵敏度,能够检测出常规核型分析所不能发现的 DNA 小片段(1~10³ kb)改变;因此,FISH 检测大大提高了 CLL 患者遗传学异常的检出率。

本研究中的 59 例患者中位年龄为 62 岁,男性患病率为女性的 2.5 倍,FISH 检测出的遗传学异常率为 83.1%,高于国内报道的 63.3%~72.7%^[3-4],与 Döhner 等^[5]的报道相近。最常见的分子遗传学异常为 del(13q),占有异常的 69.4%;其次为+12 和 p53 基因缺失,各占 22.4%;ATM 缺失仅有 5 例,占 10.2%。与 Lai 等^[2]报道的 del(13q)(56.4%),+12(34.5%),p53 基因缺失(33.5%)和 ATM 缺失(30.5%)相比,

除了 del(13q14) 检出率较高以外,其余检出率均较低,但高于 Durak 等^[6]报道的 del(11q22)5.1% 的检出率。

有研究表明,单纯 del(13q) 的患者预后较好,其总体生存率甚至高于核型正常患者,但同时伴有 +12、ATM 缺失或 P53 缺失的患者预后较差^[7]。Döhner 等^[5]的研究指出 del(13q) 的中位生存期(MS)为 133 个月,无治疗生存期(TFS)可达 92 个月。但李文君等^[8]发现 RB1 缺失阳性的患者 Binet 分期级别较高。本研究中 23 例 RB1 阳性患者 Binet 分期处于 A 期的有 11 例,B~C 期的有 12 例,并无显著差异。同时,本研究发现 60 岁以上患者 del(13q) 检出率显著高于 60 岁以下患者($P=0.03$)。

+12 是首先被发现的 CLL 常发的染色体异常,发生率为 10%~35%^[2]。有文献报道,+12 的患者常见于晚期,具有中等的预后及生存率^[9]。但也有学者在用 FISH 评估 +12 对预后的影响时发现,患者是否存在 +12 与其生存期的长短并无相关性^[5,10]。丛佳等^[11]的研究发现 +12 遗传学异常在 >60 岁年龄组中更易出现。本研究中 11 例检出 +12 的患者中有 7 例为 >60 岁,但并未发现 +12 与年龄之间具有显著相关性。

ATM 基因位于 11q22 常见的缺失区,可能在细胞周期调控的 DNA 损伤修复中发挥作用,并与激活肿瘤抑制基因 p53 有关,伴有 ATM 基因缺失的 CLL 患者发病年龄一般在 55 岁以下,且病程常表现为侵袭性,有广泛的外周、腹部、纵隔淋巴结肿大,疾病进展迅速,预后差^[11]。本研究中,<60 岁的患者 ATM 缺失率为 13.6%,≥60 岁的患者为 5.4%,提示 ATM 缺失的年轻患者较多。李文君等^[8]发现 ATM 缺失与患者血红蛋白水平有显著相关性,ATM 缺失的患者更易出现全身广泛淋巴结肿大,而全身淋巴结肿大和低血红蛋白水平均导致预后不良。但本研究中的 5 例 ATM 缺失患者中,有 4 例处于 Binet A 期,且 5 例患者的 Hb 浓度均高于 110 g/L,可能与样本量较少或区域差异有关。

p53 基因定位于 17p13,是人体重要的抑癌基因。p53 基因缺失是预后不良的重要指标,患者多处于疾病晚期^[2]。El-Ghammaz 等^[12]指出 17p- 阳性患者多为 65 岁以上,Rai 分期 II 以上,并具有更高水平的 LDH 和 β_2 -MG。而买买提力·依马木等^[13]的研究结果提示 p53 基因缺失与疾病后期及 ZAP-70 高表达有关。本研究发现女性患者 p53 基因缺失的异常率(35.2%)显著高于男性患者(11.9%),差异有统计学意义($P=0.04$);p53 基因缺失的患者中,≥60 岁和 Rai 分期 II 以上的患者,均占 45.5%(5/11);但仅有 1 例患者 ZAP70 高表达。各项临床指标与 p53 基因缺失的相关性有待于继续扩大样本量进行深入研究。

B 细胞 CD38 或 ZAP70 表达与免疫球蛋白重链可变区(IgHV)突变情况有一定相关性,CD38 或 ZAP70 阳性患者预后差^[1]。因此,CD38 或 ZAP70 常被作为有价值的 CLL 预后指标。本研究中检出 7 例 CD38 或 ZAP70 高表达患者,其中 2 例处于 Binet A 期,均为单纯 del(13q);5 例处于 Binet B~C 期,其中 2 例 p53 基因缺失,1 例 +12,1 例 del(13q) 伴 +12。但未发现 CD38 或 ZAP70 表达与临床分期及各种遗传学异常间的相关性。研究中还发现 1 例 RB1、D13S25、ATM、+12 和 p53 均扩增的患者,Binet 分期 A 期,其临床表现及预后还有待于进一步随访观察。

本研究发现各遗传学异常与患者临床分期、外周血淋巴细胞绝对值计数、Hb、PLT、LDH、 β_2 -MG、CD38 和 ZAP70 表达

水平之间无明显相关性;≥60 岁患者 del(13q) 检出率显著高于 <60 岁患者;女性患者 p53 基因缺失的检出率显著高于男性患者。将来,本实验室将通过扩大样本量及对患者预后做长期随访观察以深入探讨遗传学异常与 CLL 预后的相关性。

参考文献

- [1] 李建勇,邱录贵. 中国慢性淋巴细胞白血病诊断与治疗专家共识[J]. 中华血液学杂志,2010,31(2):141-144.
- [2] Lai YY, Huang XJ. Cytogenetic characteristics of B cell chronic lymphocytic leukemia in 275 Chinese patients by fluorescence in situ hybridization; a multicenter study[J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(16): 2417-2422.
- [3] 戴丹,张秀群,张学忠,等. 30 例慢性淋巴细胞白血病分子遗传学异常的 FISH 检测的意义[J]. 中国实验血液学杂志,2009,17(1):31-35.
- [4] Qiu HX, Xu W, Cao XS, et al. Cytogenetic characterisation in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia: a prospective, multicenter study on 143 cases analysed with interphase fluorescence in situ hybridization [J]. Leuk Lymphoma, 2008, 49(10): 1887-1892.
- [5] Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia[J]. N Engl J Med, 2000, 343(26): 1910-1916.
- [6] Durak B, Akay OM, Aslan V, et al. Prognostic impact of chromosome alterations detected by FISH in Turkish patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia[J]. Cancer Genet Cytoenet, 2009, 188(2): 65-69.
- [7] Saqatys EM, Zhang L. Clinical and laboratory prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia [J]. Cancer Control, 2012, 19(1): 18-25.
- [8] 李文君,郭力,侯明,等. 慢性淋巴细胞白血病间期荧光原位杂交检测染色体异常及临床分析[J]. 中国实验血液学杂志,2010,18(2):494-498.
- [9] Zenz T, Döhner H, Stilgenbauer S. Genetics and risk-stratified approach to therapy in chronic lymphocytic leukemia[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2007, 20(3): 439-453.
- [10] 曹鹏飞,陈苏华,张国平,等. 荧光原位杂交技术检测慢性淋巴细胞白血病细胞遗传学的异常[J]. 临床血液学杂志,2014,27(3):240-243.
- [11] 丛佳,李辉,周道斌,等. 84 例慢性淋巴细胞白血病遗传学异常及预后分析[J]. 基础医学与临床,2012,32(1):1-6.
- [12] El-Ghammaz AM, Abdelwahed E, Mostafa NN, et al. De novo deletion 17p13.1 as a predictor for disease progression in chronic lymphocytic leukemia[J]. Clin Exp Med, 2014:317-318.
- [13] 买买提力·依马木,古再丽努尔·吾甫尔,王晓敏,等. 荧光原位杂交技术检测新疆慢性淋巴细胞白血病患者 p53 基因缺失及其临床意义[J]. 中华医学遗传学杂志,2014, 31(4):499-503.