

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 17. 003

322 例急性髓系白血病分子遗传学分型特征的研究^{*}

苟 阳,唐永杰,杨 程,墙 星,陈思宇,彭贤贵[△]
陆军军医大学新桥医院血液病医学中心,重庆 400037

摘要:**目的** 分析急性髓系白血病(AML)患者的染色体及基因改变情况,并对其进行基因分型。**方法** 对 2017 年 5 月至 2018 年 12 月于该院就诊的 322 例初诊 AML 患者的骨髓细胞进行染色体、荧光定量 PCR 和二代测序检测。用 WHO 2016 髓系白血病分型系统和 NEJM 2016 文献定义的标准对其进行基因分型。**结果** 322 例 AML 患者中,95.7% 的患者检测到遗传学或分子学改变;FLT3、NPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA 双突变为最常见的 5 种基因改变;58.7% 的 AML 可被分到 WHO 2016 定义的基因型中,77.8% 的 AML 可被分到 NEJM 2016 定义的基因类型中,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 结合染色体和基因检测结果,依据现有的国际统一的 WHO 疾病分型标准,超过半数的 AML 可被划分到一个独立的基因型;依据 NEJM 2016 的研究结果,更多的患者可以被划分到一个独立的基因型。

关键词:急性髓系白血病; 基因突变; 基因分型; 二代测序

中图法分类号:R733.7

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)17-2440-04

Genotyping of acute myeloid leukemia in 322 cases^{*}

GOU Yang, TANG Yongjie, YANG Cheng, QIANG Xing, CHEN Siyu, PENG Xiangui[△]
Medical Center of Hematology, Xinqiao Hospital of Army Medical
University, Chongqing 400037, China

Abstract: Objective To analyze the chromosomal and genetic changes of the acute myeloid leukemia (AML) patients, and to genotype them. **Methods** A test of chromosome, fluorescence quantitative PCR and next-generation sequencing was done for the bone marrow cells of 322 AML patients treated in Xinqiao hospital from May 1, 2017 to December 31, 2018. Genotyping them with the standards of WHO 2016 and NEJM 2016. **Results** A total of 95.7% was detected with a mutation or chromosome abnormal; FLT3, NPM1, DNMT3A, NRAS, and the CEBPA double mutation were the five most common genetic changes; 58.7% were genotyped with the standards of WHO 2016, 77.8% were genotyped with the standards of NEJM 2016, The difference was statistically significant. **Conclusion** More than half of the AML can be divided into an independent genotype combining chromosome and genetic abnormal, on the basis of the existing international unified standard of disease classification, and more basing on the NEJM 2016 research.

Key words: acute myeloid leukemia; gene mutation; genotyping; next-generation sequencing

急性髓系白血病(AML)是一大类以髓系原始细胞克隆性增殖为特征的肿瘤,其具体分型已经从 1976 年的以原始细胞比例和形态学特点为分型标准的 FAB 分型进展到最新的以遗传学和分子学改变为主要分型标准的 WHO 分型^[1-2]。相对于以细胞形态表象为特征的 FAB 分型,WHO 分型更着眼于肿瘤细胞的本质,其分型为临床治疗和预后判断提供了更多的参考价值。WHO 2016 对 AML 的分型包括一大类伴有重新性遗传学改变的 AML:伴 PML-RAR α 、AML1-ETO、CBF β -MYH11、NPM1、CEBPA 双突变、MLL-AF9、BCR-ABL、inv3/t(3;3)等异常的 AML。在临床工作中,不是每例 AML 患者都有上述遗传学

或分子学异常,除了上述异常,还有许多其他常见异常,如:TP53、C-KIT、ASXL1、FLT3-ITD、RAS、DNMT3A、TET2、复杂核型、5q-、7q-等。这些遗传学和分子学异常对 AML 患者预后的判断有很大的价值,有些基因成为药物靶向治疗的靶点,但很多基因的预后价值和靶向治疗的疗效研究报道各不相同^[3-6]。这是因为往往多个基因相互作用决定一个肿瘤的形成和转归,只有对某类基因共同作用形成一个亚型的 AML 以及对 AML 的本质有清晰的认识,才能对所有的 AML 患者进行基因分型,真正做到精准治疗和预后判断^[7]。笔者对在本院就诊的 AML 患者进行遗传学和分子学检测,尝试利用其染色体和基因改变信

^{*} 基金项目:重庆市社会事业与民生保障科技创新专项项目(cstc2017shmsA130003)。

作者简介:苟阳,女,技师,主要从事血液系统疾病的研究。 [△] 通信作者,E-mail:pxg1964@sina.com。

息对 AML 患者进行基因分型,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本取自 2017 年 5 月至 2018 年 12 月在本院初诊的 322 例 AML 患者,经 MICM 分型符合 AML 的诊断分型标准。按 FAB 分型,其中 M1 20 例,M2 97 例,M3 49 例,M4 71 例,M5 46 例,M7 1 例,AML 未分型 20 例(因其形态复杂性,本医院未对其做出具体的 FAB 分型);另有 AML-MRC 18 例,患者具体信息见表 1。分别采集 2~4 mL 骨髓标本进行染色体、融合基因和基因突变检测。

表 1 322 例 AML 患者的基本信息

FAB 分型	n	性别(n)		年龄 (岁)	中位年龄 (岁)
		男	女		
AML-M1	20	7	13	24~73	42
AML-M2	97	47	50	8~76	49
AML-M3	49	29	20	13~80	47
AML-M4	71	35	36	8~79	46
AML-M5	46	30	16	8~69	48
AML-M7	1	0	1	50	50
AML-MRC	18	10	8	18~76	42
AML 未分型	20	11	9	21~80	61

1.2 仪器与试剂 二代测序仪(Miniseq, Illumina), 荧光定量 PCR 仪(Combas z480, 罗氏), 细胞培养箱(M2300, 希尔顿), 染色体图文分析系统(Genikon, NIKON), 高速离心机(Micro21R, Thermo)等;全血或骨髓 DNA 提取试剂盒(天根), TRIZOL(Invitrogen), 43 种融合基因分型检测试剂盒(上海源奇生命科技有限公司), AML、MDS、MPN 常见突变基因检测试剂盒(上海源奇生命科技有限公司)等。

1.3 方法

1.3.1 染色体检测 骨髓细胞培养、R 显带、Giemsa 染色,分析 20 个细胞分裂象。

1.3.2 融合基因检测 骨髓标本提取 mRNA,采用上海源奇生命科技有限公司的 AL43 种融合基因分型检测试剂盒进行检测,检测基因包括:BCR-ABL、AML1-ETO、PML-RAR α 、CBF β -MYH11、MLL-AF9、MLL-AF6/10/ELL/ENL、MLL-AF17/AFX、F1P1LI-PDGFR α 、TEL-PDGFR β 、ETV6-PDGFR α 、PLZF-RAR α 、STAT5b-RAR α 、DEK-CAN、TEL-ABL、NUP98-HOX、NPM-MLF1、AML1-MDS1/EVI1/MTG16 等。

1.3.3 基因突变检测 骨髓标本提取 DNA,采用上海源奇生命科技有限公司的 AML/MDS/MPN 相关二代测序试剂盒对基因进行突变检测,检测基因包括:FLT3、NPM1、C-KIT、CEBPA、DNMT3A、IDH1、IDH2、GATA2、WT1、TET2、EZH2、RUNX1、ASXL1、PHF6、TP53、SF3B1、SRSF2、U2AF1、ZRSR2、NRAS、CBL、SETBP1、BCOR、JAK2、KMT2A 等。

1.4 统计学处理 按 WHO 2016 和 NEJM 2016^[8] 文献报道对 AML 患者进行基因分型,采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,WHO 2016 和 NEJM 2016 对 AML 进行基因分型的比例采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AML 的染色体和基因改变情况 322 例 AML 患者中,308 例检测到染色体或基因改变,占 95.7%;其中 141 例(43.9%)有融合基因形成,144 例(44.8%)有基因突变,98 例(30.4%)有融合基因相关易位之外的染色体改变。融合基因中,最常见的几类为 PML-RAR α 、AML1-ETO、BCR-ABL、CBF β -MYH11、MLL-AF9;突变基因中,最常见的几类为 FLT3、NPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA 双突变、C-KIT,基因突变分布情况见图 1。染色体改变中,复杂核型者 29 例(9.0%),除常见的易位以外,其余最常累及的染色体为 21(4.5%)、8(3.6%)、7(3.1%)、10(2.7%)、5(2.7%)、11(1.8%)、20(1.3%)、X(1.3%)、Y(1.3%)等。

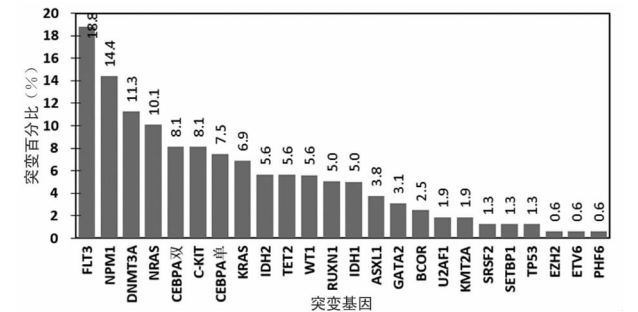


图 1 AML 患者的基因突变分布

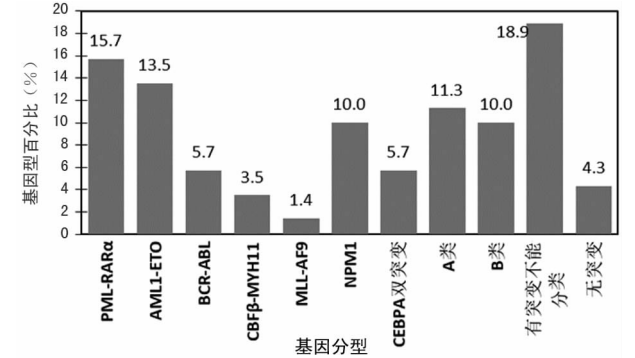
2.2 AML 按 WHO 2016 进行基因分型的情况 按 WHO 2016 的分型标准,PML-RAR α (15.7%)、AML1-ETO(13.5%)、BCR-ABL(5.7%)、CBF β -MYH11(3.5%)、MLL-AF9(1.4%)、NPM1(10.0%)、CEBPA 双突变(5.7%)、RUNX1(3.5%)等基因阳性者合计 189 例(58.7%),除有 1 例 PML-RAR α 阳性者合并 RUNX1 突变外,未见任意以上两种或几种基因同时出现于一个 AML 病例中,本研究未见 t(6;9) DEK-NUP214 及 inv(3)/t(3;3) 等极少见的基因改变类型。

有 133 例(41.3%)的 AML 不能归到 WHO 2016 分型中的任何基因型,这 133 例 AML 中近 90% 还有其余基因或染色体改变,突变最多的仍然是 FLT3(10.5%)、DNMT3A(9.5%)、CEBPA 单突变(8.4%)、IDH1(6.3%)、NRAS(5.3%)等,染色体改变中复杂核型、+21、-5/5q-、-7/7q-较常见。

2.3 AML 按 NEJM 2016 文献报道进行基因分型的情况 在 NEJM 2016 的研究中,对 AML 的基因分型是在 WHO 2016 的基础上删除了一类暂定的伴 RUNX1 突变的 AML,增加了两大类,即伴染色体或

RNA 剪接相关的基因突变的 AML(本研究简称为 A 类): 伴 RUNX1、ASXL1、BCOR、EZH2、SRSF2、SF3B1、U2AF1、ZRSR2、MLL-PTD 或 STAG 基因突; 伴 TP53 突变或非整倍体染色体的 AML(本研究简称为 B 类): 伴-7/7q、-5/5q、-4/4q、-9q、-12/12p、-17/17p、-18/18p、-20/20q、+11/11q、+13、+21 或 +22。有 A 类或 B 类基因突变的患者预后均较差。

按 NEJM 2016 的分类标准, 本研究将有 36 例 (11.3%, RUNX1 阳性) 被分到 A 类, 32 例 (10.0%) 被分到 B 类, 合计有 77.8% 的患者 (具体分型数据见图 2) 可以分到一个基因型, 相对于 WHO 2016 的 58.7%, χ^2 检验结果显示其差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: A 类为伴染色体或 RNA 剪接相关的基因突变的 AML; B 类为伴 TP53 突变或非整倍体染色体的 AML

图 2 AML 患者的基因分型

2.4 AML 各基因亚型伴随基因突变的情况 21 例 (41.6%) PML-RARα 阳性者伴有 FLT3-ITD (15 例) 或 KIT、RAS 突变; 14 例 (32.2%) AML1-ETO 阳性者伴有 KIT/RAS (11 例) 或 FLT3-ITD 突变; 10 例 AML1-ETO 阳性者伴有易位以外的染色体异常, 且有 3 例为复杂核型; 4 例 (37.5%) CBFβ-MYH11 阳性者伴有 KIT/RAS 突变; 215 例 (65.2%) NPM1 阳性者伴有 DNMT3A/FLT3-ITD/TET2/IDH 突变; 8 例 (46.2%) CEBPA 双突变者伴有 KIT 或染色体改变; BCR-ABL 阳性者仅有 3 例 (15.4%) 伴有基因和染色体改变, MLL 阳性者仅有 3 例 (28.5%) 伴有基因和染色体改变。即在 AML 各基因亚型中最常见的伴随基因为信号通路相关基因改变 (FLT3、KIT、RAS) 和表观遗传学相关基因改变 (DNMT3A、IDH、TET2), NPM1 和 AML1-ETO 阳性的 AML 伴随基因改变较多, MLL 和 BCR-ABL 阳性的 AML 伴随基因改变较少。

3 讨论

随着测序技术的进步以及该技术在临床的广泛应用, AML 等肿瘤的基因检测广度和深度有了大幅度提升, AML 患者的基因改变图谱越来越清晰, 我国也有相关的研究报道, 这些研究一般只聚焦在核型正常的 AML, 着重分析 AML 的基因突变情况。

WANG 等^[9]研究中, 145 例 AML 患者一共发现了 39 个基因的 503 个突变, NPM1、CEBPA、DNMT3A、GATA2、NRAS、TET2、FLT3、IDH2 和 WT1 的突变率超过 10%。WANG 等^[10]对 95 例患者进行 101 个基因的筛查, 发现 CEBPA、NPM1、DNMT3A、FLT3-ITD、NRAS、IDH2、WT1 基因的突变超过 10%。上述 2 个报道中, 中国人 CEBPA 的突变频率 (28.4%~36.9%) 均高于欧洲人 (4%~8%)。本研究的数据中, AML 前 5 位的突变基因与北京的报道非常相似, 中国人群 CEBPA 的突变率确实比欧洲人群高^[11]。

有很多关于基因突变与 AML 预后的报道, 但是联合核型改变、融合基因形成和基因突变来对 AML 进行基因分型的文章和数据比较少^[11-12], 其中最具有权威性的一篇报道就是 NEJM 2016。在 NEJM 2016 对 1 540 例 AML 的研究中, 有 96% 的 AML 可检测到遗传学或分子学改变, 与本研究的 95.7% 非常相似。本研究中 77.8% 的 AML 可被分到 NEJM 2016 定义的基因类型中, 相对于 NEJM 2016 的 86% 少, 可能跟我国人群中 CEBPA 的突变频率高有一定关系, 本研究中 5.2% 的 CEBPA 单突变 AML 均不能划分到任何基因型中。

在对 AML 进行了基因分型后, 各亚型的 AML 伴随基因改变情况, 以及不同患者的临床和预后仍然都有差异, 比如 NPM1 阳性的 AML, 可同时伴有 DNMT3A 突变, 再伴有 FLT3-ITD 阳性的患者预后明显差于不伴 FLT3-ITD 阳性的患者。笔者对 AML 的基因分型仍只分了几大类, 根据其伴随基因的不同, 各大类还可以继续分为很多小类, 但由于数据量不够及疾病的复杂性, 国际上对各大类基因亚型 AML 的进一步分类还没有比较统一的认识。

AML 的发病机制决定了如何对其进行基因分型, 人们对 AML 发病机制的认识从最初的二次打击理论发展到今天的多个功能类的基因改变共同作用导致 AML 的形成^[7,13-14]。ETO、RARα、CBFβ、NPM1、CEBPA 等为影响细胞分化的基因, KIT、RAS、FLT3 等为信号通路相关影响细胞增殖的基因, TET2、IDH1、IDH2 等为甲基化相关基因, ASXL1、SRSF2、SF3B1、BCOR 等为 RNA 或染色体剪接相关的基因。影响细胞分化相关的基因改变对细胞影响大, 在小鼠模型中可直接导致相关肿瘤形成^[7,14], 因此可根据它们直接把相关 AML 分为一个基因亚型; 甲基化相关基因在各种肿瘤和少部分老年人中普遍存在, 故对分型的意义不大; RNA 或染色体剪接相关的基因和染色体整体的改变对细胞的影响也很大, 故 NEJM 2016 能根据这两类基因改变增加两种新的基因型。虽然 NEJM 2016 对 AML 的基因分型更为全面, 但是增加的两大类里面包含的基因众多, 形态表象不典型, 还有部分病例可同时归到两种基因型, 也有些病例不能归到这些基因型, 还有待寻找更准确、

细致的基因分型标准。或许在未来,人们会发现每个 AML 都有一个独立的基因型,即每个 AML 都有一个独立的发病模式:如 A 患者先有 PML-RAR α ,再有 FLT3-ITD 突变,最终形成 AML-M3; B 患者先有 DNMT3A 突变,再有 PML-RAR α ,也形成 AML-M3; C 患者先有 TET2 突变,再有 ASXL1 突变,再有 NRAS 突变,最终形成伴 RNA 或染色体剪接相关的基因改变的 AML; D 患者只有 +7,形成伴 TP53 突变或非整倍体染色体的 AML, E 患者先有 TET2 突变,再有 FLT3-ITD 突变,形成另一种 AML。即几大类基因改变在不同的患者个体先后发生,最终导致 AML 的形成。

综上所述,本研究结果部分符合二次打击理论,还有更大部分符合多个功能类基因共同导致 AML 形成的理论^[13]。只有做到针对多个功能类基因联合的靶向治疗,控制肿瘤细胞与正常细胞的生长平衡,才能真正做到精准治疗。

参考文献

[1] BENNETT J M, CATOVSKY D, DANIEL M T, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group[J]. Br J Haematol, 1976, 33(4): 451-458.

[2] 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.

[3] ESTEY E, DÖHNER H. Acute myeloid leukemia[J]. Lancet, 2016, 368(9550): 1894-1907.

[4] PRADA-ARISMENDY J, ARROYAVE J C, RÖTH LIS-BERGER S. Molecular biomarkers in acute myeloid leuke-

mia[J]. Blood Rev, 2017, 31(1): 63-76.

[5] 何海涛, 李惠民. 急性髓系白血病靶向治疗的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(1): 245-249.

[6] KAYSER S, LEVIS M J. Advances in targeted therapy for acute myeloid leukaemia[J]. Br J Haematol, 2018, 180(4): 484-500.

[7] 沈杨, 陈赛娟. 急性白血病基因突变与多步骤发病机制和临床相关性[J]. 中国科学(生命科学), 2013, 43(1): 39-45.

[8] PAPAEMMANUIL E, GERSTUNG M, BULLINGER L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2016, 374(23): 2209-2221.

[9] WANG S, ZHANG Y X, HUANG T, et al. Mutation profile and associated clinical features in Chinese patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia[J]. Int J Lab Hematol, 2018, 40(4): 408-418.

[10] WANG B H, LIU Y Y, HOU G Y, et al. Mutational spectrum and risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia patients based on next-generation sequencing[J]. Oncotarget, 2016, 7(22): 32065-32078.

[11] 王舒, 陈冰. 急性髓细胞白血病的分子分型[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2016, 36(8): 1223-1230.

[12] TAYLOR J, XIAO W B, ABDEL-WAHAB O. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics[J]. Blood, 2017, 130(4): 410-423.

[13] MURATI A, BRECCQUEVILLE M, DEVILLIER R A, et al. Myeloid malignancies: mutations, models and management[J]. BMC Cancer, 2012, 12(1): 304-319.

[14] 苟阳, 杨武晨, 杨程, 等. 髓系肿瘤克隆演变的研究进展[J]. 重庆医学, 2015, 44(31): 4443-4445.

(收稿日期: 2019-01-02 修回日期: 2019-03-20)

(上接第 2439 页)

P, et al. Surgical management of lower urinary tract symptoms attributed to benign prostatic hyperplasia: AUA guideline[J]. J Urol, 2018, 200(3): 612-619.

[3] DAVYDOV D S, TSARICHENKO D G, BEZRUKOV E A, et al. Complications of the holmium laser enucleation of prostate for benign prostatic hyperplasia[J]. Urologiia, 2018(1): 42-47.

[4] 吴佼佼, 马红梅, 廖春霞, 等. 医护一体化工作模式在护理领域中的应用现状[J]. 中国医药导报, 2017, 14(4): 38-42.

[5] 卢艳红, 牛红丽. 医护一体化模式在优质护理服务中的应用分析[J/CD]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 66(4): 12990-12991.

[6] 段泉泉, 胜利. 焦虑及抑郁自评量表的临床效度[J]. 中国心理卫生杂志, 2012, 26(9): 676-679.

[7] 邹全信, 侯四川. 经尿道前列腺电切术后并发症的研究进

展[J]. 医学综述, 2011, 17(4): 600-602.

[8] LEYH H, NECKNIG U. Transurethral prostatectomy: management of complications [J]. Urologe A, 2014, 53(5): 699-705.

[9] 汤红霞. 综合护理对老年患者 TURP 术后并发症及患者焦虑状况的影响[J]. 临床护理, 2017, 15(16): 216.

[10] 常宗霞, 袁玮, 刘云, 等. 医护一体化培训模式对提高护理人员核心能力的效果研究[J]. 中华护理教育, 2014, 11(11): 855-857.

[11] 杨力. 医护一体化工作模式运用的研究进展[J]. 当代护士(中旬刊), 2015, 23(1): 9-11.

[12] 夏梅. 大型综合医院护理单元“医护一体化”工作模式的思考与探索[J/CD]. 实用临床护理学电子杂志, 2017, 20(2): 190-192.

(收稿日期: 2019-01-14 修回日期: 2019-04-13)