

急性早幼粒细胞白血病 PML 维甲酸受体 α 融合基因定量检测的应用价值

林 纲, 陈 蕾, 焦志军 (江苏大学附属医院检验科, 江苏镇江 212001)

【摘要】 目的 探讨早幼粒细胞白血病 PML 维甲酸受体 α 融合基因 (PML-RAR α) 定量检测在急性早幼粒细胞白血病诊断、治疗中的临床应用价值。**方法** 采用实时定量聚合酶链反应对 12 例急性早幼粒细胞白血病患者初诊、治疗后完全缓解及复发时 PML-RAR α 进行定量检测, 分析不同阶段其变化程度, 并与同阶段细胞形态学、染色体分析进行比较。**结果** 12 例急性早幼粒细胞白血病患者初发时 PML-RAR α 均为阳性, 完全缓解阶段转为阴性或定量结果呈逐渐下降趋势, 当复发时 PML-RAR α 再次并早于细胞形态学和染色体分析出现阳性, 且定量结果明显高于初发阶段。**结论** PML-RAR α 定量检测可为急性早幼粒细胞白血病诊断、治疗及提示复发提供可靠的依据。

【关键词】 急性早幼粒细胞白血病; 早幼粒细胞白血病 PML 维甲酸受体 α 融合基因; 聚合酶链反应
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 10. 002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)10-1203-02

Clinical application value of quantification of PML-RAR α fusion gene in acute promyelocytic leukemia LIN Gang, CHEN Lei, JIAO Zhi-jun (Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

【Abstract】 Objective To explore the clinical application value of quantification of PML-RAR α fusion gene in the diagnosis and therapy of acute promyelocytic leukemia (APL). **Methods** The PML-RAR α fusion gene was quantified using real-time quantitative real time-polymerase chain reaction in 12 APL patients at initial diagnosis, complete remission and relapse. The levels of PML-RAR α fusion gene, morphology and chromosomal alterations at different times were compared. **Results** PML-RAR α fusion gene was positive in all 12 APL patients at initial diagnosis and decreased or turned negative at complete remission. PML-RAR α fusion gene became positive again after relapse, which was earlier than the morphologic and chromosomal abnormalities. Furthermore, the levels of PML-RAR α fusion gene at relapse were significantly higher than that at initial diagnosis. **Conclusion** The quantification of PML-RAR α fusion gene could provide evidence for the diagnosis, therapy and relapse in APL.

【Key words】 acute promyelocytic leukemia; PML-RAR α fusion gene; polymerase chain reaction

急性早幼粒细胞白血病 (APL) 是一种特殊类型的急性白血病, 约占急性髓系白血病 (AML) 的 10%~15%, 多见于成人^[1-2]。95% 以上的 APL 患者具有 t(15;17)(q22;q21) 染色体易位, 造成 APL PML 维甲酸受体 α 融合基因 (PML-RAR α) 基因重排, 形成特异性的 PML-RAR α , 是检测 APL 微小残留病 (MRD) 的重要分子标志^[3]。因 PML 基因的断裂点不同, 可以产生 3 种不同的 PML-RAR α 异构体, 分别为长型 (L 型)、短型 (S 型) 和变异型 (V 型), 其中以 L 型和 S 型较常见, V 型较少见^[4]。本文对临床基因诊断实验室采用实时定量聚合酶链反应 (RQ-PCR) 检测的 12 例初诊 APL 患者 PML-RAR α 的定量检测结果进行回顾性分析, 以探讨其在 APL 诊断、治疗、预防复发中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2008 年 2 月至 2012 年 2 月于本院血液科初诊的 12 例 APL 患者, 其中男 6 例, 女 6 例, 年龄 18~63 岁, 平均 49.5 岁。其中 2012 年 2 月诊断的 1 例新病例因初发治疗完全缓解后尚未来本院复诊, 其余 11 例患者均完成预期治疗方案, 并从治疗开始密切随访, 随访时间 14~50 个月, 平均 28 个月, 先后共检测融合基因 106 次。诊断和分期符合《血液病诊断及疗效标准》(第 3 版) 标准^[5]。

1.2 骨髓 PML-RAR α 检测 (1) 单个核细胞分离和 RNA 提取: 应用淋巴细胞分离液 (天津灏洋生物制品科技有限责任公司

产品) 分离新鲜乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝骨髓标本得到单个核细胞, 根据 PML-RAR α 荧光定量试剂盒 (上海申友生物技术有限责任公司产品) 说明书进行总 RNA 提取。(2) 逆转录和 RQ-PCR: 在 15 μ L PCR 反应模板中加入含有逆转录酶的 10 μ L PCR 反应液, 42 $^{\circ}$ C 37 min, 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 循环 40 次, 37 $^{\circ}$ C 1 min。反应在 LightCycler PCR 荧光检测仪 (德国罗氏公司产品) 上进行, 其中 ABL 基因作为内参照基因。(3) 定量标准品设定: PML-RAR α 阳性标准品均为 3×10^4 、 3×10^5 、 3×10^6 、 3×10^7 copy/mL, ABL 阳性标准品均为 3×10^3 、 3×10^4 、 3×10^5 、 3×10^6 copy/mL。(4) 结果判定: 阴性对照的 PML-RAR α 循环阈值 (Ct) ≥ 38 或无扩增曲线; 临界对照的浓度对数为 3.83 ± 0.50 ; 阳性对照的浓度对数为 5.83 ± 0.50 者判定为阳性。以标准品拷贝数为横坐标, 实际测得的 Ct 值为纵坐标得到工作曲线, 将待测标本的 Ct 值带入标准曲线即得到该基因的拷贝数。PML-RAR α 相对含量 = PML-RAR α /ABL。如待测样本中 PML-RAR α 的 Ct ≥ 38 或无扩增曲线则判为阴性; 内参照基因 ABL 的 Ct ≥ 38 或无扩增曲线则判为降解。

1.3 细胞遗传学检查 取患者骨髓细胞培养 24 h 后收获制备染色体, 核型分析采用 R 显带技术, 按《人类细胞遗传学国际命名体制 (ISCN1995)》进行核型分析。

1.4 血细胞分析 采集 EDTA 抗凝全血, Coulter LH750 全

自动血细胞分析仪进行分析。

2 结 果

2.1 PML-RARα 定量检测结果 12 例初发患者均为阳性, 其中 9 例为 PML-RARα-L 阳性, 定量结果 0. 010 81 ~ 3. 863 63; 3 例为 PML-RARα-S 阳性, 定量结果 0. 032 95 ~ 0. 092 89(表 1)。随访的 11 例完全缓解(CR)患者长期动态检测 PML-RARα, 均于诱导治疗 1~2 个月内达到血液学缓解,

其中 8 例一直为 CR, PML-RARα 持续阴性; 1 例 L 型患者 PML-RARα 由 0. 143 24(初发)→0(CR1)→0. 072 03(第 1 次 CR1 后 13 个月出现分子生物学复发)→0. 234 61(第 1 次 CR 后 13. 5 个月血液学复发); 1 例 S 型患者 PML-RARα 由 0. 092 89(初发)→0(第 1 次 CR)→0. 126 71(第 1 次 CR 后 40 个月血液学复发), 1 例 L 型患者经诱导治疗 2 个月后虽达血液学 CR, 但 PML-RARα-L 持续阳性呈逐渐下降趋势。

表 1 12 例 APL 患者初诊检验结果

编号	性别	PML-RARα 结果	染色体结果	骨髓早幼粒细胞比例(%)	外周血白细胞计数(×10 ⁹ /L)
1	男	S+; 0. 032 95	46XY, t(15; 17){20}	68. 0	88. 5
2	女	S+; 0. 092 89	46XX, t(15; 17){20}	89. 0	4. 4
3	女	L+; 0. 010 81	46XX, t(15; 17){20}	86. 5	30. 7
4	男	L+; 0. 143 24	46XY, t(15; 17){20}	87. 5	2. 7
5	女	L+; 0. 778 78	46XX, t(15; 17){12}/46XX{8}	90. 5	1. 0
6	女	L+; 0. 233 41	46XX, t(15; 17){15}/46XX{5}	84. 0	1. 2
7	男	L+; 0. 487 49	46XY, t(15; 17){6}/46XY{14}	80. 0	1. 0
8	男	L+; 0. 149 18	46XY, t(15; 17), t(1; x)/{14}/46XY{6}	83. 5	2. 2
9	女	L+; 0. 127 81	46XX, t(15; 17), Xq- {12}/46XX{8}	90. 0	1. 2
10	男	S+; 0. 078 72	46XY, t(15; 17){13}/46XX{7}	54. 0	74. 6
11	女	L+; 3. 863 63	46XX, t(15; 17), +21, +13{10}/46XX{10}	78. 0	37. 8
12	男	L+; 0. 679 01	46XY, t(15; 17){14}/46XX{6}	80. 5	3. 8

注: + 为阳性, {20} 表示染色体 20 个分裂相。

2.2 染色体核型分析结果 12 例患者全部存在 t(15; 17), 其中 3 例同时伴有其他染色体异常。1 例 t(15; 17), +21, +13; 1 例 t(15; 17), Xq-; 另 1 例 t(15; 17), t(1; x) (表 1)。

2.3 其他实验室检验结果 细胞形态学分类以颗粒增多的早幼粒细胞为主, 比例为 54. 0%~90. 5%。白细胞计数 7 例降低(1. 0×10⁹/L~3. 8×10⁹/L); 1 例正常(4. 4×10⁹/L); 4 例增高: 2 例 L 型患者分别为 30. 7×10⁹/L、37. 8×10⁹/L, 2 例 S 型患者分别为 74. 6×10⁹/L、88. 5×10⁹/L(表 1)。

3 讨 论

RQ-PCR 是在普通 PCR 中加入能与 PCR 产物结合的荧光探针或荧光染料, 使之荧光信号随着扩增产物的增加而呈比例增长, 仪器实时检测每一个循环结束后的荧光强度, 通过与标准曲线对比得出定量结果。从扩增到产物分析都是闭管操作, 最大限度地避免了污染, 无 PCR 后处理。应用 RQ-PCR 扩增 PML-RARα 是检测 MRD 最敏感的方法。随访的 1 例 L 型病例使用全反式维甲酸诱导治疗第 1 次 CR 后 13 个月时检测 PML-RARα 转为阳性(定量结果 0. 720 3), 而与此同时骨髓细胞形态学及遗传学分别报告 CR 骨髓象和正常核型, 当该病例于 13. 5 个月再次复查骨髓象报告 APL 复发、染色体分析出现 t(15; 17) 时, PML-RARα-L 定量检测已高达 0. 234 61, 超过该患者初诊时的定量检测结果(0. 143 24), 提示 MRD 检测阳性可预示恶性血液病的全面复发, 应尽早给患者行诱导治疗, 可避免发生血液学复发^[6]。1 例 L 型患者经诱导治疗 2 个月后血液学 CR, PML-RARα-L 持续阳性, 表达水平呈进行性下降趋势; 1 例 S 型患者诱导治疗第 1 次 CR 至 40 个月时, 持续阴性的 PML-RARα-S 转为阳性, 定量结果为 0. 126 71, 而此时的细胞形态学报告仅为 APL 复发趋势。以上信息分别提示 APL 患者诱导治疗后融合基因比细胞形态学、遗传学检测指

标消失得更晚, 而在复发时却最先出现阳性。RQ-PCR 是目前最精确的检测急性白血病 MRD 的方法, 对 APL 患者 PML-RARα 表达量的测定及动态变化监测可获知白血病细胞是否存在和不同治疗方式的治疗效果^[7]。

PML-RARα 是 APL 发病学和治疗学的基础, 具有高度特异性。正常情况下, PML 显示类似肿瘤抑制基因的功能, RARα 则促进分化和抑制生长活性。PML-RARα 编码的蛋白既破坏了核体的正常结构, 又通过与 PML 或其他维甲酸结合蛋白形成稳定的二聚体, 从而对野生型 PML 和 RARα 等位基因起显性负调控作用, 最终导致细胞恶性转化^[3]。本文检测的 12 例初发 APL 患者 100% 为 PML-RARα 阳性, 其中 L 型 9 例(75%), S 型 3 例(25%), 与文献[8]报道比例相仿, 可能因病例数较少, 本研究未发现 V 型阳性患者。

95% 以上的 APL 患者有 t(15; 17) 染色体易位, 并且该易位只见于 APL 患者, 因此 t(15; 17) 是 APL 高度特异性的细胞遗传学标志。12 例 APL 患者 100% (12/12) 检测到了 t(15; 17), 其中 25% (3/12) 同时伴有其他染色体异常。该 3 例病例初诊时融合基因的定量检测结果均高于诱导治疗后单纯 t(15; 17) 同期的定量检测结果, 提示染色体核型分析与融合基因的定量结果有一定的相关性, 需进一步扩大病例来求证。不论是否有附加染色体异常, APL 患者发病时的白细胞计数、骨髓早幼粒细胞比例等差异均无统计学意义。

12 例 APL 患者初诊时骨髓象早幼粒细胞增多, 比例为 54. 0%~90. 5%, 有学者分析了 42 例 APL 有 2 例早幼粒细胞比例在 50. 0% 以下, 但幼稚细胞数量与 PML-RARα 的表达水平没有相关性^[9-10]。外周血白细胞总数大多表现为降低^[10], 12 例病例中 L 型和 S 型各有 2 例白细胞总数升高, 且 L 型患者的白细胞总数明显低于 S 型患者的白细胞(下转第 1207 页)

标,β₂-MG 是一项敏感、准确、可靠的反映肾功能早期损害的指标,对于临床上早期发现糖尿病肾脏受损和肾功能改变具有指导意义。本研究发现,β₂-MG 在早期 DN 的水平及检出率较 Urea、Cr 水平及检出率高,与上述结果相符。UmALB 是指常规方法难以检出的一些尿蛋白,正常情况下尿液中蛋白质含量很低,在肾小球病变的早期,尿液中清蛋白就会轻微增加,并且出现时间早于尿蛋白定性阳性及其他临床指征出现之前,是肾脏疾病的早期诊断指标,其升高程度与肾小球受损程度有关^[8]。血清 Cys C 和 UmALB 联合检测可提高糖尿病早期肾功能损害检出率,有利于糖尿病继发肾功能损害的早期预防和治疗^[9]。本研究结果发现,尿常规蛋白阴性组 UmALB 水平明显高于健康对照组,其阳性检出率也明显高于同组的 Urea、Cr 阳性检出率,充分说明了 UmALB 在 DN 患者早期临床诊断中的作用。

3.3 本研究发现,血清 Cys C、β₂-MG 及 UmALB 在尿常规蛋白阴性组其水平和阳性检出率均明显高于健康对照组,说明尿常规蛋白阴性患者早已存在肾损害,此时患者尿常规蛋白定性为阴性,血 Urea、Cr 均正常,是治疗的关键时期,及时正确的治疗可以阻止 DN 的进展,甚至可以逆转 DN 的病理改变。本研究结果充分证明了血清 Cys C、β₂-MG 及 UmALB 可作为 DN 的早期临床诊断指标,其优点明显高于一般肾功能检测指标(Urea、Cr)。另外,本文就血清 Cys C、β₂-MG 及 UmALB 进行了联合检测,结果发现其对 DN 的早期临床诊断敏感度和准确度大大提高。

总之,血清 Cys C、β₂-MG 及 UmALB 可作为 DN 的早期临床诊断指标,其三者联合检测可大大提高 DN 的早期临床诊

断敏感度和准确度,具有重要临床意义。

参考文献

[1] 周焄,吴月平. 尿微量蛋白在糖尿病肾病早期诊断中的应用[J]. 检验医学与临床,2011,8(19):2342-2343.

[2] 丛玉隆,尹一兵,陈瑜. 检验医学高级教程[M]. 北京:人民军医出版社,2010:623.

[3] 汤树庆,陈雪功. 糖尿病肾病的早期诊断研究进展[J]. 安徽预防医学杂志,2008,14(1):37-39.

[4] 方一卿,马骏,沈汉超,等. 血清胱抑素 C 评价慢性肾脏病患者早期肾损害的临床研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2007,8(3):145-148.

[5] 李莉,刘凌云,赵元明,等. 测定血清胱抑素 C 在肾脏疾病中的诊断价值[J]. 中华全科医学,2011,9(3):457-458.

[6] 任小英,李晓芳,徐春林,等. 血清胱抑素 C 与尿素氮和肌酐在糖尿病肾病中的比较分析[J]. 中国医药指南,2011,9(13):13-15.

[7] 杨从茂. β₂-微球蛋白在糖尿病肾病早期诊断中的应用[J]. 检验医学与临床,2012,9(11):1358-1359.

[8] 涂植光. 临床检验生物化学[M]. 北京:高等教育出版社,2006:203.

[9] 何凌志. 血清胱抑素 C 联合尿微量清蛋白检测在糖尿病肾病早期诊断中的价值[J]. 检验医学与临床,2011,8(9):1057-1058.

(收稿日期:2012-11-06)

(上接第 1204 页)

总数。

总之,采用 RQ-PCR 方法跟踪检测 PML-RARα 可早期发现分子生物学复发情况,及时干预治疗避免血液学复发。PML-RARα 表达水平与病情进展相一致,应根据 MRD 水平正确评价治疗效果,预测预后,制订个体化治疗方案。

参考文献

[1] Lo Coco F, Diverio D, Falini B, et al. Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia[J]. Blood, 1999, 94(1):12-22.

[2] Grimwade D, Lo Coco F. Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia[J]. Leukemia, 2002, 16(10):1959-1973.

[3] Melo RA, de Vasconcellos JF, Melo FC, et al. PML-RARα fusion gene transcripts and biological features in acute promyelocytic leukemia patients [J]. Clin Lab Haematol, 2006, 28(2):126-129.

[4] Reiter A, Lengfelder E, Grimwade D. Pathogenesis, diagnosis and monitoring of residual disease in acute promyelocytic leukaemia [J]. Acta Haematol, 2004, 112(1/2):55-67.

[5] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:134-135.

[6] 蔡莹,张迎媚,李金梅,等. 急性早幼粒细胞白血病亚砷酸治疗后的微量残留病检测[J]. 中华血液学杂志,2009,30(9):637-638.

[7] 赵峻峰,李华,王立新. 急性早幼粒细胞白血病融合基因荧光定量动态检测的临床意义[J]. 中国老年学杂志,2010,30(18):2571-2573.

[8] González M, Barragán E, Bolufer P, et al. Pretreatment characteristics and clinical outcome of acute promyelocytic leukaemia patients according to the PML-RAR alpha isoforms; a study of the PETHEMA group [J]. Br J Haematol, 2001, 114(1):99-103.

[9] Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)-a Europe against Cancer program [J]. Leukemia, 2003, 17(12):2474-2486.

[10] Schnittger S, Weissner M, Schoch C, et al. New score predicting for prognosis in PML-RARA⁺, AML1-ETO⁺, or CBFMBYH11⁺ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts[J]. Blood, 2003, 102(8):2746-2755.

(收稿日期:2012-10-26 修回日期:2012-12-28)