

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2020. 02. 004

223 例儿童白血病 30 种融合基因检测结果分析

黄倩雯, 陈海雷, 黄 燕, 沈妙娜, 刘 勇[△]

中山大学孙逸仙纪念医院儿科血液室, 广东广州 510120

摘要:目的 通过对 30 种融合基因在儿童白血病中的结果分析, 结合形态、免疫分型和细胞遗传学明确其在儿童白血病中的分布情况。方法 选取 2017 年 5 月至 2019 年 4 月该院儿科 223 例初发或复发白血病肿瘤患儿作为研究对象, 其中男 124 例, 女 99 例, 年龄 1 个月至 14 岁, 采用实时荧光探针 PCR 进行融合基因检测, 融合基因包括急性淋巴细胞白血病(ALL)和急性髓系白血病(AML)常见的如 BCR-ABL1、AML1-ETO、CBFβ-MYH11、MLL 和 PML-RARα 等 30 种融合基因。结果 223 例患儿中诊断为 B-ALL 152 例, T-ALL 9 例, AML 49 例, 以及其他 13 例, 包括 B-NHL 2 例, T-NHL 1 例, 混合型急性白血病 1 例, 分类不明急性白血病 2 例, JMML 1 例, CML 转 AML 1 例, CML 5 例。30 种融合基因筛查总阳性率为 43.0%(96/223), 其中 B-ALL 阳性率为 32.2%(49/152), T-ALL 阳性率为 22.2%(2/9), AML 阳性率为 75.5%(37/49), 其他病例阳性率为 61.5%(8/13)。ALL 中最常见的融合基因为 TEL-AML1, 占 15.5%(25/161), BCR-ABL1 占 4.3%(7/161), E2A-PBX1 占 3.7%(6/161), 其次为 AML-MTG16, 占 1.9%(3/161), MLL-AF4 占 1.2%(2/161), MLL-AF10 占 1.2%(2/161), MLL-ENL 占 1.2%(2/161), TLS-ERG 占 1.2%(2/161), MLL-AF6 占 0.6%(1/161); AML 中最常见的融合基因为 AML1-ETO, 占 20.4%(10/49), PML-RARα 占 16.3%(8/49), CBFβ-MYH11 占 10.2%(5/49), DEK-CAN 占 6.1%(3/49), MLL-AF10 占 8.2%(4/49), 其他包括 MLL-AF4、MLL-AF9、MLL-AF1p、NPM-MLF、TEL-ABL、SET-CAN、BCR-ABL1 各 1 例。结论 白血病患者白血病融合基因阳性率较高, 加强对白血病 30 种融合基因的检测有助于提高儿童白血病的诊治水平。

关键词: 儿童; 白血病; 融合基因; 实时荧光定量聚合酶链反应

中图分类号: R725.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)02-0154-04

Distribution characteristics of 30 fusion gene screening in the 223 children with acute leukemia

HUANG Qianwen, CHEN Hailei, HUANG Yan, SHEN Miaona, LIU Yong[△]

Department of Pediatric Homeopathy, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510120, China

Abstract: **Objective** To evaluate the diagnostic and significance of 30 fusion gene screening in combination with morphology, immunophenotyping and cytogenetics in children with hematologic neoplasms. **Methods** A total 223 children from Sun Yat-sen memorial hospital with acute leukemia newly or recurrently diagnosed from May. 2017 to Apr. 2019 were enrolled into this study. There were 126 males and 99 females, aged from 1 month to 15 years old. Real-time fluorescent probe PCR assay was used for detection of 30 fusion genes including the common type of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML), such as BCR-ABL1, AML1-ETO, CBFβ-MYH11, MLL and PML-RARα. **Results** There were 152 cases children who were diagnosed as B-ALL, and 9 cases were diagnosed as T-ALL, 49 cases were diagnosed as AML, the other 13 cases were diagnosis as following: 2 cases were B-NHL, 1 case were T-NHL, 1 case was mixed leukemia, 1 case was indeterminate leukemia, 1 case was JMML, 1 case was AML transformed from CML, 5 cases were CML. Total positive rate of fusion gene was 43.0% (96/223), and which of the B-ALL and T-ALL were 32.2% (49/152) and 22.2% (2/9). In addition, positive rate of AML was 75.5% (37/49), which of the other types was 61.5% (8/13). The most common positive fusion genes in ALL were as following: TEL-AML1, accounted for 15.5%(25/161); BCR-ABL1, accounted for 4.3%(7/161); E2A-PBX1, accounted for 3.7%(6/161); AML-MTG16, accounted for 1.9%(3/161); MLL-AF4, accounted for 1.2%(2/161); MLL-AF10, accounted for 1.2%(2/161); MLL-ENL, accounted for 1.2%(2/161); TLS-ERG, accounted for 1.2%(2/161); MLL-AF6, accounted for 0.6%(1/161). The most common positive fusion genes in AML was AML1-ETO, accounted for 20.4%(10/49); PML-RARα, accounted for 16.3%(8/49); CBFβ-MYH11, accounted for 10.2%(5/

49); DEK-CAN,accounted for 6.1%(3/49); MLL-AF10,accounted for 8.2%(4/49),the other genes included MLL-AF4 (1 case),MLL-AF9 (1 case),MLL-AF1p (1 case),NPM-MLF (1 case),EL-ABL (1 case),ET-CAN (1 case) and BCR-ABL1 (1 case). **Conclusion** The positive rate of leukemia fusion gene is higher in children with leukemia. Strengthening the 30 kinds of fusion gene screening could help to evaluate the risk stratification and prognosis effectively.

Key words:children; leukemia; fusion gene; real time fluouescence quantitative PCR

儿童白血病在儿童恶性肿瘤中所占比例最高,且发生率呈逐渐上升趋势^[1]。目前采用 MICM 分型对初诊患儿进行实验室诊断和分型,使白血病的诊断从细胞形态学水平上升到分子生物学水平,不仅对研究白血病发病、复发、耐药机制和生物学特征有重大意义,而且对指导临床治疗和判断预后也有实用价值^[2]。本研究对 223 例初发或复发的血液肿瘤患儿进行回顾性分析,以明确 30 种融合基因筛查在儿童白血病肿瘤中的分布情况,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对 2017 年 5 月至 2019 年 4 月本院 223 例初发或复发白血病患者进行回顾性分析,其中男 124 例,女 99 例,年龄 1 个月至 14 岁,平均(5.5±3.2)岁。采用实时荧光探针 PCR 进行融合基因检测,包括急性淋巴细胞白血病(ALL)和急性髓系白血病(AML)常见的如 BCR-ABL1、AML1-ETO、CBFβ-MYH11、MLL 和 PML-RARα 相关等 30 种融合基因,见表 1。

表 1 PCR 反应液及融合基因检测		
反应液编号	融合基因名称	荧光信号
A	MLL-AF9	HEX,Cy5
	PML-RARα	FAM,Cy5
	AML1-ETO	ROX,Cy5
B	MLL-AF4	HEX,Cy5
	TEL-AML1	FAM,Cy5
	E2A-PBX1	ROX,Cy5
C	MLL-ENL	HEX,Cy5
	BCR-ABL1	FAM,Cy5
	SIL-TAL1	ROX,Cy5
D	MLL-AF10	HEX,Cy5
	CBFβ-MYH11	FAM,Cy5
	AML1-MDS-EV11	ROX,Cy5
E	FIP1L1-PDGFRΑ	HEX,Cy5
	E2A-HLF	ROX,Cy5
	SET-CAN	FAM,Cy5
	DEK-CAN	ROX,FAM,Cy5
F	MLL-SEPT6	HEX,Cy5
	TEL-PDGFRB	ROX,Cy5
	TLS-ERG	FAM,Cy5

续表 1 PCR 反应液及融合基因检测		
反应液编号	融合基因名称	荧光信号
G	MLL-ELL	HEX,ROX,Cy5
	MLL-AF17	HEX,Cy5
	NPM1-MLF1	ROX,Cy5
	NPM1- RARα	FAM,Cy5
	MLL-AF1q	HEX,ROX,Cy5
H	PLZF- RARα	HEX,FAM,Cy5
	MLL-AF1p	HEX,Cy5
	AML1-MTG16	ROX,Cy5
	TEL-ABL1	FAM,Cy5
	MLL-AF6	HEX,ROX,Cy5
	AML1-EAP	ROX,FAM,Cy5

1.2 方法

1.2.1 免疫分型和细胞遗传学 选取肝素钠抗凝骨髓 2~3 mL,予 PBS 清洗 2 遍后进行计数,每管控制细胞数在 5×10⁵~1×10⁶ 个,采用四色直接免疫荧光法标记,包括 B 系、T 系和髓系的常用抗体,如 CD3、CD8、CD19、CD20、CD33 和 CD117 等 40 种,采用流式细胞仪 FACSCalibur(美国 BD 公司)进行标准化检测。同时进行染色体核型分析和 FISH 探针分析,包括 N-MYC、TCF-PBX1、ETO-AML1、PML-RARα、CBFβ-inc(16)、MLL、BCR-ABL、TEL-AML1、CCND-IgH、ALK 和 MALT1 等。

1.2.2 RNA 提取及浓度测定 取 EDTA 抗凝骨髓 200 μL,按照 TIANGEN 医药有限公司的 RNA 提取试剂盒说明书进行总 RNA 提取,使用 nanodrop 测定 RNA 浓度,其 A₂₆₀/A₂₈₀ 应在 1.9~2.1,A₂₆₀/A₂₃₀≥2.0,浓度应>0.02 μg/μL。

1.2.3 反转录 采用厦门至善生物医药有限公司的 30 种白血病相关融合基因试剂提取盒进行检测,首先将反转录试剂及 LF Positive Control 裂解,然后配制反转录体系,将配制好的反转录体系按照 37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s 条件进行反转录,反转录完毕后,取 10 μL 反转录产物加入 40 μL H₂O,经该试剂盒中内参检测 Ct 值≤30 时,该标本 RNA 的转录产物 cDNA 方可进入后续的融合基因相关检测。

1.2.4 检测体系配制 取出试剂盒中各种反应液室温融化,并振荡混匀后,离心数秒,每个样品使用 A~

H 8 管 PCR mix 检测。根据样品数量 n , 分别配制 8 管 mix。取 $n \times 19.8 \mu\text{L}$ mix 和 $n \times 0.2 \mu\text{L}$ LF polymerase 加到 1.5 mL 离心管中, 振荡混匀数秒, 离心。将配好的 A~H 8 管 mix 分别以 $20 \mu\text{L}$ 分装于 PCR 管中。取 $5 \mu\text{L}$ 稀释好的样品或阴、阳性对照 cDNA 加到每个 PCR 反应管中, 离心数秒。

1.2.5 PCR 扩增与分析 采用 ABI7500 仪进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 预变性 50°C 2 min, 95°C 3 min; Touchdown 循环: 95°C 20 s, 65°C 1 min (每个循环下降 1°C), 72°C 1 min, 10 个循环; PCR 循环: 95°C 20 s, 56°C 32 s (4 通道采光, FAM、HEX、ROX、Cy5), 72°C 1 min。扩增结束后在扩增曲线界面进行分析。以软件默认设定 3~15 个循环的平均荧光信号为基线, 在阴性对照无扩增情况下, 阈值设定在无扩增曲线样本的最高点, 且以阴性对照未检出为原则, 确定起始阈值。

2 结 果

2.1 30 种融合基因筛选诊断情况 223 例初发或复发白血病患者进行 30 种融合基因筛选, 综合 MICM 国际通用的细胞形态学、免疫学、细胞遗传学和分子生物学分型标准最终诊断分布为: B-ALL 152 例, T-ALL 9 例; AML 49 例; 其他 13 例, 分别为非霍奇金淋巴瘤 B 系 (B-NHL) 2 例, 非霍奇金淋巴瘤 T 系 (T-NHL) 1 例, 混合型急性白血病 1 例, 分类不明急性白血病 2 例, 幼年型粒单核细胞白血病 (JMML) 1 例, 慢性粒细胞白血病转 AML 1 例, 慢性粒细胞白血病 (CML) 5 例。

2.2 融合基因阳性分布特点 223 例患儿中融合基因阳性率为 43.0% (96/223), 其中 B-ALL 阳性率为 32.2% (49/152), T-ALL 阳性率为 22.2% (2/9); AML 阳性率为 75.5% (37/49); 其他病例阳性率为 61.5% (8/13)。ALL 中最常见的融合基因阳性率分别为: TEL-AML1 15.5% (25/161), BCR-ABL1 4.3% (7/161), E2A-PBX1 3.7% (6/161), AML-MTG16 1.9% (3/161), MLL-AF4、MLL-AF10、MLL-ENL、TLS-ERG、MLL-AF6 均为 1.2% (2/161); AML 中最常见的融合基因阳性率分别为: AML1-ETO 20.4% (10/49), PML-RAR α 16.3% (8/49), CBF β -MYH11 10.2% (5/49), DEK-CAN 6.1% (3/49), MLL-AF10 8.2% (4/49), MLL-AF4、MLL-AF9、MLL-AF1p、NPM-MLF、TEL-ABL、SET-CAN、BCR-ABL1 均为 2.0% (1/49)。SIL-TAL1 见于 B-ALL, 而 MLL-AF4 和 MLL-AF10 在 ALL 和 AML 中均可出现。

2.3 融合基因与免疫分型的关系 分别选取本研究 ALL 和 AML 最常见的两种融合基因 TEL-AML1 和 AML1-ETO, 对其免疫分型进行分析发现, 24 例 TEL-AML1 阳性病例中有 22 例免疫表型为 com-B-ALL, 仅 2 例为 Pre-B-ALL, 共同特点为 CD45 阴性,

TdT 阳性, 无跨系表达; 10 例 AML1-ETO 阳性病例中有 2 例伴 CD19 跨系表达。

2.4 融合基因与染色体核型分析和荧光原位杂交 (FISH) 的结果比较 96 例融合基因阳性患儿同时进行染色体和 FISH 检测, 染色体结果为异常核型 43 例, 正常核型 35 例, 另外 18 例因无分裂象等原因无结果; 而 FISH 结果中 58 例异常, 26 例正常, 12 例无结果。在共同阳性的病例中, 3 种方法学融合基因和易位结果均一致。

3 讨 论

过去几十年, 通过建立白血病危险因素和研究其生物学机制, 儿童整个生存期已大为改善, 分子遗传学从基因途径提供了有益信息。大部分白血病存在染色体结构异常, 包括缺失、重复、倒位、易位等, 导致原癌基因及抑癌基因结构变异, 原癌基因激活或抑癌基因失活, 产生新的融合基因, 编码融合蛋白。有些基因是调控细胞增殖、分化和凋亡的转录因子, 当基因发生变异时, 产生白血病表型, 直接影响下游信号传递途径, 导致细胞增殖能力增强、凋亡障碍、分化障碍等^[3]。

有文献报道, 约有 85% 的儿童白血病可检测出克隆型染色体异常, 其中平衡性易位最为常见, 并导致融合基因产生, 融合基因特定易位的存在已证实白血病的恶性转化过程中起重要作用^[4]。融合基因的检测有助于儿童白血病的危险分层, 判断预后, 并有助于选择合适的化疗方案。儿童急性淋巴细胞性白血病中, 最常见的是 t(12;21)(p13;q22) 染色体易位, 形成融合基因 TEL-AML1, 其余较常见的如 t(4;11)(q21;q23) 染色体易位, 形成 MLL-AF4, 婴儿白血病发生率达 60% 以上^[5]; t(1;19)(q23;p13) 染色体易位形成 E2A-PBX1, 检出率为 5.8%^[6]; t(9;22)(q34;q11) 染色体易位形成 BCR-ABL1, 检出率为 3%~5%^[7]。有研究表明, E2A-PBX1、BCR-ABL1 与 MLL-AF4 转归类似, 多数预后较差, 并与疾病初诊时的高白细胞计数和年龄偏大相关^[8]。

根据文献报道, MLL 融合基因的多样化是由于 MLL 伙伴基因可与 30 多种不同基因发生融合, 常见的两种 MLL 融合基因 AF9 和 AF4 在 ALL 和 AML 中均可发现, 其中 AF9 常见于白血病 M4、M5 型, 偶见于 M1、M2 型^[9]。本研究融合基因 AF4 和 AF10 阳性率较 AF9 高, 且在 ALL 和 AML 中均有发生, AF9 阳性只见于 1 例诊断为 M4 的患者中。MLL-AF10 在 ALL 和 AML 中均有发生, 其发病机制少见报道。TLS-ERG 融合基因为较罕见的融合基因之一, 在 ALL 和 AML 患儿中均可发生, 根据北京儿童医院血液肿瘤中心统计数据显示, 该融合基因在儿童新诊治的白血病中发生率仅为 0.7%, 对于 ALL 患儿的治疗及预后影响不大, 但伴有 TLS-ERG 融合基因

的 AML 患儿治疗困难,预后较差^[10]。90% 以上的 CML 患者存在 Ph 染色体及 BCR-ABL1 融合基因,治疗关键在于慢性期是否能获得分子水平的缓解,以甲磺酸伊马替尼为代谢的酪氨酸激酶抑制剂,是 CML 的一线治疗药物^[11]。

国外文献报道,AML1-ETO 常常伴有 CD19 表达^[12],本研究 24 例 TEL-AML1 病例中其免疫表型 22 例为 com-B-ALL,且 CD45 阴性,TdT 阳性,说明该融合基因可能仅出现在白血病的某一分化阶段;而 AML1-ETO 常常伴有 CD19 的表达,与文献^[12]报道一致,因此通过确认免疫分型的结果可预判推测某种融合基因阳性。

综上所述,融合基因对白血病的诊断、鉴别诊断及危险分层、预后评估、靶向治疗均有重要指导意义,重视并加强对白血病 30 种融合基因的检测,有助于提高儿童白血病的诊治水平。

参考文献

[1] LINABERY A M,ROSS J A. Trends in childhood cancer incidence in the U. S. (1992-2004)[J]. Cancer, 2008, 112 (2): 416-432.

[2] PUI C H. Genomic and pharmacogenetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Front Med, 2015, 9(1): 1-9.

[3] KUMAR S,RAZZAQ S K,VO A D,et al. Identifying Fusion transcripts using next generation sequencing[J]. Wiley Interdiscip RevRNA, 2016, 7(6): 811-823.

[4] KUMAR D,PANIGRAHI M K,SAIKIA K K,et al. Molecular analysis of childhood B-acute lymphoblastic leukemia; identification and prognosis of rare breakpoints[J].

Mol Boil(Mosk), 2015, 49(6): 944-948.

[5] 郭霞,李强. 急性白血病发病机制研究进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(7): 690-693.

[6] MARTINEZ-MANCILLA M, RODRIGUEZ-AGUIRRE I, TEJOCOTE-ROMERO I, et al. Clinical relevance of the fusion transcripts distribution pattern in mexican children with acute lymphoblastic leukemia[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2013, 35(3): 170-173.

[7] LEE H J, THOMPSON J E, WANG E S, et al. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: current treatment and future perspectives [J]. Cancer, 2011, 117(8): 1583-1594.

[8] SANJUAN-PLA A, BUENO C, PRIETO C, et al. Revisiting the biology of infant t(4;11)-MLL-AF4+ B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2015, 126 (25): 2676-2685.

[9] 洪佳琼,岳春燕,朱阳敏,等. 79 例 11q23-MLL 基因重排阳性成人急性髓系白血病的临床特征及预后分析[J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(8): 702-704.

[10] 林巍,谢静,郑胡镛,等. 10 例伴 TLS-ERG 融合基因阳性儿童急性白血病临床病例分析[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2016, 21(2): 73-76.

[11] 中华医学会血液学分会. 中国慢性髓性白血病诊断与治疗指南(2013 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(5): 464-470.

[12] JOHNSON R C, MA L, CHERRY A M, et al. B-cell transcription factor expression and immunoglobulin gene rearrangement frequency in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22)[J]. Am J Clin Pathol, 2013, 140(3): 355-362.

(收稿日期:2019-05-12 修回日期:2019-08-26)

(上接第 153 页)

长抑素对上消化道出血患者血清炎性因子及凝血功能的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2018, 26(5): 343-348.

[13] 刘记平,张治涛. 血氨水平与凝血指标变化对肝硬化合并肝癌的诊断意义[J]. 实用医药杂志, 2018, 35(1): 29-30.

[14] 程宜,严志涵. 肝硬化患者血小板相关参数和凝血指标的检测价值研究[J]. 临床输血与检验, 2017, 19(6): 574-577.

[15] 李一龙. 肝病患者多项凝血指标检测的应用价值分析[J/CD]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(92): 18034-18037.

[16] 李博,梁新妹. 凝血酶原时间和血小板参数诊断肝硬化的临床价值研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2017, 38(16): 1916-1917.

[17] 朱智全,郭广红,袁新红,等. 血小板活化指标及血小板参

数在乙肝肝硬化患者中的检测价值研究[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(24): 4688-4690.

[18] 张红胜,张敏. 血清 RBP、凝血四项和血小板指标检测在重症肝病辅助诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(17): 2413-2415.

[19] 郝明. 肝硬化患者凝血酶原时间及血小板的检验价值分析[J]. 中国卫生标准管理, 2016, 7(6): 144-145.

[20] 汤磊,彭蕾,郝玉峰,等. 血小板计数与凝血功能指标对乙型肝炎肝硬化患者的临床意义[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2015, 7(4): 101-103.

[21] 葛金莲,买买提伊明·吐尔逊,罗德梅. 血浆凝血因子和血小板参数检测在重症肝硬化诊断中的价值分析[J]. 新疆医科大学学报, 2015, 38(1): 70-72.

(收稿日期:2019-05-28 修回日期:2019-09-08)