

儿童急性淋巴细胞白血病遗传学异常的临床分析*

Clinical analysis of genetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia

岳志霞¹ 李彬¹ 赵晓曦¹ 李伟京¹ 郑胡镛¹

[关键词] 白血病,淋巴细胞,急性;细胞遗传学;逆转录聚合酶链反应;微小残留病

Key words acute lymphoblastic leukemia;cytogenetics;reverse transcription polymerase chain reaction;minimal residual disease

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2015.03.016

[中图分类号] R733.71 [文献标志码] B

白血病是儿童期最常见的恶性肿瘤,其中以急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)为主。儿童 ALL 中特异性的遗传学异常是白血病形态学、免疫学、细胞遗传学和分子生物学分型的重要组成部分,根据患儿的遗传学异常以及治疗早期的微小残留病(minimal residual disease, MRD)水平,划分复发危险度并进行分型治疗,使得儿童 ALL 的预后有了很大的提高^[1]。但儿童白血病,尤其是儿童 ALL 骨髓细胞染色体制备往往因中期分裂指数低、染色体短粗、不分散等问题,影响染色体检查成功率和异常核型检出率。为此,本实验室联合常规染色体核型分析和多重逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术,检测 52 例儿童 ALL 的细胞及分子遗传学异常,并将遗传学结果与患儿早期治疗反应,包括治疗第 8 天泼尼松诱导试验结果、第 33 天骨髓和 MRD 结果以及患儿预后联合分析,以期更好地指导临床治疗。

1 资料与方法

1.1 资料

2010-12—2011-3 我院收治的儿童 ALL 初诊患者 52 例,包括 B-ALL 42 例,T-ALL 10 例。其中男 29 例(55.8%)、女 23 例(44.2%),男:女为 1.26:1.00,中位年龄 4(1~15)岁。随访时间统计至 2014 年 8 月。

1.2 常规细胞遗传学检测

1.2.1 骨髓细胞染色体标本的制备 采用 24 h 短期培养法,建立 2 种培养体系:①胎牛血清组:5 ml 培养液中含 1640 培养液 4 ml、胎牛血清 1 ml;②自体血浆组:5 ml 培养液中含 1640 培养液 4 ml、自体血浆 1 ml。分别于 2 种培养体系中加入适量标本白细胞及混合后的全骨髓,接种细胞密度为(2~

3)×10⁶/ml。常规收获、固定、制片,于胰酶消化液中(胰酶母液浓度 0.0125%)显带 10~60 s,瑞特姬姆萨染液染色 8 min。

1.2.2 染色体核型分析 每例标本检测 20 个核型,核型异常命名根据《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN)2005》进行描述。

1.3 多重巢式 RT-PCR

1.3.1 标本采集 采集患者骨髓 2 ml,分离获得白细胞后,采用 TRIZOL Reagent(购自 Invitrogen 公司)提取细胞总 RNA。利用随机逆转录反应,将 2 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA,置于 -40℃ 保存备用。

1.3.2 多重巢式 PCR 共设立 8 组平行 PCR 反应,分别用第 1~8 组多重 PCR 引物,采用广泛表达的 E2A 基因的 mRNA 作为阳性内对照。具体反应条件见参考文献[2]。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 治疗方案

根据我院 CCLG-ALL 2008 方案,予 VDLD 方案[长春新碱(VCR)、柔红霉素(DNR)、左旋门冬酰胺酶(L-Asp)、地塞米松(DXM)]诱导缓解治疗,缓解后继续按 CAM 方案[环磷酰胺(CTX)、阿糖胞苷(Ara)、6-巯基嘌呤(6-MP)]巩固治疗。ALL 患儿于治疗第 33 天抽取骨髓,分别检测骨髓幼稚细胞缓解情况和 MRD 水平,MRD≥1×10⁻⁴ 为 MRD 阳性组,即分子生物学未缓解,<1×10⁻⁴ 为 MRD 阴性组,即分子生物学缓解^[3]。

2 结果

2.1 常规细胞遗传学分析

52 例患儿标本,培养成功 51 例,1 例培养失败,未找到中期分裂相染色体,培养成功率 98.1%(51/52)。52 例 ALL 患儿中,31 例具有克隆性染色体异常,异常核型检出率 59.6%(31/52)。全部异常核型中,单纯数目异常 10 例,包括>50 的高超二倍体及<46 的亚二倍体;其他 21 例为单纯结构

* 基金项目:北京市医院管理局临床医学发展专项经费资助(No:ZY201404)

¹首都医科大学附属北京儿童医院血液肿瘤中心(北京,100045)

通信作者:郑胡镛,E-mail:zhenghuyong@vip.sina.com

异常或结构与数目均异常形成的复杂核型。

2.2 多重巢式 RT-PCR

52 例 ALL 患儿有 48 例进行了多重巢式 RT-PCR 检测,均获得成功。48 例患者标本中,18 例分别被检测出携带 7 种融合基因,异常检出率为 37.5% (18/48),分别为 10 例 TEL/AML1(+),2 例 SIL/TAL1(+),2 例 E2A/PBX1(+),2 例 BCR/ABL(+),1 例 MLL/ENL(+),1 例 AFF1/MLL(+).

2.3 细胞遗传学与 PCR 检测结果的比较

在多重 PCR 检出携带融合基因的 18 例患儿中,5 例患儿的核型分析检出了相应的染色体易位,但也有 13 例核型分析未发现相应的染色体畸变,包括 10 例携带 TEL/AML1,2 例携带 SIL/TAL1 者均未检出 t(12;21)(p13;q22)或 del(1)(p34;p34),另外 1 例携带 BCR/ABL 者也未检出费城染色体。但是,我们也发现有 1 例患儿(14 号),核型分析检出了 t(1;19)(q23;p13),但 PCR 检测结果为阴性。将常规细胞遗传学与 PCR 结果联合分

析,38 例具有遗传学改变,使 ALL 患儿遗传学异常检出率提高到 73.1%(38/52)。

2.4 遗传学异常与患儿早期治疗反应的比较及预后的关系

45 例接受治疗的 ALL 患儿中,36 例具有遗传学异常,其中泼尼松诱导试验反应不敏感的有 4 例,全部具有遗传学异常;治疗第 33 天骨髓未缓解 5 例,也全部具有遗传学异常;治疗第 33 天 MRD 阳性 29 例,其中 23 例具有遗传学异常,占 79.3% (23/29)。综合以上 3 项即泼尼松诱导试验反应不敏感、第 33 天骨髓和 MRD 均未缓解者共 2 例,染色体核型分别为:46,XY[4]/49,XY,+3,+del(6)(q15),+14,+15,-20[2]/high hyperdiploidy [14];46,XY[14]。

最后 1 例虽然染色体分析为正常核型,但 PCR 检测到患儿具有 SIL/TAL1 融合基因。随访期间共有 4 例患儿白血病复发,1 例死亡,全部具有遗传学异常。具体结果见表 1。

表 1 ALL 患儿遗传学异常与早期治疗反应和预后的比较

序号	核型	RT-PCR	泼尼松 诱导实验	MRD	BM	检测 结果	随访 /月
1	46,XX,t(11;19)(q23;p13)[4]	MLL/ENL(+)	Poor	NR	R	CR	44
2	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[6]/46,XY[1]	BCR/ABL(+)	Good	NR	R	CR	38
3	46,XY,t(1;19)(q23;p13),+del(1)(p32),I(9)(q10),-13,+mar[1]/45,XY,idem,-6[7]/44,XY,idem,-6,-22[1]/44,XY,idem,-6,-7[1]/44,XY,t(1;19),+del(1)(p32),-6,-9,-9,-13,+mar[1]/46,XY,t(1;19),+del(1)(p32),i(9)(q10),-13,+21[1]/46,XY[8]	E2A/PBX1(+)	Good	NR	R	relapse	40
4	45,X,-X,add(19)(p13)[5]/46,XX[2]	TEL/AML1(+)	Good	R	R	CR	43
5	46,XY,dup(1)(q12q44),der(19)t(1;19)(q23;p13)[6]/46,XY[10]	E2A/PBX1(+)	Good	R	R	CR	42
6	46,XY[18]/47,XY,+7[2]/45,XY,-2[2]	TEL/AML1(+)	Good	R	R	CR	42
7	46,XY[17]/45,XY,-12[3]	SIL/TAL1(+)	Good	NR	R	CR	41
8	46,XY[10]/45,XY,-8[2]/55-56[8]	BCR/ABL(+)	Good	NR	R	CR	40
9	46,XX[5]/high hyperdiploidy[15]	(-)	Good	NR	R	CR	44
10	45,XY,inv(3)(q21q26),del(12)(p12),-15[2]/44,XY,idem,-7[1]/43,XY,idem,-7,-22[1]/44,XY,inv(3),-6,-7,+del(12)(p12),-15[1]/44,XY,-12,-18[2]/46,XY[14]	(-)	Good	NR	R	Dead	16
11	46,XX,del(4)(q21),add(14)(q32)[2]/46,XX,add(14)(q32)[1]/46,XX[17]	(-)	Good	NR	R	CR	43
12	46,XX[3]/54-55,XX,+X,+X,+6,+10,+14,+17,+18,+21,+21[15]	(-)	Good	NR	R	CR	43
13	46,XY,i(9)(q10),+mar[3]/46,XY,idem,10q-[1]/45,XY,idem,10q-,-18[1]/46,XY,t(9;9)(q10;q10)[2]/45,X,-Y,idem[1]/45,XY,idem,-13[1]/47,XY,idem,+mar[1]	(-)	Good	R	R	CR	42
14	46,XY,t(1;19)(q23;p13)[2]/45,X,-Y,t(1;19)[3]/46,XY[2]	(-)	Good	NR	NR	CR	42

序号	核型	RT-PCR	泼尼松 诱导实验	MRD	BM	检测 结果	随访 /月
15	45,XY,-8[2]/45,XY,-14[2]/45,XY,-5[1]/46,XY[7]	(-)	Good	NR	R	CR	42
16	46,XX[13]/46,XX,i(7)(q10;q10)[6]/46,XX,i(7)(q10;q10),t(10;14)(q24;q32)[1]	(-)	Good	R	R	relapse	8
17	46,XX[20]/45,XX,-22[2]	(-)	Good	R	R	CR	41
18	46,XX[3]/44,XX,-7,t(9;13;17)(q10;q10;q10),-19,21q+[17]	(-)	Good	NR	R	CR	40
19	45,XX,-3,add(7)(q34),-8,+mar[8]/46,XX[5]	(-)	Good	NR	R	CR	40
20	46,XY[5]/46,XY,del(9q),-13,+21[2]	(-)	Good	NR	R	CR	40
21	46,XX[20]/45,XX,-22[2]	(-)	Good	R	R	CR	40
22	45,XX,-7,add(12)(q13)[5]/44,XX,-3,-12[1]/45,XX,-7[1]/45,XX,-7,-12,+16[1]/45,XX,-10[1]/46,XX[3]	(-)	Good	NR	NR	CR	40
23	46,XX,t(3;14)(q26;q32),-7,del(17)(p11),+mar[4]	(-)	Good	NR	NR	relapse	10
24	46,XY[4]/49,XY,+3,+del(6)(q15),+14,+15,-20[1]/high hyperdiploidy[14]	(-)	Poor	NR	NR	CR	43
25	46,XY,add(15)(p10)[5]	(-)	Good	NR	R	CR	39
26	47,XY,-16,+mar1,+mar2[2]/45,XY,-20[2]/46,XY[17]	(-)	Good	NR	R	CR	42
27	46,XY,t(4;11)(q21;q23)[2]/46,XY[7]	AFF1/MLL(+)	Good	NR	R	CR	39
28	46,XX[3]	TEL/AML1(+)	Good	NR	R	CR	41
29	46,XX[20]	TEL/AML1(+)	Good	R	R	CR	41
30	46,XX[20]	TEL/AML1(+)	Good	R	R	CR	40
31	46,XY[14]	SIL/TAL1(+)	Poor	NR	NR	relapse	3
32	46,XY[3]	TEL/AML1(+)	Good	R	R	CR	42
33	46,XY[20]	TEL/AML1(+)	Good	R	R	CR	43
34	46,XX[20]	TEL/AML1(+)	Poor	NR	R	CR	40
35	46,XY[20]	TEL/AML1(+)	Good	R	R	CR	41
36	46,XX[20]	TEL/AML1(+)	Good	R	R	CR	41
37	46,XX[20]	(-)	Good	NR	R	CR	40
38	46,XX[20]	(-)	Good	NR	R	CR	42
39	46,XY[20]	(-)	Good	NR	R	CR	40
40	46,XY[8]	(-)	Good	NR	R	CR	18
41	46,XY[20]	(-)	Good	NR	R	CR	41
42	46,XX[20]	(-)	Good	NR	R	CR	42
43	46,XY[10]	(-)	Good	R	R	CR	9
44	46,XY[20]	(-)	Good	R	R	CR	43
45	46,XX[20]	(-)	Good	R	R	CR	40

BM:骨髓;R:缓解;NR:未缓解;CR:完全缓解。

3 讨论

白血病特异遗传学异常的确定及其与预后关系的研究对儿童 ALL 具有极其重要的意义。近年来,虽然儿童 ALL 的治疗效果有了很大改善,但复发仍然是影响预后的严峻挑战。根据遗传学异常进行危险度分层,并指导治疗,可以改善预后,提高患儿生存率。在过去的 30 年中,虽然遗传学检测技术有了突飞猛进的发展,但受条件制约,目前染

色体核型分析和 RT-PCR 仍是临床工作中最广泛使用的用于遗传学检测的手段^[4-5]。染色体核型分析由于能对整个染色体组进行全面扫描,是检测数目异常必不可少的手段,缺点是受中期分裂相制约,检测时间长,分辨率低,一些微小异常如 t(12;21)无法检测。而 RT-PCR 技术则大大缩短了检测时间,尤其提高了隐匿性染色体易位的检出率,有力地弥补了染色体核型分析的不足,但其覆盖面仍

有限,对 29 种以外的其他染色体结构畸变和数目异常则无能为力,而染色体数目异常则与儿童 ALL 的预后密切相关^[6]。因此 2 种方法联合可以相互弥补,提高异常的检出率。本研究单独应用染色体核型分析和 RT-PCR 技术对 52 例初诊 ALL 患儿进行遗传学检测,异常率分别为 59.6% 和 39.6%,若将 2 种结果联合分析,则使 ALL 患儿的遗传学异常检出率提高到 73.1%,与文献报道一致,其中核型分析染色体易位仅占 35.5%,主要以数目和染色体臂的缺失增加异常为主。

我们将上述 2 种方法联合检测到的遗传学异常与患儿的早期疗效及预后进行了评估,发现遗传学异常与 ALL 患儿的预后关系密切,而染色体核型分析尤其具有无可替代的作用。在早期治疗反应中,第 8 天泼尼松诱导试验反应不敏感的有 4 例,全部具有遗传学异常,占 100%,异常主要涉及 t(11;19)、t(12;21)、6q- 和 1p-;治疗第 33 天骨髓未缓解 5 例,也全部具有遗传学异常,异常率 100%,异常包括 t(1;19)、6q-、-7、1p-、-Y。多项研究表明,诱导缓解治疗结束时 MRD 水平是儿童 ALL 强有力的预后因素,如果 MRD $>1 \times 10^{-4}$,则容易出现复发^[7-8]。根据国外文献报道,具有不同遗传学特征的白血病,其 MRD 阳性率有差异,携带 BCR/ABL 融合基因的患者,其 MRD 结果几乎均为阳性^[9]。本研究治疗第 33 天 MRD 阳性 29 例,23 例具有遗传学异常,占 79.3%,其中 2 例具有 BCR/ABL、2 例具有 SIL/TAL1 融合基因的患儿 MRD 全部为阳性,与文献报道一致。值得一提的是,本研究以上 3 项早期疗效均未缓解者共 2 例,其中 1 例核型为:46,XY[4]/49,XY,+3,+del(6)(q15),+14,+15,-20[2]/high hyperdiploidy[14],RT-PCR 未检测到融合基因阳性,此患儿虽然具有预后良好的高超二倍体核型^[10],但因同时伴随有预后不良的 6q- 异常,导致患儿具有较差的早期疗效,提示临床要对高超二倍体进行全面的评估,不能忽视附加异常。在预后评估中,随访期间共有 4 例患儿白血病复发,1 例死亡,全部具有遗传学异常。而且经过分析发现除 1 例仅携带 SIL/TAL1 融合基因外,其他患儿均具有较复杂和少见的核型异常(表 1),进一步体现了染色体核型分析在儿童 ALL 中无可替代的作用。

另外,本研究还通过核型分析检测出 1 例患儿具有罕见的 inv(3)(q21q26)畸变,此异常在儿童 ALL 中未见报道。经查阅文献,t(3;3)(q21;q26)或 inv(3)(q21;q26)畸变发生率很低,可能导致位于 3q26 的 EVI1 基因及位于 3q21 的基因如 GATA2 等的激活,这种畸变常见于 AML、骨髓增生异常综合征以及慢性粒细胞白血病急变期的患者,此畸变常合并预后差的染色体异常-7/7q-,具有

此异常的患者对常规化疗不敏感,预后不良^[11-13]。本研究中患儿核型为:45,XY,inv(3)(q21q26),del(12)(p12),-15[2]/44,XY,idem,-7[1]/43,XY,idem,-7,-22[1],免疫表型为 B-ALL,患儿治疗第 33 天分子学未缓解,治疗第 16 个月白血病复发死亡。鉴于国内儿童 ALL 中未见此异常的报道,我们将继续加大样本量关注此畸变,以汲取临床经验。

白血病是一种遗传学上异质性疾病,已证实某些遗传学异常是导致白血病发生的直接因素,可用于临床监测患者的治疗反应^[14]。最新的白血病 WHO 分型标准,更加侧重于在细胞遗传学及基因学水平上来诊治疾病,并指导预后^[15]。本研究联合 2 种技术,获得了儿童 ALL 较全面的遗传学异常,并将遗传学异常与早期疗效和预后共同分析,为儿童 ALL 的诊治提供了重要依据和手段,有助于我们研究白血病发生的分子机制,并进行危险度分层,预后评估及指导治疗,从而提高患儿生存率。

参考文献

- [1] Heng JL, Chen YC, Quah TC, et al. Dedicated cytogenetics factor is critical for improving karyotyping results for childhood leukemia-experience in the National University Hospital, Singapore 1989-2006[J]. Ann Acad Med Singapore, 2010, 39: 102-106.
- [2] 李志刚, 吴敏媛, 朱平, 等. 白血病 29 种染色体畸变形成的融合基因分析[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(11): 682-685.
- [3] Cui L, Li Z, Wu M, et al. Combined analysis of minimal residual disease at two time points and its value for risk stratification in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia[J]. Leuk Res, 2010, 34: 1314-1319.
- [4] Sandberg AA, Meloni-Ehrig AM. Cytogenetics and genetics of human cancer: methods and accomplishments[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 203: 102-126.
- [5] Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update[J]. J Clin Oncol, 2011, 29: 551-565.
- [6] Harrison CJ. Acute lymphoblastic leukemia[J]. Clin Lab Med, 2011, 31: 631-647.
- [7] Izraeli S, Waldman D. Minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: current status and challenges[J]. Acta Haematol, 2004, 112: 34-39.
- [8] Ryan J, Quinn F, Meunier A, et al. Minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukaemia patients at multiple time-points reveals high levels of concordance between molecular and immunophenotypic approaches[J]. Br J Haematol, 2009, 144: 107-115.
- [9] Madzo J, Zuna J, Muziková K, et al. Slower molecular response to treatment predicts poor outcome in patients with TEL/AML1 positive acute lymphoblastic

- leukemia: prospective real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction study [J]. Cancer, 2003, 97: 105–113.
- [10] Kato M, Imamura T, Manabe A, et al. Prognostic impact of gained chromosomes in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia: a collaborative retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group and Japan Association of Childhood Leukaemia Study [J]. Br J Haematol, 2014, 166: 295–298.
- [11] Wieser R. Rearrangements of chromosome band 3q21 in myeloid leukemia [J]. Leuk Lymphoma, 2002, 43: 59–65.
- [12] De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Basinko A, et al. Conventional cytogenetics and breakpoint distribution by fluorescent in situ hybridization in patients with malignant hemopathies associated with inv(3)(q21; q26) and t(3;3)(q21; q26) [J]. Anticancer Res, 2011, 31: 3441–3448.
- [13] Treaba DO, Chaump M, Merriam P, et al. Unusual blasts with basophilic granules in 2 cases of de novo acute myeloid leukemia with inv3 (q21q26. 2) and monosomy 7 and coexpression of CD2 and CD31 [J]. Ann Diagn Pathol, 2014, 18: 33–40.
- [14] Woo JS, Alberti MO, Tirado CA. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update [J]. Exp Hematol Oncol, 2014, 3: 1–16.
- [15] Iacobucci I, Papayannidis C, Lonetti A, et al. Cytogenetic and molecular predictors of outcome in acute lymphocytic leukemia: recent developments [J]. Curr Hematol Malig Rep, 2012, 7: 133–143.

(收稿日期: 2014-07-24)

IBU 预处理方案行自体造血干细胞移植治疗 急性髓系白血病 10 例的疗效*

Curative effect of IBU preconditioning regimen for autologous hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of acute myeloid leukemia

程英英¹ 王彪¹ 董伟民¹ 凌云¹ 王志林¹ 邱国强¹ 曹祥山¹

[关键词] 白血病, 髓系, 急性; 预后; 去甲氧柔红霉素; 白消安; 自体造血干细胞移植

Key words acute myeloid leukemia; prognosis; idarubicin; busulfan; autologous hematopoietic stem cell transplantation

doi: 10.13201/j.issn.1004-2806.2015.03.017

[中图分类号] R733.71 [文献标志码] B

急性髓系白血病(AML)是造血系统常见的恶性肿瘤,对获得完全缓解(CR)后患者的治疗选择主要为巩固化疗、异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)或自体造血干细胞移植(AHSCT)。NCCN指南及国内 AML 治疗的专家共识均推荐对于中高危组 AML 患者 CR 后治疗首选 allo-HSCT,但仍有部分患者由于未能找到合适供者,以及经济受限或个人意愿等原因,无法进行 allo-HSCT,我们对这类患者选择 AHSCT 术来改善预后。考虑到自体移植存在较高的复发率,我们在传统预处理方案的基础上进行了改良,选取了具有更强清髓作用的去甲氧柔红霉素(IDA)联合白消安(BU)组成的 IBU 方案,希望更好地清除体内残留的白血病细

胞,减少移植后白血病的复发率。现将我科近年来采用 IBU 预处理方案进行 AHSCT 的 10 例 AML 患者移植情况及随访结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料

10 例 AML 患者中,男 6 例,女 4 例;中位年龄 32(16~56)岁;诊断均符合张之南等^[1]主编的血液病诊断及疗效标准。根据患者初诊血常规、免疫分型、是否骨髓浸润及细胞遗传学、分子生物学等情况,所有患者均属于临床预后不良组,其中 8 例为细胞遗传学及分子遗传学预后分层标准的中高危组。10 例患者均未找到合适的异基因供者,并同意行 AHSCT。根据患者的具体情况,一般在 CR 后巩固化疗 2~5 个疗程再行清髓移植。末次巩固化疗联合外周血干细胞采集进行。患者移植前的基本资料见表 1。其中例 1 患者初诊 WBC $62 \times 10^9/L$,免疫分型伴 T 淋系表达,细胞遗传学 2 种异

* 基金项目:江苏省科教兴卫工程-临床医学中心资助项目(No:ZX201102)

¹常州市第一人民医院(苏州大学第三附属医院)血液科(江苏常州,213003)

通信作者:曹祥山, E-mail: czcao@medmail. com. cn