

再生障碍性贫血髓系肿瘤基因突变 靶向测序临床研究*

张婷¹ 陈洋¹ 李瑞鑫² 陈曦³ 龙启强³ 乔纯² 王琰² 王蓉² 何广胜² 师锦宁¹ 李建勇²

[摘要] 目的:分析常见髓系肿瘤基因突变在再生障碍性贫血(AA)中的发生率和特点,与 AA 患者的临床特征和免疫抑制治疗(IST)结果的相关性。方法:收集 213 例 AA 患者初诊及 IST 后第 6、12、24 个月的外周血标本,使用二代基因测序法对 34 种常见髓系肿瘤基因进行检测,分析基因突变特点与 AA 患者的临床特征、IST 疗效及疾病转化之间的相关性。结果:初诊时 32 例患者检测到基因突变,突变频率为 15.02%,18 个基因发生总计 34 次突变。突变次数最多的前 3 位基因分别为 *PIGA* 35.29%(12/34)、*TET2* 14.71%(5/34)、*ASXL1* 11.76%(4/34);儿童组(0~18 岁)、青中年组(18~59 岁)及老年组(≥ 60 岁)突变率分别为 12.50%(4/32)、13.99%(20/143)和 21.05%(8/38);重型 AA 患者突变发生率显著高于非重型 AA 患者(20.20% vs 10.53%, $P=0.0487$)。环孢菌素治疗组突变发生率低于抗人胸腺细胞免疫球蛋白联合环孢菌素治疗组(0 vs 6.9%, $P=0.018$)。治疗新出现预后不良基因突变 2 例,均无效。结论:AA 患者的髓系肿瘤基因突变发生与疾病严重程度和治疗措施可能有关,新出现髓系肿瘤相关基因突变可能与疗效不良有关。

[关键词] 再生障碍性贫血;免疫抑制治疗;环孢菌素;抗人胸腺细胞免疫球蛋白;髓系肿瘤基因;二代基因测序法

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.03.005

[中图分类号] R556.5 [文献标志码] A

Targeted sequencing of genetic mutations in patients with aplastic anemia

ZHANG Ting¹ CHEN Yang¹ LI Ruixin² CHEN Xi³ LONG Qiqiang³ QIAO Chun²
WANG Yan² WANG Rong² HE Guangsheng² SHI Jinning¹ LI Jianyong²

(¹Department of Hematology, the Affiliated Jiangning Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 211100, China; ²Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University; ³Department of Hematology, the Second Hospital of Dongnan Medical University)

Corresponding author: HE Guangsheng, E-mail: heguangsheng1972@sina.com

Abstract Objective: To analyze the incidence of common myeloid tumor gene mutation and its correlation with the clinical characteristics as well as immunosuppressive therapy(IST) results in patients with aplastic anemia (AA). **Methods:** Peripheral blood samples from 213 AA patients were collected at initial diagnosis, and 6, 12, 24 months after IST. A total of 34 common myeloid tumor genes in blood samples were detected by the next-generation gene sequencing(NGS). The association between the results of NGS and the clinical features, efficacy of IST as well as disease transformation of AA patients was elevated. **Results:** Gene mutations were detected in 32 patients at the time of initial diagnosis, and the mutation frequency was 15.02%. It was found that 18 gene mutated with a total of 34 times. The top three mutations were *PIGA* (35.29%), *TET2* (14.71%) and *ASXL1* (11.76%), respectively. The mutation rates of children group(0-18 years old), young and middle-aged group (18-59 years old) and elderly group (≥ 60 years old) were 12.50%(4/32), 13.99%(20/143) and 21.05%(8/38), respectively. The mutation rate of SAA patients was significantly higher than that of non SAA patients(20.20% [20/99] vs 10.53% [12/114], $P=0.0487$). The mutation rate of cyclosporin treatment group was lower than that of anti-thymocytoglobulin and cyclosporin treatment group(0 vs 6.9%; $P=0.018$). **Conclusion:** The occurrence of myeloid tumor gene mutations in AA patients may be related to the severity of the disease and treatment measures, and the new myeloid tumor related gene mutations may be related to poor therapeutic efficacy.

Key words aplastic anemia; immunosuppressive therapy; cyclosporine; anti-thymocytoglobulin; myeloid tumor gene; second generation gene sequencing

*基金项目:江苏省医学重点项目(No:BL2014086);江苏省普通高校优势学科(No:JX10231801);南京医科大学科技发展基金一般项目(No:NMUB2019236);国家中医药管理局行业专项(No:201407001-4);北京康盟基金会项目(No:WS019E)

¹南京医科大学附属江宁医院血液内科(南京,211100)

²江苏省人民医院,南京医科大学第一附属医院血液内科

³南京市第二医院东南大学附属第二医院血液内科

通信作者:何广胜,E-mail:heguangsheng1972@sina.com

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)是一种获得性骨髓造血功能衰竭症,主要表现为骨髓造血功能低下,全血细胞减少^[1]。抗人胸腺细胞免疫球蛋白(anti-thymocytoglobulin, ATG)联合环孢菌素(cyclosporine, CsA)强化免疫抑制治疗(immune suppressive therapy, IST)对60%~70%的AA有效,但有部分AA在IST后出现克隆性疾病转化,如阵发性睡眠性血红蛋白尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)、骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)和急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML),这些疾病与AA存在一定关联^[2]。近年来二代基因测序(next-generation gene sequencing, NGS)为AA这类细胞少取材差不易研究疾病提供了新方法,提示AA存在克隆性造血,并可能与IST疗效,克隆性疾病转化有关。但东亚人群中非严重型AA(non-severe AA, NSAA)和CsA治疗患者中NGS结果、临床特征与严重型AA(severe AA, SAA)之间异同尚无报道。我们对此进行了初步总结分析,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料

选取2015年8月—2018年8月就诊于南京医科大学附属江宁医院及江苏省人民医院血液科的AA患者共213例,男106例,女107例,中位年龄39.5(4~85)岁。

1.2 诊断

按照2016年英国再生障碍性贫血诊断治疗指南^[3],AA程度分级:(1)重型诊断标准(Camitta标准):①骨髓细胞增生程度<正常的25%;如≥正常的25%但<50%,则残存的造血细胞应<30%。②血常规:需具备下列3项中的2项:ANC<0.5×10⁹/L;校正的网织红细胞<1%或绝对值<20×10⁹/L;BPC<20×10⁹/L。③若ANC<0.2×10⁹/L为极重型AA。(2)非重型AA诊断标准:未达到重型标准的AA。

1.3 靶向基因二代测序

1.3.1 目标基因筛选和多重PCR引物设计 利用IonAmpliSeq Designer引物设计工具,目标基因(ASXL1、BCOR、BCOR1、CALR、CSF3R、EZH2、PIGA、GATA2、MLL、ETV6、RUNX1、TP53、CBL、CEBPB、DNMT3A、IDH1、IDH2、JAK2、KIT、MPL、NPM1、NRAS、PHF6、SETBP1、SF3B1、SRSF2、SH2B3、TET2、U2AF1、ZRSR2、PHF6、PDGFRA、AML1、WT和FLT3)进行多重PCR引物设计,扩增产物长度在350~375 bp。

1.3.2 样本制备 抽取患者新鲜血液标本,使用血液DNA提取试剂盒提取DNA。使用Qubitds-

DNA测定浓度和纯度。

1.3.3 NGS测序 ①构建文库:经扩增目标DNA、加barcode接头、纯化扩增文库后,采用QubitdsDNA试剂盒对文库定量。②乳液PCR和阳性模板富集:采用IonPGM™Template OT2 200进行乳液PCR,PCR产物用Dynabeads-MyOne-Streptavidin C1 Beads进行阳性模板富集。③Ion Torrent PGM测序:用Ion 316™Chip Kit,在PGM上测序,测序结果用相关生物信息学软件进行分析,得到整体数据量、变异信息、平均测序深度和参考序列匹配程度等数据。原始结果经过二次过滤条件,得到最终结果。

依据文献相关报道,将突变组DNMT3A、ASXL1、TP53、RUNX1、CSMD1、JAK2、JAK3、AML1分为预后不良组,突变组BCOR、BCOR1、PIGA分为预后良好组,TET2、RIT1、SETBP1、GNAS、PRC2、LAMB4、WT1、DH2、CUX1、RBBP4、CBL、PRPF8、BRCC3、PEG3、ATRX、PHF6、ATM、KRAS、MPL、NF1、POT1、RAP1A、STAT3、DIS3、SH2B3、TERT为预后中等组^[3]。

1.4 统计学处理

统计分析采用SPSS 20.0软件。率的比较均采用 χ^2 检验,样本用精确法计算,数量差别采用独立样本的 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因分布的特点

32例(15.02%)发生突变,共检测到18种基因发生34次突变,2种基因突变2例,单基因突变30例。突变次数最多的前3位基因分别是PIGA(12/34,35.29%)、TET2(5/34,14.71%)、ASXL1(4/34,11.76%),其余TP53、SH2B3、SF3B1、BCOR、DNMT3A各有2次(2/34,各占5.88%),CEBPA、KRAS、CSF3R各1次(1/34,各占2.94%)。

表观遗传学(ASXL1, DNMT3A, TET2):共11/34次突变,突变率32.35%;转录因子和激酶系统等(KRAS, BCOR, CEBPA):共4/34次突变,突变率11.76%;TP53突变:2/34次,突变率5.88%;剪接子复合物(SF3B1, SH2B3, CSF3R)突变:5/34次,突变率14.71%;PIGA突变:12/34次,突变率35.29%。

男女突变率相当:13.21%(14/106) vs 16.82%(18/107), $P=0.301$ 。突变组与无突变组在平均年龄上差异无统计学意义(34.5岁 vs 38.5岁, $P=0.529$)。

儿童组(0~18岁)、青中年组(18~59岁)及老年组(≥60岁)AA患者的突变率分别为12.50%(4/32),13.99%(20/143),21.05%(8/38),3组间突变率差异无统计学意义($P=0.181$)。

32 例突变患者中有 8 例进行第 2 次检测,6 例患者的 *SF3B1*、*ASXL1*、*PIGA*、*TET2*、*TP53*、*DNMT3A* 突变基因消失,另外 2 例患者的 *PIGA*、*ASXL1* 基因突变持续存在。ATG 治疗后新出现突变 6 例(均是第 1 次检测无突变患者),其中 2 例 *BCOR* 突变,均有效;2 例 *PIGA* 突变,1 例有效;另外 *RUNX1* 突变 1 例,*AML1* 及 *ASXL1* 同时突变 1 例,对 IST 无效。

2.2 基因突变与疾病严重程度

SAA 组及 NSAA 组突变率分别为 20.20% (20/99) 和 10.53% (12/114), 差异有统计学意义 ($P=0.0487$); SAA 组中基因突变预后良好、预后中等、预后不良构成分别为 5/99 (5.05%)、9/99 (9.09%)、5/99 (5.05%) (其中 1 例合并 *ASXL1* 及 *BCOR* 突变), NSAA 组中基因突变预后良好、预后中等、预后不良构成分别为 1/114 (0.87%)、3/114 (2.63%)、7/114 (6.14%) (其中 1 例合并 *ASXL1* 及 *PIGA* 突变), 预后组构成差异无统计学意义 ($P=0.188$)。

SAA、NSAA 中 *PIGA* 突变比例 4.04% (4/99) vs 7.02% (8/114) ($P=0.347$), 表观遗传学突变比例 35.00% vs 25.00% ($P=0.412$) 及转录因子和激酶系统 20% vs 0 ($P=0.485$), 均差异无统计学意义。

2.3 基因突变与疾病疗效的关系

2.3.1 IST 与突变基因分布

各有 87 例和 108 例患者使用 ATG 或 CsA 治疗, 另有 18 例患者使用其他治疗方法, 未纳入分析。结果发现 ATG 治疗有效率为 66.67% (58/87), 其中 20 例突变, 16 例治疗有效, 有效率为 80.00% (16/20); 67 例无突变, 有效率为 62.69% (42/67), 疗效差异无统计学意义 ($P=0.14$)。108 例 CsA 治疗患者, 治疗有效率为 68.52% (74/108), 其中 11 例突变, 治疗有效率为 54.55% (6/11), 死亡 1 例; 97 例无突变, 治疗有效率为 70.10% (68/97), 疗效差异亦无统计学意义 ($P=0.47$)。ATG 组预后良好、预后中等、预后不良各有 5 例 (5.75%)、76 例 (87.36%)、5 例 (5.75%) (其中 1 例合并 *ASXL1* 及 *BCOR* 突变), 疗效差异无统计学意义: 80.00% (4/5)、67.11% (51/76)、60.00% (3/5) ($P=0.88$); CsA 组预后良好、预后中等、预后不良各有 6 例 (5.56%)、101 例 (93.52%) 和 0 例 (1 例合并 *ASXL1* 及 *BCOR* 突变), 疗效也差异无统计学意义: 66.67% (4/6)、68.32% (69/101) ($P=1.00$)。ATG 联合 CsA 治疗后 6 例 (6/87, 6.9%) 出现突变, 但 CsA 后未有新出现突变 ($P=0.018$)。

2.3.2 克隆转化及死亡

9 例患者死亡 (4.23%, 9/213), 其中突变组死亡 2 例 (6.25%, 2/32), 无突变组死亡 7 例 (3.87%, 7/181) ($P=0.89$)。无突变组转化 MDS 4 例 (2.21%, 4/181), 转化 AML

2 例 (1.10%, 2/181), 转化为滤泡淋巴瘤 1 例 (0.55%, 1/181), 而突变组未见克隆转化。

3 讨论

Kulasekararaj 等^[4]对 57 例 AA 患者进行 835 个与造血功能衰竭或髓系肿瘤相关的体细胞突变基因进行筛查(该研究鉴于 PNH 与 AA 密切相关, 排除了 *PIGA* 基因), 并在 93 例患者中验证。此外, 对 150 例 AA 患者进行体细胞突变基因筛查, 结果发现 29 例 (19%, 29/150) 有基因突变, 主要累及 *ASXL1* (12 例)、*DNMT3A* (8 例)、*BCOR* (6 例)。Yoshizato 等^[5]在 156 例 (36%) 患者中发现了 249 个基因突变, 最常见的突变基因是 *BCOR* 和 *BCORL1* (9.3%), *PIGA* (7.5%), *DNMT3A* (8.4%) 和 *ASXL1* (6.2%)。我们的结果与既往研究类似, *PIGA* 和 *BCOR* 两个预后良好的基因突变最常见, 其余常见的是表观遗传学相关基因突变: *ASXL1* 和 *DNMT3A*。*DNMT3A* 和 *ASXL1* 突变在 MDS、AML 中常见, 但 AA 最常见的是 *BCOR/BCORL1* 和 *PIGA* 突变, 另一些突变基因, 如剪接子复合物基因、*JAK2*、*RUNX1*、和 *TP53* 等与 MDS、AML 关联性更强的基因在 AA 中突变率低, 提示 AA 与 MDS、AML 在克隆选择上存在不同的离散机制。

与文献报道不同的是, 本文发现 *TET2* 突变比率高于 *ASXL1* 和 *DNMT3A*。目前已经发现 *TET2* 突变与炎症相关, 并可能抑制造血。艾曲波帕^[6]可能改善 *TET2* 突变诱发的造血抑制, 临床上是否对此类 AA 有更好的疗效, 值得进一步观察。

有报道显示, 随着年龄增加外周血液样本中表观遗传学相关基因, 如 *ASXL1* 和 *DNMT3A* 基因突变会增高^[7-8]。Yoshizato 等^[5]发现不良预后的体细胞突变与大龄、男性有关。但本文未发现髓系基因突变在性别、年龄中存在关联, 可能与涉及基因较多, 样本量相对不足有关。与文献报道结果类似^[4-5], 在采用 ATG 联合 CsA 或 CsA 单药治疗 SAA 或 NSAA 的疗效未见差异; 与 Yoshizato 等^[5]报道相同, 经连续测序克隆分析, 本研究中 2 例 IST 后出现 *RUNX1*、*AML1* 及 *ASXL1* 基因突变的克隆者对 IST 反应差。

本文还发现 SAA 组患者的突变率高于 NSAA, 可能是由于 SAA 的造血干/祖细胞有着更重的免疫/炎症损伤和更大的选择压力, 导致 NGS 发现异常比例较高; 而且 ATG 联合 CsA 后出现基因突变的概率高于 CsA 单药治疗者。

总之, 我们的结果初步显示 AA 患者存在克隆造血, 最常见的是 *PIGA* 和 *BCOR* 两个预后良好的基因突变和表观遗传学相关基因突变, 但治疗后出现的预后不良基因者 IST 疗效差; AA 的克隆造血与疾病严重、治疗措施可能相关, 值得进一步积累数据分析。

11例白血病异基因造血干细胞移植后复发行二次移植的临床研究*

刘夫红¹ 薛松¹ 张永平¹ 黄文秋¹ 王静波¹

【摘要】 目的:研究第二次异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)治疗白血病的疗效,探讨如何提高二次移植的成功率。方法:总结本院2012—2019年11例因allo-HSCT后复发行第二次allo-HSCT(更换供者)的急性白血病患者临床资料,回顾性分析其治疗过程及转归,并分析二次移植前患者的缓解状态、供者选择、预处理方案等对总生存、无病生存、复发死亡率、移植相关死亡率等移植疗效的影响。结果:11例患者在二次移植后均获得早期缓解,随访至今,2例患者无病存活,存活时间分别为9个月、18.4个月,2例患者因移植后合并症(血栓性微血管病/肺部移植物抗宿主病)死亡,7例患者因复发死亡。其中早期死亡(移植后3个月内)2例,二次移植至死亡中位时间为9个月(2~48个月)。11例患者二次移植后中位总生存期11个月(2~18.4个月),中位无病生存期6个月(1~18.4个月),复发死亡率63.6%,移植相关死亡率18.2%。结论:二次移植是治疗allo-HSCT后复发的一种有效手段,部分患者可获得长久无病生存,但二次移植合并症多、复发率高,需要慎重考虑,强化预处理、更换供者、缓解期行二次移植被认为是提高二次移植疗效的可能手段。

【关键词】 二次移植;异基因造血干细胞移植;移植后复发;急性白血病

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.03.006

【中图分类号】 R457.7 **【文献标志码】** A

Clinical study of second transplantation of 11 leukemia cases with recurrence after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

LIU Fuhong XUE Song ZHANG Yongping HUANG Wenqiu WANG Jingbo

(Department of Hematology, Aerospace Center Hospital, Beijing, 100049, China)

Corresponding author: WANG Jingbo, E-mail: wangjingbo@asch.net.cn

Abstract Objective: To study the efficacy of the second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation(allo-HSCT) in the treatment of recurrent leukemia after the first allo-HSCT, and to explore how to improve the success rate of the second transplantation. **Methods:** The clinical data of 11 patients with acute leukemia who received the second allo-HSCT(donor change) in our hospital from 2012 to 2019 due to the recurrence after the first allo-HSCT were summarized. The treatment process and outcome were retrospectively analyzed. The effects of remission status, donor selection and preconditioning regimen of the patients before the second transplantation on the transplantation efficacy, such as overall survival, progression-free survival, recurrence and death, and transplant-related mortality were also analyzed. **Results:** The 11 patients obtained early remission after the second

*基金项目:首都临床特色应用研究与成果推广(北京市科技计划项目)(No:Z171100001017103)

¹航天中心医院血液科(北京,100049)

通信作者:王静波,E-mail:wangjingbo@asch.net.cn

参考文献

- [1] Peslak SA, Olson T, Babushok DV. Diagnosis and treatment of aplastic anemia[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2017, 18(12): 70.
- [2] 何广胜. 二代测序时代看再生障碍性贫血的克隆性造血[J]. *中国实用内科杂志*, 2016, 36(5): 350-351.
- [3] Killick SB, Bown N, Cavenagh J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia[J]. *Br J Haematol*, 2016, 172(2): 187-207.
- [4] Kulasekararaj Aj, Jiang J, Smith AE, et al. Somatic mutations identify a subgroup of aplastic anemia patients who progress to myelodysplastic syndrome[J]. *Blood*, 2014, 124(17): 2698-2704.
- [5] Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, et al. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(1): 35-47.
- [6] 柴星星,何广胜,何耀,等. 艾曲波帕联合标准剂量强化免疫抑制治疗老年重型再生障碍性贫血[J]. *临床血液学杂志*, 2019, 32(9): 683-686.
- [7] Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(26): 2477-2487.
- [8] Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(26): 2488-2498.

(收稿日期:2020-10-31)