

• 论著-研究报告 •

染色体微阵列分析在骨髓增生异常综合征诊疗中的应用

肖艰¹ 刘晓冬¹ 华芳¹ 彭薇¹ 李兰¹ 张晋¹ 陈坤¹ 罗姗¹ 杨焜¹ 潘峻²

[摘要] 目的:探讨染色体微阵列分析(CMA)在指导骨髓增生异常综合征(MDS)的诊断、治疗方式选择及预后判断中的意义。方法:收集2016年3月至2020年6月收治的确诊及疑诊MDS并行CMA检查的36例患者的临床资料,对染色体核型、治疗及预后情况进行回顾性分析。结果:确诊MDS患者27例,其中18例检测到恶性血液疾病相关的染色体改变,占66.67%。其中含Loss、LossMosaic 14例,占77.78%;含GainMosaic 3例,占16.67%;含UPD 7例,占38.89%。27例患者中位总生存时间11(1~96)个月。相关性分析显示,患者的临床结局与性别($P < 0.05$),是否确诊MDS($P < 0.01$),危险度分级(中低危 vs 高危)($P = 0.001$)和CMA检测结果($P < 0.01$)具有相关性。logistic回归分析提示,CMA检测结果[阴性 vs 阳性, $OR = 2.565(95\%CI 1.059 \sim 4.345)$, $P < 0.05$]是预测临床结局的独立危险因素。生存曲线分析显示CMA检测为阴性的患者总生存率优于CMA检测为阳性的患者,但两者生存曲线差异无统计学意义($P = 0.051$)。结论:CMA检测对MDS诊断可以弥补染色体核型分析的不足,提升诊断率,同时可以为MDS患者提供更为准确的生存预测。

[关键词] 染色体微阵列分析;骨髓增生异常综合征;染色体核型分析

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2022.08.009

[中图分类号] R551.3 **[文献标志码]** A

Application of chromosomal microarray in diagnosis and treatment of myelodysplastic syndrome

XIAO Jian¹ LIU Xiaodong¹ HUA Fang¹ PENG Wei¹ LI Lan¹ ZHANG Jin¹
CHEN Kun¹ LUO Shan¹ YANG Kun¹ PAN Ling²

(¹Zigong First People's Hospital, Zigong, 643000, China; ²West China Hospital, Sichuan University)

Corresponding author: XIAO Jian, E-mail: 16188702@qq.com

Abstract Objective: To explore the significance of chromosomal microarray analysis(CMA) in guiding the diagnosis, treatment and prognosis of myelodysplastic syndrome(MDS). **Methods:** The clinical data, karyotype analysis, treatment and prognosis of 36 patients with diagnosed or suspected MDS in the Department of Hematology of our hospital from March 2016 to June 2020 were analyzed retrospectively. All the patients were performed CMA check. **Results:** Among the 27 patients with MDS, 18 cases were detected chromosome changes related to malignant hematological diseases, accounting for 66.67%. There were 14 cases of loss and loss mosaic, accounting for 77.78%; Gainmosaic was found in 3 cases, accounting for 16.67%; 7 cases with UPD, accounting for 38.89%. The median overall survival time of 27 patients was 11(1-96) months. Correlation analysis showed that the clinical outcome of patients was correlated with gender($P < 0.05$), diagnosis of MDS($P < 0.01$), risk grade (medium and low risk vs high risk)($P = 0.001$) and CMA test results($P < 0.01$). Logistic regression analysis showed that CMA test results(negative vs positive, $OR = 2.565[95\%CI, 1.059-4.345]$, $P < 0.05$) were independent risk factors for predicting clinical outcomes. Survival analysis showed that the overall survival rate of patients with negative CMA was better than those with positive CMA, but there was no significant difference between the two survival curves($P < 0.05$). **Conclusion:** CMA can make up for the deficiency of chromosome karyotype analysis and improve the diagnosis rate. CMA detection can provide more accurate survival prediction for patients with MDS.

Key words chromosome whole genome chip; myelodysplastic syndrome; karyotype analysis

¹自贡市第一人民医院(四川自贡,643000)

²四川大学华西医院

通信作者:肖艰,E-mail:16188702@qq.com

国内外骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)的诊断标准中均涉及 MDS 相关的染色体异常^[1-2]。染色体核型分析(metaphase cytogenetics, MC)是应用时间最长,已被证明在血液系统恶性肿瘤的诊断、治疗以及预后判断中有极为重要价值的染色体检查手段,它可以检测平衡的染色体变化,包括易位或倒位,以及不平衡的染色体变化,包括三体性、重复和缺失^[3-5]。但 MC 也存在一定的技术局限性,包括其相对较低的分辨率,需要进行有丝分裂中期细胞的培养等,因此该技术并非最佳的 MDS 诊断检测技术,仅 40%~50% 的 MDS 患者通过 MC 可检测到基因组异常^[6-8]。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism arrays, SNP-As)检查技术是全基因组的高通量检测技术,它有很高的灵敏度,可检出大小仅为几十 Kb 的染色体变异;还可通过等位基因分型技术鉴别异常克隆的嵌合现象,可精确检测出丰度为 10% 的低水平异常克隆细胞群的染色体变异^[9-10]。另外, SNP-As 可以更好地判断获得性中性杂合性缺失(acquired copy-neutral LOH, aCN-LOH)在 MDS 患者中相对常见的染色体异常^[11-12]。染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis, CMA)是以微阵列为技术基础的基因组拷贝数变异分析技术,主要包括基于比较基因杂交的微阵列(array-based comparative genomic hybridization, aCGH)和基于单核苷酸多态性的微阵列(single nucleotide polymorphism array, SNP array)^[13]。本研究选择 CMA 技术作为 MC 的替代和补充,对 2016 年 3 月至 2020 年 6 月我院血液科收治的确诊及疑诊 MDS 并完善 CMA 检查的 36 例患者进行回顾性分析,初步探讨 CMA 联合 MC 技术在 MDS 诊断、治疗方式的选择及患者预后判断中的作用。

1 资料与方法

1.1 资料

分析 2016 年 3 月至 2020 年 6 月我院收治的 MDS 患者 36 例,诊断根据《骨髓增生异常综合征中国诊断与治疗指南(2019 年版)》^[1],确诊患者 27 例,疑诊患者 9 例。其中男 20 例,女 16 例;平均年龄 61(31~88)岁,中位年龄 65 岁。所有患者随访时间截止 2021 年 2 月,平均随访时间 19(1~50)个月,中位随访时间 16 个月。采用 WHO(2016) MDS 修订分型标准:27 例确诊患者中 MDS-MLD 16 例,占 59.3%,MDS-RS-MLD 2 例,占 7.4%,MDS-EB1 4 例,占 14.8%,MDS-EB2 5 例,占 18.5%。36 例患者基线资料见表 1。

1.2 方法

1.2.1 MC 检查方法 抽取骨髓液 0.5 mL,无菌注入装有 5 mL 培养液的培养瓶中,37℃ 培养 24~72 h,培养终止前 0.5 h 加入秋水仙碱溶液(终浓度

为 10 μg/mL),经低渗、固定后收获细胞,采用 G 显带法制片,分析细胞核型,每个样本分析 20 个中期细胞,核型描述依据 ISCN 2013。

表 1 36 例患者的基线资料 $\bar{X} \pm S$

项目	确诊 MDS	疑诊 MDS
例数	27	9
年龄/岁	65(31~88)	59(48~79)
性别/例		
男	17	3
女	10	6
中性粒细胞/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	1.58 (0.02~22.69)	1.93 (0.69~9.51)
血红蛋白/($g \cdot L^{-1}$)	74(34~117)	83(54~119)
血小板/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	49(6~511)	71(13~1162)
随访时间/月	11(1~50)	19(9~34)

1.2.2 CMA 检测方法 通过使用 CytoScan 750K 检测试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行 SNP-Array 分析。使用全血 DNA 提取试剂盒提取 DNA。配制消化预混液[分别设置阳性对照(商品化的人类基因组)和阴性对照(Low EDTA TE)]及连接反应预混液进行消化反应和连接反应,后行聚合酶链式反应(PCR)程序。PCR 产物经验证、纯化和纯化定量后,进行片段化反应。片段化完成后,配制标记混合液进行标记反应程序,最后加入杂交预混液进行杂交反应程序。将芯片拆封,升温至室温加入杂交液,然后放入杂交炉,杂交 16~18 h,即可依次进行洗染和扫描。扫描得到原始数据经过 ChAS 软件的转换即可用于分子遗传学分析,可观察染色体全基因组的拷贝数变异,包括拷贝数扩增和缺失(>50 Kb),嵌合体(>10%),单亲二体 UPD 或杂合性缺失 LOH。

1.2.3 MDS 预后评分标准 根据修订国际预后积分系统(IPSS-R)将患者分为极高危、高危、中危、低危、极低危 5 组^[12]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。分类变量比较使用 Fisher 精确检验和 χ^2 检验,测量数据比较使用方差分析。使用 logistic 回归进行单因素和多因素分析,单因素分析检验 $P < 0.05$ 的变量将被纳入多因素分析,使用 Kaplan-Meier 方法进行生存分析,双侧 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 染色体核型及 CMA 检查结果

36 例患者中 21 例完成了染色体核型检查,检测率 58.33%(21/36),阳性结果 4 例,检测阳性率为 19.05%(4/21),其中复杂核型异常 3 例。36 例

患者均完成了CMA检查,检测率100%(36/36),有18例存在恶性血液病相关的获得性染色体改变,检测阳性率50.00%(18/36)。在27例确诊为MDS的患者中,12例完成MC,阳性结果4例,占33.33%(4/12)。27例完成CMA检查,其中18例检测到恶性血液疾病相关的染色体获得性改变,占66.67%(18/27);存在临床意义暂不明确基因改变者22例,占81.48%(22/27)。CMA技术能够检测到的染色体异常包括以下几种类型:缺失(Loss)、嵌合型缺失(LossMosaic)、嵌合型扩增(GainMosaic)、扩增(Gain)和异常的单亲二倍体(UPD)。恶性血液疾病相关的获得性改变中,含Loss或LossMosaic 14例(Loss 3例, LossMosaic 11例),占77.78%(14/18);含GainMosaic 3例,占16.67%(3/18);含UPD 7例,占38.89%(7/18),主要涉及染色体改变见图1。

同时进行CMA及染色体核型2种检测的患者中,所有染色体阳性患者CMA均有阳性发现。CMA检测出有恶性血液疾病相关的获得性染色改变的患者,同时行染色体核型检查的8例患者中存在染色体核型异常者4例,染色体核型阴性,同时行CMA检查的8例患者中检出有恶性血液疾病相关的获得性改变患者有4例。相对于CMA检

查,MC的漏检率为50%。染色体核型未能检测到的恶性血液疾病相关的获得性染色体改变包括:UPD(1p); Loss/LossMosaic(13q, 17q); UPD(19p); Loss(21q22.12); UPD(4q21.21qter),见表2。

2.2 相关性分析结果

选取患者临床资料进行相关性分析,患者的临床结局与性别($P < 0.05$),是否确诊MDS($P < 0.01$),危险度分级(中低危 vs 高危)($P = 0.001$)和CMA检测结果($P < 0.01$)具有相关性;CMA检测结果与是否确诊MDS($P = 0.01$)和危险度分级($P < 0.01$)具有相关性;MC结果与是否确诊MDS($P = 0.01$)具有相关性;而CMA检测结果与MC结果之间具有相关性($P < 0.05$),见表3和图2。

2.3 logistic 回归分析

通过logistic回归分析单因素筛选影响临床结局的危险因素,结果显示危险等级分组和CMA检测结果是预测临床结局的危险因素($P < 0.05$)。进一步行多因素logistic回归分析,仅CMA检测结果[阴性 vs 阳性, $OR = 2.565(95\%CI 1.059 \sim 4.345)$, $P < 0.05$]是预测临床结局的独立危险因素,见表4。

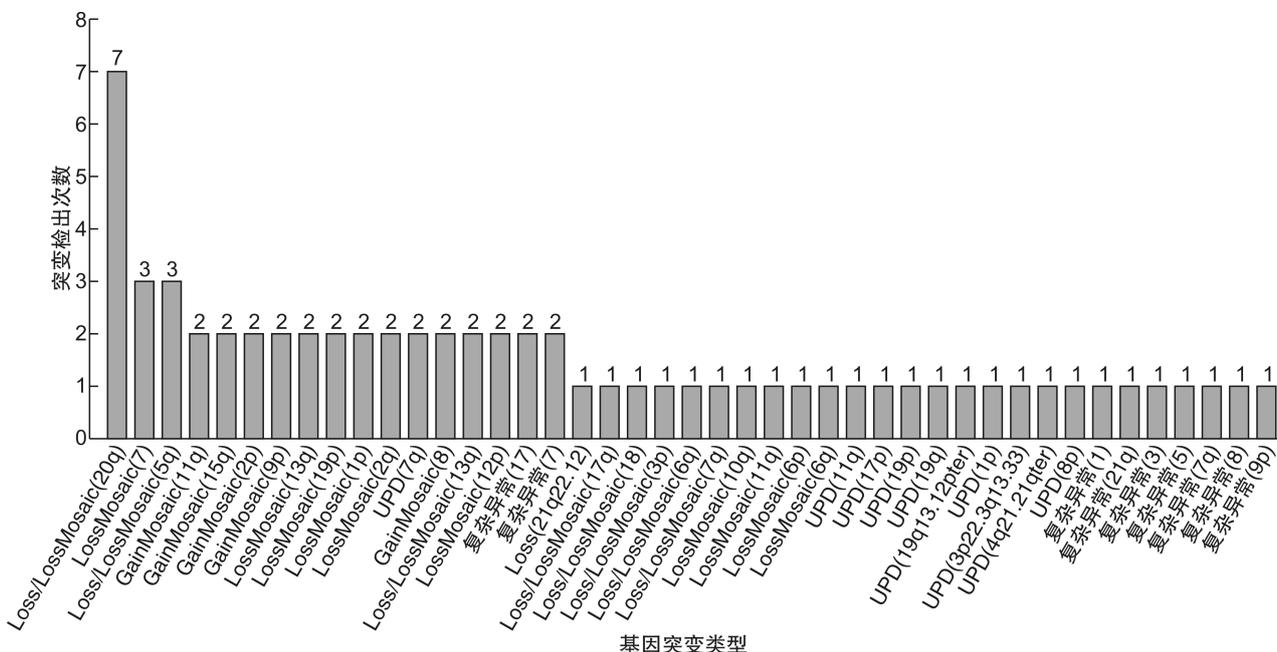


图1 确诊MDS恶性血液系统疾病相关改变检出情况

2.4 随访结果及患者总体生存率分析

对所有纳入研究患者进行临床随访,随访截止日期为2020年12月,27例确诊患者,中位随访时间37个月,平均随访时间36个月(17~57个月)。极高危组9例(33.3%),高危组5例(18.5%),中危组9例(33.3%),低危组1例(3.7%),极低危组

3例(11.1%)。采用去甲基化药物联合或不联合小剂量阿糖胞苷规律治疗患者12例,未采用规范治疗患者15例,中位生存时间11(1~96)个月。根据危险因素分层其中极高危组中位生存时间5个月,高危组16个月,中危组19个月,低危组49个月,极低危组38个月。12例规律治疗患者:极高

危组 4 例(33.3%),高危组 3 例(25.0%),中危组 3 例(25.0%),低危组 1 例(8.3%),极低危组 1 例(8.3%);中位总生存时间 19 个月(2~50)个月。未采用规律治疗的 15 例患者:极高危组 5 例(33.3%),高危组 2 例(13.3%),中危组 6 例(40.0%),低危组 0 例,极低危组 2 例(13.3%);中位总生存时间 8(1~96)个月。

进一步对患者进行 Kaplan-Meier 生存曲线分析,基因检测为阴性的患者与基因检测为阳性的患者间生存曲线差异无统计学意义,log-rank = 3.797, P = 0.051,但曲线之间拉开差异,基因检测为阴性的患者总生存率(OS)优于基因检测为阳性的患者;中低危组患者 OS 率显著优于高危组患者,log-rank = 5.898, P = 0.015,见图 3、4。

表 2 确诊 MDS 恶性血液系统疾病相关改变检出情况

编号	恶性血液疾病相关的获得性改变	CNV 多态性改变	临床意义暂不明确	正常人常见 UPD 改变	染色体检查结果
1	[LossMosaic (7, 11q)] 和 [GainMosaic(8)]	Gain(14q)	Loss(22q11.23, Xq26.2q26.3)	UPD(3p)	46,XY,-7,+8,del(11)(q21)[5]/46,XY[6]
2	UPD(1p)	无	Gain(1q)	无	46,XY[20] 44,XY,-3,del(5)(q13),der(7) dic(3;7)(p21;q22) der(3) del(3)(p11.2p14) inv(3)(p26p21),der(20) del(20)(q11) dic(20;22)(p13;p11.2),-22[19]/46,XY[1]
3	Loss/LossMosaic (3p,5q,7q,20q)	无	无	Gain(14q)	47,XX,del(7)(q22q23),del(9)(p13),-17,-18,del(20)(q11),+mar1,+mar2,+mar3,+mar4[17]/46,XX[3]
4	[Loss/LossMosaic (6q,18,20q)] 和复杂异常 [(7q,9p,17,21q)]	无	UPD(Xp)	UPD (Xq11.1q13.1, Xq13.2q21.1, Xq22.3q23)	46,XX,del(7)(q22q23),del(9)(p13),-17,-18,del(20)(q11),+mar1,+mar2,+mar3,+mar4[17]/46,XX[3]
5	[Loss (20q)] 和 [UPD(11q)]	Gain(14q)	UPD(1q)	无	46,XY,del(20)(q11)[20]
6	[Loss/LossMosaic (13q,17q)] [UPD (19p)]	无	UPD(3q)	无	46,XY[20]
7	Loss(21q22.12)	Gain(14q)	UPD (7q22.3q31.1, Xp21.1p11.4)	UPD (3p21.31p21.1, Xq11.1q21.1)	46,XX[20]
8	UPD(4q21.21qter)	无	无	无	46,XY[20]

表 3 临床资料间的相关性分析

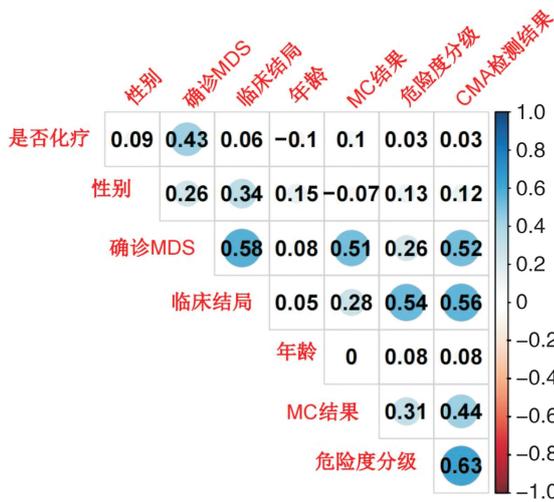
项目	临床结局		CMA 检测阳性		MC 阳性	
	相关系数	P	相关系数	P	相关系数	P
年龄	0.054	0.753	0.076	0.659	0.002	0.992
性别	0.335	0.046	0.125	0.468	0.068	0.692
确诊 MDS	0.577	<0.001	0.516	0.001	0.513	0.001
危险度分级	0.538	0.001	0.628	<0.001	0.307	0.068
是否化疗	0.058	0.738	0.026	0.881	0.097	0.572
MC 结果	0.276	0.104	0.438	0.008	—	—
CMA 检测结果	0.559	<0.001	—	—	0.438	0.008

3 讨论

根据《骨髓增生异常综合征中国诊断与治疗指南(2019 年版)》^[1],MDS 的诊断除血细胞减少,需排除其他可能的原因。在骨髓形态学检查不够诊断标准时,染色体异常成为能否进行确诊及后续进行预后分期和分层治疗的重要依据。

研究显示,50%的原发 MDS 患者和 95%的继发 MDS 患者可检出染色体变异^[14]。作为传统的

诊断工具,MC 因检测方式的局限性,其敏感性较低,容易造成漏诊或误诊,以及预后分期不准确等问题。本组确诊为 MDS 患者 27 例中有 12 例进行染色体核型检查,仅有 4 例检测呈阳性,阳性率略低于文献报道的 40%~50%^[6-8]。而 27 例患者同时进行 CMA 检测,恶性血液疾病相关获得性染色体改变的检出率为 66.7%,大大提升了 MDS 相关染色体异常的检出率,对于 MDS 诊断有很大的价值。



蓝色为正相关,红色为负相关,图中变量之间的相关性用数字和颜色共同标注,数字越大,颜色越深,代表相关性越大,反之则相关性越小。

图 2 临床资料之间的相关性分析

表 4 临床结局单因素 logistic 回归分析

项目	OR (95%CI)	P
年龄 (<60 岁 vs ≥60 岁)	1.600(0.310~8.247)	0.574
性别(男 vs 女)	3.250(0.611~17.283)	0.167
危险度分级 (中低危组 vs 高危组)	7.000(1.098~44.607)	0.039
CMA 检查结果 (阴性 vs 阳性)	6.500(1.094~38.633)	0.040
染色体核型检查结果 (阴性 vs 阳性)	—	0.999
是否化疗(否 vs 是)	0.318(0.059~1.705)	0.181

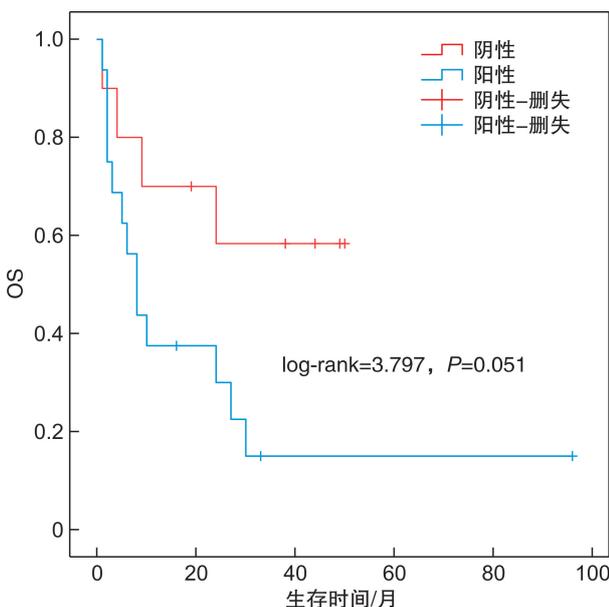


图 3 基因检测是否为阳性 Kpllan-Meier 生存曲线分析

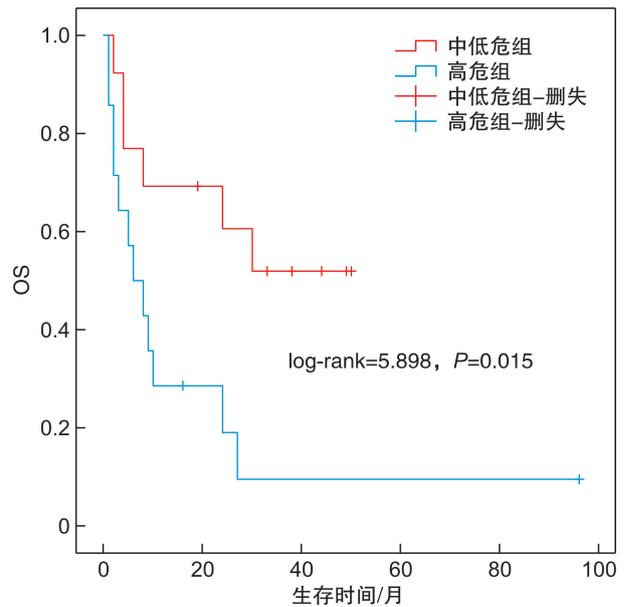


图 4 危险度分级 Kpllan-Meier 生存曲线分析

CMA 检出的恶性血液疾病相关获得性改变中,MDS 的染色体异常以不平衡易位为主,与文献报道一致^[15]。主要涉及到的染色体改变包括: Loss/LossMosaic (20q)、LossMosaic (7)、Loss/LossMosaic(5q),与文献报道最常见染色体异常一致,突变频率上略有差异,可能本研究病例数偏少有关^[15]。

根据单因素和多因素 logistic 回归的结果显示,CMA 检测结果是预测临床结局的独立危险因素,相较于 CMA 诊断为阴性的 MDS 患者,CMA 检测为阳性的 MDS 患者出现死亡的概率为 2.565 倍。从随访的结果可见,CMA 检测为阴性的 MDS 患者与阳性的 MDS 患者 5 年 OS 率有差异,但未能显示出统计学差异($P=0.051$)。

从 MDS 患者的危险度分级来看,单因素 logistic 回归分析提示,高危组患者发生死亡的风险是中低危组的 7 倍($P<0.05$),同时生存曲线提示中低危组患者的 5 年 OS 率要明显优于高危组患者($P=0.015$)。说明 MDS 患者的危险度分级对于预测患者的预后具有重要的价值,对于高危患者一定要引起足够的重视。综合来看,CMA 检测结果可用于 MDS 患者临床结局的预测。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中华医学会血液学分会.骨髓增生异常综合征中国诊断与治疗指南(2019年版)[J].中华血液学杂志,2019,40(2):89-97.
 [2] 朱雨,何广胜.世界卫生组织2016年骨髓增殖性肿瘤及骨髓增生异常综合征/骨髓增殖性肿瘤分类更新解读[J].中国实用内科杂志,2016,36(8):658-661,667.
 [3] Byrd JC,Mrózek K,Dodge RK,et al.Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction

- success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia; results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461)[J]. *Blood*, 2002, 100(13): 4325-4336.
- [4] Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties [J]. *Blood*, 1998, 92(7): 2322-2333.
- [5] Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes[J]. *Blood*, 1997, 89(6): 2079-2088.
- [6] Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes; evidence from a core dataset of 2124 patients[J]. *Blood*, 2007, 110(13): 4385-4395.
- [7] Solé F, Luño E, Sanzo C, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes [J]. *Haematologica*, 2005, 90(9): 1168-1178.
- [8] Pozdnyakova O, Miron PM, Tang G, et al. Cytogenetic abnormalities in a series of 1,029 patients with primary myelodysplastic syndromes; a report from the US with a focus on some undefined single chromosomal abnormalities[J]. *Cancer*, 2008, 113(12): 3331-3340.
- [9] Mohamedali AM, Gäken J, Ahmed M, et al. High concordance of genomic and cytogenetic aberrations between peripheral blood and bone marrow in myelodysplastic syndrome(MDS)[J]. *Leukemia*, 2015, 29(9): 1928-1938.
- [10] Stevens-Kroef MJ, van den Berg E, Olde Weghuis D, et al. Identification of prognostic relevant chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia using microarray-based genomic profiling[J]. *Mol Cytogenet*, 2014, 7(1): 3.
- [11] Maciejewski JP, Tiu RV, O'Keefe C. Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies[J]. *Br J Haematol*, 2009, 146(5): 479-488.
- [12] Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, et al. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML[J]. *Blood*, 2008, 111(3): 1534-1542.
- [13] 国家卫生健康委员会临床检验中心产前筛查与诊断室间质量评价专家委员会. 染色体微阵列分析实验室技术要求专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(9): 745-751.
- [14] 周庆兵, 胡晓梅, 刘峰, 等. 骨髓增生异常综合征的遗传学检测研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(6): 1536-1540.
- [15] Xiao X, He X, Li Q, et al. Single-Nucleotide Polymorphism Array Technique Generating Valuable Risk-Stratification Information for Patients With Myelodysplastic Syndromes[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 962. (收稿日期: 2021-12-22 修回日期: 2022-02-07)

本刊文后参考文献著录规范

为了反映论文的科学依据和作者尊重他人研究成果的严肃性以及向读者提供有关信息的出处, 论文中应列出参考文献。所列的参考文献应限于作者直接阅读过的、最主要的、且为发表在正式出版物上的文章。参考文献应注重权威性和时效性, 要求引用近 3~5 年发表的文献(以近 3 年为佳)。

参考文献附于正文之后, 著录方法采用顺序编码制, 即按论文中引用文献编码依次列出。格式如下(主要列出期刊和专著):

[期刊] 作者(3 位以内姓名全列, 每位之间加“,”; 3 位以上只写前 3 位, “,”后加“等”或“et al”)。文题[J]。刊名, 年份, 卷(期): 起-止页。

[专著]

作者(3 位以内姓名全列, 每位之间加“,”; 3 位以上只写前 3 位, “,”后加“等”或“et al”)。文题[M]//主编。书名。版次。出版地: 出版者, 出版年: 起-止页。

主编(3 位以内姓名全列, 每位之间加“,”; 3 位以上只写前 3 位, “,”后加“等”或“et al”)。书名[M]。版次。出版地: 出版者, 出版年: 起-止页。