

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.011

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.011

## 595 例初诊儿童急性髓系白血病患者 36 种融合基因筛查分析

陈雪<sup>1</sup>, 王芳<sup>1</sup>, 房建成<sup>1</sup>, 张阳<sup>1</sup>, 朱平<sup>2</sup>, 张英<sup>2</sup>, 聂代静<sup>1</sup>, 马小丽<sup>1</sup>, 张薇<sup>1</sup>, 张羽<sup>1</sup>,  
王明宇<sup>1</sup>, 刘红星<sup>1,3</sup>

(1. 河北燕达陆道培医院病理和检验医学科, 河北 廊坊 065201; 2. 北京大学第一医院血液科, 北京 100034;  
3. 北京陆道培血液病研究院, 北京 100176)

**[摘要]** 目的: 分析初诊儿童急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者36种融合基因情况。方法: 回顾分析2006至2017年595例初诊儿童( $\leq 14$ 岁)AML患者的36种融合基因筛查结果。采集初诊儿童AML患者的骨髓或外周血标本, 采用多重巢式PCR方法进行36种融合基因筛查。 $\chi^2$ 检验比较不同年龄组患儿之间融合基因阳性率差异。结果: 共纳入AML患儿595例, 最终在338例(56.81%)患儿中检测到17种不同的融合基因。其中1例(0.17%)诊断为急性粒-单核细胞白血病伴嗜酸粒细胞增多亚型(acute myelomonocytic leukemia with eosinophilia, AML-M4EO)的患儿同时存在CBFB-MYH11和BCR-ABL1(e1a2型)两种融合基因。与 $>2$ 岁患儿相比,  $\leq 2$ 岁患儿融合基因总阳性率无显著差异, 但融合基因分布特征差异有统计学意义。TLS-ERG, CBFB-MYH11和MLL-AF9在 $\leq 2$ 岁患儿中更常见, 而AML1-ETO主要见于 $>2$ 岁患儿。结论: 各种融合基因在AML中的阳性率及其在不同年龄组中的分布不同, 为进一步改进临床适用的融合基因检测方案提供了数据基础。

**[关键词]** 急性髓系白血病; 融合基因; 儿童白血病

## Analysis of 36 fusion genes in 595 cases of *de novo* pediatric acute myeloid leukemia

CHEN Xue<sup>1</sup>, WANG Fang<sup>1</sup>, FANG Jiancheng<sup>1</sup>, ZHANG Yang<sup>1</sup>, ZHU Ping<sup>2</sup>, ZHANG Ying<sup>2</sup>, NIE Daijing<sup>1</sup>, MA Xiaoli<sup>1</sup>,  
ZHANG Wei<sup>1</sup>, ZHANG Yu<sup>1</sup>, WANG Mingyu<sup>1</sup>, LIU Hongxing<sup>1,3</sup>

(1. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Hebei Yanda Lu Daopei Hospital, Langfang Hebei 065201; 2. Department of Hematology, Peking University First Hospital, Beijing 100034; 3. Beijing Lu Daopei Institute of Hematology, Beijing 100176, China)

**Abstract** **Objective:** To analyze the gene-fusion landscape of 36 fusion genes in children with *de novo* acute myeloid leukemia (AML). **Methods:** We retrospectively analyzed the gene-fusion landscape of 36 fusion genes in 595 children ( $\leq 14$  years) with *de novo* acute myeloid leukemia (AML) during a 11-year period from 2006 to 2017. Peripheral blood or bone marrow of childhood with *de novo* AML were collected and total RNA were extracted. Fusion genes were assessed by multiplex-nested RT-PCR. Fisher's exact test was performed to

收稿日期 (Date of reception): 2018-02-22

通信作者 (Corresponding author): 刘红星, Email: starliu@pku.edu.cn

compare the incidences and frequencies of different fusion genes in different age groups. **Results:** A total of 595 children with AML were included into the study. Finally, 17 different types of fusion genes were detected in 338 patients (56.81%). One patient (0.17%) diagnosed with acute myelomonocytic leukemia with eosinophilia (AML-M4EO) was positive of both CBF $\beta$ -MYH11 and BCR-ABL1 (e1a2). The gene-fusion spectrums between patients less than or equal to 2 years of age and patients older than 2 years of age were significantly different, although there was no statistical difference in the total positive rate of fusion genes between the two age groups. The incidences of TLS-ERG, CBF $\beta$ -MYH11 and MLL-AF9 were higher in patients less than or equal to 2 years of age, while AML1-ETO was more common in patients older than 2 years of age. **Conclusion:** The positive rate of various fusion genes in AML and their distribution in different age groups are different, which will help to provide a data basis for further improvement of fusion gene screening panel in clinical applications.

**Keywords** acute myeloid leukemia; fusion genes; pediatric leukemia

急性白血病是儿童最常见的肿瘤, 约占儿童肿瘤的30%。其中, 急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)占儿童白血病的15%~20%<sup>[1-2]</sup>。在过去几十年中, 遗传学危险分层的应用、联合化疗方案的改进、小分子靶向药的应用和造血干细胞移植术的进展使得儿童AML的预后取得极大改善。目前AML的总体存活率已高达75%, 但仍有25%~35%的患者复发<sup>[1]</sup>。因此, 早期诊断、准确分型、评估预后并及早预测复发, 是目前儿童AML治疗和研究的重点。

融合基因是白血病中常见且重要的分子生物学异常, 大多数已明确病理意义的融合基因伴随肿瘤细胞稳定存在, 可作为白血病诊断、分型、预后评估、治疗方案选择及靶向药物研发的重要依据, 也可作为高灵敏度监测微小残留病变的分子标志。2001版WHO造血和淋巴组织肿瘤分类<sup>[3]</sup>将AML1-ETO, PML-RARA, CBF $\beta$ -MYH11和MLL相关的融合基因纳入AML的分类标准; 2016版WHO分类标准<sup>[4]</sup>新增了DEK-CAN, RBM15-MKL1和BCR-ABL1作为AML分型的依据。

北京大学第一医院血液研究室自2002年9月起参考Pallisgaard等<sup>[5]</sup>报道的方案开始开展融合基因筛查检测。后来刘红星等<sup>[6]</sup>对该方案加以改进, 建立了同时筛查血液肿瘤中36种常见融合基因的检测方案, 并在临床推广应用。通过该方案的应用, 北京大学第一医院和河北燕达陆道培医院在十几年的时间里积累了大量的血液肿瘤融合基因筛查病例和数据。本研究通过系统性回顾11年间中国初诊儿童AML患者的36种融合基因筛查结

果, 分析各种融合基因在儿童AML患者中的阳性率及其在不同年龄组患者中的分布特征。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

纳入2006年9月至2017年7月期间, 河北燕达陆道培医院和北京大学第一医院实验室收检的进行融合基因筛查的中国籍儿童( $\leq 14$ 岁)AML患者共计1 362例, 从中选择可明确诊断的初诊AML患者共595例, 其中男322例, 女273例, 男女比例为1.18:1; 年龄0.5~14(中位数4)岁。AML的诊断依据WHO 2008分类标准<sup>[7]</sup>, 结合患儿的临床表现, 细胞形态学、流式免疫分型、细胞遗传学、分子细胞遗传学和分子遗传学检查结果进行整合诊断。本研究经河北燕达陆道培医院和北京大学第一医院医学伦理委员会审核批准, 患者或其监护人均知情同意。

### 1.2 多重巢式PCR进行融合基因筛查

采集患者骨髓或外周血标本, 分离单个核细胞后提取RNA, 用多重巢式PCR方案检测血液肿瘤中36种常见融合基因的共129种mRNA基因型<sup>[8-9]</sup>, 包括: AML1-EAP, AML1-ETO, AML1-MECOM, BCR-ABL1, BCR-FGFR1, CBF $\beta$ -MYH11, DEK-CAN, E2A-HLF, E2A-PBX1, FIP1L1-PDGFRA, MLL-AF10, MLL-AF17, MLL-AF1p, MLL-AF1q, MLL-AF4, MLL-AF6, MLL-AF9, MLL-AFX, MLL-ELL, MLL-ENL,

MLL-PTD, NPM1-ALK, NPM1-MLF1, NPM1-RARA, NUP98-HOXA9, NUP98-HOXD13, PLZF-RARA, PML-RARA, RPN1-MECOM, SET-CAN, SIL-TAL1, TEL-ABL1, TEL-AML1, TEL-PDGFRB, TLS-ERG, ZNF198-FGFR1。

### 1.3 统计学处理

应用SPSS 20.0统计软件进行数据分析。不同年龄组患者之间融合基因阳性率的比较采用 $\chi^2$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用Circos V0.67软件绘制阳性融合基因的分布图。

## 2 结果

### 2.1 融合基因阳性率及分布特征

在595例AML患者中,融合基因阳性者338例,阳性率为56.81%。在AML患者中共检测到17种不同的融合基因,其中最常见依次为:AML1-ETO, PML-RARA, TLS-ERG, CBFB-MYH11, MLL-AF9, MLL-PTD, MLL-AF10, MLL-AF6和DEK-CAN,阳性率分别为26.39%, 6.55%, 4.54%, 4.03%, 3.70%, 3.19%, 2.86%, 2.02%和1.01%。其余融合基因的阳性率均低于1%

(图1)。其中有1例FAB分型诊断为急性粒-单核细胞白血病伴嗜酸粒细胞增多亚型(acute myelomonocytic leukemia with eosinophilia, AML-M4EO)的6岁男性患儿,同时存在CBFB-MYH11和BCR-ABL1(e1a2型)两种融合基因。MLL相关的融合基因(MLL-FG)和MLL基因自身部分外显子发生串联重复突变(MLL-PTD)阳性者共计81例,阳性率为13.61%。

### 2.2 不同年龄组的融合基因分布特征差异

将所有入组患者按年龄分为0~2, 3~5, 6~10和11~14岁4组,分别统计各种融合基因在各年龄组的阳性率,结果显示: $\leq 2$ 岁患儿的融合基因分布特征与 $>2$ 岁患儿的融合基因分布特征差异有统计学意义(图2A)。进一步按0~2岁和3~14岁对所有患者进行分组,并比较两组患者中各种融合基因的阳性率(图2B),结果显示:两组患者的融合基因总阳性率差异无统计学意义(55.22% vs 57.01%,  $P = 0.795$ ),但TLS-ERG和CBFB-MYH11在 $\leq 2$ 岁患儿中更常见,而AML1-ETO主要见于 $>2$ 岁患儿。MLL-FG/MLL-PTD的总阳性率在两组患者中差异无统计学意义(19.40% vs 12.88%,  $P = 0.183$ ),但MLL-AF9在 $\leq 2$ 岁患儿中的阳性率显著高于 $>2$ 岁患儿的阳性率(11.94% vs 3.60%,  $P = 0.007$ ;表1)。

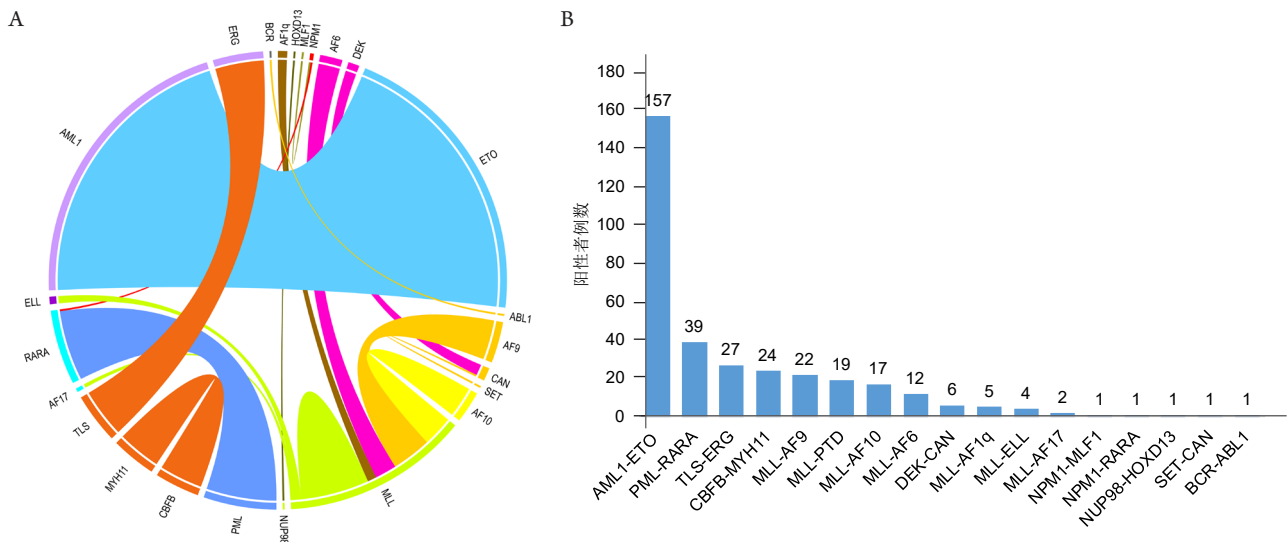


图1 在595例儿童AML患者中检测到的融合基因

Figure 1 Fusion genes detected in 595 AML children

(A) 17种不同融合基因的Circos图; (B) 各种融合基因阳性者频数分布。

(A) Circos image of 17 distinct fusion genes; (B) Frequencies of the 17 fusion genes.

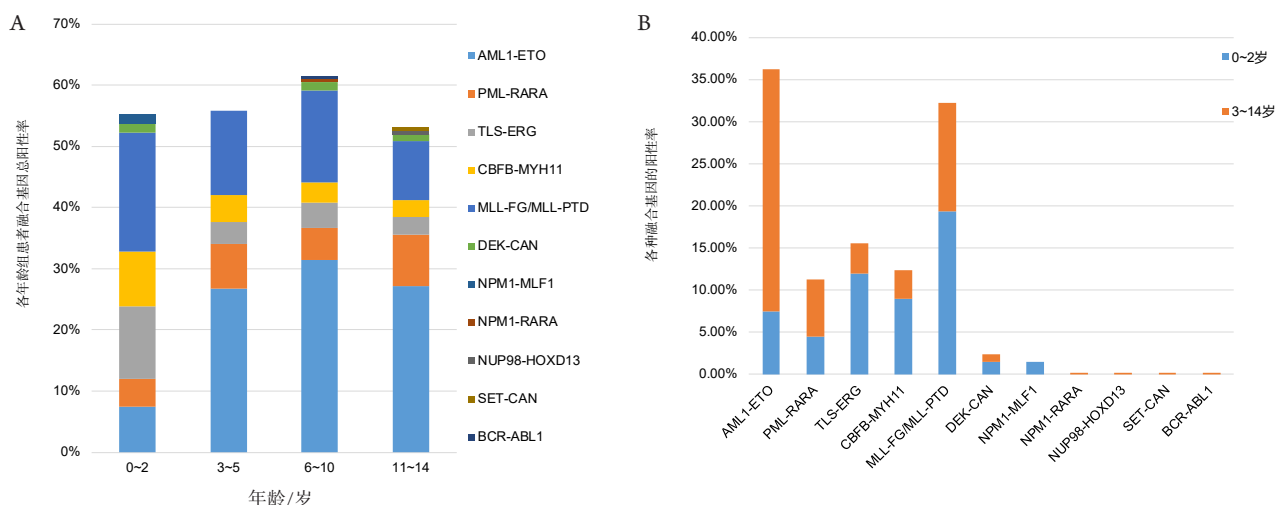


图2 不同年龄组各种融合基因分布

Figure 2 Distribution of fusion genes in different age groups

(A) 0~2岁, 3~5岁, 6~10岁和11~14岁4个年龄组中各种融合基因的分布特征; (B) 0~2岁和3~14岁2个年龄组中各种融合基因的分布特征。

(A) Distribution characteristics of fusion genes in four age groups including 0-2, 3-5, 6-10 and 11-14 years old; (B) Distribution characteristics of fusion genes in two age groups including 0-2 and 3-14 years old.

表1 最常见的6种融合基因在≤2岁和&gt;2岁患儿间的阳性率

Table 1 Positive rate of the six most common fusion genes in ≤2 and &gt;2 years old patients

融合基因	≤2岁/[例(%)]	>2岁/[例(%)]	P
TLS-ERG	8 (11.94)	19 (3.60)	0.007
CBFB-MYH11	6 (8.96)	18 (3.41)	0.042
AML1-ETO	5 (7.46)	152 (28.79)	<0.001
MLL-FG/MLL-PTD	13 (19.40)	68 (12.88)	0.183
PML-RARA	3 (4.48)	36 (6.82)	0.606
DEK-CAN	1 (1.49)	5 (0.95)	0.513

### 3 讨论

重现性的融合基因是导致AML发生的重要分子病因, 见于约20%的AML患者<sup>[10]</sup>, 具有极好的疾病分型相关性, 并伴随肿瘤细胞稳定存在。融合基因的鉴定为AML的诊断、分型、疗效监测和靶向药物研发提供了特异性的分子指标, 例如分子发病机制PML-RARA融合基因的鉴定, 以及靶向治疗药物全反式维甲酸和砷剂的联合应用, 已使急性早幼粒细胞白血病从一种高度致死性的白血病转变为一种可以近乎治愈的疾病<sup>[11-12]</sup>。部分融合基因, 如MLL-AF9, 还可作为预测儿童AML复发

的指标<sup>[13]</sup>。

近年来, 随着新一代测序技术的发展, 越来越多AML相关的重现性融合基因被鉴定出来, 但每一种融合基因在AML中的阳性率有限<sup>[14]</sup>。同时检测数十种具有明确病理意义的融合基因可有效解决单个融合基因检测阳性率低的问题。儿童AML相对较为罕见, 年发病率约为百万分之七<sup>[15]</sup>, 因此目前多为单一融合基因的研究和分析<sup>[16-17]</sup>, 多种常见融合基因筛查的报道较为罕见, 更缺乏较大样本量的报道。

本研究在595例儿童AML患者中检测36种血液肿瘤中常见的融合基因, 最终在338例中检测

到17种不同的融合基因,总阳性率为56.81%,显著高于Iijima-Yamashita等<sup>[16]</sup>的研究结果(56.81% vs 46.21%,  $P=0.001$ )。Iijima-Yamashita等<sup>[16]</sup>仅检测了AML1-ETO, CBFβ-MYH11, MLL-AF9, MLL-ELL, MLL-AF6, TLS-ERG, NUP98-HOXA9和PML-RARA 8种常见的融合基因,提示同时筛查多种血液肿瘤常见的融合基因,可在更多患者中发现其分子发病原因。

在本研究中,AML1-ETO的阳性率最高,为26.39%,显著高于Harrison等<sup>[18-19]</sup>的结果(13%~14%),与日本的报道<sup>[16]</sup>相似(27.68%)。MLL-FG/MLL-PTD是继AML1-ETO之后,在所有入组患者中阳性率最高的一类融合基因,阳性率为13.61%,低于文献<sup>[15,19]</sup>报道的20%~24%,而与文献<sup>[16]</sup>报道的结果差异无统计学意义(13.61% vs 10.27,  $P=0.105$ )。上述研究提示地域差异对儿童AML的发生有一定影响。

MLL的伙伴基因有数百种,见于各种急性白血病<sup>[20]</sup>。本研究的融合基因筛查中包括了发生率最高的MLL-PTD和10种MLL-FG,其中以MLL-AF9的阳性率最高,为3.70%,其次为MLL-PTD, MLL-AF10和MLL-AF6。其余3种MLL-FG的阳性率均低于1%,另外4种MLL-FG未检测出阳性。虽然单一MLL-FG的阳性率较低,但MLL-FG/MLL-PTD的总阳性率并不低。伙伴基因的不同对MLL相关的白血病的临床表现和预后影响不同。除MLL-AF9阳性的AML归为中危组外,其他伴MLL重排的白血病均归为高危组<sup>[21]</sup>。因此,面对众多有病理意义、但单个阳性率极低的MLL-FG,需进一步改进检测方法,以提高其检出率。

目前基于多重巢式PCR或荧光定量PCR技术的融合基因筛查或单个融合基因定量检测具有经济快速、检测灵敏度高等优势,但仅能检测有限数量的特定融合基因型,难以全面检测MLL-FG。基于新一代高通量基因测序技术的融合基因筛查方案,可同时检测常见和少见型的融合基因,但目前仍存在成本高、实验周期长、检测灵敏度有限、对分析人员要求高等缺点。因此临床设计新的融合基因检测方案时,应结合各种融合基因的发生率、病理意义及实际需求综合分析。

本研究用基于较大样本量的数据给出了36种已有明确病理意义的融合基因在AML中的阳性率及其在不同年龄组中的分布特征,可为进一步改进临床适用的融合基因检测方案提供数据基础。

## 参考文献

- Klein K, de Haas V, Kaspers GJ. Clinical challenges in de novo pediatric acute myeloid leukemia[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018, 18(3): 277-293.
- Kolb EA, Meshinchi S. Acute myeloid leukemia in children and adolescents: identification of new molecular targets brings promise of new therapies[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2015, 2015(1): 507-513.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997[J]. *Histopathology*, 2000, 36(1): 69-86.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. *Blood*, 2016, 127(20): 2391-2405.
- Pallisgaard N, Hokland P, Riishoj DC, et al. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia[J]. *Blood*, 1998, 92(2): 574-588.
- 刘红星, 朱平, 张英, 等. 聚合酶链反应阵列同时定量检测37种白血病融合基因[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(8): 526-532.  
LIU Hongxing, ZHU Ping, ZHANG Ying, et al. Real-time PCR array for simultaneous detection of 37 kinds of genes in leukemia[J]. *National Medical Journal of China*, 2007, 87(8): 526-532.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia rationale and important changes[J]. *Blood*, 2008, 114(5): 937-951.
- 刘红星, 滕文, 王芳, 等. 白血病融合基因筛查检测方法[P]. CN107217104A, 2017-09-29.  
LIU Hongxing, TENG Wen, WANG Fang, et al. Methods for screening of fusion genes of leukemia[P]. CN107217104A, 2017-09-29.
- 刘红星, 滕文, 王芳, 等. 白血病融合基因筛查检测试剂盒[P]. CN107385031A, 2017-11-14.  
LIU Hongxing, TENG Wen, WANG Fang, et al. Test kit for screening of fusion genes of leukemia[P]. CN107385031A, 2017-11-14.
- Moarii M, Papaemmanuil E. Classification and risk assessment in AML: integrating cytogenetics and molecular profiling[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2017, 2017(1): 37-44.
- Komatsu N. Guest editorial: acute promyelocytic leukemia: change from "highly fatal to highly curable" leukemia[J]. *Int J Hematol*, 2014, 100(1): 16-17.
- Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable[J]. *Blood*, 2008, 111(5): 2505-2515.

13. Matsuo H, Iijima-Yamashita Y, Yamada M, et al. Monitoring of fusion gene transcripts to predict relapse in pediatric acute myeloid leukemia[J]. *Pediatr Int*, 2018, 60(1): 41-46.
14. Bullinger L, Dohner K, Dohner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(9): 934-946.
15. Zwaan CM, Kolb EA, Reinhardt D, et al. Collaborative efforts driving progress in pediatric acute myeloid leukemia[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(27): 2949-2962.
16. Iijima-Yamashita Y, Matsuo H, Yamada M, et al. Multiplex fusion gene testing in pediatric acute myeloid leukemia[J]. *Pediatr Int*, 2018, 60(1): 47-51.
17. Pan J, Zhang Y, Zhao YL, et al. Impact of clinical factors on outcome of leukemia patients with TLS-ERG fusion gene[J]. *Leuk Lymphoma*, 2017, 58(7): 1655-1663.
18. Harrison CJ, Hills RK, Moorman AV, et al. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(16): 2674-2681.
19. Balgobind BV, Hollink IH, Arentsen-Peters ST, et al. Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia[J]. *Haematologica*, 2011, 96(10): 1478-1487.
20. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017[J]. *Leukemia*, 2018, 32(2): 273-284.
21. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel[J]. *Blood*, 2017, 129(4): 424-447.

本文引用: 陈雪, 王芳, 房建成, 张阳, 朱平, 张英, 聂代静, 马小丽, 张薇, 张羽, 王明宇, 刘红星. 595例初诊儿童急性髓系白血病患者36种融合基因筛查分析[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(6): 1202-1207. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.011

**Cite this article as:** CHEN Xue, WANG Fang, FANG Jiancheng, ZHANG Yang, ZHU Ping, ZHANG Ying, NIE Daijing, MA Xiaoli, ZHANG Wei, ZHANG Yu, WANG Mingyu, LIU Hongxing. Analysis of 36 fusion genes in 595 cases of *de novo* pediatric acute myeloid leukemia[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(6): 1202-1207. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.011