

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.008

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.008

1 392 例初诊儿童急性淋巴细胞白血病患者 36 种融合基因筛查分析

张建平¹, 杨君芳², 王芳³, 房建成³, 张阳³, 朱平⁴, 张英⁴, 聂代静³, 马小丽³, 张羽³,
王明宇³, 张薇³, 陈雪³, 刘红星^{3,5}

- (1. 河北燕达陆道培医院造血干细胞移植科, 河北 廊坊 065201; 2. 河北燕达陆道培医院血液科, 河北 廊坊 065201;
3. 河北燕达陆道培医院病理和检验医学科, 河北 廊坊 065201; 4. 北京大学第一医院血液科, 北京 100034;
5. 北京陆道培血液病研究院, 北京 100176)

[摘要] 目的: 分析1 392例急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)患儿的36种融合基因情况。方法: 回顾性分析2006年9月至2017年4月1 392例[1 185例急性B淋巴细胞白血病(B-cell acute lymphocytic leukemia, B-ALL)和207例急性T淋巴细胞白血病(T-cell acute lymphocytic leukemia, T-ALL)]初诊儿童(≤ 14 岁)ALL患者的36种融合基因筛查结果。采集初诊儿童ALL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。 χ^2 检验比较B-ALL和T-ALL之间融合基因阳性率差异。结果: 1 392例患者中, 411例(29.53%)检测到17种融合基因, 其中2例(0.49%)同时携带2种融合基因。B-ALL患者中融合基因总阳性率显著高于T-ALL患者(31.73% vs 16.91%, $P < 0.001$)。BCR-ABL1, E2A-PBX1和TEL-AML1基因型常见于B-ALL, 而SIL-TAL1仅见于T-ALL。结论: 各种融合基因在ALL中的阳性率及其在B-ALL和T-ALL中的分布特征, 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。

[关键词] 急性淋巴细胞白血病; 融合基因; 儿童白血病

Analysis of 36 fusion genes in 1 392 patients of de novo pediatric acute lymphoblastic leukemia

ZHANG Jianping¹, YANG Junfang², WANG Fang³, FANG Jiancheng³, ZHANG Yang³, ZHU Ping⁴, ZHANG Ying⁴,
NIE Daijing³, MA Xiaoli³, ZHANG Yu³, WANG Mingyu³, ZHANG Wei³, CHEN Xue³, LIU Hongxing^{3,5}

- (1. Department of Bone Marrow Transplantation, Hebei Yanda Lu Daopei Hospital, Langfang Hebei 065201; 2. Department of Hematology, Hebei Yanda Lu Daopei Hospital, Langfang Hebei 065201; 3. Department of Pathology & Laboratory Medicine, Hebei Yanda Lu Daopei Hospital, Langfang Hebei 065201; 4. Department of Hematology, Peking University First Hospital, Beijing 100034;
5. Beijing Lu Daopei Institute of Hematology, Beijing 100176, China)

Abstract **Objective:** To analyze the gene-fusion landscape of 36 fusion genes in 1 392 patients (≤ 14 years) of de novo acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Methods:** The results of 36 fusion gene screening tests were retrospectively analyzed in 1 392 cases [1 185 B-cell acute lymphocytic leukemia (B-ALL) and 207 T-cell acute lymphocytic

收稿日期 (Date of reception): 2018-02-01

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

leukemia (T-ALL)] from September 2006 to April 2017. Peripheral blood or bone marrow of childhood cases of de novo ALL were collected and total RNA were extracted. Fusion genes were assessed by multiplex-nested RT-PCR. Fisher's exact test was performed to compare the incidences and frequencies of different fusion genes between B-ALL and T-ALL. **Results:** Of 1 392 patients, 17 types of fusion genes were detected in 411 patients (29.53%), and two of those cases (0.49%) with co-existence of two different fusion genes were identified. The incidence of fusion genes was statistically higher in B-ALL than in T-ALL patients (31.73% vs 16.91%, $P < 0.001$). The incidences of BCR-ABL1, E2A-PBX1 and TEL-AML1 were higher in B-ALL, while SIL-TAL1 was detected only in T-ALL patients. **Conclusion:** It will help to provide a data basis for further improvement of fusion gene screening panel in clinical applications.

Keywords acute lymphoblastic leukemia; fusion genes; pediatric leukemia

融合基因是血液肿瘤中一类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版世界卫生组织(WHO)造血和淋巴组织肿瘤分类开始将部分融合基因纳入白血病的分类标准, 目前2016版WHO分类标准里纳入的融合基因指标已有数十种^[1]。

北京大学第一医院血液研究室自2002年9月起参考Pallisgaard等^[2]报道的方案开始开展融合基因筛查检测。刘红星等^[3-5]对该方案加以改进, 建立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。通过应用该方案, 北京大学第一医院与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2006年9月至2017年4月中国初诊儿童急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)患者的36种融合基因筛查结果, 分析各种融合基因在ALL中的阳性率及其在急性B淋巴细胞白血病(B-cell acute lymphocytic leukemia, B-ALL)和急性T淋巴细胞白血病(T-cell acute lymphocytic leukemia, T-ALL)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4月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(≤ 14 岁)ALL患者共计3 198例, 从中选择可明确诊断的初诊ALL患者共1 392例(B-ALL 1185例、T-ALL 207例), 其中男842例, 女550例, 男女比例为1.53:1; 年龄2个月~14岁, 中位年龄4岁。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 方法

采用多重巢式PCR进行融合基因筛查。采集患者骨髓或外周血标本(1 315例骨髓标本, 77例外周血标本), 分离单个核细胞后提取RNA, 用多重巢式PCR方案检测36种常见融合基因的共129种mRNA基因型^[4-5], 包括: AML1-EAP, AML1-ETO, AML1-MECOM, BCR-ABL1, BCR-FGFR1, CBF-MYH11, DEK-CAN, E2A-HLF, E2A-PBX1, FIP1L1-PDGFR, 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统计软件进行分析。 χ^2 检验比较B-ALL和T-ALL的融合基因阳性率。 $P < 0.05$ 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 ALL患者中各融合基因阳性率及分布特征

在1 392例ALL患者中, 融合基因阳性者411例, 阳性率为29.53%。共检测到17种融合基因, 最常见的依次为TEL-AML1, E2A-PBX1, BCR-ABL1, SIL-TAL1和MLL-AF4, 阳性率分别为12.64%, 5.53%, 4.81%, 2.23%和1.44%。其余融合基因的阳性率均低于1%。MLL-PTD和其他MLL融合基因阳

性共45例(3.23%), TEL-ABL1和TEL-PDGFRB阳性各1例(图1)。

在376例B-ALL患者中检测到15种不同的融合基因, 总阳性率为31.73%(376/1 185)。最常见的依次是TEL-AML1, E2A-PBX1, BCR-ABL1和MLL-AF4, 阳性率分别为14.85%, 6.50%, 5.57%和1.69%, 其余各种融合基因阳性率均低于1%。其中1例B-ALL患者BCR-ABL1 e1a2型和MLL-PTD同时阳性。在35例T-ALL患者中检测到6种不同的融合基因, 总阳性率为16.91%(35/207)。其中30例为

SIL-TAL1阳性, 该融合基因在B-ALL中未检测到。另有3例为MLL-PTD及其他MLL融合基因阳性, 1例为SET-CAN阳性, 1例SIL-TAL1和BCR-ABL1 e1a2型同时阳性。

2.2 各种融合基因在 B-ALL 和 T-ALL 中的分布差异

B-ALL患者中, 融合基因阳性率显著高于T-ALL患者(31.73% vs 16.91%, $P < 0.001$)。TEL-AML1和E2A-PBX1仅见于B-ALL, SIL-TAL1仅见于T-ALL, BCR-ABL1在B-ALL中阳性率更高(表1)。

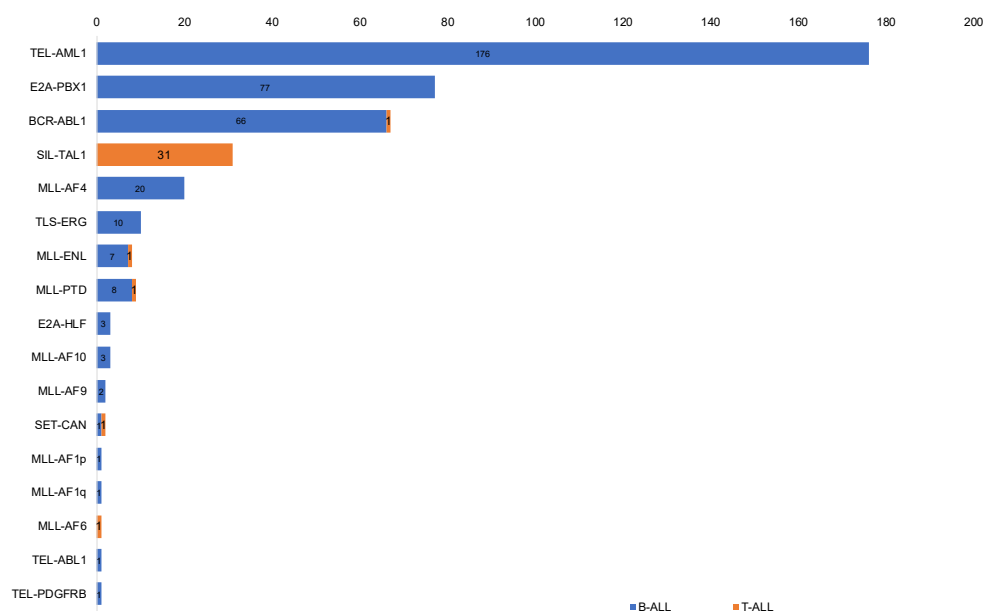


图1 儿童ALL患者中阳性融合基因的分布

Figure 1 Patients positive of fusion genes in the pediatric ALL patients

表1 B-ALL和T-ALL中阳性率有统计学差异的融合基因

Table 1 Fusion genes of statistical difference between B-ALL and T-ALL

组别	n	BCR-ABL1/[例(%)]	E2A-PBX1/[例(%)]	SIL-TAL1/[例(%)]	TEL-AML1/[例(%)]
B-ALL	1 185	66 (5.57)	77 (6.50)	0 (0.00)	176 (14.85)
T-ALL	207	1 (0.48)	0 (0.00)	31 (14.98)	0 (0.00)
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

血液肿瘤中重现性的融合基因是导致疾病发生的主要分子病因, 其具有极好的疾病分型相关性, 并伴随肿瘤细胞稳定存在。融合基因的鉴定为血液肿瘤的诊断、分型、疗效监测和靶向药物

研发提供了特异性的分子指标。但融合基因与血液肿瘤表型的关系复杂, 不仅是单纯的一一对应的关系, 且每种融合基因在血液肿瘤中的阳性率有限。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。目前国内外研究^[6-7]多为单一融合基因的研究

和分析, ALL中常见融合基因筛查的报道较少, 且缺乏较大样本量的研究。

本研究共检测36种血液肿瘤中常见的融合基因, 在ALL患者中共发现有17种阳性。B-ALL中TEL-AML1阳性率最高, 其次为E2A-PBX1, 且这两种融合基因仅见于B-ALL。欧美及其他亚洲国家的研究^[8-10]报道: 儿童B-ALL中TEL-AML1阳性率为18.8%~25%。我国相关研究^[11-12]报道的阳性率为13.3%~15.34%。本研究中TEL-AML1在儿童B-ALL中的发生率为14.85%, 进一步证实中国儿童B-ALL患者中TEL-AML1发生率显著低于欧美及其他亚洲人群。本研究中E2A-PBX1阳性率为6.50%, 略高于欧美国家所报道的2.1%~6%^[8-12]。BCR-ABL1在成人ALL中发生率超过20%, 并随年龄增加而增高, 但在儿童ALL中较少见^[13]。本研究的B-ALL患者中BCR-ABL1阳性率为5.57%, 高于欧美国家(1.5%~3%), 且差异有统计学意义^[8-9]。本研究的T-ALL患者中仅1例BCR-ABL1阳性, 且该患者同时有仅见于T-ALL的SIL-TAL1阳性。

BCR-ABL1样ALL是近年来鉴定的另一组ALL中常见且具有临床预后和治疗指导意义的疾病亚型, 已被纳入2016版WHO血液肿瘤分类指南^[1]。研究^[13-14]报道: BCR-ABL1样ALL在儿童ALL中发生率呈随年龄增加的趋势, 1~9岁患者中发生率约10%, 而青少年患者中发生率接近20%。虽然总发生率较高, 但BCR-ABL1样ALL的基因组异常具有极强的异质性, 患者常伴有ABL1, ABL2, JAK2, PDGFRA, PDGFRB等激酶基因与其他伙伴基因形成的融合基因。由于这些基因的伙伴基因众多且不固定, 因此单个特定的融合基因阳性率低^[14-15]。在本研究检测的融合基因中, TEL-ABL1, TEL-PDGFRB是BCR-ABL1样ALL中最常见的融合基因。但在本研究1 392例患者中, 这两种融合基因仅分别检测到1例阳性。提示面对众多有病理意义、但单个阳性率极低的BCR-ABL1样ALL相关的融合基因, 需采用全新的不同的检测方法。

研究^[16]显示: MLL的伙伴基因已有数百种, 见于各种急性白血病。不同的MLL融合基因在不同白血病中的分布、对临床表现和预后的影响亦有不同。本研究的融合基因筛查中包括文献^[16]中报道的发生率最高的MLL-PTD和10种MLL融合基因, 在儿童ALL中总的阳性率为3.23%。除MLL-AF4阳性率达1.44%外, MLL-PTD及其他5种MLL融合基因的阳性率均低于1%, 另5种MLL融合基因

未检测出阳性。由于MLL的伙伴基因众多, 真实存在的MLL融合基因可能更多, 需要进一步改进方法, 以提高MLL融合基因的阳性率。

近年来基因检测和分析技术飞速进展, 新的融合基因及对对应疾病分类的报道也不断增多^[17]。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相关融合基因或BCR-ABL1样ALL相关融合基因。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36种已有明确病理意义的融合基因在ALL中的阳性率及其在B-ALL和T-ALL中的分布特征, 可帮助临床医师更好地认识和评估各种融合基因在ALL诊断和预后判断中的价值, 并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

- 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 fusion genes in leukemia[J]. *National Medical Journal of China*, 2007, 87(8): 526-532.
- 刘红星, 滕文, 王芳, 等. 白血病融合基因筛查检测方法[P]. 中国专利: CN107217104A, 2017-09-29.
LIU Hongxing, TENG Wen, WANG Fang, et al. Leukemia fusion gene screening test method[P]. Chinese patent: 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]. 中国专利: CN107385031A, 2017-11-24.

- LIU Hongxing, TENG Wen, WANG Fang, et al. Leukemia fusion gene screening test kit[P]. Chinese patent: CN107385031A, 2017-11-24.
6. Zhao X, Hong Y, Qin Y, et al. The clinical significance of monitoring the expression of the SIL-TAL1 fusion gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Int J Lab Hematol, 2017, 39(6): 613-619.
 7. Pan J, Zhang Y, Zhao Y L, et al. Impact of clinical factors on outcome of leukemia patients with TLS-ERG fusion gene[J]. Leuk Lymphoma, 2016, 58(7): 1655-1663.
 8. Szczepański T, Harrison CJ, van Dongen JJ. Genetic aberrations in paediatric acute leukaemias and implications for management of patients[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(9): 880-889.
 9. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(5): 429-438.
 10. Ariffin H, Chen SP, Kwok CS, et al. Ethnic differences in the frequency of subtypes of childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the Malaysia-Singapore Leukemia Study Group[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2007, 29(1): 27-31.
 11. Liang DC, Shih LY, Yang CP, et al. Frequencies of ETV6-RUNX1 fusion and hyperdiploidy in pediatric acute lymphoblastic leukemia are lower in far east than west[J]. Pediatr Blood Cancer, 2010, 55(3): 430-433.
 12. Chen B, Wang YY, Shen Y, et al. Newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in China (I): abnormal genetic patterns in 1346 childhood and adult cases and their comparison with the reports from Western countries[J]. Leukemia, 2012, 26(7): 1608-1616.
 13. Herold T, Baldus C D, Gökbuget N. Ph-like acute lymphoblastic leukemia in older adults[J]. N Engl J Med, 2014, 371(23): 2235.
 14. 张阳, 刘红星. Ph样急性淋巴细胞白血病的分子遗传学进展: 第56届美国血液学会年会报道[J]. 白血病·淋巴瘤, 2015, 24(2): 74-78.
ZHANG Yang, LIU Hongxing. Progression of molecular genetics in Ph-like acute lymphoblastic leukemia: reports from the 56th American Society of Hematology annual meeting[J]. Journal of Leukemia & Lymphoma, 2015, 24(2): 74-78.
 15. Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2017, 130(19): 2064-2072.
 16. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017[J]. Leukemia, 2018, 32(2): 273-284.
 17. 刘红星, 王芳, 聂代静. 血液系统疾病基因组学分析及临床应用进展[J]. 白血病·淋巴瘤, 2018, 27(2): 69-72.
LIU Hongxing, WANG Fang, NIE Daijing. Progress of genomic analysis and its clinical application in hematological diseases[J]. Journal of Leukemia & Lymphoma, 2018, 27(2): 69-72.

本文引用: 张建平, 杨君芳, 王芳, 房建成, 张阳, 朱平, 张英, 聂代静, 马小丽, 张羽, 王明宇, 张薇, 陈雪, 刘红星. 1 392例初诊儿童急性淋巴细胞白血病患者36种融合基因筛查分析[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(5): 956-960. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.008

Cite this article as: ZHANG Jianping, YANG Junfang, WANG Fang, FANG Jiancheng, ZHANG Yang, ZHU Ping, ZHANG Ying, NIE Daijing, MA Xiaoli, ZHANG Yu, WANG Mingyu, ZHANG Wei, CHEN Xue, LIU Hongxing. Analysis of 36 fusion genes in 1 392 patients of de novo pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(5): 956-960. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.008