

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.06.018

TEL/AML1、BCR/ABL、E2A/PBX1、MLL/AF4 阳性儿童急性淋巴细胞白血病的临床特点及预后

王颖超¹,殷楚云¹,李涛²,冯磊¹,王春美¹,盛光耀¹

Clinical Features and Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia with TEL/AML1,BCR/ABL,E2A/PBX1 and MLL/AF4 Positive

Wang Yingchao¹,Yin Chuyun¹,Li Tao²,Feng Lei¹,Wang Chunmei¹,Sheng Guangyao¹

1. Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China, 2. Department of Hematology

Abstract: Objective To explore the expression and clinical significance of TEL/AML1,BCR/ABL,E2A/PBX1 and MLL/AF4 fusion gene in childhood acute lymphoblastic leukemia(ALL). **Methods** Bone marrow samples were collected from 312 children with newly diagnosed ALL, and E2A/PBX1,BCR/ABLp190(e1a2)and p210(b2a3,b3a2) isoforms, TEL/AML1 and MLL/AF4 fusion gene were detected by RQ-PCR. Meanwhile, Clinico-biological characteristic, therapeutic response and outcome were retrospectively analyzed. **Results** (1) The fusion genes were positive in 120 ALL children. 72 cases(23.1%) expressed TEL/AML1,22 cases(7.1%) expressed BCR-ABL(including 16 cases(5.1%)p190 and 6 cases(1.9%) p210,18 cases(5.8%) expressed E2A/PBX1 and 8 cases(2.6%) expressed MLL/AF4). (2) In TEL/AML1 positive children,the leukocyte count was $(18.02 \pm 6.45) \times 10^9/L$ with a 100% complete remission(CR) rate and none relapsed during follow-up. In BCR/ABL positive children,the mean age was (9.40 ± 3.55) years old with 81.8% CR rate, 6 cases still expressed the fusion gene at the end of intensive treatment, 8 children relapsed and 8 children died during follow-up. In E2A/PBX1 positive children, all of them were given chemotherapy according to high risk standard. The CR rate was 88.9%. Three cases expressed micro-content fusion gene at the end of intensive treatment. 2 cases relapsed during follow-up. In MLL/AF4 positive children, the leukocyte count was $(41.53 \pm 9.46) \times 10^9/L$. 2 cases still expressed the fusion gene at the end of intensive treatment,and both of them relapsed and died. **Conclusion** Fusion genes are important indexes for risk stratification,MRD monitoring and prognosis estimation in children with ALL.

Key words: Acute Leukemia;Children;Fusion gene;TEL/AML1;BCR/ABL;E2A/PBX1;MLL/AF4

摘要:目的 探讨儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)TEL/AML1、BCR/ABL、E2A/PBX1、MLL/AF4 四种融合基因的表达及其临床诊治意义。**方法** 用实时荧光定量 PCR(RQ-PCR)方法检测 TEL/AML1、BCR/ABL(p190 和 p210 两种亚型)、E2A/PBX1、MLL/AF4 四种融合基因在 312 例 ALL 患儿中的表达情况,并总结融合基因阳性患儿的临床和生物学特点、治疗反应及预后情况。**结果** (1)融合基因阳性共 120 例,TEL/AML1 阳性组 72 例(23.1%),BCR/ABL 阳性组 22 例(7.1%),p190 16 例(5.1%)、p210 6 例(1.9%),E2A/PBX1 阳性组 18 例(5.8%),MLL/AF4 阳性组 8 例(2.6%)。(2)TEL/AML1 阳性组诊断时 WBC 平均值为 $(18.02 \pm 6.45) \times 10^9/L$,诱导化疗结束完全缓解率(CR)100%,随访期间无复发;BCR/ABL 阳性组发病时年龄 (9.40 ± 3.55) 岁,诱导化疗结束 CR 81.8%,强化治疗末仍有 6 例融合基因未转阴,随访中有 8 例(36.3%)复发,8 例死亡;E2A/PBX1 阳性组全部按高危标准给予化疗,诱导化疗结束 CR 88.9%,强化治疗期末仍有 3 例基因微量表达,随访中 2 例复发;MLL/AF4 阳性组发病时 WBC $(41.53 \pm 9.46) \times 10^9/L$,强化治疗期末仍有 2 例基因呈阳性,随访中均复发死亡。**结论** 融合基因可作为 ALL 危险度分层、监测微小残留病、判断预后的重要指标之一。

关键词: 急性白血病;儿童;融合基因;TEL/AML1;BCR/ABL;E2A/PBX1;MLL/AF4

中图分类号: R733.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)06-0687-04

0 引言

近年来,随着化疗方案的逐步改良和完善,儿童

急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia,ALL)的治疗效果明显提高,但仍有少数群体存在预后不良,其中融合基因是影响预后的重要因素之一。白血病相关融合基因检测不仅能提供分子生物学诊断依据,而且对治疗方案的制定、治疗效果评估及预后的判断产生重要影响。现将本院儿科收治的经荧光定量 PCR 检测融合基因的 312 例急性淋

收稿日期:2011-08-01;修回日期:2011-11-18

作者单位:1. 450052 郑州,郑州大学第一附属医院儿科,2. 血液病研究所

作者简介:王颖超(1970-),男,硕士,副教授,主要从事儿童血液或肿瘤疾病的研究

巴细胞白血病患儿检测结果分析如下,以评估其在辅助白血病临床诊断、药物疗效及预后判定方面的应用价值。

1 资料与方法

1.1 病例资料

收集 2007 年 1 月—2010 年 1 月郑州大学第一附属医院儿科病房收治 312 例急性淋巴细胞白血病患儿资料,其中男 178 例,女 134 例,T-ALL 40 例,B-ALL 272 例,中位年龄 7 岁(2~14 岁)。

1.2 方法

1.2.1 诊断 312 例白血病患者均经 MICM 诊断和分型。从完全缓解(CR)后计算长期无事件生存率(EFS),平均随访时间 38 月(18~54 月)。

1.2.2 治疗方案 按中华医学会儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第三次修订草案)^[1]进行治疗。以诱导治疗结束骨髓检查中原始淋巴细胞+幼稚淋巴细胞<5%为骨髓完全缓解。化疗前均已征得患儿家属的知情同意并签署化疗知情同意书。

1.2.3 检查方法

1.2.3.1 细胞形态学检查 骨髓和外周血涂片采用瑞氏染色分类计数,并进行化学染色,包括过氧化酶(POX)、特异性酯酶(CE)等,参照 FAB 标准。

1.2.3.2 免疫学检查 采用 FACScan 型流式细胞仪,用 CD45/SSC 设门分析异常细胞,阳性判断标准:急性淋巴细胞性白血病抗原阳性细胞≥30%。

1.2.3.3 融合基因检测 对初治时骨髓标本,采用实时荧光定量 PCR 方法对四种融合基因进行定量检测,并于诱导化疗结束、维持治疗前及停药后随访期间,定期采取骨髓标本对初治时阳性的融合基因进行定量检测。各融合基因的引物序列见表 1。

表 2 各组患儿的临床及生物学特点

Table 2 Clinical and biological characteristics of children with different fusion genes

Presenting feature	TEL/AML1(+)	BCR/ABL(+)	E2A/PBX1(+)	MLL/AF4(+)	Negative
Number	72(23.1%)	22(7.0%)	18(5.8%)	8(2.6%)	192(61.5%)
Mean age(year)	5.79 ± 3.48	9.40 ± 3.55	9.33 ± 3.28	7.88 ± 4.21	6.86 ± 3.01
Gender					
Male	46(63.9%)	14(63.6%)	6(33.3%)	6(75.0%)	106(55.2%)
Female	26(36.1%)	8(36.4%)	12(66.7%)	2(25.0%)	86(44.8%)
WBC(×10 ⁹ /L)					
$\bar{x} \pm s$	18.02 ± 6.45	30.63 ± 13.42	25.90 ± 8.60	41.53 ± 9.46	19.66 ± 8.64
<20×10 ⁹ /L	59(82.0%)	10(45.5%)	10(55.6%)	0	137(71.4%)
≥20×10 ⁹ /L	13(18.0%)	12(54.5%)	8(44.4%)	8(100%)	55(28.6%)
Blasts in bone marrow					
$\bar{x} \pm s(\%)$	78.48 ± 7.61	83.55 ± 5.24	81.56 ± 5.24	89.00 ± 5.72	73.64 ± 11.19
Mmunophenotype					
Pro pre-B cell type	0	0	0	0	14(7.3%)
Common cell type	57(79.2%)	20(90.9%)	4(22.2%)	2(25.0%)	113(58.8%)
Pre-B cell type	15(20.8%)	0	14(77.8%)	6(75.0%)	36(18.8%)
T-ALL	0	2(9.1%)	0	0	29(15.1%)

表 1 各融合基因的引物序列

Table 1 Primer sequences for different fusion gene

Fusion gene	Primer reverse and forward 5'-3'
E2A-PBX1	forward GCCACGGGGCGCTGGCCTCAGGTTT reverse CACGCCTTCCGCTAACAG
MLL-AF4	forward AGAATCAGGTCCAGAGCAGAGC reverse ATGCTGAGAGTCCTTTGTAGGG
TEL-AML1	forward AAGCCCATCAACCTCTCTCATC reverse TGAAGGCGGCGTGAAGC
BCR-ABL p190	forward ACCTCACCTCCAGCGAGGAGGACTT reverse TCCACTGGCCACAAAATCATAACAGT
BCR-ABL p210	forward GCTCATCAATAAGGAAGA reverse GATGCTACTGGCCGCTGA
ABL	forward CCT TCA GCG GCC AGT AGC reverse GGA CACAGG CCC ATGGTAC

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 版统计软件进行统计学分析。计量资料均采用均数±标准差表示,各组间均数比较采用单因素方差分析,率的比较采用卡方检验,采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 TEL/AML1、BCR/ABL、E2A/PBX1、MLL/AF4 融合基因在 ALL 中的检测结果及临床特点

所有标本均经 RQ-PCR 反复检测,未见有同时表达 2 种或 2 种以上融合基因者。312 例 ALL 患儿中融合基因阳性共 120 例,不同融合基因检测结果及其临床特点见表 2。

2.2 性别及年龄

BCR/ABL、E2A/PBX1 阳性组平均发病年龄明显高于其他组($P = 0.009$)。TEL/AML1 阳性组男性占 63.9%,E2A/PBX1 阳性组男性只占到 33.3%,见表 2。

2.3 实验室检查

TEL/AML1 阳性组有 82.0% 病例发病时 WBC $< 20 \times 10^9 / L$; BCR/ABL、MLL/AF4 阳性组 WBC 高于其他组 ($P = 0.000$)。骨髓中原始 + 幼稚细胞比例以 MLL/AF4 阳性组 (89.00 ± 5.72)% 最高, 阴性组最低 ($P = 0.000$), 见表 2。

2.4 免疫分型

四种融合基因在 40 例 T-ALL 中仅有 2 例表达 BCR/ABL, 余均为阴性。TEL/AML1 阳性组、BCR/ABL 阳性组及阴性组均以普通 B-ALL 为主, E2A/PBX1 阳性组、MLL/AF4 阳性组以前 B-ALL 为主, 见表 2。

2.5 早期治疗反应及远期疗效

在不同时期对融合基因阳性儿童进行监测, 详见表 3。BCR/ABL 阳性组 2 例化疗早期死亡, 强化治疗末仍有 6 例融合基因未转阴, 随访中复发, 其中 1 例发病时高白细胞 14 岁男孩于诊断 7 月后复发并发生中枢神经系统白血病, 化疗持续不缓解而死亡。E2A/PBX1 阳性组 3 例未转阴者有 2 例, 分别在无病生存 10 月、15 月后复发, 遂后死亡; MLL/AF4 阳性组 2 例持续阳性者复发。对各组患儿进行 Kaplan-Meier 生存分析, TEL/AML1 阳性组、阴性组患儿无病生存时间明显长于具有其他融合基因阳性患者 ($\chi^2 = 51.27, P = 0.000$), 见图 1。

3 讨论

儿童 ALL 的危险度分层是制定治疗方案的基础, 融合基因已经成为 ALL 危险度分层的重要指标。同时, 融合基因也是微小残留病 (MRD) 检测的基础, RQ-PCR 方法结合了荧光探针和 PCR 两种技术, 通过定量检测白血病细胞中标志性基因实时观测 MRD, 敏感度可达 10^{-6} 数量级 (即 10^{-6} 数量级的目的基因也可被检测到), 已成为临床实验室建立 MRD 检测的主要方法之一^[2]。因此融合基因的检测已经成为儿童白血病从诊断到治疗的常规检测项目。TEL/AML1、BCR/ABL (p190 和 p210 两个亚型)、E2A/PBX1 和 MLL/AF4 是 ALL 中最常见的融合基因。融合基因具有很强的特异性, 几乎所有阳性者都只表达一种融合基因, 在本研究中, 所有标本经反复检测, 未见有同时表达 2 种或 2 种以上的融合基因者。Jiménez-Morales 等^[3]发现 1 例 BCR/ABL 阳性患儿同时表达 E2A/PBX1, 推测可能是有两个独立的事件诱发而成, 具体机制尚有待于进一步研究。

混合谱系白血病基因 MLL 是血液系统恶性疾病中常累及的基因之一。在儿童 ALL 病例中, MLL 的发生率为 6%, 其中大部分 (80%) 为婴幼儿白血病^[4], 在 pre-B ALL 中更常见, 大于 50%^[5]。因婴幼儿白血病本身预后极差, 为避免干扰分析结果, 我们未将其纳入研究范围。目前发现 MLL 基因易位重排类型有 60 多种, 其最常见的是 MLL/AF4。研究中发现涉及 MLL 融合基因的白血病大多恶性程度高, 对常规化疗不敏感, 缓解率低。Bardini 等^[6]认为 MLL 阳性婴幼儿白血病发生机制与其他类型白血病不同, 预后更加恶劣。

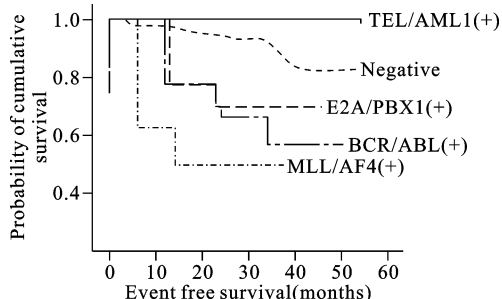


图 1 各组患儿的 Kaplan-Meier 生存分析曲线
Figure 1 Kaplan-Meier survival curve with Logrank test

表 3 各组患儿的治疗反应及预后

Table 3 Therapeutic response and clinical outcome of fusion genes positive patients

Time	TEL/AML1(+)	BCR/ABL(+)	E2A/PBX1(+)	MLL/AF4(+)
At diagnosis				
Number	72	22	18	8
Gene expression level	5.2%~318.8%	0.07%~91.8%	1.6%~603.7%	0.02%~0.32%
Mean	113.4%	43.6%	311.4%	0.24%
At the end of induction chemotherapy				
Number	10	16	6	5
Gene expression level	0.0032%~0.34%	0.018%~14.2%	0.0076%~25.1%	0.02%~0.78%
Mean	0.0081%	0.041%	0.014%	0.48%
At the end of intensive chemotherapy				
Number	1	6	3	2
Gene expression level	0.0015%	0.0016%~0.047%	0.0014%~0.028%	0.005%~0.013%
Mean	0.0015%	0.0025	0.029%	0.009%
Early response to chemotherapy				
CR	72(100.0%)	18(81.8%)	16(88.9%)	4(50.0%)
PR	0	2(9.1%)	2(11.1%)	2(25.0%)
Long-term efficacy				
Sustained remission	70(95.6%)	6(27.3%)	12(66.7%)	2(25.0%)
Relapse	0	8(36.4%)	2(11.1%)	2(25.0%)
Death	2(4.3%)	8(36.4%)	6(33.3%)	4(50.0%)

BCR/ABL 融合基因是诊断慢性粒细胞性白血病类型及分期的重要指标之一,也是影响儿童 ALL 预后的一个重要原因。成人 ALL 中 BCR/ABL 的检出率为 25%,而在儿童 ALL 中约占 2%~6%^[7],有人推测这可能是儿童 ALL 预后远好于成人的原因之一。虽然儿童 ALL 目前总体治愈率已达 80%,而 BCR/ABL 阳性 ALL 患儿 5 年无事件生存率仅为 20%~40%^[8]。BCR/ABL 融合基因已被列为高危 ALL 的独立危险因素,儿童 ALL 伴 BCR/ABL 的不良预后与高肿瘤负荷及高年龄有关,而且以男性居多。本研究资料显示,BCR/ABL 阳性组中 11 例 ALL 患儿中 7 例男童,发病时平均年龄高,而且初诊时白细胞计数都很高,缓解率低,复发快,预后差。P. A. BARTLEY 等用巢式 RT-PCR 检测 BCR/ABL 监测 MRD,敏感度可达 10^{-6} 数量级,为临床尽早发现复发、及时调整治疗方案和准确判断预后提供了重要指导^[9]。

TEL/AML1 融合基因在儿童 B 前体细胞 ALL 中的发生率高达 20%~25%,是儿童 ALL 最常见的遗传学改变^[10]。大多数研究认为,TEL/AML1 阳性是儿童 ALL 预后好的标志,Loh 等^[11]最近的研究指出,TEL/AML1 阳性儿童 ALL 的 5 年无事件生存率和总生存率分别高于 TEL/AML1 阴性儿童 ALL。本研究中发现大多数 TEL/AML1 阳性儿童发病时白细胞负荷低,对化疗敏感度高,CR 期长,早期复发率低。但有 1 例 TEL/AML1 阳性儿童发病时白细胞极高,早期死亡。这可能是由于 TEL/AML1 阳性儿童 ALL 是一个异质性群体,存在多种分子、细胞遗传学异常。因此,关于 TEL/AML1 与儿童 ALL 的临床及预后关系仍需要更大样本量、更深入的研究。

E2A/PBX1 融合基因见于 5%左右的 ALL 儿童,尤其是在 B 细胞性 ALL 中占 20%~25%^[12]。本研究 312 例白血病患者中,E2A/PBX1 阳性有 18 例(5.8%)与文献一致。过去认为,该亚型白血病患者对化疗的反应差,并且只能获得短期缓解;然而,Pui 等^[13]发现提高化疗强度后该亚型 ALL 患儿预后很好。目前已公认,早期治疗反应是重要的预后因素,E2A/PBX1 阳性的 ALL 儿童对强的松的体外耐受是独立的预后因素^[14]。这一点在本研究中也得到了证实,16 例 E2A/PBX1 阳性患儿在高强度化疗下第 14 天即完全缓解,至今仍无病生存。

不同类型的白血病患者染色体畸变形成的融合基因不相同,其临床表现、免疫学分型、对治疗的反应及预后意义也不同,即使同一种类型白血病具有不同的融合基因时,其临床特征及预后也不相同。实时荧光定量 PCR 技术可以有效地检测出白血病常见融合基因并进行定量分析,为临床诊断、指导治疗、判断预后提供重要依据,尤其是检测 MRD 水平的应用,对临床白血病患者个体化治疗发挥越来越重要的作

用。此外,遗传学异常在某些类型白血病的发病机制中起着重要的作用^[15],这些融合基因的产生不仅有助于部分解释白血病的发病机制,而且也成为了继化学药物治疗之外靶向诱导白血病缓解的依据。

参考文献:

- [1] The Subspecialty Group of Hematology Diseases. The society of pediatrics, Chinese Medical Association. The Editorial Board. Chinese Journal of Pediatrics. Suggestion of diagnosis and treatment of acute lymphoblastic leukemia in childhood (The 3rd revised version)[J]. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2006, 44(5):392-5. [中华医学会儿科学分会血液学组. 儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第三次修订草案)[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(5):392-5.]
- [2] Szczepański T, Orfão A, van der Velden VH, et al. Minimal residual disease in leukaemia patients[J]. Lancet Oncol, 2001, 2(7):409-17.
- [3] Jiménez-Morales S, Miranda-Peralta E, Saldaña-Alvarez Y, et al. BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients[J]. Leuk Res, 2008, 32(10):1518-22.
- [4] Chowdhury T, Brady HJ. Insights from clinical studies into the role of the MLL gene in infant and childhood leukemia[J]. Blood Cells Mol Dis, 2008, 4(2):192-9.
- [5] Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study [J]. Blood, 2009, 114(12):2489-96.
- [6] Bardini M, Galbiati M, Lettieri A, et al. Implementation of array based whole-genome high-resolution technologies confirms the absence of secondary copy-number alterations in MLL-AF4-positive infant ALL patients[J]. Leukemia, 2011, 25(1):175-8.
- [7] Na IK, Kreuzer KA, Lupberger J, et al. Quantitative RT-PCR of Wilms tumor gene transcripts(WT1) for the molecular monitoring of patients with accelerated phase bcr/abl + CML[J]. Leuk Res, 2005, 29(3):343-5.
- [8] Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia[J]. N Engl J Med, 2004, 350(15):1535-48.
- [9] Bartley PA, Ross DM, Latham S, et al. Sensitive detection and quantification of minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia using nested quantitative PCR for BCR-ABL DNA [J]. Int J Lab Hematol, 2010, 32(6 Pt 1):e222-8.
- [10] Lin D, Liu SH, Zhu XF, et al. Study of the childhood acute lymphoblastic leukemia with t(12;21)[J]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2004, 25(1):17-21. [林冬, 刘世和, 竺晓凡, 等. t(12;21)儿童急性淋巴细胞白血病的研究[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(1):17-21.]
- [11] Loh ML, Goldwasser MA, Silverman LB, et al. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01 [J]. Blood, 2006, 107(11):4508-13.
- [12] Foa R, Vitale A, Mancini M, et al. E2A-PBX1 fusion in adult acute lymphoblastic leukemia: biological and clinical features [J]. Br J Hematol, 2003, 120(3):484-7.
- [13] Pui CH, Sandlund JT, Pei D, et al. Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children [J]. JAMA, 2003, 290(15):2001-7.
- [14] Stams WA, Beverloo HB, den Boer ML, et al. Incidence of additional genetic changes in the TEL and AML1 genes in DCOG and COALL-treated t(12;21) positive pediatric ALL, and their relation with drug sensitivity and clinical outcome [J]. Leukemia, 2006, 20(3):410-6.
- [15] Dong M, Blobel GC. Role of transforming growth factor- β in hematologic malignancies [J]. Blood, 2006, 107(12):4589-96.