



高分辨率熔解曲线分析法检测 毛细胞白血病 BRAF 基因突变

章艳茹 刘慧敏 齐军元 刘薇 邱录贵

【摘要】 目的 探讨高分辨率熔解曲线分析(HRM)法检测毛细胞白血病(HCL)患者 BRAF V600E 基因突变的可行性及其意义。方法 用 HRM 法检测 4 例初治确诊 HCL 患者 BRAF V600E 基因突变情况,并回顾性分析患者临床资料。结果 HRM 法分析 4 例 HCL 患者均发生 BRAF V600E 突变。测序结果与 HRM 分析结果一致。结论 用 HRM 法检测临床样本 BRAF V600E 基因突变,具有操作简便、结果准确、成本低的优点,可用于临床辅助诊断。

【关键词】 白血病,多毛细胞; 基因,BRAF; DNA 突变分析; 高分辨率熔解曲线分析法

Detection of BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia by high-resolution melting analysis
Zhang Yanru, Liu Huimin, Qi Junyuan, Liu Wei, Qiu Lugui. Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China
Corresponding author: Qi Junyuan, Email: qi_jy@yahoo.com

【Abstract】 Objective To explore the feasibility and diagnostic implication of BRAF V600E mutation identified by high-resolution melting (HRM) assay in patients with hairy cell leukemia (HCL). **Methods** The V600E mutation of BRAF exon 15 in four HCL patients were detected by HRM assay and patients' clinical data were retrospectively analyzed. **Results** All four HCL patients were positive for the BRAF V600E mutation, which were identical to the results of DNA sequencing. **Conclusion** The HRM assay for BRAF V600E mutation provides a useful tool to aid the laboratory diagnosis of HCL with easy operability, accuracy, and low cost.

【Key words】 Leukemia, hairy cell; Gene, BRAF; DNA mutational analysis; High resolution melting assay

毛细胞白血病(HCL)是一种罕见的B淋巴细胞增殖性疾病,骨髓和外周血出现多毛细胞、全血细胞减少、脾脏肿大、典型免疫表型为主要的特征,约占成人白血病的2%。当患者骨髓和外周血出现毛细胞形态细胞并共表达 CD11c、CD103 及成熟B细胞抗原如 CD19、CD20、CD22,强烈提示HCL。但变异型毛细胞白血病(HCL-V)、脾边缘区淋巴瘤、伴毛细胞的脾淋巴瘤、脾脏弥漫红髓小B细胞淋巴瘤等B细胞淋巴瘤/白血病亦具有上述特点,因此,不易与HCL鉴别。

2011年 Tiacchi 等^[1]发现HCL患者均存在 BRAF 基因第15外显子1799位点T>A突变,密码子600位

的缬氨酸被谷氨酸替代(V600E),即 BRAF V600E 基因突变,但在其他外周B细胞淋巴瘤或白血病患者中未检测到该突变。HCL可能是基于特定基因突变的均一疾病。提示我们在拟诊HCL时,应检测 BRAF V600E 基因突变协助诊断。

高分辨率熔解曲线(high resolution melting, HRM)分析是在实时荧光定量PCR基础上通过荧光饱和染料监控核酸的熔解曲线变化进行分析的新兴分子诊断技术。具有不受突变碱基位点和类型的局限、无需序列特异性探针、无需测序、操作简便快捷、高通量、低成本等特点。我们旨在评估 HRM 法检测 HCL 患者 BRAF V600E 基因突变的可行性及辅助诊断价值。

病例和方法

1. 病例:纳入2011年7月至2013年3月我院收治的4例初诊HCL患者,所有病例的诊断均符合文献[2-3]标准。其中男、女各2例,起病中位年龄

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.03.006

基金项目:国家科技(重大新药创制)专项(2011ZX09302-007-04)

作者单位:300020 天津,中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所、血液病医院淋巴瘤诊疗中心

通信作者:齐军元,Email:jqy66@gmail.com



55.5(43~78)岁。

2. 一般检查:记录所有患者就诊时的临床指标,包括年龄、性别、主要临床表现(脾大、发热、出血、感染等)及体征、血细胞计数、血生化及骨髓细胞形态、骨髓活检、细胞化学染色、细胞免疫表型、电镜、佛波醇酯(TPA)诱导分化试验、染色体核型、染色体荧光原位杂交(FISH)等检查结果。

3. HRM法检测 BRAF V600E 基因突变:收集患者骨髓石蜡包埋组织切片,提取总DNA后,用紫外分光光度计检测DNA浓度并调整DNA浓度至30 ng/μl 备用。引物设计与合成:正义链:5'-CTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAG-3';反义链 5'- TGGATCCAGACA ACTGTTCAAA- 3'。按 Type -it HRM PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司产品)说明书操作并优化。检测 BRAF 基因突变的 qPCR-HRM 反应总体系为 20 μl,包括 2×HRM PCR Master Mix 缓冲液 10 μl,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μl,模板 1.0 μl, DEPC 水 8 μl。循环参数:95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 20 s, 共 45 个循环。熔解过程:70~90 °C 2 s, 每个循环升温 0.1 °C。用 HRM 仪器分析软件对熔解曲线进行基因突变统计分析。

4. 直接测序法检测 BRAF V600E 基因突变:将 DNA 扩增产物送至北京华大基因公司测序。

结 果

1. 一般检查:患者临床特征详见表 1。①仅例

2 出现全血细胞减少。所有患者外周血淋巴细胞比例升高,最高占 0.97。其中 3 例外周血可见毛细胞。②所有患者骨髓涂片小淋巴细胞浸润,比例最高达 0.950。例 2 骨髓增生减低,其余患者为增生活跃至极度活跃。大多可见典型毛细胞。③所有患者进行骨髓活检,为增生活跃或极度活跃,大多可见毛细胞呈弥漫或簇状分布,未见纤维组织增生。值得注意的是,例 2 外周血及骨髓小淋巴细胞形态结构不典型。④骨髓免疫组化均提示 CD3 阴性、CD5 阴性、CD19 阳性、CD20 阳性、CD117 阴性、CyclinD1 阴性。其中例 3 加做膜联蛋白 A1(Annexin A1)提示阴性。⑤骨髓及外周血流式细胞术免疫表型检查:均表达 CD11c、CD19、CD20、CD22、CD25、CD38、CD103、FMC7, 1 例表达 sIgM, 均不表达 CD5、CD10、CD23、CyclinD1(表 2)。⑥TPA 诱导分化试验:例 1 行骨髓 TPA 体外诱导分化试验,为阳性,表现为 24、48 及 72 h 黏附聚集明显,且有时间依赖性。⑦细胞化学染色:例 2、3、4 行耐酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)试验检查。3 例患者酸性磷酸酶(ACP)均阳性且不被 L-酒石酸抑制。⑧除例 1 外,均行骨髓细胞遗传学及 FISH 检查。均为正常染色体核型。无 p53、RB1、ATM 基因缺失,无 IgH 易位。

2. HRM 分析结果:4 例患者均发生 BRAF 基因第 15 外显子 1799 T>A 突变,即密码子 600 位的缬氨酸被谷氨酸替代(V600E)。

3. 直接测序结果:4 例患者均发生 BRAF V600E 基因突变(图 1),与 HRM 分析结果一致。

表 1 4 例毛细胞白血病患者临床特征

例号	性别	年龄(岁)	临床表现	染色体核型	TRAP 试验	TPA 诱导分化试验	Annexin A1 表达	治疗	目前状态
1	男	48	脾大	ND	ND	阳性	ND	干扰素	完全缓解
2	男	76	全血细胞减少、脾大	46,XY[20]	阳性	ND	ND	2-氯脱氧腺苷	完全缓解
3	女	56	乏力、白细胞、血小板减少	46,XX[11]	阳性	ND	阴性		
4	女	43	脾大	46,XX[11]	阳性	ND	ND	2-氯脱氧腺苷	完全缓解

注:TRAP:耐酒石酸酸性磷酸酶;TPA:佛波醇酯;Annexin A1:膜联蛋白 A1; ND:未测

表 2 4 例毛细胞白血病患者细胞免疫表型

例号	CD5	CD10	CD11c	CD19	CD20	CD22	CD23	CD25	CD38	CD103	FMC7	sIgM	CyclinD1
1	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
2	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
3	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
4	-	-	+	+	+	+	-	+	±	+	+	-	-

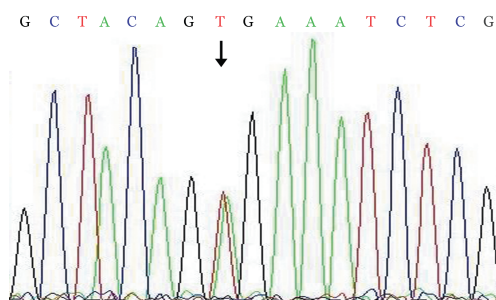


图1 毛细胞白血病患者BRAF基因直接测序结果(箭头所示为突变位点)

讨 论

HCL具有独特的临床、形态、免疫表型特征,2011年Tiacci等^[1]在HCL患者发现BRAF V600E基因突变。本研究中4例HCL患者均发生BRAF V600E基因突变,与文献报道一致^[1,4-5]。

目前HCL的诊断主要依赖细胞形态、流式细胞术免疫表型、免疫组化等重要手段,但亦有明显不足。如例2患者外周血及骨髓小淋巴细胞形态结构并不典型,不易鉴别。典型毛细胞表达成熟B细胞抗原CD19、CD20、CD22、sIgM以及表达CD11c、CD25、CD103,而CD5、CD10、CD23等早期表型一般为阴性,但淋巴增殖性疾病,如HCL-V的免疫表型与此相近,因此不易鉴别。病理免疫组化检测DBA44和Annexin A1表达及TRAP和TPA等试验虽然可以帮助明确诊断HCL,但受限于实验方法,可能出现假阴性,如本组例3 Annexin A1检测结果示阴性。因此,在诊断与鉴别诊断HCL时,BRAF V600E基因突变检测有可能作为HCL的诊断手段之一。在其他与HCL免疫表型相近的淋巴增殖性疾病中,如HCL-V缺乏BRAF V600E突变^[1,4-6],BRAF突变分析可以在分子水平上将HCL与HCL-V、IGVH4-34突变病例鉴别开来。

HCL治疗上,在20世纪80年代中期,干扰素取代脾切除术成为大部分HCL患者的主要治疗方法,总有效率在60%左右,但几乎没有患者能获得完全缓解(CR)。近年来随着嘌呤核苷酸类似物(2-氯脱

氧腺苷和喷司他汀)应用于临床,CR率最高可达90%,目前已成为治疗HCL的首选药物。但是大约40%的患者复发,出现嘌呤类似物耐药,需探索新的治疗方法。BRAF激酶特异抑制剂维罗非尼治疗BRAF V600E基因突变的初治晚期黑色素瘤,部分患者取得良好疗效^[7],为治疗HCL提供了新思路。

目前,国内外检测BRAF基因突变的方法很多,如TaqMan探针法、直接测序法、变性高效液相色谱法。TaqMan探针法准确度高、特异性强,但价格昂贵。直接测序法是检测基因突变的金标准,但其成本高,操作复杂,不适合临床常规检测。HRM操作简便、成本低并且特异性好,可用于临床BRAF V600E基因突变检测,辅助HCL的诊断和治疗。

参 考 文 献

- [1] Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364 (24): 2305-2315.
- [2] Jones G, Parry-Jones N, Wilkins B, et al. Revised guidelines for the diagnosis and management of hairy cell leukaemia and hairy cell leukaemia variant* [J]. *Br J Haematol*, 2012, 156 (2): 186-195.
- [3] Naik RR, Saven A. My treatment approach to hairy cell leukemia [J]. *Mayo Clin Proc*, 2012, 87(1):67-76.
- [4] Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, et al. The BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms [J]. *Blood*, 2012, 119(1):188-191.
- [5] Blombery P, Wong SQ, Hewitt CA, et al. Detection of BRAF mutations in patients with hairy cell leukemia and related lymphoproliferative disorders [J]. *Haematologica*, 2012, 97(5): 780-783.
- [6] Ewalt M, Nandula S, Phillips A, et al. Real-time PCR-based analysis of BRAF V600E mutation in low and intermediate grade lymphomas confirms frequent occurrence in hairy cell leukaemia [J]. *Hematol Oncol*, 2012, 30(4):190-193.
- [7] Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation [J]. *N Engl J Med*, 2011,364(26):2507-2516.

(收稿日期:2013-09-05)

(本文编辑:王叶青)

更正

本刊2014年第35卷第1期刊登的“妊娠合并血细胞减少86例临床分析”一文,72页讨论第15行中“硫酸亚铁100 g/d”应为“硫酸亚铁100 mg/d”,特此更正。

本刊编辑部