

# 骨髓增生异常综合征基因突变特征及突变负荷相关临床分析

吕晓东<sup>1</sup> 李扬威<sup>1</sup> 郭珍<sup>1</sup> 辛雅萍<sup>2</sup> 胡杰英<sup>1</sup> 范瑞华<sup>1</sup> 宋永平<sup>1</sup>

<sup>1</sup>郑州大学附属肿瘤医院 河南省肿瘤医院中心实验室, 郑州 450008; <sup>2</sup>郑州大学第二附属医院内分泌科, 郑州 450014

通信作者: 吕晓东, Email: 13523417973@163.com

**【摘要】目的** 探讨骨髓增生异常综合征(MDS)基因突变特征及突变负荷与患者一般情况、疾病亚型、染色体核型间的关系和临床价值。**方法** 采用高通量测序靶向检测以2016年1月至2019年4月于河南省肿瘤医院就诊的191例MDS患者和9例MDS继发急性髓细胞白血病(SAML)患者的65种血液肿瘤相关基因,分析异常基因特点、突变负荷,及与疾病亚型、染色体核型和患者年龄等的关系。**结果** 共有148例(77.5%)MDS患者发现突变,其中包含47种异常基因和186个突变位点。9例SAML患者均发现基因突变,突变个数显著高于MDS患者( $\chi^2=11.911, P=0.018$ )。MDS患者检出异常基因中,U2AF1(37.3%)和ASXL1(41.6%)等突变频率较高,且不同异常基因间突变负荷间差异有统计学意义( $F=91.946, P<0.001$ )。不同亚型MDS患者,基因突变个数存在差异,EB-2型基因突变个数最多[(2.2±1.5)个]。在SLD、MLD、EB-1和EB-2中,携带≥3个突变的比例逐渐增高( $\chi^2=52.471, P=0.037$ )。TP53突变与异常核型相关( $r_s=0.177, P=0.019$ ),特别与复杂核型相关( $r_s=0.440, P<0.001$ ),而NPM1突变与正常染色体核型相关( $r_s=0.173, P=0.024$ )。30岁以下患者携带突变个数最少,突变个数随着年龄增大而增加,其中60~79岁患者的突变个数最多( $P=0.017$ ),表观遗传学相关基因随年龄增长而突变频率增加( $P=0.041$ )。**结论** MDS相关基因突变特征及其突变负荷与疾病的亚型、染色体核型及患者年龄等临床因素密切相关。

**【关键词】** 骨髓增生异常综合征; 高通量测序; 基因突变; 突变负荷

**基金项目:** 河南省自然科学基金(182300410371); 河南省科技攻关项目(192102310051)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20190806-01751

## Clinical analysis of gene mutation characteristics and mutation burden in myelodysplastic syndrome

Lü Xiaodong<sup>1</sup>, Li Yangwei<sup>1</sup>, Guo Zhen<sup>1</sup>, Xin Yaping<sup>2</sup>, Hu Jieying<sup>1</sup>, Fan Ruihua<sup>1</sup>, Song Yongping<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Central Laboratory, the Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China; <sup>2</sup>Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China

Corresponding author: Lü Xiaodong, Email: 13523417973@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the relationship between gene mutation characteristics, mutation burden and general condition, disease subtype and karyotype of patients with myelodysplastic syndrome (MDS), and its clinical value. **Methods** High-throughput sequencing was used to detect 65 blood tumor-related genes in 191 MDS patients and 9 secondary acute myelocytic leukemia patients (SAML), and to analyze the characteristics of abnormal genes, mutation burden, as well as the relationship with disease subtypes, chromosome karyotypes and age. **Results** Mutations were found in 148 patients (77.5%), including 47 abnormal genes and 186 mutation sites. And gene mutations were found in 9 SAML patients, the number of mutations was significantly higher than that in MDS patients ( $\chi^2=11.911, P=0.018$ ). Among the abnormal genes, the mutation frequency of U2AF1 (37.3%) and ASXL1 (41.6%) were higher, and there were significant differences in mutation burden among different abnormal genes ( $F=91.946, P<0.001$ ). There were differences in the number of gene mutations among different subtypes of MDS, and the number of EB-2 gene mutations was the highest (2.2±1.5). In SLD, MLD, EB-1 and EB-2, the proportion of carrying ≥ 3 mutations increased gradually ( $\chi^2=52.471, P=0.037$ ). TP53 mutation was associated with abnormal karyotype ( $r_s=0.177, P=0.019$ ), especially with complex karyotype ( $r_s=0.440, P<0.001$ ), while NPM1 mutation is

associated with normal karyotype ( $r_s=0.173$ ,  $P=0.024$ ). The number of mutations carried by patients under 30 years old was the least, and the number of mutations increased with the increase of age. The number of mutations was the most in patients aged 60 to 79 years old ( $P=0.017$ ), and the mutation frequency of epigenetic related genes increased with the increase of age ( $P=0.041$ ). **Conclusions** The mutation characteristics and mutation load of MDS-related genes are closely related to clinical factors such as disease subtype, chromosome karyotype and patient age.

**【Key words】** Myelodysplastic syndrome; High-throughput sequencing; Gene mutation; Mutation burden

**Fund program:** Natural Science Foundation of Henan Province(182300410371); Key Scientific and Technological Projects in Henan Province(192102310051)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20190806-01751

骨髓增生异常综合征(MDS)是一种来源于造血干细胞的高度异质性髓系肿瘤,其发生可能涉及多类基因的异常改变,是一个多步打击的过程<sup>[1-2]</sup>。近年来,随着高通量测序技术应用的日益广泛,MDS相关的基因突变,包含根据变异等位基因频率(VAF)所提供的突变负荷等信息,在其诊断、治疗药物的选择和判断预后上发挥着越来越重要的作用<sup>[3]</sup>。本研究基于高通量测序技术,针对65种MDS相关热点基因进行靶区域测序,分析其与疾病的相关性,现报道如下。

## 对象与方法

1. 病例资料:以2016年1月至2019年4月,于河南省肿瘤医院血液科就诊的191例MDS患者和9例MDS继发急性髓细胞白血病(SAML)患者为研究对象,其中男106例,女94例,中位年龄54(10~87)岁,回顾性分析其高通量测序结果及相关临床资料。采用MDS中国诊断与治疗指南(2019年版)进行诊断和分型<sup>[4]</sup>。

2. 高通量测序靶向检测基因突变:采集患者初诊时骨髓2 ml,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,采用天根血液基因组DNA提取试剂盒提取DNA。使用PCR引物扩增目的基因热点区域(65种AML/MDS相关基因),采用Ion Torrent PGM测序平台进行测序。测序后数据利用人基因组数据库(HG19),COSMIC、1000 genomes 和 dbSNP 等数据库进行分析。平均基因覆盖率>99%,平均测序深度为1 500×,目标区域测序深度超过500×,检测灵敏度5%。

3. 染色体核型分析:骨髓细胞经过24 h培养,收集细胞制片,采用常规R显带技术进行核型分析,根据《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN2013)》进行描述。

4. 统计学分析:使用SPSS 20.0软件进行统计

分析。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料偏态分布的采用中位数表示,计数资料采用例(%)表示。不同组间分类资料的比较采用 $\chi^2$ 检验、Fisher精确检验或似然比检验,多样本定量资料的比较采用方差分析。交叉分类资料相关性分析采用列联表相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结果

1. 患者一般资料:191例MDS患者中,MDS伴单系血细胞发育异常(MDS-SLD)25例(13%),MDS伴多系血细胞发育异常(MDS-MLD)54例(28%),MDS伴环状铁粒幼细胞(MDS-RS)15例(8%),MDS伴单纯del(5q)2例(1%),MDS伴原始细胞增多(MDS-EB)85例,其中MDS-EB-1 46例(24%)和MDS-EB-2 39例(20%),MDS不能分类(MDS-U)8例(4%)。其中,176例患者诊断时具有可供分析的染色体核型结果,染色体核型正常108例(61%),异常68例(39%)。而9例SAML患者中,5例核型异常(55.6%),与MDS核型结果差异无统计学意义。依据IPSS-R染色体核型分组:极好核型4例(2%),良好核型115例(65%),中等核型39例(22%),不良核型8例(5%),极差核型10例(6%)。依据IPSS-R预后分组:极低危组19例(10%),低危组58例(33%),中危组46例(27%),高危组32例(18%)和极高危组21例(12%)。

2. 基因突变特征及突变负荷分析:采用高通量测序检测基因突变,MDS患者中148例(77.5%)患者发现突变,其中47种异常基因,包含186个突变位点。检出基因突变的患者中,62例(32.5%)患者携带1种基因突变,2种45例(23.6%),3种22例(11.5%),4种或以上19例(9.9%)。而9例SAML患者中均发现基因突变,包含16种异常基因,其

中 2 例(22.2%)患者携带 1 种基因突变, 2 种 3 例(33.3%), 4 种 2 例(22.2%), 5 种 2 例(22.2%), 携带异常基因的个数显著高于 MDS 患者( $\chi^2=11.911$ ,  $P=0.018$ )。

根据 MDS 患者检出突变基因功能分类: 主要为表观遗传相关基因(占 41.9%, 包括 ASXL1、DNMT3A、TET2、SETBP1、EZH2、IDH1/2、ATRX 和 KMT2C), 转录调节相关基因(占 40.5%, 包括 RUNX1、EP300、ETV6、GATA2、IKZF1、CALR、BCOR、PML、CEBPA、CREBBP、WT1 和 PHF6), 剪切因子相关基因(占 35.1%, 包括 U2AF1、SRSF2、SF3B1 和 ZRSR2), 信号传导相关基因(占 33.8%, 包括 CSF1R、CBL、ROBO2、NRAS、KRAS、FLT3、NOTCH1、PTPN11、CSF3R、KIT、JAK2、NOTCH2、SH2B3、CDKN2A 和 JAK1), 和细胞增殖或凋亡相关基因(占 18.9%, 包括 TP53、NPM1、TNFAIP3、TTN、BCL2 和 MPL)。

检出 MDS 患者异常基因中, 突变例数较多的基因及其突变负荷中位数分别为 U2AF1(41 例, 37.3%), 其余依次为 ASXL1(28 例, 41.6%), RUNX1(17 例, 37.2%), TP53(14 例, 36.3%), TET2(12 例, 46.4%), EP300(11 例, 12.6%), SETBP1(11 例, 38.0%), ETV6(10 例, 34.5%), NPM1(9 例, 36.1%), DNMT3A(9 例, 41.7%)等, 其各异常基因间的突变负荷差异有统计学意义( $F=91.946$ ,  $P<0.001$ ) (图 1)。而 9 例 SAML 中, 发现突变例数较多的的基因

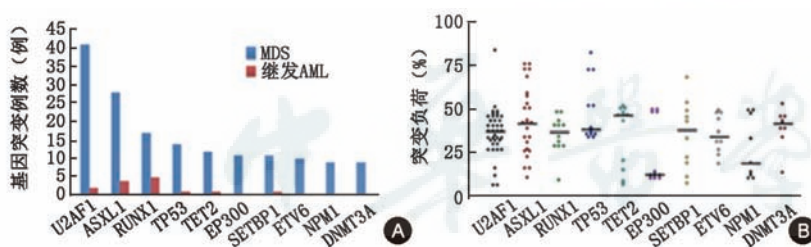


图 1 骨髓增生异常综合征患者异常基因及突变负荷

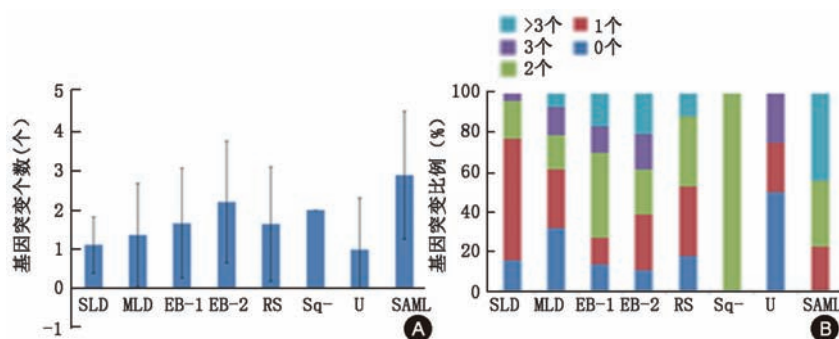


图 2 骨髓增生异常综合征患者基因突变与 MDS 类型的关系

及突变负荷分别为 RUNX1 突变(5 例, 突变比例为 55.6%; 突变负荷为 32.6%) 和 ASXL1 突变(4 例, 突变比例为 44.4%; 突变负荷为 38.1%)。

3. 基因突变个数与 MDS 亚型的关系: 不同类型 MDS 中, 基因突变个数最高为 EB-2 型, 为  $(2.2 \pm 1.5)$  个, 其余依次为 5q- 型 2 个, EB-1 型  $(1.7 \pm 1.4)$  个, RS 型  $(1.7 \pm 1.5)$  个, MLD 型  $(1.4 \pm 1.3)$  个, SLD 型  $(1.1 \pm 0.7)$  个和 U 型  $(1.0 \pm 1.3)$  个, 组间差异有统计学意义( $F=2.544$ ,  $P=0.022$ ) (图 2A)。且在 SLD、MLD、EB-1 和 EB-2 中, 携带 3 个及 3 个以上突变比例逐渐增高, 组间差异有统计学意义( $\chi^2=52.471$ ,  $P=0.037$ ) (图 2B)。根据 IPSS-R 预后分组, 极高危险组基因突变个数最多, 为  $(1.7 \pm 1.4)$  个, 但各组间差异无统计学意义。SF3B1 与 RS 亚型呈中度相关( $r_s=0.282$ ,  $P<0.001$ ), 其余异常基因与 MDS 亚型未见相关性。

4. 基因突变与染色体核型的关系: 基因突变与染色体核型结果显示, 异常核型患者基因突变比例为 76.5% (52/68), 而正常核型基因突变比例为 77.8% (84/108), 二者差异无统计学意义。各异常基因在正常核型与异常核型患者中的分布比例存在差异, TP53 与异常核型呈弱相关( $r_s=0.177$ ,  $P=0.019$ ), 与复杂核型相关性增加( $r_s=0.440$ ,  $P<0.001$ ), 而 8 例 NPM1 阳性患者均发生在正常核型患者中( $r_s=0.173$ ,  $P=0.024$ ) (图 3)。

5. 基因突变与年龄的关系: 根据患者年龄分组, 分析年龄与基因突变个数和异常基因类型的关系。结果显示, 30 岁以下患者的突变个数均值为  $(1.0 \pm 1.2)$  个, 随着年龄增加, 突变个数逐渐增加, 并与 60~79 岁患者间突变个数  $[(1.8 \pm 1.5)$  个] 差异有统计学意义 ( $P=0.017$ ), 而 80 岁以上患者突变个数  $[(1.7 \pm 1.5)$  个] 有所减少。年龄与异常基因类型方面分析, 显示 80 岁以上患者表观遗传学相关基因的检出率明显高于其他年龄分组的 MDS 患者 ( $P=0.041$ ), 其他类型异常基因未见年龄分布差异 (图 4)。

## 讨 论

MDS 是一种高度异质性的髓系肿瘤, 其发病过程可能累积多种

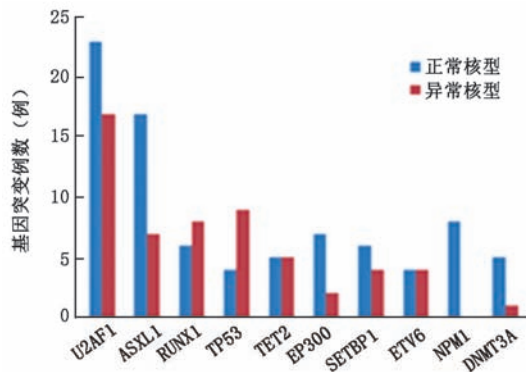


图3 骨髓增生异常综合征患者基因突变与染色体核型的关系

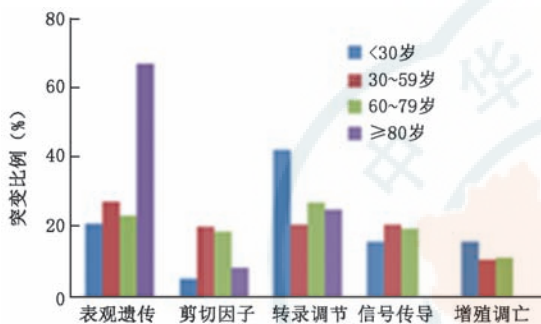


图4 基因突变与年龄的关系

异常基因。近年来,随着高通量测序在临床检测中的应用,MDS相关异常基因,如SF3B1、TET2和DNMT3A等,越来越多地被检出,并指导其临床的诊断和治疗<sup>[3]</sup>。但在检出异常基因的同时,我们发现MDS自身基因突变存在高度异质性和多样性。国内肖志坚教授团队就511例MDS患者的基因突变情况进行分析,发现U2AF1等异常基因的突变频率较高<sup>[5]</sup>。而陈苏宁教授研究团队对73例MDS患者进行分析,结果显示ASXL1等异常基因突变频率较高<sup>[6]</sup>,两项研究的高频突变基因具有一定差异性。国外相关研究也不尽相同,Hafnerlach等<sup>[2]</sup>报道944例MDS患者突变频率最高的基因为TET2,Papaemmanuil等<sup>[7]</sup>通过738例MDS患者的高通量测序检测发现SF3B1的突变频率最高。本研究通过191例MDS患者的研究发现U2AF1和ASXL1等基因的突变频率较高,与肖志坚教授报道最高突变频率基因一致,但相关高频异常基因仍存在差异。分析其原因,一方面,国内与国外的结果差异可能是由于种族不同的遗传背景或生活习惯和环境等造成的;另一方面,可能主要是由于高通量测序检测Panel的设计原因,目前高通量测序由于受其技术和成本的影响,通常采用靶基因热点区域测序,这就可能造成不同实验室所检测相关基因的热

点区域不同,从而导致基因突变检出频率不同,造成不同实验室间结果差异。因此高通量测序检测及基因检测范围的规范化、标准化需要进一步完善,使之有助于疾病更加精准的诊断、评估。

基因突变是肿瘤特异的分子标记,高通量测序技术检出基因突变的同时也提供了突变负荷等相关信息。其突变负荷分析为评估疾病的克隆多样性,以及异常基因在疾病发病过程中所起的作用具有重要的意义。本研究发现,MDS相关异常基因中,各基因的突变负荷分布具有显著差异,提示MDS发病过程的多样性,其基因突变作为分子克隆标记可能在不同个体存在于不同的克隆中,也提示突变负荷可以进一步作为分析MDS克隆多样性的指标<sup>[3]</sup>。

MDS相关异常基因主要涉及表观遗传学、转录调节、剪接因子和细胞凋亡增殖等基因<sup>[8]</sup>。本研究检出148例(77.5%)患者携带至少一个基因突变,符合既往研究报道突变频率为50%以上<sup>[9-10]</sup>。并发现不同亚型的MDS患者中,基因突变个数存在差异,基因突变个数最高的为EB-2(2.21个),且在SLD、MLD、EB-1和EB-2中,携带多个( $\geq 3$ )突变的比例逐渐增高,与以往研究结果相近<sup>[5]</sup>。而5q-和U型基因突变个数与其他亚型结果差异较大,主要考虑入组患者数较少,可能存在结果偏倚。突变个数与IPSS-R预后相关性分析,虽然极高危组突变个数最多,但差异无统计学意义,主要原因可能是预后评分系统中包含细胞遗传学、骨髓原始细胞以及血细胞计数等多个指标,可能会影响其关联性。而SAML患者中,检出异常基因突变个数显著高于MDS患者,也进一步证实MDS发病是涉及多种基因多步打击的过程<sup>[11]</sup>。

基因突变和染色体核型的相关分析,进一步证实了SF3B1与环型铁粒幼细胞与RS亚型具有相关性<sup>[10]</sup>。TP53与异常核型相关,特别是与复杂核型相关,这与Papaemmanuil等<sup>[7]</sup>和国内同类研究<sup>[5]</sup>一致。而本研究中8例NPM1突变的患者,其染色体核型均正常。而Montalban-Bravo等<sup>[12]</sup>也报道,31例携带NPM1突变的MDS患者中,24例(77%)患者染色体核型正常,上述结果均提示,NPM1与正常核型具有一定的相关性。NPM1在染色体核型正常的急性髓系白血病患者中,提示预后较好,而在MDS患者中,突变频率较低,临床价值尚未明确<sup>[13]</sup>。

基因突变与年龄的相关分析,发现30岁以下患者携带突变个数最少,随着年龄的增加,携带突

变个数逐渐增加。Jain 等<sup>[14]</sup>研究发现,随着年龄的增长,MDS的前驱疾病中,携带相关基因突变个数逐渐增加,且主要表现为表观遗传学相关基因,提示基因突变数与年龄相关,这与本研究结果相近。本研究中60~79岁患者的突变个数最多,而80岁以上患者携带的突变个数出现下降,主要考虑是由于80岁以上患者人数较少,可能造成结果偏倚。而年龄与异常基因功能方面的分析,发现表观遗传学相关基因在80岁以上年龄组比例明显增高,与以往报道相符<sup>[14]</sup>。

综上所述,高通量测序技术在MDS临床诊疗中的应用,揭示了疾病的基因突变谱,为从基因角度进一步分析MDS的发生,以及诊断分型、精准治疗和早期预后评估提供了可能,有助于为延长患者总体生存期提供新的治疗策略。但同时也应看到,高通量测序技术的规范化、标准化,以及实验室人员对于数据分析的能力和医生对于测序结果的临床解读,亟待进一步提高和完善。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参 考 文 献

- [1] 肖志坚. 骨髓增生异常综合征的精确诊断[J]. 中华血液学杂志, 2015, 36(5): 361-362. DOI: 10.3760 / cma. j. issn.0253-2727.2015.05.001.
- [2] Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes [J]. *Leukemia*, 2014, 28(2): 241-247. DOI: 10.1038 / leu.2013.336.
- [3] Walter MJ, Shen D, Shao J, et al. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes[J]. *Leukemia*, 2013,27(6):1275-1282. DOI: 10.1038/leu.2013.58.
- [4] 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. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.02.001.
- [5] 李冰,王静雅,刘晋琴,等. 靶向测序检测511例骨髓增生异常综合征患者基因突变[J]. 中华血液学杂志,2017,38(12): 1012-1016. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.12.002.
- [6] 王凯,晁红颖,吴品,等. 高通量测序联合DNA-PCR检测骨髓增生异常综合征患者51种血液肿瘤相关基因突变[J]. 中华血液学杂志,2018,39(5): 431-434. DOI: 10.3760 / cma. j. issn.0253-2727.2018.05.018.
- [7] Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes[J]. *Blood*, 2013,122(22):3616-3627. DOI: 10.1182 / blood-2013-08-518886.
- [8] Kennedy JA, Ebert BL. Clinical implications of genetic mutations in myelodysplastic syndrome[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(9):968-974. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.0806.
- [9] Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(15): 1384-1395. DOI: 10.1056 / NEJMoa1103283.
- [10] Visconte V, Makishima H, Jankowska A, et al. SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts[J]. *Leukemia*, 2012, 26(3): 542-545. DOI: 10.1038/leu.2011.232.
- [11] Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(1): 5-19. DOI: 10.1038/nrc.2016.112.
- [12] Montalban-Bravo G, Kanagal-Shamanna R, Sasaki K, et al. NPM1 mutations define a specific subgroup of MDS and MDS/MPN patients with favorable outcomes with intensive chemotherapy[J]. *Blood Adv*, 2019, 3(6): 922-933. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018026989.
- [13] 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. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- [14] Jain M, Tripathi A. ICUS/CCUS/CHIP: basics & beyond[J]. *Expert Rev Hematol*, 2017,10(10): 915-920. DOI: 10.1080 / 17474086.2017.1371588.

(收稿日期:2019-08-06)

(本文编辑:周阳)

·读者·作者·编者·

## 本刊对论文中实验动物描述的要求

根据国家科学技术部1988年颁布的《实验动物管理条例》和卫生部1998年颁布的《医学实验动物管理实施细则》,本刊对论文中有关实验动物的描述,要求写清楚以下事项:(1)品种、品系及亚系的确切名称;(2)遗传背景或其来源;(3)微生物检测状况;(4)性别、年龄、体重;(5)质量等级及合格证书编号;(6)饲养环境和实验环境;(7)健康状

况;(8)对动物实验的处理方式。

医学实验动物分为四级:一级为普通级;二级为清洁级;三级为无特定病原体(SPF)级;四级为无菌级(包括悉生动物)。卫生部级课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。