

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.04.043

分子生物学在血液病诊断和治疗中的应用及研究进展*

史美玉¹ 唐诗哲¹ 徐挺亮¹ 周凯燕¹ 周洪波^{1,2Δ}

(1 中南大学资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083)

(2 中南大学生物冶金教育部重点实验室 湖南 长沙 410083)

摘要: 分子生物学自问世以来在各个领域都有着非常广泛的应用。随着分子生物学手段的不断发展,其在医学诊断和疾病治疗等领域的作用也获得医护人员的认可。分子生物学方法在血液病诊断和治疗方面的应用也尤为突出。本文综述了 PCR, 荧光原位杂交技术、基因芯片和二代测序等分子生物学手段在血液病中的应用, 为血液病的诊断、治疗监测以及用药指导等方面的研究提供参考。

关键词: PCR; 荧光原位杂交技术; 基因芯片; 二代测序; 白血病; 淋巴瘤

中图分类号: Q75; R-33; R55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)04-797-04

Research Progress on the Application of Molecular Biology in Hematological Diseases*

SHI Mei-yu¹, TANG Shi-zhe¹, XU Ting-liang¹, ZHOU Kai-yan¹, ZHOU Hong-bo^{1,2Δ}

(1 School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan, 410083, China;

2 Key Laboratory of Biometallurgy, Ministry of Education, Central South University, Changsha, Hunan, 410083, China)

ABSTRACT: Molecular biology has been widely used in many fields. With the continuous development of molecular biology, its role in medical diagnosis and disease treatment has been recognized by medical staff. The application of molecular biological methods in the diagnosis and treatment of hematological diseases is particularly prominent. The application of molecular biological methods such as PCR, fluorescence in situ hybridization, gene microarray and second-generation sequencing in hematological diseases were reviewed in this paper.

Key words: PCR; FISH; SNP-Array; NGS; Leukemia; Lymphoma

Chinese Library Classification(CLC): Q75; R-33; R55 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)04-797-04

前言

分子生物学(molecular biology)是一门生命学科,主要从分子水平研究生命现象、生命本质、生命活动及其规律等等。分子生物学技术诞生于 20 世纪 80 年代中期,主要研究核算、蛋白质等生物大分子。随着精准医学的发展,这种技术已成为血液病诊断非常重要的一环,主要检测患者 DNA 或 RNA 水平的变异,进一步补充和深化其他技术平台如流式细胞术、细胞形态学和细胞遗传学等检测。分子生物学技术可辅助血液病的诊断分型、判断预后、治疗监测、用药指导、微小残留病(MRD)的监测等等。本文主要介绍,如 PCR(Polymerase Chain Reaction)、二代测序(Next-generation sequencing, NGS)、荧光原位杂交技术(Fluorescence in situ hybridization, FISH)和基因芯片(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)等技术的原理及在血液病中的应用。

1 RQ-PCR 在血液病中的应用

PCR 是一种简便、快速的扩增技术。近几年随着精准医学的不断发展,PCR 技术在血液病的诊断及复发监控等方面发挥着重要的作用。

根据研究目的和方法的不同,PCR 技术可以分为,实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)、多重 PCR(multiplex PCR)、不对称 PCR(asymmetric PCR)、巢式 PCR(nested PCR)和原位 PCR(In situ PCR)等^[1]。下面主要介绍两种 PCR 技术在血液病中的应用。

多重 PCR 是在同一个 PCR 体系中加入两对或两对以上引物分别扩增不同模板,从而获得多个核酸片段。这种方法能够在一定程度上提高基因检测效率,并缩短检测时间^[1]。该技术能够有效帮助诊断白血病患者的异常基因情况,进行定期监控,从而判断患者预后情况。王振华等^[2]对 16 例初发急性白血

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31870115);湖南省自然科学基金省市联合基金资助项目(15JJ5006);

中南大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2015zzts268)

作者简介:史美玉(1992-),女,硕士研究生,主要研究方向:分子生物学,E-mail: 937037598@qq.com

Δ 通讯作者:周洪波(1969-),男,教授,博士生导师,主要研究方向:分子生物学和微生物发酵,E-mail: zhoubh@csu.edu.cn

(收稿日期:2019-05-23 接受日期:2019-06-18)

病患者应用多重逆转录 PCR (multiplex reverse transcription PCR, M-RT-PCR)方法检测 MLL 基因异常情况并进行统计。16 例患者中 13 例 AML (1 例 M1, 2 例 M2, 5 例 M4, 4 例 M5, 1 例 M6), 3 例 ALL。检测结果显示 AML 患者中有 5 例检出 MLL-AF4, 3 例 MLL-AF9, 2 例 MLL-AF6, 2 例 MLL-MLL, 1 例 MLL-ELL 和 1 例 MLL-SEPT6。而 3 例 ALL 患者中检测 MLL-AF4。对这 16 例出现 MLL 融合基因的患者进行一定的治疗和随访, 其中一部分患者进行了造血干细胞移植, 发现这些患者的 3 年总生存率仅约 40%, 无进展生存率 (PFS) 约 30%。MLL 基因位于 11 号染色体, 在儿童中的突变率要高于成人, 尤其是婴幼儿急性白血病^[3]。伴有 MLL 基因的急性白血病患者预后差, 复发风险高。无论是成人还是儿童, 都应高度重视该基因的融合情况, 以及有针对性制定治疗方案^[3,4]。虽然 RT-PCR 技术能够检测 MLL 基因的异常情况, 但是 MLL 基因有近 100 种, 有些属于罕见类型, 所以会出现一定程度的漏检^[5]。此时需要结合其他技术如荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术进行综合诊断。

RT-qPCR 是一种在 PCR 的基础上, 加入荧光基团, 通过检测荧光信号的顺序及强弱, 与标准模板进行对照后, 对未知模板进行定量的技术^[6]。这种方法操作简便, 省时, 灵敏度高。该技术已很成熟, 主要应用于患者的融合基因的筛查、MRD 的监测以及患者预后判断等方面。吴薇等^[6]采用 RQ-PCR 的方法对 60 例 CML 进行 BCR-ABL 融合基因的检测。其中 33 例患者为慢性期, 13 例为加速期, 14 例为急变期。在治疗前后分别每隔 3 个月进行一次检测并随访。结果发现慢性期和加速期的 CML 患者, BCR-ABL 转录本水平明显低于急变期。且经过异基因造血干细胞移植或者服用伊马替尼 6 个月后, 患者的 BCR-ABL 转录本水平也明显低于治疗前。通过检测 BCR-ABL 融合基因能够在疾病的监控, 微小残留的检测中发挥重要作用。BCR-ABL 融合基因是由 t(9;22) 形成的。其中 22 号染色体上有 3 个断裂点, 9 号染色体上有 2 个断裂点, 这些断裂点融合后, 形成三种蛋白, 分别为 p190, p210 和 p230^[7-9]。95% 的慢性粒细胞白血病 (CML) 患者常有 BCR-ABL p210 形成, 除可通过 RT-qPCR 技术检测外, 还可通过染色体核型分析判断是否有费城染色体。但是因染色体核型分析的分辨率低, 常有阴性的可能。所以需要结合 RT-qPCR 技术进行分型和定量。15~30% 的成人急性淋巴细胞白血病 (ALL) 及 3~5% 的儿童 ALL 患者常出现 BCR-ABL p190, 在 p210 阳性的 CML 患者中也偶有出现 p190。依据 NCCN 临床实践指南: 慢性髓性白血病 (2019. V1)^[10] 和成人慢性粒细胞白血病诊疗规范 (2018 年版), BCR-ABL 阳性的患者可服用伊马替尼, CML 患者 10 年生存率可达 85%~90%。

2 FISH 在血液病中的应用

FISH 是一种利用快速、简便、分辨率高、特异性高与敏感性高的技术, 它是利用碱基互补配对原则, 已知探针与目的 DNA 进行杂交, 通过荧光显微镜观察信号模式的原理判断基因是否发生重排、易位、缺失等染色体变异。染色体核型分析分辨率较低, 有些隐匿的变异可能无法检测出来, 此时可以通过 FISH 技术检测^[11]。

近年来, FISH 技术在血液病中的应用也越来越广, 是 MICM 分型诊断不可或缺的一个环节。尤其是白血病融合基因的检测、三打击淋巴瘤的判断、骨髓增生异常综合征 (MDS)、多发性骨髓瘤 (MM) 和慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 等疾病的预后分层和用药指导。张建清等^[12]在研究 p53 基因在白血病患者中的异常情况时, 应用 FISH 技术检测 50 例复杂核型异常白血病患者和 25 例非复杂核型异常的白血病患者 p53 基因。结果显示 14 例伴有 17 号染色体核型异常的患者, 3 例 -17, 3 例 17p, 1 例 17q 和 2 例 17 号染色体的不平衡易位。而 12 例患者检出 p53 的缺失。p53 基因的缺失主要与患者复杂核型异常有关。p53 基因在 50 例复杂核型异常的患者中突变频率为 48.0%, 在 25 例非复杂核型异常的患者中突变频率为 4.0%。p53 基因可见于多种血液疾病, 如慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、性粒细胞白血病 (CML) 以及急性淋巴细胞白血病 (ALL) 和多发性骨髓瘤 (MM) 等^[13], 在 ALL 中, 以 -17 更为多见。17p13.1 缺失是血液病预后较差的核型之一, 17 号染色体整个短臂, 影响到该区域 p53 基因的分子监视功能, 该功能的缺陷可能使有 DNA 分子异常的细胞逃过监视而存活, 逐渐累积异常的基因, 最终可导致肿瘤的发生^[14]。

约 80% 的慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 患者有克隆性遗传学异常, 细胞遗传学可帮助 CLL 患者的鉴别诊断、分型、治疗方案选择和疗效评估等^[15]。NCCN 指南明确提出 CLL 患者都应行细胞周期蛋白 D1 (CCND1) 的免疫组化检测或 t(11;14) 的 FISH 检测^[16]。IgH/CCND1 也常见于套细胞淋巴瘤 (MCL), 该融合基因对于 MCL 的诊断具有重要意义^[17]。

IgH 基因位于 14q32, 基因重排可见于粒系、淋系、混合系白血病。常见于 CLL 和 MM 等血液疾病中。Irons 等^[18]应用 FISH 技术检测出 80% 的 CLL 患者出现克隆性遗传学异常, 尤其是 IgH 基因重排。14 号染色体和其他染色体发生平衡易位时则会形成不同的融合基因, 这些融合基因可常见于不同淋巴系统肿瘤中^[19]。不同类型的 14q32 异常则相对独立地代表某种类型的淋巴系统恶性肿瘤, 常见的如 t(8;14) 可见于 70% 的 Burkitt 淋巴瘤; t(14;18) 多见于 70%~90% 的滤泡性淋巴瘤^[11,20-22]; t(3;14) 可见于大细胞淋巴瘤白血病; t(9;14) 可见于浆细胞白血病^[23]。而 14q+, t(14;16), t(6;14), t(14;20) 常见于 MM 等。

3 基因芯片在血液病中的应用

基因芯片技术也叫基因微阵列, 其原理是基于单核苷酸多态性的微阵列分析 (SNP-Array) 直接从 DNA 水平开始实验, 是一个能够弥补染色体核型分析、FISH、一代测序和二代测序不足的技术, 能够检测出高频突变的基因^[24]。基因芯片技术具有高效、快速、多参数等优点^[25]。相较于传统染色体核型分析技术, 无需细胞培养, 可以检测全部基因组的拷贝数异常情况, 同时可以检测基因的扩增、丢失、杂合性丢失 (LOH) 以及单亲二倍体 (UPD)^[26]。

基因芯片技术因其独特的优势, 在 MDS、CLL 和 MM 中有着非常广泛的应用。MDS 患者中常出现 +8, 20q-, -7/7q-, -5/5q-, -Y 等染色体变异^[27,28]。通过传统的染色体核型分析, 由于其分辨率较低, 所以检出率可能较低。FISH 技术是指南中推荐的检测染色体异常的方法, 能够弥补染色体核型分析的不足,

但是 FISH 不能够覆盖全部区域,无法全基因组范围观察染色体的变化。徐岚等^[29]在研究 MDS 患者的染色体情况时,应用基因芯片技术能够准确定位染色体异常的位置,建立了 MDS 分子标志基因突变谱,弥补了传统核型分析因为自身技术缺陷造成的无法准确定位的不足。罗锦霞等^[30]通过多种分子技术结合综合分析 1 例 MDS 患者,基因芯片检测到多条染色体的多个区域存在大片段的缺失,为患者遗传咨询提供帮助。该患者同时做了染色体核型分析,但仅监测到 5 号染色体和 11 号染色体的长臂部分缺失,而且无法确定具体缺失位置。

基因芯片技术虽然分辨率高,能够检测到染色体核型分无法确定的具体变异情况,并且和 FISH 结果一致。但是也有其局限性,即无法检测平衡易位。所以对于伴有融合基因的急性白血病,无法检测出融合基因的形成。此时需要运用 PCR 的方法判断融合基因是否存在。

4 二代测序在血液病中的应用

2008 年 Ley 等^[31]应用二代测序技术检测第 1 例正常核型急性髓系白血病 (AML),发现 FLT3-ITD 突变是正常核型 AML 预后不良标志之一。随后在 2013, *New England Journal of Medicine* 上发表了一项关于 200 例 AML 中基因突变的研究,发现了 FLT3、DNMT3A 和 NPM1 等基因的突变可应用于临床^[32]。

二代测序技术具有通量高、敏感性高,可相对定量等优点,能够分析几十万到几百万的 DNA 片段^[33]。二代测序相比于一代测序其灵敏性更高,可以检测到 0.1% 的突变,同时针对突变的结果进行分析,更好地应用于临床^[34]。程焕臣等^[35]对 68 例 AML 和 57 例 MDS 患者,应用二代测序技术检测这两种疾病基因突变情况,对患者 MRD 监测及疾病进展预测的可行性分析。结果显示 TET2 在 AML 和 MDS 中的突变率分别为 55.9% 和 56.1%。CEBPA、DNMT3A、C-KIT 和 FLT3 基因在 AML 中的突变频率在 TET2 之后,MDS 患者中出现了 U2AF1 基因和 SRSF2,突变率为 10.5%。这些基因中 CEBPA 这个基因可以作为 AML 患者 MRD 的监测及预后指标。CEBPA 在 AML 患者中是预后良好的标志之一^[36,37]。

NPM1 是一种磷蛋白质,46~62% 的正常核型或 10~15% 核型异常的 AML 中可能出现 NPM1 基因突变,NPM1 基因是 AML 预后良好的基因之一,其突变一般对化疗药物较敏感,有更好地无复发生存率和总生存期^[38]。但是 NPM1 基因对 AML 患者的预后需结合 FLT3-ITD 的突变情况^[39]。25% 的 AML 患者或伴有 t(15;17)、t(6;9) 和正常核型的 AML 患者可能出现 FLT3-ITD 基因突变,但是在伴有 t(8;21)、inv(16) 和 11q23 异常的患者中少见。在 20% 的超二倍体 ALL 患者也可检出 FLT3-ITD^[40]。另一种 FLT3 基因突变则为 FLT3-TKD,常见于正常核型的 AML 患者中,在 AML 中的发生率为 5~7%^[41]。大约 3.4% 的 MDS 患者及 2.8% 的 ALL 患者也可发现 FLT3 基因的点突变。FLT3 基因突变总阳性率超过 30%,使其成为 AML 中最普遍发生突变的靶基因;FLT3 基因突变患者一般预后较差^[42]。胡偏等^[43]通过二代测序技术对 234 例原发 AML 患者和 32 例 MDS 患者的基因突变情况进行检测。发现基因突变情况能够有效帮助诊断 MDS、MDS/AML 以及原发 AML 的疾病转归情况,同时可以鉴别 MDS/AML 和原发 AML^[44]。

越来越多的研究学者将目光放到了二代测序技术在血液病诊断及预后判断的研究上,尤其是涉及肿瘤生长、RAS 途径、RNA 剪切、转录等过程相关的基因突变。如 ASXL1 基因,位于 20q11,在血液细胞等多组织中均有广泛表达^[45,46]。已经有研究证明 ASXL1 基因突变与髓系肿瘤预后密切相关^[47]。滕广帅等^[48]探讨具有 ASXL1 基因突变的髓系肿瘤患者的共基因突变谱及预后临床意义,应用二代测序技术在 1355 例髓系肿瘤患者中进行 ASXL1 基因筛查,发现髓系肿瘤患者在 ASXL1 基因突变时会发生多种基因共同突变的现象,同时预后较差^[49]。

虽然二代测序技术在数据通量上是由于一代测序的,但是在血液肿瘤中的诊断,一代测序仍然是金标准。而且当二代测序技术出现点突变或者插入/缺失突变时,需要一代测序进行验证。所以一代测序仍是不可替代的技术。另外二代测序因为敏感性差,成本高等缺点,在一定程度上也会限制该技术在血液病诊断中的应用。所以需要结合其他技术进行综合诊断^[50]。

5 小结与展望

随着精准医学的不断发展,血液病的诊断已经不能单纯地依靠细胞形态学,而是需要结合流式细胞术、染色体核型分析、分子生物学等技术进行综合诊断。分子生物学技术的发展突飞猛进,从 PCR、RT-qPCR、ARMS-PCR、ddPCR 的简单片段扩增技术,到片段分析、MLPA 的大片段缺失和扩增,再到 Sanger 测序、NGS 测序的点/插入/缺失突变,以及染色体微阵列的基因芯片技术。新型分子生物学技术在血液病中的应用也越来越广泛,如文中所提到的融合基因和基因突变的检测等,这些技术在血液病的诊断、预后、用药指导及复发监测中发挥着重要作用。在未来的发展中,新型分子生物学也将随着技术的不断更新换代,如以 CRISPR/Cas9 系统为代表的基因编辑技术,已经用于多种血液病的治疗研究,虽然离临床还有很长的路要走,但是简便性、特异性和经济性的特点使其拥有巨大的应用潜力。随着这些新技术的出现,会有更多、更可靠的分子生物学方法应用于血液病的诊断和治疗。新技术的应用也面临着一些挑战,如功能未知的基因位点,该如何判断患者情况。因此,我们需要大量的科研和临床数据配合分子生物学手段,多尺度全方位的解析检测结果,才能使疾病的诊断和治疗监测更加精确合理。期待未来先进的分子生物学和大数据手段能在更多的疾病诊疗中得到应用,为人类健康事业做出贡献。

参考文献(References)

- [1] 肖恒,李守霞. 白血病融合基因及检测方法研究进展 [J]. 医学综述, 2015, 21(22): 4130-4133
- [2] 王振华,戴莉,王莉红,等. 伴 MLL 基因异常白血病的检测及其临床意义 [J]. 实用医学杂志, 2018, 34(15): 2533-2536
- [3] Caroline D, Ralph T, Jurg S. Targeting multiple nodes of MLL complexes to improve leukemia therapy [J]. *ONcotarget*, 2017, 8(53): 90614-90615
- [4] PIETERS R, SCHRAPPE M, DE LORENZO P, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial [J]. *The Lancet*, 2007, 370(9583): 240-250
- [5] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [Z]. Version, 2016

- [6] 吴薇, 韩瑞玲, 张力, 等. RQ-PCR 在慢性粒细胞白血病细胞 BCT-ABL 融合基因检测中的应用 [J]. 检验医学与临床, 2016, 13 (22): 3133-3137
- [7] An X, Twari Ak, Sun Y, et al. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review[J]. Leuk Res, 2010, 34(10): 1255-1268
- [8] Ma A. Chronic Myeloid Leukemia in the Era of Tyrosine Kinase Inhibitors: An Evolving Paradigm of Molecularly Targeted Therapy[J]. Mpl Diagn Ther, 2016: 1-19
- [9] Deininger M, Goldman J M, Melo J V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia[J]. Blood, 2000, 96(10): 3343-3356
- [10] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Chronic Myeloid Leukemia[Z]. Version, 2019
- [11] Pan Y, Meng B, Sun B, et al. Frequencies of BCL2 and BCL6 translocations in representative Chinese follicular lymphoma patients: morphologic, immunohistochemical, and FISH analyse[J]. Diagn Mol Pathol, 2012, 21(4): 234-240
- [12] 张建清, 王志林. p53 基因异常在白血病患者中的研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(21): 1603-1605
- [13] Bowen D, Groves MJ, Bumett AK, et al. TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype and is associated with very poor prognosis[J]. Leukemia, 2009, 23(1): 203-206
- [14] Schoch C, Kein W, Kohimann A, et al. Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2005, 43(3): 227-238
- [15] 李丹. FISH 检测 56 例慢性淋巴细胞白血病染色体异常的临床分析[D]. 新疆:新疆医科大学, 2014
- [16] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Chronic Lymphocytic Leukemia/ Small Lymphocytic Lymphoma[Z]. Version, 2019
- [17] Chu H, Han X, Jiang H, et al. Nuclei micro-array FISH, a desirable alternative for MCL diagnosis [J]. Ann Hematol, 2011, 90 (11): 1299-1305
- [18] Irons RD, Le A, Bao L, et al. Characterization of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma(CLL/SLL) in Shanghai, China: molecular and cytogenetic characteristics, IgV gene restriction and hypermutation patterns[J]. Leuk Res, 2009, 33(12): 1599-1603
- [19] 王丽丽, 陈云昭, 李锋. FISH 技术在恶性淋巴瘤诊断中的应用[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(4): 820-821
- [20] Zhang HW, Cheng NL, Chen ZW, et al. Clinical Impact of t(14;18) in Diffuse Large B-cell Lymphoma [J]. Chin J Cancer Res, 2011, 23(2): 160-164
- [21] Zeng LP, Wen YL, Ma Y, et al. Mechanism and clinical significance of anti-apoptotic gene bcl-2 expression in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2011, 40(6): 377-381
- [22] Horn H, Schmelter C, Leich E, et al. Follicular lymphoma grade 3B is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles[J]. Haematologica, 2011, 96(9): 1327-1334
- [23] 王艳芳, 王化, 邵连永, 等. 利用 FISH 技术检测多发性骨髓瘤不同类型标本分子遗传学异常 [J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(5): 1352-1356
- [24] Gauthier Vassort A, Thauvin Robinet C, Bruel AL, et al. Application of whole-exome sequencing to unravel the molecular basis of undiagnosed syndromic congenital neutropenia with intellectual disability [J]. Am J Med Genet A, 2017, 173(1): 62-71
- [25] Haeflrich T, Kohlmann A, Bacher U, et al. Gene expression profiling for the diagnosis of acute leukemia [J]. Br J Cancer, 2007, 96 (4): 535-540
- [26] Dudda sabnm anya R, Lucchese G, Kandue D, et al. Clinical applications of DNA microarray analysis [J]. J Exp Ther onco, 2003, 3: 293-304
- [27] Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients [J]. Blood, 2007, 110: 4385-4395
- [28] Chen B, Zhao WL, Jin J, et al. Clinical and cytogenetic features of 508 Chinese patients with myelodysplastic syndrome and comparison with those in Western countries[J]. Leukemia, 2005, 19(5): 767-775
- [29] 徐岚. 骨髓增生异常综合征全基因组测序和基因突变谱预后分析 [D]. 上海:上海交通大学, 2014
- [30] 罗锦霞, 艾晨, 黄羽珊, 等. 基因组检测综合分析在骨髓增生异常综合征诊治中的应用 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21 (6): 1501-1506
- [31] Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukemia genome [J]. Nature, 2008, 456 (7218): 66-72
- [32] Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2013, 368(22): 2059-2074
- [33] 马亮, 姜永玮, 王少婷, 等. 高通量测序在 FLT3-ITD 阳性急性髓细胞白血病患者中的应用 [J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(02): 381-387
- [34] 赵芳. 二代测序在急性髓系白血病中的应用价值 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(75): 141-144
- [35] 程焕臣, 刘生伟, 刘宇, 等. 二代测序在 AML/MDS 诊治中的应用研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(6): 1631-1635
- [36] Gou H, Zhou J, Ye Y, et al. The prevalence and clinical profiles of FLT3-ITD, FLT3-TKD, NPM1, C-KIT, DNMT3A, and CEBPA mutations in a cohort of patients with de novo acute myeloid leukemia from southwest China[J]. Tumor Biol, 2016, 37(6): 7357-7370
- [37] Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E, et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts[J]. Blood, 2015, 126(2): 233-241
- [38] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia [J]. N Engl J Med, 2016, 374(23): 2209-2221
- [39] Haslam K, Catherwood MA, Dobbin E, et al. Inter-laboratory Evaluation of a Next-Generation Sequencing Panel for Acute Myeloid Leukemia[J]. Mol Diagn Ther, 2016, 20(5): 457-461
- [40] Duncavage EJ, Tandon B. The utility of next-generation sequencing in diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes[J]. Int J Lab Hematol, 2015, 37(Suppl 1): 115-121
- [41] Smith CC, Wang Q, Chin CS, et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukemia[J]. Nature, 2012, 485(7397): 260-263

- 2018, 14(13): 1813-1821
- [15] Athira KP, Vanathy K, Kulkarni R, et al. The prevalence of occult hepatitis B infection among the blood donors in a tertiary care hospital, Puducherry[J]. Indian J Med Microbiol, 2018, 36(3): 426-428
- [16] Costa JEF, Morais VMS, Gonçalves JP, et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with leprosy [J]. J Med Virol, 2019, 91 (5): 775-780
- [17] Zhang BF, Cheng ML, Lu S, et al. Effects of tenofovir and telbivudine on HBV RNA in pregnant women with different genotypes of HBeAg-positive hepatitis B in Guizhou Province [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2018, 98(43): 3503-3508
- [18] Zheng CL, Fu YM, Xu ZX, et al. Hepatitis B virus core protein dimer interface is critical for viral replication[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(1): 262-270
- [19] Wang L, Fan YX, Dou XG. Declining diagnostic accuracy of non-invasive fibrosis tests is associated with elevated alanine aminotransferase in chronic hepatitis B [J]. World J Clin Cases, 2018, 6(12): 521-530
- [20] 林孟新, 苏智军, 郭如意. 乙型肝炎患者血清免疫球蛋白和补体 C3/C4 检测的意义[J]. 实用肝脏病杂志, 2015, 18(2): 182-183
- [21] 杨律, 范明亮, 许沉龙. 血清中免疫球蛋白检验在乙型肝炎诊治中的意义[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(20): 5110-5111+5120
- [22] 苏秋霞. 他克莫司软膏联合胸腺肽治疗慢性乙型肝炎合并口腔扁平苔藓的疗效及对患者免疫功能的影响 [J]. 内科, 2018, 13(04): 599-602
- [23] 李军莉. 乙型肝炎患者免疫球蛋白检测的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(22): 3255-3256
- [24] 赵秀娟, 金大鹏, 张小云, 等. 慢性乙型肝炎和肝硬化患者血清 TLR4、TGF- β 1 和 IL-17 水平及其临床意义 [J]. 实用肝脏病杂志, 2018, 21(4): 581-584
- [25] 李萍, 王丽, 胡蓉, 等. 血清纤维化标志物和肝功能指标在慢性乙型肝炎患者肝纤维化诊断中的价值 [J]. 疑难病杂志, 2017, 16(6): 575-578
- [26] 王晓慧. 慢性乙型肝炎、乙肝后肝硬化中医病理特征及其与肝纤维化指标的关系研究[D]. 福建中医药大学, 2017
- [27] 陈秀清. 扶正化瘀胶囊联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(10): 1129-1133
- [28] 王庆强, 钱晶晶, 左凌云, 等. 恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎对机体炎症反应、肝功能及肝纤维化的影响 [J]. 海南医学院学报, 2018, 24(14): 1315-1318
- [29] 李琰. 慢性乙型肝炎后肝硬化患者中医证候与血清 TGF- β 1、HA、LN、IV-C、PC-III 水平相关性研究 [J]. 中医学报, 2017, 32(9): 1749-1752
- [30] 魏雁虹, 宋帅, 耿辉, 等. 慢性乙型肝炎患者血清 α 1 微球蛋白检测的临床意义[J]. 吉林大学学报(医学版), 2017, 43(1): 96-100
- [31] 耿辉. 慢性乙型肝炎患者血清中 α 1 微球蛋白检测的临床意义[D]. 吉林大学, 2017

(上接第 800 页)

- [42] Small D. Targeting FLT3 for the treatment of Leukemia [J]. Semin Hematol, 2008, 45(3 Suppl 2): S17-S21
- [43] 胡偏, 毛敏, 王燕, 等. MDS、MDS/AML 及 AML 基因突变的频谱分析[J]. 广州医药, 2018, 49(4): 1-6
- [44] Eisfeld A, Mrozek K, Kohlschmidt J, et al. The mutational oncoprint of recurrent cytogenetic abnormalities in adult patients with de novo acute myeloid leukemia[J]. Leukemia, 2017, 31(10): 2211-2218
- [45] Gelsi Boyer V, Breckeville M, Devillier R, et al. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid disease[J]. J Hematol Oncol, 2012, 5: 12
- [46] Fisher CL, Pineault N, Brookes C, et al. Loss-of function additional sex combs like 1 mutations disrupt hematopoiesis, but do not cause severe myelodysplasia or leukemia[J]. Blood, 2010, 115(1): 38-46
- [47] Patnail MM, Itzykson R, Lasho TL, et al. ASXL1 and SETBP1 mutation and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients [J]. Leukemia, 2014, 28(11): 2206-2212
- [48] 滕广帅, 王颖昭, 徐晶, 等. ASXL1 突变的髓系肿瘤患者共突变基因突变谱及其临床意义[J]. 天津医药, 2018, 46(12): 1295-1299
- [49] Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower risk myelodysplastic syndromes [J]. Journal of Clinical Oncology, 2012, 30(27): 3376-3382
- [50] Haslam K, Catherwood M A, Dobbin E, et al. Inter-Laboratory Evaluation of a Next-Generation Sequencing Panel for Acute Myeloid Leukemia[J]. Mol Diagn Ther, 2016, 20(5): 457-461