

早幼粒细胞白血病分子遗传学诊疗技术在临床中的应用 *

宋 鹏¹ 张 鑫¹ 赵海岳² 佟 菲¹ 周 晋^{1△}

(1 哈尔滨医科大学第一临床医学院血液内科, 黑龙江省血液肿瘤研究所, 卫生部细胞移植重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150001 ;

2 哈尔滨派斯菲科生物公司 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的 综合多种急性早幼粒细胞白血病 (APL) 分子遗传学检测方法, 比较染色体核型分析(CC)检测方法在临床诊疗中的应用优势。方法 采用急性早幼粒细胞白血病(APL)临床诊断中常用的分子生物学 (反转录巢式聚合酶链反应 --RT-nest-PCR)、细胞形态学和荧光原位杂交 (FISH) 方法分别对 83 例来本院初、复诊的 APL 患者的骨髓标本进行分析, 将结果分别与染色体核型分析(CC)的结果进行比较。结果 83 例 APL 患者中染色体诊断出现典型的 t(15;17)异位为 79 例, 占总人数的 95.2% 2 例出现复杂染色体变化即 t(15;17)+7 和 t(15;17)+9, 占总人数的 2.4 % ; 1 例出现 t(11;17)异位, 占总人数的 1.2 % ; 1 例为正常。PCR 对融合基因检测阳性率为 92.8 % 细胞形态学检测结果阳性率为 92.8% 荧光原位杂交阳性率为 97.6 %。结论 染色体核型分析是对 APL 疾病诊断的可靠法, 特别是在对一些复杂核型的判断上相对于 PCR 和细胞形态学以及 FISH 的检测方法上均有很大优势, 是其他诊断方法无法取代的。

关键词 染色体 核型分析 急性早幼粒细胞白血病

中图分类号 R733.71 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 24-4638-04

Promyelocytic Leukemia Molecular Genetic Diagnosis Technology in Clinical Application*

SONG Peng¹, ZHANG Xin¹, ZHAO Hai-yue², TONG Fei¹, ZHOU Jin^{1△}

(1 Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Institute of Hematology & Oncology of Heilongjiang Province, Cell Transplantation Emphasis Laboratory of Ministry of Public Health, Harbin 150001, China;

2 Pacific Biopharmaceutical Company of Harbin, Harbin, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To integrate a variety of acute promyelocytic leukemia (APL) molecular genetic detection method, comparison of karyotype analysis (CC) detection method in clinical diagnosis application advantages. **Methods:** We tested chromosomal abnormalities in bone marrow samples from 83 patients with de novo and relapsed APL, by using RT-nest-PCR, fluorescence in situ hybridization and morphological staining on the basis of CC. **Results:** Chromosomal 15 and 17 translocation [t(15;17)] was identified in 79 patients (95.2 %). Two patients showed complex abnormalities with t(15;17)+7 and t(15;17)+9 patients (2.4%). One sample was t(11;17) patients (1.2 %), and the other one was with normal karyotype. PCR on detection of fusion gene positive rate was (92.8%); the results showed that the positive rate of the cell morphology test was 92.8%; Fluorescence in situ hybridization positive rate (97.6 %). **Conclusion:** Compared to PCR, fluorescence in situ hybridization and morphology, chromosomal analysis is an ideal technique in diagnosis of APL, especially for patients with complex karyotype, that could not be replaced by other diagnostic methods.

Key words: Chromosome; Karyotype analysis; Acute promyelocytic leukemia

Chinese Library Classification (CLC) : R733.71 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)24-4638-04

前言

急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 是一种特殊类型的急性髓细胞性白血病, 90 %以上 APL 患者具有特征性的分子遗传学改变 -- 染色体易位 t(15;17) (15q22 ; 17q21)。易位使 17 号染色体上的 RAR α 基因与 15 号染色体上的 PML 基因融合, 产生融合基因 PML-RAR α 。融合基因 PML-RAR α 的表达使粒细胞的终末分化停滞在早幼粒细胞阶段, 最终导致 APL 的发生。分化治疗药物全反式维甲酸 ATRA 和 ATO 通过靶向作用于染色体易位 t (15;17) (15q22 ;

17q21) 产生的 PML-RAR α 融合的基因蛋白上, 发挥治疗 APL 的作用^[1]。正是这两种分化治疗药物的发现, 使具有 t (15;17) (15q22 ; 17q21) 异位的 APL 成为白血病中预后最好的, 核型分析对 APL 型白血病的诊断分型、预后评估、个体化治疗策略的实行都具有重要参考价值^[2-5]。本文通过结合 PCR 对融合基因 (PML-RAR α)、细胞形态学和和荧光原位杂交的检测对比分析, 来讨论染色体核型分析在 APL 型白血病的临床诊断中的意义及价值。

1 材料与方法

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目 (30901736) 辽宁省教育厅资助科研项目 (L2010641)

作者简介 宋鹏 (1981-) 男, 主要研究方向 血液病遗传学诊断, E-mail: laoba_08@163.com

△通讯作者 周晋, E-mail: 20220758@qq.com

(收稿日期 2012-03-25 接受日期 2012-04-21)

1.1 临床资料

收集 2009 年-2011 年于哈尔滨医科大学附属第一医院就诊的临床诊断为 APL 的 83 例患者骨髓进行核型、融合基因、细胞形态学和荧光原位杂交技术(FISH)检测分析。其中男 45 例,女 38 例,男女比例为 1:0.8,年龄 12-77 岁,平均 37.5 岁。每个患者均按张之南《血液病诊断及疗效标准》^[6]并结合 MIC 协作组提出了白血病的形态学、免疫学、细胞遗传学(MIC)诊断方案进行确诊。

1.2 细胞遗传学检测方法

无菌条件抽取患者骨髓 2-3mL,肝素抗凝后,注入 PR-MI1640 培养基内(细胞终浓度为 $1 \times 10^9/L \sim 2 \times 10^9/L$)。37℃ 二氧化碳培养箱培养 18 h。收获染色体前 1 h 加 50 μ L 秋水仙素,0.075 M 氯化钾低渗 30 min,甲醇:冰醋酸=3:1 固定液固定 3 次,R 显带。染色体异常根据《人类细胞遗传学国际命名体制 ISCN (2009)》^[7]的有关规定加以识别和描述。见图 1。

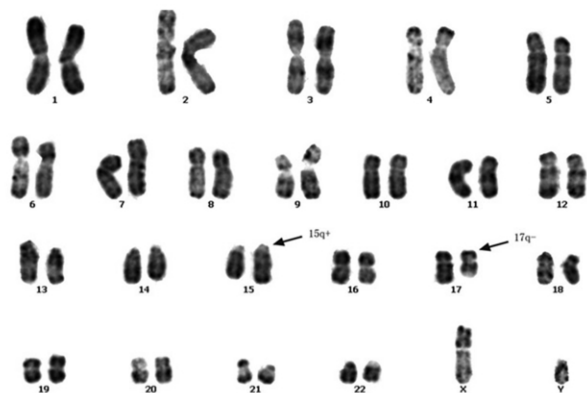


图 1 典型的 APL 患者细胞遗传学染色体核型易位 t(15;17)

Fig.1 A typical APL patients cytogenetics chromosome translocation: t(15;17)

1.3 荧光原位杂交检测方法

无菌条件抽取患者骨髓 2-3 mL,肝素抗凝后,注入 PR-MI1640 培养基内用 0.075 M 氯化钾低渗 30 min,甲醇:冰醋酸=3:1 固定液固定 3 次后滴片,以细胞不聚集为宜。采用购进于金菩嘉的探针试剂盒检测。见图 2。

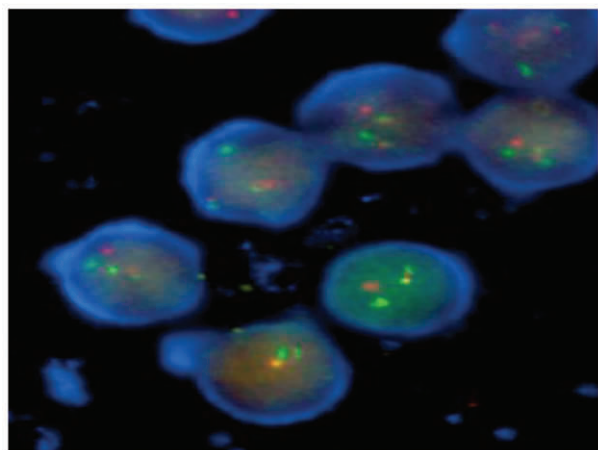


图 2 典型的 APL 患者 FISH 检查结果

Fig.2 A typical APL patients fluorescence in situ hybridization results

1.4 形态学检查

骨髓及血涂片经瑞氏染色及过氧化物酶染色(POX)等相关细胞化学染色,计数 200 个有核细胞,按 FAB 诊断标准确定 APL 患者。见图 3。

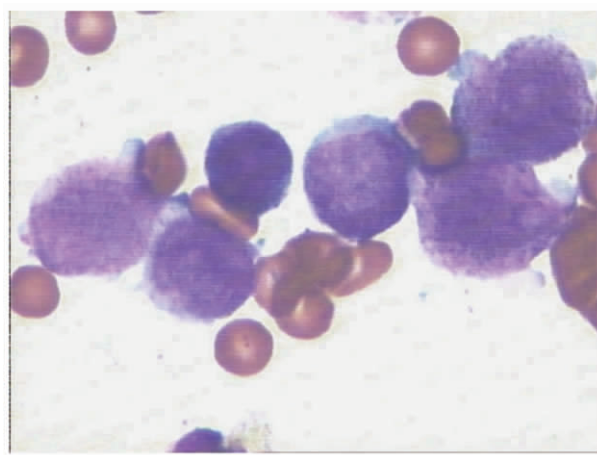


图 3 典型的 APL 患者形态学检查结果

Fig.3 A typical APL patients morphologic examination results

1.5 融合基因(PML-RARα)检测方法

无菌条件抽取患者骨髓 2-3 mL,Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液分离单个核细胞,采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 t(15;17)易位的 PML-RARα 融合基因转录本。反应条件为总体积 50 μ L;每个引物各 50 pmol,dNTP 各 100 μ mol/L;Taq DNA 聚合酶 2 U,循环数 30 个循环,计算拷贝数。最后取 10 μ L PCR 产物在 2%的琼脂糖凝胶中进行电泳,在凝胶仪上观察,成像。见图 4。

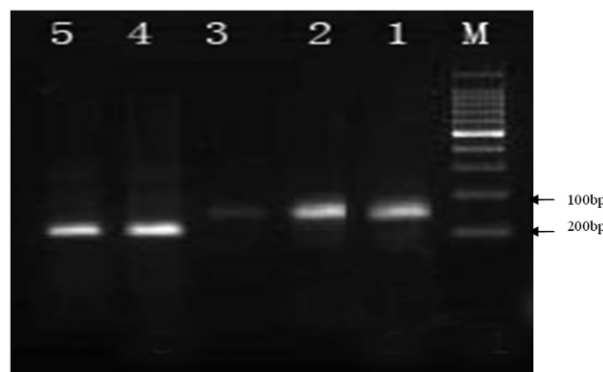


图 4 典型的 APL 患者 PML-RARα 检测结果

M:marker; 1,2,3 样本; 4,5 β -actin

Fig.4 A typical APL patients with PML-RARα test results

M:marker; 1,2,3:Sample; 4,5: β -actin

2 结果

临床诊断为 APL 患者中染色体异常的 83 例患者,结合 PCR 检测融合基因、形态学和 FISH 检测阳性结果进行对比分析,分别有 77 例、77 和 81 例吻合,吻合率分别为 92.8%、92.8%和 97.6%。其中 PCR 检测 PML-RARα 融合基因结果 77 例

阳性,6 例阴性 细胞形态学分析结果阳性为 77 例,阴性 6 例; FISH 检测中 81 例阳性,2 例阴性。染色体核型分析中 t (15; 17) (15q22 ;17q21) 者 79 例 ;(11; 17) 一例,但 PCR、细胞形态学分析和 FISH 检测为阴性 ;(15; 17) 伴 +7 一例,PCR、细胞形态学

和 FISH 分析皆为阳性 ;(15; 17) 伴 +9 一例,PCR 检测结果为阴性而细胞形态学和 FISH 检测分析为阳性; 正常一例中只有细胞形态学分析为阳性。具体结果见表 1。

表 1 临床诊断急性早幼粒细胞白血病患者染色体核型与 PML-RAR α 融合基因 PCR、细胞形态学分析和 FISH 结果比较(n=83)
Table 1 The clinical diagnosis of acute promyelocytic leukemia karyotype, FISH and PML-RAR fusion gene PCR, cell morphology analysis(n=83)

染色体核型分析结果		PCR 结果		细胞形态学分析结果		FISH 结果	
Chromosome karyotype analysis results		The results of PCR		Morphologic analysis results		The results of FISH	
Karyotype	An example	+	-	+	-	+	-
46,XX,t(15;17)	37	36	1	35	2	37	0
46,XY,t(15;17)	42	40	2	39	3	42	0
46,XY,t(11;17)	1	0	1	0	1	0	1
47,XY,t(15;17)+7	1	1	0	1	0	1	0
47,XY,t(15;17)+9	1	0	1	1	0	1	0
46,XX	1	0	1	1	0	0	1
合计	83	77	6	77	6	81	2
Total							

3 讨论

在本文中,统计 83 例 APL 病例,其中,染色体核型分析、PCR、细胞学诊断和 FISH 检测,阳性率分别为 98.8 % (82/83) 、92.8 % (77/83) 、92.8 % (77/83) 和 97.6 % (81/83) 。核型分析结果除一例正常外其余 82 例均为异常,其中最常见核型为 t(15; 17),共 79 例,占 96.3 % (79/82) ;复杂性异位 t (11;17) 一例,占 1.2 % (1/82) ,但 PCR、细胞形态学和 FISH 检测为阴性 ;(15; 17) +7 一例,占 1.2 % (1/82) ,PCR、细胞形态学和 FISH 检测皆为阳性 ;(15;17) +9 一例,占 1.2 % (1/82) ,PCR 检测结果为阴性而细胞形态学和 FISH 检测为阳性,最后通过结合临床和细胞免疫分型等实验室检查确诊为 APL。

目前已确定 RAR α 有 5 种不同的配偶基因,即 PML (promyelocytic leukemia)、PLZF (promyeloytie leukemia zinc finger)、NPM(nucleophosmin)、NuMA (nuclear matrix-mototic apparatus)、STAT5b (signal transduers and activators of transcription) 基因^[8]。发生 t (11;17) 一例,为 PLZF/RAR α 型或 NuMARAR α 型,该种核型在 APL 中也是较常见的核型^[9,10],但我院收集病例中仅有一例,在跟踪观察治疗中效果并不明显,两个月后自动出院,其余患者经过亚砷酸治疗后有所好转后相继出院。PML/RAR α 融合基因的致病机制是研究最为纯熟的,已将其研究成果有效应用于临床诊治。

在 APL 中,染色体易位使得 17 号染色体上的 RAR α 基因与位于其他染色体上的配偶基因发生融合,而后表达相应的融合蛋白^[11]引起某些因子的上调或下调而致病^[12]。PML/RAR α 融合基因是由于 15 号染色体的 PML 基因与位于 17 号染色体上的 RAR α 基因发生易位而形成,是染色体核型分析及 PCR、FISH 等技术的发展依据。APL 是临床上第一个应用诱导分化治疗取得显著疗效的人类恶性肿瘤,是人类从分子水平上认识

白血病的一个成功例子。在仅有 t (15;17) 核型异位的患者中自全反式维甲酸(ATRA)诱导 APL 成功以来,APL 患者的缓解率及生存率均有大幅度增加。该融合蛋白具有不同于正常 RAR α 等位基因编码的野生型维甲酸受体的功能,可阻断粒细胞的分化成熟,导致 APL 发生,是治疗 APL 的靶向基因,并且仅有很少的副反应及轻微的骨髓抑制^[13-16]。

染色体 t(15;17)易位只见于 APL,约 90%的 APL 有独特的染色体易位 t(15;17),因而 t(15;17)的检出成为该型白血病高度特异性的细胞遗传学标志^[8],这与本文统计结果一致。发生 t (11;17) 一例,为 PLZF/RAR α 型或 NuMARAR α 型,该种核型在 APL 中也是较常见的核型,但我院收集病例中仅有一例,在跟踪观察治疗中效果不明显两个月后自动出院。7 号染色体的数目或结构异常可涉及多种疾病,在血液病中是急性白血病较为常见的遗传学改变之一,多见于原发性或治疗相关性急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia,AML)、急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia,ALL)及由骨髓增生异常综合征(myelody splast ic syndr ome, MDS)转化的 AML,主要异常有 -7/7q- 及易位,发生 t(15;17) 同时伴有 +7 异位的在我院较为少见,经过本院治疗病情有所缓解。9 号染色体的增加在具有 t (15;17) 的血液病中的报道也很少,因具有典型 APL 患者临床表现,最终确诊为 APL,并进行治疗^[17,18]。

相对来说,RT-PCR 检测过程中所需的试剂成本较高,标本处理过程中要求比较严格,而更重要的是必须有相应的引物和探针才能够进行检测,在众多的引物序列中只要有一个碱基对出现错误就可能造成整个检测的失败,这大大增加了检测的难度和成本,也局限了其检测范围。细胞形态学在分析过程中对制片和染色的要求比较高,既要防止标本稀释又要注意染色的时间 在检测过程中由于各种细胞类型较多,对工作人员的要求也较高。FISH 检测中探针不稳定、荧光极容易淬灭,要有

独立的暗室进行操作,同时在 DNA 探针杂交的过程中容易杂交不上,造成实验的失败或假阳性,同时所用试剂成本较高,在本次与染色体核型分析的对比中,对含有 +7 和 +9 的标本,在未知的情况下很难检测出来,我们也是在核型分析结果提示的基础上加入 +7、+9 的探针才完成本次的检测。但相对来说 FISH 检测特异性好,定位准确。染色体核型分析在日常工作中所需试剂均为常规试剂可自行配置,分析过程也只需要一台显微镜即可,这大大节省了经济成本。对于基因缺失、扩增、结构改变造成的多种异常能够直观的反应出来。在识别染色体的来源与性质的基础上,为骨髓异基因移植后的效果进行评估,对于白血病的治疗和预后均有重要意义^[19]。同时染色体核型分析不仅在血液病诊断中占有重要的地位,同时在产前诊断和遗传性疾病、不孕症、多发性流产和畸胎等^[20,21]有生殖功能障碍的疾病诊断中占有不可或缺的地位。

综上所述,染色体核型分析、RT-PCR、细胞形态学分析和 FISH 检测都是诊断 APL 的可靠指标,染色体显带的核型分析能对全部染色体中进行分析,可以较全面和直观的检测、评价细胞遗传学的改变,大大弥补了其他检测技术的不足,对 APL 的疾病诊断具有重要意义,特别是在白血病的发病机理仍不明确、新类型染色体畸变层出不穷的情况下,细胞遗传学检查常常能够发现额外染色体异常,这些异常常常出现在临床转变之前,是判断疾病预后不良的有效标志^[22]。

在对复杂核型的判断中相对于 PCR、细胞形态学和 FISH 检测在临床诊断中占有重要地位,是其他诊断方法无法取代的。为研究白血病的分子机制提供了重要线索,从而为治疗白血病提供重要依据。

参考文献 (References)

- [1] Warrell RP Jr, Frankel SR, Miller WH Jr, et al. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid)[J]. N Engl J Med, 1991, 324: 1385
- [2] Dewald GW, Stupca P. 154 chromosome anomalies in hematologic malignancies[J]. Leuk Res, 2000, 24(6): 487-489
- [3] Mahaffey VJ, Spurbeck JL, Carlson RO, et al. Hematologic malignancies, critical genes and representative pictures for 166 chromosome anomalies[J]. Leuk Res, 2004, 28(12): 1351-1356
- [4] Dewald GW, Ketterling R, Wyatt WA, et al. Cytogenetic studies in neoplastic hematologic disorders [M]. McClatchey KD. Clinical laboratory medicine. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 1-30
- [5] 薛永权, 王勇, 吴亚芳, 等. 恶性血液病中 51 种常见染色体异常的 R 带部分核型图及其说明[J]. 中华血液学杂志, 2007, 28(1): 57-59
Xue Yong-quan, Wang Yong, WU Ya-fang, et al. Malignant blood disease in 51 kinds of common chromosomal abnormality karyotype figure and its description of part R belt [J]. Chinese Journal of Hematology, 2007, 28(1): 57-59
- [6] 张之南. 血液病诊断与疗效标准 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 103-121
Zhang Zhi-nan. The standard of diagnosis and treatment of hematology [M]. 3ed. Beijing: Science Press, 2007: 103-121
- [7] ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature [J]. Mitelman F (ed); S. Karger, Basel, 2009: 1-138
- [8] Lin RJ, Sternsdorf T, Tini M, et al. Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukaemia [J]. Oncogene, 2001, 20: 7204-7215
- [9] Chen SJ, Zelent A, Tong JH, et al. Rearrangement of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11; 17) (q23; q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia [J]. J Clin Invest, 1993, 91(5): 2260-2267
- [10] Chen Z, Brand NJ, Chen A, et al. Fusion between a novel kuppel-like zinc finger gene, and the retinoic acid receptor-locus due to a variant t(11; 17) translocation associated with acute promyelocytic leukemia [J]. EMBOJ, 1993, 12(3): 1161-1167
- [11] Rego EM, Pandolfi PP. Analysis of the molecular genetics of acute promyelocytic leukemia in mouse models [J]. Semin Hematol, 2001, 38: 54-70
- [12] Park DJ, Vuong PT, deVos S, et al. Comparative analysis of genes regulated by PML/RARα and PLZF/RARα in response to retinoic acid using oligonucleotide arrays [J]. Blood, 2003, 102: 3727-3736
- [13] Fenaux P, Chevret S. Long-term follow-up confirms the benefit of all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia [J]. Leukemia, 2000, 14(8): 1371-1377
- [14] Kastner P, Lawrence HJ, Waltzinger C, et al. Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RARα [J]. Blood, 2001, 97: 1314-1320
- [15] Duprez E. A new role for C/EBPβ in acute promyelocytic leukemia [J]. Cell Cycle, 2004, 3: 389-390
- [16] Smith E, Sigvardsson M. The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation [J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(6): 973
- [17] Degos L, Dombret H, Chomienne C, et al. ATRA as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia [J]. Blood, 1995, 85(10): 2643-2653
- [18] Chen GQ, Zhu J, Shi XG, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with down regulation of bcl-2 expression and modulation of PML-RAR/PLZF protein localization [J]. Blood, 1996, 88(3): 1052-1061
- [19] 王燕, 滕清良. 急性白血病常见染色体异常及预后 [J]. 山东医药, 2011, 11: 101-102
Wang Yan, Teng Qing-liang. Common chromosomal abnormalities and prognosis in acute leukemia [J]. Shandong Medicine, 2011, 11: 101-102
- [20] Carp H, Feldman B, Oelsner Q, et al. Parental karyotype and subsequent live births in recurrent miscarriage [J]. Fertil Steril, 2004, 81(5): 1296-1301
- [21] Ogasawara M, Aoki K, Okada S, et al. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages [J]. Fertil Steril, 2000, 73(2): 300-304
- [22] 刘辉, 常乃柏, 裴蕾, 等. 细胞遗传学动态检测在慢性粒细胞白血病中的应用 [J]. 临床血液学杂志, 2002, 15(6): 264-265
Liu Hui, Chang Nai-bai, Pei Lei, et al. Cytogenetic dynamic detection in chronic myeloid leukemia in application [J]. Journal of Clinical Hematology, 2002, 15(6): 264-265