

急性淋巴细胞白血病患者造血干细胞移植后监测E2A-PBX1融合基因的意义初探

赵晓甦 秦亚溱 张艳玲 徐永艳 王昱 陈欢 王峰蓉 王景枝 黄晓军

【摘要】 目的 观察伴有E2A-PBX1融合基因的急性淋巴细胞白血病(ALL)患者造血干细胞移植后E2A-PBX1融合基因表达水平的变化特点,初步探讨其临床意义。方法 回顾性分析2010年12月至2015年1月于北京大学血液病研究所行异基因造血干细胞移植的10例E2A-PBX1融合基因阳性ALL患者临床资料,采用荧光实时定量PCR方法监测E2A-PBX1融合基因水平,分析其水平变化与疾病复发和治疗的相关性。结果 10例E2A-PBX1融合基因阳性患者(其中4例为移植前阳性),移植后6例E2A-PBX1基因转阳,中位转阳时间90(75~180)d,第1次转阳基因中位水平为25.200%(0.022%~353.600%),从E2A-PBX1基因转阳至血液学复发间隔中位时间30(0~74)d,4例最终血液学复发,中位复发时间为164(75~240)d。6例E2A-PBX1融合基因转阳患者4例死亡,3例死于复发,1例死于弥漫性肺泡大出血。结论 伴有E2A-PBX1融合基因ALL患者移植后一旦E2A-PBX1基因转阳,其水平迅速上升,病情进展迅速,预后差。

【关键词】 造血干细胞移植; E2A-PBX1融合基因; 肿瘤,残余

Clinical significance of monitoring E2A-PBX1 fusion gene expression in patients with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation Zhao Xiaosu, Qin Yazhen, Zhang Yanling, Xu Yongyan, Wang Yu, Chen Huan, Wang Fengrong, Wang Jingzhi, Huang Xiaojun. Peking University People's Hospital, Peking University Institute of Hematology, Beijing 100044, China

Corresponding author: Zhao Xiaosu, Email: zhao.xiaosu@outlook.com

【Abstract】 Objective To investigate the clinical characteristics of E2A-PBX1 (immunoglobulin enhancer binding factor-pre-B leukemia) fusion gene in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) after allogeneic stem cell transplantation (allo-HSCT). **Methods** Clinical data of 10 patients received allo-HSCT in Peking University Institute of Hematology from December 2010 to January 2015 were retrospectively collected. The E2A-PBX1 gene was examined by real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR). The correlation between its expression level and the disease status was analyzed. **Results** Among 10 cases of enrolled ALL, the E2A-PBX1 expression of six patients converted to positive after transplant at a median time of 90 days (range, 75–180 days). The expression level of the first positive sample was 25.200% (range, 0.022%–353.600%). The duration from E2A-PBX1 positive to hematological relapse was 30 days (range, 0–74 days). Finally, 4 patients underwent relapse at a median time of 164 days (range, 75–240 days) after allo-HSCT. The expression of E2A-PBX1 and minimal residual disease (MRD) level examined by flow cytometry were positive correlated (Spearman $r=0.743$, $P=0.002$). Once E2A-PBX1 expression converted to positive after transplant, MRD would increase rapidly. Patients with this type of ALL would have little response to the current intervention towards relapse. **Conclusion** Monitoring E2A-PBX1 by RQ-PCR could be used to evaluate MRD status after allo-HSCT. Patients with positive E2A-PBX1 at early stage of transplant will have a poor prognosis.

【Key words】 Hematopoietic stem cell transplantation; E2A-PBX1 fusion gene; Neoplasm, residual

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.12.002

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81300440);北京市自然科学基金面上项目(7132181);首都临床特色应用研究(Z121107001012085)

作者单位:100044 北京大学人民医院、北京大学血液病研究所,造血干细胞移植治疗血液病北京市重点实验室;血液学协同创新中心
通信作者:赵晓甦,Email:zhao.xiaosu@outlook.com

伴t(1;19)(q23;p13)细胞遗传学异常的急性淋巴细胞白血病(ALL)占儿童ALL的3%~5%、成人ALL的3%左右^[1-2],易位形成E2A-PBX1融合基因(immunoglobulin enhancer binding factor- pre-B leukemia);该亚型ALL的预后不佳,异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)是其根治的重要手段^[3]。现有研究表明E2A-PBX1融合基因可作为微小残留病(MRD)标志,在诱导化疗后其表达水平有重要的预后判断价值,该基因早期快速转阴的患者复发率相对较低^[4]。但是,E2A-PBX1融合基因能否作为allo-HSCT后MRD的预测指标国内外未见相关报道。本研究中我们对10例E2A-PBX1融合基因阳性ALL患者allo-HSCT后E2A-PBX1融合基因的表达水平进行了动态监测,观察其与疾病复发及治疗的相关性,旨在为移植后临床复发的干预及治疗提供新的思路。

病例和方法

1. 病例:2010年12月至2015年1月在北京大学血液病研究所进行allo-HSCT的伴有E2A-PBX1融合基因阳性的ALL患者10例,所有患者均经临床、细胞形态学、流式细胞学、分子学及细胞遗传学检查确诊,诊断参照文献^[5]标准。

2. 移植预处理方案及移植物抗宿主病(GVHD)的预防:HLA同胞相合患者采用改良BU/CY方案,HLA配型不合患者在改良BU/CY基础上加用抗胸腺细胞球蛋白(ATG)^[6]。所有患者均接受环孢素(CsA)+霉酚酸酯(MMF)+短程甲氨蝶呤(MTX)预防GVHD。

3. 标本采集:分别于初诊、移植前、+30 d、+60 d、+90 d、+180 d留取患者骨髓标本4 ml,EDTA抗凝,分离骨髓单个核细胞,采用TRIzol法提取细胞总RNA,逆转录为cDNA后存放于-80℃冰箱备用。

4. E2A-PBX1融合基因的定量检测:采用ABI Prism 7500型(美国ABI公司产品)荧光实时定量PCR仪进行检测,相关试剂均为仪器配套产品。反应体系10 μl:上、下游引物各0.3 μmol/L、TaqMan探针0.2 μmol/L、2×TaqMan通用PCR公共体系5 μl、cDNA 1 μl(相当于100 ng RNA)。引物序列:E2A-PBX1上游引物:5'-CCAGCCTCATGCACAACCA-3';下游引物:5'-CCCTCCCTGACCTGTCTCGGCC-3';探针序列:(FAM)-GGGCTCCTCGGATACT-CAAAA-(TAMRA)^[7]。PCR条件:50℃ 2 min,1个

循环;95℃ 10 min,1个循环;95℃ 15 s,62℃ 1 min,40个循环。内参基因为ABL。E2A-PBX1融合基因表达水平(%)=E2A-PBX1融合基因拷贝数/ABL基因拷贝数×100%。

5. 免疫残留及WT1基因检测:参照文献^[6,8]方法,采用四色流式细胞术检测免疫残留,采用实时定量PCR检测WT1基因表达水平。

6. 随访及疗效判定:所有病例通过门诊复查或电话进行随访,随访截至2015年7月1日,中位随访时间180(52~1 535)d。观察患者一般情况、复发及干预措施、生存情况,监测移植后MRD。血液学复发及完全缓解(CR)定义参照文献^[6]。

7. 复发干预及治疗策略:对于移植后E2A-PBX1融合基因转阳患者给予减停CsA、注射重组人IFN-α或化疗联合供者淋巴细胞输注(DLI)干预;出现血液学复发患者给予化疗联合DLI治疗。化疗方案包括MTX单药、CODP(环磷酰胺+长春新碱+柔红霉素+泼尼松)方案、左旋门冬酰胺酶(L-Asp)、阿糖胞苷(Ara-C)联合MTX等。

结 果

1. 患者E2A-PBX1融合基因水平与临床转归:患者主要临床特征见表1。10例患者移植前共4例(例3、5、9、10)E2A-PBX1融合基因阳性,中位表达水平为0.160%(0.003%~2.000%),形态学达CR,免疫残留均为阴性。移植后共6例患者在常规骨髓检测时发现E2A-PBX1融合基因转阳,中位转阳时间为90(75~180)d,第1次转阳E2A-PBX1融合基因中位表达水平为25.200%(0.022%~353.600%),其余4例患者E2A-PBX1融合基因持续阴性,均无复发。移植前E2A-PBX1融合基因阳性的4例患者中,移植后3例E2A-PBX1融合基因再次出现阳性;移植前E2A-PBX1融合基因阴性的6例患者,移植后3例E2A-PBX1融合基因出现阳性。移植后基因转阳的6例患者中4例为成人,2例为儿童。共4例患者(例2、3、5、6)出现血液学复发,中位复发时间为164(75~240)d,E2A-PBX1融合基因转阳至血液学复发间隔中位时间30(0~74)d。例2、例3 E2A-PBX1融合基因阳性与血液学复发同时发生,但这2例患者在+30 d时均未检测E2A-PBX1融合基因。例2 +30 d时免疫残留已为0.260%,形态学CR,WT1表达正常,+75 d时即出现血液学复发;例3 +30 d骨髓形态学、免疫残留及WT1检测均正常,+75 d时也出

表1 患者临床特点及骨髓E2A-PBX1融合基因表达与免疫残留水平

例号	性 别	年 龄 (岁)	移植前状态	E2A-PBX1融合基因表达水平(%)									
				初诊	移植前	+30 d	+60 d	+75 d	+90 d	+105 d	+120 d	+135 d	+180 d
1	女	13	CR2	15.300	0	0	0	-	0	-	-	0	0
2	女	23	CR1	-	0	-	-	353.600	149.400	-	-	280.900	279.100
3	男	35	CR1	310.000	2.000	-	-	191.800	247.900	-	-	-	-
4	女	60	CR1	457.100	0	0	0	-	0	-	-	0	0
5	男	34	CR1	268.300	0.003	0	0	-	0	-	-	0	28.100
6	男	7	CR1	-	0	0	0	-	22.200	151.400	128.400	218.800	294.200
7 ^a	女	12	CR1	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-
8	女	35	CR1	-	0	0	0	-	0.0560	0.420	-	1.950	18.900
9	男	17	CR1	11.300	0.310	0	0	-	0	-	-	0	0
10	男	14	CR1	34.700	0.003	0	0	-	0.022	5.600	3.800	0	0

例号	免疫残留(%)									复发	转归
	+30 d	+60 d	+75 d	+90 d	+105 d	+120 d	+135 d	+180 d			
1	0	0	-	0	-	-	0	0	否	存活	
2	0.260	-	18.090	1.750	-	-	44.220	53.070	是	死亡	
3	0	-	2.020	55.080	-	-	-	-	是	死亡	
4	0	0	-	0	-	-	0	0	否	存活	
5	0	0	-	0	-	-	0	0	是	死亡	
6	0	0	-	3.370	4.500	10.210	17.540	88.300	是	存活	
7	0	-	-	-	-	-	-	-	否	死亡	
8	0	0	-	0	0	-	0	0	否	存活	
9	0	0	-	0	-	-	0	0	否	存活	
10	0	0	-	0	0	0	0	0	否	存活	

注:MRD:微小残留病;CR1、CR2分别为第1次、第2次完全缓解;-:未检测;a:移植前化疗过程中曾检出E2A-PBX1融合基因阳性

现了血液学复发。10例患者中4例死亡,3例(例2、3、5)死于复发,1例(例7)移植后早期死于弥漫性肺泡大出血。

2. 移植后E2A-PBX1融合基因水平与其他MRD监测指标的相关性:6例患者移植后E2A-PBX1融合基因阳性,在各时间点检测该特异性融合基因的同时,还进行了骨髓细胞形态学及免疫残留检测,如表1所示,当移植后患者E2A-PBX1融合基因表达水平高于100%时,免疫残留均阳性。分析E2A-PBX1融合基因及免疫残留阳性患者骨髓检测结果,共分析15例次,结果提示免疫残留水平与E2A-PBX1融合基因水平有正相关趋势。其余9例次E2A-PBX1融合基因水平低于100%的阳性标本E2A-PBX1中位表达水平为1.950%(0.056%~28.100%),除1例次(例6,+90d)E2A-PBX1融合基因水平为22.200%伴免疫残留为3.370%外,另6例次免疫残留均阴性。

对4例移植后E2A-PBX1融合基因阳性患者进行了22例次WT1基因的检测,其中2例(例3、5)

WT1基因水平随E2A-PBX1融合基因转阳而异常高表达,共7例次E2A-PBX1及WT1表达双阳性(191.800%对0.76%、247.900%对2.70%、28.100%对1.40%、174.900%对6.30%、203.500%对7.70%、220.200%对7.40%、358.300%对5.50%)。另2例患者初诊时WT1水平即正常,无论移植后E2A-PBX1融合基因阳性与否,WT1基因表达始终正常。

3. 临床干预/治疗措施对E2A-PBX1融合基因水平的影响:3例患者(例6、8、10)在移植后E2A-PBX1融合基因阳性时给予抢先干预防止复发。例6予CODP方案化疗联合DLI,但E2A-PBX1融合基因水平仍持续上升,换用MTX化疗联合DLI并予IFN- α 注射,仍未能阻止其血液学复发,现正进行L-Asp化疗。例8予IFN- α 注射,但E2A-PBX1融合基因水平仍逐渐升高,给予化疗联合DLI干预,之后复查基因水平仍呈上升趋势,其后继以IFN- α 注射治疗,E2A-PBX1融合基因曾转阴2个月后再次阳性(0.003%),暂未复发。例10在+90dE2A-PBX1融合基因转阳,最高达5.600%,之后给予IFN- α 注

射,1个月后基因转阴,暂未复发。

另3例患者(例2、3、5)出现血液学复发后给予化疗联合DLI等治疗。例2和例3在+75 d出现血液学复发,例2连续给予2次化疗加DLI治疗均未能缓解,最终死于复发。例3复发后给予MTX联合Ara-C化疗,于粒细胞缺乏期死于重度肺部感染。例5 E2A-PBX1融合基因与免疫残留均转阳后准备给予干预,但1个月内再次复查骨髓象已呈血液学复发,随后接受了MTX化疗联合DLI,1个月后复查E2A-PBX1融合基因及免疫残留仍呈阳性,遂减停CsA并给予IFN- α 注射诱发移植物抗白血病效应,再次给予CODP方案化疗联合DLI,复查骨髓象提示血液学复发,最终死于复发。

讨 论

既往许多研究表明,无论采用流式细胞术进行免疫残留检测,还是进行白血病特异性融合基因/非特异性基因的检测,移植前MRD水平是移植后疾病复发的独立危险因素^[9-10]。本研究结果提示,移植前E2A-PBX1融合基因低水平表达者似乎移植后再次出现E2A-PBX1阳性的概率略高,而复发率并未明显升高。但结论尚不肯定,一方面因病例数较少,且均为较低的水平,不能再进一步根据基因水平进行复发危险分层;另一方面随访期还不够长,可能未到复发时间,需积累更多病例完善移植前相关临床资料进行多因素分析来验证。

对于伴有t(1;19)的ALL患者,我们研究发现E2A-PBX1融合基因一般于移植后早期就迅速升高,从基因转阳到血液学复发时间较短,提示该类型白血病肿瘤细胞倍增时间短、复发迅速。此外,移植后E2A-PBX1融合基因转阳要早于免疫残留阳性,在基因水平小于100%时,除例6(E2A-PBX1融合基因表达水平为22.200%时免疫残留为3.370%)外,免疫残留都呈阴性,因此在未明确移植后监测该基因的临床意义前,复发的抢先干预措施有时会相对保守,而一旦出现血液学复发,以化疗联合DLI为主的治疗方式均未显示明显疗效。另外,由于E2A-PBX1融合基因水平快速上升,临床上很可能来不及干预就已出现血液学复发。上述结果提示对于该类型患者在移植后可能需要更频繁的骨髓监测,以便更早期发现MRD并干预,也许有助于改善疗效。

免疫残留作为B细胞ALL MRD监测指标的临床意义已获得肯定^[11]。在本研究中,我们观察到E2A-PBX1融合基因和免疫残留显示出正相关的趋势,说明E2A-PBX1融合基因可作为该类型白血病移植后MRD监测的有效指标。此外,对于同时高表达WT1的病例,我们也比较了E2A-PBX1融合基因与WT1基因水平的相关性。因B细胞ALL患者并非所有患者均高表达WT1,而其中高表达者其WT1水平代表着一定的肿瘤负荷,本研究中2例患者E2A-PBX1融合基因与WT1基因的结果显示两者也呈现了较为平行的变化,从另一个角度提示E2A-PBX1融合基因可以作为移植后MRD的监测指标,且在敏感性和特异性方面均优于免疫残留和WT1监测。

本研究中纳入的儿童患者已是从前期化疗中筛选出的高危病例,而成人患者是前期化疗疗效尚可、可进入到移植程序的病例,尽管如此,E2A-PBX1融合基因阳性的成人ALL预后更差,6例移植后基因转阳患者中4例为成人。临床干预/治疗措施与E2A-PBX1融合基因变化的分析提示,该基因阳性的ALL白血病细胞恶性程度较高,免疫治疗及化疗等手段均无明显疗效。这也可能由于大部分患者是E2A-PBX1融合基因水平较高或出现血液学复发时才进行干预或治疗。2例患者(例8、10)E2A-PBX1融合基因阳性后还未复发也许与他们在基因水平<2%时就给予干预有关,另一方面他们基因首次转阳时拷贝数较低(0.056%和0.022%),也可能提示其肿瘤细胞倍增时间较长,恶性度相对较低。

综上所述,伴有E2A-PBX1融合基因阳性的ALL是预后不良的白血病,特别是成人患者,仍建议在第1次CR期进行allo-HSCT。本研究结果提示通过荧光实时定量PCR方法检测E2A-PBX1融合基因可作为移植后监测该类型白血病MRD的方法之一,临床上可根据该基因水平变化给予复发干预,而更早期的干预是否能最终改善患者预后,仍需更大样本的临床研究来进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Crist WM, Carroll AJ, Shuster JJ, et al. Poor prognosis of children with pre-B acute lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19)(q23;p13): a Pediatric Oncology Group study [J]. *Blood*, 1990, 76(1):117-122.
- [2] Rambaldi A, Attuati V, Bassan R, et al. Molecular diagnosis and clinical relevance of t(9;22), t(4;11) and t(1;19) chromosome

- abnormalities in a consecutive group of 141 adult patients with acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leuk Lymphoma*, 1996, 21(5/6):457-466.
- [3] Vey N, Thomas X, Picard C, et al. Allogeneic stem cell transplantation improves the outcome of adults with t(1;19)/E2A-PBX1 and t(4;11)/MLL-AF4 positive B-cell acute lymphoblastic leukemia: results of the prospective multicenter LALA-94 study[J]. *Leukemia*, 2006, 20(12):2155-2161.
- [4] 赵玮, 李志刚, 高超, 等. 儿童急性淋巴细胞性白血病E2A/PBX1融合基因的检测及临床意义[J]. *中华儿科杂志*, 2008, 46(7):550-551.
- [5] 中华医学会血液学分会, 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会. 中国成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗专家共识[J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(9):789-792.
- [6] Zhao XS, Jin S, Zhu HH, et al. Wilms' tumor gene 1 expression: an independent acute leukemia prognostic indicator following allogeneic hematopoietic SCT [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2012, 47(4):499-507.
- [7] Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program [J]. *Leukemia*, 2003, 17(12):2318-2357.
- [8] Zhao XS, Liu YR, Zhu HH, et al. Monitoring MRD with flow cytometry: an effective method to predict relapse for ALL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Ann Hematol*, 2012, 91(2):183-192.
- [9] Ma L, Hao S, Diong C, et al. Pre-transplant achievement of negativity in minimal residual disease and French-American-British L1 morphology predict superior outcome after allogeneic transplant for Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia: an analysis of Southeast Asian patients [J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(5):1362-1369.
- [10] Tian H, Chen GH, Xu Y, et al. Impact of pre-transplant disease burden on the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplant in refractory and relapsed acute myeloid leukemia: a single-center study [J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(5):1353-1361.
- [11] Holowiecki J, Krawczyk-Kulis M, Giebel S, et al. Status of minimal residual disease after induction predicts outcome in both standard and high-risk Ph-negative adult acute lymphoblastic leukaemia. The Polish Adult Leukemia Group ALL 4-2002 MRD Study [J]. *Br J Haematol*, 2008, 142(2):227-237.
- (收稿日期:2015-04-01)
(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

2015年本刊可直接用英文缩写的常用词汇

磷酸盐缓冲液 PBS	乳酸脱氢酶 LDH	粒-巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF
胎牛血清 FBS	凝血酶原时间 PT	巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF
血红蛋白 HGB	部分激活的凝血活酶时间 APTT	链霉素抗生素蛋白-过氧化物酶 S-P
白细胞计数 WBC	EB病毒 EBV	粒-巨噬细胞集落形成单位 CFU-GM
血小板计数 PLT	巨细胞病毒 CMV	细胞毒性T淋巴细胞 CTL
核因子-κB NF-κB	乙型肝炎病毒 HBV	佛波醇酯 TPA
聚合酶链反应 PCR	丙型肝炎病毒 HCV	噻唑蓝实验 MTT实验
逆转录-聚合酶链反应 RT-PCR	人类免疫缺陷病毒 HIV	弥漫性血管内凝血 DIC
酶联免疫吸附实验 ELISA	自然杀伤细胞 NK细胞	磁共振成像 MRI
动脉血氧分压 PaO ₂	白细胞介素 IL	正电子发射断层扫描 PET
动脉血二氧化碳分压 PaCO ₂	干扰素 IFN	乙二胺四乙酸 EDTA
辅助性T淋巴细胞 Th	肿瘤坏死因子 TNF	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE
丙氨酸转氨酶 ALT	红细胞生成素 EPO	二甲基亚砷 DMSO
天冬氨酸转氨酶 AST	血小板生成素 TPO	荧光原位杂交 FISH
谷氨酰转氨酶 GGT	干细胞生长因子 SCF	美国国家综合癌症网络 NCCN
碱性磷酸酶 ALP	粒细胞集落刺激因子 G-CSF	

本刊编辑部