

# WT1 基因 rs16754 多态性与急性髓系白血病患者临床特征及预后关系的研究

许晶 李莉 李娟 陈瑶 王宏伟

**【摘要】** 目的 探讨WT1 基因 rs16754 多态性与急性髓系白血病(AML)患者临床特征及预后的关系。方法 收集2010年1月至2013年12月山西医科大学第二临床医学院115例AML患者初诊时骨髓及177名健康体检者外周血样本,采用高分辨溶解曲线法(HRM)进行WT1 基因rs16754多态性位点分型,并通过直接测序法验证,回顾性分析该位点单核苷酸多态性(SNP)与AML发病风险、患者临床特征、缓解及生存情况的相关性。**结果** WT1 基因rs16754多态性与AML发病风险无关( $P=0.296$ ),GA/AA组与GG组在患者性别、年龄及临床各指标间及化疗缓解率上差异均无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ ),GA/AA组骨髓原始细胞比例高于GG组( $P=0.025$ )。随访99例患者生存情况,单因素分析发现GA/AA组总体生存率高于GG组( $P=0.035$ )。多因素分析显示A等位基因是AML患者的独立预后因素,GA/AA型患者的死亡风险高于GG型患者( $HR=1.681,95\% CI 1.046-2.700, P=0.032$ )。**结论** WT1 rs16754多态性与AML预后有关,可作为AML患者预后判断的指标之一。

**【关键词】** 基因,WT; 多态性,单核苷酸; 白血病,髓样,急性; 预后

**基金项目:**山西省回国留学人员重点科研资助项目(2015-重点5)

**Association of WT1 rs16754 polymorphism with clinical features and prognosis in patients with acute myeloid leukemia** Xu Jing\*, Li Li, Li Juan, Chen Yao, Wang Hongwei\*. *Department of Hematology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China*  
Corresponding author: Wang Hongwei, Email: wanghw68@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To explore the relationship between WT1 rs16754 polymorphism and clinical features and prognosis in patients with acute myeloid leukemia (AML). **Methods** Bone marrow samples of 115 newly diagnosed AML patients and peripheral blood samples of 177 healthy controls were collected from the Second Hospital of Shanxi Medical University from January 2010 to December 2013. The genotype of rs16754 was screened by high-resolution melting (HRM) and validated by direct sequencing. The association between the single nucleotide polymorphism (SNP) and the risk, clinical features, remission and survival state of AML patients was analyzed retrospectively. **Results** This polymorphism was not associated with risk for AML ( $P=0.296$ ), the GA/AA group and GG group had no significant difference in gender, age, clinical features and remission rate of chemotherapy ( $P>0.05$ ), the percentage of bone marrow cells in GA/AA group was higher than that in GG group ( $P=0.025$ ). The survival state of 99 patients were followed up, single factor analysis found that the difference of the overall survival rate was statistically significant ( $P=0.035$ ) between the two groups, the rate of GA/AA group was higher than that of the GG group. Multivariate analysis showed that the A allele was an independent prognostic factor for AML patients and the mortality risk of GA/AA patients were higher ( $HR=1.681, 95\% CI 1.046-2.700, P=0.032$ ). **Conclusion** WT1 rs16754 polymorphism is associated with the prognosis of AML, and can be used as one of the indicators for the prognosis of AML patients.

**【Key words】** Gene, WT1; Polymorphism, single nucleotide; Leukemia, myeloid, acute; Prognosis

**Fund Program:** Key Project of Overseas Returnee Research of Shanxi Province(2015-key 5)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.10.017

作者单位:030001 太原,山西医科大学第二医院血液病研究所、血液病分子诊疗山西省重点实验室(许晶、李娟、王宏伟),山西医科大学(李莉、陈瑶)

通信作者:王宏伟,Email: wanghw68@hotmail.com

急性髓系白血病(AML)是骨髓恶性克隆性疾病,由于造血干祖细胞的增殖失控、分化受阻从而导致正常造血不足<sup>[1-2]</sup>。作为原癌基因,WT1基因的过表达已被作为临床上检测 AML 微小残留病(MRD)的生物学标志。近几年 WT1 基因单核苷酸多态性(SNP)对疾病的影响受到人们的广泛关注,且研究热点主要集中在 rs16754 位点。该位点位于 WT1 基因突变热点区第 7 外显子<sup>[3]</sup>,存在明显的种族差异<sup>[4]</sup>,其与 AML 患者临床特征及预后的关系目前尚不明确。中国地区相关报道较少<sup>[3,5-6]</sup>,我们以 115 例初发 AML 患者及 177 名健康志愿者为研究对象,采用高分辨溶解曲线(HRM)法进行 WT1 rs16754 多态性分型,研究其与 AML 发病风险、患者临床特征、缓解及生存情况的关系。

## 对象与方法

### 一、研究对象

2010年1月至2013年12月在我院血液科确诊的115例初发AML(非M<sub>3</sub>)住院患者及177名健康体检者纳入本次回顾性研究。收集患者初发时骨髓样本和健康对照者外周血样本。对照组男96例,女81例,中位年龄49(11~80)岁。所有AML患者按WHO(2008)标准进行诊断,其中男66例,女49例,中位年龄47(12~80)岁。其中伴有重现性遗传学异常者8例,伴有t(8;21)(q22;q22)者6例,伴有inv(16)(p13q22)者2例;不做分类者104例(M<sub>0</sub>4例,M<sub>1</sub>3例,M<sub>2</sub>15例,M<sub>4</sub>44例,M<sub>5</sub>29例,M<sub>6</sub>8例,M<sub>7</sub>1例);未知3例。所有入组患者均接受IA(去甲氧柔红霉素+阿糖胞苷)、DA(柔红霉素+阿糖胞苷)、MA(米托蒽醌+阿糖胞苷)等标准“3+7”方案诱导缓解治疗,完全缓解(CR)后根据遗传学预后分层、经济情况及有无合适供者等情况给予后续强化巩固治疗或行造血干细胞移植术,未达CR者采用大剂量阿糖胞苷(Ara-C)为基础的方案[FLAG(氟达拉滨+Ara-C+G-CSF),Ara-C联合去甲氧柔红霉素或柔红霉素或蒽醌类药物)或含G-CSF的预激方案再诱导治疗,1~2个疗程后评估是否达CR。以查阅病历和电话随访的形式进行随访,随访截止至2016年3月1日。总生存(OS)期定义为确诊至死亡或末次随访的时间。

### 二、SNP位点检测

1. 基因组DNA提取:采用OMEGA DNA提取试剂盒提取AML患者骨髓及健康对照组外周血标本基因组DNA,放置-80℃冰箱保存。

2. HRM法检测WT1 rs16754位点进行基因分型:通过GeneBank数据库在该位点两侧设计分型引物,上游:5'-CGTACAAGAGTCGGGGCTAC-3';下游:5'-CCTCTTACTCTCTGCCTGC-3'。反应体系共10μl,其中2×PCR Premix Taq酶5μl(日本TaKaRa公司产品),高低温内标MIX 0.2μl,LC Green 0.7μl,上下游引物(10μmol/L)各0.1μl,DNA模板1μl,ddH<sub>2</sub>O补充至10μl。反应条件:95℃预变性5min,然后95℃30s,60℃30s,72℃7s,共35个循环;72℃延伸7min。接着95℃30s,25℃2min;94℃30s,24℃4min。将含PCR产物的96孔板置于LightScanner™ Instrument 96分析仪(美国Idaho Technology公司产品)中。采用高低温内标进行标准化校正,读取各标本基因型。

3. 直接测序法验证基因分型:HRM法分型后各基因型随机抽取5个样本进行第7外显子(共151bp)扩增。测序引物上游:5'-ACCTGC-CACCCCTTCTTTG-3';下游:5'-GCCCA-CAGCCTCTTTACA-3'。反应体系为10×Taq缓冲液5μl,dNTPs(10μmol/L)1μl,上下游引物(20μmol/L)1μl,MgCl<sub>2</sub>(1.5mmol/L)3μl,Taq DNA聚合酶(1U/μl)3μl,DNA模板4μl,ddH<sub>2</sub>O补充至50μl。产物长413bp。反应条件为95℃预变性3min,然后95℃变性30s,60℃退火30s,72℃延伸45s,共35个循环;72℃再延伸10min。产物送北京华大基因研究院测序。

### 三、患者核型分析

所有患者骨髓样本均采用G显带技术判断核型是否正常。所有样本均分析20个分裂象。

### 四、FLT3-ITD突变分析

上游引物:5'-GCAATTTAGGTATGAAAGC-CAGC-3';下游引物:5'-CTTTCAGCATTTTGACG-GCAACC-3'。反应体系:10×Taq缓冲液2.5μl,dNTPs(10μmol/L)0.5μl,上下游引物(20μmol/L)1μl,MgCl<sub>2</sub>(1.5mmol/L)1.5μl,Taq DNA聚合酶(1U/μl)1.5μl,DNA模板2μl,ddH<sub>2</sub>O补充至25μl。反应条件为95℃预变性3min,然后95℃变性30s,60℃退火30s,72℃延伸45s,共35个循环,72℃再延伸10min。产物进行100g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳,凝胶成像系统拍照读取结果。

### 五、统计学处理

采用SPSS17.0软件进行数据分析。对健康对照组该位点基因型采用拟合优度卡方检验进行Hardy-Weinberg遗传平衡检验。AML患者各临床

指标,计量资料采用中位数(极差)形式描述,组间比较采用非参数秩和检验;计数资料率的比较采用卡方检验或Fisher确切概率法。采用Kaplan-Meier法估算患者OS率,Log-rank检验比较组间OS率差异;多因素分析采用Cox比例风险模型。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. WT1 基因rs16754位点基因型分布情况:115例初发AML患者中,GG型59例(51.3%),GA型43例(37.4%),AA型13例(11.3%)。健康对照组GG型94例(53.1%),GA型72(40.7%)例,AA型11(6.2%)例。其中有1例M<sub>3</sub>患者多次采用HRM法分型失败,将其PCR产物送测序。随机抽取的15个样本直接测序结果与HRM法分型结果完全一致。两组间基因型分布差异无统计学意义( $P=0.296$ ),且两组间年龄( $P=0.472$ )、性别( $P=0.596$ )分布差异也无统计学意义,即均衡可比。对照组基因型分布服从Hardy-Weinberg遗传平衡定律( $P=0.938$ )。对于研究人群,rs16754 G为其主要等位基因,该位点基因

型差异与AML发病风险无关。HRM法分型得到的标准化熔解曲线及基因分型图见图1,PCR扩增产物测序图见图2。由于AA基因型人数较少,故将AA、GA型合并起来进行后续分析。

HRM法分型失败的患者(M<sub>3</sub>型)经测序发现其WT1基因第7外显子发生移码突变,突变表现为该多态性位点后2个碱基处插入GCCC 4个碱基(c.1299-1300insGCCC),从而导致翻译提前终止(p.V371P fsX16),产生截短蛋白,导致DNA结合功能域蛋白的缺失(图2D)。该患者多态性位点为杂合型即GA型,患者未达到CR且伴有高白细胞、高乳酸脱氢酶(LDH)、高骨髓原始细胞,生存期仅为1个月。

2. AML患者WT1 rs16754不同基因型间临床指标比较:56例GA/AA型与59例GG型患者在骨髓原始细胞比例上差异有统计学意义( $P=0.025$ )。在年龄、性别、WBC、RBC、HGB、PLT、中性粒细胞计数、LDH水平、WHO2008分型、染色体核型及FLT3-ITD突变上差异均无统计学意义( $P$ 值均 $> 0.05$ )(表1)。

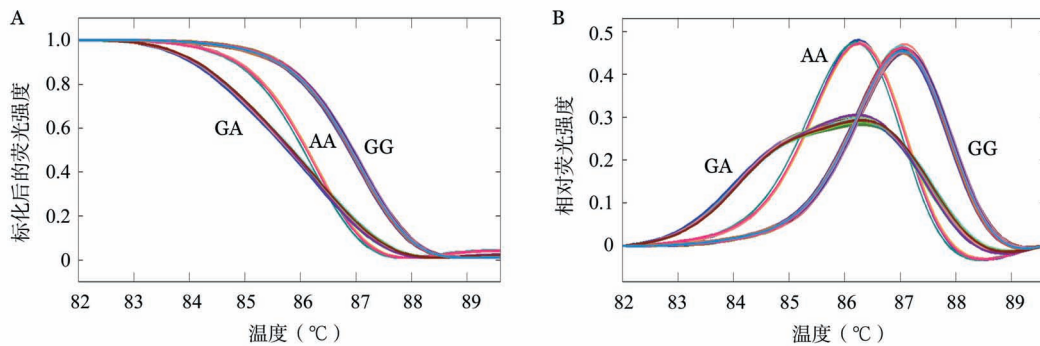
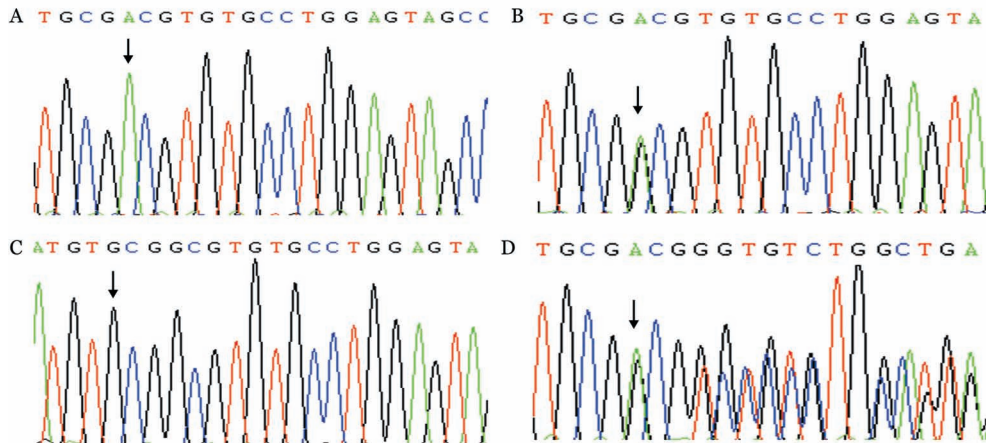


图1 WT1 基因rs16754多态性位点经高低温内校正后的标准化熔解曲线(A)及基因分型图(B)



A、B、C分别为AA、GA、GG基因型(箭头所示为多态性位点);D:GA基因型患者第7外显子移码突变(c.1299-1300insGCCC)(箭头所示为插入起始位置)

图2 WT1 基因rs16754多态性位点基因型测序图

3. AML患者WT1 rs16754不同基因型间化疗反应及生存情况的比较:59例GG型患者化疗后CR 51例(86.4%),56例GA/AA型患者化疗后CR 47例(83.9%),差异无统计学意义( $P=0.704$ )。

115例患者中16例失访,99例获得生存情况数据,其中GA/AA组45例,GG组54例,共有5例患者行移植术,其中异基因造血干细胞移植2例,自体造血干细胞移植2例,微移植1例;GG组3例(5.6%),GA/AA组2例(4.4%),两组间移植率差异无统计学意义( $P=1.000$ )。用Kaplan-Meier法估算患者OS率。经Log-rank检验,两组间OS率差异有统计学意义( $P=0.035$ )(图3)。GG组患者OS率高于GA/AA组患者,提示等位基因A可能是预后的危险因素。利用Cox比例风险模型,对年龄( $\geq 60$ 岁和 $< 60$ 岁)和性别两因素进行校正,结果显示rs16754位点A等位基因是AML患者生存情况的独立预后因素,

GA/AA型患者死亡的风险高于GG型患者( $HR=1.681, 95\% CI 1.046\sim 2.700, P=0.032$ )。

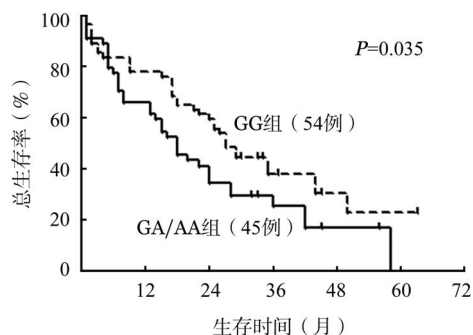


图3 急性髓系白血病患者WT1 rs16754 GA/AA基因型组与GG基因型组生存情况比较

### 讨论

WT1基因位于染色体11p13,由10个外显子组

表1 WT1基因rs16754 GG及GA/AA基因型急性髓系白血病(AML)患者临床指标比较

临床特征	rs16754基因型		P值
	GG(59例)	GA/AA(56例)	
年龄[岁, M(范围)]	46(12~80)	48(13~79)	0.825
性别[例(%)]			0.483
男	32(54.2)	34(60.7)	
女	27(45.8)	22(39.3)	
WBC[ $\times 10^9/L, M$ (范围)]	8.01(0.62~227.99)	6.89(0.44~355.25)	0.823
RBC[ $\times 10^{12}/L, M$ (范围)]	2.29(1.13~4.46)	2.35(1.43~4.74)	0.479
HGB[g/L, M(范围)]	78.30(14.10~138.00)	79.75(48.00~148.00)	0.356
PLT[ $\times 10^9/L, M$ (范围)]	41.90(1.75~302.00)	50.40(2.60~286.00)	0.455
中性粒细胞绝对计数[ $\times 10^9/L, M$ (范围)]	0.93(0~30.00)	0.78(0.01~32.04)	0.737
LDH[U/L, M(范围)]	308.5(80.0~1 427.0)	345.0(9.7~5 901.0)	0.804
骨髓原始细胞[M(范围)]	0.488(0.065~0.930)	0.656(0.100~0.940)	0.028
WHO(2008)分型[例(%)]			0.439
伴有重现性遗传学异常AML			
伴有t(8;21)(q22;q22)	3(5.1)	3(5.4)	
伴有inv(16)(p13q22)	0	2(3.6)	
不做分类的AML			
M <sub>0</sub>	3(5.1)	1(1.8)	
M <sub>1</sub>	1(1.7)	2(3.6)	
M <sub>2</sub>	10(16.9)	5(8.9)	
M <sub>4</sub>	24(40.7)	20(35.7)	
M <sub>5</sub>	13(22.0)	16(28.6)	
M <sub>6</sub>	4(6.8)	4(7.1)	
M <sub>7</sub>	1(1.7)	0	
未知AML	0	3(5.4)	
核型分析[例(%)]			0.357
正常	51(86.4)	49(87.5)	
异常	4(6.8)	7(12.5)	
未做	4(6.8)	0	
FLT3-ITD突变[例(%)]			0.480
是	5(8.5)	7(12.5)	
否	54(91.5)	49(87.5)	



成,长约50 kb,1990年首次被克隆,可以转录出3 kb的mRNA<sup>[7-8]</sup>。外显子1~6编码含有N末端的转录调节结构域,外显子7~10编码含有C末端的锌指结构域(4个)<sup>[8]</sup>。它在泌尿系统及造血系统疾病的发展中扮演重要角色<sup>[9]</sup>。

WT1 rs16754多态性表现为密码子可由CGA替换成CGG<sup>[10]</sup>,后者编码精氨酸是前者的两倍。另外,rs16754能够改变翻译的速率,从而潜在影响蛋白的折叠。WT1 SNP rs16754有两个等位基因:A、G,在亚洲人群中主要等位基因是G,而欧洲人群则为A,表现出明显的种族和地域差异。

在本研究中我们采用HRM法对115例初发AML患者骨髓及177名健康志愿者外周血样本WT1基因rs16754多态性位点进行基因分型,测序法验证分型准确性,结果显示该多态性位点与AML发病风险无关( $P=0.296$ )。将患者分为GA/AA组和GG组,两组在年龄( $P=0.825$ )、性别分布( $P=0.483$ )上差异均无统计学意义。另外,两组各临床指标比较显示在WBC、RBC、HGB、PLT、中性粒细胞计数、LDH水平、WHO(2008)分型及核型情况两组差异均无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ )。FLT3-ITD突变是AML预后不良的一个指标,我们比较了两组FLT3-ITD突变率,结果发现两组间差异无统计学意义( $P=0.357$ )。但GA/AA组骨髓原始细胞比例更高,差异有统计学意义( $P=0.025$ )。

两组患者化疗CR率分别为86.4%和83.9%,差异无统计学意义( $P=0.704$ ),提示该多态性位点与化疗敏感性无关。分析99例AML患者生存情况,GG组患者OS率高于GA/AA组( $P=0.035$ ),提示等位基因A可能是预后的危险因素。用年龄( $\geq 60$ 岁和 $<60$ 岁)和性别两因素进行校正,结果显示rs16754位点A等位基因与AML患者预后有关,GA/AA型患者死亡的风险高于GG型患者( $HR=1.681$ ,95%  $CI$  1.046~2.70, $P=0.032$ )。

中国学者对该多态性位点与AML预后关系的研究不多。早期一项对127例中国初发儿童AML该位点多态性的研究结果显示与WT1 AA、WT1 AG基因型患者相比,WT1 GG基因型患者OS和无复发生存(RFS)率明显提高<sup>[5]</sup>。Luo等<sup>[6]</sup>对112例成人AML(非M<sub>3</sub>)患者的研究得出WT1 GG基因型及WT1低mRNA表达提示更好的OS及无病生存。随后中南大学湘雅医院Zhang等<sup>[3]</sup>对中国南部地区205例初发AML患者及188名健康志愿者rs16754多态性位点与AML发病风险及预后关系的研究发

现G为主要等位基因且与发病风险无关,相比WT1 GG基因型,WT1 GA、AA基因型患者mRNA表达量较低,提示好的预后,有更长的OS和RFS时间,尤其在老年患者组。本研究结果与Zhang等<sup>[3]</sup>的研究结果相似。

该多态性位点影响预后的可能机制不清,可能与药物的敏感性相关,另外,WT1 SNP的次等位基因A可能与其他基因的SNP有关联(如存在连锁不平衡现象),而这些基因影响药物敏感性或机制,可能会改变那些决定AML良好预后的基因的功能。

综上所述,WT1 rs16754位点多态性与AML患者预后相关,A等位基因是一个独立的预后因子。由于样本量及随访时间等因素限制以及AML各亚型的异质性,其作用机制及对预后的影响尚需进一步研究和验证。

#### 参考文献

- [1] de Jonge HJ, Huls G, de Bont ES. Gene expression profiling in acute myeloid leukaemia[J]. Neth J Med, 2011, 69(4):167-176.
- [2] Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia [J]. N Engl J Med, 1999, 341(14):1051-1062. doi: 10.1056/NEJM199909303411407.
- [3] Zhang DY, Yan H, Cao S, et al. Wilms Tumor 1 rs16754 predicts favorable clinical outcomes for acute myeloid leukemia patients in South Chinese population[J]. Leuk Res, 2015, 39(6): 568-574. doi: 10.1016/j.leukres.2015.03.005.
- [4] Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations [J]. Nature, 2010, 467(7311):52-58. doi: 10.1038/nature09298.
- [5] Chen X, Yang Y, Huang Y, et al. WT1 mutations and single nucleotide polymorphism rs16754 analysis of patients with pediatric acute myeloid leukemia in a Chinese population [J]. Leuk Lymphoma, 2012, 53(11):2195-2204. doi: 10.3109/10428194.2012.685732.
- [6] Luo S, Yu K, Yan QX, et al. Analysis of WT1 mutations, expression levels and single nucleotide polymorphism rs16754 in de novo non-M3 acute myeloid leukemia [J]. Leuk Lymphoma, 2014, 55(2):349-357. doi: 10.3109/10428194.2013.791985.
- [7] Call KM, Glaser T, Ito CY, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus[J]. Cell, 1990, 60(3):509-520.
- [8] Scott RH, Murray A, Baskcomb L, et al. Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis[J]. Oncotarget, 2012, 3(3):327-335. doi: 10.18632/oncotarget.468.
- [9] Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT1 proteins: functions in growth and differentiation[J]. Gene, 2001, 273(2): 141-161.
- [10] Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15:R196-R201.

(收稿日期:2016-03-26)

(本文编辑:王叶青)