

高通量测序检测酪氨酸激酶抑制剂耐药的慢性髓性白血病患者82种血液肿瘤相关基因突变

赵慧芳¹ 张奕莉¹ 吕晓东¹ 郭珍¹ 杨静宜² 李珍¹ 祖璿玲¹ 周健¹ 喻凤宽¹
宋永平¹

¹郑州大学附属肿瘤医院、河南省肿瘤医院 450008; ²中国科学院北京基因组研究所
100101

通信作者:宋永平, Email: songyongping001@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.10.015

High throughput sequencing for detection of 82 kinds of hematologic malignancy related gene mutations in patients with chronic myeloid leukemia resistant to tyrosine kinase inhibitors

Zhao Hui Fang¹, Zhang Yanli¹, Lyu Xiaodong¹, Guo Zhen¹, Yang Jingyi², Li Zhen¹, Zu Yingling¹, Zhou Jian¹, Yu Fengkuan¹, Song Yongping¹

¹Department of Hematology, Henan Cancer Hospital, the Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China; ²Beijing Institute of Genome, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Corresponding author: Song Yongping, Email: songyongping001@126.com

尽管酪氨酸激酶抑制剂(TKI)治疗使得慢性髓性白血病慢性期(CML-CP)患者的总生存时间接近正常同龄人群,但治疗期间约三分之一的患者对TKI产生耐药^[1],治疗失败的CML-CP患者最终将进展至急变期(BP),而CML-BP患者的生存期仅6~10个月,预后极差^[2]。已知ABL1激酶区突变是导致TKI耐药的主要原因之一。然而,约50%的TKI耐药CML患者检测不到ABL1激酶区突变^[3]。ABL1激酶区突变阴性的TKI耐药CML患者的治疗选择仍是困扰临床医师的难题。国外学者研究显示非ABL1基因突变在CML TKI耐药和疾病进展过程发挥重要作用^[4-6]。国内尚未见类似报道。本中心应用高通量靶向测序法对28例TKI耐药的CML患者进行涵盖82种血液肿瘤相关基因的突变检测,现总结如下。

病例与方法

1. 病例资料:以2017年3月至2018年9月于河南省肿瘤医院就诊的28例TKI耐药的CML患者为研究对象。高通量测序检测82种血液肿瘤相关基因,同时应用Sanger测序进行ABL1激酶区突变检测。TKI耐药定义参考文献^[7]。

2. ABL1激酶区突变的检测:利用巢式PCR对ABL1激酶区进行突变检测,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后,利用Sanger测序仪对PCR产物进行测序,检测ABL1激酶区突变情况。

3. 高通量测序:DNA提取试剂盒(美国Genra公司产品)抽取基因组DNA。验证DNA浓度和纯度后将基因组

DNA样品稀释至50 ng/μl。取样品基因组DNA 12 ng,按照Ion AmpliSeq文库试剂盒标准建库流程构建文库;采用AMPure XP磁珠纯化文库,去除小片段,并通过PCR扩增文库。采用赛默飞世尔科技(中国)有限公司的S5系统进行高通量DNA测序,IGV软件分析结果。数据读取时选择外显子上的基因突变。平均基因覆盖率大于99%,平均测序深度为2 000×,检测灵敏度3%~5%。参照文献^[8]对所测82种血液肿瘤相关靶基因进行功能分类:①表观遗传相关基因:ASXL1、TET2、WT1、IDH1、IDH2、DNMT3A、SETBP1、EZH2、EP300、ATRX、PAX5;②转录调节基因:RUNX1、GATA2、IKZF1、CREBBP、BCOR、PHF6、CEBPA;③信号传导相关基因:KRAS、NRAS、JAK2、JAK1、JAK3、PTPN11、SH2B3、CBL、KIT、FLT3、PTEN、IL7R、MYD88、NOTCH1、NOTCH2、CSF3R、CCND1、BRAF、CALR、MPL、PIK3CA、ROBO1、ROBO2、STAT3、ID3;④RNA剪接子相关基因:U2AF1、SF3B1、SRSF2、RZR2;⑤黏连蛋白复合体基因:RAD21、SMC1A、SMC3、STAG2;⑥肿瘤抑制相关基因:TP53、TNFAIP3、ETV6;⑦细胞凋亡相关基因:BIRC3、BCL2、NPM1;⑧其他功能相关的基因:MLH1、CSF1R、CRLF2、ABCB1、FBXW7、CDKN2A、AKT3、CARD11、CD79B、DIS3、DNAH9、FAM5C、GSTP1、MAP2K1、MEF2B、NF2、NQO1、NT5C2、PML、RHOA、STAT5B、TERC、TERT、SMAD4、TTN。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。

4. 统计学处理:采用SPSS17.0软件进行分析。分类变

量以例数(构成比)表示,采用 Fisher 确切概率法进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 高通量测序检测时 28 例 TKI 耐药 CML 患者的临床特征:28 例 TKI 耐药 CML 患者,包括 13 例 TKI 耐药但仍处于 CP 的患者和 15 例进展至加速期(AP)或 BP 的 TKI 耐药患者,其中 AP 5 例,BP 10 例(急髓变 6 例和急淋变 4 例)。男 21 例,女 7 例,中位年龄 43(12~69)岁。13 例 CML-CP 患者,TKI 治疗至首次耐药的中间时间为 6(3~16)个月,15 例进展期患者,TKI 治疗至 AP 或 BP 的中位时间为 23(3~60)个月。

2. 28 例 TKI 耐药 CML 患者非 ABL1 基因突变特点:57.1%(16/28)的 TKI 耐药 CML 患者检出非 ABL1 基因突变,其中 62.5%(10/16)检出一种基因突变,37.5%(6/16)检出 ≥ 2 种基因突变,其中 4 例检出 2 种基因突变、1 例检出 3 种基因突变、1 例检出 5 种基因突变。按基因功能分类和出现频次依次为:表观遗传学相关基因占 42.3%(11/26),包括 TET2、ASXL1、WT1、ATRX、IDH2;转录调节相关基因占 19.2%(5/26),包括 RUNX1、GATA2;信号转导通路相关基因占 15.4%(4/26),包括 PTPN11、JAK2、CSF1R、KRAS;肿瘤抑制基因占 15.4%(4/26),包括 TNFAIP3、MLH1;RNA 剪接子相关基因占 3.8%(1/26):U2AF1;黏连蛋白复合体基因占 3.8%(1/26):RAD21。

28 例 TKI 耐药 CML 患者共检出 15 种非 ABL1 基因型。出现频率较高的基因型依次为:TET2 占 17.9%(5/28)、RUNX1 占 14.3%(4/28)、ASXL1 占 10.7%(3/28)、TNFAIP3 占 10.7%(3/28),以上四种突变在 CP 和进展期均可出现。WT1、U2AF1、JAK2、KRAS、GATA2、IDH2、RAD21、PTPN11、MLH1、ATRX、CSF1R 检出率均为 3.6%,除 CSF1R 外其他基因仅在 BP 中出现,其中 RAD21 和 U2AF1 突变在 2 例髓外急变患者中检出。

3. 不同疾病分期 CML 患者非 ABL1 基因突变和 ABL1 激酶区突变表达情况:13 例 TKI 耐药 CP 患者,非 ABL1 基因突变检出率为 38.5%(5/13),其中 20.0%(1/5)为 2 种非 ABL1 基因突变。ABL1 激酶区突变检出率为 7.7%(1/13)。7.7%(1/13)的 CP 患者同时检出非 ABL1 基因突变和 ABL1

激酶区突变。5 例检出非 ABL1 基因突变的 CML-CP 患者的基因突变情况见表 1。15 例进展期 CML 患者,非 ABL1 基因突变检出率为 73.3%(11/15),其中 45.5%(5/11)检出 ≥ 2 种非 ABL1 基因突变。ABL1 激酶区突变检出率为 46.7%(7/15),包括 T315I、E255K/V、Y253H、M244V、D276G、F359V 突变。60.0%(3/5)的 AP 患者和 80.0%(8/10)的 BP 患者同时检出非 ABL1 基因突变和 ABL1 激酶区突变。进展期患者 ABL1 激酶区突变的检出率显著高于 CP 患者($P = 0.017$),非 ABL1 基因突变检出率显著高于 CP 患者($P = 0.039$),进展期 ≥ 2 种非 ABL1 基因突变的检出率高于 CP 患者,但差异无统计学意义($P = 0.315$)。15 例进展期 CML 患者基因突变情况见表 2。

讨 论

二代基因测序技术的广泛应用,进一步揭示了恶性血液病的发生、发展以及耐药的分子机制。近来,多个研究中心应用全外显子测序技术在 TKI 耐药的 CML-CP 和进展期以及初诊 CML 患者中均检出不同比例的非 ABL1 基因突变,其中以表观遗传学和转录调节相关基因突变较常见^[4-6]。本研究对 28 例 TKI 耐药 CML 患者检测 ABL1 基因之外的 82 种其他血液肿瘤相关热点基因,结果显示:非 ABL1 基因突变检出率为 57.1%(16/28),16 例患者共检出 15 种基因型,62.5%(10/16)的患者检出一种基因突变,37.5%(6/16)的患者检出 ≥ 2 种基因突变,以表观遗传学相关基因检出率最高,其次为转录调节相关基因、信号转导通路相关基因、肿瘤抑制基因、RNA 剪接因子相关基因和黏连蛋白复合体基因比例较低。所涉及的非 ABL1 基因功能分类同文献^[4-6]报道一致。TET2、RUNX1、ASXL1、TNFAIP3 基因突变在 CML-CP 和进展期患者中均有出现。而 WT1、U2AF1、JAK2、KRAS、GATA2、IDH2、RAD21、PTPN11、MLH1、ATRX 仅在 BP 患者中检出,高频突变型的排序同 Soverini 等^[9]和 Grossmann 等^[10]报道类似,但仍存在一些差异,本研究中 TNFAIP3(肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3)出现频率较文献报道高,2 例髓外急变患者分别检出 RAD21 和 U2AF1 突变,追溯差异原因可能与不同研究中检测的热点基因的范围存在差异有关,本研究涵盖了 82 种血液肿瘤相关基因。

表 1 5 例检出非 ABL1 基因突变慢性髓性白血病慢性期患者的基因突变情况

例号	性别	年龄(岁)	ABL1 激酶区突变	非 ABL1 基因突变	外显子	氨基酸变化	核苷酸变化	等位基因变异频率 (%)
2	男	40	-	CSF1R	22	p.Gly936Ser	c.2806G>A	46.6
				TET2	11	p.Ile1762Val	c.5284A>G	52.6
4	女	64	-	TNFAIP3	2	p.Ala2Pro	c.4G>C	23.9
5	女	69	T315I	TET2	11	p.Ile1762Val	c.5284A>G	49.0
25	女	60	-	RUNX1	5	p.S141L	c.C4227	15.7
26	男	45	-	ASXL1	12	p.Q695X	c.2083C>T	8.1

注:-:阴性

表2 15例进展期慢性髓性白血病患者基因突变情况

例号	性别	年龄(岁)	疾病分期	ABL1 激酶区突变	非 ABL1 基因突变	外显子	氨基酸变化	核苷酸变化	等位基因变异频率(%)
1	男	31	AP	T315I	ASXL1	12	p.Asp855fs	c.2562_2563insTT	48.5
3	女	47	AP	-	-	-	-	-	-
22	男	27	AP	T315I	-	-	-	-	-
23	男	69	AP	T315I	TET2	6	p.Arg1261His	c.3782G>A	11.5
27	男	65	AP	T315I、E255V	ASXL1	13	p.Glu705Ter	c.2113G>T	49.8
17	男	28	急髓变(髓外)	-	TNFAIP3	7	p.Ser544Gly	c.1660A>G	49.0
6	女	57	急淋变	-	RAD21	2	p.Cys35Gly	c.103T>G	30.1
9	女	53	急淋变	-	TET2	3	p.Asn36Ser	c.107A>G	49.0
					JAK2	7	p.Tyr266Ser	c.797A>C	9.7
15	男	43	急淋变	-	RUNX1	6	p.Arg204Ter	c.610C>T	41.2
					ATRX	9	p.Asp766Gly	c.2297A>G	49.1
19	女	12	急淋变	-	TNFAIP3	3	p.Asn102Ser	c.305A>G	55.2
8	男	52	急髓变	M244V、E255K/V、D276G	PTPN11	3	p.Asn58Tyr	c.172A>T	13.9
					RUNX1	5	p.Asn146_Thr148dup	c.436_444dupAATGCTACC	29.7
10	男	69	急髓变	-	MLH1	12	p.Lys461Glu	c.1381A>G	50.6
					-	-	-	-	-
12	男	40	急髓变(髓外)	-	U2AF1	2	p.Ser34Phe	c.101C>T	31.6
21	男	23	急髓变	F359V	WT1	1	p.Pro210GlnfsTer34	c.629_639delCCGCTATTTCGC	21.6
					-	-	-	-	-
28	女	42	急髓变	Y253H	TET2	11	p.Ile1762Val	c.5284A>G	98.3
					GATA2	4	p.Leu321Phe	c.961C>T	46.6
					KRAS	2	p.Gly12Asp	c.35G>A	42.0
					RUNX1	8	p.Arg320Ter	c.958C>T	40.6
-	-	-	-	IDH2	8	p.Val351fs	c.1050_1051insT	30.5	

注: AP:加速期; -:阴性

研究显示 CML TKI 耐药和疾病进展可伴有不同程度的体细胞突变及异常基因的累积,且随着疾病进程的演化,突变率呈上升趋势,据报道 CML-BP 患者的非 ABL1 基因突变率可达 76.9%^[9-11]。Kim 等^[5]对 13 例 TKI 治疗失败但 ABL1 激酶区突变阴性的 CML 患者进行全外显子测序,结果 6 例患者检出 ABL1、ASXL1、DNMT3A、IDH1、SETBP1、TP63 突变。该研究者在 100 例 TKI 治疗反应不同的 CML 患者中,应用深度靶向测序法对以上基因进行验证。结果显示疾病进展组、耐药 CP 组、治疗反应良好组的突变检出率分别为 88% (7/8)、28% (5/18)、8.1% (6/74),疾病进展组的中位突变个数较无进展组明显升高(14.5 对 2)。Branford 等^[12]对 46 例 TKI 治疗反应两极分化的 CML 患者分别检测肿瘤相关基因突变,数据显示,进展期患者的肿瘤相关基因突变显著高于获主要分子学反应(MMR)患者(56% 对 16%, $P=0.007$)。本研究中,进展期 CML 患者的非 ABL1 基因突变率和 ABL1 激酶区突变率均显著高于耐药 CML-CP 患者(73.3% 对 38.5%, $P=0.039$;46.7% 对 7.7%, $P=0.017$),同文献报道一

致。但本研究仅涉及 TKI 耐药的 CML 患者,缺乏与 TKI 治疗反应良好组患者的对照研究,将在下一步研究中增加 TKI 治疗反应良好组作为对照队列,以及对比耐药或疾病进展前后突变结果,进一步追踪非 ABL1 基因突变和 ABL1 激酶区突变获得的先后顺序及其与疾病特定阶段的关系。

近来,随着血液肿瘤相关热点基因在 CML 中的研究,研究者发现伴 ASXL1 突变的 CP 患者较无 ASXL1 突变者进展至 BP 的中位时间显著延长(21 个月对 4.5 个月, $P=0.037$)^[12]。本研究 3 例伴 ASXL1 突变患者,分别随访 4、9、11 个月,无一例进展至 BP。有研究者认为转录因子 RUNX1 是导致 CML TKI 耐药和疾病进展的独立影响因素^[10]。Zhao 等^[13]在小鼠模型中发现 BCR-ABL1 和 RUNX1 突变共表达可诱导 CML-BP 样疾病,提示 RUNX1 突变可导致 CML 疾病进展。本研究 4 例伴 RUNX1 突变者,3 例(75%)发生急变。去甲基化药物在伴 TET2 突变而无 ASXL1 突变的骨髓增生异常综合征患者显示较好疗效^[14]。Amabile 等^[15]在小鼠模型中证实阿扎胞苷(DNA 甲基转移酶抑制剂)同样可延长 CML

的生存。Gallipoli 等^[16]研究显示尼洛替尼联合芦可替尼(JAK2/STAT5 抑制剂)可在体内外清除原代 CML 干细胞。Jia 等^[17]在小鼠模型中发现 miR-17-92 可通过抑制 TNFAIP3 表达,进而导致 NF- κ B 信号通路激活,最终诱发 CML,未来 miR-17-92 亦有望成为治疗 CML 的新靶点。

总之,随着基因测序检测深度的提高和检测范围的扩大,越来越多的肿瘤耐药相关分子机制被揭示,为肿瘤的精准治疗提供更多潜在靶点。本组 TKI 耐药 CML 患者中检出较高比例的 TET2、ASXL1、RUNX1、TNFAIP3 突变,为 TKI 耐药和进展期 CML 患者联合其他非 TKI 分子靶向药物治疗提供新的分子靶点,为未来耐药 CML 的多靶点联合治疗开启新的征程。

参考文献

- [1] Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, et al. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369 (19):1783- 1796. DOI: 10.1056/NEJMoa1306494.
- [2] Chen Z, Cortes JE, Jorgensen JL, et al. Differential impact of additional chromosomal abnormalities in myeloid vs lymphoid blast phase of chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy [J]. *Leukemia*, 2016, 30 (7): 1606-1609. DOI: 10.1038/leu.2016.6.
- [3] Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, et al. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate[J]. *Leukemia*, 2006, 20(10): 1767-1773. DOI: 10.1038/sj.leu.2404318.
- [4] Togasaki E, Takeda J, Yoshida K, et al. Frequent somatic mutations in epigenetic regulators in newly diagnosed chronic myeloid leukemia [J]. *Blood Cancer J*, 2017, 7 (4):559. DOI: 10.1038/bcj.2017.36.
- [5] Kim T, Tyndel MS, Zhang Z, et al. Exome sequencing reveals DNMT3A and ASXL1 variants associate with progression of chronic myeloid leukemia after tyrosine kinase inhibitor therapy [J]. *Leuk Res*, 2017, 59: 142- 148. DOI: 10.1016/j.leukres.2017.06.009.
- [6] Makishima H, Jankowska AM, McDevitt MA, et al. CBL, CBLB, TET2, ASXL1, and IDH1/2 mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia [J]. *Blood*, 2011, 117 (21): 198- 206. DOI: 10.1182/blood-2010-06-292433.
- [7] 中华医学会血液学分会. 中国慢性髓性白血病诊断与治疗指南(2016年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(8): 633-639. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.08.001.
- [8] Gill H, Leung AY, Kwong YL. Molecular and Cellular Mechanisms of Myelodysplastic Syndrome: Implications on Targeted Therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (4): 440. DOI: 10.3390/ijms17040440.
- [9] Soverini S, de Benedittis C, Mancini M, et al. Mutations in the BCR-ABL1 kinase domain and elsewhere in chronic myeloid leukemia [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2015, Suppl: S120-128. DOI:10.1016/j.clml.2015.02.035.
- [10] Grossmann V, Kohlmann A, Zenger M, et al. A deep-sequencing study of chronic myeloid leukemia patients in blast crisis (BC-CML) detects mutations in 76.9% of cases [J]. *Leukemia*, 2011, 25(3): 557-560. DOI:10.1038/leu.2010.298.
- [11] Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, et al. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(7):2254-2264. DOI: 10.1172/JCI41246.
- [12] Branford S, Wang P, Yeung DT, et al. Integrative genomic analysis reveals cancer-associated mutations at diagnosis of CML in patients with high-risk disease [J]. *Blood*, 2018, 132(9): 948-961. DOI: 10.1182/blood-2018-02-832253.
- [13] Zhao LJ, Wang YY, Li G, et al. Functional features of RUNX1 mutants in acute transformation of chronic myeloid leukemia and their contribution to inducing murine full-blown leukemia [J]. *Blood*, 2012, 119 (12): 2873-2882. DOI: 10.1182/blood-2011-08-370981.
- [14] Bejar R, Lord A, Stevenson K, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients [J]. *Blood*, 2014, 124 (17): 2705-2712. DOI: 10.1182/blood-2014-06-582809.
- [15] Amabile G, Di RA, Müller F, et al. Dissecting the role of aberrant DNA methylation in human leukaemia [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:7091. DOI: 10.1038/ncomms8091.
- [16] Gallipoli P, Cook A, Rhodes S, et al. JAK2/STAT5 inhibition by nilotinib with ruxolitinib contributes to the elimination of CML CD34+ cells in vitro and in vivo [J]. *Blood*, 2014, 124(9):1492-1501. DOI: 10.1182/blood-2013-12-545640.
- [17] Jia Q, Sun H, Xiao F, et al. miR-17-92 promotes leukemogenesis in chronic myeloid leukemia via targeting A20 and activation of NF- κ B signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 487(4):868-874. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.04.144.

(收稿日期:2019-04-08)

(本文编辑:王叶青)