

## 慢性髓性白血病患者CD34<sup>+</sup>细胞 BCR-ABL融合基因的检测意义

马轶轩 王璐 米瑞华 王献伟 吕晓东 范瑞华 魏旭东

**Significance of BCR-ABL fusion gene detection in CD34<sup>+</sup> cells of chronic myelogenous leukemia patients** Ma Yixuan, Wang Lu, Mi Ruihua, Wang Xianwei, Lyu Xiaodong, Fan Ruihua, Wei Xudong

Corresponding author: Wei Xudong, Department of Hematology, the Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University; Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China. Email: weixudong63@126.com

慢性髓性白血病(CML)是一种起源于造血干细胞的恶性克隆性疾病<sup>[1]</sup>。其特征性标志是Ph染色体及BCR-ABL融合基因。酪氨酸激酶抑制剂(TKI)作为CML患者靶向治疗药物,极大程度提高了CML患者的临床疗效,现已成为CML临床一线治疗药物<sup>[2]</sup>。但是,长期服用TKI仍存在血液学和非血液学不良反应、TKI耐药以及经济负担重等问题。因此,如何安全停药以及安全停药的标准成为目前研究的热点。我们检测32例CML患者CD34<sup>+</sup>细胞内BCR-ABL融合基因转录水平,初步探讨其与CML疾病状态的关系。

### 病例与方法

1. 病例来源:我院2014年9月至2016年10月收治的32例CML患者,诊断标准均符合文献[2]。中位TKI治疗时间38(24~68)个月,疗效评价达完全分子学反应(CMR),获得CMR中位时间为12(9~15)个月,疗效评价参照文献[2]标准。其中男21例,女11例,中位年龄45(20~60)岁。本试验经我院伦理委员会批准,所有患者均知情并签署知情同意书。

2. 主要试剂及仪器:人CD34<sup>+</sup>细胞分选磁珠、autoMACS Running Buffer、QuadroMACS分选器、MACS LS细胞分选柱均为德国美天旎生物技术有限公司产品;OMEGA Micro Elute总RNA提取试剂盒为美国Omega Bio-Tek公司产品;ABI 7500实时荧光定量PCR仪为美国应用生物系统公司产品;BD FACSCalibur全自动多色分析流式细胞仪系统为美

国BD公司产品;紫外分光光度计购自GE医疗集团。

3. 免疫磁珠法提纯CD34<sup>+</sup>细胞:取已达CMR的CML患者新鲜骨髓8 ml,加入肝素液2 ml抗凝,应用红细胞裂解液分离单个核细胞。计数单个核细胞,加入相应剂量的FcR Blocking Reagent以及CD34<sup>+</sup>细胞分选磁珠,孵育30 min后,洗脱未结合的磁珠抗体。加入3 ml缓冲液吹打混匀后过分离柱。细胞悬液全部通过分离柱后,将分离柱移出磁场,加入3 ml缓冲液,迅速加入新的15 ml离心管。离心后弃上清液得到CD34<sup>+</sup>细胞,分离少量细胞,采用流式细胞术测定CD34<sup>+</sup>细胞纯度。

4. RT-PCR技术检测BCR-ABL融合基因:应用OMEGA Micro Elute总RNA提取试剂盒提取CD34<sup>+</sup>细胞内的RNA,严格按照说明书操作,并采用分光光度法测定RNA纯度及浓度,取吸光度(A)<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>≥1.80为合格样品。将提取的RNA置于-80℃冰箱保存。

利用反转录试剂盒将获得的RNA进行反转录获得模板链cDNA,以cDNA为模板,利用PCR试剂盒完成PCR。相关引物序列及探针选择按照Beillard等<sup>[3]</sup>报道的方法设计并合成。按照秦亚涛等<sup>[4]</sup>报道的方案在ABI prism 7500 PCR系统中进行BCR-ABL转录本水平检测。根据标准曲线分别计算标本中ABL及BCR-ABL的拷贝数,如果ABL拷贝数≥3×10<sup>4</sup>,即认为该标本合格。按照以下公式计算BCR-ABL水平:BCR-ABL水平(%)=(BCR-ABL拷贝数/ABL拷贝数)×100%。

5. 观察指标:观察患者CD34<sup>+</sup>细胞内BCR-ABL转录本的水平、TKI治疗时间、获得CMR时间、检测时间、附加染色体异常、疾病状态及治疗情况等。

### 结 果

32例患者均未发现附加染色体异常。口服伊马替尼27例,伊马替尼转达沙替尼3例,伊马替尼转尼洛替尼2例,转换时间及转换原因见表1。32例患者中CD34<sup>+</sup>细胞BCR-ABL阳性12例(37.5%),阴性20例(62.5%)。阳性患者中,男7例,女5例,中位年龄42(20~60)岁,中位TKI治疗时间31(26~40)个月,阳性患者CD34<sup>+</sup>细胞内BCR-ABL转录本水平在0.002%~0.510%,口服TKI获得CMR中位时间为9(9~15)个月,检测CD34<sup>+</sup>细胞内BCR-ABL转录本中位时间为获得CMR后的19(5~30)个月,其中口服伊马替尼11例,伊马替尼转尼洛替尼1例。阴性患者中,男14例,女6例,中位年龄45(23~64)岁,中位TKI治疗时间44(24~68)个月,口服

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.02.016

基金项目:国家自然科学基金(81170520)

作者单位:450008 郑州大学附属肿瘤医院(河南省肿瘤医院)血液科

通信作者:魏旭东, Email: weixudong63@126.com

TKI获得CMR的中位时间为12(9~15)个月,检测CD34<sup>+</sup>细胞内BCR-ABL转录本中位时间为获得CMR后的26(3~47)个月,其中口服伊马替尼16例,伊马替尼转达沙替尼3例,伊马替尼转尼洛替尼1例。截止到随访结束,所有患者均继续口服TKI治疗,且均维持CMR状态。所有患者基本情况见表1。

## 讨 论

CML是骨髓造血干细胞克隆性增殖形成的恶性肿瘤,占成人白血病的15%<sup>[1]</sup>。以伊马替尼为代表的多种TKI作为一线治疗药物使CML患者的10年生存率达85%~

90%<sup>[2]</sup>。然而,长期应用TKI仍存在血液学及非血液学不良反应、耐药、经济负担重及对妊娠的影响等相关问题。因此,如何安全停药以及安全停药的标准成为目前研究的热点。

2010年Mahon等<sup>[5]</sup>进行了一项旨在探索安全地停止应用伊马替尼的临床试验。他们选取了应用伊马替尼治疗2年以上并达CMR的患者,停止应用伊马替尼后,定期监测这些患者BCR-ABL转录本水平,评估疾病状态。随访1年后发现复发率高达61%。并且在复发的患者中,有95%的患者在停药的前6个月内出现复发。同时后续进行的一系列相关的TKI停药试验所报道的分子学复发率为44%~71%,并

表1 32例慢性髓性白血病患者的基本情况

例号	性别	年龄(岁)	骨髓或外周血BCR-ABL水平	CD34 <sup>+</sup> 细胞BCR-ABL水平(%)	TKI类别	应用TKI时间(月)	获得CMR时间	CD34 <sup>+</sup> 细胞BCR-ABL融合基因检测时间(月) <sup>a</sup>	更换TKI原因及时间
1	男	42	-	0.070	尼洛替尼	26	更换尼洛替尼后9个月	5	伊马替尼及达沙替尼不耐受,12个月
2	男	44	-	0.070	伊马替尼	28	9个月	17	
3	男	57	-	-	伊马替尼	30	12个月	18	
4	男	59	-	-	伊马替尼	38	12个月	26	
5	男	37	-	-	伊马替尼	38	12个月	26	
6	男	45	-	-	尼洛替尼	27	更换尼洛替尼后12个月	3	伊马替尼疗效差,12个月
7	女	23	-	-	伊马替尼	31	12个月	19	
8	女	24	-	-	伊马替尼	24	12个月	12	
9	女	20	-	0.040	伊马替尼	31	9个月	22	
10	女	28	-	0.510	伊马替尼	39	9个月	30	
11	男	41	-	-	伊马替尼	45	15个月	30	
12	男	55	-	-	伊马替尼	45	12个月	37	
13	男	30	-	-	伊马替尼	40	12个月	28	
14	男	35	-	-	达沙替尼	40	更换达沙替尼后12个月	10	出现E225K突变,18个月
15	女	60	-	0.022	伊马替尼	28	9个月	19	
16	女	58	-	0.016	伊马替尼	40	12个月	28	
17	男	27	-	-	伊马替尼	49	12个月	37	
18	男	29	-	-	伊马替尼	56	9个月	47	
19	男	37	-	0.036	伊马替尼	27	9个月	18	
20	男	46	-	0.210	伊马替尼	26	15个月	11	
21	男	43	-	0.002	伊马替尼	36	9个月	27	
22	男	49	-	0.003	伊马替尼	33	12个月	21	
23	女	45	-	-	达沙替尼	64	更换达沙替尼后12个月	14	伊马替尼治疗后失去CMR,30个月
24	女	27	-	-	达沙替尼	68	更换达沙替尼后12个月	3	伊马替尼治疗后失去CMR,43个月
25	女	39	-	-	伊马替尼	50	9个月	41	
26	女	45	-	-	伊马替尼	48	12个月	36	
27	男	60	-	-	伊马替尼	32	9个月	23	
28	男	57	-	-	伊马替尼	36	12个月	24	
29	男	54	-	-	伊马替尼	44	12个月	32	
30	女	45	-	0.030	伊马替尼	35	9个月	26	
31	男	64	-	-	伊马替尼	45	12个月	33	
32	男	46	-	0.007	伊马替尼	31	12个月	19	

注:TKI:酪氨酸激酶抑制剂;CMR:完全分子学反应;<sup>a</sup>指CMR后的时间;-:低于最低检测极限;我中心BCR-ABL转换系数为0.81

且有少量患者甚至进入加速或急变期<sup>[6-11]</sup>。这些研究表明,即使获得CMR的CML患者,停止应用TKI的风险也是很高的。

那么,在已经获得CMR的患者中,导致疾病复发的根源究竟在哪里?2011年,Chomel等<sup>[12]</sup>提纯CML患者骨髓液中CD34<sup>+</sup>细胞,并进行体外培养,随后在这些细胞中检测出了BCR-ABL融合基因的表达。这项试验提示在CML患者的干细胞中也存在BCR-ABL的复制和表达,而导致疾病复发的原因可能就在于这些干细胞,因此监测干细胞的BCR-ABL表达水平可以更准确地了解疾病的真实状态。随后van Kooten Niekerk等<sup>[13]</sup>收集了17例应用TKI治疗后达CMR的CML患者的新鲜骨髓液,经流式细胞术分选出CD34<sup>+</sup>细胞,通过iFISH及RT-PCR方法分别检测干细胞BCR-ABL融合基因的表达水平,其阳性率分别为41%和21%。

我们采用免疫磁珠法提纯CD34<sup>+</sup>细胞,提取RNA后应用RT-PCR技术检测BCR-ABL转录本水平,此方法提纯CD34<sup>+</sup>细胞简便快捷,且获得的干细胞纯度高,无杂质细胞干扰。32例患者中,BCR-ABL转录本阳性占37.5%,高于van Kooten Niekerk等报道的21%阳性率。从实验结果可以看出,即使获得CMR的患者,部分患者的CD34<sup>+</sup>细胞中仍可检测出BCR-ABL融合基因的转录,需要口服TKI治疗。同时部分因初始伊马替尼疗效差或出现基因突变而更换药物的患者,仍可获得CD34<sup>+</sup>细胞内BCR-ABL融合基因转录阴性,提示这些患者有机会安全停药。但是目前检测病例数较少,且尚未对阳性患者进行动态监测,无法明确患者CD34<sup>+</sup>细胞内融合基因水平与疾病状态及停药的关系。因此,仍需扩大病例、增加检测次数、延长随访时间,以明确CD34<sup>+</sup>细胞内BCR-ABL融合基因与CML疾病状态的真正关系。

### 参考文献

- [1] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Chronic Myelogenous Leukemia, V.1.2016. [http://www.nccn.org/pmfessionals/physician\\_gls/f-guidelines.asp#cml](http://www.nccn.org/pmfessionals/physician_gls/f-guidelines.asp#cml).
- [2] 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(2013年版)[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(5):464-470. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.05.021.
- [3] Beillard E, Pallisaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program [J]. *Leukemia*, 2003, 17(12): 2474-2486. DOI: 10.1038/sj.leu.2403136.
- [4] 秦亚涛, 李金兰, 主鸿鹄, 等. 实时定量RT-PCR监测慢性粒细胞白血病患者造血干细胞移植后 bcr-abl mRNA 水平 [J]. 中华血液学杂志, 2006, 27(8):511-514.
- [5] Mahon FX, Réa D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(11):1029-1035. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70233-3.
- [6] Ross DM, Branford S, Seymour JF, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study [J]. *Blood*, 2013, 122(4):515-522. DOI: 10.1182/blood-2013-02-483750.
- [7] Matsuki E, Ono Y, Tonegawa K, et al. Detailed investigation on characteristics of Japanese patients with chronic phase CML who achieved a durable CMR after discontinuation of imatinib - an updated result of the Keio STIM study [J]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2012, 120(21):2788.
- [8] Yhim HY, Lee NR, Song EK, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia who have received front-line imatinib mesylate therapy and achieved complete molecular response [J]. *Leuk Res*, 2012, 36(6):689-693. DOI: 10.1016/j.leukres.2012.02.011.
- [9] Rousselot P, Huguet F, Rea D, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years [J]. *Blood*, 2007, 109(1):58-60.
- [10] Takahashi N, Kyo T, Maeda Y, et al. Discontinuation of imatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia [J]. *Haematologica*, 2012, 97(6):903-906. DOI: 10.3324/haematol.2011.056853.
- [11] Rea D, Rousselot P, Guilhot F, et al. Discontinuation of second generation (2G) tyrosine kinase inhibitors (TKI) in chronic phase (CP) - chronic myeloid leukemia (CML) patients with stable undetectable BCR-ABL transcripts [J]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2012, 120(21):916.
- [12] Chomel JC, Bonnet ML, Sorel N, et al. Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease [J]. *Blood*, 2011, 118(13):3657-3660. DOI: 10.1182/blood-2011-02-335497.
- [13] van Kooten Niekerk PB, Petersen CC, Nyvold CG, et al. Cell sorting enables interphase fluorescence in situ hybridization detection of low BCR-ABL1 producing stem cells in chronic myeloid leukaemia patients beyond deep molecular remission [J]. *Br J Haematol*, 2014, 164(1):53-60. DOI: 10.1111/bjh.12589.

(收稿日期:2016-07-28)

(本文编辑:王叶青)