

骨髓增生异常综合征患者去甲基化治疗后 WT1 mRNA 水平的变化及其预后意义

张弘扬^{1,2,3} 耿素霞^{2,3} 李敏明^{2,3} 赖沛龙^{2,3} 邓程新^{2,3} 陆泽生^{2,3} 黄欣^{2,3}
王玉连^{2,3} 翁建宇^{2,3,4} 杜欣^{1,2,3,4}

¹南方医科大学第二临床医学院,广州 510515; ²广东省人民医院(广东省医学科学院),广州 510080; ³广东省老年医学研究所,广州 510080; ⁴华南理工大学医学院,广州 510006

通信作者:杜欣,Email:miyadu@hotmail.com

【摘要】 目的 监测骨髓增生异常综合征(MDS)患者去甲基化治疗后 WT1 mRNA 水平的变化,评估 WT1 mRNA 水平变化在判断患者疗效、区分不同疾病稳定(stable disease, SD)状态中的意义。方法 以2009年11月至2018年3月56例在广东省人民医院接受去甲基化治疗(≥ 4 个疗程)的MDS患者为研究对象,实时定量PCR检测其骨髓或外周血 WT1 mRNA 的表达,观察 WT1 mRNA 表达水平的动态变化与患者临床疗效和预后的相关性。结果 去甲基化治疗3个疗程后,MDS患者 WT1 mRNA 水平较治疗前显著降低。20例疾病进展患者病情进展或转为急性髓系白血病(AML)后 WT1 mRNA 表达水平较治疗前明显升高。45例SD的MDS患者,根据SD期间 WT1 mRNA 表达水平变化分为WT1升高与未升高两组,SD期间 WT1 mRNA 表达水平升高的患者中病情进展或转AML的比例为95.65% (22/23),而SD期间 WT1 mRNA 表达水平未升高的患者中病情进展或转AML的比例为9.09% (2/22)($\chi^2 = 33.852, P < 0.001$)。与SD期间 WT1 mRNA 表达水平未升高的患者相比,SD期间 WT1 mRNA 表达水平升高的患者的总生存期[17(95% CI 11~23)个月对未达到, $P < 0.001$]和无进展生存期[13(95% CI 8~18)个月对未达到, $P < 0.001$]明显缩短。结论 WT1 mRNA 表达水平是评估MDS患者去甲基化治疗后疗效变化有效的实验室指标,尤其对于SD的患者,动态检测 WT1 mRNA 表达水平,可预测病情演变,从而指导临床治疗。

【关键词】 骨髓增生异常综合征; 基因,WT1; 去甲基化治疗; 疾病稳定

基金项目:国家自然科学基金(81500012);广东省科技计划(2014B020212009、2017B020230004)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.05.013

Changes of WT1 mRNA expression level in patients with myelodysplastic syndromes after hypomethylating agents and its prognostic significance

Zhang Hongyang^{1,2,3}, Geng Suxia^{2,3}, Li Minming^{2,3}, Lai Peilong^{2,3}, Deng Chengxin^{2,3}, Lu Zesheng^{2,3}, Huang Xin^{2,3}, Wang Yulian^{2,3}, Weng Jianyu^{2,3,4}, Du Xin^{1,2,3,4}

¹The Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

²Guangdong Provincial People's Hospital / Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; ³Guangdong Institute of Geriatric Medicine, Guangzhou 510080, China; ⁴School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

Corresponding author: Du Xin, Email: miyadu@hotmail.com

【Abstract】 Objective To monitor the WT1 mRNA level and its dynamic changes in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) after hypomethylating agents (HMA), as well as to assess the significance of WT1 mRNA levels and its dynamic changes in evaluating the efficacy of HMA and distinguishing the disease status of heterogeneous patients with stable disease (SD). **Methods** Bone marrow or peripheral blood samples of 56 patients with MDS who underwent hypomethylating agents (≥ 4 cycles) from November 2009 to March 2018 were tested by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) to detect the expression of WT1 mRNA, and to observe the correlation between the dynamic changes of WT1 mRNA expression and clinical efficacy and prognosis of patients. **Results** WT1

mRNA expression levels of MDS patients decreased significantly after 3 cycles of hypomethylating agent treatment. Besides, the WT1 mRNA expression levels of patients increased significantly after diseases progression. According to the dynamic changes of WT1 mRNA expression levels during SD, 45 cases could be further divided into increased group and non-increased group. In those SD patients with increased WT1 mRNA expression level, the ratio of suffering disease progression or transformation to AML was 95.65% (22/23), whereas the ratio turned to be 9.09% (2/22) for the non-increased group ($\chi^2 = 33.852$, $P < 0.001$). Compared with those SD patients reporting no increase in WT1 mRNA expression level, the overall survival [17(95% CI 11–23)months vs not reached, $P < 0.001$] and progression-free survival [13(95% CI 8–18)months vs not reached, $P < 0.001$] of those SD patients reporting increase in WT1 mRNA expression level were significantly shorter. **Conclusion** WT1 mRNA expression level is a useful indicator to assess the efficacy of hypomethylating agents in MDS patients. Especially in patients with SD, detection of the changes in WT1 mRNA expression level is able to predict disease progression and help to make clinical decision.

【Key words】 Myelodysplastic syndrome; Gene, WT1; Hypomethylating agents; Stable disease

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81500012); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2014B020212009, 2017B020230004)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.05.013

目前去甲基化药物阿扎胞苷和地西他滨是骨髓增生异常综合征(MDS)的标准治疗之一^[1-2],临床上采用修订的国际工作组(IWG)标准来评估去甲基化治疗的疗效以及判断是否需要更改治疗方案^[3]。但IWG标准中疾病稳定(stable disease, SD)的患者预后存在显著不同,一部分患者持续稳定或缓解,而另一部分患者却出现疾病进展或快速转化为急性髓系白血病(AML)。WT1基因是白血病原始细胞肿瘤负荷的标志物,WT1 mRNA高表达与AML预后不良相关^[4-5]。WT1表达水平也与MDS患者的预后显著相关^[6]。本研究我们通过检测MDS患者去甲基化治疗前后WT1转录本水平的变化,评估WT1转录本变化在判断患者疗效、区分不同SD状态患者中的意义。

病例与方法

1. 病例:以2009年11月至2018年3月我院确诊的临床资料齐全并接受了至少4个疗程去甲基化治疗的56例MDS患者为研究对象,诊断及分型参照WHO 2008标准。

2. 去甲基化治疗方案及疗效判断:地西他滨:20 mg·m⁻²·d⁻¹×5 d,静脉滴注,4~6周为1个疗程;阿扎胞苷:75 mg·m⁻²·d⁻¹×7 d,皮下注射,4~6周为1个疗程。根据IWG 2006标准^[3]判断疗效,SD定义为疗效未能达到最低程度的部分缓解,但至少两个月无证据显示疾病进展。

3. RNA提取和cDNA合成:收集患者治疗前、每个去甲基化治疗疗程开始前骨髓或外周血标本。56例患者中,有28例患者标本采自骨髓,其余

28例采自外周血,每一例患者不同时间点WT1评估标本均为同一类型标本(全部骨髓或外周血)。用红细胞裂解液裂解红细胞,按TRIzol提取试剂盒(美国Invitrogen公司产品)说明提取总RNA,逆转录合成cDNA,按操作说明进行。

4. 定量PCR(Q-PCR)检测WT1 mRNA表达:以ABL1基因为内参,ABL1和WT1转录本Q-PCR引物和探针序列参照文献^[7-8],由上海英潍捷基生物科技有限公司合成。由于ABL1与WT1引物和探针的扩增效率接近,故二者共用ABL1标准曲线进行计算^[9]。每一标本分别进行2次WT1和ABL1基因的定量检测,总反应体系为20 μl,其中含标准品或样品cDNA 1 μl,引物0.3 μmol/L,探针0.2 μmol/L,2×Taqman Universal Master Mix 10 μl(ABI),反应条件为:50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,62 ℃ 1 min,45个循环。骨髓WT1水平正常范围为0~15.94,外周血WT1水平正常范围为0~1.12,WT1水平超过正常范围的上限则定义为表达水平升高^[10]。每例患者中位检测WT1 5(3~12)次。在检测区间内,WT1水平持续升高的患者归为WT1升高组,WT1水平持续降低或在正常范围附近波动的患者归为WT1未升高组;对于WT1水平波动的患者,如果最后一个检测点的结果仍明显高于正常范围,归为WT1升高组,如果降低至正常或接近正常范围,归为WT1未升高组。

5. 随访:随访至2018年3月1日,中位随访时间为23(5~100)个月。总生存(OS)期按确诊日期至任何原因死亡或随访结束日计算。无进展生存(PFS)期按确诊日期至疾病进展或死亡或随访结束

日计算。

6. 统计学处理:采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析。WT1水平以中位数(范围)表示,两组间比较采用配对Wilcoxon符号秩检验。两组间疾病进展率的比较采用卡方检验。生存分析使用Kaplan-Meier法,Log-rank检验进行组间比较。以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般临床资料:56例MDS患者中,男36例(64.3%),女20例(35.7%)。中位年龄61(21~75)岁。WHO 2008分型:难治性贫血伴原始细胞增多(RAEB)-1 13例,RAEB-2 27例,难治性血细胞减少伴多系发育异常(RCMD)4例,慢性粒单核细胞白血病(CMML)11例,5q-综合征1例。15例患者经阿扎胞苷治疗,41例患者经地西他滨治疗,中位去甲基化治疗7(4~23)个疗程。IPSS危险度分层:中危-1 18例,中危-2 26例,高危12例。IPSS染色体核型分组:预后好32例,预后中等10例,预后差14例。

2. 去甲基化治疗后WT1水平变化及与疗效关系:56例MDS患者去甲基化治疗3个疗程后WT1 mRNA水平[57.310(0.010~3 309.510)]较治疗前[114.354(0.175~6 249.793)]明显降低($z = -4.845, P < 0.001$)。15例接受阿扎胞苷治疗的患者治疗后WT1 mRNA水平[55.397(0.271~3 309.510)]较治疗前[103.429(6.550~6 249.793)]明显降低($z = -2.613, P = 0.009$)。41例接受地西他滨治疗的患者治疗后WT1 mRNA水平[59.222(0.010~1 307.644)]较治疗前[125.279(0.175~2 282.547)]亦明显降低($z = -4.024, P < 0.001$)。

按照治疗过程中达到的最佳反应分析,入组的56例患者治疗后均获得了SD以上的疗效:骨髓完全缓解(mCR)31例(55.4%),血液学改善(HI)2例(3.6%),SD 23例(41.0%)。最终24例患者发生疾病进展或转化为AML,其中阿扎胞苷治疗组11例,地西他滨治疗组13例。4例患者进展后未进行WT1表达水平检测,余20例患者病情进展或转AML后的WT1 mRNA表达水平[626.421(11.717~11 878.792)]较治疗前[142.266(6.361~6 249.793)]明显升高($z = -3.435, P = 0.001$)。

3. SD期间WT1水平变化与预后的关系:56例患者中45例SD期持续至少2个疗程,可以对其SD

期间的WT1水平变化情况进行分析。其中23例患者SD期间WT1 mRNA表达水平升高(WT1升高组),22例患者的WT1 mRNA水平在SD期间降低或在正常范围附近波动(WT1未升高组)。

WT1升高组中,22例(95.65%)患者转化为AML或进展后死亡,其余1例死于消化道出血,死亡前无疾病进展。WT1未升高组中,2例(9.09%)疾病进展,12例(54.55%)在达到SD后维持SD或获得骨髓缓解,且直至随访结束时仍然存活,6例(27.27%)死亡前无疾病进展,分别死于出血性休克、呼吸衰竭和肺部转移;其余2例失访。WT1升高组患者疾病进展和转化为AML的比例显著高于WT1未升高组($\chi^2 = 33.852, P < 0.001$)。

4. SD期间WT1水平变化与生存期的关系:SD期间WT1升高组患者中位OS时间为17(95% CI 11~23)个月,中位PFS时间为13(95% CI 8~18)个月。WT1未升高组中,中位OS与PFS时间均未达到。SD期间WT1 mRNA水平升高的患者OS和PFS时间均明显短于WT1 mRNA水平非升高患者(P 值均 < 0.001)(图1)。

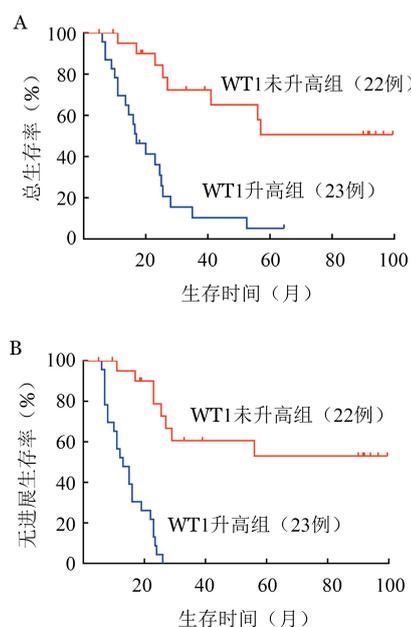


图1 疾病稳定期间骨髓增生异常综合征患者按WT1 mRNA水平变化分组的总生存(A)和无进展生存(B)比较

讨 论

使用去甲基化药物进行表观遗传学治疗是现今MDS的标准治疗之一^[2,11]。但是,去甲基化治疗的有效率仍然较低,且较多患者在治疗过程中会失

去疗效^[12-13]。SD患者是否真正处于稳定状态,是否应继续使用去甲基化治疗或更改治疗方案,是临床上常见的问题。

WT1基因是白血病细胞的肿瘤标志^[14]。而且,WT1表达水平与MDS的疾病进展过程是显著相关的。Tamaki等^[6]报道骨髓和外周血中WT1表达水平随着MDS的疾病进展过程成比例地显著增加。且外周血中WT1表达水平与RAEB或RAEB-t在6个月内进展为明显的AML显著相关。Cilloni等^[15]报道MDS各亚型患者的骨髓和外周血样本中WT1 mRNA表达水平平均高于健康志愿者。RAEB和MDS转化的继发AML(s-AML)患者中WT1 mRNA表达水平远高于难治性贫血(RA)患者,且在疾病进展期间WT1 mRNA表达水平增加。最近发表的研究结果亦表明恶性程度较高的MDS分型的WT1基因表达水平较高^[16-17]。根据WHO2016分型标准进行分析亦可发现,随着疾病分型恶性程度增加,WT1表达呈增高趋势^[18]。我们通过检测地西他滨或阿扎胞苷治疗的患者多个时间点的WT1 mRNA水平,发现治疗3个疗程后,MDS患者WT1 mRNA水平较治疗前显著降低。患者发生疾病进展后,WT1 mRNA的表达水平较治疗前明显增高,与已发表的研究结果一致。说明在使用去甲基化治疗时,WT1 mRNA水平也可反映MDS病情变化与去甲基化治疗的疗效。

根据IWG2006标准^[3],疾病稳定(SD)指患者的疗效不能达到最低程度的部分缓解(partial remission, PR),但至少8周无证据显示疾病进展。临床发现,去甲基化治疗后处于SD期的MDS患者具有一定的异质性。而且,不同患者的SD持续时间不同,目前仍不清楚SD期患者不良预后的影响因素。我们检测SD期MDS患者的WT1 mRNA表达水平的动态变化,发现SD期间WT1 mRNA表达水平并非恒定,部分患者WT1水平呈升高趋势,部分患者WT1水平持续降低或在正常范围波动。根据WT1水平的变化将患者分为升高与未升高两组。95.65% SD期间WT1 mRNA表达水平升高的患者病情进展,而在未升高组中,只有9.09%患者病情进展。表明MDS患者去甲基化治疗后,WT1 mRNA水平在SD期的变化可确切反映患者的预后,通过监测WT1 mRNA水平在SD期的变化可尽早发现病情可能进展的患者。

近期发表的研究报道WT1 mRNA表达水平较

高的MDS患者的OS、PFS、无白血病生存(LFS)时间均较短^[16-17]。我们随访发现SD期WT1 mRNA表达水平升高的患者OS和PFS时间均较未升高的患者明显缩短,说明WT1 mRNA水平在SD期逐渐升高是生存期较短的可靠预测指标。

迄今很多指标可以用作预测去甲基化药物治疗急性白血病或MDS的临床反应^[19]。其中包括性别、年龄、骨髓原始细胞比例、血小板改变、基因突变、基因甲基化水平、基因表达、Micro-RNA、蛋白质表达、细胞信号通路等。叶丽等^[20]关于小剂量地西他滨治疗较低危MDS的研究显示,年龄是影响疗效的独立预后因素,年龄<60岁组患者的总体反应率高于年龄≥60岁组(68.2%对31.0%, $P=0.010$)。同时年龄、基因突变对PFS有显著影响,年龄<60岁组患者中位PFS时间长于≥60岁组(未达到对10.3个月, $P=0.001$),基因突变阴性患者中位PFS时间长于突变阳性(除单纯SF3B1阳性)者(18.5个月对9.2个月, $P=0.008$)。赵佑山等^[21]报道TP53基因突变、1个疗程后PLT倍增及复杂核型可预测地西他滨完全缓解。上述指标在临床上作为地西他滨治疗MDS的疗效评价及预后评估指标均有一定的实用价值,但其中大部分未作为临床常规检测指标。WT1检测具有易于操作且较经济、已在临床推广、准确性较高等优点,与上述指标结合可取得较全面的评估结果。更重要的是,我们的研究首次表明,WT1 mRNA表达水平对预测SD期患者临床发展趋势具有实用价值。

综上所述,WT1 mRNA表达水平变化是评估MDS患者去甲基化治疗后疗效与疾病进展的有价值的实验室指标。尤其对处于SD的患者,动态检测WT1 mRNA表达水平,可预测病情演变,从而指导临床治疗。由于本研究为单中心回顾性研究,并且对WT1 mRNA表达对OS和PFS仅作了单因素分析,这些因素可能致研究结果存在偏倚。因此,WT1 mRNA在评估和预测MDS患者病情方面的确切临床意义还需在前瞻性、大样本临床研究中进一步明确。

参考文献

- [1] Szmigielska-Kaplon A, Robak T. Hypomethylating agents in the treatment of myelodysplastic syndromes and myeloid leukemia [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011, 11(7):837-848.
- [2] Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2015 Update on diagnosis, risk-stratification and management [J]. *Am J*

- Hematol, 2015, 90(9):831-841. DOI: 10.1002/ajh.24102.
- [3] Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia [J]. Blood, 2006, 108(2):419-425. DOI: 10.1182/blood-2005-10-4149.
- [4] Bergmann L, Miething C, Maurer U, et al. High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome[J]. Blood, 1997, 90(3):1217-1225.
- [5] Garg M, Moore H, Tobal K, et al. Prognostic significance of quantitative analysis of WT1 gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukaemia[J]. Br J Haematol, 2003, 123(1):49-59.
- [6] Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, et al. The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes [J]. Leukemia, 1999, 13(3):393-399.
- [7] Beillard E, Pallisgaard 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.
- [8] Van Dijk JP, Knops GH, Van De Locht LT, et al. Abnormal WT1 expression in the CD34-negative compartment in myelodysplastic bone marrow[J]. Br J Haematol, 2002, 118(4):1027-1033.
- [9] 耿素霞, 翁建宇, 黄欣, 等. 慢性髓性白血病患者酪氨酸激酶抑制剂治疗 3 个月分子反应的预后价值[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(7): 561- 565. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253- 2727. 2013.07.001.
- [10] Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(31): 5195- 5201. DOI: 10.1200/JCO. 2009.22.4865.
- [11] 中华医学会血液学分会. 骨髓增生异常综合征诊断与治疗中国专家共识(2014年版)[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(11): 1042-1048. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.11.023.
- [12] Steensma DP, Baer MR, Slack JL, et al. Multicenter study of decitabine administered daily for 5 days every 4 weeks to adults with myelodysplastic syndromes: the alternative dosing for outpatient treatment (ADOPT) trial [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(23):3842-3848. DOI: 10.1200/JCO.2008.19.6550.
- [13] Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B [J]. J Clin Oncol, 2002, 20(10): 2429- 2440. DOI: 10.1200/JCO. 2002.04.117.
- [14] Tamaki H, Ogawa H, Inoue K, et al. Increased expression of the Wilms tumor gene (WT1) at relapse in acute leukemia [J]. Blood, 1996, 88(11):4396-4398.
- [15] Cilloni D, Gottardi E, Messa F, et al. Significant correlation between the degree of WT1 expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(10): 1988-1995. DOI: 10.1200/JCO.2003.10.503.
- [16] Nagasaki J, Aoyama Y, Hino M, et al. Wilms Tumor 1 (WT1) mRNA Expression Level at Diagnosis Is a Significant Prognostic Marker in Elderly Patients with Myelodysplastic Syndrome [J]. Acta Haematol, 2017, 137(1):32- 39. DOI: 10.1159/ 000452732.
- [17] Jiang Y, Liu L, Wang J, et al. The Wilms' tumor gene-1 is a prognostic factor in myelodysplastic syndrome: a meta analysis [J]. Oncotarget, 2018, 9(22):16205- 16212. DOI: 10.18632/ oncotarget.23671.
- [18] You Y, Huo J, Lu S, et al. The diverse expression of the WT1 gene in patients with acquired bone marrow failure syndromes [J]. Leuk Lymphoma, 2018, 59(4):950- 957. DOI: 10.1080/ 10428194.2017.1352092.
- [19] Wang H, Li Y, Lv N, et al. Predictors of clinical responses to hypomethylating agents in acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes [J]. Ann Hematol, 2018, 97(11): 2025-2038. DOI: 10.1007/s00277-018-3464-9.
- [20] 叶丽, 任艳玲, 谢丽丽, 等. 小剂量地西他滨治疗较低危骨髓增生异常综合征患者疗效初步观察[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(4): 307- 312. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253- 2727.2017. 04.009.
- [21] 赵佑山, 郭娟, 许峰, 等. 地西他滨治疗骨髓增生异常综合征及相关肿瘤的疗效预测因素研究[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(2):124-128. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.02.008.

(收稿日期:2018-10-01)

(本文编辑:刘爽)