

骨髓增生异常综合征RAS基因突变的分子学特征及预后意义

黄慧君 李冰 秦铁军 徐泽锋 胡耐博 潘丽娟 曲士强 刘丹 张喻堤 肖志坚
中国医学科学院、北京协和医学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所);实验血液学国家重点实验室,国家血液系统疾病临床研究中心,天津 300020
通信作者:肖志坚,Email:zjxiao@ihcams.ac.cn

【摘要】 目的 探讨骨髓增生异常综合征(MDS)RAS基因突变的分子学特征及其对预后的影响。**方法** 收集2011年12月至2018年12月新诊断且完成二代测序的776例MDS患者病例资料,回顾性分析RAS基因突变患者的临床及分子学特征,并比较不同突变状态对总生存(OS)的影响。**结果** 共52例(6.7%)患者伴有RAS基因突变,NRAS突变38例(4.9%),KRAS突变18例(2.3%),4例(0.5%)同时伴NRAS及KRAS突变,全部NRAS突变及65%的KRAS突变位于第12、13及61号密码子。RAS基因突变与PTPN11、FLT3、U2AF1、RUNX1、WT1、ETV6及NPM1突变呈显著正相关($Q < 0.05$),且常为亚克隆突变。伴RAS基因突变的患者中诊断为MDS伴原始细胞增多(MDS-EB)的比例(82.7%)明显高于无RAS突变患者(35.2%)($P < 0.001$)。与无RAS基因突变患者相比,伴RAS基因突变患者的外周血白细胞水平和中性粒细胞水平明显升高[WBC: $4.33(0.98 \sim 20.42) \times 10^9/L$ 对 $2.71(0.61 \sim 21.17) \times 10^9/L$, $P < 0.001$; ANC: $2.13(0.18 \sim 17.37) \times 10^9/L$ 对 $1.12(0 \sim 16.00) \times 10^9/L$, $P < 0.001$],血小板水平明显减低[$48(2 \sim 430) \times 10^9/L$ 对 $62(2 \sim 694) \times 10^9/L$, $P = 0.048$],骨髓粒系比例有升高的趋势(47%对40%, $P = 0.085$),骨髓原始细胞比例明显升高(7%对2%, $P < 0.001$)。按照修订的国际预后积分系统(IPSS-R)进行预后分层,RAS基因突变患者中较高危分组(高危和极高危组)的比例显著增高(71.1%对37.9%, $P < 0.001$)。单因素分析中,NRAS突变与更短的OS显著相关($P = 0.011$),经多因素校正后,NRAS突变对OS的影响失去显著性,突变基因中仅PTPN11及SETBP1为独立的不良OS因素。**结论** RAS基因突变常作为亚克隆发生在MDS疾病晚期且常与转录因子及信号转导相关的突变伴随发生。RAS通路相关的PTPN11突变在MDS中为独立不良预后因素。

【关键词】 骨髓增生异常综合征; RAS基因; 突变; 克隆演变; 预后

基金项目:国家自然科学基金(81870104,81470297);天津市自然科学基金重点项目(18JCZD-JC34900);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-1-001)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.09.004

Molecular features and prognostic value of RAS mutations in patients with myelodysplastic syndromes

Huang Huijun, Li Bing, Qin Tiejun, Xu Zefeng, Hu Naibo, Pan Lijuan, Qu Shiqiang, Liu Dan, Zhang Yudi, Xiao Zhijian

State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Xiao Zhijian, Email: zjxiao@ihcams.ac.cn

【Abstract】 Objective To explore the molecular features and prognostic value of RAS mutations in patients with myelodysplastic syndromes (MDS). **Methods** 112-gene targeted sequencing was conducted to detect RAS mutations in 776 patients with newly diagnosed primary MDS from December 2011 to December 2018. The mutual exclusivity and co-occurrence in gene mutations and clonal architecture were explored. Moreover, the prognostic significance of RAS mutations in MDS was analyzed. **Results** RAS gene mutations were found in 52 (6.7%) cases, 38 (4.9%) of whom harbored NRAS mutation, 18 (2.3%) KRAS mutation, and 4 (0.5%) both NRAS and KRAS mutations. All the NRAS mutations and 65% of the KRAS mutations were located in codons 12, 13, and 61. PTPN11, FLT3, U2AF1, RUNX1, WT1, ETV6, and NPM1 mutations were enriched in patients with RAS mutations ($Q < 0.05$).

Around 80% of RAS mutations represented subclonal lesions in patients who harbored at least two different mutations. Patients with RAS mutations were more frequently diagnosed with MDS with excess blast (MDS-EB) (82.7% vs. 35.2%, $P < 0.001$) and had higher levels of white blood cell count ($4.33 \times 10^9/L$ vs. $2.71 \times 10^9/L$, $P < 0.001$), neutrophil absolute count ($2.13 \times 10^9/L$ vs. $1.12 \times 10^9/L$, $P < 0.001$), and bone marrow blast percentage (7% vs. 2%, $P < 0.001$) but lower levels of platelet count ($48 \times 10^9/L$ vs. $62 \times 10^9/L$, $P = 0.048$). RAS mutations were correlated with higher-risk categories in the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) (71.1% vs. 37.9%, $P < 0.001$). The median overall survival of patients with NRAS mutations was shorter than the others ($P = 0.011$), while the significance was lost in the multivariable model. **Conclusion** RAS gene mutations always occurred in the late-stage MDS and co-occurred with other signal transduction- and transcription factor-related gene mutations. PTPN11, a RAS pathway-related gene, is an independent poor prognostic factor in MDS patients.

【Key words】 Myelodysplastic syndromes; Gene, RAS; Mutation; Clonal evolution; Prognosis
DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.09.004

RAS信号通路在调节细胞增殖、分化和凋亡的过程中发挥重要作用,RAS蛋白的持续激活可以导致信号传导紊乱,促进细胞的增殖及恶性转变^[1]。既往研究表明RAS癌基因的激活突变常见于多种血液系统恶性肿瘤,包括急性髓系白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增生异常综合征/骨髓增殖性肿瘤(MDS/MPN)等,且常与疾病进展相关^[2-4]。我们采用二代测序在776例初诊原发性MDS患者中发现52例伴有RAS基因突变,本文对RAS基因突变患者的分子学、临床和实验室特征,及其对总生存(OS)的影响进行了分析,现报道如下。

病例与方法

1. 病例资料:2011年12月至2018年12月于中国医学科学院血液病医院MDS和MPN诊疗中心确诊并完成二代测序的初诊MDS患者纳入研究,共776例,男494例(63.7%),中位年龄54(14~83)岁。按照《骨髓增生异常综合征中国诊断与治疗指南(2019年版)》标准^[5],MDS伴单系发育异常(MDS-SLD)34例(4.4%),MDS伴多系发育异常(MDS-MLD)378例(48.7%),MDS伴环形铁粒幼红细胞(MDS-RS)37例(4.7%),MDS伴原始细胞增多-1(MDS-EB-1)153例(19.7%),MDS伴原始细胞增多-2(MDS-EB-2)145例(18.7%),MDS伴5q-7例(0.9%),MDS未分类(MDS-U)22例(2.8%)。678例(87.4%)患者具有可分析的染色体核型结果,采用修订的国际预后积分系统(IPSS-R)^[6]对患者进行预后分层:极低危组21例(3.1%)、低危组169例(24.9%)、中危组216例(31.9%)、高危组152例(22.4%)、极高危组120例(17.7%)。575例患者可追踪到治疗方案,其中48例(8.3%)接受单纯支持治疗,303例(52.7%)接受免疫抑制剂或免疫调节剂

治疗,91例(15.8%)接受地西他滨治疗,74例(12.9%)接受造血干细胞移植,38例(6.6%)接受CAG/HAG(阿克拉霉素/高三尖杉酯碱+阿糖胞苷+G-CSF)方案化疗,21例(3.7%)接受“中医”治疗。

2. 染色体核型分析:骨髓细胞经过24 h培养,收集细胞常规制片,R显带,根据《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN2013)》描述核型异常。按照IPSS-R染色体核型分组标准^[6]进行染色体核型预后分组。

3. 靶向测序检测基因突变:所有患者DNA样本来源于骨髓单个核细胞。使用PCR引物扩增目的基因组(涵盖112个血液肿瘤相关基因),富集后采用Ion Torrent半导体测序平台进行测序。平均基因覆盖率98.1%,平均测序深度1310×。测序后原始数据利用CCDS、人类基因组数据库(HG19)、dbSNP(v138)、1000genomes、COSMIC、PolyPhen-2等数据库进行生物信息学分析,筛选致病性基因突变位点。具体方法参见本课题组此前已发表文献^[7]。

4. 突变时序分析:采用等位基因突变频率(VAF)对携带两种及以上突变的患者进行突变时序分析。参考文献[8-9]方法,VAF值显著高的突变被判定为主克隆,显著低的突变被判定为亚克隆,当不同突变的VAF值之间无显著差异时,其均被判定为主克隆。

5. 随访:随访截止时间为2019年5月31日,随访资料来源于住院病历、门诊病历及电话随访记录。对随访期间死亡的病例,按照病历记录或与患者家属电话联系确认。中位随访时间为17(2~87)个月,失访患者共89例(11.5%)。OS期指自诊断日期到死亡或未次随访日期。

6. 统计学处理:统计分析利用SPSS 25.0及R 3.6.1软件完成。非正态分布的计量资料以“中位

数(范围)”表示,采用Mann-Whitney *U*检验进行组间比较;分类变量组间比较采用卡方检验或Fisher精确概率法,并采用Benjamini-Hochberg法对双侧检验*P*值进行多重校正, $Q < 0.05$ 为差异有统计学意义。突变时序分析采用皮尔森拟合优度检验^[9]。采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,Log-rank检验进行单因素分析,Cox等比例回归进行多因素分析,双侧检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。应用Graphpad Prism 7.0及R 3.6.1绘图。

结 果

1. RAS基因的突变频率及突变位点分布: 776例MDS患者中共发现NRAS和(或)KRAS突变52例(6.7%),其中NRAS突变38例(4.9%),KRAS突变18例(2.3%),4例(0.5%)患者同时伴有NRAS及KRAS突变。52例患者共检出46个NRAS突变及22个KRAS突变,皆为点突变。全部NRAS突变及65%的KRAS突变均发生在第12、13和61号密码子,其中以第12号密码子最为常见,分别占NRAS突变的63%和KRAS突变的55%(图1)。

2. RAS基因与其他基因突变的相关性及突变时序分析:伴有RAS突变的患者携带其他基因的平均

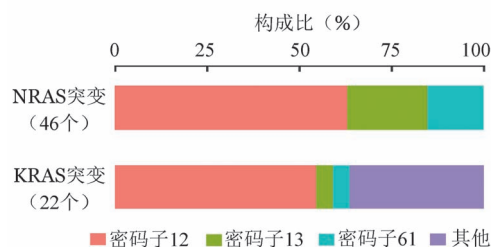
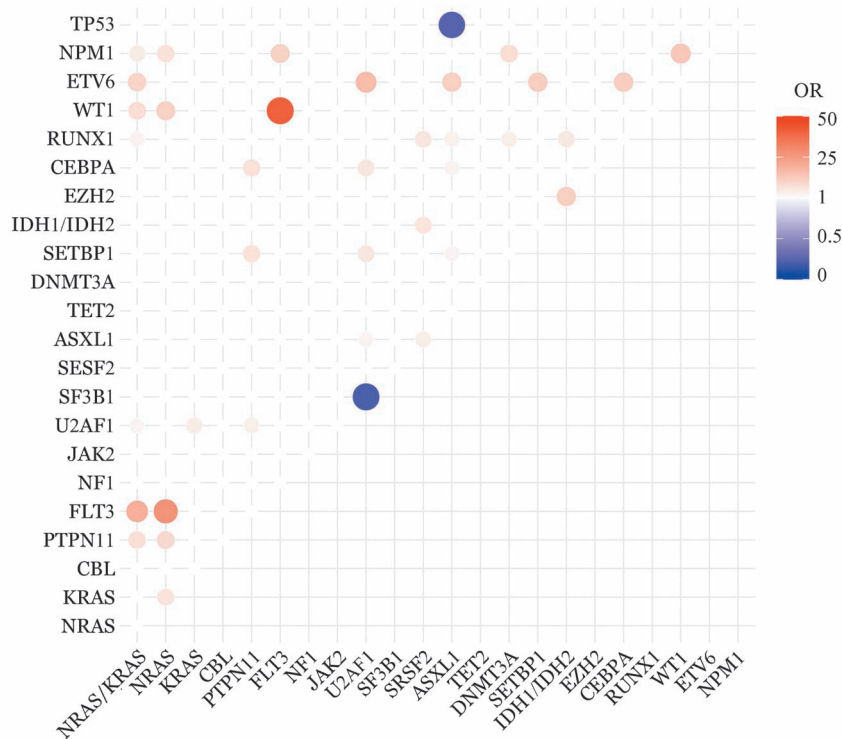


图1 52例RAS基因突变的骨髓增生异常综合征患者突变位点分布情况

均突变数为(3.71±1.46)个,其中NRAS突变患者平均为(3.68±1.44)个,KRAS突变患者平均为(4.06±1.51)个,高于无RAS基因突变患者的(1.76±1.44)个。除NRAS/KRAS突变外,全部776例患者中突变频率较高(>5%)的基因还有U2AF1(20.4%)、ASXL1(12.4%)、SF3B1(9.4%)、TP53(7.3%)、RUNX1(7.1%)、DNMT3A(6.7%)、TET2(6.3%)和SETBP1(5.8%)。

RAS突变常与PTPN11($Q < 0.001, OR = 7.096$)、FLT3($Q < 0.001, OR = 18.945$)、U2AF1($Q = 0.012, OR = 2.206$)、RUNX1($Q = 0.025, OR = 2.610$)、WT1($Q = 0.006, OR = 7.416$)、ETV6($Q = 0.039, OR = 9.534$)及NPM1($Q = 0.012, OR = 4.409$)突变同时发生(图2)。NRAS突变分别与KRAS、PTPN11、



红色为呈正相关,蓝色为呈负相关;Q值以圆圈大小表示,Q值越小,圆圈越大

图2 776例骨髓增生异常综合征(MDS)患者中常见基因突变之间的相关性分析(Benjamini-Hochberg法对*P*值进行校正)

FLT3、WT1 及 NPM1 突变呈正相关(Q 值均 < 0.05), KRAS 与 U2AF1 突变呈正相关($Q < 0.05$)(图 2)。

RAS 突变的中位 VAF 为 7.30(1.40~49.07), 其中 NRAS 突变为 7.85(1.77~49.07), KRAS 突变为 4.90(1.40~48.34)。各诊断分型及预后分组之间 RAS 突变 VAF 无显著差异(P 值均 > 0.05)。对 39 例出现 1 个及以上除 NRAS 和(或)KRAS 以外基因突变的患者的 VAF 进行分析, 其中 8 例(20.5%)患者的 NRAS/KRAS 突变为克隆, 31 例(79.5%)为亚克隆, NRAS 突变和 KRAS 突变中亚克隆的比例分别为 75.0%(21/28)和 85.7%(12/14), 提示 RAS 基因突变在 MDS 中常常为发生于晚阶段的分子事件。图 3 展示了 15 例除 NRAS/KRAS 以外 2 个以上基因突变的患者各基因 VAF 的分布情况。

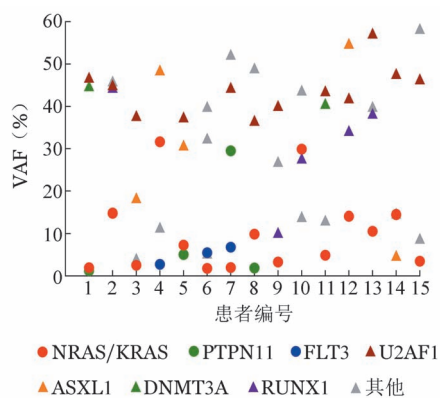


图 3 15 例除 NRAS/KRAS 以外 2 个以上基因突变的骨髓增生异常综合征患者各基因等位基因突变频率(VAF)分布情况

3. 伴 RAS 基因突变患者的临床及实验室特征: 我们分别将 RAS 突变组、NRAS 突变组及 KRAS 突变组患者的临床及实验室特征与无 RAS 突变组患者进行比较。各组之间性别与年龄分布差异均无统计学意义(P 值均 > 0.05)。根据 WHO(2016)诊断及分型标准, RAS 突变组、NRAS 突变组和 KRAS 突变组中 MDS-EB 的比例(分别为 82.7%, 81.6% 和 83.3%)均显著高于无 RAS 突变组(35.2%, P 值均 < 0.001)。与无 RAS 突变组相比, 三组 RAS 突变患者的外周血 WBC 和 ANC 水平均明显升高(P 值均 < 0.05), RAS 突变组 PLT 水平明显减低($P = 0.048$), 各组之间 HGB 水平无明显差异(表 1)。RAS 突变组患者骨髓粒系比例较无 RAS 突变组有升高的趋势($P = 0.085$), 三组伴 RAS 突变患者的骨髓原始细胞比例均明显高于无 RAS 突变患者(P 值均 < 0.001)(表 1)。

RAS 突变与各染色体核型之间无显著相关性。按照 IPSS-R 对患者进行预后分组, RAS 突变

组、NRAS 突变组及 KRAS 突变组中较高危分组(IPSS-R 高危和极高危组)所占的比例均显著高于无 RAS 突变组(P 值均 < 0.05)。各组之间临床及实验室特征比较详见表 1。

4. RAS 基因突变的预后研究: 截止末次随访, 随访患者中死亡 228 例(33.1%), 其中 RAS 突变组 23 例(48.9%), NRAS 突变组 18 例(50.0%), KRAS 突变组 5 例(35.7%), 无 RAS 突变组 205 例(32.0%)。中位 OS 期: RAS 突变组患者为 21(95% CI 12.72~29.29)个月, NRAS 突变组为 21(95% CI 4.58~37.42)个月, KRAS 突变组未达到, 无 RAS 突变组为 52(95% CI 32.47~71.53)个月。

单因素分析中, 伴有 RAS 及 NRAS 基因突变患者的 OS 期较无突变患者显著缩短($P = 0.003$ 、0.011), 而 KRAS 突变对 OS 无显著影响($P = 0.491$)(图 4A~C)。RAS、NRAS 及 KRAS 的主克隆和亚克隆突变患者之间的 OS 差异无统计学意义(P 值均 > 0.05)(图 4D~F)。突变频率 $> 2\%$ 的其他基因突变中, 还有 TET2、SETBP1、PTPN11 和 TP53 突变与更短的 OS 期显著相关(P 值均 < 0.05), SRSF2 和 RUNX1 突变患者的 OS 期有缩短的趋势($P = 0.090$ 、0.084)(表 2)。将单因素分析中 $P < 0.1$ 的基因以及年龄(< 60 岁/ ≥ 60 岁)、IPSS-R 预后分层纳入 COX 等比例风险模型, NRAS 基因突变对 OS 的影响失去显著性($P = 0.825$), 而 PTPN11($HR = 2.137$, 95% CI 1.068~4.278, $P = 0.032$)、SETBP1($HR = 1.936$, 95% CI 1.089~3.442, $P = 0.024$)为 OS 的独立预后不良因素(表 2)。

讨 论

RAS 基因家族由 NRAS、KRAS 和 HRAS 三个成员组成。其编码的 RAS 蛋白经翻译后修饰可定位于细胞膜内侧并通过 RAS/RAF/MEK 和 RAS/PI3K 等信号通路传导细胞信号, 并最终激活核内转录因子, 调控细胞增殖、分化和凋亡^[10]。RAS 基因的激活突变可导致 RAS 通路的持续活化及细胞的过度增殖、凋亡减少, 与髓系肿瘤的发生密切相关^[1]。此外, 编码 RAS 蛋白上游分子的基因(FLT3、CBL 等)或参与 RAS 信号通路调节的基因(PTPN11、NF1 等)发生突变均可导致 RAS 调控的紊乱^[11]。

RAS 突变为 MDS 中首个被发现的基因突变。二十世纪八九十年代, 即有多个小样本报道了在 MDS 患者中检出 RAS 基因突变, 这些基于寡核

表1 伴RAS基因突变骨髓增生异常综合征(MDS)患者的临床及实验室特征

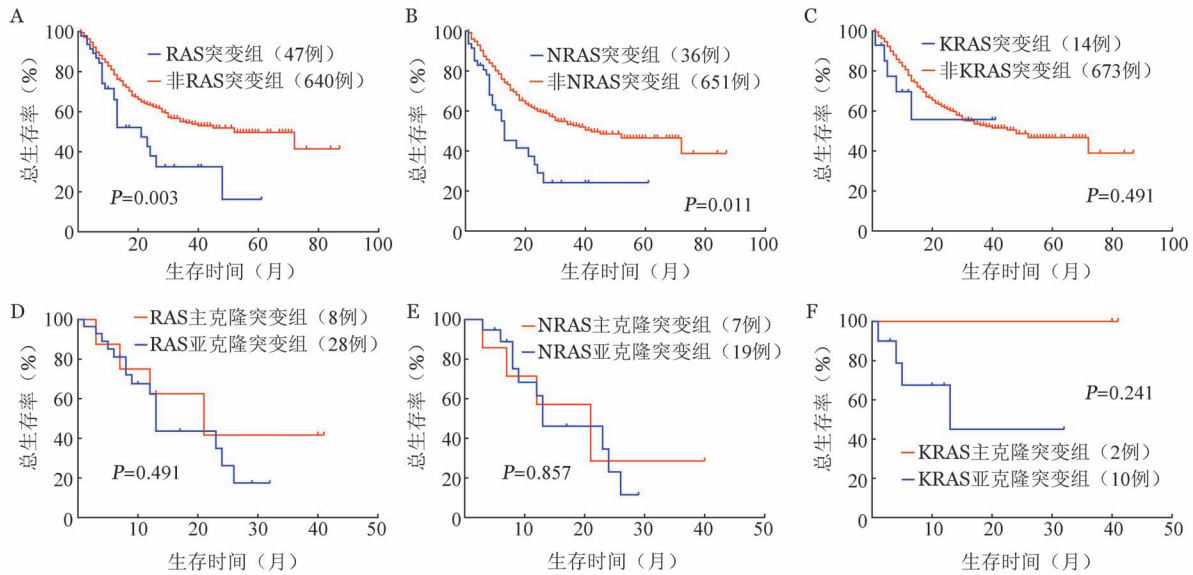
特征	RAS突变组 (52例)	NRAS突变组 (38例)	KRAS突变组 (18例)	无RAS突变组 (724例)	P1	P2	P3
性别[例(%)]					0.999	0.492	0.320
男	33(63.5)	22(57.9)	14(77.8)	461(63.7)			
女	19(36.5)	16(42.1)	4(22.2)	263(36.3)			
年龄[岁, M(范围)]	53(16~80)	56(16~80)	52(36~74)	54(14~83)	0.826	0.762	0.765
2016 WHO 诊断分型[例(%)]					<0.001	<0.001	0.011
MDS-SLD	1(1.9)	1(2.6)	0(0.0)	33(4.6)			
MDS-SLD-RS	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	22(3.0)			
MDS-MLD	8(15.4)	6(15.8)	3(16.7)	370(51.1)			
MDS-MLD-RS	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	15(2.1)			
MDS-EB1	21(40.4)	17(44.7)	5(27.8)	132(18.2)			
MDS-EB2	22(42.3)	14(36.8)	10(55.6)	123(17.0)			
5q-	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	7(1.0)			
MDS-U	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	22(3.0)			
MDS-EB[例(%)]	43(82.7)	31(81.6)	15(83.3)	255(35.2)	<0.001	<0.001	<0.001
HGB[g/L, M(范围)]	73(32~143)	73(32~143)	76(45~108)	78(31~155)	0.101	0.108	0.741
WBC[×10 ⁹ /L, M(范围)]	4.33(0.98~20.42)	3.39(0.98~13.59)	4.40(0.98~20.42)	2.71(0.61~21.17)	<0.001	0.006	0.001
ANC[×10 ⁹ /L, M(范围)]	2.13(0.18~17.37)	1.68(0.18~10.26)	2.64(0.18~17.37)	1.12(0~16.00)	<0.001	0.009	0.021
PLT[×10 ⁹ /L, M(范围)]	48(2~430)	51(2~397)	41(11~430)	62(2~694)	0.048	0.125	0.188
骨髓粒系比例[例(%)]	47(3~85)	45(3~84)	47(21~85)	40(0~96)	0.085	0.156	0.439
骨髓原始细胞比例[例(%)]	7(0~19)	7(0~18)	7(1~19)	2(0~19)	<0.001	<0.001	<0.001
染色体核型[例(%)]							
单纯+8	5(11.1)	3(9.4)	2(11.8)	52(8.2)	0.416	0.742	0.645
单纯20q-	1(2.2)	0(0.0)	1(5.9)	31(4.9)	0.715	0.391	0.581
单纯-5/5q-	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	9(1.4)	0.999	0.999	0.999
单纯-7/7q-	1(2.2)	0(0.0)	1(5.9)	14(2.2)	0.999	0.999	0.331
复杂核型	3(6.7)	3(9.4)	0(0.0)	104(16.4)	0.092	0.457	0.09
IPSS-R 预后分组[例(%)]					<0.001	0.004	0.031
极低危	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	21(3.3)			
低危	3(6.7)	2(6.3)	1(5.9)	166(26.2)			
中危	10(22.2)	8(25.0)	3(17.6)	206(32.5)			
高危	20(44.4)	15(46.9)	7(41.2)	132(20.9)			
极高危	12(26.7)	7(21.9)	6(35.3)	108(17.1)			
IPSS-R 较高危组 ^a [例(%)]	32(71.1)	22(68.8)	13(76.5)	240(37.9)	<0.001	0.001	0.002

注: MDS-SLD: MDS 伴单系发育异常; RS: 环形铁粒幼红细胞; MDS-MLD: MDS 伴多系发育异常; MDS-EB: MDS 伴原始细胞增多; MDS-U: MDS 未分类; IPSS-R: 修订的国际预后积分系统。P1: RAS 突变组与无RAS突变组比较; P2: NRAS 突变组与无RAS突变组比较; P3: KRAS 突变组与无RAS突变组比较。^a: 高危/极高危

昔酸探针的杂交测序技术大多特异地针对第12、13和61号密码子的热点突变进行检测, 检出率为3%~48%^[12-15], 并发现RAS突变常在特定的FAB分型中富集, 包括难治性贫血伴原始细胞增多(RAEB)、难治性贫血伴原始细胞增多转变型(RAEB-t)、慢性粒-单核细胞白血病(CMML)^[12,14,16]。一代测序技术的应用使得RAS突变的检出率较前有所下降, 但仍差异较大, 在0~25%之间^[17-18], 可能由于患者的构成差异、样本量的限制、不同的检测方法等多个因素所致。随着MDS诊断标准从FAB标准过渡到WHO诊断分型标准, 将FAB分型中的RAEB-t归为AML, CMML归为MDS/MPN^[19]; 随着

高通量的二代测序技术的广泛应用, 报道的MDS患者RAS基因突变频率逐渐趋于一致, 在5%~10%之间, 其中NRAS突变率约为5%, KRAS突变率为2%^[20-21]。本研究队列中NRAS及KRAS基因的突变频率及位点分布情况与上述二代测序结果基本一致。

有研究表明, RAS基因突变与RAS通路相关的基因突变在AML、幼年型粒-单核细胞白血病(JMML)等多种髓系肿瘤中互斥, 提示RAS通路中的任一基因单独发生突变即可导致RAS通路的调控紊乱从而获得生长增殖优势^[22-23]。而在MDS中RAS突变与其他基因突变之间的相关性尚不十分



A:RAS突变;B:NRAS突变;C:KRAS突变;D:RAS突变时序;E:NRAS突变时序;F:KRAS突变时序

图4 伴RAS基因突变骨髓增生异常综合征(MDS)患者生存分析

表2 影响骨髓增生异常综合征患者总生存的单因素及多因素分析

影响因素	单因素分析		多因素分析	
	HR(95% CI)	P值	HR(95% CI)	P值
年龄≥60岁	2.175(1.673 ~ 2.828)	<0.001	2.721(2.033 ~ 3.643)	<0.001
IPSS-R 预后分组				
低危/极低危	参照	1.000	参照	1.000
中危	1.730(1.096 ~ 2.730)	0.019	2.073(1.304 ~ 3.295)	0.002
高危	3.236(2.089 ~ 5.013)	<0.001	3.409(2.188 ~ 5.312)	<0.001
极高危	7.386(4.757 ~ 11.469)	<0.001	8.330(5.324 ~ 13.034)	<0.001
U2AF1 突变	1.282(0.933 ~ 1.760)	0.125		
SF3B1 突变	1.146(0.745 ~ 1.765)	0.535		
SRSF2 突变	1.655(0.925 ~ 2.963)	0.090	0.888(0.458 ~ 1.722)	0.726
TET2 突变	1.948(1.285 ~ 2.952)	0.002	1.451(0.921 ~ 2.285)	0.108
DNMT3A 突变	1.350(0.834 ~ 2.186)	0.222		
SETBP1 突变	1.724(1.077 ~ 2.760)	0.023	1.936(1.089 ~ 3.442)	0.024
RUNX1 突变	1.516(0.946 ~ 2.429)	0.084	1.268(0.758 ~ 2.119)	0.366
NRAS 突变	1.838(1.135 ~ 2.977)	0.011	1.057(0.589 ~ 1.897)	0.852
KRAS 突变	1.359(0.560 ~ 3.300)	0.491		
PTPN11 突变	2.601(1.416 ~ 4.777)	0.002	2.137(1.068 ~ 4.278)	0.032
TP53 突变	2.921(1.972 ~ 4.328)	<0.001	1.371(0.848 ~ 2.216)	0.197

明确。曾有研究报道RAS突变与RUNX1、ASXL1、EZH2、BCOR、STAG2等突变呈正相关,与SF3B1突变呈负相关^[9,24]。有意思的是,我们的结果提示RAS突变与PTPN11、FLT3等RAS通路相关的基因突变呈正相关,且常与其他信号转导及转录因子相关基因突变同时发生,如RUNX1、NPM1、WT1等,这与Ogawa等^[25]、Makishima等^[26]的研究接近。我们推测突变相关性不一致可能的原因有:①不同检测方法的检出率及检测位点不一致;②不同队列中某些

突变的发生频率不一致;③相比于AML、JMML等,RAS通路突变在MDS中发生更晚,突变负荷更低,发生单一突变的克隆获得增殖优势的能力较弱,使得携带不同突变的亚克隆共存,并加速疾病的进展。

除了相关性,我们还就RAS基因突变在MDS克隆演变中的发生阶段进行了探讨。结果表明,RAS突变多为亚克隆,其突变负荷明显低于U2AF1、DNMT3A、ASXL1等,并与PTPN11、FLT3

等接近。近年来,随着测序技术的发展,研究者们对MDS突变谱系及克隆演进模式的认知逐步深入。几个大系列的研究均提示剪接子及DNA甲基化相关的突变多发生在疾病早期,为MDS的驱动突变;染色质修饰与转录因子相关的突变则发生相对较晚,却通常早于RAS通路相关基因突变^[9,20,27]。Makishima等^[26]发现相较于高危MDS, NRAS、FLT3、PTPN11等7个基因在继发性AML中高度富集;相比于低危MDS, KRAS、TP53、RUNX1等8个基因在高危MDS中聚集出现。以上结果均证明RAS基因突变发生于MDS的较晚阶段,并与疾病进展相关。

迄今所报道的RAS基因突变大多发生在较晚期的MDS,如RAEB、RAEBt、CMML^[14,16,28],而在难治性贫血(RA)、环形铁粒幼细胞性难治性贫血(RAS)中罕见。连续性研究表明RAS突变与MDS的进展和转AML相关^[18, 29-30]。本研究的结果显示RAS突变在MDS-EB中的发生率明显高于其他分型,与文献^[18, 29-30]报道一致。本研究中RAS突变患者的WBC明显升高,PLT明显减低,骨髓原始细胞比例明显增高,这与Bjar等^[31]、Al-kali等^[3]的结果一致。曾有研究报道RAS突变与染色体+8异常相关^[32],而在我们的队列中未得到验证,可能与不同队列的患者构成比不同有关。鉴于较高的原始细胞比例及较低的PLT,我们发现RAS突变与IPSS-R较高危分组显著相关。

目前关于RAS突变在MDS中的预后效力尚无定论。部分研究表明RAS突变或单独NRAS突变提示预后不良^[15,29,33],Hasse等^[34]的结果提示NRAS突变在MDS伴复杂核型的患者中为独立的不良预后因素;也有学者认为RAS或NRAS突变状态与OS无明显相关性^[3,18,31]。多数研究未发现KRAS与不良的OS相关,而Hefarlach等^[20]对944例患者进行分析后发现KRAS突变为OS的独立预后不良因素,而NRAS突变对OS无影响。我们的结果表明,RAS突变,尤其是NRAS突变在单因素分析中与更短的OS期显著相关,KRAS突变无影响,而在纳入IPSS-R预后分层以及数个基因突变的多因素分析中NRAS突变的影响失去显著性,提示RAS突变,尤其是NRAS突变的不良预后可能主要由于其和部分高危因素的相关性所导致,如更高的骨髓原始细胞比例,高危的IPSS-R预后分层,伴发的信号转导及转录因子相关基因突变等。

我们的结果还表明PTPN11和SETBP1为独立

的不良预后因素。PTPN11属于RAS通路相关基因,其突变在JMML中为主要分子事件之一^[35],在MDS中少见。关于PTPN11在MDS中的研究较少,比较明确的是其在原发AML中的突变频率明显高于MDS^[25],且与MDS进展为AML密切相关。PTPN11的预后价值还有待多中心大样本的分析加以证实。SETBP1为表观遗传相关基因,Tefferi等^[36]的研究提示SETBP1为OS的独立预后不良因素,与我们的结果相一致。我们前期研究表明TP53突变在经复杂核型校正后不再是一独立的不良预后因素^[37],本研究在扩大样本量后与前期研究结果一致。

综上,本研究证实RAS基因突变多发生在MDS的晚期,且常与转录因子及信号转导相关的突变伴随发生,共同促进疾病进展和白血病转化。RAS通路相关的PTPN11突变是一个独立的不良预后因素,对MDS患者的预后判断有一定的指导价值。本研究尚存在一些不足,由于在随访中无法获得所有患者是否存在明确的AML转化信息,因此没有回答RAS突变对MDS转AML的影响,此外,本研究为单中心回顾性分析,结论仍需多中心前瞻性研究加以证实。

参考文献

- [1] 周霞,侯健,王东星. Ras及其信号转导异常与血液系统恶性肿瘤治疗研究进展[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(4):247-250.
- [2] Ricci C, Fermo E, Corti S, et al. RAS mutations contribute to evolution of chronic myelomonocytic leukemia to the proliferative variant[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(8):2246-2256. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2112.
- [3] Al-Kali A, Quintás-Cardama A, Luthra R, et al. Prognostic impact of RAS mutations in patients with myelodysplastic syndrome [J]. Am J Hematol, 2013, 88 (5):365- 369. DOI: 10.1002/ajh.23410.
- [4] Bowen DT, Frew ME, Hills R, et al. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years [J]. Blood, 2005, 106 (6):2113- 2119. DOI: 10.1182/blood-2005-03-0867.
- [5] 中华医学会血液学分会. 骨髓增生异常综合征中国诊断与治疗指南(2019年版)[J]. 中华血液学杂志, 2019, 40(2):89-97. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.02.001.
- [6] Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes [J]. Blood, 2012, 120(12):2454-2465. DOI: 10.1182/blood-2012-03-420489.
- [7] 李冰,王静雅,刘晋琴,等. 靶向测序检测511例骨髓增生异常综合征患者基因突变[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(12): 1012-1016. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.12.002.
- [8] Li B, Liu J, Jia Y, et al. Clinical features and biological implica-

- tions of different U2AF1 mutation types in myelodysplastic syndromes [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2018, 57 (2):80-88. DOI: 10.1002/gcc.22510.
- [9] Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes [J]. *Blood*, 2013, 122 (22):3616-3627; quiz 3699. DOI: 10.1182/blood-2013-08-518886.
- [10] Khan AQ, Kuttikrishnan S, Siveen KS, et al. RAS-mediated oncogenic signaling pathways in human malignancies [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 54: 1-13. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.03.001.
- [11] Santos F, Getta B, Masarova L, et al. Prognostic impact of RAS-pathway mutations in patients with myelofibrosis [J]. *Leukemia*, 2020, 34(3):799-810. DOI: 10.1038/s41375-019-0603-9.
- [12] Lyons J, Janssen JW, Bartram C, et al. Mutation of Ki-ras and N-ras oncogenes in myelodysplastic syndromes [J]. *Blood*, 1988, 71(6):1707-1712.
- [13] Yunis JJ, Boot AJ, Mayer MG, et al. Mechanisms of ras mutation in myelodysplastic syndrome [J]. *Oncogene*, 1989, 4 (5): 609-614.
- [14] Nakagawa T, Saitoh S, Imoto S, et al. Multiple point mutation of N-ras and K-ras oncogenes in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia [J]. *Oncology*, 1992, 49 (2):114-122. DOI: 10.1159/000227023.
- [15] Padua RA, Guinn BA, Al-Sabah AI, et al. RAS, FMS and p53 mutations and poor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow-up [J]. *Leukemia*, 1998, 12 (6):887-892. DOI: 10.1038/sj.leu.2401044.
- [16] Constantinidou M, Chalevelakis G, Economopoulos T, et al. Codon 12 ras mutations in patients with myelodysplastic syndrome: incidence and prognostic value [J]. *Ann Hematol*, 1997, 74(1):11-14. DOI: 10.1007/s002770050248.
- [17] Horiike S, Misawa S, Nakai H, et al. N-ras mutation and karyotypic evolution are closely associated with leukemic transformation in myelodysplastic syndrome [J]. *Leukemia*, 1994, 8 (8): 1331-1336.
- [18] Shih LY, Huang CF, Wang PN, et al. Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2004, 18(3):466-475. DOI: 10.1038/sj.leu.2403274.
- [19] 肖志坚, 郝玉书. 骨髓增生异常综合征的诊断和治疗 [J]. *中华血液学杂志*, 2004, 25 (1):61-62. DOI: 10.3760/j.issn:0253-2727.2004.01.022.
- [20] Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes [J]. *Leukemia*, 2014, 28(2):241-247. DOI: 10.1038/leu.2013.336.
- [21] Pellagatti A, Boulwood J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes [J]. *Eur J Haematol*, 2015, 95(1):3-15. DOI: 10.1111/ejh.12515.
- [22] Loh ML, Vattikuti S, Schubert S, et al. Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis [J]. *Blood*, 2004, 103(6):2325-2331. DOI: 10.1182/blood-2003-09-3287.
- [23] Loh ML, Sakai DS, Flotho C, et al. Mutations in CBL occur frequently in juvenile myelomonocytic leukemia [J]. *Blood*, 2009, 114(9):1859-1863. DOI: 10.1182/blood-2009-01-198416.
- [24] Niimi H, Harada H, Harada Y, et al. Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations [J]. *Leukemia*, 2006, 20 (4):635-644. DOI: 10.1038/sj.leu.2404136.
- [25] Ogawa S. Genetics of MDS [J]. *Blood*, 2019, 133 (10):1049-1059. DOI: 10.1182/blood-2018-10-844621.
- [26] Makishima H, Yoshizato T, Yoshida K, et al. Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes [J]. *Nat Genet*, 2017, 49 (2):204-212. DOI: 10.1038/ng.3742.
- [27] Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations [J]. *Blood*, 2015, 125(9):1367-1376. DOI: 10.1182/blood-2014-11-610543.
- [28] Neubauer A, Greenberg P, Negrin R, et al. Mutations in the ras proto-oncogenes in patients with myelodysplastic syndromes [J]. *Leukemia*, 1994, 8(4):638-641.
- [29] Takahashi K, Jabbour E, Wang X, et al. Dynamic acquisition of FLT3 or RAS alterations drive a subset of patients with lower risk MDS to secondary AML [J]. *Leukemia*, 2013, 27 (10): 2081-2083. DOI: 10.1038/leu.2013.165.
- [30] Badar T, Patel KP, Thompson PA, et al. Detectable FLT3-ITD or RAS mutation at the time of transformation from MDS to AML predicts for very poor outcomes [J]. *Leuk Res*, 2015, 39 (12): 1367-1374. DOI: 10.1016/j.leukres.2015.10.005.
- [31] Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364 (26):2496-2506. DOI: 10.1056/NEJ-Moa1013343.
- [32] de Souza Fernandez T, Menezes de Souza J, Macedo Silva ML, et al. Correlation of N-ras point mutations with specific chromosomal abnormalities in primary myelodysplastic syndrome [J]. *Leuk Res*, 1998, 22(2):125-134. DOI: 10.1016/s0145-2126(97)00112-4.
- [33] Paquette RL, Landaw EM, Pierre RV, et al. N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome [J]. *Blood*, 1993, 82(2):590-599.
- [34] Haase D, Stevenson KE, Neuberger D, et al. TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups [J]. *Leukemia*, 2019, 33 (7): 1747-1758. DOI: 10.1038/s41375-018-0351-2.
- [35] Flotho C, Kratz C, Niemeyer CM. Targeting RAS signaling pathways in juvenile myelomonocytic leukemia [J]. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(6):715-725. DOI: 10.2174/138945007780830773.
- [36] Tefferi A, Lasho TL, Patnaik MM, et al. Targeted next-generation sequencing in myelodysplastic syndromes and prognostic interaction between mutations and IPSS-R [J]. *Am J Hematol*, 2017, 92(12):1311-1317. DOI: 10.1002/ajh.24901.
- [37] 黄慧君, 史仲珣, 李冰, 等. 伴 TP53 基因异常骨髓增生异常综合征患者的临床特征及预后研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2019, 40 (3): 215-221. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.03.010.

(收稿日期:2020-05-06)

(本文编辑:刘爽)