

伴ETV6-RUNX1融合基因阳性的儿童急性淋巴细胞白血病患者造血干细胞移植后监测该融合基因的意义

洪艳 秦亚湊 徐永艳 周松海 王昱 许兰平 张晓辉 黄晓军 赵晓甦

【摘要】 目的 观察伴有ETV6-RUNX1融合基因阳性的儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)患者异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)后融合基因表达水平的变化特征,初步探讨其临床意义。方法 回顾性分析2009年5月至2016年3月行allo-HSCT的13例ETV6-RUNX1融合基因阳性儿童ALL患者的临床资料,采用实时荧光定量PCR法监测融合基因水平,并结合临床转归进行相关分析。结果 13例患者中男7例,女6例,中位年龄11(5~17)岁。移植前6例阳性,移植后7例阳性(5例为移植前阳性者,2例为新增者);其移植后基因中位转阳时间为137(28~270)d,第1次基因阳性中位表达水平为0.034%(0.004%~0.061%),从基因第1次阳性至血液学复发间隔的中位时间为196(28~666)d,其中4例血液学复发(均死亡),中位复发时间为294(104~803)d。结论 移植前伴有ETV6-RUNX1融合基因阳性的儿童ALL患者移植后再次阳性的概率较高;移植后融合基因阳性者预后差。

【关键词】 造血干细胞移植; 白血病,淋巴细胞,急性; 融合基因,ETV6-RUNX1; 微小残留病

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81300440);首都卫生发展科研专项项目(2016-1-4082);国家自然科学基金(81670175)

Clinical significance of monitoring ETV6-RUNX1 fusion gene expression in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation Hong Yan, Qin Yazhen, Xu Yongyan, Zhou Songhai, Wang Yu, Xu Lanping, Zhang Xiaohui, Huang Xiaojun, Zhao Xiaosu. Peking University People's Hospital, Peking University Institute of Hematology, Beijing 100044, China
Corresponding author: Zhao Xiaosu, Email: zhao.xiaosu@outlook.com

【Abstract】 Objective To investigate the clinical significance of monitoring ETV6-RUNX1 fusion gene in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) after allogeneic stem cell transplantation (allo-HSCT). **Methods** Clinical data of 13 children received allo-HSCT in Peking University Institute of Hematology from May 2009 to March 2016 were retrospectively collected. The ETV6-RUNX1 gene was examined by real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR). The correlation between its expression level and the disease status was analyzed. **Results** Of 13 enrolled ALL cases, the ETV6-RUNX1 expression of 7 patients converted to positive after transplant at a median time of 137 days (range, 28–270 days). The expression level of the first positive sample was 0.034% (range, 0.004%–0.061%). The duration from ETV6-RUNX1 positive to hematological relapse was 196 days (range, 28–666 days). Four patients experienced relapse at a median time of 294 days (range, 104–803 days) after allo-HSCT. The ETV6-RUNX1 expression converted to positive prior to MRD. Patients with positive ETV6-RUNX1 gene expression pre-transplantation would be more likely to relapse. **Conclusion** Monitoring ETV6-RUNX1 by RQ-PCR could be used to evaluate MRD status after allo-HSCT. Patients with positive ETV6-RUNX1 after transplant had a poor prognosis.

【Key words】 Hematopoietic stem cell transplantation; Leukemia, lymphocytic, acute; Fusion gene, ETV6-RUNX1; Minimal residual disease

Fund program: The Youth Program of National Natural Science Foundation of China (81300440); The Capital Health Development Special Scientific Research Projects (2016-1-4082); National Natural Science Foundation of China(81670175)

伴 t(12;21)(p13;q22) 细胞遗传学异常的急性淋巴细胞白血病(ALL)占儿童 ALL 的 20%~25%, 易位导致位于染色体 12p13 的 TEL 基因和位于染色体 21q22 的 AML1 基因断裂、重接形成 TEL-AML1 融合基因^[1-2]。在 NCCN 指南(2015.V2)中, 将 TEL-AML1 更名为 ETV6-RUNX1。此前有研究者报道该亚型患者预后较好, 虽然常出现晚期复发, 但 5 年无事件生存(EFS)率可达 80%~97%^[3-5]。de Haas 等^[6]认为 ETV6-RUNX1 融合基因可作为微小残留病(MRD)标志, 在诱导化疗后的表达水平有重要的预后价值。但该融合基因能否作为异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)后 MRD 的预测指标尚未见报道。在本研究中我们对 ETV6-RUNX1 融合基因阳性的儿童 ALL 患者 allo-HSCT 后该融合基因的表达进行动态检测, 观察其与疾病复发及治疗的相关性, 为移植后该类型患者临床复发的干预及治疗提供依据。

病例与方法

1. 病例: 以 2009 年 5 月至 2016 年 3 月在我院行 allo-HSCT 且伴 ETV6-RUNX1 融合基因阳性的 13 例儿童 ALL 患者为研究对象, 所有患者均经临床、细胞形态学、流式细胞术、分子学及细胞遗传学检查确诊, 诊断参照文献^[7]标准。

2. 移植预处理方案及移植物抗宿主病(GVHD)的预防: HLA 同胞相合患者采用改良白消安/环磷酰胺(Bu/Cy)方案, HLA 配型不合患者在改良 Bu/Cy 基础上加用抗胸腺细胞球蛋白(ATG)^[8]。所有患者均接受环孢素 A+吗替麦考酚酯+短程甲氨蝶呤预防 GVHD。

3. 标本采集: 分别于初诊、移植前、+30 d、+60 d、+90 d、+180 d 等多时间点留取患者骨髓标本 4 ml, EDTA 抗凝, 分离骨髓单个核细胞, 采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA 后存放于 -80 °C 冰箱备用。

4. ETV6-RUNX1 融合基因的定量检测: 采用 ABI Prism 7500 型荧光实时定量(RQ)-PCR 仪(美国 ABI 公司产品)进行检测, 相关试剂为仪器配套产品。反应体系 10 μl: 上、下游引物各 0.3 μmol/L、TaqMan 探针 0.2 μmol/L、2×TaqMan 通用 PCR 公共

体系 5 μl、cDNA 1 μl(相当于 100 ng RNA)。引物序列 ETV6-RUNX1 上游引物: 5'-CTCTGTCTCCCC-GCCTGAA-3', 下游引物: 5'-CGGCTCGTGCTG-GCAT-3'; 探针序列: (FAM)-TCCCAATGGGCAT-GGCGTGC-(TAMRA)^[9]。PCR 条件: 50 °C 2 min, 1 个循环; 95 °C 10 min, 1 个循环; 95 °C 15 s, 62 °C 1 min, 40 个循环。内参基因为 ABL。融合基因表达水平(%)=ETV6-RUNX1 融合基因拷贝数/ABL 基因拷贝数×100%。

5. 免疫残留及 Wilms tumor 1(WT1)基因检测: 参照文献^[8, 10]方法, 采用 8 色流式细胞术(FCM)检测免疫残留, 阳性指检测到表型异常淋巴幼稚细胞, 比例≥0.01%。采用实时定量 PCR 法检测 WT1 基因表达水平。WT1 表达水平由以下公式计算: WT1 基因表达水平(%)=WT1 拷贝数/ABL 拷贝数×100%, <0.6% 为阴性。MRD 阳性定义: 连续 2 次 WT1≥0.6%, 或连续 2 次 FCM 检测阳性, 2 次间隔时间至少 2 周; 或同一次标本 WT1>0.6% 且 FCM 检测阳性。

6. 随访及疗效判定: 所有病例通过门诊复查或电话进行随访, 随访截至 2016 年 10 月 18 日, 中位随访时间 805(108~2 724)d。观察患者一般情况、复发及干预措施、生存情况, 监测移植后 MRD。

复发包括血液学复发、髓外复发, 均通过骨髓形态学检查或组织病理学检查确诊。对 MRD 阳性患者进行的干预措施包括化疗、减停免疫抑制剂、化疗联合供者淋巴细胞输注(DLI)、嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T)免疫治疗等。

结 果

1. 患者主要临床特征和融合基因表达水平: 13 例患者中男 7 例, 女 6 例, 中位年龄 11(3~17)岁。13 例患者中 3 例在外院初诊时未查 ETV6-RUNX1 融合基因, 9 例在外院初诊时 ETV6-RUNX1 融合基因阳性, 1 例初诊时在我院检查 ETV6-RUNX1 融合基因表达水平为 108.9%。13 例患者中移植前有 6 例融合基因阳性, 中位表达水平为 0.026%(0.010%~1.200%), 均获形态学完全缓解(CR); 移植后有 7 例患者融合基因阳性, 第 1 次出现阳性的中位时间为 137(28~270)d, 其阳性中位表达水平为 0.034%

(0.004%~0.061%),其中4例(例2、5、6、12)出现血液学复发,中位复发时间为278(87~803)d,移植后融合基因持续阴性的6例患者均无复发(表1)。

2. 移植后 ETV6-RUNX1 融合基因水平与其他 MRD 监测指标的相关性:6 例患者移植后 ETV6-RUNX1 基因阳性2次以上,在各时间点检测该融合基因的同时,还进行了骨髓形态学、FCM、WT1 基因水平检测。移植后 ETV6-RUNX1 阳性与 FCM、WT1 结果对比见表2。同一标本中 FCM 与 ETV6-RUNX1 基因均检测共 78 例次,所有患者出现免疫残留阳性时 ETV6-RUNX1 基因均阳性。同一标本中 WT1 与 ETV6-RUNX1 基因均检测共 50 例次,其中共 16 例次 ETV6-RUNX1 及 WT1 表达双阳性。ETV6-RUNX1 基因检验血液学复发的敏感度为

1.00,特异度为0.854,最佳检验界值为1.275%。

3. 临床干预/治疗措施对 ETV6-RUNX1 融合基因水平的影响:4 例患者(例2、3、6、13)在移植后融合基因阳性时给予抢先干预。

表2 ETV6/RUNX1 融合基因检测与流式细胞术(FCM)、WT1 基因检测结果的相关性分析(例次)

	ETV6-RUNX1(+)	ETV6-RUNX1(-)
FCM(+)	24	0
FCM(-)	21	33
WT1(+)	16	1*
WT1(-)	16	17

注:同一标本中 FCM 与 ETV6-RUNX1 基因都检测共 78 例次;同一标本中 WT1 与 ETV6-RUNX1 基因都检测共 50 例次;*WT1 基因水平为 0.72

表1 13例患者临床特征及 ETV6-RUNX1 融合基因表达与免疫残留水平

例号	性别	年龄(岁)	移植前状态	ETV6-RUNX1 融合基因表达水平(%)											
				初诊	移植前	+30 d	+60 d	+90 d	+135 d	+150 d	+180 d	+210 d	+240 d	+270 d	+360 d
1	女	17	CR1	+	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0	0
2	男	11	CR2	+	0.030	0	0	0	0.01	-	0	121.00	1.0	0.03	0.18
3	男	12	CR1	298	0.010	0.034	0	0	-	0	0	0.04	59.1	46.30	0
4	女	10	CR1	+	0	0	0	0	0	-	0	-	-	0.01	0
5	女	16	CR1	109	0.890	0	0.05	53.20	228.00	-	251.00	-	-	-	-
6	女	10	CR2	+	-	0	0	0	0.04	0.34	3.00	0	0	0	0.01
7	女	16	CR1	+	0	0	0	0	0	-	0	-	-	0	0
8	男	3	CR1	+	0.015	0	0	0	0	-	0	-	-	0	0
9	男	13	CR1	+	0	0	0	0	-	0	-	-	-	0	0
10	男	14	CR2	+	0	0	0	0	0	-	0	-	-	0	-
11	女	7	CR2	+	0	-	0	0	0	0	0	-	-	0	-
12	男	5	CR2	+	1.200	0.004	0.07	29.80	-	-	-	-	-	-	-
13	男	6	CR3	+	0.023	0	0	0	0.06	0.60	16.60	28.70	-	-	-

例号	免疫残留水平(%)										复发	转归
	+30 d	+60 d	+90 d	+135 d	+150 d	+180 d	+210 d	+240 d	+270 d	+360 d		
1	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	否	存活
2	0	0	0	0	-	0	1.18	0.03	0	0	是	死亡
3	0	0	0	-	-	0	0	-	1.19	0	否	存活
4	0	0	0	0	-	0	-	-	0	0	否	存活
5	0	0	9.87	10.80	-	39.55	-	-	-	-	是	死亡
6	0	0	0	0	0.02	0.09	0	0	0	0	是	死亡
7	0	0	0	0	-	0	-	-	0	0	否	存活
8	0	0	0	0	-	0	-	-	0	0	否	存活
9	0	0	0	-	0	-	-	-	0	0	否	存活
10	0	0	0	-	-	0	-	-	-	0	否	存活
11	0	0	0	-	0	0	-	-	0	-	否	存活
12	0	0	3.54	-	-	-	-	-	-	-	是	死亡
13	0	0	0	0	0	1.43	4.66	-	-	-	否	存活

注:CR:完全缓解;+:融合基因定性检测阳性;-:未检测

例2在+135 d时融合基因阳性未干预自行转阴,3个月后ETV6-RUNX1又升高至121.00%,同时FCM检测阳性,未干预自行转阴,但之后融合基因水平持续升高至120.2%(+309 d),同时免疫残留水平为1.45%,给予DLI仍未能阻止其血液学复发。复发后换用hyper-CAVD(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、地塞米松)-B方案化疗联合DLI后1个月复查获CR,FCM检测阴性、融合基因水平下降。DLI后2个月再次血液学复发,融合基因水平为132.7%,免疫残留水平为14.84%,WT1基因水平为3.1%,再次给予化疗联合DLI仍无法达到CR。于第1次移植后768 d进行二次移植,二次移植后472 d出现融合基因阳性,给予CODP(环磷酰胺+长春新碱+柔红霉素+泼尼松)方案化疗后一度转阴,最终中枢和骨髓复发,放弃治疗后死亡。

例3在+30 d时融合基因阳性未干预自行转阴,+210 d再次阳性(0.04%),未干预,1个月后升高至59.1%,给予化疗(盐酸伊达比星+环磷酰胺+硫酸长春地辛)联合DLI干预有效,融合基因再次转阴。

例6在+135 d出现融合基因阳性(0.04%),未干预,+150 d升高至0.34%同时FCM检测阳性,给予化疗(大剂量甲氨蝶呤+硫酸长春地辛)联合DLI无效,此后间断给予5次化疗(依次为大剂量阿糖胞苷+依托泊苷+培门冬酶,阿糖胞苷,大剂量阿糖胞苷,大剂量甲氨蝶呤+硫酸长春地辛,大剂量阿糖胞苷)和4次CAR-T治疗,融合基因持续低水平表达。末次CAR-T治疗后表达水平为0.92%,给予化疗(大剂量阿糖胞苷)干预后外周血融合基因表达水平上升至40.1%,最终死于血液学复发。

例13在+135 d时融合基因转阳(0.06%),未干预,180 d时融合基因表达水平持续上升至16.60%,给予化疗(甲氨蝶呤+培门冬酶)联合DLI后无效,210 d时融合基因水平上升至28.70%,免疫残留为4.66%,目前再次给予化疗(阿糖胞苷+依托泊苷)联合DLI干预,疗效尚未评估。

2例患者(例5、12)在融合基因转阳后未干预,而后血液学复发。例5在+60 d时融合基因转阳,未干预,+90 d血液学复发后给予化疗(依托泊苷+异环磷酰胺+培门冬酶)联合DLI治疗后无效,最终复发死亡。

例12移植后1个月融合基因持续阳性,未干预,+90 d时融合基因表达水平为29.80%,免疫残留为3.54%,患者放弃治疗,最终复发死亡。

例4在+270 d融合基因为0.01%,未行干预,3个月后复查自行转阴,截至随访结束融合基因持续阴性。

讨 论

既往的研究显示,以FCM检测免疫残留和白血病特异性融合基因/非特异性基因(如WT1)的检测作为检测MRD的手段,移植前MRD是移植后复发的独立危险因素^[11-12]。本研究结果中,移植前6例ETV6-RUNX1融合基因阳性患者中5例移植后出现阳性,其中3例死于复发,1例暂未复发,1例抢先干预有效。移植前融合基因阳性的患者复发率和移植后融合基因再次转阳率明显高于移植前阴性者。虽然此前的报道提示ETV6-RUNX1融合基因是预后较好的ALL类型^[3-5],但我们的研究结果表明,伴有ETV6-RUNX1融合基因的患者化疗后融合基因未能转阴,即使行allo-HSCT预后仍不如化疗后融合基因转阴组,这一结果与近期Lee等^[13]以亚洲人群为研究对象的报道相符,但是这一结论仍需更大的样本量验证。

赵玮婷等^[14]报道采用RQ-PCR检测ETV6-RUNX1融合基因作为MRD监测的方法,较常规骨髓细胞形态学、FCM检测具有更高的敏感度,能早期预测复发。Lee等^[13]以首次诱导化疗后30 d ETV6-RUNX1融合基因表达水平>0.1%为判断MRD阳性的标准,结果显示MDR阳性是影响患者EFS的独立因素。但移植后该基因是否能作为判断MRD阳性指标预测复发尚未见报道。我们的研究结果显示,移植后ETV6-RUNX1融合基因阳性的患者首次阳性时融合基因的表达水平都较低(<0.1%),首次ETV6-RUNX1基因阳性到血液学复发的间隔较长[196(28~666)d];除例5在移植后早期迅速复发,其余患者融合基因上升速度平缓且有反复,可能与患者移植后免疫重建恢复的快慢有关,给抢先干预留下了时间窗。

免疫残留作为B细胞ALL MRD监测指标的临床意义已获得肯定^[14]。在本研究中,我们观察到ETV6-RUNX1融合基因和免疫残留存在一定的相关性,且融合基因阳性早于免疫残留,说明该融合基因可作为该类型白血病患者移植后MRD监测更为敏感的指标。此外,除1例次ETV6-RUNX1融合基因阴性而WT1阳性,但WT1表达水平较低(0.72%)特异性不足,其余例次中融合基因阳性早于WT1,从另一个角度提示特异性基因的敏感性优

于泛白血病基因。因此,ETV6-RUNX1融合基因可作为移植后MRD的监测指标,并具有更高的敏感性和特异性。

在我们的研究中,由于未明确移植后监测该基因的临床意义,对移植后ETV6-RUNX1融合基因阳性患者干预的时机和方案不同,但可以看出移植后该融合基因阳性即使表达水平很低也明确预示着复发,分子生物学持续不缓解的患者预后不佳,这一结果与文献[16]的报道相符。因此,低水平分子生物学复发时合理干预可能更有意义。

综上,伴有ETV6-RUNX1融合基因的ALL儿童患者如移植前融合基因阳性,移植后再次阳性的概率较高,移植后阳性提示预后不良。本研究结果提示通过RQ-PCR法检测ETV6-RUNX1融合基因可作为移植后监测该类型白血病MRD的方法之一,因而建议移植后密切监测ETV6-RUNX1融合基因,临床上可根据该基因水平变化给予复发干预,而抢先干预的时机及何种干预方式能最终改善患者预后,仍需更大样本的临床研究和更长时间的随访来证实。

参考文献

- [1] Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12; 21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis [J]. *Leukemia*, 1995, 9(12): 1985-1989.
- [2] Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(11): 4917-4921.
- [3] Forestier E, Heyman M, Andersen MK, et al. Outcome of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO-ALL-1992 protocol: frequent late relapses but good overall survival [J]. *Br J Haematol*, 2008, 140(6): 665-672. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.06980.x.
- [4] Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, et al. Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(13): 2186-2191. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.3552.
- [5] Bhojwani D, Pei D, Sandlund JT, et al. ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy [J]. *Leukemia*, 2012, 26(2): 265-270. DOI: 10.1038/leu.2011.227.
- [6] de Haas V, Breunis WB, Dee R, et al. The TEL-AML1 real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) might replace the antigen receptor-based genomic PCR in clinical minimal residual disease studies in children with acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2002, 116(1): 87-93.
- [7] 中华医学会血液学分会, 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会. 中国成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗专家共识 [J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(9): 789-792. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2012.09.028.
- [8] Zhao XS, Jin S, Zhu HH, et al. Wilms' tumor gene 1 expression: an independent acute leukemia prognostic indicator following allogeneic hematopoietic SCT [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2012, 47(4): 499-507. DOI: 10.1038/bmt.2001.121.
- [9] Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program [J]. *Leukemia*, 2003, 17(12): 2318-2357.
- [10] Zhao XS, Liu YR, Zhu HH, et al. Monitoring MRD with flow cytometry: an effective method to predict relapse for ALL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Ann Hematol*, 2012, 91(2): 183-192. DOI: 10.1007/s00277-011-1285-1.
- [11] Ma L, Hao S, Diong C, et al. Pre-transplant achievement of negativity in minimal residual disease and French-American-British L1 morphology predict superior outcome after allogeneic transplant for Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia: an analysis of Southeast Asian patients [J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(5): 1362-1369. DOI: 10.3109/10428194.2014.956318.
- [12] Zhao XS, Qin YZ, Liu YR, et al. The impact of minimal residual disease prior to unmanipulated haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia in complete remission [J]. *Leuk Lymphoma*, 2017, 58(5): 1135-1143. DOI: 10.1080/10428194.2016.1239264.
- [13] Lee JW, Kim SK, Jang PS, et al. Outcome and Prognostic Factors for ETV6/RUNX1 Positive Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Treated at a Single Institution in Korea [J]. *Cancer Res Treat*, 2017, 49(2): 446-453. DOI: 10.4143/crt.2016.211.
- [14] 赵玮婷, 高怡瑾, 朱晓华, 等. TEL-AML1融合基因定量检测在急性白血病患者微小残留病监测中的应用 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2009, 24(15): 1158-1160, 1171.
- [15] Holowiecki J, Krawczyk-Kulis M, Giebel S, et al. Status of minimal residual disease after induction predicts outcome in both standard and high-risk Ph-negative adult acute lymphoblastic leukaemia. The Polish Adult Leukemia Group ALL 4-2002 MRD Study [J]. *Br J Haematol*, 2008, 142(2): 227-237. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07185.x.
- [16] Madzo J, Zuna J, Muziková K, et al. Slower molecular response to treatment predicts poor outcome in patients with TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia: prospective real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction study [J]. *Cancer*, 2003, 97(1): 105-113.

(收稿日期:2016-11-15)

(本文编辑:刘志红)