

定量多色FISH检测儿童ETV6-RUNX1阳性急性淋巴细胞白血病的异质性及克隆演化

张丽 胡林萍 刘晓明 郭晔 杨文钰 张家源 刘芳 刘天峰 王书春
陈晓娟 阮敏 戚本泉 常丽贤 陈玉梅 邹尧 竺晓凡

【摘要】 目的 研究儿童ETV6-RUNX1阳性急性淋巴细胞白血病(ALL)中肿瘤细胞的异质性及克隆演化情况,探讨克隆演化与预后的相关性。**方法** 应用单细胞定量多基因荧光原位杂交(QM-FISH)技术对2006年2月至2011年6月收治的48例ETV6-RUNX1阳性ALL患儿的骨髓标本进行多个基因拷贝数变异的检测,并进行克隆演化分析。将4例复发患儿初诊与复发时的情况进行比较。**结果** 在48例行QM-FISH检测的患儿中,初诊时为1个克隆的有34例(70.8%),2个克隆的有9例(18.8%),≥3个克隆的有5例(10.4%)。患儿的肿瘤细胞存在异质性,各亚克隆之间呈线性或树枝状演化。白血病细胞的亚克隆数与患者预后无相关性(5年总生存率: $P=0.469$;5年无病生存率: $P=0.116$)。复发克隆可能与初诊时克隆一致,也可能为新出现克隆。复发克隆为新出现克隆的患儿再次缓解时间短,预后更差。**结论** ETV6-RUNX1阳性ALL患儿肿瘤细胞存在异质性及克隆演化情况。QM-FISH有助于研究白血病细胞的克隆演化,复发克隆为新出现克隆的患儿可能预后更差。

【关键词】 儿童; 白血病,淋巴细胞,急性; DNA拷贝数异常

基金项目:国家自然科学基金(81200396、81470339);天津市科技支撑计划(12ZCDZSY18100);天津市卫生计生委科技基金重点项目(2014KR12);天津市疾病预防控制中心科技基金项目(CDCKY1406)

Heterogeneity and clonal evolution in pediatric ETV6-RUNX1⁺ acute lymphoblastic leukemia by quantitative multigene fluorescence in situ hybridization Zhang Li, Hu Linping, Liu Xiaoming, Guo Ye, Yang Wenyu, Zhang Jiayuan, Liu Fang, Liu Tianfeng, Wang Shuchun, Chen Xiaojuan, Ruan Min, Qi Benquan, Chang Lixian, Chen Yumei, Zou Yao, Zhu Xiaofan. Department of Pediatrics, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China
Corresponding author: Zhu Xiaofan, Email: xfzhu1981@126.com

【Abstract】 Objective To evaluate heterogeneity and clonal evolution in pediatric ETV6-RUNX1⁺ acute lymphoblastic leukemia (ALL) in China. **Methods** Totally 48 children (<14 years) with newly diagnosed ETV6-RUNX1⁺ ALL in Institute of Hematology and Blood Disease Hospital, CAMS and PUMC, from February 2006 to June 2011 were included. The copy number variations were analyzed by quantitative multigene fluorescence in situ hybridization (QM-FISH) in 48 patients. Non-normal distribution of measurement data were shown with Median (range), count data were shown with percent (%). Overall survival and event-free survival were estimated by the Kaplan-Meier method and compared with the log-rank test. **Results** Forty-eight patients were tested by QM-FISH. Of 48 patients, 70.8% harbored one clone, 18.8% two subclones, and 10.4% three or more subclones. The clone heterogeneity was detected by two different models: the linear succession model and the branching evolution model. ETV6-RUNX1⁺ ALL relapse evolved from an ancestral clone or a new clone. The patients relapsed from a new clone got the worse outcome. **Conclusion** The clone evolution was detected in pediatric ETV6-RUNX1⁺ ALL in China. QM-FISH might be helpful to evaluate the outcome of relapsed patients. A new clone was

associated with a poorer outcome.

【Key words】 Child; Leukaemia, lymphoblastic, acute; DNA copy number variation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81200396, 81470339); National Science and Technology Infrastructure Program of Tianjin (12ZCDZSY18100); Key Project of Tianjin Municipal Health and Family Planning Commission (2014KR12); Tianjin Center for Disease Control and Prevention and Control of Science and Technology Fund Project (CDCKY1406)

近年来,多项研究表明肿瘤细胞存在异质性^[1-4]。急性淋巴细胞白血病(ALL)为血液系统的恶性肿瘤。Gawad等^[4]在6例儿童ALL患者中进行了1479个单细胞的全基因组测序,发现在同一患者体内,即使是在同一疾病时期,仍存在4000种以上的白血病亚克隆,从而肯定了在ALL中存在巨大的克隆异质性的观点。因而,在ALL患儿中,肿瘤细胞存在异质性。

Anderson等^[5]对ETV6-RUNX1阳性ALL患儿进行单细胞水平研究,发现不同细胞内的基因改变并不一致,不同的亚克隆呈线状或树枝状演化。遗憾的是,Anderson等未对ETV6-RUNX1亚克隆状况与预后的相关性进行探讨。目前,在中国儿童ETV6-RUNX1阳性ALL中肿瘤细胞的异质性及克隆演化情况尚未见报道。为了解我国儿童ETV6-RUNX1阳性ALL中肿瘤细胞的异质性及克隆演化情况,探讨其与预后的相关性,我们应用单细胞定量多基因荧光原位杂交(quantitative multigene fluorescence in situ hybridization, QM-FISH)技术对2006年2月至2011年6月我院收治的48例初诊ETV6-RUNX1阳性ALL患儿进行回顾性研究,现报告如下。

对象与方法

1. 对象:选取2006年2月至2011年6月我院收治的初诊住院ETV6-RUNX1阳性ALL患儿进行回顾性分析。共对48例ETV6-RUNX1阳性ALL患儿初诊骨髓标本进行QM-FISH检测,选取10名健康志愿儿童作为正常对照,取外周血进行QM-FISH检测。纳入本研究的患儿及正常儿童志愿者的监护人均签署知情同意书。本研究通过医院伦理委员会审批。

2. 治疗方案:2006年1月至2008年3月收治的患儿治疗方案参见文献[6]。2008年4月至2011年6月收治的患儿治疗方案参见文献[7]。

3. QM-FISH:依据前期工作的结果,我们选用拷贝数改变频率最高的CDKN2A/2B、PAX5基因及

对ALL预后影响较大的IKZF1基因参与组成基因探针组合。最终的基因探针组合包括ETV6(TEL)、RUNX1(AML1)、PAX5、P16(CDKN2A/2B)和IKZF1基因探针。TEL-AML1探针购自美国Vysis公司,其中RUNX1(AML1)基因使用红色荧光染料(符号R),ETV6(TEL)基因使用绿色荧光染料(符号G),产生的融合信号为黄色(符号F)。其余探针制作所选定的细菌人工染色体(BAC)克隆号见表1,依据文献[8]描述的步骤进行探针的制备、制片及图像采集工作。进行QM-FISH检测的每例患儿骨髓标本计数200个ETV6-RUNX1阳性的白血病细胞,每个细胞的统计内容包括:ETV6-RUNX1融合信号(F)、ETV6(G)、RUNX1(R)、PAX5(O)、CDKN2A/2B(P)和IKZF1(B)信号的个数。基因拷贝数改变的比例大于相应的cut-off值则为阳性。cut-off值的确定:正常人无ETV6-RUNX1融合信号,基因ETV6、RUNX1、PAX5、CDKN2A/2B和IKZF1均有2个等位基因信号,然而可能因为信号在空间结构上的重叠、扭转等造成融合基因、扩增、缺失等假阳性现象,计数10名正常对照标本中各种基因异常的比例并计算其均数(\bar{x})与标准差(s),以 $\bar{x}+2s$ 为cut-off值。基因拷贝数改变的cut-off值如表2所示。将信号表型完全相同的细胞称为一个亚克隆。阳性亚克隆是指所含基因拷贝数改变为阳性且比例>3%。

表1 PAX5、P16和IKZF1基因选定的细菌人工染色体克隆片段及标记

基因	荧光染料	克隆号	符号
PAX5	PF590-dUTP(橙色)	RP11-243F8、RP11-101P22、 RP11-450B8	O
P16	HyPer5-dCTP(紫色)	RP11-97A22、RP11-55A19	P
IKZF1	PF415-dUTP(蓝色)	RP11-663L2	B

4. 随访:随访时间截止至2015年11月20日或失访日期(失访者),失访定义为病历中无记载病情转归或无法电话联系到患者。中位随访时间65.5

(8~115)个月。无复发生存(RFS)期定义为自诊断到复发(包括分子生物学和临床复发)或末次随访日期。无事件生存(EFS)期定义为自诊断到第1次事故[包括分子生物学和临床复发、在完全缓解(CR)期间的死亡]或末次随访日期。无病生存(DFS)期指CR至白血病复发或在CR期间死亡或末次随访日期。总生存(OS)期指自诊断到死亡或末次随访日期。

表2 定量多基因荧光原位杂交中各探针的cut-off值(%)

探针	缺失 1个信号	缺失 2个信号	获得 1个信号	基因融合
ETV6-RUNX1				0.81
ETV6	1.91	0.46		
RUNX1	1.93	0.46	1.36	
PAX5	1.94	0.56		
CDKN2A/2B	1.92	0.47		
IKZF1	1.35	0.47		

5. 统计学处理:所有数据采用SPSS 16.0软件进行处理。非正态分布的计量资料用M(范围)表示,计数资料以例(%)表示。生存分析应用Kaplan-Meier生存曲线,Log-rank检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般资料:48例ETV6-RUNX1阳性的ALL

患儿进行QM-FISH检测。其中男24例(50.0%)、女24例(50.0%),中位年龄4(1~13)岁。中位初诊WBC 9.35(1.75~239.80)×10⁹/L,中位初诊PLT 51.5(9~294)×10⁹/L。

2. 生存分析:48例患儿中,6例复发。2例复发后放弃治疗死亡,4例治疗缓解后再次复发死亡。5年RFS率为(87.4±4.8)%,EFS率为(85.4±5.1)%,DFS率为(85.4±5.1)%,OS率为(87.1±4.9)%。

3. QM-FISH检测多个基因拷贝数变异及克隆演化分析:48例初诊ETV6-RUNX1阳性ALL患儿中,ETV6-RUNX1融合基因及ETV6、RUNX1和CDKN2A/2B基因检测到基因拷贝数的改变。2例融合信号增加;6例RUNX1信号减少,6例RUNX1信号增加;24例ETV6信号减少,1例ETV6信号增加;2例CDKN2A/2B信号减少。初诊时为1个克隆者34例(70.8%),2个克隆者9例(18.8%),≥3个克隆者5例(10.4%)。初诊患儿的各亚克隆之间呈线性或树枝状演化(举例见图1)。将患者按照白血病细胞的亚克隆数进行分组,1个克隆组、2个克隆组、≥3个克隆组患儿的5年DFS率分别为(85.3±6.1)%、100.0%、(60.0±21.9)% (P=0.116)(图2A);5年OS率分别为(81.4±8.3)%、100.0%、(80.0±17.9)% (P=0.469)(图2B)。各组患者间的预后差异无统计学意义。

应用QM-FISH的方法对有初诊及复发时骨髓标本的3例患儿进行检测及比较,通过检测我们发现:例1第1次复发时的主要克隆与初诊时的主要

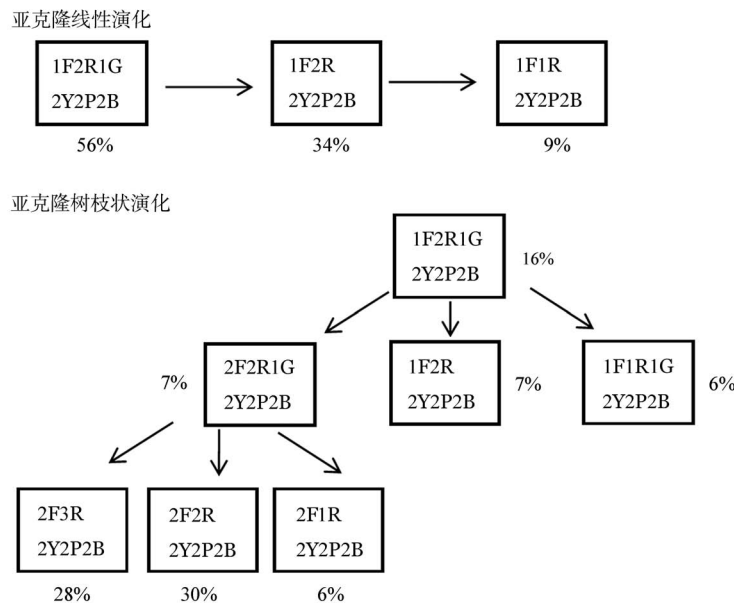


图1 初诊患儿骨髓中白血病细胞的各亚克隆之间呈线性或树枝状演化

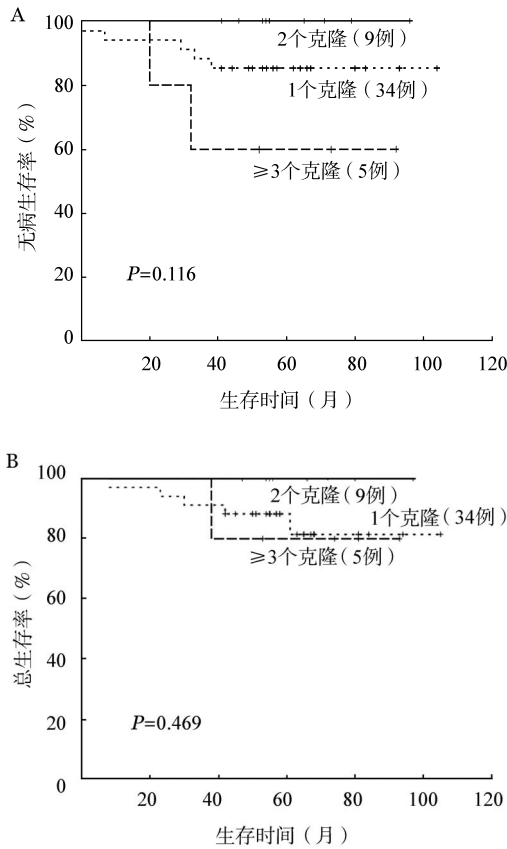


图2 依据白血病细胞的亚克隆数分组患者的无病生存(A)和总生存(B)曲线

克隆一致;例2和例3第1次复发时的克隆为克隆演化的新出现克隆(图3)。另外,还有1例患儿(例4)仅有第3次复发时的骨髓细胞标本并进行了QM-FISH检测,由图4可见,例4患儿复发时有ETV6、RUNX1、IKZF1基因拷贝数的增加,CDKN2A/2B基因拷贝数的缺失。同时存在多个亚克隆,且各亚克隆之间存在演化情况。例4患儿初诊时的骨髓应用多重连接探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)技术检测,结果表明:该患儿存在ETV6和PAX5基因拷贝数的增加,而CDKN2A/B与IKZF1基因的拷贝数无变化。因而,可以推测出例4第3次复发时的克隆为克隆演化的新出现克隆。4例患儿的临床特征与预后的情况详见表3,复发克隆为新出现克隆的患儿(例2、3、4)再次缓解时间短,甚至不缓解,最终均死亡。

讨论

Nowell等^[2]认为白血病起源于获得了始动基因异常的单个异常细胞,后代细胞获得额外的突变后在克隆选择的压力下最终发展成为白血病。因而,

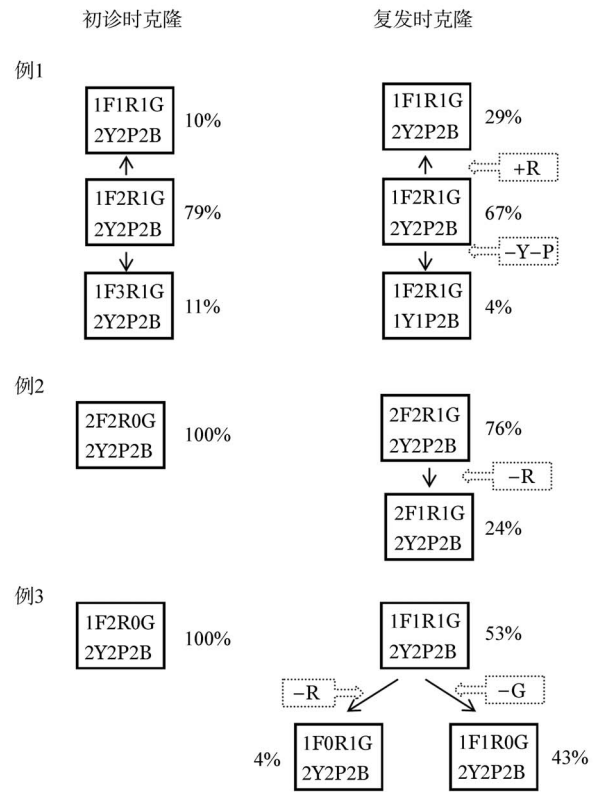


图3 3例患儿初诊及复发时骨髓标本的定量多基因荧光原位杂交检测结果

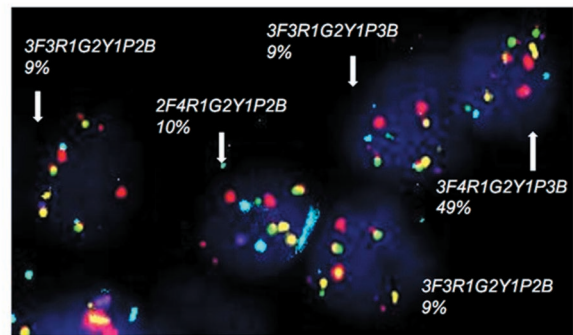


图4 例4患儿第3次复发时骨髓标本的定量多基因荧光原位杂交检测结果

克隆异质性是克隆选择的首要条件。Mitelman数据库中记载着ALL中染色体畸变的数据,其中84.0%的患者只有1个克隆,14.0%的患者含有2个亚克隆,2.3%的患者含有3个亚克隆,0.4%的患者含有4个及4个以上亚克隆^[9]。与其结果类似,我们的结果显示70.8%的ETV6-RUNX1阳性ALL患者初诊时含有1个克隆,18.8%的患者含有2个克隆,10.4%的患者含有3个或3个以上克隆。

同一患者体内的肿瘤细胞存在克隆演化的情况。克隆演化在疾病的早期阶段已经存在,这些亚

表3 4例复发ETV6-RUNX1阳性急性淋巴细胞白血病患者临床特征及转归

例号	WBC ($\times 10^9/L$)	PLT ($\times 10^9/L$)	复发 部位	CR ₁ 时间 (月)	CR ₂ 时间 (月)	CR ₃ 时间 (月)	CR ₄ 时间 (月)	OS期 (月)	转归	第1次 复发克隆
1	3.60	27	骨髓	33	46	未缓解	/	91	死亡	同初诊
2	3.53	23	骨髓	29	8	5	/	51	死亡	新克隆
3	228.53	86	骨髓	34	20	/	/	61	死亡	新克隆
4	23.70	98	骨髓 ^a	14	15	28	未缓解	72	死亡	新克隆 ^b

注: CR:完全缓解;OS:总生存。^a第1次复发时有皮肤结节;^b第3次复发时的克隆;/:无数据

克隆在存活、增殖及治疗耐药等方面的能力存在差异,并且可能相互竞争。当治疗开始后,治疗的压力会加入到亚克隆竞争选择中去,那些对药物敏感的亚克隆会被清除,而耐药克隆得以存活,最终导致复发。ALL中这种克隆演化及对化疗的反应已得到证实^[10-11]。Anderson等^[5]对ETV6-RUNX1阳性ALL患者进行QM-FISH检测,发现不同细胞的基因改变并不一致,不同的亚克隆呈线状或树枝状演化。患儿复发时的克隆可能为初诊时的克隆,亦可能为新出现的克隆。此外,有研究表明,B-ALL的复发常与在一些基因(如CREBBP、NT5C2、SETD2等)中获得耐药的突变有关^[12-14]。我们对48例ETV6-RUNX1阳性ALL患儿进行检测,并依据人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN2016版)中对于干系、旁系克隆定义及ETV6-RUNX1阳性的标准信号,进行克隆演化的顺序推测。我们发现,患儿的肿瘤细胞存在克隆演化情况,各亚克隆之间呈线性或树枝状演化。我们对3例复发患者应用第1次复发时的骨髓标本与初诊时的骨髓标本进行QM-FISH检测,另外对1例患儿第3次复发的骨髓标本进行QM-FISH检测,并与初诊时MLPA检测结果进行比较。发现ETV6-RUNX1阳性ALL患儿的复发可能来源于初诊时的克隆,亦有可能来源于新的克隆。从4例复发患儿的转归来看,第1次复发克隆为新出现克隆的患儿再次缓解持续的时间短,甚至出现不缓解的情况。我们推测,其原因可能为在化疗药物的治疗选择下,出现的新克隆的恶性程度更高或为耐药亚克隆。此外,例1在第2次复发后再化疗不能缓解,亦可能与复发时出现了新的克隆有关。遗憾的是第2次复发未能进行QM-FISH检测。Bashford-Rogers等^[15]也认为,获得耐药突变后肿瘤细胞可能发生耐药,从而导致治疗强度不够。因而,我们认为对于复发克隆为新出现克隆的情况,应在缓解后尽快采取干细胞移植等更强的治疗,以改善预后。遗憾的是,我们仅仅能通过3个基

因的拷贝数变化来推测存在克隆演化情况,无法得知对于耐药基因等其他更多基因可能改变的情况,需要进一步的深入研究来证实。

由于染色体FISH技术的特点,可能存在荧光信号在空间结构上的重叠、扭转等,会有假阳性的可能。为避免假阳性,需设定cut-off值,因而不能区分出比例极小的亚克隆的存在。发现比例极小的亚克隆,需要采用更精确的实验方法来实现。

总之,我国儿童ETV6-RUNX1阳性ALL肿瘤细胞存在异质性,不同的亚克隆呈线状或树枝状演化。ETV6-RUNX1阳性ALL患儿复发时的主要克隆可能为初诊时的主要克隆,亦可能为新出现的克隆。QM-FISH技术有助于研究白血病细胞的克隆演化,推测复发的根源,对于复发患者的预后判断可能有一定的提示作用。对于复发克隆为新出现克隆的患儿建议尽早采取更强的治疗方案,以改善预后。

志谢:感谢我院细胞遗传室李承文老师提供指导和支持

参考文献

- [1] Shibata M, Shen MM. The roots of cancer: stem cells and the basis for tumor heterogeneity [J]. *Bioessays*, 2013, 35 (3):253-260. DOI: 10.1002/bies.201200101.
- [2] Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations [J]. *Science*, 1976, 194(4260):23-28.
- [3] Landau DA, Carter SL, Getz G, et al. Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications [J]. *Leukemia*, 2014, 28(1):34-43. DOI: 10.1038/leu.2013.248.
- [4] Gawad C, Koh W, Quake SR. Dissecting the clonal origins of childhood acute lymphoblastic leukemia by single-cell genomics [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111 (50):17947-17952. DOI: 10.1073/pnas.1420822111.
- [5] Anderson K, Lutz C, van Delft FW, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia [J]. *Nature*, 2011, 469(7330):356-361. DOI: 10.1038/nature09650.
- [6] 刘芳, 邹尧, 张丽, 等. 培门冬酶治疗儿童初发急性淋巴细胞白血病的远期疗效 [J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2010, 15(6): 254-257. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5323.2010.06.005.

- [7] Gao C, Zhao XX, Li WJ, et al. Clinical features, early treatment responses, and outcomes of pediatric acute lymphoblastic leukemia in China with or without specific fusion transcripts: a single institutional study of 1,004 patients [J]. *Am J Hematol*, 2012, 87(11):1022-1027. DOI: 10.1002/ajh.23307.
- [8] 王英婵, 胡林萍, 林冬, 等. 用定量多色荧光原位杂交检测t(8; 21)急性髓系白血病的异质性及亚克隆间的进化关系[J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34(10):844-850. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.10.005.
- [9] Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer[DB/OL]. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman> (2012).
- [10] Schmitz M, Breithaupt P, Scheidegger N, et al. Xenografts of highly resistant leukemia recapitulate the clonal composition of the leukemogenic compartment [J]. *Blood*, 2011, 118(7):1854-1864. DOI: 10.1182/blood-2010-11-320309.
- [11] Nowak D, Liem NL, Mossner M, et al. Variegated clonality and rapid emergence of new molecular lesions in xenografts of acute lymphoblastic leukemia are associated with drug resistance [J]. *Exp Hematol*, 2015, 43(1):32-43.e1-35. DOI: 10.1016/j.exphem.2014.09.007.
- [12] Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Nature*, 2011, 471(7337):235-239. DOI: 10.1038/nature09727.
- [13] Meyer JA, Wang J, Hogan LE, et al. Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(3):290-294. DOI: 10.1038/ng.2558.
- [14] Mar BG, Bullinger LB, McLean KM, et al. Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Nat Commun*, 2014, 5:3469. DOI: 10.1038/ncomms4469.
- [15] Bashford-Rogers RJ, Nicolaou KA, Bartram J, et al. Eye on the B- ALL: B- cell receptor repertoires reveal persistence of numerous B-lymphoblastic leukemia subclones from diagnosis to relapse [J]. *Leukemia*, 2016, 30(12):2312-2321. DOI: 10.1038/leu.2016.142.

(收稿日期:2016-11-14)

(本文编辑:王叶青)

《中华血液学杂志》第九届编辑委员会委员名单

顾问 曹雪涛 陈赛娟 阮长耿

名誉总编辑 王建祥

总编辑 黄晓军

副总编辑 胡豫 马军 邵宗鸿 沈志祥 吴德沛 肖志坚 张凤奎

编辑委员(按汉语拼音排序) 艾辉胜 秘营昌 常英军 陈虎 陈方平 陈芳源 陈国安 陈国强

陈洁平 陈苏宁 陈协群 陈元仲 程涛 董文革 方美云 冯建明 付蓉 高春记

高子芬 韩明哲 侯健 侯明 胡豫 胡灯明 胡建达 黄河 黄慧强 黄晓军

纪春岩 江明 江倩 金洁 克晓燕 赖永榕 李娟 李薇 李晓 李艳

李建勇 李军民 李扬秋 李玉明 梁爱斌 刘红 刘林 刘霆 刘代红 刘开彦

刘启发 刘卓刚 罗建民 马军 牛挺 裴雪涛 彭军 邱录贵 任汉云 邵宗鸿

沈志祥 石远凯 宋永平 孙自敏 王椿 王敏 王欣 王季石 王健民 王景文

王学锋 魏旭东 吴德沛 肖志坚 徐卫 徐开林 杨林花 杨仁池 于力 张梅

张曦 张凤奎 张广森 张连生 张晓辉 赵洪国 赵维莅 赵永强 郑以州 周晋

周道斌 周剑峰 朱军 竺晓凡

通讯编委(按汉语拼音排序) 白海 常春康 崔久嵬 杜欣 冯四洲 韩冰 韩艳秋 胡炯

贾永前 姜尔烈 李剑 刘兵 刘澎 钱文斌 邱林 汝昆 施均 宋玉琴

孙春艳 唐晓文 佟红艳 王迎 王昱 王宏伟 魏辉 吴彤 肖扬 许兰平

俞文娟 张磊 张翼鹭 郑国光 庄俊玲