

TP53基因突变阳性成人急性髓系白血病患者 初诊临床及分子遗传学特征分析

陈文敏¹ 刘虹² 李玲娣¹ 龙玲玉¹ 赖悦云¹ 石红霞¹ 赵晓甦¹ 江浩¹
江倩¹ 刘艳荣¹ 秦亚溱¹

¹北京大学人民医院、北京大学血液病研究所 100044; ²新疆维吾尔自治区人民医院血液科, 乌鲁木齐 830001

通信作者: 秦亚溱, Email: qin2000@aliyun.com

基金项目: 国家自然科学基金(81870125)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.06.016

Clinical, molecular and cytogenetic characteristics of newly diagnosed adult acute myeloid patients with TP53 gene mutation

Chen Wenmin¹, Liu Hong², Li Lingdi¹, Long Lingyu¹, Lai Yueyun¹, Shi Hongxia¹, Zhao Xiaosu¹, Jiang Hao¹, Jiang Qian¹, Liu Yanrong¹, Qin Yazhen¹

¹Institute of Hematology, Peking University Peoples' Hospital, Beijing 100044, China; ²Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumchi 830001, China

Corresponding author: Qin Yazhen, Email: qin2000@aliyun.com

急性髓系白血病(AML)是一类起源于髓系造血干祖细胞的恶性克隆性增殖性疾病。AML具有高度异质性,因此危险分层及预后判断是当前AML诊疗中不可或缺的部分。细胞遗传学分析是危险分层和预后判断的经典方法和框架^[1-2]。随着诊断技术的不断进步,许多基因突变被证实与AML的发病及预后密切相关。抑癌基因TP53作为一个多功能转录因子,在调控细胞周期、凋亡、分化、DNA修复和保持基因稳定性等方面发挥重要作用,多项研究显示TP53基因突变参与了多种实体肿瘤的发生和发展^[3],近年研究显示TP53突变亦与AML的发病及预后相关^[4-8]。为了探讨TP53突变阳性AML患者的临床、分子及遗传学特征,我们采用PCR结合一代测序技术检测并分析了154例初诊成人AML患者的TP53基因突变情况。

对象与方法

一、对象

选取2016年8月至2018年8月于我院检测骨髓细胞TP53突变的连续154例初诊成人AML患者,除外急性早幼粒细胞白血病(APL),男80例,女74例;中位年龄48(18~85)岁。AML诊断标准均符合成人急性髓系白血病(非APL)中国诊疗指南(2011年版)^[9]。其中M₂ 94例(61.0%), M₄ 29例(18.8%), M₅ 28例(18.2%), M₆ 2例(1.3%), M₇ 1例(0.6%)。本研究经我院伦理委员会批准,获得患者知情同意。

二、分子生物学检测

1. 提取RNA和DNA: 经EDTA-Na₂抗凝的患者骨髓标本,用红细胞裂解液(NH₄Cl 0.144 mol/L, NH₄HCO₃ 0.01 mmol/L)处理获取有核细胞。用TRIzol和DNAzol试剂(美国Invitrogen公司产品)分别提取总RNA和DNA。

2. 逆转录合成cDNA: 以高效逆转录试剂盒(美国Invitrogen公司产品)配制逆转录体系进行逆转录,其中随机六聚体引物终浓度5 ng/μl、逆转录酶MMLV终浓度10 U/μl、总RNA 2 μg/20 μl。

3. TP53基因扩增: 采用Primer Express软件3.0版设计TP53基因扩增引物,采用巢式PCR扩增。第一轮反应体系为25 μl,包括2×Taq Plus PCR MasterMix(北京天根公司产品)12.5 μl,上游引物F1和下游引物R1各0.3 μmol/L, cDNA 1 μl,反应条件为95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35个循环; 72℃ 7 min。第二轮扩增分为两个反应,引物对分别为F2/R2和F3/R3,反应终体积为50 μl,包括2×Taq Plus PCR MasterMix 25 μl,上下游引物各0.3 μmol/L,第一轮产物1 μl,反应条件为95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35个循环; 72℃ 7 min。相关引物名称、序列及PCR产物大小如表1所示。PCR终产物相应于第36~350个氨基酸。

4. 测序: 扩增产物由北京诺赛生物技术公司纯化并利用ABI Prism 3730 DNA测序仪(美国ABI公司产品)采用Sanger测序法进行双向测序。将测序结果到美国GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.cn/Blast>)中进行序列同源性比较,确定突变点,判断相应氨基酸,氨基酸编号以GenBank

NM 000546.5 为参照。同时观察测序图谱来发现野生与突变型的杂合体。

表 1 TP53 基因突变 PCR 相关引物名称、序列及扩增产物大小

名称	序列(5'→3')	产物(bp)
F1	CCCCCTGAGTCAGGAAACA	1108
R1	TTATGGCGGGAGGTAGACTG	
F2	GTCCCAAGCAATGGATGATT	554
R2	CATAGGGCACCACCACACTA	
F3	TGGCCATCTACAAGCAGTCA	573
R3	TGAGTTCCAAGGCTCATTC	

5. AML 相关融合基因及其他突变的检测:按照已报道方法,在 ABI Prism 7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)上进行 BCR-ABL、RUNX1-RUNX1T1、PML-RAR α 、CBF β -MYH11 和 MLL 融合基因及 NPM1 基因 A、B、D 型突变的实时定量 PCR 检测^[10-12]。NPM1 为 DNA,其余均为 cDNA 样本。反应体系为 20 μ l,含有上下游引物各 0.3 μ mol/L, TaqMan 探针 0.2 μ mol/L, 2 \times TaqMan Universal PCR Master Mix(美国 ABI 公司产品) 10 μ l, DNA 或 cDNA 2 μ l(相当于 1 μ g DNA 或 RNA)。PCR 条件:50 $^{\circ}$ C 2 min;95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,62 $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环。cDNA 和 DNA 分别以 ABL 和 ALB 作为内参基因,每批 PCR 均包括阴性对照、阳性对照和空白对照。采用 DNA 通过定性 PCR 结合 Sanger 测序检测 FLT3-ITD 和 CEBPA 基因突变。

三、染色体核型分析

采用常规 G 显带技术进行核型分析,根据《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN2016)》进行描述。正常核型至少分析 20 个中期分裂象,至少 2 个中期分裂象具有相同的结构异常或相同的三体、至少 3 个中期分裂象具有相同的单体时被认为是异常克隆。复杂核型定义为 ≥ 3 个异常克隆^[13];单体核型定义为在一个克隆内存在 2 种或 2 种以上常染色体单体,或 1 种常染色体单体伴有其他常染色体结构异常^[14]。

四、统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,数值变量进行非参数 Mann-Whitney 和 Kruskal Wallis 检验,数据以中位数和范围表示,分类变量采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. TP53 基因突变检出率和类型:154 例 AML 患者中 14 例(9.1%)检出 TP53 基因突变。突变类型共 15 种,其中 13 种均各见于 1 例患者,其余 2 种同时发现于 1 例患者。点突变 13 种,缺失移码突变 2 种。突变位于外显子 6、7 和 8 上各 4、2 和 7 种,外显子 5 和 9 上各 1 种。突变类型分别为:K132R(AAG>AGG)、R156G(CGC>GGC)、R175H(CGC>CAC)、R181C(CGC>TGC)、H214R(CAT>CGT)、Y220H(TAT>

CAT)、Y234H(TAC>CAC)、C238Y(TGT>TAT)、G245C(GGC>TGC)、R248W(CGG>TGG)、E258K(GAA>AAA)、G266R(GGA>AGA)、V274L(GTT>CTT)、c.472delC(R158fs*12)和 c.723delC(C242fs*5)。

2. TP53 基因突变患者临床及实验室特征:14 例 TP53 基因突变患者中,男 9 例,女 5 例;中位年龄 54.5(35~69)岁;M₂ 9 例,M₄ 2 例,M₄、M₅ 和 M₇ 各 1 例。TP53 基因突变与无突变患者相比外周血 WBC 更低($P = 0.005$)、更趋向于年长($P = 0.076$),FAB 分型分布差异亦存在统计学意义($P < 0.001$),M₄、M₅ 相对更少而 M₆、M₇ 相对更多;而性别、HGB、PLT 及骨髓原始细胞比例差异均无统计学意义(P 值均 > 0.05)(表 2)。

3. TP53 基因突变患者分子学特征:如表 3 所示,BCR-ABL、RUNX1-RUNX1T1、PML-RAR α 、CBFB-MYH11 和 MLL 相关融合基因以及 NPM1、FLT3-ITD 和 CEBPA 突变在 TP53 基因突变患者中均未检出,但 TP53 突变和无突变患者以上分子学异常的发生率差异均无统计学意义(P 值均 > 0.05)。

4. TP53 基因突变患者核型特征:5 例患者未见可供分析的染色体核型,余 149 例患者中 69 例为正常核型,80 例为异常核型。14 例 TP53 基因突变患者中 13 例检出异常核型,且均为复杂核型,10 例为单体核型,5 例存在 -3/3q-,8 例存在 -7/7q-,8 例存在 -17/17p-。与 TP53 基因无突变患者相比较,突变患者中异常核型、复杂核型、单体核型、-3/3q-、-7/7q-、-17/17p- 检出率均显著增高(P 值均 < 0.01)(表 3)。具有复杂核型、单体核型及 -17/17p- 的 AML 患者中,TP53 基因突变的检出率分别为 40.6%、62.5% 及 66.7%。

讨 论

人类 TP53 基因定位于染色体 17p13。TP53 作为转录因子在维持基因组的稳定性、保持正常细胞的状态中发挥关键作用。TP53 突变是恶性肿瘤中最普遍的分子学异常,可见于各种实体肿瘤和血液恶性肿瘤中,往往与疾病的晚期阶段相关,预后不良^[3]。我们以本中心连续检测的 154 例初诊 AML 患者为研究对象,研究其中 TP53 基因突变的发生率、类型及初诊特征。

文献报道的 TP53 突变位点主要分布于第 4~10 外显子上^[4-8],由于分布范围较大并且突变基本见于外显子上,因此与 DNA 相比,以 cDNA 为样本进行 PCR 结合 Sanger 测序来检测 TP53 突变更加简便而经济。此外,已有研究发现在实体瘤中采用 cDNA 检测 TP53 的敏感度高于 DNA^[15]。因此,本研究以 cDNA 为样本,采用巢式 PCR 法扩增外显子 4~10 的部分来进行 TP53 基因突变的检测。

除了美国 MD Anderson 报道的 18% 的发生率^[7],绝大多数文献报道 AML 中 TP53 突变检出率在 5%~10%^[4-6,8],本研究得到了类似的结果。此外,突变类型及位点与文献报道也

类似。从临床特征看,TP53突变患者的外周血 WBC 更低,并且更趋向于年长,与文献报道一致^[4-7]。

尽管未显示统计学意义,本研究发现所有 TP53 基因突变患者中均未检出 AML 中常见的融合基因和突变。之前的研究发现 TP53 基因突变与 NPM1 及 FLT3-ITD 等突变均呈明显负相关^[4-7]。该结果提示了 TP53 在 AML 的发生和进展中独立于这些分子学异常之外发挥自身独特的作用。同时也提示在临床常规诊断中针对具有这些分子学异常患者的 TP53 突变的检出可能性很小、检测意义不大。

染色体核型异常是成人 AML 患者经典的预后因素。复杂核型、单体核型、-3/3q-、-7/7q-、-17/17p- 等是公认的 AML 高危核型异常,并已体现在 ELN 及 NCCN 指南中^[16-17]。在本研究中,具有 TP53 基因突变的 AML 患者以上高危的异常核型的检出率均显著高于无突变组。该结果与国际上的文献报道相似^[4-8]。这种相关性提示,TP53 基因突变影响了其在维持基因组稳定性中的重要作用,导致了各种染色体异常的发生。本研究尽管未进行生存分析,但是与高危核型异常的高相关性提示 TP53 突变预后不良。

表2 急性髓系白血病患者 TP53 基因突变与临床及实验室特征的关系

特征	TP53 基因无突变组(140 例)	TP53 基因突变组(14 例)	统计量	P 值
性别[例(%)]			0.939 ^a	0.247
男	71(50.7)	9(64.3)		
女	69(49.3)	5(35.7)		
年龄[岁, M(范围)]	47(18~85)	54.5(35~69)	1.773 ^b	0.076
WBC[×10 ⁹ /L, M(范围)]	13.1(0.7~376.0)	2.7(1.1~68.9)	2.781 ^b	0.005
HGB[g/L, M(范围)]	90.0(17.0~144.0)	82.5(57.0~121.0)	1.069 ^b	0.285
PLT[×10 ⁹ /L, M(范围)]	54.0(4.0~806.0)	41.5(9.0~168.0)	0.478 ^b	0.633
骨髓原始细胞比例[M(范围)]	0.625(0.035~0.985)	0.670(0.280~0.960)	0.669 ^b	0.503
FAB 分型[例(%)]			32.176 ^a	<0.001
M ₂	85(60.7)	9(64.3)		
M ₄	28(20.0)	1(7.1)		
M ₅	27(19.3)	1(7.1)		
M ₆	0(0)	2(14.3)		
M ₇	0(0)	1(7.1)		

注:^aχ²检验;^b非参数检验

表3 急性髓系白血病患者 TP53 基因突变与分子及遗传学表现的关系[例(%)]

组别	总体(154 例)	TP53 基因无突变组(140 例)	TP53 基因突变组(14 例)	统计量	P 值
分子分型					
BCR-ABL	2(1.3)	2(1.4)	0(0)	0.203	1.000
RUNX1-RUNX1T1	13(8.4)	13(9.3)	0(0)	1.420	0.610
CBFβ-MYH11	7(4.5)	7(5.0)	0(0)	0.733	1.000
MLL 相关融合基因	7(4.5)	7(5.0)	0(0)	0.733	1.000
NPM1 突变	26(16.9)	26(18.6)	0(0)	3.128	0.129
FLT3-ITD 突变	22(14.3)	22(15.7)	0(0)	2.567	0.222
CEBPA 突变	7(4.5)	7(5.0)	0(0)	0.733	1.000
染色体核型					
异常核型	80(51.9)	67(49.6)	13(92.9)	9.533	0.001
复杂核型	32(20.8)	19(14.1)	13(92.9)	46.685	<0.001
单体核型	16(10.4)	6(4.4)	10(71.4)	59.377	<0.001
-3/3q-	8(5.2)	3(2.2)	5(35.7)	28.004	<0.001
-7/7q-	22(14.3)	14(10.4)	8(57.1)	22.050	<0.001
-17/17p-	12(7.8)	4(3.0)	8(57.1)	50.283	<0.001

本研究以 cDNA 为样本采用巢式 PCR 检测发现, 具有 TP53 基因突变的 AML 患者的临床、分子和遗传学均呈现一定的特征, 并且 TP53 基因突变与不良预后的细胞遗传学异常相关。TP53 突变的预后意义有待结合治疗进行进一步的生存分析。

参考文献

- [1] Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study[J]. *Blood*, 2000, 96(13):4075-4083.
- [2] Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461)[J]. *Blood*, 2002, 100(13):4325-4336. DOI: 10.1182/blood-2002-03-0772.
- [3] Stiewe T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(3):165-168. DOI: 10.1038/nrc2072.
- [4] Bowen D, Groves MJ, Burnett AK, et al. TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis [J]. *Leukemia*, 2009, 23(1):203-206. DOI: 10.1038/leu.2008.173.
- [5] Rucker FG, Schlenk RF, Bullinger L, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome [J]. *Blood*, 2012, 119(9):2114-2121. DOI: 10.1182/blood-2011-08-375758.
- [6] Hou HA, Chou WC, Kuo YY, et al. TP53 mutations in de novo acute myeloid leukemia patients: longitudinal follow-ups show the mutation is stable during disease evolution [J]. *Blood Cancer J*, 2015, 5:e331. DOI: 10.1038/bcj.2015.59.
- [7] Kadia TM, Jain P, Ravandi F, et al. TP53 mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia: clinicomolecular characteristics, response to therapy, and outcomes [J]. *Cancer*, 2016, 122(22):3484-3491. DOI: 10.1002/cncr.30203.
- [8] Stengel A, Kern W, Haferlach T, et al. The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: an analysis of 3307 cases [J]. *Leukemia*, 2017, 31(3):705-711. DOI: 10.1038/leu.2016.263.
- [9] 中华医学会血液学分会. 成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2011年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2011, 32(11): 804-807. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2011.11.021.
- [10] Qin YZ, Liu YR, Zhu HH, et al. Different kinetic patterns of BCR-ABL transcript levels in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients after achieving complete cytogenetic response [J]. *Int J Lab Hematol*, 2008, 30(4):317-323. DOI: 10.1111/j.1751-553X.2007.00962.x.
- [11] Qin Y, Zhu H, Jiang B, et al. Expression patterns of WT1 and PRAME in acute myeloid leukemia patients and their usefulness for monitoring minimal residual disease [J]. *Leuk Res*, 2009, 33(3):384-390. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.08.026.
- [12] Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations [J]. *Leukemia*, 2006, 20(6):1103-1108. DOI: 10.1038/sj.leu.2404149.
- [13] Mrózek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype [J]. *Semin Oncol*, 2008, 35(4):365-377. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2008.04.007.
- [14] Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(29):4791-4797. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.0259.
- [15] Szybka M, Zakrzewska M, Rieske P, et al. cDNA sequencing improves the detection of P53 missense mutations in colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9:278. DOI: 10.1186/1471-2407-9-278.
- [16] Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel [J]. *Blood*, 2017, 129(4):424-447. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196.
- [17] National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology. Chronic Myelogenous Leukemia. Version 3.2017. <https://www.nccn.org>.

(收稿日期:2018-11-01)

(本文编辑:王叶青)