

成人急性淋巴细胞白血病中JAK/STAT信号通路突变患者的预后分析

樊文娟¹ 徐婷婷² 郭洁洁¹ 李亚飞³ 姜中兴¹

¹郑州大学第一附属医院血液科 450000; ²河南省人民医院输血科, 郑州 450000; ³郑州大学第一附属医院血液科实验室 450000

通信作者:姜中兴, Email: 1028284634@qq.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.07.011

Prognostic analysis of patients with mutations in the JAK/STAT signaling pathway in adult acute lymphoblastic leukemia

Fan Wenjuan¹, Xu Tingting², Guo Jiejie¹, Li Yafei³, Jiang Zhongxing¹

¹Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China; ²Department of Blood Transfusion, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, China;

³Department of Hematology Laboratory, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

Corresponding author: Jiang Zhongxing, Email: 1028284634@qq.com

急性淋巴细胞白血病(ALL)是以原始幼稚淋巴细胞异常增殖为特征的异质性血液系统恶性肿瘤,具有独特的遗传学特征^[1]。目前ALL患者的预后影响因素主要集中在血液学、临床特征和遗传因素上,如初诊时WBC、年龄、治疗反应、细胞遗传学和分子学改变以及微小残留病(MRD),后两者与疾病预后密切相关^[2-3]。近年来,四色流式细胞术、二代测序技术(NGS)的开展极大地提高了分子遗传学改变的检测能力,本研究通过分析246例ALL患者JAK/STAT信号通路突变,以期发现新的有预后价值的基因和新的靶向治疗策略。

病例与方法

1. 研究对象:2017年1月至2019年12月就诊于我院血液科的初治ALL患者246例,包括B-ALL 202例, T-ALL 40例,混合表型4例,其中男138例,女108例。所有患者均经分子生物学、免疫学、细胞形态学和遗传学明确诊断,并且符合2016年WHO分型标准。骨髓标本的采集入组患者均知情且签订知情同意书。

2. 主要试剂和仪器:人淋巴细胞分离液为美国Qiagen公司生产;DNA提取试剂盒为中国天根生化科技公司生产; Miseq二代测序仪为美国Illumina公司产品; FACSCanto流式细胞仪为美国Becton Dickinson公司产品。

3. 白血病免疫分型及MRD检测:采用叶绿素蛋白(pr5eCP)、异硫氰酸荧光素(FITC)、别藻蓝素(APC)、藻红蛋白(PE)四种免疫荧光染料标记美国BD公司生产的单克

隆抗体, B-ALL、T-ALL及MRD检测的抗体选择参照文献[4],具体操作步骤同文献[5]。使用FACSCanto流式细胞仪分析20 000个细胞,以CD45/SSC双参数设门,原始幼稚细胞 $\geq 20\%$ 为阳性。

4. NGS检测:无菌操作环境中,用EDTA-K₂凝抗管收集骨髓液标本2 ml。采用人淋巴细胞分离液收集单个核细胞,随后进行细胞总DNA提取及文库构建。应用NGS共检测16种ALL相关突变基因,包括NT5C2、CREBBP、PHF6、CRLF2、PAX5、JAK1、NOTCH1、PTEN、IL-7R、FBXW7、SH2B3、TP53、JAK3、FLT-3、JAK2、IKZF1。

5. 治疗方案、疗效评价及随访:246例初治ALL患者,其中7例拒绝治疗出院,其他患者根据情况以VDC(L)P(长春地辛、柔红霉素、环磷酰胺、门冬酰胺酶、地塞米松)为基础方案化疗,后续给予Hyper-CAVD(环磷酰胺、吡柔比星、长春地辛、地塞米松)、CAM(环磷酰胺、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤)等方案。BCR-ABL阳性者加用口服达沙替尼等酪氨酸激酶抑制剂。参照《血液病诊断及疗效标准》(第4版)评价疗效。MRD > 0.0001为阳性。

6. 随访:随访截止日期为2020年1月31日,采用查阅病例及电话的方式随访,中位随访时间7(1~35)个月。失访30例(包含未治疗的7例),失访率为12.2%。无疾病进展生存(PFS)期为确诊日至疾病进展或死亡的时间,总生存(OS)期为确诊日至死亡或者末次随访的时间。

7. 统计学处理:采用SPSS 21.0统计软件分析数据,计数资料的比较采用 χ^2 检验,生存分析采用Kaplan-Meier法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般特征:246 例成人 ALL 患者中,初诊首发症状以发热为主(66%),其次为乏力(35%)、出血(20%)。肝脾肿大者 111 例(44.9%),淋巴结肿大者 100 例(40%)。

2. 基因突变情况:通过 NGS 共检出 69 例患者伴基因突变,总突变率为 28.0%,共 12 种突变基因,T-ALL(70.0%)较 B-ALL(18.8%)患者更易发生基因突变($P < 0.05$)。突变基因详见表 1。在 T-ALL 中突变较频繁的基因依次为 NOTCH1、JAK3、FBXW7、IL-7R;B-ALL 中突变较频繁基因为 TP53、IL-7R、PAX5。

表 1 成人急性淋巴细胞白血病(ALL)突变频率较高的基因及其突变率[例(%)]

突变基因	B-ALL(202 例)	T-ALL(40 例)	T/B-ALL(3 例)
NOTCH1	2(1.0)	16(36.4)	0(0)
IL-7R	9(4.5)	5(12.5)	0(0)
TP53	11(5.4)	1(2.5)	0(0)
JAK3	1(0.5)	8(20.0)	1(33.3)
FBXW7	0(0)	5(12.5)	1(33.3)
FLT-3	4(2.0)	2(5.0)	0(0)
PAX5	5(2.5)	0(0)	0(0)

所有发生基因突变的 ALL 中 27.5%(19/69)的患者发生基因共突变(即同时发生 2 个或 2 个以上的基因突变),其中 84.2%(16/19)涉及 JAK/STAT 信号通路(表 2)。有 2 例 T-ALL 患者发生三种基因共突变:JAK3、TP53 和 PHF6 共突变 1 例, JAK1、NOTCH1 和 FBXW7 共突变 1 例;另外,1 例双表型患者发生 JAK3、JAK1 和 FBXW7 共突变。余为 NOTCH1 和 FBXW7 共突变、NOTCH1 和 TP53 共突变、PAX5 和 CREBBP 共突变各 1 例。共突变之间存在基因互斥和共存现象, NOTCH1、FBXW7 基因与其他基因存在共存,而 IL-7R 与 JAK3 和 JAK1 之间存在互斥。

表 2 成人急性淋巴细胞白血病(ALL)中 JAK/STAT 信号通路基因共突变情况(例)

突变基因	NOTCH1	FBXW7	PHF6	SH2B3
JAK3				
T-ALL	3	1	3	0
B-ALL	1	0	0	0
IL-7R				
T-ALL	3	0	0	0
B-ALL	0	0	0	1
JAK1				
T-ALL	2	1	0	0
B-ALL	0	0	0	0

另外,本研究发现所有发生共突变的基因中与 JAK3 基因发生共突变的最多,10 例 JAK3 突变患者中有 9 例发生了基因共突变,其临床特征见表 3。

3. 疗效分析:本研究中涉及较多的信号通路包括 JAK/STAT 信号通路(JAK1、JAK3、IL-7R)和 NOTCH 信号通路(NOTCH1、FBXW7)。JAK/STAT 信号通路突变的患者在诱导治疗时完全缓解(CR)率低于阴性组,差异无统计学意义,但诱导治疗后 MRD 的阳性率却较阴性组高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在 T-ALL 中 NOTCH 信号通路突变的患者诱导治疗的 CR 率与阴性组相似,但 MRD 阳性率低于阴性组,差异无统计学意义(表 4)。因 NOTCH 信号通路突变在 B-ALL 中发生率极低,未进行分析。

本研究进一步对 216 例可随访的患者进行生存分析, JAK/STAT 通路突变阳性组的中位 OS 期(12 个月对 13 个月)及中位 PFS 期(6 个月对 9 个月)均低于阴性组,但差异无统计学意义,由于随访时间尚短,需进一步随访。

讨 论

研究表明 NOTCH 信号通路能激活 JAK-STAT 信号通路和 PI3K/AKT 信号通路^[6]。较高的突变频率及其在调节 ALL

表 3 JAK3 基因突变急性淋巴细胞白血病(ALL)患者的临床特征和基因突变情况

例号	外显子	突变位点	突变频率 (%)	年龄 (岁)	性别	类型	WBC ($\times 10^9/L$)	共突变基因	融合基因	转归
1	13	A573V	28.81	23	男	T-ALL	1.2	TP53、PHF6	阴性	死亡
	15	R657Q	19.23							
2	11	M511I	46.68	21	女	T-ALL	4.9	NOTCH1	阴性	死亡
3	15	R657Q	32.00	17	男	B-ALL	96.6	NOTCH1	阴性	死亡
4	11	M511I	6.81	38	男	T-ALL	317.1	NOTCH1	阴性	死亡
5	15	R657Q	85.28	23	男	T-ALL	6.9	NOTCH1	SET-CAN	完全缓解
6	11	M511I	90.08	16	男	T/B-ALL	150.5	JAK1、FBXW7	阴性	完全缓解
7	15	R657Q	14.45	14	女	T-ALL	5.7	FBXW7	阴性	完全缓解
8	15	V674A	7.08	18	男	T-ALL	93.8	PHF6	SET-CAN	完全缓解
9	15	V674A	69.18	21	男	T-ALL	11.2	PHF6	TLS-ERG	完全缓解
10	15	R657Q	15.61	17	男	T-ALL	158.0	无	阴性	完全缓解

表4 信号通路突变对急性淋巴细胞白血病(ALL)患者初始治疗疗效的影响[例(%)]

疗效	所有 ALL 患者			T-ALL 患者		
	JAK/STAT 通路突变阳性 (25 例)	JAK/STAT 通路突变阴性 (214 例)	P 值	NOTCH1 突变阳性 (18 例)	NOTCH1 突变阴性 (21 例)	P 值
CR	16(64.0)	153(71.5)	0.225	13(72.2)	15(71.4)	0.876
NR/PR	9(36.0)	61(28.5)		5(27.8)	6(28.6)	
MRD 阳性	17(68.0)	97(45.3)	<0.001	8(44.4)	12(57.1)	0.066
MRD 阴性	8(32.0)	117(54.7)		10(55.6)	9(42.9)	

注:CR:完全缓解;PR:部分缓解;NR:未缓解;MRD:微小残留病

细胞存活和增殖中的中心作用,使 NOTCH1 成为 T-ALL 治疗的重要靶标^[7]。具有 NOTCH1 和(或)FBXW7 突变的患者比没有这些突变的患者早期治疗反应好,且具有更好的 OS 和 PFS^[8],但是国内的一项研究显示,NOTCH1 突变与预后无关^[9]。目前 MRD 是 ALL 患者较强的预测因子^[10-11]。

JAK/STAT 信号通路突变在 ALL 中很常见,在 B-ALL 中发生率为 11%^[12],在 T-ALL 中更高,本研究中 JAK/STAT 通路突变在 T-ALL 中的发生率为 40%。IL-7R 的激活导致 JAK/STAT 信号通路的磷酸化,从而介导了白血病细胞对糖皮质激素的抵抗,早期治疗反应差。本研究中早期诱导治疗的 CR 率低于阴性组,而 MRD 阳性率更是明显高于阴性组,提示预后可能差。有研究表明,在 BCR-ABL 阴性的 B-ALL 患者中 JAK/STAT 信号通路突变的患者预后差^[13],其研究主要涉及 JAK1、JAK2 突变基因。本研究中,JAK/STAT 信号通路突变涉及的基因是 IL-7R 和 JAK3。在难治/复发的 T-ALL 的 RNA 测序中发现,JAK/STAT 和 RAS/PTEN 信号通路是耐药或早期复发最常见的途径,通常与 NOTCH1/FBXW7 突变相关,而 JAK/STAT 通路中以 JAK3 的突变率最高。在仅携带 NOTCH1/FBXW7 突变的患者中观察到明显更好的生存,但伴随这些通路突变时则消除了这种有利的预后效果^[14]。本研究中 JAK3 突变与 NOTCH1 共突变的患者最多,其中 3 例患者目前死亡,预后极差,另 1 例存活的患者 2 个疗程化疗后 MRD 均为阳性。与 FBXW7 共突变的患者有 2 例,目前均为 CR。截至末次随访日期生存时间最长为 11 个月。一项 81 例成人 T-ALL 患者的二代测序研究中也发现 JAK3 突变多发生于高危 T-ALL 患者^[15]。

本研究中,在 ALL 中共发现 4 种 JAK3 的突变位点,其中 3 种突变位点位于 JH2 区:A573V、R657Q、V674A。T 细胞幼淋巴细胞白血病(T-cell prolymphocytic leukemia, T-PLL)是一种罕见的以成熟的 T 细胞为特征的老年性疾病,治疗效果差且常面临复发,预后不良。T-PLL 中 JAK1/JAK3 突变频率很高,其中 M511I 是最常检出的位点,其突变位于 SH2 结构域和 JH2 结构域之间^[16-18]。Bergmann 等^[16]发现同时携带 V674F 和 V678L 的突变体及 M511I 和 R657Q 突变体。Bellanger 等^[17]发现同时携带 M511I 和 A572V 的突变体。本研究中我们发现 1 例 A573V 和 R657Q 同时突变的患者,该患者化疗获得 CR,但 MRD 阳性,最终因感染性休克死亡。研究表明 M511I 突变在 T-ALL 中最常见,在 34.7% 的 JAK3 突

变患者中,检测到 M511I 突变以及 JAK3 的第二个突变。两个 JAK3 突变或 JAK3 和 JAK1 共突变,一个 JAK3 突变通常是主要克隆,第二个突变则是次要克隆^[19]。与单独的突变相比,多个 JAK3 突变的激活能力更强^[20]。JAK3 M511I 和 JAK3 A573V 在早期前体 T 淋巴细胞白血病(ETP-ALL)中是突变率较高的位点^[21]。而本研究中检测到最多的突变位点为 R657Q,约占 50%,其次为 M511I(30%)。全基因组分析显示 JAK3 V674A 突变可能与疾病的复发密切相关^[22]。本研究中有 2 例患者出现 V674F 突变,1 例诱导治疗时获得部分缓解(PR),另 1 例获得 CR,但 MRD 阳性,目前 2 例患者均为 CR 状态,需继续随访。JAK3 突变在 B-ALL 中罕见,Mullighan 等^[23]在儿童高危 ALL 中发现 1 例 JAK3 S789P 突变的 B-ALL 患者。我们在研究中发现 1 例 B-ALL 患者,突变位点为 R657Q,该患者入院 1 周即死亡,预后极差。在儿童 ALL 中 JAK3 突变率最高的位点为 JAK3 V722I,且可能与疾病复发有关。

既往研究表明,IL7R-JAK 信号传导途径(IL-7R、JAK1、JAK3)与表观遗传修饰因子(WT1、PHF6、PRC2)之间存在功能性相互作用^[19]。据报道 PHF6 突变常伴随 SET-CAN、TLS-ERG 融合基因表达,PHF6 是 X 连锁的,几乎只在男性中出现突变,与预后不良相关^[24]。本研究中 3 例 JAK3 突变的患者合并 PHF6 突变,均为男性,其中 2 例分别表达 SET-CAN、TLS-ERG 融合基因,目前均持续 CR,但诱导治疗后 MRD 均为阳性,另 1 例患者死于严重感染,诸多因素可能提示患者预后不佳,但随访时间尚短。本研究中 JAK3 突变患者共计 10 例,诱导治疗中反应相对较好,1 例死亡,1 例 PR,其余均为 CR,但是 MRD 阳性率却远高于 JAK3 突变阴性组,提示 JAK3 突变的患者预后差。

综上所述,在 T-ALL 中普遍存在基因突变和共突变,而对一些基因的预后意义尚未达成共识。

参考文献

[1] Horowitz NA, Akasha D, Rowe JM. Advances in the genetics of acute lymphoblastic leukemia in adults and the potential clinical implications [J]. Expert Rev Hematol, 2018,11 (10):781- 791. DOI: 10.1080/17474086.2018.1509702.
 [2] Salari F, Shahjehani M, Shahrabi S, et al. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: optimal methods and clin-

- ical relevance, pitfalls and recent approaches [J]. *Med Oncol*, 2014,31(11):266. DOI: 10.1007/s12032-014-0266-3.
- [3] Schrappe M. Detection and management of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2014, 2014 (1):244- 249. DOI: 10.1182/asheducation-2014.1.244.
- [4] 中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组. 四色流式细胞术用于急性白血病免疫分型的中国专家共识(2015年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36 (4): 265-271. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.04.001.
- [5] 赵雪飞, 王洪岩, 赵旭, 等. 急性淋巴细胞白血病的免疫分型和基因的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2018, 26(4): 947-952. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2018.04.001.
- [6] Yap LF, Lee D, Khairuddin A, et al. The opposing roles of NOTCH signalling in head and neck cancer: a mini review [J]. *Oral Dis*, 2015, 21(7):850-857. DOI: 10.1111/odi.12309.
- [7] Bellavia D, Palermo R, Felli MP, et al. Notch signaling as a therapeutic target for acute lymphoblastic leukemia [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22 (4): 331- 342. DOI: 10.1080/14728222.2018.1451840.
- [8] Valliyammai N, Nancy NK, Sagar TG, et al. Study of NOTCH1 and FBXW7 Mutations and Its Prognostic Significance in South Indian T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2018, 40 (1):e1- e8. DOI: 10.1097/MPH.0000000000001006.
- [9] 刘卉, 朱琳, 刘宇宏. FBXW7 与 NOTCH1 突变对成人急性 T 淋巴细胞白血病患者生存的影响 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2018, 26(5): 1294-1300. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2018.05.007.
- [10] Zhang Q, Shi C, Han L, et al. Inhibition of mTORC1/C2 signaling improves anti-leukemia efficacy of JAK/STAT blockade in CRLF2 rearranged and/or JAK driven Philadelphia chromosome-like acute B-cell lymphoblastic leukemia [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(8):8027-8041. DOI: 10.18632/oncotarget.24261.
- [11] Delgado-Martin C, Meyer LK, Huang BJ, et al. JAK/STAT pathway inhibition overcomes IL7-induced glucocorticoid resistance in a subset of human T-cell acute lymphoblastic leukemias [J]. *Leukemia*, 2017, 31 (12): 2568- 2576. DOI: 10.1038/leu.2017.136.
- [12] Zia S, Shahid R. Mutagenic players in ALL progression and their associated signaling pathways [J]. *Cancer Genet*, 2019, 233-234:7-20. DOI: 10.1016/j.cancergen.2019.02.002.
- [13] Li CH, Chen Y. Insight Into the Role of Long Noncoding RNA in Cancer Development and Progression [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2016, 326:33-65. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2016.04.001.
- [14] Gianfelici V, Chiaretti S, Demeyer S, et al. RNA sequencing unravels the genetics of refractory/relapsed T- cell acute lymphoblastic leukemia. Prognostic and therapeutic implications [J]. *Haematologica*, 2016, 101 (8):941- 950. DOI: 10.3324/haematol.2015.139410.
- [15] Neumann M, Vosberg S, Schlee C, et al. Mutational spectrum of adult T- ALL [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (5):2754- 2766. DOI: 10.18632/oncotarget.2218.
- [16] Bergmann AK, Schneppenheim S, Seifert M, et al. Recurrent mutation of JAK3 in T-cell prolymphocytic leukemia [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014, 53 (4):309- 316. DOI: 10.1002/gcc.22141.
- [17] Bellanger D, Jacquemin V, Chopin M, et al. Recurrent JAK1 and JAK3 somatic mutations in T-cell prolymphocytic leukemia [J]. *Leukemia*, 2014, 28(2):417-419. DOI: 10.1038/leu.2013.271.
- [18] López C, Bergmann AK, Paul U, et al. Genes encoding members of the JAK-STAT pathway or epigenetic regulators are recurrently mutated in T-cell prolymphocytic leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2016, 173(2):265-273. DOI: 10.1111/bjh.13952.
- [19] Vicente C, Schwab C, Broux M, et al. Targeted sequencing identifies associations between IL7R-JAK mutations and epigenetic modulators in T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Haematologica*, 2015, 100 (10):1301- 1310. DOI: 10.3324/haematol.2015.130179.
- [20] Degryse S, Bornschein S, de Bock CE, et al. Mutant JAK3 signaling is increased by loss of wild- type JAK3 or by acquisition of secondary JAK3 mutations in T-ALL [J]. *Blood*, 2018, 131(4):421-425. DOI: 10.1182/blood-2017-07-797597.
- [21] Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Nature*, 2012, 481(7380):157-163. DOI: 10.1038/nature10725.
- [22] Kawashima-Goto S, Imamura T, Seki M, et al. Identification of a homozygous JAK3 V674A mutation caused by acquired uniparental disomy in a relapsed early T-cell precursor ALL patient [J]. *Int J Hematol*, 2015, 101 (4): 411- 416. DOI: 10.1007/s12185-014-1711-y.
- [23] Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, et al. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (23):9414- 9418. DOI: 10.1073/pnas.0811761106.
- [24] Xiang J, Wang G, Xia T, et al. The depletion of PHF6 decreases the drug sensitivity of T-cell acute lymphoblastic leukemia to prednisolone [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109:2210- 2217. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.11.083.

(收稿日期:2020-12-02)

(本文编辑:王叶青)