

获得性骨髓衰竭患者 8 号染色体三体的克隆演变及临床意义

周立伟 施均 黄振东 聂能 邵英起 李星鑫 葛美丽 张静 金朋
黄金波 郑以州

中国医学科学院、北京协和医学院血液病医院(血液学研究所);实验血液学国家重点实验室,天津 300020

通信作者:施均,Email:shijun@ihcams.ac.cn

【摘要】 目的 分析获得性骨髓衰竭患者 8 号染色三体(+8)的克隆演变及其临床意义。方法 回顾性分析 2011 年 6 月至 2018 年 9 月 63 例伴单纯+8 染色体的获得性骨髓衰竭患者临床资料,总结克隆演变模式及其与免疫抑制治疗(IST)疗效的关系。结果 63 例患者中 AA 39 例,相对低危 MDS 24 例,男 24 例,女 39 例。MDS 患者治疗前+8 克隆负荷大于 AA 患者[65% (15%~100%)对 25% (4.8%~100%)], $z=3.48, P=0.001$ 。AA 及 MDS 患者+8 克隆大小 <30%、30%~<50%、≥50% 3 组间的比例差异有统计学意义[AA 分别为 55.6% (20/36)、22.2% (8/36)、22.2% (8/36), MDS 分别为 19.0% (4/21)、19.0% (4/21)、61.9% (13/21), $P=0.007$];两两比较显示+8 克隆 <30% 的 AA 患者明显多于 MDS 患者($P=0.002$),+8 克隆 ≥50% 的 AA 患者明显少于 MDS 患者($P=0.002$)。AA 与 MDS 患者中位年龄分别为 28 (7~61) 岁、48.5 (16~72) 岁,且两者+8 克隆负荷与年龄均无显著相关性(r_s 分别为 0.109、-0.022, P 值分别为 0.528、0.924)。异常克隆负荷 ≥50% 定义为大克隆, <50% 为小克隆,AA 患者大小克隆两组间总铁结合力、转铁蛋白、红细胞生成素差异有统计学意义(P 值分别为 0.016、0.046 及 0.012)。AA 与 MDS 患者 IST 有效率分别为 66.7% (22/33)、43.8% (7/16) ($P=0.215$)。AA 患者治疗后 1~2 年的+8 克隆负荷[45% (5%~85%)]较初诊时[27.3% (4.8%~100.0%)]增加,但差异无统计学意义($z=0.83, P=0.272$);MDS 患者治疗后 1~2 年的克隆负荷为 70.5% (10%~100%),相比初诊时[72.5% (25%~100%)]略减少。IST 后 0.5~<1 年、1~2 年、>2 年,AA +8 克隆减少组与增加组的 IST 有效例数无明显变化。AA +8 克隆有 4 种动态演变模式,分别为克隆持续(45%)、克隆消失(30%)、克隆新发(10%)以及克隆反复(15%)。结论 AA 患者+8 克隆低负荷,而 MDS 患者+8 克隆高负荷;AA 患者的+8 克隆在 IST 后无明显扩增,+8 克隆的增减对 IST 疗效无明显影响。

【关键词】 获得性骨髓衰竭; 8 号染色三体; 克隆演变; 免疫抑制治疗

基金项目:国家自然科学基金(81370606、81670120)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.06.011

Clonal evolution and clinical significance of trisomy 8 in acquired bone marrow failure

Zhou Liwei, Shi Jun, Huang Zhendong, Nie Neng, Shao Yingqi, Li Xingxin, Ge Meili, Zhang Jing, Jin Peng, Huang Jinbo, Zheng Yizhou

Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China; State Key Laboratory of Experimental Hematology, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Shi Jun, Email: shijun@ihcams.ac.cn

【Abstract】 Objective To analyze clonal evolution and clinical significance of trisomy 8 in patients with acquired bone marrow failure. **Methods** The clinical data of 63 patients with acquired bone marrow failure accompanied with isolated trisomy 8(+8) from June 2011 to September 2018 were analyzed retrospectively, the clonal evolution patterns and relationship with immunosuppressive therapy were summarized. **Results** Totally 24 male and 39 female patients were enrolled, including 39 patients with aplastic anemia (AA) and 24 patients with relatively low-risk myelodysplastic syndrome (MDS). Mean size of +8 clone in MDS patients [65% (15%~100%)] was higher than that of AA patients [25% (4.8%~100%)], $z=3.48, P=0.001$. The patients were divided into three groups (<30%, 30%~<50%,

and $\geq 50\%$) according to the proportion of +8 clone. There was significant difference among the three groups between AA [$< 30\% : 55.6\% (20/36)$; $30\% - 50\% : 22.2\% (8/36)$; $\geq 50\% : 22.2\% (8/36)$] and MDS patients [$< 30\% : 19.0\% (4/21)$; $30\% - 50\% : 19.0\% (4/21)$; $\geq 50\% : 61.9\% (13/21)$] ($P = 0.007$). The proportion of AA patients with +8 clone $< 30\%$ was significantly higher than that of MDS patients ($P = 0.002$); and the proportion of AA patients with +8 clone $\geq 50\%$ was significantly lower than that of MDS patients ($P = 0.002$). The median age of AA and MDS patients was respectively 28 (7-61) years old and 48.5 (16-72) years old. Moreover, there was no correlation between age and +8 clone size in AA or MDS ($r_s = 0.109$, $P = 0.125$; $r_s = -0.022$, $P = 0.924$, respectively). There was statistical difference in total iron binding capacity, transferrin and erythropoietin between high and low clone group of AA patients ($P = 0.016$, $P = 0.046$, $P = 0.012$, respectively), but no significant difference in MDS patients. The immunosuppressive therapy (IST) efficacy of AA and MDS patients was respectively 66.7% and 43.8% ($P = 0.125$). Comparing with initial clone size (27.3%), the +8 clone size (45%) of AA patients was increased 1-2 year after IST, but no statistical difference ($z = 0.83$, $P = 0.272$). Consistently, there was no significant change between initial clone size (72.5%) and 1-2 year clone size (70.5%) after IST in MDS patients. There was no significant difference in IST efficient rate between +8 clone size expansion and decline group of in AA patients at 0.5- < 1 , 1-2 and > 2 years after IST. We found four dynamic evolution patterns of +8 clone, which were clone persistence (45%), clone disappearance (30%), clone emergence (10%) and clone recurrence (15%). **Conclusions** AA patients had a low clone burden, while MDS patients had a high burden of +8 clone. The +8 clone of AA patients didn't significantly expanded after IST, and the changes of +8 clone also had no effect on IST response.

【Key words】 Acquired bone marrow failure; Trisomy 8; Clonal evolution; Immunosuppressive therapy

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81370606, 81670120)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.06.011

克隆性造血在血液系统疾病的分层、诊断、治疗及预后等方面具有重要指导作用。细胞遗传学异常作为评价克隆性造血的指标之一,在再生障碍性贫血(AA)和骨髓增生异常综合征(MDS)这两种常见的获得性骨髓衰竭疾病中的发生率分别为4%~15%^[1]和50%^[2]。其中,8号染色体三体(+8)是AA及MDS细胞遗传学异常中最常见的类型之一^[3-4],且被纳入MDS国际预后评分系统(IPSS)。但该核型异常并非AA及MDS特有,也可见于急性髓系白血病^[5]、慢性粒单核细胞白血病^[6]及某些骨髓增殖性肿瘤^[7]。国外研究提示+8是AA免疫抑制治疗(IST)有效的预测因素之一^[8],但目前尚缺乏关于AA及MDS患者+8克隆负荷及其IST后动态演变的研究。本研究中,我们回顾性分析了63例获得性骨髓衰竭患者的+8克隆在疾病治疗过程中的动态演变并分析其临床意义,现报道如下。

病例与方法

1. 病例:回顾性分析2011年6月至2018年9月就诊于我院的63例初诊或IST后伴单纯+8的获得性骨髓衰竭患者的临床资料。其中男24例,女39例,中位年龄36(7~72)岁,中位随访时间21(6~124)个月。AA患者39例(62%),其中1例为重型

再生障碍性贫血(SAA) I型,2例为SAA II型,余均为非重型AA(NSAA);MDS患者24例(38%),其中1例为MDS伴环形铁粒幼细胞贫血伴单系病态造血(MDS-RS-SLD),余均为MDS伴多系病态造血(MDS-MLD),IPSS评分均为低危/中危-1。所有患者诊断均符合文献[9-10]标准。所有患者均未检测到阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)克隆。

2. 染色体核型检测:常规取患者骨髓液,采用24~48 h短期培养法制备染色体,核型分析采用R+G显带技术,按《人类细胞遗传学国际命名体制(1995)》进行描述。每例患者分析20个中期分裂相。当 ≥ 2 个中期分裂相出现相同的染色体数目增加异常时判定为克隆性异常核型。如果可分析中期分裂相不足20个,但异常克隆数达到上述标准者也纳入本研究。约6个月对患者进行一次染色体核型检测,48例(76%)患者染色体检查 ≥ 2 次且均有足够中期分裂相。7例AA患者、8例MDS患者只有1次染色体核型检查结果。染色体核型检查 ≥ 3 次的AA患者有20例。AA及MDS均有3例患者初诊时没有而后续随访时才出现+8克隆。+8核型骨髓细胞占总分裂相细胞数的比例(即异常克隆负荷) $\geq 50\%$ 定义为大克隆, $< 50\%$ 为小克隆。随访时的+8克隆负荷与初诊时对比,高于初诊水平定义为克隆

增加,低于初诊水平定义为克隆减少。

3. 治疗方案:SAA患者采用兔或猪抗人胸腺淋巴细胞免疫球蛋白(ATG/ALG)联合环孢素A(CsA)、雄激素、左旋咪唑治疗。NSAA及MDS患者采用CsA联合雄激素、左旋咪唑治疗,部分MDS患者单用雄激素治疗。

4. 疗效评价:AA患者按照文献[9]标准评价疗效,完全缓解(CR)及部分缓解(PR)定义为有效。MDS患者依据文献[11]标准评价疗效,CR、PR、骨髓完全缓解(mCR)和血液学改善(HI)定义为有效。

5. 统计学处理:使用SPSS 19.0软件进行统计学分析。计量资料用中位数(范围)表示,正态分布资料采用两独立样本 t 检验,非正态分布资料采用Mann-Whitney U 检验;率和构成比的比较采用Fisher精确概率法;变量间相关性采用Sperman相关分析。双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 基线克隆负荷:36例AA患者初诊时伴单纯+8,基线克隆负荷为25%(5%~100%);21例MDS患者初诊时伴单纯+8,基线克隆负荷为65%(15%~100%),MDS患者基线+8克隆负荷大于AA患者($z = 3.48, P = 0.001$)。AA与MDS患者中位年龄分别为28(7~61)岁、48.5(16~72)岁,两组+8克隆负荷与年龄均无显著相关性(r 分别为0.109、-0.022, P 值分别为0.528、0.924)。

根据+8克隆负荷分为 $< 30%$ 、 $30\% \sim < 50%$ 、 $\geq 50%$ 3组,AA患者分布在这3组间的比例分别为55.6%(20/36)、22.2%(8/36)、22.2%(8/36),MDS患者分别为19.0%(4/21)、19.0%(4/21)、61.9%(13/21),Fisher精确概率法显示差异有统计学意义($P = 0.007$)。采用Bonferroni调整后显示,+8克隆 $< 30%$ 的AA患者比例明显多于MDS患者($P = 0.002$);+8克隆在 $30\% \sim < 50%$ 的AA与MDS患者比例无明显差异($P = 0.397$);+8克隆 $\geq 50%$ 的AA患者比例明显少于MDS患者($P = 0.002$)。AA患者中,大小克隆两组间总铁结合力、转铁蛋白、红细胞生成素水平差异有统计学意义,而MDS患者间差异均无统计学意义(表1)。

2. IST疗效及预后:49例患者接受IST,其中1例SAA患者接受了ATG联合CsA、雄激素、左旋咪唑治疗,其余患者均采用CsA联合雄激素、左旋咪唑治疗。IST整体有效率为59.2%(29/49)。AA

患者IST有效率[66.7%(22/33)]高于MDS患者[43.8%(7/16)],但差异无统计学意义($P = 0.215$)。AA患者小克隆与大克隆两组间疗效差异无统计学意义[64%(16/25)对75%(6/8), $P = 0.687$]。MDS患者小克隆与大克隆两组间有效率分别为40%(2/5)、45%(5/11)。随访过程中,AA患者全部存活且均未进展为MDS或急性髓系白血病(AML);MDS患者中有1例初诊为小克隆的MDS-MLD患者进展为MDS伴原始细胞增多1型(MDS-EB1),2例初诊为大克隆的MDS-MLD患者进展为AML。

表1 获得性骨髓衰竭患者+8克隆大小与常见临床指标关系

组别	例数	总铁结合力 ($\mu\text{mol/L}$)	转铁蛋白 (g/L)	红细胞生成素 (U/L)
AA				
小克隆	26	68.22 \pm 13.13	2.91 \pm 0.76	41(1~797)
大克隆	6	52.73 \pm 12.99	2.24 \pm 0.71	774(281~774)
统计量		2.568	1.944	-3.712
P 值		0.016	0.046	0.012
MDS				
小克隆	9	49.47 \pm 7.89	1.83 \pm 0.35	459(33~797)
大克隆	13	49.93 \pm 7.73	1.95 \pm 0.40	112(4.26~797)
统计量		-0.135	-0.680	0.596
P 值		0.894	0.869	0.445

注:AA:再生障碍性贫血;MDS:骨髓增生异常综合征;小克隆:+8核型骨髓细胞占总分裂相细胞数的比例 $< 50%$;大克隆:+8核型骨髓细胞占总分裂相细胞数的比例 $\geq 50%$

3. 克隆负荷与IST疗效:分析45例至少有2次染色体核型检测患者初诊及IST后1~2年的+8克隆负荷,32例AA患者IST后1~2年+8克隆负荷[45%(5%~85%)]较初诊时[27.3%(4.8%~100.0%)]增加,但差异无统计学意义($z = 0.83, P = 0.272$);13例MDS患者治疗后1~2年的克隆负荷[70.5%(10%~100%)]与初诊时[72.5%(25%~100%)]相比略减少。将随访时的+8克隆负荷与初诊时对比发现,IST后0.5~ < 1 年、1~2年、 > 2 年,AA患者+8克隆减少组与增加组的IST有效例数无明显变化(表2)。

4. AA患者+8克隆动态演变模式:通过分析20例至少有3次染色体核型AA患者的+8克隆动态变化,发现共有4种动态演变模式,分别为克隆持续(45%)、克隆消失(30%)、克隆新发(10%)以及克隆反复(15%),IST有效率分别为77.8%(7/9)、83.3%(5/6)、50.0%(1/2)、66.7%(2/3)。

表 2 获得性骨髓衰竭患者+8克隆负荷的变化与免疫抑制治疗(IST)疗效(例数)

组别	IST后0.5~<1年		IST后1~2年		IST后>2年	
	有效	无效	有效	无效	有效	无效
AA						
+8克隆减少组	7	5	9	5	6	0
+8克隆增加组	5	5	7	3	6	1
MDS						
+8克隆减少组	1	3	1	2	3	1
+8克隆增加组	1	4	2	2	1	1

注:AA:再生障碍性贫血;MDS:骨髓增生异常综合征

讨 论

既往研究多为横向研究特定时间点染色体核型异常与疾病的关系,我们此次纵向分析了IST前后AA及MDS患者染色体核型+8克隆性异常的动态变化,其中染色体检查≥2次以上的患者占76%,为后续进行深入的+8克隆性异常研究提供了难得的素材。

目前国内外的研究显示+8在AA中的发生率为2%~3%^[1,12],尚缺乏关于AA+8克隆的大小、动态变化等报道。我们的研究显示,AA患者中+8小克隆最常见,而且年轻患者多见。另外,+8克隆的大小与年龄没有明显相关性,并不会随着年龄的增加克隆越大,提示它并不是与年龄相关的克隆性造血。但是,部分年老患者由于身体等因素不能定期随访染色体核型,同时也不能排除染色体核型检出率低导致的误差。经过筛选常见的临床指标,比如血常规、淋巴亚群、铁代谢等,我们发现大小克隆两组间总铁结合力、转铁蛋白及红细胞生成素之间差异有统计学意义,提示+8克隆可能与红系造血有关,有待于进一步研究。

+8是AA患者最常见的细胞遗传学异常之一,但它是否在AA发病机制中起到一定作用尚不清楚。其中一项关于MDS+8的基础研究提出,和-7及正常核型的CD34⁺细胞相比,+8患者的CD34⁺细胞高表达Fas抗原且凋亡增加,而且其骨髓单个核细胞对Fas介导的凋亡也更加敏感^[13]。同时该研究显示,在免疫抑制的情况下+8骨髓细胞展现出了增殖优势,在接受了CsA治疗的+8AA患者骨髓细胞中也得到了验证。因此,作者提出了关于+8在骨髓衰竭疾病中的作用机制假设:+8克隆是骨髓衰竭的一种诱因,邻近+8细胞的活化T细胞针对+8的新生抗原产生了免疫反应,释放IFN-γ、TNF-α等细胞因

子,上调造血细胞表面的Fas抗原。在我们的研究中,AA患者治疗后1~2年的+8克隆负荷虽然较初诊时略增加,但差异无统计学意义。原因可能是+8染色体的出现与导致骨髓衰竭的自身免疫反应没有相关性。另外,通过分析20例至少有3次染色体核型AA患者的+8克隆,总结出4种IST后+8克隆的动态变化模式,包括克隆持续、消失、新发以及反复。克隆持续组又有多种变化模式,包括宽幅振荡,即克隆波动范围大于50%,还有克隆倍增、克隆减少以及克隆增加但未达倍增。由此看出,+8克隆的变化多种多样,并无特定规律,而且+8的发生率很低,更加倾向于它是在骨髓衰竭导致的压力性造血情况下基因组不稳定的一种表现。另外,+8克隆的变化也不会影响IST的疗效。

一部分相对低危MDS患者,没有原始细胞,也可伴有+8克隆,IST有效。而且约10%的MDS患者同时伴有骨髓增生低下,与AA鉴别诊断十分困难,因为AA也可能有轻度或中度的病态造血,尤其是红系。本文通过对两者的+8克隆进行多方面的细致分析,希望能对两者的鉴别诊断有一定的帮助。据文献报道,MDS患者中+8的比例为8%~20%^[14-15],高于AA患者。本研究中MDS患者+8以大克隆为主,整体克隆负荷大于AA患者,中位年龄48.5岁,IST有效率43.8%,低于+8AA患者(66.7%)。而且,在随访过程中,有3例MDS患者出现了恶性进展,AA患者均未进展为MDS或AML。伴有单纯+8的AA及相对低危MDS患者+8克隆负荷以及预后均不相同,表明+8的出现在这两种常见的获得性骨髓衰竭疾病中可能有不同的临床意义。

我们的研究提示,AA患者中+8克隆性异常存在多种动态演变方式;IST对获得性骨髓衰竭患者的+8克隆无明显影响,而+8克隆的变化也不会影响IST疗效。由于MDS患者病例数较少,未来需要进一步的研究验证我们初步的结论。科学认识+8克隆性异常在获得性骨髓衰竭疾病中的生物学特征,有助于指导临床诊断及治疗决策。

参 考 文 献

[1] Gupta V, Brooker C, Tooze JA, et al. Clinical relevance of cytogenetic abnormalities at diagnosis of acquired aplastic anaemia in adults[J]. Br J Haematol, 2006, 134(1):95-99. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06105.x.

[2] Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes [J]. Ann Hematol, 2008, 87(7):515-526. DOI: 10.1007/s00277-008-0483-y.

- [3] Ogawa S. Clonal hematopoiesis in acquired aplastic anemia[J]. Blood, 2016, 128(3):337-347. DOI: 10.1182/blood-2016-01-636381.
- [4] Drevon L, Marceau A, Maarek O, et al. Myelodysplastic syndrome (MDS) with isolated trisomy 8: a type of MDS frequently associated with myeloproliferative features? A report by the Groupe Francophone des Myélodysplasies [J]. Br J Haematol, 2018, 182(6):843-850. DOI: 10.1111/bjh.15490.
- [5] Wolman SR, Gundacker H, Appelbaum FR, et al. Impact of trisomy 8 (+8) on clinical presentation, treatment response, and survival in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study[J]. Blood, 2002, 100(1):29-35.
- [6] Wassie EA, Itzykson R, Lasho TL, et al. Molecular and prognostic correlates of cytogenetic abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia: a Mayo Clinic-French Consortium Study [J]. Am J Hematol, 2014, 89(12):1111-1115. DOI: 10.1002/ajh.23846.
- [7] Barraco D, Cerquozzi S, Hanson CA, et al. Cytogenetic findings in WHO- defined polycythaemia vera and their prognostic relevance [J]. Br J Haematol, 2018, 182(3):437-440. DOI: 10.1111/bjh.14798.
- [8] 中华医学会血液学分会红细胞疾病(贫血)学组. 再生障碍性贫血诊断与治疗中国专家共识(2017年版)[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(1): 1-5. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.01.001.
- [9] Killick SB, Bown N, Cavenagh J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia [J]. Br J Haematol, 2016, 172(2):187-207. DOI: 10.1111/bjh.13853.
- [10] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [J]. Blood, 2016, 127(20):2391-2405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- [11] 中华医学会血液学分会. 骨髓增生异常综合征诊断与治疗中国专家共识(2014年版)[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(11): 1042-1048. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.11.023.
- [12] 李玉龙, 刘禄社, 翟亚萍, 等. 伴有细胞遗传学异常的再生障碍性贫血患者的临床特征及疗效分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(1): 84-86. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2013.01.020.
- [13] Sloand EM, Kim S, Fuhrer M, et al. Fas-mediated apoptosis is important in regulating cell replication and death in trisomy 8 hematopoietic cells but not in cells with other cytogenetic abnormalities [J]. Blood, 2002, 100(13):4427-4432. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0096.
- [14] Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients [J]. Blood, 2007, 110(13):4385-4395. DOI: 10.1182/blood-2007-03-082404.
- [15] 曲士强, 刘旭平, 徐泽锋, 等. 不同细胞遗传学预后分组对原发性骨髓增生异常综合征患者预后意义的研究[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(12):819-824. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2011.12.004.

(收稿日期:2018-12-23)

(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

作者投稿须知

1. 按本刊要求写作:登录《中华血液学杂志》网站(<http://www.hematoline.com>),参见首页作者中心栏中的“投稿须知”及“写作指导”栏目。

2. 作者注册:请打开本刊网站首页点击“在线投稿”即进入中华医学会网站(<http://cmaes.medline.org.cn>)。在网站首页注册并申请为杂志作者(用户名和密码为您在中华医学会统一的登录信息,请牢记!忘记密码可通过电子信箱索取)。

3. 投稿:注册成功后进入“业务中心”。点击【远程稿件管理系统】,相应的功能即显示在下方。点击“作者投稿”,按要求填写内容,摘要在字数允许范围内尽可能详细,并上传原稿(点击“暂存”稿件进入【我的草稿】模块)。选择《中华血液学杂志》,并点击“投稿”。

4. 邮寄纸稿及介绍信:请在投稿平台上下载论文投送介绍信及授权书,签字盖章后连同原稿打印件(注明稿件编号)一并寄至本刊编辑部。

本刊编辑部