

高通量测序联合 DNA-PCR 检测骨髓增生异常综合征患者 51 种血液肿瘤相关基因突变

王凯 晁红颖 吴品 何川 张日 沈宏杰 陈苏宁

High throughput sequencing combined with DNA-PCR for detection of 51 kinds of hematologic malignancy related gene mutations in patients with myelodysplastic syndromes Wang Kai, Chao Hongying, Wu Pin, He Chuan, Zhang Ri, Shen Hongjie, Chen Suning

Corresponding author: Zhang Ri, Jiangsu Institute of Hematology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Key Laboratory of Thrombosis and Hemostasis of Ministry of Health, Suzhou 215006, China. Email: jinghb2008@163.com

骨髓增生异常综合征(MDS)是一类以不同程度血细胞减少、骨髓病态造血及高风险向白血病转化为特征的异质性髓系肿瘤。基因突变、基因表达失控及表观遗传学改变在MDS的发生、发展中起关键作用^[1]。为了进一步了解MDS的分子生物学机制,为其精准诊断和白血病转化风险预测提供线索,本研究我们通过高通量测序联合DNA-PCR技术检测了73例初发MDS患者51种血液肿瘤相关基因突变情况,现报道如下。

病例与方法

1. 病例资料:以2015年10月至2017年7月于苏州大学附属第一医院门诊及住院治疗的73例MDS患者为研究对象,其中男43例,女30例,中位年龄43(15~81)岁。采用MDS诊断与治疗中国专家共识(2014年版)进行诊断与分型^[2]。其中难治性贫血(RA)4例,难治性贫血伴有环状铁粒幼红细胞(RARS)7例,难治性贫血减少伴有多系发育异常(RCMD)6例,难治性贫血伴有原始细胞过多(RAEB)-1型23例,RAEB-2型33例。IPSS分组:低危组4例,中危-1组25例,中危-2组31例,高危组13例。

2. 基因组DNA的提取:初诊时采集患者骨髓液,EDTA抗凝,分离骨髓单个核细胞,DNA提取试剂盒(美国Gentra公司产品)抽取基因组DNA。验证DNA浓度和纯度后将基因组DNA样品稀释至50 ng/ μ l。

3. 高通量测序检测:通过高通量测序检测49种常见血

液肿瘤基因突变情况,平均基因覆盖率大于99%,平均测序深度为2 000 \times ,检测灵敏度3%~5%。参考文献[3]对所测基因进行功能分类,包括:①转录调节基因:RUNX1、TP53、BCOR、PHF6、CEBPA及GATA2;②RNA剪接因子相关基因:SF3B1、SRSF2、ZRSR2及U2AF1;③RAS信号转导通路相关基因:NRAS、KRAS、PTPN11及CBL;④组蛋白修饰基因:ASXL1及EZH2;⑤参与DNA甲基化的表观遗传学调节基因:DNMT3A、TET2、IDH1/2;⑥酪氨酸激酶受体基因:JAK2、FLT3、KIT及PDGFRA/B;⑦其他常见肿瘤基因包括:BCORL1、ETV6、SH2B3、CALR、MPL、CSF3R、SETBP1、ASXL2、ETNK1、SETD2、STAG2、PIGA、CSMD1、NOTCH1、IL7R、JAK1、JAK3、PAX5、BIRC3、FBXW7、PTEN、BRAF、CDKN2A、WT1、MYD88。取样品基因组DNA 12 ng,按照Ion AmpliSeq文库试剂盒标准建库流程构建文库;采用AM-Pure XP磁珠纯化文库,去除小片段,并通过PCR扩增文库;在避光条件下用Qubit 2.0检测文库浓度。采用赛默飞世尔科技(中国)有限公司的S5系统进行高通量DNA测序,IGV软件分析结果。数据读取时选择外显子上的基因突变,并去掉同义突变及多态性突变。

4. DNA-PCR检测:鉴于高通量测序技术对于大片段插入缺失序列结果读取的局限性,我们参照文献[4-5]方法,采用DNA-PCR联合Sanger测序法对CALR基因9号外显子、NPM1基因12号外显子、FLT3-ITD及CEBPA的TAD、BZIP两个功能结构域进行基因突变检测。测序结果与正常序列比对,检出突变。

5. 染色体核型分析:采用常规R显带技术进行核型分析,细胞核型根据《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN2009)》进行描述^[6]。

6. 统计学处理:采用SPSS 21.0软件进行分析。分类变量以例数(构成比)表示,采用Fisher确切概率法进行组间比较;不同年龄组间突变个数比较采用Mann-Whitney U检验,染色体核型与基因突变间的关系采用列联表 Φ 相关进行分析。

结 果

1. 基因突变的检出情况及突变类型:本研究51种基因中,共有36种基因发生165个突变。主要基因突变分布见图1。94.5%(69/73)的患者至少携带1个突变基因,其中,28.7%(21/73)的患者为单基因突变,24.6%(18/73)的患者为双基因突变,41.1%(30/73)的患者基因突变数 \geq 3个,平均突

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.05.018

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81500103);江苏省自然科学基金(BK-20151230)

作者单位:215000 苏州大学附属第一医院,江苏省血液研究所;卫生部血栓与止血重点实验室

通信作者:张日,Email: jinghb2008@163.com

变数为2.14个。突变检出率最高为ASXL1(21.9%, 16个), 其他检出率大于5%的突变依次为:RUNX1(20.5%, 15个), U2AF1(19.2%, 14个), TP53(12.8%, 9个), TET2(10.9%, 8个), RAS(10.9%, 8个:包括3个KRAS及5个NRAS), PTPN11(9.6%, 7个), DNMT3A(9.6%, 7个), NPM1(8.2%, 6个), SF3B1(8.2%, 6个), CSMD1(8.2%, 6个), BCOR(6.8%, 5个), SETBP1(5.4%, 4个), PHF6(5.4%, 4个), WT1(5.4%, 4个), GATA2(5.4%, 4个), IDH1/2(8.5%, 4个:包括3个IDH1及1个IDH2)(图1)。急性髓系白血病(AML)常见突变FLT3-ITD检出率仅为4.1%(3个)。其中, 93.3%(14/15)的RUNX1基因与其他基因突变如ASXL1、CBL、TET2、PTPN11、U2AF1及RAS等共存, 但未检测到RUNX1与NPM1突变共存。

不同功能基因突变检出率依次为:参与转录调节基因占46.5%(34/73, 包括RUNX1、TP53、BCOR、PHF6、CEBPA及GATA2), RNA剪接因子相关基因占28.8%(21/73, 包括SF3B1、SRSF2、ZRSR2及U2AF1), RAS信号转导通路相关基因占26.02%(19/73, 包括NRAS、KRAS、PTPN11及CBL), 组蛋白修饰基因占26.02%(19/73, 包括ASXL1及EZH2), 参与DNA甲基化的表观遗传学调节基因占20.5%(15/73, 包括DNMT3A、TET2、IDH1/2), 酪氨酸激酶受体基因占10.9%(8/73, 包括JAK2、FLT3、KIT及PDGFRA/B)(图2)。

2. 基因突变与年龄及染色体核型的关系分析:本组病例

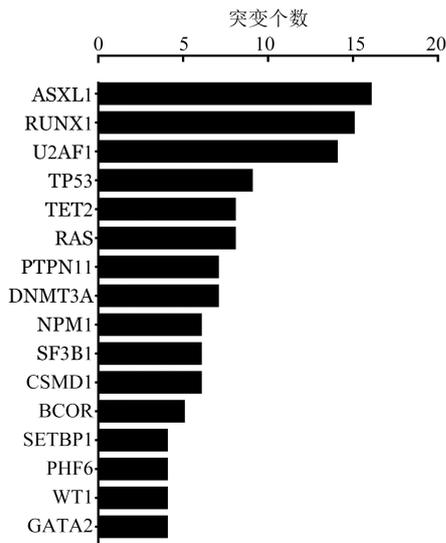


图1 骨髓增生异常综合征患者常见基因突变分布情况

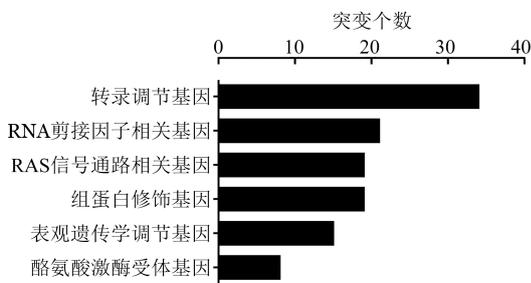


图2 骨髓增生异常综合征患者常见功能基因突变分布情况

中, 50例患者年龄<60岁, 23例患者年龄≥60岁, 比较两组患者基因突变情况: <60岁组患者中有94.0%携带至少1个基因突变, ≥60岁组患者占95.6%, 两组中位突变数分别为2.6(0~8)个对2.2(0~7)个, 差异无统计学意义($z = -1.536, P = 0.647$); ASXL1突变在<60岁组中的检出率高于≥60岁组($P = 0.015$), TP53突变在≥60岁组患者中的检出率为26.1%, 高于<60岁组患者的6.0%($P = 0.024$)(表1)。

表1 常见基因在不同年龄组骨髓增生异常综合征患者的突变情况比较[例(%)]

基因	<60岁(50例)	≥60岁(23例)	P值
ASXL1	15(30.0)	1(4.3)	0.015
RUNX1	12(24.0)	3(13.0)	0.361
U2AF1	10(20.0)	4(17.4)	1.000
TP53	3(6.0)	6(26.1)	0.024
TET2	5(10.0)	3(13.0)	0.701
RAS	6(12.0)	2(8.7)	1.000
PTPN11	6(12.0)	1(4.3)	0.421
DNMT3A	5(10.0)	2(8.7)	1.000
NPM1	4(8.0)	2(8.7)	1.000
SF3B1	4(8.0)	2(8.7)	1.000

功能分类后显示, <60岁组中组蛋白修饰基因突变检出率高于≥60岁组, 差异有统计学意义($P = 0.024$), 酪氨酸激酶受体基因突变检出率低于≥60岁组, 在0.1的水平上有统计学意义($P = 0.099$)(表2)。

表2 常见功能基因分组在不同年龄组骨髓增生异常综合征患者的突变情况比较[例(%)]

功能基因分组	<60岁(50例)	≥60岁(23例)	P值
转录调节基因	22(44.0)	12(52.2)	0.515
RNA剪接因子相关基因	13(26.0)	8(34.7)	0.441
RAS信号转导通路相关基因	15(30.0)	4(17.4)	0.390
组蛋白修饰基因	17(34.0)	2(8.7)	0.024
参与DNA甲基化的表观遗传学调节基因	9(18.0)	6(26.1)	0.427
酪氨酸激酶受体基因	3(6.0)	5(21.7)	0.099

70例患者有染色体核型分析结果, 其中40例(57.1%)检出异常核型。异常核型主要包括:+8, 20q-, 7q-, -17, t(3;3)(q21;q26)及复杂核型等, 无单独5q-。异常核型与正常核型患者MDS相关基因突变检出率分别为97.5%(39/40)对90.0%(27/30), 差异无统计学意义($P = 0.414$)。异常核型患者中常见的基因突变为TP53(9个)、U2AF1(9个)、ASXL1(9个)及RUNX1(7个)。正常核型患者常见的基因突变为ASXL1(8个)、RUNX1(8个)、DNMT3A(6个)、U2AF1(5个)、RAS(5个)及TET2(4个)。其中, TP53突变与异常核型呈中度相关($r_s = 0.332, P = 0.015$); DNMT3A与正常核型呈弱相关($r_s = 0.289, P = 0.044$)。

讨 论

MDS 是一种异质性很强、具有高风险向白血病转化的造血干细胞克隆性肿瘤。过去 10 年里, MDS 的分子遗传学研究得到了长足的发展。随着高通量测序的逐渐开展, MDS 中更多的基因异常被揭示, 且部分基因与 MDS 的临床表型、染色体核型及疾病进展等相关^[3,7]。国内肖志坚教授团队对 511 例 MDS 患者进行 112 种血液肿瘤基因进行二代测序发现, 86% 患者伴有至少 1 个基因突变^[8]。国外学者对 944 例 MDS 患者进行 104 种基因突变检测, 结果显示, 89.5% 的患者至少携带 1 个基因突变, 每例患者平均发生 3 个基因突变^[7]。本研究我们发现, 94.5% 的 MDS 患者至少携带 1 个基因突变, 稍高于文献^[7-8]的报道。近来, Gill 等^[3]综述显示, DNMT3A 及 TP53 在 MDS 中的突变检出率分别为 10% 和 9%, 本组研究结果与以上报道类似。RUNX1 在总体 MDS 中的突变检出率约为 10%, 在 MDS-RAEB 亚型中突变检出率达 23.6%^[3,9]。既往研究显示, PTPN11 在 MDS 中的突变检出率为 1.0% ~ 5.0%^[10], TET2 及 RAS 突变检出率分别为 20% ~ 25% 及 16% ~ 26%^[3,11-12]。本研究结果显示, RUNX1 及 PTPN11 突变检出率稍高于国外报道, 而 TET2 及 RAS 检出率则低于国外报道, 推测上述差异与检测敏感性及研究对象中不同 MDS 亚型构成比不同有关。Harada 等^[9]采用高通量测序发现 MDS-RAEB-1/2 患者中 RUNX1 突变检出率为 23.6%, 本研究结果与之接近; 而另一 RAS 突变检出率高的研究中, 则纳入了较多的 MDS 转化 AML 患者^[12]。

国内肖志坚教授团队的研究结果显示, 依据其功能进行分类, 突变频率依次为表观遗传相关基因(50%)、剪接子相关基因(37%)、信号传导相关基因(34%)、转录因子(24%)和细胞周期与凋亡相关基因(17%)^[8]。我们的研究结果显示, 转录调节基因及 RNA 剪接子相关基因具有较高的突变检出率, 与肖志坚教授团队的检测结果有一定差异, 分析其原因主要在于本研究纳入了较多的 MDS-RAEB 亚型。RUNX1 是本研究中最常见的转录调节基因突变, 隶属 RUNX 家族, 可双向调节造血相关基因的表达。国外文献报道, RUNX1 可与 ASXL1、RAS、IDH 及 DNMT3A 等多种基因突变共存, 但与 TET2 及 NPM1 突变互排^[7,13-14]。Bejar 等^[13]的研究显示 RUNX1、TP53 及 NRAS 突变与低的小血小板计数、及高的骨髓原始细胞水平有关, 是独立的预后不良因素。Gill 等^[3]综述显示剪接体基因 SF3B1 突变在 MDS 患者中总的检出率为 6% ~ 18%, 其中 57% ~ 75% 的患者为 RARS 和难治性血细胞减少伴多系发育异常和环状铁幼粒红细胞。Papaemmanuil 等^[15]研究中 RARS 患者 SF3B1 突变检出率高达 65%, 具有该突变的患者较少发生血细胞减少并具有更长的无事件生存期, SF3B1 突变后血小板正常或数量增多。而 SRSF2 和 ZRSR2 突变则可引起中性粒细胞减少, 其临床意义尚不明确^[16]。U2AF1 突变与染色体+8、20q-有关, 携带该突变者总生存期更短^[17-18]。本研究中 U2AF1 突变检出率高于国外报道的 8.7%^[18], 考虑与本组病例中有较多的病例携

带+8 染色体有关。

MDS 患者中常见的表观遗传异常使控制细胞增殖、黏附等功能的基因甲基化, 参与 DNA 甲基化的调节基因主要有: TET2、DNMT3A 及 IDH1/2 等, 其中, TET2 突变在 MDS 中最为常见, 占 20.0% ~ 25.0%, 高于 DNMT3A 的 10% 及 IDH1/2 的 2.0% ~ 12.0%^[3]。去甲基化药物对 MDS 患者的疗效与 DNMT3A 和 TET2 突变相关, 有 TET2 突变而无 ASXL1 突变的 MDS 患者对去甲基化药物治疗反应最好^[19]。因此, TET2 突变检测在 MDS 中具有治疗指导意义。组蛋白修饰基因 ASXL1 定位于染色体 20q11, 在造血调控及髓系肿瘤的发生中扮演重要角色, 在 MDS 中占 11%, 具有 ASXL1 突变的患者总生存期更短、白血病转化风险更高^[20]。本组病例中, TET2 及 ASXL1 突变检测率与国外报道有一定差异, 在年龄 < 60 岁患者中检出率高于 ≥ 60 岁患者, 但因病例数少且随访时间短, 其预后价值有待进一步扩大病例后行生存分析明确。

与在 AML 中的高频突变基因不同, 本研究中, FLT3-ITD 及 NPM1 突变在 MDS 中的检出率低, 与国外报道基本一致^[4,7,12]。这一结果说明, 尽管 MDS 被称为“白血病前期”, 但其基因突变谱系不同于原发性 AML, 从分子水平而言, MDS 与 AML 可能是两个不同疾病实体。

染色体核型是 MDS 患者进行 IPSS 分层的参考依据之一, 本研究 57.1% (40/70) 的患者均可检测到异常核型。Gaidzik 等^[21]发现 AML 患者中 7 号染色体单体及 13 号染色体三体与 RUNX1 突变相关; 在 MDS 患者中, TP53 突变与复杂核型及甲基化治疗相关^[22-23]。本研究中, RUNX1、ASXL1、TET2 及 U2AF1 在正常和异常核型中的分布差异无统计学意义, 但 TP53 突及 DNMT3A 突变分别与异常核型及正常核型具有一定相关性, 这与既往研究基本一致^[23-24]。

总之, MDS 患者体内存在多个不同基因突变组合的亚克隆, 未来需进一步研究这些突变的基因功能及如何共同决定 MDS 的表型, 以上分子发病机制有助于我们更深入认识 MDS 的本质, 为寻找新的治疗手段, 延长患者总体生存期提供新的治疗策略。

参 考 文 献

- [1] Haider M, Duncavage EJ, Afaneh KF, et al. New insight into the biology, risk stratification, and targeted treatment of myelodysplastic syndromes[J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2017, 37: 480-494. DOI: 10.14694/EDBK_175397.
- [2] 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.
- [3] Gill H, Leung AY, Kwong YL. Molecular and cellular mechanisms of myelodysplastic syndrome: implications on targeted therapy[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(4):440. DOI: 10.3390/ijms17040440.
- [4] 张修文, 周民, 晁红颖, 等. 150 例原发性血小板增多症患者 CALR 基因突变检测及临床观察[J]. 中华血液学杂志, 2015,

- 36 (5): 378- 382. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253- 2727.2015.05.005.
- [5] Green CL, Koo KK, Hills RK, et al. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28 (16):2739- 2747. DOI: 10.1200/JCO.2009.26.2501.
- [6] Willatt L, Morgan SM, Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ (2009): ISCN 2009 an international system for human cytogenetic nomenclature [J]. *Hum Genet*, 2009, 126: 73- 74. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0726-6>.
- [7] Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes [J]. *Leukemia*, 2014, 28(2):241-247. DOI: 10.1038/leu.2013.336.
- [8] 李冰, 王静雅, 刘晋琴, 等. 靶向测序检测 511 例骨髓增生异常综合征患者基因突变[J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(12): 1012-1016. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.12.002.
- [9] Harada H, Harada Y, Niimi H, et al. High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia [J]. *Blood*, 2004, 103 (6):2316- 2324. DOI: 10.1182/blood-2003-09-3074.
- [10] Gwak M, Yoo NJ, Chung YJ, et al. Novel oncogenic PTPN11 mutations in myelodysplastic syndrome in Korean patients [J]. *Hematol Oncol*, 2015, 33(3):166-167. DOI: 10.1002/hon.2146.
- [11] Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms [J]. *Blood*, 2009, 113 (25):6403- 6410. DOI: 10.1182/blood-2009-02-205690.
- [12] Meggendorfer M, de Albuquerque A, Nadarajah N, et al. Karyotype evolution and acquisition of FLT3 or RAS pathway alterations drive progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia [J]. *Haematologica*, 2015, 100(12):487-490. DOI: 10.3324/haematol.2015.127985.
- [13] Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364 (26):2496- 2506. DOI: 10.1056/NEJ-Moa1013343.
- [14] Moyo TK, Savona MR. Molecular testing in patients with suspected myelodysplastic syndromes [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2016, 11(6):441-448. DOI: 10.1007/s11899-016-0356-8.
- [15] Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365 (15):1384- 1395. DOI: 10.1056/NEJ-Moa1103283.
- [16] Damm F, Kosmider O, Gelsi-Boyer V, et al. Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes [J]. *Blood*, 2012, 119 (14):3211- 3218. DOI: 10.1182/blood- 2011- 12- 400994.
- [17] Wu L, Song L, Xu L, et al. Genetic landscape of recurrent ASXL1, U2AF1, SF3B1, SRSF2, and EZH2 mutations in 304 Chinese patients with myelodysplastic syndromes [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(4):4633-4640. DOI: 10.1007/s13277-015-4305-2.
- [18] Graubert TA, Shen D, Ding L, et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes [J]. *Nat Genet*, 2011, 44(1):53-57. DOI: 10.1038/ng.1031.
- [19] Bejar R, Lord A, Stevenson K, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients [J]. *Blood*, 2014, 124 (17):2705-2712. DOI: 10.1182/blood-2014-06-582809.
- [20] Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2009, 145 (6): 788-800. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07697.x.
- [21] Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features [J]. *Leukemia*, 2016, 30 (11):2160-2168. DOI: 10.1038/leu.2016.126.
- [22] Welch JS, Petti AA, Miller CA, et al. TP53 and decitabine in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375 (21):2023- 2036. DOI: 10.1056/NEJ-Moa1605949.
- [23] Svobodova K, Zemanova Z, Lhotska H, et al. Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of TP53 are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes [J]. *Leuk Res*, 2016, 42: 7- 12. DOI: 10.1016/j.leukres.2016.01.009.
- [24] Tan M, IKS N, Chen Z, et al. Clinical implications of DNMT3A mutations in a Southeast Asian cohort of acute myeloid leukaemia patients [J]. *J Clin Pathol*, 2017, 70 (8):669- 676. DOI: 10.1136/jclinpath-2016-204195.

(收稿日期:2017-09-16)

(本文编辑:刘爽)