

伴PML隐匿断裂点t(15;17)(q22;q21)阴性急性早幼粒细胞白血病一例报告并文献复习

邬成业 李玉龙 董晓燕 张琳 商保军 程薇 黄洲风 朱尊民

河南省人民医院血液病研究所,河南省血液病理重点实验室,河南省干细胞分化与调控重点实验室,郑州大学人民医院,河南大学人民医院,郑州 450003

通信作者:朱尊民,Email:zhuzm1964@163.com

基金项目:河南省医学科技攻关计划省部共建项目(SB201901094)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.01.014

Acute promyelocytic leukemia with PML cryptic breakpoint t (15; 17) (q22; q21) negative: a case report and literatures review

Wu Chengye, Li Yulong, Dong Xiaoyan, Zhang Lin, Shang Baojun, Cheng Wei, Huang Zhoufeng, Zhu Zunmin

Institute of Hematology, Henan Provincial People's Hospital; Henan Key Laboratory for Hematopathology; Henan Key Laboratory of Stem Cell Differentiation and Modification; Zhengzhou University People's Hospital, Henan University People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China

Corresponding author: Zhu Zunmin, Email: zhuzm1964@163.com

大多数急性早幼粒细胞白血病(APL)患者携带t(15;17)(q22;q12),从而导致早幼粒细胞白血病基因(PML)与RAR α 的融合^[1-4]。PML-RAR α 融合基因既是分子病因又是治疗靶点。近年来,RAR α 基因新的伙伴基因不断被发现^[5-7],PML-RAR α 除了经典型的L型、S型和V型外,其新的变异体也偶有报道^[8]。最近,我们发现了一种罕见的PML-RAR α 融合基因变异体,由PML外显子4和RAR α 外显子3断裂拼接形成PML-RAR α 。患者对全反式维甲酸(ATRA)和三氧化二砷治疗无效,现报告如下并对相关文献进行复习。

病例资料

患者,女,82岁。因发热、咳嗽、咳痰伴乏力5 d入院。血常规:WBC $1.30 \times 10^9/L$,RBC $1.69 \times 10^9/L$,HGB 39 g/L,PLT $8.0 \times 10^9/L$ 。查体:体温39.5℃,重度贫血貌,急性面容,周身散在瘀斑,齿龈出血。全身浅表淋巴结无肿大;胸骨无压痛,双肺呼吸音粗,双下肺可闻及湿性啰音;心律齐,未闻及病理性杂音;腹平坦,无压痛、反跳痛,下肢水肿。实验室检查:血浆凝血酶原时间12.6 s(参考范围11~17 s),活化部分凝血活酶时间29.2 s(参考范围28~43.5 s),纤维蛋白原4.20 g/L(参考范围2~4 g/L),D-二聚体1.37 mg/L(参考范围0~0.5 mg/L);胸部CT提示肺部炎症、双肺结节、左侧少量胸腔积液。外周血涂片分类计数:幼稚细胞占15%。髂骨穿刺骨髓涂片分类:骨髓增生活跃,粒系异常增生,以颗粒增多的异常早幼粒细胞为主,其胞体大小不等,呈圆形、椭圆形,核圆形、不规则形,可见扭曲、折叠等;染色质细致,核仁2~4个,

隐显不一;胞质量丰富,着蓝色,含有大量细小或粗大的嗜天青颗粒。中幼粒以下阶段细胞少见或缺如。嗜酸性粒细胞可见。细胞化学染色:过氧化物酶(POX)染色阳性率100%(图1A、B)。免疫分型显示异常髓系幼稚细胞占有核细胞的55.85%,表达CD117、CD33、CD13、CD123、MPO,部分表达CD38、CD15、CD64、CD4、HLA-DR,不表达CD34、CD11b、CD14、CD300e、CD10、CD19、CD20、CD8、CD3、CD7、CD2、CD56、cCD79a、cCD3、CD22、CD5、cTDT。染色体核型分析:46,XY[20](图1C)。双色标记RAR α 探针荧光原位杂交(FISH)检测显示RAR α 基因有断裂重排信号(图1D)。荧光定量PCR结果显示白血病相关56种融合基因筛查均阴性,其中包括PML-RAR α (L型)、PML-RAR α (S型)、PML-RAR α (V型)、PLZF-RAR α 、NPM-RAR α 、STAT5b-RAR α 、FIP1L1-RAR α 、PRKAR1A-RAR α 、NUMA1-RAR α 等已报道的RAR α 重排的伙伴基因。mRNA测序分析发现该患者15号染色体上的PML基因的4号外显子右侧1353位点发生断裂(NM_001077397.1),同时17号染色体上的RAR α 基因的3号外显子左侧703位点发生断裂(NM_000964.3),从而使得15号染色体与17号染色体易位形成PML-RAR α 融合基因。该融合基因与国内外文献报道的PML-RAR α 的L型、S型及V型断裂位点均不一致,参考NCBI数据库该基因的序列信息设计出PML基因引物(上游引物:5'-AGAGCAGCTGTATCCAA-GA-3',RAR α 基因下游引物:5'-TGCTTGTAGATGCGGGG-TAG-3')进行PCR扩增,获得154 bp的目的条带(图2),PCR产物一代测序证实PML-RAR α 融合基因的产生(图3A、3B,

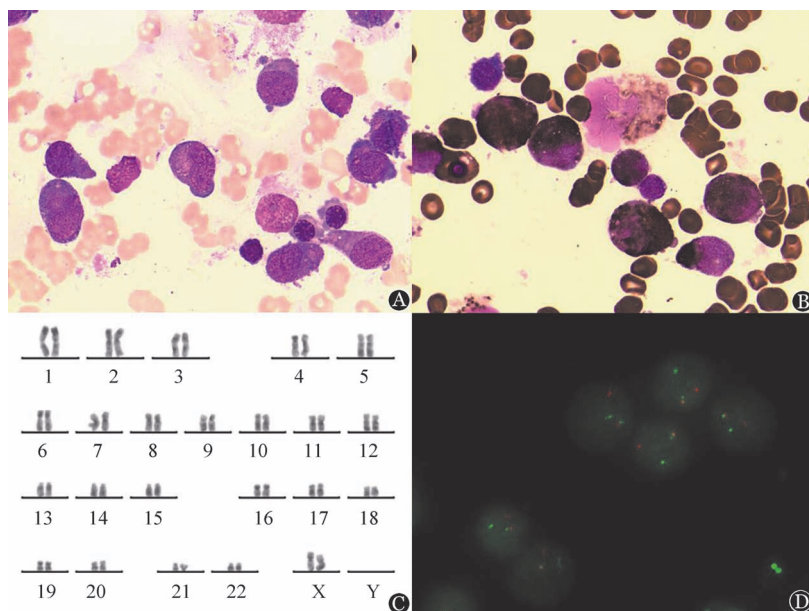


图1 t(15;17)(q22;q21)阴性急性早幼粒细胞白血病患者细胞形态和遗传学检测结果

图4)。急性髓系白血病(AML)或骨髓增生异常综合征相关的常见 22 个基因二代测序发现患者存在 IDH1:exon4:p.R132C 突变,突变频率 0.233。本例患者临床诊断为 APL,“亚砷酸+ATRA”双诱导治疗过程中发生感染合并多脏器功能衰竭,抢救无效死亡,总生存期仅 14 d。

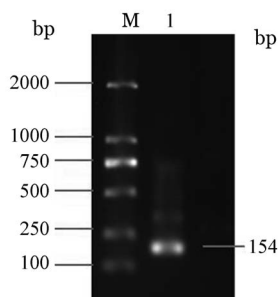


图2 RT-PCR 检测 PML-RAR α 融合基因的琼脂糖凝胶电泳结果

讨论及文献复习

APL 是 AML 的一个亚型,具有独特的分子发病机制、临床表现和治疗方案,细胞遗传学存在 t(15;17)(q24;q21) 平衡易位^[9-10]。在本文中,我们报道 1 例非典型的 PML 断裂位点 t(15;17) 阴性 APL 患者。PML 断点通常聚集在三个区域内:内含子 6(bcr1 或 L 型)、外显子 6(bcr2 或 V 型)和内含子 3(bcr3 或 S 型)。最频繁的断点是 bcr1 (40% ~ 60%) 和 bcr3 (30% ~ 50%),而只有 10% ~ 15% 的患者观察到 bcr2 断点^[11-12]。也有学者描述 bcr1 可以包含外显子 7a,但对这些患者的详细研究表明,PML 基因在 PML 外显子 7a 的第 3 个碱

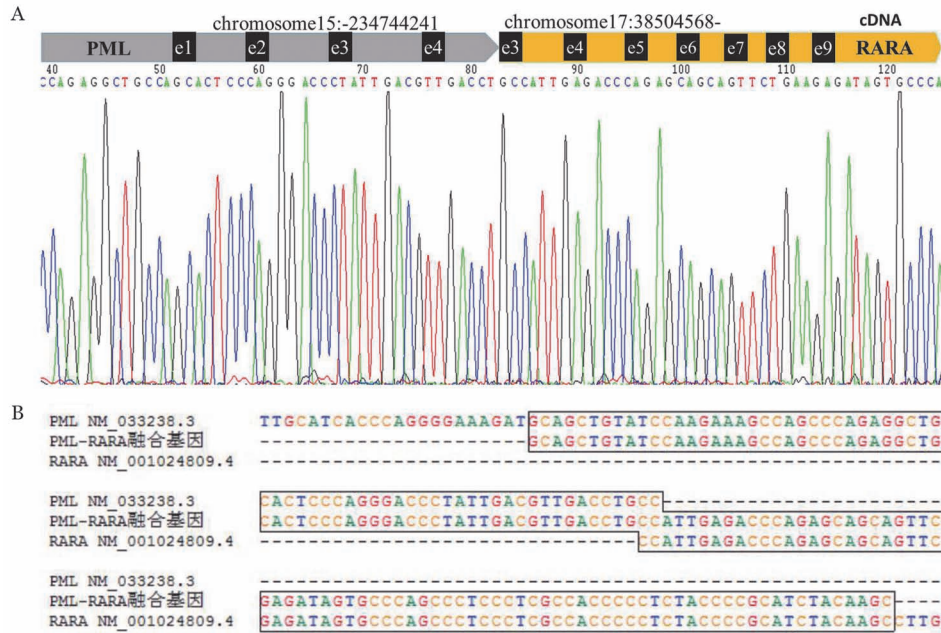
基剪接点处被破坏^[10]。

检索国内外文献共发现 3 例伴非经典 PML-RAR α 融合基因断裂点的 APL 报道。国内郑丽霞等^[13]曾报道 1 例 PML-RAR α 融合基因 S 型的变异体,并认为这一变异体仅存在于初诊的 APL 患者中,在随后的化疗过程中,S 型变异体会被普通 S 型所取代,而且该患者经过化疗获得临床完全缓解。遗憾的是文献中并未报道患者的基本信息、临床状况及治疗方案。

通过对本例 PML-RAR α 融合基因隐匿断裂点的鉴定再次证实 S 型变异体的存在。本例与首次报道的患者疾病进展、预后差异较大,与国际上报道的两例伴非经典 PML-RAR α (L/S/V) APL 患者的情况一致。常规的 PML-RAR α (L/S/V 型)融合基因检测试剂盒无法检测到该位点的融合,表明这些新的 PML 断裂点到目前为止还没有得到充分的诊断,这些罕见性融合点的发现可以有助于避免假阴性或解释异常的阳性。

不同的实验数据表明,在所有 APL 患者体内都存在着 PML-RAR α 融合蛋白或异常 PML 蛋白,而它们就是导致肿瘤发生的关键因素,因此 PML-RAR α 融合基因既是分子病因又是治疗靶点,ATRA 与三氧化二砷联合诱导化疗都是针对分子靶点的药物。然而,除了 PML 和 RAR α 基因本身突变会造成敏感性差异外^[14],不同的 PML-RAR α 融合转录本对 ATRA 的敏感性也不同。伴 PML-RAR α V 型的 APL 患者对 ATRA 敏感性降低,而另一些报告显示伴 PML-RAR α S 型融合转录本患者的预后明显比 PML-RAR α L 型差^[15-18]。

本例患者形态学诊断为 APL,细胞遗传学检查未发现 t(15;17)(q22;q21),分子生物学检查也未检测到 PML-RAR α 融合基因(包含 L 型、V 型、S 型),但利用双色双融合探针检



A: PCR产物的直接测序检出PML-RARα融合基因,断点来自PML外显子4和RARα外显子3的序列;B:用genetyx对PML外显子4、PML-RARα融合基因和RARα外显子3的基因组序列进行比对,发现PML基因外显子4和RARα基因外显子3存在断裂重组点,但融合点位置的两个胞嘧啶尚无法证实其来源

图3 t(15;17)(q22;q21)阴性急性早幼粒细胞白血病患者PML与RARα融合的分子特征

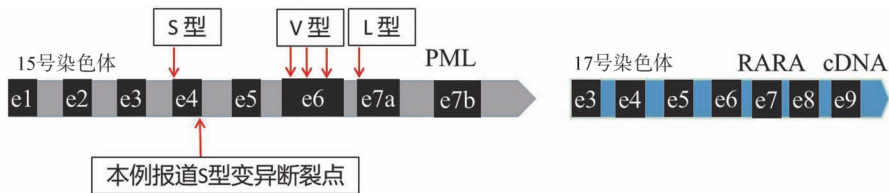


图4 PML-RARα融合基因各型断裂位点

测到 RARα 基因存在重排现象,后经 RNAseq 检测出 PML-RARα 融合基因 S 型变体(较常规 PML-RARα 融合基因 S 型多出 PML 基因的 4 号外显子),并经一代测序证实。诊断明确后该患者接受 ATRA、三氧化二砷诱导治疗,未获得缓解,在入院第 14 天因多器官衰竭死亡。提示该患者对 ATRA、三氧化二砷不敏感并在短期内死亡。虽然伴该种 PML-RARα 变体患者在异常骨髓细胞形态、流式免疫表型等方面与常见 APL 临床和实验室特点基本无差异,但是这种新的易位可能与预后差相关联。由于现有患者病例数较少,因此需要进一步扩大样本量进行统计分析。

参考文献

[1] de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, et al. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus [J]. Nature, 1990, 347(6293):558-561. DOI: 10.1038/347558a0.

[2] Chen X, Wang F, Zhang Y, et al. A novel NPM1-RARG-NPM1 chimeric fusion in acute myeloid leukaemia resembling acute promyelocytic leukaemia but resistant to all-trans retinoic acid

and arsenic trioxide[J]. Br J Cancer, 2019, 120(11):1023-1025. DOI: 10.1038/s41416-019-0456-z.

[3] 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.

[4] 中华医学会血液学分会, 中国医师协会血液科医师分会. 中国急性早幼粒细胞白血病诊疗指南(2018年版)[J]. 中华血液学杂志, 2018, 39(3): 179-183. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.03.002.

[5] Catalano A, Dawson MA, Somana K, et al. The PRKAR1A gene is fused to RARA in a new variant acute promyelocytic leukemia [J]. Blood, 2007, 110(12):4073-4076. DOI: 10.1182/blood-2007-06-095554.

[6] Won D, Shin SY, Park CJ, et al. OBFC2A/RARA: a novel fusion gene in variant acute promyelocytic leukemia [J]. Blood, 2013, 121(8):1432-1435. DOI: 10.1182/blood-2012-04-423129.

[7] Li J, Zhong HY, Zhang Y, et al. GTF2I-RARA is a novel fusion transcript in a t(7;17) variant of acute promyelocytic leukaemia with clinical resistance to retinoic acid[J]. Br J Haematol, 2015,

- 168(6):904-908. DOI: 10.1111/bjh.13157.
- [8] Zhang Z, Xu Y, Jiang M, et al. Identification of a new cryptic PML-RAR α fusion gene without t(15;17) and biallelic CEBPA mutation in a case of acute promyelocytic leukemia: a case detected only by RT-PCR but not cytogenetics and FISH [J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21 (4): 309-314. DOI: 10.1080/15384047.2019.1702398.
- [9] Liquori A, Ibañez M, Sargas C, et al. Acute Promyelocytic Leukemia: A Constellation of Molecular Events around a Single PML-RARA Fusion Gene [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12 (3): 624. DOI: 10.3390/cancers12030624.
- [10] Iaccarino L, Ottone T, Alfonso V, et al. Mutational landscape of patients with acute promyelocytic leukemia at diagnosis and relapse [J]. *Am J Hematol*, 2019, 94 (10):1091-1097. DOI: 10.1002/ajh.25573.
- [11] Biondi A, Rambaldi A, Pandolfi PP, et al. Molecular monitoring of the myl/retinoic acid receptor-alpha fusion gene in acute promyelocytic leukemia by polymerase chain reaction [J]. *Blood*, 1992, 80(2):492-497.
- [12] Grimwade D, Howe K, Langabeer S, et al. Establishing the presence of the t(15;17) in suspected acute promyelocytic leukaemia: cytogenetic, molecular and PML immunofluorescence assessment of patients entered into the M. R.C. ATRA trial. M.R.C. Adult Leukaemia Working Party [J]. *Br J Haematol*, 1996, 94(3):557-573.
- [13] 郑丽霞, 王玲, 谭获, 等. 急性早幼粒细胞白血病患者出现新的 PML-RAR α 融合基因S型变异体[J]. *广东医学*, 2006, (12): 1852-1853. DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.2006.12.038.
- [14] Fasan A, Haferlach C, Perglerová K, et al. Molecular landscape of acute promyelocytic leukemia at diagnosis and relapse [J]. *Haematologica*, 2017, 102 (6):e222-222e224. DOI: 10.3324/haematol.2016.162206.
- [15] Chillón MC, González M, García-Sanz R, et al. Two new 3' PML breakpoints in t(15;17)(q22;q21)-positive acute promyelocytic leukemia [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, 27 (1):35-43.
- [16] Gallagher RE, Li YP, Rao S, et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases with PML-RAR alpha break/fusion sites in PML exon 6: identification of a subgroup with decreased in vitro responsiveness to all-trans retinoic acid [J]. *Blood*, 1995, 86(4):1540-1547.
- [17] Vahdat L, Maslak P, Miller WH, et al. Early mortality and the retinoic acid syndrome in acute promyelocytic leukemia: impact of leukocytosis, low-dose chemotherapy, PMN/RAR-alpha isoform, and CD13 expression in patients treated with all-trans retinoic acid [J]. *Blood*, 1994, 84(11):3843-3849.
- [18] Yedla RP, Bala SC, Pydi VR, et al. Outcomes in Adult Acute Promyelocytic Leukemia: A Decade Experience [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2020, 20 (4):e158-e164. DOI: 10.1016/j.clml.2019.12.011.

(收稿日期:2020-08-31)

(本文编辑:王叶青)

·读者·作者·编者·

2020年本刊可直接用英文缩写的常用词汇

血红蛋白 HGB	辅助性T淋巴细胞 Th细胞	半乳甘露聚糖检测 GM试验
红细胞计数 RBC	调节性T淋巴细胞 Treg细胞	酶联免疫吸附实验 ELISA
白细胞计数 WBC	细胞毒性T淋巴细胞 CTL细胞	噻唑蓝实验 MTT实验
血小板计数 PLT	自然杀伤细胞 NK细胞	磷酸盐缓冲液 PBS
中性粒细胞绝对计数 ANC	白细胞介素 IL	胎牛血清 FBS
丙氨酸转氨酶 ALT	嵌合抗原受体T细胞 CAR-T细胞	乙二胺四乙酸 EDTA
天冬氨酸转氨酶 AST	肿瘤坏死因子 TNF	二甲基亚砷 DMSO
谷氨酰转氨酶 GGT	干细胞生长因子 SCF	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE
碱性磷酸酶 ALP	粒细胞集落刺激因子 G-CSF	美国国家综合癌症网络 NCCN
乳酸脱氢酶 LDH	粒-巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF	国际预后积分系统 IPSS
凝血酶原时间 PT	巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF	国际预后指数 IPI
部分激活的凝血活酶时间 APTT	粒-巨噬细胞集落形成单位 CFU-GM	异基因造血干细胞移植 allo-HSCT
红细胞生成素 EPO	弥散性血管内凝血 DIC	自体造血干细胞移植 auto-HSCT
血小板生成素 TPO	实时荧光定量PCR RQ-PCR	移植抗宿主病 GVHD
乙型肝炎病毒 HBV	磁共振成像 MRI	人类白细胞抗原 HLA
丙型肝炎病毒 HCV	正电子发射断层扫描 PET	受试者工作特征曲线 ROC曲线
人类免疫缺陷病毒 HIV	荧光原位杂交 FISH	常见不良反应事件评价标准 CTCAE
核因子- κ B NF- κ B	(1,3)- β -D葡萄糖检测 G试验	

本刊编辑部