

ETV6-RUNX1 阳性儿童急性淋巴细胞白血病基因表达谱聚类的临床特征

郑雪岭¹ 王子阳² 孙嫣然¹ 张寒¹ 高超¹ 张瑞东¹ 刘怡¹ 彭亚光³

Jing-Dong J. Han² 郑胡镛¹

¹国家儿童医学中心,首都医科大学附属北京儿童医院血液肿瘤中心,儿童血液病与肿瘤分子分型北京市重点实验室,儿科学国家重点学科,儿科重大疾病研究教育部重点实验室,北京 100045;²北京大学,前沿交叉学科研究院,北大-清华生命科学联合中心,定量生物学中心,北京 100871;³国家儿童医学中心,首都医科大学附属北京儿童医院,儿科重大疾病研究教育部重点实验室,临床流行病学与循证医学中心,北京 100045
孙嫣然现在复旦大学附属儿科医院,上海 201102;张寒现在中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650118

郑雪岭与王子阳对本文有同等贡献

通信作者:郑胡镛,Email: zhenghuyong@vip.sina.com; Jing-Dong J. Han, Email: jackie.han@pku.edu.cn

【摘要】 目的 通过基因表达谱研究儿童ETV6-RUNX1阳性急性淋巴细胞白血病(ALL)异质性,探索不同聚类分组临床特征,为临床个性化诊疗及利用测序技术探索预后相对不良组预测模型提供可行性参考。**方法** 应用改进的基因片段分析技术对2016年8月至2019年6月北京儿童医院收治的264例初诊ALL患儿的骨髓标本进行57个分型基因检测和聚类分析,重点分析56例ETV6-RUNX1阳性患者的基因表达谱与临床特点、免疫表型和早期化疗反应的关系。**结果** 基因分型聚类显示ETV6-RUNX1阳性ALL被分为两组:E/R-1组(45例,80.4%)和E/R-2组(11例,19.6%)。E/R-2聚类离散度大于E/R-1, spearman 相关系数分别为0.788、0.901; E/R-2、E/R-1组初诊PLT中位数分别为104(27~644)×10⁹/L、50(8~390)×10⁹/L($P < 0.01$),初诊骨髓原始幼稚细胞比例分别为0.830(0.270~0.975)、0.935(0.445~0.990)($P < 0.05$); CD22⁺CD34⁺CD20⁺CD117⁺CD56⁺免疫组合在E/R-2组占比更高($P < 0.001$); E/R-2和E/R-1组化疗第33天流式细胞术检测的微小残留病(MRD)转阴例数分别为5例(55.6%)和32例(88.9%)($P = 0.064$),去除临界值病例敏感性分析转阴例数分别为5例(55.6%)和32例(91.4%)($P = 0.035$);第33天PCR检测的MRD转阴例数分别为7例(77.8%)和36例(100.0%)($P = 0.047$)。 **结论** ETV6-RUNX1阳性ALL患儿在基因表达谱层面存在异质性,符合E/R-2表达特征的患儿可能初诊时血小板减少倾向小但早期化疗反应相对不良。

【关键词】 儿童; 白血病,淋巴细胞,急性; 基因表达谱; 异质性

基金项目:北京市医院管理局登峰计划(DFL20151101);首都卫生发展科研专项-重点攻关(首发2016-1-2091);国家科技重大专项(2017ZX09304029004)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.05.008

Clinical characteristics and gene expression profiles in children with ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia

Zheng Xueling¹, Wang Ziyang², Sun Yanran¹, Zhang Han¹, Gao Chao¹, Zhang Ruidong¹, Liu Yi¹, Peng Yaguang³, Jing-Dong J. Han², Zheng Huyong¹

¹Beijing Key Laboratory of Pediatric Hematology Oncology; National Key Discipline of Pediatrics (Capital Medical University); Key Laboratory of Major Diseases in Children, Ministry of Education; Hematology Oncology Center, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, National Center for Children's Health, Beijing 100045, China; ²Peking-Tsinghua Center for Life Sciences, Center for Quantitative Biology (CQB), Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Peking University, Beijing

100871, China; ³Center of Clinical Epidemiology & Evidence-based Medicine, Key Laboratory of Pediatric Major Diseases Research, Ministry of Education, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, National Center for Children's Health, Beijing 100045, China

Sun Yanran is working on the Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 201102, China; Zhang Han is working on the Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China

Zheng Xueling and Wang Ziyang are contributed equally to the article

Corresponding author: Zheng Huyong, Email: zhenghuyong@vip.sina.com; Jing-Dong J. Han, Email: jackie.han@pku.edu.cn

[Abstract] Objective To evaluate the heterogeneity in pediatric ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia (ALL) by gene expression profile and to study clinical characteristics in different clusters. **Methods** An improved advanced fragment analysis (iAFA) technique was developed to detect 57 marker genes in 264 pediatric ALL patients treated in Beijing Children's Hospital from August 2016 to June 2019. The 56 ALL patients with ETV6-RUNX1 positive were evaluated by clinical characteristics in gene expression profile, immunophenotype and early response of chemotherapy in different clusters. **Results** The 56 ETV6-RUNX1-positive patients were clustered into 2 groups of E/R-1 (45, 80.4%) and E/R-2 (11, 19.6%). Spearman coefficient was 0.788 and 0.901 in E/R-2 and E/R-1, respectively. The median of initial platelet counts was 104 (27 - 644) and 50 (8 - 390) ($P < 0.01$) in E/R-2 and E/R-1, respectively. The median of proportion of initial bone marrow immature cells was 0.830 (0.270 - 0.975) and 0.935 (0.445 - 0.990) ($P < 0.05$) in E/R-2 and E/R-1, respectively. The most specific immunophenotype at initial diagnosis, CD22⁺CD34⁺CD20⁻CD117⁻CD56⁻, mainly gathered in E/R-2 ($P < 0.001$). Patients negative of minimal residual disease detected by flow cytometry (MRD-FCM) at day 33 were 5 (55.6%) and 32 (88.9%) in E/R-2 and E/R-1, respectively. There was no significant difference in the original analysis ($P = 0.064$) but difference in sensitivity analysis ($P = 0.035$). Nevertheless, patients negative of MRD detected by polymerase chain reaction (MRD-PCR) at day 33 were 7 (77.8%) and 36 (100%) in E/R-2 and E/R-1, respectively, with significant difference ($P = 0.047$). **Conclusion** Gene expression profile shows heterogeneous in ETV6-RUNX1 ALL, and the E/R-2 profile indicates that these patients may have a less tendency to thrombocytopenia at the initial diagnosis but have poorer response to induction chemotherapy and may influence further outcome.

[Key words] Child; Leukemia, lymphoblastic, acute; Gene expression profile; Heterogeneity

Fund program: Beijing Municipal Administration of Hospitals DengFeng Program (DFL20151101); Capital Health and Development of Special Grant (2016-1-2091); National Science and Technology Key Projects (2017ZX09304029004)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.05.008

儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)精确分型对判断预后和依据危险度分层化疗至关重要。自2009年Ph-like亚型被发现以来,利用基因表达谱聚类分析已经发现了PAX5alt、PAX5P80R等多种潜在ALL亚型,显示了基因表达谱分型在揭示复杂遗传学变异规律上的巨大潜力^[1-2]。新亚型被发现的同时,常见亚型的组内异质性也受到关注。儿童ETV6-RUNX1阳性ALL整体上虽有良好的预后,但研究显示仍有约20%患者复发,且多为治疗后5~10年复发,研究该组异质性进而对预后相对不良组早期预测并提前干预,可能降低复发率^[3]。目前针对儿童ETV6-RUNX1阳性ALL异质性的研究国内外常聚焦于初诊亚克隆^[4-5]、二次打击位点^[6]、拷贝数变异^[7]等方面,而利用基因表达谱探索该组异质性尚未见报道。本研究中我们采用前期确立的儿童B系ALL57个分型基因^[8-10],对本院2016年8月至

2019年5月收治的264例初诊ALL患儿进行基因检测和表达谱聚类分析,重点分析56例ETV6-RUNX1融合基因阳性ALL患儿的表达谱异质性及其与临床特点的关系。

病例与方法

1. 病例:入组标准:①2016年8月至2019年6月在我院初诊或外院规范激素治疗能顺利衔接后续化疗的ALL初诊患儿(<18周岁)。②完成治疗前评估:全血细胞分析、外周血原始幼稚细胞计数;骨髓细胞形态学、免疫学、细胞遗传学、分子生物学分型(MICM分型)。③完成早期化疗反应评估:化疗第15、33天骨髓细胞形态学检查,均完成免疫微小残留病(MRD)流式细胞术检测和基因MRD(PCR)检测及评估。④按相应化疗方案规范完成危险度复评及化疗强度调整。排除标准:①初诊为复发病

例和曾行不规范激素治疗白血病患者；②治疗前评估与早期化疗反应评估信息不完整；③初诊无白血病相关免疫表型或无适合免疫 MRD 追踪的抗体组合；④初诊标本缺失；⑤标本质量不符合质控条件；⑥基因片段分析数据无法标准化。

根据入排标准,本研究最终纳入 264 例患者,其中 56 例 ETV6-RUNX1 阳性 ALL 患儿作为异质性探索的主要研究对象。2018 年 9 月 1 日之前入选患者(46 例)采用 CCLG-ALL-2008 方案^[11],2018 年 9 月 1 日及之后入选患者(10 例)采用 CCLG-ALL-2018 方案(<http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653/201810/aef82930c1af4fc5bf325938e2fcb075.shtml>)进行规范诊断、危险度分层及治疗,两种方案的诱导期治疗基本相同。本研究获入组患者监护人书面知情同意。

2. RNA 标本采集、质控及保存:患儿骨髓标本及总 RNA 标本来源于临床检验后的剩余标本。采用裂解红细胞的方法从骨髓中提取单个核细胞,并用 Trizol 试剂提取单个核细胞中的总 RNA。质控要求:①骨髓标本:EDTA 充分抗凝,骨髓量 > 2 ml,存放时间 < 12 h;②单个核细胞标本:存放时间 < 30 个月;③RNA 标本:存放时间 < 3 个月且浓度 > 50 ng/μl,吸光度(A)₂₆₀/A₂₈₀为 1.8~2.0。骨髓标本 4℃存放;单个核细胞标本及 RNA 标本-80℃冻存。

3. GeXP 基因多重检测及生物信息学分析:实验步骤主要包括 RNA 样本稀释、RT-PCR、GeXP 毛细管电泳、GeXP 原始数据(CQS 文件)导出及内参数据标准化,详细步骤及所用试剂见文献[9]。57 个分型基因由本课题组前期儿童 ALL 基因分型研究确立并优化得出,分型基因选择的合理性及 GeXP 平台下优化采用的“一步法”基因片段分析检测技术可靠性已得到证明^[8-10]。基因表达谱数据聚类:以每个样本中 57 个标记基因的表达值排序(高秩值表示高表达值)作为输入,使用 BIC-SKmeans 算法进行无监督聚类,参数为:--r 1000(重复 1000 次),--eg 2(基因控制因数为 2),--es 1(样本控制因数为 1),--ms = 1(指定样本聚类的距离度量为欧氏距离),--mg = 1(指定基因聚类的距离度量为欧氏距离);使用 Rtsne 包进行样本降维可视化,参数为 dims = 2, pca = FALSE, perplexity = 20, theta = 0.5, max_iter = 1000。

4. MRD 检测主要设备及试剂:①流式细胞术检测 MRD:流式细胞仪 BDFACSCanto II 购自美国 Becton Dickinson 公司,其中免疫分型主要单克隆抗体 CD5、CD7、CD41、CD2、Kappa、Lambd、MPO、

cyIgM、cyCD3、CD10、HLA-DR、cyCD79a、CD13、CD22、CD33、CD34、CD20、CD117 和 CD56 均购自美国 BDPharmingen 或 Coulter 公司。标准:淋系抗原、髓系抗原、非系列特异性抗原,阳性细胞 ≥ 20% 为表达阳性;cyCD3、cyCD79a、MPO 阳性细胞 ≥ 10% 为表达阳性。②实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 MRD:qRT-PCR 检测初诊 ETV6-RUNX1 阳性 ALL 标本融合基因拷贝数,ABI ViiA7 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

5. 临床数据查询及统计学处理:采用回顾性分析方法对纳入研究病例的一般临床资料、实验室检测结果、治疗和随访资料进行分析。采用 SPSS 21.0 统计软件及 R 语言进行统计学分析。符合正态分布的定量资料用均数 ± 标准差表示,组间比较用独立样本 *t* 检验;不符合正态分布的定量资料用中位数(范围)表示,组间比较用 Wilcoxon 秩和检验;分类资料用频数(百分比)来描述,组间比较用卡方检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。差异基因 *P* 值进行 FDR 校正,校正后 *P* 值 < 0.05 为差异有统计学意义。样本离散度用聚类系数(Clustering coefficient)描述,spearman 相关系数 > 0.6 认为两样本表达谱相似,值越小越离散。

结 果

1. 基因表达谱聚类分析:对 264 例 ALL 样本的基因表达数据聚类分析显示,ETV6-RUNX1 阳性 56 例(21.2%)、BCR-ABL 阳性 12 例(4.5%)、MLL 重排 6 例(2.3%)、TCF3-PBX1 阳性 13 例(4.9%)、T-ALL 21 例(8.0%)、超二倍体 ALL 74 例(28.0%)、其他 B-ALL 82 例(31.1%)。其中 BCR-ABL 和 ETV6-RUNX1 阳性 ALL 均存在被分为两组的聚类特点,在基因表达谱上存在组内异质性。根据样本量情况,本研究仅对 ETV6-RUNX1 阳性 ALL 两个亚组(45:11)进行分析,将样本数为 45 例组命名为“E/R-1”,离散度 spearman 相关系数为 0.901;11 例组命名为“E/R-2”,离散度 spearman 相关系数为 0.788(图 1)。

2. E/R-1、E/R-2 两组差异基因分析:为探究两组基因表达差别,根据各基因表达的 Rank 值,利用 *t* 检验对两组差异基因 *P* 值进行 FDR 校正,校正后 *P* 值 < 0.05 且 |RankChange| > 10 视为差异有统计学意义,共发现 11 个基因存在表达差异,即 WASF1、FRMD4B、STCH、CLIC5、GNG11 基因在 E/R-2 组相对低表达(*P* < 0.05);而 MARCKS、ICAM3、

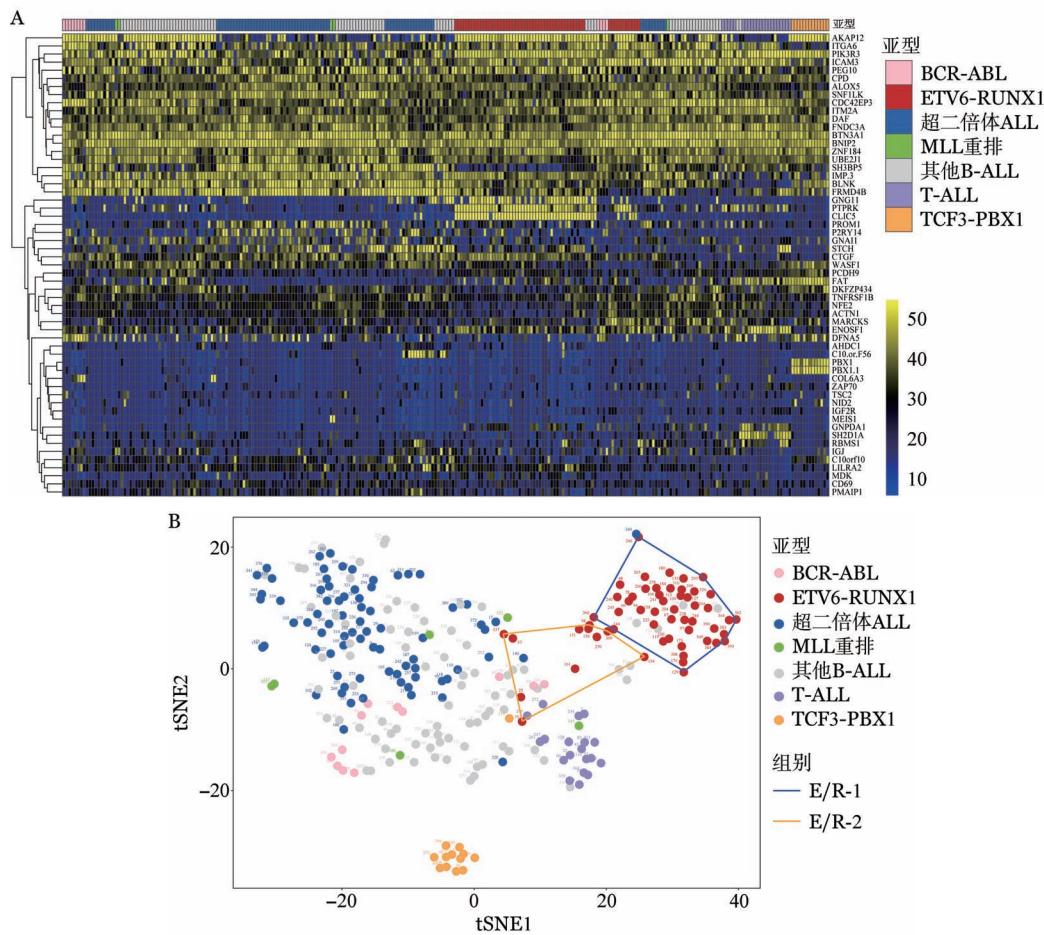
SH3BP5、NFE2、ACTN1、SNF1LK 基因在E/R-2组相对高表达($P < 0.05$);其余基因表达在两组间差异无统计学意义(图2)。

3. E/R-1、E/R-2组一般临床特征分析:对两组患者的性别、初诊年龄、WBC、PLT、HGB、外周血原始幼稚细胞比例、骨髓原始幼稚细胞比例,以及CRLF2、TPMT、NUDT15、IKZF1突变进行比较,除初诊PLT E/R-2组较E/R-1组高($P < 0.01$),初诊骨髓原始幼稚细胞比例E/R-2组较E/R-1组低($P < 0.05$),其他指标在两组中的差异均无统计学意义(P 值均 > 0.05)。详见表1。

4. E/R-1、E/R-2组白血病细胞免疫表型分析:对两组患儿的初诊白血病细胞免疫表型的特性分析结果发现,CD5、CD7、CD41、CD2、Kappa、Lambd、MPO、cyIgM、cyCD3在两组中均不表达,而CD19在两组均表达,为常量;CD10、HLA-DR、cyCD79a仅

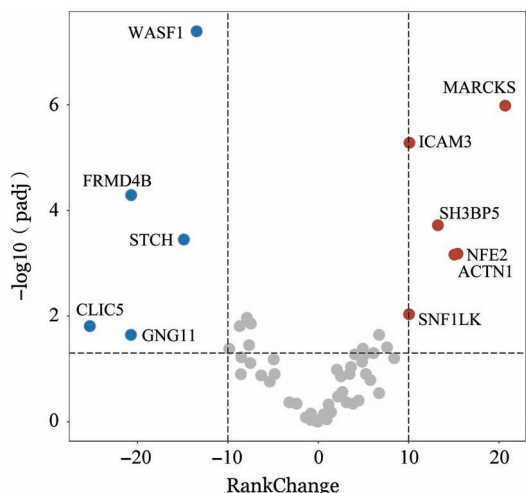
在E/R-2组中1例患儿中不表达,两组其余患儿均表达;CD13两组各有1例表达,其余均不表达;CD22、CD33、CD34、CD20、CD117和CD56在各患儿间为非常量表达,但以上20种抗原标志在两组比较中差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

通过查阅文献[12],结合跨系抗原表达和不同程度非同步抗原表达情况,针对主要非常量表达的6种免疫标志进一步利用热图聚类趋势筛选出:CD22⁺CD34⁺CD20⁻、CD20⁻CD117⁻CD56⁻、CD34⁺CD20⁻CD117⁻CD56⁻、CD22⁺CD34⁺CD20⁻CD117⁻CD56⁻、CD33⁺CD22⁺CD34⁺CD20⁻CD117⁻CD56⁻表达组合。即在下列抗原表达模式基础上行进一步的组合抗体分析:CD5、CD7、CD41、CD2、Kappa、Lambd、MPO、cyIgM、cyCD3均阴性;CD19阳性;CD10、HLA-DR、cyCD79a、CD13阳性或阴性。以上组合在E/R-2组占比更多,除CD22⁺CD34⁺CD20⁻



A: 264例ALL患儿GeXP数据聚类分析。根据57个分型基因在264例ALL样本中相对表达量排序值进行聚类分析。行为基因,列为病例;黄色表示表达量排序值高,蓝色表示表达量排序值低。B: 264例ALL患儿基因表达谱数据tSNE1分布图。图中每一个点代表一个样本,点的颜色与分型对应,不同线条构成的区域分别为E/R-1、E/R-2空间散布范围。可见E/R-1与E/R-2两组毗邻,但E/R-2在空间上更离散(spearman相关系数 = 0.788 < 0.901)

图1 264例急性淋巴细胞白血病(ALL)患儿基因表达谱聚类分析



每一个彩色圆点代表一种差异基因,红色表示相对高表达,蓝色表示相对低表达;灰色圆点代表无差异基因

图2 E/R-2、E/R-1两组差异基因

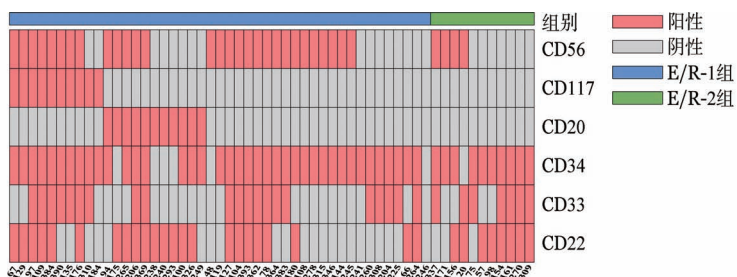
组合外,其余组合两组间差异有统计学意义(图3、表2)。

5. E/R-1、E/R-2组诱导期MRD分析:本研究入组的患儿采用CCLG-2018 ALL方案(18方案)或CCLG-2008 ALL方案(08方案)治疗,且大部分患儿尚未完成化疗,由于两方案的标危诱导治疗完全一致,故仅对两组诱导期标危共45例患儿的早期化疗反应指标进行评估比较,包括第15和33天MRD水平。结果提示两组流式细胞术检测的第15天和第33天MRD转阴情况差异无统计学意义($P=0.064$)。考虑到临界值对小样本量的影响,进一步敏感性分析中去除了MRD为临界值的1例患者(第33天流式细胞术检测的MRD = 1×10^{-4} ,第33天PCR检测的MRD = 0.54×10^{-4} ,位于E/R-1组),两组流式细胞术检测的第33天MRD水平比较差异具有

表1 E/R-2、E/R-1两组ETV6-RUNX1阳性急性淋巴细胞白血病患儿一般临床特征

临床特征	E/R-1(45例)	E/R-2(11例)	χ^2/z 值	P值
性别[例(%)]			0.218	0.640 ^a
男	28(62.2)	6(54.5)		
女	17(37.8)	5(45.5)		
初诊年龄[岁, M(范围)]	4.19(2.21~9.76)	3.83(1.84~14.97)	-0.361	0.718 ^b
WBC[$\times 10^9/L$, M(范围)]	6.78(2.18~169.10)	5.72(2.06~46.39)	-0.938	0.348 ^b
PLT[$\times 10^9/L$, M(范围)]	50(8~390)	104(27~644)	-2.847	0.004 ^b
HGB[g/L, M(范围)]	81(45~145)	92(72~156)	-1.444	0.149 ^b
外周血原始幼稚细胞[M(范围)]	0.04(0~0.96)	0(0~0.85)	-1.466	0.143 ^b
骨髓原始幼稚细胞[M(范围)]	0.935(0.445~0.990)	0.830(0.270~0.975)	-2.044	0.041 ^b
CRLF2突变[例(%)]			0.000	>0.999 ^c
阴性	43(95.6)	11(100.0)		
阳性	2(4.4)	0(0)		
TPMT突变[例(%)]			0.139	0.709 ^c
阴性	41(91.1)	11(100.0)		
阳性	4(8.9)	0(0)		
NUDT15突变[例(%)]			0.000	>0.999 ^c
阴性	35(77.8)	9(81.8)		
阳性	10(22.2)	2(18.2)		
IKZF1突变[例(%)]			0.000	>0.999 ^c
阴性	44(97.8)	11(100.0)		
阳性	1(2.2)	0(0)		

注:^a采用Pearson卡方检验;^b采用Wilcoxon秩和检验;^c有期望值小于5的实际值,采用连续性校正的卡方检验



根据表达组合特点对病例进行聚类,CD56 CD117 CD20在两组中占比呈现反向趋势

图3 56例ETV6-RUNX1阳性急性淋巴细胞白血病患儿非常量表达抗原标记热图

表2 E/R-1 与 E/R-2 两组组合抗体分析情况[例(%)]

抗体标记组合	E/R-1(45例)	E/R-2(11例)	χ^2 值	P值 ^a
CD22 ⁺ CD34 ⁺ CD20 ⁻			2.723	0.099
符合	14(31.1)	7(63.6)		
不符合	31(68.9)	4(36.4)		
CD20 ⁺ CD117 ⁺ CD56 ⁻			7.285	0.007
符合	8(17.8)	7(63.6)		
不符合	37(82.2)	4(36.4)		
CD34 ⁺ CD20 ⁺ CD117 ⁺ CD56 ⁻			8.485	0.004
符合	7(15.6)	7(63.6)		
不符合	38(84.4)	4(36.4)		
CD22 ⁺ CD34 ⁺ CD20 ⁻ CD117 ⁺ CD56 ⁻			14.259	<0.001
符合	2(4.4)	6(45.5)		
不符合	43(95.6)	5(54.5)		
CD33 ⁺ CD22 ⁺ CD34 ⁺ CD20 ⁻ CD117 ⁺ CD56 ⁻			8.820	0.003
符合	1(2.2)	4(36.4)		
不符合	44(97.8)	7(63.6)		

注:^a有期望值小于5的实际值,采用连续性校正的卡方检验

统计学意义($P=0.035$);两组 PCR 检测的第 15 天 MRD 转阴情况差异无统计学意义($P=0.327$),但第 33 天 MRD 转阴情况两组间差异有统计学意义($P=0.047$)(表 3)。

表3 E/R-1 与 E/R-2 两组化疗第 15、33 天微小残留病(MRD)情况比较[例(%)]

MRD	E/R-1 (36例)	E/R-2 (9例)	χ^2 值	P值 ^a
第 15 天 MRD(FCM)			0.006	0.941
阳性	19(52.8)	4(44.4)		
阴性	17(47.2)	5(55.6)		
第 33 天 MRD(FCM)			3.430	0.064
阳性	4(11.1)	4(44.4)		
阴性	32(88.9)	5(55.6)		
第 33 天 MRD(FCM) ^b			4.466	0.035
阳性	3(8.6)	4(44.4)		
阴性	32(91.4)	5(55.6)		
第 15 天 MRD(PCR)			0.962	0.327
阳性	19(52.8)	2(22.2)		
阴性	17(47.2)	7(77.8)		
第 33 天 MRD(PCR)			3.957	0.047
阳性	0(0.0)	2(22.2)		
阴性	36(100.0)	7(77.8)		

注:^a有期望值小于5的实际值,采用连续性校正的卡方检验;

^b去除临界值病例。FCM:流式细胞术

讨 论

本研究利用基因表达谱聚类分析将 56 例 ETV6-RUNX1 阳性 ALL 分为 2 组,E/R-1 组有 45 例(80.4%),E/R-2 组有 11 例(19.6%),在空间分布上 E/R-2 离散度(spearman 相关系数 = 0.788)大于 E/R-1 (spearman 相关系数 = 0.901),表明 E/R-2 总体上组

内表达多样性大,一种可能是伴随多样基因和通路改变致使分型基因上调或下调,另一种可能则是 E/R-2 组有更显著的初诊多克隆,两种均能导致更为多样化的表达模式。Mitelman 数据库显示约有 17% 的 ALL 初诊患者为多型克隆,我国张丽等^[5]利用定量多色 FISH 对 48 例儿童 ETV6-RUNX1 阳性 ALL 进行检测,结果显示初诊时有 34 例(70.8%)为 1 个克隆,而多个克隆则有 14 例(29.2%),本研究中 E/R-2 组占比与国内外相关研究中初诊多克隆占比相似。

在两组差异基因分析中,11 个差异基因涉及细胞膜结构、细胞增殖、细胞黏附、离子通道等方面,由于所选基因为分型基因且检测的是相对表达量,故这些表达差异可能并不是这些基因直接变异的结果,而是由其他基因或通路改变造成,需在将来利用测序技术做进一步验证。

我们将两组在基本临床特征、白血病免疫分型及早期化疗反应方面进行异质性分析时发现,两组均有初诊时血象受抑制的病例,但 E/R-2 组 PLT 多不减低($>100 \times 10^9/L$),这可能是相对较低的骨髓肿瘤细胞比例更低程度抑制血小板生成的结果。对白血病细胞免疫标记组合分析除有利于区分正常幼稚细胞外,还有利于减少治疗及多克隆造成的假阴性结果,Vervoordeldonk 等^[12-13]认为 CD22⁺CD34⁺CD20⁻免疫组合可能预测白血病复发,一定程度上也显示了组合免疫表型分析在检测肿瘤细胞中的高灵敏性。本次研究中 CD22⁺CD34⁺CD20⁻免疫表型两组比较差异虽无统计学意义($P=0.099$),但该表型在 E/R-2 组有占优的趋势,需扩大样本量进一

步验证。利用聚类热图,进一步发现 CD22⁺CD34⁺CD20⁻CD117⁻CD56⁻免疫表型集中在 E/R-2 组且差异有统计学意义($P < 0.001$),根据分化抗原的表达特性提示 E/R-2 白血病细胞可能在 CD22⁺CD34⁺CD20⁻表型基础上跨系表达和非同步表达程度较 E/R-1 更小,由于目前暂无长期预后数据,该组合表型的实际临床意义有待观察。值得注意的是,Chen 等^[13]的研究结果提示 MRD 检测靶标在初诊有多型亚克隆的情况下可能随病程的衍进而变化,导致假阴性的结果,结合 E/R-2 可能存在初诊多克隆以及两组在化疗第 33 天 MRD(流式细胞术)敏感性分析、第 33 天 MRD(PCR)转阴情况分析中呈现出差异,我们推测 E/R-2 可能存在化疗第 33 天 MRD 更难转阴的趋势,但受限于样本量,两组间差异无统计学意义,而 CD22⁺CD34⁺CD20⁻CD117⁻CD56⁻免疫组合表型是否与之相关,需进一步验证。目前研究认为诱导期的 MRD 水平是判断预后的重要指标,MRD 阳性预后较差,由此我们推测 E/R-2 组为相对预后不良组^[14-15]。

由于本研究大部分入组患儿尚处化疗期,预后特性尚未完全显露,且在揭示 ETV6-RUNX1 阳性 ALL 遗传学特性的基因选择上有较大优化空间,故研究结果存在局限性,但在一定程度上为该组临床个性化诊疗和将来应用测序数据探索预后相对不良组预测模型提供了可行性参考。我们将持续追踪本组患儿预后,进一步利用测序技术,扩大样本量对本结果进行验证。

总之,我们在基因表达谱层面发现了两组差异表达的 ETV6-RUNX1 阳性 ALL,且两组在初诊 PLT、初诊骨髓原幼细胞比例、白血病免疫表型、化疗第 33 天 MRD 方面各具特点。符合 E/R-2 表达谱特征的 ETV6-RUNX1 阳性 ALL 患儿可能在初诊时血小板减少倾向小,但因早期化疗反应相对不敏感,巩固前 MRD 转阴较难,综合考虑其预后可能相对不良。

参考文献

- [1] Den BML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(2):125-134. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70339-5.
- [2] Gu Z, Churchman ML, Roberts KG, et al. PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia [J]. *Nat Genet*, 2019, 51(2):296-307. DOI: 10.1038/s41588-018-0315-5.
- [3] Harbott J, Viehmann S, Borkhardt A, et al. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse [J]. *Blood*, 1997, 90(12):4933-4937. DOI: 10.1006/bcmd.1997.0163.
- [4] Anderson K, Lutz C, van Delft FW, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia [J]. *Nature*, 2011, 469(7330):356-361. DOI: 10.1038/nature09650.
- [5] 张丽, 胡林萍, 刘晓明, 等. 定量多色 FISH 检测儿童 ETV6-RUNX1 阳性急性淋巴细胞白血病的异质性及克隆演化 [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(7):586-591. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.07.006.
- [6] Zakaria Z, Othman N, Ismail A, et al. Whole-Exome Sequencing of ETV6/RUNX1 in Four Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia Cases [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017, 18(4):1169-1175. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.4.1169.
- [7] 邹尧, 张丽, 刘晓明, 等. 儿童 ETV6/RUNX1 阳性急性淋巴细胞性白血病基因拷贝数变异的临床研究 [J]. *中华儿科杂志*, 2016, 54(3):209-213. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2016.03.011.
- [8] Li Z, Zhang W, Wu M, et al. Gene expression-based classification and regulatory networks of pediatric acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2009, 114(20):4486-4493. DOI: 10.1182/blood-2009-04-218123.
- [9] Zhang H, Cheng H, Wang Q, et al. An advanced fragment analysis-based individualized subtype classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:12435. DOI: 10.1038/srep12435.
- [10] Sun Y, Zhang Q, Feng G, et al. An improved advanced fragment analysis-based classification and risk stratification of pediatric acute lymphoblastic leukemia [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19:110. DOI: 10.1186/s12935-019-0825-y.
- [11] 中华医学会儿科学分会血液学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第四次修订) [J]. *中华儿科杂志*, 2014, 52(9):641-644. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2014.09.001.
- [12] Vervoordeldonk SF, Merle PA, Behrendt H, et al. Triple immunofluorescence staining for prediction of relapse in childhood precursor B acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 1996, 92(4):922-928. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1996.440979.x.
- [13] Chen W, Karandikar NJ, McKenna RW, et al. Stability of leukemia-associated immunophenotypes in precursor B-lymphoblastic leukemia/lymphoma: a single institution experience [J]. *Am J Clin Pathol*, 2007, 127(1):39-46. DOI: 10.1309/7R6MU7R9YWJBY5V4.
- [14] Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study [J]. *Blood*, 2008, 111(12):5477-5485. DOI: 10.1182/blood-2008-01-132837.
- [15] Stow P, Key L, Chen X, et al. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2010, 115(23):4657-4663. DOI: 10.1182/blood-2009-11-253435.

(收稿日期:2019-11-17)

(本文编辑:王叶青)