

论著·临床研究

儿童急性髓系白血病 FLT3 突变临床分析： 单中心研究

阮敏 王雅琴 张丽 刘天峰 刘芳 刘晓明 张家源 邹尧 陈玉梅 竺晓凡

(中国医学科学院血液学研究所血液病医院,天津 300020)

[摘要] **目的** 探讨 FMS 样酪氨酸激酶 3 (FLT3) 基因的内部串联复制 (ITD) 及激酶结构域 (TKD) 点突变在儿童急性髓系白血病 (AML) 中的临床意义。**方法** 通过实时定量 PCR 法对 116 名初诊 AML 儿童进行骨髓 FLT3/ITD 及 FLT3/TKD 突变检测,分析 FLT3/ITD 及 FLT3/TKD 突变与 AML 临床特征、疗效之间的关系。**结果** 116 名患儿中,伴有 FLT3/ITD 及 FLT3/TKD 突变分别为 9 例 (7.8%)、13 例 (11.2%)。3 例 AML-M3 (3/9,33.3%) 及 3 例 AML-M5 (3/9,33.3%) 患儿出现 FLT3/ITD 突变;FLT3/TKD 突变以 AML-M3 最多见 (10/13,76.9%)。伴 FLT3/ITD 突变患儿较不伴该突变的患儿初诊时具有更高的白细胞及骨髓幼稚细胞比例 ($P<0.01$)。伴 FLT3/ITD 突变患儿 3 年总生存率明显低于不伴该突变患儿 (38.9% vs 64.3%, $P<0.05$)。**结论** FLT3/TKD 突变多见于儿童 AML-M3 患者;伴 FLT3/ITD 突变患儿初诊时具有更高的白细胞及骨髓幼稚细胞比例,且预后更差。
[中国当代儿科杂志,2011,13(11):863-866]

[关键词] 急性髓系白血病; FLT3; 基因突变; 儿童
[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)11-0863-04

FLT3 mutations in children with acute myeloid leukemia: a single center study

RUAN Min, WANG Ya-Qin, ZHANG Li, LIU Tian-Feng, LIU Fang, LIU Xiao-Ming, ZHANG Jia-Yuan, ZOU Yao, CHEN Yu-Mei, ZHU Xiao-Fan. Institute of Hematology and Blood Disease Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020, China (Zhu X-F, Email: zhuxiaof@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the clinical significance of FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) mutations including internal tandem duplication (ITD) mutation and point mutation of tyrosine kinase domain (TKD) in children with acute myeloid leukemia (AML). **Methods** Bone marrow samples from 116 children with newly-diagnosed AML were obtained. Gene mutations of FLT3/ITD and FLT3/TKD were detected by RT-PCR. The relationship of FLT3 gene mutations with the clinical characteristics and the therapeutic efficacy was observed. **Results** FLT3/ITD and FLT3/TKD mutations were detected in 9 cases (7.8%) and 13 cases (11.2%) respectively out of the 116 children. FLT3/ITD mutations were observed in 3 cases of AML-M3 (3/9; 33.3%) and in 3 cases of AML-M5 (3/9; 33.3%). FLT3/TKD mutations were the most common in AML-M3 patients (10/13; 76.9%). The patients with FLT3/ITD mutations had a significantly higher peripheral WBC count and marrow blast percentage compared with the patients without FLT3/ITD mutations at diagnosis ($P<0.01$). The 3-year overall survival rate in patients with FLT3/ITD mutations was significantly lower than that in patients without FLT3/ITD mutations (38.9% vs 64.3%; $P<0.05$). **Conclusions** FLT3/TKD mutations are common in children with AML-M3. The AML children with FLT3/ITD mutations present a high peripheral WBC count and a high marrow blast percentage at diagnosis and have an unfavorable outcome.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (11):863-866]

Key words: Acute myeloid leukemia; FLT3; Gene mutation; Child

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一组起源于造血干细胞的恶性克隆性疾病,具有高度异质性。由基因突变导致的细胞增殖、分化及凋亡途径改变是 AML 的发病基础^[1]。FMS 样酪氨酸激酶 3 (FLT3) 是Ⅲ型受体酪氨酸激酶 (RTK) 家族成员,在骨髓中仅表达于造血干/祖细胞。FLT3 与其配体 (FL) 在造血干/祖细胞的增殖和分化中起重要的调节作用^[2]。FLT3 基因突变存在于部分

[收稿日期]2011-02-11;[修回日期]2011-03-26
[基金项目]天津市科技计划项目(编号:092CZDSF03800)。
[作者简介]阮敏,女,硕士研究生,住院医师。
[通信作者]竺晓凡,教授。

AML中(成人约20%~30%),已经被公认是AML中发生率最高的一种基因改变^[3]。目前我国尚无儿童AML与FLT3基因突变的系列研究,本研究对我中心AML患儿FLT3基因内部串联复制(internal tandem duplication, ITD)及激酶结构域(tyrosine kinase domain, TKD)基因突变与临床特征、治疗效果及预后进行了初步研究。

1 资料与方法

1.1 研究对象

自2007年6月至2010年10月我科初诊AML儿童116例。男71例,女45例,年龄1~15岁(中位年龄7岁)。所有患儿均经骨髓形态学、细胞组织化学染色、细胞免疫分型、细胞遗传学及融合基因确诊^[4]。根据急性白血病的分型标准(FAB分型):M0 1例, M2 37例, M3 26例, M4 12例, M5 32例, M6 1例, M7 7例。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA制备 治疗前取患儿骨髓3~5 mL,用淋巴细胞分离液分离单个核细胞。采用天根DAN提取试剂盒提取基因组DNA,测定吸光度A₂₆₀/A₂₈₀,确定DNA浓度,并将DNA样本浓度调整至50 ng/μL。

1.2.2 PCR扩增 反应体系:10×Buffer 5 μL, dNTPs 5 μL,上下游引物各20 pmol (FLT3/ITD:上游引物GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC,下游引物CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC;FLT3/TKD:上游引物CCAGGAACGTGCTTGTC,下游引物TCAAAAATGCACCACAGTGAG),基因组DNA 2 μL, rTaq 酶0.5 μL,加水至终体积50 μL。反应条件:(1)FLT3/ITD:95℃预变性5 min;95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,循环35次;72℃延伸10 min;(2)FLT3/TKD:94℃预变性4 min;94℃ 60 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,循环35次;72℃延伸10 min。

1.2.3 PCR产物的检测 (1)FLT3/ITD:取6 μL PCR产物在1×TAE液中行1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色10 min,紫外灯下观察结果,出现额外大于原型FLT3的条带即为FLT3/ITD阳性产物。(2)FLT3/TKD:该突变多数为D835错义突变,少数为I836错义突变,由于D835和I836组成了EcoR V的酶切识别序列GATATC,因此野生型第20外显子和内含子扩增产物194 bp经EcoR酶切产生129 bp和65 bp两个片段。而D835和I836任一突变即破坏此识别序列,导致扩增产物不能被EcoR V酶切,

因此可利用EcoR V酶切方法区分野生型FLT3和累及D835/I836的FLT3突变型。反应体系:10×Buffer 2 μL, EcoR V内切酶(10 U/μL)0.5 μL, PCR产物10 μL, ddH₂O 7.5 μL;反应条件:37℃水浴3 h以上。基因扩增图见图1。

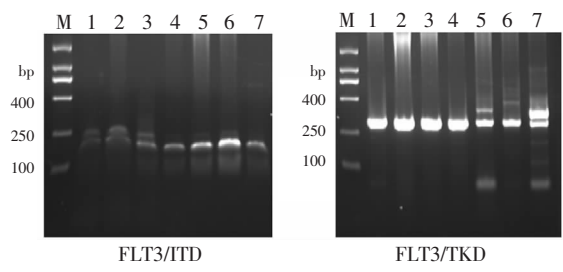


图1 FLT3基因扩增电泳图 M:DNA分子质量标准;1~3:FLT3/ITD基因突变患儿;4:正常对照;5~7:FLT3/TKD基因突变患儿。FLT3/ITD基因扩增电泳图中,1~3可见阳性条带,4~7无阳性条带;FLT3/TKD基因扩增电泳图中,1~4无阳性条带,5~7可见阳性条带。

1.3 治疗方案

1.3.1 AML-M3患儿治疗方案 诱导治疗应用全反式维甲酸(ATRA)/三氧化二砷(As₂O₃)或二者联合应用,达完全缓解(complete remission, CR)后,给予至少2疗程强化治疗,化疗方案为DA(柔红霉素+阿糖胞苷)/MA(米托蒽醌+阿糖胞苷)/HA(高三尖杉酯碱+阿糖胞苷),维持治疗采用ATRA联合6-巯基嘌呤(6-MP)和甲氨蝶呤(MTX),缓解期行腰穿加三联鞘注^[5]。

1.3.2 非AML-M3患儿治疗方案 诱导治疗应用DA/HA/HAD(高三尖杉酯碱+阿糖胞苷+柔红霉素)方案诱导治疗。获得CR后进一步巩固强化治疗,巩固强化治疗方案为MA方案、HA方案、DA方案及AA(安吡啶+阿糖胞苷)方案交替治疗;中、高危患儿接受造血干细胞移植或者包括大剂量阿糖胞苷为主的联合化疗,每3个月1次,共3次^[4]。

1.4 疗效判断标准

疗效判断按照《血液病诊断和疗效标准》第三版^[6]。无事件生存(event-free survival, EFS)期定义为自诊断到第1次事故(包括复发、在CR期间的死亡,未达CR者EFS为0)或末次随访日期。无病生存(disease-free survival, DFS)期指CR至白血病复发或至在CR期间死亡的时间。总生存(overall survival, OS)期指自诊断到死亡或末次随访日期。随访时间截至2010年12月31日,失访者截至失访日期,中位随访时间13个月(1~42个月),其中治疗满3年及以上的病例为12例。

1.5 统计学分析

采用SPSS 17.0软件对数据进行统计学处理。

计量资料采用 t 检验;计数资料采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

本研究中初诊 AML 患儿 116 例, FAB 分型以 AML-M2 最多见,AML-M5 次之,AML-M3 居第 3 位。105 例进行了染色体核型检测(另外 11 例因细胞数少或未见分裂相检测失败),其中 33 例为正常核型;72 例异常核型中分别为 $t(8;21)$ 25 例(其中 6 例为复杂核型), $t(15;17)$ 22 例(其中 5 例为复杂核型), $inv(16)$ 4 例,超二倍体 9 例(其中 3 例伴 +8),亚二倍体 7 例(其中 3 例伴 -7,1 例伴 -Y), $t(9;22)$ ($q24;q11$) 1 例,伴 11q- 3 例,伴 10q- 1 例。13 例患儿在确诊后因经济原因放弃治疗,均为不伴 FLT3 基因突变 AML 患儿。3 例患儿在诱导化疗期间死亡(2 例严重感染,1 例颅内出血)。78 例患儿在第 1 疗程诱导化疗后达 CR,第 1 疗程 CR 率为 75.7%;7 例患儿在第 2 疗程化疗后达 CR。本研究中 3 年 DFS 率为 $(72.9 \pm 6.3)\%$,3 年 EFS 率为 $(73.0 \pm 6.3)\%$,3 年 OS 率为 $(62.0 \pm 6.5)\%$ 。

2.2 FLT3/ITD 突变与 AML

116 例 AML 中检出 FLT3/ITD 阳性 9 例(7.8%)。根据电泳结果发现,在不同 AML 患儿之间,FLT3/ITD 突变存在着异质性,ITD 长度大小不一。9 例 FLT3/ITD 阳性 AML 患儿中正常核型 6 例(67.7%);伴 $t(15;17)$ 异常 3 例,其中复杂核型异常 1 例。正常核型 AML 中 FLT3/ITD 突变的检出率为 18.2%(6/33),也明显高于异常核型组(4.2%,3/72)。FLT3/ITD 突变也可以发生在 FAB 的多个亚型,其中 M2 1 例,M3 3 例,M4 1 例,M5 3 例,M7 1 例。与 FLT3/ITD 阴性 AML 患儿相比,FLT3/ITD 阳性 AML 患儿临床表现为初诊时 WBC 及骨髓幼稚细胞比例增高(均 $P<0.05$),但在性别、年龄等方面两组之间差异无统计学意义。FLT3/ITD 阳性 AML 患儿第 1 疗程 CR 率偏低,但与 FLT3/ITD 阴性患儿比较差异无统计学意义。见表 1。

FLT3/ITD 阳性患儿与 FLT3/ITD 阴性患儿 3 年 EFS 率分别为 80.0%($n=5$,95%CI 62.1%~97.9%)、

72.2%($n=80$,95%CI 65.5~78.9%),差异无统计学意义($P>0.05$);3 年 DFS 率分别为 80.0%($n=5$,95%CI 62.1~97.9%)、72.2%($n=80$,95%CI 65.5~78.9%),差异无统计学意义($P>0.05$)。而 FLT3/ITD 阳性 AML 患儿 3 年 OS 率明显低于 FLT3/ITD 阴性 AML 患儿($P<0.05$),见图 2。

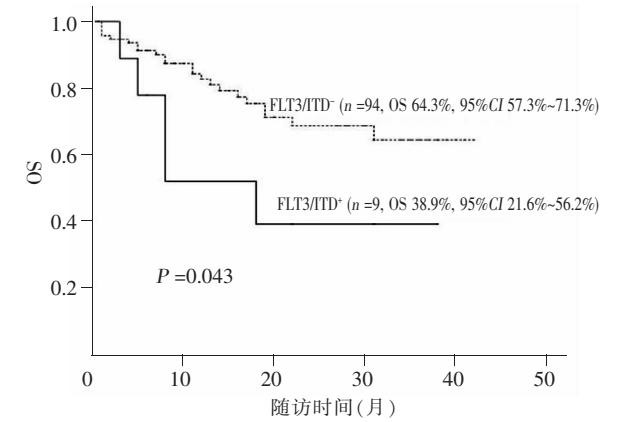


图2 FLT3/ITD⁺组与 FLT3/ITD⁻组患儿 3 年 OS 的比较

2.3 FLT3/TKD 突变与 AML

116 例 AML 中检出 FLT3/TKD 突变者 13 例(11.2%),伴 $t(15;17)$ 异常 10 例,其中复杂核型异常 3 例;伴 $t(8;21)$ 异常 2 例,其中 1 例伴 -Y;正常核型 1 例。正常核型 AML 中 FLT3/TKD 的检出率为 4.2%,低于异常核型组,但差异无统计学意义,(16.7%, $\chi^2=2.724,P=0.099$)。FLT3/TKD 突变多发生在 AML-M3 亚型(10 例),此外还有 M2 型 2 例,M5 型 1 例。与 FLT3/TKD 阴性 AML 患儿相比,FLT3/TKD 阳性 AML 患儿初诊时骨髓幼稚细胞比例偏高,但差异无统计学意义;两组性别比、年龄、白细胞计数以及第 1 疗程 CR 率比较差异无统计学意义。见表 2。

FLT3/TKD 阳性患儿与 FLT3/TKD 阴性患儿 3 年 EFS 率分别为 66.7%($n=11$,95%CI 39.5%~93.9%)、72.4%($n=74$,95%CI 66.0%~78.8%),差异无统计学意义($P>0.05$);3 年 DFS 率分别为 66.7%($n=11$,95%CI 39.5~93.9%)、72.3%($n=74$,95%CI 66.2~78.4%),差异无统计学意义($P>0.05$);3 年 OS 率分别为 90.0%($n=13$,95%CI 80.5%~99.5%)、58.1%($n=90$,95%CI 50.9%~65.3%),差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 FLT3/ITD⁺组与 FLT3/ITD⁻组患儿初诊时临床特征及缓解率的比较

	例数	性别(男/女)	中位年龄(岁)	白细胞计数($\times 10^9/L$)($\bar{x} \pm s$)	骨髓幼稚细胞比例(%)($\bar{x} \pm s$)	CR(%)
FLT3/ITD ⁻	107	65/42	7	39 $\pm$ 57	68 $\pm$ 22	77.7
FLT3/ITD ⁺	9	6/3	7	99 $\pm$ 77	94 $\pm$ 8	55.6
t 值/ χ^2 值		0.0	-0.310	2.925	3.546	1.146
P 值		1.0	0.764	0.004	0.001	0.284

表2 FLT3/TKD ⁺ 组与FLT3/TKD ⁻ 组患儿初诊时临床特征及缓解率的比较						
	例数	性别(男/女)	中位年龄(岁)	白细胞计数(×10 ⁹ /L) ($\bar{x} \pm s$)	骨髓幼稚细胞比例(%) ($\bar{x} \pm s$)	CR (%)
FLT3/TKD ⁻	103	60/43	7	45 ± 61	68 ± 23	75.6
FLT3/TKD ⁺	13	11/2	7	37 ± 59	80 ± 20	76.9
<i>t</i> 值/ χ^2 值		2.36	0.27	-0.417	1.736	0.00
<i>P</i> 值		0.125	0.788	0.682	0.07	1.00

3 讨论

FLT3 基因突变已被公认是 AML 中发生率最高的一种基因改变,最常见的突变有 ITD 和 TKD 两种形式。

FLT3/ITD 突变率随年龄增长而增高^[7],本研究中儿童 AML 的突变率为 7.8%,低于国内成人 AML^[8],与国外的报道一致^[9]。在疾病特征方面,伴 FLT3/ITD 突变儿童 AML 初诊时白细胞计数及骨髓幼稚细胞比例更高,染色体核型正常患儿发生该突变的几率较伴异常核型者更高,与国外的报道也是一致的^[10]。在预后方面,国内外多项研究已证实 FLT3/ITD 突变是 AML 一个重要的独立预后不良指标^[8-9,11-12],本研究结果显示伴 FLT3/ITD 突变儿童 AML CR 率略低,但两组之间差异无统计学意义,可能与样本数少有关,也可能是由于 FLT3/ITD 突变型与 FLT3/ITD 野生型比例大小和(或)ITD 的长度影响了 AML 的预后,伴 FLT3/ITD 突变 AML 儿童 3 年 OS 率明显低于不伴该突变组,支持其为独立的预后不良因子。

FLT3/TKD 突变率在成人原发 AML 为 4.8% ~ 7.7%^[13-14],本组病例 FLT3/TKD 突变率相对较高,为 11.2%,且在 M3 患儿中突变率更高,为 38.5% (10/26)。疾病特征方面,伴 FLT3/TKD 突变患儿并不表现出更高的白细胞计数及骨髓幼稚细胞比例,这与国外学者报道不一致^[9],可能与本研究的样本量少有关。伴有异常核型患者突变率更高,考虑与本研究中儿童 M3 突变率较高有关。预后方面,伴 FLT3/TKD 突变患者的 CR 率以及 3 年 OS 率与不伴该突变患者之间差异无统计学意义,这与国外的报道基本一致^[9]。因此,FLT3/TKD 在儿童 AML 是否可以作为独立的预后因子有待于进一步的大样本前瞻性研究。

[参 考 文 献]

[1] 彭玲,罗军. 急性髓细胞白血病 FLT3 基因突变及靶向治疗研

究进展[J]. 内科,2008,3(2):232-235.

[2] Thomson KA, Levis M. Images in clinical medicine. FLT3 mutation and acute myelogenous leukemia with leukostasis[J]. N Engl J Med, 2007, 357(16): 1639.

[3] Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, Geiger T, Cooper LC, Smith BD, et al. Detection of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay[J]. J Mol Diagn, 2003, 5(2): 96-102.

[4] 邹尧,王华,陈晓娟,王书春,张丽,陈玉梅,等. 141 例儿童急性髓系白血病的疗效及预后相关因素分析[J]. 中华血液学杂志,2006,27(9):621-625.

[5] Zhang L, Zhu X, Zou Y, Chen Y, Chen X. Effect of arsenic trioxide on the treatment of children with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia in China[J]. Int J Hematol, 2011, 93(2): 199-205.

[6] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准(第三版)[M]. 北京:科学出版社,1999.

[7] 黄河,段秀梅,黄晶. FLT3 基因内部串联复制与儿童急性白血病的关系[J]. 中国妇幼保健,2006,21(1):105-106.

[8] 杨莉,吴小津,吴德沛,梁建英,常伟荣,朱子玲,等. FLT3 突变,FLT3 表达水平在急性髓系白血病中的意义[J]. 苏州大学学报医学版,2007,27(3):364-368.

[9] Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK, et al. Prevalence and prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2001, 97(1): 89-94.

[10] Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, Zwaan M, Zimmerman M, Reinhardt D, et al. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML[J]. Blood, 2006, 108(12): 3654-3661.

[11] Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials[J]. Blood,2001,98(6):1752-1759.

[12] 徐兵,张燕,田红,周淑芸. 聚合酶链反应检测急性非淋巴细胞白血病患者 FLT3/ITD 基因突变及临床意义[J]. 中华检验医学杂志,2003,26(10):612-615.

[13] Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters – an analysis of 3082 patients[J]. Blood, 2008, 111(5): 2527-2537.

[14] Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? [J]. Blood,2007,109(2):431-448.

(本文编辑:邓芳明)