

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.01.001

论著·临床研究

儿童幼年型粒单核细胞白血病突变 基因型与临床特征分析

杨文钰 陈晓娟 王书春 郭晔 刘天峰 常丽贤 刘芳 竺晓凡

(中国医学科学院血液病医院/血液学研究所儿童血液病诊疗中心, 天津 300020)

[摘要] **目的** 探讨儿童幼年型粒单核细胞白血病(JMML)突变基因类型及其临床特征。**方法** 回顾性分析临床诊断明确且完成JMML常见突变基因检测的14例患儿临床资料。**结果** 14例JMML患儿中,男11例(79%),女3例(21%)。诊断时中位年龄2.0岁(范围0.6-6.0岁)。14例患儿中检出PTPN11基因突变4例(29%),N-RAS基因突变3例(21%),1例同时伴有PTPN11和K-RAS基因突变(7%),6例未检测到突变基因(43%)。4例PTPN11基因突变患儿均为男性,中位发病年龄2.5岁,从发病至明确诊断中位时间为1.0个月,外周血WBC计数及单核细胞绝对值明显增高,PLT计数降低,随访至今3例患儿死亡,1例病情进展;3例N-RAS基因突变患儿男女比例为2:1,中位发病年龄2.0岁,从发病至明确诊断中位时间13.7个月,随访至今2例患儿死亡,1例未见明显进展。**结论** PTPN11是JMML最常见的突变基因类型,常伴有血WBC计数及单核细胞绝对值增高,PLT计数降低,疾病进展迅速,预后不良;N-RAS突变病例病情进展缓慢;复合突变基因类型由于病例数少,临床特征有待于临床进一步观察。 [中国当代儿科杂志, 2015, 17(1): 1-5]

[关键词] 幼年型粒单核细胞白血病; 突变基因; 临床特征; 儿童

Gene mutations and clinical characteristics in children with juvenile myelomonocytic leukemia

YANG Wen-Yu, CHEN Xiao-Juan, WANG Shu-Chun, GUO Ye, LIU Tian-Feng, CHANG Li-Xian, LIU Fang, ZHU Xiao-Fan. Diagnostic and Therapeutic Center of Children's Blood Disease, Institute of Hematology, Blood Disease Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300020, China (Zhu X-F, Email: xfzhu1981@126.com)

Abstract: Objective To study gene mutations and clinical features in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). **Methods** The clinical data of 14 children who were diagnosed with JMML and were examined for the detection of common gene mutations were retrospectively analyzed. **Results** Eleven (79%) out of 14 cases were male, and 3 (21%) were female. The median age at diagnosis was 2.0 years (age range: 0.6-6.0 years). Among 14 cases, there were 4 cases (29%) with PTPN11 mutation, 3 cases (21%) with N-RAS mutation, 1 case (7%) with PTPN11 mutation and K-RAS mutation, and 6 cases (43%) without any mutation. All four cases in the PTPN11 mutation group were male, and their median age was 2.5 years; interval from onset to diagnosis was 1.0 month; the white blood cell (WBC) count and absolute monocytes in peripheral blood were significantly higher, while the platelet (PLT) count was lower, as compared with the other three groups; they were followed up, and 3 cases died and 1 case had a progressive disease. In the N-RAS mutation group, there were two male cases and one female case, and their median age was 2.0 years; interval from onset to diagnosis was 13.7 months; after follow-up, 2 cases died and 1 case did not have an obviously progressive disease. **Conclusions** PTPN11 mutation is the most common mutation in JMML. The cases with PTPN11 mutation often have higher WBC count and absolute monocytes in peripheral blood, a lower PLT count, and a rapid disease progression, and their clinical outcomes are poor. The cases with N-RAS mutation have a slow disease progression. The clinical characteristics of the patients with compound mutations are not sure because of the small number of cases, and further clinical observation is indispensable. [Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(1): 1-5]

Key words: Juvenile myelomonocytic leukemia; Gene mutation; Clinical characteristics; Child

[收稿日期] 2014-06-03; [接受日期] 2014-09-04

[基金项目] 国家自然科学基金(81300393, 81300394)。

[作者简介] 杨文钰, 女, 博士, 副主任医师。

[通信作者] 竺晓凡, 女, 主任医师。

幼年型粒单核细胞白血病 (juvenile myelomonocytic leukemia, JMML) 是临床罕见的儿童克隆性造血干细胞异常性疾病, 根据 WHO 分型为 MDS/MPN。主要累及 2 岁以下婴幼儿, 其年发病率为 1.2/10⁶, 占儿童白血病的 2%~3%。男性多于女性, 男:女比例为 1.4~2.5:1^[1-2]。JMML 临床表现非特异性, 遗传异质性较大, 预后不良。研究表明 JMML 与多种突变基因引起 RAS/ 促细胞分裂原 (mitogen) 活化的蛋白激酶 (MAPK) 通路异常有关^[3-4], 然而目前尚无有关 JMML 突变类型与患儿临床特征及预后的相关性研究。为提高 JMML 诊断水平, 探讨突变基因类型与临床特征、预后间的相关性, 本研究回顾性分析我院 2010 年 10 月至 2013 年 3 月收治的 14 例 JMML 患儿临床病例资料, 并对 JMML 基因突变类型及临床特征、预后相关性进行初步探讨。

1 资料与方法

1.1 研究对象及诊断标准

选取 2010 年 10 月至 2013 年 3 月我院收治的初诊为 JMML 患儿 14 例为研究对象, 收集患儿的临床资料进行回顾性分析。所有患儿均根据 1997 年国际 JMML 协作组诊断标准进行诊断: (1) 临床特征: ①肝脾肿大, ②淋巴结肿大, ③贫血症

状及体征, ④发热, ⑤皮肤损害; (2) 最低实验室标准 (同时满足以下 3 个条件): ① Ph 染色体或 BCR/ABL 融合基因阴性, ②外周血单核细胞计数 >1 × 10⁹/L, ③骨髓原始细胞 <20%; (3) 明确诊断要求的标准 (除了最低实验室标准至少满足以下 2 个条件): ①抗碱血红蛋白 (HbF) 随年龄增加, ②外周血涂片可见髓系幼稚细胞, ③白细胞 >10 × 10⁹/L, ④克隆性异常 (包括单体 7), ⑤体外培养髓系细胞对粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 高度敏感。

1.2 RT-PCR 检测 JMML 突变基因

取各组晨起空腹外周血或行骨穿检查取骨髓 4~5 mL, EDTA 抗凝。按照基因组 DNA 提取试剂盒 (北京博迈德生物技术有限公司) 说明书进行基因组 DNA 提取。将提取的 DNA 进行 PCR 扩增。本研究所选目的基因为 JMML 常见突变基因, 包括 PTPN11、N-RAS、K-RAS、CBL 和 NF1, 引物由北京梓熙生物科技有限公司设计合成 (表 1)。PCR 反应体系为 25 μL, 包括 DNA 样品 1~2 μL, 2 × Mix 12.5 μL, 上下游引物各 1 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 扩增条件: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 共 35 个循环; 72℃再延伸 8 min。扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳。取 PCR 产物进行测序, 测序结果应用 Mutation Surveyor v3.25 软件进行分析。

表 1 JMML 常见突变基因引物序列

| 目的基因 | 外显子 | 引物序列 (5' → 3') | 片段大小 (bp) |
|--------|------------|----------------------------|-----------|
| N-RAS | Exon 2 F | TTGCTAGAAAACACTACTCCA | 449 |
| N-RAS | Exon 3 F | GGCTTGAATAGTTAGATGC | 538 |
| CBL | Exon 7 F | GAGCCTATGGCATTGTTAC | 506 |
| CBL | Exon 8~9 F | GCAAAAATTTGTATAGGAAAC | 699 |
| PTPN11 | Exon 2 F | ACTGAATCCCAGGTCTCTACCAAG | 405 |
| PTPN11 | Exon 3 F | CGACGTGGAAGATGAGATCTGA | 384 |
| PTPN11 | Exon 4 F | AGGAGAGCTGACTGTATACAGTAG | 447 |
| PTPN11 | Exon 7 F | GAACATTTCTAGGATGAATTCC | 271 |
| PTPN11 | Exon 8 F | GACATCAGCCAGTGTTCACGTTAC | 350 |
| PTPN11 | Exon 12 F | GCTCCAAAGAGTAGACATTGTTTC | 250 |
| PTPN11 | Exon 13 F | CAACACTGTAGCCATTGCAACA | 356 |
| PTPN11 | Exon 14 F | ACCATTGTCCTCACATGTGC | 260 |
| NF1 | Exon 35 F | GGATTGAAGTAGACATGGTCTG | 373 |
| K-RAS | Exon 2 F | GATAGTGTATTAACCTTATGTGTGAC | 169 |

2 结果

2.1 一般临床特征

14例JMML患儿中，男11例(79%)，女3例(21%)，男：女为3.7:1；诊断时中位年龄2.0岁(范围0.6~6.0岁)；以白细胞增高为首发症状的5例，发热6例，咳嗽3例，面色苍白3例，皮肤黏膜出血点3例，腹泻1例。10例患儿初诊时出现浅表淋巴结肿大；11例可见肝脏肿大，平均右肋下3.2 cm(范围0.9~9.0 cm)；9例患儿脾脏肿大，平均左肋下3.6 cm(范围1.3~9.0 cm)。Hb 8.6 g/dL(范围4.5~11.1 g/dL)，WBC $21.6 \times 10^9/L$ (范围 $10.4 \sim 41.5 \times 10^9/L$)，PLT $41.0 \times 10^9/L$ (范围 $9.0 \sim 191.0 \times 10^9/L$)，单核细胞

绝对值 $3.9 \times 10^9/L$ (范围 $1.0 \sim 12.0 \times 10^9/L$)，HbF 17.8%(范围1.0%~87.8%)。9例患儿进行体外GM-CSF高敏感性实验，均呈阳性。13例患儿行染色体检查，5例出现染色体数量或结构异常，其中3例为7号染色体缺失，1例为8号染色三体，1例为复杂染色体核型异常。

2.2 JMML 突变基因检测结果分析

14例患儿中，PTPN11基因突变4例(29%)，为Exon13或Exon3的点突变或错义突变；N-RAS基因突变3例(21%)，为Exon2点突变或Exon3错义突变；1例患儿(7%)同时出现PTPN11和K-RAS突变；6例(43%)患儿未检测到常见突变。检测到突变基因的8例患儿基因测序图如图1所示。

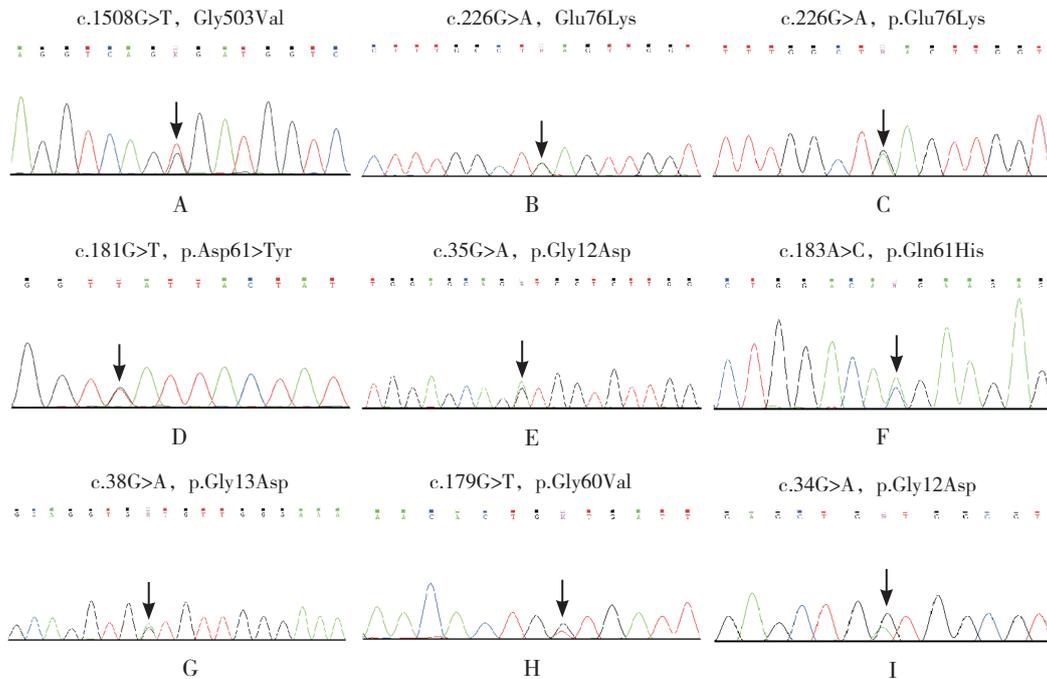


图1 8例JMML患儿突变基因DNA测序图 A: 患儿,男,3岁,PTPN11基因Exon13点突变; B: 患儿,男,2岁,PTPN11基因Exon3点突变; C: 患儿,男,2岁,PTPN11基因Exon3错义突变; D: 患儿,男,3岁,PTPN11基因Exon3错义突变; E: 患儿,女,4岁,N-RAS基因Exon2点突变; F: 患儿,男,1岁,N-RAS基因Exon3错义突变; G: 患儿,男,1岁,N-RAS基因Exon2点突变; H-I: 患儿,男,3岁,H图示检测到PTPN11基因Exon3错义突变,I图示检测到K-RAS基因Exon2错义突变。箭头所示为基因具体突变位点。

2.3 JMML 基因突变患儿临床特征及预后分析

本研究中PTPN11基因突变最常见,发生该突变的4例患儿均为男性,中位年龄2.5岁(范围2.0~3.0岁),从发病到明确诊断中位时间为1.0个月(范围0.3~2.0个月);4例患儿均表现不同程度的贫血、出血、发热及肝、脾、淋巴结肿大;

外周血Hb 8.3 g/dL(范围45~133 g/dL),HbF 17.3%(范围5.1%~29.5%),WBC计数 $31 \times 10^9/L$ (范围 $16.9 \sim 41.5 \times 10^9/L$),单核细胞绝对值 $5.7 \times 10^9/L$ (范围 $1.2 \sim 12.0 \times 10^9/L$),PLT计数 $24.7 \times 10^9/L$ (范围 $13.0 \sim 41.0 \times 10^9/L$);其中3例患儿进行染色体及BCR/ABL融合基因检测,结果显示融

合基因均为阴性, 1例出现7号染色体缺失, 2例染色体核型正常; 临床观察发现 PTPN11 基因突变患儿疾病进展迅速, 主要表现为高热, 白细胞进行性增高, 肝脾肿大, 感染症状明显, 病程中2例患儿出现多浆膜腔积液, 1例患儿心功能衰竭; 随访至今, 3例患儿死亡, 1例疾病进展。发生 N-RAS 基因突变的3例患儿中, 男2例, 女1例, 中位年龄2.0岁(范围1.0~4.0岁), 从发病到明确诊断中位时间为13.7个月(范围2.0~36.0个月); 2例出现颜面或全身散在皮疹; 外周血 Hb 9.7 g/dL (范围7.5~11.1 g/dL), HbF 7.8% (范围1.4%~17.0%), WBC 计数 $18.8 \times 10^9/L$ (范围 $12.3 \sim 28.5 \times 10^9/L$); 3例患儿均进行染色体及 BCR/ABL 融合基因检测, 结果显示融合基因均为阴性, 1例出现复杂染色体核型异常伴有7号染色体缺失, 2例染色体核型正常, 临床观察发现 N-RAS 基因突变患儿病情进展缓慢, 随访至今, 1例患儿疾病未见明显进展, 2例患儿死亡。K-RAS 合并 PTPN11 基因突变患儿为男性, 3岁, 从发病到明确诊断中位时间为3个月; 临床表现为贫血貌, 可见浅表淋巴结肿大, 肝脾肋下2 cm, 外周血 WBC 计数 $10 \times 10^9/L$; 此例患儿接受同胞相合造血干细胞移植, 随访至今血象正常。

3 讨论

JMML 是罕见的儿童克隆性造血干细胞异常性疾病, 多发生于婴幼儿, 临床表现非特异性, 对化疗药物反应极差, 预后不良, 严重威胁着患儿的健康。JMML 突变基因检测的开展, 大大地提高了临床诊断的准确率, 探讨特殊突变基因类型与临床特征之间的相关性对于提高临床诊断准确率, 判断疾病预后及选择有效治疗方案具有重要的意义。目前研究表明 JMML 发病与 NF1、RAS、PTPN11、CBL 突变引起的 RAS/ 促细胞分裂原 (mitogen) 活化的蛋白激酶 (MAPK) 通路异常有关^[3-6], 其中 PTPN11 是 JMML 最常见的突变基因, 大约 35% 的 JMML 患儿有 PTPN11 体细胞突变^[7-8]。其主要编码非受体酪氨酸磷酸酶蛋白 SHP-2, 参与生长因子下游信号转导途径, 调节多种细胞反应, 包括细胞增殖, 分化及游走。在无症状性 JMML 患者体内 PTPN11 突变常位于外显子 3、4、

13^[9], 最常见的突变类型为 226G>A, 产生 E76K 蛋白, 其具有高度磷酸酶活性, 可诱导胎儿肝脏细胞对 GM-CSF 具有高度敏感性, 且可将 BaF3 细胞系转化为细胞因子非依赖型^[8,10-11]。本研究对 14 例患儿进行了 JMML 常见突变基因检测, 其中 4 例患儿出现 PTPN11 突变, 占 29%, 其中 2 例患儿突变位点为最常见的 226G>A。

JMML 患者对化疗反应极差, 异基因造血干细胞移植是目前唯一有望治疗此类疾病的方法。但是仍有 40% 左右的患者移植后出现复发, 且由于造血干细胞来源有限以及免疫排斥反应, 使大部分患者失去异基因造血干细胞移植的机会。近年来研究发现, 部分 JMML 患者有自发缓解趋势。Matsuda 等^[12]对临床进行观察报道 3 例 N-RAS 或 K-RAS 突变 JMML 患儿临床病情进展缓慢, 并获得最终的自发缓解。Flotho 等长期观察发现 12 例明确诊断为 JMML 患儿未进行造血干细胞移植, 随访 3 年, 5 例带有 RAS 突变的患儿获得长期缓解^[13]。研究发现能够获得自发缓解的 JMML 病例一般都具有好的预后因素: 如发病年龄小, 初诊血小板 $>33 \times 10^9/L$, HbF 减低^[14-15]。还有研究报道女性病例预后不良, 可导致女性患儿总生存率 (OS), 无事件生存率 (EFS) 明显减低^[16]。本研究对 14 例 JMML 患儿进行突变基因检测, 并对突变类型及临床特征、预后进行相关性分析, 研究发现, PTPN11 突变为本研究中最常见的突变基因类型, 占总病例数的 29%, 与文献报道结果一致^[3-4]。3 例 (21%) 患儿出现 N-RAS 突变, 1 例 (7%) 患儿同时伴有 PTPN11 及 K-RAS 突变。本研究 14 例病例中男性明显多于女性, 男:女为 3.7:1, 尤其 PTPN11 突变患儿均为男性, 中位年龄 2.5 岁, 高于 RAS 及无突变基因患儿, PTPN11 患儿初诊 PLT 中位数为 $24.7 \times 10^9/L$, 而 HbF 偏高, 平均值为 17.3%, 根据文献报道均为预后不良因素。临床观察发现, 此组病例中除 1 例未进行临床相关检测及治疗外, 其余 3 例病情进展迅速, 短时间内 WBC 明显增高, 肝脾进行性增大, 进而出现多浆膜腔积液, 随访至今, 3 例患儿均死亡, 1 例患儿病情进展, 提示 PTPN11 突变类型疾病凶险, 病情进展迅速, 预后不良。N-RAS 突变组中位年龄 2.0 岁, PLT 中位数为 $35 \times 10^9/L$, HbF 明显低于 PTPN11 突变患儿, 此组病例病情进展缓慢, 从发

病到明确诊断中位时间为13.7个月。K-RAS合并PTPN11突变患儿由于接受同胞供者造血干细胞移植,目前病情恢复,血象正常,但由于此种复杂突变类型病例数较少,基因类型与临床预后关系仍有待于进一步观察。

PTPN11是JMML病例中最常见的突变类型,此种类型外周血WBC计数及单核细胞绝对值增高,PLT明显降低,疾病进展迅速,预后不良,建议诊断明确尽早行造血干细胞移植。N-RAS突变病例病情进展缓慢,部分病例疾病无进展,临床上可动态观察,根据病情变化决定治疗方案。复杂突变基因类型病例数极少,需增加病例数进一步总结分析。

[参 考 文 献]

- [1] Niemeyer CM, Kratz CP. Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia: molecular classification and treatment options[J]. *Br J Haematol*, 2008, 140(6): 610-624.
- [2] Loh ML. Childhood myelodysplastic syndrome: focus on the approach to diagnosis and treatment of juvenile myelomonocytic leukemia[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2010, 2010: 357-362.
- [3] Liu X, Sabnis H, Bunting KD, et al. Molecular targets for the treatment of juvenile myelomonocytic leukemia[J]. *Adv Hematol*, 2012, 2012: 308252.
- [4] Loh ML. Recent advances in the pathogenesis and treatment of juvenile myelomonocytic leukaemia[J]. *Br J Haematol*, 2011, 152(6): 677-687.
- [5] Emanuel PD, Bates LJ, Castleberry RP, et al. Selective hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by juvenile chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitors[J]. *Blood*, 1991, 77(5): 925-929.
- [6] Loh ML, Sakai DS, Flotho C, et al. Mutations in CBL occur frequently in juvenile myelomonocytic leukemia[J]. *Blood*, 2009, 114(9): 1859-1863.
- [7] Loh ML, Vattikuti S, Schubbert S, et al. Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis[J]. *Blood*, 2004, 103(6): 2325-2331.
- [8] Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia[J]. *Nat Genet*, 2003, 34(2): 148-150.
- [9] Kratz CP, Niemeyer CM, Castleberry RP, et al. The mutational spectrum of PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome/myeloproliferative disease[J]. *Blood*, 2005, 106(6): 2183-2185.
- [10] Schubbert S, Lieu K, Rowe SL, et al. Functional analysis of leukemia-associated PTPN11 mutations in primary hematopoietic cells[J]. *Blood*, 2005, 106(1): 311-317.
- [11] Chan RJ, Leedy MB, Munugalavadla V, et al. Human somatic PTPN11 mutations induce hematopoietic-cell hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor[J]. *Blood*, 2005, 105(9): 3737-3742.
- [12] Matsuda K, Shimada A, Yoshida N, et al. Spontaneous improvement of hematologic abnormalities in patients having juvenile myelomonocytic leukemia with specific RAS mutations[J]. *Blood*, 2007, 109(12): 5477-5480.
- [13] Flotho C, Valcamonica S, Mach-Pascual S, et al. RAS mutations and clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML)[J]. *Leukemia*, 1999, 13(1): 32-37.
- [14] Niemeyer CM, Arico M, Basso G, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a retrospective analysis of 110 cases. European Working Group on Myelodysplastic Syndromes in Childhood (EWOG-MDS)[J]. *Blood*, 1997, 89(10): 3534-3543.
- [15] Passmore SJ, Chessells JM, Kempinski H, et al. Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia in the UK: a population-based study of incidence and survival[J]. *Br J Haematol*, 2003, 121(5): 758-767.
- [16] Locatelli F, Nöllke P, Zecca M, et al. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): results of the EWOG-MDS/EBMT trial[J]. *Blood*, 2005, 105(1): 410-419.

(本文编辑: 万静)