

论著·临床研究

一步法多重 RT-PCR 对儿童急性淋巴细胞白血病常见融合基因的检测及意义

陈小文¹ 文飞球^{1,2} 吕荣钰^{1,2} 张民¹ 祖莹¹ 麦惠容²
王缨² 袁秀丽² 李长钢² 马东礼¹

(深圳市儿童医院 1. 儿科研究所; 2. 血液肿瘤科, 广东 深圳 518038)

[摘要] **目的** 探讨一步法多重 RT-PCR 对儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)常见4种融合基因的检测效果。**方法** 2003年1月至2010年12月确诊的 ALL 患儿 76 例,采集所有患儿骨髓标本,提取细胞总 RNA,一步法多重 RT-PCR 或常规巢式 PCR 法对 E2A/PBX1、MLL/AF4、BCR/ABL 和 TEL/AML1 融合基因进行检测;DNA 测序对 PCR 结果进行验证。**结果** 一步法多重 RT-PCR 及 DNA 测序验证显示 76 例 ALL 患儿中,TEL/AML1 融合基因阳性 12 例(产物长度分别为 298 bp 9 例,259 bp 3 例),E2A/PBX1 融合基因阳性 3 例(产物长度 373 bp),BCR/ABL 融合基因阳性 1 例(产物长度 2124 bp),MLL/AF4 融合基因阳性 7 例(产物长度分别为 427 bp 1 例,673 bp 6 例),与常规巢式 PCR 检出结果一致。**结论** 一步法多重 RT-PCR 可应用于儿童 ALL 常见融合基因的检测。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(4): 332-336]

[关键词] 急性淋巴细胞白血病;融合基因;多重逆转录聚合酶链式反应;儿童

One-step multiplex RT-PCR for identifying common fusion transcripts in childhood acute lymphoblastic leukemia

CHEN Xiao-Wen, WEN Fei-Qiu, LV Rong-Yu, ZHANG Min, ZU Ying, MAI Hui-Rong, WANG Ying, YUAN Xiu-Li, LI Chang-Gang, MA Dong-Li. Institute of Pediatrics, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518038, China (Wen F-Q, Email: fwen62@126.com)

Abstract: Objective To evaluate the efficiency of one-step multiplex RT-PCR for identifying four common fusion transcripts (TEL/AML1, E2A/PBX1, MLL/AF4 and BCR/ABL) in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Methods** Total RNA was extracted from bone marrow samples of 76 children who were newly diagnosed with ALL between January 2003 and December 2010. These RNAs were analyzed for TEL/AML1, E2A/PBX1, MLL/AF4 and BCR/ABL by one-step multiplex RT-PCR or common nested-multiplex PCR. The PCR products were confirmed by DNA sequencing. **Results** TEL/AML1 was found in 12 cases (the length of products was 298 bp in 9 cases and 259 bp in 3 cases), E2A/PBX1 was found in 3 cases (the length of products was 373 bp), BCR/ABL was found in 1 case (the length of products was 2124 bp), and MLL/AF4 was found in 7 cases (the length of products was 427 bp in 1 case and 673 bp in 6 cases) using one-step multiplex RT-PCR combined with DNA sequencing. The results were consistent with those using common nested-multiplex PCR. **Conclusions** One-step multiplex RT-PCR may be another alternative for detection of common fusion transcripts in children with ALL. [Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(4): 332-336]

Key words: Acute lymphoblastic leukemia; Fusion transcript; Multiplex RT-PCR; Child

急性淋巴细胞白血病(ALL)是儿童时期最常见的恶性肿瘤,目前许多发达国家治愈率接近

90%^[1-3],国内大型儿童白血病诊疗中心也已达70%~80%^[4-5]。白血病相关融合基因的研究作为白

[收稿日期] 2014-09-14; [接受日期] 2014-11-20

[基金项目] 深圳市科技创新委员会技术创新计划技术开发项目(CXZZ20130320172336579);深圳市科技创新委员会基础研究项目(JCYJ20130401114111456)。

[作者简介] 陈小文,男,硕士,副研究员。

[通信作者] 文飞球,主任医师,教授。

血病特异性的分子标志物之一，不但在分子水平上进一步阐明了白血病的发病机制，更为临床评价治疗效果、判断预后、制订个体化的化疗方案提供科学的依据。儿童 ALL 中最常见的融合基因包括 t(12;21) 易位形成的 TEL/AML1 融合基因、t(1;19) 易位形成的 E2A/PBX1 融合基因、t(9;22) 易位形成的 BCR/ABL 融合基因以及 t(4;11) 易位形成的 AF4/MLL 融合基因^[6-11]。其中前两对融合基因在 B 细胞性 ALL 患儿中发生率最高，AF4/MLL 融合基因则在婴儿白血病中占 2/3 以上。以往国内的研究大多采用巢式 RT-PCR 的方法^[12-14]，作为临床常规手段显得费时费力，本研究采用单管一步法多重 RT-PCR 一次扩增并同时检测上述儿童 ALL 中最常见的 4 对融合基因，取得较好的检测效果，具体报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2003 年 1 月至 2010 年 12 月本院确诊的 76 例 ALL 初发患儿为研究对象，其中男 53 例，女 23 例，年龄范围 5 d~12 岁，中位年龄 4.13 岁。ALL 的诊断及 FAB 分型标准参照小儿急性淋巴细胞白血病诊疗建议（第二次修订草案）^[15]；68 例患儿接受流式细胞免疫分型，其中 B 细胞型 64 例，T 细胞型 3 例，NK 细胞型 1 例。2005 年 6 月以前，化疗方案按小儿急性淋巴细胞白血病诊疗建议（第二次修订草案）^[15] 进行，以后按 GZ2002 ALL 化疗方案^[4] 进行。本研究已获得患儿家属知情同意。

1.2 RNA 抽提及 cDNA 制备

抽取 ALL 患儿化疗及输血前骨髓液（白血病细胞比例占 80% 以上）1~1.5 mL，使用 QIAamp[®] RNA Blood Mini Kit（QIAGEN，德国）抽提或采用 TRIzol（INVITROGEN，美国）提取总 RNA，紫外分光光度计测定浓度和纯度。1 μg 总 RNA 使用禽成髓细胞瘤病毒逆转录酶（大连宝生物公司）逆转录获取 cDNA。

1.3 一步法多重 RT-PCR 和巢式 PCR 检测融合基因

（1）一步法多重 RT-PCR：E2A/PBX1、AF4/MLL、BCR/ABL 和 TEL/AML1 融合基因及内参 18S

RNA 的引物设计参照文献^[16-17]（表 1），引物由上海英骏生物技术有限公司合成，采用 PrimeScript[®] One Step RT-PCR Kit（大连宝生物公司）试剂盒行 RT-PCR。反应体系（25 μL）：PrimeScript One Step Enzyme Mix 1 μL，2 × One Step Buffer 12.5 μL，上下游引物（10 μM）各 1 μL，RNA 模板 0.5 μL，余体积用 ddH₂O 补足。反应条件：50℃ 逆转录 30 min；94℃ 预变性 2 min；94℃ 变性 30 s，57℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 2 min，循环 35 次；72℃ 延伸 6 min。

表 1 一步法多重 RT-PCR 检测融合基因采用的引物参数

目的基因	引物序列 (5' → 3')	产物长度 (bp)
E2A	CACCAGCCTCATGCACAA	373/400
PBX1	TCGCAGGAGATTCATCACC	
AF4	TGTCAGTGAAGGCTCG	427/559/673
MLL	CCGCCTCAGCCACCTAC	
BCR	GACTGCAGCTCCAATGAGAAC	347/521/2 124
ABL	GTTTGGGCTTCACACCATTCC	
TEL	TGCACCCTCTGATCCTGAAC	298/259
AML1	AACGCCTCGCTCATCTTGC	
18S RNA(F)	CGGCTACCACATCCAAGGAA	187
18S RNA(R)	GCTGGAATTACCGCGGCT	

（2）巢式 PCR：引物设计参照文献^[17]（表 2），由上海英骏生物技术有限公司合成。以 cDNA 为模板进行两轮 PCR。第一轮 PCR 反应体系（25 μL）：cDNA 模板 1 μL，10 × Ex Taq 缓冲液 2.5 μL，dNTP 混合物 2 μL，上下游引物各 0.5 μL，EX Taq DNA 聚合酶 0.25 μL，余体积用 ddH₂O 补足。反应条件为：94℃ 预变性 3 min；94℃ 变性 30 s，57℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 2 min，循环 30 次；最后 72℃ 延伸 6 min。第二轮 PCR 反应体系（25 μL）：模板（第一轮 PCR 产物）0.5 μL，10 × Ex Taq 缓冲液 2.5 μL，dNTP 混合物 2 μL，上下游引物各 0.5 μL，EX Taq DNA 聚合酶 0.25 μL，余体积用 ddH₂O 补足。反应条件为：除退火温度改为 58℃ 外，其他条件与第一轮相同。PCR 反应均在 Tprofessional Std Gradient 96 扩增仪（Biometra 公司，德国）上扩增，扩增产物以 15 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳，电泳 25 min 后，于凝胶成像系统进行分析。

表 2 巢式 PCR 检测融合基因采用的引物参数

目的基因	引物序列 (5' → 3')	产物长度 (bp)
E2A-1	CACCAGCCTCATGCACAAC	289/316
E2A-2	CACCCTCCCTGACCTGTCT	
PBX1-1	TCGCAGGAGATTTCATCACG	
PBX1-2	GGCCTGCTCGTATTTCTCC	
AF4-1	TGTCACTGAGCTGAAGGTCG	370/502/616
AF4-2	CGTTCCTTGCTGAGAATTTC	
MLL-1	CCGCCTCAGCCACCTAC	
MLL-2	AGGACCGCCAAGAAAAGA	
BCR-1	GACTGCAGCTCCAATGAGAAC	207/381/186
BCR-2	CAGAACTCGCAACAGTCCTTC	
ABL-1	GTTTGGGCTTCACACCATTCC	
ABL-2	TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA	
TEL-1	TGCACCCTCTGATCCTGAAC	181/142
TEL-2	AAGCCCATCAACCTCTCTCATC	
AML1-1	AACGCCTCGCTCATCTTGC	
AML1-2	TGGAAGGCGGCTGAAGC	

1.4 DNA 测序分析

对在分析中发现的有异常条带的样本进行 DNA 测序分析验证, 测序由上海生工或大连宝生物公司完成。

2 结果

2.1 一步法多重 RT-PCR 检测结果

一步法多重 RT-PCR 对 ALL 患儿最常见的 4 对融合基因进行检测, 结果显示 TEL/AML1 融合基因阳性 12 例 (产物长度 298 bp 9 例, 259 bp 3 例), E2A/PBX1 融合基因阳性 3 例 (产物长度 373 bp), BCR/ABL 融合基因阳性 1 例 (产物长度 2124 bp), MLL/AF4 融合基因阳性 7 例 (产物长度 427 bp 1 例, 673 bp 6 例)。各种长度片段代表性电泳图谱见图 1A, 与常规巢式 PCR 方法检出结果一致 (图 1B)。

2.2 DNA 测序结果

针对两种较少见亚型融合基因扩增产物进行 DNA 测序, 结果显示与预期相符。其中 1 例 BCR/ABL 亚型片段长度证实为 2124 bp, 为 M-BCR-ABL-b3a3 型, 即 BCR 基因外显子 14 与 ABL 基因

外显子 3 的融合 (e14e3) (图 2), 此类型在儿童白血病中报道较少。6 例 MLL/AF4 亚型片段长度均为 673 bp, 为 MLL 基因外显子 11 与 AF4 基因外显子 4 的融合 (e11e4 型) (图 3)。

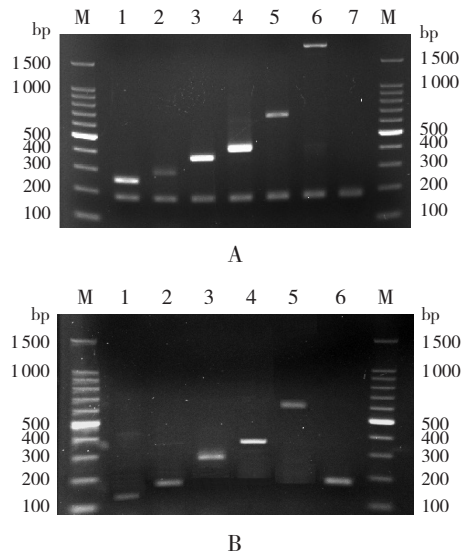


图 1 两种方法检测融合基因琼脂糖凝胶电泳分析图

A: 一步法多重 RT-PCR: M: DNA 分子标准; 1: TEL/AML1 亚型 (259 bp); 2: TEL/AML1 亚型 (298 bp); 3: E2A/PBX1 亚型 (373 bp); 4: MLL/AF4 亚型 (427 bp); 5: MLL/AF4 亚型 (673 bp); 6: BCR/ABL 亚型 (2124 bp); 7: 未检测到 4 种融合基因的阴性标本 (仅有 187 bp 片段)。泳道 1~7 中 187 bp 的条带为内参 18S RNA 的 PCR 扩增产物。B: 巢式 PCR: M: DNA 分子标准; 1: TEL/AML1 亚型 (142 bp); 2: TEL/AML1 亚型 (181 bp); 3: E2A/PBX1 亚型 (289 bp); 4: MLL/AF4 亚型 (370 bp); 5: MLL/AF4 亚型 (616 bp); 6: BCR/ABL 亚型 (186 bp)。

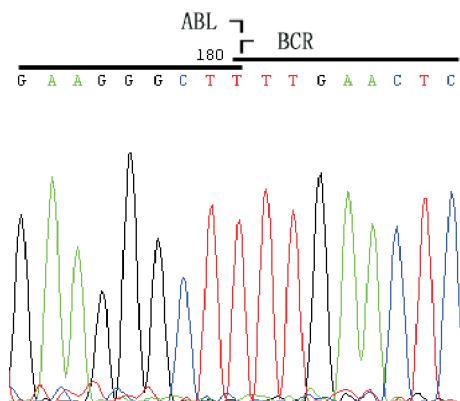


图 2 BCR 与 ABL 基因融合位置的 DNA 测序图
该融合基因左边部分为人类 ABL 基因序列, 右边部分为人类 BCR 基因序列。

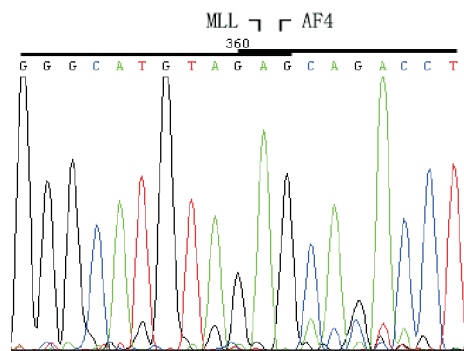


图3 MLL与AF4基因融合位置的DNA测序图 该融合基因左边部分为人类MLL基因序列,右边部分为人类AF4基因序列。

2.3 融合基因阳性ALL患儿的临床特征

76例ALL患儿中,TEL/AML1阳性12例(16%),其中11例为B系ALL;年龄1~11岁(中位年龄5.5岁),外周血WBC计数为 $2.8\sim 74.7\times 10^9/L$ (中位数 $10.5\times 10^9/L$);10例阳性患儿接受治疗,第15天完全缓解(CR)7例(70%),随访5~36个月,无早期死亡病例。TEL/AML1阴性患儿64例,年龄5d~9岁(中位年龄4.8岁),外周血WBC计数为 $5.3\sim 139.3\times 10^9/L$ (中位数 $29.6\times 10^9/L$);42例阴性患儿接受治疗,第15天CR 25例(60%),随访4~45个月,早期死亡6例。

MLL/AF4阳性7例(9%),均为B系ALL;年龄5d~6岁(中位年龄1.9岁),外周血WBC计数为 $15.3\sim 139.3\times 10^9/L$ (中位数 $39.5\times 10^9/L$);3例阳性患儿接受治疗,第15天CR 1例,第33天CR 1例,分别随访37个月、42个月,未复发;1例33d CR,随访47个月时骨髓复发后转其他院治疗。

E2A/PBX1阳性3例(4%),均为B系ALL;年龄10个月~10岁,外周血WBC计数为 $15.3\sim 68.6\times 10^9/L$ (中位数 $31.5\times 10^9/L$);第15天CR 1例,第33天CR 1例,1例转他院治疗。

BCR/ABL阳性1例(1%),患儿女,7岁,外周血WBC计数为 $11.2\times 10^9/L$,FAB分型为L1型,免疫分型为B细胞型,转他院治疗。

3 讨论

白血病融合基因筛查检测国内报道不少,主要包括荧光原位杂交(FISH)和PCR方法^[11-16]。

PCR检测方法则大多采用巢式PCR,存在相对繁琐、易污染等缺点。本研究根据儿童白血病常见融合基因的分布特点,借鉴国外的一些相关研究,进行了更为简单的多重一步法RT-PCR检测常见儿童白血病融合基因的初步尝试。电泳及测序结果显示本研究中使用的简单的多重一步法RT-PCR能检测出4种目的融合基因,可为国内儿童常见白血病融合基因的快速筛查提供新的参考思路。

本次融合基因检测研究中,4种融合基因TEL/AML1、E2A/PBX1、BCR/ABL及MLL/AF4的检出率分别为16%、4%、1%和9%,与国内外报道基本一致^[6-13]。本研究对两种较少见的融合基因亚型进行了测序证实,进一步确认了一步法多重RT-PCR的检出结果。综合相关融合基因断裂点等数据进行辅助判断,该方法在儿童ALL中应用还是有较大价值。对于条带较弱不能确定的标本,还可进行一到两种单重PCR进行验证。

4种融合基因中,TEL/AML1是小儿ALL最常见的基因改变,TEL-AML1阳性已作为临床低危的一项重要指标,与化疗敏感、复发率低相关。阳性组患儿初发时外周血WBC与阴性组患儿有差异,与朱晓华等^[12]及左英熹等^[18]的报道一致。本研究检测到7例MLL/AF4基因异常,占9%,其中3例为婴儿白血病。MLL基因重排患儿预后极差,是临床高危的一项重要指标。本组3例携带MLL基因重排的患儿在我院进行了临床治疗,1例高危患儿,强烈化疗后已CR 3年8个月;另1例经诱导化疗15d即达CR 3年;另1例经强烈化疗获得CR 47个月后骨髓复发,这提示临床对涉及MLL基因患者化疗应予强烈化疗,可改善近期疗效。本次研究检测到3例E2A/PBX1异常融合,采用强烈化疗,2例患儿均达CR。1例BCR/ABL患儿放弃治疗,未能进行有效观测。

近年来,白血病融合基因的检测主要以荧光定量PCR检测为主流发展方向,其主要优势在于灵敏度高、闭管分析无污染等特点,但它存在仪器昂贵、试剂成本检测费用高等缺点,特别在目标基因种类较多的基因筛查中更为凸显。因此常规PCR为基础的初筛系统还是非常必要,特别是在发展中国家、不发达地区。通过多重RT-PCR作为初筛手段,再结合荧光定量PCR追踪目的融合基因为靶标的微小残留病检测,应该是现阶段白

血病融合基因检测的主流选择之一。本研究则是针对儿童急性淋巴细胞白血病融合基因的分布特点,对一步法多重 RT-PCR 初筛手段进行了优化,取得了较为理想的结果,有一定的推广价值。

[参 考 文 献]

- [1] Pui CH, Evans WE. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Semin Hematol*, 2013, 50(3): 185-196.
- [2] Stary J, Zimmermann M, Campbell M, et al. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(3): 174-184.
- [3] Gaynon PS, Angiolillo AL, Carroll WL, et al. Long-term results of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983-2002: a Children's Oncology Group Report[J]. *Leukemia*, 2010, 24(2): 285-297.
- [4] 方建培, 罗学群, 屠立明, 等. GZ-2002 急性淋巴细胞白血病化疗方案治疗非高危儿童急性淋巴细胞白血病多中心协作临床研究 [J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2011, 16(2): 60-65.
- [5] 陈晓娟, 张丽, 刘天峰, 等. 225 例儿童急性淋巴细胞白血病临床疗效的回顾性分析 [J]. *中华血液学杂志*, 2008, 29(12): 824-827.
- [6] Gao C, Zhao XX, Li WJ, et al. Clinical features, early treatment responses, and outcomes of pediatric acute lymphoblastic leukemia in China with or without specific fusion transcripts: a single institutional study of 1,004 patients[J]. *Am J Hematol*, 2012, 87(11): 1022-1027.
- [7] Kerketta LS, Rao VB, Ghosh K. Chimeric fusion karyotypes in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Indian Pediatr*, 2014, 51(2): 152-153.
- [8] Carranza C, Granados L, Morales O, et al. Frequency of the ETV6-RUNX1, BCR-ABL1, TCF3-PBX1, and MLL-AFF1 fusion genes in Guatemalan pediatric acute lymphoblastic leukemia patients and their ethnic associations[J]. *Cancer Genet*, 2013, 206(6): 227-232.
- [9] Martinez-Mancilla M, Rodriguez-Aguirre I, Tejocote-Romero I, et al. Clinical relevance of the fusion transcripts distribution pattern in mexican children with acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2013, 35(3): 170-173.
- [10] Yang YL, Lin SR, Chen JS, et al. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction as diagnostic molecular screening of 4 common fusion chimeric genes in Taiwanese children with acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2010, 32(8): e323-e330.
- [11] Hutspardol S, Pakakasama S, Kanta K, et al. Interphase-FISH screening for eight common rearrangements in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia[J]. *Int J Lab Hematol*, 2013, 35(4): 406-415.
- [12] 朱晓华, 高怡瑾, 杨毅. 儿童急性淋巴细胞白血病常见融合基因的检测及意义 [J]. *临床儿科杂志*, 2007, 25(8): 644-647, 659.
- [13] 乐萍, 段荣, 张小珍. 急性淋巴细胞白血病常见融合基因检测及临床研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(21): 2484-2486.
- [14] 李志刚, 吴敏媛, 赵玮, 等. 多重 RT-PCR 方法检测同时检测 29 种白血病融合基因 [J]. *中华血液学杂志*, 2003, 24(5): 256-258.
- [15] 中华医学会儿科学分会血液组. 儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议 (第二次修订草案) [J]. *中华儿科杂志*, 1999, 37(5): 305.
- [16] Pakakasama S, Kajanachumpol S, Kanjanapongkul S, et al. Simple multiplex RT-PCR for identifying common fusion transcripts in childhood acute leukemia[J]. *Int J Lab Hematol*, 2008, 30(4): 286-291.
- [17] Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia[J]. *Leukemia*, 1999, 13(12): 1901-1928.
- [18] 左英熹, 张乐萍, 陆爱东, 等. 具有不同融合基因的 B 系急性淋巴细胞白血病患儿的临床特征分析 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(3): 172-176.

(本文编辑: 万静)