

论著·临床研究

MLPA 技术检测儿童 ETV6/RUNX1⁺ 急性 淋巴细胞白血病基因拷贝数的变异

张丽 刘晓明 郭晔 杨文钰 张家源 刘芳 刘天峰 王书春
陈晓娟 阮敏 戚本泉 常丽贤 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儿科, 天津 300020)

[摘要] **目的** 应用多重连接探针扩增技术 (MLPA) 检测在 ETV6/RUNX1⁺ 急性淋巴细胞白血病 (ALL) 患儿中基因拷贝数变异的情况, 并与常规经典染色体核型分析及荧光原位杂交技术 (FISH) 检测进行比较, 以评估 MLPA 技术的应用价值。**方法** 回顾性分析 2006 年 1 月至 2012 年 11 月 95 例 ETV6/RUNX1⁺ ALL 患儿的临床资料, 包括临床特征、染色体核型检测结果及 FISH 检测结果。应用 MLPA 技术检测 95 例患儿中多个基因拷贝数变异的情况。**结果** 95 例患儿中, 73 例 (77%) 检测到基因拷贝数的改变。每例患儿基因拷贝数变异个数的中位数为 1 (0~6) 个。拷贝数变异率超过 10% 的基因为 EBF1、CDKN2A/2B、PAX5、ETV6、RB1、BTG1。以上经 MLPA 技术检测到拷贝数变异的基因涉及的染色体片段在染色体核型检测中常检测不到改变。FISH 技术检测 ETV6 基因拷贝数的结果与 MLPA 检测结果的符合率为 66%。**结论** MLPA 可作为高效、简便的方法检测 ETV6/RUNX1⁺ ALL 患儿基因拷贝数的变异。 [中国当代儿科杂志, 2016, 18 (1): 34-38]

[关键词] 急性淋巴细胞白血病; 拷贝数变异; 儿童

Detection of copy number variations in pediatric ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia with multiplex ligation-dependent probe amplification

ZHANG Li, LIU Xiao-Ming, GUO Ye, YANG Wen-Yu, ZHANG Jia-Yuan, LIU Fang, LIU Tian-Feng, WANG Shu-Chun, CHEN Xiao-Juan, RUAN Min, QI Ben-Quan, CHANG Li-Xian, ZOU Yao, CHEN Yu-Mei, ZHU Xiao-Fan. Department of Pediatrics, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China (Zhu X-F, Email: xzfzhu1981@126.com)

Abstract: Objective To investigate the application of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in the detection of copy number variations (CNVs) in pediatric ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL), to compare this method with conventional karyotype analysis and fluorescence *in situ* hybridization (FISH), and to evaluate the value of MLPA. **Methods** The clinical data of 95 children with ETV6/RUNX1-positive ALL who were treated from January 2006 to November 2012 were analyzed retrospectively, including clinical features, results of karyotype analysis, and results of FISH. CNVs were detected with MLPA. **Results** CNVs were detected in 73 (77%), and the median number of CNVs was 1 (range 0-6). The CNVs of EBF1, CDKN2A/2B, PAX5, ETV6, RB1, and BTG1 were detected in more than 10% of all the patients. The changes in the chromosome segments carrying the genes with CNVs detected by MLPA were not detected by conventional karyotype analysis. The coincidence rate between the CNVs in ETV6 gene detected by FISH and those detected by MLPA was 66%. **Conclusions** MLPA is an efficient and convenient method to detect CNVs in children with ETV6/RUNX1-positive ALL.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(1): 34-38]

Key words: Acute lymphoblastic leukemia; Copy number variation; Child

[收稿日期] 2015-09-06; [接受日期] 2015-11-18

[基金项目] 国家自然科学基金 (81200396; 81470339); 创群基金 (81421002); 天津市科技支撑计划 (12zcdzsy18100); 天津市卫生计生委科技基金重点项目 (2014KR12); 天津市疾病预防控制中心科技基金项目 (CDCKY1406)。

[作者简介] 张丽, 女, 博士, 副主任医师。

[通信作者] 竺晓凡, 女, 主任医师。

急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 是儿童中最常见的肿瘤。基因组学研究显示: 在儿童 ALL 中, 常发生涉及淋巴细胞分化及细胞周期调控的基因拷贝数异常^[1-2]。

目前, 有多种方法可用于检测不同水平的基因拷贝数异常, 如荧光原位杂交 (FISH)、单核苷酸多态性 (SNP) 阵列及微阵列比较基因组杂交 (Array-CGH) 等, 但都因实验程序繁琐、检测能力有限、价格昂贵而具有较大局限性^[3-4]。2002 年荷兰 Schouten 等^[5] 研究建立起多重连接探针扩增 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 检测技术, 它是一种结合分子杂交、连接和 PCR 的检测技术, 于同一反应管内可同时检测出 40 多个不同核苷酸序列的拷贝数变化。该技术拥有不需进行细胞培养、高通量、高分辨率以及低成本等优点。在国外, 该技术已广泛应用于临床^[6]。

ETV6/RUNX1 融合基因 (又名 TEL/AML1) 是儿童 ALL 中最常见的融合基因。国内儿童 ETV6/RUNX1⁺ALL 的临床特征与国际上报道相似^[7]。然而, 中国儿童 ETV6/RUNX1⁺ALL 中基因拷贝数变异的研究较少。为了解我国儿童 ETV6/RUNX1⁺ALL 中基因拷贝数异常的发生情况, 了解 MLPA 技术在该类患儿中应用的可行性, 本研究应用 MLPA 技术对初诊 ETV6/RUNX1⁺ALL 患儿进行基因拷贝数异常的检测, 并同时与 Schwab 等^[8] 的研究一样, 与临床上广为应用的 FISH 检测结果相比较, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

对 2006 年 1 月至 2012 年 11 月中国医学科学院血液病医院儿童血液病中心收治的初诊为 ETV6/RUNX1⁺ALL 住院患儿的临床资料进行回顾性分析, 包括临床特征、染色体核型检测结果及 FISH 检测结果。最终有足量 DNA 标本的 ETV6/RUNX1⁺ALL 患儿共 95 例纳入本研究, 经骨髓形态学、细胞组织化学染色、细胞免疫分型及细胞遗传学确诊。另选取 38 例健康志愿儿童作为正常对照。纳入本研究的患儿及健康儿童志愿者的监护人均知情同意。

1.2 基因组 DNA 提取

取患儿和健康儿童志愿者骨髓液或外周血 2 mL, 采用 DNA 提取试剂盒 (Axygen Biosciences 公司产品, 美国) 提取基因组 DNA, -20℃ 保存备用。

1.3 MLPA 具体试验步骤

MLPA 试剂盒 P335-A4 (MRC-Holland 公司, 荷兰), 包含涉及 IKZF1 基因 (7p12.2) 8 个外显子的 8 个探针, PAX5 基因 (9p13.2) 的 7 个探针, ETV6 基因 (12p13.2) 的 6 个探针, RB1 基因 (13q14.2) 的 5 个探针, BTG1 及 BTG1 基因下游区域 (12q21.33) 的 4 个探针, EBF1 基因 (5q33.3) 的 4 个探针, CDKN2A-CDKN2B 基因 (9p21.3) 的 3 个探针, 以及 Xp22.33 区域 (其中包含 CRLF2、CSF2RA、IL3RA、P2RY8 基因及 SHOX 区)。

取 5 μL (20~30 ng/μL) 的样品 DNA, 98℃ 处理 5 min, 25℃ 暂停; 取出样品, 降至室温, 加入 3 μL 的杂交混合液 [1.5 μL probemix (黑盖) + 1.5 μL MLPA 缓冲液 (黄盖)], 95℃ 1 min, 60℃ 温浴 16~20 h; PCR 仪降到 20℃, 取出 PCR 管; 每管加入 3 μL ligase buffer A 和 10 μL 水, 吹打混匀。取 10 μL 混合液到新的 PCR 管, 分别标记为 a、b 两管; 将所有管放回 PCR 仪, 48℃ 暂停。往 a 管中加入 10 μL 连接酶混合液, 混匀; 往 b 管中加入 10 μL 连接酶-消化混合液, 混匀; 48℃ 温浴 30 min; 98℃ 加热 5 min 灭活酶; 20℃ 暂停。从 PCR 仪中取出样品, 降至室温; 加入 10 μL PCR 混合液 [PCR 混合液: 7.5 μL 双蒸水 + 2 μL PCR Primer Mix (棕盖) + 0.5 μL SALSA Polymerase (橙盖)]; PCR 扩增条件: 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 60 s, 35 个循环后, 72℃ 20 min, 15℃ 暂停。取 0.5 μL 样品 + 0.5 μL GeneScanner500LIZ® Size Standard + 9 μL Hi-Di™ Formamide 进行毛细管电泳, 将所得电泳结果通过 GeneMapper 4.0 软件和 Coffalyser 软件进行半定量分析, 了解目的基因的片段缺失或扩增情况。

1.4 染色体核型及荧光原位杂交检测

染色体核型分析: 取患儿骨髓液 2 mL, 肝素抗凝, 分离单个核细胞。经短期 (24 h) 培养后, 按常规方法制备染色体标本, G 显带分析 20 个分裂中期细胞, 核型描述按《人类细胞遗传学国际命名体制 (ISCN2009)》。

FISH 探针与检测方法: 探针选用双色双融合

TEL/AML1 FISH 探针（美国 Vysis 公司）。与处理过的骨髓标本进行杂交，荧光显微镜观察。实验方法及步骤详见参考文献^[9]。

2 结果

2.1 患者一般资料

95 例 ETV6/RUNX1⁺ 的 ALL 患儿中，男 54 例（57%），女 41 例（43%），中位年龄 4（1~13）岁。中位初诊白细胞数 $8.68(1.61\sim 239.80) \times 10^9/L$ ，中位初诊血小板数 $47(10\sim 441) \times 10^9/L$ 。

2.2 MLPA 检测结果

95 例患儿中，3 例（3%）IKZF1 基因出现拷贝数的减低，1 例（1%）IKZF1 基因出现拷贝数的扩增；13 例（14%）PAX5 基因出现拷贝数的减低，7 例（7%）PAX5 基因出现拷贝数的扩增；39 例（41%）ETV6 基因出现拷贝数的减低，13 例（14%）ETV6 基因出现拷贝数的扩增；7 例（7%）RB1 基因出现拷贝数的减低，3 例（3%）RB1 基因出现拷贝数的扩增；10 例（11%）BTG1 基因出现拷贝数的减低；9 例（9%）EBF1 基因出现拷贝数的减低，6 例（6%）EBF1 基因出现拷贝数的扩增；18 例（19%）CDKN2A/2B 基因出现拷贝数的减低；5 例（5%）出现 Xp22.33 区域拷贝数的减低，9 例（9%）出现 Xp22.33 区域拷贝数的扩增；3 例（3%）出现 Jak2 基因突变。在检测涉及的基因中，拷贝数变异率超 10% 的基因为 EBF1、CDKN2A/2B、PAX5、ETV6、RB1、BTG1。

95 例患儿基因拷贝数变异个数的中位数为 1（0~6）个。73 例（77%）患儿具有至少一种基因拷贝数的改变，其中 35 例（37%）患儿有 1 种，20 例（21%）患儿有 2 种，10 例（11%）患儿有 3 种，8 例（8%）患儿有 4 种或以上的基因拷贝数改变。

2.3 MLPA 检测结果与染色体核型结果比较

应用 MLPA 技术检测常见基因拷贝数异常的结果与染色体核型的结果进行比较，由表 1 可见，常见基因拷贝数发生变异时，染色体核型常是正常的，或者未见分裂相。分析伴有染色体复杂核型的 20 例患者中，有 2 例累及 12 号染色体的异常，分别为 46,XX,12p-,der(17)[2]/46,XX[2]

和 44-46,XY,der(12),8p+,9p+,der(11),12p-,-14,-17,+der(21),+12[cp6]/46,XY[2]，涉及了 ETV6 基因拷贝数的改变；其余的伴有染色体复杂核型的患儿均未涉及相应的常见基因拷贝数变异。

表 1 常见基因拷贝数异常与染色体核型的相关性

基因 (染色体位置)	例数	染色体核型		
		正常	未见分裂相	复杂核型
CDKN2A/2B(9p21.3)	18	8	8	2
PAX5(9p13.2)	20	10	7	3
ETV6(12p13.2)	52	33	11	8
EBF1(5q33.3)	15	9	3	3
RB1(13q14.2)	10	6	3	1
BTG1(12q21.33)	10	3	4	3

未涉及 CDKN2A/2B 基因拷贝数改变的患儿中，有 2 例累及 9 号染色体异常，其中 1 例进行了 MLPA 检测，结果正常。未涉及 ETV6 基因拷贝数改变的患儿中，有 2 例累及 12 号染色体短臂异常，分别为 46,XY,-11,12p+,+21[10]/46,XY[3]、47,XY,1q-,4q-,10q-,12p+,+21[cp9]/46,XY[6]，均进行 MLPA 检测，结果正常。未涉及 EBF1 基因拷贝数改变的患儿中，未检测到累及 5 号染色体异常的患儿。未涉及 RB1 基因拷贝数改变的患儿中，未检测到累及 13 号染色体异常的患儿。

总之，发生拷贝数变异的基因涉及的染色体片段在染色体核型检测中常检测不到改变。

2.4 MLPA 检测结果与 FISH 结果比较

95 例患儿应用 TEL/AML1 探针进行 FISH 检测，结果显示 58 例患儿 TEL (ETV6) 探针拷贝数正常（2 个绿色荧光信号），27 例患儿 TEL (ETV6) 探针拷贝数减低（<2 个绿色荧光信号），10 例患儿 TEL (ETV6) 探针拷贝数增加（>2 个绿色荧光信号）。将 FISH 的检测结果与 MLPA 检测结果相比较后发现（表 2），两者的符合率为 66%。两种检测方法结果差异最大的部分为：有 22 例（23%）经 MLPA 检测 ETV6 基因有扩增/缺失，而 FISH 检测 ETV6 基因结果正常。与 FISH 检测结果相比，MLPA 检测结果的灵敏度为 81.1%，特异度为 62.1%。

表 2 MLPA 结果与 FISH 结果比较分析

MLPA 结果	n	FISH 检测结果 (例)			符合率 (%)
		正常 (n=58)	扩增 (n=10)	缺失 (n=27)	
正常	43	36	1	6	84
扩增	13	5	7	1	54
缺失	39	17	2	20	51
符合率 (%)		62	70	74	66

3 讨论

基因组学研究显示：在儿童 ALL 中，常发生涉及淋巴细胞分化及细胞周期调控的基因拷贝数异常，甚至基因的拷贝数变异与预后及耐药均有关系^[1-2,10-12]。SNP 阵列及 Array-CGH 技术已经在儿童白血病的拷贝数改变的研究中起到了很大的作用^[3-4]。然而，由于费用昂贵、技术复杂，难以在临床中广泛应用。MLPA 技术则由于技术简单、高通量、低成本等优点已广泛应用于临床。

Schwab 等^[6]应用 MLPA (Kit 335-IKZF1) 方法检测儿童 ALL 中基因拷贝数的变化，他们的研究发现：在 ALL 患儿中，59% 的患儿有至少 1 种基因拷贝数异常，其中只有 1 种拷贝数改变的患儿占一半。在 ETV6/RUNX1⁺ALL 患儿中，ETV6 缺失占 54%，PAX5 和 CDKN2A/B 缺失各占 22%，BTG1 缺失占 15%，IKZF1 缺失仅占 3%^[6]。本研究分析了 ETV6/RUNX1⁺ALL 患儿中涉及 B 淋巴细胞发育、细胞周期调控和血细胞生成的基因拷贝数的改变。尽管 77% 的患儿具有基因拷贝数的变异，但每个患儿发生变异的个数较少（中位数为 1），并且主要集中在 EBF1、CDKN2A/2B、PAX5、ETV6 基因。基因发生改变的比例与 Schwab 等^[6]得出的结论基本上是相似的。

染色体核型检测的方法常会遗漏小的异常改变^[13]。MLPA 技术则可以检测从单个碱基缺失到整条染色体数目变化的各个水平的基因组拷贝数变异^[8]。Othman 等^[14]对 61 例染色体核型正常的 ALL 患儿应用 MLPA 及 Array-CGH 的方法进行分析后发现，可以检测到 126 个拷贝数异常，甚至在 1 例患儿中检测到了 13 个改变。我们将 MLPA 检测结果与常规染色体核型检测结果进行比较后发现，这两种方法的检测结果相关性较差。具有

基因拷贝数改变的患者常无法检测到相应染色体改变，可能与染色体检测时无分裂相有关，亦可能与拷贝数改变的片段长度很短，染色体核型检测方法无法检测到有关。另外，在累及 12 号染色体短臂的 2 例患者，MLPA 检测结果正常，其原因可能为发生改变的肿瘤细胞比例较低。与 Schwab 等^[8]和 Othman 等^[14]的报道是一致的。

我们将 FISH 的检测结果与 MLPA 检测结果相比较后发现，两者的相符率为 66%。其原因可能为：当发生拷贝数变异的细胞比例低于 20% 时，MLPA 技术无法检测到^[8]。另外，两种检测方法结果差异最大的部分为 MLPA 检测有扩增/缺失，而 FISH 检测结果正常，占 23%。其原因可能为当基因中发生改变的片段长度比较小时，FISH 方法无法检测到，而 MLPA 技术可以检测到。与 FISH 检测结果相比，MLPA 检测结果的灵敏度可以达到 81.1%，因而，将这两种方法相结合应用将更有助于 ETV6/RUNX1⁺ALL 患儿中基因拷贝数的检测。

总之，在我国 ETV6/RUNX1⁺ALL 患儿中，同样存在基因拷贝数的变异，与国际上报道相似。MLPA 方法具有良好的灵敏度，因而 MLPA 技术可应用于 ETV6/RUNX1⁺ALL 患儿中基因拷贝数变异的检测。

[参 考 文 献]

- [1] Lilljebjörn H, Heidenblad M, Nilsson B, et al. Combined high-resolution array-based comparative genomic hybridization and expression profiling of ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemias reveal a high incidence of cryptic Xq duplications and identify several putative target genes within the commonly gained region[J]. *Leukemia*, 2007, 21(10): 2137-2144.
- [2] Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Nature*, 2007, 446(7137): 758-764.
- [3] Borst L, Wesolowska A, Joshi T, et al. Genome-wide analysis of cytogenetic aberrations in ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Br J Haematol*, 2012, 157(4): 476-482.
- [4] Strefford JC, Worley H, Barber K, et al. Genome complexity in acute lymphoblastic leukemia is revealed by array-based comparative genomic hybridization[J]. *Oncogene*, 2007, 26(29): 4306-4318.
- [5] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(12): e57.

- [6] Schwab CJ, Chilton L, Morrison H, et al. Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: association with cytogenetics and clinical features[J]. *Haematologica*, 2013, 98(7): 1081-1088.
- [7] 何军, 周剑彪, 薛永权, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病 TEL/AML1 融合基因的检测及其临床意义[J]. *临床检验杂志*, 2000, 18(6): 351-352.
- [8] Schwab CJ, Jones LR, Morrison H, et al. Evaluation of multiplex ligation-dependent probe amplification as a method for the detection of copy number abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010, 49(12): 1104-1113.
- [9] 周大文, 任兆瑞. 多重连接探针扩增技术及其应用[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2009, 26(1): 45-49.
- [10] Nowak D, Liem NL, Mossner M, et al. Variegated clonality and rapid emergence of new molecular lesions in xenografts of acute lymphoblastic leukemia are associated with drug resistance[J]. *Exp Hematol*, 2015, 43(1): 32-43.
- [11] Loh ML, Mullighan CG. Advances in the genetics of high-risk childhood B-progenitor acute lymphoblastic leukemia and juvenile myelomonocytic leukemia: implications for therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(10): 2754-2767.
- [12] Bokemeyer A, Eckert C, Meyr F, et al. Copy number genome alterations are associated with treatment response and outcome in relapsed childhood ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia[J]. *Haematologica*, 2014, 99(4): 706-714.
- [13] Mrózek K, Harper DP, Aplan PD. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2009, 23(5): 991-1010.
- [14] Othman MA, Melo JB, Carreira IM, et al. High rates of submicroscopic aberrations in karyotypically normal acute lymphoblastic leukemia[J]. *Mol Cytogenet*, 2015, 8: 45.

(本文编辑: 万静)

· 消息 ·

2016 年《中国当代儿科杂志》征稿征订启事

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管, 中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊), 中国科学引文数据库(CSCD)核心库期刊, 北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威检索机构美国 MEDLINE、美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM)及世界卫生组织西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录期刊, 同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊, 并被《中国期刊网》《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重, 反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有国内外儿科研究及动态、论著(临床研究、病例分析、儿童保健、流行病学调查和实验研究)、临床经验、病例报告、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为月刊, 每月15日出版, 向国内外公开发行人。欢迎全国各高等医学院校, 各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位, 各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价20元, 全年240元。邮发代号: 国内42-188; 国外3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。

向本刊投稿一律通过网上稿件处理系统, 免审稿费, 审稿周期2~4周。欲浏览本刊或投稿, 请登录本刊网站。网站提供免费全文下载。

联系地址: 湖南省长沙市湘雅路87号《中国当代儿科杂志》编辑部, 邮编410008

电话: 0731-84327402; 传真: 0731-84327922; Email: ddek7402@163.com; 网址: <http://www.cjcp.org>

中国当代儿科杂志编辑部