

儿童急性髓细胞白血病 WT1 基因表达 及其临床意义

唐雪 郭霞 杨雪 肖慧 孙静静 袁粒星 高举

(四川大学华西第二医院儿科 / 儿童血液肿瘤科 /
出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 研究急性髓细胞白血病 (AML) 患儿 WT1 基因表达情况及其与临床预后的关系。**方法** 采用实时荧光定量 PCR 方法检测 45 例非 M3 儿童 AML 的 WT1 表达水平, 并回顾性分析其与 AML 预后的关系。**结果** 骨髓幼稚细胞比例 >60% 的 AML 患儿 WT1 表达水平高于幼稚细胞 ≤ 60% 的患儿 ($P < 0.05$)。M2 病例组初诊时 WT1 表达量低于非 M2 病例组 ($P < 0.05$)。完全缓解组患儿的 WT1 表达量显著低于初诊组和复发组 ($P < 0.01$)。诱导化疗结束时 WT1 高表达组的 2 年无病生存率 (DFS) 低于 WT1 低表达组 ($P < 0.05$)。诱导化疗结束时 WT1 下降程度 ≥ 1 个数量级病例组的 2 年总生存率 (OS) 和 DFS 高于 WT1 下降程度 < 1 个数量级病例组 ($P < 0.05$)。AML 患儿骨髓复发 2~3 个月前 WT1 表达呈上升趋势。**结论** WT1 表达水平与儿童 AML 预后密切相关, 动态监测 WT1 表达在指导儿童 AML 个体化治疗、预后评估和复发预测方面具有重要临床应用价值。
[中国当代儿科杂志, 2016, 18(12): 1211-1216]

[关键词] 急性髓细胞白血病; WT1 基因; 预后; 实时荧光定量 PCR; 儿童

Expression of WT1 gene in children with acute myeloid leukemia

TANG Xue, GUO Xia, YANG Xue, XIAO Hui, SUN Jing-Jing, YUAN Li-Xing, GAO Ju. Department of Pediatric Hematology & Oncology, West China Second University Hospital, Sichuan University; Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China (Gao J, Email: gaoju651220@126.com)

Abstract: Objective To study WT1 gene expression in children with acute myeloid leukemia (AML) and its possible correlations to clinical outcomes. **Methods** Bone marrow samples were collected from 45 children with AML (excluding acute promyelocytic leukemia, AML-M3) at different time points of AML treatment and follow-up. WT1 gene expression levels in bone marrow mononuclear cells were assayed by real-time fluorescence quantitative PCR. The correlation between WT1 expression and prognosis was retrospectively analyzed. **Results** The WT1 expression level in AML children with bone marrow blast cell percentage of >60% was significantly higher than in those with bone marrow blast cell percentage of ≤ 60% ($P < 0.05$). The lower WT1 expression level was documented in children with AML-M2 compared with in children with other non-M2 subtypes ($P < 0.05$). WT1 expression level in patients in complete remission was significantly lower than that in patients at diagnosis or relapse ($P < 0.01$). The 2-year disease-free survival (DFS) in patients with higher WT1 expression was significantly lower than in those with lower WT1 expression at the end of induction chemotherapy ($P < 0.05$). The 2-year overall survival (OS) and DFS in patients with ≥ 1 log WT1 reduction range were significantly higher than those with < 1 log reduction of WT1 expression level at the end of induction chemotherapy ($P < 0.05$). WT1 expression levels tended to rise 2-3 months prior to bone marrow relapse. **Conclusions** WT1 expression level is closely correlated prognosis in children with AML. Dynamic monitoring of WT1 expression level is of great clinical importance in terms of individualized management, prognosis evaluation and relapse prediction.
[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(12): 1211-1216]

Key words: Acute myeloid leukemia; WT1 gene; Prognosis; Real-time fluorescence quantitative PCR; Child

[收稿日期] 2016-07-08; [接受日期] 2016-08-29

[基金项目] 四川省应用基础研究计划项目 (2015JY0044)。

[作者简介] 唐雪, 女, 硕士, 住院医师。

[通信作者] 高举, 男, 主任医师, 教授。

急性髓细胞白血病（acute myeloid leukemia, AML）为髓系前体细胞恶性克隆增殖性肿瘤，在临床表现、细胞遗传学、分子遗传学、治疗反应和预后方面均呈现高度异质性。目前国内外公认细胞遗传学和分子生物学异常为 AML 分型诊断和分层治疗的重要依据，但相当部分儿童 AML 并无特异性的细胞或分子遗传学标志。因此，如何对儿童 AML 进行更精细的危险度分组以指导个体化治疗对于进一步提高 AML 预后具有重要临床意义。

肾母细胞瘤基因 1（Wilms tumor gene 1, WT1）定位于染色体 11p13，最早从 Wilms 瘤细胞中被克隆，与 Wilms 瘤发生、发展密切相关^[1-2]。国内外研究表明，WT1 高表达为很大一部分 AML 患者的常见分子生物学异常^[3-5]。WT1 作为一种泛白血病基因，其表达水平在指导 AML 治疗、预测复发和预后评估方面的临床应用价值已在国外得到高度重视^[6-8]，但国内关于 AML 患儿 WT1 表达及临床意义方面的研究较少。本研究采用实时荧光定量 PCR 方法检测儿童 AML 的 WT1 表达水平，研究其变化规律，探讨与 AML 患儿化疗反应和预后的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2009 年 4 月至 2016 年 1 月于四川大学华西第二医院确诊的 45 例儿童 AML 病例，不包括急性早幼粒细胞白血病（AML-M3）。本组 AML 病例均于我院儿童血液肿瘤科接受正规化疗，并有完整的随访资料。本研究获得医院伦理委员会批准及监护人书面知情同意。

1.2 主要试剂

淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司。Trizol 试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司。Takara 逆转录试剂盒购自日本 Takara 生物有限公司。荧光定量 PCR 体系购自北京优尼康生物科技有限公司。WT1 基因引物及探针由上海 Invitrogen 公司设计及合成。

1.3 标本采集

采集 45 例 AML 患儿不同时间点骨髓标本并检测 WT1 表达水平，共 180 例次。AML 病例组各亚型骨髓标本采集时间点和例次数见表 1。9 例复发患儿中的 1 例为随访截止点确诊复发，5 例复发患儿放弃治疗后死亡，3 例复发后姑息化疗、带瘤生存（期间未规律进行 WT1 检测）。

表 1 AML 患儿各亚型骨髓采集时间点和例次数

AML 亚型	例数	骨髓采集时间点和例次数						
		初诊	诱导化疗结束	巩固化疗期*	巩固化疗结束	停药随访期*	复发	合计
M0	2	0	2	2	0	7	0	11
M1	3	1	2	1	1	4	2	11
M2	25	9	15	18	14	39	5	100
M4	4	2	3	0	2	11	0	18
M5	8	7	8	3	7	3	1	29
M6	2	0	1	4	0	1	1	7
未知	1	0	1	0	0	3	0	4
合计	45	19	32	28	24	68	9	180

注：* 示 22 例 AML 患儿于巩固化疗期每 1~2 个月、停药随访期每 3~6 个月采集骨髓标本，共计 96 例次。

1.4 WT1 基因检测

采集 EDTA 抗凝骨髓标本 1~2 mL。淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞。采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA 后逆转录制备 cDNA。WT1 目标基因和 ABL1 内参基因引物及探针序列见表 2。WT1 和 ABL1 基因扩增产物长度分

别为 120 bp 和 129 bp。荧光定量 PCR 反应体系：Taqman Fast Master Mix（5×）4 μL，上游引物 0.5 μL，下游引物 0.5 μL，荧光探针 1 μL，cDNA 模板 5 μL，灭菌去离子水 9 μL。反应条件：95℃变性 10 min，然后进行 45 个 PCR 循环（95℃变性 10 s，60℃退火 60 s）。根据 WT1 和 ABL1 各自荧

光定量 PCR 反应的 Ct 值,对照各自相应的标准曲线,计算其拷贝数,WT1 相对表达量 = (WT1 拷贝数 / ABL1 拷贝数) × 10⁴。诱导化疗结束时 WT1

表达水平的下降程度以 log (初诊时 WT1 相对表达量 / 诱导化疗结束时 WT1 相对表达量) 表示^[9-10]。

表 2 WT1 及 ABL1 的引物及探针序列

基因	引物、探针	序列
WT1	上游引物	5'-CAGGCTGCAATAAGAGATATTTTAAGCT-3'
	下游引物	5'-GAAGTCACACTGGTATGCTTTCTCA-3'
	探针	5'-CTTACAGATGCACAGCAGGAAGCACACTG-3'
ABL1	上游引物	5'-TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT-3'
	下游引物	5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3'
	探针	5'-CCATTTTGGTTTGGGTTCACACCATT-3'

1.5 治疗方案及疗效评估

AML 治疗参照英国医学研究委员会 AML15 诊疗方案^[11]。疗效评估^[12]:骨髓原始和幼稚细胞 <5% 定义为完全缓解 (complete remission, CR); 原始和幼稚细胞 ≥ 5%, 但 <25% 定义为部分缓解; 原始和幼稚细胞 ≥ 25% 定义为未缓解; CR 后骨髓原始和幼稚细胞 ≥ 25% 定义为复发 (本研究未纳入孤立性髓外复发病例)。

1.6 随访

随访截止至 2016 年 2 月 1 日,中位随访时间 20 个月 (1~82 个月)。总生存期为确诊之日至随访终点或任何原因所致死亡的时间。无病生存期为 CR 之日至复发或任何原因死亡的时间。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行相关统计学处理。非正态分布计量资料采用中位数 (范围) 表示,多组间比较采用 Kruskal-Wallis 方法,两组比较采用 Mann-Whitney 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 生存分析进行,Log-rank 检验分析 AML 各阶段 WT1 表达水平与生存率的关系。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AML 患儿初诊时 WT1 表达水平与临床特征和诱导缓解状况的关系

19 例患儿初诊时 WT1 的中位表达量为 1525 (50~29407)。AML 初诊时 WT1 相对表达量与性别、年龄、外周血白细胞总数、染色体核型及诱导化

疗后的缓解状况均无明确相关性;如以 AML 患儿初诊时骨髓幼稚细胞比例的中位值 60% 作为截断值,骨髓幼稚细胞比例 >60% 者 WT1 表达水平较高 (*P* = 0.017); M2 病例组初诊时 WT1 中位表达量低于非 M2 病例组 (*P* = 0.043)。见表 3。

表 3 AML 初诊时 WT1 表达水平与临床特征及诱导缓解状况的关系 [中位数 (范围)]

临床特征	例数	WT1 相对表达量	Z 值	P 值
性别				
男	11	1 525(73~20608)	0.743	0.492
女	8	1 359(50~29407)		
年龄 (岁)				
≤ 10	12	403(50~10480)	1.690	0.100
>10	7	2 542(247~29407)		
外周血白细胞计数 (× 10 ⁹ /L)				
≤ 50	16	1 700(50~29407)	1.342	0.211
>50	3	7 884(687~10480)		
骨髓幼稚细胞比例 (%)				
≤ 60	10	175(50~3 378)	2.368	0.017
>60	9	4 342(247~29407)		
FAB 分型				
M2	9	191(50~10480)	2.041	0.043
非 M2	10	3 638(73~29407)		
染色体核型 ^a				
t(8;21)	11	687(50~20608)	0.679	0.536
其它核型	7	1 704(66~29407)		
1 疗程诱导是否 CR ^b				
是	14	1 106(50~56018)	0.956	0.382
否	4	893(66~2542)		

注: a 示 1 例患儿染色体核型未知; b 示 1 例患儿仍处于诱导化疗中, 尚未评估缓解状况。

2.2 WT1 表达水平与 AML 疾病状态的相关性

初诊及复发的 WT1 表达量均高于缓解期 ($P<0.01$) ; WT1 中位表达量在初诊与复发时的差异无统计学意义 ($P=0.772$) 。见表 4。

表 4 AML 不同疾病状态下 WT1 表达水平的比较
[中位数(范围)]

疾病状态	例数	WT1 相对表达量	H 值	P 值
初诊	19	1 525(50~29 407)		
完全缓解期*	54	48(0~415)	40.358	<0.01
复发	9	533(145~14 428)		

注: * 包括诱导化疗结束时进行 WT1 检测的 30 例及巩固化疗结束时进行检测的 24 例。

2.3 WT1 表达水平的动态变化与复发的关系

本研究对 22 例 AML 患儿的 WT1 表达水平进行动态检测(13 例自初诊时开始,9 例从诱导化疗结束后开始),其中 3 例 AML 骨髓复发。复发病例在持续缓解期 WT1 表达量维持在相对稳定的低水平,但骨髓复发 2~3 个月前 WT1 表达量即呈上升趋势,其中 2 例复发时 WT1 表达量(分别为 161 和 3 650)升高至初诊水平(191 和 2 542)。另 1 例 AML 患儿两次骨髓复发,第 2 次复发时 WT1 相对表达量(2 160)较首次复发时(788)升高 2.7 倍,见图 1。

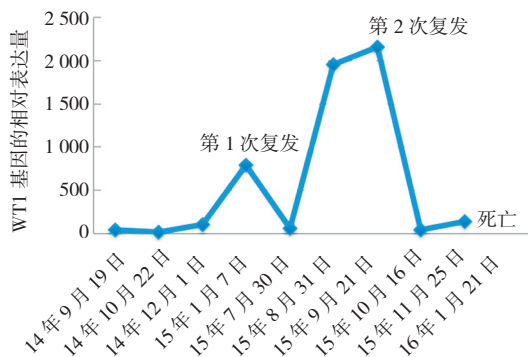


图 1 1 例两次复发的 AML 患儿 WT1 表达水平变化

2.4 WT1 表达水平与预后的关系

以 AML 患儿初诊时 WT1 中位表达量(1 525)为截断值,将 AML 患儿分为高、低表达组,高表达组和低表达组的 2 年总生存率(overall survival, OS)及无病生存率(disease-free survival, DFS)分别为 64% 和 60%,89% 和 84%,差异无统计学意义 ($P>0.05$) , 见表 5。

18 例 AML 患儿在初诊和诱导化疗结束时均进行了 WT1 表达水平的检测。诱导化疗结束时 WT1 表达下降程度的中位值为 1 个数量级,下降程度 ≥ 1 个数量级患儿的 2 年 OS 和 DFS 均高于下降程度 <1 个数量级患儿,差异具有统计学意义 ($P<0.05$) , 见表 6、图 2。

以诱导化疗结束的 WT1 中位表达量(49)为截断值分为高、低表达组。高表达组的 2 年 DFS(58%) 低于低表达组(86%) ($\chi^2=5.263$, $P=0.022$) , 见图 3; 其 2 年 OS 与低表达组的差异(67% vs 86%) 无统计学意义 ($\chi^2=2.597$, $P=0.107$) 。以巩固化疗结束时 WT1 中位表达量(53)为截断值分为高、低表达组,WT1 高表达和低表达组的 2 年 OS(73%, 92%) 及 DFS(64%, 83%) 差异均无统计学意义 ($P>0.05$) 。

表 5 AML 患儿初诊时 WT1 高、低表达组的 2 年 OS 和 DFS 比较 (%)

WT1 表达水平	例数	2 年 OS	2 年 DFS
高表达	10	64	60
低表达	9	89	84
χ^2 值		1.143	0.900
P 值		0.258	0.343

表 6 诱导化疗结束时 WT1 表达水平下降程度与生存情况的关系 (%)

WT1 表达水平	例数	2 年 OS	2 年 DFS
≥ 1 个数量级	9	100	100
<1 个数量级	9	52	27
χ^2 值		5.008	9.274
P 值		0.025	0.002

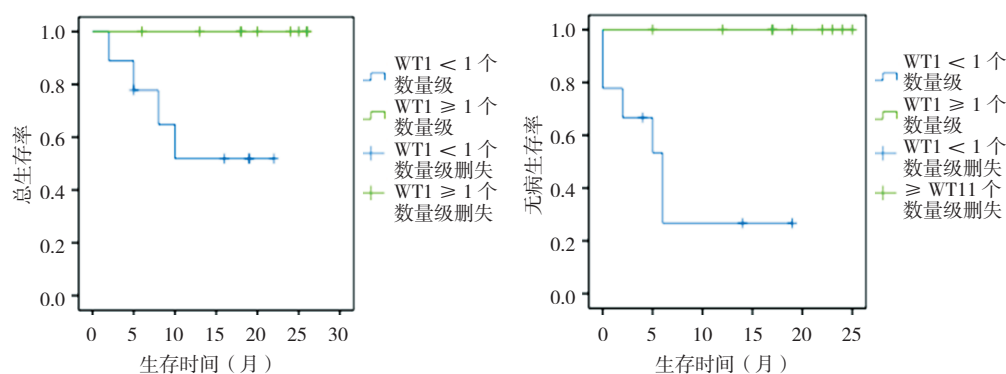


图2 诱导化疗结束时不同WT1下降程度的AML患儿生存曲线

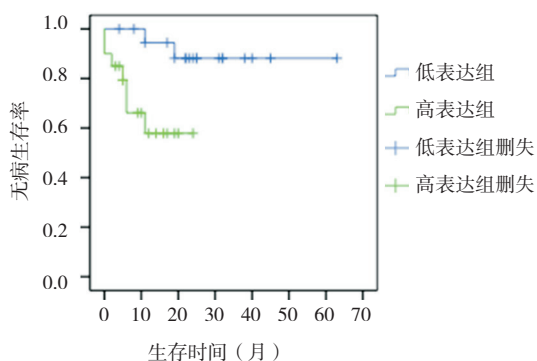


图3 AML患儿诱导化疗结束时WT1高、低表达组的无病生存曲线

3 讨论

WT1在不同AML亚型,以及相同AML亚型不同个体之间的表达情况均存在较大差异。国内外相关研究表明,WT1表达水平以AML-M3最高,其它亚型AML的WT1表达量各家报道不一^[13-14];而AML1-ETO融合基因阳性M2病例的WT1表达水平明显低于其它AML亚型^[15]。本研究未纳入AML-M3,但结果也表明,AML-M2病例组WT1表达水平最低;而且初诊时WT1的表达水平与骨髓幼稚细胞百分比具有明确相关性,与性别、年龄、外周血白细胞总数、染色体核型及第1疗程诱导是否缓解无关。

此外,本研究发现初诊及复发AML病例组WT1的表达水平高于完全缓解期病例组。动态监测22例AML患儿WT1表达水平,发现骨髓复发2~3个月前WT1表达量即呈上升趋势。我们推测,WT1表达水平与白血病肿瘤细胞负荷程度有关,因此,了解WT1基因表达水平的动态变化有助于

AML的疗效评估和复发预测。

多数研究表明,初诊时WT1高表达为成人AML独立的不良预后因素^[16-17],但对于初诊时WT1表达水平与儿童AML预后的关系仍无统一意见。Rodrigues等^[18]对41名初诊时完成WT1表达水平检测的AML患儿进行随访,结果显示WT1高表达的AML患儿总生存率更高。而Noronha等^[19]对155名AML患儿的研究显示,初诊时WT1表达量与长期生存率无明确相关性。本研究结果也表明初诊时WT1表达水平与预后无关。因此,需要扩大样本量进行长期随访研究以进一步明确初诊时WT1表达水平与儿童AML长期预后的关系。

微小残留病(minimal residual disease, MRD)水平检测在指导儿童白血病个体化治疗、预后评估和复发预测方面具有重要临床价值。对于初诊时具有特定非随机性细胞遗传学异常和/或分子生物学异常的AML病例,临床上通过动态监测这些异常是否恢复进行预后评估和复发预测。但对于很大一部分没有特定细胞遗传学和/或分子生物学异常的AML病例,WT1作为一种泛白血病标记基因即具有重要的临床应用价值。Shibasaki等^[9]对48名成人AML的研究显示,诱导化疗和巩固化疗结束时WT1表达量的降低程度如较初诊时大于2个数量级,则预后良好。本研究同样显示,诱导化疗结束时WT1表达量下降程度<1个数量级的病例其2年OS和DFS均显著低于下降程度≥1个数量级病例。Nomdedéu等^[20]分析了584名成人AML患者各时间点WT1表达水平与预后的关系,发现诱导及巩固化疗结束时WT1持续高表达者预后不良。本研究未发现AML患儿巩固化疗结束时WT1表达水平与预后具有明确相关性。结合国外

学者的研究结果,我们认为,诱导化疗阶段有效杀灭白血病细胞的程度是诱导化疗结束时 WT1 下降程度的决定性因素,诱导化疗结束时 WT1 表达水平可一定程度上反映 AML 白血病细胞对化疗的敏感性。因此,诱导化疗结束为检测 WT1 表达水平的一个重要时间节点。

综上,WT1 表达与儿童 AML 预后密切相关,但能否将 WT1 作为 AML 分型诊断和分层治疗的依据需进一步研究,但我们相信通过不断深入的研究,最终能够阐明 WT1 在 AML 中的作用机制,为临床治疗提供更多的依据。

【参 考 文 献】

- [1] Lee SB, Haber DA. Wilms tumor and the WT1 gene[J]. 2001, 264(1): 74-99.
- [2] Qi XW, Zhang F, Wu H, et al. Wilms' tumor 1 (WT1) expression and prognosis in solid cancer patients: a systematic review and meta-analysis[J]. Sci Rep, 2015, 5: 8924.
- [3] Kramarzova K, Stuchly J, Willasch A, et al. Real-time PCR quantification of major Wilms tumor gene 1 (WT1) isoforms in acute myeloid leukemia, their characteristic expression patterns and possible functional consequences[J]. Leukemia, 2012, 26(9): 2086-2095.
- [4] Lyu X, Xin Y, Mi R, et al. Overexpression of Wilms tumor 1 gene as a negative prognostic indicator in acute myeloid leukemia[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92470.
- [5] Kitamura K, Nishiyama T, Ishiyama K, et al. Clinical usefulness of WT1 mRNA expression in bone marrow detected by a new WT1 mRNA assay kit for monitoring acute myeloid leukemia: a comparison with expression of WT1 mRNA in peripheral blood[J]. Int J Hematol, 2016, 103(1): 53-62.
- [6] Miyawaki S, Hatsumi N, Tamaki T, et al. Prognostic potential of detection of WT1 mRNA level in peripheral blood in adult acute myeloid leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2010, 51(10): 1855-1861.
- [7] Lasa A, Carricondo M, Estivill C, et al. WT1 monitoring in core binding factor AML: comparison with specific chimeric products[J]. Leuk Res, 2009, 33(12): 1643-1649.
- [8] Pozzi S, Geroldi S, Tedone E, et al. Leukemia relapse after allogeneic transplants for acute myeloid leukemia: predictive role of WT1 expression[J]. Br J Haematol, 2013, 160(4): 503-509.
- [9] Shibasaki Y, Seki Y, Tanaka T, et al. The association of level of reduction of Wilms' tumor gene 1 mRNA transcript in bone marrow and outcome in acute myeloid leukemia patients[J]. Leuk Res, 2015, 39(6): 667-671.
- [10] Rossi G, Minervini MM, Melillo L, et al. Predictive role of minimal residual disease and log clearance in acute myeloid leukemia: a comparison between multiparameter flow cytometry and Wilm's tumor 1 levels[J]. Ann Hematol, 2014, 93(7): 1149-1157.
- [11] Burnett AK, Hills RK, Milligan D, et al. Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(4): 369-377.
- [12] Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, et al. Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia[J]. J Clin Oncol, 1990, 8(5): 813-819.
- [13] 万鼎铭, 边志磊, 刘延方, 等. 急性髓系白血病骨髓 WT1 基因的表达与预后的关系 [J]. 郑州大学学报 (医学版), 2014, 49(3): 386-390.
- [14] 刑冲云, 高申孟, 梁彬, 等. 实时荧光定量 PCR 检测急性髓系白血病患者 WT1 基因表达及其临床意义 [J]. 温州医学院学报, 2011, 41(6): 527-530.
- [15] Ommen HB, Nyvold CG, Braendstrup K, et al. Relapse prediction in acute myeloid leukemia patients in complete remission using WT1 as a molecular marker: development of a mathematical model to predict time from molecular to clinical relapse and define optimal sampling intervals[J]. Br J Haematol, 2008, 141(6): 782-791.
- [16] Kim HJ, Choi EJ, Sohn HJ, et al. Combinatorial molecular marker assays of WT1, survivin, and TERT at initial diagnosis of adult acute myeloid leukemia[J]. Eur J Haematol, 2013, 91(5): 411-422.
- [17] Luo S, Yu K, Yan QX, et al. Analysis of WT1 mutations, expression levels and single nucleotide polymorphism rs16754 in de novo non-M3 acute myeloid leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2014, 55(2): 349-357.
- [18] Rodrigues PC, Oliveira SN, Viana MB, et al. Prognostic significance of WT1 gene expression in pediatric acute myeloid leukemia[J]. Pediatr Blood Cancer, 2007, 49(2): 133-138.
- [19] Noronha SA, Farrar JE, Alonzo TA, et al. WT1 expression at diagnosis does not predict survival in pediatric AML: a report from the Children's Oncology Group[J]. Pediatr Blood Cancer, 2009, 53(6): 1136-1139.
- [20] Nomdedéu JF, Hoyos M, Carricondo M, et al. Bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and post-intensification in adult de novo AML[J]. Leukemia, 2013, 27(11): 2157-2164.

(本文编辑: 俞燕)