

论著·临床研究

诱导缓解第33天MRD与IKZF1基因型对于儿童急性B淋巴细胞白血病生存率的影响

旷文勇 郑敏翠 李婉丽 杨海霞 张本山 吴攀

(湖南省儿童医院血液科, 湖南长沙 410007)

[摘要] **目的** 研究诱导缓解第33天微小残留病(MRD)与IKZF1基因型对于儿童急性B淋巴细胞白血病(B-ALL)生存率的影响。**方法** 以第一疗程化疗获得完全缓解且有完整随访信息的152例初诊B-ALL患儿为研究对象。采用流式细胞术检测化疗第33天MRD,并分为3组:残留白血病细胞 $<10^{-4}$ 者为MRD标危组(60例), $10^{-4} \leq \text{MRD} < 10^{-2}$ 为MRD中危组(55例), $\text{MRD} \geq 10^{-2}$ 为MRD高危组(37例)。应用巢式RT-PCR检测化疗前所有患儿的IKZF1基因型。分析诱导缓解第33天MRD及IKZF1基因型对B-ALL患儿无复发生存率的影响。**结果** 152例初诊B-ALL患儿有7种常见IKZF1基因亚型:IK1、IK2/3、IK4、IK6、IK8、IK9和IK10,其中130例表达IKZF1基因功能亚型、22例为IKZF1基因功能缺失亚型。随访期间26例(17%)患儿复发,以高危患儿复发率最高($P < 0.05$),而标危、中危组复发率的差异无统计学意义($P > 0.05$)。IKZF1基因功能缺失亚型阳性患儿的累计复发率高于IKZF1基因功能亚型阳性的患儿($P < 0.01$)。MRD标危、中危、高危患儿的预计5年无复发生存率分别为 $(94.2 \pm 2.9)\%$ 、 $(86.7 \pm 3.8)\%$ 和 $(56.2 \pm 4.5)\%$,三组间的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。IKZF1基因功能亚型阳性患儿的5年无复发生存率高于功能缺失亚型阳性患儿($P < 0.01$)。MRD标危组IKZF1基因功能亚型阳性患儿的预计5年无复发生存率与功能缺失亚型阳性患儿的差异无统计学意义($P > 0.05$),中危组和高危组中IKZF1基因功能亚型阳性患儿的预计5年无复发生存率均高于功能缺失亚型阳性患儿($P < 0.05$)。**结论** IKZF1基因功能缺失亚型阳性的B-ALL患儿复发率高,尤其是化疗第33天MRD $\geq 10^{-4}$ 的IKZF1基因功能缺失亚型阳性B-ALL患儿。
[中国当代儿科杂志, 2018, 20(7): 538-542]

[关键词] 急性淋巴细胞白血病;微小残留病;Ikaros家族的锌指蛋白1;儿童

Effects of minimal residual disease level on day 33 of remission induction and IKZF1 genotype on the survival of children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia

KUANG Wen-Yong, ZHENG Min-Cui, LI Wan-Li, YANG Hai-Xia, ZHANG Ben-Shan, WU Pan. Department of Hematology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China (Zheng M-C, Email: mincui@sina.com)

Abstract: Objective To study the effects of minimal residual disease (MRD) level on day 33 of remission induction and IKZF1 genotype on the survival of children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). **Methods** A total of 152 children with newly-diagnosed B-ALL who had complete remission after the first cycle of the chemotherapy and had complete follow-up information were enrolled in this study. According to the MRD detection by flow cytometry on day 33 of remission induction, they were divided into three groups: standard-risk (SR) group ($\text{MRD} < 10^{-4}$; $n=60$), intermediate-risk (IR) group ($10^{-4} \leq \text{MRD} < 10^{-2}$; $n=55$), and high-risk (HR) group ($\text{MRD} \geq 10^{-2}$; $n=37$). Nested RT-PCR was used to determine the IKZF1 genotype of all children before chemotherapy. The effects of MRD level on day 33 of remission induction and IKZF1 genotype on the recurrence-free survival (RFS) of children with B-ALL were analyzed. **Results** There were 7 common IKZF1 subtypes in all the 152 children with B-ALL: IK1, IK2/3, IK4, IK6, IK8, IK9, and IK10. Of the 152 children, 130 had functional subtypes of IKZF1 and 22 had non-functional subtypes of IKZF1. During the follow-up period, relapse occurred in 26 (17%) children, and the recurrence rate was highest in the HR group ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in the recurrence rate between the SR group and the IR

[收稿日期] 2018-03-08; [接受日期] 2018-05-15

[基金项目] 国家自然科学基金(81200367);湖南省卫计委科研项目(B2014-120)。

[作者简介] 旷文勇,男,博士,副主任医师。

[通信作者] 郑敏翠,女,主任医师。

group ($P>0.05$). The cumulative recurrence rate of the children with non-functional subtypes of IKZF1 was significantly higher than that of those with functional types of IKZF1 ($P<0.01$). The predicted 5-year RFS rates in the SR, IR, and HR groups were $(94.2\pm 2.9)\%$, $(86.7\pm 3.8)\%$, and $(56.2\pm 4.5)\%$ respectively ($P<0.05$). The 5-year RFS rate of the children with functional subtypes of IKZF1 was significantly higher than that of those with non-functional subtypes of IKZF1 ($P<0.01$). There was no significant difference in the predicted 5-year RFS rate between the children with functional subtypes of IKZF1 and those with non-functional subtypes of IKZF1 in the SR group ($P>0.05$). However, the predicted 5-year RFS rate of the children with functional subtypes of IKZF1 was significantly higher than that of those with non-functional subtypes of IKZF1 in the IR group and the HR group ($P<0.05$). **Conclusions** B-ALL children with non-functional subtypes of IKZF1 have a high recurrence rate, and the recurrence rate will be even higher in B-ALL children with non-functional subtypes of IKZF1 and MRD $\geq 10^{-4}$ on day 33 of chemotherapy.

[Chin J Contemp Pediatr, 2018, 20(7): 538-542]

Key words: Acute lymphoblastic leukemia; Minimal residual disease; Ikaros family zinc finger protein 1; Child

急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 是儿童最常见恶性肿瘤, 其中 B 细胞 ALL (B-ALL) 约占儿童 ALL 的 80%, 随着治疗的进步, 80% 左右可长期无病生存^[1]。但仍有 15%~20% 的 B-ALL 复发, 这与体内的残留白血病细胞即微小残留病 (minimal residual diseases, MRD) 有关^[2]。在 ALL 的现代分层治疗中, MRD 是危险分层的重要指标, 可作为一个独立的预后参数, 诱导缓解第 33 天是 MRD 监测的重要时间点^[3-4]。中国儿童白血病协作组 (Chinese Children's Leukemia Group, CCLG) ALL-2008 方案将第 33 天 MRD 作为危险分层的一个独立参数, 第 33 天 MRD 阳性是 B-ALL 患儿的高危因素^[5-6]。IKZF1 (Ikaros family zinc finger 1) 基因的编码蛋白 Ikaros 属于锌指 DNA 结合蛋白家族, 参与染色质重塑, 发挥调控淋巴细胞分化发育, 是淋巴系统发育必需的转录因子。Ikaros 基因包含结合 DNA 的 N 端 4 个锌指结构, 以及形成二聚体的 C 端 2 个锌指结构。IKZF1 基因含 8 个外显子, 可产生 10 余种亚型, 只有 N 端含有至少 3 个锌指结构的亚型 (IK1-IK3) 才能与 DNA 正确结合而正常发挥功能, 因此 IK1-IK3 被认为是功能亚型, 而其他亚型为显性负向 Ikaros 异构体, 即功能缺失亚型。IKZF1 基因功能缺失亚型的表达与儿童 ALL 预后不良相关^[7]。而关于 IKZF1 基因型联合诱导缓解第 33 天 MRD 对 B-ALL 儿童预后的预测鲜有报道。本研究通过巢式逆转录聚合酶链反 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 方法检测儿童 B-ALL 患者 IKZF1 基因亚型表达, 并应用流式细胞术检测第 33 天 MRD 水平, 以探讨第 33 天 MRD 及 IKZF1 基因型对于生存的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集湖南省儿童医院血液内科 2012 年 1 月至 2015 年 6 月第一疗程化疗获得完全缓解且有完整随访信息的 152 例初诊 B-ALL 患者的临床资料, 均经骨髓细胞形态学、免疫学分型、细胞遗传学和分子生物学确诊, 诊断、疗效评价、复发均参照《血液病诊断及疗效标准》^[8], 并按 CCLG-ALL-2008 方案治疗^[6]。其中男 88 例、女 64 例, 平均年龄 6.25 岁。随访截至 2017 年 8 月 1 日, 中位随访时间 35 (14~68) 个月, 随访期间 2 例因严重感染死亡, 26 例复发。无复发生存期指从完全缓解 (complete remission, CR) 至第一次复发的时间。

本研究获得患儿家长的知情同意。

1.2 染色体、融合基因和 MRD 检测

染色体、融合基因和 MRD 检测均由武汉康圣达医学检验所完成。危险度分组参照 CCLG-ALL-2008 方案^[6]标准。并以第 33 天 MRD 作为危险分层的依据, 残留白血病细胞 $<10^{-4}$ 者为 MRD 标危组 (60 例), $10^{-4} \leq \text{MRD} < 10^{-2}$ 为 MRD 中危组 (55 例), $\text{MRD} \geq 10^{-2}$ 为 MRD 高危组 (37 例)。

1.3 巢式 RT-PCR 检测 IKZF1 基因亚型表达

收集化疗前的骨髓单个核细胞, 用 TRIzol 法提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA。利用 Primer Premier 6 软件设计 PCR 引物, 引物合成委托美国 Invitrogen 公司完成。内参基因 GAPDH 引物上游 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', 下游 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3', 扩增片段长度 226 bp。IKZF1 基因巢式 PCR 引物能够扩增 IKZF1 所有亚型, 外引物上游

5'-ATGGATGCTGATGAGGGTCAAGAC-3', 下游 5'-TTAGCTCATGTGGAAGCGGTGCTC-3'; 内引物上游 5'-CCCCTGTAAGCGATACTCCAGATG-3', 下游 5'-GATGGCTTGGTCCATCACGTGGGA-3'。第一轮 PCR 反应体系为 20 μ L, 包括 2 \times GoTaq Green Master Mix 10 μ L、外侧上游和下游引物 1.5 μ L、cDNA 1.5 μ L、ddH₂O 7 μ L, ddH₂O 做阴性对照。PCR 条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。取第一轮 PCR 扩增产物 0.5 μ L 与 9.5 μ L ddH₂O 混合, 从中吸取 1.5 μ L 进行第二轮 PCR。第二轮 PCR 反应体系为 20 μ L, 包括 2 \times GoTaq Green Master Mix 10 μ L、外侧上游和下游引物各 1.5 μ L、第一轮 PCR 扩增产物 1.5 μ L、ddH₂O 7 μ L, 用 ddH₂O 做阴性对照。PCR 条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。取最终扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳, 利用紫外成像仪成像分析, 电泳产物进行切胶回收测序鉴定: IK1-IK3 为功能亚型, 而缺乏 IK1-IK3 亚型为功能缺失亚型。上述实验由武汉康圣达医学检验所完成。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理。计数资料以频数或百分率 (%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验。采用 Kaplan-Meier 方法评估患儿 5 年无复发生存率, 无复发生存率的组间比较采用 log-rank 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 B-ALL 患儿中 IKZF1 基因亚型的表达

152 例 B-ALL 患儿的 IKZF1 基因型有 7 种亚型 (图 1): IK1 (945 bp)、IK2/3 (684 bp)、IK4 (558 bp)、IK6 (225 bp)、IK8 (390 bp)、IK9 (135 bp) 和 IK10 (95 bp), 并经过测序鉴定证实。130 例 (86%) 儿童 B-ALL 患者表达 IKZF1 功能亚型, 22 例 (14%) 表达 IKZF1 功能缺失亚型。

2.2 IKZF1 基因亚型及第 33 天 MRD 与 B-ALL 复发的关系

152 例患儿随访期间复发 26 例 (17%), 自诊断至复发的中位时间为 28 (6~62) 个月。随着

MRD 水平增高, 复发率逐渐增高, 以 MRD 高危患儿复发率最高 (P<0.05), 而标危、中危组复发率的差异无统计学意义 (P>0.05), 见表 1。

表达 IKZF1 基因功能缺失亚型的患儿复发率高于表达 IKZF1 功能亚型的患儿 (P<0.01), 见表 2。

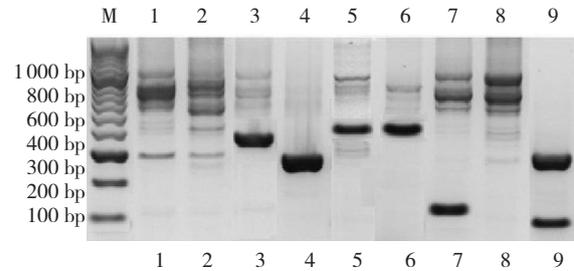


图 1 巢式 PCR 方法检测 B-ALL 患儿 IKZF1 基因表达情况 注: M 泳道为 marker, 第 1、8 泳道 945 bp 处的明显条带为 IK1 亚型, 第 2 泳道 684 bp 处的明显条带为 IK2/3 亚型, 3 泳道 390 bp 处的明显条带为 IK8 亚型, 第 4、9 泳道 225 bp 处的明显条带为 IK6 亚型, 第 5、6 泳道 558 bp 处的明显条带为 IK4 亚型, 7 泳道 135 bp 处的明显条带为 IK9 亚型, 9 泳道 95 bp 处的明显条带为 IK10 亚型。

表 1 MRD 水平对 B-ALL 患儿复发的影响 [例 (%)]

| 组别 | n | 复发 |
|------------|----|--------------------|
| MRD 标危 | 60 | 3(5) ^a |
| MRD 中危 | 55 | 7(13) ^a |
| MRD 高危 | 37 | 16(43) |
| χ^2 值 | | 9.41 |
| P 值 | | 0.0021 |

注: a 示与 MRD 高危比较, P<0.05。

表 2 IKZF1 基因亚型对 B-ALL 患儿复发的影响 [例 (%)]

| 组别 | n | 复发 |
|--------------|-----|--------|
| IKZF1 功能亚型 | 130 | 11(8) |
| IKZF1 功能缺失亚型 | 22 | 15(68) |
| χ^2 值 | | 47.3 |
| P 值 | | <0.001 |

2.3 MRD 危险分组及 IKZF1 基因型对 B-ALL 患儿 5 年无复发生存率的影响

152 例 B-ALL 患儿 5 年无复发生存率为 (82.5 \pm 1.8)%, 第 33 天 MRD 标危、中危和高危组的 5 年无复发生存率分别为 (94.2 \pm 2.9) %、(86.7 \pm 3.8) % 和 (56.2 \pm 4.5) %, 三组间的差异有统计学意义 (P<0.05); 表达 IKZF1 基因功

能亚型的患儿其5年无复发生存率[(89.6 ± 2.7)%] 高于表达功能缺失亚型的患儿[(31.3 ± 3.9)%],

差异有统计学意义(P<0.01)。见图2。

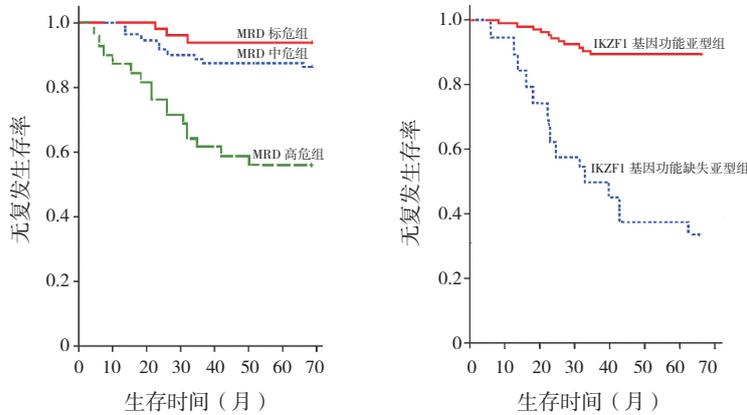


图2 MRD 分组及 IKZF1 基因亚型对 B-ALL 患儿 5 年无复发生存率的影响

2.4 MRD 危险分组与 IKZF1 基因型联合对于 B-ALL 患儿无复发生存率的预测

诱导化疗第33天 MRD 标危组中表达 IKZF1 基因功能亚型或功能缺失亚型的患儿 5 年无复发生存率分别为 (96.4 ± 2.5)% 和 (75.8 ± 3.6)%，差

异无统计学意义(P=0.058)；中危组及高危组表达 IKZF1 基因功能亚型的患儿 5 年无复发生存率 [(95.3 ± 2.2)%，(67.7 ± 2.6)%] 高于表达功能缺失亚型的患儿 [(58.3 ± 3.2)%，(14.3 ± 1.5)%]，差异有统计学意义(P<0.05)。见图3。

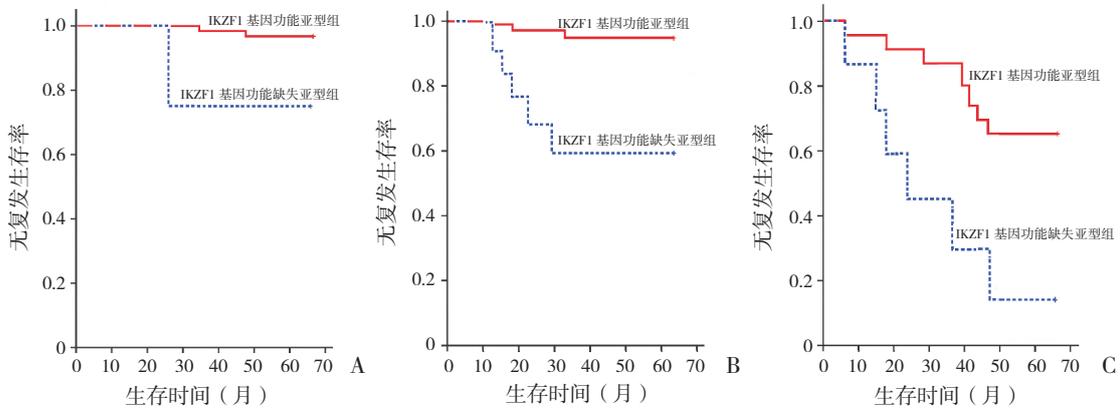


图3 MRD 危险分组与 IKZF1 基因型联合对于 B-ALL 患儿无复发生存率的预测 A: MRD 标危组; B: MRD 中危组; C: MRD 高危组。

3 讨论

近年来，儿童 B-ALL 的疗效取得很大进步，但复发仍是导致治疗失败的最主要原因，我国儿童 ALL 的累计复发率为 15% 左右^[9]。本研究 B-ALL 的累计复发率为 17.1%。B-ALL 的高复发率对危险度分级提出了挑战。MRD 监测在儿童 ALL 的疗效和预后评价方面具有重要价值，将 MRD 引入到传统的危险分层形成一种新的分层体系，能更好地判断 ALL 预后、优化治疗方案、提高治愈率^[10]。

诱导缓解第33天的 MRD 具有重要的预后意义。Pui 等^[11] 研究显示，在诱导缓解后 MRD 阴性的 382 例 ALL 中 6 例 (1.6%) 复发，而 MRD 阳性的 11 例患者 2 例 (18.2%) 复发。安粉艳等^[6] 报道第 33 天 MRD ≥ 10⁻² 是 B-ALL 患儿 5 年无事件生存率和总生存率显著减低的高危因素。因此一些医疗机构已将第 33 天 MRD 引入白血病危险分层以指导治疗^[5,12]。刘晓明等^[5] 应用第 33 天 MRD 调整危险度并进行相应强度化疗，患儿严重感染的发生率没有增加，但复发率及病死率降低。Vora

等^[12-13]进行的随机对照试验显示,诱导结束时MRD<0.01%和MRD为0.01%~0.1%的患者5年EFS分别为(87±1)%和(74±4)%,对MRD阳性患者采用更强的治疗方案可改善预后。本研究根据第33天MRD水平进行B-ALL危险分层,结果显示高危患儿复发率高于标危和中危。

IKZF1基因是与淋巴细胞发育相关的重要转录因子,编码产生IKAROS蛋白,参与造血细胞的分化发育,尤其在淋巴系统发育与肿瘤抑制中起关键作用^[14]。

近年来发现部分复发ALL儿童存在IKZF1基因的缺失和突变。而IKZF1基因缺失突变主要表现为显性负向亚型即功能缺失亚型的表达,如IK6等表达。IKZF1基因缺失被证实是ALL预后不良因素^[15]。研究表明IKZF1基因功能亚型的缺失与成人ALL早期复发与耐药有关^[16]。黄小航等^[17]报道IK6亚型(IKZF1基因功能缺失亚型)的表达可作为儿童B-ALL预后不良的标志,与B-ALL复发密切相关。本研究显示,存在IKZF1基因功能缺失亚型患儿的累计复发率高于IKZF1基因功能亚型阳性患儿,其5年无复发生存率也较低,与文献报道相似。虽然,MRD预后分层可识别出治疗反应差的B-ALL患者,但仍有部分MRD中危的患者出现复发。因此,目前的MRD预后分层系统不能真正反映患者复发风险。本研究将诱导缓解第33天MRD和IKZF1基因型联合,分析两者对于儿童B-ALL无复发生存率的共同影响。结果提示,第33天MRD标危组中存在IKZF1基因功能亚型患儿的5年无复发生存率与功能缺失亚型阳性患儿的差异无统计学意义,中危组和高危组中存在IKZF1基因功能亚型患儿的5年无复发生存率均高于功能缺失亚型阳性患儿,提示IKZF1功能缺失亚型B-ALL患儿若同时存在高水平MRD则复发率很高,预后非常差,有必要调整或探求新的治疗方案。

总之,将MRD联合IKZF1基因表达进行ALL的预后分层,可能为B-ALL患儿的个体化治疗提供更多依据。

[参 考 文 献]

[1] Pui CH, Pei D, Campana D, et al. A revised definition for cure of childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2014, 28(12): 2336-2343.
[2] Schmiegelow K, Forestier E, Hellebostad M, et al. Long-term

results of NOPHO ALL-92 and ALL-2000 studies of childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2010, 24(2): 345-354.
[3] Paganin M, Zecca M, Fabbri G, et al. Minimal residual disease is all important predictive factor of outcome in children with relapsed high-risk acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2008, 22(12): 2193-2200.
[4] Cui L, Li Z, Wu M, et al. Combined analysis of minimal residual disease at two time points and its value for risk stratification in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leuk Res*, 2010, 34(10): 1314-1319.
[5] 刘晓明, 邹尧, 王慧君, 等. CCLG-2008 方案治疗标危中危儿童急性淋巴细胞白血病中期随访结果 [J]. *中华儿科杂志*, 2014, 52(6): 449-454.
[6] 安粉艳, 张淑红, 孔令军, 等. 微量残留病在儿童 B 系急性淋巴细胞白血病危险分层及预后中的临床意义 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2017, 25(3): 729-735.
[7] Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(5): 470-480.
[8] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 19-23.
[9] 陈晓娟, 邹尧, 杨文钰, 等. CCLG-ALL 2008 方案治疗儿童急性淋巴细胞白血病复发患儿的特征分析 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2015, 17(4): 321-326.
[10] Meleshko AN, Savva NN, Fedasenka UU, et al. Prognostic value of MRD-dynamics in childhood acute lymphoblastic leukemia treated according to the MB-2002/2008 protocols[J]. *Leuk Res*, 2011, 35(10): 1312-1320.
[11] Pui CH, Pei D, Coustan-Smith E, et al. Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(4): 465-474.
[12] Vora A, Goulden N, Wade R, et al. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(3): 199-209.
[13] Vora A, Goulden N, Mitchell C, et al. Augmented post-remission therapy for a minimal residual disease-defined high-risk subgroup of children and young people with clinical standard-risk and intermediate-risk acute lymphoblastic leukaemia (UKALL 2003): a randomised controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(8): 809-818.
[14] 张海英, 白海. Ikaros 在急性 B 淋巴细胞白血病中的作用 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(4): 1194-1198.
[15] Marke R, Havinga J, Cloos J, et al. Tumor suppressor IKZF1 mediates glucocorticoid resistance in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2016, 30(7): 1599-1603.
[16] Liu P, Lin Z, Qian S, et al. Expression of dominant-negative Ikaros isoforms and associated genetic alterations in Chinese adult patients with leukemia[J]. *Ann Hematol*, 2012, 91(7): 1039-1049.
[17] 黄小航, 陈静, 李本尚, 等. 急性 B 淋巴细胞白血病患儿 IKZF1 编码蛋白 IKAROS 异常表达研究 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2013, 15(9): 743-747.

(本文编辑: 俞燕)