

E2A-PBX1 融合基因的实时定量检测 在小儿急性淋巴细胞白血病 微小残留病监测中的应用

张熔¹ 廖静¹ 李戈¹ 孙怀强³ 石毓君³ 杨季云²

(四川省医学科学院/四川省人民医院 1. 儿科; 2. 分子生物研究室, 四川 成都 610072;
3. 四川大学华西医院移植工程与移植免疫实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 实时荧光定量 PCR 方法检测 E2A-PBX1 融合基因的表达水平,探讨其在监测急性淋巴细胞白血病(ALL)患儿微小残留病(MRD)及判断预后中的临床价值。**方法** 采用实时荧光定量 RT-PCR 方法,动态检测 11 例 E2A-PBX1 融合基因阳性的 ALL 患儿在初治期(11 例)、完全缓解期(11 例)、复发期(3 例)和 10 例同期骨髓细胞形态学正常的非血液及肿瘤疾病对照组患儿的 E2A-PBX1 融合基因表达水平。**结果** 11 例 ALL 患儿初治期和复发期的 E2A-PBX1 基因表达水平均显著高于缓解期及对照组($P < 0.01$)。与诱导缓解治疗第 33 天 E2A-PBX1 水平表达阴性的患儿比较,表达阳性的患儿 3 年的复发率增高,无病生存率降低(均 $P < 0.05$)。**结论** 实时荧光定量 RT-PCR 检测 E2A-PBX1 融合基因的表达水平是监测 MRD、预测复发、指导个体化治疗的良好指标,诱导缓解第 33 天 E2A-PBX1 融合基因水平可用于判断预后。 [中国当代儿科杂志,2013,15(6):440-443]

[关键词] E2A-PBX1;实时荧光定量 PCR;微小残留病;白血病;儿童

Real-time quantitative detection of E2A-PBX1 fusion gene in children with acute lymphoblastic leukemia and its clinical application in minimal residual disease monitoring

ZHANG Rong, LIAO Jing, LI Ge, SUN Huai-Qiang, SHI Yu-Jun, YANG Ji-Yun. Department of Pediatrics, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China (Email: zzrr0007@sohu.com)

Abstract: Objective To establish a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for quantitative detection of E2A-PBX1 fusion gene mRNA in acute lymphoblastic leukemia (ALL) children and to explore its clinical significance in minimal residual disease monitoring and prognosis evaluation. **Methods** Real-time RT-PCR was used to quantitatively detect the mRNA expression of E2A-PBX1 gene in 11 newly diagnosed ALL patients at diagnosis (11 cases), complete remission (11 cases) and periods of relapse (3 cases). Ten children with normal bone marrow cell morphology and without hematopathy or tumor diseases were used as the control group. **Results** The median expression levels of E2A-PBX1 fusion gene in the ALL group at diagnosis and the relapse group were significantly higher than in the control and complete remission groups ($P < 0.01$). Compared with E2A-PBX1 negative patients on day 33 during induction of remission, the recurrence rate increased and disease free survival rate at 3 year decreased significantly in E2A-PBX1 positive patients decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Measurement of E2A-PBX1 levels by real-time RT-PCR is useful for monitoring minimal residual disease, prediction of relapse and individual treatment. The expression level of E2A-PBX1 gene on day 33 during induction of remission can be used for prognosis evaluation.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(6):440-443]

Key words: E2A-PBX1; Real time fluorescent quantitative PCR; Minimal residual disease; Leukemia; Child

在儿童急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)中 t(1;19)(q23;p13) 易位,即 19p13 的 E2A 和 1q23 上的 PBX1 易位融合。E2A-PBX1 融合基因是儿童 ALL 中较常见的染色体异常之一,约占 5%,在 B 细胞系 ALL 中约为 20%~30%^[1]。过去认为 E2A-PBX1 融合基因阳性的白血病患儿童易发生中枢神经系统白血病,预后较差,近年来通过化疗方案的改进,预后得到改善^[2],5 年无病生存率接近

[收稿日期]2012-10-12;[修回日期]2012-12-12
[项目基金]四川省卫生厅科研项目(编号 070095)。
[作者简介]张熔,女,硕士,副主任医师。

80%,但仍有部分患儿复发,进行微小残留病的监测对降低白血病的复发率及提高长期无病生存率具有重要的临床意义。近年发展起来的实时荧光定量 PCR 技术,具有敏感性高、特异性强和可重复性等优势,作为分子生物技术得到广泛应用。本研究建立一种以融合基因 E2A-PBX1 为靶分子的实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, RQ-PCR)方法,动态监测并长期随访 E2A-PBX1 阳性白血病患儿的 E2A-PBX1 融合基因 mRNA 的表达水平,并分析微小残留白血病(minimal residual disease, MRD)定量信息在判断儿童白血病预后、治疗反应及预测复发中的临床价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2005 年6月至2012 年6 月在四川省人民医院住院的急性淋巴细胞白血病 E2A-PBX1 融合基因阳性(PCR 定性检测)的初治患儿 11 例,其中男 6 例,女 5 例,年龄范围 2.5 ~ 14.3 岁,中位年龄 7.8 岁,所有患儿均进行了细胞形态学-免疫学-细胞遗传学-分子遗传学(morphology-immunology-cytogenetics-molecular, MICM)分型诊断。随访截止 2012 年6月30 日,随访时间 7 ~ 60 个月,中位时间 41.5 个月。10 例同期住院的骨髓细胞形态学正常的非血液病及非肿瘤病儿童为对照组,男 6 例,女 4 例,年龄范围 2.5 ~ 14.3 岁,中位年龄 8.0 岁。

1.2 标本采集

分别于初诊、诱导治疗后、巩固治疗后每 3 ~ 6 个月抽取骨髓 EDTA 抗凝标本 2 mL,同法抽取同期对照组的骨髓标本。RQ-PCR 法定量动态检测 E2A-PBX1 融合基因。

1.3 治疗方案

ALL 患儿按《中华儿科杂志》的儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议^[3-4]及 2010 年全国的儿童急性淋巴细胞白血病临床路径方案进行治疗。

1.4 E2A-PBX1 融合基因 RQ-PCR 检测

将抽取的骨髓标本分离单个核细胞,用 RNA Isolation Kit (美国 Promega 公司 Promega SV Total RNA Isolation System)提取总 RNA。按照逆转录试剂盒(大连宝生物有限责任公司)说明书,将提取的总 RNA 逆转录成 cDNA,置于 -20℃ 保存备用。E2A-PBX1 融合基因及 ABL 内参基因的引物及探针选用欧洲抗癌项目组公布的序列^[5-6]。引物及探针由大连宝生物工程有限公司合成。在荧光定量 PCR 仪(美国 ABI PRISM 7500)上进行荧光定量 PCR 反应,同时

扩增内参 ABL,每个标本做 2 个复孔。定量 PCR 反应体系(试剂购自大连宝生物有限责任公司): (1) Premix Ex Taq(Probe qPCR) (2 ×) 10 μL; (2) 上游引物 (10 μM) 0.4 μL; (3) 下游引物 (10 μM) 0.4 μL; (4) 荧光探针溶液 0.8 μL; (5) ROX Reference Dye II (50 ×) 0.4 μL; (6) cDNA 模板 2 μL; (7) 灭菌蒸馏水(dH₂O) 6 μL。总反应体积 20 μL。PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 34 s, 共 40 个循环。反应结束后,由软件自动记录荧光曲线并分析计算出 Ct 值,优化 PCR 反应体系及条件使 E2A-PBX1 和 ABL 具有相同的 PCR 扩增效率且接近 100% 时, E2A-PBX1 mRNA 的相对表达量由公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 得出^[7], 其中 $\Delta\Delta Ct = (\text{样品 Ct 均值} - \text{内参 Ct 均值}) - (\text{对照样品 Ct 均值} - \text{对照内参 Ct 均值})$ 。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,多个样本比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验,两样本比较采用 Mann-Whitney U 秩和检验,率的比较采用四格表精确概率法,无病生存率比较采用 Kaplan-Meier 生存分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓 E2A-PBX1 基因的表达水平

11 例 ALL 患儿初治期和复发期的 E2A-PBX1 基因表达水平均显著高于缓解期及对照组儿童(初治期 vs 缓解期, $U = -3.974, P < 0.001$; 复发期 vs 缓解期, $U = -2.572, P = 0.005$; 初治期 vs 对照组, $U = -3.874, P < 0.001$; 复发期 vs 对照组, $U = -2.539, P = 0.007$)。11 例 ALL 患儿的初治期与复发期 E2A-PBX1 基因表达水平差异无统计学意义 ($U = -0.312, P = 0.051$)。见表 1。

表 1 ALL 患儿不同时期及对照组儿童 E2A-PBX1 融合基因水平的比较 $P_{50} (P_{25}, P_{75})$

组别	例数	E2A-PBX1
对照组	10	0.167 (0.010, 0.237)
初治期	11	2.297 (1.149, 3.482) ^a
缓解期	11	0.250 (0.203, 0.467)
复发期	3	1.866 (1.231, 2.462) ^a
H 值		25.967
P 值		< 0.001

a: 与缓解期及对照组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 动态监测 11 例 ALL 患儿的 MRD 水平

诱导治疗第 33 天, 11 例 E2A-PBX1 基因阳性患儿均获得骨髓完全缓解, 但 RQ-PCR 检测仍有 5 例 E2A-

PBX1 基因阳性 ($>$ 正常对照组的 P_{75}), 6 例阴性。E2A-PBX1 基因阳性的 5 例患儿均在强化治疗及维持治疗后 E2A-PBX1 水平下降, 但其中 3 例复发, 这 3 例中 1 例患儿在诱导缓解后 6 个月时 E2A-PBX1 水平又异常升高后 1 个月复发, 1 例在维持治疗时 (诱导缓解后 18 个月) E2A-PBX1 水平升高后复发, 同时并发脑膜白血病, 1 例在停药后 2 个月 E2A-PBX1 水平再上升后 2 个月并发脑膜白血病后复发。余 2 例基因阳性患儿和 3 例阴性患儿在诱导治疗第 33 天 (阴性 6 例中 3 例在 30、36 及 56 个月失访) 至随访截止时间 E2A-PBX1 水平均在正常低水平。见图 1~3。

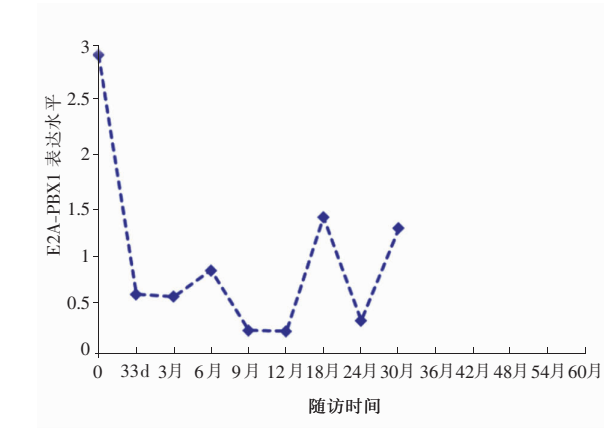


图 1 复发组化疗后患儿 MRD 均数动态变化 ($n=3$)

2.3 E2A-PBX1 基因水平与复发率和无病生存率的关系

诱导缓解第 33 天 E2A-PBX1 阳性 ($>$ 对照组的 P_{75}) 5 例, 其中 3 例复发, 复发率为 60%; E2A-PBX1 阴性 ($<$ 对照组的 P_{75}) 6 例均未复发, 2 组复发率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.161, P = 0.013$)。到截止随访时间, 阳性表达组患儿无病生存率显著低于阴性表达组 ($P = 0.0255$)。

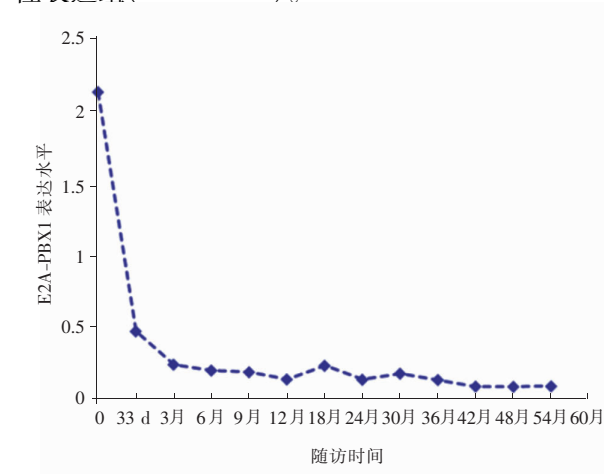


图 2 阳性组化疗后未复发患儿 MRD 均数动态变化 ($n=2$)

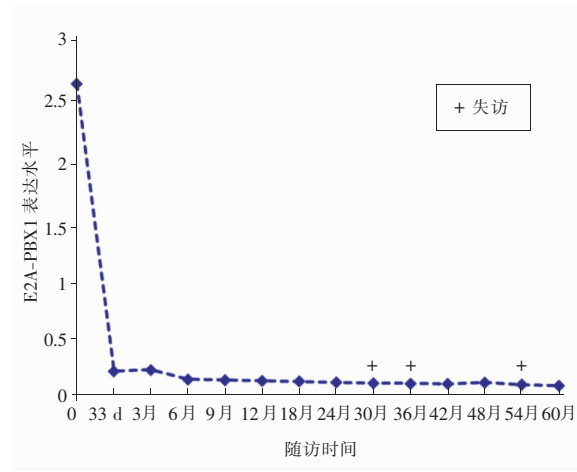


图 3 阴性组化疗后患儿 MRD 均数动态变化 ($n=6$)

3 讨论

儿童 ALL 总体预后良好, 但存在 10%~20% 患儿复发, MRD 的存在是儿童白血病复发的根源, 目前检测儿童白血病 MRD 的方法有传统形态学、细胞遗传学、免疫学、分子生物技术。本研究建立了 TaqMan 探针法的 RQ-PCR, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法检测 E2A/PBX1 基因的 mRNA 水平。传统 PCR 是到达平台期后进行检测, 则检测重复性差, 无法直接从终点产物量推算出起始模板量。RQ-PCR 技术有效地解决了传统定量只能终点检测的局限, 在 PCR 体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 实现了每一轮循环均检测一次荧光信号的强度, 大大地提高了灵敏度, 可检测 10^{-5} ~ 10^{-6} 以上, 且重复性好。其中 TaqMan 荧光探针技术特异性好, 假阳性低, 是在进行特异性引物扩增时加入特异的荧光探针进行杂交, 特异的探针可识别靶序列中单个碱基的错配、缺失或突变^[8]。

融合基因在白血病的病程中较为稳定, 不易发生克隆演变和表型转换, E2A-PBX1 在儿童 ALL 中较常见, 可作为标志基因用于 MRD 的检测。本研究中 E2A-PBX1 阳性的患儿占本院同期收治的 B 细胞-ALL 的 16% (11/68), 与 Kager 等^[1] 报道有差别, 但与左英熹等^[9] 报道相似。

特异的染色体易位是白血病的临床诊断、检测治疗、发病机制的分子学基础。E2A-PBX1 融合基因的 E2A 作为转录因子, 通过与 PBX1 的同源异型盒 DNA 结合域形成嵌合型转录因子, 从而有促进转录激活的作用^[10]。本研究发现 ALL 患儿初诊时 E2A-PBX1 融合基因水平高, 完全缓解后水平下降,

复发时升高,提示 E2A-PBX1 融合基因可能具有促肿瘤作用。

动态追踪初治 11 例 E2A-PBX1 融合基因阳性的患儿,虽第一次诱导缓解后第 33 天骨髓形态均达完全缓解,但 RQ-PCR MRD 检测有 5 例阳性,骨髓细胞形态学敏感度在 10^{-2} 左右,比 RQ-PCR 方法要低于 10 的 2 个数量级,表明 RQ-PCR 方法比骨髓形态学更灵敏,更具优越性。RQ-PCR 监测 5 例阳性患儿的 MRD 水平均在强化治疗后下降,但其中 3 例分别在开始治疗后 7 个月、18 个月、停药后 E2A-PBX1 水平显著升高而复发,这 3 例中的 2 例分别在骨髓复发前提前 1 个月和 2 个月 MRD 水平升高,表明 E2A-PBX1 水平异常升高提示骨髓复发高风险。

本研究第一次诱导缓解第 33 天在分子水平患儿并未 100% 完全缓解,有 45% 的患儿 MRD 水平较高,表明早期白血病残留病灶的清除及对治疗的反应是迟缓的,存在异质性。将第 33 天 MRD 分为两组,E2A-PBX1 阳性组复发率较高,无病生存率与阴性组比较显著降低,表明第 33 天 E2A-PBX1 mRNA 水平具有判断患儿预后的价值,此时高表达则提示预后较差,有助于临床早期发现易复发的高危人群,指导个体化治疗。这虽与高超等^[11]报道不同,可能与不同的强化治疗方案有关,但与 Bruggemann 等^[12]报道较一致,尚待扩大标本量及延长随访时间进一步研究。

实时荧光定量 PCR 检测患儿 E2A-PBX1 融合基因水平,用于 MRD 的检测对评估融合基因阳性患儿的治疗反应和预后及指导个体化治疗尤为重要,诱导缓解第 33 天是判断预后的重要时间点,此时 MRD 高水平表达提示患儿预后差。

[参 考 文 献]

[1] Kager L, Lion T, Attarbaschi A, Koenig M, Strehl S, Haas OA, et al. Incidence and outcome of TCF3-PBX1-positive acute lympho-

blastic leukemia in Austrian children[J]. *Haematologica*, 2007, 92(11): 1561-1564.

[2] Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(15): 1535-1548.

[3] 中华医学会儿科学分会血液学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 小儿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, 5(37): 305-307.

[4] 中华医学会儿科学分会血液组, 中华儿科杂志编辑委员会. 儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第三次修订草案)[J]. *《中华儿科杂志》*, 2006, 44(5): 392-395.

[5] Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program[J]. *Leukemia*, 2003, 17(12): 2474-2486.

[6] Gabert J, Beillard E, van der velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—a Europe Against Cancer Program [J]. *Leukemia*, 2003, 17(12): 2318-2357.

[7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

[8] Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction[J]. *Mol Aspects Med*, 2006, 27(2-3): 95-125.

[9] 左英熹, 张乐萍, 陆爱东, 王彬, 刘桂兰. 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.

[10] Scheele JS, Kolanczyk M, Gantert M, Zemojtel T, Dorn A, Sykes DB, et al. The Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase complex interaction motif of E2a is essential for a subset of transcriptional and oncogenic properties of E2a-Pbx1[J]. *Leuk Lymphoma*, 2009, 50(5): 816-828.

[11] 高超, 李志刚, 赵玮, 吴敏媛. 儿童急性淋巴细胞白血病 E2A-PBX1 融合基因的表达水平与临床特点、早期治疗反应的相关性[J]. *中国实验血液学杂志*, 2008, 16(3): 569-573.

[12] Bruggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottmann OG, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008[J]. *Leukemia*, 2010, 24(3): 521-535.

(本文编辑:钟乐)