

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.04.001

论著·临床研究

PAX5 缺失对于儿童无特殊重现染色体异常 B 系急性淋巴细胞白血病的预后意义

刘晓明 张丽 阮敏 刘天峰 张家源 刘芳 戚本泉 陈晓娟
王书春 杨文钰 郭晔 邹尧 陈玉梅 竺晓凡

(中国医学科学院北京协和医学院 / 血液病医院血液学研究所 / 儿童血液病诊疗中心, 天津 300020)

[摘要] **目的** 初步了解 PAX5 缺失在无特殊重现染色体异常的 B 系急性淋巴细胞白血病 (B-ALL) 患儿中的发生情况, 并进一步分析 PAX5 基因缺失与 ALL 预后的相关性。**方法** 用多重连接探针扩增 (MLPA) 技术检测 2008 年 4 月至 2013 年 4 月初诊无特殊重现染色体异常的 B-ALL 患儿及对照组 (同期非血液系统疾病及肿瘤儿童) 的 PAX5 基因拷贝数情况。根据有无 PAX5 基因缺失分为缺失组和非缺失组。**结果** 86 例患儿中 18 例 (21%) 发生了 PAX5 缺失。缺失组初诊时白细胞总数明显高于非缺失组 ($P=0.001$)。Kaplan-Meier 法分析显示: 缺失组无病生存 (DFS) 率明显低于非缺失组 (0.69 ± 0.12 vs 0.90 ± 0.04 , $P=0.017$), 但两组患儿的总生存 (OS) 率差异无统计学意义 ($P=0.128$)。Cox 法分析显示, PAX5 缺失为影响 DFS 的不利因素 ($P=0.03$)。**结论** PAX5 缺失为无特殊重现染色体异常 B-ALL 患儿 DFS 的独立危险因素。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18(4): 287-291]

[关键词] PAX5; B-急性淋巴细胞白血病; 多重连接探针扩增; 预后; 儿童

Significance of PAX5 deletion in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia without reproducible chromosomal abnormalities

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

Abstract: Objective To identify the incidence of PAX5 deletion in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) without reproducible chromosomal abnormalities and to investigate the association between PAX5 abnormalities and prognosis of ALL. **Methods** Multiplex ligation-dependent probe amplification was used to determine the copy numbers of PAX5 gene in children newly diagnosed with B-ALL without reproducible chromosomal abnormalities between April 2008 and April 2013 and controls (children with non-hematologic diseases or tumors). The patients were classified into deletion group and non-deletion group based on the presence of PAX5 deletion. **Results** Eighteen (21%) out of 86 children with B-ALL had PAX5 deletion. The deletion group had a significantly higher total white blood cell count at diagnosis than the non-deletion group ($P=0.001$). The Kaplan-Meier analysis demonstrated that the deletion group had a significantly lower disease-free survival (DFS) rate than the non-deletion group (0.69 ± 0.12 vs 0.90 ± 0.04 ; $P=0.017$), but there was no significant difference in the overall survival rate between the two groups ($P=0.128$). The Cox analysis showed that PAX5 deletion was a risk factor for DFS ($P=0.03$). **Conclusions** PAX5 deletion is an independent risk factor for DFS in B-ALL children without reproducible chromosomal abnormalities.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(4): 287-291]

Key words: PAX5; B-lineage acute lymphoblastic leukemia; Multiplex ligation-dependent probe amplification; Prognosis; Child

[收稿日期] 2016-01-14; [接受日期] 2016-02-23

[基金项目] 天津市科技支撑计划 (12ZCDZSY18100); 国家自然科学基金项目 (81470339, 81170470)。

[作者简介] 刘晓明, 女, 博士, 主治医师。

[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) 是儿童时期发病率最高的恶性疾病,也是导致儿童死亡的主要原因。近年研究发现,儿童 ALL 的预后除了主要与发病年龄、初诊时白细胞数、基因分型、治疗反应等密切相关以外,患儿治疗后体内残存的微小残留病 (minimal residual disease, MRD) 对于预后也有着至关重要的影响^[1-2]。染色体异常是白血病的关键致病因素,也是 MRD 监测的重要靶点,但对于无特殊重现染色体异常 (即无 TEL/AML1, MLL/AF4, E2A/PBX1, BCR/ABL 等融合基因及对应染色体异常) 的 ALL 患儿 MRD 的监测需要进一步寻找靶点。基因序列的突变、基因拷贝数的变异以及与淋巴系统发育、细胞周期、肿瘤抑制相关的基因杂合性缺失等都对 ALL 患儿的预后有重要的影响^[3-4], 可以作为新的预后监测靶点。

PAX5 属于高度保守的 paired-box (PAX) 结构家族,位于 9 号染色体短臂 1 区 3 带 (9p13), 是该家族中唯一在造血系统表达的成员,主要表达于 B 细胞分化发育的特定阶段,是 B 细胞分化和发育中起重要作用的转录因子^[5-6]。在 ALL 中, PAX5 基因突变、表达特征及其对临床预后生存的意义报道不一,且主要集中于基础研究或成人^[7-8]。关于 PAX5 基因拷贝数异常在儿童无特殊重现染色体异常 B-ALL 中的发生情况及临床意义国内外鲜有报道。

为了解 PAX5 基因拷贝数异常在无特殊重现染色体异常 B-ALL 患儿中的异常情况及该变化对预后的影响,我们应用多重连接探针扩增 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 技术,对 2008 年 4 月至 2013 年 4 月期间于我中心接受 CCLG-2008 方案治疗的 86 例非重现染色体异常 B-ALL 患儿初诊时的 DNA 标本进行检测,并回顾性分析该部分患儿的临床特点及预后。加深对我国非重现染色体异常 B-ALL 患儿发病特点的了解,寻找更加敏感实用的 MRD 监测指标,进一步提高儿童 ALL 的疗效。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2008 年 4 月至 2013 年 8 月期间,我

院初诊并可获得足够骨髓 DNA 量的无特殊重现染色体异常 (即无 TEL/AML1, MLL/AF4, E2A/PBX1, BCR/ABL 等融合基因及对应染色体异常) 的 B-ALL 患儿共 86 例。所有患儿均满足中国儿童白血病 ALL2008 方案 (Chinese Children Leukemia Group, CCLG-ALL2008) 纳入标准^[9-11]。同时选取 10 例非血液系统疾病及肿瘤或者造血干细胞移植供体儿童作为对照。本研究获得研究对象监护人的知情同意。

1.2 诊断、分型及治疗反应评判

诊断、分型及治疗反应标准参照 1987 年全国白血病化疗讨论会制定的标准及 CCLG-2008 化疗方案^[10-12]。中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 状态分级^[10-11] 主要依据临床表现、影像学改变、脑脊液流式细胞术或细胞形态学 (离心涂片法) 检测,分为 CNS1 状态 (无中枢神经系统白血病细胞,无中枢神经系统异常的临床表现,无中枢神经系统异常的影像学依据)、CNS2 状态 (脑脊液可见明确的白血病细胞或初次腰穿脑脊液混有红细胞) 及 CNS3 状态 (中枢神经系统白血病)。强的松治疗试验^[10-11]: 强的松治疗第 8 天外周血白血病细胞 $<1000/\mu\text{L}$ 为早期治疗反应好; 反应不良: 外周血白血病细胞 $\geq 1000/\mu\text{L}$ 。

1.3 MRD 检测

应用流式细胞检测技术检测患儿诱导治疗中 (15 d), 诱导治疗后 (33 d) 和巩固治疗期间 (90 d) 骨髓肿瘤细胞残留情况。

1.4 MLPA 检测

取肝素抗凝骨髓 3~5 mL, 经 PBS 稀释后, 用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离骨髓单个核细胞 (mononuclear cell, MNC), 1100~1200 转/min, 离心 11~12 min。吸取中间细胞层, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 2 次, 800~1000 转/min, 离心 7~8 min, 弃上清。计数细胞后分装, -20°C 冰箱冻存备用。按试剂盒步骤提取 DNA。按照 SALSA MLPA probemix P335-B2 ALL-IKZF1 试剂盒 (荷兰 MRC-Holland 公司) 说明书进行 PAX5 外显子 (PAX5-1、PAX5-2、PAX5-5、PAX5-6、PAX5-7、PAX5-8、PAX5-10) 拷贝数缺失情况检测。所得结果通过 GeneMapper 4.0 软件和 Coffalyser 软件进行半定量分析^[13]。根据有无 PAX5 缺失将 86 例患儿分成缺失组和非缺

失组。PAX5 基因 7 个待检外显子中任意 1 个或多个外显子发生缺失者进入“缺失组”；而 PAX5 基因无任何拷贝数缺失者进入“非缺失组”。

1.5 统计学分析

所有统计学分析均应用 SPSS 17.0 软件完成。计量资料采用 *t* 检验；计数资料采用卡方检验，生存曲线采用 Kaplan-Meier 分析，多因素分析采用 COX 回归分析， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。无病生存期 (disease-free survival, DFS) 指患者从获得 CR 开始至复发或死亡的时间。总生存 (overall survival, OS) 期：自诊断到死亡或末次随访的时间。随访截至 2015 年 10 月 31 日，失访者截止至失访日期。

2 结果

2.1 临床特征及 PAX5 缺失情况比较

86 例患儿中男 62 例、女 24 例，中位年龄 5.5 (1.0~15.0) 岁。18 例 (20.9%) 发生了 PAX5 缺失，具体缺失类型见表 1。86 例患儿中缺失组 18 例、非缺失组 68 例。缺失组患儿初诊时白细胞计数明显高于非缺失组 ($P < 0.05$)；而两组患儿在性别、年龄、初诊时脑脊液状态、强的松治疗试验以及第 15 天、33 天、12 周骨髓 MRD 等方面，差异均无显著性 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 18 例 PAX5 缺失患儿具体缺失情况一览表 (%)

PAX5 外显子缺失情况	例数	发生率
待检外显子 (1,2,5,6,7,8,10 外显子) 均缺失	5	28
1,5,7 号外显子缺失	3	17
1,2,5,6,7 号外显子缺失	1	6
1,2,6,7,8,10 号外显子缺失	1	6
1,5,7,8,10 号外显子缺失	1	6
5,7 号外显子缺失	1	6
7,8,10 号外显子缺失	1	6
5,7,8 号外显子缺失	1	6
6,8,10 号外显子缺失	1	6
单纯 1 号外显子缺失	1	6
单纯 6 号外显子缺失	1	6
单纯 7 号外显子缺失	1	6
合计	18	100

表 2 缺失组与非缺失组临床特征比较 [例 (%)]

临床特征	缺失组	非缺失组	χ^2 值	<i>P</i> 值
总	18(100)	68(100)		
性别				
男	13(72)	49(72)	0.001	0.989
女	5(28)	19(28)		
年龄 (岁)				
1~10	14(78)	60(88)	1.296	0.266
≥ 10	4(22)	8(12)		
CNS				
CNS 1	17(94)	64(94)	0.003	0.958
CNS 2	1(6)	4(6)		
CNS 3	0(0)	0(0)		
初诊白细胞数 ($\times 10^9/L$)				
< 50	12(67)	60(88)	4.858	0.028
≥ 50	6(33)	8(12)		
强的松试验				
反应良好	11(61)	58(85)	3.773	0.079
反应不良	6(33)	10(15)		
不详	1(6)	0(0)		
MRD (d15)				
MRD < 0.05	8(44)	33(49)	1.803	0.614
$0.05 \leq \text{MRD} < 0.25$	2(11)	14(21)		
$\text{MRD} \geq 0.25$	5(28)	11(16)		
不详	3(17)	10(15)		
MRD (d33)				
MRD < 0.0001	9(50)	39(57)	2.251	0.524
$0.0001 \leq \text{MRD} < 0.01$	6(33)	18(27)		
$\text{MRD} \geq 0.01$	2(11)	4(6)		
不详	1(6)	7(10)		
MRD (d90)				
MR < 0.0001	14(78)	52(77)	0.370	0.946
$0.0001 \leq \text{MRD} < 0.001$	0(0)	1(2)		
$\text{MRD} \geq 0.001$	1(6)	5(7)		
不详	3(17)	10(15)		

2.2 预后及相关因素比较

Kaplan-Meier 法分析显示：缺失组的 DFS 明显低于非缺失组 (0.69 ± 0.12 vs 0.90 ± 0.04 , $P = 0.017$)，但两组的 OS 无明显差异 (0.83 ± 0.09 vs 0.94 ± 0.03 , $P = 0.128$)，见图 1~2。Cox 法分析显示，在排除了年龄、性别、初诊时白细胞总数、初诊时脑脊液状态、强的松试验以及第 15 天、第 33 天、第 12 周骨髓 MRD 等因素后，PAX5 缺失仍为影响患儿 DFS 的不利因素 ($P = 0.03$)，见表 3；但对患儿的 OS 无明显影响， $P > 0.05$ 。

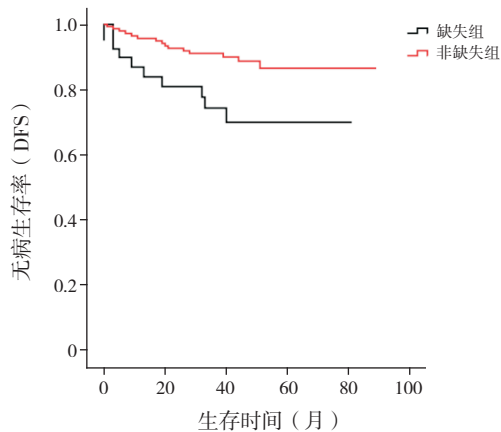


图 1 缺失组与非缺失组 3 年 DFS 比较

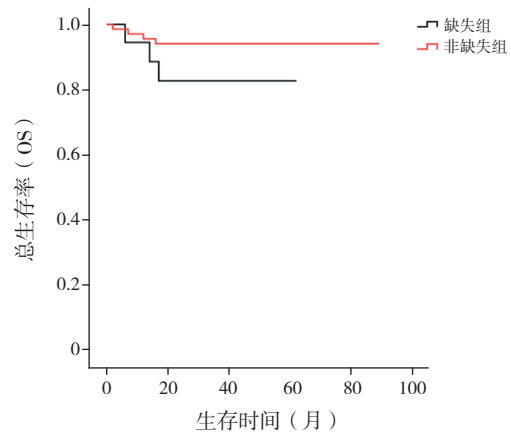


图 2 缺失组与非缺失组的 3 年 OS 比较

表 3 Cox 法分析 PAX5 缺失对无特殊重现染色体异常 B-ALL 患儿 DFS 的影响

变量	B	SE	卡方值	P 值	危险系数	95% CI	
						下限	上限
PAX5 缺失	-3.499	1.612	4.709	0.030	0.030	0.001	0.713
性别	-0.217	0.822	0.070	0.791	0.805	0.161	4.032
年龄	0.273	0.132	4.261	0.039	1.314	1.014	1.703
CSF 状态	5.160	1.833	7.923	0.005	174.112	4.792	6325.707
初诊白细胞总数	-0.002	0.009	0.054	0.817	0.998	0.979	1.016
激素是否敏感	5.016	1.478	11.522	0.001	150.789	8.328	2730.112
MRD (d15)	-0.180	0.477	0.143	0.705	0.835	0.328	2.127
MRD (d33)	1.311	0.553	5.612	0.018	3.708	1.254	10.967
MRD (d90)	0.901	0.398	5.133	0.023	2.463	1.129	5.372

3 讨论

急性淋巴细胞白血病是儿童最常见的白血病类型，其发病机制目前尚未完全阐明。在 B 细胞的定向分化和发育中，PAX5 是关键转录因子，其可通过编码 B 细胞特异性激活蛋白激活多种 B 细胞特异性基因转录表达，并抑制非 B 系细胞基因，从而在 B 细胞早期定向分化发育中起着重要的调控作用。若 PAX5 失活，可导致成熟 B 细胞去分化至幼稚阶段，从而促进白血病发生^[5]。因此，PAX5 在儿童急性淋巴细胞白血病中的作用日益引起人们的关注。本研究显示，86 例患儿中有 18 例发生了 PAX5 缺失，缺失率为 20.9%，稍低于 Ribera 等^[14]报道的成人及青年 PAX5 缺失率（34%），接近于 Stasevich 等^[15]应用单核苷酸多态性检测的儿童无特殊融合基因异常的 B-ALL 患儿 PAX5 的缺失率（27.9%）。两组患儿临床特征比较显示，缺失组患儿初诊时白细胞计数明显高

于非缺失组。提示 PAX5 缺失患儿的肿瘤细胞增殖速度可能高于非 PAX5 缺失患儿。那么，该部分患儿治疗是否宜选用更为紧凑的方案有待于进一步研究。两组患儿在性别、年龄、初诊时脑脊液状态、强的松治疗试验情况以及第 15 天、33 天、12 周骨髓 MRD 上均无明显差异。提示 PAX5 缺失对于无重现染色体异常 B-ALL 患儿可能是独立于上述因素之外的预后因素。应用 Kaplan-Meier 法及 Cox 法分析均显示 PAX5 的缺失不利于患儿的 DFS，再次证实了 PAX5 缺失在无特殊重现染色体异常 B-ALL 患儿预后中的意义。但是它对于患儿 OS 的影响虽有一定趋势，但无显著性差异。可能与随访年限较短，病例数量有限及整体医疗水平提高导致复发患儿仍可以有较长时间的生存期有一定关系。延长随访时间、扩大研究样本有望得到关于 OS 的更加有指导意义的结论。另外，由于我国染色体检测存在一定的缺陷，不是所有存在染色体异常的患儿均能准确地被检测出来，因此，

我们采用聚合酶链式反应、荧光原位杂交技术,及染色体核型分析等多种检测手段对患儿融合基因及染色体进行检测,均无特殊异常者方界定为无特殊重现染色体异常患儿,在一定程度上弥补了染色体异常检出率低的欠缺。

综上所述,无特殊重现染色体异常 B-ALL 患儿存在一定比例的 PAX5 缺失,该基因缺失往往提示患儿具有较高的白细胞水平及较短的缓解期。适当缩短化疗间期、加强化疗强度可能有望延长这部分患儿的缓解时间,为其争取更多的治疗机会,得到更加满意的治疗效果。

[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] Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study[J]. *Blood*, 2010, 115(16): 3206-3214.
- [3] 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.
- [4] Zhang J, Mullighan CG, Harvey RC, et al. Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group[J]. *Blood*, 2011(11), 118: 3080-3087.
- [5] Shahjehani M, Norozi F, Ahmadzadeh A, et al. The role of Pax5 in leukemia: diagnosis and prognosis significance[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(1):360.
- [6] Cozma D, Yu D, Hodawadekar S, et al. B cell activator PAX5 promotes lymphomagenesis through stimulation of B cell receptor signaling[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(9): 2602-2610.
- [7] 郑积富,董莎莎,王谦,等.伴有 9p 异常的急性 B 淋巴细胞白血病患者 PAX5 基因重排及缺失的研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2013, 30(5): 549-552.
- [8] Teo AE, Chen Z, Miranda RN, et al. Differential PAX5 levels promote malignant B-cell infiltration, progression and drug resistance, and predict a poor prognosis in MCL patients independent of CCND1[J]. *Leukemia*, 2016, 30(3): 580-593.
- [9] 秘营昌,卞寿庚.急性淋巴细胞白血病[M]//张之南,沈悝.血液病诊断及疗效标准.第3版.北京:科学出版社,2007: 116-121.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 秘营昌,卞寿庚.急性白血病[M]//张之南,沈悝.血液病诊断及疗效标准.第3版.北京:科学出版社,2007: 131-134.
- [13] Dörge P, Meissner B, Zimmermann M, et al. IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol [J]. *Haematologica*. 2013, 98(3): 428-432.
- [14] Ribera J, Morgades M, Zamora L, et al. Prognostic significance of copy number alterations in adolescent and adult patients with precursor B acute lymphoblastic leukemia enrolled in PETHEMA protocols[J]. *Cancer*. 2015, 121(21): 3809-3817.
- [15] Stasevich I, Inglott S, Austin N, et al. PAX5 alterations in genetically unclassified childhood Precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Br J Haematol*, 2015, 171(2): 263-272.

(本文编辑:俞燕)