

新疆维吾尔自治区60例慢性淋巴细胞白血病遗传学分析

刘虹 李燕 王晓敏 张玥玥

The genetics and prognostic analysis of 60 patients with chronic lymphocytic leukemia in Xinjiang Liu Hong, Li Yan, Wang Xiaomin, Zhang Yueyue

Corresponding author: Wang Xiaomin, Department of Hematology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China. Email: wangxiaoming@medmail.com.cn

慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) 是一种成熟B淋巴细胞克隆增殖性肿瘤,其遗传学特征对疾病的发生、发展及预后具有重要意义。CLL的发病率在不同国家有很大差别,欧美和北美地区CLL占有白血病的25%~40%,而在亚洲地区CLL仅占白血病的5%以下^[1],体现出一定的种族差异性。鉴于维吾尔族具有独特而复杂遗传背景^[2],且CLL发病率较高,推测维吾尔族CLL患者的遗传学特征可能与汉族患者存在一定的差异,故我们收集新疆维吾尔族和汉族CLL患者各30例开展此项前瞻性临床研究,分析并比较其常规细胞遗传学(CC)及FISH结果,以了解维吾尔族CLL患者遗传学特征与汉族患者有无差异性。

对象与方法

一、研究对象

收集2013年4月至2015年4月确诊为CLL的60例初诊患者,每例患者均行血常规、骨髓细胞形态学、骨髓活检、染色体核型分析、FISH检测、流式细胞术及超声检查等。诊断与分期均参照《中国慢性淋巴细胞白血病的诊断与治疗指南(2011年版)》^[3]。每例患者要求至少2代人在新疆居住生活。其中汉族30例,维吾尔族30例;男性35例(汉族19例、维吾尔族16例),女性25例(汉族11例、维吾尔族14例),男女比例为1.4:1;中位年龄为70(30~86)岁,≥60岁46例(76.7%),<60岁14例(23.3%)。临床分期按照CLL Binet分期方法,A期18例(30.0%),B期20例(33.3%),C期22例(36.7%);按照Rai分期方法,0期4例(6.7%),1期13例(21.7%),2期21例(36.70%),3期7例(11.7%),4期15例(25.0%);按修改后的Rai分期标准分为低危4例(0期),中危

34例(1、2期),高危22例(3、4期)。随访日期截至2016年3月。

二、检测方法

1. 染色体标本制备:行CPG-ODN刺激法制备染色体^[4]。取患者骨髓液5 ml置于肝素抗凝管中,按照细胞密度为(2~3)×10⁶/ml接种于含20%新生小牛血清的RPMI 1640培养液内,加CPG-ODN刺激剂,37℃培养96~108 h,终止培养前3 h加入秋水仙碱,再以0.075 mmol/L氯化钾溶液低渗处理30 min,用3:1的甲醇、冰醋酸溶液反复固定3次,火焰固定法制片,用R显带技术(87.5℃加热法)进行显带,吉姆萨染色,光学显微镜下分析染色体核型。每例患者分析20个中期分裂象,核型分析按照人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN)2009的有关规定加以描述。至少有2个细胞有同样的染色体增加或结构异常,或至少有3个细胞有一致的染色体丢失确认为1个异常克隆,具有3个或3个以上不相关的异常克隆[除外合并存在t(8;21)、t(15;17)、t(9;22)等异常]确定为复杂核型。

2. FISH检测:采用组合CLL FISH探针试剂盒:13q14(D13S25、Rb1)、11q23(ATM)、17p13(p53)、12号染色体着丝粒(CSP12)。探针购自北京金菩嘉医疗科技有限公司,依据说明书进行操作:分别加入光谱绿标记的GLP p53探针、GLP Rb1和光谱红标记的GLP D13S25探针、GLP ATM探针、CSP 12探针,进行变性杂交、快速洗脱、复染后,用OLYMPUS BX51荧光显微镜在DAPI/FITC/TRITC三色滤光镜激发下观察中期和间期细胞荧光杂交信号。正常骨髓细胞见2对红色(2R)或2对绿色(2G)荧光信号,CLL患者中异常典型的阳性信号为p53缺失:1G(绿色)、Rb1:缺失1G(绿色)、D13S25缺失:1R(红色)、ATM缺失:1R(红色)、12号三体:3R(红色)。计数200个细胞,计算异常细胞所占的百分率。结果分析时随机计数血液样本细胞。计数细胞必须是各通道信号均清晰可辨的细胞。细胞核轮廓不清或有重叠的不计数。杂交不均匀的区域不计数。以10名健康人为对照组,制备玻片及进行FISH实验。每份样本至少分析200个细胞,计算出显示异常信号的细胞数、百分比的平均值及标准差,异常阈值定义为平均值+3倍标准差。每例样本随机计数200个细胞,如果显示异常信号细胞比例的检测值大于异常阈值,判定为阳性结果;如果显示异常信号细胞比例的检测值小于异常阈值,判定为阴性结果。如果显示异常信号细胞比例的检测值接近异常阈值,加数至1 000个细胞。

三、治疗

治疗指征及治疗方法参见《中国慢性淋巴细胞白血病的

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.11.014

基金项目:国家自然科学基金(81640033);新疆维吾尔自治区人民医院科研项目(20130247)

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院血液科

通信作者:王晓敏,Email:wangxiaoming@medmail.com.cn

诊断与治疗指南(2011年版)》^[3]。

四、统计学处理

所有数据采用SPSS 17.0软件,核型和基因异常率比较、累及基因数在低中危/高危组分布差异采用卡方检验,Kaplan-Meier法计算生存率并绘制生存曲线,核型和各基因组正常与异常患者间的中位生存时间比较采用Log-rank检验。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

五、伦理审查

本研究于2013年通过我院伦理委员会审批,每例入选患者均签署知情同意书。

结 果

1. 一般比较:60例CLL患者,汉族和维吾尔族患者各30例,年龄 ≥ 60 岁各23例, <60 岁各7例。汉族男性19例,女性11例;维吾尔族男性16例,女性14例,比较汉族与维吾尔族的年龄及性别分布差异无统计学意义($\chi^2=0.0$, $P=0.619$; $\chi^2=0.617$, $P=0.300$)。汉族在低中危、高危组分别为20、10例,维吾尔族在低中危、高危组分别为18、12例,汉族与维吾尔族患者在低中危/高危组中分布差异无统计学意义($\chi^2=0.287$, $P=0.789$)。

2. CC核型结果:60例CLL患者中染色体异常检出率为31.7%(19/60)。正常/异常核型在汉族/维吾尔族CLL患者中分布差异无统计学意义($\chi^2=0.077$, $P=1.000$)。正常核型在低中危、高危组分别为30、11例,而异常核型在两组中分别为8、11例,比较发现核型正常与异常在低中危/高危组中分布差异有统计学意义($\chi^2=5.396$, $P=0.042$)。异常核型中数目异常13.3%(8/60)、结构异常13.3%(8/60)、数目结构合并异常5%(3/60)。比较这几种异常在汉族/维吾尔族($\chi^2=0.858$, $P=0.887$)和低中危组/高危组($\chi^2=6.321$, $P=0.082$)中分布差异均无统计学意义。异常染色体主要涉及13号占15%(9/60),+12占15%(9/60),11号5%(3/60),1号3.3%(2/60),6、7、14、Y各1例。

3. I-FISH分析基因组异常:60例CLL患者中检出43例(71.7%)基因异常,其中D13S25阳性32例(53.3%),RB1阳性12例(20%),CSP12阳性8例(13.3%),ATM阳性8例(13.3%),P53阳性4例(46.7%);比较发现5种探针不同异常在汉族/维吾尔族、低中危/高危组CLL患者中分布差异均无统计学意义(P 值均 >0.05)。D13S25、RB1、ATM、P53、+12等异常信号细胞比例的检测值中位数分别为58%、62%、75%、46%、46%。

4. 染色体核型分析与FISH检测比较:60例CLL患者中CC检出19例(31.7%)异常,FISH检出43例(71.7%)异常,异常检出率FISH组明显高于CC组($\chi^2=7.288$, $P=0.006$)。19例CC检出异常者中18例被FISH检出,1例异常为组合探针外异常,FISH检测不能识别;41例CC检测为阴性者25例(61.0%)FISH检测出异常,D13S25阳性23例(38.3%),RB1阳性6例(10.0%),CSP12阳性未见,ATM阳性4例(6.7%),P53阳性1例(1.7%)。

讨 论

欧美国家CLL的发病率显著高于亚洲地区,中位发病年龄65~70岁,男性患者居多,具有显著的临床预后异质性^[3]。本研究发现汉族和维吾尔族CLL患者在年龄和性别分布上差异无统计学意义,中位发病年龄70岁,男性多于女性(男:女=1.4:1),与国内外报道相符。常规染色体核型分析仅20%的CLL患者可以检测到克隆性染色体异常,加用相关有丝分裂原刺激剂后有近50%的CLL患者可检测到染色体异常,FISH检测约有80%的CLL患者可检测到异常^[4-5],最常见的有del(13q14)、+12、del(11q23)、del(17P13)、del(6q23)。本研究加用CpG-寡脱氧核苷酸免疫刺激后,染色体核型异常检出率为31.7%,低于国内报道,考虑与病例数较少有关。染色体异常及FISH异常类型与相关报道基本一致。比较汉族和维吾尔族遗传学特征初步发现二者差异无统计学意义,可积累病例数进一步证实。

近年来大量研究表明,CLL患者染色体/基因异常与预后密切相关^[6],如单纯del(13q14)预后较好,生存期较长,不需要过多治疗干预;12号染色体三体的CLL患者的生存期和正常核型患者差异无统计学意义;P53缺失、ATM缺失率在疾病复发或恶性进展时较高,患者预后差,疾病进展快,生存期短^[7-8]。

CLL经典预后积分系统多以单纯化疗时代的分析结果总结而来,随着利妥昔单抗、Ibrutinib、ABT199等新型药物的临床应用,CLL患者的疗效和缓解度不断提高^[9-10],以流式细胞术、PCR技术和靶向基因测序为代表的敏感检测技术日渐成为评估CLL疗效的新手段。今后以微小残留病、分子生物学异常、综合预后评分为代表的新型预后指标将不断丰富和完善现有的CLL预后体系^[11]。

参 考 文 献

- [1] 张之南,郝玉书,赵永强,等.血液病学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2011:1014-1024.
- [2] 韩康信.新疆古代居民的种族人类学研究和维吾尔族的体质特点[J].西域研究,1991,2:1-13.
- [3] 中华医学会血液学分会.中国慢性淋巴细胞白血病的诊断与治疗指南(2011年版)[J].中华血液学杂志,2011,32(7):498-501. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2011.07.018.
- [4] 吴亚芳,薛永权,陈苏宁,等.应用CpG-寡脱氧核苷酸免疫刺激进行慢性淋巴细胞白血病的染色体研究.中华医学遗传学杂志,2010,27(1):86-91. doi: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2010.01.019.
- [5] 吴蔚,顾健,马莉,等.荧光原位杂交技术在慢性淋巴细胞白血病检测中的应用评估[J].中国实验血液学杂志,2012,20(5):1095-1098.
- [6] 黄瑛,范磊,徐卫,等.慢性淋巴细胞白血病疗效评估和预后研究进展:第56届美国血液学会年会报道[J].白血病·淋巴瘤,2015,24(1):20-22. doi: 10.3760/cma.j.issn.1009-9921.2005.01.007.
- [7] Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, et al. Chromosomal translo-

- cations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2006, 107:742-751. doi:10.1182/blood-2005-05-2093.
- [8] 刘洁,常进.慢性B淋巴细胞增殖性疾病各亚型的鉴别诊断[J]. *白血病.淋巴瘤*, 2014, 23(8):495-497. doi:10.3760/cma.j.issn.1009-9921.2014.08.013
- [9] 邱录贵.慢性淋巴细胞白血病治疗模式的转变[J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(4):275-277. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.04.002.
- [10] 曹蕾,范磊,徐卫,等.第56届美国血液学年会研究热点报道:慢性淋巴细胞白血病治疗研究进展[J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36(4):358-360. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.04.023.
- [11] Vasyutina E, Boucas JM, Bloehdorn J, et al. The regulatory interaction of EVI1 with the TCL1A oncogene impacts cell survival and clinical outcome in CLL [J]. *Leukemia*, 2015, 29:2003-2014. doi:10.1038/leu.2015.114.

(收稿日期:2016-04-08)

(本文编辑:董文革)

重型再生障碍性贫血异基因造血干细胞移植后EBV相关淋巴细胞增殖性疾病五例报告及文献复习

周健 韩利杰 祖璿玲 张奕莉 喻凤宽 符粤文
王倩 梁利杰 周虎 房佰俊 魏旭东 宋永平

EBV related post-transplantation lymphoproliferative diseases in patients with severe aplastic anemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: five cases report and literatures review Zhou Jian, Han Lijie, Zu Yingling, Zhang Yanli, Yu Fengkuan, Fu Yuewen, Wang Qian, Liang Lijie, Zhou Hu, Fang Baijun, Wei Xudong, Song Yongping

Corresponding author: Song Yongping, Department of Hematology Affiliated Cancer Hospital Zhengzhou University, Henan Tumor Hospital, Institute of Hematology Henan Province, Zhengzhou 450003, China. Email: songyongping@medmail.com.cn

异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)后的淋巴细胞增殖性疾病(PTLD)是一种少见的致命并发症,病死率高达90%以上^[1]。国内外有关重型再生障碍性贫血(SAA)allo-HSCT后PTLD的报道较少。我们回顾性分析我院allo-HSCT后发生EBV相关PTLD SAA患者的临床特征及转归,现报告如下。

病例与方法

1. 病例资料:回顾性分析2001年1月至2016年1月在我

院行allo-HSCT的57例SAA患者,其中男39例,女18例,中位年龄10(2~45)岁。SAA-I型21例,SAA-II型36例。同胞相合移植31例,亲缘不合移植2例,无关供者移植24例;外周血干细胞移植41例,骨髓移植2例,骨髓联合外周血干细胞移植10例,脐血移植4例。

2. 移植方案及移植后监测与处理:参照文献[2-3]。

3. PTLD的诊断标准:参照2009年欧洲白血病感染EBV相关性疾病诊断标准^[4]进行诊断,依据WHO 2008标准进行病理学诊断分型。

结 果

1. PTLD发病情况:57例行allo-HSCT的SAA患者中,5例(8.77%)患者经病理活检确诊为EBV相关PTLD,其中3例结合脑脊液EBV-DNA定量、中枢神经系统(CNS)影像学检查证实PTLD累及CNS。患者一般临床资料见表1。

2. PTLD临床表现和实验室诊断结果:①发病时间:5例患者PTLD均在移植后2~3个月发生,中位发病时间为移植后54(44~70)d,发病前患者均处于完全嵌合状态。②发热:5例患者均出现广谱经验性抗感染治疗无效的反复高热。③淋巴结肿大:5例患者均有浅表淋巴结进行性肿大,伴疼痛,颈部多见。④其他器官肿大:2例患者扁桃体肿大,3例脾脏肿大,1例肝脏肿大。⑤血常规:均有不同程度PLT下降,2例患者需输注血小板,3例患者出现不同程度WBC下降,其中1例发展至粒细胞缺乏。⑥CNS:3例患者出现CNS受累,例1和例2表现为肌肉痉挛,其中例1发展至昏迷,例5表现为双侧臀部和下肢疼痛,24 h内发展为瘫痪;MRI显示

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.11.015

作者单位:450003 郑州大学附属肿瘤医院,河南省肿瘤医院血液科,河南省血液病研究所

通信作者:宋永平,Email:songyongping@medmail.com.cn