

· 论 著 ·

正常核型成人 AML 患者 NPM1 基因突变及临床特征分析

周薇^{1,2}, 王汉平^{1,2*}, 应逸¹, 谢健晋¹, 陈晓燕¹

摘要:目的 探讨正常核型成人急性髓细胞白血病(AML)患者核仁磷酸蛋白 1(NPM1)基因突变情况,并分析 NPM1 突变阳性 AML 患者的临床特征。方法 采用高分辨溶解曲线(HRM)法检测正常核型成人 AML 患者 NPM1 基因突变,结合临床资料分析 NPM1 突变阳性的临床特征。结果 85 例正常核型成人 AML 中有 19 例出现 NPM1 突变,阳性率为 22.4%,NPM1 突变型患者分别为 M2 4 例,M4 5 例,M5 9 例,M6 1 例。NPM1 突变组女性占 52.6% (10/19),NPM1 野生型组女性占 31.8% (21/66),两组有统计学差异($P<0.05$),NPM1 突变组患者外周血白细胞(WBC)为 $(66.6 \pm 59.1) \times 10^9/L$,血小板(PLT)为 $(146.4 \pm 155.8) \times 10^9/L$,而 NPM1 野生型组患者外周血 WBC 为 $(44.1 \pm 40.1) \times 10^9/L$,PLT 为 $(71.8 \pm 46.1) \times 10^9/L$,两组间 WBC 有统计学差异($t=0.04$, $P<0.05$),PLT 差异无统计学意义,NPM1 突变组患者高表达 CD33、CD13、CD117,低表达 CD34。结论 NPM1 突变阳性的正常核型的成人 AML 在临床、病理以及免疫表型方面具有独特的特质,值得深入研究。

关键词:急性髓细胞白血病;正常核型;基因突变;NPM1

中图分类号:RR733.71 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)8-919-03

NPM1 mutations in 85 adult acute myeloid leukemia patients with normal karyotypes and their clinical features. ZHOU Wei, WANG Han-ping, YING Yi et al. (1. Guangzhou Municipal First People's Hospital, Guangzhou 510180 Guangdong P. R. China; 2. Guangdong Key Laboratory of Clinical Molecular Medicine and Diagnostics, Guangzhou 510180 Guangdong P. R. China)

Abstract: Objective To investigate the clinical features of NPM1 mutation in acute myeloid leukemia(AML) patients with normal karyotypes. Methods NPM1 mutations in 85 adult AML patients with normal karyotypes were detected by HRM technology. Results NPM1 positive mutations were detected in nineteen of eighty five patients (22.4%), including four AML-M2, five AML-M4, nine AML-M5 and one AML-M6. The proportion of female occupied 52.6% of NPM1 mutant patients and NPM1 wild-type patients occupied 31.8%, showing significant difference ($P<0.05$). WBC counts in NPM1 positive mutations was $(66.6 \pm 59.1) \times 10^9/L$ and PLT was $(146.4 \pm 155.8) \times 10^9/L$, while that of the NPM1 wild-type patients was $(44.1 \pm 40.1) \times 10^9/L$, $t=0.04$, $P<0.05$ and $(71.8 \pm 46.1) \times 10^9/L$, without significant difference ($P>0.05$). CD33、CD13、CD117 were highly and CD34 was lowly expressed in NPM1 mutant patients ($P<0.05$). Conclusion NPMc+AML account for nearly one-third of AMLs with normal karyotypes and have distinct genetic, pathologic, immunophenotypic, and clinical characteristics and that further studies are needed to figure it out.

Key word: Acute myeloid leukemia; Normal karyotype; Gene mutation; NPM1

急性髓细胞白血病是一组具有高度异质性的血液系统肿瘤,其独特的细胞遗传学和分子遗传学改变是分类的基础,对疾病诊断、预后分层、微小残留病变监测以及靶向治疗的开发等均具有极为重要的意义。核仁磷酸蛋白 1(NPM1)基因是 AML 中最为常见的突变基因之一,NPM1 突变阳性患者在遗传学、病理学、免疫学和临床方面具有独特的特征,以及相对良好的预后^[1],显示出这类患者作为一种特殊的 AML 亚型的特质。我们先前应用 HRM 技术建立了 NPM1 基因突变快速筛查的方法^[2]。现运用该方法检测近年来

收治的 85 例正常核型成人 AML 中 NPM1 基因突变情况,并结合临床资料对 NPM1 突变阳性患者的临床特征进行分析,报道如下。

1 对象与方法

1.1 对象 85 例正常核型成人 AML 患者,来自 2007 年 1 月~2012 年 3 月广州市第一人民医院,其中男 54 例,女 31 例,中位年龄 46(18~80)岁。M0 1 例,M1 7 例,M2 31 例,M4 10 例,M5 32 例,M6 3 例,M71 例。AML 诊断按照张之南主编的第 3 版《血液病诊断及疗效标准》进行^[3]。

作者单位:广州市第一人民医院血液科,广东广州 510180 2. 广东省临床分子医学及分子诊断重点实验室,广东广州 510180

作者简介:周薇(1977~),女,湖北省武汉市人,硕士研究生,主治医师,主要从事恶性血液病的治疗与诊断研究。

* 通讯作者: E-mail: whanping@gmail.com

1.2 方法 PCR 扩增及 HRM 分析使用 Texas BioGene 公司的 EZHigh™ DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA，具体操作步骤按试剂盒说明书进行，参照 NCBI 网站公布的 NPM1 基因序列(NC_000005.8)设计 PCR 扩增的正反向引物，设计的扩增片段长度为 217bp。操作步骤和实验条件参考文献^[4]。采用六色流式细胞仪(FACS Canto 流式细胞仪，美国 Becton Dickinson 公司)及荧光标记鼠抗人单克隆抗体，所用抗体包括 CD7-FITC、CD15-FITC、CD14-FITC、CD22-FITC、CD10-PE、CD117-PE、CD71-PE、CD38-PE、CD5-PE-Cy7、CD113-PE-Cy7、CD33-PE-Cy7、CD19-APC-Cy7、CD3-APC-Cy7、CD16-APC-Cy7、CD4-APC-Cy7 购自美国 Becton Dickinson 公司。CD34-PC5、HLA-DR-PC5、CD13-PC5、CD20-PC5、CD45-APC、CD45-PE-Cy7、CD56-APC 购自美国 Beckman Coulter 公司。采用 CD45/SSC 设门方法，Diva 软件进行分析，收集测定细胞 3×10^4 个。抗原阳性细胞 $\geq 20\%$ 为阳性标准。免疫分型诊断标准参考文献^[5]。最后运用随机分析软件进行 HRM 分析。

1.3 统计学分析 统计学分析均使用 SPSS 13.0 软件，计数资料使用 χ^2 检验，计量资料采用独立样本 t 检验， $P < 0.05$ 差异为有统计学意义。

2 结果

2.1 HRM 技术检测 NPM1 基因突变 以 NPM1 突变体 A 型质粒为阳模，用 HRM 法筛查 NPM1 基因突

变，检测 85 例正常核型成人 AML 样本，其中 19 例 NPM1 基因突变阳性，阳性率为 22.4%(19/85)。

2.2 NPM1 基因突变 AML 患者的临床特征 NPM1 基因突变型组 AML 患者外周血 WBC 为 $(66.6 \pm 59.1) \times 10^9/L$ ，PLT 为 $(146.4 \pm 155.8) \times 10^9/L$ ，NPM1 野生型组患者外周血 WBC 为 $(44.1 \pm 40.1) \times 10^9/L$ ，PLT 为 $(71.8 \pm 46.1) \times 10^9/L$ 。WBC 在 NPM1 突变型组显著升高，两组之间有统计学差异($t=0.04$ ， $P < 0.05$)，PLT 在 NPM1 突变型组也有升高，但是两组间没有统计学差异。19 例 NPM1 突变阳性患者中 M2 4 例，M4 5 例，M5 9 例，M6 1 例。66 例 NPM1 野生型组 M0 1 例，M1 7 例，M2 27 例，M4 5 例，M5 23 例，M6 2 例，M7 1 例。相对总体 AML 而言，NPM1 突变阳性多见于 M2、M4、M5。

2.3 免疫表型分析 19 例 NPM1 基因突变型组患者中可追溯到的免疫分型资料为 10 例。66 例 NPM1 基因野生型患者中可追溯到免疫分型资料为 36 例。可供分析数据显示突变型组高表达 CD33、CD117、CD13，但与 NPM1 野生型组相比无统计学差异。另外，前者 CD34 表达较低(20% vs 72.2%， $\chi^2=10.41$ ， $P < 0.05$)，与 NPM1 野生型组相比具有统计学差异。两组还各有些较少表达抗原的差异，如 CD7、CD10、CD16、CD56、CD71 等，由于病例数少未行统计学分析，见表 1。

2.4 NPM1 基因突变年龄性别比较 NPM1 突变组

表 1 NPM1 突变型组和 NPM1 野生型组 AML 各种抗原表达情况
Table 1 Antigen expression of AML in NPM1 mutation type and NPM1 wild Type

免疫分型 Genotyping	例数 No.case	CD33	CD117	CD13	CD38	HLA-DR	CD15	CD7	CD11b	CD34	CD14	CD16	CD56	CD10	CD71
NPM1 突变型组	10	10	10	9	7	6	3	3	2	2	1	1	1	1	1
野生型组	36	33	33	27	25	21	17	6	13	26	3	3	11	3	2

患者的中位年龄为 47(18~58)岁，NPM1 野生型组中位年龄为 53(21~80)岁，两组之间差异无统计学意义。NPM1 突变组患者女性占 52.6%(10/19)，NPM1 野生型组女性占 31.8%(21/66)，两组之间有显著差异($\chi^2=4.13$ ， $P < 0.05$)。

3 讨论

近年来，NPM1 基因突变在 AML 致病过程中的作用受到越来越广泛的关注，在 2008 年 WHO 分类标准中，这类 AML 被命名为 NPMc+AML，作为一种新的亚型(Provisional entity)被单独列出。NPM1 突变是 AML 患者中最常见的基因突变之一，文献报道在成人 AML 中 NPM1 突变的发生率为 35.2%，在正常

核型 AML 中发生率高达 46%~62%^[6]。应用 NPM1 突变快速筛查技术，检测近年来收治的 85 例正常核型成人 AML 中 NPM1 基因突变情况，并结合临床资料对 NPM1 突变阳性患者的临床特征进行了分析。发现研究群体的 NPM1 突变阳性率为 22.4%，低于国外研究报道结果，但与国内朱柏贵等的研究较相近^[7]，可能与种族差异有关。基因突变分布方面，NPM1 突变在 AML M2、M4、M5 患者中频率较高，M3 则没有发现，这也与国外相关研究报道结果一致。M3 是由 t(15; 17)(q22 q12) 染色体易位导致融合基因 PML-RAR α 形成所致，与 NPMc+AML 形成机理完全不同，因此 M3 样本中没有发现 NPM1 突变理所应

当。有趣的是我们在研究中发现一例正常核型的 M3 患者 NPM1 突变阳性,该例患者维甲酸治疗无效,用三氧化二砷可以缓解。查阅文献,国外也仅见个案报道^[9],其机理未明。由于该患者仅属个案,因此我们没有将其纳入本次分析的范围,但值得进一步研究。

本研究还统计分析了 NPM1 突变组 AML 患者临床特征,如 NPM1 突变型以女性多见,WBC 和 PLT 均较高。免疫分型以 CD33、CD117、CD13 高表达为主,CD38、HLA-DR 表达也较高,但同 NPM1 野生组相比,以上抗原表达无统计学差异,CD34 表达则显著降低,有统计学差异($P < 0.05$),这与国内颜灵芝^[9]等人报道的 CD34、CD117 均低表达不同,与国外相关报道基本一致。

此外,目前研究显示 AML 中除了 NPM1 之外,FLT3、NRAS、IDH1、BAALC 等基因也存在突变,且独立或联合影响 AML 预后分层^[10],但它们之间是如何协同作用的尚有待进一步研究,NPM1 突变非常稳定,不受复发的影响,用其监测 AML 治疗后的微小残留病变是一个良好的指标^[11]。同时,针对 NPMc+AML 传导通路关键分子的靶向治疗也在进一步研究中,可为 AML 提供新的治疗思路。

综上所述,通过对 85 例正常核型成人 AML 中 NPM1 基因突变情况以及 NPM1 突变阳性患者的临床特征进行分析,我们得知在正常核型 AML 患者中 NPM1 突变高,女性患者多见,主要分布于 M4、M5 和 M2 亚型,且外周血 WBC、PLT 较高,有高度的髓单核系的免疫表型特征且 CD34 表达极低,具有较为独特的特质,对其进行深入研究不仅有助于 AML 的诊断、预后分层和 MRD 监测,更为靶向治疗提供依据,为最终攻克 NPMc+AML 奠定基础。

参考文献

- [1] Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML) [J]. Blood, 2006, 107(10):4011-4020.
- [2] Zhou W, Chen JL, Wang HP, et al. Detection of the NPM1 mutation in adult acute myeloid leukemia with a normal karyotype by high resolution melting curve analysis [J]. China tropical medicine, 2011, 11(4):464-465. (In Chinese)
- (周薇, 陈建兰, 王汉平, 等. 高分辨熔解曲线分析正常核型成人急性髓细胞白血病 NPM1 基因突变 [J]. 中国热带医学, 2012, 12(5):577-578, 581.)
- [3] Zhang ZN, Chen T. Diagnostic and Therapeutic Standards of Hematological Disorders [M]. The Third Edition. Beijing: Science Press, 2007:106-116, 131-134. (In Chinese)
- (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, 2007:106-116, 131-134.)
- [4] Xie JJ, Zhou W, Wang HP, et al. Detection of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders by high resolution melting curve Analysis [J]. China Trop Med, 2011, 11(4):464-465. (In Chinese)
- (谢健晋, 周薇, 王汉平, 等. 高分辨熔解曲线分析慢性骨髓增殖性疾病 JAK2V617F 基因突变 [J]. 中国热带医学, 2011, 11(4):464-465.)
- [5] Bene MC. Proposals for the immunological classification of acute leukemias (EGL) [J]. Leukemia, 1995, 9(10):1783-1786.
- [6] Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype [J]. N Engl J Med, 2005, 352(3):254-266.
- [7] Zhang ZC, Lu QY, Zhao JN, et al. Simultaneous detection of FLT3-ITD and NPM1 gene mutations in acute myeloid leukemia by double PCR [J]. Journal of Experimental Hematology, 2011, 19(3):717-720.
- (张泽川, 鹿全意, 赵江宁, 等. 双重 PCR 检测急性髓系白血病 FLT3-ITD 和 NPM1 基因突变 [J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(3):717-720.)
- [8] Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance [J]. Blood, 2005, 106:3747-3754.
- [9] Yan LZ, Chen SN, Liang JY, et al. Analysis of NPM1 gene mutations in acute myeloid leukemia [J]. Chin J Hematol, 2007, 28(5):289-293. (In Chinese)
- (颜灵芝, 陈苏宁, 梁建英, 等. 急性髓系白血病患者 NPM1 基因突变分析 [J]. 中华血液学杂志, 2007, 28(5):289-293.)
- [10] Damm F, Heuser M, Morgan M, et al. Integrative prognostic risk score in acute myeloid leukemia with normal karyotype [J]. Blood, 2011, 117(17):4561-4568.
- [11] Bacher U, Badbaran A, Fehse B, et al. Quantitative monitoring of NPM1 mutations provides a valid minimal residual disease parameter following allogeneic stem cell transplantation [J]. Exp Hematol, 2009, 37(1):135-142.

收稿日期 2012-04-26 编辑 符式刚