

血液疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000292

重庆地区浆细胞病遗传学改变及其临床意义

张 萍,白凤霞,罗 云,娄世锋

(重庆医科大学附属第二医院血液科,重庆 400010)

【摘要】目的:探讨间期荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)检测重庆地区浆细胞病患者遗传学变化及其临床意义。**方法:**采用组合探针(D13S319/RB1、CCND1/IgH、p53、CKS1B/CDKN2C)对 50 例浆细胞病患者骨髓进行 FISH 检测,分析其分子遗传学异常,同时行常规染色体检查,并比较其与临床指标的相关性。**结果:**50 例患者采用 FISH 检测,有 34 例(68%)检测出分子遗传学异常,24 例(48%)检出 1 种异常,10 例(20%)同时检测出 2 种及以上异常。其异常比例从高到低分别为:IgH 基因异位(36%),13 号染色体缺失(24%)和 p53 基因丢失(20%);常规染色体检查只有 6 例患者(12%)发现染色体结构异常。遗传学异常检出与患者性别、年龄、临床类型及分期无关。**结论:**FISH 较常规染色体检查更易发现异常;IgH 基因异位、13q14 缺失及 p53 基因丢失在重庆地区浆细胞病中发生率较高,p53 基因丢失及 13q14 缺失与近期预后无明确关系。

【关键词】多发性骨髓瘤;荧光原位杂交;分子遗传学

【中图分类号】R733.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-01-30

作者简介:张 萍,Email:zhangpingemail@126.com,

研究方向:血液疾病细胞遗传学及生物治疗技术。

通信作者:罗 云,Email:luo555@163.com。

基金项目:重庆市卫生局科研资助项目(编号:2012-2-076)。

优先出版:<http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150415.2221.002.html>
(2014-05-22)

response to pravastatin in the elderly[J].*Atherosclerosis*,2012,220(2):413-417.

[11] Couvert P, Giral P, Dejager S, et al. Association between a frequent allele of the gene encoding OATP1B1 and enhanced LDL-lowering response to fluvastatin therapy[J].*Pharmacogenomics*,2008,9(9):1217-1227.

[12] Tachibana-Iimori R, Tabara Y, Kusuvara H, et al. Effect of genetic polymorphism of OATP-C (SLCO1B1) on lipid-lowering response to HMG-CoA reductase inhibitors[J].*Drug Metab Pharmacokin*,2004,19(5):375-380.

[13] Martin NG, Li KW, Murray H, et al. The effects of a single nucleotide polymorphism in SLCO1B1 on the pharmacodynamics of pravastatin[J].*Br J Clin Pharmacol*,2012,73(2):303-306.

[14] Sortica VA, Fiegenbaum M, Lima LO, et al. SLCO1B1 gene variability influences lipid-lowering efficacy on simvastatin therapy in southern Brazilians[J].*Clin Chem Lab Med*,2012,50(3):441-448.

[15] Thompson JF, Man M, Johnson KJ, et al. An association study of 43 SNPs in 16 candidate genes with atorvastatin response[J].*Pharmacogenomics J*,2005,5(6):352-358.

[16] Slim K, Nini E, Forestier D, et al. Methodological index for non-randomized studies (minors): development and validation of a new instrument[J].*ANZ J Surg*,2003,73(9):712-716.

[17] Wetterslev J, Thorlund K, Brok J, et al. Trial sequential analysis may establish when firm evidence is reached in cumulative meta-analysis[J].*Journal of Clinical Epidemiology*,2008,61(1):64-75.

[18] Zhang W, Chen BL, Ozdemir V, et al. SLCO1B1 521T-->C functional genetic polymorphism and lipid-lowering efficacy of multiple-dose pravastatin in Chinese coronary heart disease patients[J].*Br J Clin Pharmacol*,2007,64(3):346-352.

[19] 唐 斌.匹伐他汀对高胆固醇血症患者降脂疗效差异的相关研究[D].中南大学,2008.

[20] Yang GP, Yuan H, Tang B, et al. Lack of effect of genetic polymorphisms of SLCO1B1 on the lipid-lowering response to pitavastatin in Chinese patients[J].*Acta Pharmacol Sin*,2010,31(3):382-386.

[21] Fu Q, Li YP, Gao Y, et al. Lack of association between SLCO1B1 polymorphism and the lipid-lowering effects of atorvastatin and simvastatin in Chinese individuals[J].*Eur J Clin Pharmacol*,2013,69(6):1269-1274.

[22] Hu M, Mak VW, Tomlinson B. Intronic variants in SLCO1B1 related to statin-induced myopathy are associated with the low-density lipoprotein cholesterol response to statins in Chinese patients with hyperlipidaemia[J].*Pharmacogenet Genomics*,2012,22(11):803-806.

(责任编辑:关蕴良)

Cytogenetic change and clinical significance of plasma cell dyscrasia in Chongqing region

Zhang Ping, Bai Fengxia, Luo Yun, Lou Shifeng

(Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To investigate the cytogenetic abnormalities of patients with plasma cell dyscrasias by fluorescence in situ hybridization (FISH) in Chongqing region and its clinical significance. **Methods:** Panel probes of D13S319/RB1, CCND1/IgH, p53 and CKS1B/CDKN2C were used to detect the chromosomal abnormalities in 50 patients with plasma cell dyscrasias. At same time the conventional chromosome check was done. The correlation of cytogenetic abnormalities with clinical feature was studied. **Results:** Molecular genetics change was found in 34 cases (68%) out of 50 cases. One kind of abnormality was found in 24 cases (48%) and two or more than two kinds of abnormality was found in 10 cases (20%). The ratio of abnormality form high to low was as followed: IgH gene aberrance (36%), 13q deletion (24%) and P53 gene deletion (20%). Only 6 cases (12%) were found chromosome structural abnormalities by conventional chromosome check. The genetics abnormality was not correlated with age, gender, subgroup and stage. **Conclusion:** FISH method can more easily find abnormality than conventional chromosome check. High incidence of IgH gene aberrance, 13q and P53 gene deletion is found among patients with plasma cell dyscrasias in Chongqing region, nevertheless, having no association with recent prognosis.

[Key words] multiple myeloma; fluorescence in situ hybridization; molecular genetics

浆细胞病包括多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM)、华氏巨球蛋白血症、系统性淀粉样变性等, 主要病种为 MM; 国内外研究表明几乎所有的 MM 患者均存在细胞遗传学及分子生物学改变, 并且同 MM 的发病机制、分期及治疗、预后等方面有密切关系^[1]。间期荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 检测可以明显提高 MM 患者的染色体异常检出率, 目前国内西部地区研究尚少, 为探究重庆地区浆细胞病患者细胞遗传学及分子生物学改变, 本研究采用 FISH 技术, 针对 MM 患者较为常见 5 种染色体异常改变进行检测, 并观察了相应的临床表现、治疗情况, 以更好地为临床医师提供治疗参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2011 年 9 月至 2013 年 9 月在重庆医科大学附属第二医院住院患者, 其中男性 29 例, 女性 21 例, 中位年龄 61 (36~83) 岁; 所有患者分别经血常规、血肾功生化、肝功、 β_2 微球蛋白、骨髓细胞形态学、免疫球蛋白、免疫固定电泳及 X 线摄片等检查确诊并分期。诊断标准参照张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》^[2], 分期参照国际分期系统。病种包括多发性骨髓瘤 45 例, 浆细胞白血病 1 例, 华氏巨球蛋白血症 1 例, 系统淀粉样变性 1 例, POEMS 综合征 1 例, 孤立浆细胞瘤 1 例; 其中初诊患者 44 例, 复发/难治患者 6 例。阴性对照选用 10 份非血液系统恶性疾病患者 (男性 6 例, 女性 4 例,

病种血小板减少性紫癜 3 例, 巨幼细胞贫血 3 例, 白细胞减少症 2 例, 缺铁性贫血 2 例) 的骨髓标本。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有患者均签署知情同意书, 在完成常规骨髓穿刺涂片后, 在无菌条件下再用干燥注射器抽取骨髓 2~3 ml 注入肝素抗凝管。

1.2.2 探针及试剂 探针均购自北京金菩嘉医疗科技有限公司。荧光显微镜购自德国莱卡公司。位点特异性探针 (locus specific prober, LSI) D13S319 检测 13q14 缺失, LSI RB1 检测 13 号染色体 RB1 基因位点缺失, LSI IgH 检测 14q32 易位, LSI CCND1 检测 11q13 异位, LSI P53 检测 17 号染色体短臂缺失, LSI CKS1B 检测 1q21 异常。骨髓细胞经低渗、固定处理后, 气干法滴片, 室温下老化过夜; 按照探针试剂说明书进行 DNA 变性、杂交、洗片及复染。荧光显微镜观察间期细胞荧光杂交信号数目。每个病例至少计数 200 个细胞, 计算阳性百分率, 超过截断值判定为阳性, 并用 FISH 2.0 软件采集图像。

1.2.3 FISH 实验分析 D13S319 探针在正常细胞内出现 2 个红色荧光信号, 细胞内只有 1 个红色荧光信号为异常; RB1 探针在正常细胞内出现 2 个绿色荧光信号, 细胞内只有 1 个绿色荧光信号为异常; IgH 探针在正常细胞内出现由 2 个红色和绿色荧光信号融合而成的黄色荧光信号, 细胞内出现分离的红色或绿色荧光信号为异常; p53 探针在正常细胞内出现 2 个绿色荧光信号, 细胞内只有 1 个绿色荧光信号为异常; CKS1B 探针在正常细胞内出现 2 个红色荧光信号, 细胞内出现 3 个红色荧光信号为异常。分析 10 份非恶性血液病患者的骨髓标本, 每个探针观察 200 个细胞, 计算出现异常信号的细胞百分率和平均值、标准差, 阈值 = (平均值 \pm 3) \times

标准差。MM 患者如果检测值大于阈值,判定为阳性结果。

1.3 染色体核型分析

取肝素抗凝患者骨髓细胞标本,24 h 不加刺激剂制备染色体标本,G 显带法进行核型分析,核型分析结果按照《人类细胞遗传学国际命名体制》进行描述。

1.4 治疗方案

有 7 例患者诊断后未治疗出院失访;剩下 43 例患者中有 8 例采用 BDT 方案(硼替佐米+地塞米松+沙利度胺),有 21 例采用 VADT(长春新碱+阿霉素+地塞米松+沙利度胺),11 例患者采用 MPT 方案(马法仑+泼尼松+沙利度胺)或 PT 方案(泼尼松+沙利度胺),3 例患者采用 CTD 方案(环磷酰胺+沙利度胺+地塞米松),有 1 例患者经过 VADT 治疗完全缓解后行自体造血干细胞移植术。

1.5 随访

所有存活患者随访至 2013 年 12 月 31 日,死亡患者以死亡时间为随访终止时间。中位随访时间 430(98~822) d。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件包,数据均为计数资料,采用率表示。logistic 回归分析 FISH 检测结果与临床表现的相关性,FISH 与常规染色体 G 显带检测异常率差异采用 McNemar 检验,患者死亡率差异用卡方检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 FISH 检查结果

50 例患者中,34 例(68%)检测出细胞遗传学异常,24 例(48%)检出 1 种异常,10 例(20%)同时检测出 2 种及以上异常。其异常比例从高到低分别为:IgH 基因异位(36%),13 号染色体缺失(24%)和 p53 基因丢失(20%)。

将 FISH 检测结果作为因变量(赋值阴性 0,阳性 1);将患者性别(赋值男性 1,女性 2)、年龄、临床类型(赋值 IgG 为 1,IgA 为 2,轻链型为 3,其他为 4)及分期(赋值 1,2,3)作为自变量;经过单因素 logistic 回归分析发现患者分期 $OR=2.489$, $95\%CI=0.994\sim 6.233$, $P=0.052$;患者年龄 $OR=1.009$, $95\%CI=0.949\sim 1.073$, $P=0.776$;性别 $OR=1.188$, $95\%CI=0.298\sim 6.233$, $P=0.807$ 及临床类型 $OR=0.756$, $95\%CI=0.399\sim 1.432$, $P=0.390$ 。患者 FISH 检测基因异常与患者性别、年龄、临床类型及分期无关。

典型 FISH 检测阳性图片见图 1、2(患者 35 号)及图 3(患者 48 号)。

2.2 染色体分析结果

共有 19 例患者发现染色体数目异常(38%),均为非整倍体改变,但其中只有 6 例(12%)患者发现了结构异常,涉及染色体有 17 号染色体 3 例,13 号染色体 2 例,11 号染色体 1 例及 1 号染色体 1 例;明显低于 FISH 检测结果,McNemar 检验 $n=50(P<0.001)$;另有 5 例患者因未见分裂相或分裂相

不佳无法分析;其余患者未发现异常。

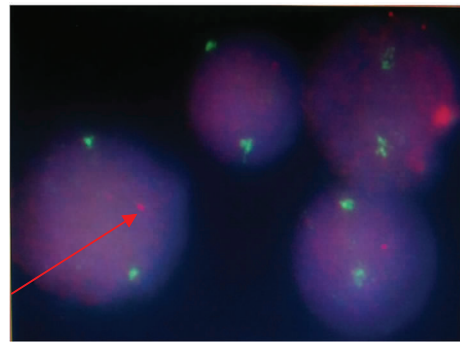


图 1 13q14.32 缺失阳性,箭头所指细胞只有 1 个红色信号
Fig.1 Depletion of 13q14 positive;the arrow indicating cell with only one red signal

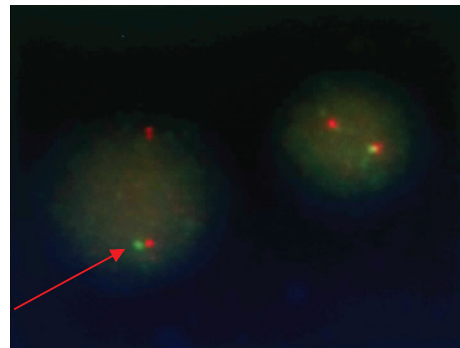


图 2 p53 缺失阳性,箭头所指细胞只有 1 个绿色信号
Fig.2 Depletion of p53 positive;the arrow indicating cell with only one green signal

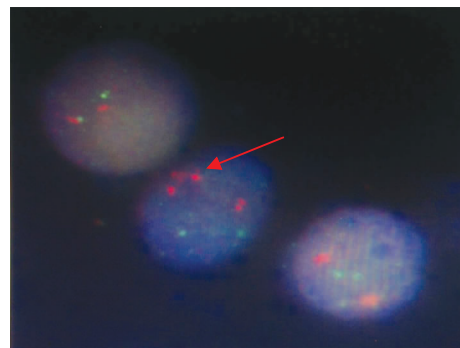


图 3 1q21 扩增阳性,箭头所指细胞出现多个红色信号
Fig.3 Positive amplification of 1q21;the arrow indicating cell with multiple red signals

2.3 治疗随访

43 例可观察的病例中包含 29 例 FISH 检测阳性患者和 14 例阴性患者,迄止到随访时间结束,共有 6 例 FISH 检测阳性患者死亡,死亡率为 20.69%(6/29),其中 4 例 P53 检测阳性(4、7、10、14 号)患者,2 例 13q-检测阳性(18、45 号)患者;1 例为 FISH 检测阴性(25 号)患者死亡,死亡率为 7.14%(1/14),但二者死亡率比较无统计学差异($P=0.396$)。

3 讨论

由于浆细胞病患者骨髓异常细胞多为成熟细胞,常规细胞遗传学方法染色体异常检出率低;本研究发现常规 G 显带有 38% 患者染色体数目异常,表现为非整倍体改变,但结构异常发现率较低仅 12%。国内李江涛等^[3]研究加用细胞因子延长培养时间后可以明显提高细胞分裂相,从而增加异常染色体的检出率。国内外研究表明应用 FISH 检测可以提高患者遗传学异常检出率,本研究采用 FISH 检测发现 68% 患者有异常,较常规染色体检查有统计学差异,提示常规染色体检查需结合 FISH 检测更有助于判断患者遗传学异常。骨髓瘤遗传学异常与患者分期有无关系各家报道不一,本研究统计也发现患者遗传学异常与患者性别、年龄、临床类型及分期无关。

有文献提出 IgH 异位是 MM 发病的第一步,随着疾病的进展,IgH 异位、13q- 及 17p- 阳性率逐渐升高^[4]。最近 Rajkumar 等^[5]在 351 例冒烟型 MM 患者中发现有 36.2% 患者 IgH 异位阳性,有 0.9% 患者 13q 缺失;本研究也显示 IgH 重排在所有异常中比例最高,因探针原因本课题只研究了 t(11;14) 亚型,拟进一步针对 IgH 重排亚型如 t(4;14)、t(14;16)、t(14;20)、t(6;14) 进行研究。同时也发现有 4 例患者同时存在 t(11;14) 和 13q 缺失阳性,2 例患者同时存在 t(11;14) 和 17p 缺失阳性,有研究显示此种情况疾病进展较快预后差,可能需及早采取干细胞移植治疗改善预后^[6]。p53 缺失(17p-) 是 MM 预后不良因素之一^[7],MM 患者 p53 基因的缺失异常检出率为 9%~34%。本组结果该基因的异常率为 20%,单因素生存分析提示伴 p53 异常者死亡风险大大高于其他基因组异常者,患者不管采用何种治疗手段预后都极差;13 号染色体短臂缺失是 MM 最常见的核型异常之一,也是 MM 患者的一个独立的不良预后因素^[8]。本研究也初步发现检测到 p53 基因缺失及 13q- 缺失患者早期死亡率较高,但统计分析未发现差异,是否与样本量偏小有关有待研究。由于本组患者随访时间较短,因此也没有对患者无事件生存期及总的生存期分析,有待进一步延长随访时间追踪结果。

本研究显示重庆地区恶性浆细胞病患者染色体 FISH 检测阳性率为 68%,而近年来国内及国外

的研究采用 CD138 抗体磁珠分选富集浆细胞结合间期荧光原位杂交技术(I-FISH)、胞质轻链免疫荧光定位浆细胞结合 I-FISH(cIg-FISH) 及免疫表型结合间期 FISH 技术(FICTION) 检测阳性率可提高到 83.3%~91%^[9],但这些技术设备及检测费用均高,尚难以在西部地区广泛开展。国外已开展对骨髓瘤患者的全基因组表达谱(gene-expression profiling, GEP) 研究。Shaughnessy 等^[10]对 532 例初发 MM 患者行 GEP 分析后发现,有 70 种基因与疾病早期死亡风险相关,其中包括 51 种基因表达上调,19 种基因表达下调,这些异常表达的基因为独立的预后不良因素。随着我国经济及研究技术的发展,相信采用这些新的技术更有利于患者检出染色体异常,从而制定更有针对性的治疗方案。

参 考 文 献

- [1] Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma[J]. Nature, 2011, 471(7339): 467-472.
- [2] 张之南, 沈 悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 232-235
- [3] 李江涛, 常乃柏, 刘 辉, 等. 多发性骨髓瘤患者 81 例细胞及分子遗传学研究[J]. 中华内科杂志, 2011, 50(12): 1039-1042.
- [4] López-Corral L, Gutiérrez NC, Vidriales MB, et al. The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(7): 1692-1700.
- [5] Rajkumar SV, Gupta V, Fonseca R, et al. Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma[J]. Leukemia, 2013, 27(8): 1738-1744.
- [6] Bergsagel PL, Mateos MV, Gutierrez NC, et al. Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma[J]. Blood, 2013, 121(6): 884-892.
- [7] Chang H, Qi C, Yi QL, et al. p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation[J]. Blood, 2005, 105(1): 358-360.
- [8] 李 倩, 安 刚, 李承文, 等. 染色体 13q14 缺失在多发性骨髓瘤发生发展中的意义及其对临床预后的影响[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(4): 217-220.
- [9] 陈丽娟, 屈晓燕, 李建勇. 大力推进多发性骨髓瘤分子细胞遗传学规范化检测进程[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(4): 290-291.
- [10] Shaughnessy JD, Zhan F, Burington BE, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1[J]. Blood, 2007, 109(6): 2276-2284.

(责任编辑: 冉明会)