

· 论 著 ·

AML1/ETO+融合基因阳性的 AML 患者骨髓细胞形态学分析

王 平, 彭贤贵[△], 陈幸华, 刘思恒, 张 曦, 孔佩艳

(第三军医大学新桥医院血液科, 重庆 400037)

摘 要:目的 探讨 AML1/ETO[t(8;21)(q22;q22)]融合基因阳性的急性髓细胞白血病(AML)的骨髓细胞形态学特点。方法 对 66 例 AML(M1, M2a, M2b, M5, MDS-RAEB-II)骨髓片用瑞氏染液染色后,按照国内 AML 分型标准进行观察分析;进行荧光原位杂交技术(FISH)检测 AML1/ETO 融合基因。结果 M2a 52 例, M2b 8 例, M5 2 例, M1 2 例, MDS-RAEB-II 2 例, AML1/ETO 融合基因阳性为 34.84%, 其中(14/52)26.9%, (8/8)100%, (0/2)0%, (0/2)0%, (1/2)50%。回顾分析 AML1/ETO 阳性病例骨髓涂片,都检测到多少不一的异形中幼粒细胞。AML1/ETO 阳性病例在治疗过程中首次化疗完全缓解(CR)率为 78.4%(9 例 M2a, 8 例 M2b 及 1 例 RAEB-II), 4 例 M2a 2 次化疗后达到 CR, 1 例 M2a 5 次化疗仍为 NR。结论 AML-M2b 都有 AML1/ETO 融合基因改变, AML1/ETO 融合基因阳性 AML 在骨髓涂片中能检测到异形中幼粒细胞。

关键词:急性髓细胞白血病 M2b; 异形中幼粒细胞; AML1/ETO 融合基因

中图分类号: R733.7

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)12-1503-02

Morphological analysis of bone marrow cells with AML1/ETO+AML

WANG Ping, PENG Xian-gui[△], CHEN Xing-hua, et al.

(Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the morphological character of AML1/ETO+ acute myeloid leukemia (AML). **Methods** The bone marrow smears prepared from 66 AML which detected AML1/ETO fusion gene by fluorescence in situ hybridization (FISH) were stained with Wright's dye and analyzed according to AML classification standards. **Results** The cases of morphological analysis of bone marrow cells were diagnosed M2a, M2b, M5, M1, MDS-RAEB-2 which were 52, 8, 2, 2, respectively. Among 66 cases of AML, the percentages of AML1/ETO fusion gene positive result was 34.84%, the percentages of positive results with M2a, M2b, M5, M1, MDS-RAEB-2 were 26.9%, 100%, 0%, 0%, 50%, respectively. Among the bone marrow smears with AML1/ETO fusion gene, we had detected some abnormal neutrophilic myelocyte in reviewing analysis. Among 23 with AML1/ETO fusion gene, During treatment, complete remission rate was 78.4% (9 cases of M2a, 8 cases of M2b and one cases of RAEB-1) after the first chemotherapy, 4 cases of M2a had complete remission after second chemotherapy. But only 1 case of M2a had no remission (NR) after fifth chemotherapy. **Conclusion** The results positive for AML1/ETO fusion gene can be detected in all AML-M2b. Some abnormal neutrophilic myelocyte are found in the bone marrow smears that prepared from AML with positive for AML1/ETO fusion gene.

Key words: acute myeloid leukemia M-2b; abnormal neutrophilic myelocyte; AML1/ETO fusion gene

白血病是造血干细胞突变所致的克隆性恶性肿瘤,染色体分析可以揭示其克隆标志,细胞遗传学较细胞形态学和免疫学表型更能反映白血病的生物学特征。半数以上急性白血病患者可检出克隆性染色体异常,其中,特异性染色体重排与特定的白血病亚型相关。细胞遗传学改变是影响白血病预后的因素^[1-2]。急性髓细胞白血病(AML)部分成熟型的 M2b 亚型是中国学者于 20 世纪 50 年代末提出的,具有髓外浸润率高、治疗反应好、完全缓解率高、缓解期长等特点。其特异性遗传标志为 8 号与 21 号染色体的长臂在二区二带断裂并相互移位[t(8;21)(q22;q22)], AML1 基因重排可作为诊断本病的分子标志^[3]。作者在工作中时常发现运用荧光原位杂交技术(FISH)方法检测的 AML1/ETO 融合基因阳性的病例检测到异形中幼粒细胞多少不一,但形态学上符合 M2b 诊断的病例却很少。2007 年 10 月至 2009 年 4 月本院对收治的 66 例 AML 患者进行 FISH 检测 AML1/ETO 融合基因,对骨髓形态学特点及 AML1/ETO 阳性结果分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2007 年 10 月至 2009 年 4 月本院进行 AML1/ETO 检测的 AML 患者 66 例,其中男 37 例,女 29 例,年龄 6~64 岁,中位年龄 46 岁。

1.2 形态学 (1)取材:于髂后上棘抽取骨髓液先涂片 5~8 张用于形态学及细胞化学染色,再抽取 1~2 mL 用肝素抗凝,用于 FISH 融合基因检查。(2)涂片染色:取 2 张干燥、涂片满意的骨髓片用瑞氏染液染色 10~15 min,油镜计数 200 个有核细胞,计算各种有核细胞的构成比。对染色不满意的骨髓片另取 1 张重新染色。(3)分型标准:将核浆发育明显不平衡、胞质中出现中性颗粒、有核仁的细胞划入“异常中幼粒细胞”,见彩插 II 图 1。AML 形态学分型标准采用国内分型标准^[4]。

1.3 FISH AML1/ETO 融合基因检测 (1)探针:采用英国 Cytocell 公司双融合 AML1/ETO 探针,光谱橘红直接标记 ETO 和光谱绿色直接标记 AML1。(2)方法:厂商提供的操作方法略加修改,简述如下:①1~2 mL 肝素抗凝骨髓血 2 500

[△] 通讯作者,电话:023-68774668;E-mail:pxg1964@163.com。

表 1 66 例 AML 形态学诊断及 AML1/ETO[t(8;21)(q22;q22)]融合基因结果

形态学诊断	AML-M2a	AML-M2b	AML-M1	AML-M5	MDS-RAEB-2	合计
<i>n</i>	52	8	2	2	2	66
AML1/ETO(<i>n</i>)	14/52	8/8	0/2	0/2	1/2	23/66
AML1/ETO(%)	26.9	100	0	0	50	34.84

r/min 离心 8 min 去上清液,加 8 mL 0.075 M KCl 30 min;②1 mL 固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)吹打混匀 1 800 r/min 离心 8 min 去上清液;③6 mL 固定液,吹打混匀 1 800 r/min 离心 8 min 去上清液,重复 2~3 次;④样本制备、滴片;⑤2×SSC,70%、85%、100%乙醇各 2 min;⑥10 μL 探针,18×18 盖玻片,封片胶封片;⑦杂交仪:变性 72 ℃ 2 min,杂交 37 ℃ 至少 16 h;⑧去盖玻片,0.3 NP40、0.4 SSC 72 ℃ 2 min,0.1 NP40、2 SSC 37 ℃ 30 s;⑨10 μL DAPI Ⅱ 加盖玻片暗视野荧光显微镜观察。(3)结果判断:用配有 DAPI/FITC/TRITC 三色激发块的 Olympus BX51 荧光显微镜检查杂交信号,用 Olympus PM30 显微照相机进行照相。正常间期细胞出现 2 橘红 2 绿色分散荧光信号,出现 2 黄色 1 橘红 1 绿色信号为 AML1/ETO 阳性细胞,每个样本观察 500 个间期细胞并观察中期分裂相。

2 结 果

2.1 形态学 66 例 AML 骨髓细胞形态学分型结果见表 1。在 AML1/ETO 融合基因阳性病例中,首次化疗完全缓解(CR)率 78.4%(9 例 AML-M2a、8 例 AML-M2b 及 1 例 MDS-RAEB-Ⅱ),4 例 AML-M2a 2 次化疗 CR,1 例 AML-M2a 5 次化疗仍 NR。

2.2 FISH AML1/ETO 融合基因检测结果 见彩插Ⅱ图 2、表 2。光谱橘红标记 ETO 和光谱绿色标记 AML1 信号明晰,正常间期细胞 2 橘红 2 绿色分散荧光信号,AML1/ETO 阳性细胞 2 黄色 1 橘红 1 绿色信号。

表 2 AML1/ETO+融合基因与异形中幼粒细胞比例构成

病例种类	AML1/ETO +构成(%)	AML1/ETO +融合基因(%)	异形中幼粒 细胞(%)
AML-M2a	14/66(21.2)	35~94	4.5~18
AML-M2b	8/66(12.1)	71~95	35~71.5
MDS-RAEB-Ⅱ	1/66(1.51)	27	16.5

3 讨 论

AML1/ETO 融合基因主要见于白血病 M2b 亚型,M2b 与国际上的[t(8;21)]M2 是同一亚型,其特异性遗传标志为 8 号与 21 号染色体的长臂在二区二带断裂并相互移位[t(8;21)(q22;q22)],形成 AML1/ETO 融合基因^[5]。急性髓系白血病的其他亚型如 M1、M4、MDS-RAEB-1 等也有少数病例表达此融合基因^[6-8]。本组形态学诊断 AML-M2b 病例均表达 AML1/ETO 融合基因(阳性率 71%~95%),部分 AML-M2a、MDS-RAEB 亦表达 AML1/ETO 融合基因(阳性率 27%~94%)。回顾分析 AML1/ETO 阳性病例骨髓涂片,都能检测到异形中幼粒细胞(表 2)。AML1/ETO[t(8;21)(q22;q22)]融合基因改变一定伴随异形中幼粒细胞表达,但异形中幼粒细胞与融合基因表达也有不一致性。本组融合基因阳性率(27%~95%)明显高于异形中幼粒细胞比例(4.5%~71.5%),基因表达先于骨髓形态表现。

本研究发现在临床中形态学诊断 AML-M2b 明显低于 AML1/ETO 融合基因检测阳性率,AML-M2b 临床诊断明显较低,其原因可能:(1)AML-M2b 主要由形态学界定,其原始粒细胞明显诊断,以异形中幼粒细胞增生为主并比例大于 30%^[7];(2)国内外报道急性髓细胞白血病其他亚型如 M1、M4、M5 等少数病例也表达 AML1/ETO 融合基因^[6-8]。在这部分病例可能伴有复杂核型,[t(8;21)(q22;q22)]不占主导作用;(3)AML1/ETO 融合基因产生一种嵌合蛋白,作为主要的抑制物改变了正常 AML1-CBF(核结合因子)β 这种与造血干细胞分化有关的转录复合物的生理功能^[5]。部分 AML-M2a、RAEB-Ⅱ,虽然检测到异形中幼粒细胞但比例小于 30%,可能不同白血病细胞分化程度的不同,部分病例可能为疾病较早期;(4)在 M2b 形态诊断中异形中幼粒细胞辨认至关重要,不同观察者标准有所不同。综合张之楠、杨崇礼等^[6,9]对异形中幼粒细胞描述,本文将核浆发育明显不平衡、胞质中可见中性颗粒、有核仁的细胞划入“异常中幼粒细胞”。

目前一般认为 AML1/ETO 阳性是预后良好的指标之一,但也有报道预后中等。刘旭辉等^[10]报道一个疗程化疗的 CR 率(80.6%)高。国内有报道复杂核型的[t(8;21)(q22;q22)]复杂异位的急性髓质白血病的实验研究,在常规临床治疗中 DA 化疗敏感差^[11]。在本组 AML1/ETO 融合基因阳性病例中,首次化疗 CR 率达 78.4%,9 例 M2a、8 例 M2b 及 1 例 MDS-RAEB-Ⅱ首次化疗 CR,4 例 M2a 2 次化疗 CR,1 例 M2a 5 次化疗仍 NR。出现异形中幼粒细胞比例高的 M2b 首次缓解率明显高于其他的 AML/ETO+AML。AML1/ETO 融合基因产生的融合蛋白与造血干细胞分化有关的转录复合物的生理功能^[5],异形中幼粒细胞表达的此类物质与化疗作用相关。目前还未见异形中幼粒细胞与化疗敏感度有关的报道,由于病例总数较少、时间较短,还需要进一步观察与总结。

参考文献:

[1] 张锦海,陈幸华,李波,等.检测 AML 多药耐药基因 mRNA 表达的多重半巢式逆转录 PCR 方法的建立[J].重庆医学,2005,34(12):1812.

[2] 曾韞璟,娄世锋,张萍,等.49 例急性白血病细胞遗传学分析[J].重庆医学,2008,37(18):2057.

[3] 谭齐贤 主编.临床血液学和血液检验[M].北京:人民卫生出版社,2003:206.

[4] 张之楠,沈梯.血液病诊断及疗效标准[M].北京:科学出版社,1998:171.

[5] Nguyen S,Leblanc T,Fenaux P,et al. A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML intergroup[J]. Blood,2002,99:3517.

[6] 杨崇礼,卞寿庚,文伟,等.一种新的 FAB(下转第 1507 页)

本研究结果一致。本研究结果还显示,输异体血组在手术时间、术中出血量、术后引流量等方面显著高于未输异体血组。分析其原因可能与手术操作、疾病种类、手术难度等因素的影响有关。对于接受髋关节置换手术的患者而言,应用术中自体血回输并保持患者术前相对较高的 Hb 浓度和体质量,减少术中出血和术后引流,可以明显降低患者输异体血的风险。关于不同病因导致手术难度不一致对是否输异体血的影响,有待于大样本病例的进一步研究。

本研究结果表明,髋关节置换术患者在术中应用自体血回输后如果仍需输异体血,则术后不良事件的发生率明显增高,主要表现为术后感染和凝血功能异常。文献报道,髋关节置换术患者如果输异体血,术后感染率为 7%,而仅接受输自体血和未输血的患者感染发生率分别为 4% 和 3%,两者差异有统计学意义,尤其以泌尿系统和呼吸系统感染并发症最为常见^[12]。髋关节置换术患者输异体血后的感染高发可能与输异体血抑制机体的细胞免疫和体液免疫系统功能相关^[13]。输异体血组手术时间长、出血多以及术前 ASA 评分高可能也是导致术后并发症增加的原因。

回收的自体血经过离心、清洗等处理后,会丢失绝大部分的凝血因子和 Plt,如果大量输入处理后的自体血有可能对患者的凝血系统产生一定程度的影响。因此,对于自体血回输量大于 2 000 mL 或术前已经存在凝血功能障碍的患者,应在监测凝血功能的基础上及时输入新鲜冰冻血浆,补充凝血因子,防止凝血障碍疾病的发生^[14]。

参考文献:

- [1] Catling S. Blood conservation techniques in obstetrics: a UK perspective[J]. Int J Obstet Anesth, 2007, 16(3): 241.
- [2] Prins HA, Houdijk AP, Nijveldt RJ, et al. Arginase release from red blood cells: possible link in transfusion induced immune suppression? [J]. Shock, 2001, 16(2): 113.
- [3] 许承斌, 柴晓文, 李剑. 4 项传染病指标在患者输血或手术前的检测分析[J]. 重庆医学, 2009, 38(16): 2119.
- [4] 招伟贤. 输血与血液保护的若干进展[J]. 广东医学, 2006, 27(6): 779.
- [5] 张先龙, 何耀华, 王琦, 等. 后路小切口人工全髋关节置换术[J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(8): 591.
- [6] Yang C, Zhu Q, Han Y, et al. Minimally-invasive total hip arthroplasty will improve early postoperative outcomes: a prospective, randomized, controlled trial[J]. Ir J Med Sci, 2010, 22. 179(2): 285.
- [7] Bridgens JP, Evans CR, Dobson PM, et al. Intraoperative red blood-cell salvage in revision hip surgery. A case-matched study[J]. J Bone Joint Surg Am, 2007, 89(2): 270.
- [8] Phillips SJ, Chavan R, Porter ML, et al. Does salvage and tranexamic acid reduce the need for blood transfusion in revision hip surgery? [J]. J Bone Joint Surg Br, 2006, 88(9): 1141.
- [9] Nuttall GA, Santrach PJ, Oliver WC, et al. The predictors of red cell transfusions in total hip arthroplasties [J]. Transfusion, 1996, 36(2): 144.
- [10] Knight JL, Sherer D, Guo J. Blood transfusion strategies for total knee arthroplasty: minimizing autologous blood wastage, risk of homologous blood transfusion, and transfusion cost[J]. J Arthroplasty, 1998, 13(1): 70.
- [11] Hatzidakis AM, Mendlick RM, Mckillip T, et al. Preoperative autologous donation for total joint arthroplasty. An analysis of risk factors for allogenic transfusion [J]. J Bone Joint Surg Am, 2000, 82(1): 89.
- [12] Bierbaum BE, Callaghan JJ, Galante JO, et al. An analysis of blood management in patients having a total hip or knee arthroplasty[J]. J Bone Joint Surg Am, 1999, 81(1): 2.
- [13] Agarwal N, Murphy JG, Cayten CG, et al. Blood transfusion increases the risk of infection after trauma[J]. Arch Surg, 1993, 128(2): 171.
- [14] 郭向阳, 段赫, 王静杰, 等. 术中使用血液回收机的节约用血效果及其对凝血功能的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2004, 26(2): 188.

(收稿日期: 2010-03-07 修回日期: 2010-04-16)

(上接第 1504 页)

- 急性粒细胞白血病亚型(M2b)特征的鉴定[J]. 中华血液学杂志, 1990, 11: 456.
- [7] 顾敏晔, 熊树民. 伴有 t(8;21) 的急性髓细胞白血病 M-2b 型患者的临床特征(附 67 例报告)[J]. 伦理学与诊断实践, 2002, 1(2): 88.
 - [8] 李承文, 蒲丽津, 代芸, 等. 双色荧光原位杂交技术在检测 t(8;21) 白血病中的应用[J]. 中华血液学杂志, 2006, 27(1): 32.
 - [9] 张之楠, 杨天楹, 郝玉书. 血液病学[M]. 北京: 人民卫生

出版社, 2003: 869.

- [10] 刘旭辉, 王云贵, 梁毅, 等. 急性髓系白血病 AML1/ETO 融合基因检测及其临床意义[J]. 现代实践医学杂志, 2005, 17(3): 136.
- [11] 张继红, 王韞秀, 张君宁, 等. 伴 t(2;8;21)(p21;q22;q22) 复杂易位的急性髓系的白血病的实验研究[J]. 山东医药, 2009, 49(13): 39.

(收稿日期: 2009-06-13 修回日期: 2009-11-17)