

AML 对柔红霉素的耐药性与 TET2 基因突变的相关性

杨 柳^{1,2} 葛 健¹ 夏瑞祥¹

摘要 目的 探讨白血病相关基因对于急性髓系白血病(AML)患者耐药性的影响。方法 选取74例AML初诊患者,对所有患者的54个白血病相关基因采用二代测序仪进行测序,选取突变率最高的基因为研究指标,对比体外药敏试验中对于常见化疗药物耐药性的差异,同时将体外耐药率与实际耐药率进行对比。结果 74例AML初诊患者中,突变率最高的基因为TET2基因,其中11例检测到TET2基因突变,体外药敏试验显示对于柔红霉素的耐药率最高,其中9例(81.82%)对其耐药,在63例TET2突变阴性的患者中,体外药敏试验显示仅4例(6.35%)对柔红霉素产生耐药;体外药敏试验显示的柔红霉素的耐药率与患者实际发生耐药的比例无明显差异。结论 TET2基因突变增加了AML对于柔红霉素耐药的发生,其可能成为判断DA方案疗效的重要指标。

关键词 急性髓系白血病; TET2; 柔红霉素; 耐药

中图分类号 R 557 + 1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)02-0246-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.016

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一类造血干细胞的恶性克隆性疾病,具有高度异质性,以骨髓原始细胞的异常增殖和分化为特征,化疗是其最主要的治疗手段之一,但因原发或继发耐药的原因而导致治疗失败率居高不下。目前有研究^[1]表明,表观遗传学异常,如DNA甲基化可影响白血病细胞对化疗药物的敏感性。研究^[2-3]显示TET2基因突变与造血系统恶性肿瘤密切相关,并在诊断、治疗和预后评估中具有潜在价值。

2017-10-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81200371); 高等学校博士学科点专项科研联合资助课题(编号:20123420120011); 安徽省自然科学基金(编号:1208085QH154, 1708085MH224); 安徽省教育厅高校优秀青年人才支持计划项目(编号:gxycZD2017029)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院血液内科,合肥 230022

²安徽马鞍山人民医院血液科,马鞍山 243000

作者简介: 杨 柳,女,副主任医师,硕士研究生;

葛 健,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: gejian77@medmail.com.cn;

夏瑞祥,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: xrx2041@163.com

Viguié et al^[4]在4例AML患者中发现4q24上的基因重排,通过BAC克隆和荧光原位杂交显示4q24断裂处0.5Mb的缺失区域。Delhommeau et al^[5]首次报道了在骨髓增殖性疾病患者中染色体4q24的杂合缺失,TET2基因突变最早发现于JAK2V617F阳性的骨髓增殖性疾病中,后来在系统性肥大细胞症,骨髓增生异常综合症及AML中也有发现。该研究利用高通量二代测序及体外药敏试验等技术手段,将54种白血病相关基因与AML对于化疗药物耐药性之间的相关性进行探讨,同时将其与临床资料结合,以期找出具有预测发生耐药的特定指标。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取2016年1月~12月安徽医科大学第一附属医院血液科初诊AML患者74例,其中男40例,女34例,年龄16~83岁,中位年龄46岁。根据2008年WHO诊断标准将患者分为:AML微分化型(M0)1例,AML未分化型(M1)2例,AML部分分化型(M2)41例,急性粒单细胞白血病(M4)11例,急性单核细胞白血病(M5)16例,急性红白血病(M6)3例。基因检测时间:初诊治疗前。高通量体外药敏检测试验抽样时间:患者接受治疗前抽取外周静脉血4~8 ml。

1.2 单个核细胞分离纯化 患者所取样本采用Ficoll密度梯度离心法分离,同时淋巴细胞分离液和细胞培养液RPMI 1640预热至室温。在15 ml离心管中加入适量的淋巴细胞分离液,取肝素抗凝静脉血与2倍量的Hank's液或RPMI 1640充分混匀,离心。离心后取中间白色云雾层狭窄带单个核细胞层,加入含有20%胎牛血清的RPMI 1640,重悬细胞。

1.3 高通量二代测序实验方法 分离提纯的单个核细胞进行DNA抽提,NanoDrop鉴定纯度。DNA与探针混合后先加温到95℃ 1 min,然后将热模块设到40℃让样本探针缓慢降温到40℃(大概需要约80 min)。然后,除未杂交上的探针,延伸并连接杂交上的探针进行PCR扩增。利用AMPure XP纯化PCR完成后的产物并进行质控,上机检测。高通量二代测序实验主要检测54个白血病相关基因,见

表 1。

1.4 体外药物敏感性检测 分离、提取的单个核细胞计数后按照 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞/1ml 在细胞加样槽中充分混匀后 采用 Corning 384 孔不透明白

色细胞培养板进行培养,每孔体积 50 μ l,细胞数目为 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ 。采用 JANUS@ automated workstation (美国 Perkin Elmer Inc 公司) 进行加药,药物名称见表2,每孔0.1 μ l,给药后37 $^{\circ}$ C、5% CO₂

表 1 基因检测列表

基因	靶向区域(外显子)	基因	靶向区域(外显子)	基因	靶向区域(外显子)
ABL1	4-6	FLT3	14+15+20	NRAS	2+3
ASXL1	12	GATA1	2	PDGFRA	12,14,18
ATRX	8-10 and 17-31	GATA2	2-6	PHF6	full
BCOR	full	GNAS	8+9	PTEN	5+7
BCORL1	full	HRAS	2+3	PTPN11	3+13
BRAF	15	IDH1	4	RAD21	full
CALR	9	IDH2	4	RUNX1	full
CBL	8+9	IKZF1	full	SETBP1	4(partial)
CBLB	9,10	JAK2	12+14	SF3B1	13-16
CBLC	9,10	JAK3	13	SMC1A	2,11,16+17
CDKN2A	full	KDM6A	full	SMC3	10,13,19,23,25+28
CEBPA	full	KIT	2,8-11,13+17	SRSF2	1
CSF3R	14-17	KRAS	2+3	STAG2	full
CUX1	full	MLL	5-8	TET2	3-11
DNMT3A	full	MPL	10	TP53	2-11
ETV6/TEL	full	MYD88	3-5	U2AF1	2+6
EZH2	full	NOTCH1	26-28,+34	WT1	7+9
FBXW7	9+10+11	NPM1	12	ZRSR2	full

表 2 药物筛查列表 (81 种)

药物名称	学术名	药物名称	学术名	药物名称	学术名
Vincristine	长春新碱	Mitoxantrone	米托蒽醌	Clofarabine	氟达拉滨
Vinblastine	长春花碱	Pirarubicin	吡柔比星	Ponatinib	泊那替尼
Etoposide	依托泊苷	Imatinib	伊马替尼	Mycophenolate mofetil	吗替麦考酚酯
Teniposide	替尼泊苷	Nilotinib	尼罗替尼	PCI32765	依鲁替尼
Irinotecan	伊立替康	Dasatinib	达沙替尼	BIBW2992	
Gemcitabine	吉西他滨	Bortezomib	硼替佐米	HY-X-0009	
Methotrexate	甲氨蝶呤	Decitabine	地西他滨	HY-16462	
Cytarabine	阿糖胞苷	Thalidomide	沙利度胺	Dinaciclib	
5-Fu	5-氟尿嘧啶	Lenalidomide	来那度胺	Palbociclib	
Cyclophosphamide	环磷酰胺	Dexamethasone	地塞米松	BTK-M-001	
Ifosfamide	异环磷酰胺	Prednisone	强的松	BTK-M-035	
Midostaurin	米哚妥林	Methylprednisolone	甲基强的松	龙 LXX5-122	
Busulfan	白消安	Hydrocortisone	氢化可的松	LXX5-213	
Melphalan	美法仑	Cinobufagin	华蟾素	LXX5-165	
Chlorambucil	苯丁酸氮芥	Disulfiram	双硫仑	LXX5-187	
Cisplatin	顺铂	Mycophenolicacid	霉酚酸	WQ-C-74	
Carboplatin	卡铂	Tepotecan	托泊替康	WQ-C-110	
Bleomycin	博来霉素	Homoharringtonine	高三尖杉酯碱	BMX-053	
Lomustine	洛莫司汀	Hydroxycamptothecin	羟基喜树碱	VPS34-015	
Carmustine	卡莫司汀	Celastrol	雷公藤红素	VPS34-046	
Dacarbazine	达卡巴嗪	Triciribine	曲西立滨	A674563	
Hydroxyurea	羟基脲	Retinoic acids	维甲酸	BHL-7059a	
Doxorubicin	阿霉素	Bexarotene	贝沙罗汀	BHL-IV-29	
Epirubicin	表柔比星	Ouabain	哇巴因	BHL-IV-30	
Daunorubicin	柔红霉素	ZincPyrithione	吡硫锌	LXX5-111	
Cladribine	克拉屈滨	Vinflunine	长春氟宁	Abl-LXS-016	
Trametinib	曲美替尼	Adefovir Dipivoxil	阿德福韦酯	PDGFR-002	

培养箱中孵育 72 h 后,加入 10 μl CellTiter-Glo 细胞增殖荧光检测试剂,静置 10 min,Envision Plate-Reader 读数。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二代测序实验结果 74 例 AML 患者中 11 例发生 TET2 基因突变,见表 3,11 例 TET2 突变患者中有 5 例患者同时发生 ASXL1 基因突变,其余 63 例患者基因检测结果显示均未发现 TET2 基因突变。

2.2 高通量体外药敏实验结果 对于 81 种药物进行检测分析,表明柔红霉素耐药性最高,结果显示 11 例 TET2 基因突变阳性患者中 9 例(81.82%)对柔红霉素不敏感,63 例 TET2 基因突变阴性患者中仅 4 例(6.35%)对柔红霉素不敏感,两组结果差异有统计学意义($\chi^2 = 31.805, P < 0.05$)。在 TET2 基因突变阳性的 11 例患者中,10 例采用柔红霉素 + 阿糖胞苷(DA)方案化疗,具体为柔红霉素 45 mg/

m²第 1~3 天,阿糖胞苷 100 mg/m²第 1~7 天,1 例放弃治疗,3 例完全缓解,7 例未缓解,耐药率为 70%,见表 4。体外药敏试验中耐药率与患者未缓解率差异无统计学意义。

3 讨论

TET2 定位于染色体 4q24 的断裂点^[6],在体内广泛表达,编码 TET2 蛋白,阻止细胞的不可控生长,进而阻止肿瘤形成。TET2 突变能使 TET2 蛋白功能丢失,从而导致造血干细胞异常的增殖和分化。近几年在多种血液恶性疾病中发现 TET2 基因突变。TET2 常见的突变类型有错义突变,无义突变,移码突变及短小插入缺失等^[6]。TET2 突变最常发生于外显子 3 和 11,突变位置与 TET 酶的功能结构域紧密相关,在催化结构 CD 和 DSBH 的突变会引起蛋白质的错误折叠和氨基酸的替换,产生无功能蛋白,从而导致肿瘤形成^[7]。目前研究^[8]推测 TET2 突变主要分为两类:一类为在骨髓增殖性肿瘤、骨髓增生异常综合征和继发性急性髓系白血病中的突变,预后意义尚不明确;另一类为在慢性粒-单核细胞白血病和原发性急性髓系白血病中的突

表 3 11 例 TET2 患者基本信息

例号	性别	年龄(岁)	FAB 分型	染色体核型分析	突变	柔红霉素
1	女	52	AML-M5	47,XX,+22(10)	TET2	不敏感
2	女	46	AML-M5	46,XX(8) 45XX-21(2)	TET2	不敏感
3	女	16	AML-M2	46,XX(10)	TET2	敏感
4	女	79	AML-M2	46,XX(1)	TET2	不敏感
5	男	67	AML-M5	未见分裂相	TET2	不敏感
6	男	51	AML-M2	46,XY(10)	TET2	不敏感
7	男	53	AML-M2	46,XY(1)	TET2	不敏感
8	男	25	AML-M2	46,XY(10)	TET2	不敏感
9	男	41	AML-M2	46,XY(3)	TET2	不敏感
10	男	37	AML-M2	46,XY(10)	TET2	不敏感
11	男	25	AML-M4	46,XY(10)	TET2	敏感

表 4 11 例 TET2 患者基因突变及用药信息

例号	用药	TET2 突变	柔红霉素相对剩余活性(1.1 μm)	伴有其他基因突变	治疗效果
1	DA	错义	76%	ASXL1 突变	未缓解
2	DA	错义	78%	-	未缓解
3	DA	错义	40%	ASXL1 突变	完全缓解
4	DA	移码	102%	ASXL1 突变	未缓解
5	未治疗	错义	89%	ASXL1 突变	-
6	DA	错义	54%	-	完全缓解
7	DA	错义	69%	ASXL1 突变	未缓解
8	DA	错义	104%	-	未缓解
9	DA	错义	83%	-	未缓解
10	DA	错义	60%	-	未缓解
11	DA	错义	47%	-	完全缓解

变,此类突变具有强致病性和侵袭性,可直接影响患者预后。在一项对原发性 AML 的大规模研究中, Metzeler et al^[9]发现 TET2 的突变率为 23%,随年龄增长,TET2 突变率增加。更重要的是研究发现核型正常的 AML 患者,若伴有 TET2 突变则预后不良。Abdel-Wahab et al^[10]检测了 91 例 AML 患者,其中 11 例发生 TET2 突变,突变率为 12%,而且发现 TET2 突变患者 5 年生存率显著低于无突变患者。Cher et al^[11]发现 72 例 AML 患者中有 8 例发生 TET2 突变,突变率 11%,且无病生存率减低。Ni-bourel et al^[12]发现 111 例完全缓解的 AML 患者中有 19 例检测到 TET2 突变,36 例没有完全缓解的 AML 患者中有 19 例检测到 TET2 突变。这些研究结果也表明 TET2 突变可以作为临床 AML 危险分层的新的生物学标志。魏计锋等^[13]在 96 例患者中检测到 13 例 TET2 突变,突变率为 13.54%。本研究对 74 例 AML 患者中 54 种白血病相关基因进行高通量测序,TET2 基因突变率相对较高,11 例患者存在该突变,突变率为 14.86%,与国内外研究^[10-13]结果相似。另外,这 11 例患者中有 5 例伴有 ASXL1 突变。ASXL1 基因定位于染色体 20q11,编码一个长为 1 541 个氨基酸的核蛋白,参与组蛋白甲基化调控。在 AML 中,ASXL1 突变易发生在老年男性患者,并与 8 号染色体三倍体、RUNX1 突变及 HLA-DR 和 CD34 的表达相关,该基因与耐药性的产生是否具有相关性,仍需进一步研究明确。

为了明确 TET2 基因突变与白血病患者耐药性产生之间的相关性,本研究随后使用 74 例 AML 患者外周血进行体外药敏试验,检测其对于常见化疗药物的敏感性,结果显示对柔红霉素耐药的比例最高。柔红霉素是蒽环类化疗药物,是周期非特异性化疗药物,具有较强的抗肿瘤性,并在 AML 中有较高的完全缓解率和较低的复发率,且与其他蒽环类药物无交叉耐药现象,半衰期长。柔红霉素联合阿糖胞苷联合化疗方案目前临床诱导治疗 AML 的主要方案之一,其中柔红霉素起着重要作用。目前几乎所有的一线标准方案中都含有柔红霉素^[14],其作用机制在于影响细胞的核酸合成,与 DNA 结合,阻碍 DNA 合成和依赖 DNA 的 RNA 的合成反应。DNA 拓扑异构酶 II 是其重要靶点。DNR 干扰拓扑异构酶 II 将 DNA 断端重新接合,造成 DNA 损伤,导致细胞凋亡^[15]。目前报道^[16]显示,临床正在使用柔红霉素时,也有部分患者出现柔红霉素耐药。其耐药机制尚不明确,可能与 NF- κ B 异常活化、I κ B 降

低,致使细胞内耐药基因 P-gp/mdrl 等的表达增多有关。多项研究^[17]结果显示,柔红霉素疗效存在一定的个体差异。目前认为表观遗传学可能影响柔红霉素的疗效,如 DNA 甲基化,组蛋白修饰,microRNA 的表达等都影响了机体对柔红霉素的反应,成为研究热点,而且在临床治疗中也确实存在使用柔红霉素方案疗效欠佳。在本研究中,11 例 TET2 基因突变阳性患者中,有 9 例对柔红霉素不敏感,而 63 例 TET2 基因突变阴性患者中仅有 4 例对柔红霉素不敏感,差异有统计学意义,这表明有 TET2 基因的突变可能有助于患者对柔红霉素产生耐药性。由于体内肿瘤微环境等因素的影响,可能体外试验并不一定与药物的实际临床疗效完全等同,因此,本研究又同时将 11 例 TET2 基因突变阳性患者对于 DA 方案的实际疗效与体外药敏试验进行对比,由于 1 例患者未行化疗,因而无法对其判断疗效,仅将另外 10 例患者的体外药敏试验与实际临床疗效进行对比,结果显示差异无统计学意义。

根据本研究结果,推测 TET2 基因突变可能确实增加了 AML 对柔红霉素产生耐药性的风险。然而,由于本研究中 TET2 基因突变阳性的患者数较少,导致本研究的结果具有一定的局限性,将会在今后的研究中进一步提高样本数,明确是否在大样本的研究中能够得到相同的结果。本研究为今后的工作提供了一个方向,可以建立动物模型,研究发生机制,使基因检测与药敏实验更好结合,对精准医疗,尤其是急性白血病个体化治疗提供依据,从而提高治疗的有效率,有较高的临床指导意义及应用前景。

参考文献

- [1] Pastor W A, Aravind L, Rao A. TET onic shift: Biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013, 14(6): 341-56.
- [2] Langemeijer S M, Aslanyan M G, Jansen J H. TET proteins in malignant hematopoiesis [J]. *Cell Cycle* 2009, 8(24): 4044-8.
- [3] An J, González-Avalos E, Chawla A, et al. Acute loss of TET function results in aggressive myeloid cancer in mice [J]. *Nat Commun* 2015, 6: 10071.
- [4] Vigué F, Aboura A, Bouscary D, et al. Common 4q24 deletion in four cases of hematopoietic malignancy: early stem cell involvement [J]. *Leukemia*, 2005, 19(8): 1411-5.
- [5] Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(22): 2289-301.
- [6] Tefferi A, Pardanani A, Lim K H, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocy-

- themia and myelofibrosis [J]. *Leukemia*, 2009, 23(5): 905 – 11.
- [7] Tefferi A, Lim K H, Abdel-Wahab O, et al. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML [J]. *Leukemia*, 2009, 23(7): 1343 – 5.
- [8] Euba B, Vizmanos J L, García-Granero M, et al. A meta-analysis of TET2 mutations shows a distinct distribution pattern in de novo acute myeloid leukemia and chronic myelomonocytic leukemia [J]. *Leuk Lymphom*, 2012, 53(6): 1230 – 3.
- [9] Metzeler K H, Maharry K, Radmacher M D, et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(10): 1373 – 81.
- [10] Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies [J]. *Blood*, 2009, 114(1): 144 – 7.
- [11] Cher C Y, Leung G M, An C H, et al. Next-generation sequencing with a myeloid gene panel in core binding factor AML Showed KIT activation Loop and TET2 mutations predictive of outcome [J]. *Blood Cancer J*, 2016, 6(7): e442.
- [12] Nibourel O, Kosmider O, Cheok M, et al. Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission [J]. *Bood*, 2010, 116(7): 1132 – 5.
- [13] 魏计锋, 陈广华, 仇惠英, 等. 急性髓系白血病患者 TET2 基因突变发生率及其临床意义 [J]. *中华血液学杂志* 2011, 32(5): 304 – 7.
- [14] O'Donnell M R, Abboud C N, Altman J, et al. NCCN clinical practice guidelines acute myeloid leukemia [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2012, 10(8): 984 – 1021.
- [15] Kaufmann S H, Karp J E, Jones R J, et al. Topoisomerase II levels and drug sensitivity in adult acute myelogenous leukemia [J]. *Blood*, 1994, 83(2): 517 – 30.
- [16] Quiney C, Billard C, Faussat A M, et al. Hyperforin inhibits P-gp and BCRP activities in chronic lymphocytic leukaemia cells and myeloid cells [J]. *Leuk Lymphoma*, 2007, 48(8): 1587 – 99.
- [17] Lughart S, Cheok M H, den Boer M L, et al. Identification of genes associated with chemotherapy crossresistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(4): 375 – 86.

Resistance to daunorubicin in acute myeloid leukemia is associated with mutations in the TET2 gene

Yang Liu^{1, 2}, Ge Jian¹, Xia Ruixiang¹

(¹Dept of Hematology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Hematology, The People's Hospital of Ma'anshan, Ma'anshan 243000)

Abstract Objective To investigate the effect of leukemia-related genes on drug resistance in patients with acute myeloid leukemia (AML). **Methods** 74 patients with newly diagnosed AML were selected and 54 leukemia-associated genes of all patients were sequenced by second-generation gene sequencing. The gene with the highest mutation rate was further analyzed in association with resistance to several common chemotherapy medicines in *in vitro* drug sensitivity assays. In addition, *in vitro* drug resistance data were compared with the clinical data of patients. **Results** The TET2 gene was the most frequent mutation among 74 patients with newly diagnosed AML, with 11 positive patients. Among these 11 TET2 positive patients, 9 (81.82%) were resistant to daunorubicin, while only 4 (6.35%) out of 63 TET2 negative patients were resistant to daunorubicin. Besides, there was no significant difference between *in vitro* resistance rate to daunorubicin and the clinical data of patients. **Conclusion** TET2 gene mutation is associated with resistance to daunorubicin in AML patients, which may become an important indicator of the therapeutic efficacy of DA regimen.

Key words acute myeloid leukemia; TET2; daunorubicin; drug resistance