

骨髓增生异常综合征患者 SF3B1 基因突变的检测及意义

许 婧 孙自敏 徐修才 伍 权 汪 健 纪濛濛

摘要 目的 研究骨髓增生异常综合征(MDS)中关于 RNA 剪接因子 3B 第 1 亚单位(SF3B1)基因突变的检出率,进一步分析其与临床特征的关系。方法 收集 70 例血液病患者骨髓标本,采用聚合酶链式反应技术(PCR)扩增目的片段,随后进行直接测序检测 SF3B1 突变情况。结果 52 例 MDS 患者中有 4 例发生 SF3B1 基因突变,发生率为 7.7%,突变类型均为 K700E。突变发生在环形铁粒幼细胞(RS)增多的 MDS 为 3/4 例,发生率为 75%。突变患者显示较长时间的生存期,但病例数较少。结论 伴 RS 增多的 MDS 患者中 SF3B1 突变常见,突变阳性患者具有独特的临床特征和较好的预后。

关键词 SF3B1 基因;骨髓增生异常综合征;聚合酶链式反应

中图分类号 R 551.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)10-1440-04

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)是因造血干细胞恶性病变而引起的一组克隆性、异质性髓系肿瘤。染色体异常在 MDS 的预后中起着重要的作用,近年来,随着全基因组的测序技术和基因芯片等技术的开展应用,已有许多获得性基因突变被证明在 MDS 的发生、发展和预后起

着重要的作用^[1-5]。最近,有研究^[6-9]显示 RNA 剪接因子 3B 第 1 亚单位(splicing factor 3B subunit 1, SF3B1)基因突变与 MDS 患者环状铁粒幼细胞(ring sideroblasts, RS)的出现密切相关,而国内有关 SF3B1 基因突变与 MDS 不同亚型的关系和预后鲜有报道^[10]。该研究旨在建立 SF3B1 基因检测方法,分析其不同 MDS 亚型患者中的检出率及其与预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 DNA 抽提试剂盒购自南京 Kar-roten 公司;DNA 聚合酶试剂盒购自大连宝生生物公司。

1.1.2 主要仪器 紫外/可见分光光度计:德国艾本德公司;TGL-46G 型低温超速离心机:上海飞鸽仪器厂;高速冷冻离心机:珠海黑马医学仪器有限公司;−80℃超低温冰箱:美国 Forma 公司;普通 −20℃冰箱:中国海尔技术有限公司;精密电子天平:上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂;DK-8D 型电热恒温水槽:上海跃进医疗器械厂;PCR 扩增仪:德国 Biometra 公司;DYY-40 型恒压恒流电泳仪:北京六一仪器厂;Gel Doc 2000 系统紫外照相仪:美国 BIO-RAD 公司

1.2 方法

1.2.1 病例资料 收集 2012 年 3 月~2013 年 12

2014-06-13 接收

基金项目:安徽省十二五科技攻关项目资助(编号:11010402164)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院血液科,合肥 230001

作者简介:许 婧,女,硕士研究生;

孙自敏,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: zmsun_vip@163.com

groups randomly, which were treated by citrate-bicarbonate dialysate and ordinary carbonate dialysate for maintenance dialysis in 12 month, respectively. The levels of interleukin-17 (IL-17) and percentages of Th17 subgroup in peripheral blood were detected by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometer, respectively. **Results** The levels of IL-17 and percentages of Th17 subgroup in patients treated with citrate-bicarbonate dialysate for more than six months were significantly lower than those treated with ordinary carbonate dialysate. Moreover, incidences of adverse reactions in group of citrate bicarbonate dialysate were lower than those of common carbonate dialysate group. **Conclusion** The pro-inflammatory effects of maintenance hemodialysis with citrate-bicarbonate dialysate on the patients are lower than those of ordinary carbonate dialysate. Citrate-bicarbonate dialysate causes the reduction of inflammatory state, and is worthy of being popularized in clinic.

Key words citrate; bicarbonate; chronic renal failure; hemodialysis

月在安徽医科大学附属省立医院住院或门诊就诊的血三系减少的血液病患者共 70 例,经骨髓细胞学、免疫分型、染色体核型、分子生物学等检查确诊为初发 MDS 44 例,非初诊 MDS 8 例,其他类型血液病 18 例(新发急性髓细胞白血病 1 例,再生障碍性贫血 15 例,慢性淋巴细胞白血病 1 例,淋巴瘤 1 例)作为对照。按照 2008 年 WHO 分型标准,本组 52 例 MDS 患者中 RARS 3 例,RCMD 16 例,伴环形铁粒幼细胞增多的 RCMD(RCMD-RS) 1 例,RAEB-1 型 17 例,RAEB-2 型 15 例。其中男 27 例,女 25 例,中位年龄 59.5(14~83 岁)。

1.2.2 基因组 DNA 的制备 在患者知情同意的情况下抽取患者新鲜骨髓标本 2 ml,取 200 μ l 采用 DNA 抽提试剂盒在无菌条件下提取基因组 DNA,应用紫外分光光度仪测定样本的 OD 值,所有用于 PCR 的 DNA 样本的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.5~1.8,去离子水稀释 DNA 至 100 ng/ μ l,剩余 DNA 放于 -80 $^{\circ}$ C 冻存。

1.2.3 PCR 扩增 根据 GeneBank 上目标基因序列,其中 SF3B1 扩增 3 个外显子,由 Invitrogen 公司合成引物,引物序列及反应条件见表 1。外显子 14、15、16 产物大小分别为 540、532、534 bp。反应体系为:10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ l, MgCl₂ 3 μ l, dNTP 0.5 μ l,上下游引物各 0.33 μ l, Taq 酶 0.2 μ l,其他由去离子水补足,PCR 扩增产物送上海华大基因公司测序。

表 1 SF3B1 引物序列及反应条件

引物	序列(5'-3')	反应条件
SF3B1 exon 14-F	CATTCTAATTGGCAAAGG	94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 40 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58.6 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min)
SF3B1 exon 14-R	CAGCCTCCTAGTAGTTGGG	
SF3B1 exon 15-F	GGGAGATAAATGGAAAGGCA	94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 40 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min)
SF3B1 exon 15-R	TTATGGATGCAGAAATATGCC	
SF3B1 exon 16-F	CGAATCTTTTGATTCTGTGT	94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 40 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57.2 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min)
SF3B1 exon 16-R	CTTTTAGGTGGTAAACAGTG	

1.2.4 染色体核型分析 采用短期培养胰酶消化 G 显带技术,采取患者骨髓标本,经 24 h、37 $^{\circ}$ C 培养后,胰酶消化、固定、制片,显微镜下核型分析,根据细胞遗传学国际命名体制(ISCN 2005)判定核型。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 19.0 软件进行分析。患者的年龄、血红蛋白计数、血小板计数、白细胞计

数的中位数比较采用秩和检验,两组间性别、染色体核型、国际预后积分系统、WHO 分型的比较采用 χ^2 检验,当有 1 格的理论频数小于 5,采用连续性校正的 χ^2 检验,如果有 1 格的理论频数小于 1,采用 Fisher 确切概率法。Kaplan-Meier 曲线计算总体生存率,率的比较采用 Log-rank 检验。

2 结果

2.1 SF3B1 在 MDS 患者中的检出率 在 52 例 MDS 患者中共检测到 SF3B1 基因突变 4 例,发生率为 7.7%。其中 SF3B1 基因突变在 MDS 亚型中的分布为:RARS 2 例、RCMD 1 例及 RCMD-RS 1 例。本组 RARS/RCMD-RS 病例中 SF3B1 基因突变的检出率为 75%。检出的 4 例点突变位于外显子 15,为杂合性突变,均为碱基由 A 变成 G,见图 1,即 AAA 变为 GAA。其他再生障碍性贫血、淋巴瘤等对照患者未检出 SF3B1 基因突变。4 例突变患者的临床特征及突变相关信息见表 2。

表 2 SF3B1 基因突变的 4 例 MDS 患者的临床特征与突变信息

序号	性别	年龄(岁)	诊断	核型	基因突变类型
1	男	80	RARS	46,XY,20q- 46,XY[10]/46,XY, 1p-5q-20p+,- 6,-10,-17,+ marker1,2,3[10]	K700E
2	男	66	RARS		K700E
3	男	83	RCMD	46,XY	K700E
4	女	73	RCMD-RS	46,XX	K700E

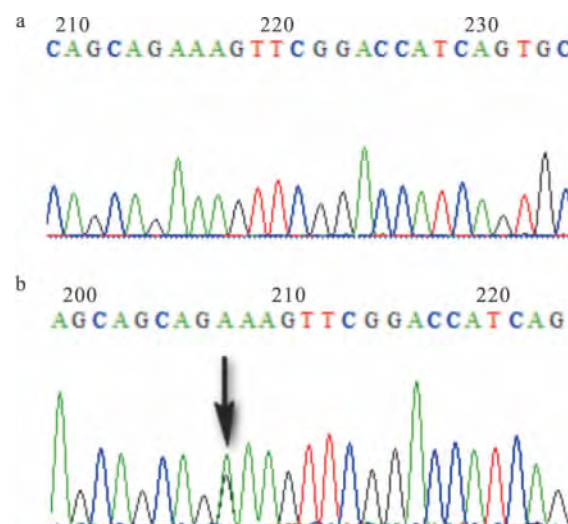


图 1 SF3B1 基因突变测序结果

a:野生型;b:突变型;碱基由 A>G;箭头处为突变位点

2.2 SF3B1 基因突变对 MDS 不同亚型和预后的影响 对 52 例 MDS 患者中进行随访,随访截止日期至 2014 年 1 月 30 日。其中 5 例失访,47 例患者中位随访时间为 9(2~144)个月,随访中死亡的患者均死于原发病。发生 SF3B1 基因突变的 MDS 患者有 4 例,1 例失访,中位生存期为 13.5(5~97)个月。未发生突变的 MDS 患者有 48 例,中位生存期为 11(2~144)个月。将随访到的患者分为两组(野生组与突变组)进行统计学分析,结果显示突变组在年龄(76.5 vs 59.0, $P=0.005$)、骨髓原始细胞比例的中位数(0.0% vs 6.4%, $P=0.024$)、血小板计数(96 vs 23, $P=0.043$)方面比较差异有统计学意义。数据显示突变患者年龄较大,拥有较低的原始细胞、较高的血小板计数以及较好的染色体核型。其余如性别、血红蛋白计数、白细胞计数、中性粒细胞计数上差异均无统计学意义。根据 WHO 分型, SF3B1 突变在各亚型中的发生率经 χ^2 检验比较差异有统计学意义,突变在 MDS 患者伴 RS 的类型中发病率为 75% 在非 RS 类型中为 2% ($P=0.002$)。再根据国际预后评分系统(International Prognostic Scoring System, IPSS),细胞遗传学方面,其染色体核型两组对比差异有统计学意义($P=0.013$),见表 3,两组总生存率相比差异无统计学意义($P=$

0.784)。本研究显示 4 名突变患者除 1 例失访以外,另 3 名至随访日均存活,自诊断至随访日 3 名 SF3B1 突变患者存活时间分别为 97、18、9 个月,其各项临床指标一直比较稳定。

3 讨论

剪接体在 RNA 剪接过程中起着重要的作用,主要由 5 个小核糖核蛋白(snRNP)复合体组成,包括 U1、U2、U3、U4、U5、U6 等。其中, SF3B1 编码的蛋白是 U2snRNP 的一个组成部分。RNA 的剪接是需要精确识别外显子-内含子交界处的位点,因重要剪接体组份的突变导致插入或者移除核苷酸,会导致将来翻译蛋白质的开放读码框架的改变,而因剪接亚型的不同导致人类多种疾病的发生已早有报道^[11]。近年来发现的关于 RNA 剪接分子的异常,如 SF3B1、U2AF1、SRSF2^[6]等,提示其与 MDS 发病密切相关。

本研究采用直接测序,检测 MDS 患者中 SF3B1 发生率。结果显示 52 例患者中 SF3B1 基因突变率为 7.7%,均为杂合突变,为常见突变类型 K700E,主要发生在伴 RS 亚型中, RARS/RCMD-RS 中突变率高达 75%,明显高于其他亚型,提示 SF3B1 基因是 MDS 伴 RS 亚型特有的分子生物学标志,与其发病机制密切相关,与其他研究^[7-8,12]结果类似。RS 是铁蛋白在红系祖细胞其线粒体膜上的异常沉积,是因血红素的合成发生障碍而导致铁的利用度下降便以铁蛋白的形式沉积在线粒体内^[13]。突变多发生于 HEAT 区域,冷冻电镜显示 HEAT 区包含了 SF3B 复合物的核心区,在这个区域包含了分支位点与 p14 的作用,突变改变了对分支位点的识别进而导致疾病的发生。

本研究显示突变组患者血红蛋白计数等和野生组比较差异无统计学意义,而骨髓原始细胞比例较野生型低,血小板数较高,年龄较大,拥有较好的染色体核型,与既往研究^[8,12]报道类似。可能是因为突变患者多出现于 MDS 伴 RS 的亚型中,与这类亚型的临床特征有关。亦有部分研究^[14]显示该突变不影响预后在单变量的分析中,突变组其总体生存率及无病生存率较野生组高,但将 RARS、RCMD-RS 两型分开研究则发现是否发生突变对预后的影响无明显差异。本研究显示 4 名突变患者除 1 例失访以外,另 3 名均存活。1 例患者 2005 年诊断为 RARS,一直在门诊随访至近两年血红蛋白维持不佳

表 3 SF3B1 基因突变组与野生组 MDS 患者一般临床资料

项目	突变型 (n=4)	野生型 (n=48)	Z 或 χ^2 值	P 值
性别(男/女)	3/1	24/24	0.194	0.659
年龄(岁)	76.5(76~83)	59.0(14~80)	7.276	0.005
白细胞($\times 10^9/L$)	2.50(1.99~3.52)	2.14(0.25~12.27)	0.865	0.328
血红蛋白(g/L)	62.5(44~96)	57.0(25~114)	0.382	0.536
血小板($\times 10^9/L$)	96(35~234)	23(2~320)	4.108	0.043
中性粒细胞绝对值($\times 10^9/L$)	1.25(0.70~1.45)	0.90(0.00~7.90)	0.449	0.503
骨髓原始细胞数(%)	0.0	6.4(0.0~17.5)	5.123	0.024
染色体核型(%)			8.719	0.013
好	1(25)	0(0)		
中度	2(25)	47(98)		
差	1(25)	1(2)		
IPSS(%)			0.709	0.782
低危	0(0.0)	1(2.0)		
中危-1	3(75.0)	26(54.2)		
中危-2	1(25.0)	18(37.5)		
高危	0(0)	3(6.3)		
WHO 分型(%)			16.903	0.002
RARS	2(50.0)	1(2.0)		
RCMD	1(25.0)	15(31.3)		
RCMD-RS	1(35.0)	0(0.0)		
RAEB-1	0(0.0)	17(35.4)		
RAEB-2	0(0.0)	15(31.3)		

予以去甲基化药物的治疗,治疗反映良好,仍在定期随访中。另2例患者1例为RCMD,另1例为RCMD-RS,均为去年诊断,都在门诊随访,各项临床指标一直比较稳定。本研究中两组总体生存率差异无统计学意义,可能是收集病例中的伴RS亚型(4例)较少,导致阳性病例数亦不多,需进一步扩大病例数得到更为可靠的结果。

综上所述,SF3B1基因的突变是一种新型的分子学异常,参与选择性剪接而导致疾病的发生,与MDS伴RS亚型的发病密切相关,为了解MDS的发病机制提供了新的研究方向。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med* 2010, 363 (25): 2424–33.
- [3] Thol F, Weissinger EM, Krauter J, et al. IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis [J]. *Haematologica* 2010, 95 (10): 1668–74.
- [4] Boultonwood J, Perry J, Pellagatti A, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia* 2010, 24 (5): 1062–5.
- [5] Harada H, Harada Y, Niimi H, et al. High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia [J]. *Blood* 2004, 103 (6): 2316–24.
- [6] Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia [J]. *Nature* 2011, 478 (7367): 64–9.
- [7] Visconte V, Rogers HJ, Singh J, et al. SF3B1 haploinsufficiency leads to formation of ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes [J]. *Blood* 2012, 120 (6): 3173–86.
- [8] Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts [J]. *N Engl J Med* 2011, 365 (15): 1384–95.
- [9] Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic myeloproliferative neoplasms [J]. *Blood* 2011, 118 (24): 6239–46.
- [10] 杨静,姚冬明,钱军等.建立高分辨熔解曲线分析法检测SF3B1基因突变[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2013, 23(1): 49–52.
- [11] Yokoi A, Kotake Y, Takahashi K, et al. Biological validation that SF3b is a target of the antitumor macrolide pladienolide [J]. *FEBS J* 2011, 278 (24): 4870–80.
- [12] Cui R, Gale RP, Xu Z, et al. Clinical importance of SF3B1 mutations in Chinese with myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts [J]. *Leuk Res* 2012, 36 (11): 1428–33.
- [13] Cazzola M, Invernizzi R. Ring sideroblasts and sideroblastic anemias [J]. *Haematologica* 2011, 96 (6): 789–92.
- [14] Patnaik MM, Lasho TL, Hodnefield JM, et al. SF3B1 mutations are prevalent in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts but do not hold independent prognostic value [J]. *Blood* 2012, 119 (2): 569–72.

Detection and clinical significance of SF3B1 gene mutation in myelodysplastic syndrome

Xu Jing, Sun Zimin, Xu Xiucui, et al

(Dept of Hematology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective In order to evaluate the incidence of Splicing factor 3 subunit 1 (SF3B1) gene mutation in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and its clinical and prognostic significance. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) was used to expand the target fragment before detecting mutations of SF3B1 gene in 70 patients with hematologic disease. **Results** SF3B1 mutations were identified in 4 of 52 (7.7%) patients including 4 cases of K700E mutation. SF3B1 mutations were mostly found with ringed sideroblast (3/4). The proportion of subjects with SF3B1 mutations in MDS with RS was 75%. The mutation cases showed longer survival time, but the number of cases was too small. **Conclusion** It is concluded that SF3B1 mutation is frequent in MDS with increased RS patients. SF3B1 mutation patients have unique clinical features and better prognosis.

Key words splicing factor 3 subunit 1; polymerase chain reaction; myelodysplastic syndrome