

• 临床检验研究论著 •

荧光原位杂交技术在骨髓增生异常综合征预后因素分析中的应用

赵文杰¹, 周洪兴^{1△}, 岑玲², 王苏建¹, 张平¹, 王家平¹

(南京医科大学附属常州市第二人民医院:1. 检验科;2. 血液科, 江苏常州 213003)

摘要:目的 探讨骨髓增生异常综合征(MDS)患者年龄、遗传学核型及是否转化为白血病等因素对预后的影响。方法 对 50 例骨髓增生异常综合征患者进行常规细胞遗传学核型分析并对 5、7、8 号染色体进行荧光原位杂交(FISH)检测,运用单因素 Cox 回归模型分析年龄、遗传学核型及是否转化为白血病等因素对患者生存率的影响。结果 50 例 MDS 患者中 19 例常规细胞遗传学核型分析法检出异常,30 例患者经 FISH 检出异常,FISH 法检出阳性率高于常规方法,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Cox 回归模型分析显示 65 岁以上患者、遗传学核型异常者、转化为白血病的患者死亡风险分别高于 65 岁以下患者、遗传学核型正常者、未转化为白血病的患者(P 均小于 0.05)。结论 FISH 技术能敏感地检测出小克隆异常,运用常规细胞遗传学技术结合多种探针进行分析,能对 MDS 患者的诊断、转归及预后进行更为准确的判断。MDS 患者的细胞遗传学核型异常及转归是影响患者预后的重要因素。

关键词:骨髓增生异常综合征; 原位杂交, 荧光; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)13-1673-03

Application of fluorescence in situ hybridization in the analysis of prognostic factors in patients with myelodysplastic syndrome

Zhao Wenjie¹, Zhou Hongxing^{1△}, Cen Ling², Wang Sujian¹, Zhang Ping¹, Wang Jiaping¹

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Haematology, the Second People's Hospital of Changzhou Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou, Jiangsu 213003, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of several factors such as age, genetic karyotype, and the leukemia transformation on the prognosis in patients with myelodysplastic syndrome(MDS). **Methods** The routine genetic karyotype analysis and the method of fluorescence in situ hybridization(FISH) for chromosome 5, 7, 8 were used in 50 patients with MDS. The effects of age, genetic karyotype as well as leukemia transformation on prognosis were then studied by Cox regression singleivariate analysis. **Results** Nineteen abnormal genetic karyotype patients were found in 50 MDS patients, and 30 anomalous cases were detected by FISH. The positive rate of FISH was significantly higher than the genetic karyotype analysis, the difference was statistically significant($P < 0.05$). It was showed by Cox regression analysis that patients with the age of more than 65 and abnormal genetic karyotype as well as those leukemia transformed cases have a high risk of death than the rest patients($P < 0.05$). **Conclusion** The method of FISH can be used to detect abnormal clone cells sensitively. For MDS patients, the diagnosis and prognosis can be determined more exactly by combined using of routine genetic karyotype analysis and multi-probe detection. The abnormal cytogenetic karyotype and leukemia transformation are the key factors affecting the prognosis of MDS patients.

Key words: myelodysplastic syndromes; in situ hybridization, fluorescence; prognosis

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)是一组造血干/祖细胞恶性克隆增殖性疾病,以骨髓病态造血和外周血细胞减少为特征,具有转变为白血病的高风险性^[1]。染色体核型异常对于 MDS 的预后具有重要影响^[2-4]。由于常规细胞遗传学分析只能分析分裂中期细胞,且受到染色体数量和制片质量的影响,因而检出 MDS 的克隆性异常率较低。近年来发展的荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)能在染色体制片和骨髓涂片的基础上分析大量分裂中期或间期细胞,用以检测染色体的数目和结构异常,因而成为细胞遗传学的重要补充^[5-6]。

本研究在进行常规细胞遗传学核型分析的基础上采用 FISH 技术对该院近年来就诊的 50 例 MDS 患者进行常见的 5、7、8 号染色体异常检测,同时对其性别、年龄、是否转化为白血病等因素进行综合分析,旨在探讨 MDS 患者的临床及遗传学因素对其预后的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 50 例 MDS 患者均为 2005 年 1 月至 2010 年 6 月在该院门诊或住院患者,其中男 29 例,女 21 例,平均年龄 60 岁(30~86 岁)。均为初诊患者,其中 MDS-RA 8 例, MDS-RCMD 5 例, MDS-RAS 2 例, MDS-RAEB 16 例, MDS-RAEB-2 19 例。诊断和疗效标准参照《血液学诊断及疗效标准》^[7]及《血液肿瘤骨髓诊断图谱》^[8]。对照组为 6 例同期住院的缺铁性贫血患者。

1.2 仪器与试剂 FISH 分析探针及试剂均购自 Vysis 公司。LSI5qEGR1/D5S23, D5S721 探针检测 - 5/5q -; LSI D7S522/CEP7 探针检测 - 7/7q -; CEP8 探针检测 8 号染色体。

1.3 方法 50 例患者取新鲜外周血标本 2 mL,肝素抗凝,加入含植物血凝素(PHA)的 RPMI 1640 培养瓶中 37 ℃ 培养 72 h,向标本中加入秋水仙酰胺至终浓度为 0.05 μg/mL,于 37 ℃

培养箱中继续培养 1 h 后,以 0.075 mol/L 的 KCl 溶液进行低渗处理 30 min,再以 3:1 的甲醇、冰醋酸溶液固定 3 次,然后气干法滴片。常规遗传学核型分析采用 R 显带技术,每例患者分析中期分裂相 20 个。杂交标本于杂交前 1 d 滴片,室温老化过夜。相差显微镜下观察,划定杂交区域。按照探针试剂说明书进行 DNA 变性、杂交、洗片及复染。用荧光显微镜观察标本,LSI5qEGR1/D5S23, D5S721 探针在正常间期细胞中表现为 2 个红色信号及 2 个绿色信号,如仅见 1 个红色信号为 5q-, 仅见 1 个绿色信号为 -5; LSI D7S522/CEP7 探针在正常间期细胞中表现为 2 个红色信号及 2 个绿色信号,如仅见 1 个红色信号为 7q-, 仅见 1 个绿色信号为 -7; CEP8 探针在正常间期细胞中表现为 2 个绿色信号,出现 3 个绿色信号为 +8。分析每例正常对照标本的 200 个间期细胞,计算出阳性信号的百分率及其均值(\bar{x})和标准差(s),以 +2s 作为截断值。分析每例 MDS 患者的 200 个间期细胞,计算出阳性信号的百分率,超过截断值者判定为阳性。每例标本均进行重复性实验。

1.4 统计学处理 所有数据以 SPSS11.0 统计软件进行统计处理。阳性率的比较采用 χ^2 检验,用 Kaplan-Meier 法进行生存分析并绘制生存曲线,Log-rank 检验比较生存曲线;用 Cox 回归模型进行生存时间的单因素分析。所有检验以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 常规遗传学结果分析 50 例患者中出现异常核型 19 例,占 38.0%,其中累及 5 号染色体 6 例,7 号染色体 4 例,8 号染色体 8 例,20q- 3 例,1q+ 2 例。

表 1 患者生存时间与各种影响预后因素的关系

因素	n	中位生存时间(月)	P(Log-rank)	
性别	男	29	26.3	0.028
	女	21	54.1	
年龄	≥65 岁	26	24.2	0.140
	<65 岁	24	36.8	
遗传学异常	有	19	15.6	0.001
	无	31	36.8	
FISH 异常	有	30	19.2	0.000
	无	20	>36.8	
转为白血病	是	17	15.6	0.000
	否	33	52.2	

2.2 FISH 结果 用 LSI5qEGR1/D5S23, D5S721 探针检查 5 号染色体,正常对照出现 1 个红信号缺失的百分比为(4.12±1.16)%,将大于 6.44% 定为 5q- 的阳性值。正常对照出现一个绿信号及一个红信号同时缺失的百分比为(1.98±0.49)%,将大于 2.96% 定为 5 号染色体缺失的阳性值。50 例 MDS 患者中检出 14 例存在 5q-/-5,阳性率 28.0%。

用 LSI D7S522/CEP7 探针检查 7 号染色体,正常对照出现 1 个红信号缺失的百分比为(1.56±0.66)%,将大于 2.88% 定为 7q- 的阳性值。正常对照出现 1 个绿信号及 1 个红信号同时缺失的百分比为(1.09±0.35)%,将大于 1.79% 定为 7 号染色体缺失的阳性值。50 例患者中检出 9 例 7q-/-7,阳性率 8.0%。

用 CEP8Acqua 探针检查 8 号染色体,对照组出现 3 个蓝

色信号的百分比为(0.29±0.12)%,将大于 0.53% 定为 8 号染色体三体的阳性值。12 例 MDS 患者被检出 8 号染色体异常,阳性率 24.0%,其中 1 例出现 8 号染色体四倍体。运用 FISH 技术,50 例患者共检出 5、7、8 号染色体异常 30 例,占 60.0%,与用常规染色体核型分析方法(38%)比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.84, P = 0.028$)。

2.3 随访结果 50 例 MDS 患者随访至 2012 年 6 月,截至随访结束,存活 19 例,死亡 29 例,失访 2 例。有 17 例转化为急性白血病,其中 14 例伴遗传学核型异常。患者生存时间与各种影响预后的因素(包括性别、年龄、常规遗传学核型分析结果、FISH 检测结果以及是否转归为白血病等)的关系见表 1。遗传学核型分析正常及异常患者的生存曲线见图 1。转化及未转化为白血病患者生存曲线见图 2。死亡危险度的单因素 Cox 回归模型分析结果见表 2。

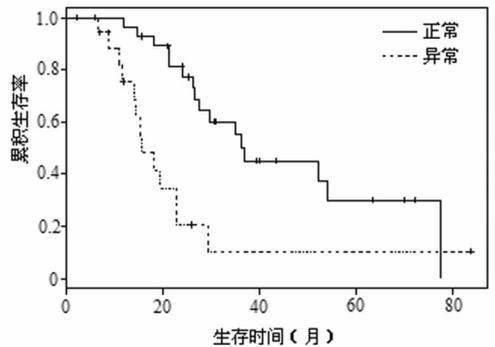


图 1 遗传学核型正常与异常患者的生存曲线

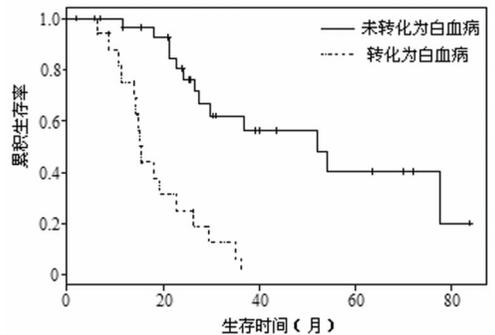


图 2 转化与未转化为白血病患者生存曲线

表 2 死亡危险度的单因素 Cox 模型分析

因素	回归系数	相对危险度	标准误	P
性别	0.914	2.49	0.429	0.133
年龄	0.029	1.03	0.014	0.043
有无遗传学异常	1.230	3.44	0.392	0.002
有无 FISH 异常	1.640	5.16	0.496	0.001
是否转为白血病	1.870	6.51	0.426	0.000

单因素 Cox 回归模型分析结果显示:常规遗传学核型分析异常者、578 号染色体 FISH 检出阳性者以及转化为白血病的患者死亡危险度较相应的正常者、阴性者及未转为白血病患者高,同时年龄越大,死亡风险也越高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

影响 MDS 患者的预后因素很多,其中克隆性染色体异常

对预后的影响已公认^[9-11]。但常规的遗传学核型分析方法往往在实验过程中不能获得令人满意的分裂相,影响了结果的判定。FISH 是近年来在细胞遗传学、分子生物学和免疫学基础上发展起来的以核酸序列特异性探针以不同的荧光素与经变性处理的靶细胞 DNA 进行杂交检测的方法,它克服了常规细胞遗传学只能分析中期细胞并受分裂相数量和质的影响,导致核型分析失败的弊端,使得确定染色体的畸变类型和染色体的缺失部位更为精确,因而成为判断 MDS 预后的重要指标并对指导其治疗提供了重要帮助^[12]。徐卫和李建勇^[13]报道 MDS 患者 5、7、8 号染色体异常率为 17.08%, 18.75%, 22.39%, 本组结果与其接近。本研究显示运用 FISH 技术,染色体异常检出的阳性率显著高于用常规细胞遗传学分析法的阳性率,提示 FISH 技术能较敏感地检测出小克隆异常,是常规核型分析法的重要补充。

本组病例中 1 例患者治疗 6 月后常规遗传学核型分析方法检出正常,但 FISH 检测仍有复杂核型的微量残留,患者于第 8 个月复发,14 个月后死亡。1 例患者初发时经 FISH 检测即为复杂核型,3 个月后转化为 M2,11 个月后死于颅内出血。有一患者常规核型分析显示为单一异常,FISH 结果显示为复杂异常,2 月后转化为 M5,6 月后死于白血病。由此可见多种探针结合的 FISH 技术较常规核型分析法能更敏感地检测出患者的复杂核型。

本组实验经单因素 Cox 回归模型分析提示患者遗传学核型及疾病的转归是患者死亡危险度的两个重要影响因素,转为白血病的患者死亡危险度最高,研究显示此类患者的细胞遗传学异常通常较形态学异常出现更早^[14-15],且多数伴有复杂核型,运用 FISH 技术能较敏感地判断患者的复杂核型,从而为及早判断这部分患者的预后提供更为可靠的依据。

参考文献

[1] 肖志坚. 骨髓增生异常综合征的诊断与分型[J]. 内科急危重症杂志, 2010, 16(4): 169-171.
 [2] Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes[J].

Ann Hematol, 2008, 87(7): 515-526.
 [3] 陈苏宁. 骨髓增生异常综合征的细胞和分子遗传学异常研究进展[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(12): 881-884.
 [4] Raza A, Galili N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(12): 849-859.
 [5] 陈丽娟, 李建勇, 肖冰, 等. 多重荧光原位杂交结合染色体涂抹技术检测骨髓增生异常综合征复杂核型异常[J]. 中华医学遗传学杂志, 2007, 24(6): 635-639.
 [6] 姜胜华, 刘红, 杨力, 等. 间期荧光原位杂交技术检测骨髓增生异常综合征-7/7q-染色体异常的价值[J]. 山东医药, 2010, 50(45): 24-25.
 [7] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版, 北京: 北京科学出版社, 2007: 157-163.
 [8] 熊树民. 血液肿瘤骨髓诊断图谱[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 74-75.
 [9] 郝建萍, 陈双, 哈力达, 等. 染色体核型分析在骨髓增生异常综合征中的应用[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(32): 2277-2279.
 [10] 徐萍, 王京华, 董家蕾, 等. 骨髓增生异常综合征 83 例患者染色体核型分析[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2011, 45(4): 380-384.
 [11] 何涛. 33 例骨髓增生异常综合征的染色体核型分析[J]. 2012, 33(1): 21-23.
 [12] 唐元艳, 梁艳, 熊涛, 等. 荧光原位杂交技术与细胞遗传学分析在骨髓增生异常综合征患者-5/5q-和-7/7q-检测中的评价应用[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(6): 86-88.
 [13] 徐卫, 李建勇. 骨髓增生异常综合征的细胞和分子遗传学[J]. 国际输血及血液学杂志, 2008, 31(3): 195-198.
 [14] 陈涛, 肖溶, 杨建和, 等. 骨髓增生异常综合征预后因素分析[J]. 临床血液学杂志, 2011, 24(7): 400-403.
 [15] Kawankar N, Vundinti BR. Cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndrome: an overview[J]. Hematology, 2011, 16(3): 131-138.

(收稿日期: 2012-12-08)

(上接第 1672 页)

标恢复不理想,如转氨酶有升高倾向。故建议这类患者要定期检测肝功能和 HBN-DNA,如有肝炎活动及活跃的病毒复制,应尽早产后给予抗病毒治疗。

综上所述,HBV 感染孕妇合并 ICP 起病妊娠早期,病情相对更重,发生并发症的机会更高,对合并 HBV 感染的孕妇更须加强围生期监护,一经确诊和并 ICP,需积极治疗,严密监测胎儿宫内状况,适时终止妊娠,加强防护,预防或减少并发症的发生。

参考文献

[1] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 107-109.
 [2] 刘淮, 张胧玲, 黄金阳. 妊娠期肝内胆汁淤积症女性激素水平与胎盘母儿血液交换面积的相关性分析[J]. 中国基层医药, 2008, 15(1): 8-10.
 [3] 杨友新, 唐明照, 谭少明. 妊娠肝内胆汁淤积症 66 例肝功能四项指标变化的探讨[J]. 内科杂志, 2011, 6(2): 127-129.
 [4] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 468-472.

[5] 中华医学会第 10 次全国病毒性肝炎乙肝学术会议. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1): 56.
 [6] 林慧贞. 血清总胆汁酸检测在妊娠期肝内胆汁淤积症的临床意义[J]. 实用心脑血管病杂志, 2010, 18(9): 1299-1230.
 [7] 潘明, 梅又文, 唐太英. 乙型肝炎病毒感染对妊娠期肝内胆汁淤积症的影响[J]. 四川医学, 2012, 33(7): 1159-1161.
 [8] 李全凤, 杨守平. 乙型肝炎病毒感染并妊娠期肝内胆汁淤积症妊娠结局分析[J]. 中国基层医药, 2010, 17(3): 384.
 [9] 刘义明, 高卉, 莫伟. 乙型肝炎病毒感染与妊娠期肝内胆汁淤积症相关性的探讨[J]. 中国热带医学, 2008, 8(9): 1546-1547.
 [10] 王昊珏. 30 例妊娠合并乙型肝炎病毒感染对妊娠的影响[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(14): 1174-1175.
 [11] 胡玉芹, 潘石蕾. 妊娠期肝内胆汁淤积症研究进展[J]. 中国妇产科临床杂志, 2009, 10(4): 315-317.
 [12] 雷玲, 李力. 妊娠期肝内胆汁淤积症发病机制研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2008, 35(5): 376-378.

(收稿日期: 2012-12-13)