

## • 个案与短篇 •

急性早幼粒细胞白血病患者 PML/RAR $\alpha$  融合基因罕见型 2 例

肖剑文, 究莹, 郭玉霞, 管贤敏

(重庆医科大学附属儿童医院血液肿瘤科, 重庆 400014)

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.075

文献标识码:C

文章编号:1673-4130(2015)11-1636-03

目前认为急性早幼粒细胞白血病(APL)属于急性髓细胞白血病(AML)的特殊类型<sup>[1]</sup>,由于 APL 细胞存在 t(15;17)(q22;q21),该易位使第 15 号染色体长臂 2 区 2 带的早幼粒细胞白血病基因(PML)和第 17 号染色体长臂 2 区 1 带的维甲酸受体- $\alpha$ (RAR $\alpha$ )基因形成 PML/RAR $\alpha$  融合基因,该基因在产生过程中因断裂点不同及 mRNA 的剪切、拼接不同会产生不同的异构体并在 APL 发病中起到重要作用<sup>[2]</sup>。本院收治 2 例 APL 患儿出现新的 PML/RAR $\alpha$  融合基因变异体,现报道如下。

## 1 资料与方法

## 1.1 一般资料

**1.1.1 案例 1** 男性患儿,14 岁 2 月,外院诊断 APL 1 月来院。患儿病初表现为进行性面色苍白 1 月,发热 3 d,牙龈出血 1 次。外院血常规:白细胞(WBC)4.2 $\times 10^9$ /L,红细胞(RBC)3.3 $\times 10^{12}$ /L,血红蛋白(Hb)144 g/L,血小板(PLT)33 $\times 10^9$ /L,中性粒细胞(N)35%,淋巴细胞(L)38%,原始粒细胞 27%。骨髓检查诊断 APL,给予三氧化二砷(ATO)10 mg/d $\times$ 28 d 及柔红霉素(DNR)40 mg/d $\times$ 3 d 静脉化疗后来本院。入院查体:重度贫血貌,皮肤少许出血点,肝肋下 4 cm,脾肋下 2 cm。本院血常规:WBC 8.12 $\times 10^9$ /L,Hb50 g/L,PLT33 $\times 10^9$ /L,L 36%,N 40%,原粒及早幼粒细胞 24%。骨髓检查后按照儿童 APL 临床路径治疗<sup>[3]</sup>:(1)诱导治疗,全反维甲酸(ATRA)口服 40 d,DNR 静滴 2 d。诱导治疗 40 d 复查骨髓细胞学、染色体核型分析、荧光原位杂交(FISH)及基因检查均完全缓解。(2)巩固治疗,DA、EA 及 HA 方案各 1 疗程。(3)维持治疗。序贯使用 ATO、ATRA、巯嘌呤(6-MP)+甲氨蝶呤(MTX)维持治疗。(4)预防中枢神经系统白血病,诱导及巩固治疗期间每 2 周给予 MTX、阿糖胞苷及地塞米松鞘注 1 次,维持治疗期间每 12 周鞘注 1 次。巩固及每个维持治疗周期第 1 天复查骨髓细胞学、FISH 检查均完全缓解。现患儿化疗结束,已停药 1 月。

**1.1.2 案例 2** 女性患儿,7 岁 3 月,因咳嗽 4 d,发热 2 d,皮肤出血点 1 d 入院。入院查体:轻中度贫血貌,全身散在针尖大小出血点,肝肋下 1.5 cm,脾未扪及。血常规:WBC 2.3 $\times 10^9$ /L,Hb 89 g/L,PLT 21 $\times 10^9$ /L,N 28%,L 72%。骨髓检查确诊 APL,按儿童 APL 临床路径治疗<sup>[3]</sup>,已完成诱导及巩固治疗,现处于维持治疗第 2 个循环中。诱导治疗 40 d、巩固及每个维持治疗第 1 天复查骨髓(同案例 1)均完全缓解。

## 1.2 检测方法

**1.2.1 骨髓细胞形态学** 骨髓涂片分类计数 200 个有核细胞,同时行过氧化物酶(POX)、非特异性酯酶及氟化钠抑制实验(NAE-NaF)组织化学染色。

**1.2.2 骨髓病理检查** 取骨髓组织固定并进行 HE 染色后分析,并行免疫组化染色,标记物包括:MPO、CD117、CD7、PAX-

5、Syn 及 TdT。

**1.2.3 免疫分型** 骨髓液抗凝后使用流式细胞分析术(FCM)检测白血病细胞免疫表型。标记物包括 CD13、CD33、CD117、MPO、CD3、CD7、CD14、CD64、HLA-DR、CD34 及 CD56。

**1.2.4 染色体检查** 骨髓细胞经短期培养 24 h 后收获并制备标本和 R 显带,核型分析根据《国际人类细胞遗传学命名法(ISCN)1995》进行。

**1.2.5 FISH 检查** 15 和 17 号全染色体涂染探针分别以红色和绿色荧光素标记,探针及检测试剂盒购自 Oncor 公司,详细操作按厂家说明进行。DAPI/Antifade 复染后以 Olympus BX60 荧光显微镜观察和采集图像。

**1.2.6 融合基因检测** 按照参考文献[4]使用 Trizol 一步法提取总 RNA,取 2  $\mu$ g RNA 以 M-MLV 逆转录为 cDNA,逆转录体系 40  $\mu$ L。取 3  $\mu$ L cDNA 加入 50  $\mu$ L 聚合酶链反应(PCR)体系,包括 10 pmol 的引物,200  $\mu$ mol/L dNTPs,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 0.3 U Taq DNA 聚合酶。取 10  $\mu$ L PCR 产物在 2%琼脂糖凝胶上进行电泳,扫描并分析结果。

**1.2.7 基因测序** 由康圣环球公司设计引物,采用 Genetic Analyzer ABI3500xL 进行,金域检验中心完成检测。

## 2 结果

## 2.1 案例 1 检测结果

**2.1.1 外院检测结果** 骨髓检查发现:(1)细胞学检测显示有核细胞增生极度活跃,原粒 1.5%,早幼粒细胞 85.0%;(2)FCM 显示为 AML-M3 型;(3)基因检测显示有 PML/RAR $\alpha$  (bcrl3 亚型)基因,见图 1。

**2.1.2 本院检测结果** 骨髓检查发现:(1)细胞学检测显示有核细胞增生活跃,原粒 8.0%,早幼粒细胞 85.0%,可见 Auer 小体,组化染色 POX(++++)、NAE 及 NAE-NaF(++),考虑 AML-M3b 型;(2)FCM 显示表达 CD13、CD33、CD117 和 MPO,不表达 CD3、CD7、CD14、CD64、HLA-DR、CD34 及 CD56,符合 AML-M3 型;染色体核型:46,XY,t(15;17)(q22;q21)(q22;q11.2)[19]/46,XY[1];多重巢式逆转录(RT)-PCR 检测到 PML/RAR $\alpha$  罕见型融合基因,见图 2,基因测序确诊见图 3;FISH 检测显示 94.0%细胞阳性。

**2.2 案例 2 检测结果** 骨髓检查发现:(1)细胞学检测结果显示有核细胞增生明显活跃,早有粒细胞 95.5%,中幼粒细胞 0.5,组化染色 POX(++++)、NAE 及 NAE-NaF(++),考虑 AML-M3a 型;(2)FCM 结果同案例 1;染色体核型:46,XX,t(15;17)(q22;q21)[10]。(3)多重巢式实时荧光定量 PCR(RQ-PCR)检测到 PML/RAR $\alpha$  罕见型,见图 4;基因测序确认见图 5。(4)FISH 检测结果显示 98%细胞阳性。(5)骨髓活检确诊为 AML。(6)组化染色显示 MPO 及 CD117 阳性,CD7、PAX-5、Syn 及 TdT 均阴性。

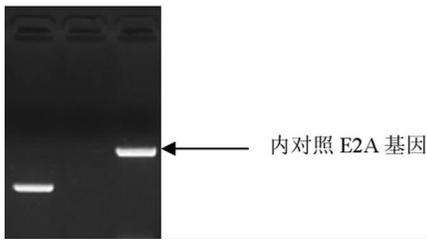


图 1 RQ-PCR 显示为 PML/RAR $\alpha$ (bcr3 型)

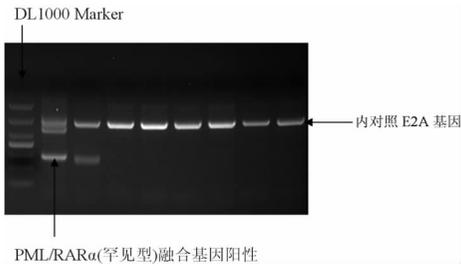
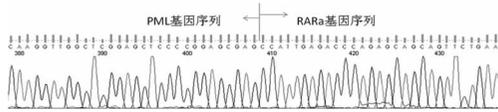


图 2 多重巢氏 RT-PCR 检测到 PML/RAR $\alpha$  罕见型融合基因



注:测序结果显示该 PML/RAR $\alpha$  融合基因转录产物中, PML 基因(15q22)断裂位点与已知的 PML/RAR $\alpha$  阳性中 PML 基因的断裂位点都不一致,属于罕见型 PML/RAR $\alpha$  阳性。

图 3 PML/RAR $\alpha$  测序图

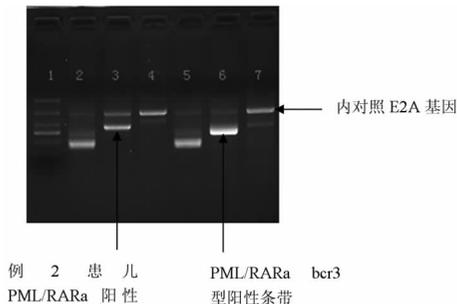


图 4 多重巢氏 RQ-PCR 检测到 PML/RAR $\alpha$  罕见型

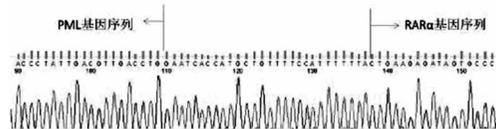


图 5 PML/RAR $\alpha$  测序图

### 3 讨论

APL 属于 AML 伴重现性遗传学异常, 约占所有 AML 的 5%~10%, 临床上以易合并弥散性血管内凝血为主要特征<sup>[1]</sup>, t(15;17)(q22;q21) 易位形成 PML/RAR $\alpha$  融合基因并有相应蛋白表达是 APL 特征性的标记。

PML/RAR $\alpha$  基因为 APL 发病和治疗的重要基础。PML/RAR $\alpha$  基因产生过程中因断裂点不同及 mRNA 的剪切、拼接不同会产生不同异构体。常见 3 种异构体分别为 BCR1、BCR3、BCR2。BCR1: 内含子 6 断裂, 称作长型(L 型); BCR3: 内含子 3 断裂, 为短型(S 型); BCR2: 外显子 6 断裂, 称为 L 变异型<sup>[6]</sup>。3 种异构体分别编码  $87 \times 10^3$ 、 $98 \times 10^3$  和  $103 \times 10^3$  蛋白质, 该蛋白阻滞早幼粒细胞分化成熟是 APL 发病机理的

重要基础<sup>[7-8]</sup>。目前 APL 治疗采用 ATRA、ATO 为主的治疗方案<sup>[7-8]</sup>。ATRA 作用于 PML/RAR $\alpha$  蛋白 RAR $\alpha$  部位, 诱导早幼粒细胞向成熟细胞转化; ATO 作用于 PML 部分, 降解 PML/RAR $\alpha$  蛋白。治疗后骨髓原粒及早幼粒细胞比例小于 5% 称细胞学缓解; t(15;17)(q22;q21) 消失和 PML/RAR $\alpha$  基因转阴分别为细胞及分子遗传学缓解。患儿不但达到细胞学缓解, 而且获得细胞及分子遗传学持续缓解则预示患儿有更长的生存期<sup>[9]</sup>。

只要 AML 患儿具有 t(15;17)(q22;q21)、PML/RAR $\alpha$  基因和/或相关蛋白表达即可诊断为 APL<sup>[2]</sup>, 而以上指标也是 APL 疗效判定的重要指标。目前国外已使用 FCM 检测 PML/RAR $\alpha$  相关蛋白, 但该方法费用高, 难以常规应用于临床<sup>[4]</sup>; 由于常规染色体显带技术检测细胞数较少, 患儿获得细胞学缓解后染色体易位及 PML/RAR $\alpha$  基因表达水平多明显降低, 故染色体核型分析及 FISH 探针法常难以有效检测到异常, 容易导致假阴性结果; RQ-PCR 技术具有精确、灵敏、可定量的特点, 很好地弥补了染色体核型分析及 FISH 技术的缺点, 目前是 APL 确诊及疗效监测的主要手段<sup>[10]</sup>。

通过 RQ-PCR 可检出 99% APL 患者 PML/RAR $\alpha$  基因<sup>[12]</sup>, 若初诊时细胞形态学及免疫分型符合 AML-M3、无相应染色体改变和/或基因检出称为 PML/RAR $\alpha$  阴性的 APL, 该类患者只能采用常规化疗方案且预后不佳。但 RQ-PCR 方法仅能检测已知突变, 对于初诊时即有基因变异体者(如案例 2)可能漏诊。多重巢式 RQ-PCR 不但灵敏度高, 而且可以发现 RQ-PCR 难以发现的未知突变<sup>[4]</sup>, 对发现有基因变异体可能者再做相关基因测序, 能明显降低基因漏检率, 对指导 AML 临床分型具有重要意义。

APL 患者若细胞及分子遗传学持续缓解则预后良好, RQ-PCR 监测随访 PML/RAR $\alpha$  基因表达水平是 APL 治疗方案选择、疗效和预后分析、预测复发最可靠的指标。但 APL 患者接受治疗(尤其是含 ATO 方案)后 PML/RAR $\alpha$  基因可发生变异出现假阴性<sup>[11]</sup>。案例 1 初诊时检测到 PML/RAR $\alpha$  基因 bcr3 亚型, 治疗后基因型发生改变, 该变异体经过多重巢式 RQ-PCR 检测出, 基因测序确诊。因此, 对于治疗后 APL 患儿的疗效监测和 MRD 检测应联合骨髓细胞学、染色体核型及 FISH、RQ-PCR 必要时多重巢式 RQ-PCR、流式细胞仪检测 PML/RAR $\alpha$  蛋白, 必要时基因测序等综合判断, 避免因假阴性导致误判 APL 状态并引起误治。

总之, PML/RAR $\alpha$  基因可出现不同变异, 而不同的变异体基因大小及相应蛋白可能有所不同, 治疗方案也有不同差异<sup>[5]</sup>, 遗憾的是由于条件限制未能做 PML/RAR $\alpha$  蛋白检测。本文报道的 2 例患儿基因大小与常见亚型无差异, 但结构不同, 因此使用 RQ-PCR 容易漏诊。但 2 例患儿接受常规治疗获得持续细胞学、细胞/分子遗传学完全缓解, 提示该罕见型基因型改变可能不影响其对治疗的反应。

综上所述, APL 患儿初诊及 ATO 治疗后可出现新的 PML/RAR $\alpha$  融合基因, 该突变基因对常规治疗仍然敏感。这提示 APL 的预后判定不能仅局限于 RQ-PCR 技术而应综合其他手段考虑<sup>[7]</sup>; 而该罕见型基因对 APL 的发病机制、预后判断、更好地进行个体化的治疗以及临床监测可能有一定意义。

### 参考文献

[1] Seftel MD, Barnett MJ, Couban S, et al. A Canadian consensus on the management of newly diagnosed and relapsed acute promyelo-

- cytic leukemia in adults[J]. *Curr Oncol*, 2014, 21(5): 234-250.
- [2] Röllig C, Schäfer-Eckardt K, Hänel M, et al. Two cycles of risk-adapted consolidation therapy in patients with acute promyelocytic leukemia[J]. *Ann Hematol*, 2015, 94(4): 557-563.
- [3] 儿童急性早幼粒细胞白血病临床路径(2010年版)[S]. 中华人民共和国卫生部; 中国标准出版社.
- [4] Sewatanon J, Liu H, Ling PD. Promyelocytic leukemia protein modulates establishment and maintenance of latent gammaherpesvirus infection in peritoneal cells[J]. *J Virol*, 2013, 87(22): 12151-12157.
- [5] Stein EM, Tallman MS. Acute promyelocytic leukemia in children and adolescents[J]. *Acta Haematol*, 2014, 132(3/4): 307-312.
- [6] Lancet JE. Postremission therapy in acute promyelocytic leukemia: room for improvement? [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(33): 3692-3696.
- [7] Lachaine J, Mathurin K, Barakat S. Economic evaluation of Arsenic trioxide for treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukaemia in Canada[J]. *Hematol Oncol*, 2014, 25(1): 2176.
- [8] Daver N, Kantarjian H, Marcucci G, et al. Clinical characteristics and outcomes in patients with acute promyelocytic leukaemia and hyperleucocytosis[J]. *Br J Haematol*, 2015, 168(5): 646-653.
- [9] Jovanovic JV, Rennie K, Culligan D, et al. Development of real-time quantitative polymerase chain reaction assays to track treatment response in retinoid resistant acute promyelocytic leukemia [J]. *Front Oncol*, 2011, 25(1): 35.
- [10] Imani-Saber Z, Ghafouri-Fard S. Promyelocytic leukemia gene functions and roles in tumorigenesis [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(19): 8021-8028.
- [11] Li J, Zhong HY, Zhang Y, et al. GTF2I-RARA is a novel fusion transcript in a t(7;17) variant of acute promyelocytic leukaemia with clinical resistance to retinoic acid[J]. *Br J Haematol*, 2015, 168(6): 904-908.

(收稿日期: 2015-01-08)

## • 个案与短篇 •

## 布鲁菌病并发化脓性关节炎 1 例

虎淑妍, 邢洁, 李娟<sup>△</sup>

(庆阳市人民医院检验科, 甘肃庆阳 745000)

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.076

文献标识码: C

文章编号: 1673-4130(2015)11-1638-02

布鲁菌病是一种人畜共患的传染病, 是全世界范围的动物源性传染病<sup>[1]</sup>。每年上报世界卫生组织的病例数逾 50 万。临床表现多为发热、疲劳、多汗、关节疼痛、肝脾肿大等, 诊断缺乏特异性<sup>[2]</sup>, 而并发化脓性关节炎的病例少见, 易漏诊或误诊。本报告采用回顾性方法, 对布鲁菌病并发化脓性关节炎的临床表现诊断、治疗进行分析总结。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 男性患者, 年龄 53 岁。2013 年 5 月 6 日因感觉浑身不适, 曾在本院门诊就诊, 查体发现患者有低烧, 在进行血常规及 X 线胸部检查后未见异常, 误诊为上呼吸道感染, 并进行治疗, 患者症状有所减轻; 4 周后患者感觉左膝关节热痛肿胀厉害, 再次就诊, 正侧位 X 线显示左膝关节有少量积液, 收住本院骨科治疗, 体温 37.6℃, 心率 82 次/分, 呼吸 27 次/分, 血压 131/92 mm Hg。生命体征平稳、四肢肌张力正常、无神经系统病理征。患者家中多年养羊数只, 对布鲁菌病防治知识缺乏, 未进行布鲁菌病疫苗接种。排除该患者曾经有过其他关节炎病史。

**1.2 实验室检查** 对患者进行关节液培养、血培养、血常规、红细胞沉降率等检查; 并辅以 X 线、B 型超声检查。血常规检查: 白细胞计数  $10.8 \times 10^9/L$ , 中性粒细胞计数 66%, 淋巴细胞计数 34%, 血小板计数  $144 \times 10^9$ ; 红细胞沉降率: 30 mm/h; 关节液常规检查: 微黄、混浊、白细胞计数  $23.6 \times 10^6/mL$ , 中性粒细胞计数 52%, 淋巴细胞计数 48%。关节液增菌培养, 72 h 培养液显示浑浊, 转至血平板及中国蓝平板, 24 h 血平板生长湿润、细小透明菌落; 革兰染色, 细沙样排列革兰阴性菌。VITEK2-compact 细菌鉴定仪鉴定结果为马耳他布鲁杆菌(生物编码为 0000001300001000, 可信度 99%)。血清学凝集:

血清抗体效价 1:640。B 超显示肝、胆、脾、胰、肾及心脏未见异常。将关节液在生物安全柜内接种至双相增菌培养瓶(上海科玛嘉生物技术有限公司产品)培养, 每日观察生长情况, 72 h 培养液浑浊, 转至血平板和中国蓝平板(郑州安图生物工程股份有限公司产品); 24 h 血平板生长湿润、透明的小菌落; 血清学凝集抗体滴度大于 160; VITEK2-compact 细菌鉴定仪鉴定结果为马耳他布鲁菌。

**1.3 治疗方法** 病例确诊后给予口服多西环素 200 mg/d, 联合利福平 600 mg/d, 同时静脉输注头孢曲松 2 g/d 进行治疗。

## 2 结果

两周后患者体温恢复正常, 疼痛减轻, 4 周后关节积液消失。住院 8 周患者出院, 随访至今预后良好, 无复发。

## 3 讨论

近年来死于布鲁菌病的牛羊非常多, 感染布鲁菌的患者也逐年增加。布鲁菌病发病没有明显的季节特点, 因其潜伏期 7~60 d, 一般为 2~3 周, 少数患者在感染后数月或 1 年以后发病。实验室中受感染者大多于 10~50 d 内发病。本文中患者为农民, 家中养羊多年, 有直接羊接触史。

近年来, 随着布鲁菌病例的不断增多, 布鲁菌病不典型病例也明显增多。布鲁菌病的临床表现及病史呈非特异表现, 病程短、淋巴结、肝脾肿大者明显减少<sup>[3]</sup>, 取而代之的是长期低热、乏力、关节痛、四肢肌肉痛等症状。布鲁菌病并发关节积液的病例少见报到, 临床医生对本病认识不足经验欠缺, 容易误诊或漏诊。对于有牛羊接触史的患者, 有不明原因的低热, 医生应多次申请相关体液或血液培养, 应用自动化连续监测的血培养及配套血培养瓶监测。初步涂片显微镜观察发现革兰染色阴性菌, 呈细沙样排列, 应该高度怀疑布鲁菌感染。

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: 174619549@qq.com.