

· 临床研究 ·

急性髓系白血病中 DNMT3A p.R882 的共存基因突变分析

刘洁¹, 华海应², 晁红颖¹, 蔡晓辉¹, 张修文¹, 陈梅玉¹, 卢绪章¹, 刘建芳^{3*}

¹南京医科大学附属常州市第二人民医院血液科, 江苏 常州 213003; ²无锡市第三人民医院血液科, 江苏 无锡 214041;

³南京医科大学附属常州市第二人民医院神经内科, 江苏 常州 213003

[摘要] 目的:探讨急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者中 DNA 甲基转移酶 3A(DNA methyltransferase 3A, DNMT3A)p.R882 的共存基因突变及其与部分临床参数间的相关性。方法:采用高通量 DNA 测序技术检测 49 种靶基因;采用基因组 DNA-PCR 联合 Sanger 测序法检测患者中 DNMT3A p.R882、CALR 基因 9 号外显子、NPM1 基因 12 号外显子、FLT3-ITD, 及 CEBPA 的 TAD、BZIP 两个功能结构域的突变发生情况。结果:① 301 例患者中共检出 41 例携带 DNMT3A p.R882 突变, 最常见为 M5 亚型;97.6%(40/41)DNMT3A p.R882 突变患者同时携带其他基因突变, 每例患者平均突变 3.17 次;其中双基因突变 9 例, 3 个基因突变共存 12 例, ≥4 个基因突变共存 19 例。② DNMT3A p.R882 伴随基因突变最常见的为 NPM1($n=27, 65.9%$), 其他依次为: FLT3-ITD($n=18, 43.9%$)、IDH1($n=9, 22.0%$)、TET2($n=8, 19.5%$)及 NRAS($n=6, 14.6%$)等;③ ≥4 个基因突变患者的白细胞水平虽然高于双基因及 3 个基因突变者, 但差异无统计学意义($P>0.05$), 同样血红蛋白及血小板水平差异亦无统计学意义($P>0.05$), 共存基因突变为 FLT3-ITD 者的外周白细胞水平高于野生型($P=0.034$), 但在年龄、血红蛋白及血小板水平方面的差异无统计学意义。伴 NPM1、IDH1 或 TET2 突变者与野生型相比, 在中位年龄、外周血白细胞水平间的差异均无统计学意义。④ 与野生型相比, 伴 NPM1 突变者具有更高的初次诱导完全缓解(complete remission, CR)率, 而伴 IDH1 突变者 CR 率较低, 差异均有统计学意义($P=0.010, 0.025$);伴 FLT3-ITD 与 TET2 突变者与野生型相比, 在 CR 率方面的差异无统计学意义。结论:95% 以上的 DNMT3A p.R882 突变 AML 均伴有额外基因突变, 共存基因突变种类及个数对患者的临床特征有一定影响。

[关键词] 急性髓系白血病;突变;DNMT3A;NPM1

[中图分类号] R733.71

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)09-1331-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20200915

Mutation analysis of coexisting genes with DNMT3A p.R882 in acute myeloid leukemia

LIU Jie¹, HUA Haiying², CHAO Hongying¹, CAI Xiaohui¹, ZHANG Xiuwen¹, CHEN Meiyu¹, LU Xuzhang¹, LIU Jianfang^{3*}

¹Department of Hematology, the Affiliated Changzhou Second Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213003; ²Department of Hematology, Wuxi Third People's Hospital, Wuxi 214041; ³Department of Neurology, the Affiliated Changzhou Second Hospital of Nanjing Medical University, Chanzhou 213003, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the coexisting mutation of DNA methyltransferase 3A (DNMT3A)p.R882 in patients with acute myeloid leukemia (AML) and its correlation with some clinical parameters. **Methods:** There were 49 target genes detected by high-throughput DNA sequencing, and the mutations of DNMT3A p.R882, exon 9 of CALR gene, exon 12 of NPM1 gene, FLT3-ITD, TAD and BZIP of CEBPA were detected by genomic DNA-PCR combined with Sanger sequencing. **Results:** ① Forty-one patients with DNMT3A p.R882 mutations were detected in 301 patients, most common in M5 subtype; nearly all DNMT3A p.R882 mutations (97.6%, 40/41) carried other gene mutations, with an average of 3.17 mutations per patient, including 9 double gene mutations, 12 co-existing 3 gene mutations and 19 coexisting ≥ 4 gene mutations. ② The most common genetic mutation associated with DNMT3Ap.R882 is NPM1 ($n=27, 65.9%$), followed by FLT3-ITD ($n=18, 43.9%$), IDH1 ($n=9, 22.0%$), TET2 ($n=8, 19.5%$) and NRAS ($n=6, 14.6%$), and so on. ③ The leukocyte level of patients with ≥ 4 gene mutations was higher than that of patients with double or three gene mutations, but there was no significant difference in leukocyte, hemoglobin or platelet level ($P>0.05$). The peripheral

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81500103);江苏省自然科学基金青年基金(BK20160283);常州市科技计划资助(CJ20180033);常州市应用基础研究(CJ20140060)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: chaohy2006@126.com

leukocyte level of patients with FLT3-ITD gene mutations was higher than that of wild patients ($P=0.034$), but there was no significant difference in age, hemoglobin and platelet level. And there was no significant difference in median age and peripheral leukocyte level between NPM1, IDH1 or TET2 mutants and wild type. ④ Compared with the wild type, patients with NPM1 mutations had a higher complete remission (CR) rate, while the patients with IDH1 mutations had a lower CR rate ($P=0.010, 0.025$). But there was no significant difference in CR rate between the patients with FLT3-ITD on TET2 mutations and the wild type. **Conclusion:** More than 95% of DNMT3A p.R882-mutated AML coexisted with additional gene mutations, the number and type of coexisting mutations had a certain impact on the clinical characteristics of patients.

[Key words] acute myeloid leukemia; mutation; DNMT3A; NPM1

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(09): 1331-1337]

研究发现,在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)、骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)及慢性骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasma, MPN)均能检测到DNA甲基转移酶3A(DNA methyltransferase 3A, DNMT3A)p.R882高频点突变,是预后不良的分子标志^[1-3]。最近,少数研究显示,该突变可与其他基因突变伴随出现,且和不同基因突变共存时的预后意义不同^[4-5],但目前研究多针对NPM1、FLT3-ITD等少数基因,尚缺乏大宗研究数据进一步证实。我们在采用基因组DNA-PCR检测301例初诊AML患者DNMT3Ap.R882热点突变的基础上,进一步通过高通量DNA测序技术检测49种常见髓系肿瘤基因突变,观察这些突变与DNMT3A p.R882的伴随发生情况,并初步探讨其临床价值。

1 对象和方法

1.1 对象

检测2010年4月—2018年8月于南京医科大学附属常州市第二人民医院及无锡市第三人民医院住院治疗的初发AML患者共301例,其中男165例,女136例,中位年龄49岁(16~81)岁;所有患者均经骨髓形态学、染色体核型、白血病免疫分型及分子生物学检查确诊。按照FAB标准分型后,M0亚型9例,M1亚型17例,M2亚型76例,M3亚型24例,M4亚型41例,M5亚型125例,M6亚型1例,未能分型AML 8例。共有282例进行了有效染色体核型分析,包括正常核型150例,异常核型132例。选取20例健康志愿者作为对照。本研究经医院伦理委员会批准,所有受试者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取

取冻存的患者首诊时骨髓单个核细胞,按照

DNA提取试剂盒(Gentra公司,美国)标准步骤抽提患者基因组DNA。根据吸光度确定患者DNA浓度,并将样品统一稀释至50 ng/ μ L后开始检测。

1.2.2 DNMT3A p.R882突变检测

设计DNMT3A p.R882扩增引物,上游5'-TCCT-GCTGTGTGTTAGACG-3';下游5'-TATTTCC-GCCTCTGTGTTT-3'。反应总体系为50 μ L:正、反向引物各2 μ L, Taq PCR Master Mix 25 μ L[3 mmol/L MgCl₂、500 μ mol/L dNTP、0.1 U/ μ L Taq聚合酶、20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3)、100 mmol/L KCL],模板DNA 4 μ L,用双蒸水补至50 μ L。PCR条件为:95 $^{\circ}$ C预变性5 min,35个循环(94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min),72 $^{\circ}$ C延伸7 min,4 $^{\circ}$ C保存。PCR产物经10 g/L的琼脂糖凝胶电泳后,紫外光透视仪分析图像。所有扩增产物均进行直接测序,测序由上海裕晶生物科技有限公司完成。

1.2.3 高通量DNA测序

取所检患者样品基因组DNA 10~12 ng,采用Termofisher的S5系统检测以下49种基因的所有外显子突变: JAK1、JAK2、JAK3、ASXL1、ASXL2、BCOR、BCORL1、ETNK1、PTPN11、U2AF1、GATA2、NRAS、WT1、MYD88、C-KIT、TET2、IDH1、IDH2、FLT3、DNMT3A、CBL、ZRSR2、ETV6、SH2B3、BIRC3、KRAS、SF3B1、MPL、CSF3R、CSMD1、IL7R、PAX5、EZH2、RUNX1、SRSF2、TP53、NOTCH1、STAG2、SETBP1、SETD2、PDGFRA、CALR、PDGFRB、PIGA、PHF6、CDKN2A、PTEN、BRAF及FBXW7。数据读取时选择外显子上的基因突变,并去掉同义突变及多态性突变。

1.2.4 DNA-PCR及Sanger测序

为防止高通量测序技术对于大片段插入缺失序列结果读取的局限性,参考文献[6],同时采用一代PCR联合Sanger测序法对FLT3-ITD、NPM1基

因 12 号外显子及 CEBPA 的 TAD、BZIP 两个功能结构域进行补充检测。

1.2.5 染色体核型分析

抽取肝素抗凝骨髓悬液 2~4 mL, 采用 24 h 短期培养法、常规 R 显带技术进行常规中期核型分析。细胞核型根据《人类细胞遗传学国际命名体制 (ISCN2009)》进行描述^[7]。

1.3 统计学方法

结果均采用 SPSS21.0 软件分析。服从正态分布的资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用独立样本 *t* 检验; 不服从正态分布的资料用中位数 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 采用 Mann Whitney *U* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNMT3A p.R882 基因突变的发生情况

301 例 AML 患者中, 共检测到 41 例患者 DNMT3A p.R882 突变阳性, 总突变率为 13.6%。突变类型主要包括: DNMT3A p.R882H ($n=27$), DNMT3A p.R882C ($n=14$)。其中, 男 18 例, 女 23 例, 年龄 (47.2±11.5) 岁, 中位外周白细胞为 33×10^9 个/L (12×10^9 个/L, 50×10^9 个/L), 血红蛋白 (79.0±19.2) g/L, 血小板为 61×10^9 个/L (35×10^9 个/L, 93×10^9 个/L)。41 例 DNMT3A 突变患者中, 包括正常核型 34 例, 异常核型 7 例, 主要包括: +8 ($n=4$), 11q23/MLL 重排 ($n=1$), +11 ($n=1$), 复杂核型 ($n=1$)。DNMT3A 突变在正常核型中的发生率明显高于异常核型 (34/146 vs. 7/132, $P < 0.01$)。DNMT3A 突变主要发生于 M5 亚型 ($n=35$), 其次为 M4 亚型 ($n=4$), 少数为 M2 亚型 ($n=2$), 在 M0、M1 及 M3 亚型中未检测到该突变, 在 M5 亚型中的检出率为 28%, 明显高于 M4 及 M2 亚型 ($P < 0.05$)。DMT3A 突变患者的一般临床资料见表 1。

2.2 共存基因突变发生情况

进一步对上述 41 例 DNMT3A p.R882 突变患者进行了 49 种肿瘤基因突变检测, 共检测到 24 种基因突变与 DNMT3A 基因突变共存, 共存发生率为 97.6% (40/41), 最常见的共存基因突变为 NPM1 ($n=27$, 65.9%), 其他基因突变依次为 FLT3-ITD ($n=18$, 43.9%)、IDH1 ($n=9$, 22.0%)、TET2 ($n=8$, 19.5%) 及 NRAS ($n=6$, 14.6%) 等。同时伴有 NPM1、FLT3-ITD 及 DNMT3A 突变者共 16 例。未发现 DNMT3A 突变与 CEBPA 双突变、TP53 及 ASXL1 突变共存病例。41 例患者中, DNMT3A p.R882 单基因突变 (该病例同时伴有 MLL 重排) 1 例, 双基因突变 9 例, 3 个基因

突变共存 12 例, ≥ 4 个基因突变共存 19 例。平均每例患者突变 3.17 次 (1~6 次)。20 例健康志愿者中未检测到突变。

按照基因功能进行归类后发现, 除 NPM1 外, DNMT3A p.R882 伴随突变依次发生在酪氨酸激酶受体基因 (58.5%, 24/41)、参与 DNA 甲基化的调节基因 (41.5%, 17/41)、RAS 信号转导通路相关基因 (22.0%, 9/41) 及转录调节因子 (19.5%, 8/41), 较少见于 RNA 剪切子 (SF3B1、U2AF1、SRSF2 及 ZRSR2), 未检测到组蛋白修饰基因突变 (ASXL1 及 EZH2)。共存基因突变分布及功能归类情况见图 1。

2.3 基因突变与部分临床参数及初次诱导完全缓解 (complete remission, CR) 率间的相关性分析

双基因、3 个基因及 ≥ 4 个基因突变共存患者的年龄分别为 (48.4±14.0)、(44.8±11.5)、(46.5±11.3) 岁, 差异无统计学意义。随着突变数目的增加, 外周白细胞水平增加, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 在血红蛋白及血小板水平方面差异亦无统计学意义 (表 2)。伴有 FLT3-ITD 突变患者的外周白细胞水平平均高于野生型患者 ($P=0.034$), 但在年龄、血红蛋白及血小板水平方面的差异无统计学意义。伴 IDH1 或 TET2 突变者与野生型患者相比, 在年龄、外周白细胞、血红蛋白及血小板水平间的差异均无统计学意义 (表 3)。

41 例患者中, 28 例接受了标准的 IA (去甲氧柔红霉素+阿糖胞苷)/DA (柔红霉素+阿糖胞苷) 方案诱导化疗, 8 例接受了减量 IA 方案诱导化疗, 5 例接受了以地西他滨联合预激方案诱导化疗。37 例可评价病例中, 64.9% (24/37) 的患者在首次诱导时达 CR。13 例未能达 CR 的患者中, 每例患者的平均基因突变次数为 3.3, 达 CR 患者的平均突变次数为 3.6, 二者之间差异无统计学意义。双基因突变、3 个基因突变及 ≥ 4 个基因突变患者的 CR 率分别为 77.8%、80.0% 及 50%, ≥ 4 个基因突变患者的 CR 率明显低于双基因突变及 3 个基因突变, 但差异无统计学意义 ($P=0.231$ 、0.226)。NPM1 突变共存者较野生型患者具有更高的 CR 率 ($P=0.010$), 而伴有 IDH1 突变共存者具有更低的 CR 率, 差异均有统计学意义 ($P=0.025$), 伴有 FLT3-ITD 及 TET2 突变者与野生型患者相比, CR 率的差异无统计学意义 (表 3)。

3 讨论

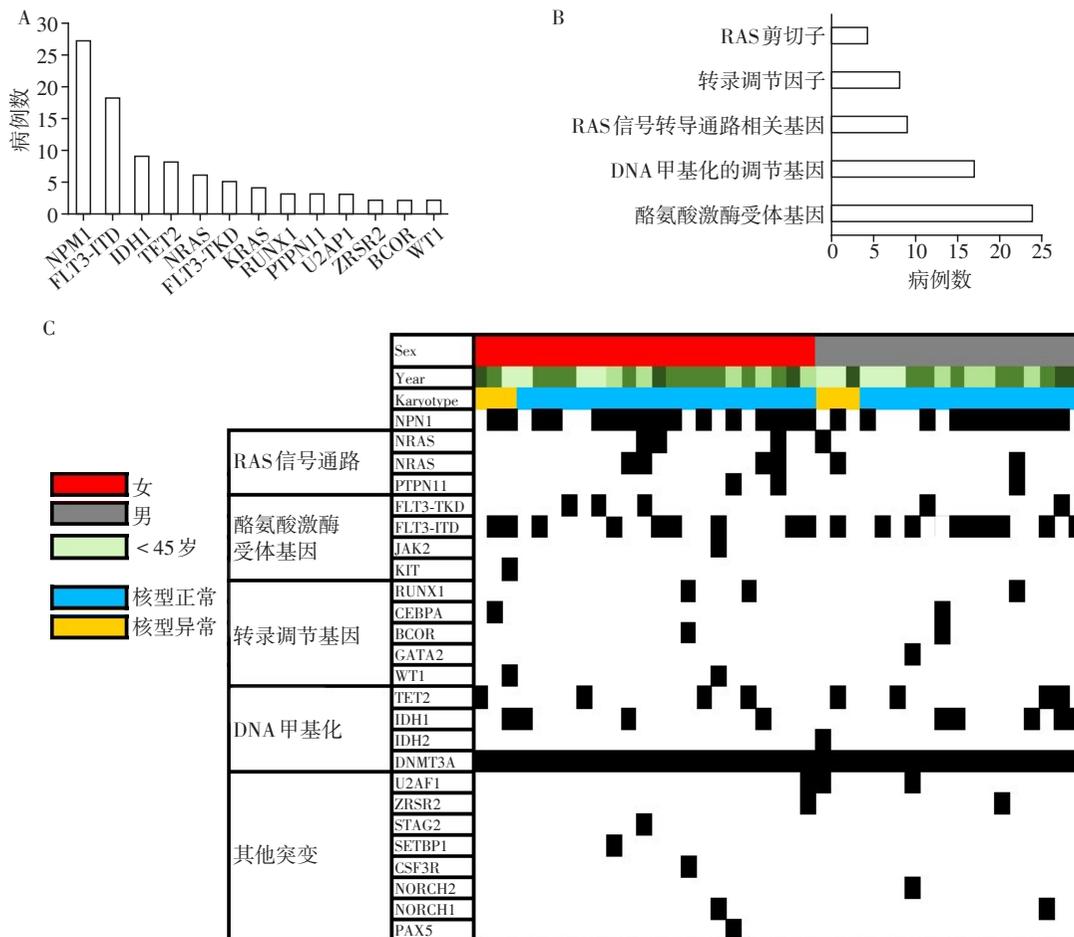
基因的表现遗传学修饰是在细胞的正常生长、

表1 DNMT3A突变患者的一般临床资料
Table 1 General clinical data of patients with DNMT3A mutation

例号	性别	年龄(岁)	FAB分型	白细胞($\times 10^9/L$)	血红蛋白(g/L)	血小板($\times 10^9/L$)	染色体核型
1	女	35	M5a	5.8	95	50	正常核型
2	男	34	M2a	52.0	60	20	正常核型
3	女	51	M5b	38.0	103	55	正常核型
4	女	47	M5b	21.8	86	67	正常核型
5	男	54	M5b	53.5	86	28	正常核型
6	女	72	M5b	6.4	84	99	+11
7	女	52	M5a	11.7	121	317	正常核型
8	男	37	M5b	33.0	107	104	+8
9	女	38	M5b	7.5	61	13	复杂核型
10	男	52	M2a	55.9	56	41	正常核型
11	男	27	M5b	1.8	70	129	+8
12	女	47	M5b	8.5	67	70	正常核型
13	女	37	M5b	76.4	51	12	正常核型
14	女	56	M5b	24.6	98	62	正常核型
15	男	50	M5b	21.7	88	111	正常核型
16	女	40	M5b	61.0	83	140	正常核型
17	男	31	M5b	1.6	111	106	正常核型
18	男	36	M5b	44.0	94	62	正常核型
19	男	55	M5b	57.0	62	18	正常核型
20	男	43	M5b	21.8	53	70	正常核型
21	男	42	M5b	2.0	54	34	正常核型
22	女	61	M4	29.4	77	50	正常核型
23	男	54	M5b	4.81	86	144	正常核型
24	男	59	M5b	47.6	69	28	正常核型
25	女	54	M5b	16.4	99	80	正常核型
26	男	26	M5b	178	132	61	正常核型
27	女	57	M5b	19.8	90	26	正常核型
28	女	50	M5b	174.0	89	59	+8
29	女	51	M5b	34.0	82	101	正常核型
30	男	51	M4	65.0	54	68	正常核型
31	女	58	M4	4.6	62	93	正常核型
32	男	66	M5b	22.8	63	77	正常核型
33	女	38	M5b	12.1	73	35	正常核型
34	女	45	M5b	1.14	68	25	正常核型
35	女	42	M5b	60.6	95	47	正常核型
36	女	49	M5b	35.0	79	58	正常核型
37	女	31	M5b	143.0	76	61	正常核型
38	男	68	M5b	91.0	68	470	正常核型
39	女	39	M5b	47.6	75	37	+8
40	女	34	M4	33.9	79	19	正常核型
41	男	67	M5b	87.5	57	54	t(11;19)

增殖及分化中起重要作用,其中,DNA甲基化是最常见的表观遗传学事件。DNMT3A是哺乳动物DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)家族成员,定位于2p23,其编码的蛋白功能是对CpG

二核苷酸中的胞嘧啶进行甲基化。近年研究发现,AML患者中DNMT3A基因突变可能通过介导基因组甲基化的异常引起白血病的发生,多数研究显示伴有DNMT3A突变的AML患者具有更大的年龄、更



A: 常见共存基因突变频率由高到低分布比较; B: 功能基因突变频率由高到低分布比较; C: 41例患者基因突变分析。

图1 常见共存基因突变分布及功能归类情况

Figure 1 Distribution and functional classification of common coexisting mutation genes

表2 基因突变个数与部分临床参数及缓解率间的相关性分析

Table 2 Correlation analysis between the number of gene mutations and some clinical parameters and remission rate

基因突变个数	例数	白细胞[$\times 10^9$ 个/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	血红蛋白(g/L, $\bar{x} \pm s$)	血小板[$\times 10^9$ 个/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	CR[% (n/N)]
双基因突变	9	22(8, 52)	86.0 \pm 20.8	54(28, 99)	77.8(7/9)
3个基因突变	12	28(15, 68)	76.0 \pm 23.5	70(59, 95)	80.0(8/10)
≥ 4 个基因突变	19	34(16, 57)	77.0 \pm 15.9	50(32, 73)	50.0(9/18)

高的白细胞水平及更短的无复发生存时间, 并与正常核型相关^[8-9]。但目前关于DNMT3A基因突变的伴随突变研究较少, 其临床意义尚无定论。

本研究通过高通量DNA测序发现, 大于95%的DNMT3A基因突变往往与其他基因突变伴随出现, 其中接近一半(46.3%)的患者同时出现4种基因突变共存, 最常见的依次为NPM1、FLT3-ITD、TET2及IDH1突变, 这一结果与Yang等^[10]的研究类似。Bhatnagar等^[11]通过二代测序发现, 即便是在AML缓解状态, DNMT3A p.R882突变仍可存在, 且缓解期同时伴有其他基因突变者, 如TET2、JAK2、ASXL1和TP53, 往往比单独DNMT3A p.R882突变具有更短

的无疾病生存时间。有研究证实单独的DNMT3A基因突变, 并不足以导致白血病的发生, 而NPM1是DNMT3A最常见的伴随突变, NPM1又在多种细胞生物活动过程中具有重要作用, 如调控抑癌基因等, 鉴于DNMT3A与NPM1基因在细胞功能结构域中的作用, 推测两者突变可能表明疾病已经进展到严重阶段^[12], 因此正常核型伴单独NPM1突变的AML患者已被美国国立综合癌症网络指南列为预后良好组, 而当与DNMT3A突变伴随出现时患者具有更高的骨髓原始细胞比例, 对总体预后影响较小, 但未进行CR率比较^[10]。FLT3-ITD突变是公认的AML预后不良的分子标志, ITD基因突变后其酪

表3 NPM1、FLT3-ITD、IDH1及TET2突变对部分临床参数的影响

Table 3 Effect of NPM1, FLT3-ITD, IDH1 and TET2 mutations on some clinical parameters

临床参数	NPM1			FLT3-ITD		
	突变型(n=27)	野生型(n=14)	P值	突变型(n=18)	野生型(n=23)	P值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	46.5 ± 9.8	49.5 ± 14.4	0.451	48.7 ± 10.6	45.9 ± 12.4	0.444
白细胞[$\times 10^9$ 个/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	35(22, 59)	10(5, 48)	0.641	41(22, 63)	23(10, 50)	0.034
血红蛋白(g/L, $\bar{x} \pm s$)	78.1 ± 19.1	81.1 ± 21.3	0.655	46.5 ± 9.8	83.9 ± 20.4	0.079
血小板[$\times 10^9$ 个/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	61(36, 70)	74(31, 106)	0.505	60(38, 75)	61(32, 103)	0.713
CR(%)	80.0	33.3	0.010	56.3	68.2	0.510

临床参数	IDH1			TET2		
	突变型(n=9)	野生型(n=32)	P值	突变型(n=8)	野生型(n=33)	P值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	46.4 ± 15.3	45.3 ± 12.9	0.865	49.5 ± 13.5	46.0 ± 10.7	0.442
白细胞[$\times 10^9$ 个/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	48(23, 61)	31(11, 52)	0.393	28(7, 37)	34(12, 57)	0.391
血红蛋白(g/L, $\bar{x} \pm s$)	88.9 ± 23.6	77.0 ± 17.3	0.102	76.6 ± 18.2	80.0 ± 19.9	0.667
血小板[$\times 10^9$ 个/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	61(44, 77)	60(33, 95)	0.865	73(53, 100)	58(35, 80)	0.572
CR(%)	28.5	70.9	0.025	83.3	61.3	0.301

氨酸激酶的活性增高,从而导致细胞的过度增殖和凋亡受抑,伴有该突变的患者也因此往往具有更高的白细胞水平,更短的生存时间及更高的复发率^[13]。最近,国外学者对128例接受异基因造血干细胞移植的AML患者进行了基因突变监测及预后分析,结果显示,单独DNMT3A突变患者的5年生存率为62%,而FLT3-ITD与DNMT3A突变共存时,其5年总体生存率为0,是强的、独立的预后不良标志^[14]。本研究显示,伴有NPM1突变者较野生型患者具有更高的CR率,差异显著,而伴有FLT3-ITD突变者初次诱导CR率低于野生型患者,但尚未达统计学意义,需要进一步扩大样本量进一步明确其意义。

IDH1和IDH2属于表观遗传学修饰基因,是近年来发现的AML中的另一常见突变,发生率分别为6%~16%及8%~19%,最常见的突变类型分别为位于IDH基因4号外显子的IDH1 p.R132、IDH2 p.R140及IDH2 p.R172^[15]。研究显示, IDH1/2基因突变最常与FLT3-ITD及NPM1突变共存,但与TET2及WT1基因互排^[16]。其中,伴有IDH1突变者,往往具有更短的无事件生存期及总体生存时间,而IDH2突变者则与之相反^[17]。国内学者研究发现, DNMT3A突变背景下,若合并IDH1/2突变,则化疗和造血干细胞移植表现出相似的无事件生存期及总体生存时间,但IDH1/2野生型患者进行移植比单纯化疗获益更多^[5]。本研究显示,伴有IDH1突变者,具有更低的初次诱导CR率,可能与IDH突变后阻滞细胞分化、促进细胞增殖,及突变后产生的2-羟基戊二酸蓄积导致AML细胞恶性进展有关,但在外周血细胞水平

上的差异无统计学意义。

TET2基因突变在AML中有较高的发生率,并随年龄增长而增加。Weissmann等^[18]对正常核型AML患者进行生存分析发现,伴有TET2突变者表现出更短的无事件生存期,且该突变与IDH突变极少伴随出现,两类基因突变有互相排斥现象,但却可以与DNMT3A突变共存。TET2与DNMT3A突变均可以调节DNA甲基化模式^[19],且均能出现在白血病转化前的“正常”细胞中^[20],但关于两种突变如何共同作用促进白血病发生及两种突变共存时对患者预后的影响尚不明确。理论上TET2可以下调DNA甲基化水平, TET2突变后白血病相关基因甲基化情况的改变,可以促进启动子的甲基化,从而导致造血干细胞的异常增殖和分化,形成肿瘤。在本研究中,伴有TET2突变者较野生型患者具有更高的初次诱导CR率,但差异无统计学意义,尚需进一步扩大样本证实。此外,尽管CEBPA双突变在正常核型AML中有较高的发生率,但我们未发现DNMT3A突变与其共存病例,提示DNMT3A突变与CEBPA双突变可能存在互相排斥,这一结果与Shin等^[21]的研究类似。

目前关于AML患者的基因突变个数对临床特征及预后的影响鲜见报道。本研究显示,随着DNMT3A p.R882伴随基因突变数目的增加,患者外周白细胞水平增加, ≥ 4 个基因突变者初次诱导后CR率明显低于双基因突变及3个基因突变者,以上结果提示,基因突变数目增加可能是影响患者预后的原因之一,但需要进一步扩大样本数证实。进行功能分类后发现,除NPM1外,最常出现的伴随基因突变为酪

氨酸激酶受体基因、参与DNA甲基化的调节基因及RAS信号通路转导基因,而极少与RNA剪切子及组蛋白修饰基因突变伴随出现,考虑与RNA剪切子及组蛋白修饰基因突变在AML中的发生率较低有关,但也不排除DNMT3A突变与其相斥的可能。

总之,AML患者中DNMT3A p.R882突变常与其他基因突变共存,共存基因数目及类型对患者的临床特征及CR率有一定影响,未来需要更多前瞻性研究来明确这些共存基因突变的临床意义及预后价值。

[参考文献]

- [1] WU S, DAI Y, ZHANG Y, et al. Mutational spectrum and prognostic stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Gene Ther*, 2018, 25(7-8): 207-213
- [2] HAFERLACH T, NAGATA Y, GROSSMANN V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes[J]. *Leukemia*, 2014, 28(2): 241-247
- [3] DELIC S, ROSE D, KERN W, et al. Application of an NGS-based 28-gene panel in myeloproliferative neoplasms reveals distinct mutation patterns in essential thrombocythaemia, primary myelofibrosis and polycythaemia vera[J]. *Brit J Haematol*, 2016, 175(3): 419-426
- [4] 唐善浩, 陆滢, 张丕胜, 等. FLT3-ITD与DNMT3A R882双突变对急性髓系白血病异基因造血干细胞移植预后的影响[J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39(7): 552-557
- [5] ZHANG X, SHI J, ZHANG J, et al. Clinical and biological implications of IDH1/2 in acute myeloid leukemia with DNMT3A^{mut} [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10(6): 2457-2466
- [6] GREEN C L, KOO K K, HILLS R K, et al. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia; impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28: 2739-2747
- [7] SHAFFER L G, SLOVAK M L, CAMPBELL L J. ISCN (2009): An international system for human cytogenetic nomenclature [M]. Basel, Switzerland: S. Karger Press, 2006: 73-74
- [8] TAN M, IKS N G, CHEN Z J, et al. Clinical implications of DNMT3A mutations in a Southeast Asian cohort of acute myeloid leukaemia patients [J]. *J Clin Pathol*, 2017, 70(8): 669-676
- [9] SAYGIN C, HIRSCH C, PRZYCHODZEN B, et al. Mutations in DNMT3A, U2AF1, and EZH2 identify intermediate-risk acute myeloid leukemia patients with poor outcome after CR1 [J]. *Blood Cancer J*, 2018, 8(1): 4
- [10] YANG X R, SHI J L, ZHANG X P, et al. Biological and clinical influences of NPM1 in acute myeloid leukemia patients with DNMT3A mutations [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 2489-2497
- [11] BHATNAGAR B, EISFELD A K, NICOLET D, et al. Persistence of DNMT3A R882 mutations during remission does not adversely affect outcomes of patients with acute myeloid leukaemia [J]. *Brit J Haematol*, 2016, 175(2): 226-236
- [12] 张叶华, 郭素丽. JAK2 V617F、DNMT3A、NPM1和FLT3-ITD基因突变与骨髓增殖性肿瘤预后的相关性分析[J]. *中国医学装备*, 2019, 16(2): 37-42
- [13] 景传红, 乔纯, 洪鸣, 等. 正常染色体核型的急性髓系白血病中相关基因突变的临床研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2013, 33(12): 1687-1692
- [14] ARDESTANI M T, KAZEMI A, CHAHARDOULI B, et al. FLT3-ITD compared with DNMT3A R882 mutation is a more powerful independent inferior prognostic factor in adult acute myeloid leukemia patients after allogeneic hematopoietics stem cell transplantation: a retrospective cohort study [J]. *Turk J Hematol*, 2018, 35(3): 158-167
- [15] IM A P, SEHGAL A R, CARROLL M P, et al. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies [J]. *Leukemia*, 2014, 28(9): 1774-1783
- [16] RAMPAL R, ALKALIN A, MADZO J, et al. DNA hydroxy-methylation profiling reveals that WT1 mutations result in loss of TET2 function in acute myeloid leukemia [J]. *Cell Rep*, 2014, 9(5): 1841-1855
- [17] ZHOU K G, JIANG L J, SHANG Z, et al. Potential application of IDH1 and IDH2 mutations as prognostic indicators in non-promyelocytic acute myeloid leukemia: a meta-analysis [J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(12): 2423-2429
- [18] WEISSMANN S, ALPERMANN T, GROSSMANN V, et al. Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2012, 26(5): 934-942
- [19] PONCIANO G A, MARTINEZ T A, VELA O J, et al. Mutations in TET2 and DNMT3A genes are associated with changes in global and gene-specific methylation in acute myeloid leukemia [J]. *Tumor Biol*, 2017, 39(10): 1010428317732181
- [20] SATO H, WHEAT JC, STEIDL U, et al. DNMT3A and TET2 in the pre-leukemic phase of hematopoietic disorders [J]. *Front Oncol*, 2016, 6: 187
- [21] SHIN S Y, LEE S T, KIM H J, et al. Mutation profiling of 19 candidate genes in acute myeloid leukemia suggests significance of DNMT3A mutations [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(34): 54825-54837