

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.11.009

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190424.1339.007.html(2019-04-26)

BCL2-938 C>A 基因多态性与儿童急性淋巴细胞白血病危险度的相关性研究*

黄体龙,李曾丽,桑宝华,雷庆龄,宋春艳,杨春会,林云碧,吕瑜,田新,杨跃煌[△]

(云南省昆明市儿童医院血液科 650228)

[摘要] **目的** 研究 BCL2-938 C>A 基因多态性与儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)危险度分组的相关性。**方法** 收集 2007 年 5 月至 2017 年 1 月昆明市儿童医院血液肿瘤科诊治的 69 例 ALL 患儿作为研究对象。采集患儿的骨髓液 1.5 mL 提取 DNA,采用质谱检测法检测 BCL2-938 C>A 基因型。分析 BCL2-938 C>A 基因型与 ALL 患儿危险度的相关性。**结果** ALL 患儿 BCL2-938 C>A 基因型与危险度分组相关($P=0.015$),CC 基因型患儿的百分比在低危(14.3%)、中危(40.0%)、高危组(52.4%)中呈上升趋势。BCL2-938 C>A 基因型间的危险度有差异,CC 基因型的 ALL 患儿比 CA/AA 基因型患儿有更高风险属于中、高危组(中危组与低危组 CC vs. CA+AA $P=0.048$;高危组与低危组 CC vs. CA+AA $P=0.007$)。**结论** BCL2-938 C>A 基因可能是儿童 ALL 危险度分组的重要标识,BCL2-938 CC 基因型可能是儿童 ALL 重要的危险因素。

[关键词] 急性淋巴细胞白血病;BCL2-938 C>A;危险度;儿童

[中图分类号] R725.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)11-1836-04

Association of BCL2-938C>A gene polymorphism with the risk stratification in childhood acute lymphoblastic leukemia*

HUANG Tulong, LI Zengli, SANG Baohua, LEI Qingling, SONG Chunyan,

YANG Chunhui, LIN Yunbi, LYU Yu, TIAN Xin, YANG Yuehuang[△]

(Department of Hematology, Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan 650228, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the association between BCL2-938 C>A gene polymorphism and risk grouping of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Methods** Sixty-nine children with ALL were recruited from May 2007 to January 2017 in the Department of Hematology and Oncology, Kunming Children's Hospital. 1.5 ml bone marrow fluid was collected and DNA was extracted. BCL2-938 C>A genotype was detected by mass spectrometry. **Results** The BCL2-938 C>A genotype of children with acute lymphoblastic leukemia was correlated with risk grouping ($P=0.015$). The percentage of CC genotype with low risk (14.3%), medium risk (40.0%) and high risk group (52.4%) showed an increasing trend. The risk grouping was different between BCL2-938 C>A genotypes. The ALL children with CC genotype had higher risk than those with CA/AA genotype belonged to the medium and high risk group (between the medium and low risk group CC vs. CA+AA; $P=0.048$; between the high and low risk group CC vs. CA+AA; $P=0.007$). **Conclusion** BCL2-938 C>A gene may be an important marker of ALL risk grouping and treatment stratification in children. BCL2-938 CC genotype is a critical risk factor for ALL in children.

[Key words] acute lymphoblastic leukemia; BCL2-938 C>A; risk stratification; children

儿童血液系统恶性肿瘤以急性淋巴细胞白血病(ALL)最常见,每年发病率 3/10 万~4/10 万,多见于学龄前期和学龄期儿童。儿童 ALL 分低、中、高危组,不同危险度 ALL 的治疗强度不同、预后不同。危

险度分级由多种预后危险因素综合评估。随着危险度分组的不断精确和治疗方案的不断改进,儿童 ALL 的治愈率在近半个世纪来得到了显著的提高,目前化疗可以使儿童 ALL 的 5 年总生存率(OS)超过

* 基金项目:云南卫生科技计划项目(2016NS126);云南省昆明市卫生和计划生育委员会医药卫生科技计划项目(2018-06-01-014);云南省卫生和计划生育委员会医学后备人才培养计划(H-2017070)。作者简介:黄体龙(1980-),副主任医师,硕士,主要从事儿童血液病基础和临床方面研究。△ 通信作者,E-mail: yangyhu416@sina.com。

80%^[1-2]。然而,长期化疗会引起严重的不良反应,尤其对高危患者而言,高强度的化疗不良反应更加严重^[3]。因此,不断发掘新的预后因素、进一步精确危险度分级,制定更加合理有效的化疗方案是提高 ALL 患儿治愈率,减少不良反应的关键。

1984 年 TSUJIMOTO 等首次在滤泡性淋巴瘤患者的肿瘤细胞中发现位于 18 号和 14 号染色体(t14;18)易位连接处的 BCL2 基因。BCL2 基因能够促进细胞生长、抗细胞凋亡^[4]。BCL2 基因位于 18 号染色体长臂 2 区 1 带(18q21),含 3 个外显子和 2 个启动子,其编码产物为 1 个由 239 个氨基酸组成的膜蛋白^[5]。已有多篇文献报道 BCL2-938 C>A 与癌症易感性和预后相关^[6-7]。本文旨在研究 BCL2-938 C>A 基因多态性在儿童 ALL 危险度分组及治疗分层中的意义,以使危险度分组更加精确,进一步提高儿童 ALL 的治愈率、减少过度治疗及治疗相关的不良反应。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2007 年 5 月至 2017 年 1 月昆明市儿童医院血液科诊断和治疗的 69 例 ALL 儿童作为研究对象,69 例患儿均按照细胞形态学、免疫学、细胞遗传学和分子生物学分型(MICM)确诊,并排除其他恶性肿瘤。按 CCLG-ALL-2008 方案进行危险度分组及治疗^[8]。本研究经昆明市儿童医院伦理委员会批准且患儿家属均签署知情同意书。69 例 ALL 患儿中,男 42 例,女 27 例;初诊年龄 0.8~12.9 岁,平均为(5.8±3.2)岁;随访时间为 2~117 个月,中位随访时间为 15 个月。其中低危组 28 例,中危组 20 例,高危组 21 例;B 系急性淋巴细胞白血病(B-ALL) 55 例,急性 T 淋巴细胞白血病(T-ALL) 14 例;55 例患儿初发白细胞计数(WBC)为 0~50×10⁹/L,14 例在 50×10⁹/L 以上。检测到分子遗传学改变有 19 例,包括 5 例 Ph 阳性(其中 1 例 BCR/ABL 阳性同时伴有 IKZF1 基因缺失),9 例 TEL/AML1 融合基因阳性,3 例 SIL/TAL1 阳性,1 例 ASS1 基因缺失,1 例有 MYC 基因分离重排。复发 8 例,其中骨髓复发 5 例,髓外复发 3 例。死亡 4 例,放弃治疗 1 例。

1.2 仪器与试剂 PCR 仪(美国 ABI, GeneAmp[®] 9700 384 Dual);点样仪(美国 Agena, MassARRAY Nanodispenser RS1000);质谱分析仪(美国 Agena, MassARRAY Compact System)。主要试剂:血液基因组提取试剂盒(中国天根 Tiangen, DP319);基因分型试剂盒(美国 Agena, Complete Genotyping Reagent Kit, 10148-2)。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集与保存 留取初诊 ALL 患儿的

骨髓 1.5 mL,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,置于-80℃冰箱保存。

1.3.2 基因组 DNA 的提取和 SNPs 分型

1.3.2.1 从患儿 EDTA 抗凝骨髓 1.5 mL 中提取 DNA,紫外分光光度法检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀。

1.3.2.2 PCR 扩增及纯化目的基因检测位点为 rs2279115,根据 SNP 位点使用 Agena 公司的 Assay Design 3.1 软件进行引物设计并用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)对合成的引物进行质检。PCR 反应体系(5 μL):去离子水 1.8 μL,正向与反向引物各 0.5 μL, DNA 模板 1.0 μL, 10×buffer 液 0.5 μL, Mg²⁺ 0.4 μL, dNTP 0.1 μL, Hotstar 0.2 μL。PCR 反应条件:95℃预变性 2 min;95℃变性 30 s, 56℃退火 30 s, 72℃延伸 60 s, 共 45 个循环;最后 72℃延伸 5 min。SAP 酶消化非特异性产物。

1.3.2.3 单碱基延伸反应延伸反应体系(2 μL): 0.619 μL 水, 10×iplex buffer 0.2 μL, Terminator mix 0.2 μL, 引物 0.94 μL, 单碱基延伸酶 0.041 μL。循环条件:94℃ 30 s, 94℃ 5 s, 52℃ 5 s, 80℃ 5 s, 内部 5 个循环, 共 45 个循环, 72℃ 3 min 结束。在每个延伸反应物加入树脂 35 min, 脱盐;将脱盐后的样品点样在样品靶上, 自然结晶。

1.3.2.4 MALDI-TOF-MS 分型检测时向延伸反应产物的 384 孔板中加入 16 μL 三蒸馏水, 在离心机中以 2 000 r/min 离心 3 min;加入树脂, 在反向摇匀仪上做树脂纯化反应 35 min, 脱盐;反应完成后, 在离心机中以 2 000 r/min 离心 3 min;将脱盐后的样品点样在样品靶上, 自然结晶。用 Typer 4.0 软件检测质谱峰, 并根据质谱峰图鉴定各样本靶位点基因型。Mass Array[®] SNP 检测 SNP 多态性, 用 MALDI-TOF-MS 检测延伸产物的相对分子质量, 分析软件 Mass Array TYPER 4.0 进行基因分型分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 服从正态分布的资料的两个样本均数的比较采用独立样本 *t* 检验;计数资料用百分比表示, 采用 χ^2 检验比较组间差异, 多组比较的计数资料采用行×列 χ^2 检验;采用 OR 分析与线性回归来分析 CC、CA/AA 基因型与不同危险组之间的关系。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BCL2-938 C>A 基因型分布特点 C 等位基因在这个样本中的频率为 0.53, A 等位基因的频率为 0.47, 基因型分布情况符合 Hardy-Weinberg 平衡。69 例 ALL 儿童 BCL2-938 C>A 基因型的检测结果显示, CC 基因型有 23 例, CA 型 27 例, AA 型 19 例, 见表 1。

表 1 BCL2-938C>A 基因型与临床危险因素

项目		BCL2-938 基因型		P
		CA+AA(n=46)	CC(n=23)	
初发年龄	1~≤10 岁	37	21	0.245
	>10 岁或<1 岁	9	2	
初发白细胞计数(/L)	0~50×10 ⁹	37	18	0.832
	≥50×10 ⁹	9	5	
免疫表型	B-ALL	39	16	0.138
	T-ALL	7	7	
危险度分组	低危	24	4	0.015
	中危	12	8	
	高危	10	11	
分子遗传学改变	无改变	33	16	0.188
	BCR/ABL 融合基因	1	4	
	TEL/AML1 融合基因	7	2	
	MYC 基因分离重排	1	0	
	SIL/TAL1 融合基因	3	0	
	IKZF1 基因突变(缺失)	0	1	
	ASS1 基因缺失	1	0	
D15 MRD	缓解	36	15	0.245
	不缓解	10	8	
D33 MRD	缓解	37	19	0.828
	不缓解	9	4	

2.2 BCL2-938C>A 基因型与临床危险因素相关性

ALL 患儿预后与发病年龄(1~≤10 岁或>10 岁)、初发外周血白细胞计数(≥50×10⁹/L)、免疫表型(T-ALL)、预后不良的分子遗传学改变(BCR-ABL 融合基因等)、早期治疗反应不良(D15 及 D33MRD 未缓解)等危险因素有关。本研究提示 BCL2-938C>A 基因型与儿童 ALL 危险因素差异无统计学意义,包括患儿的发病年龄、免疫表型、分子遗传学改变、初发外周血白细胞计数、早期治疗反应不良,见表 1。

表 2 BCL2-938 基因型与不同危险度 ALL 的相关性

组别	BCL2-938 基因型		OR(95%CI)	P
	CA/AA	CC		
低危	24	4	1	
中危	12	8	4.00(1.00~15.99)	0.048
高危	10	11	6.60(1.69~25.76)	0.007

2.3 BCL2-938 基因型多态性与 ALL 的危险度相关性

不同 BCL2-938 基因型间 ALL 的危险度差异有统计学意义($P=0.015$),见表 1。CC 基因型患儿的百分比在低危(14.3%)、中危(40.0%)、高危组(52.4%)中呈逐渐上升趋势。携带 CC 基因型 ALL

患儿出现在中高危组的频率较 CA/AA 基因型患儿高。CC 基因型的 ALL 患儿比 CA/AA 基因型患儿有更高风险分布于中、高危组($P<0.05$),见表 2。

3 讨 论

儿童急性淋巴细胞白血病的治疗是一个漫长且复杂的过程,包括早期诱导治疗、巩固治疗和继续治疗 3 个阶段。早期的诱导治疗是为了减少肿瘤细胞的负荷并恢复骨髓正常的造血功能,是决定患儿能否获得长期无病生存的关键。巩固治疗的目的是进一步清除诱导治疗后残留的白血病细胞。继续治疗包括再诱导治疗及为期 2~3 年的维持治疗,目的在于防止白血病在诱导、巩固、缓解后出现复发。在过去 20 年中,ALL 儿童生存率得到了显著改善,这归功于危险度分组的不断完善及化疗方案的不断改进。儿童 ALL 危险度分组的不断精确,得益于人们对 ALL 细胞遗传学及其他生物学特征等遗传相关预后因素的不断发现、认识及利用^[9]。儿童 ALL 分为低、中、高危险度组,不同危险度给予不同的治疗强度^[10]。低危患儿通常预后较好,予以低强度的化疗方案就可达到长期无病生存,而相对预后较差的中高危组患儿需要更高强度的化疗来避免复发。分层治疗使得高危患者接受更强的治疗以寻求长期无病生存,让不存在

高危因素的患儿治疗强度降低,从而避免过度治疗、减少化疗相关不良反应的发生。

BCL2 是在调节细胞凋亡和延迟细胞周期中起重要作用的抗凋亡蛋白^[11]。目前 BCL2 基因启动子区域仅有 1 个 SNP,其位于核苷酸-938 位置(BCL2-938 C>A)。有研究表明,BCL2-938 C>A 启动子多态性显著影响了多种癌症的 BCL2 基因启动子活性及 BCL2 的表达^[12-13]。BCL2-938 C>A 多态性与不同类型癌症的风险关联不同,这取决于组织细胞的特异性。LIU 等^[14]发现 BCL2-938 AA 基因型与食管癌的易感性有关;LI 等^[15]的研究显示 BCL2-938 CC 基因型会导致人群罹患食管癌及其癌前病变的风险增加。有文献^[16]报道 BCL2 在成年 ALL 的诱导治疗期间是一个潜在的治疗反应指标。本文研究了 BCL2-938 C>A 多态性与 ALL 危险度的关系,发现基因多态性与儿童 ALL 的危险度分组密切相关,CC 基因型 ALL 患儿出现在中高危险组的频率更高。此外,本文研究了 BCL2-938 C>A 基因多态性与目前儿童 ALL 常见的危险因素相关性,发现 BCL2-938 C>A 基因型与发病年龄、初发白细胞计数、分子遗传学改变、D15 及 D33 MRD 等危险因素无明显相关性。本研究提示 CC 基因型可能是儿童 ALL 危险分组的重要因素。

综上所述,BCL2-938 C>A 基因多态性与儿童 ALL 的危险度分组密切相关,BCL2-938 CC 基因型可能是儿童 ALL 重要的危险因素。在儿童 ALL 中,BCL2-938 C>A 基因多态性的表达可能有利于精确危险度分组及进一步指导临床治疗。

参考文献

- [1] PUI C H, CAMPANA D. Minimal residual disease in pediatric ALL[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(45): 78251-78252.
- [2] VOLEJNKOVA J, JAROSOVA M, POSPISILOVA D, et al. Treatment and prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemia on protocols ALL-BFM 90, 95 and ALL IC-BFM 2002: a retrospective single-center study from Olomouc, Czech Republic[J]. *Neoplasma*, 2016, 63(3): 456-461.
- [3] KESLER S, OGG R, REDDICK W, et al. Brain network connectivity and executive function in long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Brain Connect*, 2018, 8(6): 333-342.
- [4] RENNER W, LANGSENLEHNER U, KRENN-PILKO S, et al. BCL2 genotypes and prostate cancer survival[J]. *Strahlenther Onkol*, 2017, 193(6): 466-471.
- [5] CINGEETHAM A, VUREE S, DUNNA N R, et al. Influence of BCL2-938C>A and BAX-248G>A promoter polymorphisms in the development of AML: case-control study from South India[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(10): 7967-7976.
- [6] BHUSHANN M P, JARJAPU S, VISHWAKARMA S K, et al. Influence of BCL2-938 C>A promoter polymorphism and BCL2 gene expression on the progression of breast cancer[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(5): 6905-6912.
- [7] ZHANG X, WENG W, XU W, et al. Role of Bcl-2 -938 C>A polymorphism in susceptibility and prognosis of cancer: a meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2014, 28(4): 7241.
- [8] 鲍亮, 吴南海, 吴敏媛, 等. CCLG-ALL2008 方案治疗儿童急性淋巴性白血病单中心疗效分析[J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2016, 21(2): 66-72.
- [9] SHEN Z, GU X, MAO W, et al. Influence of pre-transplant minimal residual disease on prognosis after Allo-SCT for patients with acute lymphoblastic leukemia: systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 755-768.
- [10] HAKEEM A, SHIEKH A, BHAT G M, et al. Prognostification of ALL by Cytogenetics[J]. *Ind J Hematol Blood Transfus*, 2015, 31(3): 322-331.
- [11] EI HINDY N, BACHMANN H S, LAMBERTZ N, et al. Association of the CC genotype of the regulatory BCL2 promoter polymorphism (938C>A) with better 2-year survival in patients with glioblastoma multiforme[J]. *J Neurosurg*, 2011, 114(6): 1631-1639.
- [12] LI W, QIAN C, WANG L, et al. Association of BCL2-938C>A genetic polymorphism with glioma risk in Chinese Han population[J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(3): 2259-2264.
- [13] BACHMANN H S, HEUKAMP L C, SCHMITZ K J, et al. Regulatory BCL2 promoter polymorphism (-938C>A) is associated with adverse outcome in patients with prostate carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(10): 2390-2399.
- [14] LIU Z, SUN R, LV W, et al. The -938A/A genotype of BCL2 gene is associated with esophageal cancer[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(4): 2677-2683.
- [15] LI Y, GUO S, YING C, et al. Association between Bcl-2 gene polymorphism and risk of esophageal squamous cell carcinoma and precancerous lesions[J]. *Tumor*, 2015, 35(12): 1322-1328.
- [16] CHAUHAN P S, BHUSHAN B, SINGH L C, et al. Expression of genes related to multiple drug resistance and apoptosis in acute leukemia: response to induction chemotherapy[J]. *Exp Mol Path*, 2012, 92(1): 44-49.