

急性髓系白血病患者外周血细胞中 FLT3 基因表达与 FLT3/ITD 突变的关系及其意义

徐 兵, 史鹏程, 宋小燕, 唐家宏, 周淑芸

Correlation of Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) gene expression to FLT3/internal tandem duplication mutation in peripheral blood of acute myeloid leukemia

Bing Xu, Peng-Chang Shi, Xiao-Yan Song, Jia-Hong Tang and Shu-Yun Zhou

南方医科大学南方医院血液科,
广东 广州 510515

Department of Hematology,
Nanfang Hospital,
Southern Medical University,
Guangzhou, Guangdong, 510515,
P.R. China

通讯作者: 徐 兵

Correspondence to: Bing Xu

Tel.: 86.20.61641615

Email: xbjzj@fimmu.com

基金项目: 广东省科技计划项目
(No. 2004B30701005)

Grant: Technology Program of
Guangdong Province
(No. 2004B30701005)

收稿日期: 2008-07-09

修回日期: 2009-02-11

[Abstract] **Background and Objective:** Fms-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication (FLT3/ITD) is associated with an unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia (AML). However, the role of FLT3 expression as well as its correlation to FLT3/ITD has not sufficiently studied. This study was to evaluate the relationship between FLT3 gene expression and FLT3/ITD mutation in patients with de novo AML. **Methods:** FLT3 gene expression was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR). FLT3/ITD mutation was detected by PCR in 79 de novo AML patients. **Results:** FLT3/ITD mutations were found in 22.8% (18/79) patients. FLT3 gene expression (range: 0-7320, median: 312) was detected in 92.4% (73/79) patients, but not in normal controls. Compared to AML patients with low FLT3 expressers and without FLT3/ITD mutation, patients with high FLT3 expressers and FLT3/ITD mutation had a significantly higher white blood count as well as a higher ratio of bone marrow blasts. The positive rate of FLT3/ITD mutation was not correlated to the level of FLT3 expression, and no statistical difference of FLT3 expression was found between AML patients with and without FLT3/ITD mutation. The complete remission (CR) rate of AML patients with FLT3/ITD mutation (58.8%) was significance lower than that of those without FLT3/ITD mutation (82.1%). In AML patients without FLT3/ITD mutation, the CR rate was significantly lower in patients with high FLT3 expressers (69.2%) than in those with low FLT3 expressers (93.3%). **Conclusion:** The FLT3 expression is not associated with FLT3/ITD mutation. High-FLT3 expression may be a poor prognostic factor for AML patients without FLT3/ITD mutation.

Key words: acute myeloid leukemia, fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3), PCR, real-time quantitative

【摘 要】 背景与目的: 研究表明 FLT3/ITD 突变的急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 患者预后差, 但关于 AML 患者 FLT3 基因的表达水平在预后中的作用及其与 FLT3/ITD 突变关系的研究尚不充分。本研究探讨初治 AML 患者 FLT3 基因的表达水平与 FLT3/ITD 突变的关系及其临床意义。方法: 建立实时荧光定量 PCR 检测 FLT3 基因表达水平及 PCR 检测 FLT3/ITD 突变的方法, 分析 79 例初治 AML 患者 FLT3 基因水平、FLT3/ITD 突变及与预后的关系。结果: 22.7% (18/79) 的 AML 患者存在 FLT3/ITD 突变。92.4% (73/79) 的患者标本中可检测到 FLT3 基因表达, FLT3 基因表达水平为 0~7320, 中位数为 312, 正常对照组未检测到 FLT3 基因的表达。FLT3 基因高表达及 FLT3/ITD 突变 AML 组的白细胞计数及骨髓白血病细胞均显著高于低表达和无突变 AML 组 ($P<0.05$)。FLT3 基因高表达的 AML 组 FLT3/ITD 突变率 (25.6%) 同低表达的 AML 组 (20.0%) 相比, 差异无

统计学意义($P>0.05$),FLT3/ITD 突变 AML 患者 FLT3 基因表达中位数与无突变组比较差异也无统计学意义。FLT3/ITD 突变组的完全缓解率(58.8%)显著低于无 FLT3/ITD 突变组(82.1%)($P<0.05$);FLT3 基因高表达 AML 组 FLT3/ITD 的完全缓解率(68.6%)同低表达 AML 组(84.2%)相比差异无统计学意义($P>0.05$),但无 FLT3/ITD 突变组中,FLT3 基因高表达组完全缓解率(69.2%)显著低于低表达组(93.3%)($P<0.05$)。结论:FLT3 高表达与 FLT3/ITD 突变之间无明显相关性,FLT3 高表达对于无 FLT3/ITD 突变 AML 患者可能是一个预后不良的指标。

关键词:白血病,髓细胞,急性;FLT3;FLT3/ITD 突变;实时定量 PCR

中图分类号:R733.7 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2009)06-0632-05

急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)具有高度异质性,不同 AML 患者疗效和预后存在很大的差别,深入研究 AML 的生物学特征和发病机制,更好地区分 AML 亚群,探索包括靶向治疗在内的新的治疗措施,可以使疗效得到进一步改善。目前根据 AML 患者的遗传学核型确定的高、中、低危三组危险度分层已被广泛接受,并对临床治疗起重要的指导作用。但 50%左右的 AML 患者属于正常染色体而被归入中危组,此组患者的临床特征和预后也存在异质性。近年研究发现,分子基因改变,如基因突变或表达水平的变化可以对染色体正常 AML 患者进行进一步分层。因此,深入研究与正常核型 AML 预后相关的基因具有重要意义^[1]。

FLT3 基因在骨髓中限制性表达于 CD34⁺ 细胞,骨髓基质细胞产生的 FLT3 配体与 FLT3 相互作用,在造血干细胞的自我更新、增殖、分化等方面起重要的作用^[2]。研究发现约 20%~25%的 AML 患者存在 FLT3 基因近膜区序列内部串连重复(internal-tandem duplications, ITD),称为 FLT3/ITD 突变,进一步研究证实 FLT3/ITD 突变 AML 患者疗效差,是一个重要的独立预后因素^[3]。为进一步探讨 AML 患者 FLT3 表达水平与 FLT3/ITD 突变的关系,本研究采用实时荧光定量 PCR 检测 FLT3 基因表达水平,PCR 检测 FLT3/ITD 突变,并对其相互关系及与预后的关系进行分析。

1 资料与方法

1.1 研究对象

经细胞形态学、组织化学染色及流式细胞术免

疫学分型确诊的初治 AML 患者 79 例,其中男性 43 例,女性 36 例,中位年龄 33 岁(14~61 岁)。FAB 分型中急性髓细胞白血病微分化型(M0)3 例,急性粒细胞白血病未分化型(M1)6 例,急性粒细胞白血病部分分化型(M2)19 例,急性早幼粒细胞白血病(M3)9 例,急性粒-单核细胞白血病(M4)12 例,急性单核细胞白血病(M5)23 例,不能分类 7 例。23 名健康志愿者外周血标本作为正常对照组。阳性对照选用人慢性髓细胞白血病细胞株 K562。

所有患者采用蒽环类药物(包括柔红霉素或去甲氧柔红霉素、吡柔比星)联合阿糖胞苷(3+7)方案进行诱导化疗。

1.2 细胞 DNA、RNA 的提取

取患者外周血标本,分离单个核细胞。DNA 提取参照文献[4]。RNA 的提取采用 Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司产品),按说明提取细胞总 RNA, -80℃保存备用。

1.3 引物及探针的设计

采用 Primer Express 2.0 软件设计 FLT3 基因引物和探针,序列为:上游引物 5'-GGTGCAAAGCT GTTCATGTGA-3',下游引物 5'-TCCTCGAGTGCTTT GTTTTCTAATT-3',扩增产物为 70 bp,探针 5'-CCA TGGATTCCGGGCTCACCTGG-3'。内对照 β -actin 引物及探针序列:上游引物 5'-GCGCGGCTACAGC TTCA-3',下游引物 5'-TCTCCTTAATGTCACGCA CGAT-3',扩增产物为 59 bp,探针 5'-CACCACGG CCGAGCGGGA-3'。引物和探针在 ABI 3900 台式高通量 DNA 合成仪合成。探针 5'端标记荧光报告基团 FAM,3'端标记淬灭基团 TAMRA。FLT3/ITD 突变主要发生在 11 号外显子和 12 号外显子之间,因此在 11 号外显子近端和 12 号外显子远端分别设计保守序列引物 11F 和 12R,引物序列为 11F:5' -GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' 和 12R:5' -CTTTCAGCATTGACGGCAACC-3',由上海基康公司合成。

1.4 PCR 检测 FLT3/ITD 突变

按本室建立的方法^[4]进行。

1.5 荧光定量 PCR 标准模板的构建

从培养的 K562 细胞提取 RNA,用 FLT3 基因引物扩增 FLT3 基因,PCR 扩增产物纯化后按试剂盒说明与 pMD 18 载体连接,转化到 *E.coli* JM109,培养阳性克隆并提取质粒,荧光定量 PCR 鉴定纯化后, -20℃保存备用。

1.6 逆转录及荧光定量 PCR 检测 FLT3 基因表达

逆转录反应体系 20 μL , 含 $5\times$ 逆转录缓冲液 4 μL , 10 pmol/ μL 引物各 0.4 μL , 25 mmol/L dNTPs 0.2 μL , 10 U/ μL 逆转录酶 1 μL , 二乙基焦磷酸胺水 (DEPC) 10 μL , RNA 模板 4 μL 。反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min。荧光定量 PCR 反应体系 50 μL , 含 $5\times$ 定量缓冲液 10 μL , 10 pmol/ μL 各引物 1 μL , 探针 1 μL , 10 mmol/L dNTPs 1 μL , 2 U/ μL *Taq* 酶 2 μL , cDNA 5 μL , 双蒸水 29 μL 。反应条件为: 93 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 然后 93 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 共 40 循环。逆转录在 PE9700 PCR 仪(美国 PE 公司)进行, 荧光定量 PCR 反应在 PE7300 全自动荧光定量 PCR 仪(美国 PE 公司)进行。反应结束后, 由电脑自动分析并计算结果。

1.7 统计学处理方法

考虑到各个样本总 RNA 浓度可能存在差异, 以 β -actin 作为内参照。如果 β -actin 的表达水平低于 1×10^4 , 则标本被视为 RNA 质量不合格予以剔除。以同一份标本 (FLT3 基因拷贝数/ β -actin 基因拷贝数) $\times 10^4$ 来计算 FLT3 基因表达水平。

本研究中计量资料呈非正态分布, 以 AML 患者 FLT3 基因表达量的中位数作为区分 FLT3 基因表达水平高低的临界值 (cut-off 值), 将患者分为两组: FLT3 基因高表达组和 FLT3 基因低表达组。样本均数采用两独立样本 *t* 检验, 率的比较采用 χ^2 检验。采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实时荧光定量 PCR 方法的可信性及灵敏度分析

取冻存的阳性标准品重组质粒, 提取 RNA 及逆转录成 cDNA, 浓度为 1×10^6 拷贝/ μL , 10 倍稀释成浓度为 $1\times 10^2\sim 1\times 10^6$ 拷贝/ μL , 分别进行定量 PCR 扩增。结果显示, 本方法灵敏度达 1×10^2 拷贝。在 5 个数量级检测范围, 其对数与相应的循环阈值 (C_t) 有良好的线性相关, 相关系数 $r=0.996$ (图 1)。

2.2 初治 AML 患者 FLT3/ITD 突变及 FLT3 基因表达水平

由于 ITD 基因突变是在 FLT3 基因近膜区出现一段串联重复序列, 因此, FLT3/ITD 突变阳性病例 PCR 扩增后, 可发现 2 条特异性条带。由于不同患者 FLT3 内部串联重复的长度有所不同, 因此不同患者 ITD 特异性条带的位置也略有不同, 但均大于

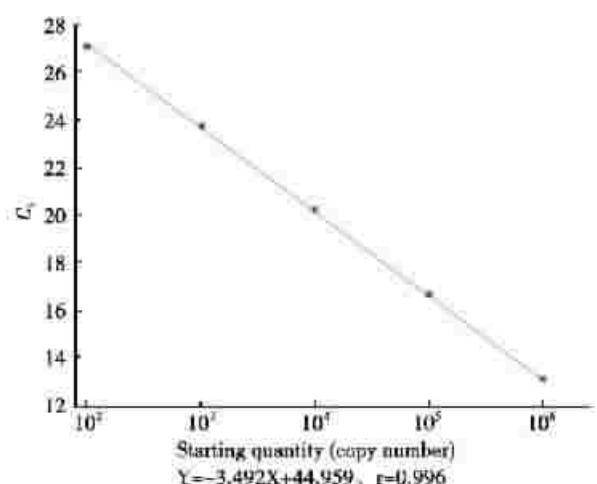


图 1 实时荧光定量 PCR 检测不同标准品浓度 FLT-3 基因扩增曲线直线回归图

Figure 1 Standard curve for amplification of FLT3 gene using real-time quantitative polymerase chain reaction analysis

329 bp (图 2)。79 例 AML 患者中, 18 例存在 FLT3/ITD 突变, 阳性率为 22.7%。79 例初治 AML 患者经荧光定量 PCR 扩增后, 73 例 (92.4%) 可检测出 FLT3 基因表达, FLT3 基因表达水平为 0~7320, 中位数为 312。23 例健康对照者外周血细胞中未检测到 FLT3 基因的表达。

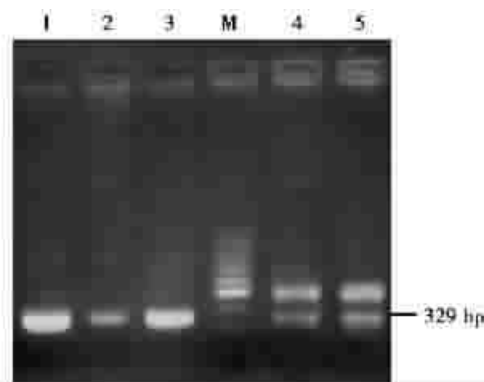


图 2 FLT3 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Figure 2 FLT3/ITD gene mutation detected by PCR

Lane M: DNA marker; Lanes 1, 3: patients without FLT3/ITD gene mutation; Lane 2: normal control; Lines 4, 5: patients with FLT3/ITD gene mutation.

2.3 FLT3 基因表达水平及 FLT3/ITD 突变与患者白血病细胞比例的关系

39 例 FLT3 基因高表达组、40 例 FLT3 基因低表达组和 18 例 FLT3/ITD 突变组、61 例 FLT3/ITD 未突变组 AML 患者发病时白细胞 (WBC) 计数、血

红蛋白(Hb)、血小板(PLT)计数及骨髓白血病细胞比例见表 1。统计分析显示,FLT3 基因高表达 AML 组的 WBC 计数及骨髓白血病细胞比例显著高于 FLT3 基因低表达 AML 组($P<0.05$),FLT3/ITD 突变组 WBC 计数及骨髓白血病细胞比例也显著高于未突变组($P<0.01$)。FLT3 基因高表达及 FLT3/ITD 突变组 AML 组的 Hb 水平、PLT 计数及同低表达组及突变阴性组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 AML 患者 FLT3 基因的表达水平及 FLT3/ITD 突变的与血象及骨髓白血病细胞比例
Table 1 Correlation of FLT3 gene expression and FLT3/ITD mutation to white blood cells (WBC) count, hemoglobin (Hb), platelet (PLT) and ratio of bone marrow blast cells for acute leukemia patients at diagnosis

	Cases	WBC($\times 10^9/L$)	Hb(g/L)	PLT($\times 10^9/L$)	Blast ratio(%)
High FLT3 expression	39	19.7 $\pm$ 12.1	81.3 $\pm$ 9.8	63.7 $\pm$ 36.2	77.6 $\pm$ 9.7
Low FLT3 expression l	40	11.4 $\pm$ 8.9	83.6 $\pm$ 11.9	69.7 $\pm$ 32.1	48.3 $\pm$ 12.8
FLT3/ITD ⁺	18	23.1 $\pm$ 13.7	80.3 $\pm$ 8.4	59.6 $\pm$ 29.4	79.2 $\pm$ 10.3
FLT3/ITD ⁻	61	9.9 $\pm$ 7.2	84.5 $\pm$ 10.6	67.8 $\pm$ 31.5	46.5 $\pm$ 11.7

2.4 AML 患者 FLT3 基因表达水平与 FLT3/ITD 突变的关系

39 例 FLT3 基因高表达 AML 组中,10 例(25.6%) 存在 FLT3/ITD 突变;40 例 FLT3 基因低表达 AML 组中 8 例(20.0%)存在 FLT3/ITD 突变。FLT3 基因高表达 AML 组 FLT3/ITD 突变阳性率同低表达 AML 组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。18 例 FLT3/ITD 突变 AML 患者 FLT3 基因的中位表达水平为 331, 而 61 例无 FLT3/ITD 突变 AML 患者 FLT3 基因的中位表达水平为 297, 两者比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.5 AML 患者 FLT3 基因表达水平与临床疗效的关系

73 例 AML 患者经 2 个疗程诱导化疗后的完全缓解(CR)率为 76.7%(56/73)。其中 FLT3/ITD 突变组 CR 率为 58.8%(10/17),无 FLT3/ITD 突变组 CR 率为 82.1%(46/56),FLT3/ITD 突变组 CR 率显著低于无突变组($P<0.05$)。FLT3 基因高表达组 CR 率为 68.6%(24/35),FLT3 基因低表达组 CR 率为 84.2%(32/38), 尽管 FLT3 基因高表达组 AML 的 CR 率低于低表达组,但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。56 例无 FLT3/ITD 突变组中,FLT3 基因高表达组 CR 率为 69.2%(18/26), 低表达组 CR 率为 93.3%(28/30),FLT3/ITD 突变阴性组中,FLT3 基因高表达组 CR 率显著低于低表达组 ($P<0.05$)。

3 讨 论

FLT3(fms-like tyrosine kinase 3)基因是近年来发现的具有酪氨酸激酶活性的生长因子受体基因,

它与 FLT3 配体结合能诱导受体自主磷酸化, 并通过各种细胞浆相关蛋白的转导激活信号而对造血发育过程起重要的调节作用。它的异常表达可导致血细胞对细胞分化和信号分子反应发生改变,从而导致白血病细胞的增殖及克隆形成。国外及我们以往研究均发现,FLT3 基因可在绝大部分 AML、部分急性淋巴细胞白血病及慢性粒细胞白血病(CML)急变期患者中出现异常表达, 而 CML 慢性期则很少表达^[2,5],提示 FLT3 基因的异常表达与急性白血病发生和发展有着密切的关系。本研究建立了实时荧光定量 PCR 检测 FLT3 基因表达的方法, 发现 92.4%AML 患者可检测出 FLT3 基因的表达,且 FLT3 基因高表达的 AML 患者外周血 WBC 计数和骨髓白血病细胞比例显著高于低表达患者,证实 FLT3 基因在白血病细胞增殖和白血病的发生中起重要作用。

ITD 是体细胞突变的新模式,它能延长原癌基因的决定性序列并激活其产物, 目前研究表明 FLT3/TID 基因突变与白血病发展(难治或复发)具有密切关系。有国外研究和我们的前期研究证实, FLT3/ITD 突变是 AML 一个重要的独立预后不良指标,FLT3/ITD 突变 AML 常伴低 CR 率、高的复发率及更短的无病生存期和总生存期^[3,4]。本研究结果显示 FLT3 高表达 AML 组 FLT3/ITD 突变率同低表达组相比差异无统计学意义, 且 FLT3/ITD 突变的 AML 患者 FLT3 表达水平也未高于无突变者, 表明 FLT3 高表达与 FLT3/ITD 突变之间无明显相关性, 提示 FLT3 高表达和 FLT3/ITD 突变可能是通过不同的机制影响 AML 的发生和发展。有研究表明野生型的 FLT3 主要通过 PI3K

(phosphatidylinositol-3 kinase)和 Ras 途径,导致 AKT (protein kinase B)、STAT5 和胞外信号调节酶 1/2 (ERK1/2)的激活;而 FLT/ITD 突变时在无需生长因子的情况下,产生胞内第一酪氨酸结构域自主磷酸化,进而主要通过 Ras 和 STAT5 途径导致造血细胞活化和自我增殖^[6],这可能是 AML 中 FLT3 基因的表达水平与 FLT3/ITD 突变无相关性的原因。

AML 疗效的进一步改善需要进行更细致的分层和个体化治疗,已证实 FLT3/ITD 突变是预后差的重要指标,但该突变仅见于 20%左右 AML,对大部分无 FLT3/ITD 突变 AML 的进一步分层显得尤为重要。本研究结果显示,无 FLT3/ITD 突变组中,FLT3 基因高表达者 CR 率显著低于低表达者。Kuchenbauer 等^[7]研究也发现无 FLT3/ITD 突变的 AML 中,FLT3 高表达很可能是独立的预后不良指标。提示 FLT3 高表达可能是无 FLT3/ITD 突变 AML 新的分层指标,由于本研究的病例数有限,此结论需进一步扩大病例数及长期随访以获得较可靠的结论。

[参 考 文 献]

- [1] Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukemia [J]. Lancet, 2006,368(9550):1894-1907.
- [2] Drexler HG, Quentmeier H. FLT3: receptor and ligand [J]. Growth Factors, 2004,22(2):71-73.
- [3] Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials [J]. Blood, 2001,98(6):1752-1759.
- [4] 徐 兵,张 燕,田 红,等. 聚合酶链反应检测急性非淋巴细胞白血病患者 FLT3/ITD 基因突变及临床意义 [J]. 中华检验医学杂志, 2003,26(10):612-615.
- [5] 徐 兵,唐家宏,李 琳,等. 各种血液肿瘤患者 FLT3/ITD 基因突变的检测及临床意义 [J]. 中国实用内科杂志, 2007, 27:1113-1115.
- [6] Choudhary C, Muller-Tidow C, Berdel WE, et al. Signal transduction of oncogenic Flt3 [J]. Int J Hematol, 2005,82(2):93-99.
- [7] Kuchenbauer F, Kern W, Schoch C, et al. Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia [J]. Haematologica, 2005,90(12):1617-1625.

[编辑及校对:张 菊]