急性髓系白血病 *CEBPA* 基因突变研究*

张 艳[1,2]，高华强[2]，华海应[2]，朱文艳[2]，周 晔[2]，王志清[2]，张苏江[1]，仇红霞[1]**
（1. 南京医科大学第一附属医院，江苏省人民医院 血液科，江苏 南京 210029；2. 无锡市第三人民医院 血液科，江苏 无锡 214000）

［摘 要］**目的**：探讨急性髓系白血病（AML）患者 *CEBPA* 基因突变的发生率，分析伴 *CEBPA* 突变的正常核型 AML（NK-AML）患者的临床特征及预后。**方法**：80 例 AML 初发患者，以基因组 DNA 为模板，分两段扩增整个 *CEBPA* 基因，扩增产物测序检测 *CEBPA* 突变，分析 NK-AML 中 *CEBPA* 突变型组及野生型组患者总生存（OS）、无事件生存（EFS）。**结果**：检出 *CEBPA* 基因突变 10 例，突变率为 12.5%（10/80），均为 M2 型，核型正常；突变主要为 N 端移码突变和 C 端框内突变；*CEBPA* 突变型组患者初诊时外周血小板计数明显低于野生型组，差异有统计学意义（$P<0.05$），*CEBPA* 突变型组患者 OS、EFS 与 *CEBPA* 野生型组，差异无统计学意义（$P>0.05$）。**结论**：*CEBPA* 基因突变多见于正常核型 AML-M2 患者，伴 *CEBPA* 突变患者初诊时外周血血小板计数较低，但不影响预后。

［关键词］基因，*CEBPA*；突变；白血病，粒细胞，急性；核型分析；血小板
［中图分类号］R733.71 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2014）05-0652-05

Analysis of *CEBPA* Mutation in Acute Myeloid Leukemia

ZHANG Yan[1,2], GAO Huaqiang[2], HUA Haiying[2], ZHU Wenyan[2], ZHOU Ye[2],
WANG Zhiqing[2], ZHANG Sujiang[1], QIU Hongxia[1]
(*1. Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, People's Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 2. Department of Hematology, the Third People's Hospital of Wuxi City, Wuxi 214000, Jiangsu, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To explore the incidence of *CEBPA* gene mutation in patients with acute myeloid leukemia (AML), and to study the clinical features and prognosis of normal karyotype AML(NK-AML) patients with *CEBPA* gene mutation. **Methods**: The entire *CEBPA* coding region of 80 AML primary patients was amplified using genomic DNA as template and sequenced. The overall survival rates (OS) and event free survival rates (EFS) of NK-AML patients in mutation group and wild type group were analyzed. **Results**: *CEBPA* mutations were found in 10 patients, and mutation rate was 12.5 % (10/80). All the 10 patients were M_2 and NK-AML. The mutations mainly were N-terminal nonsense mutations and C-terminal in-frame mutation. Compared with wild type patients, the patients with *CEBPA* mutations had lower platelet counts ($P<0.05$). The OS and EFS of AML patients with *CEBPA* mutation were similar to patients without *CEBPA* mutation ($P>0.05$). **Conclusions**: *CEBPA* mutations are mainly identified in NK-AML patients with M_2 subtype. *CEBPA* mutant cases are associated with lower platelet counts, but not affect prognosis.

［**Key words**］gene, *CEBPA*; mutation; leukemia, myeloid, acute; karyotype analysis; platelet

急性髓系白血病（AML）同时具有增殖过度和分化阻滞的遗传特征。“多次打击”学说认为，AML 的发生主要来自于增殖过度和分化阻滞累及的相关基因突变的共同作用[1]。C/EBPα 是粒系分化的重要因子，含 358 个氨基酸，由基因 *CEBPA* 编码，在调节细胞增殖与分化的平衡中起着关

*［基金项目］国家自然科学基金项目（81070456，81270652）
**通信作者 E-mail：13951668957@126.com
网络出版时间：2014-09-23 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140923.1644.014.html

键的作用[2]。本研究通过定性 PCR 结合测序方法检测 AML 患者中 *CEBPA* 基因突变的情况，同时了解 *CEBPA* 突变患者的临床特征及预后相关指标。

1　材料和方法

1.1　研究对象

80 例 AML 患者（AML 组）来自 2008 年 12 月～2013 年 06 月住院或门诊初诊病例，男性 52 例，女性 28 例，年龄 13～71 岁，中位年龄 48 岁。根据 FAB 分型标准，80 例患者中 M0 2 例，M1 6 例，M2 42 例，M3 11 例，M4 7 例，M5 8 例，M6 4 例；诊断及疗效标准参照张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》[3]。正常对照组共 10 份，每份取正常供者体检骨髓 3 mL。

1.2　方法

1.2.1　染色体核型分析　AML 患者骨髓细胞经 24 h 培养，收集细胞常规制片，R 显带，根据《细胞遗传学国际命名体制（ISCN1995）》进行染色体核型分析，80 例患者根据 AML2013 年 NCCN 指南在细胞遗传学水平进行危险分层，其中预后良好核型组 14 例，其中 t(8,21)7 例，t(15,17)5 例，inv(16) 2 例；预后中等核型组 51 例，均为正常核型；预后不良核型组 15 例，主要为复杂核型异常。

1.2.2　CEBPA 基因突变检测　以基因组 DNA 为模板，分 2 段扩增整个 *CEBPA* 基因，扩增产物覆盖全部编码区。采用 Primer Premier 5 设计引物，引物及 PCR 产物长度见表 1。反应体系（25 μL）：2 × Taq mix 12.5 μL，5 × Q-solution 5 μL，10 μmol/L 的上/下游引物各 0.5 μL，DNA 模板 2 μL，双蒸水 4.5 μL。PCR 反应条件：95 ℃ 预变性 7 min，95 ℃变性 30 s、58 ℃退火 40 s、72 ℃延伸 45 s、共 35 个循环，72 ℃延伸 10 min；4 ℃保存。1.7 g/L 琼脂糖凝胶电泳（100 V，30 min）检测 PCR 产物，目的条带分别为 508 bp 和 550 bp。电泳后剩余 PCR 产物用 PCR 产物纯化试剂盒（大连宝生物公司产品）进行产物的回收及纯化，分别用 2 对引物的正义引物进行直接测序（由大连宝生物公司完成），结果用 BLAST 与正常序列（基因库编号 NM-004364.2）比对。选取直接测序结果有重叠峰的标本，进行克隆测序分析验证，结果用 BLAST 与正常序列（基因库编号 NM-004364.2 的序列）比对分析突变发生的位置和类型。

表 1　*CEBPA* 引物系列及产物长度

Tab.1　Primer sequences and the product length of *CEBPA*

扩增引物		引物序列	产物长度
引物 1	上游	5′-tcggccgacttctacgag-3′	508 bp
	下游	5′-gcttggcttcatcctcctc-3′	
引物 2	上游	5′-gaggaggatgaagccaagc-3′	550 bp
	下游	5′-gttgcccatggccttgac-3′	

1.2.3　免疫表型检测　取新鲜抗凝骨髓液 100 μL 加不同组合抗体各 20 μL，混匀，避光 20 min，溶血后上机检测分析，采用 CD45/SsC 双参数设门，分析细胞群表面抗原表达。单克隆抗体的选择包括髓系（CD13、CD33、CD14、CD15），T 系列（CD2、CD7），B 系列（CD10、CD19、CD20）、早期抗原（CD34、HLA-DR、CD117）。结果判断：CD45/SSC 设门中原始细胞群表面抗原阳性率≥20% 为阳性，CD14≥10% 为阳性。

1.2.4　临床特征及预后指标　51 例正常核型 AML（NK-AML）患者中 37 例有初诊时临床一般资料及实验室检查资料，根据是否存在 *CEBPA* 突变将这 37 例患者分为突变组（10 例）及野生型组（27 例）。对可追踪的 37 例患者进行生存分析，总生存（OS）时间从疾病诊断计算至任何原因引起的死亡或随访结束，无事件生存（EFS）时间从开始治疗至出现首次复发、疾病进展及随访结束。

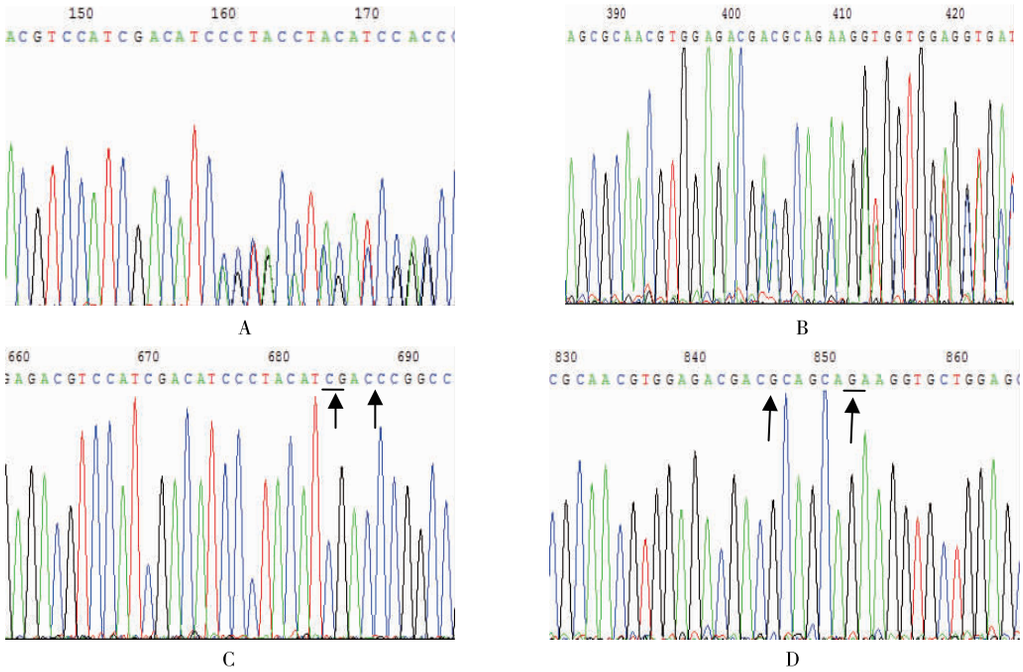
1.3　统计学处理

数据采用 SPSS 15.0 统计学软件分析。计数资料用率表示，组间比较采用 χ^2 检验，当被分析频数 <5 时，用 Fisher's Exact Test 法，计量资料计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用独立样本 t 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。对伴 *CEBPA* 突变型组及野生型组患者的 OS、EFS 采用 Kaplan-Meier 生存分析进行比较。

2　结果

2.1　*CEBPA* 基因突变

80 例 AML 患者 70 例为 *CEBPA* 野生型，测序图表现为单一峰形（图 1－A），10 例测序图出现重叠峰（图 1－B）；经克隆测序后明确存在 *CEBPA* 突变（图 1－C、D），突变率为 12.5%（10/80），在核型正常 AML 患者中为 19.6%（10/51）。10 例存在突变的 AML 患者均为正常核型 M2 患者，男性 8 例，女性 2 例；10 例正常对照未发现 *CEBPA* 突变。见表 2。



注:A、B 为 *CEBPA* 突变直接测序; C 为在 192 ~ 194 bp 处缺失 CAG 3 个碱基,在 196 处缺失单个 G 碱基克隆测序; D 为在 930 ~ 931 bp 之间插入单个 A 碱基,在 931 ~ 932 bp 之间插入 GC 两个碱基克隆测序

图 1 *CEBPA* 突变患者测序图

Fig. 1 Sequence diagram of *CEBPA* mutation patients

表 2 *CEBPA* 基因突变类型

Tab. 2 The patterns of *CEBPA* mutations

病例号	核苷酸序列改变	氨基酸序列改变
1	246delC	F82fsX159
2	192 – 194delCAG and 196delG	I64fsX158
3	267delG	E89fsX159
4	287delG, 301 – 302del2G, 304 – 305del2G, 309delC, 311delG, 314delA, 316 – 318del3T, 320delA, 322 – 323delTA, 326delC, 328 – 329del2G, 332delC, 339 – 341del3C, 345delC,	V95fsX151
5	312delC,314delA,316 – 320del3TGA,322 – 323delTA 326delC, 329delG, 331 – 332insG, 336delC, 337 – 338insT, 348delC, 354delC, 356delT, 359 – 360delTG 362 – 363del2C, 367 – 370del2GAG, 372delG, 374delA, 376 – 378del3G, 381 – 383del3C	G104fsX159
6	930 – 931insA and 931 – 932insGC	T310 – Q311insT
7	933 – 934ins2T and 934 – 935insC	Q311 – Q312insF
8	955 – 956insC, 957 – 958insA, 958 – 959insC, 962 – 963ins2G 964 – 965insCTGG, 967 – 968insT, 968 – 969insA, 974 – 975insA 977 – 978insT, 978 – 979insA, 982 – 983insC, 984 – 985insC 985 – 986insC, 987 – 988insG, 993 – 994insG, 994 – 995insACA	
	996 – 997insTGAG, 997 – 998insC	T318 – S319insTQQKVLZLT
9	918 – 919insC, 920 – 921ins2A, 921 – 922ins2A,922 – 923insGCCAAAACG 923 – 924insCTCCAC,924 – 925ins3T,925 – 926insG	R306 – Z309delVinsQKAKTSPRL
10	568 – 569insCGCACC,	S190 – H191insHP
	949 – 950insG,950 – 951insCT	E316 – L317insR

2.2 *CEBPA* 突变患者初诊时临床特征

37 例核型正常 AML 患者中，*CEBPA* 突变型组患者初诊时外周血小板计数低于 *CEBPA* 野生型组，差异有统计学意义（$P<0.05$）；而性别、年龄、外周血白细胞计数、血红蛋白及骨髓原始细胞数与野生型组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 3。白血病相关抗原 HLA-DR、CD34 及 CD7 在突变型组表达为 100%、87.5% 及 87.5%，但与野生型组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），2 组患者髓系抗原 CD13、CD33 等和淋系相关抗原 CD10、CD19 及 CD20 等表达，差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 4。

表 3　*CEBPA* 野生型组及突变组患者的临床特征

Tab. 3　Clinical characteristics of patients with *CEBPA* wild type and mutant type

临床特征	*CEBPA* 野生型组 $n=27$	*CEBPA* 突变组 $n=10$	P
性别			
男性	15	8	0.164
女性	12	2	
年龄			
≥60 岁	6	2	0.633
<60 岁	21	8	
血红蛋白(g/L)	88.1 ± 24.8	87.9 ± 26.3	0.980
血小板计数($\times10^9$/L)	53.6 ± 34.9	28.3 ± 27.4	0.047
白细胞数($\times10^9$/L)	56.8 ± 74.0	14.4 ± 18.9	0.085
原始细胞数($\times10^9$/L)	55.9 ± 24.6	68.3 ± 16.2	0.150

2.3 *CEBPA* 突变患者的预后情况

在 10 例伴 *CEBPA* 突变型组患者中，3 例因放弃治疗而死亡（OS 分别为 2、4、6 月），1 例门诊患者失访，1 例复发死亡（OS 为 24 月），2 例接受自体造血干细胞移植（OS 分别为 9 月、13 月），1 例接受异基因造血干细胞移植（OS 为 27 月），2 例患者目前均处于缓解状态（OS 分别为 2.5 月、8 月）。突变型组及野生型组患者 OS、EFS 进行比较，发现两组之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。

3　讨论

AML 作为一种异质性疾病，在 55% 的成人 AML 中可检测到特异性的染色体异常（如平衡易位、缺失、单倍体或三倍体等），根据这些细胞遗传学异常可对疾病进行分类及预后评估。既往核型正常的 AML 被认为预后中等，但近年来的研究发现这组患者的预后存在着相当大的差异[4]。国外研究显示大约 70% 的 *CEBPA* 突变见于正常核型患者，少数见于单个细胞遗传学异常或是复杂核型患者。突变可出现在 *CEBPA* 整个基因序列的任一部位，主要集中在 N 端的转录活性区及 C 端的 b-Zip 区与 DNA 结合区的交叉区，且该 2 区域中的突变类型不同。前者多为移码突变，而框内突变主要见于后者[5]。

表 4　*CEBPA* 野生型组及突变组患者免疫表型

Tab. 4　The immune phenotypes of patients with *CEBPA* wild type and mutant type

抗原表达	病例数(%) *CEBPA* 野生型组 ($n=24$)	病例数(%) *CEBPA* 突变组 ($n=8$)	P
CD34			
(+)	13(54.2%)	7(87.5%)	0.204
(−)	11(45.8%)	1(12.5%)	
HLA-DR			
(+)	21(87.5%)	8(100%)	0.555
(−)	3(12.5%)	0	
CD117			
(+)	21(87.5%)	8(100%)	0.555
(−)	3(12.5%)	0	
CD13			
(+)	24(100%)	8(100%)	1.000
(−)	0	0	
CD14			
(+)	0	1(12.5%)	0.250
(−)	24(100%)	7(87.5%)	
CD15			
(+)	14(58.3%)	5(62.5%)	1.000
(−)	10(41.7%)	3(37.5%)	
CD33			
(+)	23(95.8%)	8(100%)	1.000
(−)	1(4.2%)	0	
CD7			
(+)	13(54.2%)	7(87.5%)	0.204
(−)	11(45.8%)	1(12.5%)	

本研究中 *CEBPA* 的突变率在所有 AML 患者中为 12.5%（10/80），略高于国外的（10% ~ 11%），又略低于国内的（15%）[6-8]。在正常核型 AML 患者中 *CEBPA* 的突变率为 19.6%（10/51），低于国内 Du[9] 的报道（36.4%）。本研究结果显示 *CEBPA* 突变仅见于正常核型 AML-M2 患者，突变主要为碱基的插入和缺失，除 1 例只有 1 处突变外，其余 9 例均有 2 ~ 19 处突变。在其余各型 AML，良好核型组及复杂核型组均未见有 *CEBPA* 的突变存在。根据突变对 C/EBPα 表达及结构的影响，可分为 N 端的移码突变和 C 端的框内突变。本研究采用 2 对引物扩增了整个 *CEBPA* 基因，上

述 2 类突变在本研究中均被检测到。本研究发现 5 例为 N 端的移码突变,可导致氨基酸序列框架漂移,提前出现终止密码子,从而使得全长 42KD 蛋白合成减少,不能诱导粒系的分化[10]。5 例为 C 端的框内突变,多为碱基插入,影响了 DNA 结合能力或亮氨酸拉链区的二聚体化,可导致 C/EBPα 功能的缺失[6,11]。其中第 10 例患者在氨基酸序列第 190 及 191 个氨基酸间插入 HP 两个氨基酸,使得原先三个 HP 重复变成四个 HP 重复,Wouters 等的研究显示[12]在 AML 患者中可监测到 3.2 ~ 20% 的患者存在 HP 重复,而 8 ~ 39% 的正常人也可监测到该重复,因此考虑该插入为多态性,而非突变。而在本研究的正常对照中未发现有此类多态性存在。本研究中伴 *CEBPA* 突变的正常核型 AML 患者初诊时血小板计数较低,CD7 阳性率相当高(87.5%),而年龄、性别、白细胞计数及骨髓原始细胞数等 2 组患者未有显著差异,与 Lin 等[13]的研究结果相似。

CEBPA 作为一个独立的遗传标志,提示患者预后良好[14]。2013NCCN AML 治疗指南中 *CEBPA* 作为预后指标,用于判断正常核型 AML 患者的预后情况及指导进一步治疗。Frohling 等[15]的研究显示,伴 *CEBPA* 突变的患者其 OS、缓解期均较无突变的患者更长,即使伴 FLT3 的突变,也不影响其良好的预后。本研究中核型正常的 AML 患者进行预后评估,发现伴 *CEBPA* 突变和无突变的 2 组患者在 OS、EFS 方面并无显著差异,可能与本研究样本量较小有关,也不排除有其它影响预后的因素参与。

随着对 AML 发生、发展的分子机制的深入研究,精确定位病变细胞中致病的分子缺陷逐步成为现实,这不仅有助于预测疾病发展的自然进程及疾病的预后,而且促进了疾病治疗方法的革新。而 *CEBPA* 不同的突变类型与患者预后的具体关系还有待进一步研究。

4 参考文献

[1] Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2002(3):179 - 198.

[2] Mueller BU, Pabst T. CEBPA and the pathophysiology of acute myeloid leukemia (AML) [J]. Curr Opin Hematol, 2006(13): 7 - 14.

[3] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社, 2007:106 - 115.

[4] Martelli MP, Sportoletti P, Tiacci E, et al. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: biological and clinical implications[J]. Blood Rev, 2013(27): 13 - 22.

[5] Pabst T, Mueller BU. Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML[J]. Oncogene, 2007(26):6829 - 6837.

[6] Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, et al. for the ALFA Group. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA) [J]. Blood, 2002(100): 2717 - 2723.

[7] Pabst T, Mueller BU. Complexity of CEBPA dysregulation in human acute myeloid leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2009(15): 5303 - 5307.

[8] Han C, Lin D, Ai XF, et al. CEBPA gene mutation analysis in acute myeloid leukemia[J]. Chin J Hematol, 2013(34):566 - 571.

[9] 杜雅哲,苏龙,李薇,等. 正常核型急性髓系白血病 CEBPA 基因突变患者临床特征及疗效研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2014 (22): 16 - 19.

[10] Pabst T, Mueller BU, Zhang P, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA), in acute myeloid leukemia[J]. Nat Genet, 2001(27): 263 - 270.

[11] Leroy H, Roumier C, Huyghe P, et al. CEBPA point mutations in hematological malignancies[J]. Leukemia, 2005(19): 329 - 334.

[12] Wouters BJ, Louwers I, Valk PJ, et al. A recurrent inframe insertion in a CEBPA transactivation domain is a polymorphism rather than a mutation that does not affect gene expression profilingbased clustering of AML[J]. Blood, 2007(109): 389 - 390.

[13] Lin LI, Chen CY, Lin DT, et al. Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells [J]. Cllin Cancer Res, 2005(11): 1372 - 1379.

[14] Walter RB, Othus M, Burnett AK, et al. Significance of FAB subclassification of "acute myeloid leukemia, NOS" in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients[J]. Blood, 2013 (121): 2424 - 2431.

[15] Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, et al. Mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations[J]. J Clin Oncol, 2004 (22): 624 - 633.

(2014-08-01 收稿,2014-08-25 修回)
中文编辑: 文箐颖; 英文编辑: 周 凌