

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.014.018  
文章编号: 1005-8982 (2018) 014-0089-05

## 染色体核型分析和荧光原位杂交技术对慢性粒细胞性白血病的诊治意义

吴莉芳, 饶若, 王述文, 夏梦娟, 姚红霞

(海南省人民医院 血液病研究室, 海南 海口 570311)

**摘要: 目的** 分析染色体核型分析和荧光原位杂交 (FISH) 检测方法在慢性粒细胞性白血病 (CML) 中的诊治意义。**方法** 171 例标本应用染色体 R 显带进行核型分析, 218 例标本应用中期 FISH 进行分析。**结果** 在 171 例患者中, 116 例 (68%) 检出 Ph 染色体, 22 例 (13%) 存在其他异常核型。218 例 CML 患者标本应用 FISH 进行分析, 174 例 (80%) 检出 *BCR/ABL* 基因。76% CML 患者 *BCR/ABL* 融合基因产生的蛋白类型为 P210, 3% CML 患者 *BCR/ABL* 融合基因产生的蛋白类型为 P210 共表达 P190, 0.95% CML 患者融合基因产生的蛋白类型为 P190。另外, 18% CML 患者存在 der(9) 部分序列缺失。**结论** FISH 对 *BCR/ABL* 融合基因检出率高于染色体核型分析对 Ph 的检出率。染色体核型分析可提示 Ph 染色体及多种其他异常核型。FISH 分析可提示是否存在 *BCR/ABL* 融合基因, 也可提示不同的融合蛋白类型, 还可提示 der(9) 的部分序列缺失与否。2 种分析方法可以多角度提示 CML 患者的疾病信息, 在 CML 的诊治中有重要的临床价值。

**关键词:** 慢性粒细胞性白血病; 染色体核型分析; Ph 染色体; 荧光原位杂交; *BCR/ABL* 融合基因

**中图分类号:** R733.7

**文献标识码:** A

## Prognostic value of metaphase chromosome karyotyping and fluorescence *in situ* hybridization in patients with chronic myeloid leukemia

Li-fang Wu, Ruo Rao, Shu-wen Wang, Meng-juan Xia, Hong-xia Yao

(Hematology Laboratory, Hainan General Hospital, Haikou, Hainan 570311, China)

**Abstract: Objective** To investigate the prognostic value of metaphase chromosome karyotyping comparing with fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in patients with chronic myeloid leukemia (CML). **Methods** The metaphase chromosome karyotyping was performed in 171 cases of CML patients and the FISH was performed in 218 specimens of CML patients. **Results** Among the 171 cases of CML patients, Ph chromosome was detected in 116 cases (68%) by metaphase chromosome karyotyping, and 22 cases (13%) of CML patients had other chromosome abnormalities. Among the 218 specimens of CML patients, FISH showed that 174 specimens (80%) were BCR-ABL (+). Of the CML patients, 76% were detected with the expression of P210 fusion protein, 3% were detected with the co-expression of P210 and P190, and 0.95% only expressed P190 fusion protein. Also, FISH revealed that 18% of the CML patients had partial deletion of der(9). **Conclusions** The detection rate of FISH is higher than that of metaphase chromosome karyotyping. Metaphase chromosome karyotyping can detect Ph chromosome and other chromosome abnormalities. FISH can detect the existence of *BCR-ABL* fusion gene. Also, FISH can show different

收稿日期: 2016-12-07

[通信作者] 姚红霞, E-mail: yaohongxia768@163.com

types of BCR-ABL fusion proteins and partial deletion of der(9). The two methods can be used to show more information of CML patients, and play important roles in the diagnosis of CML.

**Keywords:** chronic myeloid leukemia; metaphase chromosome karyotyping; Ph chromosome; FISH; BCR-ABL fusion gene

慢性粒细胞性白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 具有特异性的 Ph 染色体和 / 或具有 BCR/ABL 融合基因<sup>[1]</sup>。Ph 染色体是第 9 号与第 22 号染色体相互易位形成, BCR/ABL 融合基因是由第 9 号染色体上的原癌基因与第 22 号染色体上的 BCR 基因相互易位形成<sup>[2]</sup>。根据 BCR 断裂点的不同, 可形成 3 种类型的融合基因, 分别是 m- 型、M- 型及  $\mu$  型, 相应翻译成 P190、P210 及 P230 融合蛋白<sup>[3]</sup>。该文探讨染色体核型分析和荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 2 种方法在 CML 诊治中的价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取 2011 年 7 月 -2014 年 12 月海南省人民医院门诊及住院 CML 患者 218 例。其中, 男性 126 例, 女性 92 例; 年龄 7 ~ 82 岁, 中位年龄 41 岁。本研究统计的数据均按标本接收顺序收录, 未进行人工筛选取舍。

### 1.2 方法

**1.2.1 骨髓形态学分析** 将骨髓涂片瑞氏染色, 光学显微镜下观察 200 个细胞分类计数。外周血涂片碱性磷酸酶染色, 光学显微镜下观察 100 个细胞, 积分统计, 综合进行 FAB 分型。将 CML 患者按照血液病诊断及疗效标准<sup>[4]</sup>划分为慢性期 (chronic myeloid leukemia-chronic phase, CML-CP), 加速期 (chronic myeloid leukemia-acceleration phase, CML-AP), 急变期 (chronic myeloid leukemia-blastic phase, CML-BP)。CML 患者治疗后的骨髓片参照疗效标准分为血液学完全缓解 (chronic myeloid leukemia-complete response, CML-CR)、部分缓解、未缓解。

**1.2.2 染色体核型分析** 取患者骨髓细胞, 采用直接法和 24 h 短期培养法制备染色体, R 显带技术进行染色体核型分析。核型异常按人类细胞遗传学国际命名体制 [ISCN (2005)] 加以描述。诊断标准为  $\geq 3$  个细胞有一致的染色体丢失,  $\geq 2$  个细胞有同样的染色体

增加或结构异常<sup>[4]</sup>。剩余细胞悬液保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  备用。

**1.2.3 FISH** 采用荧光素标记的位点特异性 ES 探针 GLP BCR/GLP ABL (中国北京金菩嘉医疗器械有限公司)。按试剂盒说明书进行操作。

**1.2.4 图像扫描** 用 Olympus BX51 (日本 Olympus 公司) 荧光显微镜在 UV/Rhodamine/FITC 三色滤光片的激发下观察荧光杂交信号, 每例分析 200 个细胞, 用染色体分析系统 VideoTesT-FISH 2.0 (俄罗斯 VideoTesT 公司) 进行图像采集和保存。

**1.2.5 图像分析及结果判读** 红色信号为 ABL 探针, 位于 9 号染色体。绿色信号为 BCR 探针, 位于 22 号染色体。当红色信号与绿色信号重叠时显示黄色, 即为融合信号。正常细胞的信号为 2 个红色信号和 2 个绿色信号, 无融合信号。异常细胞信号为: ① 2 个红色信号、1 个绿色信号、1 个黄色信号, 提示主要断裂点 M- 型, 产生 P210 融合蛋白; ② 1 个红色信号、1 个绿色信号、1 个黄色信号, 提示 der(9) 存在序列缺失 (ABL 或 ASS 基因缺失); ③ 1 个红色信号、1 个绿色信号、2 个黄色信号, 提示次要断裂点 m- 型, 产生 P190 融合蛋白。 $>8\%$  细胞出现融合信号 (黄色) 即判断为阳性结果。

### 1.3 统计学方法

数据处理采用 SPSS16.0 统计软件, 计数资料以率 (%) 表示, 比较做  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 骨髓形态学 FAB 分型

本研究收集 218 例 CML 患者标本, 其中 CML-CP 初诊 94 例 (43%); CML-AP 7 例 (3%); CML-BP 16 例 (7%)。CML-CR 复查 33 例 (15%)。68 例 (31%) 复查患者的骨髓片不符合正常骨髓象, 也不符合 CML-AP 和 CML-BP 骨髓象的特点, 将其归为 CML-CP。

### 2.2 染色体核型分析检出率

**2.2.1 Ph 染色体** 171 例 CML 标本做染色体核型

分析, 116 例检出 ph 染色体, 检出率为 68%。其中, CML-CP 初诊、CML-AP、CML-BP、CML-CP 复查、CML-CR 患者的 Ph 染色体检出率分别为 80%、100%、85%、60% 和 28%。

**2.2.2 其他异常核型** 171 例 CML 患者标本中, 22 例存在其他异常核型。附表列出了 18 例具有代表性的异常核型, 包括除典型 9, 22 易位以外的所有其他染色体结构及数量改变, 如变异易位、复杂易位、隐匿易位等。

**2.2.3 未检出** 171 例 CML 患者标本中, 22 例标本因分裂相少, 质量差, 未能找到可分析的分裂相。

### 2.3 FISH 检出率

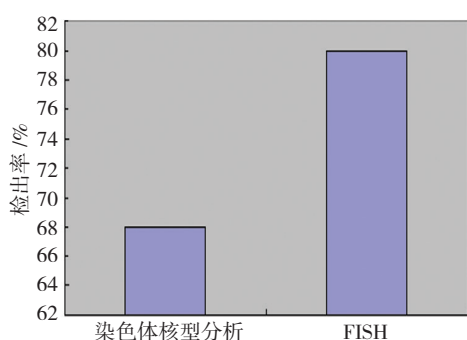
218 例 CML 患者标本做 FISH, 无不可检测标本, 174 例检出 *BCR/ABL* 基因, 检出率为 80%。其中 CML-CP 初诊、CML-AP、CML-BP、CML-CP 复查、CML-CR 患者检出率分别为 93%、100%、100%、75% 和 39%。1 例 CML-BP 患者检出 der(9) 部分序列缺失, 且产生的融合蛋白类型为 P190。

### 2.4 染色体核型分析与 FISH 的检出率比较

FISH 对 *BCR/ABL* 融合基因的检出率与染色体核型分析对 Ph 染色体的检出率比较, 差异有统计学意义 ( $\chi^2=7.249, P=0.007$ ), FISH 高于染色体核型分析。见附图。

附表 18 例伴有其他核型异常的 CML 患者

序号	性别	年龄 / 岁	病期	染色体核型
1	男	29	CML-CP 初诊	46, XY, add(7)(p21), der(22)t(9;22)(q34;q11)[6].
2	女	19	CML-CP 初诊	46, XX, t(9;22)(q34;q11)[6]/45, XX, t(9;22)(q34;q11), -13[6].
3	女	58	CML-CP 初诊	46, XY, t(9;22;11)(q34;q11;q14)[2].
4	女	32	CML-CP 初诊	46, XX, t(9;9;22)(q21;q34;q11)[7].
5	女	27	CML-CP 初诊	46, XX, add(17)(p12), der(22)t(9;22)(q34;q11)[5].
6	男	25	CML-CP 初诊	46, XY, t(10;22)(p14;q11)[4].
7	男	61	CML-AP	46, XY, t(2;9;22)(q14;q34;q11)[10].
8	男	30	CML-AP	50, XY, +4, +6, +8, del(9)(q33), +der(2)(q11)[7].
9	男	41	CML-BP	45, XY, add(4)(q10), t(9;22)(q34;q11), -13, del(20)(q11)[4].
10	男	45	CML-BP	46, XX, t(8;21)(q22;q22)[6]/46, XX[4].
11	男	47	CML-BP	61, XYY, -1, -2, -3, -4, -5, -7, +8, t(9;22)(q34;q11) × 2, -11, -15, -16, -17, -18, +21, +der(22)t(9;22)(q34;q11)[6].
12	男	47	CML-BP	60, XYY, -1, -2, -3, -4, -5, -7, +8, t(9;22)(q34;q11) × 2, -11, -14, -15, -16, -18, +22[2].
13	女	25	CML-BP	46, XX, t(9;22)(q34;q11); i(17q)[7].
14	男	52	CML-BP	45, XY, -4, add(7)(p10), t(9;22)(q34;q11)[3].
15	男	23	CML-CP 复查	46, XY, -1, -3, +der(1;3)(q10;q22), +der(1;3)(p31;p14), t(9;22)(q34;q11)[7]/46, XY[3].
16	男	78	CML-CP 复查	46, XY, t(9;22)(q34;q11)[4]/46, idem, t(1;17;3)(p13;q22; ; q23), der(16)(q11)[6].
17	男	31	CML-CR	50, XY, +4, +6, +8, del(9)(q33), +der(2)(q11)[7].
18	男	37	CML-CR	47, XY, t(9;22)(q34;q11), +mar[8]/46, XY[2].



附图 染色体核型分析与 FISH 的检出率比较

### 3 讨论

#### 3.1 染色体核型分析

本研究中,其他异常核型的检出率占 13%,高于谢新等<sup>[5]</sup>的报道。本实验在 CML 的各个分期中均检出其他异常核型,与吴蔚等<sup>[6]</sup>的报道一致。本研究发现在 CML-AP 和 CML-BP 患者中,其他异常核型检出率高于 CML-CP 初诊患者,与谢新等<sup>[5]</sup>的报道是一致的。其他异常核型包括已报道的 2Ph,+8,+21 及  $i(17q)^{[5,7]}$ ,也有 3 条染色体间的复杂易位,如  $t(9;22;11)(q34;q11;q14)$ 、 $t(9;9;22)(q21;q34;q11)$ ,以及  $t(2;9;22)(q14;q34;q11)$ 。

#### 3.2 FISH

本研究发 现 CML-CP 初诊患者与 CML-AP 患者的 *BCR/ABL* 融合基因检出率与文献的报道一致,CML-BP 患者的 *BCR/ABL* 融合基因检出率高于文献报道,CML-CR 患者的 *BCR/ABL* 融合基因检出率低于文献报道<sup>[8]</sup>。

CML 的 *BCR/ABL* 融合基因由主要断裂点断裂产生,其蛋白表达产物是 P210。RAVANDI 等<sup>[9]</sup>统计 >1 000 例 CML 患者,发现 CML 断裂点位于主要断裂点以外的发生率 <1%,位于次要断裂点的发生率更小。本研究结果表明,3.00% CML 患者 *BCR/ABL* 融合基因产生的蛋白类型为 P210 共表达 P190,0.95% CML 患者 *BCR/ABL* 融合基因产生的蛋白类型为 P190。

SINCLAIR 等<sup>[10]</sup>首先发现并报道 *der(9)* 部分序列缺失与患者的生存率和疾病进展关系密切,是一项强有力的负性预后因素。本研究发 现,18% CML 患者存在 *der(9)* 部分序列缺失,与吴炜等<sup>[11]</sup>的报道一致。其中,20% CML-CP、67% CML-AP、33% CML-BP、12% CML-CP 复查、10% CML-CR 患者存在 *der(9)*

部分序列缺失。结果表明,CML-AP 和 CML-BP 的患者更易发生 *der(9)* 部分序列缺失,与董洁等<sup>[12]</sup>的报道一致。

#### 3.3 2 种检测方法比较

171 例 CML 患者标本同时应用染色体核型分析与 FISH 检测,其中 8 例标本(4.6%)的染色体核型分析为正常核型,但 *BCR/ABL* 融合基因阳性,提示有隐蔽的 *BCR/ABL* 基因重排,与孙川等<sup>[7]</sup>的发现一致。FISH 有助于可疑 CML 的诊断<sup>[13]</sup>,在 CML 的疗效监测中具有更好的优势<sup>[14]</sup>。

FISH 可以通过对探针序列的巧妙设计,不同的信号方式提示更丰富的信息。既可以检测 *BCR* 基因断裂的位置,又可检测 *der(9)* 的部分序列缺失。但是,往往复杂的信号方式解读须参考染色体核型分析的结论。

171 例染色体核型分析的 CML 患者标本中,22 例标本因分裂相少,质量差,未能找到可分析分裂相。而 FISH 不受细胞分裂期的影响,可以分析处于各个分裂期的细胞。

染色体核型分析可以发现其他异常核型,能够全面了解染色体核型情况,但 FISH 只能检测 *BCR/ABL* 融合基因及其相关序列。

综上所述,染色体核型分析与 FISH 2 种遗传学检测方法分别提示不同的遗传信息,两者联合应用可为临床对 CML 的诊断、用药及预后提供可靠的依据。

#### 参 考 文 献:

- [1] 张之南,沈悌.血液病诊断及疗效标准[M].第3版.北京:科学出版社,2007:134-138.
- [2] MICHAEL W N, JOHN D, GODMAN M, et al. The molecular biology of chronic myeloid leukemia[J]. Blood, 2000, 96(10): 3342-3343.
- [3] MELO J V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype[J]. Blood, 1996, 88(7): 2375-2384.
- [4] 薛永权.白血病细胞遗传学及图谱[M].天津:天津科学技术出版社,2003:46-61.
- [5] 谢新,过宇,薛永权.600例慢性粒细胞性白血病的细胞遗传学分析[J].中华医学遗传学杂志,1998,15(2):85-88.
- [6] 吴蔚,顾健,马莉,等.细胞遗传学检测在慢性粒细胞性白血病中的应用价值[J].中华全科医学,2015,13(8):1320-1322.
- [7] 孙川,李倩,林颖,等.慢性粒细胞性白血病额外染色体异常在加速期和急变期的意义[J].医学研究杂志,2014,43(1):108-

- 110.
- [8] 张济, 李君君, 颜家运, 等. 荧光原位杂交对慢性粒细胞性白血病细胞 BCR/ABL 融合基因检测中的应用及其意义 [J]. 实用医学杂志, 2012, 28(5): 825-827.
- [9] RAVANDI F, CORTES J, ALBITAR M, et al. Chronic myelogenous leukaemia with p185BCR-A BL expression :characteristics and clinical significance[J]. Br J Haematol, 1999, 107: 581-586.
- [10] SINCLAIR P B, NACHEVA E P, LEVERSHA M, et al. Large deletions at the t (9; 22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia[J]. Blood, 2000, 95: 738-744.
- [11] 吴炜, 薛永权, 吴亚芳, 等. Ph 染色体阳性慢性粒细胞白血病衍生 9 号染色体缺失的 FISH 研究 [J]. 中华血液学杂志, 2006, 27: 183-186.
- [12] 董洁, 李薇, 白晶, 等. 9 号衍生染色体在慢性粒细胞白血病预后评估中的意义 [J]. 吉林大学学报, 2016, 42(2): 301-304.
- [13] BACCARANI M, DEININGER M W, ROSTI G, et al. European leukemia net recommendations for the management of chronic myeloid leukemia, 2013[J]. Blood, 2013, 122(6), 872-884.
- [14] National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology, chronic myelogenous leukemia version 2: 2014 [S/OL]. [2015-03-24]. <http://www.nccn.org> / NCCN Guidelines™ & Clinical Resources.

(董颖丹 编辑)