

不同基因突变对于急性髓系白血病预后的影响

林俊维^{1,2}, 陈禹欣^{1,2,4,5}, 刘玲玲³, 蒙裕欢^{1,2}, 陈涛^{1,2}, 范喜杰², 袁杰铖^{1,2}, 穆亚飞^{1,2}, 于世辉^{1,2,4,5}

(1. 广州医科大学金域检验学院, 广东 广州 510182; 2. 广州市金域转化医学研究院有限公司, 广东 广州 510220; 3. 中山大学血液病研究所 中山大学附属第三医院血液科, 广东 广州 510630; 4. 广州金域医学检验中心有限公司临床基因组检测中心, 广东 广州 510220; 5. 广州金域医学检验集团股份有限公司, 广东 广州 510220)

摘要 目的: 探究急性髓系白血病(AML)患者基因突变谱及其与预后的关系。方法: 回顾性收集2018年1月至2021年12月初诊于中山大学附属第三医院血液内科的AML患者的临床资料, 进行靶向深度测序(NGS 175-Panel)检测患者基因突变, 绘制基因突变谱, 分析基因突变间的共存与互斥关系以及与临床特征之间的关系; 使用Kaplan-Meier生存曲线和Cox风险比例模型进行基因突变相关的预后分析, 包括总生存期(OS)与无事件生存期(EFS)。结果: 140例初诊AML病例共发生了433个突变, *FLT3*、*CEBPA*、*NPM1*、*WT1*、*IDH2*是突变频率最高的5个基因, 而本研究中*WT1*、*CEBPA*、*NPM1*、*DNMT3A*等基因的突变频率显著高于西方人群, 同时发现了22对基因共存与互斥关系以及不同基因突变与临床特征的相关性(均 $P < 0.05$)。此外, 生存分析显示, *FLT3-ITD* (OS: $P = 0.047$, EFS: $P = 0.097$), *NRAS* (OS: $P = 0.003$, EFS: $P = 0.300$)和*WT1* (OS: $P = 0.110$, EFS: $P = 0.004$)与较差的OS或EFS相关, *FLT3-ITD*阳性伴*WT1*突变患者的OS与EFS显著差于双阴性或单一阳性的AML患者(OS: $P < 0.001$, EFS $P = 0.005$)。同时*FLT3-ITD*插入位置与临床特征以及预后的相关性分析显示, 当*FLT3-ITD*插入位置仅发生在近膜结构域(JMDsole)时, OS显著差于插入位置发生在近膜结构域与酪氨酸结构域之间(JMD/TKD1) ($P = 0.007$)。结论: 不同人群的AML基因突变谱存在显著差异, *NRAS*和*WT1*基因突变以及*FLT3-ITD*和*WT1*共突变提示预后不良。

关键词 急性髓系白血病; 突变; 预后

中图分类号: R733.71 文献标识码: A 文章编号: 2095-9664(2024)03-0001-10

Effects of different gene mutations on the prognosis of acute myeloid leukemia

LIN Junwei^{1,2}, CHEN Yuxin^{1,2,4,5}, LIU Lingling³, MENG Yuhuan^{1,2}, CHEN Tao^{1,2}, FAN Xijie², YUAN Jiechen^{1,2}, MU Yafei^{1,2}, YU Shihui^{1,2,4,5}

(1. KingMed School of Laboratory Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, Guangdong, China; 2. Guangzhou KingMed Transformative Medicine Institute Co., Ltd., Guangzhou 510220, Guangdong, China; 3. Department of Hematology, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Sun Yat-sen Institute of Hematology, Guangzhou 510630, Guangdong, China; 4. Clinical Genome Center, Guangzhou KingMed Center for Clinical Laboratory Co., Ltd., Guangzhou 510220, Guangdong, China; 5. Guangzhou KingMed Diagnostics Group Co., Ltd., Guangzhou 510220, Guangdong, China)

Corresponding author: YU Shihui, Email: zb-yushihui@kingmed.com.cn

Abstract Objective: To investigate the gene mutation landscape and its relationship with prognosis in acute myeloid leukemia (AML) patients. **Methods:** Retrospective analysis of clinical data from AML patients newly diagnosed between January 2018 and December 2021 in the Department of Hematology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University. Targeted deep sequencing (NGS 175-Panel) identified gene mutations. Mutation landscape, co-occurrence, mutual exclusivity, and associations with clinical features were analyzed. Kaplan-Meier and Cox

proportional-hazards model assessed gene mutation-related prognosis, including overall survival (OS) and event-free survival (EFS). **Results:** Among 140 AML cases, 433 mutations occurred. Top 5 mutated genes were *FLT3*, *CEBPA*, *NPM1*, *WT1*, and *IDH2*. *WT1*, *CEBPA*, *NPM1*, and *DNMT3A* mutation frequencies were significantly higher than those in Western populations. Significant co-occurrence or mutual exclusivity existing between 22 gene pairs, and various gene mutations correlated with clinical features were discovered (all $P < 0.05$). *FLT3-ITD* (OS: $P = 0.047$, EFS: $P = 0.097$), *NRAS* (OS: $P = 0.003$, EFS: $P = 0.300$), and *WT1* (OS: $P = 0.110$, EFS: $P = 0.004$) were associated with poorer OS or EFS. *FLT3-ITD* positive with *WT1* mutations had significantly worse OS and EFS than double-negative or single-positive AML patients (OS: $P < 0.001$, EFS: $P = 0.005$). Meanwhile, *FLT3-ITD* insertion sites were explored for correlations with clinical characteristics and prognosis, the results showed a significantly poorer OS when *FLT3-ITD* inserted solely in the juxtamembrane domain (JMDsole), compared to insertions between the juxtamembrane domain and tyrosine kinase domain 1 (JMD/TKD1) ($P = 0.007$). **Conclusions:** AML genetic mutation landscape differ across populations. *NRAS*, *WT1* mutations, and *FLT3-ITD* and *WT1* co-mutations suggest an unfavorable prognosis.

Key words acute myeloid leukemia; mutation; prognosis

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种以原始造血干细胞或祖细胞的克隆增殖及分化不良为特征的疾病。在世界卫生组织(WHO)2022版血液肿瘤分类指南中,以不断发展的细胞遗传学和分子生物学的技术手段定义了不同类型的AML类别并根据不同的风险分层指导临床预后^[1]。然而,具有明确基因突变定义的AML类别仅有2种,即AML伴*NPM1*突变和AML伴*CEBPA*突变,仍有大量基因突变的预后情况充满争议^[2-4]。针对不同人群的大队列研究显示,许多基因突变也可能成为临床诊断、预后、治疗反应预测或疾病监测的有用分子标志物^[5-6]。此外,AML无论在临床上还是生物学上都具有很强的异质性,不同人群的基因突变谱也存在很大的差异^[7-10]。因此,确定基于不同人群遗传背景的AML患者基因突变谱和突变模式可以更好地了解不同人群AML患者独特的分子机制。本研究基于140例初诊AML患者探究其基因突变谱,比较不同人群基因突变的差异,同时使用不同的生存分析方法关联基因突变与预后情况,以寻找与预后相关的分子标志物,从而进一步指导临床病例的预后情况判断与治疗。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究回顾性收集2018年1月至2021年12月中山大学附属第三医院血液内科初诊为AML的患者140例,其中急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukaemia, APL)患者17例,诊断依据WHO 2022年急性髓系白血病分类指南^[1],并详细收集患者临床信息。本研究经中山大学附属第三医

院医学伦理委员会批准(伦理批件号:中大附三院伦[2022]02-018-01)。

1.2 诱导治疗方案

140例初诊AML患者中经过治疗的患者有112例,AML(非APL)患者采用以下方案进行首次诱导治疗:IA±D[伊达比星(IDA)+阿糖胞苷(Ara-c)±地西他滨]、DA±D[柔红霉素(DNR)+Ara-c±地西他滨]、DMA[米托蒽醌+Ara-c±地西他滨]、TA[吡柔比星+Ara-c]、CAG±D[Ara-c+阿克拉霉素(Acla)+粒系集落刺激因子(G-CSF)±地西他滨]、小剂量阿糖胞苷(10 mg/m²)、单用去甲基化药物阿扎胞苷或地西他滨±维奈克托,单一使用靶向药物(索拉菲尼+维奈克托)。17例APL患者采用维甲酸±三氧化二砷/IA/IDA/复方黄黛片/Ara-c。本研究的强诱导治疗方案包括IA±D、DA±D、DMA、TA方案,弱诱导治疗方案包括CAG±D、小剂量阿糖胞苷,其他方案包括单用去甲基化药物阿扎胞苷或地西他滨±维奈克托、单一使用靶向药物。

1.3 基因突变检测

本研究基于140例AML患者的骨髓样本和(或)外周血样本进行血液肿瘤相关的175个基因的靶向深度测序(next-generation sequencing 175-Panel)。使用德国QIAamp DNA Mini Kit提取骨髓、外周血和(或)福尔马林固定石蜡包埋样品中的DNA。使用IDT探针和KAPA文库扩增试剂盒(美国Integrated DNA Technologies)通过混合捕获方法制备文库,使用美国Illumina NovaSeq6000系统进行DNA测序。根据癌症序列变异的解释和报告标准和指南^[11],纳入基因突变谱分析的突变为具有强临床意义的突变(1类)或潜在临床意义的突变(2类)。

此外,在 COSMIC、dbSNP、ClinVar、gnomAD、ExAC、HGMD、1000 Genomes、ESP6500 的主流数据库中未被收录的则认为是新发现的突变。

1.4 统计学分析

使用R语言(版本:4.1.0)进行统计学分析。采用 Fisher 精确检验或 Pearson 相关性分析来研究基因突变的共存与互斥关系,采用 *t* 检验确定基因突变与临床特征之间的关系,组间比较采用 *t* 检验或非参数检验,分类变量比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。采用 Kaplan-Meier 生存曲线和 Log-rank 检验进行生存分析,采用 Cox 风险比例模型进行单因素分析和多因素分析,单因素分析中 $P < 0.10$ 的变量纳入多变量分析中,使用 R 语言“status”包中的广义线性模型 (generalized linear model, glm) 用于评估变量对生存情况的优势比;总生存期 (overall survival, OS) 定义为从诊断到因任何原因死亡或最后一次随访的时间,无事件生存期 (event-free survival, EFS) 定义为从诊断到诱导治疗失败、疾病复发、患者因任何原因死亡或最后一次随访的时间。本研究的生存分析仅包含 140 例 AML 患者中非 APL 且经过治疗的 95 例患者。

2 结果

2.1 患者一般资料

本研究共入组 140 例初诊为急性髓系白血病患者,其中男 68 例 (48.6%)、女 72 例 (51.4%);初诊时中位年龄为 47 (16~87) 岁;112 例患者接受治疗,其中接受异基因造血干细胞移植 11 例,接受自体造血干细胞移植 3 例。140 例 AML 患者的临床资料见表 1。

2.2 基因突变谱与新发现的突变

在 140 例初诊 AML 患者中,127 例患者 (90.7%) 在靶向深度测序 175-Panel 中的 55 个基因 (31.4%) 发生了 433 个基因突变;在这些基因中, *FLT3* (30.7%), *CEBPA* (19.3%, 其中 *CEBPA_{bi}* 为 12.2%, *CEBPA_{mo}* 为 7.1%), *NPM1* (19.3%), *WT1* (15.0%), *IDH2* (14.3%) 为 AML 病例中突变频率最高的 5 个基因。140 例初诊 AML 患者基因突变谱见图 1。

将突变频率最高的 20 个突变基因按功能进行通路分析,所涉及的通路包括信号通路 (69/140, 49.3%)、髓系转录因子 (42/140, 30.0%) 等。此外,在新诊断的 140 例 AML 病例中共发现 139 个新发现的突变,其中 *CEBPA*、*WT1* 和 *TET2* 的新发现的基因位

表 1 140 例 AML 患者临床资料

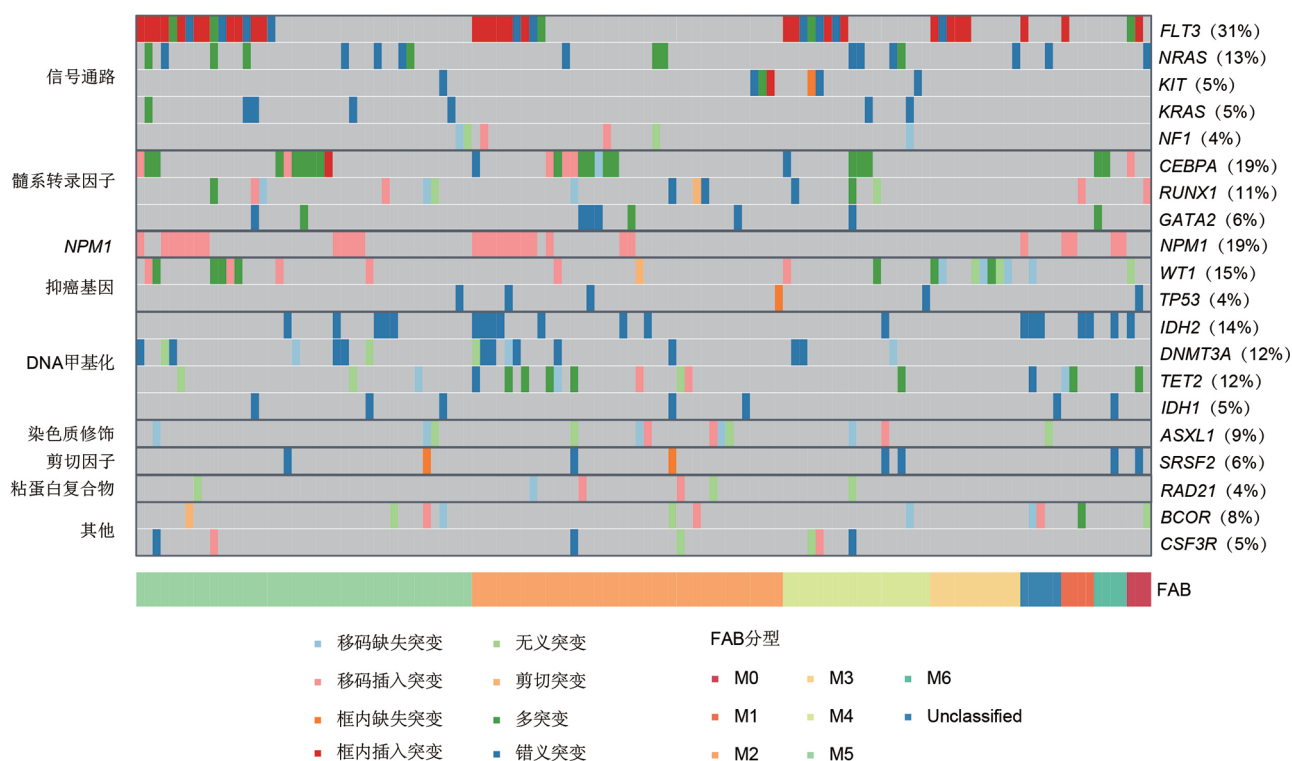
项目	数值
年龄[M(R)]	47(16~87)岁
性别	
男性	68例
女性	72例
RBC[$\times 10^{12}/L$,M(R)]	2.21(1.06~5.58)
WBC[$\times 10^9/L$,M(R)]	9.84(0.49~353.00)
PLT[$\times 10^9/L$,M(R)]	34.00 (4.00~381.00)
HGB[g/L,M(R)]	69.00 (34.00~144.00)
FAB分型[例(%)]	
急性粒细胞白血病微分化型(M0)	3(2.1)
急性粒细胞白血病未分化型(M1)	4(2.9)
急性粒细胞白血病部分分化型(M2)	45(32.1)
急性早幼粒细胞白血病(M3)	17(12.1)
急性粒-单核细胞白血病(M4)	18(12.9)
急性单核细胞白血病(M5)	44(31.4)
红白血病(M6)	4(2.9)
未分类	5(3.6)
治疗方案[例(%)]	
强诱导化疗方案	74(52.9)
APL治疗方案	17(12.1)
弱诱导治疗方案	16(11.4)
其他	5(3.6)
未治疗	28(20.0)

注:RBC:红细胞计数;WBC:白细胞计数;PLT:血小板计数;HGB:血红蛋白;FAB分型:French-American-British classification systems。

点都超过了 15 个,三者的基因突变所影响的氨基酸改变见图 2。

2.3 基因突变的共存互斥分析及相关临床特征

140 例初诊的 AML 病例首先进行基因突变的共存与互斥关系分析,共存的基因突变为 *ASXL1* 与 *RAD21*、*RUNX1*、*SRSF2*、*BCOR* 与 *RUNX1*、*IDH1*、*IDH2*、*DNMT3A* 与 *FLT3-ITD*、*NPM1*、*FLT3-TKD* 与 *KIT*、*WT1*、*RUNX1* 与 *RAD21*、*biCEBPA*、*NPM1* 与 *FLT3-ITD*、*IDH2*、*TET2*、*SRSF2* 与 *TET2*、*IDH1*、*RUNX1*、*moCEBPA* (均 $P < 0.05$),互斥的基因突变为 *NPM1* 与 *biCEBPA*、*RUNX1*、*WT1* (均 $P < 0.05$)。此外,对 140 例 AML 患者的基因突变与初诊时的临床特征进行相关性分析,*ASXL1* ($P = 0.030$),*DNMT3A* ($P = 0.030$),*NPM1* ($P = 0.010$),*RUNX1* ($P = 0.010$),*SRSF2* ($P < 0.001$) 和 *TET2* ($P < 0.001$) 更常见于年老的



注: 每一列代表一个初诊的 AML 患者, 左侧为基因富集的通路, 右侧是基因突变及其频率, 不同颜色代表不同的基因突变类型。FAB 分型: French-American-British classification systems。

图1 140例初诊 AML 患者基因突变谱

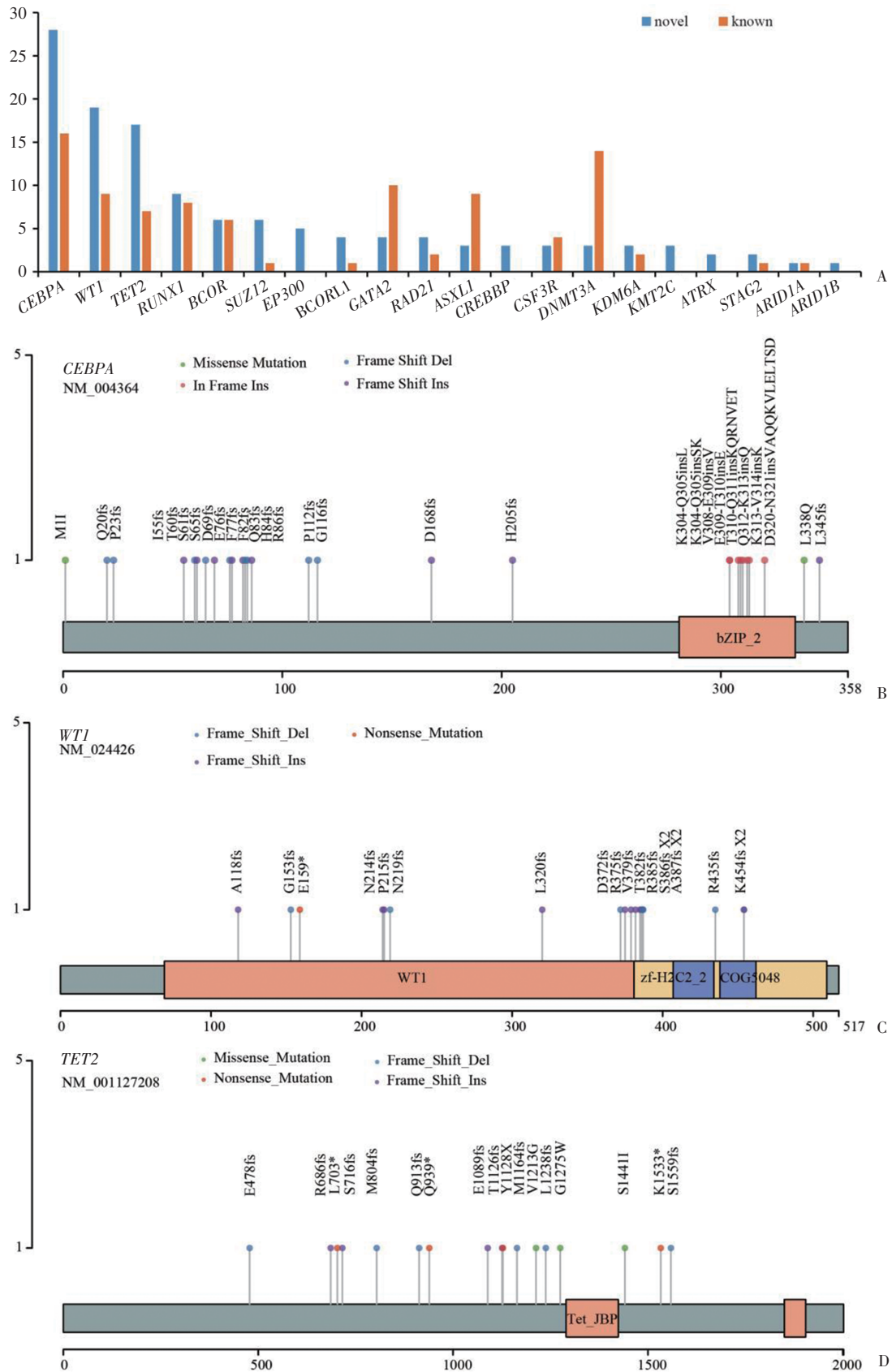
AML 患者, *FLT3*-other($P=0.040$)则更常见于年轻的 AML 患者, *RUNX1*($P=0.040$)更常见于男性 AML 患者, *TET2*($P=0.006$)则在女性 AML 患者中更常见, *biCEBPA* 与较高的血红蛋白($P=0.002$)以及较高的红细胞计数($P<0.001$)显著相关, *ASXL1*($P=0.002$), *moCEBPA*($P=0.001$), *RUNX1*($P=0.003$), *SRSF2*($P<0.001$), *TET2*($P=0.030$)与较高的中性粒细胞绝对值显著相关, *IDH2* 与较高的血小板显著相关($P=0.020$), *BCOR*($P=0.020$)则与较低的红细胞计数显著相关, *FLT3-ITD*($P=0.003$), *moCEBPA*($P<0.001$), *NPM1*($P=0.005$), *SRSF2*($P=0.020$)和 *TET2*($P<0.001$)与较高的白细胞计数相关。

2.4 基因突变的预后影响

首先对 140 例中的非 M3 且经过治疗后的 95 例 AML 患者进行 Kaplan-Meier 生存分析。 *FLT3-ITD* (OS: $P=0.047$; EFS: $P=0.097$)和 *NRAS*(OS: $P=0.003$, EFS: $P=0.300$)与更差的 OS 相关, *WT1*(OS: $P=0.110$; EFS: $P=0.004$)则与更差的 EFS 相关。此外, 本研究进一步探讨不同基因突变组合对预后的共同影响, 结果表明单一的 *FLT3-ITD* 阳性或 *WT1* 突变的预后

情况与 *FLT3-ITD* 阴性伴 *WT1* 野生型基本一致, 但是当 *FLT3-ITD* 阳性伴 *WT1* 突变时, 患者的 OS 与 EFS 显著降低($P<0.001$, $P=0.005$)。见图 3。

此外, 将基因突变频率最高的前 20 个基因以及临床特征进行单变量分析, 结果显示, OS 的不良预后影响因素包括年龄较大($HR=2.921$, $P=0.040$), *FLT3-ITD* ($HR=2.864$, $P=0.057$), *NRAS* ($HR=4.451$, $P=0.006$)和 *IDH1* ($HR=3.302$, $P=0.070$)突变, OS 的良好预后影响因素是使用强诱导化疗方案($HR=0.427$, $P=0.033$)。EFS 的不良预后影响因素包括年龄较大($HR=2.070$, $P=0.023$), *IDH1* ($HR=2.253$, $P=0.090$), *TET2* ($HR=2.303$, $P=0.023$)和 *WT1* ($HR=2.874$, $P=0.005$)突变, EFS 的良好预后影响因素包括使用强诱导化疗方案($HR=0.618$, $P=0.051$), 进行骨髓移植($HR=0.086$, $P=0.015$), 较高的红细胞计数($HR=0.722$, $P=0.076$), *biCEBPA* 突变($HR=0.396$, $P=0.080$)。此外, 多因素分析显示, *FLT3-ITD* ($HR=4.955$, $P=0.011$)和 *NRAS* ($HR=6.779$, $P=0.003$)突变被确认为较差 OS 的独立预后影响因素, 使用移植方案($HR=0.104$, $P=0.028$)被确认为较好 EFS 的独立



注:A为携带新发现的突变最多的基因;B为CEBPA基因的新发现的突变所影响的氨基酸位置;C为WT1基因的新发现的突变所影响的氨基酸位置;D为TET2的新发现的突变所影响的氨基酸位置。

图2 本研究新发现的基因突变

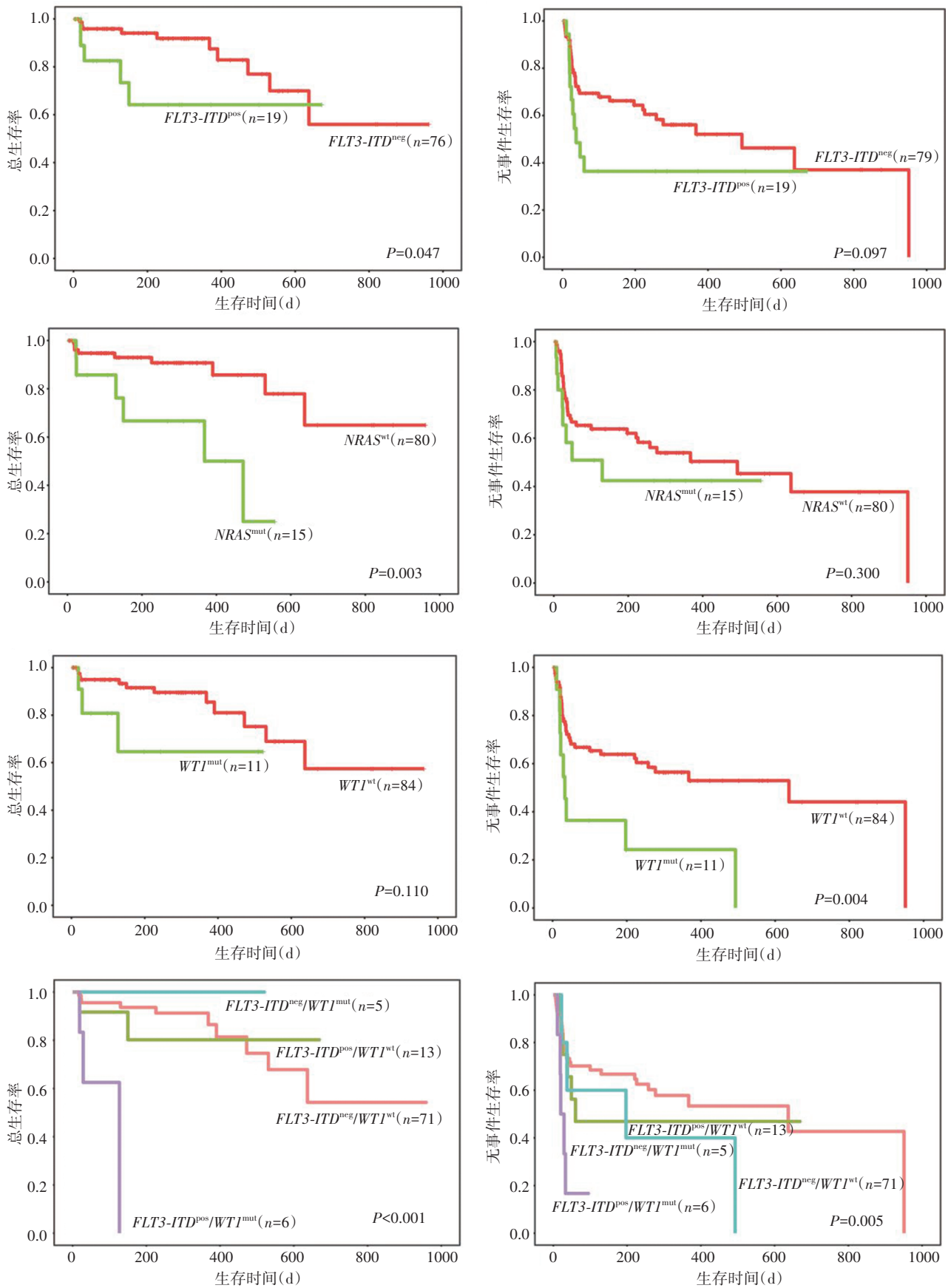


图3 基因突变相关的OS和EFS的Kaplan-Meier生存曲线

预后影响因子, *WT1* ($HR=2.242, P=0.050$) 突变则被确认为较差EFS的独立预后影响因子。见表2。同时,使用glm计算变量优势比,以进一步量化基因突变和临床特征对生存的影响。对于总生存期而言, *IDH1* ($OR=6.42, P=0.030$), *NRAS* ($OR=5.26, P=0.010$), *FLT3-ITD/WT1* ($OR=6.42, P=0.030$) 突变是影响OS的显著危险因素;而 *WT1* 突变 ($OR=6.30, P=0.020$), 年龄较大 ($OR=1.03, P=0.020$) 是影响EFS的显著危险因素。

2.5 *FLT3-ITD*的插入位置对预后的影响

本研究的140例初诊AML患者中发生了33例(23.6%) *FLT3-ITD* 突变,其中发生了1次ITD插入的病例为26例(78.8%),发生了2次ITD插入的病例为4例(12.1%),发生了3次ITD插入的病例为3例(9.1%)。不同的ITD插入位置也会影响不同的氨基酸区域,最常受影响的氨基酸分别为E598(87.9%, $n=29$), Y599(84.8%, $n=28$), D600(81.8%, $n=27$), Y597(81.8%, $n=27$), L601(78.8%, $n=26$), E596(78.8%, $n=26$)。此外根据文献报道,不同的ITD插入位置可分为JMDsole组、JMD/TKD1组和TKD1sole组^[12]。在本研究中,发生在JMDsole的病例为19例(57.6%),发生在JMD/TKD1的病例为14例(42.4%),但没有发生在TKD1sole的病例。在JMD/TKD1组和JMDsole组中,JMD/TKD1组ITD的插入长度显著长于JMDsole组 ($P<0.001$), *NPM1* 突变也更常见于JMD/TKD1组中 ($P=0.040$)。

不同的ITD插入位置的预后情况也有所不同,首先对33例 *FLT3-ITD* 突变的病例中非M3且经过治疗的19例病例进行Kaplan-Meier生存分析,结果

显示, JMDsole组的OS显著差于JMD/TKD1组 ($P=0.007$), 而在EFS中二者无显著差异 ($P=0.160$), 见图4。随后进行单因素分析确认JMDsole是OS的不良预后影响因素 ($HR=12.237, P=0.029$), 而对于EFS而言, JMDsole组的优势比无显著的统计学意义 ($HR=2.407, P=0.163$)。

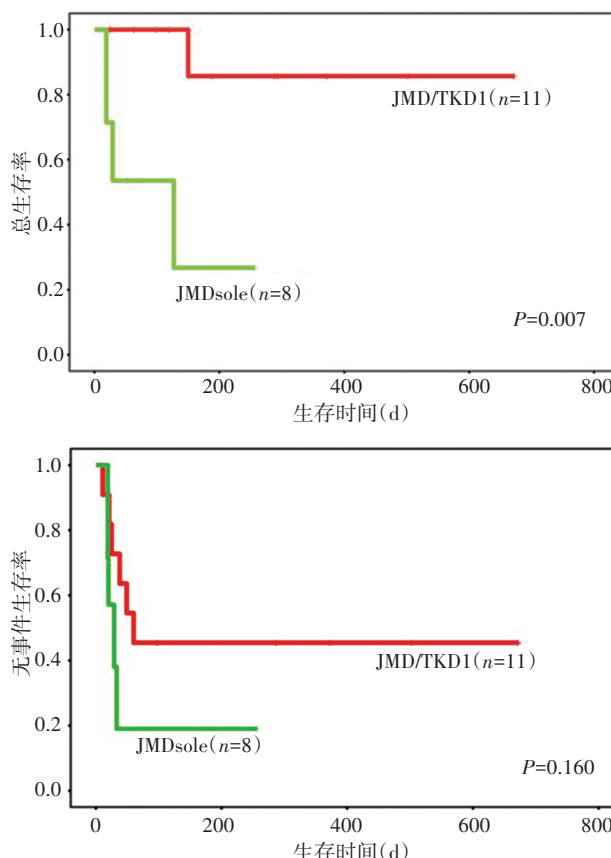


图4 *FLT3-ITD*插入位置的OS和EFS的Kaplan-Meier生存曲线

表2 基于单因素和多因素分析的基因突变的预后分析

因子	HR(95%CI)	P值	因子	HR(95%CI)	P值
无事件生存期单因素分析			总生存期单因素分析		
移植方案	0.086(0.012~0.625)	0.015	治疗方案	0.427(0.196~0.932)	0.033
治疗方案	0.618(0.381~1.001)	0.051	年龄	2.921(1.052~8.114)	0.040
红细胞计数	0.722(0.504~1.035)	0.076	<i>FLT3-ITD</i>	2.864(0.969~8.463)	0.057
年龄	2.070(1.104~3.881)	0.023	<i>IDH1</i>	3.302(0.905~12.049)	0.070
<i>biCEBPA</i>	0.396(0.141~1.116)	0.080	<i>NRAS</i>	4.451(1.537~12.888)	0.006
<i>IDH1</i>	2.253(0.882~5.759)	0.090	总生存期多因素分析		
<i>TET2</i>	2.303(1.124~4.718)	0.023	<i>FLT3-ITD</i>	4.955(1.449~16.952)	0.011
<i>WT1</i>	2.874(1.365~6.050)	0.005	<i>NRAS</i>	6.779(1.958~23.469)	0.003
无事件生存期多因素分析					
移植方案	0.104(0.014~0.785)	0.028			
<i>WT1</i>	2.242(1.000~5.033)	0.050			

3 讨论

本研究首先对经过 NGS 175-Panel 检测的 140 例 AML 患者进行基因突变谱分析,发现 *FLT3*、*CEBPA*、*NPM1*、*WT1* 和 *IDH2* 是本研究队列中最常见的基因突变,这与既往研究中关于中国 AML 患者基因突变谱分析基本一致^[13]。此外,中国 AML 患者基因突变谱与日本 AML 患者相比具有一定的相似性,但是在 *WT1* (本研究:15.0% vs 日本 Kihara 等:7.6%, $P=0.030$), *IDH2* (14.3% vs 6.1%, $P=0.010$), *ASXL1* (8.6% vs 2.5%, $P=0.020$), *SRSF2* (5.7% vs 1.0%, $P=0.020$), *KIT* (5.0% vs 14.2%, $P=0.006$) 基因中仍存在显著差异^[14-15]。同时,本研究与不同的西方国家 AML 队列的基因突变谱相比存在更大的差异^[9-10,16], *CEBPA* (本研究:19.3% vs 美国 Hogg 等:5.2%, 欧洲 Papaemmanuil 等:7.4%, 德国 Metzeler 等:6.0%), *NPM1* (19.3% vs 9.9% vs 28.6% vs 33.3%), *WT1* (15.0% vs 3.9% vs 5.0% vs 13.1%), *NRAS* (7.7% vs 2.5% vs 17.5% vs 21.7%), *DNMT3A* (12.1% vs 19.0% vs 23.4% vs 31.5%), *RUNX1* (10.7% vs 13.5% vs 8.9% vs 15.4%) 等基因差异存在显著统计学意义。Wang 等^[8]在 AML 患者中同样发现了与西方国家在 *NPM1* 和 *DNMT3A* 基因中存在显著差异,与本研究一致,这也体现了 AML 较强的分子生物学异质性,在不同人群间的差异基因可能是由人群遗传背景引起的。然而,由于本研究病例数相对较少,AML 基因突变谱的人群差异问题仍需进一步大队列研究的验证。此外,本研究经过不同数据库的筛选也发现了新突变,这种新发现的突变的筛选方法在其他血液肿瘤的相关研究中也有报道^[17]。本研究中 *CEBPA*、*WT1* 和 *TET2* 是发生新发现的突变最多的基因,其中 *CEBPA* 和 *WT1* 突变频率显著高于国外人群。*CEBPA* (CCAAT/增强子结合蛋白 α) 基因编码一种髓系分化所必需的转录因子^[18],大量研究表明 *CEBPA* 双突变和发生在碱性亮氨酸拉链区 (bZIP) 的突变都与较好的预后相关^[19-21]。*WT1* (Wilms' tumor gene) 在造血细胞中与调节 DNA 羟甲基化的表观遗传蛋白 *TET2* 和 *TET3* 相互作用^[22],而 *TET2* 负责编码可启动多步骤 DNA 去甲基化过程的酶活性蛋白^[23],被认为与克隆性造血相关^[24],*WT1* 突变也可能影响 *TET2* 作为肿瘤抑制因子的作用^[22,25]。总的来说,本研究新发现的突变可以进一步扩充中国 AML 患者基因突变数据库,为后续可能的实验

证提供理论基础。此外,基于 140 例 AML 病例的基因突变的共存与互斥分析以及与临床特征的相关性分析与其他报道基本一致^[26-27],基因突变的共存与互斥关联表明了 AML 发病机制中不同致癌途径之间的功能协同与拮抗作用。

为了进一步探究不同基因突变的预后影响,本研究使用 Kaplan-Meier 生存曲线,单因素与多因素分析以及广义线性模型关联不同的基因突变与预后情况,三种不同的统计学方法均指向 *NRAS*、*WT1* 基因突变与 *FLT3-ITD*、*WT1* 共突变可能与不同的预后情况相关。本研究中 *WT1* 突变展示了较差的 EFS,而在 OS 中差异无统计学意义,这与文献报道并不完全一致^[26,28];值得一提的是,Tazi 等^[7]通过贝叶斯聚类算法确定了 *WT1* 突变可能是一个独特的 AML 类别,并将 *WT1* 突变病例的预后情况划分为中等风险,同时本研究结果显示 *FLT3-ITD* 与 *WT1* 共突变时患者显示出更差的总生存期以及生存质量,这与多篇报道的结果一致^[29-30]。Annesley 等^[31]构建 *WT1* 突变 (R394W) 敲入小鼠与 *FLT3-ITD* 敲入小鼠进行杂交,发现具有两种突变的小鼠出现了骨髓增生异常-骨髓增殖性肿瘤,并有发展为 AML 的趋势,同时与任一单一突变的小鼠相比预后更差。*NRAS* 基因突变对预后的影响一直以来都存在争议,但一些队列研究表明 *NRAS* 基因突变并不能影响患者预后^[32-33],这与本研究结果并不一致,这可能是由于遗传背景差异或抽样误差导致的。

本研究进一步探讨了 *FLT3-ITD* 不同的插入位置与临床特征以及预后的关系,JMD/TKD1 组的 *FLT3-ITD* 插入长度显著长于 JMDsole 组,这与文献中报道的 ITD 插入长度越靠近蛋白的羧基端 (C 端),插入片段往往越长的结论是一致的^[34];此外,Kaplan-Meier 生存曲线和单因素分析显示,JMDsole 组的 OS 显著低于 JMD/TKD1 组,而 EFS 在两组间差异无统计学意义,这与 Rucker 等^[12]的报道基本一致,但是需要注意的是纳入本研究 *FLT3-ITD* 插入位置的预后研究数量较少,仍需大队列研究进一步探讨 *FLT3-ITD* 插入位置的预后以及对药物的耐受情况。

本研究仍存在一定的局限性:(1)本研究为单中心、回顾性研究,纳入研究的样本量相对较少,可能导致潜在的影响因素在统计学计算中被忽略;(2)没有在研究中纳入重要的细胞遗传学结果,不能全面分析中国人群背景下 AML 基因突变、染色体

异常与预后之间的关系。我们相信通过进一步扩大AML病例数据量,收集完整的细胞遗传学和分子生物学检测结果进行分析,探讨AML突变与不同治疗方案,疗效和预后等方面的关系,能够为临床提供更有价值的参考。

参考文献

- [1] Khoury JD, Solary E, Abla O, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms [J]. *Leukemia*, 2022, 36(7): 1703-1719.
- [2] Zhang Y, Wang F, Chen X, et al. Mutation profiling of 16 candidate genes in de novo acute myeloid leukemia patients [J]. *Front Med*, 2019, 13(2): 229-237.
- [3] Kurzer JH, Weinberg OK. Updates in molecular genetics of acute myeloid leukemia [J]. *Semin Diagn Pathol*, 2023, 40(3): 140-151.
- [4] 黎若祺,文晓玲,张夏林,等. CSF3R突变对急性髓系白血病患者疗效和生存的影响 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2023, 31(3): 628-632.
- [5] 史超君,苏雁华,高玉娟,等. 核心结合因子相关性急性髓系白血病的临床特征、基因突变情况及治疗研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(9): 1769-1774.
- [6] 盛烨萍,华海应. 急性髓系白血病基因突变及预后研究进展 [J]. *交通医学*, 2021, 35(3): 235-238, 242.
- [7] Tazi Y, Arango - Ossa JE, Zhou Y, et al. Unified classification and risk - stratification in Acute Myeloid Leukemia [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4622.
- [8] Wang S, Zhang YX, Huang T, et al. Mutation profile and associated clinical features in Chinese patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia [J]. *Int J Lab Hematol*, 2018, 40(4): 408-418.
- [9] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(23): 2209-2221.
- [10] Hogg G, Severson EA, Cai L, et al. Clinical characterization of the mutational landscape of 24, 639 real - world samples from patients with myeloid malignancies [J]. *Cancer Genet*, 2023, 278-279: 38-49.
- [11] Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists [J]. *J Mol Diagn*, 2017, 19(1): 4-23.
- [12] Rücker FG, Du L, Luck TJ, et al. Molecular landscape and prognostic impact of FLT3-ITD insertion site in acute myeloid leukemia: RATIFY study results [J]. *Leukemia*, 2022, 36(1): 90-99.
- [13] Gao Y, Jia M, Mao Y, et al. Distinct mutation landscapes between acute myeloid leukemia with myelodysplasia - related changes and de novo acute myeloid leukemia [J]. *Am J Clin Pathol*, 2022, 157(5): 691-700.
- [14] Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, et al. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients [J]. *Leukemia*, 2014, 28(8): 1586-1595.
- [15] Shin SY, Lee ST, Kim HJ, et al. Mutation profiling of 19 candidate genes in acute myeloid leukemia suggests significance of DNMT3A mutations [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(34): 54825-54837.
- [16] Metzeler KH, Herold T, Rothenberg - Thurley M, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2016, 128(5): 686-698.
- [17] Mu Y, Chen Y, Meng Y, et al. Machine learning models - based on integration of next-generation sequencing testing and tumor cell sizes improve subtype classification of mature B - cell neoplasms [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1160383.
- [18] Avellino R, Havermans M, Erpelinck C, et al. An autonomous CEBPA enhancer specific for myeloid - lineage priming and neutrophilic differentiation [J]. *Blood*, 2016, 127(24): 2991-3003.
- [19] Taube F, Georgi JA, Kramer M, et al. CEBPA mutations in 4708 patients with acute myeloid leukemia: differential impact of bZIP and TAD mutations on outcome [J]. *Blood*, 2022, 139(1): 87-103.
- [20] Wakita S, Sakaguchi M, Oh I, et al. Prognostic impact of CEBPA bZIP domain mutation in acute myeloid leukemia [J]. *Blood Adv*, 2022, 6(1): 238-247.
- [21] Su L, Shi YY, Liu ZY, et al. Acute myeloid leukemia with CEBPA mutations: current progress and future directions [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 806137.
- [22] Rampal R, Alkalin A, Madzo J, et al. DNA hydroxymethylation profiling reveals that WT1 mutations result in loss of TET2 function in acute myeloid leukemia [J]. *Cell Rep*, 2014, 9(5): 1841-1855.
- [23] Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification [J]. *Nature*, 2010, 466(7310): 1129-1133.

- [24] Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age - related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies[J]. Nat Med,2014,20(12): 1472-1478.
- [25] Wang Y, Xiao M, Chen X, et al. WT1 recruits TET2 to regulate its target gene expression and suppress leukemia cell proliferation[J]. Mol Cell,2015,57(4): 662-673.
- [26] Shen Y, Zhu YM, Fan X, et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia[J]. Blood,2011,118(20): 5593-5603.
- [27] Chen X, Zhu H, Qiao C, et al. Next-generation sequencing reveals gene mutations landscape and clonal evolution in patients with acute myeloid leukemia [J]. Hematology, 2021,26(1): 111-122.
- [28] 刘洋,刘述川. 不同基因突变的急性髓系白血病患者疗效及预后研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2023,31(22): 4284-4289.
- [29] Niktoreh N, Walter C, Zimmermann M, et al. Mutated WT1, FLT3 - ITD, and NUP98 - NSD1 fusion in various combinations define a poor prognostic group in pediatric acute myeloid leukemia [J]. J Oncol, 2019, 2019: 1609128.
- [30] Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, et al. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group[J]. Blood,2009,113(19): 4505-4511.
- [31] Annesley CE, Rabik C, Duffield AS, et al. Knock-in of the Wt1 R394W mutation causes MDS and cooperates with Flt3/ITD to drive aggressive myeloid neoplasms in mice [J]. Oncotarget,2018,9(82): 35313-35326.
- [32] Mustafa Ali MK, Williams MT, Corley EM, et al. Impact of KRAS and NRAS mutations on outcomes in acute myeloid leukemia [J]. Leuk Lymphoma, 2023, 64 (5) : 962-971.
- [33] Bowen DT, Frew ME, Hills R, et al. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years[J]. Blood,2005,106(6): 2113-2119.
- [34] Engen C, Hellesøy M, Grob T, et al. FLT3-ITD mutations in acute myeloid leukaemia - molecular characteristics, distribution and numerical variation[J]. Mol Oncol,2021,15(9): 2300-2317.

(收稿日期:2024-01-22)

(本文编辑:孙勇)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

什么样的临床研究需要注册?

目前,临床研究注册的要求是,前瞻性随机对照研究必须在研究开始前注册,观察性研究目前尚无统一要求,但有需要注册的趋势。该规定自2004年开始实行,但我国学者在临床研究注册方面的意识比较薄弱,须进一步加强。国际认可的临床研究注册网站均为免费注册,美国、澳大利亚、英国、日本及中国均有国际认可的注册网站。

WHO国际临床试验注册平台一级注册机构:澳大利亚-新西兰注册中心(ANCTR)、中国临床试验注册中心(CHICTR)、印度临床试验注册中心(CTRIndia)、英国ISRCTN、伊朗临床试验注册中心(IranCTR)、斯里兰卡临床试验注册中心(SLCTR)、荷兰临床试验注册中心(NLCTR)、德国临床试验注册中心(GCTR)、日本临床试验注册协作网(JRCTR)、美国临床试验注册中心(ClinicalTrial.gov)、泛非临床试验注册中心(PACTR)、拉美临床试验注册中心(LACTR)等。

我国一级注册机构是中国临床试验注册中心(www.chictr.org)。2005年10月中国临床试验注册中心开始正式接受临床试验注册。要求:所有在人体中和采用取自人体的标本进行的研究,包括各种干预措施的疗效和安全性的有对照或无对照试验(如随机对照试验、病例-对照试验、队列研究及非对照研究)、预后研究、病因学研究以及包括各种诊断技术、试剂、设备的诊断性试验,均需注册并告知。中国临床试验注册中心为非盈利机构,一律免费注册。具体的注册程序请登录我国的一级注册机构网站(<http://www.chictr.org/cn/registry.aspx>)见详细介绍。