

• 临床检验研究 •

荧光原位杂交技术在判断异基因造血干细胞移植预后中的应用*

刘思恒, 彭贤贵[#], 王 平, 墙 星, 邓小娟, 张洪洋, 张 曦[△]

(第三军医大学新桥医院血液科/重庆市医学重点学科, 重庆 400037)

摘要:目的 研究荧光原位杂交(FISH)技术在判断异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)预后中的意义。方法 收集异基因外周血干细胞移植、骨髓移植、脐血移植及多种干细胞联合移植标本 63 例, 收集条件为融合基因(BCR/ABL、AML1/ETO)阳性表达, 供受者性别不同或同时满足以上 2 项条件者, 分为同性别间干细胞移植和不同性别间干细胞移植两组; 同性别间干细胞移植者 20 例, 应用相应的基因探针进行检测; 不同性别间干细胞移植者应用相应的基因探针及 XY 染色体探针联合检测。结果 43 例异性 allo-HSCT 的受者中, 25 例供、受者骨髓嵌合率在 99% 以上; 13 例早期嵌合率偏低(82%~98%), 在随访过程中逐渐上升至 99% 以上, 微量残留病灶(MRD)阴性, 移植后原病均未复发; 3 例嵌合率由 99%~100% 逐渐下降, MRD 比例上升, 出现血液学复发。20 例供、受者性别相同的 allo-HSCT 受者中, 15 例移植后未检测到原来的异常基因; 2 例检测到微量残留病灶, 经免疫抑制剂减量、供者淋巴细胞输注等治疗后降为 1%, 目前仍在完全缓解中; 3 例在移植后 1~4 个月时出现原来的基因异常, 复查骨髓为原病复发。结论 FISH 技术简便、快速、准确性高、特异性强, 对异基因干细胞移植预后判断具有重要意义。

关键词: 原位杂交, 荧光; 造血干细胞移植; 嵌合度; 微量残留病灶

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.11.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)11-1154-02

Application of fluorescence in situ hybridization in the prognostic estimation of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*

Liu Siheng, Pen Xiangui[#], Wang Ping, Qiang Xing, Deng Xiaojuan, Zhang Hongyang, Zhang Xi[△]

(Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the significance of fluorescence in situ hybridization(FISH) in prognostic estimation of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation(allo-HSCT). **Methods** 63 cases of samples were collected from patients with peripheral blood stem cell transplantation, bone marrow transplantation, umbilicus stem cell transplantation or combined transplantation of multiple stem cell. All enrolled patients were positive with fusion genes (BCR/ABL, AML1/ETO), with gender difference with corresponding donors, or be fit for both of the two criteria, and were divided into two groups of same sex and different sex allo-HSCT, according to the sex of donors and patients. 20 cases were enrolled in group of same sex allo-HSCT and were detected by using corresponding gene probes, and 43 cases in group of different sex allo-HSCT were detected by using corresponding gene probe and combined XY chromosome probes. **Results** Among the 43 cases of the opposite sex allo-HSCT, 25 cases of chimerism ratio of bone marrow of donors and recipients were higher than 99%, chimerism ratio of 13 cases, with low early chimerism ratio (82%—98%), gradually increased to more than 99% during follow-up, without minimal residual disease(MRD) and relapsed original disease after transplantation, and chimerism rate of 3 cases decreased from 99%—100%, with hematological relapse and increased MRD positive rate. Among 20 cases of same sex allo-HSCT, 15 patients were without the abnormal gene, MRD were detected in 2 cases, and after decrement of immunosuppressive agents and donor lymphocyte infusion, MDR positive rate decreased to 1% and patients were still in complete remission, 3 cases were with original genetic abnormality during 1 to 4 months after transplantation and relapsed original diseases. **Conclusion** FISH detection can be simple, rapid, accurate and specific, and be great significant on the prognostic estimation of allo-HSCT.

Key words: in situ hybridization, fluorescence; hematopoietic stem cell transplantation; chimerism ratio; minimal residual disease

自 20 世纪 60 年代骨髓移植在临床上获得成功以来, 造血干细胞移植已从骨髓移植拓宽到外周血干细胞移植、骨髓移植、脐血移植及多种干细胞联合移植。移植后的植入状态分析对于判断移植是否成功, 指导移植后免疫抑制剂的应用, 掌握供者淋巴细胞输注(DLI)的时机和数量以及预防移植排斥反应(GVHD)和监测疾病状态都起到了非常重要的作用。荧光原位杂交(FISH)技术具有简便、快速、准确性高、特异性强等优点, 因此, 在血液系统疾病的遗传学检测中得到广泛应用^[1-3]。本科应用 X、Y 性染色体特异性探针和序列特异性探

针双色双融合(DC-DF)间期荧光原位杂交技术, 检测异基因造血干细胞移植病例的嵌合率及 MRD, 分析判断预后, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院 2008 年 1 月至 2010 年 12 月 allo-HSCT 后的患者 63 例, 其中男 35 例, 女 28 例。满足条件: 融合基因(BCR/ABL、AML1/ETO)阳性表达; 供、受者性别不同, 具备以上 2 个条件或其中之一。同性别间移植 20 例, 不同性别间移植 43 例。原发病为慢性粒细胞白血病(CML)40 例, 急性非

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81070388); 重庆市自然科学基金重点项目(2009BA5056); 第三军医大学临床科研基金资助项目(2010D249)。 △ 通讯作者, E-mail: zhangxxi@sina.com.cn。 # 共同第一作者。

淋巴细胞白血病(AML1/ETO+AML)6 例,急性淋巴细胞白血病(BCR/ABL+ALL)17 例。

1.2 检测项目 63 例 allo-HSCT 的受者在移植后第 28 天采集骨髓,FISH 法检测受者的融合基因或性染色体,以评价供、受者骨髓的嵌合状态及 MRD 比例,后续则随访观察。20 例供、受者性别相同而有特殊染色体异常的 allo-HSCT 受者,应用 FISH 法检测微量残留病灶。43 例异性 allo-HSCT 受者同时检测融合基因与骨髓嵌合状态。

1.3 检测方法 X、Y 性染色体着丝粒特异性 DNA 探针和双色双融合融合基因 DNA 探针(BCR/ABL、AML1/ETO)均购自 Cyocell 公司(英国)。X 和 BCR 探针标记绿色荧光,Y 和 ABL 探针标记红色荧光,按试剂盒提供的操作说明进行标本处理、变性、杂交后洗脱等操作,在奥林巴斯 BX51 荧光显微镜下通过三色滤光镜观察荧光信号,绿色信号为 X、BCR、ETO 信号,红色信号为 Y、ABL、AML1 信号,融合基因为红绿融合信号。应用 X 和 Y 染色体着丝粒探针进行 FISH 检测的标本中,女性为 2 个绿色信号,男性为 1 红 1 绿 2 个信号。应用 BCR/ABL、AML1/ETO 双色双融合基因探针进行 FISH 检测的标本中,融合基因阴性的细胞可见 2 红与 2 绿分离杂交信号,而融合基因阳性细胞为 1 红 1 绿 2 融合的 4 个信号。用 LUCIA Cytogenetics 荧光图像处理系统(捷克 LUCIA 公司)进行图像分析,每例样本计数 1 000 个细胞,并记录杂交信号及统计各信号的百分率^[4]。

2 结 果

2.1 移植后 28 d 首次 FISH 检测结果 见表 1。

组别	融合基因 FISH(MRD)		性 FISH		两者共同
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
CML 同性别移植	2	12	/	/	/
CML 异性别移植	5	18	9	14	2
ALL 同性别移植	3	2	/	/	/
ALL 异性别移植	3	12	8	7	3
AML 同性别移植	0	1	/	/	/
AML 异性别移植	0	5	1	4	0

/:无数据。

2.2 不同性别 allo-HSCT 的 FISH 检测 移植后 28 d 首次 FISH 检测显示,不同性别 allo-HSCT 的 43 例患者中 25 例供、受者骨髓嵌合率在 99% 以上,MRD 呈阴性,此类患者目前均持续 CR 中。13 例患者嵌合率较低(12 例为 95%~98%,1 例为 82%),但 MRD 均呈阴性,此类患者经停用或减量免疫抑制剂、供者淋巴细胞输注等处理后嵌合率均上升至 99% 以上,目前均持续 CR 中。3 例患者供、受者骨髓嵌合率在 99% 以上,同时检出 MRD 阳性(1.0%~5.5%),此 3 例患者经停用或减量免疫抑制剂、供者淋巴细胞输注等处理后多次复查,检出嵌合率逐渐下降,融合基因阳性率逐渐上升,最终均原病复发。此外,1 例患者经多次 FISH 检测,嵌合率维持 17%~19%,MRD 呈阴性,该患者多次行骨髓细胞学及骨髓病理检查,结果均符合 PRCA,目前仍在随访中。

2.3 同性别 allo-HSCT 的 FISH 检测 移植后 28 d 首次 FISH 检测,同性别 allo-HSCT 的 20 例患者中,15 例未检测到原来的异常基因,此类患者目前持续 CR 中。2 例检测到微量残留病灶(3.5%~5.5%),经免疫抑制剂减量、供者淋巴细胞

输注等治疗后降为 1%,目前仍在完全缓解中。3 例检测到微量残留病灶(0.5%~7.0%),此后多次 FISH 检查发现 MRD 比例持续增高,均于移植后 1~4 个月出现原病复发。

3 讨 论

FISH 技术是检测融合基因及性别染色体的常用技术,广泛应用于异基因造血干细胞移植的预后判断。融合基因的检测目前主要采用 FISH 和 PCR 技术,两者各有优势,Cortes 等^[5]联合两种方法对 280 例接受伊马替尼治疗的患者检测结果发现,对于 FISH 阳性的样本,RQ-PCR 与 FISH 检测结果有良好的相关性;造血干细胞移植嵌合率检测目前多采用 STR 和 FISH 技术。FISH 技术通过对原有特定的融合基因检测来判断是否有造血干细胞移植后 MRD 存在;通过对不同性别染色体的检测来判断受者及供者源性的 XX 或 XY 的百分率,以精确了解供者源克隆或受者源残存克隆的嵌合比例。本组 63 例病例中,40 例(63.5%)患者的 MRD 及嵌合率均呈阴性结果。剩余 23 例病例中,15 例(23.8%)单独检出嵌合率偏低或 MRD 现象,甚至个别病例嵌合率低至 82%,此类病例经临床处理后均呈嵌合率增高、MRD 下降,最终达到 MRD 阴性,嵌合率稳定于较高水平,并在随后可观察到随移植时间的延长,供者源性的克隆长期存在,出现完全嵌合状态。而 3 例嵌合率偏低和 MRD 现象均检出的病例最终都原病复发。而且仅通过性染色体确定 MRD 有其局限性,因 FISH 技术的局限性,无法分辨受者源性细胞为造血细胞还是基质细胞。Awaya 等^[6]报道,接受移植 27 年,骨髓分析 100% 为供者源性染色体的受者,其骨髓基质仍表达为受者源性。钱思轩和薛永权^[7]认为,融合基因阳性提示患者体内存在基因阳性细胞,但不能确定其是否具有增殖能力。故受者源性细胞的出现不一定表明 MRD 或复发,这提示融合基因及嵌合率联合检测的意义远大于单独检测嵌合率。

FISH 能显示不同比例的供、受者源性染色体,从而可显示嵌合体状态及程度^[8-9]。但临床工作中也发现有嵌合率与 MRD 不同步的现象。如本组中 1 例行异性 allo-HSCT 的 BCR/ABL+ALL 患者,其移植后 28 d 的 FISH 检测结果为供者源性细胞 99.5%、MRD 阴性,但在其后数次 FISH 检查中发现,该患者 MRD 持续阴性,同时供者源性细胞比例逐步下降,最终在供者源细胞比例 72% 时出现形态学复发。

由于体内的微小残留病灶(MRD)存在,接受异基因骨髓干细胞移植后仍有一定的复发率,而 ph+ALL 及 CML 在复发早期即行供者淋巴细胞输注和甲磺酸伊马替尼治疗可取得较好疗效,说明 MRD 的检测在 allo-HSCT 后有非常重要的意义^[10]。传统染色体分析及逆转录-聚合酶链反应作为检测 MRD 的常规手段都有其缺陷。作者采用间期 FISH 技术检测 MRD,该方法与传统方法相比,具有检测简便、快速、准确性高、特异性强且不受分裂相影响的特点,可在临床推广使用。

参考文献

[1] Mallo M, Arenillas L, Espinet B, et al. Fluorescence in situ hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelo-dysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 5q-[J]. Haematologica, 2008, 93(7): 1001-1008.

[2] Hernandez JA, Rodriguez AE, Gonz ales M, et al. A high number of losses in13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic-lymphoid leukemia[J]. Haematologica, 2009, (下转第 1158 页)

例患者有皮肤或黏膜出血点,3 例出现发热,1 例发生肺部感染,2 例患者出现口腔黏膜炎,7 例患者出现轻度髋骨胀痛。

2.2 造血功能重建情况 经预处理后 24~36 h 回输自体 PBSC,所有病例预处理后均发生严重骨髓抑制,在移植+6~+14 d(造血干细胞移植后第一天开始计算为+1 d),白细胞下降到最低点($<0.1\times10^9/L$),血小板计数下降到最低($<10\times10^9/L$)。丹参酮联合 rhG-CSF 组:中性粒细胞恢复到 $0.5\times10^9/L$ 时间为+10.4 d[(+8~+14)d],PLT 恢复到 $20\times10^9/L$ 时间为+13.8 d[(+10~+17)d];单用 rhG-CSF 组:中性粒细胞恢复到 $0.5\times10^9/L$ 时间为+10.8 d[(+8~+15)d], $P>0.01$,血小板计数恢复到 $20\times10^9/L$ 时间为+14.2 d[(+11~+19)d], $P>0.01$ 。2 组移植患者均无一例发生移植相关并发症而死亡。

3 讨 论

APBSCT 是治疗恶性血液系统肿瘤的一种重要、有效手段^[10],而 PBSC 的动员是影响 APBSCT 成功的关键因素。目前可供临床选用的动员方法有三种:单用细胞因子;单用骨髓抑制性化疗;化疗联用细胞因子^[11]。单用细胞因子者有刺激髓体内肿瘤细胞增殖的危险,单用化疗虽然可以避免上述情况,但动员作用太弱,无法动员足够数量的干细胞。而化疗联合细胞因子 rhG-CSF 动员方案可以克服上述两个缺点,目前已经被广泛运用于自体外周血造血干细胞移植。但一些经过多次化疗或者年龄偏大的患者,因其骨髓储备能力较差,动员效果往往不理想,不能动员足够的干细胞到外周血液循环中,故增加采集次数及难度^[12],同时增加了患者的痛苦及费用。丹参酮具有促进、动员骨髓干细胞到外周血的作用,具体机制不详,可能与其活血化痰的作用相关^[3]。作者在化疗联合 rhG-CSF 动员方案的基础上加用丹参酮进行干细胞动员,并与不加丹参酮组的患者进行比较。从采集当天动员到外周血液循环中的 MNC 细胞数,采集所得的 MNC 总数、CD34⁺ 细胞数、采集次数来看,化疗加细胞因子(rhG-CSF)联合丹参酮动

员效果优势明显。说明本方案是 PBSC 动员安全、有效、可行的方案,对于老年患者和多次化疗患者,动员优势可能更加明显,值得临床进一步推广。

参考文献

[1] 李虎生,张华,陶晓明. 自体外周血造血干细胞移植治疗恶性血液病及实体瘤[J]. 广西医学,2009,31(7):654-656.

[2] To LB, Haylock DN, Simmons PJ, et al. The biology and clinical uses of blood stem cell[J]. Blood,1997,89(7):2233-2258.

[3] 唐映,杨万章. 丹参诱导干细胞分化的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2007,5(8):721-723.

[4] 钟鸣,苏海. 心肌损伤时复方丹参滴丸的骨髓干细胞动员作用[J]. 浙江中西医结合杂志,2008,18(9):529-531.

[5] 高蕾,陈幸华,刘林,等. MOEP 化疗联合 G-CSF 动员外周血干细胞的临床观察[J]. 重庆医学,2002,31(6):493-495.

[6] 张玉红,单泓. 外周血造血干细胞采集及移植效果分析[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(34):6743-6745.

[7] 王良绪,禹涛,赵昕,等. 外周血干细胞的动员和采集及移植造血重建研究[J]. 中华血液学杂志,1995,17(5):254-256.

[8] 彭贤贵,陈幸华,刘林,等. -80℃条件下不同细胞浓度外周血干细胞冻存效果的实验观察[J]. 重庆医学,2003,32(10):1307-1308.

[9] 杜鹃,吴胜其,吴杨. 自体外周血造血干细胞动员采集及冻存研究[J]. 现代肿瘤医学,2005,13(1):63-64.

[10] 卢英豪,王季石,孙志强,等. 自体外周血造血干细胞移植治疗恶性血液病临床运用研究[J]. 贵州医药,2008,32(3):195-198.

[11] Ruiz GJA, Lopez-Ongil S, Gonzalez-Rubio M, et al. Reactiveoxygen species induce proliferation of bovine aortic endothelialcells[J]. J Cardiovasc Pharmacol,2000,35(1):109-113.

[12] 胡炯,赵维莅,朱莉萍,等. 造血干细胞的动员及采集的影响因素[J]. 上海交通大学学报,2007,27(9):1132-1139.

(收稿日期:2011-03-07)

(上接第 1155 页)

94(3):364-371.

[3] Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiplemyeloma; the experience of the intergroupe francophone du myélome[J]. Blood,2007,109(8):3489-3495.

[4] Du QF, Liu XL, Song LL, et al. The application of dual fusion iter-phase fluorescence in situ hybridization probe in detecting minimal residual disease in chronic myeloid leukemia[J]. Chin J Intern Med,2002,41:801-804.

[5] Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, et al. Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(9):3425-3432.

[6] Awaya N, Rupert K, Bryant E, et al. Failure of adult marrow-derived stem cells to generate marrow stroma after successful hematopoietic stem cell transplantation[J]. Experimental Hematology,2002,30:937-943.

[7] 钱思轩,薛永权. 荧光原位杂交技术在异性间造血干细胞移植后

Ph 阳性白血病的检测意义[J]. 中华内科杂志,2006,45(3):234-235.

[8] Turkiewicz D, Gorczynska E, Toporski J, et al. Monitoring of hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation(allo-SCT) by dual-color FISH analysis of X and Y chromosomes[J]. Leukemia Research,2003,27(11):993-999.

[9] Fuehrer M, Gerusel-Bleck M, Konstantopoulos N, et al. FISH analysis of native smears from bone marrow and blood for the monitoring of chimerism and clonal markers after stem cell transplantation in children[J]. International journal of molecular medicine,2005,15(2):291-297.

[10] Olavarria E, Ottmann OG, Deininger M, et al. Response to imatinib in patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronicmyeloid leukemia[J]. Leukemia, 2003, 17(9):1707-1712.

(收稿日期:2011-03-07)