

学校编码: 10384

密级 _____

学号: 24520091152930

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

急性髓系白血病 *DNMT3A* 基因突变的临床研究

DNMT3A Gene Mutations In Acute Myeloid Leukemia

陈亚玫

指导教师姓名: 鹿全意 教授

专业名称: 内科学

论文提交日期: 2012年5月

论文答辩日期: 2012年5月

2012年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

| | |
|---|----|
| 中文摘要 | 1 |
| 英文摘要 | 11 |
| 第一章 绪论 | 1 |
| 第一节 白血病的概况 | 1 |
| 1.1 白血病的历史 | 1 |
| 1.2 AML 的 FAB 分型方案 | 2 |
| 1.3 白血病危险度分层 | 2 |
| 第二节 白血病发生的分子机制 | 3 |
| 2.1 基因突变在白血病发生中的作用 | 3 |
| 2.2 表观遗传学改变在白血病发生中的作用 | 9 |
| 第三节 本课题提出、内容和意义 | 10 |
| 第二章 材料和方法 | 12 |
| 第一节 <i>DNMT3A</i> 基因突变的检测 | 12 |
| 1.1 仪器设备 | 12 |
| 1.2 相关试剂的配制 | 13 |
| 1.3 方法 | 14 |
| 第二节 <i>NPM1</i> , <i>FLT3-ITD</i> 基因突变的检测 | 21 |
| 2.1 仪器设备 | 21 |
| 2.2 相关试剂的配制 | 22 |
| 2.3 方法 | 22 |
| 第三节 其它 | 24 |
| 3.1 骨髓细胞学、流式细胞学、染色体核型分析 | 24 |
| 3.2 统计学分析 | 24 |
| 第三章 结果与分析 | 26 |
| 第一节 <i>DNMT3A</i> 基因突变比例和突变类型 | 26 |
| 第二节 <i>DNMT3A</i> 基因突变患者的临床和实验室特征 | 31 |
| 2.1 <i>DNMT3A</i> 基因突变与年龄的关系 | 31 |
| 2.2 <i>DNMT3A</i> 基因突变与性别的关系 | 31 |
| 2.3 <i>DNMT3A</i> 基因突变与早期死亡的关系 | 32 |
| 2.4 <i>DNMT3A</i> 基因突变与外周血白细胞数的关系 | 32 |

| | | |
|----------------|--|-----------|
| 2.5 | <i>DNMT3A</i> 基因突变与 M5 白血病的关系 | 33 |
| 2.6 | <i>DNMT3A</i> 基因突变与不同核型 AML 的关系 | 33 |
| 2.7 | <i>DNMT3A</i> 基因突变与白血病免疫表型的关系 | 34 |
| 第三节 | <i>DNMT3A</i> 基因突变与 <i>NPM1</i> 及 <i>FLT3-ITD</i> 基因突变之间的关系 | 34 |
| 第四节 | <i>DNMT3A</i> 基因突变对白血病疗效和预后的影响 | 39 |
| 4.1 | <i>DNMT3A</i> 基因突变与 M3 亚型 | 39 |
| 4.2 | <i>DNMT3A</i> 基因突变与化疗效果关系 | 39 |
| 4.3 | <i>DNMT3A</i> 基因突变对患者预后的影响 | 40 |
| 第五节 | 病情随访 | 41 |
| 第四章 | 讨论 | 43 |
| 4.1 | <i>DNMT3A</i> 基因突变的研究方法 | 43 |
| 4.2 | <i>DNMT3A</i> 基因突变比例和突变形式 | 44 |
| 4.3 | <i>DNMT3A</i> 基因突变与 <i>NPM1</i> 、 <i>FLT3-ITD</i> 的关系 | 44 |
| 4.4 | 特殊类型白血病中 <i>DNMT3A</i> 基因突变 | 44 |
| 4.5 | <i>DNMT3A</i> 基因突变消失 | 45 |
| 第五章 | 结论与展望 | 47 |
| 参 考 文 献 | | 49 |
| 附 录 | | 55 |
| 致 谢 | | 73 |

Table of Contents

| | |
|--|----|
| Abstract in Chinese | I |
| Abstract in English | II |
| Chapter 1 Introduction | 1 |
| Section I An overview of leukemia | 1 |
| 1.1 The history of leukemia..... | 1 |
| 1.2 FAB classification | 2 |
| 1.3 Leukemia risk stratification..... | 2 |
| Section II Molecular mechanisms of Leukemia | 3 |
| 2.1 The role of gene mutations in leukemia | 3 |
| 2.2 The role of epigenetic changes in leukemia..... | 9 |
| Section III Proposal of this dissertation | 10 |
| Chapter 2 Materials and methods | 12 |
| Section I Detection of <i>DNMT3A</i> gene mutation | 12 |
| 1.1 Equipment | 12 |
| 1.2 Reagent preparations | 13 |
| 1.3 Methods..... | 14 |
| Section II Detection of <i>NPM1</i>, <i>FLT3-ITD</i> gene mutations | 21 |
| 2.1 Equipment | 21 |
| 2.2 Reagent preparations | 22 |
| 2.3 Methods..... | 22 |
| Section III Others | 24 |
| 3.1 Bone marrow cytology、Flow cytometry、Karyotype analysis..... | 24 |
| 3.2 Statistical analysis | 24 |
| Chapter 3 Results and analysis | 26 |
| Section I Rate and type of <i>DNMT3A</i> gene mutations | 26 |
| Section II Clinical and laboratory features | 31 |
| 2.1 <i>DNMT3A</i> gene mutation and age | 31 |
| 2.2 <i>DNMT3A</i> gene mutation and gender..... | 31 |
| 2.3 <i>DNMT3A</i> gene mutation and early death..... | 32 |
| 2.4 <i>DNMT3A</i> gene mutation and WBC..... | 32 |
| 2.5 <i>DNMT3A</i> gene mutation and M5 subtype..... | 33 |

| | |
|---|----|
| 2.6 <i>DNMT3A</i> gene mutation and karyotype..... | 33 |
| 2.7 <i>DNMT3A</i> gene mutation and immunophenotype..... | 34 |
| Section III <i>DNMT3A</i> gene mutation VS <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> mutations | 34 |
| Section IV <i>DNMT3A</i> gene mutation on efficacy and prognosis | 39 |
| 4.1 <i>DNMT3A</i> gene mutation and M3 subtype..... | 39 |
| 4.2 <i>DNMT3A</i> gene mutatin and the effect of chemotherapy..... | 39 |
| 4.3 <i>DNMT3A</i> gene mutation and the prognosis..... | 40 |
| Section V Follow-up | 41 |
| Chapter 4 Discussion | 43 |
| 4.1 Research methods..... | 43 |
| 4.2 <i>DNMT3A</i> gene mutation rate and types..... | 44 |
| 4.3 <i>DNMT3A,NPM1,FLT3-ITD</i> mutations..... | 44 |
| 4.4 <i>DNMT3A</i> gene mutation and special type of leukemia..... | 44 |
| 4.5 <i>DNMT3A</i> gene mutation disappears..... | 45 |
| Chapter 5 Conclusions and outlook | 47 |
| References | 49 |
| Appendix | 55 |
| Acknowledgements | 73 |

摘要

目的: 了解 *DNMT3A* 基因在急性髓系白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) 患者中的突变比例和类型, 分析 *DNMT3A* 基因突变患者的临床特征和突变在 AML 种的预后价值, 分析该突变在疾病进展中的变化情况。

方法: 抽取 101 例髓系白血病患者的骨髓或外周血, 提取 RNA 逆转录成 cDNA, 并设计两对引物用于扩增 *DNMT3A* 基因, 电泳验证产物条带后进行直接测序。提取所有患者的全基因组 DNA 进行毛细管电泳, 检测 *NPM1* 和 *FLT3-ITD* 两种基因的突变情况。同时检测其它相关危险因素, 如外周血白细胞数、免疫表型、染色体核型, 并进行统计学分析。

结果: 共检测出 14 例 (13.9%) 突变患者, 其中 M5 7 例 (50%), M1 3 例 (21.4%), M3 1 例 (7.1%), 嗜酸细胞白血病 1 例 (7.1%)。突变形式多为错义突变, 也有无义突变及缺失突变, 热点突变累积第 882 位精氨酸, 在两例患者中还发现了双突变现象。33 例正常核型 (Cytogenetically Normal, CN) 患者中, 发生 *DNMT3A* 基因突变 10 例 (30.3%)。发生该基因突变的患者还可伴随 CD4、CD7 等淋巴系抗原的表达。*DNMT3A* 基因突变与 M5 亚型、年龄及 *NPM1* 基因突变相关, 但与外周血白细胞数、性别、CD7 表达无关, 且对首次 CR 率没有影响 ($p > 0.05$)。在 1 例 CEL 患者经格列卫治疗后突变没有消失, 另外 1 例 M5 患者经 6 程 (3+7) 方案化疗后突变消失。

结论: (1) 对于中国白血病患者, *DNMT3A* 基因突变检出率为 13.9%, 推测其存在人种差异。(2) *DNMT3A* 基因突变在 M5 中占 33.3%, 与患者的年龄及 *NPM1* 突变相关, 与性别、早期死亡、初诊白细胞数、免疫表型、染色体核型、*FLT3-ITD* 突变及疗效无关, 为一独立的预后因素。(3) M3 型白血病中 *DNMT3A* 基因突变少见。(4) 化疗可能使基因突变消失, 突变能否作为微小残留病 (Minimal residual disease, MRD) 检测尚待进一步讨论。

关键词: *DNMT3A* 基因; 急性髓系白血病; 基因突变

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Objective: To detect the frequency and forms of *DNMT3A* gene mutations in patients with acute myeloid leukemia(AML),and to investigate the relationship between *DNMT3A* mutations and clinical feature of AML.Monitoring mutations in two cases during the clinical course.

Methods: DNA and RNA was Extracted from bone marrow or peripheral blood samples.PCR followed by reverse transcriptase was used to amplify the cDNA.To test the presence of *DNMT3A* mutations by direct sequencing.A double RT-PCR followed by capillary electrophoresis to analyze *NPM1* and *FLT3-ITD* alterations.Other risk factors were detected,such as initial WBC counts,immunophenotype of leukemia cells and karyotype.

Results: A total of 14 of 101 patients (13.9%) had mutations in *DNMT3A*.Among them,7(50%) patients with M5,3(21.4%) patients with M1,1 patient with M3,1 patient with Chronic eosinophilic leukemia(CEL).We identified missense mutation,nonsense and 30bp deletion encompassing *DNMT3A*.The most common of them was predicted to affect 882Arg(in 4 patients).Double mutations were detected in two cases.10 of 33(43.5%) CN-AML patients carry *DNMT3A* mutation.There was no significant difference in initial WBC counts,gander,karyotepe,phenotype,CR rate.However,*DNMT3A* mutations occurred more frequently in older (age>50y, $p<0.05$) patients,and were closely associated with *NPM1* mutation($p<0.05$).Lymphoid antigen expressed in some patients bear the mutation.We detected *DNMT3A* mutation in a CEL patient before development of frank leukemia.Mutation disspeared in a M5 patient after chemotherapy.

Conclusion: (1) *DNMT3A* mutations are highly recurrent in AML patients,especially in M5 subtype,and are independently associated with a poor outcome.However,ethnic differences exsit in the mutation rate. (2)The mutations are closely associated with M5 subtype,*NPM1* mutations and older age,but inversely associated with WBC,immunophenotype,karyotype,*FLT3-ITD* and CR rate.*DNMT3A*

gene mutation is an independent prognostic factor. (3)The mutation is hardly seen in M3 subtype,and the prognostic significance in M3 subtype is yet to be discussed. Mutations not in the functional domains won't affect the prognosis. (4)Mutations disappeared after chemotherapy,and it remains to be further discussed as a MRD marker.

Keywords: *DNMT3A*; AML; Gene mutations

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 绪论

第一节 白血病的概况

1.1 白血病的历史

白血病是血液系统恶性肿瘤中的一种,由于在儿童中发病率较高、预后较差,使人闻而生畏。人们对于这类疾病已有200多年的认识和研究,最早描述此类疾病是在1811年, Peter Cullen^[1]发现了一例以迅速增大的脾脏和乳白色血液为特征的患者。1825年, Alfred Velpeau^[2]进一步描述了白血病相关症状,如腹胀、发热、虚弱等,他也在血管中观察到类似“脓液”的物质,并认为此类疾病与循环系统病变相关。Alfred Donné则是使用显微镜研究疾病的先驱。1844年,他通过显微镜观察到一例白血病患者的白细胞成熟障碍^[3],这也是白血病的主要特征。1845年, John Bennett^[4; 5]观察到白细胞聚集现象,并将这类疾病命名为“leucocythemia”,同年, Rudolf Virchow^[6]提出了异常白细胞增多导致红细胞减少的说法,并于1847年将该类疾病命名为“leukämie”。1846年, Henry Fuller^[7]第一次对一例白血病的患者实施了长期的细胞学观察。这些早期的发现为近代对于白血病发病机制、诊断和治疗方法的研究奠定了基础。

1976年,法国、美国及英国血细胞形态学专家协作组(FAB)根据光镜下白血病细胞的形态学特征及化学染色结果提出了白血病的FAB(French-American-British)分型法,并建立了统一的细胞形态学分型标准,将AML分为M0-M7共8个亚型。1986年,在FAB分型的基础上, MIC协作组又提出了形态学(morphology, M)、免疫学(immunology, I)及细胞遗传学(cytogenetic, C)分型方案,即根据患者的FAB分型、流式细胞学检测白血病细胞免疫表型异常判断细胞分化阶段及是否存在染色体核型异常判断患者病情危重程度,进一步选择合适的化疗方案,并为是否行造血干细胞移植提供理论依据。近年来,随着分子生物学(molecular biology, M)的发展,对于白血病的研究进入了基因层面。2001年3月里昂会议公布了造血及淋巴组织肿瘤的WHO分类法,该分类方法应用了

MICM分型理论，力求从各个角度多方面反映疾病的本质，成为国际上新的通用分型标准。

1.2 AML的FAB分型方案

- M0 急性粒细胞白血病微分化型
- M1 急性粒细胞白血病未分化型
- M2 急性粒细胞白血病部分分化型
- M3 急性早幼粒细胞白血病
- M4 急性粒单核细胞白血病
- M5 急性单核细胞白血病
- M6 红白血病
- M7 急性巨核细胞白血病

1.3 白血病危险度分层

1.3.1 白血病常见染色体异常及预后

低危组：t(15;17)(q22;q22)、t(8;21)(q22;q22)、Inv(16)/del(16q)、高超二倍体、t(7;10)(q34;q24)。

中危组：+8、-Y、+6、del(12P)、正常核型。

高危组：-7、-5、inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)、复杂核型，亚二倍体(<46条染色体)、t(4;11)(q21;q23)、t(4;11)(q21;q23)(q34;q11)、涉及14q11、7q34-36和7p15、涉及8q24。

1.3.2 白血病常见白细胞分化抗原及预后

CD34、HLA-DR、CD34及HLA-DR共表达、CD117、CD56、CD7、CD13、CD33、CD10等抗原高表达，均提示了预后不良，对治疗反应性较差。

如今，分子生物学异常已经纳入白血病的诊断标准中，并深化了白血病发病机制的研究，为临床检测、化疗方案选择及是否行造血干细胞移植提供了新的依据。第二节中，我们将进行详细的讨论。

第二节 白血病发生的分子机制

白血病是由造血干/祖细胞于分化过程中的不同阶段发生分化阻滞、凋亡障碍和恶性增殖而引起的一组异质性的造血系统恶性肿瘤。据Emmanuelle Passegue^[8]报道,造血干细胞在骨髓中通过不断的自我更新复制产生,并具备多向分化的潜能。所有的血细胞,包括红细胞、粒细胞、淋巴细胞、血小板、自然杀伤细胞、树突状细胞均来源于共同的干细胞。

随着分子遗传学和分子生物学研究的发展,许多具有特异性调控造血干细胞功能及与细胞定向分化相关的基因被识别和克隆出来,比如*Hox*家族^[9]、*GATA*家族^[10]、*C/EBP*家族^[11]、*PU.1*^[11]、*AML1*^[11]、*Mafk*^[12]、*c-mpl*^[13]、*Notch*^[14]、*TAL-1/SCL*^[15]、*c-myc*^[16]、*Flk-2*^[17]、*DNMT3A*^[18]等。造血过程中,若调控干/祖细胞分化与增殖的基因发生突变,将导致某一谱系的细胞分化受阻于幼稚阶段,或大量累积于成熟阶段,最终引起白血病的发生。而调节这一过程的基因发生分子遗传学水平的改变是其直接原因,比如基因突变、融合基因。近年来越来越多的研究者开始认识到表观遗传学的改变也将导致恶性肿瘤的发生,即基因序列未发生变化,而是原癌基因被激活或抑癌基因被沉默了。

2.1 基因突变在白血病发生中的作用

许多研究已证实,基因突变对白血病的发生和演变起着重要作用,基因突变不仅可以作为诊断白血病的分子依据,也成为判断白血病预后的重要指标。Renneville^[19]将白血病中基因异常分为了三类:1、引起细胞恶性增殖的基因突变,如*FLT3*、*c-KIT*、*RAS*、*JAK2*等;2、阻碍髓系分化的基因突变,如*AML1*、*CEBPA*、*WT1*、*RUNX1*等;3、影响细胞周期和凋亡的基因突变,包括*p53*、*NPM1*等。近年来,也有新发现的基因突变,如*TET2*、*ASXL1*、*CBL*、*IDH*、*IKZF1*等^[20]。对于CN-AML患者,没有染色体异常作为预后参考,*NPM1*和*FLT3*基因突变比例较高,且有明确的预后意义,一直是科学家研究的热点。*DNMT3A*基因突变为近年来在AML中新发现的基因突变,具有独立的预后意义。

2.1.1 *DNMT3A*基因突变

*DNMT3A*基因位于染色体2p23，DNA全长109 615bp，开放读码框(ORF)4 314bp，蛋白编码区(CDS)2 739bp，编码912个氨基酸。近年来在白血病领域的研究逐渐表明其突变与白血病的发生密切相关。2010年，Yamashita^[21]等首次报道了74例白血病患者中，有3例（4.1%）发生了*DNMT3A*基因突变，且均位于882精氨酸位点，该突变导致DNA甲基化水平下降超过50%。随后，Ley^[22]通过高通量测序的方法在AML患者中发现*DNMT3A*全基因组突变的发生率高达22%，尤其是中危核型的患者则高达33.7%。突变形式包括错义突变、无义突变、插入/缺失突变等。突变集中位于*DNMT3A*基因三个保守结构域。热点突变是882位精氨酸位点，目前发现的突变形式为组氨酸（R882H）、半胱氨酸（R882C）、脯氨酸（R882P）和丝氨酸（R882S）。Yan^[23]等在急性单核细胞白血病（AML-M5）中检测出突变率为20.5%，而在急性粒-单细胞白血病（AML-M4）中，882位点的突变率则有13.6%。Walter^[24]等人还从150例骨髓增生异常综合症（MDS）患者中发现12例*DNMT3A*基因突变个体（8%），Abdel-Wahab^[25]也在46例原发性骨髓纤维化患者中发现了3例该基因突变的患者。上述两项报道表明*DNMT3A*基因突变在白血病发生之前则已经出现。国内Qiao^[26]等人针对882位点进行的研究显示，在77例AML患者中有6例（11.9%）发生了突变，且与患者*CEBPA*突变具有一定的相关性。突变的患者还可能伴随淋巴系抗原CD4、CD7表达。由此可见，*DNMT3A*全基因组突变的形式多种多样，主要集中在三个保守结构域，突变形式多为点突变且同一患者很少出现2个或2个以上突变位点。热点突变是882精氨酸位点。突变导致了患者DNA甲基化水平下降，从而进一步引起了肿瘤的发生。

2.1.2 *DNMT3A*基因突变参与白血病发病机制

对于AML发病机制的研究过程中发现白血病的进展过程通常伴有一连串的基因和表型的改变。Knudson^[27]提出的“二次打击”学说表明，肿瘤的发生需要两次基因的改变。第1次“打击”在宫内，引起染色体平衡易位形成融合基因。白血病患者在出生前和出生时血中即可检测到白血病相关的融合基因，说明融合基因起源于子宫。但白血病的仅有基因易位是不够的，关键步骤是出生后的第2次“打击”，即后天发生的分子生物学异常^[28]。表观遗传学改变进一步丰富了白血病发病机制的“二次打击学说”。表观遗传学并未改变DNA的序列，但却改变了基因的功能，某些药物可直接逆转这种改变，这也使其成为药物治疗的新靶

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库