文章编号：168085（2021）06-0088-05

WT1 联合多参数流式在急性髓系白血病预后的临床观察

*章志学[1]，肖晓芳[1]，谢　将[1]，王　英[1]，刘　云[1]，肖　祎[2]

（1.吉安市中心人民医院血液科，江西，吉安　343000；2. 井冈山大学数理学院，江西，吉安　343000）

摘　要：目的 研究 WT1 基因定量联合多参数流式（FCM）在急性髓系白血病（AML)预后的临床观察。**方法** 62 例 AML 患者分为低危组、中危组、高危组；治疗上参照《成人急性髓系白血病（非急性早幼粒细胞白血病）中国诊疗指南 2017 年版》，用 RT-qPCR 方法测定患者 WT1 基因表达水平；同时用多参数流式细胞分析技术（FCM）分析患者低水平微小残留（MRD）水平；比较不同预后患者 WT1 表达及 WT1 表达与预后的关系。观察 WT1 基因定量联合 FCM 对 AML 患者预后评估的临床意义。对患者进行随访不低于 2 年。**结果** AML 患者 WT1 高表达比例为 77.42%（48/62），不同预后分型的 AML 患者 WT1 高表达有统计学差异（$P < 0.05$）。在中、高危组的患者 WT1 高表达明显高于低危组。初发的 WT1 高表达与 WT1 低表达患者在诱导缓解率无统计学意义（$P > 0.05$），但 WT1 高表达患者的 2 年无病生存率、2 年总生存率均 WT1 低表达患者，差异有统计学意义（35.41% vs 71.43%，47.92% vs 85.71% $P < 0.05$）。WT1 基因联合 FCM 预测 AML 早期复发的敏感性、特异性均高于单独 WT1 基因和单独的 FCM（$P < 0.05$）。**结论** WT1 在 AML 患者中高表达，与患者预后相关，联合 FCM 可有效的预测患者早期复发，可作为临床治疗及预后判断的靶点。

关键词：WT1；FCM；急性髓系白血病；预后；临床观察

中图分类号：R733.7　　**文献标识码：**A　　DOI:10.3669/j.issn.1674-8085.2021.06.016

CLINICAL OBSERVATION OF WT1 COMBINED WITH UULTI-PARAMETER FLOW CYTOMETRY IN PROGNOSIS OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA

*ZHANG Zhi-Xue[1] , XIAO Xiao-Fan[1], XIE Jiang[1], WANG Ying[1], LIU Yun[1]，XIAO Yi[2]

（1. Department of Hematology , Central People's Hospital of Ji'an , Ji'an, Jiangxi 343000, China;

2. School of Mathematics and Physics, Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343009, China）

Abstract Objective: To study the prognosis of acute myeloid leukemia (AML) patients with WT1 gene combined flow cytometry method (FCM). **Methods:** 62 AML patients were divided into low-risk group, intermediate-risk group and high-risk group, according to WHO MICM classification. All patients were treated under "the 2017 adult acute AML (non-Acute promyelocytic leukemia, non-APL) Chinese guidelines" .The expression level of

收稿日期：2021-07-23；修改日期：2021-08-23
基金项目：江西省卫生健康委科技计划项目(20191430)
作者简介：*章志学(1975-)，女，江西吉安人，副主任医师，副教授，主要从事血液病的研究(E-mail:zzxliu.2007@163.com)；
肖晓芳(1984-)，女，江西吉安人，主治医师，主要从事急性白血病、淋巴瘤等血液病研究(E-mail:happy1984fang@163.com)；
谢　将(1986-)，男，江西吉安人，主治医师，硕士，主要从事恶性血液病的研究(E-mail:330812850@qq.com)；
王　英(1986-)，女，江西吉安人，主治医师，硕士，主要从事恶性血液病的研究(E-mail:3464885407@qq.com)；
刘　云(1988-)，男，江西赣州人，主治医师，硕士，主要从事恶性血液病的研究(E-mail:lyssh99@163.com)；
肖　祎(1990-)，女，江西吉安人，副教授，博士，主要从事大数据分析的研究(E-mail:xiaoyi@jgsu.edu.cn).

WT1 gene was measured by RT-qPCR method. FCM was used to analyze the minimal residual disease（MRD）level of patients. It was contrasted the expressions of WT1 in patients with different prognoses and the relationship between WT1 expressions and prognoses. It was observed the clinical significance of WT1 gene quantitative combined with FCM in evaluating the prognoses of AML patients. **Results:** The high expression rate of WT1 in AML patients was 77.42% (48/62), and there was no statistical difference in WT1 expressions of AML patients with the complete response rate (P>0.05). But the 2-year disease-free survival rate and 2-year overall survival rate of patients with the high WT1 expression were all lower than those with the low WT1 expression, and the differences were statistically significant (35.41% vs 71.43%，47.92% vs 85.71%, P<0.05). The sensitivity and specificity of WT1 gene combined with FCM to predict early recurrence of AML were higher than those of single gene and individual FCM (P<0.05). **Conclusion:** WT1 is highly expressed in AML patients and is closely related to the prognoses of patients, and WT1 combined with FCM can be used as a target for clinical treatment and prognosis judgment.

Key words: WT1; FCM; acute myeloid leukemia; prognosis; clinical observation

我国急性髓系白血病（AML）患者年发病率1.62/10 万，是最常见的源于造血干细胞恶性克隆性血液病，占成人急性白血病 60%~70%，AML 的诊断及治疗方案是临床讨论热点[1]。AML 接受治疗后诱导缓解率较高，但是复发仍然是影响 AML 患者长期预后的重要因素。目前 AML 患者的低水平微小残留（MRD）的检测仍无统一标准，大多数单位用多参数流式分析技术（FCM）监测 MRD。随着基因检测技术的发展，AML 相关异常基因的研究也成为临床关注的重点，Wilms 瘤基因（WT1）基因是一种编码转录调控蛋白，具有转录激活与抑制作用，参与调控了造血细胞的增值与分化过程，可能与 AML 的发生、发展及预后相关，可用于识别高危患者、有效预测治疗效果[2-3]。本研究旨在探讨 WT1 联合 FCM 在急性髓系白血病预后的临床观察，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取吉安市中心人民医院血液科 2017 年 4 月至 2020 年 4 月收治的 62 例 AML 患者，其中男性 32 例，女性 30 例；年龄（28~67）岁，平均（53.12 ± 3.54）岁；据 FAB 将 AML[4]分型 M0 1 例、M1 3 例、M2 35 例、M4 11 例、M5 12 例。根据 MICM 分型并预后分析，低危组 11 例、中危组 35 例、高危组 16 例。由本院医学伦理委员会审核并批准此研究。诊断标准：参照《成人急性髓系白血病（非急性早幼粒细胞白血病）中国诊疗指南 2017 年版》[5]中的 AML 相关诊断标准；纳入标准：符合上述诊断标准者；初治与未正规治疗的首次复发急性髓系白血病者（非 M3 型）；患者及家属对本研究均知情同意者等。排除标准：急性早幼粒细胞白血病（M3 型），合并其他血液疾病者；合并其他恶性肿瘤者；中途退出研究者，妊娠期、哺乳期妇女等。

1.2 方法

患者均根据《成人急性髓系白血病（非急性早幼粒细胞白血病）中国诊疗指南 2017 年版》中标准治疗方案进行治疗。在患者诱导治疗前测定 WT1 基因定量，在患者诱导缓解后 1、3、6、12、18、24 月分别抽取患者 WT1 基因定量检测和 FCM 检测。

1.2.1 WT1 检测方法

抽取患者空腹静脉血 3 mL，分离单个核细胞，提取细胞总 RNA，然后逆转录获得 cDNA，使用美国 Life Technologies Applied Biosystems（ABI）公司的 7500 荧光定量 PCR 仪检测患者 WT1 基因表达水平，用 PCR 扩增方法，及用 cDNA 天然复制过程，由变性、退火、延伸三个基本反应步骤构成，三个过程不断循环，能够将目的 DNA 片段扩增几百万倍，PCR 扩增时，用特异性 PCR 引物和探针检测 WT1 基因表达。PCR 完毕后，根据实际情况设置阈值线，分析扩增曲线，分别以 WT1 和 ABL1 标准曲线来确定具体标本的 WT1 拷贝数和 ABL1 拷贝数。用 WT1/（1×10^4ABL1）方法计算表达量，WT1 的相对表达水平以表达百分数来表示，当表达

百分数 ≤ 50%时，该样本 WT1 为低表达；当表达百分数 > 50%时，该样本 WT1 为高表达。

1.2.2 FCM 检测技术

以 Diva 6. 1 软件对数取样，每管获取 100 000 个细胞，均通过 CD45 和侧向角散射(side scatter，SSC) 设门，根据患者初诊时的白血病相关免疫表型，选择特异性 8 ~12 种抗体，每种单抗加入 20μL，震荡混匀后，室温避光温育 20 min，加入溶血素以裂解红细胞，离心去除上清液，用 PBS 洗涤后，上流式细胞仪检测。检测灵敏度是 0.01%，骨髓中白血病细 ≤ 0. 01% 为 MRD 阴性；骨髓细胞形态学或 FCM 检测白血病细胞 ≥5%为复发，多个抗体组合以数值最大者为 MRD 值。

1.3 观察指标

①WT1 表达情况：记录 AML 患者治疗前不同年龄、性别、AML 分型、白细胞计数患者 WT1 表达情况。②WT1 表达情况与预后的关系：观察不同 WT1 表达患者 1 个疗程后完全缓解率、2 年无病生存率、2 年总生存率，完全缓解定义为无 AML 所致症状、体征，血红蛋白、中性粒细胞绝对值、血小板复常，原始细胞小于百分之五，外周血中未发现白血病细胞，红细胞及巨核细胞系正常，患者生活正常[6]。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析，计数资料以[n(%)]表示，及 x^2 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同预后初发 AML 患者 WT1 表达情况

AML 初发患者 WT1 高表达比例为 77.42%（48/62）。根据 WHO 分型将患者分为低、中、高危，低危患者 WT1 高表达比例 45.45%（5/11），中危患者 WT1 高表达比例 80.0%（29/35），高危患者 WT1 高表达比例 93.75%（15/16），结果见表 1。中、高危患者的 WT1 高表达水平显著高于低危患者，其 WT1 高表达水平高于中危患者，三者比较均有显著差异，有统计学意义（P < 0.05）。结果提示，初发患者 WT1 表达水平可以帮助判断患者的预后。

表 1 不同预后初发的 AML 患者 WT1 表达情况[n(%)]

Table 1 Expression of WT1 in primary AML patients with different prognosis

AML 预后分型	AML 例数	WT1 高表达	WT1 低表达	x^2（WT1 高表达）	P（WT1 高表达）
低危组	11	5（45.45%）	6（54.55%）		
中危组	35	28（80.0%）	7（20.0%）	9.003	0.011
高危组	16	15（93.75%）	1（6.25%）		

2.2 治疗前 WT1 表达情况与预后的关系

WT1 高表达患者诱导完全缓解率较 WT1 低表达诱导缓解率低，两者无统计学差异（P>0.05）。WT1 高表达患者 2 年无病生存率及 2 年总生存率均低于 WT1 低表达患者，差异有统计学意义（35.41% vs 71.43%，47.92% vs 85.71% P<0.05），结果见表 2。

表 2 WT1 表达情况与预后的关系[n(%)]

Table 2 Relationship between WT1 expression and prognosis

项目	例数	诱导缓解率[n(%)]	2 年无病生存率[n(%)]	2 年总生存率[n(%)]
WT1 高表达	48	40(83.33)	17(35.41)	23(47.92)
WT1 低表达	14	13(92.85)	10(71.43)	12(85.71)
X^2		0.792	5.718	6.229
P		0.373	0.017	0.012

2.3 诱导缓解的 AML 患者 WT1 定量检测联合 FCM 观察患者复发情况

对诱导完全缓解的 53 例 AML 患者治疗后 2 年的 WT1 和 FCM 随访分析显示，WT1 基因定量检测 AML 复发敏感性为 69.23%，特异性 70.37%，有效性 69.8%。FCM 检测 MRD 阳性的敏感性为 80.77%，特异性 74.07%，有效性 77.42%。两种检测方法在 AML 患者中无显著差异（P>0.05）。两种方法联合检测 AML 患者敏感性 96.15%，特异性 92.59%，有效性 94.37%，明显高于单一方法检测，与 WT1 基因定量相比，有显著差异（P<0.05）。

表 3 53 例 AML 患者随访的 WT1 基因定量与 FCM 监测结果与复发诊断效能（%）

Table 3 Quantitative analysis of WT1 gene and FCM results in follow-up of 53 patients with AML

项目		病例数		敏感性（%）	特异性（%）	有效性（%）
		复发组	缓解组			
WT1	高表达	18	8	69.23	70.37	69.80
	低表达	8	19			
FCM	阳性	22	7	84.61	74.07	79.34
	阴性	4	20			
WT1 联合 FCM	阳性	25	2	96.15	92.59	94.37
	阴性	1	25			

3 讨论

目前 AML 患者诱导缓解率高，但仍有相当一部分患者会出现复发而影响患者的长期生存。动态检测 MRD 对于有效的识别高危患者、预测复发、早期发现复发并采取有效的措施就十分重要。国内目前对于 MRD 的监测仍没有统一标准。MRD 监测可以采用 qRT-PCR、FCM 以及荧光原位杂交等技术。目前临床上多采用 qRT-PCR 以及 FCM 方法，FCM 已在临床广泛使用并且成为监测 MRD 的重要手段。由于 AML 患者的异质性，缺乏特异性的融合基因。大量研究[6]显示，WT1 位于位于染色体 11P13 位点，因能调控造血细胞增生或分化，在血液肿瘤中研究较多。核因子 κ B、GATA 结合蛋白 1、GATA 结合蛋白 2、脑酸可溶性蛋白均可控制 WT1 的表达，而 WT1 的靶基因为干扰素同源序列结合蛋白、锌指蛋白 224、血管内皮生长因子、TET2 等，均为肿瘤发生发展密切相关靶基因[7]。在 70%~90%AML 患者中 WT1 基因显示高表达[8]，可以作为监测 AML 患者的 MRD 的有效方法。检测 WT1 基因定量采用 qRT-PCR 方法，敏感度达到 10^5，甚至可以达到 10^6。因此 WT1 基因定量联合 FCM 监测 MRD 可成为 AML 患者预测早期复发的重要方法。

研究发现初发的 AML 患者（非 M3）WT1 高表达比例高达 77.42%（48/62），比较不同预后分型的 AML 初发患者 WT1 表达水平，结果显示预后越差的患者 WT1 高表达的比例越高，在中、高危组的表达明显高于低危组，具有显著差异（$P < 0.05$）。此结果提示对初治的 AML 患者 WT1 的表达水平可以作为临床危险分级的指标。对不同 WT1 表达情况的患者预后情况进行观察，发现 WT1 高表达患者完全缓解率、2 年无病生存率、2 年总生存率均低于 WT1 低表达患者，提示 WT1 可作为近期及远期预后判断指标，WT1 高表达可降低初治 AML 患者诱导化疗缓解率，缩短生存时间。分析其原因为：①WT1 基因能够促进肿瘤细胞的增殖，为“泛白血病”基因，并抑制白血病癌细胞分化，因此高表达 WT1 基因可能存在癌基因特性，高表达于肿瘤细胞，能够提高白血病细胞异型性[9-10]；②WT1 基因特异性的表达多存在于未成熟原始幼稚细胞，具有转录激活与抑制作用，而在成熟细胞表达受到抑制，表达程度低，因此高表达 WT1 基因往往代表有更高的肿瘤负荷[11]；③WT1 表达增加可能通过聚集去甲基化 TET2、非洲爪蟾同系物 1/2 的相关因子进而导致白血病细胞异常增殖，提高 AML 的恶性程度[12-14]。

本研究中，对于诱导完全缓解的 53 例 AML 患者随访了至少 2 年，WT1 基因表达与患者缓解状态呈负相关，对缓解后 FCM 持续阴性，而 WT1 持续高表达的患者复发可能性极大，需要尽早行造血干细胞移植。WT1 基因定量和 FCM 水平都能单独有效的预测 AML 的早期复发，监测 MRD 的 WT1 基因定量特异性高于敏感性，而 FCM 水平的敏感性高于特异性，两者有互补作用，两者联合分析的敏感性（96.15%）、特异性（92.59%）及有效性（94.37%）都明显高于各自独立的预测。此结果提示在 AML 患者中 WT1 联合 FCM 可更有效地预测患者早期复发，这与国内郝英婵等[15]的研究是相符的。

综上，WT1 在 AML 患者中高表达，且与患者预后息息相关，联合 FCM 可以监测患者 MRD，预测早期复发，可作为临床治疗及预后判断的靶点，值得进一步研究。

参考文献：

[1] 崔汉民,邵兵,魏学婷,等.白血病和非白血病骨髓细胞 WT1 基因表达水平及对预后的影响[J].临床和实验医学杂志, 2017, 16(5): 457-460.

[2] 唐雪,郭霞,杨雪,等. 儿童急性髓细胞白血病 WT1 基因表达及其临床意义[J].中国当代儿科杂志, 2016, 18(12): 1211-1216.

[3] 郑玉婷,李冰霞,孙玉晶,等. 急性髓系白血病患者骨髓中 WT1 的表达及其对预后的影响[J].中国实验血液学杂志, 2016, 24(3): 649-654.

[4] 聂波,杨弘,武坤,等. WT1 基因在白血病患者中的表达及临床意义[J].昆明医科大学学报, 2016, 37(4): 80-83.

[5] 王建祥.成人急性髓系白血病（非急性早幼粒细胞白血病）中国诊疗指南(2017 年版)[J].中华血液学杂志, 2017, 38(3): 177-182.

[6] 施青青,吴蔚,孙幸,等. 定量检测 WT-1 基因在急性白血病病人中的表达及临床意义[J]. 蚌埠医学院学报, 2020, 45(1): 14-17.

[7] 阳洁,陈宏. WT1 基因与急性髓系白血病的预后及主动特异性免疫治疗的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(7): 1209-1213.

[8] Kavser S, Walter R B, Stock W， et al.Minimal residual disease in acutemyeloid leukemia — current status and future perspectives[J].Curr Hematol Malig Rep,2015,10(2): 132-144.

[9] 周寅,姚玉华,王志林,等. 急性白血病患者 WT1 基因表达水平和不同类别核型异常之间的关系[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(12): 914-916.

[10] 代湘云,石静云,吴涛,等.WT1 基因阳性合并 AML1-ETO 阳性急性髓系白血病 M2 型 1 例报道[J]. 中华全科医学, 2018, 16(12): 2131-2132.

[11] 姜丽,邬成业,朱尊民,等. WT1 基因多态性对治疗老年急性髓系白血病患者的疗效及预后的影响[J]. 中华老年医学杂志, 2019, 38(1): 50-54.

[12] 王善娟. 急性白血病患者 WT1、PRAME、ERG、TRX-2 基因表达的检测及其与疾病分型、疗效的关系[J]. 海南医学院学报, 2015, 21(6): 785-787, 790.

[13] 刘军民,罗伟,孙洪波,等. WT1 基因表达对 CAG 预激方案联合与不联合地西他滨治疗 AML 和 MDS 的疗效预估价值[J]. 广东医学, 2020, 41(16): 1664-1668.

[14] 闭军琴,包黎明,王兴娟,等. DACT1 基因羟甲基化在儿童 WT1、IDH1/2、TET2 基因突变的急性髓细胞白血病中的特征及临床意义[J]. 重庆医科大学学报, 2019, 44(2): 139-145.

[15] 郝英婵,徐修才.WT1 定量联合 FCM 在急性髓细胞白血病 MRD 监测中的临床应用[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(3): 392-396.