

多参数流式细胞仪在检测急性髓系白血病微小残留病灶中的运用

魏佳综述,李惠民[△]审校

(昆明医科大学第一附属医院血液科 650032)

[关键词] 白血病,髓样;流式细胞仪;微小残留病灶;抗原表型

[中图分类号] R733.71

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)26-3712-02

急性髓系白血病(AML)并非是一种单一的疾病,而是一组具有不同形态学、免疫表型、细胞遗传学和分子生物学特征的异质性、克隆性造血干/祖细胞疾病。通过化疗能使大部分 AML 患者缓解,完全缓解(CR)率达 50%~80%^[1],但仍有约 65% 的患者最终在 3~5 年内复发,提示目前的治疗方案尚不能完全清除体内的病变细胞,而这些残留的白血病细胞,即微小残留病灶(MRD),是最终复发的根源^[2-3]。目前用于 MRD 的检测方法有经典的细胞形态学方法、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR、RQ-PCR)、多参数流式细胞仪(MFC)和荧光原位杂交(FISH)。MFC、PCR 是临床上最常用的检测手段,二者的出现打破了单纯依靠细胞形态学来定义 CR 的局限性。MFC 可在短时间内分析大量白血病细胞检测 MRD,能够提供独立预后信息和及时、可靠的临床一手资料,指导制订个体化的治疗方案,达到降低复发率和延长生存期的目的。

1 白血病细胞的免疫表型特点

白血病相关免疫表型(LAIPs)在正常骨髓或外周血细胞上不表达或低表达,而在白血病细胞上表达或高表达。AML 中的 LAIPs 具有以下特点:(1)抗原跨系表达(如 CD2、CD4、CD5、C7、C10、C19、C56);(2)抗原跨阶段表达(如 CD34⁺/CD11⁺,CD34⁺/CD15⁺);(3)抗原的过度表达、低表达或缺失(如 CD34、CD13、CD38、CD33 和 HLA-DR 等抗体的荧光强度明显增强或减弱);(4)光散射异常(CD13⁺光散射异常)^[4]。这些抗原异常表达的特点成为识别白血病细胞,检测 MRD 的基础。

2 MFC 检测 MRD 的适用范围与优势

聚合酶链反应(PCR)虽然特异性和敏感性高,但 AML 中存在合适的目标分子(如:PML-RARa、AML-ETO、CBFβ-MHY11 等)加上 FLT3、NPM1 等基因突变的患者仅占 60%~70%^[5],因此运用局限。并且白血病细胞在克隆演变的过程中可能发生靶基因长度和位点的变化,甚至出现新的突变基因,将导致 PCR 法检测的漏诊和监测的中断,意味着将有更多的患者无法用 PCR 对 MRD 实行有效的监测。

MFC 可以在短时间内对大量单个核细胞进行多参数分析,是 AML 患者检测 MRD 的有效方法^[6]。美国 St Jude 儿童医院 AML02 研究中检测到 95% 的 AML 患者存在 LAIPs, MFC 适用于几乎所有 AML 患者^[7]。运用 MFC 的检测方法不仅能准确定量残留白血病细胞数,还可以进一步分析残留白血病细胞的增殖、凋亡及耐药等生物学特性,反映白血病细胞对化疗的敏感性、自身生物学特性及体内肿瘤负荷情况。此外,MFC 可以在同一次检测中追踪多个异常的免疫表型,在 MRD 检测时只需要一种异常分子标志即可被检出,不会像基

因突变那样影响检测效能。但 AML 细胞在复发时出现“抗原漂移”的频率高,因此目前建议诊断时至少需要记录 2 个异常免疫表型用于以后的 MRD 检测。初诊时全面而完整的免疫表型分析、个体化设计表型组合、多个白血病相关标志联合等策略均能增加 MFC 检测结果的可信度。

3 MFC 检测 MRD 的敏感性

影响检测的灵敏度、特异性的因素有:(1)恶性细胞缺乏抗原特异性;(2)一些小克隆的亚群存在并且很难识别;(3)表型转换无法识别;(4)缺乏有经验和专业技术的工作人员。当灵敏度达 10^{-5} ~ 10^{-4} ,标本需要的有核细胞数约 500 000 个,保证样本质量是保证灵敏度的前提。MD 安德森癌症中心^[4]采用的是 8 色的流式细胞仪,检测时标本有核细胞数量大于 200 000 个以保证灵敏度至少为 10^{-4} ,先检测大量正常骨髓标本建立一个评估的基线,以此为参照,根据 CD13、CD34、CD38、CD45、CD117、HLA-DR 等抗体的荧光强弱分析是否是 LAIPs。Al-Mawali 等^[8]是在 CD45/CD34/CD117 的基础上添加不同的淋巴系或髓系抗原以提高检出 LAIPs 的灵敏度。随着 8 色、10 色流式细胞检测技术的面市,MRD 检测的灵敏度和可靠性得到了更大的提高。

4 MRD 检测的时机和阳性阈值

MRD 的结果不仅应与检测时间点和治疗方法相联系,还应考虑患者的个体因素和疾病特征。目前认为影响预后重要的时间点是诱导治疗后、巩固治疗后、维持治疗后及移植前后。不过,有的研究认为持续动态进行 MRD 监测更有意义,对于某个确定时间点的 MRD,并不能完全反映治疗效果^[4]。

定义 MRD 的阈值主要是为了早期发现高复发风险患者,据此调整治疗策略。Feller 等^[9]通过多中心的研究推荐 MRD 的阈值为 0.01%,目前国内大多学者对此也比较认同^[10]。对高 MRD(CR 后任何时间点 MRD 水平大于 10^{-4})患者建议进行强化的缓解后治疗或针对 MRD 的靶向治疗,对低 MRD(CR 后所有时间点 MRD 水平小于 10^{-4})或 MRD 阴性患者,建议降低治疗强度或缩短治疗时间,以达到人性化、个体化、规范化的治疗策略。

最近国外也有研究将 0.15% 作为判断预后的阈值,据此将患者划分为复发组和长期生存组,但实验数据显示仍有 44% MRD 阴性的患者最后复发。相较而言,另有学者认为任何数量的 MRD 存在均与预后相关,很可能不同的时间点、不同的患者有不同的阈值,这些都由患者本身的分子生物学特性所决定。MRD 阈值水平不同,所得到的研究结论亦很难进行统一的评价,这个缺陷将是 MFC 检测 MRD 在临床运用中所面临的一个重要挑战^[11]。

5 MFC 在 AML 中的运用

在 AML 患者中, Al-Mawali 等^[8]运用 5 色 MFC 发现: 非同步表达往往在相对成熟骨髓细胞中易见(如早期的抗原表达 CD34、CD117 和相对成熟的标志 CD15、CD65 共表达), 而跨系表达在原始髓细胞中是最常见的 LAIPs 类型(表达淋巴系标志 CD2、CD4、CD5、C7、C10、C19)。

5.1 化疗后的监测 运用 MFC 检测 AML 患者的 MRD, 最有效的方法就是在诊断时识别 1 个或多个 LAIPs, 为后续治疗建立一个完善的评价体系。Kern 等^[12]对 58 例诱导治疗和 62 例巩固治疗的 AML 患者进行了研究, 这些患者中 LAIPs 包括: 抗原不同步表达、抗原跨系表达、抗原缺失、抗原过表达。每例患者至少追踪 1 个 LAIPs, 从诊断到治疗达 CR, LAIPs 阳性细胞减少的程度用 LD 值表示。在巩固治疗组 LD 值与总生存率(OS)、无复发生存期(RFS)均相关($P=0.005$); 在诱导治疗组 LD 值只与 RFS 相关, 与 OS 无关($P=0.0001$); LD 值越大, 2 年的总生存率(OS)、5 年的无病生存(EFS)越高, 另外, LD 值可作为细胞遗传学的协变量, 并认为 3 个疗程巩固治疗后的 MRD 水平预后价值更大。无论是在儿童或是成人, MFC 监测的 MRD 与复发密切相关, 并且认为 MFC 更灵敏、可靠。Loken 等^[13]发现, 27 例 AML 患者中有 7 例没有达到细胞形态学的缓解, 这 7 例患者 MFC 检测的 MRD 是阴性的, 却相比剩下的 20 例患者获得更长的生存期。Inaba 等^[14]发现诱导治疗后大于或等于 0.1% MRD 复发风险高, 预后差, 相较于细胞形态学, MFC 检测 MRD 预后的意义更大。

5.2 异基因造血干细胞移植前后的监测 异基因造血干细胞移植已经成为中危、高危患者治疗的重要手段, Bastos-Oreiro 等^[15]检测了 29 例 AML 患者在异基因造血干细胞移植前后 MRD 的情况, 其中 18 例移植后 MRD 阴性(LAIPs $\leq 0.1\%$)比 MRD 阳性(LAIPs $\geq 0.1\%$)复发率低(15% vs. 66%, $P=0.045$)、1 年的 OS 高(83% vs. 52%, $P=0.021$)。12 例移植后 MRD 阳性的患者, 采取了移植后的干预治疗(逐渐减少免疫抑制、供体淋巴细胞输注或二次移植), 其中有 5 例 MRD 消失, 疾病得到了控制, 其他 7 例患者复发。Walter 等^[16]对 99 例 CR1 后行异基因造血干细胞移植的 AML 患者进行研究, 运用 10 色流式细胞术监测移植前 MRD 阳性与高复发率相关, 并能缩短 DFS、OS。Anthias 等^[17]认为移植前的 MRD 与疾病复发、诱导治疗失败相关, 对于 MRD 阳性($>0.1\%$)的患者, 应调整相应的移植策略, 例如早期增加 GVL 效应或移植后预防性的给予供者淋巴细胞输注; 而对于 MRD 阴性的患者则可以适当降低治疗强度。Diez-Campelo 等^[18]认为在移植后 100 d 监测 MRD 意义较大, MRD 大于或小于 0.1% 区分患者的不同风险度。

6 结 语

2014 年 NCCN 临床实践指南中提出目前尚无推荐的检测 MRD 的方法。但根据临床实践发现, MFC 和 PCR 是 AML 中定量检测 MRD 最可靠、有效的两种方法, 但各有利弊。PCR 应用范围窄, 检测的靶基因清除慢, 不适合早期时间点的检测, 多用于巩固和维持治疗后。MFC 适用于所有 AML 亚型的患者, 可在早期发现高危患者, 及时调整治疗方案, 但未来需要明确在什么时间点选用什么方法最有效, 如何将 MRD 定量检测的过程标准化, 建立统一的阈值水平, 需要实验室与实验室间、实验室和临床医生间加强合作, 共同突破这些局限。MRD 检

测结果不仅应与检测的时间点相联系, 还应与患者的年龄、疾病分层、治疗方法相联系, 选择有经验的实验室也十分重要, 只有综合分析多种影响因素, 才能更客观地评价疾病状态, 有效地指导制订患者的治疗方案。

最近有研究者使用 MFC 分析白血病干细胞(Leukemic stem cells, LSCs), LSCs 通过自我更新和无限增殖模拟正常造血作用, 产出白血病细胞, 化疗虽然能有效杀死白血病细胞, 但却不能完全清除白血病干细胞, 这些细胞可能导致 MRD 的持续存在, 最终导致复发。与造血干细胞类似, LSCs 表达 CD34⁺/CD38⁻^[19], 体外成瘤实验发现 CD123, CD44, CD47 可以用以区分 LSCs^[20]。因此 MFC 可以用来识别这些潜在的 MRD 来源, 帮助发现潜在的治疗靶点来消除它。

参考文献

- [1] Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia; coming of age[J]. Hematology Am SOC Hematol Educ Program, 2012(1): 35-42.
- [2] Bachas C, Schuurhuis GJ, Assaraf YG, et al. The role of minor subpopulations within the leukemic blast compartment of AML patients at initial diagnosis in the development of relapse[J]. Leukemia, 2012, 26(6): 1313-1320.
- [3] Ravandi F. Relapsed acute myeloid leukemia; why is there no standard of care? [J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2013, 26(3): 253-259.
- [4] Jaso JM, Wang SA, Jorgensen JL, et al. Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: past, present and future[J]. Bone marrow transplantation, 2014, 49(9): 1129-1138.
- [5] Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations [J]. Blood, 2012, 120(15): 2963-2972.
- [6] Coustan-Smith E, Campana D. Should evaluation for minimal residual disease be routine in acute myeloid leukemia? [J]. Current opinion in hematology, 2013, 20(2): 86-92.
- [7] Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia; results of the AML02 multicentre trial[J]. The lancet oncology, 2010, 11(6): 543-552.
- [8] Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia[J]. Am J Clin Pathol, 2009, 131(1): 16-26.
- [9] Feller N, van der Velden VH, Brooimans RA, et al. Defining consensus leukemia-associated immunophenotypes for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia in a multicenter setting [J]. Blood Cancer J, 2013, 3(8): e129.
- [10] 张之南, 杨天楹, 郝玉书. 血液病学(上册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [11] Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The use of receiver operating characteristic analysis for detection(下转第 3737 页)

的“病例分析”方面优势更为明显($t=33.538, P=0.000$)。因此, PBL 教学法对培养学生临床思维能力、独立思考能力、科学探索和创新能力更为有效; 更能激发学生潜能、提高实际操作能力, 可能对培养出真正能满足临床需求的应用型人才更有效。

参考文献

[1] 邱文洪, 艾永循, 郭凯文, 等. PBL 模式在临床医学专业教育中的应用及思考[J]. 基础医学教育, 2013, 15(2): 174-176.

[2] 毛海青, 张意志. LBL 结合 CBL 教学模式在骨外科教学中的探索[J]. 基础医学教育, 2013, 15(1): 61-63.

[3] 程丕显, 洪敏, 李吉庆, 等. 适应 21 世纪基础医学实验课教学改革思考与实践[J]. 山西医科大学学报: 基础医学教育版, 2000, 6(S1): 136.

[4] 周昌龙, 贺学农, 夏小辉, 等. 以问题为导向的教学方法在神经外科学临床实习中的应用与研究[J]. 重庆医学, 2014, 43(5): 633-634.

[5] Flynn AB, Biggs R. The development and implementation of a problem-based learning format in a fourth-year undergraduate synthetic organic and medicinal chemistry laboratory course[J]. J Chem Educ, 2012, 89(1): 52-57.

[6] 黄育妆, 陈利国, 董军, 等. PBL 教学模式的理论及应用[J]. 中国高等医学教育, 2012, 14(2): 11-12.

[7] 汪青. 国内医学院校 PBL 教学模式的应用现状及问题剖析[J]. 复旦教育论坛, 2010, 18(5): 88-91.

[8] Azzalis LA, Giavarotti L, Sato SN, et al. Integration of basic sciences in health's courses[J]. Biochem Mol Biol Educ, 2012, 40(3): 204-208.

[9] 吕琳, 梅浙川. 以问题为基础的教学模式在留学生消化内科见习中的应用及评价[J]. 重庆医学, 2013, 42(36): 4479-4480.

[10] 文艳平. PBL 对不同水平学生影响的研究[J]. 中国高等医学教育, 2007, 7(12): 1-3.

[11] 车春莉, 郭庆峰, 张一梅, 等. PBL 教学模式在中国高等医学教育中应用的思考[J]. 中国高等医学教育, 2010, 12(1): 126-127.

[12] 夏颖颖, 顾兵, 黄珮珺, 等. 案例式教学在我国医学教育中的应用进展[J]. 西北医学教育, 2011, 19(5): 923-925.

[13] 胡兆华, 艾文兵, 简道林. PBL 教学模式在医学教育运用中的问题与建议[J]. 南方医学教育, 2011, 3(8): 26-35.

(收稿日期: 2015-03-08 修回日期: 2015-06-18)

(上接第 3713 页)

of minimal residual disease using five - color multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia identifies patients with high risk of relapse[J]. Cytometry Part B: Clinical Cytometry, 2009, 76(2): 91-101.

[12] Kern W, Voskova D, Schoch C, et al. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2004, 104(10): 3078-3085.

[13] Loken M R, Alonzo T A, Pardo L, et al. Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia; a report from Children's Oncology Group [J]. Blood, 2012, 120(8): 1581-1588.

[14] Inaba H, Coustan-Smith E, Cao X, et al. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia [J]. J Clin Oncol, 2012, 30(29): 3625-3632.

[15] Bastos - Oreiro M, Perez - Corral A, Martínez - Laperche C, et al. Prognostic impact of minimal residual disease analysis by flow cytometry in patients with acute myeloid leukemia before and after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation [J]. Eur J Haematol, 2014, 93

(3): 239-246.

[16] Walter R B, Gooley TA, Wood BL, et al. Impact of pre-transplantation minimal residual disease, as detected by multiparametric flow cytometry, on outcome of myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia [J]. J Clin Oncol, 2011, 29(9): 1190-1197.

[17] Anthias C, Dignan FL, Morilla R, et al. Pre-transplant MRD predicts outcome following reduced-intensity and myeloablative allogeneic hemopoietic SCT in AML [J]. Bone marrow transplantation, 2014, 49(5): 679-683.

[18] Díez-Campelo M, Pérez-Simón JA, Pérez J, et al. Minimal residual disease monitoring after allogeneic transplantation may help to individualize post - transplant therapeutic strategies in acute myeloid malignancies [J]. Am J Hematol, 2009, 84(3): 149-152.

[19] Jawad M, Yu N, Seedhouse C, et al. Targeting of CD34+ CD38-cells using Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in combination with tipifarnib (Zarnestra) in Acute Myeloid Leukaemia [J]. BMC cancer, 2012, 12(1): 431.

[20] Majeti R. Monoclonal antibody therapy directed against human acute myeloid leukemia stem cells [J]. Oncogene, 2011, 30(9): 1009-1019.

(收稿日期: 2015-04-08 修回日期: 2015-07-11)