

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.29.008

# 微小残留白血病检测在 AML 治疗及预后判断中的意义

文 钦<sup>1</sup>, 陈 果<sup>1</sup>, 钟江帆<sup>2</sup>

(1. 第三军医大学新桥医院全军血液病中心, 重庆 400037; 2. 美国南加州大学 keck 医学院 90089-0641)

[关键词] 微小残留白血病; 急性髓细胞白血病; 治疗; 预后

[中图分类号] R733.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)29-4054-03

急性髓细胞白血病(AML)是较为常见的造血系统恶性克隆性疾病,尤其是成人急性白血病。据国外文献报道,大剂量化疗后完全缓解率约为 50%~80%,但由于缓解后复发,仅 30%~40%的年轻患者,不及 20%的老年患者能达到长期无病生存<sup>[1-3]</sup>。究其根源,微小残留白血病(MRD)是导致白血病复发的重要原因,对于微小残留病变,目前尚无统一标准定义,但现有的技术可以在一定程度上对 MRD 进行相关指标的检测,现有的研究也表明,利用多参数流式细胞技术(multiparameter flow cytometry, MFC)以及实时荧光定量 PCR(RQ-PCR)等手段监测 MRD 对于明确诊断后治疗决策的选择以及治疗后预后判断均有重要意义<sup>[4-5]</sup>。以下就 MRD 相关指标的检测在 AML 治疗及预后中的研究及应用进展进行阐述。内容涉及 MRD 检测方法简述、MRD 检测与 AML 危险度分层及治疗决策及 MRD 检测与疾病预后。

## 1 MRD 检测方法

MRD 定义为急性白血病完全缓解后体内残留微量白血病细胞的状态。即患者症状、骨髓及外周血形态学以及病理学检测提示完全缓解,但体内仍存在白血病细胞的情形。因此 MRD 检测主要利用细胞遗传学、分子遗传学及免疫学技术,曾有文献报道过细胞培养的方法,即在体外培养条件下靠特定的培养条件来实现对白血病细胞的筛选及鉴别,但这种方法阳性率低,很难控制条件,且对能够生长的细胞仍需进行相关鉴定。同样,早期的核型分析及免疫学方法由于敏感性较低近年相关研究较少也不在此处赘述<sup>[6]</sup>。目前用于检测 MRD 的主要方法为 MFC 以及 RQ-PCR。

**1.1 MFC** 该方法适用于大多数的 AML 患者,因为其测定的是完整的细胞,并能结合细胞分选进一步进行细胞亚型分析。对于目标基因为罕见的突变基因者,流式细胞术更具可行性。相对于 RQ-PCR,还有一个重要优势在于成本低<sup>[7]</sup>。Lacombe 等<sup>[8]</sup>报道,相对于传统的流式细胞技术,多参数的设置将显著提高 MRD 检测的可靠性及灵敏度,适当的参数设置可使其灵敏度提高到约  $10^3 \sim 10^4$ 。

**1.2 RQ-PCR** 近年来兴起的 RQ-PCR 技术是一种将荧光基团加入 PCR 反应体系,利用荧光信号的累积实现对整个 PCR 反应进程的实时监测,并对起始模板进行定量分析的方法。有别于普通 PCR 在反应结束后对终产物的定量分析,RQ-PCR 技术在扩增的指数期对起始模板进行定量。该技术的飞速发展对 MRD 分子遗传学检测带来了新的突破,利用这项技术,可以针对已知的异常融合基因、突变基因及过表达基因进行检测,其灵敏度可达  $10^3 \sim 10^5$ <sup>[9-10]</sup>。

## 2 MRD 检测在白血病分层及治疗决策选择中的意义与现状

细胞遗传学的异常可以说是评估白血病患者危险程度及

判断其预后的最可靠的指标。每当收治 AML 患者时,首要的任务就是对其危险程度进行判断和分层,然后据此制订接下来的诊疗计划。例如,一位患者本应属于低危组,那么如果将其按照高危组进行大剂量化疗或者异基因造血干细胞移植,显然对病情并不十分有利,反之亦然。国外调查显示,成年 AML 患者中约有 50%能检出有意义的克隆性染色体改变,根据细胞遗传学检测可将 AML 患者危险程度分为高、中、低危 3 组,处于高危组的患者长期生存率仅 5%~10%<sup>[11]</sup>。细胞遗传学方法评估白血病危险度有利于高危组和低危组的鉴别,但是对于中危组,尤其是一些有罕见异常基因的患者,这项检查的可靠性仍不尽如人意,随着近年来越来越多新的分子标记被发现并鉴定,细胞遗传学检测技术能检测的范围也将得到极大的扩展,有助于更可靠地评估 AML 危险度。

细胞遗传学检测技术的发展使白血病的治疗效果有了进一步提高,但是必须看到,利用细胞遗传学技术进行危险度分层依然困难重重。(1)前文提及的一些罕见的基因突变。事物是发展变化的,各种新的基因改变层出不穷,现有的技术如何来适应这种变化,如何在这种情况下达到较高的检测可靠性,以适应临床诊疗活动的需要,无论对研究者还是临床工作者都是一项艰巨的任务。(2)在日益强调治疗个体化的今天,每位患者因其具体情况的不同,所接受的治疗方案也不同,文献报道,使用不同治疗方案最终的复发率有很大的差异。

对于 AML,约 40%患者可检出 NPM1 突变而不伴有 FLT3-ITD 基因突变,这类患者的危险程度相对于 FLT3-ITD 基因联合突变的患者来说较低,前者有较好的治疗反应,经标准化治疗后平均无病生存期也较后者更长。综合以上,将细胞遗传学检测结果与患者的治疗方案及治疗结果相结合来评估 AML 患者的危险程度,采取相应的治疗手段更为合适。对于儿童 AML 进行类似分析也得出一些相同结论,例如:应当将标危组 MRD 阳性的患者归为高危组<sup>[12]</sup>,从而采用相应的治疗方案。由此可见 MRD 检测对于 AML 的危险度分级以及与之对应的治疗决策的选择具有重要意义。

## 3 MRD 监测在患者预后评估中的意义与应用

临床上不少化疗达完全缓解的患者在随访过程中出现异常基因,短期内疾病复发。当然,相当一部分失访患者往往是在其复发时才返院,大部分患者能检测出细胞遗传学的异常。然而遗传学无异常的患者也不代表绝对不复发,研究报道,即使是检测出较为有利的核型,仍然有少部分患者最终会复发<sup>[13]</sup>。尽管如此,在大多数情况下,白血病细胞学检测往往落后于基因检测,因此对于化疗缓解或移植后患者,MRD 监测有助于提示早期复发,从而采取相应措施予以干预,以期提高治疗成功率,减少复发,延长患者无病生存期。对于移植后患者,

MRD 监测同样有重要意义。以 RQ-PCR 为手段的 MRD 监测可以在异基因造血干细胞移植之后量化检测供、受体细胞比例,同时一定程度上达到预测复发的目的。对于某些已知的基因突变,如前文提及的 NPM1,利用目前已有的技术已能进行残留病的检测,进而早期发现疾病复发的迹象,但对于一些新发现的或者未知的遗传学异常,目前的 MRD 监测仍然做不到。

既往有研究提示嵌合体的检测可用于移植后 MRD 监测。Bader 等<sup>[14]</sup>对 81 例儿童 AML 患者进行监测,结果发现其中 19 例患者嵌合体基因与白血病复发呈正相关,只有供者基因或仅少量嵌合体基因的患者 3 年无病生存率高于嵌合体基因比例高的患者,提示嵌合体基因与白血病复发有关。但是, Huisman 等<sup>[15]</sup>的研究得出的结论与之并不一致,仅在 25% 的患者中找到嵌合体与复发的联系,尽管在移植后 6 个月间两者具有某种联系,但不能作为预测白血病复发的指标。

另外,对于 MRD 监测,研究者选用 NPM1 和 FLT3 突变基因、WT1 基因等作为监测的目标基因,发现相对于联合 FLT3-ITD 基因突变的患者来说,NPM1 突变的患者预后更好<sup>[16]</sup>。WT1 基因则更趋向于一种亚群检测,对预报白血病复发意义不大<sup>[17]</sup>。

Kern 等<sup>[18]</sup>使用 MFC 技术检测 AML 细胞特异性的 LAIPs 信号,该信号与 AML 的发生密切相关,研究发现,检出 LAIPs 阳性细胞的患者在移植后 3~6 周的复发率高达 60%。而 LAIPs 阴性患者则表现出持续缓解。由此推知,利用 MFC 对免疫表型的分析有助于移植后监测 MRD,对患者预后提示作用,但要要将这项技术用于常规的临床实验室检查仍有许多问题需要进一步的研究解决。

#### 4 展 望

随着医学技术的发展,对于 AML 患者,其无病生存率以及生活质量均得到了显著提高。即使是高危患者,也可以采取大剂量化疗,或者造血干细胞移植等手段缓解病情,甚至有望达到长期无病生存。但是,白血病一旦复发,其再次治疗的难度和危险性大大增加,因此,如何减少缓解后复发,如何早期诊断白血病复发并采取适当措施进行医疗干预,在白血病治疗中是极其重要的一环。利用 MFC 和 RQ-PCR 等手段监测 MRD 对于明确诊断后治疗决策的选择以及治疗后预后判断均有重要意义。然而必须看到,现有的实验室检测还远未达到在临床普及的程度,相关的研究仍然需要进一步的深入,对于 MRD 的认识仍有待进一步加深。相信在未来大量研究的支持下,会有一个统一的标准来评估白血病残留的情况,这将极大促进 MRD 监测在临床应用的实施,从而实现白血病复发的早期诊断和早期干预。

#### 参考文献

- [1] Lo WG. Strategies in the treatment of acute myeloid leukemia[J]. Haematologica, 2004, 89(9): 1029-1032.
- [2] Suciu S, Mandelli F, De Witte T, et al. Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMAAML-10 trial[J]. Blood, 2003, 102(4): 1232-1240.
- [3] Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RM, et al. Random-

ised comparison of addition of autologous bone marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia in first remission: results of MRC AML10 trial[J]. Lancet, 1998, 351(9104): 700-708.

- [4] Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2012, 119(2): 332-341.
- [5] Courtney D, Nardo D, Selina M. Beyond morphology: minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. [J]. Curr Opin Hematol, 2012, 19: 82-88.
- [6] 陈琳军, 丁训杰. 微量残留白血病检测方法研究进展[J]. 肿瘤, 1998, 18(2): 58-60.
- [7] Grimwade D, Vyas P, Freeman S. Assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia[J]. Curr Opin Oncol, 2010, 22(6): 656-663.
- [8] Lacombe F, Arnoulet C, Maynadié M, et al. Early clearance of peripheral blasts measured by flow cytometry during the first week of AML induction therapy as a new Independent prognostic factor: a GOELAMS study[J]. Leukemia, 2009, 23(2): 350-357.
- [9] Shook D, Coustan-Smith E, Ribeiro RC, et al. Minimal residual disease quantitation in acute myeloid leukemia[J]. Clin Lymphoma Myeloma, 2009, 9 Suppl 3: S281-285.
- [10] Santamaria C, Chillón MC, Fernández C, et al. Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia[J]. Haematologica, 2007, 92(3): 315-322.
- [11] Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials[J]. Blood, 2010, 116(3): 354-365.
- [12] Alonzo TA, Go PA, Gerbing RB, et al. Conventional cytogenetics molecular profiling, and flow cytometric response data allow the creation of a two-tiered risk-group system for risk-based therapy allocation in childhood AML-a report from the children's oncology group[J]. Blood, 2010, 116(21): 334-335.
- [13] Campana D. Determination of minimal residual disease in leukemia patients[J]. Br J Haematol, 2003, 121(6): 823-838.
- [14] Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, et al. Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective[J]. Bone Marrow Transplant, 2004, 33(8): 815-821.
- [15] Huisman C, De Weger RA, De Vries L, et al. Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia[J]. Bone Marrow Transplant, 2007, 39(5): 285-291.
- [16] Schnittger S, Kern W, Tschulik C, et al. Minimal residual

disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML [J]. Blood, 2009, 114(11): 2220-2231.

- [17] Barragan E, Pajuelo JC, Ballester S, et al. Minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia by mutant nucleophosmin (NPM1): comparison with WT1 gene expression [J]. Clin Chim Acta, 2008, 395(1/2): 120-123.

- [18] Kern W, Danhauser-Riedl S, Ratei R, et al. Detection of

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.29.009

minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry for definition of leukemia-associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow [J]. Haematologica, 2003, 88(6): 646-653.

(收稿日期: 2015-04-08 修回日期: 2015-07-21)

## 骨髓基质细胞相关分子在急性髓系白血症发生、发展中的表达及意义<sup>\*</sup>

向茜茜 综述, 张 曦<sup>△</sup>, 杨世杰 审校

(全军血液病中心/第三军医大学新桥医院血液科, 重庆 400037)

[关键词] 白血病, 髓细胞, 急性; 黏附分子; 细胞外基质

[中图分类号] R733.71

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)29-4056-03

造血微环境是由骨髓基质细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) 和细胞外基质 (ECM) 构成, 其对造血干细胞定居、增殖、分化、发育和成熟起到重要的支持和调节作用<sup>[1]</sup>。BMSCs 是起源于胚胎发育的间充质干细胞, 可分化产生成纤维细胞、内皮细胞、成骨细胞、脂肪细胞、巨噬细胞等, 在造血干/祖细胞的定居、增殖、分化、发育、成熟、释放、迁移、凋亡等生理病理过程中发挥重要作用。正常的造血过程需要造血干细胞和造血微环境之间复杂的双向相互作用, 一旦微环境的性质和功能发生改变, 将会对造血干细胞的性状和功能产生较大的影响, 导致白血病的发生。急性髓系白血病 (acute myelogenous Leukemia, AML) 是造血系统的克隆性疾病, 源于造血干细胞的恶性增殖, 产生无效造血, 具有较强的植入和侵袭能力。较多的研究指出 AML 患者的 BMSCs 出现了重要的性质和功能的改变, 且其数量有明显地减少, 对未成熟的造血细胞支持能力减弱。BMSCs 是造血微环境的重要组成部分, 通过与白血病细胞的黏附作用、分泌细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 在 AML 的发生、发展中起重要作用。

### 1 BMSCs 与急性白血病细胞的黏附作用

BMSCs 和白血病细胞表面均表达多种黏附分子, 根据黏附分子其编码基因结构的同源性及产物的功能特点, 将其分为 6 个家族, 包括免疫球蛋白家族、钙黏素家族、选择素家族、血管附着素家族、整合素家族及 CD44 等黏附分子家族。这些黏附分子介导了细胞与细胞、细胞与细胞外基质的直接接触, 通过这些黏附作用发挥各自的作用。正是 BMSCs 和白血病细胞间的相互接触, 使 BMSCs 对白血病细胞的存活和增殖发挥了重要的调节作用。

血管细胞黏附分子 1 (VCAM1) 是免疫球蛋白超家族中的重要成员, 表达于骨髓间质细胞、血管内皮细胞及一些造血细胞, 主要为 BMSCs 所分泌。VCAM1 是整合素家族 B1 组 VLA-4 的配体, VCAM1 与 VLA-4 共同介导了造血细胞对间质细胞和细胞外基质的黏附, 在干细胞的归巢方面起重要作用。间质细胞表面黏附分子的改变, 引起了骨髓龛中造血细胞

和间质细胞的交互作用, 导致机制信号的损害, 出现肿瘤基因突变和基因的不稳定性, 从而形成不正常的间质微环境, 使造血细胞分化受阻。国内外均有报道显示, 在初诊 AML 骨髓基质细胞中 VCAM1 呈低水平表达<sup>[2-5]</sup>。VCAM-1 及 VLA-4 两者相互作用后还可能使干细胞不能接受正常的增殖分化信号, 从而出现白血病干细胞的无限增生和分化受阻, 促进了白血病细胞的恶性增殖<sup>[4,6]</sup>。国内李学刚等<sup>[2]</sup>研究表明, AML 患者复发期骨髓基质细胞培养液中 VCAM-1 的水平高于缓解期, 其在有髓外浸润患者中表达增高, 推测可能与 AML 的复发及髓外浸润具有一定的相关性。

细胞间黏附分子 1 (ICAM-1, CD54), 是目前研究最多的黏附分子, 表达于骨髓造血细胞和 BMSCs, 主要表达于血管内皮细胞上, 其配体为 LFA-1 (CD11a)。两者通过参与 BMSCs 与肿瘤细胞的黏附和对肿瘤细胞免疫杀伤这两个过程, 影响肿瘤细胞的存活与侵袭力。国内有研究报道, 通过对 AML 基质细胞上 ICAM-1 分子进行检测, 结果显示其阳性率高于正常对照组; 且经 DA 方案化疗后, ICAM-1 阳性率高的患者比阳性率低的患者疗效差<sup>[7]</sup>。ICMA-1 这种黏附特性的增强, 有利于白血病细胞在受损的微环境下的增殖、侵袭能力增强, 白血病细胞的自我保护及抗药性提高, 可能使残留白血病细胞重新获得增殖优势。

黏附分子对诱导白血病细胞耐药和抑制其凋亡产生了重要的作用<sup>[8]</sup>。已有研究表明, 骨髓中神经细胞黏附分子 (NCAM, CD56)、ICAM-1、VCAM-1 表达的增高, 与白血病细胞的髓外浸润密切相关, AML 细胞可能通过黏附机制介导其浸润的发生<sup>[9-10]</sup>。

钙黏素是介导  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性细胞间黏附的一大类黏附分子, 属于跨膜糖蛋白家族, 已知一定类别和分化阶段的造血细胞及 BMSCs 表达 E-钙黏素、N-钙黏素、VE-钙黏素。E-钙黏蛋白 (E-cadherin, CDH1) 是黏附分子钙黏蛋白超家族的重要成员, 主要表达于上皮细胞, 为一种膜糖蛋白, 形成关键的细胞间黏附。有研究报道 E-cadherin 在 AML 的 BMSCs 中被检测

<sup>\*</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81270569)。 作者简介: 向茜茜 (1985—), 硕士, 主治医师, 主要从事造血微环境、急性白血病的基础及临床研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, Tel: (023) 68755609; E-mail: zhangxxi@sina.com。