

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.35.012

流式技术监测急性白血病微小残留病的临床研究

蒋莉梅,马慧,李玲,白晓川[△]

(宁夏医科大学总医院血液内科 750004)

[摘要] 目的 探讨流式细胞术(FCM)动态监测白血病微小残留病(MRD)对判断成年急性白血病(AL)患者(非 M3)复发、预后及指导个体化治疗的临床意义。方法 搜集该院 76 例 AL 患者资料,以 1×10^{-4} 为 MRD 阈值,分别统计急性髓细胞白血病(AML)和急性淋巴细胞白血病(ALL)患者在治疗缓解后 3、6、12 及 12 个月后 MRD 检测结果、复发率及生存状况。结果 57 例 AML 患者在首次完全缓解(CR)3 个月及 12 个月后 MRD 阳性组的复发率显著高于阴性组($P < 0.05$);CR 后 12 个月,两组复发率差异无统计学意义($P = 0.586$);4 个阶段中 MRD 阴性、阳性组中位无进展生存期(RFS)差异均有统计学意义($P < 0.05$)。19 例 ALL 患者在 CR 后 12 个月及 12 个月后,MRD 阳性组复发率显著高于阴性组($P < 0.05$);在 CR 后 3、6 个月,两组复发率差异无统计学意义($P > 0.05$);4 个阶段中 MRD 阴性、阳性组中位 RFS 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 动态监测成年 AL 患者 CR 后 MRD 可预测复发及预后,为临床个体化治疗提供依据。

[关键词] 白血病,双表型,急性;流式细胞术;微小残留病;复发,预后

[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)35-4487-04

Clinical research on flow cytometry technique for monitoring minimal residual disease in acute leukemia

JIANG Limei, MA Hui, LI Ling, BAI Xiaochuan[△]

(Department of Hematology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

[Abstract] **Objective** To research the clinical significance of dynamically monitoring minimal residual disease(MRD) in acute leukemia by flow cytometry (FCM) for judging non-M3 recurrence, prognosis and guiding the individualized treatment in the patients with adult acute leukemia (AL). **Methods** The data in 76 cases of AL in this hospital were collected. With 1×10^{-4} as the MRD threshold, the MRD detection results, recurrence rate and survival status at 3, 6, 12 months and 12 months later after complete remission (CR) in the patients with acute myelocytic leukemia (AML) and acute lymphocytic leukemia (ALL) were statistically analyzed. **Results** In 57 cases of AML, the recurrence rate at 3 months after initial remission and 12 months later in the MRD positive group was significantly higher than that in the MRD negative group ($P < 0.05$); the recurrence rate at 12 months after CR had no significant difference between the two groups ($P = 0.586$); in the four stages, the difference between MRD negative and positive median recurrence-free survival(RFS) had statistical significance. In 19 cases of ALL, the recurrence rate at 12 months after initial remission and 12 months later in the MRD positive group was significantly higher than that in the MRD negative group ($P < 0.05$); the recurrence rate at 3, 6 months after CR had no statistically significant difference between the two groups ($P > 0.05$); the median RFS in the four stages had statistical difference between the MRD negative and MRD positive ($P < 0.05$). **Conclusion** Dynamically monitoring MRD after CR can predict the recurrence and prognosis in the adult patients with AL, which can provide a basis for individualized treatment in clinic.

[Key words] leukemia, biphenotypic, acute; flow cytometry; minimal residual disease; recurrence; prognosis

现有标准方案已使绝大多数初治急性白血病(acute leukemia, AL)得到缓解。但大部分 AL 患者疾病复发仍是影响患者长期生存白血病微小残留,及预后的主要问题,一旦复发,治疗难度明显增加。复发的

根本原因是患者体内存在白血病微小残留病(minimal residual disease, MRD)是指 AL 患者在经诱导治疗缓解后用骨髓细胞形态学方法难以检测出的体内残留少量白血病细胞的状态^[1]。应用流式细胞数

(FCM)监测 MRD 动态变化能更早发现白血病复发迹象,以便及早临床干预,减少复发,改善生存。本研究通过回顾性分析应用 FCM 动态监测成年 AL 患者在完全缓解(CR)后不同时间段内 MRD 的变化情况,探讨此项技术对判断 AL 患者复发风险、评价其预后及指导个体化治疗的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009 年 9 月 30 日至 2016 年 6 月 7 日在本院确诊并行化疗达 CR 的 76 例监测过 MRD 的成年 AL 患者(年龄大于或等于 14 岁)的临床资料,其中急性髓细胞白血病(AML)患者(非 M3) 57 例, M1 型 7 例, M2 型 24 例, M4 型 12 例, M5 型 12 例, M6 型 1 例, M7 型 1 例;急性淋巴细胞白血病(ALL)患者 19 例, B-ALL 14 例, T-ALL 3 例, T/B-ALL 2 例。AML 患者中男 34 例,女 23 例,中位年龄 40 岁(14~74 岁)。ALL 患者中男 11 例,女 8 例,中位年龄 29 岁(15~60 岁)。诊断标准及疗效评价参照张之南等主编的第三版《血液病诊断及疗效标准》^[2]。

1.2 治疗方案 确诊患者按照 AL 的标准化疗方案进行诱导治疗,其中 AML 多采用以阿糖胞苷为主的吡柔比星+阿糖胞苷(TA)、米托蒽醌+阿糖胞苷(NA)、伊达比星+阿糖胞苷(HA)等方案, ALL 多采用以长春瑞滨+地塞米松(VP)为基础的吡柔比星+长春瑞滨+培门冬酶+地塞米松(DVLP)、吡柔比星+长春瑞滨+培门冬酶+环磷酰胺+地塞米松(DVLC)等方案。强化巩固治疗多使用原诱导缓解方案及大、中剂量阿糖胞苷单药交替化疗。

1.3 随访 随访时间自确诊时起,至患者复发、死亡或随访截止期 2017 年 1 月 31 日。失访病例随访至末次就诊时间。定义无进展生存期(RFS),为患者达 CR 后至其出现复发、死亡或随访截止期。

1.4 方法

1.4.1 研究方法 搜集 76 例自 2009 年 10 月至 2016 年 6 月于本院确诊 AL 并经诱导治疗达血液学 CR 后监测过 MRD 的成人患者资料,对 AML 及 ALL 患者在 CR 后 3、6、12 及 12 个月后 MRD 阳性及阴性组复发率及 RFS 进行统计学分析。

1.4.2 微小残留检测方法 抽取患者 CR 后不同时间点骨髓液 3~4 mL 肝素钠抗凝,采用 FCM 检测(流式细胞仪由美国 Becton-Dickinson 公司生产),可供选择的单克隆标记方法有 6 色、8 色及 10 色荧光分析,以 CD45/SSC 来设门,定义 $MRD \geq 1 \times 10^{-4}$ 为阳性, $MRD < 1 \times 10^{-4}$ 为阴性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件分析数据,非正态分布的计量资料用中位数表示;计数资料用百分率(%)表示,比较采用 χ^2 或 Fisher 确切概率法。生存曲线比较使用 Kaplan-Meier 法。以 $P < 0.05$ 为差

异有统计学意义。

2 结果

2.1 FCM 检测 MRD 与骨髓细胞形态学结果比较

2.1.1 两种检测方法检出率的比较 76 例 AL 患者检测 MRD 同时行骨髓细胞形态学检查。57 例 AML 患者在随访期采用 FCM 方法内分别检测 1~12 次,中位检测次数 3 次,共检测 234 例次;其中 MRD 阳性 40 例次,阴性 194 例次,阳性检出率为 17.1%;而骨髓形态学检测复发仅 5 例次,CR 结果 229 例次,复发检出率为 2.1%,FCM 检测 MRD 阳性率高于骨髓形态学检测复发检出率($P < 0.05$)。19 例 ALL 患者在随访期内采用 FCM 方法分别检测 1~9 次,中位检测次数 2 次,共检测 57 例次;其中 MRD 阳性 17 例次,阴性 40 例次,阳性检出率为 29.8%;而骨髓形态学检测复发仅 4 例次,CR 结果 53 例次,复发率为 7.0%,FCM 检测 MRD 阳性率高于骨髓形态学检测复发检出率($P < 0.05$)。

2.1.2 两种检测方法阳性与复发时间比较 骨髓形态学检测复发的 5 份 AML 标本中有 1 份在提前于形态学 3 个月发现 MRD 阳性,另外 4 份同时发现 MRD 阳性。骨髓形态学检测复发的 4 份 ALL 标本中有 1 份在提前于形态学 1 个月发现 MRD 阳性,另外 3 份同时发现 MRD 阳性。

2.2 不同治疗阶段 MRD 与复发及无复发生存时间关系

2.2.1 AML 患者

2.2.1.1 AML 患者首次 CR 后 3 个月 此阶段 33 份标本,MRD 阳性组 7 例,6 例均在 3 个月内复发,1 例未复发;MRD 阴性组 26 例,复发 5 例,其中仅 1 例在 MRD 阴性后 6 个月复发;4 例分别在 MRD 阴性后 7~13 个月复发。MRD 阳性组复发率高于 MRD 阴性组($P < 0.05$)。MRD 阳性组及 MRD 阴性组的中位 RFS 分别为 1.0 个月(0~12 个月)、13.5 个月(3~37 个月),差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

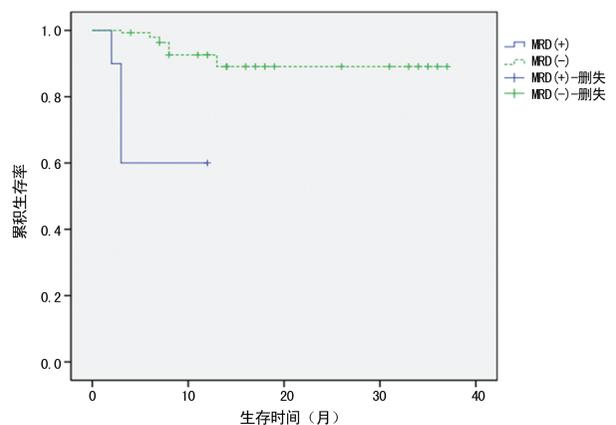


图 1 AML 患者首次 CR 后 3 个月 MRD 阴性及 MRD 阳性组的生存曲线图

2.2.1.2 AML 患者首次 CR 后 6 个月 此阶段 24 份标本均为 MRD 阴性,复发 6 例,分别在 MRD 阴性后 4~15 个月复发,中位 RFS 为 29.0 个月(3~36 个月)。

2.2.1.3 AML 患者首次 CR 后 12 个月 此阶段 35 份标本,MRD 阳性 5 例,复发 2 例,分别在 MRD 阳性后 1、10 个月复发;MRD 阴性 30 例,复发 7 例,分别在 MRD 阴性后 1、3、4、5、6、12、15 个月复发。两组复发率差异无统计学意义($P=0.586$)。MRD 阳性组及阴性组的中位 RFS 分别为 5.0 个月(4~10 个月)、25.0 个月(1~35 个月),两组差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

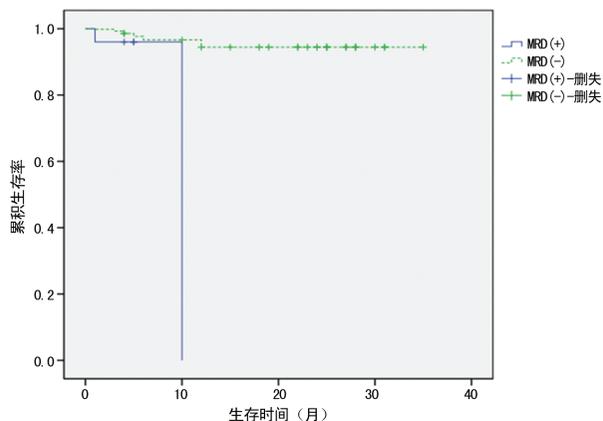


图 2 AML 患者首次 CR 后 12 个月 MRD 阴性及 MRD 阳性组的生存曲线图

2.2.1.4 AML 患者首次 CR 12 个月后 此阶段 142 份标本,MRD 阳性 29 例,复发 12 例(其中 10 例在 MRD 阳性后 6 个月内复发,仅 2 例分别在 MRD 阳性后 7、21 个月复发);MRD 阴性组 113 例,复发 23 例(其中仅 4 例在 MRD 阴性后 6 个月内复发;19 例分别在 MRD 阴性后 7~36 个月复发)。MRD 阳性组复发率高于 MRD 阴性组($P=0.019$)。阳性组及阴性组的中位 RFS 分别为 5.0 个月(0~24 个月)、13.0 个月(1~45 个月),两组差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3。

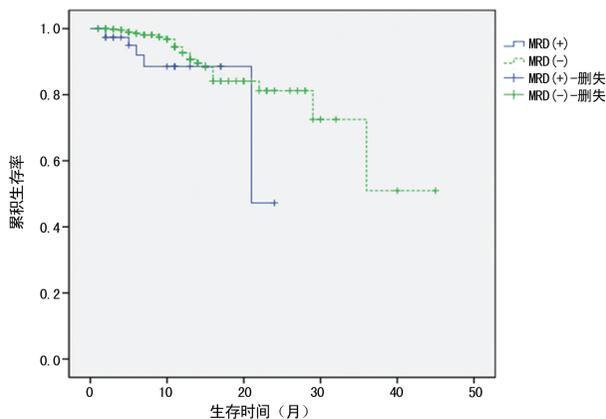


图 3 AML 患者首次 CR 12 个月后 MRD 阴性及 MRD 阳性组的生存曲线图

2.2.2 ALL 患者

2.2.2.1 ALL 患者首次 CR 后 3 个月 此阶段 9 份标本,MRD 阳性 4 例,其中 3 例分别在 MRD 阳性后 7 个月内复发,1 例未复发;MRD 阴性 5 例,仅 1 例在 MRD 阴性后 5 个月复发。两组复发率差异无统计学意义($P=0.206$)。MRD 阳性组及 MRD 阴性组的中位 RFS 分别为 4.5 个月(0~10 个月)、8.0 个月(5~16 个月),两组差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

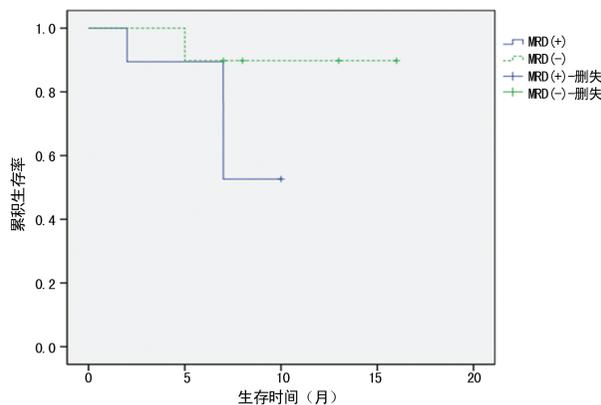


图 4 ALL 患者首次 CR 后 3 个月 MRD 阴性及 MRD 阳性组的生存曲线图

2.2.2.2 ALL 患者首次 CR 后 6 个月 此阶段 9 份标本,MRD 阳性 4 例,其中 2 例在 MRD 阳性后 2 个月内复发;MRD 阴性组 5 例,仅 1 例在 MRD 阴性后 4 月内复发。两组复发率差异无统计学意义($P=0.524$)。MRD 阳性组及 MRD 阴性组的中位 RFS 分别为 3.0 个月(0~5 个月)、24.0 个月(3~27 个月),两组差异有统计学意义($P<0.05$),见图 5。

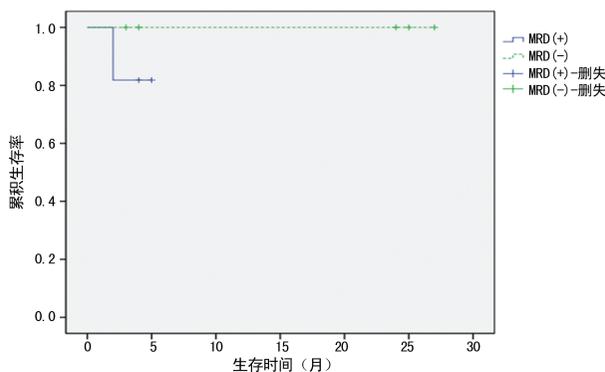


图 5 ALL 患者首次 CR 后 6 个月 MRD 阴性及 MRD 阳性组的生存曲线图

2.2.2.3 ALL 患者首次 CR 后 12 个月 此阶段 11 份标本,MRD 阳性 4 例,其中 3 例分别在 MRD 阳性后 2 个月内复发;MRD 阴性 7 例,均未复发。MRD 阳性组复发率高于 MRD 阴性组($P=0.024$)。MRD 阳性组及阴性组的中位 RFS 分别为 1.5 个月(0~3 个月)、10.0 个月(3~25 个月),两组差异有统计学意义($P<0.05$),见图 6。

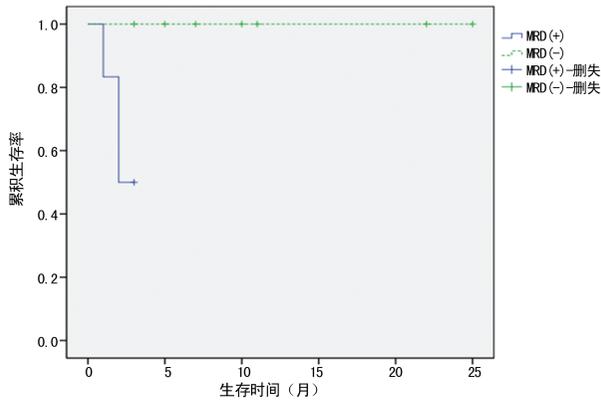


图 6 ALL 患者首次 CR 后 12 个月 MRD 阴性及阳性组的生存曲线图

2.2.2.4 ALL 患者首次 CR 12 个月个后 此阶段 29 份标本,MRD 阳性 6 例,均在 MRD 阳性后 15 个月内复发;MRD 阴性 23 例,仅 3 例分别在 MRD 阴性后 5~11 个月复发。MRD 阳性组复发率高于阴性组 ($P < 0.05$)。MRD 阳性组及 MRD 阴性组的 RFS 分别为 10.0 个月 (0~15 个月)、14.0 个月 (1~24 个月),两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 7。

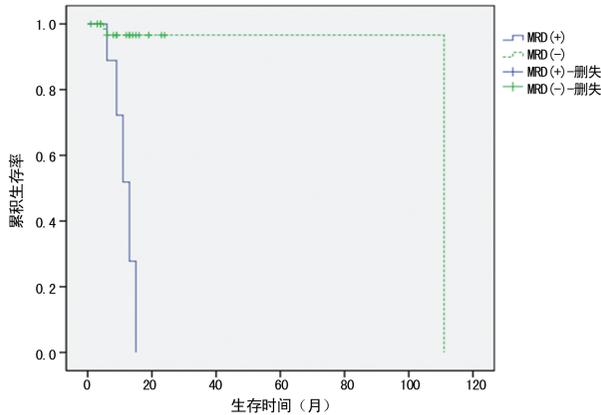


图 7 ALL 患者首次 CR 12 个月个后 MRD 阴性及 MRD 阳性组的生存曲线图

2.3 动态检测 MRD 与治疗转归 57 例 AML 患者检测出 MRD 的中位间隔时间为 3 个月 (1~27 个月)。其中 11 例在骨髓形态学复发前出现 MRD 阳性,中位提前时间为 2 个月 (1~22 个月)。7 例 MRD 阳性后,经加强治疗 MRD 转阴,但部分出现交替转阳。19 例 ALL 患者检测出 MRD 的中位间隔时间为 3 个月 (1~10 个月)。其中有 3 例在形态学复发前出现 MRD 阳性,中位提前时间为 3 个月 (1~6 个月)。

3 讨论

已有研究显示 CR 后 MRD 监测结果是 AL 无病生存的独立预后因素^[3-5]。本研究分析了本院 76 例 AL 患者在首次 CR 后 3、6、12 及 12 个月后的 4 个阶段 MRD 结果,显示 MRD 阳性组患者的中位 RFS 较 MRD 阴性组缩短;且相应阶段 MRD 阳性组生存率

较 MRD 阴性组低,但两组的复发率并非在各阶段都有显著性差异。可能受病例数较少;检测 MRD 的时间点及间隔时间无统一规范;部分患者的随访时间较短,随访期内尚无复发迹象;取材、操作误差等因素影响。而首次 CR 后 3 个月及 12 个月后 MRD 阳性患者的复发相对更多,前者可能提示患者体内白血病细胞存在原发耐药克隆;而后者多次化疗后仍然检出 MRD 阴性,提示存在白血病细胞继发耐药。目前相关研究相对较少, MARSHALL 等^[6]通过临床研究,认为第 1、12、24 个月时 MRD 高水平提示复发意义更大,与本研究基本一致。

本研究还显示,FCM 检测 AL 患者 MRD 阳性率较形态学检测复发率高,多数患者在骨髓形态学复发前即可发现 MRD 阳性,说明 FCM 的灵敏度更高,能更早发现 AL 复发迹象,以便及早采取对策。这与国内外的研究结果基本一致。

有关 MRD 检测时间点及时间间隔,目前尚不统一,但普遍认为在 AL 诱导缓解及巩固治疗后的时间段内检测对判断预后意义更大,时间间隔建议是每 3 个月检测 1 次^[7-8]。有关检测 MRD 的时间间隔,或许根据不同时间段 MRD 的具体值及变化趋势来制定,可能对指导患者的后续治疗更有帮助。

有关 FCM 检测 MRD 的阳性阈值,众多研究之间差异较大,从 7.5×10^{-5} ~ 1.0×10^{-2} 不等,但大多采用的是 0.01% 作为 MRD 阳性阈值^[9-11]。本研究也是以 1×10^{-4} 为 MRD 阳性阈值。此外,单次 MRD 阳性的患者在随访期内并非都出现骨髓形态学复发,而连续数次 MRD 阳性患者更容易出现骨髓形态学复发;且多次 MRD 阳性的患者如出现单次 MRD 阴性则仍需后续的监测。只有连续动态监测 MRD 水平的变化才能对 AL 患者的复发及预后判断提供可靠的临床依据。此外,部分患者 MRD 的检测结果是交替变化的,提示随着治疗的更改,MRD 的检测结果可出现一定程度的变动,所以将 FCM 检测 MRD 结果作为判断治疗效果的惟一指标尚不可取。有条件者应当借助更为灵敏的检测方法如分子学、基因测序等查找 MRD。已有文献提出增加 AL 患者缓解及治愈的分子学诊断标准^[12-13]。

综上,FCM 动态监测 MRD 对判断 AL 患者的复发、预后及指导个体化治疗有较大的临床价值。但目前 MRD 检测时间、间隔时间及阳性阈值等尚无统一标准。此外,提高检测灵敏度也是亟待解决的问题之一。

参考文献

[1] FADERL S, KANTARJIAN H M, (下转第 4496 页)

乏力和出血症状,伴有重现性遗传异常的 AML-M3 和 DNMT3A 基因突变。

参考文献

- [1] 王会芳,苏显都,于彩霞,等. 125 例成人急性髓系白血病免疫表型特点分析[J]. 解放军医学院学报,2015(4):363-367.
- [2] VARDIMAN J W, HARRIS N L, BRUNNING R D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms[J]. *Blood*,2002,100(7):2292-2302.
- [3] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:106.
- [4] SHAFFER L G, MCGOWAN-JORDAN J, SCHMID M. ISCN(2013): An international system 9 for human cytogenetic nomenclature [M]. Basel, Switzerland: Karger, 2013:16-31.
- [5] 胡婷. 342 例急性白血病免疫表型分析及 CD44、CD87、CD123 在急性白血病中表达的意义[D]. 南昌:南昌大学,2015.
- [6] 郭睿,沈安俐,王琰,等. CD56 阳性急性髓系白血病患者的免疫表型分析[J]. 中国实验血液学杂志,2015,23(5):1231-1234.
- [7] 杨林林,甘思林,刘延方,等. CD56⁺ 急性单核细胞白血病的临床特征及预后分析[J]. 中国实验血液学杂志,2013,

21(3):596-600.

- [8] IRIYAMA N, HATTA Y, TAKEUCHI J, et al. CD56 expression is an Independent prognostic factor for relapse in acute myeloid leukemia with t(8;21)[J]. *Leuk Res*,2013,37(9):1021-1026.
- [9] MONTESINOS P, RAYON C, VELLENGA E, et al. Clinical significance of CD56 expression in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based regimens[J]. *Blood*, 2011, 117(6):1799-1805.
- [10] HOPFER O, KOMOR M, KOEHLER I S, et al. Aberrant promotor methylation in MDS hematopoietic cells during in vitro lineage specific differentiation is differently associated with DNMT isoforms[J]. *Leuk Res*,2009,33(3):434-442.
- [11] MARKOVÁ J, MICHKOVÁ P, BURCKOVÁ K, et al. Prognostic impact of DNMT3A mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia[J]. *Eur J Haematol*,2012,88(2):128-135.
- [12] MEDEIROS B C. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia[J]. *N Engl J Med*,2009,360(17):10.

(收稿日期:2018-05-18 修回日期:2018-08-02)

(上接第 4490 页)

- TALPAZ M, et al. Clinical significance of minimal residual disease in leukemia[J]. *Int J Oncol*,2000,17(6):1277-1287.
- [2] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:131-133.
- [3] BUCCISANO F, MAURILLO L, DEL PRINCIPE M I, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia [J]. *Blood*,2012,119(2):332-341.
- [4] BRÜGGEMANN M, RAFF T, FLOHR T, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*,2006,107(3):1116-1123.
- [5] PETERS J M, ANSARI M Q. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia[J]. *Arch Pathol Lab Med*,2011,135(1):44-54.
- [6] MARSHALL G M, HABER M, KWAN E, et al. Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Clin Oncol*,2003,21(4):704-709.
- [7] RUBNITZ J E, INABA H, DAHL G, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia; results of the AML02 multicentre trial [J]. *Lancet Oncol*,2010,11(6):543-552.
- [8] BUCCISANO F, MAURILLO L, DEL PRINCIPE M I, et

al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia [J]. *Blood*,2012,119(2):332-341.

- [9] BUCCISANO F, MAURILLO L, DEL PRINCIPE M I, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia [J]. *Blood*,2012,119(2):332-341.
- [10] LEUNG W. Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia[J]. *Blood*,2012,120(2):468-472.
- [11] 徐翀,何妙侠,郑建明. 儿童急性淋巴细胞白血病微小残留病检测及其进展[J]. 检验医学,2013,28(04):342-347.
- [12] SAN MIGUEL J F, VIDRIALES M B, L? PEZ-BERGES C, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and May contribute to postinduction treatment stratification [J]. *Blood*, 2001, 98(6):1746-1751.
- [13] KERN W, BACHER U, HAFERLACH C, et al. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*,2010,23(3):379-390.

(收稿日期:2018-06-20 修回日期:2018-09-04)