

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.17.020

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190715.1450.006.html(2019-07-16)

## FLT3-ITD 基因阳性急性髓系白血病的免疫表型及临床特征研究\*

吴国才<sup>1</sup>, 杨志刚<sup>1</sup>, 李庆华<sup>2</sup>, 马境志<sup>2</sup>

(1. 广东省湛江中心人民医院血液风湿科 524000; 2. 广东医科大学附属第一医院血液内科, 广东湛江 524000)

**[摘要]** **目的** 探讨急性髓系白血病(AML)患者 FMS 样酪氨酸激酶 3 内部串联重复序列(FLT3-ITD)的免疫表型特征及血小板(PLT)、血红蛋白(Hb)水平等临床指标变化。**方法** 选取广东医科大学附属第一医院血液内科 2016 年 5 月至 2018 年 11 月收治的 140 例 AML 患者为观察对象,其中 FLT3-ITD 阳性 25 例(阳性组),FLT3-ITD 阴性 115 例(阴性组)。回顾性分析 AML 患者 FLT3-ITD 阳性及阴性的免疫表型,并观察临床指标特点,同时结合相关文献进行总结分析。**结果** 与阴性组患者比较,阳性组患者免疫表型 CD33、CD56、CD7 表达率及外周血白细胞计数(WBC)、骨髓白血病细胞占比均明显升高,而 CD117 表达率明显降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );但两组患者的 Hb 及 PLT 水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );阴性组患者的治疗总反应率高于阳性组患者(72.63% vs. 40.91%),两组患者治疗总反应率比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** AML 患者的白血病细胞抗原与 FLT3-ITD 基因型有关,FLT3-ITD 阳性患者的淋系抗原 CD56、CD7 及髓系抗原 CD33 均呈高表达,而髓系抗原 CD117 呈低表达,且治疗缓解率低。

**[关键词]** 急性髓系白血病;FMS 样酪氨酸激酶 3 内部串联重复序列;基因型;临床特征;免疫表型;完全缓解率

[中图法分类号] R363

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)17-2964-03

## Immunophenotype and clinical features of acute myeloid leukemia with positive FLT3-ITD\*

WU Guocai<sup>1</sup>, YANG Zhigang<sup>1</sup>, LI Qinghua<sup>2</sup>, MA Jingzhi<sup>2</sup>

(1. Department of Hematology and Rheumatology, Zhanjiang Central People's Hospital, Zhanjiang, Guangdong 524000, China; 2. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524000, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the immunophenotypic features of FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication (FLT3-ITD) and the changes of clinical indexes, such as platelet (PLT) and hemoglobin (Hb) level, in patients with acute myelogenous leukemia (AML). **Methods** 140 AML patients admitted to the department of hematology of affiliated hospital of Guangdong Medical University from May 2016 to November 2018 were selected as the observation objects. Among them, 25 cases were positive for FLT3-ITD (the positive group), and 115 cases were negative (the negative group). The immunophenotypes of AML patients with positive FLT3-ITD and negative FLT3-ITD were prospectively analyzed, and the characteristics of clinical indexes were observed. At the same time, relevant literatures were combined for summary and discussion. **Results**

The expression rates of immunopathotype CD33, CD56 and CD7, white blood cells (WBC) count and proportion of leukemia cells in peripheral blood of FLT3-ITD positive AML patients were higher than those of FLT3-ITD negative AML patients, while the expression rate of CD117 was lower, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). However, there was no significant change in Hb and PLT levels ( $P > 0.05$ ). The total response rate in FLT3-ITD negative patients was higher than those in FLT3-ITD positive patients (72.63% vs. 40.91%), and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Leukemia cell antigen in AML patients is associated with genotype FLT3-ITD. In FLT3-ITD positive patients, lymphoid antigen CD56, CD7 and myeloid antigen CD33 show high expression, while myeloid antigen CD117 shows low expression and low remission rate.

**[Key words]** acute myeloid leukemia; FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication; genotype; clinical features; immunophenotype; complete response rate

\* 基金项目:广东省科学技术厅关于下达 2014 年度省公益研究与能力建设专项资金项目(2014A020212300)。

作者简介:吴国才

(1979—), 副主任医师, 硕士, 主要从事血液病诊治、造血干细胞移植及 ITP 发病机制研究。

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是成人最常见的急性白血病,患病率在年轻人群中为 2/10 万人~3/10 万人,老年群体则有所上升,为 13/10 万人~15/10 万人<sup>[1-2]</sup>。随着近年医学研究及技术的进步,给予患者规范化化疗及采取造血干细胞移植等手段提高了临床治愈率,相关数据显示治愈最高可达 50%以上<sup>[3-4]</sup>。相关文献提示 AML 的整个发生、发展是一个多因素参与过程,而在这个过程中,酪氨酸激酶受体通路起着一定的作用,研究显示酪氨酸激酶受体通路会促进细胞的分化<sup>[5]</sup>。有研究发现,FMS 样酪氨酸激酶 3 内部串联重复序列(FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication, FLT3-ITD)与 AML 的治疗反应及预后有密切联系<sup>[6]</sup>,而当前对于该类型的 AML 患者免疫表型特点及临床特征报道较少,作者选择广东医科大学附属第一医院血液内科 2016 年 5 月至 2018 年 11 月收治的 140 例 AML 患者,分析 FLT3-ITD 阳性与阴性患者的免疫表型及实验室相关指标变化,以为临床提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择广东医科大学附属第一医院血液内科 2016 年 5 月至 2018 年 11 月收治的 140 例 AML 患者,其中男 86 例,女 54 例;年龄 19~83 岁,平均(47.73±3.58)岁。140 例 AML 患者中 FLT3-ITD 阳性 25 例(阳性组),其中男 15 例,女 10 例;年龄 18~82 岁,平均(46.33±2.87)岁。FLT3-ITD 阴性患者 115 例(阴性组),其中男 71 例,女 44 例;年龄为 19~83 岁,平均(47.73±3.58)岁。依据法国、英国和美国协作组(FAB)标准及世界卫生组织(WHO)标准将 140 例 AML 患者进行分型:M<sub>2</sub> 45 例, M<sub>4</sub> 36 例, M<sub>5</sub> 12 例, M<sub>6</sub> 13 例,余下 34 例形态不能分类。纳入标准:(1)均符合 AML 临床诊断标准<sup>[7]</sup>;(2)所有纳入者均通过骨髓细胞形态学、细胞免疫学、染色体、基因突变等确诊;(3)完全符合 WHO、FAB 相关标准;排除了急性早幼粒细胞白血病(APL)、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、骨髓增生异常综合征(MDS)等疾病转化为的 AML 及治疗相关白血病。

1.2 方法

1.2.1 FLT3-ITD 基因检测 在患者入院次日,抽取晨起空腹骨髓标本 5 mL,分离并取其上悬液,其中包含有 1.0×10<sup>7</sup> 单个核细胞,应用 DNA 提取试剂盒(美国 Pro-mega 公司提供)提取受检标本的 DNA,对标本 DNA 的吸光度进行测定,并调整标本 DNA 水平为 50 ng/mL,随后进行 PCR 扩增处理,所用引物设计参考文献<sup>[7]</sup>,使用含有 Gold View 核酸染色剂的 2%琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳分析后,采用 Tanon<sup>MP</sup> 系统予以摄像并分析处理,若出现重叠 329 bp 条带,则可以确定为 FLT3-ITD 突变阳性。

1.2.2 免疫表型的检测 取受检者 2 mL 肝素抗凝骨髓液,随后给予骨髓标记染色处理,可应用单克隆

抗体(荧光素标记)进行染色,并应用散点图设门法流式细胞术(CD45/SSC 双参数)检测细胞免疫表型,分别检测淋系和髓系抗原。

1.2.3 化疗方案 主要用药包括高三尖杉酯碱、蒽环类药物及阿糖胞苷等,若患者年龄超过 60 岁则在诱导治疗时,注意药物剂量的使用。临床常备化疗方案包括去甲氧柔红霉素、柔红霉素与高三尖杉酯碱分别联合阿糖胞苷,对于部分呈低增生性白血病患者或者高龄患者,则选择阿克拉霉素联合阿糖胞苷与粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。对于 FLT3-ITD 基因阳性或者阴性的治疗具体依据患者情况随机选用。

1.2.4 疗效评价 依据血液病学诊断与疗效标准<sup>[8]</sup>,完全缓解(CR):白血病的症状体征消失,血象中血红蛋白(Hb)≥100 g/L(男)或 90 g/L(女及儿童),中性粒细胞绝对值(ANC)≥1.5×10<sup>9</sup> g/L,血小板(PLT)≥100×10<sup>9</sup> g/L,外周血无白血病细胞(LC);骨髓象中原始粒细胞+早幼粒细胞(原始单核细胞+幼单核细胞或原始淋巴细胞+幼淋巴细胞)小于 5%,红系及巨核系正常。部分缓解(PR):骨髓原始细胞 5%~20%;或临床、血象 2 项中 1 项未达 CR 标准者。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析,计数资料以百分率描述,组间比较采用  $\chi^2$  检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 AML 患者的 LC 免疫表型比较 本研究中共检测出 CD7、CD13、CD14、CD15、CD11b、HLA-DR、CD33、CD34、CD38、CD16、CD117、CD11c、CD56 及 CD64 共 14 个抗原,其中 CD7、CD33、CD56 及 CD117 存在异常表达;与阴性组患者比较,阳性组患者 CD117 表达率明显降低,而 CD7、CD33 及 CD56 的表达率明显升高,两组比较差异均有统计学意义(P<0.05),见表 1。

表 1 两组 AML 患者的 LC 免疫表型比较[n(%)]

组别	n	CD117	CD56	CD33	CD7
阳性组	25	19(76.00)	6(24.00)	21(84.00)	11(44.00)
阴性组	115	105(91.30)	9(7.83)	76(66.09)	24(20.87)
$\chi^2$		13.925	23.548	14.755	25.569
P		0.005	0.001	0.002	0.000

2.2 两组 AML 患者的临床特点比较 初诊时,外周血白细胞计数(WBC)阳性组中 17 例患者(>50~100)×10<sup>9</sup>/L,占比为 68.00%,8 例患者的外周血 WBC>100×10<sup>9</sup>/L,占比为 32.00%;阳性组患者外周血 WBC>100×10<sup>9</sup>/L 的比例明显高于阴性组 AML 患者,两组比较差异有统计学意义(P<0.05)。17 例阳性组患者的骨髓 LC>80%,占比为 68.00%,明显高于阴性患者,两组患者比较差异有统计学意义(P<0.05),而两组患者的 Hb 及 PLT 水平比较,差异无统

计学意义( $P>0.05$ ),见表 2。

表 2 两组 AML 患者相关指标比较[n(%)]

项目	阳性组(n=25)	阴性组(n=115)	$\chi^2$	P
Hb(g/L)				
<60	5(20.00)	16(13.91)	0.769	0.077
60~<90	20(80.00)	99(86.09)	1.392	0.179
WBC( $\times 10^9/L$ )				
>50~100	17(68.00)	107(93.04)	24.506	0.001
>100	8(32.00)	8(6.96)	30.916	0.001
PLT( $\times 10^9/L$ )				
<10	17(68.00)	69(60.00)	0.845	0.090
10~<20	8(32.00)	46(40.00)	1.120	0.881
骨髓 LC>80%	17(68.00)	43(37.39)	36.037	0.000

**2.3 两组 AML 患者的临床治疗效果比较** 阳性组患者中,3 例患者在化疗中死亡(死因为严重感染或出血并发症),余下 22 例患者中,CR 6 例(27.27%);PR 3 例(13.64%);治疗总反应率为 40.91%。阴性组患者中参与此次评价的共 95 例,CR 49 例(51.58%),PR 20 例(21.05%),治疗总反应率为 72.63%(69/95),阴性组患者的治疗总反应率明显高于阳性组患者,两组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 3。

表 3 两组 AML 患者的临床治疗效果比较[n(%)]

组别	n	CR	PR	治疗总反应率
阳性组	22	6(27.27)	3(13.64)	9(40.91)
阴性组	95	49(51.58)	20(21.05)	69(72.63)
$\chi^2$		15.332	27.091	38.127
P		0.004	0.001	0.000

### 3 讨论

近年,相关研究证实 AML 的发生及预后中,FLT3 的相关基因突变类型发挥着重要作用。而在 AML 中,近膜区域的 ITD 突变是 FLT3 的最为常见的突变形式,国内相关文献报道显示,对于成人 AML 患者而言,FLT3-ITD 的突变发生率最高为 20.8%<sup>[8]</sup>,另外亦有研究及文献报道 FLT3-ITD 的突变发生率高达 31%以上<sup>[9-10]</sup>。本研究结果显示在 140 例初诊 AML 患者中,25 例发生了 FLT3-ITD 的突变,与国内其他文献报道结果相似<sup>[11-12]</sup>。FLT3-ITD 的突变发生率文献报道存在差异可能与选择的样本量不同有关。

相关研究及报道提示,与 FLT3-ITD 突变阴性比较,FLT3-ITD 突变阳性 AML 患者免疫细胞表面 CD34 与 CD117 均呈现低表达,而 CD4、CD13、CD14、CD33 及 CD64 的表达均较高<sup>[13]</sup>,本研究结果显示,与 FLT3-ITD 突变阴性比较,FLT3-ITD 突变阳性 AML 患者 CD7、CD33 及 CD56 呈高表达而 CD117 呈低表

达,与该研究报道相符,由此提示 FLT3-ITD 阳性 AML 患者 LC 有明显的免疫标记异常情况发生。

PORT 等<sup>[14]</sup>的研究中,对 AML 患者中的核仁磷酸蛋白 1(NPM1)基因突变、FLT3-ITD 突变、CD56 阳性及高 LC 患者的完全缓解率、生存率进行了比较分析,结果表明 FLT3-ITD 突变患者与 CD56 阳性患者的无事件生存率较相应的阴性对照低,完全缓解率也相对较低,可见 FLT3-ITD 的突变及 CD56 的高表达与 AML 患者的预后较差有一定关联性。本研究针对性比较了 FLT3-ITD 阳性与 FLT3-ITD 阴性患者的细胞免疫表型,结果显示 FLT3-ITD 阳性患者的 CD56 呈高表达且明显高于 FLT3-ITD 阴性患者,由此提示 FLT3-ITD 阳性 AML 患者预后不佳可能与 CD56 的高表达有关。有研究显示,在部分 AML 患者中,LC 表面出现了淋系抗原表达,其中 CD7 是淋系抗原中 T 淋巴细胞分化的重要标志且主要表达于外周 T 淋巴细胞及胸腺细胞中<sup>[15]</sup>,有研究显示,在 AML 患者中 CD7 的表达率为 11.9%~33.5%,且 FLT3-ITD 突变 AML 患者的 CD7 呈高表达,证实 AML 患者的 FLT3-ITD 基因发生突变与 CD7 的高表达有直接关系<sup>[16]</sup>。本研究中,FLT3-ITD 阴性患者的 CD7 表达较低,且明显低于 FLT3-ITD 阳性患者,再次证实 AML 患者的 FLT3-ITD 基因突变与 CD7 的高表达有直接相关性。有文献表明,FLT3-ITD 阳性患者均有骨髓 LC 占比较高、外周血 WBC 高及完全缓解率较低的临床特征<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,在初诊时,FLT3-ITD 阳性 AML 患者外周 WBC $>100 \times 10^9/L$  及骨髓 LC $>80\%$  的占比均高于 FLT3-ITD 阴性患者,同时结果显示,FLT3-ITD 阳性患者的治疗反应率明显低于 FLT3-ITD 阴性患者,可见 FLT3-ITD 基因突变在 AML 的整个发病及病情进展过程中起着重要作用,加强对 FLT3-ITD 的研究,对于了解患者预后状况有一定的意义和价值,同时可以指导临床制订合适的治疗方案。

综上所述,对 AML 患者 FLT3-ITD 基因型的免疫表型及临床实验指标进行分析,表明 FLT3-ITD 阳性 AML 患者呈现出特异免疫表达异常,临床实验室指标有特殊性,对 AML 患者的临床治疗及预后具有极为重要的意义。

### 参考文献

- [1] 刘莎,魏旭东,尹青松,等. 索拉非尼联合化疗治疗 FLT3-ITD 突变阳性急性髓系白血病 9 例报告并文献复习[J]. 中华血液学杂志,2015,36(3):241-244.
- [2] 马影影,孔佩艳. 索拉非尼靶向治疗 FLT3-ITD 阳性急性髓系白血病[J]. 肿瘤防治研究,2015,42(9):938-941.
- [3] 宫本法,王迎,林冬,等. 急性早幼粒细胞白血病 FLT3-ITD 突变分析[J]. 中国实验血液学杂志,2016,24(6):1615-1621.

- mation and rupture [J]. *Immunology*, 2009, 183(1): 593-603.
- [5] TURGUT CELEN Y, PEKER Y. Cardiovascular consequences of sleep apnea: impact of continuous positive airway pressure treatment [J]. *Anadolu Kardiyol Derg*, 2010, 10(3): 274-280.
- [6] SCHULZ R, GREBE M, EISELE H J, et al. Obstructive sleep apnea-related cardiovascular disease [J]. *Med Klin (Munich)*, 2006, 101(4): 321-327.
- [7] MAEKAWA M, SHIOMI T. Sleep apnea syndrome (SAS) and ischemic heart disease (IHD) [J]. *Nippon Rinsho*, 2000, 58(8): 1702-1706.
- [8] YAN W X, ARMISHAW C, GOYETTE J, et al. Mast cell and monocyte recruitment by S100A12 and its hinge domain [J]. *Biol Chem*, 2008, 283(19): 13035-13043.
- [9] MOOE T, FRANKLIN K A, HOLMSTROM K, et al. Sleep-disordered breathing and coronary artery disease: long-term prognosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(10): 1910-1913.
- [10] LINDAHL B, TOSS H, SIEGBAHN A, et al. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease; FRISC Study Group: Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease [J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(16): 1139-1147.
- [11] CHOLIDOU K G, KOSTAKIS I D, MANALI E D, et al. Calprotectin, a protein related to cardiovascular risk in adult patients with obstructive sleep apnea [J]. *Cytokine*, 2013, 61(3): 917-923.
- [12] SAITO T, HOJO Y, OGOYAMA Y, et al. S100A12 as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery disease [J]. *Circ J*, 2012, 76(11): 2647-2652.
- [13] 张鹏, 程习辉, 张华, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者血清 S100A12 水平的研究 [J]. *重庆医学*, 2017, 46(34): 4780-4782.
- [14] 中华医学会呼吸病学分会睡眠呼吸障碍学组. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者持续气道正压通气临床应用专家共识(草案) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 35(1): 13-18.
- [15] 张鹏, 欧阳松云, 孙培宗, 等. 无创正压通气对睡眠呼吸暂停综合征合并心律失常的影响 [J]. *中华心血管病杂志*, 2013, 41(9): 747-750.

(收稿日期: 2018-11-18 修回日期: 2019-03-10)

(上接第 2966 页)

- [4] 王洁, 叶芳, 李国霞, 等. 急性髓细胞性白血病基因表达特点分析 [J]. *中国医药导报*, 2016, 13(1): 13-16.
- [5] 俞罡, 陈静桂. 急性髓系白血病患者 FLT3-ITD 和 NPM1 基因突变表达及在判断预后中的意义 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2015, 14(7): 565-568.
- [6] 刘筱妹, 龙慧, 黄宇贤, 等. 索拉非尼联合小剂量阿糖胞苷治疗 FLT3<sup>+</sup> 复发、难治性急性髓系白血病的初步临床研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2016, 24(2): 394-398.
- [7] 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, 2008: 106-121.
- [8] 周念. 急性髓系白血病 FLT3-ITD 及 NPM1 基因突变分析及其预后意义 [D]. 福州: 福建医科大学, 2013.
- [9] 熊丽芳. FLT3-ITD、C-KIT-D816V、NPM1 基因突变与急性髓系白血病临床特征及预后相关性研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2013.
- [10] LIU Y, HE P, LIU F, et al. Prognostic significance of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia: A meta-analysis [J]. *Mol Clin Oncol*, 2014, 2(2): 275-281.
- [11] SHAMAA S, LAIMON N, ALADLE D A, et al. Prognostic implications of NPM1 mutations and FLT3 internal tandem duplications in Egyptian patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia [J]. *Hematology*, 2014, 19(1): 22-30.
- [12] 魏辉, 张轶群, 林冬, 等. 初诊急性髓系白血病 NPM1 突变患者临床特征的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(1): 11-15.
- [13] MA Y, WU Y, SHEN Z, et al. Is allogeneic transplantation really the best treatment for FLT3/ITD-positive acute myeloid leukemia? A systematic review [J]. *Clin Transplant*, 2015, 29(2): 149-160.
- [14] PORT M, BOTTCHE M, THOL F, et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis [J]. *Ann Hematol*, 2014, 93(8): 1279-1286.
- [15] 谢惠敏, 高丽, 王楠, 等. AML1/ETO 阳性急性髓系白血病患者 FLT3 基因高表达及其临床意义 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(5): 1199-1205.
- [16] 陈燕, 李晓明, 马涛, 等. FLT3-ITD 阳性急性髓系白血病免疫表型及临床特征分析 [J]. *西南军医*, 2016, 18(4): 308-310.
- [17] 谢伟成, 程淑琴, 林翠芳, 等. 急性髓系白血病患者 FLT3-ITD 基因突变检测的意义 [J]. *广东医学*, 2014, 35(16): 2558-2560.

(收稿日期: 2018-12-12 修回日期: 2019-04-04)