

慢性髓系白血病干细胞移植后微小残留病的检测

汪健¹ 孙自敏¹ 徐修才² 郭志伟² 刘会兰¹

〔摘要〕 目的:评价 3 种不同方法在动态检测慢性髓系白血病(CML)患者造血干细胞移植(HSCT)后微小残留病(MRD)中的意义。方法:采用细胞遗传学(CC)、双色荧光原位杂交(D-FISH)、逆转录巢式聚合酶链反应(RT-PCR)3 种方法检测 Ph 染色体及 bcr/abl 融合基因。结果:HSCT 前的 24 例 CML 患者仅 1 例 Ph 染色体核型占 96%,其余均 100%。HSCT 后 1 个月,CC 检测成功率为 83%,15%患者 Ph 阳性,2 个月后 Ph 均阴性。D-FISH 检测结果显示,2 例变异型 Ph 易位患者阴性,其余患者 HSCT 前的阳性细胞率明显低于 CC,HSCT 后 2 个月内,即使 Ph 核型比例很低甚至阴性,仍然检出很多阳性细胞,但敏感度低于 RT-PCR,HSCT 后 1 个月开始显现出显著差异。结论:CC 只能部分反映供受者性别不合的嵌合状态,对 MRD 检测的意义不大;CML 患者在 HSCT 后 2 个月内,选择 D-FISH 检测 MRD 较适合,D-FISH 阴性后,则采用敏感度更高的 RT-PCR 方法。

〔关键词〕 白血病,髓系,慢性;干细胞移植;微小残留病

〔中图分类号〕 R733.72 **〔文献标志码〕** A **〔文章编号〕** 1004-2806(2012)11-0732-02

t(9;22)(q34;q11)易位(Ph 染色体)以及形成的 bcr/abl 融合基因,是慢性髓系白血病(CML)发病的分子基础和恶性克隆标志,也是临床诊断和疗效评价的重要依据。我们联合应用细胞遗传学(CC)、双色荧光原位杂交(D-FISH)和逆转录巢式聚合酶链反应(RT-PCR)检测造血干细胞移植(HSCT)后患者体内的白血病细胞微小残留病(MRD),探讨 3 种检测方法的应用价值,以便选择最适合的检测方法,满足临床监测 MRD 的需要。

1 资料与方法

1.1 一般资料

24 例 CML 均系我院 2002—2005 年 HSCT 的患者,其中 2 例为变异易位,即 t(1;9;22)(q11;q34;q11)、t(2;9;22)(q11;q34;q11),其余是典型的 Ph;1 例为加速期,2 例急变,21 例为慢性期患者。男 15 例,女 9 例;年龄 10~53 岁,中位年龄 32 岁。11 例供受者性别不同。患者预处理方案为清髓性的白消安加环磷酰胺方案;8 例接受 HLA 相合的同胞外周血干细胞移植(PBSCT),3 例接受了异基因骨髓移植(BMT),11 例接受了 PBSCT 联合 BMT,2 例为无血缘关系的脐血干细胞移植(UCBT)。

1.2 方法

1.2.1 CC 分析 无菌条件下抽取骨髓 1~2 ml,24 h 短期培养,常规制备染色体并进行 G 显带核型分析,根据分裂相质量,每份标本分析 20~50 个中期分裂相细胞。

1.2.2 RT-PCR 检测 bcr/abl 融合基因转录本 RT-PCR 引物及条件参考文献[1]。

1.2.3 D-FISH 检测 bcr/abl 融合基因 探针选用 Vysis LSI BCR/ABL 的双色单融合易位探针,

操作按说明书进行,在荧光显微镜下观察结果。红色信号为 abl,绿色信号为 bcr,融合基因阳性的可见 1 绿 1 红 2 个信号和 1 个黄色的融合信号。每例至少观察 1 000 个细胞,计算出阳性细胞的百分率。正常对照为 HSCT 供者骨髓细胞。

2 结果

HSCT 前只有 1 例 CML 患者 Ph 核型占 96%,其余均 100%;HSCT 后 1 个月,有 4 例患者骨髓标本无分裂相,改用 PHA 刺激外周血培养仍无分裂相。Ph 阳性患者 3 例,分别占分析核型的 2%、54%、100%,此 3 例中 2 例为供/受者性别不同,其中 1 例 XY/XX 核型几乎各占一半,1 例仍是受者且全部是 Ph 核型(2M 时核型转为供者性别),1 例供/受者性别相同,阳性率仅占 2%。HSCT 后 2 个月,除 2 例无分裂相(均为供/受者性别不同)外,Ph 均为阴性,其余供/受者性别不同的 9 例患者分裂相均为供者核型。移植后 3 个月,除 2 例死于严重并发症未检测外,仍有 2 例无分裂相,其余 Ph 均阴性。

D-FISH 检查结果显示:正常对照骨髓细胞中出现阳性信号的比例均在 0.5%以下,患者在此阈值下的判定为阴性。HSCT 前,2 例 Ph 变异型易位患者为阴性,其余 22 例均阳性,出现阳性信号的的比例占有核细胞总数的 54%~93%。HSCT 后 1 个月,患者阳性检出为 59%,2 个月后为 18%,3 个月时,除 2 例死于严重并发症的患者未检测外,其余均为阴性。而 RT-PCR 检测结果显示:HSCT 前,所有患者 bcr/abl 融合基因均为阳性,HSCT 后 1 个月,63%的患者阳性,其中 1 例为弱阳性;HSCT 后 2 个月,46%的患者阳性,其中弱阳性 4 例;3 个月时,17%患者持续阳性,继续跟踪检测显示;4 个月时,患者 1、3 转为阴性,患者 2、9 于 5 个月时转为阴性。HSCT 后所有 bcr/abl 融合基因转为阴性的患者,在随后 3 年的连续跟踪检测中均

¹安徽医科大学附属省立医院血液科(合肥,230001)

²安徽医科大学附属省立医院中心实验室

未出现阳性结果。

3 讨论

CC 显带不仅能检出 Ph 染色体,而且还能检测出其他染色体异常,但需要培养才能获得足够分析的核型,CML 慢性期增殖细胞基本上是白血病干细胞,HSCT 后早期骨髓穿刺获取的细胞有限,CC 的成功率及 Ph 阳性检测率低,不能反映体内白血病负荷。本研究共做了 95 次 CC 检测,总成功率为 93%,HSCT 后 1 个月最低。HSCT 前,绝大多数患者处于临床血液学缓解期,但核型基本全为 Ph 阳性,HSCT 后 1 个月,Ph 阳性率 15%,此后的检测全部阴性,可见 CC 在检测 MRD 中敏感度很低。D-FISH 检测的是单个细胞水平上的 Ph 染色体异常,巢式 PCR 是利用两套 PCR 引物进行两轮 PCR 扩增反应,降低了扩增多个靶位点的可能性,增加了检测的敏感性、可靠性,特异性,灵敏度可达 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 。与 CC 相比,D-FISH 检测无需细胞培养、无需新鲜标本、不受分裂相限制、可观察的细胞量多、受干扰因素少,所以,本研究中 D-FISH 结果显示 HSCT 前 bcr/abl 阳性细胞比例显著低于 CC,HSCT 后的 2 个月内,尽管部分患者 Ph 核型比例很低甚至阴性,D-FISH 仍可以检出相当高比例的阳性细胞,结果更加灵敏、准确地反映体内 MRD 的情况。但 D-FISH 检测也有局限性,首先要选择特异的、合适的探针。本实验使用的双色单融合探针,只能检测 5' bcr/abl 基因融合,不适用于变异的 Ph 染色体的融合基因检测^[2],所以 2 例变异型 Ph 染色体易位的患者检测结果阴性,应选择双色双融合探针。另外,我们与敏感性类似的判定供受者嵌合程度的短串联重复序列-聚合酶链

反应(STR-PCR)结果比较,发现混合嵌合时 bcr/abl 为阳性或弱阳性,完全嵌合时无一例 bcr/abl 为阳性,从相互印证的结果来看,并未出现理论上认为的 RT-PCR 的敏感度高,容易出现假阳性和假阴性的结果^[3],实验结果可靠。有研究认为,RT-PCR 持续阳性的病例,需要特别注意疾病的复发^[4],但从我们长期监测的结果来看,HSCT 后部分患者 bcr/abl 持续阳性,没有 1 例复发,说明体内虽有白血病细胞的微小残留,但并不意味着复发,可能被供者重建的免疫细胞发挥的 GVL 效应所清除。

参考文献

- [1] 徐修才,翟志敏,汪建,等. Bcr/abl 融合基因检测在慢性粒细胞白血病诊断及残留病灶监测中的应用[J]. 现代检验医学杂志,2007,22(1):29-31.
- [2] 刘旭平,刘世和,李承文,等. 慢性粒细胞白血病患者 Ph 染色体变异易位的细胞遗传学特征与荧光原位杂交研究[J]. 中国实验血液学杂志,2004,12(3):298-303.
- [3] RAANANI P, BEN-BASSAT I, GAN S, et al. Assessment of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia patients-comparison between the FISH, multiplex and RT-PCR methods[J]. Eur J Haematol, 2004,73:243-250.
- [4] SEONG C M, GIRALT S, KANTARJIAN H, et al. Early detection of relapse by hypermetaphase fluorescence in situ hybridization after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia[J]. J Clin Oncol, 2000,18:1831-1836.

(收稿日期:2012-01-02 修回日期:2012-05-14)

重组人白介素-11 治疗急性髓系白血病化疗后 血小板减少的临床研究

路萍¹ 王永志¹ 朱桂华¹ 侯十前¹ 陈锦华¹ 吴冬梅¹ 范秋兰¹ 岳鸿丽¹ 朱理平¹

[摘要] 目的:探讨重组人白介素-11 治疗急性髓系白血病(AML)化疗后血小板减少的有效性和安全性。方法:分别选择 21 例患者 43 例次化疗为治疗组和对照组,治疗组化疗结束 24 h 或血小板低于 $100 \times 10^9/L$ 时给予皮下注射重组人白介素-11 $25 \mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,观察患者化疗后血小板计数变化、输注血小板剂量和药物不良反应。结果:治疗组和对照组化疗后最低血小板计数和输注血小板次数差异无统计学意义($P > 0.05$)。血小板恢复至 $50 \times 10^9/L$ 的天数和恢复至 $100 \times 10^9/L$ 的天数差异有统计学意义($P < 0.01$),治疗组较对照组平均约提前 2.5 d。治疗组耐受性良好,观察到的不良反应有全身乏力、水肿、注射部位疼痛,其发生率均不到 10%。结论:重组人白介素-11 辅助治疗 AML 可以一定程度上缩短患者化疗后血小板低下持续的时间,且耐受性良好。

[关键词] 白血病,髓系,急性;重组人白介素-11;血小板减少;化疗

[中图分类号] R733.71 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)11-0733-03

¹ 玉溪市人民医院血液风湿科(云南玉溪,653100)