

急性白血病缓解期微小残留病灶与预后的关系

徐瑞琴¹ 陆小云¹ 张敏¹

【摘要】 目的:研究急性白血病缓解期微小残留病灶(MRD)变化情况及其与预后的关系。**方法:**对 62 例成年人急性淋巴细胞白血病(ALL)完全缓解患者(男 34 例,女 28 例)和 126 例成年人急性髓细胞白血病(AML)完全缓解患者(男 67 例,女 59 例),采用流式细胞术检测骨髓中 MRD,与传统骨髓形态学检查结果进行比较。所有患者平均跟踪随访 6(3~24)个月,记录 MRD 值的变化及相应的预后情况:是否复发及复发时间,骨髓确诊复发的时间,不同性别、年龄、难治性的复发情况。**结果:**ALL 患者共有骨髓标本 174 份,MRD 阳性 146 份,其中 31 份标本 MRD ≥ 0.05 ,MRD 阴性(MRD < 0.001)28 份。骨髓确诊复发 24 例。其中 18 例患者 MRD 持续阳性于 9~24 个月后出现骨髓复发,较骨髓确诊复发平均提前 6 个月。预测 ALL 不同治疗时间 MRD 诊断复发的敏感性均为 100%;特异性 1~12 个月为 76.9%,13~24 个月为 77.8%,差异无统计学意义($P>0.05$)。126 例 AML 患者检测完全缓解时 MRD 共 126 次,骨髓确诊复发 21 例。ALL 和 AML 患者均可见 MRD > 0.001 时复发率明显升高,而复发率与性别、年龄、是否为难治性无关($P>0.05$),MRD ≥ 0.01 患者的复发时间明显短于 MRD ≤ 0.005 和 $0.005< \text{MRD}< 0.01$ ($P<0.05$)。**结论:**利用流式细胞术能够对急性白血病缓解期患者进行 MRD 检测预测复发,MRD 可作为预后评价的敏感指标。MRD > 0.001 时复发的可能性大。连续定期动态观察对复发提示、预后预测及个体化治疗的指导有重要意义。

【关键词】 微小残留病灶;急性白血病缓解期;预后

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2016.03.010

【中图分类号】 R733.71 **【文献标志码】** A

Relationship between minimal residual disease and prognosis in acute leukemia patients in remission

XU Ruiqin LU Xiaoyun ZHANG Min

(Department of Hematology, Heze Hospital of Traditional Chinese Medicine, Heze, 274000, China)

Corresponding author: XU Ruiqin, E-mail: yygyaf@163.com

Abstract Objective: To observe the change of minimal residual disease (MRD) in acute leukemia patients in remission, and explore the relationship between MRD and the prognosis. **Method:** Sixty-two cases of adult acute myeloid leukemia (ALL) with complete response (male 34, female 28) and 126 cases of adult acute myeloid leukemia (AML) with complete response (male 67, female 59) were enrolled. We used flow cytometry technology (FCM) to detect MRD in bone marrow, and the results were compared with traditional bone marrow cell morphology. After average 6-month follow-up (3 to 24 months) of all the patients, we recorded the changes of MRD value and prognosis including relapse and relapse time, relapse rate among different gender, age and refractory status. **Result:** In 174 bone marrow samples of ALL patients, MRD were positive in 146 samples, including 31 samples with MRD ≥ 0.05 , and 28 samples with MRD < 0.001 (MRD negative). Twenty-four patients were diagnosed as relapse by bone marrow cell morphology, of which 18 were finally diagnosed as relapse 9 to 24 months (average 6 months) after continually positive in MRD. The average sensitivity of MRD assay in predicting relapse were all 100% and the specificity were 76.9% in 1 to 12 months group, and 77.8% in 13 to 24 months group, showing no significant difference between two groups ($P>0.05$). A total of 126 patients with AML in complete remission detected MRD 126 times, of which 21 patients were diagnosed as relapse by bone marrow cells morphology. ALL and AML patients with MRD > 0.001 had obviously higher recurrence rate, and the recurrence rate had no relation with the gender, age and refractory ($P>0.05$). MRD ≥ 0.01 patients had significantly shorter relapse time than MRD ≤ 0.005 and $0.005< \text{MRD}< 0.01$ patients. **Conclusion:** Relapse of acute leukemia can be predicted by MRD detection with the use of FCM. MRD can be used as a sensitive index for the evaluation of prognosis. When MRD is higher than 0.001, the risk of relapse is higher. Continuous dynamic monitor of MRD has important significance in predicting the recurrence and prognosis and directing the individualized treatment.

Key words minimal residual disease; remission of acute leukemia; prognosis

¹ 菏泽市中医医院血液病科(山东菏泽, 274000)

通信作者: 徐瑞琴, E-mail: yygyaf@163.com

急性白血病发病急,病死率高,是一组高度异质性的恶性血液病,骨髓和外周血中以原始细胞为主发病时体内白血病细胞约有 $10^{12}/L$ 。临床上根据白血病细胞类型分为急性淋巴细胞白血病(ALL)和急性髓细胞白血病(AML)两大类,这两大类又可以分为几个亚型。随着联合化疗及造血干细胞移植技术的应用,白血病的治疗取得较大进展,但复发常常导致治疗失败,复发的根源则是患者体内持续存在的白血病细胞残留。经过治疗可达到缓解期,即症状体征消失,光学显微镜下骨髓中白细胞计数 <0.05 。此时,肿瘤负荷在 10^{10} 以下,骨髓形态学方法对白血病细胞的残留无法达到有效检测^[1]。为预测复发、判断预后及指导个体化治疗,必须寻求更敏感的方法检测白血病微小残留病灶(MRD)。肖志坚等(2003)提出应用免疫学和(或)分子生物学方法检测,以 MRD 量作为缓解标准: ≥ 0.1 为未缓解; $0.1 \sim 0.001$ 为部分缓解;而 < 0.001 为完全缓解,应作为急性白血病治疗的目标。流式细胞术(FCM)是临床常用的检测 MRD 的方法。本研究使用 FCM 检测 188 例急性白血病缓解期患者的骨髓 MRD,并根据 MRD 水平进行复发风险和预后的判断,指导个体化治疗。

1 资料与方法

1.1 资料

2011-06—2013-06 我院血液科收治的急性白血病患者,包括确诊并接受正规化疗方案达到缓解的 62 例 ALL 和 126 例 AML。均按国际 MICM 标准进行细胞形态、免疫表型等检测。62 例 ALL 中,男 34 例,女 28 例;年龄 11~60 岁,平均 (31.2 ± 1.8) 岁;病程 3~24 个月,平均 (6.1 ± 0.4) 个月; B-ALL 56 例, T-ALL 6 例。126 例 AML 中,男 67 例,女 59 例;年龄 14~66 岁,平均 (35.3 ± 2.1) 岁;病程 3~24 个月,平均 (6.2 ± 0.3) 个月; M_0 7 例, M_1 11 例, M_2 37 例, M_3 16 例, M_4 10 例, M_5 36 例, M_6 9 例。所有患者病史完整,初治时均采用正规化疗方案: ALL 采用 VDCP、VDLP 等化疗方案; AML 采取 DA、IA、HA 等方案。ALL 患者中 13 例未缓解或部分缓解, AML 患者中 8 例未缓解,属

难治性,经二次化疗后均取得完全缓解。

1.2 方法

FCM 检测:所有患者初诊时均进行免疫分型检测,含有明确的白血病相关免疫表型标志,根据每例患者的免疫分析结果,采用相应单克隆抗体检测,检测时间为诱导缓解后 2~3 周查骨髓 MRD,此后 4~8 周复查 1 次。所有单克隆抗体购自美国 Beckman coulter 公司,采取肝素抗凝的新鲜骨髓标本,调整细胞数至 $500\,000 \sim 1\,000\,000$,分管标记抗体后采用 Beckman coulter FC500 流式细胞仪进行分析检测,数据的采集和分析用 CXP 软件进行。对 ALL 患者,采用 $MRD > 0.05$ 为本次研究诊断复发的标准,与骨髓形态学检查进行敏感性和特异性比较。对 ALL 和 AML 患者,记录 MRD 与复发数和复发时间的关系。

1.3 疗效判断标准

疗效判断参照张之南^[2]主编的《血液病诊断及疗效标准》。复发:骨髓形态学脱离完全缓解状态^[3]。MRD 阳性标准^[1]: $MRD \geq 0.001$ 。

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件对数据进行统计分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对设计资料的 t 检验或两独立样本资料的 t 检验;定性资料采用独立样本 $R \times C$ 列联表资料的 χ^2 检验。按 $\alpha = 0.05$ 的检验水准,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALL 患者不同治疗时间 MRD 阳性标本数和临床复发病例数

62 例 ALL 缓解患者共有 174 份骨髓标本,均进行 FCM 检测,其中 115 份标本 $0.001 \leq MRD < 0.05$, 31 份标本 $MRD \geq 0.05$, 即有 146 份标本 MRD 阳性, 28 份标本 $MRD < 0.001$ (MRD 阴性)。FCM 检测 MRD 阳性率随时间的延长略有下降,但治疗 3 个月与治疗 19~24 个月比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.319, P = 0.572$)。共 24 例患者骨髓确诊复发,而 FCM 提示复发标本数 31 份。治疗 7 个月开始出现骨髓复发, 24 个月内复发率为 13.8% (24/174)。详见表 1。

表 1 ALL 患者不同治疗时间 MRD 阳性标本数和临床复发病例数

治疗时间	标本数 /份	MRD 阳性数/份			MRD 阳性数 /份(%)	骨髓复发数/例
		$MRD < 0.001$	$0.001 \leq MRD < 0.05$	$0.05 \leq MRD$		
3 个月	20	2	18	0	18(90.0)	0
4~6 个月	30	4	26	0	26(86.7)	0
7~9 个月	35	5	25	5	30(85.7)	4
10~12 个月	28	5	15	8	23(82.1)	6
13~18 个月	37	7	20	10	30(81.1)	8
19~24 个月	24	5	11	8	19(79.2)	6
合计	174	28	115	31	146(83.9)	24

2.2 FCM检测MRD对诊断ALL复发的敏感性和特异性与骨髓形态学比较

MRD结果均为首次检查结果。FCM检查对诊断ALL不同治疗时间复发的敏感性均为100%,特异性1~12个月为76.9%(10/13),13~24个月为77.8%(14/18),差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 ALL及AML复发与MRD的关系

ALL复发与MRD的关系:62例ALL患者中,不论性别、年龄、难治性,MRD >0.001 时复发例数均多于MRD ≤ 0.001 时,两者差异有统计学意义($\chi^2=7.440, P=0.006$)。而复发率与性别、年龄、是否为难治性无关($P>0.05$)。

AML复发与MRD的关系:126例AML患者

检测完全缓解时MRD共126次,骨髓确诊复发21例。不论性别、年龄、难治性,MRD >0.001 时复发例数均多于MRD ≤ 0.001 时,两者差异有统计学意义($\chi^2=8.779, P=0.003$)。而复发率与性别、年龄、是否为难治性无关($P>0.05$)。详见表2。

2.4 ALL及AML复发时间与MRD的关系

ALL患者复发共24例,其中4例9个月内复发,7例9~12个月内复发,13例 ≥ 12 个月复发。AML患者复发共21例,其中4例9个月内复发,6例9~12个月内复发,11例 ≥ 12 个月复发。不论ALL和AML,MRD ≥ 0.01 患者的复发时间明显短于MRD ≤ 0.005 和 $0.005<MRD<0.01$ ($P<0.05$)。详见表3。

表2 ALL及AML复发与MRD的关系

例

项目	ALL				AML			
	例数	复发数	MRD ≤ 0.001	MRD >0.001	例数	复发数	MRD ≤ 0.001	MRD >0.001
性别								
男	34	14	4	10	67	12	2	10
女	28	10	2	8	59	9	2	7
发病年龄/岁								
≤ 30	29	8	2	6	50	8	1	7
>30	33	16	4	12	76	13	3	10
难治性								
阴性	49	18	6	12	118	16	3	13
阳性	13	6	0	6	8	5	1	4

表3 ALL及AML复发时间与MRD的关系

例, $\bar{x} \pm s$

复发时间	ALL				AML			
	例数	MRD ≤ 0.005	$0.005<MRD<0.01$	MRD ≥ 0.01	例数	MRD ≤ 0.005	$0.005<MRD<0.01$	MRD ≥ 0.01
≤ 9 个月	4	0	0	4	4	0	0	4
9~12个月	7	1	1	5	6	1	1	4
≥ 12 个月	13	8	4	1	11	7	3	1
合计	24	9	5	10	21	8	4	9
平均复发时间/月		17.24 ± 1.33	16.53 ± 1.64	8.84 ± 1.43		16.83 ± 1.52	15.62 ± 1.24	7.93 ± 1.14

3 讨论

近年来,治疗白血病的方法有了明显提高,但仍有部分患者由于体内MRD的存在,大剂量化疗或造血干细胞移植后还是会发生复发。MRD则为白血病复发和阻碍长期无病生存的主要原因,故白血病治疗的关键即在达到完全缓解后,及时检测到少量白血病细胞并予以彻底清除。德国成人ALL多中心协作组发现^[1],约10%的患者治疗后第24天MRD <0.001 ,为低危组;约23%的患者第16周MRD仍 ≥ 0.0001 ,为高危组;其余为中危组,三者3年复发率分别为0、94%和47%。由此可见,减少低危患者不必要的强化治疗,高危患者及时给予强

化治疗或更改治疗方案,对避免形态学缓解后治疗的盲目性有重要意义。

检测MRD临床上有多种方法。传统的骨髓形态学检测难以反映缓解期内肿瘤负荷的变化,灵敏度仅能达到 5×10^{-2} 水平。现如今检测MRD的方法主要包括FCM、多聚酶链反应(PCR)、细胞遗传学方法(包括染色体核型分析及荧光原位杂交法)。常规染色体核型分析受到分裂项多少的影响,灵敏度不高;荧光原位杂交技术敏感性高,但需特异性探针,成本较高;PCR方法敏感快速,但过于敏感有时与临床不符;FCM通过检测白血病相关抗原表型来定量MRD,这种白血病相关抗原表型

在白血病细胞上表达或高表达,在正常骨髓或外周血细胞上低表达或不表达,FCM 与 PCR 相比速度更快,不足之处在于此方法要求必须详尽掌握患者初发时的表型特征,以便选择适当的标准进行检测^[1]。

本次研究采用 FCM 进行急性白血病患者缓解期 MRD 的检测,结果显示 ALL 患者中,18 例 MRD 持续阳性患者均出现复发,而持续阴性者无一例复发,表明 MRD 水平对患者的预后具有重要意义,这与 Dworzak 等(2002)的研究结果相一致,是由于血液学上骨髓中白细胞计数 <0.05 即为缓解,但 <0.05 的白血病细胞中也可存在恶性增殖能力,从而导致复发,故 MRD 的存在是复发的根源。本研究中所有患者 MRD >0.001 时复发率升高,而复发率与性别、年龄、是否为难治性无关($P>0.05$)。故只要 MRD >0.001 ,须引起高度重视。但梅妍妍等^[4]研究中有 1 例 MRD <0.001 的患者复发,故阴性者不能完全排除复发,仍需加强监测。而 MRD ≥ 0.01 患者的复发时间明显短于 MRD ≤ 0.005 和 $0.005<MRD<0.01$ 的患者,与 Miguel 等(2001)报道的结果一致,对于这类患者,临床上需加大监测并及时调整化疗方案或更换治疗方案。FCM 检测 MRD 在急性白血病治疗过程中具有预测复发、判断预后的作用。但在 ALL 患者的统计结果中发现,复发的敏感性各组均为 100%,但特异性分别为 76.9%、77.8%。可能是因为白血病细胞与正常细胞相比低达 $10^{-5}\sim 10^{-6}$,可低于 FCM 检测范围;同时病程发展,细胞表面抗原变化,也可造成假阴性,从而降低特异性^[5]。尽管如此,从整体

考虑,FCM 检测简单快速,创伤小,比骨髓确诊复发平均提前 6 个月,可采取连续定期动态监测的方法,提高检测结果的准确性,为临床早期复发的预测提供有力证据,有利于临床个体化方案治疗。临床上也有报道采用 RQ-PCR 检测在某些患者可弥补治疗中出现的 FCM 检测 MRD 假阴性的不足^[5]。故综合运用 2 种方法,可较好的避免假阴性。

综上所述,MRD 的水平与急性白血病缓解期患者的预后密切相关,可作为预后评价的敏感指标,MRD ≥ 0.01 时,急性白血病复发的可能性大。FCM 可作为 MRD 检测的常用手段,为临床复发预测、预后判断及个体化治疗提供价值依据。

参考文献

- [1] 袁婷婷. 流式细胞术检测急性白血病完全缓解期微小残留病及临床意义[D]. 浙江:浙江大学医学院,2009.
 - [2] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:103-122.
 - [3] 田孝鹏,孙爱宁,李渭阳,等. 多参数流式细胞术检测白血病微小残留病在急性髓细胞性白血病诱导治疗阶段的临床意义[J]. 苏州大学学报(医学版),2012,32(3):376-399.
 - [4] 梅妍妍,高超,崔蕾,等. 半胱氨酸蛋白酶 A 相关蛋白 2 及微小残留病灶的联合检测在儿童急性淋巴细胞白血病中的预后意义[J]. 中国循证儿科杂志,2013,8(2):122-125.
 - [5] 罗琼,黄志新,罗柳萍,等. TRX-2 基因表达在急性白血病微小残留病灶监测中的作用[J]. 中南大学学报:医学版,2013,38(4):383-387.
- (收稿日期:2015-11-16)
-
- (上接第 208 页)
- ### 参考文献
- [1] Cutolo M, Pizzomi C, Sulli A. Vitamin D endocrine system involvement in autoimmune rheumatic diseases[J]. Autoimmun Rev,2011,11:84-87.
 - [2] Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells[J]. J Immunol,2001,167:4974-4980.
 - [3] Helming L, Bose J, Ehrchen J, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 is a potent suppressor of interferon gamma-mediated macrophage activation[J]. Blood,2005,106:4351-4358.
 - [4] Etten E, Stoffels K, Gysemans C, et al. Regulation of vitamin D homeostasis: implications for the immune system[J]. Nutri Rev,2008,66:S125-S134.
 - [5] Pelajo CF, Lopez-Benitez JM, Miller LC. Vitamin D and autoimmune rheumatologic disorders[J]. Autoimmun Rev,2010,9:507-510.
 - [6] Mahon BD, Wittke A, Wever V, et al. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells[J]. J Cell Biochem,2003,89:922-932.
 - [7] Joseph RW, Bayraktar UD, Kim TK, et al. Vitamin D receptor upregulation in alloreactive human T cells[J]. Hum Immunol,2012,73:693-698.
 - [8] Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? [J]. Arch Biochem Biophys,2012,523:123-133.
 - [9] Hewison M. An update on vitamin D and human immunity[J]. Clin Endocrinol (Oxf),2012,76:315-325.
 - [10] Hu X, Gu Y, Wang Y, et al. Increased CD4⁺ and CD8⁺ effector memory T cells in patients with aplastic anemia[J]. Haematologica,2009,94:428-429.
 - [11] Cantorna MT, Zhu Y, Fruicu M, et al. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system[J]. Am J Clin Nutr,2004,80:1717-1720.
 - [12] Cantorna MT, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence[J]. Exp Biol Med (Maywood),2004,229:1136-1142.
- (收稿日期:2015-10-28)