

- [29] Witzig TE, Tobinai K, Rigacci L, et al. PILLAR-2: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study of adjuvant everolimus (EVE) in patients (pts) with poor-risk diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34:7506.
- [30] Jaeger U, Trneny M, Melzer H, et al. Rituximab maintenance for patients with aggressive B-cell lymphoma in first remission; results of the randomized NHL13 trial[J]. *Haematologica*, 2015, 100:955-963.
- [31] Thieblemont C, Tilly H, Gomes da Silva M, et al. Lenalidomide maintenance compared with placebo in responding elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with first-line rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35:2473-2481.
- [32] Georgiou K, Chen L, Berglund M, et al. Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas[J]. *Blood*, 2016, 127:3026-3034.
- [33] 金静霞, 郑翠苹, 陈丽雅, 等. PD-1、PD-L1 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤组织中的差异性表达及其临床意义[J]. *临床血液学杂志*, 2018, 31(1):34-37.
- [34] Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Blood*, 2015, 126:2193-2201.
- [35] Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, et al. Nivolumab in patients with relapsed or refractory hematologic malignancy: preliminary results of a phase Ib study [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34:2698-2704.

(收稿日期:2018-01-22)

## 流式细胞术对急性髓系白血病微小残留病的检测及研究进展

霍莹莹<sup>1</sup> 李艳<sup>1</sup>

[关键词] 流式细胞术;急性髓系白血病;微小残留病灶;风险评估

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2018.11.017

[中图分类号] R733.71 [文献标志码] A

### Detection and the progress of the minimal/measurable residual disease in acute myeloid leukemia with the method of flow cytometry

**Summary** Acute myeloid leukemia (AML) is a series of highly heterogeneous neoplasm, with the development of detections, whose current therapeutic goal is to realize molecular remission to prolong overall survival. Approximately 40% to 65% AML patients will subsequently relapse because of the residual leukemia cells termed minimal/measurable residual disease (MRD) appearing in bone marrow and peripheral blood. The techniques include flow cytometry (FCM), fluorescence in situ hybridization (FISH), quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR), next-generation sequencing technology (NGS) and so on. However, FISH and qPCR can sensitively identify PML-RAR $\alpha$  fusion gene in the diagnosis of 90% acute promyelocytic leukemia (APL) and has been applied to detect MRD widely. While in AML (not including APL), the methods of MRD are in no agreement. This paper reviews the progress of FCM, the most prevailing detection, in MRD assessment among AML (not including APL) patients.

**Key words** flow cytometry; acute myeloid leukemia; minimal/measurable residual disease; risk assessment

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一类以造血干细胞分化减弱、克隆增殖、原始细胞大量聚集为特点的血液系统恶性肿瘤, 与其他血液系统恶性肿瘤相比, AML 近几十年仍无关键性药物被批准使用并从中获益, 治疗上始终是以蒽环类药物为主的经典“7+3”诱导治疗方案<sup>[1]</sup>。

微小残留病灶 (minimal/measurable residual disease, MRD) 这一概念于 20 世纪 90 年提出, 解答了完全缓解的患者再次复发的根本原因, 并根据这一概念建立了 MRD 预后评估。流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 是一项高敏感性及特异性的检测技术, 在淋巴瘤、骨髓瘤中的诊断意义较为明确<sup>[2-3]</sup>, 在 AML 中却无统一标准, 但多个研究中心均已证实了 MRD 与 AML 预后的相关性<sup>[4-5]</sup>。本文拟对 FCM 检测 AML 患者 MRD 的技术方法、时间点、

<sup>1</sup> 中国医科大学附属第一医院血液科 (沈阳, 110000)  
通信作者: 李艳, E-mail: liyan2@medmail.com.cn

阈值及其与 AML 预后的最新成果进行综述,为 AML 患者个体化治疗提供更精准的 MRD 标记资料。

## 1 FCM 在 AML 患者中 MRD 检测的方法与原理

### 1.1 FCM

FCM 是目前检测 MRD 较成熟且应用最广泛的技术,国内多采用 4~8 色、国外多采用 6~10 色 FCM 技术检测 MRD,灵敏度可达  $10^{-4} \sim 10^{-3}$ 。在 AML 中,90%~95% 的患者可检测白血病相关免疫表型(leukemia associated immune phenotypes, LAIPs)<sup>[6]</sup>。LAIPs 异常涵盖了抗原非同步表达( $CD15^+ CD33^+ CD34^+ / CD65^+ CD33^+ CD34^+$ )、抗原跨系表达( $CD33^+ CD2^+ CD34^+ / CD34^+ CD13^+ CD19^+$ )、抗原表达增强( $HLA-DR^{++} CD33^{++} CD34^{++} / CD64^{++} CD4^+ CD45^{++}$ )、抗原表达减弱甚至缺失等( $HLA-DR^- CD33^+ CD34^+$ )<sup>[7]</sup>。但通过 LAIPs 进行 MRD 检测可出现治疗后免疫表型克隆演化和退化,从而导致结果假阴性及假阳性,且国际各临床中心对 MRD 检测的抗体组合尚无一致意见。对于 10%~20% 无 LAIPs 的患者,则可应用“different from normal”,该方法优势在于不受初诊时 LAIPs 的限制,即使白血病细胞存在抗原转变也能准确的捕捉到异常细胞,但仅局限于一些专业性较高的实验室,尚未广泛开展。

### 1.2 MRD 样本来源与样本质量

目前大多研究机构利用骨髓标本进行检测, Maurillo 等(2007)对 50 例患者的骨髓和外周血检测发现二者 MRD 水平具有明显相关性,有研究中心正在尝试将外周血标本代替骨髓进行 MRD 检测,发现骨髓标本具有更高的灵敏度,外周血将导致灵敏度降低 1~1.5 个对数级<sup>[8-9]</sup>; Zeijlemaker 等<sup>[10]</sup>对 114 例 AML 患者的外周血和骨髓标本进行统计,发现原始的白血病细胞( $CD34^+$ 、 $CD117^+$ 、 $CD133^+$ )在外周血中频率显著降低,外周血比骨髓更具有特异性,高特异性的外周血标本检测 MRD 可能具有显著作用。另外,FCM 的灵敏度也受样本质量的影响,灵敏度如需达到  $10^{-4}$ ,则至少需获取  $7.5 \times 10^5$  个细胞,对骨髓样本的需求量较大, Zeijlemaker 等<sup>[11]</sup>同时检测 15 个抗原的方法极大减少了骨髓样本量。为了尽量全面筛查出有复发风险的 AML 患者,目前骨髓仍然是首选的样本来源,FCM 更加精确的检测方法可减少样本需求量从而提高灵敏度。

### 1.3 MRD 检测的抗原选择

AML 患者免疫学标记抗原通常为:  $CD34$ 、 $CD117$  或  $CD33$  并联合一种髓系表达的抗原或  $HLA-DR$ 。刘艳荣等(2007)研究在 610 例 AML 患者中(包括 APL),  $CD117$ 、 $CD38$  的表达率在 95% 左右,  $CD117$  的阳性表达率较国外同类研究高,认

为  $CD117$  对 AML 诊断的特异度和灵敏度均较高,可鉴别 AML 与 B-ALL;另一项对 122 例初诊的白血病患者研究发现 87% 患者表达 2 个或 2 个以上的 LAIPs 表型,抗原跨系列表达者占 40.9%,其中最常见组合是  $CD56^+ CD13^+ / CD33^+$ ,其次是  $CD7^+ CD13^+ / CD33^+$ ,抗原非同步表达占 20.9%,其中最常见组合是  $CD34^+ CD11b^+$ ,其次是  $CD117^+ CD11b^+$ ; Chatterjee 等<sup>[12]</sup>认为在 MRD 检测中,  $CD34 / CD56$  灵敏度可达  $10^{-4}$ , AML 患者中高表达  $CD87^+$ ,  $CD34$  和  $CD87$  也可作为另一备选组合; Roug 等<sup>[13]</sup>发现人骨髓抑制型 C 型凝集素(human myeloid inhibitory C-type lectin, hMICL, 也称 CLEC12A)联合  $CD123$  抗体组合敏感度达  $10^{-4}$ ,基于 hMICL 和  $CD123$  的 FCM 检测有望成为 MRD 的检测工具;由于 AML MRD 的免疫标记组合尚无统一标准,目前各中心基于 FCM 的 MRD 数据缺乏可比性。

## 2 MRD 检测标准

### 2.1 MRD 的阈值

MRD 检测的阈值水平对无复发生存率(re-lapse free survival, RFS)及总生存率(overall survival, OS)影响显著,由于暂无对 MRD 阈值的统一标准,不同研究中心选择的阈值也不尽相同,其范围介于 0.035%~1.000%。Al-Mawali 等(2009)对 54 例 AML 患者进行 ROC 曲线分析认为,可将阈值设定为 0.15% 对 AML 患者进行危险分层; Felle 等(2004)将首次诱导化疗、第 2 次诱导化疗、巩固治疗后的 MRD 中位阈值分别定为 1%、0.14%、0.11%,认为在不同检测时间点选择不同阈值(0.06%~1.00%)与预后结局的相关强度更明显; Walter 等<sup>[14]</sup>对第 1 次完全缓解( $n=183$ )和第 2 次完全缓解( $n=70$ )患者接受造血干细胞移植前的骨髓标本进行分析,认为移植前 MRD 阴性( $<0.1\%$ )和 MRD 阳性( $>0.1\%$ )患者的 3 年 OS 及复发率差异有统计学意义;在另一大型多中心临床试验中,首次前瞻性的对 MRD 阈值进行了验证,并将 0.1% 作为 MRD 阈值<sup>[4]</sup>。目前 0.1% 是应用最广泛的阈值标准。

### 2.2 MRD 检测时间点

MRD 检测时间点同样极具争议性。不同检测时间点的 MRD 均独立影响 OS 及 RFS<sup>[4]</sup>,其中巩固治疗后检测 MRD 可提供更多信息,并影响后续治疗方案的选择,但目前尚未有对于 MRD 检测最佳时机的统一标准。在一项对儿童 AML 的前瞻性研究中认为,第 1 次诱导治疗后  $MRD > 0.1\%$  是独立不良预后因素<sup>[15]</sup>。目前全球的多个合作中心(包括 GIMEMA、HOVON-SAKK 和 PETHEMA-LMA)的临床试验已接近尾声,相信不久的将来可在此问题上取得突破进展。

### 3 MRD 检测与 AML 的预后关系

#### 3.1 诱导缓解治疗后 MRD 水平与 AML 的预后关系

Terwijn 等<sup>[4]</sup>将 517 例 <60 岁的成人 AML 患者依据细胞遗传学及分子学特征分为良好预后组、中等预后组和不良预后组,对诱导治疗后的 3 个风险组分析发现,MRD 阳性(MRD>0.1%)的患者具有更高的复发风险,在诱导治疗的 2 个治疗周期后对 MRD 进行检测,发现无论是在所有患者还是中等预后组中,MRD 均是独立预后因子,MRD 不仅可以预测结局,还可以指导后续的个体化治疗;Freeman 等<sup>[5]</sup>研究了 >60 岁患者的 MRD 数据,认为第 1 个诱导治疗后的 MRD 可以独立预测 OS,并识别出中等预后组中预后不良的患者,还认为灵敏度更高的方法检测 MRD 在早期治疗中作用有限。多个研究均认为诱导治疗后 MRD 迅速下降提示预后良好<sup>[16-17]</sup>。因此,早期检测 MRD 有助于识别出需接受多次化疗及移植的高风险患者。

#### 3.2 巩固治疗后 MRD 水平与 AML 的预后关系

Venditti 等(2000)认为巩固治疗后 MRD  $\geq 3.5 \times 10^{-4}$  甚至更高提示预后不佳,这一结论在 Maurillo 等(2008)的研究中再次论证,并提出 MRD 阴性的患者无论接受何种移植方案均可获得更好的生存结局;Buccisano 等<sup>[18]</sup>将 143 例 AML 患者综合细胞遗传学、分子学特征与巩固治疗后 MRD 水平对 AML 患者进行风险评估,发现低危核型、中危核型或 FLT3 野生型等分型的患者预后主要取决于巩固治疗后 MRD 状态,巩固治疗后检测 MRD 可以避免过度治疗或治疗不足。但由于巩固治疗检测时间较晚,对治疗的指导意义有限。

#### 3.3 MRD 水平对造血干细胞移植的影响

既往多数研究已经证明在骨髓性自体或异体造血干细胞移植时检测 MRD 可以独立预测完全缓解、复发和短期生存的指标<sup>[19-21]</sup>,不论是接受骨髓性及非骨髓性造血干细胞移植的患者,移植前 MRD 阳性均提示预后不佳<sup>[22]</sup>;Walter 等<sup>[4]</sup>检测了 253 例异基因骨髓移植患者的 MRD,认为移植前 MRD 为独立的预后因子,任何可检测到的 MRD 数量均提示不良预后结局,这一结论在 359 例患者中再次印证<sup>[23]</sup>;因此移植前进行 MRD 检测对预处理方案的选择及移植后维持治疗具有指导意义。

#### 3.4 FCM 检测 MRD 对儿童 AML 患者的意义

儿童 AML 患者出现特异性的基因较成人 AML 比例低,而约 95% 的儿童 AML 患者通过 FCM 检测 MRD,因此儿童 AML 应用 FCM 检测 MRD 较为常用。Rubnitz 等<sup>[15]</sup>认为在第 1 次诱导治疗后 MRD 阳性与预后明显相关,且 MRD 高水平(>1%)患儿的累积复发率和诱导治疗失败率明显高于 MRD 相对低水平(0.1%~1.0%)患儿。

根据 AIEOP-AML 2002/01 研究方案对儿童 AML 进行 FCM 检测,在第 1 次诱导治疗后 MRD > 0.1% 为无病生存率的预后不良指标,诱导治疗后进行 FCM 检测可判断疾病预后,根据 MRD 结果对其分层来选择适宜的缓解后治疗方案<sup>[23]</sup>。由于暂时缺乏儿童 AML 的 MRD 标准,目前至少有 2 个国际合作小组正在进行收集工作。

综上所述,通过对近几年来 FCM 检测 MRD 研究成果的总结,相信 MRD 的时代正在到来,FCM 对 AML 中 MRD 检测意义主要包括以下 2 个方面:①将 AML 的细胞遗传学、分子学特征与 FCM 水平的 MRD 综合评估进行治疗后的危险分层;②在危险分层后尽早识别出应答差、预后不良的高风险患者。但 FCM 仍有许多问题亟待解决:①缺乏国际化统一的抗体选择标准及实验流程;②检测过程中易发生“抗原漂移”;③对化疗后检测 MRD 的时间点及阈值尚无统一标准;④MRD 的评估标准是否同样适用于老年 AML 患者。然而以上困难并非无解决之道。一项欧洲的白血病组织就 AML 应用 FCM 的规范步骤和抗体选择作出推荐并进行验证,以促成其在临床实践中达成共识<sup>[24-25]</sup>,我国也就 FCM 检测 MRD 的原理方法等提出了共识,具有指导意义;针对“抗原漂移”,除了选择多种 LAIPs 提高检测的灵敏度,还可应用“different from normal”的方法避免结果受到“抗原漂移”的影响;此外,将 FCM 与分子技术、二代基因测序等多种方法相结合可以弥补 FCM 方法的不足,已有多项研究对此进行了研究并取得满意成果<sup>[26-28]</sup>。

虽然 FCM 在检测 AML 患者的 MRD 中尚存许多疑问,但随着多种检测技术的不断发展,相信也能为 FCM 带来启发,实现 AML 患者 MRD 的标准化流程及个体化的风险评估和治疗。

#### 参考文献

- [1] DeAngelo DJ, Stein EM, Ravandi F. Evolving therapies in acute myeloid leukemia: progress at last? [J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2016, 35: e302-e312.
- [2] 翁香琴.《流式细胞学在非霍奇金淋巴瘤诊断中的应用专家共识(2016年版)》解读[J]. 临床血液学杂志, 2017, 30(9): 687-692.
- [3] 刘志伟, 郭桂凤, 韩泽平, 等. 流式细胞技术在多发性骨髓瘤诊断中的应用研究[J]. 临床血液学杂志, 2017, 30(9): 714-716.
- [4] Terwijn M, van Putten WLJ, Kelder A, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia; data from the HOVON/SAKK AML 42A study[J]. J Clin Oncol, 2013, 31: 3889-3897.
- [5] Freeman SD, Virgo P, Couzens S, et al. Prognostic relevance of treatment response measured by flow cyto-

- metric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31: 4123–4131.
- [6] Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel [J]. *Blood*, 2017, 129: 424–447.
- [7] Kern W, Haferlach C, Haferlach T, et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer*, 2008, 112: 4–16.
- [8] Ossenkoppele G, Schuurhuis GJ. MRD in AML: does it already guide therapy decision-making? [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2016, 2016: 356–365.
- [9] Paietta E. Should minimal residual disease guide therapy in AML? [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2015, 28: 98–105.
- [10] Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff YJ, et al. Peripheral blood minimal residual disease may replace bone marrow minimal residual disease as an immunophenotypic biomarker for impending relapse in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2016, 30: 708–715.
- [11] Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff YJ, et al. A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2016, 30: 439–446.
- [12] Chatterjee T, Mallhi RS, Venkatesan S. Minimal residual disease detection using flow cytometry: Applications in acute leukemia [J]. *Med J Armed Forces India*, 2016, 72: 152–156.
- [13] Roug AS, Larsen HO, Nederby L, et al. hMICL and CD123 in combination with a CD45/CD34/CD117 backbone—a universal marker combination for the detection of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2014, 164: 212–222.
- [14] Walter RB, Buckley SA, Pagel JM, et al. Significance of minimal residual disease before myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for AML in first and second complete remission [J]. *Blood*, 2013, 122: 1813–1821.
- [15] Rubnitz JE, 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: 543–552.
- [16] Walter RB. Should acute myeloid leukemia patients with actionable targets be offered investigational treatment after failing one cycle of standard induction therapy? [J]. *Curr Opin Hematol*, 2016, 23: 102–107.
- [17] Kohnke T, Sauter D, Ringel K, et al. Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse [J]. *Leukemia*, 2015, 29: 377–386.
- [18] Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, et al. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2010, 116: 2295–2303.
- [19] Walter RB, Gooley TA, Wood BL, et al. Impact of pre-transplantation minimal residual disease, as detected by multiparametric flow cytometry, on outcome of myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29: 1190–1197.
- [20] Leung W, Pui CH, Coustan-Smith E, et al. 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: 468–472.
- [21] Zhou Y, Othus M, Araki D, et al. Pre- and post-transplant quantification of measurable (minimal) residual disease via multiparameter flow cytometry in adult acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2016, 30: 1456–1464.
- [22] Walter RB, Gyurkocza B, Storer BE, et al. Comparison of minimal residual disease as outcome predictor for AML patients in first complete remission undergoing myeloablative or nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. *Leukemia*, 2015, 29: 137–144.
- [23] Araki D, Wood BL, Othus M, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia: time to move toward a minimal residual disease-based definition of complete remission? [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34: 329–336.
- [24] Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: consensus document from ELN MRD Working Party [J]. *Blood*, 2018, 131: 1275–1291.
- [25] Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10 [J]. *Leukemia*, 2011, 25: 567–574.
- [26] Getta BM, Devlin SM, Levine RL, et al. Multicolor flow cytometry and multigene next-generation sequencing are complementary and highly predictive for relapse in acute myeloid leukemia after allogeneic transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2017, 23: 1064–1071.
- [27] Zhao X, Yan C, Liu D, et al. Combined use of WT1 and flow cytometry monitoring can promote sensitivity of predicting relapse after allogeneic HSCT without affecting specificity [J]. *Ann Hematol*, 2013, 92: 1111–1119.
- [28] 邱林. 未来精准治疗白血病的卫士——新一代高通量测序技术 [J]. *临床血液学杂志*, 2017, 30(5): 342–344, 349.