

# 血液恶性肿瘤诊断现状与挑战

秦亚溱 黄晓军

**Current status and challenges of diagnosis and monitoring of hematologic malignancies** Qin Yazhen, Huang Xiaojun

Corresponding author: Huang Xiaojun, Peking University People's Hospital, Peking University Institute of Hematology, Beijing 100044, China. Email: huangxiaojun@bjmu.edu.cn

血液恶性肿瘤是一种严重危害人类健康的重大疾病。随着新技术的发明应用,其总体诊断水平得以明显提高,伴随着新药的临床应用,治疗水平明显进步。科学而有效地应用各项诊断指标,使其在治疗中发挥最佳指导作用是当前血液恶性肿瘤领域面临的挑战。

## 一、血液恶性肿瘤诊断现状

血液恶性肿瘤诊断当前有两大特点,即精确诊断和动态监测。

1. 精确诊断:以白血病为例,早年主要依据细胞形态学及细胞化学染色诊断,1976年由此制定出FAB分型系统<sup>[1]</sup>。进入20世纪80年代中期,人们发现采用流式细胞术检测的免疫表型以及染色体核型和荧光原位杂交技术(FISH)检测的染色体变化对诊断、治疗及预后判断具有重要意义,因此提出了MIC分型<sup>[2]</sup>。随后,白血病的分子特征研究取得明显进展,特别是检出的染色体易位形成的融合基因反映了白血病的生物学本质,因而提出了白血病MICM分型方案。近年来,与白血病发生及预后相关的分子异常的不断发现使得诊断越来越精细<sup>[3-4]</sup>。例如在美国NCCN急性髓系白血病(AML)指南(2015年第1版)中,通过联合细胞遗传学和分子学异常进行分层,其中inv(16)和t(8;21)AML均属于预后良好组,但是如果伴有c-KIT突变即归于

中危组。因此,当前白血病的诊断是结合多项检测指标进行的综合评判,精确分层诊断促进了治疗分层。

精确诊断促进了白血病机制的深入研究、指导了规范化治疗,从而显著改善患者预后。急性早幼粒细胞白血病(APL)在FAB分型系统中被定为AML-M<sub>3</sub>亚型,随后发现其具有特征性的t(15;17)(q22;q21)及相应的融合基因PML/RAR $\alpha$ ,这是APL发病的关键<sup>[5]</sup>。伴随着发病机制研究的深入,APL的治疗经历了化疗、维甲酸联合化疗、砷剂以及维甲酸联合砷剂的阶段,患者总体存活率由45%升至97%,成为第一个可以治愈的白血病<sup>[6]</sup>。对于慢性髓性白血病(CML),2008年版WHO分类中已明确其具有Ph染色体和(或)BCR-ABL融合基因,结合染色体核型分析、FISH及PCR技术来诊断。从20世纪90年代开始,以伊马替尼为首的靶向作用于BCR-ABL的酪氨酸激酶抑制剂(TKI),使CML及Ph(+)急性淋巴细胞白血病(ALL)疗效明显改善<sup>[7-8]</sup>,尤其是CML已从致死性疾病转变为慢性病,大部分患者总体生存期已与正常人群相同<sup>[9]</sup>。

2. 微小残留病(MRD)的动态监测:MRD是指患者完全缓解后残留在体内的少量肿瘤细胞,很可能是导致肿瘤复发的根源。其主要检测方法包括流式细胞术和PCR。不同患者治疗期间MRD的动力学变化不同并具有预后意义,因而,通过MRD的监测可以了解患者低水平的肿瘤负荷、发现患者耐药表现并更早预测血液恶性肿瘤复发、尽早调整治疗方案以降低复发。MRD监测在儿童ALL治疗分层中发挥重要作用,欧洲AIEOP-BFMALL 2000临床试验显示,根据第33天和第78天的MRD能够将患儿分成累积复发率(CIR)及无事件生存(EFS)明显不同的三组<sup>[10]</sup>。美国NCCN指南(2015年第1版)、欧洲ELN推荐<sup>[11]</sup>及中国指南<sup>[12]</sup>均明确依据CML患者TKI治疗中特定时间点的分子学/细胞遗传学反应来评估疗效,并推荐随后的治疗:不变、换用第二代TKI或异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)。尤其是治疗早期(3个月及6个月)的分子学/细胞遗传学反应已证明能够预测长期的分子学

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.12.001

基金项目:国家自然科学基金(81170483);北京市科技计划(Z141100000214011)

作者单位:100044 北京大学人民医院、北京大学血液病研究所

通信作者:黄晓军,Email: huangxiaojun@bjmu.edu.cn

反应、事件发生、疾病进展及生存<sup>[13]</sup>。正是TKI的成功应用和BCR-ABL mRNA水平的监测推动了CML治疗目标的演变,从最初的完全血液学缓解(CHR),经过完全细胞遗传学缓解(CCyR)、主要分子学缓解(MMR)发展到深层次分子缓解(如MR4.5)。在获得稳定深层次分子反应的患者中进行的停药试验证明部分患者能够成功停药<sup>[14]</sup>,因此CML患者“临床治愈”已成为可能。

根据MRD对患者分层并优化治疗策略,从而改善总体预后同样在其他血液恶性肿瘤中得以实现。北京大学人民医院AML05临床试验显示,根据巩固2~8个疗程期间的AML1-ETO mRNA水平是否下降3-log能够将t(8;21)AML患者分为低危和高危组,高危患者通过CIR下降、无疾病生存(DFS)及总生存(OS)的改善而获益于allo-HSCT,而低危患者通过OS的改善获益于化疗<sup>[15]</sup>。在inv(16)AML患者中亦得到类似结论<sup>[16]</sup>。多发性骨髓瘤(MM)中MRD的应用在近几年成为热点,流式细胞术和高通量测序(NGS)技术检测的MRD可以对患者进行分层<sup>[17]</sup>。在淋巴瘤领域,随着多个新药的研发应用,MRD监测也成为治疗需求,MRD的预后意义已经得到证明<sup>[18]</sup>。

## 二、血液恶性肿瘤诊断面临的挑战

1. 标准化的应用与推广:要做到精确诊断,检测标准化是基本要求,包括室内标准化和室间标准化两方面。前者指实验室内部标准化的操作程序、室内质控品日常监测等。当前这方面整体意识薄弱,主要问题包括:质控品选择不规范、质控频度把握不准、质控方法掌握不准确、靶值确定不准确以及室内质控数据管理不规范等。室间标准化是指实验室间的结果比对。美国病理协会(CAP)是目前全球影响力最大的室间质评平台,许多血液恶性肿瘤常规诊断项目包含其中,但是其中很多项目比对最终仅展示参与实验室总体结果而不做评估。国内室间比对主要由卫生部临床检验中心发起,目前主要是检验科常规项目。血液恶性肿瘤诊断项目由于多样、复杂及进展快等特点,大部分尤其是分子诊断项目国内尚无官方质评。

标准化执行不好会导致检测结果不准确和意义不明确。2010年,国内10家大医院检测同一样本的BCR-ABL mRNA水平,2家结果明显偏离,另外8家结果比较一致,但之间仍有1-log左右的差异。这一方面是由于检测程序出现问题,另一方面反映不同实验室定量检测结果很可能不同。同样,国际上

三家著名实验室对同一样本BCR-ABL的定量检测结果也不一样<sup>[19]</sup>。在当前TKI治疗CML的背景之下,为了实现不同实验室BCR-ABL mRNA水平结果可比和意义相同,2006年国际上提出了转换系数(CF)的概念,即各家实验室检测值与自身CF相乘,得出国际标准化的BCR-ABL(BCR-ABL<sup>IS</sup>),BCR-ABL<sup>IS</sup>为0.1%即代表CML患者获得了MMR,从而实现意义明确<sup>[19]</sup>。

CF通过与参比实验室样本比对获得。中国CML联盟于2010年开始的“中国CML患者BCR-ABL定量检测标准化项目”是开展室间质评、实现检测标准化的成功模式<sup>[20]</sup>。2012年,北京大学人民医院成功通过了与澳大利亚阿德莱德IMVS国际参比实验室的样本比对,获得有效CF,并成为中国CML参比实验室,通过与国内其他实验室间的样本比对,使他们获得转换BCR-ABL<sup>IS</sup>的CF<sup>[21]</sup>。到目前为止,全国42家医院及3家商业检测中心参加了该项目,已有37家获得CF。CF获得后继续通过定期样本比对进行CF的再确认以保证其持续准确<sup>[22]</sup>。数据显示,北京大学人民医院治疗的CML患者的细胞遗传学反应率与德国CML study IV临床试验近似,在各自转换为BCR-ABL<sup>IS</sup>后,治疗3个月和6个月的不同分子学反应各组患者比例亦近似<sup>[23]</sup>,说明BCR-ABL<sup>IS</sup>实现了不同实验室结果可比。此外,中国CML联盟还开展了BCR-ABL酪氨酸激酶区突变检测的室间标准化工作<sup>[24]</sup>,并将推进该方面的继续教育工作。因此,在没有官方质评时,各实验室间的合作同样可以开展室间标准化。

2. 监测的推广、普及和检测项目的选择:MRD监测尚未普及。即使是执行得最好的CML患者的监测,现实依然不能令人满意。在欧洲和美国,分别有59%和64%的患者检测频率与欧洲ELN的推荐不相符,有14%的医生不认为监测对所有患者是必要的<sup>[25]</sup>。中国CML联盟的调查数据显示只有15%的患者能够按照ELN的推荐进行BCR-ABL的监测。因此,需要不断开展继续教育,强化MRD监测的理念,推动实际应用。

目前存在检测项目选择过度和不足的问题。对于白血病分子诊断的应用,一种现象是对所有患者均进行同样的多基因全筛查而不考虑疾病类型,另一种现象是初诊时检出的异常项目要么都不监测要么所有异常项目均随访。诊断项目的选择不能一刀切,而初诊时异常的项目并不都适合做MRD监测。

3. 商业检测的利与弊:商业检测对于诊断的发展起了很大推动作用。医院实验室和商业检测中心各有优缺点。医院实验室的优势包括:紧扣临床、注重临床意义,与临床相互交流便利,标本送达迅速,某些项目能够快速出结果而有利于临床尽早治疗;劣势包括:人员配置、试剂设备的选择及新项目的增加等受医院管理体制的限制,受医院人才评估体系的限制等导致开展新项目积极性不高。商业检测中心的优势在于:开展新项目快,目标明确,管理相对简单;劣势在于:项目泛化,与临床存在一定脱节以及易发生检测项目选择过多的问题。以诊断范可尼贫血的检测项目之一染色体断裂试验为例,某商业检测中心仅报告了患者及对照的断裂率,而国际诊断标准中则是根据积分评估,同时要考虑断裂方式。另外商业检测中心可能存在影响样本质量的寄送问题。因此,商业检测中心是医院实验室很好的补充,为了克服劣势,还需要加强与大学及医院的合作。

4. 新技术的应用:当前新技术中有代表性的是NGS和数字PCR(dPCR)。NGS是相对于传统的sanger测序法而命名,其最大特点是高通量,能够提供丰富的信息,同时检测费用和时间大大降低,另一特点是能够定量并可以提高敏感性。近几年,NGS在发现新基因异常、发病机制研究及临床诊断方面均开始发挥作用。例如,通过对入组美国ECOG E1900临床试验的398例≤60岁的成人AML患者采用NGS靶向测序18个基因,发现了这些基因异常的分布特征及相互关系,并通过组合更精确地分层患者<sup>[26]</sup>。此外,NGS检测与实时定量PCR等检测的NPM1突变及FLT3-ITD之间均呈现出很好的一致性,提示NGS有可能用于MRD的监测<sup>[27]</sup>。尽管NGS得到广泛推崇,但是其结果是否真的可靠尚存在疑问。有人对同一组原始数据用两种常用的生物信息技术处理后发现,二者相关系数很低,存在明显差异<sup>[28]</sup>。因此,NGS应用于临床之前还需要技术和流程的标准化,只有可靠性得到充分验证之后才能推向临床诊断。此外,如何将NGS技术最有效应用于不同类型患者还有待探讨。

dPCR实现了绝对定量从而使定量更准确并提高了敏感度。目前报道的主要是应用于TKI治疗的CML患者,dPCR能够检测出实时定量PCR不能检出的BCR-ABL,因而能够继续检测更低水平的动力学变化<sup>[29]</sup>。dPCR(+)与年龄结合可能鉴别出停药后高复发风险的患者<sup>[30]</sup>。不过在检测敏感度提

高的同时必须考虑假阳性的问题。之前已有报道采用高敏感的巢式PCR在正常人外周血中普遍检测到BCR-ABL等融合基因<sup>[31-32]</sup>。dPCR在正常人中能否检出融合基因未见报道。此外,高敏感dPCR的应用对整个实验过程的防污染提出了更高要求。另外,标准化对于保证dPCR的结果准确同样是必要的,但是如何实施仍是一个空白。以上潜在问题的解决是dPCR推向临床的前提。

诊断是实现血液恶性肿瘤精准治疗的前提,只有准确诊断才能发挥其临床指导作用,而实施标准化是准确诊断的基础。新技术前景十分美好,但是目前应用并不十分满意。当今挑战与机遇并存,我们既要追求创新,又要保持谨慎,推动诊断稳步前进,促进血液恶性肿瘤诊治水平的进步。

#### 参考文献

- [1] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group[J]. Br J Haematol, 1976, 33(4):451-458.
- [2] First MIC Cooperative Study Group. Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemias[J]. Cancer Genet Cytogenet, 1986, 23(3):189-197.
- [3] Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations[J]. Blood, 2012, 120(15):2963-2972.
- [4] Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, et al. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients[J]. Leukemia, 2014, 28(8):1586-1595.
- [5] Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable[J]. Blood, 2008, 111(5):2505-2515.
- [6] Efficace F, Mandelli F, Avvisati G, et al. Randomized phase III trial of retinoic acid and arsenic trioxide versus retinoic acid and chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia: health-related quality-of-life outcomes[J]. J Clin Oncol, 2014, 32(30):3406-3412.
- [7] Towatari M, Yanada M, Usui N, et al. Combination of intensive chemotherapy and imatinib can rapidly induce high-quality complete remission for a majority of patients with newly diagnosed BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2004, 104(12):3507-3512.
- [8] Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2003, 349(15):1423-1432.
- [9] Castagnetti F, Gugliotta G, Breccia M, et al. Long-term outcome of chronic myeloid leukemia patients treated frontline with

- imatinib[J]. *Leukemia*, 2015, 29(9):1823-1831.
- [10] Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study[J]. *Blood*, 2010, 115(16):3206-3214.
- [11] Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013[J]. *Blood*, 2013, 122(6):872-884.
- [12] 中华医学会血液学分会. 中国慢性髓性白血病诊断与治疗指南(2013年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34(5):464-470.
- [13] Hanfstein B, Müller MC, Hehlmann R, et al. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML) [J]. *Leukemia*, 2012, 26(9):2096-2102.
- [14] Mahon FX, Réa D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(11): 1029-1035.
- [15] Zhu HH, Zhang XH, Qin YZ, et al. MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial[J]. *Blood*, 2013, 121(20):4056-4062.
- [16] Qin YZ, Xu LP, Chen H, et al. Allogeneic stem cell transplant may improve the outcome of adult patients with inv(16) acute myeloid leukemia in first complete remission with poor molecular responses to chemotherapy [J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 12:1-8. DOI:10.3109/10428194.2015.1032964.
- [17] Rawstron AC, Gregory WM, de Tute RM, et al. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction [J]. *Blood*, 2015, 125(12):1932-1935.
- [18] Pott C, Hoster E, Delfau-Larue MH, et al. Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study [J]. *Blood*, 2010, 115(16): 3215-3223.
- [19] Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results [J]. *Blood*, 2006, 108(1):28-37.
- [20] 秦亚涛, 程辉, 岑建农, 等. 定量检测 bcr-abl(P210)转录本水平多中心比对研究[J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34(2): 104-108.
- [21] 秦亚涛, 林振兴, 岑建农, 等. 用于转换国际标准的 BCR-ABL (P210)转录本水平的转换系数多中心确认研究[J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(2): 134-137.
- [22] 秦亚涛, 马道新, 王云贵, 等. 转换国际标准化的 BCR-ABL (P210)转录本水平的转换系数多中心再确认研究[J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36(10): 814-817.
- [23] Qin YZ, Jiang Q, Jiang H, et al. Which method better evaluates the molecular response in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia patients with imatinib treatment, BCR-ABL (IS) or log reduction from the baseline level? [J]. *Leuk Res*, 2013, 37(9): 1035-1040.
- [24] 秦亚涛, 王冬梅, 乔纯, 等. BCR-ABL 酪氨酸激酶区点突变检测多中心比对研究[J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36(11): 902-905.
- [25] Goldberg SL, Akard LP, Dugan MJ, et al. Barriers to physician adherence to evidence-based monitoring guidelines in chronic myelogenous leukemia [J]. *J Oncol Pract*, 2015, 11(3): e398-404.
- [26] Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(12):1079-1089.
- [27] Thol F, Köhling B, Damm F, et al. Next-generation sequencing for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD or NPM1 mutations [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012, 51(7):689-695.
- [28] Bodini M, Ronchini C, Giacobbe L, et al. The hidden genomic landscape of acute myeloid leukemia: subclonal structure revealed by undetected mutations [J]. *Blood*, 2015, 125(4): 600-605.
- [29] Goh HG, Lin M, Fukushima T, et al. Sensitive quantitation of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia using nanofluidic digital polymerase chain reaction assay [J]. *Leuk Lymphoma*, 2011, 52(5):896-904.
- [30] Mori S, Vagge E, le Coutre P, et al. Age and dPCR can predict relapse in CML patients who discontinued imatinib: The ISAV study [J]. *Am J Hematol*, 2015, 90(10):910-914.
- [31] Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, et al. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease [J]. *Blood*, 1998, 92(9):3362-3367.
- [32] Song J, Mercer D, Hu X, et al. Common leukemia- and lymphoma-associated genetic aberrations in healthy individuals [J]. *J Mol Diagn*, 2011, 13(2):213-219.

(收稿日期:2015-10-12)

(本文编辑:徐茂强)