

急性髓系白血病患者诱导化疗后第七或第八天微小残留病检测的预后意义

彭楠 魏辉 林冬 周春林 刘兵城 王迎 刘凯奇 宫本法
魏述宁 张广吉 刘云涛 弓晓媛 邱少伟 秘营昌 王建祥

【摘要】 目的 探讨急性髓系白血病(AML)患者诱导化疗后骨髓抑制期,采用多参数流式细胞术(MPFC)检测的骨髓微小残留病(MRD)在疗效判断及预后中的价值。方法 回顾性分析85例初诊并于诱导化疗后第7~8天采用八色MPFC检测了骨髓MRD的AML(非急性早幼粒细胞白血病)患者临床资料,对其与疗效及预后的关系进行统计学分析。结果 在85例患者中,男42例(49.4%),女43例(50.6%),中位年龄35(15~54)岁,诱导化疗后第7~8天MRD中位数0.58%(0~81.11%),1个疗程诱导治疗后完全缓解(CR)患者70例(82.4%)。根据受试者工作特征曲线(ROC曲线)得到MRD的阈值为2.305%(Se=0.867, Sp=0.800)。MRD<2.305%的患者1个疗程CR率为96.6%(56/58),MRD \geq 2.305%的患者1个疗程CR率为51.9%(14/27),两组CR率差异有统计学意义($\chi^2=22.348$, $P<0.001$);两组无复发生存率差异无统计学意义($\chi^2=1.08$, $P=0.299$);两组总生存率差异无统计学意义($\chi^2=0.42$, $P=0.516$)。多因素分析结果显示,以2.305%为界的MRD($OR=21.560$, 95% CI 4.129~112.579, $P<0.001$)是第1个疗程诱导疗效的唯一独立预后因素。结论 AML患者诱导化疗后骨髓抑制期,采用MPFC检测骨髓MRD以2.305%为界能够预测诱导化疗疗效。

【关键词】 白血病,髓样,急性; 多参数流式细胞术; 微小残留病; 预后

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81430004);天津市临床医学研究中心基金(15ZXLC-SY00010)

Prognostic significance of flow cytometric minimal residual disease in acute myeloid leukemia during aplasia Peng Nan, Wei Hui, Lin Dong, Zhou Chunlin, Liu Bingcheng, Wang Ying, Liu Kaiqi, Gong Benfa, Wei Shuning, Zhang Guangji, Liu Yuntao, Gong Xiaoyuan, Qiu Shaowei, Mi Yingchang, Wang Jianxiang. Institute of Hematology & Blood Disease Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China
Corresponding author: Wang Jianxiang, Email: wangjx@ihcams.ac.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the impact of minimal residual disease (MRD) by multiparameter flow cytometry (MPFC) during aplasia on efficacy and prognosis of de novo acute myeloid leukemia (AML) (non M_3) patients. **Methods** The MRD data by 8-color MPFC during aplasia (day 14-15 of induction therapy) in 85 de novo AML (non M_3) patients and the MRD impact on efficacy and prognosis were retrospectively analyzed. **Results** Data of 85 patients, including 42 males (49.4%) and 43 females (50.6%), were collected, with a median age of 35 (15-54) years. The median MRD by MPFC during aplasia was 0.58% (0-81.11%), and 70 (82.4%) patients achieved complete remission (CR) after first induction chemotherapy. The cutoff of MRD by receiver operating characteristic (ROC) analysis was 2.305% (Se = 0.867, Sp = 0.800). The CR rate after one course was significantly higher in patients with MRD < 2.305% [96.6% (56/58)] than in patients with MRD \geq 2.305% [51.9% (14/27)] ($\chi^2 = 22.348$, $P < 0.001$); no significant difference with respect to relapse-free survival rate ($\chi^2 = 1.08$, $P = 0.299$) or overall survival rate ($\chi^2 = 0.42$, $P = 0.516$) could be demonstrated for the comparison of the two groups. Multivariate analysis showed MRD divided by 2.305% was the only independent prognostic factor for CR after one course ($OR = 21.560$, 95% CI 4.129-112.579, $P < 0.001$). **Conclusion** Flow cytometric MRD divided by 2.305% during aplasia could be a predictor of efficacy after first induction therapy in AML patients.

【Key words】 Leukemia, myeloid, acute; Multiparameter flow cytometry; Minimal residual disease; Prognosis

Fund program: State Key Program of National Natural Science of China (81430004); Tianjin Clinical Medicine Research Centre Foundation (15ZXLCSY00010)

诱导化疗后第7~8天(骨髓抑制期)评估的骨髓白血病细胞残留数量与急性髓系白血病(AML)的诱导化疗疗效及长期生存密切相关^[1-4]。我们既往的研究显示,第1个疗程诱导化疗后骨髓抑制期形态学检测的骨髓幼稚细胞比例是AML患者的独立预后因素^[5-6]。形态学检测的灵敏度为1%,多参数流式细胞术(multiparameter flow cytometry, MPFC)检测的灵敏度和特异度较形态学更高,MPFC是目前微小残留病(minimal residual disease, MRD)的主要监测方法之一^[7-10]。Köhnke等^[11]2015年报道了诱导化疗后骨髓抑制期流式细胞术评估MRD对无复发生存(RFS)和总生存(OS)的预测价值。我们在本研究中分析了诱导化疗后第7~8天采用MPFC检测骨髓MRD在AML患者疗效及预后判断中的价值。

病例与方法

1. 病例:2015年2月25日至11月17日于我院白血病诊疗中心住院治疗的初诊AML(非急性早幼粒细胞白血病)患者中,85例于诱导治疗后骨髓抑制期采用MPFC检测MRD。所有病例根据病史、骨髓细胞形态学、免疫表型分析、细胞遗传学、分子生物学特征,按WHO 2008标准^[12]确诊,参照NCCN 2015指南进行危险度分组^[13]。骨髓染色体核型分析采用G显带法,分子生物学检测采用实时定量PCR方法。

2. 治疗方案:患者均采用高三尖杉酯碱(HHT)、阿糖胞苷(Ara-C)与柔红霉素(DNR)三药联合方案(HAD方案)进行诱导化疗^[14-15]。完全缓解(CR)后按NCCN危险度分组选择不同的治疗:预后良好组首选巩固化疗;有合适供者的预后不良组或预后中等组选择异基因造血干细胞移植,无移植条件者进行巩固化疗。巩固化疗给予大剂量Ara-C、DA(DNR联合Ara-C)、MA(米托蒽醌联合Ara-C)或HA(HHT联合Ara-C)等方案治疗。

3. 骨髓MRD的MPFC检测:在诱导化疗后第7~8天(骨髓抑制期)进行骨髓穿刺检查评估MRD。采集患者骨髓2~3 ml,肝素钠抗凝,分离有核细胞,按照我院流式细胞室检验常规,采用八色

MPFC标记白血病相关免疫表型检测MRD(美国BD公司FACS Callibur多色流式细胞仪)。

4. 疗效标准及随访:疗效评估标准参考文献^[16]。OS时间为确诊之日至任何原因引起的死亡或末次生存随访时间。RFS时间为从达到形态学无白血病状态的日期至AML复发、任何原因引起的死亡或末次生存随访时间,仅适用于获CR患者。随访时间截至2016年4月2日。

5. 统计学处理:采用SPSS 12.0软件进行统计分析,MRD阈值的确定采用绘制受试者工作特征曲线(ROC曲线)。MRD阴性组和阳性组的年龄、HGB、初诊骨髓原始细胞的比较采用*t*检验,性别比较采用二项分布,WBC、PLT、乳酸脱氢酶(LDH)的分布比较采用非参数检验,NCCN危险度各组比较采用Pearson卡方检验。MRD阴性组和阳性组CR率的比较应用连续性校正 χ^2 检验。生存曲线采用Kaplan-Meier法作图,不同组别生存率比较采用Log-rank检验。影响第1个疗程诱导化疗疗效的多因素分析采用二分类Logistic回归模型。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 临床特征:诱导化疗后骨髓抑制期评估MRD的85例初诊AML患者中,男42例,女43例,中位年龄35(15~54)岁。初诊时WBC中位数21.10(0.74~141.94) $\times 10^9/L$,HGB中位数83(51~153)g/L,PLT中位数43(7~294) $\times 10^9/L$,LDH中位数426(130~3 820)U/L,初诊骨髓原始细胞中位数0.640(0~0.910)。按照WHO分型:AML伴t(8; 21)13例,AML伴inv(16)3例,非特殊类型AML 68例(M₀1例, M₁2例, M₂18例, M₄9例, M₅37例, M₆1例)。NCCN危险度分组:预后良好28例,预后中等35例,预后不良22例。骨髓抑制期MPFC检测MRD中位数0.58%(0~81.11%)。

2. 疗效:85例诱导化疗后骨髓抑制期检测MRD的患者中,1个疗程诱导化疗后达CR 70例(82.4%),2个疗程达CR 76例(89.4%),最终CR患者77例(90.6%)。8例患者未进行巩固治疗,77例于缓解后进行巩固化疗,6例行异基因造血干细胞

移植。77例CR患者中复发8例,死亡1例,8例非CR患者中死亡1例。中位随访时间为6.6(1.2~12.3)个月。

3. MRD的阈值:MRD的ROC曲线下面积为0.841($SE=0.051$,95% CI 0.741~0.941, $P=0.000$),相应的ROC曲线见图1。

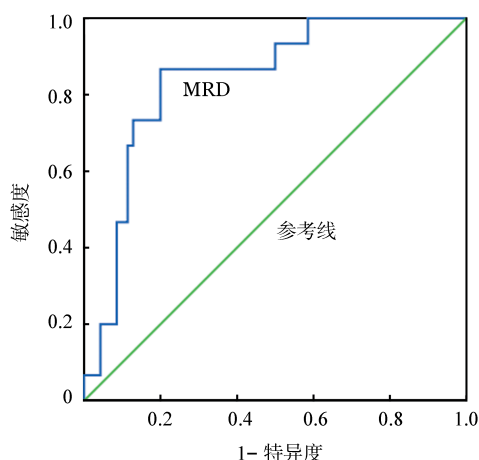


图1 微小残留病(MRD)的受试者工作特征曲线

根据ROC曲线得到MRD的每个界值对应的敏感度(Se)和1-特异度(Sp),计算每个界值的Youden指数、阴性预测值(PV₋)。选取Youden指数最大值(0.667)对应的2.305%(Se=0.867,Sp=0.800)为MRD阈值,其阴性预测值为97%,即当MRD \leq 2.305%时,患者第1个疗程诱导化疗获CR的比例为97%。

4. MRD阴性组和阳性组临床特征及预后比较:MRD<2.305%(58例)定义为MRD阴性,阴性组患者MRD中位数0.08%(0~2.25%);MRD \geq 2.305%

(27例)定义为MRD阳性,阳性组患者MRD中位数8.89%(2.36%~81.11%)。

MRD阴性组中NCCN预后良好患者比例高于阳性组($P=0.015$),NCCN预后不良患者比例低于阳性组($P=0.033$),预后中等患者比例与阳性组相比差异无统计学意义($P=0.676$);两组患者其余初诊时临床特征差异均无统计学意义(P 值均 >0.05) (表1)。

MRD阴性组和阳性组第1个疗程治疗后CR率分别为96.6%(56/58)、51.9%(14/27),差异有统计学意义($\chi^2=22.348$, $P<0.001$)。单因素分析显示,MRD阳性($OR=26.000$,95% CI 5.251~128.747, $P<0.001$)、NCCN危险度分组预后不良($OR=4.571$,95% CI 1.417~14.748, $P=0.011$)、年龄<40岁($OR=0.934$,95% CI 0.880~0.992, $P=0.026$)为1个疗程CR的不良预后因素。多因素分析显示,以2.305%为界的MRD($OR=21.560$,95% CI 4.129~112.579, $P<0.001$)是第1个疗程诱导疗效的唯一独立预后因素;而年龄($OR=0.268$,95% CI 0.043~1.689, $P=0.161$)和NCCN危险度分组($OR=3.475$,95% CI 0.822~14.688, $P=0.090$)不是独立预后因素。

56例CR的MRD阴性患者复发5例,死亡1例;21例CR的MRD阳性患者复发3例,两组的RFS率差异无统计学意义($\chi^2=1.080$, $P=0.299$)(图2)。2例死亡患者MRD均阴性,两组的OS率差异无统计学意义($\chi^2=0.420$, $P=0.516$)(图3)。

讨 论

目前AML患者MRD的监测方法包括实时定

表1 微小残留病(MRD)阴性组和阳性组初诊时临床特征比较

| 临床特征 | MRD阴性组(58例) | MRD阳性组(27例) | 统计量 | P值 |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------|-------|
| 年龄(岁) | 37.5(16~54) | 32(15~54) | 1.983 | 0.051 |
| 性别(例,男/女) | 26/32 | 16/11 | 1.535 | 0.215 |
| WBC[$\times 10^9/L$,M(范围)] | 22.35(0.74~141.94) | 13.54(1.71~101.93) | -1.119 | 0.263 |
| HGB[g/L,M(范围)] | 84(55~153) | 78(51~125) | 1.901 | 0.061 |
| PLT[$\times 10^9/L$,M(范围)] | 41(7~294) | 45(15~198) | -1.043 | 0.297 |
| LDH[U/L,M(范围)] | 436.5(165~3 820) | 356(130~3 167) | -0.826 | 0.409 |
| 初诊骨髓原始细胞[M(范围)] | 0.620(0~0.890) | 0.748(0.040~0.910) | -1.499 | 0.138 |
| NCCN危险度分组[例(%)] | | | | |
| 预后良好 | 24(41.4) | 4(14.8) | 5.885 | 0.015 |
| 预后中等 | 23(39.7) | 12(44.4) | 0.174 | 0.676 |
| 预后不良 | 11(19.0) | 11(40.7) | 4.554 | 0.033 |

注:MRD阴性:诱导化疗后骨髓抑制期MRD<2.305%;MRD阳性:诱导化疗后骨髓抑制期MRD \geq 2.305%

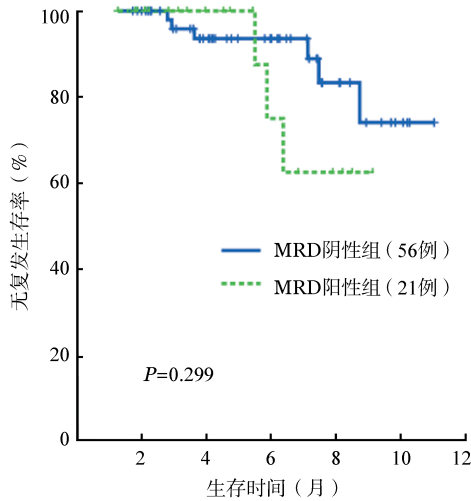


图2 诱导化疗后骨髓抑制期微小残留病(MRD)阳性和阴性组患者的无复发生存曲线

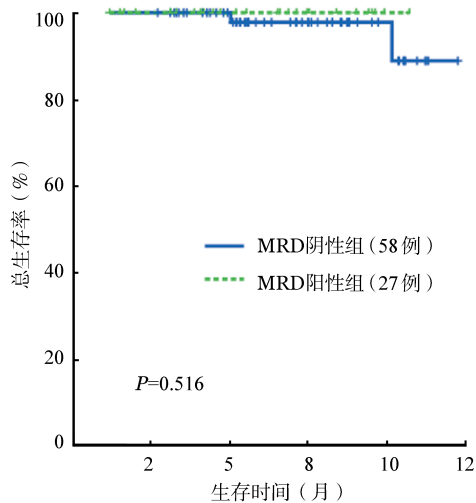


图3 诱导化疗后骨髓抑制期微小残留病(MRD)阳性和阴性组患者的总生存曲线

量PCR检测白血病特异的基因靶点和MPFC识别白血病相关的免疫表型^[7-10]。实时定量PCR检测的灵敏度为 $10^{-4} \sim 10^{-5}$,但仅适用于约三分之一的患者;MPFC检测的灵敏度为 $10^{-3} \sim 10^{-5}$,可适用于85%~90%的患者^[7,8,11]。大宗病例的临床研究证实,MPFC监测的骨髓MRD在<60岁^[8]和>60岁^[17]的AML患者中对评价诱导和巩固治疗后的CR、OS以及RFS均有显著意义。

诱导化疗后第7~8天行骨髓穿刺评价AML患者的早期疗效对于判断预后具有重要价值。德国AML协作组^[1]研究表明,第1个疗程第16天(诱导化疗后1周)评估骨髓形态学幼稚细胞比例能够反映个体对于化疗的敏感性,是CR、OS及RFS的独立预后因素,并且第16天幼稚细胞低于0.100的患者CR率、5年OS率和RFS率更高。薛华等^[5]报道以

10%为界,诱导化疗后第7~10天骨髓涂片幼稚细胞是第1个疗程CR、OS和无病生存(DFS)的独立预后因素。姜波等^[6]证明以5%为界亦得到与上述研究同样的结论。然而,早期采用MPFC评估MRD的研究相较诱导和巩固治疗后的研究较少。Köhnke等^[11]报道,以>0.15%为诱导化疗后第7天骨髓抑制期MRD阳性,MRD阳性患者的5年RFS率(16%)明显低于MRD阴性者(43%, $P < 0.001$),5年OS率分别为32%和55%($P = 0.019$);但以5%或10%为界值的骨髓抑制期形态学检测MRD未显示对RFS或OS有影响;更重要的是,骨髓抑制期未检测出MRD患者的预后不受骨髓抑制期形态学检测白血病细胞数或诱导治疗后MRD状态的影响。Ferrara等^[2]研究显示,仅对诱导化疗后第7天流式细胞术监测骨髓白血病细胞超过10%的患者采用双诱导治疗,CR率为67%(20/30),中位OS时间为15个月,中位DFS时间为12个月。以上报道表明在诱导化疗后骨髓抑制期进行骨髓检查不仅可以预测诱导化疗疗效及长期生存,而且可据此调整化疗计划,改善患者的疗效及预后。

本研究中85例AML患者诱导化疗后第7~8天采用MPFC检测MRD,我们根据ROC曲线得到MRD的阈值为2.305%($Se = 0.867, Sp = 0.800$),分析显示MRD<2.305%的患者CR率为96.6%(56/58),而 $\geq 2.305\%$ 的患者仅为51.9%(14/27)($P < 0.001$)。表明骨髓抑制期采用MPFC检测骨髓MRD能够预测诱导化疗疗效。我们同时发现当MRD $\leq 2.305\%$ 时,患者第1个疗程诱导化疗疗效为CR的比例为97%。然而,AML伴t(8;21)的13例患者中,4例MRD $\geq 2.305\%$ 和9例MRD<2.305%的患者均第1个疗程获得CR;AML伴CEBPA双突变的11例患者中,3例MRD $\geq 2.305\%$ 和8例MRD<2.305%的患者均获CR;提示AML伴t(8;21)及AML伴CEBPA双突变患者诱导治疗后骨髓抑制期的MRD对CR率的影响不大。多因素分析显示,诱导化疗后骨髓抑制期以2.305%为界的骨髓MRD($OR = 21.560, 95\% CI 4.129 \sim 112.579, P < 0.001$)是第1个疗程诱导化疗疗效的唯一独立预后因素,与采用骨髓形态学检测幼稚细胞的相关预后文献报道结论相符^[1,4-6]。NCCN指南的危险度分组综合了患者细胞遗传学和分子学异常的特征,用于评估患者的长期预后,我们的研究亦显示NCCN危险度分组预后不良($OR = 4.571, 95\% CI 1.417 \sim 14.748, P = 0.011$)为影响1个疗程CR率的不良预后因素,

但不是独立预后因素($P = 0.090$)。这提示诱导治疗后骨髓抑制期的 MRD 对于诱导治疗效果的预测要优于以遗传学为基础的预后分组。但是我们的结果未显示诱导治疗后骨髓抑制期的 MRD 对 OS、RFS 的预测意义,尚需更长期的随访予以证实。

总之,我们的研究结果显示,AML 患者诱导化疗后骨髓抑制期,采用 MPFC 检测 MRD 以 2.305% 为界对于第 1 个疗程诱导化疗疗效有显著的预测价值,因此根据 MRD 可以动态调整 AML 的诱导治疗方案及策略,从而提高患者的临床治疗效果。

参考文献

- [1] Kern W, Haferlach T, Schoch C, et al. Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML Cooperative Group (AMLCG) 1992 Trial [J]. *Blood*, 2003, 101(1): 64-70. DOI: 10.1182/blood-2002-02-0532.
- [2] Ferrara F, Izzo T, Criscuolo C, et al. Day 15 bone marrow driven double induction in young adult patients with acute myeloid leukemia: feasibility, toxicity, and therapeutic results [J]. *Am J Hematol*, 2010, 85(9): 687-690. DOI: 10.1002/ajh.21791.
- [3] Arellano M, Pakkala S, Langston A, et al. Early clearance of peripheral blood blasts predicts response to induction chemotherapy in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer*, 2012, 118(21): 5278-5282. DOI: 10.1002/cncr.27494.
- [4] Bertoli S, Bories P, Béné MC, et al. Prognostic impact of day 15 blast clearance in risk-adapted remission induction chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: long-term results of the multicenter prospective LAM-2001 trial by the GOELAMS study group [J]. *Haematologica*, 2014, 99(1): 46-53. DOI: 10.3324/haematol.2013.091819.
- [5] 薛华, 李睿, 张莉, 等. 急性髓系白血病诱导缓解治疗期残留白血病细胞比例的预后价值 [J]. *中华血液学杂志*, 2007, 28(5): 341-343. DOI: 10.3760/j.issn:0253-2727.2007.05.014.
- [6] 姜波, 秘营昌, 林冬, 等. 急性髓系白血病患者预后分组方式的探讨 [J]. *中华内科杂志*, 2009, 48(4): 316-320. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2009.04.017.
- [7] Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2012, 119(2): 332-341. DOI: 10.1182/blood-2011-08-363291.
- [8] Terwijn M, van Putten WL, 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(31): 3889-3897. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.9628.
- [9] Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? [J]. *Blood*, 2014, 124(23): 3345-3355. DOI: 10.1182/blood-2014-05-577593.
- [10] Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(12): 1136-1152. DOI: 10.1056/NEJMr1406184.
- [11] Köhnke 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(2): 377-386. DOI: 10.1038/leu.2014.186.
- [12] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues [M]. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2008: 110-147.
- [13] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines (R)) Acute Myeloid Leukemia (Version 1. 2015). http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf.
- [14] Mi Y, Xue Y, Yu W, et al. Therapeutic experience of adult acute myeloid leukemia in a single institution of China and its relationship with chromosome karyotype [J]. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49(3): 524-530. DOI: 10.1080/10428190701836852.
- [15] Liu J, Mi Y, Fu M, et al. Intensive induction chemotherapy with regimen containing intermediate dose cytarabine in the treatment of de novo acute myeloid leukemia [J]. *Am J Hematol*, 2009, 84(7): 422-427. DOI: 10.1002/ajh.21441.
- [16] Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(24): 4642-4649. DOI: 10.1200/JCO.2003.04.036.
- [17] Freeman SD, Virgo P, Couzens S, et al. Prognostic relevance of treatment response measured by flow cytometric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(32): 4123-4131. DOI: 10.1200/JCO.2013.49.1753.

(收稿日期:2017-03-14)

(本文编辑:王叶青)