

# 多参数流式细胞术检测的微小残留病与儿童急性B淋巴细胞白血病预后的相关性研究

冯静 陈晓娟 刘晓明 邹尧 郭晔 杨文钰 陈玉梅 张丽 王书春 阮敏  
刘芳 刘天峰 戚本泉 竺晓凡 王慧君

中国医学科学院、北京协和医学院血液病医院(血液学研究所),天津 300020

通信作者:王慧君,Email:wanghuijun@ihcams.ac.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.08.010

## A correlation study between the minimal residual disease detection using multiparameter flow cytometry and prognosis of childhood acute B lymphoblastic leukemia

Feng Jing, Chen Xiaojuan, Liu Xiaoming, Zou Yao, Guo Ye, Yang Wenyu, Chen Yumei, Zhang Li, Wang Shuchun, Ruan Min, Liu Fang, Liu Tianfeng, Qi Benquan, Zhu Xiaofan, Wang Huijun

Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Wang Huijun, Email: wanghuijun@ihcams.ac.cn

白血病复发是由于治疗后骨髓中残留的极少的白血病细胞所致,采用敏感、精准的方法检测微小残留病(MRD)是提高治疗疗效的关键<sup>[1-2]</sup>。流式细胞术检测MRD的临床意义已被多项研究所证实,并逐渐成为儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)的常规检查<sup>[3-4]</sup>。本研究回顾性分析多参数流式细胞术(MFC)检测MRD与儿童B-ALL 预后的相关性。

### 对象与方法

1. 研究对象和治疗:回顾性分析2014年5月至2015年4月在本中心就诊的153例B-ALL患儿的临床资料,诊断、危险度分层、治疗方案符合CCLG-ALL 2008方案<sup>[5]</sup>,危险度分层也根据MRD水平再次调整,将患者诱导治疗第33天骨髓MRD < 1×10<sup>-4</sup>归为标危组,诱导治疗第33天骨髓MRD < 1×10<sup>-2</sup>归为中危组,诱导治疗第33天骨髓MRD ≥ 1×10<sup>-3</sup>或12周MRD ≥ 1×10<sup>-3</sup>归为高危组。患者接受的所有治疗和检查均得到患儿家长或其他监护人的知情同意并签署同意书。

2. MFC检测MRD:在诱导缓解治疗第15天(TP1)、第33天(TP2)、第84天(TP3)三个时间点抽取患儿骨髓标本3~4 ml(有核细胞总数>5×10<sup>6</sup>),肝素抗凝。加入CD38-FITC、CD10-PE、CD20-PE-CY7、CD19-APC、CD34-PerCP-cy5.5、CD33-BV421、CD45-BD Horizon V500(7色为骨架抗体,部分患者加做了CD13或CD58)5~20 μl用于标记细胞,随后加入骨髓细胞(1~2)×10<sup>6</sup>,室温避光孵育15~20 min,溶血、洗涤、离心后加入100 μl PBS上机检测。Navios流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司产品)获取有核细胞5×10<sup>5</sup>,应用Kaluza软件进行数据分析,FSC/SSC设门去除细胞碎片,CD19/SSC设门分析CD19<sup>+</sup>细胞,CD38/CD20双参数散点图设门分出成熟B细胞群、Hematogone群和浆细胞群,同时分

析CD10/CD20、CD38/CD34、CD34/CD10、CD10/CD45、CD38/CD45、CD33/CD10、CD45/SSC等散点图,依据DNF(Different from normal)原理<sup>[6]</sup>确认异常细胞群,计算残留白血病细胞占有核细胞的比例,得出MRD值(图1)。

3. 随访:采用查阅病历或电话的方式进行随访,随访截止时间为2018年7月。

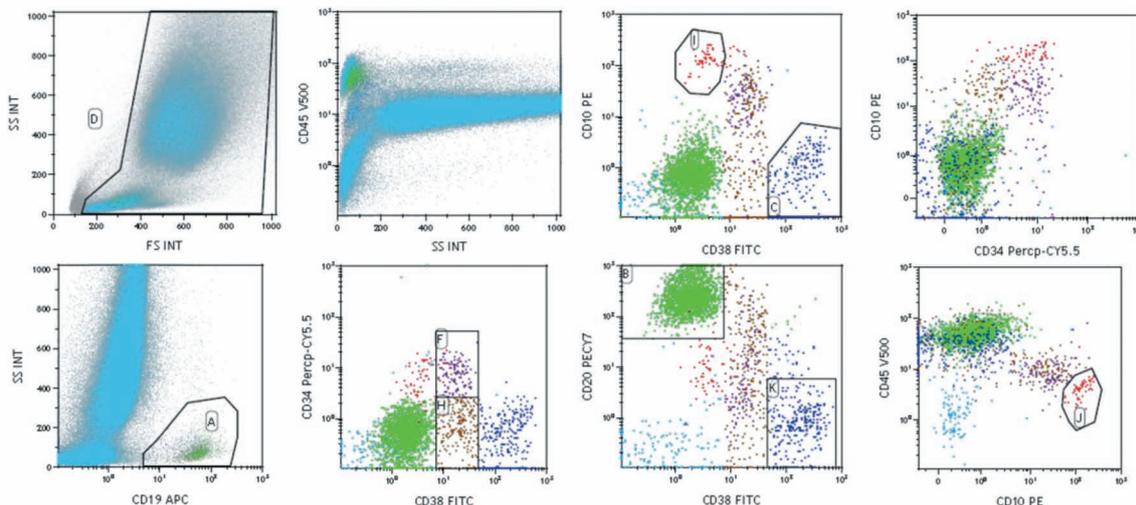
4. 统计学处理:将不同时间点的骨髓MRD检测结果分别以1×10<sup>-3</sup>、1×10<sup>-4</sup>为界值进行分组。应用Kaplan-Meier曲线计算无复发生存(RFS)率,采用Kaplan-Meier曲线的Log-rank检验进行单因素分析。P < 0.05为差异有统计学意义。

### 结果

1. 患者临床特征及与预后的关系:2014年5月至2015年4月我院共收治153例B-ALL患儿,发病时中位年龄4(1~13)岁,男88例,女65例,男女比例为1.35:1。153例患儿的临床特征及与预后的关系见表1。

随访至2018年7月,153例患儿中28例复发,复发率为18.3%,中位复发时间21.5(3~45)个月,其中超早期复发(诊断至复发时间<18个月)13例(46.4%),早期复发(诊断至复发时间18~36个月)11例(39.3%),晚期复发(诊断至复发时间>36个月)4例(14.3%)。复发后确认死亡17例,复发死亡率为60.7%。125例无复发患者中确认死亡2例,无复发死亡率1.6%。所有患儿中位总生存(OS)时间为44(2~51)个月,中位RFS时间为38(2~47)个月。

2. MRD与预后的相关性:入组的153例B-ALL患儿中,TP1、TP2和TP3时间点分别有147、146、135例接受了骨髓MRD检测。分别比较MRD以1×10<sup>-3</sup>为界值及以1×10<sup>-4</sup>为界值时MRD与预后相关性,结果详见表2、3。结果显示TP1



异常B细胞(I/J门红色细胞群)占有核细胞的0.01% (57events), 强表达CD10, 表达CD19、CD34, 弱表达CD38、CD20、CD45; 图中可见正常成熟B细胞(B门绿色细胞群), Hematogone I 阶段细胞(F门CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>紫色细胞群), Hematogone II 阶段细胞(H门CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>棕色细胞群)及浆细胞群(K门蓝色细胞群)

图1 儿童急性B淋巴细胞白血病治疗后多参数流式细胞术检测的微小残留病阳性病例

表1 153例急性B淋巴细胞白血病患者临床特征及与预后的关系(%,  $\bar{x} \pm s$ )

特征	例数	3年RFS率	P值
性别			0.557
男	88	83.0±4.0	
女	65	78.3±5.4	
年龄(岁)			0.281
< 10	132	83.9±3.3	
≥10	21	89.7±6.9	
WBC( $\times 10^9/L$ )			0.026
< 50	127	87.5±3.0	
≥50	26	57.4±12.5	
泼尼松反应			0.056
好	127	83.3±3.3	
差	26	61.5±9.5	
危险度分层			0.000
标危	64	95±3.6	
中危	45	72.3±7.2	
高危	44	61.2±9.2	

注:RFS:无复发生存

时间点MRD <  $1 \times 10^{-3}$  组的3年RFS率明显高于MRD ≥  $1 \times 10^{-3}$  组( $P = 0.004$ ); 而MRD <  $1 \times 10^{-4}$  组的3年RFS率与MRD ≥  $1 \times 10^{-4}$  组差异无统计学意义( $P = 0.159$ )。TP2、TP3时间点MRD <  $1 \times 10^{-3}$  组的3年RFS率明显高于MRD ≥  $1 \times 10^{-3}$  组, 并且MRD <  $1 \times 10^{-4}$  组亦明显高于MRD ≥  $1 \times 10^{-4}$  组( $P$ 值均 < 0.05)。

TP1时间点MRD <  $1 \times 10^{-3}$  组42例患儿中1例复发, 复发率为2.4%; MRD ≥  $1 \times 10^{-3}$  组105例患儿中23例复发, 复发率为21.9%, 差异有统计学意义( $P = 0.003$ )。TP2时间点MRD <  $1 \times 10^{-4}$  组116例患儿中13例复发, 复发率为11.2%,

表2 儿童急性B淋巴细胞白血病以  $1 \times 10^{-3}$  为界值时MRD水平与预后的关系(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	3年RFS率	$\chi^2$ 值	P值
第15天			8.071	0.004
MRD < $10^{-3}$	107	97.1±2.8		
MRD ≥ $10^{-3}$	41	79.0±4.1		
第33天			21.500	0.000
MRD < $10^{-3}$	129	89.3±2.8		
MRD ≥ $10^{-3}$	17	33.0±16.4		
第84天			12.690	0.000
MRD < $10^{-3}$	128	87.2±3.0		
MRD ≥ $10^{-3}$	7	28.6±17.1		

注:MRD:微小残留病;RFS:无复发生存

表3 儿童急性B淋巴细胞白血病以  $1 \times 10^{-4}$  为界值时MRD水平与预后的关系(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	3年RFS率	$\chi^2$ 值	P值
第15天			1.986	0.159
MRD < $10^{-4}$	128	93.8±6.1		
MRD ≥ $10^{-4}$	20	84.4±3.3		
第33天			8.210	0.004
MRD < $10^{-4}$	116	89.1±3.0		
MRD ≥ $10^{-4}$	30	68.5±9.4		
第84天			14.642	0.000
MRD < $10^{-4}$	123	87.5±3.0		
MRD ≥ $10^{-4}$	12	48.6±14.8		

注:MRD:微小残留病;RFS:无复发生存

MRD ≥  $1 \times 10^{-4}$  组30例患儿中14例复发, 复发率为46.7%, 差异有统计学意义( $P = 0.000$ )。TP3时间点MRD <  $1 \times 10^{-4}$  组123例患儿中16例复发, 复发率为13.0%, MRD ≥  $1 \times 10^{-4}$  组

12例患儿中5例复发,复发率为41.7%,差异有统计学意义( $P=0.022$ )。

## 讨 论

近几十年中,儿童ALL的治愈率大幅度提升,但复发仍是影响预后的主要因素,复发的患者即使接受造血干细胞移植,5年无事件生存率(EFS)仍不超过18%<sup>[7]</sup>。降低复发率是进一步提高疗效的关键。近年发现MRD水平是判断预后的重要因素<sup>[2,5]</sup>,并已逐渐成为儿童ALL的常规检查<sup>[2]</sup>。一般选择在诱导和巩固治疗期间监测骨髓MRD,前者用于指导早期危险度分层和下一步巩固治疗策略的选择,后者用于指导维持治疗的强度以及出现MRD水平复发时的挽救治疗策略,研究显示监测诱导治疗最初3个月骨髓MRD水平对于儿童ALL分层指导的意义更大<sup>[2]</sup>。因此我们选择在诱导治疗第15、33和84天监测骨髓MRD。有些ALL的相关研究显示,骨髓MRD $>1\times 10^{-3}$ 或 $1\times 10^{-4}$ 提示预后不良<sup>[2]</sup>。为了更好地界定MRD阈值,我们选取 $1\times 10^{-3}$ 、 $1\times 10^{-4}$ 作为界值。

MRD作为一个独立的调整危险度分层因素被普遍采纳<sup>[3,8]</sup>。美国和欧洲的儿童研究曾根据诱导缓解后或巩固治疗后危险度分层,MRD阳性患者加强治疗,MRD阴性患者减弱治疗<sup>[3]</sup>。Berry等<sup>[3]</sup>曾综合分析39个研究中13 637例患者MRD与预后的关系,MRD阴性患儿10年EFS率约77%,而MRD阳性患儿10年EFS率仅32%。我国卫生健康委员会发布的最新儿童ALL诊疗规范(2018年版)<sup>[9]</sup>中,低危组MRD的标准为诱导治疗第15~33天MRD $<1\times 10^{-2}$ 和巩固治疗前MRD $<1\times 10^{-4}$ ,中危组MRD的标准为诱导治疗第15~19天MRD $\geq 1\times 10^{-3}$ ~ $1\times 10^{-1}$ 或诱导治疗后第33~45天MRD $\geq 1\times 10^{-4}$ ~ $<1\times 10^{-2}$ 或巩固治疗前MRD $<1\times 10^{-4}$ ,高危组MRD的标准为诱导治疗第15~19天MRD $\geq 1\times 10^{-1}$ ,或诱导治疗后第33~45天MRD $\geq 1\times 10^{-2}$ ,或巩固治疗前MRD $\geq 1\times 10^{-4}$ 。本研究根据患儿骨髓MRD水平再次分组,并根据再次分组对治疗方案进行调整<sup>[6]</sup>,与最新发布的诊疗规范相比本研究得出的MRD精确度更高,但本研究病例数有限,结果有待大样本量研究证实。

MFC检测MRD覆盖面广、检测速度快,更容易指导临床医师选择恰当的治疗方案<sup>[2]</sup>。我们用MFC定期监测153例B-ALL患儿诱导治疗期间的骨髓MRD,发现了MRD与患儿的预后有明显的相关性,同时我们发现MRD阳性的患儿复发率明显高于MRD阴性的患儿,由于再次复发后生存率低,须接受异基因造血干细胞移植治疗,以获得长期生存。

相较MFC而言,RT-PCR对儿童ALL的检测范围有局限性,因为65%左右的ALL患儿缺乏特异性融合基因,而RQ-PCR的方法检测IgH重排虽然对于ALL适用性广,但是试验方法繁琐,费用昂贵,影响了临床检测的普及性<sup>[10]</sup>,因此目前国内外广泛应用的MRD检测方式是MFC。本研究采用的MFC是8色流式细胞术,相较传统的3~4色流式细胞术敏感度明显提高,可达 $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ <sup>[11]</sup>。此外,近年来二代测序技术(NGS)逐渐兴起,其在白血病MRD检测方面更加灵敏且

适用性更广,为我们提供了一个新的MRD监测平台,但同时其也存在着费时、昂贵、需要已知治疗前信息等问题,限制了临床的普及<sup>[3,10-11]</sup>。

综上所述,MFC是目前临床监测MRD的主要方法。儿童B-ALL诱导治疗第15、33及84天的骨髓MRD是提示预后的关键和敏感指标。MRD的监测对于B-ALL患儿早期调整治疗方案以及改善预后至关重要。

## 参 考 文 献

- [1] van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, et al. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies [J]. *Blood*, 2015,125 (26):3996- 4009. DOI: 10.1182/blood-2015-03-580027.
- [2] 中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组. 多参数流式细胞术检测急性白血病及浆细胞肿瘤微小残留病中国专家共识(2017年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(12):1001-1011. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.12.001.
- [3] Berry DA, Zhou S, Higley H, et al. Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis [J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(7):e170580. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.0580.
- [4] 计雪强, 季正华, 丁云芳, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病微小残留病的流式细胞术分析[J]. *中华检验医学杂志*, 2009, 32(10): 1133-1137. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2009.10.011.
- [5] Cui L, Li ZG, Chai YH, et al. Outcome of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia treated with CCLG-ALL 2008: The first nation-wide prospective multicenter study in China [J]. *Am J Hematol*, 2018, 93 (7):913- 920. DOI: 10.1002/ajh.25124.
- [6] Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(1):47-53. DOI: 10.1002/cyto.b.21239.
- [7] Health Quality Ontario. Minimal residual disease evaluation in childhood acute lymphoblastic leukemia: a clinical evidence review [J]. *Ont Health Technol Assess Ser*, 2016, 16(7):1-52.
- [8] Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update [J]. *Blood Cancer J*, 2017, 7(6):e577. DOI: 10.1038/bcj.2017.53.
- [9] 中华人民共和国卫生健康委员会. 儿童急性淋巴细胞白血病诊疗规范(2018年版)[Z]. 2018.10.16.
- [10] Chen X, Wood BL. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities [J]. *Blood Rev*, 2017, 31 (2): 63-75. DOI: 10.1016/j.blre.2016.09.006.
- [11] Theunissen PMJ, de Bie M, van Zessen D, et al. Next-generation antigen receptor sequencing of paired diagnosis and relapse samples of B-cell acute lymphoblastic leukemia: Clonal evolution and implications for minimal residual disease target selection [J]. *Leuk Res*, 2019, 76:98- 104. DOI: 10.1016/j.leukres.2018. 10.009.

(收稿日期:2018-12-13)

(本文编辑:王叶青)