

# 初诊 t(8;21) 急性髓系白血病中白血病干细胞相关抗原的表达特征及预后意义

刁凤亭 杨璐 王亚哲 常艳 江倩 江浩 刘艳荣 黄晓军 秦亚溱

北京大学人民医院、北京大学血液病研究所, 国家血液系统疾病临床医学研究中心  
100044

通信作者: 秦亚溱, Email: qin2000@aliyun.com

**【摘要】** 目的 研究白血病干细胞(LSC)相关抗原 CD34、CD38、CD123、CD96 和 TIM3 在 t(8;21) 急性髓系白血病(AML)中的表达及预后意义。方法 采集 2015 年 10 月至 2018 年 4 月北京大学人民医院收治的 47 例初诊 t(8;21) AML 患者的骨髓标本, 采用流式细胞术检测 LSC 相关膜表面抗原 CD34、CD38、CD123、CD96 和 TIM3 的表达, 分析其与复发的关系。结果 47 例 t(8;21) AML 患者中, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup> 细胞在有核细胞中比例的中位数分别为 2.37%、0.24%、0.27%、0.06%; CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup> 和 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup> 细胞比例与诱导治疗 1 个疗程缓解率无明显相关性 ( $P$  值均  $> 0.05$ ); CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> 和 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup> 细胞比例高的患者较比例低的患者具有更高的 2 年累积复发 (CIR) 率 ( $P$  值分别为 0.049、0.030、0.045), 而 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup> 细胞的比例对 CIR 无明显影响 ( $P > 0.05$ ); CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞比例及微小残留病 (MRD) 水平是影响患者 CIR 的独立预后因素 ( $HR = 6.9$ , 95%  $CI$  1.3 ~ 37.4,  $P = 0.025$ ;  $HR = 11.1$ , 95%  $CI$  1.2 ~ 99.2,  $P = 0.031$ )。结论 不同的 LSC 相关抗原在 t(8;21) AML 中的预后意义不同, 初诊骨髓有核细胞中高比例的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 以及 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> 和 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup> 细胞可能与 t(8;21) AML 患者的复发有关。

**【关键词】** 白血病干细胞相关抗原; t(8;21) 急性髓系白血病; 抗原, CD34; 抗原, CD38; 微小残留病

基金项目: 国家自然科学基金 (81570130、81870125)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.10.007

## Characteristic and prognostic significance of leukemia stem cells associated antigens expressions in t(8;21) acute myeloid leukemia

Dao Fengting, Yang Lu, Wang Yazhe, Chang Yan, Jiang Qian, Jiang Hao, Liu Yanrong, Huang Xiaojun, Qin Yazhen

Peking University Peoples' Hospital, Peking University Institute of Hematology, National Clinical Research Center for Hematologic Disease, Beijing 100044, China

Corresponding author: Qin Yazhen, Email: qin2000@aliyun.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the characteristic and prognostic significance of leukemia stem cells associated antigens expressions including CD34, CD38, CD123, CD96 and TIM-3 in t(8;21) AML. **Methods** Bone marrow samples of 47 t(8;21) AML patients were collected at diagnosis from October 2015 to April 2018 in Peking University Peoples' Hospital, then flow cytometry method was performed to detect the expression frequencies of CD34, CD38, CD123, CD96 and TIM-3 to analyze the relationship between leukemia stem cells associated antigens expressions and relapse. **Results** Of 47 t(8;21) AML patients tested, the median percentages of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup> cells among nucleated cells were 2.37%, 0.24%, 0.27% and 0.06%, respectively. All the frequencies of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup> cells had no impact on the achievement of CR after the first course of induction. All higher frequencies of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup> cells were related to higher 2-year CIR rate. Whereas, the frequency of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup> cells had no impact on CIR rate. Both high frequency of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells and the high level of minimal residual diseases (patients with  $< 3$ -log reduction in the RUNX1- RUNX1T1 transcript level after the second consolidation therapy) were

independent poor prognostic factors of CIR [ $P=0.025$ ,  $HR=6.9$  (95%  $CI$  1.3–37.4);  $P=0.031$ ,  $HR=11.1$  (95%  $CI$  1.2–99.2)]. **Conclusion** Different leukemia stem cells associated antigens had distinct prognostic significance in t(8;21) AML. High frequencies of  $CD34^+CD38^-$ ,  $CD34^+CD38^-CD123^+$  and  $CD34^+CD38^-CD96^+$  cells at diagnosis predicted relapse in patients with t(8;21) AML.

**【Key words】** Leukemia stem cells associated antigen; t(8;21) AML; Antigen, CD34; Antigen, CD38; Minimal residual diseases

**Fund program:** Natural Science Foundation of China (81570130,81870125)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.10.007

急性髓系白血病(AML)是常见的造血系统的恶性肿瘤。异种鼠移植模型证实,白血病干细胞(LSC)具有自我更新能力,能成功移植并重建人白血病<sup>[1]</sup>。LSC还是AML复发的根源<sup>[1-2]</sup>。目前一般认为 $CD34^+CD38^-$ 是LSC的免疫表型特征<sup>[3-5]</sup>,此外,CD123、CD96和TIM-3亦被证实是LSC抗原标志<sup>[6-11]</sup>。临床研究显示, $CD34^+CD38^-$ 细胞群高比例与AML预后不良相关<sup>[12-13]</sup>。亦有一些研究结果提示CD123、CD96及TIM-3高表达可能是AML的预后不良因素<sup>[14-16]</sup>。

t(8;21)见于10%~15%的AML患者中,尽管属于低危核型,但仍有约40%的患者复发<sup>[17]</sup>,因此寻找预后指标对其进行进一步危险分层以指导临床治疗显得尤为重要。目前有关LSC相关抗原预后意义的研究多以AML整体为目标,其在t(8;21)AML中的表达及预后意义尚不清楚。本研究通过流式细胞术(FCM)检测47例初诊t(8;21)AML患者的LSC相关抗原CD34、CD38、CD123、CD96和TIM-3,研究其表达特点及对复发的影响。

## 病例与方法

1. 病例资料:遵照医学伦理学标准,通过北京大学人民医院伦理委员会审查,经患者本人知情同意,收集本院2015年10月至2018年4月的47例初诊t(8;21)AML患者的新鲜骨髓标本,依据细胞形态学、免疫学、遗传学及分子学(MICM)分型确诊。男24例,女23例,中位年龄41(15~69)岁。病例随访截止时间为2018年12月,中位随访13(1~32)个月。

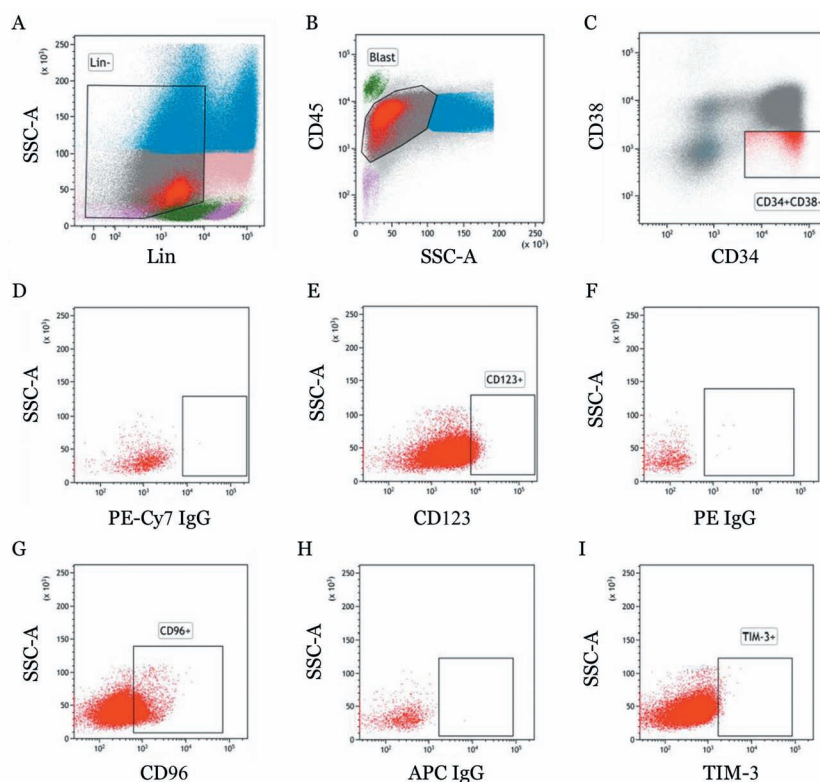
2. 治疗方案:47例患者均在本院接受标准剂量IA、DA或HAA方案诱导化疗,44例患者在达到完全缓解(CR)之后接受了2~6个疗程以阿糖胞苷为基础的巩固治疗,其中31例患者仅接受了化疗,13例患者化疗1~5个疗程后在CR状态下接受异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)(单倍型移植7例,全相合移植6例)。

3. 试剂与仪器:FACS™裂解液为美国Becton

Dickinson公司产品;单克隆抗体CD45-V500、CD34-PerCP-Cy5.5、CD38-V450、CD3、CD14为美国Becton Dickinson公司产品,TIM-3-APC、CD96-PE、CD123-PE-Cy7、CD16、CD20、CD36为美国BioLegend公司产品,Lineage-APC-H7/Cy7由CD3、CD14、CD16、CD20和CD36组成(简称为Lin);FACS Canto II型流式细胞仪为美国Becton Dickinson公司产品;Kaluza流式分析软件为美国Beckman Coulter公司产品。

4. 检测方法:采集新鲜骨髓样本后进行细胞计数,每管加入 $2 \times 10^6$ 细胞,然后加入7色荧光素标记的单克隆抗体CD45、CD34、CD38、Lin、CD123、CD96和TIM-3充分混匀,室温避光孵育15 min,加入 $1 \times$ FACS™裂解液,室温避光静置15 min,溶血后 $300 \times g$ 离心5 min,弃上清,用含有0.1%  $NaN_3$ 和1% BSA的PBS洗液 $300 \times g$ 离心洗涤5 min,弃上清,加PBS缓冲液300  $\mu$ l,上流式细胞仪检测,获取 $1 \times 10^6$ 个细胞。设门方式如图1所示,先以FSC-H/FSC-A设门去除双连体,SSC-A/FSC-A设门去除细胞碎片和非特异性细胞,界定有核细胞;再以SSC-A/Lin设门在有核细胞中界定Lin<sup>-</sup>细胞群(图1A),随后在Lin<sup>-</sup>细胞群中以CD45/SSC-A设门界定出CD45<sup>dim</sup>/SSC<sup>low</sup>细胞群即为Blast细胞群(图1B),在Blast细胞中以CD34/CD38设门界定 $CD34^+CD38^-$ 细胞群(图1C),再在 $CD34^+CD38^-$ 细胞中分别以SSC-A/CD123、SSC-A/CD96、SSC-A/TIM-3设门,根据同型对照界定出 $CD34^+CD38^-CD123^+$ (图1D、E)、 $CD34^+CD38^-CD96^+$ (图1F、G)和 $CD34^+CD38^-TIM-3^+$ (图1H、I)细胞群。

5. 统计学处理:应用SPSS 19.0和GraphPad Prism 5软件进行数据处理。应用Mann-Whitney  $U$ 检验比较各组间的差异,用Chi-square检验比较各组百分率的差异。以复发为指标生成ROC曲线,并根据约登指数确定最适cut-off值。总生存(OS)率的计算及累积复发率(CIR)的比较采用Kaplan-Meier生存分析和Log-rank检验。 $P < 0.2$ 的单因素



A: 有核细胞中的 Lin<sup>-</sup> 细胞群; B: Lin<sup>-</sup> 细胞中的 Blast 细胞群; C: Blast 细胞中的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞群; D、E: CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞中 CD123<sup>-</sup> 细胞群的同型对照及 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup> 细胞群; F、G: CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞中 CD96<sup>-</sup> 细胞群的同型对照及 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> CD96<sup>+</sup> 细胞群; H、I: CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞中 TIM-3<sup>-</sup> 细胞群的同型对照及 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> TIM-3<sup>+</sup> 细胞群

图1 流式细胞术分析界定白血病干细胞各群细胞方式

纳入 Cox 回归模型进行多因素分析。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 结 果

1. 患者初诊生物学特征及疗效: 47 例 t(8; 21) AML 患者初诊时中位 WBC 为  $9.0(1.1 \sim 50.6) \times 10^9/L$ , HGB 为  $74(44 \sim 151)g/L$ , PLT 为  $30(9 \sim 293) \times 10^9/L$ ; 中位骨髓原始细胞比例  $0.430(0.150 \sim 0.900)$ ; 27 例 (53.2%) 检测到 c-KIT 突变; 可进行染色体核型分析的 46 例患者中, 26 例 (56.5%) 有 t(8; 21) 之外的其他核型异常。

46 例 (97.9%) 患者在 1~3 个疗程诱导治疗后达到 CR, 随后接受巩固治疗的 44 例患者中 7 例 (14.9%) 复发 (6 例为血液学复发, 1 例为髓外复发), 2 例 (4.3%) 死亡。全部患者 2 年 OS 率为 95.4% (95% CI 82.7% ~ 98.8%)。

基于本所前期研究, t(8; 21) AML 患者在 2 个疗程巩固治疗后, RUNX1-RUNX1T1 转录本水平与基线相比下降  $< 3$  个数量级和  $\geq 3$  个数量级 (即 RUNX1-RUNX1T1 转录本水平  $> 0.4\%$  和  $\leq 0.4\%$ ) 分别定义为微小残留病 (MRD) 高水平 (MRD-H) 和

MRD 低水平 (MRD-L)。至少随访至巩固治疗 2 个疗程后的 44 例患者中, 16 例 (36.4%) 为 MRD-H, 28 例 (63.6%) 为 MRD-L。

2. LSC 相关抗原的表达情况: 47 例 t(8; 21) AML 患者中, 可进行 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>、CD123、CD96 及 TIM-3 分析的分别为 47、47、43 和 44 例。有核细胞中的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup> 细胞比例的中位值 (范围) 分别为 2.37% (0.10% ~ 15.89%)、0.24% (0.0013% ~ 7.48%)、0.27% (0.000 2% ~ 5.04%)、0.06% (0 ~ 2.09%)。有核细胞中的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup> 细胞比例明显低于 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> 和 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup> 细胞比例 ( $P = 0.007$ ,  $P = 0.021$ ), 而 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> 和 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup> 细胞比例差异无统计学意义 ( $P = 0.870$ )。

在本研究中, 利用 ROC 曲线获得 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup> 的 cut-off 值分别为 3.5%、3.4%、1.6%、0.11%。 $\geq$  各自 cut-off 值定义为高比例组,  $<$  各自 cut-off 值则定义为低比例组, 患者在各组中的分布情况如下: CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞高、低比例组分别为

14、33例，CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>细胞分别为3、44例，CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup>细胞分别为4、39例，CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup>细胞分别为18、26例。

3例CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>细胞高比例患者均属于CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞高比例组，4例CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup>细胞高比例患者中有3例属于CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞高比例组，18例CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup>细胞高比例患者中有10例属于CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞高比例组。

3. LSC相关抗原的表达对CR获得的影响:40例(85.1%)t(8;21)AML患者在1个疗程诱导化疗后达到CR,CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup>和CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup>细胞的比例对CR的获得无明显影响(92.9%对81.8%,*P*=0.600;100.0%对84.1%,*P*=1.000;75.0%对84.6%,*P*=0.520;83.3%对84.6%,*P*=1.000)。

4. LSC相关抗原的表达对复发的影响:44例CR之后接受巩固治疗的患者中,CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>及CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup>细胞高比例患者具有更高的2年CIR率[39.6%(95%CI 6.6%~72.9%)对9.9%(95%CI 0.1%~47.5%),*P*=0.049;66.7%(95%CI 17.5%~91.0%)对12.7%(95%CI 0.7%~42.4%),*P*=0.030;50.0%(95%CI 5.8%~84.5%)对17.1%(95%CI 1.1%~49.9%),*P*=0.045](图2A~C)。但是CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup>细胞比例对2年CIR率无明显影响(*P*=0.270,图2D)。

如果把接受allo-HSCT的患者截尾至移植前,CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>及CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>细胞高比例患者均较CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>及CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>细胞低比例患者具有更高的2年CIR率[52.5%(95%CI 11.8%~82.3%)对11.8%(95%CI 0.1%~50.7%),*P*=0.033;33.3%(95%CI 0.0%~85.8%)对14.8%(95%CI 1.0%~45.6%),*P*=0.032],CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup>细胞高比例患者有较高的2年CIR率的趋势,但差异无统计学意义[50.0%(95%CI 5.8%~84.5%)对23.7%(95%CI 1.8%~59.6%),*P*=0.100]。CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup>细胞比例对患者的2年CIR率仍无明显影响(*P*=0.220)。

5. 单因素及多因素分析:随访至巩固治疗2个疗程后的44例t(8;21)AML患者,MRD-H的患者较MRD-L的患者有更高的2年CIR率[39.8%(95%CI 12.1%~66.9%)对4.2%(95%CI 0.0%~63.9%),*P*=0.005]。47例t(8;21)AML患者中,仅接受化疗的患者有较高的2年CIR率趋势,但差异无统计学意义(*P*=0.068)。患者初诊时的年龄、性别、WBC、HGB、PLT、骨髓中原始细胞比例、t(8;21)之外的其他异常核型及c-KIT突变与2年CIR率均无明显相关性(*P*值均>0.05)。

根据单因素分析结果,把患者初诊时血小板计数、2个疗程巩固治疗后MRD水平、治疗方式及CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞比例纳入多因素分析,2个疗程巩固治疗后MRD水平及CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞比例是

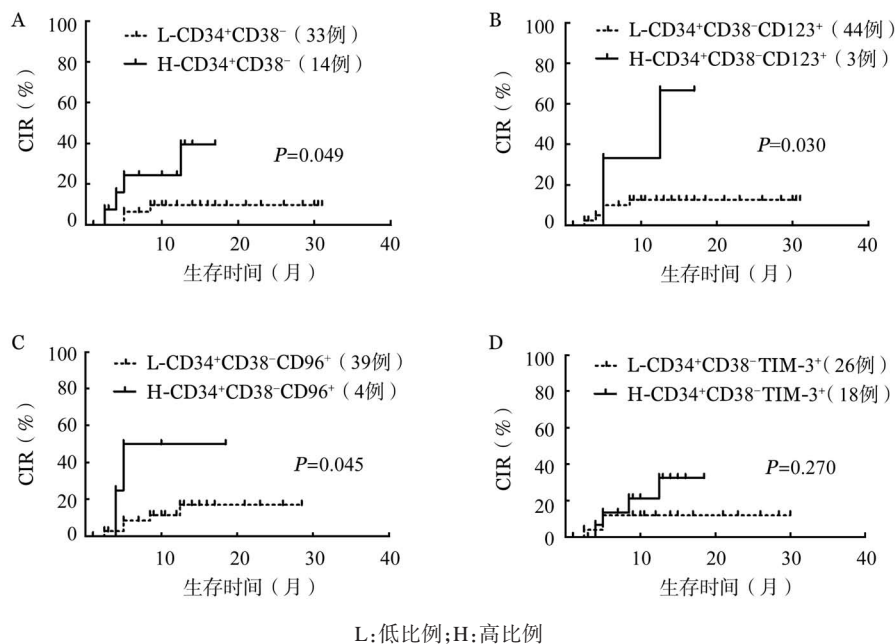


图2 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>(A)、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>(B)、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup>(C)和CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup>细胞的比例(D)对2年累积复发率(CIR)率的影响



t(8;21)AML 患者 CIR 的独立预后不良因素 [ $HR = 11.1$  (95%  $CI$  1.2 ~ 99.2),  $P = 0.031$ ;  $HR = 6.9$  (95%  $CI$  1.3 ~ 37.4),  $P = 0.025$ ]。CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> 细胞比例和 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup> 细胞比例分别替代 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞比例纳入多因素分析, 则 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> 细胞比例和 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup> 细胞比例均不再是 t(8;21)AML 患者 CIR 的独立预后因素 ( $P = 0.240$ ,  $P = 0.240$ )。

## 讨 论

染色体易位 t(8;21) 形成融合基因 RUNX1-RUNX1T1 是 t(8;21)AML 发病的分子基础。t(8;21)AML 是一种高异质性疾, 尽管属于低危核型, 仍有约 40% 的患者复发<sup>[17-18]</sup>。因此, 有必要寻找其他预后指标对 t(8;21)AML 患者进一步危险分层以指导临床治疗。

采用细胞毒药物非特异性地杀伤增殖细胞仍是目前 AML 患者的基本治疗手段, 但由于 LSC 主要处于静止期, 往往对化疗不敏感, LSC 是 AML 复发的根源<sup>[19]</sup>。LSC 群体表型具有异质性, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 和 CD34<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> 均被证实是 LSC 的免疫表型特征<sup>[20-24]</sup>。其中, 相比 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> 和 CD34<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞群, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞群移植至免疫缺陷小鼠体内易于成功复制人 AML 模型, 且对化疗更加不敏感, 因此, 一般认为 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 是 LSC 的免疫表型特征<sup>[2-5,25-29]</sup>。近年来, 相继有寻找 AML 更多 LSC 相关抗原的研究, 包括 IL-3 受体  $\alpha$  链 CD123、免疫球蛋白超家族成员之一 CD96、TIM 基因家族成员 TIM-3 等<sup>[6-11]</sup>。由于目前的研究多以 AML 为整体, 尚未见针对特定类型 AML 的 LSC 相关抗原的研究。所以, 本研究以 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 作为 LSC 的基本抗原标志, 并针对 LSC 相关抗原 CD123、CD96、TIM-3 在初诊 t(8;21)AML 的表达特点及预后意义进行分析。

之前一些研究已证明 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞高比例与 AML 预后不良相关<sup>[13,25]</sup>, 最近, Zeijlemaker 等<sup>[12]</sup> 在 890 例 AML 患者的大样本研究中发现初诊时 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞高比例是 AML 患者的独立预后不良因素。与这些以 AML 为整体目标的研究一致, 本研究发现, t(8;21)AML 患者初诊时 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞高比例的患者较低比例的患者具有更高的 2 年 CIR 率, 提示在 t(8;21)AML 中, 初诊时 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞高比例亦与预后不良相关。

有关其他 LSC 相关抗原的研究表明, AML 患者

初诊时 CD123 高表达与较短的 OS 及较短的无病生存 (DFS) 时间相关, 是 AML 预后不良因素<sup>[14-15]</sup>。关于 CD96 和 TIM-3 在 AML 患者中的预后意义研究很少, Jiang 等<sup>[16]</sup> 发现在 AML 患者中, CD96 高表达的患者比 CD96 低表达的患者对化疗更加不敏感, 且中位生存时间更短。Dawish 等<sup>[30]</sup> 用 RT-PCR 的方法发现 TIM-3 过表达与 AML 患者较短的 OS 相关。本研究在 t(8;21)AML 中发现, 初诊时 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> 细胞高比例的患者和 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup> 细胞高比例的患者均较相应的低比例的患者有更高的 2 年 CIR。然而, 本研究在 t(8;21)AML 患者中尚未发现 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>TIM-3<sup>+</sup> 细胞比例与 t(8;21)AML 复发相关。

以 RUNX1-RUNX1T1 转录本为代表的 MRD 水平是 t(8;21)AML 疗效监测的重要指标, 其他研究及本所相关研究结果显示 MRD 水平是 t(8;21)AML 的独立预后因素<sup>[31-32]</sup>。Zeijlemaker 等<sup>[12]</sup> 的研究也证实通过联合 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 比例和 MRD 水平可识别预后极差的 AML 患者。本研究通过多因素分析发现 t(8;21)AML 患者初诊时 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞群高比例和 2 个疗程巩固治疗后 MRD 高水平均是 CIR 的独立预后不良因素, 提示在这些患者的预后评估中, 初诊时生物学特征的分析和治疗后的分子学监测均占据重要的地位。

综上所述, 不同的 LSC 相关抗原表达在 t(8;21)AML 中的预后意义不同, 初诊骨髓有核细胞中高比例的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 以及 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> 和 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup> 细胞与 t(8;21)AML 患者的复发有关。本研究结果提示在 t(8;21)AML 患者中, 除了对以 RUNX1-RUNX1T1 转录本为代表的 MRD 水平进行监测, 初诊时通过 FCM 对 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 以及 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> 和 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD96<sup>+</sup> 细胞进行评估也是有必要的。本研究病例数较少, 随访时间较短, 研究结果有待扩大样本量进一步验证。

## 参 考 文 献

- [1] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice [J]. Nature, 1994, 367(6464):645-648.
- [2] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. Nat Med, 1997, 3(7):730-737.
- [3] Horton SJ, Huntly BJ. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology [J]. Haematologica, 2012, 97(7):966-974. DOI: 10.3324/haematol.2011.054734.
- [4] Buss EC, Ho AD. Leukemia stem cells [J]. Int J Cancer, 2011,

- 129(10):2328-2336. DOI: 10.1002/jtc.26318.
- [5] Wiseman DH, Greystoke BF, Somerville TC. The variety of leukemic stem cells in myeloid malignancy[J]. *Oncogene*, 2014, 33(24):3091-3098. DOI: 10.1038/onc.2013.269.
- [6] Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, et al. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(6): 708-717. DOI: 10.1016/j.stem.2010.11.014.
- [7] Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, et al. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells[J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(17):17ra9. DOI: 10.1126/scitranslmed.3000349.
- [8] Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells[J]. *Leukemia*, 2000, 14(10): 1777-1784.
- [9] Vergez F, Green AS, Tamburini J, et al. High levels of CD34+CD38low/-CD123+ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: a Groupe Ouest-Est des Leucemies Aigues et Maladies du Sang (GOELAMS) study[J]. *Haematologica*, 2011, 96(12):1792-1798. DOI: 10.3324/haematol.2011.047894.
- [10] Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, et al. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1):31-42. DOI: 10.1016/j.stem.2009.04.018.
- [11] Hosen N, Park CY, Tatsumi N, et al. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(26):11008-11013. DOI: 10.1073/pnas.0704271104.
- [12] Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, et al. CD34+CD38- leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2019, 33(5):1102-1112. DOI: 10.1038/s41375-018-0326-3.
- [13] Plesa A, Dumontet C, Mattei E, et al. High frequency of CD34+CD38-low immature leukemia cells is correlated with unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia[J]. *World J Stem Cells*, 2017, 9(12):227-234. DOI: 10.4252/wjsc.v9.i12.227.
- [14] Testa U, Pelosi E, Frankel A. CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies[J]. *Biomark Res*, 2014, 2(1):4. DOI: 10.1186/2050-7771-2-4.
- [15] 岳文勤, 唐古生, 柳敏, 等. CD123在急性髓系白血病患者骨髓异常细胞群中的表达及预后价值[J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(10): 876-882. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.10.010.
- [16] Jiang Y, Xu P, Yao D, et al. CD33, CD96 and death associated protein kinase (DAPK) expression are associated with the survival rate and/or response to the chemotherapy in the patients with acute myeloid leukemia (AML)[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23:1725-1732. DOI: 10.12659/msm.900305.
- [17] Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461)[J]. *Blood*, 2002, 100(13): 4325-4336. DOI: 10.1182/blood-2002-03-0772.
- [18] Peterson LF, Zhang DE. The 8;21 translocation in leukemogenesis[J]. *Oncogene*, 2004, 23(24):4255-4262. DOI: 10.1038/sj.onc.1207727.
- [19] Guan Y, Gerhard B, Hogge DE. Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML)[J]. *Blood*, 2003, 101(8):3142-3149. DOI: 10.1182/blood-2002-10-3062.
- [20] Taussig DC, Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, et al. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells[J]. *Blood*, 2008, 112(3):568-575. DOI: 10.1182/blood-2007-10-118331.
- [21] Kong Y, Yoshida S, Saito Y, et al. CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL[J]. *Leukemia*, 2008, 22(6):1207-1213. DOI: 10.1038/leu.2008.83.
- [22] Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, et al. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity[J]. *Nat Med*, 1998, 4(9):1038-1045. DOI: 10.1038/2023.
- [23] Anjos-Afonso F, Currie E, Palmer HG, et al. CD34(-) cells at the apex of the human hematopoietic stem cell hierarchy have distinctive cellular and molecular signatures[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(2):161-174. DOI: 10.1016/j.stem.2013.05.025.
- [24] Anjos-Afonso F, Bonnet D. Forgotten gems: human CD34(-) hematopoietic stem cells[J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(4):503-504. DOI: 10.4161/cc.27788.
- [25] Terwijn M, Zeijlemaker W, Kelder A, et al. Leukemic stem cell frequency: a strong biomarker for clinical outcome in acute myeloid leukemia[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e107587. DOI: 10.1371/journal.pone.0107587.
- [26] Ng SW, Mitchell A, Kennedy JA, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia[J]. *Nature*, 2016, 540(7633):433-437. DOI: 10.1038/nature20598.
- [27] Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(11): 1315-1321. DOI: 10.1038/nbt1350.
- [28] Bradbury C, Houlton AE, Akiki S, et al. Prognostic value of monitoring a candidate immunophenotypic leukaemic stem/progenitor cell population in patients allografted for acute myeloid leukaemia[J]. *Leukemia*, 2015, 29(4):988-991. DOI: 10.1038/leu.2014.327.
- [29] Jentzsch M, Bill M, Nicolet D, et al. Prognostic impact of the CD34+CD38- cell burden in patients with acute myeloid leukemia receiving allogeneic stem cell transplantation[J]. *Am J Hematol*, 2017, 92(4):388-396. DOI: 10.1002/ajh.24663.
- [30] Darwish NH, Sudha T, Godugu K, et al. Acute myeloid leukemia stem cell markers in prognosis and targeted therapy: potential impact of BMI-1, TIM-3 and CLL-1[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(36):57811-57820. DOI: 10.18632/oncotarget.11063.
- [31] Jourdan E, Boissel N, Chevret S, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2013, 121(12):2213-2223. DOI: 10.1182/blood-2012-10-462879.
- [32] 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. DOI: 10.1182/blood-2012-11-468348.

(收稿日期:2019-05-21)

(本文编辑:王叶青)