

流式技术检测外周血白血病细胞在 AML 复发监测中的应用

方健源¹, 胡淑芬¹, 李秋娴¹, 邹茂贤¹, 谢碧霞²

(广州市番禺区中心医院检验科¹、血液科², 广东 广州 511400)

【摘要】 目的 探讨多参数流式技术(FCM)检测外周血白血病细胞在急性髓细胞白血病(AML)复发监测中的临床应用价值。方法 选择2012年1月至2014年6月我院血液科收治的56例AML患者,于首次诱导化疗结束、巩固化疗6个月、巩固化疗12个月应用FCM定期检测患者外周血标本,同时检测骨髓细胞形态学的变化。MRD \geq 0.01%为MRD阳性,否则为MRD阴性。AML患者首次诱导化疗结束后外周血MRD水平分为高(MRD \geq 10⁻²)、中(10⁻²<MRD<10⁻⁴)、低(MRD \leq 10⁻⁴)三个水平。采用 χ^2 检验方法比较首次诱导化疗结束、巩固化疗6个月、巩固化疗12个月的MRD阳性组和MRD阴性组复发率差异,同时比较首次诱导化疗结束后外周血MRD高、中、低三组复发率差异。结果 FCM检测外周血MRD阳性组在首次诱导化疗结束、巩固化疗6个月、巩固化疗12个月的复发率分别为72.7%、89.3%、93.8%,MRD阴性组分别为25.0%、18.1%、0%;MRD阳性组与MRD阴性组相比较,首次诱导化疗结束($\chi^2=7.240, P=0.007$)、巩固化疗6个月($\chi^2=15.554, P=0.000$)、巩固化疗12个月($\chi^2=19.562, P=0.000$)三个时间点的复发率差异均有统计学意义($P<0.05$);首次诱导化疗结束后外周血MRD高水平组的复发率明显高于中水平组($\chi^2=8.207, P=0.004$)、低水平组($\chi^2=14.667, P=0.000$),差异有统计学意义($P<0.05$)。中水平组的复发率与低水平组比较差异无统计学意义($\chi^2=1.398, P=0.237>0.05$)。结论 FCM检测外周血白血病细胞对诊断AML复发及指导个体化治疗有重要意义。

【关键词】 流式技术;外周血;白血病细胞;复发

【中图分类号】 R733.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)04-0529-03

Application of flow cytometry for detection of peripheral blood leukemic cells in monitoring of recurrence of acute myeloid leukemia. FANG Jian-yuan¹, HU Shu-fen¹, LI Qiu-xian¹, ZOU Mao-xian¹, XIE Bi-xia². Department of Clinical Laboratory¹, Department of Hematology², Central Hospital of Panyu District, Guangzhou 511400, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the application of multi-parameter flow cytometry (FCM) for detection of peripheral blood leukemic cells in monitoring of recurrence of acute myeloid leukemia (AML). **Methods** Fifty-six patients with AML from January 2012 to June 2014 in Department of Hematology in our hospital were enrolled. Peripheral blood samples of the patients were detected using FCM regularly after the first induction chemotherapy, 6 months, 12 months of consolidation chemotherapy. Changes in morphology of bone marrow cell were detected. MRD \geq 0.01% was defined as MRD positive, and MRD<0.01% was defined as MRD negative. MRD levels of AML patients after the first induction chemotherapy were divided into high level (MRD \geq 10⁻²), medium level (10⁻²<MRD<10⁻⁴), low level (MRD \leq 10⁻⁴). Chi square test was used to compare the recurrence rates between MRD positive group and MRD negative group after the first induction chemotherapy, 6 months, 12 months of consolidation chemotherapy. At the same time, the recurrence rates were compared between high level, medium level, low level group after the first induction chemotherapy. **Results** The recurrence rates after the first induction chemotherapy, 6 months, 12 months of consolidation chemotherapy were 72.7%, 89.3%, 93.8% in MRD positive group, 25%, 18.1%, 0% in MRD negative group, with statistically significant difference between the MRD positive group and MRD negative group after induction chemotherapy ($\chi^2=7.240, P=0.007$), 6 months of consolidation chemotherapy ($\chi^2=15.554, P=0.000$) and 12 months of consolidation chemotherapy ($\chi^2=19.562, P=0.000$), $P<0.05$. After the first induction chemotherapy, the recurrence rate in MRD high level group was significantly higher than that in the medium level group ($\chi^2=8.207, P=0.004$) and low level group ($\chi^2=14.667, P=0.000$), and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no statistically significant difference in the the recurrence rate between the medium level group and low level group ($\chi^2=1.398, P=0.237>0.05$). **Conclusion** FCM detection of Leukemia cells in peripheral blood has important significance for the diagnosis of recurrent AML and guiding individual treatment.

【Key words】 Flow cytometry; Peripheral blood; Leukemic cells; Recurrence

急性髓细胞白血病(AML)是一种由于造血干/祖细胞基因突变所致的恶性克隆性疾病。目前的治疗手段主要包括诱导及巩固治疗以及造血干细胞移植。目前认为造成白血病复发的关键因素是白血病经治疗后体内仍残留少量的肿瘤细胞,即存在微量残留白血病细胞(MRD),这些肿瘤细胞的克隆增殖导致白血病复发。白血病细胞通常表达异常的表面抗原表型,即白血病相关表型(LAIP)^[1],以及异常光散射特性,因此能与正常造血成分相互区别。联合利用多种单克隆抗体,多参数流式技术可以同时检测细胞表面不同抗原表达的多参数荧光信号,进而识别完全缓解后混于正常造血细胞中的MRD。本研究收集AML患者的骨髓和外周血标本进行检测分析,探讨AML患者外周血白血病细胞的监测对AML复发及指导个体化治疗的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2012年1月至2014年6月我院血液科收治的56例AML患者(不包括急性早幼粒细胞白血病患者),于首次诱导化疗结束、巩固化疗6个月、巩固化疗12个月定期监测。诊断符合法美英协作组(FAB)及2008年世界卫生组织(WHO)的诊断标准^[2]。

1.2 标本检测

1.2.1 多参数流式技术检测方法 采集外周血(EDTA-K2抗凝),利用四色荧光(四种荧光素分别为FITC、PE、APC、PerCP)直接免疫标记法进行免疫分型检测。在每支检测试管中加 1×10^6 有核细胞。根据每例患者的白血病特点选择单克隆抗体组合(试剂均为美国BD公司产品),按照试剂所说明书进行操作。至少收集10万个可供分析的有核细胞,用流式细胞仪(美国BD公司)收集细胞,每支试管用配套的CellQuest软件分析细胞标志。根据原始细胞上抗原是否跨系表达、表达不同步(不同阶段的抗原同时表达)、表达过强、过弱、丢失等判定是否为MRD,MRD $\geq 0.01\%$ 为阳性,否则为阴性。

1.2.2 骨髓细胞形态学检测方法 骨髓液涂片6~8张,经吉姆萨-瑞士染色后,在日本Olympas显微镜油镜下分类200个细胞,根据形态进行不同阶段的分类计数。根据张之南等^[3]主编的第3版《血液病诊断及疗效标准》判断疗效是否为复发。

1.3 治疗方案 AML(非M3)的诱导化疗方案采用柔红霉素加阿糖胞苷(DA)、去甲氧柔红霉素加阿糖胞苷(IA)或米托蒽醌加阿糖胞苷(MA)方案。骨髓达CR后采用原方案巩固强化治疗2个疗程后,分别用中或大剂量阿糖胞苷治疗,完成4个疗程后休息2个月,然后用DA和米MA方案交替2个疗程,每个疗程间隔3个月,此后停止化疗,定期随访。

1.4 随访 56例AML患者在首次诱导化疗结束后获得CR后开始随访,定期监测,以FAB分型骨髓形态学作为判断复发的金标准,至复发随访结束,未复发随访至今,随访时间1~30个月,中位数16个月。

1.5 统计学方法 应用SPSS13.0软件对数据进行分析,计数资料以百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AML患者首次诱导化疗结束后定期监测外周血MRD随访结果 AML患者首次诱导化疗结束后定期监测外周血MRD随访结果 AML患者首次诱导化疗结束获得CR后开始随访,分别在首次诱导化疗结束、巩固化疗6个月、巩固化疗12个月进行外周血MRD检测。MRD阳性组在首次诱导化疗结束、巩固化疗6个月、巩固化疗12个月的复发率分别为72.7%、89.3%、93.8%,MRD阴性组分别为25.0%、18.1%、0(表1)。MRD阳性组与MRD阴性组相比较,首次诱导化疗结束($\chi^2=7.240, P=0.007$)、巩固化疗6个月($\chi^2=15.554, P=0.000$)、巩固化疗12个月($\chi^2=19.562, P=0.000$)三个时间点的复发率差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 AML患者首次诱导化疗结束后定期监测外周血MRD随访结果[例(%)]

检测时间	例数	MRD阳性		MRD阴性	
		复发	未复发	复发	未复发
首次诱导化疗结束	56	32(57.1)	12(21.4)	3(5.4)	9(16.1)
巩固化疗6个月	39	25(64.1)	3(7.7)	2(5.1)	9(23.1)
巩固化疗12个月	27	15(55.6)	1(3.7)	0(0)	11(40.7)

2.2 AML患者首次诱导化疗结束后外周血MRD水平与复发率的关系 56例AML患者按照首次诱导化疗结束后外周血MRD水平分为高(MRD $\geq 10^{-2}$)、中($10^{-2} < \text{MRD} < 10^{-4}$)、低(MRD $\leq 10^{-4}$)三组。经统计分析,高水平组的复发率明显高于中水平组($\chi^2=8.207, P=0.004$)、低水平组($\chi^2=14.667, P=0.000$),差异有统计学意义($P < 0.05$)。中水平组的复发率与低水平组比较差异无统计学意义($\chi^2=1.398, P=0.237 > 0.05$)。

表2 AML患者首次诱导化疗结束后外周血MRD水平与复发率的关系[例(%)]

MRD水平	例数	复发	未复发
高(MRD $\geq 10^{-2}$)	21	20(95.2)	1(4.8)
中($10^{-2} < \text{MRD} < 10^{-4}$)	23	12(52.2)	11(47.8)
低(MRD $\leq 10^{-4}$)	12	3(25.0)	9(75.0)

3 讨论

FCM是目前检测白血病微观水平最有应用前景的方法之一。它是在单细胞水平辨认细胞形态、大小和荧光特征,从而区分白细胞和正常细胞的一种方法,其优势是每秒可检测5000~10000个细胞,快速地对各个细胞进行多参数定量分析,灵敏度达 10^{-4} 。

FCM 是基于对白血病细胞特殊表达的免疫表型进行识别来定量检测 MRD, 应用多色荧光技术可在 1×10^4 或更多正常细胞中检测出 1 个白血病细胞。临床上对急性白血病治疗效果的评价主要通过骨髓细胞形态学检查, 其具有一定的局限性, 其诊断标准一般在体内白血病细胞数超过 1% 时方能检测到, 而体内 MRD 的持续存在会导致患者最终白血病的复发。目前 MRD 检测大多是以骨髓为标本。由于白血病的非均一分布, 加上髓外浸润以及化疗后骨髓重建引起的造血细胞反应性增生, 有时会影响 MRD 的检测结果。白血病患者反复损伤性骨髓穿刺不易接受, 且存在稀释等问题。从患者角度出发, 外周血取材方便, 采集外周血无疑更合适。采用 FCM 测定 MRD 是根据白血病细胞与正常细胞成分之间的抗原表达存在的量或质的区别来进行的, 在某些抗体组合中, 它们有时只适合外周血标本的检测而不适合于骨髓标本的检测^[4]。为此, 本文针对 AML 患者的骨髓和外周血标本进行检测分析, 探讨 AML 患者外周血白血病细胞的监测对 AML 复发的临床指导意义。

Buccisano 等^[5]认为外周血的检测同骨髓一样有意义, 如果同时检测外周血及骨髓, 可能提高检出率。如果巩固化疗后外周血的 MRD 水平高于 0.015%, 复发概率增加。外周血白血病细胞水平可间接反映骨髓情况, 用于治疗监测。目前国际上推荐对白血病的治疗采用个体化治疗原则。期间动态监测患者白血病细胞的 MRD 水平直接反映体内白血病细胞的负荷量, 根据体内白血病细胞的负荷决定治疗方案。本研究外周血 MRD 阳性组在首次诱导化疗结束、巩固化疗 6 个月、巩固化疗 12 个月的复发率分别为 72.7%、89.3%、93.8%, MRD 阴性组分别为 25.0%、18.1%、0。MRD 阳性组与 MRD 阴性组相比较, 首次诱导化疗结束、巩固化疗 6 个月、巩固化疗 12 个月三个时间点的复发率均有明显差异。Couston-Smith 等^[6]研究在诱导治疗结束时和持续治疗第 14、32、56 周共收集 629 份标本, 每个时间点可检出 MRD 阳性 ($>10^{-4}$) 均与高复发率相关, 尤其是诱导治疗结束时 ($>10^{-3}$) 或维持治疗 14 周 ($>10^{-3}$) 有高水平 MRD 的患者预后差。本研究外周血 MRD 阳性组巩固化疗 12 个月、巩固化疗 6 个月的复发率要比首次诱导化疗结束的复发率要高, 考虑与化疗强度不够或对以往的化疗药耐药有关。

本研究高水平 ($\text{MRD} \geq 10^{-2}$) 组的复发率 (95.2%) 明显高于中水平 ($10^{-2} < \text{MRD} < 10^{-4}$) 组 (52.2%)、低水平 ($\text{MRD} \leq 10^{-4}$) 组 (25%)。Pawinska 等^[7]认为, 诱导缓解末 $\text{MRD} \geq 10^{-4}$ 的患者需要在治疗过程中严密监测 MRD 量的变化, 以便及时采取有效治疗方案。孙楠楠

等^[8]研究提出, 对 ALCR 后 FCM 连续动态监测 MRD 发现, CR 后患者 MRD 水平差异较大, 不能作为评价 CR 的单一指标。而对于每一名处于 CR 的 AL 患者而言, 随着治疗时间的延长、化疗次数的增多, MRD 水平总体上呈现下降趋势, 但是波动幅度较大, 且部分 MRD 阴性患者在巩固治疗过程中出现阳转。因此, FCM 动态监测 MRD 可为 ALCR 患者化疗方案的选择提供依据。根据 MRD 水平, 对复发危险度高的患者给予强有力的化疗以增加治愈率, 对复发危险度低的患者避免过度化疗以减轻副作用, 从而实现个体化治疗。

MRD 是一个强烈提示缓解和复发的预后因素。临床应用 MRD 检测可有效指导 CR 后的治疗, 包括 CR、部分缓解 (PR) 和未缓解 (NR) 的重新定义, 根据 MRD 的水平进行预后分级及选择相应的化疗方案等。若 MRD 持续阴性, 可停止治疗; 若 MRD 持续阳性, 应予患者更强的化疗, 或考虑骨髓移植。在诱导缓解治疗期的早期时间点检测 MRD 评估预后, 价值是否等同于或优于在诱导缓解治疗末时间点检测 MRD 尚待进一步研究证实^[9]。很多研究认为其他时间点的检测结果同样具有预后意义, 且连续的 MRD 监测可提供更多的预后信息。

综上所述, FCM 检测外周血白血病细胞也能很好地提示复发, 且外周血取材方便, 创伤性相对较轻, 对提示 AML 复发及指导个体化治疗有重要意义。

参考文献

- [1] Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I, et al. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia [J]. *Am J Clin Pathol*, 2009, 131: 16-26.
- [2] Arber DA, Brunning RD, Le Beau MM, et al. Acute myeloid leukemia and related precursor neoplasms [M]//WHO classification of tumours of the haematopoietic and lymphoid tissues. 4th edition. Lyon: International agency for research on cancer, 2008: 109-147.
- [3] 张之南, 沈 悌. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 131-133.
- [4] 汤永民. 流式细胞术在急性白血病微小残留病检测中的应用 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2002, 17(6): 370-372.
- [5] 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: 332-341.
- [6] Couston-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2000, 96(8): 2691-2696.
- [7] Pawinska K, Balwierz W, Baran J, et al. Minimal residual disease in childhood acute leukemias [J]. *Przegl Lek*, 2006, 63(1): 41-43.
- [8] 孙楠楠, 甘思林, 孙 慧, 等. 流式细胞术动态监测急性白血病完全缓解后微小残留病与预后的关系 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(2): 339-342.
- [9] 景 清. 流式细胞术检测儿童急性淋巴细胞白血病微小残留病研究进展 [J]. *实用医院临床杂志*, 2007, 11(4): 98-100.

(收稿日期: 2014-08-06)