

儿童急性淋巴细胞白血病微小残留病与复发的相关分析

夏焱,李文益,郭海霞,邓庆丽,方建培,薛红漫,周敦华

(中山大学孙逸仙纪念医院儿科,广东·广州 510120)

[摘 要] 目的 分析小儿急性淋巴细胞白血病(急淋)缓解时和缓解不同时期微小残留病(MRD)的水平与复发的相关性。方法 用极限稀释定量PCR法和巢式PCR法追踪检测MRD,数据处理用Kaplan-Meier方法及COX回归模型等。结果 46例急淋患儿缓解时MRD值与骨髓复发呈正相关($r = 0.4396, P < 0.01$),骨髓复发组MRD值为 7.359×10^{-3} ,与未复发组MRD值(3.954×10^{-4})差异有显著性($P < 0.01$);缓解期MRD持续阳性或由阴性转为阳性者,骨髓复发的相对危险度明显增高($P < 0.05$)。结论 缓解时MRD水平及缓解期MRD定性结果可作为估计急淋预后的一个重要指标,动态追踪检测MRD是指导治疗和预防复发的有效手段。

[关 键 词] 急性淋巴细胞白血病;微小残留病;复发;儿童

[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2002)03-0171-03

Relationship Between Relapse and Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia

XIA Yan, LI Wen-Yi, GUO Hai-Xia, et al.

Department of Pediatrics, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China

Abstract: **Objective** To study the relationship between bone marrow relapse and the level or changes of minimal residual disease(MRD) in childhood acute lymphoblastic leukemia(ALL). **Methods** The MRD level was detected using the modified limiting dilution PCR and nested-PCR in 46 children with ALL; the data was analyzed using the Kaplan-Meier method and COX model. **Results** The MRD level of the 46 patients by the time of complete remission(CR) was positively correlated with marrow relapse($r = 0.4396, P < 0.05$). There was a significant difference in the MRD level between marrow relapse children and non-relapse children(7.359×10^{-3} vs $3.954 \times 10^{-4}; P < 0.05$). The cases whose MRD was persistently positive or changed from negative to positive during CR had a higher relative risk for relapse($P < 0.05$). **Conclusions** The MRD level by the time of CR and the qualitative findings in the period of CR are important markers in accessing the prognosis in childhood ALL. MRD detection by PCR can be used to identify the relative risk for relapse and make more effective treatment and prophylaxis regimens for relapse in childhood ALL.

Key words: Acute lymphoblastic leukemia; Minimal residual disease; Relapse; Child

随着急性淋巴细胞白血病(急淋)微小残留病(minimal residual disease, MRD)检测方法的不断改进与完善,人们越来越关注MRD检测的生物学意义与临床意义间的关系,以及缓解时体内残留白血病细胞的负荷量(即MRD值)、缓解期MRD的存在与否及持

续时间与复发是否具有良好的相关性?PCR法可检测到的MRD在何种临界水平强烈预示复发?MRD存在与否能不能作为估计急淋患者预后的一个因素,其价值如何?本文总结6年来追踪检测MRD的小儿急淋46例资料,对此进行研究分析。

[收稿日期] 2001-08-24; [修回日期] 2002-01-18
[基金项目] 广东省卫生厅科研基金资助项目(No. A1997148)
[作者简介] 夏焱(1970-),女,博士研究生,主治医师。

1 资料和方法

1.1 病例来源

1994~2000 年在我院儿科确诊为急淋、坚持治疗且 MRD 资料完整的患儿 46 例,其中男 34 例、女 12 例,年龄 1~13 岁。急淋分型如下:L1 36 例、L2 7 例、L3 3 例,B 系 38 例,T 系 8 例,高危型 10 例,标危型 36 例。对初诊时具有基因重排阳性的这 46 例患儿追踪检测 MRD,分别于初诊时、完全缓解时、缓解后每隔 3 月取骨髓和外周血标本进行检测,追踪 3~60 月。治疗方案采用新华 88 方案、中山医科大学 97 方案^[1]及全国儿童白血病协作组方案。

1.2 检测方法

缓解时 MRD 采用极限稀释定量 PCR 法^[2]和巢式 PCR 法^[3],缓解期间 MRD 追踪采用巢式 PCR 法。按常规酚/氯仿抽提法提取 DNA,以 TCR γ 、IgH、TCR δ 基因重排为标志作 PCR 扩增,引物由中国科学院上海细胞生物研究所合成,引物序列及具体操作步骤见文献^[2,3],阳性对照的细胞株为 CEM(T-ALL 细胞株)及 RAJ(B 淋巴瘤细胞瘤/B-ALL 细胞株)。

1.3 统计学方法

缓解时及缓解不同时期 MRD 定性结果与复发的相关分析采用 Kaplan-Meier 方法,定量结果的分析用 COX 回归模型及秩和检验。

2 结果

2.1 TCR γ 、IgH、TCR δ 重排阳性率及转归

46 例急淋患儿中,3 种基因的总检出率为 88.3%,其中 TCR δ 30 例,TCR γ 24 例,IgH 29 例;同时检出 TCR δ +TCR γ 8 例,其中 T-ALL 5 例,B-ALL 3 例,IgH+TCR γ 10 例,IgH+TCR δ 17 例。未见同一标本具有 3 个基因重排的现象。46 例患儿中,完全缓解 28 例、骨髓复发 18 例、中枢神经系统白血病复发 12 例、睾丸白血病 2 例、死亡 13 例。

2.2 缓解时 MRD 与复发的相关关系分析

2.2.1 缓解时 MRD 定性结果与复发相关分析 46 例急淋患儿完全缓解时骨髓 MRD 阳性 29 例,相对危险度为 1.945;阴性 17 例,相对危险度为 1,MRD 阳性者复发的相对危险度是 MRD 阴性的近 2 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。缓解时 MRD 阴性的患儿,其存活率明显高于 MRD 阳性的患儿($P < 0.05$)。

2.2.2 缓解时 MRD 定量结果与复发相关分析

COX 回归模型显示缓解时 MRD 定量值与骨髓复发的相关系数为 0.4396,相对危险度高达 838.43 倍,说明缓解时 MRD 定量值与骨髓复发正相关($P < 0.01$)。缓解时 MRD 定量值越高,其复发的危险度明显增高。秩和检验分析骨髓复发组与未复发组的 MRD 值分别为 7.359×10^{-3} 及 3.954×10^{-4} ,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 缓解时 MRD 水平与骨髓复发相关分析
Table 1 Correlation between marrow relapse and the level of MRD at the time of complete remission

方法	P	
COX 回归分析		
* "COX 回归系数	6.732	
* "相对危险度	838.43	< 0.01
* "相关系数 r	0.4396	
秩和检验		
* "骨髓复发组 MRD 值	7.359×10^{-3}	< 0.01
* "骨髓未复发组 MRD 值	3.954×10^{-4}	

注:MRD 的定量值以 MRD 细胞占有核细胞的比例表示

2.3 缓解不同时期 MRD 与复发的相关分析

在缓解早期(0~3 月),MRD 持续阳性的复发相对危险度是 MRD 持续阴性的 2.5 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在缓解中期(3~24 月),MRD 持续阳性的复发相对危险度仍然很高(3~6 个月为 3.649,6~24 个月为 4.847);MRD 由阴性变为阳性的患儿,其复发相对危险度明显增高(3~6 个月为 3.106,6~24 个月为 5.103),分别是同期 MRD 持续阴性的患儿的 3.1 倍和 5.1 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在缓解后期(24~60 月),MRD 由阴性变为阳性的患儿,其复发相对危险度(3.871)仍然较高。

3 讨论

46 例急淋患儿完全缓解时仍有 29 例(63.1%)可检出残留的白血病细胞,说明完全缓解(complete remission, CR)后巩固、维持治疗以及追踪检测 MRD 的必要性。在 CR 后 MRD 的存在是否一定预示复发?众说纷纭,曾有很长一段时期国内外学者^[5~7]都认为,CR 后的一段时间内(6~18 个月)MRD 存在并不能预示复发,仅代表 MRD 在骨髓中的清除过程。近年 Cave 等^[4]在分析欧洲国家 226 例化疗 CR 的急淋患儿后认为,CR 后的残留白血病细胞数量能预测患儿的复发,在诱导化疗结束时,残留白血病细胞数 $\geq 10^{-2}$ 时复发的机会明显增加。他们提出一个新的观

点 ,即残留白血病细胞的数量是影响生存的最重要指标。我们在对 46 例急淋患儿 CR 时检测 MRD 后也发现类似的现象。CR 时体内 MRD 阳性 ,其复发的相对危险度较高 ,是 MRD 阴性的近 2 倍 ,生存曲线分析显示 ,缓解时 MRD 阴性的患儿 ,其存活率确实明显高于 MRD 阳性的患儿。那么 ,缓解时 MRD 的存在与否 ,能否作为继年龄、免疫分型、白细胞计数及危险分类等之后的另一个重要的预后指标呢 ? 我们进一步用 COX 回归模型分析了缓解时 MRD 定量值与骨髓复发的相关系数为 0.4396 ,相对危险度高达 838.43 倍 ,说明 MRD 定量值与骨髓复发正相关 ,缓解时 MRD 定量值越高 ,其骨髓复发的危险度明显增高。所以 ,缓解时 MRD 的存在与否可以更为准确地预示复发 ,是一个更为重要的预后因素。我们根据本研究认为 ,缓解时 MRD 值 $\geq 7.0 \times 10^{-3}$ 时复发的危险性明显增高 ,这与 Cave 等^[4]的结果略有出入 ,可能是检测方法的敏感性不同 ,或不同的化疗方案以及患儿的个体差异影响了 MRD 的检出率。

Cave 等在进行纵向与多因素的分析后 ,认为 MRD 值 $\geq 10^{-3}$ 或 MRD 阳性组 ,其骨髓复发率是相似的 ,其差异无统计学意义($P > 0.05$)我们在研究中也得到与文献一致的结果 ,缓解时 MRD 阳性或 MRD 值 $\geq 7.0 \times 10^{-3}$ 其骨髓的复发率均明显增高($P < 0.01$)。

完全缓解不同时期存在的 MRD 与复发的相关性说明 ,在完全缓解期 ,随着维持和巩固治疗的加强 ,就整体水平而言 ,体内 MRD 呈一个逐渐减少的清除过程 ,随着 MRD 的减少 ,总体的复发危险度是下降的 ,这与文献报道一致^[4~9] ;但就个体而言 ,完全缓解某个时段 MRD 的存在并不能确定其预后是复发还是持续缓解。

我们进一步分析了缓解不同时期 MRD 的变化的 4 种情况与复发的相关性。发现在缓解早期(0 ~ 3 月) ,MRD 持续阳性的复发相对危险度是 MRD 持续阴性的 2.5 倍 ,在缓解中期(3 ~ 24 月) ,MRD 持续阳性的复发相对危险度仍然很高 ,MRD 由阴性变为阳性的患儿 ,其

复发相对危险度明显增高 ,分别是同期 MRD 持续阴性的患儿的 3.1 倍和 5.1 倍 ,在缓解后期(24 ~ 60 月) ,MRD 由阴性变为阳性的患儿 ,其复发相对危险度依然很高 (由于例数减少使差异不显著 ,加大样本量可解决这一问题)。所以 ,在完全缓解期追踪检测 MRD 并分析其变化显得尤其重要 ,MRD 持续阳性或由阴性变为阳性 ,其复发的危险度是明显增高的 ,这对及时调整化疗方案、预防复发有着重要的临床意义。

[参 考 文 献]

[1] 陈纯 ,黄绍良 ,方建培 ,等 . 儿童急性淋巴细胞白血病 45 例疗效及预后分析 . 中山医科大学学报 , 2001 , 22(2) : 151 - 153 .
[2] 夏焱 ,李文益 ,邓庆丽 ,等 . 巢式 PCR 法检测急性淋巴细胞性白血病微小残留病 [J] . 实用儿科临床杂志 , 1997 , 12(5) : 292 - 294 .
[3] 郭海霞 ,李文益 ,邓庆丽 ,等 . 极限稀释 PCR 法对急性淋巴细胞性白血病微小残留病的检测及意义 [J] . 中华儿科杂志 , 1999 , 37(11) : 688 - 690 .
[4] Cave H , van der Werff ten Bosch J , Suciu S , et al . Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia [J] . N Engl J Med , 1998 , 339(9) : 591 - 598 .
[5] Yamada M , Wasserman R , Lange B , et al . Minimal residual disease in childhood B-lineage lymphoblastic leukemia . Persistence of leukemia cells during the first 18 months of treatment [J] . N Engl J Med , 1990 , 322(7) : 448 - 455 .
[6] Nizet Y , Van Daele S , Lewalle P , et al . Long - term follow-up of residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients in complete remission using clonogenic IgH probes and the polymerase chain reaction [J] . Blood , 1993 , 82(5) : 1618 - 1625 .
[7] Vilmer E , Suciu S , Ferster A , et al . Long - term results of three randomized trials(58831 , 58832 , 58881) in childhood acute lymphoblastic leukemia : a CLCG-EORTC report [J] . Leukemia , 2000 , 14(12) : 2257 - 2266 .
[8] Li AH , Rosenquist R , Forestier E , et al . Detailed clonality analysis of relapsing precursor B acute lymphoblastic leukemia : implications for minimal residual disease detection [J] . Leuk Res , 2001 , 25(12) : 1033 - 1045 .
[9] Eckert C , Biondi A , Seeger K , et al . Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia [J] . Lancet , 2001 , 358(9289) : 1239 - 1241 .

(本文编辑 : 刘丽旭)