

· 临床研究 ·

MRD 监测对儿童 B 系急性淋巴细胞性白血病疗效评估的意义

叶启东, 顾龙君, 汤静燕, 薛惠良, 陈静, 潘慈, 董璐, 周敏, 蒋黎敏

(上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心血液肿瘤科, 上海 200127)

[摘要] **目的** 研究监测微小残留白血病(MRD)在 B 系急性淋巴细胞白血病(ALL)患儿治疗中的作用。**方法** 回顾性研究了 2001 年 9 月 1 日至 2005 年 4 月 31 日,采用 ALL-XH-99 方案治疗的 B 系 ALL 患儿中进行 MRD 监测的患儿共 124 例。用四色多参数流式细胞仪监测 ALL 患儿治疗过程中不同时间点的 MRD。**结果** 在 124 例进行过 MRD 监测的 B 系 ALL 患儿中,其中 MRD <0.01%、0.01%~0.1% 和 >0.1% 的分别有 103 例、13 例和 8 例,其 5 年无复发生存率(RFS)分别为(88.9±3.9)%、(70.0±14.5)% 和 0%,而 5 年无事件生存率(EFS)分别为(82.4±4.4)%、(21.2±18.0)% 和 0%,两者均 $P<0.01$;将首次 CR 后半年内 MRD 检查分成阴性(<0.01%)和阳性两组,其 5 年 RFS 分别为(87.7±4.1)% 和 (58.3±14.2)% ($P<0.01$);5 年 EFS 分别为(80.7±4.6)% 和 (25.6±13.8)% ($P<0.01$);首次 CR 后半年以后 MRD 检查阴性和阳性两组的 5 年 RFS 分别为(92.0±3.6)% 和 (48.5±15.5)% ($P<0.01$)。多因素分析显示结果显示诱导缓解后 MRD、泼尼松诱导窗口反应、第 19 天骨髓象是否达 M-1 级骨髓象和是否检出 BCR-ABL 或 MLL-AF4 融合基因对患儿治疗过程中是否发生复发有预后价值($P<0.05$)。**结论** 在 B 系 ALL 患儿治疗过程中,无论在诱导缓解达到 CR 时,还是在随后的治疗过程中,监测 MRD 水平对于评估 ALL 患儿疗效有重要意义。[中国当代儿科杂志,2008,10(3):333-336]

[关键词] 白血病,急性;微量残留白血病;无事件生存;儿童

[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)03-0333-04

Clinical importance of minimal residual disease testing in the therapy of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia

YE Qi-Dong, GU Long-Jun, TANG Jing-Yan, XUE Hui-Liang, CHEN Jing, PAN Ci, CHEN Jing, DONG Lu, ZHOU Min, JIANG Li-Min. Department of Hematology/Oncology, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China (Gu L-J, Email: ljgusmc@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the role of minimal residual disease (MRD) in the evaluation of therapeutic effectiveness of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Methods** MRD testing was performed in 124 children with B-cell ALL, who were newly diagnosed and enrolled in the ALL-XH-99 treatment protocol from September 2001 to April 2005. MRD was determined by 4-color flow cytometry in the different time points during the treatment period. **Results** After induction therapy, 103, 13 and 8 patients showed MRD < 0.01%, 0.01%-0.1% and > 0.1%, respectively. The 5-year relapse-free survival (RFS) in the patients with MRD < 0.01%, 0.01%-0.1% and > 0.1% was 88.9±3.9%, 70.0±14.5% and 0%, respectively and the 5-year event-free survival (EFS) was 82.4±4.4%, 21.2±18.0% and 0%, respectively. There were significant differences in the RFS and EFS among the patients with different MRD levels ($P<0.01$). Within half a year after induction remission, the 5-year RFS in patients with MRD negative (<0.01%) and positive was 87.7±4.1% and 58.3±14.2%, respectively ($P<0.01$) and the 5-year RFS was 80.7±4.6% and 25.6±13.8%, respectively ($P<0.01$). After half a year with induction remission, the patients with MRD negative and positive also showed statistical differences in the 5-year RFS (92.0±3.6% vs 48.5±15.5%; $P<0.01$) and EFS (85.6±4.5% vs 21.4±11.0%; $P<0.01$). Multivariate analysis confirmed that the MRD level after induction chemotherapy together with the reaction to prednisone, the bone marrow features on the 19th day of induction, and the fusion gene with BCR-ABL or MLL-AF4 had prognostic significance in childhood B-cell ALL. **Conclusions** The MRD level in the whole course of therapy is an important outcome indicator in childhood B cell ALL.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (3):333-336]

Key words: Leukemia, acute; Minimal residual disease; Event free survival; Child

[收稿日期]2007-09-17;[修回日期]2007-10-3
[基金项目]上海市卫生局科研基金(No. 044060)
[作者简介]叶启东,男,博士,副主任医师。主攻方向:儿童血液肿瘤。
[通讯作者]顾龙君,教授,上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心,邮编:200127。

随着联合化疗的应用,目前,儿童急性淋巴细胞性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)有较好的预后,美国 St. Jude 儿童研究医院报道的 B 系 ALL 患儿的 5 年无事生存率(event-free survival, EFS)高达 92%^[1]。在过去的 30 年中,有许多临床和生物学因素已被用来判断预后,并用于指导治疗,近来的研究越来越强调早期治疗反应在 ALL 治疗中的作用,而微量残留白血病(minimal residual disease, MRD)的检测比形态学检测的灵敏度至少高 100 倍^[2]。本研究总结从 2001 年 9 月至 2005 年 4 月间,用开展多参数流式细胞术(MP-FCM),对本院接受 ALL-XH-99 方案治疗的儿童 ALL 215 例中的 124 例作 MRD 监测的结果,并讨论其对估价预后的意义。

1 病例和方法

1.1 病例

2001 年 9 月至 2005 年 4 月进入我院接受 ALL-XH-99 方案治疗的 ALL 患儿共有 215 例,剔除在外院接受过化疗、免疫分型为 T 细胞型和成熟 B 细胞型、双克隆型和放弃治疗或治疗过程中失访的 ALL 患儿,共有 152 例进入本研究,其中男性 101 例(66.4%),女 51 例(33.6%);有 124 例(81.6%)在诱导治疗达完全缓解(CR)后进行了 MRD 监测。诊断时平均年龄 5.92 ± 3.66 岁(0.7~17.2 岁)。白血病诊断、分型和治疗按本院所制定的 ALL-XH-99 方案^[3]进行。治疗后持续完全缓解(CCR)时间从达 CR 起统计到 2007 年 4 月。

1.2 免疫分型和 MRD 监测

取肝素抗凝骨髓 2~3 mL,常规分离有核细胞,以 CD2, CD5, CD7, cCD3, CD10, CD19, CD22, cCD79a, Cμ, CD13, CD33, CD14, CD15, cAnti-MPO, CD41 和 CD34 为单抗标记,采用流式细胞仪作活细胞荧光检测。阳性判断标准:淋系和干系抗原阳性细胞 >30%,髓系抗原阳性细胞 >20%。MRD 检测时,将骨髓单个核细胞调节为每管细胞数 $(2 \sim 3) \times 10^5$,用 CD38-FITC、CD10-PE、CD34-PerCP 和 CD19-APC 单抗进行染色,以能够明确区分白血病细胞和正常骨髓细胞作为抗体组合有效。诱导治疗结束后患儿的骨髓标本经 Ficoll 分离单个核细胞,进行四色荧光标记检测,分析时,如果在筛选时白血病细胞出现的区域内仍有细胞存在,即判断为 MRD 阳性,以这些残存细胞占骨髓单个核细胞总数的比例数值作为 MRD 的测得数值。

1.3 染色体和分子生物学检查

治疗前取肝素抗凝骨髓 5 mL,采用直接法、24 h 培养法和同步法制备染色体,采用 R 带或 G 带技术显带,描述核型。用巢式逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测各种融合基因。

1.4 治疗

采用本院制定的 ALL-XH-99 方案^[3]进行危险度分型和治疗。

1.5 统计学处理

EFS 和无复发生存率(relapse-free survival, RFS)情况分析用 Kaplan-Meier 方法统计。无事生存在以下情况时终止:未缓解、诱导时死亡、复发、第二肿瘤和缓解时死亡等,其中未缓解、诱导时死亡认为无事生存时间为 0.1 年。不同组间生存情况比较用双侧 log-rank 检验。Cox 比例风险模型用于分析独立因素的影响。采用 SPSS 10.0 软件。

2 结果

从 2001 年 9 月开展流式细胞术进行 MRD 监测至 2005 年 4 月期间接受 ALL-XH-99 方案治疗的 ALL 患儿中在诱导缓解后进行了 MRD 监测的患儿有 124 例,男性 83 例,女性 41 例;发病时年龄为 5.86 ± 3.54 岁(1.30~17.20 岁),其中 >10 岁的患儿有 18 例;发病时的白细胞计数为 $31.1 \pm 56.9 \times 10^9/L$ ($0.7 \sim 400.0 \times 10^9/L$), $>50.0 \times 10^9/L$ 的患儿有 23 例;在 FAB 分型中,属于 L1、L2 和 L3 的患儿分别有 83 例、32 例和 9 例;融合基因中检测出 BCR-ABL 和 MLL-AF4 的分别有 9 例和 2 例;染色体分析发现高倍体和低倍体的患儿分别有 26 例和 8 例,有 19 例未发现中期分裂相,其余 71 例为正常核型;进入低危组、中危组和高危组方案治疗的患儿分别有 31 例、54 例和 39 例。

进入本研究的 124 例 ALL 患儿其总的 5 年 EFS 和 RFS 分别为 $(67.91 \pm 4.38)\%$ 和 $(80.15 \pm 4.02)\%$,其中有 8 例为骨髓未复发,但因为肺炎、败血症等感染原因而死亡。在诱导达 CR 后接受 MRD 检查的 ALL 患儿共有 124 例,其中 MRD <0.01%、0.01%~0.1% 和 >0.1% 的分别有 103 例、13 例和 8 例;在首次 CR 缓解后半年内接受 MRD 检查的有 117 例,其中 MRD <0.01%、0.01%~0.1% 和 >0.1% 的分别有 104 例、6 例和 7 例;而在首次 CR 后半年以后接受 MRD 检查的有 112 例患儿,其中 MRD <0.01%、0.01%~0.1% 和 >0.1% 的分别有 98 例、5 例和 9 例。

按照诱导缓解后 MRD 分组,在分成 <0.01%、0.01%~0.1%和>0.1%三组后,其5 年 RFS 分别为(88.9±3.9)%、(70.0±14.5)%和0%,而5 年 EFS 分别为(82.4±4.4)%、(21.2±18.0)%和0%(图1),无论是RFS 和EFS 均在统计学上存在显著性差异,两者均 $P<0.01$;单独比较0.01%~0.1%和>0.1%两组资料,在RFS 上两组差异仍存在显著性($P<0.01$),而在EFS 上两组差异无显著性。把首次CR 后半年内MRD 检查分成阴性(<0.01%)和阳性两组,其5 年RFS 分别为(87.7±4.1)%和(58.3±14.2)%,($P<0.01$);5 年EFS 分别为(80.7±4.6)%和(25.6±13.8)%,($P<0.01$)。把首次CR 后半年后MRD 检查分成阴性(<0.01%)和阳性两组,其5 年RFS 分别为(92.0±3.6)%和(48.5±15.5)%,($P<0.01$);5 年EFS 分别为(85.6±4.5)%和(21.4±11.0)%,($P<0.01$)。共有94 例ALL 患儿在治疗过程MRD 始终保持阴性,这部分患儿的5 年RFS 和EFS 分别为(93.8±3.2)%和(86.3±4.3)%。

COX 比例风险模型用于分析患儿起病时性别、年龄、外周血白细胞数、形态学 FAB 分型、是否检出 BCR-ABL 或 MLL-AF4 融合基因、染色体类型、泼尼松诱导窗口反应、第19 天骨髓像是否达 M-1 级骨髓象、达 CR 时间和诱导缓解后 MRD 对预后的影响,结果显示诱导缓解 CR 后 MRD、泼尼松诱导窗口反应、第19 天骨髓像是否达 M-1 级和是否检出 BCR-ABL 或 MLL-AF4 融合基因对患儿治疗过程中是否发生复发有预后价值,各预后因素见表1。

诱导缓解后 MRD 阴性的患儿,在今后半年中和半年后分别只有4.5%和6.8%的患儿在随访中出现MRD 阳性;而诱导缓解后 MRD 阳性的患儿,在以后半年中和半年后将分别会有47.4%和42.1%的患儿再次出现MRD 阳性;在诱导缓解后MRD>0.1%的患儿中,除了因为死亡无法进行监测的患儿外,再次出现MRD 阳性的比例更高,半年中和半年后再次出现MRD 阳性的患儿比例分别达66.7%和100%。

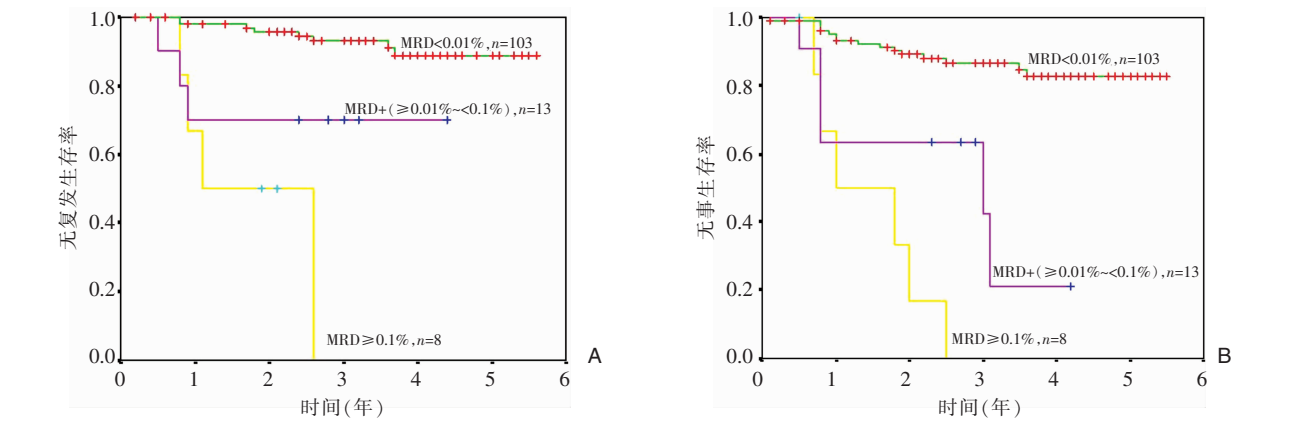


图1 ALL 患儿诱导缓解后不同MRD 水平的RFS 和EFS

A:ALL 患儿诱导缓解后不同MRD 水平的5 年无复发生存率; B:ALL 患儿诱导缓解后不同MRD 水平的5 年无事件生存率

	Score	P
诱导缓解后 MRD	10.759	0.001
性别	2.071	0.150
WBC 是否>5 万	0.686	0.444
年龄是否>10 岁	0.137	0.711
FAB 分型	3.368	0.186
是否有不良融合基因	6.017	0.014
是否有低倍体染色体	0.567	0.716
泼尼松窗口反应	8.915	0.003
诱导后达 CR 时间	0.588	0.682
诱导第19 天骨髓	6.624	0.010

3 讨论

近年儿童 ALL 疗效的提高主要有赖于对患儿的个体化治疗,尤其是根据早期治疗反应来调整治疗避免复发的可能。越来越多的资料表明早期白血病细胞对药物的敏感性是预后的可靠指标,通过监测泼尼松反应、第19 天骨髓象和诱导早期正常外周血中性粒细胞的恢复程度等都能评估早期反应^[4],这种评估的手段最近仍不断提高,本世纪来国外主要依赖MRD 的监测。MRD 是白血病复发的重要原因和指征,受到国内外学者的广泛关注^[5, 6]。目前主要有PCR(聚合酶链式反应)和MP-FCM 等两种

技术检测 MRD,有时辅以荧光原位杂交(FISH)法。国外研究发现两种方法有一定的可比性,而流式细胞术的速度更快,但在部分患儿中由于缺乏表面抗原标记而使其应用受到限制,因此,如果能综合应用两种方法,则能较好的避免假阴性^[7]。

在 ALL 患儿治疗过程中监测 MRD 能够及时反应治疗的敏感性,国外主要儿童白血病诊治中心的资料已经证明 MRD 是重要的、独立的预后指标^[8,9]。本院的 124 例回顾性研究资料同样证明 MRD 监测在 ALL 患儿治疗过程中判断预后的重要作用。无论在诱导期、缓解早期和维持治疗过程中,MRD 阳性均意味着高度的复发风险,尤其是MRD > 0.1% 的患儿。

目前,在发现 MRD 阳性后,一般采取诱导和巩固化疗时类似的方案进行强烈化疗,但国外有研究发现,这种方法往往并不奏效,在发现 MRD 持续阳性后应该采取更为有力的办法,如进行异体造血干细胞移植^[10]。在我们的资料中,诱导缓解后 MRD 阳性的患儿,即使再次进行强烈化疗,在今后半年中和半年后仍将分别有 47.4% 和 42.1% 的患儿再次出现 MRD 阳性;而诱导缓解后 MRD 阴性的患儿,在今后出现 MRD 阳性的机会明显要低;尤其是诱导缓解后 MRD > 0.1% 的患儿,再次出现 MRD 阳性的比例更高,这部分患儿可以考虑直接进入移植组方案,在我们的 ALL-2005 方案中已经得以实施。

在以往的研究中,国内外资料均表明泼尼松窗口反应和诱导缓解第 19 天骨髓象对于预后具有重要意义,而一些融合基因的存在也将明显影响预后,这些都已成为共识^[4]。我们的统计资料也表明,对提示复发有预后价值的指标为诱导缓解后 MRD、泼尼松诱导窗口反应、第 19 天骨髓象是否缓解和是否有 BCR-ABL 或 MLL-AF4 融合基因。因此,治疗过程中重视患儿的这些生物学特征从而及时进行监测,对改善儿童 ALL 的疗效会有一定的促进作用。

目前有学者认为,有近 2/3 的 ALL 患儿可能只需要 12 个月的治疗就能达到治愈,但目前尚很难有可靠的指标来识别这类 ALL 患儿,故所有 ALL 患儿目前常规接受 2 年以上的连续化疗^[11]。因此,目前在白血病治疗过程中困扰我们的是,如何把那些需要很强烈化疗的患儿与那些轻度化疗即能取得治愈的患儿鉴别开来。MRD 能够直接检测每个 ALL 患儿化疗时白血病细胞对药物的反应性,综合体现了治疗中临床、细胞学和药物学等的变化,可以作为可靠的危险度分级和再分级指标^[11]。在诱导缓解后 MRD < 0.01% 的 ALL 患儿其预后较好,反之,则需

考虑更强烈的化疗方案,在新方案中,我们目前采取的是使用“转阴”方案(包括大剂量地塞米松、大剂量阿糖胞苷、表鬼臼毒素和左旋门冬酰胺,DEAL),并提高危险度分级,其疗效有待进一步观察,对于 MRD > 0.1% 的患儿必须密切监测其 MRD 变化,必要时考虑作异体造血干细胞移植。

[参 考 文 献]

- [1] Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia [J]. N Engl J Med, 2006, 354(2): 166-178.
- [2] Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia; a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG) [J]. Blood, 2007, 109(3): 926-935.
- [3] 顾龙君,李娟,薛惠良,汤静燕,陈静,赵惠君,等. ALL-XH-99 方案治疗儿童急性淋巴细胞白血病 158 例疗效分析 [J]. 中华血液学杂志,2004,25(1):1-4.
- [4] Schrappe M, Camitta B, Pui CH, Eden T, Gaynon P, Gustafsson G, et al. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Leukemia, 2000, 14(12): 2193-2194.
- [5] 夏焱,李文益,郭海霞,邓庆丽,方建培,薛红漫,等. 儿童急性淋巴细胞白血病微小残留病与复发的相关分析 [J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(3): 171-173.
- [6] Krejci O, Velden VH, Bader P, Kreyenberg H, Goulden N, Hancock J, et al. Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia; a report of the Pre-BMT MRD Study Group [J]. Bone Marrow Transplant, 2003, 32(8): 849-851.
- [7] Laughton SJ, Ashton LJ, Kwan E, Norris MD, Haber M, Marshall GM. Early responses to chemotherapy of normal and malignant hematologic cells are prognostic in children with acute lymphoblastic leukemia [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(10): 2264-2271.
- [8] Taube T, Eckert C, Korner G, Henze G, Seeger K. Real-time quantification of TEL-AML1 fusion transcripts for MRD detection in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. Comparison with antigen receptor-based MRD quantification methods [J]. Leuk Res, 2004, 28(7): 699-706.
- [9] Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, Well C, Dietz K, Coustan-Smith E, et al. Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR [J]. Br J Haematol, 2005, 128(6): 774-782.
- [10] Marshall GM, Haber M, Kwan E, Zhu L, Ferrara D, Xue C, et al. Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(4):704-709.
- [11] Smith EC, Ribeiro RC, Stow P, Zhou Y, Pui CH, Rivera GK, et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome [J]. Blood, 2006, 108(1):97-102.

(本文编辑:吉耕中)