

论著·临床研究

原血细胞对于儿童急性B淋巴细胞白血病预后判断的价值

王月芳¹ 江咏梅¹ 高举² 周平¹ 张鸽¹

(四川大学华西第二医院 1. 检验科; 2. 儿童血液科, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 探讨儿童急性B淋巴细胞白血病(B-ALL)巩固化疗期骨髓原血细胞(HGs)对于儿童急性B淋巴细胞白血病(B-ALL)预后判断的意义。**方法** 回顾性分析196例初发B-ALL患儿,根据危险分型分为高危($n=55$)、中危($n=69$)和低危($n=72$)3组;根据临床结局分为完全缓解($n=165$)和复发组($n=31$)。采用欧洲BIOMED-1标准化流式细胞术微小残留病(MRD)检测方案,检测巩固化疗期HG_s数量。Kaplan-Meier生存曲线统计患儿无事件生存率(EFS)。**结果** 高危组患儿HG_s明显低于中危和低危组,差异均有统计学意义($P<0.05$);完全缓解组HG_s明显高于复发组,差异有统计学意义($P<0.05$);HG_s≤1.0%组患儿的EFS明显低于HG_s>1.0%组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** HG_s可反映B-ALL化疗效果,可用于B-ALL患儿疗效及预后的监测。
[中国当代儿科杂志, 2016, 18(4): 292-296]

[关键词] 急性B淋巴细胞白血病;流式细胞术;原血细胞;微小残留病;儿童

Prognostic value of bone marrow hematogones in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia

WANG Yue-Fang, JIANG Yong-Mei, GAO Ju, ZHOU Ping, ZHANG Ge. Department of Laboratory Medicine, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Jiang Y-M, Email:jiangyongmei-1@163.com)

Abstract: Objective To study the prognostic value of hematogones (HG_s) for childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) during consolidation chemotherapy. **Methods** A retrospective analysis was conducted for 196 children with newly-diagnosed B-ALL. They were divided into high-risk group ($n=55$), intermediate-risk group ($n=69$), and low-risk group ($n=72$) by risk stratification, and into complete remission group ($n=165$) and relapse group ($n=31$) by clinical outcome. The European BIOMED-1 standard flow cytometry for minimal residual disease (MRD) was used to determine the number of HG_s during consolidation chemotherapy. The Kaplan-Meier survival curve was used to assess event-free survival (EFS). **Results** The high-risk group had a significantly lower number of HG_s than the intermediate-risk and low-risk groups ($P<0.05$). The number of HG_s in the complete remission group was significantly higher than in the relapse group ($P<0.05$). The children with HG_s≤1.0% had a significantly lower EFS than those with HG_s>1.0% ($P<0.05$). **Conclusions** HG_s can be used to assess the treatment outcome and prognosis in children with B-ALL, and proliferation of HG_s reflects the good effect of chemotherapy in such children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(4): 292-296]

Key words: B-lineage acute lymphoblastic leukemia; Flow cytometry; Hematogone; Minimal residual disease; Child

原血细胞(hematogones, HG_s)为骨髓正常B系前体淋巴细胞(B-lymphocyte precursors, BCP)的良性扩增,根据其成熟程度及免疫表型特征,

分为pro-B, pre-B和immature B亚群,患者年龄不同、疾病所处阶段不同,各亚群比例会发生相应的改变^[1-2]。急性B淋巴细胞白血病(acute

[收稿日期] 2015-11-18; [接受日期] 2016-02-04

[基金项目] 由四川省科技厅基金项目资助,四川省应用基础研究计划项目(2015JY0044)。

[作者简介] 王月芳,女,硕士,主管技师。

[通信作者] 江咏梅,女,教授。

B-lymphoblastic leukemia, B-ALL) 患者化疗后造血功能恢复时, HGs 可达 5~50%^[3-6]。但根据骨髓形态学很难鉴别 HGs 与白血病细胞, 给临床造成困扰, 故两者的鉴别具有极其重要的临床意义。

目前有报道提出, HGs 与急性髓细胞白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 的预后相关, 为 AML 良好预后的因素之一^[5-6]。同时有报道指出, B-ALL 患者在造血干细胞移植后, HGs>1% 提示预后良好^[7]。但目前国内尚无 HGs 与儿童 B-ALL 预后关系的研究。本研究采用回顾性队列研究, 运用欧洲 BIOMED-1 标准化流式微小残留病 (minimal residual disease, MRD) 检测技术^[8], 通过对 B-ALL 患儿巩固化疗期 HGs 与白血病细胞的比较和鉴别, 初步探讨 HGs 作为监测 B-ALL 微小残留病补充指标的临床可行性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2008 年 4 月至 2012 年 9 月在四川大学华西第二医院确诊的 B-ALL 患儿 196 例。均采用中国儿童白血病协作组 (Chinese Childhood Leukemia Group, CCLG) ALL-2008 诊疗方案进行诊断、危险分型和治疗。患儿年龄 1~16 岁, 男性 128 例、女性 68 例。根据危险分型分为高危 ($n=55$)、中危 ($n=69$) 和低危 ($n=72$) 3 组。按临床结局分为持续完全缓解 ($n=165$) 和复发组 ($n=31$)。复发组中, 髓外复发 (中枢神经系统、睾丸) 3 例; 其中巩固化疗期 MRD>0.1% 者 3 例、MRD>0.1% 同时伴骨髓复发者 25 例。

纳入人群需进行: (1) 完成 5 周诱导化疗, 初诊时以及诱导化疗期每周检测 1~2 次外周血象, 并行泼尼松敏感试验、第 33 天骨髓形态学和 MRD 检测等; (2) 完成 >3 个月的巩固化疗。低中危和高危患儿分别在巩固化疗期第 1 次 HD-MTX 或 HR-1 方案的第 1 天行骨穿检测 HGs 和 MRD。由于儿童 B-ALL 诱导化疗强, 诱导结束时骨髓抑制严重, 无法统计诱导化疗末 HGs 值。本研究获得医院伦理委员会批准及监护人书面知情同意。

复发标准^[9]: 完全缓解后出现以下之一判断为 B-ALL 复发: (1) 骨髓幼稚淋巴细胞 (原始淋巴细胞 + 幼稚淋巴细胞) >5% 但 \leq 20%, 予以积极治疗, 骨髓幼稚淋巴细胞仍未能 <5%, 则判断为复发; (2) 骨髓幼稚淋巴细胞 (原始淋巴细胞 + 幼稚淋巴细胞) >20%; (3) 髓外白血病细胞浸润 (称髓外复发); (4) 美国 COG (Children's Oncology Group) 大样本研究报道, 巩固化疗期间 MRD>0.1% 的 B-ALL 患者 5 年后复发率为 100%。故将巩固化疗期 MRD>0.1% 也作为 B-ALL 复发标准之一^[10]。

1.2 资料收集分析

收集患儿完整临床资料和随访资料, 统计分析无事件生存率 (event-free survival, EFS)。病例随访至复发、死亡、第二肿瘤或随访截止日 (2015 年 9 月)。持续完全缓解组随访时间 >3 年。

1.3 标本采集

采集患儿巩固化疗期间骨髓 (EDTA 或肝素抗凝), 24 h 内完成流式细胞术检测。同时制备至少 3 张骨髓涂片进行骨髓形态学检测。

1.4 试剂

固定破膜剂 (美国 Invitrogen 公司)。单克隆抗体: 胞膜 CD45、CD19、CD10、CD20、CD34、CD38、CD22、cyTdT, 以上抗体均购至美国 BD Pharmingen 或 Coulter 公司。

1.5 流式细胞术检测 HGs

每例标本标记 6 管或 7 管, 取血球稀释液稀释至浓度 $10\sim 20 \times 10^9/L$ 的骨髓 100 μL 与 4 或 5 管膜表面抗体组合充分混匀, 避光、室温孵育 15 min, 若初诊有跨系表达, 加管标记分析; 加入 2 mL \times FACS 溶血素 (蒸馏水 1:10 稀释) 充分混匀, 静置 10 min, 1300 转 /min 离心 5 min, 弃上清液; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 充分混匀, 1300 转 /min 离心 5 min, 弃上清液; 加入 500 μL PBS 混悬, 待上机; 两管胞浆抗体需加入 500 μL 破膜剂静置 10 min, 洗涤后加入破膜抗体室温、避光孵育 30 min, PBS 洗涤后即可流式细胞仪 (BD FACSCalibur) 检测, 记录 500000 个细胞。利用 BD Cell QuestTM Pro 软件分析数据。主要抗体组合见表 1。

表 1 四色流式染色方案

	FITC	PE	PerCP	APC
胞膜抗体				
管 1	PBS	PBS	CD45	CD19
管 2	CD10	CD19	CD45	CD20
管 3	CD38	CD34	CD45	CD19
管 4	CD34	CD22	CD45	CD19
管 5	初诊异常 表达抗体*	初诊异常 表达抗体*	CD45	CD19
胞浆抗体				
管 6	PBS	PBS	CD45	CD19
管 7	cyTdT	CD10	CD45	CD19

注: [FITC] 异硫氰酸荧光素; [PE] 藻红蛋白; [PerCP] 多甲藻叶绿素蛋白; [APC] 别藻青蛋白。* 示免疫分型检测到的 B 系特异抗体之外的抗体。

通过 SSC/FSC 设门, 将高 SSC 低 FSC 信号的细胞碎片排除。以 CD19 设门, 观察 CD19 阳性 B 细胞的免疫表型, 判断是否存在异常的抗体表达。HG 数量用正常 BCP 占骨髓总有核细胞的百分比 (%) 表示, 包括 pro-B cells (stage I): $CD10^+CD20^-CD34^+CD38^+CD22^+TdT^+CD19^+$; pre-B cells (stage II): $CD10^+CD20^+CD34^-/loCD38^+CD22^+TdT^+CD19^+$; immature B cells (stage III): $CD10^+CD20^+CD34^-CD38^+CD22^+TdT^+CD19^+$ ^[1-2,4,11-13]。因本研究的 pre-B cells 和 immature B cells 采集位点有重叠(图 1 E1、E2), 故将这两阶段细胞合并分析。在正常细胞表达模式之外出现的异常细胞群视为 MRD 细胞(图 1 R1~R22), 超过 15 events 成簇分布视为异常, 总计超过 50 events 判断为有临床意义。

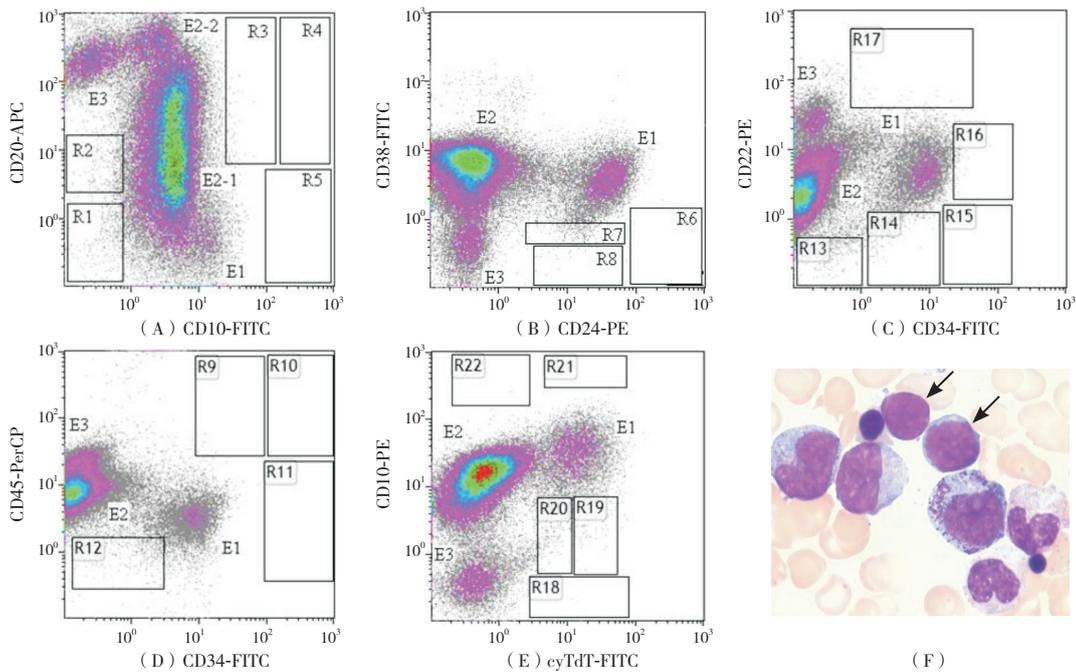


图 1 四色流式 HGs 与 B-ALL MRD 的鉴别 以 CD19 设门, 各管抗体组合方式: (A) CD10/CD20/CD19/CD45; (B) CD34/CD38/CD19/CD45; (C) CD34/CD22/CD19/CD45; (D) CD19/CD34/CD45; (E) TdT/CD10/CD19/CD45。E1: stage I HGs; E2: stage II + III HGs (E2-1: Pre-B, E2-2: immature B)。E3: mature B; R1-R22: MRD 细胞。(F) HGs 细胞形态学 (HE 染色, $\times 1000$): HGs 染色质致密均一、胞浆量少、核仁不明显(箭头所示)。

1.6 统计学分析

统计学处理采用 SPSS 17.0 软件完成。非正态分布计量资料用中位数(范围)表示, 计数资料用百分率(%)表示。多组比较采用校正检验或 Fisher 确切概率法。对于连续变量, 利用 Mann-

Whitney *U* 检验进行两组间比较、Kruskal-Wallis test 进行多组间比较。相关分析采用 Pearman 等级相关分析法。生存曲线采用 Kaplan-Meier 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

骨髓形态学与流式细胞术检测结果不一致是指骨髓形态学显示 5%< 幼稚淋巴细胞 <20%，而 MRD<0.1%。196 例巩固化疗期的患儿有 29 例 (14.8%) 出现不一致结果。总 HGs、stage II + III HGs 与骨髓幼稚淋巴细胞比例均呈正相关 ($r=0.44、0.45, P<0.05$)，stage I HGs 与骨髓幼稚淋巴细胞比例无显著相关性 ($P>0.05$)。

2.1 各组间 HGs 差异比较

低、中、高危 3 组的总 HGs 逐步降低，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；但 stage II + III HGs 及 stage I HGs 在高、中、低危 3 组的差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 不同危险组患儿 HGs 比较 [中位数(范围), %]

分组	例数	总 HGs	stage II + III	stage I
低危	72	3.60(0.02~28.82)	1.98(0.02~27.19)	1.08(0.00~5.97)
中危	69	2.20(0.04~36.12)	0.80(0.02~33.15)	0.84(0.02~5.02)
高危	55	1.09(0.03~45.91) ^{a,b}	1.15(0.02~43.81)	1.21(0.00~7.73)
χ^2 值		8.82	2.36	0.42
P 值		$P<0.05$	0.31	0.81

注：[HGs] 原血细胞。a 示与低危组比较， $P<0.05$ ；b 示与中危组比较， $P<0.05$ 。

196 例患儿共有 31 例 (15.8%) 复发。完全缓解组的总 HGs 表达明显高于复发组，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；stage II + III 及 stage I HGs 的表达在两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。

表 3 不同临床结局患儿 HGs 比较 [中位数(范围), %]

分组	例数	总 HGs	stage II + III	stage I
完全缓解	165	2.78(0.02~45.91)	1.25(0.02~43.81)	0.96(0~7.73)
复发	31	0.77(0.04~13.94)	1.24(0.03~35.29)	1.58(0~4.73)
χ^2 值		-3.34	-0.70	-0.48
P 值		$P<0.05$	0.49	0.63

注：[HGs] 原血细胞。

2.2 各组 B-ALL 患儿 EFS 分析

为寻找 HGs 的最佳临界值，将患儿分为 HGs $\leq 1\%$ ($n=69$)， $1\%<HGs \leq 2\%$ ($n=30$)， $2\%<HGs \leq 3\%$ ($n=9$)， $3\%<HGs \leq 4\%$ ($n=13$)， $4\%<HGs \leq 5\%$ ($n=5$)， $HGs>5\%$ ($n=70$) 6 个组

进行 EFS 分析。HGs $\leq 1\%$ 的 EFS 最低 (72.3%)，差异有统计学意义 ($\chi^2=11.272, P=0.046$)。故以 1% 为界，比较巩固化疗期 HGs $\leq 1\%$ ($n=69$) 与 HGs $>1\%$ ($n=127$) 患儿的 EFS 差异，显示 HGs $\leq 1\%$ 组 EFS (72.3%) 明显低于 HGs $>1\%$ 组 (90.1%)，差异有统计学意义 ($\chi^2=7.597, P=0.006$)。见图 2。

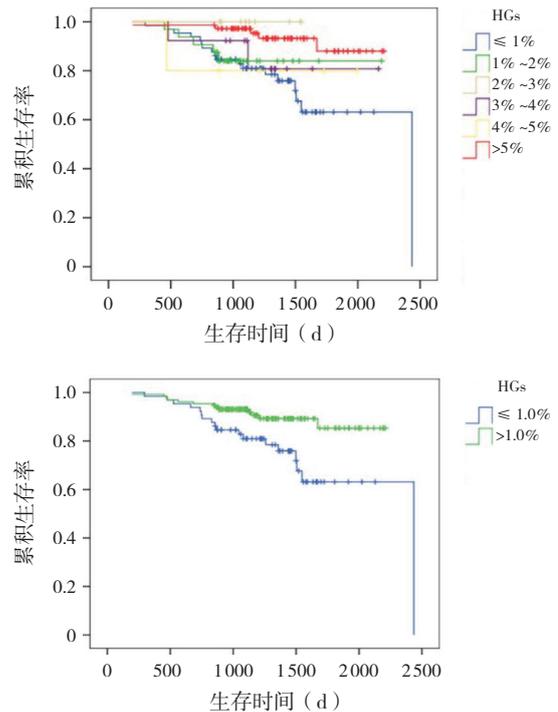


图 2 各组 B-ALL 患儿 EFS 分析 A：将患儿分为 HGs $\leq 1\%$ ($n=69$)， $1\%<HGs \leq 2\%$ ($n=30$)， $2\%<HGs \leq 3\%$ ($n=9$)， $3\%<HGs \leq 4\%$ ($n=13$)， $4\%<HGs \leq 5\%$ ($n=5$)， $HGs>5\%$ ($n=70$) 6 组，以 HGs $\leq 1\%$ 组 EFS 最低；B：以 HGs 1% 为界，HGs $\leq 1\%$ 的 EFS 低于 HGs $>1\%$ 者。

3 讨论

B-ALL 是最为常见的儿童血液肿瘤，近年依据早期治疗反应来指导临床危险度分型和个体化治疗的观念受到广泛关注。HGs 为骨髓中正常 B 系前体淋巴细胞，体积差异较大，染色质致密均一、胞浆量少、核仁不明显，很难仅根据形态学与 B-ALL 幼稚细胞鉴别。由于白细胞抗体重叠、漂移等现象可影响流式细胞术 MRD 准确度，导致形态学显示完全缓解而 MRD $>0.1\%$ 的不一致性^[14-15]。本研究通过相关性分析发现，HGs 与骨髓幼稚淋巴细胞呈正相关，提示 HGs 是导致形态学与 MRD 不一致的可能原因。不一致的 29 例中仅 4 例复发。提

示临床不能单纯依据骨髓形态学判断复发,需结合流式细胞术 HGs 分析以鉴别幼稚细胞与正常 B 系前体细胞。

大量 HGs 多出现于化疗后再生的骨髓^[3-6]。国外已有报道指出, HGs 与 AML 的预后相关^[5-6]。但由于 HGs 与 B-ALL 幼稚细胞在形态学上很难鉴别^[6], 仅有个别报道 HGs 在成人 B-ALL 的预后意义^[16]。但有研究报道, 欧洲 BIOMED-1 标准化流式 MRD 检测技术可准确鉴别 HGs 与 B-ALL 残留白血病细胞(准确率达 98%)^[8]。本研究采用欧洲 BIOMED-1 标准化流式 MRD 检测技术, 以 B-ALL 为研究对象, 检测巩固化疗期的 HGs 并分析与 EFS 的关系。结果显示, 高危患儿的 HGs 明显低于中、低危患儿, 提示骨髓 HGs 与 B-ALL 的危险度存在一定相关性; 完全缓解组的 HGs 明显高于复发组, 提示 HGs 增生反映化疗效果良好, 可用于 B-ALL 患儿疗效判断及预后监测。有研究显示, AML 诱导化疗后 HGs>0.01% 的患儿总体生存率和无病生存率明显高于 HGs<0.01% 患儿^[5-6]。另有研究指出, HGs>0.1% 的 AML 预后良好^[17]。Chantepie 等^[16]报道, MRD 阴性且 HGs 阳性的成人 B-ALL 总体生存率和无病生存率高于 HGs 阴性者。本研究发现, HGs>1% 的 B-ALL 患儿 EFS 明显高于 HGs ≤ 1% 者, 本研究 HGs 临界值高于文献报道^[5-6,17-18], 可能与儿童骨髓 HGs 较成年人高^[2,4], 并且巩固化疗期的骨髓较诱导化疗末增生更活跃有关。

综上, HGs 可反映 B-ALL 疗效, 可作为 B-ALL 疗效及预后监测指标。流式细胞术检测 HGs 需要多抗体联合标记, 且抗体组合多样, 但各实验室常常根据自身需要采用不同的抗体组合模板, 容易造成结果差异。因此需要标准化流式检测方案, 欧洲 BIOMED-1 流式 MRD 检测方案易于形成标准化, 使 HGs 用于 B-ALL 疗效监测更具有实际临床意义。

[参 考 文 献]

- [1] Hurford MT, Altman AJ, DiGiuseppe JA, et al. Unique pattern of nuclear TdT immunofluorescence distinguishes normal precursor B cells (Hematogones) from lymphoblasts of precursor B-lymphoblastic leukemia[J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129(5): 700-705.
- [2] Sevilla DW, Colovai AI, Emmons FN, et al. Hematogones: a review and update[J]. *Leuk Lymphoma*, 2010, 51(1): 10-19.
- [3] McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, et al. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry[J]. *Blood*, 2001, 98(8): 2498-2507.
- [4] Chantepie SP, Cornet E, Salaün V, et al. Hematogones: an overview[J]. *Leuk Res*, 2013, 37(11): 1404-1411.
- [5] Chantepie SP, Salaün V, Parienti JJ, et al. Hematogones: a new prognostic factor for acute myeloblastic leukemia[J]. *Blood*, 2011, 117(4): 1315-1318.
- [6] Honebrink T, Dayton V, Burke MJ, et al. Impact of bone marrow hematogones on umbilical cord blood transplantation outcomes in patients with acute myeloid leukemia[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012, 18(6): 930-936.
- [7] Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, et al. Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Blood*, 2013, 121(5): 840-848.
- [8] Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, et al. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings[J]. *Leukemia*, 2001, 15(8): 1185-1192.
- [9] 陈珊珊. 急性白血病 [M]// 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 132.
- [10] Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study[J]. *Blood*, 2008, 111(12): 5477-5485.
- [11] Tsao L, Colovai AI, Jiang JG, et al. Characterizing CD43 expression in haematogones using multicolor flow cytometric analysis[J]. *Br J Haematol*, 2005, 128(6): 820-823.
- [12] LeBien TW. Fates of human B-cell precursors[J]. *Blood*, 2000, 96(1): 9-23.
- [13] LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function[J]. *Blood*, 2008, 112(5): 1570-1580.
- [14] van der Sluijs-Gelling AJ, van der Velden VH, Roeffen ET, et al. Immunophenotypic modulation in childhood precursor B-ALL can be mimicked in vitro and is related to the induction of cell death[J]. *Leukemia*, 2005, 19(10): 1845-1847.
- [15] Dworzak MN, Gaipa G, Schumich A, et al. Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78(3): 147-153.
- [16] Chantepie SP, Dugue AE, Chevallier P, et al. Prognostic impact of bone marrow B lymphocyte precursors (hematogones) detection in 95 acute lymphoblastic leukemia cases[C]. *ASH Annu Meeting Abstr*, 2012, 120: 4791.
- [17] Zheng J, Du W, Yao J, et al. Analysis of hematogones in bone marrow from acute myeloid leukaemia cases post therapy[J]. *Eur J Clin Invest*, 2013, 43(1): 1140-1146.
- [18] Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(26): 9194-9199.