

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.08.013

论著·临床研究

CD58 在儿童急性 B 淋巴细胞白血病中的表达及其用于微小残留病检测的可行性研究

李亚飞 赵晓明 盛光耀 岳保红 罗源

(郑州大学第一附属医院儿科, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 检测淋巴细胞功能相关抗原-3 (CD58) 在儿童急性 B 淋巴细胞白血病 (B-ALL) 中的表达情况, 并探讨其用于儿童 B-ALL 微小残留病 (MRD) 检测的可行性。**方法** 选取 2014 年 1~9 月确诊为 B-ALL 的 87 例患儿为研究对象, 同期选取 20 例非肿瘤、非血液病且骨髓涂片细胞形态正常的住院患儿作为对照组。应用四色流式细胞术 (FCM) 检测对照组及 B-ALL 患儿初诊时、诱导化疗 15 d 时骨髓标本的 CD58 表达水平。在诱导化疗 33 d 时, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 和 FCM 对 B-ALL 患儿进行 MRD 检测。**结果** 87 例 B-ALL 患儿骨髓 CD58 平均荧光强度 (MFI) (91 ± 33) 高于对照组 (14 ± 6) ($P < 0.01$); 其中 44 例 B-ALL 患儿 CD58 强表达。在诱导化疗过程中, 诱导化疗 15 d 时 B-ALL 患儿骨髓 CD58 的表达量 (105 ± 22) 与初诊时 (107 ± 26) 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。对 44 例 CD58 强表达 B-ALL 患儿进行 MRD 检测, FCM 检测 MRD 阳性患儿 9 例, 阴性患儿 35 例; RT-PCR 检测 MRD 阳性患儿 11 例, 阴性患儿 33 例, 42 例 (95%) 检测结果一致, 两种检测方法检测 MRD 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** CD58 在 B-ALL 患儿中高表达且表达稳定, 可以作为 B-ALL 患儿 MRD 检测的指标。 [中国当代儿科杂志, 2015, 17(8): 825-829]

[关键词] CD58; 微小残留病; 急性 B 淋巴细胞白血病; 儿童

Expression of CD58 in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia and its feasibility in minimal residual disease detection

LI Ya-Fei, ZHAO Xiao-Ming, SHENG Guang-Yao, YUE Bao-Hong, LUO Yuan. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Sheng G-Y, Email: shenggy2959@126.com)

Abstract: Objective To measure the expression of lymphocyte function-associated antigen-3 (CD58) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) and to explore the feasibility of CD58 as an indicator for minimal residual disease (MRD) detection in childhood B-ALL. **Methods** Eighty-seven children diagnosed with B-ALL between January 2014 and September 2014 were enrolled, and 20 hospitalized children who had no tumor or blood disease and had normal bone marrow cell morphology served as the control group. The expression features of CD58 in bone marrow samples from the two groups (at diagnosis, on day 15 of induction chemotherapy) were analyzed by four-color flow cytometry (FCM). Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and FCM were used to detect MRD in B-ALL patients on day 33 of induction chemotherapy. **Results** The mean fluorescence intensity of CD58 expression in the 87 B-ALL cases (91 ± 33) was significantly higher than that in the 20 controls (14 ± 6) ($P < 0.01$); CD58 was over-expressed in 44 of the B-ALL cases. In the B-ALL children, the expression of CD58 on day 15 of induction chemotherapy (105 ± 22) was not significantly different from that at diagnosis (107 ± 26) ($P > 0.05$). In the 44 B-ALL patients with CD58 over-expression, FCM showed 9 MRD(+) cases and 35 MRD(-) cases, while qRT-PCR showed 11 MRD(+) cases and 33 MRD(-) cases; 42 cases (95%) showed consistent results of the two tests, so there was no significant difference between the two methods in detecting MRD ($P > 0.05$). **Conclusions** CD58 is over-expressed and stable in children with B-ALL, and it can be considered as an indicator for MRD detection in childhood B-ALL.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(8): 825-829]

Key words: CD58; Minimal residual disease; B-lineage acute lymphoblastic leukemia; Child

[收稿日期] 2015-01-19; [接受日期] 2015-03-11

[作者简介] 李亚飞, 男, 硕士, 住院医师。

[通信作者] 盛光耀, 男, 教授, 主任医师。

急性 B 淋巴细胞白血病 (acute B-lymphocytic leukemia, B-ALL) 发病率约占急性淋巴细胞白血病的 85%, 是儿童最常见的恶性血液病^[1]。白血病复发是白血病治疗失败的主要原因, 复发的根源在于体内残存的白血病细胞。因此, 在化疗过程中准确检测患儿体内微小残留病 (minimal residual disease, MRD) 显得越来越重要。目前, 普遍应用基于白血病细胞免疫表型的多参数流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 检测 MRD, 作为儿童 ALL 预后的独立指标^[2]。FCM 检测 MRD 的关键是找到一种免疫表型能够高度灵敏特异地鉴别正常 B 系前体细胞和白血病细胞^[3]。近来, Lee 等^[4]研究表明 CD58 在 B-ALL 白血病细胞上的表达量高于正常的 B 系前体细胞。本研究通过检测分析 CD58 在白血病细胞表面的表达特点, 评估其用于 B-ALL 患儿骨髓标本的 MRD 检测的可行性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2014 年 1~9 月于郑州大学第一附属医院住院的 B-ALL 患儿 87 例为研究对象, 所有患者都经过 FAB 分型法和 FCM 免疫分型法明确诊断, 其中男 64 例, 女 23 例, 年龄 8 个月~13 岁。所有患儿均采用 VDLP (长春新碱 + 柔红霉素 + 左旋门冬酰胺酶 + 泼尼松) 方案进行诱导缓解治疗。在第 1 疗程结束、达到临床缓解后以及在以后的持续治疗过程中共有 44 例患儿进行了 MRD 的监测。同期选取 20 例非肿瘤、非血液病且骨髓涂片细胞形态正常的住院患儿作为对照组, 其中男 15 例, 女 5 例, 年龄 1~13 岁。本研究获得郑州大学医学伦理委员会研究批准, 且所有入组患儿家属均签署知情同意书。

1.2 FCM 检测各组 CD58 表达

将 B-ALL 患儿各阶段的骨髓标本用 Ficoll 液分离单个核细胞, PBSA 洗涤两次, 用 PBSA 悬浮, 调节有核细胞数至每管 10^6 个左右。用 CD58-FITC、CD10-PE、CD19-APC、CD45-ECD 单克隆抗体 (均购自美国 BD 公司) 进行膜表面抗体标记, 室温暗置 15 min。加入 1 mL 溶血剂 (0.83% 的氯化铵溶液) 暗置 10 min, 用 PBSA 洗两遍加入低聚甲醛待检。采用 FACSCalibur 型 (美国 BD 公司)

流式细胞仪进行检测, 荧光激发波长为 488 nm, 测定前用标准荧光微球校准仪器。用 CellQuest 软件 (version 3.3) 对数据进行采集, CD58 的结果以平均荧光强度 (MFI) 表示。

根据 FCM 检测 CD58 表达量的结果, 将 B-ALL 患儿分为 CD58 低表达组和 CD58 强表达组。分组原则为: 患儿 CD58 过强表达, 导致 B-ALL 细胞在流式 CD58 和 CD10 双参数点图上与正常骨髓 CD19⁺CD10⁺ 的细胞无重叠, 明显区分开时, 确认为 CD58 强表达组; 而其余患儿的 B-ALL 细胞在流式 CD58 和 CD10 双参数点图上与正常骨髓 CD19⁺CD10⁺ 的细胞有重叠而无法区分时, 确认为 CD58 低表达组。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应检测 MRD 水平

用 Ficoll 液分离骨髓单个核细胞, 按照 Qiagen DNA 提取试剂盒的说明书提取 DNA。采用多重聚合酶链反应 (多重 PCR) 筛查 IgH 和 TCR 基因重排。所用引物及反应体系见文献^[5-6]。多重 PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 7 min; 95℃ 变性 45 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 共 35 个循环。多重 PCR 产物经电泳后, 选择克隆重排的样本, 纯化后送上海生工生物工程技术公司进行测序。将测序所得的 DNA 序列输入 BLAST 和 IMGT 数据库与保守的 VDJ 序列进行比对, 未比对上的序列为患者白血病细胞特异性连接区序列。

以患儿特异性 IgH 和 TCR 基因为靶基因设计特异性引物。用正常人的 DNA 将初诊时的骨髓细胞 DNA 稀释至 1.0×10^{-6} ~ 1.0×10^{-1} 浓度以建立 IgH/TCR 基因重排的标准曲线; 以去离子水将正常人 DNA 梯度序列稀释以建立内参基因 albumin 的标准曲线。在实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 仪 (美国 ABI PRISM 7500) 上对患儿化疗第 33 天的骨髓细胞 DNA 进行检测, 以 IgH/TCR 基因重排的相对表达量反映 MRD 水平。根据诱导治疗结束时骨髓 MRD 水平进行判断, MRD $\geq 10^{-4}$ 为阳性, MRD $< 10^{-4}$ 为阴性^[7]。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析, 正态分布计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两独立样本均数的比较采用 *t* 检验, 配对设计计量资料比较采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD58 在正常分化 B 系前体细胞和 B-ALL 白血病细胞中的表达情况

B-ALL 患儿初诊时骨髓 CD58 的 MFI (91 ± 33) 显著高于对照组 (14 ± 6) ($t=10.33, P<0.001$) (图 1)。CD58 的阳性率为 99% (86/87), 44 例 (51%, 44/87) B-ALL 患儿的白血病细胞在流式 CD58 和 CD10 双参数点图上与正常骨髓 CD19⁺CD10⁺ 的细

胞无重叠, 确认为 CD58 强表达。

2.2 CD58 在诱导化疗过程中的表达稳定性

为检测 CD58 在诱导治疗过程中表达的稳定性, 从 44 例 CD58 强表达患儿中随机选取 38 例, 在诱导化疗后第 15 天检测骨髓细胞 CD58 的表达强度, 结果显示, 化疗第 15 天时, 38 例 CD58 强表达患儿的 CD58 MFI (105 ± 22) 与初诊时 (107 ± 26) 比较差异无统计学意义 ($t=0.801, P=0.428$), 见图 1。

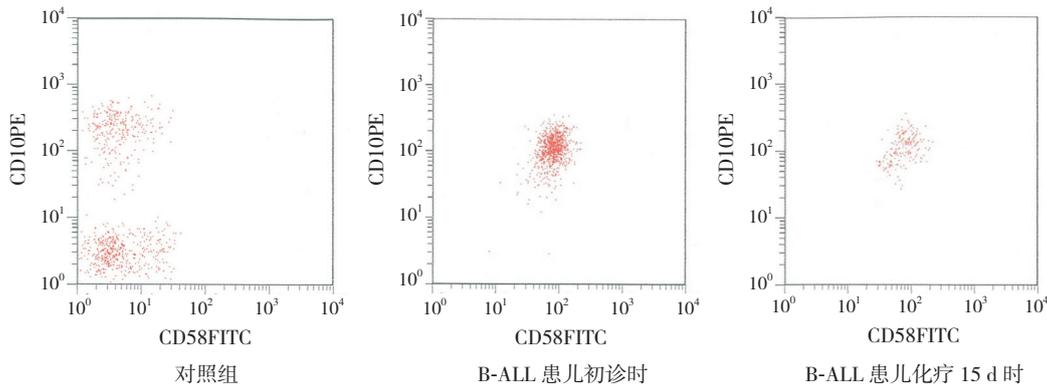


图 1 对照组正常早期 B 细胞及初诊和化疗 15 d 时 B-ALL 患儿 B 系白血病细胞的 CD58 表达情况 图中细胞均以 CD19 阳性设门。对照组正常的早期 B 细胞 CD58 MFI 显著低于 B-ALL 患儿初诊时白血病细胞 CD58 MFI; 经化疗 15 d 后, B-ALL 患儿白血病细胞数量减少, 但 CD58 MFI 与初诊时比较差异无统计学意义。

2.3 CD58 用于 MRD 检测的准确性

在 B-ALL 患儿诱导化疗第 33 天, 且已达临床完全缓解状态时, 为评价 CD58 能否作为检测 MRD 的一个指标, 采用 FCM 和 RT-PCR 两种方法对 44 例 CD58 强表达的 B-ALL 患儿进行 MRD 监测。结果显示: FCM 检测 MRD 阳性患儿 9 例, 阴性患儿 35 例, 白血病细胞比例为 0.01%~0.29%; RT-PCR 检测 MRD 阳性患儿 11 例, 阴性患儿 33 例, 白血病细胞比例为 0.01%~0.47% (表 1)。采用 FCM 检测为阳性的 9 例患儿用 RT-PCR 检测结果均为阳性; 另 2 例 RT-PCR 检测结果为阳性而 FCM 检测结果为阴性的患儿, 白血病细胞比例范围为 0.001%~0.01%。两种方法的检测结果差异无统计学意义 ($\chi^2=0.50, P=0.500$)。

表 1 FCM 和 RT-PCR 监测 B-ALL 患儿化疗 33 d 时骨髓 MRD 结果比较 (例)

分组	PCR(+)	PCR(-)	合计
FCM(+)	9	0	9
FCM(-)	2	33	35
合计	11	33	44

3 讨论

近年来发现白血病细胞可表达一些在正常前体细胞上不表达的特异性免疫标记物, 称为异型表型^[8-9]。基于这种考虑, 目前研究的重点放在发现能够准确甄别正常 B 系前体细胞和白血病细胞的特异性免疫标记物上, 并且要求该免疫标记物具有高度的敏感性和特异性, 且能够在治疗前后表达稳定^[10-11]。

CD58 又称为淋巴细胞功能相关抗原-3, 属于免疫球蛋白超家族, 配体为 CD2 (LFA-2), 参与杀伤性 T 淋巴细胞与靶细胞、抗原提呈细胞与 T 淋巴细胞、胸腺细胞与胸腺上皮细胞间的黏附反应, 提供共刺激信号, 已被证实在多种细胞上均有表达, 但表达强度各有不同, 并且 CD58 在 ALL 中的表达强度高于正常的 B 系前体细胞, 可能作为儿童 ALL MRD 检测的一种新的免疫标记物^[12-13]。本研究对 87 例 B-ALL 患儿的初诊骨髓标本和 20 例因其他原因住院的患儿的正常骨髓标本检测后表明, B-ALL 患儿 CD58 的表达强度显著高于对照组

患儿。研究结果还显示白血病细胞 CD58 的阳性率为 99%，44 例（51%）B-ALL 患儿 CD58 分子强表达，白血病细胞 CD58 MFI 和正常骨髓细胞 MFI 无重叠。因此，CD58/CD10/CD19/CD45 抗体组合可以用于儿童 B-ALL MRD 检测。

FCM 检测白血病 MRD 出现假阴性结果的一个重要因素是在化疗过程中或诱导缓解后白血病细胞表面的单克隆标记表达强度发生改变，可能潜在影响 MRD 检测的准确性^[14-15]。在儿童 ALL 治疗过程中也会出现表型的改变，尤其是在使用类固醇激素的过程中^[16]。为评估 CD58 在儿童 B-ALL 诱导化疗过程中表达是否稳定，本研究检测了 38 例 CD58 强表达 B-ALL 患儿化疗第 15 天时骨髓细胞 CD58 的表达情况，与初诊时比较差异无统计学意义。所以，CD58 在细胞膜上是一种表达稳定的表型，可用于 B-ALL MRD 检测。

CD58 在 B-ALL 中表达率在 90% 以上，并且相对于正常儿童骨髓中的 B 系前体细胞和成熟淋巴细胞 CD58 的表达量呈现过度表达的特点，而且 CD58 在白血病细胞上的表达量在化疗过程中的稳定性较好，因此提示 CD58 可作为儿童 B-ALL MRD 监测的较好指标。为分析 CD58 用于 MRD 检测结果的准确性，本研究对 44 例 CD58 强表达 B-ALL 患儿化疗第 33 天的骨髓（涂片骨髓形态学检查均为临床完全缓解状态）分别采用四色 FCM 和 RT-PCR 两种方法进行 MRD 检测，比较两者准确性，结果差异无统计学意义。但是，有 2 例患儿 RT-PCR 检测结果为 MRD 阳性，而 FCM 检测为阴性。这种差异可能是由于采用标本中淋巴细胞数量的差异造成的，因为 RT-PCR 检测的标本是经过 Ficoll 淋巴细胞分离液分离出来的单个核细胞，而 FCM 检测的标本是骨髓中的所有细胞^[17]。由于 ALL 中部分白血病细胞和正常的 B 系前体细胞在免疫表型上有相似之处，都表达 CD10 和 CD45^[18]，而一些白血病细胞的 CD58 表达量较低，在 B 系前体细胞群也可能残留有白血病细胞，从而造成 MRD 假阴性，因此需要增加抗体鉴别白血病细胞。但是 CD58/CD10/CD19/CD45 抗体组合的检测结果表明 CD58 可用于 B-ALL MRD 的检测，并且具有较好的准确性。

到目前为止，国内外均无监测 MRD 的经典组合，因为白血病细胞是病理性细胞，分子表达

存在许多不确定性和偶然性，需要靠多个组合来把握和筛选可能的 MRD 细胞。本实验室常用 TDT/CD10/CD34/CD19，CD38/CD10/CD34/CD19，CD45/CD10/CD34/CD19 抗体组合，其敏感性分别为 58.7%、42.5%、47.4%。从本研究可见 CD58/CD10/CD19/CD45 抗体组合用于儿童 B-ALL MRD 检测的敏感性为 51%，仅次与 TDT/CD10/CD34/CD19 组合。另外，CD58 只是作为 MRD 检测的其中一个指标，它和别的组合一并使用，可使 MRD 检测的覆盖面增加。由于 MRD 检测的临床意义也有一定的时间性，根据我们的临床实践和临床检测，确实发现不少完全缓解的病例在检测到 CD58⁺ 的早期 B 淋巴细胞（如 CD10⁺，CD34⁺，CD38⁺）出现后如果不加干预，就出现异常细胞（白血病细胞）逐渐增多。由于没有长时间的随访研究，在与时间的特异性上还不能下结论。

综上所述，CD58 在大部分 B-ALL 患儿中呈现高表达，表达状态稳定；CD58 作为 MRD 检测抗体组合其中的一个指标，具有较高的敏感性。因此，CD58 可以作为 FCM 监测 B-ALL MRD 的一个指标。

[参 考 文 献]

- [1] Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(10): 3407-3415.
- [2] Patkar N, Alex AA, Ahmed R, et al. Standardizing minimal residual disease by flow cytometry for precursor B lineage acute lymphoblastic leukemia in a developing country[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2012, 82(4): 252-258.
- [3] Liu Q, Wang M, Hu Y, et al. Significance of CD71 expression by flow cytometry in diagnosis of acute leukemia[J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55(4): 892-898.
- [4] Lee RV, Braylan RC, Rimsza LM. CD58 expression decreases as nonmalignant B cells mature in bone marrow and is frequently overexpressed in adult and pediatric precursor B cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Am J Clin Pathol*, 2005, 123(1): 119-124.
- [5] 李彦媚, 叶铁真, 赖冬波, 等. RQ-PCR 检测 Ig/TCR 基因重排监测急性淋巴细胞白血病患者治疗过程微小残留白血病[J]. *中国循证儿科杂志*, 2012, 7(6): 454-458.
- [6] Garand R, Beldjord K, Cave H, et al. Flow cytometry and IG/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL[J]. *Leukemia*, 2013, 27(2): 370-376.
- [7] 帖利军, 顾龙军, 蒋黎敏, 等. 流式细胞技术与 PCR 技术联用筛选儿童急性淋巴细胞白血病微量残留标记[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(4): 246-250.

- [8] Gaipa G, Basso G, Biondi A, et al. Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2013, 84(6):359-369.
- [9] Lutz C, Woll PS, Hall G, et al. Quiescent leukemic cells account for minimal residual disease in children lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2013, 27(5): 1204-1207.
- [10] Zhao XS, Liu YR, Zhu HH, et al. Monitoring MRD with flow cytometry: an effective method to predict relapse for ALL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Ann Hematol*, 2012, 91(2): 183-192.
- [11] 张耀东, 谭利娜, 胡群, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病免疫分型特征及其临床意义 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(3): 188-191.
- [12] Comerici CJ, Mace EM, Banerjee PP. CD2 promotes human natural killer cell membrane nanotube formation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47664.
- [13] Nina F, Lars P, Ryder, et al. Identification of residual leukemic cells by flow cytometry in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: verification of leukemic state by flow-sorting and molecular/cytogenetic methods[J]. *Haematologica*, 2012, 97(1): 137-141.
- [14] Thörn I, Forestier E, Botling J, et al. Minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a Swedish multi-centre study comparing real-time polymerase chain reaction and multicolour flow cytometry[J]. *Br J Haematol*, 2011, 152(6): 743-753.
- [15] Denys B, van der Sluijs-Gelling AJ, Homburg C, et al. Improved flow cytometric detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2013, 27(3): 635-641.
- [16] Ratei R, Basso G, Dworzak M, et al. Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction[J]. *Leukemia*, 2009, 23(3): 528-534.
- [17] 王丽. 儿童急性白血病微小残留病检测方法与评价 [J]. *国际儿科学杂志*, 2011, 38(3): 229-231.
- [18] Sędek Ł, Balsa J, Sonsala A, et al. The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: how different are they from their normal counterparts?[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014, 86(5): 329-339.

(本文编辑: 万静)

· 消息 ·

2015年《中国当代儿科杂志》征稿征订启事

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管, 中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊), 中国科学引文数据库(CSCD)核心库期刊, 北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威检索机构美国MEDLINE、美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM)及世界卫生组织西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录期刊, 同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊, 并被《中国期刊网》《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重, 反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有国内外儿科研究及动态、论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究和病例分析)、临床经验、病例报告、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为月刊, 每月15日出版, 向国内外公开发行人。2014年起本刊改为全彩版, 版面编排、设计更加美观。欢迎全国各高等医学院校, 各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位, 各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价20元, 全年240元。邮发代号: 国内42-188; 国外3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。

向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统, 免审稿费, 审稿周期3~6周。欲浏览本刊或投稿, 请登录本刊网站。网站提供免费全文下载。

联系地址: 湖南省长沙市湘雅路87号《中国当代儿科杂志》编辑部, 邮编410008

电话: 0731-84327402; 传真: 0731-84327922; Email: ddek7402@163.com; 网址: <http://www.ejcp.org>

中国当代儿科杂志编辑部

2015年5月20日