

# 多参数流式细胞术与实时定量 PCR 技术 检测 Ph 阳性急性 B 淋巴细胞白血病 异基因造血干细胞移植前 微小残留病的预后意义比较

王欣玉 常英军 刘艳荣 秦亚臻 许兰平 王昱 张晓辉 闫晨华 孙于谦  
黄晓军 赵晓甦

北京大学人民医院, 北京大学血液病研究所, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 造血干细胞移植治疗血液病北京市重点实验室 北京 100044

通信作者: 赵晓甦, Email: zhao.xiaosu@outlook.com

**【摘要】** 目的 探讨多参数流式细胞术(MFC)与实时定量聚合酶链反应技术(RQ-PCR)两种方法检测费城染色体阳性(Ph<sup>+</sup>)急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)患者异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)前微小残留病(MRD)的预后意义。方法 回顾性分析 2014 年 7 月至 2018 年 2 月在北京大学血液病研究所接受 allo-HSCT 的 280 例 Ph<sup>+</sup> B-ALL 患者, 同时用 MFC 和 RQ-PCR 法(检测 BCR-ABL 融合基因表达)检测移植前 MRD。结果 RQ-PCR 与 MFC 检测 MRD 具有相关性( $r_s = 0.435, P < 0.001$ )。MFC、RQ-PCR 法检测移植前 MRD 的阳性率分别为 25.7% (72/280)、60.7% (170/280)。移植前 MFC-MRD 阳性组患者移植后白血病 3 年累积复发率(CIR)明显高于 MFC-MRD 阴性组(23.6% 对 8.6%,  $P < 0.001$ )。RQ-PCR 检测 BCR/ABL 融合基因阳性组(RQ-PCR MRD 阳性组)的 3 年 CIR、非复发死亡(NRM)、无白血病生存(LFS)、总生存(OS)与 BCR/ABL 融合基因阴性组(RQ-PCR MRD 阴性组)相比差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。移植前 RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$  组比  $< 1\%$  组具有更高的 3 年 CIR (23.1% 对 11.4%,  $P = 0.032$ )、更低的 LFS 率(53.8% 对 74.4%,  $P = 0.015$ )与 OS 率(57.7% 对 79.1%,  $P = 0.009$ )。多因素分析显示, 移植前 MFC-MRD 阳性是影响移植后 CIR 的危险因素( $HR = 2.488, 95\% CI 1.216 \sim 5.088, P = 0.013$ ), 移植前 RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$  是影响 LFS ( $HR = 2.272, 95\% CI 1.225 \sim 4.215, P < 0.001$ )、OS ( $HR = 2.472, 95\% CI 1.289 \sim 4.739, P = 0.006$ ) 的危险因素。MFC 检测 MRD 预测复发的敏感性、特异性、阳性预测值(PPV)、阴性预测值(NPV)分别为 48.50%、77.56%、23.62%、87.16%。以 RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$  预测复发的敏感性、特异性、PPV、NPV 分别为 23.00%、88.59%、17.15%、91.84%。移植前 MFC-MRD 阳性或 RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$  二者任一成立为指标预测移植后复发的敏感性、特异性、PPV、NPV 分别为 54.29%、73.88%、45.70%、91.87%。结论 MFC 和 RQ-PCR 法检测移植前 MRD 水平均可预测 Ph<sup>+</sup> B-ALL 患者移植预后。移植前 MFC-MRD 阳性是移植后复发的危险因素。联合使用两种方法(移植前 MFC-MRD 阳性状态或 RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$  成立)可提高预测移植后复发的敏感性、阳性预测值与阴性预测值, 有助于更好筛选出高危患者。

**【关键词】** 急性淋巴细胞白血病; 微小残留病; 流式细胞术; 实时定量 PCR

基金项目: 国家自然科学基金(81670175、81870137)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.02.005

**Comparison of prognostic significance between multiparameter flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction in the detection of minimal residual disease of Philadelphia chromosome-positive acute B lymphocytic leukemia before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation**

Wang Xinyu, Chang Yingjun, Liu Yanrong, Qin Yaqin, Xu Lanping, Wang Yu, Zhang Xiaohui, Yan Chenhua, Sun Yuqian, Huang Xiaojun, Zhao Xiaosu

Peking University People's Hospital & Peking University Institute of Hematology, National Clinical

Research Center for Hematologic Disease, Beijing Key Laboratory of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Beijing 100044, China

Corresponding author: Zhao Xiaosu, Email: zhao.xiaosu@outlook.com

**【Abstract】 Objective** To explore the different values of minimal residual disease (MRD) detection by multiparameter flow cytometry (MFC) and real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) before hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for predicting relapse, leukemia-free survival (LFS), and overall survival (OS) in Philadelphia chromosome-positive ALL (Ph<sup>+</sup> ALL). **Methods** A retrospective study ( $n=280$ ) was performed. MRD was determined using multiparameter flow cytometry and RQ-PCR. **Results** MRD analysis with MFC and RQ-PCR of the BCR-ABL fusion transcript showed a strong correlation before transplantation. The positive rates of MRD detected by MFC and RQ-PCR before transplantation were 25.7% (72/280) and 60.7% (170/280), respectively. MFC MRD-positive (MRDpos) Ph<sup>+</sup> ALL patients had a higher 3 year cumulative incidences of relapse (CIR) than did MFC MRD-negative (MRDneg) Ph<sup>+</sup> ALL patients (23.6% vs 8.6%;  $P<0.001$ ). However, the RQ-PCR MRDpos group had similar rates of 3 year OS, LFS, and NRM compared with those in the RQ-PCR MRDneg group. Moreover, patients with RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$  experienced higher 3 year CIR (23.1% vs 11.4%;  $P=0.032$ ), lower LFS (53.8% vs 74.4%;  $P=0.015$ ), and OS (57.7% vs 79.1%;  $P=0.009$ ) compared with the RQ-PCR MRD  $< 1\%$  group. Multivariate analyses confirmed the association of MFC MRD status and RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$  with outcomes ( $P<0.05$ ). The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of MFC detection MRD to predict recurrence were 48.50%, 77.56%, 23.62%, and 87.16%, respectively. Moreover, the sensitivity, specificity, PPV, and NPV were 23.00%, 88.59%, 17.15%, and 91.84%, respectively, when RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$  was used to predict recurrence. Additionally, the sensitivity, specificity, PPV, and NPV were 54.29%, 73.88%, 45.7% and 91.87%, respectively, when MRD-positive status before transplantation (MFC MRDpos or RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$ ) was used to predict recurrence after transplantation. **Conclusions** Both MFC and RQ-PCR detection of pretransplant MRD levels can predict the prognosis of Ph<sup>+</sup> B-ALL patients receiving allogeneic HSCT. MFC MRD-positive status before transplantation is the risk factor of leukemia recurrence after transplantation. The combined use of the two methods (MFC MRDpos or RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$ ) can improve the sensitivity, PPV, and NPV of predicting recurrence and help to better screen high-risk patients for intervention, thereby improving clinical efficacy.

**【Key words】** Leukemia, lymphocytic, acute; Minimal residual disease; Flow cytometry; RQ-PCR  
**Fund program:** National Natural Science Foundation of China(81670175, 81870137)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.02.005

异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)是目前治愈急性白血病有效甚至唯一的手段<sup>[1]</sup>。然而,微小残留病(MRD)的持续存在是白血病复发、移植失败的主要根源。多项研究显示,移植前通过多参数流式细胞术(MFC)与实时定量聚合酶链反应(RQ-PCR)技术检测MRD已经成为急性白血病移植后复发的独立预后因素<sup>[2-4]</sup>。对于所有B-ALL患者,MFC检测MRD已经成为普遍适用的敏感监测方法,部分伴有特异融合基因的白血病类型,RQ-PCR是MFC检测MRD预测预后的有效补充<sup>[5]</sup>。对于Ph染色体阳性的急性B淋巴细胞白血病(Ph<sup>+</sup>B-ALL)患者,RQ-PCR检测BCR-ABL水平是评估预后的重要因素<sup>[6]</sup>。本中心一项回顾性研究显示,MFC与RQ-PCR检测移植后MRD对预测Ph<sup>+</sup>B-ALL患者预后具有良好的相关性与互补性<sup>[7]</sup>。然而,对于移植前MRD,尚不明确MFC与RQ-PCR检测的MRD预测Ph<sup>+</sup>B-ALL患者移植前后有何联系与区别。因此,我们回顾性分析了本单位280例接

受allo-HSCT的Ph<sup>+</sup>B-ALL患者的病历资料,旨在比较MFC与RQ-PCR两种方法检测移植前MRD水平对移植预后预测的差异。

## 病例与方法

1. 病例:回顾性分析北京大学血液病研究所2014年7月至2018年2月期间接受allo-HSCT的280例Ph<sup>+</sup>B-ALL患者,其中男162例,女118例,中位年龄27(3~63)岁。所有患者在治疗前均签署知情同意书。本研究获得北京大学人民医院伦理委员会批准。

2. 预处理:单倍型移植(haplo-HSCT)采用改良Bu-Cy+ATG方案(白消安+环磷酰胺+抗胸腺细胞球蛋白),人类白细胞抗原(HLA)匹配的同胞供者移植(MSDT)应用Bu-Cy方案(白消安+环磷酰胺)<sup>[8]</sup>。移植来源均为骨髓联合外周血。

3. 酪氨酸激酶抑制剂(TKI)在移植前后的应用:所有患者在移植前均应用TKI(主要为伊马替

尼)进行诱导/巩固治疗。移植后伊马替尼的应用指征包括:①无论 BCR-ABL 转录物水平如何,患者外周血中性粒细胞绝对计数(ANC)  $> 1.0 \times 10^9/L$  (在未应用粒细胞集落刺激因子情况下),  $PLT > 50.0 \times 10^9/L$ 。②连续 2 次检测骨髓中 BCR-ABL 转录物水平阳性且转录物水平增加,或者初次植入后 BCR-ABL 转录物水平  $\geq 10^{-2}$ 。其他开始治疗的标准包括患者可以耐受口服伊马替尼而无肠道移植抗宿主病(GVHD)或威胁生命的感染。所有患者在移植后均应用了 TKI 治疗。成人( $> 17$ 岁)患者伊马替尼的初始剂量为 400 mg/d,儿童( $< 17$ 岁)患者初始剂量为  $260 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

4. 移植前 MRD 检测:采集新鲜骨髓标本(RQ-PCR 法选用 EDTA 抗凝, MFC 法选择肝素或 EDTA 抗凝),在移植前 30 d 内、移植后 30、60、90、135、180、270、360 d 行 MRD 检测,随后至少每半年评估 1 次。

本研究利用一管八色抗体组合(CD10、CD19、CD20、CD34、CD38、CD45、CD58 和 CD123 抗体)检测 MRD<sup>[3]</sup>,抗体均为美国 Becton Dickinson 公司产品。检测异常细胞占总 CD45<sup>+</sup>白细胞数的百分比。质量控制流程参见文献[3]。

RQ-PCR 法检测 BCR-ABL 融合基因水平参照文献[9]。BCR-ABL 融合基因  $> 0$  被定义为 RQ-PCR MRD 阳性。BCR-ABL 和 ABL1 的引物和探针序列与文献[9]一致。

5. 临床预后评估:本研究的主要观察终点为白血病累积复发(CIR),次要观察终点为非复发死亡(NRM)、无白血病生存(LFS)以及总生存(OS)。NRM、复发、LFS 和 OS 的定义见文献[10]。急性 GVHD 根据受累器官的类型与严重程度进行定义和分级<sup>[11]</sup>。慢性 GVHD 根据国际标准<sup>[12]</sup>进行诊断和分级。

6. 供者淋巴细胞输注(DLI):DLI 的适应证包括:①用于治疗血液学复发;②对移植后 MFC 或 RT-PCR 法检测 MRD 持续阳性,但处于 CR 状态的患者进行干预治疗;③移植失败;④对抗病毒治疗和利妥昔单抗无反应的巨细胞病毒或 EB 病毒感染。

7. 随访:随访资料来自门诊、住院病历及电话随访。随访截止日期为 2019 年 12 月 31 日。

8. 统计学处理:采用 SPSS 22.0 进行数据处理和分析。患者特征采用两个独立样本的非参数检验或者独立样本 *t* 检验。OS、LFS、NRM 和 CIR 率的计算采用 Kaplan-Meier 法,两组生存曲线比较采用

Log-rank 检验采用 Spearman 法进行相关性分析,ROC 曲线性评估预测复发的敏感性、特异性、阳性预测值(PPV)及阴性预测值(NPV), $P < 0.10$  的参数纳入 Cox 多因素分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 患者基本资料:280 例 Ph<sup>+</sup>B-ALL 患者总体和两种 MRD 检测方法阳性、阴性分组的临床特征见表 1。RQ-PCR MRD  $< 1\%$  (254 例)、RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$  (26 例)两组患者的临床特征见表 2。

所有患者移植后均获得中性粒细胞植入,中位植入时间为 14 (9~26) d; 280 例患者中 267 例 (95.4%) 获得血小板植入,中位植入时间为 15 (6~312) d; II~IV 度急性 GVHD 的发生率为 20.0% (95% CI 15.3%~24.7%),慢性 GVHD 发生率为 38.6% (95% CI 32.8%~44.3%)。至随访截止,中位随访时间为 901 (24~2575) d。移植后 3 年 CIR、NRM、LFS、OS 率分别为 12.5% (95% CI 8.6%~16.3%)、15.0% (95% CI 10.8%~19.1%)、72.5% (95% CI 67.3%~77.7%)、77.1% (95% CI 72.2%~82.0%)。

2. MFC 和 RQ-PCR 检测移植前 MRD 的相关性分析:在移植前,我们应用 RQ-PCR 和 MFC 对 280 例患者进行移植前 30 d 内 MRD 评估。结果提示,RQ-PCR 检测 BCR-ABL 融合基因水平与 MFC 检测 MRD 具有相关性 ( $r_s = 0.435, P < 0.001$ ),对于 RQ-PCR 与 MFC 检测均为阳性的样本,两者检测的 MRD 值也具有相关性 ( $r_s = 0.745, P < 0.001$ )。MFC、RQ-PCR 法检测的移植前 MRD 阳性患者分别为 72 例 (25.7%)、170 例 (60.7%)。在 RQ-PCR 法判定为 MRD 阳性的 170 例患者样本中,有 61 例 (35.9%) 经 MFC 分析判定为 MRD 阴性。而 RQ-PCR 法判定为 MRD 阴性的 110 例患者样本中,有 99 例 (90.0%) 经 MFC 分析鉴定为 MRD 阴性。26 例 RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$  的患者中,15 例为 MFC-MRD 阳性。

3. 移植前 MFC-MRD 对移植预后的影响:根据 MFC 检测的移植前 MRD 状态(MFC-MRD)将患者分为 MFC-MRD 阳性组 (72 例) 与 MFC-MRD 阴性组 (208 例)。MFC-MRD 阳性组移植后 3 年 CIR 明显高于阴性组 [23.6% (95% CI 13.7%~33.4%) 对 8.6% (95% CI 4.8%~12.4%)],  $P < 0.001$ 。MFC-MRD 阴性组、阳性组的 II~IV 度急性 GVHD 发生

表1 280例接受异基因造血干细胞移植 Ph<sup>+</sup> B-ALL 患者的临床特征

患者特征	总体 (280例)	MFC-MRD			RQ-PCR MRD		
		阴性组 (208例)	阳性组 (72例)	P值	阴性组 (110例)	阳性组 (170例)	P值
年龄[岁, M(范围)]	31(3~63)	27(3~63)	33(6~60)	0.123	30(6~61)	27(3~63)	0.558
男性[例(%)]	162(57.9)	137(68.2)	25(73.5)	0.710	56(50.9)	106(62.4)	0.059
移植前疾病状态[例(%)]				<0.001			0.286
CR <sub>1</sub>	253(90.4)	196(94.2)	57(79.2)		102(92.7)	151(88.8)	
≥CR <sub>2</sub>	27(9.6)	12(5.8)	15(20.8)		8(7.3)	19(11.2)	
移植类型[例(%)]				0.908			0.697
MSDT	73(26.1)	58(27.9)	15(20.8)		37(33.6)	36(21.2)	
haplo-HSCT	207(73.9)	150(72.1)	57(79.2)		73(66.4)	134(78.8)	
供受者性别关系[例(%)]				0.200			0.309
男供男	58(20.7)	41(19.7)	17(23.6)		19(17.3)	39(22.9)	
男供女	49(17.5)	35(16.8)	14(19.4)		23(20.9)	26(15.3)	
女供女	107(38.2)	79(38.0)	28(38.9)		37(33.6)	70(41.2)	
女供男	66(23.6)	53(25.5)	13(18.1)		31(28.2)	35(20.6)	
供受者关系[例(%)]				0.160			0.079
同胞供同胞	137(48.9)	105(50.5)	32(44.4)		60(54.5)	77(45.3)	
父母供子女	90(32.1)	65(31.3)	25(34.7)		28(25.5)	62(36.7)	
子女供父母	47(16.8)	33(15.9)	14(19.4)		21(19.1)	26(15.3)	
其他	6(2.2)	5(2.4)	1(1.4)		1(0.9)	5(2.9)	
供受者血型相合程度[例(%)]				0.258			0.302
全合	156(55.7)	121(58.2)	35(48.6)		66(60.0)	90(52.9)	
主要不合	58(20.7)	38(18.3)	20(27.8)		20(18.2)	38(22.4)	
次要不合	53(18.9)	41(19.7)	12(16.7)		19(17.3)	34(20.0)	
主次均不合	13(4.6)	8(3.8)	5(6.9)		5(4.5)	8(4.7)	
回输有核细胞	8.040	8.015	8.205	0.532	8.105	7.895	0.473
[×10 <sup>8</sup> /kg, M(范围)]	(2.530~15.670)	(2.530~13.140)	(5.750~15.670)		(2.530~13.140)	(4.918~15.670)	
回输 CD34 <sup>+</sup> 细胞	2.395	2.400	2.295	0.638	2.365	2.415	0.846
[×10 <sup>6</sup> /kg, M(范围)]	(0.588~8.510)	(0.588~8.510)	(0.793~8.070)		(0.588~8.200)	(0.793~8.510)	
供者淋巴细胞输注[例(%)]				0.168			0.533
预防或干预复发	11(3.9)	7(2.5)	4(5.6)		6(5.5)	5(3.0)	
治疗复发	12(4.3)	6(2.9)	6(8.3)		7(6.4)	5(3.0)	

注: Ph<sup>+</sup> B-ALL: Ph 染色体阳性急性 B 淋巴细胞白血病; MFC: 多参数流式细胞术; RQ-PCR: 实时定量聚合酶链反应技术; MRD: 微小残留病; MSDT: HLA 匹配的同胞供者移植; haplo-HSCT: 单倍型造血干细胞移植; CR<sub>1</sub>、CR<sub>2</sub> 分别为第 1、2 次完全缓解

率分别为 20.2% (95% CI 14.7% ~ 25.6%)、19.4% (95% CI 10.2% ~ 28.6%) ( $P=0.891$ ), 慢性 GVHD 发生率分别为 41.3% (95% CI 34.6% ~ 48.1%)、30.6% (95% CI 19.8% ~ 41.2%) ( $P=0.106$ ), 移植后 3 年 NRM 率分别为 16.8% (95% CI 11.7% ~ 21.9%)、9.7% (95% CI 2.8% ~ 16.6%) ( $P=0.183$ ), LFS 率分别为 74.5% (95% CI 68.6% ~ 80.5%)、66.7% (95% CI 55.8% ~ 77.6%) ( $P=0.145$ ), OS 率分别为 78.8% (95% CI 73.3% ~ 84.3%)、72.2% (95% CI 61.8% ~ 82.6%) ( $P=0.268$ )。将表 3 中单

因素分析 ( $P<0.10$ ) 的因素纳入多因素分析, 结果显示, 影响 CIR 的危险因素有移植前 MFC-MRD 阳性 ( $HR=2.488$ , 95% CI 1.216 ~ 5.088,  $P=0.013$ ) 与移植前状态  $>CR_1$  ( $HR=2.182$ , 95% CI 1.133 ~ 4.203,  $P=0.020$ )。

4. 移植前 RQ-PCR MRD 对移植预后的影响: 根据 RQ-PCR 检测移植前 BCR-ABL 融合基因状态将患者分为 RQ-PCR MRD 阳性组 (170 例) 与 RQ-PCR MRD 阴性组 (110 例)。RQ-PCR MRD 阳性组、阴性组的 3 年 CIR [11.7% (95% CI 6.9% ~

表 2 移植前 RQ-PCR MRD < 1%、≥1% 两组 Ph<sup>+</sup> B-ALL 患者的临床特征

患者特征	RQ-PCR MRD < 1% (254 例)	RQ-PCR MRD ≥ 1% (26 例)	P 值
年龄 [岁, M(范围)]	31 (4 ~ 61)	34 (3 ~ 63)	0.078
男性 [例 (%)]	149 (57.8)	13 (50.0)	0.395
移植前疾病状态 [例 (%)]			0.003
CR <sub>1</sub>	233 (91.7)	20 (76.9)	
≥CR <sub>2</sub>	21 (8.3)	6 (23.1)	
移植类型 [例 (%)]			0.715
MSDT	67 (26.4)	6 (23.1)	
haplo-HSCT	187 (73.6)	20 (76.9)	
供受者性别关系 [例 (%)]			0.809
男供男	53 (20.9)	5 (19.2)	
男供女	44 (17.3)	5 (19.2)	
女供女	98 (38.6)	9 (34.6)	
女供男	59 (23.2)	7 (26.9)	
供受者关系 [例 (%)]			0.560
同胞供同胞	126 (49.6)	11 (42.3)	
父母供子女	80 (31.5)	10 (38.5)	
子女供父母	43 (16.9)	4 (15.4)	
其他	5 (2.0)	1 (3.8)	
供受者血型相合程度 [例 (%)]			0.510
全合	143 (56.3)	13 (50.0)	
主要不合	52 (20.5)	6 (23.1)	
次要不合	48 (18.9)	5 (19.2)	
主次均不合	11 (4.3)	2 (7.7)	
回输有核细胞 [×10 <sup>8</sup> /kg, M(范围)]	8.040 (2.530 ~ 15.670)	8.085 (5.520 ~ 10.920)	0.724
回输 CD34 <sup>+</sup> 细胞 [×10 <sup>6</sup> /kg, M(范围)]	2.405 (0.588 ~ 8.510)	2.115 (0.910 ~ 6.230)	0.689
供者淋巴细胞输注 [例 (%)]			0.017
预防或干预复发	9 (3.5)	2 (7.7)	
治疗复发	10 (3.9)	2 (7.7)	

注: Ph<sup>+</sup> B-ALL: Ph 染色体阳性急性 B 淋巴细胞白血病; MFC: 多参数流式细胞术; RQ-PCR: 实时定量聚合酶链反应技术; MRD: 微小残留病; MSDT: HLA 匹配的同胞供者移植; haplo-HSCT: 单倍型造血干细胞移植; CR<sub>1</sub>、CR<sub>2</sub> 分别为第 1、2 次完全缓解

表 3 280 例 Ph<sup>+</sup> ALL 患者异基因造血干细胞移植预后影响因素分析

变量	单因素分析			多因素分析		
	HR	95% CI	P 值	HR	95% CI	P 值
复发						
移植前疾病状态 (≥CR <sub>2</sub> , CR <sub>1</sub> )	3.058	1.669 ~ 5.605	< 0.001	2.182	1.133 ~ 4.203	0.020
移植前 MFC-MRD (阳性, 阴性)	3.125	1.608 ~ 6.071	0.001	2.488	1.216 ~ 5.088	0.013
RQ-PCR MRD (≥1%, < 1%)	2.539	1.052 ~ 6.128	0.038			
总生存						
移植前疾病状态 (≥CR <sub>2</sub> , CR <sub>1</sub> )	1.677	0.902 ~ 3.115	0.102			
移植前 RQ-PCR MRD (≥1%, < 1%)	2.323	1.213 ~ 4.452	0.011	2.472	1.289 ~ 4.739	0.006
慢性 GVHD (有, 无)	0.390	0.216 ~ 0.706	0.002	0.379	0.209 ~ 0.686	0.001
无白血病生存						
移植前疾病状态 (≥CR <sub>2</sub> , CR <sub>1</sub> )	1.865	1.090 ~ 3.190	0.023			
移植前 RQ-PCR MRD (≥1%, < 1%)	2.102	1.135 ~ 3.896	0.018	2.272	1.225 ~ 4.125	0.009
慢性 GVHD (有, 无)	0.387	0.226 ~ 0.664	0.001	0.371	0.219 ~ 0.644	< 0.001
非复发死亡						
血小板植入 (植入, 未植入)	0.046	0.023 ~ 0.091	< 0.001	0.039	0.017 ~ 0.086	< 0.001
急性 GVHD (Ⅲ/Ⅳ度, 0 ~ Ⅱ度)	2.726	0.825 ~ 9.009	0.100	3.309	0.979 ~ 11.178	0.054

注: Ph<sup>+</sup> B-ALL: Ph 染色体阳性急性 B 淋巴细胞白血病; MFC: 多参数流式细胞术; RQ-PCR: 实时定量聚合酶链反应技术; MRD: 微小残留病; MSDT: HLA 匹配的同胞供者移植; haplo-HSCT: 单倍型造血干细胞移植; CR<sub>1</sub>、CR<sub>2</sub> 分别为第 1、2 次完全缓解

16.6%)对13.6%(95% CI 7.2%~20.1%), $P=0.644$ ]、NRM率[15.3%(95% CI 9.8%~20.7%)对14.5%(95% CI 7.9%~21.1%), $P=0.864$ ]、LFS率[72.9%(95% CI 66.3%~76.6%)对71.8%(95% CI 63.3%~80.3%), $P=0.837$ ]、OS率[76.5%(95% CI 70.1%~82.9%)对78.2%(95% CI 70.5%~86.0%), $P=0.740$ ]、II~IV度急性GVHD发生率[20.6%(95% CI 14.5%~26.7%)对19.1%(95% CI 11.7%~26.4%), $P=0.760$ ]、慢性GVHD发生率[38.8%(95% CI 31.5%~46.1%)对38.2%(95% CI 29.1%~47.3%), $P=0.914$ ]差异均无统计学意义。

按照移植前BCR-ABL融合基因水平将患者分为RQ-PCR MRD<0.01%(132例)、0.01%~<0.1%(62例)、0.1%~<1%(60例)、 $\geq 1\%$ (26例)四组。结果显示,RQ-PCR MRD $\geq 1\%$ 组患者的3年CIR(23.1%)高于<0.01%组(12.1%, $P=0.072$ )、0.01%~<0.1%组(9.7%, $P=0.039$ )、0.1%~<1%组(11.7%, $P=0.096$ ),其余三组各组间CIR差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

以移植前BCR-ABL融合基因水平(RQ-PCR MRD)1%为界值,将全部患者分为RQ-PCR MRD<1%组(254例)、RQ-PCR MRD $\geq 1\%$ 两组(26例)。RQ-PCR MRD $\geq 1\%$ 较BCR/ABL<1%组具有更高的CIR[23.1%(95% CI 6.6%~39.6%)对11.4%(95% CI 7.5%~15.3%), $P=0.032$ ]、更低的LFS率[53.8%(95% CI 34.3%~73.4%)对74.4%(95% CI 69.0%~79.8%), $P=0.015$ ]与OS率[57.7%(95% CI 38.3%~77.1%)对79.1%(95% CI 74.1%~84.1%), $P=0.009$ ]。将表3中单因素分析 $P<0.10$ 的因素纳入多因素分析后提示,移植前RQ-PCR MRD $\geq 1\%$ 是影响LFS( $HR=2.272$ ,95% CI 1.225~4.215, $P<0.001$ )与OS( $HR=2.472$ ,95% CI 1.289~4.739, $P=0.006$ )的危险因素。

5. MFC与RQ-PCR两种MRD检测方法预测移植后复发的效能:MFC法检测MRD预测移植后复发的敏感性(48.50%)略低于RQ-PCR法(57.50%),特异性(77.56%)、PPV(23.62%)均高于RQ-PCR法(42.31%,11.77%),NPV与RQ-PCR相仿(87.16%对88.00%)。当以RQ-PCR MRD $\geq 1\%$ 为标准预测移植后复发时,敏感性、特异性、PPV、NPV分别为23.00%、88.59%、17.15%、91.84%。将MFC-MRD阳性、RQ-PCR MRD $\geq 1\%$ 两种指标联合应用,预测移植后复发的敏感性、特异性、PPV、NPV分别为54.29%、73.88%、45.70%、91.87%。

## 讨 论

移植前MRD与B-ALL患者的移植预后密切相关<sup>[2,4,13-14]</sup>。在本研究中,我们回顾性分析了280例接受allo-HSCT的Ph<sup>+</sup>B-ALL患者,比较了MFC与RQ-PCR两种方法检测移植前MRD水平对移植预后预测的差异。研究发现,在allo-HSCT模式下,MFC和RQ-PCR检测的移植前MRD水平均可预测Ph<sup>+</sup>B-ALL患者移植预后,两种方法联合使用可提高预测移植后复发的敏感性,有助于筛选出高危患者进行干预,改善临床疗效。

移植前MFC检测的MRD不易受到移植后再生期骨髓重建与再生期前体B细胞的干扰,减少了MRD检测的假阴性与假阳性<sup>[15]</sup>。在本研究中,移植前MFC-MRD阳性Ph<sup>+</sup>B-ALL患者的CIR明显增高,MFC-MRD阳性状态是移植后复发的危险因素,与文献<sup>[2,13,16]</sup>的结果相符。我们研究显示,基于移植前RQ-PCR MRD水平分层时RQ-PCR MRD $\geq 1\%$ 组较其他分组方式具有更高的复发风险。这与文献<sup>[4]</sup>报道的BCR-ABL水平分层与预后相关的研究结果相符。同样BCR-ABL转录本水平 $\geq 1\%$ 也符合本中心在移植前对Ph<sup>+</sup>B-ALL患者干预治疗的条件。然而,我们并未发现移植前单纯BCR-ABL MRD状态对移植预后的影响,与文献<sup>[14,17]</sup>结果存在差异。鉴于本研究haplo-HSCT患者占比较高(73.9%),考虑这种差异可能是由于不同的移植模式和供者选择条件下,移植前MRD对移植的预后影响不同有关。

近期,本中心回顾性分析了202例Ph<sup>+</sup>B-ALL患者,比较移植前MRD在不同移植模式下对移植预后的影响。结果显示,相比于HLA相合同胞供者移植(MSDT),haplo-HSCT移植前MRD状态对移植预后无显著影响;对于Ph<sup>+</sup>B-ALL患者,尤其是移植前MRD阳性的患者而言,haplo-HSCT组的CIR显著低于MSDT组<sup>[18]</sup>。此外,Mariotti等<sup>[19]</sup>报道的一项多中心研究结果显示auto-HSCT后复发的霍奇金淋巴瘤患者再次接受haplo-HSCT具有较低的CIR,本中心一项研究结果显示haplo-HSCT在根除AML患者移植前MRD方面优于MSDT<sup>[20]</sup>,提示haplo-HSCT可能较MSDT具有更强的移植植物抗白血病(GVL)效应。

对于Ph<sup>+</sup>B-ALL患者而言,RQ-PCR与MFC检测的MRD对复发和生存的预测呈现出不同的预测作用。传统上认为通过RQ-PCR检测MRD的灵敏

度较 MFC 更高,检测阈值可达  $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 。但临床上,由于 RQ-PCR 检测的灵敏度过高,使得 RQ-PCR MRD 对移植后复发预测的特异性与 PPV 均较低,特别是在 GVL 作用较强的 haplo-HSCT 模式下。RQ-PCR 在预测复发时假阴性与假阳性使得复发高危的患者出现漏诊,也容易让一些无需干预的患者过度治疗,增加化疗药物毒副作用。因此,结合临床治疗方式选择合适的监测方法和界值,才能更好地指导临床。本研究结果显示,移植前 MFC MRD 阳性与 RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$  均为对移植预后进行精准危险分层的较好指标。近年来,Zhao 等<sup>[7]</sup>、Thörn 等<sup>[21]</sup>学者应用 RQ-PCR 检测 BCR-ABL 基因水平与 MFC 对接受移植的 Ph<sup>+</sup> B-ALL 患者进行 MRD 检测,均证实 PCR 与 MFC 两种方法具有互补性。MFC MRD 与 RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$  为条件的 MRD 检测结果在预测预后上亦可互相补充。当联合应用 MFC-MRD 阳性或 RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$  为条件来预测复发时,其预测的敏感性、PPV 以及 NPV 较单一方法时得到提升,减少了移植后复发预测的假阴性与假阳性,有助于在 Ph<sup>+</sup> B-ALL 患者中更加精准分辨出复发高危人群,在移植前对高危人群进行个体化干预治疗,采用诸如博纳吐单抗<sup>[22]</sup>和嵌合抗原受体 T 细胞输注<sup>[23]</sup>等策略尽量使移植前 MFC-MRD 转阴、RQ-PCR MRD 水平降低至 1% 以下,从而改善移植预后。

综上所述,本研究对 RQ-PCR 与 MFC 检测 Ph<sup>+</sup> B-ALL 患者移植前 MRD 的预后预测作用进行了分析对比。MFC 和 RQ-PCR 检测的 MRD 均可作为 Ph<sup>+</sup> B-ALL 患者 MRD 监测的有效指标。移植前 MFC-MRD 阳性是移植后复发的危险因素。联合使用两种方法(移植前 MFC-MRD 阳性或 RQ-PCR MRD  $\geq 1\%$ )可提高预测移植后复发的敏感性、PPV 与 NPV,有助于在 Ph<sup>+</sup> B-ALL 患者中更好地筛选出高危患者以便及时给予适当干预,改善临床疗效。

#### 参考文献

- [1] Chang YJ, Huang XJ. Haploidentical stem cell transplantation: anti-thymocyte globulin-based experience [J]. *Semin Hematol*, 2016, 53(2): 82-89. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2016.01.004.
- [2] Elorza I, Palacio C, Dapena JL, et al. Relationship between minimal residual disease measured by multiparametric flow cytometry prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and outcome in children with acute lymphoblastic leukemia [J]. *Haematologica*, 2010, 95(6): 936-941. DOI: 10.3324/haematol.2009.010843.
- [3] Zhao XS, Liu YR, Xu LP, et al. Minimal residual disease status determined by multiparametric flow cytometry pretransplantation predicts the outcome of patients with ALL receiving unmanipulated haploidentical allografts [J]. *Am J Hematol*, 2019, 94(5): 512-521. DOI: 10.1002/ajh.25417.
- [4] Lussana F, Intermesoli T, Gianni F, et al. Achieving molecular remission before allogeneic stem cell transplantation in adult patients with philadelphia chromosome- positive acute lymphoblastic leukemia: impact on relapse and long-term outcome [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2016, 22(11): 1983-1987. DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.07.021.
- [5] Alm SJ, Engvall C, Asp J, et al. Minimal residual disease monitoring in childhood B lymphoblastic leukemia with t(12;21)(p13;q22); ETV6-RUNX1: concordant results using quantitation of fusion transcript and flow cytometry [J]. *Int J Lab Hematol*, 2017, 39(2): 121-128. DOI: 10.1111/ijlh.12593.
- [6] Eckert C, Henze G, Seeger K, et al. Use of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation based on minimal residual disease response improves outcomes for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in the intermediate-risk group [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(21): 2736-2742. DOI: 10.1200/JCO.2012.48.5680.
- [7] Zhao X, Zhao X, Chen H, et al. Comparative analysis of flow cytometry and RQ-PCR for the detection of minimal residual disease in philadelphia chromosome- positive acute lymphoblastic leukemia after hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018, 24(9): 1936-1943. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.03.015.
- [8] Wang Y, Fu H X, Liu D H, et al. Influence of two different doses of antithymocyte globulin in patients with standard-risk disease following haploidentical transplantation: a randomized trial [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2014, 49(3): 426-433. DOI: 10.1038/bmt.2013.191.
- [9] Qin YZ, Liu YR, Zhu HH, et al. Different kinetic patterns of BCR-ABL transcript levels in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients after achieving complete cytogenetic response [J]. *Int J Lab Hematol*, 2008, 30(4): 317-323. DOI: 10.1111/j.1751-553X.2007.00962.x.
- [10] Xu L, Chen H, Chen J, et al. The consensus on indications, conditioning regimen, and donor selection of allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematological diseases in China- recommendations from the Chinese Society of Hematology [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 33. DOI: 10.1186/s13045-018-0564-x.
- [11] Huang XJ, Liu DH, Liu KY, et al. Treatment of acute leukemia with unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and bone marrow transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009, 15(2): 257-265. DOI: 10.1016/j.bbmt.2008.11.025.
- [12] Pavletic SZ, Vogelsang GB, Lee SJ. 2014 National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: preface to the series [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015, 21(3): 387-388.

- DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.12.035.
- [13] Zhao XS, Liu YR, Xu LP, et al. Minimal residual disease status determined by multiparametric flow cytometry pretransplantation predicts the outcome of patients with ALL receiving unmanipulated haploidentical allografts [J]. *Am J Hematol*, 2019, 94 (5): 512-521. DOI: 10.1002/ajh.25417.
- [14] Shen ZL, Gu XZ, Mao WW, et al. Influence of pre-transplant minimal residual disease on prognosis after Allo-HSCT for patients with acute lymphoblastic leukemia: systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18 (1): 755. DOI: 10.1186/s12885-018-4670-5.
- [15] Theunissen PMJ, Sedek L, De Haas V, et al. Detailed immunophenotyping of B-cell precursors in regenerating bone marrow of acute lymphoblastic leukaemia patients: implications for minimal residual disease detection [J]. *Br J Haematol*, 2017, 178(2): 257-266. DOI: 10.1111/bjh.14682.
- [16] Ravandi F, Jorgensen JL, Thomas DA, et al. Detection of MRD may predict the outcome of patients with Philadelphia chromosome-positive ALL treated with tyrosine kinase inhibitors plus chemotherapy [J]. *Blood*, 2013, 122 (7): 1214-1221. DOI: 10.1182/blood-2012-11-466482.
- [17] Nishiwaki S, Imai K, Mizuta S, et al. Impact of MRD and TKI on allogeneic hematopoietic cell transplantation for Ph+ALL: a study from the adult ALL WG of the JSHCT [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2016, 51(1): 43-50. DOI: 10.1038/bmt.2015.217.
- [18] Li SQ, Fan QZ, Xu LP, et al. Different effects of pre-transplantation measurable residual disease on outcomes according to transplant modality in patients with Philadelphia chromosome positive ALL [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 320. DOI: 10.3389/fonc.2020.00320.
- [19] Mariotti J, Devillier R, Bramanti S, et al. T Cell-replete haploidentical transplantation with post-transplantation cyclophosphamide for Hodgkin lymphoma relapsed after autologous transplantation: reduced incidence of relapse and of chronic graft-versus-host disease compared with HLA-identical related donors [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018, 24 (3): 627-632. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.11.030.
- [20] Chang YJ, Wang Y, Liu YR, et al. Haploidentical allograft is superior to matched sibling donor allograft in eradicating pre-transplantation minimal residual disease of AML patients as determined by multiparameter flow cytometry: a retrospective and prospective analysis [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10 (1): 134. DOI: 10.1186/s13045-017-0502-3.
- [21] Thörn I, Botling J, Hermansson, M, et al. Monitoring minimal residual disease with flow cytometry, antigen-receptor gene rearrangements and fusion transcript quantification in Philadelphia-positive childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leuk Res*, 2009, 33 (8): 1047-1054. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.11.031.
- [22] Gökbuget N, Dombret H, Bonifacio M, et al. Blinatumomab for minimal residual disease in adults with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2018, 131 (14): 1522-1531. DOI: 10.1182/blood-2017-08-798322.
- [23] Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368 (16): 1509-1518. DOI: 10.1056/NEJMoa1215134.

(收稿日期:2020-08-27)

(本文编辑:徐茂强)

·读者·作者·编者·

## 本刊对医学名词及术语的一般要求

医学名词应使用全国科学技术名词审定委员会公布的名词。尚未通过审定的学科名词,可选用最新版《医学主题词表(MESH)》、《医学主题词注释字顺表》、《中医药主题词表》中的主题词。对于没有通用译名的名词术语,在文内第一次出现时应注明原词。中西药名以最新版《中华人民共和国药典》和《中国药品通用名称》(均由中国药典委员会编写)为准。英文药物名称则采用国际非专利药名。在题名及正文中,药名一般不得使用商品名,确需使用商品名时应先注明其通用名称。冠以外国人名名的体征、疾病、试验、综合征等,人名可以用中译文,但人名后不加“氏”(单字名除外,例如福氏杆菌);也可以用外文,但人名后不加“'s”。

文中应尽量少用缩略语。已被公知公认的缩略语可以不加注释直接使用,例如:DNA、RNA、HBsAg、CT、MRI等。不常用的、尚未被公知公认的缩略语以及原词过长在文中多次出现者,若为中文可于文中第一次出现时写出全称,在圆括号内写出缩略语;若为外文可于文中第一次出现时写出中文全称,在圆括号内写出外文全称及其缩略语。不超过4个汉字的名词不宜使用缩略语,以免影响论文的可读性。

本刊编辑部