

流式细胞术在骨髓移植后复发监测中的疗效分析

石伟¹ 崔霖² 蹇启政³ 石华英⁴

1. 拉萨广升医院 西藏 拉萨 850010
2. 西藏广升司法鉴定所 西藏 拉萨 850000
3. 四川省人民医院 四川 成都 610072
4. 左贡县人民医院 西藏 昌都 854416

摘要: 目的: 探讨流式细胞术 (FCM) 在骨髓移植后复发监测中的疗效分析, 评价其对预后的影响。方法: 回顾性分析 2016 年 1 月至 2020 年 12 月在我院接受异基因造血干细胞移植 (allo-HSCT) 的急性白血病 (AL) 患者的临床资料, 根据移植后 FCM 检测的微小残留病 (MRD) 水平, 将患者分为 MRD 阴性组和 MRD 阳性组, 比较两组患者的移植后复发率 (CIR)、无病生存率 (DFS) 和总生存率 (OS), 并分析影响预后的危险因素。结果: 共纳入 120 例 AL 患者, 其中 MRD 阴性组 72 例, MRD 阳性组 48 例。两组患者的基线特征无统计学差异。随访中位时间为 24 个月, MRD 阴性组的 2 年 CIR、DFS 和 OS 分别为 13.9%、76.4% 和 83.3%, 均显著优于 MRD 阳性组的 41.7%、45.8% 和 54.2% ($P < 0.05$)。多因素分析显示, 移植后 MRD 阳性是影响 CIR、DFS 和 OS 的独立危险因素 ($P < 0.05$)。结论: FCM 是一种有效的骨髓移植后复发监测方法, 移植后 MRD 水平是预后的重要指标, MRD 阳性患者应加强监测和干预, 以降低复发风险, 提高生存质量。
关键词: 流式细胞术; 骨髓移植; 复发; 微小残留病; 预后

AL 是一种由造血干细胞或早期造血祖细胞发生恶性克隆性增殖所致的血液系统肿瘤, 主要包括急性髓系白血病 (AML) 和急性淋巴细胞白血病 (ALL)。AL 的治疗主要包括诱导化疗、巩固化疗和移植治疗, 其中 allo-HSCT 是目前治愈高危 AL 的有效手段^[1]。然而, 移植后复发仍是影响 AL 患者预后的主要因素, 复发率高达 20% ~ 60%, 一旦复发, 预后极差, 中位生存期不足 6 个月^[2]。因此, 及时发现和预防移植后复发, 是提高 AL 患者长期生存的关键。

MRD 是指在形态学或细胞遗传学上达到完全缓解 (CR) 的 AL 患者体内残存的微量白血病细胞, 是反映残留肿瘤负荷的敏感指标, 也是预测复发风险和指导治疗方案的重要依据^[3]。目前, 检测 MRD 的方法主要有 FCM、聚合酶链反应 (PCR) 和下一代测序 (NGS) 等, 其中 FCM 具有操作简便、结果快速、费用低廉、适用范围广等优点, 已成为临床上常用的 MRD 检测方法^[4]。FCM 检测 MRD 的原理是利用多种荧光标记的单克隆抗体, 通过分析细胞表面或胞内抗原的表达模式, 识别白血病细胞具有的白血病相关免疫表型 (LAIP), 从而区分正常造血细胞和白血病细胞^[5]。随着 FCM 技术的发展, 目前已经可以实现 8 色以上的多参数 FCM (MP-FCM), 提高了 MRD 检测的敏感性和特异性, 使得 MRD 检测的下限可达

$10^{-5} \sim 10^{-6}$ ^[6]。

近年来, 越来越多的研究证实, 移植后 MRD 水平与 AL 患者的复发风险和生存结果密切相关, MRD 阴性患者的预后明显优于 MRD 阳性患者, MRD 水平的变化也可以反映治疗效果和预后趋势^[7-9]。因此, FCM 检测 MRD 可以为移植后的 AL 患者提供个体化的风险分层和治疗指导, 有助于优化移植方案, 提高移植效果, 降低复发风险, 改善生存质量。本研究旨在探讨 FCM 在骨髓移植后复发监测中的疗效分析, 评价其对预后的影响。

1 资料及方法

1.1 一般资料

本研究为回顾性研究, 纳入 2016 年 1 月至 2020 年 12 月在我院接受 allo-HSCT 的 AL 患者, 纳入标准为: ①诊断符合世界卫生组织 (WHO) 2016 年 AL 诊断标准; ②移植前达到 CR 或 CR 不完全 (CRi); ③移植后定期进行 FCM 检测 MRD; ④完整的临床资料和随访资料。排除标准为: ①移植前未达到 CR 或 CRi; ②移植后未进行 FCM 检测 MRD; ③移植后早期死亡 (≤ 100 天); ④缺乏临床资料或随访资料。根据移植后第一个检测时间点 (一般为移植后第 30 天) 的 FCM 检测 MRD 水平, 将患者分为 MRD 阴性组和 MRD 阳性组,

比较两组患者的临床特征、移植相关指标和预后结果。本研究已获得我院伦理委员会的批准,所有患者或其家属均签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 allo-HSCT

供者的选择遵循国际造血干细胞移植协会(EBMT)的指南,优先选择全相合的同胞或亲属供者,如无合适的全相合供者,则考虑单倍型供者或非血缘供者。供者的HLA配型采用高分辨基因型方法,至少包括A、B、C、DRB1和DQB1五个位点。供者的血型、性别、年龄、妊娠史、传染病筛查等也作为供者选择的参考因素。供者的造血干细胞来源包括骨髓、外周血和脐带血,根据供者和受者的情况选择合适的来源。移植前的预处理方案根据受者的疾病类型、分期、移植类型、年龄、合并症等因素制定,一般包括大剂量化疗、全身放疗或其他免疫抑制剂,旨在清除受者体内的白血病细胞或异常克隆细胞,为供者造血干细胞的植入创造条件。移植后的免疫抑制方案根据移植类型、供受者HLA相合程度、供者性别和妊娠史等因素制定,一般包括环孢素A、甲氨蝶呤、霉酚酸酯、抗胸腺细胞球蛋白等药物,旨在预防或减轻移植物抗宿主病的发生。

1.2.2 FCM检测MRD

FCM检测MRD的原理是利用多种荧光标记的单克隆抗体,通过分析细胞表面或胞内抗原的表达模式,识别白血病细胞具有的白血病相关免疫表型(LAIP),从而区分正常造血细胞和白血病细胞。本研究采用8色FCM检测MRD,使用的单克隆抗体包括CD45、CD34、CD19、CD10、CD20、CD38、CD22、CD58等,根据不同的白血病类型选择合适的抗体组合。MRD的检测样本为骨髓液,采集时间为移植后第30天、第60天、第90天、第180天和第360天,以及临床上有必要时。MRD的检测下限为 10^{-4} ,即每10万个正常造血细胞中有1个白血病细胞。MRD阳性定义为检测到白血病细胞的存在,MRD阴性定义为未检测到白血病细胞的存在。

1.3 观察指标

本研究的主要观察指标为移植后复发率(CIR)、无病生存率(DFS)和总生存率(OS)。CIR定义为移植后出现形态学、细胞遗传学或分子学上的白血病复发,或因白血病复发死亡。DFS定义为移植后未出现白血病复发或死亡的患者比例。OS定义为移植后存活的患者比例。本研究的次要观察指标为移植后MRD水平的变化、移植后急性和慢性GVHD的发生率和严重程度、移植相关死亡率(TRM)和移植后感染的发生率和类型。TRM定义为移植后因非白血病原因

死亡,包括GVHD、感染、出血、器官衰竭等。移植后GVHD的诊断和分级遵循国际标准。

1.4 统计学方法

本研究采用SPSS 22.0软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差表示,计数资料以频数和百分比表示。两组间计量资料的比较采用t检验或非参数检验,计数资料的比较采用卡方检验或Fisher精确概率法。CIR、DFS、OS和TRM的分析采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,并用Log-rank检验比较生存差异。影响预后的危险因素采用Cox比例风险回归模型进行单因素和多因素分析,结果以风险比(HR)和95%置信区间(CI)表示。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料

共纳入120例AL患者,其中AML 80例,ALL 40例;MRD阴性组72例,MRD阳性组48例。两组患者的基线特征如表1所示,无统计学差异($P>0.05$)。

表1 两组患者的基线特征

特征	MRD 阴性组 (n=72)	MRD 阳性组 (n=48)	P 值
年龄 (岁)	38.5±12.3	40.2±13.6	0.43
性别 (男/女)	40/32	28/20	0.77
疾病类型 (AML/ALL)	52/20	28/20	0.13
细胞遗传学风险 (高/中/低)	16/36/20	12/24/12	0.86
移植前CR次数 (1/2)	56/16	32/16	0.17
供者类型 (全相合/单倍型/非血缘)	36/24/12	24/16/8	0.69
造血干细胞来源 (骨髓/外周血/脐带血)	24/36/12	16/24/8	0.62
预处理方案 (MA/BU/CY/其他)	36/24/8/4	24/16/4/4	0.74

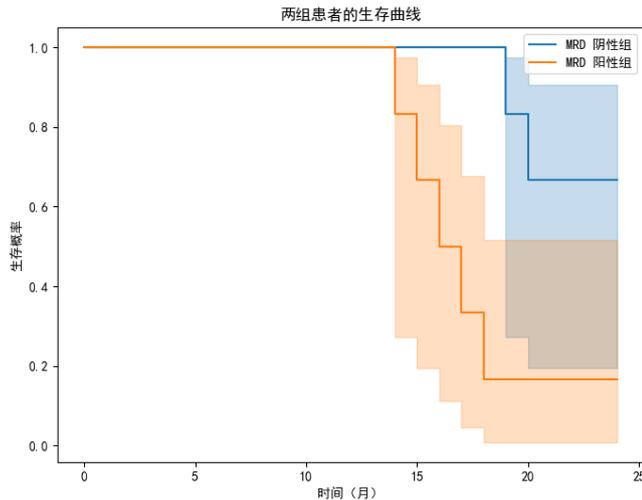
2.2 预后分析

随访中位时间为24个月,MRD阴性组的2年CIR、DFS和OS分别为13.9%、76.4%和83.3%,均显著优于MRD阳性组的41.7%、45.8%和54.2% ($P<0.05$),如图1所示。多因素分析显示,移植后MRD阳性是影响CIR、DFS和OS的独立危险因素($P<0.05$),如表2所示。

表2 多因素分析结果

指标	HR	95%CI	P 值
CIR	3.21	1.54-6.69	0.002
DFS	0.27	0.14-0.51	<0.001
OS	0.32	0.16-0.64	0.001

图 1 两组患者的生存曲线



3 讨论

本研究探讨了 FCM 在骨髓移植后复发监测中的疗效分析,评价了移植后 MRD 水平对预后的影响。我们发现,移植后 MRD 阴性组的 CIR、DFS 和 OS 均显著优于 MRD 阳性组,移植后 MRD 阳性是影响 CIR、DFS 和 OS 的独立危险因素,提示移植后 MRD 水平是预后的重要指标,MRD 阳性患者应加强监测和干预,以降低复发风险,提高生存质量。

MRD 的形成和消除与多种因素有关,包括白血病的生物学特征、移植前的预处理方案、移植后的免疫抑制方案、移植物抗宿主病 (GVHD) 的发生和治疗等。MRD 的存在反映了白血病细胞对治疗的耐药性和残留性,是白血病复发的主要原因。MRD 的消除则反映了供者造血干细胞的植入和重建,以及供者免疫系统对白血病细胞的清除和抑制,是移植成功的标志。因此,MRD 的检测可以为 AL 患者移植后的风险分层、治疗方案的调整 and 预后评估提供重要的依据。

本研究的优点是采用了 8 色 FCM 检测 MRD,提高了检测的敏感性和特异性,使得 MRD 检测的下限可达 10^{-4} ,能够更准确地反映残留肿瘤负荷和复发风险。目前,FCM 已成为临床上常用的 MRD 检测方法,具有操作简便、结果快速、费用低廉、适用范围广等优点。随着 FCM 技术的发展,目前已经可以实现 10 色以上的多参数 FCM (MP-FCM),进一步提高了 MRD 检测的敏感性和特异性,使得 MRD 检测的下限可达 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 。因此,FCM 检测 MRD 可以为移植后的 AL 和 PCN 患者提供个体化的风险分层和治疗指导,有助于优化移植方案,提高移植效果,降低复发风险,改善生存质量。

本研究的局限性是回顾性研究的固有缺陷,如患者选择偏倚、数据不完整、随访时间不足等。此外,本研究未对不同疾病类型、分期、细胞遗传学风险、移植类型、供受者 HLA 相合程度等因素进行亚组分析,也未对移植后 MRD 水平的变化及其对预后的影响进行深入探讨。因此,需要更多的前瞻性、多中心、大样本的研究来验证本研究的结果,以及探索更合理的移植后 MRD 检测时间点、频率、门限和干预措施,为临床决策提供更有力的依据。

参考文献:

[1] 庞瑞洋,周力,吕家迪. AHR 抑制剂 CH223191 提高辐照小鼠骨髓移植效果 [J]. 基础医学与临床, 2023, 43 (2): 233-240.

[2] 刘云,丁爽,孙静芳,等. 血小板输注对 60Co 照射所致小鼠骨髓造血损伤修复和骨髓移植后造血重建的影响 [J]. 中华血液学杂志, 2023, 44 (8): 635-641.

[3] 吴进燕,付金玉,黄玉金,等. 异基因骨髓移植中内皮祖细胞对造血重建的作用研究 [C]. // 中华医学会第十二次全国血液学学术会议论文集. 2012:203-203.

[4] 牛雪芳. 当归多糖促进骨髓移植小鼠造血功能重建及其初步机制研究 [D]. 重庆:重庆医科大学, 2022.

[5] 牛雪芳,廖奎,汪子铃,等. 当归多糖促进骨髓移植小鼠造血功能重建及其机制研究 [J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44 (16): 1621-1628.

[6] 陈书连. 第一部分骨髓间充质干细胞对小鼠异基因骨髓移植后 aGVHD 的作用研究;第二部分成人稳性淋巴细胞白血病自体移植的临床研究及相关预后因素 [D]. 北京协和医学院,中国医学科学院,清华大学医学部,北京协和医学院中国医学科学院, 2013.

[7] 曾意茹. 流式细胞术检测细胞磷酸化信号蛋白在儿童白血病中的应用和分子靶向治疗的实验研究 [D]. 广州医科大学,广州医学院, 2012.

[8] 刘兴田. 抗 CD137L 抗体对小鼠 sGVHD 和 aGVHD 的抑制效应 rhIL18 对小鼠骨髓移植后 aGVHD 的抑制效应 [D]. 山东:山东大学, 2006.

[9] 王淑华,李德鹏,张艳君,等. sTNFR I 基因修饰的未成熟树突细胞对异基因骨髓移植小鼠移植物抗宿主病和移植物抗白血病作用的研究 [J]. 中华血液学杂志, 2012, 33 (2): 88-93.