

急性髓系白血病伴巨核系发育异常的临床特征及预后研究

汪智琼¹ 高爱君^{2*} 黄丽芳¹ 刘娴¹ 肖敏¹ 隗佳¹

¹华中科技大学同济医学院附属同济医院血液科,湖北武汉 430030

²山西白求恩医院(山西医学科学院同济山西医院),山西医科大学第三医院血液科,山西太原 030032

摘要 目的:研究急性髓系白血病(AML)伴巨核系发育异常的临床特征及预后,进一步探讨影响 AML 预后的危险因素。方法:收集 81 例进行小巨核酶标染色的初诊 AML 患者,其中伴巨核系发育异常的 43 例为观察组,巨核系发育正常的 38 例为对照组,回顾性比较治疗前 2 组的临床特征、骨髓细胞形态学、融合基因、基因突变、染色体核型等以及治疗后 2 组初次诱导化疗的疗效及总生存期。结果:2 组临床特征比较,差异无统计学意义(P 均 >0.05),2 组骨髓细胞形态学上,FAB 分型以 AML-M2 型为主,观察组骨髓原始细胞占比低于对照组[(43.21 ± 20.64)% vs (57.30 ± 22.49)%, $P < 0.05$]。观察组多基因突变(≥ 3 个基因)的概率更高(37.3% vs 13.3%, $P < 0.01$),核型程度较不复杂,正常核型占比高(54.1% vs 39.4%, $P = 0.02$)。AML 标准化疗方案初次诱导 1 个疗程后,观察组完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、未缓解(NR)率分别为 8%、44%、48%,对照组分别为 12.0%、64.0%、24.0%,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。观察组总生存期短于对照组(11 个月 vs 23 个月, $P < 0.05$)。结论:AML 伴巨核系发育异常的患者多基因突变概率更高、CR 率较低、生存期较短、预后较差,巨核系发育异常是 AML 预后不良的危险因素之一。

关键词 巨核系发育;急性髓系白血病;预后不良

中图分类号 R552; R733; R733.71

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzzz20230105

Clinical characteristics and prognosis of acute myeloid leukemia with abnormal megakaryus development WANG Zhi-qiong¹, GAO Ai-jun^{2*}, HUANG Li-fang¹, LIU Xian¹, XIAO Min¹, WEI Jia¹. ¹Department of Hematology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan, 430030, China; ²Department of Hematology, Shanxi Bethune Hospital, Shanxi Academy of Medical Sciences, Tongji Shanxi Hospital, Third Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi Taiyuan, 030032, China

Corresponding author: GAO Ai-jun, E-mail: 1059630094@qq.com

Abstract Objective: To study the clinical characteristics and prognosis of acute myeloid leukemia (AML) with abnormal megakaryus and investigate the risk factors of AML. Methods: A total of 81 initial AML patients with small megakaryocyte enzyme label staining were collected, including 43 patients with abnormal megakaryus development in the observation group and 38 patients with normal megakaryus development in the control group. Clinical characteristics, bone marrow cell morphology, fusion gene, gene mutation and chromosome karyotype of the two groups before treatment were retrospectively compared, as well as the efficacy and overall survival of the two groups after initial induction chemotherapy. Results: The clinical characteristics of two groups showed no statistically significant difference ($P > 0.05$). Morphology of bone marrow cells in two groups revealed the predominant AML-M2 of FAB typing. The proportion of bone marrow primitive cells in the observation group was significantly lower than in the control group [(43.21 ± 20.64)% vs (57.30 ± 22.49)%, $P < 0.05$]. The probability of multiple gene mutations (≥ 3 genes) was higher in the observation group (37.3% vs 13.3%, $P < 0.001$) and the percentage of the normal karyotype was higher (54.1% vs 39.4%, $P = 0.02$) than in the control group. After the initial induction of standard chemotherapy regimen for one course of treatment, the rates of complete remission (CR), partial remission (PR) and unremission (NR) were 8%, 44% and 48% in the observation group, and 12%, 64% and 24% in the control group, respectively, with the difference being significant ($P < 0.05$). The median survival was 11 and 23 months in the observation group and in the control group, respectively. The overall survival in the observation group was significantly shorter than that in the control group ($P < 0.05$). Conclusion: AML patients with megakaryocyte dysplasia have a higher probability of multiple gene mutations, lower CR rate, shorter survival and poorer prognosis, and megakaryocyte dysplasia is one of the risk factors for poor prognosis of AML.

Key words Macrocytic lineage development; Acute myeloid leukemia; Poor prognosis

* 通信作者:高爱君, E-mail: 1059630094@qq.com, 山西省太原市小店区龙城大街 99 号

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是髓系原始细胞异常克隆性增殖,抑制正常细胞成熟分化的一种恶性血液系统疾病,年发病率和死亡率分别为 13/10 万人口和 7.1/10 万人口^[1]。WHO 将外周血或骨髓原始细胞 $\geq 20\%$ 作为急性白血病的诊断标准,当患者被证实有克隆性重现性细胞遗传学异常 t(8;21)(q22;q22)、inv(16)(p13;q22)或 t(16;16)(p13;q22)以及 t(15;17)(q22;q12)时,即使原始细胞 $< 20\%$,也诊断为 AML^[2]。将伴有重现性细胞遗传学异常、有多系发育异常以及治疗相关性 AML 独立单列。伴有多系发育异常的 AML 来源于多能造血干细胞,三系发育异常或者两系发育异常是其主要的形态学特征。粒系发育异常主要是指胞浆颗粒减少或假 P-H 畸形核;红系发育异常主要是指出现核碎裂、核碎片或者多核红细胞;巨核系发育异常主要是指出现单圆核、多圆核小巨核细胞或淋巴样小巨核细胞^[3]。本研究采用小巨核酶标技术进行特殊染色,总结伴巨核系发育异常 AML 的临床特征并评估其预后。

资料与方法

一般资料 收集 2019 年 7 月-2022 年 7 月华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科收治的 81 例 AML 患者临床资料,收集患者的血常规、骨髓原始细胞计数、融合基因、基因突变、染色体核型的结果。纳入标准:①符合 AML 诊断标准,参考《血液病诊断与疗效标准(第 4 版)》;②AML 患者骨髓标本同时进行小巨核酶标染色。排除标准:①急性早幼粒细胞白血病患者;②AML 未进行小巨核酶标染色患者。

方法

1. 血常规及骨髓细胞学检查。入院时抽取 2 mL 静脉血 EDTA 抗凝,采用全自动血细胞分析仪计数各类血细胞及比例。抽取 0.1 mL 骨髓液进行涂片,待涂片干燥后进行瑞氏-吉姆萨染色,光学显微镜下计数 200 个有核细胞并计算各阶段细胞的比例,同时进行过氧化物酶(POX)染色,以明确形态学类型。

2. 小巨核酶标染色新鲜骨髓液涂片。采用 CD41a 抗体检测试剂盒(免疫组织化学法)进行染色,生物素化一抗,碱性磷酸酶标记的链霉卵白素为二抗,加入显色液,根据抗原抗体结合、底物显色的原理,对巨核细胞进行染色,显微镜下观察巨核细胞是否发育异常并计数。参考标准(参考小巨核酶标

染色检测说明书):①双核巨核细胞(胞体 $> 40 \mu\text{m}$);②多核巨核细胞(胞体 $> 40 \mu\text{m}$);③大单圆核巨核细胞(胞体 $25 \sim 40 \mu\text{m}$);④双圆核小巨核细胞(胞体 $12 \sim 40 \mu\text{m}$);⑤多圆核小巨核细胞(胞体 $12 \sim 40 \mu\text{m}$);⑥单圆核小巨核细胞(胞体 $12 \sim 25 \mu\text{m}$);⑦淋巴样小巨核细胞(胞体 $< 12 \mu\text{m}$)。小巨核酶标阳性的标准是:异常发育的巨核细胞(④+⑤+⑥+⑦) $\geq 10\%$ 。

3. 染色体核型检查。抽取 5 mL 骨髓液肝素抗凝,采用骨髓细胞培养和 G 显带方法,根据《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN2016)》^[1]对各号染色体的结构特征进行核型描述。

4. 基因突变检查。抽取 5 mL 骨髓液肝素抗凝,采用 Real-TimePCR、Sanger 测序、高通量测序法检测常见的融合基因和基因突变。

随访时间 对所有患者均进行随访,包括查阅病历及电话随访。随访截止时间为 2022 年 9 月 3 日或患者死亡。

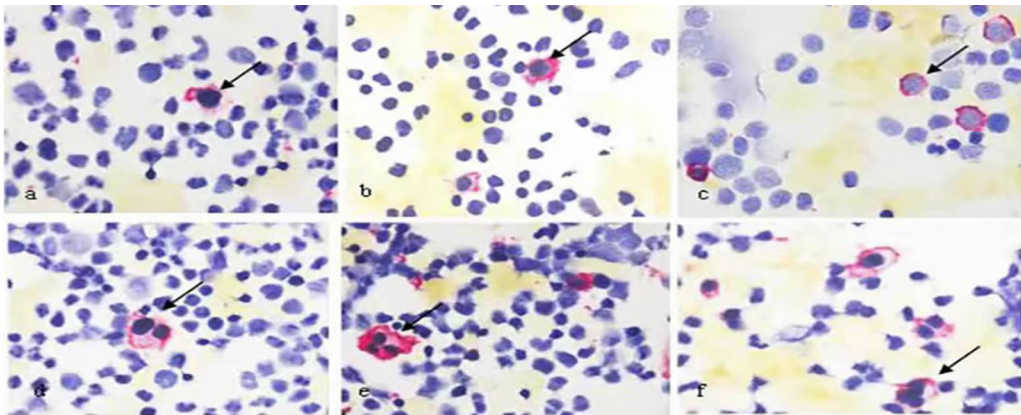
统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,两独立样本采用 t 检验;计数资料用百分数(%)表示,采用 χ^2 检验,生存分析用 Kaplan-Meier 曲线。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

临床特征、血常规以及骨髓细胞形态学 根据小巨核酶标染色参考标准,光学显微镜下出现多种巨核细胞发育异常的细胞,见图 1。将 43 例 AML 伴巨核发育异常的设为观察组,38 例巨核发育正常的为对照组,2 组法-英-美协作组(French-American British Cooperative Group, FAB)分型均以 AML-M2 型为主,见表 1。观察组伴粒系或红系发育异常有 22 例,对照组仅 5 例。

融合基因和基因突变 观察组 39 例进行了融合基因的检测,其中 8 例阳性,常见融合基因阳性由高到低的表达依次为 MLL-PTD 10.3%(4/39),MLL-ELL、BCR-ABL、AML1-MDS1/EV11、TLS-ERG 2.6%(1/39)。对照组中 34 例患者进行检测,其中 13 例阳性,由高到低的表达依次为 AML1-ETO 14.7%(5/34),CBF β -MYH11、MLL-PTD 8.8%(3/34),NUP98-H0XA9、MLL-AF 62.94%(1/34)。2 组之间融合基因的表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 组单个基因突变数量比较,差异无统计学意



注:a、b 中箭头所指是单圆核小巨核细胞(胞体 12~25μm);c 中箭头所指是淋巴样小巨核细胞(胞体 <12μm),d 中箭头所指是双圆核小巨核细胞(胞体 12~40μm);e、f 中箭头所指是多圆核小巨核细胞(胞体 12~40μm)

图1 各种形态的巨核细胞发育异常(×1000)

表1 2组临床特征、血常规、骨髓细胞形态学比较

项目	观察组(<i>n</i> = 43)	对照组(<i>n</i> = 38)	<i>P</i> 值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	55 ± 16	53 ± 11	>0.05
<60岁[例(%)]	24(55.8)	28(73.7)	0.11
男[例(%)]	28(65.1)	27(71.1)	0.64
白细胞($\times 10^9/L$, $\bar{x} \pm s$)	18.54 ± 41.29	21.38 ± 60.88	0.90
血小板($\times 10^9/L$, $\bar{x} \pm s$)	78.84 ± 116.25	51.65 ± 52.07	0.62
血红蛋白(g/L, $\bar{x} \pm s$)	73.00 ± 20.47	69.11 ± 16.06	0.35
骨髓原始细胞(% , $\bar{x} \pm s$)	43.21 ± 20.64	57.30 ± 22.49	0.0027
FAB分型(例)			
M1	3	8	0.22
M2	24	20	
M4	4	4	
M5	10	5	
M6	0	1	
M7	2	0	

义($P>0.05$),2组基因突变数量比较,观察组基因突变数量 ≥ 3 个的占37.3%,基因突变阴性的占17.1%,对照组基因突变数量 ≥ 3 个的占13.3%,基因突变阴性的占36.7% ($P<0.01$),见表2。

染色体核型 观察组核型程度较不复杂,2组染色体核型分布比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。

初次诱导化疗后缓解率 观察组25例进行了化疗,18例拒绝治疗,对照组25例进行了化疗,13例拒绝治疗。经过初次诱导化疗后,观察组完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、未缓解(NR)率分别为8%、44%、48%,对照组分别为12.0%、64.0%、24.0%,观察组CR和PR更低,NR更高(P 均 <0.05)。

总生存期 观察组中位生存期较对照组更短(11个月 *vs* 23个月, $P<0.05$),见图2。

表2 2组基因突变的结果比较[例(%)]

突变基因	观察组 (<i>n</i> = 35)	对照组 (<i>n</i> = 30)	<i>P</i> 值
高风险突变			
RUNX1	3(8.6)	1(3.3)	0.62
ASXL1	1(2.9)	1(3.3)	>0.99
TP53	3(8.6)	1(3.3)	0.62
FLT3-ITD	4(11.4)	3(10.0)	>0.99
低风险突变			
CEBPA	3(8.6)	4(13.3)	0.69
NPM1	4(11.4)	2(6.7)	0.68
风险未归类突变			
DNMT3A	6(17.1)	1(3.3)	0.11
U2AF1	3(8.6)	0(0)	0.24
EZH2	3(8.6)	0(0)	0.24

续表

突变基因	观察组 (n = 35)	对照组 (n = 30)	P 值
IDH2	6(17.1)	3(10.0)	0.49
PTPN11	3(8.6)	0(0)	0.24
TET2	3(8.6)	2(6.7)	>0.99
CBL	1(2.9)	0(0)	>0.99
KRAS	1(2.9)	1(3.3)	>0.99
基因突变数			
0 个	6(17.1)	11(36.7)	0.0002
1 个	11(31.4)	10(33.3)	
2 个	5(14.3)	5(16.7)	
≥3 个	13(37.1)	4(13.3)	

表 3 2 组染色体核型分布比较[例(%)]

染色体核型	观察组 (n = 37)	对照组 (n = 33)	P 值
未见分裂相核型	3(8.1)	1(3.0)	0.02
正常核型	20(54.1)	13(39.4)	
异常非复杂核型	8(21.6)	13(39.4)	
复杂核型	6(16.2)	6(18.2)	

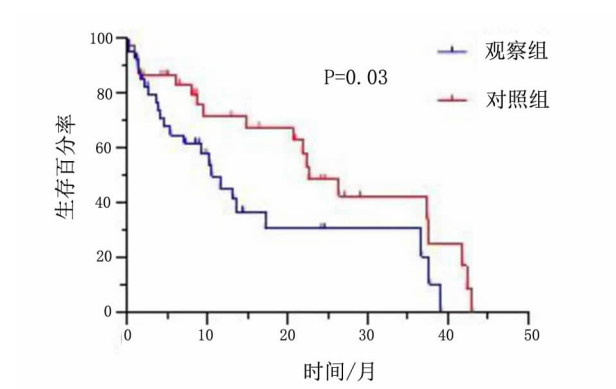


图 2 2 组中位生存期比较

讨论

AML 是最常见的一种白血病,起源于造血干细胞,遗传特征具有高度异质性,自然病程较短,往往数月^[4,5]。由于 AML 具有较大的异质性,对治疗的反应和生存时间也存在很大的差异性^[6],寻找合适的预后指标有助于更客观地评估预后,及时诊疗^[7]。在 AML 中,细胞遗传学和分子遗传学在预后评估中越来越受到重视^[8],而形态学与预后的关系研究相对较少,本研究探讨巨核系发育异常对 AML 预后的影响。

本研究中 2 组年龄、性别、血常规比较,差异无统计学意义,观察组原始细胞比例低于对照组,FAB 分型 2 组均以 AML-M2 型为主。考虑观察组患者可

能是由骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndrome, MDS) 发展转化而来,早期患者临床症状不明显,就医较晚,没有 MDS 病史,入院即为初诊 AML,而对照组发病时原始细胞比例较高,考虑原始细胞异常增殖分化导致的初发白血病。有文献报道 MDS 的显著特征为一系或多系发育异常,疾病进展的终末期为 AML^[9]

本文 2 组融合基因阳性突变率上差异无统计学意义,观察组更易表达 MLL 融合基因,阳性率 62.5%。MLL 基因位于 11q23,重排形式有部分串联重复、缺失、易位、插入等,其中易位形成的 MLL 融合蛋白引起转录调控异常及诱导 MLL 下游目的基因的异常表达,导致白血病、MDS 等的发生^[10]。Grimwade 等^[11]研究发现伴有 MLL 融合重排的 AML 具有缓解率低、容易复发、预后差的临床特征。

欧洲白血病网将细胞遗传学和分子遗传学进行危险度分层^[12],AML 患者分为 3 组:低危、中危和高危,其中伴有 TP53、RUNX1、FLT3-ITD3 的突变属于高危组,TP53 基因位于 17 号染色体短臂,编码 TP53 蛋白,主要作用是调控细胞周期、修复 DNA 损伤,是抑癌基因^[13],TP53 的突变主要为错义突变,预后较差^[14]。FLT3 基因位于染色体 13q12,包含 24 个外显子,属于Ⅲ型受体酪氨酸激酶 (RTK) 受体亚家族^[15],FLT3 的突变主要是破坏正常血细胞的增殖、分化与凋亡,从而导致白血病的发生,并且与疾病的进展相关。Haeflrich 等^[16]研究提示伴 FLT3-ITD 基因预后不良。Gaidzik 等^[17]研究显示伴 RUNX1 基因异常 AML 患者预后不佳。本研究进行单个基因突变分析,2 组间 TP53、RUNX1、FLT3-ITD3 等高风险突变基因比较,差异无统计学意义,提示高风险单基因突变在 2 组的预后上没有起到关键作用。本研究观察组突变基因更复杂,观察组基因突变率高达 82.9%,≥3 个基因突变占 37.1%。多基因突变可能在巨核系发育异常的 AML 预后上起到显著性作用。国内外大部分学者认为复杂染色体核型是预后不良的独立危险因素^[18]。染色体核型分为正常核型、异常非复杂核型、复杂核型。本研究中对对照组染色体核型较观察组更复杂,观察组正常核型占 54.1%,提示染色体核型不是巨核系发育异常 AML 的重要影响因素。

本文观察组和对照组的 CR 是 8.0% 和 12%, PR 是 44% 和 64%,NR 是 48% 和 24%。观察组缓解率更低,未缓解率更高,观察组总生存期更短(P 均 <0.05),提示巨核系发育异常是 AML 预后不良

的危险因素。

传统模式中,发现病态的巨核细胞更多依赖光学显微镜,而近年来运用小巨核酶标染色,采用生物素标记一抗,再用碱性磷酸酶标记的链霉卵白素二抗与一抗结合,酶和显色液反应,更简洁识别小巨核细胞,弥补了光学显微镜不易观察到小巨核细胞的缺陷,提高了反应的灵敏度和特异性^[19]。在 MDS 中,淋巴样、单圆核、双圆核及多圆核小巨核细胞是巨核细胞形态发育异常的典型表现,反映了病态造血的特征^[20],研究表明恶性克隆细胞比正常克隆细胞更易出现发育异常,大多数病态巨核细胞来自恶性克隆细胞^[21]。文献报道小巨核细胞为 MDS 预后不良的因素^[22]。本研究进一步阐述了巨核系发育异常的 AML 临床特征,AML 伴巨核系发育异常的患者基因突变率更高更复杂,缓解率更低,生存期更低,预后更差。综上所述,巨核系发育异常是 AML 预后不良的危险因素。

参 考 文 献

1 Youngal,Tong RS,Biramnn BM,et al. Clonal haematopoiesis and risk of acute myeloidleukemia[J]. Haematologica,2019,104(12):2410-2417.

2 Arber DA,Orazla,Hasserjian R,et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of Myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. Blood,2016,127(20):2391-2405.

3 伍俞亮,罗治彬,王琛,等. 69 例骨髓增生异常综合征病态造血特征对预后意义的研究[J]. 中国实验血液学杂志,2015,23(1):150-154.

4 Sanz MA,Iacoboni G,Montesinosp,et al. Emerging strategies for the treatment of older patients with acute myeloid leukemia[J]. AnnHematol. 2016,95(10):1583-1593.

5 鲁猛,赵耀顺,杨白梅,等. FLAG-IDA 方案可改善高危急性髓细胞性白血病患者初始诱导缓解治疗的疗效[J]. 内科急危重症杂志,2022,28(2):117-120.

6 Thol F,Ganser A. Treatment of relapsed acute myeloid leukemia [J]. Curr Treat Options Oncol,2020,21(8):66.

7 Wakita S,Sakaguchi M,Oh L,et al. Prognostic impact of CEBPA bZ-IP domain mutation in acute myeloid leukemia[J]. Blood Adv,2022,6(1):238-247.

8 Sugunae ,Farhana R,Kanimozhi E,et al. Acute myeloid leukemia:diagnosis and management based on current molecular genetics approach[J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets,2018,18(3):199-207.

9 Greenberg PL,Stone RM,AL-KALI A,et al. Myelodysplastic syndromes

version2. 2017 NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. J Natl Compr CancNetw,2017,15(1):60-87.

10 Krivtsov AV,Armstrong SA. MLL translocations histone modifications and leukaemia stem-cell development [J]. Nat Rev Cancer,2007,7(11):823-833.

11 Grimwade D,Hills RK,Moorman AV,et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials[J]. Blood,2010,116(3):354-365.

12 Döhnerh,Esteye ,Grimwade D,et al. Diagnosis and management of AML in adults; 2017 ELN recommendations from an international expert panel[J]. Blood,2017,129(4):424-447.

13 Prokocimer M,Molchadskya,Rotterv. Dysfunctional diversity of p53 proteins in adult acute myeloid leukemia: projections on diagnostic workup and therapy[J]. Blood,2017,130(6):699-712.

14 黄慧君,史仲珣,李冰,等. 伴 TP53 基因异常骨髓增生异常综合征患者的临床特征及预后研究[J]. 中华血液学杂志,2019,40(3):215-221.

15 Pratz KW,Stoato T,Muprhy KM,et al. FLT3-mutant allelic burden and clinical status are predictive of response to FLT3 inhibitors in AML[J]. Blood,2010,115(7):1425-1432.

16 Haferlach T,Bbcher U,Alpermannit ,et al. Amount of bone marrow blasts is strongly correlated to NPM1 and FLT3-ITD mutation rate in AML with normal karyotype[J]. Leuk Res,2012,36(1):51-55.

17 Gaidzik VI,Teleanu V,Papaemmanuil E,et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associatedwith distinct clinico-pathologic and genetic features[J]. Leukemia,2016,30(11):2160-2168.

18 Xu J, Huang B, Liu X, et al. Poor prognosis in acute myeloid leukemia patients with monosomal karyotypes[J]. Turk J Haematol,2017,34(2):126-130.

19 Huang JJ,Wang ZQ,Huang LF,et al. CD41 immune staining of micromegakaryocytes improves the diagnosis of myelodysplastic syndrome and differentiation from pancytopenia [J]. Leukemia Res,2018,66(1):15-19.

20 Matsuda A,Germing U,Jinnai I,et al. Improvement of criteria for refractory cytopenia with multilineage dysplasia according to the WHO classification based on prognostic significance of morphological features in patients with refractory anemia according to the FAB classification[J]. Leukemia,2007,21(4):678-686.

21 Invernizzi R,Quagliaf ,Porta MG. Importance of classical morphology in the diagnosis of myelodysplastic syndrome[J]. Mediterr J Hematol Infect Dis,2015,7(1):e2015035.

22 刘帅,曹征,张晓飏,等. 流式细胞术分析骨髓增生异常综合征小巨核细胞的初步研究[J]. 重庆医学. 2016,45(3):351-353.

(2022-10-21 收稿 2022-11-30 修回)