

# wt1 定量联合 FCM 在急性髓细胞白血病 MRD 监测中的临床应用

郝英婵, 徐修才

**摘要** 目的 探讨在急性髓细胞白血病(AML)中 Wilms 瘤基因 1(*wt1*) mRNA 定量联合多参数流式细胞术(FCM)分析监测微小残留病灶的临床应用。方法 采用实时荧光定量聚合酶链反应技术(qRT-PCR)检测 35 例 AML 患者的 *wt1* 表达水平;将患者根据不同亚型分组检测;并且对 9 例缓解和 4 例复发患者进行随访,检测 *wt1* 表达水平。采用 FCM 分析 AML 中微小残留病灶(MRD)水平。结果 与对照组比较,AML 病例组 *wt1* 表达水平明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在初诊的各种 AML 亚型中,M2 亚型 *wt1* 表达水平最高,M6 亚型 *wt1* 表达水平最低。9 例随访患者提示在达到完全缓解时 *wt1* 表达水平下降,而 4 例随访复发患者在复发时再次升高。FCM 检测 MRD 在不同阶段异常髓系细胞比例明显不同。联合 qRT-PCR 和 FCM 技术对 MRD 检测的敏感性和特异性大大提高,两者具有一致性;利用 ROC 曲线对复发病例进行分析得到的监测阈值为 3.33%。结论 在急性髓细胞白血病中 *wt1* mRNA 定量联合多参数流式细胞术分析可用于监测 MRD、评估治疗效果、预后及预测疾病复发风险。

**关键词** Wilms 瘤基因 1;急性髓细胞白血病;实时荧光定量聚合酶链反应;多参数流式细胞术;微小残留病灶

**中图分类号** R 446.11

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2017)03-0392-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.019

*wt1* 基因是一种肿瘤抑制基因,也是调控造血细胞增殖和(或)分化基因的转录抑制剂,在恶性血液系统疾病的发生中可能起重要作用。急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)特别是无特异融合基因标记的患者,临床缓解后的低水平微小残留病灶(minimal residual disease, MRD)监测一直缺乏有效的手段<sup>[1]</sup>。该研究通过 *wt1* 基因转录水平定量检测,并联合多参数流式细胞分析技术(flow cytometry method, FCM),探讨对无特异融合基因标记

的 AML 患者 MRD 监测的有效途径。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集 2014 年 9 月~2015 年 9 月初发 AML 患者 35 例,男 19 例,女 16 例,17~74 岁,中位年龄 54 岁,其中 M0 2 例, M1 5 例, M2 10 例, M4 7 例, M5 9 例, M6 2 例;治疗后期完全缓解组 9 例,复发 5 例。所有患者经血常规、骨髓象等检查,并结合免疫表型和核型分析,符合国内现行白血病分型标准<sup>[2]</sup>。另收集诊断为缺铁性贫血、过敏性紫癜、免疫性血小板减少性紫癜、巨幼细胞性贫血共 22 例的骨髓作为正常对照组,并确定骨髓中 *wt1* 转录本的正常参考水平。随访时间 1~36 个月,中位随访时间 24 个月。所有患者在初诊时同时通过多重 PCR 方法筛检常见融合基因<sup>[3]</sup>,复发病例同时收集同时期的细胞形态学结果进行比较。试验中涉及到的内容均经医院医学伦理学委员会批准,并且与患者签署知情同意书。

## 1.2 荧光定量 PCR 检测 *wt1* 转录水平

**1.2.1 单个核细胞分离和总 RNA 的提取** 采集新鲜骨髓 0.5~1 ml, EDTA 抗凝后,用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离出单个核细胞,用 TRIzol 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司)提取总 RNA,分光光度计检测  $OD_{260}/OD_{280}$  应在 1.8~2.0。抽提好的 RNA 加入 RNase-free 水混匀溶解。以此 15  $\mu$ l 处理液作 PCR 反应模板。

**1.2.2 实时荧光定量 PCR 分析** PCR 反应采用一步法,定量 PCR 试剂盒购自上海源奇生物技术公司。反应体系如下:PCR 反应液 8  $\mu$ l,混合酶液 2  $\mu$ l, 15  $\mu$ l RNA (1  $\mu$ g);反应条件:42  $^{\circ}$ C 30 min; 94  $^{\circ}$ C 5 min; (94  $^{\circ}$ C 15 s; 60  $^{\circ}$ C 60 s) 40 个循环。在 PCR 循环第 2 步 60  $^{\circ}$ C 时收集荧光信号。*wt1*、*abl* 的标准曲线,和样品同时检测,设定 3~15 个循环的平均荧光信号为基线,并由分析软件计算出标准曲线,再计算样品的拷贝数。每次实验以 *abl* 基因作为内对照,保证实验结果有效可靠;*wt1* 的表达水平以 *wt1/abl* 的百分比来表示。

**1.3 FCM 分析** 本实验所用的流式细胞仪购自美

2016-12-06 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171605)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院中心实验室,合肥 230001

作者简介:郝英婵,女,硕士研究生;

徐修才,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: xuxiucail972@163.com

国 Becton Dickinson 公司,仪器型号为 Canton II; 单克隆抗体 CD15、CD13、CD11b、CD33、CD34、CD45 等均购自美国 Beckman Coulter 公司。以 Diva 6.1 软件对数取样,每管获取 100 000 个细胞,均首先通过 CD45 和侧向角散射 (side scatter, SSC) 设门,根据患者初诊时的白血病相关免疫表型,选择特异性 8~12 种抗体,每种单抗加入 20  $\mu$ l,震荡混匀后,室温避光温育 15 min,加入溶血素以裂解红细胞,离心去除上清液,用 PBS 洗涤后,上流式细胞仪检测。骨髓中白血病细胞  $\geq 0.01$  和  $< 5\%$  为 MRD 阳性;骨髓细胞形态学或 FCM 检测白血病细胞  $\geq 5\%$  为复发,多个抗体组合以数值最大者为 MRD 值。

**1.4 统计学处理** 用 SPSS 10.0 统计分析软件作统计分析。符合正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料组间比较采用  $t$  检验分析,多组间比较用方差分析及 LSD- $t$  法,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 急性白血病不同分型的 AML 患者初发时 wt1 基因表达水平** 通过对正常对照组和 AML 各型白血病进行分析,结果显示 AML 病例组 wt1 基因表达水平  $[(35.76 \pm 14.34)\%]$  显著高于对照组  $[(0.18 \pm 0.15)\%]$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。从图 1 中可以看出,经 abl 内参基因校正后, M2 亚型 wt1 基因表达水平最高, M6 亚型 wt1 表达水平最低, M2 亚型与其他亚型之间差异显著 ( $P < 0.05$ ), M1 与 M5 亚型之间 wt1 水平有差异 ( $P < 0.05$ ), 其他各亚型之间 wt1 表达水平差异无统计学意义。

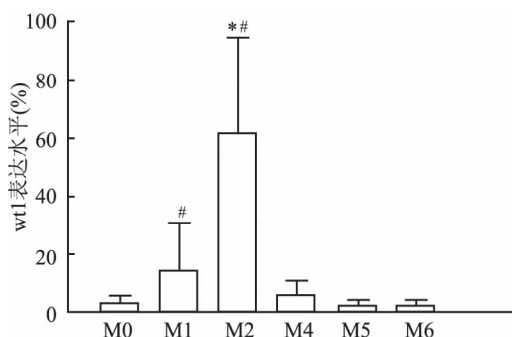


图1 各型无特异融合基因的 AML 患者初诊 wt1 表达水平与 M0、M1、M4、M6 比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 M5 比较: #  $P < 0.05$

### 2.2 随访患者中不同阶段 wt1 表达水平的变化

本研究随访了 9 例完全缓解患者和 5 例复发患者,经 abl 内参基因校正后,从图 2 中可以看出患者在初诊时 wt1 基因表达水平高,经治疗达到完全缓解

时 wt1 表达水平低,甚至低于检测水平。图 3 说明 wt1 基因表达水平在初诊、缓解、复发 3 个阶段差异显著,达到缓解时表达量几乎为 0,复发时明显再次升高。结合图 4~6 可以表明 FCM 检测 MRD 在初诊时显示 11% 异常髓系细胞,缓解时残存的异常细胞比例为 0.12%,但在复发时明显升高,异常髓系细胞达到 71%。

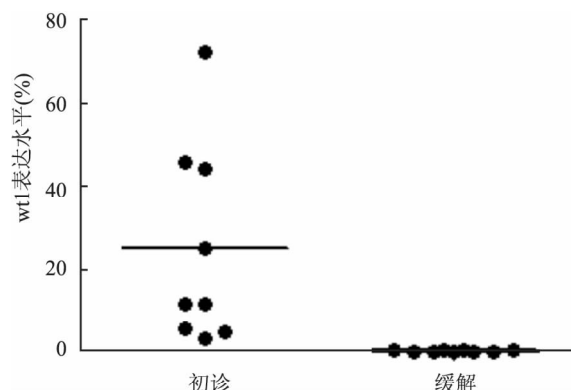


图2 9 例 AML 患者 wt1 表达水平在初诊和缓解时的动态变化

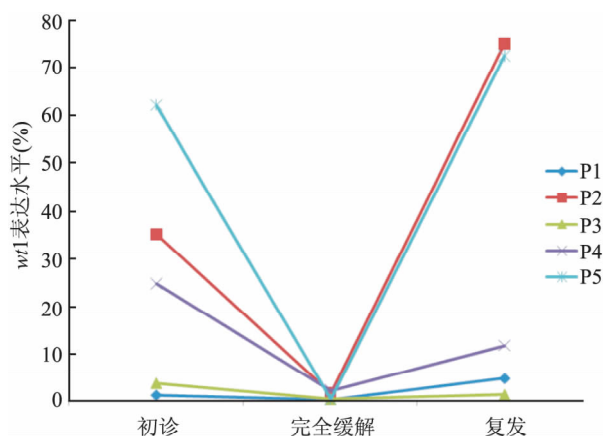


图3 5 例 AML 患者 wt1 表达水平在不同病程时的动态变化

### 2.3 定量 PCR 和多参数流式细胞技术对 35 例 AML 随访患者 MRD 监测结果

经过分析 wt1 和 FCM 两种方法对白血病 MRD 检测的敏感性没有差别,在 AML 中两者无显著差异,具有一致性。PCR 检测 AML 阳性率为 71%, FCM 检测阳性率为 63%,联合两种方法检测 AML 阳性率为 97%,明显高于单一方法检测。见表 1。

表1 定量 PCR 和 FCM 术对 35 例 AML 随访患者 MRD 监测结果(n)

wt1	FCM		合计
	+	-	
+	13	12	25
-	9	1	10
合计	22	13	35

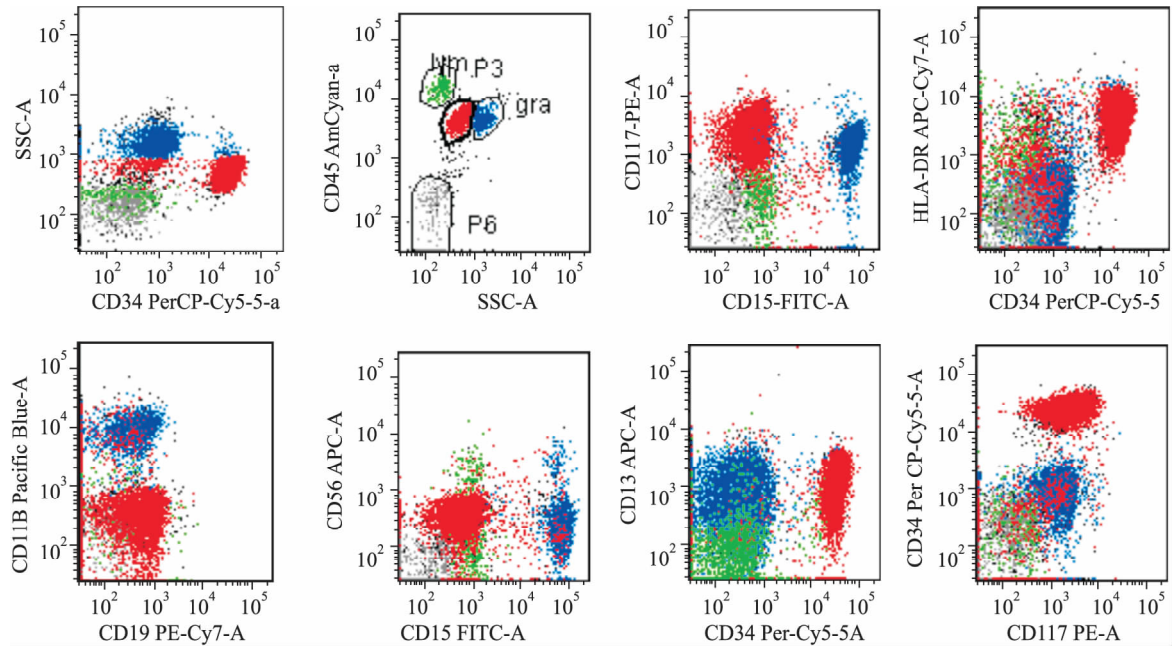


图4 AML患者在初诊时FCM检测MRD结果

注: 红色为异常细胞

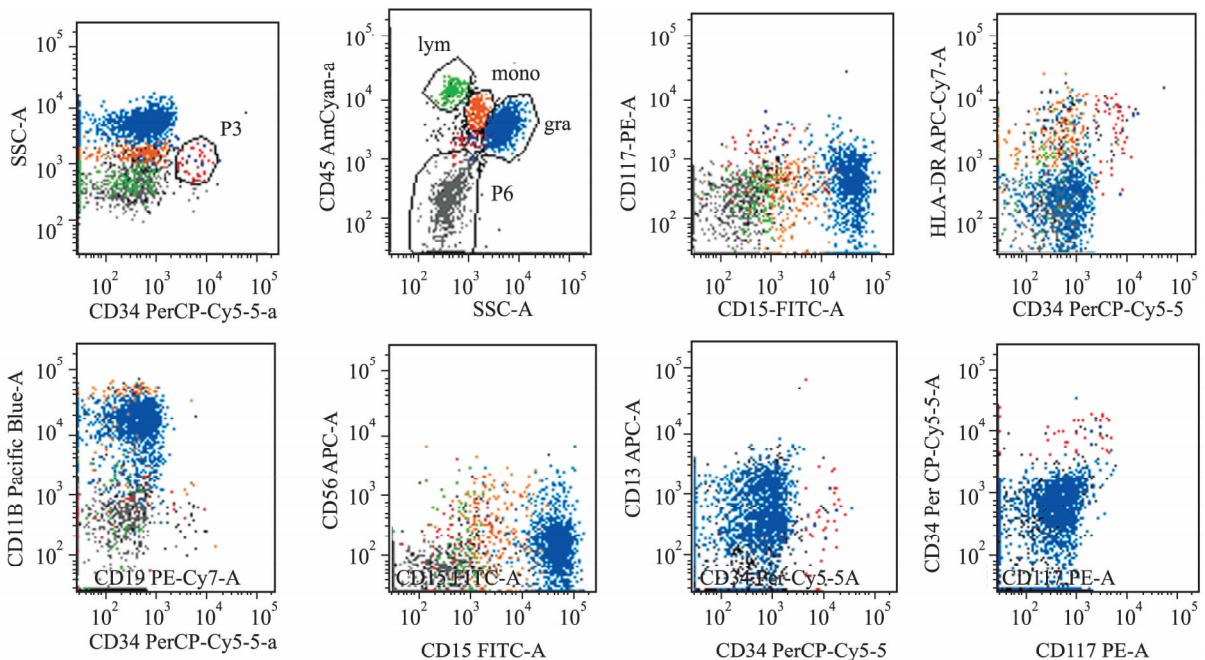


图5 AML患者在缓解时FCM检测MRD结果

注: 红色为异常细胞

**2.4 ROC 曲线分析** 将复发组作为检验变量,未复发组作为状态变量,对移植后复发的病例进行阈值分析,利用 ROC 曲线计算出置信区间 95% 时的阈值。曲线下面积为 0.81,95% CI 为 0.65 ~ 0.97,分析得出特异性为 0.79,敏感性为 0.71,约登系数最大时对应的 *wt1* 阈值为 3.33%,表明在 *wt1* 表达

水平大于该值时很有可能预示复发,临床上进行进一步的治疗。

### 3 讨论

AML(不包括 M3) 是一类高度异质性疾病,不同亚型甚至同一亚型预后差别很大。尽管 AML 患

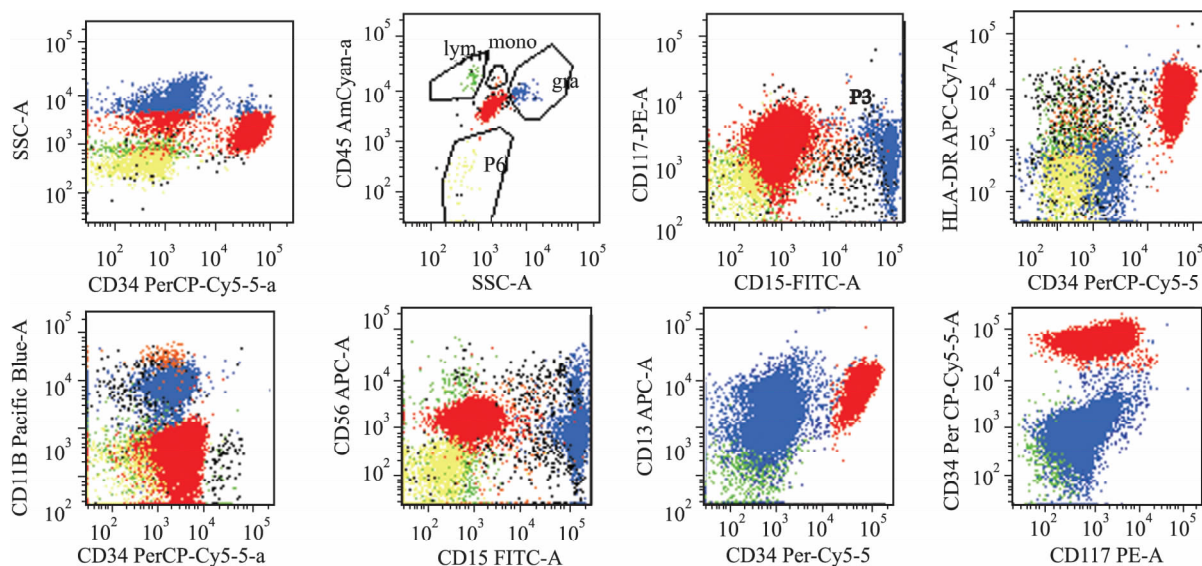


图6 AML患者在复发时FCM检测MRD结果

注:红色为异常细胞

者的缓解率很高,但是仍有不少患者早期死亡和复发,因此动态监测MRD对于识别高危患者、有效预测复发、针对复发采取有效措施具有十分重要的意义,检测MRD成为白血病治疗过程中的重要环节<sup>[4]</sup>。

在AML中,FCM、qRT-PCR、荧光原位杂交等技术可以有效地检测出MRD。目前,检测MRD最敏感的方法是RQ-PCR,其敏感度可以达到 $10^3 \sim 10^5$ ,甚至可以达到 $10^5 \sim 10^6$ ,在临床上通常作为诊断和监测残留病变的金标准<sup>[5]</sup>,但其适用范围限于特异性融合基因标记的患者,如*aml-eto*、*cbfb-myh11*、*mll*、*flt-3*等;然而超过50%的AML病例缺乏特异性融合基因标记,因此寻找识别大部分患者的分子标记十分重要。大量研究<sup>[6]</sup>证实,*wt1*基因在70%~90%AML患者中高表达,可以作为监测评估MRD的有效指标。另外,FCM已成为检测急性白血病MRD的重要手段。AML有多种亚型,单一抗原或某一亚型难以准确检测MRD,使用多参数单克隆抗体进行标记,可全面的、特异的检测AML异常抗原的分布情况,使AML细胞和正常骨髓细胞区分更为客观准确,进一步明确白血病细胞的起源及分化程度,为临床诊断、治疗及判断预后提供重要依据。研究<sup>[7]</sup>显示约90%的AML患者可以采用FCM技术检测MRD,因此联合应用qRT-PCR和FCM技术监测MRD成为白血病治疗和预测复发的重要手段。

本研究中,通过比较不同FAB分型的AML患者初发时*wt1*表达水平,结果显示:与正常对照组比较,AML各亚型的*wt1*表达水平均明显上升,且

90%病例*wt1*表达含量高出正常对照组100倍,40%病例*wt1*表达含量高于正常对照组1000倍;关于AML各亚型的*wt1*基因表达量各研究得出的结论不一致,已有报道<sup>[8]</sup>表明M4亚型*wt1*基因表达最高、M5亚型表达最低。本研究中M2亚型*wt1*基因表达水平最高、M6亚型表达最低,与Sakamoto et al<sup>[9]</sup>的结果不一致。原因可能是样本的不典型导致诊断AML亚型有一些偏差,另一方面样本量较小,下一步拟进一步收集病例并在体外实验进行验证。本研究随访了5例AML复发患者,在初诊时*wt1*基因表达明显高于对照组,达到临床完全缓解标准后,*wt1*基因表达降低,甚至低于检测限,而在复发时*wt1*表达再次升高。同时利用FCM检测AML患者初诊、缓解、复发时MRD,在初诊时发现异常髓系细胞,随着治疗得到缓解,异常细胞比例降低到0.1%,但是在复发异常细胞明显增高。因此联合qRT-PCR和FCM两种检测手段监测MRD,对于评估治疗效果、预后及预测疾病复发有重要作用。由于*wt1*定量水平在各实验室的正常参考范围变化很大,本研究经过对复发病例进行分析,利用ROC曲线得到置信区间95%时的阈值,在移植后实时监测*wt1*值,一旦高于3.33%说明很有可能复发,应及时进行骨髓细胞学和MRD等检查。实验中比较qRT-PCR检测定量*wt1*和FCM两种方法对白血病微小残留的检出率,*wt1*表达水平>1%时确定为阳性标本,两种方法对AML的差异无统计学意义,具有一致性。此外,通过对检出阳性率比较,可以表明两种方法联合检测时阳性率明显高于单一方法,大大提

高特异性和灵敏度,降低了漏诊率和误诊率,因此,qRT-PCR和FCM均可以作为AML患者MRD动态监测的有效方法<sup>[10]</sup>,两者可以作为相互补充的指标,更加全面的诊断AML和监测AML患者缓解状态。

综上所述,本研究表明 *wt1* mRNA 定量检测可以作为跟踪AML患者病情进展的指标,FCM采用特异性抗体组合,针对不同病例具有个体化的治疗方案,使MRD检测准确度增高,其监测MRD具有无可替代的优势,特别是对于无特异性融合基因的AML患者。因此,由于 *wt1* 作为监测标记,其联合FCM对监测MRD、评测预后、了解病情进展情况、预防移植后复发,指导临床进行早期干预具有重要意义。

### 参考文献

- [1] Xiang L, Zhou J, Gu W, et al. Changes in expression of WT1 during induced differentiation of the acute myeloid leukemia cell lines by treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine and all-retinoic acid [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(2): 1521 - 6.
- [2] 张之南,沈 悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3版.北京:科学出版社,2007: 103 - 16.
- [3] 江 梅,万腊根. RQ-PCR技术检测白血病融合基因及其临床应用[J]. 实验与检验医学,2010,28(5): 469 - 72.
- [4] Malagola M, Skert C, Borlenghi E, et al. Postremission sequential monitoring of minimal residual disease by WT1 RQ-PCR and multiparametric flow cytometry assessment predicts relapse and may help to address risk-adapted therapy in acute myeloid leukemia patients [J]. *Cancer Med*, 2016, 5(2): 265 - 74.
- [5] Yamauchi T, Negoro E, Lee S, et al. Detectable Wilms' tumor-1 transcription at treatment completion is associated with poor prognosis of acute myeloid leukemia: a single institution's experience [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(8): 3335 - 40.
- [6] Kayser S, Walter R B, Stock W, et al. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia—current status and future perspectives [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2015, 10(2): 132 - 44.
- [7] 李珊凤,易汉杰,金明威,等. 多参数流式细胞术检测91例急性白血病免疫表型分析[J]. 现代实用医学,2014,26(7): 907 - 8.
- [8] 王旭莉,柴忆欢,胡绍燕,等. WT1基因在急性白血病患者中的表达及其临床意义[J]. 实用儿科临床杂志,2010,25(3): 167 - 9.
- [9] Sakamoto Y, Mariya Y, Sasaki S, et al. WT1 mRNA level in peripheral blood is a sensitive biomarker for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2009, 219(2): 169 - 76.
- [10] 张岩,田莉萍,张莹,等. 两种方法动态监测急性早幼粒细胞白血病微小残留病变的前瞻性比较研究[J]. 中国实验血液学杂志,2014,22(1): 50 - 3.

## Clinical application of MRD in acute myelogenous leukemia by *wt1* quantitative combined with FCM

Hao Yingchan, Xu Xiucan

(Central Laboratory of the Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To discuss the clinical application of minimal residual disease in acute myelogenous leukemia (AML) by *wt1* mRNA quantitative combined with multi-parameter flow cytometry (FCM). **Methods** Real time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) method was established for detecting *wt1* gene expression level in 35 AML patients. The indexes were detected by different subtypes; And 9 cases of ease and 4 cases of recurrence in patients was followed-up and detected the *wt1* level. The multiparameter flow cytometry was used to analyze the minimal residual disease in AML. **Results** The expression of *wt1* gene was significantly higher than that of the control group. Significant difference was found ( $P < 0.05$ ). In the newly diagnosed AMLs, *wt1* was the highest in M2 and the lowest in M6. Follow-up of 4 AML patients showed that *wt1* gene expression level was markedly decreased after CR, but obviously increased after relapse. The proportion of abnormal myeloid cells in different phases significantly changed by FCM. There was no difference of minimal residual disease in AML by qRT-PCR and multiparameter flow cytometry. The ROC curve was used to analyze the recurrent cases to get the threshold value (3.33%). **Conclusion** The quantitative analysis of *wt1* combined with multi-parameter flow cytometry can be used to monitor minimal residual disease in leukemia patients, assess the treatment efficacy and prognosis, and predict the risk of recurrence.

**Key words** *wt1* gene; acute leukemia; real time quantitative polymerase chain reaction; multiparameter flow cytometry; minimal residual disease