

## 微小残留病灶(MRD)监测在慢性淋巴细胞白血病(CLL)中的应用进展

任雨虹(综述) 刘 澎<sup>△</sup>(审校)

(复旦大学附属中山医院血液科 上海 200032)

**【摘要】** 慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)是西方国家最常见的成人白血病,在我国的发病率也日益增加。近年来针对 CLL 的新药层出不穷,微小残留病灶(minimal residual disease, MRD)监测逐渐成为评估疗效的重要手段。本文总结了目前常用的 MRD 检测方法,包括流式细胞学和基于 PCR 法的分子学检测,并介绍了其在初治 CLL 疗效评价、预后评估和在移植后 CLL 复发预警方面的应用进展。

**【关键词】** 慢性淋巴细胞白血病(CLL); 微小残留病灶(MRD); 监测

**【中图分类号】** R733.72 **【文献标识码】** B **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2019.03.019

## Progress of minimal residual disease (MRD) monitoring in chronic lymphocytic leukemia (CLL)

REN Yu-hong, LIU Peng<sup>△</sup>

(Department of Hematology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**【Abstract】** Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the commonest adult leukemia in Western countries. Recent years has witnessed an increasing incidence rate in China. Since new agents have been developed over the decades, minimal residual disease (MRD) monitoring became an efficient way to assess the treatment effect. Here we reviewed the common methods to test MRD including flow cytometry and molecular detection methods based on PCR technique. Also we introduced the progress of MRD monitoring in response and prognostic assessment in newly-treated CLL patients and early relapse detection in CLL patients after allogeneic stem cell transplantation.

**【Key words】** chronic lymphocytic leukemia (CLL); minimal residual disease (MRD); monitoring

\* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81570123).

慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)是一种成熟 B 淋巴细胞克隆增殖性肿瘤,以淋巴细胞在外周血、骨髓、脾脏和淋巴结聚集为特征,在西方国家的年发病率为 4.2/10 万,80 岁以上人群年发病率甚至超过 30/10 万<sup>[1]</sup>。CLL

的治疗方案经历了从传统化疗到化学免疫治疗的转变,但 CLL 的首要治疗目标仍是获得更深程度的缓解和更持久的无进展生存(progression free survival, PFS)。能达到更深检测程度的微小残留病灶(minimal residual disease, MRD)监测逐渐成

为了疗效评估的重要指标。不同于其他白血病, CLL 预后的高度异质性和累及多部位的特点使得针对其 MRD 的监测比其他白血病更复杂。本文将就目前 MRD 监测在 CLL 中的应用进展进行介绍。

**MRD 在 CLL 中的检测方法** 作为一项评估疗效深度的监测指标,理想的 MRD 检测方法需满足可定量、标准化、便捷性的要求。目前最常见的是流式细胞学(flow cytometry, FCM)和 PCR 两大类,但只有灵敏度高于  $10^{-4}$  才能被纳入标准化评估<sup>[2]</sup>。

**流式细胞学** FCM 检测的优劣与细胞计数、仪器、解读方式等密切相关。研究者试图通过检测 CD5/19 共表达和  $\kappa/\lambda$  限制性表达的方法在 3 色 FCM 上检测残留病灶,然而 3 色 FCM 的灵敏度只能达到  $10^{-3}$ ,尤其当 B 细胞计数较低时,限制性更显著<sup>[3-4]</sup>。Rawstron 等<sup>[5]</sup>通过优化 4 色 FCM,不仅在骨髓和外周血 CLL 细胞上能检测到不同于正常 B、T 细胞的异常表达抗原,同时还实现了定量检测及高于  $10^{-4}$  的检测灵敏度<sup>[5-6]</sup>。但在后续应用中,4 色 FCM 的检测灵敏度在低细胞计数时仍难以保证。经利妥昔单抗治疗的 CLL 患者亦会低表达 CD20,与 CLL 特征性的弱表达 CD20 可能难以鉴别,对操作人员的解读要求较高。鉴于 3 色、4 色 FCM 的局限性,目前部分中心采用 6 色、8 色或 10 色 FCM,不仅可以达到  $\geq 10^{-4}$  的灵敏度,还可以将多种所需抗体同时放进单管中,准确性和可靠性更高,更适合经过多次治疗的 CLL 患者。当细胞总数为  $1.8 \times 10^6$  时,单管 10 色 FCM 的检测灵敏度可达  $10^{-5}$ <sup>[7]</sup>。

**基于 PCR 法的分子学检测** PCR 检测对细胞计数和解读方式的要求相对较低,但在引物设计上亦有其限制性。采用能结合到 *IGHV* 基因的保守区域的通用型引物的 PCR 在 MRD 检测中灵敏度仅能达到  $10^{-2}$ <sup>[6]</sup>。甚至在部分 *IGHV* 变异的 CLL 克隆上,由于通用型引物无法结合 *IGHV*,导致克隆扩增失败。目前常用的是采用等位基因特异性寡核苷酸(allele-specific oligonucleotide, ASO)探针的实时定量 PCR 检测,可以对异常克隆的 *IGHV* 基因进行测序,并设计 *IGHV* CDR3 区域特异性的 ASO 探针扩增异常 *IGHV* 基因,以及定量检测,其灵敏度可达  $10^{-5}$  程度<sup>[8]</sup>。所以 ASO-PCR 法相比 FCM 有灵敏度更高、更稳定可靠的优势,但同时它的操作更繁琐,价格也更高。

另有一种基于 PCR 法的分子学检测方法——高通量测序(high-throughput sequencing, HTS),

又称为下一代测序(next-generation sequencing, NGS)。目前 HTS 主要包括以下 3 种:(1)焦磷酸测序,即应用发光计量法检测当单个核苷酸在微乳液 PCR 中被添加到 DNA 模板时所释放的焦磷酸产物;(2)多元合成测序技术,即检测 DNA 小片段在重新合成时所释放的光信号;(3)离子半导体测序,即检测 DNA 聚合时所释放的氢离子。通过这些技术可以检测 B 细胞抗原受体(B cell receptor, BCR)重排和 T 细胞受体(T-cell receptor, TCR)基因<sup>[9-10]</sup>。在治疗前对患者的克隆型基线水平先进行测序,在治疗后用通用型引物对 *IGHV* 全片段进行扩增,再进行 HTS 检测,通过特定算法即可在多克隆背景下对异常克隆进行定量检测<sup>[9]</sup>,HTS 的检测灵敏度可达到  $10^{-5} \sim 10^{-6}$ ,操作方法相较于 ASO-PCR 也更简单<sup>[11]</sup>。但在应用 HTS 检测稀释标本的 MRD 时,约有 10% 的标本在第一步 PCR 扩增阶段即无法识别其克隆性重排<sup>[12]</sup>,而且 HTS 测得的 MRD 定量仅为近似值<sup>[13]</sup>。HTS 对操作技术要求较高,费用较贵,目前仅在移植后 CLL 患者的研究中有应用,尚未广泛开展。

**MRD 监测在 CLL 治疗中的应用** 起初研究者们仅在应用阿仑单抗(alemtuzumab)治疗 CLL 的一系列临床研究中监测 MRD,发现 MRD 阴性的 CLL 患者有更长的无治疗生存(treatment free survival)和总生存(overall survival, OS)<sup>[15-16]</sup>。2008 年,国际 CLL 工作组(iWCLL)在指南中提出 CLL 疗效评估中除了外周淋巴细胞计数、影像学检查、骨髓形态学检查之外,还应检测 MRD,并确定了  $\text{MRD} < 10^{-4}$  为 MRD 阴性<sup>[17]</sup>。随着 CLL 患者危险分层的完善和治疗方案的进步,进行 MRD 监测的意义也在更大范围内得到拓展。

**初治 CLL 患者** Böttcher 等<sup>[18]</sup>在德国 CLL 研究组(German CLL Study Group, GCLLSG)CLL8 研究中对 493 例随机进入 FC(氟达拉滨+环磷酰胺)或 FCR(氟达拉滨+环磷酰胺+利妥昔单抗)治疗组的初治 CLL 患者分别在初发分期、3 疗程后评估分期、末次疗程后 1 个月、末次疗程后 3 个月和此后每 3 个月随访一次,一共至少在 5 个时间点用 4 色 FCM 定量监测外周血 MRD;在末次疗程后 1 个月对达到完全缓解(complete remission, CR)的患者取骨髓测 MRD。研究发现不伴有 del(17p)和具有突变 *IGHV* 基因的患者测得的 MRD 定量值更低。MRD 阴性的患者 PFS 更长,低( $< 10^{-4}$ )、中( $\geq$

$10^{-4}$ 、 $<10^{-2}$ )、高( $\geq 10^{-2}$ )MRD3组的中位PFS分别为68.7、40.5和15.4个月。MRD是独立于患者基线特征和治疗方案的预后影响因素<sup>[18]</sup>。Kovacs等<sup>[19]</sup>进一步对CLL8和CLL10两项研究中的554位患者在末次疗程后1个月和3个月的外周血MRD进行分析,发现MRD阴性CR,MRD阴性部分缓解(partial remission, PR),MRD阳性CR和MRD阴性PR的患者,其中位PFS分别为61、54、35和21个月,其中MRD阴性CR和MRD阴性PR患者的PFS并无显著差异。研究中对351位同步完成骨髓MRD检测的患者进一步分析发现,外周血和骨髓MRD均为阴性的患者的PFS比仅有外周血MRD阴性、骨髓MRD阳性的患者长<sup>[19]</sup>。该研究对MRD阴性PR患者进一步分析,发现治疗后仍有淋巴结肿大的MRD阴性PR患者的PFS比MRD阴性CR患者显著缩短,但治疗后仍有脾大,骨髓形态学PR或仍有多灶累及的MRD阴性PR患者的PFS与MRD阴性CR患者并无显著差异<sup>[19]</sup>。所以MRD定量监测对经一线治疗后获得CR的患者具有判断预后的价值,但CLL累及多部位的特点使得其对PR患者的疗效评估仍存在难度。Kwok等<sup>[20]</sup>对536位经各线治疗至少达到PR的CLL患者在治疗结束时检测骨髓MRD,并进行10年随访,发现MRD阴性是PFS和OS的预后影响因素,独立于治疗方案和已知的具有预后意义的遗传分子学改变,将其对CLL疗效评估和预后意义从仅接受一线治疗的患者基础上进一步拓宽。

在探索MRD定量监测对CLL预后意义的同时,部分研究亦分析了诱导治疗期间的中期评估中MRD的意义。GCLLSG CLL8研究中493位患者均接受了6周期FC/FCR治疗,其中经3周期治疗后外周血达到MRD阴性的患者和经6周期治疗后外周血达到MRD阴性的患者的PFS并无差异<sup>[18]</sup>。Strati等<sup>[21]</sup>对初治CLL患者应用FCR方案治疗,分别有17%的患者在3周期后获得骨髓MRD阴性,43%的患者在6周期后获得骨髓MRD阴性。前者中有部分患者因治疗相关毒性停止了后续治疗,但这部分仅接受了3周期一线治疗的患者的PFS与3周期后达到骨髓MRD阴性且完成了6周期治疗的患者,以及3周期后骨髓MRD阳性但在6周期后达到骨髓MRD阴性的患者的PFS并无显著差异<sup>[21]</sup>。上述研究提示MRD阴性或可成为FC/FCR诱导治疗的治疗终点,但在新药时代仍需更多

临床研究协助验证MRD可替代传统的疾病进展或复发点,作为临床试验新的治疗终点。

除此之外,多个研究提出对经一线方案诱导治疗后未达到MRD阴性的患者加用阿仑单抗或利妥昔单抗作为巩固/维持治疗,可使部分CR患者进一步获得MRD阴性,这部分患者的临床反应持续有效期比MRD阳性的CR患者和MRD阴性但未接受巩固/维持治疗的患者更长。但与此同时,增加巩固/维持治疗后所带来的治疗风险如感染、骨髓毒性、继发肿瘤等发生率也相应增加<sup>[22]</sup>。由于CLL细胞原本就可导致正常免疫功能受损,增加感染、自身免疫紊乱和继发肿瘤的风险,所以如何在规避治疗不良反应和追求深度缓解之间寻得平衡仍值得进一步研究。在决定是否追加后续治疗时,除MRD之外,同时需结合提示预后不良的遗传分子学改变,以及患者年龄、治疗耐受性等多因素综合考量。在评价MRD定量监测用于评价巩固/维持治疗的意义时,PFS可能不再是最合适的研究终点,但MRD对于后续治疗的独立指导作用仍有待商榷。

**移植后CLL患者** 由于异基因造血干细胞移植(allogenic stem cell transplantation, allo-SCT)的目的是治愈疾病,其治疗深度往往大于普通化学免疫治疗,所以对CLL移植后患者的疾病监测要求更高。Logan等<sup>[10]</sup>对40名高危CLL患者在移植预处理前(d-12)和移植后1、3、6、9、12、18、24、30、36个月分别留取外周血的单个核细胞标本,应用IGH-ASO-PCR法和IGH-HTS法对共计403个标本检测MRD以进行回顾性分析。其中25名患者的174个样本同时应用两种方法检测,16个标本在ASO-PCR下为阴性,但在IGH-HTS下为阳性,这16个标本的疾病负荷大多 $<10^{-4}$ ,符合IGH-HTS具有更高检测深度的预期。在40名患者中有9名在不到12个月时即出现疾病复发,于是研究者们用IGH-HTS对其余31名患者在移植后12个月的MRD进行检测和分析,发现其中10名MRD阳性的患者中仅20%仍保持无疾病状态,而在MRD阴性的患者中,86%的人保持长期缓解;当对移植后9个月及更早的标本进行检测时发现,由于受到免疫抑制和植入动力学的影响,MRD定量检测十分困难;移植后9个月及以后的标本如检测到MRD $>10^{-6}$ 则提示有复发的风险。所以MRD可作为判断接受allo-SCT后CLL患者的预后指标。Logan等<sup>[14]</sup>还提出MRD倍增时间的概念,在20名复发患

者中 18 名的 MRD 倍增时间小于 12 个月,进一步佐证了移植后 12 个月可能是 allo-SCT 后 CLL 患者最有意义的监测点。而且 MRD 值波动多出现于 allo-SCT 后 12 个月内,12 个月后多数患者已脱离免疫抑制<sup>[2]</sup>,allo-SCT 后 12 个月 MRD 阴性患者有更好的无事件生存(event-free survival,EFS)<sup>[23]</sup>。

移植后 12 个月测得 MRD 阳性是否可作为预防复发的治疗干预指标则仍尚未明确<sup>[10]</sup>。在 GCLLSG CLL3X 研究中,对 52 名 allo-SCT 后 CLL 患者进行移植后 MRD 监测,27 名在 12 个月时为 MRD 阴性的患者中仅 2 名出现复发,1 名为非复发相关死亡。同时对 6 名 MRD 阳性的患者进行预防性供体淋巴细胞输注,仅 3 人获得 MRD 阴性的 CR,尚不足以证明 MRD 指导的预防性治疗是否有意义。针对 MRD 的移植后干预治疗的大样本研究目前较少,MRD 或可协助判断 CLL 移植后患者的预后,其对移植后患者治疗的指导意义仍待探究。

**结语** 在过去的十几年里,CLL 的治疗目标已发生了巨大转变,不再仅满足于传统意义的 CR,更要求达到深度缓解,尤其是对可以耐受一线治疗的患者。MRD 监测在血液恶性肿瘤中早已不陌生,但 CLL 累及多部位的特点和预后异质性导致临床分期不平行于 MRD,使其应用和推广仍存在困难。目前多色 FCM 和 ASO RQ-PCR 是检测 MRD 较为主流的方法,随着检测技术发展和检测灵敏度提高,将来 MRD 阴性的标准可能进一步降低。由于移植后患者的特殊性,更高灵敏度的 MRD 检测方法如 HTS 更具应用价值,移植后第 12 个月是应用 MRD 监测疾病复发的首选时间点,但针对 MRD 阳性患者进行早期干预的意义尚未明确。诱导治疗中期 MRD 评估阴性或可缩短接受一线方案治疗的 CLL 患者治疗疗程,以减轻治疗不良反应。对诱导治疗后 MRD 持续阳性的 CLL 患者,需结合分子遗传学异常等指标探索合适的巩固/维持治疗方案以达到深度缓解和不良反应之间的平衡,并且随访 MRD 在治疗过程中的变化趋势。

## 参 考 文 献

- [1] ROBINSON HR, QI J, COOK EM, *et al.* A CD19/CD3 bispecific antibody for effective immunotherapy of chronic lymphocytic leukemia in the ibrutinib era[J]. *Blood*, 2018, 132(5):521-532.
- [2] THOMPSON PA, WIERDA WG. Eliminating minimal residual disease as a therapeutic end point: working toward cure for patients with CLL[J]. *Blood*, 2016, 127(3):279-286.
- [3] ROBERTSON LE, HUH YO, BUTLER JJ, *et al.* Response assessment in chronic lymphocytic leukemia after fludarabine plus prednisone: clinical, pathologic, immunophenotypic, and molecular analysis[J]. *Blood*, 1992, 80(1):29-36.
- [4] LENORMAND B, BIZET M, FRUCHART C, *et al.* Residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients and prognostic value[J]. *Leukemia*, 1994, 8(6):1019-1026.
- [5] RAWSTRON AC, VILLAMOR N, RITGEN M, *et al.* International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia[J]. *Leukemia*, 2007, 21(5):956-964.
- [6] RAWSTRON AC, KENNEDY B, EVANS PA, *et al.* Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy[J]. *Blood*, 2001, 98(1):29-35.
- [7] SARTOR MM, GOTTLIEB DJ. A single tube 10-color flow cytometry assay optimizes detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2013, 84(2):96-103.
- [8] BOTTCHER S, HALLEK M, RITGEN M, *et al.* The role of minimal residual disease measurements in the therapy for CLL: is it ready for prime time? [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2013, 27(2):267-288.
- [9] FAHAM M, ZHENG J, MOORHEAD M, *et al.* Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 2012, 120(26):5173-5180.
- [10] LOGAN AC, ZHANG B, NARASIMHAN B, *et al.* Minimal residual disease quantification using consensus primers and high-throughput IGH sequencing predicts post-transplant relapse in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Leukemia*, 2013, 27(8):1659-1665.
- [11] PUIG N, SARASQUETE ME, BALANZATEGUI A, *et al.* Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry[J]. *Leukemia*, 2014, 28(2):391-397.
- [12] MARTINEZ-LOPEZ J, LAHUERTA JJ, PEPIN F, *et al.* Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2014, 123(20):3073-3079.
- [13] VAN DONGEN JJ, LANGERAK AW, BRUGGEMANN M, *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations; report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936[J]. *Leukemia*, 2003, 17(12):2257-2317.
- [14] LOGAN AC, GAO H, WANG C, *et al.* High-throughput VDJ sequencing for quantification of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia and immune reconstitution assessment[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(52):21194-21199.