

CD38 表达对非 M3 型急性髓系白血病疾病进展和预后的意义

卢业健¹, 邱兰兰², 王莉莉¹

¹解放军总医院 血液科, 北京 100853; ²北京市世纪坛医院 血液科, 北京 100038

摘要: 目的 探讨 CD38 在非 M3 型急性髓系白血病中的表达及其对预后意义。方法 选取 2011 年 1 月 - 2015 年 12 月在解放军总医院就诊的原发性急性髓系白血病患者共 123 例, 使用流式细胞术检测患者骨髓样本中白血病细胞 CD38 的表达强度并分为 CD38⁺ 组和 CD38⁻ 组, 其中 CD38⁺ 组男性 52 例, 女性 43 例, 中位年龄 42 岁; CD38⁻ 组男性 21 例, 女性 7 例, 中位年龄 47.5 岁; 回顾性分析两组患者的临床特点和预后转归。结果 CD38⁻ 患者较 CD38⁺ 患者遗传学分层差 (35.7% vs 21.1%, $P=0.02$), 诱导缓解率低 (60.7% vs 84.2%, $P=0.01$), 3 年无事件生存率低 (24.9% vs 36.8%, $P=0.05$), 5 年总生存率低 (27.2% vs 36.2%, $P=0.01$); 多因素分析显示 CD38⁻ 为独立的预后不良因素 ($HR=1.7$, $P=0.048$)。在 CD38⁺ 和 CD38⁻ 队列中, 异基因造血干细胞移植患者的 5 年总生存率均优于未移植者 (48.8% vs 26.0%, $P=0.006$; 53.3% vs 7.9%, $P=0.02$)。随访中 CD38⁺ 转变为 CD38⁻ 提示疾病进展。结论 CD38 表达减弱是非 M3 型急性髓系白血病疾病进展和预后不良的标志, 移植治疗有望改善 CD38⁻ 患者的预后。

关键词: 急性髓系白血病; 白细胞分化抗原 38; 预后

中图分类号: R 733.712 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2017)09-0810-05 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2017.09.002

网络出版时间: 2017-05-23 10:49

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20170523.1049.002.html>

Significance of CD38 in disease progression and prognosis of non-M3 acute myeloid leukemia

LU Yejian¹, QIU Lanlan², WANG Lili¹

¹Department of Hematology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ²Department of Hematology, Beijing Shijitan Hospital of Capital Medical University, Beijing 100038, China

Corresponding author: WANG Lili. Email: daughter126@126.com

Abstract: Objective To investigate the expression of CD38 in non-M3 acute myeloid leukemia and its prognostic significance. **Methods** One hundred and twenty-three patients with non-M3 subtype of primary acute myeloid leukemia were enrolled in Chinese PLA General Hospital from January 2011 to December 2015. The expression level of CD38 on leukemic cells was detected by flow cytometry, and the patients were then divided into CD38⁺ group and CD38⁻ group. There were 52 males and 43 females with a median age of 42 years in CD38⁺ group, and 21 males and 7 females with a median age of 47.5 years in CD38⁻ group. The clinical characteristics and the survival status were analyzed between these two cohorts retrospectively. **Results** Patients in CD38⁻ group were associated with poorer risk stratification status (35.7% vs 21.1%, $P=0.02$), lower complete remission rate (60.7% vs 84.2%, $P=0.01$), lower 3-year EFS (24.9% vs 36.8%, $P=0.05$) and 5-year OS (27.2% vs 36.2%, $P=0.01$) when compared with CD38⁺ group. Multivariate analysis also demonstrated that CD38⁻ could be an independent poor prognostic predicting factor ($HR=1.7$, $P=0.048$). The 5-year OS rates of patients receiving allogeneic stem cell transplantation were superior to those in the patients not receiving transplantation in both CD38⁺ and CD38⁻ cohorts (48.8% vs 26.0%, $P=0.006$; 53.3% vs 7.9%, $P=0.02$). During the follow-up, the transformation of CD38⁺ to CD38⁻ on the myeloid leukemia cells suggested disease progression. **Conclusion** The decreased expression of CD38 can be served as a predictor suggesting disease progression and poor prognosis in non-M3 acute myeloid leukemia. Allogeneic stem cell transplantation may improve the poor outcome of CD38⁻ patients.

Keywords: acute myeloid leukemia; CD38; prognosis

急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一组具有不同遗传学背景的血液系统恶性疾病,

虽然通过常规化疗、去甲基化治疗、免疫治疗和造血干细胞移植等方法可以显著提高 AML 患者的生存时间, 但大多数患者仍旧无法逃避疾病复发的命运, 患者的 5 年生存率仅为 40% 左右^[1-2]。因此, 研究 AML 的发病机制、预后指标和新的靶向药物仍然具有非常重要的临床意义。CD38 是正常造血细胞或白血病细胞表面常见的一个分子量为 45 kU 的跨膜糖蛋白, 具有酶促活性, 能够调控 Ca²⁺ 的流动并影响细胞内多个信号通路, 也可作为受体或黏附因子调节细胞的增殖、凋亡和其他新

收稿日期: 2017-04-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81370636; 81170517; 30973394); 北京市自然科学基金面上项目 (7102142)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81370636; 81170517; 30973394); Beijing Natural Science Foundation of China (7102142)

作者简介: 卢业健, 男, 在读硕士。研究方向: 血液系统肿瘤的免疫逃逸机制。Email: abc6606288@163.com

通信作者: 王莉莉, 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 解放军总医院血液科实验室主任。Email: daughter126@126.com

陈代谢活动^[3-5]。关于 CD38 在血液肿瘤中的作用机制和对预后的意义研究早有报道,在慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) 中, CD38 可以协同 B 细胞受体通过促进 CLL 细胞向次级淋巴器官迁移和归巢以增强细胞增殖,从而促进 CLL 的发生;也可产生免疫耐受原从而抑制抗肿瘤免疫应答,使肿瘤细胞获得增殖优势,其高表达是 CLL 患者的一个独立预后不良因素^[6-8]。但是,关于 CD38 在 AML 中的作用机制和其对预后的意义研究仍然较少。Keyhani 等^[9]认为在原发急性髓系白血病中, CD38 表达增强与患者的良好预后生存相关。但是由于该研究综合讨论了包括 AML-M3 在内的所有亚型患者,而 CD38 在 AML-M3 中的表达具有明显差异,且 AML-M3 患者的治疗方案和疾病结局不同于其他亚型 AML 患者, CD38 对非 AML-M3 患者的预后意义尚不明了。因此,本研究旨在探讨非 M3 型 AML 患者中 CD38 的表达差异及其临床价值。

对象和方法

1 研究对象 纳入 2011 年 1 月 - 2015 年 12 月在解放军总医院血液科就诊的 123 例原发 AML 患者 (M3 型除外),其中男性 73 例,女性 50 例,中位发病年龄 43(33 ~ 53) 岁,中位随访时间 34.5(27 ~ 49) 个月。所有患者均按照 WHO 标准 (morphology, immunology, cytogenetics, molecular, MICM) 进行诊断,其中形态学 (morphology) 分型参照法美英 (French、Ameirican、Britain, FAB) 白血病形态学协作组根据骨髓和外周血细胞形态制订的标准分为 M0-M7 亚型。根据 CD38 表达强度将患者分为 CD38⁺ 组 (> 80% 原幼细胞表达 CD38) 和 CD38⁻ 组 (> 20% 原幼细胞不表达 CD38),其中 CD38⁺ 组男性 52 例,女性 43 例,中位年龄 42.0 岁; CD38⁻ 组男性 21 例,女性 7 例,中位年龄 47.5 岁。

2 样本采集 在患者初治时、诱导化疗结束后以及随访过程中,选取髂后上棘合适部位进行骨髓穿刺,抽取 2 ml 骨髓液注入预先准备好的混有肝素抗凝的试管或者培养瓶内,迅速送检进行免疫表型和基因核型分析。

3 流式细胞术分析 参照每 2×10^5 个细胞加入 10 μ l 抗体的标准,使用多种嵌合荧光标记物的单克隆抗体 (Beckman Coulter, 美国) 标记每个骨髓样品,避光孵育 30 min,随后使用红细胞裂解液排除成熟的红细胞,并用 PBS 缓冲液洗涤两次,最后使用 FC500 流式细胞仪 (Beckman Coulter,

Fullerton, CA) 检测样品并通过 CXP 软件进行分析。采集条件设置为每个样本至少收集 1×10^5 个细胞。FSC/SSC (前向散射 / 侧向散射) 门控用于排除细胞碎片; CD45/SSC 门控用于识别白血病细胞 (CD45^{dim} vs SSC^{low}),并在每个细胞群中计算白血病相关免疫表型。

4 基因与染色体核型分析 通过从骨髓单核细胞中提取 RNA 并进行逆转录获得互补 DNA,随后使用针对 FLT3-ITD、CEBPA 和 NPM1 等基因的引物进行扩增,进行 qRT-PCR 评估 AML 相关的基因突变状态。参照《人类细胞遗传学国际命名体制》(2009 版),对来自骨髓标本的短期培养物进行诊断性核型分析,至少分析 20 个分裂中期细胞以排除克隆异常。上述检测结果主要参照美国国立综合癌症网络发布的《急性髓系白血病指南 (2016 版)》进行遗传学危险度分层: 1) 良好遗传学分层主要包括 inv(16)、t(16; 16)、t(8; 21) 等异常染色体核型,以及在正常核型前提下,CEBPA 双等位基因突变和无 FLT3-ITD 异常的 NPM1 突变; 2) 中等遗传学分层主要包括正常染色体核型、t(9; 11) 易位和其他未定义的异常染色体核型; 3) 不良遗传学分层主要包括复杂染色体核型、单倍体核型、-5、-7 和 t(6; 9) 等异常染色体核型以及 FLT3-ITD 基因突变。

5 研究方法 根据流式细胞术检测 CD38 的结果将患者分为 CD38⁺ 组和 CD38⁻ 组,分析两组患者的一般特征、遗传学危险度分层、治疗反应和生存状况,探讨 CD38 表达强度对患者预后的影响。

6 统计学分析 使用 SPSS17.0 软件进行数据分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验;非正态分布的计量资料用中位数 (M) 及四分位数 (P₂₅, P₇₅) 表示,组间比较采用秩和检验;计数资料以率 (%) 表示,组间比较采用 χ^2 检验;Kaplan-Meier 生存曲线分析无事件生存时间 (event-free survival, EFS) 和总生存时间 (overall survival, OS),采用 Log-rank 法进行单因素分析;通过 COX 回归模型进行危险因素分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结果

1 两组一般特征比较 CD38⁺ 组和 CD38⁻ 组年龄、白细胞数、血小板、血红蛋白、性别构成和 FAB 分型差异无统计学意义 (*P* > 0.05),但是后者的遗传学危险度分层较差 (21.1% vs 35.7%, *P*=0.02) 且诱导缓解率较低 (84.2% vs 60.7%, *P*=0.01);

两组患者接受异基因造血干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Allo-SCT) 的比例分别为 53.7% 和 32.1%, 差异有统计学意义 ($P=0.05$)。见表 1。

表 1 两组非 M3 型 AML 患者的一般特征比较
Tab. 1 General characteristics of patients with non-M3 AML in two groups

	CD38 ⁺ (n=95)	CD38 ⁻ (n=28)	<i>P</i>
Age (yrs, <i>Med</i>)	42(33,52)	47.5(33,59)	0.29
WBC ($10^9/L$)	38.1 ± 64.1	30.5 ± 44.7	0.95
PLT ($10^9/L$)	65.2 ± 71.6	73.4 ± 74.1	0.66
Hb (g/L)	85.0 ± 24.2	89.7 ± 28.3	0.47
Gender (n,%)			0.06
Male	52(54.7)	21(75.0)	
Female	43(45.3)	7(25.0)	
Subtype (n,%)			0.56
M2	39(41.1)	8(28.6)	
M4	23(24.2)	10(35.7)	
M5	28(29.5)	8(28.6)	
M0/M1/M6	5(5.2)	2(7.1)	
Risk status (n, %)			0.02
Fav+inter	90(78.9)	18(64.3)	
Poor	15(21.1)	10(35.7)	
Allo-SCT (n,%)	51(53.7)	9(32.1)	0.05
CR (n,%)	80(84.2)	17(60.7)	0.01

Fav+inter: favorable+intermediate

2 两组预后 随访过程中, 剔除 7 例服用中药的患者, 余下 116 例患者接受常规巩固维持治疗或者异基因造血干细胞移植治疗, 其中 CD38⁺ 组 89 例, CD38⁻ 组 27 例。CD38⁻ 组较 CD38⁺ 组的 3 年 EFS 低 (24.9% vs 36.8%, $P=0.05$), 5 年 OS 低 (27.2% vs 36.2%, $P=0.01$)。见图 1。

3 两组异基因造血干细胞移植与预后比较 CD38⁺ 组移植 51 例, 未移植 38 例; CD38⁻ 组移植 9 例, 未移植 18 例。CD38⁺ 组中移植患者的 5 年 OS 优于未移植患者 (48.8% vs 26.0%, $P=0.006$); CD38⁻ 组中移植患者的 5 年 OS 优于未移植患者 (53.3% vs 7.9%, $P=0.02$)。但在接受移植的前提下, CD38⁻ 组与 CD38⁺ 组的 5 年 OS 没有统计学差异 (53.3% vs 48.8%, $P=0.55$); 在未接受移植的前提下, CD38⁻ 组较 CD38⁺ 组的 5 年 OS 低 (7.9% vs 26.0%, $P=0.02$)。见图 2。

4 CD38 表达与病情进展 在后续监测过程中, CD38 表达强度并未随疾病缓解而增强或者减弱。但在部分早期复发的 CD38⁺ 患者中可出现 CD38 表达降低甚至阴性的现象, 该部分患者无论是接受原方案还是其他方案再诱导治疗, 都未能获得再次缓解 (0/6), 而其他 CD38⁺ 复发患者中, 仍可有 31.4%(11/35) 的概率获得二次缓解。

5 单因素和多因素死亡危险因素分析 在单因素

表 2 AML 患者死亡危险因素单因素和多因素分析

Tab. 2 Univariate and multivariate analysis of risk factors of mortality in AML patients

Factors	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	<i>P</i>	HR (95% CI)	<i>P</i>
WBC ($< 50 \times 10^9/L$ vs $\geq 50 \times 10^9/L$)	0.8(0.4-1.6)	0.510		
Age (< 60 years vs ≥ 60 years)	1.7(0.9-3.1)	0.090	0.7(0.4-1.4)	0.350
Risk status (fav+inter vs poor)	2.2(1.3-3.8)	0.003	1.9(1.1-3.4)	0.020
Phenotype (CD38 ⁺ vs CD38 ⁻)	2.1(1.2-3.7)	0.006	1.7(0.9-2.9)	0.048
Allo-SCT (yes vs no)	3.2(1.9-5.4)	0.001	3.2(1.8-5.7)	0.001

Fav+inter: favorable+intermediate; HR: hazard rate

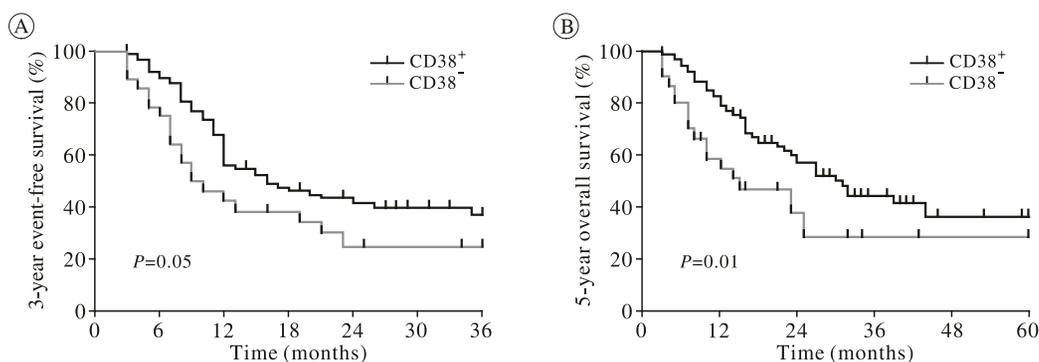


图 1 AML 患者中 CD38 表达与 3 年 EFS (A) 和 5 年 OS (B)

Fig.1 Kaplan-Meier survival curves for 3-year EFS (A) and 5-year OS (B) in AML patients in two groups

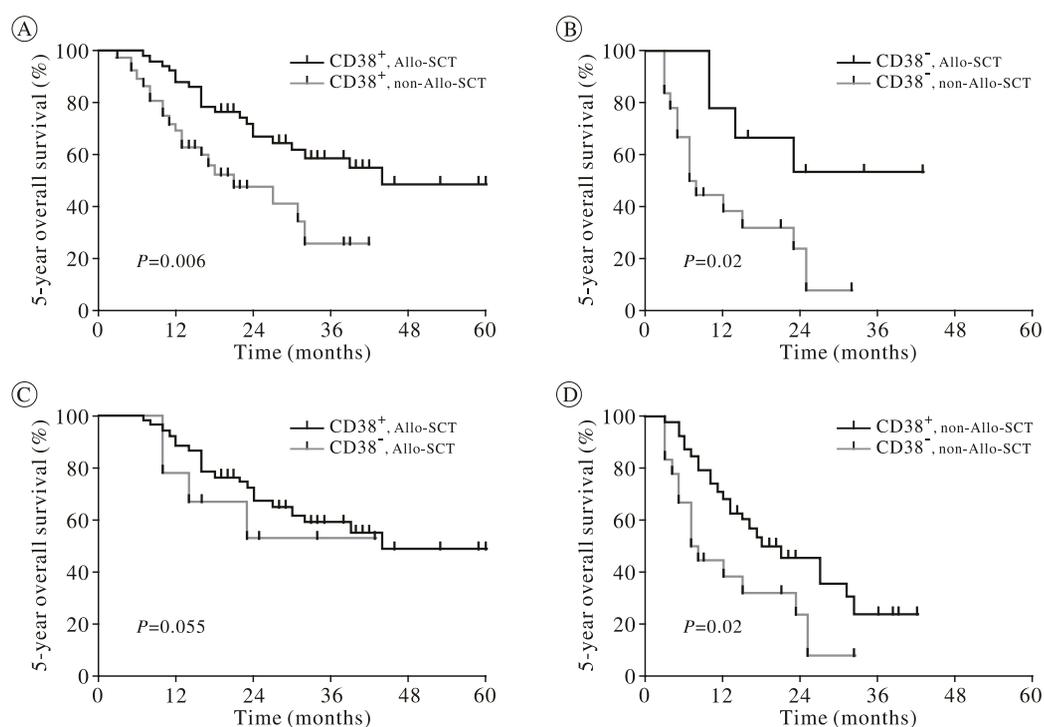


图 2 两组造血干细胞移植与预后比较:CD38⁺组(A)、CD38⁻组(B)、移植组(C)和未移植组(D)
Fig.2 Five-year overall survival curves for AML patients by CD38 expression and Allo-SCT: CD38⁺ group (A), CD38⁻ group (B), Allo-SCT group (C) and non-Allo-SCT group (D)

分析中,不良遗传学危险度分层和 CD38⁻免疫表型是影响患者死亡风险的因素,高龄(≥ 60 岁)虽然是公认的危险因素,但是在本队列中并未体现出统计学差异($HR=1.7, P=0.09$)。而移植作为强化治疗手段,能够显著改善患者的生存时间($HR=3.2, P=0.001$)。在多因素分析中,不良遗传学危险度分层、CD38⁻表型和未移植的 HR 分别为 1.9、1.7 和 3.2,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。见表 2。

讨论

急性髓系白血病是一组异质性较大的恶性血液病,近年来虽然基因检测和染色体核型分析等遗传学手段为疾病的预后分层提供了有力的依据,但是现有的遗传学分层体系仍无法对此类患者进行精准的预后评估^[10]。既往有研究显示,一些肿瘤细胞的表面抗原的表达增强或减弱与血液肿瘤的预后相关^[11-14]。这些发现为肿瘤的预后分层提供了新的思路。

早期研究发现,CD38 的表达可能与 AML 的预后相关。Keyhani 等^[9]研究了 304 例 AML 患者幼稚细胞的 CD38 表达,发现 CD38 的表达增高与预后良好相关(OS 延长),但并未发现 CD38 的表达高低与细胞遗传学预后分组、CR 率或疾病的进展复发有相关性;而且其研究中包括了 AML-

M3 亚型的患者,该亚型与其他亚型白血病的治疗方案和病情转归有着明显差异,因而有可能导致整体研究结果的偏倚。其他一些研究结果也提示,CD34 阳性联合 CD38 表达减弱,可能是白血病干细胞表型之一,该类型白血病细胞的分化可能阻滞在更原始阶段,并与疾病耐药或预后不良相关^[15-18],进一步的分子机制研究将有助于揭示 CD38 在 AML 发生发展中的作用,并为改善预后评估体系提供有价值的新线索。

本研究结果显示,CD38⁻组具有更差的遗传学特征和治疗反应,更短的无事件生存时间和总生存时间;在疾病复发进展过程中,部分患者的白血病幼稚细胞 CD38 的表达减弱甚至转变为阴性;多因素分析也进一步证明 CD38⁻可以作为 AML 的一个独立的预后不良因素。这些结果提示了 CD38 表达减弱与非 M3 型 AML 的预后不良有关。

本研究结果还显示,异基因造血干细胞移植不但可以改善 CD38⁺组患者的预后,亦可明显延长 CD38⁻组患者的生存时间。该结果提示对于预后不良的 CD38⁻组患者,应当结合遗传学等其他预后分层标志制订个体化治疗策略,尽早选择移植治疗,从而改善患者预后。

综上所述,我们的研究发现 AML 细胞 CD38 减弱与遗传学预后不良有一定的相关性,白血病

细胞由 CD38⁺ 转变为 CD38⁻ 可能提示疾病的进展和复发。CD38 免疫表型在 AML 中有望作为一个独立预后因素, 为进一步完善疾病的预后分层体系提供有力的依据。

参考文献

- 1 Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373 (12): 1136–1152.
- 2 Khaled S, Al Malki M, Marcucci G. Acute Myeloid Leukemia : Biologic, Prognostic, and Therapeutic Insights [J]. *Oncology (Williston Park, NY)*, 2016, 30 (4): 318–329.
- 3 Mehta K, Shahid U, Malavasi F. Human CD38, a cell–surface protein with multiple functions [J]. *FASEB J*, 1996, 10 (12): 1408–1417.
- 4 Deaglio S, Mehta K, Malavasi F. Human CD38 : a (r) evolutionary story of enzymes and receptors [J]. *Leuk Res*, 2001, 25 (1): 1–12.
- 5 Konopleva M, Estrov Z, Zhao S, et al. Ligation of cell surface CD38 protein with agonistic monoclonal antibody induces a cell growth signal in myeloid leukemia cells [J]. *J Immunol*, 1998, 161 (9): 4702–4708.
- 6 Burgler S. Role of CD38 Expression in Diagnosis and Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia and Its Potential as Therapeutic Target [J]. *Crit Rev Immunol*, 2015, 35 (5): 417–432.
- 7 Nipp RD, Volkheimer AD, Davis ED, et al. CD38 variation as a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55 (1): 191–194.
- 8 Brachtl G, Piñón Hofbauer J, Greil R, et al. The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Ann Hematol*, 2014, 93 (3): 361–374.
- 9 Keyhani A, Huh YO, Jendiroba D, et al. Increased CD38 expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia [J]. *Leuk Res*, 2000, 24 (2): 153–159.
- 10 Estey E. Acute myeloid leukemia : 2016 Update on risk–stratification and management [J]. *Am J Hematol*, 2016, 91 (8): 824–846.
- 11 Cario G, Rhein P, Mitlöhner R, et al. High CD45 surface expression determines relapse risk in children with precursor B–cell and T–cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL–BFM 2000 protocol [J]. *Haematologica*, 2014, 99 (1): 103–110.
- 12 Wang L, Wang H, Li PF, et al. CD38 expression predicts poor prognosis and might be a potential therapy target in extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type [J]. *Ann Hematol*, 2015, 94 (8): 1381–1388.
- 13 Guo RJ, Atenafu EG, Schimmer AD, et al. Expression of CD4 is correlated with an unfavorable prognosis in wild–type NPM1, FLT3–ITD–negative cytogenetically normal adult acute myeloid leukemia [J/OL]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijlh.12649/abstract>; jsessionid=A1A7F60E938DD5ABE44D2609050E8718.f02t03.
- 14 王会芳, 苏显都, 于彩霞, 等. 125 例成人急性髓系白血病免疫表型特点分析 [J]. *解放军医学院学报*, 2015, 36 (4): 363–367.
- 15 Vergez F, Green AS, Tamburini J, et al. High levels of CD34+CD38low/–CD123+ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia : a Groupe Ouest–Est des Leucémies Aigues et Maladies du Sang (GOELAMS) study [J]. *Haematologica*, 2011, 96 (12): 1792–1798.
- 16 Terwijn M, Zeijlemaker W, Kelder A, et al. Leukemic stem cell frequency : a strong biomarker for clinical outcome in acute myeloid leukemia [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (9): e107587.
- 17 Kersten B, Valkering M, Wouters R, et al. CD45RA, a specific marker for leukaemia stem cell sub–populations in acute myeloid leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2016, 173 (2): 219–235.
- 18 Won EJ, Kim HR, Park RY, et al. Direct confirmation of quiescence of CD34 CD38– leukemia stem cell populations using single cell culture, their molecular signature and clinicopathological implications [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15 (1): 1–11.