

急性髓系白血病微小残留病监测方式的展望

陈 冰, 睦净旋

(上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海血液学研究所, 上海 200025)

关键词: 急性髓系白血病; 微小残留病灶; 多参数流式细胞术; 实时定量聚合酶链反应; 二代测序

中图分类号: R733.7 文献标识码: A 文章编号: 1671-2870(2017)01-0017-10

DOI: 10.16150/j.1671-2870.2017.01.005

在我国人群的肿瘤疾病发生谱中,白血病的发病率为 (4~5)/10 万,死亡率在恶性肿瘤占第六位(男)和第八位(女),在儿童及 35 岁以下成人中居第一位,是威胁我国人群健康的一类重大疾病。其中,急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一种以异常髓系原始幼稚细胞大量增殖、使骨髓正常造血受抑为主要特征的血液系统恶性克隆性疾病。随着检测手段的进步和化疗方案的不断完善,成人 AML 患者的完全缓解率达到了 50%~80% 不等^[1],但有 40%~65% 的患者仍然会复发^[2-4],5 年生存率也只能达到 30%~40%^[5]。白血病缓解后复发这一难题依然困扰着患者和医务人员。

二十世纪八、九十年代,微小残留病 (minimal residual disease, MRD) 的概念被提出,认为在达到传统形态学定义中的血液学完全缓解后,患者骨髓、外周血或其他髓外组织中仍然存在着少量的白血病细胞,即 MRD^[6],这也解释了大部分获得完全缓解的患者仍会在数年内复发的原因。作为治疗效果的直接反映,MRD 在病情评价和预后评估中起着重要作用。灵敏、有效的 MRD 监测成为 AML 临床治疗中重要的一环。

AML 的骨髓 MRD 监测技术及应用

目前,检测 MRD 的实验室技术手段主要有传统光学显微镜细胞形态学检查、荧光原位杂交、多参数流式细胞术 (multiparameter flow cytometry, MFC)、荧光实时定量聚合酶链反应 (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 和二代测序 (next-generation sequencing, NGS), 其中具有足够灵敏度

和特异度、临床应用最广泛的检测手段为 MFC 和荧光实时 qPCR。

一、MFC

流式细胞术是一种利用细胞物理特性 (细胞大小和胞内颗粒) 及细胞特异性免疫标志物的数量进行快速定量分析的技术。在血液学领域,流式细胞术对血液疾病诊断、白血病细胞骨髓细胞形态学-免疫学-细胞遗传学-分子生物学 (morphology-immunology-cytogenetics-molecular, MICM) 分型、MRD 监测、造血干细胞移植、细胞分选、干细胞研究、细胞增殖及凋亡研究等均起着重要作用。

随着骨髓造血干细胞逐步分化发育,血细胞表面或细胞质内依次出现不同的抗原表达。通过检测这些抗原的种类和数量可以确定所检测血细胞的种类和分化程度。在白血病细胞上,抗原的表达模式与正常细胞不同,这些异常的抗原表达称为白血病相关免疫表型 (leukemia-associated immunophenotypes, LAIPs)。MFC 以 LAIPs 为基础,利用白血病细胞的抗原表达特点定量追踪检测异常骨髓细胞,灵敏度远高于传统的显微镜下形态学检查。

LAIPs 主要可以分为 4 类: ①抗原非同步表达,即不同成熟阶段的抗原同时表达,如髓系原始细胞标志 CD117 和较成熟阶段的 CD11b 共表达; ②抗原的跨系表达,即非髓系细胞相关抗原表达在髓系细胞上,如髓系细胞上出现淋系标志 CD7、CD56、CD19、CD2、CD5 等; ③正常抗原表达强度改变,如白血病原始细胞上 CD13 表达增强,HLA-DR 表达减弱; ④抗原表达缺失,如在 CD34⁺CD117⁺细胞上本应表达 CD38 而 AML 细胞则可以不表达^[7]。约 80% 的 AML 病例中存在可检测的 LAIPs^[8],也有文献报道高达 95% AML 者可检出 LAIPs^[9-10],故 MFC 的适应性较广,可以应用于绝大多数的 AML 患者。

对于 10%~20% 无 LAIPs 的 AML 患者,可用

基金项目: 国家自然科学基金 (81470311, 81670137); 上海交通大学医学院高峰高原计划——“临床专研队伍”项目 (20152501)

通讯作者: 陈冰 E-mail: chenbing.rjsih@yahoo.com

“不同于正常”(different-from-normal approach)的分析方法来替代 LAIPs 进行 MRD 的相关研究^[1]。“不同于正常”法认为 AML 细胞抗原表达模式与正常骨髓细胞不同,因而在进行流式细胞术分析时,出现在正常细胞不应出现的抗原图像区域内的细胞群体就是 AML 细胞。不同于传统 LAIPs 法,这种方法不限于初诊时获取的 LAIPs 信息,而是每次都以标准的抗体方案去检测与正常血细胞分化不同的细胞群。这种方法的运用使得部分无可利用 LAIPs 或者无初发免疫表型信息患者的 MRD 也能用流式细胞术加以检测。

在灵敏度方面,MFC 检测 MRD 的灵敏度值取决于 AML 细胞免疫表型与正常骨髓中各分化阶段细胞免疫表型的差异程度。从这方面来说,具有更高特异性的白血病相关抗原的发现能进一步提高 MFC 检测的灵敏度。从方法学上来说,MFC 的灵敏度也受获取细胞总数和认定 MRD 群体所需最少细胞数的影响。假设确定一个阳性白血病细胞群体至少需要 20 个细胞,理论上至少获取 20 万个细胞才能达到 10^{-4} 的灵敏度。要达到 10^{-5} 的灵敏度,则至少需要 200 万个细胞。由于正常骨髓或重建骨髓中 LAIPs 类似表型的存在,实际上所需要的总细胞数可能更高。最近,Zeijlemaker 等^[12]设计了 1 组在 8 色流式细胞仪上同时检测 15 个抗原的抗体组合,这种单管即可追踪 MRD 的方法可将实验所需的骨髓细胞数减至最少。目前,对于急性淋巴细胞白血病来说,MFC 检测的特异度可达到 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 。在 AML 患者中,MFC 检测 MRD 的灵敏度可维持在 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 水平^[13-15]。对于某些表型特殊的 AML,其灵敏度能达到更高的水平。

在儿童或成人 AML 中,MFC 监测的 MRD 的预后价值已得到大量研究的证实,治疗后 MRD 阳性预示着更短的无复发生存期和总生存期。这些文献报道中,所选择的监测 MRD 的时间点和划分阴阳性的阈值不尽相同。

目前,MRD 研究中普遍应用的时间点主要包括诱导缓解治疗后或和巩固化疗完成后^[5,16]。在这 2 个时间点,同时纳入年龄、诊断时白细胞计数、遗传-分子异常等进行多因素分析,MFC 检测 MRD 结果仍具有独立预后价值^[10,17-21]。Buccisano 等^[15]指出,约有 30% 的诱导化疗后 MRD 阳性的患者在巩固化疗完成后 MRD 转阴,这部分患者在临床结果上与诱导化疗后 MRD 阴性者间无统计学差异,因此,监测巩固治疗完成后的 MRD 可能更有预后意义。从

指导治疗方面来说,监测诱导治疗完成后的 MRD 有利于临床治疗方案的及时调整,也有一定的临床价值,这点在 Terwijn 等^[5]的研究中得到了证实。

此外,有些研究关注治疗早期的 MRD,提出早期 MRD 就有提示预后的作用。Langebrake 等^[22]分析了患者诱导治疗后第 15 天、第 29 天、第 60 天、第 96 天的 MRD 数据,发现早期时间点(第 15 天、第 29 天)MRD 就开始具有预后意义。Kohnke 等^[18]也报道,在化疗后的骨髓抑制期,即诱导缓解化疗开始后的 16~18 d,测定的 MRD 具有预后价值。

在不同研究中,AML 病例所采用的 MRD 阴、阳性阈值也不同,基本介于 0.035%~1.000% 间^[5,11,15,18,20,23-25]。0.1%是目前应用最广的阈值^[5,16,25-26],诱导或巩固治疗后,骨髓 MRD 大于 0.1%组和小于 0.1%组的无复发生存期、总生存期具有显著差异。除此之外,也有其他阈值见报道。Al-Mawali 等^[20]运用受试者工作特征曲线分析回顾了 54 例 AML 患者资料,结果显示,无论在诱导治疗或巩固治疗后,将 0.15%作为阈值具有最优的灵敏度和特异度。而 Buccisano 等^[27-28]则通过 Maximally selected log-rank statistic 分析得到 0.035%是最有意义的结论。有文献称,不同阈值有不同程度的预后价值^[29-31]。也有部分研究在不同的时间点应用不同的阈值^[5,10,32],如 Freeman 等^[33]提出应依据不同的 LAIPs 定义不同阈值。

二、荧光实时 qPCR(以下简称 qPCR)

在具有染色体重排、基因突变和基因过表达的白血病患者中,qPCR 可用于 MRD 的监测。一方面,其具有高灵敏度,可达 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 水平^[34-35],高出 MFC 一个对数数量级。同时,相较于 MFC,qPCR 的检测过程更易标准化。这些优势使 qPCR 具有一定吸引力。目前,可用 qPCR 检测 MRD 的分子异常包括融合基因、基因突变和基因过表达三类。

1. 融合基因:在具有染色体重排的白血病患者中,可对染色体易位产生的融合基因转录本进行 MRD 监测。2003 年,欧洲抗癌计划建立起融合基因 qPCR 的通用步骤准则,将方法学过程标准化,使其结果更具有实验室间的可比性,这成为融合基因 qPCR 临床应用的里程碑^[36]。MRD 检测中,临床应用最广泛的是 BCR-ABL1 融合基因,其 qPCR 已成为慢性粒细胞性白血病 MRD 的最主要检测手段。在 AML 中,常见的融合转录本为急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)相关融合基因 PML-RAR α ,核心结合因子相关 AML 的相关融合基因(RUNX1-RUNX1T1/CBF β -MYH11)。此

外,也有实验室以 MLL-MLLT3 进行 MRD 研究^[37-39]。

APL 中,PML-RAR α 融合基因作为其致病机制及治疗靶点,成为疾病进展及疗效评估的关键分子标志,达到分子缓解(即 PML-RAR α 融合基因转阴)是 APL 治愈的必要指标,以 qPCR 监测 PML-RAR α 融合基因 MRD 也是预示复发的最重手段。笔者所在的研究所发现,PML-RAR α 融合基因除经典的长型和短型融合转录本外,还存在着一类变异型融合转录本,断裂点都包含在 RAR α 基因的第二内含子内,伴有这类变异型 PML-RAR α 融合基因的患者对于维 A 酸诱导治疗反应不佳^[40]。上述研究进一步丰富细化了对 APL 中 PML-RAR α 融合基因的 MRD 监测及分子复发鉴定。

在核心结合因子相关白血病中,RUNX1-RUNX1T1、CBF β -MYH11 都被证明具有提示患者预后的意义。治疗后 RUNX1-RUNX1T1 转录本水平显著下降或分子缓解预示优良的预后。Yin 等^[35]对 Medical Research Council(MRC) AML-15 临床试验病例以 qPCR 结果进行预后分析,提出在第一次诱导后的 t(8;21)患者中,骨髓 RUNX1-RUNX1T1 转录本拷贝数下降小于 3 个对数级对预测复发意义显著,并且其 3 年累积复发率更高、无复发生存更短。随后,一项前瞻性多中心试验报道,经多因素分析显示,在青年核心结合因子相关 AML 中,外周血白细胞计数、KIT 和(或)FLT3 突变情况及首次巩固治疗后 RUNX1-RUNX1T1 转录本拷贝数下降是否小于 3 个对数级均具有独立预后意义,RUNX1-RUNX1T1 拷贝数下降少于 3 个对数级者复发风险更高。

证实 RUNX1-RUNX1T1-MRD 的预后价值。值得注意的是,在纳入多因素分析后,RUNX1-RUNX1T1 转录本成为唯一的预后因素,提示融合基因的 MRD 比治疗前基因突变更有治疗分层意义^[41]。此外,Zhu 等^[42]的多中心前瞻性队列研究也证实了 3 个对数级减少量的意义,并指出二次巩固后是 MRD 检测的最佳时间。

对于 inv (16)(p13.1;q22)/t (16;16)(p13.1;q22) AML,CBF β -MYH11-MRD 具有与 RUNX1-RUNX1T1 类似的提示预后价值。Yin 等^[35]报道第一次诱导治疗后,外周血 CBF β -MYH11 拷贝数大于 10(以 10⁵ ABL1 基因拷贝为内参)的 inv(16)AML 患者有更高的复发风险。Corbacioglu 等^[43]分析临床相关时间点的 MRD,CBF β -MYH11 转录本持续阳性的患者具有高复发风险。

2. 基因突变:融合基因只存在于约 30%的 AML 中,在不具有染色体易位的 AML 中,需要其他的分子标志来进行 MRD 检测。虽然 99%以上的 AML 病例都存在基因突变^[44],但只有存在突变热点且突变发生率不低的基因突变才适合建立有效、稳定的临床检测方法。

笔者所在研究所发现,在 t(8;21)AML 患者中约有 48%的患者同时存在 C-KIT 基因突变,t (8;21)染色体易位导致的 RUNX1-RUNX1T1 融合基因和 C-KIT 突变二次打击共同参与白血病发病^[45]。同步监测 RUNX1-RUNX1T1 融合基因转录本水平和 C-KIT 突变情况更有利于提高 MRD 监测的准确率。

此外,近年来应用 qPCR 方法进行 NPM1 突变的分子 MRD 监测也逐渐体现出临床相关价值。

正常核型 AML 患者中,NPM1 突变发生率可达 45%~60%。虽然 NPM1 的突变类型较多,但 3 个主要突变型(A 型、B 型及 D 型)占比 90%以上。同时其复发表达较稳定,灵敏度也可达到 10⁻⁵ 水平。在预后方面,已有多个研究报道 NPM1 突变的 qPCR MRD 的预后价值。Kronke 等^[46]报道,在 245 例患者中,2 次诱导后及治疗完成后 NPM1 MRD 阴性患者的累积复发率均低于阳性者(6.5%比 53.0%, $P<0.001$;15.7%比 66.5%, $P<0.001$)。Shayegi 等^[47]强调异基因移植后连续监测 NPM1 MRD 的潜在提示预后作用。近期,Ivey 等^[48]亦证实 NPM1 在预后评估中的价值:在 2 次化疗后,NPM1 突变转录本残留检测阳性病例相较阴性病例,有着较高的 3 年复发率(82%比 30%, $P<0.001$)及低生存率(24%比 75%, $P<0.001$)。这项研究还显示,在多因素分析中,NPM1-MRD 是生存相关的唯一独立预后不良因素。

3. 基因过表达:类似于 LAIPs 中的抗原表达量异常,在白血病细胞中,有一些在正常骨髓细胞中不表达或低表达的 mRNA 转录本出现异常高表达。这类过表达的基因覆盖面较广,在大部分 AML 中,都有一个或多个这种基因过表达。其中,WT1 基因过表达的监测在临床应用较为广泛。

Nomdedéu 等^[49]根据诱导治疗后 WT1 的表达量将患者分为 3 组:拷贝数小于 17.5 组、17.6~170.5 组及大于 170.5 组(以 10⁴ ABL1 基因拷贝作为内参),其无病生存期和总生存期随着拷贝数增高逐渐降低。同样是诱导治疗后,Zhong 等^[50]认为 WT1 水平高于 150 拷贝意味着更短的无复发生存期。Malagola 等^[51]的回顾性研究提示,1 次巩固治疗后,骨髓 WT1 ≥ 121 拷贝是影响无复发生存期的独立

因素($P=0.02$)。Pozzi 等^[52]报道,在移植后无论哪个时间点,WT1>100 拷贝都是预示复发的强有力因素($HR=4.5$, $P=0.0001$)。这些研究均显示,WT1 的 qPCR-MRD 具有预后价值。

另一方面,在对这类基因进行表达水平的 MRD 评估时,必须考虑到其在正常组织中可能存在一定背景表达。因此,其检测准确性也有一定限制。在经过 9 种实验方法评估 WT1 之后,欧洲白血病网认为,在正常骨髓和外周血中分别最高存在 250 和 50 拷贝数的 WT1 野生表达,故其疾病相关 MRD 阈值设置应当高于这个值^[53]。

三、NGS 与数字 PCR

1. NGS:上述内容可见,利用 qPCR 检测 AML 的 MRD 时,融合基因只适用于部分患者;另一方面,AML 中基因突变类型繁多,因此设计一套适用于大部分 AML MRD 检测的 qPCR 方案显得尤为困难。加之正常组织中有一定的体细胞突变存在以及基因突变和过表达状态易于改变,PCR 测得的 MRD 可靠性还有待进一步探究。NGS 技术在 MRD 中的新应用使这些问题有望得到解决。

NGS 不仅可做到传统意义上的 MRD 监测,更具有一些新的特点。首先,NGS 具有高通量性,可同时全面地检测多个突变,降低成本的同时提高了效率,而且使突变共同作用相关分析更为简便,能更全面地了解患者的遗传信息。其次,NGS 在检测突变存在同时,可检测基因的突变比率,这是一代测序所不能做到的,这点对 FLT3-ITD 突变的临床意义解析显得尤为重要。目前对于 FLT3-ITD 突变的预后相关性已得到了广泛的认可,2017 年欧洲白血病网对 AML 的遗传危险分层已进一步将 FLT3-ITD 突变通过突变型与野生型等位位点之间的频率比率更细致地分为高频突变(≥ 0.5)和低频突变(< 0.5),重新定义其预后分层意义^[54]。第三,由于 NGS 的高灵敏度,其可识别一代测序不能发现的低频突变。最后,在连续追踪 MRD 时,NGS 可通过突变基因及频率变化的动态监测,提供分子克隆演变和优势克隆相关信息,为 MRD 与复发机制研究提供新思路^[55]。DNMT3A 突变是上海血液学研究所利用 NGS 技术,在急性单核细胞白血病中发现的高频突变^[56],提示患者预后不良^[57]。近年来的多项研究表明,与其他 AML 分子标志相比,DNMT3A 突变克隆更难清除,是疾病复发或克隆进展的分子基础之一^[58-59]。

作为新技术,NGS 目前还有一些难以忽视的

不足。首先,受限于测序技术及生物信息学分析的基础错误率,其可靠灵敏度仅有 1%,这与 MFC、qPCR 都难以相比。其次,目前关于 NGS 可用的 MRD 相关突变方面的研究还不多。第三,目前 NGS 技术检测 MRD 缺乏统一可靠的实验标准。虽然存在一些问题,但 NGS 还是具有很大的发展潜力,相信在不久的将来,定会成为 MRD 检测的可靠手段。

2. 数字 PCR (digital-PCR,dPCR):dPCR 是对 qPCR 进行改革,利用油包水乳化微滴、集成微流体通路等技术均匀分割 PCR 反应体系,进行单分子扩增的技术。其在反应结束后通过检测有荧光信号的反应单元数来计算目的核酸序列的拷贝数,从而达到核酸的绝对定量。

不同于 qPCR,dPCR 不需要标准参照物,不被扩增效率所影响,其分割 PCR 反应体系的特点可降低复杂的背景干扰,提取出低丰度目的基因信号,从而做到微量信号的定量检测。准确率高、灵敏度强、可重复性好等特点使其可分析微小拷贝数的变异、验证低频突变,从而提高分子 MRD 的检测灵敏度^[60]。

在淋巴系肿瘤中,Drandi 等^[61]的研究证实 dPCR 具有高灵敏度、准确率和可重复性,是检测 MRD 的可靠工具。该研究在 222 例样本中证实了 dPCR 和 qPCR 方法对 BCL2-IGHMBR 检测结果的一致性,还成功地将 dPCR 应用于 3 例 qPCR 无法检测的病例。在慢性髓系白血病中,也有初步实验提出,与 qPCR 相比,dPCR 能进一步降低可测得 MRD 的最低值,达到 0.001%甚至 0.0001%国际标准^[62]。在 AML 中,Bacher 等^[63]用 dPCR 精确检测出 37 种罕见的 NPM1 突变亚型。当今 dPCR 的应用面已日益拓展。

AML MRD 监测的拓展应用

一、MRD 监测在外周血中的应用

目前绝大多数研究者着眼于骨髓的 MRD 研究。但骨髓穿刺创伤较大,患者无法配合频繁评估。外周血相对容易采集,对患者创伤较小,以外周血作为标本可以允许更为连续地对其进行评估。

外周血白血病细胞来源于骨髓,在化疗药物作用下消除得更为迅速。Yu 等^[64]报道,化疗第 5 天,AML 外周血白血病细胞的清除率与治疗反应及预后相关。其次,外周血不含正常原始细胞,其在判断小群体异常细胞中的准确性远优于骨髓,这点已得

到证实^[21]。另外,鉴于外周血细胞群体相对数目少并且较明确,对于 MFC 来说,结果分析显得更为简单,在一定程度上可减小研究者经验差距对研究结果带来的影响。

在分子水平上,核心结合因子 AML 患者中, RUNX1-RUNX1T1、CBF β -MYH11 在外周血中的残留水平具有与骨髓同等的预后意义^[35]。有研究报道 AML 中外周血和骨髓中的 NPM1 基因突变转录本水平有较强的关联性^[46]。同样,巩固治疗后外周血和骨髓的 WT1 转录本水平有同等提示复发价值,外周血的灵敏度等同或高于骨髓^[53,65]。在流式细胞术方面, Maurillo 等^[66]对比研究 50 例 AML 患者诱导、巩固治疗后的外周血和骨髓,首次证实 AML 的外周血与骨髓 MRD 间存在相关性,以 0.015% 作为界值,巩固治疗后外周血 MRD 阳性是无复发生存期的独立影响。2015 年, Zeijlemaker 等^[21]随访 114 例 AML 患者,得到的统计学结果再次证实外周血和骨髓 MRD 有显著的对应关系 ($r=0.67, P<0.001$),此外,诱导后及巩固治疗后外周血 MRD 阴性组与阳性组的 1 年复发率和 3 年生存率都有显著的差异,因此他们认为检测诱导及巩固治疗后的外周血 MRD 都有预后意义。这些研究均证实,在 AML 中以外周血代替骨髓进行 MRD 的监测是可行的,外周血 MRD 同样具有预后评估价值。

二、MRD 监测在造血干细胞移植中的应用

在获得完全缓解后,大部分细胞-分子遗传学异常危险分层为高危组的 AML 患者将接受异体或自体造血干细胞移植治疗。在这些移植患者中,白血病复发依然是导致移植治疗失败的一大原因。在移植评估中,MRD 同样发挥着重要作用。

一方面,异基因移植后早期 MRD 监测作为移植后治疗效果的直接评价,其阳性提示不良预后^[67],有助于移植后治疗方案调整。另一方面,移植前 MRD 水平对移植的患者也有一定的预后价值^[23]。Walter 等^[68]回顾 99 例达到首次完全缓解后进行清髓性造血干细胞移植的 AML 患者移植前 MRD,可检出 MRD 阳性组和未检出 MRD 组预计 2 年生存率分别为 30.2% 和 76.6%,复发率分别为 64.9% 和 17.6%,多因素分析的结果显示移植前 MRD 阳性是独立的不良预后因素。也有研究报道^[69],在接受清髓性及非清髓性造血干细胞移植治疗的患者中,移植前 MRD 阳性均提示预后不良。2013 年,一项研究者分析了 253 例移植 AML 患者资料,结果显示任何可检测到的移植前 MRD 均预示着不良预后^[70];

对首次完全缓解后移植的患者和二次完全缓解后进行移植的患者来说,MRD 阳性也均提示不良预后。

三、MRD 相关临床治疗指导应用

MRD 在临床上的治疗应用研究还很少,主要包括指导治疗强度、提示预先治疗、作为治疗相关临床试验指标三方面。

已有临床实验中运用 MRD 作为调整治疗方案的指标之一。在 232 例儿童 AML 中, Rubnitz 等^[71]以 MFC 检测根据第一次诱导治疗后的 MRD 结果,来确定第二次化疗的时间以及药物的选择;进一步结合临床危险度分层分子标志和 MFC 检测 MRD 水平作为关键指标选择巩固治疗方案,结果显示,患者长期生存优于同期其他治疗方案。因此认为,以基因特点和 MRD 水平作为危险分层能有效地改善儿童 AML 的预后。Zhu 等^[42]在成人核心结合因子相关 AML 中,将第二次巩固后的 RUNX1/RUNX1T1 转录本 MRD 是否达到 1×10^{-3} 作为接受异基因移植治疗或化疗、自体移植的指标,接受 MRD 指导治疗患者的预后优于拒绝这种治疗的患者(高危组总生存期为 72% 比 27%, $P=0.007$; 低危组总生存期为 100% 比 76%, $P=0.013$)。

早期干预治疗相关研究主要集中在分子 MRD 指示上。Pozzi 等^[52]对 38 例出现分子(WT1)复发的异基因移植后患者中的 17 例(非随机性)进行供者淋巴细胞回输,接受回输者的总生存期优于其余的 21 例(总生存期 44% 比 14%)。

此外,MRD 的另一个临床应用是作为临床实验效果指标。在随机化吉妥单抗 ALFA-0701 试验中, Lambert 等^[72]发现,在吉妥单抗组,伴 NPM1 因基突变病例的 MRD 检测阴性率显著高于对照组,其 2 年总生存期和无事件生存也优于对照组。在核心结合因子相关 AML 中,有前瞻性研究显示,高剂量柔红霉素组比标准剂量组 ($90 \text{ mg/m}^2 \times 3 \text{ d}$ 比 $45 \text{ mg/m}^2 \times 3 \text{ d}$) 有更低的核结合因子相关 MRD 水平及更好的临床疗效^[73]。

MRD 在指导临床治疗上的作用还有待前瞻性大样本随机性试验来证实。最近正在实施中的 MRC AML18 试验随机观察在诱导后不缓解或 MRD 阳性的高危病例中强化治疗方案对疗效和预后的改善作用。这项试验可能会为 MRD 指导治疗带来新发展。MRC AML17 和 AML19 中对可进行 MRD 检测的患者是否进行 MRD 监测进行随机分配,终点为总生存期。对于分子复发者是否行预先治疗,也许能在其中能得到新突破。

存在的问题及展望

MRD 作为可靠的治疗效果评价监测手段,已成为 AML 临床实践中不可或缺的部分,但其目前同样存在着一些有待进一步解决的问题。

在 MFC 方面,各实验室所用的检测方法、设备、抗体组合不尽相同,检测结果解读分析很大程度上决定于分析者的专业水平,这使得实验室间的结果很难直接进行比较,不易标准化。其次,MRD 检测时间点和阈值还有待进一步探讨。第三,患者可能存在多个白血病亚克隆群体,治疗后亚克隆的增殖优势变化导致患者 LAIPs 变化,或者治疗过程中免疫表型发生变异,使得后续追踪 MRD 时可能出现假阴性结果。最后,强烈的骨髓重建可能出现与 LAIPs 类似的免疫表型,易被误认为异常细胞群体,导致假阳性结果。

这些不足之处并不是不可克服的。欧洲白血病网曾推出急性白血病流式细胞术的标准化实验制备步骤与抗体方案推荐^[74]。原则上,标准化的实验方法能极大地提高实验的可重复性,分析人员差异才是主要障碍。在 2013 年的一项研究中,5 个不同实验室以相同的 MFC 检测方案对相同的患者进行独立分析平行比较。通过 1 个中心实验室的评估和指导,4 个培训实验室的 LAIPs 鉴定灵敏度和覆盖面都得到了很大提高,综合 LAIPs 漏检率下降了 11%~23%,报道的无 LAIPs 患者比例从 21%~33% 降低到了 7%~18%^[75]。研究结果表明,不同的研究机构间检测 MRD 的人员分析差异是可以减弱的。针对 LAIPs 转变的问题,同时用 2 个及以上的 LAIPs 可以大量减小其转变带来的影响。此外,“不同于正常”法不只是利用初发 LAIPs 来检测 MRD,而是全程利用大量的抗体组合来检测白血病细胞,该方法可有效避免 AML 病例中因免疫表型变异或者优势克隆转化导致的假阴性结果。

qPCR 也存在克隆转变导致的假阴性问题。此外,由于可检测的融合基因、基因突变或异常表达只占人群的 60%~70%^[76],qPCR 的覆盖率目前也仅为 70%。再者,由于分子标志的多样性,qPCR 的应用需要多种不同的引物和探针,其整个检测过程较为耗时,劳动力和试剂成本也较高。最后,qPCR 的定量是相对的,在低转录本水平时受扩增效率和背景表达的影响较大。

NGS 和 dPCR 的出现很大程度上解决了 qPCR

的问题。NGS 高通量的特点使其在理论上几乎可用于所有病例,同时也使克隆追踪演化不再成为一个令人困扰的问题。dPCR 的绝对定量和对背景干扰耐受性高等特点则使分子标志检测的准确率和灵敏度能够大幅度提高。相信在不久的将来,随着方法学上的不断突破、新检测位点的提出和相关研究不断增加,NGS、dPCR 在 AML MRD 监测上能得到更多的应用。

目前 AML MRD 监测还存在着一定的局限性,但其可发展的潜力是巨大的。结合快速发展中的新技术,综合应用各种手段,AML MRD 的监测必将得到新发展,可更好地为 AML 的临床诊治提供可靠依据。

[参考文献]

- [1] Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management[J]. Am J Hematol,2013, 88(4):318-327.
- [2] Pabst T, Vellenga E, van Putten W, et al. Favorable effect of priming with granulocyte colony-stimulating factor in remission induction of acute myeloid leukemia restricted to dose escalation of cytarabine[J]. Blood,2012,119(23): 5367-5373.
- [3] Ravandi F. Relapsed acute myeloid leukemia: why is there no standard of care? [J]. Best Pract Res Clin Haematol,2013,26(3):253-259.
- [4] Bachas C, Schuurhuis GJ, Assaraf YG, et al. The role of minor subpopulations within the leukemic blast compartment of AML patients at initial diagnosis in the development of relapse[J]. Leukemia,2012,26(6):1313-1320.
- [5] Terwijn M, van Putten WL, Kelder A, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study[J]. J Clin Oncol,2013, 31(31):3889-3897.
- [6] Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance[J]. Blood,1995,85(6):1416-1434.
- [7] Kern W, Bacher U, Haferlach C, et al. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML [J]. Best Pract Res Clin Haematol,2010,23(3):379-390.
- [8] Kern W, Voskova D, Schoch C, et al. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia[J]. Blood,2004,104(10):3078-3085.

- [9] Coustan-Smith E, Campana D. Should evaluation for minimal residual disease be routine in acute myeloid leukemia? [J]. *Curr Opin Hematol*, 2013, 20(2): 86-92.
- [10] van der Velden VH, van der Sluijs-Geling A, Gibson BE, et al. Clinical significance of flowcytometric minimal residual disease detection in pediatric acute myeloid leukemia patients treated according to the DCOG AN-LL97/MRC AML12 protocol [J]. *Leukemia*, 2010, 24(9): 1599-1606.
- [11] Loken MR, Alonzo TA, Pardo L, et al. Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group [J]. *Blood*, 2012, 120(8): 1581-1588.
- [12] Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff YJ, et al. A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2016, 30(2): 439-446.
- [13] Al-Mawali A, Gillis D, Hissaria P, et al. Incidence, sensitivity, and specificity of leukemia-associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry [J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129(6): 934-945.
- [14] Campana D. Status of minimal residual disease testing in childhood haematological malignancies [J]. *Br J Haematol*, 2008, 143(4): 481-489.
- [15] Buccisano F, Maurillo L, Del Principe ML, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2012, 119(2): 332-341.
- [16] Inaba H, Coustan-Smith E, Cao X, et al. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(29): 3625-3632.
- [17] Chen X, Xie H, Wood BL, et al. Relation of clinical response and minimal residual disease and their prognostic impact on outcome in acute myeloid leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(11): 1258-1264.
- [18] Köhnke T, Sauter D, Ringel K, et al. Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse [J]. *Leukemia*, 2015, 29(2): 377-386.
- [19] Sievers EL, Lange BJ, Alonzo TA, et al. Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2003, 101(9): 3398-3406.
- [20] Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The use of receiver operating characteristic analysis for detection of minimal residual disease using five-color multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia identifies patients with high risk of relapse [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2009, 76(2): 91-101.
- [21] Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff YJ, et al. Peripheral blood minimal residual disease may replace bone marrow minimal residual disease as an immunophenotypic biomarker for impending relapse in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2016, 30(3): 708-715.
- [22] MRD-AML-BFM Study Group, Langebrake C, Creutzig U, et al. Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: the MRD-AML-BFM Study Group [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(22): 3686-3692.
- [23] Leung W, Pui CH, Coustan-Smith E, et al. Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia [J]. *Blood*, 2012, 120(2): 468-472.
- [24] Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012, 2012: 35-42.
- [25] Tierens A, Bjørklund E, Siitonen S, et al. Residual disease detected by flow cytometry is an independent predictor of survival in childhood acute myeloid leukaemia; results of the NOPHO-AML 2004 study [J]. *Br J Haematol*, 2016, 174(4): 600-609.
- [26] Karol SE, Coustan-Smith E, Cao X, et al. Prognostic factors in children with acute myeloid leukaemia and excellent response to remission induction therapy [J]. *Br J Haematol*, 2015, 168(1): 94-101.
- [27] Buccisano F, Maurillo L, Piciocchi A, et al. Minimal residual disease negativity in elderly patients with acute myeloid leukemia may indicate different postremission strategies than in younger patients [J]. *Ann Hematol*, 2015, 94(8): 1319-1326.
- [28] Buccisano F, Maurillo L, Gattei V, et al. The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts on duration of response and survival of patients with acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2006, 20(10): 1783-1789.
- [29] San Miguel JF, Vidriales MB, López-Berges C, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification [J]. *Blood*, 2001, 98(6): 1746-1751.
- [30] Zeijlemaker W, Kelder A, Wouters R, et al. Absence of leukaemic CD34⁺ cells in acute myeloid leukaemia is of high prognostic value: a longstanding controversy deciphered [J/OL]. *Br J Haematol*. 2015-06-24[2017-01-20].

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26104974>.
- [31] Vidriales MB, Pérez-López E, Pegenaute C, et al. Minimal residual disease evaluation by flow cytometry is a complementary tool to cytogenetics for treatment decisions in acute myeloid leukaemia[J]. *Leuk Res*,2016,40: 1-9.
 - [32] Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, et al. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia[J]. *Blood*,2010,116(13):2295-2303.
 - [33] Freeman SD, Virgo P, Couzens S, et al. Prognostic relevance of treatment response measured by flow cytometric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia[J]. *J Clin Oncol*,2013,31(32):4123-4131.
 - [34] Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? [J]. *Blood*,2014,124 (23):3345-3355.
 - [35] Yin JA, O'Brien MA, Hills RK, et al. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial [J]. *Blood*,2012,120(14):2826-2835.
 - [36] Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program[J]. *Leukemia*,2003,17(12):2318-2357.
 - [37] Abildgaard L, Ommen HB, Lausen B, et al. A novel RT-qPCR assay for quantification of the MLL-MLLT3 fusion transcript in acute myeloid leukaemia[J]. *Eur J Haematol*, 2013,91(5):394-398.
 - [38] Scholl C, Breitinger H, Schlenk RF, et al. Development of a real-time RT-PCR assay for the quantification of the most frequent MLL/AF9 fusion types resulting from translocation t (9;11)(p22;q23) in acute myeloid leukemia [J]. *Genes Chromosomes Cancer*,2003,38(3):274-280.
 - [39] Scholl C, Schlenk RF, Eiwen K, et al. The prognostic value of MLL-AF9 detection in patients with t(9;11)(p22;q23)-positive acute myeloid leukemia[J]. *Haematologica*, 2005,90(12):1626-1634.
 - [40] Gu BW, Xiong H, Zhou Y, et al. Variant-type PML-RAR (alpha) fusion transcript in acute promyelocytic leukemia: use of a cryptic coding sequence from intron 2 of the RAR(alpha) gene and identification of a new clinical subtype resistant to retinoic acid therapy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2002,99(11):7640-7645.
 - [41] Jourdan E, Boissel N, Chevret S, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia [J]. *Blood*,2013,121(12):2213-2223.
 - [42] Zhu HH, Zhang XH, Qin YZ, et al. MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial[J]. *Blood*,2013,121 (20):4056-4062.
 - [43] Corbacioglu A, Scholl C, Schlenk RF, et al. Prognostic impact of minimal residual disease in CBFB-MYH11-positive acute myeloid leukemia[J]. *J Clin Oncol*,2010, 28(23):3724-3729.
 - [44] Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia[J]. *N Engl J Med*,2013,368(22):2059-2074.
 - [45] Wang YY, Zhou GB, Yin T, et al. AML1-ETO and C-KIT mutation/overexpression in t (8;21) leukemia: implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2005,102(4):1104-1109.
 - [46] Krönke J, Schlenk RF, Jensen KO, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group[J]. *J Clin Oncol*,2011,29(19): 2709-2716.
 - [47] Shayegi N, Kramer M, Bornhäuser M, et al. The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML[J]. *Blood*,2013,122(1):83-92.
 - [48] Ivey A, Hills RK, Simpson MA, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML [J]. *N Engl J Med*,2016,374(5):422-433.
 - [49] Nomdedéu JF, Hoyos M, Carricondo M, et al. Bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and post-intensification in adult de novo AML[J]. *Leukemia*,2013, 27(11):2157-2164.
 - [50] Zhong L, Wei L, Chen J, et al. WT1 Expression in Circulating RNA as a Minimal Residual Disease Marker for AML Patients After Stem-Cell Transplantation[J]. *Mol Diagn Ther*,2015,19(4):205-212.
 - [51] Malagola M, Skert C, Borlenghi E, et al. Postremission sequential monitoring of minimal residual disease by WT1 Q-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):265-274.
 - [52] Pozzi S, Geroldi S, Tedone E, et al. Leukaemia relapse after allogeneic transplants for acute myeloid leukaemia:

- predictive role of WT1 expression[J]. *Br J Haematol*, 2013,160(4):503-509.
- [53] Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study[J]. *J Clin Oncol*,2009,27(31): 5195-5201.
- [54] Döhner H, Estey E, 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.
- [55] Zuffa E, Franchini E, Papayannidis C, et al. Revealing very small FLT3 ITD mutated clones by ultra-deep sequencing analysis has important clinical implications in AML patients[J]. *Oncotarget*,2015,6(31):31284-31294.
- [56] Yan XJ, Xu J, Gu ZH, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia[J]. *Nat Genet*,2011, 43(4):309-315.
- [57] Shen Y, Zhu YM, Fan X, et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia[J]. *Blood*,2011,118(20): 5593-5603.
- [58] Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia[J]. *Nature*,2014,506(7488):328-333.
- [59] Pløen GG, Nederby L, Guldberg P, et al. Persistence of DNMT3A mutations at long-term remission in adult patients with AML[J]. *Br J Haematol*,2014,167(4):478-486.
- [60] Alikian M, Ellery P, Forbes M, et al. Next-Generation Sequencing-Assisted DNA-Based Digital PCR for a Personalized Approach to the Detection and Quantification of Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia Patients[J]. *J Mol Diagn*,2016,18(2):176-189.
- [61] Drandi D, Kubiczkoa-Besse L, Ferrero S, et al. Minimal Residual Disease Detection by Droplet Digital PCR in Multiple Myeloma, Mantle Cell Lymphoma, and Follicular Lymphoma: A Comparison with Real-Time PCR[J]. *J Mol Diagn*,2015,17(6):652-660.
- [62] Jennings LJ, George D, Czech J, et al. Detection and quantification of BCR-ABL1 fusion transcripts by droplet digital PCR[J]. *J Mol Diagn*,2014,16(2):174-179.
- [63] Bacher U, Dicker F, Haferlach C, et al. Quantification of rare NPM1 mutation subtypes by digital PCR[J]. *Br J Haematol*,2014,167(5):710-714.
- [64] Yu C, Kong QL, Zhang YX, et al. Clinical significance of day 5 peripheral blast clearance rate in the evaluation of early treatment response and prognosis of patients with acute myeloid leukemia[J]. *J Hematol Oncol*,2015,8:48.
- [65] Cilloni D, Messa F, Arruga F, et al. Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukemia by measurement of WT1 transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy[J]. *Haematologica*, 2008,93(6):921-924.
- [66] Maurillo L, Buccisano F, Spagnoli A, et al. Monitoring of minimal residual disease in adult acute myeloid leukemia using peripheral blood as an alternative source to bone marrow[J]. *Haematologica*,2007,92(5):605-611.
- [67] Díez-Campelo M, Pérez-Simón JA, Pérez J, et al. Minimal residual disease monitoring after allogeneic transplantation may help to individualize post-transplant therapeutic strategies in acute myeloid malignancies[J]. *Am J Hematol*,2009,84(3):149-152.
- [68] Walter RB, Gooley TA, Wood BL, et al. Impact of pre-transplantation minimal residual disease, as detected by multiparametric flow cytometry, on outcome of myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia[J]. *J Clin Oncol*,2011,29(9):1190-1197.
- [69] Walter RB, Gyurkocza B, Storer BE, et al. Comparison of minimal residual disease as outcome predictor for AML patients in first complete remission undergoing myeloablative or nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation[J]. *Leukemia*,2015,29(1):137-144.
- [70] Walter RB, Buckley SA, Pagel JM, et al. Significance of minimal residual disease before myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for AML in first and second complete remission[J]. *Blood*,2013,122(10):1813-1821.
- [71] Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial [J]. *Lancet Oncol*,2010,11(6):543-552.
- [72] Lambert J, Lambert J, Nibourel O, et al. MRD assessed by WT1 and NPM1 transcript levels identifies distinct outcomes in AML patients and is influenced by gemtuzumab ozogamicin[J]. *Oncotarget*,2014,5(15):6280-6288.
- [73] Prebet T, Bertoli S, Delaunay J, et al. Anthracycline dose intensification improves molecular response and outcome of patients treated for core binding factor acute myeloid leukemia[J]. *Haematologica*,2014,99(10):e185-e187.
- [74] Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10[J]. *Leukemia*,2011,25(4):567-574.
- [75] Feller N, van der Velden VH, Brooimans RA, et al. Defining consensus leukemia-associated immunophenotypes for detection of minimal residual disease in acute

myeloid leukemia in a multicenter setting[J]. Blood Cancer J,2013,3:e129.

- [76] Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on

molecular mutations[J]. Blood,2012,120(15):2963-2972.

(收稿日期:2017-01-25)

(本文编辑:褚敬申)

· 简讯 ·

《诊断学理论与实践》医学科技术语缩写名录(二)

本刊对以下部分常用缩写的英文全称在正文中将减少或不再出现,届时以中文(英文缩写)形式出现,英文全称以本刊缩写名录为准。

- (24)异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)
- (25)磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)
- (29)血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)
- (30)甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)
- (31)人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)
- (32)食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)
- (33)高分辨率 CT(high resolution computed tomography, HRCT)
- (34)结核菌素纯蛋白衍生物(purified protein derivative of tuberculin ,TB-PPD)
- (35)干扰素(interferon,IFN)
- (36) 高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein

cholesterol, HDL-C)

(37) 低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, HDL-C)

(38) 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)

(39) 磁共振胰胆管造影 (magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)

(40)三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)

(41) 非小细胞肺癌 (non-small-cell lung carcinoma, NSCLC)

(42)骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndromes, MDS)

(43)骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative, MPN)

(44)荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH)

(45)三酰甘油(triacylglycerol, TG)

(46)CT 血管造影 (computed tomography angiography, CTA)