

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.07.006

文章编号: 1005-8982(2019)07-0030-04

临床研究·论著

## 急性髓细胞白血病患者 CD96 和 CD123 的表达及对预后的意义\*

钟敏, 苏群豪, 胡敏, 徐璐, 陶石

(海南医学院第一附属医院 血液内科, 海南 海口 570102)

**摘要: 目的** 检测 CD96、CD123 在急性髓细胞白血病 (AML) 患者中的表达, 探讨其与 AML 疗效和预后的关系。**方法** 选取 156 例 AML 患者为观察对象, 选取同期该院健康体检者 150 例作为对照组。采用流式细胞术检测 CD96、CD123 表达情况, 并分析 CD96、CD123 表达与化疗疗效的关系。**结果** AML 患者 CD96、CD123 的阳性表达率与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); AML 患者中 CD96、CD123 阳性表达的缓解率均低于阴性表达者 ( $P < 0.05$ ); AML 患者中 CD96、CD123 阳性表达的生存率均低于阴性表达者 ( $P < 0.05$ ); AML 患者中 CD96、CD123 阳性表达的化疗后感染、化疗后复发发生率均高于阴性表达者 ( $P < 0.05$ ); AML 患者中 CD96、CD123 阳性表达的中位生存期均低于阴性表达者 ( $P < 0.05$ )。**结论** CD96、CD123 在 AML 中均有不同程度的表达, 其阳性表达可能与原发耐药或复发进展有关, 可作为判断 AML 患者预后的相关指标。

**关键词:** 白血病, 髓样, 急性; CD96; CD123; 预后

**中图分类号:** R733.7

**文献标识码:** A

## Clinical significance of CD96 and CD123 in acute myelocytic leukemia\*

Min Zhong, Qun-hao Su, Min Hu, Lu Xu, Shi Tao

(Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570102, China)

**Abstract: Objective** To study the expression of CD96 and CD123 in acute myelocytic leukemia (AML) patients and their potential clinical significance. **Methods** Totally 156 AML patients were selected as subjects. Flow cytometry was performed to detect the expression of CD96 and CD123. Relationship between CD96/CD123 and clinical characteristics were analyzed. **Results** The positive expression rates of CD96 and CD123 were significantly increased in AML group when compared with control group ( $P < 0.05$ ). Remission rates and survival in patients with positive expression of CD96 and CD123 were dramatically lowered when compared with other AML patients ( $P < 0.05$ ). Patients with double positive expression of CD96 and CD123 experienced increased incidence of post-chemotherapy infection and recurrence rates ( $P < 0.05$ ) when compared with those in other AML patients ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** CD96 and CD123 are differentially expressed in AML patients. The positive expression of CD96 and CD123 may be related to poor outcome.

**Keywords:** acute myelocytic leukemia; CD96; CD123; prognosis

白血病是由造血干/祖细胞分化、凋亡失调和恶性增殖引起的一组异质性造血系统恶性肿瘤。大量研

收稿日期: 2018-08-19

\* 基金项目: 海南省卫计委科研立项 (No: 1501320243A2001)

究表明,血液中有微量的细胞群,仅占白血病细胞的 0.1%~1.0%,称为白血病干细胞<sup>[1]</sup>。这些细胞通常会导致白血病复发,对化疗药物敏感性降低,耐药性增加。急性髓细胞白血病(acute myelocytic leukemia, AML)是一种起源于髓系造血干/祖细胞的恶性肿瘤。临床表现包括贫血、出血、感染、发热、脏器浸润和代谢异常。大多数病例表现为急性和重度状态,预后较差。白血病干细胞的免疫表型在不同类型的白血病和个体间有差异,与临床特征、治疗反应、生存和预后有关<sup>[2]</sup>。作为免疫球蛋白超家族的成员,CD96 在大多数 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> 的 AML 干细胞上表达。据报道,CD96 的表达与白血病干细胞的功能有关<sup>[3]</sup>。新近研究证实在不同的人 AML 细胞移植小鼠模型中,所有的未成熟 AML 亚群细胞中的白血病干细胞表达 IL-3 受体  $\alpha$  链(CD123)<sup>[4]</sup>。目前,AML 中白血病干细胞相关抗原 CD123、CD96 表达与预后的关系尚不清楚。本研究探讨 AML 中白血病干细胞相关抗原 CD123、CD96 与疗效、预后的关系,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2011 年 1 月—2013 年 6 月海南医学院第一附属医院血液内科住院治疗的 156 例 AML 患者为研究对象。其中,男性 86 例,女性 70 例;年龄 15~49 岁,平均(38.2±10.5)岁。所有患者诊断符合 2016 年 WHO 修订版造血和淋巴组织肿瘤分类诊断标准<sup>[5]</sup>。FAB 分类:M1 27 例,M2 35 例,M3 25 例,M4 40 例,M5 29 例。选取同期在本院健康体检者 150 例作为对照组。其中,男 79 例,女 71 例;年龄 18~56 岁,平均(46.5±20.1)岁。所有患者都知情同意,并获得医院伦理委员会批准。

治疗方案及疗效标准:AML 患者除急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)外采用三尖杉酯碱(HA)诱导治疗 2~3 mg/d, 5~7 d 或米托蒽醌(NA)10 mg/d, 3 d,其次是阿糖胞苷 150~300 mg/d, 巩固 5~7 d。APL 患者主要用亚砷酸钠诱导,或亚砷酸和视黄酸双重诱导治疗。除化疗外,所有患者均给予输血、抗感染与综合支持治疗。疗效评价基于血液病诊断和规范治疗准则:①完全缓解(CR):无贫血、出血、感染或白血病细胞浸润性表现;血红蛋白>90 g/L,白细胞正常或减少,无未成熟细胞,血小板>100×10<sup>9</sup>/L;原始细胞和早期细胞骨髓中的婴儿期细胞(或未成熟细胞)<5%,正常红细胞和巨核

系。②部分缓解(PR):临床、血液和骨的 3 个方面中的 1 个或 2 个方面骨髓不符合 CR 标准;骨髓原始细胞和早期幼稚细胞<20%。③无缓解(NR):临床、血液和骨髓方面未能满足 CR 骨髓中的原始细胞和早期幼稚细胞>20%,包括无效患者。

所有患者随访 5 年,方式为电话或门诊,记录生存时间、化疗后感染、化疗后复发、髓外浸润等情况。

### 1.2 免疫分型检测

采用乙二胺四乙酸(EDTA)提取骨髓 2~5 ml。化疗前采用密度梯度离心法分离骨髓,用淋巴细胞分离液(Ficoll)分离单个核细胞。分别使用 4 种颜色荧光标记的 FITC-CD34、PE-CD38、PACP-CD123 及 APC-CD96 抗体(购自美国 BD 公司)检测细胞。室温避光孵育 10 min。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,最后加入磷酸盐缓冲溶液(PBS)300  $\mu$ l 混匀悬浮细胞,用流式细胞仪检测分析 CD123、CD96 表达。FSC/SSC 排除碎片,SSC/CD45 作为空白对照,CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 为造血干细胞。此外,CD123<sup>+</sup> 是设置 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 造血干细胞鉴定白血病干细胞。若是超过阴性对照 20% 就确定为抗原表达阳性。

### 1.3 统计学方法

数据处理采用 SPSS 18 统计软件,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,比较用  $t$  检验;计数资料以例(%)表示,比较采用  $\chi^2$  检验;Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,比较采用 Log-rank- $\chi^2$  检验; $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CD96、CD123 在 AML 患者中的表达

AML 患者 CD96 阳性表达率为(12.85±9.04)%, CD123 阳性表达率为(41.24±10.42)%;对照组:CD96 阳性表达率为(0.26±0.06)%, CD123 阳性表达率为(0.73±0.21)%;AML 患者的 CD96 与 CD123 阳性表达率与对照组比较,差异有统计学意义( $t=12.300$  和 34.328,均  $P=0.000$ )。见图 1。

### 2.2 AML 患者中 CD96、CD123 表达与临床疗效的关系

AML 患者中 CD96、CD123 阳性表达的缓解率低于 CD96、CD123 阴性表达者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1。

### 2.3 AML 患者 CD96、CD123 表达与预后的关系

AML 患者中 CD96、CD123 阳性表达的生存率低

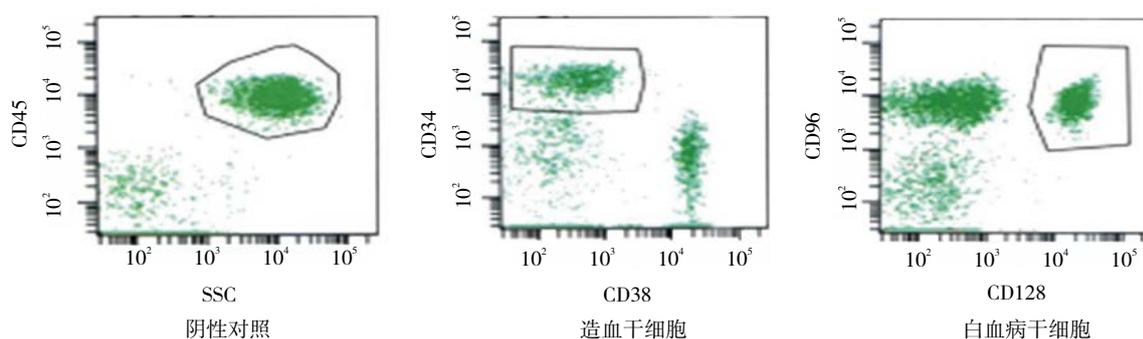


图 1 AML 患者中 CD96、CD123 的表达情况

表 1 CD96、CD123 表达与临床疗效的关系 例

表型	CR+PR	NR	$\chi^2$ 值	P 值
<b>CD96</b>				
-	53 (67.9)	25 (32.1)	7.561	0.006
+	36 (46.1)	42 (53.9)		
<b>CD123</b>				
-	56 (71.8)	22 (28.2)	13.839	0.000
+	33 (42.3)	45 (57.7)		

于 CD96、CD123 阴性表达者, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); AML 患者中 CD96、CD123 阳性表达的化疗后感染、化疗后复发发生率高于 CD96、CD123 阴性表达者, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); AML 患者中 CD96、CD123 阳性表达的髓外浸润发生率高于 CD96、CD123 阴性表达者, 但差异无统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2、3。

表 2 AML 患者 CD96 表达与预后的关系 [n=78, 例(%)]

组别	生存率	化疗后感染	化疗后复发	髓外浸润
CD96 <sup>+</sup>	44 (56.4)	31 (39.7)	44 (56.4)	22 (28.2)
CD96 <sup>-</sup>	62 (79.5)	15 (19.2)	23 (29.5)	18 (23.1)
$\chi^2$ 值	6.027	8.047	9.036	1.224
P 值	0.017	0.001	0.000	0.336

表 3 AML 患者 CD123 表达与预后的关系 [n=78, 例(%)]

组别	生存率	化疗后感染	化疗后复发	髓外浸润
CD123 <sup>+</sup>	49 (62.8)	35 (44.9)	57 (73.1)	17 (21.8)
CD123 <sup>-</sup>	57 (73.1)	17 (21.8)	27 (34.6)	14 (17.9)
$\chi^2$ 值	4.403	6.312	9.615	2.528
P 值	0.038	0.013	0.000	0.169

AML 患者中 CD96 阳性表达与阴性表达患者中位生存期分别为 (29.33 ± 6.12) 和 (36.07 ± 8.53) 个月, 差异有统计学意义 ( $t=5.670, P=0.000$ )。AML 患者中 CD123 阳性表达与阴性表达患者中位生存期分别为 (30.51 ± 10.01) 和 (35.77 ± 8.91) 个月, 差异有统计学意义 ( $t=3.467, P=0.001$ )。见图 2。

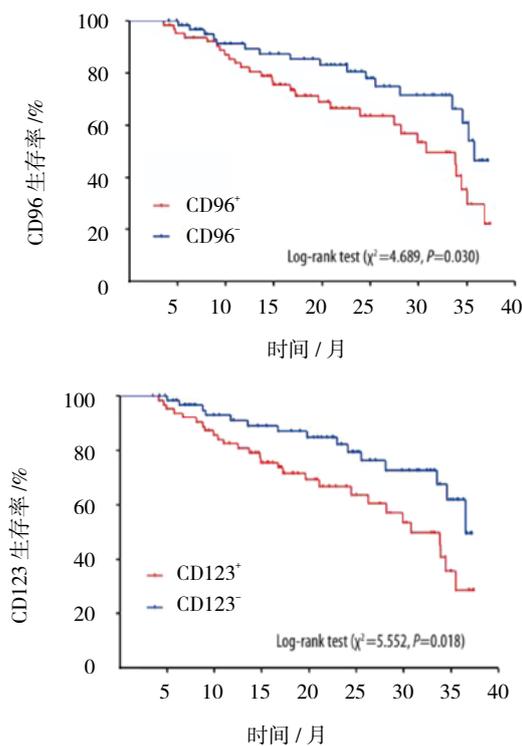


图 2 CD96、CD123 不同表达患者生存率比较

### 3 讨论

多项研究表明, AML 的发病与白血病干细胞密切相关<sup>[6]</sup>。白血病干细胞是一群具有自我更新能力的细胞群, 可产生异质性白血病细胞群, 在白血病细胞增殖、存活、转移和复发中起重要作用。针对靶向白血病干细胞的多种生物治疗方法, 如 CD33 单克隆抗

体、CD44 单克隆抗体和 IL-3 细胞因子偶联细胞毒素,取得良好的临床效果。白血病干细胞是由正常造血干细胞基因突变在发育过程中产生,因此具有与正常造血干细胞相同的表型,如 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>、HLA-DR 和 CD71。然而也有不同的表型与造血干细胞,如 CD117 和 CD90。因此,检测白血病细胞表面特异性抗原标志物,预测疾病治疗反应及预后更具有重要的临床意义。

CD123 是 IL-3 受体的  $\alpha$  亚基,在成人正常骨髓单核细胞中所占比例很低(0.1% ~ 0.6%)<sup>[7]</sup>。相反,CD123 被发现在 CD34<sup>+</sup> 细胞的阳性率为 2%。CD123 广泛表达在大多数 AML 原始细胞及白血病干细胞表面,且与 AML 不良预后相关。有研究发现超过 45% 的 AML 患者白血病细胞高表达 CD123,且与 AML 预后密切相关<sup>[8]</sup>。国外研究表明,CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> 细胞可诱导和维持白血病细胞,提示该组细胞具有白血病干细胞特征,CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> 可作为白血病干细胞的表面标志物<sup>[9]</sup>。

CD96 是免疫球蛋白超家族 CD226 亚家族的组成部分之一,已报道在 T 和 NK 细胞中表达,但在 B 细胞、粒细胞、单核细胞或红细胞中不表达<sup>[10]</sup>。有报道称 CD96 在 AML 中表达率为 30%,不受疾病亚型的影响<sup>[11]</sup>。有临床研究发现,AML 患者高表达 CD96,且 CD96 阳性表达患者缓解率更低,复发率高<sup>[12]</sup>。另外研究发现<sup>[13]</sup>,AML 患者 CD96、CD123 表达率高于 ALL 患者,且两者化疗缓解率差异有统计学意义,提示 CD96 与 AML 的耐药有关。

本研究结果发现,41.2%、12.8% 的 AML 患者白血病干细胞表达 CD123、CD96,分别高于对照组患者。疗效分析显示 CD123、CD96 阳性表达 AML 患者的缓解率低于 CD123、CD96 阴性表达患者,生存分析发现 CD123、CD96 阳性表达 AML 患者的化疗后感染、化疗后复发发生率更高,中位生存期更短。提示白血病干细胞高表达 CD123、CD96 的 AML 患者预后更差,为临床判断 AML 患者预后及指导治疗决策提供简便易行的评估手段。

综上所述,通过对 CD123、CD96 表达的检测可用于评价 AML 患者化疗疗效及生存预后,分辨出耐药性高的患者,以便早期干预。同时,靶向 CD123、CD96 的细胞免疫治疗成为今后研究的方向。不过还

有待于大量的实验来验证,观察不同亚型患者 CD96、CD123 表达情况及预后,这也是今后研究的方向之一。

#### 参 考 文 献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.
- [2] 吕心路,王金湖. CD123 与 CD47 在急性髓细胞白血病干细胞中的表达及临床意义[J]. 浙江临床医学, 2016, 18(12): 2188-2190.
- [3] 韦湘,杨丽萍. 急性白血病患者骨髓干细胞 CD96、CD123 的表达及与预后的相关性[J]. 江西医药, 2017, 52(5): 422-424.
- [4] LIU K, ZHU M, HUANG Y, et al. CD123 and its potential clinical application in leukemias[J]. Life Sci, 2015, 1(122): 59-64.
- [5] ARBER D A, ORAZI A, 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.
- [6] EHNINGER A, KRAMER M, RÖLLIG C, et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia[J]. Blood Cancer J, 2014, 13(4): e218.
- [7] MARDIROS A, DOS S C, MCDONALD T, et al. T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2013, 122(18): 3138-3148.
- [8] HE S Z, BUSFIELD S, RITCHIE D S, et al. A Phase I study of the safety, pharmacokinetics and anti-leukemic activity of the anti-CD123 monoclonal antibody CSL360 in relapsed, refractory or high-risk acute myeloid leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2015, 56(5): 1406-1415.
- [9] LI L J, TAO J L, FU R, et al. Increased CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> cells in myelodysplastic syndrome displaying malignant features similar to those in AML[J]. Int J Hematol, 2014, 100(1): 60-69.
- [10] DU W, HU Y, LU C, et al. Cluster of differentiation 96 as a leukemia stem cell-specific marker and a factor for prognosis evaluation in leukemia[J]. Mol Clin Oncol, 2015, 3(4): 833-838.
- [11] JIANG Y, XU P, YAO D, et al. CD33, CD96 and death associated protein kinase (DAPK) expression are associated with the survival rate and/or response to the chemotherapy in the patients with acute myeloid leukemia (AML)[J]. Med Sci Monit, 2017, 9(23): 1725-1732.
- [12] DING Y, GAO H, ZHANG Q. The biomarkers of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia[J]. Stem Cell Investig, 2017, 2(4): 19.
- [13] YABUSHITA T, SATAKE H, MARUOKA H, et al. Expression of multiple leukemic stem cell markers is associated with poor prognosis in de novo acute myeloid leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2017, 18: 1-8.

(王荣兵 编辑)