

· 临床研究 ·

## NK细胞绝对值对初诊慢性粒细胞白血病慢性期患者TKI治疗反应的预测价值

杨丽葭, 刘文洁, 孙倩, 洪鸣, 钱思轩\*

南京医科大学第一附属医院血液科, 江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:探讨初诊慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)患者初诊时自然杀伤细胞绝对值(absolute natural killer cell counts, ANKC),以及接受酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)治疗后ANKC的变化对治疗反应(治疗后3、12个月)的预测价值。方法:回顾性纳入80例初诊CML慢性期(CML-CP)患者,均接受一代或二代TKI(伊马替尼或尼洛替尼、达沙替尼)治疗,依据治疗反应分为最佳反应和警告/治疗失败两组,进行ANKC及相关临床资料对预后影响的分析。利用受试者工作特性(receiver operating characteristic, ROC)曲线优化临床指标的cut-off值。结果:初诊时 $ANKC \geq 0.14 \times 10^9$ 个/L的患者3个月和12个月治疗反应明显优于ANKC低者( $P < 0.05$ )。TKI治疗3个月后达最佳反应的患者,3个月时ANKC较初诊时明显降低( $P < 0.001$ ),而疗效为警告/治疗失败的患者ANKC则明显增高( $P=0.017$ )。动态分析13例患者初诊、治疗3个月、治疗12个月时ANKC变化与疗效相关性,发现达最佳反应的患者,ANKC在治疗3个月时较初诊时明显降低( $P=0.025$ ),治疗12个月则较初诊时明显增高( $P=0.015$ )。结论:CML-CP患者的ANKC为TKI治疗反应的有效预测预后指标,初诊时 $ANKC \geq 0.14 \times 10^9$ 个/L可预测最佳治疗反应。

**[关键词]** 慢性粒细胞白血病;NK细胞;TKI;治疗反应

**[中图分类号]** R733.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)07-991-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20200711

## Predictive value of absolute NK cells counts in response to TKI in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia patients

YANG Lijia, LIU Wenjie, SUN Qian, HONG Ming, QIAN Sixuan\*

Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the dynamic change of absolute natural killer cell counts (ANKC) and its prognostic value for the treatment response in the newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia (CML) before and after 3 months and 12 months of tyrosine kinase inhibitors (TKI) treatment. **Methods:** All 80 patients with chronic-phase CML (CML-CP) diagnosed from 2014 to 2019 were treated with first-generation TKI (imatinib) or second-generation TKI (nilotinib, dasatinib). According to the treatment response, they were divided into two groups: the optimal response group and the warning/treatment failure group, aiming to analyze the influence of ANKC and related clinical data on prognosis. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to optimize the cut-off values of clinical indicator. **Results:** After 3 months and 12 months of treatment, the efficacy of patients with  $ANKC \geq 0.14 \times 10^9$  /L at the first diagnosis was better than those with lower ANKC ( $P < 0.05$ ). Following 3 months of TKI treatment, ANKC in patients with optimal response was significantly lower than that at initial diagnosis ( $P < 0.001$ ), whereas ANKC in patients without optimal response was significantly higher ( $P=0.017$ ). Dynamic analysis was performed on the correlation between the changes in ANKC and the efficacy in 13 patients receiving dasatinib, and we found that in the patients with optimal response, ANKC after 3 months of treatment was significantly lower than that at the initial diagnosis ( $P=0.025$ ), whereas ANKC after 12 months of treatment was significantly higher than that at the initial diagnosis ( $P=0.015$ ). Multivariate analysis showed that ANKC, white blood cells count and second-generation TKI were independent factors for treatment response ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** ANKC in CML-CP patients is an effective prognostic factor for TKI treatment response, meanwhile patients with  $ANKC \geq 0.14 \times 10^9$ /L at diagnosis can achieve an optimal response.

**[Key words]** chronic myeloid leukemia; NK cell; TKI; treatment response

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81870119)

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(07):991-995]

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: qiansx@medmail.com.cn

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是一种骨髓造血干细胞恶性克隆性增殖的血液系统肿瘤,其特征是9号和22号染色体长臂易位形成Ph染色体和BCR-ABL融合基因,编码具有活性的致病性酪氨酸激酶。酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)的问世为CML的治疗带来了革命性的进展。在带来持久的深度分子学反应(deep molecular responses, DMR)的同时,TKI药物还让部分患者实现了停药后的无治疗缓解(treatment-free remission, TFR)。近年来,越来越多的文献阐明了免疫因素是维持TFR的重要原因<sup>[1-3]</sup>,并且提出通过免疫疗法如利用自然杀伤(natural killer, NK)细胞获取持久的TFR<sup>[4]</sup>。NK细胞作为一类重要的淋巴细胞亚群,通过释放穿孔素、颗粒酶、激活巨噬细胞等以抵抗病原体及肿瘤的侵袭,发挥免疫监督作用。目前研究者已发现初诊CML患者的NK细胞功能存在缺陷,TKI治疗后达到DMR的CML患者,其NK细胞功能缺陷被不同程度地修复<sup>[5-6]</sup>。而对于接受TKI治疗的CML患者,其NK细胞绝对值(absolute NK cell counts, ANKC)及其动态变化与治疗反应的相关性鲜有报道,故本文分析初诊CML慢性期(CML-CP)患者初诊时和接受TKI治疗后ANKC的变化,探讨其与治疗反应(治疗3、12个月)的相关性和预后价值。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

选取2014年1月—2019年12月南京医科大学第一附属医院血液科收治的80例CML-CP患者为研究对象。纳入标准:①均满足CML-CP诊断标准(2016年中国慢性髓系白血病诊断与治疗指南<sup>[7]</sup>);②初诊及TKI治疗后进行血常规和流式检测淋巴细胞和NK细胞比例;③截至疗效评估时,患者未更换TKI。

纳入的80例患者中男54例(67.5%),女26例(32.5%);中位年龄44.5(18~90)岁;初诊中位ANKC  $0.26 \times 10^9$  ( $0 \sim 1.51 \times 10^9$ )个/L;24例(30.0%)服用一代TKI伊马替尼400 mg每日1次,26例(32.5%)服用二代TKI尼洛替尼300 mg每日2次,30例(37.5%)服用二代TKI达沙替尼100 mg每日1次。本研究经医院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

### 1.2 方法

回顾性录入患者病历资料,采用流式细胞仪检测得到患者TKI治疗前后的外周血淋巴细胞比例和

NK细胞(CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>和/或CD56<sup>+</sup>)比例,结合同步检测的外周血白细胞数(white blood cells counts, WBC),可得到ANKC。流式抗体为CD3-FITC、CD4-PE、CD8-APC、CD16-PE、CD56-APC鼠抗人单克隆荧光抗体及其同型对照抗体(BD Biosciences公司,美国)。

80例患者在TKI治疗后3个月均进行了血液学、细胞遗传学、分子生物学检测评估疗效,其中57例在治疗后12个月再次评估疗效。43例CML-CP患者在初诊、TKI治疗后3个月均检测了ANKC;其中13例达沙替尼治疗的患者在初诊、治疗后3个月和12个月均检测了ANKC。同时纳入了初诊白细胞、初诊血小板、BCR-ABL<sub>IS</sub>定量、染色体核型、Sokal、Hasford、EUTOS危险度评分等可能影响预后的临床资料。

疗效评估采用中国慢性髓系白血病诊断与治疗指南<sup>[7]</sup>标准:①最佳反应为3个月至少达到部分细胞遗传学反应(PCyR, Ph<sup>+</sup>细胞 $\leq 35\%$ ),国际标准值BCR-ABL<sub>IS</sub> $\leq 10\%$ ;12个月BCR-ABL<sub>IS</sub> $\leq 0.1\%$ ;②警告为3个月未达到PCyR(Ph<sup>+</sup>细胞36%~95%),BCR-ABL<sub>IS</sub> $> 10\%$ ;12个月 $0.1\% < \text{BCR-ABL}_{IS} \leq 1.0\%$ ;③治疗失败为3个月未达到完全血液学反应(CHR),无任何细胞遗传学反应(CyR, Ph<sup>+</sup>细胞 $> 95\%$ );12个月未达到完全细胞遗传学缓解(CCyR, Ph<sup>+</sup>细胞 $> 0$ ),BCR-ABL<sub>IS</sub> $> 1\%$ 。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析;Graph-Pad Prism 8软件进行制图。计量资料呈非正态分布时,以中位数(四分位数)[ $M(P_{25}, P_{75})$ ]表示,采用非参数检验。Mann-Whitney *U*检验、Kruskal-Wallis检验分析独立样本组间差异性,配对样本采用Wilcoxon秩和检验。计数资料组间比较采用卡方检验。运用受试者工作特性(receiver operating characteristic, ROC)曲线得到ANKC、WBC最佳cut-off值。二元Logistic回归分析治疗反应的影响因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CML-CP患者基本临床资料分析

由表1可见,3个月达最佳反应的患者共51例,警告/治疗失败29例。初诊ANKC、初诊WBC、EUTOS评分、TKI种类在3个月达最佳反应和警告/治疗失败两组间具有统计学差异( $P < 0.05$ )。性别、年龄、初诊血小板计数、BCR-ABL<sub>IS</sub>、染色体核型、Sokal评分、Hasford评分在组间无统计学差异( $P > 0.05$ )。

## 2.2 初诊时 ANKC 与治疗反应的关系

依据3个月治疗反应,运用ROC曲线分析初诊 ANKC 对治疗反应的预测价值,得到曲线下面积(area under the curve, AUC)为 0.666 (95% CI: 0.537~0.795),通过最大约登指数得到最佳 cut-off 值为  $0.14 \times 10^9$  个/L,灵敏度 90.2%,特异度 58.6%。依此将 ANKC 分为两组:  $\geq 0.14 \times 10^9$  个/L 组和  $< 0.14 \times 10^9$  个/L 组。同样可得到 WBC 最佳 cut-off 值  $129.47 \times 10^9$  个/L (AUC=0.749, 95% CI: 0.635~0.863, 灵敏度 69.0%, 特异度 74.5%), 以此分为两组:  $\geq 129.47 \times 10^9$  个/L 组和  $< 129.47 \times 10^9$  个/L 组。

将表1中  $P < 0.05$  的因素,包括初诊 ANKC、初诊 WBC、TKI 种类和 EUTOS 评分纳入多因素 Logistic 回归分析,结果可见 ANKC  $\geq 0.14 \times 10^9$  个/L 是3个月最佳反应的独立预测指标。进一步进行12个月治疗反应多因素分析,得到相同结果。此外二代 TKI 治疗也是最佳反应独立影响因素, WBC  $\geq 129.47 \times 10^9$  个/L 提示治疗反应不佳(表2)。

## 2.3 治疗前、后 ANKC 的动态变化

80例患者中有43例患者在治疗3个月时同时进行了治疗反应和 ANKC 动态分析。治疗反应评估为:26例达最佳反应,17例为警告/治疗失败。结合 ANKC 动态变化发现,最佳反应组的 ANKC 比初诊时显著降低 ( $P < 0.001$ ); 而警告/治疗失败组的 ANKC 较初诊时显著升高 ( $P=0.017$ , 图1A、B)。

有13例患者在初诊、治疗后3和12个月均进行了治疗反应的评估和 ANKC 的检测。其中9/13例(69.2%)在治疗3个月时达最佳反应,12个月时仍达最佳反应。图1C可见,该9例患者治疗后3个月的 ANKC 较初诊时显著下降 ( $P=0.025$ ), 但治疗后12个月 ANKC 明显高于初诊和治疗后3个月 ( $P < 0.05$ ), 而4/13例警告/治疗失败患者的 ANKC 变化无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

人类的免疫防御可分为固有免疫和适应免疫,

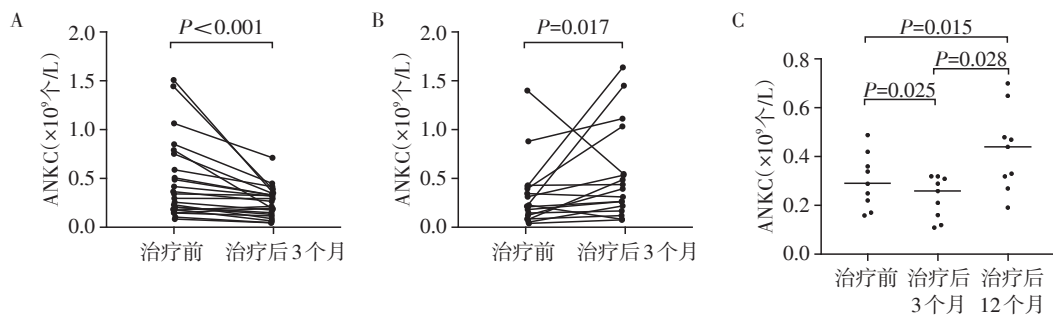
表1 CML-CP患者3个月治疗反应与临床特征的关系

临床资料	总体(n=80)	最佳反应(n=51)	警告/治疗失败(n=29)	P值
年龄(岁)	44.5(29.0~59.0)	49.0(31.0~59.0)	38.0(27.5~59.5)	0.378
性别[n(%)]				0.229
男	54(67.5)	32(62.7)	22(75.9)	
女	26(32.5)	19(37.3)	7(24.1)	
TKI[n(%)]				<0.001
一代(伊马替尼)	24(30.0)	7(13.7)	17(58.6)	
二代(尼洛替尼、达沙替尼)	56(70.0)	44(86.3)	12(41.4)	
WBC( $\times 10^9$ 个/L)	105.5(45.7, 211.1)	79.9(37.5, 132.8)	183.0(104.5, 277.9)	<0.001
ANKC( $\times 10^9$ 个/L)	0.26(0.16, 0.38)	0.29(0.18, 0.49)	0.20(0.07, 0.33)	0.014
血小板( $\times 10^9$ 个/L)	394.5(276.3, 642.0)	388.0(313.0, 707.0)	397.0(233.0, 570.0)	0.360
BCR-ABL <sub>IS</sub> (%)	109.8(70.4, 158.5)	104.6(71.9, 152.9)	121.3(54.0, 165.5)	0.886
染色体[n(%)]				0.545
经典	50(94.3)	31(91.2)	19(100.0)	
附加额外	3(5.7)	3(8.8)	0(0.0)	
Sokal[n(%)]				0.801
低危	39(48.8)	26(51.0)	13(44.8)	
中危	32(40.0)	20(39.2)	12(41.4)	
高危	9(11.2)	5(9.8)	4(13.8)	
Hasford[n(%)]				0.314
低危	46(57.5)	30(58.8)	16(55.2)	
中危	28(35.0)	19(37.3)	9(31.0)	
高危	6(7.5)	2(3.9)	4(13.8)	
EUTOS[n(%)]				0.024
低危	72(90.0)	49(96.1)	23(79.3)	
高危	8(10.0)	2(3.9)	6(20.7)	

表2 治疗反应的多因素 Logistic 回归分析

Table 2 Multivariate logistic regression analysis of treatment response

影响因素	3个月		12个月	
	OR(95%CI)	P值	OR(95%CI)	P值
TKI(一代 vs. 二代)	0.087(0.023~0.331)	<0.001	0.083(0.012~0.593)	0.013
WBC( $\geq 129.47 \times 10^9$ 个/L vs. $< 129.47 \times 10^9$ 个/L)	0.161(0.042~0.611)	0.007	0.132(0.020~0.856)	0.034
ANKC( $\geq 0.14 \times 10^9$ 个/L vs. $< 0.14 \times 10^9$ 个/L)	4.244(1.015~17.745)	0.048	20.811(2.258~191.784)	0.007
EUTOS(低 vs. 高)	2.354(0.304~18.207)	0.412	28.867(0.733~1 136.312)	0.073



A:TKI 治疗后 3 个月达最佳反应者 ANKC 的变化( $n=26$ );B:TKI 治疗后 3 个月警告/治疗失败者 ANKC 的变化( $n=17$ );C:达沙替尼治疗达最佳反应者 ANKC 的动态变化( $n=9$ )。

图1 TKI 治疗前、后 ANKC 的变化

Figure 1 Changes of ANKC before and after TKI treatment

NK 细胞作为固有免疫的主要组成部分,在 CML 的免疫应答中起到重要作用。根据细胞表面 CD56 抗原的相对密度可以分为 2 个亚群,CD56<sup>bright</sup> 和 CD56<sup>dim</sup>,前者主要存在于次级淋巴组织,具有分泌细胞因子和向 CD56<sup>dim</sup> 方向分化的能力,后者多见于外周血,能快速诱导炎症反应以及表现出强力的细胞毒作用<sup>[8]</sup>。NK 细胞功能的调节有赖于细胞表面不同的激活受体和抑制受体,借助不同表面受体有两种肿瘤识别模型,“丢失自我”和“压力诱导”识别模型,前者由于肿瘤细胞表面 MHC I 类分子丢失,与 NK 细胞表面针对 MHC I 类分子的抑制受体的结合缺失,抑制信号减弱,而后者是肿瘤表面蛋白,与 NK 细胞激活受体结合,刺激 NK 细胞活化,发挥细胞毒作用,通过直接或者间接的方式杀死肿瘤细胞<sup>[9]</sup>。

既往研究发现初诊时 CML 患者 NK 细胞存在缺陷,表现为总体数量的改变、脱颗粒能力受损、CD56<sup>dim</sup> NK 细胞比例及数量降低、激活受体表达减少而抑制受体增加,并且随着疾病的进展,数量和功能进一步下降<sup>[4,6,10]</sup>。而关于初诊时 ANKC 与 TKI 治疗反应相关性的报道较少。本研究发现 CML-CP 患者初诊时高 ANKC 是预测治疗最佳反应的独立影响因素,这与既往在慢性淋巴细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的报道一致<sup>[11-12]</sup>。此外,我们发现初诊 WBC $< 129.47 \times 10^9$ 个/L 和二代

TKI 治疗也是治疗最佳反应的独立影响因素,与相关报道一致<sup>[13-14]</sup>。有文献报道了关于伊马替尼停药成功率与 NK 细胞的相关性,其中发现停药前 ANKC 越高, TFR 率越高;CD56<sup>bright</sup> NK 细胞越高,复发率越高<sup>[1-2]</sup>。由此可以推测,治疗前 NK 细胞即便在功能上存在缺陷,当 ANKC 较高时,伴随着成熟 NK 细胞相对较高,可以发挥相对较强的抗 CML 作用,预示着较好的治疗反应。

本研究发现随着患者治疗后 3 个月获得最佳反应,BCR-ABL<sup>+</sup>细胞迅速下降,ANKC 较初诊时明显降低。有文献报道在 CML(尤其进展期 CML)患者中发现,NK 细胞的祖细胞<sup>[4]</sup>或外周血 NK 细胞<sup>[15]</sup>可检测到 BCR-ABL 阳性,推测 CML 的疾病初期存在异常 NK 细胞增殖,经过 TKI 有效治疗后异常 NK 细胞减少。这正好解释了本研究中 ANKC 的变化,即 3 个月治疗有效的患者 ANKC 呈现下降趋势。

在动态分析 ANKC 变化与疗效的相关性时发现,12 个月能达最佳反应的患者,其 ANKC 在治疗 3 个月时出现一过性降低,治疗 12 个月时升高并高于初诊时 ANKC。这种改变表明在 TKI 治疗过程中,CML 患者的 NK 细胞在数量及功能上发生了变化。有文献报道 CML 患者初诊时 NK 细胞数量及功能虽均受损,在达到 DMR 后,NK 细胞比例及数量增加、表现为更成熟的表型且细胞毒性增加,同时部分表



面激活受体表达增加,抑制受体表达降低,这些现象均提示TKI可以恢复NK细胞的功能<sup>[5,10,16]</sup>。

综上,免疫功能在CML的发生、转归和停药后维持TFR中起到了重要作用。本研究发现CML-CP患者初诊时ANKC $\geq 0.14 \times 10^9$ 个/L可以预测TKI治疗后3、12个月的治疗最佳反应,同时ANKC动态变化的趋势预示着治疗反应。由于本研究为回顾性分析,仍需前瞻性临床研究和扩大样本量进一步验证,同时深入探讨NK细胞的功能状态。

#### [参考文献]

- [1] ILANDER M, OLSSON-STROMBERG U, SCHLUMS H, et al. Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2017, 31(5): 1108-1116
- [2] DUMAS P Y, BERARD E, BREAL C, et al. Killer immunoglobulin-like receptor genotypes and chronic myeloid leukemia outcomes after imatinib cessation for treatment-free remission[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(11): 4976-4985
- [3] KUMAGAI T, NAKASEKO C, NISHIWAKI K, et al. Dasatinib cessation after deep molecular response exceeding 2 years and natural killer cell transition during dasatinib consolidation[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(1): 182-192
- [4] CARLSTEN M, JARAS M. Natural killer cells in myeloid malignancies: immune surveillance, NK cell dysfunction, and pharmacological opportunities to bolster the endogenous NK cells[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2357
- [5] HUGHES A, CLARSON J, TANG C, et al. CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors and decreased PD-1 and immune suppressors[J]. *Blood*, 2017, 129(9): 1166-1176
- [6] CHEN C I, KOSCHMIEDER S, KERSTIENS L, et al. NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR-ABL-positive mice[J]. *Leukemia*, 2012, 26: 465-474
- [7] 中华医学会血液学分会. 中国慢性髓性白血病诊断与治疗指南[J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(8): 633-639
- [8] MORETTA L. Dissecting CD56dim human NK cells[J]. *Blood*, 2010, 116(19): 3689-3691
- [9] LEE H R, BAEK K H. Role of natural killer cells for immunotherapy in chronic myeloid leukemia (review) [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41: 2625-2635
- [10] CHANG M C, CHENG H I, HSU K, et al. NKG2A down-regulation by dasatinib enhances natural killer cytotoxicity and accelerates effective treatment responses in patients with chronic myeloid leukemia[J]. *Front Immunol*, 2019, 9: 3152
- [11] 王文婷,王莉,吴雨洁,等. 外周血NK细胞绝对值在慢性淋巴细胞白血病中的预后价值[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(5): 611-614
- [12] KLANOVA M, OESTERGAARD M Z, TRNENY M, et al. Prognostic impact of natural killer cell count in follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(15): 4634-4643
- [13] QIN Y Z, JIANG Q, JIANG H, et al. Combination of white blood cell count at presentation with molecular response at 3 months better predicts deep molecular responses to imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia patients [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(2): e2486
- [14] CORTES J, REA D, LIPTON J H. Treatment-free remission with first- and second-generation tyrosine kinase inhibitors [J]. *Am J Hematol*, 2019, 94(3): 346-357
- [15] SOPPER S, MUSTJOKI S, GJERTSEN B T, et al. NK cell dynamics and association with molecular response in early chronic phase chronic myelogenous leukemia (CML-CP) patients treated with nilotinib [J]. *Leukemia*, 2017, 31: 2264-2267
- [16] RODRIGUES-SANTOS P, LÓPEZ-SEJAS N, ALMEIDA J S, et al. Effect of age on NK cell compartment in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2587

[收稿日期] 2020-02-12