

成人 t(8;21) 急性髓系白血病患者初诊 Ki-67 的表达特征及预后意义*

刀凤亭 杨璐 王亚哲 常艳 袁晓英 李玲娣 陈文敏 龙玲玉 刘艳荣 秦亚涛**

(北京大学人民医院 北京大学血液病研究所 国家血液系统疾病临床医学研究中心 北京 100044)

摘要 目的: 研究成人 t(8;21) 急性髓系白血病(AML) 初诊 Ki-67 抗原的表达特征及预后意义。方法: 采集 2012 年 7 月至 2019 年 2 月本院 57 例成人初诊 t(8;21) AML 患者的新鲜骨髓标本, 采用流式细胞术(FCM) 检测 CD34 和 Ki-67 抗原, 分析 Ki-67 表达与患者初诊生物学特征、疗效及复发的关系。结果: 全部患者中, CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例的中位值为 30.5% (范围: 10.0% ~ 65.8%); 通过受试者工作特征(ROC) 曲线确定 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例的最适分界阈值, CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞高比例与初诊 c-KIT 基因突变阳性及 WT1 转录本低水平均明显相关 ($P=0.001$; $P=0.042$)。随访的 36 例患者中, CD34⁺ Ki-67⁺ 高比例比低比例患者具有明显更高的 1 年累积复发 (CIR) 率 ($P=0.035$); 此外, 初诊 WT1 转录本低水平和微小残留病 (MRD) 高水平 (2 个疗程巩固治疗后 RUNX1-RUNX1T1 转录本水平下降 $<3\text{-log}$) 均与更高的 1 年 CIR 率明显相关 ($P<0.0001$; $P=0.041$), 初诊 c-KIT 基因突变阳性和白细胞计数 $>10 \times 10^9/\text{L}$ 的患者分别有较高的 1 年 CIR 率趋势 ($P=0.091$; $P=0.054$)。联合分组显示, MRD 高水平同时 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞高比例的患者比其他患者具有明显更高的 1 年 CIR 率 ($P<0.0001$)。结论: 初诊骨髓高比例的 CD34⁺ Ki-67⁺ 可能是成人 t(8;21) AML 患者预后不良因素, MRD 联合初诊 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例可能比单纯 MRD 更好地预测复发。

关键词 Ki-67 抗原 t(8;21) 急性髓系白血病 c-KIT WT1 微小残留病

中图分类号 Q25

1 背景

t(8;21) AML 是常见的 AML 类型, 尽管属于低危核型, 但患者疗效差异大^[1-3], 因此, 有必要寻找更多指标对患者进一步危险分层以实现精准治疗。目前已有的研究显示, 分子生物学特征是 t(8;21) AML 患者的重要预后评估指标, 初诊 c-KIT 基因突变阳性、WT1 转录本低水平及以 RUNX1-RUNX1T1 转录本水平代表的 MRD 高水平均与预后不良相关^[4-9], 而细胞生物学特征在 t(8;21) AML 中的预后意义相关研究较少。

增殖是细胞的重要生物学特征, 可反应肿瘤细胞

侵袭性。Ki-67 是一种细胞周期依赖性核蛋白, 常用于评估细胞增殖能力, 在临床上已常规检测用于淋巴瘤的分期及预后评估^[10-14]。但目前 AML 领域中关于 Ki-67 抗原的研究较少, 其预后意义尚不清楚^[15-25], 在 t(8;21) AML 中 Ki-67 抗原的表达特征及预后意义未见报道。因此, 本研究将采用 FCM 检测 57 例成人初诊 t(8;21) AML 患者 CD34⁺ 细胞群的 Ki-67 抗原, 来研究 Ki-67 抗原的表达特征及预后意义。

2 方法

2.1 病例资料

遵照医学伦理学标准, 通过北京大学人民医院伦理委员会审查, 经患者本人知情同意, 共纳入本院 2012 年 7 月至 2019 年 2 月确诊的 57 例 t(8;21) AML 患者,

收稿日期: 2019-08-22

* 国家自然科学基金(81570130、81870125)资助项目

** 通讯作者, 电子信箱: qin2000@aliyun.com

依据细胞形态学、免疫学、遗传学及分子学确诊。男 30 例,女 27 例,中位年龄 39 (16 ~ 68) 岁。36 例在本院接受治疗随访,其中男 17 例,女 19 例,中位年龄 38 岁 (18 ~ 59) 岁。病例随访截止日期至 2019 年 7 月,中位随访 17.5 (1.5 ~ 67.5) 月,把接受异基因造血干细胞移植 (allo-HSCT) 的患者随访时间截止至移植前的中位随访时间为 7 (1.5 ~ 66.5) 月。

2.2 治疗方案

36 例患者在本院接受标准剂量 IA、DA 或 HAA 方案诱导化疗,34 例患者在达到完全缓解 (CR) 之后接受了 2 ~ 6 个疗程以阿糖胞苷为基础的巩固治疗,其中 19 例患者仅接受了化疗,15 例患者化疗 1 ~ 5 个疗程后在 CR 状态下接受了 allo-HSCT (单倍体半相合移植 9 例,全相合移植 6 例)。

2.3 试剂与仪器

FACS™ 裂解液 (美国, Becton Dickinson 公司); 固定破膜剂 (中国, 联科生物公司) 单克隆抗体 CD45-V500、CD34-PerCP-Cy5.5、Ki-67-PE (美国, Becton Dickinson 公司); FACS Canto II 型流式细胞仪 (美国, Becton Dickinson 公司); Kaluza 流式分析软件 (美国, Beckman Coulter 公司)。

2.4 检测方法

初诊 t(8;21) AML 患者的新鲜骨髓样本采集后进行细胞计数,每管加入 2×10^6 细胞,然后加入 4 色荧光素标记的单克隆抗体 CD45、CD34 充分混匀,室温避光孵育 15min,加入 $1 \times$ FACS™ 裂解液,室温避光静置 15min,溶血后 300g 离心 5min,弃上清,加入 100 μ l 固定破膜剂 MEDIUM A,室温避光孵育 15min,加入 3ml 含有 0.1% NaN₃ 和 1% BSA 的 PBS 洗液 300g 离心洗涤 5min,弃上清,涡旋振荡,加入 100 μ l 固定破膜剂 MEDIUM B 和单克隆抗体 Ki-67,涡旋振荡,室温避光孵育 15min,加入 3ml PBS 洗液 300g 离心洗涤 5min,弃上清,加 PBS 缓冲液 300 μ l,上流式细胞仪检测,获取 1×10^6 个细胞。设门方式如图 1 所示,以 FSC-H/FSC-A 设门去除双连体,SSC-A/FSC-A 设门去除非特异性细胞及细胞碎片,界定有核细胞,在有核细胞中以 CD45/SSC-A 设门界定出 CD45^{dim}/SSC^{low} 细胞群即为 Blast 细胞群 (图 1a),随后在 Blast 细胞中以 SSC-A/CD34 设门界定 CD34⁺ 细胞群 (图 1b),在 CD34⁺ 细胞中以 SSC-A/Ki-67 设门,根据阴性对照 (图 1c) 界定出 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞群 (图 1d)。

2.5 统计学分析

应用 SPSS 19.0 (美国, SPSS 公司) 和 GraphPad

Prism 5 软件 (美国, GraphPad 公司) 进行数据处理。应用 Mann Whitney 检验比较各组间的差异,用 Chi-square 检验比较各组百分率的差异。以复发为指标生成 ROC 曲线,并根据约登指数确定最适分界阈值。总生存率 (OS) 的计算及累积复发率 (CIR) 的比较采用 Kaplan-Meier 生存分析和 Log-rank 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 患者初诊生物学特征及疗效

57 例 t(8;21) AML 患者中,29 例 (50.9%) c-KIT 基因突变阳性。基于本所前期研究^[7], WT 转录本水平 $> 5\%$ 和 $\leq 5\%$ 分别定义为 WT1 转录本高水平 (H-WT1) 和 WT1 转录本低水平 (L-WT1),40 例 (70.2%) 为 H-WT1,17 例 (29.8%) 为 L-WT1。

基于本所前期研究^[9], t(8;21) AML 患者在 2 个疗程巩固治疗后, RUNX1-RUNX1T1 转录本水平与基线相比下降 $< 3\text{-log}$ 和 $\geq 3\text{-log}$ (即 RUNX1-RUNX1T1 转录本水平 $> 0.4\%$ 和 $\leq 0.4\%$) 分别定义为 MRD 高水平 (H-MRD) 和 MRD 低水平 (L-MRD)。至少随访至 2 个疗程巩固治疗的 31 例患者中,14 例 (45.2%) 为 H-MRD;17 例 (54.8%) 为 L-MRD。

随访的 36 例 t(8;21) AML 患者中,35 例 (97.2%) 在 1-3 个疗程诱导治疗后达到 CR,随后接受巩固治疗的 34 例患者中 9 例 (26.5%) 复发,其中 5 例 (14.7%) 在接受 allo-HSCT 前血液学复发,4 例 (11.8%) 在接受 allo-HSCT 后复发 (2 例为血液学复发,2 例为髓外复发);1 例 (2.8%) 死亡。全部患者 2 年 OS 率为 96.3% [95% CI 76.5% ~ 99.5%], 2 年 CIR 率为 38.5% [95% CI 13.2% ~ 63.8%]。

3.2 Ki-67 表达情况

57 例 t(8;21) AML 患者中, CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例的中位值为 30.5% (范围 10.0% ~ 65.8%), 随访的 36 例患者中, CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例的中位值为 32.8% (范围 10.0% ~ 59.9%)。在本研究中,利用 ROC 曲线获得 CD34⁺ Ki-67⁺ 的分界阈值为 26.0%, 大于等于分界阈值定义为高比例组 (H-CD34⁺ Ki-67⁺), 小于分界阈值则定义为低比例组 (L-CD34⁺ Ki-67⁺)。57 例 t(8;21) AML 患者中,35 例 (61.4%) 为 H-CD34⁺ Ki-67⁺,22 例 (38.6%) 为 L-CD34⁺ Ki-67⁺; 随访的 36 例患者中,22 例 (61.1%) 为 H-CD34⁺ Ki-67⁺,14 例 (38.9%) 为 L-CD34⁺ Ki-67⁺。

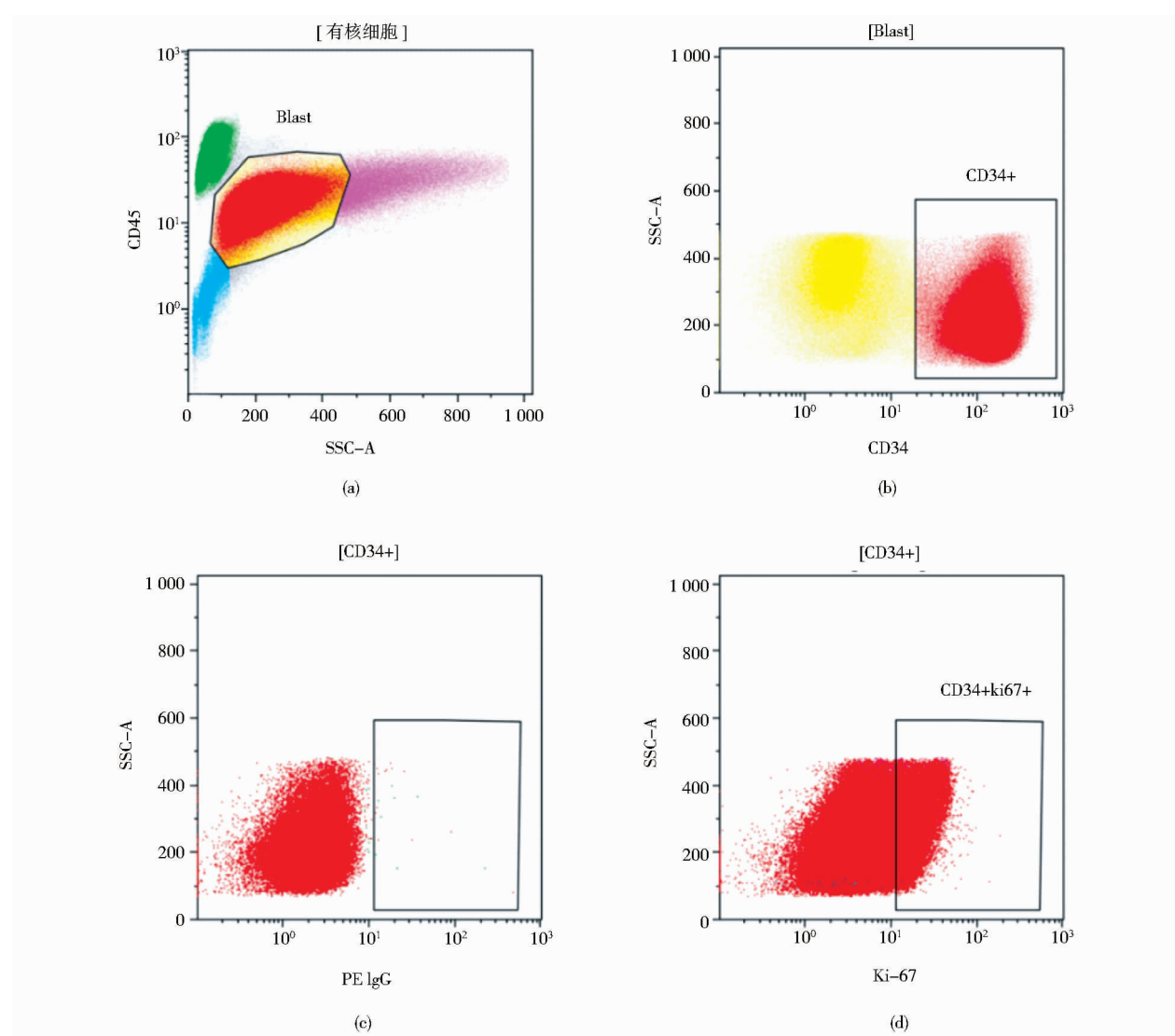


图1 FCM 各群细胞分析界定方式

Fig.1 Gating strategy

(a) blast cells in Lin- cells (b) CD34⁺ cells within blast cells (c) isotype control of Ki-67⁺ cells (d) Ki-67⁺ cells in CD34⁺ cells

3.3 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例与初诊生物学特征的关系

CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例与初诊生物学特征的关系如表1。H-CD34⁺ Ki-67⁺ 患者初诊 c-KIT 基因突变阳性率明显高于 L-CD34⁺ Ki-67⁺ 患者 (24/35 vs 5/22; 68.6% vs 22.7%; $P = 0.001$) ; H-CD34⁺ Ki-67⁺ 与 L-WT1 明显相关 (14/35 vs 3/22; 40% vs 13.6%; $P = 0.042$) ; H-CD34⁺ Ki-67⁺ 患者具有更高的女性患者比例 (15/22 vs 4/14; 68.2% vs 28.6%; $P = 0.039$) 。CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例与患者初诊时的年龄、白细胞计数、血红蛋白、血小板计数及 t(8;21) 之外的其它异常

核型均无明显相关 ($P > 0.05$) 。

3.4 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例对 1 个疗程诱导化疗后 CR 获得及 MRD 的影响

随访的 36 例 t(8;21) AML 患者中, 30 例 t(8;21) AML 患者在 1 个疗程诱导化疗后达到 CR (83.3%), CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞的比例与 CR 的获得无明显相关。 (18/22 vs 12/14; 81.8% vs 85.7%, $P = 1.0$) 。

14 例 H-MRD 的患者中, 8 例 (57.1%) 为 H-CD34⁺ Ki-67⁺, 17 例 L-MRD 的患者中, 11 例 (64.7%) 为 H-CD34⁺ Ki-67⁺, CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例与 MRD 水平无明显相关性 ($P > 0.05$) 。

表 1 患者初诊 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例与初诊生物学特征的关系

Table 1 The relationship between the percentage of CD34⁺ Ki-67⁺ cells and Characteristics of the patients at diagnosis

参数	H-CD34 ⁺ Ki-67 ⁺ (n = 35)	L-CD34 ⁺ Ki-67 ⁺ (n = 22)	P 值
年龄			
≤ 40 岁	16	14	0.28
> 40 岁	19	8	
性别			
男	16	14	0.28
女	19	8	
白细胞计数			
≤ 10 × 10 ⁹ /L	21	12	0.58
> 10 × 10 ⁹ /L	12	10	
血红蛋白			
≤ 80 g/L	18	14	0.58
> 80 g/L	15	8	
血小板			
≤ 35 × 10 ⁹ /L	20	14	1.0
> 35 × 10 ⁹ /L	13	8	
t(8;21)之外的其它异常核型 (n = 35)			
有	10	10	0.089
无	12	3	
c-KIT 基因突变			
阳性	24	5	0.001
阴性	11	17	
WT1 转录本水平			
L-WT1	14	3	0.042
H-WT1	21	19	

3.5 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例及 MRD 对复发的影响

把随访的 36 例 t(8;21) AML 患者中接受 allo-HSCT 的患者截尾至移植前,1 年 CIR 率为 22.9% [95% CI 2.6% ~ 55.0%]。34 例 CR 之后接受巩固治疗的患者中 5 例复发,这 5 例患者均为 H-CD34⁺ Ki-67⁺ 的患者,H-CD34⁺ Ki-67⁺ 的患者比 L-CD34⁺ Ki-67⁺ 的患者具有明显更高的 1 年 CIR 率(40.1% [95% CI 10.1% ~ 69.4%] vs 0;P = 0.035;图 2a)。

随访至 2 个疗程巩固治疗的 31 例患者中,H-MRD 的患者比 L-MRD 的患者有明显更高的 1 年 CIR 率

(44.6% [95% CI 10.3% ~ 75.0%] vs 8.3% [95% CI 0.0% ~ 70.5%];P = 0.041;图 2b)。

由于 CD34⁺ Ki-67⁺ 比例及 MRD 水平分别与 CIR 相关并且二者之间无明显相关,因此,我们进一步将 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例与 MRD 水平联合。结果显示,8 例 H- CD34⁺ Ki-67⁺ 同时 H-MRD 的患者(H-CD34⁺ Ki-67⁺/H-MRD)中,4 例(50%)复发,H-CD34⁺ Ki-67⁺/H-MRD 患者比其它患者具有明显更高的 1 年 CIR 率(79.2% [95% CI 49.4% ~ 92.6%] vs 6.3% [95% CI 0% ~ 67.7%];P < 0.000 1;图 2c)。

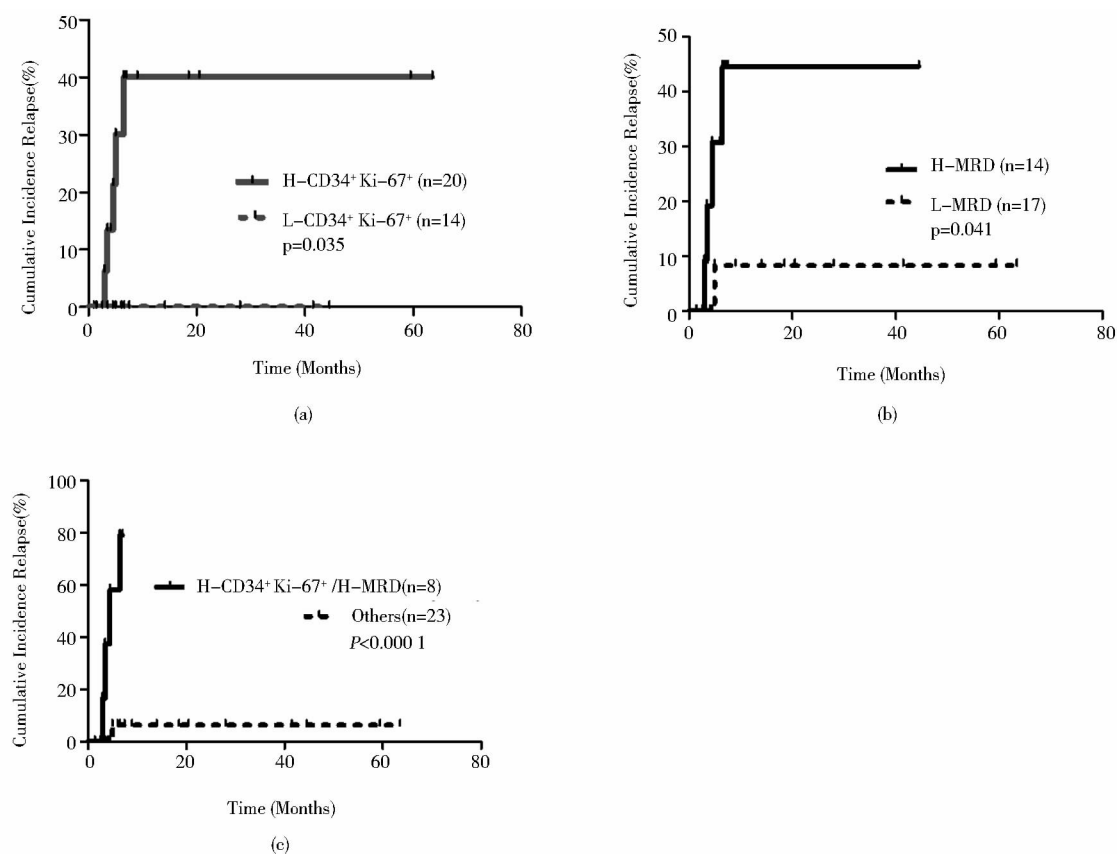


图2 初诊 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例、MRD 水平及 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例联合 MRD 水平对患者 1 年 CIR 率的影响

Fig. 2 The impact of the percentage of CD34⁺ Ki-67⁺ cells, the MRD level and the combination of both on 1-year CIR rate

(a) H-CD34⁺ Ki-67⁺ vs L-CD34⁺ Ki-67⁺ (b) H-MRD vs L-MRD (c) H-CD34⁺ Ki-67⁺ /H-MRD vs Others

4 讨论

初诊生物学特征是 t(8;21) AML 的重要临床指标,其中分子生物学特征已成为重要的预后评估指标^[26-27]。III 型酪氨酸激酶家族成员 c-KIT 通过调节下游信号通路参与造血干细胞的增殖和分化,初诊 c-KIT 基因突变阳性被认为是 t(8;21) AML 患者的预后不良因素^[4-6,28-29];WT1 是一种转录因子,在包括 AML 在内的多种类型肿瘤患者中往往呈过表达状态,初诊 WT1 转录本水平在 AML 患者中的预后意义存在争议,本所前期研究发现初诊时 WT1 转录本低水平预示 t(8;21) AML 患者预后不良^[7,30-33]。此外,RUNX1-RUNX1T1 转录本水平是 t(8;21) AML 疗效监测的重要指标,其他研究及本所研究证实其代表的 MRD 水平是 t(8;21) AML 的独立预后因素^[8,9]。除了分子学之外,细胞生物学特

征在 t(8;21) AML 患者中的预后意义有待研究。增殖是重要的细胞生物学特征,肿瘤细胞的增殖能力可在一定程度上反映疾病恶性程度。Ki-67 抗原主要表达于细胞周期中的 G1 中期至 M 期,是细胞增殖的标志,通过检测 Ki-67 抗原可反映细胞增殖情况^[10-11]。免疫组织化学染色法是 Ki-67 抗原表达的传统检测方法,普遍应用于淋巴瘤等实体瘤,早年对 AML 患者 Ki-67 表达的研究也主要运用此方法^[15-18]。与免疫组织化学染色法相比,FCM 适用于更多类型的样本,尤其可以对不同细胞群进行各自分析,因而更适于白血病患者骨髓样本 Ki-67 抗原的检测^[19-23]。本研究即通过 FCM 检测成人初诊 t(8;21) AML 患者 CD34⁺ 细胞群的 Ki-67 阳性率,了解 t(8;21) AML 白血病干/祖细胞的增殖特征,并研究 Ki-67 表达与初诊生物学特征、疗效及复发的关系。

有关 AML 患者的研究发现, Ki-67 表达与人口学特征及血象特征无关^[19,22], 但未见针对 t(8;21) AML 的研究报道。本研究发现, 成人 t(8;21) AML 患者 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞高比例与初诊 c-KIT 基因突变阳性和 WT1 转录本低水平相关, 提示高增殖活性与目前已明确的预后不良因素有关, CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例可能有预后意义; 与有关总体 AML 的研究一致^[19,22], 本研究亦未发现 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例与其他初诊生物学特征相关。此外, CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例与 MRD 水平无明显相关, 提示初诊时高增殖活性可能与 MRD 是两个独立的因素。

Ki-67 表达在 AML 患者中的预后意义的研究较少并且未见进行生存分析的研究^[18-19], Han 等^[19] 通过 FCM 检测发现 AML 患者中有核细胞的 Ki-67 阳性率与 CR 率和存活率无关。Nowicki 等^[18] 通过免疫组织化学法检测发现诱导化疗 15 天原始细胞 Ki-67 表达阴性与儿童高危 AML 患者早期死亡相关。本研究亦发现, 成人 t(8;21) AML 患者初诊 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例与 1 个疗程诱导后 CR 率无关。我们通过生存分析还发现, CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞高比例与更高的 CIR 率相关, 提示成人 t(8;21) AML 白血病人/祖细胞的高增殖活性与预后不良相关。

本研究发现成人 t(8;21) AML 中, CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞高比例和 MRD 高水平均与高 CIR 率相关。由于 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞比例代表了患者初诊生物学特征, 而 MRD 水平代表了患者对治疗的分子学反应, 并且两者无明显相关, 因此, 我们进一步将这两个指标组合对患者分组, 结果提示, 联合比单一指标能够更好地分组患者, 具有更显著的复发预测意义。该结果提示, 对患者初诊生物学特征的评估和治疗后分子学反应的监测对于成人 t(8;21) AML 患者预后分层同样重要, 两者联合或能更敏感地预测复发。

综上所述, 本研究发现, 初诊骨髓高比例的 CD34⁺ Ki-67⁺ 可能是成人 t(8;21) AML 患者预后不良因素, 初诊 CD34⁺ Ki-67⁺ 细胞高比例同时 MRD 高水平比单纯 MRD 可能更好地预测复发。由于本研究病例数较少, 随访时间较短, 研究结果有待扩大样本量进一步验证。

参考文献

[1] Byrd J C, Mrozek K, Dodge R K, et al. Cancer and leukemia Group B (CALGB 8461). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of

relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*, 2002, 100(13):4325-4336.

- [2] Schlenk R F, Benner A, Krauter J, et al. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol*, 2004, 22(18):3741-3750.
- [3] Marcucci G, Mrózek K, Ruppert A S, et al. Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*, 2005, 23(24):5705-5717.
- [4] Schnittger S, Kohl T M, Haferlach T, et al. KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood*, 2006, 107(5):1791-1799.
- [5] Wang Y Y, Zhou G B, Yin T, et al. AML1-ETO and C-KIT mutation/overexpression in t(8;21) leukemia: implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(4):1104-1109.
- [6] Qin Y Z, Zhu H H, Jiang Q, et al. Heterogeneous prognosis among KIT mutation types in adult acute myeloid leukemia patients with t(8;21). *Blood Cancer J*, 2018, 8(8):76.
- [7] Qin Y Z, Wang Y, Zhu H H, et al. Low WT1 transcript levels at diagnosis predicted poor outcomes of acute myeloid leukemia patients with t(8;21) who received chemotherapy or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Chin J Cancer*, 2016, 35:46.
- [8] 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. *Blood*, 2013, 121(12):2213-2223.
- [9] Zhu H H, Zhang X H, Qin Y Z, 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. *Blood*, 2013, 121(20):4056-4062.
- [10] Shevra C R, Ghosh A, Kumar M. Cyclin D1 and Ki-67 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *J Postgrad Med*, 2015, 61(1):15-20.
- [11] Zheng J N, Pei D S, Mao L J, et al. Inhibition of renal cancer cell growth in vitro and in vivo with oncolytic adenovirus armed short hairpin RNA targeting Ki-67 encoding mRNA. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16(1):20-32.
- [12] He X, Chen Z, Fu T, et al. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: evidence from a systematic meta-analysis. *BMC Cancer*, 2014, 14:153.

- [13] Vose J M. Mantle cell lymphoma; 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *Am J Hematol*, 2013, 88(12):1082-1088.
- [14] Xu P, Yu D, Wang L, et al. Analysis of prognostic factors and comparison of prognostic scores in peripheral T cell lymphoma, not otherwise specified: a single—institution study of 105 Chinese patients. *Ann Hematol*, 2015, 94(2):239-247.
- [15] Shome D K, Khurana N. Distinctive AgNOR patterns of myeloid and lymphoid blasts in acute leukemia. *Am J Hematol*, 1999, 61(2):149-152.
- [16] 王喜安, 金冠球, 肖正达, 等. 白血病细胞 Ki-67 表达和 Ag-NORs 计数及其临床意义. *白血病·淋巴瘤*, 2001, 10(1):22-24.
- Wang X A, Jin G Q, Xiao Z D, et al. Ki-67 expression and Ag-NORs count of leukemia cells and its clinical significance. *Leukemia · Lymphoma*, 2001, 10(1):22-24.
- [17] Sun X, Medeiros L J, Lu D, et al. Dysplasia and high proliferation rate are common in acute myeloid leukemia with inv(16)(p13q22). *Am J Clin Pathol*, 2003, 120(2):236-245.
- [18] Nowicki M, Ostalska-Nowicka D, Miskowiak B. Prognostic significance of Ki67-negative blast cell clone in the high risk group of children treated for acute myeloid leukemia. *Folia Histochem Cytobiol*, 2006, 44(1):49-52.
- [19] Han K, Kahng J, Kim M, et al. Expression of functional markers in acute nonlymphoblastic leukemia. *Acta Haematol*, 2000, 104(4):174-180.
- [20] Kaaijk P, Kaspers G J, Van Wering E R, et al. Cell proliferation is related to in vitro drug resistance in childhood acute leukemia. *Br J Cancer*, 2003, 88(5):775-781.
- [21] 施均, 邵宗鸿, 刘鸿, 等. 骨髓增生异常综合征患者骨髓细胞周期及 CD34⁺ 细胞增殖特征的研究. *中华血液学杂志*, 2004, 25(11):641-644.
- Shi J, Shao Z H, Liu H, et al. Study on the characteristics of cell cycle and proliferation of CD34⁺ hematopoietic stem cells in myelodysplastic syndromes. *Chinese Journal of Hematology*, 2004, 25(11):641-644.
- [22] 杨文群. Ki-67、P-gp 在急性白血病中的表达及意义. 长沙: 中南大学, 2011.
- Yang W Q. The expression and significance of Ki-67 and P-gp in patients with acute leukemia. Changsha: Central South University, 2011.
- [23] 王敏, 王立茹. Ki-67 在急性髓系白血病中的研究进展. *中华实验血液学*, 2016, 24(4):1264-1268.
- Wang M, Wang L R. Research progress of Ki-67 in acute myeloid leukemia. *J Exp Hematol*, 2016, 24(4):1264-1268.
- [24] Jothilingam P, Basu D, Dutta T K. Angiogenesis and proliferation index in patients with acute leukemia: a prospective study. *Bone Marrow Res*, 2014, 2014:634874.
- [25] Staber P B, Linkesch W, Zauner D, et al. Common alterations in gene expression and increased proliferation in recurrent acute myeloid leukemia. *Oncogene*, 2004, 23(4):894-904.
- [26] Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML 10 Trial. *Blood*, 1998, 92(7):2322-2333.
- [27] Bloomfield C D, Lawrence D, Byrd J C, et al. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res*, 1998, 58(18):4173-4179.
- [28] Besmer P, Murphy J E, George P C, et al. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*, 1986, 320(6061):415-421.
- [29] Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest*, 1993, 92(4):1736-1744.
- [30] Ho P A, Kuhn J, Gerbing R B, et al. WT1 synonymous single nucleotide polymorphism rs16754 correlates with higher mRNA expression and predicts significantly improved outcome in favorable-risk pediatric acute myeloid leukemia: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*, 2011, 29(6):704-711.
- [31] Miglino M, Colombo N, Pica G, et al. WT1 overexpression at diagnosis may predict favorable outcome in patients with de novo non-M3 acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2011, 52(10):1961-1969.
- [32] Damm F, Heuser M, Morgan M, et al. Integrative prognostic risk score in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*, 2011, 117(17):4561-4568.
- [33] Nomdedéu J F, Hoyos M, Carricondo M, et al. Bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and postintensification in adult de novo AML. *Leukemia*, 2013, 27(11):2157-2164.

Characteristics and Prognostic Significance of Ki-67 Expression at diagnosis in Adult t(8;21) Acute Myeloid Leukemia

DAO Feng-ting YANG Lu WANG Ya-zhe CHANG Yan YUAN Xiao-ying LI Ling-di CHEN Wen-min

LONG Ling-yu LIU Yan-rong QIN Ya-zhen

(Peking University Peoples' Hospital, Peking University Institute of Hematology,

National Clinical Research Center for Hematologic Disease, Beijing China, 100044)

Abstract Objective: To investigate the characteristics and prognostic significance of Ki-67 antigen expression at diagnosis in adult t(8;21) acute myeloid leukemia (AML). Methods: Bone marrow samples of 57 adult t(8;21) AML patients were collected at diagnosis from July 2012 to February 2019 in our hospital, their frequencies of Ki-67 in CD34⁺ cells were detected by flow cytometry method, and the relationships between Ki-67 and the biological characteristics, therapeutic effect and relapse were analyzed. Results: Of all patients tested, the median percentage of CD34⁺ Ki-67⁺ cells were 30.5% (range: 10.0% ~ 65.8%); A receiver operating characteristic (ROC) curve was used to identify the optimal cutoff levels of CD34⁺ Ki-67⁺ cells, higher frequencies of CD34⁺ Ki-67⁺ cells were significantly related to higher rate of c-KIT mutation and lower WT1 transcript level at diagnosis ($P=0.001$; $P=0.042$). Of all patients followed up, higher frequency of CD34⁺ Ki-67⁺ cells was significantly related to a higher 1-year cumulative incidence relapse (CIR) rate ($P=0.035$). In addition, both lower WT1 transcript level at diagnosis and higher level of minimal residual diseases (MRD, < 3-log reduction of the RUNX1-RUNX1T1 transcript level after the second consolidation therapy) were significantly related to a higher 1-year CIR rate ($P<0.0001$; $P=0.041$), and patients with c-KIT mutation and white blood cell count $>10 \times 10^9/L$ at diagnosis tended to have higher 1-year CIR rates, respectively ($P=0.091$; $P=0.054$). Patients simultaneously with high frequency of CD34⁺ Ki-67⁺ cells and high MRD levels have a significantly higher 1-year CIR rate than others ($P<0.0001$). Conclusion: In adult patients with t(8;21) AML, high frequency of CD34⁺ Ki-67⁺ cells at diagnosis may be a poor prognostic factor, combination of MRD levels and frequency of CD34⁺ Ki-67⁺ cells at diagnosis may better predict relapse than MRD alone.

Key words Ki-67 antigen t(8;21) AML Proto-oncogene proteins c-KIT WT1 Minimal residual diseases