

• 临床检验研究论著 •

多参数流式细胞术在白血病免疫分型中的应用探讨

熊 见,解小红,黄 敏,王长本
(重庆三峡中心医院临床检验科 404000)

摘 要:目的 探讨多参数流式细胞术(FCM)在白血病免疫分型中的应用。方法 利用 CD45/SSC 设门的四色荧光 FCM 检测 339 例白血病患者骨髓细胞表面标记。结果 339 例白血病中急性髓系白血病(AML)150 例,占 44.2%,髓系抗原表达率以 CD33(86.7%)最高,其余从高到低依次为 CD117、CD3、cMPO、CD15。淋巴细胞性白血病 183 例,占 54.0%,其中急性 B 淋巴细胞白血病(ALL-B)110 例、急性 T 淋巴细胞白血病(ALL-T)27 例、慢性淋巴细胞白血病(CLL)46 例。ALL-B 淋巴系抗原表达率以 CD19 最高,其余由高到低依次为 cCD79a、CD10、CD22、CD20,ALL-T 淋巴系抗原表达率以 CD7 最高,其余由高到低依次为 CD2、CD5、CD3。髓系白血病中常见交叉表达淋巴系抗原 CD56、CD7、CD9。ALL 中常见交叉表达髓系抗原 CD13、CD33、CD14 的表达与单核细胞白血病相关。结论 应用多参数 FCM 能对白血病进行分型,对于白血病的诊断治疗和预后判断均有重要价值。

关键词:白血病; 流式细胞术; 免疫分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.12.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)12-1427-03

Application of multi-parameter flow cytometry for the immunophenotyping of leukemia

Xiong Jian, Xie Xiaohong, Huang Min, Wang Changben

(Department of Clinical Laboratory, Chongqing Three George Center Hospital, Chongqing 404000, China)

Abstract: Objective To observe the application and clinical significance of multi-parameter flow cytometry(FCM) for the immunophenotyping of leukemia. **Methods** Immunophenotyping of 339 cases of bone marrow specimens from patients with leukemia were analyzed by four color FCM with the method of CD45/SSC double parameter and scatter spot picture. **Results** In the 339 cases of leukemia, acute myeloid leukemia(AML) was for 150 cases(44.2%), and among medullary system antigens, CD33 expression rate was the highest(86.7%), followed by CD117, CD3, cMPO and CD15. Lymphocytic leukemia was for 183 cases(54.0%), including acute lymphoblastic leukemia(ALL)-B 110 cases, ALL-T 27 cases and chronic lymphoblastic leukemia(CLL) 46 cases. Among B-series of lymphocyte system antigens, expression rate of CD19 was the highest, followed by cCD79a, CD10, CD22 and CD20. Among T-series of lymphocyte system antigens, expression rate of CD7 was the highest, followed by CD2, CD5 and CD3. CD56, CD7 and CD9 were the common cross-expressed lymphocyte system antigens in myeloid leukemia, CD13 and CD3 were the common cross-expressed myeloid system antigens in ALL, and the expression of CD14 might be associated with monocytic leukemia. **Conclusion** Multi-parameter FCM could be used for the identification of leukemia, and be with great value for the diagnosis, therapy and prognosis of leukemia.

Key words: leukemia; flow cytometry; immunophenotyping

白血病是一种常见的恶性血液病,由于形态学分型存在主观性,加上白血病细胞的异质性和多态性,对白血病细胞类型的判断符合率低(64%~77%)^[1]。近年来流式细胞术(FCM)以其简便、快速、灵敏及特异等特点被广泛应用于白血病的免疫分型,笔者利用 CD45/SSC(侧向角散射)设门的四色荧光 FCM 检测 339 例白血病患者中白血病细胞细胞质、细胞膜抗原的表达,并进行白血病的分型诊断与预后判断,旨在探求白血病中白细胞抗原的表达规律。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院门诊及住院白血病患者共 339 例,其中男性 211 例,女性 128 例,年龄 3~87 岁,中位年龄 48 岁。所有病例均同时进行细胞形态学、细胞化学与免疫表型检查后确诊^[2]。其中急性髓系白血病(AML)150 例,急性淋巴细胞白血病(ALL)137 例,慢性淋巴细胞白血病(CLL)46 例,混合型白血病 6 例。考虑到慢性粒细胞性白血病(CML)的细胞表面抗原表达特殊性,本研究未对其进行归类总结。

1.2 方法

1.2.1 免疫荧光标记 采用单克隆抗体四色(FITC、PE、Per-

CP、APC)直接免疫荧光标记法。取样品 100 μ L,与单克隆抗体 20 μ L 混匀后,室温遮光孵育 15 min,加入溶血剂混匀,避光 10 min 后 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加磷酸盐缓冲液(PBS)2 mL 洗涤,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 PBS 500 μ L,混匀待检。免疫分型抗体、破膜剂、PBS 等均购自美国 BD 公司,选择二十余种单克隆抗体如下:髓系:CD33、CD117、CD13、CD14、CD15、cMPO、CD11b;T 淋巴系:CD3、CD5、CD7;B 淋巴系:CD10、CD19、CD20、CD23、cCD79a;自然杀伤(NK)细胞:CD56;非特异性标志:CD34、HLA-DR、CD38、CD45 等。

1.2.2 FCM 分析 采用美国 BD 公司 FACS Calibur 型流式细胞仪,488、628 nm 双色激发光源。测定前用标准荧光微球校正仪器,应用 CELL QUEST 软件,以 CD45/SSC 设门获取,分析每管内 10 000 个细胞。

1.2.3 AML 的免疫分型标准 参照文献[3],根据目前已知各系列抗原特异性,参考欧洲白血病免疫学分型研究组(EGIL)提倡的抗原积分系统分为未分化型(AUL):每系列积分均小于 2 分;单纯型:要求 T、B 淋巴系或髓系中某一系列积分大于或等于 2 分,其他系列积分为 0 分;变异型:要求某一系

列积分大于或等于 2 分,其他系列积分小于 2 分;混合型:要求 2 个或 2 个以上系列积分大于或等于 2 分^[4]。

1.4 统计学处理 结果用 SPSS10.0 软件进行相关分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 339 例白血病患者中 AML 150 例,占 44.2%(150/339),除外非特异性标志,髓系抗原表达率以 CD33(86.7%,130/150)最高,其次为 CD117(82.7%,124/150) $>$ CD13(82.0%,123/150) $>$ cMPO(72.7%,109/150) $>$ CD15(70.0,105/150),见表 1。

2.2 淋巴细胞白血病 183 例,占 54.0%(183/339),其中急性 B 淋巴细胞白血病(ALL-B)110 例,急性 T 淋巴细胞白血病(ALL-T)27 例,CLL 46 例。除外非特异性标志,ALL-B 淋巴系抗原表达率以 CD19(97.3%,107/110)最高,其次为 cCD79a(81.8%,90/110) $>$ CD10(76.4%,84/110) $>$ CD22(46.4%,51/100) $>$ CD20(27.3%,30/110),ALL-T 淋巴系抗原表达率以 CD7(96.3%,26/27)最高,其次为 CD2(70.4%,19/27) $>$ CD5(59.2%,16/27) $>$ CD3(44.4%,12/27),见表 2。

2.3 髓系白血病细胞可不同程度地表达淋巴系抗原,本组资料显示 150 例 AML 中伴淋巴系抗原表达者以 CD7(27.3%,41/150)最高,其次为 CD9(14.0%,21/150)、CD56(18.7%,28/150)、CD4(14.7%,22/150)。

表 1 各类型髓系白血病主要抗原表达情况(n)									
抗原	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	合计
CD2	0	0	1	4	2	1	0	0	8
CD4	0	1	1	1	13	5	1	0	22
CD5	0	0	2	0	0	0	0	0	2
CD7	2	3	23	0	7	1	5	0	41
CD9	0	0	1	19	1	0	0	0	21
CD11b	0	1	17	4	14	9	2	1	48
CD13	3	12	42	28	23	7	7	1	123
CD14	0	0	2	0	20	8	0	0	30
CD15	0	6	42	16	23	11	6	1	105
CD19	1	0	6	0	0	0	0	0	7
CD56	0	3	17	1	2	5	0	0	28
CD33	3	12	41	30	23	10	11	0	130
CD34	4	15	47	2	19	0	6	0	93
CD38	3	14	50	28	24	11	11	1	142
CD64	0	1	14	10	17	11	1	0	54
CD117	2	14	49	23	21	4	11	0	124
CD123	0	2	10	4	3	3	1	0	23
TdT	1	0	0	0	1	0	0	0	2
CD71	0	0	0	0	0	0	6	0	6
HLA-DR	3	13	47	5	24	12	8	0	112
GLY-A	0	0	0	1	0	0	10	0	11
cMPO	0	6	45	30	17	3	8	0	109

2.4 ALL 中交叉髓系抗原表达以 CD33(13.1%,18/137)为主,其次为 CD15(12.4%,17/137);CD23 在 CLL 中大量表达,

占 65.2%(30/46)。

2.5 非特异性抗原表达中以 CD34 在 AML 中以 M2 表达率最高,占 50.5%(47/93),随细胞的成熟逐渐减弱至消失。CD38 广泛表达于造血细胞及非造血细胞系,在各类型 AML 中均有较高的表达,在 M2 中表达率最高,占 35.2%(50/142)。HLA-DR 在 AML 中以 M2(42.0%,47/112)中表达率最高,在 M7 中无表达。

表 2 淋巴细胞白血病主要抗原表达情况(n)				
抗原	ALL-B	ALL-T	CLL	合计
CD2	3	19	0	22
CD3	1	12	0	13
CD4	1	4	0	5
CD5	1	16	28	45
CD7	3	26	0	29
CD8	0	10	0	10
CD10	84	0	1	85
CD11c	0	0	19	19
CD13	11	3	0	14
CD15	14	3	0	17
CD19	107	0	45	152
CD20	30	0	42	72
CD22	51	0	31	82
CD23	0	0	30	30
CD33	14	4	0	18
CD34	74	13	0	87
CD38	95	25	10	130
cCD79a	90	0	8	98
HLA-DR	103	7	46	156
cTdT	52	1	1	54

3 讨 论

目前 FAB 分型仍是诊断白血病的基本方法,但其诊断具有一定局限性,对于形态不典型的病例难以作出准确判断^[5]。通过 FCM 行免疫表型检测,不但可确定诊断,还可提供肿瘤细胞来源,以 CD3、cCD79a、cMPO 分别作为 ALL-T、ALL-B、AML 的系列特异性标志抗原可以很好地鉴别各系列,当表达缺失时需参考其他相关抗原。

150 例 AML 中表达率较高的抗原 有 CD33、CD13、CD117、cMPO。CD13 和 CD33 是骨髓细胞中髓系和单核细胞系细胞标志之一,在判断白血病细胞是否为髓系来源时具有很高的诊断价值,在髓系抗原的鉴别中优于其他抗原。CD117 为 C2Kit 原癌基因细胞表面分化抗原,是多能造血干细胞的重要标志,其在正常成熟细胞中不表达,CD117 在髓系白血病中常高表达,因此可以把 CD117 作为髓系的特异性抗原看待^[6]。cMPO 是髓系特异性最高的标志^[7],其敏感性较高。本研究中,cMPO 在 AML 中的阳性表达率 72.7%,低于 CD117,可能是因为部分 M1 型白血病中,髓系分化程度较低,导致细胞膜内 cMPO 抗原检测不到。cMPO 阳性率高说明细胞分化较成熟,预后较差^[8]。

CD14 在 M4、M5 中有较高表达率,CD14 和 CD64 联合检测可在髓系白血病中鉴别 M4 及 M5。CD64 敏感性最好,但它同时表达于其他类型 AML 中,特异性较差,CD4 和 CD14 仅在 M4 和 M5 两型中有高表达,特异性较好,与国外报道相符^[9]。

白血病细胞中白细胞抗原的异常表达表现在许多方面,部分可作为鉴别诊断和预后不良的指标^[10]。CD7 和 CD56 常在 M2 中大量表达,对 M2 的诊断可提供一定的依据,AML 免疫标记中伴淋系抗原 CD7、CD56 阳性被认为是预后不良的表现^[11]。CD2 和 CD9 仅在 M3 中高表达,与国外报道相似^[12]。

FCM 免疫分型可以根据特异性白细胞抗原将 ALL 分为 ALL-B 和 ALL-T,而根据 FAB 标准则很难区分二者。本研究 110 例 ALL-B 和 27 例 ALL-T 均至少表达 2 项以上特异性白细胞抗原。CD19 和 CD7 分别在 ALL-B、ALL-T 中表达量最高,因此可作为除特异性膜内抗原外最具诊断价值的抗原,cCD79a 作为 B 淋巴系特异性最高的膜内抗原在 ALL-B 中的表达占到了 81.8%,在 ALL-T 中无表达,因此 cCD79a 可作为 FCM 免疫分型区分 ALL-B 和 ALL-T 的主要指标^[13]。CD23 在 ALL 中不表达,经 FAB 分型和临床确诊为 CLL 的患者中,CD5 和 CD23 双阳性表达率为 60.9%(28/46),所以 CD5 和 CD23 可作为 CLL 的辅助鉴别诊断指标。

本研究中有混合型白血病 6 例,占 1.8%(6/339),其中 2 例形态学诊断为 AML,4 例形态学诊断为 AML,但经免疫学表型检测确诊为急性混合型白血病,证明过去疗效差的 ALL 及 AML 病例中部分可能是急性混合型,采用 FCM 进行免疫学分型有其实用价值^[14]。综上所述,利用 FCM 进行白血病免疫分型能够弥补形态学诊断的不足,使白血病的分型更为精确,有利于判断预后及治疗方案的选择。对于免疫分型诊断与形态学分型诊断不一致的,要以免免疫分型诊断为准。

参考文献

[1] 许文荣,王建中.临床血液学与检验[M].4 版.北京:人民卫生出版社,2007:240-245.

(上接第 1426 页)

步骤的顺利进行;二是检验操作人员需要培训上岗,掌握相关的基因分型理论和技能,这有利于准确判断基因分型结果。

综上所述,基因分型方法具有操作简单、检测周期短、灵敏度高、结果可靠、重复性良好、分型结果可长期保存等优点,在鉴定血型尤其是疑难血型时,可以弥补血清学分型的不足之处。

参考文献

[1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:246-256.
[2] 夏琳.临床输血诊疗技术[M].北京:人民卫生出版社,2008:62-84.
[3] 王亚馥,戴灼华.遗传学[M].北京:高等教育出版社,1998:464-470.
[4] 李勇.临床红细胞血型相容性试验中基因和血清学技术孰重孰轻[J].中国输血杂志,2007,20(4):338-340.
[5] 赵桐茂.人类血型分型的新纪元[J].中国输血杂志,2007,20(1):

[2] 张之南,沈悌.血液病诊断及疗效标准[M].3 版.北京:科学出版社,2007:103-107.
[3] 刘贵建.急性白血病的 MICM 分型[J].中华检验医学杂志,2004,27(6):399-400.
[4] Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemia. European Group for the immunological characterization of leukemias(EGIL)[J]. Leukemia, 1995, 9(10):1783-1786.
[5] 朱易萍.急性白血病的形态学免疫学细胞遗传学分型[J].实用儿科临床杂志,2004,19(5):340-341.
[6] 刘艳荣,于弘,常艳,等.四色荧光标记抗体在白血病免疫分型中的应用及意义[J].中国实验血液学杂志,2002,10(5):423-425.
[7] 王建中.临床流式细胞分析[M].上海:上海科学技术出版社,2005:296-306.
[8] Kuriyama K, Tomonaga M, Kobayashi T, et al. Morphological diagnoses of the Japan adult leukemia study group acute myeloid leukemia protocols: central review[J]. Int J Hematol, 2001, 73(1):93-99.
[9] Kiehl KA, Liddle PF, Hopfinger JB. Error processing and the rostral anterior cingulate: an event-related fMRI study[J]. Psychophysiology, 2000, 37(2):216-223.
[10] 江雁,穆红,唐志琴,等.急性白血病系列特异性抗原表达分析[J].国际检验医学杂志,2009,6(6):532-534.
[11] 承璐雅,王伟光,庄静丽,等.CD7⁺急性髓细胞性白血病临床及实验室特征分析[J].内科急危重症杂志,2006,12(2):85-86.
[12] Kaleem Z, Crawford E, Pathan MH, et al. Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data[J]. Arch Pathol Lab Med, 2003, 127(1):42-48.
[13] 黄欣.流式细胞术用于急性白血病免疫分型现状[J].检验医学与临床,2006,3(4):160-162.
[14] 唐娟,李山.流式细胞术在急性双表型白血病诊断中的应用[J].国际检验医学杂志,2009,30(6):568-570.

(收稿日期:2011-09-19)

1-2.

[6] 陈稚勇,赵桐茂,张工梁.中国人 ABO 血型分布[J].遗传,1982,4(2):4-7.
[7] 闫朝春,蒋玲,陈丽梅,等.导致微柱凝胶卡式交叉配血试验假阳性结果的原因分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(15):1737-1738.
[8] 王军梅,马亚平,钟万芬.冷凝集致 ABO 正反定型和交叉配血不符原因分析[J].国际检验医学杂志,2009,30(3):303.
[9] Garratty G, Arndt P, Co A. Fatal hemolytic transfusion reaction resulting from ABO mistyping of a patient with acquired B antigen detectable only by some monoclonal anti-B reagents[J]. Transfusion, 1996, 36(4):351-353.
[10] 毛晓露,胡丽华.ABO 血型不合的造血干细胞移植引起免疫性溶血的研究进展[J].临床血液学杂志:输血与检验,2010,23(4):251-253.
[11] 田兆嵩.临床输血学[M].2 版.北京:人民卫生出版社,1998:218.

(收稿日期:2012-01-31)