

• 临床检验研究论著 •

慢性淋巴细胞白血病免疫表型及凋亡相关蛋白分析

刘越坚¹, 郭莉¹, 邱阳¹, 单路娟¹, 郭慧淑¹, 张婵^{2△}

(1. 大连医科大学附属第一医院中心实验室, 辽宁大连 116011; 2. 大连市妇产医院检验科, 辽宁大连 116033)。

摘要:目的 探讨慢性淋巴细胞白血病(CLL)免疫表型和凋亡相关蛋白表达特征及其临床意义。方法 应用 CD45/SSC 设门方案, 通过三色流式细胞术对 150 例 CLL 患者、105 例急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)患者骨髓或外周血进行免疫分型。结果 150 例 CLL 患者均高表达 CD19; HLA-DR、CD20、CD5、CD22、CD38、CD23 阳性率依次为 96.67%、95.33%、84.67%、86.67%、40.67%、60.66%; CD10、cCD79a、CD3、CD25、CD34、ZAP70、FMC7 阳性率较低, 依次为 3.33%、15.33%、4.67%、1.33%、3.33%、11.43%、8.67%。其他抗体均无表达; 与 B-ALL 患者相比, CLL 患者 CD5、CD20 阳性率升高($P < 0.05$), CD10、CD34、CD22、cCD79a 阳性率降低($P < 0.05$), CD19、HLA-DR 表达率无统计学差异($P > 0.05$)。CLL 患者凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 阳性率分别为 74.67% 和 7.33%。结论 CD5、CD20、CD19 是 CLL 特异性免疫表型, ZAP70、CD38 可作为预后判断指标, CLL 细胞 Bcl-2 高表达、Bax 低表达, 在疾病发生、发展中意义重大。

关键词: 白血病, 淋巴细胞, 慢性; 免疫表型; 流式细胞术

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.010

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)01-0025-02

Analysis on immunophenotypes and expression of apoptosis protein of chronic lymphocytic leukemia

Liu Yuejian¹, Guo Li¹, Qiu Yang¹, Shan Lujuan¹, Guo Huishu¹, Zhang Chan^{2△}

(1. Central Laboratory, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116011, China;

2. Clinical Laboratory, Dalian Obstetrics and Gynecology Hospital, Dalian, Liaoning 116033, China)

Abstract: Objective To investigate the characteristics of immunophenotyping and expression of apoptosis protein in chronic lymphocytic leukemia(CLL) and related clinical significance. Methods CD45/SSC gating and three colors flow cytometry were used to analyze immunophenotyping and expression of apoptosis protein in 150 patients with CLL and 105 patients with acute B-lymphoblastic leukemia(B-ALL). Results CD19 was highly expressed in CLL patients. The positive rates of HLA-DR, CD20, CD5, CD22, CD38, CD23 were 96.67%, 95.33%, 84.67%, 86.67%, 40.67% and 60.66%, those of CD10, cCD79a, CD3, CD25, CD34, ZAP70 and FMC7 were low, which were 3.33%, 15.33%, 4.67%, 1.33%, 3.33%, 11.43% and 8.67%. The other antigens were negative. Compared with B-ALL patients, the positive rates of CD5 and CD20 were significantly higher in CLL patients and those of CD10, CD34, CD22 and cCD79a were significantly lower($P < 0.05$), but there were no significant differences of CD19 and HLA-DR between the two groups($P > 0.05$). The positive rates of Bcl-2 and Bax were 74.67% and 7.33%. Conclusion CD5, CD20 and CD19 could be specific immunophenotypic markers in CLL. ZAP70 and CD38 could be used as prognosis markers in CLL. High level of Bcl-2 and low level of Bax in CLL might play a pivotal role in pathogenesis and progression of CLL.

Key words: leukemia, lymphocytic, mchronic; immunophenotyping specificities; flow cytometry

慢性淋巴细胞白血病(CLL)是由于细胞凋亡途径受抑而导致的淋巴细胞克隆性增殖性疾病, 早期诊断率较低。随着流式细胞术的发展, 免疫分型成为诊断血液恶性肿瘤的重要指标之一, 尤其对 CLL 的诊断和鉴别诊断具有重要意义。本文探讨了流式细胞术免疫分型在 CLL 诊断、鉴别诊断及疾病发生和发展中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2003 年 1 月至 2011 年 10 月于本院确诊的 CLL 初诊患者 150 例(CLL 组), 年龄 43~93 岁, 平均 64.7 岁, 男女比例为 2.2:1; 同期于本院确诊的 B-ALL 初诊患者 105 例纳入对照组。两组患者均符合《血液病诊断及疗效标准》^[1]。

1.2 仪器与试剂 FACS Vantage SE 流式细胞仪、配套单克隆抗体 FITC、PerCP、PE 标记对照抗体及 CD45、CD5、CD19、CD25、bcl-2、CD23、CD10、CD34、HLA-DR、CD38、CD22、zap70、CD103、CD20、CD3、FMC7、CD79a、Bcl-2、Bax 荧光标记抗体、溶血剂、破膜剂(美国 BD)。

1.3 方法 所有患者于治疗前采集肝素抗凝骨髓或外周血 2 mL, 采用荧光标记抗体进行细胞膜及细胞质染色后进行细胞免疫分型检测, 检测步骤参照仪器及试剂说明书。流式细胞仪检测采用 CELLQUEST 软件采集 10 000 个细胞信息; 通过 CD45/SSC 设门, 根据 CD45 表达强度和细胞颗粒大小, CLL 患者选取偏成熟淋巴细胞群位置, B-ALL 患者选取幼稚细胞群位置, 进行免疫表型分析。结果判断以细胞表面抗原表达大于或等于 20%, CD34 表达大于或等于 5% 为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析; 计数资料以百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 显著性检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 CD45/SSC 二维点图特点 CD45-SSC 设门后可将待测细胞分为成熟淋巴细胞群、单核细胞群、髓细胞群、幼稚细胞群及有核红细胞群。CLL 细胞为成熟淋巴细胞发生的凋亡障碍, 因此本研究选取成熟淋巴细胞群作为分析对象。

2.2 CLL 免疫表型及凋亡相关蛋白检测 150 例 CLL 患者

免疫表型分别依次为:CD19 150 例(100%)、HLA-DR 145 例(96.67%)、CD20 143 例(95.33%)、CD5 127 例(84.67%)、CD22 130 例(86.67%)、CD38 61 例(40.67%)、CD23 91 例(60.66%)、cCD79a 23 例(15.33%)、CD10 5 例(3.33%)、CD3 7 例(4.67%)、CD25 2 例(1.33%)、CD34 5 例(3.33%)、FMC7 13 例(8.67%)。检测 70 例患者胞浆 ZAP70, 8 例阳性(11.43%),其他抗体均无表达。凋亡相关蛋白阳性率为:bcl-2 112 例(74.67%)、bax 11 例(7.33%)。

2.3 CLL 与 B-ALL 免疫表型比较 CLL 组 CD5、CD20 表达率高于 B-ALL 组($P < 0.05$),CD10、CD34、CD22、CD79a 表达率低于 B-ALL 组($P < 0.05$),CD19、HLA-DR 表达率组间比较无统计学差异($P > 0.05$),见表 1。

表 2 CLL 与 B-ALL 患者免疫表型比较

抗原	CLL(n=150)	B-ALL(n=105)
CD19	150(100.00)*	105(100.00)
CD5	127(84.67)#	2(1.90)
CD22	130(86.67)#	100(95.24)
HLA-DR	145(96.67)*	102(97.14)
CD20	143(95.33)#	35(33.33)
CD10	5(3.33)#	99(94.29)
CD34	5(3.33)#	88(83.81)
cCD79a	23(15.33)#	102(97.14)

*: $P > 0.05$; #: $P < 0.05$,与 B-ALL 患者表达率比较。

3 讨论

CLL 以成熟淋巴细胞增生为主,是血液恶性肿瘤中相对惰性的一种,常见于中老年患者。本组患者年龄为 43~93 岁,平均 64.7 岁,略低于西方国家患者发病年龄 65~70 岁^[2],与国内报道基本一致^[3],可能与入种差异有关。

CD5、CD19 双阳性是 CLL 典型的免疫表型^[4],但也有报道认为 CD19⁺CD20⁺CD5⁺可作为 CLL 的诊断依据^[5]。本研究 150 例 CLL 患者,CD19、CD5、CD20 表达率较高,与类似研究报道基本相符^[6-7],可用于确诊 CLL。CD5 一般表达于成熟 T 淋巴细胞表面,在 CLL 中呈阳性,与 B 细胞进入激活状态有关。本研究发现 CLL 患者 CD5 表达率高于 B-ALL 患者,但仍有 15.33% 的患者不表达 CD5,与类似研究报道的 7%~20% 阴性表达率相近^[8]。因此,对于 CD5 阴性,而 CD19、CD20 阳性患者,不能因缺失 CD5 表达而否认其为 CLL 的可能性。本研究 CLL 患者 CD10、CD34、CD22、cCD79a 表达率低于 B-ALL 患者。cCD79a 是 B 淋巴细胞功能性蛋白,在 B 细胞不同分化阶段均高度特异表达,在绝大多数 B-ALL 中为阳性,但在 CLL 细胞阳性率极低,可作为二者鉴别诊断的指标。

ZAP-70 是一种酪氨酸蛋白激酶,参与 T 细胞信号转导,在 B 细胞中表达升高,可作为 B-CLL 的诊断指标,对于预后判断也有重要意义^[9]。本研究中,70 例患者细胞质 ZAP70 阳性率为 11.43%,低于文献报道^[10],可能与守时患者疾病进展不同有关。CD38 在一些相对幼稚的细胞广泛表达,可作为 CLL 独立的预后判断指标。有文献报道,CD38 阳性 B-CLL 患者较阴性者病情进展迅速、生存期明显缩短^[11]。因此,有必要在 CLL 初诊时进行 CD38 和 ZAP-70 表达水平检测。

Bcl-2 蛋白是细胞凋亡抑制因子,其同源蛋白 Bax 则为促

进细胞程序化死亡的因子。本研究中 150 例 CLL 患者 Bcl-2 表达率高达 74.67%,高于文献报道^[12],而 Bax 表达率仅为 7.33%,说明 CLL 可能与成熟 B 淋巴细胞经抗原激活后持续活化而不能发生细胞凋亡相关^[13]。有研究显示 CLL 患者中普遍存在 Bcl-2 高表达及基因重排、易位^[14],另有学者指出 Bcl-2 和 Bax 可作为患者化疗耐药性的重要监测指标^[15]。由此可见,CLL 初治患者应检测凋亡相关蛋白表达水平检测对指导临床治疗意义重大。

综上所述,应用流式细胞仪进行免疫分型检测有利于疾病的确诊,凋亡相关蛋白表达检测则对临床用药监测有重要价值。

参考文献

- [1] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007:373-380.
- [2] Oscier D, Fegan C, Hillmen P, et al. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia [J]. Br J Haematol, 2004, 125(3):294-317.
- [3] 刘艳荣, 常艳, 王卉, 等. 慢性淋巴细胞系统白血病免疫表型分析[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(1):17-21.
- [4] 许晓东, 常乃柏, 赵声明, 等. 慢性淋巴细胞白血病患者 31 例免疫表型分析[J]. 中华老年医学杂志, 2010, 29(2):135-137.
- [5] Schriever F, Huhn D. New directions in the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukaemia[J]. Drugs, 2003, 63(7):953-969.
- [6] 纪爱芳, 林路平, 朱镭. 慢性淋巴细胞白血病三色流式细胞术免疫表型分析[C]. 第八届全国暨国际诊断学学术交流会议. 实验诊断学检查规范化研讨会论文集. 2005.
- [7] 易莎, 张小斌, 陈燕. 103 例慢性淋巴细胞白血病患者免疫表型的研究[J]. 临床血液学杂志, 2010, 23(3):86-88.
- [8] Inamdar KV, Buoso-Ralnos CE. Pathology of chronic lymphocytic leukemia: an update[J]. Anna Diag Pathol, 2007, 11(5):363-389.
- [9] Sheikholeslami MR, Jilani I, Keating M, et al. Variations in the detection of ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia: Comparison with IgV(H) mutation analysis[J]. Cytometry Part B (Clin Cytomet), 2006, 70(4):270-275.
- [10] 王贤, 张葵, 夏永泉. ZAP-70、CD38 在慢性淋巴细胞白血病中的表达及意义[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(2):245-247.
- [11] Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL[J]. Blood, 2004, 103(4):1202-1210.
- [12] Abdel-Ghafar AA, El Din El Telbany MA, Mahmoud HM, et al. Immunophenotyping of chronic B-cell neoplasms: flow cytometry versus immunohistochemistry[J]. Hematol Rep, 2012, 4(1):6-11.
- [13] Landgren O, Rapkin JS, Caporaso NE, et al. Respiratory tract infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukemia[J]. Blood, 2007, 109(5):2198-2201.
- [14] 向直富, 陈燕, 李慧玉, 等. 慢性淋巴细胞白血病 bcl-2 基因表达与重排的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 1998, 6(1):45-48.
- [15] Buggins AG, Pepper CJ. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia[J]. Leuk Res, 2010, 34(7):837-842.

(收稿日期:2012-09-02)