

• 临床检验研究论著 •

多参数流式细胞术在非霍奇金淋巴瘤诊断中的应用及价值*

易思华¹, 张晓薇², 赵丽^{2△}, 周兰霞², 柴晓静², 张晨³

(兰州大学第一医院: 1. 输血科; 2. 中心实验室; 3. 检验科, 甘肃兰州 730000)

摘要:目的 探讨流式细胞术(FCM)在非霍奇金淋巴瘤诊断中的价值。方法 收集 34 例淋巴增殖性疾病的患者淋巴结穿刺液及淋巴结组织, 对穿刺液进行多参数流式细胞免疫表型分析, 对淋巴结组织进行病理学常规和免疫组化检查。结果 34 例患者中, 成熟 B 细胞淋巴瘤 23 例, 19 例慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤 CD19 和 CD5 共同表达率为 100.0%。2 种方法诊断非霍奇金淋巴瘤的符合率为 80.6%, 通过 FCM 免疫表型分析和病理检查, 诊断恶性淋巴瘤准确率可达 96.8%。结论 流式细胞术对淋巴瘤肿瘤细胞的免疫表型分析具有较高准确率, 能为临床诊断非霍奇金淋巴瘤提供客观依据, 具有较高的应用价值。

关键词:流式细胞术; 非霍奇金淋巴瘤; 免疫表型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.017

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)22-2982-02

The application and value of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of malignant lymphoma*

Yi Sihua¹, Zhang Xiaowei², Zhao Li^{2△}, Zhou Lanxia², Chai Xiaojing², Zhang Chen³

(1. Blood Transfusion Service; 2. Central Laboratory; 3. Clinical Laboratory, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Objective To discuss the value of multidimensional flow cytometry in the diagnosis of malignant lymphoma. Methods Lymphnode puncture and lymphnode tissues of 34 cases of lymphoproliferative disease were collected. The lymphnode puncture were analyzed by multiparameter flow cell immunophenotype analysis, and the lymphnode tissue were examined by the methods of pathematology and immunohistochemistry. Results There were 23 cases of mature B-cell lymphoma of 34 cases of lymphoproliferative disease. The expression proportion of CD19 and CD5 of 19 cases of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma were 100.0%. The match ratio of non-Hodgkin lymphoma diagnosis were 80.6%, and the ratio could improve to 96.8% through the method of FCM pathematology and immunophenotype analysis. Conclusion The flow cytometry are more effective than other methods in the immunophenotype analysis of lymphoma cell and the former has higher accuracy rate. The flow cytometry has high clinical value and could provide objective foundation to the diagnosis of malignant lymphoma.

Key words: flow cytometry; malignant lymphoma; immunophenotyping

恶性淋巴瘤是常见的血液系统肿瘤, 其中主要为非霍奇金淋巴瘤, 由于其病理学诊断较为困难, 以往主要通过免疫组化方法对恶性淋巴瘤进行分型诊断。免疫组化操作复杂, 耗时长, 难以多重标记等特点使该项技术在非霍奇金淋巴瘤的诊断分型中具有一定的局限性^[1]。目前, 流式细胞术(FCM)已成为诊断血液系统恶性疾病的重要工具^[2]。本研究探讨了 FCM 在非霍奇金淋巴瘤中的诊断价值, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 6 月至 2012 年 8 月在兰州大学第一医院就诊的 34 例淋巴增殖性疾病患者, 其中男性 23 例, 女性 11 例, 年龄 8~69 岁, 中位年龄 24.5 岁。

1.2 仪器与试剂 流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司产品, 型号为 EpicsXL。所有抗体均为美国 CALTAG 公司产品。细胞周期主要试剂 PI 购自 SIGMA 公司。

1.3 方法 对 34 例患者进行淋巴结穿刺并且对肿大淋巴结进行活检。

1.3.1 穿刺标本的制备 应用 10 mL 注射器, 22-G 或 23-G 针头穿刺浅表肿大淋巴结 2~3 次, 每次均从 3~4 个方向进行穿刺以获取足够数量的细胞, 将获得的细胞注入 1.5~2 mL 的 PBS 缓冲液中, 计数细胞, 调整细胞悬液的浓度至 (1~

10) × 10⁶ /mL 准备进行流式细胞检测。同时进行细胞涂片, 自然风干后瑞氏染色, 观察细胞大小及形态。

1.3.2 活检标本的制备 未经固定的新鲜标本用眼科剪剪碎, 至肉眼见成浑浊的溶液状, 加 1~2 mL PBS 液, 用 300 目滤网过滤, 调整细胞悬液的浓度至 (1~10) × 10⁶ /mL 标记后进行流式细胞检测。同时做细胞印片或涂片, 瑞氏染色后观察细胞大小及形态。若标本当天不处理, 可置 4 ℃ 冰箱保存, 最长不超过 48 h。

1.3.3 流式细胞仪检查 荧光素标记单克隆抗体包括: IgG1、CD2、CD3、CD4、CD8、CD5、CD7、CD10、CD19、CD20、CD22、CD23、CD34、CD16、CD56、Kappa(κ)、Lambda(λ)、CD45。采用 FS/SS 设门和 CD45/SS 设门来寻找目标细胞(异常的淋巴细胞), 每个样品至少检测 5 000 个目标细胞。经 5 个参数[FSC、SSC、FITC、PE 和 PE-CY5]分析, 确定免疫表型。全部数据用 EXPO 32 ADC 软件获取和分析, 以百分率表示抗原阳性的细胞。阳性细胞比率大于 20%, 判定为该抗原表达阳性。表型分析参照世界卫生组织(WHO)2000 年恶性淋巴瘤的分类法^[3]。

2 结果

按照 2008 年 WHO 对淋巴瘤分类: 成熟 B 细胞淋巴瘤 23

* 基金项目: 甘肃省自然科学基金计划项目(1010RJZA084)。 作者简介: 易思华, 女, 副主任检验师, 主要从事临床检验研究。 △ 通讯作者, E-mail: zhaoli@lzu.edu.cn。

例,其中慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤 19 例(83.3%),主要表达为 CD5、CD19,且两者同时表达;弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 2 例(8.8%),表达为 CD20、CD10;滤泡性淋巴瘤 1 例(4.3%),表达为 CD10、CD23;Burkitt 淋巴瘤 1 例(4.3%),表达为 CD19、CD10、CD20;成熟 T 细胞和自然杀伤(NK)细胞淋巴瘤 4 例,其中,结外 NK/T 细胞淋巴瘤 2 例,T 细胞前幼淋巴细胞白血病 1 例,外周 T 细胞淋巴瘤 1 例。34 例患者中,1 例为霍奇金淋巴瘤,2 例为反应性增生。25 例淋巴结穿刺液 FCM 检查与淋巴结病理活检、免疫组化结果相符,符合率为 80.6%(25/31)。在 6 例结果不符病例中,FCM 免疫表型分析有 5 例可确诊,结果对比见表 1。

表 1 2 种方法对淋巴瘤分类结果

病例编号	免疫组化检测结果	FCM 检测结果
1	小淋巴细胞淋巴瘤	Burkitt 淋巴瘤
2	小淋巴细胞淋巴瘤	套细胞淋巴瘤
3	Burkitt 淋巴瘤	小淋巴细胞淋巴瘤
4	反应性增生	B 淋巴瘤母细胞淋巴瘤
5	分类不明	T 淋巴瘤母细胞瘤
6	分类不明	分类不明

3 讨 论

恶性淋巴瘤由淋巴细胞或其前体发生瘤性恶变引起。可分为霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤(NHL),后者更常见。WHO 将细胞形态和免疫表型作为依据,分为前驱淋巴瘤、成熟 B 细胞淋巴瘤和成熟 T 细胞淋巴瘤三大类。NHL 分型与诊断、治疗及预后关系极其密切。以往淋巴结活检是诊断 NHL 的首选方法,但形态学检查只能描述恶性增生的细胞在淋巴结中的位置和特殊形态学表现,常常无法判断单克隆性和准确提示分化阶段,而免疫组化操作技术复杂,耗时长,使得淋巴瘤诊断成为病理学诊断难度最大的疾病之一。目前,FCM 能够用于区分细胞分化程度,明确细胞群克隆性、异质性和抗原表达,已逐步成为诊断 NHL 的重要手段。

FCM 在诊断 B-NHL 方面具有明显的优势。健康人 B 淋巴细胞 κ 轻链与 λ 轻链之间比例通常为 3 : 2,显示其 B 淋巴细胞为多克隆的特性;肿瘤性 B 细胞除了免疫表型与正常 B 细胞有一定差异外,其主要特征有 Ig 轻链限制性,即全部肿瘤 B 细胞仅表达 κ 轻链或仅表达 λ 轻链,B 细胞表面 Ig 轻链表达的比例大大偏离正常值是支持成熟 B 细胞克隆性增生的有力证据^[4]。此外,通过测定 B 细胞所表达的免疫表型帮助分型,进一步达到鉴别诊断的目的。

在本次研究中,2 例反应性增生患者淋巴穿刺液 FCM 检测 κ 轻链与 λ 轻链比值正常,而其他 B 淋巴细胞增殖性疾病患者该比值偏离正常比值。说明该值测定在鉴别反应性 B 淋巴细胞增生和 B 淋巴细胞肿瘤方面具有较高的准确性。有研究发现^[5],17 例 B 慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤(B-CLL/SLL),CD19、CD5、CD20、HLA-DR 阳性率都达 100.0%,CD10 全部阴性,CD5、CD19 共同表达率达 100.0%。在本次研究中,最后确诊的 20 例小淋巴细胞淋巴瘤其 CD5 与 CD19 同时表达阳性率也为 100.0%,证实了 CD5 与 CD19 同时阳性

是 B-CLL/SLL 的特征性表达。

在本次研究中,通过淋巴结活检,有 6 例出现误诊或诊断不明,诊断 NHL 的准确率为 80.6%(25/31);结合流式细胞免疫表型分析,上述 6 例中有 5 例得到明确诊断,诊断准确率提高到 96.8%(30/31)。

流式细胞术在淋巴系统疾病的诊断、分期、预后都有较高应用价值。此外,在淋巴系统疾病治疗过程中,流式细胞术在检测残余恶性淋巴细胞及评估治疗效果方面也具有不可取代的作用。有研究文献表明^[6],在治疗慢性淋巴细胞白血病的过程中,残余恶性淋巴细胞是评估患者无病生存率和整体生存率的一个独立因素。而使用单管联合单克隆抗体可检测出外周血及骨髓中的残余恶性淋巴细胞。研究证明^[7],FCM 与国际标准化的方法相比可获得相同的准确率,但却采用较少的标本及试剂,操作方法也更简便可行。这种方法提高了慢性淋巴细胞治疗过程中残余恶性淋巴细胞的检测准确率,也可对患者化疗的疗效进行评估。

多参数流式细胞术可替代免疫组化法对套细胞淋巴瘤和小淋巴细胞淋巴瘤进行诊断,诊断准确率可分别达到 64%和 69%^[8]。此外,多参数流式细胞术在 NHL 诊断中也具有较高价值,结合病例形态学检查,能够有效提高诊断的准确性。此外,在判断淋巴瘤分期、预后及对治疗反应方面具有不可取代的作用。随着流式细胞分析技术和分子生物学的进一步发展,流式细胞分析在临床上会得到更广泛的应用。

参考文献

[1] 陆伟,丁润生,姜胜华,等.多参数流式细胞术在非霍奇金淋巴瘤诊断中的应用[J].南通大学学报:医学版,2008,28(4):266-267.

[2] Kanamori E, Itoh M, Tojo N, et al. Flow cytometric analysis of Notch1 and Jagged1 expression in normal blood cells and leukemia cells[J]. Exp Ther Med, 2012, 4(3):397-400.

[3] Huh YO, Ibrahim S. Immunophenotypes in adult acute lymphocyticleukemia. Role of flow cytometry in diagnosis and monitoring of disease[J]. Hemotol Oncol Clin North Am, 2000, 14(6):1251-1265.

[4] 叶树俊,张葵,陈军浩,等.流式细胞术检测 B 淋巴细胞表面免疫球蛋白轻链及临床意义[J].临床检验杂志,2007,25(6):432-434.

[5] 凌家瑜,孙晓非.112 例淋巴系统恶性肿瘤骨髓免疫表型分析[J].癌症,2007,26(4):418-422.

[6] Sartor MM, Gottlieb DJ. A single tube 10-color flow cytometry assay optimizes detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2013, 84(2):96-103.

[7] Bromberg JEC, Breems DA, Kraan J, et al. CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignancies[J]. Neurology, 2007, 68(20):1674-1679.

[8] Zare H, Bashashati A, Kridel R, et al. Automated analysis of multidimensional flow cytometry data improves diagnostic accuracy between mantle cell lymphoma and small lymphocytic lymphoma[J]. Am J Clin Pathol, 2012, 37(1):75-85.

(收稿日期:2013-02-28)