

• 临床检验研究论著 •

非霍奇金淋巴瘤骨髓侵犯细胞形态学和免疫表型分析

李新星¹, 彭贤贵², 邓小娟², 伊远学^{1△}

(1. 武警重庆总队医院检验科, 重庆 400061; 2. 第三军医大学新桥医院血液科, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨骨髓细胞形态学和免疫表型在诊断非霍奇金淋巴瘤骨髓浸润中的价值。方法 采用骨髓涂片和流式细胞术联合检测非霍奇金淋巴瘤(NHL)骨髓侵犯(BMI)。骨髓涂片经瑞氏-吉姆萨液染色, 分类计数 4 种类型 NHL 细胞: 小细胞成熟细胞型、大细胞幼稚型、大细胞原始型、组织细胞型。采用流式细胞术经 FSC、SSC、McAb1-FITC、McAb2-PE、CD45-Percp 五参数分析, 确定免疫表型。结果 38 例 NHL 分别被诊断为 B 细胞淋巴瘤 28 例、T 细胞淋巴瘤 7 例、NK 细胞淋巴瘤 2 例, 间变性大细胞淋巴瘤 1 例。38 例 NHL 细胞骨髓侵犯的骨髓细胞形态学分型结果为小细胞成熟型 25 例(65.8%)、大细胞幼稚型 3 例(7.9%)、大细胞原始型 6 例(15.8%)、组织细胞型 4 例(10.5%)。结论 应用骨髓细胞形态学和流式细胞术联合检测 NHL-BMI, 可以提高诊断的准确性并提供相应的病理分型意见。

关键词: 非霍奇金淋巴瘤; 骨髓浸润; 骨髓细胞形态学; 免疫分型; 流式细胞术

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.020

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)22-2988-03

Analysis of morphology and immunophenotype of bone marrow involvement of non-Hodgkin's lymphoma

Li Xinxing¹, Peng Xiangui², Deng Xiaojuan², Yi Yuanxue^{1△}

(1. Clinical Laboratory, Chongqing Armed Police Hospital, Chongqing 400061, China; 2. Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To research the value of morphology and immunophenotype of bone marrow involvement(BMI) of non-Hodgkin's lymphoma(NHL). **Methods** Combined examination of bone marrow smear and flow cytometry(FCM) were used to detect the BMI of NHL. Bone marrow smears were stained by Wright-Giemsa staining solution and tumor cells of NHL were differentially counted under optical microscope. Cells of NHL were divided into 4 types in bone marrow: Small mature lymphoma cells types, large immature lymphoma cells types, large primitive lymphoma cells types, and histiocyte types. Five analysis parameters in FCM including FSC, SSC, McAb1-FITC, McAb2-PE, and CD45-Percp were used to determine the immunophenotype of NHL cells. **Results** 28 cases of B-cell lymphoma, 7 cases of T-cell lymphoma, 2 cases of NK-cell lymphoma, 1 case of anaplastic large cell lymphoma(ALCL) were diagnosed in 38 cases of NHL with BMI. There were 25 cases of small mature lymphoma cells types(65.8%), 3 cases of large immature lymphoma cells types(7.9%), 6 cases of large primitive lymphoma cells types(15.8%), and 4 cases of histiocyte types(10.5%) classified by using bone marrow cell morphology detection. **Conclusion** Combination of bone marrow cell morphology and FCM in the detecting of NHL-BMI could improve the diagnostic accuracy and provide views of the pathological classification.

Key words: non-Hodgkin lymphoma; bone marrow involvement; bone marrow morphology; immunophenotype; flow cytometry

非霍奇金淋巴瘤(NHL)是恶性淋巴细胞增殖性肿瘤, 容易发生骨髓侵犯(BMI), 后期发展为淋巴瘤细胞白血病(LMCL)。骨髓细胞形态学检查是诊断非霍奇金淋巴瘤 BMI 的重要手段^[1]。NHL 细胞在骨髓中的形态有高度异质性, 但由于其不同病理类型的细胞特征各不相同, 要切实地把握并作出正确的诊断十分困难。本研究采用骨髓细胞形态学和流式细胞术(FCM)联合检测 NHL 细胞骨髓侵犯, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 武警重庆总队医院检验科于 2010 年 1 月至 2011 年 2 月诊断淋巴细胞肿瘤 124 例, 结合骨髓涂片、骨髓活检、流式细胞术及 FISH 技术检测, 确诊为急性淋巴细胞白血病(ALL)56 例、慢性淋巴细胞白血病(CLL)30 例和 NHL 骨髓侵犯 38 例。38 例 NHL 骨髓侵犯均为武警重庆总队医院血液科门诊或住院患者, 其中男 25 例, 女 13 例, 年龄 5~80 岁, 平均 51.8 岁。

1.2 方法

1.2.1 标本制备 无菌条件下行骨髓穿刺, 抽吸 0.3 mL 骨髓液, 涂 7 张片备用。再抽吸骨髓细胞液 1~2 mL, 肝素抗凝摇匀, 置 4℃ 冰箱保存, 48 h 内做 FCM 检测。

1.2.2 细胞形态学检查 细胞涂片经瑞氏-姬姆萨混合液染色, 在油镜(1 000 倍)下分类计数 500 个细胞。每个病例的骨髓涂片均加做 PAS 和 POX 染色。骨髓涂片重点查找有无淋巴瘤细胞, 观察细胞的异质性, 包括大小、异形变、分化程度及有无成簇分布现象。判断标准按国内勇氏诊断标准: 骨髓中瘤细胞数大于或等于 0.05 时, 诊断为 BMI; 瘤细胞数大于或等于 0.20 时, 诊断为 LMCL。

1.2.3 多参数 FCM 检测 流式细胞仪采用美国 BD 公司 4 色双激光管 FACS Calibur 机型, Cellquest 软件荧光定量分析。每份标本分析 10 000 个细胞, 细胞在波长 488 nm 处检测 PE 的红荧光和 FITC 的绿荧光, 分别通过 575 nm 和 513 nm

滤光片收集, Percp 的荧光通过 635 nm 滤光片收集。采集 CD45/SSC 设门, 重点分析幼稚细胞群及成熟淋巴细胞群, 经 FSC、SSC、McAb1-FITC、McAb2-PE、CD45-Percp 五参数分析, 确定免疫表型。单克隆抗体来源荧光标记的单克隆抗体包括 T、B、髓系细胞系列, 用两个系列或阶段特异性单抗加 CD45 进行三色荧光染色: McAb1-FITC、McAb2-PE、CD45-Percp。单克隆抗体有 CD10、CD79a、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD103、CD3、CD5、CD7、CD4、CD8、CD13、CD14、CD33、MPO、CD41a、CD61、CD71、CD34、CD38、CD45、HLA-DR、TdT、Kappa、Lambda 等均从 BD 公司购买。按 FCM 常规方法标记表面抗原和胞内抗原。

1.2.4 FCM 判断 NHL 细胞骨髓侵犯的原则和方法 首先在 CD45/SSC 散点图上, 查找幼稚细胞群和成熟淋巴细胞群, 进行设门。采用多组单克隆抗体标记细胞, 分析不同系别、不同阶段的免疫标志表达情况。以 CD20 和 CD3 的表达情况, 来区分瘤细胞源于 B 细胞系或 T 细胞系。B 淋巴细胞含有 CD10、CD34 考虑为前体 B 淋巴细胞; 不表达 CD10、CD34 而表达 CD22、CD23、CD25 者, 考虑为外周 B 淋巴细胞。T 淋巴细胞表达 CD7、TdT 及 CD34 者考虑为前体 T 淋巴细胞; 不表达 TdT 及 CD34 而表达 CD4、CD8、CD5 者考虑为外周 T 淋巴细胞。外周 B 淋巴细胞肿瘤中, CD5⁺CD10⁻CD23⁺ 者, 考虑为 CLL/SLL; CD5⁺CD10⁻CD23^{-/+} 者, 考虑为套式淋巴瘤; CD5⁻CD10⁺CD23⁻ 或 CD5⁺CD10⁻CD23⁻ 者, 考虑为滤泡型淋巴瘤; CD5⁻CD10⁺ 或 CD5⁺CD10⁻, 都伴 CD43⁺ 者, 考虑为伯基特淋巴瘤; CD5⁻CD10⁻伴 CD25⁺CD103⁺, 考虑为毛细胞白血病; CD20⁺CD38⁺CD138⁺ 者, 考虑为浆细胞白血病(PCL)或多发性骨髓瘤(MM)。外周 T 淋巴细胞肿瘤中, CD4⁺CD8⁻CD25⁺ 者, 考虑为成人 T 淋巴细胞白血病/淋巴瘤; CD4⁺CD8⁻CD56⁺CD3⁻ 者, 考虑为 NK 细胞淋巴瘤或 T 细胞淋巴瘤; CD4⁺CD8⁻CD30⁺CD56⁺CD3⁻ 者, 考虑间变大细胞淋巴瘤。

2 结 果

2.1 淋巴瘤细胞骨髓侵犯的形态表现 不同病理类型的 NHL 细胞形态、大小和染色质分化程度各不相同。参考 FAB 关于 ALL 分型方法, 将瘤细胞的大小与 ALL-L1 型和 ALL-L2 型划分原则等同, 即 L1 型大小的瘤细胞为小细胞(细胞直径约 6~12 μm), L2 型大小的瘤细胞为大细胞(细胞直径约 12~25 μm)。将瘤细胞的大小和染色质分化程度综合判断, 骨髓 NHL 细胞分为 4 种类型: 小细胞成熟细胞型、大细胞幼稚型、大细胞原始型、组织细胞型。小细胞成熟型淋巴瘤细胞特征为: 以小细胞为主, 胞质少, 易见伪足, 胞质灰蓝色; 核圆形或畸形, 染色质粗块状; 核仁消失或留有核仁残迹。大细胞幼稚型瘤细胞特征为: 以大细胞为主, 外形不规则, 可见伪足, 胞质丰富, 灰蓝色; 核圆形或类圆形, 染色质粗颗粒或小块状, 副染色质区不显著; 核仁不清晰或留有核仁残迹。大细胞原始型瘤细胞特征为: 以大细胞为主, 胞质丰富, 灰蓝色; 核圆形或类圆形, 染色质粗颗粒状; 核仁大而清晰, 呈暗蓝色。组织细胞型瘤细胞特征为: 胞体大小不等, 差异悬殊, 小者如淋巴样组织细胞, 大者可为多核巨大瘤细胞。外形极不规则, 易见伪足和瘤状突起, 胞质多少不一, 灰蓝色, A 颗粒多少不定; 核畸形变显著, 呈凹陷、裂痕, 折叠, 易见双核、多核现象; 染色质粗细不定; 核仁大, 深蓝, 一到数个不等。本组病例按上述分型方法, 38 例病例分别分型为小细胞成熟细胞型 25 例、大细胞幼稚型 3

例、大细胞原始型 6 例和组织细胞型 4 例。

2.2 骨髓 NHL 细胞免疫表型结果分析 经 FCM 检测, 根据骨髓瘤细胞特异性抗原的表达情况, 38 例 NHL 分别被诊断 B 细胞淋巴瘤 28 例、T 细胞淋巴瘤 7 例、NK 细胞淋巴瘤 2 例, 间变性大细胞淋巴瘤 1 例。在 28 例 B 细胞淋巴瘤中, SLL/CLL 12 例、套细胞淋巴瘤(MCL)2 例、滤泡淋巴瘤(FL)1 例、边缘带淋巴瘤(MZL)2 例、不能定型的外周 B 淋巴细胞肿瘤 8 例, 弥漫大 B 细胞淋巴瘤 2 例(DLBCL), 前体 B 细胞淋巴瘤 1 例。在 7 例 T 细胞淋巴瘤中, 前体 T 细胞瘤 3 例、外周 T 淋巴细胞瘤 2 例(PTL), 不能定型的外周 T 淋巴细胞肿瘤 2 例。

2.3 骨髓 NHL 细胞形态学分型与免疫表型的关系 38 例 NHL 细胞骨髓侵犯的骨髓细胞形态学分型结果为小细胞成熟型 25 例(65.8%)、大细胞幼稚型 3 例(7.9%)、大细胞原始型 6 例(15.8%)、组织细胞型 4 例(10.5%), 与免疫分型的关系见表 1。

表 1 骨髓 NHL 细胞形态学分型与免疫表型的关系(n)

免疫表型	小细胞成熟大细胞 大细胞 组织			
	细胞型	幼稚型	原始型	细胞型
SLL/CLL	12	0	0	0
套细胞淋巴瘤(MCL)	2	0	0	0
滤泡淋巴瘤(FL)	1	0	0	0
边缘带淋巴瘤(MZL)	2	0	0	0
B 外周淋巴细胞瘤未能分型(BLL)	6	1	0	1
弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)	0	1	1	0
前 B 细胞淋巴瘤(B-LBL)	0	0	1	0
前体 T 细胞瘤(T-LBL)	0	0	2	0
外周 T 细胞瘤(PTCL)	2	0	0	1
T 淋巴细胞瘤未能分型(TLL)	0	1	0	1
NK 细胞淋巴瘤	0	0	2	0
间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)	0	0	0	1

3 讨 论

骨髓细胞形态学检查是诊断 LBMI 和 LMCL 最常用的手段之一, 在诊断的灵敏度和阳性率方面略低于骨髓活检^[2]。骨髓 NHL 细胞的形态是多种多样的, 有报道将其分为 3 种类型^[3-4], 但由于没有细胞分化程度的条件, 不利于临床进行准确的病理分型。本研究将 NHL 瘤细胞分为 4 种类型, 从分化程度和细胞大小对瘤细胞进行归类分析, 意在能给临床诊断工作提供一个较为有效的诊断意见。单一靠骨髓涂片检查可以检出瘤细胞, 在瘤细胞数量较多的情况下, 可以作出 LBMI 或 LMCL 的鉴别诊断, 但无法提供准确的病理分型。采用 FCM 技术检测出的 NHL 细胞的免疫表达结果, 可以印证骨髓涂片的结论, 同时, 2 种综合分析可以作出较为准确的病理分型^[5]。

从本组病例看, NHL 骨髓侵犯最常见的病理类型是 B 淋巴细胞瘤(73.7%), T 细胞淋巴瘤次之(18.4%)、NK 细胞淋巴瘤少见(5.3%), 间变性大细胞淋巴瘤更少见(2.6%)。骨髓细胞形态学显示, 骨髓 NHL 细胞以小细胞成熟细胞型为主。

骨髓小细胞成熟细胞型 NHL 免疫表型提示仅见于外周 B 淋巴细胞肿瘤和外周 T 淋巴细胞肿瘤, 而以外周 B 淋巴细胞肿瘤最为常见, 占 92%; 外周 T 淋巴细胞肿瘤仅占 8%。在 23

例小细胞的 B 细胞肿瘤中,以 SLL 为主,占 52.2%。从形态学来讲,外周 B 淋巴细胞瘤中除典型的 CLL、HCL、浆细胞样淋巴瘤细胞淋巴瘤和边缘绒毛状细胞淋巴瘤可以作出初步诊断外,其他如 MCL、FL 和 MZL 等都很难作出准确的判断。在各个类型之间,细胞特征仍有细微的差异。本组病例经形态学和 FCM 结果相互印证发现,MCL 在骨髓像里,通常表现出 2 类细胞:一是形态特征与正常小淋巴细胞极为相似,仅易见伪足和核畸形变;二是部分细胞胞体偏大且大小不一,外形不规则,易见伪足和瘤状突起,胞质量较多,细胞核大,伴畸形;染色质偏细,部分有核仁。在化疗后,骨髓像发现通常第一类细胞减少不显著,第二类细胞减少明显。这种骨髓瘤细胞在经受细胞毒性药物杀伤后出现分化程度低的细胞减少,分化程度高的细胞不减的现象,可能就是 MCL 具备类似弥漫性大淋巴瘤淋巴瘤的侵袭性和低恶性度淋巴瘤的不可治愈性的细胞学表现^[6]。FL 细胞在骨髓表现为偏成熟的淋巴细胞,胞体略大于小淋巴细胞,染色质粗,但不呈块状或龟背状改变。MZL 形态与 CLL 接近,但通常细胞膜外缘易见绒毛状突起。

大细胞幼稚型的 NHL 细胞可见于 BLL、TLL,形态学特征对病理分型帮助意义不明。大细胞原始型的 NHL 细胞可见于 DLCL、B-LBL、T-LBL 和 NK 细胞淋巴瘤。从本组病例看 T 细胞和 NK 细胞淋巴瘤所占比例较高,共 66.7%。T 细胞淋巴瘤在 FCM 检测中胞浆 CD3 阳性对诊断价值较高,但由于 NK 或 NK/T 淋巴瘤可能丢失多个 T 细胞抗原标志,因此,NK/T 细胞淋巴瘤在骨髓中的诊断应综合分析。组织细胞型的 NHL 细胞多见于 T 细胞淋巴瘤和间变大细胞淋巴瘤,B 细胞淋巴瘤少见。其细胞特点在于细胞大小悬殊,外形极不规则,呈多种细胞形态改变,容易伴随浆细胞、组织细胞、吞噬细胞等反应性细胞增多,须与感染相关的噬血细胞综合征相鉴别^[7]。

应用骨髓细胞形态学和流式细胞术联合检测 NHL 细胞 BMI,可以提高诊断的准确性并对大部分 NHL BMI 进行病理分型^[8-9]。骨髓细胞形态学在对外周淋巴瘤细胞的诊断上,由于瘤细胞与正常淋巴细胞难以鉴别,容易漏诊,此时应用 FCM 技术联合检测可以帮助确定淋巴细胞是否是克隆性改变。在 T 细胞及 NK 细胞淋巴瘤的诊断上,由于伴发的髓系标志较多以及大量的 T 细胞标志丢失,FCM 诊断结果有不确定

定性,结合骨髓细胞形态学及细胞化学染色,可以最终明确诊断。

由于 NHL 在细胞形态和免疫表型的多样性和复杂性,很多 LBMI 的诊断仅靠骨髓细胞形态学和 FCM 还不能做到准确分型,需要结合淋巴结病理形态和免疫组织化学、染色体核型分析以及突变基因检测的结果进行综合分析判断^[10]。

参考文献

[1] 江红. 侵犯骨髓的非霍奇金淋巴瘤细胞形态特点[J]. 广西医科大学学报,2009,26(6):928.

[2] Howell SJ,Grey M,Chang J,et al. The value of bone marrow examination in the staging of Hodgkin's lymphoma;a review of 955 cases seen in a regional cancer centre[J]. Br J Haematol,2002,119(2):408-411.

[3] 任新明,肖瑛,杨宝珍,等. 非霍奇金淋巴瘤骨髓浸润的瘤细胞特点[J]. 宁夏医学杂志,2007,29(11):967-968.

[4] 江红. 侵犯骨髓的非霍奇金淋巴瘤细胞形态特点[J]. 广西医科大学学报,2009,26(6):928-929.

[5] 凌家瑜,孙晓非,严苏丽,等. 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] Howe JG,Crouch J,Cooper D,et al. Real-time quantitative reverse transcription-PCR for cyclin D1 mRNA in blood,marrow,and tissue specimens for diagnosis of mantle cell lymphoma[J]. Clin Chem,2004,50(1):80-87.

[7] 刘恩彬,陈辉树,杨晴英,等. 非霍奇金淋巴瘤侵犯骨髓的病理形态及免疫表型特点分析[J]. 中国肿瘤临床,2005,32(16):923-927.

[8] 万岁桂,孙雪静,惠吴函,等. 多参数流式细胞术检测 B 细胞非霍奇金淋巴瘤骨髓侵犯[J]. 中国实验血液学杂志,2010,18(2):473-476.

[9] Stetler-Stevenson M,Braylan RC. Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders[J]. Sem in Hematol,2001,38(2):111-123.

[10] 王娜,谢守军,申兴斌,等. 细胞遗传学联合免疫细胞化学检查在首诊非霍奇金淋巴瘤骨髓侵犯中的应用[J]. 中国实验诊断学,2010,14(4):582-584.

(收稿日期:2013-05-08)

(上接第 2987 页)

Oncol,2007,2(8):706-714.

[5] Chapoval AI,Ni J,Lau JS,et al. B7-H3:A costimulatory molecule for T cell activation and IFN-γ production[J]. Nat Immunol,2001,2(3):269-274.

[6] Sun M,Richards S,Prasad DVR,et al. Characterization of mouse and human B7-H3 genes[J]. J Immunol,2002,168(12):6294-6297.

[7] Steinberger P,Majdic O,Derdak SV,et al. Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3,a member of the B7 family with four Ig-like domains[J]. J Immunol,2004,172(4):2352-2359.

[8] Zhang G,Xu Y,Lu X,et al. Diagnosis value of serum B7-H3 expression in non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer,2009,66(2):245-249.

[9] 孙静,茆勇,顾文超,等. 协同刺激分子 B7-H3 在非小细胞型肺癌

中的表达及其临床意义[J]. 中国免疫学杂志,2011,27(7):594-596.

[10] Prasad DVR,Nguyen T,Li Z,et al. Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells[J]. J Immunol,2004,173(4):2500-2506.

[11] Sun X,Vale M,Leung E,et al. Mouse B7-H3 induces antitumor immunity[J]. Gene Ther,2003,10(20):1728-1734.

[12] Luo L,Qiao H,Meng F,et al. Arsenic trioxide synergizes with B7H3-mediated immunotherapy to eradicate hepatocellular carcinomas[J]. Int J Cancer,2006,118(7):1823-1830.

[13] Wu CP,Jiang JT,Tan M,et al. Relationship between co-stimulatory molecule B7-H3 expression and gastric carcinoma histology and prognosis[J]. World J Gastroenterol,2006,12(3):457-459.

(收稿日期:2013-05-10)