

• 临床检验研究论著 •

## MICM 分型在急性早幼粒细胞白血病诊断中的应用

胡彩虹<sup>1</sup>, 杨桂斌<sup>2△</sup>, 张 夏<sup>2</sup>, 黄传荣<sup>2</sup>, 黄 明<sup>2</sup>, 王建华<sup>2</sup>

(1. 安徽省临泉县人民医院检验科, 安徽临泉 236400; 2. 安徽省阜阳市人民医院, 安徽阜阳 236000)

**摘 要:**目的 探讨 MICM 分型在急性早幼粒细胞白血病(APL, M3)诊断中的价值。方法 形态学采用 Wright 染色, 细胞化学过氧化物酶(POX)、糖原染色(PAS)、非特异性酯酶加氟化钠抑制试验(NSE+NaF)、特异性酯酶(CE)染色按常规方法; 应用免疫酶标记技术和流式细胞术进行免疫学分型; 用 24 h 短期培养法 G 带方法进行染色体核型分析; 用 RT-PCR 检测 PML/RARa 融合基因。结果 61 例 APL 中粗颗粒型 17 例、细颗粒型 12 例、混合颗粒型 30 例、变异型 2 例, POX、NSE、NSE+NaF、PAS、CE 阳性率分别为 99.7%、82.4%、71%、97%、99.6%; 33 例免疫学分型: CD13 90.8%、CD14 91.8%、CD33 96.6%、CD68 86%、MPO 96.6%、HLA-DR 28.7%、CD19 15%、CD10 12%、CD3 不表达; 31 例染色体分析中 21 例具有 t(15;17), 其中 1 例还具有额外累及 17 号染色体异常, 6 例正常核型, 4 例培养无分裂象; 24 例 APL 中 17 例 PML/RARa 融合基因转录本阳性, 4 例阴性, 3 例失败。结论 MICM 分型使 APL 的诊断更准确, 便于临床更好地选择治疗方案和判断预后。

**关键词:** 白血病, 急性; 早幼粒细胞; MICM 分型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)24-3347-02

### The application of MICM classification in diagnosis of acute promyelocytic leukemia

Hu Caihong<sup>1</sup>, Yang Guibin<sup>2△</sup>, Zhang Xia<sup>2</sup>, Huang Chuanrong<sup>2</sup>, Huang Ming<sup>2</sup>, Wang Jianhua<sup>2</sup>

(1. Department of Medical Laboratory, People's Hospital of Linquan, Linquan, Anhui 236400, China;

2. People's Hospital of Fuyang, Fuyang, Anhui 236000, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the value of MICM classification in diagnosis of acute promyelocytic leukemia(APL). **Methods** the diagnosis of acute promyelocytic leukemia; morphology and chemical staining were tested under microscope, immunological classification were examined immunohistochemistry, cytogenetics was used by Giema-binding chromosome, PML/RARa fusion gene was determined by RT-PCR. **Results** 61 APL cases including 17 cases of coarse morphology, 12 cases of fine morphology, 30 cases mixed particles, 2 case of variant morphology, positive rate of POX, NSE, NSE+NaF, PAS, CE were 99.7%, 82.4%, 71%, 97%, 99.6%, respectively. Immunological classification of 33 cases; positive rates of CD13, CD14, CD33, CD68, MPO, HLA-DR, CD19, CD10, CD3 were 90.8%, 91.8%, 96.6%, 86.0%, 96.6%, 28.7%, 15.0%, 12.0%, 0.0%, respectively. Chromosomal analysis of 31 cases; 21 cases were chromosomal translocation(15;17), 6 cases were normal karyotype, 4 cases were cultural failure. PML/RARa fusion gene were positive in 17 cases, 4 cases were negative and 3 cases fail from all of detected 24 cases. **Conclusion** MICM classification is more accurate in diagnosis of acute promyelocytic leukemia, so that clinicians choose initial treatment regimen better and judge prognosis.

**Key words:** leukemia, acute; promyelocyte; MICM classification

急性早幼粒细胞白血病(APL)是一种特殊类型的急性髓性细胞白血病, 临床出血趋势重, 易引起 DIC、脑出血等严重并发症, 常导致患者早期死亡。自 1986 年首用全方式维甲酸(ATRA)和以后应用三氧化二砷治疗取得了较好的治疗效果。但不同的分子生物学特征和亚型对于治疗方案的选择及预后判断至关重要<sup>[1]</sup>。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 为本院 2000~2005 年骨髓检查形态学诊断确定为 APL 的患者 61 例, 全部为初诊病例, 未治疗前进行形态学(morphology)-免疫学(immunology)-细胞遗传学(cytogenetics)-分子生物学(molecular biology)分型, 即 MICM 分型, 男 25 例, 女 36 例, 年龄 4~73 岁, 中位年龄 31 岁。

**1.2 形态学和细胞化学检查** 骨髓及血片经 Wright 染色分类, 同时进行细胞化学染色, 包括过氧化物酶(POX)、糖原染色(PAS)、非特异性酯酶+氟化钠抑制试验(NSE+NaF)、特异性酯酶(CE)。试剂购自上海太阳生物技术公司、上海虹桥实验试剂公司; POX 为自配试剂。按血液病诊断及治疗标准确

定 APL 亚型<sup>[2]</sup>。

**1.3 免疫学分型** 用免疫酶标记技术和流式细胞术进行免疫学分型, 免疫酶标记原+早幼粒细胞大于或等于 30% 为阳性, 流式细胞术采用 CD45 设门大于或等于 20% 为阳性; 所用单克隆抗体(McAb)包括: CD3、CD10、CD19、CD68、CD13、CD14、CD33、MPO、HLA-DR。单抗试剂购自中国医学科学院血液学研究所, 上海太阳生物技术公司和 BD 公司, 按说明书操作方法。阳性表达: 细胞膜或细胞浆鲜红色沉淀物; 阴性表达: 细胞膜或细胞浆无鲜红色沉淀物; 白血病细胞阳性率大于或等于 30% 为阳性表达。流式细胞术按 FACS calibur 操作说明和培训要求操作。

**1.4 细胞遗传学检查** 染色体标本取自骨髓。用 24 h 短期培养法, 1640 培养基购自北京协和医院, 行 G 带方法显带。根据国际人类染色体命名(ISCN, 1985 年)命名核型。

**1.5 分子生物学检测融合基因** 应用反转录-多聚酶链反应(RT-PCR)检测 PML/RARa 融合基因, 引物及试剂盒购自中国医学科学院血液学研究所、上海血液病研究所, 按试剂盒说

说明书操作,扩增仪为 Permer(英国产)。取 10  $\mu$ L RT-PCR 扩增产物 20 g/L 琼脂糖电泳,溴乙啶染色进行产物鉴定。紫外线下观察结果,出现 168 bp 区带为阳性。

2 结 果

2.1 形态学分型和细胞化学染色结果 形态学诊断 APL 61 例,其中粗颗粒型 17 例,细颗粒型 12 例,混合型 30 例,变异型(M3V)2 例,胞浆内有柴捆样 Auer 小体 34 例。57 例细胞化

表 1 57 例细胞化学染色结果

项目	POX	NSE	NSE+NaF	PAS	CE
阳性率(%)	99.7(95~100)	84.2(71~97)	71(64~87)	87(94~100)	99.6(96~100)
积分	397(388~400)	251(223~374)	194(162~261)	310(285~371)	382(307~392)

2.3 细胞遗传学分析结果 31 例染色体核型分析,其中 21 例具有 t(15;17),1 例除有 t(15;17)外还有额外累及 17 染色体异常,6 例正常核型,4 例无细胞生长,未发现 t(11;17)异常和其他染色体异常。

2.4 PML/RARa 融合基因检测结果 24 例 APL 做了 PML/RARa 融合基因,阳性者 17 例,4 例阴性,3 例 RNA 抽取失败。

2.5 细胞遗传学与 PML/RARA 融合基因结果比较 16 例同时做染色体检查和 PML/RARA 融合基因检测,12 例具有 T(15;17)改变的,PML/RARA 融合基因也是阳性;4 例正常核型者,PML/RARA 融合基因均为阳性。

3 讨 论

自从应用 ATRA 和 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 取得很好的疗效以来,APL 是临床最有希望治愈的急性白血病。因此正确地诊断 APL 在临床上尤为重要。典型的 APL 骨髓细胞形态学上有较明显的特征,核有扭曲、折叠,核仁隐显不清;胞浆量较多,有内外浆之分,胞浆内含有粗、细或不均一的颗粒,或颗粒集中于胞浆一隅,多数含有 Auer 小体,呈柴捆样排列等。M3v 形态学不易诊断,其核扭曲、折叠程度和胞浆内颗粒特点与典型 M3 比较有所不同,易与 M2b 相混淆;而 McKenna<sup>[2]</sup>认为 APL 变异型易与 M4 或 M5 等其他亚型相混淆。本组 APL 形态学上全部符合 M3 的诊断标准<sup>[3]</sup>。细胞化学 POX、PAS、NSE、CE 均为强阳性,NSE+NaF 不被抑制。PAS 是鉴别急淋与急非淋较好的细胞化学染色方法,急淋 PAS 一般呈粗粒状、珠状、块状,而急非淋呈细粒状弥散分布。NSE 呈强阳性但不被 NaF 抑制是区分单核细胞白血病的方法。免疫学能更好地区分急淋和急非淋。形态学结合细胞化学染色是诊断 M3 简便方法<sup>[4]</sup>。本组 APL 的淋巴细胞标记偶有表达,但阳性率低于 30%,视为阴性,这可能与 APAAP 的方法学有关;CD68、CD13、CD14、CD33、MPO 有很强的表达,HLA-DR 阳性率低。Edger 等<sup>[5]</sup>用流式细胞仪分析 50 例 APL,认为 HLA-DR 在 APL 表达缺如,CD14 表达率低,CD13、CD33、CD117、阳性率高,本组 CD14 表达率高可能与方法学有关。陈蕾蕾等<sup>[6]</sup>用流式细胞仪检测到 1 例 PML/RARA 融合基因阳性的 APL 免疫学 HLA-DR 阳性,提示临床上不能单靠免疫表型作为诊断 APL 的独立指标,而应该结合 FAB、FISH 和 PCR 等结合协助诊断。

细胞遗传学和分子生物学检测是正确诊断 APL 的良好方法,90%以上的 M3 患者有 t(15;17)(q21;q21)的特异性染色异常,17q 的维甲酸受体(RARa)和 15q 上的早幼粒细胞白血病基因(PML)发生易位,形成 PML/ RARa 或 RARa/PML 二种融合基因,是 M3 的分子标志,而且具有这种标志的 M3 对维甲酸诱导分化、砷制剂诱导凋亡治疗有很好的疗效;还有 t

学染色结果(平均值及范围)见表 1,POX、NSE、PAS、CE 均为强阳性,NSE+NaF 不被抑制。

2.2 免疫学分型结果 61 例 APL 患者中有 33 例进行了免疫学分型,CD3、CD10、CD19、CD13、CD14、CD33、CD68、MPO、HLA-DR 的阳性率分别为:0.0%、12.0%、15.0%、90.8%、91.8%、96.6%、86.0%、96.6%、28.7%。

(11;17)(q23;q22)、t(5;17)(q35;q21),此改变系 11q 上锌指基因与 17q 的 RARa 融合形成 PLZF/ RARa,5q 上的 NPM 与 17q 上 RARa 形成 NPM/RARa,这两种融合基因对野生型 RARa 有显性负作用,患者化疗效果欠佳,维甲酸及砷剂耐药。还可出现 t(11;17)(q11;q21)形成 NUMA/RARa、t(17;17)(q11;q21)STAT5b/ RARa,这些特殊改变的 APL 在形态上、免疫表型及临床特征等方面与典型 t(15;17)/APL 基因一致<sup>[7]</sup>。本组 21/31 例检出 t(15;17),未见 t(11;17)、t(5;17)异常;PT-PCR 检测 PML/ RARa 融合基因 17/24 例阳性,粗细颗粒和混合颗粒、M3v 中 t(15;17)、PML/ RARa 变化未有差异,可能与例数方面较少有关。本组 16 例同时做染色体核型分析和 PML/RARA 融合基因检测,12 例具有 t(15;17)改变者 PML/RARa 也是阳性,4 例核型正常者 PML/RARa 融合基因全部阳性,说明 PML/RARa 融合基因检测比染色体检查更敏感。汪慧平等<sup>[8]</sup>对 12 例根据形态学难以区分 M2、M3 型 AML 进行 MICM 分型,4 例具有 t(8;21)的 AML1/ETO 融合基因转录本阳性,2 例具有 t(15;17)患者 PML/RARa 融合基因转录本阳性,另 6 例核型正常的 1 例 PML/RARa 融合基因阳性,3 例 AML1/ETO 阳性,2 例 AML1/ETO 和 PML/RARa 均为阴性;2 例在基层医院诊断 FAB-M3v,用维甲酸治疗效果不佳,用双色 FISH 技术对 AML1/ETO 融合基因检测结果均为阳性;免疫表型:12 例中 CD13 阳性 9 例,CD33 阳性 11 例,CD34 阳性 6 例,CD19 阳性 4 例。由于 APL 有特异的遗传学特征 t(15;17)、t(11;17)导致 PML/RARa、PLZF/RARa 融合基因的形成,所以分子生物学检测使 APL 诊断更准确。Gruer 等<sup>[1]</sup>用 tCGH(translocation-based comparative genomic hybridization)对 2 例不常见的 APL 进行检测,1 例核型分析和 FISH 检测缺乏 t(15;17),另 1 例缺乏典型的形态学和免疫学特征,但这 2 例涉及 3 种方式的 PML/RARA 的变异移位。Danielle 等和 WHO 分型协作组认为观察外周血和骨髓中早幼粒细胞形态可预测其遗传学异常<sup>[9-10]</sup>,本组未对此作比较。魏负禾等<sup>[11]</sup>应用 FISH、FCM 联合检测 APL,结果细胞遗传学正常核型的 APL,M-FISH 仍可检测到 PML/RARA 融合基因,结果提示 M-FISH 更敏感,FCM 的检测灵敏度高于 FISH,但缺乏可定向、定量和定位的优点,二者结合起来更有助于 APL 诊断和判断预后。

参考文献

[1] Gruver AM,Rogers HJ,Cook JR,et al. Modified array-based comparative genomic hybridization detects cryptic and variant PML-RARA rearrangements in acute promyelocytic(下转第 3350 页)

3 讨 论

PG1 主要由胃底腺的主细胞和黏液颈细胞分泌。除了胃底腺的主细胞和黏液颈细胞外,贲门腺和胃窦的幽门腺的黏液颈细胞以及十二指肠上段也能产生 PG2。通常情况下,约有 1% 的 PG 透过胃黏膜毛细血管进入血液循环,进入血液循环的 PG 在血液中非常稳定。血清 PG1 和 PG2 反映胃黏膜腺体和细胞的数量,也间接反映胃黏膜不同部位的分泌功能。当胃黏膜发生病理变化时,血清 PG 含量也随之改变。因此,监测血清中 PG 的浓度可以作为监测胃黏膜状态的手段<sup>[4-5]</sup>,联合测定 PGR 可起到胃底腺黏膜“血清学活检”的作用。

本研究结果显示,血清 PG1 水平及 PGR 值在非萎缩性胃炎组、胃溃疡组、萎缩性胃炎组及胃癌组中呈逐渐下降趋势,以胃癌组降低最为明显,显著低于其他三组患者( $P<0.01$ ),血清 PG2 水平,胃溃疡组要显著高于其他三组( $P<0.01$ ),而其他三组之间水平无明显差异( $P>0.05$ ),与付明生等<sup>[6]</sup>及程清等<sup>[7]</sup>报道一致,胃溃疡及萎缩性胃炎是胃癌的主要癌前病变,由于黏膜萎缩,正常腺体功能丧失,被幽门腺或肠上皮化生代替,腺体和主细胞数量减少,酶原的产生受到影响,故血清 PG1 水平下降。此外有研究认为,致癌因子使得胚细胞中的 PG 基因受损而突变失去了分泌 PG1 的能力,基因突变的胚细胞又更新黏膜细胞,从而使 PG1 的分泌持续下降<sup>[8]</sup>,而 PG2 主要是在成熟的腺细胞中产生,分泌 PG2 的胃黏膜细胞分布较广以及幽门腺化生使 PG2 产生增多,与癌细胞分化的关系不大,故非萎缩性胃炎组、萎缩性胃炎组及胃癌组中血清 PG2 水平无显著性差异,胃溃疡患者由于胃黏膜损伤明显,使 PG2 进入血液循环的机会增加,而造成血清 PG2 水平显著增高。李志等<sup>[8]</sup>及凌鑫等<sup>[9]</sup>学者报道胃癌患者血清 PG1 水平及 PGR 值与萎缩性胃炎患者比较并无显著性差异,与本文研究结果不同,其原因除可能与选取病例范围、例数及检测方法不同有关外,与血清 PG 含量会因国家、种族及其他一些膳食因素、感染因素、饮食习惯、年龄及性别的影响而不同有关。故在应用血清 PG1、PG2 作为胃癌初筛指标时必须充分考虑不同人群的差异和其偏态分布特征<sup>[10]</sup>。

本研究中胃溃疡、萎缩性胃炎及胃癌组 PG1 及 PGR 均低

于非萎缩性胃炎组( $P<0.01$ ),因此,血清 PG1 及 PGR 明显降低可作为胃癌及癌前病变的一项血清学诊断指标。笔者以  $PG1<70\text{ }\mu\text{g/L}$  且  $PGR<3.0$  为判断界值,其诊断胃癌的敏感性和特异性分别为 85.8% 和 78.6%,表明血清 PG 检测对胃癌初筛具有较高敏感性和特异性,并具有易于接受、成本低等优势,适用于大面积人群普查,对于提高胃癌早期诊断率和早期治疗率,从而降低病死率具有积极意义,但本研究样本量较少,还需大样本进一步比较分析诊断胃癌的最佳界值、敏感性 & 特异性,以便提高胃癌的筛查和早期诊断。

参考文献

[1] 徐巧莲,万小勇,杜燕,等.血清胃蛋白酶原检测在胃癌筛查中的价值[J].胃肠病学,2012,17(10):614-617.

[2] Fock KM, Talley N, Moayyedi P, et al. Asia-Pacific consensus guidelines on gastric cancer prevention[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(3):351-365.

[3] 中华医学会消化病学分会.中国慢性胃炎共识意见[J].胃肠病学,2006,11(11):674-684.

[4] 于中麟,冀明,杨迅.血清胃蛋白酶原对胃癌普查的价值探讨[J].中华消化内镜杂志,2008,25(10):512-515.

[5] 熊军,王宗喜,郭辉,等.检测血清胃蛋白酶原水平在萎缩性胃炎中的诊断价值[J].中国实验诊断学,2012,16(10):1844.

[6] 付明生,潘淑贤,许兰涛,等.血清胃蛋白酶原对胃癌的诊断价值[J].胃肠病学和肝病杂志,2012,21(5):420-422.

[7] 程清.血清胃蛋白酶原对胃癌早期诊断的意义[J].现代检验医学杂志,2013,28(1):67-69.

[8] 李志,于秒,刘卫红,等.慢性萎缩性胃炎及胃癌患者血清胃蛋白酶原检测的临床价值[J].国际检验医学杂志,2012,33(24):2965-2966.

[9] 凌鑫,汤金海,沈国荣,等.血清胃蛋白酶原 I、II 在萎缩性胃炎和早期胃癌诊断中的价值[J].临床军医杂志,2012,40(2):336-338.

[10] 费凤英,王金山,祝新华,等.血清胃蛋白酶原检测在胃部疾病诊断中的意义[J].检验医学,2012,27(1):27-29.

(收稿日期:2013-08-10)

(上接第 3348 页)

leukemia lacking classic translocations[J]. Diagnostic Molecular Pathology, 2013, 22(1):10-21.

[2] McKenna RW. Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias[J]. Clin Chem, 2000, 46(8):1252-1259.

[3] 张之楠.血液病诊断及疗效标准[M].北京:北京科学技术出版社,1998:184.

[4] 杨桂斌,沈孟贤,黄明,等.急性早幼粒细胞白血病细胞化学特点[J].白血病.淋巴瘤,1994,4.

[5] Edger GR, Fernando LP, Sergio LR, et al. Microgranular and t(11;17)/PLZF-RARA variants of acute promyelocytic leukemia also present the flow cytometry pattern of CD13, CD34, CD15. expression characteristic of PML/RARA gene rearrangement[J]. Hematol, 2004, 76:45-51.

[6] 陈蕾蕾,孙雪梅,陈军浩,等.FISH 在免疫表型特殊的急性早幼粒细胞白血病诊断中的应用[J].标记免疫分析与临床,2005,4(1):1-2.

[7] 邱慧颖,王健民,薛永权.急性髓系白血病细胞及分子遗传学研究进展[J].中华血液学杂志,2004,25(4):761-764.

[8] 王慧萍,李国霞,乔振华,等.MICM 分型诊断在鉴别 M2 和 M3 型急性髓性白血病中的意义[J].临床血液学杂志,2005,18(2):89-91.

[9] Sainty D, Liso V, Cantù-Rainoldi A, et al. A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements[J]. Blood, 2000, 96(4):1287-1296.

[10] 王荷花,郝玉书,肖志坚.髓系肿瘤世界卫生组织(WHO)分类[J].国外医学:输血及血液学分册,2003,26(2):99-107.

[11] 魏负禾,张晓宏,于波海,等.应用 FISH、FCM 检测 APL PML/RARA 融合基因及临床应用的研究[J].中国优生与遗传杂志,2003,11(4):35-37.

(收稿日期:2013-08-14)