

• 检验技术与方法 •

流式细胞术对非霍奇金氏淋巴瘤的诊断价值

陈家逸, 陈 峻

(武汉市第一医院检验科, 湖北武汉 430022)

摘要:目的 评价流式细胞术(FCM)对非霍奇金淋巴瘤(NHL)诊断的临床效能。方法 采用病理形态学检查、免疫组织化学染色及 FCM 检测 32 例 NHL 及 30 例非 NHL 患者。结果 32 例 NHL 患者中,病理形态学检查、免疫组织化学染色及 FCM 诊断的敏感性分别为 78.1%、46.9%及 84.4%。30 例非 NHL 患者中,病理形态学检查、免疫组织化学染色及 FCM 诊断的特异性分别为 100.0%、80.0%及 83.3%。结论 FCM 提高了淋巴结活检样本的淋巴瘤诊断准确率。

关键词:淋巴瘤; 流式细胞术; 活组织检查; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)10-1318-02

The value of flow cytometry in diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma

Chen Jiayi, Chen Jun

(Department of Clinical Laboratory, the First Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei 430022, China)

Abstract:Objective To evaluate the clinical performance of flow cytometry(FCM) in diagnosis of non-hodgkin's lymphoma (NHL). **Methods** Pathological examination, immunohistochemical staining and FCM were adopted to detect the 32 patients with NHL and 30 patients with non-NHL. **Results** In 32 patients with NHL, the diagnostic sensitivities of pathological examination, immunohistochemistry and FCM were 78.1%, 46.9% and 84.4%, respectively. In 30 patients with non-NHL, the diagnostic specificities of pathological examination, immunohistochemical staining and FCM were 100.0%, 80.0% and 83.3%, respectively. **Conclusion** FCM improves diagnostic accuracy of lymphoma in lymph node biopsy samples.

Key words: lymphoma; flow cytometry; biopsy; diagnosis

据世界卫生组织统计,目前全球每年约有 3 千万新发非霍奇金淋巴瘤(non-hodgkin's lymphoma, NHL),该疾病病死人数超过 20 万。中国 NHL 的发病率为 0.02%,每年新增患者约 2.5 万,病死人数约 2 万。目前对于淋巴瘤的诊断方法主要有病理形态学、免疫组织化学染色、细胞遗传学和基因诊断。本研究通过流式细胞术(flow cytometry, FCM)与病理诊断和免疫组织化学染色诊断的比较分析,探讨 FCM 对淋巴瘤诊断的应用价值。

1 材料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 3 月至 2012 年 9 月于本院诊治 62 例患者,其中,男 35 例,女 27 例;年龄 15~73 岁,平均 43.52 岁;NHL 32 例,非 NHL 30 例。

1.2 主要试剂与仪器 荧光素标记单克隆抗体包括:IgG1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD10、CD22、CD23、CD24、CD45、CD45RO、CD56、smIg、Kappa(κ)、Lambda(λ)及末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TDT)。所有抗体、溶血剂及破膜剂均为美国 Beckman Coulter 公司产品。主要仪器为 EPICS XL 分析型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.3 检测方法 (1)病理形态学检查:取手术切除的淋巴结进行病理组织学检查;血液和骨髓标本涂片染色,行形态学检查。参照 2000 年恶性淋巴瘤 WHO 分类法进行初步诊断^[1-2]。(2)免疫组织化学染色:对于需要进一步证据证实的标本,再行免疫组织化学染色,选择的单抗包括 CD3、CD4、CD8、CD12、CD20、CD21、CD34、CD45RO、CD79a 及 TDT 等。(3)FCM:对于淋巴结样本,需用盐水保存,采用机械法破碎组织,制取细胞悬液并稀释至 $20 \times 10^9/L$,取 100 μL 细胞悬液样本加入相应

抗体孵育 20 min 后,加溶血剂 2 mL,待红细胞破裂溶血后(膜内抗体需加破膜剂于 2~10 $^{\circ}C$ 孵育 20 min,再用破膜洗液洗涤离心,加相应抗体再行孵育 20 min 后用破膜洗液洗涤),离心,倾去上清液,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)2 mL 洗涤,离心倾去上清液,加 PBS 300~400 mL,重悬,混匀,上机。标本以 CD45 和侧向角设门,选择可疑细胞群进行多参数 FCM 分析,再经 4 个参数[异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)、别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)、多甲藻黄素-叶绿素-蛋白质复合物(peridinin-chlorophyll-protein complex, PerCP)]分析,确定免疫表型。全部数据用 Cell-Quest 软件获取和分析,以百分率表示抗原阳性的细胞。阳性细胞率小于 20%,判定为该抗原表达阴性;阳性细胞率大于 50%,判定该抗原表达阳性;介于 20%和 50%之间,则判定为弱阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计数资料用率表示,率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

3 种诊断方法对于 32 例 NHL 确诊患者和 30 例排除 NHL 干扰患者的检测诊断结果见表 1。32 例 NHL 患者中,病理诊断与 FCM 诊断一致,且与临床诊断符合的有 25 例,敏感性为 78.1%,有 2 例病理诊断不明确,FCM 诊断正确,FCM 对 NHL 诊断的敏感性为 84.4%,两者差异无统计学意义($P>0.05$)。而免疫组织化学染色确诊的有 15 例,敏感性为 46.9%,与 FCM 诊断比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。30 例非 NHL 病例,病理诊断、免疫组织化学染色诊断和 FCM 诊断的特异性分别为 100.0%、80.0%及 83.3%,见表 1、2。由于

本研究样本量不够,不足以得出可靠的各种分期、分型的疾病表型。本研究有 1 例为 CD23 阴性,1 例为 CD4⁺/CD8⁺ 阳性。

表 1 病理形态学、免疫组织化学染色及 FCM 诊断结果的比较(n)

组别	n	病理形态学诊断		免疫组织化学染色诊断		FCM 诊断	
		NHL	非 NHL	NHL	非 NHL	NHL	非 NHL
确诊 NHL 组	32	25	7	15	17	27	5
排除 NHL 组	30	0	30	6	24	5	25

表 2 3 种检测方法诊断 NHL 的敏感性、特异性及符合率比较(%)

检测方法	敏感性	特异性	符合率
病理形态学检查	78.1 [△]	100.0 [△]	88.7 [△]
免疫组织化学染色	46.9 [*]	80.0 [△]	64.5 [*]
FCM	84.4	83.3	83.9

^{*}:*P*<0.05;[△]:*P*>0.05,与 FCM 比较。

3 讨 论

淋巴瘤可分为霍奇金病和 NHL 两大类,而且以 NHL 为主。NHL 的诊断主要依据组织病理学,而病理检查手段并不包括对 NHL 的临床分型、肿瘤负荷情况、浸润程度以及对治疗的反应等。因此,淋巴瘤的诊断除了综合临床发现和影像学检查外,实验室检测发挥了越来越重要的作用。此外,实验室检测损伤小,敏感性高,可协助早期淋巴瘤筛查。淋巴瘤是病理学诊断中难度最大的一种疾病,这是由于:(1)淋巴结切片中反应性增生与淋巴瘤的形态学诊断非常困难;(2)淋巴结从取材,要经过固定、包埋、切片、标记和显色等多道工序,才能检测淋巴细胞的免疫表型,在此过程中可能造成细胞的损伤,使淋巴细胞表面标记的检出存在困难,极大地影响了淋巴瘤的病理诊断;(3)在光学显微镜下,由病理科医师判断单色的免疫表型结果,对单克隆性的判断存在着正确性和客观性方面的不完善;(4)用分子生物学方法扩增相关的基因也存在技术上和诊断上的假象。FCM 技术则在一定程度上满足了上述的不足。

在确诊 NHL 组中,有 2 例病理检测未能诊断,FCM 则能检测出,并予以分型。但是有 1 例,FCM 虽然能检测,却将 B 系 NHL 误诊为 T 系 NHL。而在排除 NHL 干扰组中,病理诊断均阴性,FCM 则有一定的假阳性结果。因此,虽然 FCM 对于淋巴瘤的检测敏感性较病理诊断高,但是特异性不如前者,所以 FCM 并不能取代病理诊断,应作为其辅助手段,提高其诊断效用。

目前,已有关于 FCM 在淋巴瘤快速诊断方面的研究报道,国内也有 FCM 分析技术在淋巴瘤免疫学中应用的报道^[3-4]。本研究用 FCM 检测淋巴结活检标本进行淋巴瘤诊断的敏感性为 84.4%,与病理诊断的 78.1%相比,差异无统计学意义(*P*>0.05),而相对于免疫组织化学染色的 46.9%,差异有统计学意义(*P*<0.05)。FCM、病理诊断和免疫组织化学染色的诊断特异性分别为 83.3%、100.0%及 80.0%,三者之间差异无统计学意义(*P*>0.05)。FCM、病理诊断的符合率分别为 83.9%、88.7%,均明显高于免疫组织化学染色诊断的 64.5%。本研究结果与文献^[5-7]一致,因此,在淋巴瘤诊断上,FCM 具有较高的诊断价值,且在标本取得当天即可获得报告。

研究认为 FCM 分析对于淋巴瘤诊断具有表型特异性,较适用于鉴别淋巴组织反应性增生与小细胞类的淋巴瘤,区分弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和 Burkitt 淋巴瘤与非淋巴瘤的疾病,将形态学上相似的淋巴瘤进一步分型^[4,8-10]。本研究中,FCM 将 1 例弥漫性大 B 细胞淋巴瘤病理诊断为 T 系淋巴瘤,且有 1 例干扰病例错误地诊断为 T 系淋巴瘤,可见,FCM 分析对于诊断 B 细胞系的恶性肿瘤可靠性较 T 细胞系大,且更为成熟,FCM 对于 B 系淋巴瘤诊断的特异性高于 T 系。

FCM 在细针穿刺活检(fine-needle aspiration biopsy, FNAB)以及体液、血液和骨髓检查中可以发挥最大优势, FNAB 联合 FCM 对于淋巴瘤的诊断有效率可达到 75%~90%^[11]。当然,FCM 并不能完全取代现有的病理检查而独立地进行淋巴瘤的诊断,因为它对霍奇金淋巴瘤的诊断意义很小,对 T 细胞淋巴瘤的诊断相对薄弱,富含 T 细胞的 B 细胞淋巴瘤也需联合形态学和免疫组织化学法进行诊断,自然杀伤细胞淋巴瘤、白血病的诊断必须建立在对形态学、免疫表型分析和临床表现综合分析的基础上,而不能仅靠 FCM 就对其克隆性作出判断。对于阴性样本,FCM 也出现了一定的假阳性。因此,对于淋巴瘤的诊断,应结合病理、FCM 等的诊断,综合分析,同时,FCM 要求新鲜组织,形态学不能兼顾,被检细胞数量很少时异常表现不能被检出,这些都使 FCM 的应用受到一定的限制。总之,流式细胞仪的使用提高了淋巴瘤,尤其是早期淋巴瘤的诊断准确率。

参考文献

[1] Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms[J]. Blood, 2002, 100(7):2292-2302.

[2] 李甘地, 刘卫平. 从争论到统一——介绍 WHO 新的恶性淋巴瘤分类[J]. 中华病理学杂志, 2001, 30(2):137-140.

[3] 刘亮. 流式细胞术在肿瘤免疫学中的应用[J]. 药品评价, 2012, 9(18):46-48.

[4] 杨凡, 周小鸽. 流式细胞分析技术在淋巴瘤诊断中的应用[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35(4):197-202.

[5] 河福金, 谢彦, 李吉友, 等. 多参数流式细胞术在非霍奇金淋巴瘤诊断中的应用[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35(4):203-208.

[6] Meda BA, Buss DH, Woodruff RD, et al. Diagnosis and subclassification of primary and recurrent lymphoma. The usefulness and limitations of combined fine-needle aspiration cytomorphology and flow cytometry[J]. Am J Clin Pathol, 2000, 113(5):688-699.

[7] Zardawi IM, Jain S, Bennett G. Flow-cytometric algorithm on fine-needle aspirates for the clinical workup of patients with lymphadenopathy[J]. Diagn Cytopathol, 1998, 19(4):274-278.

[8] Kaleem Z. Flow cytometric analysis of lymphomas: current status and usefulness[J]. Arch Pathol Lab Med, 2006, 130(12):1850-1858.

[9] 余英豪, 王晨. B 细胞淋巴瘤的免疫学表型及其在诊断和鉴别诊断中的意义[J]. 中国误诊学杂志, 2006, 6(8):1494-1496.

[10] 任立群, 吕宁. 流式细胞免疫表型分析在淋巴瘤诊断中的应用[J]. 实用癌症杂志, 2005, 20(4):431-433.

[11] Dunphy CH. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology[J]. Arch Pathol Lab Med, 2004, 128(9):1004-1022.