

• 论 著 •

急性双表型白血病细胞形态学和免疫表型的研究

张小芳, 栗瑞敏, 张运刚, 李守霞[△]

(河北省邯郸市中心医院检验科 056001)

摘要:目的 探讨骨髓细胞免疫表型在急性双表型白血病中的诊断价值及其与骨髓细胞形态学的比对研究。方法 对 190 例急性白血病患者采用流式细胞仪四色免疫荧光直接标记技术检测细胞免疫表型,通过骨髓细胞形态学分型进行分析。采用流式细胞术四色免疫荧光直接标记技术与 CD45/SSC 设门分析技术检测 11 例双表型急性白血病患者,根据欧洲白血病免疫分类协作组(EGIL)积分标准进行免疫学分型。结果 190 例急性白血病中被免疫分型诊断为急性髓系白血病 88 例(占 46.3%),急性淋系白血病 88 例(占 46.3%),未分化白血病 3 例(占 1.6%),与骨髓细胞形态学和组织化学诊断具有高符合率。190 例急性白血病中被免疫分型诊断为急性双表型白血病 11 例(占 5.8%),其中髓系与 B 系共表达的抗原 7 例(占 3.7%),均共同表达 cCD79a 和 cMPO,胞膜抗原 CD19 和 CD10 表达量较高;髓系与 T 系共表达的抗原 3 例(占 1.6%),均共同表达 cCD3 和 cMPO,胞膜抗原 CD5 和 CD7 表达量较高;髓系、B 系与 T 系均表达的抗原 1 例(占 0.5%)。此外,急性双表型白血病患者高表达 CD34 胞膜抗原(占 81.8%),提示预后不良。结论 急性双表型白血病发病率较低,骨髓细胞免疫表型对诊断及鉴别双表型急性白血病有特异性,以髓系和 B 系抗原共表达为主。采用骨髓细胞形态学和流式细胞术联合检测急性双表型白血病可提高诊断准确性,能有效地指导临床制订治疗方案和进行预后判断。

关键词:急性双表型白血病; 流式细胞术; 免疫表型; 抗原; 荧光标记技术; 细胞形态学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.21.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)21-2999-03

Analysis of cell morphology and immunophenotype in patients with biphenotypic acute leukemia

ZHANG Xiaofang, LI Ruimin, ZHANG Yungang, LI Shouxia[△]

(Department of Clinical Laboratory, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China)

Abstract: Objective To discuss the diagnostic value of myeloid immunophenotype in detection the biphenotypic acute leukemia (BAL) and to compare the value with morphology of bone marrow cells. **Methods** Immunophenotype of 190 patients with acute leukemia (AL) were detected by four-color direct immunofluorescence staining methods of flow cytometry (FCM). And by morphology of bone marrow cells, the immunophenotype were analyzed. Four-color direct immunofluorescence staining methods combined with CD45/SSC gating analysis was used to analyze immunophenotype of 11 cases with BAL according the standard score of EGIL. **Results** Among 190 cases with AL, 88 cases were acute myeloid leukemia (AML), which accounted for 46.3%, and 88 cases (46.3%) were acute lymphocytic leukemia (ALL) and 3 cases (1.6%) were undifferentiated AL. These results had a high coincidence rate with morphology of bone marrow cell and tissue chemistry diagnosis. Among 190 cases with AL, 11 cases (5.8%) were diagnosed of acute BAL. Among of them, 7 cases (3.7%) expressed of B lymphoid and myeloid together which showed that both cCD79a and cMPO immunophenotyping were expressed, meanwhile the expression of membrane antigen CD19 and CD10 was higher. Three cases (1.6%) expressed T lymphoid and myeloid together which showed that both cCD3 and cMPO immunophenotyping were expressed, and the expression of membrane antigen CD7 and CD5 was higher. Only one case (0.5%) expressed B, T and myeloid. Patients with BAL showed high expression of membrane antigen CD34 (81.8%) indicating poor prognosis. **Conclusion** The incidence of BAL is low and immunophenotype of morphology of bone marrow cells is a very specific diagnosis of BAL. The co-expression of B lymphoid and myeloid antigen is major feature of BAL. Combination detection of morphology of bone marrow cell and flow cytometry in patients with BAL could improve the diagnostic accuracy, which can effectively guide the clinical treatment and judge prognosis.

Key words: biphenotypic acute leukemia; flow cytometry; immunophenotype; antigen; fluorescent markers; cell morphology

长期以来,临床上根据细胞形态学和组织化学染色进行分型诊断,但其分型结果已无法满足目前临床对白血病的诊断要求,尤其对于某些发病率低、治疗困难的急性白血病,如急性双表型白血病(BAL)。BAL 是 1 种少见类型的白血病,男性多于女性,目前国内外 BAL 发病率较低并缺乏系统研究,要切实把握并作出正确诊断十分困难。本研究采用骨髓细胞形态学和流式细胞术(FCM)联合检测 190 例急性白血病患者进行免

疫学分型特点,探讨骨髓细胞免疫表型对 BAL 未分化型及伴系表达白血病的诊断及鉴别诊断价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 1 月至 2015 年 5 月在邯郸市中心医院检验科结合骨髓涂片和 FCM 检测确诊为急性白血病患者 190 例,年龄 6~68 岁;男 90 例,女 77 例,平均年龄(39.7±0.5)岁。

1.2 仪器与试剂 美国 BD Biosciences 公司生产的流式细胞荧光分选技术(FACS) Cabibur 双激光四色分选流式细胞仪、涡旋混匀器和离心机;荧光标记的单克隆抗体、FACS 溶血素、FACS 破膜剂均购自美国 BD Biosciences 公司。

1.3 方法

1.3.1 原理 采用 FCM 检测急性白血病抗原的表达,将单克隆抗体与骨髓细胞共孵育,裂解红细胞,洗涤固定后上机检测。该方法操作简便、快速、重复性好,人为因素的影响小,检测敏感性高、准确性好,能提高急性白血病的诊断率,降低误诊率。

1.3.2 标本制备 无菌条件下行骨髓穿刺,抽取 0.3 mL 骨髓液,涂 7 张片备用;再抽取骨髓细胞液 1~2 mL 加到肝素钠抗凝的真空采血管中颠倒混匀,置 4 ℃ 冰箱保存,48 h 内做 FCM 检测。

1.3.3 细胞形态学检查 细胞涂片经瑞氏-姬姆萨混合染液染色,在油镜(1 000 倍)下分类计数 500 个细胞,按法、美、英分型(FAB 分型)。每例患者的骨髓涂片均加做糖原(PAS)和过氧化物酶(POX)染色,细胞化学染色方法按本实验室常规染色进行。骨髓涂片重点观察骨髓细胞的增生程度、各系形态、分化程度及有无成簇分布现象^[1-2]。

1.3.4 FCM 检测 采用美国 BD 公司 FACS Cabibur 双激光四色分选流式细胞仪,Cell quest 软件荧光定量分析。每例标本分析 15 000 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,分析幼稚细胞群及成熟各系细胞群,经 FSC、SSC、McAb1-FITC、McAb2-PE、CD45- Percp、McAb3-APC 共 6 个参数分析,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 2 个系列或阶段特异性单抗加 CD45 进行四色荧光染色。单克隆抗体有:B 淋巴细胞白血病包括 CD20、kappa、lambda、CD19、cCD79a、CD22、CD10、cIgM; T 淋巴细胞白血病包括 CD4、CD8、CD3、cCD3、CD2、

CD5、CD7、CD1a、TCR;NK 淋巴细胞白血病包括 CD16、CD56、CD57;髓系白血病包括 c MPO、CD117、CD14、CD13、CD33、CD15、CD11b、CD64、CD36、CD11c;红白血病包括 GlyA(血型糖蛋白 A);巨核细胞白血病包括 CD41、CD42、CD61;白血病系列非特异性抗原包括 CD34、CD38、HLA-DR。按 FCM 常规方法标记表面抗原和胞内抗原。

1.3.5 BAL 诊断标准 BAL 的诊断标准:世界卫生组织推荐采用修改后的欧洲白血病免疫分类协作组(EGIL)积分标准^[3]。髓系细胞和淋巴系细胞(T、B 系中任何 1 个系)标记各积 2 分以上便可确诊。表面抗原大于 20%或胞内抗原大于 10%即为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;计数资料采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 急性白血病的骨髓细胞形态表现 所有患者骨髓增生极度活跃或活跃,其中被诊断为急性髓系白血病(AML)90 例(占 47.4%)、急性淋系白血病(ALL)95 例(占 50.0%)、未分化白血病 3 例(占 1.6%)、急性混合性白血病 2 例(占 1.0%)。

2.2 急性白血病细胞免疫表型结果分析 经 FCM 检测,根据骨髓细胞特异性抗原的表达情况,190 例急性白血病中被免疫分型诊断为 AML 88 例(占 46.3%),ALL 88 例(占 46.3%)和未分化白血病 3 例(占 1.6%),其与骨髓细胞形态学和组织化学诊断具有高符合率。190 例急性白血病中被免疫分型诊断为 BAL 的 11 例(占 5.8%),其中髓系与 B 系共表达的抗原 7 例(占 3.7%),均共同表达 cCD79a 和 cMPO,胞膜抗原 CD19 和 CD10 表达量较高;髓系与 T 系共表达的抗原 3 例(占 1.6%),均共同表达 cCD3 和 cMPO,胞膜抗原 CD5 和 CD7 表达量较高;髓系、B 系与 T 系均表达的抗原 1 例(占 0.5%)。见表 1。此外,BAL 患者高表达 CD34 胞膜抗原(81.8%),提示预后不良。见表 2。

表 1 11 例 BAL 免疫分型结果(n)

类型	n	免疫表型										
		cCD3	cCD79a	cMPO	CD7	CD5	CD19	CD10	CD34	CD117	CD33	CD13
髓系/B系	7	0	7	7	6	0	10	9	5	5	6	5
髓系/T系	3	3	0	3	2	2	0	0	2	2	2	2
髓系/B系/T系	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0

表 2 CD34 免疫分型结果

表型	n	CD34 阳性(n)	CD34 阴性(n)	阳性率(%)
BAL	11	9	2	81.8
ALL	88	29	25	33.0
AML	88	31	57	35.2

3 讨 论

目前国内外对白血病的临床诊断多采用细胞形态、免疫学等检测方法,可区分为 AML 或 ALL,但有 3%~8% 急性白血病在同一白血病细胞群同时表达髓系和淋系相关抗原,依据免疫表型被诊断为 BAL^[4-7]。例如早期前体 T 细胞 ALL 免疫特

征为 CD7 和 CD3 的强表达,同时异常表达 CD11b、CD13、CD33、CD117 和 CD34 等某些髓系抗原,治疗上应予以考虑^[8-10]。本院诊治的 190 例急性白血病,其中 BAL 有 11 例,占 5.8%。本研究 11 例 BAL 患者中,骨髓细胞学和化学染色考虑为急性混合性白血病的 2 例,AML 的 2 例(M5b1 例,M4b1 例),ALL 的 7 例(L1 型 5 例,L2 型 2 例),但被免疫表型检测后均诊断为 BAL。BAL 原始细胞形态并不一致,可能表现出髓系分化特征或显示淋系/未分化细胞形态特征;BAL 原始细胞起源于早期造血干祖细胞,通过形态学检测很难识别未分化或微分化的原始细胞类别。免疫表型可对 BAL 免疫分型进行有效区分,能全面、特异、准确地检测出细胞抗原分布情况,依据细胞表达的抗原判定细胞的来源和良恶性,有利于指

导临床制订治疗方案和进行预后判断^[11]。因此,急性白血病的分型诊断必须结合免疫表型、细胞形态学和化学染色进行综合分析。BAL 免疫表型具有异质性,包括髓系/B 系、髓系/T 系、髓系/B 系/T 系和 B 系/T 系 4 种表型,大多数研究报道表明,约 70% 的 BAL 患者为髓系/B 系,23%~30% 的患者为髓系/T 系表型,髓系/B 系/T 系和 B 系/T 系表型极少见^[12]。本研究经 FCM 检测显示,BAL 的免疫分型中最常见为髓系/B 系分化抗原的混合表达(占 63.6%);其次为髓系/T 系分化抗原的混合表达(占 27.2%);少见髓系/B 系/T 系分化抗原的混合表达(仅 1 例,占 9.1%),与相关报道一致。髓系与 B 系共表达的抗原 7 例,均共同表达 cCD79a 和 cMPO,胞膜抗原 CD19 和 CD10 表达量较高;髓系与 T 系共表达的抗原 3 例,均共同表达 cCD3 和 cMPO,胞膜抗原 CD5 和 CD7 表达量较高。在本研究中,BAL 细胞 CD34 阳性率高达 81.8%,与同时期诊断的 AML(占 33.0%)和 ALL(占 35.2%)比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。其他学者研究表明,CD34 和末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)的阳性率超过 80%^[13-14]。由于 CD34 和 TdT 为干细胞特有抗原,提示 BAL 细胞来源于干、祖细胞。有研究报道,CD34 阳性 BAL 患者的缓解率显著低于 CD34 阴性 BAL 患者的缓解率,表明 CD34 阳性是 BAL 预后不良指标^[15]。BAL 属特殊类型白血病,有其独特临床生物学特征,还涉及预后和治疗等复杂问题,不能仅对其进行简单诊断。因此,结合免疫表型、细胞形态学和化学染色对急性白血病患者进行综合分析可最大程度减少结果判断的主观性,可提高结果判断准确性,是 1 种可确诊 BAL 的简单方法。

参考文献

[1] 张宗,雷敏捷,赵佳,等. 恶性肿瘤骨髓转移的诊断和细胞形态学分析[J]. 白血病·淋巴瘤,2011,20(12):753-755.
[2] 陈文杰,陈辉树. 造血系统疾病临床病理学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997:1.
[3] Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias (EGIL) [J]. Leukemia, 1995, 9(10): 1783.
[4] 姜鹏君,夏雯,徐祖琼,等. 135 例急性髓细胞白血病免疫表型特点及意义[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(21):

2590-2591.
[5] 季正华,赵文理,计雪强,等. 伴 t(8;21)、(q22;q22)易位的儿童急性双表型白血病的生物学特征[J]. 苏州大学学报:医学版,2012,32(3):386-416.
[6] Yu L, Reader JC, Chen C, et al. Activation of a novel palmitoyltransferase ZDHHC14 in acute biphenotypic leukemia and subsets of acute myeloid leukemia[J]. Leukemia, 2011, 25(2): 367-371.
[7] 陈丽娟,陈万新,薛梅,等. 细胞形态酷似 Burkitt 细胞白血病的急性 T/M 双表型白血病 1 例[J]. 临床血液学杂志,2011,24(2):174-175.
[8] 吴波,舍晓红. 急性双表型白血病的临床治疗和实验室特征及预后分析[J]. 临床输血与检验,2011,34(19):56-59.
[9] 刘爱俊. 双表型急性白血病临床治疗分析[J]. 中国医药导刊,2011,13(4):67-68.
[10] 沈腾飞,薛清贵. 成人急性双表型白血病的临床治疗和研 究[J]. 中华肿瘤杂志,2012,24(4):211-214.
[11] Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms[J]. Blood, 2008, 111(8): 3941-3967.
[12] Xu XQ, Wang JM, Lv SQ, et al. Clinical and biological characteristics of adult acute biphenotypic leukemia in comparison with that of acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a case series of a Chinese population[J]. Hematology, 2009, 94(7): 919-927.
[13] 王爱清,耿美菊,朱明清,等. 109 例慢性 B 淋巴系白血病免疫表型特征分析[J]. 中国实验血液学杂志. 2011, 19(6):1374-1377.
[14] 郝乐,刘艳荣,王亚哲,等. B 淋巴细胞白血病骨髓 B 细胞 CD34⁺CD38⁺ 和 CD34⁺CD38^{low/-} 细胞亚群的临床意义 [J]. 中国实验血液学杂志,2012,20(4):801-805.
[15] 张婧婧,张楠,张新富,等. 双系表型急性白血病的免疫分型特点及疗效分析[J]. 中国实验血液学杂志,2011, 19(2):317-320.

(收稿日期:2016-04-30 修回日期:2016-06-20)

(上接第 2998 页)

[29] Liu Y, Yu L, Zhang D, et al. Positive association between variations in CDKAL1 and type 2 diabetes in Han Chinese individuals [J]. Diabetologia, 2008, 51(11): 2134-2137.
[30] Wen J, Ronn T, Olsson A, et al. Investigation of type 2 diabetes risk alleles support CDKN2A/B, CDKAL1, and TCF7L2 as susceptibility genes in a Han Chinese cohort [J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9153.
[31] Ng MC, Tam CH, Lam VK, et al. Replication and identification of novel variants at TCF7L2 associated with type 2 diabetes in Hong Kong Chinese [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(9): 3733-3737.
[32] Ng MC, Park KS, Oh B, et al. Implication of genetic variants near TCF7L2, SLC30A8, HHEX, CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, and FTO in type 2 diabetes and obe-

sity in 6 719 Asians [J]. Diabetes, 2008, 57(8): 2226-2233.
[33] Chang YC, Chang TJ, Jiang YD, et al. Association study of the genetic polymorphisms of the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and type 2 diabetes in the Chinese population [J]. Diabetes, 2007, 56(10): 2631-2637.
[34] 刘艳丽. 基于通路分析的方法探讨精神分裂症与 II 型糖尿病致病机理的关联性研究[D]. 上海:华东师范大学, 2013.

(收稿日期:2016-03-15 修回日期:2016-05-28)

