

(7):630-633.

[8] 杜传书. 医学遗传学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2014.

[9] CHEN L M, LAZCANO O, KATZMANN J A, et al. The role of conventional cytology, immunocytochemistry, and flow cytometric DNA ploidy in the evaluation of body cavity fluids: a prospective study of 52 patients[J]. Am J Clin pathol, 1998, 109(6):712-721.

[10] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.

[11] COLDITZ G A, CROWLEY J. DNA cytometry testing for cervical cancer screening: approaches and reporting standards for new technologies [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(22):6971-6972.

[12] 董云灿, 耿建祥, 张劲松, 等. 1 722 例已婚女性宫颈细胞中人乳头瘤病毒基因的分型[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(7):817-820.

[13] 王春兰, 仲玉英, 耿建祥, 等. 967 例女性宫颈细胞 DNA 定量检测的临床研究[J]. 中国妇幼保健 2015, 30(29): 4959-4962.

[14] FOLLEN M, SCHOTTENFELD D. Surrogate endpoint biomarkers and their modulation in cervical chemoprevention trials[J]. Cancer, 2001, 91(9):1758-1776.

[15] 范雪梅, 徐薇, 耿建祥, 等. 879 例女性宫颈液基细胞学检查与 DNA 定量分析法的对比研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(23):3165-3170.

(收稿日期:2017-07-22 修回日期:2017-09-27)

• 短篇论著 •

非霍奇金淋巴瘤 DNA 倍体的流式细胞术检测分析*

蔡植华, 郑乃莹, 林永华

(广州医科大学附属肿瘤医院内二科, 广州 510095)

摘要:目的 分析流式细胞术检测非霍奇金淋巴瘤(NHL)患者 DNA 倍体情况,以期提高对 NHL 患者病变程度及预后预测水平。方法 选择 2014 年 11 月至 2015 年 10 月该院收治的 NHL 患者 84 例,所有患者均经手术病理确诊为 NHL,并根据术中所见分期,84 例患者按照病理分期为 4 组(I 期 16 例,II 期 23 例,III 期 31 例,IV 期 14 例)。选取该院同期收治的 20 例淋巴结增生患者作为对照组,所有淋巴瘤患者均于术中取淋巴瘤组织,淋巴结增生患者采用穿刺获取淋巴组织,进行 DNA 倍体流式细胞检测相关指标(包括 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DNA 指数)。分析不同临床分期 NHL 患者与淋巴结增生患者的 DNA 倍体变异相关指标的差异,分析患者的国际预后指数(IPI)与 DNA 倍体流式细胞检测指标(DNA 异倍体率、S 期细胞率、DNA 指数)的相关性。结果 84 例患者 DNA 倍体参数 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DNA 指数均明显高于对照组,组间差异有统计学意义($P<0.05$);NHL III 期与 IV 期患者的 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DNA 指数均明显高于 NHL I 期、II 期患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。NHL 患者 IPI 指数与 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DNA 指数均呈正相关。结论 流式细胞术检测 NHL 患者的 DNA 倍体参数,有助于临床医生对患者的病情程度进行判断并预测患者的预后情况,对患者的诊治方案选择具有重要临床意义。

关键词:非霍奇金淋巴瘤; 流式细胞术; DNA 倍体; 临床价值

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.03.025 中图法分类号:R733.4

文章编号:1673-4130(2018)03-0341-03 文献标识码:B

非霍奇金淋巴瘤(NHL)是淋巴结和其他淋巴组织发生的肿瘤^[1],流式细胞术是一种可以对细胞或亚细胞结构进行快速分析和分选的技术^[2-3]。本文对 NHL 患者与淋巴结增生患者采用流式细胞术进行 DNA 倍体相关参数的检测,分析这些参数与 NHL 形态学分型间的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2014 年 11 月至 2015 年 10 月本院收治的 NHL 患者共 84 例纳入研究,所有患者均经

手术病理检查确诊为 NHL,并根据术中所见进行分期,分为 4 组(I 期 16 例、II 期 23 例、III 期 31 例、IV 期 14 例)。选取本院同期收治的 20 例淋巴结增生患者作为对照组。5 组患者的性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 纳入排除标准^[3] 纳入标准:(1)经手术病理确诊为 NHL;(2)患者了解参加此次研究的利弊,并愿意配合此次研究的各项工作,签署知情同意书。排除标准:(1)其他恶性肿瘤的患者;(2)未签署知情同意

* 基金项目:吴阶平医学基金科研项目(320675014198)。
本文引用格式:蔡植华,郑乃莹,林永华. 非霍奇金淋巴瘤 DNA 倍体的流式细胞术检测分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(3):341-343.

书者。

1.3 淋巴瘤分期标准 按照 Ann Arbor 分期标准对 NHL 进行分期。Ⅰ期:受侵淋巴结或淋巴结外器官受侵≤1 个,Ⅱ期:横膈一侧受侵淋巴结或淋巴结外器官受侵≥2 个,Ⅲ期:横膈两侧均有淋巴结区域受侵),Ⅳ期:淋巴结外器官广泛受侵。

1.4 方法及观察指标 所有淋巴瘤患者均于术中获取淋巴瘤组织,淋巴结增生患者采用穿刺获取淋巴组织,进行 DNA 倍体流式细胞检测相关指标[DNA 异倍体率、S 期细胞率、DNA 指数(DI)]。分析不同临床分期 NHL 患者与淋巴结增生患者的 DNA 倍体变异相关指标的差异,分析患者的国际预后指数(IPI)与 DNA 倍体流式细胞检测相关指标(DNA 异倍体率、S 期细胞率、DI)的相关性。

1.4.1 流式细胞仪测定病变淋巴 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DI^[4] 将手术或者穿刺所得淋巴瘤组织进行破碎研磨成匀浆,匀浆加入生理盐水混匀过滤,得到单细胞悬液。显微镜下观察单细胞悬液,加生理盐水至细胞数浓度为 10×10⁹/L,加入经调整浓度后的单细胞悬液 100 μL,加入鼠抗人单克隆抗体工作液 0.1 mL,孵育 30 min。加入 PBS 10 mL 洗涤 1 次,加入羊抗鼠 FITC-IgG 二抗工作液 100 μL,避光孵育 30 min。设 PBS 代替一抗和二抗的阴性对照,以及只加一抗或二抗的阳性对照。分析 DNA 倍体:二倍体参考细胞的 DNA 含量以 DI 表示,DI=1.0,若标准 CV 值为 5%,则 DI=1.0±0.1(0.9~1.1)为二倍体;超出此范围则为异倍。分析增殖指数(PI)及 S 期细胞比值(SPF):采用 DNA 细胞周期分析软件计算 DNA 组方图各时相分布的百分比,计算 PI 及 SPF 值。

1.4.2 IPI 标准 以年龄、行为状态、Ann Arbor 分期、LDH 及结外病变受侵部位数 5 项目为判断内容,每个项目按照严重程度分为 0 分、1 分,每一预后不良因素计为 1 分,5 项总和为 IPI 指数,指数越高预后越差。

1.5 统计学处理 对文中所得数据采用 SPSS13.0 统计软件分析。计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 分析,采用 Pearson 分析 IPI 与 DI、PI 及 SPF 间的相关性系数。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 5 组患者 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DI 比较 84 例患者 DNA 倍体参数 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DI 均明显高于对照组,组间差异有统计学意义(*P*<0.05);NHLⅢ期与Ⅳ期患者的 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DI 均明显高于 NHLⅠ期、Ⅱ期患者,差异有统计学意义(*P*<0.05);NHLⅠ期、Ⅱ期对照组,但组间比较差异无统计学意义(*P*<0.05),见表 1。

表 1 5 组患者 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DI 的比较			
组别	DNA 异倍体率(%)	DI	SPF
对照组	1.00±0.00	5.79±1.24	
NHL 患者	47.23±5.32*	1.32±0.12*	8.33±1.98*
NHLⅠ期	3.28±1.83	1.07±0.01	6.56±1.57
NHLⅡ期	21.03±3.22*#	1.14±0.11	8.73±1.83*
NHLⅢ期	56.41±6.18*#△	1.42±0.13*#△	12.02±3.16*#△
NHLⅣ期	64.11±7.23*#△	1.51±0.13*#△	15.21±4.15*#△

注:与对照组比较,**P*<0.05,与Ⅰ期比较,#*P*<0.05,与Ⅱ期比较,△*P*<0.05;—:表示该项无数据

2.2 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DI 与 IPI 的相关性分析 将 84 例患者的 IPI 分别和其对应的 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DI 输入 Pearson 程序,NHL 患者的 IPI 与 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DI 均呈正相关,见表 2。

表 2 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DI 与 IPI 的相关性分析			
项目	IPI	<i>r</i>	<i>P</i>
DNA 异倍体率	0.653	1.870	0.03
S 期细胞率	0.689	1.690	0.02
DI	0.763	1.788	0.03

3 讨 论

不同类型的淋巴瘤因为发病部位、病因、细胞遗传学等特点,存在较大的差异,因此,世界卫生组织将不同类型的淋巴瘤视为独立疾病,临床应采取不同的治疗策略^[5-6]。临床对 NHL 的分类分型对其治疗方案选择具有非常重要的作用,直接影响到患者的治疗预后效果^[7-8]。目前对 NHL 患者分分类以肿瘤细胞的形态学为基础进行分型,临床影响细胞形态学的因素非常多,尤其是临床病理医生对形态学的认知及经验,其诊断结果具有一定的主观性。细胞免疫表型是表现细胞内在功能、结构等参数的指标,可呈现为客观的数据,如用于临床对 NHL 的分型,具有稳定、客观的优势^[9-10]。流式细胞术是目前可对细胞免疫表型实施定量化分析的临床技术。该方法对所分析的细胞进行克隆后,单个细胞或其他生物粒子进行多参数、快速定量分析^[11-12]。对分析各种临床病变的分子改变,从而了解病变的分子变化,为临床诊断治疗提供更为客观的数据。该方法的优点是快速、大批量测试、精度高、准确性。该方法实现了细胞定量在医疗领域的应用。流式细胞术分子表型分析可对细胞中特异性核酸序列或特异性基因是否发生改变进行分析,将流式细胞术分子表型分析与免疫表型分析相结合,成为特定细胞亚群的特异性核酸序列(如癌基因、病毒核酸等)检测最为有效的工具^[13-14]。这一工具对

于临床复杂病变的患者的诊断、治疗方案监测、治疗反应及预后分析提供了客观可靠的数据支持。NHL 是非常复杂的一类恶性肿瘤,目前临床各指南对于该病的诊治分类极其复杂,对临床医生掌握该疾病造成非常大的困难,不利于该病的临床诊治^[15]。

机体发生癌变主要是致癌因素所致。致癌因素通过不同的机制,使得正常细胞发生基因组变化和基因组外变化。这些变化在流式细胞术检测 DNA 含量参数方面,表现为特异性的 DI 值变大或变小, DNA 倍体类型的改变及 SPF 百分率的改变。恶性淋巴瘤多会发生异倍体现象,在 NHL 中,异倍体的检出率较高。根据 SPF 指标,能够将淋巴瘤的恶性程度进行划分,辅助临床治疗。基于此,本文采用流式细胞术对 NHL 患者的 DNA 倍体情况进行检测,分析不同临床分期患者及非 NHL 淋巴瘤患者 DNA 倍体相关指标的变化,并与 NHL 国际预后指数的相关性进行分析,结果显示, NHL 患者的 DNA 倍体参数 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DI 均明显高于其他淋巴瘤患者高,差异有统计学意义($P < 0.05$); NHL III 期与 IV 期患者的 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DI 均明显高于 NHL I 期、II 期患者,差异有统计学意义($P < 0.05$); NHL I 期、II 期对照组,但组间比较差异无统计学意义($P < 0.05$)。NHL 患者的 IPI 指数与 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DI 均呈正相关。说明流式细胞术对于 NHL 患者 DNA 倍体监测结果与患者的病情严重程度及预后预测有密切的关系,具有进一步扩大研究范围明确其对 NHL 患者诊治的临床价值的意义。

综上所述,流式细胞术检测 NHL 患者的 DNA 倍体参数,可指导临床医生对患者的病情程度进行判断并预测患者的预后情况,对患者的诊治方案选择具有重要临床意义。

参考文献

- [1] STACCHINI A, DEMURTAS A, ALIBERTI S, et al. Single-Tube flow cytometry assay for the detection of mature lymphoid neoplasms in paucicellular samples[J]. *Acta Cytol*, 2016, 60(4): 385-394.
- [2] PELUSO A L, IENI A, MIGNOGNA C, et al. Lymph node Fine-Needle cytology: beyond flow cytometry[J]. *Acta Cytol*, 2016, 60(4): 372-384.
- [3] COZZOLINO I, ROCCO M, VILLANI G, et al. Lymph node Fine-Needle cytology of Non-Hodgkin lymphoma: diagnosis and classification by flow cytometry[J]. *Acta Cytol*, 2016, 60(4): 302-314.
- [4] 唐寅,王蔚,高丽,等. 细胞遗传学检查在诊断非霍奇金淋

- 巴瘤患者骨髓受累中的应用[J]. *中国实验血液学杂志*, 2016, 24(3): 727-732.
- [5] 卢绮思,许娜,周璇,等. 35 例治疗相关血液肿瘤患者的临床特征及预后分析[J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(3): 221-226.
- [6] 李艳萍,张志华,赵凤亭. 流式细胞术对非霍奇金氏淋巴瘤的诊断价值评价[J]. *中国实验血液学杂志*, 2016, 24(1): 102-105.
- [7] 崔艳香,王新花,陈勋. 应用流式细胞术检测 B 细胞淋巴瘤患者 CyclinD1 和 BCL-2 的价值分析[J]. *中国实验血液学杂志*, 2016, 24(1): 98-101.
- [8] 钟亮尹,曾智华. 流式细胞术检测免疫表型和分析 DNA 倍体对非霍奇金淋巴瘤患者的临床价值[J]. *中国实验血液学杂志*, 2016, 24(1): 94-97.
- [9] WEBER T, BÖTTICHER B, MIER W, et al. High treatment efficacy by dual targeting of Burkitt's lymphoma xenografted mice with a (177)Lu-based CD22-specific radioimmunoconjugate and rituximab[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2016, 43(3): 489-498.
- [10] CAIVANO A, LAURENZANA I, DE LUCA L, et al. High serum levels of extracellular vesicles expressing malignancy-related markers are released in patients with various types of hematological neoplastic disorders[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(12): 9739-9752.
- [11] WU D, THOMAS A, FROMM J R. Reactive T cells by flow cytometry distinguish hodgkin lymphomas from T cell/Histiocyte-Rich large B cell lymphoma[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(5): 424-432.
- [12] OHMOTO A, MAESHIMA A M, TANIGUCHI H A, et al. Histopathological analysis of B-cell non-Hodgkin lymphomas without light chain restriction by using flow cytometry[J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(12): 3301-3305.
- [13] KIM B, LEE S T, KIM H J, et al. Bone marrow flow cytometry in staging of patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma[J]. *Ann Lab Med*, 2015, 35(2): 187-193.
- [14] 宋卫卫,谢彦,邓丽娟,等. 流式细胞学技术对非霍奇金淋巴瘤骨髓侵犯的诊断价值[J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(38): 2996-3000.
- [15] PAIVA B, MONTES M C, GARCÍA-SANZ R, et al. Multiparameter flow cytometry for the identification of the Waldenström's clone in IgM-MGUS and Waldenström's Macroglobulinemia: new criteria for differential diagnosis and risk stratification[J]. *Leukemia*, 2014, 28(1): 166-173.

(收稿日期: 2017-07-23 修回日期: 2017-09-28)