

论著·临床研究

骨髓活检联合多参数流式细胞术及 FISH 技术在慢性淋巴细胞白血病诊断中的应用

金 恂, 胡永军

(淮安市淮安医院检验科, 江苏淮安 223200)

摘要:**目的** 研究骨髓活检联合多参数流式细胞术及荧光原位杂交技术(FISH)在慢性淋巴细胞白血病(CLL)诊断中的应用。**方法** 选取 2015 年 2 月至 2018 年 2 月 120 例在该院住院治疗的 CLL 患者为研究对象,另选取该院健康体检的老年人 120 例作为对照组,分别对研究对象进行骨髓活检、多参数流式细胞术及 FISH 技术检测,分析骨髓细胞的形态学诊断及诊断效能差异。**结果** CLL 患者中的交叉髓系抗原以 CD33 (33.33%, 40/120) 居多,通过对患者进行 FISH 技术检测,患者的核酸变异以 CHI2/D10Z1/D17Z1 多倍体 (46.67%, 56/120) 为主。骨髓切片的检出率 (100.00%, 120/120) 高于骨髓涂片 (83.33%, 100/120);骨髓切片的诊断效能显著优于骨髓涂片,且诊断灵敏度高于骨髓涂片。联合检测诊断灵敏度显著高于单独检测。**结论** 骨髓活检对 CLL 患者的诊断效能较高,同时对患者采用流式细胞仪检测,可有效对患者的骨髓形态学形成互补,并通过对患者进行 FISH 技术检测,可作为患者治疗效果监测的重要依据。

关键词:骨髓活检; 多参数流式细胞术; 荧光原位杂交技术; 慢性淋巴细胞性白血病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.22.021

中图法分类号:R733.72

文章编号:1673-4130(2019)22-2775-05

文献标识码:A

Application of bone marrow biopsy combined with multiparameter flow cytometry and FISH in the diagnosis of chronic lymphoblastic leukemia

JIN Xun, HU Yongjun

(Department of Clinical Laboratory, Huaian Hospital of Huaian City, Huaian, Jiangsu 223200, China)

Abstract:**Objective** To study the application of bone marrow biopsy combined with multiparameter flow cytometry and fluorescence in situ hybridization (FISH) in the diagnosis of chronic lymphoblastic leukemia (CLL). **Methods** Totally 120 CLL patients hospitalized in our hospital from February 2015 to February 2018 were selected as the research object, and 120 healthy elderly people in our hospital were selected as the control group. Bone marrow biopsy, multi-parameter flow cytometry and FISH technology were used to detect the subjects, and the differences of morphological diagnosis and diagnostic efficiency of bone marrow cells were analyzed. **Results** CD33 (33.33%, 40/120) was the predominant cross-myeloid antigen in CLL patients. The nucleic acid mutation was mainly CHI2/D10Z1/D17Z1 polyploid (46.67%, 56/120) by FISH. The detection rate of bone marrow sections (100.00%, 120/120) was higher than that of bone marrow smears (83.33%, 100/120), the diagnostic efficiency of bone marrow sections was significantly better than that of bone marrow smears, and the diagnostic sensitivity was higher than that of bone marrow smears. The diagnostic sensitivity of combined detection was significantly higher than that of single detection. **Conclusion** Bone marrow biopsy has a high diagnostic efficiency for CLL patients. At the same time, flow cytometry can effectively complement the bone marrow morphology of patients, and FISH technology can be used as an important basis for monitoring the therapeutic effect of patients.

Key words: bone marrow biopsy; multiparameter flow cytometry; fluorescence in situ hybridization; chronic lymphocytic leukemia

慢性淋巴细胞白血病(CLL)是临床较为常见的老年性肿瘤疾病之一,其主要发病机制是机体 B 淋巴

作者简介:金恂,女,副主任技师,主要从事血液病学诊断研究。

本文引用格式:金恂,胡永军.骨髓活检联合多参数流式细胞术及 FISH 技术在慢性淋巴细胞白血病诊断中的应用[J].国际检验医学杂志,2019,40(22):2775-2778.

细胞发生克隆性异常增殖^[1]。流行病学资料显示^[2], 90% 的 CLL 患者的发病年龄在 50 岁以上, 男性患者发病率高于女性^[3]。临床表现以贫血、出血及发热为主, 病因包括环境因素、遗传性因素及病毒感染所致的免疫缺陷等。骨髓细胞形态学检查作为血液系统疾病常见检测方法, 在临床中的应用越来越多。但是受到骨髓结构、增生及细胞分布情况的影响, 骨髓涂片往往不能准确反映患者的造血功能^[4]。多参数流式细胞术对于 CLL 患者的免疫分型诊断具有积极的意义。荧光原位杂交技术(FISH)对间期和分裂期细胞的诊断准确、灵敏, 对患者的预后具有较好的预测功能。本研究通过对骨髓活检联合多参数流式细胞术及 FISH 技术在 CLL 诊断中的应用分析, 以期对诊断和预后判断提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 2 月至 2018 年 2 月的在本院住院治疗的 120 例 CLL 患者为研究对象, 依据中国 CLL 的诊断与治疗指南和 Binet 分期^[5], 将患者分为 A 期 38 例, B 期 40 例, C 期 42 例, 患者平均年龄为(54.23±1.09)岁。参考欧洲白血病免疫学会分型研究 3 组提倡的抗原积分系统对患者进行免疫抗原分组^[6], 其中未分化型患者 52 例, 单纯型患者 24 例, 变异型患者 22 例, 混合型患者 22 例。另选取本院健康体检的老年人 120 例作为对照组, 两组患者的性别、年龄比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。所有患者的治疗方案均为 CLL ICB-FM2002。所有研究对象家属均签署知情同意书, 并通过本院医学伦理委员会论证通过。

患者纳入标准:(1)所有患者均符合 CLL 诊断标准^[5], 外周血淋巴细胞计数 $\geq 5 \times 10^9/L$; (2)外周血涂片特征性表现为小的、形态成熟的淋巴细胞显著增多, 其细胞质少、核致密、核仁不明显、染色质部分聚集, 并易见涂抹细胞, 外周血淋巴细胞中不典型淋巴细胞及幼稚淋巴细胞 $<55\%$; (3)典型的流式细胞术免疫表型为 CD19⁺、CD5⁺、CD23⁺、CD200⁺、CD10⁻、FMC7⁻、CD43⁺, 表面免疫球蛋白(sIg)、CD20 及 CD79b 弱表达(dim); (4)均未有肿瘤远处转移; (5)已获得患者及家属知情同意。排除标准:(1)排除严重心脏、肝、肾功能障碍患者; (2)对本研究药物过敏患者; (3)中途停止治疗或者转院患者。

1.2 研究方法

1.2.1 骨髓活检 分别对 2 组患者使用骨髓活检专用针进行髂后上棘骨髓抽吸, 将抽吸好的骨髓进行涂片检测。

1.2.2 骨髓病理切片检测 将以上获得的骨髓样品瑞姬氏染色, 经 bouin 液进行固定, 使用乙醇进行梯

度脱水处理, 石蜡包埋后, 将患者的样本进行 2~3 μm 及 5 μm 切片, 2~3 μm 切片进行苏木素-姬姆萨-酸性品红染色(HGF), 5 μm 切片进行 gomori 网状纤维银染色。

1.2.3 多参数流式细胞术 使用 BD 公司生产的 FACS Galibur 型流式细胞仪对 2 组患者的骨髓样本进行检测, 使用 CELL QUEST 软件进行患者的骨髓形态和免疫抗原检测。CD33 抗体由上海信裕生物技术有限公司提供。

1.2.4 FISH 检测 使用八探针 FISH 系统对患者进行骨髓检测, 分别对 2 组患者的骨髓形态及核酸物质(MYC、P16、E2A、CHI2/D10Z1/D17Z1、TEL/AML1、MLL、BCR/ABL1、IGH)差异进行对比分析。实验试剂由上海起发实验试剂有限公司提供。

1.3 观察指标 (1)骨髓细胞的形态学诊断: 分别对比观察骨髓涂片和骨髓活检切片骨髓形态的诊断差异。(2)骨髓形态学的诊断效能比较: 使用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)对患者的诊断效能进行对比观察。(3)多参数流式细胞术对患者的检测结果分析。(4)FISH 技术检测结果分析。

1.4 统计学处理 所有数据均使用统计软件 SPSS16.0 进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 计数资料以率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓细胞的形态学诊断比较 骨髓涂片的检出率(83.33%)低于骨髓切片(100.00%), 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 骨髓细胞的形态学诊断比较

标本	n	骨髓增生度					检出率(%)
		1+	2+	3+	4+	5+	
骨髓涂片	120	48	18	10	12	12	83.33
骨髓切片	120	60	48	12	0	0	100.00
χ^2				37.641			32.821
P				0.000			0.000

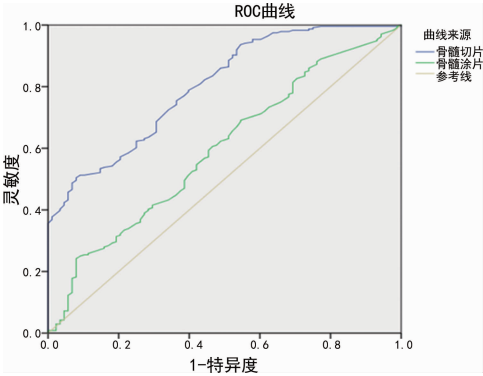


图 1 骨髓形态学的诊断 ROC 曲线分析

2.2 骨髓形态学的诊断效能对比 通过对骨髓涂片和骨髓切片的 ROC 曲线分析,骨髓切片的诊断效能

显著高于骨髓涂片,其诊断灵敏度高于骨髓涂片,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 骨髓形态学的诊断效能比较

诊断方法	真阳例数 (<i>n</i>)	假阳例数 (<i>n</i>)	真阴例数 (<i>n</i>)	假阴例数 (<i>n</i>)	准确率 (%)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	标准误	曲线下 面积	95%CI	<i>P</i>
骨髓切片	42	55	12	131	22.50	77.78	8.39	24.28	17.91	0.039	0.775	0.520~0.872	0.017
骨髓涂片	41	56	41	102	34.17	50.00	28.67	28.67	42.27	0.036	0.603	0.600~0.746	0.000

表 3 多参数流式细胞术对患者的检测结果分析

项目	未分化型 (<i>n</i> =52)	单纯型 (<i>n</i> =24)	变异型 (<i>n</i> =22)	混合型 (<i>n</i> =22)
CD2	2	1	1	0
CD4	1	0	2	1
CD5	9	2	1	0
CD7	1	0	1	0
CD9	2	1	1	0
CD11B	1	0	1	0
CD13	1	0	1	0
CD14	1	1	1	2
CD15	1	2	1	1
CD19	1	1	0	1
CD56	1	1	2	1
CD33	22	7	5	6
CD34	1	2	1	1
CD38	2	2	1	1
CD64	1	1	2	1
CD117	1	1	1	1
CD123	1	1	0	1
TDT	0	0	0	1
CD71	1	1	0	1
HLA-DR	1	0	0	1
GLY-A	0	0	0	1
Empo	1	0	0	1

2.3 多参数流式细胞术对患者的检测结果分析 通

过对患者进行多参数流式细胞仪检测,CLL 患者中的交叉髓系抗原以 CD33(33.33%,40/120)居多,其中,未分化型患者、单纯型患者、变异型患者、混合型患者均以 CD33 表达为主,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.4 FISH 技术检测结果分析 通过对患者进行 FISH 技术检测,患者的核酸变异以 CHI2/D10Z1/D17Z1 多倍体(46.67%,56/120)为主,其中,未分化型患者、单纯型患者、变异型患者、混合型患者均以 CHI2/D10Z1/D17Z1 多倍体表达为主,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

表 4 FISH 技术检测结果分析

项目	未分化型 (<i>n</i> =52)	单纯型 (<i>n</i> =24)	变异型 (<i>n</i> =22)	混合型 (<i>n</i> =22)
MYC	3	1	0	1
P16	2	1	1	1
E2A	2	1	1	1
CHI2/D10Z1/D17Z1	23	12	11	10
TEL/AML1	12	1	2	3
MLL	7	6	5	4
BCR/ABL1	2	1	1	1
IGH	1	1	1	1

2.5 单独检测和联合诊断效能分析 通过对患者的单独检测和联合诊断效能比较,3 种方法联合检测诊断灵敏度显著高于单独检测,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 5。

表 5 单独检测和联合诊断效能分析

诊断方法	真阳例数 (<i>n</i>)	假阳例数 (<i>n</i>)	真阴例数 (<i>n</i>)	假阴例数 (<i>n</i>)	准确率 (%)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	标准误	曲线下 面积	95%CI	<i>P</i>
骨髓活检	51	59	59	71	46.36	45.38	45.83	41.80	50.00	0.039	0.775	0.520~0.872	0.017
多参数流式 细胞术	66	67	61	46	49.62	57.01	52.92	58.93	47.66	0.036	0.603	0.600~0.746	0.000
FISH 技术	95	31	91	23	75.40	79.82	77.50	80.51	74.59	0.030	0.692	0.607~0.816	0.000
联合检测	109	32	85	14	77.30	85.86	80.83	88.62	72.65	0.020	0.721	0.639~0.918	0.000

3 讨 论

CLL 疾病是一种恶性淋巴增殖性疾病,多见于老年男性患者^[2],其中以 CD5⁺ 的 B 细胞 CLL 疾病占绝大多数,约占 95%^[7]。目前,CLL 的中位生存期大约为 10 年^[8],患者的预后随患者的性别、年龄及体能状态而各异。对于 CLL 疾病的诊断,目前临床多采用骨髓镜检方式,骨髓形态学检查是最为基本的检查手段之一^[9],骨髓涂片相对简单,骨髓细胞结构较为清晰,胞质着色较鲜艳,在白血病的分型中普遍使用,但是在对疾病的进展及预后评价中存在一定的缺陷。而骨髓切片活检,则可以准确预估患者的骨髓增生情况^[10],通过直观对患者的骨髓造血细胞的分布、定位及数量评价,综合患者间质水肿及骨小梁改变等情况,观察骨髓增生异常综合征的粒系病态,进而对患者的预后状态进行准确评价。

本研究中,骨髓涂片的检出率(83.33%)低于骨髓切片(100.00%),同时通过对患者 2 种检测方法的诊断灵敏度分析,骨髓切片的诊断效能显著高于骨髓涂片,分析认为,在患者的骨髓涂片制作过程中,某些骨髓增生较低患者的取材失败率较高,患者的骨髓纤维组织也在一定程度上影响患者的取材^[11],而骨髓活检过程采取环钻法进行,有效弥补了患者涂片取材过程中的不足^[12],提升患者样本中低活跃度病变组织,在实际诊断过程中,造成患者的漏诊。通过对患者的 ROC 曲线分析,骨髓切片活检的诊断灵敏度显著高于骨髓涂片。杨娣娣等^[13]对患者骨髓细胞形态学的涂片和活检结果对比观察显示,骨髓活检效能显著高于对照组,与本研究相互印证。

在采用多参数流式细胞术对患者的检测中,CLL 患者的交叉髓系抗原以 CD33(33.33%)居多,在对患者的流式细胞术的检查中,通过对膜内抗原的检测,在骨髓形态学检测中的单纯型 CLL 疾病的诊断,有 4 例患者被免疫抗原诊断为混合型 CLL 疾病,证实通过对患者进行流式细胞仪检测,对患者的形态学诊断具有一定的弥补作用。董莘等^[14]对 CLL 的诊断中,流式细胞仪检测对于 CLL 诊断具有一定的弥补性,与本研究相互印证。

另外,在对患者的核酸物质的检测中,通过探针原位杂交检测,患者的核酸变异以 CHI2/D10Z1/D17Z1 多倍体(46.67%)为主,在 56 例 CHI2/D10Z1/D17Z1 多倍体的分析中,40 例患者表现为多倍体,8 例患者未见分裂象,其余 8 例患者表现为分裂相,但是无法进行具体分析。通过本研究证实,接近 50% 的 CLL 患者均表现为 CHI2/D10Z1/D17Z1 多倍体变异,在实际患者的诊断和治疗过程中,可以通过对 CHI2/D10Z1/D17Z1 多倍体的变异情况,对患者的治

疗效果及预后评价具有积极的作用。在对患者的骨髓活检和流式细胞仪检测中,有效形成互补,对于患者的个性化治疗提供重要依据。

本研究中采用骨髓涂片,通过免疫组织化学检查,对患者的核酸具有一定的特异性。通过对患者的骨髓活检,相比传统的骨髓涂片检查,对患者的核酸诊断具有显著的灵敏度。通过对患者的核酸异质性进行精准诊断,对患者的治疗方案的选择具有积极意义。

4 结 论

综上所述,骨髓活检对 CLL 患者的诊断效能较高,同时对患者采用流式细胞仪检测,可有效对患者的骨髓形态学形成互补,并通过对患者采用 FISH 技术检测,可作为患者治疗效果监测的重要依据。

参考文献

- [1] 王会芳,牛慧艳,张占强,等. 56 例慢性淋巴细胞白血病免疫表型和遗传学特点分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2016,30(4):358-360.
- [2] 李增军,邱录贵. 慢性淋巴细胞白血病治疗研究进展[J]. 白血病·淋巴瘤,2017,26(1):5-7.
- [3] 李金花,庞楠楠,张正昊,等. PD-1/PD-L1 共刺激分子在慢性淋巴细胞白血病患者中的表达及临床意义[J]. 中华血液学杂志,2017,38(3):198-199.
- [4] 韩秀蕊,杨娣娣,张丽洁,等. 骨髓形态联合免疫分型检测对慢性淋巴细胞白血病诊断及预后价值研究[J]. 陕西医学杂志,2016,45(11):1552-1554.
- [5] 中华医学会血液学分会. 中国慢性淋巴细胞白血病的诊断与治疗指南(2011 年版)[J]. 中华血液学杂志,2011,32(7):498-501.
- [6] SOO J M, YUN J J, BIN P J, et al. Folliculotropic mycosis fungoides in 20 korean cases: clinical and histopathologic features and response to ultraviolet A-1 and/or photodynamic therapy[J]. Ann Dermatol, 2018, 30(2):192-193.
- [7] 刘澎. 复旦大学附属中山医院慢性淋巴细胞白血病/小淋巴瘤淋巴瘤诊疗规范(2018)[J]. 中国临床医学, 2018, 25(1):157-160.
- [8] 金肖牧,糜坚青. 慢性淋巴细胞白血病并自身免疫性溶血性贫血的研究进展[J]. 白血病·淋巴瘤, 2018, 27(9): 573.
- [9] MICHALLET A S, AKTAN M, HIDDEMANN W, et al. Rituximab plus bendamustine or chlorambucil for chronic lymphocytic leukemia: primary analysis of the randomized, open-label MABLE study[J]. Haematologica, 2018, 103(4):698-706.
- [10] EUN K J, SOO-CHAN K. Insect bite-like reaction with bullous lesions mimicking bullous pemphigoid in a patient with chronic lymphocytic leukemia[J]. Ann Dermatol, 2018, 30(4):468-472.

的和前瞻性试验数据支持。

参考文献

- [1] DURANTON F, LUNDIN U, GAYRARD N, et al. Plasma and urinary amino acid metabolomic profiling in patients with different levels of kidney function[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2014, 9(1):37-45.
- [2] KIMURA T, HAMASE K, MIYOSHI Y, et al. Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease[J]. Sci Rep, 2016, 6:26137.
- [3] FADEL F I, ELSHAMAA M F, ESSAM R G, et al. Some amino acids levels: glutamine, glutamate, and homocysteine, in plasma of children with chronic kidney disease[J]. Int J Biomed Sci, 2014, 10(1):36-42.
- [4] EL-SADEK A E, BEHERY E G, AZAB A A, et al. Arginine dimethylation products in pediatric patients with chronic kidney disease[J]. Ann Med Surg (Lond), 2016, 9(1):22-27.
- [5] YERRAMILI M, FARACE G, QUINN J, et al. Kidney disease and the nexus of chronic kidney disease and acute kidney injury the role of novel biomarkers as early and accurate diagnostics[J]. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2016, 46(6):961-993.
- [6] YOKOMATSU A, FUJIKAWA T, TOYA Y A, et al. Loss of amino acids into dialysate during hemodialysis using hydrophilic and nonhydrophilic polyester-polymer alloy and polyacrylonitrile membrane dialyzers[J]. Ther Apher Dial, 2014, 18(4):340-346.
- [7] ZHAO X J, CHEN J H, YE L, et al. Serum metabolomics study of the acute graft rejection in human renal transplantation based on liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Proteome Res, 2014, 13(5):2659-2667.
- [8] ZHANG F, WANG Q H, XIA T Y, et al. Diagnostic value of plasma tryptophan and symmetric dimethylarginine levels for acute kidney injury among tacrolimus-treated kidney transplant patients by targeted metabolomics analysis[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):14688.
- [9] BERBEL BUFARAH M N, DE GOES C R, DE OLIVEIRA M C, et al. Estimating catabolism; a possible Tool for nutritional monitoring of patients with acute kidney injury[J]. J Ren Nutr, 2017, 27(1):1-7.
- [10] FOX B M, GIL H W, KIRKBRIDE-ROMEIO L, et al. Metabolomics assessment reveals oxidative stress and altered energy production in the heart after ischemic acute kidney injury in mice[J]. Kidney Int, 2019, 95(3):590-610.
- [11] MARTENS-LOBENHOFFER J, BODE-BÖGER S M. Fast and efficient determination of arginine, symmetric dimethylarginine, and asymmetric dimethylarginine in biological fluids by hydrophilic-interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. Clin Chem, 2006, 52(3):488-493.
- [12] BETZ B, MOELLER-EHRLICH K, KRESS T, et al. Increased symmetrical dimethylarginine in ischemic acute kidney injury as a causative factor of renal L-arginine deficiency[J]. Transl Res, 2013, 162(2):67-76.
- [13] FLECK C, SCHWEITZER F, KARGE E, et al. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases[J]. Clin Chim Acta, 2003, 336(1/2):1-12.
- [14] TAYLOR M W, FENG G S. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism[J]. FASEB J, 1991, 5(11):2516-2522.
- [15] TORRES M I, LOPEZ-CASADO M A, LORITE P, et al. Tryptophan metabolism and indoleamine 2,3-dioxygenase expression in coeliac disease[J]. Clin Exp Immunol, 2007, 148(3):419-424.
- [16] SCHEFOLD J C, ZEDEN J P, FOTOPOULOU C A, et al. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease; a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms[J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(6):1901-1908.

(收稿日期:2019-03-18 修回日期:2019-05-30)

(上接第 2778 页)

- [11] ZHENG Q F, LI J Y, QIN L, et al. Gastrointestinal involvement by mantle cell lymphoma identified by biopsy performed during endoscopy[J]. Medicine, 2018, 97(6):e9799.
- [12] TETSUYA Y, TSUNEAKI K, MASANORI M, et al. A case report of myocarditis combined with hepatitis caused by herpes simplex virus[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2018, 18(1):134-135.
- [13] 杨娣娣, 韩秀蕊, 张丽洁, 等. 3 374 例血液病患者骨髓细胞形态及活检同步检测的比较分析[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(6):952-954.
- [14] 董苹, 祁德波, 王新国, 等. 运用 RMH 免疫标志积分系统诊断中国慢性淋巴细胞白血病[J/CD]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2017, 5(1):56-61.

(收稿日期:2019-04-02 修回日期:2019-06-14)