

93 例急性白血病免疫表型分析

王麟辉,朱红倩,袁 军(贵州省人民医院血液内科,贵阳 550004)

【摘要】 目的 探讨流式细胞术免疫分型在急性白血病诊断及治疗中的意义。**方法** 采用 CD45 侧向角光散射(SSC)双参数散点图设门四色流式细胞术,对 93 例急性白血病患者进行免疫表型分析。**结果** 69 例急性髓性白血病患者主要表达 CD13、CD33、人类白细胞抗原(HLA)-DR、CD117;20.2%的患者伴有淋巴细胞系抗原 CD7 表达;CD7⁺与 CD7⁻的完全缓解率(CR)比较差异有统计学意义($P<0.05$)。13 例急性 B 淋巴细胞白血病病患者主要表达 CD19、CD34、HLA-DR、CD20、CD22。31%的患者伴有髓细胞系抗原 CD13 表达;CD13⁺与 CD13⁻的 CR 比较差异无统计学意义($P>0.05$)。7 例急性 T 淋巴细胞白血病病患者主要表达 CD5、CD3、CD7、CD34。**结论** 采用流式细胞术对急性白血病进行免疫分型,对白血病诊断的准确性及分型、选择治疗方案及判断预后具有重要临床意义。

【关键词】 白血病; 急性病; 免疫表型分型; 流式细胞术

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.19.013 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)19-2327-02

Analysis of immunophenotype in 93 cases of acute leukemia WANG Lin-hui, ZHU Hong-qian, YUAN Jun (Department of Internal Hematology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550004, China)

【Abstract】 Objective To explore the significance of immunophenotype by flow cytometry in the diagnosis and treatment of acute leukemia(AL). **Methods** Flow cytometry and CD45/side scatter (SSC) gating were used to analyze antigenic expressions in 93 patients with AL. **Results** The antigens expressed in 69 patients with acute myeloid leukemia (AML) were mainly CD13, CD33, HLA-DR and CD117; lymphoid antigens expression was identified in 20.2% of AML patient, there was a significant difference between CD7⁺ and CD7⁻ in the percent CR ($P<0.05$). In 13 patients with acute B-lymphoblastic leukemia, the expressed antigens were mainly CD19, CD34, HLA-DR, CD20, CD22, and 31% of these patients were found to be positive for myeloid antigen expression. There was no significant difference between CD13⁺ and CD13⁻ in the percent CR ($P>0.05$). The antigens expressed in 7 patients with acute T-lymphoblastic leukemia were mainly CD5, CD3, CD7, and CD34. **Conclusion** Immunological classification by flow cytometry has important value in therapy and prognosis of AL.

【Key words】 leukemia; acute disease; immunophenotyping; flow cytometry

随着技术不断进步,临床上对白血病的传统法美英急性白血病分类法(FAB)分型已远不能满足需要。应用流式细胞仪对白血病进行免疫分型,可明显提高急性白血病诊断的准确性,能更准确地区分白血病细胞的来源及分化阶段,对确定诊断、预后及选择治疗方案具有重要意义。本研究对本院 2007 年 9 月至 2010 年 10 月收治的 93 例急性白血病患者分别应用形态学及免疫学分型检测,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 93 例均为本院 2007 年 9 月至 2010 年 10 月收治的急性白血病患者,其中男 63 例,女 30 例,年龄 12~77 岁。经血象、骨髓象和细胞化学染色确诊,符合血液病诊断标准。其中急性髓细胞性白血病(AML)69 例,包括 M0 4 例, M1 7 例, M2 8 例, M3 11 例, M4 18 例, M5 17 例, M6 4 例;急性淋巴细胞白血病(ALL)20 例;混合细胞白血病 4 例。另有 6 例形态学无法确定。

1.2 免疫学检查 检测指标包括 T 淋巴细胞系的 CD2、CD3、CD4、CD5、CD7; B 淋巴细胞系的 CD10、CD19、CD20、CD22。髓细胞系的 CD11b、CD14、CD15、CD33、CD64、CD117、髓过氧化物酶、CD34 及人类白细胞抗原(HLA)-DR 等。

1.3 实验方法

1.3.1 取患者骨髓 2 mL,肝素抗凝。采用 FACSCan 型流式细胞仪(美国 Becton-Dickinson 公司),488 nm 激光光源,用 CD45 侧向角光散射(SSC)设门分析 R2 内细胞,根据细胞

CD45 的抗原表达程度区分各种细胞及异常细胞群。试剂由 Becton-Dickinson 公司提供。阳性细胞大于或等于 20% 判为阳性。

1.3.2 取患者骨髓 2 mL,每管加入骨髓 50 μ L 及 4 种荧光标记抗体各 20 μ L,室温避光孵育约 15 min,再加入 2 mL 红细胞溶解液,震荡后置室温 10 min,离心后弃上清液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,加入 0.5 mL PBS,上机待检。结果判断以 HLA $\geq$ 20% 为阳性。AML 和 ALL 免疫分型标准参照文献[1],急性混合细胞白血病的免疫学诊断标准参照欧洲协作组积分标准[2]。

1.4 化疗药物及疗效判定标准 ALL 采用 VDLP(长春新碱、柔红霉素、门冬酰胺酶和泼尼松)或 Hyper-CVAD(大剂量环磷酰胺、长春新碱、阿霉素和地塞米松)方案诱导缓解; AML 采用 DA(柔红霉素、阿糖胞苷)或 MA(米托蒽醌、阿糖胞苷)或 HDA(高三尖杉酯碱、阿糖胞苷、柔红霉素)方案诱导缓解; M3 采用全反式维甲酸+DA 方案诱导完全缓解。疗效评价按照 1987 年苏州会议标准[3]。

1.5 统计学方法 两组间率的比较采用四格表的确切概率法。

2 结 果

2.1 AML 69 例 AML 患者主要表达的抗原是 CD13 (69.56%)、CD117 (59.42%)、CD11b (43.48%)、CD33 (60.87%)、CD14 (59.42%),主要在 M4、M5 中表达。16 例(23.

19%) 伴淋巴细胞系抗原表达的 AML(Ly⁺ AML) 主要表达的抗原是 CD7(13. 04%)、CD22(4. 35%)、CD2(1. 45%)、CD3(4. 35%) 见表 1。

表 1 69 例 AML 患者的免疫表型结果(n)

类型	n	CD11b	CD13	CD14	CD15	CD33	CD64	CD117	CD34	HLA-DR	MPO	CD19	CD4	CD7	CD71	cdyA	CD22	CD2	CD8
M0	4	1	3	—	—	3	—	3	4	3	—	—	—	2	—	—	—	—	—
M1	7	—	4	—	—	4	3	5	5	5	—	—	—	2	—	—	1	—	1
M2	8	—	6	6	—	—	6	5	6	4	6	—	—	—	2	—	1	1	—
M3	11	—	6	8	—	8	8	6	1	2	—	4	—	—	—	—	—	—	1
M4	18	15	14	12	—	15	7	10	16	18	5	—	1	4	—	—	—	—	—
M5	17	14	14	14	—	12	7	11	12	13	6	3	3	—	—	—	1	—	1
M6	4	—	1	1	—	—	—	1	2	1	3	—	—	1	4	3	—	—	—
M7	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注：—表示无数据。

表 2 20 例 ALL 患者的免疫表型结果(n)

类型	n	CD2	CD3	CD5	CD7	CD8	CD34	HLA-DR	CD19	CD20	CD22	CD10	CD33	CD117	CD13
T-ALL	7	2	3	5	2	0	2	1	0	0	0	0	1	1	1
B-ALL	13	0	0	0	0	0	13	13	11	9	9	10	0	0	4

2.3 急性杂合细胞白血病 4 例急性杂合细胞白血病中,1 例同时表达 CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD11b、CD14, 弱表达 CD19、CD21、CD20、CD22;1 例同时表达 CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD19、CD21、CD20、CD22 及 CD11b、CD117;1 例同时表达 CD2、CD3、CD7、CD11b、CD117、CD15 及髓过氧化物酶;1 例同时表达 CD2、CD7、CD11b、CD13、CD117。

2.4 免疫表型与疗效 20 例 ALL 中,可评价疗效的 14 例, CD13⁺ ALL 和 CD13⁻ ALL 患者的完全缓解率(CR)分别为 80. 00%和 78. 80%,两组差异无统计学意义。69 例 AML 可评价疗效的 33 例,CD19⁺ AML 和 CD19⁻ AML 患者的 CR 分别为 42. 9%和 88. 5%,差异有统计学意义(P<0. 05)。

3 讨 论

白血病目前分型及预后判断主要依据细胞形态学、细胞免疫学、细胞遗传学和分子生物学,其中细胞免疫学表型检测以其快速、准确的特点在临床发挥着越来越重的作用。免疫学分型可确定形态学不能或很难区分的白血病类型及亚型,如混合细胞白血病等,以弥补法美英协作组形态学分型的不足,并且可以指导白血病的治疗,检测白血病微小残留及判断预后。流式细胞术是国际上公认的白血病免疫分型的最佳方法。

本研究结果表明,形态学作为诊断急性白血病的基本方法,由于方法本身的限制,容易受主观因素的影响,造成结果偏差。而流式细胞术免疫学分型用已知的单克隆抗体鉴定细胞表面或细胞内的免疫标志,检测位点多、特异性强,更能客观、准确、及时地反映白血病的来源及分化阶段。流式细胞术对血液有核细胞胞膜、细胞核特定生物大分子物质的分析,可精确判定其良恶性、分类、所处周期等,可大大提高白血病诊断的灵敏度及分型的准确性。目前国外已广泛应用于血液系统恶性疾病的诊断、指导治疗及残留细胞检测,国内也正在逐渐普及。本组 69 例 AML 中最常见抗原表达为 CD13(69. 56%)、CD33(60. 87%)、CD11b(43. 48%),因此 CD13、

2.2 ALL 20 例 ALL 患者主要表达的抗原是 HLA-DR(70. 00%)、CD34(75. 00%)、CD19(55. 00%),见表 2。

CD33、CD11b 是髓系特异性表达标志物。CD34、HLA-DR 多表达于分化低的类型,如 M0、M1、M4、M5,在分化较成熟 M3 中极少表达。M3 中高表达 CD13 及 CD33,与文献报道一致,有一定特异性^[4-5]。CD14 为单核细胞相关抗原,在 M4、M5 中的表达率分别为 66. 67%和 82. 35%,表明 CD14 有助于 M4、M5 与其他类型区分^[6]。CD117 59. 42%的表达率,与欧洲白血病分类组织(EGIL)研究的 1 103 例 AML 患者 67%的 CD117 表达率相近^[7]。在 ALL 中 CD117 表达仅 5. 00%,表明 CD117 是髓系标记的一个特异性指标。

急性混合细胞白血病是一组免疫表现复杂的疾病,显示不同系统标记的共同表达,反映了白血病细胞的特异性及细胞分化发育过程中表面标记表达的复杂性,其诊断、治疗及预后均不同于表型单一的急性白血病^[8]。本组 4 例混合细胞白血病中 3 例为髓细胞系、T 淋巴细胞系混合(M/T),1 例为髓细胞系、T 淋巴细胞系、B 淋巴细胞系混合(M/T/B)。CD34、HLA-DR、CD117 等在 AML 患者中有一定高表达,提示 AML 的细胞来源较早,这与文献报道基本一致。Ly⁺ AML 或 My⁺ ALL 患者化疗方案应选用兼顾髓细胞系、淋巴细胞系的化疗方案。因此,免疫表型为急性白血病治疗措施的个体化提供了一定的依据。

部分 AML 患者可表达淋巴细胞系抗原,如 CD7(13. 04%)、CD19(10. 14%),在各亚型均可见。部分 ALL 患者可表达髓系抗原,如 CD13。此类患者化疗效果普遍较差,CR 约为 35%,远低于不表达者(P<0. 05)。本组结果示 CD13⁺ ALL 和 CD13⁻ ALL 患者的 CR 两组差异无统计学意义,与文献报道髓系抗原表达对 ALL 预后无明显影响的结果一致;CD19⁺ AML 和 CD19⁻ AML 患者的 CR 差异有统计学意义(P<0. 05)。但观察例数较少,尚需进一步积累病例。

综上所述,采用流式细胞术对急性白血病进行免疫分型,对白血病的明确诊断及分型、选择治疗方案(下转第 2330 页)

的结果表明,脂肪肝患者血浆 Leptin 水平显著地高于健康对照组($P<0.01$),其升高的机制可能是患者体内血压 Leptin 受损,这种升高有可能反馈性造成 ob 基因的表达产生更多的瘦素有关。

IL-1 有促进 ob 基因的表达的作用^[5]。可以认为 IL-1 含量均高而促使 ob 基因表达增加,即瘦素含量增加,同时 IL-1 可直接作用于脂肪细胞刺激被素生成^[6]。本文检测结果表明:脂肪肝患者血清 IL-1 含量显著高于健康对照组($P<0.01$),其升高的机制作者认为是,IL-1 可刺激促肾上腺释放激素分泌,后者可增加肾上腺的脂质类固醇产生,而糖皮质激素可增加人类瘦素,即 IL-1 含量变化可通过 PHA 轴来调节被素的分泌。而瘦素也可通过中枢神经系统反馈性造成 IL-1 含量升高。是否还有其他因素参与尚待进一步的研究和。

IL-18 是一种具有多种生物学活性的细胞因子,主要由活化的巨噬细胞和肝脏 kupffer 细胞产生,是内毒素诱发的关键因子。在肝脏炎性损伤过程中的作用广泛受到临床科研工作者的关注。本文检测结果表明,脂肪肝患者血清 IL-18 水平非常显著地高于健康对照组($P<0.01$),其升高机制可能是:(1)脂肪肝患者肝脏累积的酒精及其氧化代谢产物可直接刺激机体产生内毒素,进而激活肝脏 kupffer 细胞产生大量核被素因子 NF- κ B 等,NF- κ B 诱导激活肝脏 kupffer 细胞,释放大量的 IL-18、IFN- γ 、IL-2 等炎性因子。(2)已有的损伤的肝细胞又可合成 IL-18^[7]。

脂肪组织不再被认为是单纯储备能量的器官,而是可分泌具有生物活性的功能蛋白(脂肪因子),对全身器官系统有重要的调节作用。其中分泌的脂联素含 244 个氨基酸的多肽和瘦素 167 个氨基酸多肽不仅能调节糖脂代谢,参与神经调节免疫,而且与心血管病的发生有十分密切的关系^[8]。其含量的增高可通过神经内分泌系统影响脂类代谢。

本文检测结果表明,脂肪肝患者血清 ADP 水平低于健康对照组($P<0.01$)。其降低的机制初步认为是:(1)脂肪肝患

者存在有高胰岛素血症,可存在不同程度的免疫反应。(2)ADP 可增加胰岛素的敏感性降低免疫反应有关。

总之,作者认为,脂肪肝患者血浆 Leptin 和血清 IL-1、IL-18 和 ADP 水平的变化可判断肝损伤严重程度的一个指标,具有十分重要的临床价值。

参考文献

[1] 厉有名,高维新. 脂肪肝现代诊断[M]. 南京:江苏科技出版社,2003:17-18.

[2] 中华医学会肝脏病学脂肪肝和酒精性肝病学会. 非酒精性脂肪肝病诊断指南[J]. 中华肝脏病杂志,2006,14(3):161-163.

[3] 李维,倪安民. Leptin 与内分泌代谢[J]. 国外医学内分泌学分册,1999,19(3):100-101.

[4] 贾伟平,项坤三,陆俊盘,等. 局部体脂及内分泌脂肪调节激素对被素水平的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志,2000,16(1):70-72.

[5] Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, et al. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia[J]. J Exp Med, 1997,185(1):171-175.

[6] 黄欣,立宏建. 影响人类的 Leptin 因素[J]. 国外医学内分泌学分册,1999,19(3):103-105.

[7] Vencchiet J, Falascak, Cacciatore P, et al. Association Between plasma interleukin-18 levels and liver injury in chronic hepatitis C Virus infection and monalcoholic fatty liver lisease[J]. Ann Clin Lab Cci,2005,35(4):415-422.

[8] 王淑芳,崔莹,赵家军. 脂联素及其内分泌调节[J]. 中国动脉硬化杂志,2005,13(2):242-244.

(收稿日期:2011-05-22)

(上接第 2328 页)
有重要临床意义。

参考文献

[1] Jennings DC, Foon KA. Recent advances in flow cytometry; application to the diagnosis of hematologic malignancy[J]. Blood,1997,90(8):2863-2892.

[2] Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposal for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias(EGIL)[J]. Leukemias,1995,9(10):1783-1795.

[3] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京:科学出版社,2007:131-133.

[4] 鹿群先,张光彩,李德鹏,等. 急性髓细胞白血病免疫表型

分析[J]. 临床内科杂志,2001,18(2):127-129.

[5] 秘营昌,卞寿庚,薛艳萍,等. 急性髓细胞白血病免疫表型特点及预后的关系[J]. 白血病,1997,6(4):194-196.

[6] 张秋堂,李涛. 201 例成人急性白血病免疫分型特点[J]. 检验医学,2005,20(4):373-375.

[7] Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO, et al. The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias(EGIL)[J]. Blood,1998,92(2):596-599.

[8] 黄欣. 流式细胞术用于急性白血病免疫分型现状[J]. 检验医学与临床,2006,5(4):160-162.

(收稿日期:2011-03-11)

