

免疫组化对形态学上难以分型的急性白血病的诊断价值

王尚武, 丁爱华, 李鹤群, 周小毛(湖南省益阳市桃江县人民医院检验科 413400)

【摘要】 目的 探讨骨髓片免疫组化检查对急性白血病的诊断价值。**方法** 对 48 例形态学难以分型的急性白血病进行免疫表型分析, 与形态学诊断结果进行比较, 并和流式细胞仪分型进行对照。**结果** M_0 的形态学分型与免疫组化分型存在差异, 经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。免疫组化分型与流式细胞仪分型有很好的 consistency, 较形态学诊断的正确率更高。**结论** 骨髓片免疫组化对形态学难以分型的急性白血病分型中有较好的临床价值, 能为临床提供更可靠的治疗依据。

【关键词】 骨髓片; 免疫组织化学; 白血病

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.20.022 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)20-2477-02

Clinical study of immunohistochemistry in acute leukemia that hard to be morphologically classified WANG Shang-wu, DING Ai-hua, LI He-qun, ZHOU Xiao-mao (Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Taojiang County, Yiyang, Hunan 413400, China)

【Abstract】 Objective To discuss the value of bone marrow smear immunohistochemistry examination in the diagnosis of acute leukemia. **Methods** We did the immunophenotype analysis on 48 patients with acute leukemia that hard to be diagnosed morphologically, and compared it to the results of morphology diagnosis, with the flow cytometry (FCM) morphology as the control. **Results** There was statistically significant difference between the diagnosis morphology and immunohistochemistry morphology of M_0 by χ^2 test ($P < 0.05$). There was good consistency between the immunohistochemistry morphology and FCM morphology, with higher correctness rate than the morphology diagnosis. **Conclusion** The bone marrow smear immunohistochemistry examination has a high clinical value in the diagnosis of acute leukemia, which could provide more reliable treatment references.

【Key words】 bone marrow smear; immunohistochemistry; leukemia

白血病是造血干细胞克隆性疾病, 是一组高度异质性的恶性血液病, 其特点为白血病细胞异常增生、分化成熟障碍, 并伴有凋亡减少, 细胞成熟障碍, 在较早阶段称为急性白血病^[1]。白血病的诊断方法进展很快, 从最初的形态学到免疫学、细胞遗传学和分子生物学 (MICM) 分型, 再到现今的融合基因 (FISH) 技术, 使白血病的确诊率显著提高。但是, 由于基层医院条件的限制, 更多地依赖于形态学的诊断, 这使得疾病的诊治很受限制, 误诊率较高, 而开展免疫组化分型所受条件限制较少。作者通过对近几年来在形态学上难以诊断的急性白血病进行免疫组化分析, 使诊断的正确率明显提高, 取得了满意的效果, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2001 年 10 月至 2010 年 9 月在本院血液内科住院治疗以及门诊白血病患者共 48 例, 其中男 30 例, 女 18 例, 年龄 8~59 岁, 平均 (31.5±8.2) 岁。

1.2 方法

1.2.1 骨髓细胞形态学分型 按常规进行骨髓穿刺涂片, 经瑞-姬染色, 油镜下分类计数 250 个细胞, 形态学分型采用 FAB 分型标准^[2], FAB 分型提出原始细胞大于或等于 30% 为急性白血病的诊断标准, 以原始细胞形态学特征, 将急性白血病分为急性淋巴细胞白血病 (ALL)、急性髓细胞白血病 (AML) 或称急性非淋巴细胞白血病 (ANLL) 两大类及其亚型。本组病例采用此标准进行形态学分型, 并结合 α -醋酸萘酚酯酶染色、

氟化钠抑制实验 (NAE/NaF)、糖原染色 (PAS)、过氧化物酶染色等细胞化学染色诊断急性白血病类型。

1.2.2 免疫组化分型 试剂来自福州迈新生物技术开发有限公司免疫组化 ElivisionTMplus 广谱试剂盒。常规抽取骨髓用硅化玻片涂片 5~7 张, 同时用乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝的试管抽取 2 mL 静脉血行流式细胞学 (FCM) 检查。免疫组化步骤: (1) 固定, 使用 10% 中性缓冲甲醛固定液固定 10 min, 然后自然干燥 60 min。(2) 根据每一种抗体的要求, 对细胞抗原进行相应的修复。(3) 每张涂片加 50 μ L 3% 过氧化氢溶液, 室温下孵育 5~10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性。磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 3 次, 每次 3 min。(4) 每张涂片根据需要加 50 μ L 的第一抗体 (如 CD₂、CD₇、CD₃₃、CD₃₄、TdT、MPO、CD₁₄、CD₁₃、CD₁₀ 等), 室温下孵育 60 min。(5) 除去 PBS, 每张涂片加 50 μ L 聚合物 (Polymer Enhancer), 室温下孵育 20 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。(6) 除去 PBS, 每张涂片加 50 μ L 酶标抗鼠/兔聚合物 (Polymerized HRP-Anti Ms/Rb IgG), 室温下孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。(7) 除去 PBS, 每张涂片加 50 μ L 新鲜配制的 DAB 或 AEC 溶液, 显微镜下观察 3~10 min。(8) 自来水冲洗, 苏木紫复染, 11% 盐酸分化, 自来水冲洗, PBS 返蓝。(9) 涂片经过梯度乙醇脱水干燥, 用 DAE 显色, 中性树胶封固, 待干镜检。

1.3 统计学方法 对两种诊断结果用 SPSS11.0 软件进行统计学处理, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计

学意义。

2 结 果

2.1 骨髓细胞免疫标记^[1] M₀ 典型的免疫标记为 CD₃₄、CD₃₃、CD₁₃, M₁ 典型的免疫标记为 MPO、CD₃₄、CD₁₃, M_{5a} 典型的免疫标记为 MPO、CD₃₃、CD₁₄、CD₁₃, T-ALL 典型的免疫标记为 CD₃、CD₇、CD₂、CD₅、TdT, 前 B-ALL 典型的免疫标记为 CD₁₉、CD₂₀、CD₂₂、TdT、Cyu, B-ALL 典型的免疫标记为 CD₁₉、CD₂₀、CD₂₂、Smlg。

2.2 骨髓细胞形态学分类 见表 1。从表 1 可见 M₀ 的诊断 FAB 分型与免疫组化分型存在差异, 经 χ^2 检验, χ^2 值为 3.357 8 ($P < 0.05$), 差异具有统计学意义。两者与流式细胞学 (FCM) 分型比较, 免疫组化分型与 FCM 分型有很好的一致性。

表 1 骨髓细胞形态学分类 (n)

方法	n	M ₀	M ₁	M _{5a}	L ₂	L ₃	T-ALL	前 B-ALL	B-ALL
FAB	48	0	17	19	9	3	0	0	0
免疫组化	48	5	14	17	0	0	4	5	3
FCM	48	5	14	17	0	0	4	5	3

3 讨 论

FAB 分型标准明确, 是目前应用最多和最广的分型及诊断方法, 对急性白血病的诊断、治疗、预后及生物学特征的研究起到重要作用。但形态学诊断存在主观性, 加上白血病细胞的异质性和多态性, 判断符合率低, 仅为 64%~77%。细胞化学染色补充了单凭形态学对细胞辨别的不足, 加上染色方法的增多, 采用多项染色和超微细胞化学染色等技术, 使大多数白血病的诊断及分型得以明确, 使诊断符合率明显提高, 但此项技术尚存在试剂及方法的质量控制、标准化等环节的问题, 稳定性、重复性及可比性也存在一定难度。免疫学分型是利用了造血细胞分化成为成熟细胞过程中会出现一系列的免疫表型的变化, 白血病细胞往往停滞在细胞分化的某一抗原表达阶段, 因此可以利用单克隆抗体检测相应白细胞表面抗原或分化抗原, 用急性白血病的一线单抗来筛选急性髓系白血病及 T、B 淋巴系白血病, 用二线单抗进一步确定系内亚型, 从而指导治疗、判断预后, 且与流式细胞仪分型对照, 发现有较好的一致性^[2]。

M₀ 型白血病细胞形态较小, 也可较大, 核仁明显, 核呈圆形, 胞质少, 无颗粒, 亦可透明, 嗜碱性, 无 Auer 小体, 易误诊为 ALL 的 L₂ 或 L₁ 型。M₁ 型白血病细胞胞体小, 与淋巴细胞相似, 核染色质呈细颗粒状, 较正常原粒细胞密集, 胞核圆形, 核仁 1~2 个, 有伪足, 应与淋巴细胞鉴别。M_{5a} 型白血病细胞胞核较小, 呈圆形, 有核仁, 从形态学上观察很难与 M₀ 型鉴别, 需进一步做免疫学标志检查, M_{5a} 型白细胞表面抗原表达为

CD₁₃、CD₁₄、CD₃₃、CD₃₄, M₀ 型表达 CD₃₄、CD₃₃、CD₁₃、CD₁₄ 中至少有一种阳性, 不表达淋巴系特异性抗原 (CD₁₀、CD₁₉、CD₂₄、CD₂₂、CD₂、CD₃、CD₅)。本研究结果也显示单纯从形态学上没有诊断出 1 例 M₀ 型白血病, 通过进行免疫组化检查诊断出 5 例 M₀ 型白血病, 同时免疫组化分型与流式细胞仪分型结果一致, 这与相关文献报道相符^[3-4], 说明与 FAB 分型相比, 不仅客观、准确、重复性好, 还可鉴别白血病的起源、分化阶段的特点, 提高了白血病的正确诊断。ALL 的免疫组化分型不同, 临床表现与预后亦有差别, CD₃ 对 T-ALL 有高度敏感性^[5-6], 而 CD₁₉ 对前 B-ALL 与 B-ALL 有高度的敏感性和特异性。B-ALL 与 T-ALL 预后较差, 前 B-ALL 预后良好, 成人早期前 T-ALL 较其他 ALL 更凶险, 因此建议对 T-ALL 迅速采取化疗方案治疗^[7]。

总之, 免疫组化分型与 FAB 分型相比, 免疫组化分型补充了形态学的不足, 故已成为白血病诊断、治疗及基础研究的重要手段。但尚不能取代形态学分型, 由于白血病细胞具有“异质性”和“非同步性”, 且常伴有抗原表达紊乱现象, 有时分化抗原在单抗表达上也会出现一些差异, 所以适当运用免疫组化与形态学组合进行联合检测^[8], 这样可使急性白血病分型准确率明显提高, 为临床提供可靠的治疗依据。

参考文献

- [1] 谭齐贤, 张树平. 临床血液学和血液学检验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 192-196.
- [2] 梁效功. 骨髓涂片免疫组化在急性淋巴细胞白血病中的应用 [J]. 华西医学, 2005, 20(4): 651.
- [3] 王超, 李明, 刘跃平, 等. 骨髓涂片免疫组化在形态学难以诊断的急性白血病中的临床研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(6): 538-541.
- [4] 刘晓红, 季海生. 81 例急性髓系白血病形态学与免疫学分型分析 [J]. 医学检验与临床, 2009, 20(5): 69-71.
- [5] 桂兰, 陈玲. 急性白血病细胞免疫表型分析及临床意义 [J]. 山东医药, 2007, 47(17): 33-34.
- [6] Leong FJ, Leong AS. Essential markers in malignant lymphoma: a diagnostic approach [J]. J Histotechnology, 2002, 25(4): 215-227.
- [7] 卢新天. 小儿急性淋巴细胞白血病 [J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(1): 91-92.
- [8] 王红霞, 朱芸, 王翠霞, 等. 急性髓系白血病形态学诊断与免疫学分型 [J]. 河北医科大学学报, 2007, 28(4): 291-294.

(收稿日期: 2011-05-22)