

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.12.011

急性与非急性早幼粒细胞白血病患者免疫表型比较

蔡 莉,郑 萍[△]

河南省信阳市中心医院输血科,河南信阳 464000

摘要:目的 分析急性早幼粒细胞白血病(APL)与其他类型急性髓细胞白血病(即非 APL)患者异常幼稚细胞免疫表型特点及意义。方法 利用 4 色流式细胞仪对 30 例 APL(APL 组)及 97 例非 APL(非 APL 组)患者进行免疫表型检测。结果 APL 组患者 SSC 均偏大一些,幼稚抗原 CD34 和 HLA-DR 阳性率较低,为 16.7%和 13.3%,而 CD117 和 CD38 阳性率为 96.7%;泛髓系抗原 CD13 和 CD33 的阳性率为 100.0%和 93.3%,髓系成熟抗原 CD64 和 CD15 的阳性率分别为 96.7%和 43.3%,而 30 例 APL 组患者无一例表达成熟抗原 CD11b;CD9 在 APL 组中阳性率较高,为 96.7%。非 APL 组患者中,幼稚抗原 CD38 阳性率为 97.9%,CD117 和 HLA-DR 的阳性率为 88.7%,CD34 的阳性率为 66.0%;93 例(95.9%)和 85 例(87.6%)患者表达泛髓系抗原 CD33 和 CD13;68 例(70.1%)、66 例(68.0%)和 27 例(27.8%)患者表达髓系成熟抗原 CD15、CD64 和 CD11b;只有 45 例(46.4%)和 35 例(36.1%)患者表达 CD56 和 CD9。结论 APL 具有独特的免疫表型特征,其特点表现为高 SSC、CD13⁺CD9⁺CD38⁺CD33⁺CD117⁺CD64⁺CD11b⁻CD34⁻HLA-DR⁻,多参数流式细胞术检测可辅助 APL 的快速诊断,为患者早期治疗提供可靠依据。

关键词:急性早幼粒细胞白血病; 免疫表型; 流式细胞术

中图法分类号:R446.6;R733.7

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)12-1669-04

Comparison of immunophenotype between patients with acute promyelocytic leukemia(APL) and non-APL

CAI Li,ZHENG Ping[△]

Blood Transfusion Department, Xinyang Central Hospital, Henan 464000, China

Abstract: Objective To analyze the immunophenotype in patients with acute promyelocytic leukemia (APL) and other types of acute myeloid leukemia(non-APL), and to discuss their characteristics and significance. **Methods** Immunophenotyping was performed in 30 patients with APL (APL group) and 97 patients with non-APL (non-APL group) using 4-color flow cytometry. **Results** The SSC of patients in APL group was higher, the positive rates of CD34 and HLA-DR were 16.7% and 13.3%, while the positive rates of CD117 and CD38 were 96.7%. The positive rates of pan-myeloid antigens CD13 and CD33 were 100.0% and 93.3%, and the positive rates of myeloid mature antigens CD64 and CD15 were 96.7% and 43.3%, respectively. None of the 30 patients in APL group expressed mature antigen CD11b. The positive rate of CD9 in APL group was 96.7%. In non-APL group, the positive expression rates of naive antigen and pan-myeloid antigen were higher, 97.9% of patients expressed CD38, 88.7% expressed CD117 and HLA-DR, and 66.0% expressed CD34. Ninety-three cases (95.9%) and 85 cases (87.6%) expressed pancreatic myeloid antigens CD33 and CD13, respectively. Sixty-eight cases (70.1%), 66 cases (68.0%) and 27 cases (27.8%) expressed myeloid mature antigens CD15, CD64 and CD11b. Only 45 cases (46.4%) and 35 cases (36.1%) expressed CD56 and CD9. **Conclusion** APL has a unique immunophenotypic characteristic with high SSC, CD13⁺CD9⁺CD38⁺CD33⁺CD117⁺CD64⁺CD11b⁻CD34⁻HLA-DR⁻. Multi-parameter flow cytometry can assist in the rapid diagnosis of APL and provide a reliable basis for early treatment of patients.

Key words: acute promyelocytic leukemia; immunophenotype; flow cytometry

急性早幼粒细胞白血病(APL)是一种特殊类型的急性髓系白血病(AML),其发病率约占 AML 发病率的 10%^[1-3]。APL 病情发展迅速,出血和弥散性血管内凝血(DIC)是 APL 的突出特点,也是早期主要的致死原因^[4]。及时给予 APL 患者早期干预,控制出凝血,是治疗 APL 患者的关键所在,这势必要求对

APL 患者做出快速诊断^[5]。目前,APL 的诊断依然依赖实验室的 MICM 分型确诊,尤其是分子生物学的 PML-rara 基因与细胞遗传学的 t(15;17)对 APL 诊断至关重要,但是这两项检验耗时长,无法给予快速诊断,所以细胞形态学与免疫表型则为 APL 的快速诊断提供了重要手段。流式细胞术免疫表型检测使

用少量样本快速获取结果,并具有良好的重复性,可以弥补细胞形态学对于形态不典型的病例而无法做出准确判断的劣势,提高诊断的准确性,同时对评估预后提供重要提示。本研究回顾性分析 30 例 APL 患者与 97 例其他类型急性髓细胞白血病(即非 APL)患者免疫表型结果,并进行比较,总结出 APL 免疫表型特点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有标本取自 2013 年 12 月至 2017 年 7 月本院住院及门诊患者,其中初治 APL 患者(APL 组)30 例,非 APL 患者(非 APL 组)97 例。每例患者均经形态学、免疫学和细胞遗传学、分子生物学检测并最终确诊。APL 组男 19 例,女 11 例;年龄 26~71 岁,中位年龄 48.5 岁。非 APL 组男 56 例,女 41 例;年龄 18~68 岁,中位年龄 42.0 岁。

1.2 仪器与试剂 4 色流式细胞仪(FACSCalibur 型)购自美国 Becton Dickinson 公司。单克隆抗体包括异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE)、多甲藻叶绿素蛋白(Percp)或别藻青蛋白(APC)4 种荧光素标记的抗体,具体有:CD34-FITC、CD7-FITC、CD38-FITC、HLA-DR-FITC、CD16-FITC、CD15-FITC、CD4-FITC、CD9-FITC、MPO-FITC、CD123-PE、CD13-PE、CD117-PE、CD10-PE、CD2-PE、CD64-PE、CD11b-APC、CD19-APC、CD33-APC、CD56-APC、CD14-APC、CD45-Percp。单克隆抗体及红细胞裂解液均购自美国 Becton Dickinson 公司。

1.3 检测方法 所有患者均取新鲜骨髓液 1~2 mL,肝素抗凝,24 h 内进行样本处理并检测。标记抗体后用 4 色流式细胞仪(FACS Calibur)上机检测,CellQuest 软件获取 50 000 个细胞,对数取样,通过 CD45/SSC 设门区分细胞群,选定幼稚细胞群,分析抗原表达情况。检查结果以阳性细胞占该细胞群的 80%以上为强阳性表达,20%~80%为弱阳性表达,<20%为阴性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。检验方法采用 χ^2 检验、Fisher 确切概率法检验、*t* 检验及方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 骨髓中细胞群 CD45/SSC 设门分析 以 SSC 与 CD45 设门分析幼稚细胞群,与非 APL 组比较,30 例 APL 组患者中幼稚细胞群 SSC 均较大,为 100 左右,非 APL 组患者幼稚细胞群 SSC 偏小,为 10 左右,同时 APL 组患者免疫表型的自发荧光较强,抗原表达本底偏高。

2.2 两组患者幼稚细胞免疫表型频率分布 APL 组患者:30 例患者全部表达 CD13(100.0%),29 例患者表达 CD117、CD38、CD64 和 CD9,表达频率为 96.7%。28 例患者表达 CD33,表达频率为 93.3%。其次表达频率较高的抗原是 CD15,30 例患者中有 13 例(43.3%)表达。幼稚抗原 CD34 和 HLA-DR 表达很低,只有 4 例

部分表达 CD34,阳性率不足 13.3%。5 例患者表达 HLA-DR,阳性率 16.7%。成熟抗原 CD11b 及其他系别抗原如 CD56、CD2、CD7、CD4 表达均较低。非 APL 组患者:幼稚抗原与泛髓系抗原阳性表达率均比较高,97 例患者中,有 95 例患者表达 CD38,阳性率达 97.9%,86 例患者表达 CD117 和 HLA-DR(88.7%),表达 CD34 的患者为 64 例(66.0%)。分别有 93 例(95.9%)和 85 例(87.6%)患者表达泛髓系抗原 CD33 和 CD13。68 例(70.1%)、66 例(68.0%)和 27 例(27.8%)患者表达髓系成熟抗原 CD15、CD64 和 CD11b。只有 45 例(46.4%)、35 例(36.1%)患者表达 CD56 和 CD9。见图 1、表 1。

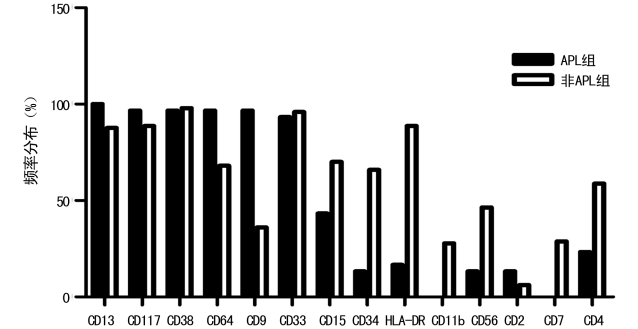


图 1 两组患者骨髓幼稚细胞免疫表型频率分布

2.3 两组患者幼稚细胞抗原强度表达比较 两组病例根据抗原表达频率及荧光强度比较发现,幼稚抗原 CD38 和 CD117 表达频率均较高,但非 APL 组中荧光强度更强,以强阳性居多,差异有统计学意义($P<0.05$)。同时,幼稚抗原 CD34 和 HLA-DR 在 APL 组中不仅表达频率低,荧光强度也较弱,30 例患者中均未见强表达,而非 APL 组阳性患者中以强表达为主,差异有统计学意义($P<0.05$)。泛髓系抗原 CD13 和 CD33 虽然在两组中表达频率均较高,但 APL 组中 CD13 荧光强度更强,强阳性表达更多,差异有统计学意义($P<0.05$)。而 CD33 在两组中的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。成熟髓系抗原 CD15、CD64 和 CD11b 在两组中的表达情况存在明显差异,CD64 在 APL 组中阳性表达率明显高于非 APL 组,并且表达强度也更高。而 CD15 和 CD11b 在非 APL 组中的阳性率更高,但荧光强度弱表达居多,差异有统计学意义($P<0.05$)。淋系抗原 CD56 在非 APL 组内阳性率及荧光强度均较高,差异有统计学意义($P<0.05$)。非系别抗原 CD9 在 APL 组中表达频率较高,并且荧光强度更强,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 两组患者抗原分布

抗原	阴性(n)	弱阳性(n)	强阳性(n)	P
CD117				0.039
APL 组	1	17	12	
非 APL 组	15	31	55	
CD33				0.293
APL 组	2	4	24	
非 APL 组	4	26	67	

续表 1 两组患者抗原分布				
抗原	阴性(<i>n</i>)	弱阳性(<i>n</i>)	强阳性(<i>n</i>)	<i>P</i>
CD13				0.001
APL 组	0	7	23	
非 APL 组	12	48	37	
CD15				0.013
APL 组	17	12	1	
非 APL 组	29	50	18	
CD64				0.002
APL 组	1	16	13	
非 APL 组	33	44	22	
CD11b				0.005
APL 组	30	0	0	
非 APL 组	70	21	6	
CD38				0.000
APL 组	1	11	18	
非 APL 组	2	7	88	
CD34				0.000
APL 组	26	4	0	
非 APL 组	33	26	38	
HLA-DR				0.000
APL 组	25	5	0	
非 APL 组	11	31	55	
CD9				0.000
APL 组	1	2	27	
非 APL 组	62	22	13	
CD4				0.001
APL 组	23	7	0	
非 APL 组	40	32	25	
CD14				—
APL 组	30	0	0	
非 APL 组	84	13	0	
CD19				0.235
APL 组	29	1	0	
非 APL 组	83	9	5	
CD2				0.147
APL 组	26	3	1	
非 APL 组	91	6	0	
CD56				0.005
APL 组	26	3	1	
非 APL 组	52	26	19	
CD7				0.004
APL 组	30	0	0	
非 APL 组	69	15	13	
CD123				0.189
APL 组	14	2	0	
非 APL 组	32	9	7	

注：—表示此项无数据。

3 讨 论

APL 是一种特殊类型的 AML,与其他非 APL 的 AML 相比,其临床表现疾病进展迅速,出凝血异常。早诊断、早治疗对 APL 预后至关重要。目前,急性白血病的诊断主要依据形态学、流式免疫表型、基因及

细胞遗传学的诊断,但基因与细胞遗传学诊断具有时间滞后性,快速诊断主要依赖形态学与流式免疫表型,尤其对形态不典型、较难区别亚型的急性白血病患者,流式细胞术免疫表型提供了有效的快速诊断方法^[5-6],可以快速区别 APL 与非 APL。

本研究针对 AML 患者的免疫表型进行统计,分析非 APL 组及 APL 组的免疫表型特点,结果发现,与非 APL 组相比,APL 组患者异常幼稚细胞 SSC 均偏大,显示细胞的细胞质颗粒较大,而非 APL 组中异常幼稚细胞细胞质颗粒较小,除去急性粒细胞白血病(M2 型)伴早幼粒细胞增多患者,此类患者因为异常原始细胞中混有早幼粒细胞,流式免疫分型也可以表现为 SSC 偏大。按照抗原的分化阶段不同分析发现,APL 组患者的异常幼稚细胞更加容易丢掉原始幼稚抗原 CD34 和 HLA-DR,与以往文献报道一致^[3],幼稚抗原 CD117 在两组中的阳性率比较接近,但是非 APL 组有更多的患者强表达 CD117,APL 组的 CD117 表达比较分散,稍弱一些。而泛髓系抗原 CD13 和 CD33 在两组中阳性表达率均很高,但 CD13 在 APL 组中表达比较集中,荧光更强。髓系成熟抗原 CD64、CD15 和 CD11b 在两组中也有着明显区别,CD64 在 APL 组阳性率更高,同时表达更强。而 CD15 和 CD11b 抗原在非 APL 组中表达率更高。值得注意的是,APL 组 30 例患者无一例表达 CD11b。按照抗原系别不同发现非 APL 组更容易伴有其他系别抗原的表达。B 系抗原 CD19 在本研究中的表达虽然差异无统计学意义,但是非 APL 组表达更多一点,也有文献报道过 CD19⁺更多见于 ETO⁺的 AML 患者^[7]。APL 组 30 例患者中,无一例表达 T 系抗原 CD7,而非 APL 组患者比较常见伴随表达 CD7,同样的,非 APL 组患者更多表达神经黏附因子 CD56,而非 APL 组患者则更少表达 CD56,这与文献报道一致^[8-10]。两组患者 CD2 的表达率均较低,且差异无统计学意义(*P* > 0.05),但是 APL 组中 CD2 与 CD34 出现表达一致性,即 4 例 CD2⁺患者的 CD34 均表达。有文献报道,APL 患者表达 CD2 和 CD34 提示高危^[11]。

相较于 APL 组患者,非 APL 患者免疫表型特点主要表现为低 SSC、CD34⁺ HLA-DR⁺ CD38⁺ CD33⁺ CD117⁺ CD64⁺,可同时伴有 CD9⁺ CD15⁺ CD11b⁺ 以及其他系别抗原 CD7⁺ CD56⁺ CD4⁺。在 AML 的免疫表型诊断中,综合分析及个体化分析尤为重要,因免疫表型可表现多种多样,无绝对规律遵循,如 CD34[−]与 HLA-DR[−]并不仅仅见于 APL 患者,也常见于 NPM1 突变阳性患者^[12-13]。如果 CD34[−]和 HLA-DR[−]的患者,同时该患者表型符合 AML 的免疫表型,在区分亚型时,结合 CD9 与 CD11b 的表达情况至关重要,若 CD9 表达阳性而 CD11b 阴性,并且 CD9 的荧光强度更强,那么诊断 APL 的可能性较大。近期有文献报道,CD9⁺结合 CD11b[−] HLA-DR[−]可以

帮助诊断 APL^[14-15], 与本研究结果相似, 同时本研究发现 CD64 的作用也非常重要, CD9⁺ CD64⁺ CD11b⁻ HLA-DR⁻ 综合判断对诊断 APL 具有重要参考意义。

综上所述, APL 的免疫表型与非 APL 相比有其独特特点, APL 患者免疫表型特点主要表现为表达高 SSC、CD13⁺ CD9⁺ CD38⁺ CD33⁺ CD117⁺ CD64⁺ CD11b⁻ CD34⁻ HLA-DR⁻, 可以为临床提供快速诊断, 为患者的早期治疗提供帮助。

参考文献

[1] 沈志祥, 王鸿利, 胡翊群. 血液疾病诊断学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 114-135.

[2] 许文荣, 王建中. 临床血液学与检验[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 259-260.

[3] 刘茵, 陈苑婷, 李俊勋. 71 例急性早幼粒细胞白血病患者白血病细胞免疫表型分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(4): 806-811.

[4] 李军民, 任雨虹. 急性早幼粒细胞白血病出血并发症的机制及治疗进展[J]. 临床血液学杂志, 2015, 28(3): 190-193.

[5] 陈芳, 胡延平, 王孝会. 急性早幼粒细胞白血病免疫表型特点[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(2): 321-325.

[6] WEIR E G, BOROWITZ M J. Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia[J]. Semin Hematol, 2001, 38(2): 124-138.

[7] 边程, 何平, 王畅. AML1-ETO 阳性急性髓系白血病 CD19 的表达及其预后的意义[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(12): 1809-1814.

[8] GORCZYCA W. Acute promyelocytic leukemia: four dis-

tinct patterns by flow cytometry immunophenotyping[J]. Pol J Pathol, 2012, 63(1): 8-17.

[9] ROHRS S, SCHERR M, ROMANI J, et al. CD7 in acute myeloid leukemia: correlation with loss of wild-type CEB-PA, consequence of epigenetic regulation[J]. J Hematol Oncol, 2010, 14(3): 15-19.

[10] CHANG H, BRANDWEIN J, YI Q L, et al. Extramedullary infiltrates of AML are associated with CD56 expression, 11q23 abnormalities and inferior clinical outcome[J]. Leuk Res, 2004, 28(10): 1007-1011.

[11] TESTA U, LO-COCO F. Prognostic factors in acute promyelocytic leukemia: strategies to define high-risk patients[J]. Ann Hematol, 2016, 95(5): 673-680.

[12] 王迪, 肖敏, 朱莉. NPM1 基因突变的急性髓系白血病免疫表型研究[J]. 淋巴瘤·白血病, 2012, 21(4): 193-196.

[13] SCHNITTGER S, SCHOCH C, KERN W, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype[J]. Blood, 2005, 106(12): 3733-3739.

[14] HORNA P, ZHANG L, SOTOMAYOR E M, et al. Diagnostic immunophenotype of acute promyelocytic leukemia before and early during therapy with all-trans retinoic acid[J]. Am J Clin Pathol, 2014, 142(4): 546-552.

[15] REN F, ZHANG N, XU Z, et al. The CD9⁺ CD11b⁻ HLA-DR⁻ immunophenotype can be used to diagnose acute promyelocytic leukemia[J]. Int J Lab Hematol, 2019, 41(2): 168-175.

(收稿日期: 2019-09-20 修回日期: 2020-03-08)

(上接第 1668 页)

burden of disease study 2013 [J]. Lancet, 2015, 385(9963): 117-171.

[4] AFDHAL N H, NUNES D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review[J]. Am J Gastroenterol, 2004, 99(6): 1160-1174.

[5] JAMALI R, ARJ A, RAZAVIZADE M, et al. Prediction of nonalcoholic fatty liver disease via a novel panel of serum adipokines[J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(5): e2630.

[6] DONG Z X, SU L, ESMAILI S, et al. Adiponectin attenuates liver fibrosis by inducing nitric oxide production of hepatic stellate cells[J]. J Mol Med, 2015, 93(12): 1327-1339.

[7] HAGHGOO S M, SHARAFI H, ALAVIAN S M. Serum cytokines, adipokines and ferritin for non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic liver disease: a systematic review[J]. Clin Chem Lab Med, 2019, 57(5): 577-610.

[8] JAMALI R, RAZAVIZADE M, ARJ A, et al. Serum adipokines might predict liver histology findings in non-alcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(21): 5096-5103.

[9] KALAFATELI M, TRIANTOS C, TSOCHATZIS E, et al. Adipokines levels are associated with the severity of liver disease in patients with alcoholic cirrhosis [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(10): 3020-3029.

[10] BUECHLER C, HABERL E M, REIN-FISCHBOECK L A. Adipokines in liver cirrhosis[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(7): e1392.

[11] PRYSTUPA A, BOGUSZEWSKA-CZUBARA A, BOJARSKA-JUNAK A, et al. Activity of MMP-2, MMP-8 and MMP-9 in serum as a marker of progression of alcoholic liver disease in people from Lublin Region, Eastern Poland[J]. Ann Agr Env Med, 2015, 22(2): 325-328.

[12] 闫瑞斌, 马淑梅, 卓玛. 慢性乙型肝炎患者血清 MMP-2 和 TIMP-2 水平及超声检查指标评估肝纤维化分期意义探讨[J]. 实用肝脏病杂志, 2019, 22(4): 506-509.

[13] MADRO A, CZECHOWSKA G, SLOMKA M, et al. The influence of serum MMP-2 activity on the development or liver fibrosis in patients with alcoholic liver cirrhosis[J]. Gastroenterology, 2011, 140(5 Suppl 1): S461-S467.

(收稿日期: 2019-10-09 修回日期: 2020-04-07)