论著

文章编号:1000-5404(2006)05-0472-03

71例儿童急性髓系白血病多参数流式细胞术免疫表型分析

苏庸春,李 欣,于 洁,戴碧涛,徐酉华,肖剑文 (重庆医科大学儿童医院血液/肿瘤科,重庆 400014)

提 要:目的 为了解儿童急性髓系白血病(acute myeloid leukemia,AML)免疫表型特征,分析儿童AML不同亚型抗原表达的差异,并探讨其诊断价值。**方法** 采用三色FCM CD45/SSC双参数散点图设门方法,对71例患者幼稚细胞表面及胞浆内分化抗原进行分析,结合FAB分类进行比较分析。**结果** 在儿童急性髓系白血病患者中,CD33和CD13的表达最常见,分别达97.2%和94.4%,其次为HLA-DR(69%)。57.7%的病例伴有淋系抗原表达,以CD19表达最常见(36.6%),其次为CD7(28.2%),未见CD20的表达。3例M_0患儿经免疫分型确诊。**结论** 结合FAB分类,多参数流式细胞术有助于对AML的准确诊断和分型。FAB不同型别具有不同的免疫表型特征。

关键词:急性髓系白血病;免疫表型;多参数流式细胞术;儿童

中图法分类号:R392.11;R446.6;R733.71 **文献标识码**:A

Immunophenotypic analysis of acute myeloid leukemia in 71 children by multi-color flow cytometry

SU Yong-chun, LI Xin, YU Jie, DAI Bi-tao, XU You-hua, XIAO Jian-wen (Department of Hematology and Oncology, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To study the characteristics and distribution of childhood acute myeloid leukemia (AML) antigen expressions. Methods The cell-surface and cytoplasmic antigen expressions in 71 AML children were analyzed with multiparameter flow cytometry and CD45/SSC gating. All patients admitted to our hosopital from Nov 2001 to Jun 2005, 50 male and 21 female, aged 2 months to 14 years (average 6.5 years). The results were compared with the French-American-British (FAB) Cooperative Group classification: M_0 3 cases, M_1 10 cases, M_2 22 cases, M_3 4 cases, M_4 2 cases, M_5 28 cases, M_6 2 cases, M_7 none. Results Among the 71 cases of AML, CD33, CD13 and HLA-DR were the most commonly expressed antigen (97.2%, 94.4% and 69% respectively). The lymphoid antigen was positive in 57.7% of cases, with the highest frequency of CD19 (36.6%) followed by CD7 (28.2%). There was no CD20 expression among these patients. Three M_0 patients were confirmed by immunophenotypic analysis. Conclusion The immunophenotype analysis of AML combined with FAB classification may help in AML diagnosis and typing. Some immunophenotypic features are correlated with FAB type.

Key words: acute myeloid leukemia; immunophenotype; multiparameter flow cytometry; childhood

儿童急性白血病(acute leukemia,AL)是由于造血细胞分化阻滞并克隆性增生所致的恶性疾病,免疫分型不仅可以识别白血病细胞的系列来源,以及所处的分化阶段,而且某些抗原表达及亚型与预后有密切的关系[1]。现今流式细胞术(flow cytometry, FCM)免疫表型分析已成为AL诊断和分型的重要工具。FCM CD45/侧散射双参数散点图设门方法可清楚地识别白血病细胞克隆,排除了正常细胞对免疫分型的影响,使得白血病免疫分型结果更为准确可靠。我们应用三色FCM CD45/SSC双参数散点图设门方法对2001年11月至2005年6月来本院就诊的71例儿童急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者进行了较全面的免疫表型分析,并结合FAB形态学分类比较了不同亚型中抗原表达的差异。现将结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 病例选择

2001年11月至2005年6月来本院就诊并送检免疫分型的患者共71例,男性50例,女性21例;年龄2个月至14岁,中位年龄6.5岁。按FAB标准分类,M_0 3例,M_1 10例,M_2 22例,M_3 4例,M_4 2例,M_5 28例,M_6 2例,无M_7病例。

1.2 主要试剂

所用标准单克隆抗体(MoAb)包括异硫氰酸荧光素

作者简介:苏庸春(1971-),男,四川省渠县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事血液肿瘤性疾病发病机制方面的研究。电话:(023)63632756-3685;E-mail:yongchun_su@163.com

收稿日期:2005-09-14;修回日期:2005-10-16

(FITC)、藻红蛋白(PE)、CD10、CD19、CD20、CD22、CD2、CD5、CD7、CD13、CD33、CD34、CD117、TdT、PE-Cy5、HLA—DR 以及同型对照 IgG、溶血素、透膜剂等，均购自美国 Becton-Dickinson (BD)公司。

1.3　细胞膜和细胞质内抗原的荧光标记

化疗前采集骨髓，肝素抗凝，用磷酸盐缓冲液(PBS 0.01 mol/L pH 7.4)适当稀释骨髓备用。抗体组合 FITC-IgG1/PE—IgG1/CD45，CD10/CD19/CD45，CD33/CD7/CD45，HLA-DR/CD13/CD45，CD34/CD117/CD45，CD5/CD20/CD45，CD22/CD2/CD45，CD14/CD64/CD45。各管上述抗体和稀释后骨髓[控制细胞量 $5\times(10^5\sim10^6)$]混匀后，室温避光孵育 20 min，再向各试管中加入 BD 溶血素 500 μl，混匀置室温避光，10 min 后离心去上清，用 1 ml PBS 洗涤细胞 1 次；TdT 的检测为稀释骨髓溶血后再加 PSI 透膜剂(美国 BD 公司)，10 min 后用 PBS 洗涤细胞再进行胞内抗原染色。所有样本最终加入 200 μl PBS 重悬，上流式细胞仪检测。

1.4　流式细胞术分析

用 FACsCaLibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)和 CeLLQuest 软件获取并分析 10 000 个细胞。通过 CD45/SSC 设门识别幼稚细胞群，再分析计算该幼稚细胞群各白血病相关抗原的阳性率。即根据 CD45 表达程度和 SSC 颗粒度大小确定幼稚细胞群，通过二维表型图谱，分析其抗原表达情况。结果判断以白血病细胞表面抗原阳性率≥20% 为阳性[2]。

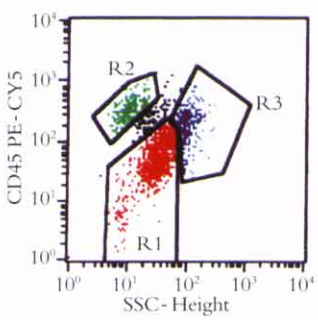
2　结果

2.1　形态学分型特点

71 例 AML 中，以 M_5 型最常见，占 39.4%，其次为 M_2 型，占 31%。本组病例中 3 例 M_0 患者，最初形态学分类均为 ALL-L_2 型，POX 染色均阴性，而免疫分型显示均表达 CD13、CD33，除 2 例表达 CD7 外无其他淋系抗原的表达，最后根据免疫分型结果定为 M_0 型。

2.2　CD45/SSC 设门的 FCM 检测结果

CD45/SSC 双参数散点图设门方法所得到白血病免疫分型结果见图 1。采用该方法可以较清楚地将白血病细胞群与骨髓正常粒细胞、单核细胞、有核红细胞及淋巴细胞辨别开来。71 例儿童急性髓系白血病细胞比例为 68.6% ~98.4%，与形态学结果(65% ~97%)基本一致，最大误差 <5%。



R1：幼稚细胞；R2：淋巴细胞；R3 成熟粒细胞

图 1　CD45、SSC 设门的三色 FCM 免疫分型检测结果

2.3　FAB 各亚型免疫表型特征及主要抗原的表达特点

采用 FAB 分型法各亚型的免疫表型特征见表 1，主要抗原的表达特点如下。

表 1　儿童急性髓系白血病免疫表型特征

抗原	M_0	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5	M_6	合计(%)
CD34	1/3	4/10	18/22	0/4	2/2	6/28	1/2	32/71(47.9)
HLA-DR	2/3	7/10	18/22	2/4	2/2	17/28	1/2	49/71(69.0)
CD117	2/3	9/10	18/22	1/4	2/2	14/28	1/2	47/71(62.2)
CD13	3/3	10/10	21/22	4/4	2/2	25/28	2/2	67/71(94.4)
CD33	3/3	9/10	22/22	4/4	2/2	27/28	2/2	69/71(97.2)
CD14	0	0/2	1/5	0	0	0/2	0	1/9(11.1)
CD64	0	0/2	0/5	0	0	2/2	0	2/9(22.2)
CD2	0/3	0/10	1/22	1/4	0/2	1/28	0/2	3/71(4.2)
CD7	2/3	4/10	8/22	0/4	0/2	4/28	0/2	20/71(28.2)
CD10	0/3	0/10	1/22	0/4	0/2	1/28	0/2	2/71(2.8)
CD19	0/3	6/10	10/22	0/4	1/2	9/28	0/2	26/71(36.6)
CD20	0/3	0/10	0/22	0/4	0/2	0/28	0/2	0/71(0)
CD22	0/3	0/10	1/22	0/4	0/4	1/28	0/2	2/71(2.8)
TdT	0/2	0/1	1/9	0	0	0/3	0	4/15(6.7)

2.3.1　造血细胞主要早期抗原在 AML 中的表达　CD34 和 HLA-DR 在 AML 中总的表达率分别为 47.9% 和 69.0%，由于在 M_3 中 CD34 无阳性表达，因而在非 M_3 的 AML 中表达阳性率就达 50.7% 和 70.1%。其中 CD34 在 M_2 和 M_1 中表达最高，在 M_3 中无表达。相对于 CD34 而言，CD117 在 AML 中表达更为广泛，达 66.2%。其中 M_3 中表达率相对较低(25%)，M_1 中表达最高(90%)。

2.3.2　髓系相关抗原在 AML 中的表达　在所有 AML 患者中，CD13 和 CD33 的表达阳性率分别为 94.4% 和 97.2%。除 M_1、M_5 外，其余类型 AML 均表达 CD13 和 CD33。进行了 CD14 和 CD64 检测的 9 例病例中，1 例 M_2 型患儿 CD14 阳性，2 例 M_5 型 CD64 阳性。

2.3.3　淋巴相关抗原和 TdT 在 AML 中的表达　本组病例中，伴有淋系相关抗原表达的病例有 41 例，占 57.7%。其中以 CD19 表达最常见，阳性率为 36.6%，该抗原以 M_1 及 M_2 中表达较高，分别为 60% 和 45.5%。其次为 CD7，3 例 M_0 2 例 CD7 阳性，该抗原在 M_1、M_2 中阳性率分别达 40% 及 36.4%。CD2、CD10、CD22 的表达极低，未见 CD20 的表达。在进行了 TdT 检测的 15 例病人中，仅 1 例 M_2 表达 TdT。

3　讨论

近年来白血病/淋巴瘤的免疫分型已成为诊断血液恶性肿瘤的重要标准之一。目前国内外均主张采用 FCM CD45/SSC 双参数散点图设门方法进行白血病免疫分型，采用此法可将骨髓细胞清晰地分出淋巴细胞、单核细胞、成熟粒细胞、幼稚细胞和有核红细胞群，这样可以排除正常细胞对免疫分型的干扰，从而提高了

免疫分型的准确性。采用流式细胞术有助于白血病亚型的诊断，特别对用形态学、细胞化学染色不能肯定细胞来源时及杂合性白血病。本组病例中3例M_0患者，最初形态学分类均为ALL-L_2型，最终根据免疫分型结果及M_0型诊断标准[3]改定为M_0型，这也充分显示了免疫分型对于AML诊断的重要性。此外，在AML治疗过程中，包括初次诱导治疗以及形态学缓解后的流式细胞术监测对患者的复发以及总的无病生存率均有独立的预后判断意义[4,5]。因此，流式细胞术对于AML的临床治疗尤其是个体化治疗方面也有极其重要的指导意义。

髓系白血病是造血系统的恶性肿瘤，尽管在形态上变化相当大，仍能表达正常血细胞所具有的抗原，因而仍可依据其抗原的表达谱对其进行免疫分型。但是，由于白血病细胞具有肿瘤细胞的特征，其抗原表达又不完全同于正常血细胞，常可出现某些抗原表达缺乏、过度表达、交叉表达某一系列或阶段不应有的抗原，因此，髓系白血病细胞在免疫表型方面也具有其自身的一些特征。

髓系相关抗原的表达反映了髓系白血病细胞的起源，但并不能完全代替细胞的成熟程度，目前对CD34有了一定共识，都认为CD34为造血干细胞标志，CD34表达与AML分化形式相关，且在M_1和M_2型往往有较高的表达率[6]。本组病例中CD34在M_1和M_2阳性率分别为40%和81.8%，与Porwit等[6]报道的结果一致。作为另一造血系统早期抗原，HLA-DR在M_3表达频率较低[7]，国内翟志敏等[8]也报道24例成人M_3 HLA-DR均阴性，本组4例M_3患者有2例表达HLA-DR，虽表达频率仍明显低于其他类型AML，但却高于前述文献报道，分析原因可能与本组病例中M_3例数少且均为儿童病例有关。但总之，HLA—DR阴性对于AML M3的诊断仍具有一定参考价值。作为髓系早期抗原，CD117在正常各类髓系细胞的阳性率极低，一般小于4%，故CD117的表达有助于髓系白血病克隆的识别，其特异性较CD13和CD33更强[2]。本研究资料中CD117的阳性率为66.2%，且以M_1和M_2中阳性率最高，分别达90%和81.8%，与国内另一作者报道相一致[9]，因此，CD117阳性对于诊断髓系白血病尤其对M_1和M_2具有较高的敏感性。

关于淋系抗原在AML中的表达率各家报道不一，多数报道AML中淋系抗原的表达率界于16%～22%之间[10]，国内有淋系抗原表达阳性率为40%的报道[11]，均是以CD7的表达最常见。本研究中，淋系抗原表达阳性率为57.7%，高于上述报道，且以CD19表达最常见，分析其可能原因是本组均为儿童病例，且样本量以及FAB分型构成比方面均与报道有所不同所致。

总之，本研究资料表明：在儿童髓系白血病中，CD33及CD13阳性率最高，淋系抗原以CD19最常见；结合FAB分类，流式细胞术有助于对AML的准确分型，随着该项技术的广泛应用，在白血病个体化治疗方面也将发挥重要作用。

参考文献：

[1] TALLMAN M S. Relevance of pathologic classifications and diagnosis of acute myeloid leukemia to clinical trials and clinical practice[J]. Cancer Treat Res, 2004,121(1): 45－67.

[2] BENE M C, BERNIER M, CASASNOVAS R O, *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.

[3] KALEEM Z, WHITE G. Diagnostic criteria for minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). Evaluation and a proposal[J]. Am J Clin Pathol, 2001,115(6): 876－884.

[4] SIEVERS E L, LANGE B J, ALONZO T A, *et al*. Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2003, 101(9): 3398－3406.

[5] SAN-MIGUEL J F, VIDRIALES M B, LOPEZ-BERGES C, *et al*. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification[J]. Blood, 2001, 98(6): 1746－1751.

[6] PORWIT-MACDONALD A, JANOSSY G, IVORY K, *et al*. Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. IV. CD34 overexpression in acute myelogenous leukemia M2 with t(8;21) [J]. Blood, 1996, 87(3): 1162－1169.

[7] GUGLIELMI C, MARTELLI M P, DIVERIO D, *et al*. Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukaemia: correlation with morphology, type of PML gene breakpoint and clinical outcome. A cooperative Italian study on 196 cases[J]. Br J Haematol, 1998, 102(4): 1035－1041.

[8] 翟志敏，何晓东，戴海明，等. 112例成人急性白血病免疫分型[J]. 中华血液学杂志，2001，22(12)：633－635.

[9] 王兴兵，姚军霞，郑金娥，等. 115例急性髓细胞白血病多参数流式细胞术免疫表型分析[J]. 中国实验血液学杂志，2005，13(2)：250－253.

[10] AUEWARAKUL C U, PROMSUWICHA O, U-PRATYA Y, *et al*. Immunophenotypic profile of adult acute myeloid leukemia (AML): analysis of 267 cases in Thailand[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2003, 21(3): 153－160.

[11] 高怡瑾，吴 玥，陈笑韵，等. 160例儿童急性白血病免疫表型分析[J]. 中国当代儿科杂志，2004，6(1)：30－33.

（编辑 汪勤俭）