文章编号:1000-5404(2010)24-2661-03

短篇论著

流式细胞仪分析76例成人急性粒细胞白血病免疫分型特点

张可珺,帖儒修,陈 伟,邓少丽,陈 鸣 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科)

【摘要】 目的 探讨流式细胞仪在急性粒细胞白血病(acute myeloid leukemia,AML)免疫分型中的特点和规律。**方法** 利用流式细胞术中CD45/SSC双参数散点图设门法,对四色荧光素(FITC、PE、PC5、ECD)标记的骨髓血细胞免疫表型分析。取初发患者骨髓单细胞悬液100μl加入到测试管中,再加入特定抗体,室温避光1 h,然后经溶血处理,上机检测。每管均设置同型对照。**结果** 在76例AML中,髓系相关抗原MPO、CD33、CD65表达最高,总阳性率分别为96.1%、94.7%和93.4%,CD13、CD15、CD16的表达率较低,总阳性率分别为50.0%、63.2%和89.5%;CD14、CD64在M4、M4EO、M5中阳性率最高;CD41、CD61在M7中的阳性率最高;CD34在M1和部分M2中强表达,但总阳性率约为46.1%。**结论** 本研究成功分析不同亚型AML的CD45/SSC散点图异常细胞分布的特定位置,同时结合各种不同系列分化特异性抗原的表达综合分析,实现与FAB法在AML分型比较符合率高达97%。

【关键词】 白血病;流式细胞术;免疫分型
【中图法分类号】 R446.6;R733.71 **【文献标志码】** A

细胞免疫表型分析是从分子水平对血液恶性肿瘤进行分型诊断、预后评估的一种方法。与该类疾病诊断用的金标准FAB法比较,流式细胞术(flow cytometry, FCM)具有大量收集细胞,对该群细胞进行分类和细胞膜及胞内蛋白质进行定量分析的独特优势[1-2]。但FCM应用临床以来,对急性粒细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)分型诊断不够全面,不够规范,本研究应用CD45/ SSC法设门,用四色荧光通道的FCM检测76例AML分化抗原表达和散点图分布特征及与FAB分型进行比较。

1 资料与方法

1.1 标本来源

76例骨髓标本来自第三军医大学大坪医院野战外科研究所血液科在2008年1月至2010年3月的初诊住院患者,其中男性36例,女性40例,年龄为20~79岁,中位年龄55岁。所有病例为FAB法和临床诊断确诊病例。

1.2 标本采集

标本采集均按无菌操作规程,取患者髂后上棘位骨髓液3~5 ml(无菌),用EDTA-K_2钾抗凝,30 min内送检验科。

1.3 荧光抗体标记

所有单克隆抗体均购自Backman Coulter公司,所有标本均采用四色直接免疫荧光标记法。具体操作步骤见文献[1]。本研究选用髓系相关的cMPO、CD33、CD65、CD13、CD15、CD16、CD14、CD64、CD41、CD61、CD71、CD235a和系列非相关性的CD34、CD45等荧光标记的特异性单克隆抗体。抗体组合设计为:①cMPO-FITC + cCD22-PE + CD45-PC5;②CD65-FITC + CD15-PE + CD45-PC5;③CD14-ECD + CD33-FITC + CD45-PC5;④CD61-FITC + CD41-PE + CD45-PC5;⑤CD64-FITC + CD45-PC5;⑥CD13-FITC + CD45-PC5;⑦CD16-FITC + CD45-PC5;⑧CD235a-FITC + CD71- PE + CD45-PC5;⑨CD38-FITC + CD34-PE + CD45-PC。

1.4 流式细胞仪及试剂

仪器为美国Beckman Coulter公司生产的EPICS XL型流式细胞仪,激光波长为488 nm,输出功率200 mW,检测前先用荧光微球进行常规光路校正及调整荧光补偿。检测时以CD45/SSC双参数散点图设门,每测定管收集10 000个细胞,以线性放大器(LIN)收集前向角散射光(FSC)侧向角散射光(SSC)信号,以对数放大器(LOG)收集荧光信号FL1(530 nm)、FL2(585 nm)、FL3(625 nm),FL4(675nm)。测量数据和图形输入G4Apple计算机,应用Cell Quest程序软件进行信号处理。所有荧光直标(FITC、PE、ECD、PC5)抗体、破膜剂Reagent Ⅰ\Ⅱ、溶血剂等试剂均购自美国Beckman Coulter公司。

1.5 同型对照的设置

本研究中所选用的同型对照为人IgG1-PE/IgG1-FITC/IgG1-PC5,即以该种抗体混合物对所分析的骨髓细胞进行标记,排除特异性抗体的非特异性结合,检测时利用同型对照结果调试电压和补偿,将不同抗体的非特异性结合排除为零。

2 结果

2.1 76例AML患者骨髓白细胞免疫分型

由表1可见,76例AML中,大部分类型中cMPO、CD33和CD65都呈阳性,只有M7时为阴性,该3项指标总阳性率依次为96.1%、94.7%和93.4%;其次为CD13、CD15、CD16,这3项指标在AML中的阳性率较低,其中CD16的阳性率最高,该3项指标总阳性率依次为50.0%、63.2%和89.5%;CD14、CD64在M4、M4EO及M5中都呈阳性,CD64偶尔会在少数M2中阳性表达,由于这3型AML较M2少见,因此以上2项指标总阳性率有所下降,分别为10.5%和14.5%;CD41、CD61在M7中都呈阳性表达;M6是极为少见AML,其中CD71、cMPO、CD33都呈阳性表达,但CD235a为阴性;CD34只有在M1中阳性表达率最高,而在M2中只有约52%,在其他型中的阳性率更低,其总阳性率约为46.1%。

【通信作者】 陈 鸣,电话:(023)68757601,E-mail:chenming1971@yahoo.com

表 1　76 例成人 AML 患者各亚型主要抗原的表达(%)

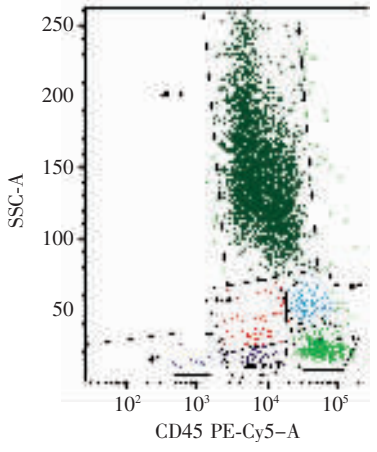
FAB 分型	例数	MPO	CD33	CD65	CD15	CD13	CD16	CD14	CD64	CD41	CD61	CD71	CD235a	CD34
M1	1	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	100
M2	58	100	96.6	100	48.3	65.5	100	0	5.2	0	0	0	0	51.7
M3	5	100	100	80.0	20.0	40.0	20.0	0	0	0	0	0	0	40.0
M4	3	100	100	100	100	33.3	100	100	100	0	0	0	0	33.3
M4EO	1	100	100	100	100	0	100	100	100	0	0	0	0	0
M5	4	100	100	100	75.0	75.0	100	100	100	0	0	0	0	25.0
M6	1	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
M7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	100	66.7	0	0	0
总阳性率		96.1	94.7	93.4	50.0	63.2	89.5	10.5	14.5	3.9	2.6	1.3	0	46.1

2.2　76 例成人 AML 免疫分型与 FAB 分型的比较

经统计分析,FCM 分型与 FAB 分型符合率达 97%。

2.3　正常成人骨髓检测 CD45/SSC 双参数散点图与异常细胞群的鉴定

2.3.1　正常骨髓检测 CD45/SSC 散点图特点　　正常骨髓检测的 CD45/SSC 散点图,见图 1。



granulocyte 指粒细胞,包括幼稚和成熟粒细胞;blast 指髓系原始细胞,monocyte 指各种分化阶段的单核细胞,lymphocyte 指成熟淋巴细胞,normal preB 指前体 B 细胞,RBC 指有核红细胞

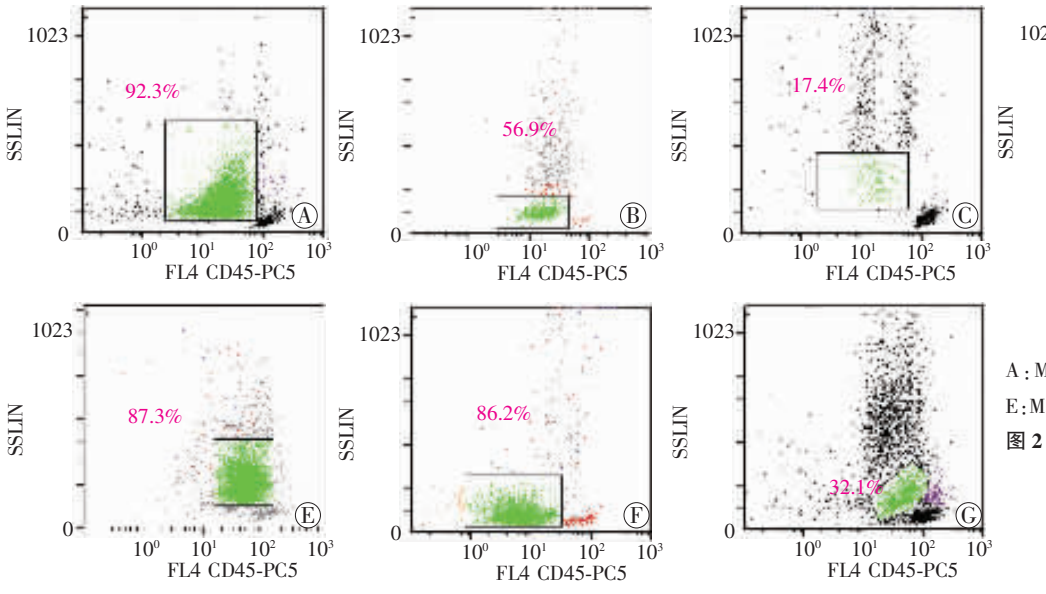
图 1　正常成人 CD45/SSC 双参数散点图分布特点

各型 AML 的 CD45/SSC 散点图分别与正常者该图比较找到异常细胞群,并对该群细胞的特异性抗原表达量进行分析。与正常同型对照相比,该指标有表达时即为阳性。

2.3.2　异常细胞群的鉴定　　异常细胞群均设置为 A 门中,在 CD45/SSC 散点图中位于原始细胞区,而只有 M3 中,异常幼稚粒细胞在粒细胞区。异常原始细胞占收集总细胞数量百分比均符合 FAB 法对 AML 分型的标准。其中,M1 中原始粒细胞大于骨髓非红系有核细胞(NEC)的 90%;M2 中原始粒细胞占 NEC 比例介于 30% ~89%;M3 中以早幼粒细胞为主,该类细胞在 NEC 中大于 30%,该型缺乏增多原始粒细胞;M4 是以原始粒细胞与不同分化阶段单核细胞共同增多为特点,其中各阶段原始单核细胞占 A 门中总细胞数的 20% 以上;M5 中各阶段单核细胞占 NEC80% 以上;M6 中 A 门细胞包括幼稚红细胞和原始粒细胞等,其中幼稚红细胞在 50% 以上;M7,原始巨核细胞大于 30%。见图 2。

3　讨论

目前,国内外均少有完整的关于 AML 的免疫分型结果,而且国外很少利用散点图分布特点进行分析,而本研究将以 CD45\SSC 为参数分析散点图的分布特点,结合各种特异性抗原表达变化来综合分析,形成了完整、准确的 AML 免疫分型诊断方法。



A:M1; B:M2; C:M3; D:M4; E:M5; F:M6;G:M7

图 2　76 例 AML 患者各型 CD45/SSC 双参数散点图分布特点

分析对 AML 免疫分型诊断所用指标价值的大小十分重要[3]。cMPO 在各型 AML 诊断中的价值最大，阳性率达 100%，该指标随着在粒细胞和单核细胞中都表达，而且细胞越成熟，表达越高；其次为 CD33 和 CD65，阳性率同样很高，CD33 在 M3 中阳性表达率最高，对该型诊断有较高价值[4]；但在 M7 时，cMPO、CD33 和 CD65 都可呈阴性表达；此外，在 M6 时，cMPO 与 CD33 常为阳性表达；CD33 在 M2 中表达略低于 M3，在 M5、M7 表达也较低，与理论认识中在非成熟粒细胞表达较高保持相一致[5]；CD65 表达与 cMPO 相似，细胞越幼稚表达越低；CD13、CD15 在 AML 中的价值较低，其阳性率较低，且无稳定规律表达，目前认为，CD15 和 CD16 在较为成熟粒细胞表达，尤其是 CD16 常可作为判断粒细胞成熟度的较好指标，CD14 和 CD64 在诊断 M5 和 M4 中的价值最大[6]，CD14 的特异性强于 CD64，后者还偶表达于受特定刺激的中性粒细胞膜表面，由于 M5 和 M4 较为少见，因此在本研究 AML 中阳性率都较低[7]；CD41 和 CD61 对诊断 M7 价值很大，特别是 CD41 表达量较高，但其阳性率与 CD61 表达相一致[8]。特别指出 CD34 表达在 M1 表达较高，其他型 AML 中表达都较低，在总 AML 患者阳性率为 48.6%，这就意味着仍有约 50% 的 AML 患者其骨髓血细胞 CD34 表达并不增高，或分析时错过增高时期[9]。

FCM 免疫分型与 FAB 分型在 AML 诊断中符合率均很高，基本实现了应用 FCM 对 AML 进行免疫分型，不再依赖 FAB 分型方法；而且随着新的特异性 CD 分子的不断发现，FCM 检测可以实现对 AML 进行更为细致的分型，这必将更有利于实现 AML 的个性诊断和治疗[10]。

表型的跨系表达或双表型在 FCM 检测中较为常见，本研究发现，在 AML 中常有 CD2、CD7 的表达[11]，阳性率均为 1.5%。表型的跨系表达或双表型是 FAB 诊断方法无法实现的，通常作为评价预后不良的指标。因此，FCM 免疫分型在判断 AML 预后更具有独特优势。

综上所述，利用 FCM 进行白血病细胞免疫分型已经成为血液恶性肿瘤诊断不可或缺的基本手段之一，是对 FAB 分型的补充和细化，特别是对预后的判断和指导个性治疗等方面具有明显的优势[12-13]，并为 AML 临床和基础研究提供更为详细和确切的证据。

参考文献：

[1] Wood B L, Arroz M, Barnett D, *et al*. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2007, 72(Suppl 1): S14 - S22.

[2] 张诚，陈幸华，张曦，等. 急性混合细胞白血病诊断及疗效的临床研究[J]. 第三军医大学学报，2007，29(19)：1896 - 1899.

[3] 邱阳，刘越坚，郭慧淑，等. 流式细胞术在 159 例急性白血病免疫分型中的应用[J]. 中国实验诊断学，2009，13(1)：103 - 105.

[4] Craig F E, Foon K A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms[J]. Blood, 2008, 111 (8): 3941 - 3967.

[5] Scallon B J, Snyder L A, Anderson G M, *et al*. A review of antibody therapeutics and antibody-related technologies for oncology[J]. Immunother, 2006, 29(4): 351 - 364.

[6] Krasinskas A M, Wasik M A, Kamoun M, *et al*. The usefulness of CD64, other monocyte-associated antigens, and CD45 gating in the subclassification of acute myeloid leukemias with monocytic differentiation[J]. Am J Clin Pathol, 1998, 110(6): 797 - 805.

[7] Dunphy C H, Orton S O, Mantell J. Relative contributions of enzyme cytochemistry and flow cytometric immunophenotyping to the evaluation of acute myeloid leukemias with a monocytic component and of flow cytometric immunophenotyping to the evaluation of absolute monocytoses [J]. Am J Clin Pathol, 2004, 122(6): 865 - 874.

[8] Kussick S J, Stirewalt D L, Yi H S, *et al*. A distinctive nuclear morphology in acute myeloid leukemia is strongly associated with loss of HLA-DR expression and FLT3 internal tandem duplication[J]. Leukemia, 2004, 18(10): 1591 - 1598.

[9] Bhargava P, Kallakury B V, Ross J S, *et al*. CD79a is heterogeneously expressed in neoplastic and normal myeloid precursors and megakaryocytes in an antibody clone-dependent manner[J]. Am J Clin Pathol, 2007, 128(2): 306 - 313.

[10] Digiuseppe J A. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and detection of minimal residual disease following therapy[J]. Clin Lab Med, 2007, 27(3): 533 - 549, vi.

[11] Bene M C, Castoldi G, Knapp W, *et al*. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)[J]. Leukemia, 1995, 9(18): 1783 - 1786.

[12] Donnenberg A D, Donnenberg V S. Rare-event analysis in flow cytometry[J]. Clin Lab Med, 2007, 27(3): 627 - 652, viii.

[13] Rawstron A C, de-Tute R, Jack A S, *et al*. Flow cytometric protein expression profiling as a systematic approach for developing disease-specific assays: identification of a chronic lymphocytic leukaemia-specific assay for use in rituximab-containing regimens[J]. Leukemia, 2006, 20(12): 2102 - 2110.

（收稿：2010-07-22 修回：2010-08-28）
（编辑 王 红）