临床研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1761-04

113 例急性髓细胞白血病细胞形态学及免疫表型分析

钟辉秀,殷明刚,杨新春
(自贡市第一人民医院检验科,自贡 643000)

【摘 要】目的:探讨细胞形态学(包括细胞化学)、免疫表型及二者联合分析对初诊急性髓细胞白血病(Acute myeloid leukemia,AML)的诊断价值,以指导流式细胞术对 AML 的诊断工作,提高诊断分型准确率。方法:回顾性分析已确诊的 113 例 AML 患者的细胞形态学与免疫表型结果。免疫表型采用流式细胞术,用 23 种荧光标记单克隆抗体(McAb)测定白血病细胞的抗原表达。结果:①形态学分型与最终诊断符合率为 79.4%,免疫表型分型与最终诊断符合率为 85.3%,二者联合分析与最终诊断符合率为 96.5%。②髓系抗原 CD117、CD13、CD33 可在各型中高表达,无特异性;cMPO 可在除 M_0 的各型中高表达;CD14、CD64 在 M4、M5 中高表达;CD34 及 HLADR 在 M_3 中低表达;各型 AML 均可见淋系抗原表达,主要是 CD4、CD7、CD9、CD10、CD19、CD56。结论:AML 患者细胞抗原表达复杂,异质性强,多个抗原综合分析及 SSC/CD45 散点图上的细胞分布特征,有助于判断白血病细胞的来源、种类与阶段;流式细胞仪对白血病细胞的计数受多种因素影响,其百分比例不如形态学准确;联合应用细胞形态学与免疫表型分析,可以相互弥补,大大提高诊断与分型的准确率。

【关键词】急性髓细胞白血病;细胞形态学;细胞免疫表型;流式细胞术
【中国图书分类法分类号】R733.71 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-04-02

Immunophenotype and morphology in acute myeloid leukemia: an analysis of 113 cases

ZHONG Hui-xiu, et al
(*Department of chinical Laboratory, the First Hospital of Zigong*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the value of morphology, immunophenotype, and combined analysis of both for primary diagnosis of acute myeloid leukemia(AML). in order to conduct the diagnosis of AML by flow cytometry and raise the diagnostic accuracy. *Methods*: A retrospective study on cell morphology and immunophenotype of 113 cases of established AML was performed. Immunophenotype

作者介绍:钟辉秀(1968-),女,副主任检验师,
研究方向:各种血液病的形态学诊断及实验室检查。

野之间形成一道屏障,阻隔支配腮腺的神经向支配面部汗腺及毛细血管的神经错联吻合,虽然这些方法都获得了较好的效果,但这些方法往往较为复杂,增大了手术损伤,同时血肿、感染等并发症也增加。因此寻找一种简便易行、确切有效的方法,减少腮腺手术后 Frey's 综合征的发生,改进患者术后生活质量具有较大的临床意义。

海奥口腔修复膜是一种异种脱细胞真皮基质,经过脱细胞冷冻干燥形成的三维支架结构,其主要成分是胶原蛋白,因而具有极好的生物相容性,不具有免疫原性和毒性作用,它可通过空间诱导让创面的上皮细胞快速长入形成组织屏障,有效地阻止神经纤维的错位长入,以达到预防 Frey's 综合征的作用,同时在形成自身组织屏障后 3~6 个月其修复膜分解吸收。目前我们还未查见用口腔修复膜来预 Frey's 综合征的研究报道。本研究首次证明了在腮腺肿瘤术后植入口腔修复膜能显著降低术后 Frey's 综合征的发生,同时方法简单易行,在传统切口和创面的基础上不增加新的手术切口和创面,也没发现有其它任何毒副作用。因此,该方法具有较高的临床应用价值,值得推广应用。

参 考 文 献

[1] Santos R C, Chagas J F, Bezerra T F, et al. Frey syndrome prevalence after partial parotidectomy[J]. Braz J Otorhinolaryngol, 2006, 72(1): 112-115.

[2] 张德保,吕 洁. 改良腮腺良性肿瘤切除术后并发症分析[J]. 南华大学学报医学版, 2008, 36(2): 212-213.

[3] Ferreira P C, Amarante J M, Rodrigues J M, et al. Parotid surgery: review of 107 tumors(1990-2002)[J]. Int Surg, 2005, 90(3): 160-166.

[4] 周晓萍,张茹慧. 味觉出汗综合征的治疗与预防[J]. 口腔医学, 2005, 25(5): 314-315.

[5] Foustanos A, Zavrides H. Face-lift approach combined with a superficial musculoaponeurotic system advancement flap in parotidectomy[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2007, 45(8): 652-655.

[6] Wille-Bischof berger A, Rajan G P, Linder T E, et al. Impact of the SMAS on Frey's syndrome after parotid surgery: A prospective, long-term study[J]. Plast Recomtr Surg, 2007, 120(6): 1519-1523.

(责任编辑:张学颖)

analysis was carried out by flow cytometry, and 23 kinds of immune fluorescence marked McAb were used to detect the antigen expression of leukemia cells. *Results*: The coincidence between the morphology type and the final diagnosis was79.4%, that between immunophenotype and the final diagnosis was 85.3%. When morphology type and immunophenotype were combined, the final coincidence rate was 96.5%. The expression rates of modularly system antigen CD117, CD13, and CD33 were high, but with no specificity. cMPO was expressed in almost each morphology type except M0. The expressions of CD14 and CD64 in type M4 and M5 were higher than those in other types. The expressions of CD34 and HLADR in type M3 were lower than those in other types. Lymphatic system antigen was expressed in every type of AML, mainly CD4, CD7, CD9, CD10, CD19, and CD56. *Conclusion*: The antigen expression in each type of AML was complicated and with high heterogeneity. Analysis with enough antigens and the scatter situation of cells in Gate SSC/CD45 would be helpful for judging the origin, type, and phase of leukemic cells. Because of many influencing factors, the counting by flow cytometry is not as exact as classification by morphology. Analysis of morphology combined with immunophenotype can improve the accuracy of diagnosis and classification.

【Key words】Acute myeloid leukemia; Morphology; Immunophenotype; Flow cytometry

白血病的正确诊断与分型是白血病预后判断、选择治疗方案的重要依据，近年来，随着白血病临床和基础研究的不断深入，白血病的实验诊断技术也取得了显著进展，2000 年 WHO 提出了白血病的 MICM 分型标准，但其中细胞遗传学及分子生物学分型受试剂、仪器及技术难度的限制，在大多数医院尤其一些地区级医院的应用受阻，而免疫学分型则随着流式细胞仪的发展，在临床的应用日趋广泛，已成为白血病诊断与分型的一项可行、快速、准确、重要的技术，为了更好地应用该技术，本文研究了 113 例初诊急性髓细胞白血病（Acute myeloid leukemia，AML）患者的细胞免疫表型结果，并与传统形态学分型比较，现报告如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象

113 例患者均为我院确诊的门诊或住院 AML 患者，根据形态学、细胞化学和细胞免疫学等方法确诊，均符合国内急性白血病的诊断标准[1]。男性 51 例，女性 62 例，年龄 2 岁-78 岁，平均年龄 41 岁，其中 AML-M_0（M_0）3 例、AML-M_1（M_1）25 例、AML-M_2（M_2）28 例、AML-M_3（M_3）22 例、AML-M_4（M_4）11 例、AML-M_5（M_5）18 例、AML-M_6（M_6）6 例。

1.2 试剂与仪器

流式细胞仪（Flow cytometer）为美国 Coulter 公司产品，型号为 EPICS-XL。鞘液、破膜剂、溶血剂及单克隆抗体均为美国 Beckman-Coulter 公司提供。所用单克隆抗体包括：cy-CD79a、CD10、CD20、CD19、CD9、cyCD3、CD3、CD4、CD5、CD8、CD7、CD56、cyMPO、CD117、CD33、CD13、CD14、CD71、CD64、GlyA、CD34、HLADR、CD45。细胞化学染色试剂由上海太阳生物技术有限公司提供。

1.3 样本

采集患者骨髓液，制作骨髓涂片供细胞形态及细胞化学分析，同时将 1.0 ml 左右骨髓液注入肝素钠抗凝管中，立即混匀后送流式细胞室进行细胞免疫分型检测。

1.4 方法

1.4.1 细胞形态学检查 将骨髓涂片进行瑞氏染色，在光学显微镜下分类计数，并同时进行细胞化学染色检查，包括过氧化物酶（POX）、非特异性脂酶 + 氟化钠抑制实验（α-NAE +NaF）、中性粒细胞碱性磷酸酶（NAP）和过碘酸 - 雪夫染色（PAS），参照 FAB 标准[1]确定类型。

1.4.2 免疫表型检测 流式细胞仪进行测定，采用SSC/CD45 设门，用 23 种免疫荧光标记单克隆抗体分别测定白血病细胞的抗原表达。判断标准[2]：对细胞膜抗原荧光阳性细胞 >20%为相应抗原阳性，对 CD34 和胞浆抗原 >10%为阳性。根据各抗原的积分参照欧洲白血病免疫学分型研究组（EGIL）积分系统[3]确定类型。

1.5 统计学处理

结果采用 χ^2 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 分型结果

113 例 AML 患者采用细胞形态学分型诊断为：M_1 27 例，M_2 26 例，M_3 19 例，M_4 7 例，M_5 22 例，M_6 5 例，7 例被误诊为急性淋巴细胞白血病（Acute myeloid leukemia，ALL），与最终诊断符合率为 79.4%；采用免疫表型诊断为：M_0 3 例，M_1 22 例，M_2 34 例，M_3 20 例，M_4 9 例，M_5 21 例，M_6 4 例，与最终诊断符合率为 85.3%；采用二者联合分析诊断为：M_0 3 例，M_1 25 例，M_2 29 例，M_3 23 例，M_4 10 例，M_5 17 例，M_6 6 例，与最终诊断符合率为 96.5%。联合分型与形态学相比差异有显著统计意义（$P<0.005$），与免疫表型分型相比差异也有显著统计学意义（$P<0.010$），而形态学与免疫表型相比差异无统计学意义，结果详见下表 1。

2.2 细胞抗原表达情况

113 例各型 AML 免疫表型特征详见上表 2。主要抗原表达情况如下：以髓系抗原 CD33、CD13、cyMPO、CD117 表达最常见，分别为 95.6%、92.9%、87.6%及 81.4%；非系列标记 HLADR、CD34 也有较高表达，分别为 76.1%及 64.6%，其中 cyMPO 可在除 M_0 外的各型 AML 中表达；CD117 可在 AML 各型中表达；CD34 及 HLADR 在 M_3 型中表达率分别为 22.7%、4.5%，远低于其余类型 74.7%及 93.4%的表达，二者

差异均有显著性统计学意义(P均 <0.005);CD14 在 M_2、M_3、M_6 型中表达率为 7.1%，但远低于在 M_4、M_5 型中 68.9%的表达，二者差异有显著统计学意义(P<0.005)，但在 M_4、M_5 中表达分别为 63.6%及 72.2%，差异无统计学意义;CD64 只在 M_4、M_5 型中表达，分别为 72.7%、77.7%，但在 M_4 及 M_5 型中的表达差异无统计学意义;CD71 虽为红系标记，但不特异，可在各型中表达(65.5%);GlyA 是红系特异性标记，在 M_6 型中高表达(100%)。淋系抗原表达率为 37.6%，其中 cyCD3、CD3、cyCD79a 和 CD20 在各型中未见表达;CD4 可在 AML 的 M_1、M_2、M_4 及 M_5 型中表达(4.6%);CD7 可在 AML 各型中表达(8.8%);CD9 可在 M_3 及 M_5 型中表达，但在 M_3 中的表达为 59.1%，远高于 M_5 中的表达(5.6%)，二者差异有统计学意义(P<0.005);CD10 可 M_0、M_1、M_2 及 M_5 中表达(3.5%)，CD19 可在 M_1、M_5 中表达(1.8%);CD56 可在 M_1、M_2、M_4 及 M_5 型中表达，但在 M_5 型中表达(38.9%)高于 M_1、M_2、M_4 型(4.7%)，二者差异有显著性统计学意义(P<0.005)。

3 讨 论

细胞形态学分型是根据细胞的形态和细胞化学染色并利用显微镜进行检查，仍是白血病诊断的基石之一，其 FAB 分型标准明确，反映了主要的细胞类型，可对 AML 进行亚型诊断，目前已被各国广泛采用，但该检查方法是基于细胞形态学水平的直观判断，易受检测水平及主观因素影响，尤其对部分细胞的鉴别较困难，如原始粒细胞、原始单核细胞与

表 1 113 例 AML 患者分别用形态学分析、免疫表型分析及联合分析结果

类型	形态学分型(1)	免疫表型分型(2)	联合分型(3)	最终准确分型
	例数/诊断符合率(%)	例数/诊断符合率(%)	例数/诊断符合率(%)	例数
M_0	0(0.00)	3(100.0)	3(100.0)	3
M_1	27(92.6)	22(88.0)	25(100.0)	25
M_2	26(92.9)	34(82.4)	29(96.5)	28
M_3	19(86.4)	20(90.9)	23(95.6)	22
M_4	7(63.6)	9(81.8)	10(90.9)	11
M_5	22(81.8)	21(85.7)	17(94.4)	18
M_6	5(83.3)	4(66.7)	6(100.0)	6
ALL	7(0.00)	0	0	0
总符合率	79.4	85.3	96.5	

注表 1 中:(3)与(1)相比χ^2=13.628，P<0.005;(3)与(2)相比χ^2=7.560，P<0.010;(1)与(2)相比:χ^2=0.759，0.25<P<0.5

表 2 113 例 AML 患者各型的细胞抗原表达情况

抗原种类	M_0	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5	M_6	总阳性率(%)
	例数/阳性率(%)	例数/阳性率(%)	例数/阳性率(%)	例数/阳性率(%)	例数/阳性率(%)	例数/阳性率(%)	例数/阳性率(%)	
CD34	3(100.0)	20(80.0)	20(71.4)	5(22.7)	8(72.7)	13(72.2)	4(66.7)	64.6
HLADR	3(100.0)	24(96.0)	26(92.9)	1(4.5)	10(90.9)	17(94.4)	5(83.3)	76.1
CyMPO	0(0.0)	21(84.0)	26(92.9)	22(100)	10(90.9)	15(83.3)	5(83.3)	87.6
CD117	3(100.0)	22(88.0)	23(82.1)	17(77.2)	9(81.8)	13(72.2)	5(83.3)	81.4
CD33	3(100.0)	24(96.0)	27(96.4)	22(100.0)	9(81.8)	17(94.4)	6(100.0)	95.6
CD13	2(66.7)	23(92.0)	26(92.9)	21(95.5)	10(90.9)	17(94.4)	6(100.0)	92.9
CD14	0(0.0)	0(0.0)	1(3.6)	2(9.1)	7(63.6)	13(72.2)	1(16.7)	21.2
CD64	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	8(72.7)	14(77.7)	0(0.0)	20.4
CD71	2(66.7)	18(72.0)	20(71.4)	13(59.1)	6(54.5)	11(61.1)	4(66.7)	65.5
GlyA	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(100)	4.4
CD4	0(0.0)	1(4.0)	1(3.6)	0(0.0)	1(9.1)	1(5.6)	0(0.0)	4.6
CD7	1(33.3)	1(4.0)	1(3.6)	2(9.1)	1(9.1)	3(16.7)	1(16.7)	8.8
CD9	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	13(59.1)	0(0.0)	1(5.6)	0(0.0)	12.4
CD56	0(0.0)	1(4.0)	1(3.6)	0(0.0)	1(9.1)	7(38.9)	0(0.0)	8.8
CD10	1(33.3)	1(4.00)	1(3.6)	0(0.0)	0(0.0)	1(5.6)	0(0.0)	3.5
CD19	0(0.0)	1(4.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(5.6)	0(0.0)	1.8

原始淋巴细胞，Ⅱ型原始粒细胞与早幼粒细胞，早幼粒细胞与原始单核细胞等，虽然细胞化学可辅助鉴别诊断 AML 与 ALL 及 AML 的部分类型，但它与细胞形态之间的符合率也不高，部分病例出现相互矛盾的结果，导致诊断困难或误诊[4]，诊断准确率低，一般为 60%~80%[5]，我们的分析表明，AML 各型均有病例被误诊，尤其是 M_0 及 M_4 型，诊断符合率很低，分别为 0.0%及 63.6%，有 7 例 AML 被误诊为 ALL，总的诊断符合率为 79.4%，与文献报道相符[6]。

白血病免疫分型是通过流式细胞术(Flow cytometry，FCM)检测细胞内、外的特异性抗原，根据抗原表达谱对细胞的来源及分化阶段进行更精细准确的分析，从而准确判断白血病细胞的种类与阶段，尤其是一些少见、疑难的病例，如 AML-M_0、AML-M_7、AUL(急性未分化白血病)等，我们的资料表明：7 例形态学诊断为 ALL 的患者经免疫分型均被诊断为 AML，且有部分病例被诊断为伴淋系抗原表达的 AML(LY+AML)，弥补了形态学诊断不足，不过，在应用过程中我们发现：流式细胞仪测得的白血病细胞百分比不如形态学准确，影响了 AML 部分类型的诊断准确率，而采用免疫学与形态学联合分析，可以相互弥补，大大提高 AML 的诊断与分型准确率，可达 96.8%，明显优于单独的形态学与免疫分型。流式细胞术免疫分型测得白血病细胞数量低于形态学分类计数的原因可能是：①骨髓被外周血稀释；②CD34 及 CD117 阴性的原始细胞存在；③涂片计数有时包括原血细胞；④细胞碎片的存在。而高于形态学分类计数的原因可能是：①溶血破坏近成熟 RBC，对 M_6 的红系比例有影响；②制片过程中细胞易碎影响计数；③CD117 可能表达在一些较成熟的细胞，被误认为原始细胞；④颗粒减少的粒系，侧向散射光值低而落于原始细胞窗内。

AML 患者细胞抗原表达复杂，异质性强，是免疫分型的依据，但多数抗原缺乏特异性及敏感性，并可出现错乱表达，单独某一抗原阳性表达对细胞鉴别价值不大，应尽可能同时检测多种抗原的表达水平，综合分析其抗原表达谱，才能较准确地判断白血病细胞的来源、种类与阶段，以减少漏诊和误诊的机率，尤其是对一些抗原表达或形态不典型的患者。我们的分析表明，113 例 AML 中以髓系抗原 CD13、CD33、cMPO、CD117 的表达最常见，其次是 HLADR、CD34 及 CD71，与文献报道相符[7]，其中 CD13、CD33 可在各型 AML 中高表达，是鉴别 AML 与 ALL 的重要抗原；cMPO 是特异性的髓系抗原，其阳性强力支持 AML 的诊断[7,8]；CD117 的表达有助于 AML 细胞克隆的识别，其特异性较 CD13 和 CD33 更强，是鉴别 AML 的一个重要抗原[9]；造血干/祖细胞抗原 CD34 及非系列抗原 HLADR 在 M_3 型中表达率远低于其他各型，是鉴别 M_3 型的重要抗原，也是鉴别原始细胞的重要抗原[8]；CD14、CD64 是单核细胞特异性的标记，在原、幼单核细胞上的表达率远高于原始粒细胞，是 M_4、M_5 与其他 AML 类型进行鉴别诊断的重要抗原[8]；CD71 及 GlyA 可在幼红细胞中高表达，但特异性 CD71 不如 GlyA，GlyA 只在红系上表达，对 M_6 的诊断具有重要价值。

白血病细胞可出现抗原的错乱表达，现在一般认为仅异常表达个别次要非系列相关抗原不能诊断为双表型白血病，而应诊断为 LY+AML 或 MY+ALL，因此在进行 AML 免疫表型分析时应增加多种淋系抗原的检测，以提高 AML 各型及 LY+AML 的诊断准确率。本研究资料表明，次要淋系抗原在 AML 中的错乱表达并不少见，总的表达率为 37.6%，介于文献报道的结果之间[9,10]，主要是 CD4、CD7、CD9、CD10、CD19 及 CD56，以 CD7、CD9 及 CD56 较常见，其中 CD9 对 M_3 的鉴别诊断有重要价值，联合应用 CD9 抗原及其他免疫标记，是诊断 M_3 的一个有用依据；CD56 可辅助 M_5 的鉴别诊断；淋系特异性抗原 cyCD3、CD3 及 cyCD79a 及 CD20 在 AML 各型中未见表达，它们阴性强力支持 AML 的诊断。

总之，本研究结果证实，不同类型 AML 存在非同期抗原共表达、交叉系列抗原表达、抗原过度表达等[11]，在分化过程中形态学上也具有异质性，应用流式细胞仪进行测定时，白血病细胞在 SSC/CD45 散点图上具有不同的分布特征，可以辅助各型 AML 的诊断，与细胞抗原表达相结合，可充分发挥流式细胞术进行免疫分型的优势作用。

参 考 文 献

[1] 张之南，沈 悌.血液病诊断及疗效标准[M].第 2 及第 3 版.北京科学出版社，1998.2008.

[2] Catovsky D，Mayutese E. The classification of acute leukemias [J]. Leukemia，1992，6(2)：1.

[3] Bene M C，Castoldi G，Knapp W，et al . Proposal for the immunological classification of acute leukemias [J]. leukemia，1995，9 ：1783-1786.

[4] 李艳明，曹志红，彭敏源.169 例急性白血病免疫表型分析[J].实用预后医学，2008，15(3)：670.

[5] 周 帆，李连勇，薛永权，等.形态学、免疫学和细胞遗传学分型对急性白血病的诊断价值[J].上海医学，1997，12：713-714.

[6] 艾克拜尔·阿布都热衣木，迪丽娜孜·阿布来提，哈力达·亚森.急性髓细胞白血病免疫分型和 FAB 分型的关系[J].新疆医科大学学报，2008，31(4)：452.

[7] 佟海侠，王慧涵，张继红，等.192 例急性髓系白血病免疫表型、细胞遗传学及临床特征的研究[J].中国实验血液学杂志，2009，17(5)：1175-1177.

[8] 刘联斌，曾庆芳，周茂华，等.临床常见急性白血病免疫表型特征分析[J].实验与检验医学，2008，26(4)：379.

[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] 陈为民，林 芸，廖丽升，等.急性髓细胞白血病 30 例免疫分型特点分析[J].福建医药杂志，2006，28(5)：16-17.

[11] 贺景娟，李耀华，孙雪静，等.126 例急性白血病异常免疫表型分析[J].中国实验血液学杂志，2007，15：1032-1036.

(责任编辑：冉明会)