

· 论 著 ·

流式细胞术在首诊非霍奇金淋巴瘤骨髓侵犯中的作用*

彭贤贵, 孔佩艳, 张 曦, 刘 红, 刘思恒, 王 平, 墙 星, 邓小娟, 张洪洋, 陈幸华[△]
(第三军医大学新桥医院血液科, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨流式细胞术(FCM)在诊断非霍奇金淋巴瘤(NHL)骨髓浸润中的价值。方法 采用骨髓涂片和切片联合 FCM 检测 NHL 骨髓侵犯。骨髓涂片经瑞氏-吉姆萨液染色, 分类计数瘤细胞。骨髓切片采用塑料包埋法制作组织切片, 常规苏木精-姬姆萨-酸性品红(HGF)染色。流式细胞仪每份标本分析 10 000 个细胞。检测方案采用 CD45/侧向散射角(SSC)设门, 重点分析幼稚细胞群及成熟淋巴细胞群, 经前向散射角(FSC)、SSC、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的单克隆抗体(McAb1-FITC)、藻红蛋白(PE)标记的单克隆抗体(McAb2-PE)、CD45-Percp 五参数分析确定免疫表型。结果 17 例骨髓首诊病例中, 骨髓穿刺(BMA)确诊 12 例(70.6%), 骨髓活检(BMB)确诊 15 例(88.2%), FCM 确诊 17 例(100%), FCM 确诊率最高, 较 BMA 差异有统计学意义($P < 0.05$), 较 BMB 差异无统计学意义($P > 0.05$)。BMB 检查发现 NHL 骨髓浸润方式间质型、结节型和弥漫型均易见, 分别占 23.5%, 23.5% 和 52.9%。FCM 检测结果为 B 细胞淋巴瘤 13 例(76.5%)、T 细胞淋巴瘤和 NK/T 细胞淋巴瘤 4 例(23.5%)。结论 骨髓涂片和骨髓切片检查是诊断 NHL-BMI 的基本方法, 可以做出定性诊断。FCM 可进一步做出明确的病理诊断。对于骨髓检查首诊 NHL-BMI 的病例, 3 种技术的联合应用可以提高 NHL-BMI 的诊断正确性和阳性率。

关键词:淋巴瘤, 非霍奇金; 骨髓检查; 流式细胞术; 免疫分型

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.30.005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)30-3027-02

Effects of flow cytometry in bone marrow involvement of non-Hodgkin's lymphoma at initial diagnosis*

Peng Xianguai, Kong Peiyan, Zhang Xi, Liu Hong, Liu Siheng, Wang Ping,
Qiang Xing, Deng Xiaojuan, Zhang Hongyang, Chen Xinghua[△]

(Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To research the value of flow cytometry(FCM) to examine bone marrow involvement(BMI) of non-Hodgkin's lymphoma(NHL). **Methods** Combined examination of BMA, BMB and FCM was used to detect the BMI of NHL. Bone marrow smears were stained by Wright-Giemsa and tumor cells of NHL were differentially counted under optical microscope. BMB tissue was embedded in plastic. Sections were routinely stained with HGF. 10,000 cells were tested on each sample by FCM. Detection scheme included designing CD45/SSC doors and analyzing importantly the group of immature-cell and mature lymphocyte. The five-parameter analysis including FSC, SSC, McAb1-FITC, McAb2-PE, CD45-Percp were used to determine the immunophenotype. **Results** 12 cases of NHL-BMI were diagnosed by BMA(70.6%), 15 cases by BMB(88.2%) and 17 cases by FCM(100%) in all 17 cases at initial diagnosis. The rate of diagnosis of FCM was higher than BMA and BMB, obviously different with BMA($P < 0.05$) and not different with BMB($P > 0.05$). Many involvement types of NHL-BMI were found in BMB, which the ratio of interstitial type was 23.5%, nodular type was 23.5% and diffused type was 52.9% respectively. FCM result was 13 cases of B-cell lymphoma(76.5%) and 4 cases of T cell lymphoma and NK cell lymphoma. **Conclusion** At initial diagnosis of NHL, examination with BMA and BMB is a basic method and examination with FCM can provide precise views of the pathological classification further. Combined examination with BMA, BMB and FCM detecting BMI of NHL could improve the diagnostic accuracy and positive ratio.

Key words: lymphom, non-hodgkin; bone marrow examination; flow cytometry; immunophenotype

本院血液病实验诊断中心采用骨髓穿刺(bone marrow aspirate, BMA)涂片和骨髓活检(bone marrow biopsy, BMB)联合流式细胞术(flow cytometry, FCM)首诊了 17 例骨髓淋巴瘤细胞侵犯(NHL-BMI)或淋巴瘤细胞白血病(LMCL), 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 病例资料 17 例首诊淋巴瘤的患者均为本科室 2010 年 1 月至 2011 年 4 月收治的住院患者, 其中男 11 例, 女 6 例; 年龄 12~77 岁, 平均 51.0 岁; 就诊时病程 1~6 个月。首发症状及体征表现为头晕、乏力、心悸、面色苍白 15 例(88.2%), 出血(四肢、躯干、牙龈、内脏)5 例(29.4%), 贫血 11 例(64.7%), 发热 11 例(64.7%), 肝脾大 8 例(47.1%), 骨痛或胸骨压痛 4 例(23.5%)。6 例(35.3%)患者浅表淋巴结轻度肿大, 所有患

者未能进行淋巴结病理检查。

1.2 方法

1.2.1 标本制备 无菌条件下行 BMA 和 BMB。BMB 取材标本长度为 0.8~2.0 cm, 标本采集后立即在 2 mL 的 Bovine 氏液中固定。BMA 抽吸 0.3 mL 骨髓液, 制备 7 张涂片备用。另制备 2 张外周血涂片同时镜检。再抽吸骨髓细胞液 1~2 mL, 肝素抗凝, 摇匀后置 4℃ 保存, 48 h 内进行 FCM 检测。

1.2.2 细胞形态学检查 细胞涂片经瑞氏-姬姆萨混合染液染色, 在油镜(1 000 倍)下分类计数 500 个细胞。每个病例的骨髓涂片均做 PAS 和 POX 染色。骨髓涂片镜检有无淋巴瘤细胞, 并观察细胞的异质性, 包括大小、异形变、分化程度及有无成簇分布现象。

1.2.3 骨髓活检 标本经乙醇梯度脱水、塑料包埋后制备 3

张切片,行 HGF 及 Gomori 染色后封片镜检。骨髓切片镜检有无淋巴瘤细胞侵犯灶,并判断浸润类型。

1.2.4 多参数 FCM 检测 采用美国 BD 公司 FACSCalibur 型流式细胞仪及 Cellquest 软件进行荧光定量分析。每例标本分析 10 000 个细胞,细胞在波长 488 nm 处检测藻红蛋白(PE)的红色荧光和异硫氰酸荧光素(FITC)的绿色荧光,分别通过 575 nm 和 513 nm 滤光片收集,多甲藻叶绿素蛋白(Percep)的荧光通过 635 nm 滤光片收集。对 CD45/侧向散射角(SSC)进行设门,重点分析异常细胞群,经 FSC、SSC、McAb1-FITC、McAb2-PE、CD45-Percep 参数分析,确定免疫表型。

荧光标记的单克隆抗体包括 T、B 淋巴细胞及髓系细胞系列,用 2 个系列或阶段特异性单克隆抗体加 CD45 单克隆抗体进行三色荧光染色(McAb1-FITC、McAb2-PE、CD45-Percep)。单克隆抗体所针对的抗原包括 CD10、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD79a、CD103、CD138; CD3、CD5、CD7、CD4、CD8; CD13、CD14、CD33、CD41a、CD61、CD71、MPO; CD34、CD38、CD45、人类白细胞抗原(HLA)-DR (human leukocyte antigen DR)、TdT、Kappa、Lambda 等。以上试剂均购自 BD 公司。按 FCM 常规方法标记表面抗原和胞质抗原。

1.3 骨髓浸润判断标准 骨髓浸润的判断标准参照勇氏法,即骨髓涂片中淋巴瘤细胞不少于 5% 者诊断为 BMI,淋巴瘤细胞不少于 20% 者诊断为 LMCL。BMB 的 LBMI 浸润类型分为间质型、结节型、小梁旁型、弥漫型和窦内型。

1.4 统计学处理 对数据进行方差分析、*t* 检验和 χ^2 检验数据统计处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

本组 17 例病例中,FCM 确诊 NHL-BMI 17 例;BMB 疑诊 2 例,确诊 15 例;BMA 疑诊 5 例,确诊 12 例,诊断阳性率分别为 100%、88.2%、70.6%。FCM 检测到的瘤细胞群细胞比例为 60.83%,BMA 计数的瘤细胞比例为 60.34%。FCM 检测结果为 B 细胞淋巴瘤 13 例(76.5%)、T 细胞淋巴瘤和 NK/T 细胞淋巴瘤 4 例(23.5%)。BMB 检查发现 NHL 骨髓浸润方式间质型、结节型和弥漫型均易见,分别占 23.5%、23.5% 和 52.9%。

3 讨论

BMA 和 BMB 是诊断 NHL-BMI 的常用方法,两者各有优劣。BMA 方法简便快捷,在诊断的敏感性和阳性率方面略低于 BMB^[1-3]。BMA 和 BMB 可以对 NHL-BMI 做出定性诊断,FCM 则可以直接对异常的瘤细胞群进行免疫标志的识别,做出明确的免疫分型诊断。将 3 种技术对 NHL-MBI 诊断的敏感性比较,目前较为公认 FCM 优于 BMA,而将 FCM 与 BMB 比较,两者各有优势^[4-5]。本组病例中 BMA 的诊断阳性率是 70.6%,BMB 是 88.2%,FCM 是 100%,统计显示 FCM 较 BMA 差异有统计学意义($P < 0.05$),FCM 与 BMB 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

BMA 对 NHL-BMI 的判断是依赖于细胞形态学特征。由于淋巴细胞的多变性和 NHL 细胞的复杂性,BMA 查见病理性淋巴细胞有时也难以做出 NHL-BMI 的判断。本组病例 BMA 所计数的淋巴细胞比例占 60.34%,与 FCM 检测到的瘤细胞群细胞比例 60.83% 相近,但有 5 例未能做出 NHL-BMI 的诊断,这 5 例标本均是被 FCM 确诊为外周淋巴瘤肿瘤。外周淋巴瘤肿瘤的瘤细胞是以成熟淋巴型为主,与正常淋巴细胞相似,在没有瘤细胞数量显著增多的情况下,BMA 对 NHL-BMI 的判别十分困难,容易出现漏诊和误诊。而采用 FCM 技术,则可以通过对淋巴细胞的免疫标志的检测,发现异常克隆,进而明确诊断。

BMB 是诊断 NHL-BMI 最有效的检查手段,它通过对瘤细胞的弥漫性增生或灶性增生来判断 NHL-BMI^[6]。本组 2 例病例 BMB 未能明确诊断,经 FCM 确诊为 1 例 MCL 和 1 例外周 T 淋巴细胞淋巴瘤。分析原因可能为瘤细胞数量不多,呈散在或成簇状分布,或伴有明显纤维化,不能排除非克隆性淋巴细胞增生,故而 BMB 未能做出 NHL-BMI 的诊断。

应用 FCM 来判断 NHL-BMI 目前报道很多^[7-10]。各种单克隆抗体包括 B 细胞、T 细胞和 NK 细胞的广泛应用,使得大多数骨髓 NHL 的病理诊断得到明确^[11-12]。在骨髓 FCM 检测中,不同系别骨髓细胞在 CD45 及 SSC 散点图中有固定区域;正常淋巴细胞与异常克隆细胞的免疫标志不同,可以呈现不同细胞群,进而分别设门进行分析。FCM 的优势在于,在形态学认为是正常的淋巴细胞,其免疫标志有可能是典型的异常表达。本组确诊的 2 例 MCL 中,1 例是在 BMA 和 BMB 不确诊的情况下,FCM 根据瘤细胞 CD5⁺CD10⁻CD23⁻的结果,做出 MCL 的诊断。1 例是在 BMB 提示 LMCL,FCM 结果为 CD5⁺CD10⁻CD23⁺疑诊 MCL,BMA 示瘤细胞以成熟淋巴细胞为主,但同时伴有胞体大,核畸形变明显的幼稚细胞。综合分析,临床得出 MCL 诊断。

由于存在一个或多个泛 T 标志丢失的情况,T 细胞淋巴瘤和 NK 细胞淋巴瘤的诊断较为困难^[13]。本组 4 例此类 NHL 有 2 例是经综合分析最后得出的临床诊断。一例的 FCM 仅 cyCD3⁺,其他 T 细胞标志如 CD5、CD7、CD4、CD8、CD56 等多个缺失,诊断 NHL 困难,但 BMA 查见大量的淋巴细胞特征的原始细胞,且有成簇分布现象,POX-PAS⁺⁺,最终临床综合判断为 T-NHL(IV b 期)。一例的 FCM CD4⁺CD56⁺提示 NK/T 细胞标志,但多个髓系标志 CD11c、CD33、CD117 阳性使诊断变得棘手。BMA 原始细胞特征不支持 AML,且 POX-PAS⁺⁺,综合判断,临床诊断为 NK/T 细胞白血病/淋巴瘤。

FCM 技术的应用可以提高 NHL-BMI 诊断率,但部分病例的最终诊断仍需要结合 NHL 其他相关检查。本组 2 例 3 种技术的检测结果只提示为外周 B 淋巴瘤肿瘤,由于这 2 例患者血浆蛋白电泳 IgM 显著增高,最终临床诊断为浆细胞样淋巴瘤淋巴瘤。由于 NHL 在细胞形态和免疫表型方面的多样性和复杂性,很多 LBMI 的诊断仅靠 BMA、BMB 和 FCM 还不能做到准确的分型,需要结合淋巴结病理形态和免疫组织化学、染色体核型分析、突变基因检测以及临床病史和其他相关检查来进行综合分析判断^[14-16]。

仔细分析本组病例发现,骨髓瘤细胞为 26.5%~99.0%,而未查见淋巴瘤细胞低于 10% 的病例,这有可能与是否及早做 FCM 检测有关。部分病例由于骨髓涂片检查未发现明显异常细胞而未做 FCM 分析,而这部分病例在 BMB 检查中有异常。因此作者认为诊断或疑诊淋巴瘤患者,骨髓检查均应做 FCM 分析,这有利于进一步提高 NHL-BMI 检出率。

参考文献:

- [1] Howell S, Grey M, Chang J, et al. The value of bone marrow examination in the staging of Hodgkin's lymphoma: a review of 955 cases seen in a regional cancer centre [J]. Br J Haematol, 2002, 119(2): 408-411.
- [2] 李虎生, 张华. 396 例恶性淋巴瘤骨髓涂片分析 [J]. 检验医学与临床, 2010, 7(21): 2379-2380.
- [3] 彭贤贵, 张曦, 孔佩艳, 等. 联合骨髓涂片和骨髓活体诊断非霍奇金淋巴瘤骨髓侵犯 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(7): 1195-1196, 1198. (下转第 3031 页)

的预后以及肿瘤细胞的淋巴结转移存在关系。作者在前期的研究也发现^[5], PINCH-1 蛋白表达于骨髓基质细胞胞质中, 且对于在白血病中 PINCH-1 蛋白的表达有明显上调的趋势。特异性地阻断 PINCH-1 的表达, 可能会影响白血病骨髓微环境对白血病细胞的庇护作用, 并实现对白血病增殖黏附功能的影响。

RNAi 技术是一种有效沉默靶向基因实现其功能阻断的技术, 在癌基因以及肿瘤信号转导的研究中, RNAi 技术可以有效沉默目的基因实现对肿瘤生物学行为的调控, 并有可能成为肿瘤治疗重要的技术^[8]。非病毒载体系统的细胞转染和以病毒为载体的细胞感染方式是 RNAi 的主要转染方式, 目前慢病毒技术是 RNAi 应用于基础和临床的主要研究方向, 其具备高转染效率、稳定传代以及对宿主细胞的毒性和免疫反应弱的特点^[11]。本试验中作者成功设计合成了针对 PINCH-1 的靶向 RNAi 引物, 并通过酶切、重组构建了包含 PINCH-1 shRNA 序列的慢病毒载体, 通过慢病毒包装产毒后, 能够有效转染人骨髓基质细胞, 并在初步的验证试验中发现其能有效阻断 PINCH-1 RNA 表达。该实验为本院后续研究阻断 PINCH-1 后骨髓微环境功能变化及其对白血病细胞的影响奠定了基础。

参考文献:

[1] 李晓青, 吕跃. 骨髓基质细胞与白血病的关系及其在基因治疗中的研究进展[J]. 癌症, 2005, 24(8): 1033-1036.

[2] Ezoë S, Matsumura I, Satoh Y, et al. Cell Cycle. regulation in hematopoietic stem/progenitor cells [J]. Cell Cycle, 2004, 3(3): 326-332.

[3] Chuanyue WU. PINCH, N(i)ck and the ILK: network wiring at cell-matrix adhesions [J]. Trends Cell Biol, 2005, 15(9): 460-466.

[4] 凌家瑜, 孙晓非, 严苏丽, 等. 112 例淋巴瘤系统恶性肿瘤骨髓免疫表型分析[J]. 癌症, 2007, 26(4): 418-422.

[5] Sah SP, Matutes E, Wotherspoon AC, et al. A comparison of flow cytometry, bone marrow biopsy, and bone marrow aspirates in the detection of lymphoid infiltration in B cell disorders[J]. J Clin Pathol, 2003, 56(2): 129-132.

[6] Maes B, Achten R, Demunter A, et al. Evaluation of B cell lymphoid infiltrates in bone marrow biopsies by morphology, immunohistochemistry and molecular analysis [J]. J Clin Pathol, 2000, 53(11): 835-840.

[7] Palacio C, Acebedo G, Navarrete M, et al. Flow cytometry in the bone marrow evaluation of follicular and diffuse large B-cell lymphoma[J]. Haematologica, 2001, 86(9): 934-940.

[8] Gomyo H, Shimoyama M, Minagawa K, et al. Morphologic, flow cytometric and cytogenetic evaluation of bone marrow involvement in B-cell lymphoma[J]. Haematologica, 2003, 88(12): 1358-1365.

[9] 万岁桂, 孙雪静, 惠吴函, 等. 多参数流式细胞术检测 B 细胞非霍奇金淋巴瘤骨髓侵犯[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(2): 473-476.

[10] Stetler-Stevenson M, Braylan RC. Flow cytometric analy-

[4] Tu Y, Li F, Goicoechea S, et al. The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(3): 2425-2434.

[5] 徐葳, 曾东风, 孔佩艳, 等. PINCH-1 因子在白血病骨髓基质细胞中的表达及意义[J]. 免疫学杂志, 2009, 25(6): 701-704.

[6] Dougherty GW, Jose C, Gimona M, et al. The Rsu-1-PINCH1-ILK complex is regulated by Ras activation in tumor cells [J]. Eur J Cell Biol, 2008, 87(8/9): 721-734.

[7] Chen K, Tu Y, Zhang Y. PINCH-1 regulates the ERK-Bim pathway and contributes to apoptosis resistance in cancer cells [J]. J Biol Chem, 2008, 283(5): 2508-2517.

[8] Tiemann K, Rossi JJ. RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects [J]. EMBO Mol Med, 2009, 1(3): 142-151.

[9] Meade BR, Dowdy SF. The road to therapeutic RNA interference (RNAi): Tackling the 800 pound siRNA delivery gorilla [J]. Discov Med, 2009, 8(43): 253-256.

[10] Ito S, Takahara Y, Hyodo T, et al. The roles of two distinct regions of PINCH-1 in the regulation of cell attachment and spreading [J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(23): 4120-4129.

[11] Towne C, Aebischer P. Lentiviral and adeno-associated vector-based therapy for motor neuron disease through RNAi [J]. Methods Mol Biol, 2009, 555: 87-108.

(收稿日期: 2011-04-17 修回日期: 2011-05-25)

(上接第 3028 页)

[4] 凌家瑜, 孙晓非, 严苏丽, 等. 112 例淋巴瘤系统恶性肿瘤骨髓免疫表型分析[J]. 癌症, 2007, 26(4): 418-422.

[5] Sah SP, Matutes E, Wotherspoon AC, et al. A comparison of flow cytometry, bone marrow biopsy, and bone marrow aspirates in the detection of lymphoid infiltration in B cell disorders[J]. J Clin Pathol, 2003, 56(2): 129-132.

[6] Maes B, Achten R, Demunter A, et al. Evaluation of B cell lymphoid infiltrates in bone marrow biopsies by morphology, immunohistochemistry and molecular analysis [J]. J Clin Pathol, 2000, 53(11): 835-840.

[7] Palacio C, Acebedo G, Navarrete M, et al. Flow cytometry in the bone marrow evaluation of follicular and diffuse large B-cell lymphoma[J]. Haematologica, 2001, 86(9): 934-940.

[8] Gomyo H, Shimoyama M, Minagawa K, et al. Morphologic, flow cytometric and cytogenetic evaluation of bone marrow involvement in B-cell lymphoma[J]. Haematologica, 2003, 88(12): 1358-1365.

[9] 万岁桂, 孙雪静, 惠吴函, 等. 多参数流式细胞术检测 B 细胞非霍奇金淋巴瘤骨髓侵犯[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(2): 473-476.

[10] Stetler-Stevenson M, Braylan RC. Flow cytometric analy-

sis of lymphomas and lymphoproliferative disorders [J]. Sem in Hematol, 2001, 38(2): 111-123.

[11] 王娜, 谢守军, 申兴斌, 等. 细胞遗传学联合免疫细胞化学检查在首诊非霍奇金淋巴瘤骨髓侵犯中的应用[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(4): 582-584.

[12] 河福金, 谢彦, 李吉友, 等. 多参数流式细胞术在非霍奇金淋巴瘤诊断中的应用[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35(4): 203-208.

[13] LeBoit P, Burg G, Weedon D, et al. World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of skin tumors [M]. Lyon: IARC Press, 2006: 220.

[14] 刘恩彬, 陈辉树, 杨晴英, 等. 非霍奇金淋巴瘤侵犯骨髓的病理形态及免疫表型特点分析[J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(16): 923-927.

[15] John GH, Jill C, Dennis C, et al. Real-time quantitative reverse transcription PCR for cyclin D1 mRNA in blood, marrow and tissue specimens for diagnosis of mantle cell lymphoma [J]. Clin Chem, 2004, 50(1): 80-87.

[16] Zanetto U, Dong H, Huang Y, et al. Mantle cell lymphoma with aberrant expression of CD10 [J]. Histopathology, 2008, 53(1): 20-29.

(收稿日期: 2011-04-17 修回日期: 2011-05-25)