

• 研究报告 •

成人急性淋巴细胞白血病免疫表型特征及临床意义

陈琦¹ 朱雄鹏¹ 黄远玲¹ 苏密龙¹ 李碧玲¹ 吴立德¹ 杨建忠¹

【摘要】目的:探讨成人急性淋巴细胞白血病(ALL)细胞免疫表型特点及其对疗效的影响。**方法:**46 例成人 ALL 初治患者,采用流式细胞术方法分析患者的免疫表型,然后给予标准诱导缓解方案(VDCLP 方案)化疗,并观察其疗效。分析比较 ALL 骨髓系相关抗原(CD11b、CD13、CD14、CD15、CD33、CD117、cMPO)阳性患者与阴性患者之间的完全缓解(CR)率,HLA-DR 表达情况及其与化疗后 CR 的关系。**结果:**46 例 ALL 患者中,共有 28 例表达髓系相关抗原。髓系抗原表达阳性患者(My+ALL)CR 率为 78.6%,与髓系抗原表达阴性患者(My-ALL)CR 率(83.3%)比较差异无统计学意义($P>0.05$)。ALL 患者 HLA-DR+ 表达率为 65.2%,HLA-DR+ 和 HLA-DR- ALL 患者 CR 率比较差异有统计学意义(70% : 100%, $P<0.05$)。**结论:**ALL 患者无论有无髓系抗原的表达其疗效无显著差异,但 HLA-DR 表达则明显降低化疗后 CR 率。

【关键词】 白血病,淋巴细胞,急性;免疫表型;临床意义

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2015.03.013

【中图分类号】 R733.71 【文献标志码】 A

Immunophenotype features and its clinical significance in adult acute lymphocytic leukemia

CHEN Qi ZHU Xiongpeng HUANG Yuanling SU Milong
LI Biling WU Lide YANG Jianzhong

(Department of Hematology, the First Hospital of Quanzhou Affiliated to Fujian Medical University, Quanzhou, 362000, China)

Corresponding author: ZHU Xiongpeng, E-mail: xiongpengzhu@163.com

Abstract Objective: To investigate the characteristics of immunophenotype in adult acute lymphocytic leukemia (ALL) and its relationship with treatment. **Method:** The immunophenotype of forty-six newly diagnosed adult patients with ALL were examined by indirect immunofluorescence method. All cases were treated with standard VDCLP chemotherapy regimen, and the curative effect was investigated. The difference of complete remission (CR) rates between myeloid antigen positive ALL (CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, CD117, cMPO) and myeloid antigen negative ALL was compared, and the relationship between HLA-DR and CR was analyzed. **Result:** Twenty-eight patients expressed medullary system antigens in 46 ALL. CR rate of patients with myeloid antigens expression was 78.6%, which was lower than 83.3% of patients without myeloid antigens expression, but there was no statistical significance ($P>0.05$). CR rate in HLA-DR+ ALL was lower than that in HLA-DR- ALL, there was statistical significance between them (70% vs 100%, $P<0.05$). **Conclusion:** In adult ALL, there is no relevance between myeloid antigens expression and CR rate. But expression of HLA-DR is helpful to evaluate effect of induction chemotherapy.

Key words acute lymphocytic leukemia; immunophenotype; clinical significance

急性淋巴细胞白血病(ALL)是一种恶性增殖性血液系统疾病,随着单克隆抗体技术的发展及多参数流式细胞术的普遍应用,能较准确地鉴别白血病细胞的所属系别来源并判断白血病细胞的分化程度,进而可评价其预后。现对本院 46 例初治 ALL 患者的免疫表型进行回顾性分析,探讨肿瘤细胞抗原表达特点及其对疗效的影响。

1 资料与方法

1.1 资料

收集我院 2011-01—2012-10 收治确诊的初治 ALL 患者共 46 例,按 FAB 分型标准:L₁ 17 例,L₂ 23 例,L₃ 5 例,未分型 1 例。其中男 31 例,女 15 例;年龄 18~61 岁,中位年龄 42 岁。所有患者均排除合并有严重心、肺、脑、肝、肾等重要脏器功能障碍及其他血液系统疾病。

1.2 治疗方法

所有患者均采用 VDCLP 诱导方案(长春新碱 2 mg · d⁻¹, d1、8、15、22;柔红霉素 40~45 mg ·

¹福建医科大学附属泉州第一医院血液科(福建泉州, 362000)

通信作者:朱雄鹏, E-mail: xiongpengzhu@163.com

$m^{-2} \cdot d^{-1}$, d1~3, 15~17; 环磷酰胺 $600 mg \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$, d1, 15; 左旋门冬酰胺酶 $10000 u \cdot d^{-1}$, d19~28; 泼尼松 $40 \sim 60 mg \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$, d1~28)。化疗结束后常规行骨髓细胞学检查评估疗效。疗效判断按张之南等^[1]血液病诊断及疗效标准。

1.3 研究方法

1.3.1 细胞形态学分型诊断 骨髓涂片采用瑞特姬萨姆染色,于油镜下观察计数200个细胞,并做过氧化物酶染色(POX)、过碘酸-雪夫反应(PAS)及 α -醋酸萘酚酯酶染色和氟化钠抑制试验(NAE/NaF)等细胞化学染色;血涂片采用瑞特姬萨姆染色,油镜下分析计数100个细胞。

1.3.2 骨髓涂片免疫组织化学分析 取患者新鲜骨髓或外周血(WBC $> 10 \times 10^9/L$, 原始幼稚细胞 $> 20\%$)涂片,应用抗生物素蛋白生物素复合物(ABC-AP)免疫组织化学二步法常规操作,显色后以苏木精复染,显微镜观察计数阳性细胞百分率。阳性判断标准以细胞阳性率 $\geq 20\%$, CD34 细胞阳性率 $\geq 10\%$ 为阳性,其他抗原 $\geq 20\%$ 为阳性。各亚型分类参考Jenning和Foon的报道^[2]。

1.3.3 白血病细胞免疫表型分析 采用FACS-Canto II流式细胞仪(480 nm 氩离子为激发光源),3种荧光抗体荧光素异硫氰酸荧光素(FITC)/红蛋白(PE)/多甲藻叶绿素蛋白(PerCP)、鞘液(PBS)均购自美国Becton Dickinson公司。所有检测单克隆抗体包括T系CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8;B系CD10、CD19、CD20、CD22、CD79a;髓系CD13、CD14、CD15、CD33、CD117、MPO;细胞质抗原cCD3、cCD79a、cMPO;非特异性抗原单抗CD34、CD38、CD45、HLA-DR等。

1.3.4 实验方法 取EDTA抗凝的白血病患者全血或骨髓血2ml,采用直接免疫荧光法,对每一份标本,设对照管和实验管。分别加入EDTA抗凝全血100 μl ,3种荧光标记抗体各20 μl ,室温避光孵育约15 min,再加入2ml红细胞溶解液,震荡后置室温10 min,离心后弃上清,用磷酸盐缓冲液

(PBS)洗涤2次,加入15 ml PBS,上机待检。阳性判断标准:原始细胞 $\geq 20\%$, CD38、HLA-DR 均 $\geq 20\%$ 或细胞质抗原 cCD3、cCD79a、cMPO $\geq 10\%$, 其他单抗 $\geq 20\%$ 。

2 结果

2.1 免疫学分型特点

2.1.1 髓系相关抗原在ALL中的表达 46例ALL中,髓系相关抗原表达的发生率比较高,总计有28例,占60.9%(28/46),但未达到双表型急性白血病标准。B-ALL中有24例,占61.5%(24/39);T-ALL中有2例,占50.0%(2/4);T/B-ALL中有2例,占66.7%(2/3)。CD33⁺总计22例,占47.8%(22/46);CD13⁺总计20例,占43.5%(20/46);CD13⁺CD33⁺总计14例,占30.4%(14/46);CD11b⁺总计11例,占23.9%(11/46);CD117⁺总计8例,占17.4%(8/46),CD14、CD15、cMPO未见表达。详见表1。

2.1.2 髓系相关抗原与ALL临床特点的关系 My+ALL与My-ALL在性别、年龄、WBC、BCR/ABL融合基因方面,均差异无统计学意义。见表2。

2.1.3 干/祖细胞抗原及CD45在ALL各亚型中的表达 46例患者中,CD34、CD38、HLA-DR在B-ALL中的表达率最高。HLA-DR在T-ALL中的表达率最低,与在B-ALL和T/B-ALL中的表达率比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。大部分标本(87.0%)的幼稚细胞均出现CD45的缺失及弱表达。详见表3。

2.1.4 干/祖细胞相关抗原与ALL临床特点的关系 分别对CD34⁺与CD34⁻ALL、CD38⁺与CD38⁻ALL、HLA-DR⁺与HLA-DR⁻ALL的年龄、WBC、BCR/ABL融合基因比较,均差异无统计学意义。见表4。

2.2 免疫表型与化疗后完全缓解的关系

2.2.1 髓系抗原表达与化疗后完全缓解的关系 髓系抗原表达与化疗后完全缓解(CR)率无明显相

表1 ALL中髓系相关抗原表达

分型	例数	CD11b ⁺	CD13 ⁺	CD33 ⁺	CD13 ⁺ CD33 ⁺	CD14	CD15	CD117 ⁺	cMPO
B-ALL	39	10	16	17	10	0	0	7	0
T-ALL	4	1	3	3	3	0	0	0	0
T/B-ALL	3	0	1	2	1	0	0	1	0
合计	46	11	20	22	14	0	0	8	0

表2 ALL中髓系相关抗原表达与临床特征的关系

分组	例数	男:女	年龄/岁	WBC/例		Ph染色体/例	
				$\geq 30 \times 10^9/L$	$< 30 \times 10^9/L$	阳性	阴性
My+ALL	28	19:9	42.3 \pm 10.6	10	18	5	23
My-ALL	18	12:6	41.8 \pm 10.9	11	7	4	14

表 3 干/祖细胞相关抗原及 CD45 表达情况

分组	例数	例(%)			
		CD34	CD38	CD45	HLA-DR
B-ALL	39	22 (56.4)	26 (66.7)	5 (12.8)	28 (71.8)
B 祖	22	22 (100)	17 (77.3)	0	16 (72.7)
前 B	11	0	6 (54.5)	1 (9.1)	7 (63.6)
成熟 B	6	0	3 (50.0)	4 (66.7)	5 (83.3)
T-ALL	4	0	3 (75.0)	1 (25.0)	1 (25.0) ¹⁾
T/B-ALL	3	1 (33.3)	1 (33.3)	0	1 (33.3)
合计		23 (50.0)	30 (65.2)	6 (13.0)	30 (65.2)

与 B-ALL 和 T/B-ALL 比较,¹⁾ P<0.01。

关性,28 例髓系抗原表达阳性者(My+ALL)中达 CR 者 22 例,18 例髓系抗原表达阴性者(My-ALL)中达 CR 者 15 例,二者 CR 率比较差异无统计学意义(78.6% : 83.3%, $\chi^2=0.16, P>0.05$)。

2.2.2 祖/干细胞免疫表型与化疗后 CR 的关系
23 例 CD34⁺ ALL 中达 CR 者 18 例;23 例 CD34⁻ ALL 中达 CR 者 19 例,两者 CR 率比较差异无统计学意义(78.3% : 82.6%, P>0.05)。30 例 CD38⁺ ALL 中达 CR 者 24 例,16 例 CD38⁻ ALL 中达 CR 者 13 例,二者 CR 率比较亦差异无统计学意义(80.0% : 81.3%, P>0.05)。表明 ALL 患者 CD34 和 CD38 的表达并不降低其对化疗的反应性。30 例 HLA-DR⁺ ALL 中达 CR 者 21 例,16 例 HLA-DR⁻ ALL 中达 CR 者 16 例,两者 CR 率比较差异有统计学意义(70% : 100%, P<0.05)。

3 讨论

白血病是造血细胞恶性克隆性疾病,并表达与之相应的特异分化抗原,这些抗原可作为分类造血细胞的标记,因此可利用造血细胞分化抗原来标记检测白血病细胞。结合免疫学分型,可使白血病分

型准确率超过 90%,进而使白血病得到更正确的诊断和分型,以指导临床治疗^[3]。

本次研究 46 例 ALL 中,伴髓系抗原表达(My+ALL)是 ALL 常见的表型特征之一,即髓系细胞有淋系抗原表达或淋巴系细胞具有髓系抗原表达。此后国内外多数学者将伴有髓系抗原表达的 ALL(My+ALL)定义为骨髓细胞形态学和组织学符合 ALL,免疫表型则以淋系分化抗原为主伴有髓系抗原表达。据文献报道 My+ALL 在 ALL 中占 52.7%,认为其起源于比淋巴定向干细胞更原始的干细胞,故常见于分化较差的 ALL 患者^[4]。本研究中 28 例表达髓系相关抗原,发生率较高。髓系抗原中 CD13、CD33 在 ALL 中表达率分别为 43.5%和 47.8%,两者共表达占 30.4%,髓系相关抗原表达依次为 CD33>CD13>CD11b>CD117, CD14、CD15、cMPO 几乎未见表达。关于非淋系相关抗原表达与预后的意义,各报道不尽一致。国外有报道 My+ALL 的 CR 率及预后与 My-ALL 差异无统计学意义,而国内有报道 My+ALL 与 CR 率呈负相关,且认为 My+ALL 预后不良。我们未能得出此结论,原因可能是治疗方案和化疗剂量不同以及疗效判断时机不一等。虽然 My+ALL CR 率与 My-ALL 比较差异无统计学意义,但目前认为 My+ALL 对常规 VDCP 化疗方案反应较差,加用含阿糖胞苷兼顾髓系和淋系的方案如 DOAP 较好^[5]。

本研究 46 例成人 ALL 中有 40 例(87.0%)出现白细胞共同抗原 CD45 的缺失及弱表达,为最常见的免疫表型异常。CD34、CD38 和 HLA-DR 为造血细胞早期分化阶段的表面分化抗原,无系列特异性,但有利于区别白血病细胞的分化程度。46 例 ALL 中 CD34、CD38 和 HLA-DR 的表达率分别为 50.0%、65.2%和 65.2%。B-ALL 中的 CD34、CD38 均具有较高的表达,并且 CD38 的表达率高于 CD34。有资料表明,CD34 是预后相关的一项指标,且与治疗效果呈负相关^[6]。CD38 在干细胞上的表达晚于 CD34,而 CD38 的表达与 ALL 患者发

表 4 ALL 干/祖细胞相关抗原与临床特征的关系

临床特征	例数	年龄/岁	WBC/例		Ph 染色体/例	
			≥30×10 ⁹ /L	<30×10 ⁹ /L	阳性	阴性
CD34 ⁺ ALL	23	41.6±11.7	8	15	5	18
CD34 ⁻ ALL	23	42.7±9.5	6	17	4	19
CD38 ⁺ ALL	30	41.7±10.5	9	21	4	26
CD38 ⁻ ALL	16	42.9±11.0	6	10	5	11
HLA-DR ⁺ ALL	30	43.8±11.1	8	22	6	24
HLA-DR ⁻ ALL	16	39.6±9.40	4	12	3	13

表 3 MS-DAT 检测体内产生的抗红细胞抗体结果

	$\bar{x} \pm s$	
	抗红细胞抗体 IgG/(ng · ml ⁻¹)	
	有丝分裂原刺激型	无刺激型
WAIHA 患者		
治疗前	621 ± 95	517 ± 87
治疗后 6 个月	226 ± 32 ¹⁾	209 ± 30 ¹⁾
治疗后 12 个月	284 ± 39 ¹⁾	277 ± 24 ¹⁾
治疗后 24 个月	458 ± 56	411 ± 58
CHD 患者		
治疗前	579 ± 102	486 ± 85
治疗后 6 个月	214 ± 25 ¹⁾	209 ± 23 ¹⁾
治疗后 12 个月	206 ± 22 ¹⁾	203 ± 21 ¹⁾
治疗后 24 个月	263 ± 30 ¹⁾	254 ± 27 ¹⁾

与组内治疗前比较, ¹⁾ P < 0.05。

表 4 MS-DAT 检测不同浓度利妥昔单抗对抗红细胞抗体的影响

利妥昔单抗浓度 /(μg · ml ⁻¹)	抗红细胞抗体 IgG /(ng · ml ⁻¹)
0	477 ± 85
25	486 ± 93
50	197 ± 21
100	201 ± 21
200	186 ± 19
400	195 ± 20

(上接第 228 页)

病及转归密切相关,高表达者 CR 率低^[7]。其机制可能与多药耐药 P 糖蛋白(P-170)的表达有关,我们在今后的研究中会继续探讨这个问题。

HLA-DR 在 B-ALL 和 T/B-ALL 中的表达率较高,其阳性患者 CR 率明显低于阴性患者。故对于该类患者,临床上可采用相对大剂量的化疗方案以争取提高缓解率。

总之,免疫表型分析能增加诊断的正确率,预测急性白血病的预后,更有利于给予及时适当的治疗,为白血病治疗措施的个体化提供了一定的依据。我们通过对 46 例初治成人 ALL 的免疫表型分析,了解该疾病的表型特点,对此类疾病的诊断、治疗及预后都有重要的意义。

参考文献

[1] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版,北

本研究采用前瞻性设计的同时存在不足之处,未设置对照组且研究的样本量有限,但这并不影响本实验的结论:使用小剂量利妥昔单抗联合短期口服泼尼松治疗 AIHA 有效,可以使患者缓解,并能够减少自身抗体的产生。

参考文献

[1] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京:科学出版社,2008:69-70.
 [2] Swiecicki PL, Hegerova LT, Gertz MA. Cold agglutinin disease[J]. Blood, 2013, 122: 1114-1121.
 [3] Crowther M, Chan YL, Garbett IK, et al. Evidence-based focused review of the treatment of idiopathic warm immune haemolytic anaemia in adults[J]. Blood, 2011, 118: 4036-4040.
 [4] Lechner K, Jäger U. How I treat autoimmune hemolytic anemias in adults[J]. Blood, 2010, 116: 1831-1838.
 [5] Patel VL, Mahévas M, Lee SY, et al. Outcomes 5 years after response to rituximab therapy in children and adults with immune thrombocytopenia[J]. Blood, 2012, 119: 5989-5995.
 [6] Penalver FJ, Alvarez-Larrán A, Díez-Martin JL, et al. Rituximab is an effective and safe therapeutic alternative in adults with refractory and severe autoimmune hemolytic anemia[J]. Ann Hematol, 2010, 89: 1073-1080.

(收稿日期:2014-05-28)

京:科学出版社,2007:116-120.

[2] Winslow ER, Brunt LM, Drebin JA, et al. Portal vein thrombosis after splenectomy[J]. Am J Surg, 2002, 184: 631-636.
 [3] 胡群. 急性淋巴细胞性白血病的 MICM 分型[J]. 实用儿科临床杂志, 2008, 23: 1141-1142.
 [4] 王翠翠,周春林,王慧君,等. 成人急性淋巴细胞白血病的分型探讨[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(7): 439-444.
 [5] 庄红丽,孙慧,张秋堂. 急性淋巴细胞白血病免疫分型与疗效分析[J]. 临床荟萃, 2006, 21(18): 1321-1322.
 [6] 宣柳,沈佐君,李筱青. 双表型急性白血病的免疫分型[J]. 安徽医科大学学报, 2007, 42(6): 705-706.
 [7] 丁才智. CD34、CD38 和 HLA-DR 表达及其对急性白血病诊治的意义[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(20): 2502-2504.

(收稿日期:2014-07-30)