

免疫相关性血细胞减少症的诊断及鉴别诊断*

刘惠¹ 付蓉¹ 邵宗鸿¹

[关键词] 免疫相关性血细胞减少症;自身抗体;骨髓库姆试验;流式细胞术;骨髓衰竭

[中图分类号] R552 [文献标志码] C [文章编号] 1004-2806(2013)07-0437-03



专家介绍:邵宗鸿,男,教授,主任医师,博士生导师。1982年毕业于上海医科大学(现复旦大学上海医学院),现任天津医科大学总医院血液内科主任。曾2次赴美国学习。兼任中华医学会血液学分会副主任委员兼红细胞疾病学组组长;中国医师协会血液科医师分会副会长;中国免疫学会血液免疫学分会候任主任委员兼临床治疗学组组长,天津医学会血液学分会主任委员,《中华血液学杂志》副主编等。擅长再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合征、免疫相关性血细胞减少症、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、出凝血疾病及造血系统肿瘤性疾病的诊断和治疗。

免疫相关性血细胞减少症(immuno-related hemocytopenia, IRH)是近十余年从骨髓衰竭性疾病中分离出的一类新的疾病体系。其发病机制是由于某种未知病原刺激后,主要抗原呈递细胞树突状细胞亚群出现异常,引起下游T淋巴细胞调控失衡,导致B淋巴细胞数量、亚群、功能异常,进而产生仅针对骨髓造血细胞的自身抗体,通过介导巨噬细胞吞噬、激活补体原位溶血或封闭造血细胞膜上的功能蛋白,抑制造血细胞增殖分化而导致骨髓衰竭或无效造血^[1-10]。临床上,IRH常被误诊为不典型再生障碍性贫血(AA)或骨髓增生异常综合征(MDS),且疗效欠佳,迁延不愈。因此,正确诊断IRH,将其与其他骨髓衰竭性疾病鉴别开是临床上提高疗效的前提。以往IRH的诊断主要依靠骨髓库姆试验(BMMNC-Coombs试验)或流式细胞术(FCM)检测骨髓造血细胞膜自身抗体,近几年随着检测技术的发展,IRH的诊断亦不断进展,现阐述如下。

1 IRH的提出

上世纪90年代,我们在临床上观察到一组患者初诊时表现为二系或三系血细胞减少,而常规检

查结果又不符合阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、慢性病贫血、缺铁性贫血(IDA)、叶酸和(或)维生素B12缺乏性巨幼细胞贫血、自身免疫性溶血性贫血、AA、MDS及先天性溶血性贫血等已知血细胞减少症的诊断标准,但对肾上腺皮质激素或(和)大剂量静脉滴注丙种球蛋白(HDIVIG)疗效明显^[11-12]。这提示我们此类病症可能由自身抗体介导,故我们尝试用骨髓单个核细胞代替成熟红细胞进行BMMNC-Coombs试验,结果发现明显细胞聚集现象,证实在此类疾病中存在自身抗体。IRH的提出,不仅有利于临床上采用正确的治疗方法,提高疗效,减轻患者负担,而且有利于深入研究其病理机制,减少对其他血细胞减少症的诊断、治疗及发病机制研究的干扰,增加其他血细胞减少症研究的客观性和可靠性。

2 IRH的诊断

IRH的诊断主要依据患者临床表现和实验室检查结果综合诊断。其拟诊标准为:①两系或全血细胞减少,网织红细胞和(或)中性粒细胞比例不低;骨髓中红系细胞比例正常或偏高,易见红系细胞“造血岛”及红细胞吞噬现象;②除外其他原发、继发性血细胞减少症。其确诊标准为符合拟诊标准,并进一步应用BMMNC-Coombs试验(凝集法)或FCM检测到骨髓造血细胞膜自身抗体(荧光法)即可确诊(治疗前确诊);若未进行检测或未检测到骨髓未成熟造血细胞膜结合自身抗体,但经HDIVIG和(或)糖皮质激素等免疫抑制剂治疗有效也可确

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81170472、30971286、30971285);卫生部卫生行业科研专项(No:201202017);天津市自然科学基金重点项目(No:12JCZDJC21500);天津市抗癌专项(No:12ZCDZSY17900、12ZCDZSY18000);天津市卫生局科技攻关项目(No:11KGL35)

¹天津医科大学总医院血液内科(天津,300052)

通信作者:邵宗鸿,E-mail:shaozonghong@sina.com

诊(治疗后确诊)。

孙娟等(2005)研究显示,BMMNC-Coombs 试验阳性率约为 67%,其灵敏性为 60.3%,特异性为 100%;FCM 检测自身抗体阳性率约为 90%,其中干祖细胞自身抗体阳性率约 94.1%,有核红细胞自身抗体阳性率约 43.1%,粒细胞自身抗体阳性率约为 66.7%。结合患者临床表现、其他实验室检查及疗效观察,我们发现上述 2 种实验仍存在一定缺陷:BMMNC-Coombs 试验灵敏性偏低,FCM 检测法易出现假阳性(尤其是在 CD34⁺干祖细胞上),仍有少部分患者临床特征极似 IRH,但 2 种方法均未检测出自身抗体等。

针对上述问题,我们经过不断的摸索对 FCM 检测方法进行了改进:①提取肝素抗凝的新鲜骨髓后应先用 PBS 洗涤 3 次,去除细胞表面非特异性吸附的免疫球蛋白等可能干扰检测的物质,减少假阳性率,提高特异性。②以往数据显示干祖细胞自身抗体阳性率偏高,经过长期的临床观察,我们发现此部分实验特异性明显低于其他细胞系。究其原因主要是由于 CD34⁺干祖细胞数量极少,以往检测过程中只在前向角(FSC)和侧向角(SSC)的散点图中利用单一设门选取骨髓单个核细胞团的方法易出现假阳性。因此,我们选取骨髓单个核细胞后再次应用 CD34 和 SSC 设门,纯化这部分细胞,之后再检测其细胞膜上自身抗体的阳性率。同时,建议上机检测时至少收集 10 万细胞,确保足够数量的 CD34⁺干祖细胞,可明显降低假阳性。③在每次检测前,注意利用单阳管(CD15⁺、GlyCoA⁺、CD34⁺)调整 FITC 和 PE 两种荧光素之间的补偿,以保证实验的准确性。④建议取材时注意骨髓的增生程度,如部分患者髂骨增生重度减低,实验过程中无法得到足够数量的造血细胞,可能出现假阴性或假阳性,导致实验误差。这种情况下可考虑抽取胸骨骨髓标本,有利于提高实验准确率。

此外,我们发现小部分患者在临床特征上与 IRH 极其相似,但 BMMNC-Coombs 试验及 FCM 检测自身抗体均为阴性,提示我们这 2 种实验仍存在假阴性。为进一步提高 IRH 的检出率,我们尝试骨髓间接 Coombs 试验,应用待测患者的骨髓上清液与 IDA 对照者的骨髓有核细胞孵育 45 min,FCM 检测骨髓造血细胞膜抗体。结果显示,其阳性率约为 50%,其中骨髓直接 Coombs 试验阴性者中阳性率为 50%。提示部分 IRH 患者骨髓上清液中存在自身抗体^[13]。该实验可在一定程度上弥补骨髓直接 Coombs 试验的不足,降低临床漏诊率,但目前试验样本量尚小,仍需进一步改善方法,增加样本量。

IRH 的诊断中必不可少的一点就是要除外其他血液系统或非血液系统疾病,临床工作中尤其要

重视排除诊断。因此,不明原因的血细胞减少患者初诊时要进行全面、系统的检查以除外其他疾病。主要检查项目有:①血液系统常规检查,包括血常规(包括网织红细胞)、外周血 CD59 和 CD55、外周血 Coombs 试验、血小板相关抗体检测、凝血功能、免疫功能状态(CD4⁺/CD8⁺T 细胞亚群、调节性 T 细胞、B 细胞亚群、NK 细胞等)、双部位骨髓涂片、骨髓活检、骨髓 Coombs 试验或 FCM 检测自身抗体实验、染色体、FISH 检测、骨髓 CD34⁺干祖细胞检测等;②非血液系统检查,包括肝肾功能、免疫风湿全项、心电图、腹部 B 超(肝胆胰脾肾)、胸片等。

3 IRH 的鉴别诊断

临床上 IRH 易与其他骨髓衰竭性疾病混淆,如 AA、PNH、MDS、急性造血功能停滞(AHA)及 Coombs 试验阴性的 Evans 综合征等。其鉴别如下:①AA 是一种以骨髓造血组织为靶器官、T 细胞免疫功能亢进为特征的自身免疫性疾病。其与 IRH 的根本区别在于 AA 为细胞免疫亢进,而 IRH 为体液免疫亢进。故诊断 AA 既要有形态学上的骨髓衰竭证据,又要有 T 细胞免疫功能亢进的证据^[14]。因此,建议初诊患者在完善骨髓常规检测的同时,要检测其免疫功能状态(包括 T、B 细胞),并且在治疗后定期监测,有助于观察疗效及疾病进展情况。②近年发现部分患者的 PNH 克隆未及分化至成熟红细胞就被补体在骨髓原位溶解,且这些溶解的细胞因子未形成血红蛋白,几乎无血管内容血表现,极易漏诊。另外,当原位溶血的 PNH 细胞处于干祖细胞阶段时,骨髓造血就呈衰竭状态,这部分 PNH 极易与 AA、MDS 或 IRH 混淆。目前,临床上诊断 PNH 的“金标准”是检测外周血中性粒细胞和成熟红细胞膜上锚链蛋白 CD59、CD55 表达(Ⅱ型和Ⅲ型细胞为 PNH 克隆)。近几年发展起来的嗜水气单胞菌溶素变异体(FLAER)检测法可直接检测 GPI 锚,而非锚链蛋白,较 CD59、CD55 更敏感、准确;其缺点是仅可检测白细胞,而不能检测红细胞,故建议与 CD59、CD55 联合检测^[15]。③MDS 是一类造血干细胞恶性克隆性疾病,表现为骨髓病态造血及无效造血,外周血细胞一系或多系减少伴形态异常,高风险转化为急性白血病。MDS 的诊断,尤其是低危 MDS 的诊断历来是国内外血液学家关注的焦点。2007 年,维也纳会议达成共识,进一步明确 MDS 为髓系肿瘤性疾病,并提出 MDS 最低诊断标准(维也纳标准),涵盖了诊断 MDS 所需的多项指标^[16]。该诊断标准包括 2 个必备条件(持续 6 个月以上的血细胞减少并除外其他疾病)、3 个确诊条件(病态造血、原始细胞比例及典型染色体核型异常)及 3 个辅助条件(免疫表型、细胞遗传学检测发现单克隆造血及集落形成异常)。满足必备条件和 1 个以

上确诊条件者可诊断为MDS;若只满足必备条件,则参照辅助条件,满足的越多,MDS诊断成立的可能性越大。如今,联合多指标综合诊断(细胞形态学、组织化学、分子遗传学、免疫表型等)是MDS诊断的主导思想。④AHA是一种良性、获得性、自限性造血功能衰竭症,多数患者有一定诱因(感染、药物、化学中毒、接触射线、疫苗接种等),发病时表现为急剧、重度全血细胞减少伴骨髓衰竭(骨髓片尾可见大红细胞或大粒细胞),去除诱因并给予充分支持治疗后血象和骨髓在6周内完全恢复正常且不复发。AHA多为回顾性诊断(按上述特点),少数患者有明确诱因,且骨髓形态特点典型可前瞻性诊断。其发病机制尚未明了,可能为早期、可逆的良性持久性骨髓衰竭症(AA、IRH)。对临床上短期(1个月左右)完全恢复的骨髓衰竭症(无论用何种治疗)都应想到AHA的可能。⑤少数Evans综合征患者外周血Coombs试验呈阴性,临床上易与未检测到骨髓造血细胞自身抗体、治疗后确诊的IRH混淆。两者区别在于Evans综合征患者有明确溶血证据,如间接胆红素明显升高、游离血红蛋白明显增高/结合珠蛋白消失等,而IRH患者则无明显溶血证据。

综上,IRH作为一个全新的疾病体系,其诊断不仅仅依赖于骨髓自身抗体的检测,更要注重与其他骨髓衰竭性疾病的鉴别及除外诊断。只有正确诊断,才能正确治疗,从而提高临床疗效。今后,随着疾病发病机制的深入研究及实验技术的不断发展,相信会有更为灵敏、特异的指标用于IRH的诊断。

[编者按:免疫相关性血细胞减少症(IRH)是本文作者邵宗鸿教授多年来的主要研究成果之一。它的提出及围绕其诊断、鉴别诊断、治疗等的相关研究引起了血液学界的极大关注。本文特请原创者系统、扼要地介绍了有关IRH的主要观点及近期成果,以期进一步深化IRH的研究和讨论。]

参考文献

- [1] 滕广帅,付蓉,刘惠,等.免疫相关性全血细胞减少症患者树突状细胞亚群、数量及其临床意义[J].中国实验血液学杂志,2012,20(3):722-726.
- [2] 付蓉,陈瑾,王红蕾,等.骨髓Coombs试验阳性血细胞减少症患者调节性T细胞数量及功能状态[J].中华医学杂志,2010,90(42):2989-2992.
- [3] 付蓉,王红蕾,陈瑾,等.骨髓单个核细胞Coombs试

验(+)血细胞减少症患者Th17细胞数量及功能研究[J].中华血液学杂志,2010,31(10):684-687.

- [4] FU R,SHAO Z H,LIU H,et al. Role of B lymphocyte and its subpopulations in pathogenesis of immunorelated pancytopenia[J]. Chin Med Sci J,2007,22:199-202.
- [5] 王一浩,付蓉,邵宗鸿,等.骨髓单个核细胞Coombs实验(+)血细胞减少患者骨髓巨噬细胞数量及功能的研究[J].中华血液学杂志,2009,30(8):538-542.
- [6] 王一浩,付蓉,邵宗鸿,等.骨髓单个核细胞Coombs试验阳性血细胞减少患者骨髓巨噬细胞活化抗原表达及其临床意义[J].中华内科杂志,2010,49(2):146-149.
- [7] 陈瑾,付蓉,李丽娟,等.骨髓单个核细胞Coombs试验阳性的血细胞减少患者补体水平变化及其意义[J].中华血液学杂志,2009,30(7):544-547.
- [8] 刘惠,付蓉,李丽娟,等.骨髓单个核细胞Coombs试验(+)血细胞减少症患者有核红细胞膜EPO受体与自身抗体关系的初步研究[J].中华血液学杂志,2010,31(6):413-415.
- [9] 王一浩,付蓉,刘惠,等.免疫相关性全血细胞减少症患者自身抗体IgG对红细胞生成素受体封闭的作用[J].中华血液学杂志,2011,32(11):794-795.
- [10] 付蓉,刘惠,王珺,等.骨髓单个核细胞Coombs试验阳性血细胞减少患者骨髓红系造血细胞膜靶抗原初步研究[J].中华医学杂志,2012,92(38):2689-2663.
- [11] 邵宗鸿,付蓉.免疫相关性血细胞减少症——一种新认知的疾病(上)[J].中国医刊,2005,40(1):5-8.
- [12] 邵宗鸿,付蓉.免疫相关性血细胞减少症——一种新认知的疾病(下)[J].中国医刊,2005,40(2):70-73.
- [13] 邵丽娟,付蓉,刘惠,等.骨髓间接Coombs试验方法的应用及其对免疫相关性全血细胞减少症患者的临床诊断意义[J].中国实验血液学杂志,2012,20(2):505-509.
- [14] 中华医学会血液学分会红细胞疾(贫血)学组.再生障碍性贫血诊断治疗专家共识[J].中华血液学杂志,2010,31(11):790-792.
- [15] SUTHERLAND D R,KUEK N,DAVIDSON J,et al. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry[J]. Cytometry B Clin Cytom,2007,72:167-177.
- [16] VALENT P,HORNY HP,BENNETT J M,et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference[J]. Leuk Res,2007,31:727-736.

(收稿日期:2013-06-17)