

阵发性睡眠性血红蛋白尿症患者血细胞表面 CD55 和 CD59 的检测及临床意义

吴敏乐¹, 张臣青^{2△}, 黄家福¹, 曾绍毅¹, 王丹林¹ (1. 福建医科大学医学检验系, 福州 350004; 2. 福建医科大学附属协和医院流式细胞室, 福州 350001)

【摘要】 目的 探讨红细胞和粒细胞膜 CD55 与 CD59 抗原表达在阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)诊断中的应用。**方法** 采用流式细胞术结合直接免疫荧光法检测 25 例 PNH、20 例再生障碍性贫血(AA)、20 例健康对照者外周血红细胞和粒细胞膜 CD55 和 CD59 抗原的表达,并同时做酸化血清溶血试验(Ham 试验)、蔗糖溶血试验和尿含铁血黄素试验(尿 Rous 试验)。**结果** 与 AA 组和健康对照组相比,PNH 患者外周血红细胞、粒细胞膜 CD55、CD59 表达缺失率均明显增高($P < 0.05$);而 AA 组和健康对照组缺失率均小于 5%,且两者之间差异没有统计学意义($P > 0.05$)。25 例 PNH 患者中,9 例 Ham 试验阴性,6 例蔗糖溶血试验阴性,7 例尿 Rous 试验阴性,这些患者的红细胞、粒细胞的 CD55、CD59 表达缺失率均大于 5%。**结论** 利用流式细胞术同时检测患者红细胞和粒细胞膜 CD55 与 CD59 抗原对 PNH 的诊断与鉴别诊断具有重要价值。

【关键词】 CD55; CD59; 阵发性睡眠性血红蛋白尿症; 流式细胞术

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.07.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)07-0771-02

Detection and clinical significance of CD55 and CD59 expressed on blood cells surface of patients with PNH WU Min-le¹, ZHANG Chen-qing^{2△}, HUANG Jia-fu¹, ZENG Shao-yi¹, WANG Dan-lin¹ (1. Laboratory Medical Science, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350004, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350000, China)

【Abstract】 Objective To discuss the application of CD55 and CD59 antigen expressions of the erythrocyte and granulocyte cell membranes in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). **Methods** Expressions of CD55 and CD59 antigens in the cell membranes of peripheral erythrocytes and granulocytes were detected in 25 cases with PNH, 20 cases with aplastic anemia (AA) and a control group of 20 healthy individuals through the use of flow cytometry and direct immunofluorescence. Sucrose hemolysis test, Ham test, and Urine Rous test were simultaneously done. **Results** The negative expression rates of CD55 and CD59 antigens in the cell membranes of peripheral erythrocytes and granulocytes in the PNH patients were markedly higher than those in the AA patients and healthy individuals in the control group ($P < 0.05$), whose negative expression rates were both less than 5%. There was no statistically significant difference ($P > 0.05$). Six cases of negative sucrose hemolysis, nine cases of negative Ham test and seven cases of negative Urine Rous test were found among the 25 PNH patients, whose negative expression rates of CD55 and CD59 antigens were both greater than 5%. **Conclusion** The simultaneous detection of patients' CD55 and CD59 antigens in the cell membranes of erythrocytes and granulocytes by flow cytometry is significantly valuable in the diagnosis and differential diagnosis of PNH.

【Key words】 antigens CD55; antigens CD59; paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; flow cytometry

阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)是一种获得性红细胞膜缺陷性疾病,发病时临床表现为清晨酱油色尿,慢性血管内溶血,可伴有全血细胞减少和反复血栓形成^[1]。传统诊断 PNH 常用的方法有尿 Rous 试验、蔗糖溶血试验、Ham 试验,但这些方法敏感性、特异性差^[2-3]。作者应用流式细胞仪检测 PNH 患者外周血粒细胞和红细胞膜抗原 CD55、CD59 表达,探讨 CD55、CD59 抗原检测在 PNH 诊断中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 5 月至 2012 年 4 月福建医科大学附属协和医院门诊及住院贫血或全血细胞减少患者 45 例,其中 PNH 患者 25 例,男 19 例,女 6 例,中位年龄 36.0 岁(20~66 岁);再生障碍性贫血(AA)20 例,男 9 例,女 11 例,中位年龄 43.7 岁(10~72 岁)。同时选健康者 20 例作为健康对照组,男 10 例,女 10 例,中位年龄 33.2 岁(23~47 岁)。PNH

和 AA 诊断参照文献[4]。

1.2 方法

1.2.1 试剂 IgG1-FITC 同型对照、IgG1-PE 同型对照、CD55-PE、CD59-FITC 和溶血素 OptiLyse C 均购自美国贝克曼库尔特公司;蔗糖溶血试验、尿 Rous 试验、酸化血清溶血试验所用试剂为本科配制^[5]。

1.2.2 红细胞膜 CD55、CD59 检测 应用直接免疫荧光标记法^[6]。取 3 支空白试管,分别标记 1、2、3,10 μ L 肝素抗凝经磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后稀释于 1.5 mL 的 PBS 中,各取 100 μ L 分别加入 3 支管中。于管 1 中加入 20 μ L 同型对照,于管 2 中加入 20 μ L 荧光抗体 CD59,于管 3 中加入 20 μ L 荧光抗体 CD55,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 2 mL PBS 洗 2 遍。重悬于 1 mL PBS 中,上机检测。

1.2.3 粒细胞膜 CD55、CD59 检测 应用直接免疫荧光标记

△ 通讯作者, E-mail: chengqingzhang68@yahoo.com。

法^[6]。取 3 支试管,分别标记 1、2、3,取 100 μ L 全血于管中,于管 1 中加入 20 μ L 同型对照,于管 2 中加入 20 μ L 荧光抗体 CD59 和管 3 中加入 20 μ L 荧光抗体 CD55,室温避光 30 min;于 3 支管中加入 500 μ L 溶血素,室温避光 10 min,溶血完全后 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 2 mL PBS 洗 2 遍,重悬于 0.5 mL PBS 中,上机检测。

1.2.4 血液生化检验 Ham 试验、蔗糖溶血试验、尿 Rous 试验采用常规方法^[7]。

1.3 判断标准 以健康者红细胞和粒细胞的 CD55、CD59 表达作为对照设定阴性阈值,CD55、CD59 抗原表达阴性百分率大于 5%被判为抗原表达缺失,可认定为 PNH 克隆^[8]。

1.4 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用 SPSS10.0 软件分析数据,两组间比较用 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PNH 患者粒细胞与红细胞 CD55、CD59 抗原缺失表达 PNH 组粒细胞膜 CD55、CD59 抗原表达缺失率分别为 (39.0 $\pm$ 12.8)%和 (48.1 $\pm$ 11.2)%,红细胞膜则为 (31.9 $\pm$ 9.5)%和

(43.6 $\pm$ 11.2)%,与 AA 组和健康对照组比较明显升高,见表 1。

2.2 PNH 患者 Ham 试验检查与粒细胞和红细胞 CD55、CD59 抗原缺失率的关系 PNH 组中,Ham 试验阳性患者的粒细胞和红细胞 CD55、CD59 抗原缺失率分别为 (54.5 $\pm$ 14.9)%、(63.9 $\pm$ 8.2)%和 (41.8 $\pm$ 12.0)%、(59.3 $\pm$ 11.7)%,与 Ham 试验阴性者比较差异有统计学意义 (*P*<0.05),见表 2。

2.3 PNH 患者蔗糖溶血试验检查与粒细胞和红细胞 CD55、CD59 抗原缺失率的关系 与蔗糖溶血试验阴性患者比较,19 例蔗糖溶血试验阳性 PNH 患者红细胞、粒细胞的 CD55、CD59 缺失率有所升高(见表 2),但两者之间的差异没有统计学意义 (*P*>0.05)。

2.4 PNH 患者尿 Rous 试验检查与粒细胞和红细胞 CD55、CD59 抗原缺失率的关系 与 PNH 组中尿 Rous 试验阴性患者的红细胞、粒细胞的 CD55、CD59 缺失率比较,PNH 组中 18 例尿 Rous 试验阳性患者的红细胞膜、粒细胞膜 CD55、CD59 抗原缺失率有所升高(见表 2),但差异无统计学意义 (*P*>0.05)。

表 1 PNH 组、AA 组和健康对照组粒细胞与红细胞 CD55、CD59 抗原缺失率($\bar{x}\pm s$,%)

组别	<i>n</i>	红细胞		粒细胞	
		CD55	CD59	CD55	CD59
PNH 组	25	31.9 $\pm$ 9.5 ^{ab}	43.6 $\pm$ 11.2 ^{ab}	39.0 $\pm$ 12.8 ^{ab}	48.1 $\pm$ 11.2 ^{ab}
AA 组	20	3.7 $\pm$ 0.9	3.5 $\pm$ 1.1	2.6 $\pm$ 0.7	2.9 $\pm$ 0.9
健康对照组	20	3.5 $\pm$ 0.7	1.6 $\pm$ 1.4	1.2 $\pm$ 1.4	0.4 $\pm$ 0.5

注:与 AA 组比较,^a*P*<0.05,与健康对照组比较,^b*P*<0.05。

表 2 25 例 PNH 患者血液生化检查与粒细胞和红细胞 CD55、CD59 缺失率的关系($\bar{x}\pm s$,%)

组别	<i>n</i>	红细胞		粒细胞	
		CD55	CD59	CD55	CD59
Ham 试验	阴性组 9	14.4 $\pm$ 7.7	16.5 $\pm$ 6.7	11.5 $\pm$ 6.5	19.9 $\pm$ 14.8
	阳性组 16	41.8 $\pm$ 12.0 ^a	59.3 $\pm$ 11.7 ^a	54.5 $\pm$ 14.9 ^b	63.9 $\pm$ 8.2 ^b
蔗糖溶血试验	阴性组 6	17.0 $\pm$ 12.4	25.2 $\pm$ 20.3	19.6 $\pm$ 17.1	32.2 $\pm$ 29.3
	阳性组 19	36.9 $\pm$ 11.4	49.3 $\pm$ 13.0	45.1 $\pm$ 15.5	52.8 $\pm$ 12.5
尿 Rous 试验	阴性组 7	29.4 $\pm$ 20.0	35.1 $\pm$ 23.5	24.2 $\pm$ 18.0	33.2 $\pm$ 21.7
	阳性组 18	32.9 $\pm$ 12.0	46.8 $\pm$ 13.8	44.7 $\pm$ 16.4	53.9 $\pm$ 13.3

注:Ham 试验为酸化血清溶血试验;尿 Rous 试验为尿含铁血黄素试验。与阴性组比较,^a*P*<0.05,^b*P*<0.01。

3 讨 论

PNH 是一种获得性造血干细胞基因突变引起血细胞膜缺陷所致的克隆性疾病,其特征为细胞膜表面缺乏一系列糖基磷脂酰肌醇锚蛋白,导致异常细胞对自身补体敏感性增加而发生溶血。CD55 和 CD59 可检测仅占 3% 的异常细胞存在,而传统诊断 PNH 试验的目的是为证明有对补体敏感的红细胞,如蔗糖溶血试验、尿 Rous 试验作为筛选试验,以 Ham 试验阳性作为 PNH 的确诊试验,但 PNH 患者 Ham 试验的阳性率只有 60%~80%^[9]。近年来,使用单克隆抗体和流式细胞术检测 CD55、CD59 标记明显优于传统的溶血试验,已成为诊断 PNH 特异的重要手段^[10-11]。

本研究结果表明,25 例 PNH 患者中,蔗糖溶血试验 6 例阴性;Ham 试验 9 例阴性;尿 Rous 试验 7 例阴性,这些患者的红细胞、粒细胞的 CD55 缺失率、CD59 缺失率均大于 5%,这说明 CD55、CD59 检测对于 PNH 诊断的敏感性明显优于 Ham

试验、蔗糖溶血试验及尿 Rous 试验。本研究还发现,CD59 缺失率细胞高于 CD55 缺失率,说明检测 CD59 比 CD55 敏感性高^[12]。临床上 PNH 与 AA 的临床表现有相似之处,且少数 AA 可以转变 PNH,因此 PNH 应与 AA 相鉴别。本研究发现,PNH 与 AA 患者 CD55、CD59 在粒细胞和红细胞膜上的表达情况明显不同,因此 CD55、CD59 检测可用于 PNH 诊断及鉴别诊断。此外,值得一提的是由于 PNH 患者在溶血、输血以后,PNH 克隆红细胞被破坏,而正常输入的红细胞寿命又较长,若仅检测红细胞的 CD55、CD59 容易造成假阴性。

综上所述,作者认为应用单克隆抗体和流式细胞术同时检测粒细胞和红细胞膜 CD55、CD59 具有传统方法无可比拟的优势,是血液生化检查的重要补充和进一步深化,是目前诊断 PNH 可靠的、敏感的方法,也可以作为评判病情疗效的监测手段。因此,建议检测粒、红细胞膜 CD55 和 CD59 表达作为诊断 PNH 的常规检查项目。(下转第 774 页)

续表 1 142 株洋葱伯克霍尔德菌的药敏试验结果(%)

抗菌药物	耐药	中介	敏感
头孢曲松	75.1	9.8	15.1
亚胺培南	67.4	13.8	18.8
环丙沙星	63.8	5.1	31.1
氨曲南	30.9	40.2	28.9
米诺环素	22.8	0.0	78.2
头孢哌酮/舒巴坦	8.5	17.0	74.5
头孢吡肟	7.6	9.3	83.1
复方磺胺甲噁唑	7.1	2.0	90.9
头孢他啶	5.9	3.8	90.3
左氧氟沙星	5.5	7.2	87.3
哌拉西林/他唑巴坦	5.1	7.7	87.2

3 讨 论

在医院环境中,洋葱伯克霍尔德菌可通过污染水、消毒液及导管等而导致多种医院感染,如呼吸道感染、新内膜炎、败血症、尿路感染、伤口感染等,其耐药现象严重,应引起临床抗感染治疗的高度重视。尤其是 ICU 患者,免疫功能低下,使用气管切开插管、深静脉留置导管等侵入性操作,而且长期使用激素以及头孢菌素、碳青霉烯类等抗菌药物,此菌的感染率较高。复方磺胺甲噁唑、头孢他啶、左氧氟沙星、哌拉西林/他唑巴坦可作为南海区第三人民医院和佛山市第一人民医院治疗该菌的经验用药。洋葱伯克霍尔德菌耐药机制复杂,一方面具有天然耐药性,比如对氨基糖苷类、多粘菌素类药物;另一方面在抗菌药物选择性压力下具有后天获得耐药性,文献报道该菌可以通过质粒或整合子等可移动耐药元件的转移而产生耐药性^[3]。本研究中,该菌对亚胺培南的敏感率仅为 18.8%,但头孢他啶的耐药率相对较低,是因为该菌能产生一种水解亚胺培南的金属酶-I(PCM-I)及特异性膜孔蛋白通道 oprD 缺失所致,PCM-I 对头孢他啶的水解作用较弱^[4-5]。该菌对喹诺酮类的耐药主要是由于外排泵系统。

总之,洋葱伯克霍尔德菌引起的感染治疗困难,临床要注

意预防感染的发生,加强消毒管理等预防制度,防止医院环境的污染,尤其是水和医用器械管路^[6-9]。另外,应根据药敏试验结果合理地选用抗菌药物;当经验用药时,应根据所在医院的细菌耐药趋势加以使用。

参考文献

[1] Romero-Gómez MP, Quiles-Melero MI, Peña García P, et al. Outbreak of Burkholderia cepacia bacteremia caused by contaminated chlorhexidine in a hemodialysis unit[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008, 29(4): 377-378.

[2] 叶应妩, 王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京: 东南大学出版社, 1997: 472-531.

[3] Chernish R N, Aaron S D. Approach to resistant gram-negative bacterial pulmonary infections in patients with cystic fibrosis[J]. Curr Opin Pulm Med, 2003, 9(6): 509-515.

[4] 李金钟. 洋葱伯克霍尔德菌复合体的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(3): 233-235.

[5] 薛红漫, 李红玉, 邹燕琴, 等. 洋葱伯克霍尔德菌医院感染的分布特征及耐药性分析[J]. 中国热带医学, 2007, 7(7): 1243-1244.

[6] 吕琳, 宋诗铎, 王玉宝, 等. 应用 REP-PCR 调查洋葱伯克霍尔德菌医院血流感染暴发[J]. 中国感染控制杂志, 2007, 6(4): 219-223.

[7] 刘义刚, 陶传敏, 陈文昭, 等. 156 株洋葱伯克霍尔德菌的临床分布及耐药性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2008, 39(1): 53-55.

[8] 张媛媛, 安东善. 洋葱伯克霍尔德菌感染临床资料与耐药性分析[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(11): 1549-1550.

[9] 朱婉, 褚卓卓, 张静萍. 2001~2006 年我院洋葱伯克霍尔德菌分离情况及耐药性分析[J]. 山东医药, 2008, 48(44): 99-100.

(收稿日期: 2012-09-08 修回日期: 2012-10-29)

(上接第 772 页)

参考文献

[1] 王艳, 左雅蓓, 王玉昭, 等. 阵发性睡眠性血红蛋白尿症的诊治[J]. 河北医药, 2012, 34(3): 430-432.

[2] 付蓉. 阵发性睡眠性血红蛋白尿症现代诊断与治疗[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 32(5): 327-330.

[3] 邹农, 韩冰, 蔡昊, 等. 76 例阵发性睡眠性血红蛋白尿症患者临床特点分析[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(6): 471-474.

[4] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 51-55.

[5] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国检验临床操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2009: 553-558.

[6] 刘艳荣. 实用流式细胞术——血液病篇[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2010: 289-290.

[7] 管洪在. 临床血液学与检验实验指导[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版, 2007: 94-123.

[8] 朱明清, 耿美菊, 陈黎, 等. CD55、CD59 检测阵发性睡眠性血红蛋白尿症标准方法建立[J]. 中国血液流变学杂志, 2006, 16(3): 447-448.

[9] 邵宗鸿, 刘惠. 阵发性睡眠性血红蛋白尿症病理机制[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 32(5): 324-326.

[10] 张田, 梁勇, 付蓉, 等. 阵发性睡眠性血红蛋白尿症患者 T 细胞亚群及其数量与功能的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(3): 721-725.

[11] 吕敏, 朱焕玲, 蒋能刚, 等. 血细胞减少患者衰变加速因子和膜反应性溶血抑制物表达缺失检测的临床意义[J]. 华西医学, 2012, 27(2): 163-167.

[12] Hernandez-Campo PM, Martin-Ayaso M, Almeida J, et al. Comparative analysis of different flow cytometry based immunophenotypic methods for the analysis of CD59 and CD55 expression on major peripheral blood cell subsets[J]. Cytometry, 2002, 50(3): 191-201.

(收稿日期: 2012-09-13 修回日期: 2012-11-22)