

免疫分型在单核细胞相关性急性髓细胞性白血病(M4/M5)鉴别诊断中的应用

林元峰, 郑源海, 周艳贞, 梅序桥(福建医科大学附属漳州市医院检验科 363000)

【摘要】 目的 探讨 CD14、CD11b、CD64、CD4 在鉴别诊断单核细胞相关性急性髓细胞性白血病(AML)(M4/M5)中的应用评价。**方法** 采用流式细胞术分析 420 例急性髓细胞性白血病患者骨髓或外周血标本的免疫表型。**结果** 在单核细胞相关性 AML(M4/M5)中 CD14、CD11b、CD64 和 CD4 的表达率依次为 45.4%、46.1%、83.0% 和 62.4%。与非单核细胞相关性急性髓细胞性白血病相比表达率高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。其中 CD14、CD11b 特异性高(100%和 91.8%), CD64 敏感性高(83.0%)。**结论** CD14、CD11b、CD64、CD4 有助于 M4/M5 与其他 AML 各亚型的鉴别诊断。

【关键词】 急性髓细胞性白血病; 急性单核细胞相关性髓细胞白血病; CD14; CD11b; CD64; CD4

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.19.010 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)19-2520-02

Differentially diagnostic value of immuno-phenotype in monocyte lineage relative acute myeloid leukemia (M4/M5)

LIN Yuan-feng, ZHENG Yuan-hai, ZHOU Yan-zhen, MEI Xu-qiao (Department of Clinical Laboratory, Zhangzhou Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

【Abstract】 Objective To study the differentially diagnostic value of CD14, CD11b, CD64 and CD4 in monocyte lineage relative acute myeloid leukemia (M4/M5). **Methods** Peripheral blood and bone marrow of 420 cases with acute myeloid leukemia was analyzed by flow cytometry. **Results** In monocyte lineage relative acute myeloid leukemia, the expression percentages of CD14, CD11b, CD64 and CD4 were 45.4%, 46.1%, 83.0% and 62.4%, which were significantly higher than patients with non-monocyte lineage relative acute myeloid leukemia ($P < 0.01$). CD14 and CD11b were with high specificity (100% and 91.8%) and CD64 was with high sensitivity (83.0%). **Conclusion** Detection of CD14, CD11b, CD64 and CD4 could be helpful for the differential diagnosis between M4/M5 and other types of acute myeloid leukemia.

【Key words】 acute myeloid leukemia; monocyte lineage relative acute myeloid leukemia; CD14; CD11b; CD64; CD4

传统 FAB 分型受主观因素的影响, 重复性较差, 准确率较低。20 世纪 80 年代初, 一个白血病的 MIC 研究协作组提出 MIC 分型标准^[1-2]。到 1999 年, 世界卫生组织(WHO)将具有特殊细胞遗传学及分子遗传学改变的白血病进行单独分类。MICM(Morphologic Immunologic Cytogenetic Molecular biology)分型使急性白血病诊断符合率大于 90%^[3]。作者采用四色流式细胞术 CD45/SSC 双参数散点图设门法对 420 例急性髓细胞性白血病(AML)患者进行白血病免疫分型检测, 观察 CD14、CD11b、CD64、CD4 在 AML 的表达情况, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 2007 年 9 月至 2012 年 4 月在本科进行免疫分型检测的 AML 患者 420 例, 其中急性髓细胞白血病微分型(M0)6 例、急性髓细胞白血病未成熟型(M1)18 例、急性髓细胞白血病部分成熟型(M2a)163 例、急性髓细胞白血病部分成熟型(M2b)28 例、急性早幼粒细胞白血病(M3)51 例、急性单核细胞相关性髓细胞白血病(M4/M5)141 例、红白血病(M6)11 例、急性巨核细胞白血病(M7)2 例。年龄 1~85 岁, 男 249 例, 女 171 例。以张之南的《血液学诊断与疗效标准》为诊断依据^[4]。

1.2 标本 化疗前采骨髓或外周血 2~5 mL 肝素钠抗凝。

1.3 仪器与试剂 Cytomics FC 500 流式细胞仪为 Beckman Coulter 公司产品。单克隆抗体异硫氰酸荧光素(FITC)标记: CD1a、CD3、CD4、CD7、CD9、CD15、CD34、CD38、CD41、CD71、

MPO; 藻红蛋白(PE)标记: CD2、CD8、CD10、CD13、CD22、CD33、CD42、CD64、CD117、Gly-A、CD79a; 藻红蛋白偶联物(PE-Cy5)标记: cCD3、HLA-DR、CD14、CD19、CD20、CD11b、CD56、CD123、TdT; 藻红蛋白偶联物(PE-Cy7)标记标记的 CD45; 破膜剂、溶血素及鞘液, 以上试剂均购自 Beckman Coulter 公司。

1.4 试验方法 各试管中分别加入肝素抗凝骨髓或外周血 50 μ L, 分别加入相应抗体各 5 μ L, 混匀室温避光孵育 15 min, 加入 500 μ L 溶血素, 混匀室温放置 10 min 后加入 500 μ L 磷酸盐缓冲液(PBS 0.01 mol/L pH 7.4)洗涤。胞浆内抗原 cMPO、cCD79a、cCD3、cTdT 的检测需加破膜剂, 再加相应抗体标记后, PBS 洗涤。所有样本最后均加入 500 μ L PBS 重悬上机检测。应用 CXP 分析软件每管获取 10 000 个细胞。抗体组合: CD4/CD64/CD14、CD7/CD10/CD19、CD38/CD22/CD20、CD15/CD13/CD11b、CD3/CD33/CD56、CD9/CD2/CD123、CD34/CD117/HLA-DR、cMPO/cCD79a/cTdT 经上述抗体检测后, 疑为 T-ALL 加做 CD4/CD8/cCD3、CD1a/CD2/CD5, 疑为 M6 或 M7, 加做 CD71/Gly-A 或 CD41/CD42。分析数据时, 观察 CD45/SSC 双参数散点图, 计算淋巴细胞、单核细胞、粒细胞、幼稚细胞和有核红细胞各群的比例, 确定异常细胞群, 进一步分析幼稚细胞的免疫表型特点。

1.5 统计学分析 所有的统计均采用 SPSS13.0 统计软件完成, 率的比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CD14、CD11b、CD64、CD4 在 AML 各亚型中的表达
CD14 在 M4/M5 中表达 45.4%(64/141),M0、M1、M2a、M2b、M3、M6、M7 都阴性;CD11b 除 M0、M7 不表达外,在 M4/M5 中表达 46.1%(65/141)显著高于 M1、M2a、M2b、M3、M6($P<0.01$);CD64 除 M0、M6、M7 不表达外,在 M4/M5 中表达 83.0%(117/141)显著高于 M1、M2a、M2b、M3($P<0.01$),其中 M3 也高表达 CD64 (60.8%);CD4 在 M4/M5 中表达 62.4%(88/141)显著高于 M2a、M2b($P<0.01$),M0、M1、M3、M6、M7 都阴性。见表 1。

表 1 CD14、CD11b、CD64、CD4 在各亚型 AML 的表达[n(%)]

亚型	n	CD14	CD11b	CD64	CD4
M0	6	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
M1	18	0(0.0)	2(11.1) ^a	2(11.1) ^a	0(0.0)
M2a	163	0(0.0)	14(8.6) ^a	33(20.2) ^a	1(0.6) ^a
M2b	28	0(0.0)	2(7.1) ^a	3(10.7) ^a	1(3.5) ^a
M3	51	0(0.0)	4(7.8) ^a	31(60.8) ^a	0(0.0)
M4/M5	141	64(45.4)	65(46.1)	117(83.0)	88(62.4)
M6	11	0(0.0)	1(9.1) ^a	0(0.0)	0(0.0)
M7	2	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

注:与 M4/M5 比较,^a $P<0.01$ 。

2.2 CD14、CD11b、CD64 诊断 M4/M5 敏感性及特异性
CD14、CD11b 诊断 M4/M5 具有高特异性,但敏感性不足。虽然 CD64 特异性较 CD14、CD11b 稍差,但敏感性高于 CD14、CD11b。见表 2。

表 2 CD14、CD11b、CD64 诊断 M4/M5 敏感性
及特异性[n(%)]

项目	n	CD14	CD11b	CD64
敏感性	141	64(45.4)	65(46.1)	117(83.0)
特异性	279	279(100.0)	256(91.8)	210(75.3)

3 讨 论

免疫分型在诊断血液系统恶性肿瘤在占有重要地位。随着对白血病分化抗原的不断深入,学者们发现有些抗原的敏感性高,但特异性不强;有些抗原的特异性强,而敏感性不足。因此,结合多抗原检测,有助于提高 AL 诊断的准确性。本研究以 CD14 为中心,结合 CD11b、CD64、CD4 的表达情况,以提高 M4/M5 诊断的准确性。

CD14 是单核细胞分化抗原,主要在正常及异常的单核/巨噬细胞上表达,而在中性粒细胞上不表达或弱表达,在其他细胞上不表达^[5]。本研究中 M4/M5 患者 45.4%(64/141)表达 CD14,其他 AML 各亚型均不表达。CD14 鉴别诊断单核细胞相关性 AML(M4/M5)的敏感性为 45.4%,特异性为 100%,与 Krasinkas 等^[6]报道一致。CD14 是单核/巨噬细胞最好的标志,它在 AML 分型诊断中特异性高(100%),但其敏感性较低(45.4%),因此,它对 M4/M5 的诊断作用有限。

CD11b 属于整合素家族,具有整合素 α 亚单位的结构,与 CD18 形成的复合物 Mac-1(CD11b/CD18)能结合 iC3b、ICAM-1、ICAM-2 等。CD11b 是粒单核细胞成熟阶段的分化抗原,在原始粒细胞上不表达或低表达,但在单核细胞上高表达^[7]。

CD11b 在鉴别诊断 M4/M5 与其他 AML 各亚型的报道很少,而各家报道不一致,宁铂涛等^[8]认为有助于 M2 与 M4/M5 的鉴别,而梁建英等^[9]则认为 CD11b 表达在 AML 的 FAB 各亚型之间的分布差异无统计学意义。这可能与 CD11b 在原始粒细胞上也有弱表达有关。本研究 CD11b 在 420 例 AML 患者中,除 M0、M7 中不表达外,在 M4/M5 中表达显著高于 M1、M2a、M2b、M3、M6($P<0.01$),说明 CD11b 是有助于 M4/M5 与其他 AML 亚型的鉴别诊断。它在 AML 分型诊断中特异性较高(91.8%),但其敏感性较低(46.1%)。

CD64 也是单核/巨噬细胞的分化抗原,在单核/巨噬细胞上有强表达,在健康人的中性粒细胞上表达很弱^[10]。本研究 CD64 在 420 例 AML 患者中,除 M0、M6、M7 不表达外,在 M4/M5 中表达 83.0%(117/141)显著高于 M1、M2a、M2b、M3($P<0.01$)。51 例 M3 患者中有 31 例表达 CD64,阳性表达为 60.8%,有较高的阳性表达,这与国内外报道一致^[11-12]。本研究认为 CD64 对诊断 M4/M5 具有较高敏感性(83.0%)及特异性(75.3%),与国外文献报道一致^[13]。

CD4 是 T 淋巴细胞抗原,并不是诊断 M4/M5 特异性指标,但其在单核/巨噬细胞上有弱表达,而有较高的敏感性^[16]。本研究 141 例 M4/M5 患者中有 88 例表达 CD4,阳性表达为 62.4%,且在 AML 其他亚型中很少表达,M2a(0.6%)、M2b(3.5%),M0、M1、M3、M6、M7 都阴性。279 例非 M4/M5 的其他 AML 亚型患者仅有 2 例为阳性表达,因此,CD4 对鉴定诊断 M4/M5 有一定价值。

综上所述,作者认为以 CD14 为中心,结合 CD11b、CD64、CD4 有助于 M4/M5 与其他 AML 各亚型的鉴别诊断。

参考文献

[1] Morphologic,immunologic,and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemias. Report of the workshop held in Leuven, Belgium, April 22-23, 1985. First MIC Cooperative Study Group [J]. Cancer Genet Cytogenet,1986,23(3):189-197.

[2] Morphologic,immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias. Second MIC Cooperative Study Group[J]. Br J Haematol,1988, 68(4):487-494.

[3] Jaffe ES,Harris NL,Stein H,et al. World Health Organization classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues[M]. France:Iarc press,2001:78.

[4] 张之南,沈悌. 血液学诊断及疗效标准[M]. 2 版. 北京:北京科学出版社,1998:171-194.

[5] Kishimoto T,Kikutani H,Von DG,et al. Leucocyte typing VI[M]. New York&London:Garland Publishing Inc, 1997:929-965.

[6] Krasinskas AM,Wasik MA,Kamoun M,et al. The usefulness of CD64,other monocyte-associated antigens,and CD45 gating in the subclassification of acute myeloid leukemias with monocytic differentiation [J]. Am J Clin Pathol,1998,110(6):797-805.

[7] 陈葆国,纪东辉,褚邦勇,等. 多参数流式细胞术鉴别诊断单核细胞相关性白血病的意义[J]. 中国免疫学杂志, 2006,22(3):237-240. (下转第 2523 页)

表 1 各组血清 Cys C 及尿 mAlb 变化情况 ($\bar{x}\pm s$,mg/L)

组别	n	Cys C				尿 mAlb			
		入院时	1 d	3 d	5 d	入院时	1 d	3 d	5 d
对照组	50	0.73±0.15	0.75±0.19	0.74±0.20	0.73±0.13	10.2±6.8	11.5±5.7	10.8±6.1	10.5±4.5
轻度组	60	0.91±0.16 ^a	1.13±0.56 ^a	0.92±0.24 ^a	0.76±0.12	16.8±6.4 ^a	18.5±7.3 ^a	14.2±3.5 ^a	11.0±5.6
中度组	53	1.36±0.62 ^{ab}	1.44±0.38 ^{ab}	1.05±0.39 ^{ab}	0.83±0.28 ^a	43.5±25.8 ^{ab}	54.6±29.7 ^{ab}	37.5±16.7 ^{ab}	20.4±10.0 ^{ab}
重度组	46	2.08±0.56 ^{abc}	2.34±0.24 ^{abc}	1.60±0.34 ^{abc}	1.22±0.41 ^{abc}	359.5±135.5 ^{abc}	377.4±106.7 ^{abc}	143.1±76.4 ^{abc}	42.3±12.0 ^{abc}

注:与对照组比,^a $P<0.05$;与轻度组比,^b $P<0.05$;与中度组比,^c $P<0.05$ 。

3 讨 论

我国每年大约有 7 万例 AOPP 患者,约 10% 的病例死亡,可见死亡原因与肾损伤有密切关联,早期发现 AOPP 所致的 GFR,并予以积极治疗,对改善预后极其重要^[3]。临床上常采用血清尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)水平来判断。但用血清 BUN 和(或)Scr 作为肾功能早期受损的指标并不可靠^[4]。Cys C 生成速度和血浓度稳定,不受其他病理变化影响,且与性别、年龄、肌肉量无关,能被肾小球自由滤过,在近曲小管上皮细胞内分解代谢,不被肾小管重吸收和分泌。同时肾小管也不分泌 Cys C,所以使肾脏成为清除循环中 Cys C 的惟一场所,血清 Cys C 水平主要由 GFR 决定,且 Cys C 检测容易进行。所以 Cys C 是反映早期 GFR 变化的一个理想、可靠的内源性标志物^[5]。本研究结果显示,在不同中毒水平的 AOPP 患者中,Cys C 随着中毒程度的加深而增高。同时在治疗的过程中,不同组别的 Cys C 也逐渐降低,伴随临床症状明显好转,表明 Cys C 对早期肾损伤有很高的灵敏度和特异性。郭欣等^[6]研究发现,正常情况下只有少量可通过肾小球滤过膜,所以正常尿中 Alb 的含量极低。各种致病因子作用下,肾小球滤过膜和肾小管发生结构功能损伤,使尿液中 Alb 浓度升高,因此对尿 mAlb 的检测可作为评价肾小球功能的一项灵敏指标,并可提示损伤部位^[7]。本研究结果显示,随着 AOPP 患者中毒程度的加重,尿 mAlb 水平逐渐上升,且由高到低依次为重度中毒组、中度重度组、轻度中毒组。

综上所述,血清胱抑素 C 对于早期肾功能损害,与尿 mAlb 有良好一致性^[8]。因此联合检测对监测急性有机磷农药中毒患者早期肾功能损害具有明显的临床意义。

参考文献

[1] Chang SS, Lu TH, Eddleston M, et al. Factors associated

(上接第 2521 页)

[8] 宁铂涛,汤永民,沈红强,等.多参数流式细胞术检测急性白血病患儿 CD14 表达的意义[J].临床儿科杂志,2003,21(4):197-199,204.

[9] 梁建英,张宏,常英军,等.急性髓细胞白血病 CD11b 表达的临床意义[J].江苏医药,2001,27(4):259-260.

[10] 饶若,金丽华,王述文.等 CD64 在急性白血病免疫分型中的意义[J].免疫学杂志,2011,27(10):871-874.

[11] Krasinskas AM, Wasik MA, Kamoun M, et al. The usefulness of CD64, other monocyte-associated antigens, and CD45 gating in the subclassification of acute myeloid leukemias with monocytic differentiation [J]. Am J Clin Pathol,1998,110(6):797-805.

with the decline in suicide by pesticide poisoning in Taiwan: a time trend analysis, 1987-2010 [J]. Clin Toxicol (Phila),2012,50(6):471-480.

[2] Ribichini F, Gambaro G, Graziani MS, et al. Comparison of serum creatinine and cystatin C for early diagnosis of contrast-induced nephropathy after coronary angiography and interventions[J]. Clin Chem,2012,58(2):458-464.

[3] Felicio ML, Andrade RR, Castiglia YM, et al. Cystatin C and glomerular filtration rate in the cardiac surgery with cardiopulmonary bypass [J]. Rev Bras Cir Cardiovasc, 2009,24(3):305-311.

[4] Song S, Meyer M, Türk TR, et al. Serum cystatin C in mouse models: a reliable and precise marker for renal function and superior to serum creatinine[J]. Nephrol Dial Transplant,2009,24(4):1157-1161.

[5] 刘欣.血清胱抑素 C 测定及临床意义[J].国际检验医学杂志,2010,31(5):473-474.

[6] 郭欣,于永光,王丹,等.急性有机磷农药中毒患者血尿胱抑素 C 的变化及意义[J].中国急救医学,2010,30(2):161-164.

[7] Li H, Liu LT, Zhao WM, et al. Effect of traditional and integrative regimens on quality of Life and early renal impairment in elderly patients with isolated systolic hypertension[J]. Chin J Integr Med,2010,16(3):216-221.

[8] Wang T, Jia G, Zhang J, et al. Renal impairment caused by chronic occupational chromate exposure[J]. Int Arch Occup Environ Health,2011,84(4):393-401.

(收稿日期:2013-01-22 修回日期:2013-04-23)

[12] 饶若,金丽华,王述文,等. CD64 在急性白血病免疫分型中的意义[J].免疫学杂志,2011,27(10):871-874.

[13] Cherie H, Dunphy MD, Wohzan MT. The value of CD64 expression in distinguishing acute myeloid leukemia with monocytis differentiation from other subypes of acute myeloid leukemia[J]. Arch Pathol Lab Med,2007,131(3):748-754.

[14] Darrell C, Foon KA. Recent advances in flow cytometry. application to the diagnosis of hematologia malignancy [J]. Blood,1997,90(8):2863-2892.

(收稿日期:2013-01-21 修回日期:2013-05-15)