

联合骨髓形态与基因检测在骨髓增生异常综合征与溶血性贫血中的诊断意义^{*}

康慧媛, 李绵洋[△], 潘玉玲, 刘改霞, 冯晓倩, 王成彬(解放军总医院临床检验科, 北京 100853)

【摘要】 目的 分析形态及遗传检测参数的差异在骨髓增生异常综合征(MDS)与溶血性贫血(HA)鉴别诊断中的临床意义。**方法** 选取解放军总医院 2011 年 1 月至 2013 年 12 月确诊的 MDS 患者 56 例, HA 患者 44 例, 分析比较其临床一般参数、骨髓形态参数(骨髓原始细胞计数及病态造血)及遗传参数(染色体及基因检测)检测的差异。**结果** MDS 组与 HA 组患者的一般临床参数比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 而 MDS 组患者骨髓细胞病态造血较 HA 组患者更明显, 组间比较差异有统计学意义($P=0.001$), 特别是红系及巨核系病态造血; MDS 组患者的骨髓原始细胞计数较 HA 组更高, 比较差异有统计学意义($P=0.002$); 且染色体异常与基因异常更频繁发生于 MDS 组患者, 与 HA 组比较差异有统计学意义($P=0.000$)。**结论** MDS 患者与 HA 患者的鉴别诊断可以联合形态及遗传检测, 达到更加及时、准确的检测目的。

【关键词】 骨髓增生异常综合征; 溶血性贫血; 遗传学; 形态学

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.23.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)23-3233-03

Diagnosis significance of Morphous and gene characteristic between MDS and Hemolytic Anemia^{*} KANG Hui-yuan, LI Mian-yang[△], PAN Yu-ling, LIU Gai-xia, FENG Xiao-qian, WANG Cheng-bin (Department of Clinical Tests, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】 Objective To analyze the clinical significance of morphous and genetic tests difference between myelodysplastic syndrome (MDS) and hemolytic anemia (HA) patients. **Methods** Analyse the differences of clinical data, morphous (bone marrow blast and dyshaematopoiesis) and genetic status (karyotype and gene) in 56 MDS patients and 44 HA patients. **Results** Dyshaematopoiesis ($P=0.001$), bone marrow blast counts ($P=0.002$), abnormal Karyotype ($P=0.000$) and abnormal genes ($P=0.000$) had significant differences in MDS patients and HA patients. NO significant differences between MDS patients and HA patients were performed in clinical data ($P>0.05$). **Conclusion** Combining morphous and genetic tests was more useful for making difference MDS patients with HA patients.

【Key words】 myelodysplastic syndrome; hemolytic anemia; genetic; morphous

骨髓增生异常综合征(MDS)一定程度上被认为是白血病前期,属于血液系统恶性疾病范畴,约 30% MDS 患者可进展为急性髓系白血病^[1]。临床上, MDS 与溶血性贫血(HA)都可表现为贫血或外周血三系(粒系、红系及巨核系)减少,骨髓象均示增生活跃,红系增生明显^[2-3]。HA 作为一种血液系统良性疾病,有时与 MDS 很难鉴别^[4]。特别是以外周血三系减少或贫血为主,骨髓中红系增生明显、髓系原始细胞比例不高的 MDS 患者,但二者治疗方法及预后转归迥然不同。因此,及时、准确鉴别 MDS 患者及 HA 患者意义重大。为此,本研究拟对本院明确诊断的 56 例 MDS 患者及 44 例 HA 患者进行骨髓形态(包括髓系原始细胞计数及粒系、红系、巨核系三系病态造血)及遗传检测(包括染色体核型分析及基因异常检测)联合分析,明晰 MDS 患者及 HA 患者在骨髓形态检测及基因异常检测中可鉴别之处。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院 2011 年 1 月至 2013 年 12 月确诊的 MDS 患者 56 例, HA 患者 44 例。诊断标准为 2008 年世界卫生组织标准^[5]。其中, MDS 难治性贫血 (MDS-RA) 患者 24

例, MDS-环形铁粒幼细胞性难治性贫血 (MDS-RAS) 患者 3 例, MDS-难治性血细胞减少伴有多系增生异常 (MDS-RCMD) 患者 13 例, MDS-难治性血细胞减少伴原始细胞增多 1 型 (MDS-RAEB1) 患者 9 例, MDS-难治性血细胞减少伴原始细胞增多 2 型 (MDS-RAEB2) 患者 6 例, 5q-综合征患者 1 例。

1.2 仪器与试剂 骨髓形态检查中, 瑞氏染料购自 Sigma 公司, 显微镜为 Olympus 公司 BX51 型; 染色体检查中, 胎牛血清及 RPMI1640 均购自 Hyclone 公司, 显微镜购自蔡司公司; 基因分析中, 定性聚合酶链式反应 (PCR) 仅为 ABI 公司 Veriti, 定量 PCR 仅为 ABI 公司 7900, 引物及 MGB 探针购自 ABI 公司, 定量 PCR 反应试剂 (Master Mix) 购自 ABI 公司, 定性 PCR 反应试剂 (Universal Master Mix) 购自 Promega 公司。

1.3 方法

1.3.1 骨髓形态检查 一是油镜下计数每个标本的骨髓涂片细胞 250 个, 原始细胞计数按照髓系原始细胞在 250 个有核细胞中所占比例计算; 二是病态造血的评价根据世界卫生组织标准^[2], 油镜下计数粒系、红系及巨核系每系细胞中大于或等于 10% 细胞存在病态被认为是明显病态造血。各系病态表现如

^{*} 基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项项目任务 (2012YQ03026107); 解放军总医院苗圃基金 (12KMM35);

解放军总医院临床科研扶持基金临床特色优势技术项目 (2012FC-TSYS-3051)。

作者简介: 康慧媛, 女, 博士, 主治医师, 主要从事血液肿瘤形态学及遗传学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: limianyang301@163.com。

下。(1)粒系:分叶过多、颗粒减少或增多、双核型粒细胞、环形杆状核粒细胞、假 P-Hy 样畸形,假 Chediak-Higashi 颗粒等;(2)红系:巨幼红样变、双核或多核(特别是奇数核)、大小核、核畸形、H-J 小体、空泡变性、环核铁粒幼红细胞、糖原染色阳性等;(3)巨核系:小巨核细胞、微小巨核细胞、单圆核、多圆核、多分裂核巨核细胞、低分叶小巨核等。

1.3.2 染色体检查 骨髓标本 2~3 mL,肝素抗凝,按照 1.5×10^9 /L 白细胞量接种培养液,培养 24 h,加入终浓度 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 秋水仙碱,0.075 mol/mL 氯化钾溶液中低渗 30 min,再以甲醇冰乙酸溶液固定 3 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后制片,R 显带核型分析,参照《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN2009)》标准分析。应用德国蔡司公司染色体图像自动分析系统进行分析。所涉及的 MDS 经典异常核型为-5/5q⁻, -7/7q⁻, +8, 20q⁻ 及复杂核型等^[5]。

1.3.3 基因分析 骨髓标本 2~3 mL,乙二胺四乙酸(ED-TA)抗凝,2:1 量加入 Tizol 提取 RNA 后反转录为 cDNA,定

性及定量 PCR(MGB 探针)检测基因突变、融合及数量异常增加。所有检测均设立阳性对照、阴性对照、空白对照及复孔。所涉及的 MDS 经典异常基因包括:N-RAS, FLT3, AML1, EVI-1, TEL, MLL, p53 及 IRF-1 突变、融合或异常表达等^[6]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计学软件进行数据处理;计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher's 精确检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验或校正 t 检验;以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组一般参数比较 HA 组与 MDS 组患者的性别、年龄差异不明显,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$);HA 组与 MDS 组患者的白细胞计数、血红蛋白水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);MDS 组患者的血小板计数较 HA 组患者更低,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者的一般参数比较

组别	<i>n</i>	性别(男/女)	年龄(岁, $\bar{x}\pm s$)	白细胞($\times 10^9$ /L)	血红蛋白(g/L, $\bar{x}\pm s$)	血小板($\times 10^9$ /L, $\bar{x}\pm s$)
HA 组	44	24/20	39 $\pm$ 18	3.47(2.69~4.40)	89 $\pm$ 27	179 $\pm$ 127
MDS 组	56	29/27	41 $\pm$ 19	4.20(3.02~4.45)	76 $\pm$ 30	63 $\pm$ 64
<i>P</i>		0.824	0.682	0.160	0.126	0.001

2.2 两组骨髓原始细胞计数比较 MDS 组患者骨髓原始细胞计数均数为 2.6% $\pm$ 4.1%,最高值达 19.2%;HA 组均数为 0.8% $\pm$ 0.5%,均低于 2.0%,范围为 0.0%~1.6%;MDS 组患者的骨髓原始细胞计数明显高于 HA 组,二者差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 两组骨髓细胞计数病态造血比较 MDS 组患者的病态造血发生率(85.7%)明显高于 HA 组患者(54.5%),组间比较差异有统计学意义($P=0.001$);特别是红系及巨核系病态造血, MDS 组患者的发生率均明显高于 HA 组,比较差异均有统计学意义($P=0.001$, $P=0.000$);而两组粒系病态造血的发生率比较,差异无统计学意义($P=0.151$)。见表 2。

表 2 两组患者骨髓细胞计数病态造血比较[*n*(%)]

组别	<i>n</i>	病态造血	粒系	红系	巨核
HA 组	44	24(54.5)	12(27.3)	14(37.5)	0(0.0)
MDS 组	56	48(85.7)	23(41.1)	36(64.3)	17(30.4)
<i>P</i>		0.001	0.151	0.001	0.000

2.4 两组染色体与基因分析比较 MDS 组和 HA 组患者所涉及的经典染色体异常包括-5/5q⁻, -7/7q⁻, +8, 20q⁻ 及复杂核型(≥ 3 种异常核型)等, MDS 组患者的染色体异常发生率 37.5%(21/56)明显高于 HA 组(0.0%),两组比较差异有统计学意义($P=0.000$)。MDS 组和 HA 组患者所涉及的经典基因异常包括 N-RAS, FLT3, AML1, EVI-1, TEL, MLL, p53 及 IRF-1 突变、融合或异常表达等, MDS 组患者中基因异常发生率为 48.2%(27/56),而 HA 组基因异常发生率 0.0%, MDS 组基因异常发生率较 HA 组更频繁,其差异具有统计学意义($P=0.000$)。

2.5 联合分析 MDS 组患者中发生染色体异常的阳性率为 37.5%(21/56),发生基因异常的阳性率为 48.2%(27/56),而发生染色体或基因异常任一项的阳性率为 62.5%(35/56),二者联合覆盖率更高;MDS 组中病态造血不明显的患者中发生染色体或基因异常的阳性率为 50.0%(4/8)。

3 讨 论

MDS 与 HA 有相似的临床表现如贫血、乏力等,血象均可表现为贫血或外周血三系减少,骨髓象中可呈现红系明显增生,二者鉴别较困难,特别是部分骨髓中原始细胞计数不高的 MDS 患者与 HA 患者难以鉴别。病态造血、原始细胞计数及染色体与基因检测在部分 MDS 诊断中具有较明显特征^[2,5-7]。本研究拟采用骨髓形态、染色体与基因联合检测的模式,探讨其在 MDS 与 HA 鉴别诊断中的意义。

本研究显示, MDS 组和 HA 组患者在年龄、性别、白细胞计数及血红蛋白水平等一般临床参数中差异均不明显,仅 MDS 组血小板计数较 HA 组更少,组间比较差异有统计学意义($P=0.001$)。HA 患者以贫血为主要表现,可表现为外周血三系减少,但血小板减少并非最主要特征;MDS 患者多数以贫血表现为主,亦可表现为外周血三系任一系或多系减少及发育异常,特别是部分 MDS 患者表现为血小板的明显减少。因此, MDS 患者血小板减少现象及程度较之 HA 患者可能更显著。在本研究所涉及病例中 MDS 组表现为血小板计数减少更明显。当仅凭一般临床状况不能对患者进行明确诊断时,要联合分析骨髓形态及遗传学检测。

本组研究结果显示, MDS 组患者的骨髓中髓系原始细胞计数明显高于 HA 组,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。通常 HA 患者的骨髓标本中红系增生明显而髓系原始细胞计数并无明显增高,而 MDS 患者骨髓中可能发生髓系原始细胞比

例增高,对于此类 MDS 患者鉴别较容易,但对于红系增生明显而髓系原始细胞比例不高的 MDS 患者的诊断存在一定困难。

进而检测 MDS 组与 HA 组骨髓标本的病态造血情况。MDS 组患者病态造血阳性率、程度及种类均明显多于 HA 组,本研究显示,MDS 组患者病态造血发生率、红系、巨核系病态造血发生率均明显高于 HA 组患者,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。进一步研究发现,MDS 患者与 HA 患者病态造血类型亦不同。MDS 患者巨核系病态造血可见巨核细胞体积小,核分叶少,可存在典型的单圆核、多圆核及淋巴样小巨核细胞;粒系可见经典的 P-H 样畸形、环形核、奇数核细胞;红系病态造血可见到浆中空泡变性、环核铁粒幼红细胞及有核红细胞 PAS 染色阳性等。而 HA 患者一般不存在此类有明显特征的病态造血,MDS 与 HA 均可见的粒系病态造血为类巨变、核分叶过多、核浆发育失衡、浆中颗粒减少;MDS 与 HA 均可见的红系病态造血为类巨变、核浆发育失衡、核畸形;MDS 与 HA 均可见的巨核系病态造血为巨核细胞体积偏大,核分叶过多。因此,对于 MDS 与 HA 的鉴别诊断,除了分析病态造血的发生率,更应关注病态造血的类型。骨髓细胞病态造血是 MDS 较明确的特征,但并非所有 MDS 患者都有典型的病态造血表现,同时病态造血可发生于多种血液系统或非血液系统疾病,如粒系、红系的巨幼样变、核浆发育失衡等 HA 患者骨髓象中也经常存在^[2-3]。因此,对于部分 MDS 患者仅根据骨髓细胞病态造血类型及程度也不能明确诊断。

遗传学检测方面,本研究涉及的主要核型异常(-5/5q,-7/7q,+8,20q- 及复杂核型)及基因异常(N-RAS,FLT3,AML1,EVI-1,TEL,MLL,p53 及 IRF-1 突变、融合或异常表达)与恶性细胞增殖、分化有关,与疾病的进展、预后有关^[6-16]。本研究中,染色体检测可鉴别 37.5% 的 MDS 患者,基因检测可鉴别 48.2% 的 MDS 患者,MDS 组中联合检测染色体及基因异常,其任一项异常发生率为 62.5%(35/56)。而 HA 患者标本中未检测到以上遗传学异常。因此,联合细胞遗传学及分子遗传学,可在很大水平上提高 MDS 的检出率。

综上所述,骨髓原始细胞计数、病态造血类型及遗传学异常的检测可对部分患者的鉴别诊断起到重要作用;然而,部分 MDS 患者原始细胞数并不增高,也没有明显的病态造血差异,此时遗传学改变的检测则极为重要。但是并非每个 MDS 患者都可检测到具有诊断意义的遗传学异常标志,因此不能仅凭借遗传学异常来诊断 MDS。MDS 的准确诊断及与 HA 的鉴别诊断需形态学与遗传学联合,才是临床检测的重要模式。

参考文献

- [1] Scott BL,Deeg HJ. Myelodysplastic syndromes[J]. Annu Rev Med,2010,61(3):345-358.
- [2] Mufti GJ,Bennett JM,Goasguen J,et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome; International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts [J]. Haematologica,2008,93(11):1712-1717.
- [3] 陆再英,钟南山. 内科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版

- 社,2008:582.
- [4] 张连生,李莉娟,陈慧玲. 溶血性贫血诊断进展[J]. 临床血液学杂志,2013(4):443-445.
- [5] Vardiman J. The classification of MDS; from FAB to WHO and beyond[J]. Leuk Res,2012,36(12):1453-1458.
- [6] Greenberg PL. Molecular and genetic features of myelodysplastic syndromes[J]. Int J Lab Hematol,2012,34(3):215-222.
- [7] Bacher U,Haferlach T,Kern W,et al. The impact of cytomorphology, cytogenetics, molecular genetics, and immunophenotyping in a comprehensive diagnostic workup of myelodysplastic syndromes[J]. Cancer,2009,115(19):4524-4532.
- [8] Francois Mullier Sylvie Daliphard Richard Garand. Morphology, cytogenetics, and survival in myelodysplasia with del(20q) or ider(20q): a multicenter study[J]. Ann Hematol,2012(91):203-213.
- [9] Liu D,Chen Z,Xue Y,et al. The significance of bone marrow cell morphology and its correlation with cytogenetic features in the diagnosis of MDS-RA patients[J]. Leuk Res,2009,33(8):1029-1038.
- [10] Haferlach T, Bacher U, Kern W, et al. A comprehensive approach to the diagnosis of MDS after triage by morphology towards cytogenetics and other techniques[J]. Cancer Treat Rev,2007,33 (Supple 1):31-41.
- [11] Zhao Y,Guo J,Zhang X,et al. Downregulation of p21 in myelodysplastic syndrome is associated with p73 promoter hypermethylation and indicates poor prognosis[J]. Am J Clin Pathol,2013,140(6):819-827.
- [12] Cazzola M,Della Porta MG,Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance[J]. Blood,2013,122(25):4021-4034.
- [13] Papaemmanuil E,Gerstung M,Malcovati L,et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes [J]. Blood,2013,122(22):3616-3627.
- [14] Pellagatti A,Benner A,Mills KI,et al. Identification of gene expression-based prognostic markers in the hematopoietic stem cells of patients with myelodysplastic syndromes[J]. J Clin Oncol,2013,31(28):3557-3564.
- [15] Al-Kali A,Quintás-Cardama A,Luthra R,et al. Prognostic impact of RAS mutations in patients with myelodysplastic syndrome[J]. Am J Hematol,2013,88(5):365-369.
- [16] Tothova Z,Steensma DP,Ebert BL. New strategies in myelodysplastic syndromes; application of molecular diagnostics to clinical practice[J]. Clin Cancer Res,2013,19(7):1637-1643.