

网络出版时间: 2016-5-9 15:43:11 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160509.1543.066.html>

改进的流式细胞积分对骨髓增生异常综合征诊断价值的研究

郭进京^{1,2,3}, 王会平^{1,2}, 熊术道^{1,2}, 孙磊^{1,2}, 翟志敏^{1,2}

摘要 筛选 94 例患者评价改进的流式细胞术(FCM)积分在骨髓增生异常综合征(MDS)中的诊断效能。用抗体组合 CD34/CD19/CD33/CD45 分析四参数流式积分,通过 CD19 和 CD33 将 B 系和髓系前体细胞分离。对疑为 MDS 的患者行流式积分,评价两种方法的诊断参数。改进的积分有更高的诊断参数。11 例通过改进的方案改变积分,其中 5 例因积分改变获得正确诊断。改进积分实用方便,更好地分离 B 系和髓系前体细胞。

关键词 骨髓增生异常综合征; 流式细胞术; 免疫表型

中图分类号 R 551.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)06-0903-04

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)是一组克隆性源于造血干细胞的髓样肿瘤^[1]。有较高的风险演变为急性髓系白血病^[2]。其年发病率每 10 万人口约为 5 例,60 岁后年发病率增至每 10 万人口约 20~50 例^[3]。MDS 诊断主要依靠骨髓形态学检测病态造血和细胞遗传学克隆性改变及其他的异常,如骨髓铁染色环形铁粒幼细胞 $\geq 15\%$ ^[4],但低危 MDS 患者半数初诊时无上述异常。流式细胞术(flow cytometry, FCM)分析细胞免疫表型的异常可弥补形态学和遗传学的不足,多个

研究^[5]组织标准化操作流程用 FCM 对 MDS 进行诊断,表明 FCM 检测细胞发育不良比形态学更敏感。Della Porta et al^[6]整合多中心实验室数据制定了 FCM 积分四参数评分 MDS,具有很高的诊断效能。该研究通过一组抗体组合,改进设门方案来评估 FCM 积分四参数,并评估改进方案的临床诊断效能。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第二附属医院血液科因外周血一系或多系减少而就诊的患者 108 例,行细胞形态学、染色体以及铁染色等检查,同时进行 FCM 积分方案分析。参照维也纳最低诊断标准和 2008 年 WHO 分型^[4,7]对疑为 MDS 的患者进行诊断和分类。首次检测 47 例符合 MDS 确定标准,30 例为非克隆性血细胞减少,31 例为意义未明的特发性血细胞减少症(idiopathic cytopenia of uncertain significance, ICUS)。31 例 ICUS 患者随访 6 个月,其中 7 例诊断为 MDS; 10 例失访; 11 例为非 MDS,其中 1 例因 CD34⁺细胞过少而剔除; 3 例为慢性单核细胞白血病。最终确诊 54 例 MDS 患者和 40 例非 MDS 患者,并纳入研究,其中 MDS 患者男 33 例,女 21 例; 年龄 20~86 岁,中位年龄 66 岁。非 MDS 患者男 25 例,女 15 例; 年龄 22~81 岁,中位年龄 64 岁。MDS 和非 MDS 组患者年龄差异无统计学意义($t=1.557$, $P=0.123$)。诊断资料见表 1。

1.2 FCM 积分方案的流式分析

1.2.1 样本制备 抽取新鲜骨髓,肝素抗凝,加入抗体组合,避光孵育,氯化铵溶血,上机测试。所用的抗体组合为 CD34-FITC、CD19-PE、CD33-APC、

2016-03-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81141104); 安徽省高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2014Z017)

作者单位: ¹安徽医科大学第二附属医院血液内科,合肥 230601

²安徽医科大学血液病研究中心,合肥 230061

³安徽医科大学附属阜阳市人民医院检验科,阜阳 230601

作者简介: 郭进京,男,硕士研究生;

翟志敏,女,主任医师,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: zzzm889@163.com

the levels of serum uric acid and homocysteine: H type hypertension and hyperuricemia group($n=30$); H type hypertension($n=20$); simple hypertension($n=20$). The differences of blood pressure, blood glucose, blood lipid and intima-media thickness among groups were analyzed. IMT was significantly higher in H type hypertension and hyperuricemia group compared with the other two groups($P<0.05$). Hyperuricemia was the independent risk factor for IMT($P<0.05$) and more prone to atherosclerosis in H type hypertension.

Key words serum uric acid; hypertension; atherosclerosis

CD45-PC7,所有抗体购自美国 Beckman Coulter 公司,使用 FC500 MPL 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)进行分析,分析软件为 EXPO 32 Multi-Comp software(美国 Beckman Coulter 公司)。每测试管至少计数 10^5 个有核细胞和 500 个 $CD34^+$ 细胞。

1.2.2 设门策略 用上述抗体组合进行分析,设门。如图 1 所示:① 在 FSC 和 SSC 散点图上,设 P1 门去除细胞碎片,代表全部有核细胞。在 P1 门中选择 SSC 较小的细胞群设为 P2 门;② P2 门中的细胞表达在 CD34 和 CD45 的散点图上,设置 $CD34^+ CD45^{dim}$ 的细胞为 P3 门,代表原始细胞群;③ P3 门中的细胞表达在 CD19 和 CD33 的散点图上, $CD33^+ CD34^+ CD45^{dim}$ 代表髓系前体细胞: D 门, $CD19^+ CD34^+ CD45^{dim}$ 代表 B 系前体细胞: C 门,此为本研

究改进的设门方案;④ P3 门中的细胞表达在 CD45 和 SSC 的散点图上,其中表达更低的 SSC 和 CD45 的细胞群为 B 系前体细胞: P5 门,剩余的细胞为 P4 门为髓系前体细胞,此为参考文献的方法分离 B 系和髓系前体细胞;⑤ P1 门中的全部有核细胞表达在 CD45 和 SSC 的散点图上,P6 代表淋巴细胞,P7 代表粒细胞;⑥ 淋巴细胞 CD45 的平均荧光强度;⑦ 髓系前体细胞 CD45 的平均荧光强度;⑧ 粒细胞 SSC 的峰值强度;⑨ 淋巴细胞 SSC 的峰值强度。

1.3 评分标准 根据文献^[6]评分标准如下:髓系前体细胞和有核细胞的比值 $\geq 2\%$ (参数 1);B 系前体细胞和 $CD34^+$ 细胞的比值 $\leq 5\%$ (参数 2);淋巴细胞和髓系前体细胞 CD45 平均荧光强度的比值 ≤ 4 或 ≥ 7.5 (参数 3);粒细胞和淋巴细胞 SSC 峰值的比值 ≤ 6 (参数 4)。每个参数符合标准计分为 1 分,不

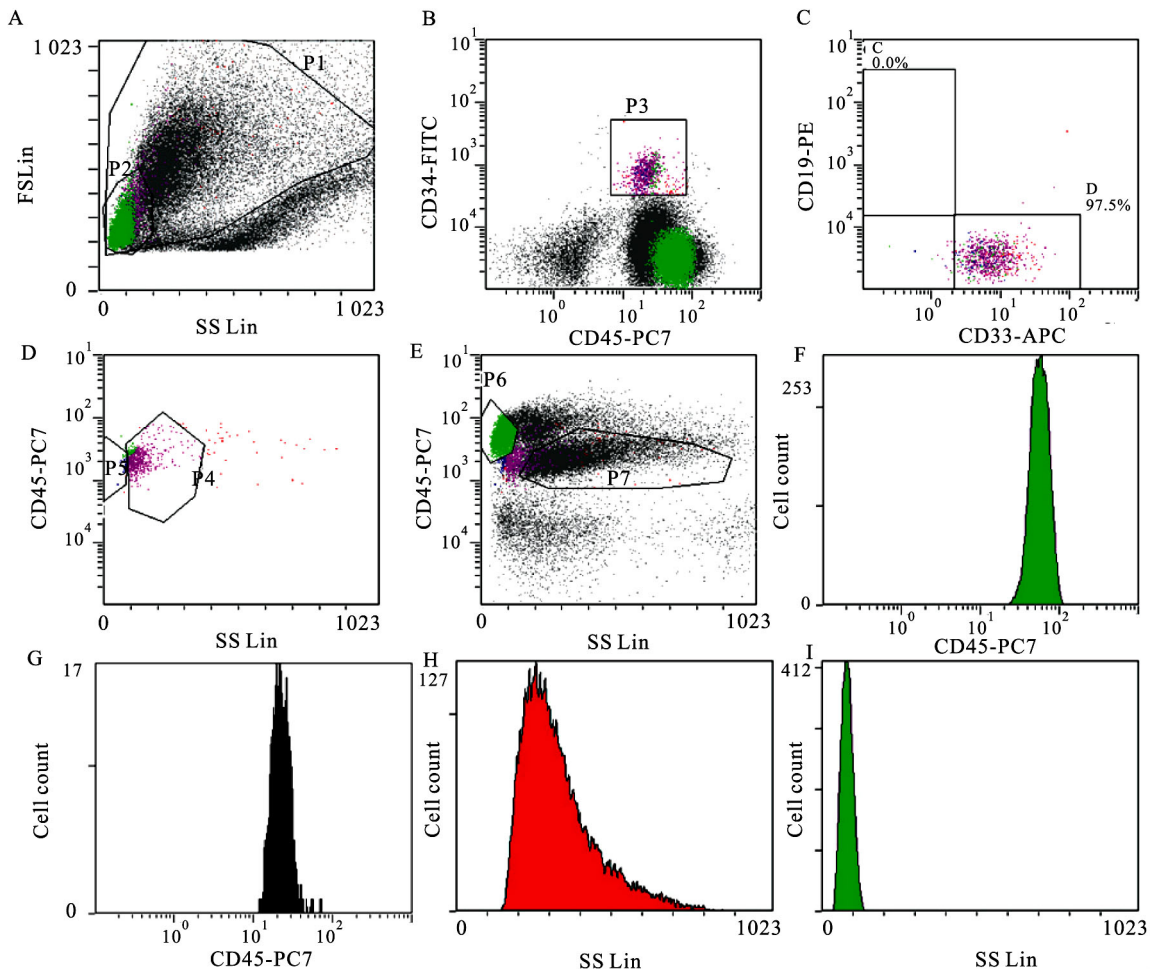


图 1 抗体组合 CD34/CD19/CD33/CD45 分析 FCM 积分四参数

A: 全部有核细胞 P1 和低 SSC 表达的 P2; B: P2 在 CD34 和 CD45 中的表达, $CD34^+ CD45^{dim}$ 为 P3; C: P3 在 CD19 和 CD33 中的表达, 此为改进方案分离髓系和 B 系前体细胞; D: P3 在 CD45 和 SSC 中的表达, 此为文献方案分离髓系和 B 系前体细胞; E: P1 在 CD45 和 SSC 中的表达, P6 为淋巴细胞, P7 为粒细胞; F: 淋巴细胞 CD45 的平均荧光强度; G: 髓系前体细胞 CD45 的平均荧光强度; H: 粒细胞 SSC 的峰值强度; I: 淋巴细胞 SSC 的峰值强度

表1 患者诊断结果(n)

| 项目 | n |
|---------------------------|----|
| 非 MDS 组 | |
| 叶酸, VitB ₁₂ 缺乏 | 3 |
| 缺铁性贫血 | 2 |
| 慢性肝病 | 6 |
| 再生障碍性贫血 | 6 |
| 肾性贫血 | 2 |
| 慢性病性贫血 | 1 |
| 药物性血细胞减少 | 1 |
| 骨髓浸润性血细胞减少 | 1 |
| 自身免疫性血细胞减少 | 3 |
| 特发性血小板减少性紫癜 | 8 |
| 感染性血球减少 | 3 |
| 阵发性睡眠性血红蛋白尿 | 1 |
| 实体肿瘤相关血球减少 | 2 |
| 嗜血细胞综合症 | 1 |
| MDS 组(WHO, 2008) | |
| 难治性贫血伴一系发育异常(RCUD) | 3 |
| 难治性贫血伴环形铁粒幼细胞(RARS) | 6 |
| 难治性贫血伴多系发育异常(RCMD/RS) | 25 |
| MDS 不能分类(MDS-U) | 1 |
| 难治性贫血原始细胞增多-1(RAEB-1) | 12 |
| 难治性贫血原始细胞增多-2(RAEB-2) | 7 |

符合为 0 分, 总分 ≥ 2 诊断为 MDS。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析。如参数为正态分布, 两组均数比较用独立样本 *t* 检验, 非正态分布的差异比较采用 *Z* 检验。使用配对四格表 χ^2 检验比较两种方案诊断 94 例患者资料的差异。

2 结果

2.1 MDS 组和非 MDS 组人口资料和四参数分析

MDS 组中位积分和中位参数 1 明显高于非 MDS 组, 而中位参数 2 和中位参数 4 均明显低于非 MDS 组, 两组中位参数 3 差异无统计学意义, 但统计显示 MDS 组中位参数 3 结果不符合高斯分布, 正态性检验 $P=0.033$, 而非 MDS 组为高斯分布, 正态性检验 $P=0.791$ 。见表 2。

表2 MDS 组和非 MDS 组患者人口资料和四参数分析

| 项目 | MDS 组(n=54) | 非 MDS 组(n=40) | t 值 | P 值 |
|------------|------------------|------------------|-------|-------|
| 中位参数 1(范围) | 2.00(0.04~16.75) | 0.43(0.01~2.30) | 5.156 | 0.000 |
| 中位参数 2(范围) | 0.7(0.0~10.0) | 5.51(0.00~44.00) | 4.292 | 0.000 |
| 中位参数 3(范围) | 4.1(1.8~16.1) | 4.8(2.3~10) | 0.584 | 0.561 |
| 中位参数 4(范围) | 5.7(3.3~9.6) | 6.7(4.9~7.9) | 3.437 | 0.001 |
| 中位积分(范围) | 3(1~4) | 1(0~3) | 12.15 | 0.000 |

2.2 改进的 FCM 积分和文献 FCM 积分诊断效能的比较

2.2.1 改进的 FCM 积分诊断 MDS 的效能 以 ≥ 2 分诊断为 MDS, 54 例 MDS 中有 52 例诊断正确, 敏感性为 96.3% (49/54), 40 例非 MDS 中有 5 例 ≥ 2 分, 特异性为 87.5% (35/40)。诊断符合率为 92.6% [(52+35)/(54+40)]。阳性似然比和阴性似然比分别为 7.7 [敏感性/(1-特异性)] 和 0.04 [(1-敏感性)/特异性]。

2.2.2 参考 FCM 积分诊断 MDS 的效能 按参考方法进行评分, 54 例 MDS 中 49 例诊断符合, 敏感性为 90.7%, 40 例非 MDS 中 7 例 ≥ 2 分, 特异性为 82.5%, 诊断符合率为 87.2%, 阳性似然比和阴性似然比分别为 5.2 和 0.1。

2.2.3 配对四格表比较两种 FCM 积分的诊断效能

两种方案分别对 94 例患者进行评分, 以 ≥ 2 分为界, 诊断为 MDS, 采用配对设计四个表的 χ^2 检验比较两种积分的诊断效能是否有差异。两种积分方案诊断 MDS 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 74.343$, $P = 1.000$), 且两种方案有很强的诊断吻合度 ($k = 0.889$, $P = 0.000$)。见表 3。

表3 改进的流式积分和参考流式积分在诊断 MDS 中的比较(n)

| 改进积分 | 参考积分 | | |
|-------|------|-------|----|
| | MDS | 非 MDS | 总计 |
| MDS | 54 | 3 | 57 |
| 非 MDS | 2 | 35 | 37 |
| 总计 | 56 | 38 | 94 |

3 讨论

因 MDS 异质性的特点, 临床诊断较为困难。形态学和遗传学是确诊 MDS 的主要检查, 而形态学的检测易受骨髓采集、制片水平、染色因素的影响, 且异质性使细胞分化成熟障碍, 在判断分化阶段上易受操作者主观判断^[8], 遗传学有明确的染色体检出可确诊 MDS, 但近一半的患者无异常染色体核型^[9]。FCM 检测骨髓标本质量优劣对免疫表型分析的影响不如对形态学那么明显^[10], 故很多研究机构制订了诊断 MDS 的积分系统, 但大多需要标记多个抗体组合, 分析复杂, 不易被临床医师解读, 也加重了患者的经济负担。Della Porta et al^[6] 制定的四参数 FCM 积分有很高的诊断参数, 尤其适用于低危 MDS 患者的诊断。本研究证实了该方法的临床实用性, 同时本研究改进了设门方案, 仅需 4 个抗体, 一个组合就能分析该四参数积分, 四色的流式分析仪就可以做到, 用 CD19 和 CD33 在 CD34⁺ 的细胞

群中的表达代替文献中用 SSC 和 CD45 表达的强度把 B 系前体细胞和髓系前体细胞分离,文献方案仅凭更弱表达的 SSC 和 CD45 分离 B 系前体细胞,易受操作者主观判断,本改进方案杜绝了操作者主观的因素。在临床资料研究中,改进的 FCM 积分似乎有更高的灵敏度和特异性以及诊断符合率,11 例因方法学的改变而改变了 FCM 积分,11 例中有 5 例因积分的改变而得到正确的诊断,其中 MDS 组有 3 例用改进的 FCM 积分纠正了参考方案的诊断,非 MDS 组有 2 例纠正了参考方案的诊断。 χ^2 检验比较改进的 FCM 积分和参考 FCM 积分诊断 MDS 无差异性,说明改进的流式方案能胜任文献中 FCM 积分的分析。

本改进方案仅代表本院的临床资料,尚需更多实验室数据来验证这种简洁方便、经济实用、高诊断参数、易于推广的筛查 MDS 的 FCM 积分方案。

参考文献

[1] Yin C C, Medeiros L J, Bueso-Ramos C E. Recent advances in the diagnosis and classification of myeloid neoplasms—comments on the 2008 WHO classification [J]. *Int J Lab Hematol*, 2010, 32(5): 461–76.
 [2] Wang Z, Tang X, Xu W, et al. The different immunoregulatory functions on dendritic cells between mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with low-risk or high-risk myel-

odysplastic syndromes [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57470.
 [3] Neukirchen J, Schoonen W M, Strupp C, et al. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS-registry [J]. *Leuk Res*, 2011, 35(12): 1591–6.
 [4] Vardiman J W, Thiele J, Arber D A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes [J]. *Blood*, 2009, 114(5): 937–51.
 [5] 卢丹,刘艳荣. 免疫分型在骨髓增生异常综合征的诊断和预后判断中的作用研究进展 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(3): 785–90.
 [6] Della Porta M G, Picone C, Pascutto C, et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European Leukemia NET study [J]. *Haematologica*, 2012, 97(8): 1209–17.
 [7] Valent P, Horny H P, 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(6): 727–36.
 [8] 刘艳荣,徐娟,万岁桂. 实用流式细胞术: 血液病篇 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2013: 132–3.
 [9] Gangat N, Patnaik M M, Begna K, et al. Evaluation of revised IPSS cytogenetic risk stratification and prognostic impact of monosomal karyotype in 783 patients with primary myelodysplastic syndromes [J]. *Am J Hematol*, 2013, 88(8): 690–3.
 [10] 李锦. 骨髓增生异常综合征病态造血的流式细胞术检测 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(4): 1069–72.

On the value of improved flow cytometry score in MDS diagnosis

Guo Jinjing^{1,2,3}, Wang Huipin^{1,2}, Xiong Shudao^{1,2}, et al

(¹Dept of Hematology, The Second Hospital of Anhui Medical University, ²Hematology Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230061; ³Dept of Laboratory Medicine, Fuyang Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Fuyang People's Hospital, Fuyang 236400)

Abstract Screening 94 patients to evaluate the diagnostic effectiveness of an improved FCM-score in MDS. A set of antibody combination: CD34/CD19/CD33/CD45 was used to analyze the four parameters FCM-score, and through CD19 and CD33 to separate progenitor B-cell blasts and myeloblasts. Analysis of the FCM-score in patients with suspected MDS and the diagnostic parameters of the two methods were evaluated. The improved FCM-score had higher diagnosis parameters. 11 patients with improved method changed the integral, 5 of 11 cases changed classification and got correct diagnosis. The improved FCM-score is simple and easy and can better separate of progenitor B-cell blasts and myeloblasts.

Key words myelodysplastic syndromes; flow cytometry; immunophenotype