CD160 在慢性淋巴细胞白血病中的生物学特征研究

陈葆国 干灵红 李伯利 郑 瑞 石卫武 罗文达

摘 要 目的 探讨 CD160 在慢性淋巴细胞白血病中的表达及临床意义。**方法** 应用流式细胞仪检测 22 名健康对照者、91 例 CLL 患者、76 例 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 CD160 的表达。同时检测 91 例 CLL 患者和 22 名对照者 PTEN、p－Akt 的表达。**结果** 22 名健康对照 1 例(4.5%)CD160 呈弱阳性。91 例 CLL 患者 89 例(97.80%)CD160 阳性,远高于对照组,差异有统计学意义($\chi^2=89.38$,$P<0.01$)。CLL 患者 PTEN 蛋白较对照组表达明显减低,p－Akt 表达较对照组显著增高,且 CLL 患者 CD160 表达水平与 p－Akt 表达水平呈正相关,而与 PTEN 表达水平呈负相关。76 例淋巴瘤患者 5 例(6.58%)CD160 阳性,分别为 4 例 HCL,1 例 SMZL。48 例 MCL 患者 CD160 均阴性。CD160 在 CLL 中的阳性率远高于淋巴瘤,差异有统计学意义($\chi^2=140.06$,$P<0.01$)。CLL 与 MCL 免疫表型差异主要是 CD23 与 FMC7 的阳性率不同,CD160 在 CLL 中的阳性率远高于 MCL,差异有统计学意义($\chi^2=130.51$,$P<0.01$)。四格表诊断性试验分析显示,CD160 在 CLL 中的敏感度为 97.80%,特异性为 90.79%,准确度为 94.61%。CD160 在 CLL 患者高表达与临床预后无关。**结论** CD160 在 CLL 细胞中普遍高表达,有助于 CLL 的诊断和鉴别诊断。

关键词 CD160 慢性淋巴细胞白血病 套细胞淋巴瘤 p－Akt

[中图分类号] R733.72 [文献标识码] A

Biological Characteristics of CD160 in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Chen Baoguo, Gan Linghong, Li Boli, et al. Central Laboratory, Department of Hematology of Affiliated Taizhou Hospital, Wenzhou Medical College, Zhejiang 317000, China*

Abstract Objective To investigate the expression of CD160 in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and its clinical signification. **Methods** Twenty－two healthy control, 91 cases of CLL and 76 cases of B cell non hedgkin limphoma (NHL) were detected for CD160 expression by flow cytometry, and PTEN and p－Akt were also analyzed from CLL patients and control by flow cytometry. **Results** Most of CLL patients expressed CD160 positively (89/91, 97.80%), compared with healthy control with CD160 expression weakly positive in only one person (1/22, 4.5%), and the positive rate between two group had significant differences ($\chi^2=89.38$, $P<0.01$). In the same time, we detected a decrease in PTEN protein accompanied by an increase in phospho－AKT in CLL patients, and data showed that CD160 expression positively correlated with phospho－AKT and negatively correlated with PTEN protein expression. In lymphoma group, 5/76 (6.58%) patients expressed CD160 positively, that included in 4 cases of HCL and 1case of splenic marginal zone lymphoma (SMZL). All patients of mantle cell lymphoma (MCL) were CD160 negative. The positive rate of CD160 expression were significantly higher in CLL patients than in lymphoma patients ($\chi^2=140.06$, $P<0.01$). Apart from CD23 and FMC7 differentially expressed in CLL and MCL, significant differences ($\chi^2=130.51$, $P<0.01$) of CD160 expression were observed in the two groups. Diagnostic test by four-fold table analysis showed that CD160 expression sensitivity in CLL was 97.80%, specificity 90.79% and 94.61% accuracy. CD160 high expression in CLL patients was not associated with clinical prognosis in this study. **Concluson** The higher CD160 expression generally in CLL cells would be helpful for the diagnosis and differential diagnosis of CLL.

Key words CD160; Chronic lymphocytic leukemia; Mantle cell lymphoma(MCL); Phospho－Akt(p－Akt)

慢性淋巴细胞白血病(CLL)是一种 CD5 阳性的 B 淋巴细胞克隆性肿瘤,淋巴细胞在骨髓、淋巴结、血液、脾、肝脏及其他器官聚集。既往研究显示,CLL 发病与凋亡抑制因子 Bcl－2 表达上调,促进因子 Bax 表达下调有关。新近有研究发现,CD160 与 CLL 发病密切相关[1]。少量临床研究显示,CD160 在 CLL 中高表达[2]。为了解 CD160 在 CLL 中的生物学特征,本研究组系统地分析了 CD160 在 CLL 患者中的表达及与 PTEN 和 p－Akt 的关系,以探讨其病理生理意义和临床应用价值。

对象与方法

1. 研究对象:自 2010 年 1 月～2013 年 11 月笔者医院确诊的 167 例成熟 B 淋巴细胞肿瘤,分别为慢性淋巴细胞白血病(CLL)91 例 和 B 细胞非霍奇金淋巴瘤(B－NHL)76 例,分

基金项目:浙江省 151 人才工程基金资助项目[台人社发(2011)121 号]

作者单位:317000 临海,温州医科大学附属台州医院中心实验室(陈葆国、干灵红、李伯利、郑瑞、石卫武),血液科(罗文达)

通讯作者:郑瑞,电子信箱:baoguochen@126.com

别为套细胞淋巴瘤(MCL)48 例,毛细胞白血病(HCL)4 例,滤泡型淋巴瘤(FL)15 例,淋巴浆细胞淋巴瘤(LPL)5 例,脾边缘区淋巴瘤(SMZL)4 例。男性 112 例,女性 56 例,患者年龄 37～78 岁,中位年龄 61 岁。所有病例均符合国内 CLL 和 NHL 诊断标准[3]。22 份健康对照外周血为体检者的样本,男性 13 名,女性 9 名,年龄 32～68 岁。

2. 主要试剂和仪器:鼠 IgG_1 -(PE、FITC 或 APC)、CD20 - FITC、CD10 - FITC、CD23 - FITC、FMC7 - FITC、CD25 - FITC、CD38 - FITC、ZAP - 70 - PE、CD5 - PE、CD22 - PE、CD11c - PE、Kappa - FITC、Lambda - PE、CD103 - PE、CD138 - PE、CD19 - Percp 购自美国 BD 公司。CD160 - FITC 购自美国 eBioscience 公司。PTEN - FITC、p - Akt - PE 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。固定剂(Fix buffer)、细胞膜通透剂(Prem Buffer)购自美国 Caltag 公司。流式细胞仪 FACS Canto Ⅱ为美国 BD 公司产品。

3. 标本:化疗前采急性白血病患者骨髓 2～5ml 肝素钠抗凝,对照组抽外周血 3ml EDTA 抗凝。常规分离单个核细胞(MNC),用磷酸盐缓冲液制成细胞浓度为 1×10^7/ml 的单细胞悬液备用。

4. 单克隆抗体标记及流式分析:(1)CD19 - Percp/SSC 设 B 淋巴细胞门,分析相关抗原的表达。(2)胞质抗原标记:先用 CD19 - Percp 进行细胞膜染色,再固定、破膜,作胞质内 ZAP - 70、PTEN、p - Akt、Kappa、Lambda 抗体染色,具体方法按试剂说明书进行。用流式细胞仪和 DIVA 软件获取并分析 10000～60000 个单核细胞。(3)结果:CD160、PTEN、p - Akt 的表达用百分率表示,CD38 以≥30% 为阳性。ZAP - 70 以≥40%,且 CLL 细胞和正常 B 细胞的 ZAP - 70 MFI 比值≥2 为阳性[4]。其余抗原表达以≥20% 为阳性。

5. 统计学方法:应用 SPSS 13.0 软件包进行分析。首先对计量资料进行正态性检验。ZAP - 70、CD38 阳性组与阴性组 CD160 表达水平比较,CD160、PTEN、p - Akt 在对照组和 CLL 中表达比较,数据呈偏态分布用 $M(P_{2.5} \sim P_{97.5})$ 表示,用 *Mann - Whitney U* 检验。CD160 在 CLL 临床分期中的表达水平比较用多个样本比较的 *Kruskal - Wallis* 秩和检验。CD160、CD23、FMC7 在 CLL 和 MCL 中的阳性率比较采用两样本率 χ^2 检验。CLL 患者 CD160 表达与 PTEN 和 p - Akt 表达的相关性采用直线相关分析。CD160 在 CLL 中的诊断价值用四格表的诊断性试验分析。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. CD160 在健康对照者成熟 B 淋巴细胞中的表达:22 份健康对照者样本中外周血 B 淋巴细胞 CD160 表达百分率为 1.45%(0.45% ～4.13%)。其中 CD160 阳性 1 例,占 4.5%。表明正常成熟 B 细胞 CD160 阳性率很低。

2. PTEN 在 CLL 中的表达:22 例健康对照 PTEN 的表达率为 75.44%(51.87% ～86.44%)。91 例 CLL 患者 PTEN 的表达率为 35.26%(12.15% ～87.40%),两者差异有统计学意义($U = 5.12$, $P < 0.01$)。相关性分析显示 CD160 在 CLL 中的表达与 PTEN 的表达呈负相关($r = -0.50$, $t = 5.48$, $P < 0.01$,表 1)。

表 1　CD160、PTEN、p - Akt 在对照组和 CLL 中的表达水平比较[$M(P_{2.5} \sim P_{97.5})$,%]

组别	n	CD160	PTEN	P - Akt
健康对照组	22	1.45 (0.45～4.13)	75.44 (51.87～86.44)	1.3 (0.45～2.03)
CLL 组	91	57.14 (6.87～90.55)	35.26 (12.15～87.40)	54.41 (15.06～87.22)
U		6.93	5.12	7.25
P		<0.01	<0.01	<0.01

3. p - Akt 在 CLL 中的表达:22 例健康对照 p - Akt 的表达率为 1.3%(0.45% ～2.03%)。91 例 CLL 患者 p - Akt 的表达率为 54.41%(15.06% ～87.22%),两者差异有统计学意义($U = 7.25$, $P < 0.01$)。相关性分析显示 CD160 在 CLL 中的表达与 p - Akt 的表达呈正相关($r = 0.93$, $t = 24.14$, $P < 0.01$,表 1)。

4. CD160 在小 B 淋巴细胞肿瘤中的表达:91 例 CLL 患者中,CD160 阳性 89 例,占 97.80%,远高于对照组,差异有统计学意义($\chi^2 = 89.38$, $P < 0.01$)。76 例淋巴瘤患者中,5 例 CD160 阳性,占 6.58%,分别为 4 例 HCL,1 例 SMZL。CD160 在 CLL 中的阳性率远高于淋巴瘤,差异有统计学意义($\chi^2 = 140.06$, $P < 0.01$)。

5. CLL 与 MCL 免疫表型比较:91 例 CLL 中,CD19、CD5、CD20、CD22 均阳性,CD10 均阴性。CD23 有 88 例阳性,占 96.70%。FMC7 有 18 例阳性,占 19.78。骨髓活检免疫细胞组织化学法 CyclinD1 均阴性,细胞遗传学检查未见 t(11;14)异常。48 例 MCL 中 CD19、CD5、CD20、CD22 均阳性,CD10 均阴性。CD23 有 12 例阳性,占 25.0%。FMC7 有 46 例阳性,占 95.83%。CyclinD1 均阳性,43 例细胞遗传学检查有 t(11;14)异常,5 例未作染色体分析。上述结果显示,CLL 与 MCL 免疫表型差异主要是 CD23 与 FMC7 的阳性率不同,CD160 在 CLL 中高表达,MCL 中不表达有助于两者鉴别诊断(表 2,图 1)。

表 2　CD160、CD23、FMC7 在 CLL 和 MCL 中的阳性率比较[n(%)]

组别	n	CD160 阳性	CD23 阳性	FMC7 阳性
CLL	91	89(97.80)	88(96.70)	18(19.78)
MCL	48	0(0)	12(25.0)	46 (5.83)
χ^2		130.51	80.04	73.16
P		<0.01	<0.01	<0.01

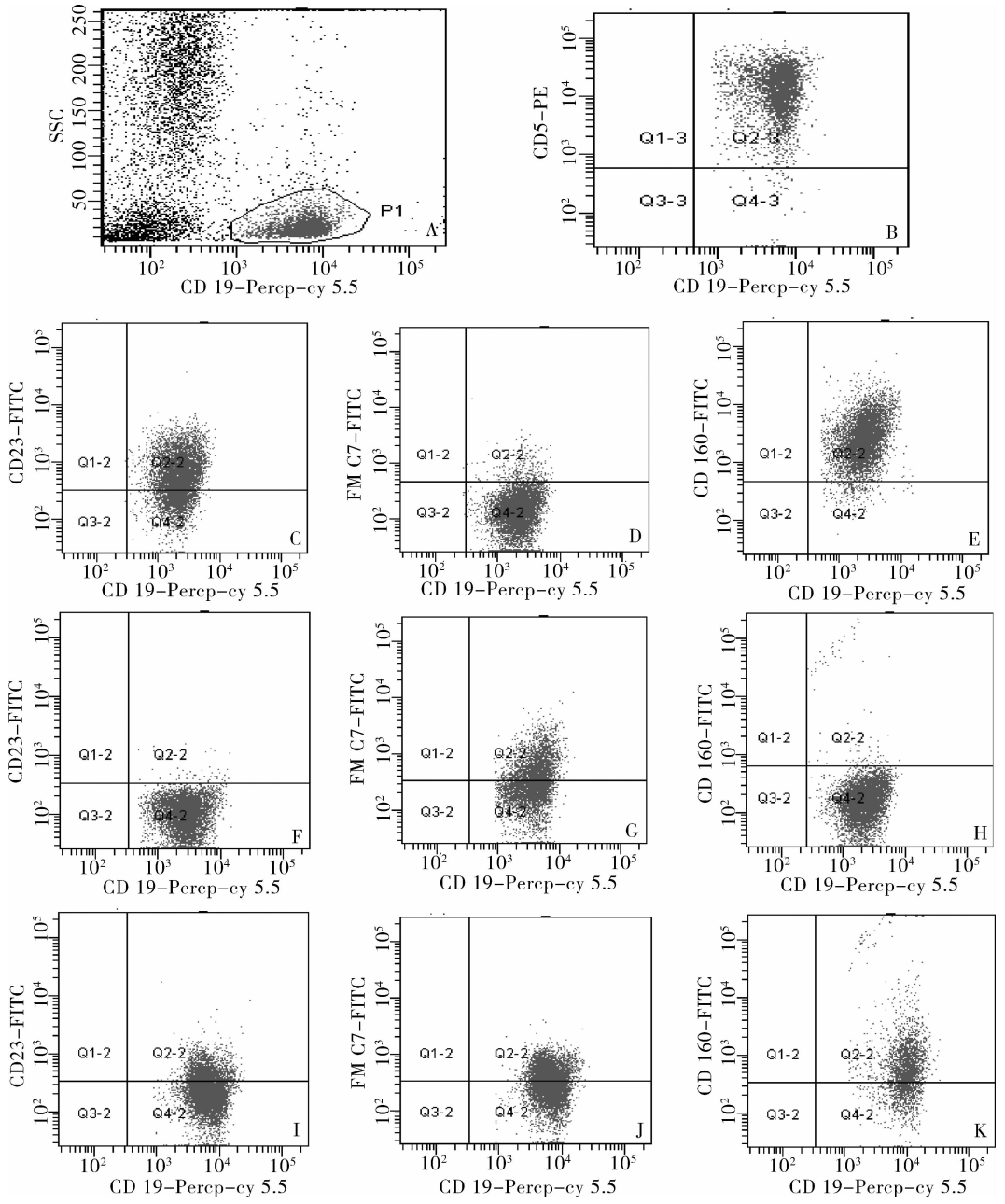

图 1　CLL 和 MCL 患者免疫表型流式细胞仪分析图

A. SSC/CD19 散点图，设 B 淋巴细胞门（P1）；B. CD19/CD5 双阳性；C ~ E. CLL 患者免疫表型；C. CD23 阳性；D. FMC7 阴性；E. CD160 阳性；F ~ H. MCL 患者免疫表型；F. CD23 阴性；G. FMC7 阳性；H. CD160 阴性；I ~ K. CLL 患者不典型免疫表型；I. CD23 阳性；J. FMC7 阳性；K. CD160 阳性

6. CD160 在 CLL 中的特异性、敏感度和准确度分析：经四格表诊断性试验分析显示，CD160 在 CLL 中的敏感度为 97.80%，特异性为 90.79%，准确度为 94.61%，阳性预测值 92.71%，阴性预测值 97.18%，阳性似然比 + LR = 10.62，阴性似然比 - LR = 0.024。提示 CD160 在 CLL 诊断中有一定的价值。

7. CD160 与 CLL 临床分期的关系：根据 Binet 临床分期，91 例 CLL 中，A 期 52 例，B 期 23 例，C 期 16 例。CD160 在 3 期中的表达水平差异无统计学意义（$H = 2.12$，$P > 0.05$，表 3）。表明 CD160 表达水平与 CLL 临床分期无关，提示其与 CLL 预后无关。

8. CD160 与 ZAP - 70、CD38 的关系：ZAP - 70、CD38 是目前较为公认的 CLL 预后免疫表型标志，其阳性表达往往提示 CLL 患者临床预后较差。本组 91 例 CLL 中，ZAP - 70 阳性 30 例，占 32.97%，CD38 阳性 35 例，占 38.46%。ZAP - 70、CD38 阳性组与阴性

表 3　CD160 在 CLL 临床分期中的表达水平比较

[$M(P_{2.5} \sim P_{97.5})$, %]

临床分期	n	CD160
Binet A	52	56.64(7.09 ~ 88.16)
Binet B	23	59.68(28.87 ~ 89.75)
Binet C	16	47.21(9.83 ~ 91.39)
H		2.12
P		0.35

组 CD160 的表达水平差异无统计学意义(U 分别为 0.79、0.02, P 均 > 0.05, 表 4)。提示 CD160 表达水平与 CLL 的预后无关。

表 4　ZAP - 70、CD38 阳性组与阴性组 CLL CD160 的表达水平比较[$M(P_{2.5} \sim P_{97.5})$, %]

组别		n	CD160	U	P
ZAP - 70	阳性组	30	60.63(1.07 ~ 88.07)	0.79	0.43
	阴性组	61	56.32(23.05 ~ 93.18)		
CD38	阳性组	35	58.02(1.14 ~ 88.04)	0.02	0.98
	阴性组	56	56.74(22.95 ~ 93.67)		

讨　论

CD160 是一种免疫球蛋白样活化 NK 细胞受体,属糖基磷脂酰肌醇(GPI)固定膜蛋白,其基因定位于染色体 1q42.3,主要表达在 NK 细胞和细胞毒性 T 细胞亚群,而正常 B 淋巴细胞和 EBV 转化的 B 淋巴细胞系并不表达[5,6]。CD160 的生理功能是低亲和性结合 MHC Ⅰ类分子,活化 PI_3K/Akt 和 ERK 信号通路,促进 NK 细胞和细胞毒性 T 细胞分泌 IL - 6、IL - 8、IFN - γ、TNF - α,产生细胞毒效应[7,8]。新近 Liu 等[1]发现 CD160 在 CLL 患者肿瘤细胞普遍高表达,体外实验表明,CD160 分子上调 p - AKt、Bcl - 2 表达,促进 CLL 细胞生存,用 PI_3K 抑制剂 Wortmanin 和 Ly294002 阻滞后,p - Akt 减少,caspase - 3 被激活,进而诱导 CLL 细胞凋亡。本研究组结果显示,健康对照组外周血 B 淋巴细胞 CD160 基本不表达,91 例 CLL 患者 CD160 呈高表达。CLL 患者 PTEN 蛋白较对照组表达明显减低,p - Akt 表达较对照组显著增高。相关性分析显示,CLL 患者 CD160 表达水平与 p - Akt表达水平呈正相关,而与 PTEN 表达水平呈负相关。上述结果提示,CD160 分子与 PTEN - PI_3K/Akt 信号通路活化密切相关,可能与 CLL 细胞生存和持续无序增生有关。

Farren 等[2]报道,600 例 CLL 患者中,590 例 CD160 阳性,占 98%;32 例 HCL 患者 100% 阳性;34 例 MCL 患者中 5 例阳性,占 15%;145 例其他 B 淋巴细胞增生性疾病患者中 23 例阳性,占 16%;而正常 B 淋巴细胞,包括 $CD34^+CD19^+$ 及幼稚、成熟 B 淋巴细胞 CD160 均不表达。本研究组结果显示,91 例 CLL 患者中,CD160 阳性 89 例,占 97.80%。76 例 B 淋巴细胞淋巴瘤患者中,5 例 CD160 阳性,占 6.58%,分别为 4 例 HCL,1 例 SMZL。但是 48 例 MCL 患者中 CD160 均阴性。CD160 在 CLL 中的阳性率远高于 B 淋巴细胞淋巴瘤,差异有统计学意义($P < 0.01$)。22 例健康对照组外周血 B 淋巴细胞仅 1 例阳性,且呈低表达,与文献报道结果基本一致。这提示,CD160 仅在恶性 B 淋巴细胞中高表达,有助于鉴别恶性 B 淋巴细胞克隆。

CLL 与 MCL 均为较成熟型小 B 淋巴细胞,形态学诊断存在一定困难,细胞遗传学检查诊断费时,流式细胞术免疫表型分析往往起着关键的作用。典型 CLL 免疫表型为 $CD5^+CD19^+CD23^+CD22^+CD20^+FMC7^-$ cyclinD1$^-$,典型 MCL 免疫表型为 $CD5^+CD19^+CD23^-CD22^+CD20^+FMC7^+$ cyclinD1$^+$。两者的差异主要是 CD23、FMC7、cyclinD1 表达不同。cyclinD1 目前尚无可靠的流式检测抗体,主要应用免疫细胞组织化学方法检测。流式免疫分型只能依据 CD23、FMC7 的表达来鉴别 CLL 和 MCL。但是临床上不典型 CLL、MCL 免疫表型经常出现,文献报道,CD23、FMC7 在 CLL 和 MCL 中高频率的交叉表达[9,10]。本组 91 例 CLL 患者中 21 例呈不典型表型(3 例 CD23 阴性,18 例 FMC7 阳性),占 23.08%,但 CD160 均为阳性。48 例 MCL 患者中 14 例呈不典型表型(12 例 CD23 阳性,2 例 FMC7 阴性),占 29.17%,而 CD160 均为阴性。因此,CD160 检测对鉴别不典型 CLL 和 MCL 具有一定的意义。四格表诊断性试验分析显示,CD160 在 CLL 中的敏感度为 97.80%,特异性为 90.79%,准确度为 94.61%,阳性预测值 92.71%,阴性预测值 97.18%。结果进一步证实 CD160 在 CLL 诊断和鉴别诊断中有较高的价值。

CD160 与 CLL 临床分期的关系显示,根据 Binet 临床分期,CD160 在 A、B、C 3 期中的表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。此外,ZAP - 70、CD38 是 CLL 预后免疫表型标记,其阳性表达预示临床预后较差。本组 91 例 CLL 中,ZAP - 70 阳性占 32.97%,CD38 阳性占 38.46%。ZAP - 70、CD38 阳性组与阴性组 CD160 的表达水平差异无统计学意义(P 均 >

0.05)。上述结果提示 CD160 表达水平与 CLL 患者的临床预后无关。

综上所述,在 CLL 患者中 CD160 与 PTEN - PI_3K/Akt 信号通路活化相关。CD160 在 CLL 细胞中普遍高表达,一方面有助于 CLL 的诊断和鉴别诊断,另一方面 CD160 在正常 B 淋巴细胞中不表达,可能是潜在的微量残留病检测标志。

参考文献

1 Liu FT, Giustiniani J, Farren T, *et al*. CD160 signaling mediates PI_3K - dependent survival and growth signals in chronic lymphocytic leukemia[J]. Blood,2010,115(15): 3079 - 3088

2 Farren TW, Giustiniani J, Liu FT, *et al*. Differential and tumor - specific expression of CD160 in B - cell malignancies[J]. Blood,2011, 118(8): 2174 - 2183

3 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[J]. 3 版. 北京:科学出版社, 2007:139 - 140

4 Nagwa M, Hassanein NM, Kathryn R. A single tube, four - color flow cytometry assay for evaluation of ZAP - 70 and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia[J]. Am J Clin Pathol,2010,133(5): 708 - 717

5 Šedy JR, Bjordahl RL, Bekiaris V, *et al*. CD160 activation by herpesvirus entry mediator augments inflammatory cytokine production and cytolytic function by NK cells[J]. J Immunol,2013,191(2):828 - 836

6 D′Addio F, Ueno T, Clarkson M, *et al*. CD160Ig fusion protein targets a novel costimulatory pathway and prolongs allograft survival[J]. PLoS One,2013,8(4):e60391

7 Bouma G, Baggen JM, van Bodegraven AA, *et al*. Thiopurine treatment in patients with Crohn′s disease leads to a selective reduction of an effector cytotoxic gene expression signature revealed by whole - genome expression profiling[J]. Mol Immunol,2013,54(3 - 4):472 - 481

8 Fuchs A, Vermi W, Lee JS, *et al*. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL - 12 - and IL - 15 - responsive IFN - γ producing cells[J]. Immunity,2013,38(4):769 - 781

9 Perkovic S, Bašic - Kinda S, Aurer I, *et al*. Multiparameter flow cytometry is necessary for detection, characterization and diagnostics of composite mature B - cell lymphoproliferative neoplasms[J]. Int J Hematol,2013,98(5):589 - 596

10 El Desoukey NA, Afify RA, Amin DG, *et al*. CD200 expression in B - cell chronic lymphoproliferative disorders[J]. J Investig Med, 2012,60(1):56 - 61

(收稿日期:2014 - 05 - 12)
(修回日期:2014 - 05 - 26)

仙鹤草总黄酮纯化工艺研究

白 甫 朱丽红 柳小莉 唐志书 郭东艳

摘 要 目的 优选仙鹤草总黄酮纯化工艺条件。**方法** 采用大孔吸附树脂法,以总黄酮含量为评价指标,分别对树脂型号、树脂径高比、上样药液浓度、上样药液速度、洗脱液浓度、洗脱剂用量进行考察。**结果** 优选的纯化工艺条件为选用 D101 型大孔树脂,上样药液浓度为 0.15g/ml,上样速度为 1BV/h,树脂径高比为1∶10,洗脱液为 3BV 50% 乙醇洗脱。固形物中总黄酮含量为 31.05%。**结论** 该纯化工艺条件合理、稳定,可用于工业化生产。

关键词 仙鹤草 总黄酮 大孔树脂 纯化
[中图分类号] R284.2 [文献标识码] A

Purification Technology of Total Flavones from *Herba Agrimoniae*. *Bai Fu, Zhu Lihong, Liu Xiaoli, et al. The Medicine College of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi 712046, China*

Abstract Objective To optimize purification technology conditions of total flavones from Herba Agrimoniae. **Methods** By using macroporous adsorption resin and taking the total flavones content as evaluation index, we research the resin type, diameter - height ratio of resin column, concentration of sample solution, velocity of sample solution, eluent concentration and eluent amount respectively. **Results** The optimum purification technology conditions were as follows: the type of macroporous adsorption resin was D101, concentration of sample solution was 0.15g/ml, velocity of sample solution was 1BV/h, diameter - height ratio of resin column was 1∶10, eluent was

基金项目:陕西省教育厅基金资助项目(09JC018)
作者单位:712046 咸阳,陕西中医学院药学院