

- 7 Park K, Ji J, Yang H, *et al.* Overexpression of pigment epithelium-derived factor inhibits retinal inflammation and neovascularization [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(2): 688 – 698
- 8 Nicholis SJ. Rosuvastatin and progression of atherosclerosis [J]. *Exper Rev Cardiovasc Ther*, 2008, 6(7): 925 – 933
- 9 Calabro P, Yeh EH. The pleiotropic effects of statins [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2005, 20(6): 541 – 546
- 10 王丽娟, 陈还珍, 王芳, 等. 国产瑞舒伐他汀对血脂及炎症因子影响的临床研究 [J]. *当代医学*, 2011, 17(3): 141 – 142
- 11 Li J, Wang JJ, Chen D, *et al.* Systemic administration of HMG – CoA reductase inhibitor protects the blood – retinal barrier and ameliorates retinal inflammation in type 2 diabetes [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 89(1): 71 – 78
- 12 陈虎, 李元奎, 李小峰. 412 例老年人血糖与血脂关系的相关性分析 [J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(24): 3286 – 3287
- 13 高丽君, 齐晓勇, 王秀平, 等. 调脂药物对高脂模型大鼠炎症因子的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2008, 28(21): 2083 – 2085
- (收稿日期: 2014 – 07 – 03)
- (修回日期: 2014 – 08 – 26)

FCM 和细胞遗传学检查在恶性淋巴瘤诊断中的意义

钱卫清 陈梅玉 仇惠英 郑积富 魏计锋 朱明清 岑建农 潘金兰 孙爱宁 吴德沛

摘要 **目的** 评价流式细胞术联合细胞遗传学检查在恶性淋巴瘤确诊中意义。**方法** 笔者医院 2009 ~ 2012 年 29 例门诊及住院疑似淋巴瘤患者淋巴组织标本, 制备单个核悬浮细胞, 分别行流式细胞术检测细胞表面抗原的表达和 R – 显带检测细胞遗传学细胞核型。**结果** 29 例患者中 8 例病理诊断为反应性增生或慢性炎, 通过流式细胞仪和细胞遗传学诊断恶性淋巴瘤, 12 例患者发现核型异常, 流式细胞术细胞表面抗原的检测可区分 B 淋系还是 T 淋系, 区分不同亚型有指导意义, 12 例患者检测到异常核型, 其中 4 例淋巴结病理提示淋巴结炎或者增生但核型发现异常染色体改变, 肯定了为恶性改变, 并发现有与亚型相关的特异性核型改变 t(11;14), t(14;18), 9 例患者为复杂核型, 提示预后不良。**结论** 淋巴组织病理学检查是诊断恶性淋巴瘤的基础, 结合流式细胞术以及染色体检查可以提高恶性淋巴瘤的诊断率, 并对淋巴瘤亚型分型以及预后判断具有指导性意义。

关键词 恶性淋巴瘤 FCM 细胞遗传学检测

中图分类号 R733.4

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.043

Significance of Flow Cytometry and Cytogenetic Techniques in the Diagnosis of Malignant Lymphoma. Qian Weiqing, Chen Meiyu, Qiu Huiying, *et al.* Suzhou Health College, Jiangsu 215009, China

Abstract **Objective** To evaluate the significance of flow cytometry (FCM) and cytogenetic techniques in the diagnosis of malignant lymphoma. **Methods** Twenty-nine cases of suspected lymphoma patients from our hospital outpatient and inpatient from 2009 to 2012 were selected. Lymphoid tissue samples were prepared for mononuclear cell suspension. Cell surface antigen expression were detected by FCM and Karyotype analysis were conducted by R – banding techniques. **Results** Eight cases out of 29 cases of patients with pathological diagnosis of reactive hyperplasia or chronic inflammation were diagnosed as malignant lymphoma by flow cytometry and cytogenetic. Twelve patients were found abnormal karyotype. B or T lymphoid expression was distinguished by flow cytometry detection of cell surface antigens, which had guiding significance to distinguish different subtypes. Twelve patients were found abnormal karyotype, including four cases of lymph node pathology diagnosed as lymphadenitis or Lymph node hyperplasia. Abnormal chromosome karyotype change certainly conformed a malignant change. t(11;14) and t(14;18) subtype – specific karyotype found in some patients were closely related to lymphoma. Nine patients with complex karyotype indicated a poor prognosis. **Conclusion** Lymphoid tissue pathological examination as the basis for the diagnosis of malignant lymphoma, combined with flow cytometry and chromosome examination can improve the rate of diagnosis of malignant lymphoma, and guiding significance for lymphoma subtype classification and prognosis.

Key words Malignant lymphoma; FCM; Cytogenetic examination

基金项目: 苏州卫生职业技术学院院级课题 (SZWZY201001)

作者单位: 215009 苏州卫生职业技术学院 (钱卫清); 215006 苏州大学附属第一医院、江苏省血液研究所、卫生部血栓与止血重点实验室 (陈梅玉、仇惠英、郑积富、魏计锋、朱明清、岑建农、潘金兰、孙爱宁、吴德沛)

通讯作者: 仇惠英, 电子信箱: qiuhuiying@aliyun.com

恶性淋巴瘤是淋巴结和结外部位淋巴组织的免疫细胞肿瘤,目前淋巴瘤的诊断主要依靠病理切片检查。但是恶性淋巴瘤的诊断和分型一直是病理学有争议的领域之一,尤其是非霍奇金淋巴瘤组织学的改变复杂,与淋巴结的多种良性病变在常规染色形态学多有交叉,一定情况下鉴别困难,误诊率较高。本研究在常规染色形态学检查同时,采用流式细胞术联合细胞遗传学检查,以提高恶性淋巴瘤的确诊率,现将结果报道如下。

材料与方法

1. 标本来源:笔者医院 2008~2011 年 29 例门诊及住院疑似淋巴瘤患者淋巴组织标本,其中男性 23 例,女性 6 例,患者年龄 13~80 岁,中位年龄 58 岁。本研究 29 例标本全部采用病理学检查和流式细胞术测定,其中 24 例标本另外采用细胞遗传学检查。

2. 流式细胞术检测:标本的制备:新鲜的淋巴组织标本置于生理盐水中,剪切成直径 2~3mm 的小块,放在特制的带旋转刀片的盒子中,加 1ml 生理盐水,以一定的速度旋转刀片 2~3min,将组织分散成单个细胞或极小的组织块,然后用 50 μ m 直径的尼龙网过滤后,再用含 0.1% 牛血清白蛋白的 PBS 低速(1000~1200r/min)离心 5min,洗涤两次,悬浮单个核细胞在洗液中备用。采用多个细胞系列的抗体(T 系、B 系、髓系)和细胞发育早期和后期的抗体,利用三色免疫荧光染色,CD45/SSC 设门鉴别幼稚和成熟细胞,获得较多参数分析。具体步骤如下:使用流式细胞仪,开机后以 CaliBRITE3 荧光微球和 FACSComp 自动检查仪器灵敏度,并自动设定实验的获取条件,包括 PMT 电压和荧光补偿等,然后进入 Multi-SET 自动分析软件或 CellQuest 分析软件,按软件的提示自动或手动设置各 T 淋巴细胞亚群门,获取 15000 个细胞,自动分析各样本管淋巴细胞免疫表型。

3. 细胞遗传学检测:所有标本按照常规方法制备染色体标本及 R 显带进行细胞遗传学检查。按上述方法制备细胞悬液后置 37℃ 恒温箱培养 24h,早晚定期摇匀培养物 1 次。于终止培养前 1h 加入秋水酰胺,终浓度为 0.05 μ g/ml,阻留中期分裂相。将培养物 1000r/min 离心 10min,弃去上清,沿管壁缓慢加入 37℃ 的 0.075mol/L 的 KCl 溶液 6~8ml,混匀后至 37℃ 恒温箱 30min。然后加入 3:1 甲醇、冰醋酸固定液 1ml,吹打混匀,1000r/min 离心 10min 后弃上清,加新鲜配置的 3:1 甲醇、冰醋酸固定液 6~8ml,吹打混匀后再次离心 10min,重复上述两步,使细胞经过 3 次固定,制成合适浓度的细胞悬液。用吸管将细胞悬液吸取少量,从 10cm 高处滴至一端倾斜 15° 的经冰水或 20% 乙醇浸泡过的洁净无脂的玻片上,每张玻片 2~3 滴,过火数次后使其干燥。将干燥的玻片放入预温 87.5℃ 的 Earle's 溶液中,温浴时间在 60~120min 之间。然后用新鲜配制的 10% Giemsa 染色液染色 8~10min,取出水洗待干。核型异常根据《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN

2009)》的规定进行描述。正常核型者至少分析 20 个分裂象,异常核型者至少分析 10 个分裂象,2 个或 2 个以上具有相同的核型异常定为异常克隆。

4. 结果判定标准:FCM 测定免疫表型分析参照 WHO 2000 年恶性淋巴瘤分类法^[1]。核型异常命名根据《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN 2009)》^[2]的标准。

结 果

1. 29 例患者最终诊断:29 例患者按照恶性淋巴瘤 WHO 分类法最终诊断弥漫大 B 细胞淋巴瘤 6 例,间变大 B 细胞淋巴瘤 2 例,外周 T 细胞性淋巴瘤 2 例,霍奇金淋巴瘤 1 例,B 淋巴母细胞淋巴瘤 1 例,T 细胞血管免疫母细胞淋巴瘤 3 例,嗜酸细胞白血病 1 例,纵隔淋巴结大细胞癌 1 例,巨球蛋白血症 1 例,脾边缘区淋巴瘤 1 例,淋巴浆细胞淋巴瘤 1 例,套细胞淋巴瘤 2 例,滤泡性淋巴瘤 3 例,未能明确分型的淋巴瘤 4 例。其中有 8 例病理诊断为反应性增生或慢性炎症,通过流式细胞仪和细胞遗传学检测而最终确诊为外周 T 细胞淋巴瘤 1 例,霍奇金淋巴瘤 1 例,T 细胞血管免疫母细胞淋巴瘤 1 例,滤泡性淋巴瘤 1 例,嗜酸性白血病 1 例,巨球蛋白血症 1 例,未明确分型的淋巴瘤 2 例。

2. 流式细胞仪对淋巴瘤诊断作用:流式细胞仪对表面抗原检测,如果分析发现较多细胞群体有克隆性 B 淋系或 T 淋系,往往提示有恶性克隆的存在。另外可区分 B 淋系还是 T 淋系,7 例为 T 淋系抗原表达,如例 22,流式细胞仪检测到 CD30 阳性的成熟异常 T 淋系表达,而且染色体也发现异常,最终诊断 T 细胞淋巴瘤。通过不同抗原检测对区分不同亚型有指导意义,如例 6 有强阳性 CD20 表达,与病理切片提示滤泡性恶性淋巴瘤相符合,提示临床上可采用抗 CD20 单抗美罗华治疗;例 9 流式检测符合 MCL 表型,同时染色体也发现 t(11;14),支持套细胞淋巴瘤诊断。

3. 核型分析意义:12 例患者检测到异常核型,其中 4 例淋巴结病理提示淋巴结炎或者增生但核型发现异常染色体改变,肯定了为恶性改变。例 9 和例 13 检测到 t(11;14)(p13;q11),而例 9 病理检查为成熟克隆性 B 淋巴细胞,流式细胞仪也检测到异常的淋系表达符合套细胞淋巴瘤 CD5⁺、CD10⁻、CD23⁻,核型分析肯定了套细胞淋巴瘤的诊断,例 13 病理诊断为 T 淋巴母细胞性淋巴瘤,核型分析也肯定了病理诊断。例 28 核型检测到 t(14;18)(q32;q21),该易位是滤泡性淋巴瘤的特征性改变,但是病理提示右颈

淋巴结反应性增生,最后临床诊断滤泡性淋巴瘤,经过美罗华联合 CHOP 方案治疗得到缓解。核型分析显示 9 例患者为复杂核型,提示预后不良。

讨 论

恶性淋巴瘤分为霍奇金病和非霍奇金病两大类,临床以无痛性淋巴结肿大为典型特征,晚期有恶病质、发热及贫血。淋巴瘤的发生率近年来呈上升的趋势,病死率为 1.5/10 万,占有恶性肿瘤死亡位数的第 11~13 位。淋巴瘤诊断依据淋巴组织活检,通过病理切片形态和免疫病理诊断。流式细胞术是一种高通量的主要针对细胞的检测方法,通过物理特性和其他荧光标记方法达到对细胞分类筛选的目的。染色体异常与一些特异淋巴瘤类型有关,如套细胞淋巴瘤可见 $t(11;14)(q13;q32)$,间变性大细胞淋巴瘤中可见 $t(2;5)(q23;q32)$,Burditt 淋巴瘤有 $t(8;14)(q24;q32)$,滤泡性淋巴瘤可见 $t(14;18)(p32;q21)$ 。但因淋巴瘤诊断很多情况下在各个科室因怀疑其他疾病比如扁桃腺肿大、鼻咽部肿瘤或者胃肠道肿瘤行手术切除,病理切片后诊断,而标本已经固定石蜡包埋,无法再次得到新鲜标本行染色体和流式细胞仪检查,另外有时因取材较少比如是穿刺标本或者小淋巴结,不能实施多种方法检测,因此目前国内较少同时开展淋巴组织的分子生物学的多项检测。笔者在 3 年期间有意识留取 29 例疑似淋巴瘤的病例,结果显示标本中病理学检查与 FCM 检查结果符合的有 21 例(72.4%),不符合的有 8 例(27.6%)。

虽然病理学检查是疾病诊断的金标准,但是病理学检查镜下分析细胞少,同时受到主观判断影响,不难发现病理学检查对淋巴瘤的诊断存在一定的漏诊率和误诊率;而且单纯的形态学检查只能描述恶性细胞在淋巴结的位置和特殊形态,无法提示分化阶段,对临床医生治疗方案的选择以及患者的预后评估也不能提供有效的依据。Lanne 等^[3]通过组织样本穿刺的方法获得 424 例淋巴组织样本,采用免疫组化和流式细胞术方法检测,证实两种检测方法对低度恶性 B-NHL 的一致性为 95%,淋巴滤泡增生为 97%,而高度恶性的 B-NHL 及 T-NHL 一致性稍低,分别为 78% 及 53%。NHL 是恶性淋巴系单克隆增生,80% 起源于 B 细胞,20% 起源于 T 细胞或非 B 非 T 细胞。FCM 通过激光照射细胞产生 FSC 和 SSC 来区分细胞群体,其中 FSC 的数值和细胞大小呈正比,SSC 的数值和细胞颗粒度的多少呈正比。

免疫荧光法测定细胞表面抗原对淋巴瘤的免疫

分型有重要的意义。例如套细胞淋巴瘤(MCL)为 B 淋巴克隆性疾病,表达 CD19、CD20、CD22、CD43, IgM 中度表达, IgD 弱表达或阴性,多数病例 CD5⁺/CD23⁻、CD10 阴性。滤泡性淋巴瘤(FL) CD19、CD20、CD22 阳性,经常表达 CD23、FMC7、CD10,缺乏 CD5、CD43、CD11c 和 CD103,因此可以利用细胞表面抗原表达的特异性进行淋巴瘤类型的区别。本研究中 1 例套细胞淋巴瘤患者染色体检查出 $t(11;14)$ 异常并伴有其他染色体异常的复杂核型,这与多数学者所报道的 MCL 具有 $t(11;14)(q13;q32)$ 特异的细胞遗传学改变是符合的。 $t(11;14)(q13;q32)$ 改变引起 BCL-1/PRAD-1 重排,导致原癌基因 CyclinD1 蛋白的表达。Bosch 等报道 PRAD-1/CyclinD1 是 MCL 敏感及特异的分子标志,FCM 检测该蛋白可以为 MCL 提供诊断依据,因病例数少笔者未开展此项检测。有报道证实,淋巴瘤的标本产生特异的细胞群的概率与炎症增生等非淋巴瘤标本产生特异细胞群的概率比具有统计学的意义,但是不能排除淋巴结内细胞种类多而复杂,特异细胞较少产生的假阳性和假阴性结果,所以 FCM 不能取代病理学检查。

Colorado 等^[4]对 223 个淋巴组织标本进行检测,发现 FCM 敏感度和特异性分别为 87.25% 和 95.95%,对霍奇金淋巴瘤和富于 T 细胞/组织细胞大 B 细胞淋巴瘤的诊断,FCM 诊断较为困难,这可能与两者的生物学特性相似,<10% 的克隆性 B 细胞亚群会伴随有 T 淋巴细胞毒性的改变。排除霍奇金淋巴瘤后,FCM 诊断的敏感度明显提高。病理上确诊的淋巴瘤患者考虑骨髓或中枢侵犯,可行骨髓或脑脊液 FCM 检测可以明确诊断,尤其是区分细胞发育早期和晚期,淋巴母细胞淋巴瘤、ALL 均是淋巴细胞发育早期阶段,相应的早期抗原和系列抗原阳性。弥漫性大细胞淋巴瘤和弥漫性小无裂细胞淋巴瘤是淋巴细胞发育晚期阶段的肿瘤,相应的晚期抗原和系列抗原阳性。

一项多中心研究报道,对 174 例初诊高危 NHL 患者行 FCM 及脑脊液细胞学检测,FCM 发现 10% (18/174) 患者脑脊液阳性,而细胞学检测 4% ($P < 0.001$)^[5]。FCM 检测脑脊液阳性的患者无论两年无病生存率及总生存率均低于阴性患者。对高危 NHL 患者通过 FCM 行脑脊液检查降低中枢神经系统复发及改善预后有重要意义。而 Alvarez 等^[6]也做了相应的研究,认为虽然 FCM 检测比传统的细胞学更为敏感和特异,但是并未减低中枢神经系统的复发率。而

染色体检查对淋巴瘤的诊断有进一步补充的作用。不同的淋巴瘤有特异的性的染色体改变,如 t(14;18)(q32;q21)和 t(11;14)(q13;q32)分别有助于 FL 和 MCL 的诊断^[4]。许多染色体的异位又引起一些新的融合基因和蛋白表达,这些融合基因和蛋白反应淋巴瘤的发生机制,对淋巴瘤的诊断和分型,特别是形态学和免疫学难以确定的病例的诊断和分型有重要意义。

本研究通过 3 种方法组合检测对 29 例患者进行了精确的分类,各种类型均有,这单凭病理学检查是做不到的。特别是 8 例病理诊断为反应性增生或慢性炎症,通过流式细胞仪和细胞遗传学检测而最终确诊为外周 T 细胞淋巴瘤 1 例,霍奇金淋巴瘤 1 例, T 细胞血管免疫母细胞淋巴瘤 1 例,滤泡性淋巴瘤 1 例,嗜酸性白血病 1 例,巨球蛋白血症 1 例,未明确分型的淋巴瘤 2 例,避免了漏诊。流式细胞仪对表面抗原检测可以发现是否有克隆性 B 淋系或 T 淋系异常表达,本研究病例 7 例(24.1%)为 T 淋系抗原表达与文献报道的 80% 起源于 B 细胞,20% 起源于 T 细胞或非 B 非 T 细胞结果相类似,同样 FCM 检测到一些病例有强阳性 CD20 表达,为治疗上选择抗 CD20 单抗提供了依据。本研究细胞遗传学核型分析 12 例患者检测到异常核型,肯定了患者为恶性改变,同时一些特异性染色体改变如 t(11;14)(p13;q11)和 t(14;18)(q32;q21)对特定亚型诊断具有重要意义。

本研究结果显示,淋巴组织病理学检查是诊断恶性淋巴瘤的基础,结合流式细胞术以及染色体检查可以提高恶性淋巴瘤的诊断率,并对淋巴瘤亚型分型以及预后判断具有指导意义,值得临床开展。

参考文献

- 1 Evans LS, Hancock BW. Non - hodgkin lymphoma [J]. Lancet, 2003, 362(9378):139 - 146
- 2 Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. ISCN (2009): an international system for human cytogenetic nomenclature [M]. Basel: S. Karger, 2009
- 3 Laane E, Tani E, Björklund E, *et al.* Flow cytometric immunophenotyping including Bcl - 2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non - Hodgkin's lymphoma [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2005, 64(1):34 - 42
- 4 Colorado M, Cuadrado MA, Insunza A, *et al.* Simultaneous cytologic and multiparametric flow cytometric analysis on lymph node samples is faster than and as valid as histopathologic study to diagnose most non - Hodgkin lymphomas [J]. Am J Clin Pathol, 2010, 133(1):83 - 91
- 5 Benevolo G, Stacchini A, Spina M, *et al.* Final results of a multicenter trial addressing role of CSF flow cytometric analysis in NHL patients at high risk for CNS dissemination [J]. Blood, 2012, 120(16):3222 - 3228
- 6 Alvarez R, Dupuis J, Plonquet A, *et al.* Clinical relevance of flow cytometric immunophenotyping of the cerebrospinal fluid in patients with diffuse large B - cell lymphoma [J]. Ann Oncol, 2012, 23(5):1274 - 1279

(收稿日期:2013 - 10 - 20)

(修回日期:2013 - 12 - 11)

联合应用血必净与钠洛酮干预重症胸腹损伤急性肝细胞功能损害的效果

李志伟 郭雅琼 王文军 徐旭 董浩 代文光 王树龙 马之嘉 付芳 赵立强

摘要 **目的** 探讨联合应用血必净(XBJ)、钠洛酮(NX)干预重症胸腹损伤急性肝细胞功能损害的效果。**方法** 以 2009 年 1 月~2013 年 6 月在笔者医院就诊,创伤指数(TI)≥17 分,除外合并颅脑损伤及在急诊死亡的重症胸腹创伤患者为入选标准,干预组 112 例,对照组 57 例;干预组患者在就诊及入院时分别检查谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、内毒素(LPS)、白细胞介素-6(IL-6)、磷脂酶 A₂(PLA₂),对照组仅于入院时进行同样项目检查。**结果** 干预组患者就诊时 ALT 为 328.43 ± 21.35 U/L, AST 为 298.49 ± 19.62 U/L;入院时 ALT 为 58.12 ± 11.67 U/L, AST 为 54.72 ± 10.31 U/L。对照组患者入院时 ALT 为 350.88 ± 27.72 U/L, AST 为 302.91 ± 24.31 U/L;干预后 ALT、AST 降低,与干预前及对照组相比差异有统计学意义 $P < 0.01$ 。**结论** 联合应用 XBJ 与 NX 治疗可显著减轻重症胸腹损伤后急性肝细胞功能损害,对减少并发症、预防多器官功能障碍综合征(MODS)有重要意义。

作者单位:010051 呼和浩特,中国人民解放军第 253 医院急诊科

通讯作者:赵立强,电子邮箱:Zhao Li qiang nm@163.com