

不同方法学检测急性髓系白血病 MPO 阳性率的比较及意义

郑 瑞 章 鸯 陈葆国 沈芝颖 林爱芬

摘 要 **目的** 比较免疫组化、细胞化学及流式细胞学 3 种方法检测急性髓系白血病(AML)胞内 MPO 阳性率的差异及临床意义。**方法** 对 90 例 AML 患者同时进行骨髓活检组织免疫组织化学染色,细胞涂片细胞化学染色及骨髓流式细胞学分析,检测 MPO 表达情况。**结果** 3 种方法联合检测,AML 患者 MPO 总阳性率为 95.5%,其中免疫组织化学、细胞化学及流式细胞学方法检测 MPO 阳性率分别为 66.7%、93.3% 及 87.8%,以免疫组化方法检测 MPO 敏感度最低,明显低于细胞化学和流式细胞学检测方法(P 均 <0.05),而细胞化学与流式细胞学方法比较,MPO 表达率差异无统计学意义($P>0.05$);AML 患者中,除 M7 外,以 M5 患者 MPO 阳性率最低(88.9%),其中免疫组织化学法 MPO 的检出率最低(37.0%),明显低于细胞化学法(88.9%, $P<0.05$),但与流式细胞学方法比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 细胞化学及流式细胞术检测 AML 患者 MPO 表达的阳性率优于活检组织的免疫组化法,三者结合比单独一种更有利于 AML 与急性淋巴细胞白血病的鉴别诊断。

关键词 髓过氧化物酶 急性髓系白血病 免疫组织化学 细胞化学 流式细胞学

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.03.019

Comparison and Clinical Significance of Different Methodology in Detecting MPO Expression in Acute Myeloid Leukemia Patient. Zheng Rui, Zhang Yang, Chen Baoguo, et al. Medical Research Center, Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 317000, China

Abstract **Objective** To compare the difference of immunohistochemistry, cytochemistry and flow cytometry methods in detecting the expression of MPO in acute myeloid leukemia (AML) and its clinical significance. **Methods** The immunohistochemistry, cytochemistry and flow cytometry technique were used for detecting the MPO expression. **Results** The total positive rate of MPO by the three methods was 95.5%. The positive rates of MPO by immunohistochemistry, cytochemistry and flow cytology were 66.7%, 93.3% and 87.8%, respectively. The sensitivity of MPO detection by immunohistochemical method was the lowest, and the positive rate of MPO detected by immunohistochemical method was significantly lower than that of cytochemistry and flow cytology ($P<0.05$), but there was no significant difference in the positive rate of MPO between cytochemistry and flow cytometry ($P>0.05$). Except for M7 subtype, the positive rate of MPO in M5 patients was the lowest (88.9%), and the positive rate of MPO by immunohistochemistry was the lowest (37.0%), which was significantly lower than that by cytochemical method (88.9%, $P<0.05$), but there was no significant difference compared with flow cytology ($P>0.05$). **Conclusion** The cytochemistry and flow cytometry MPO positive rate in patients with AML was better than that of immunohistochemistry, and the combination of the three methods was more beneficial to the differential diagnosis of AML from acute lymphoblastic leukemia than that of single one.

Key words Myeloperoxidase; Acute myeloid leukemia (AML); Cytochemistry; Flow cytometry; Immunohistochemistry

白血病的精准诊断需要多学科(形态学、免疫学、遗传学和分子生物学)的综合诊断。目前骨髓细胞涂片形态学仍是基础,形态学对急性髓系白血病(AML)的分型主要依据 1986 年的 FAB(French - American - Britain)的分型标准。组织化学染色辅助用

于白血病的形态学分型,其中髓过氧化物酶(MPO)染色是鉴别髓系白血病的关键指标。实际工作中,笔者发现部分 AML 患者骨髓病理切片、细胞涂片及流式细胞学检测白血病细胞胞内 MPO 活性的结果并不一致,本研究通过对这 3 种方法检测 AML 胞内 MPO 的结果进行比较,探讨三者之间的优缺点及临床意义。

资料与方法

1. 一般资料:对笔者医院 2012 年 5 月~2016 年 3 月初诊 AML,且均进行骨髓活检、免疫学分型及骨

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2014KYB311);国家人类遗传资源共享服务平台项目(2005DKA21300)

作者单位:317000 临海,浙江省台州医院中心实验室(郑瑞、陈葆国、章鸯、沈芝颖),组织库(林爱芬)

通讯作者:林爱芬,电子邮箱:linaf@enzemed.com

髓形态学检查的患者,共计 90 例,其中男性 58 例,女性 37 例,患者年龄 1 ~ 93 岁,中位年龄 60.5 岁,按 FAB 分型,详见表 1。

2. 检测方法: (1) 骨髓活检标本 MPO 染色: ①Bouin氏固定液固定过夜;②放入 EDTA 脱钙液脱钙 4 ~ 5h;③流水冲洗 15min,投入脱水机,常规脱水、透明,石蜡包埋切片 3μm;④MPO 染色:72℃烤片 1h,二甲苯脱蜡 2 缸(10 分钟/每缸),梯度乙醇脱水(梯度乙醇 100%、95%、75%,2 分钟/每次),PBS 洗 5 次,高压修复,PBS 洗 5 次,3% 双氧水室温孵育 10min,PBS 洗 5 次,加兔抗人 MPO 多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)37℃ 1h,PBS 洗 5 次,二抗 37℃ 20min、三抗各 10min,DAB 显色 5 ~ 10min,苏木精复染 2min,自来水冲洗,盐酸酒精分化,逐级梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。中性粒细胞作内对照或阳性标本做阳性对照,用 PBS 做阴性对照,低倍镜或高倍镜判断,MPO + 或 MPO 少量 + 均按阳性统计。(2)骨髓涂片 MPO 染色:采用联苯胺法染色,方法按试剂盒(上海太阳生物技术有限公司)说明书进行:新鲜骨髓涂片滴加 I 液(含联苯胺等)数滴覆盖血膜,室温放置 1min,滴加 II 液(含过氧化氢)数滴,混匀后室温放置 5min,流水冲洗,滴加 95% 乙醇脱色,流水冲洗后瑞士 - 吉姆萨复染。阳性颗粒呈棕黄或蓝黑色,颗粒阳性的原始细胞(包括幼稚单核细胞) > 3% 为 MPO 表达阳性。(3)流式细胞术检测胞内 MPO:抽取骨髓液 1.5ml,枸橼酸钠抗

凝,取 2 支试管,两管均加入 10μl CD45 - PerCP - Cy5.5 单抗与 50μl EDTA 抗凝骨髓液[(1 ~ 2) × 10⁶ 个细胞]组合,避光 15min。加溶血素 2ml 避光 15min。300 × g 离心 10min,去上清,加 2ml PBS 洗一次,弃上清,每管加入 100μl 固定液(MEDIUM A)(杭州联科生物技术股份有限公司),室温孵育 15min,加入 2ml PBS 洗 1 次,弃上清,每管加入 100μl 破膜剂(MEDIUM B)(杭州联科生物技术股份有限公司),第 1 管加入 IgG1 - FITC 及 IgG1 - APC 同型抗体各 10μl,第 2 管加 MPO - FITC 单抗(美国 BD 公司)10μl 及 CD3 - APC 单抗 5μl,室温孵育 30min,加入 2ml PBS 洗 1 次,弃上清,每管加 1% 多聚甲醛 0.5ml, BD FACS canto II 流式细胞仪获取,数据用 FACS Diva 软件分析,阳性 MPO 表达的原始细胞(包括幼稚单核细胞) > 10% 为 MPO 表达阳性。

3. 统计学方法:所有数据采用 SPSS 24.0 统计学软件对数据进行统计分析,计数资料多组之间的比较采用 χ^2 检验,组间比较采用 *Bonferroni* 方法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. AML 患者 MPO 总体表达分析:AML 患者共 90 例,MPO 表达阴性仅见 4 例,3 种方法联合检测 MPO 表达阳性率为 95.5%。除 AML - M7 亚型均呈 MPO 阴性表达外,MPO 阴性患者仅出现在 AML - M5 亚型(表 1)。

表 1 AML 患者 FAB 分型及 MPO 阳性率

项目	FAB 分型								总数
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	
患者数量(<i>n</i>)	2	6	28	16	8	27	2	1	90
MPO 阳性(<i>n</i>)									
IHC	0	3	24	16	6	10	1	0	60
CCM	0	6	28	16	8	24	2	0	84
FCM	2	6	28	16	8	17	2	0	79
MPO 共阴性(<i>n</i>)	0	0	0	0	0	3	0	1	4

IHC(immunohistochemistry). 免疫组织化学;CCM(cytochemistry). 细胞化学;FCM(flow cytometry). 流式细胞术

2. 3 种方法检测 AML 患者 MPO 阳性率的比较: 90 例 AML 患者骨髓活检组织、骨髓涂片及骨髓液标本 MPO 阳性率分别是 66.7% (60/90)、93.3% (84/90) 及 87.8% (79/90)(表 1),阳性率明显不同,差异有统计学意义($\chi^2 = 24.782, P = 0.000$)。其中,免疫组织化学方法检测 MPO 阳性率显著低于骨髓涂片细胞化学法和流式细胞学方法($P < 0.05$),而细胞化学

法和流式细胞术检测 MPO 阳性率比较,差异无统计学意义($P < 0.05$)。

3. AML - M5 患者 MPO 表达:除 M7(急性巨核细胞白血病外),MPO 共阴性的标本只见于 M5 患者中,因此,为比较 3 种方法对原始幼稚单核细胞 MPO 表达的敏感度,对 27 例 M5 患者的 MPO 表达分析,免疫组化阳性率为 37% (10/27) 明显低于细胞化学

法(88.9%, 24/27), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 免疫组化法低于流式细胞学方法(63.0%, 17/27), 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 而细胞化学和流式细胞术检测 MPO 结果比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。以其中 1 例 M5b 患者为例, 组化显示原始及幼稚单核细胞 MPO(-), 但骨髓涂片原始及幼稚单核细胞胞质内可见明显 MPO 阳性颗粒, 免疫学分型显示 MPO 阳性率占 14.2% (图 1)。

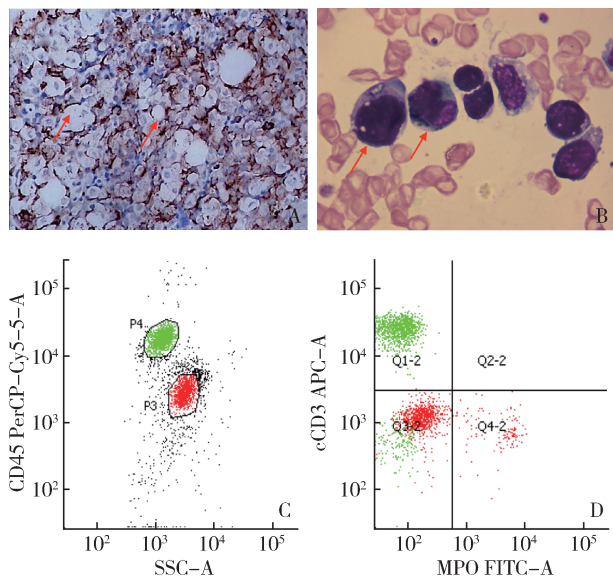


图 1 1 例 AML-M5b 患者酶免疫组织化学、细胞化学及流式细胞学 MPO 检测结果比较

A. 活检组织原始及幼稚细胞 MPO 表达(-), 如箭头所示; B. 骨髓涂片原始及幼稚单核细胞 MPO 表达阳性(+ ~ ++, 阳性率 7%), 如箭头所示; C. 流式细胞术 CD45/SSC 散点图, P3 为原始幼稚细胞群, P4 为淋巴细胞群; D. 胞内 MPO 阳性率 14.2%

讨 论

多参数流式细胞学的应用使白血病的免疫学分型更为精确, 但 MPO 仍然是 FAB 及 WHO 分型鉴定 AML 或者急性非淋巴细胞白血病 (ANLL) 关键的参考指标^[1]。流式细胞学、免疫组织化学及细胞化学 3 种方法, 任何一种能检测到白血病细胞 MPO 表达阳性的结果, 都可以认为其具髓系分化特征^[2]。上述 3 种检测方法相互补充, 本研究对 90 例 AML 患者的 MPO 进行检测, 均为阴性结果的标本仅为 4 例, 其中包含 1 例 M7 患者, 可见通过多种方法对急性白血病骨髓标本 MPO 的检测可以鉴定绝大多数急性非淋巴细胞白血病, 然而在 AML 的实验室诊断实际过程中, 上述 3 种检测时间并不同步, MPO 检测结果并非完全一致。因此本研究回顾分析了笔者医院部分初诊 AML 患者 MPO 表达情况, 对上述 3 种检测结果进行比

较和分析, 以利于临床医生对检测报告更好的解读。

本研究数据表明 3 种方法对 MPO 检测, 结果明显不一致, 差异有统计学意义。其中, 活检组织 MPO 阳性率最低, 显著少于细胞化学及流式细胞学方法检测 MPO 的阳性率(P 均 < 0.05), 细胞化学与流式细胞学两者检测 MPO 阳性率最接近($P > 0.05$)。从 FAB 分型中各类 AML 细胞 MPO 阳性率看, 除 M0 和 M7 之外, AML-M5 患者的 MPO 阳性率各种方法检测均最低, 各组间差异亦明显, 而以组织化学方法检测 MPO 阳性率最低, 与细胞化学之间的差异最明显。相对而言, 细胞化学法或流式细胞学方法检测 AML 患者 MPO 敏感度更高。对于多克隆抗体检测活检组织白血病细胞 MPO 敏感度低于细胞化学法和流式细胞学方法的原因, 笔者认为, 可能在于原始及幼稚单核细胞本身低表达 MPO, 病理免疫组化涂片对弱或极弱表达的 MPO 不易分辨, 而油镜下对骨髓涂片 MPO 阳性颗粒较少的细胞更容易辨认, 流式细胞术 MPO 单克隆抗体检测通过设门分析有能够排除背景细胞干扰的优势。三者检测原理的区别在于联苯胺法是对 MPO 酶活性的鉴定, 而多克隆抗体方法对骨髓活检组织切片或单克隆抗体流式细胞术等免疫学方法检测胞内 MPO, 只能反映 MPO 是否存在, 不能反映酶的活性。这样, 理论上会存在对部分患者用 3 种方法检测 MPO 结果不一致的现象^[3]。

本研究 AML-M0 患者共 2 例, 虽然活检组织及细胞涂片 MPO 阴性反应, 但流式细胞术显示 2 例均表达 MPO 蛋白, 足见流式细胞术在白血病分型中的优势, 这或许因为本研究 2 例 M0 患者仅存在 MPO 前体蛋白, 而无酶活性有关^[3]。除外电子显微镜检测技术, 免疫学方法较细胞化学方法更敏感^[4]。除 AML-M0 外, 本研究细胞化学染色法与流式细胞学方法检测 MPO 相比较, 结果较一致, 与文献报告结果相似^[5,6]。此外, 本研究两例 AML-M5a 患者细胞化学检测 MPO 阳性而流式细胞术未检出, 或许和两者阳性率判断标准有关, 大样本资料更有利于统计学分析。

总之, 本研究显示不同的 MPO 检测方法, AML 患者 MPO 阳性检出率不尽相同, 流式细胞术对 AML-M0 的诊断有不可替代的优势, 细胞化学染色对 AML-M5 患者 MPO 的敏感度优于流式细胞术, 三者结合可以显著提高 AML 患者 MPO 的检出率, 比单独一种方法更有助于急性白血病的准确分型。

(下转第 88 页)

以右美托咪定对顺式阿曲库铵产生的神经肌肉阻滞作用几乎无影响^[9,10]。这可能是本研究中最主要的机制。(2)与右美托咪定应用剂量有关,Narimatsu等^[11]报道将远高于临床剂量的右美托咪定和可乐定分别用于活体大鼠,可使罗库溴铵神经肌肉阻滞作用增强,其作用机制并不是通过 α_2 AR所介导的,而是可乐定和右美托咪定通过阻断突触后膜的N胆碱能受体来实现的,其认为临床剂量的可乐定和右美托咪定不会影响非去极化肌松药所产生的肌松作用。这可能就是出现本研究结果的原因之一。

Sen等^[12]研究发现,右美托咪定可以抑制术中应激反应,维持血流动力学稳定,降低不良事件的发生率。右美托咪定的推荐负荷剂量为 $1\mu\text{g}/\text{kg}$,10min内缓慢静注。但有研究显示,按此剂量或速度给药对患者心血管系统可产生不利影响^[13]。因此,本研究选择负荷剂量为 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$,15min内输注完毕,结果发现按此方法给药患者血流动力学较为稳定。拔管操作对气道可产生强烈刺激,加剧心血管反应,增加颅内压,甚至导致颅内再次出血,严重影响患者预后。因此,在神经外科手术中应让患者安全平稳地度过拔管期,以免发生意外及并发症。本研究中DI组拔管期间HR与DII组拔管期间HR和BP均明显低于对照组,且麻醉恢复时间均未见明显延迟,由此说明术中以 $0.17\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 的速度持续输注右美托咪定对拔管所诱发的应激反应抑制作用不明显,而术中以 $0.33\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 的速度持续输注可显著抑制伤害性刺激诱发的应激反应,有效控制拔管期间血流动力学的剧烈波动。

综上所述,在全凭静脉麻醉下的神经外科手术中,右美托咪定对顺式阿曲库铵用量及肌肉松弛效应无影响。

参考文献

- Mohamed HS, Asida SM, Salman OH. Dexmedetomidine versus ni-

modipine for - controlled hypotension during spine surgery[J]. Egypt J Anaesth, 2013, 29(4): 325 - 331

- 吴新民,王天龙,薛张纲,等. 右美托咪定临床应用指导意见(2013)[J]. 中华麻醉学杂志,2013, 33(10): 1165 - 1167
- Talke PO, Caldwell JE, Richardson CA, *et al.* The effects of dexmedetomidine on neuromuscular blockade in human volunteers [J]. Anesth Analg, 1999, 88(3): 633 - 639
- Ozcan A, Ozcan N, Gulec H, *et al.* Comparison of the effects of fentanyl, remifentanyl, and dexmedetomidine on neuromuscular blockade [J]. J Anesth, 2013, 26(2): 196
- Weinger MB, Partridge BL, Henry AF. Dexmedetomidine does not modify the neuromuscular blocking action of vecuronium in the anaesthetized rat[J]. Br J Anaesth, 1995, 74(4): 455 - 457
- Zhang X, Bai X. New therapeutic uses for an alpha2 adrenergic receptor agonist - dexmedetomidine in pain management[J]. Neurosci Lett, 2014, 561(9): 7 - 12
- 任志强,钱燕宁. 麻黄碱对非去极化肌松药起效时间的影响[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2014, 35(8): 732 - 734
- Lawrence CJ, Prinzen FW, de Lange S. The effect of dexmedetomidine on nutrient organ blood flow[J]. Anesth Analg, 1996, 83(6): 1160 - 1165
- 赵艾华,冯立. 顺式阿曲库铵的临床药理学研究进展[J]. 河北医药, 2015, 37(2): 253 - 256
- Ali MZ, Ebied RS, Atallah MA, *et al.* Cisatracurium dose - response relationship in patients with chronic liver disease [J]. Egypt J Anaesth, 2014, 30(2): 197 - 202
- Narimatsu E, Niiya T, Kawamata M, *et al.* Lack in effects of therapeutic concentrations of dexmedetomidine and clonidine on the neuromuscular blocking action of rocuronium in isolated rat diaphragms [J]. Anesth Analg, 2007, 104(5): 1116 - 1120
- Sen S, Chakraborty J, Santra S, *et al.* The effect of dexmedetomidine infusion on propofol requirement for maintenance of optimum depth of anesthesia during elective spine surgery[J]. Indian J Anaesth, 2013, 57: 358 - 363
- 梁晓君,张洪杰. 不同剂量的右美托咪啉在老年颌面外科麻醉气管插管时对心血管反应的疗效比较[J]. 现代口腔医学杂志, 2016, 3: 160 - 162 (收稿日期:2018 - 05 - 14) (修回日期:2018 - 05 - 24)

(上接第84页)

参考文献

- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, *et al.* Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French - American - British cooperative group [J]. Ann Intern Med, 1985, 103(4): 620 - 625
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [J]. Blood, 2016, 127(20): 2391 - 2405
- Lee EJ, Pollak A, Leavitt RD, *et al.* Minimally differentiated acute nonlymphocytic leukemia; a distinct entity [J]. Blood, 1987, 70(5):

1400 - 1406

- Eguchi M, Mikami T, Kurosawa H, *et al.* Electron microscopic and cytochemical studies of peroxidase - negative acute nonlymphoblastic leukemia [J]. Med Electron Microsc, 2001, 34(1): 61 - 70
- Kaleem Z, Crawford E, Pathan MH, *et al.* Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data [J]. Arch Pathol Lab Med, 2003, 127(1): 42 - 48
- 常军林,巨小英. 髓过氧化物酶染色对急性白血病分型诊断的价值 [J]. 吉林医学, 2014, 35(22): 4925 - 4926 (收稿日期:2018 - 05 - 02) (修回日期:2018 - 05 - 11)