

· 论 著 ·

# 维吾尔族骨髓增生异常综合征患者淋巴细胞免疫表型检测的临床意义

黄竞<sup>1,2Δ</sup>, 徐丽<sup>2</sup>, 阿依姆妮萨·阿卜杜热合曼<sup>2</sup>, 海热萨·阿不力米提<sup>2</sup>, 维尼拉·吐尔洪<sup>2</sup>, 刘志<sup>1</sup>, 努尔阿米娜·依明尼亚孜<sup>2</sup>, 努尔比亚·阿布都热西提<sup>2</sup>, 艾克拜尔·阿布都热衣木<sup>2</sup>

1. 广东省第二人民医院血液内科, 广东 广州 510317;

2. 喀什地区第一人民医院血液内科, 新疆 喀什 844000

**摘要:** **目的** 分析维吾尔族骨髓增生异常综合征(MDS)患者淋巴细胞免疫表型特点及其在诊断、分型和预后中的临床意义。**方法** 选择新疆喀什第一人民医院 2013 年 3 月到 2016 年 3 月 41 例 MDS 患者(MDS 组)和 30 例非 MDS 患者(non-MDS 组)为研究对象。运用多参数流式细胞术(CD45/SSC 设门法)识别淋巴细胞群及进行免疫分型检测骨髓淋巴细胞群比例,观察不同分化抗原的表达水平。**结果** (1)淋巴细胞群比例在 MDS 组较 non-MDS 组显著升高[(23.47 ± 10.12)% vs (15.15 ± 10.08)% ,  $P < 0.01$ ];在 MDS 各亚型[难治性血细胞减少伴多系发育异常(RCMD)、难治性贫血伴原始细胞增多(RAEB)-I、RAEB-II]间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。(2)淋巴细胞群不同分化抗原表达,MDS 组的 CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、CD7 及 CD8 表达水平均较 non-MDS 组显著升高( $P$  均  $< 0.01$ );CD5、CD19 表达水平显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD4、CD25 及 CD56 表达水平两组差异无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ );CD5 的表达水平在 RCMD 与 RAEB-II 显著高于 RAEB-I ( $P < 0.01$ );CD25 的表达水平在 RCMD 高于 RAEB-I 和 RAEB-II ( $P < 0.05$ );其他 MDS 抗原的各亚型间差异无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ )。**结论** 多参数 FCM 能检测到维吾尔族 MDS 患者淋巴细胞异常免疫表型特征,可给 MDS 患者的临床诊断、分型及预后评价提供更多有价值的客观信息。

**关键词:** 流式细胞术;骨髓增生异常综合征;淋巴细胞群;免疫表型;临床意义

中图分类号: R 551.3 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2017)02-0145-04

## Clinical significance of detecting lymphocytes immunological phenotype in Uyghur patients with myelodysplastic syndromes

HUANG Jing\*, XU Li, A yimunisa Abudureheman, Hairesa Abulimiti, Weinila Tuerhong,

LIU Zhi, Nueramina Yimingniyazi, Nuerbiya Abudourexiti, Aikebaier Abudoureyimu

\* Department of hematology, Guangdong NO. 2 Provincial People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510317, China

**Abstract: Objective** To analyze the feature of lymphocytes immunological phenotype of myelodysplastic syndrome (MDS) in Uyghur ethnic group and its clinical significance for diagnosis, classification and prognosis. **Methods** Flow cytometry (FCM) based on multiple parameters, 41 cases of MDS patients and 30 cases of MDS (non-MDS) lymphocytes in patients with immune sign expression rate for testing. **Results** (1) The proportion of lymphocyte population in MDS group was significantly higher than that in non-MDS group [(23.47 ± 10.12)% vs (15.15 ± 10.08)% ,  $P < 0.01$ ], while there no significant difference among subsets [refractory thrombocytopenia with multiple lineage dysplasia (RCMD), refractory anemia with excess blasts (RAEB)-I, RAEB-II] ( $P > 0.05$ ). (2) Expressions of different differentiation antigens of lymphocyte population; compared with non-MDS group, expression levels of CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD7 and CD8 in MDS group increased significantly (all  $P < 0.01$ ); expression levels of CD5 and CD19 in MDS group decreased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); there were no significant differences in expression levels of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD4, CD25 and CD56 between two groups (all  $P > 0.05$ ). The expression level of CD5 in RCMD and RAEB-II was significantly higher than those in RAEB-

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2017.02.001

基金项目: 广东省科技计划项目 (2015A020210068, 2014A020209047); 广东省第二人民医院青年基金项目 (YQ2015-012, YQ2015-005)

注: Δ 现为喀什地区第一人民医院援疆专家。

I ( $P < 0.01$ ). The expression level of CD25 in RCMD was significantly higher than those in RAEB-I and RAEB-II ( $P < 0.05$ ), and there were no significant differences among other subsets of MDS antigens (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** Multiparameter FCM can detect the feature of abnormal immunological phenotype in Uyghur MDS patients and provide more valuable objective information for clinical diagnosis, classification and prognosis of MDS patients.

**Key words:** Flow cytometry; Myelodysplastic syndrome; Lymphocyte population; Immunological phenotype; Clinical significance

骨髓增生异常综合征(MDS)作为典型的异质性克隆性疾病,其起源于造血干细胞或多能干细胞,属于WHO(2008)髓系肿瘤中的一种,其形态学特征是病态造血,可伴有原始细胞增多,血液学特征为外周血细胞的一系或多系数量降低,有较高风险转化成急性白血病(AL)<sup>[1]</sup>。在本研究中,应用流式细胞术(FCM)以及CD45/SSC设门策略,并实现多种单克隆抗体相组合,针对维吾尔族MDS患者的淋巴细胞群所表现出的免疫表型特征进行研究,明确其在MDS患者的临床诊断、分型及预后评价中的价值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 以新疆喀什第一人民医院2013年3月到2016年3月的门诊及住院MDS患者作为MDS组,入选41例,男29例,女12例;中位年龄62岁。分型采用世界卫生组织2008年制定的分型标准,均经细胞形态学与遗传学确诊,具体分型:10例为难治性血细胞减少伴多系发育异常(RCMD),16例为难治性贫血伴原始细胞增多-I(RAEB-I),15例为难治性贫血伴原始细胞增多-II(RAEB-II)。另选择血液科30例非MDS(non-MDS)患者作为non-MDS组,男14例,女16例;中位年龄57岁;11例为再生障碍性贫血(AA),7例营养性贫血(NA),4例急性髓性白血病部分分化型(AML-M2),4例属于不确定的特发性血细胞减少症(ICUS),2例慢性病性贫血(ACD),2例特发性血小板减少性紫癜(ITP)。

**1.2 实验试剂** 本实验试剂为单克隆抗体组合:CD64-FITC/CD10-PE/CD45-PerCP/CD14-APC; CD15-FITC/CD33-PE/CD45-PerCP/HLA-DR-APC; CD34-FITC/CD5-PE/CD45-PerCP/CD117-APC; CD16-FITC/CD11b-PE/CD45-PerCP/CD13-APC; CD61-FITC/CD66d-PE/CD45-PerCP/CD56-APC; CD71-FITC/GPA-PE/CD45-PerCP/CD105-APC; CD8-FITC/CD25-PE/CD45-PerCP/CD4-APC; CD7-FITC/CD133-PE/CD45-PerCP/CD19-APC; CD38-FITC/CD123-PE/CD45-PerCP/CD34-APC。

在上述抗体试剂当中,CD133是在eBioscience公司采购获得,CD105是在BioLegend公司采购获得,

CD13与CD66d是在BD Pharmingen公司采购获得;其他抗体试剂均购自Becton Dickinson公司。

**1.3 实验仪器** 本研究中应用的仪器主要有Becton Dickinson公司生产的FACSCalibur流式细胞仪;功率为15 mW的氩离子激光,为双激发模式,波长分别为488 nm与635 nm;台式离心机,型号Beckman Coulter ALLegra X-15R。

**1.4 检测方法** 将50  $\mu$ l新鲜采样的EDTA抗凝骨髓添加到流式试管里面,依次投进不同组合的抗体,混合摇匀,在室温环境下孵育20 min,应避免光线照射;添加2 ml的红细胞裂解液,在室温环境下静置10 min,应避免光线照射;使用离心机进行离心处理,时间为5 min,设置为1 000 r/min;将上清液弃除,添加PBS 2 ml进行洗涤,再将上清液弃除,添加0.3 ml的多聚甲醛缓冲液进行固定(浓度为1%)。通过运行CellQuest软件可以提取到10 000个细胞,再运用CD45/SSC设门策略将淋巴细胞群有效识别出来,然后研究观察不同分化抗原的实际表达水平。

**1.5 统计学方法** 采用SPSS 20.0软件处理数据。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验,RCMD、RAEB-I及RAEB-II三亚型间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 淋巴细胞群所占比例比较** MDS组较non-MDS组淋巴细胞群比例有显著提升[(23.47  $\pm$  10.12)% vs (15.15  $\pm$  10.08)% ,  $P < 0.01$ ]。见表1。在MDS各亚型之间,淋巴细胞群比例差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表2。

**2.2 淋巴细胞群主要抗原表达分析结果** MDS组患者骨髓淋巴细胞群的CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、CD7及CD8表达水平均较non-MDS组患者显著升高( $P$ 均 $< 0.01$ );CD5与CD19表达水平显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD4、CD25与CD56表达水平两组比较差异无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ )。见表3。CD5在RCMD与RAEB-II的表达水平显著高于RAEB-I ( $P < 0.01$ );CD25的表达水平在RCMD高于RAEB-I和RAEB-II ( $P < 0.05$ );其他抗原的

表 1 MDS 组与 non-MDS 组骨髓中淋巴细胞群所占比例比较

组别	例数	骨髓中淋巴细胞群(%, $\bar{x} \pm s$ )	t 值	P 值
MDS 组	41	23.47 ± 10.12	3.431	0.001
non-MDS 组	30	15.15 ± 10.08		

表 2 MDS 各个亚型骨髓当中淋巴细胞群所占比例比较

亚型	例数	骨髓中淋巴细胞群(%, $\bar{x} \pm s$ )	F 值	P 值
RCMD	10	22.98 ± 8.60	0.841	0.439
RAEB- I	16	25.90 ± 11.82		
RAEB- II	15	21.21 ± 9.11		

表 3 MDS 组与 non-MDS 组骨髓淋巴细胞群抗原表达水平比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD25 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD4	CD5	CD7	CD8	CD19	CD25	CD56
MDS 组	41	16.84 ± 5.23	37.48 ± 2.42	37.48 ± 12.09	62.64 ± 19.80	80.21 ± 7.75	31.12 ± 8.69	15.37 ± 10.37	23.29 ± 13.38	25.06 ± 11.52
non-MDS 组	30	15.96 ± 6.27	3.27 ± 1.28	39.57 ± 14.30	71.51 ± 7.13	73.87 ± 8.62	25.60 ± 6.27	25.45 ± 8.95	23.48 ± 5.39	24.99 ± 9.56
t 值		0.640	3.685	0.666	2.644	3.244	2.958	4.182	0.073	0.027
P 值		0.524	0.000	0.508	0.011	0.002	0.004	0.000	0.942	0.978

表 4 MDS 各个亚型的骨髓淋巴细胞群抗原表达水平比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

亚型	例数	CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD25 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD4	CD5	CD7	CD8	CD19	CD25	CD56
RCMD	10	19.29 ± 6.90	4.53 ± 2.45	39.47 ± 10.84	74.31 ± 11.22	79.01 ± 7.41	36.01 ± 9.02	16.52 ± 10.21	32.30 ± 24.59	22.98 ± 12.86
RAEB- I	16	16.28 ± 4.50	4.36 ± 2.06	33.42 ± 12.06	50.15 ± 23.89	80.44 ± 7.79	28.72 ± 6.02	13.60 ± 12.20	19.26 ± 4.36	23.81 ± 10.61
RAEB- II	15	15.80 ± 4.47	5.73 ± 2.69	40.50 ± 12.43	68.19 ± 10.94	80.76 ± 8.36	30.43 ± 10.04	16.49 ± 8.65	21.58 ± 4.79	27.79 ± 11.81
F 值		1.526	1.361	1.549	7.224	0.158	2.394	0.369	3.501	0.666
P 值		0.230	0.269	0.226	0.002	0.854	0.105	0.694	0.040	0.520

MDS 各亚型之间对比差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。见表 4。

### 3 讨论

当前对 MDS 的临床诊断,通常是以患者的临床症状、细胞遗传学、外周血、骨髓涂片及活检形态学等实施综合判断,但在临床实践中,部分 MDS 患者可能存在多元化临床症状表现,尤其是骨髓涂片及活检的形态学变化,不可避免会受到诊断者主观因素的影响;另外,一般存在细胞遗传学异常的患者仅占到总数的 45% 左右<sup>[2-3]</sup>,这就导致了 MDS 诊断的困难。FCM 是以高能量激光照射高速流动状态下经荧光标记的单细胞,通过检测产生的散射光和荧光素发射荧光的强度,从而对细胞进行定性或者定量检测,实现对目的细胞分析或分选的技术。FCM 免疫分型是鉴别肿瘤细胞抗原异常水平表达的常用手段<sup>[4]</sup>,在此前的二十年时间里,已被普遍运用到了血液系统恶性肿瘤的临床诊断、分型及预后效果判断上,特别是在急性白血病方面具有较好的应用效果<sup>[5]</sup>。MDS 是典型的血液系统肿瘤,同样能够使用 FCM 开展研究分析,明确其免疫表型异常情况,具体表现是某个分化发育阶段所对应的正常抗原出现丢失,也就是部分抗原丧失并表现出阶段特异性。上述异常在临床诊断及预后判断方面可以有良好的意义,能够作为传统诊断手段的必要补充。所以,近几年,FCM 在其中的应用也越来越广泛和重要。Nakamura 等<sup>[4]</sup>研究提示 FCM 结果和形态学、遗传学结果有密切联系。近来大量研究提供了 FCM 检测骨髓病态造血的信息,表

明多参数 FCM 有助于 MDS 的诊断和预后评价<sup>[6-13]</sup>。本研究希望通过多参数 FCM 检测维吾尔族 MDS 患者的骨髓淋巴细胞表面抗原表达进行观察,明确其存在的免疫表型特征,从中筛选能够为 MDS 临床分型、治疗及预后判断提供参照的有价值信息。

本研究结果提示维吾尔族 MDS 患者淋巴细胞群的比例在 MDS 组比 non-MDS 组显著升高,考虑可能由成熟粒细胞减少引起,也可能是 MDS 疾病本身所致,但在 MDS 各亚型间无统计学差异,提示 FCM 检测淋巴细胞群比例可能有助于 MDS 的诊断,但不能为 MDS 分型提示有效信息。

本研究中,淋巴细胞群 CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、CD7 及 CD8 表达水平均显著升高,而 CD5 与 CD19 的表达水平都显著降低,同时 CD5 与 CD25 表达水平在 RCMD、RAEB- I 以及 RAEB- II 三亚型间有统计学差异,该结果和 Sternberg 等<sup>[14]</sup>的研究具有契合性,可见淋巴细胞抗原表达谱可能存在异常。最近研究显示 MDS 患者出现造血异常的同时还可能存在着造血微环境异常<sup>[15-16]</sup>。Baumann 等<sup>[17]</sup>研究发现,MDS 患者体内所分离的 T 淋巴细胞可以在体外有效抑制脐血粒-单系祖细胞的(CFU-GM)与红系造血祖细胞(CFU-E)的表达,提示 MDS 患者 T 细胞处于异常激活状态,可导致自身组织受到攻击,但该抑制作用也会遭到环孢素 A 的负面影响,可见该阻断作用应该为多种免疫抑制剂治疗 MDS 的常见机制<sup>[18-20]</sup>。骨髓间充质干细胞(MSCs)可分化成基质细胞,同时产生免疫抑制影响,所以会在 MDS 发病时产生关键作用。刘丽辉等<sup>[21]</sup>研究发现,在 MDS 患者体内会出现

MSCs 抑制 T 细胞水平下降的情况(无法让 T 细胞分化发育处于 G0/G1 期),研究还发现正常人来源的 MSCs 能够对 T 细胞早期活化标志产生抑制影响,如 CD69、CD25 表达,同时 MDS 患者 MSCs 抑制性也会显著降低,提示 MDS 患者的 MSCs 抑制 T 细胞活化能力降低;进一步研究还观察到,MDS 患者体内的 MSCs 抑制能力有所提升,由此可见 MDS 患者具有 MSCs 免疫异常的发生,其原因可能是针对 MDS 患者临床开展的免疫抑制治疗产生了实际效用。伴随疾病程度的加深,T 淋巴系抗原的表达水平也会有显著提升,而 B 淋巴系早期抗原则会有所降低,其原因可能是患者的骨髓恶性克隆扩增,使得 T 淋巴系出现显著活化,同时对 B 淋巴系增殖产生抑制作用,或 MDS 患者的 B 细胞出现异常克隆现象。

多参数 FCM 可以为维吾尔族 MDS 患者的骨髓淋巴细胞群提供免疫表型异常信息,从而给免疫表型特征与发病机制的研究提供新手段,也可给 MDS 的临床诊断、分型及预后评价等奠定基础,具备良好的临床价值。但由于本研究病例数偏少,仍需继续累积病例进行探讨。

#### 参考文献

- [1] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:157-159.
- [2] Kawankar N, Vundinti BR. Cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndrome: an overview[J]. Hematology, 2011, 16(3): 131-138.
- [3] 肖志坚. 骨髓增生异常综合征的细胞形态学和细胞遗传学[J]. 临床血液学杂志, 2014, 27(1): 8-14.
- [4] Nakamura K, Ogata K, An E, et al. Flow cytometric assessment of CD15 + CD117 + cells for the detection of minimal residual disease in adult acute myeloid leukaemia[J]. Br J Haematol, 2000, 108(4): 710-716.
- [5] Sievers EL, Lange BJ, Alonzo TA, et al. Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2003, 101(9): 3398-3406.
- [6] Kussick SJ, Fromm JR, Rossini A, et al. Four-color flow cytometry shows strong concordance with bone marrow morphology and cytogenetics in the evaluation for myelodysplasia[J]. Am J Clin Pathol, 2005, 124(2): 170-181.
- [7] van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, et al. Identification of distinct prognostic subgroups in low-and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry[J]. Blood, 2008, 111(3): 1067-1077.
- [8] Della Porta MG, Lanza F, Del Vecchio L, et al. Flow cytometry immunophenotyping for the evaluation of bone marrow dysplasia[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2011, 80(4): 201-211.
- [9] Porwit A. Role of flow cytometry in diagnosis of myelodysplastic syndromes—beyond the WHO 2008 classification[J]. Semin Diagn Pathol, 2011, 28(4): 273-282.
- [10] Chopra A, Pati H, Mahapatra M, et al. Flow cytometry in myelodysplastic syndrome: analysis of diagnostic utility using maturation pattern-based and quantitative approaches[J]. Ann Hematol, 2012, 91(9): 1351-1362.
- [11] Kern W, Bacher U, Haferlach C, et al. Multiparameter flow cytometry provides independent prognostic information in patients with suspected myelodysplastic syndromes: A study on 804 patients[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2015, 88(3): 154-164.
- [12] Somasundaram V, Soni S, Chopra A, et al. Value of quantitative assessment of myeloid nuclear differentiation antigen expression and other flow cytometric parameters in the diagnosis of myelodysplastic syndrome[J]. Int J Lab Hematol, 2016, 38(2): 141-150.
- [13] Cremers EM, Westers TM, Alhan C, et al. Multiparameter flow cytometry is instrumental to distinguish myelodysplastic syndrome from non-neoplastic cytopenias[J]. Eur J Cancer, 2016, 54: 49-56.
- [14] Sternberg A, Killick S, Littlewood T, et al. Evidence for reduced B-cell progenitors in early (low-risk) myelodysplastic syndrome[J]. Blood, 2005, 106(9): 2982-2991.
- [15] Aizawa S, Nakano M, Iwase O, et al. Bone marrow stroma from refractory anemia of myelodysplastic syndrome is defective in its ability to support normal CD34-positive cell proliferation and differentiation in vitro[J]. Leuk Res, 1999, 23(3): 239-246.
- [16] Coutinho LH, Geary CG, Chang J, et al. Functional studies of bone marrow haemopoietic and stromal cells in the myelodysplastic syndrome(MDS)[J]. Br J Haematol, 1990, 75(1): 16-25.
- [17] Baumann I, Scheid C, Koref MS, et al. Autologous lymphocytes inhibit hemopoiesis in long-term culture in patients with myelodysplastic syndrome[J]. Exp Hematol, 2002, 30(12): 1405-1411.
- [18] Sauntharajah Y, Nakamura R, Wesley R, et al. A simple method to predict response to immunosuppressive therapy in patients with myelodysplastic syndrome[J]. Blood, 2003, 102(8): 3025-3027.
- [19] Asano Y, Maeda M, Uchida N, et al. Immunosuppressive therapy for patients with refractory anemia[J]. Ann Hematol, 2001, 80(11): 634-638.
- [20] Novitzky N, Mohamed R, Finlayson J, et al. Increased apoptosis of bone marrow cells and preserved proliferative capacity of selected progenitors predict for clinical response to anti-inflammatory therapy in myelodysplastic syndromes[J]. Exp Hematol, 2000, 28(8): 941-949.
- [21] 刘丽辉,陈虎,陈斌,等. 骨髓增生异常综合症患者间充质干细胞对 T 细胞的免疫抑制作用[J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16(2): 299-304.