

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.13.018

流式细胞术检测外周血淋巴细胞诊断淋巴瘤的应用研究*

莫小辉^{1#} 杨连娟^{1#} 余琦¹ 章楚光¹余茜¹ 吴飞¹ 李瑾² 郭怡^{3Δ} 谭飞^{1,4Δ} 赖永贤¹

(1 上海市皮肤病医院中心实验室 上海 200443; 2 解放军第 107 医院 山东 烟台 264000;

3 云南省阜外心血管病医院 云南 昆明 650021; 4 扬州大学医学院 江苏 扬州 225001)

摘要 目的:探讨流式细胞术(FCM)检测外周血淋巴细胞在淋巴瘤诊断中的应用价值。**方法:**通过筛选 2011 年 8 月至 2017 年 8 月期间初诊的皮肤淋巴瘤病例 25 例,淋巴节良性病变 6 例,采用 FCM 检测外周血淋巴细胞表面抗原分子,通过与病理切片 HE 染色和免疫组化法(金标准)比较,分析两种检测方法之间的差异。**结果:**在 31 例检测病例中,FCM 检测结果与金标准检测结果一致性较高(Kappa=0.61);26 例检查结果相同,5 例检查结果不一致;检测 19 例 T 淋巴细胞淋巴瘤,FCM 检测结果与金标准检测结果一致性也较高(Kappa=0.57);检测 14 例初诊为 T 细胞淋巴瘤病例,FCM 检测 T 淋巴瘤细胞的表面抗原标志 CD3 分子为阳性,与组织学结果相符,另有 5 例 T 细胞淋巴瘤病例 HE 染色和免疫组化诊断明确,而 FCM 未能检出。检测 6 例 B 细胞淋巴瘤病例,6 例淋巴瘤病例 FCM 检测结果都为阳性,FCM 检测 B 淋巴瘤细胞的表面抗原标志 CD19 分子为阳性,与金标准检测结果符合率为 100%。6 例淋巴节良性病变病例 FCM 检测结果与金标准检测结果一致。**结论:**通过 FCM 检测外周血可以检测出部分皮肤淋巴瘤,FCM 在皮肤淋巴瘤诊断和分型中有一定的临床价值,是检测皮肤淋巴瘤的有效的辅助方法。

关键词:皮肤淋巴瘤;流式细胞学技术;免疫组化;免疫表型**中图分类号:**R733;R446 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)13-2488-06

The Application of Flow Cytometry (FCM) for Detecting Peripheral Blood Immunophenotype in Diagnosis of Lymphoma*

MO Xiao-hui^{1#}, YANG Lian-juan^{1#}, YU Qi¹, ZHANG Chu-guang¹, YU Qian¹, WU Fei¹, LI Jin², GUO Yi^{3Δ}, TAN Fei^{1,4Δ}, LAI Yong-xian¹

(1 Central Laboratory, Shanghai Dermatology Hospital, Shanghai, 200443, China;

2 The 107 Hospital of PLA, Yantai, Shandong, 264000, China;

3 Yunnan Fuwai Cardiovascular Hospital, Kunming, Yunnan, 650021, China;

4 Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225001, China)

ABSTRACT Objective: To analyze clinical value of flow cytometry (FCM) for detecting peripheral blood immunophenotype in diagnosis of cutaneous lymphoma. **Methods:** Peripheral blood and biopsy specimens from 25 persons who were suspected as cutaneous lymphoma and 6 persons with benign lesions of lymph node were collected. The comparison between FCM and HE staining & immunohistochemistry (IHC, gold standard) in diagnosis of lymphoma was made. **Results:** In all 31 cases, the FCM test results are in good agreement with the gold standard test results (Kappa=0.61); the results of the examination were the same in 26 cases, and the results of 5 cases were inconsistent. In the 19 TNHL (T cell non-Hodgkin lymphoma, TNHL) cases, the FCM test results are also in good agreement with the gold standard test results (Kappa=0.57). In the 19 cases of T cell lymphoma, the 14 cases of newly diagnosed T cell lymphoma were detected by FCM. Abnormal peripheral blood lymphocyte subsets could be detected by FCM. The surface antigen marker of T lymphoma cells from peripheral blood was positive for CD3 by FCM, which was consistent with histological findings. FCM and HE staining & IHC were equally effective for diagnosis of lymphoma in 14 patients. But FCM did not detected abnormal cells in 5 patient with T lymphoma. Abnormal peripheral blood lymphocyte subsets could be detected by FCM in the 6 cases of B cell lymphoma. The surface antigen marker of B lymphoma cells from peripheral blood was positive for CD19 by FCM, which was consistent with histological findings. In 6 cases with benign lesions of lymph node, the FCM test results are also in good agreement with the gold standard test results. **Conclusion:** The immunophenotype analysis by FCM was used to diagnose cutaneous lymphoma and provided an approach to increase sensitivity for diagnosis of lymphoma.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81502738);上海市卫计委项目(20114Y057);上海卫计委重点学科项目(12GWZX0902)

作者简介:莫小辉(1980-),男,主管技师,博士,主要研究方向:病毒与肿瘤发病机制,电话:18017336542,E-mail: moxiaohui1980@163.com

杨连娟(1974-),女,副主任医师,博士,主要研究方向:感染性皮肤病,电话:13917656480,E-mail: pifubingli@126.com

为共同第一作者

Δ 通讯作者:谭飞,医学博士,博士后,副主任医师,研究生导师,主要研究方向:线粒体与肿瘤发病机制研究,E-mail: tanfeitru@126.com

郭怡,硕士,主治医师,主要研究方向:心血管急危重症诊治,E-mail: 22459402@qq.com

(收稿日期:2018-01-12 接受日期:2018-02-09)

Key words: Cutaneous lymphoma; Flow cytometry; Immunohistochemistry; Immunophenotype

Chinese Library Classification(CLC): R733; R446 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)13-2488-06

淋巴瘤是一类起源于淋巴造血系统的肿瘤,可侵犯全身任何器官和组织。临床上主要表现为浅表和深部淋巴结无痛性肿大及肝脏和脾脏肿大;部分患者可伴有消瘦、盗汗、低热以及皮肤瘙痒等症状^[1-3]。初发症状往往比较复杂,临床初诊时误诊漏诊率较多。淋巴瘤总体发病率较低,但它对患者生活质量有着严重影响,死亡率也较高^[4-6]。淋巴瘤发病原因尚不明确,许多证据证实其与遗传、免疫、病毒感染等因素有关;临床治疗方法一般包括化疗放疗等,近期有免疫疗法、生物疗法等;不同患者疗效差异比较大,但是总体而言,早诊断早发现早治疗患者,对预后影响较大。对淋巴瘤进行分型分期分类是进一步选用治疗措施的关键步骤^[7,8]。淋巴瘤的分类方法主要根据病理形态学、免疫表型、遗传学及临床特点等来定义^[9,10],但这些方法有其自身的不足之处^[11-13],多操作复杂,诊断周期长,费用较高等。流式细胞术(flow cytometry, FCM)可快速对大量细胞进行多参数检测和分析,并可从整个群体中分选出特定的细胞亚群,已被广泛应用于血液系统疾病的诊断^[14-16]。本文主要通过流式细胞术检测外周血淋巴细胞,分析其在皮肤淋巴瘤的诊断及分型中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 病例和标本采集

2011年8月至2017年8月初诊的淋巴结病变病例中筛选诊断为淋巴瘤的标本,采集病人外周血及留取淋巴结组织。

1.2 临床资料

门诊及病房收治的淋巴结病变患者31例,其中男性患者23例,女性患者8例,患者年龄范围为47~68岁,平均年龄为(56.69±2.87)岁。根据病理诊断结果判断19例为非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)T细胞淋巴瘤,6例为非霍奇金淋巴瘤(NHL)B细胞淋巴瘤,6例为良性病变。

1.3 仪器和试剂

淋巴细胞亚群检测采用美国 Beckman Coulter 公司。T 细胞亚群检测采用 CD45 / SSC 设门,试剂(单克隆抗体

CD3-PC5/CD4-PE / CD8-ECD / CD45 -FITC)主要采用 Beckman 公司的产品;NK 细胞和 B 细胞亚群检测采用 FFC / SSC 设门,单克隆抗体 CD3-FITC/CD(16+ 56)-PE/CD19-PC5 为 Beckman 公司产品。

1.4 实验方法

1.4.1 流式细胞检测 两试管中分别加入 100 μ L 的抗凝静脉血,然后分别加入 10 μ L 四色标记的单克隆抗体 CD3/CD4/CD8/CD45,双标记单克隆抗 CD3/CD(16+56) 10 μ L 和 10 μ L 单标记 CD19,室温温育 15 min(注意避光),加入 500 μ L 红细胞溶解液作用 20 min,然后加入 500 μ L 生理盐水及 100 μ L 细胞计数液,混匀后上流式细胞仪分析。通过与病理切片 HE 染色和免疫组化比较,判断 FCM 的准确性。

1.4.2 免疫组织化学染色 将组织切片置于玻片架上风烤使石蜡溶解,再将吹烤充分的切片置入脱蜡液中脱蜡至水。抗原修复,用蒸馏水润洗切片 2 次,滴加 100 μ L 3% H_2O_2 溶液。将切片置于玻片架上,用蒸馏水润洗切片 2 次;用 pH=7.2-7.4 的 PBS 缓冲液浸泡组织 3 次;加入一定的稀释比例的抗体(一抗),37℃ 孵育 1hr,用蒸馏水润洗切片,加入二抗,室温孵育 30 min。用蒸馏水润洗切片,用 pH=7.2~7.4 的 PBS 缓冲液浸泡组织后,加入 DAB 显色液室温下显色。染色后的切片进行苏木素复染,封片保存。

1.5 统计学分析

应用软件 SPSS 19.0 进行 Kappa 检验,若 $P<0.05$ 判断两者具有良好一致性。

2 结果

2.1 总体检测情况

以病例切片和免疫组化检测结果为金标准,并结合临床表现,确诊本研究中 31 例患者共有 25 例淋巴瘤,6 例良性增生。通过 FCM 检测结果显示,25 例淋巴瘤患者中 19 例检出阳性,6 例良性增生检出都为阴性。外周血 FCM 检测淋巴瘤与金标准检测结果一致性较高, $Kappa=0.61$ 。结果如表 1 所示。

表 1 FCM 和金标准检测淋巴结病变患者结果比较
Table 1 The Results of all cases by FCM and Gold Standard

		FCM		
		Positive	Negative	Total
Gold Standard	Positive	20	5	25
	Negative	0	6	6
	Total	20	11	31

Note: $Kappa=0.61$.

2.2 T 细胞淋巴瘤的检测

本研究中初诊 19 例 T 细胞淋巴瘤,其中 14 例通过 FCM 检测外周血淋巴细胞亚群可以诊断,采用 FCM 检测淋巴瘤细胞的表面抗原标志 CD45、CD3 分子为阳性,而 B 细胞表面分

子 CD19 和 NK 细胞表面分子 CD56 为阴性其结果(见图 1A-1D)。HE 染色和免疫组化结果(图 1E-1H)显示 T 细胞分子标记 CD3 分子为阳性,而 B 细胞分子标记 CD19 和 NK 细胞分子标记 CD56 为阴性,结果与 FCM 检测结果一致。

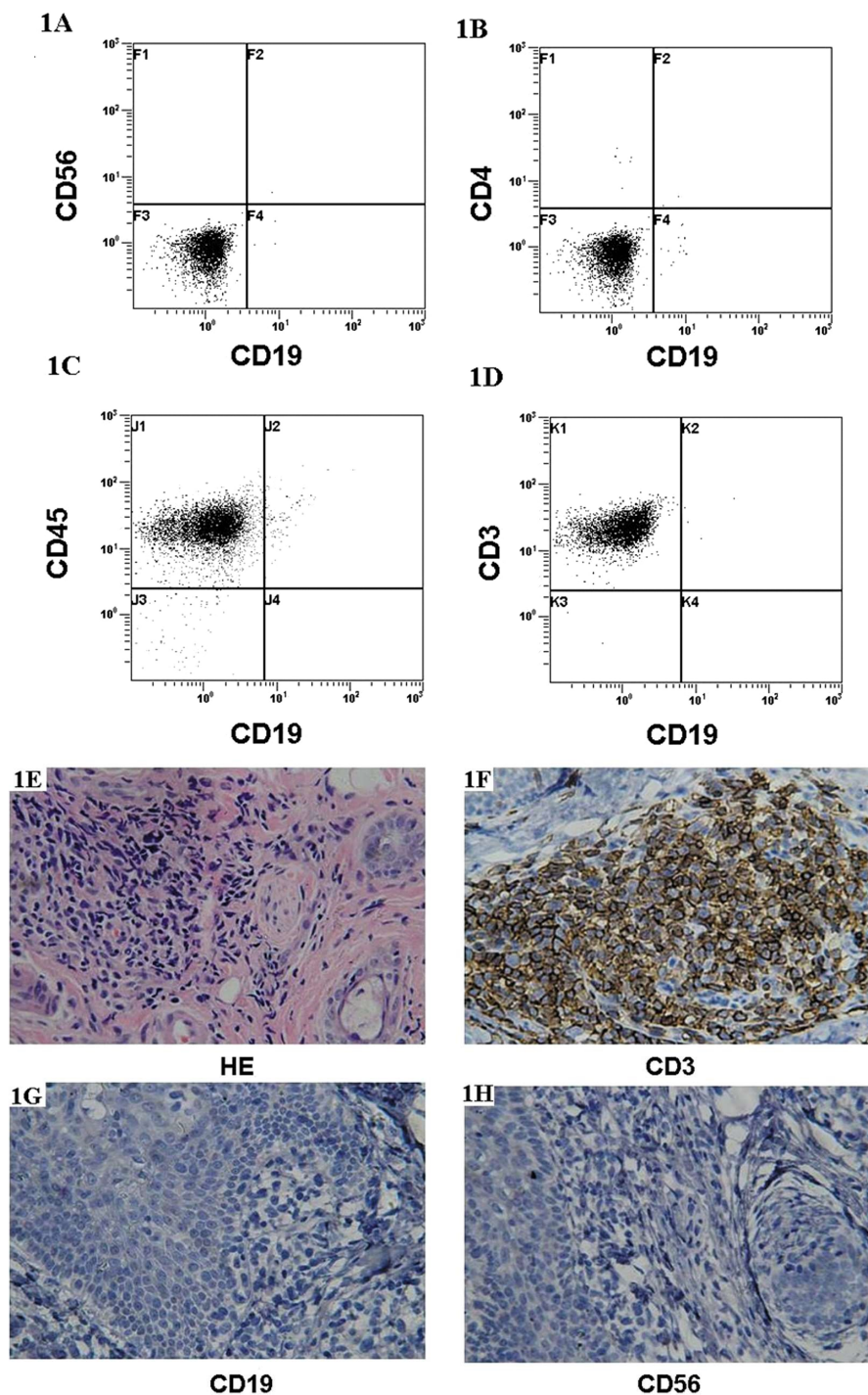


图 1 FCM 在皮肤 T 细胞淋巴瘤患者外周血中检测出异常的细胞群

Fig. 1 The abnormal cell groups in the peripheral blood from cutaneous T-cell lymphoma patients

Note: Fig. 1A, 1B, 1C and 1D show the detection results of FCM; Fig. 1E, 1F, 1G and 1H show the detection results of HE staining & immunohistochemistry.

此外,有 5 例 FCM 未检测出异常表型的恶性单克隆细胞群,但患者病理切片形态学及免疫组化(FCM 结果见图 2A-2D,免疫组化结果见图 2E-2H)显示 T 细胞分子标记 CD3 分子为阳性,而 B 细胞分子标记 CD19 和 NK 细胞分子标记 CD56 为阴性,结果提示为 T 细胞淋巴瘤。

统计分析,外周血 FCM 检测 T 细胞淋巴瘤与金标准检测一致性较高, Kappa=0.57。结果如表 2 所示。

2.3 B 细胞淋巴瘤的检测

本研究有 6 例初诊的 B 细胞淋巴瘤病例。6 例 FCM 检测

细胞克隆结果显示淋巴瘤细胞的表面抗原标志 CD45、CD19 分子为阳性,而 T 细胞标记分子 CD3 和 NK 细胞标记分子 CD56 为阴性(见图 3A-3D)。免疫组化结果(图 3E-3H)显示 B 细胞分子标记 CD19 分子为阳性,而 T 细胞分子标记 CD3 和 NK 细胞分子标记 CD56 为阴性,结果与 FCM 检测结果一致。

3 讨论

皮肤淋巴瘤的诊断和分型诊断和鉴别以临床表现结合组织形态学改变为金标准^[17-19]。免疫组化采用石蜡组织切片将

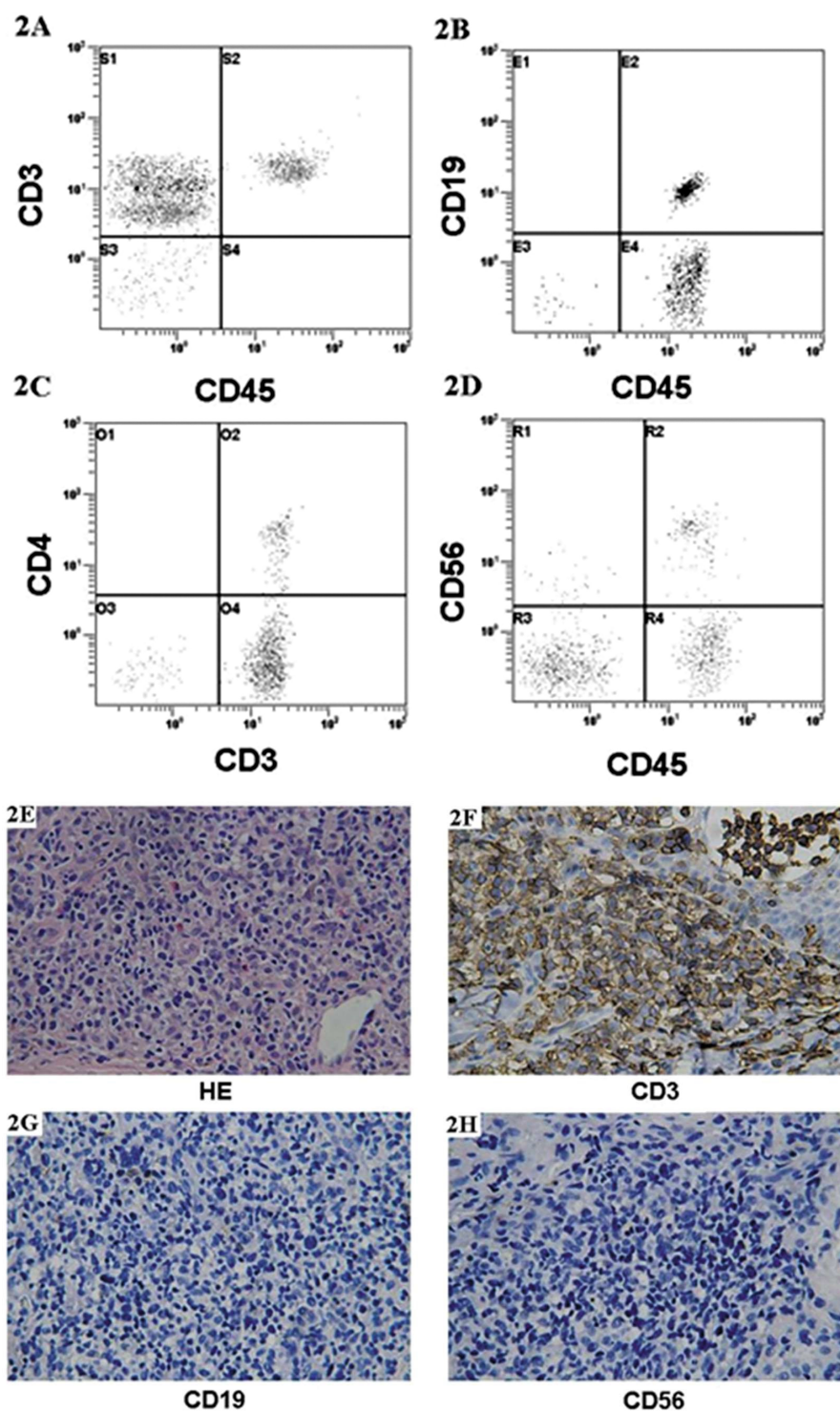


图 2 FCM 外周血检测正常的皮肤 T 细胞淋巴瘤

Fig. 2 Negative detection of Peripheral blood from cutaneous lymphoma patients by FCM

Note: Fig.2A, 2B, 2C and 2D show the detection results of FCM; Fig. 2E, 2F, 2G and 2H show the detection results of HE staining & immunohistochemistry

表 2 FCM 和金标准检测 T 细胞淋巴瘤结果比较

Table 2 The Results of TNHL by FCM and Gold Standard

		FCM		Total
		Positive	Negative	
Gold Standard	Positive	14	5	19
	Negative	0	6	6
	Total	14	11	25

Note: TNHL: T cell non-Hodgkin lymphoma, Kappa=0.57.

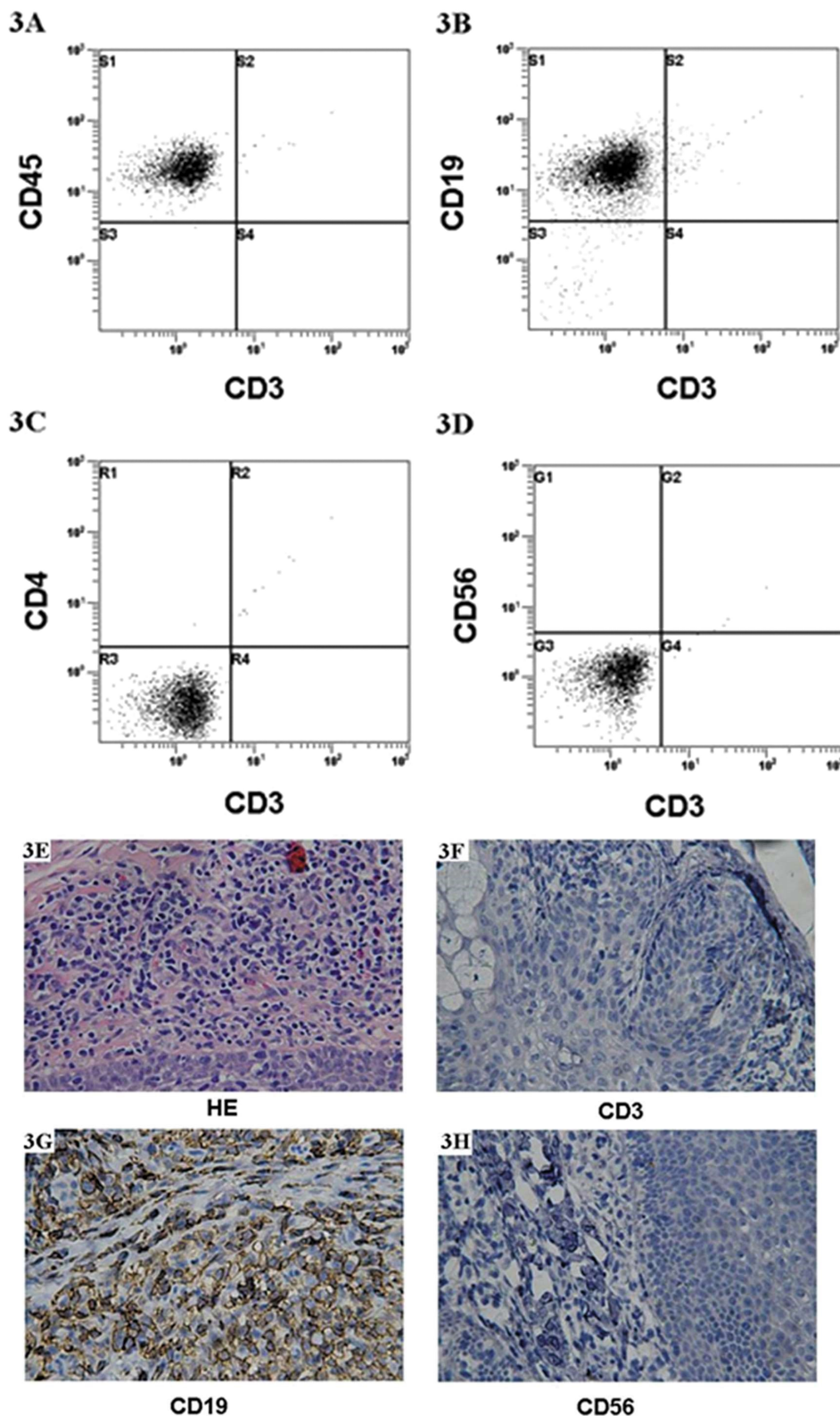


图 3 FCM 在皮肤 B 细胞淋巴瘤患者外周血中检测出异常的细胞群

Fig. 3 The abnormal cell groups in the peripheral blood from cutaneous B-cell lymphoma patients

Note: Fig.3A, 3B, 3C and 3D show the detection results of FCM; Fig.3E, 3F, 3G and 3H show the detection results of HE staining & immunohistochemistry

胞形态学、组织结构和抗原表达较好结合起来,但在病理标本不易采集,且石蜡标本制作过程中,部分细胞抗原表位收到破坏,假阴性率增高。而 FCM 可以同时检测血液标本中细胞的多种抗原标记,从而检测出患者外周血中的异常的淋巴单克隆细胞群,且检测敏感性高,适合临床上对皮肤淋巴瘤的初步

诊断^[20-23]。

本研究分析了 31 例初诊的淋巴瘤和淋巴结良性增生的病例,通过 FCM 检测淋巴瘤患者外周血淋巴细胞,与病理形态学和免疫组化结果进行比较。19 例初诊为 T 细胞淋巴瘤病例均通过病理形态学和免疫组化进行确诊,而 FCM 检测到 14 例异

常表型的单克隆恶性细胞群, 另外有 6 例 B 细胞淋巴瘤 FCM 也检测到异常表型的单克隆恶性细胞群。两种方法比较结果的一致性较高 ($Kappa=0.61$), 表明 FCM 在皮肤淋巴瘤诊断中是对病理诊断的一种有价值辅助检测手段, 从而得到更准确的诊断。5 例初诊为皮肤 T 细胞淋巴瘤病例, FCM 未检测到异常表型的单克隆恶性细胞群, 其原因可能是存在于外周血中的肿瘤细胞数目极少, 故因流式细胞学技术检测的细胞数目有限而无法反应整体情况。

本研究中纳入的病例数较少, 需要更多的病例数来验证 FCM 在皮肤淋巴瘤诊断中的实际价值。另外, FCM 检测皮肤淋巴瘤患者外周血淋巴细胞时, 部分标本未检测到异常表型的单克隆恶性细胞群, 表明 FCM 的检测与病理切片免疫组化的检测结果还存在差异。总之, 流式细胞学技术能检测到部分皮肤淋巴瘤患者外周血到异常表型的单克隆恶性细胞群, 可作为皮肤淋巴瘤诊断的一种有价值辅助检测手段。

参 考 文 献(References)

- [1] Kamstrup MR, Skov L, Zachariae C, et al. Psoriasis and risk of malignant lymphoma: A population-based cohort study [J]. *Br J Dermatol*, 2017, 12 (16). doi: 10.1111/bjd.16245. [Epub ahead of print]
- [2] Castañeda-Ruiz P, Rada FVY, Serra-Jaramillo R, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: a single disease [J]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 2017, 34(3): 551-559
- [3] Unsal O, Soytaş P, Hascicek SO, et al. Clinical approach to pediatric neck masses: Retrospective analysis of 98 cases[J]. *North Clin Istanb*, 2017, 10(24); 4(3): 225-232
- [4] Kuwahara K, Kudo K, Yashima-Abo A, et al. Classic Hodgkin lymphoma with osseous involvement mimicking Langerhans cell histiocytosis in a child [J]. *Hum Pathol*, 2018, 4. pii: S0046-8177(17) 30487-2. doi: 10.1016/j
- [5] Martínez-Escala ME, Posligua AL, Wickless H, et al. Progression of undiagnosed cutaneous lymphoma after anti-tumor necrosis factor alpha therapy[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2017, 12.068[Epub ahead of print]
- [6] Grant M, Bollard CM. Developing T-cell therapies for lymphoma without receptor engineering[J]. *Blood Adv*, 2017, 12(8), 1(26): 2579-2590
- [7] Shepherd L, Ryom L, Law M, et al. Differences in Virological and Immunological Risk Factors for Non-Hodgkin and Hodgkin Lymphoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 12(18)
- [8] Yap E, Law ZK, Aslan Abdullah NM, et al. Consolidation radiotherapy for advanced-stage aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma: A systematic review and meta-analysis [J]. *EXCLI J*, 2017, 21; 16: 1233-1248
- [9] Sýkorová A, Pytlík R, Móciková H, et al. Staging and Treatment Response Evaluation in Malignant Lymphomas - Czech Lymphoma Study Group Recommendations According to Criteria Revised in 2014 (Lugano Classification)[J]. *Klin Onkol*, 2016, 29(4): 295-302
- [10] Mitteldorf C, Grabbe S. WHO classification and clinical spectrum of cutaneous lymphomas[J]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 2017, 68(9): 682-695
- [11] Melissa Pulitzer. Cutaneous T-cell Lymphoma [J]. *Clinics in laboratory medicine*, 2017, 37(3): 527-546
- [12] Cerroni L. Past, present and future of cutaneous lymphomas [J]. *Seminars in diagnostic pathology*, 2017, 34(1): 3-14
- [13] Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management [J]. *American journal of hematology*, 2016, 91(1): 151-165
- [14] Rout ED. Lymphoid Neoplasia: Correlations Between Morphology and Flow Cytometry [J]. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 2017, 47(1): 53-70
- [15] Ahmed OI, Salih ZT. Dual malignancy in a thyroid; papillary thyroid carcinoma and small lymphocytic lymphoma; a report of a case with a cyto-histologic correlation[J]. *Diagnostic cytopathology*, 2017, 45(9): 851-856
- [16] Kotwal J, Malik A, Dutta V, et al. A rare case of leukemic presentation of blastoid variant of mantle cell lymphoma with isolated splenic involvement: Flowcytometric revelation [J]. *Medical journal*, 2015, 71(Suppl 1): 145-147
- [17] Kluk MJ, Ho C, Yu H, et al. MYC Immunohistochemistry to Identify MYC-Driven B-Cell Lymphomas in Clinical Practice[J]. *Am J Clin Pathol*, 2016, 145(2): 166-179
- [18] Ghatlaj P, Porter J, Wroblewski D. Primary cutaneous marginal zone lymphoma associated with juxta-articular fibrotic nodules in a teenager[J]. *Journal of cutaneous pathology*, 2013, 40(5): 477-484
- [19] Cho SY, Lee SS, Back DH, et al. Primary cutaneous B-cell lymphoblastic lymphoma in an elderly man[J]. *The Korean journal of hematology*, 2011, 46(4): 283-286
- [20] Battle-López A, González de Villambrosía S, Francisco M, et al. Stratifying diffuse large B-cell lymphoma patients treated with chemoimmunotherapy: GCB/non-GCB by immunohistochemistry is still a robust and feasible marker[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 18036-18049
- [21] Chatterjee T. Flow cytometric detection of minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia by using "MRD lite" panel [J]. *Medical journal, Armed Forces India*, 2017, 73(1): 54-57
- [22] Dworzak MN. Flow cytometric detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia & lymphoma*, 2003, 44 (9): 1445-1455
- [23] Karube K, Aoki R, Nomura Y, et al. Usefulness of flow cytometry for differential diagnosis of precursor and peripheral T-cell and NK-cell lymphomas: analysis of 490 cases [J]. *Pathology international*, 2008, 58(2): 89-97