

慢性髓细胞白血病急变期 MICM 分型回顾性分析

袁翠英 周 敏 谢品浩 张 谦 董海波 陈兰昕 欧阳建[△]

(南京大学医学院附属鼓楼医院 江苏 南京 210008)

摘要 目的 探讨慢性髓细胞白血病急变期(CML-BC)患者的细胞形态学(M)、免疫学(I)、细胞遗传学(C)和分子生物学(M)的特征及应用价值。方法 对38例CML-BC患者的MICM分型进行回顾性分析。结果 以FAB分型为基础的形态学确诊率达94.7%;免疫分型结果为38例CML-BC中CML-AML占71.0%,其中37.0%伴淋系表达;CML-ALL占23.7%,均为B细胞性,其中66.67%伴髓系表达;CML-MAL(混合性白血病)占5.3%,均为B系和髓系混合表达;CD34+26例(68.4%),CD7+10例(26.3%),均与CD34共表达。细胞遗传学结果显示CML特征性Ph染色体检出率为94.3%(36/38),附加异常染色体检出率为60.5%(23/38),发生频率较高的类型是+Ph,+8和i(17q);FISH检测BCR/ABL融合基因阳性率为100%,der(9)缺失占14.7%。RT-PCR检测20例患者BCR/ABL融合基因均为阳性,其中b2a2型(12/20),b3a2型(8/20),1例(1/20),b2a2和b3a2双阳性(1/20)。结论 CML-BC是造血干细胞疾病,原始细胞分化阻滞在早期阶段,预后差。MICM分型对CML-BC的诊断、治疗和预后判断均有重要价值。

关键词 慢性髓细胞白血病 急变 MICM 分型

中图分类号 R733.72 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)19-3645-03

Analysis of Morphology, Immunology, Cytogenetic and Molecular Biology Classification of Patients with Chronic Myeloid Leukemia in Blastic Crisis

YUAN Cui-ying, ZHOU Min, XIE Pin-hao, ZHANG Qian, DONG Hai-bo, CHE Lan-xin, OUYANG Jian[△]

(The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School Nanjing, 210008, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the characteristic and value of bone marrow morphology, immunology, cytogenetic and molecular biology (MICM) in patients with chronic myeloid leukemia in blastic crisis (CML-BC). **Methods:** 38 patients with CML-BC were studied by MICM analysis. **Results:** The accuracy rate of morphological diagnosis based on FBA classification was 94.7%. Immunology results, the percentage of CML-AML was 71.0%, in which 37.0% patients expressed lympholytic associated antigen; The percentage of CML-ALL was 23.7% and all were B lympholytic immunophenotype, in which 66.7% patients expressed myeloid associated antigen; The percentage of CML-MAL was 5.3% with all expressing B lymphoid and myeloid immunophenotype. 26 cases (68.4%) had CD34 expression and 10 cases (26.3%) had CD7 and CD34 Co-expression. In cytogenetic result, the positive rate of Ph chromosome was 94.3%. Other chromosome abnormality rate was 60.5% with +ph,+8 and i (17q) in high appearance rate. The positive rate of BCR /ABL gene by FISH reached 100% with 14.7% del(9). The positive rate of BCR /ABL gene by RT-PCR also reached 100% with b2a3(12/20),b3a2(8/20) and b2a3+b3a2(1/20). **Conclusion:** CML-BC is a kind of disease of stem cell. The differentiation of blast cell is blocked in the early stage. MICM has great value in diagnosis, therapy and prognosis judgement.

Key Words: Chronic myeloid leukemia; Blastic crisis; MICM analysis

Chinese Library Classification(CLC): R733.72 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)19-3645-03

慢性髓细胞白血病(CML)是造血干细胞的恶性克隆性疾病,其发病率为1-1.5/100,000,占成人白血病总数的15%~25%^[1]。由t(9;22)产生的bcr-abl融合基因是其遗传学特征。CML是一种具有高度异质性的疾病,病程从数月到数年不等,临床上该病可分为3期:慢性期、加速期和急变期(CML-BC),初诊时大部分患者为慢性期,一般在确诊2-5年内由慢性期进展到加速期,最后发展到急变期(CML-BC),急变后化疗有效率不超过30%,中位生存期1~13个月,预后极差。CML-BC期可涉及所有系的造血细胞,而不同急变类型的预后及治疗原则不尽相同,此时细胞形态学和组织化学难以完全确定急变类型,需辅

以免疫分型加以鉴别,结合细胞遗传学和分子生物学检查,有助于急变类型的诊断、治疗和预后的判断。现将我院2003年1月-2010年10月诊治的38例CML-BC患者进行MICM分析总结,报告如下:

1 资料和方法

1.1 临床资料

38例CML-BC患者均为本院收治的患者,其中男25例,女13例,年龄20-61岁,中位年龄40.2岁。37例脾肿大,其中巨脾25例,肝肿大9例,浅表淋巴结肿大7例,胸骨压痛8例。1例髓外急变,3例患者首发急变,其余均由慢性期转变而来。入院时患者血红蛋白为 75.6 ± 21.5 (g/L),血小板数为 102.6 ± 69.3 ($\times 10^9/L$),白细胞数为 20.6 ± 16.5 ($\times 10^9/L$),诊断及分期标准参照《血液病诊断及疗效标准》^[2]。

作者简介 袁翠英(1967-)女,本科,主管技师,主要研究方向:血液病学,电话025-83304616-60362 E-mail: ly6367@126.com

△通讯作者 欧阳建 E-mail: by626@sina.com

(收稿日期 2011-02-25 接受日期 2011-03-18)

1.2 MICM 检测

细胞形态学检查:常规抽取骨髓液涂片,待干后做瑞氏染色,同时做细胞化学染色,包括:髓过氧化物酶(POX)、特异性酯酶染色(CE)、非特异性酯酶染色(NSE)、NSE+氟化钠抑制试验(NSE+NaF)、糖原染色(PAS)。按 FAB 标准进行形态学分型。

免疫表型分析:用微量全血法对肝素抗凝骨髓进行活细胞免疫荧光标记,采用三色细胞术进行细胞免疫分型,FASC-Clibur 流式细胞仪及单克隆抗体均为美国 BD 公司产品。所用单克隆抗体:T 淋系为 CD2、CD3、CD7;B 淋系为 CD10、CD19、CD22;髓系为 CD13、CD33、CD14;巨核系为 CD42b、CD61;干/祖细胞标志 CD34。结果判定:CD34 细胞阳性率≥10%为阳性标准,淋系、髓系和巨核系均以抗原阳性细胞≥20%为阳性标准。急性混合细胞白血病(MAL)的诊断标准参照 Catovsky 的积分标准。

细胞遗传学检查:采用骨髓细胞直接法或短期培养法制片,热变性核姬姆萨 R 显带,平均分析中期细胞数 15-20 个,染色体核型分析根据《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN 2005)》进行描述^[3]。

FISH 检测:用 bcr-abl 双色双融合探针或 ES 探针行荧光原位杂交(FISH)检测,检测 bcr-abl 融合基因及 der(9)缺失,探针购自北京金菩嘉医疗科技有限公司,依据厂家提供的方法进行标本的变性、杂交在 OlympusBX51 荧光显微镜下分析。

分子生物学检测:肝素抗凝骨髓提取单个核细胞,采用 RT-PCR 检测 BCR/ABL 融合基因,检测项目包括 b2a2 和 b3a2,同时设置阴性和阳性对照。

1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件分析,非配对 Student t 检验进行数据分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学

根据骨髓细胞形态和常规细胞化学染色,38 例 CML-BC 患者可分为三类急变型:髓系 CML-AML27 例(71.1%),淋系 CML-ALL10 例(29.0%),类型待定 1 例(2.6%)。

2.2 免疫表型分析

免疫分型结果显示:急变为 CML-AML27 例(71.0%),其中 10 例(37.0%)伴淋系表达,急变为 CML-ALL9 例(23.7%),均为 B 细胞急淋,其中 6 例(66.67%)伴髓系表达。细胞形态学诊断为 ALL1 例和类型待定 1 例最终结合免疫分型诊断为急性混合细胞白血病 CML-MAL,占 5.3%,均为 B 系和髓系混合表达。CD34+26 例(68.4%),其中 AML17/27(63.0%), ALL4/9(44.4%),MAL1/2 (50.0%)。CD7+10 例(10/38)(26.3%),均与 CD34 共表达,占 AML9/27 ((33.3%)、ALL0/9 (0%)、MAL1/2 (50.0%)。

2.3 细胞遗传学检查

染色体检查的 38 例患者中,36 例 Ph 染色体阳性,2 例阴性,CML 特征性 Ph 染色体检出率为 36/38 (94.7%)。23 例(60.5%)急变患者出现 Ph 染色体外的附加异常,出现的异常包括 1 (1;2)、+1p、+1、+4、5q+、+7、-7、t (8;14)、+8、-8、i (9q)、+9、14q+、17p-、i (17q)、21q+、+Ph。发生频率较高的类型是: +Ph (5/23)、+8(4/23)和 i(17q)(4/23)。23 例患者中复杂异常 10 例(43.5%)。5 例涉及 17 号染色体变异的病例(4 例 i (17q),1 例 17p-) 的患者均为 CML-AML,而 2 例 -7 的患者均为 CML-ALL,未发现其他亚型。附加染色体异常出现在 18/27 (66.6%) AML、4/9 (44.4%) ALL 和 1/2 (50.0%) MAL 急变患者中,三者中附加染色体出现的差异无统计学意义(P>0.05)。

2.4 融合基因及 der(9)缺失检测

行 FISH 检测的 28 例急变患者中,均检测到 bcr-abl 融合基因(含 2 例 Ph 阴性患者),der(9)缺失 4 例占 CML-BC4/28 (14.3%),在 CML-AML、CML-ALL 中分别占 3/22(13.6%)、1/6 (16.6%),急髓变和急淋变两组病例中 der(9) 缺失的概率无显著性差异(P>0.05)。

2.5 分子生物学检测

20 例患者 BCR/ABL 融合基因均阳性(含 2 例 Ph 阴性患者),其中 b2a2 型(12/20),占 CML-AML11/16 (68.7%)、CML-ALL1/4 (25.0%)。b3a2 型(9/20),占 CML-AML6/16 (37.5%)、CML-ALL1/4 (75.0%),其中 1 例 CML-AMLb2a2 和 b3a2 双阳性(1/20)。CML-AML 中 b2a2 型高于 CML-ALL,而 CML-ALL 中 b3a2 型阳性率高于 CML-AML 中(P<0.05)。38 例 CML-BC 患者 MICM 联合检测结果见附表。

表 1 38 例 CML-BC 患者 MICM 资料
Table 1 MICM of 38 cases with CML-BC

急变类型(Blastic type)	CML-AML	CML-ALL	CML-MAL	共计
检测项目(Test item)	(急髓变)	(急淋变)	(急性混合细胞变)	(Total)
例数及百分比(Cases and percent)	27(71.0%)	9 (23.7%)	2 (5.3%)	38
CD34+	17/27(63.0%)	4/9(44.4%)	1/2(50.0%)	22/38(68.4%)
CD34+ CD7+	9/27((33.3%)	0/9(0%)	1/2 (50.0%)	10/38(26.3%)
附加染色体异常(Additional chromosome abnormalities)	18/27 (66.6%)	4/9 (44.4%)	1/2 (50.0%)	23/38(60.5%)
i(17q)及 17p-	5	0	0	5
-7	0	2	0	2
der(9)缺失 del(9)	3/22(13.6%)	1/6(16.6%)		4/28(14.1)
b2a2	11/16(68.8%)	1/4(25.0%)		12/20
b3a2	6/16(37.5%)	3/4(75.0%)		9/20

3 讨论

CML 是多能干细胞的克隆性疾病,急变时可表现为多种类型,由于形态学分类受主观影响较大,且细胞化学染色不能使一些分化差的细胞反映出特征性的化学性质,因此仅靠常规细胞形态学和细胞化学染色难以完全识别急变后的原始细胞类型,而免疫分型不受上述因素影响,可以弥补形态学分类的不足。本研究中急变为急性髓细胞白血病 CML-AML27 例,占 71.0%,急变为急性淋巴细胞白血病 CML-ALL9 例,占 23.7%,与文献报道^[4,5]相符。1 例形态学诊断为 ALL 和 1 例类型无法确认的病例经免疫分型确诊为 CML-MAL,均为 B 系和髓系混合表达。因此形态学确诊率仅为 94.7%(36/38),而免疫表型分析使准确率达 100%。

本研究结果显示,CML-AML 中 37.0%伴淋系表达,而 CML-ALL 均为 B 细胞性,66.67%伴髓系表达;淋系和髓系抗原的共表达被认为是早期祖细胞的特征之一。CD34 是一种阶段特异性细胞分化抗原,选择性地表达于造血干细胞、祖细胞、血管内皮细胞和胚胎成纤维细胞膜上,在最早期的造血细胞有高水平表达,但随着细胞的成熟其表达水平下降。而近年研究证实 CD7 抗原并非 T 系特异性标志,具有多向分化潜能的造血干/祖细胞阶段也可表达此抗原,Normann 等研究发现^[6]在进展的 CML 患者中 CD7 与 CD34 共阳性细胞比例较初诊时明显增加,Kosugi 等^[7]研究表明 CD34+CD7+ 细胞比例与治疗反应及病程有密切的关系,因此我们对患者的骨髓进行了 CD34 和 CD7 的检测,结果发现 CD34 抗原在 68.2%的 CML-BC 患者中均有表达,在 AML、ALL、MAL 阳性率分别为 17/27(63.0%),3/9(33.3%)和 1/2(50.0%),其中 CD7 与 CD34 共表达占 CML-BC 26.3%,分别在 CML-AML、CML-ALL、CML-MAL 中占 29.6%、0%、50.0%,CML-ALL 患者中二者的表达低于其他两种亚型。Cervantes F 等^[8]的研究表明,淋系急变患者在化疗疗效与生存期方面均好于非淋系急变患者。因此我们推测具有 CD34+CD7+ 表达的 CML-BC 干细胞分化过程中可能被阻滞在更早的阶段,恶性程度更高。

CML 进入急变期后 60%-80%的病例出现附加染色体异常^[9],在我们的研究中,60.5%病例伴有附加染色体异常,出现在 18/27 (66.6%) AML、4/9 (44.4%) ALL 和 1/2 (50.0%) MAL 急变患者中,其中 43.5%为复杂染色体异常,体现了 CML-BC 期细胞遗传学的不稳定性。本组附加异常发生频率较高的类型是: +Ph(5/21)、+8(4/21)和 i(17q)(4/21)。有文献报道,在 CML-BC 中附加染色体的异常在急髓变中较急淋变更常见,+8、+19,尤其是 i(17q)是 CML 急髓变的特征,而 -7 和其它不典型的附加异常常发生于 CML-ALL 患者中。本组 CML-AML 患者中出现附加染色体异常比例最高,其中 5 例均涉及 17 号染色体变异,而 2 例 -7 的患者均为 CML-ALL,未发现其他亚型,与文献报道相符合。目前多个研究提示^[10-14],急变期无附加染色体异常的预后较好,异常染色体出现或增加预示病情恶化,附加染色体在诊断初期即存在的患者生存期较短,i(17q)或其它引起 17p 缺失改变的患者预后尤其不佳,而在急变期出现 +8 或 +Ph 的也提示预后不良。

进行 FTSH 检测的 28 例急变患者,均检测到 bcr-abl 融合基因(含 2 例 Ph 阴性患者),阳性率为 100%。90%以上的 CML 可通过细胞遗传学分析检测出 Ph 染色体,而其余的 5%-10%却缺乏细胞遗传学证据^[15],在常规细胞遗传学分析的基础上,选用分子遗传学 FISH 技术可以明显提高染色体异常的检出率及准确率。本研究中 der(9)缺失 4 例占 CML-BC14.1%,近年来 der(9)缺失在 CML 发病机制中的作用逐渐引起人们的关注,伴 der(9)缺失的患者易进展且预后不良被相继证实,Ph⁺ 的 CML 患者中该缺失的发生率为 10%~15%^[16],对伴有 der(9)缺失的 CML 患者接受伊马替尼治疗的一项研究^[17]发现:应用伊马替尼治疗能够改善伴有 der(9)缺失患者的预后,提示 der(9)的缺失对治疗方案的选择可能具有指导意义。

应用 RT-PCR 技术检测的 20 例患者的 BCR/ABL 融合基因均为阳性(含 2 例 Ph 阴性患者)。本组 CML-AMLb2a2 型 11/16(68.7%)高于 CML-ALL1/4(25.0%),而 CML-ALL 中 b3a2 型 3/4(75.0%)阳性率高于 CML-AML6/16(37.5%)($P < 0.05$),有研究认为:断裂点在亚区 b2 与亚区 b3 比较,发生 AML 的急变明显多于 ALL 的急变^[18,19],b3a2 型患者预后倾向于更好,如慢性期长、不易出现额外染色体异常等^[20]。

综上所述,MICM 分型对 CML-BC 的急变类型诊断,预后判断和治疗方案的制订均有着重要价值。

参考文献(References)

- [1] Sessions J. Chronic myeloid leukemia in 2007 [J]. J Manag Care Pharm, 2007,13(8 supplA): 4-7
- [2] 张之南,主编 血液病诊断和疗效标准[M].第二版.北京:科技出版社 1998, 220-221
Zhang Zhi-nan, chief editor. Second version. Diagnosis and efficacy standards of hemopathy[M]. Beijing: Science Press.1998: 220-221
- [3] Shaffer LG, Tommerup N (eds). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN (2005)[M]. Basel (Switzerland): Karger Basel publication, 2005: 55-83
- [4] Wadhwa J, Szydlo R M, Apperley J F, et al. Factors affecting duration of survival after onset transformation of chronic myeloid leukemia [J]. Blood, 2002, 99: 2304-2309
- [5] Favre G, Passweg J, Hoffmann T, et al. Immunophenotype of blast crisis in chronic myeloid leukemia [J]. Schweiz Med Wochenschr, 1998, 128: 1624-1626
- [6] Normann AP, Egeland T, Madhus IH, et al. CD7 expression by CD34+ cells in CML Patients, of prognostic significance?[J]. Eur J Haematol, 2003, 71: 266-275
- [7] Kosugi N, Ebihara Y, Nakahata T, et al. CD34+ CD7+ leukemic progenitor cells may be involved in maintenance and clonal evolution of chronic myeloid leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(2): 505-511
- [8] Cervantes F, Villamor N, Esteve J, et al. 'Lymphoid' blast crisis of chronic myeloid leukemia is associated with distinct clinicohaematological features[J]. Br J Haematol, 1998, 100: 123-128
- [9] Johansson B, Fioretos T, Mitelman F, et al. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia [J]. Acta Haematol, 2002, 107: 76-94
- [10] Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis [J]. Blood, 2004, 103: 4010-4022

(下转第 3674 页)

后处理图像无法比拟的,原始轴位可准确测量斑块密度、形状及狭窄程度。上述几种重组图像及原始轴位图像互相结合使用,可清楚、准确显示下肢血管病变发生部位、范围、程度、侧支循环的建立情况及闭塞远段血管主干,为临床提供更加丰富、有效的影像资料。

动脉狭窄在 CTA 上表现为血管腔不同程度变细、变形、狭窄、闭塞。各种血管重组图像显示狭窄段血管腔呈虫蚀状、细线状,管壁毛糙,部分管腔管壁钙化,闭塞段血管中断。病变血管周围可见侧支血管形成。血管炎表现为血管壁扭曲、形态不规则和程度不等的强化,钙化少见。急性肢体动脉栓塞表现为栓塞处管腔突然中断。

综上所述下肢血管 CTA 图像可从各方位、多角度直观受检血管,在发现闭塞远端血管情况方面优于 DSA,在适当延迟扫描时间条件下可最大程度显示侧支血管的供血情况,为临床治疗提供更全面资料。随着 64 排螺旋 CT 临床广泛应用,在下肢血管疾病诊断方面的优势势必得到长足发展。

参考文献(References)

- [1] 梁长红,赵振军等多层螺旋 CT 血管成像 [M]. 2008,341-342
Liang Chang-hong,Zhao Zhen-jun,et al. Multislice helical CT angiography [M].2008,341-342
- [2] Poruggallter HR,Schoellnast H,Hausegger KA,et al. Multislice helical CT angiography in peripheral arterial occlusive disease A valuable too in detecting significant arterial lumen narrowing [J].Eur Radiol, 2004,14(9):1681
- [3] Storto ML,Battis D.Advances in vascerals Sem in Ultrasound CT and MR [J],2004 25(1):25
- [4] 赵绍宏 郭伟 刘小平等. 多层螺旋 CT 血管造影诊断髂及下肢动脉闭塞性病变的价值[J].中国医学影像学杂志.2007;15(5):344-346
Zhao Shao-hong, Guo Wei, Liu Xiao-ping, et al. MSCT Angiography in Arterial Occlusive Disease of the Aortoiliac System and Lower Extremities [J]. Chinese J Med Imaging, 2007;15(5):344-346
- [5] Rieker O, Duber C, Schmidt W, et al. Prospective comparison of CT angiography of legs with intraarterial digital subtraction angiography [J]. AJR,1996,166:269-276

(上接第 3647 页)

- [11] Geraldo B,Cavalcanti J, Eliane P,et al.Implications of gene and p53 protein alterations in determining progression of chronic mye-lold leukemia phases[J]. Blood,2004,104:4328
- [12] JamilKD,DavidWS,Martin C. CML progenitor cells have chro-mosal instability and display increasedDNA damage atDNA fragile sites[J]. Blood,2005,106:1989
- [13] WendelHG, de-Stanchina E, Cepero E,et al.Loss of p53 im-pedes the antileukemic response to BCR-ABL inhibition [J]. Proc Natl Aced SciUSA,2006,103:7444-7449
- [14] Brazma D, Grace C, Howard J,et al. Genomic profile of chronic myelogenous leukemia: imbalances associated with disease pro-gres-sion[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2007,46: 1039-1050
- [15] Batista DA, HawkinsA, Murphy KM,et al. BCR/ABL rearrange-ment in two cases of Philadelphia chromosome negative chronic mye-lold leukemia: deletion on the derivative chromosome 9 may or not bep-resent[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2005, 163: 164-167
- [16] GorusuM, Benn P, LiZ, et al. On the genesis and prognosis of va-riant translocations in chronic myeloid leukemia [J]. Cancer Genet Cyto-genet, 2007, 173: 97-106
- [17] Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha M, et al. Large deletions atthe t(9; 22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis sub-group of patients with chronic myeloid leukemia [J]. Blood, 2000,95: 738-743
- [18] Morris SW, Daniel L, Ahmed CML, et al. Relationship of ber break-point to chronic phase duration, survival and blast crisis lineage in chronic myelogenous leukemia patients presenting in early chronic phase[J]. Blood, 1990, 75: 2035-2041
- [19] Pane F,Intrieri M,Quintarelli C,et al. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations [J]. Oncogene,2002,21:8652-8667
- [20] Quintas-CardamaA, KantarjianH, TalpazM, et al. Imatinibmesy-late therapy may overcome the poor prognostic significance of dele-tions ofderivative chromosome 9 in patientswith chronicmyelogenous leukem[J]. Blood, 2005,105: 2281-2286