

急性髓系白血病患者外周血粒细胞、单核细胞膜 GPI 锚链和红细胞表面 CD59 表达水平的研究*

范臻佳, 金丽兰, 史册, 刘禹, 蔡刚 (上海交通大学医学院附属瑞金医院检验科, 上海 200025)

摘要:目的 通过流式细胞术研究急性髓系白血病(AML)患者粒细胞、单核细胞糖基磷脂酰肌醇(glycosyl-phosphatidyl inositol, GPI)锚链和红细胞 CD59 表达水平及其临床意义。方法 该研究纳入了 36 例并发血管内容血的 AML 患者及 21 例阵发性睡眠性血红蛋白尿(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)患者, 依据国际临床流式细胞协会推荐的 PNH 流式诊断指南, 分别对受试对象的红细胞和有核细胞进行 PNH 克隆检测, 统计分析 AML 患者粒细胞、单核细胞及红细胞 PNH 克隆的水平。结果 AML 组患者与 PNH 组患者相比较无明显红细胞 CD59 表达缺陷(I 型红细胞 98.49 ± 4.61 vs 61.41 ± 25.86 , II 型红细胞 1.33 ± 4.55 vs 16.82 ± 19.92 , III 型红细胞 0.17 ± 0.85 vs 21.71 ± 21.12 , 差异均有统计学意义($t=6.43, 3.41, 4.71$, 均 $P<0.001$); 粒细胞、单核细胞缺陷克隆检测存在但与 PNH 组比较则明显减少(粒细胞 26.46 ± 23.36 vs 73.12 ± 28.41 , 单核细胞 35.80 ± 27.80 vs 78.37 ± 25.03 , 差异有统计学意义($t=4.59, 3.76$, 均 $P<0.001$)。结论 AML 患者有核细胞中可出现 FLAER 阴性的 PNH 克隆, 但未见 CD59 表达缺陷的红细胞, 可与 PNH 区分。

关键词:急性髓系白血病; 糖基磷脂酰肌醇; CD59 检测; 嗜水气胞菌溶素变异体检测

中图分类号: R557; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2019)01-026-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.01.007

Expression Level of Peripheral Blood Granulocytes and Monocytes GPI Anchor Chain and Erythrocyte CD59 in AML Patients

FAN Zhen-jia, JIN Li-lan, SHI Ce, LIU Yu, CAI Gang (Department of Clinical Laboratory, Ruijin Hospital of Medical College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

Abstract: Objective To study the expression levels and the clinical significance of glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI) and CD59 in AML patients by flow cytometry (FCM). **Methods** From 2014 to 2018, 36 AML patients combined with intravascular hemolysis from Shanghai Ruijin Hospital were studied in this study, while 21 cases of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients were included as control. Multiparameter FCM was used to detect the expression levels of GPI anchor chain of Fluorescent-labeled aerophilic plasminogen (FLAER) treated granulocytes and monocytes in peripheral blood samples. FCM was performed to evaluate the expression level of CD59 of erythrocyte. **Results** Compared with PNH group patients, AML group patients had no obvious deficiency in CD59 expression (type I erythrocyte 98.49 ± 4.61 vs 61.41 ± 25.86 , type II erythrocyte 1.33 ± 4.55 vs 16.82 ± 19.92 , type III erythrocyte 0.17 ± 0.85 vs 21.71 ± 21.12), the differences were statistically significant ($t=6.43, 3.41, 4.71$, all $P<0.001$). And the detection of granulocyte and mononuclear cell defects by cloning was found, but it was significantly reduced compared with PNH group patients (granulocyte 26.46 ± 23.36 vs 73.12 ± 28.41 , monocyte 35.80 ± 27.80 vs 78.37 ± 25.03), the differences were statistically significant ($t=4.59, 3.76$, all $P<0.001$). **Conclusion** FLAER negative PNH clones could be found in nucleated cells of AML patients, while no CD59 expression defects could be found in erythrocytes, which could be differentiated from PNH.

Keywords: AML; GPI; CD59 detection; FLAER detection

急性髓系白血病(acute myelocytic leukemia, AML)是克隆性造血干细胞疾病的一类,是髓系造血干/祖细胞的恶性疾病。以骨髓和外周血中原始和幼稚的髓性细胞增生为主要特征,临床表现为贫血、出血、感染、发热、脏器浸润和代谢异常等,发病早期部分症状与阵发性睡眠性血红蛋白尿(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)的部分临床表现较为相似,特别是血管内容血的相关表现^[1]。这可能与 AML 患者外周和骨髓异常血细

胞缺乏相关膜锚链蛋白有关。众所周知,PNH 是以膜锚链蛋白 CD55 和 CD59 缺乏致血管内容血为主要病理特征,其本质是造血干细胞的 GPI 锚链合成障碍,导致包括 CD55 和 CD59 在内的多种血细胞膜锚链蛋白缺乏。目前已有一些证据表明 AML 患者外周异常血细胞也存在 CD59 等相关膜锚链蛋白缺乏,但其是否也存在 GPI 链的缺乏,以及其表现是否与典型 PNH 相同,尚不清楚。嗜水气胞菌溶素变异体(fluorescent-labeled aéro-

* 作者简介:范臻佳(1983—),男,本科,主管技师,专业:流式细胞术检测及临床意义, E-mail: 83795231@qq.com。

通讯作者:蔡刚(1975—),男,博士,副主任技师, E-mail: caigangsmmu@hotmail.com。

philic plasminogen, FLAER)是一种可与 GPI 锚链特异性结合的物质^[2],目前,通过流式细胞术采用荧光标记的 FLAER 及膜锚链蛋白的单克隆抗体检测 GPI 锚链及其锚定蛋白的缺乏是国际临床流式细胞协会(international clinical cytometry society, ICCS)和欧洲临床细胞分析学会(european society for clinical cell analysis, ESSCA)推荐的对患者粒细胞和单核细胞进行 PNH 克隆诊断的确诊方法^[3]。ICCS/ESSCA 也同时推荐检测红细胞表面 CD59 的表达水平,判断其是否存在 CD59 部分缺陷(II 型细胞)或完全缺陷(III 型细胞)的细胞^[4,5]。通过有核细胞与红细胞共同确定患者是否存在 PNH 克隆。

基于 ICCS/ESSCA 推荐的 PNH 检测方法,我们拟在本研究中,采用流式细胞术对不同类型的 AML 患者进行外周血红细胞 CD59 和有核细胞 FLAER 检测,同时以确诊的 PNH 患者作为对照,分析 AML 患者是否存在 FLAER 阴性的类 PNH 克隆及其特点。

1 材料和方法

1.1 研究对象 收集瑞金医院 2014 年~2018 年门诊和住院患者 57 例,确诊为 PNH 患者 21 例(其中伴有再生障碍性贫血的 5 例,男性 8 例,女性 13 例);AML 患者 36 例(其中 M2 3 例, M3 21 例, M4 5 例, M5 7 例;男性 17 例,女性 19 例)。

1.2 仪器和试剂 美国 BD 公司 CantoII 流式细胞仪, anti-CD59- FITC, FLAER-ALEXA488, anti-CD33- APC, anti-CD14- Pacific Blue, anti-CD24-

PE, anti-CD45-PC5 等荧光标记流式抗体及溶血素等均购自 BD Pharmingen。

1.3 方法

1.3.1 外周血粒细胞和单核细胞 FLAER 检测

根据 ICCS/ESSCA 指南,基于 CantoII 平台,采用五色流式细胞术检测。避光孵育 30 min 后加入溶血素裂红,完全溶血后加入 PBS 洗涤细胞,并上机检测,从而得到目的细胞亚群的百分数。正常参考范围:CD24⁻FLAER⁻细胞/CD45⁺粒细胞<1%, CD14⁻FLAER⁻细胞/CD33⁺单核细胞<1%。

1.3.2 外周血红细胞 CD59 检测:根据 ICCS/ESSCA 指南,基于 CantoII 平台,采用单色流式细胞术检测。将荧光素标记的各种单克隆抗体加入到洗涤红细胞中,与细胞膜上相应的抗原结合,孵育后再次洗涤、重悬等步骤后,在流式细胞仪上进行分析,从而得到表达缺陷细胞的百分数。正常参考范围:II 型细胞和 III 型细胞比率均<1%。

1.4 统计学分析 用 SAS 9.0 软件进行数据分析,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 红细胞 CD59 的表达水平 见图 1。AML 组患者未检出明显的 CD59 表达缺陷的细胞,PNH 组患者进行检测后 CD59 抗原表达出现不同程度缺失,AML 组患者检测结果与 PNH 组相比,各型红细胞比例差异均有统计学意义(*t*=3.41~6.43, 均 *P*<0.001)。

表 1 AML 组和 PNH 组外周血细胞抗原缺失率($\bar{x} \pm s, \%$)

项 目	PNH 组(<i>n</i> =21)	AML 组(<i>n</i> =36)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
I 型红细胞(CD59)	61.41±25.86	98.49±4.61	6.43	<0.001
II 型红细胞(CD59)	16.82±19.92	1.33±4.55	3.41	<0.001
III 型红细胞(CD59)	21.71±21.12	0.17±0.85	4.71	<0.001
粒细胞 GPI 缺失率	73.12±28.41	26.46±23.36	4.59	<0.001
单核细胞 GPI 缺失率	78.37±25.03	35.80±27.80	3.76	<0.001

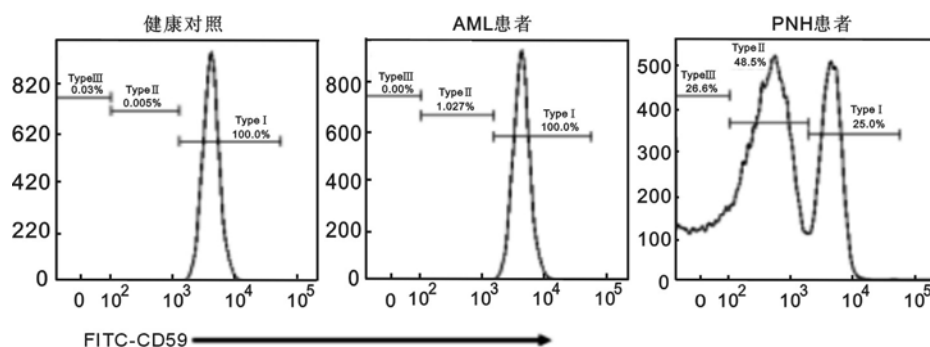


图 1 健康对照、AML 及 PNH 患者红细胞 CD59 流式比较

2.2 粒系和单核系 见图 2。AML 组患者和 PNH 组患者进行检测后粒细胞和单核细胞均出现

了 GPI 双阴性的缺失细胞。但 AML 组患者的缺失细胞的克隆比例与 PNH 组患者相比,差异具有统计学意义,结果见表 1。同时,可在 AML 患者中

检出不同数量的 FLAER 单阳性细胞,例如 $CD24^-FLAER^+$ 的粒细胞和 $CD14^-FLAER^+$ 单核细胞。

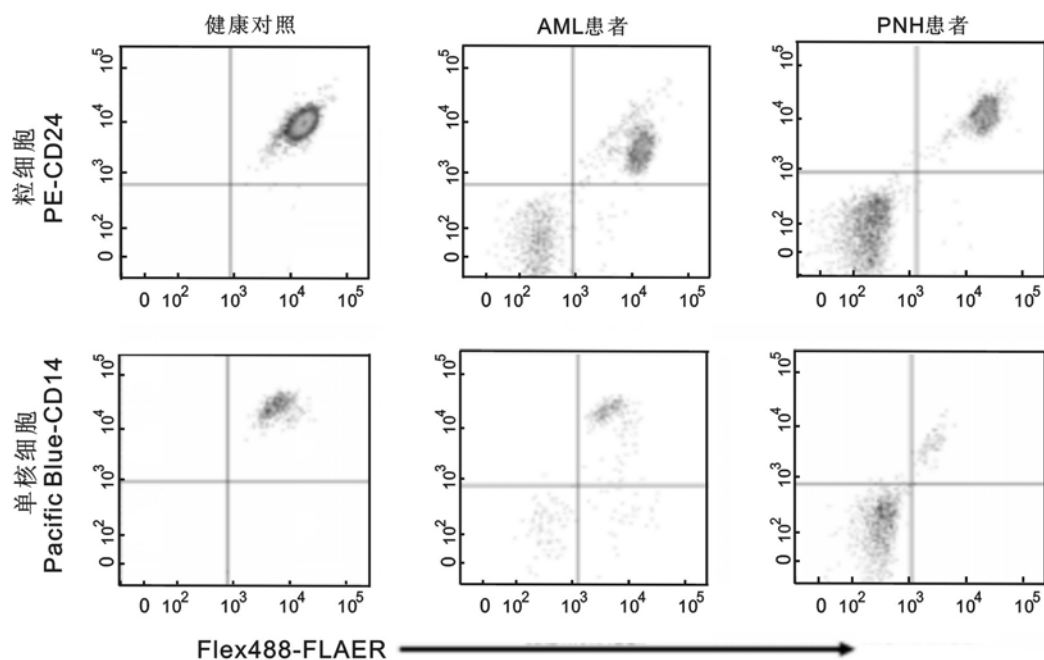


图2 健康对照、AML及PNH患者粒细胞、单核细胞FLAER流式比较

3 讨论 由于白血病细胞具有“异质性”和“非同步性”,常伴有抗原表达紊乱现象^[6],并且其分化发育各个阶段出现了不规律和调节紊乱,从而导致其膜抗原的表达异常^[7]。既往已有研究发现,部分AML患者常伴有粒、单细胞的CD55或CD59缺陷,可能是导致这些患者并发血管内容血的重要原因。众所周知,CD55和CD59是保护细胞免受异常补体激活杀伤的重要膜锚链蛋白^[8]。AML患者这些CD55或CD59缺陷的细胞究竟是仅为膜锚链蛋白缺乏,还是也涉及糖基磷脂酰肌醇(glycosyl-phosphatidyl inositol, GPI)锚链的合成障碍,尚不完全清楚。由于GPI锚链合成障碍会导致包括CD55和CD59在内的多种膜锚链蛋白缺乏,可能对AML患者血细胞的多种生物学功能产生影响。

在本研究中,我们的结果清晰的显示,尽管AML患者粒细胞、单核细胞检出的典型PNH克隆明显小于PNH患者,但毋庸置疑的是多种类型的AML病患都存在GPI膜锚链的合成障碍和/或锚链蛋白的缺失,不仅有典型的粒细胞、单核细胞PNH克隆出现,同时还存在不同数量的FLAER单阳性细胞,表明这些恶性干、祖细胞的相关抗原表达或蛋白合成明显紊乱,这也与既往文献报道AML患者粒细胞表面存在CD59表达异常的发现相一致^[9]。值得注意的是,部分M3和M5患者均不仅有恶性细胞系的GPI锚链合成障碍,而且也

存在其它有核细胞系的GPI锚链合成障碍,提示这部分患者骨髓的异常改变可能发生在造血细胞更原始的阶段。但是,我们在纳入的AML患者中未检出明显异常的CD59缺陷克隆,一方面间接提示了AML患者粒细胞、单核细胞的恶性改变未在DNA水平明显影响红系细胞的发展;另一方面,这也有助于鉴别诊断AML患者是否伴有PNH,因为典型的PNH患者都有明显的CD59缺陷的II型和/或III型细胞,表现为红系及有核细胞系的多系造血细胞GPI锚链合成障碍^[10]。由于本研究未纳入红白血病患者,因此未能对该类型患者的红系及有核细胞系进行评估,观察这类病人是否会同时出现红系和粒细胞、单核细胞系的GPI锚链合成障碍,这需要在下次研究中予以澄清。

通过本研究,我们了解到粒细胞、单核细胞等有核细胞系GPI锚链合成障碍在AML患者中是一种常见现象,尽管检测到的锚链缺陷克隆小于典型PNH患者。由于GPI锚链具有重要的生物学意义,因此,其缺陷对AML等疾病的病理生理有何影响值得深入地进行研究;同时也表明,对AML患者检测粒细胞、单核细胞的GPI锚链水平对于判断病情及评估预后可能具有重要的临床意义。

参考文献:

- [1] 龚亚文,何广胜.阵发性睡眠性血红蛋白尿症的临床进展[J].中国实验血液学杂志,2013,21(6):1627-1630.

(下转33页)

- fication of bacteria and its clinical significance[J]. World Notes on Antibiotics, 2003, 24(1): 18-20.
- [9] 吴敏. 粪肠球菌和屎肠球菌毒力基因、PAI 相关基因及耐药性分析[D]. 广州: 南方医科大学, 2008.
- WU Min. Presence of virulence genes, PAI-associated genes and antibiotic resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2008.
- [10] 邹绍伟, 王占黎, 王英, 等. 屎肠球菌和粪肠球菌多位点序列分析及耐药相关性研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(1): 22-26.
- ZOU Shaowei, WANG Zhanli, WANG Ying, et al. Multilocus sequence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and the relationship between sequence types and drug resistance[J]. Journal of Pathogenic Biology, 2018, 13(1): 22-26.
- [11] 赵娣, 段志刚, 崔新格, 等. 动物源粪肠球菌的遗传关系分析[J]. 农业科学, 2017, 7(2): 140-146.
- ZHAO Di, DUAN Zhigang, CUI Xinge, et al. MLST analysis of different sources of *Enterococcus faecalis* [J]. Agricultural Science, 2017, 7(2): 140-146.
- [12] KUCH A, WILLEMS R J L, WERNER G, et al. Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe[J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(3): 551-558.
- [13] KUDO M, NOMURA T, YOMODA S, et al. Nosocomial infection caused by vancomycin-susceptible multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* over a long period in a university hospital in Japan[J]. Microbiology & Immunology, 2015, 58(11): 607-614.
- [14] GHEBREMEDHIN B, IBUKUN A, ODUGBEMI T, et al. Clonal lineages of resistant (HLAR) & virulent *Enterococcus faecalis* isolates from diverse sources in Nigeria[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2014, 21(S1): 413.
- [16] 孙琅, 刘建华, 聂彤颖, 等. 万古霉素非敏感肠球菌的筛选和基因型分析[J]. 中国医药生物技术, 2016, 11(3): 206-215.
- SUN Lang, LIU Jianhua, NIE Tongying, et al. Screening and genotypic analysis of vancomycin-non-susceptible enterococci[J]. China Medical Biotechnology, 2016, 11(3): 206-215.
- 收稿日期: 2018-12-17 修回日期: 2018-12-28
- (上接 28 页)
- GONG Yawen, HE Guangsheng. Clinical progres of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. Journal of Experimental Hematology, 2013, 21(6): 1627-1630.
- [2] 梁悦怡, 谢守军. FLAER 多参数检测 PNH 克隆的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(8): 1139-1141.
- LIANG Yueyi, XIE Shoujun. Significance of FLAER multi-parameter detection of PNH cloning[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2016, 37(8): 1139-1141.
- [3] 刘淑媛, 万腊根, 闻芳, 等. FLAER 检测及其在阵发性睡眠性血红蛋白尿症诊断中的意义[J]. 实验与检验医学, 2015(1): 4-6, 15.
- LIU Shuyuan, WAN Lagen, WEN Fang, et al. Significance of FLAER detection in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. Experimental and Laboratory Medicine, 2015(1): 4-6, 15.
- [4] ALGHASHAM N, ABULKHAIR Y, KHALIL S. Flow cytometry screening for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: A single-center experience in Saudi Arabia[J]. Cytometry Part B Clinical Cytometry, 2015, 88(6): 389-394.
- [5] DAHMANI A, ROUDOT H, CYMBALISTA F, et al. Evaluation of fluorescently labeled aerolysin as a new kind of reagent for flow cytometry tests optimization of use of FLAER, hints, and limits[J]. American Journal of Clinical Pathology, 2016, 145(3): 407-417.
- [6] 韩秀蕊, 杨娣娣, 王九菊, 等. 136 例急性白血病免疫表型特点及临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(4): 91-93.
- HAN Xiurui, YANG Didi, WANG Jiu-ju, et al. Immunophenotypic characteristics and clinical significance of 136 patients with acute leukemia[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(4): 91-93.
- [7] 袁莉, 杨玉琮, 陈藏. 93 例急性白血病流式细胞术免疫分型的特点分析[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(2): 127-129.
- YUAN Li, YANG Yuzong, CHEN Wei. Analysis of immunophenotypic features by flow cytometer in 93 cases with acute leukemia[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(2): 127-129.
- [8] 杨柯, 郭晓宇, 欧剑锋, 等. 外周血粒细胞 CD55, CD59 和 FLAER 检测在贫血及 PNH 诊断中的意义[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(3): 6-10.
- YANG Ke, GUO Xiaoyu, OU Jianfeng, et al. Diagnostic significance of detecting peripheral blood granulocyte CD55, CD59 and FLAER in anemia and PNH [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(3): 6-10.
- [9] 谢亚荣, 任方刚, 张娜, 等. CD55 CD59 检测在阵发性睡眠性血红蛋白尿症诊断中的意义[J]. 中国药物与临床, 2016, 16(5): 756-758.
- XIE Yarong, REN Fanggang, ZHANG Na, et al. Significance of CD55 CD59 detection in the diagnosis of paroxysmal sleep hemoglobinuria[J]. Chinese Remedies and Clinical, 2016, 16(5): 756-758.
- [10] 赵阿兰, 陈智超, 张青艳, 等. 有核细胞嗜水气单胞菌溶素变异体流式法: 一种更敏感稳定的阵发性睡眠性血红蛋白尿症检测方法[J]. 临床内科杂志, 2013, 30(3): 199-202.
- ZHAO Alan, CHEN Zhichao, ZHANG Qing-yan, et al. Karyocyte base FLAER flow cytometry: a more stable and sensitive means to detect PNH[J]. Journal of Clinical Internal Medicine, 2013, 30(3): 199-202.
- 收稿日期: 2018-11-07 修回日期: 2018-12-19