

慢性淋巴细胞白血病骨髓细胞遗传学检测中添加脂多糖 提高核型分析效能的应用研究

华佳敏¹, 钱向雨¹, 王小钦², 徐玉兵¹ (1. 上海金域医学检验所有限公司细胞遗传室, 上海 201321; 2. 复旦大学附属华山医院血液科, 上海 200040)

摘要: **目的** 研究脂多糖(LPS)在慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞遗传学检测中的应用价值, 以期提高CLL的染色体核型分析效能。**方法** 选取2020年6月~2023年12月送检上海金域医学检验所有限公司的93例诊断为CLL的骨髓样本, 每例样本同期分别接种2种培养液, 对照组培养液中不含LPS, 实验组在培养液中添加LPS(83 μ g/ml), 采用G显带技术进行染色体核型分析。比较实验组与对照组的染色体培养成功率、异常核型检出率和复杂核型检出率。**结果** 实验组与对照组染色体培养成功率分别为91.40%、87.10%, 复杂核型检出率分别为18.82%、9.88%, 差异无统计学意义($\chi^2=0.90$ 、2.68, 均 $P>0.05$); 染色体异常核型检出率分别为56.47%、28.40%, 差异具有统计学意义($\chi^2=13.36$, $P=0.0003$)。5例核型异常样本同步做了荧光原位杂交(FISH)检测, 结果表明添加LPS的染色体核型分析异常结果与FISH检测结果一致。**结论** LPS刺激剂的添加可以提高CLL患者的染色体异常核型检出率, 并可检测到更多复杂核型, 为CLL的临床诊疗和预后分层提供更多有用的信息, 可在CLL的染色体核型分析中推广使用。

关键词: 慢性淋巴细胞白血病; 脂多糖; 细胞遗传学; 染色体核型分析

中图分类号: R557.4; Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2026)03-046-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2026.03.008

Application Study on the Addition of Lipopolysaccharide to Bone Marrow Cytogenetic Detection in Chronic Lymphocytic Leukemia to Enhance the Efficacy of Karyotype Analysis

HUA Jiamin¹, QIAN Xiangyu¹, WANG Xiaoqin², XU Yubing¹ [1. *Cytogenetics Laboratory, KingMed Diagnostics (Shanghai) Laboratory, Shanghai 201321, China*; 2. *Department of Hematology, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China*]

Abstract: **Objective** To investigate the application value of lipopolysaccharide (LPS) in cytogenetic detection of chronic lymphocytic leukemia (CLL), and improve the efficiency of chromosome karyotype analysis in CLL. **Methods** A total of 93 bone marrow samples diagnosed with CLL and submitted to KingMed Diagnostics Shanghai Laboratory from June 2020 to December 2023 were enrolled. Each sample was inoculated into two culture media simultaneously: the control medium without LPS, while the experimental medium supplemented with LPS (83 μ g/ml). Chromosome karyotype analysis was performed using G-banding technique. The culture success rate, detection rate of abnormal karyotypes, and detection rate of complex karyotypes were compared between the experimental group and the control group. **Results** The success rates of chromosome culture in the experimental group and the control group were 91.40% and 87.10%, respectively, and the detection rates of complex karyotypes were 18.82% and 9.88%, respectively, without statistically significant differences ($\chi^2=0.90$, 2.68, all $P > 0.05$). The detection rates of abnormal karyotypes were 56.47% and 28.40%, respectively, with a statistically significant difference ($\chi^2=13.36$, $P=0.0003$). Five samples with abnormal karyotypes were simultaneously detected by fluorescence in situ hybridization (FISH), and the results showed that the abnormal karyotypes identified by LPS stimulated chromosome analysis were consistent with FISH results. **Conclusions** Application of LPS can improve the detection rate of abnormal karyotypes for CLL, and help identify more complex karyotypes, providing more useful information for clinical diagnosis, treatment and prognosis stratification of CLL. LPS can be widely used in karyotype analysis for CLL.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia; lipopolysaccharide; cytogenetic; chromosome karyotype analysis

慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)是血液系统肿瘤,以淋巴细胞在外周血、骨髓、脾脏和淋巴聚集为特征,患者多为老年人,男性更多见,临床预后异质性较大。细胞遗传学异常为

作者简介: 华佳敏(1982-),女,本科,主管技师,研究方向:细胞遗传学, E-mail: 58680937@qq.com。

通讯作者: 王小钦(1968-),女,博士,主任医师,研究方向:血液肿瘤, E-mail: wangxiaoqin@shmu.edu.cn。

徐玉兵(1984-),男,本科,副主任技师,研究方向:医学检验, E-mail: sh-xuyubing@kingmed.com.cn, 同为通讯作者。

CLL的预后评估提供了重要信息^[1]。但是由于CLL细胞大多处于分裂间期,增殖能力较低^[2],不添加额外刺激剂所培养的CLL细胞分裂像较少,染色体核型分析异常检出率很低。荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术较核型分析异常检出率高,但其探针种类有限,无法检测到所有染色体的异常。因此,如何提高CLL染色体核型分析的异常检出率显得尤为重要。国外有一些实验室使用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激剂,并有报道^[3]添加LPS可以提高CLL染色体异常检出率,国内使用者甚少,尚未见报道。本研究拟对93例CLL样本使用LPS刺激剂进行培养,并将其培养成功率和异常检出率与对照组进行比较,分析LPS在CLL染色体核型分析中的效能和临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选取2020年6月~2023年12月期间送检上海金域医学检验所有限公司的临床诊断为CLL的骨髓样本。纳入标准:①初诊未治疗的CLL患者;②送检足量的骨髓样本。排除标准:①化疗后的CLL患者;②只有外周血样本;③骨髓标本量不足,不能同时接种2种培养液。符合以上标准的样本共93例,其中男性59例,女性34例,男女比例1.74:1。中位年龄68岁。每例样本同期分别接种2瓶培养液,将未添加LPS的设定为对照组,添加LPS的设定为实验组。本研究经过金域医学伦理委员会审批(伦理编号:2025065)

1.2 仪器与试剂 2406-2细胞培养箱(美国Sheldon Manufacturing, Inc), Ikaros染色体核型分析软件(德国Metasystems公司), LPS刺激剂(货号:L2880,美国Sigma-Aldrich公司),骨髓细胞培养基G(货号:12260-014,美国赛默飞世尔科技有限公司),骨髓细胞培养基U(规格:6 ml/瓶,青岛莱佛生物工程研究所)

1.3 方法

1.3.1 染色体核型分析:文献[3]报道添加LPS可以提高CLL染色体异常核型检出率,但浓度为40 μ g/ml时染色体异常检出率仅为12.5%。我们尝试将添加的LPS终浓度调整为文献报道的2倍,观察CLL的异常核型检出率能否有所改善。由于我们使用的骨髓培养液规格为6 ml/瓶,为了实验添加方便,每瓶培养基中加入100 μ l LPS刺激剂,则其终浓度为83 μ g/ml。抽取骨髓样本2~3 ml,肝素钠抗凝,按照(1~2) \times 10⁶/ml细胞密度接种,每例样本同时接种两瓶培养液,分别为对照组(常规骨髓细胞培养基G,不含LPS)和实验组(每6ml常规骨髓细胞培养基U中加入浓度为5mg/ml的LPS溶液100 μ l)。骨髓细胞培养液G的主要成分为条件培养液(来自基质细胞)、血清、L-谷氨酰胺。骨髓细胞培养液U的主要成分为RPMI1640

粉、血清和抗菌素。置于37 $^{\circ}$ C培养箱内,对照组样本培养48h,实验组样本培养72h。加入20 μ g/ml秋水仙素20 μ l混匀,继续培养2.5h,常规收获,制片,胰酶消化,吉姆萨染色。蔡司半自动扫描系统采集拍摄图像。按照行业标准,每例样本分析 \geq 20个分裂像,根据国际人类细胞遗传学命名系统《ISCN2020》^[4]写出核型结果。计算染色体培养成功率=(样本总数-培养失败样本数)/样本总数,染色体异常核型检出率=核型异常样本总数/(样本总数-培养失败样本数),复杂核型检出率=复杂核型样本总数/(样本总数-培养失败样本数)。

1.3.2 FISH检测:5例核型分析结果异常的样本同时做FISH检测。同时使用CEP12、ATM/CEP11、TP53/CEP17和RB1四种探针,常规FISH实验操作,每种探针镜下分析500个间期细胞,计算阳性细胞百分比。阳性细胞比率大于正常域值者为阳性。CEP12、ATM/CEP11、TP53/CEP17和RB1四种探针的cut off值分别为2.0%、4.0%、4.5%、4.5%。

1.4 统计学分析 采用STATA11.0统计软件,以百分比(%)表示染色体培养成功率、异常核型检出率和复杂核型检出率。实验组和对照组之间的比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓染色体培养成功率比较 93例未添加LPS的对照组样本中,12例样本培养失败,染色体培养成功率为87.10%(81/93)。93例添加LPS的实验组样本中,8例样本培养失败,培养成功率达到91.40%(85/93),实验组培养成功率略有提高,但是差异无统计学意义($\chi^2=0.90, P=0.34$)。

2.2 染色体异常核型检出率比较 93例对照组样本中检出异常核型23例,异常核型检出率为28.40%(23/81)。93例实验组样本中检出异常核型48例,异常核型检出率为56.47%(48/85)。实验组异常核型检出率显著高于对照组,差异具有统计学意义($\chi^2=13.36, P=0.0003$)。在对照组未检测到异常核型的25例样本中,其中4例为样本培养失败,21例检测结果为正常核型。但在同期的实验组样本中检测到了+12、t(14; 18)、11q-、17p-、复杂核型等CLL中常见的染色体异常。

实验组检测到的染色体异常涉及所有23对染色体。检出12号染色体三体总共15例,占比17.65%(15/85); t(14; 18)总共6例,占比7.06%(6/85); 存在17p-/17共6例,占比7.06%(6/85); 13q-/13共4例,占比4.71%(4/85); 11q-/11共7例,占比8.24%(7/85); t(14; 19)1例,占比1.18%(1/85)。检测到的其他染色体异常按照出现的频率依次为7号染色体长臂缺失4例; 2、3号染色体短臂缺失各3例; 6号染色体长臂缺失3例; 丢失4、9、22号染色

体各3例; X、12号染色体长臂缺失各2例; 丢失21号染色体2例; 7、8号染色体短臂缺失各1例; 其他免疫球蛋白重链(IGH)重排1例; 丢失X染色体1例; 额外获得一条X、3、7、15、20号染色体各一例; der(13;14)(q10;q10)、der(13;17)(q10;q10)、der(Y;22)(q10;q10)各一例; inv(3)、i(8)(q10)、dic(17;18)(p11.2;p11.2)各一例; 平衡易位还包括t(1;17)、t(13;18)、t(4;13;14)、t(18;22)、t(1;22)、t(2;14)、t(1;6)、t(2;7)、t(15;16)各一例。

2.3 复杂核型检出率比较 实验组样本中检出 ≥ 3 种异常的复杂核型总共16例, 复杂核型检出率为18.82%(16/85)。而对照组样本中检出复杂核型8例, 复杂核型检出率仅为9.88%(8/81), 实验组复杂核型检出率明显高于对照组, 但是因为样本量偏小, 所以差异无统计学意义($\chi^2=2.68, P=0.10$)。在8例对照组未检出复杂核型的样本中, 其中1例是样本培养失败, 7例是正常核型, 但是实验组样本均检出复杂核型, 而且检测到几乎所有23对染色体数目或结构异常。

2.4 染色体检查结果与FISH检测结果的比较 与FISH检测结果比对的5例样本中, 有3例核型分析结果中存在12号染色体三体, FISH检测结果均为12号染色体三体阳性。1例染色体核型分析结果中存在11q-, FISH检测结果为ATM基因缺失阳性。1例染色体核型分析结果中存在17p-, FISH检测结果为TP53基因缺失。结果表明添加LPS刺激剂检测到的染色体核型异常结果与FISH检测结果一致。

3 讨论

CLL是一种具有特定免疫表型特征的成熟B淋巴细胞克隆增殖性肿瘤。一般CLL患者的中位生存期约10年, 但不同个体之间预后存在高度异质性。因此, 准确地评估CLL患者的预后显得尤为重要。细胞遗传学异常与CLL患者的诊断、预后及治疗存在密切的联系, 是CLL危险度分层的主要因素, 是关键预后标记物^[5-6], 也是与患者治疗方案密切相关的参考指标。FISH可以检测微小异常、小克隆和间期分裂像, 异常检出率大于常规染色体核型分析。但是FISH探针种类有限, 无法检测所有23对染色体的整体情况, 对于复杂核型的检出十分有限, 因此还需要结合染色体核型分析的结果对患者预后进行综合评估。由于CLL细胞为终末期细胞, 有丝分裂活性较低, 如果仅使用常规培养基, CLL的染色体培养成功率、异常检出率较低, 需要添加额外刺激剂进行改善。LPS是革兰氏阴性菌细胞壁中的一种特有成分, 其在结构上是由类脂A、核心多糖和O-多糖侧链组成的。大肠埃希菌的脂多糖是一种常用的B细胞促分裂因子, 即多克隆活化因子。脂多糖是一种有丝分裂原, 可以刺激B淋巴细胞转化为淋巴母细胞, 促使细胞增值分裂。

我们的研究结果发现添加LPS的实验组样本培养成功率略高于对照组(91.40% vs 87.10%)。实验组样本异常核型检出率显著高于对照组(56.47% vs 28.40%), 复杂核型检出率也高于对照组(18.82% vs 9.88%)。在25例对照组未检出异常核型的标本中, 实验组检测到了+12、t(14;18)、11q-、17p-、复杂核型等CLL中常见染色体异常。单独存在12号染色体三体的CLL患者预后中等^[7]。del(11q)是未经治疗的CLL患者预后不良因素, 伴有ATM基因的缺失提示疾病进展迅速^[8-9]。单纯伴有del(13q)往往提示CLL预后良好^[8]。目前有文献认为t(14;18)在CLL中预后良好^[10]。伴t(14;19)的CLL预后分层多为中高危, 有着较强的疾病侵袭性^[11]。存在17p-的患者预后最差^[12]。存在染色体复杂核型的CLL患者预后同样最差^[12]。总生存期(OS)和首次治疗时间(TTFT)明显缩短^[13]。具有复杂核型的CLL患者具有更短的无治疗生存期(TFS)^[14]。复杂核型是影响CLL患者无进展生存期(PFS)的不利因素, 是免疫化疗时代与生存有关的预后不良因素^[15]。伴有t(18;22)的CLL可能具有难治性和易复发等特点^[10]。根据预后评估标准, 添加了LPS后这25例样本中的10例可被归为预后不良组。表明添加LPS刺激剂不仅可以提高CLL的培养成功率, 还可以提高CLL患者的异常核型检出率和复杂核型检出率, 为CLL的临床诊治及预后分层提供更多有价值的信息。

国外有文献[3]报道常规外周血样本培养24 h, CLL染色体异常检出率为0, 添加LPS培养72 h可以提高异常检出率, 但异常检出率仅为12.5%, 分析检出率低的原因可能是其添加LPS的终浓度较低, 仅为40 $\mu\text{g/ml}$ 。在我们的研究中, 采用骨髓样本, 并上调LPS的终浓度至83 $\mu\text{g/ml}$, 培养72 h, 异常核型检出率为56.47%。文献[13]报道佛波醇酯TPA刺激剂可以使CLL异常核型检出率提高至38%~70%, 但由于TPA有毒性, 不适合实验室常规使用。CpG寡脱氧核苷酸联合IL-2同样可以提高CLL异常检出率, 目前国内相关文献^[13, 16-17]报道的异常检出率在46.40%~60.71%。但目前其使用成本仍较高, 每例样本添加CpG寡脱氧核苷酸联合IL-2的成本约为100元, 而LPS仅需约10元。因此, LPS可能是性价比相对更高, 也是更安全的选择。

本研究也存在一些局限性。由于CLL异质性比较大, 本研究的样本量还是偏少, 所以有的数据虽然有明显差异, 但差异无统计学意义。考虑到临床检测成本等问题, 我们未做浓度梯度的验证, 更高浓度是否有更好的效果还需进一步探索。

总之, 本研究结果表明脂多糖的使用可以提高CLL患者染色体核型分析的培养成功率, 同时更能提高CLL的异常检出率, 并能检出更多复杂核型,

与FISH检测相结合,可以为CLL的临床诊断、治疗及预后评估提供更全面准确的信息,临床可以在CLL的染色体核型分析实验中推广使用。

参考文献:

- [1] 张菁,仇海荣,杨慧,等. 伴t(14;18)(q32;q21)的慢性淋巴细胞白血病八例报告并文献复习[J]. 中华血液学杂志, 2021, 42(7): 577-582.
ZHANG J, QIU H R, YANG H, et al. Chronic lymphocytic leukemia with t(14;18)(q32;q21): report of eight cases and a literature review[J]. Chinese Journal of Hematology, 2021, 42(7): 577-582.
- [2] 张海英,杨艳丽,赵强,等. 荧光原位杂交技术检测慢性淋巴细胞白血病分子遗传学异常[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(5): 1474-1479.
ZHANG H Y, YANG Y L, ZHAO Q, et al. Fluorescence in situ hybridization for detecting molecular cytogenetic abnormalities of chronic lymphocytic leukemia [J]. Journal of Experimental Hematology, 2020, 28(5): 1474-1479.
- [3] WREN C, MORIARTY H, MARSDEN K, et al. Cytogenetic investigations of chronic lymphocytic leukemia[J]. Cancer Genetics and Cytogenetics, 2010, 198(2): 155-161.
- [4] MCGOWAN-JORDAN J, HASTINGS R J, MOORE S. ISCN 2020: An international system for human cytogenomic nomenclature[M]. Basel: Karger Publishers, 2020.
- [5] 李丹,曹苏娟,李洵婷,等. FISH检测慢性淋巴细胞白血病染色体异常及与疾病进展预后关系分析[J]. 基层医学论坛, 2022, 26(4): 17-19.
LI D, CAO S J, LI X T, et al. Detecting chromosomal abnormalities of chronic lymphocytic leukemia by FISH and analyzing the relationship of these abnormalities with disease progression and prognosis[J]. The Medical Forum, 2022, 26(4): 17-19.
- [6] 曾睿,胡欣婷,云晓雅,等. 荧光原位杂交对197例慢性淋巴细胞白血病的诊断[J]. 山东大学学报(医学版), 2021, 59(11): 35-40.
ZENG R, HU X T, YUN X Y, et al. Fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of 197 cases of chronic lymphocytic leukemia[J]. Journal of Shandong University (Health Science), 2021, 59(11): 35-40.
- [7] WIERDA W G, BROWN J, ABRAMSON J S, et al. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma, version 2.2024, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 2024, 22(3): 175-204.
- [8] 孙峰,温慧灵,宋国齐,等. 慢性淋巴细胞白血病患者的临床和分子遗传学研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2022, 42(1): 53-57, 89.
SUN F, WENG H L, SONG G Q, et al. Molecular cytogenetic and clinical study of chronic lymphocytic leukemia[J]. Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences), 2022, 42(1): 53-57, 89.
- [9] ZOU Y X, TANG H N, ZHANG J, et al. Low prevalence and independent prognostic role of del(11q) in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia[J]. Translational Oncology, 2021, 14(10): 101176.
- [10] 向鑫,刘恒芳,曾招,等. 三例伴有t(18;22)(q21;q11)慢性淋巴细胞白血病的细胞及分子遗传学研究[J]. 临床输血与检验, 2021, 23(4): 473-478.
XIANG X, LIU H F, ZENG Z, et al. Cytogenetic and molecular genetic studies on chronic lymphocytic leukemia with t(18;22)(q21;q11): three cases[J]. Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine, 2021, 23(4): 473-478.
- [11] 杨慧,郭睿,时雨,等. 伴t(14;19)(q32;q13)小B淋巴细胞增殖性疾病20例临床分析[J]. 中华血液学杂志, 2022, 43(8): 674-679.
YANG H, GUO R, SHI Y, et al. Clinical analysis of 20 cases of small B lymphocyte proliferative disease with t(14;19)(q32;q13)[J]. Chinese Journal of Hematology, 2022, 43(8): 674-679.
- [12] 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会,中华医学会血液学分会,中国慢性淋巴细胞白血病工作组. 中国慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤的诊断与治疗指南(2025年版)[J]. 中华血液学杂志, 2025, 46(2): 105-112.
Hematological Oncology Committee of China Anti-Cancer Association, Hematology Committee of Chinese Medical Association, Chinese Working Group for Chronic Lymphocytic Leukemia. The guidelines for diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma in China (2025)[J]. Chinese Journal of Hematology, 2025, 46(2): 105-112.
- [13] 刘恒芳,黄海雯,白淑潇,等. DSP30和IL-2在慢性淋巴细胞白血病常规染色体检测中的应用[J]. 中华血液学杂志, 2020, 41(2): 143-148.
LIU H F, HUANG H W, BAI S X, et al. Chromosomal aberrations detection in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using DSP30 and IL-2[J]. Chinese Journal of Hematology, 2020, 41(2): 143-148.
- [14] CHATZIKONSTANTINOUS T, DEMOSTHENOUS C, BALIAKAS P. Biology and treatment of high-risk CLL: significance of complex karyotype[J]. Frontiers in Oncology, 2021, 11: 788761.
- [15] 马兰,李艳,王继军,等. 慢性淋巴细胞白血病患者临床特征及长期生存分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2023, 31(5): 1345-1351.
MA L, LI Y, WANG J J, et al. Clinical characteristics and long-term survival of patients with chronic lymphocytic leukemia[J]. Journal of Experimental Hematology, 2023, 31(5): 1345-1351.
- [16] 买地娜·艾尔肯,刘虹,王-林,等. CpG-寡核苷酸免疫刺激法在慢性淋巴细胞白血病遗传学研究中的应用[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(2): 470-475.
MAIDINA·A E K, LIU H, WANG Y L, et al. Application of CpG oligodeoxynucleotide immunostimulation in chromosome study of chronic lymphoblastic leukemia[J]. Journal of Experimental Hematology, 2020, 28(2): 470-475.
- [17] 贾晓冬,李建伟,毛翠. CpG-ODN DSP30联合IL-2刺激在慢性B淋巴细胞增殖性疾病细胞遗传学检测中的临床价值[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(14): 2048-2052.
JIA X D, LI J W, MAO C. Clinical value of CpG-ODN DSP30 combined with IL-2 immune stimulation in cytogenetic detection of B-cell chronic lymphoproliferative disorders[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2023, 20(14): 2048-2052.

收稿日期: 2025-05-28

修回日期: 2025-10-12