

[7] Kang CP, Lee HS, Ju H, et al. A functional haplotype of the *PADI4* gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(1): 90-96.

[8] Hoppe B, Häupl T, Gruber R, et al. Detailed analysis of the variability of peptidylarginine deiminase type 4 in German patients with rheumatoid arthritis: a case-control study[J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(2): R34.

[9] Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, et al. Replications of putative candidate-gene association with rheumatoid arthritis in > 4 000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with *PTPN22*, *CTLA4*, and *PADI4* [J]. *Am J Hum Genet*, 2005, 77(6): 1044-1060.

[10] Harney SM, Meisel C, Sims AM, et al. Genetic and genomic studies of *PADI4* in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 44(7): 869-872.

[11] Caponi L, Ptit-Teixeira E, Sebbag M, et al. A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the *PADI4* gene in a white French population[J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(4): 587-593.

[12] Lee YH, Rho YH, Choi SJ, et al. *PADI4* polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis[J]. *Rheumatol Int*, 2007, 27(4): 827-833.

[13] Burr ML, Naseem H, Hinks A, et al. *PADI4* genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(4): 666-670.

[14] Freudenberg J, Lee HS, Han BG, et al. Genome-wide association study of rheumatoid arthritis in Korea: population-specific loci as well as overlap with European susceptibility loci [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(4): 884-893.

[15] 冯忠军, 梁芸, 闻海丰, 等. 中国河北地区汉族健康人与 RA 患者 *PADI4*₉₄ 单核苷酸多态性的研究[J]. *临床检验杂志*, 2009, 27(2): 97-99.

[16] 钟兵, 方勇飞, 李华, 等. *PADI4* 基因多态性与类风湿关节炎的相关性研究[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(11): 1155-1157.

[17] Takizawa Y, Sawada T, Suzuki A, et al. Peptidylarginine deiminase 4 (*PADI4*) identified as a conformation-dependent autoantigen in rheumatoid arthritis[J]. *Scand J Rheumatol*, 2005, 34(3): 212-215.

[18] Kapitany A, Szabo Z, Lakos G, et al. Associations between serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in Hungarian patients with rheumatoid arthritis[J]. *Isr Med Assoc J*, 2008, 10(1): 32-36.

[19] 常丽丽, 刘雁鹰, 粟占国. RA 患者易感基因肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 mRNA 的表达及其意义[J]. *中华风湿病学杂志*, 2007, 11(11): 641-644.

[20] 赵金霞, 何菁, 贾汝琳, 等. 抗 *PADI4* 抗体检测方法的建立及其在类风湿性关节炎中的临床意义[J]. *中华风湿病学杂志*, 2008, 12(1): 4-8.

[21] 史恒星, 钱龙, 李向培, 等. 血清抗肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 抗体检测在类风湿性关节炎诊断中的意义[J]. *免疫学杂志*, 2010, 2(4): 329-332.

[22] Chang X, Yamada R, Sawada T, et al. The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 44(3): 293-298.

[23] Lundberg K, Nijenhuis S, Vossenaar ER, et al. Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity[J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(3): R458-467.

[24] Bang SY, Han TU, Choi CB, et al. Peptidylarginine deiminase type IV (*PADI4*) haplotypes interact with shared epitope regardless of anti-cyclic citrullinated peptide antibody or erosive joint status in rheumatoid arthritis: a case control study[J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(3): R115.

[25] Kochi Y, Thabet MM, Suzuki A, et al. *PADI4* polymorphism predisposes male smokers to rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(3): 512-515.

(收稿日期: 2011-05-15)

流式细胞免疫分型在临床的应用研究

周萍 综述, 唐吉斌 审校

(安徽省铜陵市人民医院临床检验中心 244009)

关键词: 研究; 细胞分化抗原群; 流式细胞术; 免疫分型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.16.032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)16-1854-03

流式细胞仪的应用对白血病、淋巴瘤等血液系统疾病的分型、诊断、治疗及预后判断均有重要作用, 本文就流式细胞免疫分型在临床中的应用进行简要综述。

1 免疫分型的应用基础

血细胞在分化的不同阶段及细胞活化的过程中出现或消失的细胞表面抗原分子统称细胞分化群(cluster of differentiation, CD)。在白细胞系、红细胞系、巨核细胞系、血小板及非造血细胞均有不同的分化抗原簇表达, 分布在细胞膜、细胞质中。血液肿瘤细胞的特征是丧失了正常细胞的系列专一性和分化阶段的规律性, 因此, 运用流式细胞术(flow cytometry, FCM)将具有系列特异性并涵盖不同分化阶段的单克隆抗体作为分

子探针来检测血液肿瘤细胞的内外抗原可以反映其本质上与正常造血细胞的差异^[1], 对确定其来源和分化阶段、判断微量残留病变的存在及推测预后均有价值。FCM是以流式细胞仪和荧光素标记的单克隆抗体作为工具来分析异常细胞群体, 针对不同疾病采用不同设门策略^[2], 如在急性白血病中采用CD45/SSC设门法可以将分化程度低的白血病细胞(CD45低表达)与正常细胞(CD45高表达)区分开; 在B细胞淋巴瘤中用一个全B细胞的抗体来分析抗κ链和抗λ链; T细胞淋巴瘤时用一个全T细胞抗体设门来精确分型肿瘤细胞。相对于传统的免疫组化染色技术, FCM能对血液肿瘤细胞同时进行多重抗体标记, 因此具有快速、简便、客观、多参数定量分析等优

势,目前在临床上已经广泛应用于细胞分析和细胞分选。

2 确定淋巴系肿瘤细胞的来源和分化程度

世界卫生组织(WHO)对淋巴系肿瘤依据细胞形态、免疫表型、分子遗传学结合临床特征的分型体系确立了免疫分型为其重要的辅助诊断工具^[3]。淋巴系肿瘤按淋巴细胞的来源分为 B 细胞和 T/自然杀伤(NK)细胞两大类,再根据细胞成熟程度进一步分为前驱淋巴瘤/急性淋巴细胞白血病(LBL/ALL)、成熟淋巴细胞(B/T/NK 细胞)肿瘤。

2.1 T 细胞系 T 细胞早期阶段肿瘤(T-LBL、T-ALL)表达 T 细胞抗原 cCD3、CD7、CD5、CD2、CD4/CD8 共同表达和非系列相关性早期抗原 TdT、CD34、HLA-DR,但早期抗原的表达率相对较低^[4]。T-ALL 骨髓系抗原表达以 CD33 最常见,其次为 CD13 和 CD117。目前,CD7、cCD3 和 TdT 已作为检测 T-ALL 微小残留病变的主要抗体。T 细胞发育后期肿瘤(外周 T 细胞淋巴瘤)则早期抗原 TdT、CD34、HLA-DR 阴性,CD3、CD7、CD5、CD4 或 CD8 阳性。

2.2 B 细胞系 B 细胞早期阶段肿瘤(B-LBL、早 B-前体 ALL、前 B-ALL)表达 B 细胞抗原 CD19、cCD79a、CD10、CD22、CD20 和早期抗原 TdT、HLA-DR、CD34^[5]。B 细胞发育后期肿瘤(B-ALL、CLL、滤泡性淋巴瘤、Burkitt 淋巴瘤、弥漫大 B 细胞淋巴瘤等)早期抗原 TdT、HLA-DR、CD34 阴性,B 细胞抗原 CD19、CD20、cCD79a、SIgM 阳性以及 Kappa 和 Lambda 轻链的单一抑制性表达^[6]。B-ALL 骨髓系抗原表达主要为 CD13、CD33。在成熟 B 淋巴细胞肿瘤中,肿瘤细胞与正常淋巴细胞(反应性 B 淋巴细胞)相比不仅有免疫球蛋白的轻链限制还有异常抗原的表达如 bcl-2 和 CD10 的共表达、CD5 阳性的 B 细胞同时有着 B 细胞系列相关抗原染色强度的改变等^[7],因此,具体分类不仅要考虑 B 细胞抗原的表达特点(有无典型表型及表达强弱),而且需要结合形态学特征及细胞遗传学检查。

3 诊断形态学分型难以分类的急性髓系白血病

1976 年,法、美、英协作组(FAB)提出的形态学分型标准是急性白血病的诊断、分型的主要依据,但对形态不典型、化学染色不特异的类型,结合免疫分型是正确诊断所必不可少的。AML-M0 型(微分化型)的白血病细胞的形态及染色与 ALL 不易区分,不表达 T、B 淋巴系抗原,至少表达一个髓特异性单抗(CD13、CD33、MPO)或超微结构 MPO 阳性,常表达 HLA-DR、CD34 等干/祖系标志。AML-M3 型(急性早幼粒细胞白血病)典型的免疫表型为:高表达 CD13、CD33、CD117,很少表达 CD34 和 HLA-DR。有报道 CD123 作为急性髓系白血病干细胞的一个标志,在正常造血干细胞极少表达,而在 M3 型白血病细胞上,CD123、CD33 和 CD9 的阳性表达率很高,而且阳性细胞的比例也高,在 90% 左右且分布一致,因此 CD123、CD33 和 CD9 更适合于 M3 的 MRD 检测^[8-9]。在形态学难以区分 M2 型和 M3 型的病例中,表达 CD33 为均一性强阳性,且 CD34 和 HLA-DR 共阴性并不伴有 CD2 以外的淋巴系抗原的表达时,M3 型的可能性更大^[10-11]。在 AML 中,对于相对较少见且依据单纯形态学诊断有困难的 M6 型(红白血病)和 M7 型(急性巨核细胞白血病),检测其特异性抗原血型糖蛋白 A(GPA)和血小板糖蛋白(CD41、CD42b、CD61)有重要的诊断价值。

4 诊断其他少见类型的急性白血病

急性未分化型白血病(AUL)的白血病细胞分化差,形态

学和细胞化学染色与 ALL 相似,高表达 HLA-DR、CD34、CD38、CD7(T 系定向祖细胞)等干/祖系标志而不表达其他系列特异或系列相关抗原,从而区别于其他分化较差的急性白血病。急性混合细胞白血病(MAL)包括双表型、双系列型和系列转换型。对于确定白血病细胞是同时表达淋巴细胞系和髓细胞系特征(双表型)还是一部分表达淋巴细胞系,另一部分表达髓细胞系特征(双系列型)或是由一系列向另一系列转换(系列转换型),免疫分型是诊断的重要手段。在双表型病例中,B 淋巴系、髓系共同表达多于 T 淋巴系、髓系共同表达,B/T 淋巴系或上述三系共同表达者最少^[12]。目前,诊断 MAL 依据欧洲白血病免疫特征研究组(EGIL)标准^[13]。

5 检测微小残留病变

微小残留病变(MRD)是急性白血病复发的根源。FCM 检测 MRD 的诊断分型基础是白血病细胞的相关免疫表型(LAIP),LAIP 即白血病细胞所具有的而在正常骨髓和外周血细胞中不具备或表达量极低的免疫表型,主要包括 4 种类型:抗原跨系列表达、不同步表达、过度表达及表达缺失^[14]。LAIP 用于 MRD 的检测具有适应性广的特点,体现于采用大的抗体组合及多参数 FCM 分析几乎在所有的急性白血病(AL)中都可检出 LAIP^[15]。Buccisano 等^[16]研究认为,诱导缓解后 MRD 和预后关系不大,巩固治疗后 MRD 是 AL 一个独立的预后因素, 3.5×10^{-4} MRD 域值水平可作为预后判断指标。

6 辅助诊断多发性骨髓瘤

虽然骨髓瘤细胞来源于 B 细胞,但几乎不表达正常 B 细胞抗原,正常效应 B 细胞几乎全部为 CD19 阳性、CD56 阴性,而骨髓瘤细胞 CD19 阴性 CD56 阳性,因此,CD56 是区分良、恶性效应 B 细胞的重要标志^[17]。大部分多发性骨髓瘤(MM)的免疫表型为:CD38、CD138 和 CD56 阳性,CD45 阴性/弱阳性,CD19 阴性。有报道 CD117 阳性的 MM 患者预后较好,而 CD117 阴性患者多存在染色体易位 t(4;14)^[18]。另有报道 CD200 阴性者无病生存期(EFS)较阳性者延长,因此是 MM 患者 EFS 的独立危险因素^[19]。

7 辅助诊断骨髓增生异常综合征

骨髓增生异常综合征(MDS)以血细胞减少和一系或多系的病态造血,表现是非特异性的,但由于其本质是克隆性血液系统疾病,通过 FCM 多抗体组合检测幼稚细胞群、成熟粒细胞和单核细胞群可以发现其不同于良性血液病的免疫表型。其异常抗原表达可归纳为 5 类:抗原跨系表达异常、跨阶段表达异常、抗原表达缺失、成熟粒细胞抗原分化异常、幼稚细胞群和成熟粒细胞群 CD45/SSC 异常。抗原跨系表达以幼稚细胞表达 CD7 和成熟粒细胞群表达 CD38、CD56 为多见,跨阶段表达异常以幼稚细胞群 CD34⁺ CD11b⁺ 和 CD34⁺ CD15⁺ 等多见^[20]。表达缺失如幼稚细胞群 CD33 表达缺失、成熟粒细胞群 CD10 表达缺失等。应用 FCM 对形态学不典型及无异常染色体核型的 MDS 免疫表型分析对其诊断具有独特优势。

8 结语与展望

目前,流式细胞免疫分型不仅普遍应用于白血病等临床血液系统肿瘤的诊断、治疗和预后判断,而且对出凝血和血栓性疾病(血小板功能缺陷性疾病等)及红细胞系统疾病(再生障碍性贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿症等)的诊断有着重要的意义和进一步的研究价值^[21]。随着新的单克隆抗体和多参数分

析技术的发展, FCM 将更加广泛地应用于肿瘤细胞 DNA 含量及细胞周期分析、耐药基因分析以及免疫学、病理学、男科学、微生物学等更多的临床医学领域^[22-23]。

参考文献

[1] Ichinohasama R, DeCoteau JF, Myers J, et al. Three color flow cytometry in the diagnosis of malignant lymphoma based on the comparative cell morphology of lymphoma cells and reactive lymphocytes[J]. *Leukemia*, 1997, 11(11): 1891-1903.

[2] 许文荣, 王建中. 临床血液学与检验[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 124.

[3] Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. Health organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues[M]. Lyon: IARC Press, 2001: 12-13.

[4] 凌家瑜, 孙晓非, 严苏丽, 等. 112 例淋巴系统恶性肿瘤骨髓免疫表型分析[J]. *癌症*, 2007, 26(4): 418-422.

[5] 许艳丽, 李庆山, 杜庆华, 等. 胞膜和胞浆分化抗原联合检测在儿童白血病免疫分型中的意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2007, 28(2): 134-135.

[6] 任立群, 薛丽燕, 毕蕊, 等. 流式细胞免疫表型分析在恶性淋巴瘤诊断中的应用[J]. *中华血液学杂志*, 2007, 28(10): 674-675.

[7] 于亚平. 流式细胞仪免疫分型在 B 细胞淋巴瘤诊断中的应用[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(3): 579-580.

[8] Munoz L, Nomdedeu JF, Lóopez O, et al. Interleukin-3 receptor α chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies[J]. *Haematologica*, 2001, 86(12): 1261-1269.

[9] 王亚哲, 秦亚溱, 江滨, 等. 221 例急性早幼粒细胞白血病免疫表型特点与微小残留病变检测及基因标志的关系[J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(2): 274-275.

[10] 孙海敏, 钱思轩, 吴雨洁, 等. 急性早幼粒细胞白血病 143 例免疫表型研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(1): 178-179.

[11] 许艳丽, 杜庆华, 毛平, 等. 50 例急性早幼粒细胞白血病流式免疫表型结果分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 30(12): 1194-1195.

[12] Killick S, Matutes E, Powles RL, et al. Outcome of biphenotypic acute leukemia[J]. *Haematologica*, 1999, 84(8): 699-706.

[13] Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias (EGIL)[J]. *Leukemia*, 1995, 9(10): 1783-1786.

[14] Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry[J]. *Cytometry*, 1999, 38(14): 139-152.

[15] Oлару D, Campos L, Flandrin P, et al. Multiparametric analysis of normal and postchemotherapy bone marrow: implication for the detection of leukemia-associated immunophenotypes[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008, 74(1): 17-24.

[16] Buccisano F, Maurillo L, Gattei V, et al. The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts on duration of response and survival of patients with acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2006, 20(10): 1783-1789.

[17] Sahara N, Takeshita A, Shigeno K, et al. Chnicipathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma [J]. *Br J Haematol*, 2002, 11(4): 882-885.

[18] Bataille R, Pellat-Deceunynck C, Robillard N, et al. CD117(c-kit) is aberrantly expressed in a subset of MGUS and multiple myeloma with unexpectedly good prognosis[J]. *Leuk Res*, 2008, 32(3): 379-382.

[19] Moreaux J, Hose D, Reme T, et al. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2006, 108(13): 4194-4197.

[20] 郭轶先, 孙雪静, 路继莲, 等. 87 例骨髓增生异常综合征多参数流式细胞术免疫表型分析[J]. *内科危急重症杂志*, 2009, 15(5): 241-244.

[21] 欧阳红梅, 张芹, 甸自金, 等. CD55、CD59 在健康者红细胞及中性粒细胞上表达的研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(2): 109-110.

[22] 莫扬, 许小东. 流式细胞术检测体液 T 淋巴细胞亚群的临床应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(1): 50-51.

[23] 朱宇芳. 流式细胞术检测人类白细胞抗原-B27 在诊断强直性脊柱炎中的价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(7): 735-736.

(收稿日期: 2011-05-20)

• 综 述 •

Th17/Treg 在肝脏疾病中的作用研究进展

黄 勇¹, 朱争艳²综述, 杜 智^{3△}审校

(1. 天津医科大学研究生院胆外科 300070; 天津市第三中心医院; 2. 人工细胞重点实验室/再生医学与疾病生物治疗工程研究中心; 3. 肝胆外科 300070)

关键词: 动态平衡; 肝; 免疫; Th17; Treg

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.16.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)16-1856-03

辅助性 T 细胞 17(Th17)与调节性 T 细胞(Treg)细胞有着密切而又复杂的关系,介导炎性反应的 Th17 与介导免疫耐受的 Treg 具有共同的起源,都来源于初始 T 细胞,它们表面的大部分趋化受体均相同^[1],但两者的功能和分化过程相互对抗,抑制 Th17 产生可以促进 Treg 的分化、发育。在正常情况下两者保持动态平衡,有利于机体免疫稳定状态的维持使机体

产生适当强度的免疫反应。它们之间平衡的打破可能是多种疾病发生的关键因素,本文就 Th17 及 Treg 细胞的功能及其分泌的细胞因子在肝脏疾病中的作用作一综述。

1 Th17 细胞

Th17 细胞是近年发现的一种 CD4⁺ T 细胞亚群,其分泌的细胞因子及其功能明显不同于传统的 Th1、Th2 亚群,具有

△ 通讯作者, E-mail: zhi-du@163.com.