

• 论 著 •

## 93 例 B 细胞非霍奇金淋巴瘤患者骨髓受累的诊断分析\*

乔文斌, 冶 薇, 黄艳春<sup>△</sup>

(新疆医科大学附属肿瘤医院检验科, 新疆乌鲁木齐 830011)

**摘要:**目的 探讨骨髓细胞形态学与流式细胞在检测 B 细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)骨髓受累中的价值。方法 B-NHL 患者同时做骨髓涂片和流式细胞检测。骨髓涂片经瑞氏吉姆萨染色, 分类计数骨髓细胞; 流式细胞检测先处理样本后加荧光染色, 上机处理。结果 93 例 B-NHL 患者经骨髓涂片检测阳性者为 11 例, 阳性率为 11.8%; 经流式细胞检测阳性者为 27 例, 阳性率为 29.0%, 两种方法比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在 11 例骨髓涂片阳性的样本中, 有 1 例经流式细胞检测为阴性。结论 骨髓涂片和流式细胞检测都是诊断 B-NHL 骨髓受累的重要方法, 两者各有优势, 联合运用两种方法可为诊断 B-NHL 骨髓受累提供更准确的依据。

**关键词:**非霍奇金淋巴瘤; 流式细胞检测; 骨髓受累

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.09.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)09-1175-03

### The analyse of examining the bone marrow involvement in ninety-three patients of non-Hodgkin's lymphoma\*

Qiao Wenbin, Ye Wei, Huang Yanchun<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

**Abstract: Objective** To explore the value of combined detection of bone marrow smear(BMS) and flow cytometry(FCM) to examine bone marrow involvement(BMI) of B cell non-Hodgkin's lymphoma(B-NHL). **Methods** Patients with B-NHL were detected by BMS and FCM simultaneously. Smears were stained with Wright-Giemsa's staining to differentially count neoplastic cells and the processed sample with fluorescent staining for the FCM. **Results** 93 cases of patients with B-NHL were detected. The detection rate of BMS and FCM were 11.8% and 29.0%. There was statistical difference of detection rate between the two method( $P < 0.05$ ). In 11 cases patients of BMI with the method of BMS, while using the method of FCM 10 cases were positive. **Conclusion** Both BMS and FCM are useful to diagnose BMI of B-NHL, each of them has individual characteristics. Combined detection of these two methods can increase the diagnostic of BMI.

**Key words:** non-Hodgkin's lymphoma; flow cytometry; bone marrow involvement

恶性淋巴瘤是一组起源于淋巴结和(或)结外部位淋巴组织的恶性肿瘤, 分为霍奇金淋巴瘤(HL)及非霍奇金淋巴瘤(NHL)。B 细胞 NHL(B-NHL)是 NHL 常见的一种类型<sup>[1]</sup>。淋巴结与淋巴组织遍布全身, 淋巴液和血液在全身循环, 故淋巴瘤可发生和侵犯身体的任何部位, 其中骨髓是淋巴瘤常见累及部位, 尤其是 NHL 骨髓侵犯较常见。目前, 骨髓涂片形态学检查是诊断淋巴瘤患者骨髓受累的重要手段, 但敏感度低且受很多因素影响易漏检。由于淋巴瘤细胞单克隆性的特点<sup>[2]</sup>, 用流式细胞仪对其轻链进行分析从而得出骨髓中是否存在淋巴瘤细胞, 进而可判断骨髓是否受累。本研究通过分析比较两种方法在诊断 B-NHL 患者骨髓受累情况, 从而为淋巴瘤患者骨髓受累的诊断提供依据。

#### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2014 年 1 月至 2015 年 6 月本院血液内科经活检病理组织学诊断初治为 B-NHL 患者 93 例。其中男性 51 例, 女性 42 例, 年龄 14~78 岁, 中位年龄 57 岁, 其中维吾尔族 9 例、汉族 67 例、回族 10 例、哈萨克族 7 例; 按世界卫生组织(WHO)的临床分期标准, I 期 14 例, II 期 23 例, III 期 19 例, IV 期 37 例。

**1.2 仪器与试剂** CD19-PECY5/Kappa-FITC/Lambda-PE、

溶血素及 PBS 液均来自美国 BECKMAN COULTER 公司。检测使用美国 BECKMAN COULTER 公司的 CYTomics FC500 流式细胞仪。瑞氏吉姆萨染液及过氧化物酶(POX)组织化学染液均来自 BASO 公司。

**1.3 方法** 93 例 B-NHL 患者的骨髓标本需由经验较为丰富的临床医师进行采集, 抽取骨髓液 0.2~0.3 mL 置于载玻片上, 快速涂片 8 张, 送细胞形态学检查; 更换 10 mL 无菌注射器, 抽取骨髓液 1 mL, 将抽取的骨髓标本逐滴加入肝素抗凝管中混匀, 送流式细胞实验室检查。骨髓细胞形态学样本需当日及时染色处理, 流式细胞检测标本于 4 h 处理完毕。骨髓细胞学检测样本做瑞氏吉姆萨染色, 并同时作 POX 组织化学染色, 然后对样本进行分类计数。所有需流式细胞检测的抗凝骨髓标本按如下方式处理: (1)将骨髓标本用 300 目分子筛过滤。(2)用 5 mL PBS 液将骨髓标本洗涤 2 遍。(3)取 1 支流式管, 加入 10  $\mu$ L 荧光标记的单克隆抗体 CD19、Kappa、Lambda。(4)在上述试管中加入 100  $\mu$ L 洗涤好的骨髓液, 微型振荡器混匀, 避光室温放置 20 min。(5)加入溶血素 500  $\mu$ L, 微型振荡器混匀, 避光室温放置 20 min。(6)加入 500  $\mu$ L PBS 液, 避光室温放置 10 min。(7)对流式细胞仪进行常规质量控制。(8)使用 Beckman 流式细胞仪进行分析, 实验结果从流式细胞仪

\* 基金项目:新疆医科大学科研创新基金资助项目(XJC201390)。

作者简介:乔文斌,男,主管检验师,主要从事临床血液学检验研究。

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: huangyanchun0619@sohu.com。

获得并用流式细胞相关软件进行数据处理分析。

**1.4 质量控制** 为了保证实验数据的可靠严谨及结果的可信性,减少实验误差,在本实验过程中,骨髓形态学样本由两名经验丰富的形态学工作者检验,每个样本的骨髓片分类计数 200 个细胞;流式细胞检测严格遵循质量控制原则:分析样本前,对样本及时正确处理,正确校准和标准化实验仪器。确保流式细胞仪激光光路与样品流处于正交状态,减少变异,保证样品检测时仪器处于最佳工作状态。免疫荧光染色保证在室温下进行。操作过程中严格遵循试剂盒说明及操作流程。流式细胞仪的检测由检验中心的专人负责,检测过程完全在质量控制的条件下完成。

**1.5 判断标准** 骨髓涂片的细胞形态学分析,按照卢兴国<sup>[3]</sup>骨髓涂片细胞分类中淋巴瘤细胞大于 5% 且小于或等于 20% 者诊断为 NHL 骨髓侵犯;淋巴瘤细胞大于 20% 者诊断为 NHL 合并白血病(淋巴瘤细胞白血病)为标准,判断骨髓受累情况,诊断时都应做 POX 组织化学染色。流式细胞检测用 CD19 选择 B 淋巴细胞,然后分析其轻链,选择 B 淋巴细胞轻链  $\kappa/\lambda > 6$  或小于 0.3 作为单克隆 B 淋巴细胞的诊断标准<sup>[4]</sup>,判断骨髓受累情况。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件包进行数据处理和统计学分析,率的比较采用  $\chi^2$  检验。取检验水准  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两种检测方法阳性情况比较** 93 例 B-NHL 患者经骨髓涂片阳性者为 11 例,阳性率为 11.8%;经流式细胞检测阳性者为 27 例,阳性率为 29.0%,两者比较差异有统计学意义( $\chi^2 = 8.467, P = 0.004$ ),见表 1。在 11 例骨髓涂片阳性的样本中,有 1 例经流式细胞检测为阴性。

表 1 93 例 B 细胞 NHL 患者两种检测方法的比较 [ $n(\%)$ ]

项目	阳性	阴性
骨髓细胞形态	11(11.8)*	82(88.2)
流式细胞检测	27(29.0)	66(71.0)

\*:  $P < 0.05$ , 与流式细胞检测结果比较。

### 2.2 两种检测方法结果判读情况

**2.2.1 骨髓形态学检测** 93 例 B-NHL 患者在形态学检测方面,11 例阳性的样本中 4 例诊断为淋巴瘤细胞白血病,7 例诊断为 NHL 骨髓侵犯。淋巴瘤细胞白血病患者的骨髓象表现为增生极度活跃,淋巴瘤细胞比值高( $> 20\%$ ),细胞胞体大、核大、核型不规则,核染色质疏松,部分细胞核中可见大小不等的核仁 1~2 个见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”);NHL 骨髓侵犯的患者骨髓象表现为增生活跃,淋巴瘤细胞数量较少(5%~20%),细胞散在分布,形态描述同淋巴瘤细胞白血病患者见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

**2.2.2 流式细胞检测** 93 例 B-NHL 患者在流式细胞检测方面,骨髓未受累的患者 B 细胞的数量较少,Kappa 和 Lambda 的比值范围为 0.3~6,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”);骨髓受累的患者 B 细胞的数量较多,并且 Kappa 和 Lambda 相差较大,比值远小于 0.3 或远大于 6,见图 4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

## 3 讨论

NHL 是一组来源于淋巴造血系统高度异质性的恶性肿

瘤,其发病率比较高,一些地区 NHL 的发病率可以达到恶性肿瘤发病的前 3 位。近 20 年来其发病率和病死率在世界各地均呈现出逐年上升的趋势<sup>[5-6]</sup>。B-NHL 是 NHL 常见的一种类型,较易发生骨髓受累,在临床分期中骨髓是否受累起着关键性的作用,一旦骨髓受累,临床上就将其分到 IV 期,因此,骨髓检查是 B-NHL 患者诊断和治疗过程中必不可少的检测项目之一。

常用的骨髓检测方法为骨髓穿刺涂片细胞形态学检查,本研究的 93 例 B-NHL 患者在形态学检测方面,阳性者为 11 例,阳性率为 11.8%。国内外有报道 NHL 患者的骨髓侵犯发生率为 16%~75%<sup>[7-9]</sup>,本研究使用骨髓涂片学检测的结果略偏低。分析原因,与以下几方面有关:(1)取材部位及涂片的质量。B-NHL 患者在做过骨髓穿刺时通常选取的部位为髂后上棘,因该处取材较为安全,成功率高,然而有时部分患者骨髓侵犯的部位未必就在取材的部位;同时涂片的质量也是一个不容忽视的因素,在涂片的操作中,一般找骨髓小粒比较丰富的区域进行,且涂片选取的骨髓量较少,加之分析涂片时也是随机选取玻片中部及尾部的部分区域进行分类计数,若骨髓侵犯的量较少,容易造成漏诊。(2)骨髓瘤细胞的形态特点。B-NHL 的病理分型较多,有成熟型的,也有早期未成熟型的,如果患者的病理分型为成熟 B 淋巴细胞的型别,其骨髓象中淋巴瘤细胞与成熟的淋巴细胞很难辨识区别,如果侵犯的数量也不多,那么在形态学中就极易漏诊。本研究方法的 11 例阳性样本中 4 例诊断为淋巴瘤细胞性白血病,7 例诊断为 NHL 骨髓侵犯。在判断为阴性的 82 例样本中还有 10 例样本,其淋巴瘤细胞比例未能达到 5%,按照标准未能放入骨髓受累的患者中。

流式细胞技术具有高通量,多参数检测的优点,近年来越来越多的被应用到淋巴瘤的分型及诊断上来。B-NHL 是一种单克隆增殖的免疫增殖性疾病,淋巴瘤细胞呈轻链限制性,仅表达单一的轻链(Kappa 轻链或者 Lambda 轻链),而正常 B 淋巴细胞呈多克隆表型,既表达 Kappa 轻链,又表达 Lambda 轻链。本研究利用流式细胞学的优势以及 B-NHL 淋巴瘤细胞单克隆性的特点,分析了 93 例 B-NHL 患者的骨髓样本。按照轻链  $\kappa/\lambda > 6$  或小于 0.3 作为单克隆 B 细胞的诊断标准分析得出阳性者为 27 例,阳性率为 29.0%。在结果中发现,阴性的患者,其 B 细胞的数量较少,部分患者甚至还未达到 1%,故而轻链的分析失去了价值。在阳性患者中其 B 细胞不仅数量多,其轻链的表达远超过判断标准。

通过比较两种方法在诊断 B-NHL 患者骨髓受累的情况,发现流式细胞检测的阳性率高于骨髓细胞形态学的阳性率。但在具体分析结果时发现,有 1 例经骨髓细胞学检测为阳性的患者,在流式细胞检测中呈阴性,且轻链的表达较少,这是否与该患者 B 细胞表达轻链丢失有关,有待进一步研究证实。两种方法在诊断 B-NHL 患者骨髓受累时各有其优势,也有其不足,在具体诊断时应合理选用,如有条件可以同时选用两种方法。

NHL 在临床上按侵犯范围分为 4 期,一旦骨髓受累及即属于 IV 期,预后较差。所以,NHL 是否出现骨髓浸润对分析病情进展、拟订治疗方案、评价预后都具有十分重要的作用。对于分期较晚患者,自体造血干细胞移植是治疗 B-NHL 的重要手段,但若移植前骨髓已受累,并由于移植前治疗不充分,移植中仍有淋巴瘤细胞残留,则会增加移植后淋巴瘤复发的可能性。因此准确合理诊断 B-NHL 患者骨髓是否受累(下转第 1179 页)

HIV 阳性者年龄段,以 18~35 岁 HIV 确认阳性 27 例为主占阳性率的 77.14%;阳性者年龄最小 18 岁,最大 51 岁,以青壮年男性阳性者为主,可能与此年龄段为性生活活跃期有关,同徐州市献血者 HIV 阳性者年龄段基本相同。HIV 阳性者职业分布以农民、企业职员、服务业、机关干部等占多数。其中以农民阳性 8 例占 22.86%(8/35)最多,这可能与农民长期外出打工夫妻两地分居有婚外无保护性行为和文化水平较低,获得预防 AIDS 相关知识途径少有关。发现 1 例在校大学生 HIV 阳性,说明 AIDS 已向韶关市在校学生扩散,这与近年来青少年比较开放,性观念淡薄,自我约束能力和自我保护意识差有关,应引起学校相关部门的高度重视。HIV 阳性者与婚姻关系,未婚阳性 25 例占 71.43%(25/35),已婚 10 例占 28.57%(10/35),调查发现未婚者 HIV 阳性率明显高于已婚者,这是否与未婚者因没有配偶和家庭约束有关,有待今后继续跟踪调查;经市疾控中心监测暂无发现配偶同时感染 HIV。HIV 阳性率与文化程度高低有一定关系,学历高阳性率相对低,学历低阳性率高,可能与了解性传播疾病知识和自我防护意识有关。因此,血站在无偿献血宣传工作中重点对文化程度较低的人群进行相关知识宣传,是降低 HIV 感染的有效措施之一。HIV 感染与户籍关系,以本市户籍 26 例占 74.29%为主,其次是外地户籍 9 例占 25.71%,无发现外国户籍阳性者。第一次献血 HIV 阳性 24 例,献血大于或等于 2 次 HIV 阳性 11 例,献血次数与 HIV 阳性率有一定关系,发现 HIV 阳性者献血次数最多 11 次,2 次间隔时间最短 8 个月;因此,血站使用缩短检出 HIV “窗口期”的试剂和招募固定的献血者对输血安全起到重要作用。35 例 HIV 阳性者均为 HIV-1 型病毒,未发现 HIV-2 型病毒感染;检出特异性蛋白带 gp160、gp120、p24 均 100%,其他带型 gp41、p51、p31、p55 检出率不同均低于新乡地区<sup>[7]</sup>,特异性蛋白带出现率不一致原因,是否与病毒感染时间和个体差异以及地区差异有关,有待今后继续研究。发现 6 份 HIV 检测不确定标本,已屏蔽不能献血,由韶关市疾控中心随访定期观察 WB 带型变化。HIV 阳性传播途径都是以性传播,未发现因吸毒共用注射器和经血液传播者;其中又以异性性传播 32 例占 91.43%为主,与多数地区报道相同,说明 HIV 感染与不洁的性行为有密切关系。HIV 阳性合并感染其他病毒以梅毒较多,与南通地区相似<sup>[8]</sup>,这与本市 HIV 阳性者以异性性传播有一定关系。35 例阳性者献血区域分布于全市各个县(市、区),从表 2 发现不同采血区域 HIV 感染相差甚大,南雄市献

血者阳性率 0.585/万最低,而新丰县阳性率 5.369/万最高,两县相差近 10 倍,是否新丰县靠近珠三角地区流动人员较多有关,还是什么原因有待今后进一步研究。

综合分析,韶关虽然地处广东粤北山区,但从本市无偿献血者 HIV 感染上升的数量和特点分析,对韶关市输血安全是一个严峻的考验,作为采供血机构应积极应对并采取如下措施严把血液质量关。(1)与当地疾控部门合作,在宣传献血知识的同时加入 AIDS 防治知识宣传,让更多献血者献血前了解危险行为的种类及经血传播疾病的危害,使高危行为者能主动放弃献血;(2)献血前加强献血者健康征询工作,仔细进行身份识别,尽量排除有高危行为的人群献血;(3)有条件可以考虑建立全国联网的采供血机构献血身份识别系统和献血屏蔽制度,防止不宜献血者异地献血。同时加强与疾控机构 HIV 疫情信息共享;(4)纠正临床上用血的误区,提倡合理用血,减少不必要输血。开展安全输血新技术,逐步推广自身输血,降低经输血传播疾病的风险;(5)强化检验人员的质量安全意识,选择特异性好和灵敏度高的试剂,缩短 HIV 检出“窗口期”;同时规范操作,提高检测水平,避免漏检,保障临床用血安全。

参考文献

[1] 温秀明, 邹旭群, 刘永梅, 等. 深圳市志愿无偿献血者 HIV 感染状况分析[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(8): 769-771.  
 [2] 王庆, 王德文, 余霖, 等. 东莞市无偿献血者抗-HIV 检测结果分析[J]. 广东医学院学报, 2014, 32(2): 203-205.  
 [3] 严凤好, 钟展华, 曾少丽. 惠州市无偿献血者血液检测结果分析[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(1): 25-26.  
 [4] 赵艳梅, 孟宪军, 祝凯捷. 徐州市无偿献血者抗-HIV 检测结果分析[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(10): 888-889.  
 [5] 熊建平, 刘绍少. 南昌市献血者 HIV 感染 10 年资料分析[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(9): 811-812.  
 [6] 宋文倩, 张丽, 高勇, 等. 全国 357 家采供血机构检测献血人群 HIV 检出率调查[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(12): 1244-1246.  
 [7] 孟毓, 卢涛, 潘献荣, 等. 2002~2011 年新乡地区无偿献血者 HIV 感染状况分析[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(5): 464-465.  
 [8] 王克成. 南通地区无偿献血者抗-HIV 检测情况分析[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(4): 372-373.

(收稿日期: 2015-12-22)

(上接第 1176 页)

累对于正确分期、制定治疗方案具有双重意义。

参考文献

[1] 许文荣, 谷俊侠. 临床血液学检验[M]. 南京: 东南大学出版社, 2001: 256.  
 [2] 王兰兰, 许化溪. 临床免疫学检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 298-311.  
 [3] 卢兴国. 造血和淋巴组织肿瘤现代诊断学[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 482.  
 [4] Böttcher S, Ritgen M, Buske S, et al. Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma; methods and significance of four-color flow cytometry compared to consensus IGH-polymerase chain reaction at initial staging and for follow-up examinations [J]. Haematologica, 2008, 93(4): 551-559.  
 [5] Huh J. Epidemiologic overview of malignant lymphoma[J]. Kore-

an J Hematol, 2012, 47(2): 92-104.

[6] 袁延楠, 杨雷, 孙婷婷, 等. 1998~2010 年北京市户籍居民恶性淋巴瘤发病情况[J]. 中华预防医学杂志, 2014, 48(8): 669-673.  
 [7] 刘恩彬, 陈辉树, 张培红, 等. 侵犯骨髓的非霍奇金淋巴瘤 41 例病理诊断探讨[J]. 诊断病理学杂志, 2011, 6(3): 178-181.  
 [8] 万祥辉, 杨媚媚, 邹学森. 淋巴瘤侵犯骨髓患者初次血常规综合指标分析[J]. 实用检验医师杂志, 2013, 12(4): 241-242.  
 [9] 宋卫卫, 谢彦, 邓丽娟, 等. 流式细胞技术对非霍奇金淋巴瘤骨髓侵犯的诊断价值[J]. 中华医学杂志, 2014, 10(94): 2996-3000.

(收稿日期: 2016-01-28)

