

• 共识解读 •

《流式细胞术检测组织样本中血液肿瘤细胞的专家共识》解读*

李良梅¹, 陈双¹, 李莲¹, 杨再林¹, 毛霞², 朱明霞³, 景红梅³, 肖敏², 刘耀¹, 刘艳荣^{4△}

1. 重庆大学附属肿瘤医院血液肿瘤中心/肿瘤转移与个体化诊治转化研究重庆市重点实验室, 重庆 400030;

2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科/湖北省血液免疫细胞治疗临床医学研究中心,

湖北武汉 430030; 3. 北京大学第三医院血液内科/淋巴瘤研究中心, 北京 100191; 4. 北京大学

人民医院/北京大学血液病研究所, 北京 100044

摘要: 血液肿瘤, 如淋巴瘤、骨髓瘤和髓系肿瘤, 可发生在髓外组织中。传统的组织病理形态学和免疫组化染色检查存在标本处理耗时久、结果报告周期长等局限性, 且在样本细胞数量较少的情况下, 其检测灵敏度相对较低。流式细胞术在检测组织样本时具有检测过程快、结果报告周期短, 检测结果准确性和灵敏度高等优点, 可作为病理形态学和免疫组化染色检查方法的有效补充。然而, 目前流式细胞术在组织样本检测的应用中, 如何对组织样本进行采集与保存、如何对组织样本进行单细胞悬液制备、在样本量少的情况下如何设计抗体组合方案、如何进行检测结果分析及结果报告等方面缺乏统一的认识和规范。为推动流式细胞术在检测组织样本中血液肿瘤细胞的规范化应用, 中国生物工程学会细胞分析专业委员会组织专家制定了《流式细胞术检测组织样本中血液肿瘤细胞的专家共识》(以下简称《共识》)。该《共识》详细阐述了流式细胞术检测组织样本的技术要点, 内容涵盖样本处理、抗体组合方案设计、检测结果分析、报告内容及质量管理等环节, 并重点推荐了组织样本细胞数量较少时流式细胞术检测的抗体组合方案和检测的结果分析方法。该文将针对《共识》中的重点内容进行解读, 以推动其在临床实践中更好的应用。

关键词: 流式细胞术; 组织样本; 血液肿瘤; 共识; 解读

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2025.11.001 **中图法分类号:** R733

文章编号: 1673-4130(2025)11-1281-09 **文献标志码:** A

Interpretation of Chinese expert consensus on flow cytometric detection of hematological malignant cells in tissue samples*

LI Liangmei¹, CHEN Shuang¹, LI Lian¹, YANG Zailin¹, MAO Xia², ZHU Mingxia³, JING Hongmei³, XIAO Min², LIU Yao¹, LIU Yanrong^{4△}

1. Center of Blood Tumor, Chongqing University Cancer Hospital/Chongqing Key Laboratory of Translational Research for Cancer Metastasis and Individualized Treatment, Chongqing 400030, China; 2. Department of Hematology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology/Hubei Clinical Medical Research Center of Blood Immune Cell Therapy, Wuhan, Hubei 430030, China; 3. Department of Hematology/Lymphoma Research Center, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; 4. Peking University People's Hospital/Peking University Institute of Hematology, Beijing 100044, China

Abstract: Hematologic malignancies, such as lymphoma, myeloma, and myeloid neoplasms, can occur in extramedullary tissues. Traditional histopathological morphology and immunohistochemical staining have limitations, including time-consuming specimen processing, prolonged reporting cycles, and relatively low sensitivity in cases of limited cell numbers. Flow cytometry offers significant advantages in detecting tissue samples, such as rapid processing, shorter reporting cycles, and high accuracy and sensitivity, making it an effective complement to histopathological and immunohistochemical methods. However, the application of flow cytometry in tissue sample detection currently lacks standardized protocols for sample collection and preservation,

* 基金项目: 重庆市科学技术局技术创新与应用发展重点专项(CSTB2024TIAD-KPX0031); 中央高校基本科研业务费(2022CDJYGRH-001); 重庆市科卫联合医学科研项目(2025DBXM002); 国家自然科学基金面上项目(82270203)。

△ 通信作者, E-mail: yrliu163@163.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20250326.1410.002.html\(2025-03-26\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20250326.1410.002.html(2025-03-26))

single-cell suspension preparation, antibody panel design for limited samples, data analysis, and result reporting. To promote the standardized application of flow cytometry in detecting hematologic tumor cells in tissue samples, the Cell Analysis Professional Committee of the Chinese Society of Biotechnology organized experts to develop the *Chinese Expert Consensus on Flow Cytometry for Detecting Hematologic Tumor Cells in Tissue Samples* (hereinafter referred to as the *Consensus*). This *Consensus* elaborates on the technical aspects of flow cytometry for tissue sample detection, covering sample processing, antibody panel design, data analysis, reporting content, and quality management. It particularly emphasizes recommended antibody panels and data analysis methods for flow cytometry when tissue sample cell counts are low. This article aims to interpret the key points of the *Consensus* to facilitate its better application in clinical practice.

Key words: flow cytometry; tissue samples; hematologic malignancies; consensus; interpretation

流式细胞术(FCM)作为血液肿瘤诊断、分型、疗效及预后评估的重要手段,在临床应用中展现了其独特优势^[1]。淋巴瘤、浆细胞肿瘤及髓系肿瘤等血液肿瘤可发生于髓外组织。传统的组织病理形态学及免疫组化染色检查存在标本处理耗时久、结果报告周期长、样本细胞数量较少时检测结果灵敏度较低等局限性。FCM 在检测组织样本时具有检测过程快、结果报告周期短、检测结果准确性和灵敏度高等优点,能够成为病理形态学和免疫组化染色检查方法的有效补充^[2]。FCM 通过检测组织样本中不同细胞的抗原表达特征,能够快速区分细胞的系别、分化阶段及克隆性,可用于血液肿瘤的诊断、分型、鉴别诊断及微小残留病灶(MRD)监测,同时还可为患者的预后评估、靶向治疗选择提供重要依据^[3]。

然而,利用 FCM 检测组织样本时,在如何对组织样本进行采集与保存、如何对组织样本进行单细胞悬液制备、如何在样本细胞数量少的情况下设计抗体组合方案、如何对检测数据进行分析及结果报告等方面缺乏统一的认识和规范。为了促进 FCM 检测组织样本中血液肿瘤细胞的规范应用,中国生物工程学会细胞分析专业委员会组织了来自临床医学、检验医学和病理学领域的多位专家,结合国内外最新研究和临床实践,制定了《流式细胞术检测组织样本中血液肿瘤细胞的中国专家共识》^[4](以下简称《共识》)。该《共识》内容涵盖了 FCM 检测的样本采集与处理、单细胞悬液的制备与评估、流式抗体选择与抗体组合设计、荧光染色与上机检测、结果报告内容、检测的局限性及结果分析时的注意事项、质量管理 7 个方面,重点针对组织样本细胞量较少时 FCM 检测的抗体组合方案及检测结果的分析方法进行了详细的推荐。该《共识》共形成 10 条相关建议,具体内容如下。

建议 1:应根据不同的病变部位选择合适的样本取材方法。用于 FCM 检测的组织样本应具有代表性,并有足够数量的细胞。送检样本不能使用固定剂固定,并按要求及时送检。

建议 2:应根据组织样本来源部位的不同,选择合适的单细胞悬液制备方法。在 FCM 检测前应制备组织标本的印片或细胞悬液涂片用于形态学观察,并在

FCM 抗体组合方案中加入细胞活性染料[如 7-氨基放线菌素 D(7-AAD)]进行细胞活性评估。

建议 3:应根据样本细胞数量的多少,合理设计 FCM 检测的抗体组合方案。在细胞数量少的情况下,建议使用《共识》推荐的分步检测的抗体组合方案,以确保肿瘤细胞检测的准确性。当细胞数量极少仅能够完成一管的 FCM 检测时,建议优先选择《共识》推荐的“泛筛”管的抗体组合方案。实际检测过程中,可根据取材部位肿瘤的发生率,调整抗体组合方案。

建议 4:建议参照《共识》推荐的“泛筛”管逻辑设门分析方法对组织样本中肿瘤细胞的系别进行筛查。细胞数量足够时,应根据筛查结果选择《共识》推荐的后续抗体组合方案(“分型”管)进行分层检测,并进行更为全面的诊断分析。

建议 5:样本的细胞数量较少,选择“泛筛”管方案检测时,建议再保留一管单细胞悬液备用。样本的细胞数量充足,进行 FCM 检测时,在每支检测试管中应加入大约 5×10^5 个细胞。组织样本制备成单细胞悬液后,应尽快完成 FCM 检测。

建议 6:流式细胞仪应定期校准以保持仪器的精确度。上机检测前应先使用校准微球调整仪器设置和光路补偿。上机检测时,应避免检测管之间的交叉污染。对于细胞数量较少的样本,应从上样检测开始时立即记录数据,直至获取检测管中的全部细胞。

建议 7:FCM 检测结果报告单应包含患者信息、样本类型和检测内容等基本信息,以及仪器型号、样本制备方法、所使用的抗体信息等检测信息。应对所检测标本中的细胞分类及结果分析进行描述,应给出相应的诊断结论、诊断提示或进一步检测的建议,并附上典型改变的流式分析图。

建议 8:报告解读时需充分了解 FCM 检测组织样本的局限性。当 FCM 检测结果和病理诊断(主要指病理形态学和免疫组化染色检查)结果不一致时,须分析检测结果差异产生的原因,并做好和临床、病理科室的沟通。

建议 9:开展 FCM 检测组织样本中血液肿瘤细胞项目的实验室,应对该项目开展实验室间比对,以确

保检测结果的质量。

建议 10: 结果分析时, 须注意因送检样本接触到固定剂导致部分荧光素抗体染色失败的可能性。来自淋巴结生发中心或胸腺的样本可能包含具有特殊表型的正常细胞群, 需要与肿瘤细胞相鉴别。免疫靶向治疗的应用可能导致肿瘤细胞某些标志物丢失, 设门时需采取多个抗体标志联合设门。此外, 须注意对复合淋巴瘤、不同部位存在不同组织学亚型的淋巴瘤、肿瘤细胞在不同部位的分化发育可能不同步或免疫表型不一致的病例的结果进行分析。

本文将对该《共识》中推荐的组织样本细胞量较少情况下的 FCM“泛筛”管与“分型”管如何应用等重点内容进行解读, 以推动其在临床实践中的应用。

1 检验前注意事项

组织样本与血液、骨髓液、胸腔积液、腹水、脑脊液等液体样本不同, 组织样本的取材部位、组织结构、细胞脆性及细胞凋亡敏感性等因素均可能影响 FCM 检测结果的准确性^[5]。《共识》对组织样本的送检要求做出了推荐, 包括: (1) 送检 FCM 检测的组织样本, 应取自与组织病理形态学和免疫组化染色检查样本相邻的部位; (2) 内镜下活检取材的组织样本至少送检 2 块, 且每块长度应 > 0.5 cm; 手术切除取材的组织样本至少提供 1 块, 且长度应 > 1 cm; 对于纵隔或腹膜后等深部病变部位, 样本取材首选粗针穿刺, 建议送检组织样本 2 条以上; 若为细针穿刺, 推荐送检组织样本 3~4 条; (3) 组织样本需置于等渗缓冲液中低温运输保存, 严禁使用含甲醛等固定剂的溶液^[6], 并于取材后立即送检; (4) 组织样本需制备成单细胞悬液后进行 FCM 检测。《共识》对单细胞悬液的制备方案及质控也做了推荐, 包括: (1) 手工研磨法是常用的单细胞悬液制备技术, 有条件的机构也可使用全自动组织处理仪; (2) 实体器官(胃肠道、肺脏、肝脏、皮肤)来源的组织样本在制备单细胞悬液时, 建议根据不同组织样本来源的特性, 选择适当的消化酶处理样本, 以确保细胞活性和抗原表位的完整性; 文献^[7-8]推荐的酶包括 Dispase(可分解细胞外基质, 特别是胶原 IV 和纤连蛋白)、Collagenase(可分解胶原蛋白, 释放细胞)、Hyaluronidase(可降解透明质酸)、DNase-I(可防止细胞聚集)、Accutase(可提高细胞产量和抗原

保存)和 TrypLE(可模拟胰蛋白酶活性, 改善细胞存活率)等; (3) 完成单细胞悬液制备后, 推荐使用台盼蓝或 7-AAD 染色进行细胞活性评估; (4) 建议对制备组织样本的印片或细胞悬液涂片进行形态学观察, 为 FCM 检测结果提供一定参考。

2 检验中注意事项

2.1 抗体组合方案设计 FCM 检测组织样本时的抗体组合方案的设计与待检测样本细胞数量的多少有关。对于细胞数量少的样本, 检测时应侧重选择用于判定肿瘤细胞系别、发育阶段及克隆性的抗体组合方案; 而对于细胞数量充足的样本, 抗体组合方案设计应尽可能全面, 在判定肿瘤细胞系别、发育阶段及克隆性的抗体组合的基础上, 进一步加入可区分肿瘤亚型的抗体。此外, 抗体组合方案的设计还应考虑患者的病史、临床表现及病变部位等信息, 例如: (1) 对于初诊患者, 抗体组合方案应能识别肿瘤细胞来源的系别、鉴定肿瘤类型及区分肿瘤亚型; (2) 对于已有诊断倾向的患者, 应以病史和初诊时肿瘤细胞的免疫表型作为选择抗体组合方案设计的依据; (3) 对于复诊患者, 抗体组合方案应能准确识别 MRD^[9]。此外, 《四色流式细胞术用于急性白血病免疫分型的中国专家共识(2015 年版)》^[10]、《急性白血病系别判断的流式细胞免疫分型专家共识^[11]》及《流式细胞学在非霍奇金淋巴瘤诊断中的应用专家共识(2016 年版)》^[12]等也可以为 FCM 检测组织样本抗体组合方案的设计提供参考。

根据待检测样本细胞数量的不同, 该《共识》提出了逐步分层检测的抗体组合方案, 分为“泛筛”管和“分型”管。对于细胞数量较少的样本, 推荐优先使用“泛筛”管抗体组合方案进行初步检测, 全面筛查异常细胞并分析其系别来源。若剩余样本量可以支持进一步检测, 则可根据“泛筛”管的系别分析结果, 再选择与之对应系别的“分型”管抗体组合方案进行下一步检测, “分型”管推荐的抗体组合方案可以用于 B 细胞系、T 细胞系、自然杀伤(NK)细胞系、浆细胞系、幼稚细胞系及非造血细胞系来源的异常细胞的全面免疫表型分析。具体“泛筛”管和“分型”管的抗体组合方案见表 1。

表 1 《共识》推荐的抗体组合方案

分类	名称	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	BV421	V500	BV605/ECD	APC-R700
“泛筛”管	LL1	CD4+κ	CD56+λ	7-AAD	CD7	CD3+ CD138	CD20+ CD8	CD19	CD45	CD5	CD88
“分型”管											
B 细胞系	B2	nTdT	BcI-2	CD79b*	CD10	Ki-67	CD200	CD23	CD45	CD34	CD19
	B3	FMC-7	CD22	—	—	CD43	—	CD81	CD45	—	CD19

续表 1 《共识》推荐的抗体组合方案

分类	名称	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	BV421	V500	BV605/ECD	APC-R700
T 细胞系	T2	TRBC1	TCRγδ	CD279*	CD10	CD26/ CD30 [△]	CD4	CD7	CD45	CD3	CD8
	T3 [#]	CD99	CD30	CD8	CD45RA	CD2	CD45RO	CD3	CD45	CD34	CD4
	T4	CD57	TCRγδ	CD3	TCRVδ1	—	—	TCRVδ2	CD45	—	—
	T5 [▲]	nTdT	CD1a	CD117	CD33	cMPO	CD34	cCD3	CD45	CD13	HLA-DR
NK 细胞系	NK2	Ki-67	cPerforin	cCD3	CD94	CD30	CD16	CD57	CD45	CD3	CD56
	NK3	CD159a	CD159c	CD3	CD158 (a/g/h)	CD158b	CD56/CD16	CD158e	CD45	CD94	—
浆细胞系	PC2	κ	λ	CD28	CD117	CD138	CD56	CD19	CD45	CD27	CD38
幼稚细胞系	M2	CD14	CD64	CD34	CD123	CD117	HLA-DR	CD13	CD45	CD33	CD15
	M3	cMPO	cCD79a	CD34	CD117	cCD3	CD16	CD13	CD45	CD11b	—
非造血细胞系	S2	CD326	GD2	—	CD9	CK	—	—	CD45	—	—

注：+表示同时加 2 个抗体；/表示根据前一管结果选做其一；—表示预留通道；*表示荧光素为 PE-Cy5.5；[△]表示若样本只够做一管 T2 管，优先选做 CD30，若样本够 T2 和 T3 管，T2 管可做 CD26；[#]表示儿童优先选择 T3 管；[▲]表示可疑 T 淋巴瘤母细胞淋巴瘤/急性淋巴细胞白血病(T-LBL/ALL)时做 T5 管。

2.2 “泛筛”管及“分型”管的应用

2.2.1 B 细胞肿瘤

在“泛筛”管中的有核细胞通过 CD38/CD3+CD138 设门，圈出非浆细胞群，再通过 CD19/CD20+CD8 设门，观察 B 细胞群的 FSC、SSC 变化及 CD19、CD20、CD45、CD5 和细胞膜轻链(κ、λ)表达情况，具体圈门逻辑见图 1。若出现轻链表达异常[包括限制性表达(即 κ/λ 比值>3:1 或<1:3)、κ 和 λ 均不表达]的 B 细胞，或出现前向散射光(FSC)、侧向散射光(SSC)变大或出现 CD19、CD20、CD45、CD5 表达异常的 B 细胞，均应怀疑为异常 B 细胞，可视样本细胞数量的剩余情况，根据“泛筛”管分析结果出具报告，或者选择对应的 B 细胞系“分型”管进行免疫表型分析。当样本细胞数量足够，应加做“分型”管中 B2 管及 B3 管(逐管分层检测，即做完 B2 管，仍有剩余待检细胞再做 B3 管)，结合异常细胞的免疫表型和体积大小进一步明确肿瘤亚型。需注意的是组织样本在制备过程中可能因研磨操作导致细胞的 FSC 发生变化，组织印片及单细胞悬液涂片中异常细胞的形态学大小也可为细胞体积大小的评估提供参考。《共识》推荐的组织样本中常见 B 细胞肿瘤检测及诊断提示流程，尤其适用于样本细胞数量较少的情况下的 FCM 逐步分层检测，可实现慢性淋巴细胞白血病/小细胞淋巴瘤(CLL/SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、伯基特淋巴瘤(BL)、弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)、B 淋巴瘤母细胞淋巴瘤/急性淋巴细胞白血病(B-LBL/ALL)及 CD5-CD10-B-非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)等 B 细胞肿瘤亚型分类，见图 2。

若“泛筛”管出现 CD19⁺CD20⁺CD5⁺CD45^{bri+} 和 κ/λ 轻链限制性表达的 B 细胞(少部分患者轻链可能

不表达)，在样本细胞数量少仅仅能完成“泛筛”管的情况下，依据此表型特征结合 FSC 大小，结果可提示为 CD5⁺的小 B 细胞肿瘤或 CD5⁺的大 B 细胞肿瘤的报告建议。在加做“分型”管的情况下：(1)若 B2 管检测异常 B 细胞免疫表型为 CD10⁻CD20^{dim+}CD200⁺CD23⁺CD79b⁻，可进一步加做 B3 管，若 B3 管检测异常 B 细胞免疫表型为 CD43⁺CD81⁻CD22^{dim/-}FMC7⁻，且“泛筛”管轻链(κ 或 λ)呈现弱表达水平或阴性，FSC 较小(与正常淋巴细胞相似)，则结果可提示为典型 CLL/SLL；若异常 B 细胞免疫表型符合典型 CLL/SLL，但 FSC 中等大小或偏大，则结果可提示为 CLL Richter 转化。(2)若 B2 管检测异常 B 细胞免疫表型为 CD10⁻CD20^{bri+}CD200⁻CD23^{-/dim}CD79b^{bri+}，可进一步加做 B3 管，若 B3 管检测异常 B 细胞免疫表型为 CD22^{bri+}FMC7^{bri+}，且“泛筛”管轻链(κ 或 λ)呈中或强表达水平，FSC 较小，CyclinD1 免疫组化染色或者 IGH/CCND1 融合基因相关检测阳性，则结果可提示为典型 MCL；若异常 B 细胞免疫表型符合典型 MCL，但 FSC 中等大小或偏大，CyclinD1 免疫组化染色或者 IGH/CCND1 融合基因相关检测阳性，则结果可提示为侵袭性 MCL 可能。(3)若 B2 管检测异常 B 细胞免疫表型为 CD10⁻CD20⁺CD200^{-/+}CD23^{-/dim+}CD79b⁺，且结合异常 B 细胞 FSC 及细胞形态学体积中等大小或偏大，当 CyclinD1 免疫组化染色或者 IGH/CCND1 融合基因阴性时，结果可提示为 DLBCL 或 CyclinD1 阴性的 MCL 可能；因为 DLBCL 的免疫表型具有高度异质性，明确诊断需进一步结合病理形态学检查及免疫组化染色等结果综合分析；CyclinD1 阴性的 MCL 还需结合 SOX11 免疫组化染色、

CCND2 或 CCND3 基因重排结果来进行综合判断。

若“泛筛”管出现 CD19⁺ CD20⁺ CD5⁻ CD45^{bri+} 和 κ/λ 轻链限制性表达的 B 细胞(少部分患者轻链可能不表达),在样本细胞数量少仅仅能完成“泛筛”管的情况下,依据此表型特征结合 FSC 大小,结果可提示为 CD5⁻ 的小 B 细胞肿瘤或 CD5⁻ 的大 B 细胞肿瘤的报告建议。在加做“分型”管的情况下,(1)若 B2 管检测异常 B 细胞免疫表型为 CD10⁺ Bcl-2^{bri+} CD34⁻ nT-dT⁻ CD45^{bri+},可进一步加做 B3 管,若 B3 管检测异常 B 细胞免疫表型为 CD43⁻ CD81⁺ CD22⁺ FMC7^{+/-},且 FSC 较小,则结果可提示为 FL(1~2 级);若满足以上表型,但 FSC 为中等大小/偏大,则结果可提示为 FL(3 级)。(2)若 B2 管检测异常 B 细胞免疫表型为 CD10⁻ nTdT⁻ CD34⁻ CD45⁺,可进一步加做 B3 管,若 B3 管检测异常 B 细胞免疫表型为 CD43⁻ CD81⁺ CD22⁺ FMC7^{+/-},且 FSC 较小,报告结果可提示为 CD5⁻ CD10⁻ B-NHL,必要时可结合临床特征及病史资料在抗体组合预留通道位置增加相应抗体组合进一步检测,具体亚型诊断可结合病理形态学、免疫组化染色、分子生物学等检查结果综合分析。(3)若 B2 管检测异常 B 细胞免疫表型为 CD10⁺ Bcl-2⁻ CD34⁻ nTdT⁻ CD45⁺,且 FSC 中等大小/偏大,则结果可提示为 BL 或 DLBCL 可能,可结合组织印片及单细胞悬液涂片中异常细胞的形态学特征,必要时结合病理学相关检查进行综合判断。需注意的是,生发中心来源的正常 B 细胞也可能出现 κ/λ 升高,此时需与 Burkitt 淋巴瘤进行鉴别;(4)若 B2 管检测异常 B 细胞免疫表型为 CD10⁻ Bcl-2^{+/-} CD34⁻ nTdT⁻ CD45⁺,且 FSC 大,则结果可提示 DLBCL 可能。

若“泛筛”管出现 CD19⁺ CD20^{-/+} CD5⁻ CD45^{-/+} 和 κ/λ 轻链不表达的 B 细胞,在样本细胞数量少仅仅能完成“泛筛”管的情况下,依据此表型特征,结果可提示可疑为幼稚 B 细胞肿瘤的报告建议。在加做“分型”管的情况下,若 B2 管检测异常 B 细胞免疫表型为 CD10^{+/-} nTdT^{+/-} CD34^{+/-} CD45^{+/-} (当 nTdT⁻ 或 CD34⁻,结合 CD19⁺ CD20^{-dim} 表型),则需考虑为 B-LBL/ALL 或急性白血病发生于髓外;为进一步明确诊断,可根据组织样本中细胞数量的多少,决定是否增加 B 系(cCD79a、cCD22、cIgM)、T 系(cCD3、CD7)、髓系(MPO、CD117、CD13、CD33)等抗体,以协助鉴别急性白血病亚型或是否存在混合表型白血病。

2.2.2 T 细胞肿瘤 在“泛筛”管中的非浆细胞群通过 CD45/SSC 设门,圈出淋巴细胞,再通过 CD19/CD3+CD138 设门,圈出 CD3⁺ T 细胞,观察 CD3、CD4、CD8、CD5、CD7、CD45 表达情况,具体圈门逻辑见图 1。若 CD3⁺ T 淋巴细胞出现 CD4 或 CD8 的表达比例异常(如 CD4/CD8 明显增高或减低、CD4⁺

CD8⁺ 细胞比例增高、CD4⁻ CD8⁻ 细胞比例增高)或 CD4、CD8、CD5、CD7 表达异常(包括增强、减弱、缺失)时,均应考虑为异常 T 细胞;淋巴细胞再通过 CD19/CD3+CD138 设门,圈出 CD3⁻ CD19⁻ 细胞,观察 CD5、CD7、CD56 表达情况,若出现 CD3⁻ CD7⁺ CD56⁻ CD5^{-/+} 的情况,应考虑为异常 T 细胞或异常自然杀伤(NK)细胞。可视标本细胞数量的剩余情况,根据“泛筛”管分析结果出具报告,或者选择对应的 T 细胞系“分型”管进行免疫表型分析。《共识》推荐的组织样本中常见 T 细胞肿瘤检测及诊断提示流程,同样适用于样本细胞数量较少情况下的 FCM 逐步分层检测,可以初步实现血管免疫母细胞性 T 细胞淋巴瘤(AITL)、Sezary 综合征/蕈样霉菌病(SS/MF)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、γδ T-非霍奇金淋巴瘤(γδ T-NHL)、T 淋巴母细胞淋巴瘤/急性淋巴细胞白血病(T-LBL/ALL)、早期 T 前体急性淋巴细胞白血病(ETP-ALL)等 T 细胞肿瘤亚型分类,见图 2。

若“泛筛”管出现 CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ 的异常表型 T 细胞,在样本细胞数量少仅仅能完成“泛筛”管的情况下,依据此表型特征,结果可提示为查见 CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ 异常表型(含 CD5、CD7 表达情况)T 细胞的报告建议。若样本细胞数量足够,应加做“分型”管中的 T2 管或 T3 管(逐管分层检测,即做完 T2 管,仍有剩余再做 T3 管)。(1)若 T2 管检测异常 T 细胞免疫表型为 CD10^{+/+} CD279^{bri+} CD7^{+/-} CD5⁺,且伴 TRBC1 的克隆性异常(T 细胞表达 TRBC1 的界值 >85% 或 <15% 提示具有克隆性),可进一步加做 T3 管,若 T3 管检测异常 T 细胞免疫表型为 CD45RO⁺ CD45RA⁻ CD34⁻ CD30⁻,且胞膜 CD3 弱表达或阴性,结果可提示为 AITL;(2)若 T2 管检测异常 T 细胞免疫表型为 CD26⁻ CD279^{+/-} CD7⁻ CD5⁺,且伴 TRBC1 的克隆性异常,可进一步加做 T3 管,若 T3 管检测异常 T 细胞免疫表型为 CD45RO⁺ CD45RA⁻ CD34⁻ CD30⁻,结合患者典型皮肤病变的临床表征,结果可提示为 SS/MF;(3)若 T2 管检测异常 T 细胞免疫表型 CD30^{bri+} CD3^{+/-} CD7^{-/+} CD5^{-/+},且伴 TRBC1 的克隆性异常,可进一步加做 T3 管,若 T3 管异常 T 细胞免疫表型为 CD45RO⁺ CD45RA⁻ CD34⁻,且 FSC 较大或大小不等,结果可提示为 ALCL。

若“泛筛”管出现 CD3⁺ CD8^{-/+} CD4⁻ 的异常表型 T 细胞,在样本细胞数量少仅仅能完成“泛筛”管的情况下,依据此表型特征,结果可提示为查见 CD3⁺ CD8^{-/+} CD4⁻ 异常表型(含 CD5、CD7 表达情况)T 细胞的报告建议。若样本细胞数量足够,应加做“分型”管中的 T2 管。若 T2 管检测异常 T 细胞免疫表型为 TCRγδ⁺ CD30^{-/+} CD10⁻ CD7^{-/+} CD5^{+/-},可进一步加做 T4 管以确定 TCRγδ 细胞的克隆性^[13];若 T4 管

异常 T 细胞免疫表型为 TCRv δ 1⁺ TCRv δ 2⁻, 结果可提示 $\gamma\delta$ T-NHL; 若“泛筛”管出现 CD3⁺ CD8⁺ CD4⁻ 的异常表型 T 细胞, 在样本细胞数量少仅仅能完成“泛筛”管的情况下, 依据此表型特征, 结果可提示为查见 CD3⁺ CD8⁺ CD4⁻ 异常表型(含 CD5、CD7 表达情况)T 细胞的报告建议。若样本细胞数量足够, 应加做“分型”管中的 T2 管。若 T2 管检测异常 T 细胞免疫表型为 TCR $\gamma\delta$ ⁻ CD30^{+/-} CD10⁻ CD7^{+/-} CD5^{+/-}, 且伴 TRBC1 的克隆性异常, 结果可提示为 T-非霍奇金淋巴瘤(T-NHL), 必要时可结合临床特征及病史资料在抗体组合方案的预留通道位置增加相应抗体组合进一步检测, 具体亚型诊断可结合病理形态学、免疫组化染色、分子生物学等检查结果综合分析。

若“泛筛”管出现 CD3 不表达, 但同时表达 CD4、CD8、CD5、CD7 任一标记的异常表型细胞(需除外正常 NK 细胞、CD4 弱阳性的单核细胞), 在样本细胞数量少仅仅能完成“泛筛”管的情况下, 依据此表型特征, 结果可提示为查见 CD3⁻ 异常表型(含 CD4、CD8、CD5、CD7、CD45、CD56 表达情况)T 细胞的报告建议, 或结合 CD45^{-/dim} 异常表型, 提示可疑为幼稚 T 细胞的报告建议。若样本细胞数量足够, 应加做“分型”管中的 T3 管和 T5 管, 若样本细胞数量少, 应优先加做 T5 管。儿童患者根据初筛结果优先做 T3 和 T5 管。(1) 若“泛筛”管免疫表型为 CD3⁻ CD7^{+/-} CD5^{+/-} CD4^{-/+} CD8^{-/+}, 加做 T5 管检测异常 T 细胞免疫表型为 cCD3⁺ CD1a⁻ CD34⁻ nTdT⁻ CD117⁻, 结果可提示为 T-NHL。(2) 若“泛筛”管免疫表型为 CD3⁻ CD7^{+/-} CD5^{+/-} CD4^{-/+} CD8^{-/+}, 加做 T5 管检测异常 T 细胞免疫表型为 cCD3⁺ CD34^{+/-} nTdT^{+/-} CD1a^{+/-} CD117^{+/-}, 结果可提示为 T-LBL/ALL, 必要时可结合病理形态学、骨髓细胞形态学、分子生物学等检查结果综合分析;(3) 若“泛筛”管免疫表型为 CD3⁻ CD7^{+/-} CD5^{+/-} CD4^{-/+} CD8^{-/+}, 可进一步加做 T5 管, 若 T5 管免疫表型为 cCD3⁺ CD5^{dim+} CD1a⁻ CD8⁻ cMPO⁻ CD34⁺, 且至少表达一个髓系细胞标记, 例如 CD117、CD13 或 CD33, 结果可提示为 ETP-ALL, 必要时可结合病理形态学、骨髓细胞形态学、分子生物学等检查结果综合分析。

《共识》推荐了 4 个 T 细胞系“分型”管的抗体组合(T2、T3、T4、T5), 并对每管的应用进行了说明, 例如:(1) 当“泛筛”管出现异常时, 需要做 T2、T3 管; 若样本量只够做一管时, 优先选择 T2 管, 在 TRBC1 可以判定 T 细胞克隆性的情况下^[14], T2 管中 APC 荧光通道须优先选择 CD30;(2) 儿童患者优先选择 T3 管, 原始/幼稚标记(CD99、CD34)及细胞分化标记(CD45RA、CD45RO)可以辅助急性 T 淋巴细胞白血

病(T-ALL)的诊断^[15], CD30 还可辅助诊断 ALCL^[16], 但值得注意的是, 儿童型 ALCL 多以小细胞型 ALCL 为主, 且 CD30 常呈阴性或者弱阳性表达^[17];(3) 当怀疑为 T-LBL/ALL 时, 需要加做 T3 管和 T5 管, 若细胞量少, 应优先选择 T5 管, 完善原始及系别的特异性标记。

2.2.3 NK 细胞肿瘤 “泛筛”管中的淋巴细胞通过 CD19/CD3+CD138 设门, 圈出 CD3⁻ CD19⁻ 细胞, 观察 CD7、CD56、CD5、CD8、CD45 的表达情况及 SSC 等特征。若出现 CD7⁺ CD56^{dim/bri} CD5⁺、CD8 全表达或不表达, CD45 表达增强等异常表型及 SSC 明显增大, 均应考虑可能存在异常表型的 NK 细胞, 可视标本细胞数量的剩余情况, 根据“泛筛”管分析结果出具报告, 或者选择对应的 NK 细胞系“分型”管进行免疫表型分析。

《共识》推荐了 2 个 NK 细胞系“分型”管抗体组合(NK2、NK3): 包含 NK 细胞特异性标记(CD56、CD16)、NK 细胞毒性标记(cPerforin)、NK 细胞克隆性标记(CD94、CD159a、CD159c、CD158a/g/h、CD158b、CD158e)、疾病鉴别标记(CD30、CD57)、疾病侵袭性标记(Ki67), 可辅助诊断 NK 细胞肿瘤。

虽然 NK 细胞慢性淋巴增殖性疾病(CLPD-NK)、结外 NK/T 细胞淋巴瘤(ENTCL)及侵袭性 NK 细胞白血病(ANKL)等 NK 细胞肿瘤亚型三者 KIR 家族系列抗原均呈现克隆性增殖(某种抗原单一表达或者全阴性), 但临床表现不同, 有助于三者的鉴别。CLPD-NK 常表现为原因不明的外周血 NK 淋巴细胞持续性增多, 呈惰性临床过程, 多数患者无肝、脾、淋巴结肿大, 外周血的 FCM 检测有重要价值, 免疫表型通常为 CD3⁻ CD56^{dim} CD16⁺ CD8^{+/-} CD5^{+/-} cPerforin⁺ CD2^{dim/-} CD7^{dim/-} CD57^{dim/-}。ENTCL 鼻型主要累及上呼吸道, 包括鼻腔、鼻及鼻旁窦等, 其中以鼻腔累及最多见, 当样本取材来源于这些部位时, FCM 检测的抗体组合方案应酌情考虑增加 NK 细胞系列标记。ANKL 呈爆发性临床经过, 肿瘤可累及全身器官, 但以外周血、骨髓、肝、脾累及常见。虽然 ANKL 和 ENTCL 均表现为 CD56^{bri+}, 但 ANKL 常为 CD16⁺, 而 ENTCL 则常为 CD16⁻^[18]。

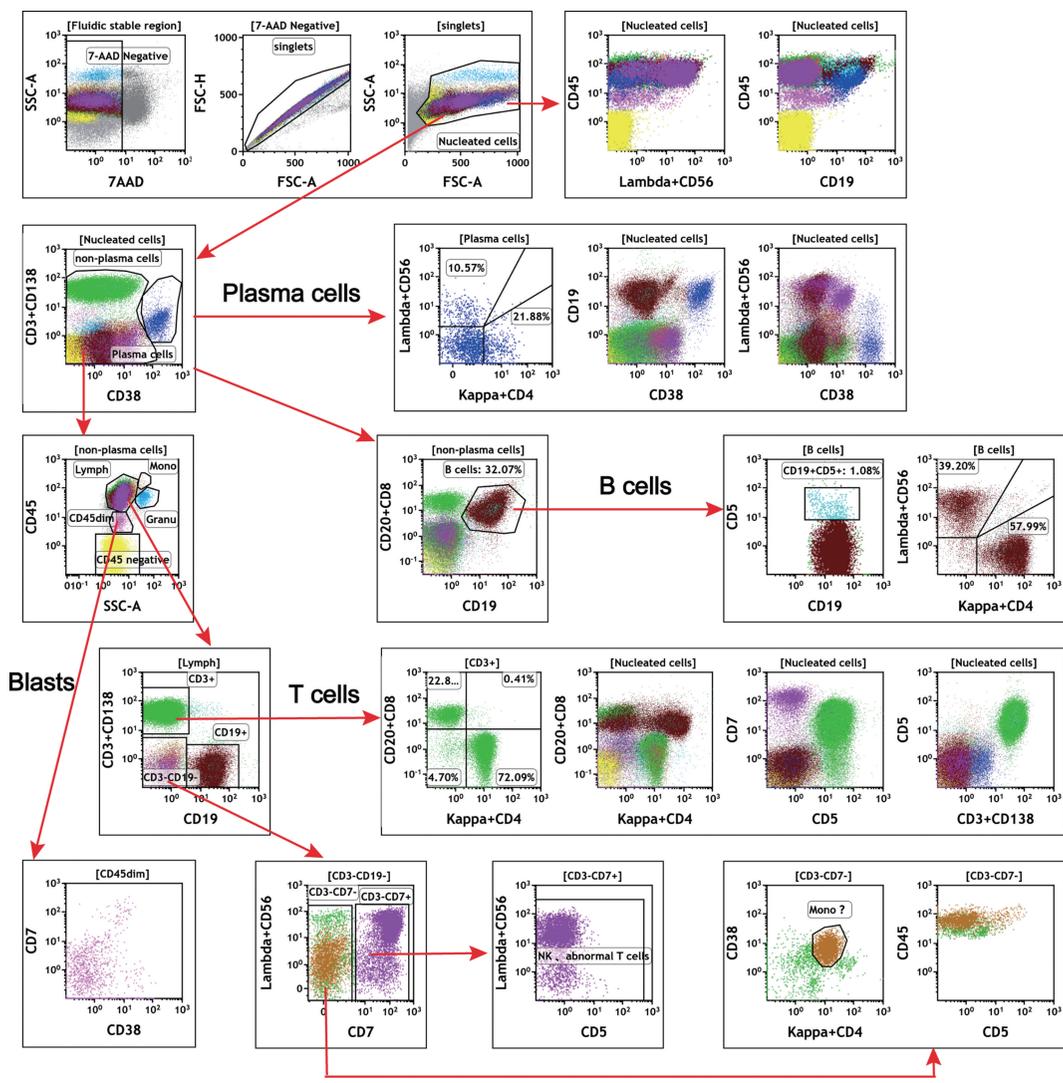
2.2.4 浆细胞肿瘤 “泛筛”管中的有核细胞通过 CD38/CD3+CD138 设门, 圈出浆细胞群, 观察细胞膜 κ 、 λ 、CD19、CD56、CD45 表达情况, 若出现 κ 、 λ 均不表达(极少部分患者浆细胞可出现膜轻链限制性表达), CD19⁻/CD56⁺ CD45^{dim/-} 的情况, 均应考虑存在异常表型的浆细胞, 视标本细胞数量的剩余情况, 根据“泛筛”管分析结果出具报告, 或者选择对应的浆细胞系“分型”管进行免疫表型分析。浆细胞系“分型”管可以实现浆细胞肿瘤的分类。

《共识》推荐了 1 个浆细胞系“分型”管抗体组合 (PC2): 包含浆细胞特异性标记 (CD38、CD138), 克隆性判断的标记 ($c\kappa$ 、 $c\lambda$), 预后标记 (CD56、CD117、CD28、CD27)。当浆细胞相关标记 (CD38、CD138) 阳性伴轻链限制性表达 ($c\kappa/c\lambda$ 比值 $>3:1$ 或 $<1:3$) 时, 且 $CD56^{+/-} CD19^{-} CD28^{+/-} CD27^{+/-} CD117^{+/-}$, 考虑为浆细胞肿瘤。相关研究发现, CD27 不表达或低表达、CD28 表达可能与较差的预后相关, 而 CD117、CD56 表达则患者可能有较好的预后^[19-21]。

2.2.5 髓系肿瘤 “泛筛”管中的非浆细胞群 通过 CD45/SSC 圈出 $CD45^{dim}$ 幼稚细胞群, 根据 CD3、CD7、CD5、CD19、CD10、CD56 及 CD38 表达情况, 可初步判断出幼稚细胞的系别。若幼稚细胞群出现表

达 CD38, $CD7^{dim+}$ 或部分表达, 不表达 B 系标记 CD19、CD20 的情况, 则可疑为异常髓系细胞 (包括髓系原始幼稚细胞、嗜碱性粒细胞或树突细胞)。可视标本细胞数量的剩余情况, 根据“泛筛”管分析结果出具报告, 或者选择对应的髓系“分型”管进行免疫表型分析。

《共识》推荐了 2 个髓系“分型”管抗体组合 (M2、M3): 注意此处的 M2、M3 为髓系“分型”管的编号而非 AML 的亚型。涵盖了髓系、淋系等系别特异性标记和分化发育阶段标记等, 结合第 5 版 WHO 造血与淋巴组织肿瘤分类中急性白血病积分系统^[22], 可对髓系原始细胞的具体免疫表型的鉴定、是否为混合表型以及有无幼稚单核细胞进行分析。



注: Plasma cells 为浆细胞; Blasts 为原始细胞; B cells 为 B 细胞; T cells 为 T 细胞。

图 1 共识推荐的“泛筛”管筛查肿瘤细胞的流式圈门策略 (以正常淋巴结样本为例)

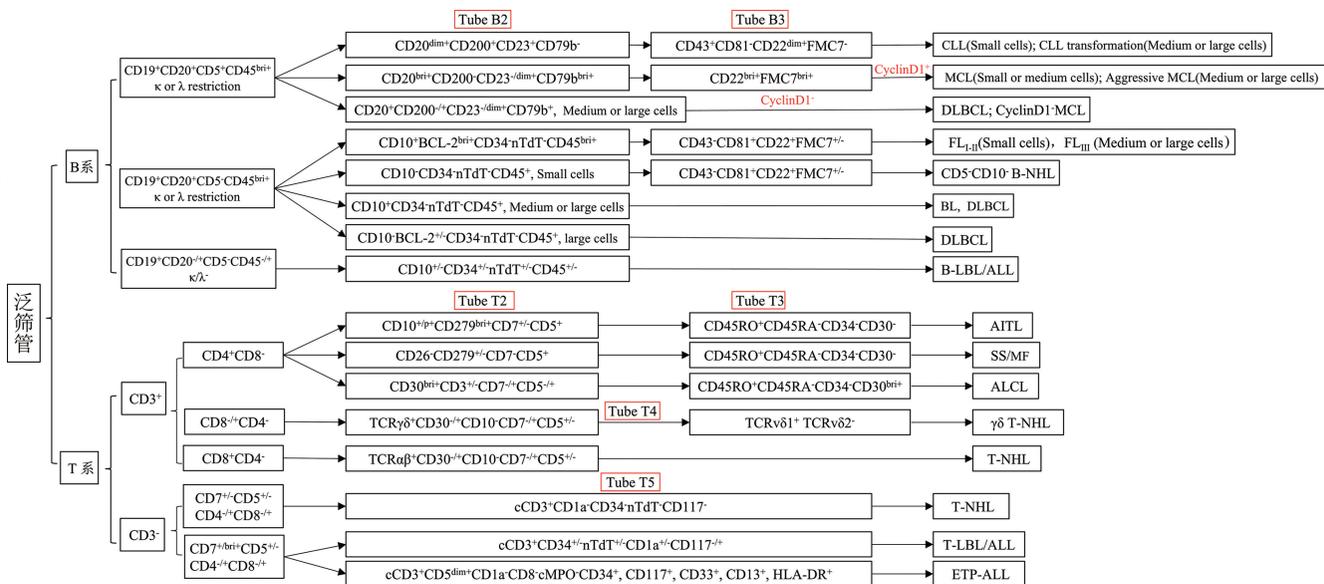
2.2.6 非造血细胞肿瘤 在“泛筛”管中有核细胞门内和非浆细胞门内, 对 $CD45^{-}$ 的细胞进行分析, 若出现 $CD45^{-} CD56^{+}$ 的细胞群, 且不表达初筛管中的造血细胞系别标记, 则倾向为非造血细胞。视标本细胞数

量的剩余情况, 根据“泛筛”管分析结果出具报告, 或者选择对应的非造血细胞“分型”管进行免疫表型分析。

《共识》推荐了 1 个非造血细胞“分型”管抗体组

合(S2):包括了CK、CD326、CD9 和 GD2 常见的非造血细胞标记,其中 CK 和 CD326 主要表达于上皮细胞,而 CD9 和 GD2 主要表达于神经系统来源的细胞,可以用来鉴别异常细胞是上皮来源还是神经母细胞来源。但由于应用于 FCM 检测的非造血细胞系的抗

体较少,导致 FCM 对非造血细胞肿瘤的诊断能力相对有限^[23]。此外,必要时可结合临床特征及病史资料在抗体组合方案的预留通道位置增加其他非造血细胞标志物进一步检测,如 CD81、CD90、CD99、CD141、CD15、CD11b、CD166 和 CD171 等^[24-27]。



注: Tube B2、Tube B3、Tube T2、Tube T3、Tube T4、Tube T5 分别为 B2 管、B3 管、T2 管、T3 管、T4 管、T5 管。

图 2 共识推荐的常见 B 细胞及 T 细胞肿瘤检测及诊断流程

3 检验后

该《共识》明确提出了相关人员在组织样本的 FCM 检测结果进行报告解读和临床沟通时需了解的注意事项:(1)组织样本的 FCM 检测在大多数 B 细胞肿瘤、部分 T 细胞肿瘤、浆细胞肿瘤及幼稚细胞肿瘤诊断中具有重要价值,但对霍奇金淋巴瘤、非造血细胞来源的肿瘤诊断价值有限^[13,23];(2)FCM 判断是否为淋巴瘤细胞最主要依据是淋巴细胞的克隆性异常,但淋巴细胞克隆性异常并不等同于肿瘤细胞,还需结合其免疫表型和患者临床表现做出综合判断;(3)在样本制备过程中,组织研磨可能会导致细胞的 FSC 发生变化,使 FCM 和病理检查对细胞大小的评估产生差异;(4)与病理免疫组化染色相比,FCM 对细胞质和细胞核标志物(如 Bcl-2 和 Ki-67)的检测结果稳定性较差,可能导致同一标志物在两种方法中的表达水平存在差异;(5)当 FCM 检测结果与病理检测结果不一致时,相关技术人员需与临床医生及病理科进行沟通,分析差异原因并给出合理解释。

4 小结

《共识》中还详细描述了 FCM 检测组织样本中血液肿瘤细胞时的质量控制,展示了利用一管“泛筛”抗体组合方案筛查组织样本中常见血液肿瘤细胞的图例,本文不再赘述。FCM 在检测组织样本时具有以下优势:结果报告周期短,适用于危重患者、紧急情

况下的快速诊断和初筛;能严格区分造血细胞的系别和阶段,克隆性判断准确;同一样本多群肿瘤细胞并存时,能独立分析;肿瘤细胞数量少时同样能实现高灵敏度检测。但其临床应用的局限性同样不可忽视,不能完全取代传统的病理形态学和免疫组化染色检查方法,可作为病理形态学和免疫组化染色检查方法的有效补充。尤其是该《共识》中推荐的在样本细胞数量少的情况下,FCM 检测抗体组合方案和结果分析策略,可显著提高组织样本 FCM 检测结果的准确性和可靠性。本文围绕《流式细胞术检测组织样本中血液肿瘤细胞的中国专家共识》中的组织样本 FCM 检测“泛筛”管与“分型”管的应用等重点内容进行了解读,希望能为从事 FCM 相关工作的广大同行、临床及病理医生提供一些帮助,推动组织样本 FCM 检测血液肿瘤细胞在临床实践中的应用。

参考文献

[1] 赵凯祺,苏丽萍. MICM 分型在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的作用研究进展[J]. 陕西医学杂志, 2023, 52(9): 1275-1278.

[2] STACCHINI A, ALIBERTI S, DEMURTAS A, et al. Flow cytometry identification of nonhemopoietic neoplasms during routine immunophenotyping[J]. Int J Lab Hematol, 2019, 41(2): 208-217.

[3] NGUYEN P C, NGUYEN T, WILSON C, et al. Evalua-

- tion of T-cell clonality by anti-TRBC1 antibody-based flow cytometry and correlation with T-cell receptor sequencing[J]. *Br J Haematol*, 2024, 204(3):910-920.
- [4] YANG Z, MAO X, ZHU M, et al. Chinese expert consensus on flow cytometric detection of hematological malignant cells in tissue samples[J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 5(1):28-37.
- [5] CHI P D, FREED N S, WAKE L, et al. A simple and effective method for flow cytometric study of lymphoid malignancies using needle core biopsy specimens[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2018, 94(5):637-643.
- [6] 刘云, 苏黎. 多聚甲醛固定对流式细胞术检测抗原表达的影响[J]. *医学信息*, 2017, 15(30):68-71.
- [7] HUANG H L, HSING H W, LAI T C, et al. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells[J]. *J Biomed Sci*, 2010, 17(1):36.
- [8] REICHARD A, ASOSINGH K. Best practices for preparing a single cell suspension from solid tissues for flow cytometry[J]. *Cytometry A*, 2019, 95(2):219-226.
- [9] 中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组. 多参数流式细胞术检测急性白血病及浆细胞肿瘤微小残留病中国专家共识(2017年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2017, 12(38):1001-1011.
- [10] 中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组. 四色流式细胞术用于急性白血病免疫分型的中国专家共识(2015年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36(4):265-271.
- [11] 中国中西医结合学会检验医学专业委员会. 急性白血病系别判断的流式细胞免疫分型专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2021, 12(44):1113-1125.
- [12] 翁香琴. 流式细胞学在非霍奇金淋巴瘤诊断中的应用专家共识(2016年版)解读[J]. *临床血液学杂志*, 2017, 30(9):687-692.
- [13] 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会. 流式细胞学在非霍奇金淋巴瘤诊断中的应用专家共识[J]. *中华病理学杂志*, 2017, 46(4):217-222.
- [14] BERG H, OTTESON G E, CORLEY H, et al. Flow cytometric evaluation of TRBC1 expression in tissue specimens and body fluids is a novel and specific method for assessment of T-cell clonality and diagnosis of T-cell neoplasms[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2021, 100(3):361-369.
- [15] FALCÃO R P, GARCIA A B. Expression of CD45RA (naive) and CD45RO (memory) antigens in T-acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Br J Haematol*, 1993, 85(3):483-486.
- [16] GANAPATHI K A, NICOLAE A, EGAN C, et al. Peripheral T-cell lymphomas expressing CD30 and CD15 expand the spectrum of anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative[J]. *Br J Haematol*, 2024, 204(5):1862-1871.
- [17] SUMMERS T A, MONCUR J T. The small cell variant of anaplastic large cell lymphoma[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2010, 134(11):1706-1710.
- [18] ZANELLI M, PARENTE P, SANGUEDOLCE F, et al. Intravascular NK/T-cell lymphoma: what we know about this diagnostically challenging, aggressive disease [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(21):5458.
- [19] CHU B, BAO L, WANG Y, et al. CD27 antigen negative expression indicates poor prognosis in newly diagnosed multiple myeloma[J]. *Clin Immunol*, 2020, 213:108363.
- [20] 张平平, 李李佳, 胡忠利, 等. CD28 表达在初诊多发性骨髓瘤中的临床意义[J]. *中国实验血液学杂志*, 2022, 30(6):1785-1790.
- [21] PAN Y, WANG H, TAO Q, et al. Absence of both CD56 and CD117 expression on malignant plasma cells is related with a poor prognosis in patients with newly diagnosed multiple myeloma[J]. *Leuk Res*, 2016, 40:77-82.
- [22] KHOURY J D, SOLARY E, ABLA O, et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms[J]. *Leukemia*, 2022, 36(7):1703-1719.
- [23] WONG-ARTETA J, REY M, ARAGÓN L, et al. The utility of flow cytometry in the diagnostic work up of malignant effusions due to nonhematopoietic neoplasms[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2020, 98(6):504-515.
- [24] FERRAGUT F, VACHETTA V S, TRONCOSO M F, et al. ALCAM/CD166: a pleiotropic mediator of cell adhesion, stemness and cancer progression[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2021, 61:27-37.
- [25] SAUZAY C, VOUTETAKIS K, CHATZHOANNOU A, et al. CD90/Thy-1, a cancer-associated cell surface signaling molecule[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7:66.
- [26] CHANG A, BENDA P M, WOOD B L, et al. Lineage-specific identification of nonhematopoietic neoplasms by flow cytometry[J]. *Am J Clin Pathol*, 2003, 119(5):643-655.
- [27] SAMATOV T R, WICKLEIN D, TONEVITSKY A G. LICAM: cell adhesion and more[J]. *Prog Histochem Cytochem*, 2016, 51(2):25-32.

(收稿日期:2025-01-17 修回日期:2025-03-19)

(本文编辑:宣艳艳 张耀元)