

515 例急性淋巴细胞白血病的免疫分型*

白 炎 申明燕 张德芳 赖春宁 陈 勇 孙瑛勋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘 要

用抗人白细胞分化抗原单克隆抗体对 515 例急性淋巴细胞白血病患者进行了免疫分型诊断。区分出 T 细胞型 (T-ALL) 和非 T 细胞型 (Non-T-ALL) 白血病。后者又分为普通型 (C-ALL)、无标志型 (Null-ALL) 以及 B 细胞型 (B-ALL) 等主要亚型。T 细胞及非 T 细胞型白血病细胞根据其表型特点又可进一步划分。

本研究所观察到 ALL 细胞表型基本反映正常 T 或 B 淋巴细胞亚群分化阶段或某些类型细胞的表型特征。急性淋巴白血病免疫分型不仅有助于判断白血病细胞的来源, 与 FAB 分型方法配合使用还可以大大提高对白血病的诊断准确率。同时, 分型结果显示出与临床表现、治疗反应以及预后转归有一定的相关性。本文对中国急性淋巴患者的发病特点也进行了探讨。

关键词: 急性淋巴白血病, 免疫表型, 单克隆抗体, 分型诊断

白血病是我国九大肿瘤之一。其中淋巴细胞白血病约占白血病发病总数的 30%, 主要危及儿童和青少年^[1]。

由于淋巴细胞白血病在血液学特征、临床表现、治疗反应以及预后转归等方面具有多样性, 因此应用传统的形态学检查和/或细胞化学分析均不能充分反映出其多样化的特点, 更难以进行准确的分型。

为此, 国际上免疫学与血液学工作者经过多年的共同努力, 现今已研制出一系列识别人类白细胞表面分化抗原的单克隆抗体, 并应用于淋巴细胞白血病的免疫分型。通过这一手段, 再辅之以形态学和细胞化学的方法, 获得了较为理想的分型效果, 从而为提高白血病的诊治水平开辟了一条新途径。

为使免疫分型工作尽快在我国开展起来, 自 1984 年以来, 我们以自制单克隆抗体为主, 逐步形成一组配套的免疫分型抗体和相应的检测分析方法, 并对北京地区有关医院临床经 FAB 分型确诊的 515 例急性淋巴细胞白血病 (ALL) 患者进行了免疫分型研究。

一、材 料 与 方 法

1. 病例来源 选自北京地区儿童医院、北京医科大学附属医院、解放军总医院等 21 所

本文 1989 年 9 月 9 日收到, 1990 年 2 月 28 日收到修改稿。

* 国家自然科学基金资助项目。

医院临床诊断为急性淋巴白血病的患者共 515 例,其中儿童 343 例,成人 172 例;男性 336 例,女性 179 例,男:女为 1.9:1。

2. 白血病细胞 本研究采样于初发或复发疗前 ALL 患者的外周血或骨髓,其中幼稚细胞比例 $\geq 50\%$,经肝素抗凝,用淋巴细胞分离液(比重 1.077,上海第二试剂厂生产)分离出单个核细胞,再用 PBS 制备成单细胞悬液,或经细胞涂片机制成涂片后,对有关细胞进行检测。

3. 免疫荧光测定 (1) 间接免疫荧光检测活细胞膜抗原,按文献[2]进行。本研究所选用免疫分型单克隆抗体见表 1。FITC 标记羊抗鼠 IgG 为本室制备。

表 1 用于白血病细胞免疫分型的单克隆抗体

抗体名称	特异性	分子量 (kD)	CD 分类	来源
LN67/LS96	全部 T 细胞	41	CD ₇	本研究室
H65*	全部 T 细胞、B 慢淋	67	CD ₃	本研究室
JN205*	羊红细胞受体	50	CD ₂	本研究室
UCHT-1*	全部 T 细胞	20	CD ₃	Beverley 博士惠赠
T4a*	T 辅助细胞	55	CD ₄	本研究室
P218*	T 抑制/杀伤细胞	30	CD ₈	本研究室
S35	人组织相容性 DR 抗原	32/28	(HLA-DR)	本研究室
8EB1*	全部 B 细胞	95	CD ₁₉	Ling 博士惠赠
55/79*	CALLA 抗原	100	CD ₁₀	本研究室
RFB-4*	成熟 B 细胞	135	CD ₂₂	Janossy 博士惠赠
MS107	人免疫球蛋白 μ 链	72		本研究室
MY9*	全部粒细胞	67	CD ₃₃	Coulter 公司
UCHM-1*	单核细胞	55	CD ₁₄	Hogg 博士惠赠
抗 TdT 单抗	牛末端脱氧核酸转移酶			Sera Lab 公司
NK244	人免疫球蛋白 κ 轻链	25		本研究室
NT130	人免疫球蛋白 λ 轻链	25		本研究室

* 已经国际 Workshop 鉴定校准的单克隆抗体。

(2) 细胞表面 Ig (SmIg) 测定采用直接免疫荧光法^[3]。所用 FITC 标记的羊抗人 SmIg 为本室制备。

(3) 胞浆 Ig 染色^[4]系将白血病细胞涂片置 95% 乙醇中于 -20℃ 固定 15min 之后,用有关单抗或羊抗人 Ig 抗体进行间接或直接免疫荧光染色。

以上各类检测均用小鼠血清作为阴性对照。

4. 碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶桥联酶标组化染色^[5](简称 APAAP 方法) 将有关单抗(一抗)经适当稀释后滴加于干燥的细胞涂片上,室温孵育 30min,继而 PBS 漂洗 3 次,加羊抗鼠 IgG 血清(二抗)室温孵育 30min, PBS 洗 3 次,再滴加小鼠的抗碱性磷酸酶单抗(三抗,本室制备)与碱性磷酸酶(美国 Sigma 公司产品)复合物,继续孵育 30min, PBS 充分漂洗后用底物液(萘酚-坚固红盐)显色,最后苏木素或伊文氏蓝复染。

5. 组化染色 髓过氧化物酶 (POX)、非特异性酯酶 (NSE)、糖元 (PAS) 以及酸性磷酸酶 (Acp) 均按常规方法进行。

6. 免疫分型标准 本研究所采用免疫分型标准见表 2。

表 2 本室所采用的免疫分型标准*

T 细胞性 白血病 (T-ALL)	1. T 细胞标志表达 (CD _{7,5,2,3,4,8} 等) 2. 无 B 细胞标志及粒细胞标志表达
非 T 细胞性 白血病 (non-T-ALL)	1. B 细胞标志表达 (CD _{10,20,22} , SmIg 等) 2. 无 T 细胞标志及粒细胞标志表达
急性非淋巴 白血病 (ANLL)	1. 粒系细胞标志表达 (CD _{11,13,14,15, 33,41,42} 等) 2. 细胞化学反应 POX, NSE 阳性
杂合型白血病 细胞 (ANLL)	1. 幼稚细胞数 > 75% 2. 具有淋巴细胞特征 表达至少两种 T 或 B 细胞标志, PAS, ACP 或 TdT 阳性 3. 具有粒细胞特征 有粒细胞表达, POX 阳性率 ≥ 10% 4. 两种幼稚细胞分别具有淋巴或粒系细胞特性为双系性, ≥ 10% 幼稚白血病细胞具有两类细胞特性为双表型

* 除个别指出的以外, 抗体标记细胞 ≥ 50% 定为阳性细胞。

二、结 果

1. 急性淋巴白血病的免疫分型

经形态学和细胞化学诊断为 ALL 的 515 例患者的白血病细胞免疫分型结果见表 3。其中以 C-ALL 居首, 依次为 T-ALL, Null-ALL, B-ALL, HAL, 亦有少数 AML (占 3.9%) 和无法分型 (占 4.4%) 病例。

表 3 515 例急淋白血病患者细胞分型结果

免疫分型	例数	百分率(%)
无标志型 Null-ALL	77	15.0
普通型 C-ALL	270	52.4
B 细胞型 B-ALL	7	1.4
T 细胞型 T-ALL	115	22.3
急性粒白血病 AML	20	3.9
杂合型白血病 HAL	3	0.6
不可分类	23	4.4
合 计	515	100.0

(1) T-ALL 细胞免疫表型 在所观察的 115 例 T-ALL 患者中, 77 例的白血病细胞表型 (见表 4) 大体上可分成早期胸腺细胞型 (I)、胸腺皮质细胞型 (II) 和胸腺髓质细胞型 (III), 与 Reinherz^[8], Greaves^[9] 及 Lanier^[10] 等人描述的相似。其余 38 例 T-ALL 细胞或对 CD₃ 抗原表达有一定特点, 或表达 CALLA, HLA-DR 等抗原 (表 5)。

(2) Non-T-ALL 细胞免疫表型 本文分析了 354 例 Non-T-ALL 患者白血病细胞表型。根据表型特点可分为无标志型 (Null-ALL)、普通型 (C-ALL) 和 B 细胞型 (B-ALL)。其中 Null-ALL 细胞根据有无 CD₁₉ 抗原表达可分成两类, C-ALL 细胞根据胞浆出现 μ 链又可进一步分出前 B 细胞型 (pre-B-ALL), 详见表 6。

表 4 77 例 T 细胞急性淋巴白血细胞免疫分型

分 型	免 疫 表 型 特 征						出现频率 (%)
	CD ₇	CD ₈	CD ₂	CD ₃	CD ₄	CD ₈	
I 早期胸腺 细胞型	+	-	-	-	-	-(14.3)*	52.0
	+/-	+/-	+/-	-	-	-(22.4)	
	+	+	+	-	-	-(14.3)	
II 胸腺皮质 细胞型	+	+	+	-	+	+(16.9)	22.1
	+	+	+	+	+	+(5.2)	
III 胸腺髓质 细胞型	+	+	+	+	+/-	-/(16.8)	25.9
	+	+	+	-	+/-	-/(9.1)	

* 括号中数字为各种表型出现频率。

表 5 38 例 T 急淋白血细胞对某些抗原的表达

分型	出现频率(%)			合计
	CD ₃	CALLA	HLA-DR	
1	100.0(8)*	63.6(7)	52.6(10)	65.8(25)
2	0	36.4(4)	5.3(1)	13.2(5)
3	0	0	42.1(8)	21.0(8)
合计	100.0(8)	100.0(11)	100.0(19)	100.0(38)

* 括号中为病例数。

表 6 354 例非 T 细胞急淋白血细胞免疫表型

分型	免 疫 表 型 特 征					出现频率 (%)
	HLA-DR	CD ₁₉	CD ₁₀	Cyμ	SmIg (或 κ + λ)	
Null-ALL	+	-	-	-	-(13.1)*	21.8
	+	+	-	-	-(8.7)	
C-ALL	+	+	+	-	-(53.0)	76.2
	+	+	+	+	-(23.2)	
B-ALL	+	+	-/+	-	+(2.0)	2.0

* 括号中数字为各种表型出现频率。

(3) 杂合型急性白血病 (HAL) 细胞免疫表型 本研究发现 3 例杂合型急性白血病, 其细胞学检查及表型特征见表 7。按照 HAL 诊断标准, 例 1 为 T 与粒杂合型, 例 2 属 B 与粒杂合型, 例 3 同时检测 CD₁₀ 和 Cyμ 链呈阳性反应, 故为前 B 与粒杂合型。依据淋、粒细胞表面标志表达百分数, 例 1 和例 3 考虑为双系性白血病(淋+粒阳性标志约为 100%), 其中例 3 用胶体金银法与 APAAP 法双标记证实两类标记细胞为各自独立的群体; 而例 2 为双表型白血病(淋+粒阳性标志大于 150%)。

2. 不同免疫类型 ALL 患者某些临床特点

(1) 血常规 我们对 4 种主要免疫类型 ALL 患者外周血象进行了比较, 发现 T-ALL

表 7 3 例杂合型白血病细胞特征

检查项目	结 果		
	例 1	例 2	例 3*
幼稚细胞百分数	80	94	96
形态学	M + L	M2	M1
组织化学			
POX	+	+	+
NSE	-	ND	±
PAS	+	ND	-
Acp	+	ND	±
TdT	ND**	+	ND
细胞表面标记(阳性率%)			
CD ₇	88	20	4
CD ₅	80	8	3
CD ₂	10	7	1
CD ₁₉	0	66	57
SmIg	0	57	7
CD ₃₃	10	90	40
CD ₁₄	0	0	ND

* 此患者 CD₁₀、HLA-DR 亦为阳性, **ND 未检测。

表 8 4 种主要免疫类型急淋患者外周血象比较

血象指标	免 疫 分 型			
	C-ALL	Null-ALL	B-ALL	T-ALL
白细胞				
平均数(个/mm ³)	42500	52150	27000	151000
范围	1000—700000	850—610000	2000—73400	2000—720000
>10 ⁴ /mm ³ 比例(%)	10.7	18.3	0.0	33.3
血红蛋白				
平均数(g%)	7.7	8.0	9.2	9.7
范围	0.1—15.5	2.1—15.6	6.6—12.0	4.0—18.6
血小板				
平均数(10 ⁴ /mm ³)	6.0	6.5	8.4	6.5
范围	0.2—35.1	0.6—28.6	3.1—18.5	0.3—24.8

患者恶性淋巴细胞增殖明显高于其他几种类型。而 C-ALL 患者血红蛋白(Hb)及血小板(pl) 均值都较其他几型为低,表明该型的骨髓抑制状态在 ALL 中居首位(表 8)。

(2) 临床表现 在 C-ALL 患者中对部分前 B 和非前 B 型患者病情按中国医学科学院血液学研究所提出的根据临床、血象、体征将 ALL 患者分为标准危险组(标危)及高危险组(高危组)标准进行了划分。经过比较,结果显示(表 9),病情更为凶险的前 B 型患者,高危类型比例高。

(3) 治疗反应与预后 对部分患者的治疗反应及缓解持续时间观察表明,在 4 种主要

免疫类型急性淋巴患者中,以 C-ALL 对治疗反应最佳,与 T-ALL 病例相比,其持续缓解时间也相对长久些(表 10,11)。

表 9 91 例 C-ALL 中前 B 和非前 B 患者病情比较

免疫分型	临 床 表 现		合 计
	高危	标危	
前 B-ALL	6(100.0)*	0(0.0)	6
非前 B-ALL	35(41.2)	50(58.8)	85
合计	41	50	91

* 括号中为发生率(%).

表 10 78 例不同免疫类型急淋患者初发完全缓解率比较

缓解情况 (%)	免 疫 分 型				合 计
	C-ALL	Null-ALL	B-ALL	T-ALL	
完全缓解	97.8(45)*	78.6(11)	0.0(0)	35.7(5)	78.2(61)
未缓解	2.2(1)	21.4(3)	100.0(4)	64.3(9)	21.8(17)
合计	100.0(46)	100.0(14)	100.0(4)	100.0(14)	100.0(78)

* 括号为病例数.

表 11 44 例 C-ALL 和 T-ALL 患者的持续缓解时间

完全缓解时间	免 疫 分 型		合 计
	C-ALL	T-ALL	
≥ 6 月	35(97.2)*	4(50.0)	39
< 6 月	1(2.8)	4(50.0)	5
合计	36(100.0)	8(100.0)	44

* 括号中为百分率.

表 12 469 例不同免疫类型急淋白血病的构成比

免疫表型	构 成 比 (%)		合 计
	儿童(≤14 岁)	成人(>14 岁)	
Null-ALL	13.9(43)*	21.4(34)	16.5(77)
C-ALL	61.8(192)	49.1(78)	57.5(270)
B-ALL	1.3(4)	1.9(3)	1.5(7)
T-ALL	23.0(71)	27.6(44)	24.5(115)
合 计	100.0(310)	100.0(159)	100.0(469)

* 括号中为病例数.

3. 4种主要免疫类型 ALL 的发病特点

本研究对 469 例 4 种主要免疫类型的 ALL 患者检出率、发病年龄及性别进行了分析.结果表明,儿童和成人 ALL 构成比(表 12)依次排列均为 C-ALL > T-ALL > Null-ALL > B-ALL.

在年龄分布上, C-ALL 与其他 3 种类型急性淋巴不同, 在 5 岁左右有一明显发病高峰。性别分布可见, 男性罹患 ALL 比例高于女性(307/162, 1.9:1), 尤以 T-ALL 患者为著(192/23, 4.0:1), 其次 C-ALL (165/105, 1.6:1), Null-ALL (47/30, 1.4:1)、B-ALL 男:女为 0.8:1(3/4)。

三、讨 论

本研究对 469 例 4 种主要免疫类型的急性淋巴病例进行了分析, 结果表明, 此类细胞表型具有高度异质性。其中大多数急性淋巴患者白血病细胞表型与各发育阶段正常 T、B 淋巴细胞表型有相关性。表 4 已揭示出各类 T-ALL 表型与不同分化阶段胸腺细胞表型的对应关系。同样, 各类 Non-T-ALL 细胞实际也具备不同分化时期 B 细胞表型的特点^[11](如表 6 所示)。然而, 少数恶性淋巴细胞表型也不完全符合上述规律。如 CD₄, CD₈ 抗原表达分离的 T-ALL 细胞有些则无成熟 T 细胞 CD₃ 标志的出现(表 4)。表 5、表 7 所列举的具有特殊表型特征的 ALL 细胞, 可能与某些少见类型正常淋巴细胞亚群表型相对应。如: 分型所见表达 CD₃ 抗原并有早期胸腺细胞标志的 ALL 细胞是否与具有 γ 、 δ 链抗原受体的正常 T 细胞相关, 尚有待进一步研究; 表达 CALLA 标志的 T-ALL 细胞表型与正常胸腺被膜下某些幼稚胸腺细胞表型的相应性文献早已报道^[12,13]; 那些表达 HLA-DR 抗原的 T-ALL 细胞, 或与正常 T 祖细胞表型相似, 或与激活 T 细胞有关^[14]; 最近也有人报道^[15], CD₁₉ 与 CD₂ 其表达的 Non-T-ALL 细胞这一特殊类型在胎肝的造血细胞中有相似表型。

表 7 列举了 3 个杂合型急性白血病免疫表型病例。对于这类白血病的发病机制, 目前一般认为, 倘若恶变发生于低分化的干细胞水平, 则白血病细胞可能波及粒、淋两系; 假使较少分化的恶变干、祖细胞发生了基因重排, 可导致某系表型的非典型表达, 常常会出现双表型的白血病细胞^[6]。尽管杂合型急性白血病的发生率很低, 却对白血病诊断提出了新课题^[16]。

急性淋巴细胞的上述异质性, 是传统的 FAB 分型诊断所无法辨析的。我们曾对 213 例 FAB 分型确诊为 L₁—L₃ 型的病例进行免疫分型, 结果显示两者之间无明确的关系。单纯应用形态学与细胞化学检查, 有时难于精确鉴别细胞起源, 甚至于粒、淋相互混淆, 尤其在 FAB 分型的 M₁ 和 L₂ 之间更是如此, 常常造成误诊误治的不良后果。我们所分型的 515 例 FAB 诊断为 ALL 的患者中, 20 例经免疫分型等手段证实为急粒 (AML), 如表 3 所示。相反, 有些形态学诊断为 AML 的病例, 免疫分型结果却属 ALL。因此, FAB 分型需与免疫分型相结合, 才能提高白血病诊断的准确性。不可否认, 用单克隆抗体分析白血病细胞表型有时在诊断中起着关键性的作用。本实验室目前的诊断准确率可达 95%。

本研究结果还表明, ALL 的主要免疫类型与疾病过程、治疗反应及预后转归有一定相关性。在 C-ALL 病例中, 前 B 细胞白血病患者的临床症状较为凶险。近年来亦有人报道^[17], 表达 CALLA 的 T-ALL 与不表达 CALLA 的 T-ALL 患者相比较, 易诱导缓解, 缓解期维持时间较长。

通过免疫分型研究, 我们发现中国急性淋巴发病学方面有别于其他人种的特点: ALL 的主要免疫亚型按检出率排列, 在儿童和成人均为 C-ALL > T-ALL > Null-ALL > B-ALL。成年白种人主要亚型构成比虽与中国人一致, 但儿童组 Null-ALL 却居第二位。非洲黑人 ALL 中则以 T-ALL 为最高。从年龄分布上显示, 在 4 种主要免疫亚型中唯有 C-ALL 在

5 岁时出现一发病高峰。T-ALL 男性发病数明显高于女性等特点, 中国人与白种人相似^[18]。此外, 亦发现在中国人群中为数较多表达 HLA-DR 抗原的 T-ALL 患者, 它占所观察 T-ALL 病例的 16.5% (19/115)。其中 HLA-DR 抗原分布又有其特点(见表 5), 一部分为具有幼稚表型的 T-ALL 细胞表达, 另一部分则出现于具有成熟表型 T-ALL 的细胞中。后者是否属于激活状态的 T 细胞, 以及激活的原因等均引起我们的关注。

最后应该指出, 为进一步提高诊断水平, 对白血病细胞进行遗传学分析, 如染色体畸变的研究以及免疫基因重排的分析, 无疑也是十分必要的^[19]。

参 考 文 献

- [1] Chou, J. L. & Pan, S. P., *Leukemia Research*, 1985, 9: 771.
- [2] 白 炎, 军事医学科学院院刊, 1983, 6: 603.
- [3] Hudson, L. & Hay, F. C., *Practical Immunology*, 2nd Ed. Oxford London, Edinburgh Boston Melbourne, Blackwell Scientific Publication, 1980, 54.
- [4] Janossy, G. et al., in *Methods in Hematology: Monoclonal Antibodies* (Ed. Beverlry, P. C. L), Churvhill Livingstone, 1986, 97.
- [5] 李春富等, 中华血液杂志, 9(1988), 9: 351.
- [6] Gale, R. P. et al., *Br. J. Haematol.*, 65(1987), 261.
- [7] Hoff brand, AV et al., *Blood Reviews*, 1988, 2: 9.
- [8] Reinherz, E. L. et al., *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 77(1980), 1588.
- [9] Greaves, M. F., *Sci.*, 234(1986), 697.
- [10] Lanier, L. L. et al., *Immuno*, 137(1986), 2501.
- [11] Korsmeyer, S. J., *J. Clin Invest.*, 79(1987), 1291.
- [12] Neudorf, S. M. L. et al., *Leuk Res.*, 8(1984), 173.
- [13] 谭子兴等, 上海免疫学杂志, 1986, 6: 95.
- [14] Drexler, H. G. et al., *Blut*, 57(1988), 327.
- [15] Uckon, F. M. et al., *Tissue Antigens*, 33(1989), 183.
- [16] Gonzalez, M. et al., *Br. J. Haematol.*, 67(1987), 116.
- [17] Dowell, B. L. et al., *Cancer*, 59(1987), 2020.
- [18] Greaves M. F., et al., *Leuk Res.*, 9(1985), 715.
- [19] Second, MIC Cooperative Study Group, *Br. J. Haematol.*, 68(1988), 487.