

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003273

流式免疫表型分析在 11 例侵袭性 NK 细胞白血病中的
诊断价值分析

杨莹, 张欣, 廖红艳

(四川大学华西医院实验医学科, 成都 610041)

【摘要】目的:探讨流式细胞术(flow cytometry, FCM)免疫分型及临床和实验室特征对侵袭性 NK 细胞白血病(aggressive NK-cell leukemia, ANKL)的诊断价值。**方法:**回顾性分析 2019 年 1 月至 2019 年 12 月在四川大学华西医院确诊的 11 例 ANKL 患者临床资料, 包括骨髓细胞形态学、流式免疫表型及病理结果。**结果:**所有患者均出现发热症状并均伴噬血细胞淋巴组织细胞增生症(hemophagocytic lymphohistocytosis, HLH)。8 例骨髓涂片中可见噬血细胞。流式细胞学示 11 例 ANKL 患者免疫表型均为: CD2⁺sCD3⁻CD4⁻CD8⁻CD56⁺CD19⁻, CD45 和 CD56 表达强度增高($P=0.048$)、细胞体积偏大($P=0.000$), 5 例 CD16⁻, 6 例 CD7 表达缺失或部分缺失。8 例行免疫组化检测, 结果均为: CD3ε⁺、粒酶 B⁺ 及 EBER1/2-ISH⁺。**结论:**ANKL 的免疫表型有独特的特征, 在 ANKL 的诊断和鉴别诊断中具有重要意义。综合分析病例的临床特点、细胞形态学、免疫表型等检查结果可实现对 ANKL 的及时诊断和鉴别诊断。

【关键词】侵袭性 NK 细胞白血病; 细胞形态学; 流式细胞学; 免疫表型; 免疫组化

【中图分类号】R446

【文献标志码】A

【收稿日期】2022-06-08

The diagnostic role of flow cytometry immunophenotyping analysis
in 11 cases of aggressive NK-cell leukemia

Yang Ying, Zhang Xin, Liao Hongyan

(Department of Laboratory Medicine, West China Hospital of Sichuan University)

【Abstract】Objective: To explore the diagnostic role of flow cytometry (FCM) immunophenotyping and the clinical and laboratory characteristics of aggressive NK-cell leukemia (ANKL). **Methods:** A retrospective analysis was performed on clinical data of 11 patients diagnosed of ANKL in West China Hospital from January 2019 to December 2019. Bone marrow cytomorphology, immunophenotype and pathological findings were collected and analyzed. **Results:** All patients suffered from fever accompanied with hemophagocytic lymphohistocytosis (HLH). Hemophagocytic cells were found in bone marrow smears of 8 cases. FCM revealed an immunophenotype of CD2⁺sCD3⁻CD4⁻CD8⁻CD56⁺CD19⁻ in all 11 cases of ANKL. The expression of CD45 and CD56 increased ($P=0.048$), and the volume of cells was relatively large ($P=0.000$). CD16⁻ was found in 5 patients, and partial or complete loss of CD7 expression was identified in 6 patients. Immunohistochemical tests were performed on 8 patients, and the results were CD3ε⁺, granzyme B⁺, and EBER1/2-ISH⁺. **Conclusion:** The immunophenotype of ANKL has unique characteristics and is of great significance in the diagnosis and differential diagnosis of ANKL. Timely and differential diagnosis of ANKL can be achieved by comprehensive analysis of clinical characteristics, bone marrow cell morphology, immunophenotype and immunohistochemistry.

【Key words】aggressive NK-cell leukemia; cell morphology; flow cytometry; immunophenotyping; immunohistochemistry

侵袭性自然杀伤细胞白血病(aggressive NK-cell leukemia, ANKL)是一种罕见的起源于 NK 细胞

的恶性淋巴组织增生性疾病, 临床侵袭性过程明显。ANKL 患者起病急, 有发热、肝脾肿大、器官衰竭等表现, 特征是外周血和骨髓淋巴细胞浸润、淋巴细胞减少, 常伴克隆性大颗粒淋巴细胞, 预后极差。有研究报道绝大多数 ANKL 病例与 EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)感染有关^[1], EBV 的检出可以帮助诊断 ANKL, 而最终确诊需依赖临床表现、细胞形

作者简介: 杨莹, Email: 15802894459@163.com,

研究方向: 血液系统疾病的实验室诊断。

通信作者: 廖红艳, Email: hongyanliao19@163.com。

基金项目: 四川省自然科学基金资助项目(编号: 2023NSFSC1484)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1046.R.20230717.1542.018.html>

(2023-07-18)

态、免疫表型及分子遗传学,还需与多种T细胞和NK细胞淋巴瘤鉴别。然而,ANKL病情发展迅速,预后较差,对多种治疗方案反应不佳,生存期多<3个月^[2],早期诊断并采取治疗能够使患者获益。本研究通过回顾性分析并总结11例ANKL患者的临床表现和实验室检查结果,并关注各检测方法的敏感性和特异性,以期为合理选择检测方法、解读检查结果、帮助临床早期诊断ANKL并改善临床结局提供参考。

1 材料与方法

1.1 临床资料

2019年1月至2019年12月在四川大学华西医院就诊的ANKL患者共11例,诊断依据2016年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)造血与淋巴组织肿瘤分类,收集患者的临床表现、实验室指标及治疗情况,并进行随访。其中男9例,女2例,住院患者10例,1例门诊;中位年龄42(23, 67)岁。

1.2 方法

1.2.1 外周血或骨髓流式细胞学(flow cytometry, FCM)检测 主要单抗包括CD2、sCD3、CD4、CD7、CD8、CD16、CD56、CD158a/h/g、CD158b、CD158e、CD94、CD159和CD161。用FACS Canto II (BD)进行检测, FACS Diva 软件进行数据分析。

1.2.2 免疫组织化学检测 活检标本经10%中性甲醛固定、石蜡包埋制片后行免疫组织化学染色。主要抗体包括CD3e、CD20、CD30、CD56、颗粒酶B以及T细胞胞浆内抗原1(T cell intracytoplasmic antigen 1, TIA-1)等,均使用SP法,使用DAB作为显色底物。

1.2.3 原位杂交 以已知EBER I/2阳性的鼻咽癌组织切片作为阳性对照进行原位杂交检测。

1.2.4 T细胞受体(T cell receptor, TCR)- γ 基因重排检测 2

例进行了TCR- γ 基因重排检测,采用PCR法。

1.3 统计学处理

使用SPSS 23.0版进行分析。采用独立样本 t 检验分析11例ANKL患者异常NK细胞免疫表型与11个健康人对照正常NK细胞的表达差异,为保证数据近似正态分布,CD56平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)数据采用对数 \log^{10} 进行转换后分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 临床资料

11例患者中4例出现腹部不适,B超发现脾大就诊;4例出现乏力;2例体格检查发现下肢水肿;3例淋巴结肿大;所有患者均出现发热症状;所有患者均伴噬血细胞淋巴瘤组织细胞增生症(hemophagocytic lymphohistocytosis, HLH)。

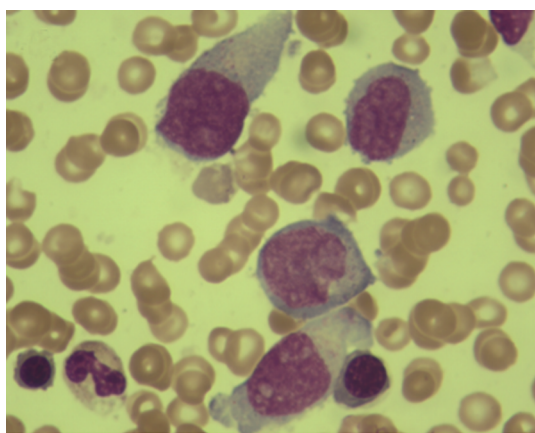
2.2 血象及骨髓象

2.2.1 血象 患者确诊时外周血血红蛋白(hemoglobin, Hb)中位值78(49, 113) g/L;血小板(blood platelet, PLT)中位值19(3, 123) $\times 10^9$ 个/L;中性分叶核粒细胞绝对值(neutral segmented granulocyte absolute value, NEUT)中位值0.70(0.11, 2.42) $\times 10^9$ 个/L;淋巴细胞比例中位值37.1%(5.9%~84.9%)。

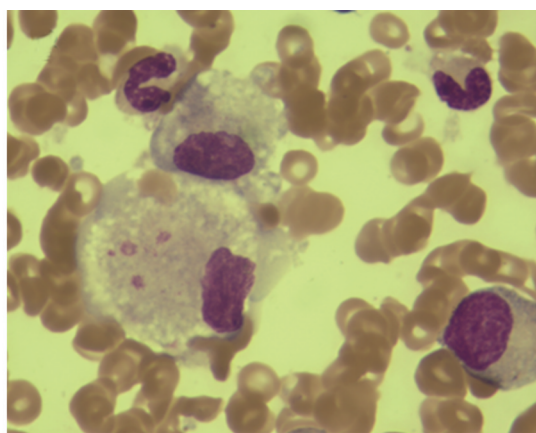
2.2.2 骨髓象 11例患者骨髓细胞均显示增生活跃,淋巴细胞比例中位值为23.5%(4.0%~33.5%),其中7例淋巴细胞比例>20%;8例可见异常形态淋巴细胞,胞体体积大,不规则,胞浆量多,染深蓝色,核染色质粗糙,部分细胞胞浆可见嗜天青颗粒,多有伪足和空泡;8例患者骨髓涂片可见噬血细胞。如图1所示。

2.3 实验室检查

11例患者血清乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)水平明显升高;9例患者行铁蛋白检测,均高于正常水平,其中7例超出检测限;6例患者行IL-2R检测,均明显升高,其中有3例超出检测限(5 000 U/mL);9例患者行EBV-DNA检测,均为阳性,病毒载量最高为 1.76×10^6 copies/mL。



A. 异常形态淋巴细胞



B. 噬血细胞

图1 侵袭性NK细胞白血病患者骨髓细胞形态(瑞氏染色, 1 000 \times)

2.4 免疫表型

2.4.1 流式细胞学 11 例 ANKL 患者的骨髓细胞流式免疫表型分析结果见表 1。所有病例均呈 CD2⁺sCD3⁻CD4⁻CD8⁻CD56⁺, 其中, CD56 表达的平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 值明显高于健康人正常 NK 细胞 ($P=0.048$) (图 2); 10 例患者 FSC/SSC 较大, CD45 较强; 5 例患者无 CD16 表达; 6 例患者 CD7 表达部分或完全缺失; 5 例患者行 CD159a、CD161、CD94 抗体检测, 其中 4 例均表达上述 3 个抗体, 1 例均不表达; 5 例患者行 KIR 家族相关抗体检测, 其中 4 例均不表达 CD158a/h/g、CD158b 和 CD158e, 1 例限制性表达 CD158b 和 CD158e, 不表达 CD158a/h/g。流式分析抗体表达如图 3 所示。

2.4.2 免疫组织化学 8 例患者同时行骨髓活检组织病理学检查结果显示: 8 例表达颗粒酶 B 和 CD3ε, 6 例 CD56 阳

性, 所有病例均不表达原始细胞标记 CD34、TdT 以及粒系标记 MPO。

2.5 原位杂交

8 例患者进行了 EBER 1/2 原位杂交检测, 结果均为阳性。

2.6 分子遗传学

2 例患者行 TCR/IgH 基因重排检测, TCRγ、IgH 均为阴性; 2 例患者检测到 HLH 相关基因的突变位点。

2.7 治疗和预后

10 例住院患者中 3 例患者未行化疗, 其中 1 例入院 15 d 后死亡; 其余 7 例患者中, 2 例行 GLIDE 方案 (吉西他滨+异环磷酰胺+依托泊苷+地塞米松+培门冬酶); 2 例行减量的 GLIDE 方案; 1 例行 LVD 方案化疗 (门冬酰胺酶+长春地辛+地塞米松); 1 例行 VP 方案化疗 (足叶乙甙+地塞米松); 均未接受造血干细胞移植。预后情况详见表 2。

表 1 11 例侵袭性 NK 细胞白血病患者流式免疫表型结果

病例	CD2	sCD3	CD7	CD4	CD16	CD56	CD8	CD57	CD159a	CD161	CD94	CD158a/h/g、 CD158b、CD158e
1	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
2	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
3	+	-	-	-	-	+	-	-	ND	ND	ND	ND
4	+	-	+	-	-	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
5	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
6	+	-	-	-	+	+	-	-	ND	ND	ND	ND
7	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
8	+	-	+	-	-	+	-	-	ND	ND	ND	ND
9	+	-	+	-	+	+	-	+	ND	ND	ND	ND
10	+	-	-	-	+	+	-	-	ND	ND	ND	ND
11	+	-	-	-	-	+	-	ND	-	-	-	CD158a/h/g ⁻ 、 CD158b ⁺ 、CD158e ⁺

注: +, 表达; -, 不表达; ND: 不确定

表 2 11 例侵袭性 NK 细胞白血病患者临床特征

病例	性别	年龄/岁	主要临床表现	血象					预后
				HGB/ (g/L)	PLT/ ($\times 10^9$ 个/L)	NEUT/ ($\times 10^9$ 个/L)	淋巴细胞 比例 ^a /%	淋巴细胞 比例 ^b /%	
1	男	42	发热、便血	62	17	0.21	46.3	33.5	化疗 1 个疗程后缓解
2	男	23	发热、下肢水肿、肝脾肿大	78	15	0.41	40.9	23.5	化疗 1 个疗程后转院
3	男	42	发热	74	19	0.11	70.5	31.5	化疗四个疗程, 3 个月后进展
4	男	60	发热、乏力	113	107	2.24	11.4	7.0	未行化疗, 入院 15 d 后死亡
5	男	35	发热、便血、畏寒	49	11	2.42	45.2	24.0	失访
6	男	41	发热、畏寒、腹泻、淋巴结肿大	79	53	0.70	37.1	4.0	失访
7	男	25	发热、乏力、腹泻、脾大、淋巴结肿大	74	12	0.30	20.0	5.0	化疗一疗程后缓解
8	女	67	发热、淋巴结肿大	81	89	2.41	5.9	4.0	失访
9	男	61	发热、乏力、脾大	85	3	0.76	9.3	26.5	失访
10	男	28	发热、乏力、畏寒、脾大	111	123	0.37	84.9	26.5	化疗 4 个疗程后转院
11	女	46	发热、畏寒、双下肢水肿	57	84	1.44	11.0	21.0	化疗 1 个疗程后转院

注: a, 外周血; b: 骨髓

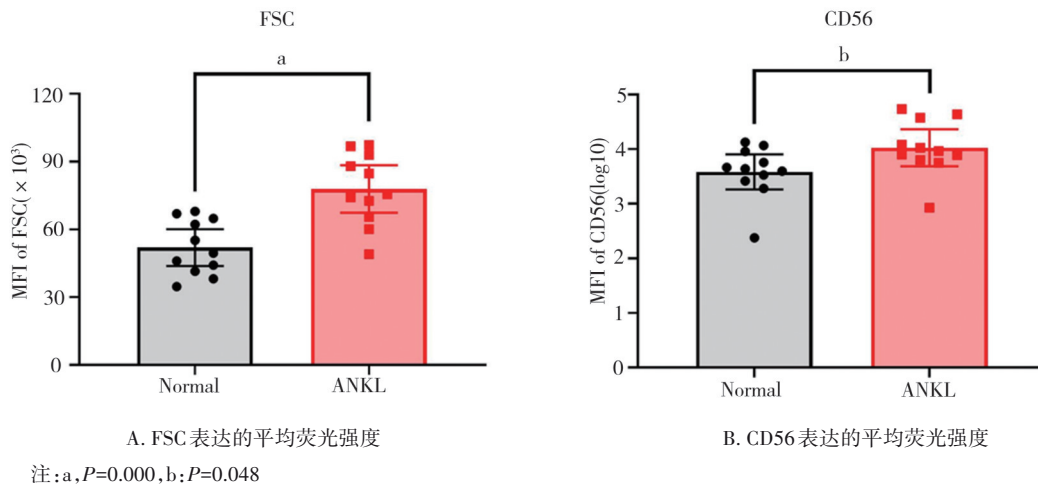
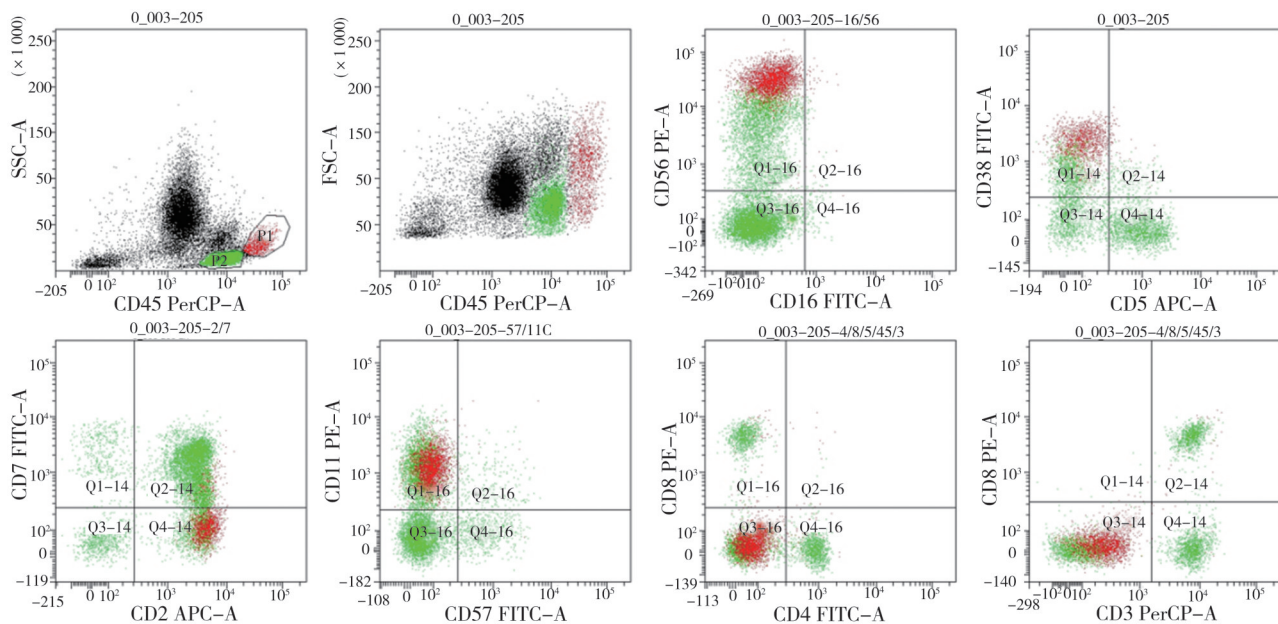


图2 ANKL与健康人正常NK细胞的MFI比较



注:异常NK细胞(红色)的抗体表达

图3 ANKL代表病例的骨髓细胞流式免疫分析图

3 讨论

ANKL是一种罕见的成熟NK细胞恶性增殖性疾病,病情进展快,常伴HLH和凝血功能障碍,预后极差,生存期短^[3-4]。尽早诊断并且采用有效治疗方案对改善ANKL患者的临床结局具有重大意义^[5]。目前,国内外对ANKL尚无统一的诊断标准,其诊断主要依据患者的临床表现、细胞形态学、细胞遗传学及免疫表型特点综合考虑。主要特点为:①好发于中青年;②发热、肝、脾肿大,肝功能异常,凝血功能障碍,全血细胞减少常见,部分患者可有淋巴结肿大、胸腔积液、腹腔积液等;③与EB病毒感染密

切相关;④外周血或骨髓中常出现大颗粒淋巴细胞,胞浆淡染、可见嗜苯胺蓝颗粒,偶见核仁,易见噬血细胞;⑤典型的流式免疫表型为 $sCD3^-$ 、 $CD5^-$ 、 $CD16^{+/-}$ 、 $CD56^+$ 、 $CD57^-$,并且不表达B细胞和髓系特异性标志抗原;⑥无TCR和IgH重排;⑦没有特异的细胞遗传学改变,较常见的染色体异常为 $del(6)(q21q25)$ 和 $del(11q)$ ^[6]。本研究11例ANKL患者的临床特点及病理表现与上述特点基本相符。

ANKL还需要与以下疾病鉴别诊断^[7-8]:①大颗粒淋巴细胞白血病(large granular lymphocytic leukemia, LGL):典型流式免疫表型为: $sCD3^+$ 、 $CD16^+$ 、 $CD57^+$ 和 $TCR\alpha\beta^+$,少数可表达 $TCR\gamma\delta$;②结外NK/T细胞淋巴瘤:好发于中年男性,超过80%的病例累

及鼻和鼻旁组织,根据原发部位分为鼻型和非鼻型 2 种亚型,外周血和淋巴结受累较罕见,如果明显有外周血和骨髓累及应考虑 ANKL;③NK 细胞慢性淋巴组织增生性疾病(NK-cell chronic lymphoproliferative disease,CLPD-NK):多见于成人,呈惰性临床过程,表现常持续 6 个月以上;EBV 检测多为阴性,CD56 弱阳性或阴性,抗-KIR 抗体限制性表达某一亚群或表达完全缺失;预后多良好,极少数会转化为 ANKL。因此,诊断 ANKL 时,需结合临床表现和 FCM 检测中一系列其他抗体联合判断。

NK 细胞是固有免疫效应细胞,表面缺乏像 B 细胞的 κ 、 λ 轻链限制或者 T 细胞的 TCR 重排等单克隆增生的特异性标志,且 ANKL 患者外周血和骨髓中的异常细胞数量不等,通常 <5%,常需多次送检才能检出,因此诊断难度大。细胞形态学对检测细胞克隆性的能力有限,且付杰等^[9]的研究发现,ANKL 患者形态幼稚的淋巴瘤细胞可能会被误认为幼稚或原始淋巴细胞,造成临床的误诊。免疫组化检测时间较长易延误病情,此外,对于缺乏典型遗传异常的 ANKL 患者来说,以 PCR 为靶点识别细胞遗传学和分子异常是不适用的,流式免疫表型分析能弥补上述方法的不足^[10]。本研究 11 例患者均通过流式细胞术查见 NK 细胞表型的异常检出淋巴瘤细胞;8 例通过骨髓涂片形态学检出异常淋巴细胞;8 例患者行免疫组化检查,其中 6 例检出淋巴瘤细胞。因此,流式细胞术敏感度和特异度较高,能帮助发现微小病灶,对临床早期诊断 ANKL 来说具有极大应用价值。

在免疫表型分析中,常用检测 NK 细胞的免疫学标记为 CD2、CD7、sCD3、cCD3、CD5、CD56 和 CD57 等,无 TCR $\gamma\delta$ 和 TCR $\alpha\beta$ 的表达。临床工作中通常选择 CD158a/h/g、CD158b 和 CD158e 用于 NK 细胞克隆性检测。本研究显示,几乎所有 NK 肿瘤细胞存在抗原表达的缺失、减弱或者表达正常 NK 细胞不存在的抗原,最常见的表达缺失或减弱的抗原 CD7、CD57、CD16、CD161 及 CD94^[11]。CD56 是重要的 NK 细胞标志物,是一种神经细胞黏附分子,有助于神经细胞的浸润和侵袭。CD56 没有系别特异性,在一些髓系肿瘤、结外 NK/T 细胞淋巴瘤及母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤(blastic plasmacytoid dendritic cell tumor, BPDCN)中也可以表达。本研究显示,ANKL 常伴有 CD56 高表达,与 Lima M^[12]的研究一致,可作为流式检测中重要的辅助诊断依据之一。

流式细胞术对快速流动的细胞进行多参数、快

速的定量分析和分选,敏感性和特异性较强,为了提高敏感度,还可从多个区域获取标本,例如外周血和胸腔积液,来帮助检出异常细胞,流式细胞术和其他临床检查应相互关联和互补,协助为 ANKL 的诊断提供有效的线索。综上,流式细胞术在 ANKL 的诊断中具有重要价值,在临床实践中,应该纳入此方法为 ANKL 的实验室诊断路径。

参 考 文 献

- [1] Hu X, Yang Y, Chen L, et al. Chronic active Epstein-barr virus infection progresses to aggressive NK cell leukemia with a poor prognosis[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(10):12006-12015.
- [2] Donato UM Jr, Shoeleh C, Galligan A. A case report on aggressive natural killer cell leukemia in a pediatric patient[J]. *Cureus*, 2022, 14(6):e25634.
- [3] Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms[J]. *Leukemia*, 2022, 36(7):1720-1748.
- [4] Yang R, Ai Y, Liu C, et al. Aggressive natural killer cell leukemia in an adolescent patient: a case report and literature review[J]. *Front Pediatr*, 2022, 10:829927.
- [5] Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms[J]. *Blood*, 2016, 127(20):2375-2390.
- [6] El Hussein S, Medeiros LJ, Khoury JD. Aggressive NK cell leukemia: current state of the art[J]. *Cancers*, 2020, 12(10):2900.
- [7] Jiang NG, Jin YM, Niu Q, et al. Flow cytometric immunophenotyping is of great value to diagnosis of natural killer cell neoplasms involving bone marrow and peripheral blood[J]. *Ann Hematol*, 2013, 92(1):89-96.
- [8] 周剑峰, 李春蕊. 侵袭性 NK 细胞白血病的诊断与鉴别诊断[J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(4):278-279.
- [9] Zhou JF, Li CR. Diagnosis and differential diagnosis of aggressive NK cell leukemia[J]. *Chin J Hematol*, 2014, 35(4):278-279.
- [10] 付杰, 解丽丽, 李博, 等. 大颗粒淋巴细胞白血病的形态学和免疫表型特点[J]. *临床血液学杂志*, 2014, 27(11):987-989.
- [11] Fu J, Xie LL, Li B, et al. Morphologic and immunophenotypic features of large granular lymphocytic leukemia[J]. *J Clin Hematol*, 2014, 27(11):987-989.
- [12] Li Y, Wei J, Mao X, et al. Flow cytometric immunophenotyping is sensitive for the early diagnosis of de novo aggressive natural killer cell leukemia (ANKL): a multicenter retrospective analysis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(8):e0158827.
- [13] Lima M, Spínola A, Fonseca S, et al. Aggressive mature natural killer cell neoplasms: report on a series of 12 European patients with emphasis on flow cytometry based immunophenotype and DNA content of neoplastic natural killer cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(1):103-112.
- [14] Lima M. Extranodal NK/T cell lymphoma and aggressive NK cell leukaemia: evidence for their origin on CD56⁺ bright CD16^{-/+} dim NK cells[J]. *Pathology*, 2015, 47(6):503-514.

(责任编辑:唐秋娟)