

# 白血病细胞 DNA 及 CD44 的临床研究

纪春岩 张 锊 刘海鹏 刘亚民 徐从高 朱媛媛 刘春生 管 辉 张茂宏

**摘要** 通过综合研究不同病期急性白血病、慢粒急变及骨髓增生异常综合征——难治性贫血伴幼稚细胞增多(MDS-RAEB)患者外周血白血病细胞 DNA、细胞周期及 CD44 的变化,发现其与临床的关系,以指导临床诊断及治疗。应用流式细胞仪(FCM)研究了 46 例急性白血病,10 例慢粒急变及 5 例 MDS-RAEB 患者 DNA 指数、DNA 倍体和 S 期百分率(SP)的分布及血液 CD44 表达情况,并与正常对照进行了比较。急性白血病、慢粒急变及 MDS-RAEB 三组患者 DNA 异倍体检出率相似;急性白血病难治/复发组 DNA 非整倍体率均高于完全缓解组,且 FCM 可发现体内存在的低于光镜检测水平的残留白血病细胞。初诊时呈现 DNA 整倍体及低 DNA 指数的急性白血病患者具有较好的治疗效果。患者组血液 CD44 表达与正常对照组间无显著性差异。急性白血病患者制定化治疗方案时,DNA 指数及 DNA 非整倍体率可作为一重要参考指标。

**关键词** 白血病细胞;DNA;CD44

近年来,流式细胞仪(FCM)在白血病的研究中已广泛应用。检测白血病细胞 DNA 含量异常,可作为辅助诊断的一个参考指标。快速分析白血病细胞动力学的变化,可以估价其增殖能力,并可评估化疗的疗效。淋巴细胞 CD44 作为粘附分子参与淋巴细胞与小静脉内皮细胞反应,促使其归巢,即作为淋巴细胞归巢受体起作用。近来发现 CD44 在肿瘤生长及浸润转移中起重要作用。

本研究通过综合研究不同病期白血病患者外周血细胞 DNA 及细胞周期变化、CD44 的变化,以期发现白血病患者细胞生物学特性、CD44 与预后的关系,以指导临床诊断及治疗。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验方法

1.1.1 DNA 流式细胞术检测 取肝素抗凝血 2.0ml,用淋巴细胞分层液进行梯度密度离心,将分离的单个核细胞用 PBS 洗二次,70% 冰乙醇固定,放置 0~4℃ 冰箱备检。将制备好的单细胞悬液固定剂弃之,用 PBS 洗二次,取  $10^6$ /ml 白血病细胞加入 PI 染色液(内含 PI50ug/ml, RNase 50ug/ml),经室温 30' 即可上机分析。同时用正常人淋巴细胞作外参。

1.1.2 CD44 流式细胞术检测 取肝素抗凝血 100μl,

加入荧光标记单克隆抗体 CD44-FITC 15μl 放置避光处室温 30',加入溶血素 2ml,混匀,10' 后离心,用 PBS 洗涤两次,上机检测。所用流式细胞仪型号为 FACS Vantage,由美国 Becton Dickinson 公司生产。RNase、EB 由 Sigma 公司生产, CD44 单抗由 Immunotech 公司生产。

1.2 观察对象及分组 选取 1996 年 4 月至 1997 年 8 月在山医大附院血液内科病房住院病例 61 例,其中男 39 例,女 22 例,年龄 12~66 岁,平均 35.59 岁。急性白血病患者 46 例,其中急淋 15 例(初诊 10 例、复发/难治 3 例、完全缓解 2 例),急非淋 31 例(初治 22 例、复发/难治 4 例、完全缓解 5 例)。慢粒急变 10 例。骨髓增生异常综合征——难治性贫血伴幼稚细胞增多(MDS-RAEB)5 例。所有病例均经细胞学及免疫学确诊。

1.3 标本采集及处理 采集受检者空腹静脉血 5ml,肝素抗凝(50u/ml),4000 rpm 离心 5 分钟,用淋巴细胞分层液常规方法获取单个核细胞,待测。

1.4 统计学方法 采用 POMS 2.00 医学统计程序集,IBM 微机进行  $\chi^2$  检验及方差分析。

## 2 结果

2.1 急性白血病组 DNA 指数、DNA 非整倍体率及 S 期百分率(SP)均略高于慢粒急变及 MDS-RAEB 组,但经统计学处理后三组无显著性差异。

2.2 急性白血病各亚组 DNA 指数、DNA 倍体和 SP 分布可见表 1。急性白血病完全缓解组 DNA 指数、DNA 非整倍体率及 SP 均明显低于急性白血病难治/

作者单位:250012 济南,山东医科大学附属医院肿瘤中心(纪春岩、张 锊、徐从高、朱媛媛、刘春生、管 辉、张茂宏);山东省医学科学院(刘海鹏、刘亚民)

复发组,  $P < 0.05$ , 完全缓解组与初治组及初治组与难治/复发组间均无显著性差异。

表 1

急性白血病各亚组 DNA 指数、DNA 倍体和 SP 的分布

组别	例数	DNA 指数	DNA 非整倍体率	SP
初治组	32	1.13±0.19	50.00%	5.60±7.31
难治/复发组	7	1.22±0.16	85.71%	5.23±3.12
完全缓解组	7	1.03±0.10 *	14.29% *	0△

注:完全缓解组和难治复发组比较 \*  $P < 0.05$ ; △  $P < 0.01$

表 2 急性白血病初治组 DNA 指数、DNA 倍体和 SP 的分布与化疗疗效之间的关系

组别	例数	DNA 指数	DNA 非整倍体率	SP
急性白血病初治 CR 组	17	1.06±0.08 *	29.41% *	5.36±7.41
急性白血病初治非 CR 组	15	1.21±0.24	73.33%	5.87±7.45

注:CR 组和非 CR 组比较 \*  $P < 0.05$

表 2 可见急性白血病初治完全缓解(CR)组 DNA 指数及 DNA 非整倍体率明显低于急性白血病初治非 CR 组, 经统计学处理后  $P < 0.05$ 。尽管急性白血病初治 CR 组 SP 略低于急性白血病初治非 CR 组, 但两者间无显著性差异。即急性白血病初治组 DNA 指数及 DNA 非整倍体率低者较急性白血病 DNA 指数及 DNA 非整倍体率高者, 更易获得完全缓解。

2.4 正常对照组及各组病例 CD44 表达情况研究发现, 三组病人 CD44 表达与正常对照组相比较均无显著性差异。

### 3 讨论

应用流式细胞仪(FCM)可较快速对细胞群体多参数分析和细胞分选, 它以单个核细胞为测定单位, 能测量细胞各种特性, 如: 细胞大小、生化组成、蛋白表型以及生理状态和酶的活性<sup>[1]</sup>。正常组织、反应性组织以及良性肿瘤的 FCM 研究表明: 它们都具有正常的二倍体 DNA 含量<sup>[2]</sup>, 白血病、MDS 等则为非整倍体。在不同疾病或同一疾病的不同类型中, 非整倍体检出率不同, 如急性白血病(AL)为 20%~50%, 实体瘤为 70%~80%, 急淋检出率高于急非淋<sup>[3~5]</sup>。但尚未见有关 MDS-RAEB 及慢粒急变大宗病例分析报告。本研究中急性白血病 DNA 指数、非整倍体率与其它报道相近, SP 比其它学者报告略低, 可能原因为其它学者标本为骨髓或骨髓及外周血所致。本研究中, 慢粒急变、MDS-RAEB 以上三指标与急性白血病相比均无显著性差异。

Andreef 等对 102 例成人 AL 研究表明 FCM 可发现体内存在的低于光镜检测水平的残留白血病细胞, 以利于制定维持化疗方案及发现早期复发<sup>[6]</sup>。本研究显示急性白血病初治组及难治/复发组 DNA 指数、DNA 非整倍体率、SP 均高于完全缓解组, 其中难治/复发组与 CR 组的差异更为显著, 均具有统计学意义。随着患者达到 CR、DNA 指数、DNA 非整倍体率、SP 均显著下降, 但仍有部分 CR 患者存在 DNA 非整倍体。此类患者应引起临床医师重视, 以更大限度地延长患者长期生存率。

2.3 急性白血病初治组 DNA 指数、DNA 倍体及 SP 分布与化疗疗效之间的关系(见表 2)。

AL 的 DNA 指数(DI)预后意义尚未解决。194 例急性髓性白血病(AML)的研究表明: 二倍体及 DI 低的病人化疗反应较好, 生存期长, 而 Andreef 等认为: 无论采用什么技术, SP 似乎也不能在治疗前提供任何信息<sup>[6]</sup>。本研究显示 AL 初治达 CR 组 DNA 指数及 DNA 非整倍体率均低于 AL 初治未达 CR 组。但两组 SP 相比无显著性差异, 即 SP 并不能决定患者的治疗效果。此结果与以上学者报道相似。故本文作者认为在 AL 患者制定化疗方案时除可以 mdrl 作为依据外, 患者 DNA 指数及 DNA 非整倍体率亦可作为一重要参考指标。

王江方等<sup>[7]</sup>分析了 10 例正常人和 58 例 ALL 患者骨髓单个核细胞表面粘附分子的表达。与正常人相比较, CD116、CD54 在各型白血病肿瘤细胞上表达都明显下降, 与之相反, CD44 和 CD49d 的荧光阳性率明显升高。但本研究未发现患者组与对照组的差异, 此结果还有待于进一步扩大样本量进行深入探讨。

### 参 考 文 献

- 1 McCulloch EA. Stem cell in normal and leukemic hemopoiesis. Blood, 1983, 62:1
- 2 Barlogie B, Raber MN, Schumann J, et al. Flow cytometry in clinical cancer research. Cancer Res, 1983, 43:3982
- 3 张瑞欣. 流式细胞术在急性白血病临床的应用. 国外医学输血及血液学分册, 1988, 11(3):132
- 4 宋华, 郭淑芳, 徐淑芝, 等. 用流式细胞仪测定小儿急性白血病细胞 DNA 及其临床意义研究. 中华血液学杂志, 1994, 15(3):137

- 5 左连富, 郭建文, 王敏彦. 流式细胞仪在白血病化疗中的应用. 中华血液学杂志 1991, 12(3):131
- 6 Andreef M, Darzynkiewicz Z, Sharpless TK, et al. Discrimination of Human Leukemia Subtypes by Flow Cytometric Analysis of Cellular DNA and RNA. Blood, 1980, 55:282
- 7 王江方, 张学先, 张毅, 等. 急性淋巴细胞性白血病细胞及其骨髓基质细胞粘附分子表达和粘附行为的探讨. 中国免疫学杂志, 1996, 12:290

## The Clinical Study of Leukemia Cell DNA And CD44

Ji Chunyan et, al

Department of oncology, shandong medial university, Jinan 250012

**Objective:** We studied the peripheral blood leukemic cell DNA, cell cycle and CD44 changes of acute leukemia, blast crisis of CML and MDS-RAEB Patients to find their relationship with clinical feature in order to guide the clinical diagnosis and treatment.

**Methods:** By using FCM, the DNA index, DNA ploidy and SPof 46 acute leukemia, 10 blast crisis of CML, 5 MDS-RAEB patients and also blood CD44 expressions were studied in the above patients. **Results:** There was difference of DNA aneuploidy in acute leukemia, blast crisis of CML and MDS-RAEB Patients; DNA aneuploidy was higher in radical/relapsed acute leukemia patients than that of CR acute leukemia patients. The treatment of acute leukemia patients with diploids and lower DNA index was more effective. There was no difference of blood CD44 expression between patients and normal controls. **Conclusion:** DNA index and aneuploidy may be regarded as an important reference in giving chemotherapy regimens of acute leukemia.

**Key words:** Leukemic cell; DNA; CD44

## 儿童乳腺叶状囊肉瘤 1 例

刘孝伟 杜贤芹

患者女, 10岁, 因左乳房肿块半年余, 于1997年5月10日收入院。本体: 左乳房有肿物, 大小约6cm×6cm×2cm, 质硬、活动差, 压痛(+), 乳头无分泌物。初步论断: 乳房纤维瘤。于1997年5月13日在基础麻醉下行右乳肿物切除术, 包膜完整; 术后病理诊断: 叶状囊肉瘤。

叶状囊肉瘤和乳腺纤维腺瘤都属于乳腺纤维上皮型肿瘤, 具有良性形态学表现者称巨纤维腺瘤, 而叶状囊肉瘤指间质细胞有恶性表现的肿瘤; 巨纤维腺瘤和叶状囊肉瘤的主要成份是增性的纤维样间质细胞; 巨纤维腺瘤具有良性细胞学特征, 核小而规则异形性不显著。叶状囊肉瘤的间质细胞高度增生, 细胞大小、形状不一, 有核分裂相。临幊上大多数为40岁以上的妇女, 以乳腺肿块为表现。病程长, 在短期内增长迅速, 边界清楚, 与皮肤不粘连; 但大多皮肤表面有静脉曲张, 肿块凹凸不平, 呈结节分叶状。发生于青春期, 由于青

春期作为小叶支架的纤维组织增生最快, 对雌激素敏感的纤维细胞在此期内容易过度增生。

叶状囊肉瘤主要是手术治疗, 局部切除的复发率很高, 复发后可再作广泛切除仍能获得较好的效果, 该肿瘤主要是血道转移, 偶见淋巴道转移。有人报告: 淋巴结转移达4%。认为叶状囊肉瘤临幊无淋巴结肿大时的手术范围需将整个乳腺切除, 包括皮肤及胸肌筋膜切除。临幊有淋巴结肿大者应作改良根治术, 如胸肌有侵犯应同时切除胸肌。

叶状囊肉瘤对放射线不敏感, 如手术切除不完全, 应术后放疗, 剂量约50~60GY。该肿瘤经适当的治疗后预后良好, 至于放疗及化疗、免疫治疗的疗效尚难评价。

作者单位: 272123 济宁肿瘤医院(刘孝伟); 济宁医学院附院(杜贤芹)