

## 外周血涂片中涂抹细胞与幼稚淋巴细胞的比例在慢性淋巴细胞白血病中的意义

姜 玉<sup>1</sup>, 张建富<sup>2\*</sup>, 王 蓉<sup>2</sup>, 吴雨洁<sup>2</sup>, 卢绪章<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属常州市第二人民医院血液实验室, 江苏 常州 213000; <sup>2</sup>南京医科大学第一附属医院血液研究所, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨外周血涂片中涂抹细胞占淋巴细胞的比例和幼稚淋巴细胞占淋巴细胞的比例预测慢性淋巴细胞白血病预后的价值。方法:每例患者计数外周血涂片中200个淋巴细胞,计算涂抹细胞、幼稚淋巴细胞占淋巴细胞的比例。同时用流式细胞仪检测外周血中ZAP-70、CD38阳性细胞在CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>淋巴细胞中的比例,分析涂抹细胞、幼稚细胞与细胞表达ZAP70、CD38的相关性。结果:在53例慢性淋巴细胞白血病患者中,涂抹细胞的比例为24.5%(1%~65%),幼稚细胞的比例为5.3%(1%~51%),涂抹细胞的比例和幼稚细胞的比例呈负相关( $r = -0.317, P = 0.021$ )。在ZAP70阳性的11例(20.5%)患者中,涂抹细胞的比例明显低于ZAP70阴性的患者( $P = -0.046$ ),而幼稚细胞比例则高于ZAP70阴性的患者( $P = 0.002$ ),涂抹细胞比例和ZAP70表达呈负相关( $r = -0.782, P = 0.004$ )。在CD38阳性15例(28.3%)患者中,涂抹细胞的比例低于CD38阴性的患者( $P = 0.024$ ),而幼稚细胞则高于CD38阴性的患者( $P < 0.001$ ),幼稚细胞比例和ZAP70、CD38均呈正相关(ZAP70: $r = 0.685, P = 0.020$ ; CD38: $r = 0.575, P = 0.025$ )。结论:慢性淋巴细胞白血病患者外周血中涂抹细胞、幼稚细胞、ZAP70和CD38的表达基本一致,其中检测涂抹细胞和幼稚细胞比例的操作简单易行,在未开展流式细胞仪检测的基层可以作为预测慢性淋巴细胞白血病预后的指标。

**[关键词]** 涂抹细胞;幼稚细胞;ZAP70;CD38;慢性淋巴细胞白血病

**[中图分类号]** R733.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)04-495-04

doi:10.7655/NYDXBNS20140419

## Significance of smudge cells and prolymphocytic cells on peripheral blood smear in chronic lymphocytic leukemia

Jiang Yu<sup>1</sup>, Zhang Jianfu<sup>2\*</sup>, Wang Rong<sup>2</sup>, Wu Yujie<sup>2</sup>, Lu Xuzhang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Laboratory of Hematology, Changzhou No.2 People's Hospital Affiliated to NJMU, Changzhou 213000; <sup>2</sup>Research Institute of Hematology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the proportion of smudge cells and prolymphocytic cells in lymphocytes from peripheral blood smear to predict prognosis value of chronic lymphocytic leukemia (CLL). **Methods:** We counted 200 lymphocyte in each patient's routine blood smear, and calculated the proportion of smudge cells and prolymphocytic cells in lymphocytes. We detected the expression of ZAP70 or CD38 among CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> cells by flow cytometry. We analyzed the correlation of smudge cells, prolymphocytic cells, ZAP70<sup>+</sup> cells and CD38<sup>+</sup> cells. **Results:** In 53 patients with CLL, the median percentage of smudge cell was 24.5% (1%~65%), the median percentage of prolymphocytic cell was 5.3% (1%~51%). Smudge cells were negatively related to prolymphocytic cells ( $r = -0.317, P = 0.021$ ). The proportion of smudge cells in 11 patients with ZAP70<sup>+</sup> was significantly lower than that in patients with ZAP70<sup>-</sup> ( $P = -0.046$ ), and the proportion of prolymphocytic cell was higher than that in patients with ZAP70<sup>-</sup> ( $P = 0.002$ ), smudge cells proportion was negatively correlated with ZAP70<sup>-</sup> expression ( $r = -0.7818, P = 0.004$ ). In 15 patients with CD38<sup>+</sup>, the proportion of smudge cells was lower than that in patients with CD38<sup>-</sup> ( $P = 0.024$ ), and the proportion of prolymphocytic cells was higher than that in patients with CD38<sup>-</sup> ( $P < 0.001$ ), the proportion of prolymphocytic cells was positively correlated with ZAP70 or CD38 expression

**[基金项目]** 南京医科大学“十二五”教育研究课题(NY222201339)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: BLOOD409@163.com

(ZAP70:  $r = 0.685, P = 0.020$ ; CD38:  $r = 0.575, P = 0.025$ ). **Conclusion:** In CLL patients, smudge cells or prolymphocytic cells on peripheral blood smear and expression of ZAP70 and CD38 in peripheral blood were the same. The detection of smudge cells and prolymphocytic cells on peripheral blood smear is simple and easy, it can be used as a prognostic indicator of CLL patients in basic hospital which did not carry out flow cytometry.

[Key words] smudge cell; prolymphocytic cell; ZAP70; CD38; CLL

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(04): 495-498]

慢性淋巴细胞白血病(CLL)是一种淋巴系统增殖性疾病,好发于中老年人,是一种低度恶性的小淋巴细胞异质性疾病,临床预后差异大,有的患者进展缓慢终生无需治疗,有的患者进展迅速,在初诊时即表现为侵袭性。因此,能够进行正确、早期评估对于患者来说非常关键。目前的研究表明,在CLL预后的众多相关因素中,ZAP-70与CD38的表达是CLL预后及临床分期的两个独立预测指标<sup>[1]</sup>。本研究通过分析患者外周血涂片中涂抹细胞和幼稚淋巴细胞占淋巴细胞的比例及其与ZAP-70和CD38的关系,说明其在慢性淋巴细胞白血病预后中的意义。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

自2008年4月~2011年1月在本院已确诊CLL的患者53例,其中男31例,女22例,中位年龄为62(41~84)岁。所有患者进行外周血常规、外周血涂片和骨髓细胞形态学检查、多参数流式细胞术免疫分型及染色体核型分析。其诊断均符合国内诊断标准,且排除其他疾病<sup>[2]</sup>。

单克隆抗体CD5-FITC、ZAP-70-PE、CD19-ECD、CD38-CY5等及其相应的标记荧光素的同型对照,除ZAP-70及PE标记的同型对照为美国calt-ag产品(clone 1E7.2)之外,其余单克隆抗体均为法国Immunotech公司产品。流式细胞仪为美国Beckman-Coulter公司的Epics XL型,采用Expo32-ADC分析软件。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 流式细胞术检测CD38、ZAP-70表达水平

新鲜抽取的肝素抗凝外周血用密度梯度法分离出单个核细胞,调整细胞密度至 $0.5 \times 10^6$ 个/ml,取100  $\mu$ l细胞悬浊液加CD5-FITC、CD19-ECD、CD38-CY5各20  $\mu$ l避光孵育15 min,进一步加入Fix & Perm试剂盒A固定液100  $\mu$ l,避光孵育15 min,加入PBS 2 ml,90 g离心5 min,弃去上清,再加入Fix & Perm试剂盒100  $\mu$ l B破膜剂避光孵育5 min,然后加ZAP-70-PE抗体5  $\mu$ l避光孵育15 min,加入PBS 2 ml,90 g离心5 min,弃去上清,用500  $\mu$ l PBS

重新悬浮后上机检测,至少检测 $10^4$ 个细胞;同时做同型对照管。根据前向散射光和侧向散射光以淋巴细胞设门,进一步在CD5、CD19双阳性(B-CLL细胞)的基础上分析ZAP-70和CD38的表达率, $\geq 20\%$ 为阳性<sup>[3]</sup>。

#### 1.2.2 外周血涂片检查

应用瑞氏和姬姆萨复合染液,室温染色15 min,水洗晾干后镜检,在涂片佳、染色良好,细胞分布均匀处每张外周涂片计数200个淋巴细胞,其中涂抹细胞即为退化细胞,幼稚淋巴细胞特征为:细胞胞体大,核质比高,胞质较深,嗜碱性,核染色质中度块状,有1个明显的核仁,可含少量嗜天青颗粒。计算涂抹细胞及幼稚淋巴细胞所占比例。患者涂片细胞计数由1个实验员完成。

### 1.3 统计学方法

应用SPSS13.0统计软件处理数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较用 $t$ 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。涂抹细胞、幼稚细胞、ZAP-70和CD38相关性进行Spearman相关性检验。

## 2 结果

### 2.1 CLL患者外周血涂片中涂抹细胞和幼稚细胞的比例

53例CLL的患者中,涂抹细胞比例在1%~65%,平均涂抹细胞的比例是24.2%。幼稚淋巴细胞比例在1%~51%,平均幼稚淋巴细胞比例是5.3%。涂抹细胞的比例和幼稚细胞的比例呈负相关( $r = -0.317, P = 0.021$ ,图1)。

### 2.2 涂抹细胞的比例与ZAP-70、CD38的相关性

ZAP-70阳性的11例患者中涂抹细胞比例的平均值为16.6%,ZAP-70阴性的42例患者涂抹细胞比例的平均值为26.2%,两组之间差异有统计学意义( $t = 2.047, P = 0.046$ ,表1)。同时涂抹细胞的比例数和ZAP-70+细胞的比例数呈负相关( $r = -0.782, P = 0.004$ ,图2)。CD38阳性的15例患者中涂抹细胞比例为17.3%,CD38阴性的38例患者中涂抹细胞比例为27.0%,两组之间有显著差异( $t = 2.330$ ,

$P = 0.024$ , 表 1)。同时在 CD38 阳性的患者中涂抹细胞比例和 CD38 阳性细胞数无相关性( $r = -0.257$ ,  $P = 0.354$ , 图 2)。

表 1 外周血涂片中涂抹细胞和幼稚细胞的比例

Table 1 Percentage of smudge cells and prolymphocytic cells on routine blood smear (%)

细胞类型	<i>n</i>	涂抹细胞比例	幼稚细胞比例
ZAP70(+)	11	16.6 ± 3.8	11.8 ± 4.3
ZAP70(-)	42	26.2 ± 2.2*	3.8 ± 0.6*
CD38(+)	15	17.3 ± 2.6	11.3 ± 3.3
CD38(-)	38	27.0 ± 2.4 <sup>#</sup>	3.2 ± 0.4 <sup>#</sup>

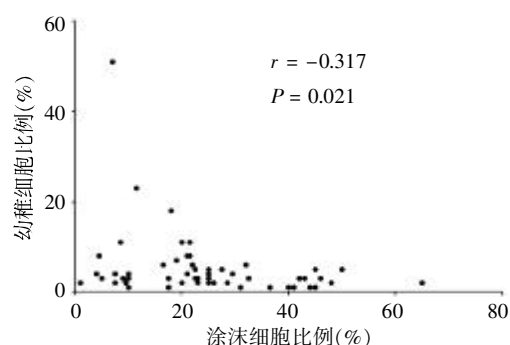


图 1 外周血涂片中涂抹细胞和幼稚细胞的关系

Figure 1 Correlation of smudge cells with prolymphocytic cells

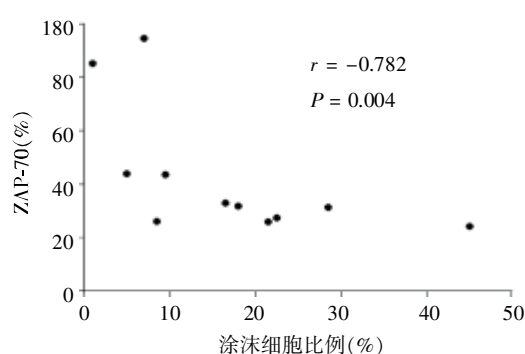
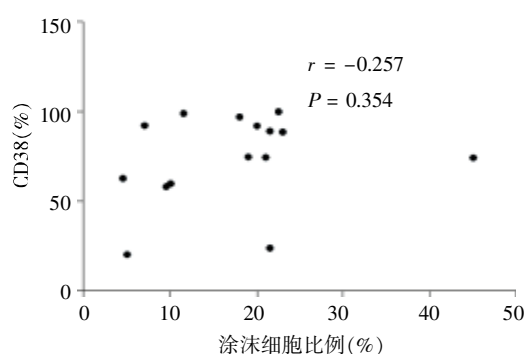


图 2 外周血涂片中涂抹细胞和 ZAP-70、CD38 的关系

Figure 2 Correlation of smudge cells with ZAP-70 and CD38



### 2.3 幼稚细胞的比例与 ZAP-70、CD38 的相关性

ZAP-70 阳性的 11 例患者中幼稚细胞比例的平均值为 11.8%, ZAP-70 阴性的 38 例患者幼稚细胞比例的平均值为 3.8%, 两组之间有明显差异 ( $t = 3.270$ ,  $P = 0.002$ , 表 1)。同时在 ZAP-70 阳性的患者中幼稚细胞的比例数和 ZAP-70 阳性细胞的比例数

呈明显正相关( $r = 0.685$ ,  $P = 0.020$ , 图 3)。CD38 阳性的 15 例患者幼稚细胞比例为 11.3%, CD38 阴性的 38 例患者中幼稚细胞为 3.2%, 两组之间有明显差异( $t = 3.767$ ,  $P < 0.001$ , 表 1), 同时在 CD38 阳性的患者中幼稚细胞比例数和 CD38 阳性细胞比例数呈正相关( $r = 0.575$ ,  $P = 0.025$ , 图 3)。

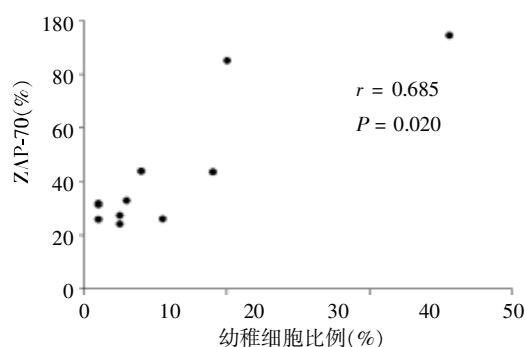
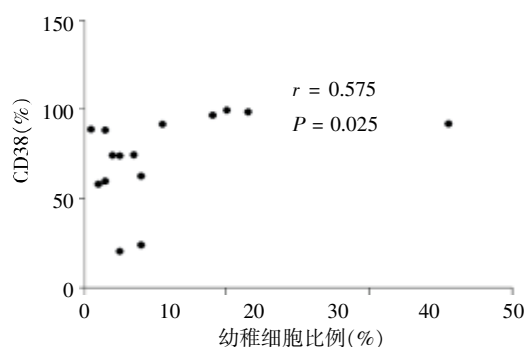


图 3 外周血中幼稚细胞和 ZAP-70、CD38 的关系

Figure 3 Correlation of Prolymphocytic cells with ZAP-70 and CD38



## 3 讨论

CLL 是一种低度恶性的小淋巴细胞异质性疾病, 临床上预后差异较大, 预后相关因素多, 在多种预后参数中, IgVH 基因有无突变是 CLL 最好的预

后指标<sup>[4-5]</sup>, 目前的研究表明, 异型淋巴细胞表面 CD38 及 ZAP-70 蛋白的表达与 CLL 的临床分期及预后有一定的相关性<sup>[6]</sup>。Rassenti 等<sup>[7]</sup>发现, CLL 患者 CD38 表达与 IgVH 突变状态呈负相关, CD38 阳性患者即使处于 Rai0 期, CD38 阳性者亦常有侵袭

性疾病发生。ZAP-70 表达联合 IgVH 突变、染色体改变、CD38 阳性率、淋巴细胞倍增时间等可更全面地监测 CLL 的预后及进展<sup>[8]</sup>。

外周血涂片中的涂抹细胞是 CLL 患者的特征性细胞,所有的 CLL 患者都表达一定比例的涂抹细胞,而在其他的淋巴增殖性疾病比较罕见<sup>[9-10]</sup>。最近的研究发现,涂抹细胞的形成是因为淋巴细胞中有一种波形蛋白与细胞硬度有关,其低表达可以使淋巴细胞更加脆弱,在推片过程中易于破碎,因此在外周血中表现为涂抹细胞<sup>[11]</sup>,淋巴细胞这种波形蛋白高表达与无 IgVH 基因突变与不良的预后有关<sup>[12]</sup>,另一方面,这种波形蛋白还参与正常细胞与异常或有害细胞的能量转换<sup>[13]</sup>。所以涂抹细胞的比例与 CLL 患者有无 IgVH 基因突变及预后是否良好有着非常密切的关系。以前的研究表明,不典型细胞形态学、存在幼稚或核裂的淋巴细胞与预后不良有关<sup>[13]</sup>。因此涂抹细胞能够作为反映白血病细胞一些生物学特征的较好指标。

本研究结果表明,涂抹细胞比例在 CD38<sup>+</sup>或 ZAP-70<sup>+</sup>的 CLL 患者明显低,且涂抹细胞的比例与 ZAP70<sup>+</sup>细胞比例呈明显负相关,说明涂抹细胞和 CD38、ZAP-70 一致,可能提示预后相对好。幼稚淋巴细胞的比值在 CD38<sup>+</sup>、ZAP-70<sup>+</sup>患者中明显高,且幼稚细胞的比值和 ZAP-70、CD38 阳性细胞比例呈明显的正相关,说明幼稚细胞和 ZAP-70、CD38 的表达一致,可能提示预后相对差。CLL 患者外周血涂片中涂抹细胞比例和幼稚细胞比例呈负相关,提示涂抹细胞增高,幼稚淋巴细胞减低对于 CLL 患者预后是一种良好的预示。相反地随着涂抹细胞的减低,幼稚淋巴细胞的增高,对于 CLL 患者预示着不良的预后。

本研究表明 CLL 患者外周血涂片的涂抹细胞与幼稚淋巴细胞的比值与 ZAP-70 蛋白的表达及 CD38 的表达基本一致,在方法上更为简便,易行,在流式细胞术还未开展的基层医院来说,可以作为预测 CLL 患者预后的指标。

#### [参考文献]

[1] Rossi FM, Del Principe MI, Rossi D, et al. Prognostic impact of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia: mean fluorescence intensity T/B ratio versus percentage of positive cells [J]. J Transl Med, 2010, 3 (8): 8-23

[2] 张之南, 沈 梯. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 北京科学出版社, 2007: 139-147

[3] Durig J, Nuckl H, Crmer M, et al. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia [J]. Leukemia, 2003, 17(12): 2426-2434

[4] Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated IgV (H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia [J]. Blood, 1999, 94(6): 1848-1854

[5] Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, et al. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V (H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course [J]. Leukemia, 2002, 16(6): 993-1007

[6] 吴雨洁, 李建勇, 朱光荣, 等. ZAP-70 在 24 例 B 细胞慢性淋巴细胞白血病中的表达研究 [J]. Exp Hematol, 2006, 14(2): 237-240

[7] Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, et al. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia [J]. Blood, 2001, 98(9): 2633-2639

[8] Del Poeta G, Del Principe MI, Consalvo MA, et al. The addition of rituximab to fludarabine improves clinical outcome in untreated patients with ZAP-70-negative chronic lymphocytic leukemia [J]. Cancer, 2005, 104(12): 2743-2752

[9] Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, et al. Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: A universally available prognostic test [J]. Mayo Clin Proc, 2007, 82 (4): 449-453

[10] Schleiffenbaum B, Fehr J. Value of the blood picture and flow cytometry immunotyping in the early diagnosis of low-grade lymphoma [J]. Ther Umsch, 1996, 53(2): 117-122

[11] Nowakowski GS, Lee YK, Bone ND, et al. Analysis of chronic lymphocytic leukemia cells identifies vimentin as a novel prognostic factor for aggressive disease [J]. Blood, 2005, 106(pt 1): 209a

[12] Schwarz J, Mikulenkova D, Cermakova M, et al. Prognostic relevance of the FAB morphological criteria in chronic lymphocytic leukemia: correlations with IgVH gene mutational status and other prognostic markers [J]. Neoplasma, 2006, 53(3): 219-225

[13] Nieminen M, Henttinen T, Merinen M, et al. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration [J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(2): 156-162

[收稿日期] 2013-07-08