

慢性粒-单核细胞白血病骨髓活检病理学分析

梁 艳¹, 沈文怡¹, 张建富¹, 王 蓉¹, 李建勇¹, 张苏江^{2*}, 陆 化^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院血液科, 江苏 南京 210029; ²上海交通大学附属瑞金医院北院血液科, 上海 200000)

[摘要] 目的:分析慢性粒-单核细胞白血病(chronic myelomonocytic leukemia, CMML)的细胞形态学特点,为对照,探索免疫标记物在 CMML 诊断中的意义及临床应用价值。方法:采用骨髓活检病理组织学方法分析 39 例 CMML 的病理学特点;采用免疫组化法,以 CMML 为实验组,慢性粒细胞白血病(chronic myelocytic leukemia, CML)及急性单核细胞白血病(acute monocytic leukemia, AMoL)为对照组,检测 CD15、MPO、CD34、CD14、CD56、CD68(PG-M1)、CD163 在上述 3 组中的表达。结果:CMML 骨髓病理组织学提示 33 例(84.6%)骨髓增生极度活跃,粒系细胞增生明显且形态异常,29 例(74.4%)单核细胞增多,20 例(51.3%)巨核细胞形态异常。粒细胞标记物 CD15、MPO 在 CMML 中的阳性表达率分别为(21.69 ± 7.06)%、(33.96 ± 5.94)%,其与 CML 及 AMoL 均有统计学差异。单核细胞标记物 CD14、CD56、CD68(PG-M1)及 CD163 的阳性表达率分别为(10.10 ± 2.51)%、(8.69 ± 2.66)%、(13.35 ± 4.32)%、(11.43 ± 4.15)%,除 CD56 外,其余在 CMML 与 AMoL 的阳性率均有明显差异。原始细胞标记物 CD34 的阳性表达率为 4.31 ± 1.98%,与 CML 有统计学差异。结论:骨髓病理组织学及免疫组化有助于 CMML 的诊断及鉴别诊断。

[关键词] 慢性粒-单核细胞白血病;骨髓活检;免疫组化

[中图分类号] R737.7

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2015)12-1735-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20151214

Analysis of bone marrow biopsy pathology in chronic myelomonocytic leukemia

Liang Yan¹, Shen Wenyi¹, Zhang Jianfu¹, Wang Rong¹, Li Jianyong¹, Zhang Sujiang^{2*}, Lu Hua^{1*}

(¹Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Hematology, Ruijin Hospital North Affiliated with Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200000, China)

[Abstract] **Objective:** To analysis the cell morphological characteristics in chronic myelomonocytic leukemia (CMML), and investigate the expression of immune marker in the diagnose and clinical application value of CMML. **Methods:** Using the bone marrow biopsy pathology to analysis the pathology characteristics in 39 cases of CMML. By using the immunohistochemistry to detect the expression of antibodies which included CD15, MPO, CD34, CD14, CD56, CD68 (PG-M1) and CD163 in CMML, comparison with chronic myelocytic leukemia (CML) and the acute monocytic leukemia (AMoL) patients. **Results:** Hypercellularity was the markedly feature of the bone marrow histology in 33 cases (84.6%) of CMML. Increased granulocytic proliferation and obviously morphological abnormalities were observed in these cases. Monocytic cells were increased in 29 cases (74.4%) and 20 cases (51.3%) presented megakaryocytic morphological abnormalities. The marker in the granulocytic lineage expresses CD15 and MPO, which had respectively positive percentage of 21.69 ± 7.06% and 33.96 ± 5.94%, there were significantly statistical differences compared with CML and AMoL. The marker in the monocytes expresses CD14, CD56, CD68 (PG-M1) and CD163, which were positive (10.10 ± 2.51)%、(8.69 ± 2.66)%、(13.35 ± 4.32)%、(11.43 ± 4.15)%, respectively. Except from CD56 positive CMML and AMoL, the rest had significantly statistical differences. The original marker which was positive expressed in CMML such as CD34 had the percentage of (4.31 ± 1.98)%, which had significantly statistical differences with CML. **Conclusion:** Morphological and immunohistochemical features of bone marrow biopsy are helpful in the diagnosis and differentiation.

[Key words] chronic myelomonocytic leukemia; bone marrow biopsy; immunohistochemistry

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(12): 1735-1738]

[基金项目] 江苏省卫生厅指导性科研项目(Z201402);国家自然科学基金青年基金(81400079)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zbruce.zhang@gmail.com

慢性粒-单核细胞白血病 (chronic myelomonocytic leukemia, CMML) 是一种克隆性造血系统恶性肿瘤, 以外周血单核细胞增多为特征。2008年新的WHO髓系肿瘤分类中将CMML归属于骨髓增生异常/骨髓增殖性肿瘤(myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms, MDS/MPN)的范畴^[1]。CMML的诊断是基于血常规、血涂片、骨髓涂片等, 将CMML分为CMML-1(外周血原始细胞<5%和骨髓原始细胞<10%)和CMML-2(外周血原始细胞5%~19%或骨髓原始细胞10%~19%, 或Auer小体阳性, 不管外周血或骨髓原始细胞+幼单核细胞数)。目前骨髓活检病理组织学在临床诊断中的报道相对较少。为此对39例CMML的骨髓活检病理学进行了分析, 以探讨其在诊断中的意义及临床应用价值。

1 对象和方法

1.1 对象

39例CMML患者均为南京医科大学第一附属医院血液科自2008年1月—2015年9月期间收治的初诊患者, 其诊断依据2008年WHO血液及淋巴组织肿瘤分类中提出的诊断标准。CMML-1型21例, CMML-2型18例, 病程中有8例(2例CMML-1及6例CMML-2)发生急变, 其中4例急变为急性粒细胞白血病部分分化型(acute non-lymphocytic leukemia-M2, ANLL-M2), 2例急性粒单核细胞白血病(acute myelomonocytic leukemia, AMML), 2例急性单核细胞白血病(acute monocytic leukemia, AMoL)。男26例, 女13例; 年龄16~76岁, 中位年龄62岁。初诊时患者主要以乏力, 发热, 出血, 脾肿大, 淋巴结肿大等为首发症状。

对照组选取同期慢性粒细胞白血病(chronic myelocytic leukemia, CML)40例, 其中男26例, 女14例; 年龄32~72岁, 中位年龄49岁; 急性单核细胞白血病AMoL患者40例, 其中男25例, 女15例; 年龄18~76岁, 中位年龄43岁。

1.2 方法

选择髂前或髂后上棘局部麻醉后, 用骨髓活检针进行取材, 标本的长度在1cm左右。骨髓活检组织离体后立即固定于4%中性甲醛溶液中, 脱钙2.5h, 脱水透明, 浸蜡后放入包埋框内包埋。每例标本连续切片3~5张3 μ m厚行HE染色。

免疫组化染色: 石蜡包埋组织块连续切片3~4 μ m, 70℃烤30min; 脱蜡、乙醇梯度水化; 采用微波抗原修复10~15min; 室温自然冷却, PBS缓冲液

冲洗; 滴加一抗(鼠抗人CD14、CD15、CD68(PG-M1)、CD34、CD56、CD163、MPO单克隆抗体)50 μ L, 置4℃冰箱内孵育过夜; PBS冲洗后滴加二抗50 μ L, 室温下放置25~30min, PBS冲洗3次, 每次3min; DAB显色, 切片置于苏木素中复染, 盐酸乙醇分化, 用水冲洗, 脱水干燥, 后经过二甲苯透明, 中性树胶封片。

免疫组化结果判定: CD14、CD15、CD56、CD163的阳性标记为细胞膜可见棕黄色或淡黄色颗粒沉积; CD68(PG-M1)、MPO为胞浆可见上述颗粒沉积; CD34为细胞膜和(或)细胞浆见上述颗粒沉积。阳性表达判断: 以着色部位出现棕黄色或淡黄色颗粒。随机观察具代表性的5个高倍镜($\times 400$)视野, 不包括骨皮质和骨小梁的骨膜结缔组织、脂肪组织或出血区, 每个视野计数100个非红系细胞, 总阳性细胞数/500为每100个细胞的阳性率。分别计算CMML、CML、AMoL阳性率。

1.3 统计学方法

采用SPSS19.0统计软件进行统计处理, 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 不同组间的比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.001$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CMML骨髓病理特点

骨髓活检病理组织学示84.6%(33/39)增生极度活跃, 12.8%(5/39)增生正常, 仅2.6%(1/39)增生减低。粒红比增高, 粒系细胞增生明显, 以中性中幼粒细胞及以下阶段为主; 原始细胞比例增高, 易见散在原始细胞, 特别是CMML-2及CMML急变患者, 6例可见幼稚前体细胞异常定位(abnormal localization of immature precursors, ALIP)现象。另外, 29例(74.4%)单核细胞增多, 呈散在、成簇状或小灶状分布, 胞核不规则, 常呈肾形、马蹄形或S型。红系增生正常至减低, 7例可见红细胞异常增生, 即巨幼红细胞、双核幼红细胞等。巨核细胞数量正常或增多, 51.3%(20/39)有不同程度的形态异常, 大小悬殊, 多形性较明显, 可见小巨核细胞、单圆核巨核细胞、多圆核巨核细胞。35.9%(14/39)纤维组织增生明显(图1)。

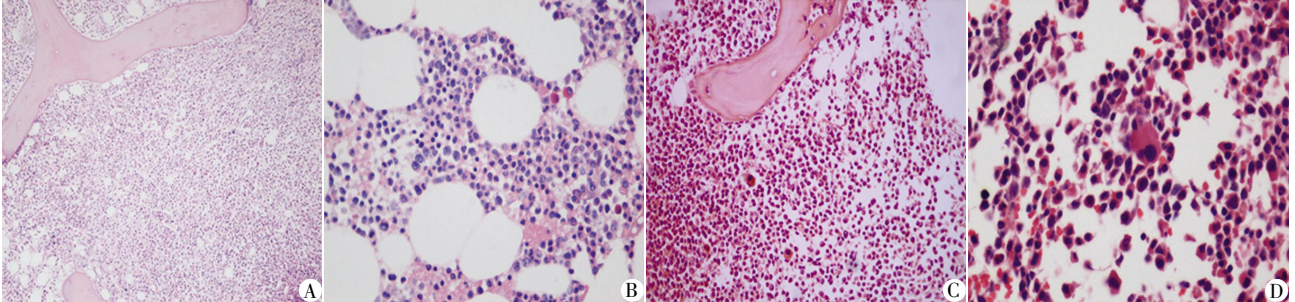
2.2 免疫组化结果

粒细胞标记物CD15、MPO在CMML中的阳性表达率低于CML($P < 0.001$, 表1, 图2)。

单核细胞标记物CD14在CMML的阳性表达率最高, 其次为AMoL。CMML中CD56、CD68(PG-M1)、CD163阳性表达率, 明显高于CML, 低于AMoL

(表 1,图 3)。CD68(PG-M1)标记的单核细胞其阳性部位及阳性强度存在差异性,成熟的单核细胞较原始的单核细胞的阳性颗粒更粗大。

原始细胞标记物 CD34 在 CML 表达率最低(表 1,图 2)。急变的 8 例 CMML 中 CD34 阳性率在均>5%,高于均值。



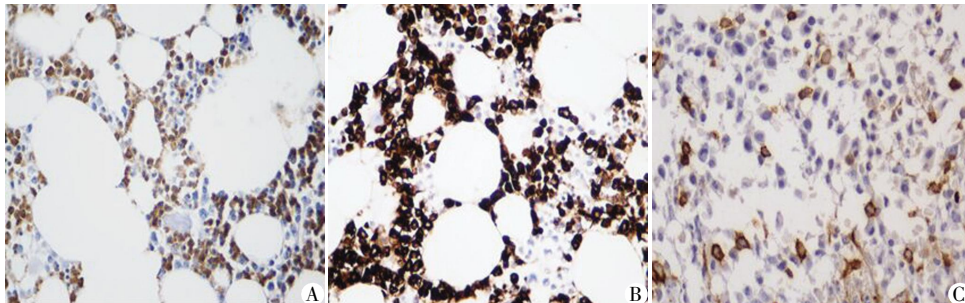
A、B:骨髓增生极度活跃,粒系细胞增生明显,粒系以早幼至晚幼阶段多见(A:×100;B:×200);C、D:巨核细胞数量增多,有不同程度的形态异常,可见小巨核或核分叶过少的巨核细胞(C:×200;D:×400)。

图 1 CMML 骨髓病理(HE)
Figure 1 Marrow pathology of CMML(HE)

表 1 CMML、CML、AMoL 免疫组化结果

	CD15	MPO	CD14	CD56	CD68(PG-M1)	CD163	CD34
CMML(n=39)	21.69 ± 7.06	33.96 ± 5.94	10.10 ± 2.51	8.69 ± 2.66	13.35 ± 4.32	11.43 ± 4.15	4.31 ± 1.98
CML(n=40)	40.44 ± 12.60	54.78 ± 12.33	0.97 ± 0.47	0.68 ± 0.40	0.78 ± 0.33	0.57 ± 0.36	0.64 ± 0.42
AMoL(n=40)	6.42 ± 3.49	0	5.31 ± 1.38	10.15 ± 2.52	23.89 ± 9.25	23.39 ± 9.02	5.92 ± 3.84
P_1	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
P_2	<0.001	<0.001	<0.001	0.022	<0.001	<0.001	0.007

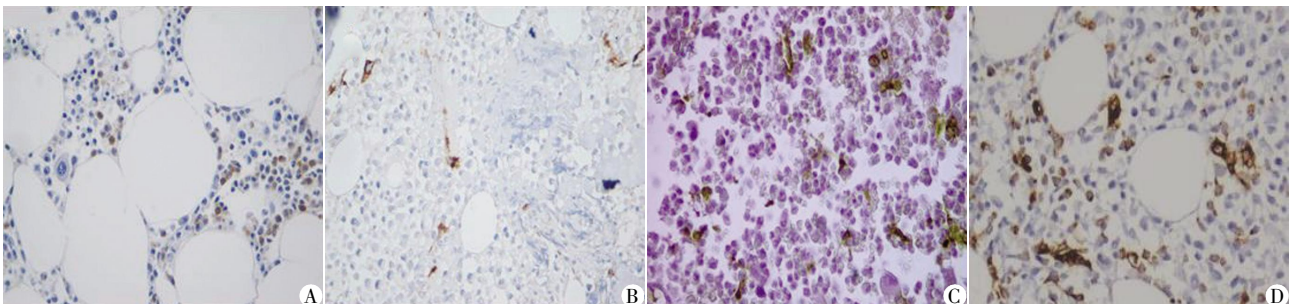
P_1 :CMML 与 CML 比较; P_2 :CMML 与 AMoL 比较。



A:CD15 标记较成熟的粒细胞;B:MPO 的阳性表达率明显增高(×400);C:CD34 标记原始细胞及未成熟的前体细胞。

图 2 CD15、MPO 及 CD34 在 CMML 免疫组化中的阳性表达(×400)

Figure 2 Positive expression of CD15, MPO and CD34 in immunohistochemical of CMML(×400)



A:CD14 标记单核细胞;B:CD56 的阳性表达率较低;C:CD163 标记单核细胞及巨噬细胞;D:CD68(PG-M1)标记的单核细胞阳性表达率高于 CD163。

图 3 CD14、CD56、CD163 及 CD68(PG-M1)在 CMML 免疫组化中的阳性表达(×400)

Figure 3 Positive expression of CD14, CD56, CD163 and CD68 (PG-M1) in immunohistochemical of CMML(×400)

3 讨论

CMML是临床上少见的一种恶性血液病,其特征为患者就诊时临床和血液学表现兼有MDS和MPN的特点。多数CMML患者骨髓组织病理学表现为骨髓增生极度活跃,尤以粒系增生明显及生成不良为典型特征,粒系细胞异常主要表现为颗粒减少、核分叶过少(P-H畸形)、胞浆中出现空泡等病态现象。

粒细胞标记物CD15在CMML中的阳性表达率明显低于CML,但较AMoL高,Qubaja等^[2]也有相同的试验结果,并且认为这与粒细胞异常增生有关。MPO在AMoL中不表达,可与CML及CMML鉴别,在Cibull等^[3]的试验中也得到证实。

单核细胞标记物CD14的特异性较强,但敏感性不高^[4];且以较成熟的单核细胞表达较强,而较原始的细胞表达减低。本试验中CMML的CD14阳性表达率较AMoL高,CML的表达率极低。与CMML相比,AMoL中单核细胞系增生以原、幼单核细胞为主,而CMML单核细胞增生多为成熟单核细胞,故CD14能区分CMML与CML、AMoL。

CD56在正常的单核细胞中低表达,而单核细胞反应性增生时高表达。Kojima等^[5]认为CD56阳性的白血病细胞可能来源于单核细胞与NK细胞的共同前体,这是对CMML中CD56异常表达细胞来源的一种大胆猜测。但CD56的异常表达并不作为CMML患者特异的诊断标志,因为MDS、急性白血病、唐氏综合症及一些接受过化疗的患者,甚至一些反应性单核细胞增多症的良性疾病均可见到CD56表达异常^[6]。

CD68(PG-M1)在AMoL的阳性表达率最高,CMML其次,CML最低。在AMoL中,CD163的阳性率较CD68(PG-M1)稍高,结合试验结果,CD163标记更原始的单核细胞,AMoL单核细胞增生以原、幼单核细胞为主,而CMML多为成熟单核细胞。Naresh等^[7]也得出相同的结论,认为可能是骨髓中CD68(PG-M1)并不能标记所有的单核细胞,或者是经过固定及脱钙后表达太弱而无法看到。

原始细胞标记物CD34在CMML中的阳性率<10%,AMoL阳性率略高于CMML,无明显统计学差异;而CML几乎阴性,故CD34标记的原始细胞阳性率能帮助我们鉴别CMML与CML。有研究表明,鉴于CD34在原始单核细胞上表达或有缺失^[8],CD34阳性率低并不能绝对说明原始细胞少。Orazi等^[9]的

试验显示CD34能鉴别CMML-1、CMML-2和CMML急性变的病例,并且认为原始细胞越多,预后越差。Della等^[10]认为在MDS中CD34能影响无病生存期和总生存期,且CD34阳性率越高,发生急变的可能性越大,这或许对CMML也有参考价值。

从以上结果分析,骨髓病理组织切片的观察及免疫组织化学在识别细胞类型上有重要意义,为CMML的诊断、鉴别诊断及预后判断等提供线索。

[参考文献]

- [1] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues[M]. 2008:76-79
- [2] Qubaja M, Marmey B, Le Tourneau A, et al. The detection of CD14 and CD16 in paraffin-embedded bone marrow biopsies is useful for the diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia [J]. Virchows Arch, 2009, 454 (4):411-419
- [3] Cibull TL, Thomas AB, O'Malley DP, et al. Myeloid leukemia cutis: a histologic and immunohistochemical review[J]. J Cutan Pathol, 2008, 35(2):180-185
- [4] Xu Y, McKenna RW, Wilson KS, et al. Immunophenotypic identification of acute myeloid leukemia with monocytic differentiation[J]. Leukemia, 2006, 20(7):1321-1324
- [5] Kojima H, Bai A, Mukai HY, et al. Chronic myelomonocytic leukemia derived from a possible common progenitor of monocytes and natural killer cells[J]. Leuk Lymphoma, 2000, 37(5-6):617-621
- [6] Lacronique-Gazaille C, Chaury MP, Le Guyader A, et al. A simple method for detection of major phenotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes: expression of CD56 in CMML [J]. Haematologica, 2007, 92 (6): 859-860
- [7] Naresh KN. Morphological evaluation of monocytes and monocyte precursors in bone marrow trephine biopsies - need for establishing diagnostic criteria[J]. Haematologica, 2009, 94(11):1623-1624
- [8] Germing U, Strupp C, Knipp S, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in the light of the WHO proposals [J]. Haematologica, 2007, 92(7):974-977
- [9] Orazi A, Chiu R, O'Malley DP, et al. Chronic myelomonocytic leukemia; The role of bone marrow biopsy immunohistology[J]. Mod Pathol, 2006, 19(12):1536-1545
- [10] Della PM, Malcovati L, Boveri E, et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(5):754-762

[收稿日期] 2015-10-08