

·临床研究·

恶性血液病患者 CD₅₄ 表达及其与 临床特征、疗效的关系

童秀珍, 李娟, 罗绍凯, 洪文德, 孔庆瑜, 彭爱华

(中山医科大学附属第一医院血液科, 广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨细胞间黏附分子-1(CD₅₄)在恶性血液病的表达。【方法】用免疫荧光方法检测 19 例急性髓系白血病, 34 例急性淋巴细胞白血病, 10 例慢性粒细胞白血病, 15 例多发性骨髓瘤, 21 例非霍奇金淋巴瘤和 16 例正常人骨髓单个核细胞表达 CD₅₄。【结果】①除多发性骨髓瘤、慢性粒细胞性白血病外, 急性髓系白血病细胞、非霍奇金淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病患者骨髓单个核细胞表面 CD₅₄ 表达低于正常人。② CD₅₄ 在急性早幼粒细胞白血病(M₃)表达高于在其它类型急性髓系白血病细胞表达, 在 T-急性淋巴细胞白血病表达明显低于 B-急性淋巴细胞白血病表达。③高白细胞数、中枢神经系统白血病、脾肿大者表达水平下降($P < 0.05$)。④ CD₅₄ 的表达在急性淋巴细胞白血病完全缓解组明显高于未缓解组, $P < 0.01$ 。随着病情缓解 CD₅₄ 表达可升至正常范围。【结论】不同的恶性血液病, 黏附分子 CD₅₄ 表达不同, 并与细胞类型、临床特征及疗效有关。

关键词: 胞间黏附分子 1; 多发性骨髓瘤; 白血病; Lymphoma, non-hodgkin

中图分类号: R733.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2002)03-0204-04

Expression of CD₅₄ in Malignant Hematopoietic Diseases and Its Correlation with Clinical Features and Treatment Effect TONG Xiu-zhen, LI Juan, LUO Shao-kai, HONG Wen-de, KONG Qin-yu, PENG Ai-hua. (Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the expression of intercellular adhesion molecule 1 in malignant hematopoietic diseases and its correlation with certain clinical features. 【Methods】Monocytic cells of bone marrow samples from 19 acute myeloid leukemia (AML), 34 acute lymphocytic leukemia (ALL), 10 chronic myelocytic leukemia (CML), 15 multiple myeloma (MM), 21 non-Hodgkins lymphoma (NHL) and 16 healthy subjects were measured by immunological fluorescence analysis for CD₅₄ expression. 【Results】① Except MM, CML, AML, NHL, ALL blasts expressed relatively lower levels of CD₅₄ than normal hematopoietic cells. ② CD₅₄ expression was higher in acute promyelocytic leukemia (M₃) than in other AML cells. CD₅₄ expression was lower in T-ALL than in B-ALL. ③ A significant positive correlation was demonstrated between low CD₅₄ expression and high peripheral leucocyte counts, central nervous system involvement and splenomegaly at the time of diagnosis ($P < 0.01$). ④ Expression of CD₅₄ in complete remission group of ALL was much higher than that in non-remission group, $P < 0.01$. The level of CD₅₄ returned to normal at remission. 【Conclusion】There are abnormalities in the expression of cell adhesion molecules CD₅₄ in malignant hematopoietic diseases, which has an impact on the clinical characteristics of haematological malignancies and treatment effect.

Key words: intercellular adhesion molecule-1; multiple myeloma; leukemia; lymphoma, non-hodgkin

各种黏附分子及其配体介导的造血细胞与骨髓基质细胞, 以及细胞外基质黏附, 是造血细胞锚泊依赖性生长的分子基础, 使造血细胞锚泊于微环境的特定区间内, 接受各种信息的刺激, 影响其增殖和分化。细胞间黏附分子-1 属于免疫球蛋白超基因家族, 约 90×10^9 ku 的糖蛋白, 是 β_2 亚家族淋巴细胞相关功能抗原 (LFA-1, CD_{11a}) 的配体, 主要分布于内皮细胞、成纤维细胞、造血干细胞膜表

面^[1]。参与淋巴细胞与内皮细胞的黏附, 为淋巴细胞活化提供重要的共刺激信号及调节淋巴细胞迁移。以前我们的研究显示 LFA-1 在各种淋巴增殖性疾病存在异常表达, 并与疾病的发生、发展有关^[2], 本研究进一步观察其配体细胞间黏附分子-1 CD₅₄ 在各种恶性血液病的表达。

1 材料和方法

收稿日期: 2001-10-26

基金项目: 广东省卫生厅基金资助项目(A1999146)

作者简介: 童秀珍(1965-), 女, 江西德安人, 博士生, 副主任医师。

1.1 研究对象

1.1.1 多发性骨髓瘤(MM)组 15例初诊或复发患者,男9例,女6例,中位年龄58(45~57)岁。骨髓中骨髓瘤细胞占20%~60%,平均35%。

1.1.2 非霍奇金淋巴瘤(NHL)组 21例初诊患者,男13例,女8例,中位年龄32(18~58)岁。NHL按WHO 1982工作分类的病理分型,低度恶性4例,中度恶性8例,高度恶性9例。骨髓浸润有9例,淋巴瘤性细胞比例为35%~90%,平均60%。

1.1.3 急性淋巴细胞白血病(ALL)组 34例初治或复发患者,男18例,女16例,中位年龄32(17~58)岁,按本免疫室建立的方法进行免疫分型,T-ALL 6例、B-ALL 18例、混合型10例。

1.1.4 急性髓系白血病(AML)组 19例初治或复发患者,男10例,女9例,中位年龄30(18~55)岁,按FAB分型,其M₃ 9例,其它类型AML 10例。

1.1.5 慢性粒细胞白血病(CML)组 10例初治慢性期患者,男8例,女2例,中位年龄34(24~60)岁。

1.1.6 正常对照组 16例,男9例,女7例,中位年龄30(19~35)岁,均为无恶性血液病的正常骨髓作为对照。

1.2 标本采集

按本室常规进行,分别抽取正常人骨髓3 mL和患者骨髓3 mL或外周血5 mL,枸橼酸钠抗凝,淋巴细胞分离液分离单个核细胞,用RPMI1640液洗涤2次,调整单个核细胞浓度为 2×10^6 /mL用于实验,急性白血病、有骨髓浸润的淋巴瘤、多发性骨髓瘤患者单个核细胞涂片染色分别为白血病细胞>90%、淋巴瘤细胞>88%、骨髓瘤细胞>85%。慢粒患者单个核细胞涂片染色早、中、晚幼粒细胞分别为5%、60%、35%。

1.3 主要试剂

用于免疫分型的单克隆抗体CD₂、CD₃、CD₄、CD₇、CD₈、CD₁₅、CD₁₀、CD₁₉、CD₂₀、CD₂₂,用于细胞表型研究的黏附分子CD₅₄单克隆抗体、荧光标记的羊抗鼠IgG(由BD公司出品)均购于深圳晶美生物工程有限公司。

1.4 免疫分型检测

按常规法检测34例ALL标本分离获得的单个核细胞表面抗原

1.5 免疫荧光反应

参考文献[2,3],每份标本取100 μL细胞悬液分别加入2个试管中(1个检测管,1个空白对照),在检测管中加入CD₅₄-PE荧光标记的鼠抗人特异性单抗工作液20 μL,对照管加入鼠抗人IgG₁-PE,室温避光作用30 min,用Q-prep全血处理系统后,2000 r/min离心5 min,去上清液后加300 μL PBS混匀上流式细胞仪检测分析。激光管预热30 min后用荧光微球调整仪器,使各放大器接收的信号HCV值小于2%,以对照管作为空白定标,记算10000个细胞,记录标本的阳性细胞百分率。阳性细胞%=阳性细胞数/(阳性细胞数+阴性细胞数)×100%-非特异结合细胞%。

1.6 统计方法

各组患者与正常对照组的比较采用*t*检验及*F*检验,两参数间的相关性采用Spearman等级检验。

2 结果

2.1 恶性血液病患者骨髓单个核细胞表面CD₅₄的表达

与正常对照组比较,CD₅₄在急性髓系白血病(AML)及急性淋巴细胞白血病(ALL)患者骨髓单个核细胞的表达明显下降,见表1。ALL表达低于AML,非霍奇金淋巴瘤患者有骨髓浸润低于无骨髓浸润组,分别为 $8.5\% \pm 7.6\%$ 、 $19.5 \pm 9.5\%$, $P < 0.05$;低度恶性非霍奇金淋巴瘤(NHL)表达高于中、高度,分别为 $25.5\% \pm 10.5\%$ 、 $7.5\% \pm 6.6\%$, $P < 0.05$ 。另CD₅₄在多发性骨髓瘤、慢性粒细胞白血病表达与正常对照比较无显著差异。

表1 恶性血液病患者骨髓单个核细胞表面CD₅₄的表达

Table 1 The Expression of CD₅₄ on tumor cells of different hematological malignant disorders (%)

Group	<i>n</i>	CD ₅₄ ⁺ cell
Control	16	47.7 ± 12.1
AML	19	23.8 ± 8.3 ¹⁾
ALL	34	12.2 ± 5.8 ²⁾
CML	10	35.7 ± 12.9
NHL	21	13.9 ± 6.7 ²⁾
MM	15	38.7 ± 10.3

vs control group, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$

2.2 急性白血病CD₅₄表达与细胞类型的关系

CD₅₄在 M₃ 表达高于其它类型 AML 表达, 在 T-ALL 表达明显低于 B-ALL 表达, 见表 2。

表 2 各型急性白血病 CD₅₄ 表达与细胞类型的关系

Table 2 The relation between the expression of CD₅₄ on leukemic cells and the cell type (%)

Group	n	CD ₅₄ ⁺ cell (%)
B-ALL	18	12.7 ± 6.1 ¹⁾
T-ALL	6	4.8 ± 1.8
Mix-ALL	10	13.6 ± 6.7
M ₃	9	41.2 ± 13.1 ²⁾
Other AML	11	18.3 ± 8.1

1) B-ALL group compared with T-ALL group $P < 0.01$, 2) M₃ group compared with Other AML groups $P < 0.05$

2.3 ALL 患者临床特征及有关指标与黏附分子的关系

CD₅₄ 表达与成人急性淋巴细胞白血病发病年龄、性别、就诊时血红蛋白、血小板、肝肿大、FAB 分型等因素无相关关系。外周血白细胞数超过 $20 \times 10^9/L$ 、有中枢神经系统白血病、脾肿大者 CD₅₄ 表达低下, 结果见表 3。

表 3 ALL 临床特征与 CD₅₄ 表达

Table 3 The relation between ALL clinical features and the expression of CD₅₄ (%)

Group	n	CD ₅₄ ⁺ cell (%)	P
White blood cell			
≤ 20 × 10 ⁹ /L	16	15.3 ± 6.2	< 0.05
≥ 20 × 10 ⁹ /L	18	7.2 ± 4.8	
Central nervous system leukemia			
Absent	24	16.2 ± 8.2	< 0.05
Present	10	6.9 ± 3.1	
Splenomegaly			
Absent	19	14.5 ± 7.1	< 0.05
Present	15	4.5 ± 2.6	

2.4 ALL 患者临床疗效与 CD₅₄ 表达的关系

完全缓解组 (23 例) CD₅₄ 阳性率明显高于未缓解组 (11 例) ($44.3\% \pm 15.2\%$ vs $12.7\% \pm 5.6\%$, $P < 0.01$)。动态观察 20 例 ALL 患者, 在 CD₅₄ 下降的患者中, 化疗达完全缓解 (12 例) 后, 表达升至

正常范围。8 例患者再复发时 CD₅₄ 表达又下降 ($11.4 \pm 6.9\%$)。

3 讨论

正常情况下, 树突状细胞、单核细胞、淋巴细胞膜表面的细胞间黏附分子-1 (CD₅₄) 与 LFA-1 结合, 参与 T 细胞激活、B 淋巴细胞分化、淋巴细胞迁移, 以及增强细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)、NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤。肿瘤细胞膜表达一定水平的 CD₅₄, 有利于免疫效应细胞识别和杀伤作用。CD₅₄ 降低与肿瘤发生、发展有关^[3]。体外实验证明粒单系细胞刺激因子 (GM-CSF) 可上调 AML 细胞 CD₅₄ 表达, 从而增强 AML 细胞 IL-2 激活的 NK 细胞杀伤白血病细胞作用^[4]。全反式维甲酸使急淋白血病骨髓基质细胞 CD₅₄ 表达增高, 可增强白血病骨髓基质细胞对正常造血细胞的黏附能力而促进造血^[5]。

本实验显示, 非霍奇金淋巴瘤、急性髓性、淋巴系白血病患者骨髓单个核细胞 CD₅₄ 表达明显下降, 急性淋巴细胞白血病 (ALL) 表达低于急性髓系白血病 (AML), 而初治的慢性粒细胞白血病 (CML)、多发性骨髓瘤表达正常。国外文献也证实慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病^[6]、有结外病变、骨髓浸润的非霍奇金淋巴瘤细胞^[7] CD₅₄ 表达低下。CD₅₄ 可分布在骨髓基质细胞上, 急性淋巴细胞白血病 (ALL) 骨髓基质细胞表达 CD₅₄ 明显下降^[8]。本研究说明 CD₅₄ 表达低下可能参与多种恶性血液病的发生。推测由于 CD₅₄ 表达低下导致肿瘤细胞逃避机体免疫系统的监视有关。

我们比较了成人 ALL 白血病细胞 CD₅₄ 表达与临床浸润的关系, 浸润组 CD₅₄ 表达均显著低于非浸润组。外周血高白细胞、脾肿大、中枢神经白血病多浸润体征者, CD₅₄ 表达低下, 与 Mielcarek^[9] 报道的儿童急淋白血病的结果相符。这提示 CD₅₄ 低表达与急性淋巴细胞白血病临床浸润程度密切相关, 可能与低水平表达 CD₅₄ 的急淋白血病细胞易脱离骨髓释放至外周血有关。有研究显示了 CD₅₄ 表达异常与某些肿瘤性疾病预后有关, 非霍奇金淋巴瘤 IV 期患者 CD₅₄ 表达低下, 而病变比较局限的 NHL 表达增加, CD₅₄ 表达阳性者比阴性者存活期长^[7], CD₅₄ 是判断 NHL 预后的一个有效指标之一。CD₅₄ 表达是否与粒系白血病及其他肿瘤的临床特征有关还有待于进一步研究。

本研究显示 CD₅₄在成人 B-ALL 表达明显高于 T-ALL 表达,对于 AML, CD₅₄在 M₃ 型中表达明显高于其它类型。这与新近他人^[9]在儿童急性淋巴细胞白血病的结果相一致,说明 CD₅₄表达与细胞类型有关。

本资料显示化疗后完全缓解组 CD₅₄表达可升至正常范围。这提示有效的化疗药物可调节白血病细胞黏附分子表达,检测黏附分子 CD₅₄改变可预示化疗疗效。

参考文献:

- [1] Boyd A W, Dunn S M, Fecondo J V, *et al.* Regulation of expression of a human intercellular adhesion molecules during lymphohematopoietic differentiation [J]. *Blood*, 1989, 73(7): 1896.
- [2] 董秀珍, 罗绍凯, 洪文德, 等. 黏附分子 CD_{11a}, CD_{11b}, CD_{62L}在恶性淋巴增殖性疾病的表达 [J]. *中国免疫学杂志*, 2000, 16(11): 211.
- [3] 傅宇阳, 何晓顺, 陈剑琳, 等. 外周血淋巴细胞 LAF-1 与肝移植急性排斥的关系 [J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(3): 192.

- [4] Bendall L J, Kortlepe L K, Gottlieb D J, *et al.* GM-CSF enhances IL-2 activated natural killer cell lysis of clonogenic AML cell by up-regulating target cell expression of ICAM-1 [J]. *Leukemia*, 1995, 9(2): 677.
- [5] 黄耘, 李树浓, 罗学群, 等. 全反式维甲酸对急淋白血病骨髓基质细胞黏附能力的影响 [J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(5): 369.
- [6] Molica S, Dattilo A, Mannella A, *et al.* Expression on leukemic cells and serum circulating levels of intercellular adhesion molecules-1(ICAM) in B-cell chronic lymphocytic leukemia; implications for prognosis [J]. *Leuk Res*, 1995, 19(8): 243.
- [7] Terol M J, Lopez-Guillermo A, Bosch F, *et al.* Expression of the adhesion molecule ICAM in non-hodgkin lymphoma: relationship with tumor dissemination and prognostic importance [J]. *J Clin Oncol*, 1998, 16(1): 35.
- [8] 王江方, 张学光, 张毅, 等. 急性淋巴细胞性白血病细胞及其骨髓基质细胞黏附分子表达和黏附行为的探讨 [J]. *中国免疫学杂志*, 1996, 12(5): 290.
- [9] Mielcarek M, Sperling C, Schrappe M, *et al.* Expression of intercellular adhesion molecules 1(ICAM) in childhood acute lymphoblastic leukemia; correlation with clinical features and outcome [J]. *Br J Haematol*, 1997, 96(2): 301.

(编辑 黄小延)

(上接第 179 页 from page 179)

所得到的抗体能否与 hBLyS 分子膜外区结合,我们采用了流式细胞技术。结果显示,1c6 单克隆抗体能与激活的人外周血单个核细胞和 T 细胞结合(主要是 CD3⁺CD8⁻T 细胞),1g4 抗体与激活的人外周血单个核细胞和 T 细胞结合率高于对照组而低于 1c6,但 7a4、7c3、和 1g2 等 3 株细胞分泌的单抗不能结合激活的人外周血单个核细胞膜上的 BLyS。这提示 1c6 和 1g4 抗体所针对的抗原决定簇位于 hBLyS 分子的膜外区,而 7a4、7c3 和 1g2 细胞株所分泌抗体所针对的抗原决定簇位于 hBLyS 分子的膜内区或跨膜区。分析 1c6 抗体的免疫学特性分析表明,它属于 IgG2b,其在腹水中抗体的效价达到了 1:25 600。

综上所述,我们得到了 1c6 和 1g4 杂交瘤细胞株,它们可以分泌特异性结合 hBLyS 分子细胞膜外区的单克隆抗体,为下一步建立自身免疫性疾病的检测指标等奠定基础。

(本文图 2 见封 3 Fig. 2 Shown in inside back cover)

参考文献:

- [1] Moore P A, Belvedere O, Orr A, *et al.* BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator [J]. *Science*, 1999, 285(5425): 260.
- [2] Mukhopadhyay A, Ni J, Zhai Y, *et al.* Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue

- that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB and c-Jun NH2-terminal kinase [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(23): 15978.
- [3] Shu H B, Hu W H, Johnson H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens [J]. *J Leukoc Biol*, 1999, 65(5): 680.
- [4] Gross J A, Johnston J, Mudri S, *et al.* TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease [J]. *Nature*, 2000, 404(6781): 995.
- [5] Hu S, Tamada K, Ni J, *et al.* Characterization of TNFRSF19, a novel member of the tumor necrosis factor receptor superfamily [J]. *Genomics*, 1999, 62(1): 103.
- [6] Schneider P, MacKay F, Steiner V, *et al.* BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth [J]. *J Exp Med*, 1999, 189(11): 1747.
- [7] MacKay F, Woodcock S A, Lawton P, *et al.* Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations [J]. *J Exp Med*, 1999, 190(11): 1697.
- [8] Laabi Y, Strasser A. Lymphocyte survival: ignorance is BlyS [J]. *Science*, 2000, 289(5481): 883.
- [9] Waldschmidt T J, Noelle R J. Long live the mature B cell - a BAFFing mystery resolved [J]. *Science*, 2001, 293(5537): 2012.
- [10] Thompson J S, Bixler S A, Qian F, *et al.* BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF [J]. *Science*, 2001, 293(5537): 2018.
- [11] Schiemann B, Gommernan J L, Vora K, *et al.* An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway [J]. *Science*, 2001, 293(5537): 2111.

(编辑 张敏瑞)