

急性 B 淋巴细胞白血病 CD304 表达的临床意义

王卫国¹, 王伟伟¹, 冯玉虎²

[摘要] **目的:**探讨急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)CD304 表达的临床意义及其应用价值。**方法:**采用流式细胞术(FCM)检测初诊的 32 例 B-ALL 细胞 CD304 和相关白血病抗原表达,5 例急性 T 淋巴细胞白血病(T-ALL)和 10 例良性血液病对照者细胞 CD304 的表达;21 份初诊时融合基因和 CD304 共阳性的治疗后 B-ALL 样本,FCM 和 PCR 检测微小残留病(MRD)水平,比较两者符合率。**结果:**BCR-ABL1 阳性病人 CD304 表达阳性率高于 E2A-PBX1 和融合基因阴性病人($P < 0.05$)。5 例 T-ALL 细胞和 10 例对照者 B 细胞上 CD304 均阴性表达,初诊 43.75% (14/32) B-ALL 病人 CD304 阳性表达;10 例 BCR-ABL 阳性(12 例)、1 例 TEL-AML1 阳性和 3 例融合基因阴性(14 例)病人 CD304 阳性表达,而 3 例 E2A-PBX1 阳性和 2 例 MLL/AF4 阳性病人 CD304 阴性表达。CD304 阳性病人 B-ALL 细胞 CD66c 表达频率升高($P < 0.01$)。21 例 MRD 中,PCR 阳性 11 份,FCM 阳性 10 份,共阳性 10 份,与 PCR 结果比较,FCM 阳性符合率为 91%,总符合率为 95%。**结论:**CD304 在 B-ALL 中异常表达对诊断和监测 MRD 具有重要的临床价值。

[关键词] B 细胞急性淋巴细胞白血病;CD304;微小残留病

[中图分类号] R 733.71 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2023.01.024

The clinical significance of expression of CD304 in B-cell acute lymphoblastic leukemia

WANG Wei-guo¹, WANG WEI-wei¹, FENG Yu-hu²

(1. Department of Clinical Laboratory, 2. Department of Hematology, Fuyang People's Hospital, Fuyang Anhui 236001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the clinical significance and application value of CD304 expression in B-cell acute lymphoblastic leukemia(B-ALL). **Methods:** The expression of CD304 in 32 newly diagnosed B-ALL patients, 5 T-cell acute lymphoblastic leukemia patients and 10 control cases with benign hematologic disease were tested by flow cytometry(FCM); 21 specimens in B-ALL patients with co-positive BCR-ABL and CD304 after treatment were detected for minimal residual disease(MRD) by FCM and PCR, and the coincidence rate was then compared. **Results:** The positive rate of CD304 expression in BCR-ABL1 positive patients was higher than those in E2A-PbX1 and fusion gene-negative patients. CD304 were negative expression in T-ALL($n = 5$) and control groups($n = 10$). CD304 was positive in 43.75% (14/32) in newly diagnosed B-ALL cases, including 10 positive in 12 BCR-ABL, 1 positive in TEL-AML1, and 3 positive without fusion gene, while CD304 was negative in 3 E2A-PBX and 2 MLL/AF4 cases. The expression frequency of CD66c in CD304-positive B-ALL was increased($P < 0.05$). As for MRD of 21 samples, 11 samples were PCR positive, 10 were FCM positive, 10 were double positive. Compared with PCR, the positive coincidence rare of FCM was 91% and total coincidence rare was 95%. **Conclusions:** CD304 abnormal expressed in B-ALL has an important clinical value in the diagnosis and monitoring MRD.

[Key words] B-cell acute lymphoblastic leukemia; CD304; minimal residual disease

急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)是发生于淋巴系前体细胞的恶性肿瘤,从免疫表型上可分为急性 T 淋巴细胞白血病(T-ALL)和急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)。白血病相关免疫表型是相关基因表达异常的表观特征之一,对 ALL 的诊断、治疗后的监测和预后判断上都有极其重要的价值^[1-2]。CD304 是一种非酪氨酸激酶的跨膜 C 型凝集素,是血管内皮生长因子共受

体,参与神经元引导和血管生成,可在浆细胞样树突细胞、内皮细胞和多种实体瘤上表达,CD304 异常表达对诊断母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤具有重要价值^[3-4]。目前,CD304 在 ALL 中表达和应用价值国内尚未发现相关文献报道,本研究通过对 ALL 细胞 CD304 表达进行分析,并探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 7 月至 2020 年 8 月我院诊断的 ALL 病人 37 例,其中 B-ALL 病人 32 例,T-ALL 病人 5 例。ALL 的诊疗依据《成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗指南(2016 年版)》^[5]。选取 10 例良性血液病作为对照;5 例缺铁性贫血、5 例巨幼细胞性贫血病人,检测骨髓中前体 B 细胞

[收稿日期] 2020-11-30 [修回日期] 2022-07-22

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81670179)

[作者单位] 安徽省阜阳市人民医院 1. 检验科, 2. 血液科, 236001

[作者简介] 王卫国(1974-),男,硕士,副主任技师。

[通信作者] 冯玉虎,硕士研究生导师,主任医师,教授。E-mail: fyh_418@126.com

CD304 的表达。

1.2 试剂和仪器 CD117、CD33、CD7、CD19、CD10、CD34、CD9、CD200、CD15、CD13、CD56、CD123、CD38、CD66c、CD5、CD22、Cu 和 CD79a 荧光标记单克隆抗体、溶血剂、鞘液、FACSCalibur 流式细胞仪 (FCM) 均购自 BD Biosciences 公司,藻红蛋白标记 CD304 购自 DAKO 公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫表型的检测 抽取骨髓 2 mL,计数后调整细胞浓度为 $(10 \sim 20) \times 10^9/L$,采用四色抗体组合。胞质抗原需要对细胞固定、破膜,胞膜抗原的检测:每管加入标本 25 μL ,分别加入相应量的抗体,避光染色 15 min,每管加入 2 mL 溶血剂溶血 10 min,离心后弃上清,加入 300 μL 磷酸盐缓冲液上机检测,Cellquest 软件分析。对照组采用 CD10/CD304/CD45/CD19 组合检测 B 祖细胞上 CD304 的表达。抗原表达 $\geq 20\%$ 为阳性,抗原表达 $< 20\%$ 为阴性,阳性率 $\geq 50\%$ 为强阳性, $< 50\%$ 为弱阳性^[6]。

1.3.2 CD304 和 BCR-ABL 共阳性 ALL 病人微小残留病 (minimal residual disease, MRD) 检测 为评估 CD304 在 MRD 检测中的价值,选择本研究中阳性频次较多的 BCR-ABL 和 CD304 共阳性的样本,利用 FCM 和 PCR (通过 15189 认证第 3 方分子实验室) 检测。选取 21 份样本,BCR-ABL 融合基因采用实时定量 PCR 方法 (最低检出限为 $1/10^5$),FCM 法采用包括 CD304 的四色组合,至少收集 20 万个细胞 (最低检出限为 $1/10^4$)。

1.4 统计学方法 采用 t (或 t') 检验、 χ^2 检验和 Fisher's 确切概率法。

2 结果

2.1 B-ALL 病人一般临床资料比较 BCR-ABL1 阳性病人 CD304 表达阳性率高于 E2A-PBX1 和融合基因阴性病人 ($P < 0.05$); CD304 阴性和阳性 B-ALL 病人的性别、年龄、白细胞计数 (WBC)、红细

胞计数 (RBC)、血红蛋白 (Hb) 和血小板计数 (PLT) 比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 1)。

2.2 B-ALL 细胞 CD304 表达 5 例 T-ALL 细胞和 10 例对照者 B 细胞上均不表达 CD304, B-ALL 病人 43.75% (14/32) 表达 CD304; 10 例 BCR-ABL 阳性 (12 例)、1 例 TEL-AML1 阳性和 3 例融合基因阴性 (14 例) 病人 CD304 阳性表达,而 3 例 E2A-PBX1 阳性和 2 例 MLL/AF4 阳性病人 CD304 阴性表达。CD304 表达模式见图 1。

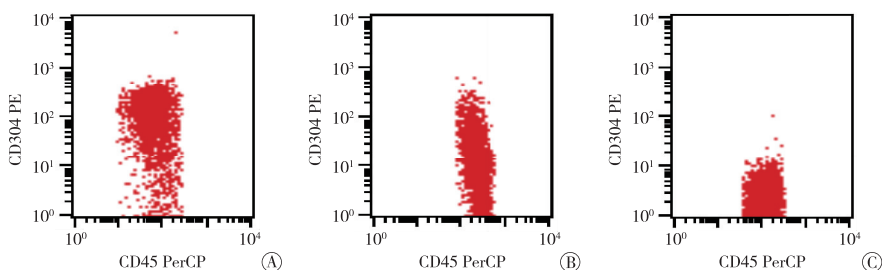
表 1 B-ALL 病人一般临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

临床特征	CD304 阳性 ($n=14$)	CD304 阴性 ($n=18$)	t	P
男/女	7/7	11/7	—	$>0.05^*$
年龄/岁	36.5 ± 19.5	33.6 ± 19.2	0.42	>0.05
WBC/($\times 10^9/L$)	25.9 ± 39.9	51.3 ± 84.9	1.12^Δ	>0.05
RBC/($\times 10^{12}/L$)	2.59 ± 1.06	2.33 ± 0.86	0.77	>0.05
Hb/(g/L)	78.1 ± 32.1	69.7 ± 23.6	0.86	>0.05
PLT($\times 10^9/L$)	27.4 ± 46.3	53.5 ± 52.4	1.47	>0.05
融合基因				
BCR-ABL1	10	2		
E2A-PBX1	0	3		
MLL/AF4	0	2	$15.65^\#$	<0.01
TEL-AML1	1	0		
阴性	3	11		

* 示 Fisher's 确切概率法; # 示 χ^2 值; Δ 示 t' 值

2.3 CD304 阴、阳表达的 B-ALL 细胞其他相关 CD 分子阳性频率比较 与 CD304 阴性比较, CD304 阳性病人 B-ALL 细胞 CD66c 表达频率升高 ($P < 0.01$) (见表 2)。

2.4 FCM 与 PCR 检测 MRD 符合率 共检测了 21 份样本 MRD, PCR 阳性 11 份, FCM 阳性 10 份, 共阳性 10 份, 阳性符合率为 91%, 阴性符合率 91%, 总符合率为 95%。



A: 强阳性; B: 弱阳性; C: 阴性
图 1 B-ALL 细胞 CD304 表达模式图

表 2 CD304 阴、阳性表达的 B-ALL 白血病相关 CD 阳性频率比较 (n)

	n	CD7	CD33	CD10	CD34	CD9	CD20	CD15	CD13	CD56	CD38	CD66c
CD304 阳性	14	1	5	13	13	13	5	1	7	7	12	13
CD304 阴性	18	—	6	13	11	16	4	2	6	8	18	6
χ^2	—	0.02	0.00	1.06	2.71	0.00	0.20	0.00	0.91	1.00	0.85	11.57
P	—	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01

3 讨论

免疫表型对白血病类型的诊断极其重要,发现 ALL 细胞异常表达的抗原,对诊断和鉴别诊断价值极高。CD304 对于 ALL 细胞是一种跨系抗原,本次实验发现 B-ALL 中 CD304 阳性率为 43.75% (14/32),这与国外相关文献报道的阳性率相当^[7-8],而 T-ALL 和其他非 ALL 的对照者的 B 细胞中均未发现阳性表达,提示 CD304 的阳性表达对 B-ALL 白血病母细胞具有较高的特异性。B-ALL 不同融合基因阳性的细胞抗原表达谱存在差异,如 BCR-ABL 阳性常表达 CD13、CD25、CD66c, TEL-AML1 阳性不或弱表达 CD9、CD20, MLL 基因重排阳性常表达 NG2、CD15^[9-10]。本研究发现 12 例 BCR-ABL 融合基因阳性病人中有 10 例 CD304 阳性,1 例 TEL-AML1 阳性病人表达 CD304,而 3 例 E2A-PBX1 和 2 例 MLL 阳性病人不表达 CD304, BCR-ABL 融合基因阳性病人存在较高的阳性率。MEYERSON 等也报道 10 例 Ph + 阳性 B-ALL 有 9 例表达 CD304^[11], GUDAPATI 等的研究也支持这种结果。SOLLY 等^[12]报道 27 例 TEL-AML1 均表达 CD304^[12], CD304 表达与 TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) 融合基因呈正相关,而与 TCF3-PBX1 (E2A-PBX1) 融合基因呈负相关^[7],本次检测结果虽然数量较少,但佐证了上述报道结果,提示 CD304 在 B-ALL 中表达与否与其他抗原一起对融合基因的预判具有一定价值,也发现 14 例融合基因阴性病人中有 3 例表达 CD304,提示 CD304 的异常表达在 B-ALL 有一定的广泛性和异质性。分析 B-ALL 中其他抗原表达,发现 CD304 阳性白血病细胞 CD66c 表达阳性频率增加,这与本次样本中 BCR-ABL 阳性比例较高有关^[13]。单一免疫表型与白血病预后的关系一直存在争议,虽然有报道认为 CD304 表达是 B-ALL 预后不良因素^[14],但在预后较差的 E2A-PBX1、MLL 融合基因阳性病人出现频率较低^[7-8,11-12],说明 CD304 的表达与 B-ALL 预后的关系尚需进一步研究,尤其是新药时代下 BCR-ABL

阳性的 ALL 的疗效已发生明显变化^[15]。

由于 FCM 评估 MRD 优势比较明显,经济、便捷、样品易得,新的免疫标记可以提高流式细胞仪监测 MRD 的适用性和准确性。区分性好的跨系对 MRD 的准确测定价值很高,虽然抗原表达的荧光强度是判断标准之一,但由于抗体比例不当或该特定通道的电压较低,易导致表达水平降低的误判。我们对本次研究中融合基因阳性并表达 CD304 的病人进行 MRD 检测结果比较,结果显示利用 CD304 标记的 FCM 法与 PCR 法具有较好的符合率,其中有 1 例 PCR 结果阳性而 FCM 阴性,可能是因为本实验 FCM 不是二代流式,其检测结果的灵敏度没有 PCR 高。

总之,虽然本次是小样本量的研究,但结果显示 CD304 是一种在 B-ALL 病人中表达频率较高,具有较好的临床价值,利用 CD304 检测适用病人的 MRD 是一种较好的选择。

[参 考 文 献]

- [1] SUI JN, CHEN QS, ZHANG YX, *et al.* Identifying leukemia-associated immunophenotype-based individualized minimal residual disease in acute myeloid leukemia and its prognostic significance[J]. *Am J Hematol*, 2019, 94(5):528.
- [2] TSAGARAKIS NJ, PAPHADIMITRIOU SI, PAVLIDIS D, *et al.* Flow cytometric predictive scoring systems for common fusions ETV6/RUNX1, BCR/ABL1, TCF3/PBX1 and rearrangements of the KMT2A gene, proposed for the initial cytogenetic approach in cases of B-acute lymphoblastic leukemia[J]. *Int J Lab Hematol*, 2019, 41(3):364.
- [3] SEO HS, HYEON J, SONG IH, *et al.* Relationship between neuropilin-1 expression and prognosis, according to gastric cancer histology[J]. *J Mol Histol*, 2020, 51(2):199.
- [4] LYU Z, JIN H, YAN Z, *et al.* Effects of NRP1 on angiogenesis and vascular maturity in endothelial cells are dependent on the expression of SEMA4D[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(4):1321.
- [5] 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会, 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 中国成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗指南(2016年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(10):837.
- [6] 时杰, 张茵, 孙恺, 等. CD56 和(或) CD117 表达在以硼替佐米为基础一线治疗的初诊多发性骨髓瘤患者中的预后意义[J]. *中华血液学杂志*, 2019, 40(8):693.

- in Qingdao, East China[J]. *J Med Virol*, 2015, 87(12):2114.
- [19] SUN B, HE J, CHEN X, *et al.* Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection in Harbin, Northeast China[J]. *Arch Virol*, 2014, 159(5):1027.
- [20] FORMAN D, DE MARTEL C, LACEY C J, *et al.* Global burden of human papillomavirus and related diseases[J]. *Vaccine*, 2012, 30S:F12.
- [21] ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses and cancer; from basic studies to clinical application[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(5):342.
- [22] ZHAO R, ZHANG WY, WU MH, *et al.* Human papillomavirus infection in Beijing, People's Republic of China: a population-based study[J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(9):1635.
- [23] DAI M, BAO YP, LI N, *et al.* Human papillomavirus infection in Shanxi Province, People's Republic of China: a population-based study[J]. *Br J Cancer*, 2006, 9(5):96.
- [24] XUE H, LIN X, LI T, *et al.* Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection in asymptomatic women in Liaoning province, China[J]. *J Med Virol*, 2015, 87(7):1248.
- [25] MIJIT F, ABLIMIT T, ABDUXKUR G. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes detected by routine pap smear in uygur-muslim women from Karasay Township Hotan (Xinjiang, China) [J]. *J Med Virol*, 2015, 87(11):1960.
- [26] SUN LL, JIN Q, LI H, *et al.* Population-based study on the prevalence of and risk factors for human papillomavirus infection in Qujing of Yunnan province, Southwest China [J]. *Virol J*, 2012, 9:153.
- [27] TSAO KC, HUANG CG, KUO YB, *et al.* Prevalence of human papillomavirus genotypes in northern Taiwanese women [J]. *J Med Virol*, 2010, 82:1739.
- [28] LI Z, LIU F, CHENG S, *et al.* Prevalence of HPV infection among 28,457 Chinese women in Yunnan Province, southwest China [J]. *Sci Rep*, 2016, 12(6):1.
- [29] SUN B, HE J, CHEN X, *et al.* Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection in Harbin, Northeast China[J]. *Arch Virol*, 2014, 159(5):1027.
- [30] ZENG Z, YANG H, LI Z, *et al.* Prevalence and genotype distribution of HPV infection in China; analysis of 51,345 HPV genotyping results from China's largest CAP certified laboratory [J]. *J Cancer*, 2016, 7(9):1037.
- [31] DE MARTEL C, PLUMMER M, VIGNAT J, *et al.* Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(4):664.
- [32] GUO T, GAO YL, GAO Z, *et al.* Human papillomavirus genotype distribution among HPV-positive women in Sichuan province, Southwest China[J]. *Arch Virol*, 2018, 163(1):65.
- [33] 黄斌, 李瑞珍, 吴瑞芳, 等. HPV L1 壳蛋白与 hTERC 基因检测及联合分析对宫颈筛查的意义[J]. *华中科技大学学报:医学版*. 2010, 39(4):554.
- [34] 刘宗花, 张国翔, 刘香环. HPV 多重感染与宫颈病变关系的初步研究[J]. *中华妇产科临床杂志*, 2015, 16(5):436.
- [35] 赵红霞, 董艳双, 蔡友治, 等. 人乳头状瘤病毒多重感染对高度鳞状上皮内病变和宫颈癌发生的影响[J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(8):1268.
- [36] 劳国颖, 张文瓔, 刘平, 等. 人乳头瘤状病毒感染型别及多重感染与宫颈癌发病风险的关系研究[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2017, 37(6):493.

(本文编辑 刘畅)

(上接第 129 页)

- [7] GUDAPATI P, KHANKA T, CHATTERJEE G, *et al.* CD304/neuropilin-1 is a very useful and dependable marker for the measurable residual disease assessment of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2020, 98(4):328.
- [8] SEDEK Ł, THEUNISSEN P, SOBRAL DA COSTA E, *et al.* Differential expression of CD73, CD86 and CD304 in normal vs. leukemic B-cell precursors and their utility as stable minimal residual disease markers in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Immunol Methods*, 2019, 475:112429.
- [9] HATTA Y, HAYAKAWA F, YAMAZAKI E. JSH practical guidelines for hematological malignancies, 2018; I. leukemia-3. acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma (ALL/LBL) [J]. *Int J Hematol*, 2020, 112(4):439.
- [10] GANDEMER V, AUBRY M, ROUSSEL M, *et al.* CD9 expression can be used to predict childhood TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia; proposal for an accelerated diagnostic flowchart. [J]. *Leuk Res*, 2010, 34(4):430.
- [11] MEYERSON HJ, BLIDARU G, EDINGER A, *et al.* NRP-1/CD304 expression in acute leukemia: a potential marker for minimal residual disease detection in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 137(1):39.
- [12] SOLLY F, ANGELOT F, GARAND R, *et al.* CD304 is preferentially expressed on a subset of B-lineage acute lymphoblastic leukemia and represents a novel marker for minimal residual disease detection by flow cytometry [J]. *Cytometry A*, 2012, 81(1):17.
- [13] TANG GS, WU J, LIU M, *et al.* BCR-ABL1 and CD66c exhibit high concordance in minimal residual disease detection of adult B-acute lymphoblastic leukemia [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(3):632.
- [14] HAGAG AA, NOSAIR NA. Prognostic Impact of Neuropilin-1 Expression in Egyptian Children with B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia [J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2015, 7(1):e2015009.
- [15] SLAYTON WB, SCHULTZ KR, SILVERMAN LB, *et al.* How we approach Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in children and young adults [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2020, 11:e28543.

(本文编辑 刘畅)