

血液学检验技术在血液肿瘤诊治中的应用及展望

童春容

作者单位:101601 北京市,北京道培医院血液科

【摘要】 血液学检验技术从早期经典的细胞形态学及细胞化学染色方法,到后来的组织病理学检验和免疫学分析,再到细胞遗传学及分子遗传学分析、分子生物学分析,进而对血液肿瘤的认识从细胞形态上升到遗传和基因水平,对血液肿瘤的类型也有了更准确和更细致的划分。随着科学技术的发展,新的检测技术不断涌现,不同的检测技术适用于不同血液肿瘤的诊治,而多种技术联合检测也能够提高诊断血液肿瘤的准确性,为临床提供可靠的实验依据,对血液肿瘤患者的诊治和预后评估有着重要意义。

【关键词】 血液学检验;血液肿瘤;细胞形态学;细胞遗传学;分子遗传学;基因测序;基因芯片技术;融合基因检测

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.04.001

上世纪 80 年代中期以前,对血液肿瘤的检测主要根据光镜及电镜下观察细胞形态及细胞化学染色、组织病理学检查及临床表现形式将其分为白血病、淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)、骨髓增殖性疾病等。自 1966 年来,组织病理学检查联合免疫组织化学染色(immunohistochemistry, IHC)成为淋巴瘤诊断与分型的金标准。1976 年开始,法国、美国、英国三国专家组成的急性白血病(acute leukemia, AL)诊断与分型协作组主要依据细胞形态及细胞化学染色最早提出了 AL 的诊断标准及分型意见,此后又进行了多次修改补充,同时对 MDS 也提出了诊断与分型标准。

随着免疫学、细胞遗传学及分子遗传学、分子生物学技术的飞速发展与临床应用,综合多种技术方法对血液肿瘤进行诊断和分型的一致性、重复性更好、更客观,且更能反映疾病亚型的生物学及临床特征,能更好地帮助判断预后,指导制订治疗方案及路线、监测疗效,甚至有助于对疾病发病原因、发病机制更深入的了解,帮助开发新的治疗方法。自 1995 年开始,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)召集欧洲血液病理协会、国际血液病理协会、国际血液学及肿瘤学临床专家成立了 WHO 造血淋巴系统肿瘤诊断与分型指导委员会,提出了血液肿瘤的统一诊断与分型标准。之后曾多次修订,最近一次修订为 2008 年^[1]。另外,WHO 在 2011 年-2014 年对骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasms,

MPN)的诊断与分型标准提出了修改意见,并对部分淋巴系统肿瘤的诊断标准进行了修订^[2-6];国际 MDS 预后工作组于 2012 年提出了修改的 MDS 预后积分系统^[7]。

国际上一些大的协作组也在 WHO 基础上提出一些修改的或更细化的血液肿瘤诊治指南,如美国国立综合癌症网络 2015 年版,欧洲白血病网指南 2013 年版等。我国也在近年来对血液肿瘤诊治指南进行了制定和修订,如中国抗癌协会造血/淋巴系统肿瘤专业委员会于 2014 年提出的《中国 B 细胞慢性淋巴增殖性疾病诊断专家共识(2014 年版)》^[8]、中华医学会血液学分会实验诊断血液学学组于 2014 年提出的《中国慢性髓性白血病诊疗监测规范(2014 年版)》^[9]。血液肿瘤的实验诊断技术发展很快,如果检验医生及临床医师知识不能及时更新,可能导致同一患者的标本在不同医院常常得到不同的诊断结论。国际上发达国家诞生了血液病理医师,整合临床各方面信息及肿瘤的形态学、组织病理学、IHC、流式细胞分析(flow cytometry, FCM)、细胞遗传学及分子遗传学、分子生物学,甚至病原学结果,做出整合诊断报告。血液肿瘤进入了整合诊断时代已经是不争的事实。如何应用这些实验诊断技术,以期得到更好的诊断结果,是每位检验医生应当思考的。本文就目前临床上常用的血液肿瘤检验诊断技术进行简要介绍,为检验医生和临床医师提供参考。

1 细胞形态学及细胞化学染色

细胞形态学检验是对血涂片、骨髓穿刺液涂片、其他部

位细胞涂片或组织印片进行染色后在光镜下观察形态。多种细胞化学染色反应也可帮助鉴别不同系列来源或不同成熟阶段的细胞^[10]。

细胞形态学及细胞化学染色是血液肿瘤诊断与分型的基础方法,易于在基层单位推广。无论新技术如何发展,这一方法仍有不可替代的价值。由于细胞涂片一般是骨髓穿刺第一针抽取的标本,各种组织印片、体液细胞均可以制备成细胞涂片观察细胞形态及细胞化学染色,取材方便。细胞涂片很少稀释,几乎未处理,或对本标处理很少,细胞一般很少变形,因此判断血液肿瘤细胞的比例更准确;在标本量很少的情况下,对形态观察要求高的 MDS,一些少见的、大的恶性细胞的确优于其他方法^[11]。细胞化学染色简单、快速、经济、直观,染色一般 10-30 min 完成,因此细胞形态学检验往往是在较短时间内报告结果的方法,可为其他检测做出提示。

细胞形态学及细胞化学染色诊断除了需要检验医生的经验外,还依赖良好的染色技术及高分辨率的光学显微镜。计算机及图像分析软件目前可以让检验医生更方便地打印出带图像的报告,但因尚不能自动辨认细胞,仍需人工辨别,这就需要检验医生有丰富的细胞形态学知识和经验。随着大数据电子化及图像分析软件的智能化,相信细胞形态学报告对检验医生经验的依赖会有所下降。

2 组织病理学检查

组织病理学检查是通过各种组织活检标本,包括骨髓活检组织标本进行固定、处理、切片、染色后在光镜下观察做出诊断。

活检的组织标本取出后一般立即放入固定液直接固定,不容易损失细胞信息,因此恶性细胞的比例更准确客观,而且可以直接观察到组织结构,容易确定恶性细胞在组织的定位,对一些有特殊形态或结构改变的淋巴瘤诊断意义较大^[2]。组织病理学检查观察的范围比抽取骨髓血进行细胞形态学及细胞化学染色检查的范围大,尤其对一些抽不出细胞的组织,或少见细胞、体积很大的细胞仍可诊断,如骨髓纤维化、浆细胞肿瘤、淋巴瘤、转移癌、组织细胞、巨噬细胞、树突细胞、霍奇金细胞等,因此该方法也是诊断实体肿瘤最重要的方法^[3]。在我国,肿瘤医院或综合医院肿瘤科医生较重视组织病理诊断,而血液科医生往往更重视抽取骨髓血涂片的形态、免疫分型核型分析、染色体、基因检查,容易忽视对骨髓组织活检的病理学检查,导致对伴骨髓纤维化的血液肿瘤、MDS 尤其容易漏诊或误诊。

3 免疫学分析

免疫学分析主要包括 IHC 和 FCM。采用不同染料或荧光染料标记的单克隆抗体对细胞悬液、细胞涂片或骨髓组织切片进行染色,然后在流式细胞仪、荧光显微镜或光镜下观察细胞表面或细胞内的抗原标记,对血液肿瘤进行免疫分型。

3.1 IHC IHC 一般用染料或荧光染料标记的抗体对组织病理切片的组织进行细胞染色,抗体与抗原结合后标记的染料显色,可在光镜下观察着色反应;或荧光素发出荧光,可在荧光显微镜下观察荧光反应,从而了解细胞表达的免疫标记,是目前病理检查最广泛应用的方法,一般与组织病理普通染色同时进行^[5]。病理组织标本具有组织病理学的优点,在此基础上进行 IHC,比 FCM 更容易确定某一免疫标记阳性或阴性细胞在组织部位的定位,对一些抽不出的细胞、少见细胞、体积很大的细胞,仍可诊断,一些免疫标记用 IHC 检测比 FCM 更准确,如细胞周期蛋白 D1。

IHC 的发展依赖于可用于组织病理切片染色的单抗、标记单抗的可显色染料、显微镜的分辨能力,还有大数据电子化及图像分析软件的智能化等技术领域的发展。相信随着这些技术的不断发展,组织病理学检查及 IHC 诊断对病理医生经验的依赖会有所下降。

3.2 FCM FCM 是将标本制备成单个细胞悬液,然后用荧光染料标记单抗细胞,再用流式细胞仪检测。流式细胞仪可以探测单个细胞的大小、细胞内颗粒的多少及标记在细胞上的荧光光谱,并将光信号转化为电信号,用计算机存储下来,再用分析软件分析。

流式细胞仪除了直接探测细胞的大小、细胞内颗粒的多少外,还可一次性检测同一个细胞上 3~10 种以上免疫标记是否表达、表达强度、不同免疫标记之间的关系。如果含有不同细胞群的标本在同一试管染不同荧光标记的抗体,可以划出有同样荧光标记的一群细胞所在区域(设门),分析和计算该细胞群的特征和数量。FCM 可以在几个小时内完成对同一患者几十万细胞上数百种免疫标记的分析,与 IHC 相比更为快速、简便,一致性及重复性更好。

虽然血液肿瘤细胞上的单个免疫标记与正常细胞差异很小,但是综合多种免疫标记的分析,与正常细胞相比,大多数的恶性血液细胞具有一些异常表达的现象,可帮助判断细胞的良恶性,与细胞形态学、组织病理学和 IHC 相比,FCM 能更好地判断细胞的良恶性,在此基础上,更容易判断恶性细胞的系列来源及成熟阶段。因为很多免疫标记在正常细胞上也存在,因此进行血液肿瘤免疫分型时应该确定免疫标记在血液肿瘤细胞表面,而不是简单地根据某一免疫标记的细胞数量来判断。尤其是当组织中存在大量的正常细胞,肿瘤细胞比例很低时,或有正常早期免疫标记的细胞反应性增加时,单纯用 IHC 判断肿瘤细胞的系列来源及分化阶段可能造成误诊。很多免疫表型复杂的血液肿瘤几乎只能用 FCM 来诊断,而不能用 IHC 诊断,尤其是同一患者存在多种恶性血液肿瘤克隆,如 T 细胞、B 细胞、浆细胞、髓细胞共存,淋巴瘤和 AL 共存,甚至有血液肿瘤和其他系统肿瘤共存的现象。FCM 还可以对一些转移癌等非造血系统肿瘤做出提示性诊

断。由于 FCM 检查的细胞数量多,分析的免疫标记多,FCM 可以检查很微量的血液肿瘤细胞,敏感性可达 $10^{-3} \sim 10^{-4}$;且覆盖面广,对 80% 以上的血液肿瘤细胞都可用 FCM 检测,因此 FCM 是监测治疗后微小肿瘤残留病(minimal residual disease, MRD)最常用的方法^[12]。

血液肿瘤细胞上的一些分化抗原决定簇,如 CD20、CD52、CD19、CD30 等,已经有单抗、嵌合性受体基因转染的 T 细胞等有效治疗方法,检测这些免疫标记可帮助选择靶向治疗。靶向治疗后,肿瘤细胞上的这些抗原还有可能丢失,因此监测这些抗原的变化可指导更精确的靶向治疗。有些免疫标记代表血液肿瘤的预后不好,如急性混合细胞性白血病。

FCM 可检测多种标本,如血液、骨髓、活检组织、各种细针或粗针穿刺标本、胸水、腹水、脑脊液等多种体液,因此容易检测血液肿瘤在其他部位的浸润。

FCM 诊断的准确性与标本处理方式、仪器校准、检测抗体的选择、抗体组合、目标细胞的设门、抗原表达比例及强度的判断,检验医生的相关专业知识和经验等因素有关。目前国内外不同机构的检测结果尚不易互认,尤其对血液肿瘤细胞比例很小的 MRD 监测,差异及分歧很大。国际上一些协作组监测 MRD 时,一般仅选择 1~3 个实验室来报告。为了减少不同实验室之间的报告误差,国际上先后出台了一些 FCM 诊断血液肿瘤的专家共识^[4-6]。

FCM 的发展依赖单抗、荧光染料、流式细胞仪、计算机分析能力、多参数(包括荧光颜色)分析软件等技术的发展。近 10 多年来,以上技术都有飞速的发展,导致越来越多的血液肿瘤被鉴别。其中单抗从 2001 年的 166 种增加到 2008 年的 350 种,标记单抗的荧光染料也明显增加,目前已经有 10 多种可以应用的荧光染料。流式细胞仪性能的增加,比如探测荧光光谱的激光增加,分辨不同光谱的能力增加。计算机大数据分析能力增加及分析软件的改善,可以多维的同时分析细胞上的全部参数(包括细胞大小、细胞内颗粒及标记的荧光参数),这样可使 FCM 诊断减少对检验医生经验和知识的依赖。

4 细胞遗传学及分子遗传学分析

细胞遗传学主要采用染色体核型分析,分子遗传学分析主要采用荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术。

4.1 细胞遗传学分析 染色体存在于细胞核中,在细胞进行有丝分裂且在分裂中期时,染色体高度浓缩呈现可见的形态,经体外处理出现不同的条带,在光学显微镜下可分析。染色体及基因异常在血液肿瘤的诊断、预后分层中起到越来越重要的作用。

很多血液肿瘤细胞具有染色体异常,一些染色体异常在多个患者中发现,具有一些共同的临床及血液学特征,称为

重现性染色体异常,具有独立的预后评估及指导临床治疗的价值。对一些患者具有重要的诊疗价值,如有复杂染色体异常,-5、-7 等染色体异常的急性髓细胞性白血病(acute myelocytic leukemia, AML)预后很差,需要尽快进行异基因造血干细胞移植。 $t(15;17)(q22;q12)$ 染色体异常仅见于急性早幼粒细胞性白血病,对全反式维甲酸、砷剂及葱环(醌)类药物治疗的疗效好,其治愈率可达 90% 以上。对上述患者来说,应用染色体核型分析及早诊断,对患者的治疗和预后评估都有极大的帮助。一般来说,诊断 AL 需要骨髓和/或外周血中原始细胞 $\geq 20\%$ 才能诊断,在 WHO(2008)标准中,当证实有一些重现性染色体易位或由此引起的融合基因时,即使原始细胞 $< 20\%$ 也可诊断 AML。

与 FISH 技术比较,染色体核型分析反映了全基因组的遗传学改变,可同时发现多种染色体异常,与其他基因分析技术比较,对整条染色体或较大片段染色体(数百万碱基以上的片段)的丢失或增加或易位的发现更直观、快速、便捷。

染色体核型分析准确率的提高依赖于核型制备方法的改善,使肿瘤细胞分裂以便有可供分析的染色体核型以及显微镜分辨率的提高,而计算机及分析软件的智能化则极大地提高了染色体核型分析的工作效率。目前染色体核型扫描系统及分析软件可明显缩短检验医生寻找染色体核型的时间,研究人员也在研究用 FCM 分辨染色体,但迄今为止尚不能完全代替人工分辨。随着计算机大数据、图像分析能力、及人工智能化程度的增加,可能进一步减少对检验医生检测时间的耗费和经验的依赖。

4.2 分子遗传学分析技术 分子遗传学分析技术主要为 FISH, FISH 采用荧光标记不同染色体或基因片段的探针,和染色体或细胞的基因杂交后,在荧光显微镜下分析荧光信号,从而判断染色体或基因的异常。

与染色体核型分析比较, FISH 可以检测染色体变化很微小的异常,可以检测不分裂的细胞,分析的细胞数目明显比染色体核型分析多,一般可分析 500 个以上的细胞,而染色体核型分析一般仅能分析 20 个细胞,因此大大增加了染色体分析的敏感性和准确性,对于已知的染色体/基因异常,可用 FISH 监测治疗后的 MRD。与其他基因检测技术比较, FISH 更容易检查基因发生的多种易位、染色体内基因扩增、大片段基因丢失等^[13]。FISH 检测需要的标本量较少,染色体滴片、细胞涂片、组织印片,甚至既往室温保存的骨髓、血液涂片,石蜡切片均可用于 FISH 检测。如果选用的探针质量好,染色技术好, FISH 诊断对检验医生的经验要求比染色体核型分析低一些。对于检验医生肉眼难以辨认的染色体异常,如果可估计可疑的染色体号或条带,可用相应的探针及 FISH 确定。肿瘤细胞不易分裂从而产生假阴性染色体结果,因此,检验医生常常把与这些疾病相关的有诊断、预后评估

和指导临床治疗价值的探针组合,形成 FISH 套餐,给临床医生更好的指导。和其他基因检测技术比较,FISH 使用的探针范围比较大,对一些容易发生与多种伙伴基因易位形成多种融合基因的异常,染色体内大范围基因的扩增、重复,FISH 技术比基因分析更为直观、简单、便捷。如弥漫性大 B 细胞淋巴瘤发生 C-MYC 扩增或易位,或同时伴有 BCL-2 和/或 BCL-6 扩增或易位,则预后很差,用一线治疗方案疗效差,用 FISH 技术能够更准确的检测出这种扩增或异位,指导临床治疗。再比如,MLL、PDGFRB、ABL 基因易位至很多部位与不同基因易位形成融合基因,这些基因易位预后差,一般需要移植,酪氨酸激酶抑制剂对 PDGFRB 基因、ABL 基因易位的血液肿瘤疗效较好。FISH 技术很容易判断这些基因是否发生了易位,且不容易漏诊或误诊。

FISH 技术的发展需要开发更多可用于临床诊断的探针,多色荧光显微镜,以及大数据分析和更加智能化的软件分析系统,使检验医生可以用 FISH 技术发现更多的染色体或基因异常。

5 基因分析

血液肿瘤是由于造血干/祖或前体细胞染色体异常或基因突变,导致细胞增殖、分化或凋亡异常,恶性血液细胞大量增加的疾病。造血细胞的基因突变可以是点突变、基因片段丢失或增加或重复扩增,也可以是染色体易位等异常形成新的融合基因。两条染色体断裂,原本不相干的断端连接在一起,形成染色体易位。染色体易位通过干扰、去除或代替临近的基因导致原癌基因激活、抑癌基因灭活,或融合基因产生某种功能的融合蛋白。干细胞向淋巴细胞分化过程中,T 细胞受体(T cell receptor, TCR)和免疫球蛋白重链 IgH 基因的可变区(V)和结合区(J)基因会发生重排,即两个距离很远的片段重新排列在一起,形成新片段。每个淋巴细胞都有各自序列不同的 TCR 或 IgH 片段,淋巴细胞肿瘤增殖呈单克隆性,如果检测出一种基因重排片段明显升高,可考虑有单克隆淋巴细胞增生。因此 IgH 及 TCR 基因重排分析技术可帮助鉴别淋巴细胞是否为单克隆性增生。目前临床应用的基因检测技术主要有融合基因检测、基因测序和基因芯片技术。

5.1 融合基因检测 染色体断裂,使不同部位的两段基因融合在一起,形成血液肿瘤特有的融合基因。检查和治疗后定量监测这些融合基因有非常重要的临床意义。

血液肿瘤重现性融合基因异常与其相应的染色体异常具有相同的临床意义,包括疾病的诊断、预后评估和指导治疗。检测融合基因主要采用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术。有时染色体断裂易位的片段很小,用普通染色体核型分析方法检测不出来,但是可以用 FISH 或 PCR 检测出相应的融合基因,称为隐性染色体易位,这些融合基因具有与该染色体易位相同的价值。如患者具有慢性

髓细胞性白血病的临床及血液学特征,染色体正常,但有 BCR-ABL 融合基因,仍可诊断为慢性髓细胞性白血病,因为这类患者仍然可用格列卫等治疗后缓解。融合基因可用定量 PCR 技术定量监测 MRD,迄今为止,荧光标记探针的实时定量 PCR 技术监测融合基因拷贝数是最敏感的监测白血病 MRD 的方法,具有很好的预后评估及指导治疗的意义。

目前检测白血病特有的融合基因应用最多的仍是 PCR 和荧光标记实时定量 PCR 技术,这也是临床分子生物学的主要诊断技术。临床上先进行数十种融合基因、上百种变异体的筛查,再对阳性的融合基因定量,已被广泛认可为血液肿瘤融合基因诊断首选的检测方案^[13]。

近年来 PCR 技术较为显著的改进是快速且超保真的 DNA 聚合酶(Phusion、Q5 等)、快速 PCR 仪(xxpress 定量 PCR 仪等),以及数字 PCR 技术。如 Phusion 聚合酶具有 50 倍于普通 Taq 酶的保真性,对于需要较高灵敏度的基因突变检测有益。Phusion 聚合酶还具有超强的抗杂质干扰能力,更容易保证微量或复杂标本检测结果的准确性。联合快速聚合酶和快速 PCR 仪可使 PCR 扩增过程从原来的 2 h 左右缩短为十几分钟,可以显著缩短检测周期和临床报告时间。数字 PCR 技术本质上是对同一份标本和扩增目标同时进行很多个微量的 PCR 检测,尤其有利于高灵敏度点突变检测和精确的拷贝数分析。但由于检测通量和成本的限制,目前阶段还难以成为临床常规应用的检测技术。

5.2 基因测序 基因大片段丢失或扩增(数百万碱基以上的片段变化)可用染色体核型分析或 FISH 检测;检测数百万碱基以下的片段变化可用基因芯片技术进行基因片段拷贝数变异(copy number variant, CNV)分析,又称为 CNV 芯片技术。但是对数百个碱基长度以下的片段变化,尤其是基因碱基点突变需要用基因测序技术。随着基因检测技术在临床及研究领域的广泛应用,发现基因突变对血液肿瘤的诊断具有重要的临床意义,而这又促进了基因检测技术的发展。

基因测序是检测突变的最常用方法,可以检测目的基因的全部突变类型,与既往的方法比较,提高了基因突变的检出率。基因测序可以用骨髓/血涂片、组织切片、组织印片等少量标本做几十种甚至上百种基因突变筛查。

基因突变检测对血液肿瘤有辅助诊断的作用,尤其是对 MPN、MDS、MDS/MPN 综合征等没有特异性的免疫分型、染色体核型或融合基因异常的血液肿瘤,在早期时难以与再生障碍性贫血、类白血病等非肿瘤疾病鉴别。几乎所有的血液肿瘤都能检测到某种或多种基因突变,因此当患者具有临床表现及一些实验室特征时,相关基因突变阳性对这些疾病的诊断有重要意义。例如 JAK2 基因突变可见于多种 MPN 及其他血液肿瘤。需要注意的是,一些健康人也可能查出某种基因突变,如果没有临床、血液学及其他异常表现,则不能诊断

血液肿瘤。

基因突变对 AML、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、MDS、MPN、MDS/MPN 等多种血液肿瘤都有预后评估作用,越来越多的基因突变被纳入危险分层方案中。基因突变的检测还可帮助选择靶向药物或其他药物,如 FLT3-ITD 突变阳性的 AML 患者可用索拉非尼、苏坦等靶向药物治疗暂时获得完全缓解或部分缓解,为移植创造有利条件;有 KIT 基因突变者用格列卫等酪氨酸激酶抑制剂治疗有较好的疗效;表观基因突变者可用甲基化抑制剂(氮杂胞苷、地西他滨)及组蛋白去乙酰化酶抑制剂治疗,对部分 MDS、AML 有效,尤其是 TET2 基因突变者用氮杂胞苷疗效较好等。一些血液肿瘤采用靶向药物治疗后可能发生耐药性基因突变,检测耐药基因突变可指导临床调整靶向药物,如 BCR-ABL 阳性的血液肿瘤,采用一代酪氨酸激酶抑制剂治疗耐药后,可根据 ABL 激酶区突变的类型选择第二代或第三代靶向药物。基因突变的类型及部位也与选择靶向药物有关。如粒细胞集落刺激因子 3 受体突变主要见于慢性中性粒细胞白血病,如果在近膜区突变(主要为 T618I、T615A)对 JAK 抑制剂敏感,如果是胞浆内尾区的突变(截短型突变)则对达沙替尼敏感。

基因突变检测为了解血液肿瘤的发病原因及机制提供了新的证据。既往的观点认为,引起血液肿瘤的大多数基因突变是后天获得的,约 5% 的 AL 与遗传有关。近年来,随着基因研究的深入,发现血液肿瘤患者有遗传易感基因的可能明显高于既往报告的结果。

根据目前深度基因测序结果,每个血液肿瘤患者都可检测出多种基因突变,中位突变数达 10 多个,一个患者最多可有 50 多个基因突变,一些基因突变存在于几乎全部血液肿瘤细胞中,是基础基因突变,一些为驱动基因突变,一些是伴随基因突变。同一患者的血液肿瘤细胞可有不同基因突变的克隆,一些是主要克隆,一些是小克隆,还有一些为肿瘤前期克隆。治疗缓解后,主要克隆消失,肿瘤前期克隆持续存在,如果各种因素导致肿瘤前期克隆获得新的基因突变,细胞获得生长优势、失去分化成熟或凋亡的能力,则导致血液肿瘤复发;或治疗前耐药的小克隆增长成为主要克隆,也可导致血液肿瘤复发。这些提示攻克血液肿瘤需要多种方法、多种途径。由于化疗、放疗是基因突变的诱变剂,如何减少诱变剂,防止细胞发生新的基因突变,从而减少耐药或复发也是需要进一步研究探讨的。

目前全基因组测序、全外显子测序、目标基因的测序等多种技术的相继开展,基因信息迅速增长,如何判读这些信息,哪些是不同人的多态性,哪些是致病的基因突变还是需要深入研究的问题。血液肿瘤是多个基因突变引起的,每个患者可有多个基因突变,每个基因突变的类型也可有多种,相同的基因在不同患者中的突变类型也不同,其临床意义也

不同,不同突变之间可以相互作用,每个患者的基因突变类型组合等共同组成了患者疾病的独特性,这就造成了解读血液肿瘤基因突变临床意义的复杂性。

经过十余年的快速发展,第二代高通量基因测序技术已经发展出成熟的检测平台,并且成为近年来分子诊断技术进展的重点。第三代基因测序技术目前正在开展,尤其在单个测序结果的读取方面具有显著的优势,但还尚无非常成熟的产品。

5.3 基因芯片技术 这是较第二代高通量基因测序技术更早发展的分子生物学检测技术。基因芯片技术在大规模单核苷酸多态性检测和基因表达谱分析上有一定的优势。目前单核苷酸多态性芯片已经成为疾病风险预测等检测的主流选择。与传统的比较基因组杂交技术相比,对 CNV 分析更有优势,具有其他技术难以替代的特点。因为肿瘤和遗传病经常会有某个基因所在的染色体片段丢失或拷贝数的增加,有时可能是某个基因的一部分发生了缺失,即 CNV。但当缺失的片段长度在数千至数百万碱基之间时,染色体核型分析(适于检测数百万碱基以上的片段变化)并不能发现,而基因测序(适于检测数百个碱基长度以下的片段变化)亦难以检出。CNV 芯片通过使用几十万至数百万个分布于基因组上探针信号的检测,可以分析全基因组范围的所有连续超过数千个碱基以上的片段缺失或扩增,弥补了上述两种检测技术之间的不足。

综上所述,随着分子生物学技术、基因组学的发展,对血液肿瘤的检验途径有了更多的选择。然而由于新技术正处于发展阶段,很多方面有待开发和完善,且不同的检测技术均有其优点和局限性。因此,针对不同情况选择适宜的检验技术,才是获得对临床有用的实验依据的关键。而结合多种检测方法,整合诊断报告,为临床诊断提供更准确、更有效的实验室检测结果,也是今后值得探讨和思考的方向。

6 参考文献

- 1 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. Lyon: IARC, 2008, 1-439.
- 2 Vardiman J, Hyjek E. World Health Organization classification, evaluation, and genetics of the myeloproliferative neoplasm variants. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011, 2011: 250-256.
- 3 Gotlib J. World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2014 update on diagnosis, risk stratification, and management. Am J Hematol, 2014, 89: 325-337.
- 4 Kvasnicka HM. WHO classification of myeloproliferative neoplasms (MPN): A critical update. Curr Hematol Malig Rep, 2013, 8: 333-341.
- 5 Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, et al. The 2008 WHO classifica-

- tion of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 2011, 117: 5019-5032.
- 6 Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2012, 120: 2454-2465.
- 7 Malcovati L, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*, 2013, 122: 2943-2964.
- 8 中国抗癌协会造血/淋巴系统肿瘤专业委员. 中国 B 细胞慢性淋巴增殖性疾病诊断专家共识 (2014 年版). *中华血液学杂志*, 2014, 35: 781-784.
- 9 中华医学会血液学分会实验诊断血液学学组, 中国慢性髓性白血病专家组联盟. 中国慢性髓性白血病诊疗监测规范 (2014 年版), *中华血液学杂志*, 2013, 35: 781-784.
- 10 Palmer L, Briggs C, Mcfadden S, et al. ICSH guidelines for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2015, 37: 287-303.
- 11 中华医学会血液学分会实验诊断血液学学组. 血细胞形态学分析中国专家共识 (2013 年版). *中华血液学杂志*, 2013, 34: 558-560.
- 12 中华医学会血液学分会实验诊断血液学学组. 血液病细胞-分子遗传学检测中国专家共识 (2013 年版). *中华血液学杂志*, 2013, 34: 733-736.
- 13 中华医学会血液学分会实验诊断血液学学组. 血液病分子生物学诊断技术中国专家共识 (2013 年版). *中华血液学杂志*, 2013, 34: 643-646.

(收稿日期: 2015-10-24)

(本文编辑: 陈淑莲)

消 息

第四期细胞培养与细胞生物学常用技术学习班

细胞生物学实验技术是当今生命科学领域应用最广泛和最重要的研究手段之一,学习和掌握细胞生物学常用技术对于生命科学研究者来说至关重要。为推广细胞生物学基础理论与实验技术,满足临床医技人员、教学科研人员、在读研究生及其他有需要人员的要求,北京市理化分析测试中心将于 2016 年 1 月 8 日-12 日在北京举办细胞培养与细胞生物学常用技术学习班,欢迎全国各地学员参加。

本班将在细胞分子生物学实用技术学习班基础上对细胞转染、细胞划痕、细胞免疫荧光、软琼脂克隆形成及细胞活力测定等细胞生物学实验技术展开理论与实践培训,力求使每位学员在 4 d 时间内都能学有所值、学有所用。

1 培训日程

1.1 讲座 1: 细胞生物学常用技术原理与应用

实验操作 1: HepG2 细胞传代、计数; 实验操作 2: 细胞接种(用于活力测定、细胞划痕愈合实验); 实验操作 3: 细胞爬片(用于细胞转染、免疫荧光实验); 实验操作 4: 软琼脂克隆形成实验; 实验操作 5: 细胞转染; 实验操作 6: 总 RNA 提取; 实验操作 7: 细胞荷药; 实验操作 8: 逆转录反应; 实验操作 9: 细胞划痕愈合。

1.2 讲座 2: 基于细胞培养的基因功能研究技术和策略

实验操作 10: 荧光定量 PCR 实验; 实验操作 11: 细胞转染效率检测; 实验操作 12: 细胞划痕愈合实验结果观察; 实验操作 13: 细胞活力测定; 实验操作 14: 细胞免疫荧光实验(固定、漂洗、封闭、一抗孵育)。

1.3 讲座 3: 荧光定量 PCR 原理与应用

实验操作 15: 细胞免疫荧光实验(二抗孵育, 染色、封片、检测); 实验操作 16: 荧光定量 PCR 结果分析。

1.4 结班仪式

2 培训时间与地点

报到时间: 2016 年 1 月 8 日 14:00-18:00

报到地点: 北京康福瑞假日酒店西山店。

培训时间: 2016 年 1 月 9 日-12 日。

培训地点: 北京市海淀区永丰产业基地丰贤中路 7 号孵化楼 B 座四层。

3 联系方式

联系人: 王老师

电 话: 18910809780

E-mail: swyxp@163.com