

淋巴细胞微核检测指标在多发性骨髓瘤应用的研究

陈海生 陈悦美

佛山市中医院 广东佛山 528000

摘要：目的 探讨多发性骨髓瘤患者外周血淋巴细胞微核细胞率变化及临床意义。**方法** 用培养法检测 MM 患者和体检健康人外周血微核细胞率。组间比较采用两样本 t 检验，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 Spearman 相关分析法分析 MM 患者外周血淋巴细胞微核细胞率与骨髓单克隆型浆细胞的增殖指数、血 β_2 微球蛋白的关系。**结果** MM 组和对照组外周血微核细胞率分别为 8.1 ± 2.33095 、 0.7333 ± 0.59362 ，组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。MM 患者淋巴细胞微核细胞率与其骨髓瘤细胞比例有相关性 ($r_s = 0.994, P < 0.05$)，呈正相关。MM 患者外周血淋巴细胞微核细胞率与血 β_2 微球蛋白存在相关关系 ($r_s = 0.994, P < 0.05$)。**结论** MM 患者外周血微核细胞率高于体检健康人群，检测外周血微核细胞率可用于 MM 的辅助诊断及疗效观察。

关键词：多发性骨髓瘤；浆细胞；血 β_2 微球蛋白；微核细胞

中图分类号：R446.1

文献标识码：A

文章编号：1009-6647 (2018) 07-001-02

基金项目：佛山市科技局立项淋巴细胞微核检测指标在多发性骨髓瘤应用的研究，立项编号：20161021010044

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是骨髓内单一浆细胞异常增生的一种血液系统恶性肿瘤。我国多发性骨髓瘤发病率为 1/10 万，多发于中老年，其发病率逐年升高，并有年轻化的趋势。^[1] 微核 (micronucleus, 简称 MCN)，也叫卫星核，是指位于细胞浆中独立于主核的核小体，细胞损伤后，染色体丢失或断裂，从而在胞浆中形成 1 个或数个微核^[2]。微核是反映早期生物学效应的指标，这一效应认为与癌变的发生有关，其可作为生物标记物，用于疾病的诊断及患者预后判断。本文就 MM 患者外周血淋巴细胞微核细胞率进行分析，研究多发性骨髓瘤患者外周血淋巴细胞微核细胞率变化及临床意义。

1 对象和方法

1.1 对象

2016 年 6 月至 2018 年 4 月在佛山市中医院血液科收治的确诊为多发性骨髓瘤的患者 20 例为观察组，所有患者的临床表现及骨髓细胞形态学等实验室检查均符合 MM 诊断标准^[3]。对照组为健康体检人群 25 名。

1.2 外周血淋巴细胞微核制备

1.2.1 无菌肝素抗凝外周血 0.5ml 接种于 MN 培养基中静置普通温箱 ($35 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 培养 72h。

1.2.2 终止培养后加入低渗液 (KC10.075mol/L) 4.5ml，混匀，静置 2min，加冰醋酸：无水乙醇 (1:3) 1ml 固定，充分混匀。1200r/min 离心 6min。

1.2.3 去上清液，留底液约 0.3ml，轻柔混匀，加固定液 5ml，混匀，室温静置 10-30min，1200r/min 离心 6min。

1.2.4 重复步骤 1.2.3 一至两次，总固定时间至少 30min。

1.2.5 弃上清，留底液约 0.2ml，轻柔打匀，滴片。

1.3 结果

观察 Giemsa 染色 20min，镜检计数淋巴细胞微核细胞。每例均观察 2 张片子，每张片子计数 1000 个结构完整、着色清晰的转化淋巴细胞，记录含有微核的细胞数。

表 1：健康人与确诊为多发性骨髓瘤患者外周血微核细胞率比较 (单位：%， $\bar{x} \pm s$)

指标	对照组	观察组	t 值	P 值
微核细胞率 (%)	0.7333 ± 0.59362	8.1 ± 2.33095	-11.795	0.000

2.2 MM 患者外周血淋巴细胞微核细胞率与骨髓瘤细胞比例、血 β_2 微球蛋白的相关性

MM 患者微核细胞率为 (8.1 ± 2.33095) %、骨髓

淋巴细胞微核的判断标准：微核呈圆形或椭圆形，与主核没有核物质相连游离于主核，大小小于主核的 1/3，微核折光性与结构与主核一致。在计数时，细胞中无论有一个或者多个微核均按一个微核细胞计算^[4]。

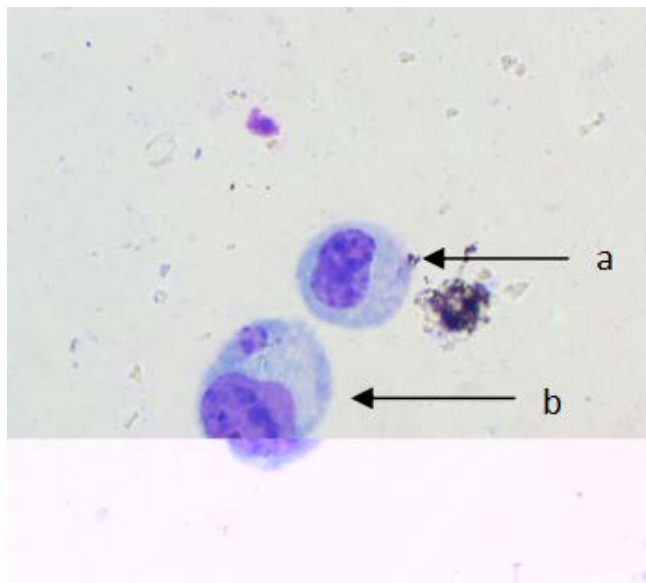


图 1：a：转化成功淋巴细胞 b：微核细胞 Giemsa 染色 $\times 1000$

1.4 统计学处理

采用统计软件 SPSS 22.0 进行数据统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较用两样本 t 检验。相关性分析用 Spearman 相关分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 健康人与确诊为多发性骨髓瘤患者观察组的微核细胞率比较

由表 1 可见，MM 患者淋巴细胞微核细胞发生率高于健康对照组。两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

瘤细胞比例为 (11.5 ± 5.27573) %、血 β_2 微球蛋白为 (2.447 ± 0.55873) mg/L。本研究采用 Spearman 相关判断 MM 患者外周血淋巴细胞微核细胞率与骨髓瘤细胞比例、血 β_2 微

球蛋白的关系。通过绘制散点图,见图 2、图 3,直接判断两者有单调关系。由表 2 可得,MM 患者外周血淋巴细胞微核细胞率与骨髓瘤细胞百分比存在正相关,具有高度相关性。两者之间相关关系具有统计学意义($r_s=0.994, P<0.05$)。MM 患者外周血微核细胞率与血 β_2 微球蛋白存在相关关系($r_s=0.994, P<0.05$)。

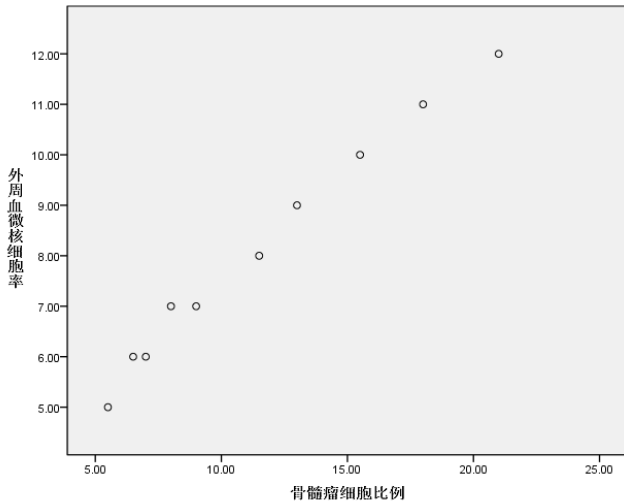


图 2

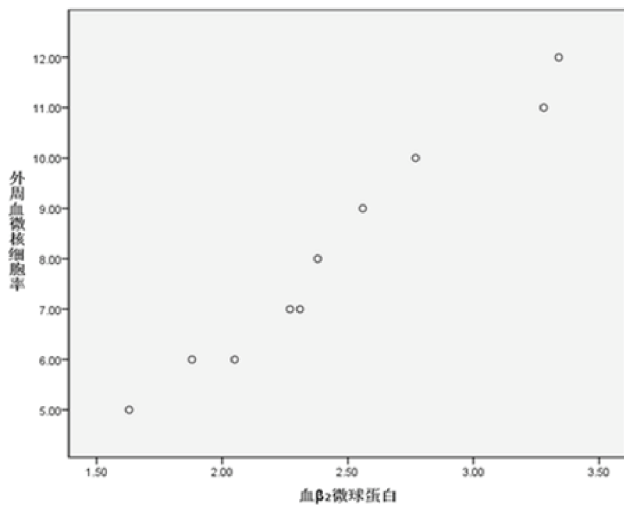


图 3

表 2: MM 患者外周血微核细胞率与骨髓瘤细胞比例、血 β_2 微球蛋白的相关性

	相关系数 (r_s)	P 值
MM 患者外周血微核细胞率与骨髓瘤细胞比例	0.994	0.000
MM 患者外周血微核细胞率与血 β_2 微球蛋白	0.994	0.000

3 讨论

多发性骨髓瘤是一种浆细胞恶性增殖肿瘤,骨髓瘤细胞在骨髓中不均匀分布。绝大多数 MM 患者可发现染色体异常,微核试验是反应染色体损伤的重要试验方法。近年来,细胞

遗传学的地位在血液系统疾病中的预后诊断中逐步上升。随着分子生物学技术的迅速发展和其在微核试验中的应用,微核试验已发展成为能检测染色体断裂、丢失、分裂延迟、不分离、DNA 损伤修复障碍、Hprt 基因突变、凋亡、细胞分裂不平衡多种遗传损害终点^[5]。

本次研究采用培养法检测外周血淋巴细胞微核细胞率,结果显示,MM 患者观察组外周血微核细胞率高于对照组,两组差异具有统计学意义($P<0.05$),提示外周血淋巴细胞微核细胞率在 MM 的辅助诊断发挥重要作用。MM 患者临床表现多样,早期可无明显症状,极易发生漏诊、误诊,约有 2/3 患者确诊时已为中晚期,以致错过最佳的治疗时期,因此,早期诊断和治疗对 MM 患者极为重要。外周血淋巴细胞微核细胞率与常规血清游离轻链检查、免疫固定电泳、免疫球蛋白定量等实验结果进行联合进行诊断,可提高 MM 的检出率。目前评价多发性骨髓瘤疗效及患者预后的指标主要包括血 β_2 微球蛋白、C 反应蛋白、骨髓瘤细胞增殖标记指数等。疗效良好时,浆细胞比例下降,血 β_2 微球蛋白水平降低。相反,治疗效果不理想时病情加重时,浆细胞比例会升高,血 β_2 微球蛋白含量增多。本研究结果显示 MM 患者外周血淋巴细胞微核细胞率与骨髓瘤细胞比例、血 β_2 微球蛋白之间高度相关,呈正相关,两者相关关系具有统计学意义(r_s 均=0.994, P 均 <0.05)。提示外周血淋巴细胞微核细胞率可作为评估 MM 患者预后疗效的一个重要指标。骨髓穿刺检查是诊断多发性骨髓瘤的金标准,浆细胞增殖率是多发性骨髓瘤的一个重要的独立预后因素。但骨髓穿刺有其局限性,创伤大,而且穿刺成功率低,对患者需进行多次、多部位穿刺。外周血淋巴细胞微核试验创伤较小,而国内外大量对比试验研究,比较一致的看法是该方法在敏感性、特异性和准确性方面与经典的染色体畸变分析方法基本相当。

综上所述,MM 患者外周血淋巴细胞微核细胞率较于体检健康人群升高,检测患者外周血微核细胞率可用于 MM 的辅助诊断及预后判断。

参考文献

- [1] 林卫,黄晓华,卢新兆,等.多发性骨髓瘤患者实验室指标分析及在临床诊断中的意义[J].蛇志,2016,28(1).
- [2] 曹佳,林真,余争平主编:微核试验——原理、方法及其在人群检测和毒性评价中的应用[M].北京:军事医学科学出版社,2000:1-9.
- [3] 张之南.血液病诊断及疗效标准[M].2版.北京:科学出版社,1998:378-380.
- [4] 王怡净,张立实.TK6 和 WTK1 细胞体外微核试验比较研究[J].现代预防医学,2005,32(8):869-971.
- [5] Fenech M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method[J]. Mutat Res, 1997, 392(1-2):11-18.
- [6] Huber R, Streng S, Bauchinger M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry[J]. Mutat Res, 111(2):185-193.