

流式细胞术检测皮肤组织在母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤诊断中的应用

郑凤丽^{1,2} 王春艳¹ 刘松雅¹ 毛霞¹ 易淑娟¹

¹华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科,湖北武汉 430030

²山西白求恩医院(山西医学科学院同济山西医院)血液内科,山西太原 030032

摘要 目的:探讨流式细胞术(FCM)检测皮肤组织样本在诊断母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤(BPDCN)中的作用。方法:利用多色流式检测皮肤组织与骨髓,并结合组织病理学、骨髓细胞形态学、遗传学、二代测序(NGS)等检测结果对3例已确诊的BPDCN进行回顾性分析。结果:3例患者均以皮肤损害为首发症状,FCM检测骨髓仅发现1例患者标本存在BPDCN细胞,而3例患者皮肤组织标本中均发现BPDCN细胞;与皮肤组织病理免疫组化结果诊断一致;病例2患者骨髓细胞学和遗传学检查均未发现BPDCN细胞,病例1患者骨髓细胞学中发现BPDCN细胞,病例3患者NGS检测到BPDCN相关基因突变。结论:流式细胞免疫分型是BPDCN诊断的实用辅助手段,可以在早期皮肤组织标本中快速精准地诊断BPDCN,同时进行鉴别诊断。

关键词 流式细胞术;皮肤;母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤

中图分类号 R733.3 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20240306

Application of cutaneous tissue detected by flow cytometry in the diagnosis of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm ZHENG Feng-li^{1,2}, WANG Chun-yan¹, LIU Song-ya¹, MAO Xia¹, YI Shu-juan¹. ¹Department of Hematology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China; ²Department of Hematology, Shanxi Bethune Hospital, Shanxi Academy of Medical Sciences, Tongji Shanxi Hospital, Shanxi Taiyuan 030032, China

Corresponding author: YI Shu-juan, E-mail: yisj01@163.com

Abstract Objective: To investigate the value of flow cytometry (FCM) in the diagnosis of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN) by detecting cutaneous tissue samples. Methods: The cutaneous tissue and bone marrow were detected by multi-color FCM, and the results of histopathology, bone marrow cell morphology, genetics, and second-generation sequencing were analyzed retrospectively in 3 cases of confirmed BPDCN. Results: All 3 patients had skin damage as the initial symptom. FCM detection of bone marrow only found BPDCN cells in one patient sample, while FMC detection of skin tissue samples found BPDCN cells in all 3 patients. The diagnosis was consistent with the pathological and immunohistochemical diagnosis of skin tissue. The bone marrow cytology and genetic examination in one patient (case 2) did not detect BPDCN cells. BPDCN cells were found in bone marrow cytology of one patient (case 1), and BPDCN related gene mutations were detected in one patient (case 3) by second-generation sequencing. Conclusion: FCM immunophenotyping is a practical auxiliary tool for the diagnosis of BPDCN, which can quickly and accurately diagnose BPDCN in early skin tissue specimens, and perform differential diagnosis. It is an effective pathological auxiliary tool.

Key words Flow cytometry; Skin tissue; Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm

母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤(blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm, BPDCN)是一种来源于浆样树突细胞(plasmacytoid dendritic cell, pDC)的罕见高度侵袭性造血系统恶性肿瘤,常以皮肤损害为首发症状,临床表现各异,典型的皮肤病变表现为瘀斑样皮肤红斑或结节。随着疾病的进展,外周血、骨髓、中枢神经系统、纵隔、胰腺、肺均可受累。少数患者以白血病起病,特别是终末期,可不伴

皮肤损害;长期生存率低,预后差,对初始化疗敏感,但缓解期不持久,往往复发后对治疗耐药,中位生存期12~16个月。在2008年世界卫生组织(WHO)造血和淋巴细胞肿瘤分类标准中列为一个独立的实体肿瘤^[1]。由于该疾病罕见,其皮肤症状缺乏特异性,临床确诊困难,易误诊或漏诊,尤其对于仅有皮肤损害的早期患者,首诊不一定在血液科,从首次症状出现至诊断的中位时间为4个月,最长可达1.5

年^[2,3]。过去该疾病诊断主要依靠病理活检及免疫组化表型特征,但随着近年来流式细胞术(flow cytometry, FCM)的发展,检测外周血及骨髓样本诊断 BPDCN 及监测残留优势显著^[4]。本文回顾 3 例 BPDCN 患者通过皮肤组织 FCM 和病理检查确诊,探讨 FCM 检查皮肤组织样本对 BPDCN 的早期诊断价值和意义。

资料与方法

1. 一般资料:收集 2017 年 10 月-2022 年 8 月华中科技大学同济医学院附属同济医院收治采用 FCM 检测皮肤组织样本后确诊的 3 例 BPDCN。病例 1:患者女,29 岁,发热 2 周,左侧颈部淋巴结肿痛,皮肤可见瘀斑样损害入院,就诊期间多次抗感染治疗无好转;病例 2:患者男,29 岁,无明显诱因发现右腰背部皮肤损伤,可见多发皮疹,伴瘙痒及右腋下结节(约 2 cm 大小)入院, PET/CT 提示右侧腋窝多发淋巴结增大,考虑肿瘤性病变可能。病例 3:患者男,12 岁,无明显诱因出现四肢及躯干散在淡红色皮疹,口服中药治疗,未见好转,后皮疹逐渐增多增大,触之疼痛。3 例患者均送检皮肤组织(病例 1 取背部皮疹处,病例 2 取右侧腰背部皮肤损伤处,病例 3 取腰部皮疹处)进行组织病理学、免疫组化检查及送检 FCM 检测。本研究经医院伦理委员会批准(批号:TJ-IRB20231252)。

2. 方法:

(1)仪器与试剂:FACSCanto 型和 LSRFortessa 流式细胞仪(美国 BD 公司),血细胞分析仪(中国迈瑞公司),流式分析采用 FACSDiva 软件;单克隆抗体与配套试剂(美国 BD 公司),本研究标记的流式抗体如下:CD45、CD4、CD56、CD123、BDCA-2 (CD303)、BDCA-4 (CD304)、BDCA-1、BDCA-3、HLA-DR、CD14、CD64、CD3、末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TDT)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、cCD79a、CD117、CD34、CD38、CD13、CD33、CD2、CD7、CD8、CD11b。

(2)流式细胞标本制备及检测方法:①标本的保存:皮肤组织标本置于 RPMI(Roswell Park Memorial Institute)1640 培养基中,4℃ 保存 48 h 内处理,或置于生理盐水中,立即处理上机使用;②单细胞悬液的制备:组织标本先用胰酶 37℃ 下消化 30 min,中间摇匀数次,消化结束收集细胞消化液,200 目滤网过滤,生理盐水冲洗 2~3 遍至试管中混匀,以 1 500 转/min 离心 5 min,弃去上清,加入 300 μL 磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS),

制成单细胞悬液;③细胞计数:血细胞分析仪计数单细胞悬液,调整标记成 $10^5 \sim 10^6$ /mL 个细胞;④裂红细胞:在制备好的单细胞悬液中加入不含固定剂的 NH_4Cl 溶液,10 min 后以 1 500 转/min 离心 5 min,弃去上清;⑤标记抗体:裂红后的单细胞悬液中分别加入上述多种荧光抗体(抗体量按照不同抗体滴度最合适量加入),室温避光孵育 15 min;⑥洗涤后上机检测。加入 2 mL 的 PBS,以 1 500 转/min 离心 5 min。弃去上清,200 目滤网过滤后加入 PBS 200~500 μL,上机检测,每个样本至少收集 5×10^5 个细胞。

3. 统计学分析:采用 FACSDiva 统计学软件对数据进行双变量散点图分析。根据细胞大小,采用 FSC-A/SSC-A 或 CD45/SSC-A 及单克隆抗体表达设门,荧光素标记的单克隆抗体及流式细胞仪检测细胞抗原的表达从而区分细胞亚群。

结果

1. FCM 检测皮肤组织免疫分型结果:病例 1:有 70.3% 细胞(占全部有核细胞)表达 CD45^{dim} 、CD4、CD56^{br}、HLA-DR^{br}、CD123、BDCA-4,部分表达 CD36,不表达 BDCA-2、BDCA-1、CD117、CD34、CD14、CD64、CD2、CD8、CD7、TDT、MPO、cCD3, CD45/SSC 图位于原始幼稚细胞区域,为恶性原始细胞,考虑为 BPDCN,见图 1A。

病例 2:有 53.8% 细胞(占全部有核细胞)表达 CD45、CD4、CD56^{br}、CD123、HLA-DR^{br}、BDCA-4、TDT,部分表达 CD7^{dim} ,不表达 BDCA-2、CD64、CD34、CD117、CD14、CD7、cCD3, CD45/SSC 图位于原始幼稚细胞区域,为恶性原始细胞,考虑为 BPDCN,因标本量少,部分抗原未能继续加做,见图 1B。

病例 3:有 81.1% 细胞(占全部有核细胞)表达 CD45、CD4^{dim}、CD56、CD123、HLA-DR^{br}、BDCA-4、 CD7^{dim} ,不表达 BDCA-2、CD64、CD14、CD34、CD117、CD8、TDT、cCD3、CD13、CD33, CD45/SSC 图位于原始幼稚细胞区域,为恶性原始细胞,考虑为 BPDCN,见图 1C。

2. 骨髓流式结果:骨髓免疫表型 2 例未见到明显异常细胞,病例 1 可见 92% 异常细胞群,表达 CD4、CD56、BDCA-4^{dim}、CD123、HLA-DR,考虑树突状细胞来源可能性大。

3. 皮肤组织病理结果:病例 1 和 2 患者皮肤组织病理均诊断 BPDCN,病例 3 在外院皮肤包块病理诊断皮肤淋巴瘤,后来我院会诊确诊为 BPDCN;免疫组化结果见表 1。

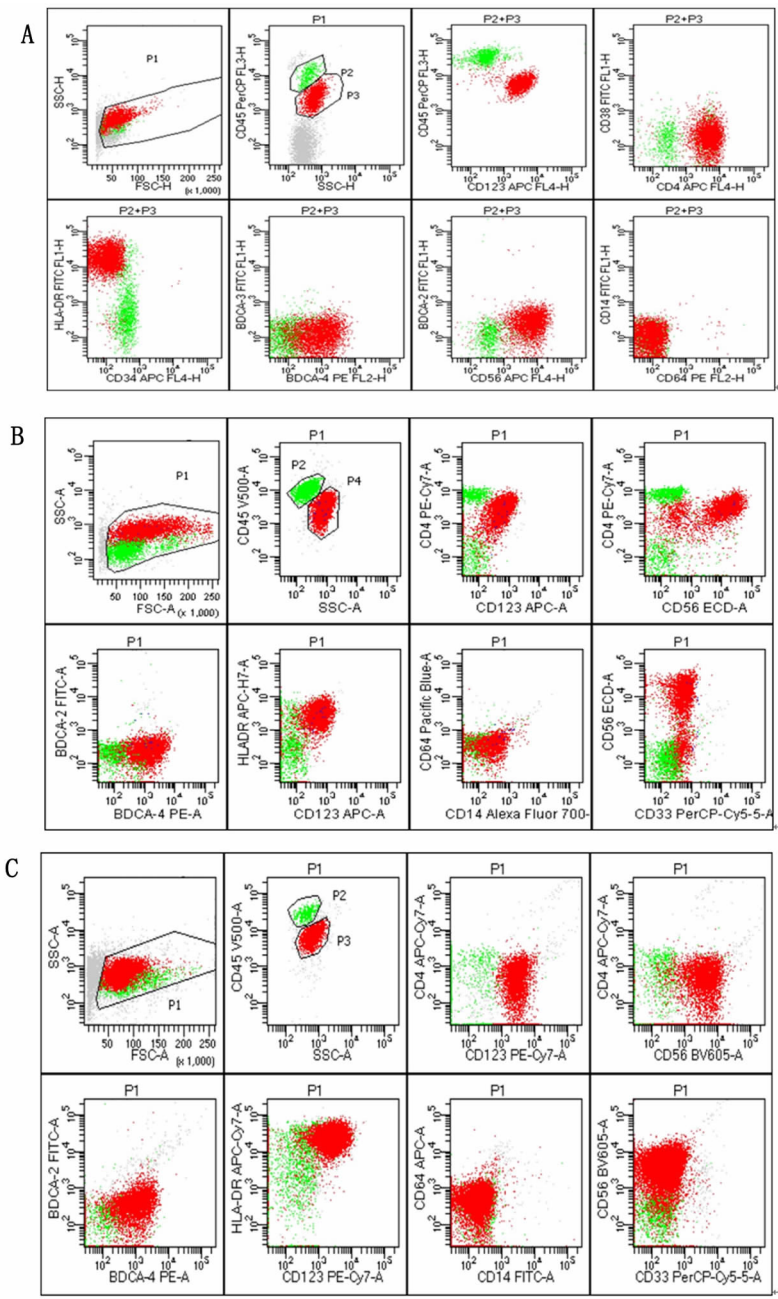


图 1 流式细胞免疫分型结果(A 为病例 1;B 为病例 2;C 为病例 3;绿色为正常淋巴细胞;红色为异常 BPDCN 细胞)

表 1 3 例 BPDCN 的免疫组化表型

病例	性别	受累部位	免疫表型
1	女	淋巴结、皮肤、骨髓	CD4 +、CD56 +、CD123 +、CD99 -、CD3 -、TDT -、CD34 -、CD117 -、CD20 -、PAX5 -、MPO -、CD38 -
2	男	淋巴结、皮肤	CD4 +、CD56 +、CD123 +、CD43 +、CD7 +、CD3 -、TDT 部分中等 +、CD34 -、ALK -、CD10 -、MPO -、CD68 -、CD20 -、PAX5 -、Ki - 67 (阳性率约 80%)
3	男	皮肤	CD4 +、CD56 +、CD123 +、CD68 +、CD43 +、CD3 - CD7 +、CD34 -、CD117 -、CD20 -、PAX5 -、MPO -、CD25 -、ERG -、Ki - 67 (阳性率约 70%)

4. 二代测序(next-generation sequencing, NGS)结果:病例2未查到NGS结果;病例1示TET2基因上检测到1个错义突变(突变频率49.37%)和1个无义突变(突变频率43.22%);病例3示ASXL1基因突变(突变频率41.9%)和RUNX1基因突变(突变频率35.8%)。

5. 骨髓细胞学与遗传学:病例1骨髓细胞学可见BPDCN细胞,病例2、3骨髓细胞均未见到BPDCN细胞;3例患者遗传学染色体核型均示正常核型。

讨论

BPDCN是一种非常少见的血液系统恶性肿瘤,临床侵袭性极强,预后差,与多种淋巴瘤和血液病在临床表现、组织形态、免疫表型方面有重叠,BPDCN的诊断较为困难,易漏诊误诊^[5,6]。近年来发现BPDCN呈现双峰发病模式,即20岁以下和60岁以上发病率较高,对化疗和放疗均不敏感^[7,8]。本研究中3例患者均为年轻患者。本病倾向于多部位侵犯,首发皮肤(几乎100%左右),其次为骨髓和外周血(70%左右),以及淋巴结(40%左右)^[7]。本文中3例患者均以皮肤斑块或结节为首发表现,1例累及骨髓。

目前,BPDCN的诊断主要依靠皮肤病理活检和免疫组化表型特征,BPDCN的细胞形态特点呈现母细胞形态,不易与白血病原始细胞区分,形态学对其肿瘤细胞不能做出明确判断,难与急性髓系白血病(acute myelocytic leukemia, AML)和其它淋巴瘤区分^[9,10],但BPDCN有其相对特异的免疫表型:表达CD4、CD56,同时伴有一个以上pDC标志(CD123^{hi} +, BDCA-2 +, BDCA-4 +, cTCL1 +),不表达髓系(MPO)、T系(cCD3、CD3)、B系(CD19、CD22、CD79a)、NK细胞标志(CD16、CD57、CD94、CD161)和单核标志(CD64、CD14),还可表达HLA-DR^{hi}、CD36、CD68、CD45RA、CD43、CD117中的一种或多种标志;一般不表达CD34^[11]。诊断时以上抗体应联合应用,在排除了淋巴组织肿瘤与AML后,若CD4和CD56阳性则高度提示本病,若浆细胞样树突状细胞相关标记阳性则可确诊。有研究报道,少部分BPDCN瘤细胞可表达TDT与T细胞相关标记,但并非系别特异性标记CD2、CD7以及髓系相关标记CD117、CD33,注意不要与T细胞急性淋巴细胞白血病(T-cell acute myelocytic leukemia, T-ALL)/淋巴瘤母细胞淋巴瘤(lymphoblastic lymphoma, LBL)和AML混

淆^[12]。部分AML可异常表达CD4和CD56,CD123阳性亦可见于慢性粒单核细胞白血病、急性单核细胞白血病、急性B淋巴细胞白血病(B-cell acute lymphoblastic Leukemia, B-ALL),也要注意鉴别^[13]。本研究3例患者均送检皮肤组织进行FCM检测,均检测到高比例的BPDCN瘤细胞,与最终病理结果诊断一致。需要注意的是,送检流式检测的皮肤组织不能浸泡在甲醛中,新鲜组织要第一时间放入装有生理盐水的容器中,否则会影响抗体与细胞的结合从而使结果出现假阴性。有报道称确诊的BPDCN患者多次进行皮肤病理活检时,免疫表型由CD4 + CD56 + 变为CD4-CD56 +,表明此疾病在进展过程中,免疫表型变化多样^[14];由于此疾病的罕见性,病理免疫组化的免疫表型有时与髓系肿瘤交叉;不典型病变时BPDCN的特异性标志会表达不佳。而FCM具有抗体多,特异性好,能用特异性抗体设门找到目标细胞等优点,便于与髓系及淋系肿瘤鉴别,是BPDCN诊断的重要辅助手段。

FCM是一种应用广泛的荧光免疫技术,具有检测快速、灵敏度高、多参数分析的特点^[15],应用FCM检测组织标本可辅助诊断血液肿瘤和淋巴瘤,尤其是肿瘤细胞尚未侵入骨髓时,流式技术的多色方案可以做到以最少标本获取最多标记参数,提高疾病诊断率。本研究中对3例患者查阅病史后采用的流式抗体方案,在确定pDC数量和免疫表型来确诊BPDCN中起到关键作用,而且流式前期处理组织细胞的方法比病理免疫组化方法所用时间短,能及早诊断肿瘤细胞。本研究中3例患者均同时送检皮肤和骨髓进行FCM检测,皮肤组织均发现大量免疫表型符合BPDCN的细胞,与病理免疫组化结果一致,而骨髓中仅有1例患者发现BPDCN细胞,因此流式仅送检骨髓容易漏诊。

BPDCN与AML关系密切,部分BPDCN累及骨髓和皮肤时表现与急性白血病皮肤浸润的临床特点相似,骨髓形态学难以区别。少数BPDCN患者以白血病起病,部分患者可并发或者发展为髓系白血病^[12]。本研究中3例患者FCM检测皮肤和骨髓免疫表型结果均未发现AML原始细胞,且皮肤中的肿瘤细胞均不表达单核标志(CD14 + CD64 +),可与侵犯皮肤的慢性粒单核细胞白血病相鉴别。BPDCN还要与AML伴浆细胞样树突状细胞(AML-pDC)增生进行鉴别。BPDCN中的pDC来自CD56 + 的pDC前体,而AML-pDC中的pDC来自CD34 + 的原始细胞;免疫表型上,BPDCN多为CD4 +、CD56 +、

CD123 +、CD45^{dim} +、CD303 +、CD304 +、HLA-DR^{bri} +；AML-pDC 免疫表型常常为 CD4 +、CD56 -，多数为 CD303 +、CD304 +、CD34 +，CD123 和 cTCL1 表达弱。在分子水平上，BPDCN 中突变通常为 TET2、ASXL1、NRAS，而 RUNX1 突变少见(2%)，而 AML-pDC 通常有 RUNX1 突变(64%)，其次是 ASXL1(36%)、DNMT3A(32%)，两者预后均较差^[13,14]。BPDCN 还需与皮肤 T 细胞淋巴瘤，淋巴瘤细胞淋巴瘤相鉴别，皮肤 T 细胞淋巴瘤浸润真皮表层，缺乏 CD56 表达。此外，T 细胞受体基因的重排有助于区分 BPDCN 和 T 细胞淋巴瘤^[16,17]；淋巴瘤细胞性淋巴瘤的瘤细胞形态呈母细胞样，可见星空及坏死，CD10、CD99、CD34、TDT 阳性，可表达 B 细胞或 T 细胞相关抗原，病例 2 也表达了 T 系标志 CD7 和 TDT，病理易与 T 淋母混淆，但 T 淋母细胞表达胞浆 CD3，可与 BPDCN 鉴别，病例 2 患者肿瘤细胞不表达胞浆 CD3。若出现不典型的免疫表型时，还需结合临床资料、病理及其它检查结果综合分析作出全面客观诊断。

遗传学方面，BPDCN 常涉及多条染色体畸形，但至今没有发现特异性改变，常见的重现性染色体异常涉及 5q(72%)、12p(64%)、13q(64%)、6q(50%)、15q(43%) 和单体 9(28%) 呈部分或完全缺失^[16,18]。本研究中 3 例患者遗传学均显示染色体正常核型。

有研究显示，BPDCN 和 AML 在基因突变谱上有部分重叠，70% 左右的髓系白血病伴 pDC 患者有 RUNX1 突变和 ASXL1 突变^[19]。病例 3 患者 NGS 检测出 RUNX1 突变和 ASXL1 突变。

本研究有一定局限性，皮肤组织有时会因为采样原因导致标本量少，抗体不易做全，病例 2 患者组织细胞较少，未能加做更多抗体，因此建议送检皮肤组织时越多越好。BPDCN 多发于老年人，而本研究中 3 例均为 30 岁以下年轻人，需要在以后的研究中增大样本量进行进一步深入分析。在病理结果和 FCM 检测骨髓细胞不能及时诊断该疾病时，建议同时送检皮肤组织做病理和流式细胞免疫分型检测。

参考文献

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. *Blood*, 2016, 127(20): 2391-1405.
- Pemmaraju N, Lane AA, Sweet KL, et al. Tagraxofusp in blastic plasmacytoid dendritic-cell neoplasm[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(17): 1628-1637.

- Kim JH, Park HY, Lee JH, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm; analysis of clinicopathological feature and treatment outcome of seven cases[J]. *Ann Dermatol*, 2015, 27(6): 727-737.
- Wang W, Khoury JD, Miranda RN, et al. Immunophenotypic characterization of reactive and neoplastic plasmacytoid dendritic cells permits establishment of a 10-color flow cytometric panel for initial workup and residual disease evaluation of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm[J]. *Haematologica*, 2021, 106(4): 1047-1055.
- Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4; three marks for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood[J]. *J Immunol*, 2000, 165(11): 6037.
- Kerr D, Sokol L. The advances in therapy of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2018, 27(9): 733-739.
- Venugopal S, Zhou S, Jamal SE, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm-current insights[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2019, 19(9): 545-555.
- 张枫, 左英燕, 陆爱东, 等. 儿童母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤 5 例病例系列报告[J]. *中国循证儿科杂志*, 2019, 14(4): 271-275.
- 王箬, 王静波, 李静静, 等. CD74 基因表达对急性髓系白血病细胞增殖与侵袭的抑制作用[J]. *内科急危重症杂志*, 2023, 29(2): 146-150.
- 汪智琼. 急性髓系白血病伴巨核系发育异常的临床特征及预后研究[J]. *内科急危重症杂志*, 2023, 29(1): 18-22.
- Koerber RM, Held SAE, Vonnahme M, et al. Blastic plasmacytoid dendritic - cell neoplasia: a challenging case report. [J] *J Cancer Res Clin Oncol*, 2022, 148: 743-748.
- Wang W, Xu J, Khoury JD, et al. Immunophenotypic and molecular features of acute myeloid leukemia with plasmacytoid dendritic cell differentiation are distinct from blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(14): 3375.
- Hamadeh F, Awadallah A, Meyerson HJ, et al. Flow cytometry identifies a spectrum of maturation in myeloid neoplasms having plasmacytoid dendritic cell differentiation[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2020, 98(1): 43-51.
- Garnache-Ottou F, Vidal C, Büchlé S, et al. How should we diagnose and treat blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm patients? [J] *Blood Adv*, 2019, 3(24): 4238-4251.
- 刘艳荣. 实用流式细胞术——血液病篇[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2010.
- Ishida F, Kwong YL. Diagnosis and management of natural killer-cell malignancies [J]. *Expert Rev Hematol*, 2010, 3(5): 593-602.
- 王春艳, 刘松雅, 何成, 等. 伴大量浆细胞增殖的血管免疫母细胞性 T 细胞淋巴瘤临床分析[J]. *内科急危重症杂志*, 2021, 27(5): 382-388.
- Cota C, Vale E, Viana I, et al. Cutaneous manifestations of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm -morphologie and phenotypic variability in a series of 33 patients[J]. *Am J Surg Pathol*, 2020, 34(1): 75-87.
- Xiao W, Chan A, Waarts MR, et al. Plasmacytoid dendritic cell expansion defines a distinct subset of RUNX1-mutated acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2021, 137(10): 1377-1391.

(2023-10-11 收稿 2024-04-11 修回)