

• 论 著 •

多参数流式细胞术在多发性骨髓瘤及其微小残留疾病的免疫表型分析*

许艳丽,王顺清,毛 平,杜庆华
(广州市第一人民医院血液科,广东广州 510180)

摘要:目的 探讨多参数流式细胞术(MFC)在多发性骨髓瘤患者初诊和微小残留疾病的检测意义。方法 采用多参数流式细胞技术,通过 CD138 或 CD38 抗原标记识别 74 例多发性骨髓瘤患者的浆细胞,联合 CD45、CD56、CD19、CD20、CD117 表面抗原标记及胞浆 Kappa 和 Lambda 轻链鉴别异常骨髓瘤细胞。结果 44 例初诊病例中,CD138 在可检测的病例中均呈阳性表达,同时 CD19 阴性,42 例病例(95%)CD45 阴性或弱阳性,其他表面抗原标记 CD38、CD56、CD20、CD117 的检测率分别为 98%、93%、45%、41%,胞浆 Kappa 和 Lambda 轻链均呈限制性克隆型表达。14 例病例用于评估初诊及治疗过程中免疫表型的变化,其中 11 例病例(79%)出现至少 1 个及以上异常表型的变化,4 例(29%)病例化疗后抗原标记荧光强度显著增加,7 例(50%)病例荧光强度显著降低。CD45、CD19、胞浆免疫球蛋白轻链为最稳定的标记,未见显著抗原标记的变化,2 例 CD38(14%)、7 例 CD56(50%)、4 例 CD20(29%)及 2 例 CD117(14%)病例呈现显著的抗原密度的变化。30 例已治疗病例用于评估 MRD 的免疫表型,其中 25 例检测出异常的瘤细胞,5 例病例未见显著的限制性轻链克隆型表达,Kappa 与 Lambda 比值在 0.5~2,认定 MRD 阴性。结论 流式细胞术用于多发性骨髓瘤的诊断疗效及预后的判断具有重要意义,采用胞浆免疫球蛋白轻链的检测可提升微小残留检测的正确性。

关键词:多发性骨髓瘤; 多参数流式细胞术; 免疫表型; 微小残留疾病
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.06.018 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)06-0760-03

Immunophenotypic analysis of multiparametric flow cytometric in multiple myeloma and minimal residual disease*

Xu Yanli, Wang Shunqing, Mao Ping, Du Qinghua

(Department of Hematology, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510180, China)

Abstract: **Objective** To investigate the detectable significance of multiparameter flow cytometry(MFC) for the first visiting and minimal residual disease (MRD) in the patients with multiple myeloma. **Methods** MFC was used to identify the plasma cells by the expression of CD138 or CD38 antigen in 74 patients with multiple myeloma. By combining surface antigens like CD45, CD56, CD19, CD20, CD117 and the cytoplasm Kappa and Lambda light chain, the aberrant myeloma cells were differentiated from normal plasma cells. **Results** In the 44 first visiting cases, the positive expression of CD138 can be detected in all cases, while the expression of CD19 was negative and 42 cases (95%) were negative or weak positive expression for CD45. The detection rates of CD38, CD56, CD20 and CD117 were 98%, 93%, 45% and 41%, respectively. The cytoplasm Kappa and Lambda light chains were showed the limited expression. Of the patients with MM, 14 cases were used for evaluating the change of immunophenotype at first visiting and during the treatment process, among them, 11 cases(79%) appeared the changes in at least one of aberrant phenotypes. 4 cases (29%) had the significant enhancement of antigen marker fluorescence intensities after chemotherapy and 7 cases (50%) had significant decrease of antigen marker fluorescence intensities after chemotherapy. CD45, CD19 and cytoplasm immunoglobulin light chains were the most stable marker, no obvious antigen marker changes were found during the treatment, while there was a significant antigen density change in 2 cases of CD38 (14%), 7 cases of CD56 (50%), 4 cases of CD20 (29%) and 2 cases of CD117 (14%). Of the 30 cases for evaluating MRD immunophenotype, the abnormal myeloma cells were detected in 25 cases. In 5 cases, no expression of limited Kappa and Lambda light chains was found and the ratio of Kappa and Lambda was 0.5-2, which were identified as negative for MRD. **Conclusion** The multiparameter flow cytometry has important significance in evaluating the diagnosis, therapeutical effect and prognosis. The detection by adopting cytoplasm immunoglobulin light chains can improve the accuracy in MRD detection.

Key words: multiple myeloma; multiparametric flow cytometry; immunophenotype; minimal residual disease

采用流式细胞术可特异性的鉴定浆细胞群体。传统的鉴别标记是 CD38 与 CD45 或 CD56 的组合,根据浆细胞 CD38 强阳性,骨髓瘤细胞 CD45 阴性或弱阳性、CD56 阳性的特点,将瘤细胞群体从浆细胞群体中鉴别出来。但 CD38 是非特异性标记,在造血祖细胞群、T、B 细胞等均有表达,部分瘤细胞标记 CD38 可能有较低抗原密度表达,增加了鉴定浆细胞的难度,因此近年来流式更加倾向用 CD138 检测浆细胞群。CD138 是浆细胞的特异标记,在造血干祖细胞、T、B 细胞均不表达,采用

CD138 设门的方式,检出浆细胞群,并联合其他抗原标记,多参数分析浆细胞免疫表型,即可鉴定浆细胞的恶性与否。本文除采用 CD45、CD56、CD19 等常用检测骨髓瘤细胞的标记外,也增加了胞浆免疫球蛋白轻链的检测,胞浆 Kappa 链和 Lambda 链在良性浆细胞中以接近 1:1 的比例存在,但在骨髓瘤细胞中通常呈克隆型的轻链限制性表达。本文采用上述的抗原标记,回顾性分析了初诊与治疗过程中的骨髓瘤患者的免疫表型,并对比分析治疗前后抗原表型的变化,为流式在骨髓瘤的

* 基金项目:广东省中医药局基金资助项目(20121010)。 作者简介:许艳丽,女,副主任技师,主要从事流式细胞术临床医学诊断研究。

诊断、MRD 的检测及合理的设计抗体组合提供一些参考价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 74 例样本来源于 2010 年 1 月至 2012 年 6 月在广州市第一人民医院流式细胞仪室进行检测的骨髓标本。男 43 例,女 31 例,平均 60 周岁,中位年龄 60 周岁。

1.2 仪器与试剂 FACS Canto 流式细胞仪(美国 BD 公司),配置 488 nm 及 633 nm 激光器。采用六色荧光标记技术,用异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE)、草履虫叶绿素蛋白-花青素 5.5(PerCP-Cy5.5)、PE-Cy7、别藻蓝蛋白(APC)及 APC-Cy7 荧光染料分别标记 CD19、CD20、CD38、CD45、CD56、CD117 等抗体。以上试剂及溶血素、穿透液分别购自美国 BD 公司、法国 Immunotech 公司。kappa FITC/Lambda PE 购自丹麦 DAKO 公司,CD138APC 购自德国 Miltenyi 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备 每样品管加肝素抗凝的骨髓 100 μL(相当于 5×10⁵ 个细胞)及 20 μL 荧光标记抗体,室温避光孵育 20 min;表面抗原染色:溶血素 2 mL,室温避光孵育 10 min,离心 300×g 5 min,弃上清,PBS 洗涤 300×g 5 min,弃上清,500 μL PBS 悬浮沉淀,4 ℃待检;胞浆抗原染色:固定液 100 μL,室温避光孵育 15 min,离心 300×g 5 min,弃上清,穿透液 100 μL,室温避光孵育 5 min,加 Kappa/Lambda 抗体,室温避光孵育 15 min,离心 300×g 5 min,弃上清,PBS 洗涤 300×g 5 min,弃上清,500 μLPBS 悬浮沉淀,4 ℃待检。

1.3.2 流式细胞术分析 FACS Canto 流式细胞仪,配置氩离子激光器及氦-氖激光器,激发波长分别为 488 nm 和 633 nm。采用 CD38/SSC 及 SSC/CD138 设门方法,Diva 软件分析鉴定浆细胞,收集测定细胞 30 000 个。骨髓瘤细胞表型认定基于异于良性浆细胞的表达模式,主要包括抗原的缺失表达,不存在于良性细胞的异常抗原表达,髓系标记的跨系表达等。考虑到随着时间的推移,仪器状态或试剂批号的改变会干扰抗原荧光强度变化的鉴别,以良性粒细胞群体的 CD45 荧光强度作为内参,以高于或低于初诊骨髓瘤细胞荧光强度 log 对数值的一半认定荧光强度的升高或降低。

2 结果

44 例初诊病例中,瘤细胞约占有核细胞群体 3%~60%(中位值:14%,平均值:21%)。CD138 在可检测的病例中均呈阳性表达,CD19 阴性,42 例病例(95%)CD45 阴性或弱阳性,其他表面抗原标记 CD38、CD56、CD20、CD117 的检测率分别为 98%、93%、45%、41%,胞浆 Kappa 和 Lambda 轻链均呈限制性克隆型表达,64%病例胞浆 Kappa 阳性 Lambda 阴性,36%病例胞浆 Kappa 阴性 Lambda 阳性。每 1 病例至少出现 2 个以上异常的抗原表达模式,以 CD56 阳性 CD19 阴性较为常见,克隆型轻链限制性表达常见。

14 例病例用于评估初诊及治疗过程中免疫表型的变化,如表 1 所示,其中 11 例病例(79%)出现至少 1 个及以上异常表型的变化,4 例化疗后抗原标记荧光强度显著增加,7 例荧光强度显著降低。CD20 标记在 1 例化疗后获得,1 例化疗后丢失;CD45、CD19 及胞浆免疫球蛋白轻链为最稳定的标记,未见显著抗原标记的变化;CD38、CD56 分别在 2 例、3 例病例中表现抗原密度下调;4 例病例 CD56 表达密度上调。4 例 CD20 及 2 例 CD117 呈现显著的抗原密度的变化。

30 例已治疗病例用于评估 MRD 的免疫表型,其中 25 例检测出异常的瘤细胞,以 CD56 阳性 CD19 阴性常见,均出现克隆型免疫球蛋白轻链限制性表达。其余 5 例病例,CD19 部分阳性,CD56 阴性,Kappa 与 Lambda 比值在 0.5~2,认定 MRD

阴性。初诊及治疗组免疫表型如表 2 所示,良恶性浆细胞胞浆免疫球蛋白轻链流式图谱如图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)所示。

表 1 14 例多发性骨髓瘤患者治疗期间的抗原表达变化(%)

抗原标记	未有变化	抗原获得	阳性细胞群 荧光强度增强	阳性细胞群 荧光强度减弱	抗原丢失
CD38	86	0	0	14	0
CD56	50	0	21	29	0
CD20	72	7	7	7	7
CD117	86	0	7	7	0
合计	73	2	9	14	2

表 2 多发性骨髓瘤患者浆细胞抗原表达率

抗原标记	异常表达病例数[n(%)]	
	初诊	治疗期
CD138	28 (100)	19 (100)
CD38	43 (98)	29 (97)
CD56	41 (93)	24 (80)
CD45	42 (95)	25 (83)
CD20	20 (45)	13 (43)
CD117	18 (41)	12 (40)
CD19	44 (100)	25 (83)
胞浆 Kappa	18 (64)	139(68)
胞浆 Lambda	10 (36)	11 (58)

3 讨论

流式细胞术应用于多发性骨髓瘤细胞的研究,更侧重于浆细胞良恶性的鉴定,而非瘤细胞定量分析。由于样本的采集及样本制备过程对瘤细胞的影响,需排除骨髓稀释对检测的干扰,在 MRD 阴性的病例中样本应存在良性浆细胞^[1-2]。本文所有病例均以鉴别出的浆细胞群为基础进行免疫表型分析。

流式鉴别骨髓瘤细胞的传统抗原组合是 CD38(强阳性)/CD45(阴性或弱阳性)。但 CD38 不是在所有骨髓瘤疾病中呈强阳性表达,部分抗原密度下调,易与造血祖细胞、T、B 细胞的 CD38 阳性群体混淆,CD45 在瘤细胞群体也有阳性病例的报道^[2],因此采用 CD38/CD45 设门方法可能会遗漏鉴定瘤细胞群。CD138 几乎表达于所有浆细胞,是浆细胞的特异标记,采用 CD138 设门的方法评估浆细胞是最为可信赖的方法,尤其在瘤细胞低浸润的病例中^[3]。本文采用 CD138/SSC 设门,联合 CD38、CD56、CD19 等免疫标记,可明显鉴定浆细胞群体。

浆细胞良恶性的鉴别主要基于不同于良性浆细胞的免疫表型,如 CD19 阴性,CD56 阳性,CD20、CD117 的异常表达等。文献^[4-5]研究指出,这些异常的浆细胞表型也可能在健康人群存在,如 CD56 在良性浆细胞表达水平介于 0%~47%。骨髓瘤患者中也有 5%的病例表达 CD19,仅 70%~80%患者表达 CD56,Deshmukh 等^[3]报道在 33%~92%病例有 CD56 表达。因此仅采用有限的 CD19/CD56 的抗体组合有可能造成瘤细胞的漏检。本文除采用以上抗原标记外,亦增加了胞浆轻链的检测,以提高瘤细胞的检出率。

骨髓瘤患者在治疗过程中,瘤细胞异常免疫表型不是固定不变的,文献^[6-7]分别报道有 31%、41%患者免疫表型发生了变化。本文研究有 79%病例表型变化,与 Gupta 等^[8]研究(78%)基本一致。研究者定义的表型变化除抗原的获得或缺失外,也增加了抗原密度的变化,即以高于或低于初诊骨髓瘤

细胞荧光强度 log 对数值的一半认定荧光强度的升高或降低,抗原表达在治疗前后仍为阳性;另一方面各研究人员所选择的监测瘤细胞的抗体也并不完全相同。但免疫表型的不稳定性确实存在的。免疫表型不稳定的认知对骨髓瘤患者后续残留疾病的检测提出了挑战。采用有限的抗体组合会干扰临床诊断的正确性。

浆细胞克隆性评估是判断浆细胞良恶性的另外一种有效方法,由于是胞浆抗原的检测,在样本制备方面不同于常规的表面抗原染色,但对瘤细胞的监测尤其在 MRD 检测中的作用愈来愈引起人们的重视。健康人群中浆细胞胞浆免疫球蛋白轻链 Kappa 与 Lambda 轻链的比值大概在 0.5~2,而骨髓瘤患者经常出现比值高于 2 以上或低于 0.5 的 Kappa 单克隆阳性群或 Lambda 阳性群。应用胞浆 Kappa 和 Lambda,比值低于 0.2 或大于 16 与高水平的浆细胞相关且预后不良^[3]。值得注意的是如果浆细胞克隆性评估用于 MRD 的监测,应采用多克隆优于单克隆的胞浆免疫球蛋白轻链进行检测^[9]。本文研究也证实胞浆免疫球蛋白轻链是最稳定的标记之一,治疗前后未有显著变化,其检测可作为评估浆细胞良恶性的一种稳定可靠的方法。

Spears 等^[6]指出,采用胞浆轻链分析而不是表面标记的免疫表型进行 MRD 的评估可提升残留瘤性细胞的检测能力,更为重要的是对那些已转化良性的免疫表型但仍保留轻链抑制的残留瘤细胞的鉴别。由于免疫表型的变化,部分病例化疗后获得了 CD19 的表达,与良性浆细胞非常相似,这些病例如果不采用轻链检测,鉴别瘤细胞是不可能的。

在后期的样本中增加了胞浆免疫球蛋白的检测,收集至少 3 万以上的细胞,确实更加容易监测瘤细胞。3 例 MRD 阴性的患者其浆细胞呈 Kappa、Lambda 的多克隆表达,认定为良性浆细胞。

目前,研究人员分析浆细胞除常规的 CD19、CD56 外,也渐渐补充 CD27、CD28 等标记的检测^[10-11],无疑提升临床诊断的正确性及残留疾病的监测能力,但免疫表型结合克隆分析是流式定义浆细胞性质的最好方法,尤其在治疗后检测异常细胞时,克隆评估是唯一可能提供的信息,是临床疗效强有力的预测指标。广泛的抗体组合、多参数的流式细胞术对多发性骨髓瘤的诊断疗效及预后的判断具有重要意义。

参考文献

[1] Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al. Report of the European

Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders [J]. *Haematologica*, 2008, 93(3): 431-438.

[2] Lin P, Owens R, Tricot G, et al. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma [J]. *Am J Clin Pathol*, 2004, 121(4): 482-488.

[3] Deshmukh M, Elderfield K, Rahemtulla A, et al. Immunophenotype of neoplastic plasma cells in AL amyloidosis [J]. *J Clin Pathol*, 2009, 62(8): 724-730.

[4] Cannizzo E, Bellio E, Sohani AR, et al. Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in multiple myeloma: The diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78(4): 231-238.

[5] Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, et al. Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant immunophenotype in bone marrow of healthy donors [J]. *Cytometry B*, 2011, 80(5): 318-323.

[6] Spears MD, Olteanu H, Kroft SH, et al. The immunophenotypic stability of plasma cell myeloma by flow cytometry [J]. *Int J Lab Hematol*, 2011, 33(5): 483-491.

[7] Cao W, Goolsby CL, Nelson BP, et al. Instability of immunophenotype in plasma cell myeloma [J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129(6): 926-933.

[8] Gupta R, Bhaskar A, Kumar L, et al. Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma [J]. *Am J Clin Pathol*, 2009, 132(5): 728-732.

[9] Van Velzen JF, van den Blink D, Bloem AC. Inability of a monoclonal anti-light chain antibody to detect clonal plasma cells in a patient with multiple myeloma by multicolor flow cytometry [J]. *Cytometry Part B*, 2013, 84(1): 30-32.

[10] Cannizzo E, Carulli G, Del Vecchio L, et al. The role of CD19 and CD27 in the diagnosis of multiple myeloma by flow cytometry: A new statistical model [J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 137(3): 377-386.

[11] Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB, et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PET-HEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(16): 2737-2744.

(收稿日期: 2014-11-08)

(上接第 759 页)

医学杂志, 2001, 24(6): 325.

[2] Alien KR, Degg TJ, Rushworth PA, et al. Measurement of phenylalanine and tyrosine in plasma by high-performance liquid chromatography using the inherent fluorescence of aromatic amino acids [J]. *Ann Clin Biochem*, 1999, 36(2): 207-211.

[3] Tcherkas YV, Kartsova LA, Krasnova IN. Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 913(1/2): 303-308.

[4] 蔡宗友, 胡定波, 曹小英, 等. 苯丙酮尿症的新生儿筛查及方法比较 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2002, 10(4): 95.

[5] Pey AI, Desviat LR, Gamez A, et al. Phenylketonuria: Genotype-Phenotype correlations based on expression analysis of structural

and functional mutations in PAH [J]. *Hum Mutat*, 2003, 21(4): 370-378.

[6] 莫喜明, 唐爱国. HPLC 法测定末梢血中苯丙氨酸与酪氨酸及在苯丙酮尿症中的应用 [J]. *现代检验医学杂志*, 2008, 23(4): 20-23.

[7] 闫卫东. 苯丙酮尿症常用筛查方法的比较 [J]. *生物学通报*, 2007, 42(4): 10-11.

[8] 唐爱国, 洪敏, 莫喜明, 等. 两种血清苯丙氨酸高效液相色谱测定法的比较 [J]. *中国实验诊断学*, 2005, 9(4): 607-609.

[9] 包日新, 梁东春. 两种苯丙氨酸荧光检测试剂盒的比较 [J]. *天津医科大学学报*, 2003, 9(3): 346.

[10] 田国力, 许洪平, 朱伟明, 等. 新生儿苯丙酮尿症两种实验室筛查方法的质量评价 [J]. *检验医学*, 2007, 22(2): 171-173.

(收稿日期: 2014-12-08)