

多参数流式细胞术免疫表型分析在多发性骨髓瘤诊疗中的应用

林 阳¹, 万岁桂²

(1. 青岛大学附属烟台毓璜顶医院, 山东 烟台 264000; 2. 首都医科大学宣武医院, 北京 100053)

摘要: 随着多发性骨髓瘤治疗方法快速发展, 对于该病的诊断、微小残留病灶监测及预后的判断有了越来越多的方式及方法, 多参数流式细胞术免疫表型分析, 通过细胞免疫表型的异质性及胞内轻链的克隆性, 能够准确、客观的鉴别出良性及恶性浆细胞比例以及抗原表达水平, 不仅为多发性骨髓瘤患者的诊断提供依据, 同时能够追踪患者的微小残留病灶, 这对预测多发性骨髓瘤患者的预后密切相关, 全文将对多参数流式细胞术免疫表型分析在多发性骨髓瘤诊断、微小残留病灶监测及预后方面进行综述。

关键词: 流式细胞术; 免疫表型; 多发性骨髓瘤; 诊断; 微小残留病灶

中图分类号: R733.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)02-0102-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.02.B005

Multiparameter Immunophenotyping by Flow Cytometry in Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma

LIN Yang¹, WAN Sui-gui²

(1. The Affiliated Yantai Yuhuangding Hospital of Qingdao University, Yantai 264000, China;

2. Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China)

Abstract: The multiparameter immunophenotyping by flow cytometry can accurately and objectively identify the ratio of normal and malignant plasma cells and expression levels of multiple antigens through analysis of cellular immunophenotype heterogeneity and intracellular light chain clonality. It can not only provide the basis for the diagnosis, but also trace the minimal residual diseases of multiple myeloma, which are closely related to the prognosis of patients. This article reviews the application of multiparameter flow cytometry immunophenotyping in the diagnosis, monitoring of minimal residual disease and prognosis of multiple myeloma patients.

Subject words: multiparameter flow cytometry; immunophenotype; multiple myeloma; prognosis; minimal residual disease

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种恶性浆细胞肿瘤, 其发病率排在血液系统恶性肿瘤第2位。随着新药的不断出现以及自体造血干细胞移植的广泛应用, MM患者的总体生存期有所延长, 但绝大多数患者最终都会复发, 难于治愈。疾病复发的根源在于体内存在微小残留病灶(minimal residual disease, MRD), 因此如何彻底清除体内的MRD

是进一步提高MM患者的疗效、延长生存期的关键和难题。随着多参数流式细胞术(multiparametric flow cytometry, MFC)和单克隆抗体技术的发展, MFC免疫表型分析在MM诊疗中的应用已备受关注。MFC免疫表型分析能鉴别良恶性浆细胞; MFC检测的MRD水平(MFC-MRD)与MM患者预后密切相关, MFC-MRD水平作为MM疗效判定标准已经被列入国内外MM诊疗指南^[1-4]。本文将从MFC免疫表型分析对MM诊断、MRD监测及预后中的意义方面进行综述。

通信作者: 万岁桂, 主任医师, 研究生导师, 硕士; 首都医科大学宣武医院血液科, 北京市西城区长椿街45号(100053); E-mail: wansg2013@sina.com

收稿日期: 2019-07-19; **修回日期:** 2019-09-19

1 MFC 免疫表型分析在 MM 诊断中的应用

对于骨髓瘤细胞群的确定,多年来很多文献对此进行了报道,正常浆细胞为多克隆,Kappa 轻链与 Lambda 轻链的比值约为 1.5:1,而肿瘤浆细胞为轻链限制性表达,欧洲骨髓瘤组织(EMN)将 Kappa/Lambda 轻链的比值>8(存在 Kappa 克隆)或<0.2(存在 Lambda 克隆)作为出现单克隆异常浆细胞的标志。通过增加获取的骨髓总细胞数,MFC 可以检测出骨髓细胞中大于 0.01%的肿瘤浆细胞,直接评估骨髓肿瘤负荷^[5]。

CD38 和 CD138 是识别浆细胞的重要标记。虽然 CD34+造血祖细胞、NK 细胞、活化 T 细胞、单核细胞等也可表达 CD38,但正常浆细胞表面 CD38 表达水平明显高于其它细胞,CD38 联合侧向角散射光或 CD45 设门可以识别骨髓浆细胞。CD138 是造血系统内浆细胞特异性标记,除浆细胞外的造血细胞均不表达 CD138。异常浆细胞表面 CD38 往往表达减弱,与活化 T 细胞和 B 祖细胞有时不易区分,因此联合 CD138 和 CD38 设门是识别骨髓异常浆细胞的常用有效的方法^[6]。

骨髓正常浆细胞是终末期的 B 细胞,异质性的表达 CD19 但不表达大多数泛 B 抗原如 CD20、CD22 等,大多数正常浆细胞和反应性浆细胞 CD19+CD45+CD81+CD27+,但 CD56-,因此通常把 CD19-CD45-/dim+CD27-CD56+作为恶性浆细胞的标记。少部分正常浆细胞 CD19-,极少部分 CD56+,此时需要进行胞浆 Kappa/Lambda 染色,确定其是正常浆细胞还是异常的单克隆浆细胞。此外,骨髓正常浆细胞不表达 CD117、CD33、CD28、CD200 等,而部分或少部分异常浆细胞可表达 CD117、CD33、CD28、CD200 和 CD20,浆细胞免疫表型分析时加入这些抗体可以帮助识别异常浆细胞。

另外,近些年发现的一些新的抗体可识别恶性浆细胞,Muccio 等^[7]由第 9 届白细胞国际研讨会提供的 82 个分子的表达,在 5 个 MM 细胞系和 20 个新诊断的 MM 中通过 MFC 分析抗原,得出 CD150、CD86 和 CD200 可以帮助识别恶性浆细胞,CD272、CD319、CD229、CD48 在所有浆细胞中高表达,这些抗体可以为将来靶向药物的研究提供重要方向。

2 MFC 免疫表型分析在 MM 患者 MRD 监测中的应用

MFC 检测 MRD 有独特的优势^[8]:(1)可通过多种参数共同识别和描述单个浆细胞;(2)在较短时间内收集评估较多细胞,提高 MRD 检测的敏感性;(3)可以对不同细胞群及其进行定量评估相应的抗原表达水平;(4)可以通过不同抗体的组合检测细胞表面和细胞内抗原。Narita 等^[9]的研究表明,利用 MFC 技术对 MM 骨髓 MRD 的评估,相比游离轻链对疾病复发的预测更有意义。

MM 的 MRD 分析和报告指南共识中专家指出^[10-11],采用适合的设门方式识别浆细胞使其能够与骨髓其他细胞区分出来,可以最大限度地减少主观性并最大化可重复性,较好的抗体组合必须能够识别较低或变异表达 CD38、CD45 和/或 CD138 的骨髓瘤细胞,但不包括污染淋巴细胞、其他细胞碎片。欧洲骨髓瘤网(EMN)推荐的方法使用至少五个门控参数(CD38、CD138、CD45、FSC 和 SSC)在同一管内用于识别浆细胞,这种方式能够最大化的包括正常和肿瘤浆细胞的同时去除非浆细胞污染。之后需要进一步区分正常浆细胞与肿瘤浆细胞,正常浆细胞最常见的免疫表型为 CD38+bright,CD138+bright,CD19+,CD45+,CD20-,CD27+,CD28-,CD56-,CD81+,CD117-,CD200-,CyIgκ/CyIgλ 呈多克隆表达;肿瘤浆细胞常见免疫表型为 CD38low,CD138+,CD19-,CD45-,CD20-/+,CD27-/low,CD28+,CD56+,CD81-/low,CD117-/+,CD200+,CyIgκ/CyIgλ 呈单克隆表达。MM 骨髓 MRD 检测推荐≥6 色标记组合,CD45/CD38/CD138/CD19/CD56 组合可检测多数 MM 病例的 MRD,但需注意可能存在 CD19-/CD56-或 CD19-/CD56+及 CD19+CD56+的正常浆细胞,需进行 ckappa/claamda 染色加以鉴别。CD45/CD38/CD138/CD19/CD56/CD117/CD27/CD81 组合可以检测 97%以上的病例 MRD 并不需要 ckappa/claamda 染色(在无治疗前免疫表型时可加做,帮助分析)。检测 MDR 时获取的细胞数影响检测的准确性和敏感性。为了提高检测的准确性(CV<10%),至少计数 100 个浆细胞,MRD 检测敏感性达到 0.01%时需计数 10⁶ 个细胞。

在检测 MRD 过程中需要注意的是治疗后的肿

瘤性浆细胞免疫表型可能发生变化,这是因为骨髓瘤细胞具有亚克隆,这种治疗后的变化应该被解释为克隆选择而不是治疗后的抗原转变。

3 MFC 免疫表型分析在 MM 预后判断中的作用

MM 免疫表型分析过程中,人们发现骨髓瘤细胞表面抗原表达呈异质性,对提示患者的预后提供了一些线索。研究发现,CD45-肿瘤浆细胞与不良临床结果相关^[12-13]。CD56 属于免疫球蛋白超家族成员,是介导造血细胞黏附的黏附分子之一,与骨髓瘤细胞和骨髓基质细胞的相互作用有关。研究报道髓外骨髓瘤及侵袭性浆细胞白血病常伴 CD56 表达的缺失,提示骨髓瘤细胞 CD56 表达缺失与髓外浸润有关,CD56-MM 患者常预后不良^[14]。随着大剂量化疗及造血干细胞移植等治疗的应用,有研究报道 CD56+ 与 CD56-MM 患者的生存率并无差异,造血干细胞移植和含硼替佐米的化疗方案可能抑转 CD56-骨髓瘤患者的预后。CD117(C-kit)是一种具有酪氨酸酶活性的造血生长因子,一些正常细胞如造血干细胞、黑色素细胞、胃肠间质细胞、肥大细胞、生殖细胞等表达 CD117,部分上述细胞来源的肿瘤也可表达 CD117,骨髓正常浆细胞不表达 CD117。部分 MM 患者的肿瘤性浆细胞可表达 CD117,CD117 高表达可能与高肿瘤负荷及高增殖活性有关,但也有研究认为,CD117+ 的 MM 患者对化疗更加敏感从而更易获得缓解。

近十余年来,越来越多的证据显示 MRD 水平可以作为评估 MM 治疗效果、预后的生物指标。MFC-MRD 具有快速、适用性广等优势,增加获取的细胞数还可以进一步提高 MRD 检测的敏感性,MM 患者 MFC-MRD 检测评估疗效和预后已得到学界肯定。无论是新诊断的还是难治愈复发的 MM 患者,MRD 阴性与更长缓解期及无病生存期密切相关^[15-20]。

此外,Andrew 等^[21]研究表明,在多个治疗阶段的 MM 患者中,MFC 检测到循环浆细胞(circulating plasma cells,CPCs)的存在与疾病更差的结果相关。行自体造血干细胞移植的 MM 患者 CPCs 的存在与较差的疾病无进展生存期(PFS)高度相关。对非常好的部分缓解(VGPR)或更好的患者的亚组分析

时,显示没有 CPCs 患者的中位 PFS 更长。通过建立 Cox 风险模型,其中包括初诊时高风险细胞遗传学和 ISS 分期,显示造血干细胞移植后维持治疗,存在 CPCs 的患者疾病进展或死亡风险上升 43%。自体外周造血干细胞采集时 CPCs 的存在可以预见早期复发或较高的死亡风险,可以为监测疾病进展提供早期依据。

4 小 结

MFC 免疫表型分析在 MM 诊断、MRD 监测及预后预测方面起到重要的作用,它不仅能够准确的区分良恶性浆细胞,直接评估骨髓肿瘤负荷,还能检测骨髓瘤细胞表面抗体表达的异质性,可提示患者的预后,并且通过肿瘤浆细胞表面抗体的研究可以为将来靶向药物的研究提供方向。

参考文献:

- [1] Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma[J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(8): e328-e346.
- [2] Rawstron AC, Gregory WM, de Tute RM, et al. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction[J]. *Blood*, 2015, 125(12): 1932-1935.
- [3] Landgren O, Devlin S, Boulad M, et al. Role of MRD status in relation to clinical outcomes in newly diagnosed multiple myeloma patients: a meta-analysis[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2016, 51(12): 1565-1568.
- [4] Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al. Report of the Europe Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders[J]. *Haematologica*, 2008, 93(3): 431-438.
- [5] Zhu P. Application of bone marrow cell immunophenotyping analysis in diagnosing and monitoring of multiple myeloma[J]. *Chin J Lab Med*, 2011, 34(1): 2-4. [朱平. 应用骨髓细胞免疫表型分析诊断和监测多发性骨髓瘤[J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(1): 2-4.]
- [6] Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(1): 61-72.
- [7] Muccio VE, Saraci E, Gilestro M, et al. Multiple myeloma:

- New surface antigens for the characterization of plasma cells in the era of novel agents [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(1): 81–90.
- [8] Ludwig H, Milosavljevic D, Zojer N, et al. Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients [J]. *Leukemia*, 2013, 27(1): 213–219.
- [9] Narita K, Kobayashi H, Abe Y, et al. Quantification of bone-marrow plasma cell levels using various International Myeloma Working Group response criteria in patients with multiple myeloma [J]. *Int J Hematol*, 2018, 108(4): 371–374.
- [10] Arroz M, Came N, Lin P, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(1): 31–39.
- [11] Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(1): 61–72.
- [12] Hu K, Wang J, Zhu MX, et al. Immunophenotype characteristics of patients with multiple myeloma in different risk stratification [J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2014, 22(6): 1624–1627. [胡凯, 王晶, 朱明霞, 等. 不同预后分层的多发性骨髓瘤患者免疫表型特征分析 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(6): 1624–1627.]
- [13] Guo H, Cruz-Munoz ME, Wu N, et al. Immune cell inhibition by SLAMF7 is mediated by a mechanism requiring src kinases, CD45, and SHIP-1 that is defective in multiple myeloma cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(1): 41–51.
- [14] Narita T, Inagaki A, Kobayashi T, et al. t(14;16)-positive multiple myeloma shows negativity for CD56 expression and unfavorable outcome even in the era of novel drugs [J]. *Blood Cancer J*, 2015, 5: e285.
- [15] Lahuerta JJ, Paiva B, Vidriales MB, et al. Depth of response in multiple myeloma: a pooled analysis of three PETHEMA/GEM clinical trials [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(25): 2900–2910.
- [16] Galtseva IV, Davydova YO, Kapranov NM, et al. Minimal residual disease in multiple myeloma: Benefits of flow cytometry [J]. *Int J Lab Hematol*, 2018, 40(1): 12–20.
- [17] Landgren O, Lu SX, Hultcrant M. MRD testing multiple myeloma: The main future driver for modern tailored treatment [J]. *Semin Hematol*, 2018, 55(1): 44–50.
- [18] Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(8): e328–e346.
- [19] Landgren O, Devlin S, Boulad M, et al. Role of MRD status in relation to clinical outcomes in newly diagnosed multiple myeloma patients: a metaanalysis [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2016, 51(12): 1565–1568.
- [20] Deng SH, Xu Y, Sui WW, et al. Role of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry in newly diagnosed multiple myeloma: an analysis of 106 patients [J]. *Chinese Journal of Hematology*, 2018, 39(5): 376–381. [邓书会, 徐燕, 隋伟薇, 等. 多参数流式细胞术检测多发性骨髓瘤患者微小残留病 106 例临床观察 [J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39(5): 376–381.]
- [21] Cowan AJ, Stevenson PA, Libby EN, et al. Circulating plasma cells at the time of collection of autologous plasma for transplant in multiple myeloma patients is a negative prognostic factor even in the age of post-transplant maintenance therapy [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018, 24(7): 1386–1391.