

多发性骨髓瘤免疫表型特征及其临床意义

张翠萍^a, 汪鹏^b, 李庆^a, 徐修才^a, 胡超杰^a, 郑南^a

(安徽医科大学附属省立医院、安徽省立医院, a 中心实验室, b 肾脏内科, 合肥 230001)

[摘要] **目的** 探讨流式细胞术检测多发性骨髓瘤(MM)的免疫表型特征及其临床意义。**方法** 应用多参数流式细胞术(MP-FCM), 采用 CD138/CD45/SSC 设门, 检测 40 例 MM 患者和 20 例正常献髓者骨髓细胞免疫表型。**结果** MM 患者抗原异常表达率由高到低分别为 CD45^{dim+/-} (95%)、CD81^{dim+/-} (80%)、CD56⁺ (70%)、CD27^{dim+/-} (50%)、CD200⁺⁺ (48%)、CD33⁺ (40%)、CD28⁺⁺ (35%)、CD117⁺ (18%)、CD19⁺ (5%) 和 CD20⁺ (3%)。CD56⁺、CD200^{dim+}、CD28^{dim+} 在正常浆细胞的表达率分别为 10%、10% 和 5%。**结论** 应用 MP-FCM 检测 MM 细胞免疫表型, 可准确地鉴别良恶性浆细胞, 有助于 MM 的诊断、预后判断及靶向治疗。

[关键词] 多发性骨髓瘤; 免疫表型分型; 浆细胞; 流式细胞术

中图分类号: R733.3 文献标识码: A DOI: 10.3969/J.issn.1672-6790.2016.03.002

Immunophenotype and its clinical significant of multiple myeloma Zhang Cuiping*, Wang Peng, Li Qing, Xu Xiucui, Hu Chaojie, Zheng Nan(* Central Laboratory of Medical Research Center, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, China)

[Abstract] **Objective** To explore the immunophenotype and its clinical significant of Multiple Myeloma (MM). **Methods** The immunophenotype of 40 patients with MM and 20 normal volunteers were detected by multiparameter flow cytometry (MP-FCM). **Results** The abnormality expression of antigens sequence of patients with MM was CD45^{dim+/-} (95%), CD81^{dim+/-} (80%), CD56⁺ (70%), CD27^{dim+/-} (50%), CD200⁺⁺ (48%), CD33⁺ (40%), CD28⁺⁺ (35%), CD117⁺ (18%), CD19⁺ (5%), CD20⁺ (3%) in order. However the positive ratios of CD56⁺, CD200^{dim+} and CD28^{dim+} were 10%, 10% and 5%, respectively. **Conclusion** MP-FCM inspections can accurately discriminate the benign and malignant plasma cell, and provide evidence for prognosis evaluation and targeted therapy.

[Key words] Multiple myeloma; Immunophenotyping; Plasma Cells; Flow cytometry

多发性骨髓瘤(MM)是骨髓内单一浆细胞株异常增生, 并伴单克隆免疫球蛋白增多和溶骨性病变为特征的一种恶性肿瘤。多发于中老年人, 临床表现多样。由于骨髓病变呈灶性分布, 浆细胞达不到诊断标准, 或为不分泌型, 且部分骨髓瘤细胞和反应性增多的浆细胞与正常浆细胞在形态上难以区别, 因此诊断较为困难。近年来, 多参数流式细胞术(MP-FCM)在 MM 诊断、治疗和疗效观察等方面的价值日益突出。国内一般通过四色免疫荧光 MP-FCM 测定 MM 患者骨髓细胞的免疫表型, 本实验室采用八色流式细胞术分析其免疫表型特点, 为临床明确诊断和预后判断提供重要的实验依据。

1 材料和方法

1.1 病例资料 收集安徽省立医院 2013-2015 年住院的 40 例初诊 MM 患者, 均符合《血液病诊断及疗效标准》第 2 版诊断标准^[1]。其中男 27 例, 女 13 例; 年龄 32 ~ 77 岁, 中位年龄 60.5 岁; 免疫球蛋白类型 IgG 型 22 例, IgA 型 11 例, IgD 型 2 例, 轻链型 5 例; 按照 Durie-Salmon 分期诊断标准 I 期 1 例, II 期 10 例, III 期 29 例。20 例健康对照组均为志愿献髓者, 男 12 例, 女 8 例, 年龄 21 ~ 48 岁, 中位年龄 34 岁。

1.2 主要仪器和主要试剂 流式细胞仪为美国 Becton Dickinson 公司的 FACS Canto II 型。荧光标记鼠抗人单克隆抗体包括 CD138、CD38、CD19、CD56、CD81、CD22、CD20、CD27、CD117、CD28、CD33、CD34、CD200、CD45, 以及各自对应的同型阴性对照试剂, 红细胞裂解液, 破膜剂均购自美国

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81472018); 安徽省自然科学基金面上项目(1408085MH145)

作者简介: 张翠萍, 主管技师, Email: 794609084@qq.com

Becton Dickinson 公司,抗 Kappa-FITC /Lambda - PE 组合抗体(克隆号 FR481)购自丹麦 DAKO 公司。

1.3 检测方法 EDTA 抗凝的新鲜骨髓液送检后于 4 h 内按八色免疫荧光直接标记方法,分别进行细胞膜表面和胞浆内染色。染色前用 PBS 洗 2 次,去除亲细胞抗体。处理后的标本在 2 h 内上机检测,用 BD FACS Diva 软件获取 500 000 个细胞,对数取样。正确的设门策略是分析浆细胞表型的关键。本实验采用 CD138/CD45/SSC 联合设门,圈出 CD45⁺ 或 CD45^{dim+/-}CD138⁺ 细胞群(P2),分析该群细胞(P2)的抗原表达情况,见图 1。流式细胞术检测结果以荧光强度 < 10² 为阴性(-),10² ~ 10³ 范围内为弱阳性(dim+),10³ ~ 10⁴ 范围内为阳性(+),大于 10⁴ 为强阳性(++)。抗原表达 > 20% 确定为抗原阳性。

2 结果

2.1 骨髓中浆细胞比例 MM 患者骨髓标本采用 CD138/CD45/SSC 设门后,可见 CD45^{dim+/-}CD138⁺ 区域有一群异常细胞,该群细胞占全部有核细胞的比例在 3.5% ~ 88.9% (中位值为 17.55%)。同时送检的骨髓涂片中原幼稚浆细胞的比例在 1.5% ~ 77.5% (中位值为 16.5%)。20 例正常对照骨髓,CD45⁺/CD138⁺ 区域有微量细胞群,该细胞占全部有核细胞的比例在 0.01% ~ 0.42% (中位值为 0.18%)。

2.2 MM 患者异常浆细胞免疫表型 利用 MP-FCM 同时检测胞膜抗原 CD38、CD138、CD45、CD19、CD56、CD81、CD200、CD27、CD28、CD117、CD20、CD33,以及胞膜和胞浆免疫球蛋白轻链(kappa/Lambda)的表达情况,可见多项抗原表达异常。MM 中抗原异常表达率由高到低分别为 CD45^{dim+/-} (95%)、CD81^{dim+/-} (80%)、CD56⁺ (70%)、CD27^{dim+/-} (50%)、CD200⁺⁺ (48%)、CD33⁺ (40%)、CD28⁺⁺ (35%)、CD117⁺ (18%)、CD19⁺ (5%) 和 CD20⁺ (3%);限制性表达胞浆轻链,其中 Kappa 轻链型占 55%,Lambda 轻链型占 45%。所有异常浆细胞均高表达 CD138⁺⁺ 和 CD38⁺,均不表达胞膜 Kappa 和胞膜 Lambda。见表 1。

2.3 健康对照组浆细胞免疫表型 健康对照组浆细胞均表达 CD38⁺⁺、CD138⁺、CD19⁺、CD81⁺、CD27⁺⁺ 和 CD45⁺,不表达 CD117、CD33、CD20、胞膜 Kappa 和胞膜 Lambda;多克隆性表达胞浆轻链

Kappa 和 Lambda。20 例正常骨髓中有 2 例(10%)表达 CD56⁺,2 例(10%)弱表达 CD200^{dim+},1 例(5%)弱表达 CD28^{dim+}。见表 1。

表 1 正常浆细胞和异常浆细胞免疫表型特点

抗原	正常表达模式	正常浆细胞表达率(%)	异常表达模式	异常表达率(%)
CD38	强阳性	100	强阳性	100
CD138	阳性	100	阳性	100
CD45	阳性	100	弱阳性/阴性	95
CD19	阳性	100	阴性	95
CD56	阴性	95	阳性	70
CD81	阳性	100	弱阳性/阴性	80
CD200	弱阳性	10	强阳性	48
CD27	强阳性	100	弱阳性/阴性	50
CD28	弱阳性/阴性	5	强阳性	35
CD117	阴性	100	阳性	18
CD20	阴性	100	阳性	3
CD33	阴性	100	阳性	40
kappa	阴性	100	阳性	0
lambda	阴性	100	阳性	0
cykappa	阳性	100	阴性	45
cylambda	阳性	100	阴性	55

3 讨论

近年来,随着对 MM 认识的深入,多参数流式细胞术检测骨髓瘤细胞免疫表型特征成为 MM 诊断和预后判断的重要依据^[2]。流式细胞术分析骨髓瘤细胞免疫表型时,合理的设门策略是提高敏感性和可重复性的关键。根据 2008 年欧洲骨髓瘤工作组(EMN)^[3] 的推荐,为了准确定量和富集骨髓瘤细胞,至少要有一个管抗体组合,将 CD38、CD138、CD45 包括在内;初始设门应该包括 CD38⁺⁺ 和 CD138⁺ 共表达。本研究采用 CD138/CD45/SSC 联合设门,每管均包括 CD138 和 CD45 两种抗体,其中有一管包括 CD38、CD138 和 CD45 三种抗体,与 EMN 的要求一致,分析时首先使用 CD38/CD138 表达而不是 CD138/CD45 设门,可确保不遗漏 CD45⁺ 浆细胞;同时选择多项细胞膜表面和胞浆抗原来区别正常与异常浆细胞。与国内相关研究比较,本研究具有设门方案更精确,检测抗原谱更广,参数更多的特点。

本研究对 MM 患者和正常骨髓进行了胞浆 Kappa 及 Lambda 的检测,采用 EMN 推荐的检测组合(cykappa/Lambda/CD19/CD38/CD138/CD45),

可以同时分析 CD38⁺⁺ CD138⁺ CD19⁻和 CD38⁺⁺ CD138⁺ CD19⁺两类细胞的轻链克隆性,提高了检测的灵敏度。结果显示,MM 患者异常浆细胞的胞浆免疫球蛋白轻链均存在单克隆限制性表达,而正常浆细胞均呈多克隆表达。异常浆细胞典型的免疫表型为 CD38⁺⁺、CD138⁺、CD19⁻、CD56⁺、CD117⁺、CD45^{dim+/-}、CD20⁺[3]。虽然绝大部分正常浆细胞表型是 CD19⁺ CD56⁻ CD45⁺,然而可以检测到少量正常浆细胞免疫表型与异常浆细胞相似。国外学者[4-6]报道正常骨髓中有 20% ~ 40% 的正常浆细胞不表达 CD19,10% ~ 47% 的正常浆细胞表达 CD56。在正常骨髓者骨髓中可以检测到浆细胞 CD45 弱表达(dim)[5],CD45 的表达随着浆细胞分化过程逐渐下降[7-8]。少量正常浆细胞 CD19⁻ CD56⁺ CD45^{dim+} 的表达可能导致异常浆细胞百分比的错误计算[6]。Tembhare 等[9]报道 CD19、CD56 和 CD45 抗原鉴别正常浆细胞和异常浆细胞特异性低,特异性分别为 50%、74%、59%;CD20 虽然有高的特异性(91%),但是敏感度只有 34%;CD81 联合以上抗原检测特异性和敏感度均可以达到 100%。

本研究结果表明,40 例 MM 患者全部表达 CD38⁺⁺、CD138⁺,有 38 例(95%)CD45 弱阳性表达或阴性,有 28 例(70%)CD56 阳性表达,2 例(5%)CD19 阳性表达;20 例正常组骨髓全部表达 CD19⁺ 和 CD45⁺,有 2 例(10%)表达 CD56⁺。CD81 在正常浆细胞上全部表达,但是在异常浆细胞上弱表达或阴性,是区别正常浆细胞和异常浆细胞的有效诊断指标[10]。本研究显示 40 例 MM 病例有 16 例 CD81 弱阳性表达或阴性,较 Tembhare 等[9]报道的比值偏低,而健康对照组无一例 CD81 弱阳性表达或阴性。CD81 是鉴别良恶性浆细胞的重要标志之一,并且可能与 MM 发病机制密切相关,可以作为骨髓瘤的一种新的恶性预后指标[11]。CD200 也是鉴别良恶性浆细胞的有效诊断指标之一,在正常浆细胞上弱表达,而在异常浆细胞上强表达。本研究显示 MM 组有 19 例(48%)强表达 CD200⁺⁺,比 Aref 等[12]报道的比例低,而健康对照组有 2 例(10%)弱表达 CD200^{dim+}。CD200 异常表达与疾病进展密切相关,是预后不好的因素[13-14]。目前国内尚无关于 CD81 和 CD200 在 MM 患者中检测和应用的报道。本研究将 CD81 和 CD200 作为 MM 病例常规检查指标,提高了诊断率和准确度。多项研究[15-21]表明,基本的检测组合包括 CD19 和 CD56 可

以覆盖至少 90% 的 MM 患者,联合 CD20、CD117、CD28 和 CD27 抗原可以增加到 95% 以上的患者。本组 40 例 MM 患者骨髓中恶性浆细胞诊断效率达到 100%。

多项研究表明,CD19⁺、CD56⁺、CD117⁺、CD20⁺、CD27^{dim+/-}、CD28⁺⁺、CD33⁺ 等抗原表达异常与 MM 患者的预后密切相关,是预后不好的因素[3,22-24]。有研究报道 CD117 抗原表达与酪氨酸激酶的活化有相关性,如果患者 CD117 抗原表达阳性率高,可以提示临床采用酪氨酸激酶抑制剂治疗[25]。CD20 阳性 MM 患者是否对利妥昔单抗有效,目前报道不一致。有研究[26]报道,疗效与患者 CD20 阳性细胞的比例有关。

总之,利用 MP-FCM 同时检测胞膜 CD38、CD138、CD45、CD19、CD56、CD81、CD200、CD27、CD28、CD117、CD20 和 CD33 多项抗原,及胞膜和胞浆免疫球蛋白轻链(kappa/Lambda)的表达情况,可以区分良恶性浆细胞,在 MM 的诊断与鉴别诊断,预后判断,靶向治疗等方面有着重要的价值。

(本文图 1 见封三)

参考文献

- [1] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 2 版. 北京: 科学出版社,1998:373-380.
- [2] Carulli G, Ottaviano V, Cannizzo E, et al. Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry as a diagnostic tool in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance[J]. Clin Ter, 2012, 163(5): 387-392.
- [3] 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.
- [4] Paiva B, Almeida J, Perez-Andres M, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2010, 78(4): 239-252.
- [5] 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.
- [6] 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 Clin Cytom, 2011, 80(5): 318-323.

- [7] Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: A critical regulator of signaling thresholds in immune cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21(1): 107-137.
- [8] Jensen GS, Mant MJ, Belch AJ, et al. Selective expression of CD45 isoforms defines CALLA⁺ monoclonal B-lineage cells in peripheral blood from myeloma patients as late stage B cells[J]. *Blood*, 1991, 78(3): 711-719.
- [9] Tembhare PR, Yuan CM, Venzon D, et al. Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor disease[J]. *Leuk Res*, 2014, 38(3): 371-376.
- [10] Tohami T, Drucker L, Shapiro H, et al. Overexpression of tetraspanins affects multiple myeloma cell survival and invasive potential[J]. *FASEB J*, 2007, 21(3): 691-699.
- [11] Paiva B, Gutierrez NC, Chen X, et al. Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients[J]. *Leukemia*, 2012, 26(8): 1862-1869.
- [12] Aref S, Azmy E, El-Gilany AH. Upregulation of CD200 is associated with regulatory T cell expansion and disease progression in multiple myeloma[J/OL]. *Hematol Oncol*, 2015. doi: 10.1002/hon.2206.
- [13] 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*, 2015. doi: 10.1002/cyto. b.21279.
- [14] Vela-Ojeda J, Garcia-Ruiz Esparza MA, Padilla-Gonzalez Y, et al. CD200 protein, bad prognostic in patients with multiple myeloma[J]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 2015, 53(4): 438-443.
- [15] Perez-Andres M, Almeida J, MartinAyuso M, et al. Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment[J]. *Leukemia*, 2005, 19(3): 449-455.
- [16] Dahl IM, Rasmussen T, Kauric G, et al. Differential expression of CD56 and CD44 in the evolution of extramedullary myeloma[J]. *Br J Haematol*, 2002, 116(2): 273-277.
- [17] San Miguel JF, Gutierrez NC, Mateo G, et al. Conventional diagnostics in multiple myeloma[J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(11): 1510-1519.
- [18] Mateo G, Castellanos M, Rasillo A, et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10): 3661-3667.
- [19] Mateo Manzanera G, San Miguel Izquierdo JF, Orfao de Matos A. Immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma[J]. *Methods Mol Med*, 2005, 113(1): 5-24.
- [20] Moreau P, Robillard N, Jejo G, et al. Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome[J]. *Br J Haematol*, 2006, 132(2): 168-170.
- [21] Rawstron AC, Davies FE, Das Gupta R, et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation[J]. *Blood*, 2002, 100(9): 3095-3100.
- [22] Pozdnyakova O, Morqan EA, Li B, et al. Patterns of expression of CD56 and CD117 on neoplastic plasma cells and association with genetically distinct subtypes of plasma cell myeloma[J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(10): 1905-1910.
- [23] Moreau P, Robillard N, Avet-Loiseau H, et al. Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma[J]. *Haematologica*, 2004, 89(5): 547-551.
- [24] Robillard N, Wullemme S, Lode L, et al. CD33 is expressed on plasma cells of a significant number of myeloma patients, and may represent a therapeutic target[J]. *Leukemia*, 2006, 19(11): 2021-2022.
- [25] 孙莹, 方美云, 刘越坚. 多发性骨髓瘤免疫表型特征及其意义[J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(2): 381-384.
- [26] Moreau P, Voillat L, Benboukher L, et al. Rituximab in CD20 positive multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2007, 21(4): 835-836.

(收稿日期: 2015-10-08)