

流式细胞术在多发性骨髓瘤治疗中的应用价值

邓 娜,吴冠宇,杨 柳,谷和先,盛德菁,周 娜,王何惧

(马鞍山市人民医院血液科,安徽 马鞍山 243000)

摘要:目的 使用流式细胞仪分析免疫表型在初诊多发性骨髓瘤中的特点,并分析在疾病不同分型及分期中表达类型的差异及其与预后的关系。**方法** 选取 2015 年 4 月—2020 年 3 月我院收治的 34 例初诊多发性骨髓瘤患者为研究对象,使用双激光四色流式细胞仪分析免疫表型,比较不同分期、不同分型的多发性骨髓瘤疾病中的表达差异。**结果** CD38、CD138 阳性率为 100.00%。CD45、CD38、CD19、CD56、CD20、CD28、CD117、CD9、CD23 的表达与疾病分型无关($P>0.05$),CD33 的表达与疾病分型有关($P<0.05$)。CD45、CD38、CD56、CD20、CD28、CD117、CD9、CD23、CD33 的表达与 ISS 分期无关($P>0.05$),CD19 的表达与 ISS 分期有关($P<0.05$)。**结论** 免疫表型的分析更符合诊断标准,能更准确的区分良、恶性浆细胞,对于多发性骨髓瘤的预后及治疗后的监测均有临床意义。

关键词:流式细胞术;免疫表型;多发性骨髓瘤

中图分类号:R738.1

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.02.018

文章编号:1006-1959(2022)02-0075-04

Application Value of Flow Cytometry in the Treatment of Multiple Myeloma

DENG Na,WU Guan-yu,YANG Liu,GU He-xian,SHENG De-jing,ZHOU Na,WANG He-ju

(Department of Hematology, Maanshan People's Hospital, Maanshan 243000, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To analyze the characteristics of immunophenotype in newly diagnosed multiple myeloma by flow cytometry, and to analyze the difference of expression types in different types and stages of the disease and its relationship with prognosis. **Methods** A total of 34 patients with newly diagnosed multiple myeloma in our hospital from April 2015 to March 2020 were selected as the research objects. The immunophenotype was analyzed by double laser four-color flow cytometry, and the expression differences of multiple myeloma diseases in different stages and different types were compared. **Results** The positive rates of CD38 and CD138 were 100.00%. The expression of CD45, CD38, CD19, CD56, CD20, CD28, CD117, CD9 and CD23 was not correlated with disease classification ($P>0.05$); the expression of CD33 was correlated with disease classification ($P<0.05$). The expression of CD45, CD38, CD56, CD20, CD28, CD117, CD9, CD23 and CD33 was not correlated with ISS stage ($P>0.05$); the expression of CD19 was correlated with ISS stage ($P<0.05$). **Conclusion** The analysis of immunophenotype is more consistent with the diagnostic criteria and can distinguish benign and malignant plasma cells more accurately, which is of significance for the prognosis and post-treatment monitoring of multiple myeloma.

Key words: Flow cytometry; Immunophenotype; Multiple myeloma

多发性骨髓瘤(multiple myeloma)是血液科常见疾病之一,其发病率呈逐年升高趋势^[1-3]。既往多发性骨髓瘤的诊断主要依赖于骨髓细胞学、血清蛋白电泳、临床表现及影像学改变,诊断水平相对较低,同时难以与其他浆细胞病相鉴别。近年来,流式细胞术已成为多发性骨髓瘤诊断和分型的重要依据,其能快速、准确、客观地反映多发性骨髓瘤细胞的生物学特性,鉴别多发性骨髓瘤及其他浆细胞病,并能用于治疗后多发性骨髓瘤微小残留病(minimal residual disease, MRD)的监测,提高诊断水平,进而指导临床治疗^[4-6]。有研究表明^[7],二代流式细胞术能增强 MRD 的检出率。目前,治疗后的免疫表型分析已被纳入多发性骨髓瘤新的疗效评价标准。基于此,本研究旨在分析多发性骨髓瘤表型的特点及其在疾病不同分期和分型中的差异,分析其与骨髓细胞学等监测手段之间的相关性,进一步评价流式细胞术在多发性骨髓瘤诊治中的应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 4 月—2020 年 3 月在马鞍山市人民医院血液科住院的初诊多发性骨髓瘤患者 34 例为研究对象,其中男 22 例,女 12 例,年龄 48~88 岁,中位年龄 75 岁。所有初诊患者均完善骨髓形态(包含组化染色)、流式免疫分型、骨髓活检、血尿免疫固定电泳及必要的影像学检查,符合多发性骨髓瘤分型诊断标准(国际骨髓瘤工作组诊断标准—2014 修订版)^[8]。本研究经医院伦理委员会审批通过,患者知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法 采集初诊多发性骨髓瘤患者新鲜骨髓液,调整细胞数至 $(0.5\sim1.0)\times10^6$ 个/ml,使用 BD FAC-SCalibur 流式细胞仪及其配套试剂(试剂均购自美国 Becton Dickinson 公司,试剂批号:347193、341025、31096、652814、652803)以及双激光四色流式细胞分析仪检测胞膜抗原。每管取 100 μ l 样本加不同组合抗体各 20 μ l,同时做同型对照管,混匀,避光 20 min,溶血后上机检测分析,每管至少获取 10 000 个细胞。使用 CD45/SSC 进行设门,对 CD38、CD138、CD19、CD56、CD20、CD28、CD117、CD9、CD10、

基金项目:马鞍山市科技局项目(编号:KY2017-012)

作者简介:邓娜(1984.10-),女,山东枣庄人,硕士,主治医师,主要从事血液科临床工作

CD33、Cyκ、Cyλ 表型的表达进行分析。流式图中用 10 的指数来表示抗原表达强弱,设十字门,表达抗原细胞 $\geq 20\%$ 判定为阳性, $\geq 80\%$ 判定为强阳性。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计数资料以($n, \%$)表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞学表型特点 CD38、CD138 阳性率均为 100.00%;CD45 阳性率为 5.88%,其中 1 例患者异常

细胞群表达 CD45;另 1 例患者有 2 群异常细胞,其中一群细胞表达 CD45,一群不表达,见表 1。

2.2 流式免疫表型与多发性骨髓瘤分型的关系 CD45、CD38、CD19、CD56、CD20、CD28、CD117、CD9、CD23 的表达与疾病分型无关 ($P > 0.05$),CD33 的表达与疾病分型有关 ($P < 0.05$),见表 2。

2.3 流式免疫表型与多发性骨髓瘤分期的关系 CD45、CD38、CD56、CD20、CD28、CD117、CD9、CD23、CD33 的表达与 ISS 分期无关 ($P > 0.05$),CD19 的表达与 ISS 分期有关 ($P < 0.05$),见表 3。

表 1 34 例患者异常细胞群流式免疫表型表达($n, \%$)

抗原	阳性	构成比	抗原	阳性	构成比
CD45	2	5.88	CD20	3	8.82
CD38	34	100.00	CD23	1	2.94
CD138	34	100.00	CD33	6	17.65
CD19	3	8.82	CD10	0	0
CD56	27	79.41	CD9	14	41.18
CD117	14	41.18	Cyκ	20	58.82
CD28	10	29.41	Cyλ	14	41.18

表 2 不同疾病分型的表型差异 [$n(\%)$]

抗原	表达	疾病分型						χ^2	P
		IgA 型	IgE 型	IgG 型	Kappa 轻链型	LAM 轻链型	未分泌型		
CD45	阳性	1(9.09)	0	1(5.56)	0	0	0	0.521	0.991
	阴性	10(90.91)	1(100.00)	17(94.44)	1(100.00)	2(100.00)	1(100.00)		
CD38	强阳性	5(45.45)	1(100.00)	8(44.44)	0	2(100.00)	0	5.214	0.390
	阳性	6(54.55)	0	10(55.56)	1(100.00)	0	1(100.00)		
CD19	阳性	0	0	2(11.11)	0	1(50.00)	0	5.687	0.338
	阴性	11(100.00)	1(100.00)	16(88.89)	1(100.00)	1(50.00)	1(100.00)		
CD56	阳性	8(72.73)	1(100.00)	16(88.89)	1(100.00)	1(50.00)	0	6.723	0.242
	阴性	3(27.27)	0	2(11.11)	0	1(50.00)	1(100.00)		
CD20	阳性	0	0	2(11.11)	0	0	0	1.889	0.864
	阴性	11(100.00)	1(100.00)	16(88.89)	1(100.00)	2(100.00)	1(100.00)		
CD28	阳性	3(27.27)	1(100.00)	4(22.22)	0	1(50.00)	1(100.00)	6.097	0.297
	阴性	8(72.73)	0	14(77.78)	1(100.00)	1(50.00)	0		
CD117	阳性	4(36.36)	1(100.00)	8(44.44)	0	0	1(100.00)	5.142	0.399
	阴性	7(63.64)	0	10(55.56)	1(100.00)	2(100.00)	0		
CD9	阳性	6(54.55)	0	7(38.89)	0	1(50.00)	0	3.015	0.698
	阴性	5(45.45)	1(100.00)	11(61.11)	1(100.00)	1(50.00)	1(100.00)		
CD23	阳性	0	0	1(5.56)	0	0	0	0.916	0.969
	阴性	11(100.00)	1(100.00)	17(94.44)	1(100.00)	2(100.00)	1(100.00)		
CD33	阳性	3(27.27)	0	1(5.56)	0	2(100.00)	0	12.488	0.029
	阴性	8(72.73)	1(100.00)	17(94.44)	1(100.00)	0	1(100.00)		

表 3 不同分期的表型差异[n(%)]

抗原	表达	ISS 分期			χ^2	P
		I 期	II 期	III 期		
CD45	阳性	0	0	2(6.90)	0.366	0.833
	阴性	1(100.00)	4(100.00)	27(93.10)		
CD38	强阳性	1(100.00)	3(75.00)	12(41.38)	2.754	0.252
	阳性	0	1(25.00)	17(58.62)		
CD19	阳性	1(100.00)	0	2(6.90)	10.854	0.004
	阴性	0	4(100.00)	27(93.10)		
CD56	阳性	1(100.00)	4(100.00)	22(75.86)	1.520	0.468
	阴性	0	0	7(24.14)		
CD20	阳性	0	0	2(6.90)	0.366	0.833
	阴性	1(100.00)	4(100.00)	27(93.10)		
CD28	阳性	1(100.00)	0	9(31.03)	4.103	0.129
	阴性	0	4(100.00)	20(68.97)		
CD117	阳性	1(100.00)	1(25.00)	12(41.38)	1.861	0.394
	阴性	0	3(75.00)	17(58.62)		
CD9	阳性	1(100.00)	1(25.00)	12(41.38)	1.861	0.394
	阴性	0	3(75.00)	17(58.62)		
CD23	阳性	0	0	1(3.45)	0.178	0.915
	阴性	1(100.00)	4(100.00)	28(96.55)		
CD33	阳性	0	0	6(20.69)	1.256	0.534
	阴性	1(100.00)	4(100.00)	23(79.31)		

3 讨论

多发性骨髓瘤系血液系统恶性疾病之一,由于体内浆细胞恶性增殖产生异常免疫球蛋白而致病。近年来该疾病发病率呈上升趋势,多发于中老年人,男性发病率高于女性,也是一种不可治愈的恶性血液病^[4]。流式细胞术是一种在溶液中对单个细胞进行快速多参数分析的技术,其作为检测工具,在过去的 30 年里取得了巨大的进步,使免疫系统和细胞生物学其他领域的研究获得了较大突破^[5]。随着近年来多发性骨髓瘤诊断的不断更新,骨髓细胞学中原幼浆细胞比例对于诊断的意义在不断减弱,而更加看重克隆性浆细胞的占比^[6],且骨髓细胞学的主观形态检查已经无法满足新诊断标准,因此免疫分型的应用更加广泛。

CD38、CD138 作为浆细胞的主要标志,其在本研究中阳性率均为 100.00%;CD45 弱表达在本研究中占比仅 5.88%,但依靠这 3 种免疫表型缺乏特异性,很难与正常浆细胞区分,仍需要结合其他的免疫表型进行临床诊断。CD19 和 CD56 可区分免疫表型正常和病理浆细胞^[9]。既往对多发性骨髓瘤异常免疫表达的研究中也将 CD19 和 CD56 作为区分异常浆细胞的主要表型^[10,11]。

本研究结果显示,CD28 阳性率为 28.41%,

CD117 阳性率为 41.18%。CD28 是 T 淋巴细胞表面表达的共刺激分子,对 T 细胞的活化起到重要作用,其表达被认为与增殖活性增强及骨髓、器官、组织的侵入以及高风险的细胞遗传学异常有关,可以使多发性骨髓瘤细胞产生生长因子,降低肿瘤细胞的凋亡,并且可导致免疫细胞异常,为多发性骨髓瘤的免疫治疗提供了新的靶点^[12,13]。CD117 又称 c-kit,是具有酪氨酸激酶活性的造血生长因子,在正常浆细胞上表达缺失,异常表达于恶性浆细胞表面。在多发性骨髓瘤患者中,CD117 的表达是提示疾病早期和预后较差的指标之一^[14-16]。

本研究结果显示,CD20 阳性率为 8.82%,CD9 阳性率为 41.18%,CD23 阳性率为 2.94%,CD33 阳性率为 17.65%。CD20 表达于除浆细胞(分泌免疫球蛋白的 B 细胞)外的发育分化各阶段 B 细胞的表面,通过调节跨膜钙离子流动直接对 B 细胞起作用,在 B 细胞增殖和分化中起重要的调节作用。CD20 在多发性骨髓瘤表达率偏低,因 CD20 阳性骨髓瘤细胞具有异质性的临床特征、细胞形态、免疫表型和细胞遗传学特征,因此对于常规治疗后的预后影响不大^[17]。CD9 有多种生物学功能,其在细胞黏附、细胞运动、激活、分化、肿瘤转移以及精卵融合等方面都发挥着重要的作用;并与多发性骨髓瘤的活

动与否有关,与生存预后关系不大。CD23 是一种低亲和力 IgE 受体,主要表达于成熟的 B 细胞和滤泡树突状细胞,可用于标记生发中心的活化 B 细胞,在多发性骨髓瘤中表达偏低。CD33 是髓系细胞分化抗原,主要分布在髓系血细胞,特别是在分化的早期阶段。研究表明^[18],多发性骨髓瘤中 CD33 阳性率为 10%~25% 往往提示预后不良,化疗和复发可以增加 CD33 在多发性骨髓瘤中的表达。

此外,本研究中 $C_{\gamma K}$ 、 $C_{\gamma L}$ 的阳性率分别为 58.82%、41.18%,这与国内学者^[19,20]提出轻链的同型排斥理论相符,即一个克隆的浆细胞只表达一种轻链,浆细胞恶性转化后,Ig 合成异常,尤以单一成分的轻链合成过量为突出表现。作为鉴别正常与异常浆细胞表型的重要标志,胞浆轻链的表达在多发性骨髓瘤的诊断中具有重要作用^[21,22]。本研究中依据差异性分析,不同分期及分型之间免疫表型大部分呈一致性,部分有差异的表型可能与本研究中病例数较少,并且分型集中于 IgG 型、分期集中于 III 期有关。因此,今后有待扩大样本量后再验证表型差异的可靠性。

综上所述,免疫表型的分析更符合诊断标准,能更准确的区分良、恶性浆细胞,对于多发性骨髓瘤的预后及治疗后的监测均有意义。

参考文献:

- [1]张静洁,郑志兵,李松.多发性骨髓瘤的靶向治疗[J].沈阳药科大学学报,2017,34(8):723-728.
- [2]张津京,李艳.初诊多发性骨髓瘤合并肾功能不全患者的临床特点和疗效分析[J].中国医科大学学报,2016,45(6):494-498.
- [3]杜鹃,侯健.《中国多发性骨髓瘤诊治指南(2015 年修订)》诊断部分解读[J].中华内科杂志,2016,55(2):91-92.
- [4]Liu J,Liu W,Mi L,et al.Union for China Lymphoma Investigators of the Chinese Society of Clinical Oncology; Union for China Leukemia Investigators of the Chinese Society of Clinical Oncology. Incidence and mortality of multiple myeloma in China, 2006-2016: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2016[J].J Hematol Oncol,2019,12(1):136.
- [5]McKinnon KM.Flow Cytometry: An Overview [J].Curr Protoc Immunol,2018(120):5.1.1-5.1.11.
- [6]Rihova L,Vsianska P,Bezdekova R,et al.Minimal Residual Disease Assessment in Multiple Myeloma by Multiparametric Flow Cytometry[J].Klin Onkol,2017,30(Supplementum2):21-28.
- [7]Flores-Montero J,Sanoja-Flores L,Paiva B,et al.Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma [J].Leukemia,2017,31(10):2094-2103.
- [8]Rajkumar SV.Multiple myeloma: Every year a new standard? [J].Hematol Oncol,2019(37 Suppl 1):62-65.
- [9]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.

- [10]Alaterre E,Raimbault S,Garcia JM,et al.Automated and simplified identification of normal and abnormal plasma cells in Multiple Myeloma by flow cytometry [J].Cytometry B Clin Cytom,2018,94(3):484-492.
- [11]Skerget M,Skopec B,Zadnik V,et al.CD56 Expression Is an Important Prognostic Factor in Multiple Myeloma Even with Bortezomib Induction [J].Acta Haematol,2018,139(4):228-234.
- [12]Drent E,Poels R,Ruiter R,et al.Combined CD28 and 4-1BB Costimulation Potentiates Affinity-tuned Chimeric Antigen Receptor-engineered T Cells [J].Clin Cancer Res,2019,25(13):4014-4025.
- [13]Wang J,Zheng Y,Tu C,et al.Identification of the immune checkpoint signature of multiple myeloma using mass cytometry-based single-cell analysis [J].Clin Transl Immunology,2020,9(5):e01132.
- [14]Ceran F,Falay M,Dagdas S,et al.The Assessment of CD56 and CD117 Expressions at the Time of the Diagnosis in Multiple Myeloma Patients [J].Turk J Haematol,2017,34(3):226-232.
- [15]Wang H,Zhou X,Zhu JW,et al.Association of CD117 and HLA-DR expression with shorter overall survival and/or progression-free survival in patients with multiple myeloma treated with bortezomib and thalidomide combination treatment without transplantation [J].Oncol Lett,2018,16(5):5655-5666.
- [16]Shi J,Sun K,Zhu ZM,et al.Prognostic significance of CD56 and CD117 expression in patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with bortezomib-based first-line therapy [J].Chin J Hematol,2019,40(8):693-696.
- [17]Huang B,Li J,Liu J,et al.CD20-positive multiple myeloma: can conventional chemotherapy still be used to achieve ideal outcome for these patients? [J].Leuk Lymphoma,2016,57(2):335-340.
- [18]Muchtar E,Gertz MA.The colorful landscape of multiple myeloma [J].Leuk Lymphoma,2019,60(9):2099-2100.
- [19]刘帅,李翌博,张帆,等.37 例 CD45 阳性的多发性骨髓瘤浆细胞免疫学表型特征 [J].检验医学,2017,32(2):76-80.
- [20]朱杰,赵成艳,王敏,等.多发性骨髓瘤免疫表型及胞浆轻链检测的临床意义 [J].实用检验医师杂志,2013,17(6):1068-1071.
- [21]Moore S,Suttle JM,Nicola M.Cytoplasmic Immunoglobulin Light Chain Revelation and Interphase Fluorescence In Situ Hybridization in Myeloma [J].Methods Mol Biol,2017(1541):127-142.
- [22]Papanikolaou X,Alapat D,Rosenthal A,et al.The flow cytometry-defined light chain cytoplasmic immunoglobulin index and an associated 12-gene expression signature are independent prognostic factors in multiple myeloma [J].Leukemia,2015,29(8):1713-1720.

收稿日期:2021-04-29;修回日期:2021-06-15

编辑/杜帆