

多发性骨髓瘤免疫表型及胞浆轻链检测的临床意义

朱杰 赵成艳 王敏 李良军 高艳飞

作者单位:116027 大连市,大连医科大学附属第二医院检验科(朱杰 赵成艳 王敏 李良军)

124000 盘锦市,辽河油田第二医院检验科(高艳飞)

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.01.014

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是以克隆性恶性浆细胞(骨髓瘤细胞)在骨髓中异常增殖,并伴有单克隆免疫球蛋白增多为特征的疾病^[1],其发病机制尚不清楚。特点是单克隆的浆细胞在骨髓中异常增殖(可达骨髓内细胞总数的90%),破坏骨髓造血功能并分泌单克隆免疫球蛋白或其多肽链亚单位(如轻链),并通过多种机制产生临床症状及体征。MM多发于中老年人,临床表现多种多样,主要表现为骨髓瘤细胞增生、浸润和破坏骨组织及髓外其他组织,出现骨痛、病理性骨折、贫血、出血,以及骨髓瘤细胞产生大量单克隆免疫球蛋白而出现感染、高钙血症、肾脏病变、高黏滞血症、淀粉样变等,尤其在疾病早期,表现无特异性,极易漏诊和误诊。本文通过四色流式细胞术对其进行免疫表型分析,以期能为MM的诊断提供更可靠的实验室依据和方法。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择2011年1月至2011年12月我院住院MM患者45例,其中女性12例,男性33例,平均年龄(60±12.0)岁;均为初诊患者,骨髓细胞学检查瘤细胞占(15%~95%),其中分泌型为37例(IgG型为27例,IgA型为10例),轻链型为5例(λ链型4例,κ链型1例),不分泌型3例,均经血清免疫球蛋白和轻链检测确定。

1.2 仪器与试剂 FACSCalibur流式细胞仪为美国BD公司产品。CD38-FITC/CD56-PE/CD19-Percp、CD138-PE、CD45-APC、κ-FITC/λ-PE/CD19-Percp、κ-FITC/λ-PE、IgG2a-FITC、IgG1-PE、溶血素和破膜剂,均购自美国BD公司。

1.3 标本的采集 无菌操作抽取0.2 ml骨髓液涂片,行显微镜形态学检查。另抽取2 ml骨髓液置于EDTA-K₂抗凝血常规管内作免疫分型,6 h内完成检验。

1.4 标本的处理 骨髓涂片行瑞-吉染色,显微镜下观察并分类计数200个有核细胞。抗凝的骨髓液1 ml,加3 ml PBS液,混匀后,在水平离心机上以离心半径20 cm,1500 rpm离心5 min,弃去上清液,加1 ml PBS液,计数骨髓细胞数,调节至5×10⁶/ml,制成细胞悬液备用。

1.5 方法

1.5.1 胞膜的标记及胞浆内轻链的标记 (1)胞膜的标记:每管100 μl细胞悬液分别加入(IgG2a-FITC、IgG1-PE、CD45-APC)、(CD38-FITC/CD56-PE/CD19-Percp、CD45-APC)、(CD138-PE、CD45-APC)各20 μl,混匀避光15 min,加配置好的溶血素2 ml,避光10 min,在水平离心机上以离心半径20 cm,1500 rpm离心5 min,弃去上清液,加1 ml PBS液,混匀备用。(2)胞浆内轻链的标记:取两支试管,每管100 μl细胞悬液分别加入CD45-APC 20 μl,避光15 min,再加入破膜剂A液100 μl,避光10 min,加溶血素2 ml,避光10 min,在水平离心机上以离心半径20 cm,1500 rpm离心5 min,弃去上清液,加入溶血素B液50 μl,分别加入(IgG2a-FITC、IgG1-PE)、(κ-FITC/λ-PE),避光15 min,加2 ml PBS洗涤,在水平离心机上以离心半径20 cm,1500 rpm离心5 min,弃去上清液,加1 ml PBS液,混匀备用。

1.5.2 流式细胞仪测定 用荧光微球校准仪器及补偿后,用Cellquest软件收取10 000个细胞,通过CD45/SSC和CD38/CD56联合设门,确定瘤细胞的位置及抗原表达情况。每个抗体阳性率>20%为该抗体表达阳性。

2 结果

2.1 免疫表型的检测结果 每例标本先在CD38/CD56图中确定瘤细胞(CD38⁺CD56⁺或CD38⁺CD56⁻细胞群),然后在CD45/SSC图中标记瘤细胞位置,并根据此圈定瘤细胞群及设门,为以后的各图分析做好准备。CD38/CD56瘤细胞比率占10.56%~75.45%,平均为35.23%。图1中R1群为CD38⁺CD56⁻细胞群,在图2中表现为R3的位置为CD45⁻。图3 R1群为CD38⁺CD56⁻细胞群,在图4中表现为R3的位置为CD45⁻。

2.2 MM细胞免疫表型及胞浆轻链表达情况 37例分泌型MM中,CD38⁺CD56⁺CD19⁻CD45⁻及CD138⁺表达率均为100%;5例轻链型MM中,仅CD138⁺表达率为100%;3例不分泌型MM中,CD38⁺CD56⁻CD19⁻CD45⁻及CD138⁺表达率均为100%。

胞浆轻链的表达中,3 种类型 MM 均为 cλ 链表达率较高,分别为 73%、80%和 67%。见表 1。

3 讨论

临床上诊断 MM 一般根据骨髓细胞学和免疫学方法分析检测血和尿的异常 M 蛋白及轻链。然而,有时形态学偏成熟的骨髓瘤细胞与正常的浆细胞在形态上难以区分。而采用免疫分型法对 MM 进行分析,是行之有效的方法^[2]。文献^[3,4]报道正常的浆细胞表达为 CD38⁺、CD19⁺、CD138⁺、CD56⁻。本文对 45 例 MM 患者的检测结果表明:典型的骨髓瘤细胞免疫表型为 CD45⁻、CD38⁺、CD56^{+/+}、CD138⁺、cκ^{+/+}或 cλ^{+/+},但 CD19⁺未表达。

Carlo-Stella 等^[5]报道多数 MM 患者有 CD56⁺表达,而正常浆细胞没有 CD56 的表达。因此,有学者^[6]认为 CD56 是区分正常与恶性浆细胞的重要标志之一。本文研究中,45 例 MM 患者 CD56⁺占 87%(39/45),比 Carlo-Stella 等^[5]报道的

78%要高,且 CD56⁻的 MM 患者也占 13%(6/45)。因此提示,虽然 CD56 是区分正常与恶性浆细胞的重要标志,CD56⁺有助于 MM 的诊断,但 CD56⁻不能排除 MM 的诊断,还应该结合其他特性进行综合分析,这与黄春妮等^[7]的观点一致。

CD19 是包括正常浆细胞在内的 B 细胞系的一个重要标志,但本文研究的 45 例 MM 标本中,无一例细胞具有 CD19⁺表征,一些文献^[8-10]研究也表明 CD19 在 MM 中几乎不表达。因此,应用多参数流式细胞术,根据特定细胞群 CD56 和 CD19 表型可以明确 MM 骨髓中瘤细胞的负荷量。本文研究的 6 例 CD56⁻MM 中,3 例为轻链型,3 例为不分泌型,并且临床表现较一致,均是外周血三系减少的病例,那么 CD56⁻是否与疾病的不良过程有关,因本文的病例较少,还需要长期的临床观察,进一步研究探讨。

CD38;CD38 是 NAD 糖基水解酶,与细胞增殖和激活有关。在人的正常骨髓中,无论是髓系或 B 淋巴系前体细胞以

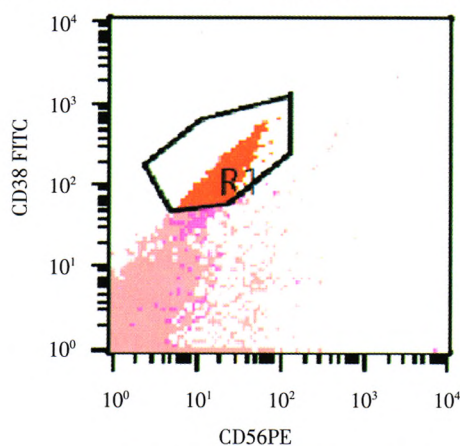


图 1 R1 为 CD38⁺CD56⁺细胞群

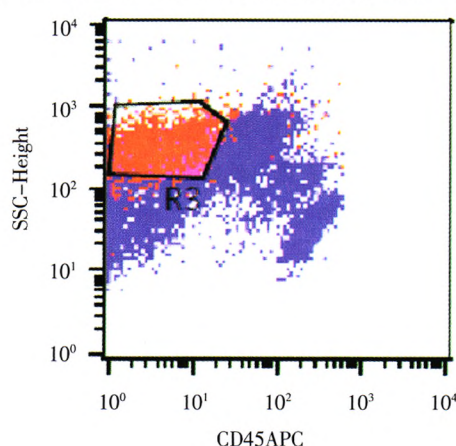


图 2 R3 表示为 R1 的细胞群为 CD45⁻

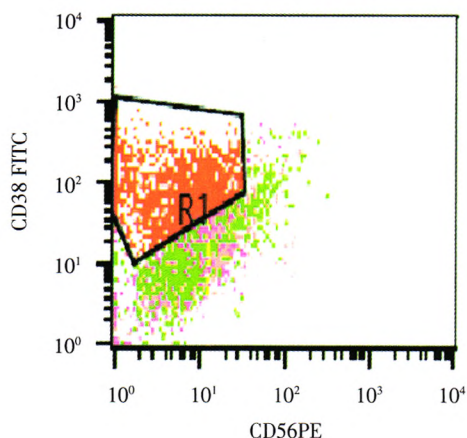


图 3 R1 为 CD38⁺CD56⁻细胞群

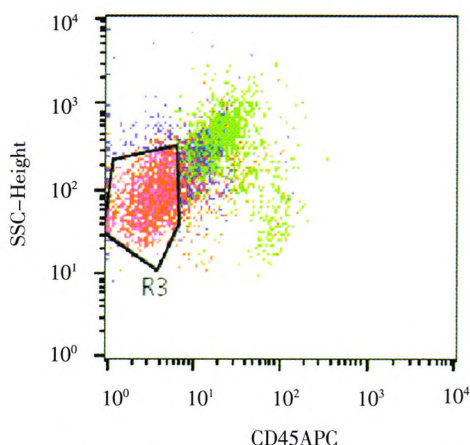


图 4 R3 表示为 R1 的细胞群为 CD45⁻

表 1 MM 细胞免疫表型及胞浆轻链的表达(%)

分型	例数	CD38 ⁺ CD56 ⁺ CD19 ⁻ CD45 ⁻	CD38 ⁺ CD56 ⁻ CD19 ⁻ CD45 ⁻	CD138 ⁺	CD19 ⁺	胞浆轻链 (cκ 链)	胞浆轻链 (cλ 链)
分泌型	37	100(37/37)	0(0/37)	100(37/37)	0(0/37)	27(10/37)	73(27/37)
轻链型	5	40(2/5)	60(3/5)	100(5/5)	0(0/5)	20(1/5)	80(4/5)
不分泌型	3	0(0/3)	100(3/3)	100(3/3)	0(0/3)	33(1/3)	67(2/3)

及成熟的淋巴细胞、单核细胞、粒细胞, CD38 均有不同程度的表达, 但仅在浆细胞表面可被检测到超强表达, 被认为是特异性的浆细胞表面标志^[11]。本文研究中所有的瘤细胞均表达 CD38, 对确定瘤细胞的位置起到很大作用。CD38 在稳定期仍高表达, 表明稳定期中虽然患者的临床症状有所改善, 骨髓中浆细胞比例恢复正常, 但肿瘤克隆细胞仍没有被完全清除^[12]。

CD45: 即白细胞分化抗原, 是单链跨膜糖蛋白, 属于蛋白酪氨酸磷酸酶家族的成员, 其广泛地存在于除了成熟红细胞和血小板之外所有的造血系细胞表面, 在淋巴细胞的发育激活中起重要作用。其广泛表达于浆细胞表面, 而在 MM 细胞中呈阴性或弱阳性表达。CD45 是近期骨髓瘤免疫表型研究的一个新的热点, CD45 设门常被应用到 MM 的流式免疫分型中, 但近年来有研究^[13]发现, 有相当比例的 MM 患者可监测到 CD45 高强度表达, 而几乎所有的 MM 患者均含有一小群有增殖活性的浆细胞, 此类细胞的表型特点为 CD45 强阳性, 因此目前多结合 CD138 或 CD38 等其他表型抗原设门来提高流式免疫分型检测的精确性。本文研究中所有的瘤细胞 CD45 均为阴性表达, 可能与收集的病例较少有关。

CD138: Syndecan-1 分子属于黏附分子跨膜硫酸乙酰肝素蛋白聚糖家族成员, 其表达具有细胞类型和发育阶段的特异性, 他们可以参与细胞增殖、细胞黏附等多种功能, 并与肿瘤细胞的归巢及转移等过程有关。CD138 特异的表达于浆细胞, 因此被认为是骨髓瘤细胞最特异的免疫标志。张琦^[14]认为几乎所有的 MM 患者均表达 CD138, 且不会在骨髓造血前体细胞和淋巴细胞上表达。丁润生等^[15]曾报道 MM 的浆细胞主要表达 CD138, 并证明 MM 细胞 CD138 表达水平高于正常浆细胞, 认为 CD138 阳性细胞即为骨髓瘤细胞。研究^[11, 16]发现 MM 患者骨髓瘤细胞 CD138 阳性率几乎达到 100%。这些都证实了 CD138 为 MM 细胞最特异的免疫标志。

本文研究的所有 MM 患者全部表达 CD138, 但 CD38、CD138 表达并不特异, 正常浆细胞亦有表达, 故 CD38、CD138 可以作为浆细胞筛选和纯化的标志。由于 CD138 在骨髓瘤细胞的广泛表达, 是抗骨髓瘤靶向治疗的理想的作用位点。可以认同以往学者的观点, 即针对 CD138 抗原的单抗是一个有效的抗骨髓瘤的药物。

检测胞浆轻链判断骨髓瘤细胞的克隆性具有高度的可靠性, 张琦^[14]认为一个 B 淋巴细胞克隆在其一生中仅仅产生两型轻链中的一型, 我们称其为轻链的同型排斥, 鉴于其克隆的独特性, 轻链的表达可以作为 B 系肿瘤的克隆增殖标志, 因此如果所有 B 细胞的损害表现为轻链的单一表达, 该肿瘤就很可能是单克隆的, 相反的, 如果两种轻链数目接近, 则可能为多克隆的。胞浆内轻链的检测对于 MM 的诊断有着重要的意义, 一方面骨髓瘤细胞膜表面不表达轻链, 只在胞

浆内表达, 而且只表达一种类型的轻链, 称之为轻链不平衡现象, 这对骨髓瘤的诊断和临床跟踪及微小残留病变的检测有着重要的作用, 这也将是我们以后工作的重点。本文研究中虽然所有 MM 胞浆内均表达 c κ 链和 c λ 链, 但后者的表达率更高(见表 1)。另一方面对于临床上某些特殊类型的骨髓瘤的明确诊断是必需的, 特别是不分泌型骨髓瘤, 此种瘤细胞不分泌免疫球蛋白, 也不分泌轻链, 这就为诊断带来困难, 但我们现在能够检测胞浆内轻链, 只要检测到只分泌一种轻链, 就可以明确诊断。本文研究中的 3 例不分泌型 MM, 骨髓细胞学检查找到典型的骨髓瘤细胞, 但临床检查中免疫球蛋白及轻链检测均是阴性, 因此进一步行胞浆轻链检测, 结果显示均为阳性, 给临床确诊和治疗提供了可靠的实验室依据。因此胞浆轻链的检测对确诊 MM, 尤其是不分泌型 MM 起到不可忽视的作用。另外, 胞浆轻链检测也可用于意义未明的单株免疫球蛋白血症、反应性浆细胞增多症和重链病等的鉴别诊断。

总之, 利用四色流式细胞术进行 CD45/SSC、CD38/CD56 来标记骨髓瘤细胞, 并进行 CD19、CD138、胞浆轻链的检测, 可准确地识别骨髓瘤细胞, 有助于 MM 的诊断及治疗疗效的监测。

4 参考文献

- 1 李金兰, 刘艳荣, 常艳, 等. 多发性骨髓瘤细胞的免疫表型特点. 中国实验血液学杂志, 2002, 10: 226-228.
- 2 傅爱林, 沈文香, 罗青松. 多发性骨髓瘤 38 例分析. 中国误诊学杂志, 2011, 11: 1701-1702.
- 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. Haematologica, 2008, 93: 431-438.
- 4 Gupta R, Bhaskar A, Kumar L, et al. Flow Cytometric Immunophenotyping and Minimal Residual Disease Analysis in Multiple Myeloma. Am J Clin Pathol, 2009, 132: 728-732.
- 5 Carlo-Stella C, Guidetti A, Dinicola M, et al. CD52 antigen expressed by malignant plasma cells can be targeted by alemtuzumab in vitro in NOD/SCID mice. Exp Hematol, 2006, 34: 721-727.
- 6 Ngo NT, Brodie C, Giles C, et al. The significance of tumour cell immunophenotype in myeloma and its impact on clinical outcome. J Clin Pathol, 2009, 62: 1009-1015.
- 7 黄春妮, 李山, 秦雪. 流式细胞术测定多发性骨髓瘤细胞表面标记的研究. 广西医学, 2007, 29: 953-956.
- 8 Andy C, Rawstron, Alberto O, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. Haematologica, 2008, 93: 431-438.
- 9 Harada H, Kawano MM, Huang N, et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. Blood, 1993, 81:

2658-2663.

10 Ely SA, Knowles DM. Expression of CD56/neural cell adhesion molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance and lymphomas with plasmacytoid differentiation. *Am J Pathol*, 2002, 160: 1293-1299.

11 秦燕, 丁润生, 陆伟. 多参数流式细胞术在多发骨髓瘤诊断中的价值. *交通医学*, 2009, 23: 137-140.

12 孙江飞, 楼燕如, 牧启田, 等. 多发骨髓瘤 T 细胞亚群及免疫表型分析. *现代实用医学*, 2005, 17: 17-19.

13 李倩, 荣雯玉, 刘尚勤. 流式免疫分型在多发骨髓瘤诊治中的应用进展. *航空航天医药*, 2010, 21: 265-267.

14 张琦. 表面分化抗原及胞浆轻链检测在多发骨髓瘤中的应用进展. *河南医学研究*, 2006, 15: 78-81.

15 丁润生, 秦燕, 陆伟, 等. 流式细胞术在多发骨髓瘤诊断中的应用. *中国实验诊断学*, 2011, 15: 1117-1119.

16 Cumova J, Kovarova L, Potacova A, et al. Optimization of immunomagnetic selection of myeloma cells from bone marrow using magnetic activated cell sorting. *Int J Hematol*, 2010, 92: 314-319.

(收稿日期: 2012-10-30)

(本文编辑: 李霖)

消息

第七届全国临床检验实验室管理学术会议暨 中华医学会第十次全国检验医学学术会议

为提高我国检验领域学术交流的水平和规模,由中华医学会、中华医学会检验分会和中国医院协会临床检验管理专业委员会联合主办的中国医院协会临床检验管理专业委员会第七届全国临床检验实验室管理学术会议暨中华医学会第十次全国检验医学学术会议(简称 2013 年全国检验医学大会, 2013NCLM)将于 2013 年 5 月 8-11 日在西安举行。这是中华医学会检验分会和中国医院协会临床检验管理专业委员会共同举办的大规模检验学学术会议,也将是 2013 年度我国检验医学的一次盛会。本次会议将涵盖临床检验和实验室管理各领域最新的研究成果和发展趋势,并将对检验医学所面临的新形势和新挑战进行广泛充分的交流探讨。届时将邀请国际、国内一流专家与会做专题报告。会议还将举办继续教育、临床实验室设备新技术交流和展览会。全体参会者可获国家级医学继续教育学分。欢迎全国检验医学界同仁踊跃投稿参会。现将有关事宜通知如下。

1 会议征文主要范围

生化新技术和新方法;血液体液新技术和新方法;免疫新技术和新方法;微生物新技术和新方法;实验室管理及其他检验医学相关内容。

2 征文要求

稿件要求提供 600 字摘要一份。包括目的、方法、结果和

结论,论文要求未在国内公开发行的刊物上发表,文责自负,概不退稿。

本次大会只通过网上在线投稿,不接受邮寄和 E-mail 投稿,网上论文投稿请登录大会网站: www.cslm.org.cn/nc-clm2013/cn。

大会接受中文及英文投稿,但是一篇论文不得同时递交中文和英文稿件。

投稿截止日期: 2013 年 2 月 15 日

前期注册截止日期: 2013 年 4 月 10 日

注册费: 2013 年 4 月 10 日前 800 元, 4 月 10 日之后及现场 1000 元

3 会议时间及地点

会议时间: 2013 年 5 月 8-11 日

会议地点: 西安曲江国际会议中心

4 联系方式

联系人: 贾玲

电话: +86(10)85158129

传真: +86(10)85158132

电子邮件: lilyjia@163.com

地址: 北京东四西大街 42 号