

八色多参数流式细胞术检测微小残留病 在多发性骨髓瘤预后评估中的应用

陆秀盼 赵四书 屈晓燕 史青林 吴雨洁 许戟 李建勇 陈丽娟

南京医科大学第一附属医院、江苏省人民医院血液科 210029

通信作者:陈丽娟, Email: chenlj@126.com

基金项目:国家自然科学基金(81372540、81670199);江苏省医学重点人才项目(ZDRCA2016015)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.02.013

Application of 8-color fluorescent antibody panels to detect minimal residual disease in multiple myeloma and its significance

Lu Xiupan, Zhao Sishu, Qu Xiaoyan, Shi Qinglin, Wu Yujie, Xu Ji, Li Jianyong, Chen Lijuan

Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Province Hospital, Nanjing 210029, China

Corresponding author: Chen Lijuan, Email: chenlj@126.com

近年来多发性骨髓瘤(MM)患者的缓解率和缓解深度得到很大改善,超过50%的患者可以达到完全缓解(CR)。而长期的临床实践结果表明,获得传统意义CR的MM患者预后有很大差异,有的患者在2年内复发,而有的患者可获得长期生存。微小残留病(MRD)的评估实现了对个体治疗的严密监控和对预后更加精确的判断^[1-2]。本研究中,我们采用8色多参数流式细胞术(MFC)检测54例新诊断MM(NDMM)患者在达到最佳疗效时MRD状态并评估其预后意义。

病例与方法

1. 病例资料:回顾性分析我院2015年1月至2017年12月收治的54例NDMM患者资料。诊断及疗效判定符合《中国多发性骨髓瘤诊治指南(2015年修订)》标准。确诊后患者接受CTD(环磷酰胺+沙利度胺+地塞米松)或PCD(硼替佐米+环磷酰胺+地塞米松)方案进行治疗。CTD方案:环磷酰胺 $300\text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ 第1、8、15天,地塞米松 40 mg/d 第1~4、9~12天,沙利度胺 100 mg/d ,21d为1个疗程。PCD方案:硼替佐米 $1.3\text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ 第1、4、8、11天,环磷酰胺 $300\text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ 第1、8、15天,地塞米松 20 mg/d 第1~2、4~5、8~9、11~12天,21d为1个疗程。所有患者均至少接受4个疗程诱导化疗,后续根据疗效评估、患者意愿选择外周血自体造血干细胞移植(ASCT)、原方案巩固化疗或维持治疗。

2. 8色MFC检测MM患者MRD情况:用8色(CD38 PBE/CD56 A750/CD19 PerCP-Cy5.5/CD138 APC/CD45 KO/CD27 Pe-Cy7/cκ FITC/cλ PE)MFC对达到CR或严格意义的完全缓解(sCR)患者进行MRD分析。建立FSC/SSC点图,

分析CD38⁺CD138⁺门内细胞,根据CD19和CD56表达,确定CD19⁺CD56⁻为正常浆细胞(nPC),CD19⁻CD56⁺为异常浆细胞(aPC),进一步分析aPC及nPC门内细胞cκ/cλ比值,cκ/cλ比值 >3.0 或 <0.3 定义为克隆性浆细胞(cPC)。获取500 000个细胞,cPC细胞最低50个,灵敏度为0.01%。

3. 随访:通过门诊或住院资料查阅及电话联系进行随访,随访截至2018年6月,中位随访19个月。总生存(OS)定义为确诊至患者死亡或末次随访时间。无进展生存(PFS)定义为患者从接受治疗开始到疾病进展或死亡时间。

4. 统计学处理:采用SPSS 23.0和GraphPad Prism 5.0软件进行统计学分析。患者临床特征的比较采用Mann-Whitney U检验或 χ^2 检验,生存分析采用Kaplan-Meier法,组间比较采用Log-rank检验;多因素分析逐步Cox比例风险模型。双侧 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MRD阴性与阳性患者组间比较:8色MFC检测结果显示,MRD阴性患者36例,MRD阳性患者18例,两组主要临床特征见表1,在性别、年龄、HGB、白蛋白(ALB)、血清肌酐(sCr)、血清LDH、血清钙(Ca^{2+})、最佳缓解状态间的差异均无统计学意义($P>0.05$),而MRD阳性患者 β_2 微球蛋白(β_2 -MG)明显高于MRD阴性患者[6.02(2.28~35.90)mg/L对3.37(0.40~31.70)mg/L, $P=0.005$]。MRD阴性与阳性患者生存比较见图1,两组中位OS时间均未达到,中位PFS时间分别为16.8(95% CI 13.1~21.0)个月、未达到($P<0.001$)。两组患者的2年OS率分别为94%、88%($P=0.060$),2年PFS率分别为85%、15%($P=0.004$)。

表1 8色多参数流式细胞术检测微小残留病(MRD)阴性与阳性多发性骨髓瘤患者的临床特征比较

临床特征	MRD阴性组(36例)	MRD阳性组(18例)	统计量	P值
性别(例,男/女)	67/33	56/44	-0.790	0.425
年龄[岁,M(范围)]	60(37~76)	62(47~75)	1.277	0.202
β_2 微球蛋白[mg/L,M(范围)]	3.37(0.40~31.70)	6.02(2.28~35.90)	2.809	0.005
HGB[g/L,M(范围)]	97(58~146)	100(52~120)	-1.716	0.086
白蛋白[g/L,M(范围)]	33.7(22.0~48.4)	37.6(22.1~50.2)	0.707	0.480
血肌酐[μ mol/L,M(范围)]	76.1(22.7~678.5)	101.3(51.7~820.0)	1.853	0.064
血清LDH[U/L,M(范围)]	161(82~351)	182(80~1805)	0.752	0.452
血清钙[mmol/L,M(范围)]	2.15(1.78~2.75)	2.29(1.64~4.80)	1.019	0.308
最佳缓解状态[例(%)]			0.178	0.673
完全缓解	26(72.2)	12(66.7)		
严格意义的完全缓解	10(27.8)	6(33.3)		

2. 亚组分析:以65岁为界,<65岁者40例,≥65岁者14例。40例<65岁患者中,MRD阴性与阳性患者的中位PFS时间(未达到对16.4个月, $P=0.001$)及中位OS时间(未达到对32.4个月, $P=0.005$)差异均有统计学意义,而在≥65岁组中,MRD阴性及阳性患者的OS、PFS差异均无统计学意义(P 值分别为0.480、0.488)。

32例国际分期系统(R-ISS)Ⅱ期患者中,MRD阴性与阳性患者中位PFS时间差异有统计学意义(未达到对16.8个月, $P=0.002$),中位OS时间差异无统计学意义(未达到对32.4个月, $P=0.083$)。R-ISSⅠ期和Ⅲ期患者均7例,未进行统计学分析。

在38例CR患者中,MRD的出现与较短的PFS时间(未达到对18.7个月, $P=0.003$)以及OS时间($P=0.036$)相关。16例sCR患者中无一例死亡,仅MRD阴性组1例出现疾病进展。

38例患者接受了PCD方案化疗,另外16例接受了CTD方案化疗。PCD组9例(23.6%)和CTD组4例(25.0%)出现了疾病进展。尽管两组中不同MRD状态中位OS时间差异无统计学意义(PCD: $P=0.064$;CTD: $P=0.724$),但PCD组及CTD组MRD阴性患者中位PFS时间(PCD:未达到对18.7个月, $P=0.012$;CTD:未达到对16.6个月, $P=0.001$)均高于MRD阳性患者。

3. 预后因素分析:由于病例数有限,大多数常规阴性标志物在PFS单因素分析中并未成为显著的预后因素。在单因素分析中,除了MFC MRD阳性外,还有4个因素被认为对PFS有不利影响:HGB<100 g/L、ALB≤35 g/L、LDH>271 U/L、血清Ca²⁺>2.65 mmol/L。多因素Cox回归结果见表2,MFC MRD阳性($P=0.005$, $HR=5.948$,95%CI 1.727~20.487)是PFS的独立危险因素。

讨 论

MFC可识别浆细胞异常抗原的表达并精确判断克隆性,常用于MM患者MRD的检测,以评价治疗的有效性并预

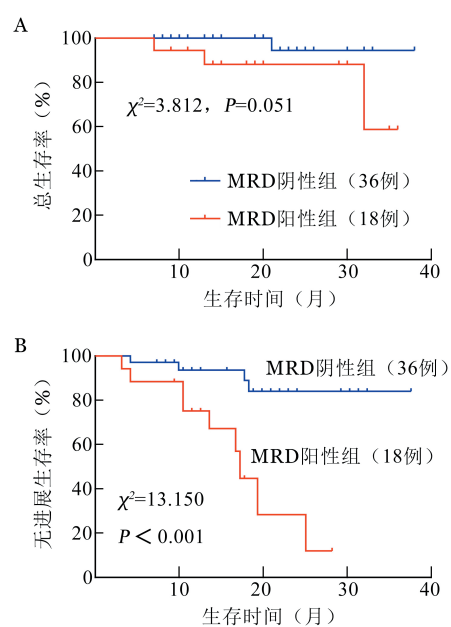


图1 8色多参数流式细胞术检测微小残留病(MRD)阴性与阳性多发性骨髓瘤患者的总生存(A)和无进展生存(B)曲线

表2 影响多发性骨髓瘤患者无事件生存的多因素Cox回归分析

因素	HR	95% CI	P值
MFC MRD 阳性	5.948	1.727~20.487	0.005
白蛋白≤35 g/L	1.717	0.427~6.899	0.446
HGB < 100 g/L	3.376	0.709~16.065	0.126
LDH > 271 U/L	2.739	0.448~16.723	0.275
血清钙 > 2.65 mmol/L	3.043	0.290~31.909	0.353

注:MFC MRD:8色多参数流式细胞术检测微小残留病

测预后。最初,MRD的检测常采用4色MFC,而6色或8色MFC能提高对MRD检测的敏感度^[3]。目前8色MFC检测MRD的灵敏度可达10⁻⁵,若结合新型软件可使得MRD检测的精确度更高^[4]。8色MFC因其检测特异度、灵敏度良好及

其在临床使用中有着较好的适用性而受到关注,其在MM中检测MRD的价值已被证实^[5]。在本研究中我们获取的细胞数为500 000个,检测低限为0.01%,采用的是一组以CD38/CD138对浆细胞进行设门,同时检测胞膜抗原CD45、CD19、CD56、CD27及胞质轻链 κ 、 λ 的8色抗体组合,均采用被验证过的抗体组合,灵敏度较高。

既往研究表明,MM患者的缓解深度及其缓解持续时间与预后密切相关。在Rawstron等^[6]的临床研究中,ASCT后100 d获得MRD阴性的患者预后明显优于MRD阳性患者^[6]。在一项前瞻性的Ⅲ期临床试验中,MRD阴性组患者PFS时间更长(59个月对29个月, $P < 0.001$)^[7]。目前影响MRD的因素尚不确定,我们比较了MRD阴性与阳性患者的临床参数,两组患者在性别、年龄、HGB、ALB、sCr、LDH和最佳缓解状态间差异无统计学意义,而两组患者 β_2 -MG差异有统计学意义($P = 0.005$)。 β_2 -MG是I类主要组织相容性抗原(MHC)轻链的组成部分,骨髓瘤细胞也分泌 β_2 -MG,因此, β_2 -MG水平与骨髓瘤细胞总量有关。由于 β_2 -MG相对分子量小(仅12 000),主要由肾脏排出和重吸收,因此, β_2 -MG也是检测肾损伤的相关指标,肾功能不全亦被认为是骨髓瘤的预后不良指标^[8],因此MM初诊时若 β_2 -MG较高,不仅会影响患者治疗方案的选择,并且常常提示患者预后不佳,也可能会进一步影响MRD的状态。

我们的研究结果显示,MRD阴性患者PFS及OS存在优势。在亚组分析中, < 65 岁达到MRD阴性的患者PFS及OS时间明显长于MRD阳性患者。然而, ≥ 65 岁的患者中,MRD阴性与阳性组在PFS及OS方面差异无统计学意义。考虑可能为老年患者耐受性差、化疗不良反应性大、更加恶性的肿瘤细胞学特征以及不具备移植条件有关。随着患者年龄的增长,机体开始衰老,逐渐出现各个脏器的功能减退以及躯体或认知功能障碍,因此老龄患者合并症多,化疗相关死亡率高,我们应该在老年患者治疗前进行健康状况评估,从而实施个体化诊疗^[9]。对健康状况差的患者,仍需要积极使用新药化疗,使得患者达到最佳的缓解疗效,从而延长患者的PFS及OS时间。

Usmani等^[10]报道,高风险患者的CR率并不低于低风险患者,然而,两组的CR维持时间的差异是显著的,高风险患者的PFS和OS时间较低风险患者更短^[11]。在Rawstron等^[6]的研究中,高危和标危遗传学患者的MRD转阴率相似,在高危和标危亚组评估分析时,MRD状态可以预测PFS(标危组:33.7个月对44.2个月, $P = 0.014$;高危组:8.7个月对15.7个月, $P = 0.009$)。在我们的亚组分析中,MRD对R-ISS II期患者的PFS时间(未达到对16.8个月, $P = 0.002$)有明显的区分。后续我们将增加初诊患者的FISH检查率,同时延长随访时间,进一步评估R-ISS不同分期患者以及各分期之间的OS及PFS时间的差异是否具有统计学意义。

在本研究中,我们评估了MRD在两种诱导方案中的差异性,发现CTD方案中62.5%的患者MRD阴性,而接受硼替佐米治疗的患者中有68.4%的患者MRD转阴。在硼替佐

米及沙利度胺组中,MRD阴性患者均具有显著的PFS优势,并且,硼替佐米组MRD阴性有良好的OS趋势。说明PCD方案可提高MM患者的缓解深度和改善患者的生存,这均与国外文献报道数据一致^[12-14]。CTD方案在PFS方面差异有统计学意义,说明大部分患者能从该方案中获益,且该化疗方案相对温和,耐受性好,对经济条件有限的MM患者也不失为较好的选择。

少数患者在临床CR和MRD分析之间存在不一致。在整体治疗临床试验1(TT1)和TT2的数据中,有68例符合临床CR,其中64例证明为MRD阴性;在17例非CR患者中,3例被认为是MRD阴性^[15]。研究表明,sCR且MRD阴性的患者的预后是最有利的(3年PFS率为95%),CR且MRD阴性其次^[16]。我们同时比较了CR以及sCR患者中MRD阴性或阳性患者的PFS和OS,CR且MRD阴性的患者的预后是有利的,sCR组尚未出现死亡事件,并且仅MRD阴性组1例患者出现疾病进展,提示深度缓解的患者预后更佳。将sCR与MRD状态相结合,对患者的预后能产生更长远的影响。本研究的随访时间相对偏短,病例数较少,需要更进一步的研究,这也同时说明将疗效评估标准与MRD状态相结合,可以更精准地预测患者的预后。

综上,MRD能更敏感、更深层次反映疾病的缓解深度,且与疾病预后密切相关。监测MRD可以用于评估治疗效率、观察疾病控制程度、判断患者预后,达到MRD阴性状态及其持续时间的长短应被视为MM治疗的最终目标。本研究为回顾性研究,且病例数相对较少,未来需要更多的前瞻性大样本研究针对性探讨MRD缓解的临床意义,并进一步指导MM的个体化治疗。

参考文献

- [1] Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2014, 123(20):3073-3079. DOI: 10.1182/blood-2014-01-550020.
- [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. DOI: 10.1182/blood-2014-07-590166.
- [3] Paiva B, Vidriales MB, Cerveró J, et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation[J]. *Blood*, 2008, 112(10):4017-4023. DOI: 10.1182/blood-2008-05-159624.
- [4] Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols[J]. *Leukemia*, 2012, 26(9):1986-2010. DOI: 10.1038/leu.2012.122.
- [5] Behdad A, Ross CW, Jacques J, et al. Utility of nine-color, 11-parameter flow cytometry for detection of plasma cell neoplasms: a comparison with bone marrow morphologic

- findings and concurrent M-protein studies in serum and urine [J]. *Am J Clin Pathol*, 2014, 142 (3):398-410. DOI: 10.1309/AJCPO5GQPXF8QCEC.
- [6] Rawstron AC, Child JA, de Tute RM, et al. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31 (20):2540-2547. DOI: 10.1200/JCO.2012.46.2119.
- [7] Mateos MV, Oriol A, Martínez-López J, et al. GEM2005 trial update comparing VMP/VTP as induction in elderly multiple myeloma patients: do we still need alkylators? [J]. *Blood*, 2014, 124(12):1887-1893. DOI: 10.1182/blood-2014-05-573733.
- [8] Kleber M, Ihorst G, Deschler B, et al. Detection of renal impairment as one specific comorbidity factor in multiple myeloma: multicenter study in 198 consecutive patients [J]. *Eur J Haematol*, 2009, 83 (6): 519-527. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2009.01318.x.
- [9] 陈海敏, 周帆, 韦苇, 等. 93例70岁以上多发性骨髓瘤患者的临床特点及转归 [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(9):744-748. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.09.003.
- [10] Usmani SZ, Crowley J, Hoering A, et al. Improvement in long-term outcomes with successive Total Therapy trials for multiple myeloma: are patients now being cured? [J]. *Leukemia*, 2013, 27 (1):226-232. DOI: 10.1038/leu.2012.160.
- [11] Barlogie B, Anaissie E, van Rhee F, et al. Incorporating bortezomib into upfront treatment for multiple myeloma: early results of total therapy 3 [J]. *Br J Haematol*, 2007, 138 (2):176-185. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06639.x.
- [12] Reeder CB, Reece DE, Kukreti V, et al. Cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone induction for newly diagnosed multiple myeloma: high response rates in a phase II clinical trial [J]. *Leukemia*, 2009, 23 (7):1337-1341. DOI: 10.1038/leu.2009.26.
- [13] Cavo M, Pantani L, Pezzi A, et al. Bortezomib-thalidomide-dexamethasone (VTD) is superior to bortezomib-cyclophosphamide-dexamethasone (VCD) as induction therapy prior to autologous stem cell transplantation in multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2015, 29(12):2429-2431. DOI: 10.1038/leu.2015.274.
- [14] Kumar S, Flinn I, Richardson PG, et al. Randomized, multicenter, phase 2 study (EVOLUTION) of combinations of bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, and lenalidomide in previously untreated multiple myeloma [J]. *Blood*, 2012, 119 (19):4375-4382. DOI: 10.1182/blood-2011-11-395749.
- [15] Barlogie B, Mitchell A, van Rhee F, et al. Curing myeloma at last: defining criteria and providing the evidence [J]. *Blood*, 2014, 124 (20):3043-3051. DOI: 10.1182/blood-2014-07-552059.
- [16] Paiva B, Martínez-López J, Vidriales MB, et al. Comparison of immunofixation, serum free light chain, and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29 (12):1627-1633. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.1967.

(收稿日期:2018-06-27)

(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

本刊对医学名词及术语的一般要求

医学名词应使用全国科学技术名词审定委员会公布的名词。尚未通过审定的学科名词,可选用最新版《医学主题词表(MESH)》、《医学主题词注释字顺表》、《中医药主题词表》中的主题词。对于没有通用译名的名词术语,在文内第一次出现时应注明原词。中西药名以最新版《中华人民共和国药典》和《中国药品通用名称》(均由中国药典委员会编写)为准。英文药物名称则采用国际非专利药名。在题名及正文中,药名一般不得使用商品名,确需使用商品名时应先注明其通用名称。冠以外国人名名的体征、疾病、试验、综合征等,人名可以用中译文,但人名后不加“氏”(单字名除外,例如福氏杆菌);也可以用外文,但人名后不加“s”。

文中应尽量少用缩略语。已被公知公认的缩略语可以不加注释直接使用,例如:DNA、RNA、HBsAg、CT、MRI等。不常用的、尚未被公知公认的缩略语以及原词过长在文中多次出现者,若为中文可于文中第一次出现时写出全称,在圆括号内写出缩略语;若为外文可于文中第一次出现时写出中文全称,在圆括号内写出外文全称及其缩略语。不超过4个汉字的名词不宜使用缩略语,以免影响论文的可读性。

本刊编辑部