

BIOMED-2 标准化 Ig 基因重排 在多发性骨髓瘤中的应用研究

艾晓非 王晓静 王波 陈晟华 王君 李庆华 安刚 汝昆

【摘要】 目的 探讨BIOMED-2标准化Ig基因重排技术在多发性骨髓瘤(MM)诊治中的应用以及采用PCR片段分析毛细管电泳法(简称毛细管电泳法)进行克隆性检测的意义。方法 选取2009年至2013年167例MM患者骨髓标本,以20例反应性浆细胞增多症患者骨髓标本作为对照,采用BIOMED-2系统引物,进行多重PCR扩增并采用毛细管电泳法进行Ig基因重排的克隆性分析。结果 ①167例MM患者中IgH V_H-J_H重排阳性者107例,阴性者60例,两组患者中IgH D_H-J_H重排发生率差异有统计学意义(14.0%对30.0%, $P=0.013$);121例(72.4%)患者存在IgK重排。IgH V_H-J_H、IgH D_H-J_H、IgK联合检查,阳性检出率为94.6%。对照组Ig基因重排检测结果均为阴性。②琼脂糖电泳法结果示167例MM患者中9例(5.4%)患者IgH重排基因克隆性阳性,而毛细管电泳法结果则示为多克隆重排。③53例MM患者同时进行Ig基因重排检测和染色体荧光原位杂交IgH检测,两种方法的IgH阳性检出率差异有统计学意义(67.9%对49.1%, $P=0.049$)。结论 IgH V_H-J_H、IgH D_H-J_H、IgK联合检测可大大提高MM患者Ig基因重排克隆性的检出率,尤其对于IgH V_H-J_H重排阴性者IgH D_H-J_H重排的补充检测尤为重要。基因重排检测采用毛细管电泳法可有效地区分单克隆、多克隆和寡克隆。Ig基因重排检测较染色体荧光原位杂交技术的IgH阳性检出率高。应用BIOMED-2标准化Ig基因重排技术检测对于MM的诊断有指导意义。

【关键词】 多发性骨髓瘤; 聚合酶链反应; 片段分析; BIOMED-2标准化Ig基因重排

Application of BIOMED-2 standardized Ig gene rearrangement system in multiple myeloma Ai Xiaofei*, Wang Xiaojing, Wang Bo, Chen Shenghua, Wang Jun, Li Qinghua, An Gang, Ru Kun*. *Department of Pathology, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Ru Kun, Email: kunru@yahoo.com

【Abstract】 Objective To explore the application of BIOMED-2 standardized immunoglobulin (Ig) gene rearrangement system in the diagnosis of multiple myeloma (MM), and the significance of clonality analysis by multiplex-PCR amplifications. **Methods** A total of 167 cases of MM bone marrow samples from 2009 to 2013, and 20 cases of reactive plasmacytosis used as the controls were included in this study. Multiplex-PCR amplifications were performed and the Ig gene rearrangements were analyzed using BIOMED-2 standardized clonality analysis system. **Results** ① Of 167 MM cases, 107 showed IgH V_H-J_H rearrangement, 33 showed IgH D_H-J_H rearrangement, and 30% showed IgH D_H-J_H rearrangement in 60 IgH V_H-J_H rearrangement negative MM cases. The difference was statistically significant between IgH V_H-J_H rearrangement positive and negative cases (14.0% vs 30.0%, $P=0.032$). The total positive rate of IgH V_H-J_H, IgH D_H-J_H and IgK was 94.6%. The 20 reactive plasmacytosis (RP) cases showed negative Ig gene rearrangement. ② Of 167 MM cases, 9 (5.4%) showed clonal IgH rearrangement by agarose electrophoresis were confirmed as polyclonality by capillary electrophoresis. ③ Of 53 MM cases who have been detected by Ig gene rearrangement system and fluorescence in situ hybridization (FISH) for IgH simultaneously, 36 showed IgH rearrangement, 26 showed FISH IgH positive, and the difference was statistically significant (67.9% vs 49.1%, $P=0.049$). **Conclusion** Combined detection of IgH V_H-J_H, IgH D_H-J_H and IgK could

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.11.006

基金项目:国家自然科学基金(81400175)

作者单位:300020 天津,中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所、血液病医院(艾晓非、王晓静、陈晟华、王君、李庆华、安刚、汝昆);山西省运城市中心医院检验科(王波)

通信作者:汝昆,Email:kunru@yahoo.com

improve the positive rate of MM clonality dramatically, and measurement of IgH D_H-J_H rearrangement was more important in the IgH V_H-J_H negative cases. Ig gene rearrangement system was a faster and more sensitive method than FISH IgH. Application of BIOMED-2 standardized immunoglobulin (Ig) gene rearrangement system is of significance for MM diagnosis.

【Key words】 Multiple myeloma; Polymerase chain reaction; Fragment analysis; BIOMED-2 standardized Ig gene rearrangement system

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种克隆性浆细胞肿瘤,主要特征为单克隆免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)的异常浆细胞在骨髓内恶性增殖,因此判断浆细胞的克隆性对于诊断至关重要。传统诊断主要依据组织学活检、骨髓浆细胞计数及尿M蛋白定量等,对于临床不典型病例的诊断仍有一定困难。克隆性Ig基因重排作为B细胞恶性肿瘤基因标志,被认为是快速诊断B细胞恶性肿瘤的敏感方法^[1]。在本研究中我们采用PCR片段分析毛细管电泳法(简称毛细管电泳法)对MM患者进行BIOMED-2标准化Ig基因重排检测,探讨Ig基因重排检测对MM的诊断价值。

病例和方法

1. 病例:以2009年至2013年在我院就诊的167例MM患者为研究对象,以20例反应性浆细胞增多症(Reactive plasmacytosis, RP)患者作为对照。根据2008年WHO淋巴造血组织肿瘤分类标准进行诊断。

2. DNA提取及鉴定:采集患者骨髓后以枸橼酸钠抗凝,采用淋巴细胞分离液常规分离骨髓单个核细胞。采用DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司产品]提取DNA。采用超微量分光光度计(美国Thermo Scientific公司产品)检测DNA浓度与纯度。检测DNA产物最大片段。

3. PCR引物及扩增:按照基因重排试剂盒(美国Invivoscribe公司产品)说明书进行操作,对患者标本进行IgH V_H-J_H、IgH D_H-J_H和IgK检测。PCR条件:95℃预变性7 min,95℃ 45 s、60℃ 45 s、72℃ 90 s,共35个循环,最后72℃延伸10 min。

4. 采用毛细管电泳法进行基因重排检测:取PCR扩增产物1 μl与10 μl甲酰胺及0.1 μl GeneScan-500 LIZ(均为美国Applied Biosystems公司产品)混合,经95℃ 2 min热变性,4℃ 5 min后采用3730基因分析仪(美国Applied Biosystems公司产品)进行PCR片段分析,结果判断标准见参考文献[1]。琼脂糖电泳法参照文献[2]进行。

5. 染色体荧光原位杂交(FISH)检测:IgH双色分离探针购于美国Vysis公司,按厂商提供方法进行操作,在ThermoBrite杂交仪(美国Abbott公司产品)进行样本及探针的变性、杂交。通过Isis系统(德国Metasystems公司产品)进行分析判读并摄取图像。每个样本计数500个间期细胞。

6. 统计学处理:数据采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。采用四格表 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. DNA质量检测:样本DNA浓度均大于50 ng/μl, DNA纯度A₂₆₀/A₂₈₀为1.8~1.9。通过检测显示DNA产物完整,无DNA降解或断裂情况。

2. 167例MM患者Ig基因重排分析:①167例MM患者中IgH V_H-J_H重排阳性者107例(其中IgH V_H-J_H FR1、FR2、FR3阳性者分别为87、80、34例),阴性者60例,两组患者中IgH D_H-J_H重排发生率分别为14.0%(15/107)和30.0%(18/60),差异有统计学意义($P=0.013$)。②167例MM患者中IgK重排阳性者121例(72.4%),其中IgK V_K-J_K、V_K/intronRSS-Kde阳性者分别为91、82例。③IgH V_H-J_H、IgH D_H-J_H、IgK联合检出率为94.6%(158/167)。

3. 免疫分型:167例MM患者中86例进行了免疫分型,其中IgG型44例,IgA型20例,轻链型19例,IgD 3例。存在Ig基因重排阳性的MM患者IgG型多于IgA型及轻链型。IgG、IgA、IgD型MM患者的IgH阳性率与IgK阳性率比较,差异均无统计学意义(P 值均 >0.05);轻链型MM患者的IgH阳性率与IgK阳性率比较,差异有统计学意义($P=0.019$)(表1)。

4. 单克隆与多克隆比较:167例患者IgH重排基因产物分别采用毛细管电泳法和琼脂糖电泳法进行片段分析,琼脂糖电泳法结果显示有9例(5.4%)患者IgH重排克隆性阳性,但毛细管电泳法结果显示则为明显的多克隆重排(图1)。

5. Ig基因重排和FISH IgH检测比较:53例MM

表1 不同免疫分型多发性骨髓瘤患者Ig基因重排阳性检出率比较[例数(%)]

| 组别 | 例数 | IgH基因重排 | IgK基因重排 | P值 |
|------|----|----------|----------|-------|
| IgG型 | 44 | 37(84.1) | 32(72.7) | 0.195 |
| IgA型 | 20 | 18(90.0) | 13(65.5) | 0.127 |
| 轻链型 | 19 | 11(57.9) | 18(94.7) | 0.019 |
| IgD型 | 3 | 2(66.7) | 2(66.7) | 1.000 |

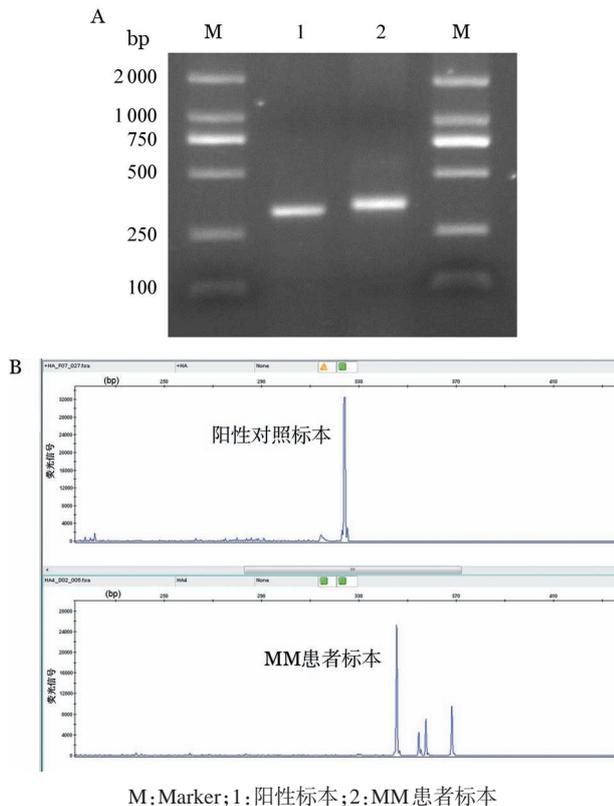


图1 阳性对照与多发性骨髓瘤(MM)患者标本IgH V_H-J_H FR1片段琼脂糖电泳法(A)与毛细管电泳法(B)结果对比图

患者同时进行Ig基因重排检测和FISH IgH检测,两种方法的IgH阳性检出率分别为67.9% (36/53)和49.1% (26/53),差异有统计学意义(P=0.049)。在FISH IgH阳性患者中均存在Ig基因重排,其中有5例患者仅存在IgK基因重排。

6. RP患者Ig基因重排分析:对照组RP患者基因重排IgH V_H-J_H、IgH D_H-J_H和IgK均为阴性。

讨论

MM是来源于B细胞系的恶性肿瘤,B细胞来源于骨髓,是人类免疫系统抗体分泌细胞(浆细胞)的祖细胞。在B淋巴细胞发育分化过程中,处于胚系状态的IgH可变区基因(V_H)、多样性区基因(D_H)、连接区基因(J_H)均需发生VDJ重排。IgH重排先于

Ig轻链重排,首先在前前B细胞(Pro-B-cell)中D_H-J_H发生重排,随后在前B细胞(Pre-B-cell)中V_H连接到DJ_H上形成V_H-J_H重排。由于参与重排基因片段的多样性、重排随机性及重排过程中V_H-J_H、D_H-J_H连接区核苷酸随机删除和插入导致每个克隆B细胞均有独特的重排方式,其中重排产生的CDRⅢ序列可变性最高,可作为B淋巴细胞克隆基因标志^[3]。在功能性V_H-J_H重排完成后,IgK开始进行重排。随后经历体细胞高突变(Somatic hypermutation, SHM)和类型转换重组(Class switch recombination, CSR)过程,MM患者的浆细胞中Ig基因具有高突变的V_H区和携带类别转换的IgH基因(IgG或IgA)的特征^[4]。SHM首选的靶序列是IgH V_H片段的互补决定区,生发中心的SHM也可以发生在IgH V_H片段的框架区,若SHM发生在引物结合部位,可影响基因与引物的有效结合,导致PCR扩增失败。在MM样本中V_H-DJ_H重排是高突变的,相对于其他B细胞恶性肿瘤有着更高的变异率,平均为9%^[5-6]。但不是所有MM患者都表达IGH V_H-DJ_H基因重排,有些存在的是IgH D_H-J_H重排,其特点是SHM的缺失,因此可以有效避免引物结合原因产生的假阴性结果。我们在本研究中发现,IgH V_H-J_H阴性患者中有30.0%存在不完全的IgH D_H-J_H重排,与阳性者(14.0%)比较差异有统计学意义(P=0.013),所以对于MM患者来说IgH D_H-J_H重排不仅增加了克隆性的检出率,也提供了新的监控微小残留病(MRD)的指标^[7]。

IgK重排开始于前B细胞阶段,首先出现V_K-J_K重排,如果片段具有功能性,细胞进入生发中心反应,最终形成IgK型浆细胞;如果是非功能性片段,则需二次重排或形成V_K-Kde重排^[7]。相对于IgH重排在SHM时可能出现的妨碍引物退火的情况,IgK重排很少受SHM的影响,可以作为IgH重排重要的互补检测项目^[8]。在本研究中我们对167例MM患者进行Ig基因重排检测,IgH+IgK的克隆性检出率可高达94.6%,在所有B系肿瘤中处于较高的检出水平。

在分型方面,Ig基因重排阳性的MM患者IgG型总数多于IgA型及轻链型等,其中IgA型MM患者中IgH阳性率高于IgK阳性率,但也许由于样本数少,两者间差异无统计学意义(P=0.127),可以通过增加样本数进行更深入研究;轻链型MM患者则以IgK基因重排为主,其与IgH基因重排阳性比较,差异有统计学意义(P=0.019)。Ig基因重排可能在不同免疫分型MM患者中存在不同的优势重排片

段,结合重排发生的过程,可以增加样本数量并且结合疾病预后进行可能的更精确的疾病分组。

正常淋巴细胞或反应性的浆细胞增多,其Ig基因编码均为多克隆性基因重排,其产物大小不一,电泳后弥漫分布;MM细胞则具有统一形式的重排,片段大小一致,PCR扩增后电泳可见特异条带。相对于普通琼脂糖电泳,基因重排PCR片段分析采用毛细管电泳技术,应用3个或4个荧光染料标记引物,在单管中进行多重PCR反应,生成的PCR产物可精确到1个碱基差,以不同颜色区分不同区间产物的克隆性,可有效地区分单克隆、多克隆和寡克隆,从而排除多克隆产物的干扰,降低假阳性率,对临床鉴别诊断具有重要的意义^[1]。基因重排检测毛细管电泳法的应用在快速识别IgK重排上尤其明显,采用不同的荧光染料分别标记IgK的Kde和intronRSS引物,经过检测,IgK V_K-Kde和intronRSS-Kde片段将以不同颜色加以区分,结果判读一目了然。

MM的细胞遗传学改变包括由超倍体和IgH重排组成的原发性改变和13号染色体异常、p53缺失、1q21扩增等继发性改变^[9],其中IgH重排是MM遗传学改变的早期事件,与疾病相关,被列为风险评估的关键参考因素^[10]。Fonseca等^[11]提出IgH重排是MM发病的第一步,其检测方法中FISH是最有效的检测法,可以检测许多断裂点。然而FISH IgH重排只能用特异性探针检测已知的染色体异常,对于涉及到多种染色体复杂核型异常或未知异常则不能检出,相对于PCR的高灵敏度和快速性仍有不足。在本研究中我们对53例MM患者同时进行了Ig基因重排检测和染色体荧光原位杂交IgH检测,两种方法的IgH阳性检出率差异有统计学意义(67.9%对49.1%, $P=0.049$),如加大样本数差异则有可能进一步增加。在26例FISH IgH阳性的患者虽然均存在Ig基因重排,但有5例患者只存在IgK重排基因,这可能是由于SHM导致的IgH V_H-J_H重排引物退火失败引起的假阴性结果。由此看来,BIOMED-2标准化Ig基因重排技术与染色体FISH IgH检测可以相互验证互为补充。

在本研究中我们发现MM患者IgH与IgK的联合检出率为94.6%,RP患者未见克隆性Ig基因重

排,由此可见,BIOMED-2标准化Ig基因重排在MM的研究中不仅可以提供具体目标监测肿瘤细胞,其快速敏感的特点对于MM的早期诊断和鉴别诊断也具有重大的指导意义。

参考文献

- [1] van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936 [J]. *Leukemia*, 2003, 17(12): 2257-2317.
- [2] 曹增,李承文,肖志坚,等. TEL-AML1阳性儿童急性淋巴细胞白血病IgH及TCR γ 基因重排的研究[J]. *中华血液学杂志*, 2008, 29(6): 408-409.
- [3] Arnold A, Cossman J, Bakbshi A, et al. Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms [J]. *N Engl J Med*, 1983, 309(26):1593-1599.
- [4] Bakkus MH, Heirman C, Van Riet I, et al. Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation [J]. *Blood*, 1992, 80(9): 2326-2335.
- [5] Gonzalez D, Balanzategui A, Garcia-Sanz R, et al. Incomplete DJH rearrangements of the IgH gene are frequent in multiple myeloma patients: immunobiological characteristics and clinical implications [J]. *Leukemia*, 2003, 17(7):1398-1403.
- [6] Kosmas C, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, et al. Origin and diversification of the clonogenic cell in multiple myeloma: lessons from the immunoglobulin repertoire [J]. *Leukemia*, 2000, 14(10):1718-1726.
- [7] González D, van der Burg M, García-Sanz R, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma [J]. *Blood*, 2007, 110(9): 3112-3121.
- [8] 艾晓非,付鸾迁,汝昆,等. 利用石蜡包埋组织进行BIOMED-2标准化IG/TCR基因重排检测在淋巴瘤诊断中的意义[J]. *中华血液学杂志*, 2013, 35(6): 495-498.
- [9] Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review [J]. *Leukemia*, 2009, 23(12): 2210-2221.
- [10] Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management [J]. *Am J Hematol*, 2011, 86(1): 57-65.
- [11] Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance [J]. *Blood*, 2002, 100(4): 1417-1424.

(收稿日期:2015-07-14)

(本文编辑:刘志红)