

免疫球蛋白重/轻链检测在IgG型多发性骨髓瘤患者微小残留病监测中的作用

张慧 周莉莉 李荣 贺婕 彭真萍 侯健

【摘要】目的 观察完全缓解(CR)期IgG型多发性骨髓瘤(MM)患者中血清免疫球蛋白重/轻链(HLC)和游离轻链(FLC)表达水平的变化,探讨HLC在MM患者疗效评价中的敏感性和准确性。**方法** 选取20例治疗后疗效评估为CR的IgG型MM患者,采用全自动SPAplus特定蛋白分析仪(应用免疫透射比浊法)同时检测患者血清标本HLC及FLC的表达水平,结合其同期血清蛋白电泳(SPE)及免疫固定电泳(IFE)结果,分析HLC在血清免疫球蛋白检测中的敏感性和准确性;同时结合其临床疗效,比较IgG κ /IgG λ 比值(rHLC)及FLC κ / λ 比值(rFLC)异常与正常者之间的差异。**结果** 20例患者中男、女各10例,中位年龄56(35~70)岁。20例患者中6例rHLC异常,而rFLC正常;3例rFLC检测异常,而rHLC正常;11例rHLC和rFLC比值均正常。中位随访18个月,6例rHLC异常患者中,4例接受干预治疗者1例复发,未治疗的2例均复发,无病生存时间分别为9.0、3.0、3.0个月。3例rFLC异常患者中,2例接受干预治疗者均未复发,1例未治疗者复发,无病生存时间为1.5个月。11例rHLC和rFLC均正常患者未接受干预治疗,其中3例复发,无病生存时间分别为3.5、5.0、5.5个月。**结论** HLC与FLC联合检测,有利于MM患者疗效评估及微小残留病监测的准确性,可以更有效地评估MM患者疾病状态。而rHLC、rFLC异常可提示患者预后不良,早期干预可提高其临床疗效,延长无病生存时间。

【关键词】 多发性骨髓瘤; 免疫球蛋白重链; 免疫球蛋白轻链; 血清游离轻链; 微小残留病

Effect of immunoglobulin heavy/light chain detection on the minimal residual disease monitoring in IgG multiple myeloma patients Zhang Hui, Zhou Lili, Li Rong, He Jie, Peng Zhenping, Hou Jian. Myeloma and Lymphoma Center, Department of Hematology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Corresponding author: Hou Jian, Email: houjian@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the specificity and sensitivity of immunoglobulin heavy/light chain (HLC) and serum free light chain (FLC) level in minimal residual disease monitoring of IgG type multiple myeloma (MM) patients during complete remission (CR). **Methods** Immunoglobulin HLC was assessed in 20 IgG myeloma patients by immune turbidimetry using SPAplus analyzer. The serum level of HLC and FLC was detected at same time. Combine with those obtained by serum protein electrophoresis (SPE) and immune fixation electrophoresis (IFE), the specificity and sensitivity of HLC in detection of serum immunoglobulin were analyzed. Combined with the clinical efficacy, kappa/lambda ratios of HLC (rHLC) and FLC (rFLC) were compared between the patients and normal controls. **Results** Among 20 patients, there were 10 male and 10 female, the median age was 56 (35–70) years. There were 6 patients with abnormal rHLC but normal rFLC; 3 patients with abnormal rFLC but normal HLC; and 11 patients with both normal rHLC and rFLC. During the mean follow-up time of 18 months, 4 of the 6 patients with abnormal rHLC accepted intervention therapies, 1 case relapsed in 9 months, the other 2 untreated patients relapsed in 3 months. Among the 3 cases with abnormal rFLC, 2 patients are still in remission after intervention therapies, the other untreated patient relapsed in 1.5 months. Among the 11 untreated patients with both normal rHLC and rFLC, 3 relapsed with the disease free survival time of 3.5 months, 5.0 months and 5.5 months respectively. **Conclusions** The combined detection of HLC and FLC is helpful to

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.02.002

基金项目:国家自然科学基金(81172248、81001050)

作者单位:200003 上海,第二军医大学长征医院血液科,全军骨髓瘤与淋巴瘤疾病中心

通信作者:侯健,Email:houjian@medmail.com.cn

assess the curative efficacy and the accuracy of minimal residual disease monitoring, and more effectively evaluate the prognosis of MM patients. Abnormal rHLC and rFLC are correlated with poor prognosis, while early intervention therapies can help to improve disease free survival.

【Key words】 Multiple myeloma; Immunoglobulin heavy chains; Immunoglobulin light chains; Free light chain; Minimal residual disease

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种恶性浆细胞克隆增殖性疾病,以单克隆免疫球蛋白或其片段异常增多引起骨破坏、肾损害等一系列临床症状为主要特征。目前,免疫固定电泳(IFE)及血清蛋白电泳(SPE)是鉴定M蛋白及分型的标准方法,但都存在一定的缺陷^[1]。国外最近研发的单克隆免疫球蛋白重/轻链(heavy/light chain, HLC)是一种新的检测指标,通过特异性识别每个免疫球蛋白分子重链和轻链结合的恒定区域,定量检测并区分免疫球蛋白及其轻链类别,得出免疫球蛋白 κ 和 λ 的浓度及比值(HLC ratio, rHLC)^[2]。有研究者发现HLC检测可作为IFE的补充,用于MM患者M蛋白的定量及微小残留病(MRD)的监测,帮助判断其预后和疗效^[3]。在本研究中我们以IgG型MM患者为研究对象,观察在SPE和IFE示M蛋白阴性及临床疗效评价为完全缓解(CR)时患者血清HLC及游离轻链(free light chain, FLC)的表达水平,评估HLC在MM患者疗效评价中的敏感性和准确性。

病例和方法

1. 研究对象:选取2013年1月至2014年3月我院收治后达到CR的IgG型MM患者20例,诊断及疗效判断符合《中国MM诊治指南(2013年修订)》标准。CR:血清和尿IFE示M蛋白阴性,软组织浆细胞瘤消失,骨髓中浆细胞比例 <0.050 。复发:血、尿IFE示M蛋白阳性,骨髓中浆细胞比例 ≥ 0.050 ,出现新的溶骨病变或软组织浆细胞瘤或残留骨病变扩大,或排除其他原因引起的高钙血症加重,以上任一项。20例患者中男、女各10例,中位年龄56(35~70)岁。M蛋白类型: IgG κ 轻链型12例, IgG λ 轻链型8例。Durie-Salmon分期: II A期3例, III A期12例, III B期5例。ISS分期: I期6例, II期6例, III期8例。

2. HLC检测试剂与仪器:人重链IgG κ/λ 检测试剂盒、轻链 κ/λ 检测试剂盒、样本稀释液II、全自动SPAplus特定蛋白分析仪均购自英国The Binding Site Group Ltd公司。重链试剂批号: IgG κ 330572A, IgG λ 330574A; 轻链试剂批号: κ

337889B, λ 337891B。

3. 检测方法:分别用真空分离凝胶促凝剂管采集患者空腹静脉血3~5 ml, 1 600 \times g离心10 min,取上层血清分装入EP管后迅速保存于-20 $^{\circ}$ C待测,检测前室温解冻,统一用SPAplus特定蛋白分析仪定量检测HLC IgG κ 和IgG λ 及FLC κ 和 λ 。按照试剂盒说明书进行操作,采用免疫透射比浊法定量检测HLC和FLC。根据检测结果分别计算出rHLC(IgG κ /IgG λ 比值)和rFLC(FLC κ/λ 比值)。

正常值参考范围参照试剂盒说明书。HLC正常值参考范围[根据126名正常人(年龄范围20~70岁)的血清样本检测的IgG κ 、IgG λ 正常值(95%可信区间)]: IgG κ 3.84~12.07 g/L, IgG λ 1.91~6.74 g/L, 中位rHLC为1.74(1.12~3.21); FLC正常值参考范围[根据282名正常人(年龄范围20~90岁)的血清样本检测的FLC正常值(95%可信区间)]: FLC κ 3.30~19.40 mg/L, λ 5.71~26.30 mg/L, 中位rFLC为0.60(0.26~1.65)。在本研究中,正常值范围参照国外标准,并在20名中国健康对照者中验证后确定如下:rHLC >3.21 为 κ 单克隆, rHLC <1.12 为 λ 单克隆; rFLC >1.65 为 κ 单克隆, rFLC <0.26 为 λ 单克隆。

结 果

1. 血清HLC及FLC检测结果:20例IgG型MM患者结果详见表1。所有患者同期SFE及IFE检测M蛋白均为阴性,临床疗效评估为CR,但通过HLC及FLC方法仍有部分患者可检出比例异常。结果显示20例患者中, rHLC正常者14例,异常者6例(同期rFLC正常, IgG κ 、IgG λ 型各3例); rFLC正常者17例,异常者3例(同期rHLC正常, IgG κ 2例, IgG λ 1例); rHLC和rFLC均正常者11例(IgG κ 6例, IgG λ 5例)。

2. 治疗及疗效:中位随访时间为18个月。6例rHLC异常患者中,4例分别接受自体干细胞移植、PAD(硼替佐米+阿霉素+地塞米松)或TAD(沙利度胺+阿霉素+地塞米松)方案等进行治疗(1例复发,无病生存时间为9.0个月),其余2例未予治疗(均复发,无病生存时间均为3.0个月)。3例rFLC异常患

表1 20例多发性骨髓瘤患者达到完全缓解后的血清免疫球蛋白重/轻链(HLC)、血清游离轻链(FLC)表达水平

例号	性别	年龄(岁)	M蛋白类型	DS分期	ISS分期	HLC(g/L)			FLC(g/L)		
						IgGκ	IgGλ	IgGκ/λ	κ	λ	κ/λ
1	男	70	IgG-κ	ⅢA	I	9.28	2.09	4.45 ^a	12.31	9.78	1.26
2	男	68	IgG-λ	ⅢB	Ⅲ	8.92	5.82	1.53	75.13	49.40	1.52
3	女	68	IgG-λ	ⅢB	Ⅲ	3.28	3.19	1.03 ^a	80.42	83.21	0.97
4	男	54	IgG-λ	ⅡA	I	2.09	2.40	0.87 ^a	9.31	9.67	0.96
5	男	65	IgG-λ	ⅢA	I	7.73	2.64	2.93	29.22	19.83	1.47
6	女	50	IgG-λ	ⅢA	Ⅱ	5.88	3.81	1.54	10.68	14.15	0.75
7	男	62	IgG-κ	ⅢA	I	5.27	3.85	1.37	9.69	12.58	0.77
8	女	41	IgG-κ	ⅡA	Ⅱ	6.33	3.22	1.97	6.50	11.34	0.57
9	女	41	IgG-κ	ⅡA	I	7.63	4.92	1.55	10.00	13.90	0.72
10	女	53	IgG-κ	ⅢB	Ⅲ	4.76	2.71	1.76	14.43	8.35	1.73 ^a
11	女	56	IgG-κ	ⅢA	Ⅲ	1.59	1.19	1.33	36.24	6.10	5.94 ^a
12	女	49	IgG-κ	ⅢA	Ⅲ	5.05	2.13	2.37	30.00	13.01	2.31 ^a
13	男	40	IgG-κ	ⅢB	Ⅱ	5.08	1.50	3.40 ^a	6.16	8.71	0.71
14	女	61	IgG-κ	ⅢA	Ⅱ	3.52	2.06	1.71	6.11	6.06	1.01
15	女	52	IgG-κ	ⅢA	I	4.56	2.21	2.06	5.29	6.44	0.82
16	男	61	IgG-λ	ⅢA	Ⅱ	10.34	5.31	1.95	37.46	60.12	0.62
17	男	35	IgG-λ	ⅢA	Ⅲ	7.61	3.81	1.99	9.88	11.00	0.90
18	男	56	IgG-λ	ⅢA	Ⅲ	3.01	4.41	0.68 ^a	7.45	15.38	0.48
19	女	62	IgG-κ	ⅢA	Ⅱ	9.54	3.17	3.01	16.07	18.21	0.88
20	男	60	IgG-κ	ⅢB	Ⅲ	18.08	4.47	4.05 ^a	42.78	36.06	1.19

注:DS分期:Durie-Salmon分期;ISS:国际分期体系;a:比值异常

者中,2例接受PAD方案治疗(均未复发),其余1例未予治疗(复发,无病生存时间为1.5个月)。11例rHLC和rFLC均正常者未接受干预治疗(3例复发,无病生存时间分别为3.5、5.0、5.5个月)。

讨 论

近年来,随着实验室检测手段及临床新药疗效的不断提高,MM患者的缓解质量也在不断改善,对M蛋白检测敏感性的要求也越来越高^[4]。而疾病的复发、进展一直是MM患者临床治疗中备受关注的问題,需要早期诊断及干预来改善预后,由此可见,MRD监测在MM患者的疗效评估及预后提示中具有非常重要的作用,也是决定干预时机的关键^[5]。因此,在本研究中我们选择治疗后临床疗效评估为CR的IgG型MM患者,分析HLC在IgG型MM患者疗效评价中的敏感性。尽管血清和尿IFE已经取代SPE成为更敏感的金指标,但在M蛋白定量方面,这两种方法均存在不足。当M蛋白水平较低时,M蛋白峰可能会与血清正常成分的电泳条带重合,干扰M蛋白的检出。如在SPE中,M蛋白可以出现在a~g间的任何区带,有时会被一些大蛋白如a2区的触珠蛋白、b区的转铁蛋白和补体3等遮盖。已有研

究报道,46%的IgA型MM患者和4%的IgG型MM患者可出现这一问题^[6-7]。因此,当小分子的M蛋白与正常血清成分重叠时,很难进行精确的定量和区分。虽然免疫比浊法可以帮助我们进一步检测和分析低水平的M蛋白,但由于正常的多克隆免疫球蛋白背景仍然存在干扰,血清蛋白浓度多趋于正常,此时的检测结果往往不够准确。最近,Bradwell等^[8]开发了一种新型的抗血清试剂,可特异识别每一个免疫球蛋白分子上重链和轻链结合恒定区的独特抗原决定表位,有助于排除M蛋白测定中的背景干扰,实现更精确的定量检测。

我们的研究结果显示,临床疗效达到CR的20例MM患者中仍可检出rHLC异常者6例(30.0%)、rFLC异常者3例(15.0%),提示CR的MM患者体内仍然存在免疫球蛋白的异常克隆,但需要更敏感指标进行监测,这与国外观点一致^[6]。本研究中rHLC异常的6例患者rFLC正常,而rFLC异常的3例患者rHLC正常,提示rHLC和rFLC均具有高敏感性,可作为互补,联合用于MM患者MRD的监测。FLC半衰期只有2~4h,且95%的MM患者会产生过多的血清FLC,因此FLC已经成为早期疗效及疾病复发的敏感指标,rFLC也已被国际骨髓瘤工

作组列为严格意义的CR(strict complete remission, sCR)评估指标之一^[9]。而对于IgG型MM患者,由于HLC检测不受IgG半衰期影响,可避免正常IgG在缓慢代谢过程中对血清样本的干扰,从而更好地区分异常克隆^[3]。

我们结合患者临床疗效随访分析发现,未接受干预治疗的rHLC和rFLC正常者复发率明显低于rHLC异常未治疗者,无病生存时间也长于后者,rHLC异常并接受干预治疗者复发率比未治疗者低且无病生存时间长,rFLC异常并接受干预治疗者复发率亦明显低于未治疗者。研究结果提示rHLC、rFLC异常可提示患者预后不良,而早期进行干预治疗或可改善其临床疗效,延长无病生存时间。近期有研究者报道对37例移植后CR的MM患者采用HLC检测进行MRD监测,结果显示虽然HLC检测值接近正常,但其rHLC与患者预后具有良好的相关性,因此认为rHLC用于MRD监测,对患者临床疗效的评估更为准确^[10-11]。进一步研究显示,MM患者达到sCR后,rHLC异常的出现早于FLC及IFE异常出现的中位时间,为5.5个月^[5]。Katzmann等^[12]对1384例意义未明单克隆免疫球蛋白血症(MGUS)患者进行包括HLC κ 、 λ 、血清M蛋白水平、重链类型及FLC的多因素分析,发现rHLC异常是MGUS患者疾病进展的独立危险因素,提示rHLC检测在评估MGUS疾病发展中有重要的作用。

总之,HLC是具有高灵敏度、高特异性的检测方法,在MM患者疾病达到CR,甚至sCR时,仍能检出残留的异常克隆的免疫球蛋白,精确地定量低M蛋白水平。同时鉴于FLC同样具有的高敏感性,以及部分MM患者疾病进展时可能出现的M蛋白类型及特性改变,我们推荐联合HLC与FLC检测进行MM患者疾病的鉴别诊断、临床疗效评估及MRD监测,对于低M蛋白水平的MM、冒烟型骨髓瘤及MGUS患者的疾病检测亦尤为重要。在本研究中我们的结果显示rHLC、rFLC异常可提示患者预后不良,早期干预可改善其临床疗效、延长无进展生存时间。因此我们相信,HLC检测技术有助于进一步提高恶性浆细胞疾病患者早期诊断的准确性,如

何早期干预,未来仍有待进一步扩大样本量进行前瞻性临床试验研究,延长随访时间以明确。

参考文献

- [1] Narayan S, Lujan MG, Baskin LB, et al. Measurement of beta1- and beta2- globulins improves detection of M- spikes on high-resolution electrophoresis[J]. Clin Chem, 2003,49(4):676-678.
- [2] Bradwell AR, Harding SJ, Fourrier NJ, et al. Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin kappa/lambda ratios [J]. Clin Chem, 2009,55(9):1646-1655.
- [3] Keren DF. Heavy/light-chain analysis of monoclonal gammopathies[J]. Clin Chem, 2009, 55(9):1606-1608.
- [4] 侯健,周莉莉. 新药治疗时代的骨髓瘤预后分层[J]. 中华血液学杂志, 2008, 3(2):88-89.
- [5] 侯健,卢静. 复发难治性多发性骨髓瘤的临床思考[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(4):289-290.
- [6] Ludwig H, Milosavljevic D, Zojer N, et al. Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients[J]. Leukemia, 2013,27(1):213-219.
- [7] Wang H, Gao C, Xu L, et al. Laboratory characterizations on 2007 cases of monoclonal gammopathies in East China[J]. Cell Mol Immunol, 2008,5(4):293-298.
- [8] Bradwell A, Harding S, Fourrier N, et al. Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig κ /Ig λ ratios in multiple myeloma patients [J]. Leukemia, 2013, 27(1):202-207.
- [9] Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma [J]. Leukemia, 2006, 20(9):1467-1473.
- [10] Keren DF. Heavy/Light-chain analysis of monoclonal gammopathies[J]. Clin Chem, 2009, 55(9):1606-1608.
- [11] Tovar N, Fernández de Larrea C, Elena M, et al. Prognostic impact of serum immunoglobulin heavy/light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission after autologous stem cell transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2012,18(7):1076-1079.
- [12] Katzmann JA, Clark R, Kyle RA, et al. Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS [J]. Leukemia, 2013, 27(1): 208-212.

(收稿日期:2014-08-21)

(本文编辑:刘志红)