

# 4色与8色荧光抗体组合检测多发性骨髓瘤患者微小残留病的比较分析

王亚哲 路瑾 郝乐 常艳 贺玲玲 黄晓军 刘艳荣

**【摘要】目的** 探讨与比较4色和8色荧光抗体组合检测多发性骨髓瘤(MM)患者治疗后微小残留病(MRD)的灵敏度。**方法** 建立一组以CD38/CD138对浆细胞进行设门,同时检测胞膜抗原CD45、CD19、CD56、CD117及胞质轻链cKappa、cLambda的8色抗体组合;6组4色抗体组合中,4组以CD38/CD138设门,分别分析CD45/CD19、CD56/CD117、CD19/CD56胞膜抗原(M1-3)和胞质轻链(C组)表达;MC1-2组分别以CD38/SSC和CD138/SSC设门,同时检测CD19或CD45胞膜抗原和胞质轻链。采用以上组合对20名健康志愿者和73例完全缓解后MM患者标本进行检测并比较分析。**结果** 8色组合识别异常浆细胞(aPCs)和克隆性浆细胞(cPCs)的阳性率均为82.19%,一致率为89.04%(65/73);cPCs中位比例为0.105%,均显示明显的单克隆轻链;敏感度为0.004%。CD38/SSC设门的浆细胞比例明显高于CD38/CD138( $P<0.001$ )和CD138/SSC( $P=0.001$ )设门。4色组合中C-胞质组MRD阳性率最低,仅为65.75%,明显低于8色组合的82.19%( $P=0.024$ );M2-<sub>56/117</sub>组检测的aPCs比例最低,为0.095%,与其他组相比差异有统计学意义( $P=0.014$ );MC1-<sub>CD38</sub>和MC2-<sub>CD138</sub>组,以cPCs作为判断标准时MRD阳性率均高于以aPCs为判断标准( $P<0.05$ ),结果一致率分别为68.49%(50/73)和79.45%(58/73)。与8色组合相比,4色组合中MC2-<sub>CD138</sub>组敏感性、准确性和阴性预测值最高,阳性预测值和特异性也较高;其次是M1-<sub>45/19</sub>组。**结论** CD38/CD138设门更准确,反映克隆性的胞质轻链检测较胞膜抗原更敏感,胞膜抗原异常表达并不完全代表为cPCs,建议胞膜抗原和胞质轻链同时检测。有条件者建议选用8色组合,4色组合中建议同时采用M1-<sub>45/19</sub>和MC2-<sub>CD138</sub>组合。

**【关键词】** 多发性骨髓瘤; 微小残留病

**基金项目:**国家重大科学仪器设备开发专项(2011YQ03013407)

**Comparison and analysis of minimal residual disease in multiple myeloma patients detected by 4-color and 8-color fluorescence antibody panels** Wang Yazhe, Lu Jin, Hao Le, Chang Yan, He Lingling, Huang Xiaojun, Liu Yanrong. Peking University Institute of Hematology, People's Hospital of Peking University, Beijing Key Laboratory of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Beijing 100044, China  
Corresponding author: Liu Yanrong, Email: yrliu163@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore and compare 4-color and 8-color fluorescence antibody panels for detecting minimal residual disease of multiple myeloma patients after therapy. **Methods** One 8-color antibody panel was built including CD38 and CD138 for the identification of plasma cells (PCs), membrane antigen CD45, CD19, CD56 and CD117, cytoplasmic Kappa ( $\kappa$ ) and Lambda ( $\lambda$ ) light chain antigen. Six tubes of 4-color panels were built, among them, membrane antigen CD45/CD19, CD56/CD117, CD19/CD56 and light chains were analyzed combined by CD38/CD138 for PCs gate in the tubes M1-3 and tube C-<sub>κ/λ</sub>, respectively; CD19 or CD45 and  $\kappa/\lambda$  light chains were detected in the tube MC1-<sub>CD38</sub> for CD38/SSC identified PCs gate and tube MC2-<sub>CD138</sub> for CD138/SSC identified PCs gate separately. Twenty normal volunteer bone marrows and seventy-three specimens from multiple myeloma patients after complete remission were measured and analyzed. **Results** MRD positive samples were discriminated in 82.19% of the specimen evaluated through either abnormal plasma cells (aPCs) or clonal plasma cells (cPCs) by 8-color antibody panel. Among of them, consistency was 89.04%. The median percentage of cPCs was 0.105%. The lowest sensitivity of experiment was 0.004%. Percentage of PCs identified by CD38/

SSC gate was higher than that by CD38/CD138 ( $P<0.001$ ) and CD138/SSC gate ( $P=0.001$ ) apparently. The lowest MRD positive rate was found in tube C (65.75%), which lower than 8-color panel obviously ( $P=0.024$ ). The percentages of aPCs measured by tube M2-<sub>56/117</sub> were significantly lower than other tubes ( $P=0.014$ ). MRD positive rate determined by cPCs was higher than that by aPCs both in the tube MC1-<sub>CD38</sub> and tube MC2-<sub>CD138</sub>, whose concordance rate were 68.49% and 79.45%, respectively. Compared with 8-color panel, tube MC2-<sub>CD138</sub> the best choice among six tubes of 4-color panels, which has the best sensitivity, accuracy and negative predicted value, higher positive predicted value and specificity. Tube M1-<sub>45/19</sub> was the second choice. **Conclusions** CD38/CD138 are the best markers for gating PCs. Membrane antigen and  $\kappa/\lambda$  detected simultaneously is a better method for MM MRD detection and 8-color antibody panel is an ideal approach. Two tubes of 4-color antibody combination, M1-<sub>45/19</sub> and MC2-<sub>CD138</sub> are recommended in the 4-color panels.

**【Key words】** Multiple myeloma; Minimal residual disease

**Fund program:** Special-funded Programme on National Key Scientific Instruments and Equipment Development (2011Y103013407)

多参数流式细胞术 (multiparameter flow cytometry, MFC) 可识别浆细胞异常抗原的表达并精确判断克隆性, 常用于多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 患者微小残留病 (minimal residual disease, MRD) 的检测, 以评价治疗的有效性并预测预后<sup>[1-5]</sup>。我们在前期工作中发现, 初诊 MM 患者高表达 CD38 和 CD138, 异常表达 CD45、CD19、CD56 和 CD117 胞膜抗原, 限制性表达胞质轻链 cKappa ( $\kappa$ ) 或 cLambda ( $\lambda$ ), 与国外报道相似<sup>[2,6]</sup>。根据上述抗原表达特点我们建立了一组 8 色抗体组合。但目前国内只有少数医院可进行 8~10 色检测<sup>[7-8]</sup>, 多数仍以 4 色为主, 缺乏统一及标准化。受荧光参数限制, 如何较好地利用 4 色仪器检测 MM 患者 MRD, 为临床诊治提供准确结果? 本文我们设计了 6 组 4 色抗体组合, 分别比较了采用 CD38/CD138、CD38/SSC 和 CD138/SSC 设门分别或同时检测胞膜抗原及胞质轻链的敏感性和特异性, 与 8 色组合检测结果进行对比分析, 旨在筛选适用范围更广、准确性及敏感性更高的抗体组合。

## 对象与方法

1. 研究对象: 以 2001 年 9 月至 2015 年 4 月我院

收治的 73 例治疗后获完全缓解的 MM 患者为研究对象, 以 20 名骨髓移植供者为健康对照, 同时进行 4 色和 8 色荧光标记 MFC 检测。研究获得所有 MM 患者和对照者的知情同意。

2. 免疫荧光标记组合及试剂来源: 根据我们前期对 379 例初诊 MM 患者浆细胞表型检测结果的分析, 选择 CD38、CD138、CD19、CD45、CD56、CD117、 $\kappa$  和  $\lambda$  8 种抗体进行组合, 抗体组合见表 1。其中  $\kappa$  FITC、 $\lambda$  PE 为丹麦 DAKO 公司产品, CD138 PE 为美国 BD Pharmingen 公司产品, CD138 APC 为德国 Miltenyi 公司产品, CD38 V450 和 CD45 V500 为美国 BD Horizon 公司产品, CD19 PerCP-Cy5.5、CD38 PerCP-Cy5.5、CD117 PE-Cy7 和 CD56 APC-Cy7 为美国 Biolegend 公司产品, 其余试剂均购自美国 BD 公司。

3. 样本制备及 MFC 检测: 取 100  $\mu$ l 骨髓血 ( $2 \times 10^6$  个细胞), 加入上述胞膜抗体, 避光孵育 (进行胞质标记需  $1 \times$  PBS 预洗 3 次); 加入红细胞溶解液, 混匀后 8 min, 离心洗涤弃上清; 破膜 (仅用于胞质标记), 先加入破膜剂 A 液, 振荡混匀, 避光孵育后加入  $1 \times$  PBS, 离心洗涤弃上清; 加入破膜剂 B 液, 轻混匀, 加入  $\kappa$  FITC、 $\lambda$  PE, 避光孵育; 加入含 0.5% ~

表 1 多发性骨髓瘤微小残留病检测的 8 色和 4 色抗体组合

通道	抗体及荧光素	设门参数
8 色组合	$\kappa$ FITC/ $\lambda$ PE/CD19 PerCP-Cy5.5/CD117 PE-Cy7 /CD138 APC/CD56 APC-Cy7/CD38 V450/CD45 V500	CD38/CD138
4 色组合		
M1- <sub>45/19</sub>	CD38 FITC/CD138 PE/CD45 PerCP/CD19 APC	CD38/CD138
M2- <sub>56/117</sub>	CD56 FITC/CD117 PE/CD38 PerCP-Cy5.5/CD138 APC	CD38/CD138
M3- <sub>19/56</sub>	CD38 FITC/CD138 PE/CD19 PerCP-Cy5.5/CD56 APC	CD38/CD138
C-胞质	$\kappa$ FITC/ $\lambda$ PE /CD38 PerCP-Cy5.5/CD138 APC	CD38/CD138
MC1- <sub>CD38</sub>	$\kappa$ FITC/ $\lambda$ PE/CD19 PerCP-Cy5.5 (或 CD45 PerCP)/CD38 APC	CD38/SSC
MC2- <sub>CD138</sub>	$\kappa$ FITC/ $\lambda$ PE/CD19 PerCP-Cy5.5 (或 CD45 PerCP)/CD138 APC	CD138/SSC

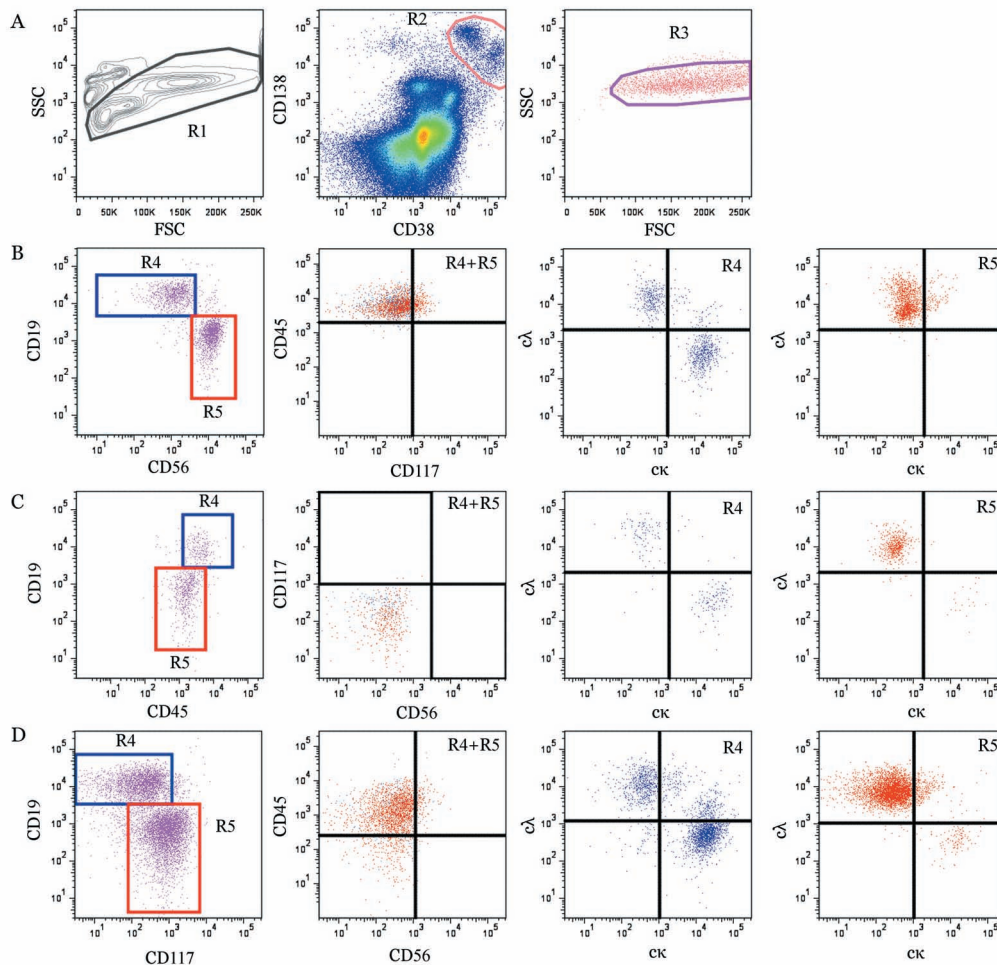
2.0% 血清的 PBS, 离心洗涤弃上清; 加入 300  $\mu$ l 1 $\times$  PBS, 上流式细胞仪进行检测。MRD 检测所用仪器为德国 Miltenyi 公司的 MACS Quant Analyzer, 获取 750 000 个有核细胞进行检测。

4. 设门参数分析: ①8 色组合: 建立 FSC/SSC 点图, 设定有核细胞 R1, CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>浆细胞 R2, 去除非特异设门 R3 (图 1A); 分析 R3 门内细胞, 根据 CD19 和 CD56 表达, 对 CD19<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>正常浆细胞 (nPCs) 和 CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>异常浆细胞 (aPCs) 分别设门 (R4 和 R5), 进一步分析门内细胞  $\kappa/\lambda$  比值, 确定克隆性浆细胞 (cPCs) (图 1B)。CD19/CD117 和 CD19/CD45 散点图 (图 1C~D) 分析同图 1B。②4 色组合: M1-3 和 C-胞质组以 CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>设门分析浆细胞, 方法同 8 色组合。MC1-CD38、MC2-CD138 组与 8 色组合类似, 先设定 R1-R3 门, R2 门不同, 分别在 CD38/SSC 和 CD138/SSC 图中设定 CD38<sup>+</sup>或 CD138<sup>+</sup>浆细胞。M1-3 组中不包括胞质轻链检测, 只根据胞膜抗原表达确定 nPCs 和 aPCs 的比例; C-胞质组、MC1-CD38 和

MC2-CD138 组先根据胞膜抗原的表达确定 aPCs 和 nPCs (C-胞质组以 CD38 弱表达、MC1-CD38 和 MC2-CD138 组以 CD19<sup>-</sup>或 CD45<sup>dim+</sup>作为区分 aPCs 和 nPCs 的标准), 再进一步分析 aPCs 和 nPCs 门内  $\kappa/\lambda$  比值, 以确定 cPCs (图 2)。

5. 判断标准: ①aPCs: 以 20 名健康对照者 nPCs 抗原表达的平均值+3SD 作为临界值: CD45<sup>dim+</sup> 比例为 18.42%, CD19<sup>-dim+</sup> 比例为 29.29%, CD56<sup>+</sup> 比例为 5.39%, CD117<sup>+</sup> 比例为 8.56%, 超过临界值则定义为 aPCs; ②cPCs: 20 名健康对照者 nPCs 均为轻链非限制性表达,  $\kappa/\lambda$  的平均比值为 1.47 $\pm$ 0.28。  $\kappa/\lambda$  比值 >3.0 或 <0.3 定义为 cPCs。③MRD 判断: 出现 aPCs 或 cPCs 均为 MRD 阳性 (MRD<sup>+</sup>), 同时出现 cPCs 和 aPCs 时, 以 cPCs 判断 MRD 是否阳性。未见 aPCs 或 cPCs 仅见 nPCs 则判断为 MRD 阴性 (MRD<sup>-</sup>)。

6. 统计学处理: 应用 SPSS 16.0 和 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行统计学分析。比较各方法



A: 设定 R1、R2、R3 细胞; B: 分析 R3 门内细胞; C: CD19/CD45 散点图; D: CD19/CD117 散点图

图 1 8 色组合免疫荧光标记法分析

检测MRD结果的阳性率采用 $\chi^2$ 检验,比较各细胞群比例采用非参数检验中Mann-Whitney *U*检验,不同组合对同一患者检测结果的比较使用配对*t*检验。

### 结 果

1. 8色组合检测结果、适用范围及敏感性:8色组合检测MRD阳性率为82.19%(60/73),aPCs比例为0.159%(0.005%~3.706%),明显高于cPCs的0.105%(0.004%~3.650%)( $t=6.690, P<0.001$ ),提示aPCs中可能含有nPCs。8色组合确定的cPCs均为明显的胞质轻链限制性表达,几乎无 $\kappa^-c\lambda^-$ 和 $\kappa^+c\lambda^+$ 非特异性细胞。当限制性表达 $\kappa$ 时, $\kappa/c\lambda$ 比值为87.496(19.000~4 999.000),限制性表达 $c\lambda$ 时, $\kappa/c\lambda$ 比值为0.013(0.001~0.050)。8色组合适用于所有MM患者,获取750 000个细胞,cPCs细胞最低30个,敏感度为0.004%。

2. 设门对浆细胞比例的影响:4色组合中M1-3、C-胞质组与8色组合均采用CD38/CD138设门,

MC1- $CD38$ 组根据CD38/SSC设门的浆细胞比例明显高于8色组合组( $P<0.001$ );CD38/CD138和CD138/SSC设门浆细胞比例差异无统计学意义( $P=0.174$ )(表2)。胞质轻链分析发现,以CD38/SSC设门,CD38 $^+$ CD19 $^-$ 和CD38 $^+$ CD19 $^+$ 细胞中常见 $\kappa^-c\lambda^-$ ,并非浆细胞,故导致浆细胞比例偏高。

3. MRD阳性率比较:C-胞质( $\kappa/c\lambda/CD38/CD138$ )组MRD阳性率最低,仅为65.75%,明显低于8色组合的82.19%( $P=0.024$ );仅检测胞膜抗原的M1-3组MRD阳性率也较低,分别为72.60%、68.49%和72.60%,与8色组相比差异均无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ )(表2)。同时分析CD19或CD45胞膜抗原及胞质轻链的MC1- $CD38$ 和MC2- $CD138$ 组与8色组合相似,MRD阳性率分别为79.45%和82.19%,差异均无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ )。

4. 不同判断标准对MRD阳性检出率的影响:8色组合和4色组合中的MC1- $CD38$ 、MC2- $CD138$ 组同时应用了胞膜和胞质抗原,分别以aPCs和cPCs作为判

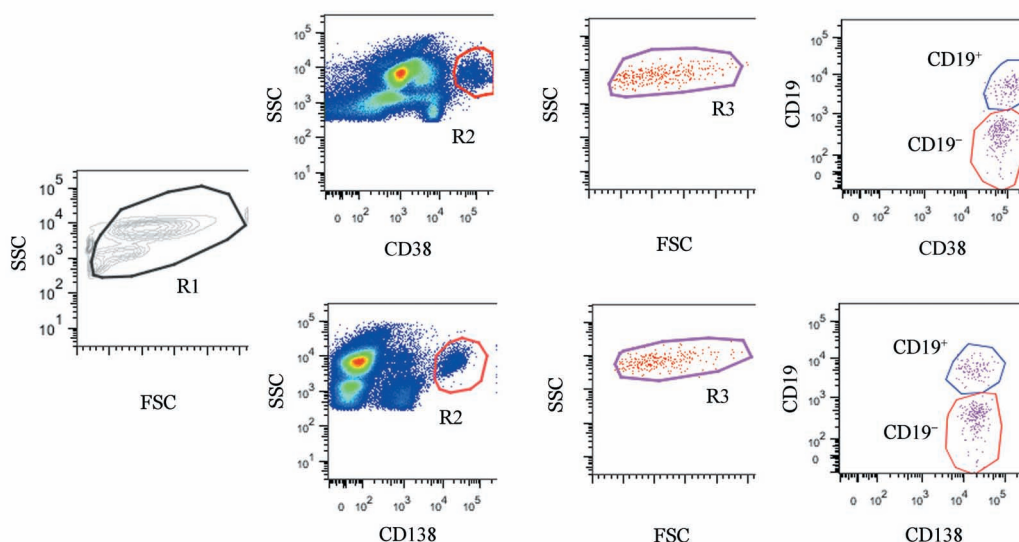


图2 4色组合MC1- $CD38$ 、MC2- $CD138$ 组分析浆细胞

表2 8色和4色荧光抗体组合检测73例多发性骨髓瘤患者微小残留病(MRD)阳性率及浆细胞比例结果比较

组别	以cPCs为判断标准			以aPCs为判断标准			浆细胞		
	MRD $^+$ [例(%)]	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值	MRD $^+$ [例(%)]	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值	比例[% , <i>M</i> (范围)]	<i>Z</i> 值	<i>P</i> 值
8色组合	60(82.19)			60(82.19)			0.290(0.040~6.520)		
4色组合									
M1- $_{45/19}$	NT			53(72.60)	1.918	0.166	0.290(0.040~6.520)		
M2- $_{56/117}$	NT			50(68.49)	3.687	0.055	0.290(0.040~6.520)		
M3- $_{19/56}$	NT			53(72.60)	1.918	0.166	0.290(0.040~6.520)		
C-胞质	48(65.75)	5.123	0.024	NT			0.290(0.040~6.520)		
MC1- $CD38$	58(79.45)	0.177	0.674	44(60.27)	8.557	0.003	0.370(0.040~6.680)	4.308	<0.001
MC2- $CD138$	60(82.19)	0.000	1.000	51(69.86)	3.044	0.081	0.330(0.060~6.590)	1.372	0.174

注:cPCs:克隆性浆细胞;aPCs:异常浆细胞;NT:未检测;*P*值均为与8色荧光抗体组合比较

断MRD标准时,8色组合中两种标准判断MRD阳性率相同,均为82.19%(60/73),MRD<sup>+</sup>及MRD<sup>-</sup>结果一致的标本分别为56份和9份,总一致率为89.04%(65/73);4份标本可见aPCs,但胞质轻链检测证实为非cPCs;另外4份标本未见aPCs,而胞质轻链检测为cPCs。4色组合中的MC1-CD38和MC2-CD138组,以cPCs判定MRD的阳性率分别为79.45%(58/73)和82.19%(60/73),均高于aPCs的60.27%(44/73)和69.86%(51/73),两组MRD<sup>+</sup>及MRD<sup>-</sup>结果一致率分别为68.49%(50/73)和79.45%(58/73),均低于8色组合,其中MC1-CD38与8色组合相比差异有统计学意义( $P<0.05$ )。另外,MC1-CD38和MC2-CD138组检测的aPCs比例均高于cPCs比例( $P$ 值均 $<0.05$ ,表3)。结果显示,反映克隆性的胞质轻链检测较胞膜抗原更敏感、更准确,增加胞膜抗原数更易识别aPCs,从而增加MRD检测敏感度;各组合中均有胞膜抗原异常与胞质轻链的限制性表达不一致的标本,最好联合应用。

5. cPCs、aPCs和nPCs比例及 $\kappa/\lambda$ 比值比较:当cPCs限制性表达 $\kappa$ 时,8色组合检测的 $\kappa/\lambda$ 比值显著高于4色组合中的C-胞质、MC1-CD38和MC2-CD138组( $P$ 值均 $<0.001$ );4色组合中,MC2-CD138组检测的 $\kappa/\lambda$ 比值高于C-胞质和MC1-CD38组( $P<0.05$ )。当cPCs限制性表达 $\lambda$ 时,8色组合检测的 $\kappa/\lambda$ 比值显

著低于4色组合中的C-胞质、MC1-CD38和MC2-CD138组( $P$ 值均 $<0.05$ ),后三组间差异无统计学意义( $P>0.05$ );各组间cPCs及nPCs比例差异无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ )。M2-56/117组检测的aPCs比例最低,与其他组相比差异有统计学意义( $P=0.014$ )(表3)。

6. 4色组合的优劣分析:与8色组合相比,4色组合中6组均有MRD检测结果不一致的标本,从表4中可以看出:①敏感性和阴性预测值:MC2-CD138组最高,分别为95.0%和76.9%,其次是MC1-CD38和M1-45/19组;而M2-56/117和C-胞质组敏感性较低。②特异性和阳性预测值:C-胞质组最高,高达100.0%,其次是M1-45/19和MC2-CD138组。③准确性:MC2-CD138和M1-45/19组最高,分别为91.8%和84.9%。综合比较,4色组合中,MC2-CD138组最优,敏感性、阴性预测值和准确性最高,特异性和阳性预测值也较高;其次是M1-45/19组。

7. 4色组合中MC2-CD138组与8色组合检测结果的比较:两组共67份结果一致,6份结果不一致。3份标本8色组合检测MRD<sup>+</sup>,但MC2-CD138组检测为MRD<sup>-</sup>,其中1份标本8色组合检测cPCs比例为0.080%,但MC2-CD138组未检测到cPCs( $\kappa/\lambda$ 比值为0.359);另外2份标本8色组合检测cPCs比例均较低,分别为0.020%和0.004%,同时伴CD19、CD56和CD117异常表达,但MC2-CD138组未显示为cPCs。此

表3 8色和4色荧光抗体组合检测73例多发性骨髓瘤患者aPCs、cPCs和nPCs比例及 $\kappa/\lambda$ 比值比较[M(范围)]

组别	aPCs 比例(%)	cPCs		
		比例(%)	$\kappa/\lambda>3.0$	$\kappa/\lambda<0.3$
8色组合	0.159(0.005~3.706)	0.105(0.004~3.650)	87.496(19.000~4 999.000)	0.013(0.001~0.050)
4色组合				
M1-45/19	0.198(0.010~3.706)	NT	NT	NT
M2-56/117	0.095(0.005~3.683) <sup>a</sup>	NT	NT	NT
M3-19/56	0.192(0.005~3.690)	NT	NT	NT
C-胞质	NT	0.263(0.002~3.898)	14.600(3.216~397.880) <sup>bc</sup>	0.080(0.001~0.295) <sup>b</sup>
MC1-CD38	0.332(0.011~3.957)	0.106(0.004~3.697) <sup>d</sup>	36.085(3.280~1 209.000) <sup>bc</sup>	0.024(0.001~0.155) <sup>b</sup>
MC2-CD138	0.244(0.024~3.858)	0.117(0.006~3.858) <sup>d</sup>	97.135(4.058~760.400)	0.031(0.000~0.235) <sup>b</sup>
组别	nPCs			
	MRD <sup>+</sup>		MRD <sup>-</sup>	
	比例(%)	$\kappa/\lambda$	比例(%)	$\kappa/\lambda$
8色组合	0.130(0.010~2.800)	1.339(0.661~2.579)	0.200(0.020~0.510)	1.623(0.716~2.263)
4色组合				
M1-45/19	0.104(0.006~2.814)	NT	0.210(0.040~0.510)	NT
M2-56/117	0.176(0.014~2.837)	NT	0.250(0.060~3.980)	NT
M3-19/56	0.137(0.012~2.830)	NT	0.210(0.040~0.510)	NT
C-胞质	0.106(0.000~2.628)	1.398(0.289~2.959)	0.210(0.040~0.510)	1.492(0.824~2.059)
MC1-CD38	0.140(0.011~2.919)	1.244(0.528~2.431)	0.212(0.035~0.612)	1.295(0.754~2.186)
MC2-CD138	0.104(0.009~2.506)	1.284(0.330~2.681)	0.147(0.000~0.397)	1.655(1.009~1.908)

注:aPCs:异常浆细胞;cPCs:克隆性浆细胞;nPCs:正常浆细胞;NT:未检测;MRD:微小残留病;<sup>a</sup>与其他各组比较, $P=0.014$ ;<sup>b</sup>与8色组合组比较, $P<0.05$ ;<sup>c</sup>与MC2-CD138组比较, $P<0.05$ ;<sup>d</sup>与MC1-CD38和MC2-CD138组检测的aPCs比例比较, $P<0.05$

表4 8色和4色荧光抗体组合检测73例多发性骨髓瘤患者微小残留病(MRD)结果比较

4色组合分组	8色组合(例)		敏感性(%)	特异性(%)	准确性(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)
	MRD <sup>+</sup>	MRD <sup>-</sup>					
M1- <sub>45/19</sub> 组	MRD <sup>+</sup>	51	85.0	84.6	84.9	96.2	55.0
	MRD <sup>-</sup>	9					
M2- <sub>56/117</sub> 组	MRD <sup>+</sup>	46	76.7	69.2	75.3	92.0	39.1
	MRD <sup>-</sup>	14					
M3- <sub>19/56</sub> 组	MRD <sup>+</sup>	50	83.3	76.9	82.2	94.3	50.0
	MRD <sup>-</sup>	10					
C-胞质组	MRD <sup>+</sup>	48	80.0	100.0	83.6	100.0	52.0
	MRD <sup>-</sup>	12					
MC1- <sub>CD38</sub> 组	MRD <sup>+</sup>	53	88.3	61.5	83.6	91.4	53.3
	MRD <sup>-</sup>	7					
MC2- <sub>CD138</sub> 组	MRD <sup>+</sup>	57	95.0	76.9	91.8	95.0	76.9
	MRD <sup>-</sup>	3					

注:敏感性、特异性、准确性、阳性预测值、阴性预测值均为与8色组合检测数据进行比较

3例应为MC2-<sub>CD138</sub>组检测假阴性。另外3份标本MC2-<sub>CD138</sub>组检测为MRD<sup>+</sup>,但8色组合检测为MRD<sup>-</sup>,其中1份标本MC2-<sub>CD138</sub>组检测cPCs比例为0.006%,但CD19<sup>-</sup>细胞中主要为κκ<sup>-</sup>cλ<sup>-</sup>的非特异染色;另外2份标本CD138<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>细胞比例均较低,分别为4.86%和19.35%,而CD19<sup>+</sup>浆细胞中κκ/cλ比值异常,分别为0.235和18.029,从而判断为cPCs,但8色组合检测结果分析均为多克隆,这3例应为MC2-<sub>CD138</sub>组检测假阳性。

## 讨 论

目前,MFC是比较公认的检测浆细胞克隆性并对微量浆细胞进行定量的方法。利用MFC检测MM MRD主要依靠aPCs表现出与nPCs表型不同的抗原,即该表达不表达,如CD19<sup>-dim+</sup>和CD45<sup>-dim+</sup>;或不该表达而表达,如CD56<sup>+</sup>和CD117<sup>+</sup>。我们在对初诊患者回顾性分析中也证实这4种抗原的异常高表达,与文献报道一致<sup>[3]</sup>。但nPCs抗原表达存在异质性<sup>[9-10]</sup>,使MRD的检测和判断出现困难。对于治疗后浆细胞,如何定义胞膜抗原表达异常?初诊白血病诊断时,普遍采用20%作为抗原阳性表达的临界值,但这种标准并不适用于MM MRD检测。前期分析中我们曾采用20%作临界值,结果4色组合M2-<sub>56/117</sub>组CD56<sup>+</sup>或CD117<sup>+</sup>细胞高于20%的标本仅53.4%(39例),远低于本组的68.5%(50例),结果有差异的11份标本经8色组合证实均为cPCs,且表达CD56或CD117,说明以20%作临界值会使M2-<sub>56/117</sub>组出现假阴性。同样,4色组合M1-<sub>45/19</sub>组中有4份标本CD19<sup>-</sup>细胞比例高于20%,但在正常值+3SD范围内,经8色组合检测证实,其中2份标本未见胞质轻链限制性表达,提示以20%作临界值会使M1-<sub>45/19</sub>组

出现假阳性。胞质轻链κκ/cλ比值目前比较公认的正常范围是0.3~3.0,我们也建立了自己的正常值,并以正常值±3SD(分别为2.31和0.63)为界进行了比较,但与8色组合相比,MC1-<sub>CD38</sub>和MC2-<sub>CD138</sub>组的假阳性与假阴性结果均增加,原因可能是后两组设门的cPCs不够准确,κκ/cλ的界值严格一些更准确,因此以κκ/cλ > 3.0或 < 0.3判断轻链限制性表达。

4色组合M1-3组通过胞膜抗原异常判断MRD,三组均判断MRD<sup>+</sup>的标本中,M2-<sub>56/117</sub>组检测的aPCs比例最低,这是因为同一份标本中CD56<sup>+</sup>或CD117<sup>+</sup>比例往往低于CD45<sup>-dim+</sup>或CD19<sup>-dim+</sup>细胞比例,提示aPCs仅有部分CD56或CD117表达,说明M2-<sub>56/117</sub>组会低估aPCs比例,检测敏感性低于M1-<sub>45/19</sub>和M3-<sub>19/56</sub>组;19份标本三组判断MRD不一致,提示单用其中任何一种抗原都可能造成假阴性结果。8色组合包括以上4种抗原,以aPCs值判断MRD的阳性率提高至82.19%,但与以cPCs值判断MRD相比,8份标本结果不一致。我们的结果说明,仅用4种胞膜抗原判断MRD会造成错误结果,仍需同时检测胞质轻链克隆性或增加胞膜抗原检测的数量,例如CD27和CD81。

4色组合C-胞质组通过CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>细胞设门检测浆细胞,不包括额外的胞膜抗原,根据CD38表达强度初步区分aPCs和nPCs,再计算κκ/cλ比值,判断aPCs是否为cPCs,此组MRD阳性检出率较低,仅为65.75%,但特异性很高,为100.0%。因为只有当cPCs比例较高时,才可明显区分CD38表达明显减弱的细胞,得出κκ/cλ比值异常的结果。30份标本8色组合检测cPCs比例均低于0.1%,其中12份C-胞质组出现假阴性,提示检测浆细胞克隆性最好先利用胞膜抗原区分aPCs与nPCs,再分析κκ/cλ比值。

在本研究中,4色组合中MC1- $_{CD38}$ 和MC2- $_{CD138}$ 组是为兼顾胞膜和胞质轻链表达而设计,但仍存在一些问题。首先,设门不精确,尤其是MC1- $_{CD38}$ 组,当浆细胞CD38表达减弱时,CD38/SSC设门会将早期B细胞、单核细胞等表达CD38的非浆细胞甚至一些非特异染色包含在内,因此出现CD19 $^{+}$ 和CD19 $^{dim+}$ 细胞中 $ck^{-}c\lambda^{-}$ 或 $ck^{+}c\lambda^{+}$ 的非特异细胞。MC2- $_{CD138}$ 组CD138/SSC设门也存在类似问题。提示最好采用CD38/CD138共同设门,利用CD19或CD45胞膜抗原区分aPCs与nPCs,同时检测 $ck$ 和 $c\lambda$ ,但4色组合标记无法兼顾,此时显示出多色标记的优势。

8色组合最突出的特点是用CD38/CD138设门,选择1种或4种异常表达胞膜抗原CD45、CD19、CD56和CD117精确界定aPCs,设门更加灵活,再进一步分析克隆性。许艳丽等<sup>[8]</sup>采用MFC检测MM患者MRD,也包括了这8种抗原,但采用的是6色组合,没有结合胞膜和胞质抗原,分析方法也不同。结果显示,60份MRD $^{+}$ 标本存在cPCs,全部为aPCs,且96.7%(58/60)标本至少伴有2种异常胞膜抗原表达,可靠性强;8色设门区分aPCs,包含的非特异细胞最少, $ck/c\lambda$ 比值差异更大,结果更准确。另外,根据国际和欧洲临床MFC协会的最新建议,MM MRD检测需报告检测低限与定量低限,这两个值均与获取的细胞数相关<sup>[11]</sup>。在本研究中我们获取的细胞数为750 000个,检测低限为0.004%,定量低限为0.008%,而我们检测到的cPCs最低比例为0.004%,与国际推荐标准一致。

总之,分析的抗原越多,对aPCs和cPCs确定越准确。欧洲临床MFC协会提出采用2管8色或1管10色抗体组合,与本组8色的差异在于增加了胞膜抗原CD27和CD81;同时建议获取 $4\times 10^6$ 个细胞,使MRD灵敏度达到 $10^{-5}\sim 10^{-6}$ ;可采用上述方法验证本组8色组合的准确性。我们的结果提示,CD38/CD138对浆细胞设门较准确;检测胞质轻链克隆性更准确,但前提是需要至少1种异常胞膜抗原识别aPCs。4色组合中MC2- $_{CD138}$ 组 $ck/c\lambda/CD19$ (或CD45)/CD138的敏感性、准确性和阴性预测值最高、阳性预测值较高且特异性尚可,最好搭配M1- $_{45/19}$ 组CD38/CD138/CD45/CD19进行异常胞膜抗原筛选。

4色组合中M1- $_{45/19}$ 、M2- $_{56/117}$ 和M3- $_{19/56}$ 组分别适用于CD45 $^{dim+/-}$ CD19 $^{-}$ 、CD56 $^{+}$ CD117 $^{+}$ 、CD19 $^{-}$ CD56 $^{+}$ 异常表达的MM患者;C- $_{胞质}$ 组适用于cPCs比例较高且CD38表达较弱的患者;MC1- $_{CD38}$ 和MC2- $_{CD138}$ 组要

根据M1- $_{45/19}$ 组筛选出的异常抗原CD19或CD45进行选择。

#### 参考文献

- [1] Bataille R, Jégo G, Robillard N, et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy [J]. *Haematologica*, 2006, 91(9): 1234-1240.
- [2] Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders [J]. *Haematologica*, 2008, 93(3): 431-438. DOI: 10.3324/haematol.11080.
- [3] 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.
- [4] Paiva B, Martinez-Lopez 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.
- [5] 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.
- [6] 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. DOI: 10.1002/cyto.b.21265.
- [7] 朱明清, 耿美菊, 陈黎, 等. 多参数流式细胞术在多发骨髓瘤微小残留病灶监测中的应用 [J]. *江苏医药*, 2007, 33(8): 778-780.
- [8] 许艳丽, 王顺清, 毛平, 等. 多参数流式细胞术在多发骨髓瘤及其微小残留疾病的免疫表型分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(6): 759-762. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.06.018.
- [9] Liu D, Lin P, Hu Y, et al. Immunophenotypic heterogeneity of normal plasma cells: comparison with minimal residual plasma cell myeloma [J]. *J Clin Pathol*, 2012, 65(9): 823-829. DOI: 10.1136/jclinpath-2012-200881.
- [10] Cannizzo E, Bellio E, Sohani AR, et al. Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in multiple myeloma: The diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78(4): 231-238. DOI: 10.1002/cyto.b.20517.
- [11] Arroz M, Came N, Lin P, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(1): 31-39. DOI: 10.1002/cyto.b.21228.

(收稿日期:2016-08-29)

(本文编辑:刘志红)