

多参数流式细胞术在多发性骨髓瘤微小残留病变检测中的应用进展

靳小可,黄东平

(皖南医学院弋矶山医院血液内科,安徽 芜湖 241000)

摘要:多发性骨髓瘤(MM)是临床常见的浆细胞恶性增殖性疾病,随着对该病研究的不断完善,新检测、治疗方法以及新药物的出现使该类患者获得了更长的生存期和更高的生存质量,但依然有很多患者无法治愈、存在复发的风险或对化疗产生耐药,这对临床的诊断、治疗以及病情监测提出了更高的要求。微小残留病变(MRD)概念的提出,使患者治疗后肿瘤负荷状态得到了更精确的描述,有利于临床监测和评价患者状态并选择恰当的诊疗时机,避免治疗不足或过度治疗。在MRD多种检测手段中,多参数流式细胞术(MFC)以其高灵敏度、快速高效、相对廉价等优点逐渐被越来越多的实验室所应用和推广。笔者对目前MFC在骨髓瘤的MRD检测中的应用情况作一综述。

关键词:多发性骨髓瘤;流式细胞术;肿瘤,残余

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.07.002

Progress of minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma

JIN Xiaoke, HUANG Dongping

(Department of Hematopathology, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241000, China)

Abstract: Multiple myeloma(MM) is a hematological malignancy of plasmocyte in clinic practice. Although the treatments and researches have improved and more patients survive for much longer time, most patients remain incurable and eventually relapse or become refractory to previous treatments. The efficacy of diagnosis need to be improved on request of clinical demand. Minimal residual disease (MRD) provides more accurate estimations of the burden of tumor cells. It would help to improve monitoring of treatment efficacy and to select appropriate time to avoid over treatment and under treatment. Multiparameter flow cytometry (MFC) is one of current techniques to monitor MRD which is widely used in lots of laboratories because of its high sensitivity, fast, high efficiency, and cost-effective. In this paper, the current application of flow cytometry in myeloma MRD detection is summarized.

Key words: Multiple myeloma; Flow cytometry, minimal residual disease; Neoplasm, residual

多发性骨髓瘤(Multiple myeloma, MM)是临床常见的血液系统肿瘤,以浆细胞恶性增殖伴有分泌单克隆免疫球蛋白或轻链为特征,全世界每年新发病例数约86 000例,占有新发肿瘤病例的1%,占血液系统肿瘤的13%^[1],中位生存期4~5年^[2]。随着各种诊疗手段的出现和诊疗水平的提升,多数患者的生存期得到明显延长,但经过现有的治疗病情最终依然会进展,部分原因为对患者病情发展阶段评估不准确,导致在治疗过程中对治疗种类、剂量及时间点的选择难以确定。近些年随着科技的发展,流式细胞术、聚合酶链反应技术、基因测序等检

测手段在临床的应用越来越多,特别是流式细胞术因其高效、高敏感度、相对廉价等优点在血液病微小病变检测中应用范围最广,对临床的治疗有着一定指导意义。

1 MM的诊疗现状及预后评价

近几十年来,硼替佐米、来那度胺等新药的开发及造血干细胞移植技术的应用,使得患者的缓解率和生存时间得到了明显的提高^[3-5],然而个体差异较大,即便是治疗后达到缓解,多数患者依然面临着疾病进展和复发^[6],进一步治疗则需要建立在对患者病情精确评估基础上。一直以来,完全缓解(complete remission, CR)作为骨髓瘤患者治疗后病情达到相对稳定的评价标准被广泛应用,患者表现为血清、尿免疫固定电泳阴性,不存在任何软组织浆细胞瘤,同时骨髓中的浆细胞数小于等于5%,但这

基金项目:安徽高校自然科学基金项目(重大项目)(KJ2016SD58)

通信作者:黄东平,男,主任医师,硕士生导师,研究方向为血液病诊疗,造血干细胞移植,E-mail: hdp_9713@163.com

难以精确反映疾病控制的深度和状态,随着患者缓解率的提高,为了满足临床诊疗需求又出现了免疫表型的 CR,分子生物学的 CR 等概念,一定程度上可以对患者体内恶性浆细胞状态描述得更加准确,但这些概念涉及到不同的方法学标准,给临床治疗方案选择带来一定困扰。

近年的研究认为微小残留病变(minimal residual disease, MRD)阳性,即治疗后形态学等传统方法缓解,但患者体内依然存在肿瘤细胞的免疫表型、分子生物或细胞基因学的表达是血液肿瘤复发的根本原因^[7]。传统检测手段判定达到缓解的患者,骨髓中依然存在约 10^9 个肿瘤细胞,被认为是 MM 患者复发的根源,为了更加准确地评估患者的疾病状态,选用更恰当的治疗,在现有技术手段下需要对患者体内肿瘤负荷进行精确的监测。在传统的检测手段中,形态学是最常用的方法,但骨髓瘤细胞往往成簇集分布,并且形态与正常浆细胞难以严格区分,这使得形态学难以精确反映浆细胞的比例和性质。骨髓瘤细胞分泌的单克隆免疫球蛋白的多少有较大的个体差异,并且有寡分泌型或不分泌型,使得血、尿蛋白电泳及免疫固定电泳等检测免疫球蛋白的方法使用受限。这就需要更加有效的检测手段对患者肿瘤负荷状态进行评估,防止治疗过度或治疗不足。

2 各种 MRD 检测手段在血液病中的应用对比

自 MRD 概念提出以来,国内外研究者均积极地将各种方法 MRD 的检测用于临床研究^[8-10],以验证其可行性和有效性,多数研究表明基于多参数流式细胞术(multiparameter flow cytometry, MFC),等位基因特异性寡核苷酸-聚合酶链式反应(Allele-specific oligonucleotide PCR, ASO-PCR)和二代测序/下一代测序(Next-generation sequencing, NGS)的 MRD 检测对临床治疗具有指导意义。这三种方法均有较高的敏感度和特异度,在急性髓系白血病,急性淋巴细胞白血病、MM 等血液病中均有相关应用研究,各有优劣。ASO-PCR 敏感度可达 10^{-6} ,但其检测依赖于融合基因、基因突变、和高表达的基因,对于无明显基因异常的恶性肿瘤难以检出,检测体系和技术要求相对高。NGS 为近些年迅猛发展的检测手段,敏感度在三种方法中最高,但成本高,需要一定平台,目前我国大多数医院难以全面开展。MFC 检测覆盖面广,结果直观,虽然各指标未完全标准化,但依然为现今临床最为普及的方法。而经过多年的技术更迭,现有的 MFC 发展到多激光多色,可通过同时标记多个抗体,根据不同的表型来区分正常浆

细胞及异常克隆浆细胞^[11],其检测敏感度最高可达到 10^{-5} (0.001%),不受浆细胞分布、单克隆球蛋白多寡等情况的影响。所以对于 MM 的 MRD 检测, MFC 为各实验室最常用的使用方法。

3 MFC 在 MM 患者 MRD 检测中的应用

3.1 MFC 检测方案及临界值选择 在浆细胞的鉴定中,CD38、CD138 的表达最具特异性,而异常的单克隆浆细胞表型通常有以下特征:(1) CD19, CD27, CD38 或 CD45 低表达;(2) CD56 过表达;(3) CD117 的异常表达^[12]。国内流式检测恶性浆细胞的抗体组合中除了 CD38(或 CD138)外一般要包括 CD45、CD56 和 CD19,各实验室设门方法不一致,但多基于 CD38、CD138、SSC 和 CD45 联合设门,常根据初诊免疫表型采用两组四色抗体组合 CD38/CD138/CD45/CD19 和 CD38/CD56/(或 CD117 等抗原)/CD45/CD19,进行检测^[13]。国外各实验室的检测方案亦未统一。为了解 MM 患者骨髓 MRD 的 MFC 检测情况,2013 年 Flanders 发表了对美国 30 家主要医疗机构进行问卷调查结果,该课题组向每家机构负责人发送包含 14 个相关问题的邮件,得到 26 家机构反馈,其中有 11 家开展此项目,获取细胞数从 10 万到 4 百万不等,敏感度和判断 MRD 的最低克隆也在较大范围波动,所使用的方案多包括 CD38、CD138、CD45、CD19,也有包括单克隆轻链, CD27 等其他方案^[14]。目前国内外各实验室在 MM 患者 MRD 的多参数流式检测方面尚未有统一方案。而对于 MRD 临界值的确定,Rawstron^[15]等的研究数据表示,将 10^{-4} 定为阴性临界值对患者体内肿瘤负荷状态进行定量评判要比单纯的阴性和阳性更确切,目前国内外多使用 10^{-4} 作为临界值,而随着八色多参数流式细胞术的不断发展,其敏感度较四色流式明显提高,理论上只要能够获取足够的细胞数,就可达到 10^{-5} ^[16]。

3.2 MFC 在 MM 患者 MRD 的检测应用情况

尽管方案未统一,MFC 在 MM 的 MRD 中的检测研究依然较多,具有重要的临床价值。早在 2002 年,就有 Rawstron AC 和 San MJF 两个课题组分别研究 MFC 在传统化疗后 MM 患者的 MRD 监测中的临床意义^[17-18]。之后有研究通过 MFC 检测 229 例新发 MM 移植后的 MRD,再次证明了 MFC 检测的 MRD 是最有价值的预后评判方法^[19]。来自英国医学研究会一项临床试验中,MM 患者造血干细胞移植后 100 d 检测 MRD 为阴性时,其无进展生存期(progression-free survival, PFS)和总生存期(overall survival, OS)均显著提高^[20]。一项来自欧洲骨髓瘤临

床试验研究报告提示高危组患者经过治疗达到 MFC 检测 MRD 阴性,其预后与标危组患者类似^[21]。在一项临床 II 期试验中,研究者同样证明了七色流式在 MM 患者 MRD 监测中的应用价值^[22],反映四色以上的 MFC 对 MRD 的检测更加灵敏。对于高敏感度的 MRD 检测方法如 MFC、PCR 和 NGS 的选择方面,Paiva B 等^[23]研究认为三者敏感度均较高,但 MFC 的应用范围更广,相对廉价,所需时间短,效率高。2014 年两个研究均对比了 MFC 和 PCR 在 MM 患者 MRD 检测中的有效性,两者结果有较好的相关性^[24-25]。就应用范围而言,MFC 相对于 NGS 更适合进行 MM 患者的 MRD 检测,但也有相当多的研究显示,MFC 的敏感度在多数情况下低于 PCR 和 NGS^[26-27],且 MFC 和 NGS 均存在未能标准化问题^[28]。最近的一项临床试验研究介绍了新一代流式技术(Next Generation flow, NGF)及相应的分析软件,通过检测 110 份达到非常好的部分缓解(VGPR)或 CR 的 MM 患者骨髓样本,对比其与传统八色流式检测结果,有 25% 的样本在传统八色 MFC 中为 MRD 阴性,而 NGF 测得 MRD 为阳性,如果治疗后能够达到 NGF 检测 MRD 阴性的患者可以有更佳的 PFS^[29],提出 NGF 检测在敏感度上有很大的进步。

3.3 MFC 的优缺点及技术进展 MFC 在检测 MM 患者骨髓标本的过程中有明显优势:(1)可以通过多种抗体组合鉴定出目的细胞;(2)可以短时间检测大量细胞;(3)可以对不同细胞群进行定量并对明确其相关抗原表达水平;(4)可以检测细胞表面抗原也可以检测细胞内抗原;(5)对患者骨髓中红系,B 系,髓系或其他细胞比例有直观的检测结果。但也有不少研究提出基于 MFC 的 MM MRD 检测也有其缺陷:(1)MFC 可能忽略部分原始程度较高、表型未曾明确但有发展成病理性浆细胞潜力的干细胞^[30],这些表型不成熟而缺乏某些抗原难以检出,从而导致假阴性;(2)分析 MFC 数据需要大量专业知识和经验;(3)传统流式的敏感度依然小于 PCR 和 NGS;(4)目前 MFC 检测 MRD 方案未能标准化。最近有研究表明 MM 患者骨髓内原始程度较高的这类干细胞数量极少,多超出检测范围^[31],对检测结果不造成可观的影响。MFC 分析对检测人员的经验性要求较高,使得不同实验人员的检测结果可能出现差异。新的计算机工具、软件或分析方法不断面世,使其有更高的可操作性和同行一致性^[32],相对于传统的四色 MFC,现在多数实验室正在更多地使用八色甚至十色的 MFC,其敏感度有了一定提

高。而对于标准化的问题,一方面国际骨髓瘤基金会开展的黑天鹅计划正对其标准化进行相关研究和制定,另一方面,NGF 在相关研究中对浆细胞的鉴定显得更易标准化,相对于传统 MFC 表现出了明显的优势。

4 小结

MM 的 MRD 检测方法多样,MFC 作为一种高效、高通量、高灵敏的技术已在全世界范围内多家机构得到应用,其针对患者治疗后体内正常及克隆性浆细胞的检测,可以一定程度上弥补传统检测方法的不足。近年随着技术发展,八色及十色的 MFC 逐渐替代四色以下的仪器,使其在实验室检测中更加便捷高效,灵敏度更高。但目前国内外基于 MFC 的 MRD 检测还没有完全标准化,要想全面用于 MM 患者治疗后病情评估及危险度分层,仍需要加强国内外各实验室交流,积极进行技术革新,对相关检测指标如抗体及检测时间点的选择进行统一,现已有相关机构进行此类研究,相信在不久的将来,MM 基于 MFC 的 MRD 检测能够在 MM 患者治疗中得到更加有效的应用。

参考文献

- [1] PHILIPPE M, MICHEL A, THIERRY F. Frontline therapy of multiple myeloma[J]. Blood, 2015, 125(20): 3076-3084.
- [2] KORDE N, KRISTINSSON SY, LANDGREN O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies [J]. Blood, 2011, 117(21): 5573-5581.
- [3] LANDGREN O, KORDE N. Treating myeloma: the future is already here[J]. Blood, 2012, 120(9): 1754-1756.
- [4] KUMAR SK, DISPENZIERI A, LACY MQ, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients[J]. Leukemia, 2014, 28(5): 1122-1128.
- [5] 张颖颖, 夏瑞祥. 减低与标准剂量硼替佐米联合地塞米松治疗多发性骨髓瘤的疗效对比分析[J]. 安徽医药, 2015, 19(5): 966-968.
- [6] 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.
- [7] ALMAWALI A, GILLIS D, LEWIS I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia[J]. Am J Clin Pathol, 2009, 131(1): 16-26.
- [8] OMMEN HB. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia: a review of the current evolving strategies[J]. T-her Adv Hematol, 2016, 7(1): 3-16.
- [9] HOKLAND P, OMMEN HB, MULE MP, et al. Advancing the

- Minimal Residual Disease Concept in Acute Myeloid Leukemia [J]. *Semin Hematol*, 2015,52(3):184-192.
- [10] RAWSTRON AC, FAZI C, AGATHANGELIDIS A, et al. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study[J]. *Leukemia*, 2016,30(4):929-936.
- [11] VAN DONGEN JJ, LHERMITTE L, BOTTCHE S, et al. Euro-Flow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes[J]. *Leukemia*, 2012,26(9):1908-1975.
- [12] PAIVA B, PUIG N, GARCIA -SANZ R, et al. Is this the time to introduce minimal residual disease in multiple myeloma clinical practice[J]. *Clin Cancer Res*, 2015,21(9):2001-2008.
- [13] 刘艳荣. 实用流式细胞术:血液病篇[M]. 北京:北京大学医学出版社,2010:9.
- [14] FLANDERS A, STETLER-STEVENSON M, LANDGREN O. Minimal residual disease testing in multiple myeloma by flow cytometry: major heterogeneity[J]. *Blood*, 2013,122(6):1088-1089.
- [15] 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.
- [16] RAWSTRON AC, DE TUTE RM, HAUGHTON J, et al. Measuring disease levels in myeloma using flow cytometry in combination with other laboratory techniques: Lessons from the past 20 years at the Leeds Haematological Malignancy Diagnostic Service [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016,90(1):54-60.
- [17] RAWSTRON AC, DAVIES FE, DASGUPTA R, et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation[J]. *Blood*, 2002,100(9):3095-3100.
- [18] SAN MJF, ALMEIDA J, MATEO G, et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome[J]. *Blood*, 2002,99(5):1853-1856.
- [19] PAIVA B, VIDRIALES MB, CERVERO 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.
- [20] RAWSTRON AC, CHILD JA, DETUTE 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.
- [21] 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.
- [22] ROUSSEL M, LAUWERS-CANCES V, ROBILLARD N, et al. Front-line transplantation program with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination as induction and consolidation followed by lenalidomide maintenance in patients with multiple myeloma: a phase II study by the Intergroupe Francophone du Myélome[J]. *J Clin Oncol*, 2014,32(25):2712-2717.
- [23] PAIVA B, VAN DONGEN JJ, ORFAO A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2015,125(20):3059-3068.
- [24] PUIG N, SARASQUETE ME, BALANZATEGUI A, et al. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry [J]. *Leukemia*, 2014,28(2):391-397.
- [25] SILVENNOINEN R, LUNDAN T, KAIRISTO V, et al. Comparative analysis of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry and enhanced ASO RQ-PCR in multiple myeloma [J]. *Blood Cancer J*, 2014,4(10):e250.
- [26] MARTINEZ-LOPEZ J, FERNANDEZ-REDONDO E, GARCIA-SANZ R, et al. Clinical applicability and prognostic significance of molecular response assessed by fluorescent-PCR of immunoglobulin genes in multiple myeloma. Results from a GEM/PETHEMA study[J]. *Br J Haematol*, 2013,163(5):581-589.
- [27] SARASQUETE ME, GARCIA-SANZ R, GONZALEZ D, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry[J]. *Haematologica*, 2005,90(10):1365-1372.
- [28] VAN DONGEN JJ, VAN DER VELDEN VH, BRUGGEMANN M, et al. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies[J]. *Blood*, 2015,125(26):3996-4009.
- [29] FLORES-MONTERO J, SANOJA-FLORES L, PAIVA B, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2017,31(10):2094-2103.
- [30] HUFF CA, MATSUI W. Multiple myeloma cancer stem cells[J]. *J Clin Oncol*, 2008,26(17):2895-2900.
- [31] THIAGO LS, PEREZ-ANDRES M, BALANZATEGUI A, et al. Circulating clonotypic B cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance [J]. *Haematologica*, 2014,99(1):155-162.
- [32] NI WM, HU BL, ZHENG CP, et al. Automated analysis of acute myeloid leukemia minimal residual disease using a support vector machine [J]. *Oncotarget*, 2016,7(44):71915-71921.

(收稿日期:2017-03-27,修回日期:2018-04-16)