

116 例多发性骨髓瘤免疫特征表型分析

刘 莉(武汉大学中南医院血液内科 430071)

【摘要】 目的 了解多发性骨髓瘤(MM)的免疫表型特征,以及 CD45、CD19 与临床特征的相关性。**方法** 采用三色流式细胞术对 116 例初诊 MM 病例进行免疫表型分析,并收集患者的实验室和临床指标。**结果** 116 例 MM 均表达 CD38,其他抗原 CD19、CD138、CD56、CD20、CD33、CD117、CD45 的阳性率分别为 10.3%、96.6%、60.7%、3.4%、70.0%、25.6%、17.2%,无 1 例表达 CD7、CD34。在 116 例 MM 中,胞浆 κ 轻链阳性率为 34.5%, λ 轻链阳性率为 48.3%。CD45 阳性患者分期较好,其表达缺失患者易出现骨破坏,微球蛋白、C 反应蛋白水平较高;CD19 表达与高分期有关,易出现贫血,微球蛋白、C 反应蛋白水平较高。**结论** 了解 MM 的免疫表型特点对此类疾病的诊断具有重要意义,其中 CD45、CD19 与分期等临床生物学特征有关,有助于判断预后。

【关键词】 多发性骨髓瘤; 免疫表型; 临床特征

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.10.024 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)10-1249-02

Analysis of immunophenotypic characteristics in 116 cases of multiple myeloma LIU Li(Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

【Abstract】 Objective To investigate the immunophenotypic characteristics of 116 cases of multiple myeloma (MM) and the relation between the immunophenotype and clinical features. **Methods** Immunophenotyping was performed in 116 patients of MM by three color multiparameter flow cytometry analysis using a panel of monoclonal antibodies. **Results** In 116 cases of MM, all cases expressed CD38, the positive ratios of other antigen such as CD19, CD138, CD56, CD20, CD33, CD117, CD45 were 10.3%, 96.6%, 60.7%, 3.4%, 70.0%, 25.6%, 17.2%, respectively. None of the MM cases expressed CD7, CD34. Lack of CD45 expression was associated with greater frequencies of destruction of bone, higher levels of β_2 -microglobulin and C reaction protein (CRP). Expression of CD19 was associated with higher frequency of advanced international staging system stages, higher levels of β_2 -microglobulin and CRP, greater frequencies of anemia. **Conclusion** The expression of CD45 and CD19 could be important clinical prognosis value for MM, which might be helpful for identifying the prognostic factors and guiding clinical treatment in MM.

【Key words】 multiple myeloma; immunophenotype; clinical features

多发性骨髓瘤(MM)是一种起源于 B 细胞的恶性克隆性浆细胞疾病,以骨髓中积聚大量恶性浆细胞并分泌单克隆免疫球蛋白和溶骨性病变为特征,但在临床中许多患者不完全具备这些典型特征。随着对 MM 认识的深入,骨髓瘤细胞的免疫表型特征及其对疾病的诊断、治疗和预后等方面的影响越来越引起人们的重视。本实验采用三色流式细胞术分析 MM 患者骨髓中骨髓瘤细胞的免疫表型特征,并分析其中 CD45 和 CD19 与临床生物学特征的关系,为临床明确诊断以及预后提供重要依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集武汉大学中南医院近 4 年收治的 MM 患者 116 例,MM 的诊断符合《血液病诊断及疗效标准》的诊断标准。所有患者均进行了 X 线片、 β_2 微球蛋白(β_2 -MG)、C 反应蛋白(CRP)、血肌酐、血常规检查。

1.2 试剂与仪器 所用单克隆抗体、溶血素、破膜剂均购自美国 BD 公司,包括 CD38、CD19、CD56、CD138、CD20、CD34、CD7、CD33、CD117、 κ 、 λ 、流式细胞仪为 Beckman FC500。

1.3 流式细胞术检测

1.3.1 膜抗原检测 取新鲜肝素抗凝骨髓液,调整细胞数至 $(4 \sim 10) \times 10^5/L$,取 100 μL 骨髓液加入单克隆抗体 20 μL ,室温避光孵育 15 min,加入溶血素溶解红细胞,磷酸盐缓冲液

(PBS)洗涤 2 遍后上机,分析 50 000 个骨髓瘤细胞表面抗原的表达情况。

1.3.2 胞浆抗原检测 将调整浓度后的 100 μL 骨髓液加入单克隆膜抗体 20 μL ,室温避光孵育 15 min,加入溶血素溶解红细胞,PBS 洗涤后加入 κ 、 λ 抗体避光孵育 15 min,PBS 洗涤 2 遍后上机。CD45/SSC 设门,以 mouse IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PerCP 作为同型对照,软件分析骨髓瘤细胞各种抗原的表达率。

1.4 判断标准 结果判断以细胞表面或细胞内抗原表达大于 20% 为阳性。

1.5 统计学方法 统计分析采用 SPSS18.0 软件,数据分析采用四格表检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MM 患者性别及年龄分布 116 例 MM 患者中,男 52 例,女 64 例;男性患者平均 58.7 岁,女性患者平均 60.1 岁,差异无统计学意义($P > 0.05$)。MM 的平均诊断年龄为 59.4 岁,其中 20 例(17.2%)发病在 70 岁以上,27 例(23.3%)发病在 60~70 岁,69 例(59.5%)发病在 60 岁以下,60 岁以下包括了 20 例 50 岁以下患者。

2.2 MM 的免疫表型分析 116 例 MM 中,CD38 阳性率为 100.0%,CD138 阳性率也较高,达 96.6%,其次阳性率由高到低分别为 CD33(70.0%)、CD56(60.7%)、CD117(25.6%),

CD19 和 CD20 的阳性率较低,均低于 20.0%,CD7 和 CD34 均为阴性表达,κ 轻链型占 34.5%,λ 轻链型占 48.3%。与典型的 MM 免疫表型不同,有 17.2%的病例 CD45 阳性,但荧光强度较正常浆细胞有所减弱。12 例患者 CD19 阳性或弱阳性,需要同正常浆细胞鉴别。CD45 与临床分期有关,阳性时分期较好。CD45 与贫血、肾损害无关;与 CD45 阴性组相比,CD45 阳性组骨破坏发生率较低,β₂-MG、CRP 水平较低。CD19 与临床分期有关,阳性时分期较差。CD19 阳性组更易发生贫血,微球蛋白、C 反应蛋白水平较高,骨破坏、肾损害的发生率与 CD19 阴性组相比差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 CD45、CD19 与临床相关表现的关系

临床表现		CD45		CD19	
		阳性 (n=20)	阴性 (n=96)	阳性 (n=12)	阴性 (n=104)
临床分期	Ⅱ期	14**	34	1*	47
	Ⅲ期	6	62	11	57
有骨破坏		7**	80	10	77
Hb<100 g/L		12	68	12*	68
Ccr>0.2 mg/L		15	75	9	81
β ₂ -MG>0.55 mg/L		5**	82	12*	75
CRP>0.6 mg/L		6**	80	12*	74

注:与阴性组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;Ccr 为肌酐清除率, Hb 为血红蛋白。

3 讨 论

本研究结果显示,116 例 MM 患者中,男性占 44.2%,女性占 55.8%,女性略高于男性,男女发病年龄未见明显差异,其中 20 例发病于 50 岁以下,平均诊断年龄为 59.4 岁,高于文献报道的平均发病年龄 65 岁,提示 MM 发病有逐渐年轻化的趋势。

多参数流式细胞术能对单个细胞进行多个抗原检测,可同时对细胞表面和细胞内抗原进行分析,并且其表达水平可以定量,因此流式细胞术能很好地识别并呈现骨髓瘤细胞的各种特征。通过检测细胞表面抗原表达的强弱、异常抗原的出现及细胞内免疫球蛋白的轻链限制性有无,可以把骨髓瘤细胞和正常浆细胞区别开来。正常浆细胞强表达 CD38 和 CD27,表达 CD138,无轻链限制性,CD45 和 CD19 与正常成熟 B 细胞相比表达较弱,不表达 CD56、CD117、CD28,不表达 B 系抗原 CD20、CD22。典型的 MM 细胞免疫分型特点为:异常表达 CD28、CD117、CD20、CD56、CD13、CD33;CD27 和 CD38 表达减弱,CD19 和 CD45 不表达,有轻链限制性。本研究与上述结论一致,但其中有 10.4%的患者表达 CD19,17.2%的患者表达 CD45,与秦燕等^[1]的结果较为一致,国外有报道骨髓瘤细胞 CD45 阳性率达到了 31.0%^[2],可能与人种差异有关。这些结果显示少部分 MM 患者的免疫表型不典型,需结合 CD38、CD56、kappa、lambda 等抗原的表达情况与正常浆细胞鉴别。这些免疫表型异质性的发现提示,骨髓瘤细胞的克隆可能经历一定程度的分化与成熟,上述标志物在早期或浆母细胞中可能会出现阳性^[3]。

CD45 和 CD19 对于 MM 患者是否有预后意义,近年来国外学者有过一些探索。Moreau 等^[2]对 95 例 MM 患者进行研究发现,浆细胞上缺失了 CD45 的患者生存期更短。Asosingh

等^[4]发现 CD45 阴性瘤细胞的小鼠骨髓中都出现了弥漫性瘤细胞浸润,其血管内皮细胞生长因子 mRNA 水平是 CD45 阳性瘤细胞的 4 倍多,提示病情进展。MM 患者中,CD45 或 CD19 阳性的比例较低,且因为样本数少的限制,目前国内还没有它们与临床分期及临床生物学指标关系的报道。本研究结果发现,骨髓瘤中浆细胞上的 CD45 表达与临床分期有关,CD45 阳性组分期较好,与 CD45 阴性组相比,骨破坏发生率更低,β₂-MG、CRP 水平较低,贫血、肾损害的发生率则无明显差异。CD45 阳性组 14q32 染色体易位发生率较低,如 t(4;14),t(14;16)等^[2],该染色体异常是多 MM 复发和预后的重要因素^[5]。Akt/PI3K 通路参与了骨髓瘤细胞的增殖,当 CD45 阳性时,Akt 不能活化,影响了骨髓瘤细胞的增殖,这些可能是 CD45 阳性者预后较好的内在机制^[6]。

CD19 是相对分子质量为 95×10³ 的糖蛋白,与 B 细胞的活化调节和发育调节相关,是在 B 细胞分化早期阶段后天获得的一个标记物,在 B 细胞成熟期间出现,在正常骨髓浆细胞大多数中仍然表达。CD19 阳性患者数量较少,但是与 CD19 阴性患者相比,CD19 阳性患者预后较差,无进展生存期和整体存活期,大约分别短 1 年和 2 年。Rawstron 等^[7]分析了 587 例经统一方案化疗后接受移植的 MM 患者,结果显示缺乏 CD56 表达,过表达 CD19、CD28 提示预后不良。本研究结果显示,CD19 与临床分期有关,阳性时分期较差。CD19 阳性时,β₂-MG、CRP 水平较高,更易发生贫血,与骨破坏、肾损害无关。β₂-MG、CRP、分期等临床指标都是 MM 的预后因素,因此,CD45 和 CD19 的表达情况与预后有一定的相关性,其发生机制还需要进一步的探索。

免疫表型检测是鉴别 MM 和其他浆细胞良性增生的重要手段,可以弥补形态学的不足。本研究通过对 116 例 MM 患者的免疫表型特征进行分析,了解 MM 的表型特点并分析了 CD45、CD19 和临床分期及临床生物学指标的关系,为此类疾病的诊断、治疗、预后评价等提供新的依据,并研究 CD45 和 CD19 的表达与骨破坏、肾损害、β₂-MG、CRP、贫血等之间可能存在的关系和临床治疗方案,减少患者痛苦及经济负担提供了一条新的线索。

参考文献

[1] 秦燕,丁润生,陆伟,等.多参数流式细胞术在多发性骨髓瘤诊断中的价值[J].交通医学,2009,23(2):137-138.

[2] Moreau P, Robillard N, Avet-Loiseau H, et al. Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma[J]. Haematologica, 2004, 89(5):547-551.

[3] Pérez-Andrés M, Almeida J, Martín-Ayuso M, et al. Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment[J]. Leukemia, 2005, 19(3): 449-455.

[4] Asosingh K, De Raeve H, Menu E, et al. Angiogenic Switch during 5T2 MM murine myeloma tumorigenesis: role of CD45 heterogeneity[J]. Blood, 2004, 103(8):3131-3137.

[5] Tricic RL. Cytogenetics of multiple myeloma(下转第 1252 页)

CO、血气氧分压(PaO₂)、二氧化碳分压(PaCO₂)差异无统计学意义($P>0.05$)。本组患儿均未发生头痛、皮疹、食欲减退、腹

泻、低血压、心动过速等不良反应。

表 1 治疗前后非侵入性血流动力学参数的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	心率(次/分)	sPAP(mm Hg)	CO(mL)	BNP(pg/mL)	PaO ₂ (mm Hg)	PaCO ₂ (mm Hg)
治疗前	140.4±5.0	69.9±18.3	36.2±16.7	7 799.2±6 451.6	71.5±16.3	30.1±8.7
治疗后	122.5±9.0	35.8±13.0*	37.7±18.4	1 887.7±1 263.7*	87.9±11.5	30.9±8.5

注:与治疗前相比,* $P<0.05$ 。

3 讨 论

HPAH 是由于空气稀薄,血液氧饱和度和氧分压均明显低于平原,慢性缺氧引起小肺动脉的血管增生和重构为主要特征,其发病机制复杂,主要包括肺血管壁持续收缩,内膜向心性或偏心性增殖和纤维化,中膜平滑肌过度增殖,外膜增厚,炎症细胞在血管周围聚集,原位血栓形成,造成肺血管阻力增加,最终引起心力衰竭和死亡的一种疾病^[6]。目前,儿童 HPAH 的治疗策略仍然以吸氧、利尿、强心等支持治疗为基础,根据急性血管扩张试验结果选择钙通道阻滞剂、前列环素类药物、内皮素受体拮抗剂或磷酸二酯酶-5 抑制剂等治疗手段,必要时可行房间隔切开术和心肺移植术等外科治疗。

前列地尔是一种具有多种药理活性的扩张剂,可靶向聚集病变部位,资料表明其具有较强的扩张肺部血管、降低肺动脉压力的作用^[6-7]。前列地尔为一种脂微球载体制剂,它是将前列腺素 E1 包裹在 0.2 μm 的脂微球内的新型靶向制剂,不仅较好地解决了前列腺素 E1 自身的缺陷,而且还衍生出新制剂。由于前列地尔采用了脂微球,故大大减少了肺灭活,并且前列地尔可以在病变处聚集;前列地尔在病变处的药物浓度可以达到普通制剂的 10~20 倍,且缓慢释放药物,从而可以维持 24 h 发挥药效^[8]。

本研究中 HPAH 患儿均来自四川西北高原地区(海拔 3 000 m 以上),并在高原现场静脉注射前列地尔注射液,用量为 5~7 ng/(kg·h),12 h 持续静脉注射,1 次/天,共 7~10 d。结果表明,注入后短期可明显降低重度 HPAH 患者 sPAP,改善心功能,且无严重不良反应发生。此外,本研究还观察到静脉注射前列地尔可降低 sPAP,改善心功能同时,还可使重度 HPAH 患儿心率下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。CO 有增加的趋势,同时血浆 BNP 水平下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。

静脉注射前列地尔靶向治疗重度 HPAH 安全有效,短期可改善心功能和非侵入性血流动力学参数,不良反应发生率。但由于本研究样本量小,且观察时间短,因此有待于进一步扩大样本数以及长期随访证实其对长期预后的影响。本研究中未发现使用前列地尔治疗比常规治疗有更多的不良反应,

其安全性与张建等^[9]研究相一致。

参考文献

[1] 张彦博,汪源,刘学良,等.人与高原[M].西宁:青海人民出版社,1996:349.

[2] Baliga RS,Macallister RJ,Hobbs AJ. New perspectives for the treatment of pulmonary hypertension[J]. Br J Pharmacol,2011,163(1):125-140.

[3] 崔建华,高亮,阳盛洪,等.伊洛前列素对缺氧性肺动脉高压自由基代谢的影响[J].西南国防医药,2012,22(3):243-245.

[4] Gali N,Hoeper MM,Humbert M. et al. guidelines for the diagnose is and treatment of pulmonary hypertension the task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European society of cardiology(ESC) and the European respiratory society(ERS),endorsed by the international society of heart and lung transplantation (ISHLT)[J]. Eur Heart J,2009,30:2493-2537.

[5] Loyd JE. Pulmonary arterial hypertension: insights from genetic studies[J]. Proc Am Thorac Soc,2011,8(2):154-157.

[6] 邓宗林.前列腺素 E1 静脉滴注治疗冠心病 40 例疗效观察[J].福建医药杂志,2010,32(1):136-137.

[7] 季瑛.前列地尔治疗急性脑梗死疗效观察[J].现代中西医结合杂志,2011,20(1):43-44.

[8] 张剑青,刘凌,舒敬奎,等.前列地尔联合低分子肝素治疗肺心病肺动脉高压的疗效观察[J].云南医药,2010,31(2):134-136.

[9] 张建,李建新,俞恒锡,等.随机盲法、阳性药对照评价前列地尔注射液治疗外周动脉闭塞性疾病的有效性和安全性多中心临床研究[J].中国药学杂志,2009,44(17):1350-1353.

(收稿日期:2012-12-28)

(上接第 1250 页)

[J]. Coll Antropol,2010,34(1):41-44.

[6] Descamps G,Pellat-Deceunynck C,Szpak Y,et al. The magnitude of Akt/phosphatidylinositol 3'-kinase proliferating signaling is related to CD45 expression in human myeloma cells[J]. J Immunol,2004,173(8):4953-4959.

[7] 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.

(收稿日期:2012-12-06)