

### 3 种实验技术在多发性骨髓瘤检测中的应用

芦 晗<sup>1</sup>, 王志银<sup>2</sup>, 李 强<sup>2△</sup> (1. 新乡医学院, 河南新乡 453000; 2. 新乡医学院第一附属医院, 河南新乡 453100)

**【摘要】** 目的 评估形态学、免疫组化和流式细胞检测技术在多发性骨髓瘤(MM)检测中的应用价值。方法 收集新乡医学院第一附属医院 2013 年 9 月至 2014 年 5 月 MM 患者 30 例, 采用免疫组化和流式细胞术分析骨髓瘤细胞免疫表型, 探讨其表达率与骨髓瘤细胞形态特征及相关检测指标的关系。3 种检测方法组间差异采用配对样本  $t$  检验, 率的比较用  $\chi^2$  检验。结果 形态学检测瘤细胞比例在 6.00%~95.00%, 免疫组化检测瘤细胞比例在 9.00%~88.00%, 流式细胞检测瘤细胞比例在 4.07%~87.42%。形态学与免疫组化、形态学与流式细胞之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 免疫组化与流式细胞之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 流式细胞术、免疫组化与形态学 3 种技术相结合, 更有助于 MM 的诊断及预后判断。

**【关键词】** 多发性骨髓瘤; 流式细胞术; 免疫组化; 形态; 免疫表型

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.09.039 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)09-1278-03

**Application of 3 kinds of experimental techniques in detection of multiple myeloma** LU Han<sup>1</sup>, WANG Zhi-yin<sup>2</sup>, LI Qiang<sup>2△</sup> (1. Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453000, China; 2. First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453100, China.)

**【Abstract】 Objective** To assess the clinical value of morphology, immunohistochemistry and flow cytometry detection techniques in the diagnosis of multiple myeloma(MM). **Methods** 30 cases of MM in the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College from September 2013 to May 2014 were collected for this study. The immunohistochemistry and flow cytometry were adopted to analyze the immunophenotyping of MM cells for investigating the relationship between the expression rates and MM cells morphological characteristics with the related detection indicators. **Results** In the morphology examination, the proportion of myeloma cells was 6.00%—95.00%, which by using immunohistochemistry was 9.00%—88.00% and which by using flow cytometry was 4.07%—87.42%. There were statistical differences between the morphology and immunohistochemistry and between the morphology and flow cytometry( $P < 0.05$ ), but there was no statistical difference between immunohistochemistry and flow cytometry( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The combination of flow cytometry, immunohistochemistry and morphology even more conduces to the diagnosis and prognosis judgment of MM.

**【Key words】** multiple myeloma; flow cytometry; immunohistochemistry; morphology; immunophenotype

多发性骨髓瘤(MM)是以 B 细胞起源, 骨髓中恶性浆细胞(瘤细胞)异常增生和聚集为特征的一种衰竭性、难以治愈的恶性肿瘤, 并伴有单克隆免疫球蛋白或其成分(M 蛋白)增多。MM 好发于 40 岁以上中老年人, 近年来, 随着我国人口老龄化加剧, MM 发病率逐年上升。由于在疾病早期其临床表现无特异性, 极易出现误诊和漏诊<sup>[1-2]</sup>。本文通过免疫组化、流式细胞术对传统骨髓细胞形态学诊断的 30 例 MM 进行细胞免疫表型分析, 并比较 3 种检测方法之间的差异, 以期对 MM 的早期诊断及疗效判断提供更可靠的检测方法。

#### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集新乡医学院第一附属医院 2013 年 9 月至 2014 年 5 月 MM 患者 30 例, 初诊 26 例, 复查 4 例; 其中男 17 例, 女 13 例, 男: 女 = 1.31 : 1; 年龄 43~78 岁, 中位年龄 64 岁。均符合《血液病诊断及疗效标准》的诊断标准<sup>[1]</sup>。初诊患者均进行骨髓穿刺、血清免疫固定电泳、流式细胞术及影像学等相关检查。

**1.2 仪器与试剂** 流式细胞仪为 BD FACSCalibur, 鼠抗人 CD38、CD45、CD138、CD19、CD56、胞浆 lambda(clambda)、胞浆

kappa(ckappa), 破膜剂、溶血素, 以上试剂均购自美国 BD 公司。免疫组化一抗用鼠抗人 CD138、Kappa 轻链、lambda 轻链单克隆抗体, 抗体购自河南赛诺特生物公司, 二抗用 Haopoly-HRP 鼠/兔通用二抗试剂盒购自上海杰浩生物技术有限公司。细胞形态学检测用瑞氏染液、免疫组化复染用苏木素染液, 均由本室配制。

#### 1.3 方法

**1.3.1 标本留取** 按常规方法进行骨髓穿刺, 取骨髓液 0.2 mL 涂片做形态学和免疫组化检测; 另抽取 2 mL 置于肝素抗凝管做流式细胞学检测, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^6/L$  备用, 48 h 内完成检验。

**1.3.2 骨髓细胞形态学检查** 挑选涂片良好的骨髓片行瑞氏染色, 显微镜下观察并分类计数 200 个有核细胞, 以浆细胞大于或等于 20% 并伴形态异常为 MM 的诊断标准<sup>[1]</sup>。

**1.3.3 免疫组化染色** (1) 染色步骤: 取新鲜干燥的骨髓涂片, 血膜周围用免疫组化笔画圈以避免抗体流失, 磷酸盐缓冲液(PBS)浸泡 5 min, 滴加封闭血清置室温孵育 10 min, 甩干, 分别滴加适量一抗(CD138、Kappa、lambda), 37 °C 孵育 1 h;

PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;滴加适量二抗,37 °C 孵育 30 min;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;DAB 显色 3~10 min,镜下观察,见有明显棕色沉淀为宜,自来水冲洗,苏木素复染,中性树胶封片、镜检。每次试验均进行阴性对照。(2)阳性结果判断:在低倍镜下找寻涂片均匀、薄厚适中、抗原表达明显的部位,高倍镜下细胞膜、胞浆或胞核显示棕黄色均匀细颗粒为阳性表达,CD138、lambda 阳性位于胞膜或胞浆,Kappa 阳性位于胞浆,阴性为不显色或显色浅淡。油镜下计数 200 个有核细胞,分别计算各抗体阳性细胞所占比例,以 10% 以上者为阳性。

**1.3.4 流式细胞仪分析** 按说明书提供的细胞表面抗原和胞内抗原方法标记,经荧光微球校准仪器及补偿后,用 Cell Quest 分析软件获取 20 000 个细胞,对数取样,通过 CD45 和 CD38/SSC 设门设定待检细胞群,分析各群细胞抗原表达情况。以目的细胞群抗原表达大于 10% 为阳性。

**1.4 观察指标** 所有病例确诊时的年龄、性别、临床表现、血红蛋白(Hb)、清蛋白(ALB)、肌酐(Cr)、血尿素氮(BUN)、血清钙浓度(Ca)、β<sub>2</sub> 微球蛋白(β<sub>2</sub>-MG)、红细胞沉降率(ESR)、血清

及尿液免疫固定电泳、尿本周蛋白(BJP)等各项检查结果逐一记录并进行回顾性分析。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS20.0 软件处理,率的比较用 χ<sup>2</sup> 检验,均数组间差异用配对样本 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 形态学检查** 26 例初诊患者均有不同程度的正色素性贫血及免疫球蛋白增多,其中 IgG 型 19 例,IgA 型 7 例。骨髓细胞形态学结果主要为异常浆细胞增生,并伴有质的改变。另外 4 例复查患者形态学检查均未达到完全缓解。

**2.2 免疫组化结果** 30 例 MM 患者 CD138 阳性表达率达到 100.0%,22 例 Kappa 阳性,8 例 lambda 阳性(表 1)。

**2.3 流式细胞检查结果** 对目的细胞群抗原 CD38、CD138、CD19、CD45、Kappa、lambda 进行研究,结果发现,30 例 MM 中 CD19 阴性表达率 100.0%;CD45 表达异常(阴性、部分阳性);CD38、CD138 阳性表达率均达到 100.0%(表 1)。

表 1 免疫组化和流式细胞术在 30 例 MM 异常浆细胞抗原表达形式比较[n(%)]

检测技术	抗原表达形式	CD138	Kappa	lambda	CD38	CD19	CD45
免疫组化	阴性	—	—	—	—	—	—
	部分阳性	—	—	—	—	—	—
	阳性	30(100.0)	22(73.3)	8(26.7)	—	—	—
流式细胞术	阴性	—	—	—	—	30(100.0)	28(93.3)
	部分阳性	—	1(3.3)	—	—	—	2(6.7)
	阳性	30(100.0)	21(70.0)	8(26.7)	30(100.0)	—	—

注:—表示无数据。

**2.4 3 种检测方法比较** 30 例 MM 患者形态学检查骨髓瘤细胞中位数比例为 58.00%(6.00%~95.00%),免疫组化检测比例为 34.55%(9.00%~88.00%),流式细胞检测比例为 35.74%(4.07%~87.42%)。对 3 种方法检测到的异常细胞群所占比例进行分析,形态学与免疫组化和流式细胞分析测定的异常细胞群比例细胞检查之间差异有统计学意义(P<0.05),免疫组化与流式细胞检查之间差异无统计学意义(P>0.05)。另外形态学与流式细胞术之间有更好的相关性(r=0.957)。

**2.5 免疫组化与流式细胞检查诊断敏感性比较** 30 例 MM 患者免疫组化结果阳性 28 例,阳性率为 93.3%(28/30),流式细胞检查结果阳性 27 例,阳性率为 90.0%(27/30),两种方法差异无统计学意义(χ<sup>2</sup>=0.215,P>0.05)。

**2.6 轻链限制性检测** 30 例 MM 进行流式检测 Kappa 限制性表达 22 例,lambda 限制性表达 8 例。

**2.7 CD138 抗原与实验室检测指标的关系** 30 例 MM 患者中 CD138 的表达与临床实验室检测指标(C 反应蛋白、BUN、Ca、ALB、β<sub>2</sub>-MG、ESR)的改变之间差异无统计学意义(P>0.05)。

**3 讨 论**

MM 在我国发病率约为 1/10 万,在血液系统肿瘤发病率仅次于恶性淋巴瘤<sup>[3]</sup>。在实验室检测中,骨髓形态学检测是 MM 诊断最基础、最普遍的检测手段,在一定程度上可以反映治疗效果。但骨髓瘤细胞常呈灶状分布,临床上为了提高诊断阳性率需要进行多次骨髓穿刺,并且当骨髓稀释时也影响诊断

敏感性<sup>[4]</sup>;在鉴别诊断时主观性强,灵敏度低。然而在多数医院对于 MM 诊断仍以形态学为主,使疾病确诊及疗效判断都受到不同程度的限制。因此,本试验采用免疫组化和流式细胞检查两种免疫检测方法弥补形态学诊断的不足。

免疫组化根据抗原抗体特异性结合的原理可以提高诊断的准确性,鉴别良、恶性疾病,以及判断疾病恶性程度,这点优于传统形态学检测。据报道,CD19 在所有 B 细胞和大多数正常浆细胞均有表达,而在 MM 中不表达<sup>[5-6]</sup>;CD138 在骨髓造血前体细胞和淋巴细胞中无表达,但在 MM 浆细胞中为阳性,具有相对特异性,便于识别;而 CD38 在髓系或 B 淋巴系统前体细胞及成熟淋巴细胞、单核、粒细胞均有不同程度的表达,目前认为 CD138 是浆细胞最特异的指标<sup>[7]</sup>。所以本试验免疫组化选择 CD138 联合 Kappa 轻链、lambda 轻链单克隆抗体作为识别异常浆细胞的标志物。在 30 例 MM 患者中,CD138 阳性表达率达 100.0%,Kappa 阳性率为 73.3%,lambda 阳性率为 26.7%,与血清免疫固定电泳结果一致。

近年来,流式细胞检测技术日渐成熟,当骨髓稀释时,流式细胞检查可以等比降低骨髓浆细胞比例,优于形态学检测<sup>[8]</sup>。在正常骨髓中,现代多参数流式细胞仪可以足够敏感地检测出至少 0.01% 的非典型浆细胞,也能对单个细胞进行多个抗原检测,同时对细胞表面和胞内抗原进行分析,并且对检测细胞的表达水平可以定量,因此流式细胞检查可以很好地识别并呈现异常浆细胞各种特征<sup>[9-10]</sup>。通过检测细胞表面抗原表达强弱、胞内免疫球蛋白是否有轻链限制性及异常抗原的出现,可以把正常和异常浆细胞区分开来。正常浆细胞强表达 CD38、

CD138, 表达 CD45, 大部分细胞表达 CD19, 不表达 B 淋巴系抗原 CD20、CD22, 无轻链限制性。典型 MM 细胞的免疫表型特点为: 异常表达 CD56, CD38 表达强度稍弱, 部分表达 CD117、CD33、CD20, 不表达 CD19, CD45 表达弱阳性或阴性, 有轻链限制性<sup>[11]</sup>。本试验中 CD138 和 CD38 阳性表达率均为 100.0%。CD19 均为阴性表达, CD45 阴性表达率为 93.3%, 轻链限制性表达, 与上述结论基本一致, 但其中有 2 例骨髓涂片和免疫组化均超过 10%。而流式细胞检查未能检出骨髓瘤细胞, 对流式细胞检查标本涂片镜检未见瘤细胞, 这可能是由于瘤细胞灶性分布, 流式细胞检查标本不一定采集到骨髓瘤细胞而漏检; 也有可能是在采集流式细胞检查标本时由于技术问题混入较多血液所致。

免疫组化和流式细胞检查联合检测的优势在于通过 lambda/Kappa 轻链限制性表达确定浆细胞是否为单克隆性, 从而与反应性浆细胞增多鉴别, 这在区分浆细胞良、恶性方面有重要作用, 二者敏感性远远高于形态学检测<sup>[12]</sup>。对于 30 例 MM 患者同时进行形态学、免疫组化和流式细胞检查检测得到以下结果: 骨髓涂片浆细胞比例与免疫组化、流式细胞检查分析测定的异常细胞群比例差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且形态学与流式细胞检查之间有更好的相关性 ( $r = 0.957$ ), 免疫组化与流式细胞术差异无统计学意义。另外对免疫组化和流式细胞检查比较分析, 两种方法检测阳性率均较高 (分别为 93.3% 和 90.0%), 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 由此说明免疫组化与流式细胞检查对 MM 确诊都有检测意义, 且均有明显的 lambda/Kappa 轻链限制性表达, 阳性表达率一致, 有助于鉴别诊断。

流式细胞检查和免疫组化在诊断 MM 方面就灵敏度而言高于传统的形态学检测, 但不能评判骨髓增生程度及肿瘤浸润程度, 而且国内外少见这两种方法对 MM 的诊断标准, 导致各实验室检测结果存在差异。可根据患者具体情况, 采用三者联合以提高阳性诊断率及疗效监测。期待在不久的将来流式细胞检查技术和免疫组化可以纳入 MM 常规诊断和评估中。

参考文献

[1] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 232-235.

(上接第 1277 页)

鉴别诊断的临床应用上具有很大的发展潜力。

参考文献

[1] 李春雨, 王艳, 车延鹏, 等. 三维超声技术在乳腺肿物诊断中的应用价值[J]. 中国医药导报, 2011, 8(20): 150-151.  
 [2] Fischer T, Filimonow S, Hamm B, et al. Characterization of sonographically detected breast lesions using three-dimensional data sets[J]. Rofo, 2006, 178(12): 1224-1234.  
 [3] 郭乐杭, 吴蓉, 马方, 等. 三维超声成像在乳腺浸润性导管癌诊断中的应用[J]. 同济大学学报: 医学版, 2012, 33(2): 76-79.  
 [4] 卢晓潇, 曹霞, 黄雪兰, 等. 三维超声 BI-RDAS-US 在乳腺结节性病变中的应用价值[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2012, 26(10): 995-997.

[2] 杨璐, 徐俊荣, 顾兵. 免疫固定电泳技术对多发性骨髓瘤的分型诊断及预后判断价值[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(16): 1975-1976.  
 [3] 田永芳, 贾海英, 田洪燕. 47 例多发性骨髓瘤综合分析[J]. 临床血液学杂志: 输血与检验版, 2010, 23(4): 473-474.  
 [4] 徐晓月. 两种不同的骨髓检验方法在多发性骨髓瘤诊疗中的价值[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(22): 2998-2999.  
 [5] Cho YU, Park CJ, Park SJ, et al. Immunophenotypic characterization and quantification of neoplastic bone marrow plasma cells by multiparametric flow cytometry and its clinical significance in korean myeloma patients[J]. J Korean Med Sci, 2013, 28(4): 542-549.  
 [6] 姜永芳, 戴海滨, 董家蓄, 等. 多发性骨髓瘤中骨髓瘤细胞免疫表型检测及其意义[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2011, 45(5): 448-450.  
 [7] 郜晓. 多发性骨髓瘤免疫表型流式细胞术研究新进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(4): 1083-1086.  
 [8] 邢娟娟. 30 例多发性骨髓瘤的流式细胞分析[J]. 实用临床医学, 2013, 14(5): 26-27.  
 [9] de Tute RM, Jack AS, Child JA, et al. A single-tube six-colour flow cytometry screening assay for the detection of minimal residual disease in myeloma[J]. Leukemia, 2007, 21(9): 2046-2049.  
 [10] 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.  
 [11] 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: 189-190.  
 [12] 曹方方, 陈芳, 胡延平, 等. 多参数流式细胞术测定多发性骨髓瘤细胞免疫标记的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(3): 620-623.

(收稿日期: 2014-11-13 修回日期: 2015-01-17)

[5] Cho N, Moon WK, Cha JH, et al. Differentiating benign from malignant solid breast masses: Comparison of two-dimensional and three-dimensional US [J]. Radiology, 2006, 240(1): 26-32.  
 [6] 吕斌, 张维, 肖芳. 二维超声及实时三维超声鉴别诊断乳腺肿块良恶性的临床价值[J]. 临床超声医学杂志, 2011, 13(9): 637-638.  
 [7] 姜妮妮, 郑永平. 三维超声成像在乳腺癌诊断中的现状与发展[J]. 中国医疗设备, 2012, 27(3): 6-13.  
 [8] 吕琛, 黄品同, 莫国强, 等. 三维超声重建冠状断面评估乳腺病灶的初步研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2012, 21(11): 1009-1010.

(收稿日期: 2014-11-19 修回日期: 2015-01-11)