

• 论 著 •

银染原位杂交技术在多发性骨髓瘤微小残留病灶检测中的临床意义*

金 捷,程诗迪,王 劲,李 郑,李 响,周 旭,刘 瑜

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所血液科,重庆 400042)

摘要:目的 探讨应用银染原位杂交(SISH)技术结合骨髓病理学方法检测多发性骨髓瘤(MM)患者骨髓微小残留病灶(MRD)的临床意义。方法 对 36 例于该院多次住院化疗的 MM 患者,在第 4 疗程和第 8 疗程结束时分别取骨髓活检标本,以骨髓病理活检+免疫组织化学法测 CD138,同时采用 SISH 法检测 κ 、 λ 基因扩增情况,以此评估 MM 患者的骨髓 MRD。结果 36 例化疗后 MM 患者病理活检所见浆细胞比例在第 4 疗程和第 8 疗程结束时分别为 25.5% 和 12.8%,差异有统计学意义($P < 0.01$),免疫组织化学法测 CD138⁺ 分别为 ++ 和 +/-, SISH 检测 κ 、 λ 基因扩增率分别为 28.3% 和 7.3%,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明该技术监测不同疗程 MM 患者的 MRD 差异显著。另外,在治疗有效的 22 例患者中, SISH 测得 κ 、 λ 基因扩增水平为 4.1%,显著低于进展组 13.5%,差异有统计学意义($P < 0.05$),并呈现出疗效越差,扩增率越高的变化趋势,与血清游离轻链测定中 κ/λ 比值变化一致。结论 SISH 技术结合骨髓病理学方法具有观察视野广、浆细胞计数稳定、基因信号准确易测等优点,对 MM 患者的疗效评估和治疗策略选择有临床意义。

关键词:多发性骨髓瘤; 银染原位杂交; 骨髓病理学; 微小残留病灶

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.09.001 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)09-1203-03

The clinical significance of silver-enhanced in situ hybridization techniques in detection of minimal residual disease in patients with multiple myeloma*

JIN Jie, CHENG Shidi, WANG Jin, LI Zheng, LI Xiang, ZHOU Xu, LIU Yu

(Department of Hematology, Daping Hospital Affiliated of Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical significance of silver-enhanced in situ hybridization (SISH) combined with bone marrow biopsy pathology in detection of minimal residual disease (MRD) in patients with multiple myeloma (MM). **Methods** The bonemarrow of 36 patients with MM were detected by combined techniques including biopsy and SISH, and CD138 protein evaluated by immunohistochemistry (IHC) and κ/λ gene amplification evaluated by SISH in plasmacells. **Results** After the fourth and eighth course of chemotherapy, the rates of plasmacells in MM patients were 25.5% and 12.8% respectively in bonemarrow biopsy ($P < 0.01$). CD138 protein evaluated by IHC were ++ and +/- . κ and λ gene amplification rates were 28.3% and 7.3% respectively ($P < 0.01$). Furthermore, the average rate of κ/λ gene amplification was 4.1%, which was significantly lower than the rate of progressive patients (13.5%) ($P < 0.05$). The results of MRD detection showed that the higher change of κ/λ gene amplification rate, the worse curative effect, just like the change of free light chains (FLC). **Conclusion** The new methods of detection MRD in MM patients have many advantages, including wider visual fields and well-distributed of plasmacells in bone marrow biopsy, more intuitive and convenient observation and accurate gene signs. It is significant of this new innovative method to be widely used in assessment of curative effect and guiding chemotherapy.

Key words: multiple myeloma; silver-enhanced in situ hybridization; bone marrow biopsy pathology; minimal residual disease

多发性骨髓瘤(MM)是一种浆细胞恶性克隆的血液系统肿瘤,其特点是骨髓中大量原始或异常浆细胞浸润,同时分泌大量单克隆免疫球蛋白或其片段(M蛋白),导致相关器官或组织损伤。初诊 MM 患者在接受多次化疗后需进行疗效评估以期获得完全缓解(CR),CR 的一般标准是骨髓浆细胞数小于 5%,血清和尿中 M 蛋白消失。虽然达到 CR 被认为是预后良好的指标,但大多数患者最终难免复发,其根本原因为 MM 患者体内仍残留的少量骨髓瘤细胞,即微小残留病灶(MRD),MRD 的数量不仅是一个预后因素,也是评价治疗效果的指标^[1]。近期本院开展银染原位杂交法(SISH)检测 κ 和 λ 基因扩增技术,并结合骨髓病理学以及免疫组织化学测 CD138⁺ 细胞的方法,共同检测不同疗程时期 MM 患者的骨髓 MRD,现总结所得临床经验和意义如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1—12 月在本院血液科多次住院化疗的 36 例 MM 患者,诊断依据符合《血液病诊断及疗效标准》。患者中男 23 例,女 13 例;年龄 46~72 岁,平均 61.8 岁。初治时骨髓形态学检查瘤细胞比例为 13%~45%,排除浆细胞白血病。MM 临床分期参考 Durie-salmon 分期系统,本研究中 MM 患者 I 期 8 例,II 期 12 例,III 期 16 例。根据血清异常免疫球蛋白的不同,可分为以下几种类型: IgG 型 14 例, IgA 型 6 例, IgM 型 4 例;轻链型 9 例及非分泌型 3 例。36 例患者均于本院住院化疗 8 个疗程以上,化疗方案包括:长春瑞滨+吡柔比星+地塞米松(VAD)12 例,长春瑞滨+吡柔比星+环磷酰胺+地塞米松(VACD)15 例,硼替佐米+吡柔比星+地塞米松(PAD)9 例。出院后患者均按疗程服用沙利度

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81500175)。

作者简介:金捷,女,主治医师,主要从事血液病学方面的研究。

胺 50~200 mg/d。所有患者均在在第 4 个疗程和第 8 个疗程结束时分别抽取骨髓行细胞学涂片和流式法细胞计数,并行骨髓活检术留取活检标本,用于检测其骨髓中瘤细胞的 MRD 水平。

1.2 方法

1.2.1 骨髓病理切片和免疫组织化学 取骨髓病理标本材长约 1 cm,所有标本均经 10%中性甲醛溶液固定,石蜡包埋。切取 4 μm 厚连续切片,后行苏木精-伊红染色观察骨髓病理形态,计数浆细胞数量。另外,按照免疫组织化学操作步骤程序(烤片、脱蜡、热修复、过氧化氢封闭后滴加一抗、37℃ 孵育 24 min、滴加二抗;37℃ 孵育 24 min;最后双花扁豆凝集素显色,苏木素复染),设置阳性及阴性对照组。阳性对照片滴加一抗 CD138 抗原;阴性对照组滴加磷酸盐缓冲液,染色程序结束后脱水封片,光镜视野下棕色显色细胞为 CD138⁺ 细胞;计数 200 个有核细胞,计数棕色浆细胞的比例,定义大于或等于 50 个为 +++ ,20~50 个为 ++ ,20 个左右为 + ,小于 20 个为 +/-。

1.2.2 SISH 检测方法 采用骨髓病理切片标本,再按 SISH 操作步骤程序,用银染色标记的探针标记 κ 和 λ 基因,显色后苏木素复染,最后自然风干后封片,镜下观察。细胞核内黑色染色为 κ 和 λ 基因扩增,计数 100 个细胞,统计黑色显色的细胞百分比即为基因扩增率。所采用试剂兔抗人 CD138 多克隆抗体、κ 和 λ 探针、银染检测试剂盒、清洗缓冲液等均购自美国罗氏诊断产品有限公司。显微镜型号 BX51 购自日本 Olympus 公司。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

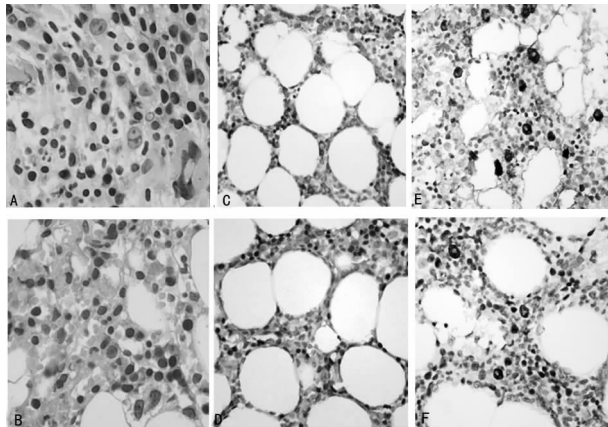
2 结果

2.1 骨髓病理 结合 SISH 技术检测骨髓瘤 MRD 结果判读由图 1 可见,骨髓病理切片光镜下视野良好,HE 染色清晰,骨髓有核细胞增生正常,均匀分布于骨小梁中及周围网状组织中。图 1C 和图 1D 分别显示的是经免疫组织化学 CD138 染色后显棕色的浆细胞在 MM 患者骨髓中的分布情况,图 1E 和图 1F 分别显示的是不同 MM 患者骨髓浆细胞中 κ 和 λ 基因扩增情况,图中 SISH 标染后细胞在光镜下呈黑色显色。

2.2 SISH 技术与骨髓细胞学、流式细胞学计数(FCM)检测 MRD 比较 36 例 MM 患者经化疗后,分别于第 4 个和第 8 个疗程结束时,抽取骨髓行骨髓细胞学计数和 FCM,并留取骨髓活检标本行病理组织化学和 SISH 检测。分别采用以上不同方法检测骨髓 MRD 的情况。将骨髓病理活视野所见浆细胞比例,组织化学染色后 CD138⁺ 细胞阳性率和 SISH 方法检测 κ 和 λ 基因阳性率(扩增情况)列出,并与骨髓涂片所见浆细胞计数,以及 FCM 仪测得骨髓中异常浆细胞水平作比较。结果显示,在第 8 疗程时,各组测得残留病灶数值均显著低于第 4 疗程组,骨髓病理报告组中可见浆细胞阳性率分别为 12.8% 和 25.5%,在 SISH 方法组检测 κ 和 λ 基因扩增情况分别为 7.3% 和 28.3%,两者比较差异均有统计学意义($P < 0.01$);免疫组织化学测 CD138⁺ 分别为 ++ 和 +/-;骨髓涂片组所测细胞计数分别为 8.5% 和 17.3%,但两组差异无统计学意义($P > 0.05$);FCM 组分别为 2.7% 和 7.4%,两者差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 SISH 检测基因扩增水平与疗效分析 36 例骨髓瘤患者,在第 8 疗程结束时,疗效评估及其血清游离轻链(FLC)测量定义参照 MM 最新的国际统一疗效标准^[2]。按照疗效评估分组可见,CR 组有 10 例,其 κ 和 λ 基因扩增水平为 2.3%;PR 组 12 例,其 κ 和 λ 基因扩增水平为 5.8%;无效组 8 例,基因扩增

水平为 10.4%;进展组患者 6 例,基因扩增水平为 13.5%,由此可观察到获得不同疗效的患者,κ 和 λ 基因扩增水平变化明显,即疗效越差,κ 和 λ 基因扩增则越增高的趋势。其中 36 例患者中总有效(CR+PR)例数 22 例,这部分治疗效果理想的患者基因扩增水平为 4.1%,显著低于进展组 13.5%,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明 SISH 方法测得的 κ 和 λ 基因扩增水平与疾病演变和治疗效果密切相关。同时本实验测定了血清 FLC 中 κ/λ 比值变化情况,其标志着血清中 M 蛋白及其片段的水平变化,参考范围为 0.26~1.65,是 MM 患者治疗取得缓解非常有意义的评估指标^[3]。结果显示,CR、PR、无效和进展的 κ/λ 值分别为 0.46、0.67、1.22 和 1.85。且治疗效果越差,κ/λ 比值同样出现升高的变化,这与 κ 和 λ 基因扩增的变化趋势是一致的。见表 1。



注:A 为治疗后未获得良好缓解的 MM 患者,可见其骨髓中散在分布浆细胞数目较多;B 为缓解良好的患者,骨髓中浆细胞形态和数目正常;C 为未获得良好缓解的 MM 患者骨髓中棕色浆细胞密集分布,CD138 阳性约为 ++;D 为缓解良好的患者骨髓中棕色浆细胞则少见;E 为未获得良好缓解的 MM 患者骨髓中存在较多显黑色细胞,提示 κ 和 λ 基因扩增水平较高;F 为见缓解良好的患者骨髓中黑色细胞明显减少,则提示 κ 和 λ 基因扩增显著降低。

图 1 骨髓病理结合 SISH 检测 MM 患者的骨髓情况

表 1 第 8 疗程结束时 SISH 检测 κ 和 λ 基因扩增率与疗效分析

疗效	n	κ 和 λ 基因扩增阳性率(%)
CR	10	2.3*
PR	12	5.8*
无效	8	10.7
进展	6	13.5
总有效	22	4.1*

注:与进展组相比,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

MM 特征是浆细胞恶性增殖并分泌过量的单克隆免疫球蛋白或多肽链亚单位,轻链产生贯穿了浆细胞发育成熟的全过程。因此,MM 的 MRD 是一群既有克隆性又具备分泌活性的异常浆细胞群。目前临床判断化疗后疾病缓解程度,主要依靠骨髓细胞形态学和对血/尿中 FLC 水平的动态监测^[4]。但由于 MM 细胞具有黏性大、局灶分布等特征,常导致抽吸涂片时存在肿瘤负荷低估或者波动较大的问题,且部分骨髓瘤细胞和正常浆细胞之间亦在形态上难以区分,因此涂片中异常浆细胞比例测量精准性不够。本研究设计方法,以骨髓活检病理切片

作为实验载体,取材更广泛,所观察到骨髓视野更广阔,肿瘤细胞的浸润程度和分布形态更直观。同时,本研究还结合免疫组织化学法将表达的 CD138 的浆细胞呈棕色显色来进一步确认浆细胞数量变化情况。CD138 又名 syndecan-1,作为浆细胞特异性标志之一,参与瘤细胞发生、增殖以及调节骨髓瘤细胞与基质间的黏附作用;而随着 MM 细胞的凋亡减灭,膜蛋白 CD138 则下调或丢失,因此 CD138 可反映 MM 患者体内肿瘤细胞的负荷^[5-6]。本研究中,36 例化疗后 MM 患者在第 8 疗程结束时,骨髓病理切片显示浆细胞和 CD138 染色细胞计数均与第 4 疗程比较降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明该方法对 MM 患者不同疗程骨髓 MRD 的残留程度有良好的评估;而骨髓涂片细胞计数可能因取材灶性分布局限及瘤细胞黏稠性强等原因,导致测量数值波动较大,差异无统计学意义($P < 0.05$)。

FCM 是诊断血液肿瘤 MRD 的常用手段,其灵敏度可达 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 。针对 MM 患者治疗的多因素分析显示 MRD 状态是无病生存期和总存活率的独立预后因子^[7]。然而由于 MM 瘤细胞的黏附特性、免疫组合方式和如何设门等不确定因素,FCM 检测并没有成为评估 MM 患者 MRD 的“金标准”^[8]。再者,有报道提示在 MM 患者治疗过程中,MRD < 0.0001 转阴率极低;在治疗随访 18 个月时,MRD 阳性仍有 95.6%,平均治疗 24 个月以上,才出现完全转阴情况,这使其疗效评估和指导诊治的意义大大受限^[9]。本实验中 36 例化疗后 MM 患者 FCM 检测 MRD 在第 4 疗程和第 8 疗程结束时分别为 7.4% 和 2.7%,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示随着化疗深入,虽然 MRD 逐渐下降并与治疗前比较差异有统计学意义($P < 0.05$),但距离阴性指标还有不小差距;而两组治疗组患者 MRD 持续阳性,对疾病复发的预测和下一步治疗方案的制订指导意义有限,因此本课题组考虑是否采取多种手段结合 FCM 更有效的检测 MM 患者的骨髓 MRD。

SISH 是近年发展起来的一种基因检测新技术,利用先进的银沉淀方法,通过银染色增强的原位杂交技术准确定位于浆细胞的核酸上,以黑色显色测试染料目标 DNA,能够得到非常精确的色素信号,也是目前唯一的全自动原位杂交分析方法。与荧光原位杂交(FISH)技术检测基因扩增比较,其符合率达到 94%~99%^[10]。研究表明,虽然用 FISH 检测 MM 患者 MRD 在敏感度上不及 PCR,但已可明确检测出骨髓浆细胞遗传学异常的持续存在。在骨髓瘤初发和复发时有大量的染色体异常,在复发时可观察到相同的染色体异常。用 FISH 的方法连续检测 MM 不同时期的细胞遗传学改变,在将来有可能受到广泛的关注^[11]。但与 FISH 比较,SISH 更具有在光镜下更直观的观察细胞组织学形态的优势,而检测耗时只是 FISH 检测所需时间的一半。因此,SISH 完全可以作为常规检测技术用于肿瘤基因扩增状态检测。本研究中采用 SISH 检测 κ 、 λ 基因扩增,在第 4 疗程和第 8 疗程结束时分别为 28.3% 和 7.3%,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明在浆细胞的核酸层面监测轻链基因的变化随着治疗深入逐渐减少,并且与血清 FLC 的变化一致,说明是该方法可作为检测 MRD 的重要手段。

本研究中所采用检测 MM 患者 MRD 方法,是以骨髓活检病理切片作为实验载体,直观的检测出组织化学染色后 CD138⁺浆细胞数目,同时结合 SISH 技术检测 κ 和 λ 基因扩增情况的组合技术。该技术兼顾细胞计数和轻链基因状态两种指标的判读,临床应用中表明对 MM 患者 MRD 的检测具有

的良好准确度和敏感度。国外报道一例采用细胞质免疫球蛋白-FISH 方法检测浆细胞内 κ 和 λ 基因扩增技术基因突变 70 例,提示 DNA 探针原位杂交技术用于浆细胞内轻链蛋白基因检测敏感性高,临床符合率高,但 SISH 方法检测骨髓瘤中致病基因尚未见报道^[12]。因此该技术具有较好的创新性,在临床应用中与骨髓细胞学和流式细胞学检测相结合,更丰富了 MM 患者病程中 MRD 的监测和治疗评估体系,具有良好的临床意义和应用前景。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 陈海飞,侯健.多发性骨髓瘤国际统一疗效标准解读[J]. *国际输血及血液学杂志*, 2007, 30(4):370-371.
- [3] Paiva B, Martinez-Lopez J, Vidriales B, 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.
- [4] Kapoor P, Kumar SK, Dispenzieri A, et al. Importance of achieving stringent complete response after autologous stem-cell transplantation in multiple myeloma[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(36):4529-4535.
- [5] Lamorte S, Ferrero S, Aschero S, et al. Syndecan-1 promotes the angiogenic phenotype of multiple myeloma endothelial cells[J]. *Leukemia*, 2012, 26(5):1081-1090.
- [6] Yoo EM, Trinh K R, Tran D, et al. Anti-CD138-Targeted Interferon Is a Potent Therapeutic Against Multiple Myeloma[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2015, 35(4):281-291.
- [7] Fulciniti M, Munshi NC, Martinez-Lopez J. Deep Response in Multiple Myeloma: A Critical Review[J]. *Biomol Res Int*, 2015, 2015:832049.
- [8] Paiva B, Garcia-Sanz R, San Miguel JF. Multiple Myeloma Minimal Residual Disease[J]. *Cancer Treat Res*, 2016, 169:103-122.
- [9] 古健,肖平,陈焯文.微小残留病灶监测在多发性骨髓瘤的临床预后应用[J]. *中国热带医学*, 2012, 12(7):848-850.
- [10] Papouchado G, Myles J, Lloyd V, et al. Silver in situ hybridization (SISH) for determination of HER2 gene status in breast carcinoma: comparison with FISH and assessment of interobserver reproducibility[J]. *Am J Surg Pathol*, 2010, 34(6):767-776.
- [11] Zang M, Zou D, Yu Z, et al. Detection of recurrent cytogenetic aberrations in multiple myeloma: a comparison between MLPA and iFISH[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33):34276-34287.
- [12] Gmidène A, Avet-Loiseau H, Sennana H, et al. Molecular cytogenetic aberrations in Tunisian patients with multiple myeloma identified by cIg-FISH in fixed bone marrow cells[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2012, 136(1):44-49.