



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105223360 A

(43) 申请公布日 2016.01.06

(21) 申请号 201510539692.1

(22) 申请日 2015.08.28

(71) 申请人 北京大学人民医院

地址 100044 北京市西城区西直门南大街  
11号

(72) 发明人 刘艳荣 王亚哲 常艳 郝乐  
袁晓英 黄晓军

(74) 专利代理机构 石家庄众志华清知识产权事  
务所(特殊普通合伙) 13123

代理人 墨伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

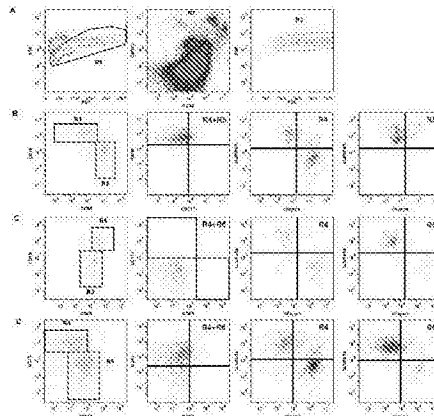
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒及应用,与流式细胞仪配套使用,所述试剂盒配备针对下述物质的单克隆抗体组合: Ig, κ Light Chain、Ig, λ Light Chain、CD19、CD117、CD138、CD56、CD38 和 CD45。本发明用 CD38 和 CD138 首先识别浆细胞,借助 CD45、CD56、CD19 和 CD117 识别浆细胞的表面标志是正常还是异常,对正常和异常表型的设门(R4 和 R5)后,再分别观察正常表型和异常表型中 cKappa 和 cLambda 的表达比值。采用本发明的试剂盒识别所有 cPCs 的应用中,具有准确率高、分析快速、方法简单的优势。



1. 一种鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒,与流式细胞仪配套使用,其特征在于所述试剂盒配备针对下述物质的单克隆抗体:Ig  $\kappa$  Light Chain/ Ig  $\lambda$  Light Chain、CD19、CD117、CD138、CD56、CD38 和 CD45,并依次按照下述顺序依次进行荧光素标记:FITC/PE、PE-Cy5、PE-Cy7、APC、APC-Cy7、V450 和 V500。

2. 根据权利要求 1 所述的鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒,其特征在于还包括固定/破膜剂和溶红细胞液。

3. 权利要求 1 所述的试剂盒在制备鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的产品中的应用,其特征在于所述应用包括:将所述试剂盒中针对 CD19、CD117、CD138、CD56、CD38 和 CD45 的单克隆抗体加入至同一个装有骨髓标本的试管中;经溶红细胞、破膜处理后,加入试剂盒中针对 Ig  $\kappa$  Light Chain/ Ig  $\lambda$  Light Chain 的单克隆抗体,制成待测试样;将待测试样经流式细胞仪检测,设门分析如下:

①建立 FSC/SSC 密度图,将有核细胞区域划为 R1;对 R1 细胞显示 CD38/CD138 散点图,将 CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>细胞划为 R2;建立 FSC/SSC 散点图只显示 R2 门内细胞,将均一分布的细胞划为 R3;

②将 R3 门内细胞分别建立 CD19/CD56、CD19/CD45 和 CD19/CD117 二维散点图,进一步对二维散点图内集中分布的细胞设门,标记为 R4 和/或 R5;

③对应 CD19/CD56、CD19/CD45 和 CD19/CD117 中 R4 和/或 R5 门内细胞分别依次建立 CD45/CD117、CD56/CD117 和 CD45/CD56 的二维散点图;

④对应 CD19/CD56、CD19/CD45 和 CD19/CD117 中 R4 和/或 R5 门内细胞分别依次建立 Ig  $\kappa$  Light Chain/ Ig  $\lambda$  Light Chain 二维散点图,分析 Ig  $\kappa$  Light Chain 和 Ig  $\lambda$  Light Chain 的表达及其比值。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒在制备鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的产品中的应用,其特征在于待测试样的处理包括以下步骤:

①洗涤细胞:用 1×PBS 缓冲液充分离心洗涤骨髓标本;

②标记抗体:将洗涤后的骨髓标本与 CD19-PE-Cy5 2.5  $\mu$ L, CD117-PE-Cy7 2.5  $\mu$ L, CD138-APC 5 $\mu$ L, CD56-APC-Cy7 2.5  $\mu$ L, CD38-V450 2.5  $\mu$ L 和 CD45-V500 3  $\mu$ L 混匀,室温避光孵育 10~20 分钟;

③溶红细胞:向步骤②的体系中加入红细胞溶解液,混匀后避光,室温放置 5~10 分钟,溶解红细胞;

④破膜处理:1500 转/分离心 8 分钟,弃上清液,加入固定/破膜剂中的细胞固定液 100  $\mu$ L,震荡混匀,避光孵育 15min;

加入 500  $\mu$ L 1×PBS 缓冲液,混匀,1500 转/分离心 8 分钟,弃上清液,加入固定/破膜剂中的破膜液 100  $\mu$ L,混匀,并同时加入 10  $\mu$ L 的 Ig  $\kappa$  Light Chain-FITC / Ig  $\lambda$  Light Chain-PE,避光孵育 15min;

⑤洗涤细胞:加入 2mL 含 0.5vol.%~2vol.% 血清和 0.1wt.% NaN<sub>3</sub> 的 1×PBS,混匀,1500 转/分离心 8 分钟,弃上清液,加入 300  $\mu$ L 1×PBS 缓冲液,混匀、待测。

## 鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒及其应用

[0001] 本发明属于细胞表型确认过程中的专用试剂盒结构设计,具体涉及一种应用八色抗体组合识别克隆性浆细胞表型的试剂盒及其应用。

### 背景技术

[0002] 浆细胞疾病是指克隆性浆细胞(clonal plasma cells, cPCs)过度增殖并产生大量单克隆免疫球蛋白的一组疾病,cPCs是浆细胞疾病的发病根源。免疫球蛋白固定电泳或游离轻链检测可以帮助确定是否存在克隆性浆细胞,但无法提示其比例;如果cPCs为非分泌型,即不合成免疫球蛋白,则无法诊断。传统的骨髓形态学方法可以识别形态异常浆细胞或幼稚浆细胞的比例,但不能确定其克隆性。某些疾病例,如意义未明的单克隆丙种球蛋白病、冒烟型骨髓瘤,或治疗后的多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM),骨髓中浆细胞数量较低,且多数同时存在cPCs和正常浆细胞(normal plasma cells, nPCs),此时通过传统的形态学方法难以鉴别。

[0003] 多参数流式细胞仪(multiparameter flow cytometry, MFC)具有高敏感、高特异性。利用MFC对膜抗原检测,可以判断是否存在nPCs和异常表型浆细胞(abnormal plasma cells, aPCs)并确定其比例;通过对胞浆内免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig) cKappa和cLambda轻链检测,可进一步判断nPCs是否为多克隆、aPCs是否为单克隆,以判断是否存在cPCs及其比例;当nPCs和aPCs同时存在且aPCs数量较低时,更显示其优越性。因此MFC被越来越多地应用于浆细胞疾病的检查,不仅可以帮助诊断,还可以在治疗后检测微量cPCs,对治疗效果进行评价,以便及时调整治疗方案。

[0004] 如何选择合适的抗体组合是利用MFC准确区分nPCs、aPCs和cPCs的关键。目前文献报道多采用3-4色抗体组合,除去设门抗体,每管试管中只能检测1-2种其它抗体,若想检测多个抗体以确定浆细胞是否异常,需重复应用设门抗体,大概需要3-5组抗体组合,总共需要9-20个抗体;这样导致费用过高、所需标本量增大、操作费时,且灵敏度不高。而且,4色抗体组合无法同时囊括设门抗体、胞膜抗体和针对胞浆Ig轻链的抗体,不能达到分群设门并进一步分析克隆性的要求。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒及其应用,其采用8色抗体组合、借助流式细胞仪一次检测、经逐级设门即可准确区分nPCs、aPCs和cPCs并提示表达比例,检测的敏感度高、成本低、适用范围广,具有广泛的应用前景与临床意义。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:

一种鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒,与流式细胞仪配套使用,所述试剂盒配备针对下述物质的单克隆抗体组合:Ig  $\kappa$  Light Chain/ Ig  $\lambda$  Light Chain、CD19、CD117、CD138、CD56、CD38和CD45,并依次按照下述顺序依次进行荧光素标记:FITC/PE、PE-Cy5、PE-Cy7、APC、APC-Cy7、V450和V500。

[0007] 本发明还提供了一种试剂盒在制备鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的产品中的应用,所述应用包括:将所述试剂盒中针对 CD19、CD117、CD138、CD56、CD38 和 CD45 的单克隆抗体加入至同一个装有骨髓标本的试管中;经溶红细胞、破膜处理后,加入试剂盒中针对 Ig  $\kappa$  Light Chain/ Ig  $\lambda$  Light Chain 的单克隆抗体,制成待测试样;将待测试样经流式细胞仪检测,设门分析如下:

①建立 FSC/SSC 密度图,将有核细胞区域划为 R1;对 R1 细胞显示 CD38/CD138 散点图,将 CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>细胞划为 R2;建立 FSC/SSC 散点图只显示 R2 门内细胞,将均一分布的细胞划为 R3;

②将 R3 门内细胞分别建立 CD19/CD56、CD19/CD45 和 CD19/CD117 二维散点图,进一步对二维散点图内集中分布的细胞设门,标记为 R4 和 / 或 R5;

③对应 CD19/CD56、CD19/CD45 和 CD19/CD117 中 R4 和 / 或 R5 门内细胞分别依次建立 CD45/CD117、CD56/CD117 和 CD45/CD56 的二维散点图;

④对应 CD19/CD56、CD19/CD45 和 CD19/CD117 中 R4 和 / 或 R5 门内细胞分别依次建立 Ig  $\kappa$  Light Chain/ Ig  $\lambda$  Light Chain 二维点图,分析 Ig  $\kappa$  Light Chain 和 Ig  $\lambda$  Light Chain 的表达及其比值。

[0008] 采用上述单克隆抗体组合鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的原理如下:nPCs 的表型是受基因严格控制的,其表型具有一致性和可重复性;nPCs 强表达 CD38(CD38st)和 CD138,同时表达 CD19 和 CD45,不表达 CD117 和 CD56,其胞浆 Ig 轻链 cKappa 和 cLambda 为多克隆性,即 cKappa 与 cLambda 的比值在 0.3-3.0 之间。aPCs 是指浆细胞抗原表达出现异常,如 CD38 的强度比 nPCs 减弱、CD19 和 CD45 变为阴性,或者异常表达 CD56、CD117、CD28、CD33 等;出现上述这些抗原的表达异常,可定义为 aPCs。但 aPCs 是否为克隆性,还需要进一步检测 cKappa 和 cLambda。如果 aPCs 只表达 ckappa 或 cLambda 一种轻链,为轻链限制性表达,可确定为 cPCs;如果 ckappa 和 cLambda 比值在正常范围内,则为多克隆,不支持诊断。

[0009] 因此,本发明设计了一组八色抗体组合,采用逐级设门方法确定 cPCs。采用本发明的试剂盒可检测所有浆细胞,通过同时检测膜抗原和胞浆 Ig 轻链以及精确设门,能够有效区分 nPCs 和 cPCs,检测的灵敏度为 0.01%。

[0010] 以多发性骨髓瘤(multiplemyeloma, MM)患者为例,采用本发明的试剂盒、借助八色流式细胞仪检测初诊和治疗后 MM 患者骨髓浆细胞上的抗原表达,结果发现:几乎所有患者均表达 CD38 和 CD138,采用 CD38/CD138 散点图对浆细胞设门,根据异常抗原的表达进一步设门后分析浆细胞的克隆性适用于所有患者;本发明的试剂盒,同时检测胞膜抗原和胞浆 Ig 轻链以确定其克隆性,能够有效区分 nPCs 和 cPCs,适用于所有初诊和治疗后 MM 患者;检测灵敏度可达 0.01%。

[0011] 采用上述技术方案产生的有益效果在于:(1)本发明的试剂盒在识别所有 cPCs 的应用中,具有准确率高、分析快速、方法简单的优势,为 cPCs 的表型分类提供了一种可靠的新的荧光标记的单克隆抗体组合;(2)本发明试剂盒的应用能够识别所有浆细胞,检测 cPCs 的灵敏度为 0.01%,有助于诊断并进行疗效判定;(3)本发明采用一组包含八个单抗的八色组合,识别浆细胞准确、可靠,同时减少了设门抗体的重复使用,减低患者和国家的经济负担,而且简化了抗体的标记过程,便于检测的标准化和规范化,具有广泛的应用前景与

临床意义；(4) 本发明的方法简单、可靠，检测敏感度可达 0.01%，易于推广。

### 附图说明

[0012] 图 1 A-D 是采用本发明试剂盒对 MM 患者 nPCs、aPCs 和 cPCs 的设门分析方法；图 2 是初诊 MM 患者浆细胞抗原表达的阳性比例。

### 具体实施方式

[0013] 鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒，与流式细胞仪配套使用，其特征在于所述试剂盒配备针对下述物质的单克隆抗体组合：Ig,  $\kappa$  Light Chain/ Ig,  $\lambda$  Light Chain、CD19、CD117、CD138、CD56、CD38 和 CD45，并依次按照下述顺序依次进行荧光素标记：FITC/PE、PE-Cy5、PE-Cy7、APC、APC-Cy7、V450 和 V500。各单克隆抗体的荧光素标记及成分等信息参见表 1。

[0014] 表 1 流式单克隆抗体信息

名称	荧光素标记	成分	克隆	产品目录号	公司
Ig, $\kappa$ Light Chain	FITC/PE	Mouse IgG1	TB28-2	349516	BD
Ig, $\lambda$ Light Chain			I-155-2		
CD19	PE-Cy5	Mouse IgG1	H1B19	302210	Biologend
CD117	PE-Cy7	Mouse IgG1	104D2	339195	BD
CD138	APC	Mouse IgG1	B-B4	130-091-250	Miltenyi
CD56	APC-Cy7	Mouse IgG1	HCD56	318332	Biologend
CD38	V450	Mouse IgG1	HB7	646857	BD Horizon
CD45	V500	Mouse IgG1	HI30	560777	BD Horizon

所述试剂盒中还包括红细胞溶解液(10 $\times$ ，货号：555899，BD 公司)、固定/破膜剂(货号：GAS006，Multisciences 公司，包括 A 液 20ml 和 B 液 20ml，A 液为细胞固定液，作用为固定细胞；B 液为破膜液，使抗体顺利进入胞内，并使细胞形态仍然保存完整)和 pH 为 7.2~7.4 的 10 $\times$ PBS 缓冲液。采用本发明的试剂盒对患者骨髓浆细胞表型测定的步骤如下：

#### 步骤一、试剂的制备

1.1、将 10 $\times$ PBS 缓冲溶液稀释为 1 $\times$ PBS 备用。

[0015] 所述 10 $\times$ PBS 缓冲液的配制方法：

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 26.3g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 3.0g

NaCl 85.0g

加蒸馏水至 1000mL，常温保存。

[0016] 1.2、将溶红细胞液用蒸馏水稀释 10 倍，备用。

[0017] 1.3、在 1 $\times$ PBS 缓冲液中加入小牛血清和 NaN<sub>3</sub>，制备含 0.5vol.%~2vol.% 血清与

0.1wt.%  $\text{NaN}_3$  的 PBS, 4℃ 保存。

**[0018]** 步骤二、标本的制备：

2.1、洗涤细胞：取洁净的 5mL 试管，加入 1mL 患者骨髓标本，加入 2mL  $1\times$ PBS 缓冲液充分混匀、离心洗涤。重复 3 遍，进行细胞计数，调整细胞浓度至  $1\times 10^7$  个细胞/mL；

2.2、标记抗体：根据流式细胞仪的需要选择流式专用 5mL 试管一只，分别加入 CD19 PE-Cy5 2.5  $\mu$ L, CD117 PE-Cy7 2.5  $\mu$ L, CD138 APC 5 $\mu$ L, CD56 APC-Cy7 2.5  $\mu$ L, CD38 V450 2.5  $\mu$ L 和 CD45 V500 3  $\mu$ L, 再加入 100  $\mu$ L 上述步骤 1 中洗涤后标本 ( $1\times 10^6$  个细胞)，轻轻混匀，室温 (环境温度保持在 22℃ 左右) 避光孵育 15 分钟；

2.3、溶红细胞：加入步骤 1.2 中稀释后的红细胞溶解液 2mL，混匀后避光，室温放置 8 分钟，溶解红细胞；

2.4、破膜处理：将经步骤 2.3 处理的标本再经 1500 转 / 分离心 8 分钟，弃上清液，加入固定 / 破膜剂中 A 液 100  $\mu$ L，震荡混匀，避光孵育 15min；加入步骤 1.1 中 500  $\mu$ L  $1\times$ PBS 缓冲液，混匀，1500 转 / 分离心 8 分钟，弃上清液，加入固定 / 破膜剂中 B 液 100  $\mu$ L，轻微混匀，并同时加入 10  $\mu$ L 的  $\kappa / \lambda$  FITC/PE，避光孵育 15min；

2.5、洗涤细胞：加入 2mL 步骤 1.3 中含 0.5vol.%~2vol.% 血清和 0.1wt.%  $\text{NaN}_3$  的 PBS，混匀，1500 转 / 分离心 8 分钟，弃上清液，加入 300  $\mu$ L  $1\times$ PBS 缓冲液，混匀、待测。

**[0019]** 步骤三、采用流式细胞仪进行检测

按照流式细胞仪的操作规程，对步骤二中制备的待测标本进行流式细胞仪测试，获取 750,000 个有核细胞。

**[0020]** 步骤四、采用流式细胞仪分析标本中的 nPCs、aPCs 及 cPCs

用流式细胞仪分析软件进行分析，具体设门方法 (参见图 1) 包括：

4.1、CD38/CD138 对浆细胞进行设门 (图 1A)

先建立 FSC/SSC 密度图，将有核细胞区域划为 R1，以排除死细胞和细胞碎片；对 R1 细胞显示 CD38/CD138 散点图，将  $\text{CD38}^+\text{CD138}^+$  细胞划为 R2，为浆细胞；建立 FSC/SSC 散点图只显示 R2 门内细胞，将均一分布的细胞划为 R3，R3 为浆细胞。

**[0021]** 、界定 nPCs、aPCs 并确定其克隆性

①建立 FSC/SSC 密度图，将有核细胞区域划为 R1；对 R1 细胞显示 CD38/CD138 散点图，将  $\text{CD38}^+\text{CD138}^+$  细胞划为 R2；建立 FSC/SSC 散点图只显示 R2 门内细胞，将均一分布的细胞划为 R3；

②将 R3 门内细胞分别建立 CD19/CD56、CD19/CD45 和 CD19/CD117 二维散点图，进一步对二维散点图内集中分布的细胞设门，标记为 R4 和 / 或 R5；

③对应 CD19/CD56、CD19/CD45 和 CD19/CD117 中 R4 和 / 或 R5 门内细胞分别依次建立 CD45/CD117、CD56/CD117 和 CD45/CD56 的二维散点图；

④对应 CD19/CD56、CD19/CD45 和 CD19/CD117 中 R4 和 / 或 R5 门内细胞分别依次建立 cKappa/cLambda 二维点图，分析 cKappa 和 cLambda 的表达及其比值。

**[0022]** 总体思路的鉴别思路是：用 CD38 和 CD138 首先识别浆细胞，借助 CD45、CD56、CD19 和 CD117 识别浆细胞的表面标志是正常还是异常，对正常和异常表型的设门 (R4 和 R5) 后，再分别观察正常表型和异常表型中 cKappa 和 cLambda 的表达比值，从而确定异常表型是否可以归为克隆性浆细胞。

[0023] 例如图 1B, 该患者具有一群 CD19<sup>+</sup> aPCs, 且 CD56 阳性, 因此, 选择 CD19/CD56 散点图, 根据 CD19 和 CD56 的表达, 对 CD19<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> nPCs 和 CD19<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> aPCs 分别设门 (R4 和 R5), 统计两者在有核细胞中所占比例; 然后分析 R4 和 R5 门内细胞抗原的表达情况及 cKappa 和 cLambda 的比值。如果 CD19 或 CD56<sup>+</sup> 细胞不明显, 可以参考 CD117<sup>+</sup> 或 CD45<sup>+</sup> 对 nPCs 和 aPCs 分别设门 (R4 和 R5) (图 1C 和 1D), 再进一步分析 R4 和 R5 门内其它抗原的表达及其胞浆 Ig 轻链的表达。以 nPCs 中 CD56、CD19、CD117、CD45 的表达作为对照, 分析 aPCs 中 CD56<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、CD117<sup>+</sup> 和 CD45<sup>dim+</sup> 细胞的比例, 将  $\geq 20\%$  定义为异常; 以 nPCs 抗原表达的强弱为标准, aPCs 抗原表达比 nPCs 强的定义为强表达, 反之为弱表达。nPCs 中 cKappa 和 cLambda 的比值在 0.3 ~ 3.0 之间, cPCs 为 cKappa 或 cLambda 单阳性。即当 cKappa 和 cLambda 的比值在 0.3 ~ 3.0 之间时为 nPCs; 当 cKappa 和 cLambda 的比值在 0.3 ~ 3.0 范围之外时, 为单阳性, 则为 cPCs。

[0024] 采用上述方法, 对 2001 年 9 月 -2013 年 8 月在北京大学人民医院、北京大学血液病研究所收治的初诊和治疗后 MM 患者进行回顾性分析。其中初诊患者 332 例, 中位年龄 60 (27-87) 岁; 治疗后患者 121 例, 共 209 份标本, 中位年龄 54 (27-84) 岁。分析结果如下:

#### 一、CD38/CD138 设门适用于所有浆细胞

初诊 MM 患者浆细胞几乎全部表达 CD38 和 CD138, 阳性率与正常浆细胞相似, 分别为 100% (332/332) 和 98.8% (328/332)。虽然个别患者 CD38 和 CD138 表达明显减弱 (CD38 弱表达者 4 例, CD138 阴性和弱表达的患者分别 4 例和 13 例) (结果见表 2), 但不存在 CD38 和 CD138 同时减弱而无法确定浆细胞的病例。

[0025] 治疗后存在 aPCs 的 96 份标本中, CD38 和 CD138 全部阳性, 11.46% (11/96) 和 36.46% (35/96) 患者 CD38 和 CD138 表达强度较 nPCs 低 (表 2), 但仍高于其它细胞。因此, 采用 CD38/CD138 可对 aPCs 和 nPCs 进行设门, 故 CD38/CD138 同时设门界定浆细胞适用于所有 MM 患者。

[0026] 表 2 初诊和治疗后 MM 患者 aPCs 中异常抗原表达的发生率

异常抗原表达	初诊 MM (N=332)		治疗后 MM (N=96)	
	N	%	n	%
CD38 <sup>dim-</sup>	4	1.2	11	11.46
CD138 <sup>-dim-</sup>	17	5.1	35	36.46
CD56 <sup>-</sup>	211	63.6	56	58.3
CD117 <sup>-</sup>	142	42.8	47	49.0
CD45 <sup>-dim-</sup>	294	88.6	44	45.8
CD19 <sup>-dim-</sup>	320	96.4	95	99.0
轻链限制性表达	318/318	100	96	100
备注	初诊患者中，轻链限制性表达的检测数为 318 人			

## 二、nPCs和 aPCs的膜抗原表达及 aPCs表达异常的抗原数目

我们对治疗后 20 份仅存在 nPCs 的标本进行了分析, 结果发现, nPCs 的表型均为 CD38<sup>st+</sup> CD138<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup>; nPCs 中 90% 以上的细胞表达 CD45 和 CD19, 低于 10% 的细胞 CD45 或 CD19 阴性或弱表达; CD45<sup>/dim+</sup>和 CD19<sup>/dim+</sup>细胞在 nPCs 中的中位比例分别为 7.18% (0-14.84%) 和 7.62% (0-25.11%), 其 cKappa/cLambda 的中位比值为 1.40% (0.99%-2.07%), 未见单克隆细胞。aPCs 表型多样, 存在一种或多种与 nPCs 相反的表型, 包括: CD38<sup>dim+</sup>、CD56<sup>+</sup>、CD117<sup>+</sup>、CD45<sup>/dim+</sup>、CD19<sup>/dim+</sup>和 CD138<sup>/dim+</sup>。

[0027] MM 患者浆细胞数量不等, 332 份初诊和 96 份治疗后标本中 aPCs 在有核细胞中的中位比例分别为 11.13% (0.09%-80.47%) 和 0.41% (0.01%-33.56%)。

[0028] 初诊患者 aPCs 的主要表型是 CD19 和 CD45 阴性或弱表达, 分别占 96.4%(320/332) 和 88.6% (294/332); 63.6% (211/332) 和 42.8% (142/332) 患者出现 CD56 和 CD117 的异常阳性表达(表 2 和图 2)。

[0029] 检测出 aPCs 的 96 份治疗后标本中, CD19<sup>/dim+</sup>和 CD45<sup>/dim+</sup>标本分别占 99.0% (95/96) 和 45.8% (44/96); CD56 和 CD117 的阳性表达率分别为 58.3% (56/96) 和 49.0% (47/96) (表 2)。

[0030] 表 3 初诊和治疗后 MM 患者 aPCs 中表达异常的膜抗原数目

异常抗原数	初诊 MM (N=332)		治疗后 MM (N=96)	
	n	%	n	%
0	3	1.0	0	0
1	12	3.6	10	10.4
2	77	23.2	39	40.6
3	159	47.9	35	36.5
4	81	24.4	12	12.5

表 3 显示了初诊与治疗后 MM 患者中 aPCs 表达异常的抗原数目及其所占比例。99.0% 初诊患者和全部治疗后患者出现至少一种抗原表达异常；初诊和治疗后异常抗原表达  $\geq 2$  个的患者比例分别为 95.4% (317/332) 和 89.6% (86/96)，说明胞膜抗原的检测适用于绝大多数 MM 患者，检查异常胞膜抗原数量越多，判断 aPCs 的准确性和特异性越强。

[0031] 但是，1.0% (3/332) 初诊患者浆细胞的胞膜抗原表达与 nPCs 相同，这种情况下，仅通过胞膜抗原检测无法鉴别；另外，96 份治疗后可见 aPCs 的标本中，有 30 份 (31.3%) 标本同时存在 nPCs，aPCs 和 nPCs 的中位比例分别为 0.12% (0.01–2.43%) 和 0.16% (0.01–0.84%)。治疗后标本中 10.4% (10/96) 的浆细胞仅出现 CD19<sup>dim+</sup>，其余胞膜抗原表达正常。因 nPCs 中少数细胞也可见 CD19<sup>dim+</sup>，故仅通过胞膜抗原检测无法确定浆细胞是否为 cPCs。以上说明，除胞膜抗原外，有必要同时检测胞内 Ig 轻链以明确诊断。

[0032] 三、aPCs 的克隆性分析———确定为 cPCs

胞浆 Ig 轻链克隆性检测结果显示，318 例初诊 MM 患者的 aPCs 和 96 份存在 aPCs 的治疗后标本全部显示轻链限制性表达。

[0033] 在初诊患者中，3 例通过胞膜抗原检测无法明确区分 aPCs 和 nPCs，经胞浆 Ig 轻链检测为限制性表达，明确为 cPCs；5 例初诊患者，结合临床特点、免疫固定电泳及游离轻链检测证实为不分泌型 MM，但流式检测显示为轻链限制性表达，因此可明确为 cPCs。另外，上述 10 例仅出现 CD19<sup>dim+</sup> 异常的治疗后标本，经胞浆轻链检测也可明确为 cPCs。结果提示，对浆细胞进行胞浆 Ig 轻链检测的克隆性分析至关重要，能够弥补仅通过胞膜抗原或其他检测手段无法明确的 aPCs。

[0034] 另外，治疗后 30% 左右的标本同时存在 nPCs 和 aPCs，当 nPCs 数量高于 aPCs 时，受 nPCs 非限制性的影响，cKappa/cLambda 比值可能显示正常，从而掩盖 cPCs 的存在；因此，除设门抗体外，还需要同时检测其它表达异常的抗原首先界定 nPCs 和 aPCs，然后再分别分析 nPCs 和 aPCs 中 cKappa 和 cLambda 的表达特点，以进一步确定其克隆性。如果不借助胞膜抗原首先区分 nPCs 和 aPCs，而直接进行胞浆 Ig 轻链检测，有时不能正确反映 cPCs 的比例。

[0035] 以上结果说明，胞膜抗原和胞浆 Ig 轻链检测相互补充可提高诊断的敏感性与特异性，本发明试剂盒的优势正是结合胞膜和胞浆 Ig 轻链检测识别 cPCs。

[0036] 胞浆 Ig 轻链的限制性表达是 MFC 确定 cPCs 的唯一指标,但由于血浆中具有较多的游离免疫球蛋白,使胞浆 Ig 轻链的检测容易出现假阴性。因此,本试剂盒强调,每份标本在进行检测时,一定要先用 PBS 洗三遍,然后再进行抗体标记。

[0037] 浆细胞的克隆性只能通过 cKappa 和 cLambda 进行识别,但如果不加入任何其它抗体,只加入这两种,不能识别浆细胞;浆细胞较特异的抗原是 CD138,CD38 表达较强,CD45 表达不等,所以国内外多采用包括 cKappa 和 cLambda 在内的 4 色组合识别克隆性浆细胞,除 cKappa 和 cLambda 外,外加 CD138、CD38 和 CD45 中的 2 个。当患者体内浆细胞都是克隆性时,比如多发性骨髓瘤初诊患者,这样做是完全没有问题的;但某些疾病中,比如意义未明的单克隆丙种球蛋白病(Monoclonal Gammopathy Of Undetermined Significance, MGUS), 冒烟型骨髓瘤(Smoldering Multiple Myeloma, SMM)或治疗后 MM, 正常浆细胞和克隆性浆细胞会同时存在,这时准确识别正常与克隆性至关重要,不但反映疾病的进展,还可以预测预后。而仅采用以上的 4 色组合或 5 色组合,无法做到明确区分正常与克隆性浆细胞的比例及比值。

#### [0038] 四、八色抗体组合检测的敏感度

正常骨髓中不存在克隆性浆细胞,理论上讲,只要获取足够多的细胞数,就能提高检测的敏感性。本实验获取 750,000 个细胞,检测的敏感度为 0.01%,增加获取的细胞数,可进一步提高敏感度。

[0039] 综上所述,研究结果表明通过本发明的试剂盒并借助八色流式细胞仪有助于精确区分并定量 nPCs、aPCs 和 cPCs,检测 cPCs 的敏感度为 0.01%。

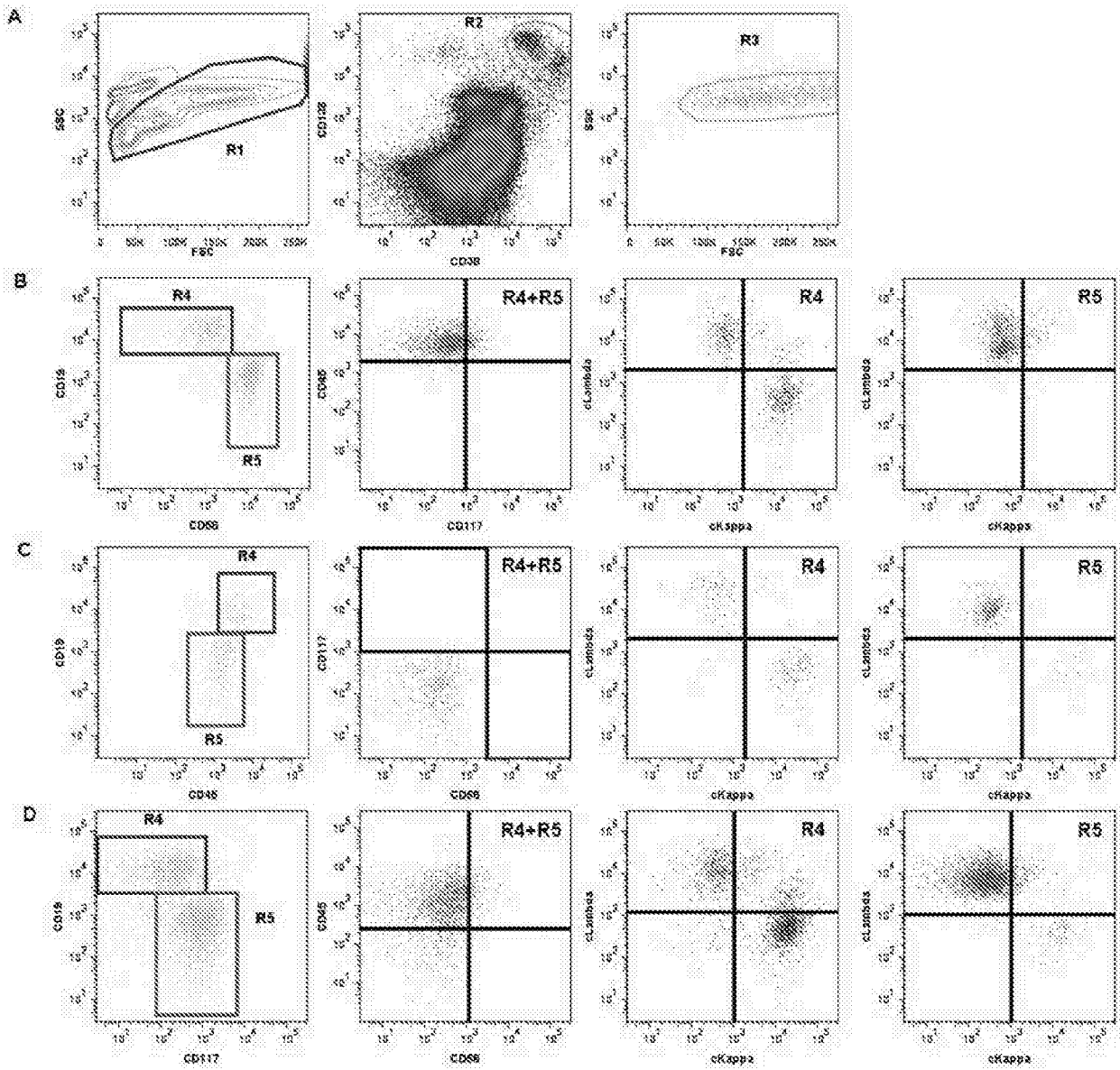


图 1

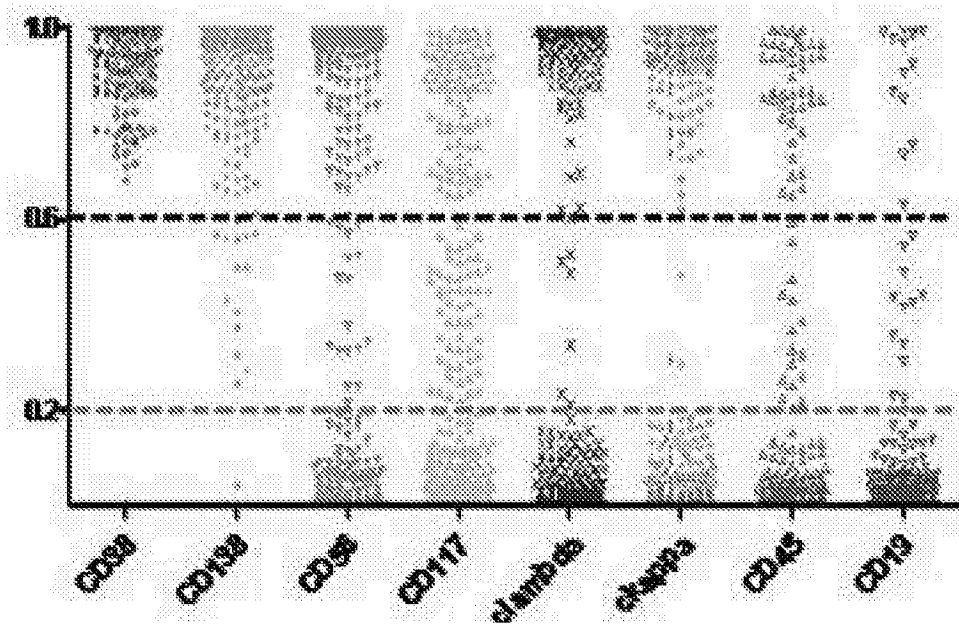


图 2

专利名称(译)	鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105223360A</a>	公开(公告)日	2016-01-06
申请号	CN201510539692.1	申请日	2015-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
[标]发明人	刘艳荣 王亚哲 常艳 郝乐 袁晓英 黄晓军		
发明人	刘艳荣 王亚哲 常艳 郝乐 袁晓英 黄晓军		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N15/14		
CPC分类号	G01N15/14 G01N33/533 G01N33/577		
其他公开文献	CN105223360B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒及应用，与流式细胞仪配套使用，所述试剂盒配备针对下述物质的单克隆抗体组合：Ig,  $\kappa$ ? Light? Chain、? Ig,  $\lambda$ ? Light? Chain、CD19、CD117、CD138、CD56、CD38和CD45。本发明用CD38和CD138首先识别浆细胞，借助CD45、CD56、CD19和CD117识别浆细胞的表面标志是正常还是异常，对正常和异常表型的设门 ( R4和R5 ) 后，再分别观察正常表型和异常表型中cKappa和cLambda的表达比值。采用本发明的试剂盒识别所有cPCs的应用中，具有准确率高、分析快速、方法简单的优势。

