

# 多发性骨髓瘤遗传学检测专家共识



中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会;中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组

执笔:陈丽娟 安刚

通信作者:邱录贵, Email: qiuqg@ihcams.ac.cn;李建勇, Email: lijianyonglm@126.com

**【摘要】** 多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种高度异质性的血液系统肿瘤,患者生存时间存在较大差异。根据 MM 的预后因素进行危险度分层,进行个体化治疗,有助于提高疗效、减轻治疗相关毒性。遗传学异常是 MM 危险度分层的基础。近年来,虽然遗传学检测对于 MM 的重要意义在国内已经取得共识,但存在检测方法不规范、阳性阈值混乱、临床价值不明确等一系列问题,亟需规范。为此有必要制订 MM 的遗传学检测专家共识,以规范国内 MM 的遗传学检测。

**【关键词】** 多发性骨髓瘤; 遗传学检测; 专家共识

**基金项目:**国家自然科学基金(81630007,81570181,81670202);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2017-I2M-1-015,2017-I2M-1-005,2016-I2M-3-013)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2019.02.001

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种高度异质性的血液系统肿瘤,患者生存时间存在较大差异。随着蛋白酶体抑制剂、免疫调节剂和新型单克隆抗体等新药的临床应用,MM 患者的疗效得到了显著的提高。根据 MM 的预后因素进行危险度分层,进行个体化治疗,有助于提高疗效、减轻治疗相关毒性。遗传学异常是 MM 危险度分层的基础<sup>[1-2]</sup>,遗传学异常的检测技术主要包括染色体核型分析、荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、基因表达谱、二代测序和微阵列比较基因组杂交等<sup>[3]</sup>。基因芯片检测技术复杂、成本高,尚不适合临床常规开展。美国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)指南将染色体核型和 FISH 技术作为初诊 MM 的主要遗传学检测技术。FISH 具有快速灵敏、特异性高、不需要中期分裂相的特点,弥补了常规染色体核型检测需要中期分裂相、分辨率低的不足,成为 MM 遗传学检测的主要方法。近年来,虽然遗传学检测对于 MM 的重要意义已经取得共识,但国内 MM 遗传学检测存在检测方法不规范、阳性阈值混乱、临床价值不明确等一系列问题,亟需进一步规范。为此我们制订了 MM 的遗传学检测专家共识,以规范国内 MM 的遗传学检测。

## 1 常规染色体核型分析

MM 肿瘤细胞为终末分化细胞,增殖率较低,传统的染色体制备很难获得足够的分裂相,加之送检标本中肿瘤细胞比例较低,导致核型异常检出率低。我国

来自 52 家医院 672 例 MM 患者标本的多中心研究结果显示:常规染色体核型分析异常检出率为 22.1%<sup>[4]</sup>。针对 MM 细胞增殖活性低的特点,染色体制备时可采用细胞因子刺激 MM 细胞增殖,延长培养时间以期获得足够的中期分裂相。Lai 等<sup>[5]</sup>采用细胞因子 GM-CSF(30 ng/mL)联合 IL-6(2000 U/mL)刺激 6 d 培养法,对 151 例 MM 患者进行染色体核型分析,129 例获得可分析的中期分裂相,其中 66 例(51%)发现克隆性染色体异常,提示加入细胞因子和延长培养时间可能能够克服部分 MM 常规染色体核型分析异常检出率低的问题。

MM 的核型改变多同时包含数量和结构改变的复杂核型异常。绝大多数为非整倍体核型,其中超二倍体(48~74 条染色体)(30%~70%),常伴有 3、5、7、9、11、15、17 和 19 号染色体三体,非超二倍体(<48 或 >74 条染色体)常伴有 13、14、16 和 22 号染色体缺失以及 14q32 易位。在常规核型分析中超二倍体患者对化疗敏感,预后较好;低二倍体是传统化疗和大剂量化疗联合自体造血干细胞移植的预后不良因素。近来有研究者认为常规染色体分析发现 del(13)而非 FISH 检测的 del(13)是预后差的指标<sup>[6]</sup>。

对于常规染色体核型分析,专家共识为:(1)MM 常规染色体核型分析虽然有一定的局限性,但在 MM 预后判断中仍有一定价值,常规染色体核型分析仍是 MM 遗传学检测的方法之一;(2)建议采用 GM-CSF 联合 IL-6 刺激 6d 培养法制备染色体标本,以期获得更多可供分析的分裂相。

## 2 FISH 检测

**2.1 FISH 方法的选择** MM 的 FISH 检测有其特殊性。与其他恶性血液疾病不同,许多 MM 患者的肿瘤细胞在骨髓中比例较低且分布不均匀,加之骨髓抽取过程中会发生外周血的稀释,浆细胞比例在遗传学检测样本中的比例一般仅占有核细胞的 1%~20%。即使骨髓涂片中浆细胞比例较高的患者,遗传学检测样本中浆细胞比例仍然可能非常低。因此,对于 MM 进行 FISH 检测时,如何准确的识别肿瘤细胞而不被正常细胞所干扰是首先需要解决的问题。应用 FISH 进行 MM 遗传学检测之前,需要进行浆细胞富集或者标记,而不能直接采用全骨髓标本进行 FISH 检测。如采用未经处理的骨髓标本进行 FISH 检测,检测结果易受实验条件、检测人员等干扰,并且容易出现接近阈值的结果,难以判读。中国医学科学院血液病医院发现对 MM 患者骨髓标本经过 CD138 磁珠分选后进行 FISH 检测,浆细胞分选可以显著提高遗传学异常检出率<sup>[7]</sup>;近期研究还发现,具有某种遗传学异常浆细胞克隆的大小同样具有较高的临床价值<sup>[8]</sup>。使用未经处理的骨髓标本进行检测,由于受到骨髓中正常单个核细胞的影响,难以获取这部分信息。国外一般采取 CD138 免疫磁珠分选、胞浆轻链(cytoplasmic light chain, cIg)富集或者标记浆细胞。

CD138 免疫磁珠分选结合 FISH 检测是目前最常用的检测方法。一般 20 mL 骨髓可以满足检测需要,分选阳性率 90%左右。CD138 磁珠分选所需设备简单,富余的浆细胞可以用于建立 MM 标本库。缺点是手工操作较多,比较耗费时间,购买免疫磁珠增加检测成本。条件允许的单位,可以使用 autoMACS<sup>®</sup> Pro 进行磁珠分选,节省时间和人力成本。胞质轻链免疫荧光结合 FISH(cIg-FISH)采用单个核细胞滴片后直接与探针杂交,洗片后再加入相应的抗轻链的抗体以标记浆细胞,计数细胞质着色的浆细胞的遗传学改变。cIg-FISH 操作前需要明确患者克隆性浆细胞轻链类型,以便选择正确的轻链抗体。值得注意的是,FISH 检测时常需要对细胞膜进行一定程度的破坏,以利于探针与细胞核内 DNA 的结合。应用 cIg-FISH 技术时,不建议使用低渗法处理骨髓单个核细胞,以免细胞膜破坏过度,难以对轻链进行标记。此外,如果患者浆细胞比例较低,进行 cIg-FISH 检测,可能会难以计数到 100 个浆细胞。

对于 FISH 检测技术的选择,专家共识为:(1)不能直接采用全骨髓标本进行 FISH 检测,必须进行浆细胞的富集或者标记;(2)不能根据骨髓涂片中浆细胞

的比例高低决定是否进行浆细胞的富集或者分选;(3)CD138 分选纯化富集浆细胞结合 FISH 技术和 cIg-FISH 技术在结果的可靠性和特异性方面有较好的一致性<sup>[9]</sup>,建议国内同行尽量根据条件选用这两种技术之一。应用 cIg-FISH 技术时,最好选取浆细胞比例较高的患者。

**2.2 FISH 标本制备和检测方法的标准化** 欧洲骨髓瘤工作组曾在 21 个实验室发起 MM 的 FISH 检测质量控制,寄送 10 例纯化的浆细胞到 21 个实验室检测 t(4;14)、t(11;14)、t(14;16)、del(13)(q14) 和 del(17)(p13) 5 种遗传学异常,发现约 0.94% 的假阳性和 1.28% 假阴性率,但各实验室阳性细胞率有明显差异,差异率有的高达 60%<sup>[10]</sup>,因此对 MM 的 FISH 检测应定期进行质量控制。

为了提高 FISH 检测结果的可靠性,对标本的制备和 FISH 的检测过程应进行以下的规范:(1)骨髓标本应尽可能抽取第一管标本,最好进行多部位穿刺,建议采用 EDTA 抗凝剂抗凝;(2)标本应尽早送至实验室,以便能 24 h 内及时处理;(3)制片最好采用甩片机使玻片上的细胞均匀分布;(4)在分选和制片过程中采用 RPMI1640(含 5% FBS)培养基进行稀释,以保持细胞形态无变形和破坏;(5)最重要的是,瘤细胞须经过纯化或用特殊标记定位,分选浆细胞纯度在 90% 以上,至少应在 70% 以上,具体方法由各实验室根据自身条件确定;(6)探针需确保质量,最好能选用性能稳定的已商业化的探针;(7)对于扩增和缺失的核型检测建议同时标记相应的着丝粒探针;(8)临床报告表述清楚,需明确检测方法、使用的探针、计数的细胞数目以及阳性细胞率等,1q21 扩增需标明扩增拷贝数。

**2.3 靶点及探针的选择与组合** 在 NCCN 指南将 FISH 检测 del(13q14)、del(17p13)、t(4;14)、t(11;14)、t(14;16) 以及 1q21 扩增作为初诊 MM 的检测指标。在美国梅奥医学中心骨髓瘤分层(Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy, mSMART)共识和国际骨髓瘤工作组危险分层中,上述遗传学异常是主要的危险分层指标。伴有 del(17p13) 的 MM 患者预后极差,硼替佐米、来那度胺等新药以及大剂量化疗均不能克服其预后不良影响<sup>[11-13]</sup>;1q21 扩增也是接受蛋白酶体抑制剂治疗的 MM 患者的重要预后不良因素;而 t(4;14)(p16.3;q32)、t(14;16)(q32;q23) 和 t(14;20)(q32;q11) 提示预后差;随着蛋白酶体抑制剂硼替佐米的应用,t(4;14)(p16.3;q32) 已由高风险因素转化成中风险因素<sup>[12]</sup>;伴 t(11;14)(q13;q32) 曾经被认为是预后良好的标记,但 Sasaki 等<sup>[14]</sup> 分析了 993 例自体造血干细胞

移植的 MM 患者预后,结果显示正常核型、t(11;14)(q13;q32)和高危遗传学异常患者的 3 年无事件生存率分别为 47%、27% 和 13%,3 年总生存率分别为 83%、63%和 34%,说明 t(11;14)(q13;q32)预后介于正常核型和高危遗传学异常之间。

对于检测靶点,专家共识建议:(1)检测靶点至少包括 del(17p13)、amp(1q21)、t(4;14)、t(14;16) 4 个与 MM 风险分层密切相关的靶点,有条件的单位可增加 del(13q14)和 t(11;14);(2)探针选择建议采用特异性识别(locus specific identifier, LSI) 1q21 检测 1q21 扩增、LSI IGH/CCND1 检测 t(11;14)、LSI IGH/FGFR3 检测 t(4;14)、LSI IGH/MAF 检测 t(14;16)、LSI p53 检测 del(17p13)和 LSI D13S319 或 RBL 基因缺失检测探针检测 del(13q14)。

**2.4 结果判读与阳性阈值确定** 阳性阈值的判定,是应用 FISH 进行 MM 遗传学检测有争议的问题。血液系统疾病 FISH 阳性标准来源于对多份染色体核型正常供者骨髓的单个核细胞进行的相应探针检测,以阳性细胞数  $\bar{x} \pm 3s$  作为标准。使用这种方法建立阳性阈值存在两方面的问题:第一,浆细胞在正常骨髓中比例较低(0.25%左右),因此该标准是根据骨髓中其他单个核细胞建立的,而不是基于浆细胞获得的;第二,由于浆细胞胞质丰富,增加了探针与细胞核 DNA 结合的难度,MM 的 FISH 检测往往信号强度不佳。因此,不能使用骨髓中其他单个核细胞获取的阈值,作为浆细胞 FISH 检测的阳性标准。如果采用上述方法建立的阈值,将导致大量假阳性的发生,尤其是拷贝数缺失的病例。

MM 的 FISH 阳性标准争议很大,各研究机构尚不统一。如欧洲骨髓瘤工作组建议采用 20%作为数目异常的核型阳性标准界值,融合基因检测采用 10%的阳性标准界值<sup>[10]</sup>。有的工作组根据生存曲线的差异设定阳性标准,如 Avet-Loiseau 等<sup>[15]</sup>在回顾性分析 IFM 的资料时根据生存曲线的意义,将 del(13)和 amp(1q21)的阳性标准定为 30%,而 del(17p)定为 60%。中国医学科学院血液病医院通过研究发现,累及 IGH 的遗传学异常属于初始遗传异常,这些遗传学

异常常累及绝大多数分选后的浆细胞,并且检出率不随疾病进程发展而发生变化。对于这部分遗传学异常来说,阳性阈值的设定对于结果影响较小<sup>[8]</sup>。del(17p)和 amp(1q21)属于继发性遗传学异常,累及浆细胞比例不一,并且随病程进展检出率逐渐升高。阳性阈值的设定,对于这部分遗传学异常尤为重要<sup>[6]</sup>。

在对实验方法进行标准化的基础上,应组织多中心临床研究,设定适合中国 MM 患者的阳性阈值。对于阳性阈值,专家共识为:(1)各实验室可分选多份染色体核型正常供者骨髓的浆细胞进行的相应探针检测,以阳性细胞数  $\bar{x} \pm 3s$  作为标准,避免使用正常骨髓单个核细胞建立的阳性阈值;(2)如实验室无法根据正常浆细胞得出阳性阈值,暂时参考欧洲骨髓瘤工作组的阳性阈值:基因拷贝数数目异常 20%,融合基因为 10%;(3)一般需计数 200 个细胞,对于高度纯化的标本或 cIg-FISH 最少可计数 50 个细胞数;(4)除了报告阳性/阴性结果外,还应该报告阳性细胞率;(5)有临床意义的阳性阈值标准应该根据我国大规模前瞻性研究结果确定。

### 3 遗传学异常与 MM 预后分层

目前国际上比较公认的 MM 危险分层体系为 2015 年新修订的国际预后分期(R-ISS 分期),R-ISS 分期是在 ISS 分期基础上结合 LDH 和高危核型[t(4;14)、t(14;16)和 17p13 缺失任何一个]进行分期,该分期能更好地诠释 MM 患者的预后(表 1)。因此,专家共识建议采用 R-ISS 分期系统进行 MM 预后分层。

表 1 修订的国际预后分期(R-ISS 分期)

| 参数     | I                                     | II              | III                                     |
|--------|---------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------|
| 国际预后分期 | I 期                                   | 非 R-ISS I、III 期 | III 期                                   |
| LDH    | 正常                                    |                 | 增高                                      |
| 核型异常   | 无高危遗传学异常[t(4;14), t(14;16)和 17p13 缺失] |                 | 或伴有高危遗传学异常[t(4;14), t(14;16)或 17p13 缺失] |

共识专家组编写组成员名单:邱林(哈尔滨血液病肿瘤研究所) 新风艳(吉林大学第一医院) 方美云(大连大学附属中山医院) 周道斌、李剑、曹欣欣(中国医学科学院北京协和医院) 陈文明、李新(首都医科大学附属北京朝阳医院) 朱宏丽(解放军总医院附属医院) 邱录贵、汝昆、安刚、徐燕、李承文(中国医学科学院血液病医院) 王亚非(天津医科大学肿瘤医院) 王鲁群(山东大学齐鲁医院) 张金巧(河北医科大学第三医院) 杨林花(山西医科大学第二医院) 陈协群(空军军医大学西京医院) 王晓敏(新疆维吾尔自治区人民医院) 李建勇、陈丽娟(南京医科大学第一附属医院) 翟勇平(南京军区南京总院) 傅玲玲、潘金兰(苏州大学附属第一医院) 傅卫军、杜鹃(第二军医大学长征医院) 侯健(上海交通大学医学院附属仁济医院) 刘澎(复旦大学附属中山医院) 阎琳(上海交通大学医学院附属瑞金医院) 施菊妹(同济大学附属上海第十人民医院) 蔡真、何静松(浙江大学医学院附属第一医院) 孙春艳(华中科技大学同济医学院附属协和医院) 周剑峰、李春蕊(华中科技大学同济医学院附属同济医院) 李菲(南昌大学第一附属医院) 牛挺(四川大学华西医院) 刘竞(中南大学湘雅三院) 夏忠军(中山大学附属肿瘤医院) 冯茹(南方医科大学南方医院) 房佰俊(河南省肿瘤医院)



利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(5): 335-348. DOI: 10.1038/nrc3257.
- [2] Munshi NC, Anderson KC, Bergsagel PL, et al. Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2[J]. Blood, 2011, 117(18): 4696-4700. DOI: 10.1182/blood-2010-10-300970.
- [3] Rack K, Vidrequin S, Dargent JL. Genomic profiling of myeloma: the best approach, a comparison of cytogenetics, FISH and array-CGH of 112 myeloma cases[J]. J Clin Pathol, 2016, 69(1): 82-86. DOI: 10.1136/jclinpath-2015-203054.
- [4] Lai YY, Huang XJ, Cai Z, et al. Prognostic power of abnormal cytogenetics for multiple myeloma: a multicenter study in China [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(15): 2663-2670. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.15.004.
- [5] Lai JL, Zandecki M, Mary JY, et al. Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis[J]. Blood, 1995, 85(9): 2490-2497.
- [6] Kiyota M, Kobayashi T, Fuchida S, et al. Monosomy 13 in metaphase spreads is a predictor of poor long-term outcome after bortezomib plus dexamethasone treatment for relapsed/refractory multiple myeloma[J]. Int J Hematol, 2012, 95(5): 516-526. DOI: 10.1007/s12185-012-1035-8.
- [7] 安刚, 李承文, 李倩, 等. 免疫磁珠分选对荧光原位杂交检测多发性骨髓瘤细胞遗传学异常的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(1): 54-58.  
An G, Li CW, Li Q, et al. Influence of immunomagnetic sorting on detecting genetic aberration of multiple myeloma cells by interphase fluorescence in situ hybridization[J]. J Exp Hematol, 2011, 19(1): 54-58.
- [8] An G, Li Z, Tai YT, et al. The impact of clone size on the prognostic value of chromosome aberrations by fluorescence *in situ* hybridization in multiple myeloma[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(9): 2148-2156. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2576.
- [9] 杨瑞芳. 应用 CD138 磁珠分选结合 FISH 和胞浆轻链免疫荧光结合 FISH 检测多发性骨髓瘤的 1q21 扩增[J]. 中华医学遗传学杂志, 2011, 28(6): 686-689. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2011.06.020.
- Yang RF. Investigation of 1q21 amplification in patients with multiple myeloma using I-FISH and clg-FISH[J]. Chin J Med Genet, 2011, 28(6): 686-689. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2011.06.020.
- [10] Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, et al. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders[J]. Haematologica, 2012, 97(8): 1272-1277. DOI: 10.3324/haematol.2011.056176.
- [11] Hebraud B, Magrangeas F, Cleynen A, et al. Role of additional chromosomal changes in the prognostic value of t(4;14) and del(17p) in multiple myeloma: the IFM experience[J]. Blood, 2015, 125(13): 2095-2100. DOI: 10.1182/blood-2014-07-587964.
- [12] Avet-Loiseau H, Leleu X, Roussel M, et al. Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p)[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(30): 4630-4634. DOI: 10.1200/JCO.2010.28.3945.
- [13] Chang H, Jiang A, Qi C, et al. Impact of genomic aberrations including chromosome 1 abnormalities on the outcome of patients with relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide and dexamethasone[J]. Leuk Lymphoma, 2010, 51(11): 2084-2091. DOI: 10.3109/10428194.2010.524325.
- [14] Sasaki K, Lu G, Saliba RM, et al. Impact of t(11;14)(q13;q32) on the outcome of autologous hematopoietic cell transplantation in multiple myeloma[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2013, 19(8): 1227-1232. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.05.017.
- [15] Avet-Loiseau H, Attal M, Campion L, et al. Long-term analysis of the IFM 99 trials for myeloma: cytogenetic abnormalities [t(4;14), del(17p), 1q gains] play a major role in defining long-term survival[J]. J Clin Oncol, 2012, 30(16): 1949-1952. DOI: 10.1200/JCO.2011.36.5726.

(收稿日期: 2018-04-24)

(本文编辑 张谦)

## • 读者 • 作者 • 编者 •

### 中华医学会杂志社对一稿两投问题处理的声明

为维护中华医学会系列杂志的声誉和广大读者的利益,现将中华医学会系列杂志对一稿两投问题的处理声明如下:(1)本声明中所涉及的文稿均指原始研究的报告或尽管 2 篇文稿在文字的表达和讨论的叙述上可能存在某些不同之处,但这些文稿的主要数据和图表是相同的。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿以及在一种刊物发表摘要或初步报道而将全文投向另一期刊的文稿。上述各类文稿如作者要重复投稿,应向有关期刊编辑部作出说明。(2)如 1 篇文稿已以全文方式在某刊物发表,除非文种不同,否则不可再将该文投寄给他刊。(3)请作者所在单位在来稿信中注明该文稿有无一稿两投问题。(4)凡来稿在接到编辑部回执后满 3 个月未接到退稿,则表明稿件仍在处理中,作者欲投他刊,应事先与该刊编辑部联系并申述理由。(5)编辑部认为文稿有一稿两投嫌疑时,应认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者,在作出处理决定前请作者就此问题作出解释。期刊编辑部与作者双方意见发生分歧时,应由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。(6)一稿两投一经证实,期刊编辑部将择期在杂志中刊出其作者姓名和单位及撤销该论文的通告;对该作者作为第一作者所撰写的一切文稿,2 年内中华医学会系列杂志将拒绝其发表,并就此事件向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

中华医学会杂志社