

· 老年人血液疾病专栏 ·

## Waldenstrom巨球蛋白血症的形态学、细胞免疫表型、细胞遗传学以及分子生物学研究

路 瑾, 鲍 立, 卢锡京, 刘艳荣, 赖悦云, 黄晓军\*

(北京大学人民医院血液病研究所, 北京 100044)

**【摘要】目的** 分析Waldenstrom巨球蛋白血症(WM)形态学、细胞免疫表型、细胞遗传学以及分子生物学(MICM)异常的特点。**方法** 收集1999至2010年MICM资料完整的初治WM患者41例,男27例、女14例。回顾性分析其临床表现、骨髓形态、细胞免疫表型、细胞遗传学、免疫球蛋白重链基因重排、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)的表达及其与临床预后之间的关系。**结果** 本组中高危患者占58.5%。细胞免疫表型分析:CD19阳性100.0%,CD20阳性97.6%,CD38阳性74.1%,FMC7阳性36.9%,CD5阳性10.0%,CD23阳性31.6%,HLA-DR阳性83.3%,CXCR4阳性85.7%。常规细胞遗传学以及荧光原位杂交发现特异性细胞遗传学异常。PRAME在WM中表达增加,且与骨髓中淋巴细胞数相关,MAGEC1/CT7在WM中不表达。WM使用含利妥昔单抗联合化疗较环磷酰胺+长春地辛+醋酸泼尼松(COP)方案治疗未见生存优势。**结论** WM具有独特的MICM特征,通过MICM的综合检测有助于早期诊断WM并对疾病进行监测,利妥昔单抗治疗未见明显优势。

**【关键词】** Waldenstrom巨球蛋白血症;免疫表型分型;细胞遗传学;治疗

**【中图分类号】** R553

**【文献标识码】** A

**【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2013.00143

## Morphology, immunophenotypes, cytogenetics and molecular biology of Waldenstrom macroglobulinemia

LU Jin, BAO Li, LU Xi-Jing, LIU Yan-Rong, LAI Yue-Yun, HUANG Xiao-Jun\*

(Institute of Hematology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

**【Abstract】 Objective** To analyze the morphology, immunophenotypes, cytogenetics and molecular biology (MICM) abnormalities of Waldenstrom macroglobulinemia (WM). **Methods** Clinical data of 41 patients with newly diagnosed WM from 1999 to 2010 were collected and studied retrospectively (including 27 males and 14 females). Their clinical manifestations, cell morphology in bone marrow, immunophenotypes, and cytogenetics, immunoglobulin heavy chain gene rearrangement, and expression of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) were examined by G-banding and FISH, PCR-IgH and RQ-PCR-PRAME and MAGE C1/CT7, and the results were analyzed with clinical prognosis. **Results** The incidence of high risk patients accounted for 58.5%. Their immunophenotypes was 100.0% positive to CD19, 97.6% positive to CD20, 74.1% positive to CD38, 36.9% positive to FMC7, 10.0% positive to CD5, 31.6% positive to CD23, 83.3% positive to HLA-DR, and 85.7% positive to CXCR4. There were specific cytogenetic abnormalities found by G-Banding and FISH. RQ-PCR-PRAME had high quantities in WM, which was related to the number of lymphocyte in bone marrow. The MAGE C1/CT7 was negatively expressed in WM. There was no significant survival difference between the Rituximab containing regimen and COP (cyclophosphamide combined with vindesine and prednisone) in treatment of WM. **Conclusion** WM has specific MICM characteristics. Integrating those measures is helpful to diagnose WM as early as possible, and to monitor the disease during the treatment. Rituximab has no survival benefit in this cohort of patients.

**【Key words】** Waldenstrom macroglobulinemia; immunophenotyping; cytogenetics; therapy

*This work was supported by the Project of Science and Technology Plan of Beijing (Z111107067311070).*

*Corresponding author: HUANG Xiao-Jun, E-mail: xjhrm@medmail.com.cn*

Waldenstrom巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia, WM)是一种少见的老年血液恶

性肿瘤,国外报告其中位发病年龄为73岁,发病率3/1000 000<sup>[1]</sup>。WM最早于1944年由Waldenstrom描

收稿日期:2013-07-08;修回日期:2013-08-01

基金项目:北京市科技计划项目(Z111107067311070)

通信作者:黄晓军, Tel: 010-88324577, E-mail: xjhrm@medmail.com.cn

述,是一种浆细胞样淋巴细胞淋巴瘤累及骨髓后的诊断,占有血液恶性肿瘤的2%。由于该病少见,国内尚无报道综合描述其形态、细胞免疫表型、细胞遗传学以及分子生物学(morphology, immunophenotype, cytogenetics and molecular, MICM)异常。本文对我所自1999年至2010年资料完整的41例原发性WM患者的临床表现、流行病学史、MICM以及治疗转归进行总结,以期了解中国WM患者的现状以及与国外患者的异同。

## 1 对象与方法

### 1.1 临床资料

选取1999年至2010年MICM资料完整的初治WM患者41例。男27例,女14例。诊断时中位年龄65岁,从有症状到明确诊断中位时间6个月。伴随疾病包括丙型肝炎2例,乙型肝炎1例。采用国际预后积分系统<sup>[2]</sup>进行危险分层,按照年龄>65岁、血红蛋白 $\leq 115\text{g/L}$ 、血小板计数 $\leq 100 \times 10^9/\text{L}$ 、 $\beta_2$ 微球蛋白 $> 3\text{mg/L}$ 、IgM $> 70\text{g/L}$ 这5个危险因素分为高、中、低危:年龄65岁以下,只具有其他危险因素1个为低危;年龄65岁以上或是具有其他危险因素2个以上为中危;年龄65岁以上,且有2个或2个以上其他危险因素为高危。其中高危24例(58.5%),中危12例(29.2%),低危5例(12.2%)。诊断以及疗效评判采用2013年国际工作组诊断及疗效评判标准<sup>[3]</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 黑色素瘤优先表达抗原及MAGEC1/CT7测定 黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)以及MAGEC1/CT7(用ABL作为内参)的实时定量检测采用文献报告方法<sup>[4]</sup>。

1.2.2 细胞免疫表型检测 主要采用4色抗体组合,主要检测的抗原CD20, CD19, CD45, CD103, CD5, CD23, CD11c, CD38, FMC7, Kappa, Lamda, CXCR4以及HLA-DR,由于时间跨度较大,检测的抗原有所不同。所有单抗购自BD公司,流式细胞仪为FASCaliber(BD公司)。

1.2.3 G显带以及FISH检测 标本来源均为骨髓,接种于含有20%小牛血清的RPMI1640培养液中,细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ ,置于 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 孵箱中培养24h,按我所常规的制片和G显带技术进行染色体分析。核型分析和异常克隆描述按人类细胞遗传学国际命名体制[ISCN(2005)]。新制备的染色体玻片在 $56^\circ\text{C}$ 下老化30~60min或室温下过夜老化。将玻片在 $37^\circ\text{C}$   $2 \times \text{SSC}$ 溶液中孵育30min,然后依次置于70%、85%

和100%乙醇中各脱水3min。自然干燥玻片。按照FISH操作步骤进行FISH实验。5个GLP探针 $2\mu\text{l}$ :(1)RB1缺失探针(13q14);(2)1q21扩增探针(1q21);(3)IgH双色分离探针(14q32);(4)P53缺失探针(17p13);(5)D13S319缺失探针(13q14)。

1.2.4 一线治疗方案 18例患者采用环磷酰胺+长春碱+醋酸泼尼松及类似方案,5例患者初始治疗为苯丁酸氮芥,3例患者初始治疗为氟达拉滨联合环磷酰胺,2例使用沙利度胺作为初始治疗,2例患者使用硼替佐米联合地塞米松作为初始治疗。11例患者使用含利妥昔单抗方案,其中联合环磷酰胺、长春地辛、醋酸泼尼松(R-COP)8例,联合环磷酰胺、醋酸泼尼松(R-CP)1例,联合氟达拉滨、环磷酰胺(R-FC)1例,单药利妥昔单抗(美罗华)1例。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS17.0统计软件进行分析。不同方案之间生存率的比较采用Log-Rank检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 临床表现、初诊时的血常规及M蛋白检查

头晕27例(65.9%),乏力35例(85.4%),神经系统症状10例(24.4%),各种部位出血11例(26.8%),包括鼻、皮肤、牙龈、眼底以及2例消化道出血。浅表淋巴结肿大12例(29.3%),肝和(或)脾大12例(29.3%)。诊断时白细胞 $(2.1 \sim 13.0) \times 10^9/\text{L}$ ,中位 $4.8 \times 10^9/\text{L}$ ;血红蛋白 $45 \sim 149\text{g/L}$ ,中位 $78\text{g/L}$ ;血小板 $(21 \sim 346) \times 10^9/\text{L}$ ,中位 $99 \times 10^9/\text{L}$ ;红细胞沉降率 $57 \sim 165\text{mm/h}$ ,中位 $140\text{mm/h}$ ;乳酸脱氢酶 $64 \sim 441\text{U/L}$ ,中位 $150\text{U/L}$ ;IgM $0.68 \sim 144.00\text{g/L}$ ,中位 $59.30\text{g/L}$ ,6例患者为IgM Lamda,35例为IgM Kappa(73.2%)。

### 2.2 骨髓形态以及骨髓活检

骨髓增生3~4级,淋巴细胞比例23%~99%,中位65.75%,其中15例患者有明显的浆样细胞,3例出现双核浆细胞,其余形态均为成熟淋巴细胞。16例患者进行骨髓活检,其中3例患者伴有明显骨髓纤维化,网织染色(++++) ,所有16例患者可见小梁间区或弥漫性大量增生的淋巴细胞或浆细胞样淋巴细胞。

### 2.3 细胞免疫表型

22例患者检测的细胞免疫表型中主要表达sIg阳性、CD20阳性、CD19阳性以及CD38(表1);而CD103, CD10, CD25为阴性;部分细胞表达FMC7,

少数表达CD23, CD5, CD138, CD11c阳性1例。在5例检测了HLA-DR的患者中5例均阳性, 4例检测了CXCR4的患者中3例阳性。

表1 WM免疫表型  
Table 1 Immunophenotype of WM

Antigen	Frequency	Positive(%)
sIg	41/41	100.0
CD20	40/41	97.6
CD19	41/41	100.0
CD103	0/22	0.0
CD38	20/27	74.1
CD138	4/17	23.5
FMC7	7/19	36.9
CD5	2/20	10.0
CD23	6/19	31.6
CD10	0/24	0.0
CD11c	2/16	12.5
CD25	0/13	0.0
HLA-DR	5/6	83.3
CXCR4	5/7	85.7

WM: Waldenstrom macroglobulinemia

### 2.4 细胞遗传学检查

35例患者进行常规细胞遗传学检查, 5例出现异常核型, 其中6q21缺失2例, inv9有1例, t(2; 4) 1例, -y出现1例; 1例未见分裂相, 其余29例均为正常核型。在25例进行FISH检查的患者中(包括1q21扩增、13p缺失、17p缺失以及IgH) 仅2例出现IgH重组, 其余未见异常。

### 2.5 分子生物学检查

8例检测了IgH重排的患者仅1例阳性, 21例检测PRAME患者中12例 $\geq 0.3\%$ , 阳性率57.1%, 定量值差异较大, 范围0.05%~203.50%(阳性界值0.30%), 分析PRAME阳性患者与白细胞、血红蛋白、血小板、乳酸脱氢酶、红细胞沉降率、C反应蛋白、血IgM数值、骨髓中淋巴细胞数值、 $\beta_2$ 微球蛋白、流式细胞仪检测的表面抗原的表达的相关性, 结果显示PRAME水平与骨髓中淋巴细胞数有一定相关性( $r = 0.751, P = 0.085$ )。7例患者检测PCR-MAGEC1/CT7均为阴性。

### 2.6 治疗

在41例患者中, 11例采用了含美罗华方案, 主要为R-COP, 在使用美罗华后, 5例患者出现输注相关反应, 表现为寒战、高热, 地塞米松治疗效果不显著, 最长持续时间6d, 1例因呼吸窘迫停止用药。在10例完成至少2个周期的患者中2例患者出现IgM的反跳, 其中1例最高升至98g/L, 二线方案使用硼替佐米联合

环磷酰胺、地塞米松(BCD)后1个疗程达部分缓解。可评估利妥昔单抗的疗效的9例患者中, 1例完全缓解(R-FC方案), 1例微小缓解, 7例部分缓解, 总有效率100%, 完全缓解率11.1%。使用利妥昔单抗方案与COP方案无疾病进展生存期及总体生存差异无统计学意义( $r = 0.298, P = 0.197$ ; 图1)。

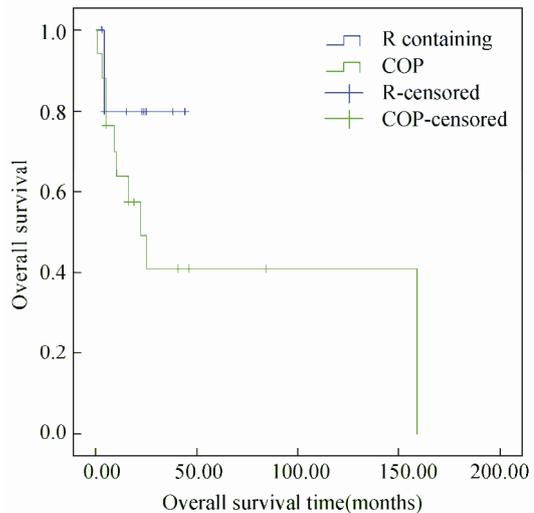
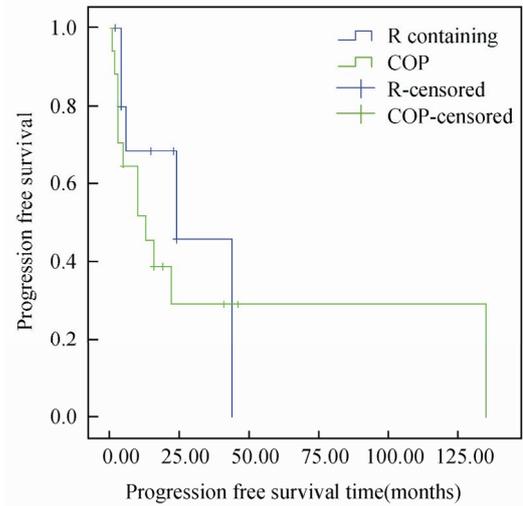


图1 WM是否使用利妥昔单抗的无疾病进展生存及总体生存  
Figure 1 Progression free survival and overall survival for WM with Rituximab containing or not  
WM: Waldenstrom macroglobulinemia; R: Rituximab; COP: cyclophosphamide combined with vindesine and prednisone

## 3 讨论

WM是一种罕见的老年血液恶性肿瘤, 由于临床表现的不典型常被漏诊, 明确其常见的临床表现以及实验室检查特点有助于早期识别。多数WM呈惰性淋巴瘤的进程表现, 但有10%~15%的患者可临床进展迅速。在临床中需及早甄别这些患者。本组41例患者的结果显示, 82%为IgM Kappa, 与国外报告相近, 高危患者占58.5%, 诊断可能存在不

足以及滞后现象,半数以上患者直至疾病严重阶段才能被诊断出来。伴有丙型肝炎仅2例,低于意大利报告的31%的阳性率。

最近在WM研究方面最大的亮点莫过于发现90%以上的WM患者MYD88L265P突变阳性(265位点的亮氨酸突变为脯氨酸)<sup>[5]</sup>,但是目前该项检查还不能在国内开展,现阶段仍应以流式细胞免疫表型作为主要诊断手段,故在此我们着重分析WM的免疫表型。在2003年之后国际巨球蛋白血症工作组就提出新的诊断标准不再强调IgM的数值以及骨髓中淋巴细胞的数值,而是只要存在单克隆的IgM同时有浆细胞样淋巴细胞或是浆细胞就可以诊断,在使用新的诊断体系后,WM的诊断标准较前更易于临床接受,但由于未限定IgM的数值以及骨髓中淋巴细胞的数值可能会存在误诊,如在边缘带淋巴瘤以及慢性淋巴细胞白血病/小细胞淋巴瘤中、滤泡淋巴瘤、套细胞淋巴瘤均有报道伴发IgM的升高,此时凸显了细胞免疫表型的诊断价值。我们的结果显示WM患者主要表达CD19, CD20, CD38, HLADR和CXCR4,部分患者表达CD138, FMC7以及CD23,不表达CD10和CD25。我们的结果中100%的患者CD19阳性,97.6%患者CD20阳性,与国外资料报告一致,与Konoplev等<sup>[6]</sup>的结果相比,CD23, CD11c以及CD25的比例明显要低,分别为31.6% vs 61.0%, 12.5% vs 81.0%, 0.0 vs 71.0%,但与OWEN等<sup>[7]</sup>报告的结果较为接近,可能与各个实验室使用标记的荧光素不同以及患者群不同有关。尽管不是在所有患者中都检测了HLA-DR以及CXCR4,但是我们发现在WM中其阳性率较高,HLA-DR作为白血病的抗原在白血病的诊断中有意义,但其在WM中的意义尚有待于进一步研究。CXCR4是与骨髓瘤以及WM细胞与基质细胞之间的黏附有关的分子,AMD3100可以拮抗其并增加其对硼替佐米的敏感性<sup>[4]</sup>,未来有可能成为治疗的靶点之一。

在WM的形态学以及免疫表型上我们都发现了浆细胞的出现,甚至在同一患者中出现克隆性的浆细胞以及克隆性的B细胞,在形态上出现既有双核浆细胞也有浆细胞样淋巴细胞,这一现象在最近一些研究中亦有报道<sup>[8]</sup>,但其临床意义尚不完全明了,提示在WM中可能也存在异质性。由于WM是少见病,未来多中心的合作研究有望进一步分析其临床意义。

常规细胞遗传学检查有40%~50%的患者出现6q的缺失<sup>[9]</sup>,在我们的35例进行常规细胞遗传学检查的患者中仅5例出现异常核型,在这5例异常核型

中6q-占2例。染色体+4被认为是WM较为特异的异常,虽然敏感性差,仅见于20%的WM<sup>[10]</sup>,在我们的结果中仅1例患者出现涉及4号染色体的异常,即t(2;4)。在我们检测的25例FISH结果中显示未见13q-、17p-,仅2例出现IgH重组信号,说明WM与多发性骨髓瘤不同,这些经常累及骨髓瘤的细胞遗传学异常在WM中并不多见。

尽管PRAME在WM中的意义尚无相关研究,但我们发现在检测的21例患者中12例阳性,1例为中危患者,其余11例均为高危患者,但分析其与疾病危险分层、IgM数值均无明显相关性;与骨髓中淋巴细胞数值有一定相关性,显示可能是一个肿瘤负荷的指标,尤其是利妥昔单抗在WM使用后部分患者会出现IgM的反跳现象,PRAME的定量检测会更准确地评估是耐药还是药物反应。由于IgM为一大分子,在体外容易形成多聚体,从而在蛋白电泳上形成一个扁而宽的峰带,而造成M蛋白检测的偏差,同时由于偏向于β区,在M蛋白含量较少的情况下,由于与IgA类似,IgM的M蛋白常常位于β区,从而会和正常免疫球蛋白混在一起不容易区分,而会出现M蛋白的假阴性<sup>[11]</sup>。近年来研究发现,在WM中MYD88L265D为特异性突变<sup>[5]</sup>,可用于鉴别多发性骨髓瘤和WM,也有人提出在WM中使用PCR方法来定量评估,但目前尚不能实现常规临床监测。我们的结果初步显示在WM中,PRAME可以作为一个很好的预后以及疗效评判标准,无论在IgM > 50g/L还是 < 10g/L都与肿瘤负荷有很好的相关性,可以作为一个疗效评估的指标与血清IgM定量以及M蛋白含量进行综合疗效判定。而MAGEC1/CT7在WM中均为阴性,可用于鉴别浆细胞疾病,后者90%以上均为阳性。

在WM的治疗中推荐以利妥昔单抗为主的方案,但我们的经验显示利妥昔单抗在WM患者中副作用较大,在11例使用患者中,高热常见且持续时间较长,且目前资料显示利妥昔单抗较COP方案并未显示明显的生存优势以及疾病进展方面的优势,但由于本研究的病例数偏少,有待于进一步积累病例后分析。

总之,我们的这41例WM临床资料显示,高危患者占到58.5%,高于国外报告49%的高危比例,除了常见文献中报告的抗原表达之外,我们发现在WM中HLA-DR以及CXCR4的表达也较高,可能成为未来治疗的靶点之一。同时PRAME在WM中阳性率较高,与骨髓中淋巴细胞数呈正相关,可用于实时检测肿瘤负荷。

【参考文献】

- [1] D'Souza A, Ansell S, Reeder C, *et al.* Waldenstrom macroglobulinaemia: the key questions[J]. *Br J Haematol*, 2013, 162(3): 295-303.
- [2] Morel P, Duhamel A, Gobbi P, *et al.* International prognostic scoring system for Waldenstrom macroglobulinemia[J]. *Blood*, 2009, 113(18): 4163-4170.
- [3] Owen RG, Kyle RA, Stone MJ, *et al.* Response assessment in Waldenstrom macroglobulinaemia: update from the VIth International Workshop[J]. *Br J Haematol*, 2013, 160(2): 171-176.
- [4] Qin Y, Zhu H, Jiang B, *et al.* Expression patterns of WT1 and PRAME in acute myeloid leukemia patients and their usefulness for monitoring minimal residual disease[J]. *Leuk Res*, 2009, 33(3): 384-390.
- [5] Treon SP, Xu L, Yang G, *et al.* MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(9): 826-833.
- [6] Konoplev S, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE, *et al.* Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia[J]. *Am J Clin Pathol*, 2005, 124(3): 414-420.
- [7] Owen RG, Hillmen P, Rawstron AC. CD52 expression in Waldenstrom's macroglobulinemia: implications for alemtuzumab therapy and response assessment[J]. *Clin Lymphoma*, 2005, 5(4): 278-281.
- [8] Zehentner BK, de Baca ME, Wells DA, *et al.* Intracloal heterogeneity in concomitant monoclonal lymphocyte and plasma cell populations: combining flow cytometric cell sorting with molecular monoclonality profiling[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2013, 13(2): 214-217.
- [9] Chang H, Qi C, Trieu Y, *et al.* Prognostic relevance of 6q deletion in Waldenstrom's macroglobulinemia: a multicenter study[J]. *Clin Lymphoma Myeloma*, 2009, 9(1): 36-38.
- [10] Terre C, Nguyen-Khac F, Barin C, *et al.* Trisomy 4, a new chromosomal abnormality in Waldenstrom's macroglobulinemia: a study of 39 cases[J]. *Leukemia*, 2006, 20(9): 1634-1636.
- [11] Uljon SN, Treon SP, Tripsas CK, *et al.* Challenges with serum protein electrophoresis in assessing progression and clinical response in patients with waldenstrom macroglobulinemia[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2013, 13(2): 247-249.

(编辑: 张青山)