

多发性骨髓瘤残留监测的方法学进展

胡建娥¹, 孙秋艳², 李良琼¹, 唐燕¹

重庆三峡中心医院检验科¹、药学部², 重庆 404000

【摘要】 多发性骨髓瘤是发生于骨髓的多灶性浆细胞肿瘤,它与血清和/或尿M-蛋白有关。大多数病例有广泛的骨髓累及。临床表现变化大,从无症状到侵袭,其临床表现主要是由于异常的免疫球蛋白链沉积所致。近年来,多发性骨髓瘤(MM)的治疗方法发生了很大的变化,大大提高了多发性骨髓瘤的缓解率,但是其复发率也很高,表明现有的检测方法不能检测出一些微量的持续性异常。传统的外周血、骨髓细胞形态学、影像学检查等检测手段仍很重要,但是, Allele-specific 聚合酶链反应、下一代测序和多色流式细胞术使微小残留病(MRD)检测灵敏度达到 10^{-5} ~ 10^{-6} ,具有更高敏感性,而新一代的质谱流式细胞术将更有助于评估治疗反应和理解耐药机制。

【关键词】 多发性骨髓瘤;最小残留病灶检测;流式细胞术;下一代测序;聚合式多聚酶链反应

【中图分类号】 R739.42 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2020)01-0118-05

Advances of multiple myeloma detection in multiple myeloma. HU Jian-e¹, SUN Qiu-yan², LI Liang-qiong¹, TANG Yan¹. Department of Clinical Laboratory¹, Department of Clinical Pharmacy², Chongqing Three George Hospital, Chongqing 404000, CHINA

【Abstract】 Multiple myeloma (MM) is a multifocal plasma cell tumor, arising from bone marrow, which is associated with serum and/or urinary M-protein. And it invades bone marrow extensively in most cases. Clinical manifestations vary significantly, from symptomless to invasion, and they are mainly due to abnormal immunoglobulin chain deposition. Recently, the treatment of multiple myeloma has undergone great changes, which considerably improved the remission rate of multiple myeloma, but its recurrence rate is also high, indicating that the existing detection methods can not detect some minor persistent abnormalities. Though traditional monitoring methods such as the morphology of peripheral blood and bone marrow cells and the imageology are still important, allele-specific polymerase chain reaction, new-generation sequencing (NGS) and multicolor flow cytometry enable minimal residual disease (MRD) detection have the higher sensitivity up to 10^{-5} to 10^{-6} . The flow cytometry with mass spectrometry (MS) will help assess responses to novel therapeutics and increase our understanding of mechanisms of resistance.

【Key words】 Multiple myeloma (MM); Minimal residual disease (MRD) detection; Flow cytometry; New-generation sequencing (NGS); Polymerase chain reaction (PCR)

多发性骨髓瘤(MM)是一种恶性疾病,其特征是骨髓或髓外(很少见)出现克隆增殖的异常浆细胞(PC),产生单克隆免疫球蛋白(IgG、IgA、IgD、IgE 免疫球蛋白)和/或单克隆免疫球蛋白轻链(κ/λ)。近年来,多发性骨髓瘤的治疗方法迅速发展^[1-3]。使用某些药物,如沙利度胺、来利多胺进行高剂量化疗(HDCT)后,然后进行自体造血干细胞移植,使多发性骨髓瘤患者能够实现相当高的总体生存率(OS)。靶向治疗以及自体造血干细胞移植(AUTO-HSCT)促进了多中心国际临床研究。新型药物的治疗增加了完全缓解率(CR),然而在高危和难治性的多发性骨髓瘤患者中,虽然有超过30%的MM病例达到CR,但是其中大多数患者都有复发。CR,甚至是严格意义的完全缓解(sCR)并不足以识别患者群体对治疗的良好反应和疾病进展的低风险。因此有必要对使用高敏感度和高特异性的方法对缓解程度进行更深层次的评价。AS-PCR和多色流

式细胞术(MFC)是能够最大限度的识别出在治疗结束后仍存在的恶性浆细胞的主要方法。2011年,IMWG基于用AS-PCR和MFC检测异常残留浆细胞的优势,增加了免疫表型和分子缓解的条件^[4]。本文对检测和评估多发性骨髓瘤缓解的传统方法以及新近出现的方法学做一简要的综述。

1 骨髓形态学

骨髓细胞形态学是目前最广泛的评估肿瘤负荷的方法。CR的标准是骨髓涂片中的浆细胞<5%。但是形态学研究应与免疫学检查相结合^[5]。CHEE等^[6]的一项研究表明,仅单克隆轻链(FLC)检测不足以确定CR,10%的FLC比率正常的患者在BM涂片中存在>5%的浆细胞。在一组92例免疫化学检测结果阴性的患者中,13例患者(14%)在骨髓涂片中浆细胞大于5%,而这些患者的总生存率低于<5%浆细胞的患者(分别为5.7年和7.9年)。通过骨髓细胞形态

通讯作者:李良琼,副主任检验师,E-mail:84985996@qq.com

学计数浆细胞的比例,不能很好的评估患者的预后及复发。

2 血清和尿液的免疫学检测

通过电泳和免疫固定电泳法定量测定血清和尿液中的M-蛋白和FLC(游离单克隆轻链),用于诊断和监测MM的治疗反应。血清游离单克隆轻链(FLC)定量已成为常规检测。FLC比率是MM的一个独立的预后因子,并且能评估疾病的进展^[7]。然而,使用FLC定量评估MRD并不能有效地划分不同的风险群体。根据MARTINEZ-LOPEZ等^[8]的研究,在94例CR患者中,69例患者(73%)达到了sCR,但在CR和sCR组中,疾病的进展时间(CR和sCR的平均进展时间分别为53和62个月)没有明显的差异。在由LOPEZ-ANGLANDA等^[9]进行的130例患者的研究获得了类似的数据。PAIVA等^[10]的研究表明,根据GEM 05>65岁的治疗方案,在260例接受治疗的MM患者中,43%达到CR,30%达到sCR,30%达到免疫化学特异性缓解(IR)。然而,在CR和sCR患者中,生存率没有明显的差异;与CR和sCR患者相比,IR患者表现出了较长的无复发生存期(RFS)。此外,一些CR患者保留了阳性的免疫固定电泳检测结果,但在这些患者中没有发现M蛋白。在MRD阳性患者中,其免疫固定电泳检测结果阴性,达到了IR,但在这些患者中,随后又检测到M-蛋白(中位数为3个月)。在sCR患者中观察到类似的情况,在诱导治疗后13个月表现出疾病进展^[11]。

3 细胞遗传学检测

有研究显示,影响多发性骨髓瘤进展期和OS最重要的独立参数是FISH检测细胞遗传畸变、IR及年龄(60岁以下或以上)^[11]。发病时检测到的染色体缺陷决定了MM的风险。用FISH方法预测疾病所需的基本组套包括染色体易位t(4;14)(p16;q32)(出现频率:13%)、t(14;16)(q32;q23)(出现频率:3%)和染色体缺失del17p13(出现频率:12%)。除此之外还可包括t(11;14)(q13;q32)(出现频率:15%)、13q缺失(出现频率:46%)、1号染色体的异常,如1q重复(出现频率:38%)^[12]。高危的多发性骨髓瘤包括t(4;14)、t(14;16)或del(17p)^[13]。微小残留病诊断(MRD)基于FISH检测有一定的局限性,一方面由于治疗后残余浆细胞数量少,另一方面FISH方法的灵敏度不足(10^{-2} ~ 10^{-3}),只高于形态学检查(10^{-1})一个数量级。

4 Allele-specific PCR

该方法是通过检测免疫球蛋白基因可变区域的特异性重排来确定肿瘤浆细胞的克隆性。B细胞的正常成熟包括V、D和J片段的重组,这些片段的组合形成了复杂的Ig基因(IGH、IGκ和IGλ),其编码多个可变免疫球蛋白分子结构域。在V(D)J段连接的位点上随机插入和缺失,引起每一个B细胞(包括癌细胞)独特

的可变区。在每个患者的骨髓瘤细胞中发现的连接区域被用作特定于肿瘤特异性的靶标,以设计特定于等位基因(或患者特异性)引物。自上世纪90年代以来,巢式PCR用于检测克隆重组,随之而来的是实时定量PCR技术。

AS-PCR的缺点包括技术困难和适用性有限(没有适当的靶基因可以分析)。PUIG等^[14]的研究显示,AS-PCR只能在42%的多发性骨髓瘤病例中使用,而在SARASQUETE等^[15]的研究中适用于75%的病例。然而,在SILVENNOINEN等^[16]的研究中进行的一系列修饰之后,AS-PCR的适用于100%的病例。此外,分子方法没有考虑遗传异质性和克隆选择,可能导致在疾病治疗过程中一些亚克隆检测不到^[17-18]。然而,选择更好的引物和探针^[16],或选择除IgH-VDJ以外的靶点,如kappa缺失区^[19],可以提高ASO-PCR的特异性、敏感性和适用性。

5 下一代测序

下一代测序(NGS)是基于使用一套引物(而不是针对每一个患者),它允许放大和测序给定样本的免疫球蛋白基因的所有重组片段($\geq 10^5$)。这个方法证明适用于超过90%的MM病例,其敏感性 $\leq 10^{-6}$ 。在MM初诊时,检测到Ig基因的克隆重组,其用于作为后面检测MRD的靶标^[21]。在MARTINEZ-LOPEZ等^[21]的研究中,MRD患者($n=133$)被分成三组:高水平组($\geq 10^{-3}$)、中等水平组(10^{-3} ~ 10^{-5})和低水平组($< 10^{-5}$);结果显示各组在进展时间上有很大差异(分别为27、48和80个月)。NGS定量检测最小残留病灶有一定的困难,尤其是在Ig基因的多克隆重组中,检测到的克隆重排的比例取决于正常B细胞数量多少,其数量是变化的,并且与治疗方式有关。NGS采用MM患者外周血评估MRD显示出其优势,这是一种无创的检测方法^[21-22]。

6 全身磁共振成像(MRI)和正电子发射/计算机断层摄影(PET/CT)

由于多发性骨髓瘤存在髓外复发的可能,MRI和PET/CT的使用使得BM中MRD阴性的患者能够全面的评估缓解状态。GALTSEVA等^[23]在2015-2016年进行的一项研究中发现,113例患者中,有4例BM中MRD阴性,但在血液中检测到M蛋白,MRI检测确认存在髓外软组织浆细胞瘤。全身MRI是检测脊椎骨的病变、提供完整的相关组织损伤程度和性质以及BM浸润的性质(局限性、弥漫性等)的最敏感的非侵入性可视化方法。但是值得注意的是,无论患者对治疗方案有无反应,在治疗后的几个月,都会观察到局部病变持续存在,这与反应性的水肿或者残留病变细胞的存在有关,导致血清学反应与MRI对缓解评估不一致。所以建议在治疗后3个月进行MRI

检查^[24]。PET/CT 通过 FDG 的摄取评估髓外和髓内病变的细胞代谢,从而定位病变,并识别溶骨损伤^[25]。事实证明,HDCT 和/或 AUTO-HSCT 后,存在异常的 FDG 摄取细胞,提示预后不良^[26]。有研究显示,采用沙立度胺/地塞米松诱导治疗,然后进行 AUTO-HSCT,有 63% 的患者 PET/CT 显示存在病变,这些患者显示不好的预后;自体造血干细胞移植后 3 个月无异常 FDG 摄取的患者预后较好;CR 患者中有 23% 显示摄取 FDG,这些患者生存期较短^[27]。但是,PET/CT 在感染或炎症过程中可产生假阳性和假阴性^[280]。对比全身 MRI 和 PET/CT,表明 PET/CT 具有与 MRI 相似的敏感性,但特异性更强。

7 多色流式细胞

浆细胞是产生抗体终末期 B 细胞。尽管浆细胞几乎可以在每个组织中产生,但大多数浆细胞是由抗原激活的 B 淋巴细胞通过多步骤转化成熟而来的,从次级淋巴组织如淋巴结、脾脏和黏膜相关的淋巴组织开始产生^[29]。这些组织中,新近产生的浆细胞通过外周血迁移,到达骨髓和其他外围组织(如脾脏和胃肠黏膜)中存活下来,这些地方通常可以检测到长期存活的浆细胞^[30]。因此,早期的浆细胞可以在次级淋巴组织和外周血中检测到,而终端分化的浆细胞通常出现在骨髓中^[31]。骨髓浆细胞通常缺乏大多数泛 B 细胞标记的表达,如 CD20、CD22 和膜表面免疫球蛋白(SmIg);此外,骨髓浆细胞显示出异质性的 CD19 的表达,CD45^{low} 和 CD56^{low}、CD38 和 CD138 高表达^[32]。值得注意的是,尽管骨髓浆细胞的常见免疫表型如此,但是骨髓浆细胞是由几个不同表型的细胞亚群组成,其显示了与成熟相关的特征^[33]。例如,大多数正常/反应的骨髓浆细胞表达 CD19,但是其中有约三分之一的正常浆细胞 CD19⁻;相似的是,尽管大多数 CD19⁺、CD19⁻ 正常/反应性骨髓浆细胞 CD45⁺CD56⁻CD81⁺,但是一小部分 CD45⁻CD81⁻CD56⁺ 的是正常/反应性浆细胞,特别是 CD19⁻ 骨髓浆细胞群中^[34-35]。这些少量的小亚群的骨髓浆细胞的精确生理意义还有待进一步研究,有可能与不同的成熟度的浆细胞有关,随着细胞成熟度的增加,细胞数量减少,例如,从主要 CD19⁺CD56⁻ 细胞群到小的 CD19⁻CD56⁻ 和 CD19⁻CD56⁺ 细胞群^[36]。

骨髓瘤细胞的表型与正常的浆细胞不同。用于检测骨髓瘤 MRD 相关的异常抗原表达标记包括 CD19、CD56、CD45、CD38、CD27,以及较少的 CD20、CD28、CD33、CD117 和 SmIg^[37]。联合检测这些标记(或其中部分标记)和胞质免疫球蛋白(CyIg) κ/λ 轻链可进一步确定可疑的克隆性浆细胞。近年来,新发现了一些骨髓瘤细胞的抗原标记,其中,CD81、CD200、CD54 和 CD307 等已成为最为熟知的标记^[38-39]。但是,

骨髓瘤细胞出现每个异常标记的频率变化很大^[40-41],除此之外,标记抗体所用的荧光素、抗体的克隆号及不同厂家生产的抗体都可能对骨髓瘤细胞表型产生影响。总而言之,不能采用单一的抗原表达异常来判断正常浆细胞与肿瘤浆细胞。确定正常与肿瘤浆细胞,需要采用多种抗体标记共同判定。例如,CD19 在肿瘤性浆细胞上是不表达的,但是 MM-MRD 时 CD19 可以表达在肿瘤浆细胞上^[42],也有大约 30% 的病例,反应性/正常浆细胞不表达 CD19^[43],相似的,CD56 被认为表达在骨髓瘤细胞,但是,有少部分正常/反应性的浆细胞出现 CD56 不同强度的表达^[44]。CD28、CD45、CD81、CD27 和 CD200 等异常标记也表达在一些正常浆细胞。但是,到目前为止,CD117 还未发现表达于正常浆细胞。因此,不能仅凭一个或者两个细胞标记判断浆细胞的正常与否,对怀疑的小亚群浆细胞加做更多的抗原标记,如 cKAPPA 或 cLAMBDA,提高检测的敏感度^[45-46]。

8 质谱流式细胞术^[47]

目前的流式细胞检测系统采用荧光基团标记抗体,荧光基团的发射光谱一般比较宽,会发生重叠,这一方面限制了检测通道的数量,很多通道的信号需要复杂的补偿计算;而质谱流式细胞仪采用金属同位素标记,可以同时检测大量的分子标记,实验数据表明,相邻通道间的干扰很少,无需计算补偿;金属元素在细胞中的含量极低,且金属同位素与细胞组分的非特异性结合能力极低,所以信号背景也极低。采用飞行质谱流式细胞技术,可以同时检测大量的分子标记,其不仅能检测出极低量的骨髓瘤细胞,还可以分析其微环境,有助于评估新的治疗方法和对耐药的理解。质谱流式细胞术是利用质谱原理对单细胞进行多参数检测的流式技术。它继承了传统流式细胞仪的高速分析的特点,又具有质谱检测的高分辨能力。针对细胞表面抗原的靶向治疗的出现,相应的就需要采用更多的抗体标记来检测残留的异常细胞,质谱流式细胞术通道间的低补偿,可以同时检测大量的分子标记,这是未来 MRD 检测的一个新的技术。

9 小结

靶向治疗以及免疫治疗等新的治疗方法的出现大大提高了治疗的有效性和缓解率。传统的骨髓细胞形态学和免疫化学检测方法并不能充分评估患者的生存率和无进展生存期。MRD 阴性的患者逐年增加,研究也证实了 MRD 阴性的患者具有更长的 PFS 和 OS。影像学检查有助于全面评估患者的缓解状态,流式细胞术和分子检测有具有较高的分析敏感性,但是每一种方法都有它自己的缺点。这也显示出了平行分析各种检测结果的重要性,尤其是在不同方法的检测结果不一致的时候。随着检测技术的发展,识别罕

见异常浆细胞的灵敏度可以达到 10^{-6} , 分子检测 (ASO-PCR 和 NGS)、细胞检测 (MFC) 都能有效的监测多发性骨髓瘤的 MRD, 这些监测方法也有助于临床调整治疗方案, 而质谱流式细胞术将更有助于检测出微量残存的异常浆细胞。

参考文献

- [1] BIANCHI G, RICHARDSON PG, ANDERSON KC. Promising therapies in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2015, 126(3): 300-310.
- [2] LONIAL S, DURIE B, PALUMBO A, et al. Monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma: current status and future perspectives [J]. *Leukemia*, 2016, 30(3): 526-535.
- [3] RAJKUMAR SV, KUMAR S. Multiple myeloma: diagnosis and treatment [J]. *Mayo Clin Proc*, 2016, 91(3): 101-119.
- [4] RAJKUMAR S, HAROUSSEAU J, DURIE B, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1 [J]. *Blood*, 2011, 117(18): 4691-4695.
- [5] JOSHI R, HORNCastle D, ELDERFIELD K, et al. Bone marrow trephine combined with immunohistochemistry is superior to bone marrow aspirate in follow-up of myeloma patients [J]. *J Clin Pathol*, 2008, 6(2): 213-216.
- [6] CHEE C, KUMAR S, LARSON D, et al. The importance of bone marrow examination in determining complete response to therapy in patients with multiple myeloma [J]. *Blood*, 2009, 114(13): 2617-2618.
- [7] KYRTSONIS M, VASSILAKOPOULOS T, KAFASI N, et al. Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma [J]. *Br J Haematol*, 2007, 137(3): 240-243.
- [8] MARTINEZ-LOPEZ J, PAIVA B, LOPEZ-ANGLADA L, et al. Critical analysis of the stringent complete response in multiple myeloma: contribution of sFLC and bone marrow clonality [J]. *Blood*, 2015, 126(7): 858-862.
- [9] LOPEZ-ANGLADA L, CUETO-FELGUEROSO C, MATEOS MV, et al. Usefulness of serum-free- light-chains-ratio (SFLCR) and serum heavy-light-chains-ratio (SHLCR) in multiple myeloma in the context of three GEM/Pethema clinical trials [J]. *Blood*, 2015, 126(23): 2962.
- [10] PAIVA B, MARTINEZ-LOPEZ J, VIDRIALES M, et al. Comparison of immuno-fixation, serum free light chain, and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(33): 1627-1633.
- [11] PAIVA B, GUTIERREZ N, ROSINOL L, et al. High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2011, 119(3): 687-691.
- [12] KUIPER R, VAN DUIN M, VAN VLIET M, et al. Prediction of high-and low-risk multiple myeloma based on gene expression and the International Staging System [J]. *Blood*, 2015, 126(17): 1996-2004.
- [13] FONSECA R, BERGSAGEL P, DRACH J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review [J]. *Leukemia*, 2009, 23(12): 2210-2221.
- [14] PUIG N, SARASQUETE M, BALANZATEGUI A, et al. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry [J]. *Leukemia*, 2014, 28(2): 391-397.
- [15] SARASQUETE ME, GARCÍA-SANZ R, GONZÁLEZ D, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry [J]. *Haematologica*, 2005, 90(10): 1365-1372.
- [16] SILVENNOINEN R, LUNDAN T, KAIRISTO V, et al. Comparative analysis of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry and enhanced ASO RQ-PCR in multiple myeloma [J]. *Blood Cancer J*, 2014, 4(10): e250.
- [17] OLIVA S, GAMBELLA M, GILESTRO M, et al. Minimal residual disease after transplantation or lenalidomide-based consolidation in myeloma patients: a prospective analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 5924-5935.
- [18] PUIG N, SARASQUETE ME, BALANZATEGUI A, et al. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry [J]. *Leukemia*, 2014, 28(2): 391-397.
- [19] PUIG N, SARASQUETE ME, ALCOCEBA M, et al. Kappa deleting element as an alternative molecular target for minimal residual disease assessment by real-time quantitative PCR in patients with multiple myeloma [J]. *Eur J Haematol*, 2012, 89(4): 328-335.
- [20] MARTINEZ-LOPEZ J, LAHUERTA J, PEPIN F, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2014, 123(20): 3073-3079.
- [21] KORDE N, MAILANKODY S, ROSCHEWSKI M, et al. Minimal residual disease (MRD) testing in newly diagnosed multiple myeloma (MM) patients: a prospective head-to-head assessment of cell-based, molecular, and molecular-imaging modalities [J]. *Blood*, 2014, 124(12): 2105.
- [22] JELINEK T, BEZDEKOVA R, ZATOPKOVA M, et al. Current applications of multiparameter flow cytometry in plasma cell disorders [J]. *Blood Cancer J*, 2017, 7(10): e617.
- [23] GALTSEVA IV, DAVYDOVA YO, SOLOVYEV MV, et al. The results of bone marrow immunophenotyping for minimal residual disease and immunochemical tests of serum in patients with multiple myeloma [J]. *Gematol Transfuziol Hematol Transfuziol*, 2016, 61(S1): 100.
- [24] HILLEGASS J, AYYAZ S, KILK K, et al. Changes in magnetic resonance imaging before and after autologous stem cell transplantation correlate with response and survival in multiple myeloma [J]. *Haematologica*, 2012, 97(11): 1757-1760.
- [25] BAILLY C, CLÉRY PF, FAIVRE-CHAUVET A, et al. Immuno-PET for clinical theranostic approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 18(1): e57.
- [26] USMANI S, MITCHELL A, WAHEED S, et al. Prognostic implications of serial 18-fluoro-deoxyglucose emission tomography in multiple myeloma treated with total therapy 3 [J]. *Blood*, 2013, 121(10): 1819-1823.
- [27] CAERS J, WITHOFS N, HILLEGASS J, et al. The role of positron emission tomography computed tomography and magnetic resonance imaging in diagnosis and follow up of multiple myeloma [J]. *Haematologica*, 2014, 99(4): 629-637.

- [28] BARTEL T, HAESSLER J, BROWN T, et al. F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2009, 114(10): 2068-2076.
- [29] RADBRUCH A, MUEHLINGHAUS G, LUGER EO, et al. Competence and competition: The challenge of becoming a long-lived plasma cell [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(10): 741-750.
- [30] CARAUX A, KLEIN B, PAIVA B, et al. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138⁺ and CD138⁻ plasma cells [J]. *Haematologica*, 2010, 95(6): 1016-1020.
- [31] AWSTRON AC, ORFAO A, BEKSAC M, et al. Report of the European myeloma network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders [J]. *Haematologica*, 2008, 93(3): 431-438.
- [32] FLORES-MONTERO J, DE TUTE R, PAIVA B, et al. Immunophenotype of normal *vs* myeloma plasma cells: toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(1): 61-72.
- [33] ROBILLARD N, WUILLEME S, MOREAU P, et al. Immunophenotype of normal and myelomatous plasmacell subsets [J]. *Front Immunol*, 2014, 3(5): 137.
- [34] CANNIZZO E, BELLIO E, SOHANI AR, et al. Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in multiple myeloma: The diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78(4): 231-238.
- [35] PAIVA B, GUTIERREZ NC, CHEN X, et al. Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients [J]. *Leukemia*, 2012, 26(8): 1862-1869.
- [36] POJERO F, CASUCCIO A, PARRINO MF, et al. Old and new immunophenotypic markers in multiple myeloma for discrimination of responding and relapsing patients: The importance of "normal" residual plasma cell analysis [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2015, 88(5): 165-182.
- [37] MATEO G, CASTELLANOS M, RASILLO A, et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10): 3661-3667.
- [38] MUCCIO VE, SARACI E, GILESTRO M, et al. Multiple myeloma: new surface antigens for the characterization of plasma cells in the era of novel agents [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(1): 81-90.
- [39] ARANA P, PAIVA B, CEDENA MT, et al. Prognostic value of antigen expression in multiple myeloma: a PETHEMA/GEM study on 1265 patients enrolled in four consecutive clinical trials [J]. *Leukemia*, 2018, 32(4): 971-978.
- [40] LIN P, OWENS R, TRICOT G, et al. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma [J]. *Am J Clin Pathol*, 2004, 121(4): 482-488.
- [41] MAHNKE YD, ROEDERER M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay [J]. *Clin Lab Med*, 2007, 27(3): 469-485.
- [42] PAIVA B, VIDRIALES MB, CERVERO J, et al. Multi-parameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation [J]. *Blood*, 2008, 112(10): 4017-4023.
- [43] LIU D, LIN P, HU Y, et al. Immunophenotypic heterogeneity of normal plasma cells: Comparison with minimal residual plasma cell myeloma [J]. *J Clin Pathol*, 2012, 65(9): 823-829.
- [44] SCHMIDT-HIEBER M, PAIVA B, PEREZ-ANDRES M, et al. CD56⁺ clonal plasma cells in multiple myeloma are associated with unique disease characteristics and have a counterpart of CD56⁺ normal plasma cells with increased maturity [J]. *Abstract Blood*, 2013, 122(11): 751-751.
- [45] PAIVA B, VAN DONGEN JJ, ORFAO A. New criteria for response assessment: Role of minimal residual disease in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2015, 125(7): 3059-3068.
- [46] YANAMANDRA U, KUMAR SK. Minimal residual disease analysis in myeloma-when, why and where [J]. *Leuk Lymphoma*, 2018, 59(8): 1772-1784.
- [47] GHOSH A, CARREAU N, MOSCATELLO A, et al. Flow cytometry based detection of MRD in bone marrow of patients with multiple myeloma: a comparison between fluorescent-based cytometry versus cytoF [J]. *Blood*, 2015, 126(23): 4195.

(收稿日期:2019-07-05)