

• 论 著 •

免疫分型在单株丙球蛋白血症中的应用评估

张露萍, 汪 萍, 沈立松

(上海交通大学医学院附属新华医院检验科, 上海 200092)

摘 要:目的 探讨免疫分型、血清免疫球蛋白的定量检测在单株丙球蛋白血症诊断中的价值。方法 收集 118 例单株丙球蛋白血症患者进行血清蛋白电泳(SPE)、免疫固定电泳(IF)、免疫球蛋白(Ig)定量及血清轻链(κ 、 λ)检测。针对免疫分型阳性、Ig 定量阴性患者进行分析。结果 免疫分型阳性、Ig 定量阴性患者 56 例, 其中游离轻链型 6 例(κ 轻链型 2 例, λ 轻链型 4 例), 未分泌型 1 例; 免疫分型阳性、Ig 定量阳性的患者 62 例。结论 IF 技术对单株丙球蛋白血症的诊断及分型具有重要意义, 可以结合血清 Ig 及轻链的定量检测等其他实验室诊断。

关键词:单株丙球蛋白血症; 免疫球蛋白定量; 免疫分型; 免疫固定电泳

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.01.027

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)01-0064-03

Application evaluation of immunophenotyping in monoclonal gammaglobulinemia

Zhang Luping, Wang Ping, Shen Lisong

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical value of immunophenotyping and quantitative analysis of serum immunoglobulin in the diagnosis and typing of monoclonal gammaglobulinemia. **Methods** 118 serum samples were collected from the patients with monoclonal gammaglobulinemia and performed the serum protein electrophoresis(SPE), serum immunofixation(IF) electrophoresis, immunoglobulins(Ig) quantitation and serum light chain κ , λ detection. The analysis was conducted aiming at the patients with immunophenotyping positive and the Ig quantitation negative. **Results** 56 cases showed immunophenotyping positive and the immunoglobulin quantitation negative, among them, 6 cases were free light chain type (κ light chain in 2 cases and λ light chain in 4 cases), 1 case was the non-secretion type; 62 cases showed immunophenotyping positive and the Ig quantitation positive. **Conclusion** The IF technique has an important significance for the diagnosis and typing of monoclonal gammaglobulinemia, its diagnosis can be combined with the other laboratory tests of serum Ig and light chain quantitative detection.

Key words: monoclonal gammaglobulinemia; Ig quantitation; immunophenotyping; immunofixation electrophoresis

单株丙球蛋白血症是由单克隆的浆细胞大量增生产生的异常免疫球蛋白(Ig), 其本质是一种免疫球蛋白或免疫球蛋白的片段, 其又称“M 蛋白”所引起的免疫增殖性疾病。M 蛋白多出现于多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症、恶性淋巴瘤等疾病。多发性骨髓瘤(MM)是一种起源于 B 细胞系并能够产生大量单克隆免疫球蛋白的恶性增殖性疾病, 良性单克隆丙种球蛋白血症(MGUS)构成了恶性的前期阶段, 当浆细胞克隆逃逸了限制肿瘤生长的调节机制则发生恶变^[1]。因瘤细胞侵犯多个脏器, 临床表现形式多样化, 易发生误诊和漏诊, 误诊率较高^[2]。中国 MM 年发病率约为十万分之一, 约占所有恶性肿瘤的 1%, 在血液系统恶性疾病中占 10% 左右, 位居第二。目前随着人口老龄化以及检测技术的不断提高, MM 的发病率不断增加^[3]。本试验分析比较了血清蛋白电泳(SPE)、Ig 的定量检测及免疫固定电泳(IF)在单株丙球蛋白血症诊断及鉴别诊断中的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1~7 月新华医院各科 M 蛋白电泳中免疫分型呈阳性的 118 例患者标本, 其免疫分型阳性、Ig 定量也呈阳性患者 62 例; 免疫分型阳性而 Ig 定量阴性患者 56 例, 其中 MM 患者 27 例(男性 15 例, 女性 12 例, 年龄 45~79 岁, 平均 64.4 岁), MGUS 患者 26 例(男性 19 例, 女性 7

例, 年龄 34~94 岁, 平均 72.5 岁), 未明确诊断的单株丙球蛋白血症患者 1 例(男性, 61 岁), 其他病例如系统性红斑狼疮(SLE)2 例(均为女性患者, 平均年龄 54 岁)。诊断均符合国内诊断标准^[4]。所有患者均排除中枢性神经系统疾病、感染性疾病、自身免疫性疾病及糖尿病等疾病。27 例 MM 患者 M 蛋白免疫分型: IgG 型 11 例, IgA 型 3 例, IgM 型 3 例, IgD 型 3 例, κ 轻链型 2 例, λ 轻链型 4 例, 未分泌型 1 例。MM 患者中稳定期 7 例, 缓解期 14 例, 进展期 6 例, 病情分期参照国际骨髓工作组 2006 年制定的统一疗效标准^[5]。

1.2 仪器与试剂 Hydrasys-Hyrys 电泳分析系统(法国 Sebia 公司)、特定蛋白仪(德国 BN ProSpec 公司)、Capillary 毛细血管电泳仪(法国 Sebia 公司)及其配套试剂盒。

1.3 方法 样本为无菌抽取外周静脉血 4 mL, 其中 2 mL 置于非抗凝管中, 分离血清, 3 000 r/min 离心 5 min, 保存血清于一 80 °C 冰箱, 待测生化指标。

1.3.1 血清蛋白区带电泳 患者标本血清 10 μ L 点于 Sebia 配套加样梳上, 在 Sebia 自动化电泳仪上进行电泳分离、染色、脱色和干燥等操作步骤, 最后进行扫描。

1.3.2 Ig 定量 采用特定蛋白仪, 运用免疫散射比浊法检测患者血清 Ig(IgG、IgA、IgM、 κ 、 λ)水平, 以 g/L 表示。

1.3.3 IF 患者标本血清用稀释液进行稀释, IgG 以 1:6 稀

释,其他(IgA、IgM、 κ 、 λ 轻链)以 1:3 稀释。加样 10 μ L,扩散 10 min,选择 IF 电泳程序进行血清蛋白质分离,然后加相应抗血清于 G-A-M- κ - λ 泳道各 25 μ L,对照泳道加 40 μ L 蛋白固定剂,孵育 5 min,然后用滤纸吸去抗血清,烘干 65 $^{\circ}$ C,10 min。洗涤、结晶紫染色、脱色、烘干等步骤,最后进行扫描,并需要对免疫分型为 κ / λ 的患者标本进行 IgD 分型。

1.4 统计学处理 由 SPSS17.0 统计软件对免疫分型阳性、Ig 定量阴性患者在良、恶性单株丙球蛋白血症及 MM 不同病期中的分布格局进行比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SPE 结果 118 例免疫分型阳性患者中,115 例 SPE 图谱显示 M 蛋白阳性,M 蛋白位于电泳的不同区域。其中 81 例 M 蛋白位于 γ 球蛋白区;28 例位于 β 球蛋白区;1 例位于 β 与 γ 球蛋白区之间;5 例显示淡染 M 区带;3 例未显示 M 蛋白。

2.2 血清 Ig 及轻链定量检测 118 例免疫分型阳性患者中有 62 例血清 Ig 定量检测阳性(其中 33 例 IgG 水平升高,16 例 IgA 水平升高,13 例 IgM 水平升高),56 例阴性(6 例轻链型中 IgG、IgA、IgM 均正常或略有降低)。

2.3 IF 结果 118 例单株丙球蛋白血症患者标本中,IgG 型 62 例,约占 52.5%;IgA 型 24 例,约占 20.3%;IgM 型 19 例,约占 16.1%;轻链型 6 例,约占 5.1%;双克隆型 4 例,约占 3.4%;IgD 型 3 例,约占 2.5%;未分泌型 1 例,约占 0.85%,见表 1。

表 1 118 例患者血清 IF 分型结果			
免疫分型	例数[n(%)]	κ 型(n)	λ 型(n)
IgG	61(51.7)	31	30
IgA	24(20.3)	9	15
IgM	19(16.1)	11	8
IgD	3(2.5)	0	3
IgE	0(0.0)	0	0
轻链型	6(5.1)	2	4
双克隆型	4(3.4)	2	2
未分泌型	1(0.9)	0	0
合计	118(100.0)	55	62

2.4 比较 SPE、Ig、IF 3 种方法对血清单株丙球蛋白血症的检出率 对 118 例诊断单株丙球蛋白血症的 3 种实验室检测方法进行比较研究,结果显示,IF 对单株丙球蛋白血症的检测敏感性最高,并确定型别,其检出率达 99.2%,准确性 100.0%,无假阳性。其次为 SPE,其阳性检出率为 97.5%,Ig 阳性检出率为 53.4%,SPE+Ig 组合阳性检出率为 97.6%,见表 2。

表 2 3 种方法对血清单株丙球蛋白的检出率(%)					
组别	n	SPE	IF	Ig	SPE+Ig
IgG 型	61	100.0	100.0	54.1	100.0
IgA 型	24	100.0	100.0	66.7	100.0
IgM 型	19	100.0	100.0	68.4	100.0
IgD 型	3	66.7	100.0	0.0	66.7
轻链型	6	83.3	100.0	0.0	83.3
未分泌型	1	0.0	0.0	0.0	0.0
双克隆型	4	100.0	100.0	25.0	100.0

3 讨 论

SPE 是分离蛋白质最简单的方法之一,可以获得有关血浆蛋白质全貌的图谱,可对血清中异常蛋白质进行初步筛选^[6],但对于轻链型和未分泌型 MM 的患者在初筛试验中易出现漏诊。本试验结果显示 118 例患者中,3 例未出现 M 蛋白峰(漏诊率为 2.5%)。

由于 MM 患者存在免疫功能障碍,Ig 定量检测可见一种或几种增高,而其他几种相应降低。有部分患者 Ig 及轻链在正常范围之内,仅两种轻链比例失调。所以单凭 Ig 定量不能很好地提示 MM,需用 IF 来鉴定有无单克隆成分的存在^[7],本研究表明,单纯的 Ig 定量检测有 46.6%的漏诊率。同时还发现,免疫分型阳性、Ig 定量检测阴性的 56 例 MM 患者在良、恶性单株丙球蛋白血症中的分布格局无显著差异,其中缓解期 MM 患者的分布水平显著高于进展期及稳定期 MM 患者,而进展期及稳定期 MM 患者之间的分布格局无显著差异。本研究认为,缓解期 MM 患者可能由于大量服用药物抑制了异常 Ig 的增殖。进而提示了 Ig 定量检测仅显示数量上的改变,但不能反映质的变化即单克隆成分存在与否,而质的改变仍需通过 IF 作验证。IF 在检出单克隆成分的同时,可从电泳图谱上确定单克隆成分的类型:IgG、IgA、IgM、IgD、IgE、轻链型或未分泌型。还可从出现的克隆化条判断瘤细胞是否为单克隆、双克隆或寡克隆,从而为 MM 的治疗和判断预后提供指导^[8]。这是定量法和 SPE 无法实现的。IF 应用单克隆抗体检测单克隆 Ig,较其他方法准确、敏感、快速。其检测的血清标本采集方便,检测速度快,整个电泳过程仅需 2 h 即可出结果,商业化琼脂糖凝胶一次可检测 9 份标本,适合临床常规检测。单克隆 Ig 是 MM 的标志性蛋白。由于在电场中的泳动速度完全相同,因此,电泳图谱上呈现与多克隆 Ig 完全不同的浓集、窄细、深染条带。IF 集合电泳技术的分离作用和单克隆抗体的特异性及高敏感性来检测血清中的单克隆 Ig,从而更容易判断结果^[9]。因此,IF 可以大大降低 MM 的误诊率,对提高临床的诊断效率有很大的帮助。

IgD 型 Ig 正常水平很少,即便单克隆 IgD 水平升高至正常水平的 200 倍以上时,SPE 上也不一定出现单克隆条带,所以,诊断 IgD 型单株丙球蛋白血症需依赖 IgD 定量和 IF,而不是 SPE^[8]。本试验中,SPE 漏诊的 3 例阴性样本,最终用 IF 证实,其中 1 例为 IgD 伴 λ 型。

MM 是一种血液系统的恶性肿瘤,由骨髓浆细胞克隆增殖而成。几乎所有的多发性骨髓瘤前体均为“前骨髓瘤”的过渡状态,其主要代表是原因不明的 MGUS 和无症状的多发性骨髓瘤^[10-11],约占 60%以上,根据定义,患者完全是无症状者^[12]。经本试验初步分析,为防止在单株丙球蛋白血症中出现漏诊误诊现象,建议 SPE、Ig 及轻链定量作为初筛试验,IF 则是单株丙球蛋白血症诊断和分型的重要手段,可作为常规检查项目,并不能被 Ig 定量检测所取代。

参考文献

[1] 汪萍,奚迪,王维维,等. CD4⁺CD25⁺CD127low/-调节性 T 细胞异常表达与多发性骨髓瘤的关联性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012,33(7):796-799.

[2] 王育芳,王佳丽,马顺高. 血清蛋白电泳和免疫固定电泳在多发性骨髓瘤中的应用分析[J]. 检验医学与临床,2013,10(5):577-579.

[3] 田永芳,贾海英,田洪燕. 47 例多发性骨髓瘤综合分析[J]. 临床血液学杂志:输血与检验版,2010,23(4):473-474. (下转第 68 页)

于 SFO 组。而其他如病程、HbA1c、SBP、HDL-C、TC、LDL-C 在两组间差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。而以有、无高血压病史分组比较, HDL-C、LDL-C、TG 两组间差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨 论

目前,大量研究发现糖尿病、高血压等心血管危险因素不仅与人体总体脂增加有关,更与腹部脂肪特别是腹部内脏脂肪增加有关。相对于腹部皮下脂肪,腹部内脏脂肪是一个独立预测代谢风险的指标^[7]。本研究表明,T2DM 患者的 VA 随年龄的增大而增加;男性和女性患者相比较,在年龄、BMI 相似情况下,VA 无明显差异,女性 PBF、TC、LDL-C 显著高于男性,与文献[8]报道一致;汉族与少数民族患者比较,在性别、年龄、BMI 相似的情况下,少数民族男性的 VA、PBF 显著高于汉族男性,汉族女性的 HDL-C 显著高于少数民族女性,提示体脂参数存在族别间差异,可能与少数民族生活方式、饮食习惯等有关,有待进一步研究。

本研究以 VA 分 VFO 组和 SFO 组,无论男女,VFO 组 BMI 水平均高于 SFO 组,男性 VFO 组 TG 高于 SFO 组,女性 VFO 组年龄、DBP 高于 SFO 组,表明体脂分布对代谢参数有较大影响,VFO 组较 SFO 组罹患心血管疾病危险性更高。

国外研究表明,肥胖可导致许多代谢疾病,包括糖尿病、高血压、血脂异常和动脉粥样硬化等,特别是腹部脂肪的积累可增加心血管疾病的患病风险^[9]。本研究结果再次证实了上述结论。在校正年龄、病程、BMI 后,女性患者 WHR 与 DBP 呈正相关,PBF 与 LDL-C 呈正相关,而 BMI 与 SBP、DBP 无相关性。男性患者的体脂参数与代谢因素间均无相关性。表明年龄、病程、BMI 对心血管危险因素与局部体脂的相关性有一定影响。本研究高血压与单纯 T2DM 的患者,心血管危险因素无明显差异,可能与患者口服降压药物、病程时间长短及病例数少等原因,有待进一步研究。

为了进一步了解体脂参数对心血管危险因素的影响程度,二者进行多元逐步回归分析发现,男性患者 BMI 与 SBP、VA 与 DBP 有关联,VA、PBF 与 HDL-C 有关联;女性患者 BMI 与 SBP、WHR 与 DBP 有关联,提示体脂分布对心血管危险因素的影响存在性别差异。相关文献报道,中国糖尿病患者常存在多种心血管病危险因素聚集现象,尤其城市十分普遍。男性和女性患者的多种心血管病危险因素并存现象因采用的肥胖诊断标准的不同存在性别差异^[10]。

腹部内脏脂肪堆积在心血管疾病、代谢综合征的发展中起重要作用,其与一些心血管疾病的危险因素如 TG、胰岛素浓度、HDL-C、高敏 C 反应蛋白等有相关性,且相关性强于 WC。因此,VA 是评估心血管疾病高风险的重要指标。

综上所述,本研究发现 T2DM 患者体脂分布以中心性肥胖,尤其是腹腔内脏脂肪增加为主,其心血管危险因素不仅与体脂含量增加有关,更与 VFO 有关。

参考文献

- [1] 冉兴无,李晓松,童南伟,等.中国肥胖人群体脂分布特点及其与心血管危险因素的关系[J]. 四川大学学报:医学版,2004,35(5): 699-703.
- [2] Rader DJ. Effect of insulin resistance, dyslipidemia, and intra-abdominal adiposity on the development of cardiovascular disease and diabetes mellitus[J]. Am J Med, 2007, 120(3,1): S12-S18.
- [3] Obesity in Asia Collaboration; OAC. Ethnic comparisons of obesity in the Asia-Pacific region: protocol for a collaborative overview of cross-sectional studies[J]. Obes Rev, 2005, 6(3): 193-198.
- [4] de Koning L, Merchant AT, Pogue J, et al. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies[J]. Eur Heart J, 2007, 28(7): 850-856.
- [5] 撤涛,孙怡宁,姚志明,等.人体成分分析仪设计-生物电阻抗原理的一种实现[J]. 北京生物医学工程, 2007, 26(7): 629-633.
- [6] 贾伟平,陆俊茜,项坤三,等.简易体脂参数估测腹内型肥胖的可靠性评价[J]. 中华流行病学杂志, 2002, 23(1): 20-23.
- [7] Nguyen-Duytb N, NichamanMZ, ChurchTS, et al. Visceral fat and liver fat are Independent predictors of metabolic risk factors in men[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003, 284(6): E1065.
- [8] Subcutaneous WB. visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome[J]. Endocr Rev, 2000, 21(6): 697-698.
- [9] Kim SK, Kim HJ, Hur KY, et al. Visceral fat thickness measured by ultrasonography can estimate not only visceral obesity but also risks of cardiovascular and metabolic diseases[J]. Am J Clin Nutr, 2004, 79(4): 593-599.
- [10] 许樟荣,敬华.标题为空.影响糖尿病患者心血管危险因素聚集现象的因素[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2001, 17(5): 272-274.

(收稿日期:2014-09-08)

(上接第 65 页)

- [4] 张之南,沈悝.血液病诊断及疗效标准[M]. 第 3 版. 北京:科学出版社, 2007: 232-235.
- [5] Bgm D. International uniform response criteria for multiple myeloma[J]. Leukemia, 2009, 20(16): 1467-1473.
- [6] 王彩云,杨敬芳,田亚平. SEB IA 电泳仪及其配套试剂测定血清蛋白电泳的方法学评价[J]. 现代检验医学杂志, 2003, 18(2): 6.
- [7] 刘汐盈,孙淑艳,宋媛媛. 血清免疫固定电泳、蛋白电泳、免疫球蛋白及轻链定量对多发性骨髓瘤临床诊断价值探讨[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(5): 680-681.
- [8] 白洁,孙玲,殷宗健,等. 血清免疫固定电泳在骨髓瘤肾脏病患者诊断中的意义[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(9): 543-545.
- [9] 韩青,孙国华. 免疫固定电泳技术在多发性骨髓瘤诊断及分型中的

的应用[J]. 大连医科大学学报, 2011, 33(2): 175-177.

- [10] Landgre O, Kyke R, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance(MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study[J]. Blood, 2009(113): 5412-5417.
- [11] Weiss BM, Abadie J, Verma P, et al. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients[J]. Blood, 2009, 113(22): 5418-5422.
- [12] Katzmann JA. Screening panels for monoclonal gammopathies: time to change[J]. Clin Biochem Rev, 2009, 112(30): 105-111.

(收稿日期:2014-10-10)