

## 二代测序检测多发性骨髓瘤 IGH 基因 克隆性重排临床价值

姚利 陈艳 翟英颖 施晓兰 岑建农 颜灵芝 傅琤琤 陈苏宁

苏州大学附属第一医院, 江苏省血液研究所, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 国家卫生健康委员会血栓与止血重点实验室 215006

通信作者: 傅琤琤, Email: fuzhengzheng@suda.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(81970136); 江苏省科教强卫工程-临床医学中心资助项目(YXZX2016002)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.08.013

### Characteristics of immunoglobulin heavy-chain gene clonal rearrangements by next-generation sequencing of patients with multiple myeloma

Yao Li, Chen Yan, Zhai Yingying, Shi Xiaolan, Cen Jiannong, Yan Lingzhi, Fu Chengcheng, Chen Suning  
National Clinical Research Center for Hematologic Diseases, Key Laboratory of Thrombosis and Hemostasis of Ministry of Health, Jiangsu Institute of Hematology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

Corresponding author: Fu Chengcheng, Email: fuzhengzheng@suda.edu.cn

多发性骨髓瘤(MM)是一种克隆性的浆细胞肿瘤,其特征为单克隆免疫球蛋白(IG)的异常浆细胞在骨髓内恶性增殖<sup>[1]</sup>。因此,判断异常浆细胞的单克隆性、克隆类型、比例以及选择合适的生物标志,对于MM的诊断及治疗随访监测至关重要<sup>[2-3]</sup>。在过去近20年,欧洲BIOMED-2重排检测方案已逐渐成为检测IG基因克隆性重排的金标准<sup>[4]</sup>。近几年,二代测序(NGS)技术在临床得到广泛应用<sup>[5]</sup>。本研究中,我们对初诊MM患者进行基于NGS的IGH基因克隆性重排检测,探讨其在MM中的临床价值。

### 病例与方法

1. 病例:以2019年9月至2020年10月来本院就诊的60例初诊MM患者为研究对象,其中男33例,女27例,中位年龄57(39~70)岁。以5名正常人外周血的混合样本作为对照,标本来自苏州大学附属第一医院生物样本库。诊断符合2016年IMWG MM诊断指南<sup>[2]</sup>和2020年中国MM诊治指南<sup>[3]</sup>。

2. DNA提取及鉴定:采集EDTA抗凝的患者骨髓,采用红细胞裂解液离心得到骨髓有核细胞。采用DNA提取试剂盒(美国Promega公司产品)提取DNA。采用分光光度计(美国Thermo公司产品)检测DNA浓度与纯度。采用Qubit(美国Thermo公司产品)定量待测标本的DNA浓度。

3. 文库制备和上机:NGS采用扩增子法建库方法来检测IGH基因重排克隆。按照LymphoTrack™重排NGS检测试剂盒(美国Invivoscribe公司产品)说明书进行操作,对患

者标本进行IGH-FR1、IGH-FR2和IGH-FR3基因重排检测。PCR条件:95℃预变性7min,95℃45s、60℃45s、72℃90s,共29个循环,最后72℃延伸10min。采用定量PCR检测试剂盒Ion Library® TaqMan Quantitation Kit(美国Applied Biosystems公司产品)对文库定量,随后进行油包水和文库富集。采用Ion S5测序仪(美国Thermo Fisher公司产品)对富集文库进行测序。

4. PCR结合毛细管电泳法(CE):按照IdentiClone™重排试剂盒(美国Invivoscribe公司产品)说明书进行操作,对患者标本PCR扩增IGH-FR1、IGH-FR2和IGH-FR3基因重排。PCR条件:95℃预变性7min,95℃45s、60℃45s、72℃90s,共35个循环,最后72℃延伸10min。取PCR扩增产物1μl与10μl甲酰胺、0.1μl GeneScan-500 LIZ(美国Applied Biosystems公司产品)混合,经95℃2min热变性,4℃保存。采用3730基因分析仪(美国Applied Biosystems公司产品)进行PCR片段分析,判断标准见参考文献[4]。

5. 数据分析和统计学处理:NGS测序数据使用商品化试剂配套的一站式自动化数据分析流程软件对序列进行比对分析。统计学分析采用SPSS10.0软件,分类变量组间比较采用Fisher精确概率法,连续变量组间比较采用Mann-Whitney U检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. DNA质量检测:本组样本DNA浓度均大于50ng/μl, DNA纯度为1.8~1.9。DNA琼脂糖电泳检测显示DNA完

整性好,无 DNA 降解断裂情况。

2. NGS 和 CE 法的比较:60 例初诊患者同时用 NGS 和 CE 检测 IGH 基因重排克隆。两种方法 IGH 基因克隆性重排双阳性 42 例,双阴性 17 例,其中 IGH-FR1 检测的一致性为 91.7% (55/60),IGH-FR2 检测的一致性为 93.3% (56/60),IGH-FR3 检测的一致性为 96.7% (58/60),IGH 检测方法总体的一致性为 98.3% (59/60)。

3. NGS-IGH 基因重排分析:60 例 MM 患者中 IGH-FR1 重排阳性 37 例,阴性 23 例,检出率为 61.7%;IGH-FR2 重排阳性 38 例,阴性 22 例,检出率为 63.3%;IGH-FR3 重排阳性 29 例,阴性 31 例,检出率为 48.3%。联合使用 IGH-FR1/FR2/FR3 重排的总检出率为 70.0% (42/60)(表 1)。

表 1 初诊多发性骨髓瘤患者中 IGH 各区域的克隆性重排检出率[例(%)]

IGH 重排	FR1	FR2	FR3	FR1/FR2/FR3
克隆性重排	37(61.7)	38(63.3)	29(48.3)	42(70.0)
非克隆性重排	23(38.3)	22(36.7)	31(51.7)	18(30.0)

4. IGH 基因克隆性重排患者临床特征:有无 IGH 基因克隆性重排初诊 MM 患者临床特征比较见表 2,两组性别、年龄差异无统计学意义。经免疫蛋白固定电泳检测 M 蛋白类型,其中 IgG 型 28 例,IgA 型 13 例,轻链型 14 例,IgD 3 例,寡分泌型 1 例,不分泌型 1 例。比较不同组别 M 蛋白类型的检出率,IgG 型与非 IgG 型的 IgH 基因重排阳性率之间差异有统计学意义 (85.7% 对 56.3%, $P=0.028$ )。国际分期系统 (ISS) 分期中 I 期 21.7%、II 期 45.0%、III 期 33.3%,修订后的国际分期系统 (R-ISS) 分期中 I 期 15.0%、II 期 68.3%、III 期 16.7%,两组 ISS、R-ISS 分期差异无统计学意义。

5. 重排克隆类型和比例:在 42 例显示克隆性 IGH 基因

重排的样本中,其中 41 例均检测到产物性重排,1 例仅检测到非产物性重排。在 IGH 基因重排中,可变区(V 区)取用频率最高的为 IGHV1-18、IGHV3-23、IGHV3-30、IGHV4-39,分别占 8.9%,其次为 IGHV4-59 和 IGHV5-51,分别占 6.7%。多样区(D 区)取用频率最高的为 IGHD3 和 IGHD2,分别占 33.3% 和 24.4%;其中 IGHD2-2、IGHD2-21 分别占 11.1%,IGHD4-17、IGHD3-3、IGHD3-16、IGHD3-10 分别占 8.9%。连接区(J 区)取用频率最高的为 IGHJ4 和 IGHJ6,分别占 40.0%(图 1)。1 例患者同时检测到 IGHV4-59/J6 和 IGHV3-33/J6 两种类型的产物性重排。3 例患者同时检测到 1 种类型的产物性重排和 1 种类型的非产物性重排,分别为 IGHV5-51/J4 和 IGHV7-4/J1、IGHV3-30/J6 和 IGHV4-39/J6、IGHV2-70/J6 和 IGHV1-46/J4。并且 42 例患者均显示各自独特的 IGH 基因重排克隆序列。初诊患者 IGH 基因重排优势克隆的比例中位数为 22.7% (5.4% ~ 88.3%),其中 V 区 SHM 的中位突变率为 9.8% (2.9% ~ 27.1%)。

### 讨论

在正常 B 淋巴细胞发育分化过程中,处于胚系状态的 IGH 基因的 V/D/J 片段均需发生基因重排。IGH 基因重排先于 IG 轻链基因重排,首先在早前 B 细胞 (Pro-B cell) 中形成 DJ 连接,随后在前 B 细胞 (Pre-B cell) 中 V 基因片段连接到 D 片段上,最终形成 VDJ 基因重排。由于参与重排基因片段的多样性、重排随机性以及重排过程中连接区核苷酸的随机插入和删除,导致每个克隆 B 细胞均有各自独特的基因重排方式,可作为 B 淋巴细胞的克隆基因标志物<sup>[6]</sup>。

在淋巴系统肿瘤的辅助诊断中,欧洲 BIOMED-2 重排检测方案已逐渐成为 IG 基因克隆性重排检测的金标准<sup>[4]</sup>。但该方案也有自身的局限性,如只能对目的片段进行定性,不能检测重排克隆的具体类型和比例。而 NGS 方法是在

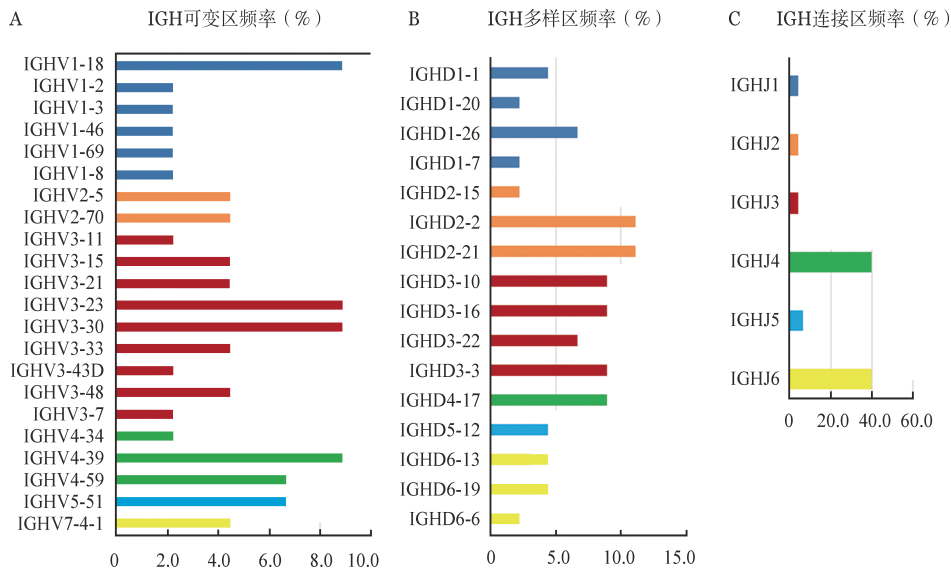


图 1 多发性骨髓瘤患者中 IGH 重排克隆可变区(A)、多样区(B)及连接区(C)片段的取用频率

**表 2** 有无 IGH 基因克隆性重排初诊多发性骨髓瘤患者临床特征比较

临床特征	IGH 重排组 (42 例)	非 IGH 重排组 (18 例)	P 值
性别(例)			0.533
男	22	11	
女	20	7	
中位年龄(岁)	57(39~70)	54(43~66)	0.890
M 蛋白类型(例)			0.019
IgG 型	24	4	0.028
非 IgG 型	18	14	
ISS 分期(例)			0.062
I 期	8	5	
II 期	23	4	
III 期	11	9	
R-ISS 分期(例)			0.371
I 期	5	4	
II 期	31	10	
III 期	6	4	

注:ISS:国际分期系统;R-ISS:修订后的国际分期系统

BIOMED-2 的基础上,采用扩增子法建库,并通过对文库进行测序来识别各种不同的重排克隆序列,实现了克隆序列的准确识别和定量<sup>[7]</sup>。本研究我们将 NGS 与 CE 方法进行比较,结果显示两种检测方法具有相似的检出率,IGH 基因检测的总体一致性为 98.3%。同时 NGS 结果显示,在 IGH-FR1、IGH-FR2 和 IGH-FR3 克隆性重排中都有较高的检出率,频率大小依次为 IGH-FR2、IGH-FR1、IGH-FR3,联合应用 IGH-FR1/FR2/FR3 的总体检出率为 70.0%。并且 42 例初诊患者均显示各自独特的 IGH 基因重排克隆序列,重排优势克隆的比例为 22.7%(5.4%~88.3%)。

本组 MM 患者的临床特征与 IGH 基因重排之间的关系显示,IGH 基因克隆性重排与患者性别、ISS 分期差异无统计学意义,但与 M 蛋白类型相关。本组患者 M 蛋白类型以 IgG 型最多,IgA 和轻链型其次,其分布类型与国内文献报道相符<sup>[8]</sup>。有意思的是,本研究发现,IgG 型 MM 患者的 IgH 重排阳性率(85.7%,24/28)高于非 IgG 型(56.3%,18/32),差异有统计学意义( $P=0.028$ ),提示 IGH 基因重排克隆与 M 蛋白类型之间存在相关性。IGH 基因克隆性重排主要存在于重链型中,而单纯轻链型中较少发生。基因重排克隆在不同类型 MM 患者中可能存在不同的重排发生机制,从而分泌各种异常的免疫球蛋白类型,具体发生机制有待更深入的研究。

在 B 细胞的成熟过程中,IG 分子还要经过生发中心的体细胞超突变(SHM)才能完成抗体亲和成熟。慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者 IGH 基因 V 区 SHM 检测已明确对疾病预后相关。本研究结果显示在 MM 患者的浆细胞中,IGH 基因 V 区显示 SHM 突变频率为 9.8%(2.9%~27.1%)。相对于其他 B 细胞恶性肿瘤,如 CLL 等<sup>[9]</sup>,MM 患者 IGHV 的 SHM 平均突变频率更高,与国外文献报道相似<sup>[10]</sup>,指出更高的突变频率可能与更好的临床预后相关。

正常 B 细胞在发育过程中会伴随 VDJ 基因重排,这些重排对 V、D、J 基因片段的取用是按照一定的规律随机发生的,而 MM 患者是否有自身的特征。本研究 60 例初诊 MM 患者的 NGS 检测结果显示 IGHV3 亚组取用频率明显高于其他组别,如 IGHV3-23 和 IGHV3-30 基因(分别占 8.9%)呈优势重排克隆。而通常在正常 B 细胞中发生的重排,如 IGHV3-20 和 IGHV3-74,本组患者中没有检测到克隆性重排。与 Medina 等<sup>[10]</sup>报道的西班牙人群 MM 患者优势重排克隆相比较,本组检测到 IGHV7-4-1 重排克隆,而西班牙研究未见报道,两组 MM 人群中存在显著性差异。该结果提示 IGH 基因重排克隆在不同人种中可能存在差异。另外有意思的是,IGHV4-34 在正常 B 细胞、急性 B 淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、套细胞淋巴瘤中发生率高<sup>[11-13]</sup>,但通常在正常浆细胞群体中缺失,在 MM 中少见,本组病例中发现 1 例。该结果与 Medina 等<sup>[10]</sup>报道相似,且本组 1 例为产物性重排,其具体的生物学意义有待更深入的研究。值得注意的是,本组 MM 患者 IGHD 区中 IGHD2-21(11.1%)和 IGHD3-10(8.9%)的取用频率明显高于健康人,与 Medina 等<sup>[10]</sup>报道相似,尤其是 IGHD2-21 可能是 MM 的一个独特标志。同时 Medina 等<sup>[10]</sup>研究也发现 IGHD2 和 IGHD3 亚组与 MM 患者更好的预后相关,但由于本研究纳入分析样本量较小,这些数据仍需通过进一步扩大样本量和延长随访时间来证实。

综上所述,本研究应用 NGS 方法可检测大部分 MM 患者的 IGH 基因克隆性重排,NGS 不仅可以检测浆细胞的克隆性,更能鉴定重排克隆的具体类型和比例,因此,对于 MM 患者可以选择 IGH 基因重排克隆作为其分子生物学标志物。此外,本结果也提示 MM 患者的 IGH 基因的 V、D、J 基因片段取用具有一定的偏向性,呈现独特的克隆重排谱系特征,是否与 MM 的发病机制和预后相关,有待更多、更详细的研究数据证实。

## 参考文献

- [1] Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15 (12):e538-548. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
- [2] Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17 (8):e328-328e346. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30206-6.
- [3] 中国医师协会血液科医师分会,中华医学会血液学分会,中国医师协会多发性骨髓瘤专业委员会.中国多发性骨髓瘤诊治指南(2020 年修订)[J]. *中华内科杂志*, 2020, 59(5):341-346. DOI: 10.3760/cma.j.cn112138-20200304-00179.
- [4] van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2

- Concerted Action BMH4-CT98-3936 [J]. *Leukemia*, 2003, 17 (12):2257-2317. DOI: 10.1038/sj.leu.2403202.
- [5] 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, 中华医学会病理学分会. 二代测序技术在血液肿瘤中的应用中国专家共识(2018年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39 (11):881-886. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.11.001.
- [6] Arnold A, Cossman J, Bakhshi A, et al. Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms[J]. *N Engl J Med*, 1983, 309(26):1593-1599. DOI: 10.1056/NEJM198312293092601.
- [7] Arcila ME, Yu W, Syed M, et al. Establishment of Immunoglobulin Heavy (IGH) Chain Clonality Testing by Next-Generation Sequencing for Routine Characterization of B-Cell and Plasma Cell Neoplasms [J]. *J Mol Diagn*, 2019, 21 (2):330-342. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2018.10.008.
- [8] 钟益芳, 饶海英, 戴数. 免疫固定电泳在诊断多发性骨髓瘤中的作用[J]. *中国微生态学杂志*, 2017, 29(5):570-573.
- [9] Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI, et al. Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(10):2488-2501. DOI: 10.1172/JCI119433.
- [10] Medina A, Jiménez C, Sarasquete ME, et al. Molecular profiling of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements unveils new potential prognostic markers for multiple myeloma patients [J]. *Blood Cancer J*, 2020, 10 (2):14. DOI: 10.1038/s41408-020-0283-8.
- [11] Hockley SL, Else M, Morilla A, et al. The prognostic impact of clinical and molecular features in hairy cell leukaemia variant and splenic marginal zone lymphoma [J]. *Br J Haematol*, 2012, 158(3):347-354. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09163.x.
- [12] Mroczek ES, Ippolito GC, Rogosch T, et al. Differences in the composition of the human antibody repertoire by B cell subsets in the blood [J]. *Front Immunol*, 2014, 5:96. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00096.
- [13] Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations [J]. *Blood*, 2007, 109 (1):259-270. DOI: 10.1182/blood-2006-03-012948.

(收稿日期:2020-12-09)

(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

## 本刊对医学名词及术语的一般要求

医学名词应使用全国科学技术名词审定委员会公布的名词。尚未通过审定的学科名词,可选用最新版《医学主题词表(MESH)》、《医学主题词注释字顺表》、《中医药主题词表》中的主题词。对于没有通用译名的名词术语,在文内第一次出现时应注明原词。中西药名以最新版《中华人民共和国药典》和《中国药品通用名称》(均由中国药典委员会编写)为准。英文药物名称则采用国际非专利药名。在题名及正文中,药名一般不得使用商品名,确需使用商品名时应先注明其通用名称。冠以外国人名的体征、疾病、试验、综合征等,人名可以用中译文,但人名后不加“氏”(单字名除外,例如福氏杆菌);也可以用外文,但人名后不加“'s”。

文中应尽量少用缩略语。已被公知公认的缩略语可以不加注释直接使用,例如:DNA、RNA、HBsAg、CT、MRI等。不常用的、尚未被公知公认的缩略语以及原词过长在文中多次出现者,若为中文可于文中第一次出现时写出全称,在圆括号内写出缩略语;若为外文可于文中第一次出现时写出中文全称,在圆括号内写出外文全称及其缩略语。不超过4个汉字的名词不宜使用缩略语,以免影响论文的可读性。

本刊编辑部