

# Study on Clinical Diagnosis Value by Combination of Fluorescence *in Situ* Hybridization and Conventional Cytogenetic Analysis in Multiple Myeloma

Jiamin Hua, Yanping Zhou, Yongqi Yue, Bo Yang, Yubing Xu\*

Kingmed Diagnostics (Shanghai) Laboratory, Shanghai  
Email: sh-huajiamin@kingmed.com.cn, sh-xuyubing@kingmed.com.cn

Received: Dec. 11<sup>th</sup>, 2018; accepted: Jan. 1<sup>st</sup>, 2019; published: Jan. 8<sup>th</sup>, 2019

---

## Abstract

**Objective:** The aim of this study was to explore the sensitivities of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and conventional chromosome analysis to detect cytogenetic abnormalities in patients with multiple myeloma, and then to discuss the clinical application and significance. **Method:** Review karyotypes of 82 multiple myeloma patients detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (after enrichment of plasma cells) and conventional chromosome analysis simultaneously and compare the positive detection rates of these two techniques. **Results:** Among the 82 patients detected, abnormalities were found in 7 (8.64%) cases, and 4 of which were complex karyotypes. 74 were normal and one failed (1.22%). Abnormalities were found in 47 (57.31%) of 82 patients detected by FISH study. Abnormalities were detected in 49 (59.76%) of 82 patients by combination of these two techniques. **Conclusion:** It suggested that combination of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and conventional chromosome analysis can increase positive detection rate in MM patients and provide clues for clinical treatment and prognosis assessment.

## Keywords

Chromosome Analysis, Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH), Multiple Myeloma

---

# 染色体核型分析联合间期荧光原位杂交检测对多发性骨髓瘤临床诊断价值的研究

华佳敏, 周燕苹, 岳永奇, 杨博, 徐玉兵\*

\*通讯作者。

上海金域医学检验所有限公司, 上海  
Email: sh-huajiamin@kingmed.com.cn, sh-xuyubing@kingmed.com.cn

收稿日期: 2018年12月11日; 录用日期: 2019年1月1日; 发布日期: 2019年1月8日

## 摘要

目的: 探讨细胞遗传学染色体核型分析技术联合间期荧光原位杂交(FISH)对多发性骨髓瘤(MM)患者异常核型检测的灵敏度及其在临床诊断中的应用价值。方法: 回顾性的分析了82例确诊MM患者同时采用常规细胞遗传学染色体核型分析方法及FISH技术(使用经浆细胞富集后的细胞)检测患者核型异常情况, 比较两者的阳性率。结果: 在进行常规染色体核型分析的82例患者中有7例(8.64%)发现异常核型; 其中4例为复杂核型。74例为正常核型, 1例(1.22%)未见分裂相。在同时进行FISH检测的这82例患者标本中47例(57.31%)存在异常核型。联合进行常规染色体核型分析和FISH检测的82例患者异常核型检出49例(59.76%)。结论: 常规染色体核型分析联合间期荧光杂交技术检测可显著提高MM患者异常检出率, 为临床治疗和预后评估提供线索。

## 关键词

染色体核型分析, 间期荧光原位杂交技术, 多发性骨髓瘤

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

多发性骨髓瘤(Multiple myeloma, MM), 是一种单克隆 B 淋巴细胞恶性增殖的浆细胞恶性肿瘤[1], 多发生于中老年人, 且男性发病率略高于女性[2], 症状复杂多样, 主要临床表现为高钙血症、反复感染、贫血、肾功能不全和骨质破坏等靶器官损害[3]。目前仍无法治愈。细胞遗传学是近年来研究最多的 MM 预后分层因素之一。研究认为 MM 患者的临床表现, 疾病过程及预后的异质性与 MM 细胞的不同生物学特性密切相关, 而决定 MM 细胞不同生物学行为的核心因素是细胞的不同遗传学特征。MM 的遗传学改变多为同时包含数量和结构改变的复杂核型异常, 所有 23 对染色体均有受累。目前应用比较多的细胞遗传学异常危险分层是 Mayo Clinic 提出的 MM 危险分层(Mayo stratification of myeloma and risk-adapted therapy, m SMART)见表 1, 依据患者的细胞遗传学结果将患者分为低危组、中危组和高危组三组, 不仅可以评估患者的预后, 而且具有指导治疗的价值, 根据患者染色体异常进行危险分层治疗[4]。由此可见, MM 的细胞遗传学数量和结构的异常检测率有着非常重要的意义。但是常规的染色体核型分析阳性率很低, 本研究联合 FISH 方法, 发现可以极大提高阳性率, 增加对临床的指导意义。

## 2. 资料和方法

### 2.1. 病例资料

收集上海金域医学检验所 2017 年 02 月~2018 年 04 月确诊为多发性骨髓瘤的患者标本同时检测骨髓染色体核型分析和间期荧光原位杂交。其中男性患者 50 例, 女性患者 32 例, 男女比例为 1.56:1, 82 例患者年龄范围为 44~84 岁, 中位数年龄为 64 岁。(伦理许可申明: 我们是商业化检测公司, 对各医院送

检标本进行常规检测，检测后不保留患者标本，及时按照国家和公司规定处理残留的标本。本文只是对病例资料进行回顾性总结，不涉及患者隐私和利益，对患者无不利影响。

**Table 1.** mSMART hazard stratification

**表 1.** mSMART 危险分层

危险分层	分层标准
高危	FISH: del (17p), t (14;16), t (14;20) GEP: 高危标志
中危	FISH: t (4; 14) 常规核型分析技术检出 del (13) 亚二倍体 浆细胞标记指数 $\geq 3\%$
低危	其他异常包括 FISH 检出 t (11; 14), t (6; 14)

注：mSMART 为 Mayo 骨髓瘤分层及风险调整治疗；FISH 为荧光原位杂交；GEP 为基因表达谱。

## 2.2. 检测方法

### 2.2.1. G 显带染色体核型分析

无菌抽取患者骨髓 2 ml~3 ml (肝素钠抗凝)，按  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ~ $2 \times 10^6/\text{ml}$  每个标本接种两瓶培养基，其中一瓶添加 1 ps 刺激剂，培养 3 天，另一瓶不加 1 ps 的培养 2 天。收获前，分别加入 20 ug/ml 秋水仙素 20  $\mu\text{l}$  混匀，放入 37°C 孵育箱继续培养，4 小时后收获。1300 rpm 离心 10 min，弃上清液；加入 0.075 M KCl 溶液(预温至 37°C) 8.0 ml 左右，轻轻混匀，置 37°C 温浴 35 min；沿着管壁缓缓加入 1 ml 固定液(甲醇：冰醋酸 = 3:1)，轻轻地混匀，1300 rpm 离心 10 min (室温)；离心后弃上清液，缓慢加入固定液约 8.0 ml，混匀，放置 45 min 固定；1300 rpm 离心 10 min，离心后弃上清液，加入固定液约 8.0 ml，混匀，放置 12 小时(过夜)固定；离心 1300 rpm 离心 10 min，弃上清液，加适量固定液配成细胞悬液。制片后置于 90°C 的烤箱中烘烤 1.5 小时。冷却后胰酶消化，姬姆萨染液染色。每例标本分析 20 个中期分裂相依据《国际人类染色体命名系统》《ISCN2016》做出诊断报告。根据克隆的标准，至少两个细胞有同样的染色体增加或结构异常，或至少三个细胞有一致的染色体丢失。肿瘤细胞遗传学检查时只有克隆性异常才有报告价值，判断为阳性。

### 2.2.2. FISH 检测

使用 CD138 磁珠分选富集浆细胞：将外周血(使用 30  $\mu\text{m}$  滤过器)或骨髓血(使用 100  $\mu\text{m}$  滤过器)通过滤过器，去除血凝块、骨块；每 1 ml 血液加 50  $\mu\text{l}$  全血 CD138 磁珠，充分混匀后在 2°C~8°C 孵育 15 分钟；然后每 1 ml 血液加 2 ml~5 ml autoMACS Running Buffer (裂解红细胞)，室温  $445 \times g$  离心 10 分钟；去上清，通过加等体积 autoMACS Running Buffer 重悬细胞沉淀；将经过 3 ml autoMACS Running Buffer 冲洗的全血过滤柱置于磁力架上，加入细胞悬液，使用  $3 \times 3$  ml autoMACS Running Buffer 过柱；将全血过滤柱从磁力架上拿下来置于一新的收集管中，加 5 ml Whole Blood Column Elution Buffer，将吸附柱上的细胞洗脱，加 autoMACS Running Buffer 制成细胞悬液；每个检测探针滴一张片，放入 56°C 烤箱中烘烤 2 小时，将玻片浸入 50 ml 2  $\times$  SSC 中，2 缸各洗涤 3 min；于 70%、80%、100% 酒精中依次放置 3 min 进行梯度脱水( $\leq 6$  个载玻片/缸)；风干玻片；用 0.2 ml EP 管混合探针(0.5  $\mu\text{l}$ ~1.0  $\mu\text{l}$ )和缓冲液(探针：缓冲液 =

1:10), 按检测项目依次混合好探针, 在杂交区域加入足量的探针(5.0  $\mu$ l~10.0  $\mu$ l), 再加上合适大小的盖玻片封盖检测区域, 用封片胶封闭盖玻片四周。运行 Thermo Brite™程序, 参数如下: 75℃变性 5 mins, 37℃杂交 14 h~18 h; 从-20℃取出 DAPI II, 置于室温解冻, 加 50 ml 杂交后洗涤缓冲液(0.4  $\times$  SSC/0.3% NP-40)至考普林缸内, 水浴升温至 72℃  $\pm$  1℃, 至少保留 30 分钟; 再取一个考普林缸(Coplin 缸), 加入 50 ml 杂交后洗涤缓冲液, 室温放置; 用镊子小心的揭开封片胶, 移去盖玻片, 去掉玻片上多余的封片胶, 将载玻片浸没在 72℃  $\pm$  1℃的杂交后洗涤缓冲液内 3 分钟( $\leq$ 6 个载玻片/缸); 从洗涤缓冲液中取出所有载玻片, 暗室直立风干(使用密闭抽屉或密闭室内的架子即可); 在载玻片目标区上加入 10  $\mu$ L 的 DAPI II 复染液, 盖上盖玻片。在进行信号计数之前, 将载玻片置于玻片盒。选择好合适的滤光片后, 开始计数细胞中的杂交信号, 信号分析采用 Meta systems ISIS 分析软件(Isis V 5.5.3/5.3.3), 每例计数 200 个间期细胞, 计算阳性细胞百分比。阳性细胞比率大于正常域值者为阳性。FISH 检测的探针包括 RB1, CKS1B/CDKN2C (P18), IGH, IGH/CCND1, IGH/FGFR3, TP53/CEP17, 13q14.3/13q34(D13S319/LAMP1), IGH/MAF。(注: CUT-OFF 值说明: 实验室开展项目之前需进行方法学验证, 建立自己实验室的 CUT-OFF 值)。

### 2.3. 统计分析

以百分比来表示染色体核型异常的阳性率, 常规染色体分析与 FISH 的阳性率比较用卡方检验, 采用 STATA11.0 统计软件,  $P < 0.05$  认为有统计学差异。

## 3. 结果

1) 常规染色体核型分析 82 例 MM 患者标本, 1 例培养失败。7 例为阳性(其中 4 例为复杂核型), 阳性率为(7/81, 8.64%)。同时进行 FISH 检测的 82 例 MM 标本, 47 例阳性, 阳性率为(47/82, 57.31%), 同时进行核型分析和浆胞富集后的间期荧光原位杂交实验, 总阳性率为(49/82, 59.76%)。有 2 例染色体结果阳性 FISH 结果阴性, 原因为染色体核型分析检测出复杂核型, 而 FISH 探针未覆盖异常的染色体位点。常规染色体分析与 FISH 的阳性率存在显著统计学差异,  $P$  值  $< 0.001$ 。两种方法学检测的阳性率比较见表 2。

**Table 2.** Positive rates of MM by different methods  
**表 2.** 不同方法学检测 MM 阳性率情况

检测方法	例数	阳性数	阳性率(%)
染色体核型分析	81*	7	8.64
FISH	82	47	57.31
染色体核型分析+FISH	82	49	59.76

\*有一例患者无分裂相

2) 82 例 MM 标本通过 FISH 检测分析发现 47 例为阳性, 探针阳性分布(表 3): RB1 探针检测的 13q14 缺失 25 例, 占总阳性比为 53.19%; CKS1B/CDKN2C (P18)探针检测的 1q21 扩增拷贝阳性 34 例, 占总阳性比为 72.34%; IGH 探针检测的 IGH 重排阳性 16 例, 占总阳性比为 34.04%; IGH/CCND1 探针检测的  $t$  (11; 14)阳性 2 例, 占总阳性比为 4.25%; IGH/FGFR3 探针检测的  $t$  (4; 14)阳性 8 例, 占总阳性比为 17.02%; TP53/CEP17 探针检测的 17p13.1 阳性 6 例, 占总阳性比为 12.77%; 13q14.3/13q34 (D13S319/LAMP1)检测的 13q14.3 阳性 3 例, 占总阳性比为 6.38%; IGH/MAF 探针检测的  $t$  (14; 16)阳性为 0, 阳性率为 0.00%。

**Table 3.** Positive probe distribution ratio in 47 MM  
**表 3.** 47 例多发性骨髓瘤 FISH 检测阳性探针分布比率

探针名称	检测位点	阳性数	阳性率(%)
RB1	13q14 缺失	25	53.19
CKS1B/CDKN2C(P18)	1q21 扩增拷贝	34	72.34
IGH	IGH 重排	16	34.04
IGH/CCND1	<i>t</i> (11; 14)	2	4.25
IGH/FGFR3	<i>t</i> (4; 14)	8	17.02
TP53/CEP17	17p13.1	6	12.77
13q14.3/13q34(D13S319/LAMP1)	13q14.3	3	6.38
IGH/MAF	<i>t</i> (14; 16)	0	0.00

#### 4. 讨论

通过本研究发现：同时联合检测常规染色体核型和 FISH 可以极大提高多发性骨髓瘤阳性检出率，从 8.64% 提高到 59.76%。常规细胞遗传学方法的染色体异常检出率低有以下几点原因：1) 骨髓瘤细胞有丝分裂指数低，增殖缓慢，骨髓浸润程度不同。2) 染色体核型分析只能检测分裂中期的染色体，并且只分析 20 个细胞。3) 对染色体质量要求较高，异常的细胞有时形态很差，难以分析辨别。4) 核型分析分辨率低，对于一些微小片段丢失，例如 RB1 缺失，隐匿的异常，例如 *t* (4; 14) (p 16; q 32) 核型分析肉眼难以发现。FISH 检测阳性率高。FISH 的优势在于，1) 不仅可以分析中期分裂相细胞，也可以分析大量间期细胞，分析细胞数是染色体的 10 倍数量级，2) 可以发现并分析 20 Kb 的微小染色体缺失或畸变，能够对已知序列片段的变化进行高度敏感而特异的检测，特别是染色体显带不易分辨的倒位、丢失以及复杂的染色体异常改变。3) 通过浆细胞富集更可以提高检测标本中浆细胞比例，进一步提高检出率。FISH 检测技术的应用可以弥补常规染色体核型分析技术的不足之处。但是 FISH 检测是用已知的探针检测靶基因的技术，且它的探针是有限的，不能覆盖全部染色体，对于不确定的染色体异常及涉及到多条染色体复杂核型，非常见的异常，FISH 技术难以检测。而常规染色体核型分析则不受此限制。所以也需要检测染色体。如本研究中，就有 2 例患者染色体阳性，但是 FISH 未发现。

国外也有类似报道，在多发性骨髓瘤的检测中，核型分析常得到正常的结果，FISH 对于有临床意义的异常染色体(例如 13q-, 17p-, IGH 重排)的检测具有更高的灵敏度。但是核型分析检测出的复杂结构和数目异常 FISH 则无法检出。13q-, IGH 重排和亚二倍体等核型均是 MM 重要的预后因素，表明对于多发性骨髓瘤，联合使用核型分析和 FISH 检测对临床具有重要意义[5]。

根据我们的研究，国内 MM 中最常见的核型异常有 1q21 扩增拷贝，13q14 缺失，IGH 重排，*t* (4; 14)，P53 缺失。在多发性骨髓瘤中，17p13.1 (抑癌基因位点 P53) 的缺失导致 TP53 的杂合性丢失，被认为是 MM 高危特征。存在 TP53 缺失的 MM 患者无进展生存时间(PFS)和 OS 较短[6]。1 号染色体异常也是多发性骨髓瘤常见改变。1q21 的获得/扩增与疾病的进展和不良预后有关[7]。RB1 基因缺失多见于多发性骨髓瘤(MM)。染色体 13q-常伴随 17p-, 1q+和(或) *t* (4; 14)，单独 13q-不是独立预后因素。13q-的预后不良与 17p-, 1q+和(或) *t* (4; 14) 的发生有关。位于 14q32 位点上的 IGH 基因(编码免疫球蛋白重链)重排，最常见的三种易位按出现频率高低依次是 *t* (4; 14) (p16; q32)，*t* (11; 14) (q13; q32) 和 *t* (14; 16) (q32; q23)。

一些研究证实  $t(4; 14)$  和  $t(14; 16)$  是影响 MM 患者生存的独立预后不良因素。 $t(11; 14)(q13; q32)$  对 PFS 和 OS 均无显著影响[8]。

因此联合应用染色体核型分析, 浆细胞富集后的 FISH 检测, 可以提高 MM 患者染色体异常的检出率。两者应该联合应用可以更全面准确发现 MM 患者的异常核型, 更好地为临床提供治疗指导和预后评估。

## 参考文献

- [1] 郑辉, 吴赞. 多发性骨髓瘤实验室检测方法分析与评价[J]. 山西医药杂志, 2016, 45(20): 2438-2440.
- [2] 邓雪梅, 张红宾. 造血干细胞移植治疗多发性骨髓瘤 38 例疗效分析[J]. 现代医药卫生, 2018, 34(9): 1316-1319.
- [3] Caers, J., Withofs, N., Hillengass, J., *et al.* (2014) The Role of Positron Emission Tomography-Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging in Diagnosis and Follow up of Multiple Myeloma. *Haematologica*, **99**, 629-637. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.091918>
- [4] 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(2017 年修订) [J]. 中华内科杂志, 2017, 56(11): 866-870.
- [5] Chang, H., Li, D., Zhuang, L., *et al.* (2004) Detection of Chromosome 13q Deletions and IGH Translocations in Patients with Multiple Myeloma by FISH: Comparison with Karyotype Analysis. *Leukemia & Lymphoma*, **45**, 965-969. <https://doi.org/10.1080/10428190310001638832>
- [6] Ishida, T. (2015) Cytogenetic Abnormalities in High-Risk Multiple Myeloma. *Nihon Rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine*, **73**, 28-32.
- [7] Hanamura, I., Stewart, J.P., Huang, Y., *et al.* (2006) Frequent Gain of Chromosome Band 1q21 in Plasma-Cell Dyscrasias Detected by Fluorescence *in Situ* Hybridization: Incidence Increases from MGUS to Relapsed Myeloma and Is Related to Prognosis and Disease Progression Following Tandem Stem-Cell Transplantation. *Blood*, **108**, 1724-1732. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-009910>
- [8] 吴昊, 张慧, 陈海燕, 等. 532 例多发性骨髓瘤患者细胞遗传学异常及对预后的影响[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(9): 739-743.

### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-9049, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [wjcr@hanspub.org](mailto:wjcr@hanspub.org)