

doi: 10.16118/j.1008-0392.2020.06.007

· 临床研究 ·

## 新免疫标志组合在多参数流式细胞术检测 多发性骨髓瘤微小残留病中的应用

左晓佳<sup>1</sup>, 冯尽意<sup>2</sup>, 叶丽霖<sup>2</sup>, 邢苗<sup>2</sup>, 邓之奎<sup>3</sup>, 刘定胜<sup>1,2</sup>

(1. 贵州医科大学, 贵阳 550004; 2. 上海健康医学院附属周浦医院肿瘤血液科, 上海 201318;

3. 江苏省淮安市第一人民医院血液科, 江苏 淮安 223000)

**【摘要】目的** 多参数流式细胞术(multiparameter flow cytometry, MFC)检测多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)微小残留病(minimal residual disease, MRD)细胞和非MM浆细胞两者免疫标志表达的区别。**方法** 2012年4月至2020年4月淮安市第一人民医院和上海健康医学院附属周浦医院收治的44例具有MRD的MM患者和43例非MM患者分别为研究组和对照组,应用10色流式细胞仪检测浆细胞CD45、CD19、CD56、CD28、CD117、CD20以及CD44、CD49d和CD184表达情况。**结果** 与非MM浆细胞高表达不同,MM的MRD细胞中CD44为低表达,两类细胞的表达差异有统计学意义( $P=0.007$ ),CD44可能是MM检测MRD免疫标志之一;CD49d和CD184广泛存在于MM的MRD细胞和非MM浆细胞中,但缺乏特异性,不能作为MM特异性免疫标志;利用CD45、CD19、CD56、CD28、CD117、CD20和CD44的界值判断免疫标志的异常个数,MM的MRD细胞中位异常免疫标志数为4(2~6)个,而非MM浆细胞为0(0~2)个。**结论** 通过MFC检测新的免疫标志组合CD45、CD19、CD56、CD28、CD117、CD20和CD44可以有效的鉴别出MM的MRD细胞。

**【关键词】** 浆细胞; 多发性骨髓瘤; 多参数流式细胞术; 微小残留病

**【中图分类号】** R553 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1008-0392(2020)06-0722-07

## Application of new combination of immune markers in detection of minimal residual disease in patients with multiple myeloma

ZUO Xiao-jia<sup>1</sup>, FENG Jin-yi<sup>2</sup>, YE Li-lin<sup>2</sup>, XING Miao<sup>2</sup>, DENG Zhi-kui<sup>3</sup>, LIU Ding-sheng<sup>1,2</sup>

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Dept. of Oncology and Hematology, Shanghai University of Medicine & Health Sciences Affiliated Zhoupu Hospital, Shanghai 201318, China; 3. Dept. of Hematology, Huai'an First People's Hospital, Huai'an 223000, Jiangsu Province, China)

**【Abstract】Objective** To investigate the new combination of immune markers in detection of the minimal residual disease(MRD) in patients with multiple myeloma(MM). **Methods** Forty-four MM patients with MRD and 43 non-MM patients admitted to the Huai'an First People's Hospital and Zhoupu Hospital from April 2012 to April 2020 were enrolled in the study. Immune markers CD45, CD19, CD56, CD28, CD117, CD20, CD44, CD49d and CD184 were detected by 10-color flow cytometry in plasma cells of all patients. **Results** The expression of CD44 in MRD cells of MM group was significantly lower than that in plasma cells of non-MM group( $P=0.007$ ). There were no significant difference in expression of CD49d and CD184 between MM and non-MM groups. By using the cut-off value of CD45, CD19, CD56, CD28, CD117, CD20 and CD44, the number of abnormal immune markers of MRD cells in MM group was 4(range, 2-6), while the number of plasma cells in non-

收稿日期: 2020-05-18

基金项目: 浦东新区卫生系统学科带头人培养计划(PWRd2015-09);上海健康医学院师资人才百人库项目(ZPBRK-19-01)

作者简介: 左晓佳(1990—),男,硕士研究生.E-mail:zxjsh2020@sina.com

通信作者: 刘定胜.E-mail:liudingsheng1973@163.com

MM group was 0 (range, 0 - 2). **Conclusion** The new combination of immune markers (CD45, CD19, CD56, CD28, CD117, CD20 and CD44) detected by multi-parameter flow cytometer may effectively identify the MRD cells in MM patients.

**【Key words】** plasma cells; multiple myeloma; multi-parameter flow cytometry; minimal residual disease

近年来,越来越多的证据表明多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)的缓解深度与患者的无进展生存(progression free survival, PFS)及总生存(overall survival, OS)有着密切关系<sup>[1-3]</sup>。微小残留病(minimal residual disease, MRD)作为判断MM缓解深度的重要标志也受到更多的关注<sup>[4-9]</sup>。多参数流式细胞术(multiparameter flow cytometry, MFC)具有检测敏感性高、方便快捷、费用适中等优势,现已成为MM临床应用最广泛的MRD检测手段<sup>[5,8,10]</sup>。本课题组先前的研究表明<sup>[11]</sup>,经CD38、CD138和CD45设门,对CD19、CD20、CD28、CD45、CD56和CD117的进行检测可有效判别MM的MRD。后续的研究进一步发现<sup>[12]</sup>,CD44、CD49d和CD184在MM细胞中高表达,流式细胞仪检测的敏感性高,但它们是否具有MM特异性免疫标志的特征以及是否可进一步帮助判别MM的MRD目前还不清楚。本研究利用MFC检测以上免疫标志组合,以了解这些新的免疫标志组合在MM的MRD检测中的意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

以2012年4月—2020年4月江苏省淮安市第一人民医院和上海健康医学院附属周浦医院收治的44例治疗后的MM患者为研究组,经过化疗、蛋白酶体抑制剂、免疫调节剂、单克隆抗体或自体造血干细胞移植至少一种治疗,存在MRD且有足够的浆细胞可用于流式细胞仪分析。每例患者均进行骨髓涂片检查,经形态学确定其浆细胞小于5%。所有患者都通过免疫固定电泳检测单克隆免疫球蛋白(M蛋白)和轻链,其中33例为阳性。以43例江苏省淮安市第一人民医院和上海健康医学院附属周浦医院收治的非浆细胞肿瘤的造血系统恶性肿瘤为对照组,进一步分为两个亚组,对照A组为12例未经治疗的非浆细胞肿瘤患者,包括2例新诊断的霍奇金淋巴瘤和10例非霍奇金淋巴瘤。对照B组31例为经化疗、靶向治疗或去甲基化治疗等各种抗肿瘤治疗达完全缓解的非浆细胞肿瘤患者,其中非霍奇金淋巴瘤8例、骨髓增生异常综合症8例、急性髓系白血病7例、急性淋巴细胞白血病3例、慢性粒细胞

白血病3例、Ph染色体阴性的骨髓增殖性肿瘤1例和霍奇金淋巴瘤1例。患者相关信息以及骨髓涂片中浆细胞计数数据见表1。研究获得所有MM患者和对照者的知情同意。

### 1.2 试剂与仪器

Navios流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司;主要试剂:CD19-PC5、CD19-FITC、CD20-PC5、CD45-KO、CD56-A700、CD117-A750、CD38-PC7、CD138-PB、 $\kappa$ 轻链-FITC和 $\lambda$ 轻链-PE购自Beckman Coulter公司;CD28-APC、CD44-APC和CD49d-APC购自美国BD公司;CD184-PC7购自美国Invitrogen公司。

### 1.3 方法

研究组和对照组患者的骨髓标本予EDTA抗凝,24h内用10色流式细胞仪检测。标本在4℃与单克隆抗体孵育15min,在室温下按标准程序裂解成熟红细胞后流式细胞仪检测。在检测胞质抗原时,按程序予破膜处理。每份标本分2管检测,使用的抗体组合如下。第1管:cytoKappa-FITC、cyto-Lambda-PE、CD38-AC7、CD138-PB、CD19-PC5、CD56-A700、CD28-ECD、CD44-APC、CD45-KO;第2管:CD38-AC7、CD138-PB、CD19-FITC、CD20-PC5、CD184-PC7、CD117-A750、CD49d-APC、CD56-A700、CD45-KO。每份标本至少分析50万个细胞,一些标本浆细胞较少,分析的细胞数达100万个,并且至少获得100个以上浆细胞用于分析。获得数据应用Kaluza2.0软件进行分析:通过FSC/SSC点图,设定有核细胞R1(图1A),浆细胞R2通过CD38/CD138高表达进行识别(图1B),通过FS-INT/SS-INT设门以排除非特异性结合,进一步纯化浆细胞R3(图1C),进而分析R3门内细胞。幼红细胞可以通过CD45/SSC识别,并且不表达CD38/CD138,据此可作为阴性内参照。通过胞质轻链 $\kappa/\lambda$ 的限制性的方法保证了浆细胞的克隆性,可以更准确的限定MM的MRD细胞。对 $\kappa/\lambda$ 轻链表达的分析在分析全部浆细胞和CD45<sup>dim/-</sup>浆细胞基础上进行,同时分析CD20阳性、CD45强阳性的淋巴细胞以确定成熟B淋巴细胞的克隆性,将B细胞淋巴瘤或白血病标本中伴有单克隆浆细胞的标本予以去除,见图1。

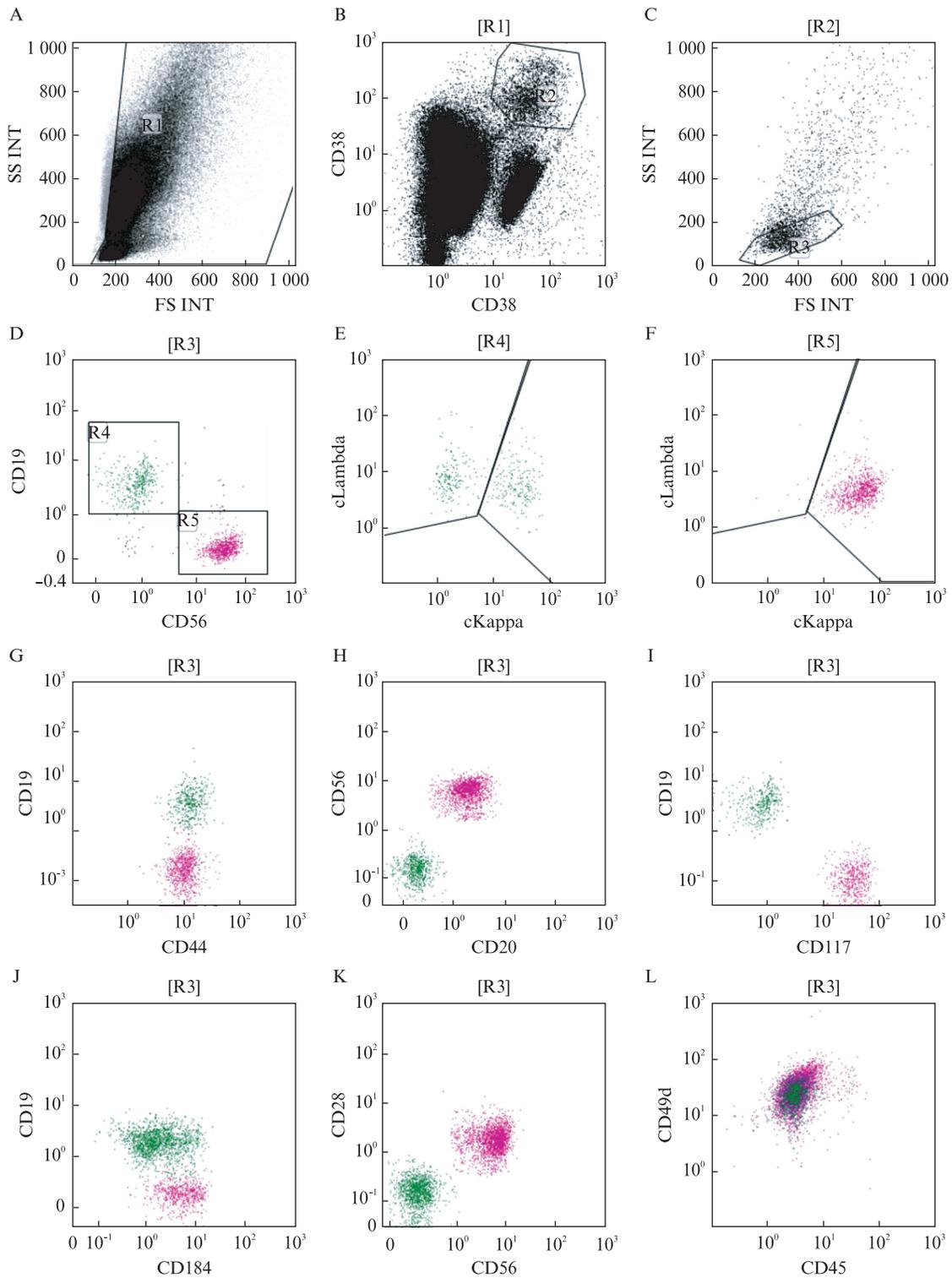


图 1 流式细胞术的免疫标志分析

Fig.1 Flow cytometry analysis

A~C: 确定 R1, R2 和 R3 细胞;D~F: 分析 R3 门内细胞;G~I: 1 例 MM 患者的 CD19/CD44、CD56/CD20、CD19/CD117 散点图;J~L: CD19/CD184、CD28/CD56 和 CD49d/CD45 散点图

1.4 统计学处理

应用 Fisher's Exact Test 分析分类变量的比较;组间比较应用 t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MM 的 MRD 细胞与非 MM 浆细胞的比较

MFC 检测显示,研究组 CD45、CD28、CD117、CD20、CD44 和 CD184 表达具有较大异质性,

CD19、CD56 和 CD49d 表达均一性较好,其中 CD19 低表达,而 CD56 和 CD49d 高表达;对照组 CD45、CD19、CD44 和 CD184 表达具有较大异质性,CD56、CD28、CD117、CD20 和 CD49d 表达均一性较好,其中 CD56、CD28、CD117 和 CD20 低表达,而 CD49d 高表达,见图 2。与对照组相比,研究组 CD45、CD19、CD56、CD28、CD117、CD20 和 CD44 表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。虽然 CD49d 在研究组中高表达,但在对照组中也高表达,而且在研究组和对照组中表达的均一性良好,差异无统计学意义( $P = 0.710$ )。同样,CD184 也有较高的表达,虽然与 CD49d 相比,CD184 在研究组和对照组中的表达有一定异质性,但研究组和对照组在统计学上差异无统计学意义( $P = 0.287$ ),见表 1。

## 2.2 非 MM 浆细胞之间的比较

两组的浆细胞大多都表达 CD45、CD19、CD44、CD49d 和 CD184,除了 CD49d 均一性高以外,其他的免疫标志表达均具有一定异质性。与此相反,CD56、CD28、CD117 和 CD20 在多数浆细胞中不表达,而且均一性较高。总体来说,在非 MM 浆细胞中,未经治疗与经抗肿瘤治疗后浆细胞以上免疫标志比较差异无统计学意义。多数浆细胞中不表达

CD28,但经抗肿瘤治疗后,CD28 表达有升高(0~27%,中位数 5%),且对照 A 组与对照 B 组比较差异有统计学意义( $P = 0.041$ ),见表 1。

## 2.3 设定阈值后 MM 的 MRD 细胞与非 MM 浆细胞比较

为了获得更好 MM 的 MRD 细胞与非 MM 浆细胞比较的敏感性和特异性,本研究通过 ROC 曲线设置了每种免疫标志的阈值。CD45、CD19、CD56、CD44 和 CD28 的最佳阈值分别为 42%、48%、26%、56% 和 42%,为了便于临床应用,分别被调整为  $\leq 40%$ 、 $\leq 50%$ 、 $\geq 25%$ 、 $\leq 55%$  和  $\geq 40%$ 。CD20 和 CD117 的最佳阈值分别是 8% 和 4%,在这种情况下为了避免高估阳性率,本研究采用了传统的 20% 作为阈值。研究组与对照组的 CD49d 与 CD184 表达差异无统计学意义,对于鉴别 MM 的 MRD 细胞与非 MM 浆细胞无特殊价值,故未设置阈值和进一步分析。本研究将超过阈值定义为阳性,研究组的浆细胞在 CD45、CD19、CD56、CD44、CD28、CD20 和 CD117 中均与对照组的浆细胞差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。MM 的 MRD 细胞中位异常免疫标志数为 4(2~6) 个,而非 MM 浆细胞为 0(0~2) 个,见表 1。

表 1 多发性骨髓瘤微小残留病细胞与非多发性骨髓瘤浆细胞的比较

Tab.1 Comparisons between MRD of MM patients and plasma cells of non-MM patients

项目	研究组 (n=44)	对照组 A (n=12)	对照组 B (n=31)	P
年龄/岁	58(46~84)	49(28~70)	52(32~80)	$P_1 = 0.046/P_2 = 0.020$
男/女	26/18	5/7	21/10	
浆细胞计数	2%(0%~4%)	1%(0%~2%)	1%(0%~2%)	$P_1 = 0.001/P_2 = 0.315$
流式检测浆细胞	0.37%(0.20%~11.05%)	0.07(0.01%~0.54%)	0.05(0.01%~0.68%)	$P_1 = 0.001/P_2 = 0.223$
浆细胞免疫标志				
CD45	52%(0%~100%)	73%(34%~99%)	66%(30%~93%)	$P_1 = 0.001/P_2 = 0.176$
≤40%	19(43%)	2(17%)	8(26%)	$P_3 = 0.006$
CD19	0%(0%~100%)	72%(46%~90%)	76%(43%~99%)	$P_1 = 0.000/P_2 = 0.365$
≤50%	42(95%)	3(25%)	4(13%)	$P_3 = 0.003$
CD56	100%(0%~100%)	2%(0%~21%)	2%(0%~13%)	$P_1 = 0.000/P_2 = 0.211$
≥25%	39(89%)	0(0%)	0(0%)	$P_3 = 0.000$
CD28	27%(0%~100%)	0%(0%~8%)	5%(0%~27%)	$P_1 = 0.032/P_2 = 0.041$
≥40%	20(45%)	0(0%)	0(0%)	$P_3 = 0.000$
CD117	10%(0%~100%)	0%(0%~3%)	0%(0%~17%)	$P_1 = 0.010/P_2 = 0.145$
≥20%	20(45%)	0(0%)	0(0%)	$P_3 = 0.000$
CD20	13%(0%~78%)	1%(0%~11%)	0(0~24)	$P_1 = 0.020/P_2 = 0.301$
≥20%	17(39%)	0(0%)	2(6%)	$P_3 = 0.001$
CD44	20%(0%~100%)	83%(50%~100%)	88%(43%~100%)	$P_1 = 0.007/P_2 = 0.630$
≤55%	28(64%)	1(8%)	1(3%)	$P_3 = 0.001$
CD49d	100%(90%~100%)	100%(89%~100%)	100%(90%~100%)	$P_1 = 0.710/P_2 = 0.870$

续表

项目	研究组 (n=44)	对照组 A (n=12)	对照组 B (n=31)	P
CD184	66% (30%~88%)	57% (38%~89%)	61% (15%~87%)	$P_1=0.287/P_2=0.365$
异常免疫标志总数	4 (2~6)	0 (0~2)	0 (0~2)	$P_1=0.000/P_2=0.667$
0	0	7	19	
1	0	4	9	
2	3	1	3	
3	9	0	0	
4	15	0	0	
5	10	0	0	
6	7	0	0	

$P_1$ : 研究组与对照组比较, T 检验;  $P_2$ : 对照组 A 与对照组 B 比较, T 检验;  $P_3$ : 利用 ROC 曲线确定界值后分类变量的比较, 研究组异常病例与对照组异常病例数据比较, Fisher's exact test

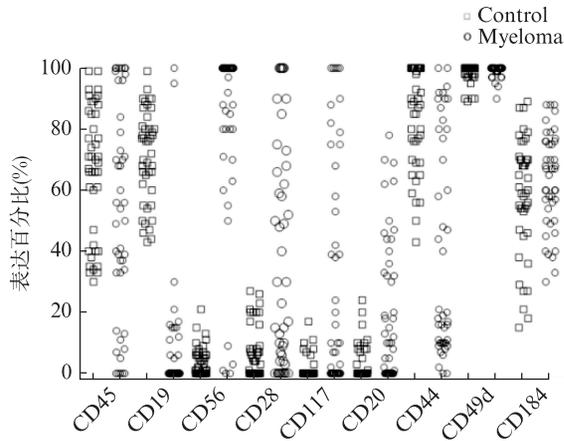


图 2 多发性骨髓瘤微小残留病细胞与非多发性骨髓瘤浆细胞免疫标志表达情况的比较

Fig.2 Immunophenotypic comparisons between MRD of MM patients and plasma cells of non-MM patients

### 3 讨 论

MM 治疗后 MRD 的检测有赖于在非 MM 浆细胞背景下对 MM 浆细胞的鉴别,而此时患者骨髓标本中,非 MM 浆细胞可能占了浆细胞总数的 99%<sup>[13]</sup>。因此,MM 的 MRD 细胞与非 MM 浆细胞的鉴别需要高敏感性和特异性的检测方法。当前,MFC 是临床上公认的应用最广泛的定量检测 MM 的 MRD 的方法。但在实际应用过程中,也发现了一些问题,如由于非 MM 浆细胞与 MM 细胞的异质性,导致两者的免疫标志有部分重叠,影响检测的特异性<sup>[14-15]</sup>;免疫标志物的选择未能完全统一<sup>[8,16]</sup>;其标准化问题也较为突出等<sup>[6,9]</sup>。还有研究表明,MM 治疗后患者免疫标志的表达发生变化,而且这些变化使得流式细胞仪检测 MRD 更趋复杂化<sup>[17-20]</sup>。因此,寻找新的 MM 免疫标志组合仍是检测 MRD 的重要挑战。

本研究使用 10 色流式细胞仪,相对于传统的 4 色、6 色的流式细胞仪,能更方便地在同一群浆细胞中分析更多的免疫标志。例如,当确认有一部分患者的非 MM 浆细胞亚群表达 CD56 时,就发现了 CD19<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>亚群和 CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>亚群浆细胞;通过在全部浆细胞和 CD45<sup>dim/-</sup>浆细胞基础上设门的方法检测多发性骨髓瘤患者  $\kappa/\lambda$  的克隆性表达。10 色流式细胞仪技术可以允许同时检测细胞膜表面免疫标志和细胞浆轻链,这种方法增加了克隆性分析的敏感性和微小残留病检测的可信度。

本研究发现,在 MM 的 MRD 细胞中 CD44 的表达具有显著的异质性,多数细胞为低表达(0~100%,中位数 20%),而对照组的 CD44 为高表达(43%~100%,中位数 88%),两类细胞的表达差异有统计学意义( $P=0.007$ ),尤其是经过 ROC 曲线确定界值后,定义  $\leq 55\%$  为异常,可以将 MM 的 MRD 细胞与非 MM 浆细胞有效区分( $P=0.001$ )。以上的检测和分析提示 CD44 可作为多发性骨髓瘤特异性免疫标志之一。

研究<sup>[12]</sup>发现,CD49d 和 CD184 在 MM 细胞中高表达,而且表达的均一性好于 CD44,同时在理论上推测有可能成为 MM 细胞新的特异性免疫标志物。本研究显示,虽然在研究组中 CD49d 和 CD184 仍然高表达,CD49d 均一性良好,CD184 显示一定的异质性,但在对照组中 CD49d 和 CD184 也同样高表达,且差异无统计学意义,提示 CD49d 和 CD184 并不能用于鉴别 MM 细胞和非 MM 浆细胞。以上结果说明,CD49d 和 CD184 广泛存在于浆细胞中,在 MM 细胞的检测中,虽然有好的敏感性,但缺乏特异性,不能作为合适的免疫标志物。

本研究证实了 CD44 可作为鉴别 MM 的 MRD 细胞与非 MM 浆细胞的新的免疫标志,因此,将 CD44 与先前已确定的 CD20、CD28、CD56、CD117、CD19 和 CD45 组合在一起,应用 ROC 曲线确定各自的界值后,确定每例 MM 患者肿瘤性浆细胞异常表达的免疫标志的个数。研究组有 4 个异常表达(范围 2~6),而对照组为 0 个异常表达(范围 0~2),差异有统计学意义( $P=0.000$ )。为了比较先前 6 个免疫标志物组合与本研究确定的 7 个免疫标志物组合的检测效率,研究组为 100% 具有 MM 微小残留病,对照组为 100% 没有 MM 微小残留病,以 2 个标记物异常定义为判断微小残留病的标准,比较两组免疫标志物组合检测 MRD 的敏感性和特异性。结果显示:原免疫标志组合灵敏度为 93.22%,特异度为 92%,新免疫标志组合灵敏度为 100%,特异度为 90.69%。本研究不但再次证实了课题组先前的工作<sup>[11]</sup>,即 CD20、CD28、CD56、CD117、CD19 和 CD45 等 6 个免疫标志可有效检测 MM 的 MRD,而且发现包括 CD44 的新的免疫标志组合进一步提高了 MM 的 MRD 的检测效率。另外,本研究还发现,先前的工作应用 ROC 曲线确定的界值<sup>[11]</sup>与本研究应用 ROC 曲线确定的界值基本在相近的范围,而经过适当调整后基本吻合。因此,在今后的工作中可以将 CD45、CD19、CD56、CD28、CD117、CD20 和 CD44 的最佳界值定义为  $\leq 40\%$ 、 $\leq 50\%$ 、 $\geq 25\%$ 、 $\geq 40\%$ 、 $\geq 20\%$ 、 $\geq 20\%$  和  $\leq 55\%$ ,超过界值可判定为异常。

本研究还发现与先前研究不完全一致的情况。(1) CD44 在 2 次研究中的表达不一致。本研究中,以 55% 为界值,MM 的 MRD 细胞 CD44 的表达多数低于此界值,非 MM 浆细胞绝大多数病例高于此界值;而在先前的研究中<sup>[12]</sup>,CD44 在 MM 的细胞中多数为高表达,中位数 76.9%,如果同样以 55% 为界值,多数病例高于此界值。对于 2 次研究的不同结果,可能是前后 2 次研究中 MM 患者的疾病状态的差异造成的。有研究<sup>[12,21]</sup>认为,MM 疾病进展和耐药时 CD44 高表达。先前工作<sup>[12]</sup>认为,MM 患者疾病状态是多样的,包括初诊、维持和难治复发的患者,这部分患者中有疾病进展或耐药的患者,因此总体 CD44 表达的升高,而本研究中研究组的患者几乎没有疾病进展和耐药患者,所以 CD44 总体表达比较低。(2) CD28 在 2 次研究中的表达不完全一致。本研究中,研究组与对照组 CD28 的

表达差异有统计学意义( $P=0.032$ ),而且对照 A 组与对照 B 组相比差异也有统计学意义( $P=0.041$ );先前的研究<sup>[11]</sup>显示,对照 A 组与对照 B 组的比较差异有统计学意义( $P=0.01$ ),提示 CD28 在经过抗肿瘤治疗后,表达可能上调,但研究组与对照组的比较差异无统计学意义( $P=0.396$ )。可能的原因是本次研究病例数相对较少,增加病例数有可能得到一致的统计结果。

综上,本研究的结果表明:(1) MM 的 MRD 细胞中 CD44 为低表达,而非 MM 浆细胞高表达,两类细胞的表达有显著性差异,CD44 可作为多发性骨髓瘤特异性免疫标志之一;(2) CD49d 和 CD184 广泛存在于浆细胞中,但缺乏特异性,不能作为多发性骨髓瘤特异性免疫标志;(3) 利用 CD45、CD19、CD56、CD28、CD117、CD20 和 CD44 新的免疫标志组合将提高 MM 的 MRD 的检测效率。虽然仍然可能存在一定的免疫标志的重叠现象,但是应用以上新的免疫标志组合,MFC 能有效地检测出 MM 的 MRD 细胞。

#### 【参考文献】

- [ 1 ] O'STEEN S, COMSTOCK M L, OROZCO J J, et al. The  $\alpha$ -emitter astatine-211 targeted to CD38 can eradicate multiple myeloma in a disseminated disease model [J]. *Blood*, 2019, 134(15): 1247-1256.
- [ 2 ] LAHUERTA J J, PAIVA B, VIDRIALES M B, et al. Depth of response in multiple myeloma: a pooled analysis of three PETHEMA/GEM clinical trials [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(25): 2900-2910.
- [ 3 ] MUNSHI N C, AVET-LOISEAU H, RAWSTRON A C, et al. Association of minimal residual disease with superior survival outcomes in patients with multiple myeloma: a meta-analysis [J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(1): 28-35.
- [ 4 ] ARANA P, PAIVA B, CEDENA M T, et al. Prognostic value of antigen expression in multiple myeloma: a PETHEMA/GEM study on 1 265 patients enrolled in four consecutive clinical trials [J]. *Leukemia*, 2018, 32(4): 971-978.
- [ 5 ] JELINEK T, BEZDEKOVA R, ZATOPKOVA M, et al. Current applications of multiparameter flow cytometry in plasma cell disorders [J]. *Blood Cancer J*, 2018, 8(1): e621.
- [ 6 ] FLORES-MONTERO J, SANOJA-FLORES L, PAIVA

- B, et al. Next generation flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2017,31(10): 2094 – 2103.
- [ 7 ] PERROT A, LAUWERS-CANCES V, CORRE J, et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2018,132(23): 2456 – 2464.
- [ 8 ] KUMAR S, PAIVA B, ANDERSON K C, 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 – e346.
- [ 9 ] PAIVA B, VAN DONGEN J J, ORFAO A. New criteria for response assessment; role of minimal residual disease in multiple myeloma [ J ]. *Blood*, 2015, 125 ( 20 ) : 3059 – 3068.
- [ 10 ] PAIVA B, PUIG N, CEDENA M T, et al. Measurable residual disease by next-generation flow cytometry in multiple myeloma [ J ]. *J Clin Oncol*, 2020, 38 ( 8 ) : 784 – 792.
- [ 11 ] LIU D S, 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.
- [ 12 ] ZHENG W L, LIU D S, FAN X S, et al. Potential therapeutic biomarkers in plasma cell myeloma: a flow cytometry study[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2013, 84(4): 222 – 228.
- [ 13 ] GUPTA R, BHASKAR A, JAIN P, et al. Flow cytometric immunophenotyping for minimal residual disease analysis in multiple myeloma [ J ]. *Blood*, 2008, 112 ( 11 ) : 2711.
- [ 14 ] SOH K T, TARIO J D Jr, WALLACE P K. Diagnosis of plasma cell dyscrasias and monitoring of minimal residual disease by multiparametric flow cytometry [ J ]. *Clin Lab Med*, 2017,37(4): 821 – 853.
- [ 15 ] WOOD B L. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry [ J ]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016,90(1): 47 – 53.
- [ 16 ] OLIVA S, D'AGOSTINO M, BOCCADORO M, et al. Clinical applications and future directions of minimal residual disease testing in multiple myeloma [ J ]. *Front Oncol*, 2020,10: 1.
- [ 17 ] SPEARS M D, OLTEANU H, KROFT S H, et al. The immunophenotypic stability of plasma cell myeloma by flow cytometry [ J ]. *Int J Lab Hematol*, 2011,33 ( 5 ) : 483 – 491.
- [ 18 ] CAO W, GOOLSBY C L, NELSON B P, et al. Instability of immunophenotype in plasma cell myeloma [ J ]. *Am J Clin Pathol*, 2008,129(6): 926 – 933.
- [ 19 ] NERRETER T, LETSCHERT S, GÖTZ R, et al. Super-resolution microscopy reveals ultra-low CD19 expression on myeloma cells that triggers elimination by CD19 CAR-T [ J ]. *Nat Commun*, 2019,10(1): 3137.
- [ 20 ] ADAMS H C 3rd, STEVENAERT F, KREJCIK J, et al. High-parameter mass cytometry evaluation of relapsed/refractory multiple myeloma patients treated with daratumumab demonstrates immune modulation as a novel mechanism of action [ J ]. *Cytometry A*, 2019, 95(3): 279 – 289.
- [ 21 ] BJORKLUND C C, BALADANDAYUTHAPANI V, LIN H Y, et al. Evidence of a role for CD44 and cell adhesion in mediating resistance to lenalidomide in multiple myeloma: therapeutic implications [ J ]. *Leukemia*, 2014,28(2): 373 – 383.