

50 例弥漫大 B 细胞淋巴瘤的细胞遗传学和预后比较

贾祝霞,姜乃可,晁红颖,岑岭,周民*

(南京医科大学附属常州二院血液肿瘤科,江苏 常州 213003)

[摘要] 目的:对 50 例弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)的细胞遗传学及预后进行比较分析。方法:采用荧光原位杂交法(FISH)对所有 DLBCL 患者的石蜡组织进行 p53、bcl-2、bcl-6 及 c-myc 基因的检测,对其进行阳性率比较。以 3 例正常的扁桃体组织的石蜡切片作为阴性对照组。结果:经 Cox 模型似然比检验结果筛选,DLBCL 患者的 P53 蛋白可作为独立的预后因素。p53 蛋白检测为阳性者死亡风险高于 p53 蛋白检测为阴性者。结论:p53 蛋白可作为 DLBCL 患者独立的预后因素,在疾病诊断初期即进行细胞遗传学检测可对 DLBCL 的预后进行准确分析。

[关键词] 弥漫大 B 细胞淋巴瘤;细胞遗传学;p53;预后

[中图分类号] R733.4

[文献标识码] B

[文章编号] 1007-4368(2012)02-246-03

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是恶性淋巴瘤 REAL 分类和 WHO 分类中最常见的非霍奇金淋巴瘤(non-Hobgkin lymphoma, NHL)类型,占 NHL 的 30%左右^[1]。与其他一些类型的淋巴瘤不同,DLBCL 并没有统一的特异性细胞遗传学标志,是一种异质性很强的病症,发病机制涉及染色体易位,基因扩增、缺失和突变等各个方面。本文对近年来收治的 50 例 DLBCL 患者的石蜡组织切片进行了荧光原位杂交(FISH)检测,旨在探讨 DLBCL 患者的细胞遗传学与预后的相互关系。

1 对象和方法

1.1 对象

50 例 NHL 患者均为 2006 年 6 月~2010 年 12 月在本院住院的患者,其中男 27 例,女 23 例,中位年龄 60 岁。诊断和疗效标准参照 1997 年 WHO 制定的造血淋巴组织肿瘤分类及参考文献[1]。所有患者临床治疗采用我院常规方案。

1.2 方法

上述病例和 3 例阴性对照扁桃体的石蜡包埋组织各切 4 mm 厚的切片数片,60℃温箱过夜。对照同方向 HE 切片,选择待检区域用钻石笔标记杂交的位置。常规脱蜡、水化后,置入煮沸蒸馏水的高压锅内,加热直至喷气后计时 3 min,在自来水冲洗下

减压后,取出切片,蒸馏水冲洗 2 次后,置入 0.1% 胃蛋白酶溶液 37℃消化 25 min,蒸馏水冲洗 2 次。梯度酒精脱水,50℃ 10 min 烘干。在所标记的区域内加入配置好的双色分离探针或双色双融合易位探针(金菩嘉生物技术有限公司),盖玻片封盖并用 Rubber Cement 封闭后,将切片放入湿盒,82℃水浴箱中使 DNA 变性 5 min,再入 42℃度温箱杂交过夜。杂交完成后,去除盖玻片,用梯度洗液依次浸洗:65℃ 0.3%NP40 中浸洗 1 min,常温 0.1%NP40 中浸洗 1 min,常温 70%乙醇中浸洗 5 min。最后加 DAPI 复染并封片。利用已经配置了相应的滤光片(Spectrum-Green, Spectrum Orange, DAPI 及 Spectrum Green/Spectrum Orange 双色滤光片)的 Olympus 显微镜观察结果,应用 Analysis 软件(Olympus 公司,日本)采集图像。每个待检标本计数 200 个带有完整信号的间期细胞核。同时从 3 例对照组织上也计数 200 个间期细胞核,得出正常细胞出现假阳性信号的概率($\bar{x} \pm s$),作为计算阳性的参考基数。所有石蜡标本采用 FISH 方法检测 Bcl-2、bcl-6、p53、c-myc 基因,进行定性分析。

1.3 统计学方法

所有数据采用软件 S-plus6.2 进行分析,Cox 比例风险回归模型筛选预后因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

患者 FISH 检测阳性率结果见表 1,p53 信号缺失,bcl-6 信号重排(图 1)。Cox 模型筛选预后因素结

[基金项目] 江苏省常州市卫生局基金资助(WZ200831)

*通讯作者, E-mail: zhoumin@medmail.com.cn

果见表 2。DLBCL 患者的 p53 蛋白可作为独立的预后因素。p53 蛋白检测为阳性者死亡风险高于 p53 蛋白检测为阴性者(图 2)。

表 1 患者 FISH 检测阳性率结果

检测位点	例数	阳性例数	阳性率(%)
bcl-2	50	27	54.0
bcl-6	50	24	48.0
p53	50	21	42.0
c-myc	50	5	10.0

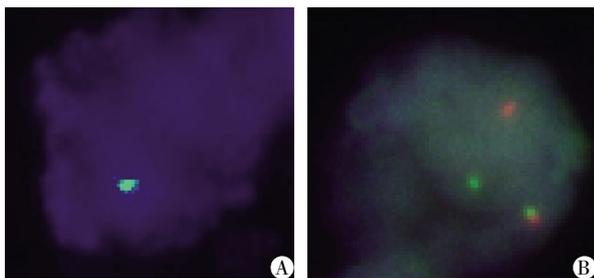


图 1 p53 信号缺失(A)与 bcl-6 重排信号(B)

表 2 患者 Cox 模型似然比检验结果

因素	回归系数	相对危险度	标准误	P 值
性别	-1.177	0.308	0.840	0.160
年龄	0.029	1.030	0.045	0.520
bcl-2	0.942	2.561	0.825	0.250
bcl-6	1.444	4.237	0.990	0.140
p53	2.387	10.885	1.061	0.024
c-myc	-5.033	0.007	35.212	0.890

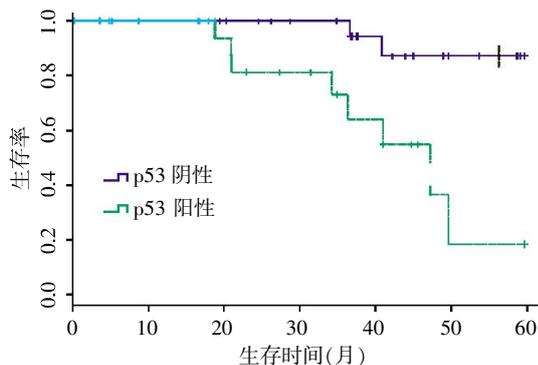


图 2 p53 阳性组与 p53 阴性组生存曲线比较

3 讨论

DLBCL 占成人 NHL 的 30%-40%，而在儿童 NHL 中的比例不足 5%^[2]。近年国内的几组报告 DLBCL 患者的中位年龄为 50.0~55.9 岁，男女比例为(1.1~2.0):1^[3]。本组病例中位年龄为 60 岁，高于国内报道；男女比例为 1.2:1，与国内报道较为接近。

DLBCL 并没有统一的特异性细胞遗传学标志，大多数病例有免疫球蛋白重链和轻链基因的重排。

bcl-2 在 DLBCL 患者中的阳性率为 20%~30%，bcl-6 基因易位的发生率为 30%~40%^[4]，p53 阳性率为 40.0%^[5]，少数患者存在 c-myc 基因重排。本组病例 bcl-2 的阳性率为 54.0%，bcl-6 的阳性率为 48.0%，p53 阳性率为 42.0%，c-myc 的阳性率为 10.0%，均高于相关报道。可能与以往报道的结果多数采用免疫组化的方法，而本组实验 FISH 方法的运用提高了患者的阳性检出率有关。

bcl-2 蛋白是一种凋亡抑制因子，通过调节线粒体、控制细胞色素 C 和其他一些凋亡因子释放对抑制凋亡起重要作用，使肿瘤细胞凋亡过程发生异常，在淋巴瘤发病以及瘤细胞对治疗的敏感性上起重要作用。该基因表达异常主要见于滤泡性淋巴瘤，部分 DLBCL 中也见 bcl-2 蛋白高表达。有关 bcl-2 蛋白高表达与 DLBCL 患者预后的关系尚有争议。bcl-6 基因的表达与淋巴瘤预后的关系目前也存在分歧。多数研究表明 bcl-6 与预后较好有关^[6]，但也有研究认为其与预后关系不大。本组实验经 Cox 比例风险回归模型筛选预后因素结果显示，初发 DLBCL 患者的 bcl-6 基因是否异常与预后并无直接关系。本组实验结果显示 bcl-2 和 bcl-6 都不是 DLBCL 的独立预后因素。有学者报道伴 bcl-2 阳性表达的患者预后不佳而伴 bcl-6 阳性表达者则有着较好的预后，但多数实验未能重复其结果，故 bcl-2 及 bcl-6 是否能作为 DLBCL 的独立预后因素尚无定论。有报道伴 p53 基因突变的患者总生存期及无病生存期较短^[7-9]，本组结果显示 p53 蛋白可作为独立的预后因素，p53 蛋白检测为阳性者死亡风险高于 p53 蛋白检测为阴性者($P < 0.05$)。

本组资料显示 p53 蛋白的阳性表达是 DLBCL 预后的独立因素，对于 bcl-2、bcl-6 及 c-myc 基因是否能作为 DLBCL 的独立预后因素，有待积累更多的标本后进一步进行分析。因此在患者初诊时进行病理学分析的同时即采用 FISH 方法进行细胞遗传学检查可更好地对患者的预后进行判断。

[参考文献]

- [1] 石远凯, 淋巴瘤 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2007: 129-151
- [2] Smedby KE, Hjalgrim H, Askling J, et al. Autoimmune and chronic inflammatory disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma by subtype [J]. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(1): 51-60
- [3] 肖 畅, 苏祖兰, 吴良秋, 等. 根据 WHO 新分类对 493 例非霍奇金淋巴瘤的临床病理分析 [J]. 中华病理学杂

志,2005,34(1):22-27

[4] Winter JN,Weller E,Horning SJ,et al. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP;a prospective correlative study [J]. Blood,2006,107(11):4207-4213

[5] Young KH,Leroy K,Moller MB,et al. Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma;an international collaborative study[J]. Blood,2008,112(8):3088-3098

[6] Ohno H. Pathogenetic and clinical implications of nonimmunoglobulin:BCL6 translocations in B-cell non-Hodgkin's lymphoma[J]. J Clin Exp Hematop,2006,46(2):43-53

[7] Pervez S,Nasir MI,Moatter T,et al. Characterization of genetic lesions in apoptosis-regulating and proliferation control genes in diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma[J]. J Cancer Res Ther,2009,5(4):254-262

[8] Stewart DA,Bahlis N,Mamasoor A. pY-STAT3 and p53 expression predict outcome for poor prognosis diffuse large B-cell lymphoma treated with high dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation [J]. Luek Lymphoma,2009,50(8):1276-1282

[9] Ressi D,Cerri M,Deambrogi C,et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del 17p13;implications for overall survival and chemorefractoriness [J]. Clin Cancer Res, 2009,15(3):995-1004

[收稿日期] 2011-06-10

本刊来稿题名和作者署名的注意事项

1. 题名

- (1) 题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容,要符合编制题录、索引和检索的有关原则,并有助于选定关键词。
- (2) 中文题名一般不超过 20 个字,必要时可加副题名。
- (3) 英文题名应与中文题名含义一致。
- (4) 题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号,尽量不出现数学式或化学式。

2. 作者署名和工作单位

- (1) 文章都应有作者署名,这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2) 作者姓名署于题名下方;
- (3) 英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序,写法为:姓前名后,姓全部大写,名的首字母大写,其余字母小写,名间加连字符,如 ZHOU Ping,SHI Hong-lei;
- (4) 作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位,如“南京医科大学第一附属医院心内科”,“南京医科大学公共卫生学院流行病与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5) 对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“*”,并在论文首页下补充基金名称、编号,以及课题负责人的 E-mail。
- (6) 本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑:接雅俐)