

## · 临床论著 ·

# B 细胞淋巴瘤 bcl-2 基因重排与 14 号染色体微卫星改变的研究

李化梅 李龙萍 苏俊 喻安孝 邓飞

**【摘要】 目的** 研究 bcl-2/IgH 基因重排与微卫星 DNA 改变在 B 细胞淋巴瘤发生发展中的作用以及 bcl-2/IgH 基因重排与微卫星不稳定和杂合性缺失之间的关系。**方法** 应用巢式 PCR 方法检测 bcl-2/IgH 基因重排;选取 14 号染色体上 2 个微卫星多态性标记,采用聚合酶链反应-单链构象多态性分析法(PCR-SSCP)检测 37 例 B 细胞淋巴瘤中微卫星不稳定和杂合性缺失。**结果** 37 例 B 细胞淋巴瘤中,bcl-2/IgH 基因重排频率为 24.3% (9/37);微卫星不稳定发生率为 48.6% (18/37),杂合性缺失发生率为 40.5% (15/37),其中 D14S65 位点微卫星不稳定和杂合性缺失频率较高,分别为 29.7% (11/37) 和 27% (10/37)。经统计学分析结果显示:D14S65 位点 bcl-2/IgH 基因重排与微卫星不稳定有关( $P < 0.05$ ),与杂合性缺失无关( $P > 0.05$ );但 D14S45 位点 bcl-2/IgH 基因重排与微卫星不稳定和杂合性缺失无关( $P > 0.05$ )。**结论** D14S65 是 B 细胞淋巴瘤中敏感的检测位点,bcl-2/IgH 基因重排和微卫星不稳定性可能共同导致 B 细胞淋巴瘤的发生。

**【关键词】** 淋巴瘤,B 细胞; 基因,bcl-2; 微卫星不稳定性; 杂合子丢失; 基因重排

## Bcl-2 gene rearrangement and 14 chromosome microsatellite alteration in B-cell Non-Hodgkin's lymphoma

LI Hua-mei, LI Long-ping, SU Jun, YU An-xiao, DENG Fei. Department of Pathology, Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi 563002, China

Corresponding author: DENG Fei, Email: mdproffeideng@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the role of bcl-2 gene rearrangement and microsatellite DNA alteration in pathogenesis of B-cell lymphoma, and to discuss the relationship of bcl-2/IgH gene rearrangement with microsatellite instability and loss of heterozygosity. **Methods** Thirty-seven cases of B-cell lymphoma were studied for bcl-2 gene rearrangement with nested-PCR method; two microsatellite makers located at chromosome 14 were selected to detect microsatellite alterations (MSI and LOH) by single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). **Results** Rearrangement rate of bcl-2 gene was 24.3% (9/37) in 37 B-cell lymphoma cases; Positive rate of MSI was 48.6% (18/37), while positive rate of LOH was 40.5% (15/37). The high frequency of MSI/LOH was at locus of D14S65 (29.7%, 27%). Bcl-2/IgH gene rearrangement was correlated with MSI at D14S65 ( $P < 0.05$ ), while no correlation was found between MSI or LOH and bcl-2/IgH gene rearrangement at D14S45 ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** D14S65 is sensitive microsatellite loci in B-cell lymphoma, bcl-2/IgH gene rearrangement and MSI might play a role in pathogenesis of B-cell lymphoma.

**【Key words】** Lymphoma, B-cell; Genes, bcl-2; Microsatellite instability; Loss of heterozygosity; Gene rearrangement

非霍奇金淋巴瘤是一组来源于淋巴免疫系统的一种常见的恶性肿瘤,从肿瘤细胞来源角度可分为 T 细胞肿瘤和 B 细胞肿瘤两型<sup>[1-2]</sup>。目前发现约 90% 的恶性淋巴瘤涉及克隆性染色体易位, bcl-2/IgH 基因重排是 B 细胞淋巴瘤常见的染色体易位<sup>[3-4]</sup>。基因组不稳

定是肿瘤细胞行为改变的基础,微卫星不稳定是衡量细胞基因组稳定性的敏感指标,本研究通过对 D14S65、D14S45 位点进行微卫星不稳定和杂合性缺失检测,与 bcl-2/IgH 基因重排进行相关性分析。

## 资料与方法

### 一、一般资料

标本来自 2005 年 1 月至 2007 年 10 月遵义医学院附属医院病理科的淋巴瘤存档材料 37 例,男 22 例,女 15 例;年龄最大者 72 岁,最小年龄为 9 岁,平均 48.9 岁。男:女为 1.5:1。所有病例均经病理学免疫组织化

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.10.019

基金项目:国家自然科学基金(30160030)

作者单位:563002 贵州省,遵义医药高等专科学校病理教研室(李化梅);贵阳市第五人民医院病理科(李龙萍);遵义医学院附属医院病理科(苏俊);遵义医学院法医教研室(喻安孝);遵义医学院(邓飞)

通讯作者:邓飞,Email:mdproffeideng@hotmail.com

(CD20、CD45RO、CD79a、CD4、CD8、CyclinD1、BCL-2、Ki67等)检查确诊。

### 二、实验试剂

(1)石蜡包埋组织DNA抽提试剂盒(德国Qiagen公司)、全血基因组DNA分离试剂盒(BBI公司);(2)PCR扩增相关试剂、电泳相关试剂购于上海生物工程有限公司;(3)bcl-2/IgH基因重排引物:由上海生物工程技术有限公司合成,内引物P1:5'-CTCGCTCGCCAAC-CAGGGTCCCTTGGCCCCA-3'; P2: 5'-CTGGTTCGGC-CCATTAGAGAGAGTTGCTTTACGTG-3';外引物P1:5'-ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT-3'; P2: 5'-GCAAT-TCCGCATTTAATTTTCATGGTATTCAGGA-3'。

### 三、方法

1. 石蜡组织DNA提取:切取8 μm厚切片10张,对照镜下组织学形态分离肿瘤组织及周边正常组织,应用石蜡包埋组织DNA抽提试剂盒进行抽提。

2. 聚合酶链反应(巢式PCR)检测bcl-2/IgH基因重排:(1)提取石蜡包埋组织DNA。(2)巢式PCR扩增:反应体系为25 μl。首轮扩增模板取基因组DNA 2 μl,95℃预变性5 min,94℃变性60 s,60℃退火60 s,72℃延伸90 s,循环40次,72℃后延伸7 min;第二轮扩增模板取第一轮扩增产物1 μl,94℃变性60 s,65℃退火60 s,72℃延伸90 s,循环30次,72℃后延伸7 min。(3)电泳:2%琼脂糖凝胶水平电泳-溴化乙啶染色检测bcl-2/IgH基因重排扩增产物。(4)结果判断:肿瘤组织和反应性淋巴结比较出现目的条带为bcl-2/IgH基因重排阳性。

3. 微卫星不稳定和杂合性缺失的检测:(1)石蜡包埋组织DNA和外周血DNA的提取;(2)微卫星位点选择:bcl-2/IgH基因融合区及周围位点(D14S65和D14S45);(3)微卫星PCR扩增和电泳:2%琼脂糖凝胶电泳出现目的条带样本进行8%变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳、硝酸银染色;(4)结果判断<sup>[5]</sup>:肿瘤组织和同一患者自身外周血DNA在相同条件下电泳,出现完全一致的电泳条带,则微卫星不稳定为阴性;如果二者比较出现条带的移位或获得额外的条带,为微卫星不稳定;若出现条带的消失,为杂合性缺失。

### 四、统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件进行确切概率法检验(Fisher's exact test in 2 × 2 table)相关分析,P < 0.05为有统计学差异。

## 结 果

1. bcl-2/IgH基因重排情况:37例B细胞淋巴瘤中有9例发生bcl-2/IgH基因重排,发生频率为24.3%

(9/37)。

2. B细胞淋巴瘤中微卫星不稳定和杂合性缺失分析:37例B细胞淋巴瘤通过PCR-SSCP分析有18例(48.6%)标本表现出微卫星不稳定。在微卫星位点D14S65、D14S45表现出微卫星不稳定性的频率分别为29.7%(11/37),18.9%(7/37)(图1,2)。有15例表现出杂合性缺失,微卫星位点D14S65、D14S45杂合性缺失的频率分别为27.0%(10/37)、13.5%(5/37)。

3. bcl-2/IgH基因重排与不同位点微卫星不稳定/杂合性缺失的关系:结果见表1~4,37例B细胞淋巴瘤中9例bcl-2/IgH基因重排阳性,其中D14S65位点微卫星不稳定阳性的6例,微卫星不稳定阴性的3例,二者有关(P < 0.05);D14S45位点7例微卫星不稳定阳性的B细胞淋巴瘤中,bcl-2/IgH基因重排阳性为3例,二者无相关(P > 0.05)。

表1 37例B细胞淋巴瘤bcl-2/IgH基因重排与D14S65位点微卫星不稳定分析(例)

微卫星不稳定	bcl-2 基因重排		合计
	+	-	
+	6	5	11
-	3	23	26
合计	9	28	37

注:经 Fisher's 检验,P = 0.011

表2 37例B细胞淋巴瘤bcl-2/IgH基因重排与D14S65位点杂合性缺失分析(例)

杂合性缺失	bcl-2 基因重排		合计
	+	-	
+	4	6	10
-	5	22	27
合计	9	28	37

注:经 Fisher's 检验,P = 0.215

表3 37例B细胞淋巴瘤bcl-2/IgH基因重排与D14S45位点微卫星不稳定分析(例)

微卫星不稳定	bcl-2 基因重排		合计
	+	-	
+	3	4	7
-	6	24	30
合计	9	28	37

注:经 Fisher's 检验,P = 0.125

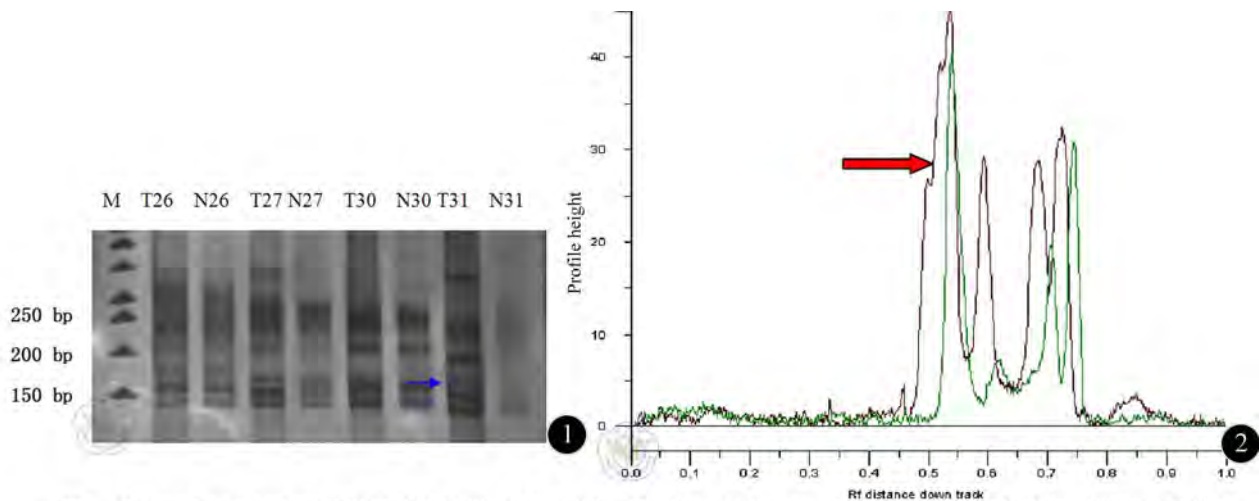


图1 D14S65(125-149bp)微卫星改变结果。M: 标准; T: 肿瘤组织; N: 自身外周血; 蓝色箭头示肿瘤条带增加  
图2 Genetools 软件分析结果: 红色箭头示T31(肿瘤组织)较N31(自身外周血)条带增多(微卫星不稳定); 绿色线: 自身外周血; 紫色线: 肿瘤组织

表4 37例B细胞淋巴瘤 bcl-2/IgH 基因重排与 D14S45 位点杂合性缺失分析(例)

微卫星不稳定	bcl-2 基因重排		合计
	+	-	
+	2	3	5
-	7	25	32
合计	9	28	37

注: 经 Fisher's 检验,  $P = 0.189$

## 讨 论

Bcl-2 基因一种重要的抑制凋亡的原癌基因,它在淋巴细胞发育过程中起着主要的作用,常易位到 14 号染色体与免疫球蛋白重链基因并列形成头尾结构,这种异常结合基因(bcl-2/IgH)导致 BCL-2 蛋白的过度表达<sup>[6-7]</sup>。bcl-2 基因大部分断裂点(>70%)位于该基因的 3'非翻译区,称为主要断裂点区(MBR);其余断裂点大多发生在 3'端的 20 kb 范围内,称为次要断裂点区(MCR)<sup>[8]</sup>。Arif 等<sup>[9]</sup>对 30 例 B 细胞淋巴瘤进行 bcl-2/IgH 基因重排研究发现:bcl-2/IgH 基因重排频率为 23.3%,但多数发生在次要断裂点(16.7%),主要断裂点仅有 6.7% 发生重排。本研究中,bcl-2/IgH 基因重排频率为 24.3%,说明 B 细胞淋巴瘤中存在 bcl-2/IgH 基因重排。但本研究只检测了主要断裂点 bcl-2/IgH 基因重排,不能全面分析 B 细胞淋巴瘤中 bcl-2 基因重排情况,有必要在次要断裂点上做进一步的研究工作。

微卫星 DNA 重复序列广泛存在于人类基因组中,如果微卫星影响了某些基因的编码区,就会导致基因功能的丧失并促进癌变。Degroote 等<sup>[10]</sup>对 28 例胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤进行微卫星不稳定与 DNA 错

配修复机制研究显示:微卫星不稳定发生频率为 28%,认为 DNA 错配修复基因 MSH6 缺陷引起微卫星不稳定,从而导致黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的发生。本研究选取了 14 号染色体 bcl-2/IgH 基因融合点及周围微卫星位点 D14S65、D14S45 对 37 例 B 细胞淋巴瘤进行微卫星不稳定/杂合性缺失分析,结果显示 D14S65、D14S45 位点均检测到微卫星不稳定性和杂合性缺失,微卫星不稳定的频率分别为 29.7%、18.9%;杂合性缺失的频率分别为 27%、13.5%。不同微卫星位点微卫星不稳定/杂合性缺失的发生率不同,在 D14S65 位点微卫星不稳定/杂合性缺失的发生频率较高,说明微卫星不稳定和杂合性缺失可能在 B 细胞淋巴瘤的形成过程中发挥一定的作用。

Idraccolo 等<sup>[11]</sup>分析 37 例淋巴瘤发现与急性淋巴瘤母细胞性白血病相比,微卫星不稳定更多发生在非霍奇金淋巴瘤;其中 4 例微卫星不稳定阳性的非霍奇金淋巴瘤均伴有 bcl-2 基因重排,认为微卫星不稳定与 bcl-2 基因重组共同导致非霍奇金淋巴瘤的发生。本试验中发现微卫星不稳定阳性的 B 细胞淋巴瘤中发生 bcl-2/IgH 基因重排率高于微卫星不稳定阴性的 B 细胞淋巴瘤(54.5%、11.5%, $P < 0.05$ ),提示微卫星不稳定与 bcl-2 基因重排之间有相关性,可以推测微卫星不稳定引起基因组的不稳定,使 bcl-2 基因过度表达,延长细胞的生存期从而导致肿瘤的形成。微卫星不稳定和 bcl-2 基因重排可能共同导致了 B 细胞淋巴瘤的发生。

本实验从分子水平探讨有关 bcl-2 基因、微卫星不稳定性与 B 细胞淋巴瘤之间的关系,为恶性淋巴瘤的基因诊断和治疗提供有意义的参考。

参 考 文 献

[1] Yang ZZ, Grote DM, Ziesmer SC, et al. Soluble and Membrane-Bound TGF- $\beta$ -Mediated Regulation of Intratumoral T Cell Differentiation and Function in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *PLoS One*, 2013, 8:e59456.

[2] Gallo E, Pérez-Gala S, Navarro R, et al. Coexistence of marginal zone cutaneous B-cell lymphoma and classic Hodgkin disease: does a biological relationship exist? *Clin Exp Dermatol*, 2013.

[3] Zhang XH, Liang Y, Wang GJ, et al. BCL-2/IgH and IgH gene rearrangements in bone marrow mononuclear cells of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2011, 19:379-384.

[4] Che YQ, Liu P, Wang Y, et al. Bcl-2/IgH expression in minimal bone marrow infiltration by follicular lymphoma cells. *Mol Med Rep*, 2012, 5:383-387.

[5] 赵岩, 刘岩然, 张淑兰. 子宫内膜癌中抑癌基因 PTEN 突变与微卫星不稳定性的相关性分析. *中国医科大学学报*, 2010, 39: 119-122.

[6] van Oers MH, Tönnissen E, Van Glabbeke M, et al. BCL-2/IgH polymerase chain reaction status at the end of induction treatment is not predictive for progression-free survival in relapsed/resistant follicular

lymphoma: results of a prospective randomized EORTC 20981 phase III intergroup study. *J Clin Oncol*, 2010, 28:2246-2252.

[7] Jiang HY, Li HL, Hu H, et al. Detection of t(14;18) translocation and bcl-2 amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2007, 36:84-89.

[8] Libra M, De Re V, Gloghini A, et al. Frequency of bcl-2/IgH translocation in patients with non-Hodgkin's lymphoma and chronic hepatitis C virus infection. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2005, 51:165-170.

[9] Arif A, Jamal S, Mushtaq S, et al. Frequency of bcl-2 gene rearrangement in B-cell Non-Hodgkin's lymphoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2009, 10:237-240.

[10] Degroote A, Knippenberg L, Vander Borgh S, et al. Analysis of microsatellite instability in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 2013, 54:812-818.

[11] Indraccolo S, Minuzzo S, Nicoletti L, et al. Mutator phenotype in human hematopoietic neoplasms and its association with deletions disabling DNA repair genes and bcl-2 rearrangements. *Blood*, 1999, 94: 2424-2432.

(收稿日期:2013-03-19)

(本文编辑:戚红丹)

李化梅, 李龙萍, 苏俊, 等. B 细胞淋巴瘤 bcl-2 基因重排与 14 号染色体微卫星改变的研究[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(10):4217-4220.

