·临床研究·

219例弥漫性大B细胞淋巴瘤免疫表型及遗传学特征分析

管冰心[①] 潘 毅[②] 房爱菊[③] 梁 艳[①] 霍颖颖[①] 孙保存[②] 王华庆[②]
付 凯[②④] 孟 斌[①]

摘要 目的：探讨国内弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)免疫表型分型及BCL-2和BCL-6基因异常的分布情况。**方法：**应用组织芯片和免疫组织化学法及FISH技术对219例DLBCL的免疫表型及BCL-2和BCL-6基因异常进行检测，根据Hans法进行分型；并收集国内7家相关研究报道，进行综合分析。**结果：**本组研究结果：219例DLBCL中，非GCB型(165例，75.3%)显著高于GCB型(54例，24.7%)(P<0.001)。BCL-2基因异常共49例(25.8%)，其中t(14；18)5例(2.6%)均为GCB型；BCL-2基因扩增44例(23.2%)，GCB型4例(8.5%)，非GCB型40例(28.0%)，有显著性差异(P=0.013)。BCL-6基因重排共42例(22.1%)，GCB型7例(14.9%)，非GCB型35例(24.5%)，差异无统计学意义(P=0.189)。BCL-2基因扩增和BCL-6基因重排呈显著负相关(r=-0.180，P=0.013)。8组综合分析：1 259例中非GCB型(879例，69.8%)明显高于GCB型(380例，30.2%)(P<0.001)；免疫表型中CD10和MUM1阳性率组间差异较小(P=0.047和P=0.048)，而BCL-6及BCL-2阳性率组间存在明显差异(P<0.001)。**结论：**我国DLBCL患者在主要免疫表型和遗传学特征方面具有独特性，对此值得进行深入研究。

关键词 弥漫性大B细胞淋巴瘤 免疫表型 BCL-2基因 BCL-6基因
doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.12.004

Immunophenotypes and Cytogenetic Alterations in 219 Cases of Diffuse Large B-cell Lymphoma

Bingxin GUAN[1], Yi PAN[2], Aiju FANG[3], Yan LIANG[1], Yingying HUO[1], Baocun SUN[2], Huaqing WANG[2], Kai FU[2,4], Bin MENG[1]
Correspondence to: Bin MENG; E-mail: mengbin@sdu.edu.cn
[1]Department of Pathology, Shandong University School of Medicine, Ji'nan 250012, China
[2]Departments of Pathology and Lymphoma, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Sino-American Center for Lymphoma Diagnosis and Therapy, Tianjin 300060, China
[3]Department of Pathology, Shandong Jiaotong Hospital, Jinan 250031, China
[4]Department of Pathology and Microbiology, 983135 Nebraska Medical Center, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-3135

Abstract Objective: To investigate the immunophenotypes, subtypes based on Hans algorithm, and alterations of Bcl-2 and Bcl-6 gene in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) from Chinese patients. **Methods:** The expression of CD10, BCL-6, MUM1, BCL-2, Ki67 and other markers were detected by immunohistochemistry in tissue microarrays of 219 DLBCL cases. Hans algorithm was applied to classify DLBCL into GCB and non-GCB subtypes. Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) was used to detect the incidence of Bcl-2 and Bcl-6 gene alterations. Other seven studies published in the last two years on DLBCL from China were collected and analyzed. **Results:** (1) This study: ① of 219 DLBCL cases, non-GCB subtype (165 cases, 75.3 %) was significantly more common than GCB subtype (54 cases, 24.7 %) (P < 0.001). ② Bcl-2 gene alteration was detected in 49 cases (25.8 %), including 5 cases with the t (14 ; 18) (2.6 %) which all existed in GCB subtype, and 44 cases of Bcl-2 amplification (23.2 %) which existed in GCB subtype in 4 cases (8.5 %) and in non-GCB subtype in 40 cases (28.0 %) (P = 0.013). ③ Bcl-6 gene rearrangement was detected in 42 cases (22.1 %), which was in GCB in 7 cases (14.9 %) and was in non-GCB in 35 cases (24.5 %) (P = 0.189). ④ a significant negative correlation between Bcl-2 gene amplification and Bcl-6 gene rearrangement was seen (r = - 0.179 6, P = 0.016 8). Amongst 5 cases having the t (14 ; 18) translocation, 2 cases accompanied by Bcl-6 gene rearrangement. Forty-nine cases with Bcl-2 gene alterations including translocation and amplification were all but one expressing BCL-2 protein, and there was no significant association between Bcl-6 gene rearrangement and BCL-6 protein expression (P = 0.726). ⑤ there was no significant difference between nodal and extranodal DLBCLs in immunophenotypes, subtypes based on Hans algorithm, and Bcl-2 and Bcl-6 gene alterations (P = 0.462, P = 0.426 and P = 0.167). (2) Comprehensive analysis of eight studies:

作者单位：①山东大学医学院病理学教研室（济南市250012）；②天津医科大学附属肿瘤医院病理科，中美淋巴血液肿瘤诊治中心；③山东省交通医院病理科；④美国内布拉斯加大学医学中心病理学与微生物学系，中美淋巴血液肿瘤诊治中心
通信作者：孟斌 mengbin@sdu.edu.cn

of the total 1, 259 cases, non-GCB subtype (879 cases, 69.8 %) was significantly more common than GCB subtype (380 cases, 30.2 %) (P < 0.001). **Conclusion:** There are some distinctive features on immunophenotypes and cytogenetic alterations in DLBCL of Chinese patients, which need elucidation by more studies.

Keywords Diffuse large B-cell lymphoma; Immunophenotype; Bcl-2 gene; Bcl-6 gene

弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma,DLBCL)是一组高度侵袭性和异质性肿瘤,约占非霍奇金B细胞淋巴瘤的30%~40%[1]。根据基因表达谱可将其分为生发中心B细胞样(germinal center B-cell like,GCB)亚型和活化B细胞样(activated B-cell like,ABC)亚型[2],GCB亚型对化疗的反应性和预后均明显好于ABC亚型。应用CD10、BCL-6和MUM1 3个标记物可将DLBCL分为GCB型和非GCB亚型[3],后者包括ABC亚型和少数未分类者,其与基因表达谱分型的符合率可达80%~86%[3-5]。有研究显示两个亚型间在化疗反应性和预后上与基因表达谱分型相似[4-6]。

我国淋巴瘤发病率和死亡率与欧美等国家存在明显差异,尤其是DLBCL和滤泡性淋巴瘤。这种差异是由于种族遗传学背景还是环境因素影响目前还不清楚,因此明确我国DLBCL免疫表型和遗传学特征具有重要的临床和病理学意义。近来国内有多家相关研究报道[7-13],但研究结果不尽一致。现对来自山东和天津地区219例DLBCL病例的免疫表型以及BCL-2和BCL-6基因异常情况进行检测分析,并与近期国内几家病例数较多的研究报告进行对比和综合分析,以明确我国DLBCL患者的遗传学特征,为继续深入研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病例来源

连续收集山东大学齐鲁医院和天津医科大学附属肿瘤医院1999年1月至2010年7月间确诊的原发DLBCL共219例。所有标本均经10%中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,并经2位以上高年资病理医师复诊。通过检索收集近2年国内外期刊正式发表的有关国内DLBCL病例的相关研究论文7篇[7-13],合计1 040例。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片制作 根据HE切片标记典型病变区域,应用组织微阵列仪(朝阳恒泰科技有限公司)在空白蜡块(25 mm×25 mm×6 mm)打孔(孔径2 mm),然后在蜡块标记部位钻取直径2 mm、长4 mm的组织芯,放入空白蜡块孔内并加以记录,依次按序操作,二次包埋后行4 μm连续切片,敷贴于APES处理的载玻片上备用。

1.2.2 免疫组织化学染色 应用S-P法检测CD10、BCL-6、MUM-1、BCL-2及其他标记物,抗体均为Invitrogen公司生产。染色按照试剂盒说明书进行,以扁桃体组织作为染色对照。30%以上肿瘤细胞着色判定为阳性。

1.2.3 荧光原位杂交(FISH) GLP IgH/BCL-2双色融合探针(金菩嘉科技有限公司)和GLP BCL-6双色分离探针(Abbott Vysis公司)用于检测t(14;18)、BCL-2基因扩增和BCL-6基因重排。

1.2.4 结果判断 IgH/BCL-2融合探针,无易位为2红2绿4个分开的信号;易位阳性细胞为1红1绿及1~2个红绿融合信号;BCL-2扩增阳性细胞显示1~2个绿色和3个及3个以上红色信号。BCL-6分离探针,无易位显示2个红绿融合信号,阳性细胞显示1个红绿融合信号和2个彼此分离的红绿信号。每例样本计数100个细胞,出现3个及3个以上阳性细胞判断为阳性。

1.3 统计学分析

应用SPSS 17.0软件进行统计学分析,不同组间比较采用χ^2检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料

本组219例DLBCL患者中,男120例,女99例,男女比例为1.21∶1;年龄16~91岁,中位年龄59岁。127例发生于结内,92例发生于结外,其中52例发生于胃肠道,40例为其他部位。其他文献报道[7-13]的病例除结内外分布以外,男女比例、发病年龄、中位或平均年龄等临床特征方面均与本组病例无明显差异。

2.2 免疫表型及分型

1)本组及其他文献报道[7-13]免疫表型及分型结果(表1)。根据Hans分型法[3],本组219例中非GCB型165例(75.3%)明显高于GCB型54例(24.7%)(P<0.001);8组研究共1 259例病例(包括本组),同样显示非GCB型879例(69.8%)明显高于GCB型380例(30.2%)(P<0.001)。2)除四川组外其余各组均为非GCB型明显高于GCB型。3)提供CD10、BCL-6和MUM1数据共6组,其中CD10和MUM1阳性率的组间差异较小(P=0.047和P=0.048),而BCL-6阳性率组间存在明显差异(P<0.001)。4)提供BCL-2数据共4组,其中本组数据与上海组相似(P=0.302),明显高于四川组及广西组(P<0.001)。

表1　各组研究报道主要免疫表型及分型比较　%(例)

Table 1　Comparative analysis of immunophenotypes and subtypes based on Hans algorithm in this study and seven other published studies

分组	总例数(结内/结外)	Hans法分型[a]		免疫表型			
		GCB	non-GCB	CD10[b]	Bcl-6[c]	MUM1[d]	Bcl-2[e]
本组	219(127/92)	24.7(54/219)	75.3(165/219)	18.3(40/219)	47.9(105/219)	68.0(149/219)	63.0(138/219)
上海组	124(122/2)	21.8(27/124)	78.2(97/124)	12.9(16/124)	36.3(45/124)	64.5(80/124)	68.5(85/124)
四川组	90(0/90)	51.1(46/90)	48.9(44/90)	17.8(16/90)	75.6(68/90)	52.2(47/90)	42.2(38/90)
北京组	136(68/68)	39.7(54/136)	60.3(82/136)	28.7(39/136)	37.3(50/136)	61.7(82/136)	-
浙江组	60(44/16)	26.7(16/60)	73.3(44/60)	20.0(12/60)	66.7(40/60)	71.7(43/60)	-
山西组	106(73/33)	24.5(26/106)	75.5(80/106)	21.7(23/106)	26.4(28/106)	56.6(60/106)	-
广西组	214(88/126)	30.8(66/214)	69.2(148/214)	-	-	-	49.5(106/214)
广东组	310(-/-)	29.4(91/310)	70.6(219/310)	-	-	-	-
合计	1 259(522/427)	30.2(380/125 9)	69.8(879/125 9)	19.9(146/735)	45.7(336/735)	62.7(461/735)	56.7(367/647)

a:除四川组外,本组与各组间均无显著性差异(P=0.260);b:除上海组与北京组(P=0.002),其余各组间无显著性差异(P=0.926);c:各组间差异明显(P<0.001);d:各除四川组略低,各组间无显著性差异(P=0.841);e:本组与上海组相似,明显高于四川组和广西组(P<0.001)

2.3　BCL-2及BCL-6基因检测

本组219例中各有190例获得IgH/BCL-2和BCL-6的FISH检测结果(表2)。1)BCL-2基因异常共49例(25.8%),其中t(14;18)仅5例(2.6%),均为GCB型;BCL-2基因扩增44例(23.2%),GCB型4例(8.5%)显著低于非GCB型40例(28.0%)(P=0.017)。2)BCL-6基因重排42例(22.1%),GCB型7例(14.9%)与非GCB型35例(24.5%)间差异无统计学意义(P=0.169 6)。3)有186例同时获得BCL-2和BCL-6基因FISH检测结果,统计显示BCL-2基因扩增和BCL-6基因重排呈显著负相关(r=-0.180,P=0.017,表3)。

表2　本组免疫表型及基因异常在GCB、非GCB亚型及结内和结外病例中的分布

Table 2　The distribution of immunophenotypes and gene alterations in GCB vs. non-GCB and nodal vs. extranodal cases

项目	例数(n=219)	分型		P	部位		P
		GCB(n=54)	non-GCB(n=165)		结内(n=127)	结外(n=92)	
分型							
GCB	54	-	-		29	25	0.462
non-GCB	165	-	-		98	67	
蛋白表达							
CD10							
阳性	40	40	0	<0.001	22	18	0.671
阴性	179	14	165		105	74	
BCL-6							
阳性	105	46	59	<0.001	62	43	0.761
阴性	114	8	106		65	49	
MUM1							
阳性	149	16	133	<0.001	90	59	0.291
阴性	70	38	32		37	33	
BCL-2							
阳性	138	23	115	<0.001	81	57	0.782
阴性	81	31	50		46	35	
基因异常							
BCL-2							
t(14;18)	5	5	0	0.002	3	2	0.656
扩增	44	4	40	0.013	23	21	0.391
阴性	141	38	103		84	57	
BCL-6							
重排	42	7	35	0.169	28	14	0.167
阴性	148	40	108		81	67	

表3 本组研究BCL-2与BCL-6基因异常之间的相互关系 例

Table 3 The correlations of gene alterations between BCL-2 and BCL-6 in this study

项目	BCL-6		P
	重排阳性	重排阴性	
t(14;18)	2	3	0.867
扩增	4	40	0.016
阴性	36	101	

2.4 基因异常与蛋白表达的关系

有BCL-2基因重排和扩增的病例几乎全部表达BCL-2蛋白，而无改变的病例仅有51.8%(71/137)表达BCL-2蛋白(P<0.001)；BCL-6基因重排与BCL-6蛋白表达之间则无明显相关性(P=0.726 6，表4)。

2.5 结内外病例免疫表型和遗传学异常比较

本组结内病例(58.0%，127/219)与结外病例(42.0%，92/219)在免疫表型分型、主要标记物表达、BCL-2和BCL-6基因异常等方面均未显示差异有统计学意义(表2)。

表4 本组研究免疫表型和基因异常之间的相互关系 例

Table 4 The correlations between the immunophenotypes and gene alterations in this study

项目	例数(n=186)	BCL-2基因异常			P	BCL-6基因重排		P
		t(14;18)(n=5)	扩增(n=44)	阴性(n=137)		阳性(n=42)	阴性(n=144)	
CD10								
阳性	35	4	4	27	0.603 2	3	32	0.027 8
阴性	151	1	40	110		39	112	
BCL-6								
阳性	94	3	20	71	0.557 1	20	74	0.667 2
阴性	92	2	24	66		22	70	
MUM1								
阳性	129	1	39	89	0.029 8	31	98	0.476 7
阴性	57	4	5	48		11	46	
BCL-2								
阳性	119	5	43	71	<0.001	29	90	0.436 7
阴性	67	0	1	66		13	54	

3 讨论

本组219例研究显示，根据Hans分型法，非GCB型明显高于GCB型(P<0.001)。8组研究总计1 259例病例综合分析同样显示非GCB型明显高于GCB型(P<0.001)。其中除四川组外，其余各组虽然在构成比上略有差异，但均显示非GCB型显著高于GCB型。四川组[12]则为GCB型(51.1%)略高于非GCB型(48.9%)，但其同时也应用了Choi和Tally分型法，Tally法则显示GCB型(34.4%)明显低于非GCB型(65.6%)。究其原因可能是因为BCL-6阳性率明显偏高而MUM-1偏低所致。

通过对8组研究结果的比较发现，BCL-6变异在各组间存在显著性差异(P<0.001)，而CD10和MUM-1的阳性率比较稳定，除个别外在各组间基本一致(P=0.047 0和P=0.048 4)。最近Meyer等[5]的研究发现实际上BCL-6对Hans分型法的影响并不大，因此造成中国人非GCB亚型明显高于GCB亚型的主要原因应该是CD10阳性率偏低和MUM-1阳性率偏高，虽然尚未经GEP分析证实，中国人DLBCL患者中非GCB亚型明显高于GCB亚型这一现象应该是可信的。

本组病例中仅有5例(2.6%)检测到t(14;18)，与国内Chen等[7](3%)和曾丽平等[11](3.7%)的研究结果相似，远低于西方20%左右的检出率[14-16]。由于t(14;18)几乎只发生在GCB亚型，因此也支持我国GCB亚型DLBCL明显偏低的特征。BCL-2基因异常除了t(14;18)易位还有获得和扩增，本研究共检测到44例BCL-2基因扩增(23.2%)，其中4例发生在GCB型(8.5%)，40例发生在非GCB型(28.0%)，差异具有统计学意义，这一结果与国外研究相似[16]。本组BCL-2蛋白表达率与国内Chen等[7]的结果一致，均高于国外的研究，其中具有BCL-2基因异常(包括易位和扩增)的49例中，除1例外其余病例BCL-2蛋白均呈阳性，但无BCL-2基因易位和扩增的病例也有一半以上有BCL-2蛋白过表达，说明除了BCL-2基因易位和扩增导致BCL-2蛋白过表达，还有未知的调控机制仍需探究。

本研究关于BCL-6基因仅对其重排进行了检测，重排阳性率(22.1%)与国外研究基本一致[17]。国外在一项对3B级滤泡性淋巴瘤的研究中发现[18]，BCL-2和BCL-6两个基因重排的发生是相互排斥

的。在本组仅有的5例*t*(14;18)阳性病例中,2例BCL-6基因重排阳性,3例BCL-6基因重排阴性,对此异常仍需更多病例证实。另外发现虽然BCL-6重排和BCL-2扩增均多见于非GCB型,但两者却呈显著负相关(r=-0.17,P=0.017)。而且,虽然具有BCL-2基因重排和扩增的病例几乎全部表达BCL-2蛋白,但BCL-6基因重排与BCL-6蛋白表达之间却无明显相关性,说明BCL-6基因在DLBCL中的变化更为复杂。Iqbal等[17]的研究显示在多达61%的DLBCL病例中可检测到BCL-6基因的异常核苷酸突变,并且在GCB亚型中明显高于ABC亚型。因此对于BCL-6基因在DLBCL中的结构及功能异常仍需要加深研究。

由于免疫疗法及标准化疗的联合应用,DLBCL的治疗效果有了明显改善,但仍有很多患者疗效较差,这部分患者大多属于ABC或非GCB亚型[2-6]。虽然尚缺乏GEP数据的证实,但包括本研究在内的多家研究均显示中国人DLBCL患者中非GCB型占绝对优势,而且在免疫表型和分子遗传学方面的研究也发现很多与欧美不同的改变,来自日本和韩国的一些研究也显示类似的趋势[19-20]。由此提示亚裔人群可能有着不同于欧美人群的遗传学背景,值得进行广泛深入的研究。

参考文献

1 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. World Health Organization Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues[M]. Lyon: IARC Press, 2008: 164.

2 Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma[J]. N Engl J Med, 2002, 346(25): 1937-1947.

3 Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma byimmunohistochemistry using a tissue microarray[J]. Blood, 2004, 103(1): 275-282.

4 CChoi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypeswith high accuracy[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(17): 5494-5502.

5 Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuselarge B-cell lymphoma treated with rituximab[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(2): 200-207.

6 Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal centerB-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(28): 4587-4594.

7 Chen Y, Han T, Iqbal J, et al. Diffuse large B-cell lymphoma in Chinese patients: immunophenotypic and cytogenetic analyses of 124 cases[J]. Am J Clin Pathol, 2010, 133(2): 305-313.

8 Song Y, Cao Z, Li L, et al. Blimp-1 protein and Hans classification on prognosis of diffuse large B-cell lymphoma and theirinterrelation[J]. Chin J Cancer, 2010, 29(9): 781-786.

9 赵 菁,赵 静,蔡莺莺,等.BCL-6基因5′非编码区突变与弥漫性大B细胞淋巴瘤生发中心亚型的相关性[J].中华病理学杂志,2010,39(9):595-599.

10 罗东兰,刘艳辉,庄恒国,等.弥漫性大B细胞淋巴瘤500例构成比及免疫表型分析[J].中华病理学杂志,2011,40(4):235-239.

11 曾丽平,文亦磊,马 韵,等.凋亡抑制基因BCL-2在弥漫性大B细胞淋巴瘤中的表达及其临床意义[J].中华病理学杂志,2011,40(6):377-381.

12 林 莉,闵 敏,毕成峰,等.原发胃肠道弥漫性大B细胞淋巴瘤的免疫分型及其与预后的关系[J].中华病理学杂志,2011,40(4):220-226.

13 张宏伟,陈振文,王晋芬,等.CD138在弥漫大B细胞淋巴瘤免疫分型构建及预后评估中的意义[J].中华肿瘤杂志,2011,33(2):115-120.

14 Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, et al. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile[J]. Blood, 2002, 99(7): 2285-2290.

15 Barrans SL, Evans PA, O′Connor SJ, et al. The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is astrong predictor of outcome[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(6): 2133-2139.

16 Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, et al. Bcl2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell-lymphoma[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(6): 961-968.

17 Iqbal J, Greiner TC, Patel K, et al. Distinctive patterns of Bcl6 molecular alterations and their functional consequences in differentsubgroups of diffuse large B-cell lymphoma[J]. Leukemia, 2007, 21(11): 2332-2343.

18 Bosga-Bouwer AG, van Imhoff GW, Boonstra R, et al. Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary *t*(14;18), 3q27, or other translocations: *t*(14;18) and 3q27 are mutually exclusive[J]. Blood, 2003, 101(3): 1149-1154.

19 Kim MK, Bae SH, Bae YK, et al. Biological characterization of nodal versus extranodal presentation of diffuse large B-Celllymphoma using immunohistochemistry[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2011, 11(5): 403-408.

20 Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Takimoto M, et al. The GCB subtype of diffuse large B-cell lymphoma is less frequent in Asian countries[J]. Leuk Res, 2007, 31(11): 1579-1583.

(2012-01-29收稿)

(2012-04-02修回)

(本文编辑:邢颖)