

骨髓增生异常综合征造血细胞bcl-2 VEGF 抗原表达及原位凋亡的研究

邱志祥^① 李 挺^② 岑溪南^① 许尉林^① 任汉云^①

摘要 目的:研究骨髓增生异常综合征(MDS)bcl-2、VEGF 抗原表达及造血细胞原位凋亡之间的关系,探讨MDS发病机理。**方法:**对MDS患者骨髓活检标本光镜下观察骨髓增生程度、各系造血细胞形态异常情况、不成熟前体细胞异常定位(ALIP)等组织病理学改变,免疫组织化学染色观测bcl-2及VEGF 抗原的表达,TUNEL法检测造血细胞原位凋亡。**结果:**13例患者骨髓均有不同程度的异常造血,异常造血主要累及的细胞系列不尽相同,RA、RAEB两组患者异常造血未见明显区别;有6例患者检出ALIP现象,其中RA 3例(3/8,37.50%),RAEB 3例(3/5,60.00%);VEGF 阳性者占9例(9/13,69.23%),其中RA 6例(6/8,75.00%),RAEB 3例(3/5,60.00%);bcl-2 阳性者占7例,其中RA 4例(4/8,50.00%),RAEB 3例(3/5,60.00%);TUNEL检测13例患者均为阳性,检出ALIP现象者,其造血细胞发生原位凋亡明显,而bcl-2、VEGF与TUNEL结果之间未见明显关联。**结论:**MDS患者均存在不同程度的细胞凋亡异常,而TUNEL法提供了简便、实用、敏感、快速特异的检测MDS细胞原位凋亡的方法。结果初步显示MDS患者ALIP现象明显者其细胞凋亡也明显,提示调控MDS患者细胞凋亡和恶性克隆增殖可能是两种完全不同的机制。

关键词 骨髓增生异常综合症 bcl-2 VEGF 原位凋亡 TUNEL

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.11.001

Investigation of bcl-2 and VEGF Antigen Expression and *In Situ* Apoptosis of Hematopoietic Cells in Myelodysplastic Syndrome

Zhixiang QIU¹, Ting LI², Xi'nan CEN¹, Weilin XU¹, Hanyun REN¹

Correspondence to: Hanyun REN; E-mail: renhy0813@163.com

¹Department of Hematology, The First Hospital of Beijing University, Beijing 100034, China

²Department of Pathology, The First Hospital of Beijing University, Beijing 100034, China

Abstract Objective: This work aims to investigate the relationship between bcl-2 and VEGF antigen expression and the *in situ* apoptosis of hematopoietic cells in myelodysplastic syndrome (MDS), and to discuss the pathogenesis of MDS. **Methods:** Through bone marrow biopsy, the degree of bone marrow hyperplasia, morphological abnormality of hematopoietic cells, and histopathological change, called abnormal localization of immature precursor (ALIP) in light microscopy were observed. Immunohistochemistry was used to monitor the bcl-2 and VEGF antigen expressions. The *in situ* apoptosis of hematopoietic cells was detected using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method. **Results:** Different degrees of hematopoietic abnormalities were found in all 13 cases. The two groups with refractory anemia (RA) and refractory anemia with excess of blasts (RAEB) had no significant differences. ALIP was detected in 6 cases, of which 3 were RA (3/8, 37.50%) and the other 3 were RAEB (3/5, 60.00%). Positive VEGF expression was observed in 9 cases, of which 6 were RA (6/8, 75.00%) and the other 3 were RAEB (3/5, 60.00%). Positive bcl-2 expression was found in 7 cases, including 4 with RA (4/8, 50.00%) and three with RAEB (3/5, 60%). All patients had positive TUNEL results. The patients with ALIP showed higher degrees of *in situ* apoptosis of hematopoietic cells. **Conclusion:** MDS patients have various degrees of abnormal apoptosis of hematopoietic cells. The TUNEL method is simple, practical, sensitive, convenient, and specific tool for detecting *in situ* cell apoptosis. However, the mechanisms in hematopoietic cell apoptosis and clonally malignant proliferation in MDS patients may differ greatly.

Keywords Myelodysplastic syndrome (MDS); bcl-2; VEGF; *in situ* apoptosis; TUNEL

骨髓增生异常综合征(MDS)是一组起源于多能造血干细胞的克隆性异常增殖性疾病,主要临床特征是骨髓病态无效造血、外周血细胞减少、治疗反应差和高风险发展为急性白血病。MDS发病机制尚不完全清楚,目前认为MDS的发病机制是多重性的,包

括:1)造血干细胞的损伤或突变,可能为一种免疫反应,不利于祖细胞的存活;2)有些细胞因子造成了骨髓细胞的过度增殖和异常凋亡;3)抑癌基因活性的丧失导致疾病的进展。bcl-2、VEGF的表达及其相互作用,是调控MDS是否发生骨髓造血细胞凋亡、恶性

作者单位:①北京大学第一医院血液内科;②病理科(北京市100034)

通信作者:任汉云 renhy0813@163.com

克隆增殖及疾病进展的关键^[1],MDS骨髓细胞凋亡的研究在MDS发病机理研究中占有重要地位。TUNEL技术,即脱氧核苷酸末端转移酶(terminal 2 deoxynucleotidyl t ransferase,TdT)介导的³²P dUTP 缺口末端标记(TdT 2 mediated 2dUTP nick end labeling,TUNEL)技术,是目前原位检测细胞凋亡最敏感、快速、特异的方法,而目前应用TUNEL法对MDS骨髓细胞凋亡的研究国内少有报道。本研究旨在通过TUNEL法检测MDS骨髓细胞凋亡情况,探讨MDS骨髓细胞凋亡与bcl-2、VEGF抗原表达及骨髓异常造血之间的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

13例北京大学第一医院确诊的MDS患者^[2],男性9例,女性4例,年龄29~84岁,平均年龄55岁。其中难治性贫血(RA)8例,难治性贫血伴原始细胞增多者(RAEB)5例。

1.2 方法

1.2.1 MDS患者骨髓检测 13例MDS患者骨髓活检标本经10%福尔马林固定后,短时脱钙(10%硝酸-甲醛液,15 min)处理,石蜡包埋。2 μm切片,常规HE染色。光镜下观察骨髓增生程度、各系细胞造血形态异常情况、不成熟前体细胞异常定位(ALIP)等组织病理学改变。

1.2.2 免疫组织化学染色 EnVision二步法。单克隆抗体:bcl-2(1:100,DAKO),VEGF(1:100),经95℃ 10 min微波抗原修复处理,DAB显色。细胞浆内棕黄色颗粒为阳性反应(图1)。

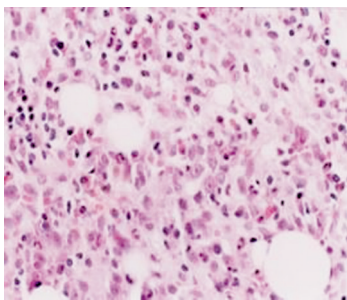


图1 免疫组织化学染色检测bcl-2和VEGF(×400)

Figure 1 Immunohistochemical staining of bcl-2 and VEGF

1.2.3 原位凋亡检测 TUNEL法:石蜡组织切片系列脱蜡水化后,Proteinase K(200 μg/mL)消化37℃,20 min。4%多聚甲醛后固定10 min,乙醇脱水风干。TUNEL反应液:2 mM dNTPs(含0.5 mM biotin-dUTP,GIBCO-BRL公司),1×TdT缓冲液,2 U TdT酶(GIBCO-BRL公司)37℃,1 hr。1:100马血清封闭60 min。Streptavidin-AP(1:500,VECTOR公司)37℃,60 min。Buffer I(50 mM Tris-HCl pH7.6,150 mM Na-

Cl,4 mM EDTA)洗10 min 3次,BufferIII(50 mM Tris-HCl pH9.6,150 mM NaCl,5 mM MgCl₂,4 mM EDTA)1 min,NBT-BCIP(300 μg/mL,150 μg/mL,B.M公司)显色,明胶甘油封片。阴性对照无2 mM dNTPs和TdT酶。细胞核呈现黑紫色为阳性反应(凋亡细胞)(图2)。

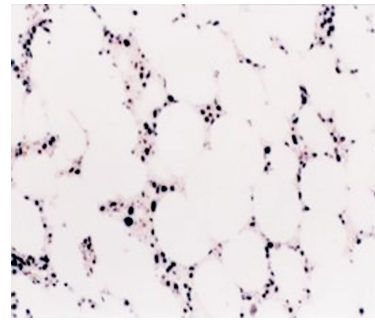


图2 TUNEL法检测细胞原位凋亡(×200)

Figure 2 *In situ* cell apoptosis detected by TUNEL method

1.3 免疫组织化学和原位凋亡结果判定

使用100倍油镜20个视野3 000个细胞,记数阳性细胞百分比。-:阳性细胞数<5%;+:阳性细胞数为5%~10%;++:阳性细胞数为10%~30%;+++ :阳性细胞数为30%~50%;++++:阳性细胞>50%。

2 结果

2.1 MDS患者骨髓检测结果

13例患者的骨髓增生情况、骨髓异常造血情况、不成熟前体细胞异常定位(ALIP)及VEGF、bcl-2、TUNEL检测结果(表1)。

表1 13例患者临床情况及骨髓ALIP、VEGF、bcl-2、TUNEL检测结果

Table 1 Clinical situation and results of detection for ALIP, VEGF, and bcl-2 using the TUNEL method in 13 patients

性别	年龄/岁	临床诊断	骨髓增生	异常造血	ALIP	VEGF	Bcl-2	TUNEL
女	29	RA	活跃	粒系明显	N	N	N	+
女	39	RA	明显活跃	三系	+	++	N	+++
男	34	RA	活跃	粒红两系	+	++	N	+++
女	36	RA	活跃	红系明显	N	N	N	+
女	72	RA	明显活跃	三系	+	+	++	++
男	29	RA	明显活跃	三系	N	+	++	+
男	70	RA	极度活跃	红系明显	N	++	+++	+
女	84	RA	活跃	三系	N	+	++	+++
女	52	RAEB	活跃	粒系	+	++	+	+++
女	63	RAEB	明显活跃	红系明显	+	+	++	+++
女	75	RAEB	活跃	三系	+	N	N	+++
女	54	RAEB	活跃	粒系明显	N	N	N	++
男	77	RAEB	明显活跃	粒红两系	N	+	+	++

N:阴性

2.2 MDS患者骨髓异常造血情况

13例患者骨髓均有不同程度的异常造血,异常造血主要累及的细胞系列不尽相同,RA、RAEB两组患者异常造血未见明显区别。

2.3 ALIP、VEGF、bcl-2及TUNEL检测结果

13例患者中共有6例出现ALIP现象,其中RA 3例(3/8, 37.50%),RAEB 3例(3/5, 60.00%);VEGF阳性者占9例(9/13, 69.23%),其中RA 6例(6/8, 75.00%),RAEB 3例(3/5, 60.00%);bcl-2阳性者占7例,其中RA 4例(5/8, 50.00%),RAEB 3例(3/5, 60.00%);TUNEL检测13例患者均为阳性。

2.4 ALIP、VEGF、bcl-2及TUNEL检测结果之间的关系

分析检测结果间的关系,骨髓活检可见ALIP现象者,其造血细胞发生原位凋亡明显,除1例TUNEL为++外,其余均为+++~++++;而bcl-2、VEGF与TUNEL结果之间暂未看出明显关联。

3 讨论

本研究中,13例MDS患者骨髓增生从活跃到极度活跃,均存在不同程度的异常造血,多为两系或三系造血异常,RA、RAEB两组患者异常造血未见明显区别。有6例患者检出ALIP现象,其中RA 3例(3/8, 37.5%),RAEB 3例(3/5, 60.00%),可见RAEB患者更易出现此病理现象。

MDS的发病机制不明,多数研究认为MDS的发生和发展是多种致病因素共同作用的结果,包括癌基因的激活、抑癌基因的失活、造血细胞凋亡(apoptosis)及新生血管的异常等,在MDS的发生和演进中均发挥一定作用。在有关MDS凋亡的研究中,bcl-2、VEGF的表达及其相互作用,是调控MDS患者是否发生骨髓造血细胞凋亡、恶性克隆增殖及疾病进展的关键,由此可见MDS骨髓细胞凋亡研究在MDS发病机制研究中占有重要地位^[3]。

细胞凋亡是一种细胞病理性死亡,从形态学、生化和分子水平上与细胞坏死有明显的不同。在形态上细胞凋亡表现为细胞固缩,染色体凝集并向核膜靠拢,最终浓缩于细胞核的一极形成新月状小体;而其生化改变特征则是Ca²⁺、Mg²⁺离子依赖的内源性核酸酶的激活,将染色体从核小体间裂断,形成由大小为180~200 bp或其多聚体组成的寡核苷酸片断。TUNEL技术是目前原位检测细胞凋亡最敏感、快速、特异的方法,而目前应用TUNEL法对MDS骨髓细胞凋亡的研究国内少有报道。本研究中,应用了陈旧的MDS患者骨髓活检标本进行TUNEL检测,得到了非常满意的检测结果。本研究显示13例MDS患者的TUNEL检测均为阳性,而有ALIP现象者,其造血细

胞发生原位凋亡更明显。ALIP现象是MDS患者骨髓特殊的病理表现,文献显示有ALIP的MDS患者预后差且易转为白血病,而白血病细胞则很少发生细胞凋亡,研究结果提示调控MDS患者细胞凋亡和恶性克隆增殖可能存在两种完全不同的机制^[4-5]。

bcl-2基因位于染色体18q21,bcl-2蛋白位于线粒体内膜,通过干扰细胞色素C(cytochrome C, Cyt-C)的释放而阻断Caspase酶的激活而抑制细胞凋亡。bcl-2研究显示早期MDS中促凋亡蛋白的表达显著高于晚期阶段,本组研究显示bcl-2的表达在RA组和RAEB组之间无明显差别(50.00%和60.00%),且与本研究TUNEL的结果亦未显示明显的相关性。结果与文献不符,其原因可能为:1)病例数少;2)本研究所用的骨髓活检标本均非新鲜活检样本,其免疫组织化学结果在不同程度上会受到影响;3)MDS凋亡调控复杂,如近年来发现的凋亡调控家族IAP家族中的存活蛋白(survivin)在MDS凋亡调控中起着重要作用^[6-7]。

VEGF是新生的血管内皮细胞主要的抗凋亡因子,Dias等^[8]研究显示,VEGFR⁺的白血病细胞系和原代白血病细胞受VEGF刺激后,其bcl-2表达水平亦明显增高。研究发现MDS患者骨髓细胞中VEGF呈高表达,而在低危组、高危组、AML组和对照组骨髓细胞中VEGF表达率和积分依次增高,各组间表达均有显著性差异,并且VEGF的表达与bcl-2呈正相关^[9-10]。本研究中VEGF在MDS骨髓细胞中也有较高的表达,表达率为69.23%,而RA和RAEB两组间VEGF的表达无明显差异(75.00%和60.00%),VEGF的表达与bcl-2的表达存在一定的相关性,而其与TUNEL的结果间则无明显相关表现,由于病例数少,无法进行统计学分析。

本研究结果表明,MDS患者均存在不同程度的细胞凋亡异常,而TUNEL法提供了简便、实用、敏感、快速且特异的检测MDS细胞原位凋亡的方法。结果初步显示MDS患者ALIP现象明显者其细胞凋亡也明显,提示调控MDS患者细胞凋亡和恶性克隆增殖可能存在两种不同的机制。而MDS细胞凋亡的程度与bcl-2和VEGF的表达不相关,可能与MDS细胞凋亡发生机制的复杂性及本研究病例数少等因素有关,有待今后进一步的研究。

参考文献

- 1 Shimazaki K, Ohshima K, Suzumiya J, et al. Evaluation of apoptosis as a prognostic factor in myelodysplastic syndromes[J]. *Br J Haematol*, 2000, 110(3): 584-590.
- 2 张之南,沈 梯,主编.血液病诊断及疗效标准[M].第3版.北京:科学出版社,2007:100.
- 3 Sekeres MA. The myelodysplastic syndromes[J]. *Expert Op in Biol*

- Ther, 2007, 7(3): 369-377.
- 4 Parker JE, Mufti GJ, Rasool F, et al. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS[J]. Blood, 2000, 96(12): 3932-3938.
 - 5 Michalopoulou S, Micheva I, Kouraklis-Symeonidis A, et al. Impaired clonogenic growth of myelodysplastic bone marrow progenitors in vitro is irrelevant to their apoptotic state[J]. Leuk Res, 2004, 28(8): 805-812.
 - 6 Badran A, Yoshida A, Wano Y, et al. Expression of the anti-apoptotic gene survivin in myelodysplastic syndrome[J]. Int J Oncol, 2003, 22(1): 59-64.
 - 7 Invernizzi R, Travaglino E, Lunghi M, et al. Survivin expression in acute leukemias and myelodysplastic syndromes[J]. Leuk Lymphoma, 2004, 45(11): 2229-2237.
 - 8 Dias S, Shmelkov SV, Lam G, et al. VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by HSP90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition[J]. Blood, 2002, 99(22): 2532-2540.
 - 9 Bellamy WT, Richter L, Sirjani D, et al. Vascular endothelial cell growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes[J]. Blood, 2001, 97(5): 1427-1434.
 - 10 孙慧, 马杰. Survivin、Bcl-2和VEGF在骨髓增生异常综合征中的表达及其相关性[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(2): 271-275. (2011-11-14收稿)
(2012-02-06修回)
(本文编辑: 贾树明)

· 病例报告与分析 ·

原发性输尿管弥漫性大B细胞淋巴瘤1例

金京春 吴福顺 朴哲 任春爱

关键词 输尿管结石 弥漫大B细胞淋巴瘤 临床病理
doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.11.017

临床上原发于输尿管的淋巴瘤罕见,本科诊断1例误诊为输尿管结石的弥漫大B细胞淋巴瘤,现报道如下。

患者男性,46岁,以“左腰痛2个月,加重1个月”为主诉于2011年6月30日入院。该患者于2个月前无明显诱因出现左腰部疼痛,性质呈钝痛,曾于外院就诊,行B超检查示左肾积水,左输尿管上端扩张。诊断为左输尿管结石,建议多喝水自行排出结石,未给予其他治疗。1个月前因疼痛明显加重收住本院。查体无明显阳性体征,行辅助检查。泌尿系彩超:左肾积水,左输尿管上端扩张;二维强化CT:考虑左输尿管中段占位,伴肾积水;左侧尿路逆行造影:左侧输尿管中段占位可能。于2011年7月1日行左输尿管肿瘤探查术。术中见:左输尿管中段4cm质硬肿物,输尿管与周围组织无粘连。术后病理示:符合弥漫性大B细胞性淋巴瘤,生发中心性。免疫组化:CD20(+),CD5(-),CD10(+),Bcl-2(-),CD23(-),CD30(-),Ki-67指数>90%,ALK(-),CK(-),Sny(-),CgA(-),LCA(+).确诊为弥漫性大B细胞性淋巴瘤,给予R-CHOP化疗方案。经过5次化疗,患者一般状态良好,病情稳定,现仍在随访中。

小结 因输尿管壁无淋巴样组织,发生于输尿管的淋巴瘤极其少见。国内文献仅查到4例原发于输尿管淋巴瘤的报道,1例为T细胞淋巴瘤^[1],2例为弥漫性大B细胞性淋巴瘤^[2-3],1例为黏膜相关淋巴组织淋巴瘤^[4]。而继发于输尿管的

病例国内有1例原发性胰腺淋巴瘤累及输尿管的报道^[5]。

结合该病例的临床症状,总结以下几点与输尿管结石进行鉴别:1)疼痛:该患者左腰部疼痛,性质呈钝痛,而输尿管结石常可引起绞痛,而非钝痛。2)血尿:该患者无血尿症状。通常输尿管结石的患者都有肉眼或镜下血尿,后者更为常见,有时活动后镜下血尿是上尿路结石的唯一临床表现。3)B超:彩色多普勒超声下结石呈强回声,而肿瘤常呈低回声,并可伴梗阻近端扩张积水。因此,彩色多普勒超声诊断输尿管结石应注意与输尿管肿瘤相鉴别。二维强化CT以及尿路逆行造影有助于对本病的诊断。本病例诊断过程提示原发于输尿管的淋巴瘤极易误诊为输尿管结石,应引起高度重视。

参考文献

- 1 刘劲松,程敬群.输尿管恶性淋巴瘤1例[J].临床与实验病理学杂志,1997,13(1):13.
- 2 杨川林,张尚福,何艳梅,等.输尿管弥漫性大B细胞淋巴瘤1例[J].诊断病理学杂志,2006,13(1):67-70.
- 3 王列祥,苏丽萍,郭燕蓉.原发输尿管淋巴瘤一例并文献复习[J].白血病·淋巴瘤,2010,19(4):244-245.
- 4 郎金田,牛振山,祁晓莉,等.输尿管黏膜相关淋巴瘤一例报告[J].中华泌尿外科杂志,2008,29(4):258.
- 5 王其海,李绍刚.原发性胰腺淋巴瘤累及输尿管1例[J].肿瘤学杂志,2008,14(4):319.

(2012-01-10收稿)

(2012-01-27修回)

(本文编辑:邢颖)

作者单位:延边大学附属医院血液科(吉林省延吉市133000)

通信作者:金京春 yjjc@yahoo.com.cn