

透射电镜下观察, N-P 细胞内可见许多嗜铁板层小体, 呈平行排列的板层状, 或数十层呈同心圆状排列, 这些是 N-P 细胞的特有标志。电镜下可见巨噬细胞有多个电子透亮的空泡, 泡内有细板层状, 嗜铁性膜样物质。细胞肿胀, 有多个具膜包裹电子透光的空泡, 泡内呈疏松排列, 有时可见同心圆或板层状的膜性物质, 线粒体肿胀, 形状改变, 嵴消失, 糖原沉积多<sup>[4]</sup>。吴丽莉等<sup>[5]</sup>报道, 嗜铁板层小体是由于溶酶体神经鞘磷脂水解酶的先天性缺陷, 对一系列膜性物质不能完全消化所致。板层小体排列不一, 疏密程度不等, 大小不同, 说明板层小体形态的多样性。我们观察到的 N-P 细胞的超微结构与武忠弼等报道的完全一致。

## 参考文献

- [1] 陈方平, 覃西. 血液学检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 198.
- [2] 黄肖耆. 泡沫细胞的形态学鉴别[J]. 临床检验杂志, 1994, 12(1): 39-40.
- [3] 孙改河, 李书杰, 黄波田. 成人型尼曼-匹克病一例[J]. 中华血液学杂志, 1998, 19(5): 271.
- [4] 武忠弼, 周晓军. 超微病理诊断学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 230-231.
- [5] 吴丽莉, 颜永碧, 沙继宏. 尼曼-匹克病肝、脾、淋巴结、骨髓细胞的超微结构观察[J]. 解剖学杂志, 1999, 22(2): 157-158.

(收稿日期: 2015-05-05)

(本文编辑: 徐茂强)

# NF- $\kappa$ B/p65 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者肿瘤组织中的表达及临床意义

林桐 欧阳建 张启国 周敏

**Clinical significance of NF- $\kappa$ B/p65 expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma** Lin Tong, Ouyang Jian, Zhang Qiguo, Zhou Min

Corresponding author: Ouyang Jian, Department of Drum Tower Hospital Graduate, Nanjing Medical University, Nanjing 210000, China. Email: oy626@sina.com

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)的发生、发展和转移与多种细胞通路异常有关, 其中具有代表性的为 NF- $\kappa$ B 通路。NF- $\kappa$ B 五个家族成员(p50/105、p52/100、p65/RelA、RelB 和 c-Rel)两两组成同质或异质二聚体, 可以通过经典或非经典途径调节细胞的生物学活性。已有研究表明, 异常激活的 NF- $\kappa$ B 通路在淋巴瘤的发生和进展, 以及在肿瘤细胞对放化疗抵抗中起重要作用<sup>[1]</sup>。在本研究中我们对 DLBCL 患者肿瘤组织中 NF- $\kappa$ B/p65 表达水平进行检测, 并结合临床资料, 分析其与患者疗效和生存的关系。

## 病例和方法

1. 病例: 收集 2008 年 1 月至 2013 年 9 月在我院就诊的 73 例 DLBCL 患者资料。73 例患者中男 41 例(56.1%), 女 32

例(43.9%); 中位发病年龄 58(18~81)岁, 其中 > 60 岁者 34 例(46.5%), ≤60 岁者 39 例(53.5%)。所有患者均经手术或穿刺活检获得病理组织标本, 采用血常规、免疫组织化学、PET-CT 以及骨髓细胞形态学检查、骨髓组织活检, 根据 2008 年 WHO 淋巴瘤分类标准确诊。Ann Arbor 分期: I~II 期 23 例(31.5%), III~IV 期 50 例(68.5%); 根据国际预后指数(IPI) 44 例(60.3%)患者被归为中高风险或高风险(3~5 分), 40 例(54.7%)患者存在 B 症状(发热、盗汗、体重减轻), 11 例(14.8%)患者在诊断时查见巨大肿块(任何部位直径超过 10 cm), 54 例(72.9%)患者有结外累及, 35 例(47.2%)患者 LDH 水平增高(>245 U/L)。

2. 免疫组织化学染色检测 DLBCL 患者肿瘤组织中 NF- $\kappa$ B/p65 表达水平: 取患者活检组织常规固定、石蜡包埋, 制备 2~3  $\mu$ m 连续切片。采用免疫组织化学链霉素-生物素过氧化物酶(SP)染色法对标本进行染色。NF- $\kappa$ B/p65 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 工作浓度为 1:400; DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。光学显微镜下观察并计算肿瘤活检组织阳性细胞的比例(所有细胞中细胞核染色呈棕黄色的细胞所占的百分数), 参照文献[2]方法计算积分: 0 分: 没有核阳性; 1 分: < 10%核阳性; 2 分: 10%~40%核阳性; 3 分: > 40%核阳性。核染色强度也被纳入评分: 0 分: 无染色; 1 分: 浅棕色; 2 分: 棕黄色; 3 分: 深棕色。最后的分数由阳性比例分数乘以染色强度分数得出, 按照最后所得分数将患者分为 NF- $\kappa$ B/p65 低表达组(0~4 分)和高表达组(6 或 9 分)。所有标本均由两位病理科医师采用双盲法独立进行评价。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.10.016

作者单位: 210000 南京医科大学鼓楼临床医学院

通信作者: 欧阳建, Email: oy626@sina.com

3. 治疗及疗效评估:所有患者均接受 R-CHOP(利妥昔单抗、环磷酰胺、阿霉素、长春新碱、泼尼松)方案化疗,平均疗程 6(2~12)个。根据《NCCN 非霍奇金淋巴瘤指南》标准评估疗效,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、未缓解(NR)。随访截止日期为 2014 年 8 月 5 日,通过电话方式进行随访,中位随访时间为 24.8(4~73)个月。总生存(OS)时间指从诊断到任何原因的死亡或最后一次随访的时间。疾病无进展生存(PFS)时间指从诊断到任何原因的死亡或首次疾病进展或复发或最后一次随访的时间。

4. 统计学处理:采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。率和构成比的比较采用卡方检验,用 Kaplan-Meier 法进行单变量生存曲线比较,用 Log-rank 法进行差异检验,多变量预后分析采用 Cox 回归模型。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1. NF- $\kappa$ B/p65 在 DLBCL 患者肿瘤组织中的表达:73 例患者中 NF- $\kappa$ B/p65 高表达者 20 例(27.4%),低表达者 53 例(72.6%)。入组患者 NF- $\kappa$ B/p65 的表达及与临床变量的关系详见表 1,NF- $\kappa$ B/p65 高表达组患者和低表达组患者在年龄、性别、分期、B 症状、IPI 评分、巨大肿块、结外累及以及 LDH 水平的差异均无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ );在非生发中心样(non-GCB)患者组中,NF- $\kappa$ B/p65 高表达者占 35.4%(17/48),

显著高于其在生发中心样(GCB)患者组的 12.0%(3/25) ( $P=0.033$ )。

2. NF- $\kappa$ B/p65 表达水平与短期疗效的关系:73 例患者均在接受 R-CHOP 方案化疗 4 或 6 个疗程后行 PET-CT 首次评价疗效,CR 者 38 例(52.0%),PR 者 33 例(45.2%),NR 者 2 例(2.7%)。NF- $\kappa$ B/p65 高表达组与低表达组患者间 CR 率差异无统计学意义( $P=0.073$ )(表 1)。

3. NF- $\kappa$ B/p65 表达水平对患者预后的影响:73 例患者中,2 年 OS 率和 PFS 率分别为 75.3%和 64.4%。NF- $\kappa$ B/p65 高表达组与低表达组患者的生存曲线见图 1。NF- $\kappa$ B/p65 高表达组较低表达组的预后差,生存期明显缩短,其 2 年 OS 率分别为 55% 和 83%( $P=0.012$ ),2 年 PFS 率分别为 35%和 73%( $P=0.005$ )。其中 GCB 患者中,NF- $\kappa$ B/p65 高表达者与低表达者的 2 年 OS 率及 PFS 率差异无统计学意义( $P$ 值分别为 0.166 和 0.109);而 non-GCB 患者中,NF- $\kappa$ B/p65 高表达者的 2 年 OS 率(52% 对 83%, $P=0.043$ )及 PFS 率(35%对 74%, $P=0.034$ )均较低表达者降低(图 2)。

单因素分析结果显示,IPI 评分中低风险(0~2 分)29 例,高风险或中高风险(3~5 分)44 例,2 年 OS 率分别为 89.7%和 72.0%( $P=0.002$ ),2 年 PFS 率分别为 82.8%和 54.5%( $P=0.000$ )(表 2)。

多因素分析结果显示,IPI 评分(OS: $HR=6.762$ ,95%CI 1.454~32.301,  $P=0.025$ ; PFS:  $HR=7.240$ , 95% CI 1.875~

表 1 73 例弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者肿瘤组织中 NF- $\kappa$ B/p65 的表达及与临床变量的关系[例数(%)]

临床因素	低表达组(53 例)	高表达组(20 例)	$\chi^2$ 值	$P$ 值
年龄 $>60$ 岁	21(39.6)	13(65.0)	2.807	0.094
男性	30(56.6)	11(55.0)	0.015	0.902
Ann Arbor 分期 III~IV 期	35(66.0)	15(75.0)	0.205	0.651
有 B 症状	30(56.6)	10(50.0)	0.256	0.613
IPI 评分 3~5 分	31(58.5)	13(65.0)	0.257	0.612
有巨大肿块	6(11.3)	5(25.0)	1.189	0.276
结外累及	38(71.7)	16(80.0)	0.520	0.471
LDH 增高( $>245$ U/L)	23(43.4)	12(60.0)	1.604	0.205
Hans 分型(非生发中心样)	31(58.5)	17(85.5)	4.532	0.033
完全缓解	31(58.5)	7(35.5)	3.210	0.073

注:IPI:国际预后指数;B 症状:发热、盗汗、体重减轻

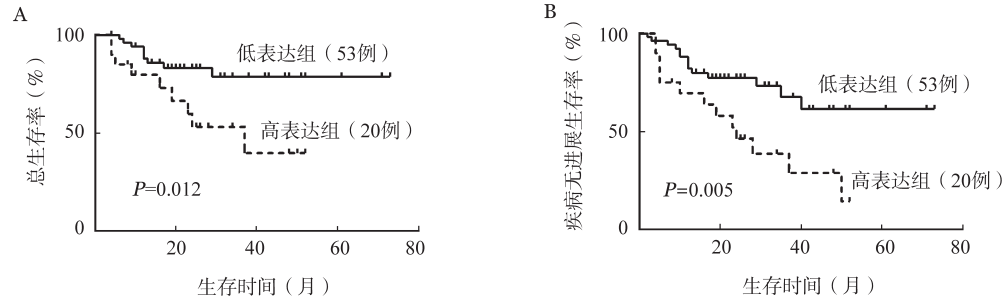


图 1 NF- $\kappa$ B/p65 表达对弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者总生存(A)和疾病无进展生存(B)的影响

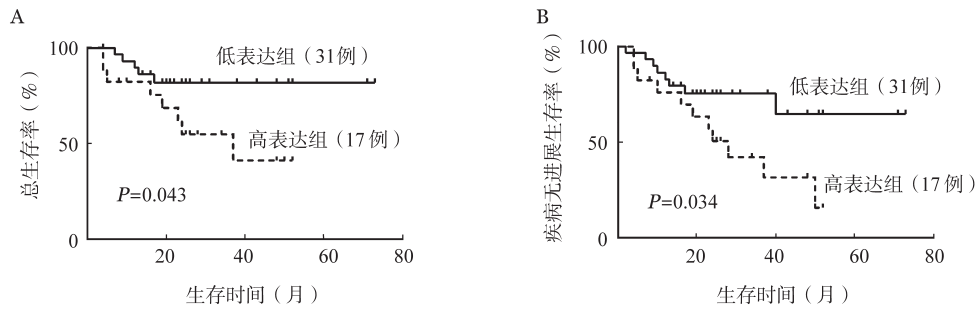


图2 NF-κB/p65 表达对非生发中心样弥漫大B细胞淋巴瘤患者总生存(A)和疾病无进展生存(B)的影响

27.488,  $P=0.004$ ) 和 NF-κB/p65 表达水平(OS:  $HR=1.954$ , 95%CI 1.475~5.090,  $P=0.032$ ; PFS:  $HR=3.472$ , 95%CI 1.883~9.279,  $P=0.005$ ) 为影响患者 OS 和 PFS 的独立预后因素(表3)。

表2 影响弥漫大B细胞淋巴瘤患者预后的单因素分析

影响因素	总生存		疾病无进展生存	
	$\chi^2$ 值	P 值	$\chi^2$ 值	P 值
年龄	2.810	0.094	3.133	0.081
性别	0.576	0.448	0.000	0.987
Ann Arbor 分期	1.438	0.231	0.769	0.380
B 症状	2.042	0.153	0.466	0.495
IPI 评分	9.888	0.002	13.860	0.000
巨大肿块	0.548	0.431	0.005	0.945
结外累及	0.152	0.697	1.576	0.209
LDH 水平	3.872	0.074	3.478	0.062
Hans 分型(GCB 或 non-GCB)	1.264	0.354	0.009	0.925
p65	6.241	0.012	7.828	0.005

注: B 症状: 发热、盗汗、体重减轻; IPI: 国际预后指数指数; GCB: 生发中心样; non-GCB: 非生发中心样

表3 影响弥漫大B细胞淋巴瘤患者预后的多因素分析

影响因素	HR	95% 可信区间		P值
		下限	上限	
总生存				
B 症状	0.657	0.240	1.797	0.413
Hans 分型	1.362	0.439	4.219	0.593
LDH 水平	0.536	0.165	1.742	0.300
IPI 评分	6.762	1.454	32.301	0.025
p65	1.954	1.475	5.090	0.032
疾病无进展生存				
B 症状	0.544	0.215	1.377	0.199
Hans 分型	1.576	0.581	4.272	0.372
LDH 水平	0.832	0.317	2.183	0.709
IPI 评分	7.240	1.875	27.488	0.004
p65	3.472	1.883	9.279	0.005

注: B 症状: 发热、盗汗、体重减轻; IPI: 国际预后指数指数

## 讨 论

NF-κB 家族成员 p65 被报道参与 NF-κB 通路激活的经典通路及非经典通路, 被视为 NF-κB 通路激活的重要证据<sup>[3]</sup>。然而, p65 表达的研究状况及其预后意义仍然非常有限。我们的研究表明在 DLBCL 患者中 NF-κB/p65 在 27.4% 的患者肿瘤组织细胞核中高表达, 尤其在 non-GCB 样 DLBCL 患者中 NF-κB/p65 高表达提示预后不良。

由于已知 NF-κB 在肿瘤的发生和转移方面发挥着重大作用, 很多研究着力于探索实体瘤中 NF-κB 表达的临床意义, 以提示疾病预后, 其中包括淋巴瘤<sup>[4]</sup>。NF-κB 的表达被认为是抵抗放疗、疾病复发从而减少生存的重要标志, 它的表达是独立于 DLBCL 传统临床病理因素的。我们的研究显示, 在所有患者中 NF-κB/p65 的高表达被证实与患者 2 年 OS 和 PFS 时间明显缩短有密切关系, 在 non-GCB 组患者中 NF-κB/p65 高表达者较低表达者预后差, 但在 GCB 组患者中并未发现。Bavi 等<sup>[5]</sup>对 203 例 DLBCL 患者进行研究, 发现有 52 例 (25.6%) 患者 NF-κB 表达阳性, 且多见于 non-GCB 样患者, 差异有统计学意义, 表达阳性者较阴性者生存期明显缩短, NF-κB 可作为预后标记物提示预后。Davis 等<sup>[6]</sup>在 non-GCB 样 DLBCL 细胞株中发现 IKK 激酶活性、IκB 迅速降解以及能与 NF-κB DNA 绑定的活性, 使得 NF-κB 二聚体得以进入细胞核, 激活 NF-κB 通路, 但在 GCB 样 DLBCL 中未发现。尽管上述两个研究的结果和我们的结果一致, 但仍有一些研究的结果与我们的结果有差异。Shin 等<sup>[7]</sup>的研究结果显示 NF-κB 阳性率为 84.3% (59/70), 在 GCB 样和 non-GCB 样患者间的差异无统计学意义, NF-κB 与 DLBCL 患者的生存未见相关性。这些差异可能与各个实验室所使用的 NF-κB 家族成员不同、所取的阈值不同、患者的治疗方案和研究的样本量等因素有关。此外在本研究中我们发现 NF-κB/p65 在 non-GCB 样 DLBCL 患者中高表达, 并与患者预后不良相关。常规的化疗方法对 GCB 样 DLBCL 患者疗效优于 non-GCB 样, 其原因与 >50% 的 non-GCB 样 DLBCL 和小部分的 GCB 样 DLBCL 患者存在一定的 NF-κB 靶基因 REL 的自身突变有关。发生靶基因 REL 自身突变使 NF-κB 处于一种异常状态, 这种状态的淋巴细胞不仅更容易向肿瘤方向生长, 且对化疗放疗都不敏感<sup>[8]</sup>。所以, NF-κB/

p65 在 DLBCL 尤其在 non-GCB 样患者中可以作为预后标志物, 然仍需进一步探索 NF- $\kappa$ B/p65 的作用和可能的机制。

在我们的研究中, 73 例患者均在结束 4 或 6 个疗程 R-CHOP 方案化疗后行 PET-CT 首次评估疗效, 但超过半数的患者因自身原因等未再进行系统的疗效评估, 故目前仅可针对患者的短期疗效分析与 NF- $\kappa$ B/p65 的表达水平有无关联。结果显示, NF- $\kappa$ B/p65 的表达水平在短期疗效上的差异无统计学意义, NF- $\kappa$ B/p65 表达水平对患者的 2 年 OS 率及 PFS 率影响差异有统计学意义, 分析其可能的原因为: ①R-CHOP 方案在 DLBCL 患者短期疗效较好, 但长期疗效尚无定论。有研究表明, 经 R-CHOP 方案治疗患者的 10 年生存期较经 CHOP 方案治疗患者生存率增高 (43.5% 对 27.6%), 但这两组患者因其他疾病死亡的风险相同, 如疾病晚期复发、二次癌症等, 5 年疾病进展的发生率约 7%。故虽然利妥昔单抗被广泛应用, 仍有小部分患者疾病进展迅速, 早期复发<sup>[9]</sup>; ②利妥昔单抗在体内是否能阻断或抑制 NF- $\kappa$ B 通路激活尚不清楚<sup>[10]</sup>。有研究发现利妥昔单抗在 DLBCL 细胞株中可以抑制 NF- $\kappa$ B 通路的激活, 然而这一发现的临床意义尚不十分清楚, 文献[10]中提到 GCB 样 DLBCL 中罕见 NF- $\kappa$ B 通路的激活, 本研究 25 例 GCB 样 DLBCL 患者中仅 3 例 (12%) 存在该通路的激活。然而有研究显示对 non-GCB 样和 GCB 样 DLBCL 来说, 加入利妥昔单抗后两者的 OS 率均显著改善<sup>[11-12]</sup>。故目前应寻找较利妥昔单抗更能抑制 NF- $\kappa$ B 通路激活、更能提高长期疗效的药物来联合 CHOP 方案作为新的治疗策略。

蛋白酶体抑制剂的使用被视为新的治疗方法, 主要原因为泛素-蛋白酶体通路是细胞的泛素化蛋白被降解的主要机制, 而许多细胞周期运行的关键蛋白, 包括那些参与在 NF- $\kappa$ B 通路激活中蛋白均被泛素化调控。也就说明使用蛋白酶体抑制剂后, 与 NF- $\kappa$ B 通路激活相关的蛋白会被泛素化而降解, 即抑制了 NF- $\kappa$ B 通路的激活。至今, 只有硼替佐米这一种蛋白酶体抑制剂被用于临床, 也有研究表明硼替佐米联合 R-CHOP 方案可以显著提高 DLBCL 患者的缓解率以及 OS、PFS 率<sup>[13]</sup>。所以, 继续发现新的 NF- $\kappa$ B 通路抑制剂不仅有利于一线治疗, 对于复发后的治疗更有价值, 这值得我们更加深入的研究。

### 参考文献

- [1] Scheidereit C. I $\kappa$ B kinase complexes: gateways to NF- $\kappa$ B activation and transcription [J]. *Oncogene*, 2006, 25 (51): 6685-6705.
- [2] Mudaliar MA, Haggart RD, Miele G, et al. Comparative gene expression profiling identifies common molecular signatures of NF- $\kappa$ B activation in canine and human diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72591.
- [3] Gasparini C, Celeghini C, Monasta L, et al. NF- $\kappa$ B pathways in hematological malignancies [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71 (11): 2083-2102.
- [4] Nogai H, Dorken B, Lenz G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(14): 1803-1811.
- [5] Bavi P, Uddin S, Bu R, et al. The biological and clinical impact of inhibition of NF- $\kappa$ B-initiated apoptosis in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) [J]. *J Pathol*, 2011, 224(3): 355-366.
- [6] Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, et al. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells [J]. *J Exp Med*, 2001, 194(12): 1861-1874.
- [7] Shin HC, Seo J, Kang BW, et al. Clinical significance of nuclear factor  $\kappa$ B and chemokine receptor CXCR4 expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma who received rituximab-based therapy [J]. *Korean J Intern Med*, 2014, 29(6): 785-792.
- [8] Houldsworth J, Mathew S, Rao PH, et al. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma [J]. *Blood*, 1996, 87(1): 25-29.
- [9] Khor S, Beca J, Krahn M, et al. Real world costs and cost-effectiveness of Rituximab for diffuse large B-cell lymphoma patients: a population-based analysis [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 586.
- [10] Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Cheng G, et al. Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(1): 264-276.
- [11] Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML, et al. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy [J]. *Blood*, 2007, 109(11): 4930-4935.
- [12] Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-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.
- [13] Ruan J, Martin P, Furman RR, et al. Bortezomib plus CHOP-rituximab for previously untreated diffused large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29 (6): 690-697.

(收稿日期: 2015-03-01)

(本文编辑: 刘志红)