

# MYC及BCL-2蛋白双表达对弥漫大B细胞淋巴瘤患者预后影响:倾向性评分匹配分析

詹景 杨诗婕 张薇 周道斌 张炎 王为 魏冲

中国医学科学院、北京协和医学院北京协和医院血液内科 100730

通信作者:张薇,Email:vv1223@vip.sina.com

**【摘要】目的** 探究MYC/BCL-2蛋白双表达对弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)患者预后的影响,观察纳入DA-EPOCH-R(利妥昔单抗+依托泊苷+泼尼松+长春新碱+环磷酰胺+表阿霉素)、中枢神经系统预防治疗、移植等治疗因素后,双表达是否仍是DLBCL的独立预后不良因素。**方法** 回顾性收集2015-2018年在北京协和医院血液科治疗且具有可用病理结果的223例初治DLBCL患者,75例MYC/BCL-2高表达的患者归为双表达组,从148例非双表达的患者中,应用倾向性评分(PSM),根据年龄、国际预后指数(IPI)评分、治疗选择等因素进行1:1匹配,筛选出75例作为对照组,比较两组患者总生存(OS)及无进展生存(PFS)等方面的差异。**结果** PSM后双表达组和非双表达组的3年OS率分别为(69.8±5.5)%及(77.0±4.9)% ( $P=0.225$ ),3年PFS率分别为(60.7±5.8)%及(65.3±5.5)% ( $P=0.390$ ),差异均无统计学意义。R-CHOP方案(利妥昔单抗+环磷酰胺+阿霉素+长春新碱+泼尼松)治疗的亚组分析显示,双表达和非双表达患者的3年OS率分别为(61.3±7.5)%及(77.2±5.6)% ( $P=0.027$ ),3年PFS率分别为(52.1±7.5)%及(70.6±6.0)% ( $P=0.040$ ),差异均具有统计学意义。多因素Cox回归分析显示年龄、Ann Arbor分期、细胞起源(COO)分型、是否进行中枢神经系统预防、是否进行移植是DLBCL患者预后的独立影响因素( $P$ 值均 $<0.05$ ),而MYC/BCL-2蛋白双表达不是预后的影响因素。**结论** MYC/BCL-2蛋白双表达在R-CHOP方案治疗下与不良预后显著相关,但在DA-EPOCH-R、移植等治疗方案下,双表达对DLBCL的不良预后影响在一定程度上得到消除。

**【关键词】** 淋巴瘤,大B细胞,弥漫性; MYC; BCL-2; 预后; 倾向性评分

基金项目:国家自然科学基金(81970188);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-1-001);北京市自然科学基金(7202154)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.01.009

## MYC and BCL-2 protein co-expression and prognosis of patients with diffuse large B-cell lymphoma: a propensity score matching analysis

Zhan Jing, Yang Shijie, Zhang Wei, Zhou Daobin, Zhang Yan, Wang Wei, Wei Chong

Department of Hematology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China

Corresponding author: Zhang Wei, Email: vv1223@vip.sina.com

**【Abstract】 Objective** We investigated the impact of MYC/BCL-2 protein co-expression on the prognosis of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients and observed whether double expression (DE) remains an independent poor prognostic factor in DLBCL after the addition of therapeutic factors such as DA-EPOCH-R, central prophylaxis, and transplantation. **Methods** Available pathological findings were retrospectively collected from 223 DLBCL patients at the Peking Union Medical College Hospital from 2015 to 2018. Seventy-five patients with high MYC/BCL-2 expression were categorized as the DE group. From the 148 non-DE patients, 75 DLBCL patients were selected as the control group, using a 1:1 matching on propensity scores for age, international prognostic index score, treatment choice, and etc. The differences in overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) between the two groups were compared. **Results** The 3-year OS was (69.8±5.5)% for the DE group and (77.0±4.9)% for the non-DE group ( $P=0.225$ ), while the 3-year PFS was (60.7±5.8)% and (65.3±5.5)%, respectively ( $P=0.390$ ). Subgroup analysis in patients treated with the R-CHOP regimen revealed that for the DE and non-DE patients, the 3-year OS was (61.3±7.5)% and (77.2±5.6)% ( $P=0.027$ ), and the 3-year PFS was (52.1±7.5)% and (70.6±6.0)% ( $P=0.040$ ), respectively. Multivariate analysis showed that age, stage of Ann

Arbor, COO staging, whether central prophylaxis was performed, and whether transplantation was performed were significant independent risk factors of the prognosis of DLBCL patients ( $P < 0.05$ ). On the other hand, MYC/BCL-2 protein double expression was not significantly associated with prognostic outcomes. **Conclusion** MYC/BCL-2 protein double expression was significantly associated with poor prognosis under R-CHOP regimen treatment, but the poor prognostic impact of DE on DLBCL was eliminated under intensive regimens such as DA-EPOCH-R and transplantation.

**【Key words】** Lymphoma, large B cell, diffuse; MYC; BCL-2; Prognosis; Propensity score matching

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81970188); Chinese Academy of Medical Sciences Medical and Health Science & Technology Innovation Project (2016- I2M- 1- 001); Beijing Natural Science Foundation(7202154)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.01.009

弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)是非霍奇金淋巴瘤中最常见的亚型,占有病例的30%以上<sup>[1]</sup>。由于DLBCL在病理亚型、基因表达谱等方面具有极高的异质性,不同亚型预后差异明显<sup>[2]</sup>。其中,同时具有MYC和BCL-2蛋白过表达的DLBCL被称为双表达淋巴瘤,占有DLBCL患者的18%~34%<sup>[3-4]</sup>。MYC蛋白和BCL-2蛋白与淋巴瘤细胞增殖、抑制凋亡、增加基因组不稳定性等生物学行为相关<sup>[5]</sup>。多项回顾性研究表明,R-CHOP方案治疗双表达淋巴瘤患者预后极差,5年无进展生存(PFS)和总生存(OS)率均低于40%<sup>[3-4,6]</sup>。关于双表达淋巴瘤的预后研究大多未纳入治疗相关因素,且回顾性分析中的混杂因素所致偏倚较高。故本回顾性研究中我们通过倾向性评分(PSM)校正双表达和非双表达DLBCL患者的临床特点与治疗选择,探索双表达对预后的影响,现报道如下。

### 病例与方法

1. 病例:回顾性收集2015年1月至2018年12月于北京协和医院初治的286例DLBCL患者临床资料,排除无可用病理结果的52例患者及未在本院接受过诱导治疗的11例患者,最终纳入223例DLBCL患者。所有患者均根据临床症状和组织活检结果,按照WHO 2008年淋巴组织肿瘤分类标准<sup>[2]</sup>进行诊断。根据免疫组化结果,设定MYC、BCL-2蛋白的阳性截断值分别为40%、50%<sup>[5]</sup>,MYC与BCL-2蛋白均高表达的75例患者为双表达组,其余148例为非双表达组。临床资料包括性别、年龄、基础疾病史、Ann Arbor分期、国际预后指数(IPI)评分、化疗前外周血LDH水平、细胞起源(COO)分型、治疗选择等。其中基础疾病包括高血压、糖尿病、冠心病等慢性全身性疾病或乙型肝炎、EB病毒(EBV)等感染性疾病。

2. 治疗方案:初始诱导治疗:①R-CHOP方案(21 d):利妥昔单抗(375 mg/m<sup>2</sup>,第1天)、环磷酰胺(750 mg/m<sup>2</sup>,第1天)、阿霉素(50 mg/m<sup>2</sup>,第1天)、长春新碱(1.4 mg/m<sup>2</sup>,第1天)和泼尼松(100 mg/d,第1~5天);②DA-EPOCH-R方案(21 d):利妥昔单抗(375 mg/m<sup>2</sup>,第1天)、依托泊苷(50 mg·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>,第1~4天)、泼尼松(60 mg/m<sup>2</sup>每日2次,第1~5天)、长春新碱(0.8 mg·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>,第1~4天)、环磷酰胺(750 mg/m<sup>2</sup>,第5天)和表阿霉素(15 mg·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>,第1~4天)(剂量调整参照既往研究<sup>[7]</sup>)。中枢神经系统(CNS)预防治疗指1次以上阿糖胞苷和地塞米松鞘内注射或甲氨蝶呤联合诱导治疗,适用于肿瘤在特定部位的患者,包括副鼻窦、硬膜外组织、骨髓、睾丸、乳腺、肾上腺、女性生殖器官、皮肤以及有2个以上的体外病灶。

3. 随访:通过查阅患者门急诊及住院病历、电话回访的方式进行随访。随访截止日期为2021年4月10日,中位随访47.1个月。OS期定义为诊断日期至死亡或未次随访时间。PFS期定义为治疗开始日期至第1次复发/疾病进展日期、因淋巴瘤导致死亡日期或未次随访日期(无复发患者)。

4. 免疫组化:由两位经验丰富的形态学和病理学专家对所有石蜡样本重新染色,并独立进行重新分析,以获得准确的免疫组化结果。此外,利用Hans算法分析CD10、BCL-6和MUM-1蛋白的免疫组化结果<sup>[8]</sup>,COO分型确定生发中心B细胞样(GCB)和非GCB亚型。

5. 疗效及不良反应评估:按照2007年国际工作组标准<sup>[9]</sup>,通过腰椎穿刺、PET-CT、增强CT评估治疗效果和疾病进展情况。在初始治疗第3~4个疗程后及治疗结束后分别进行影像学评价。治疗过程中的不良反应根据《不良事件通用术语标准》(CTCAE)v5.0进行评价。治疗相关死亡事件定义

为因感染或大量出血而非疾病进展而死亡。

6. 统计学处理:使用 SPSS 25.0 统计学软件进行分析。根据性别、年龄、基础疾病史、Ann Arbor 分期、IPI 评分、LDH 水平、COO 分型、治疗方案、CNS 预防、放疗、移植等指标,对 75 例 MYC/BCL-2 双表达患者及 148 例非双表达患者按 1:1 进行 PSM 匹配,卡钳值设为 0.1;分类资料组间比较采用卡方检验或 Fisher 精确概率法,生存分析采用 Kaplan-Meier 法,组间比较采用 Log-rank 检验,风险比(HR)通过 Cox 比例风险模型计算。除 IPI 外,单因素分析中  $P < 0.15$  的因素纳入多因素分析,多因素 Cox 分析采用条件后退法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. PSM 结果:75 例双表达组患者及 148 例非双表达组的临床特征及治疗选择资料见表 1。其中两组仅在治疗方案方面的差异有统计学意义( $P = 0.048$ ),而性别、年龄、有无基础疾病史、Ann Arbor 分期、IPI 评分、LDH 水平等方面的差异无统计学意义。应用 PSM 根据性别、年龄、有无基础疾病史、Ann Arbor 分期、IPI 评分、LDH 水平、COO 分型、诱导化疗方案、CNS 预防应用情况、移植、放疗等临床因素,按 1:1 进行匹配,选择出 75 例非双表达的患者作为对照组,匹配后两组患者临床基线特征与治疗选择方面的差异均无统计学意义,具有可比性(表 1)。

2. PSM 后两组近期疗效及生存情况比较:初始治疗结束后进行疗效评价,75 例双表达患者完全缓解(CR)42 例(56.0%),75 例非双表达患者 CR 43 例(57.3%),差异无统计学意义( $P = 0.869$ )。两组 3 年 OS 率分别为(69.8 ± 5.5)%、(77.0 ± 4.9)% ( $\chi^2 = 1.472, P = 0.225$ ),差异无统计学意义(图 1A);3 年 PFS 率分别为(60.7 ± 5.8)%、(65.3 ± 5.5)% ( $\chi^2 = 0.739, P = 0.390$ ),差异也无统计学意义(图 1B)。

3. PSM 后 R-CHOP 治疗亚组中双表达与非双表达生存对比:进一步对两组中接受 R-CHOP 方案治疗的患者进行亚组分析,分别有 49 例双表达患者与 58 例非双表达患者接受 R-CHOP 方案治疗,其中 25 例(51.0%)双表达患者和 35 例(60.3%)非双表达患者达到 CR,差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.938, P = 0.333$ )。两组 3 年 OS 率分别为(61.3 ± 7.5)%、(77.2 ± 5.6)% ( $\chi^2 = 4.892, P = 0.027$ )(图 2A);3 年 PFS 率分别为(52.1 ± 7.5)%、(70.6 ± 6.0)% ( $\chi^2 =$

4.201,  $P = 0.040$ )(图 2B)。R-CHOP 方案治疗下双表达与非双表达两组的 3 年 OS 率、PFS 率的差异均有统计学意义。

4. PSM 后 DLBCL 患者预后影响因素分析:结果如表 2 所示,单因素 Cox 分析显示,与预后相关的潜在因素是年龄、疾病分期、IPI 指数、LDH 水平、COO 分型、MYC 蛋白表达、是否进行 CNS 预防、是否进行移植。将单因素分析中  $P < 0.15$  的因素纳入多因素 Cox 回归分析,结果显示年龄、Ann Arbor 分期、COO 分型、是否进行 CNS 预防、是否进行移植是影响 DLBCL 患者预后的独立影响因素( $P < 0.05$ )。而 MYC 和 BCL-2 蛋白双表达无论在单因素还是多因素 Cox 回归分析中均不是预后的影响因素。

5. PSM 后非双表达组内 MYC 高表达与低/表达生存对比:进一步对非双表达组中 16 例 MYC 高表达和 59 例 MYC 低/无表达的患者进行亚组分析,其中 10 例(62.5%)MYC 高表达患者和 33 例(55.9%)低/无表达患者达 CR,差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.222, P = 0.638$ )。两组 3 年 OS 率分别为(81.3 ± 9.8)%、(75.7 ± 5.7)% ( $\chi^2 = 0.217, P = 0.641$ ),差异无统计学意义;3 年 PFS 率分别为(75.0 ± 10.8)%、(62.7 ± 6.3)% ( $\chi^2 = 0.618, P = 0.432$ ),差异也无统计学意义。

6. PSM 后 DA-EPOCH-R 方案与 R-CHOP 方案不良反应比较:共对 107 例接受 R-CHOP 治疗的患者和 43 例接受 DA-EPOCH-R 治疗的患者进行不良反应评估。与 DA-EPOCH-R 治疗的患者相比,R-CHOP 治疗的患者 3/4 级中性粒细胞减少(37.4%对 65.1%, $P = 0.001$ )、贫血(11.2%对 20.9%, $P = 0.121$ )和血小板减少(14.0%对 30.2%, $P = 0.021$ )发生率更低。然而,R-CHOP 和 DA-EPOCH-R 方案中出现粒细胞缺乏伴发热事件的发生率相近(20.6%对 27.9%, $P = 0.331$ )。R-CHOP 和 DA-EPOCH-R 方案组分别有 3 例(2.8%)和 2 例(4.7%)患者发生治疗相关死亡事件( $P = 0.625$ )。

## 讨 论

近来随着对 DLBCL 分子异质性认识的不断加深,MYC 和 BCL-2 蛋白在 DLBCL 中发挥的作用也逐渐明确。MYC 原癌基因位于染色体 8q24 上,其编码的转录因子在能量代谢、蛋白质合成、细胞分化等方面具有重要作用。MYC 蛋白异常表达可由染色体易位、MYC 基因扩增、基因内突变和拷贝数改变等多种机制引起,其中最常见遗传事件为

表 1 倾向性评分(PSM)前后双表达组和非双表达组 DLBCL 患者临床基线特征与治疗选择比较[例数(%)]

临床特征 及治疗选择	PSM 前			PSM 后		
	双表达组 (75 例)	非双表达组 (148 例)	<i>P</i> 值	双表达组 (75 例)	非双表达组 (75 例)	<i>P</i> 值
性别			0.855			0.414
男	34(45.3)	69(46.6)		34(45.3)	39(52.0)	
女	41(54.7)	79(53.4)		41(54.7)	36(48.0)	
年龄			0.385			0.324
<60 岁	39(52.0)	86(58.1)		39(52.0)	45(60.0)	
≥60 岁	36(48.0)	62(41.9)		36(48.0)	30(40.0)	
基础疾病			0.697			0.410
无	40(53.3)	83(56.1)		40(53.3)	45(60.0)	
有	35(46.7)	65(43.9)		35(46.7)	30(40.0)	
Ann Arbor 分期			0.870			0.570
I~II 期	17(22.7)	35(23.6)		17(22.7)	20(26.7)	
III~IV 期	58(77.3)	113(76.4)		58(77.3)	55(73.3)	
IPI 评分			0.572			0.744
0~2 分	35(46.7)	75(50.7)		35(46.7)	37(49.3)	
3~5 分	40(53.3)	73(49.3)		40(53.3)	38(50.7)	
LDH 水平			0.347			0.325
≤250 U/L	31(41.3)	71(48.0)		31(41.3)	37(49.3)	
>250 U/L	44(58.7)	77(52.0)		44(58.7)	38(50.7)	
COO 分型			0.155			0.734
GCB 型	26(34.7)	66(44.6)		26(34.7)	28(37.3)	
非 GCB 型	49(65.3)	82(55.4)		49(65.3)	47(62.7)	
MYC 表达			<0.001			<0.001
<40%	0(0.0)	120(81.1)		0(0.0)	59(78.7)	
≥40%	75(100.0)	28(18.9)		75(100.0)	16(21.3)	
DHL			0.706			0.344
无	45(93.7)	100(95.2)		45(93.7)	52(98.1)	
有	3(6.3)	5(4.8)		3(6.3)	1(1.9)	
不详	27	43		27	22	
治疗方案			0.048			0.104
R-CHOP	49(60.0)	115(77.3)		49(65.3)	58(77.3)	
DA-EPOCH-R	26(34.7)	33(22.3)		26(34.7)	17(22.7)	
CNS 预防			0.481			0.702
无	17(22.7)	40(27.0)		17(22.7)	19(25.3)	
有	58(77.3)	108(73.0)		58(77.3)	56(74.7)	
造血干细胞放疗			0.702			0.719
无	70(93.3)	136(91.9)		70(93.3)	72(96.0)	
有	5(6.7)	12(8.1)		5(6.7)	3(4.0)	
有无移植			0.128			0.220
无	68(90.7)	123(83.1)		68(90.7)	63(84.0)	
有	7(9.3)	25(16.9)		7(9.3)	12(16.0)	

注:DLBCL:弥漫大B细胞淋巴瘤;IPI评分:淋巴瘤国际预后指数评分;LDH:乳酸脱氢酶;GCB:生发中心来源;DHL:双打击淋巴瘤;R-CHOP:利妥昔单抗+环磷酰胺+阿霉素+长春新碱+泼尼松;DA-EPOCH-R:利妥昔单抗+依托泊苷+泼尼松+长春新碱+环磷酰胺+表阿霉素;CNS:中枢神经系统

MYC 与免疫球蛋白基因(IG)位点的转位突变<sup>[10-11]</sup>。淋巴瘤细胞中 MYC 蛋白表达增高将导致基因组不稳定、基因扩增和细胞增殖<sup>[12]</sup>。BCL-2 基因也是一种位于染色体 18q21 的原癌基因,其编码的 BCL-2

蛋白具有抑制细胞凋亡、维持细胞增殖的功能。尤其在同时存在 MYC 蛋白高表达的情况下,BCL-2 蛋白可发挥促进淋巴瘤进展,造成耐药<sup>[13-14]</sup>。BCL-2 蛋白增加则通常与核因子κB 信号通路的激活有关<sup>[15]</sup>。



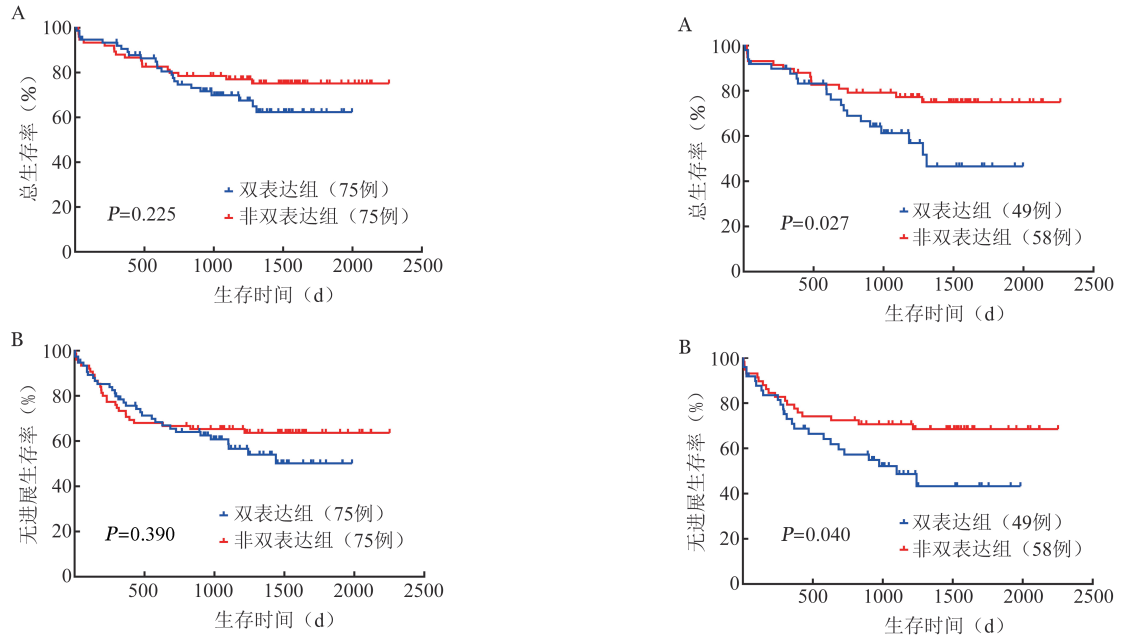


图1 MYC/BCL-2 双表达与非双表达弥漫大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)患者总生存(A)及无进展生存(B)曲线

基于MYC蛋白与BCL-2蛋白在DLBCL发生发展中的重要作用,R-CHOP方案治疗下MYC与BCL-2蛋白高表达的预后不良问题已得到广泛重视。如Green等<sup>[6]</sup>在193例DLBCL患者的回顾性研究中发现双表达患者更易出现体力活动状态差、疾病晚期、Ki-67增殖指数高、IPI评分中/高危、更多结外病灶受累等情况。另外也有多项研究报道DLBCL中MYC/BCL-2共表达与侵袭性临床过程

R-CHOP:利妥昔单抗+环磷酰胺+阿霉素+长春新碱+泼尼松;DLBCL:弥漫大B细胞淋巴瘤

图2 R-CHOP治疗方案下MYC/BCL-2双表达与非双表达DLBCL患者总生存(A)及无进展生存(B)曲线

相关,在ABC亚型中更常见,并导致R-CHOP治疗下DLBCL患者总体预后较差<sup>[4-5]</sup>。但目前绝大多数MYC/BCL-2双表达淋巴瘤的预后研究均为回顾性研究,混杂因素所致偏倚较高,且并未纳入治疗相关因素进行分析,因此DA-EPOCH-R的强化治疗方案、CNS预防治疗、放疗、化疗对于双表达淋巴

表2 倾向性评分(PSM)后弥漫大B细胞淋巴瘤患者预后的单因素及多因素Cox回归分析

因素	无进展生存						总生存					
	单因素分析			多因素分析			单因素分析			多因素分析		
	HR	95% CI	P值	HR	95% CI	P值	HR	95% CI	P值	HR	95% CI	P值
女性	1.172	0.702 ~ 1.957	0.543				0.952	0.520 ~ 1.743	0.873			
≥60岁	1.863	1.114 ~ 3.116	0.018	1.834	1.092 ~ 3.080	0.022	2.179	1.176 ~ 4.037	0.013	2.078	1.109 ~ 3.893	0.022
有基础疾病	1.323	0.794 ~ 2.206	0.282				1.055	0.574 ~ 1.937	0.863			
Ann Arbor III ~ IV期	2.547	1.208 ~ 5.369	0.014	2.999	1.418 ~ 6.342	0.004	5.467	1.688 ~ 17.707	0.005	7.622	2.322 ~ 25.017	0.001
IPI 3 ~ 5分	1.963	1.157 ~ 3.329	0.012				2.372	1.247 ~ 4.510	0.008			
LDH > 250 U/L	1.802	1.057 ~ 3.073	0.030				1.745	0.927 ~ 3.282	0.084			
非GCB型	2.019	1.123 ~ 3.631	0.019	2.235	1.237 ~ 4.037	0.008	1.770	0.890 ~ 3.523	0.104	1.841	0.919 ~ 3.692	0.085
非双表达	1.252	0.749 ~ 2.093	0.391				1.458	0.790 ~ 2.691	0.228			
MYC ≥ 40%	1.055	0.625 ~ 1.782	0.840				1.250	0.664 ~ 2.352	0.489			
DA-EPOCH-R方案 <sup>a</sup>	1.002	0.570 ~ 1.760	0.995				0.530	0.245 ~ 1.144	0.106			
有CNS预防	0.694	0.391 ~ 1.233	0.213				0.591	0.307 ~ 1.137	0.115	0.439	0.225 ~ 0.857	0.016
放疗	0.899	0.281 ~ 2.872	0.857				0.408	0.056 ~ 2.966	0.376			
移植	0.184	0.045 ~ 0.753	0.019	0.137	0.033 ~ 0.564	0.006	0.038	0.001 ~ 1.503	0.082			

注:IPI:国际预后指数;GCB:生发中心来源;DA-EPOCH-R:利妥昔单抗+依托泊苷+泼尼松+长春新碱+环磷酰胺+表阿霉素;CNS:中枢神经系统。a:与R-CHOP方案(利妥昔单抗+环磷酰胺+阿霉素+长春新碱+泼尼松)比较

瘤患者预后的影响仍未完全明确。对于使用DA-EPOCH-R、进行移植治疗的部分DLBCL患者,双表达是否仍是此类患者的预后不良因素也尚未查阅到相关报道。

由于回顾性分析并未采用前瞻性随机对照研究的随机分组方法,无法基于大数定理,消除研究组间的数据偏差及混杂变量的影响,因此回顾性研究极易出现系统性偏差。而PSM作为一种可用于利用非实验数据进行干预效应分析的统计学方法,可在一定程度上消除组别之间的干扰因素。本研究中我们回顾性纳入2015年1月至2018年12月于北京协和医院初治的DLBCL患者共223例进行分析。其中,75例(33.6%)为双表达组,与既往研究相符(18%~34%)<sup>[3-4]</sup>。随后对两组患者的临床基线特征与治疗选择比较,发现两组间在初始治疗方案选择方面的差异有统计学意义( $P=0.048$ ),于是利用PSM进行1:1匹配,消除了部分双表达组、非双表达组患者之间的选择性偏倚,使其资料更具可比性,提高了分析结果的可信度。

本研究结果显示,在仅使用R-CHOP治疗的患者中,MYC/BCL-2蛋白高表达组与非高表达组患者的OS和PFS率差异有统计学意义,与既往国内外研究结果<sup>[4-6]</sup>相符。但在纳入DA-EPOCH-R治疗、移植、CNS预防等临床治疗因素之后,MYC/BCL-2蛋白双表达与DLBCL患者3年的OS和PFS率差异无统计学意义,不再是DLBCL的独立预后因素。提示在DA-EPOCH-R、移植等治疗方案下,双表达对DLBCL的不良预后影响可能在一定程度上得到消除。

DA-EPOCH-R方案已在双表达淋巴瘤(具有MYC基因扩增或易位,同时伴BCL-2基因扩增或易位和/或BCL6基因扩增或易位的DLBCL)、复发或难治性DLBCL以及某些与高侵袭性、高增殖相关的DLBCL亚组患者中表现出了良好的效果<sup>[16-17]</sup>。但在双表达淋巴瘤患者中DA-EPOCH-R方案的治疗效果存在一些争议性的发现。2017年刘薇等<sup>[18]</sup>证实DA-EPOCH-R方案在MYC/BCL-2蛋白双表达淋巴瘤患者的一线治疗中具有良好的疗效。2019年Dodero等<sup>[19]</sup>对114例患者的随访研究中发现,DA-EPOCH-R治疗方案可显著提升65岁以下双表达淋巴瘤患者的PFS和OS率,但65岁以上患者无明显获益。同年Zhang等<sup>[20]</sup>在另一项纳入了189例DLBCL患者的回顾性研究中得出,DA-EPOCH-R方案不改善双表达淋巴瘤患者的预后,仅可使60岁

以下、GCB亚型、高危IPI的部分患者获益,并且双表达仍是DLBCL的独立预后不良因素。此外,有其他研究证明自体造血干细胞移植或异基因造血干细胞移植后,相比于无MYC/BCL-2蛋白同时高表达的患者,双表达患者的预后仍显著差于非双表达患者,双表达仍是DLBCL的独立不良预后因素<sup>[21-22]</sup>。由此可见,目前关于MYC/BCL-2蛋白双表达淋巴瘤患者的治疗方案仍然充满争议,需要更多前瞻性研究探索。

此外,DA-EPOCH-R方案的安全性也是临床应用的前提。临床使用过程中必须综合考虑年龄、合并症、对初始化疗的耐受性、ECOG评分、骨髓功能等因素方可进行个体化治疗,尤其是对于基础情况较差的老年DLBCL患者<sup>[23]</sup>。本研究结果显示,虽然DA-EPOCH-R方案治疗下患者的血液学不良反应很常见,但粒细胞缺乏伴发热事件的发生率和治疗相关死亡率并未较R-CHOP方案显著增加,这可能与临床中接受DA-EPOCH-R方案的患者更积极应用预防性抗生素和G-CSF有关。

总之,本研究结果显示在DA-EPOCH-R、移植、CNS预防等治疗下,MYC/BCL-2蛋白双表达不再是DLBCL的独立危险因素,其不良预后影响在一定程度上得到消除。但本研究也存在一些不足:①本研究为回顾性研究,尽管已使用PSM,相较于前瞻性实验仍不能完全控制偏倚;②病例数较为有限;③中位随访时间未达到5年。因此,本研究结论需要大规模前瞻性研究来进一步验证。同时我们将继续跟踪调查长期生存结果,并在未来的研究中增加样本量进行分析。

## 参考文献

- [1] Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(4): 235-242. DOI: 10.1056/NEJMoa011795.
- [2] Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms [J]. *Blood*, 2016, 127(20):2375-2390. DOI: 10.1182/blood-2016-01-643569.
- [3] Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(28):3452-3459. DOI: 10.1200/JCO.2011.41.0985.
- [4] Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-

- cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program [J]. *Blood*, 2013, 121 (20):4021-4031; quiz 4250. DOI: 10.1182/blood-2012-10-460063.
- [5] Riedell PA, Smith SM. Double hit and double expressors in lymphoma: Definition and treatment[J]. *Cancer*, 2018, 124(24):4622-4632. DOI: 10.1002/cncr.31646.
- [6] Green TM, Young KH, Visco C, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30 (28): 3460-3467. DOI: 10.1200/JCO.2011.41.4342.
- [7] Wilson WH, Dunleavy K, Pittaluga S, et al. Phase II study of dose-adjusted EPOCH and rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of germinal center and post-germinal center biomarkers [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26 (16): 2717-2724. DOI: 10.1200/JCO.2007.13.1391.
- [8] Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray [J]. *Blood*, 2004, 103(1):275-282. DOI: 10.1182/blood-2003-05-1545.
- [9] Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(5): 579-586. DOI: 10.1200/JCO.2006.09.2403.
- [10] Sewastianik T, Prochorec-Sobieszek M, Chapuy B, et al. MYC deregulation in lymphoid tumors: molecular mechanisms, clinical consequences and therapeutic implications[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1846 (2): 457-467. DOI: 10.1016/j.bbcan.2014.08.006.
- [11] Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects[J]. *Genes (Basel)*, 2017, 8(4):116. DOI: 10.3390/genes8040116.
- [12] Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(12):976-990. DOI: 10.1038/nrc2231.
- [13] Schmitt CA, Lowe SW. Bcl-2 mediates chemoresistance in matched pairs of primary E(mu)-myc lymphomas in vivo[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2001, 27 (1): 206-216. DOI: 10.1006/bcmd.2000.0372.
- [14] Letai AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(2):121-132. DOI: 10.1038/nrc2297.
- [15] Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD, et al. BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Leukemia*, 2012, 26 (6): 1383-1390. DOI: 10.1038/leu.2011.378.
- [16] Jermann M, Jost LM, Ch T, et al. Rituximab-EPOCH, an effective salvage therapy for relapsed, refractory or transformed B-cell lymphomas: results of a phase II study [J]. *Ann Oncol*, 2004, 15(3):511-516. DOI: 10.1093/annonc/mdh093.
- [17] Huang JJ, Xia Y, Wang Y, et al. A comparison of R-EPOCH and R-CHOP as a first-line regimen in de novo DLBCL patients with high Ki-67 expression in a single institution [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(27):41242-41250. DOI: 10.18632/oncotarget.9271.
- [18] 刘薇, 李健, 黄文阳, 等. 剂量调整的EP(D)OCH方案联合利妥昔单抗治疗新诊断双表达淋巴瘤的疗效分析[J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38 (6):548-551. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.06.017.
- [19] Doderio A, Guidetti A, Tucci A, et al. Dose-adjusted EPOCH plus rituximab improves the clinical outcome of young patients affected by double expressor diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Leukemia*, 2019, 33 (4):1047-1051. DOI: 10.1038/s41375-018-0320-9.
- [20] Zhang XY, Liang JH, Wang L, et al. DA-EPOCH-R improves the outcome over that of R-CHOP regimen for DLBCL patients below 60 years, GCB phenotype, and those with high-risk IPI, but not for double expressor lymphoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145 (1):117-127. DOI: 10.1007/s00432-018-2771-9.
- [21] Herrera AF, Mei M, Low L, et al. Relapsed or Refractory Double-Expressor and Double-Hit Lymphomas Have Inferior Progression-Free Survival After Autologous Stem-Cell Transplantation [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35 (1): 24-31. DOI: 10.1200/JCO.2016.68.2740.
- [22] Kawashima I, Inamoto Y, Maeshima AM, et al. Double-Expressor Lymphoma Is Associated with Poor Outcomes after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018, 24 (2):294-300. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.10.013.
- [23] Liu P, Han Y, Jiang SY, et al. A retrospective analysis of real-world outcomes of elderly Chinese patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2019, 132 (15):1807-1814. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000354.

(收稿日期:2021-04-15)

(本文编辑:刘爽)

# 遗传性蛋白S缺乏症18例临床表现与基因分析

张冬雷 薛峰 付荣凤 陈云飞 刘晓帆 刘葳 贾玉娇 李慧媛 王玉华  
肖志坚 张磊 杨仁池

中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所),实验血液学国家重点实验室,国家血液系统疾病临床医学研究中心,天津 300020

通信作者:杨仁池,Email:rcyang@ihcams.ac.cn

**【摘要】** 目的 分析18例遗传性蛋白S(PS)缺乏症患者的临床表现及分子致病机制。方法 对2016年7月至2019年2月就诊于中国医学科学院血液病医院的18例PS缺乏症患者进行回顾性分析,应用凝固法测定PS活性、应用发色底物法测定蛋白C(PC)和抗凝血酶(AT)活性并进行初步诊断,使用高通量测序(HTS)筛查凝血疾病相关基因变异并进行Sanger测序验证;使用Swiss-model软件进行三维结构分析。结果 18例患者中男15例,女3例,中位年龄37(14~62)岁。均有深静脉血栓栓塞病史,PS活性为12.5~48.2 U/dl。所有患者均检出PROS1基因变异,其中5个无义突变(c.134\_162del/p.Leu45\*, c.847G>T/p.Glu283\*, c.995\_996delAT/p.Tyr332\*, c.1359G>A/p.Trp453\*, c.1474C>T/p.Gln492\*), 2个移码突变(c.1460delG/p.Gla487Valfs\*9, c.1747\_1750delAATC/p.Asn583Wfs\*9)和1个大片段缺失(外显子9缺失)为首次报道。此外,1例妊娠期深静脉血栓形成女性患者的PS活性为55.2 U/dl,并且检出PROC基因c.565C>T/p.Arg189Trp突变。结论 该研究新发现的基因突变丰富了与遗传性PS缺乏症相关的PROS1基因突变谱。

**【关键词】** 蛋白S; PROS1基因; 血栓栓塞; 高通量测序

**基金项目:**国家自然科学基金(82070125、81970121);国家重点研发计划(2016YFC0901503、2019YFA0110802);天津市人才发展特殊支持计划(R018)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.01.010

## Clinical manifestations and gene analysis of 18 cases of hereditary protein S deficiency

Zhang Donglei, Xue Feng, Fu Rongfeng, Chen Yunfei, Liu Xiaofan, Liu Wei, Jia Yujiao, Li Huiyuan, Wang Yuhua, Xiao Zhijian, Zhang Lei, Yang Renchi

State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Yang Renchi, Email: rcyang@ihcams.ac.cn

**【Abstract】 Objective** To analyze the clinical manifestations and molecular pathogenesis of 18 patients with inherited protein S (PS) deficiency. **Methods** Eighteen patients with inherited PS deficiency who were admitted to the Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital from June 2016 to February 2019 were analyzed: activity of protein C (PC) and antithrombin (AT), PS activity were measured for phenotype diagnosis; high throughput sequencing (HTS) was used for screening of coagulation disease-related genes; Sanger sequencing was used to confirm candidate variants; Swiss-model was used for three-dimensional structure analysis. **Results** The PS:C of 18 patients ranged from 12.5 to 48.2 U/dL. Among them, 16 cases developed deep vein thrombosis, including 2 cases each with mesenteric vein thrombosis and cerebral infarction, and 1 case each with pulmonary embolism and deep vein thrombosis during pregnancy. A total of 16 PROS1 gene mutations were detected, and 5 nonsense mutations (c.134\_162del/p.Leu45\*, c.847G>T/p.Glu283\*, c.995\_996delAT/p.Tyr332\*, c.1359G>A/p.Trp453\*, c.1474C>T/p.Gln492\*), 2 frameshift mutations (c.1460delG/p.Gla487Valfs\*9 and c.1747\_1750delAATC/p.Asn583Wfs\*9) and 1 large fragment deletion (exon9 deletion) were reported for the first time. In addition, the PS:C of the deep vein thrombosis during pregnancy case was 55.2 U/dL carrying PROC gene c.565C>T/p.Arg189Trp mutation. **Conclusion** The newly discovered gene mutations enriched the PROS1 gene



mutation spectrum which associated with inherited PS deficiency.

**【Key words】** Protein S; PROS1 gene; Thromboembolism; High throughput sequencing

**Fund programs:** National Natural Science Foundation of China (82070125, 81970121); National Key Research and Development Program of China (2016YFC0901503, 2019YFA0110802); Tianjin Special Support Program for Talent Development (R018)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.01.010

蛋白S(PS)是一种依赖维生素K的单链糖蛋白,由Discipio于1977年在美国西雅图分离成功<sup>[1]</sup>。人类PS由定位于染色体3q11.2的PROS1基因编码,跨越大约80 kb,包含15个外显子,其cDNA长度约为1.8 kb,编码的前体蛋白切除24个氨基酸残基的前导肽和17个氨基酸残基后,形成635个氨基酸组成的成熟蛋白,从N端依次为 $\gamma$ 羧基谷氨酸(Gla)区域、凝血酶敏感区域(TSR)、4个表皮生长因子(EGF)结构域和1个性激素结合球蛋白同源结构域(SHBG),其中SHBG包括2个层黏连蛋白G(LamG)区域<sup>[2]</sup>。PS在肝脏合成后主要分布于外周血浆,大约60%的总PS与C4b补体蛋白结合,约40%以游离形式存在,后者发挥主要的活性<sup>[3]</sup>。作为重要的抗凝蛋白,一方面游离PS是活化蛋白C(APC)的辅因子,可以间接促进凝血因子Va(FVa)和FVIIIa的水解失活<sup>[4]</sup>;另一方面PS也可以与FVa和FXa可逆性结合,直接抑制凝血酶原复合物的活性<sup>[5]</sup>;此外,PS还可以与FVIIIa结合,从而抑制FX的激活。

遗传性PS缺乏症是一种常染色体不完全显性遗传疾病,发病机制是由于PS编码基因PROS1发生功能缺失型突变,导致PS绝对数量或生物学功能受损<sup>[6]</sup>,其临床表现以静脉血栓形成(VTE)多见,部分患者也可发生多发性动脉血栓、脑梗死等。遗传性PS缺乏症在高加索VTE患者中的占比为2%~8%,在亚洲VTE患者中的占比为10.7%~17.8%<sup>[7]</sup>。迄今为止,人类基因突变数据库(human gene mutation database, HGMD)共收录450个PROS1基因变异,其中以点突变导致的错义或无义突变最为多见(150个),其次为小片段插入缺失(74个)和剪接突变(25个)。在本研究中,我们对18例遗传性PS缺乏症患者的临床表现和PROS1基因检测结果进行回顾性分析。

## 病例与方法

1. 病例:2016年7月至2019年2月期间,224例患者因动静脉血栓、肺栓塞或少见部位血栓而就诊

于中国医学科学院血液病医院,其中18例患者被诊断为遗传性PS缺乏症。遗传性PS缺乏症的诊断基于以下标准<sup>[8]</sup>:患者临床表现为有症状的血栓栓塞性疾病,伴或不伴有血栓形成家族史,排除抗磷脂抗体、肝病、口服避孕药、肿瘤、糖皮质激素替代疗法和慢性炎症等因素下PS活性水平持续 $<60$  U/dl。纳入本研究的遗传性PS缺乏症患者及家庭成员均知情同意。

2. 血栓止血实验室检测:应用Sysmex CS5100全自动凝血分析仪检测抗凝血酶(AT)、蛋白C(PC)、PS活性,其中AT和PC活性测定采用发色底物法,PS活性测定采用凝固法。检测均距患者血栓事件至少1个月,AT活性检测距患者停用肝素至少24 h,PC、PS活性检测在患者停止抗凝治疗后2周进行。

3. 基因测序:留取患者及血缘相关的部分亲属静脉血液标本3~5 ml,采用DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司产品)提取外周有核细胞基因组DNA。高通量测序检测包含PROS1在内的76个出凝血疾病相关基因,其中PROS1、PROC和SERPINC1基因的蛋白编码区域(CDS)覆盖度均为100%,且覆盖了FV Leiden(FV Arg506Gln)和F2基因G20210A变异。在Ion Torrent测序平台(美国赛默飞世尔科技公司产品)完成高通量测序(HTS),所有样本测序靶向区域平均测序深度均 $>400\times$ ,其中测序深度 $\geq 100\times$ 的读段(reads)比例 $>90\%$ 。测序数据与人类参考基因组hg19进行比对,采用人群数据库(1000Genomes、gnomAD、ESP6500和自建数据库等)、功能预测数据库(SIFT、PolyPhen-2和Mutation Taster等)以及疾病数据库(HGMD专业版、ClinVar和ISTH-PSD<sup>[9]</sup>数据库)进行注释。根据2015年版美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)指南筛选致病变异或可能致病变异,并使用Sanger测序进行验证。采用Ion AmpliSeq<sup>TM</sup> custom panel测序的拷贝数变异可视化方法进行拷贝数变异分析<sup>[10]</sup>。

4. 蛋白结构预测:根据AlphaFold中的PS蛋白