论著·临床研究

原发性肠淋巴瘤 p53 基因与 13q14 染色体变异与预后的关系

冯莉娟[1],张国平[2],谢岷[3],曹鹏飞[2],傅春燕[4],胡忠良[4],戴茂[5]

(中南大学湘雅医院 1. 消化科; 2. 血液科; 3. 儿科,湖南 长沙 410008;
4. 中南大学基础医学院病理学系,湖南 长沙 410078; 5. 长沙医学院医学检验系, 湖南 长沙 410917)

[摘 要] **目的** 临床发现尽管原发性肠淋巴瘤的免疫表型相同,但预后也可以截然不同,提示其预后不是单一因素所决定的,可能还与其基因或染色体的变异有关。p53 基因是一种重要的抑癌基因,13q14 缺失是多种淋巴细胞增殖性疾病常见的染色体异常,该研究拟探讨 p53 基因与 13q14 染色体变异在原发性肠淋巴瘤的预后判断、指导治疗中的作用,为临床治疗方案的制定提供依据。**方法** 采用改良的 FISH 技术检测了 30 例原发性肠淋巴瘤及 10 例淋巴结反应性增生患者的石蜡切片中 p53 基因及 13q14 染色体变异情况,分析其与原发性肠淋巴瘤预后的关系。**结果** ①Ⅰ~Ⅱ期患者中 22.7% 有 p53 基因缺失,Ⅲ~Ⅳ期患者中 75.0% 有 p53 基因缺失($\chi^2=6.903$, $P<0.01$);②MALT 淋巴瘤中 14.3% 有 p53 基因缺失,非 MALT 淋巴瘤中 56.3% 有 p53 基因缺失($\chi^2=5.662$, $P<0.05$);③p53 基因缺失者平均生存期为 13.4 月,明显短于 p53 基因正常者 36.1 月($t=2.637$, $P<0.05$);④13q14 缺失在原发性肠淋巴瘤中发生率为 40%,但在 10 例淋巴结反应性增生患者的石蜡切片中未检测到。13q14 缺失与原发性肠淋巴瘤病理类型、临床分期以及平均生存期的关系不大;⑤ p53 基因缺失与 13q14 缺失无明显相关性。**结论** p53 基因缺失在非 MALT 淋巴瘤及Ⅲ~Ⅳ期患者中发生率较高。p53 基因缺失的原发性肠淋巴瘤病例恶性程度高、预后差,宜早期联合化疗。13q14 缺失与患者预后无明显相关性。

[中国当代儿科杂志,2009,11(7):555-558]

[关 键 词] 原发性肠淋巴瘤;基因表达; FISH; p53;13q14;预后

[中图分类号] R733 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)07-0555-04

Relationship between p53 gene and chromosome 13q14 variations and prognosis in primary intestinal lymphoma

FENG Li-Juan, *ZHANG Guo-Ping*, *XIE Min*, *CAO Peng-Fei*, *FU Chun-Yan*, *HU Zhong-Liang*, *DAI Mao. Department of Gastroenterology*, *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410008, *China* (*Email*: *fengljz@sina.com*)

Abstract: Objective Some research has shown that primary intestinal lymphoma with the same immunophenotype has different prognosis. It suggests that the prognosis of this disease is not determined by a single factor but may be related to genetic or chromosomal variations. The p53 gene is an important tumor suppressor gene, and 13q14 deletion is a common chromosomal abnormality of lymphocyte proliferation diseases. This study aimed to explore the role of the p53 gene and chromosome 13q14 variations in the assessment of prognosis in primary intestinal lymphoma. **Methods** p53 gene and chromosome 13q14 expression in paraffin sections of 30 cases of primary intestinal lymphoma and 10 cases of lymph node reactive hyperplasia were ascertained using an improved FISH technique. **Results** p53 gene deletion was found in 22.7% of patients with primary intestinal lymphoma at stage I-II and in 75.0% of patients at stage III-IV ($\chi^2=6.903$, $P<0.01$). The 30 patients with primary intestinal lymphoma were pathologically classified into mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) ($n=14$) and non-MALT types ($n=16$). The MALT lymphoma group had significantly lower incidence of p53 gene deletion (14.3% vs 56.3%; $\chi^2=5.662$, $P<0.05$). Average survival time in patients with p53 gene deletion was 13.41 months, being shorter than the patients with normal p53 gene (36.1 months) ($t=2.637$, $P<0.05$). 13q14 deletion was found in 40.0% of patients with primary intestinal lymphoma, but none of patients with lymph node reactive hyperplasia showed 13q14 deletion. 13q14 deletion was not significantly related to the pathological type and the clinical stage of primary intestinal lymphoma as well as the survival time. There was no significant correlation between p53 gene and 13q14 deletions. **Conclusions** There was a high incidence of p53 gene deletion in patients with non-MALT lymphoma or at stage III-IV. p53 gene deletion is related to a high tumor malignant degree and a poor prognosis, while chromosome 13q14 variation is not associated with the prognosis in patients with primary intestinal lymphoma.

[**Chin J Contemp Pediatr**, **2009**, **11** (7):**555-558**]

Key words: Primary intestinal lymphoma; Gene expression; FISH; p53; 13q14; Prognosis

[收稿日期]2009-03-31;[修回日期]2009-05-16

[作者简介]冯莉娟,女,博士,主治医师。主攻方向:消化道肿瘤的诊断及治疗。

淋巴瘤为儿童常见恶性肿瘤之一[1]。原发性肠淋巴瘤(primary intestinal lymphoma)是起源于肠黏膜下的淋巴细胞恶性增殖性疾病,属结外淋巴瘤[2]。原发性肠淋巴瘤的恶性程度差异较大,尽管免疫表型是判断淋巴瘤恶性程度的常用指标之一,但临床上常有不符合的病例。尽管免疫表型相同,但预后也可以截然不同。肿瘤恶性程度显然是制定化疗方案的重要影响因素,这也是目前临床医生治疗原发性肠淋巴瘤存在盲目性的原因之一。最近的研究表明,淋巴瘤患者存在基因和染色体变异,这些变异在淋巴瘤的发生、发展、预后评价等方面均有重要意义[3]。我们采用 FISH 技术检测了 30 例原发性肠淋巴瘤及 10 例淋巴结反应性增生患者的石蜡切片的 p53 基因缺失及 13q14 变异情况,探讨其与预后的关系,为临床治疗方案的制定提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中南大学湘雅医院 2001 年 7 月至 2008 年 8 月经病理组织学检查确诊为原发性肠淋巴瘤的 30 例住院患者蜡块。另以 10 例淋巴结反应性增生患者的石蜡切片作为对照组[4]。石蜡包埋标本采用 3 μm 连续切片。

1.2 主要设备

包括荧光显微镜、图像采集分析系统等。

1.3 主要试剂

20 mg/mL 蛋白酶 K 储存液(Sigma 公司);乙醇溶液(70% 乙醇、85% 乙醇);2 X SSC;甲酰胺洗涤液(50%、70% v/v);0.1% NP-40 /2 X SSC 洗液;0.4 X SSC/0.3% NP-40 洗液。二种荧光探针包括 P53-FITC 基因探针(绿色荧光信号);D13S25-Rhodamine B 基因探针(红色荧光信号),二种荧光探针均为北京金菩嘉医疗科技有限公司产品。

1.4 改良 FISH 技术检测 p53 基因及 13q14 染色体变异

由于检测肠淋巴瘤石蜡切片 p53 基因及 13q14 染色体变异的目的细胞是肠组织中的淋巴恶性增殖区域的淋巴细胞,此区域的淋巴细胞的消化比滴片细胞难但易于其他组织细胞。其 FISH 检测方案依照组织细胞常规 FISH 方法进行改良:包括切片 65℃下烘烤过夜,二甲苯中室温脱蜡,梯度乙醇中复水,切片至沸水中煮 15 ~ 25 min,浸入 37℃蛋白酶 K 工作液中 4 ~ 8 min,室温下于 2 × SSC 溶液中漂洗,梯度乙醇中脱水,浸入丙酮中 2 min,56℃烤片 1 h。

探针变性杂交:探针混合物置于 73℃水浴箱中变性 5 min 之后,将该试管置于 46℃水浴箱中,杂交前取出。

标本准备及变性:玻片在 78℃ 70% 甲酰胺溶液中变性 5 min。将 10 μL 变性后的探针混合物滴于玻片杂交区域,立即加盖盖玻片,用封口胶封边。将玻片置于预热的湿盒中,42℃保温箱中过夜杂交。

结果判断:根据苏木精-伊红染色的病理组织切片判断并记录淋巴瘤细胞分布位置,该组织切片(同一蜡块)的探针信号分析均以在此区域内为准。检测每种探针在间期细胞中的信号,确定结果是正常或异常。p53 正常为 2 绿色荧光点,异常类型为缺失(1 绿或无),D13S25 正常为 2 红色荧光点,异常类型为缺失(1 红或无)。

阈值建立:与 PGIL 无关的 20 例正常人外周血淋巴细胞滴片,行常规滴片血细胞 FISH 方法建立阈值。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件包处理数据,计量资料采用 t 检验,各率的比较采用卡方检验,相关性分析采用双变量相关分析,用 Kaplan-Meier 曲线分析生存情况。$P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 病人一般资料及临床表现

30 例原发性肠淋巴瘤的诊断均符合 Dawson 提出的胃肠道恶性淋巴瘤诊断标准[5,6]。年龄 6 ~ 72 岁,其中 14 岁以下儿童占 3 例。平均 42.2 岁。30 例患者均为非霍奇金淋巴瘤(NHL)。病变部位依次为:回盲部 11 例(36.7%),空肠 7 例(23.3%),回肠 5 例(16.7%),结肠 4 例(13.3%),直肠 2 例(6.7%),广泛小肠 1 例(6.7%)。其中黏膜相关样淋巴组织(MALT)淋巴瘤 14 例,非 MALT 淋巴瘤 16 例;B 细胞淋巴瘤 24 例,T 细胞淋巴瘤 5 例,非霍奇金淋巴瘤未定型 1 例。Ⅰ ~ Ⅱ期患者 22 例,Ⅲ ~ Ⅳ期患者 8 例。分期采用“Musshoff 胃肠道非霍奇金淋巴瘤分期系统”标准[7,8]。30 例患者中 24 例有随访结果。病史 3 d 至 20 月不等。症状包括:腹痛 23 例,占 76.7%;消化道出血(黑便或血便或单纯 OB 阳性) 16 例,占 53.3%;贫血 14 例,占 46.7%;腹部包块 14 例,占 46.7%;体重明显下降 8 例,占 26.7%;肠梗阻 8 例,占 26.7%;低蛋白血症 8 例,占 26.7%;发热 5 例,占 16.7%;腹泻 3 例,占 10.0%;消化道穿孔 1 例,占 3.3%;便秘 1 例,占 3.3%。

10 例淋巴结反应性增生患者的石蜡切片作为对照组，淋巴结来源部位是颈部及腹腔肿大淋巴结，年龄 18～64 岁，平均 41.1 岁。

2.2 FISH 检测 p53 基因情况

30 例原发性肠淋巴瘤患者中有 11 例 p53 基因缺失，占 36.7%。不同亚组 p53 基因缺失情况见表 1。p53 基因正常或缺失荧光染色如图 1-A，B 所示。

表 1 30 例原发性肠淋巴瘤患者 p53 基因缺失情况

分组	病理		病理		分期	
	MALT（$n=14$）	非 MALT（$n=16$）	B 细胞（$n=24$）	T 细胞（$n=5$）	Ⅰ～Ⅱ（$n=22$）	Ⅲ～Ⅳ（$n=8$）
p53 基因缺失(%)	14.3	56.3	37.5	40.0	22.7	75.0
χ^2 值	5.662		0.011		6.903	
P 值	<0.05		>0.05		<0.01	

B 细胞淋巴瘤与 T 细胞淋巴瘤中 p53 基因缺失的比例无明显差异，p53 基因缺失在非 MALT 淋巴瘤及Ⅲ～Ⅳ期患者中的比例较高。

24 例有随访结果的患者中 15 例 p53 基因正常，平均生存期为 36.1±22.4 月；9 例 p53 基因缺失，平均生存期为 13.4±16.1 月，明显短于 p53 基因正常者（$t=2.637$，$P<0.05$）。用 Kaplan-Meier 曲线分析得到：15 例 p53 基因正常者死亡 2 例，生存 13 例，生存率 86.7%，9 例 p53 基因缺失者死亡 7 例，生存 2 例，生存率 22.2%，明显低于 p53 基因正常者（$\chi^2=9.967$，$P=0.01$）。

10 例淋巴结反应性增生对照组中，均无 p53 基因缺失，两组患者中 p53 基因缺失率有明显差异（$\chi^2=5.057$，$P<0.05$）。

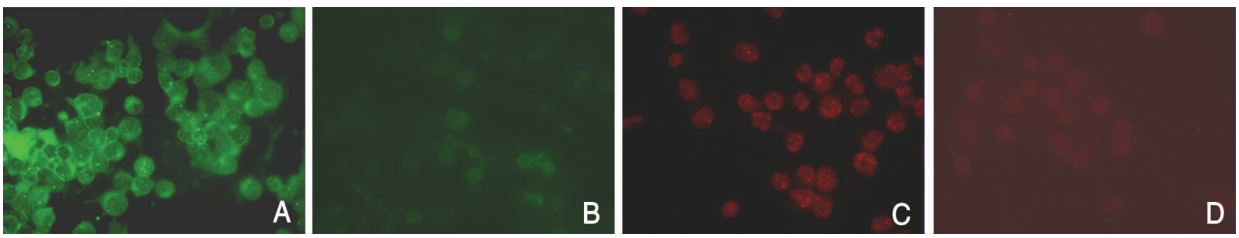

图 1 FISH 检测原发性肠淋巴瘤 p53-FITC 与 D13S25-Rhodamine B 结果 **A**：p53 检测结果正常；**B**：p53 检测异常缺失（1 绿或无绿色荧光点）；**C**：D13S25 检测结果正常；**D**：D13S25 检测异常缺失（1 红或无红色荧光点）。

2.3 FISH 检测 D13S25 情况

30 例原发性肠淋巴瘤患者中有 12 例 D13S25 缺失，占 40.0%。不同亚组 D13S25 缺失情况见表 2。D13S25 正常或缺失荧光染色如图 1-C，D 所示。

表 2 30 例原发性肠淋巴瘤患者 D13S25 缺失情况 （%）

分组	病理		病理		分期	
	MALT（$n=14$）	非 MALT（$n=16$）	B 细胞（$n=24$）	T 细胞（$n=5$）	Ⅰ～Ⅱ（$n=22$）	Ⅲ～Ⅳ（$n=8$）
D13S25 缺失	28.6	50.0	41.7	40.0	40.9	37.5
χ^2 值	1.429		0.005		0.028	
P 值	>0.05		>0.05		>0.05	

MALT 淋巴瘤与非 MALT 淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤与 T 细胞淋巴瘤、Ⅰ～Ⅱ期患者与Ⅲ～Ⅳ期患者中 D13S25 缺失的比例无明显差异。

24 例有随访结果的患者中 14 例无 D13S25 缺失，平均生存期为 23.9±20.5 月；10 例有 D13S25 缺失，平均生存期为 32.7±26.0 月，二者平均生存期差异无显著性意义（$t=0.925$，$P>0.05$）。用 Kaplan-Meier 曲线分析得到：14 例无 D13S25 缺失者死亡 7 例，生存 7 例，生存率 50.0%，10 例 D13S25 缺失者死亡 2 例，生存 8 例，生存率 80.0%，两组无明显差异（$\chi^2=2.240$，$P>0.05$）。

10 例淋巴结反应性增生对照组中均无 D13S25 缺失。两组患者中 D13S25 缺失率有明显差异（$\chi^2=5.714$，$P<0.05$）。

2.4 原发性肠淋巴瘤患者中两种基因及染色体变异相关性分析

对 30 例原发性肠淋巴瘤患者中 p53 基因及 D13S25 缺失相关性分析显示：p53 基因缺失与 D13S25 缺失无明显相关性（$r=-0.056$，$P>0.05$）。

2.5 3 例儿童原发性肠淋巴瘤患者中 p53 及 D13S25 检测情况

1 例 11 岁直肠 B 细胞性淋巴瘤患儿 p53 基因正常，D13S25 缺失；1 例 6 岁回盲部 B 细胞性淋巴瘤患儿 p53 基因正常，D13S25 正常；1 例 13 岁回盲部 B 细胞性淋巴瘤患儿 p53 基因缺失，D13S25 正常。

3 讨论

原发性肠淋巴瘤的恶性程度差异较大，尽管免疫表型是判断淋巴瘤恶性程度的常用指标之一，但临床常有不符合的病例。同样是 MALT 淋巴瘤，免疫表型相同，但临床预后相差很大。提示淋巴瘤的

预后不是单一因素所决定的,可能还与其基因或染色体的变异有关[9]。

p53 是一种重要的抑癌基因, p53 基因突变或缺失在恶性肿瘤的发生、发展中发挥着重要作用[10]。罗春英等[11]研究 38 例 T 细胞淋巴瘤中有 15 例 p53 基因组 DNA 存在异常迁移率带,总突变率为 39.5%。本研究发现 30 例原发性肠淋巴瘤中 p53 基因缺失的有 11 例,占 36.7%,其中 T 细胞淋巴瘤中 p53 基因缺失率为 40.0%,与其结果一致。有研究结果表明在 NHL 中,尤其在恶性程度较高的 NHL 中存在 p53 基因突变,且突变在 T 细胞性和 B 细胞性 NHL 中差异无显著性,p53 基因突变在 NHL 的发展演变中可能起重要作用,有助于恶性程度和预后的判断[12]。我们的研究显示:30 例原发性肠淋巴瘤中 p53 基因缺失在 B 细胞淋巴瘤与 T 细胞淋巴瘤中发生率无明显差异;但非 MALT 淋巴瘤中 p53 基因缺失的比例明显高于 MALT 淋巴瘤组;Ⅲ~Ⅳ期组患者 p53 基因缺失的比例明显高于Ⅰ~Ⅱ期组,p53 基因缺失患者的平均生存期明显短于 p53 基因正常者。提示 p53 基因的缺失可能参与了肠淋巴瘤的进展,MALT 淋巴瘤生物学行为相对惰性、进展慢,p53 基因的缺失率低,而其它病理类型的肠淋巴瘤恶性程度相对高,则 p53 基因的缺失率高。p53 基因缺失在临床分期晚的患者常见,这是预后不良的因素。p53 基因缺失的肠淋巴瘤预后差。黄波等[13]报道儿童 NHL p53 蛋白表达阳性细胞百分率是判断其恶性程度、疗效及预后较可靠的参数,p53 蛋白表达检测对中高度恶性儿童 NHL 的诊断有参考价值。但亦有研究报道儿童 NHL p53 蛋白的表达与患者的临床、病理因素间的差异均无统计学意义[14]。目前儿童原发性肠淋巴瘤中 p53 变异的相关报道少见,我们的研究中儿童病例数少,因此有关儿童原发性肠淋巴瘤中 p53 变异与预后的关系尚需进一步积累资料以行深入研究。

13q14 缺失是目前研究最多的染色体结构异常, 是 B-CLL 最常见的染色体异常[15],D13S25 是表示在 13q14.3 上唯一一个编号为 25 的 DNA 片段,它是用于检测 13q14 缺失的 DNA 片段[16]。本研究发现 30 例原发性肠淋巴瘤中 13q14 缺失的发生率为 40.0%,而 10 例淋巴结反应性增生患者未发现 13q14 缺失,两者有显著性差异,说明 13q14 染色体缺失也是原发性肠淋巴瘤肿瘤发生的重要因素之一。原发性肠淋巴瘤中 13q14 缺失与病变的部位、患者年龄、病理类型、临床分期以及预后的关系不大。表明 13q14 缺失在 PGIL 预后方面不是起重要作用的染色体改变。

p53 基因缺失或者 p53 基因缺失合并 13q14 缺失变异是原发性肠淋巴瘤恶性程度高的标志之一,此类病人宜早期采用联合化疗方案治疗,以期获得较好疗效。

[参 考 文 献]

[1] Hammer GP, Seidenbusch MC, Schneider K, Regulla DF, Zeeb H, Spix C, et al. A cohort study of childhood cancer incidence after postnatal diagnostic X-ray exposure[J]. Radiat Res, 2009, 171(4):504-512.

[2] Krol AD, le Cessie S, Snijder S, Kluin-Nelemans JC, Kluin PM, Noordijk EM. Primary extra nodal non-Hodgkin′s lymphoma (NHL): the impact of alternative definitions tested in the Comprehensive Cancer Centre West population-based NHL registry[J]. Ann Oncol, 2003, 14(1):131-139.

[3] 尹丽霞,张伟京. B 细胞非霍奇金淋巴瘤重要相关基因的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 2006, 33(3):174-177.

[4] 张恒,罗春英,许 洁,邓飞. p53 基因突变与非霍奇金淋巴瘤病因学关系研究[J]. 现代医药卫生,2008, 24(9):1268-1269.

[5] Dawson IM, Cornes JS, Morson BC. Primary malignant lymphoid tumours of the intestinal tract. Report of 37 cases with a study of factors influencing prognosis[J]. Br J Surg, 1961, 49(7):80-89.

[6] 赵宝玉,边大鹏,汪欣,汤坚强,万远廉,刘玉村. 原发性胃肠道淋巴瘤的诊断与治疗[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2007, 14(5):446-449.

[7] Musshoff K. Clinical staging classification of non-Hodgkin′s lymphomas[J]. Strahlentherapie, 1977, 153(4):218-221.

[8] 景红梅,克晓燕,董菲. 49 例 MALT 淋巴瘤临床资料分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(6):1293-1296.

[9] Ye H, Liu H, Raderer M, Chott A, Ruskone-Fourmestraux A, Wotherspoon A. High incidence of t(11; 18)(q21; q21) in Helicobacter pylori-negative gastric MALT lymphoma[J]. Blood, 2003, 101(7):2547-2550.

[10] Theodoropoulos GE, Karafoka E, Papailiou JG, Stamopoulos P, Zambirinis CP, Bramis K, et al. P53 and EGFR expression in colorectal cancer: a reappraisal of ′old′ tissue markers in patients with long follow-up[J]. Anticancer Res, 2009, 29(2):785-791.

[11] 罗春英,邓飞,刘曙光. T 细胞淋巴瘤 p53 突变与其周围微卫星改变的研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(5):399-401.

[12] 罗春英,邓飞. 非霍奇金淋巴瘤中 p53 基因突变情况研究[J]. 右江民族医学院学报,2006,5(5):712-714.

[13] 黄波,郭瑞珍. 儿童非霍奇金淋巴瘤与 p53 蛋白表达的关系[J]. 贵州医药,2003,27(5): 409-411.

[14] 韩蕴丽,刘壮,韦红英,李树全. p16 和 p53 蛋白在儿童非霍奇金淋巴瘤的表达[J]. 广西医学, 2008, 30(7):957-959.

[15] Xu W, Li JY, Pan JL, Qiu HR, Shen YF, Li L. Interphase fluorescence in situ hybridization detection of cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia[J]. Int J Hematol, 2007, 85(5):430-436.

[16] Brito-Babapulle V, Baou M, Matutes E, Morilla R, Atkinson S, Catovsky D. Deletions of D13S25, D13S319 and RB-1 mapping to 13q14.3 in T-cell prolymphocytic leukaemia[J]. Br J Haematol, 2001, 114(2):327-332.

(本文编辑:吉耕中)