

分化抑制因子 1 蛋白和基因在弥漫大 B 细胞淋巴瘤的表达及意义*

任明强¹,袁 钟¹,苏 俊²

(遵义医学院附属医院:1 血液科;2. 病理科,贵州遵义 563003)

[摘要] **目的** 观察弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)组织中分化抑制因子 1(Id1)蛋白以及骨髓细胞中 Id1 基因的表达水平,探讨 Id1 在评价 DLBCL 患者病情及预后的临床意义。**方法** 收集 2011 年 10 月至 2014 年 10 月该院收治的初治 DLBCL 患者 40 例为观察组,同期淋巴结反应性增生(RH)的初治患者 25 例为对照组。采用免疫组织化学 SP 法分别检测 Id1 在 DLBCL 组织和 RH 组织中的表达水平;采用 RT-PCR 法分别检测 Id1 mRNA 在两组患者骨髓细胞中的表达水平。**结果** 观察组 DLBCL 组织切片 Id1 蛋白阳性表达率为 75.00%(30/40),而对照组 RH 组织切片中 Id1 蛋白阳性表达率为 32.00%(8/25)。Id1 蛋白在观察组中表达水平明显高于对照组($P=0.001$),观察组中的 Id1 蛋白表达与患者性别、年龄无关($P>0.05$),与临床分期、乳酸脱氢酶(LDH)高低、结外器官受累情况等影响患者预后的指标有关($P<0.05$)。Id1 基因在观察组患者的骨髓细胞中表达水平明显高于对照组患者骨髓细胞(Id1 mRNA 水平 2.80 ± 0.87 vs. 1.37 ± 0.51 , $P<0.05$),且也与临床分期、LDH 高低、结外器官受累情况有关($P<0.05$)。**结论** Id1 蛋白及 Id1 mRNA 在 DLBCL 组织以及骨髓中的表达较 RH 组织均明显增高,与 DLBCL 病情预后有关,可能作为未来 DLBCL 治疗的靶点。

[关键词] 淋巴瘤,大 B 细胞,弥漫性;淋巴组织增殖性疾病;分化抑制因子 1

[中图分类号] R733.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)29-4039-03

Expression and clinical significance of Id1 and its gene in diffuse large B-cell lymphomas*

Ren Mingqiang¹, Yuan Zhong¹, Su Jun²

(1. Department of Hematology; 2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expressions and clinical significance of Id1 in diffuse large B-cell Lymphomas (DLBCL) tissue and Id1 gene in bone marrow cell. **Methods** Forty cases of DLBCL (observation group) and 25 cases of reactive lymphoid hyperplasia (control group) were included in this study which were admitted by our hospital from October 2011 to October 2014. The expression of Id1 proteins in DLBCL and reactive lymphoid hyperplasia were detected by immunohistochemical technique. The expression of Id1 genes in all patients' marrow cells was detected by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. The data were collected and analyzed by designed person. **Results** In 40 DLBCLs, the positive rate of Id1 were 75.00% (30/40), which was higher than in RHs 32.00% (8/25), with statistic difference ($P=0.001$). Id1 protein was not correlated with sex and age ($P>0.05$), but was correlated with clinical stage, LDH level and extranodal infiltration ($P<0.05$). The expression of Id1 genes in marrow cells in DLBCL was higher than in RH (Id1 mRNA level 2.80 ± 0.87 vs. 1.37 ± 0.51 , $P<0.05$), and also correlated with clinical stage, LDH level and extranodal infiltration ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of Id1 proteins and genes are much higher in DLBCL tissue and marrow and probably related to the prognosis of DLBCL. This discovery would contribute to predicting prognosis of DLBCL, which also could be a therapeutic target of DLBCL in the future.

[Key words] lymphomas, large B-cell, diffuse; lymphoproliferative disorders; inhibitor of differentiation 1

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphomas, DLBCL)作为非霍奇金淋巴瘤最为常见的亚型,占到非霍奇金淋巴瘤的 35%~40%^[1],属于侵袭性淋巴瘤。近年来,伴随对 DLBCL 发病机制研究的不断深入,人们发现在肿瘤的发生发展过程中,部分分子生物学指标可能起着关键作用。研究发现,分化抑制因子 1(Id1)能够负调控转录因子,阻止细胞的正常分化,同时促进其增殖,以及肿瘤血管的形成,与肿瘤的发生发展有关。本文采用免疫组织化学 S-P 法和 RT-PCR 法分别检测 Id1 蛋白在组织以及 Id1 基因在骨髓细胞中的表达水平,以探讨 Id1 评价 DLBCL 患者的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 10 月至 2014 年 10 月本院病理科确诊的 DLBCL 初治患者 40 例为观察组,其中男 22 例,女 18 例,年龄 19~67 岁,中位年龄 43 岁。淋巴结内原发 25 例,淋巴结外 15 例(7 例侵犯骨髓)。临床分期根据 Ann Arbor-

Colswolds 分期标准^[2], I 期 8 例, II 期 12 例, III 期 13 例, IV 期 7 例。另取同时期淋巴结反应性增生(RH)的初治患者 25 例为对照组,男 12 例,女 13 例,年龄 21~65 岁,中位年龄 46 岁。两组间性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。所有组织标本均经甲醛固定,石蜡包埋,并切取 2 μm 厚度切片。同时经患者同意后,对本研究全部 65 例患者取骨髓标本。40 例 DLBCL 患者均接受以标准 CHOP±R 方案为主的正规联合化疗。

1.2 主要试剂 Anti-Id1 抗体[EPR7098], GTVision™ III 抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒(基因科技上海有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学 SP 法 严格参照 Anti-Id1 抗体[EPR7098]以及 GTVision™ III 抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒的说明书进行操作。采用反应性淋巴结增生病理标本作为阴性对照, Anti-Id1 抗体[EPR7098]的阳性对照为已知的乳腺癌病理标本。步骤如下:切片一烤片一二甲苯 I 10 min

* 基金项目:贵州省科技厅计划项目[黔科合 J 字(2009)2175 号]。

作者简介:任明强(1977-), 硕士,副教授,主要从事恶性血液病研究。

—二甲苯 II 10min—无水乙醇—90%乙醇—80%乙醇—70%乙醇—过氧化氢 10 min—蒸馏水冲洗—柠檬酸高压修复—冷却后山羊血清封闭 20 min—Anti-Id1 抗体, 4 °C 冰箱过夜—用 PBS 冲洗(3 min×3 次)—滴加 A 液(HRP 标记聚合物)室温孵育 30 min—PBS 冲洗(3 min×3 次)—DAB 显色剂显色后, 冲洗, 苏木素复染并脱水, 烤干后封片。

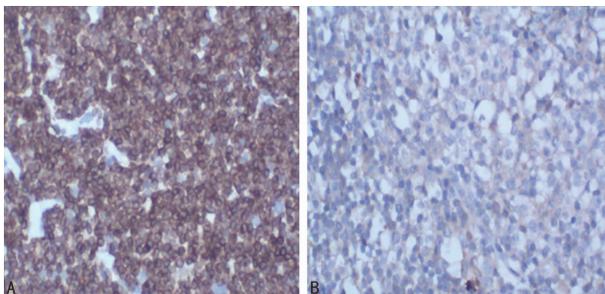
1.3.2 RT-PCR 法 根据 Genbank 中报道的人 Id1 的基因序列, 用 Primer Pre-mier5.0 软件设计 Id1 基因的引物序列。上游引物为 5'-AGG TAA ACG TGC TGC TCT ACG AC-3', 下游引物为 3'-TTG CTC ACC TTG CGG TTC T-5', 长度 91 bp。以 β -actin 为内参照, 设计特异性序列引物。上游引物为 5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3', 下游引物为 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3', 长度 186 bp。引物均由大连宝生物工程公司合成。取患者相应骨髓 5 mL, 用肝素抗凝后, 使用淋巴细胞分离液分离骨髓单个核细胞, 并计数(5~10)×10⁶ 细胞与 Trizol 总 RNA 提取液 1 mL 混匀, 冻存于 -20 °C 环境中。采用 Trizol 法一步提取骨髓单个核细胞的总 RNA。产物用 20 μ L 的 DEPC 水溶解。RNA 完整度检测用电泳法, RNA 水平和纯度的计算则用紫外分光光度计测量。提取 1 μ L 的总 RNA 构成 10 μ L 反应体系, 并参照逆转录试剂盒说明书以进行 cDNA 合成。将 cDNA 用于进一步常规 PCR 扩增。条件为: 94 °C 预变性 1 min, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 71 °C 40 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。

1.4 结果判定 免疫组织化学 SP 法结果判定参考过氧化物酶染色法的评分标准^[3], 分别对阳性细胞数量和染色强度评分。阳性细胞数: 0 分为无阳性细胞, 1 分为阳性细胞数小于 25%, 2 分为阳性细胞数 25%~50%, 3 分为阳性细胞数大于 50%; 染色强度: 0 分为无染色, 1 分为弱染色, 2 分为中染色, 3 分为强染色。阳性细胞数分值与染色强度分值之和为细胞得分。0~3 分为阴性(-), >3~<5 分为弱阳性(+), \geq 5 分为强阳性(++). RT-PCR 法结果判定则通过将 PCR 产物 10 μ L 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 同时将 100 bp Ladder 核酸分子 Marker 作对照。电泳结果通过凝胶成像分析系统进行 Id1 半定量。

1.5 统计学处理 使用 SPSS15.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用独立样本 *t* 检验。计数资料采用率表示, 用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Id1 蛋白在观察组中表达水平增高 Id1 蛋白在观察组初治患者的组织切片中表达水平增高, 阳性表达棕色颗粒见于细胞质。在对照组中, Id1 蛋白阳性表达主要分布于细胞膜、细胞质。观察组中, 40 例 DLBCL 组织切片 Id1 蛋白阳性表达率为 75.00%(30/40)。对照组中, 25 例 RH 组织切片 Id1 蛋白阳性表达率为 32.00%(8/25)。两组数据相比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 1、表 1。



A: DLBCL 中 Id1 强阳性表达; B: RH 中 Id1 弱阳性表达。

图 1 Id1 在两组中的表达 (SP×400)

2.2 Id1 蛋白与观察组患者各项临床指标相关性 根据观察组患者初诊时的性别、年龄、Ann Arbor-Colswolds 临床分期、乳酸脱氢酶(LDH)高低以及结外器官受累等临床指标进行分组, 观察 Id1 蛋白与各项指标的相关性。结果显示, 观察组 DLBCL 组织中的 Id1 蛋白与患者性别、年龄无关($P > 0.05$), 而与临床分期、LDH 高低、结外器官受累情况等影响患者预后的指标有关($P < 0.05$), 见表 2。

表 1 Id1 蛋白在两组中的表达(n)

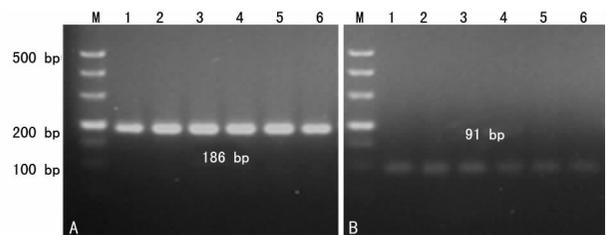
组别	n	Id1			χ^2	P
		-	+	++		
观察组	40	10	18	12	11.417	0.001
对照组	25	17	6	2		

表 2 Id1 蛋白在观察组患者按不同临床指标分组中的表达情况(n)

项目	n	Id1			χ^2	P
		-	+	++		
性别					0.135	0.503
男	22	6	9	7		
女	18	4	9	5		
年龄(岁)					0.853	0.293
>60	17	3	8	6		
\leq 60	23	7	10	6		
临床分期					7.447	0.007
I+II 期	20	9	6	5		
III+IV 期	20	1	12	7		
LDH					7.519	0.007
\leq 正常值	21	9	9	3		
>正常值	19	1	9	9		
结外器官受累*					4.302	0.038
无	25	9	13	3		
有	15	1	4	10		

*: 结外器官受累包含肺、骨、肝、骨髓。

2.3 Id1 基因在观察组患者骨髓细胞中的表达水平 Id1 在经过 RT-PCR 扩增之后, 呈 186 bp 条带, 而作为内参照的 β -actin 则呈 91 bp 条带。与对照组相比, Id1 基因在观察组患者的骨髓细胞中表达水平明显增高, 且差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 2、表 3。观察组患者骨髓细胞中的 Id1 mRNA 也与患者临床分期、LDH 高低、结外器官受累情况等指标有关($P < 0.05$), 见图 2、表 4。



M: Marker, 50~500 bp; A: Id1 基因; B: β -actin 基因; 1、2、3: DLBCL; 4、5、6: RH。

图 2 Id1 DNA 扩增产物电泳图

表 3 Id1 mRNA 在两组骨髓细胞中表达水平(±s)

组别	n	Id1 mRNA	t	P
观察组	40	2.80±0.87	9.514	0.000
对照组	25	1.37±0.51		

表 4 Id1mRNA 在观察组患者按不同临床指标分组中的表达情况

项目	n	Id1 mRNA	t	P
性别			-1.958	0.058
男	22	2.78		
女	18	2.82		
年龄(岁)			-1.588	0.121
>60	17	2.83		
≤60	23	2.78		
临床分期			-4.575	0.014
I+II期	20	2.42		
III+IV期	20	3.18		
LDH			-5.780	0.003
≤正常值	21	2.33		
>正常值	19	3.27		
结外器官受累*			-6.047	0.002
无	28	2.56		
有	12	3.37		

*:结外器官受累包含肺、骨、肝、骨髓。

3 讨论

DLBCL 作为最常见的成人侵袭性淋巴系统肿瘤,病因不明,通常对化疗反应效果佳,与利妥昔单抗联合化疗完全缓解率高,长期无病生存率为 50%~60% [2],但患者也存在治疗后耐药,甚至出现复发,严重影响了 DLBCL 患者的长期生存与预后。随着对 DLBCL 发病机制研究的不断深入,人们发现一些异常基因以及其蛋白的表达可能与淋巴瘤的发病有关,其可影响肿瘤细胞生长、分化和凋亡[3]。

Id 具有一些癌基因的属性,属于螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix,HLH) 转录因子家族的成员,包括 Id1、Id2、Id3、Id4。Id 蛋白与造血干细胞、淋巴细胞等的分化有关,影响造血系统、淋巴系统等正常的发育成熟。其中,大量研究表明 Id1 不仅参与细胞的增殖与分化,还与肿瘤的侵袭力、肿瘤的血管生成以及临床预后密切相关。关于其与前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、结直肠癌、胰腺癌等肿瘤相关性的研究已在国内外广泛展开,但 DLBCL 中关于 Id1 的研究未见报道。为明确 Id1 在 DLBCL 患者的临床意义,通过分析 DLBCL 组织中分化抑制因子 Id1 蛋白以及骨髓细胞中 Id1 基因的表达水平,结果表明 Id1 蛋白与 Id1 基因在 DLBCL 组织中与骨髓细胞中表达水平高于 RH。Id1 在其他肿瘤中存在过度增高异常表达,如肺癌、

乳腺癌、肝癌、结直肠癌等[4-5],这与本研究结果一致,分析作用机制与其通过抑制肿瘤细胞凋亡与分化、影响肿瘤细胞周期分布、诱导肿瘤细胞增殖、促进肿瘤血管新生与侵袭转移有关[6],进一步分析预后相关因素表明 DLBCL 患者组织中的 Id1 蛋白表达与患者性别、年龄无关,与临床分期、LDH 高低、结外器官受累情况等影响患者预后的指标有关,对于合并淋巴结外器官浸润、临床分期的增加、LDH 的增高 DLBCL 患者,患者 Id1 的表达也相应增加,提示 Id1 对 DLBCL 的病情预后判断可能有价值。有研究发现 Id1 与多种肿瘤的淋巴结转移、浸润范围、分化程度及临床分期相关[7-8]。这将为 DLBCL 的诊断和治疗提供新的思路,为 DLBCL 抗肿瘤药物的开发提供新的可能作用靶点,并为了解 Id1 特异性和非特异性抑制剂在肿瘤治疗的不同阶段的效果提供分子基础。

综上所述,Id1 异常高表达可能与 DLBCL 的发生发展预后有关,Id1 可能为 DLBCL 预后不良指标。但在 DLBCL 患者中 Id1 蛋白与其他蛋白互相作用的具体机制以及调控 Id1 基因表达的上游因子、下游效应子具体作用机制仍有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 葛均波,徐永健.内科学[M].北京:人民卫生出版社,2013,596-597.
- [2] 克晓燕.淋巴瘤诊疗手册[M].北京:人民卫生出版社,2010,180-181.
- [3] 沈志祥,朱熊增.恶性淋巴瘤[M].北京:人民卫生出版社,2011,57-60.
- [4] Chen D,Forootan SS,Gosney JR. Increased expression of Id1 and Id3 promotes tumorigenicity by enhancing angiogenesis and suppressing apoptosis in small cell lung cancer[J]. Genes Cancer,2014,5(56):212-225.
- [5] Gumireddy K,Li A,Kossenkov AV. ID1 promotes breast cancer metastasis by S100A9 regulation[J]. Mol Cancer Res,2014,12(9):1334-1343.
- [6] 朱博,宋超,王萍. ID1 蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 上海交通大学学报,2013,33(3):298-302.
- [7] Yang G,Zhang Y,Xiong J. Downregulation of Id1 by small interfering RNA in gastric cancer inhibits cell growth via the Akt pathway[J]. Mol Med Report, 2012,5:1075-1079.
- [8] Munipalle PC,Viswanath YK,Davis PA, et al. Prognostic value of hypoxia inducible factor 1α in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Dis Esophagus,2011,24:177-181.

(收稿日期:2015-04-15 修回日期:2015-06-16)

(上接第 4038 页)

- [11] Przepiorcka D,Kernan NA,Ippoliti C, et al. Daclizumab, a humanized anti-interleukin-2 receptor alpha chain antibody, for treatment of acute graft-versus-host disease[J]. Blood,2000,95(1):83-89.
- [12] 胡亮钉,陈虎,江岷,等. CD25 单克隆抗体在无血缘关系供者造血干细胞移植中预防急性移植物抗宿主病的临床研究[J]. 中华血液学杂志,2006,27(7):495-496.
- [13] 纪树荃,陈惠仁,王恒湘,等. G-CSF 预处理供者单倍体相合骨髓移植加用 CD25 单克隆抗体预防急性 GVHD 的临床研究[J]. 中国实验血液学杂志,2002,10(5):447-451.

- [14] 孙丽华,孟庆祥,王钧,等. 抗 CD25 单抗与抗胸腺细胞球蛋白在半相合造血干细胞移植中疗效分析[J]. 解放军医药杂志,2013,25(7):42-45.
- [15] 陈列光,罗依,胡永仙,等. 异基因造血干细胞移植后长期生存患者 CMV 感染的监测[J]. 中华医学杂志,2014,94(40):3145-3149.
- [16] 郭智,陈惠仁,刘晓东,等. 异基因造血干细胞移植后发生巨细胞病毒感染的临床分析[J]. 中国实验血液学杂志,2012,20(4):971-974.

(收稿日期:2015-04-18 修回日期:2015-07-20)