

p-AXL与c-MYC和/或BCL-2共表达在弥漫大B细胞性淋巴瘤中的临床意义

缪娜波, 黎绮铭, 李淑华, 聂钊铭, 张芬芬, 彭挺生
(中山大学附属第一医院病理科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探索磷酸化酪氨酸激酶p-AXL在弥漫大B细胞性淋巴瘤(DLBCL)中的表达情况及其临床病理意义,并进一步探讨p-AXL与c-MYC和/或BCL-2共表达的临床病理意义,及其与MYC断裂基因的临床病理联系。【方法】收集2012-2017年在中山大学附属第一医院确诊为DLBCL的病例118例,将入组的石蜡组织制作成组织芯片。免疫组化法检测DLBCL组织中p-AXL、c-MYC和BCL-2蛋白的表达;荧光原位杂交法(FISH)检测DLBCL组织中MYC断裂基因的表达情况。【结果】p-AXL蛋白在DLBCL肿瘤细胞的胞膜和/或胞质中表达;p-AXL表达与DLBCL化疗缓解呈显著性相关($P<0.01$),阳性患者化疗缓解率低于阴性患者;p-AXL表达与Hans分型显著性相关($P<0.01$),p-AXL多见于Non-GCB型;p-AXL与c-MYC、BCL-2及c-MYC/BCL-2蛋白表达均显著性相关($P<0.01$)。p-AXL/c-MYC、p-AXL/BCL-2、p-AXL/c-MYC/BCL-2蛋白共表达均与Hans分型显著性相关($P<0.01$),多见于Non-GCB型。p-AXL与患者无进展生存期(PFS)显著性相关,阳性者PFS低于阴性患者($P<0.05$);p-AXL阳性者总生存期(OS)亦低于p-AXL阴性者,但差异未达统计学意义($P>0.05$)。单变量分析显示,男性且p-AXL阳性、Non-GCB型且p-AXL阳性、p-AXL/c-MYC、p-AXL/c-MYC/BCL-2蛋白共表达均是DLBCL患者PFS和OS降低的危险因素($P<0.05$);但是,多变量分析显示,仅男性且p-AXL阳性、p-AXL/c-MYC蛋白共表达是DLBCL患者PFS和OS降低的显著性危险因素($P<0.05$; $P<0.01$)。【结论】DLBCL中p-AXL与c-MYC和/或BCL-2的表达、Hans分型、肿瘤化疗缓解率降低和PFS缩短均显著性相关;p-AXL/c-MYC共表达、男性且p-AXL阳性均可作为DLBCL的独立性预后指标。

关键词:弥漫大B细胞性淋巴瘤;p-AXL;B淋巴细胞瘤-2;c-MYC;预后

中图分类号:R733.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2020)04-0572-10

Clinical Significance of Expression of p-AXL and Co-expression with c-MYC and/or BCL-2 in DLBCL

MIAO Na-bo, LI Qi-ming, LI Shu-hua, NIE Zhao-ming, ZHANG Fen-fen, PENG Ting-sheng
(Department of Pathology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: PENG Ting-sheng; E-mail: pengtsh@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate the expression and significance of phosphorylated receptor tyrosine kinase (p-AXL) in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), and the clinical value of its co-expression with BCL-2 and/or c-MYC split gene.【Methods】Totally 118 cases of DLBCL were collected in the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University from 2012 to 2017, and prepared as tissue array. p-AXL, c-MYC and BCL-2 proteins were detected by immunohistochemistry, and c-MYC split gene was detected by FISH staining.【Results】p-AXL protein was stained on tumor cells' membrane or in the cytoplasm of DLBCL cells. p-AXL was expressed more commonly in Non-GCB type than in GCB type. The

收稿日期:2020-02-29

基金项目:国家自然科学基金(81872175);广东省科技创新战略专项资金(2018A030313361)

作者简介:缪娜波,硕士研究生,研究方向:淋巴瘤病理,E-mail: 994212891@qq.com; 彭挺生,通信作者,主任医师,博士生导师,研究方向:肿瘤病理,E-mail: pengtsh@mail.sysu.edu.cn

expression of p-AXL was significantly correlated with the chemotherapy effect ($P<0.01$), and the expression of c-MYC split gene or BCL-2 protein separately ($P<0.01$). Co-expression of p-AXL and c-MYC, or BCL-2, or both of them was significantly correlated with the Hans typing ($P<0.01$). The PFS of p-AXL positive patients was obviously lower than that of p-AXL negative patients ($P<0.05$). The OS of p-AXL positive patients was also lower than that of the negative patients, but the difference had no statistical significance ($P>0.05$). Univariate analysis showed that p-AXL and male, p-AXL and Non-GCB type, p-AXL and c-MYC co-expression, p-AXL and c-MYC and/or BCL-2 co-expression were the risk factors for PFS and OS in DLBCL patients ($P<0.05$). Multivariate analysis showed that p-AXL positive in male ($P<0.05$) and p-AXL/c-MYC co-expression ($P<0.01$) were independent risk factors for PFS and OS in DLBCL patients.【Conclusions】 p-AXL protein is expressed in DLBCL, and its expression is significantly related to the expression of c-MYC and BCL-2. p-AXL expression is associated with lower chemotherapy response rate, shorter progression-free survival and shorter overall survival. p-AXL/c-MYC co-expression or p-AXL positive in male may be an independent prognostic factor for DLBCL patients.

Key words: DLBCL; p-AXL; BCL-2; c-MYC; prognosis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2020, 41(4): 572-581]

弥漫大B细胞性淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)是最常见的成熟B细胞性肿瘤,其临床病理特征、免疫表型具有明显的异质性^[1-3];我国DLBCL发病率约占所有淋巴瘤的35.8%^[4]。根据免疫学表型DLBCL分为GCB型和Non-GCB型^[5],两种分型对靶向药物的化疗反应及患者的生存期显著不同^[6]。R-CHOP方案化疗可使DLBCL得到缓解,但仍有30%~40%患者对化疗不敏感致其生存率下降^[7];因此,寻找新的提示肿瘤治疗反应或预后的生物学标记物有重要的临床意义。受体酪氨酸激酶(Anexlekt, AXL)最早发现于慢性粒细胞白血病,AXL与肿瘤的侵袭转移密切相关,可作为生存率的预测因子^[8-9],本课题组也曾证实AXL在骨肉瘤中高表达且与预后不良呈正相关^[10],但是,目前国内外尚未有关于AXL与淋巴瘤相关性的研究。*MYC*基因可影响细胞凋亡、增殖和生长,*MYC*阳性的DLBCL预后差^[11-14],c-MYC蛋白表达对DLBCL患者的预后评估基本等同于*MYC*基因易位^[15]。研究表明c-MYC过表达可增强AXL的表达^[16],提示AXL与c-MYC之间存在调控机制。B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, *BCL-2*)基因可抑制细胞凋亡,*BCL-2*蛋白过表达是DLBCL患者预后不良的独立指标^[17-19]。c-MYC和*BCL2*蛋白双表型的DLBCL侵袭性增强、预后更差^[1,20-21]。本研究拟通过检测DLBCL组织中p-AXL、*BCL-2*、c-MYC蛋白及*MYC*断裂基因的表达水平,探索p-AXL在DLBCL中的表达情况及其临床意义,并探讨p-AXL/c-MYC、p-AXL/*BCL-2*、p-AXL/c-MYC/

*BCL-2*蛋白共表达的临床意义,以及p-AXL与*MYC*断裂基因之间的临床病理联系。

1 材料与方法

1.1 选择入组病例

本研究纳入2012年至2017年在中山大学附属第一医院确诊为原发性DLBCL的病例394例,根据以下标准筛选出118例DLBCL进行研究。入组标准:明确诊断为DLBCL;年龄>18岁;送检组织直径>1 cm。剔除标准:合并其他重大疾病,如恶性肿瘤、艾滋病、移植术后;由其它类型淋巴瘤转化而来;既往有淋巴瘤病史者。本研究经中山大学附属第一医院伦理委员会批准。所有患者均签署知情同意书。

收集上述患者的一般信息、实验室和影像学检查结果、病理形态及免疫组化和基因检测等结果、临床治疗信息及放化疗方案、疗程和疗效评价等。对所有病例进行病历记录或电话随访,结局采用无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)表示。

1.2 组织芯片的免疫组化染色

1.2.1 组织芯片制作 收集118例DLBCL患者的HE和免疫组化切片及蜡块,由两位高年资病理医师阅片,在HE切片上选择肿瘤细胞丰富的区域,并在蜡块上相应的位置标记。设计好组织芯片阵列图,使用1.0 mm采样针在蜡块标记处穿刺组织,制成组织芯片备用。

1.2.2 免疫组织化学染色 将组织芯片切成4 μm

薄片, 56 °C, 4 h; 二甲苯脱蜡 3 次×10 min; 100%、95%、80% 梯度乙醇各 10 min; 蒸馏水清洗 2 次×5 min、PBS 清洗 5 min; 柠檬酸钠/EDTA 修复液高压处理 2.5 min 后, 室温冷却 1 h; PBS 清洗 3 次; 3% H₂O₂ 溶液浸泡 10 min; PBS 清洗 3 次后封闭 1 h; 一抗 4 °C 孵育过夜, p-AXL 兔抗人多克隆抗体(美国 R&D 公司) 1:40, c-MYC 浓缩抗体(广州深达公司) 1:200, BCL-2 即用型抗体(DAKO, 丹麦); 复温后 PBS 清洗 5 次; 即用型二抗(CST)室温孵育 40 min; PBS 清洗 5 次后 DAB 显色, 苏木素复染, 冲洗, 梯度乙醇脱水, 中性树脂封片。

复习所有免疫组化片, 由两名高年资病理医师进行双盲判读, 判读不一致时讨论后统一意见。CD10、BCL-2 以肿瘤细胞膜着色为阳性表达; BCL-6、Mum-1、c-MYC 以肿瘤细胞核着色为阳性表达; 高倍镜(×400)随机挑选 10 个视野计数阳性细胞比例。阳性细胞比例≥30% 为阳性(+); 其中 c-MYC 以阳性细胞比例≥40% 为阳性(+)。p-AXL 以细胞膜或胞浆着色为阳性表达, 随机选择 10 个高倍镜视野判断阳性细胞区域及染色强度。<25% 记 1 分, 25%~50% 记 2 分, 51%~75% 记 3 分, >75% 记 4 分。染色强度判定: 无染色记 0 分, 染色稍高于背景记 1 分, 染色明显高于背景记 2 分, 强染色记 3 分。将两次得分相乘, 得分 0~1 分为阴性(-), 2~3 分为弱阳性(+), 4~6 分为阳性(++), 7~8 分为强阳性(+++)。

1.3 荧光原位杂交(FISH)

1.3.1 实验步骤 将组织芯片切成 4 μm 薄片, 56 °C, 2 h; 脱蜡, 梯度 100% 乙醇脱水; 蒸馏水洗 3 次, 用吸水纸吸取多余的水分; 双蒸水煮沸后放入切片煮 10~15 min; 蛋白酶消化, 37 °C, 10~30 min; SSC 清洗 2 次; 甲醛固定 10 min; 70% 乙醇、85% 乙醇和 100% 乙醇各 3 min。放入 56 °C 烤箱 5 min; 滴加 10 μL 探针混合物于切片上, 盖上盖玻片, 用封片胶封边; 放入杂交仪器, 设置共变性条件: 83 °C, 5 min, 杂交条件: 42 °C, 16 h; SSC 清洗 2 次; 70% 乙醇 3 min; 置于暗房自然干燥切片; 滴加 15 μL 的 DAPI 细胞核复染剂复染 15 min; 在暗房用油镜(×1000)观察切片; 阅片结束后将片子保存在 -20 °C。

1.3.2 MYC 断裂基因结果判读 参照文献的判读方法^[22], 光镜下找到肿瘤区域后转为油镜, 打开双通道观察细胞内信号。未发生基因断裂的细胞显示有 2 个融合的信号, 发生断裂的细胞显示为

1 黄 1 红 1 绿 3 个信号, 若细胞中只能观察到 1 个信号、1 黄 1 绿或 1 黄 1 红时不纳入判读范围。随机观察至少 100 个细胞, 阳性细胞比例≥15% 时记为阳性(+)

1.4 统计分析

统计分析采用 SPSS 20.0 软件, 定性资料对比采用 χ^2 检验或秩和检验; 应用 Kaplan Meier 法计算生存率及绘制生存曲线, 采用 Log Rank 检验; 单因素及多因素分析采用 Cox 回归; 定义 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 本组 DLBCL 患者的临床特征

入组的 118 例患者中, 男性占 55.1% (65/118), 女性占 44.9% (53/118); 中位年龄 57.5 岁, 发病高峰期集中在 50~60 岁之间。27.1% (32/118) 的患者起病时伴随有 B 症状, Ann Arbor 分期、淋巴瘤国际预后指数(international prognostic index, IPI) 评分等临床资料详见表 1。

2.2 本组 DLBCL 患者的随访信息

本组病例随访时间 1~85 月, 中位随访时间 23 个月, 共 86.4% (102/118) 的患者获得随访信息, 失访率 13.6% (16/118)。确诊后进行了手术或化疗, 并具有影像学资料用以评估病情发展的有 96 人, 随访结束时患者的平均生存时间(33.9±24.4)月, 平均复发和(或)死亡时间(29.2±24.2)月。49% (50/102) 的患者出现复发和(或)死亡, 且多在第一年内复发(32/50)。36.3% (37/102) 的患者死亡, 且多在第一年内死亡(23/37), 另外 63.7% (65/102) 的患者仍存活, 最长生存时间超过 85 个月。

2.3 本组 DLBCL 临床病理分型

本组病例 Hans 分型如图 1 所示, Hans 分型根据肿瘤细胞 CD10, Bcl-6 和 MUM-1 免疫组化表达情况来划分 DLBCL, CD10 阳性诊断为 GCB 型; CD10、Bcl-6 均为阴性诊断为 Non-GCB 型, 若 Bcl-6 阳性则还需结合 MUM-1 的表达情况再划分; 本组 DLBCL 病例中 GCB 型占 43.2% (51/118), Non-GCB 型占 56.8% (67/118)。

2.4 p-AXL 表达与 DLBCL 的临床病理联系

2.4.1 p-AXL, c-MYC 及 BCL-2 蛋白在本组病例中的表达 本组病例分为 GCB 组和 non-GCB 组, 其 HE 形态(HE × 400)及 p-AXL、c-MYC、BCL-2 免

免疫组化(IHC × 200)表达情况如图2。GCB型DLBCL肿瘤细胞p-AXL蛋白阳性表达量较低(图2C), non-GCB型瘤细胞p-AXL蛋白表达量较高(图2D);c-MYC在不同组织学亚型DLBCL中呈核阳性(图2E, F);不同的DLBCL组织学类型中BCL-2阳性比例及染色强度不尽相同,但均为阳性表达(图2G, H)。

2.4.2 p-AXL表达与DLBCL患者临床特征的相关性研究 p-AXL在肿瘤细胞的胞膜或胞质中表达,

阳性率44.1%(52/118),16例呈高表达。c-MYC蛋白在细胞核表达,应用 χ^2 检验统计本组实验结果,发现p-AXL表达与DLBCL患者的性别、年龄、B症状、原发部位、血清中 β 2-MG、乳酸脱氢酶(LDH)水平、Ann Arbor分期、IPI评分均无关($P>0.05$),但与患者化疗缓解率显著相关($P<0.01$),p-AXL阳性患者的化疗缓解率明显较低。p-AXL表达与DLBCL组织的Hans分型显著性相关($P<0.01$),阳性表达中73.1%(38/52)为Non-GCB型(表1)。

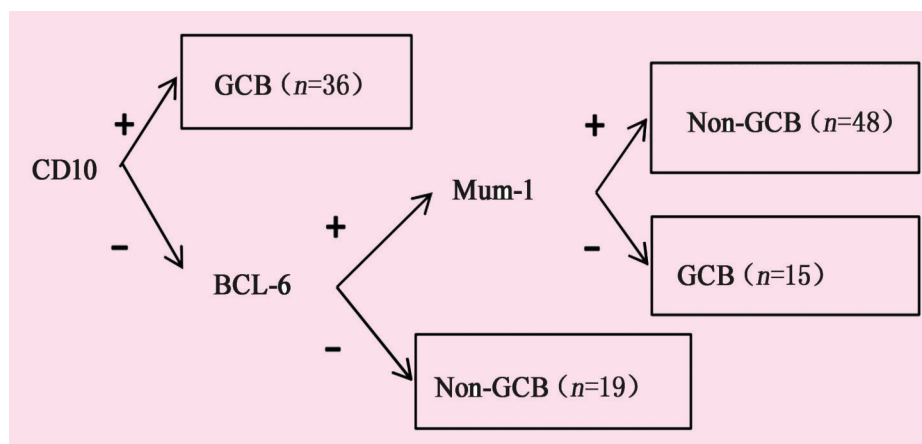
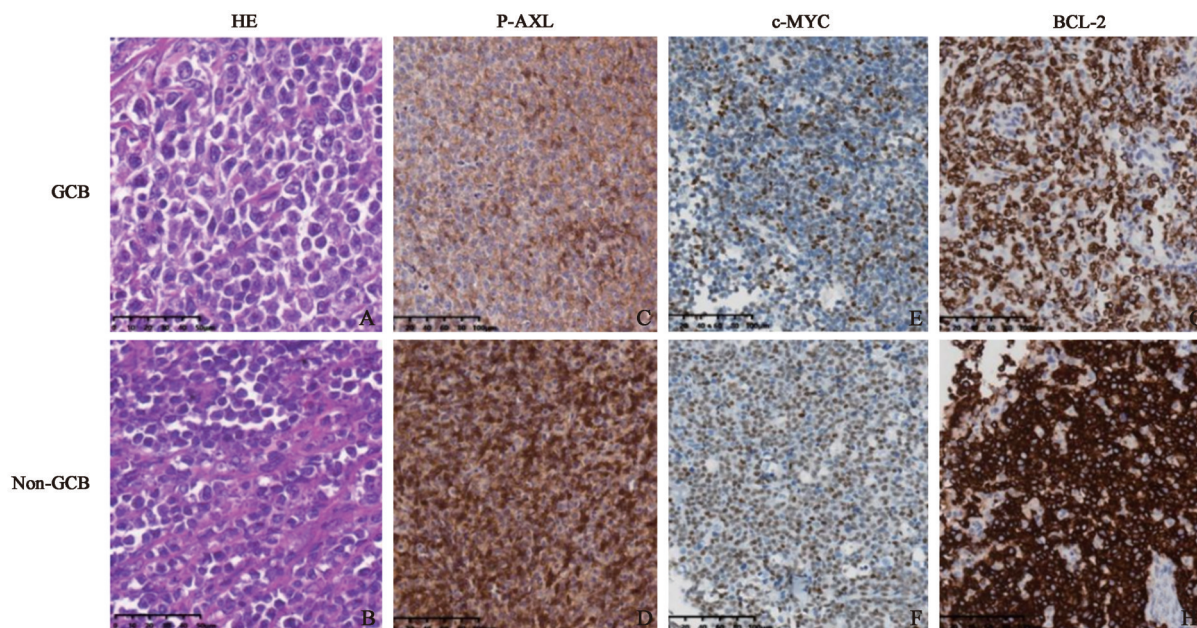


图1 本组118例DLBCL的Hans分型

Fig.1 Hans classification of 118 cases of DLBCL in this study



A-B: H&E stain, ×400; C-D: the expression of p-AXL protein, ×200; E-F: the expression of c-MYC protein, ×200; G, H: the expression of BCL-2 protein, ×200. A, C, E, G: GCB group of DLBCL; B, D, F, H: Non-GCB group of DLBCL

图2 DLBCL的组织学形态及免疫组化表达情况

Fig.2 The morphology features of the two sub-styles in this group of DLBCL

表1 p-AXL表达与DLBCL临床病理特征的关系
Table1 The relationship between the expression of P-AXL and the clinic-pathological features [n(%)]

Clinicopathological characteristics		n	The expression of p-AXL			
			positive	negative	χ^2	P
Total		118	52(44.1)	66(55.9)		
Gender	Male	65(55.1)	33(50.8)	32(49.2)	2.637	0.104
	Female	53(44.9)	19(35.8)	34(64.2)		
Age, years	<60	73(61.9)	36(49.3)	37(50.7)	2.138	0.144
	≥60	45(38.1)	16(35.6)	29(64.4)		
B symptoms	Yes	32(27.1)	16(50.0)	16(50.0)	0.627	0.429
	Non	86(72.9)	36(41.9)	50(58.1)		
Primary site	Lymph nodes	38(32.2)	18(47.4)	20(52.6)	0.248	0.619
	Extra nodes	80(67.8)	34(42.5)	46(57.5)		
LDH	Increase	61(51.7)	29(47.5)	32(52.5)	0.226	0.635
	Normal	33(28.0)	14(42.4)	19(57.6)		
β2-MG	Increase	31(26.3)	16(51.6)	15(48.4)	1.509	0.219
	Normal	28(23.7)	10(35.7)	18(64.3)		
Ann Arbor stage	I - II	55(46.6)	19(34.5)	36(65.5)	3.790	0.052
	III - IV	63(53.4)	33(52.4)	30(47.6)		
IPI score	0~2	81(68.6)	36(44.4)	45(55.6)	0.015	0.903
	3~5	37(31.4)	16(43.2)	21(56.8)		
Chemotherapy relief	CR/PR	71(60.2)	28(0.40)	43(0.60)	7.856	0.005
	SD/PD	25(21.2)	18(69.2)	7(30.8)		
Hans type	Non-GCB	67(56.8)	38(73.1)	29(43.9)	10.062	0.002
	GCB	51(43.2)	14(26.9)	37(56.1)		

B symptoms are 2 or more symptoms of fever, weight loss, and night sweats. CR: complete response; PR: partial response; SD: stable disease; PD: progressive disease; LDH: lactic dehydrogenase; β2-MG: β2-microglobulin; IPI: international prognostic index; GCB: Germinal center B-cell like; Non-GCB: Non-Germinal center B-cell like.

2.4.3 p-AXL与BCL-2或c-MYC表达的相关性研究 本组病例组织中MYC断裂基因阳性率9.7%(11/113),发生断裂的阳性细胞比例在15%~80%。p-AXL与c-MYC、BCL-2蛋白表达均显著性相关($P<0.01$);与MYC断裂基因表达未见显著相关性($P>0.05$;表2)。

2.4.4 p-AXL表达与DLBCL患者预后的相关性研究 单变量Cox回归分析发现p-AXL表达与性别($P=0.003$)、IPI评分($P=0.016$)及Hans分型($P=0.029$)等因素协同均是DLBCL患者PFS的显著影响因素;但是,多变量Cox回归(backward:LR)分析发现p-AXL表达仅与性别协同是患者PFS的独立影响因素,而p-AXL表达及其与IPI评分、Hans分

型均不是独立影响因素(表3)。

应用多变量Cox回归(backward:LR)分析,发现p-AXL表达与性别是患者OS的独立影响因素,而p-AXL与Hans分型不是独立预后影响因素(表4)。

Kaplan Meier分析显示,DLBCL患者中p-AXL阳性组的PFS率低于阴性组(Log Rank $\chi^2=6.449$, $P=0.011$),OS率亦低于阴性组,但差异尚未达到统计学意义(Log Rank $\chi^2=3.684$, $P=0.055$);其中p-AXL阴性组的3年PFS率和OS率为61.2%和69.9%,而p-AXL阳性组的3年PFS率和OS率仅41.9%和52.4%。另外,p-AXL阳性的男性患者的PFS率(Log Rank $\chi^2=7.836$, $P=0.005$)和OS率(Log Rank χ^2

表2 p-AXL与BCL-2或c-MYC表达的相关性研究
Table 2 Relationship between the expression of p-AXL and the expression of BCL-2 or c-MYC

Relevant factors	N	[n, n(%)]		χ^2	P
		p-AXL ⁺	p-AXL ⁻		
Total	118	52(44.1)	66(55.9)		
c-MYC ⁺	47	34(65.4)	13(19.7)	10.766	0.000
c-MYC ⁻	71	18(34.6)	53(80.3)		
BCL-2 ⁺	94	49(94.2)	45(68.2)	12.181	0.001
BCL-2 ⁻	24	3(5.8)	21(31.8)		
MYC gene ⁺	11	5(10.0)	6(9.5)	0.007	0.932
MYC gene ⁻	102	45(90.0)	57(90.5)		

c-MYC: cellular-myelocytomatosis proto-oncogene; BCL-2: B-cell lymphoma-2; MYC: myelocytomatosis proto-oncogene

=6.215, P=0.013)也均明显降低,其3年PFS率和OS率仅23.6%和30.0%,而女性或p-AXL阴性患者

的3年PFS率和OS率为62.6%和72.8%(图3)。

2.4.5 p-AXL/c-MYC/BCL-2蛋白共表达与DLBCL临床病理特征的相关性研究 应用 χ^2 检验统计本组实验结果,p-AXL/c-MYC/BCL-2共表达者患者的化疗缓解显著性降低(P=0.001);p-AXL/c-MYC/BCL-2蛋白共表达者与患者的Hans分型显著性相关(P=0.001),其中Non-GCB型为81.3%(26/32;表5);3种蛋白共表达与其他临床参数包括性别、年龄、B症状、原发部位、血 β 2-MG、LDH水平、Ann Arbor分期及IPI评分均无相关性(P>0.05)。

2.4.6 p-AXL与c-MYC和/或BCL-2共表达与DLBCL患者预后的相关性研究 单变量Cox回归分析发现p-AXL/c-MYC(P=0.000)、p-AXL/BCL-2(P=0.024)、p-AXL/c-MYC/BCL-2(P=0.002)蛋白共表达都是DLBCL患者PFS的危险因素;多变量Cox回归分析(backward:LR)显示只有p-AXL/c-MYC蛋白共表达是DLBCL患者PFS独立危险因素(P<0.001;表6)。

表3 52例DLBCL患者PFS的多变量Cox回归结果(1)

Table 3 Multivariate cox analysis of PFS in 52 patients with DLBCL (part 1)

Variable	b	S _b	Wald χ^2	HR	HR 95% CI	P
Gender	0.783	0.291	7.234	2.187	(1.237, 3.869)	0.007

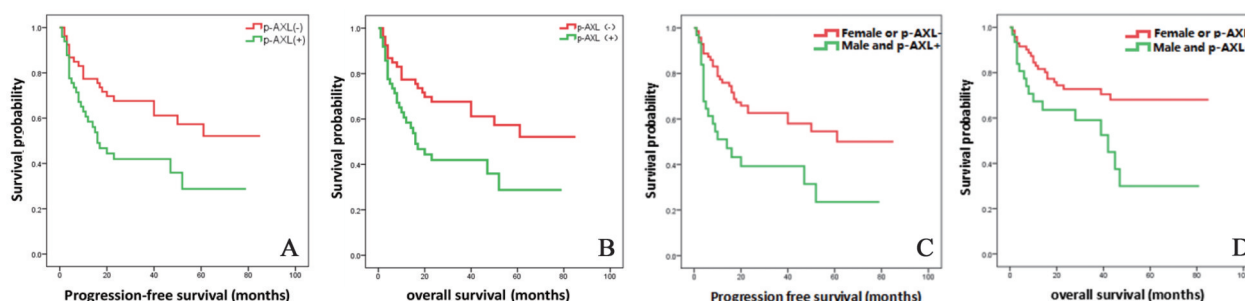
CI: confidence interval; HR: hazard ratio

表4 52例DLBCL患者OS的多变量Cox回归结果(2)

Table 4 Multivariate cox analysis of OS in 52 patients with DLBCL (part 2)

Variable	b	S _b	Wald χ^2	HR	HR 95% CI	P
Gender	0.804	0.333	5.812	2.234	(1.162, 4.295)	0.016

CI: confidence interval; HR: hazard ratio



A: DLBCL patients with positive p-AXL protein expression had shorter progression-free survival; B: DLBCL patients with positive p-AXL protein expression had shorter overall survival; C: Male DLBCL patients with p-AXL protein positive expression had shorter progression-free survival; D: Male DLBCL patients with p-AXL protein positive expression had shorter overall survival.

图3 生存曲线分析

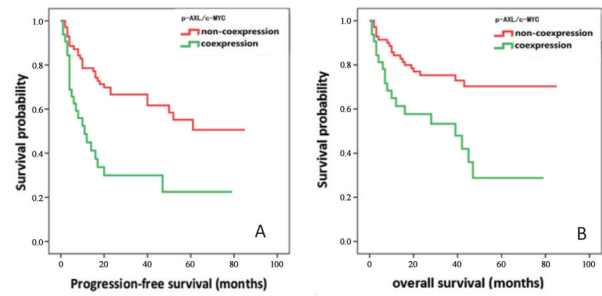
Fig.3 Survival curves of the patients

与DLBCL的PFS影响因素相类似,单变量Cox回归分析发现p-AXL/c-MYC($P=0.003$)、p-AXL/c-MYC/BCL-2($P=0.01$)蛋白共表达是DLBCL患者OS的危险因素,而p-AXL/BCL-2共表达不是患者OS的影响因素;多变量Cox回归(backward:LR)分析发现只有p-AXL/c-MYC蛋白共表达是DLBCL患者OS的独立危险因素($P=0.002$;表7)。

Kaplan Meier分析显示,p-AXL/c-MYC蛋白共表达组的PFS率(Log Rank $\chi^2=13.659, P=0.000$)和OS率(Log Rank $\chi^2=10.363, P=0.001$)明显低于非共表达组,p-AXL/c-MYC共表达患者的3年PFS率和OS率仅22.5%和28.8%,而非共表达患者的PFS率和OS率为66.6%和75.3%,明显高于共表达组的生存率(图4)。

3 讨论

非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)更常见于发达地区,发病率最高的分别是北美洲、澳洲和欧洲,最低的是加勒比地区和亚洲^[3]。



A: DLBCL patients with p-AXL/c-MYC protein co-expression had shorter progression-free survival; B: DLBCL patients with p-AXL/c-MYC protein co-expression had shorter overall survival.

图4 p-AXL/c-MYC蛋白共表达与DLBCL患者的生存曲线

Fig.4 Survival curves of patients with co-expression of p-AXL/c-MYC proteins

尽管淋巴瘤不在我国最常见的10种恶性肿瘤之内,但其死亡率仍排名第十位^[23]。DLBCL是NHL中最常见的组织学类型^[1-3],因此,对DLBCL进行更多的临床病理研究有助于深入地认识淋巴瘤的发病机制,为临床预后评估提供更多的理论依据。

表5 p-AXL/c-MYC/BCL-2蛋白共表达与DLBCL患者临床病理参数的关系

Table 5 Relationship between co-expression of P-AXL/BCL-2/c-MYC and the clinic-pathological features [n, n(%)]

Clinicopathological parameters	N	p-AXL ⁺ /c-MYC ⁺ /BCL-2 ⁺				
		Coexpression	Non-coexpression	χ^2	P	
Chemotherapy relief	CR/PR	71	14(50.0)	57(83.8)	11.780	0.001
	SD/PD	25	14(50.0)	11(16.2)		
Hans type	Non-GCB	67	26(81.3)	41(47.7)	10.714	0.001
	GCB	51	6(18.7)	45(52.3)		

CR: complete response; PR: partial response, SD: stable disease, PD: progressive disease, GCB: Germinal center B-cell like; Non-GCB: Non-Germinal center B-cell like

表6 p-AXL和c-MYC与DLBCL患者PFS的多变量Cox回归分析

Table 6 Multiple cox analysis of PFS between P-AXL and the expression of c-MYC [n(%)]

Variable	b	S _b	Wald χ^2	HR	HR95% CI	P
p-AXL ⁺ /c-MYC ⁺	1.013	0.290	12.223	2.755	1.561~4.862	0.000

c-MYC: cellular-myelocytomatosis proto-oncogene; CI: confidence interval; HR: hazard ratio

表7 p-AXL与c-MYC和/或BCL-2影响DLBCL患者OS的多变量Cox回归分析

Table 7 Multiplex analysis of OS between P-AXL and the expression of c-MYC [n(%)]

Variable	b	S _b	Wald χ^2	HR	HR95% CI	P
p-AXL ⁺ /c-MYC ⁺	1.013	0.339	9.399	2.753	1.441~5.261	0.002

c-MYC: cellular-myelocytomatosis proto-oncogene; CI: confidence interval; HR: hazard ratio

AXL蛋白阳性表达或与其他抗体联合表达是乳腺癌、肺癌及胶质母细胞瘤等^[24-26]预后不良的生物学标志物。AXL异常表达亦参与肉瘤的发生发展, Gas6激活的AXL能促进骨肉瘤细胞的迁移和侵袭^[10]。但目前国内外尚无人报道AXL与DLBCL之间的相关关系。本研究发现活化的p-AXL蛋白可在DLBCL中表达, 阳性率44.1% (52/118)。p-AXL与c-MYC蛋白、BCL-2蛋白表达显著性相关 ($P < 0.01$); 并发现p-AXL与Hans分型显著相关 ($P < 0.01$), 阳性表达中73.1% (38/52)为Non-GCB型。此外, 还发现p-AXL与DLBCL患者的化疗缓解显著相关 ($P < 0.01$), 阳性患者的化疗缓解率显著低于阴性患者。Kaplan Meier生存曲线分析显示p-AXL阳性患者的PFS率和OS率明显低于阴性患者。Cox单因素分析得出p-AXL阳性表达是影响DLBCL患者PFS的危险因素 ($P < 0.05$), 但不是影响患者OS危险因素 ($P > 0.05$)。以上结果表明p-AXL参与了DLBCL的发生发展, 与患者的化疗缓解率和PFS呈显著性负相关, 因此p-AXL蛋白有望成为评估DLBCL患者预后的新指标。

既往研究^[17-19]表明BCL-2蛋白过表达是DLBCL患者预后不良的独立指标。BCL-2蛋白阻断化疗药物诱导的细胞死亡途径, 使肿瘤细胞产生耐药性, 临床上利妥昔单抗(美罗华)提高BCL-2阳性者对化疗药物的应答率, 从而抵消BCL-2蛋白对DLBCL患者生存带来的不良影响^[20]。BCL-2在本组DLBCL中的阳性率为79.7% (90/118), 其中p-AXL/BCL-2蛋白共表达率为41.5% (49/118), p-AXL/BCL-2共表达者化疗缓解率显著性降低 ($P < 0.01$), 常见于Non-GCB型且具有显著性意义 ($P < 0.01$)。Cox单因素分析中显示, p-AXL/BCL-2蛋白共表达者患者PFS显著性降低 ($P < 0.05$), 但对患者OS无明显影响 ($P > 0.05$)。c-MYC蛋白表达和MYC基因易位亦是DLBCL患者的重要预后指标^[15]。本组DLBCL病例中p-AXL与c-MYC蛋白表达具有显著的相关性 ($P < 0.01$), 118例中有34例 (28.8%)存在p-AXL/c-MYC蛋白共表达且与Hans分型显著相关 ($P < 0.01$), 其中82.4% (28/34)为预后较差的Non-GCB型。此外, p-AXL/c-MYC蛋白共表达DLBCL患者的化疗缓解率显著性降低 ($P < 0.01$); Kaplan Meier生存曲线显示, p-AXL/c-MYC共表达亦显著性降低患者的PFS率和OS率 ($P < 0.01$)。Cox多因素回归分析证实了p-AXL/c-MYC

蛋白共表达是DLBCL患者显著的不良预后因素。

c-MYC/BCL-2蛋白共表达与DLBCL的侵袭性密切相关, 且是患者预后不良的因素之一^[20-21]。本研究中Cox单因素回归分析显示c-MYC/BCL-2、p-AXL/c-MYC、p-AXL/c-MYC/BCL-2共表达都是DLBCL患者PFS和OS的危险因素 ($P < 0.05$), 共表达组的PFS率和OS率均明显低于非共表达组 ($P < 0.05$)。将上述指标用逐步后退法(backward:LR)进行Cox多因素回归分析, 结果显示, 只有p-AXL/c-MYC共表达是患者独立的预后因素 ($P < 0.01$), 而c-MYC/BCL-2和p-AXL/c-MYC/BCL-2共表达不是患者预后的独立危险因素 ($P > 0.05$)。我们分析出现此结果可能是由于引入了p-AXL变量, 这一变量在以往DLBCL预后研究中从未被发现过, 由于p-AXL/c-MYC共表达可能对患者预后意义影响更大, 经过Cox多因素回归校正混杂因素后, 影响较小的c-MYC/BCL-2共表达不再具有统计学意义。

AXL可以通过激活AKT信号通路来介导肿瘤细胞的致癌作用或耐药性^[10, 27-28]。食管腺癌的癌细胞中AXL过表达后通过激活AKT/ β -catenin蛋白信号通路, 可以上调c-MYC的转录活性、mRNA和蛋白水平, 从而导致患者对表阿霉素产生耐药^[29]。另有文献^[16]报道肿瘤细胞通过释放活性氧可以促进Gas6分泌, 使其与受体AXL结合, 通过激活Ras/PI3K/AKT信号通路, 导致细胞中c-MYC的过表达来正向调节精氨酸琥珀酸合成酶1(ASS1)的生成, 从而合成肿瘤细胞中所需的ASS1, 同时还发现c-MYC的过表达可以反馈增强AXL的表达。综上所述, c-MYC和AXL之间并不是简单的平行关系, 两者之间可能存在信号通路相互调节的机制。我们推测在DLBCL细胞中, 过表达的AXL可能通过激活AKT或其他信号通路上调c-MYC水平, AXL和c-MYC的同时过表达可能增强DLBCL的侵袭性, 或降低了患者对化疗药物的应答率, 从而使患者的生存率下降, 其详细分子机制需要进一步的深入研究。

约10%的DLBCL中可检测到MYC易位(范围在4%~14%之间), 且更多见于GCB型患者, 此时GCB型的预后明显差于Non-GCB型^[22]。在本研究中, 113例可判读的组织中有11例MYC基因出现断裂, 阳性率9.7%, 与文献报道一致。MYC基因断裂阳性组织中GCB型为63.6% (7/11), 而Non-GCB型仅为36.4% (4/11); 11例MYC基因断裂者中9例有随访结果, 5例GCB型患者4例死亡, 而4例Non-

GCB型患者仅1例死亡,与文献所述结论基本一致,但因例数所限,本组病例中组织分型及预后的差异尚无统计学意义。本研究中p-AXL表达与MYC断裂基因共表达者仅5例,未能发现p-AXL蛋白与MYC基因断裂之间具有显著性临床病理联系。

有研究^[2,30]显示,男性DLBCL患者预后较女性差,原因之一是由于不同性别体内的化疗药物代谢率不同,男性体内血浆中的利妥昔单抗(美罗华)清除率明显快于女性。当男性使用强化剂量的美罗华时,可消除由性别引起的治疗差异^[2,31]。Kaplan Meier生存曲线显示,男性且p-AXL阳性患者的PFS率和OS率均明显低于不同时具备这两个条件的患者。Cox回归分析显示,虽然性别并不是DLBCL患者预后的影响因素,但男性和p-AXL阳性两

个因素并存却是患者PFS和OS的独立危险因素($P < 0.05$)。这一结论与文献报道的男性患者预后较女性差相一致,但还需要更深入的研究以揭示其相关分子机制。

综上所述,本研究首次发现磷酸化受体酪氨酸激酶p-AXL蛋白在弥漫大B细胞性淋巴瘤中表达,且与c-MYC、BCL-2的表达均显著性相关;p-AXL阳性表达与DLBCL患者Hans分型、化疗缓解率降低、无进展生存期及总生存期缩短显著性相关;p-AXL/c-MYC协同表达、男性且p-AXL阳性均可作为DLBCL的独立性预后指标。

致谢:本研究中组织芯片制作得到中山大学附属肿瘤防治中心病理科主任云径平教授、杨霞技师的大力支持,在此表示衷心感谢!

参考文献

- [1] Gascoyne RD, Campo E, Jaffe ES, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS[M]. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th edition Lyon: IARC Press, 2017, 291-297.
- [2] Armitage JO, Gascoyne RD, Lunning MA, et al. Non-Hodgkin lymphoma [J]. Lancet, 2017, 390 (10091): 298-310.
- [3] Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity [J]. Blood, 2015, 125 (1): 22-32.
- [4] Yang QP, Zhang WY, Yu JB, et al. Subtype distribution of lymphomas in Southwest China: analysis of 6,382 cases using WHO classification in a single institution[J]. Diagn Pathol, 2011, 6: 77.
- [5] Antonello S, Paola V, Stefano C, et al. Primary cutaneous DLBCL non-GCB type: challenges of a rare case[J]. Open Med, 2020, 15(1):119-125.
- [6] Schmitz R, Wright GW, HuangDW, et al. Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma [J]. N Engl J Med, 2018, 378(15): 1396-1407.
- [7] 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.
- [8] Zhu C, Wei Y, Wei X. AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: functions, molecular mechanisms and clinical applications [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1):153.
- [9] Zhang S, Xu XS, Yang JX, et al. The prognostic role of Gas6/Axl axis in solid malignancies: a meta-analysis and literature review [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 509-519.
- [10] Han J, Tian R, Yong B, et al. Gas6/Axl mediates tumor cell apoptosis, migration and invasion and predicts the clinical outcome of osteosarcoma patients [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 435(3): 493-500.
- [11] Ennishi D, Mottok A, Ben-Neriah S, et al. Genetic profiling of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma determines cell-of-origin-specific clinical impact[J]. Blood, 2017, 129(20): 2760-2770.
- [12] Rosenthal A, Younes A. High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6: Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma [J]. Blood Rev, 2017, 31 (2): 37-42.
- [13] Wang WG, Jiang XN, Liu ZB, et al. MYC protein-positive diffuse large B-cell lymphoma features an activated B-cell receptor signal pathway [J]. Am J Surg Pathol, 2017, 41: 541-549.
- [14] Rosenwald A, Bens S, Advani R, et al. Prognostic significance of MYC rearrangement and translocation

- partner in diffuse large B-cell lymphoma: a study by the lunenburg lymphoma biomarker consortium[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(35): 3359-3368.
- [15] Ott G, Rosenwald A, Campo E. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification [J]. *Blood*, 2013, 122(24): 3884-3891.
- [16] Tsai WB, Long Y, Park JR, et al. Gas6/Axl is the sensor of arginine-auxotrophic response in targeted chemotherapy with arginine-depleting agents[J]. *Oncogene*, 2016, 35(13): 1632-1642.
- [17] Li L, Zhang X, Zhang T, et al. Prognostic Significance of BCL-2 and BCL-6 Expression in MYC-positive DLBCL [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2018, 18(10): 381-389.
- [18] Peroja P, Pedersen M, Mantere T, et al. Mutation of TP53, translocation analysis and immunohistochemical expression of MYC, BCL-2 and BCL-6 in patients with DLBCL treated with R-CHOP [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):14814.
- [19] Tekin N, Omidvar N, Morris TP, et al. Protocol for qRT-PCR analysis from formalin fixed paraffin embedded tissue sections from diffuse large b-cell lymphoma: Validation of the six-gene predictor score [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50):83319-83329.
- [20] 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.
- [21] Teoh CS, Lee SY, Chiang SK, et al. Impact of double expression of C-MYC/BCL2 protein and cell of origin subtypes on the outcome among patients with diffuse large B-cell lymphoma: a single asian center experience[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(5): 1229-1236.
- [22] Campo E. MYC in DLBCL: partners matter [J]. *Blood*, 2015, 126(22): 2439-2440.
- [23] 陈万青,李贺,孙可欣,等. 2014年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 2018, 40(1): 5-13.
- Chen WQ, Li H, Sun KX, et al. Report of cancer incidence and mortality in china, 2014[J]. *Chin J Oncol*, 2018, 40(1): 5-13.
- [24] Tanaka K, Tokunaga E, Inoue Y, et al. Impact of expression of vimentin and axl in breast cancer [J]. *Clin Breast Cancer*, 2016, 16(6): 520-526.
- [25] Wu X, Ma W, Zhou Q, et al. AXL-GAS6 expression can predict for adverse prognosis in non-small cell lung cancer with brain metastases [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(10): 1947-1957.
- [26] Sadahiro H, Kang KD, Gibson JT, et al. Activation of the receptor tyrosine kinase axl regulates the immune microenvironment in glioblastoma [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(11): 3002-3013.
- [27] Li Y, Jia L, Ren D, et al. Axl mediates tumor invasion and chemosensitivity through PI3K/Akt signaling pathway and is transcriptionally regulated by slug in breast carcinoma [J]. *IUBMB Life*, 2014, 66(7): 507-518.
- [28] Tian Y, Zhang Z, Miao L, et al. Anexeletto (AXL) increases resistance to EGFR-TKI and activation of AKT and ERK1/2 in non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncol Res*, 2016, 24(5): 295-303.
- [29] Hong J, Maacha S, Belkhir A. Transcriptional up-regulation of c-MYC by AXL confers epirubicin resistance in esophageal adenocarcinoma [J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(12): 2191-2208.
- [30] Muller C, Murawski N, Wiesen MH, et al. The role of sex and weight on rituximab clearance and serum elimination half-life in elderly patients with DLBCL [J]. *Blood*, 2012, 119(14): 3276-3284.
- [31] Held G, Murawski N, Zeynalova S, et al. Increased rituximab (R) doses eliminate increased risk and improve outcome of elderly male patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: the SEXIE-R-CHOP-14 trial of the DSHNHL [J]. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2014, 12(8 Suppl 16): 8-9.

(编辑 余菁)