

原发不同部位的弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的基因变异谱系特点及预后差异*

华中科技大学同济医学院附属同济医院 张炜 李登举 黄丽芳 黄亮 肖敏* 周剑峰, 武汉 430030

摘要 目的:探讨原发于不同部位的弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)在基因变异谱系上的特点及其预后差异。方法:收集 302 例诊断为 DLBCL 患者的病理学资料,取活检的淋巴瘤组织进行靶向高通量测序及免疫荧光原位杂交检测,同时收集患者临床资料进行分析。结果:原发于不同部位的 DLBCL 在基因变异谱系上具有异质性。其中原发骨组织及乳腺 DLBCL 中 MYC 易位检出率显著高于其他部位 DLBCL,原发脾脏及乳腺 DLBCL 中 BCL6 易位检出率显著高于其他部位 DLBCL。绝大多数原发睾丸、中枢神经系统、玻璃体的 DLBCL 携带 MYD88 L265P、CD79B、PIM1 及 IGLL5 突变。原发皮肤组织 DLBCL 多携带 MYD88 L265P、CD79B 及 ETV6 突变。此外,原发纵隔 DLBCL 在基因突变谱系上与其他部位 DLBCL 存在显著差异。在常规治疗方案下,相比于原发结内、韦氏环、纵隔的 DLBCL,原发于胃肠道、中枢神经系统、睾丸等结外部位的 DLBCL 患者具有更低的 5 年总体生存期。结论:原发于不同部位的 DLBCL 在基因变异谱系及预后上的差异体现了其发病机制的差异,有助于人们识别 DLBCL 新的分子生物学亚类,并可以指导临床中 DLBCL 患者更精准的治疗及预后评估。

关键词 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤; 原发部位; 突变; 预后

中图分类号 R733 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20210206

Mutation pattern and prognosis of diffuse large B cell lymphoma originated from different sites ZHANG Wei, LI Deng-ju, HUANG Li-fang, HUANG Liang, XIAO Min*, ZHOU Jian-feng. Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract Objective: To study the mutational features and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) originated from different sites. Methods: The pathological data of 302 cases of DLBCL were collected. Lymphoma-associated targeted next-generation sequencing and fluorescence *in situ* hybridization study were performed on each sample. Results: DLBCL originated from different sites demonstrated heterogeneity in genetic features. MYC translocation was significantly commonly detected in DLBCL originated from the bone and breast. BCL6 translocation was more frequent in DLBCL originated from the spleen and breast. An overwhelming proportion of DLBCL originated from the testis, central nervous system, and vitreous body harbored MYD88 L265P, CD79B, PIM1, and IGLL5 mutations. Most primary cutaneous DLBCL carried MYD88 L265P, CD79B, and ETV6 mutations. In addition, primary mediastinal DLBCL had a distinct mutation pattern compared with other DLBCL cases. In terms of prognosis, patients with DLBCL originated from the gastrointestinal tract, central nervous system, and testis showed a significantly shorter 5-year overall survival than those with DLBCL originated from the lymph node, Waldeyer's ring, and mediastinum. Conclusion: The differences of genetic features and prognosis of DLBCL originated from different sites indicated the heterogeneity in pathogenesis, and provided novel insights in identifying potential distinct DLBCL entities, as well as individualized treatment and precise prognosis evaluation for patients with DLBCL.

Key words Diffuse large B cell lymphoma; Primary site; Mutation; Prognosis

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是成人最常见的淋巴组织恶性肿瘤,约占非霍奇金淋巴瘤的 30%~40%^[1]。目前临床中针对 DLBCL 的一线治疗为联合利妥昔单抗、环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、泼尼松的方案(R-

CHOP)化疗,依然有超过 30% 的患者进展为复发或难治^[2]。研究表明,DLBCL 是一组在基因水平上异质性极强的疾病,其突变谱系与肿瘤的原发部位也密切相关^[3~5]。了解原发于不同部位的 DLBCL 分子机制上的异同有助于临床医师更好地针对患者进行个体化治疗。本研究收集 302 例原发于不同部位的中国 DLBCL 患者,并对其行靶向 157 个淋巴瘤突变相关基因的高通量测序,以及 DLBCL 常见的基因

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81770211)

*通信作者:肖敏, E-mail: xiaomin@tjh.tjmu.edu.cn

易位检测,探讨原发不同部位的 DLBCL 在基因突变谱系上的差异,并结合临床资料分析其预后意义。

资料与方法

资料收集 收集 2015 ~ 2020 年华东科技大学同济医学院附属同济医院病理学诊断为 DLBCL 患者共 302 例,并回顾性分析其病理学及临床资料。所有患者均为初治,且接受了 6 ~ 8 疗程标准 R-CHOP 方案化疗。其中肿瘤侵犯中枢神经系统的 DLBCL 患者同时接受了鞘内注射以及大剂量甲氨蝶呤治疗。复发患者均视情况接受包括二线方案化疗、局部放疗、自体造血干细胞移植或细胞免疫治疗等挽救性治疗。本研究的肿瘤标本取自病理科保存的 4% 中性甲醛固定石蜡包埋 (formalin-fixed paraffin embedded, FFPE) 组织。DLBCL 的病理学分型基于免疫组织化学染色的结果,根据 Hans 等的方法分为生发中心 B 细胞样亚型 (germinal center B-cell like, GCB) 及非生发中心 B 细胞样亚型 (non-GCB)。病例诊断中部分涉及研究的内容已获华东科技大学同济医学院附属同济医院伦理委员会批准。

临床资料 收集 DLBCL 患者首诊时的年龄、性别、国际预后指数 (international prognostic index, IPI) 评分、首诊 PET-CT (positron emission tomography-computed tomography) 检查结果、首诊骨髓浸润状态、治疗及预后情况。其中仅上述所有资料完整的患者才被纳入研究。肿瘤原发部位根据 PET-CT 结果中标准摄取值最大值 (maximum of standard uptake value, SUVmax) 病灶判定。接受初治 6 ~ 8 疗程 R-CHOP 方案化疗后疾病评估根据 Lugano 分类标准判定。

基因检测方法 获取患者 FFPE 组织,用 Gene-ReadTM DNA FFPE kit (德国 Qiagen 公司) 试剂盒提取 DNA。在线设计了靶向 157 个淋巴瘤突变相关基因的编码区的高通量测序引物 (美国 Illumina 公司)。针对每个标本,提取 20 ng 基因组 DNA 并使用 Ampli SeqTM Library PLUS for Illumina 试剂盒建立测序文库。测序文库在 NextSeqTM550 平台上机,每个样本测序深度至少为 2000 ×。测序下机数据使用测序仪默认参数比对基因组序列并生成突变。其中仅筛选导致蛋白序列变异且 gnomAD 数据库 (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) 提示正常人群中位等位基因型频率 < 0.0001 的突变。最终筛选的潜在致病性突变均用 Sanger 法测序验证。

DLBCL 中常见的核型异常包括 MYC、BCL2、BCL6、IGH 等基因的易位,以及 17p 染色体区段 (含

TP53 基因) 的拷贝数变异,利用荧光原位杂交技术 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 检测 (美国 Abbott Molecular 公司),每个探针检测至少计数 200 个细胞。

统计学处理 采用 R 语言进行数据处理。组间比较根据情况相应采用非配对 *t* 检验或 Fisher 确切检验。Kaplan-Meier 法用于生存分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

研究共纳入 302 例 DLBCL,发病年龄 14.1 ~ 75.4 岁,中位年龄 49.6 岁,男女比为 1.4:1。其中原发于结内部位 143 例,原发于结外部位 159 例,见表 1。结外原发部位主要包括胃肠道、韦氏环、脾脏、中枢神经系统/玻璃体、纵隔、皮肤组织、骨、女性生殖系统、乳腺和睾丸。少见结外部位原发的 DLBCL,包括甲状腺 (5 例)、肾上腺 (4 例)、鼻腔/鼻窦 (4 例)、肾脏 (2 例)、皮下结节 (2 例)、关节/软组织 (2 例)、腮腺 (1 例)、胰腺 (1 例) 以及肺 (1 例)。原发结内患者与原发结外患者相比,前者表现为更高的男性患者比例、更低的 IPI 评分,但是在发病年龄、病理学分型、骨髓浸润的患者比例以及基于 Lugano 分类的化疗后疗效评价上两者无显著差异,见表 2。

表 1 302 例 DLBCL 患者肿瘤原发部位分布

原发部位	例
原发结内	143
原发结外	159
胃肠道	46
韦氏环	25
脾脏	12
中枢神经系统/玻璃体	10
纵隔	8
皮肤组织	8
骨	8
女性生殖系统	7
乳腺	7
睾丸	6
其他结外组织	22

基因检测方面,选取结内及每个结外部位检出率最高的 10 个突变受累基因。共有 26 个基因被纳入后续分析。本研究针对每个原发部位亚型的 DLBCL,分析其突变谱系特点。胃肠道为最常见的结外原发部位,对原发于胃肠道 DLBCL,TP53 基因变异 (含突变及 17p 缺失) 检出于超过半数 (24/46, 52%) 的病例,为该亚型最常见的基因变异,其中 10 例患者同时携带 TP53 突变及拷贝数缺失。所

表 2 原发结内与结外 DLBCL 患者的临床特征

组别	例	年龄 (岁,中位数)	性别(例)		病理分型(例)		骨髓浸润 [例(%)]
			男	女	GCB	non-GCB	
原发结内 DLBCL	143	50.7(14.2~73.4)	96	47	52	91	45(31)
原发结外 DLBCL	159	49.0(17.2~74.4)	82	77	62	97	45(28)

组别	例	IPI 评分[例(%)]			R-CHOP 方案化疗后评估[例(%)]			
		0~1 分	2~3 分	4~5 分	CR	PR	SD	PD
原发结内 DLBCL	143	39(27)	79(55)	25(17)	58(41)	38(27)	7(4)	40(27)
原发结外 DLBCL	159	25(15)	98(61)	36(22)	58(37)	44(28)	13(8)	44(28)

注:CR:完全缓解;PR:部分缓解;SD:疾病稳定;PD:疾病进展

有 TP53 突变均位于 TP53 基因 DNA 结合结构域(第 100-300 密码子)。在其他亚型中均较为少见的 SOCS1、NFKBIE 突变在原发胃肠道 DLBCL 中较为常见(28%;20%)。对于原发骨组织 DLBCL,MYC 易位检出率 63%(5/8)的患者,且病理学分型上这 5 例患者均为 GCB 亚型,而另外 3 例患者均为 non-GCB 亚型。此外,CARD11 突变的检出率在原发骨组织 DLBCL 也显著高于原发其他部位的 DLBCL(50% vs 11%, $P < 0.05$)。对于原发韦氏环的 DLBCL,其各基因突变的检出率与原发结内 DLBCL 接近,两者绝大多数基因检出率无显著统计学差异。原发脾脏 DLBCL 最显著特点为 BCL6 易位检出率高(8/12,67%),但是其他基因突变检出率与原发结内 DLBCL 相比多无显著统计学差异。原发乳腺 DLBCL 患者中,最常见的基因变异为 IGLL5 突变(71%,且多为单基因多位点体细胞高频突变)、BCL6 易位(71%)、MYC 易位(57%),其中 29%(2/7)患者符合携带 MYC、BCL6 易位双打击的高级别 B 细胞淋巴瘤诊断。原发免疫豁免部位如睾丸和中枢神经系统的 DLBCL 患者均为 non-GCB 亚型,其中 MYD88 突变(50%;70%)、CD79B 突变(33%;30%)以及 PIM1 突变(67%;70%)均较为常见。其中所有 MYD88 突变均为 L265P 型突变,CD79B 突变均为 ITAM 结构域内 Y196 位点突变,且绝大多数 PIM1 突变为体细胞高频突变。在其他多个基因的检出率中,两者也较为接近。尽管原发皮肤 DLBCL 的患者 MYD88 突变、CD79B 突变检出率也较高(75%,且均为 L265P 型突变;50%),但是与原发睾丸即原发中枢神经系统 DLBCL 相比,PIM1、IGLL5 等累及体细胞高频突变基因的检出率明显较低,且 ETV6 突变的检出率较高(50%),提示原发皮肤与原发免疫豁免区 DLBCL 在突变谱系上不完全相同。此外,原发纵隔的 DLBCL 在突变谱系上与其他 DLBCL 明显不同,其最常见的基因变异包括 SOCS1(88%)、STAT6(75%)、TNFAIP3(75%)、B2M

(63%)、NFKBIE(50%)等,提示原发纵隔 DLBCL 在基因水平上为一独特的 DLBCL 亚型。

根据基因检测的特点,本研究将突变谱系相近的原发不同部位的 DLBCL 患者整合并进行生存分析。包括以下几类:①原发结内/韦氏环 DLBCL;②原发胃肠道 DLBCL;③原发免疫豁免区如原发中枢神经系统/睾丸 DLBCL(以 MYD88L265P、CD79B、PIM1 突变为主);④原发纵隔 DLBCL(具有显著独特的突变谱系);⑤原发脾脏 DLBCL;⑥原发其他结外部位 DLBCL。所有患者均接受了 8 个疗程标准 R-CHOP 方案化疗,随后根据化疗缓解情况给予巩固治疗或二线化疗方案治疗,其中 25 例患者接受了自体造血干细胞移植。所有患者随访时间均大于 6 个月,中位随访时间 18.5 个月,最大随访时限为 5 年。根据生存曲线,原发结内/韦氏环 DLBCL 预后相对良好。与原发结内/韦氏环 DLBCL 相比,原发脾脏、中枢神经系统/睾丸等结外部位 DLBCL 总体生存率显著降低($P < 0.01$; $P < 0.05$),而原发纵隔和其他结外部位 DLBCL 在总体生存率上与原发结内 DLBCL 没有显著性差异($P = 0.78$; $P = 0.08$)。其中基于上述原发部位的分类是 DLBCL 在接受常规治疗下除 IPI 外另一个独立的预后影响因素之一($P < 0.05$)。

讨 论

本研究旨在揭示不同原发部位的 DLBCL 在基因组变异水平上的异同,分析其差异是否影响目前标准治疗方案下 DLBCL 患者的预后。本研究资料显示,DLBCL 的主要原发部位为淋巴结内,但是仍有超过半数患者原发结外起病。常见的结外原发部位包括胃肠道、韦氏环、脾脏、中枢神经系统/玻璃体、纵隔、皮肤组织、骨、女性生殖系统、乳腺和睾丸等。在评估原发部位时,我们并非根据患者活检部位确定,而是选择患者首诊治疗前 PET-CT 结果中显示肿瘤代谢摄取最高的部位,这可能会导致少数

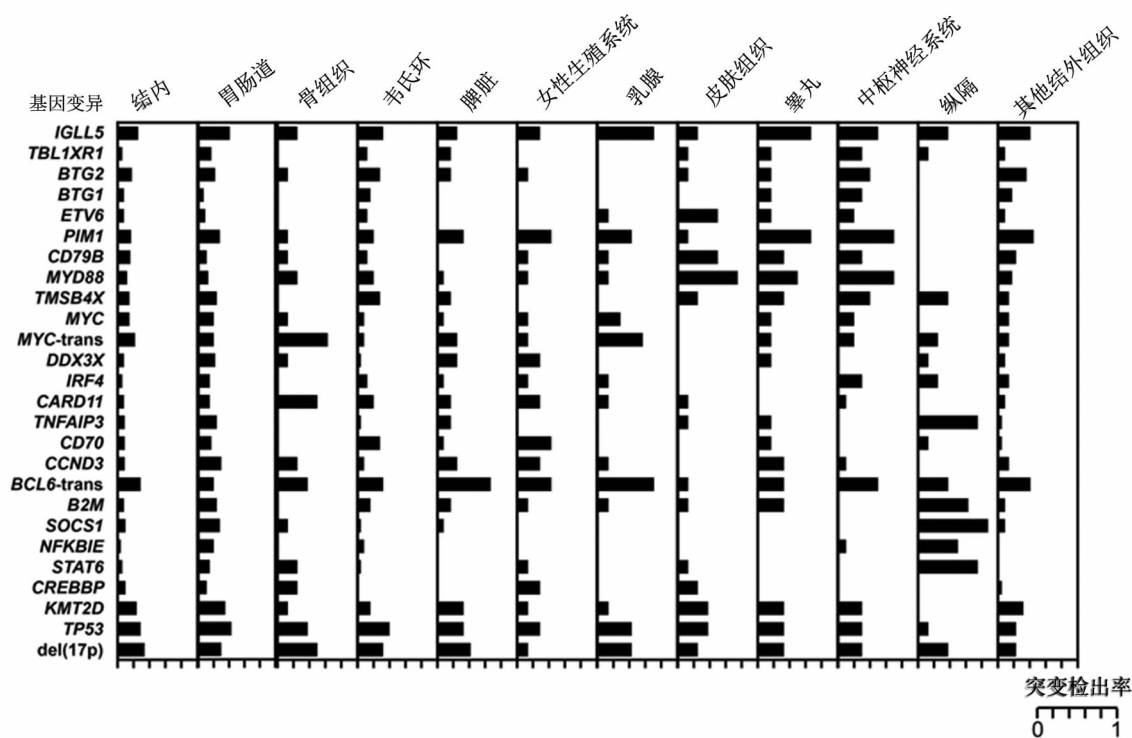
患者原发部位有出入。其中需要强调的是,原发结内 DLBCL 患者并非一定没有结外侵犯,而原发结外的 DLBCL 也可能有淋巴结受累。在比较原发结内及结外 DLBCL 临床特征时,我们发现两者在 IPI 评分上有显著差异,原发结内 DLBCL 患者具有相对更低的 IPI 评分,这可能与 IPI 评分中纳入肿瘤分期及是否存在 2 个或以上结外病灶相关。而两者在发病年龄、病理学分型以及化疗后的治疗上无显著差异,提示两者内部仍可能存在异质性,因此后续分析我们将原发结外 DLBCL 根据原发灶部位进一步细分。

本研究对所有样本行 157 个淋巴瘤相关基因的高通量测序以及 FISH 检验,并根据原发部位的不同进行对比研究,显示原发于某些特定结外部位的 DLBCL 呈现出独特的突变表型,见图 1。其中,原发于胃肠道 DLBCL 的患者其 TP53 异常的携带率明显高于其他部位患者。根据目前最新的 DLBCL 分子分型体系^[4~6],携带 TP53 基因异常的 DLBCL 多属于“A53”基因分型,此类 DLBCL 的肿瘤基因组呈高度不稳定状态,且对目前已知的治疗反应较差,患者总体生存不佳。对于原发骨组织和乳腺的 DLBCL,其 MYC 易位及 BCL6 易位的携带率较高。在诊断上,部分患者可以进一步诊断为双打击淋巴瘤,而其他患者在分子分型上更接近 Sha^[7] 和 Ennishi 等^[8] 描述的“高级别/双打击样淋巴瘤”。根据现有的报道,此类 DLBCL 预后通常较差,病理特征及疾病进程均类似伴双打击的高级别 B 细胞淋巴瘤。原发女性生殖系统的 DLBCL 中,BCL6 易位常见,且与 BCL6 易位多伴随检出的 CD70、CCND3、PIM1 等基因突变检出率均超过 20%,根据最新分类体系,其多数病例属于“BN2”分子亚型,但是国际研究对该亚型在预后意义上尚存在争议。原发脾脏 DLBCL 也多携带 BCL6 易位,但是其他与 BCL6 易位多伴随检出的基因异常如 CD70、CCND3、B2M、PIM1 等基因突变并不常见。对于中枢神经系统、角膜/玻璃体、睾丸等免疫豁免部位,本研究显示 MYD88 基因 L265P 突变、CD79B 基因 ITAM 结构域突变以及 PIM1 体细胞高频突变常见,均超过 50%。本文测序结果与之前报道相符,并提示此类患者根据最新分类体系多为“MCD”亚型,此类患者存在较高的远期复发率及较严重的结外侵犯,在目前的治疗方案下通常预后较差^[9,10]。由于该亚型的发病多与 B 细胞受体-核因子 κ B 通路组成性激活相关,布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂等药物可能对此类患者具有潜在的

获益。对于原发纵隔的 DLBCL,其突变特点与其他 DLBCL 相比存在明显的差异。本研究中原发纵隔的 DLBCL 常见的基因变异包括 SOCS1、STAT6、TNFAIP3、B2M 以及 NFKBIE 突变。其中 PD-L1 基因异常也常见于原发纵隔 DLBCL,但本研究并未对此基因变异进行检测。原发纵隔 DLBCL 其突变在谱系上更接近经典型霍奇金淋巴瘤而非常规的 DLBCL,这一结论与病理学上的发现也相符^[11]。此外,国外研究中报道的“EZB”分子分型中的特异性基因变异,如 BCL2 易位、EZH2 突变在本研究中较少检出,且在原发各结外部位的 DLBCL 中其检出率均为未超过 10%,这可能与中国 DLBCL 患者中“EZB”分子亚型较少相关^[3,12~14]。本文发现,几乎全部同时携带 BCL2 易位和 EZH2 突变的患者均为原发结内的 DLBCL。根据 2016 年世界卫生组织分类体系,原发于部分结外部位的 DLBCL 已经划分为独立的疾病实体,包括原发纵隔大 B 细胞淋巴瘤,原发中枢神经系统大 B 细胞淋巴瘤以及原发皮肤的大 B 细胞淋巴瘤(腿型)等^[1]。

本文对原发不同部位的 DLBCL 进行生存分析发现,原发结内的 DLBCL 具有更长的总体生存期,预后更好,见图 2。而对于原发结外的 DLBCL 而言,原发于胃肠道、中枢神经系统、睾丸等部位的 DLBCL 患者预后更差,这可能与此类患者多为“A53”、“MCD”等预后不良亚型相关。其中,尽管原发中枢神经系统的 DLBCL 在 R-CHOP 治疗方案的基础上还接受了局部放疗、鞘内注射甲氨蝶呤或大剂量甲氨蝶呤治疗,但是其总体预后仍未改善,这提示部分 DLBCL 亚型除了肿瘤本身的生物学行为外,其是否原发于中枢神经系统或其他重要脏器对于 DLBCL 的治疗及预后仍是重要的评估因素。尽管本研究中未根据患者的 IPI 评分等因素进行生存分析的校正,但是我们依然发现原发部位的不同是 DLBCL 患者独立的预后因素之一($P < 0.05$)。

综上,本研究表明,原发于不同部位的 DLBCL 具有不同的基因突变水平上的特征,且预后也存在差异。基于高通量测序及 FISH 检测的基因水平的研究对于 DLBCL 患者个体化治疗具有较大帮助。尤其对于缺乏检测条件的患者,基于原发部位的分型判断有助于患者的精准医疗及预后评估。随着人们对 DLBCL 发病机制的进一步研究,更多的独特表型的亚分类实体也可能被人们逐渐鉴定出来,并有助于改善 DLBCL 的诊断与治疗。



注:最左列为常见的 26 种基因变异,涵盖其中每一个不同原发部位亚类检出率最高的 10 个基因变异

图 1 302 例原发于不同部位 DLBCL 患者常见基因变异的谱系特点

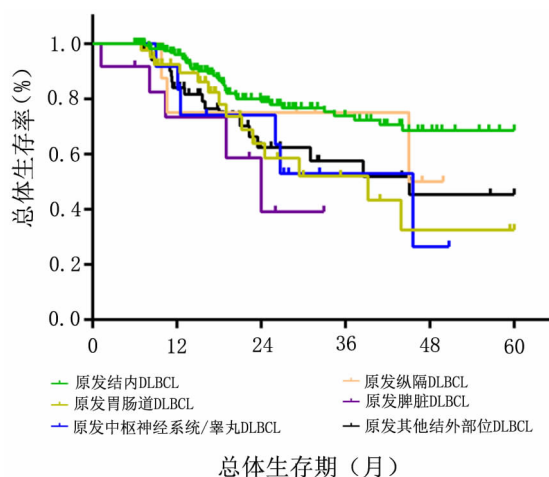


图 2 302 例原发于不同部位的 DLBCL 患者 5 年总体生存期的 Kaplan-Meier 曲线

参考文献

- 1 Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms[J]. Blood, 2016, 127(20):2375-2390.
- 2 Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma[J]. Oncogene, 2007, 26(25):3603-3613.
- 3 Reddy A, Zhang J, Davis NS, et al. Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma[J]. Cell, 2017, 171(2):481-494.
- 4 Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma[J]. N Engl J Med, 2018, 378(15):1396-1407.

- 5 Chapuy B, Stewart C, Dunford J, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes[J]. Nat Med, 2018, 24(5):679-690.
- 6 Wright GW, Huang DW, Phelan JD, et al. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications[J]. Cancer Cell, 2020, 37(4):551-568.
- 7 Sha C, Barrans S, Cucco F, et al. Molecular High-Grade B-Cell Lymphoma: Defining a Poor-Risk Group That Requires Different Approaches to Therapy[J]. J Clin Oncol, 2019, 37(3):202-212.
- 8 Ennishi D, Jiang A, Boyle M, et al. Double-Hit Gene Expression Signature Defines a Distinct Subgroup of Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma[J]. J Clin Oncol, 2019, 37(3):190-201.
- 9 Chapuy B, Roemer MG, Stewart C, et al. Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas[J]. Blood, 2016, 127(7):869-881.
- 10 Vater I, Montesinos-Rongen M, Schlesner M, et al. The mutational pattern of primary lymphoma of the central nervous system determined by whole-exome sequencing[J]. Leukemia, 2015, 29(3):677-685.
- 11 Mottok A, Hung SS, Chavez EA, et al. Integrative genomic analysis identifies key pathogenic mechanisms in primary mediastinal large B-cell lymphoma[J]. Blood, 2019, 134(10):802-813.
- 12 de Miranda NFCC, Georgiou K, Chen L, et al. Exome sequencing reveals novel mutation targets in diffuse large B-cell lymphomas derived from Chinese patients[J]. Blood, 2014, 124(6):2544-2553.
- 13 Lunning MA, Green MR. Mutation of chromatin modifiers: an emerging hallmark of germinal center B-cell lymphomas[J]. Blood Cancer J, 2015, 5(10):e361.
- 14 Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma[J]. Nat Genet, 2011, 43(9):830-837.

(2021-03-28 收稿 2021-04-12 修回)