

中国人群中弥漫性大 B 细胞淋巴瘤基于基因变异的分型及其预后意义*

张炜 沈克锋 张美兰 汪佳晨 蔡浩东 肖敏 黄亮 王瑾*

华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科, 湖北武汉 430030

摘要 目的:探讨中国弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)不同基因分型的患者在基因变异谱系上的特点及其预后差异。方法:收集 187 例初治非特指型 DLBCL 患者,行淋巴瘤相关的高通量测序及免疫荧光原位杂交检测,根据基因变异结果进行基因分型,同时收集临床资料进行分析。结果:不同基因分型 DLBCL 在基因变异谱系上具有较大异质性,其中 EZB 亚型治疗效果较好,而 A53、N1、MCD 亚型治疗效果较差。预后方面 ST2、EZB 亚型患者总体生存期显著优于 N1、A53 亚型。结论:不同 DLBCL 基因分型患者的化疗反应、总体生存期具有显著差异。DLBCL 基因分型对中国患者的治疗决策及预后评估有重大意义。

关键词 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤; 突变; 基因分型; 预后

中图分类号 R733.1

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzzz20220303

Genetic subtypes of diffuse large B-cell lymphoma in Chinese population are associated with distinct clinical outcomes ZHANG Wei, SHEN Ke-feng, ZHANG Mei-lan, WANG Jia-chen, CAI Hao-dong, XIAO Min, HUANG Liang, WANG Jin*. Department of Hematology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China

Corresponding author: WANG Jin, E-mail: wangjin_327@163.com

Abstract Objective: To study the mutation pattern and prognosis of different genetic subtype of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) in Chinese population. Method: A total of 187 DLBCL cases in our hospital were retrospectively collected. Lymphoma-associated targeted next-generation sequencing and fluorescence *in situ* hybridization study were performed and genetic subtypes were determined by the mutation pattern for each sample. The relations between genetic subtype and clinical features were further analyzed. Results: Different genetic subtypes of DLBCL demonstrated heterogeneity in genetic aberrations. Patients in EZB subgroup had more favorable response to current standard R-CHOP regimen chemotherapy than in other subgroups. On the contrary, patients in A53/N1/MCD subgroup had a poor response to the treatment. Patients in ST2/EZB subgroup had a significant longer overall survival than patients in N1/A53 subgroup. Conclusion: Different genetic subtypes resulted in different treatment response and overall survival. Genetic subtype is of great significance in the treatment decision and prognosis evaluation of DLBCL in Chinese population.

Key words Diffuse large B-cell lymphoma; Mutation; Genetical subtype; 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瘤亚型,约占非霍奇金淋巴瘤的 30%~40%^[1]。目前,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(rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone, R-CHOP)化疗。在接受 6~8 个疗程标准 R-CHOP 方案化疗后,依然有约 30%~40% 的患者复发或呈难治性疾病病程^[2,3]。因此,针对 DLBCL 发病机制进

行进一步研究以及对患者实施个体化治疗尤为重要。研究表明,DLBCL 在发病原因上累及了多种基因的突变、拷贝数异常、基因重组以及染色体水平上的变异,是一组异质性极强的疾病^[1]。目前针对 DLBCL 的分类已深入到基因水平,DLBCL 在基因水平上可分为 7 类,包括“A53”、“EZB”、“MYC + EZB”、“BN2”、“MCD”、“ST2”以及“N1”^[3-5]。不同的亚型发病机制不同,其在当前标准治疗方案下的预后也不同。本研究旨在揭示国内 DLBCL 患者群体的不同基

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No:81770211)

* 通信作者:王瑾, E-mail: wangjin_327@163.com, 湖北武汉硚口区解放大道 1095 号

因分类的分布,以及其治疗后的预后差异。

资料与方法

一般资料 回顾性收集华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科在 2017-2020 年确诊为非特指 DLBCL 全部患者。纳入标准:患者为初治,且在初次治疗时接受 6~8 个疗程的标准 R-CHOP 方案化疗;患者必须具有完整的首诊评估信息,包括国际预后指数(international prognostic index, IPI)评分、首诊正电子发射计算机断层显像(positron emission tomography-computed tomography, PET-CT)检查结果及首诊骨髓浸润状态;患者至少随访 6 个月,且在首次接受 6~8 个疗程的标准 R-CHOP 方案化疗后须行 PET-CT 及骨髓穿刺、腰椎穿刺脑脊液检查评估;患者具有可供基因检测的肿瘤组织,且肿瘤比例至少>30%。排除标准:所有进一步确诊为原发纵隔、中枢神经系统、皮肤等部位的符合 2016 年世界卫生组织(WHO)分类标准中独特亚类的 DLBCL 患者均予以排除^[1];经荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)检测符合诊断为双打击/三打击淋巴瘤,以及伴 *ALK* 或 *IRF4* 易位的大 B 细胞淋巴瘤均予以排除;经色素原位杂交(chromogenic in situ hybridization, CISH)检测为 Epstein-Barr (EB)病毒阳性予以排除;由其他惰性淋巴瘤转化的病例予以排除。本研究获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、IPI 评分、Cell-of-origin (COO)的 Han's 分类结果、首诊 PET-CT 检查结果、首诊骨髓及中枢神经系统浸润状态、首次接受 6~8 个疗程 R-CHOP 方案化疗后的治疗评估及预后情况。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)判定^[6,7]。治疗后的疾病评估根据 Lugano 分类标准判定,分为完全缓解(complete remission, CR)、部分缓解(partial remission, PR)、疾病稳定(stable disease, SD)和疾病进展(progression disease, PD)^[7]。

基因检测肿瘤标本均取自病理科保存的 4% 中性甲醛固定石蜡包埋(formalin-fixed paraffin embedded, FFPE)组织。用 GeneRead™ DNA FFPE kit 试剂盒(德国 Qiagen 公司)提取 FFPE 组织中的基因组脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)。高通量测序引物为本中心设计的靶向 157 个淋巴瘤突变相关基因的编码区(美国 Illumina 公司)。针对每个标本,提取 20 ng 基因组 DNA 并使用 AmpliSeq™

Library PLUS for Illumina 试剂盒建立测序文库。测序文库在 NextSeq™ 550 平台上机并进行初步分析处理,每个样本测序深度至少为 2 000 ×。对于生成的突变结果,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。

所有病例的肿瘤 FFPE 样本,包括 *MYC*、*BCL2*、*BCL6*、*IGH* 等基因的易位及 17p 染色体区段的拷贝数变异均利用 FISH 检测(美国 Abbott Molecular 公司)。

基因分型 根据基因检测结果以及美国国家研究所提供的网站对所有的 DLBCL 患者进行基因分型(<https://llmpp.nih.gov/lymphgen/lymphgendata-portal.php#>)。预测结果为“*A53*”、“*EZB*”、“*BN2*”、“*MCD*”、“*ST2*”及“*N1*”等 6 类中的一类。其中“*EZB*”亚型病例中合并 *MYC* 易位的进一步细化更改为“*MYC* + *EZB*”亚类。另外不属于以上 7 类中任意一类的 DLBCL 视为“其他分类”(“Other”)。

统计学分析 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

临床特征 研究共纳入 187 例非特指 DLBCL,均为本课题组既往研究病例^[8]。发病年龄 14.1~75.4 岁,中位年龄 52.1 岁,男女比为 1.4:1。其中原发于结内部位 99 例,原发于结外 88 例,包括胃肠道 30 例、韦氏环 22 例、脾脏 8 例、骨组织 5 例、女性生殖系统 5 例、肾上腺 4 例、乳腺 3 例、鼻腔/鼻窦 3 例、甲状腺 2 例、其他结外部位 6 例。在分层方面,IPI 评分为低危(0~1 分)45 例,中危(2~3 分)105 例,高危(4~5 分)37 例。其中骨髓浸润 48 例,中枢神经系统浸润 17 例。在 Cell-of-origin 病理分类方面,属于生发中心 B 细胞样(germinal center B-cell-like, GCB)亚型 57 例,属于非 GCB(non-GCB)亚型 130 例。

DLBCL 基因变异特征 对 187 例 DLBCL 患者进行基因检测,从突变谱系上来说,检出率最高的为 *BCL6* 易位(64/187, 34%)、del(17p)(60/187, 32%)、*TP53* 突变(57/187, 30%)、*IGLL5* 突变(55/187, 29%)及 *PIMI* 突变(45/187, 24%),见图 1。其中与 nonGCB 亚型比较,GCB 亚型中最具特异性检出的基因变异包括 *BCL2* 易位(*P* < 0.001)、*CREBBP*

突变 ($P < 0.001$)、*CD83* 突变 ($P = 0.004$)、*GNAI3* 突变 ($P = 0.006$) 及 *SOCS1* 突变 ($P = 0.006$)；与 GCB 亚型比较, non-GCB 亚型中最具特异性检出的基因变异包括 *CD79B* 突变 ($P < 0.001$)、*BCL6* 易位 ($P = 0.005$)、*PIM1* 突变 ($P = 0.015$)、*IRF4* 突变 ($P = 0.024$) 及 *KLF2* 突变 ($P = 0.048$)。其中从集性突变(例数 > 3) 热点包括 *MYD88* 基因 L265P 突变(20 例)、*CD79B* 基因 Y196 位点错义突变(19 例)、*NFKBIE* 基因 Y254 位点移码突变(10 例)、*STAT6* 基因 D419 位点错义突变(7 例)、*TP53* 基因 R175 位点错义突变(7 例)、*TP53* 基因 G245 位点错义突变(例 6)、*TP53* 基因 R273 位点错义突变(5 例)、*NOTCH1* 基因 P2514 位点移码突变(4 例)、*EZH2* 基因 Y646 位点错义突变(4 例)、*B2M* 基因起始密码子突变(4 例) 及 *CCND3* 基因 P284 位点错义突变(4 例)。

基于基因变异的 DLBCL 分型 此外本研究中 对 187 例 DLBCL 进行基因分型, 分型例数由多到少依次为 BN2 亚型(22%, 41/187)、EZB 亚型(9%, 17/187)、MCD 亚型(8%, 15/187)、A53 亚型(8%, 14/187)、ST2 亚型(6%, 11/187) 和 N1 亚型(2%, 4/187), 见图 2。其中不存在 MYC + EZB 的患者。另外不能归于已知的 7 类分子亚型的病例数一共 85(45%) 例。对于其中每个基因分型中最常见的 3 个基因变异, BN2 亚型中为 *BCL6* 易位(93%, 38/41)、*PIM1* 突变(32%, 13/41) 和 *KLF2* 突变(29%, 12/41); EZB 亚型为 *BCL2* 易位(82%, 14/17)、*CREBBP* 突变(65%, 11/17) 和 *KMT2D* 突变(47%, 8/17); MCD 亚型为 *PIM1* 突变(80%, 12/15)、*CD79B* 突变(73%, 11/15) 和 *MYD88* 突变(67%, 10/15); A53 亚型为 *del(17p)* (93%, 13/14)、*TP53* 突变(9/14, 64%) 和 *MEF2B* 突变(29%, 4/14); ST2 亚型为 *SGK1* 突变(64%, 7/11)、*STAT3* 突变(55%,

6/11) 和 *TET2* 突变(45%, 5/11); N1 亚型为 *NOTCH1* 突变(100%, 4/4)、*del(17p)* (50%, 2/4) 和 *TP53* 突变(50%, 2/4)。

不同基因分型 DLBCL 的预后差异 针对 187 例中国初治 DLBCL 患者, 本文分析了在首次接受 6~8 个疗程 R-CHOP 方案化疗后, PET-CT 结果评估的疾病治疗效果, 见图 3。其中, EZB 亚型患者疗效普遍较好, 47% (8/17) 患者获得 CR, 71% (12/17) 患者获得 CR 或 PR。而 N1、MCD 和 A53 亚型患者疗效普遍较差, 治疗后 PD 的患者分别占 100% (4/4)、47% (7/15) 和 43% (6/14)。同时, 本文对所有患者进行生存期随访, 所有患者随访时间均 > 6 个月, 中位随访时间为 25.1 个月。在未经过 IPI 评分等因素校正, 同时也未考虑后续治疗上的差异时, 单独分析基因亚型对预后的影响, 其中 ST2、EZB 等亚型的总体生存期显著优于 N1、A53 等亚型 ($P < 0.01$), 而 MCD、BN2、Other 等亚型的总体生存期则介于两者之间, 见图 4。

讨 论

本研究旨在揭示不同基因分类的中国 DLBCL 患者在突变谱系上的差异, 以及研究不同基因亚型是否与患者对当前化疗的治疗反应及总体预后相关。此前, 人们已经意识到 DLBCL 是一类具有极强异质性的疾病群体。2000 年, Alizadeh 等^[9,10] 根据 DLBCL 的表达谱特点, 将 DLBCL 分为 GCB 亚型、活化 B 细胞样(activated B-cell like, ABC) 亚型, 以及不属于两者的不能分类亚型, 并发现 GCB 与 ABC 亚型的 DLBCL 在预后上具有显著差异。这是人类首次对 DLBCL 进行的亚分型工作, 但是因为检测与分析难以推广, 所以限制了其在临床上的应用。2004 年, Hans 等^[11] 通过免疫组织化学的方法, 将 DLBCL 分为 GCB 和 non-GCB 两个亚型, 并与基因

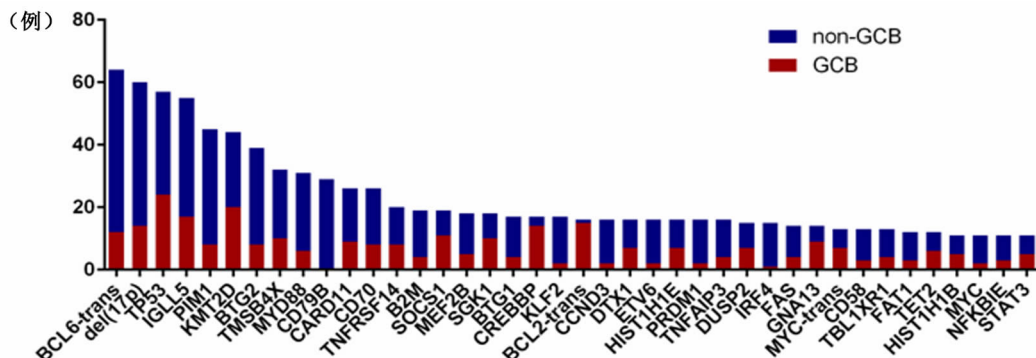


图1 DLBCL 中各基因变异的检出率

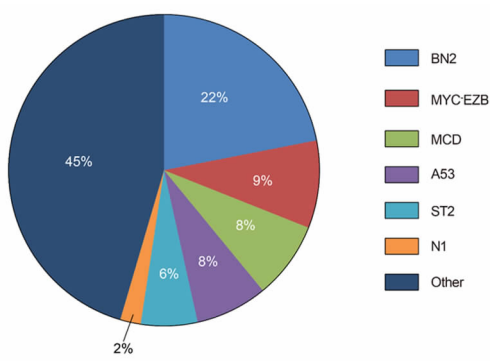


图2 不同基因分型的DLBCL患者例数分布

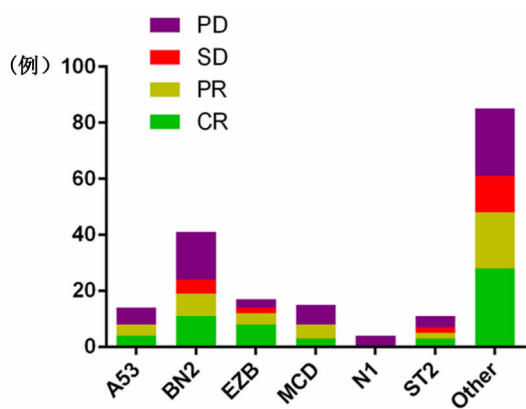


图3 同基因亚型DLBCL在接受6-8个疗程R-CHOP方案化疗后的治疗效果评估

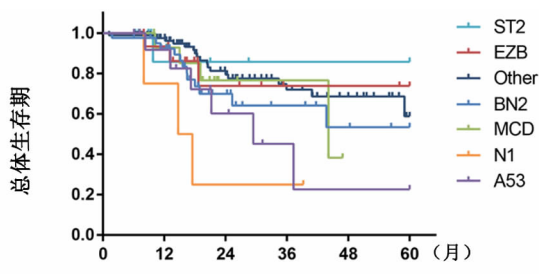


图4 不同基因亚型DLBCL患者在接受6-8个疗程R-CHOP方案化疗及必要时二线治疗下的总体生存期

表达谱结果具有较大一致性,使得这一分类体系能够大面积推广到临床日常检测中。随着下一代测序技术的发展,人们陆续发现DLBCL中具有许多重现性的染色体变异、基因突变、基因拷贝数变异,并与DLBCL的发病相关^[12~17]。2018年,Schmitz等^[5]首次利用基因异常的特征将DLBCL分为EZB、BN2、MCD、N1四类,并展示出四类DLBCL在预后上具有显著差异,此为DLBCL分类领域的里程碑式的工作。随后,Chapuy等^[3]也提出将DLBCL分为5类。最终,综合以上分类体系,Wright等^[4,18,19]对2018

年提出的分类进行了完善,将DLBCL基因分型分为7类,即A53、BN2、MYC + EZB、EZB、MCD、N1、ST2。需要强调的是,这7类并不代表全部的DLBCL,根据Wright等的数据,只占到60%~70%的DLBCL。本研究中,约55%患者按照以上7分类的方法可分为其中特定的一类,不同亚类的分布比例与国外数据基本相符,但是BN2亚类的患者更多、EZB和MCD患者相对更少,这可能与中国DLBCL独特的亚型分布相关,也可能是单中心入选误差导致。另外由于本文剔除了部分原发中枢神经系统、玻璃体、睾丸、皮肤等部位的DLBCL,而此类特指型DLBCL多为MCD亚型,也可能是本文数据中MCD患者相对偏少的原因之一^[3]。

国外研究表明,7类DLBCL患者具有不同的预后,本研究中也对化疗反应及总体生存期进行了分析。其中在化疗反应上,EZB的治疗反应最好,接近半数接受R-CHOP方案化疗后为CR。而N1、MCD、A53亚型的治疗反应相对较差,均有40%以上的患者治疗后评估为PD。这个数据与国外数据基本吻合,体现出不同基因亚型DLBCL在面对化疗药物的压力下,其增殖、抗凋亡能力的差异。另外本文还统计了DLBCL的总体生存。其中,ST2和EZB亚型患者总体生存期显著优于其他分组,而N1、A53亚型患者显著差于其他分组。以上结论基本与Chapuy和Wright等的队列数据吻合,但是国外数据均显示MCD患者预后较差,而BN2亚型患者预后较好。在本研究中,这两类与“Other”亚型的患者并未体现出预后的差异。以上预后差异可能由以下几个原因导致,如中国患者与欧美患者群体在预后上确实存在上述差异,或是本文中心预后数据可能与单中心入选患者的偏倚相关^[20]。另外由于未对患者在接受6~8个疗程R-CHOP方案化疗后的治疗进行限制,患者后续接受的治疗方案也各不相同,部分患者后期接受了新型靶向药物治疗或是嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)免疫治疗等新型治疗方法。而国外预后数据均基于化疗等传统的治疗手段,这也是我中心的总体生存期数据与国外存在差异的原因之一。

综上所述,本研究中首次在国人DLBCL群体中展示了单中心的基因亚型的分布特点,以及不同基因亚型DLBCL的突变规律、患者的治疗响应以及总体生存。本文揭示了国人DLBCL患者根据不同的基因分类具有各不相同的治疗反应及总体生存期,为基因分型今后应用到临床或写入中国DLBCL的

诊疗指南提供了一个单中心的证据和观点。

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 Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, 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.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 Yoo KH. Staging and response assessment of lymphoma: a brief review of the Lugano classification and the role of FDG-PET/CT[J]. Blood Res, 2022, 57(S1):75-78.
- 7 Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for initial evaluation staging and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification[J]. J Clin Oncol, 2014, 32(27):3059-3068.
- 8 张炜, 李登举, 黄丽芳, 等. 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[J]. 内科急危重症杂志, 2021, 27(2):112-116.
- 9 Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling[J]. Nature, 2000, 403(6769):503-511.
- 10 Wright G, Tan B, Rosenwald A, et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(17):9991-9996.
- 11 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.
- 12 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.
- 13 de Miranda NF, 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(16):2544-2553.
- 14 Mareschal S, Dubois S, Viailly PJ, et al. Whole exome sequencing of relapsed/refractory patients expands the repertoire of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2016, 55(3):251-267.
- 15 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.
- 16 Andrades A, Álvarez-Pérez JC, Patiño-Mercu JR, et al. Recurrent splice site mutations affect key diffuse large B-cell lymphoma genes[J]. Blood, 2022, 139(15):2406-2410.
- 17 Kizhakeyil A, Zaini NBM, Poh ZS, et al. DDX3X loss is an adverse prognostic marker in diffuse large B-cell lymphoma and is associated with chemoresistance in aggressive non-Hodgkin lymphoma subtypes[J]. Mol Cancer, 2022, 20(1):134.
- 18 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.
- 19 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.
- 20 冯娟. 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的研究进展[J]. 内科急危重症杂志, 2021, 36(4):46-48.

(2022-05-02 收稿 2022-06-15 修回)

医学名词规范使用的注意事项

1. 严格运用全国科学技术名词审定委员会审定公布的名词, 不应一义多词或一词多义。
2. 未经审定公布的词语, 可选用中国医学科学院医学情报研究所最新版《中文医学主题词表(CMeSH)》、《医学主题词注释字顺表》及中医古籍出版社的《中国中医药学主题词表》中的主题词。
3. 尚无统一译名的名词术语, 于文内第 1 次出现时注明原词或注释。
4. 中西药名以最新版《中华人民共和国药典》和中国药典委员会编写的《中国药品通用名称》为准, 不得使用商品名。
5. 中药药典未收录者附注拉丁文。
6. 冠以外国人名体的征、病名等人名后不加“氏”或“s”, 如帕金森病; 若为单字名, 则保留“氏”字, 如福氏杆菌、尼氏染色(Nissl's staining)。
7. 名词术语一般应用全称, 若全称较长且反复使用, 可用缩略语或简称, 第 1 次出现时写出全称, 并加括号写出简称, 后文用简称。已通用的中文简称可用于文题, 但在文内仍应写出全称, 并注简称。
8. 中国地名以最新公布的行政区划名称为准, 外国地名的译名以新华社公开使用的译名为准。
9. 复合名词用半字线连接, 如下丘脑-垂体-肾上腺轴。
10. 英文名词除专有名词(国名、地名、姓氏、协作组、公司、会议等)首字母大写外, 其余均小写。德文名词首字母大写。