

· 临床研究 ·

弥漫大B细胞淋巴瘤中细胞分裂周期蛋白6的表达及其临床意义

李园 沈明芳 郭志琴 唐伦 郭晓璐

[摘要] 目的 探讨细胞分裂周期蛋白6(CDC6)在弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)中的表达及其预后意义。方法 选择原发DLBCL患者60例为研究组,同期取20例淋巴结反应性增生组织的患者为对照组。采用免疫组化检测并比较两组CDC6蛋白表达水平,进而分析CDC6蛋白与DLBCL临床病理特征及预后的关系。结果 研究组CDC6蛋白阳性率(56.67%)高于对照组(25.00%),差异有统计学意义($\chi^2=6.02, P<0.05$);在DLBCL组织中,非生发中心型B细胞样(non-GCB)亚型患者CDC6蛋白阳性率(71.05%)明显高于生发中心型B细胞样(GCB)亚型(31.82%),差异有统计学意义($\chi^2=8.74, P<0.05$);进一步分析预后结果显示,GCB亚型的总生存期(OS)和无进展生存时间(PFS)长于non-GCB亚型,差异均有统计学意义(χ^2 分别=13.16、12.39, P 均 <0.05);联合利妥昔单抗方案化疗患者的OS和PFS均长于未联合利妥昔单抗方案化疗患者,差异均有统计学意义(χ^2 分别=4.18、4.72, P 均 <0.05),CDC6蛋白阳性表达患者的OS和PFS短于CDC6蛋白阴性表达患者,差异均有统计学意义(χ^2 分别=6.96、7.25, P 均 <0.05)。结论 CDC6蛋白在DLBCL中的表达高于淋巴结反应性增生组织,CDC6蛋白在non-GCB亚型中的表达高于GCB亚型;CDC6蛋白阳性的DLBCL患者可能预后不良。

[关键词] 细胞分裂周期蛋白6; 弥漫大B细胞淋巴瘤; 预后; 非生发中心型B细胞样

Expression and clinical significance of CDC6 in diffuse large B-cell lymphoma LI Yuan, SHEN Mingfang, GUO Zhiqin, et al. Department of Hematology, Jiaxing First Hospital, Jiaxing 314000, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and prognostic significance of cell division cyclin 6 (CDC6) in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). **Methods** Sixty patients with primary DLBCL were selected as the study group and 20 patients with reactive lymph node hyperplasia as the control group during the same period. Immunohistochemistry was performed and the expression levels of CDC6 were compared between the two groups. The relationship between CDC6 protein and the clinicopathologic characteristics and prognosis of lymphoma was analyzed. **Results** The rate of CDC6 protein positivity was higher in the study group (56.67%) than in the control group (25.00%), with statistical significance ($\chi^2=6.02, P<0.05$). In DLBCL tissue, the percentage of positive CDC6 in patients with non-GCB subtype (71.05%) was significantly higher than that of GCB subtype (31.82%), with statistical significance ($\chi^2=8.74, P<0.05$). Further analysis of the prognosis showed that the OS and PFS of the GCB subtype were longer than those of the non-GCB subtype, and the differences were statistically significant ($\chi^2=13.16, 12.39, P<0.05$). Both OS and PFS were longer with rituximab than without rituximab chemotherapy ($\chi^2=4.18, 4.72, P<0.05$). OS and PFS were shorter in patients with positive expression of CDC6 protein than in patients with negative expression of CDC6 protein ($\chi^2=6.96, 7.25, P<0.05$). **Conclusion** The expression of CDC6 protein is higher in DLBCL than in lymph node-reactive proliferating tissue, the expression of CDC6 protein is higher in the non-GCB subtype than in the GCB subtype, and patients with CDC6 protein-positive DLBCL may have a poor prognosis.

[Key words] cell division cyclin 6; diffuse large B-cell lymphoma; prognosis; non-germinal center B-cell-like

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2022.010.008

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2019KY693)

作者单位:314000 浙江嘉兴,嘉兴市第一医院血液科
(李园、沈明芳、唐伦、郭晓璐),病理科(郭志琴)

通讯作者:李园, Email:anne_263@sina.com

弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是我国最常见的侵袭性淋巴瘤^[1],不同亚型的淋巴瘤在临床表现及转归等多方面均

存在明显异质性。细胞分裂周期蛋白6(cell division cyclin 6, CDC6)主要调节DNA复制过程中G1期向S期的起始,是细胞复制及增殖所必需的蛋白质^[2]。研究显示,CDC6在许多肿瘤组织中呈现高表达,但是具体机制尚不明确^[3]。本课题组前期研究了CDC6 mRNA在DLBCL中的表达及其意义^[4],本次研究检测了DLBCL组织中CDC6蛋白的表达情况,并初步探讨其在DLBCL中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2012年1月1日至2018年12月31日期间首诊于嘉兴市第一医院经病理组织学确诊的初治原发DLBCL患者60例为研究组,其中男性35例、女性25例;年龄19~86岁,平均年龄(64.08±11.56)岁;均符合2008年淋巴瘤组织世界卫生组织分类诊断标准^[5],临床病历及随访资料相对完整;同期取20例淋巴结反应性增生组织的患者作为对照组,其中男性12例、女性8例;年龄15~77岁,平均年龄(57.55±17.68)岁;两组性别、年龄等一般资料比较,差异均无统计学意义(P 均>0.05)。本次研究获得医院伦理委员会的批准,且术前书面形式告知患者及家属,并取得知情同意。

1.2 方法 采用免疫组化检测并比较两组CDC6蛋白表达水平,进而分析CDC6蛋白与DLBCL临床病理特征及预后的关系。

1.2.1 CDC6蛋白表达情况检测及结果判定 采用组织切片免疫组织化学染色进行检测。兔抗人CDC6单克隆抗体(ab109315)购自美国abcam公司,按步骤予以福尔马林溶液固定,石蜡包埋,4 μ m连续切片,EnVision二步法染色。每例切片随机选取5个高倍视野($\times 200$),计数500个细胞,参照免疫反应积分法进行评分^[6]。阳性百分率分4级:0分:阴性;1分:<25%;2分:25%~50%;3分:>50%。染色强度分4级:0分:不显色;1分:浅黄色;2分:棕黄色;3分:棕褐色。两分级相加,0~4分判定为阴性表达, ≥ 5 分判定为阳性表达。

1.2.2 收集DLBCL患者临床病理特征 临床资料包括:性别、年龄、乳酸脱氢酶、血红蛋白,病理类型根据Hans分型标准^[7]分为生发中心型B细胞样(germinal center B cell-like, GCB)和非生发中心型B细胞样(non-germinal center B cell-like, non-GCB),根据Ann Arbor临床分期标准分为I~IV期,参照中国弥漫大B细胞淋巴瘤诊断与治疗指南(2013年版)^[8]标准进行国际预后指数(international

prognostic index, IPI)评分。

1.2.3 预后分析 末次随访时间为2020年1月12日,随访时间13~92个月,总生存期(overall survival, OS)定义为从确诊当天至任何原因所致的死亡时间或末次随访时间。无进展生存时间(progress free survival, PFS)定义为从确诊当天至疾病复发、进展或任何原因所致的死亡时间或末次随访时间。

1.3 统计学方法 采用SPSS 17.0统计软件分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间计量资料比较采用 t 检验;计数资料比较采用 χ^2 检验。CDC6蛋白表达与DLBCL患者临床病理特征的关系采用单因素分析,通过Kaplan-Meier法绘制生存曲线,并采用Log-rank法进行比较。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组CDC6蛋白的表达情况 研究组的CDC6蛋白的阳性表达率56.67%(34/60)高于对照组25.00%(5/20),差异有统计学意义($\chi^2 = 6.02, P < 0.05$)。CDC6蛋白表达的免疫组织化学图见封二图2。

由封二图2可见,CDC6阳性着色呈棕黄色颗粒状,主要定位在细胞核或细胞质中。

2.2 DLBCL患者不同临床病理特征的CDC6蛋白的表达比较见表1

表1 DLBCL患者不同临床病理特征的CDC6蛋白的表达比较/例(%)

临床特征	n	CDC6蛋白	
		阳性	阴性
Hans分型	GCB	22 7(31.82)	15(68.18)
	non-GCB	38 27(71.05)	11(28.95)
性别	男	35 17(48.57)	18(51.43)
	女	25 17(68.00)	8(32.00)
年龄	≥ 60 岁	42 26(61.90)	16(39.10)
	<60岁	18 8(44.44)	10(55.56)
乳酸脱氢酶	>245 U/L	27 16(59.26)	11(40.74)
	≤ 245 U/L	33 18(54.55)	15(45.45)
血红蛋白	≥ 100 g/L	47 25(53.19)	22(46.81)
	<100 g/L	13 9(69.23)	4(30.77)
Ann Arbor分期	I~II期	32 17(53.13)	15(46.87)
	III~IV期	28 17(60.71)	11(39.29)
IPI评分	0~2分	45 25(55.56)	20(44.44)
	3~5分	15 9(60.00)	6(40.00)
原发部位	淋巴结内	28 14(50.00)	14(50.00)
	淋巴结外	32 20(62.50)	12(37.50)

由表1可见,在DLBCL组织中,non-GCB亚型患者CDC6蛋白阳性率明显高于GCB亚型,差异有统计学意义($\chi^2=8.74, P<0.05$),不同性别、年龄、乳酸脱氢酶、血红蛋白、疾病分期、IPI评分及原发部位的CDC6蛋白阳性率比较,差异均无统计学意义(χ^2 分别=2.24、1.56、0.13、1.07、0.35、0.09、0.95, P 均>0.05)。

2.3 不同影响因素的DLBCL患者预后分析见表2

表2 不同影响因素的DLBCL患者预后分析/月

影响因素		OS	PFS
Hams分型	GCB	81.18 ± 5.79	80.34 ± 6.22
	non-GCB	33.67 ± 5.25	22.40 ± 3.10
化疗方案	联合利妥昔单抗	63.44 ± 7.44	62.84 ± 7.76
	未联合利妥昔单抗	39.96 ± 7.03	37.31 ± 7.38
CDC6	阳性	40.75 ± 6.17	37.44 ± 6.82
	阴性	71.03 ± 7.20	70.28 ± 7.63

由表2可见,GCB亚型患者的OS和PFS长于non-GCB亚型,差异均有统计学意义(χ^2 分别=13.16、12.39, P 均<0.05);联合利妥昔单抗方案化疗患者的OS和PFS均长于未联合利妥昔单抗方案化疗患者,差异均有统计学意义(χ^2 分别=4.18、4.72, P 均<0.05),CDC6蛋白阳性表达患者的OS和PFS短于CDC6蛋白阴性表达患者,差异均有统计学意义(χ^2 分别=6.96、7.25, P 均<0.05)。

3 讨论

细胞异常增殖是肿瘤发展的核心过程,CDC6是整个细胞周期中DNA复制G1/S过程的关键调节步骤,通过正性调控DNA复制,参与组装完成“复制前复合体”^[9],控制细胞从G1期进入S期。研究认为,在G1期,CDC6在细胞核内聚集,并与复制起始复合物结合,进而启动DNA复制;进入S期,CDC6被异位至细胞质,以此确保DNA复制不被重复启动。本次研究通过免疫组化检测发现,CDC6蛋白阳性着色主要定位在细胞核及细胞质中,与既往研究相一致^[10]。

本次研究显示,DLBCL组织的CDC6蛋白阳性率较淋巴结反应性增生组织明显升高($P<0.05$),提示CDC6可能在DLBCL的发生发展中发挥重要作用。CDC6不仅是DNA复制的必需调节因子,并且在细胞周期检查点机制的激活和维持中起重要作用,CDC6过表达状态可加快肿瘤细胞增殖,并能修复肿瘤受损细胞周期,同时抑制其凋亡,进而造成肿瘤细胞失控性增殖,与肿瘤发病及进展关系密

切^[11]。Mahadevappa等^[12]研究显示,乳腺癌组织中CDC6表达上调,且CDC6高表达者预后不良。赵博超等^[13]研究发现CDC6在胃癌组织中的阳性表达水平明显升高。罗志飞等^[14]采用免疫组织法检测了结肠癌中CDC6的表达情况,发现CDC6高表达与结肠癌患者的淋巴结转移数量、临床分期及远处转移密切相关,CDC6高表达者预后不良。CDC6有望成为肿瘤治疗的新靶标,但CDC6是否参与DLBCL的发生发展,至今罕见相关研究报道。

DLBCL是一类高度异质性的侵袭性肿瘤,在发病机制、病理形态及临床表现上均有较大差异。本次研究显示,GCB亚型患者的OS及PFS均明显长于non-GCB亚型患者,联合使用利妥昔单抗方案化疗可延长患者的OS及PFS(P 均<0.05),表明non-GCB亚型预后相对较差,联合使用利妥昔单抗化疗可改善DLBCL的预后。

本次研究还发现non-GCB亚型患者的CDC6蛋白阳性率明显高于GCB亚型患者,提示CDC6蛋白可能与non-GCB型DLBCL患者的较差预后有一定关系,但是具体机制还需进一步研究。同时,本次研究还显示,CDC6蛋白阳性患者的平均OS及PFS均明显短于CDC6蛋白阴性患者(P 均<0.05),提示CDC6蛋白阳性预后不良,由此推测通过测定组织中的CDC6蛋白表达情况将利于临床诊断DLBCL,并可能为临床制定、调整治疗方案提供一定的依据。

综上所述,CDC6蛋白在DLBCL中的表达高于淋巴结反应性增生组织,CDC6蛋白在non-GCB亚型中的表达高于GCB亚型;CDC6蛋白阳性的DLBCL患者可能预后不良。通过检测CDC6蛋白的表达揭示了CDC6可能作为癌基因在DLBCL的发生发展中发挥重要作用,研究CDC6对于DLBCL的诊断及治疗均具有重大意义。但是本次研究中患者数量有限,研究结果可能存在一定的误差,后续还需扩大样本量进一步研究并综合分析。此外,未来将构建CDC6过表达和小干扰RNA慢病毒表达载体,并转染B细胞DLBCL细胞株SUDHL4,过表达或敲低CDC6的表达,初步探讨CDC6调控细胞增殖和凋亡的机制。

参考文献

- 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.

(下转第905页)

- (7):691-695.
- 3 戚建臣.浙江省危重症营养治疗的医护认知与实施状况的调查研究[D].浙江:浙江大学,2016.
 - 4 肖桂珍,李俊,苏磊.危重症患者的精准营养[J].中华危重病急救医学,2017,29(11):1052-1056.
 - 5 程伟鹤,鲁梅珊,郭海凌,等.危重症患者早期肠内营养喂养不耐受的研究进展[J].中华护理杂志,2017,52(1):98-102.
 - 6 Mackenzie SL, Zygun DA, Whitmore BL, et al. Implementation of a nutrition support protocol increases the proportion of mechanically ventilated patients reaching enteral nutrition targets in the adult intensive care unit[J]. J Parenter Enteral Nutr, 2005, 29(2):74-80.
 - 7 江利冰,张松,高培阳,等.欧洲临床营养与代谢学会ICU临床营养指南(ESPEN) [J].中华急诊医学杂志,2018,27(11):1195-1197.
 - 8 Harl R, Gerber LM, Ni Q, et al. Effect of early nutrition on deaths due to severe traumatic brain injury[J]. J Neurosurg, 2008, 109(1):50-56.
 - 9 Dickerson RN, Mitchell JN, Morgan LM, et al. Disparate response to metoclopramide therapy for gastric feeding intolerance in trauma patients with and without traumatic brain injury[J]. J Parenter Enteral Nutr, 2009, 33(6):646-655.
 - 10 呼邦传,孙仁华,吴爱萍,等.ICU内喂养不耐受与重症患者临床预后的相关研究:一项多中心、前瞻性、观察性研究[J].中华急诊医学杂志,2017,26(4):434-440.
 - 11 宫雪梅,叶向红,薛阳阳,等.重症患者早期肠内营养耐受性评估及管理方案的构建[J].中华护理杂志,2019,54(4):490-494.
 - 12 王超,王军,王斌,等.肠内营养耐受评估标准化流程管理对ICU气管切开长期机械通气患者院内感染及预后的影响[J].中华危重病急救医学杂志,2018,30(12):1173-1177.
 - 13 朱金凤,罗月,姚惠萍,等.基于信息化的肠内营养耐受性动态管理对重症病人喂养效果的影响[J].肠外与肠内营养,2020,27(2):104-108.
- (收稿日期 2022-03-12)
(本文编辑 高金莲)

(上接第897页)

- 2 Xu XW, Huang SJ, Zhang BY, et al. DNA replication licensing factor CDC6 and PLK4 kinase antagonistically regulate centrosome duplication via Sas-6[J]. Nat Commun, 2017, 8:15164.
 - 3 Cai J, Wang H, Jiao X, et al. The RNA-binding protein hur confers oxaliplatin resistance of colorectal cancer by upregulating CDC6[J]. Mol Cancer Ther, 2019, 18(7):1243-1254.
 - 4 沈明芳,李园,郭志琴,等.CDC6 mRNA在弥漫大B细胞淋巴瘤中的表达及其临床意义的研究[J].中国现代医生,2020,58(7):18-22.
 - 5 Sabattini E, Bacci F, Sagamoso C, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: An overview[J]. Pathologica, 2010, 102(3):83-87.
 - 6 樊丽娟,张健,林凡忠,等.CDC6蛋白在食管鳞状细胞癌中的表达及其意义[J].实用医学杂志,2016,32(17):2900-2902.
 - 7 Alacacioglu I, Ozcan MA, Ozkal S, et al. Prognostic significance of immunohistochemical classification of diffuse large B-cell lymphoma[J]. Hematology, 2009, 14(2):84-89.
 - 8 中华医学会血液学分会,中国抗癌协会淋巴瘤专业委员会.中国弥漫大B细胞淋巴瘤诊断与治疗指南(2013年版)[S].中华血液学杂志,2013,34(9):816-819.
 - 9 Petrakis TG, Vougas K, Gorgoulis VG. CDC6: A multifunctional molecular switch with critical role in carcinogenesis[J]. Transcription, 2012, 3(3):124-129.
 - 10 齐攀,金艳,曹兴玥,等.CDC6蛋白在乳腺癌中表达及与病理指标的关系[J].中国现代药物应用,2015,9(16):37-39.
 - 11 Hossain M, Stillman B. Opposing roles for DNA replication initiator proteins ORCL and CDC6 in control of cyclin E gene transcription[J]. Elife, 2016, 5:e12785.
 - 12 Mahadevappa R, Neves H, Yuen SM, et al. The prognostic significance of CDC6 and CDT1 in breast cancer[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):985.
 - 13 赵博超,罗芮,张佳乐,等.CDC6蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义[J].临床肿瘤学杂志,2020,25(4):301-304.
 - 14 罗志飞,黄幼生,解娜,等.结肠癌组织中CDC6大的表达及临床意义[J].临床与实验病理学杂志,2020,36(1):102-104.
- (收稿日期 2022-06-12)
(本文编辑 高金莲)