

·学科进展·

## B 淋巴瘤恶变机理研究进展

苏祖兰

(中山医科大学第三临床学院,中山医科大学附属三院,广州 510630)

**[摘要]** 通过综述 B 细胞淋巴瘤的发生发展与异常免疫反应、细胞周期失调和抗凋亡的联系,认为 B 细胞淋巴瘤是研究细胞周期失调和凋亡异常,以及肿瘤免疫的最好模式,其中的 CD4 和 IL2R 的基因变化研究在 B 淋巴瘤发病机理研究中值得受到更大重视。

**[关键词]** B 细胞淋巴瘤,CD4/IL2R,基因突变,细胞周期调控

B 细胞淋巴瘤(B-Cell lymphoma, BL)是原发于免疫系统的恶性肿瘤,既具有恶性肿瘤的共性,也有免疫系统的特征。除此之外,它在细胞周期转化失调和抗凋亡方面还有自己的独特性,因此是研究这方面问题的最好的模式。随着 WHO97 新分类的逐步推广应用,一些新亚型确定后,与细胞凋亡和周期调控有关的 BL 问题就更为突出<sup>[1-3]</sup>。笔者认为,在深入探讨和理解这种肿瘤的发病机理过程中,免疫反应中具有关键作用和地位的激活 T 细胞及其淋巴因子,尤其是 CD4 细胞及其 IL2R 与 B 细胞淋巴瘤的关系值得高度重视。

### 1 B 淋巴瘤是研究细胞周期失调的最佳模式

B 淋巴瘤是淋巴瘤中占比例最大的一个分支。在中国占 60%—70%<sup>[4]</sup>,在西方则约占 80%—90%<sup>[3]</sup>。形态学上的共性是淋巴结结构破坏的同时,有的可具有形成滤泡的能力(肿瘤性滤泡),大部分亚型的瘤细胞与其正常分化或转化状态的 B 淋巴细胞几乎没有区别。免疫表型则显示为  $\kappa$  或  $\lambda$  的单克隆性增生。分子水平检测则常显示 Ig-VDJ 基因重排;滤泡型淋巴瘤抗凋亡基因 bcl-2 过表达,外套细胞淋巴瘤则周期素 Cyclin-D1 可出现过表达<sup>[3]</sup>。因此,目前有一个已经公认的看法,B 淋巴瘤是由于 B 细胞的正常转化或分化状态被阻断在某一阶段,该阶段的 B 淋巴细胞发生了单克隆性增生

并且进一步恶变所致。Stanford 大学的 Zelenetz 等人注意到,BL 的恶性进展是由于滤泡中的某一个单细胞发生恶性克隆性扩增所致,其中多伴有明显的 CD4 细胞浸润和树突状细胞成分<sup>[5]</sup>。问题在于发生阻断的原因是什么?这种阻断是否可逆?至今仍然不清楚。笔者认为,由于 B 淋巴瘤与细胞转化过程受阻有关,它的弥漫性单克隆性增生特点就为研究细胞周期失调提供了一个非常好的模式。也为抗凋亡问题的研究提供了方便。

B 淋巴瘤的发病机理研究内容不少。取得的主要成果包括:(1)EBV, HIV 为明确的病毒病因,幽门螺杆菌可能是胃肠淋巴瘤的重要病因;(2)IgH-VDJ 基因重排(BL)和 TCR 基因重排(TL);(3)五大类细胞因子(IL, TNF, IFN, CSF, TGF)与淋巴瘤的发生发展有密切关系;(4)瘤细胞的原癌基因(C-myc, N-ras, C-fos 及 RB)和抑癌基因(p53, p21, p15/16)常有异常;(5)抗凋亡基因 bcl-2 过表达,过去认为主要表达在滤泡型淋巴瘤或边缘区淋巴瘤,现在发现在弥漫性大细胞性淋巴瘤中也有 BCL-2 过表达;(6)套区淋巴瘤 CyclinD1 过表达;(7)端粒酶活性升高;(8)T 细胞可诱导 B 淋巴瘤进一步转为浆细胞瘤等。

尚未解决的问题是 EBV, HIV 等病毒病因如何导致 B 细胞转化受阻,进而恶变?目前有种看法是 EBV 可诱导 bcl-2 过表达,后者常因为发生了与 Ig 的染色体易位[t(14;18)<sup>[3,4]</sup>]。除了 EBV 外因,有无机体免疫系统内因异常,值得探讨。又据研究认为,

国家自然科学基金资助项目。  
本文于 1999 年 7 月 1 日收到。

CyclinD1 过表达也是其基因断裂点发生了染色体易位[t(11;14)(q13;32)],使 CyclinD1 表达置于 Ig 重链增强子控制之下<sup>[6,7]</sup>。在细胞周期素-细胞周期蛋白依赖性激酶-细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclins-cdks-ckIs)分子网络中,CyclinD1 作为调节亚基使 cdks 激活,加速细胞增殖,是细胞周期蛋白的最重要成分。CkIs 则抑制这种增殖过程。CkIs 包括 p16, p15, p21 和 p27 等<sup>[8]</sup>。但是,为什么主要控制 G1 期的 CyclinD1 出现过表达?它与 B 淋巴瘤发生机理有何内在联系,又值得深入研究。因为在 G1-S 和 G2-M 两个转化点中,G1 期的持续时间不同,决定了细胞增殖周期的长短,如果弄清这一问题,很可能 B 淋巴瘤发病机理的问题会得到可喜进展,因为一些 B 淋巴瘤亚型如套区淋巴瘤常常过表达 CyclinD1,其发病机理明显与细胞周期失调有关。P16 基因是细胞周期内在固有成分,p21 则是 p53 刺激 WAF1/cip1 基因编码蛋白的产物,它们与 Cyclins 构成矛盾统一体,p16 主要是与 Cyclin D1 竞争,抑制 cdk4 活性,P21 则抑制 CyclinE/cdk2 活性。恶性肿瘤患者常有 p16,21 或 p53 缺失突变。除此而外,在 B 淋巴瘤这种免疫系统恶性肿瘤,T 细胞作为免疫系统中心环节,发挥了什么作用,非常值得深入探讨。

## 2 已经发现 BL 中的 CD4 与 IL2R 有异常表现

早在 1983 年,哈佛大学麻省总院的 Nancy Harris 博士和 Bhan 博士就发表了 B 淋巴瘤中 T 细胞亚群异常的文章<sup>[9]</sup>,他们认为,BL 中的 CD4 主要表现在数量和分布异常:与反应性增生淋巴组织相比,滤泡和弥漫性大细胞 B 淋巴瘤中 Th 数量减少和 Th/Ts 比值下降;而小细胞性淋巴瘤则其中 T 细胞的分布和数量与良性反应性增生相似。从而推论 B 淋巴瘤中的 T 细胞与肿瘤性 B 细胞之间有功能上的相互作用。

与此同时,我们在辅助性 T 细胞与淋巴瘤关系的研究中已经注意到,B 淋巴瘤中 CD4 细胞数量减少,CD4/CD8 比值下降;CD4 细胞是 IL2 的主要分泌细胞,Th 细胞和 IL2 联合作用在淋巴瘤发生发展中起重要作用;上百例淋巴瘤随访,有的达 10 年之久的结果表明,外周 T 和 B 淋巴瘤的生存率曲线有既相反又相关的特点,提示微环境中重要成分在两种肿瘤中起相反作用<sup>[10-13]</sup>。根据前述免疫学原理,这种因素很可能是激活 CD4 细胞及其淋巴因子

尤其是 IL2 和受体。IL2R 的研究也已经十分成熟深入,数年前笔者在哈佛大学医学院附属麻州总院(MGH)参与的前临床研究已经表明,针对 T 细胞(CD3)和 IL2R(CD25)的双特异单抗可以防治移植物排斥反应,对淋巴瘤也有疗效<sup>[14]</sup>。美国 NIH 的 Waldmann 则在 1986 年注意到正常和恶性淋巴细胞上 IL2R 的结构功能和表达区别<sup>[15]</sup>;并且借助静止 T 细胞不表达,而成人 T 细胞淋巴瘤白血病高表达 IL2R 的特点治疗该类肿瘤,1995 年他又对临床上针对 IL2R 治疗白血病/淋巴瘤的情况,作了总结分析<sup>[16]</sup>;Ohnishi 等人将抗 CD4 的单克隆抗体引入带瘤(B 淋巴瘤)小鼠中,结果肿瘤进入冬眠状态<sup>[17]</sup>;NIH 的 Hilbert 等将有 myc 和 raf 的逆转录病毒 J3V1 在正常 BALB/C 小鼠,T 细胞缺陷裸鼠和 T 细胞重建裸鼠 3 种小鼠中诱导浆细胞瘤,结果正常 BALB/C 小鼠产生的全是分化到 B 细胞终末状态的浆细胞肿瘤,它们大多数可分泌免疫球蛋白;相反,裸鼠(无 T 细胞)主要产生不分泌免疫球蛋白的 B 细胞淋巴瘤;当对致瘤前的裸鼠输入外源性 T 细胞后,产生的 B 淋巴瘤转化为浆细胞瘤,认为 CD4 细胞起着主要诱导 B 细胞向浆细胞转化的功能<sup>[18]</sup>,这些事例充分证明 CD4 细胞对 B 淋巴瘤的发生发展有着重要意义。

借此原理,如果改变有活化缺陷的 T 细胞功能,可能使 B 淋巴瘤细胞逆转为正常 B 细胞。因此,首先需要确定的是 B 淋巴瘤中 T 细胞活化缺陷的状况及其分子基础,一旦确定,对 B 淋巴瘤患者及其相关肿瘤患者均是一大福音,因为可能产生相应的弥补 T 细胞活化缺陷的治疗措施。当然,也不排除另外一种可能性,即 T 细胞的异常是结果,而不是原因,这在其他一些肿瘤尚待分析研究,但是,根据免疫学基本原理,对 B 淋巴瘤来说,这种可能性很小,因为 T 细胞无论何时都是免疫系统的中心环节。基于这个原因,可能本课题的研究意义远超过它本身涉及的内容,B 淋巴瘤及其相关肿瘤可能因为找到恶变关键环节而成可以治愈的肿瘤。

## 3 BL 中的 CD4 与 IL2R 基因异常研究意义及前景

迄今为止,关于肿瘤浸润 T 淋巴细胞状况研究如上所说已经有不少文章报道,新近发现还有个别报道 B 淋巴瘤中 T 细胞的 P56<sup>lck</sup>, P59<sup>fm</sup>, zap-70 和 CD3 链均无异常,但是有蛋白络氨酸磷酸化方式及络氨酸激酶活性的改变的报道<sup>[19]</sup>,也有人报道 Fas-

FasL 相互反应缺陷的小鼠中发生浆细胞样肿瘤<sup>[20]</sup>, 说明这方面问题已经开始有人注意。但是, B 细胞淋巴瘤中的 CD4 分子和 IL2R 基因情况迄今仍然未发现研究报道。笔者认为这是一个十分有意义的探索。因为 Th1 和 Th2 均属于 CD4 细胞, 它们在免疫反应中的关键作用已经得到公认, 而只有 CD4 分子才能确定是 CD4 细胞, 又只有 IL2R 才能看出是 CD4 细胞处于激活的功能状态。该方面文献缺乏, 究其原因, 可能还是因为 CD4 细胞在 B 淋巴瘤中是以反应性成分出现之故。事实上, 微环境对肿瘤的影响, 已经受到关注。如肝癌中的 Ito 细胞基因改变就是证明。到底 B 淋巴瘤中的 CD4 细胞仅仅是数量、表型和功能的异常, 还是已经发生了基因水平的异常, 这既关系到 B 淋巴瘤发病机理的大问题, 也涉及细胞周期调控异常的可能源头, 很值得深入探讨。

CD4 细胞的基因, 除了自身的 CD4, TCR 基因外, 还有淋巴因子及其受体基因, 如 IL2/IL2R, IL4/IL4R, IL5/IL5R, IL9/IL9R, IL12/IL12R 等; CD4 细胞本身的数量和作用有限, 必须通过自分泌或旁分泌淋巴因子与表达在它们上面的相应受体结合后产生扩大效应才能发挥更大作用。其中 IL2 和 IFN 主要由 Th1 分泌, IL4, 5, 10 主要由 Th2 分泌。原癌基因 c-myc, N-ras, c-fos 等与淋巴细胞的增殖和恶变密切相关, 抑癌基因如 p53, p21, p15/16 等的野生型一般可控制细胞不会过度增生, 一旦突变, 涉及细胞恶变; 死亡基因及其配体 Fas/FasL, 共刺激分子 CD28/B7, CD40L 等关系 T 细胞的激活或凋亡, 也很重要。这是十分复杂的结构。总的说来, 迄今为止的研究进展虽然很多, 也有了如前 Fas/FasL 的研究, 但是还没有直接从 CD4 细胞的基因入手研究 B 细胞淋巴瘤恶变机理的报道, 这是空白点, 也是希望所在。又鉴于 CD4 细胞的作用必须在淋巴因子的作用下才能得到扩大性发挥, 尤其是 IL2 已被公认是对 Th1 的增生起主要作用的淋巴因子, 而 Th1 又是辅助分泌 IgG, IgM 的 B 淋巴细胞转化增殖的主要细胞, 故笔者设想把 CD4 细胞的 CD4 基因和其上的 IL2 受体 (IL2R) 作为主要研究对象, 探讨它们在 BL 中的变异情况和作用, 相信其结果对深入认识 BL 发病机理很有帮助。

#### 4 BL 中 CD4 和 IL2R 基因变化的研究手段选择

可采用的研究手段包括: 一般形态, 免疫表型, 功能检测, 细胞培养, PCR, SSCP, TGGE, EM, IEM, 图

像分析, Flow Cytometry, 动物试验等。目前国际上已经开始流行的最新方法 DNA 微排序 (Microarray), 或称 DNA 芯片技术 (DNA Chip)<sup>[21]</sup>, 在国内还没有成功开展的报道, 这又是一个大的空白和希望。因为该技术可以从众多基因中进行广泛筛选, 而且可以应用于玻片上。借助该方法特有的优势, 有可能从上述众多基因中快速而准确地筛选出变异基因, 从而使 B 淋巴瘤发病机理的研究出现新的突破。

此外, 研究 BL 中的 CD4 细胞是否有基因变异之后, 还需要对筛选出的变异基因进行鉴定, 这就需要进行基因转染和功能检测。至于被转染细胞的选择, 需排除 T 细胞其他基因的干扰, 不应选择正常 T 细胞; 又因为理论上 CD4 变异基因的作用是通过表达产物诱导 B 细胞发生异常转化, 而非变异基因本身与 B 细胞基因重组, 故也不应选择 B 淋巴细胞; 鉴于纤维母细胞 (Fb) 现在已经成为基因转染的最佳靶细胞之一<sup>[22]</sup>, 正可借用于本研究之中。因为 Fb 的基因工程研究进展为我们设想的实现提供了方便。

至于功能检测方法, 利用免疫学原理, 新设计下述程序可以达到目的。IL2 主要由 Th 分泌, 又可刺激表达 IL2R 的 T 细胞增生, 而转化生长因子 (TGF- $\beta$ ) 则抑制 T 细胞增殖<sup>[23]</sup>, 二者又是一对相互制约的因子。利用这个特点, 设计在细胞培养中加入外源性 IL2 或 TGF $\beta$  来观察细胞的增殖不同, 从而帮助判断基因转染是否成功, BL 中的 CD4 基因和 IL2R 有无变异, 其功能表达是否异常。还可能把筛选出的变异基因在一定条件下进行正常 B 淋巴细胞的再转染, 如能获得 B 淋巴瘤形成的证据, 这将可能是一个血液病理学上的重要成果。

#### 5 结论

综上所述, 针对 BL 常出现 BCL-2 和 CyclinD1 过表达现象, 反映其凋亡受阻或细胞周期调控异常的特点, 选择对此有重要调控作用的激活 CD4 细胞为主要研究对象, 观察 T 细胞上的 CD4 和 IL-2R 基因的可能变异情况。通过比较研究, 找出它们中与 BL 瘤细胞恶变关系最密切的基因, 针对这种基因的检测和治疗将是一条更令人鼓舞的新途径, 预期结果对 BL 及其相关的白血病和其他恶性肿瘤的诊断和治疗均有广泛而明显的临床病理应用价值。与此同时, 如果把 DNA 芯片技术加以合理应用, 广泛筛选的结果, 可以修正或肯定设想, 使肿瘤研究走向更深入的阶段。

## 参 考 文 献

- [1] Jaffe E S, Harris N L, Diebold J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1999, 111(1 Suppl 1):S8.
- [2] Jaffe E S. Hematopathology: integration of morphologic features and biologic markers for diagnosis. *Mod. Pathol.*, 1999, 12(2):109.
- [3] Harris N L, Jaffe E S, Stein H et al. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal From the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 1994, 84(5):1361.
- [4] 陈文杰, 陈辉树. 造血系统疾病临床病理学. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1997: 97.
- [5] Zelehetz A D, Campbell M J, Bahler D W et al. Follicular lymphoma: a model of lymphoid tumor progression in man. *Ann. Oncol.*, 1991 Suppl 2:115.
- [6] Monni O, Joensuu H, Franssila K et al. BCL-2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 1997, 90(3):1168.
- [7] Kuroda H, Komatsu H, Nakamura S et al. The positive nuclear staining observed with monoclonal antibody against PRAD1/CyclinD1 correlates with mRNA expression in mantle cell lymphoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1995, 86(9):8.
- [8] An S, Yap D, Knox K A. Ligation of CD40 potentiates Fas-mediated activation of the cysteine protease CPP32, cleavage of its death substrate PARP, and apoptosis in Ramos-Burkitt lymphoma B cells. *Cell Immunol*, 1997, 181(2):139.
- [9] Harris N L, Bhan A K. Distribution of T-cell subsets in follicular and diffuse lymphomas of B-cell type. *Am. J. Pathol.*, 1983, 113(2):172.
- [10] 尹廷贵, 苏祖兰, 张锡英等. 用小鼠胸腺细胞快速检测白细胞介素 II 生物活性的探讨. *华西大学学报*, 1986, 17(2):273.
- [11] 苏祖兰, 陈钦材, 尹廷贵等. 非何杰金淋巴瘤的辅助性 T 细胞和白细胞介素 II 的关系. *肿瘤*, 1987, 7(4):152.
- [12] 苏祖兰, 陈钦材, 陈彬. Th 细胞与 IL2, IL2R 在 NHL 发病学中的作用. *中华病理学杂志*, 1988, 17(4):273.
- [13] Su Zulan, Chen Bin, Zhang Zikang et al. Significance of typing in the survival malignant lymphoma. *Chinese Journal of Cancer Research*, 1993, 5(2):135.
- [14] Maclean JA, Zulan Su, Colvin RB and Wong JT. Anti-CD3: Anti-IL2 receptor-bispecific mAb mediated immunomodulation. *The Journal of Immunology*, 1995, 155:3674.
- [15] Waldmann T A. The structure, function, and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes. *Science*, 1986, 232:727.
- [16] Waldmann T A. Human T-cell lymphotropic virus type 1-associated adult T-cell leukemia. *JAMA*, 1995, 273(9):735.
- [17] Ohnishi K, Bonavida. Regulation of B-cell lymphoma growth in syngeneic SJL/J mice. Establishment of tumor dormancy following administration of anti-CD4 monoclonal antibody into tumor-bearing mice. *Leukemia*, 1993, 7(11):1801.
- [18] Hilbert D M, Shen M Y, Rapp U R et al. T cells induce terminal differentiation of transformed B cells to mature plasma cell tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92(3):649.
- [19] 刘彬彬, 叶胜龙. T 细胞信号传递途径的改变与肿瘤免疫的关系. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1998, 5(1):54.
- [20] Davidson W F, Giese T, Fredrickson T N. Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J. Exp. Med.*, 1998, 187(11):1825.
- [21] Ramsay G. DNA chips: state-of-the art, 1998, 16(1):40.
- [22] Letterio J J, Roberts A B. Molecule of the month TGF- $\beta$ : A critical modulator of immune cell function. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1997, 84(3):24.
- [23] Knaus P I, Lindemann D, Decoteau J F et al. A dominant inhibitory mutant of the type II transforming growth factor beta receptor in the malignant progression of a cutaneous T-cell lymphoma. *Molecular and Cellular Biology*, 1996, 16(7):3480.

## PATHOGENESIS OF B-CELL LYMPHOMA

Su Zulan

(The Third Clinic College, The Third Hospital of Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630)

**Abstract** B cell lymphoma (BL) pathogenesis is related to disturbance of immunological system and cell cycle as well as inability of apoptosis. This paper proposed that B cell lymphoma is one of the best model to research abnormal cell cycle and apoptosis as well as neoplastic immunology, and it should be very worthwhile to pay attention to genetic alteration of the active T cells, especially CD4 and its lymphokine receptors, particularly IL2R when pursuing the pathogenesis and mechanism of B cell lymphoma.

**Key words** B cell lymphoma (BL), CD4/IL2R, gene mutation, cell cycle