

· 论 著 ·

弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者 TLR4、NF- κ B 蛋白的表达及临床意义*

王 蕾¹, 刘 颖¹, 李新霞², 王新有¹, 孙明玲¹, 范文霞¹, 张凯乐¹, 王秀娟¹, 郭新红^{1△}

(新疆医科大学第一附属医院: 1. 血液三科; 2. 病理科, 新疆乌鲁木齐 830054)

摘 要:目的 探讨弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)患者 Toll 样受体 4(TLR4)、核因子 κ B(NF- κ B)蛋白的表达及临床意义。方法 选取 2015 年 4 月至 2017 年 1 月该院诊治的 118 例 DLBCL 患者作为观察组, 118 例体检健康者作为健康对照组, 对比 2 组研究对象 TLR4、NF- κ B 蛋白的表达水平及与不同病理学特征的关系, 并分析与 DLBCL 患者预后的关系。结果 观察组的 TLR4、NF- κ B 蛋白阳性表达率明显高于健康对照组($P < 0.05$); DLBCL 患者的临床分期、乳酸脱氢酶(LDH)及国际预后指数(IPI)与 TLR4 及 NF- κ B 蛋白阳性表达率有关($P < 0.05$), 年龄、性别、结外累及、B 症状等指标均与 TLR4、NF- κ B 蛋白阳性表达率无关($P > 0.05$); TLR4、NF- κ B 蛋白表达为阳性的患者生存率显著低于阴性表达的患者($P < 0.05$)。结论 TLR4 及 NF- κ B 蛋白在 DLBCL 患者中高表达, 且与 DLBCL 患者的临床分期、LDH 及 IPI 相关, 可作为 DLBCL 发展及预后的评定指标之一。

关键词:弥漫大 B 细胞淋巴瘤; Toll 样受体 4; 核因子 κ B

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.10.009

中图法分类号:R733.4

文章编号:1673-4130(2020)10-1187-04

文献标识码:A

Expression and clinical significance of TLR4 and NF- κ B protein in patients with diffuse large B-cell lymphoma*

WANG Lei¹, LIU Ying¹, LI Xinxia², WANG Xinyou¹, SUN Mingling¹, FAN Wenxia¹, ZHANG Kaile¹, WANG Xiujuan¹, GUO Xinhong^{1△}

(1. Third Department of Hematology; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical significance of Toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) protein in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). **Methods** From April 2015 to January 2017, 118 cases of DLBCL patients treated in this hospital were selected as observation group, and 118 cases of healthy people were used as healthy control group. The expression levels of TLR4 and NF- κ B protein and their relationship with different pathological characteristics were compared in the two groups, and the relationship with the prognosis of DLBCL patients was analyzed. **Results** The positive expression rates of TLR4 and NF- κ B proteins in the observation group were significantly higher than those in the healthy control group ($P < 0.05$). The clinical stage, lactate dehydrogenase (LDH), and international prognostic index (IPI) of patients with different DLBCL were related to the positive expression rates of TLR4 and NF- κ B protein ($P < 0.05$). Age, gender, extranodal involvement, and B symptoms and other indicators were not related to the positive expression rate of TLR4 and NF- κ B protein ($P > 0.05$). The survival rate of patients with positive TLR4 and NF- κ B protein expression was significantly lower than that of patients with negative expression ($P < 0.05$). **Conclusion** TLR4 and NF- κ B proteins are highly expressed in patients with DLBCL, and are related to the clinical stage, LDH and IPI of DLBCL patients. They can be used as one of the indicators for the development and prognosis of DLBCL disease.

Key words: diffuse large B-cell lymphoma; Toll-like receptor 4; nuclear factor κ B

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)作为一种极为常见的恶性淋巴瘤^[1], 在中国的发病率约占非霍奇金淋

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区临床医学高峰学科建设项目(2019D01C284)。

作者简介: 王蕾, 女, 副主任医师, 主要从事血液病相关研究。△ 通信作者, E-mail: guoxinhong222@sina.cn。

本文引用格式: 王蕾, 刘颖, 李新霞, 等. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者 TLR4、NF- κ B 蛋白的表达及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41

巴瘤患者的 45%^[2]。DLBCL 无论是在组织形态学、临床表现,还是在预后上均具有显著的特异性^[3]。Toll 样受体 4(TLR4)作为一种被研究最多的 Toll 样受体之一,在天然免疫系统及肿瘤的发生、发展中均发挥着积极的作用^[4]。核因子 κ B(NF- κ B)作为一种细胞核转录因子,一般存在于多种肿瘤细胞中,能够异质地与免疫球蛋白 κ 链相结合,是一种在肿瘤形成过程中发挥重要作用的活化因子^[5]。然而有关 DLBCL 的发生、发展及预后与 TLR4、NF- κ B 细胞通路相关分子的研究仍较少。本研究通过检测并分析 118 例 DLBCL 患者的 TLR4、NF- κ B 蛋白表达情况,旨在为 DLBCL 患者的预后与治疗提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 4 月至 2017 年 1 月本院就诊的 118 例 DLBCL 患者作为观察组。纳入标准:(1)均符合中华医学会血液学分会 2013 年制订的 DLBCL 诊断标准^[6];(2)人类免疫缺陷病毒、血液、肝脏、心脏等检查结果均正常;(3)年龄 18~<80 岁。排除标准:(1)心、肝等器官功能严重损害者;(2)长期进行激素药物治疗者;(3)有药物过敏史者。其中,男 61 例,女 57 例;年龄 19~72 岁,平均(44.3±13.7)岁。选取同期本院 118 例体检健康者纳入健康对照组,其中男 59 例,女 59 例;年龄 21~77 岁,平均(45.3±12.8)岁。2 组研究对象在性别和年龄等一般资料上差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。该项目所有参与试验的研究者及家属均签署知情同意书,并已通过本院伦理委员会审查。

1.2 仪器与试剂 0.3% H_2O_2 、甲醛、二甲苯及磷酸盐缓冲溶液等均购自中国上海生工公司;TLR4、NF- κ B 均为多克隆抗体,购自美国 Sigma 公司。

1.3 方法 采用 10% 甲醛溶液将标本组织固定后,用石蜡包埋制成 4 μ m 的切片,采用二甲苯进行石蜡脱化,并加入 0.3% H_2O_2 去除过氧化物酶,正常山羊血清工作液封闭,添加一抗稀释溶液,4 $^{\circ}C$ 过夜,磷酸盐缓冲溶液清洗后,苏木精复染、乙醇脱水、二甲苯透明、树胶封片,并在显微镜下查看。以磷酸盐缓冲液一抗染色作为阴性对照,以 DLBCL 患者淋巴组织染色作为阳性对照^[7]。TLR4、NF- κ B 蛋白为阳性的主要判断标准,细胞质或细胞核表现为黄色或棕黄色,否则为阴性。然后随机选择 5 个高倍视野区,在显微镜下查看具有代表性的视野,统计每 100 个细胞中阳性细胞数,从而确定细胞的阳性率^[8]。

1.4 统计学处理 本研究随访时间截止时间为 2019 年 5 月,总生存时间指随访到任何原因的死亡或最后 1 次随访的时间。采用 SPSS19.0 软件对所得数据进行处理分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,差异性分析采

用 t 检验,计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Kaplan-Meier 方法估计生存率,应用 Log-rank 检验进行生存曲线的单因素分析^[9]。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组研究对象 TLR4、NF- κ B 蛋白阳性表达率的比较 结果显示,观察组的 TLR4、NF- κ B 蛋白阳性表达率均明显高于健康对照组($P<0.05$),见表 1。

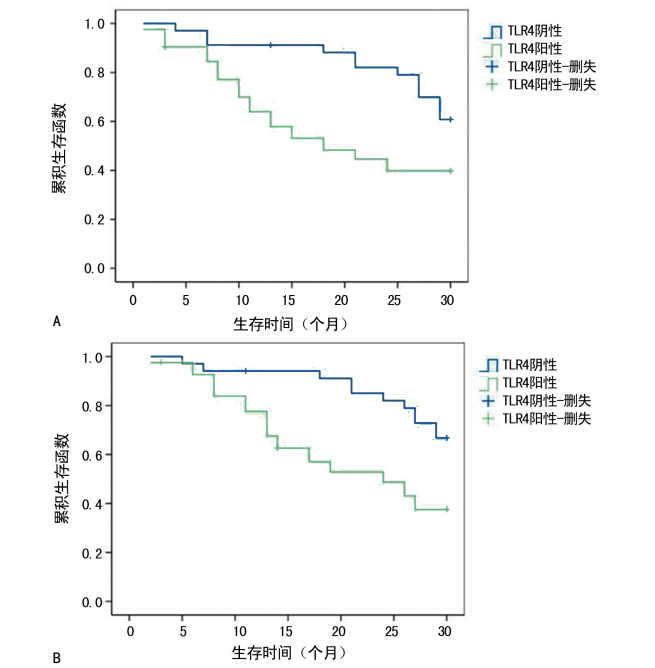
表 1 2 组研究对象 TLR4、NF- κ B 蛋白阳性表达率的比较[n(%)]			
组别	<i>n</i>	TLR4	NF- κ B
观察组	118	84(71.19)	76(64.41)
健康对照组	118	51(43.22)	33(27.97)
χ^2		18.849	31.522
<i>P</i>		0.000	0.000

2.2 不同病理学特征的 DLBCL 患者 TLR4、NF- κ B 蛋白阳性表达率比较 DLBCL 患者的临床分期、乳酸脱氢酶(LDH)及国际预后指数(IPD)均与 TLR4 及 NF- κ B 蛋白阳性表达率有关($P<0.05$),年龄、性别、结外累及、B 症状等指标均与 TLR4、NF- κ B 蛋白阳性表达率无关($P>0.05$),见表 2。

表 2 不同病理学特征的 DLBCL 患者 TLR4、NF-κB 蛋白阳性表达率比较(<i>n</i>)										
临床病理特征		<i>n</i>	TLR4(<i>n</i> =84)				NF-κB(<i>n</i> =76)			
			+	—	χ^2	<i>P</i>	+	—	χ^2	<i>P</i>
年龄(岁)					3.734	0.053			0.112	0.738
≤60	65	51	14				41	24		
>60	53	33	20				35	18		
性别					1.098	0.295			0.012	0.912
男	61	46	15				39	22		
女	57	38	19				37	20		
临床分期(期)					7.355	0.007			4.099	0.043
I ~ II	50	29	21				27	23		
III ~ IV	68	55	13				49	19		
LDH					6.517	0.011			5.360	0.021
正常	48	28	20				25	23		
升高	70	56	14				51	19		
结外累及					0.270	0.603			0.112	0.738
<2 处	65	45	20				41	24		
≥2 处	53	39	14				35	18		
IPI 指数					12.195	0.000			4.059	0.044
≤2	64	37	27				36	28		
>2	54	47	7				40	14		
B 症状					1.493	0.222			0.014	0.906
无	26	21	5				17	9		
有	92	63	29				59	33		

2.3 TLR4、NF- κ B 蛋白表达与 DLBCL 患者预后的关系 DLBCL 患者的生存时间从纳入研究开始统

计,通过定期电话随访和门诊复诊等了解患者的预后情况。结果显示,TLR4、NF-κB 蛋白表达为阳性的患者生存率显著低于阴性表达的患者($P<0.05$),见图 1。



注:A 表示 DLBCL 患者 TLR4 蛋白表达的总生存曲线;B 表示 DLBCL 患者 NF-κB 蛋白表达的总生存曲线。

图 1 不同 DLBCL 患者 TLR4、NF-κB 蛋白表达的总生存曲线

3 讨 论

DLBCL 作为一种大 B 淋巴细胞弥漫性恶性增生疾病,具有很强的异质性^[10]。该病属于侵袭性淋巴瘤,病情初期不易发现,而且病情发展较迅速,在患者发病时淋巴结快速肿大,常伴发淋巴结外病和骨髓侵犯等疾病,一旦确诊即是晚期,病死率较高^[11]。

TRL 通过从病毒及各种内源性分子中识别出不同的病原相关分子模式,主要在单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞等固有免疫系统细胞表面表达^[12]。已有研究证实,TLR4 作为 TRL 家族被研究较深入的一员,不仅广泛表达于自然杀伤细胞等免疫原性细胞,而且也常见于宫颈癌等恶性肿瘤^[13]。YANG 等^[14]报道 TRL4 在人乳腺癌细胞中具有明显的高表达。NF-κB 蛋白因子通过与核内增强子 κB 部位特异性结合从而促进相关蛋白的转录,在体液免疫及肿瘤的发生中发挥重要作用^[15]。

研究发现多种淋巴瘤细胞中都有 TLR4 表达^[16],但其具体作用机制及与淋巴瘤侵袭作用的相关性仍尚不明确。NF-κB 作为 TLR4 的经典下游分子,在肺癌、淋巴瘤、乳腺癌中高表达^[17]。本研究结果显示,观察组的 TLR4、NF-κB 蛋白阳性表达率均明显高于健康对照组($P<0.05$),本研究证实了 TLR4 在 DLBCL 患者肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭中有着显著的高表达,

而高表达的 TLR4 又可显著增强 DLBCL 患者细胞增殖、迁移与侵袭,TLR4 激活后可促进肿瘤生长和抵抗化疗。另外作为 TLR4 下游的 NF-κB 信号分子,其会随着 TLR4 表达的改变而改变,TLR4 信号途径能够激活 NF-κB 促进炎症因子的产生。通过激活 TLR4 受体,NF-κB 也随之激活,研究显示当 NF-κB 活性增强后,癌细胞活性也随之激活,同时诱导调控白细胞介素-6 等肿瘤生长因子^[18],表明 TLR4 及 NF-κB 可作为 DLBCL 发展及预后的评定指标之一,这与本文的研究结果相一致。

此外,本研究表明不同 DLBCL 患者的临床分期、LDH 及 IPI 均与 TLR4 及 NF-κB 蛋白阳性表达率有关($P<0.05$)。DLBCL 属于高侵袭性淋巴细胞瘤,肿瘤的增殖指数等病理学参数一般也较高,TLR4 及 NF-κB 蛋白在淋巴瘤组织中的表达强度也较高,提示 TLR4 及 NF-κB 蛋白在 DLBCL 疾病的发生、发展中起重要作用。此外,TLR4、NF-κB 蛋白表达为阳性的患者生存率显著低于阴性表达的患者($P<0.05$)。这表明,TLR4 及 NF-κB 蛋白的高表达加快了 DLBCL 的进展,对患者预后存在一定影响,TLR4 能够识别包括脂多糖在内的多种外源性配体,从而促进肿瘤细胞增殖和细胞繁殖等,因此,阻止 TLR4 及 NF-κB 的激活能减缓 DLBCL 肿瘤生长及延长患者的生存期。

4 结 论

综上所述,TLR4 及 NF-κB 蛋白在 DLBCL 患者中高表达,且与 DLBCL 患者的临床分期、LDH 及 IPI 相关,可作为 DLBCL 发展及预后评定指标之一,有望成为治疗及改善淋巴瘤预后的新靶点。

参考文献

- [1] CAMPO E,SWERDLOW S H,HARRIS N L,et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications [J]. Blood,2011,117(19):5019-5032.
- [2] 姜文奇,黄慧强. 中国弥漫大 B 细胞淋巴瘤治疗方案的演变及疗效[J]. 中华血液学杂志,2014,35(4):357-360.
- [3] PIRIS M A I. Pathological and clinical diversity in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Hematol Oncol,2013,31(1): 23-25.
- [4] 杨婧,郑启昌,张进祥. Toll 样受体(TLRs)信号通路 with 肿瘤发展的研究进展[J]. 临床外科杂志,2008,16(8):566-568.
- [5] JACOBSEN E D,SHARMAN J P,OKI Y,et al. Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD30 expression[J]. Blood,2015,125(9):1394-1402.
- [6] 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)[J]. 中华血液学杂志,2013,34(9):816-819. (下转第 1193 页)

力下降^[15-16]。

4 结 论

不孕组女性与对照组女性 HPV 单一感染率无明显差别, HPV 感染率在不孕组与对照组同年龄段比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), HPV 感染是否是造成女性不孕的独立因素仍有待继续研究。

参考文献

[1] 周璐, 黄薇. 不孕与宫颈人乳头瘤病毒感染的关系研究[J]. 实用妇产科杂志, 2015, 31(2): 147-149.

[2] AMBÜHL L M M, ULRIK B, KAREN D, et al. Human papillomavirus infection as a possible cause of spontaneous abortion and spontaneous preterm delivery[J]. Infect Dis Obstet Gynecol, 2016, 36(1): 1-19.

[3] 王晓昌, 陈俊, 侯铁塔, 等. 西北地区 524 例不孕症女性高危型人乳头瘤病毒感染与支原体和衣原体感染的相关性研[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(20): 2786-2787.

[4] SABEENA S, BHAT P V, KAMATH V G, et al. Community-based prevalence of genital human papilloma virus (HPV) infection: a systematic review and meta-analysis[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(1): 145-154.

[5] TRICCO A C, NG C H, GILCA V, et al. Canadian oncogenic human papillomavirus cervical infection prevalence: Systematic review and meta-analysis[J]. BMC Infect Dis, 2011, 11(1): 235.

[6] 何成山, 马晨芸, 陆志成. 上海部分区域人乳头瘤状病毒基因分型及感染状况[J]. 职业与健康, 2018, 34(1): 2226-2229.

[7] 吴颖, 曹芬芳, 刘太林, 等. 湖南地区 7 076 例女性 HPV

感染情况及分型分析[J]. 实用预防医学, 2019, 26(4): 474-476.

[8] 肖松舒, 范洁琳, 贺斯黎, 等. 16 320 例妇科门诊患 HPV 感染情况分析[J]. 中南大学学报(医学版), 2015, 40(4): 373-379.

[9] 裴杰, 崔子宸, 李运清. 病毒感染与不育不孕相关性检测方法的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(11): 126-1129.

[10] 王红, 麻安喆, 汤莉. 继发性不孕症与免疫性抗体及性激素水平相关性研究[J]. 检验杂志, 2016, 26(13): 1886-1891.

[11] 张立冬, 张慧敏, 裴静, 等. 不孕患者中宫颈 HPV 高危型别感染率及病毒载量的调查[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2007, 12(2): 159-161.

[12] 伍金华, 陈建勇, 梁惠强. 778 例不孕患者宫颈 HPV 分型结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2013, 18(23): 2980-2981.

[13] 濮德敏, 彭宇洪, 闻良珍, 等. 输卵管妊娠与人乳头状瘤病毒感染相关性研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 1997, 25(2): 133-135.

[14] 李丕宇, 葛华. 人乳头瘤病毒感染和不孕症关系的研究进展[J]. 中国医师杂志, 2010, 12(1): 140-141.

[15] LIU M, HE Z, ZHANG C, et al. Transmission of genital human papillomavirus infection in couples: a population-based cohort study in rural China[J]. Sci Rep, 2015, 5: 10986.

[16] 单玮, 张涛, 张铁军, 等. 我国女性人乳头瘤病毒(HPV)感染的流行病学现状[J]. 中华疾病控制杂志, 2017, 21(1): 89-93.

(收稿日期: 2019-12-11 修回日期: 2020-02-03)

(上接第 1189 页)

[7] 杨莉洁, 周伟. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤组织中 Bcl-2、NF- κ B、c-Myc 蛋白表达及临床意义[J/CD]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2016, 8(11): 125-128.

[8] 马瑞, 郭新红, 顾霞, 等. Toll 样受体 4 和 NF- κ Bp50 在不同类型淋巴瘤中的表达及其意义[J]. 新疆医科大学学报, 2012, 35(1): 32-36.

[9] 张森, 贺海燕, 李晶, 等. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤中 BCL-2 等蛋白表达与临床预后的相关性研究[J]. 宁夏医学杂志, 2017, 39(8): 769-771.

[10] 魏华萍, 赵小利, 王全顺, 等. BCL-2 蛋白在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的表达及预后价值[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(6): 1607-1611.

[11] 余正平, 丁家华, 陈宝安, 等. 影响弥漫大 B 细胞淋巴瘤预后的主要危险因素分析[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(12): 830-835.

[12] 黄荷, 张勇, 杨舒婷, 等. DFMG 调节 TLR-4 抑制损伤内皮细胞对平滑肌细胞增殖和迁移促进作用[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2016, 13(1): 1-5.

[13] 江宁红, 隋龙. TLR4/iNOS 信号通路在宫颈癌局部免疫

调节中的作用机制[J]. 实用妇产科杂志, 2015, 31(5): 338-341.

[14] YANG S S, TANG L, LI R G, et al. The effects of sub-clinical hypothyroidism on serum lipid level and TLR4 expression of monocyte in peripheral blood of rats[J]. Neuro Endocrinol Let, 2014, 35(1): 80-86.

[15] 陈素芹, 李君, 夏金英. 核转录因子 κ B 在炎症相关癌症中的作用[J]. 临床荟萃, 2010, 25(16): 1471-1473.

[16] 闫新星, 王晶, 张巍, 等. Toll 样受体 4 在淋巴瘤细胞株中的表达及其对细胞增殖和耐药的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(6): 437-441.

[17] ZHANG B, CALADO D P, ZHE W, et al. An oncogenic role for alternative NF- κ B signaling in DLBCL revealed upon dereg-ulated BCL6 expression[J]. Cell Rep, 2015, 11(5): 715-726.

[18] 周永芹, 韩莉. NF- κ B 与肿瘤关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(5): 855-858.

(收稿日期: 2019-12-15 修回日期: 2020-02-28)