

大剂量甲泼尼龙治疗 p53 异常的慢性淋巴细胞白血病 1 例并文献复习*

朱家斌¹ 周立涛¹ 王晓炜¹ 张丽娟¹ 刘定胜¹ 于亮¹

[关键词] 慢性淋巴细胞白血病; p53; 甲泼尼龙

[中图分类号] R733.72 [文献标志码] D [文章编号] 1004-2806(2013)07-0496-03

A case of high-dose methylprednisolone regimen for chronic lymphocytic leukemia with p53 abnormalities and literature review

Summary A case of chronic lymphocytic leukemia (CLL) with p53 gene abnormalities was reported and related literature were reviewed. The results showed that p53 gene mutation and deletion were positive, chromosomal karyotype was complex, and the high-dose methylprednisolone regimen achieved a good therapeutic effect. It suggests that the detection of p53 gene abnormalities is important for prognosis and treatment of CLL patients. High-dose methylprednisolone regimen is promising for CLL patients with p53 abnormalities.

Key words chronic lymphocytic leukemia; p53; methylprednisolone

慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 是一种淋巴细胞克隆性增殖的肿瘤性疾病, 其特点为成熟形态的淋巴细胞在体内积聚使血液和骨髓中淋巴细胞增多, 淋巴结、肝、脾肿大, 最后累及淋巴系统以外的其他组织器官。CLL 的临床进程异质性较大, 由于 Binet 或 Rai 分期系统不能预测疾病早期是否进展, 预测 CLL 预后的新指标不断被发现, 其中位于 17p 的 p53 基因异常与 CLL 的预后密切相关。近来我科收治 1 例 p53 基因异常的 CLL 患者, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料

患者, 女, 51 岁, 2012 年 3 月因腹胀至当地医院就诊。查血常规示白细胞 (WBC) $42.23 \times 10^9/L$, 血红蛋白 (Hb) 68.00 g/L, 血小板 (PLT) $63.00 \times 10^9/L$, 淋巴细胞 (L) 88.9%, 骨髓涂片示增生明显活跃, 成熟淋巴细胞比例 80%, 诊断 CLL。给予口服瘤可然 2 mg tid, 服药 2 d 后出现高热, 体温最高达 39.5℃, 胸部 CT 考虑两肺感染, 随即停用瘤可然, 并给予泰能、伏立康唑等抗感染治疗后好转。2012 年 5 月给予脾区放疗, 腹胀稍好转, 2012 年 6 月腹胀逐渐加重, 至我院就诊。体检: 神志清, 精神一般, 双侧颌下、颈部、锁骨上、腋窝及腹股沟均可触及肿大淋巴结, 最大 4 cm×4 cm, 质韧, 无明显触痛。胸骨无压痛, 心肺听诊未及异常。腹平软, 肝肋下未及, 脾肋下 10 cm, 质韧无压痛。入院后查

血常规: WBC $39.37 \times 10^9/L$, Hb 75.00 g/L, PLT $64.00 \times 10^9/L$, 肝肾功能、凝血功能无异常, 腹部彩超示肝门区多发肿大淋巴结, 脾肿大。骨髓涂片示有核细胞增生明显活跃, 原始淋巴细胞 2%, 幼稚淋巴细胞 3%, 成熟淋巴细胞 78%。

1.2 方法

FCM (flow cytometry) 免疫表型分析: 取肝素抗凝的新鲜 (6 h 内采集的) 骨髓, 调整细胞数至 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6/ml$, 取 100 μl 经直接免疫荧光标记法标记, 避光 15 min 后上溶血剂溶解红细胞。流式细胞仪 (Beckman-Coulter 公司产品, Epics XL 型, USA, 488 nm 激发波长, 采用 Expo32 ADC 分析软件) 检测至少 10 000 个细胞, FS/SS 双参数设门, 分析淋巴细胞群不同抗原的表达情况, 单克隆抗体包括 CD5、CD19、CD22、FMC-7 等 (购自法国 Immunotech 公司)。结果判断以抗原表达 $\geq 20\%$ 为阳性。

常规细胞遗传学 (conventional cytogenetics, CC) 分析: 取骨髓 5 ml, 肝素抗凝, 有核细胞计数后按 $(1 \sim 2) \times 10^6/ml$ 进行直接法或短期培养法制备染色体, 并采用 R 显带技术进行核型分析。染色体核型按照《人类细胞遗传学国际命名体制 (ISCN 2005)》描述。

间期荧光原位杂交 (FISH) 技术检测 p53 缺失及 t(11;14) 探针来源: p53 间期 FISH 探针购自美国 Vysis 公司, 用 SpectrumRed™ 标记, 具体方法参照文献 [1] 步骤。应用 Leica DRMA2 型荧光显微镜, 在 DAPI/TexasRed (德克萨斯红) 滤光镜的激发下观察间期细胞的红色荧光杂交信号, 每例分析 300 个细胞。正常间期细胞可见到 2 个红色杂交信号, 发生 p53 一个等位基因缺失者只可见到 1

* 基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (No: BK2010287); 国家自然科学基金项目 (No: 81170489)

¹ 南京医科大学附属淮安第一医院血液科 (江苏淮安, 223300)

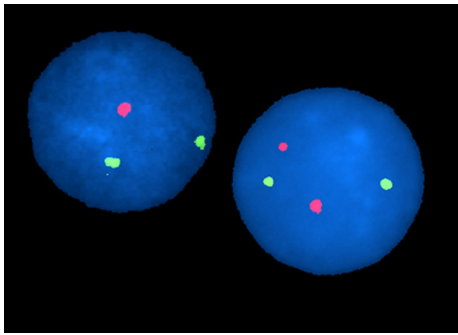
通信作者: 于亮, E-mail: yuliang1965@hotmail.com

个红色杂交信号。t(11;14)探针是分别用荧光素 SpectrumGreen™ 标记的 IgH 和用 SpectrumOrange 标记的 CCND1 探针的混合物。具体方法参照 Weisenburger 等 (1996) 步骤。应用 LeicaDM-RA2 型荧光显微镜在 DAPI/FITC/TexasRed 三色滤光镜激发下观察间期细胞荧光杂交信号:无 t(11;14)(q13;q32)异常的间期细胞核内出现 2 个红色信号和 2 个绿色信号(2R2G)。有 t(11;14)(q13;q32)异常的间期细胞核内出现绿色和红色相互靠近或叠加产生的黄色融合信号(F),每例分析 300 个细胞。

PCR 联合测序检测 p53 基因突变:取患者骨髓标本 5 ml,应用 DNA 提取试剂盒(挪威 Dynal 公司)提取 DNA。因 p53 基因有 11 个外显子(exon),exon1 不编码,故针对 p53 基因 exon2 到 exon11 用 Primer Premier 5 引物设计软件设计引物。PCR 反应体系如下:DNA 25 ng,10 mmol/L 的上、下游引物各 1 μl,MasterMix(北京天根科技有限公司)12.5 μl,加去离子水至终体积 25 μl。exon10 扩增循环参数如下:94℃ 预变性 7 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,共 35 个循环,72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存;其余外显子退火温度为 60℃,其他循环参数同前。配制 1.5% 的含溴化乙锭的琼脂糖凝胶,取 5 μl PCR 产物加样,于 0.5×TBE 缓冲液中,90 V 电泳 30 min,阳性条带回收、纯化,由上海英骏生物技术有限公司测序,测序结果与野生型 p53 基因序列比对(野生型序列见 <http://p53.iarc.fr/TP53sequenceX54156.html>)。

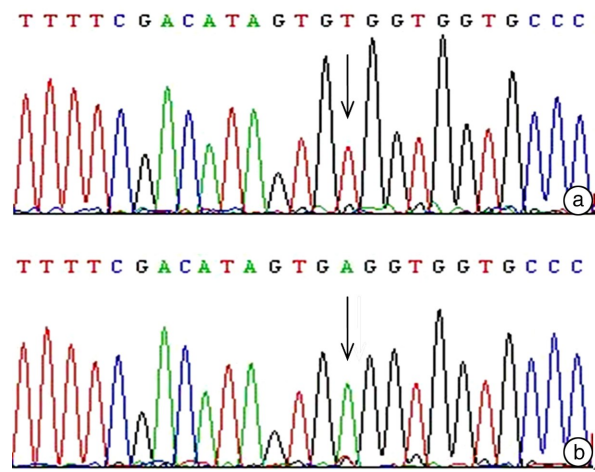
2 结果

FCM 免疫表型示 CD5、CD19、CD23 阳性,CD3、CD4、CD8、CD10、FMC7 阴性,SmIg、CD22 弱阳性。染色体:44-46,XX,del(2)(p11),-4,add(8)(q42),der(11)t(1;11)(p24;p15),add(12)(p12),-17,del(17)(p13),-20,+mar1,+mar2[20]。FISH 示 p53 缺失阳性(图 1),p53 缺失细胞比例为 93.3%(280/300),t(11;14)细胞比例为 0。PCR 联合测序检测到 p53 基因有突变(图 2)。根据患者病史、体征,结合血常规、骨髓涂片及 CLL 免疫表型积分系统,诊断为 CLL(Binet C 期,RaiⅣ期),而 t(11;14)阴性排除套细胞淋巴瘤。考虑该患者存在 p53 缺失及突变,对常规化疗耐药,予以大剂量甲泼尼龙化疗(具体剂量 1 000 mg/m²×5 d),辅以水化、碱化、保护胃黏膜等治疗。化疗结束复查血常规:WBC 21.37×10⁹/L,Hb 75.00 g/L,PLT 91.00×10⁹/L,L 73.6%。化疗后体检:双侧颌下、颈部、锁骨上、腋窝及腹股沟均可触及肿大淋巴结,最大 3 cm×3 cm,脾肋下 7 cm,病情好转出院,目前仍在治疗中。



可见 p53 基因缺失,红色信号为 p53(17p13.1)探针,绿色信号为 17 号染色体着丝粒探针。

图 1 患者间期 FISH 检测图



箭头所示为 p53 基因第 6 外显子 216 位密码子 GTG>GAG。a:p53 野生型(正常对照);b:p53 点突变。

图 2 p53 突变测序图

3 讨论

CLL 的临床进程异质性较大,一些患者在初诊时即有脏器肿大、贫血和 B 组症状等,需要立即开始治疗;另一些患者在整个疾病过程中没有任何症状或体征,寿命与同年龄的健康人群类似。因此,对 CLL 预后相关指标的研究显得极其重要。近来发现一些新的指标能预测 CLL 的预后,如淋巴细胞倍增时间、乳酸脱氢酶、血清 β2-微球蛋白、可溶性 CD23、CD38、ZAP-70、p53 基因异常及免疫球蛋白重链可变区基因突变等^[2]。其中 p53 基因的异常与 CLL 的病程及转归密切相关。

在人类肿瘤中,p53 基因的改变是迄今为止发现的变化频率最高的一种分子异常,涉及一半以上的肿瘤。p53 基因是一种抑癌基因,位于人类染色体 17p13.1,编码的蛋白质为 p53 蛋白。野生型 p53 蛋白是一种核内磷酸化蛋白,作为一种转录因子,可以激活 p21 基因的转录,诱导其表达,而 p21 蛋白可抑制 CDK 的活性,从而阻断细胞周期的演进;p53 蛋白亦可通过上调促凋亡基因 noxa、puma 和 bax,下调抗凋亡基因 bcl-2 和 mcl-1 诱导细胞凋

亡^[3]。

FISH 技术可以检测出 7%~11% 的 CLL 患者 p53 基因缺失,此种染色体异常主要由 17p10 到 17p12 之间(富含低拷贝重复序列)发生不平衡易位或者等臂染色体所致^[4]。Dohner 等(2000)通过 FISH 技术检测了 325 例患者,7% 存在 p53 基因缺失,与其他染色体异常相比,p53 缺失患者的预后最差,生存期最短。Catovsky 等(2004)对 730 例 CLL 患者的临床研究发现,p53 缺失的患者对化疗容易产生耐药,CLL 患者预后与 p53 基因缺失的阳性细胞畸变率相关,p53 缺失阳性细胞比例<20% 患者的治疗有效率为 82%~83%,而>20% 的有效率仅为 13%。p53 缺失阳性细胞畸变率越高,对化疗药物越容易产生耐药。本例患者 p53 缺失比例高达 93.3%(280/300),提示预后较差。

p53 基因突变在血液系统恶性肿瘤中并不常见,见于 10%~15% 的初治 CLL 患者,突变的患者预后不佳,对化疗耐药。Sturm 等(2003)通过测序技术检测 138 例 CLL 患者 p53 基因的外显子 5-8,23 例(16.7%)有突变。58 例初治患者仅 3 例(5.2%)检测到 p53 突变;而接受烷化剂治疗的 80 例患者中 20 例(25.0%)检测到突变,有突变的患者其中位生存期较无突变者明显缩短(12.5 个月:39.3 个月, $P<0.05$)。p53 的突变率与既往治疗有明显相关性,烷化剂和嘌呤类似物等使 p53 的突变率明显升高,原因可能是药物的选择作用。

p53 基因的缺失与突变存在相关性,缺失往往伴随另一条等位基因的突变。本例患者同时存在 p53 缺失和突变。Saddler 等^[5]检测了 106 例 CLL 患者,15 例 p53 缺失患者中 12 例(80.0%)有突变,而 91 例无缺失患者仅 4 例(4.4%)伴突变($P<0.05$)。一个 p53 等位基因的缺失导致其表达产物 mRNA 和蛋白水平下降,即单倍不足^[6]。而另一个等位基因发生点突变则改变了其结构,产生了突变的 p53 蛋白,最终导致野生型 p53 蛋白的缺乏,失去了抑制肿瘤增殖的作用。

多种化疗药物通过 p53 途径诱导细胞凋亡,如嘌呤类似物、烷化剂等,已有研究证实氟达拉滨通

过 p53 途径诱导肿瘤细胞凋亡。本例患者应用常规细胞遗传学及 FISH 技术检测到 p53 基因缺失,PCR 联合测序证实其存在 p53 基因突变,即同时存在 p53 缺失和突变,提示氟达拉滨化疗无效。因此对 p53 基因异常的患者,应选用其他不涉及 p53 信号传导系统的药物。已有研究证实,激素可诱导淋巴瘤细胞凋亡,且不通过 p53 途径作用。Sturm 等(2003)已观察到 p53 基因突变的患者是有选择地对烷化剂和氟达拉滨耐药,而对糖皮质激素并不耐药。Thornton 等(2003)报道对有 p53 突变或者缺失的难治性 CLL 患者使用大剂量甲泼尼龙($1000\text{ mg/m}^2\times 5\text{ d}$)治疗后可使患者达到部分缓解,对于其他方法无效者可考虑给予大剂量激素冲击治疗。因此,对该病例我们采用大剂量甲泼尼龙治疗,取得了良好的疗效,目前患者仍在治疗中。

参考文献

[1] 徐卫,李建勇,潘金兰,等. 荧光原位杂交技术检测慢性淋巴细胞白血病 p53 基因的缺失[J]. 中国癌症杂志,2006,16(1):17-20.

[2] CHIORAZZI N, RAI K R, FERRARINI M, et al. Chronic lymphocytic leukemia [J]. N Engl J Med, 2005,352:804-815.

[3] CHIPUK J E, GREEN D R. Dissecting p53-dependent apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2006,13:994-1002.

[4] FINK S R, SMOLEY S A, STOCKERO K J, et al. Loss of TP53 is due to rearrangements involving chromosome region 17p10 approximately p12 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2006,167:177-181.

[5] SADDLER C, OUILLETTE P, KUJAWSKI L, et al. Comprehensive biomarker and genomic analysis identifies P53 status as the major determinant of response to MDM2 inhibitors in chronic lymphocytic leukemia [J]. Blood, 2008,111:1584-1593.

[6] LYNCH C J, MILNER J. Loss of one p53 allele results in four-fold reduction of p53 mRNA and protein: a basis for p53 haploinsufficiency[J]. Oncogene, 2006, 25:3463-3470.

(收稿日期:2012-08-25)