EB病毒编码的小mRNA阴性结外NK/T细胞淋巴瘤的临床特征及预后分析

贾思思[1,2]，南飞飞[1,2]，李素彩[1,2]，曹婧语[1,2]，王冠男[3]，张明智[1,2]，张 蕾[1,2]

1. 郑州大学第一附属医院肿瘤内科，河南 郑州 450052；
2. 河南省淋巴瘤诊疗中心，河南 郑州 450052；
3. 郑州大学第一附属医院病理科，河南 郑州 450052

［摘要］ **背景与目的：**结外NK/T细胞淋巴瘤(extranodal natural killer/T–cell lymphoma，ENKTL)为非霍奇金淋巴瘤的一个亚型，中国发病率远高于西方国家。该病恶性程度高，对化疗不敏感，生存期短，预后差，EB病毒(Epstein–Barr virus，EBV)感染与该病的发生、发展有密切关系，但仍有少数患者无EBV感染。本研究探讨EBV编码的小mRNA(EBV–encoded small RNA，EBER)原位杂交阴性患者的临床特征及预后相关因素。**方法：**选取2011年8月—2015年10月郑州大学第一附属医院病理科诊断为ENKTL的326例标本，采用原位杂交技术检测其EBER表达，回顾性分析8例EBER阴性患者临床特征及预后相关因素。**结果：**326例ENKTL中，EBER表达阴性率为2.45%(8/326)，8例EBER表达阴性患者的中位生存期为17个月。EBER阴性与EBER阳性患者的生存率log-rank检验，两条生存曲线差异有统计学意义(χ^2=6.407，P=0.011)。多变量Cox比例风险回归分析表明，乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase，LDH)与EBER阴性ENKTL患者预后有关(P=0.008)，血浆中EBV-DNA拷贝数与EBER阴性患者的预后无关(P>0.05)。**结论：**EBER表达阴性ENKTL发病率低，预后较EBER阳性患者差，LDH升高可能是其预后不良因素。

［关键词］ 结外NK/T细胞淋巴瘤；EB病毒编码的小mRNA阴性；临床特征；预后
DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2016.06.009
中图分类号：R733.4　　文献标志码：A　　文章编号：1007-3639(2016)06-0533-05

The clinical features and prognosis of EBER negative extranodal natural killer/T-cell lymphoma

JIA Sisi[1,2], NAN Feifei[1,2], LI Sucai[1,2], CAO Jingyu[1,2], WANG Guannan[3], ZHANG Mingzhi[1,2], ZHANG Lei[1,2] (1.Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; 2.Lymphoma Diagnosis and Treatment Center of Henan Province, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; 3.Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China)
Correspondence to: ZHANG Lei E-mail: zl2909@163.com

［**Abstract**］ **Background and purpose:** Extranodal natural killer/T-cell lymphoma (ENKTL) is a form of non-Hodgkin’s lymphoma. The ENKTL incidence in China is much higher than that in the Western countries. The disease is highly malignant, not sensitive to chemotherapy, has short survival period and poor prognosis. Epstein-Barr virus (EBV) infection has close relationship with the development of the disease. However, there are still a few patients without EBV infection. This study aimed to discuss the clinical features and prognosis of EBV-encoded small RNA (EBER) in situ hybridization negative ENKTL. **Methods:** From Aug. 2011 to Oct. 2015, 326 cases were diagnosed with ENKTL from the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University. The expression of EBER was detected by in situ hybridization technique. The clinical pathological characteristics and prognosis of EBER-negative patients were analyzed. **Results:** In 326 patients with ENKTL, the negative rate of EBER was 2.45% (8/326). In 8 EBER-negative patients, the median survival time was 17 months. The log-rank test revealed that there was a significant difference between EBER-negative and EBER-positive curves (χ^2=6.407, P=0.011). Multivariate Cox proportional hazards regression

基金项目：河南省科技计划项目(142300410389)。
通信作者：张　蕾　E-mail: zl2909@163.com

analysis showed that in EBER-negative ENKTL, only lactate dehydrogenase (LDH) predicted survival time (P=0.008). EBV-DNA copy number in plasma was not significantly correlated with survival time (P>0.05). **Conclusion:** The incidence of EBER-negative ENKTL is low. Patients with EBER-negative ENKTL have poorer prognosis than EBER-positive patients. Elevated LDH may be a factor indicating poor prognosis.

［**Key words**］ Extranodal NK/T-cell lymphoma; EB virus-encoded small RNA negative; Clinical features; Prognosis

结外NK/T细胞淋巴瘤(extranodal natural killer/T-cell lymphoma，ENKTL)为非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma，NHL)的一个亚型，其发病率占NHL的5%~18%[1]，居T细胞淋巴瘤的首位，中国发病率远高于西方国家，主要发生在鼻腔及鼻侧的区域，是一类具有特殊形态、免疫表型和生物学行为的肿瘤。该病呈高度侵袭性进展，对化疗不敏感，生存期短，预后差。Suzuki[2]报道，EB病毒(Epstein-Barr virus，EBV)存在于几乎所有ENKTL的肿瘤细胞中，通常可用原位杂交技术在肿瘤细胞中检测到EBV编码的小mRNA(EBV-encoded small RNA，EBER)，但仍有极少数患者EBER表达阴性。关于这部分患者的临床特征及预后因素目前未见相关报道。本研究采用原位杂交技术检测326例ENKTL患者标本中EBER表达情况，回顾性研究8例EBER阴性患者血浆中EBV-DNA拷贝数及临床特征，分析其与预后的相关性。

1　资料和方法

1.1　材料

1.1.1　一般材料

收集郑州大学第一附属医院病理科2011年8月—2015年10月经HE染色和免疫组织化学确诊的ENKTL病例326例，经两位资深淋巴瘤病理医师进行重新阅片，均符合2008年WHO淋巴造血系统肿瘤分类标准[3]，用原位杂交技术筛选出8例EBER表达阴性病例。

1.1.2　试剂与仪器

ISH-6021 EBER原位杂交检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司，电热恒温培养箱(DNP-9052BS-m)购自上海新苗医疗器械制造有限公司，组织芯片机购自美国Beecher公司，TheraioBrite原位杂交仪购自美国StatSpin公司，石蜡切片机购自德国Leica公司，OLYMPUS BX51高级荧光显微镜购自日本Olympus公司。

1.2　方法

1.2.1　EBER原位杂交检测方法

将常规石蜡包埋的ENKTL病例的石蜡组织制成4 μm石蜡切片，经56~60 ℃烤片2~16 h。具体操作方法参照EBER原位杂交试剂盒说明书进行。

1.2.2　EBER原位杂交结果判定

以已知阳性的鼻咽癌组织为阳性对照，PBS缓冲液代替杂交液或一抗为阴性对照。EBER阳性信号定位于细胞核，呈棕黄色，细胞膜、细胞质不着色；反之为阴性。判断标准参照参考文献［4］：中倍视野(×20)观察阳性细胞数，分4个等级：0级(0~1个细胞)；1级(1~10个细细胞)；2级(10~100个细胞)；3级(>100个细胞)。

1.2.3　ENKTL患者的观察指标及随访

观察指标包括EBER阴性及EBER阳性的ENKTL病例的年龄、性别、原发部位、分期、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase，LDH)、是否合并B症状、预后指数、治疗前血浆EBV-DNA拷贝数和治疗方案。以电话形式进行随访，起始时间为病理确诊时间，随访截止2015年12月1日，随访时间为1.5~48.0个月。

1.3　统计学处理

采用SPSS 21.0软件进行统计学处理。生存资料中，EBER阴性及EBER阳性患者的生存分析用Kaplan-Meier生存分析法，两组患者的生存率比较用log-rank检验。多因素生存分析用Cox比例风险回归模型法。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 ENKTL中EBER表达阴性率

在326例ENKTL病例中，EBER表达阴性8例，EBER表达阳性318例，EBV阴性率为2.45%。

2.2 EBER表达阴性患者的临床特征

8例EBER表达阴性ENKTL患者中，男性6例，女性2例，男女比例为6∶2；年龄21~70岁，中位年龄(45.25±14.76)岁；7例发生于鼻腔，1例原发于食管。

所有患者均为Ⅰ~Ⅱ期；均无局部淋巴结肿大；其中3例伴发B症状；1例LDH升高；预后指数0分5例，1分2例，2分1例；共有3例患者治疗前血浆EBV-DNA拷贝数增高，分别为6.28×10^2/mL、7.13×10^4/mL和5.23×10^4/mL(表1)。

2.3 病理形态学

ENKTL的病理形态特征表现为非均质性，细胞大小不等，形态为中小细胞混合，细胞核复杂或多态性[5]。特征性表现为血管中心性病变，肿瘤细胞侵犯小血管壁或血管周围组织，导致组织缺血和广泛坏死；混合性炎性细胞多，区域坏死常见。最典型的免疫表型为CD56阳性，同时CD2、胞质CD3ε、CD8和CD45RO等T细胞相关抗原常为阳性，但细胞膜CD3阴性，可见细胞毒性颗粒蛋白，如颗粒酶B、T细胞内抗原和穿孔素等。

2.4 生存分析

截至随访日期2015年12月1日，8例EBER阴性ENKTL患者中，存活3例，死亡5例。EBER阳性患者中，共53例检测了治疗前EBV-DNA拷贝数。

用Kaplan-Meier生存分析法分析61例ENKTL患者生存情况，得出其生存曲线，EBER阴性患者中位生存期为17个月，尚无法估计EBER阳性患者中位生存期(图1)。两组生存率log-rank检验，两条生存曲线差异有统计学意义(χ^2=6.407，P=0.011)。

运用Cox模型生存分析法，以年龄、性别、原发部位、分期、LDH、B症状、预后指数、治疗前血浆EBV-DNA拷贝数和治疗方案9个因素做多因素生存分析，得出其中仅LDH与EBER阴性结外NK/T细胞淋巴瘤患者死亡有关(P=0.008)，而治疗前血浆EBV-DNA拷贝数等其他因素与EBER阴性患者的死亡均无关(P>0.05，表2)。

表1　8例EBER表达阴性ENKTL患者临床特征

Tab. 1　The clinical features of eight EBER negative ENKTL patients

No.	Age/year	Gender	Primary site	B	Local lymphonode	LDH	Stage	KPI	EBV-DNA/mL	Therapy	PFS t/month	OS t/month
1	37	Male	Nasal cavity	N	Normal	Normal	Ⅱ	0	Normal	VIPD+RT	9	9
2	51	Female	Nasal cavity	N	Normal	Normal	Ⅰ	0	Normal	RT	6	6
3	49	Male	Nasal cavity	N	Normal	Normal	Ⅰ	0	6.28×10^2	VIPD+RT	25	25
4	49	Male	Nasal cavity	N	Normal	Normal	Ⅰ	0	Normal	CHOP+RT	3	5
5	21	Male	Nasal cavity	Y	Normal	Normal	Ⅰ	1	7.13×10^4	RT	1	1.5
6	52	Male	Esophagus	N	Normal	Normal	Ⅰ	0	Normal	VIPD+RT	14	17
7	70	Male	Nasal cavity	Y	Normal	Normal	Ⅰ	1	Normal	CHOP+RT	4	9
8	33	Female	Nasal cavity	Y	Normal	Normal	Ⅱ	1	5.23×10^4	Gemcitabine	27	31

B: B symptoms; N: No; Y: Yes; KPI: The ENKTL prognostic index; RT: Radiotherapy; VIPD: Etoposide, ifosfamide, cisplatin and dexamethasone; CHOP: Cyclophosphamide, vincristine, epirubicin and prednisone; PFS: Progression-free survival; OS: Overall survival

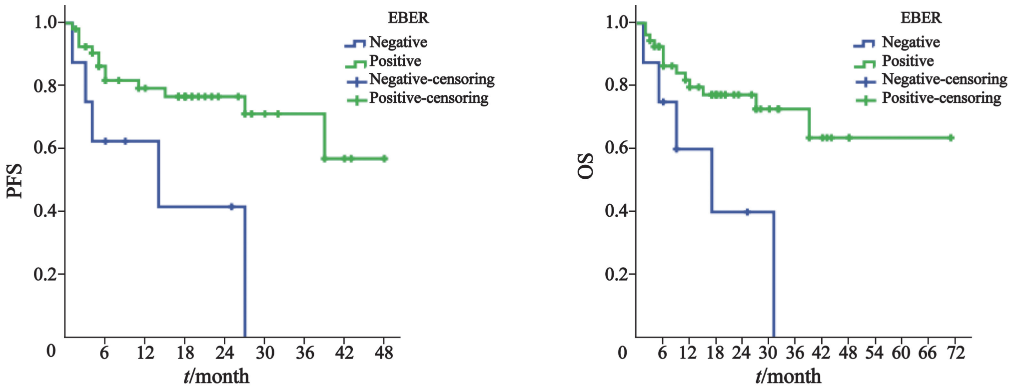

图 1 EBER阴性及EBER阳性ENKTL患者PFS及OS曲线

Fig. 1 The PFS and OS curves of EBER-negative and EBER-positive ENKTL patients

表 2 8例EBER阴性ENKTL患者Cox多变量回归分析结果

Tab. 2 The results of Cox multivariate regression analysis of EBER-negative ENKTL

Item	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0%CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
LDH*	10.003	56.203	0.032	1	0.859	22 097.286	0.000	1.528E+052

*: Forward stepwise Cox model, age, gender, primary site, staging, B symptoms, prognostic index, pretreatment plasma EBV DNA copy number, and therapy for P>0.05 excluded from the survival function, the remaining LDH as risk factors for prognosis

3 讨 论

多项研究表明，ENKTL的发生、发展与EBV感染密切相关[6-8]。EBER是EBV的表达产物，在EBV感染的任何时期转录，包括潜伏期和病毒复制期，其表达量很高，最适于临床诊断EBV感染[4]。外周血EBV-DNA拷贝数增高在疾病分期、B症状、客观缓解率及无进展生存期方面具有重要的临床意义[9]，可作为治疗后微小残留病的一项指标[10]。目前针对ENKTL的研究主要围绕EBV感染，然而EBER表达阴性者的临床病理特征及预后相关因素尚未见相关报道。

本研究对确诊为ENKTL的326例标本重新检测其EBER表达情况，发现仅有8例标本EBER表达为阴性，其EBV感染率达97.55%，与Barrionuevo等[11]的报道类似。王小艺等[12]在对2008年1月—2012年4月诊断的淋巴瘤EBV感染状态的一项调查中发现，36例ENKTL中有28例EBER表达阳性，其阳性率为84.8%。本研究结果高于王小艺等报道所占比例，可能与分子生物技术的进步、EBER原位杂交技术的灵敏度增高有关。

回顾性分析该8例患者的临床病理特征，并随访患者生存情况，发现男性患者多于女性，且好发于青年男性，原发部位多于鼻腔，这些与EBV感染者类似[1-2]。所有患者均为Ⅰ~Ⅱ期，其中3例治疗前血浆EBV-DNA拷贝数增高，1例LDH升高；8例患者中，7例均采用放疗为主联合化疗的方法治疗，1例单纯应用含吉西他滨方案化疗；中位生存时间为17个月。本研究发现，EBER阴性ENKTL患者生存期较EBER阳性者短，预后差，可能与EBER阴性患者采用放疗联合CHOP类方案治疗及EBER阴性病例数较少有关；年龄、性别、原发部位是否鼻腔、临床分期、B症状、预后指数和治疗前血浆EBV-DNA拷贝数均与生存时间无关，仅LDH升高是影响患者生存的独立因素，这与大多数报

道不一致。可能是EBER表达阴性病例少见，仍需大样本研究。

近年来，随着含吉西他滨或左旋门冬酰胺酶方案的应用，ENKTL的预后已有大幅度提升[13]，但EBV致病机制仍不明确，研究者致力于研究EBV免疫逃避的表观遗传学机制并治疗EBV感染[7,14]，从而提高ENKTL乃至所有EBV相关疾病的疗效及预后，然而在EBER不表达患者中，该种方案是否可行有待进一步研究。

本研究结果初步表明，EBER表达阴性的ENKTL的临床病理特征及预后相关因素与EBER阳性的ENKTL截然不同，但EBER原位杂交在ENKTL的诊断、治疗和预后方面仍有重要的提示作用。本研究病例数有限，仍需进一步探索。

［参 考 文 献］

［1］ AU W Y, WEISENBURGER D D, INTRAGUMTORNCHAI T, et al. Clinical differences between nasal and extranasal natural killer/T-cell lymphoma: a study of 136 cases from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project［J］. Blood, 2009, 113(17): 3931-3937.

［2］ SUZUKI R. Pathogenesis and treatment of extranodal natural killer/T-cell lymphoma［J］. Semin Hematol, 2014, 51(1): 42-51.

［3］ SABATTINI E, BACCI F, SAGRAMOSO C, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview［J］. Pathologica, 2010, 102(3): 83-87.

［4］ TAN B T, WARNKE R A, ARBER D A. The frequency of B- and T-cell gene rearrangements and Epstein-Barr virus in T-cell lymphomas: a comparison between angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified with and without associated B-cell proliferations［J］. J Mol Diagn, 2006, 8(4): 466-475, 527.

［5］ 丁　浩. 结外NK/T细胞淋巴瘤鼻型诊断和分期认识进展［J］. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2011, 11(3): 183-186.

［6］ MURATA T, SATO Y, KIMURA H. Modes of infection and oncogenesis by the Epstein-Barr virus［J］. Rev Med Virol, 2014, 24(4): 242-253.

［7］ ANAGNOSTOPOULOS I, JOHRENS K. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferations and lymphomas［J］. Pathology, 2013, 34(3): 262-271.

［8］ RICKINSON A B. Co-infections, inflammation and oncogenesis: future directions for EBV research［J］. Semin Cancer Biol, 2014, 26: 99-115.

［9］ 刘文硕, 南飞飞, 贾思思, 等. 结外NK/T细胞淋巴瘤检测EB病毒与疗效关系的研究［J］. 中国肿瘤临床, 2015, 42(2): 105-108.

［10］ WANG L, WANG H, WANG J H, et al. Post-treatment plasma EBV-DNA positivity predicts early relapse and poor prognosis for patients with extranodal NK/T cell lymphoma in the era of asparaginase［J］. Oncotarget, 2015, 6(30): 30317-30326.

［11］ BARRIONUEVO C, ZAHARIA M, MARTINEZ M T, et al. Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type: study of clinicopathologic and prognosis factors in a series of 78 cases from Peru［J］. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2007, 15(1): 38-44.

［12］ 王小艺, 岑溪南, 任汉云. 淋巴瘤患者EBV感染状态的调查［J］. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(6): 1584-1590.

［13］ ZHOU Z, LI X, CHEN C, et al. Effectiveness of gemcitabine, pegaspargase, cisplatin, and dexamethasone (DDGP) combination chemotherapy in the treatment of relapsed/refractory extranodal NK/T cell lymphoma: a retrospective study of 17 patients［J］. Ann Hematol, 2014, 93(11): 1889-1894.

［14］ TAYLOR G S, LONG H M, BROOKS J M, et al. The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease［J］. Annu Rev Immunol, 2015, 33: 787-821.

（收稿日期：2015-12-18　修回日期：2016-03-22）