



· 论 著 ·

# 弥漫大B细胞淋巴瘤中NF- $\kappa$ B/p65、PD-1、PD-L1表达相关性研究及其蛋白表达的临床意义

王 平, 杨文秀, 周 杰, 冯江龙, 林超群

贵州医科大学病理学教研室, 贵州 贵阳 550004

**【摘要】** 背景与目的: 弥漫大B细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 中NF- $\kappa$ B通路激活为重要发病机制, PD-1/PD-L1通路活化也与其相关, 且NF- $\kappa$ B/p65、程序性死亡 [ 蛋白 ] -1 (programmed death-1, PD-1)、程序性死亡 [ 蛋白 ] 配体-1 (programmed death ligand-1, PD-L1) 蛋白表达与患者不良预后有关, 但目前尚未见研究探讨它们之间的关系。探讨p65蛋白高表达与PD-1、PD-L1蛋白和mRNA的相关性, 分析p65、PD-1、PD-L1蛋白表达与临床病理学特征、总生存期 (overall survival, OS) 的关系。**方法:** 回顾性收集贵州医科大学附属医院病理科2010年1月—2017年12月90例DLBCL组织蜡块, 采用免疫组织化学染色检测p65蛋白并分为p65蛋白高表达组和低表达组; 免疫组织化学染色法检测各组PD-1蛋白; 免疫组织化学双标记染色法检测各组肿瘤细胞PD-L1或肿瘤微环境细胞PD-L1 (PD-L1 of tumor microenvironment cells, mPD-L1), 即肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor-infiltrating lymphocyte, TIL) 的细胞膜上表达的PD-L1蛋白; 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 检测各组中PD-1、PD-L1的mRNA表达水平; 收集临床病理学资料并随访; 对实验数据进行统计学分析。**结果:** 90例样本中, p65高表达率为61.11% (55/90), PD-1阳性率为32.22% (29/90), 肿瘤细胞PD-L1阳性率为24.44% (22/90), mPD-L1阳性率为28.89% (26/90); p65高表达与PD-1蛋白及mRNA均无相关性 ( $P$ 值均 $>0.05$ ), 但p65高表达与肿瘤细胞PD-L1或mPD-L1蛋白表达存在相关性 ( $P=0.022$ ,  $P=0.015$ ), 且在不同p65蛋白表达组间PD-L1 mRNA均值差异有统计学意义, p65高表达组相对较高 ( $P=0.012$ ); 随访数据显示PD-1阳性与高国际预后指数 (international prognostic index, IPI) 评分有关 ( $P=0.044$ ), PD-L1阳性与高IPI评分及B症状的出现有关 ( $P=0.007$ ,  $P=0.001$ ); Kaplan-Meier显示DLBCL中p65、PD-1、PD-L1、mPD-L1蛋白表达与患者OS相关, 且p65高表达、PD-1阳性、PD-L1阳性、mPD-L1阳性患者OS相对较短 ( $P$ 值分别为0.038、0.015、0.028、0.010)。**结论:** DLBCL中PD-L1蛋白和mRNA上调表达与p65蛋白高表达相关; p65、PD-1、PD-L1、mPD-L1蛋白水平与患者OS较短有关, 这些蛋白对临床及生存预后评估具有潜在价值。

**【关键词】** 弥漫大B细胞淋巴瘤; NF- $\kappa$ B/p65; 程序性死亡 [ 蛋白 ] -1; 程序性死亡 [ 蛋白 ] 配体-1; 相关性

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2020.05.009

中图分类号: R733.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2020)05-0375-08

**The correlation of NF- $\kappa$ B/p65, PD-1 and PD-L1 expressions and their clinical significance in diffuse large B-cell lymphoma** WANG Ping, YANG Wenxiu, ZHOU Jie, FENG Jianglong, LIN Chaoqun (Department of Pathology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China)

Correspondence to: YANG Wenxiu E-mail: ypq1964@163.com

**【Abstract】 Background and purpose:** Activation of NF- $\kappa$ B pathway is an important mechanism in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), which is also associated with the activation of programmed death-1 (PD-1)/programmed death ligand-1 (PD-L1) pathway, and protein expressions of NF- $\kappa$ B/p65, PD-1 and PD-L1 are associated with poor prognosis in patients,

but the relationship between them has not been investigated. This study attempted to investigate the correlation between high p65 protein expression and protein and mRNA levels of PD-1 and PD-L1, and to analyze the correlation among p65, PD-1 and PD-L1 protein expressions and the clinicopathological characteristics and overall survival (OS). **Methods:** A total of 90 cases of DLBCL tissue wax blocks from Department of Pathology in Guizhou Medical University were enrolled in this study from Jan. 2010 to Dec. 2017. The p65 protein was detected by immunohistochemical staining, and DLBCL tissues were divided into high expression group and low expression group. PD-1 protein in each group was detected by immunohistochemical staining, while the expression of PD-L1 in tumor cells and tumor microenvironment cells (mPD-L1) [ tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) ] was detected by immunohistochemical double labeling staining. The relative mRNA expressions of PD-1 and PD-L1 in the p65 high expression group and p65 low expression group were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR). The clinicopathological data were collected, and the follow-up was done. Finally, the experimental data were statistically analyzed. **Results:** Among all the samples, p65 positive rate was 61.11% (55/90), PD-1 positive rate was 32.22% (29/90), PD-L1 positive rate in tumor cells was 24.44% (22/90), and PD-L1 positive rate in tumor microenvironment cells (mPD-L1) was 28.89% (26/90). p65 high expression was not correlated with PD-1 protein or mRNA ( $P>0.05$ ), whereas p65 high expression was correlated with PD-L1 protein expression in tumor cells or microenvironment cells ( $P=0.022$ ,  $P=0.015$ ). There was a statistically significant difference in PD-L1 mRNA expression between groups, and the p65+ group was relatively higher ( $P=0.012$ ). Clinical data showed that PD-1 positive rate was associated with high IPI score ( $P=0.044$ ), and PD-L1 positive rate was associated with high IPI score and the occurrence of symptoms B ( $P=0.007$ ,  $P=0.001$ ). Kaplan-Meier analysis suggested that the expressions of p65, PD-1, PD-L1 and mPD-L1 were correlated with the OS of the patients with DLBCL, and the OS of patients who had p65 high expression, positive PD-1, PD-L1 and mPD-L1 was relatively short ( $P=0.038$ ,  $0.015$ ,  $0.028$ ,  $0.010$ ). **Conclusion:** The up-regulated expressions of PD-L1 protein and mRNA are correlated with the high expression of p65 protein in DLBCL. Protein expressions of p65, PD-1, PD-L1 and mPD-L1 are related to shorter OS in patients, and these protein expressions have potential value for clinical and prognostic evaluation of survival.

[Key words] Diffuse large B-cell lymphoma; NF- $\kappa$ B/p65; Programmed death-1; Programmed death ligand-1; Correlation

弥漫大B细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 是B细胞非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL) 中最常见的亚型, 尽管R-CHOP、DA-EPOCH-R等方案治疗有效, 仍有30%以上的患者复发或转变成难治性淋巴瘤<sup>[1]</sup>。目前认为核因子- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B) 通路激活是DLBCL的重要发病机制, 其中NF- $\kappa$ B扮演着关键角色, 尤其是活化细胞来源弥漫大B细胞淋巴瘤 (activated B-cell like-DLBCL, ABC-DLBCL)<sup>[2-3]</sup>; 程序性死亡受体1 (programmed cell death-1, PD-1) 及其配体 (programmed cell death ligand-1, PD-L1) 与肿瘤细胞免疫“逃逸”相关, 临床资料统计发现DLBCL患者若高表达PD-1、PD-L1其生存预后均较差<sup>[4-6]</sup>。多项体外细胞学实验发现在胃癌、乳腺癌、T细胞淋巴瘤中NF- $\kappa$ B的激活能促进或调节PD-L1的表达<sup>[7-9]</sup>。目前, 在DLBCL中NF- $\kappa$ B通路与PD-1/PD-L1通路是否存在“串话” (crosstalk) 尚未见报道; 因此, 本研究收集DLBCL患者随访数据和临床病理学资料, 并

采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)、普通免疫组织化学及免疫组织化学双标记染色检测患者蜡块组织中相关mRNA和蛋白水平, 初步分析其与患者临床病理学参数之间的关系及生存预后的价值。

## 1 资料和方法

### 1.1 研究对象

回顾性收集贵州医科大学附属医院病理科2010年1月1日—2017年12月31日DLBCL患者的组织蜡块及其临床数据; 选取直径大于0.5 cm、组织丰富且明确诊断为DLBCL的90例蜡块进行实验。

### 1.2 主要试剂

一抗 (均为单克隆抗体) PD-1、PD-L1和NF- $\kappa$ B/p65购自美国Abcam公司; 一抗Pax5, 二抗试剂盒 (PV-9001、PV-9102) 及显色剂 (DAB和AP-Red) 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。RNA提取试剂盒

购自厦门艾德生物医药科技股份有限公司；SYBR Green荧光染料、反转录试剂盒、内参均购自宝生物工程（大连）有限公司；PD-1、PD-L1引物购自生工生物工程（上海）有限公司。

### 1.3 PV二步法检测p65、PD-1蛋白并根据p65结果分组

蜡块切片4  $\mu\text{m}$ 厚，脱蜡、水化、修复抗原（EDTA pH为8.0），按试剂盒进行一抗温育过夜（p65和PD-1分别以1:2 000、1:300稀释）；DAB显色后进行判断，以扁桃体组织作为阳性对照，阴性对照以PBS（pH为7.35）替代一抗。

#### 1.3.1 p65判读

肿瘤细胞的细胞质或细胞核出现棕黄色颗粒为蛋白表达，据参考文献[10]采用阳性细胞所占比例及染色强度评分（肿瘤阳性细胞占比：无细胞阳性为0分，<10%阳性为1分，10%~40%阳性为2分，>40%阳性为3分；染色强度：无染色为0分，浅棕色为1分，棕黄色为2分，深棕色为3分），最终得分为二者的乘积，定义得分0~4分为p65低表达组，6~9分为高表达组。

#### 1.3.2 PD-1判读

PD-1表达于肿瘤组织的肿瘤浸润淋巴细胞（tumor-infiltrating lymphocyte, TIL）细胞核，该部位出现棕黄色颗粒为蛋白表达，采用计量方法，随机选择10个不重复400倍视野，每个视野随机计数400个细胞，统计阳性细胞比例，取所有视野的平均值作为该例表达率，并取所有病例表达率的均数为“截断值”（cutoff值），大于或等于该阈值定义为PD-1阳性，否则为阴性<sup>[11]</sup>。

### 1.4 免疫组织化学双标记染色检测PD-L1的表达

同1.3方法DAB显色PD-L1蛋白后，再以EDTA（pH为9.0）修复，按SAP-9102试剂盒步骤用AP-Red显色剂检测Pax5蛋白，透明封片后进行图像采集并分析。PD-L1、Pax5阳性对照分别为乳腺癌组织、扁桃体组织，阴性对照以TBS（pH为7.35）替代一抗，以TBS作为缓冲液及冲洗液。

细胞膜呈棕黄色且细胞核呈红色为肿瘤细胞

PD-L1蛋白表达，细胞膜呈棕黄色但细胞核未呈红色为肿瘤微环境细胞PD-L1（PD-L1 of tumor microenvironment cells, mPD-L1）（即TIL的PD-L1）蛋白表达；采用同PD-1一样的计量方法，统计PD-L1在肿瘤细胞或在微环境细胞上的表达率；定义肿瘤细胞表达率 $\geq$ 截断值为PD-L1阳性<sup>[11]</sup>；另外在PD-L1阴性的DLBCL病例中，若PD-L1于微环境细胞（即TIL）表达率 $\geq$ 20%，定义为mPD-L1阳性<sup>[12]</sup>。

### 1.5 RNA提取、反转录、RTFQ-PCR检测

RNA提取、反转录：取8  $\mu\text{m}$ 组织进行脱蜡、蛋白酶消化处理，据RNA提取试剂盒步骤提取RNA，并用DEPC水溶解RNA，DEPC于核酸定量仪调零后，检测RNA浓度及纯度，取 $D$ 值（ $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ ）在1.8~2.0的样本往下进行实验。按宝生物工程（大连）有限公司RR47A试剂说明，先进行去除基因组DNA（42  $^{\circ}\text{C}$  2 min），于冰上配置反转录体系后进行反转录（37  $^{\circ}\text{C}$  30 min，再加热至85  $^{\circ}\text{C}$  5 s），缓慢冷却分装后于-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

RTFQ-PCR反应：分p65蛋白高表达组和低表达组配置反应体系，据宝生物工程（大连）有限公司RR820A试剂盒说明，取cDNA样本于冰上配置SYBR Green RTFQ-PCR反应体系，PD-1上游引物为5'-GCGTGACTTCCACATGAGC-3'，下游引物为5'-GCAGGCTCTCTTTGATCTGC-3'；PD-L1上游引物为5'-CTATGGTGTGCGGACTACA-3'，下游引物为5'-TGC TTGTCCAGATGACTTCG-3'，各组中每个样本设置复孔3个（先配置总反应体系，再分装3个复孔）；以 $\beta$ -actin（上游引物为5'-TAGTTGCGTTACACCCTTTCTTG-3'，下游引物为5'-TCA CCCTTCACCGTTCCAAGTTT-3'）作为内参，于Bio-Rad CFX connect RTFQ-PCR仪上进行反应（反应条件：预变性95  $^{\circ}\text{C}$  30 s，变性95  $^{\circ}\text{C}$  5 s，退火/延伸为60  $^{\circ}\text{C}$  30 s，重复50个循环），以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值为mRNA相对表达量计算<sup>[13]</sup>（ $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ ， $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{样本}} - \Delta Ct_{\text{组内最低值}}$ ）。

### 1.6 统计学处理

SPSS 17.0软件进行统计运算；计数资料组

间差异性比较用四格表卡方检验；相关性分析用Spearman秩相关；组间mRNA均值差异比较采用 $t$ 检验，且正态分布用 $\bar{x}\pm s$ 表示，偏态分布数据经 $(\lg 10)$ 转化为正态分布后用 $(10^{\lg x} \pm 10^{\lg s})$ 表示；生存分析采用Kaplan-Meier曲线表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 临床资料

DLBCL共90例，年龄17~82岁（中位年龄58.5岁），其中男性47例，女性43例；据Hans分型，14例为GCB型，76例为non-GCB型， $< 60$ 岁48例， $\geq 60$ 岁42例，I+II期49例，III+IV期41例，25例有B症状，国际预后指数（international

prognostic index, IPI）评分0~2分组、3~5分组分别为51例、39例，51例检查血清乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase, LDH），42例检查 $\beta 2$ 微球蛋白（ $\beta 2$ -microglobulin,  $\beta 2$ -MG）。

### 2.2 p65蛋白高表达与PD-1、PD-L1蛋白的相关性

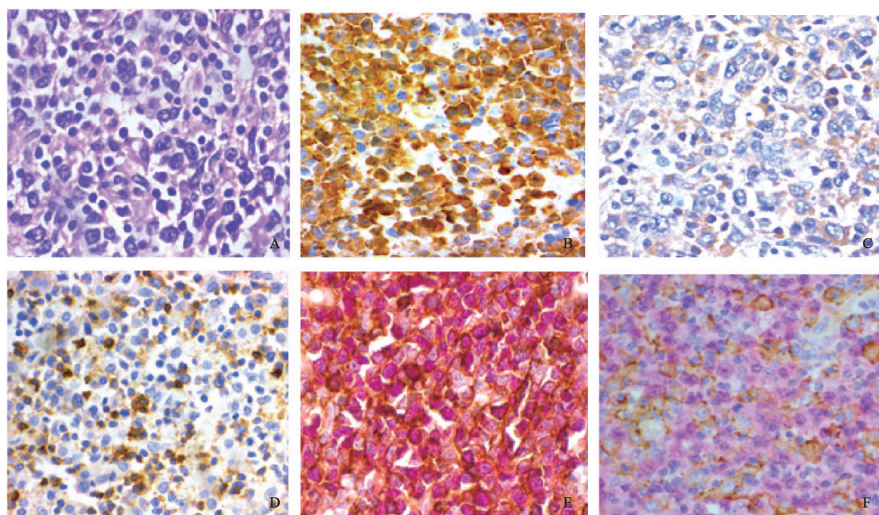
如表1所示，90例样本中p65高表达占61.11%（55/90），PD-1阳性率为32.22%（29/90），肿瘤细胞PD-L1阳性率为24.44%（22/90），mPD-L1阳性率为28.89%（26/90）；p65高表达与PD-1蛋白表达无相关性（ $\gamma=0.160$ ,  $P=0.132$ ）；但p65高表达与肿瘤细胞和肿瘤微环境细胞表达PD-L1蛋白相关（ $\gamma=0.242$ ,  $\gamma=0.295$ ； $P=0.022$ ,  $P=0.015$ ）。H-E染色、p65、PD-1、PD-L1蛋白表达见图1。

表1 90例DLBCL患者中p65蛋白表达与PD-1、PD-L1蛋白的相关性

Tab. 1 The correlation between p65 protein and PD-1, PD-L1 proteins in 90 DLBCL patients

Group	Case <i>n</i>	NF- $\kappa$ B/p65		$\gamma$	<i>P</i> value
		p65 high expression ( <i>N</i> =55)	p65 low expression ( <i>N</i> =35)		
PD-1 positive	29	21	8	0.160	0.132
PD-1 negative	61	34	27		
PD-L1 positive	22	18	4	0.242	0.022
PD-L1 negative	68	37	31		
mPD-L1 positive	26	19	7	0.295	0.015
mPD-L1 negative	42	18	24		

mPD-L1: PD-L1 of tumor microenvironment cells



(PV,  $\times 400$ )

图1 DLBCL的H-E染色和免疫组织化学染色结果

Fig. 1 Hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical results of DLBCL

A: H-E staining; B: p65 high expression; C: p65 low expression; D: PD-1 positive; E: PD-L1 positive; F: PD-L1 positive of tumor microenvironment cells

2.3 肿瘤细胞PD-1表达与mPD-L1表达的关系  
 肿瘤组织浸润T细胞表达PD-1与肿瘤细胞表达PD-L1显著相关 ( $\gamma=0.272, P=0.010$ ), 但

肿瘤组织浸润T细胞表达PD-1与微环境细胞(即TIL)表达PD-L1无相关性 ( $\gamma=0.035, P=0.777$ , 表2)。

表2 90例DLBCL患者中PD-1蛋白与PD-L1蛋白相关性

Tab. 2 The correlation between PD-1 protein and PD-L1 protein in 90 DLBCL patients

Group	Case n	PD-L1			$\gamma^\Delta$	$P^\Delta$	$\gamma^\#$	$P^\#$
		PD-L1 positive	PD-L1 negative					
			mPD-L1 positive	mPD-L1 negative				
PD-1 positive	29	12	7	10	0.272	0.010	0.035	0.777
PD-1 negative	61	10	19	32				

$\Delta$ : PD-L1 positive vs PD-L1 negative;  $\#$ : mPD-L1 positive vs mPD-L1 negative

2.4 PD-1、PD-L1相对mRNA表达量在不同p65蛋白量组间比较

采用RTFQ-PCR检测PD-1、PD-L1的mRNA, 经统计PD-1 mRNA相对表达量均值在P65蛋白低表达组(0.974 0±0.545 5)与高表达组均值(1.084 3±0.499 8)相比差异无统计学意义( $t=-0.985, P=0.327$ ); 但PD-L1 mRNA相对表达量均值在P65蛋白低表达组(1.1520±0.537 9)与高表达组(1.525 9±0.844 6)间差异有统计学意义, 且高表达组相对较高( $t=-2.566, P=0.012$ , 表3)。

表3 不同P65蛋白表达量组别中PD-1、PD-L1 mRNA相对表达量比较

Tab. 3 Comparison of relative mRNA expression levels of PD-1 and PD-L1 in different groups of P65 protein content

NF-κB/p65	Case n	PD-1 mRNA	PD-L1 mRNA
p65 low expression	35	0.974 0±0.545 5	1.152 0±0.537 9
p65 high expression	55	1.084 3±0.499 8	1.525 9±0.844 6
<i>t</i>		-0.985	-2.566
<i>P</i> value		0.327	0.012

2.5 p65、PD-1、PD-L1、mPD-L1蛋白表达与临床病理学特征的关系

p65蛋白表达在不同性别、年龄、Ann Arbor分期、B症状、IPI评分、LDH、β2-MG组中差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 但在不同Hans

分型组中存在差异, 且non-GCB组表达率相对较高 ( $P=0.007$ ); PD-1表达在不同性别、年龄、Hans分型、Ann Arbor分期、B症状、LDH、β2-MG组中差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 但PD-1蛋白表达在不同的IPI评分组中差异有统计学意义, 且3~5分组阳性率相对较高 ( $P=0.044$ ); 肿瘤细胞表达PD-L1蛋白在不同性别、年龄、Hans分型、Ann Arbor分期、LDH、β2-MG组中差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 但在不同IPI评分、B症状组中差异有统计学意义 ( $P=0.007, P=0.001$ ), 即若肿瘤细胞表达PD-L1, 患者IPI评分较高且易出现B症状; 此外, 肿瘤微环境细胞(即TIL)表达PD-L1蛋白在以上不同组别中差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ , 表4~5), 临床资料见2.1。

2.6 p65、PD-1、PD-L1、mPD-L1蛋白表达与患者的生存分析

在90例DLBCL患者中, 患者存活36例, 死亡34例, 失访20例; 中位存活时间38个月; 其中60例接受R-CHOP治疗, 余不详; Kaplan-Meier生存分析结果显示, p65高表达组患者总生存期(overall survival, OS)明显短于p65低表达组 ( $P=0.038$ ); PD-1阳性组患者OS明显短于PD-1阴性组 ( $P=0.015$ ); PD-L1阳性组患者OS明显短于PD-L1阴性组 ( $P=0.028$ ); mPD-L1阳性组患者OS明显短于mPD-L1阴性组 ( $P=0.010$ , 图2)。

表 4 90例DLBCL患者p65、PD-1表达与临床病理特征的关系

Tab. 4 Relationship between p65, PD-1 and clinicopathological characteristics in 90 DLBCL patients

Group	NF- $\kappa$ B/p65		$\chi^2$	P value	PD-1		$\chi^2$	P value
	p65 <sup>+</sup>	p65 <sup>-</sup>			PD-1 <sup>+</sup>	PD-1 <sup>-</sup>		
Gender								
Male	31	16	0.977	0.324	18	29	1.663	0.197
Female	24	19			11	32		
Age/year								
<60	31	17	0.873	0.360	15	33	0.045	0.833
$\geq$ 60	24	18			14	28		
Hans								
GCB	4	10	7.836	0.007	6	8	0.379	0.538
non-GCB	51	25			23	53		
Ann Arbor								
I - II	27	22	1.634	0.201	14	35	0.656	0.418
III - IV	28	13			15	26		
B symptoms								
Yes	18	7	1.727	0.189	10	15	0.959	0.327
No	37	28			19	46		
IPI								
0-2	27	24	3.306	0.690	12	39	4.072	0.044
3-5	28	11			17	22		
LDH Z <sub>B</sub> /(U·L <sup>-1</sup> )								
$\leq$ 245	18	10	0.158	0.691	9	19	2.092	0.148
>245	16	7			12	11		
$\beta$ 2-MG $\rho_B$ /(mg·L <sup>-1</sup> )								
1-3	18	10	0.891	0.345	9	19	1.262	0.261
>3	11	3			7	7		

表 5 90例DLBCL患者中肿瘤细胞和微环境PD-L1表达与临床病理特征的关系

Tab. 5 Relationship between expression of PD-L1 or mPD-L1 and clinicopathological characteristics in 90 DLBCL patients

Group	PD-L1			$\chi^2$ <sup>△</sup>	$\chi^2$ <sup>#</sup>	P value <sup>△</sup>	P value <sup>#</sup>
	PD-L1 positive	PD-L1 negative					
		mPD-L1 positive	mPD-L1 negative				
Gender							
Male	13	14	20	0.000	0.249	1.000	0.618
Female	9	12	22				
Age/year							
<60	10	11	27	0.726	3.146	0.394	0.076
$\geq$ 60	12	15	15				
Hans							
GCB	4	3	7	0.003	0.052	0.958	0.820
non-GCB	18	23	35				
Ann Arbor							
I - II	10	15	24	0.949	0.002	0.330	0.964
III - IV	12	11	18				
B symptoms							
Yes	11	5	9	7.167	0.047	0.007	0.828
No	11	21	33				
IPI							
0-2	6	20	25	10.245	2.172	0.001	0.141
3-5	16	6	17				
LDH z <sub>B</sub> /(U·L <sup>-1</sup> )							
$\leq$ 245	9	6	13	0.072	2.746	0.788	0.097
>245	6	9	6				
$\beta$ 2-MG $\rho_B$ /(mg·L <sup>-1</sup> )							
1-3	10	7	21	1.314	1.833	0.252	0.176
>3	6	4	4				

△: PD-L1 positive vs PD-L1 negative; #: mPD-L1 positive vs mPD-L1 negative

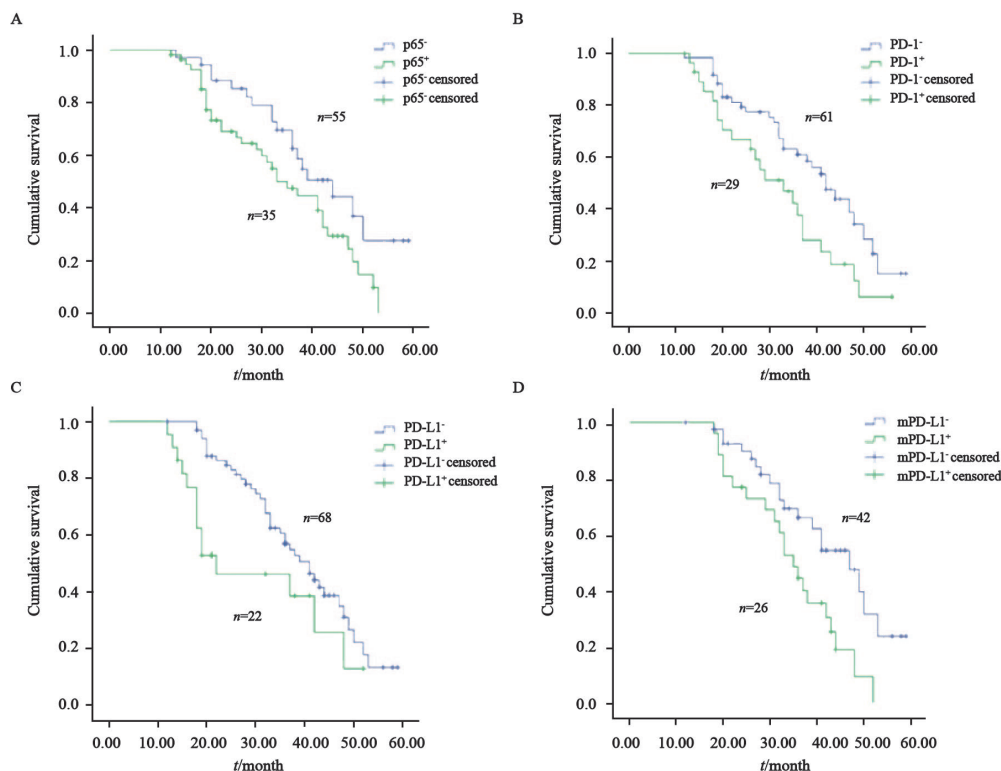


图2 DLBCL中不同组患者生存曲线比较

Fig. 2 Comparison of survival curves between different groups of patients in DLBCL

A: p65 high expression vs p65 low expression-; B: PD-1 positive vs PD-1 negative; C: PD-L1 positive vs PD-L1 negative; D: mPD-L1 positive vs mPD-L1 negative

### 3 讨 论

DLBCL具有明显的侵袭性及异质性，随着对其不断的深入研究和了解，针对该疾病的认识不再只是传统的细胞形态学及细胞起源，而是更加注重基因改变或信号转导通路激活对该疾病的影响<sup>[14]</sup>。

目前研究认为，NF- $\kappa$ B通路在淋巴瘤的发生和进展以及放化疗抵抗中起重要作用，尤其是非生发中心来源（non-GCB）型DLBCL<sup>[2-3, 11]</sup>。Davis等<sup>[15]</sup>在活化后细胞来源DLBCL细胞株离体实验中发现IKK激酶活性、NF- $\kappa$ B DNA绑定的活性及RAP活性与激活NF- $\kappa$ B通路有关，NF- $\kappa$ B通路激活是患者预后不良的原因之一。PD-1、PD-L1分别为染色体2q37、9p24.2上基因编码的一对负性共刺激分子，二者共同介导细胞凋亡及肿瘤细胞的免疫逃逸；Kiyasu等<sup>[6]</sup>、Liu等<sup>[12]</sup>团队分别检测1253例和92例DLBCL患者发现，PD-L1蛋白主要表达于non-GCB型DLBCL患者，且均与患者OS显著相关。目前关于NF- $\kappa$ B通

路与PD-1/PD-L1通路是否存在串话（crosstalk）的研究较少，尤其临床肿瘤研究中尚未见报道。

既往，Li等<sup>[7]</sup>在胃癌的离体细胞学实验中使用P65 siRNA对NF- $\kappa$ B/p65基因进行敲出能显著降低PD-L1的mRNA及蛋白表达，通过构建不同PD-L1基因启动子，发现PD-L1启动子含有一些有效的p65结合元件，提示p65可以作为转录因子直接上调PD-L1基因表达；此外，还有体外细胞研究<sup>[8-9]</sup>在乳腺癌及T细胞淋巴瘤细胞系中证实NF- $\kappa$ B的激活可以促进PD-L1的表达；本次实验检测DLBCL蜡块肿瘤组织NF- $\kappa$ B/P65、PD-L1蛋白发现：无论肿瘤细胞还是肿瘤微环境细胞（即TIL）表达PD-L1蛋白均与NF- $\kappa$ B/P65蛋白高表达显著相关；进一步通过RTFQ-PCR检测NF- $\kappa$ B/P65蛋白高表达组与低表达组PD-L1的mRNA发现PD-L1 mRNA在两组间存在显著差异，且NF- $\kappa$ B/P65蛋白高表达组PD-L1 mRNA相对表达量较高。既往实验和本研究都提示，DLBCL中PD-L1蛋白及mRNA上调表达与NF- $\kappa$ B/P65蛋白有关。

Yao等<sup>[16]</sup>在小鼠脊髓损伤后的炎症反应模

型中发现, PD-1缺乏可以促进NF- $\kappa$ B的激活;但本研究中NF- $\kappa$ B/P65高表达与PD-1蛋白及mRNA均未见相关性。

另外,在本研究中P65、PD-1、PD-L1蛋白表达均与患者OS相关;肿瘤细胞PD-L1阳性患者的IPI评分相对较高且易出现B症状;P65主要在non-GCB来源的DLBCL中表达,这些结果都与文献报道相符合<sup>[6, 12]</sup>。本实验随访数据及既往研究结果都提示, P65、PD-1和PD-L1蛋白表达与患者生存预后有关,这些蛋白表达对临床及生存预后评估都具有潜在价值;但在本次实验中PD-L1的表达在不同的Hans分型组中差异无统计学意义,这可能是样本量相对较小或者PD-L1蛋白判读的cutoff值不同所致。

作为回顾性研究,本实验样本量相对较小,结果与大样本研究相比可能存在倚倚;另外,本实验RNA的提取,使用的部分组织存储时间较长,可能会存在部分RNA降解的情况。

综上所述,DLBCL中PD-1蛋白和mRNA表达与p65蛋白高表达不相关,但PD-L1蛋白及mRNA上调表达均与p65蛋白高表达相关;P65、PD-1和PD-L1蛋白表达与这类淋巴瘤不良预后特别是OS有关,它们在这类淋巴瘤预后评估中的价值有待进一步研究证实。

#### [参 考 文 献]

- [1] ZHANG X Y, LIANG J H, WANG L, et al. DA-EPOCH-R improves the outcome over that of R-CHOP regimen for DLBCL patients below 60 years, GCB phenotype, and those with high-risk IPI, but not for double expressor lymphoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 145(1): 1-11.
- [2] LENZ G. Novel NF- $\kappa$ B regulator in ABC DLBCL [J]. *Blood*, 2016, 127(23): 2785-2786.
- [3] NIU M, SHEN Y, XU X, et al. Piperlongumine selectively suppresses ABC-DLBCL through inhibition of NF- $\kappa$ B p65 subunit nuclear import [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 462(4): 326-331.
- [4] ZHIHE L, SIYUN L, YINGMIN L, et al. PD-1 is highly expressed in diffuse large B-cell lymphoma with hepatitis B virus infection [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): 1-12.
- [5] FOUR M, CACHEUX V, TEMPIER A, et al. PD-1 and PD-L1 expression in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma are frequent and expression of PD-1 predicts poor survival [J]. *Hematol Oncol*, 2017, 35(4): 487-496.
- [6] KIYASU J, MIYOSHI H, HIRATA A, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2015, 126(19): 2193-2201.
- [7] LI H, XIA J Q, ZHU F S, et al. LPS promotes the expression of PD-L1 in gastric cancer cells through NF- $\kappa$ B activation [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(12): 9997-10004.
- [8] XUE J, CHEN C, QI M, et al. Type I  $\gamma$  phosphatidylinositol phosphate kinase regulates PD-L1 expression by activating NF- $\kappa$ B [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 42414-42427.
- [9] BI X W, WANG H, ZHANG W W, et al. PD-L1 is upregulated by EBV-driven LMP1 through NF- $\kappa$ B pathway and correlates with poor prognosis in natural killer/T-cell lymphoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9(1): 109-121.
- [10] 林 桐, 欧阳建, 张启国, 等. NF- $\kappa$ B/p65在弥漫大B细胞淋巴瘤患者肿瘤组织中的表达及临床意义 [J]. *中华血液学杂志*, 2015, 16(10): 872-875.  
LIN T, OUYANG J, ZHANG Q G, et al. The significance of NF- $\kappa$ B/p65 expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Chin J Hematol*, 2015, 16(10): 872-875.
- [11] 金静霞, 郑翠苹, 陈丽雅, 等. PD-1、PD-L1在弥漫大B细胞淋巴瘤组织中的差异性表达及其临床意义 [J]. *临床血液学杂志*, 2018, 31(1): 34-37.  
JIN J X, ZHENG C P, CHEN L Y, et al. The differential expression levels and clinical significance of PD-1 and PD-L1 in tumor tissues of diffuse large B-cell lymphoma [J]. *J Clin Hematol (China)*. 2018, 31(1): 34-37.
- [12] LIU Y, MA J, YU K, et al. Expression of programmed cell death 1/programmed cell death ligand 1 in the tumor microenvironments of primary gastrointestinal diffuse large B cell lymphomas [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(4): 507-512.
- [13] 杨 坤, 郝彦凤, 高 宁, 等. 程序性死亡受体1与其配体在T淋巴母细胞淋巴瘤/白血病中的表达及其临床意义 [J]. *白血病-淋巴瘤*, 2017, 26(10): 589-595.  
YANG K, XI Y F, GAO N, et al. Expression of programmed death 1 and programmed death ligand 1 in T-Lymphoblastic lymphoma/leukemia and their clinical significances [J]. *J Leuk Lymph*, 2017, 26(10): 589-595.
- [14] SZUMERA-CIECIEWICZ A, RYMKIEWICZ G, GRYGA LEWICZ B, et al. Comprehensive histopathological diagnostics of aggressive B-cell lymphomas based on the updated criteria of the World Health Organisation's 2017 classification [J]. *Polish J Pathol*, 2018, 69(1): 1-19.
- [15] DAVIS R E, BROWN K D, SIEBENLIST U, et al. Constitutive nuclear factor kappa B activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells [J]. *J Exp Med*, 2001, 194(12): 1861-1874.
- [16] YAO A, LIU F, CHEN K, et al. Programmed death 1 deficiency induces the polarization of macrophages/microglia to the M1 phenotype after spinal cord injury in mice [J]. *Neurotherapeutics*, 2014, 11(3): 636-650.

(收稿日期: 2019-12-30 修回日期: 2020-02-18)