

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.04.019

弥漫大 B 细胞淋巴瘤 CD68 和 CD34 表达情况及临床价值*

王雪莲, 孙丽华[△]

复旦大学附属中山医院青浦分院血液科, 上海 201700

摘要:目的 探讨弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)CD68 和 CD34 的表达及对预后的影响。方法 选取 2016 年 5 月至 2019 年 5 月该院确诊的 67 例 DLBCL 患者为研究对象。采用免疫组化法检测 CD68 和 CD34 的表达情况,分析不同特征 DLBCL 患者 CD68、CD34 的阳性表达及共表达情况,以及对预后的影响。结果 67 例 DLBCL 患者有 40 例 CD68 表达阳性,35 例 CD34 表达阳性。Ann Arbor 临床分期为 III~IV 期、国际预后指数(IPI)评分为 3~4 分、有骨髓侵犯 DLBCL 患者的 CD68 和 CD34 阳性率,以及二者的共表达率明显高于 Ann Arbor 临床分期为 I~II 期、IPI 评分为 0~2 分、无骨髓侵犯 DLBCL 患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。CD68 和 CD34 阳性患者 3 年总生存率和无进展生存率均低于 CD68 和 CD34 阴性患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 CD68 和 CD34 阳性表达与 DLBCL 患者的 Ann Arbor 临床分期、IPI 评分、骨髓侵犯及预后情况具有一定的关系,且 CD68 和 CD34 阳性 DLBCL 患者预后不良。

关键词:肿瘤微环境; 弥漫大 B 细胞淋巴瘤; 预后; CD68; CD34

中图分类号:R446.6

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)04-0518-05

Expression and clinical value of CD68 and CD34 in diffuse large B-cell lymphoma*

WANG Xuelian, SUN Lihua[△]

Department of Hematology, Qingpu Branch of Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201700, China

Abstract: Objective To investigate the expression of CD68 and CD34 in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and its influence on prognosis. **Methods** A total of 67 patients diagnosed as DLBCL in Qingpu Branch of Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University from May 2016 to May 2019 were selected as the research objects. The expressions of CD68 and CD34 were detected by immunohistochemistry method, the positive expression and co-expression of CD68 and CD34 in DLBCL patients with different characteristics were analyzed, as well as the influence on prognosis. **Results** Among 67 DLBCL patients, 40 cases were positive for CD68, and 35 cases were positive for CD34. The positive rates of CD68 and CD34, the co-expression rates of CD68 and CD34 in patients with Ann Arbor clinical stage III-IV, international prognostic index (IPI) score of 3-4, bone marrow invasion were significantly higher than those in patients with Ann Arbor clinical stage I-II, IPI score of 0-2 and no DLBCL invasion, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The 3-year overall survival rate and progression-free survival rate of CD68 and CD34 positive patients were lower than those of CD68 and CD34 negative patients respectively, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The positive expressions of CD68 and CD34 correlate with Ann Arbor clinical stage, IPI score, bone marrow invasion and prognosis of DLBCL patients, the prognosis of CD68 and CD34 positive DLBCL patient was poor.

Key words: tumor microenvironment; diffuse large B-cell lymphoma; prognosis; CD68; CD34

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)是最常见的非霍奇金淋巴瘤,是一组在遗传学、病理特征、免疫表型和临床表现及治疗反应上均具有高度异质性的侵袭性血液肿瘤^[1]。DLBCL 的影响因素包括遗传分子生物学、生活方式、家族史、药物、免疫紊乱和职业等,DLBCL 还具有不同的组织学特征,易在疾病早期发生远

处扩散。利妥昔单抗与环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松的联合使用(R-CHOP 方案)是目前治疗 DLBCL 的标准治疗方案。尽管使用了 R-CHOP 方案进行治疗,仍有许多 DLBCL 患者出现早期复发,甚至死亡^[2]。近年来,随着医疗技术的不断发展,肿瘤微环境(TME)在 DLBCL 中的作用机制及其对预后

* 基金项目:上海市青浦区卫生健康委员会面上项目(W2019-09)。

作者简介:王雪莲,女,副主任医师,主要从事淋巴瘤的基础与临床研究。△ 通信作者,E-mail:455940152@qq.com。

判断的价值已成为最新的研究热点。TME 是基于肿瘤细胞与基质成分、细胞外基质、炎症细胞和免疫细胞之间的相互作用,并在这个相互作用中表现出组成空间特征的显著异质性^[3]。肿瘤相关巨噬细胞(TAM)作为 TME 的重要组成部分,在肿瘤发生、发展中发挥着重要作用,其中 CD68 是 TAM 的特征性标志物之一。有研究发现,套细胞淋巴瘤中 CD68 阳性巨噬细胞计数升高与预后不良有关^[4]。CD34 是常用的血管内皮标志物,TAMMA 等^[5]通过对滤泡性淋巴瘤的研究发现,CD34 阳性的微血管不仅数量较多,而且 CD34 阳性的微血管数量与 CD68 阳性和 CD163 阳性巨噬细胞计数呈正相关,提示该类型巨噬细胞亚群具有重要血管生成潜力,微血管密度(MVD)升高者预后较差。所以,寻找有效的生物标志物来判断 DLBCL 的预后就显得非常重要。本研究应用免疫组化(SP)法检测 DLBCL 中 CD68 和 CD34 的表达,并分析二者判断 DLBCL 预后的价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2016 年 5 月至 2019 年 5 月本院诊断为 DLBCL 的 67 例患者资料。纳入标准:(1)符合 2008 年世界卫生组织(WHO)制订的淋巴造血组织肿瘤分类标准;(2)经病理检查确诊,且为初次诊断;(3)确诊后正常治疗;(4)患者的生存期大于 3 个月以上。排除标准:(1)合并代谢性疾病及严重心、肝、肺、肾功能障碍的患者;(2)有自身免疫性疾病病史的患者;(3)既往有恶性肿瘤病史患者;(4)由惰性淋巴瘤进展为 DLBCL 的患者。所有患者均签署知情同意书,本研究已通过本院医学伦理委员会批准。

1.2 方法 采用 SP 法检测 CD68 和 CD34 在 DLBCL 中的表达情况。手术切除肿瘤组织,石蜡切块、脱蜡、水化、烤片,浸于二甲苯 5 min,并采用 100%、95%、90%、85%和 75%乙醇梯度处理,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,阻断内源性过氧化物酶,再进行抗原修复,分别滴加稀释 CD68 单克隆抗体和鼠抗人 CD34 单克隆抗体一抗,4℃条件下过夜,滴加二抗,37℃孵育 30 min,加辣根酶标记链霉卵白素,PBS 冲洗,增敏

二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染 5 min,充分水洗,分化,返蓝,乙醇梯度,二甲苯透明,中性树脂封片,显微镜观察并拍照。

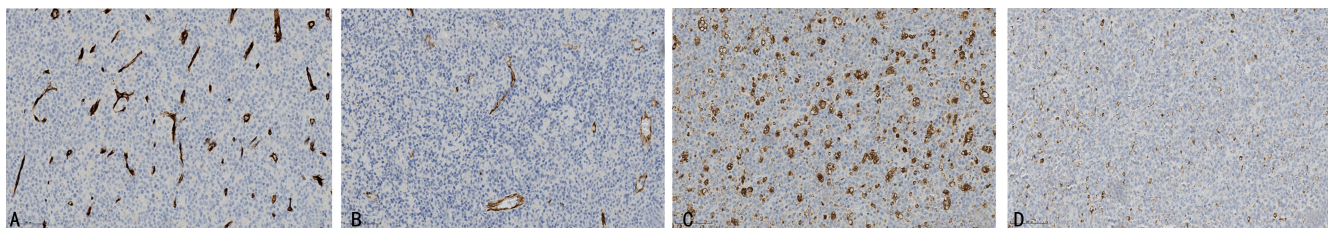
1.3 结果判断 CD68 阳性判断标准:随机选取 5 个高倍视野,与背景着色相对比,对染色强度进行评分,无色记 0 分,淡黄色记 1 分,棕黄色记 2 分,棕褐色记 3 分。对阳性细胞所占的百分比进行评分,阴性记 0 分,阳性细胞 < 10% 记 1 分,阳性细胞为 10% ~ < 30% 记 2 分,阳性细胞为 30% ~ < 50% 记 3 分,阳性细胞为 50% ~ < 75% 记 4 分,阳性细胞 ≥ 75% 记 5 分。最后得分为染色强度与阳性细胞百分比分数之和,0~1 分为 CD68 阴性表达,2~8 分为 CD68 阳性表达。CD34 标记的 MVD 判定:采用 MVD 计数方法,在低倍镜下选择 3 个密度最高的微血管区域,计算 CD34 所染成棕色的微血管数量,所得平均值则为 MVD。

1.4 随访 随访时间从疾病确诊开始,截止时间为 2022 年 5 月 31 日,随访内容包括患者的一般情况、治疗和近期复查情况,方式为查阅电子版和纸质版病历。另以电话的形式随访患者的 3 年总生存率(OS)和无进展生存率(PFS),OS 的计算是从 DLBCL 的确诊到肿瘤本身引起的死亡,或随访满 3 年终止;PFS 的计算是从 DLBCL 的确诊到肿瘤复发、转移或病情恶化。

1.5 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理及统计分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。生存曲线分析采用 Kaplan-Meier 法,组间生存期的比较采用 Log-rank 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD68 和 CD34 的总体表达情况 67 例 DLBCL 患者中,40 例 CD68 表达为阳性,阳性率为 59.7%,染色的细胞膜有棕黄色颗粒,并呈现多角形、扩张状和闭塞的条索状等不规则状态;35 例 CD34 表达为阳性,阳性率为 52.2%,细胞膜或者细胞质呈棕褐色或者棕黄色,形态清晰。见图 1。



注:A 为 CD68 阳性表达;B 为 CD68 阴性表达;C 为 CD34 阳性表达;D 为 CD34 阴性表达。

图 1 SP 染色(×400)

2.2 不同特征 DLBCL 患者的 CD68 和 CD34 表达情况比较 不同年龄、性别、原发部位、B 症状出现情况

[淋巴瘤患者出现以下任意一项症状者:原因不明的发热(通常 38℃ 以上)、盗汗、原因不明的体质量减轻

10%以上]、血清乳酸脱氢酶(LDH)水平的 DLBCL 患者 CD68 及 CD34 阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);Ann Arbor 临床分期为Ⅲ~Ⅳ期、国际预后指数(IPI)评分为 3~4 分、有骨髓侵犯 DLBCL 患

者的 CD68 及 CD34 阳性率明显高于 Ann Arbor 临床分期为 I~II 期、IPI 评分为 0~2 分、无骨髓侵犯 DLBCL 患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 不同特征 DLBCL 患者的 CD68 和 CD34 表达情况比较[(n)%]

特征	n	CD68 阳性 (n=40)	CD68 阴性 (n=27)	χ^2	P	CD34 阳性 (n=35)	CD34 阴性 (n=32)	χ^2	P
年龄(岁)				0.567	0.451			1.158	0.382
<60	31	17(54.8)	14(45.2)			14(45.2)	17(54.8)		
≥60	36	23(63.9)	13(36.1)			21(58.3)	15(41.7)		
性别				1.208	0.282			0.322	0.570
男	38	20(52.6)	18(47.4)			21(55.3)	17(44.7)		
女	29	20(69.0)	9(31.0)			14(48.3)	15(51.7)		
Ann Arbor 临床分期				5.673	0.017			5.265	0.022
I~II 期	28	12(42.9)	16(57.1)			10(35.7)	18(64.3)		
III~IV 期	39	28(71.8)	11(28.2)			25(64.1)	14(35.9)		
原发部位				0.029	0.865			0.615	0.433
淋巴结内	43	26(60.5)	17(39.5)			24(55.8)	19(44.2)		
淋巴结外	24	14(58.3)	10(41.7)			11(45.8)	13(54.2)		
IPI 评分(分)				5.272	0.022			6.479	0.011
0~2	32	14(43.8)	18(56.3)			11(34.5)	21(65.6)		
3~4	35	26(74.3)	9(25.7)			24(68.6)	11(31.4)		
B 症状				0.262	0.609			0.057	0.811
有	47	29(61.7)	18(38.3)			25(53.2)	22(46.8)		
无	20	11(55.0)	9(45.0)			10(50.0)	10(50.0)		
骨髓侵犯				4.403	0.036			5.042	0.025
有	25	19(76.0)	6(24.0)			18(72.0)	7(28.0)		
无	42	21(50.0)	21(50.0)			17(40.5)	25(59.5)		
血清 LDH 水平				0.362	0.547			<0.001	0.997
正常	22	12(54.5)	10(45.5)			12(54.5)	10(45.5)		
升高	45	28(62.2)	17(37.8)			23(51.1)	22(48.9)		

2.3 不同特征 DLBCL 患者的 CD68 和 CD34 共同表达情况比较 不同年龄、性别、原发部位、B 症状出现情况、血清 LDH 水平 DLBCL 患者的 CD68 和 CD34 共同表达率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);Ann Arbor 临床分期为Ⅲ~Ⅳ期、IPI 评分为 3~4 分、有骨髓侵犯的 DLBCL 患者 CD68 和 CD34 共同表达率明显高于 Ann Arbor 临床分期为 I~II 期、IPI 评分为 0~2 分、无骨髓侵犯 DLBCL 患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.4 CD68 和 CD34 表达对 DLBCL 患者生存预后的影响 67 例 DLBCL 患者中,共有 4 例患者失访,失访率为 6.0%。CD68 阳性患者的 3 年 OS 和 PFS 分别为 52.5%和 45.0%,CD68 阴性患者的 3 年 OS 和 PFS 分别为 77.7%和 70.4%,CD68 阳性患者的 3 年

OS 和 PFS 均低于 CD68 阴性患者,差异有统计学意义($P=0.047,0.044$);CD34 阳性患者的 3 年 OS 和 PFS 分别为 51.4%和 42.9%,而 CD34 阴性患者的 3 年 OS 和 PFS 为 75.0%和 68.8%,CD34 阳性患者的 3 年 OS 和 PFS 也低于 CD34 阴性患者,差异有统计学意义($P=0.030,0.013$)。见图 2~5。

表 2 不同特征 DLBCL 患者的 CD68 和 CD34 共同表达情况比较[(n)%]

特征	n	共同表达 (n=25)	非共同表达 (n=42)	χ^2	P
年龄(岁)				1.692	0.193
<60	31	9(29.0)	22(71.0)		
≥60	36	16(44.4)	20(55.6)		

续表 2 不同特征 DLBCL 患者的 CD68 和 CD34 共同表达情况比较 [(n)%]

特征	n	共同表达 (n=25)	非共同表达 (n=42)	χ^2	P
性别				2.627	0.105
男	38	11(28.9)	27(71.1)		
女	29	14(48.3)	15(51.7)		
Ann Arbor 临床分期(期)				7.785	0.005
I~II	28	5(17.9)	23(82.1)		
III~IV	39	20(51.3)	19(48.7)		
原发部位				2.424	0.119
淋巴结内	43	19(44.2)	24(55.8)		
淋巴结外	24	6(25.0)	18(75.0)		
IPI 评分(分)				20.442	<0.001
0~2	32	3(9.4)	29(90.6)		
3~4	35	22(62.9)	13(37.1)		
B 症状				0.065	0.798
有	47	18(38.3)	29(61.7)		
无	20	7(35.0)	13(65.0)		
骨髓侵犯				8.775	0.003
有	25	15(60.0)	10(40.0)		
无	42	10(23.8)	32(76.2)		
血清 LDH 水平				0.423	0.516
正常	22	7(31.8)	15(68.2)		
升高	45	18(40.0)	27(60.0)		

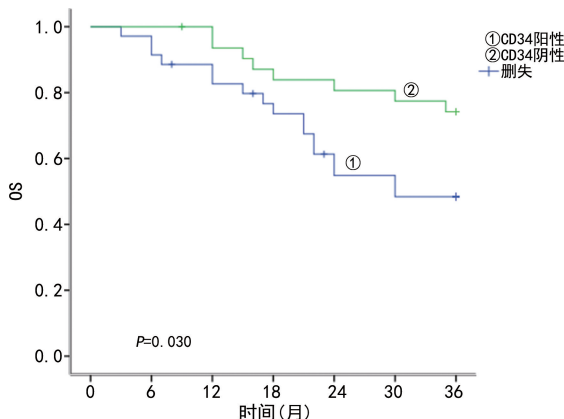


图 4 CD34 阳性与阴性患者的 3 年 OS 生存曲线比较

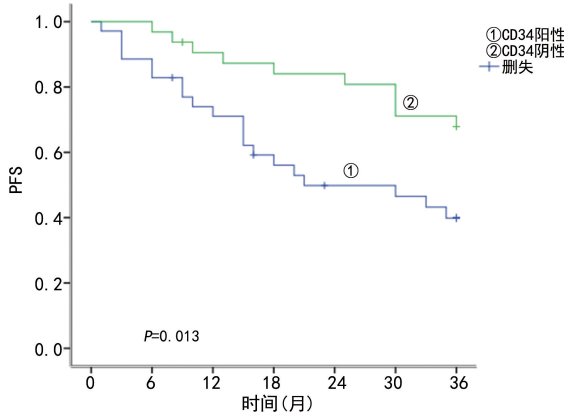


图 5 CD34 阳性与阴性患者的 3 年 PFS 生存曲线比较

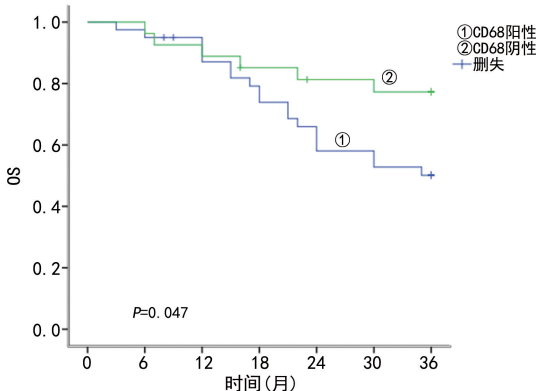


图 2 CD68 阳性与阴性患者的 3 年 OS 生存曲线比较

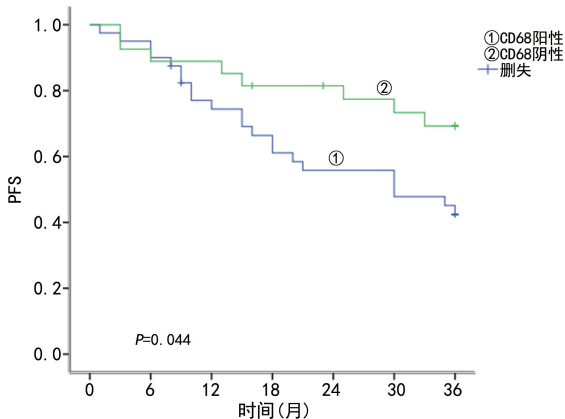


图 3 CD68 阳性与阴性患者的 3 年 PFS 生存曲线比较

3 讨论

DLBCL 占非霍奇金淋巴瘤的 30%~40%，临床上常表现为单个或多个、淋巴结内或淋巴结外快速增长的肿块。目前 DLBCL 的发病率呈逐年上升趋势，即使患者使用包括 R-CHOP 方案在内的多种不同方案进行治疗，患者 5 年生存情况也不理想，因此，寻找新的治疗方法迫在眉睫^[2]。另外，由于 DLBCL 在免疫表型、细胞形态和临床特征等方面均具有明显的异质性，所以不同的亚型、不同的个体间在治疗效果、临床特点和预后方面存在明显差异。目前，针对免疫检查点、TME、分子信号通路和表观遗传畸变的疗法，以及细胞免疫疗法共同构成了 DLBCL 治疗的新格局^[6]。所以，准确和有效地识别危险度不同的患者就显得非常重要，特别是对于高危患者，早期诊断有助于采取积极有效的治疗措施，对改善患者的预后具有重要的意义。目前，随着分子生物学技术及免疫治疗技术的发展，TME 中的某些相关因子在 DLBCL 中的表达及其临床意义逐渐受到重视。在 TME 中，TAM 不仅能够促进 TME 中的炎症反应，还可以产生细胞外基质调节因子和促血管生长因子，刺激肿瘤的生长^[7]。CD68 是巨噬细胞通用型标志物，有研究表明 CD68 的表达可以评估 TME 中 TAM 水平，在某些 DLBCL 中 CD68 的高表达提示预后不良^[8]。LI 等^[9]通过对 DLBCL 的研究发现，CD68 高表达患者的 OS 和 PSF 均低于 CD68 低表达患者，此外，还可以通过

检测 CD68 的表达进一步识别高危患者,尤其是那些被 IPI 归类为低/中危的患者。

同时,血管为肿瘤生长提供营养和氧气支持,为脏器转移提供特殊通道,肿瘤血管密度越高则越利于癌细胞生长,肿瘤的侵袭性越强。而 CD34 作为公认的血管内皮标志物,存在于内皮依赖性血管的细胞上,CD34 表达与血管生成有关,在肿瘤新生血管的内皮细胞中高表达,在正常组织的血管内皮细胞中不表达或者低表达。采用 CD34 抗体进行 SP 染色观察肿瘤 MVD,可以有效反映肿瘤的血管生成。血管内皮生长因子(VEGF)能够促进血管内皮细胞的生长,诱导 TME 中微血管的生成,促进 DLBCL 的发生及进展。TAMMA 等^[10]在另一项针对黏膜相关淋巴瘤的研究中发现,MVD 和 M2 型巨噬细胞呈正相关,该结论可为开发新的免疫治疗策略提供积极帮助。

本研究采用 67 例 DLBCL 患者作为研究对象,研究结果显示:40 例 CD68 表达为阳性,阳性率为 59.7%,35 例 CD34 表达为阳性,阳性率为 52.2%,CD68 和 CD34 的阳性率均达到 50.0%以上;同时比较了不同特征患者 CD68、CD34 的表达情况,结果发现,Ann Arbor 临床分期为 III~IV 期、IPI 评分为 3~4 分、有骨髓侵犯 DLBCL 患者的 CD68 及 CD34 阳性率明显高于 Ann Arbor 临床分期为 I~II 期、IPI 评分为 0~2 分、无骨髓侵犯 DLBCL 患者($P < 0.05$)。本研究进一步分析了 CD68 和 CD34 表达对 DLBCL 患者生存预后的影响,结果显示,CD68 阳性和 CD34 阳性患者的 3 年 OS 和 PFS 分别低于 CD68 阴性和 CD34 阴性患者,提示 TAM 与 DLBCL 的预后有关。TAM 的成分及成分之间的相互作用与患者的预后密切相关,TAM 能够更好地区分预后较差的患者,并为下一步治疗提供一个新的方向^[3]。

综上所述,CD68 和 CD34 阳性表达与 DLBCL 患者的 Ann Arbor 临床分期、IPI 评分、骨髓侵犯及生存预后具有一定的关系,且 CD68 和 CD34 阳性 DLBCL 患者预后不良。

参考文献

[1] SEHN L H, SALLES G. Diffuse large B-cell lymphoma

(上接第 517 页)

[17] STANGR O, HERMAMN W, PIETRZIK K, et al. DACH-LIGA homocystein (German, Austrian and Swiss Homocysteine Society): consensus paper on the rational clinical use of d homocysteine, folic acid, and B-vitamins in cardio-vascular and thrombotic diseases-guidelines [J]. Clin Chem Lab Med, 2003, 41(11):392-403.

[18] JAVED Y, WASIM J, SHAHAB A. Helicobacter pylori infection and micronutrient deficiencies[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(10):2137-2139.

[J]. N Engl J Med, 2021, 384(9):842-858.

[2] WANG Y, FAROOQ U, LINK B K, et al. Late Relapses in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy [J]. J Clin Oncol, 2019, 37(21):1819-1827.

[3] CIOROIANU A I, STINGA P I, STICLARU L, et al. Tumor microenvironment in diffuse large B-cell lymphoma: role and prognosis [J]. Anal Cell Pathol (Amst), 2019, 2019:8586354.

[4] RIIHIJÄRVI S, FISKVIK I, TASKINEN M, et al. Prognostic influence of macrophages in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a correlative study from a Nordic phase II trial [J]. Haematologica, 2015, 100(2):238-245.

[5] TAMMA R, INGRAVALLO G, ANNESE T, et al. Tumor microenvironment and microvascular density in follicular lymphoma [J]. J Clin Med, 2022, 11(5):1257.

[6] SMITH S D, TILL B G, SHADMAN M S, et al. Pembrolizumab with R-CHOP in previously untreated diffuse large B-cell lymphoma: potential for biomarker driven therapy [J]. Br J Haematol, 2020, 189(6):1119-1126.

[7] MOHAMED O, BASTAWISY A E, ALLAHLOBI N, et al. The role of CD68⁺ macrophage in classical Hodgkin lymphoma patients from Egypt [J]. Diagn Pathol, 2020, 15(1):10.

[8] LI P, YUAN J, AHMED F S, et al. High counts of CD68⁺ and CD163⁺ macrophages in mantle cell lymphoma are associated with inferior prognosis [J]. Front Oncol, 2021, 30, 11:701492.

[9] LI Y L, SHI Z H, WANG X, et al. Tumor-associated macrophages predict prognosis in diffuse large B-cell lymphoma and correlation with peripheral absolute monocyte count [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):1049.

[10] TAMMA R, INGRAVALLO G, ANNESE T, et al. Tumor cell microenvironment and microvessel density analysis in MALT type lymphoma [J]. Anticancer Res, 2021, 41(3):1291-1297.

(收稿日期:2022-07-26 修回日期:2022-10-15)

[19] AYESH M H, JADALAH K, AWADI E A. Association between vitamin B12 level and anti-parietal cells and anti-intrinsic factor antibodies among adult Jordanian patients with Helicobacter pylori infection [J]. Braz J Infect Dis, 2013, 17(6):629-632.

[20] 魏军旗. 老年萎缩性胃炎患者血清同型半胱氨酸、胃蛋白酶原、叶酸及维生素 B₁₂ 水平检测结果分析 [J]. 内科, 2015, 10(5):607-609.

(收稿日期:2022-04-29 修回日期:2022-10-12)