

基于NGS的弥漫大B细胞淋巴瘤预后相关基因突变研究进展

陈舒 黄浦 徐晓莹 综述 孟斌 审校

摘要 弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是一种高度侵袭性的恶性淋巴瘤,发病的分子机制尚未完全明确。二代测序(next generation sequencing, NGS)是一项日趋成熟的基因检测技术,近年来已广泛应用于DLBCL的基因研究。基于上述研究的靶向治疗也取得了一系列进展,使得基因突变在DLBCL中成为新的研究热点。本文就DLBCL预后相关基因突变研究进展进行综述。

关键词 弥漫大B细胞淋巴瘤 基因突变 二代测序

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2018.07.397

Progress in research on prognosis-related gene mutations in diffuse large B-cell lymphoma through next generation sequencing

Shu Chen, Pu Huang, Xiaoying Xu, Bin Meng

Correspondence to: Bin Meng; E-mail: mbincn@163.com

Department of Pathology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China

Abstract Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is a highly invasive malignant lymphoma, and the molecular mechanism of its pathogenesis is not fully understood. Next generation sequencing (NGS) is an increasingly mature gene assay technology, which has been widely applied in recent years to study the genetics of DLBCL. Targeted therapy development has progressed significantly on the basis of these studies, which has made genetic mutations in DLBCL become the new research hotspot. This review summarizes the progress in research on progress-related gene mutations in DLBCL.

Keywords: diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), gene mutation, NGS

弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是一组最常见的成人非霍奇金淋巴瘤,具有高度的侵袭性和异质性,发病机制尚未完全明确^[1-2]。根据基因表达谱,DLBCL可分为2个主要的分子亚型,分别是生发中心B细胞样亚型(germinal centre B-cell-like, GCB)和活化B细胞样亚型(activated B-cell-like, ABC)^[3]。R-CHOP(利妥昔单抗、环磷酰胺、阿霉素、长春新碱、强的松)是目前治疗DLBCL的一线化疗方案,较单纯CHOP方案让患者获益更大,但在治疗后发生疾病进展或复发的患者仍较多,将近50%^[4]。成本更低、速度更快、通量更高的二代测序(next generation sequencing, NGS)技术的成熟及其在多种肿瘤分子病理诊断上的广泛应用为DLBCL的深入研究提供了更好的技术支持和更优的研究平台。本文对近些年有关DLBCL基因突变的NGS相关文献进行综述(表1^[5-10])。

通过数据整理发现,NGS检测方法在DLBCL实验研究中已获得广泛的应用,检测获得的突变信息量较

大,但在不同研究之间的突变重叠率低(<20%)^[8]。对各项研究结果进一步分析,发现研究样本的种族和亚型分布存在差异,且这些差异可对检测结果产生一定的影响;同时也可观察到一些较为稳定存在的突变基因,如CD79B、CARD11、MYD88、CREBBP、EZH2及KMT2D等。本文就DLBCL中较为常见的基因突变(突变率>10%)在近些年的研究进展进行综述。

1 与信号通路相关的基因突变

在DLBCL的相关信号通路研究中,持续过度的NF- κ B信号通路活化是公认的与ABC-DLBCL患者预后不良密切相关的机制之一,其上游通路有B细胞受体(B-cell receptors, BCRs)信号通路和依赖MYD88的Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)信号通路。且在近期一项基于大样本人群的研究^[10]中也验证了CD79B、CARD11、MYD88基因等信号通路相关基因在DLBCL中发挥着驱动基因的作用。因此,更加突显出BCRs信号通路和依赖MYD88的TLRs通路上的相关基因突变在DLBCL中的重要性。

表 1 在 DLBCL 中较为常见的突变率>10%的基因^[5-10]

淋巴瘤类型	突变基因
GCB-DLBCL	Bcl-2, Bcl-6, BTG1, B2M, CREBBP, CSMD3, DMXL1, DSEL, EZH2, EP300, FAT4, GNA13, MEF2B, PCLO, SYNE1, TNFRSF14, TTN, TP53 等
ABC-DLBCL	CARD11, CD70, CD79A/B, MUC4, MYOM2, MYD88, PIM1, PRDM1, TNFAIP3 等
DLBCL	Bcl-6, B2M, BTG1, BTG2, CD79B, CREBBP, CARD11, CD58, CD70, DTX1, EZH2, EP300, FAS, HIST1H1B/C/D/E, IGLL5, KLF2, LRP1B, MYD88, MLL2, MLL3, MEF2B, MUC16, PIM1, SOCS1, SGK1, TMSB4X, TP53, ZFP36L1 等

CD79B(Ig-Beta)的编码蛋白与 BCR 相邻,可与接受抗原刺激后的 BCR 发生相互作用,使抗原刺激信号下传。该基因的常见突变位点为免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)结构域,突变率为 8.5%~38%^[11-13]。在亚型相关性分析上,继往的研究^[13]认为 CD79B 突变更常见于 ABC-DLBCL,但在近期几项研究结果中^[11,14],并未发现该基因突变与 DLBCL 亚型存在相关性。在生存分析中,Xu 等^[14]将 B 细胞受体通路(BCRs pathway)相关的突变(CARD11、LYN、CD79A/B)作为整体进行生存分析时发现,其与完全缓解(complete response, CR)患者的无进展生存期(progression-free survival, PFS)相关;Dubois 等^[15]研究发现含单一 CD79B 突变的 ABC-DLBCL 患者 PFS 更优,单一 CD79B 异常(突变或获得)也可以活化 NF- κ B 信号通路,但若合并 MYD88 突变则 NF- κ B 信号通路活性更强。在药物敏感性分析中,Wilson 等^[16]分析了 CD79B 突变与 BTK 抑制剂(依鲁替尼)应答之间的关系,发现 CD79B 突变与否均对依鲁替尼有应答,但若突变型 CD79B 合并突变型 MYD88 时,对依鲁替尼的应答率较野生型 CD79B 合并突变型 MYD88 显著增高,这与 Dubois 等^[15]在 ABC-DLBCL 中发现的含两者突变患者的总生存期(overall survival, OS)和 PFS 结果相似;Nagel 等^[17]在细胞系方面的研究也发现了该基因的突变并不影响对依鲁替尼的应答,而下游的 CARD11 突变才会影响对该药物的敏感性。CARD11 的编码蛋白与慢性活化 BCR 信号通路相关,是多蛋白 CBM 复合物的组成成员(CARD11/BCL10/MALT1),该复合物对启动 NF- κ B 信号途径发挥着重要作用^[13]。有研究表明^[18],在 ABC-DLBCL 患者中,CARD11 的活化性突变率近 10%,热点突变位点位于 Coiled-Coil 结构域。Xu 等^[14]在 DLBCL 患者中检测到 CARD11 突变率超过 10%,无亚型分布差异,而在以 BCRs 通路相关基因整体分析中发现,其与预后相关。在 CARD11 突变与药物治疗相关性的研究中,Nagel 等^[17]研究发现, CARD11 突变会降低 BTK 抑制剂对细胞系的抑制作用,使下游的 MALT1 活性不受依鲁替尼的影响,进而使细胞系产生耐药。Knies 等^[19]也通过构建 CARD11 (L225LI)突变的小鼠模型,发现这一突变发生后会引起小鼠的早期致死效应,而 BCL10 或 MALT1 缺陷又可减弱这一效应。此外,研究还发现 CARD11(L225LI)可以同时活化 NF- κ B 和 JNK 两个信号通路。

起小鼠的早期致死效应,而 BCL10 或 MALT1 缺陷又可减弱这一效应。此外,研究还发现 CARD11(L225LI)可以同时活化 NF- κ B 和 JNK 两个信号通路。

MYD88 编码产物是一种与 Toll/interleukin-1 受体信号通路密切相关的蛋白,常见的突变位点为 MYD88 L265P,这一突变的发生率与肿瘤原发部位相关,若发生在免疫豁免部位(中枢神经系统或睾丸)则突变率可达 60%以上,而发生在其他部位的总体突变率降至 16.5%^[20]。在小鼠模型研究中发现^[21],MYD88^{L265P}会引发淋巴增殖性疾病,部分可再转化为与人 ABC-DLBCL 相似的淋巴瘤,若伴有 Bcl-2 过表达会使小鼠脾肿大发生更早且整体生存率显著缩短。Xu 等^[14]研究也发现, MYD88 突变更常见于非 CR 患者,且与 Bcl-2/MYC 双表达病例之间有一定的相关性。上述研究提示,MYD88 突变可能与预后不良相关,但 Takeuchi 等^[12]研究并未发现 MYD88 突变与患者的 OS 相关。

2 与转录/翻译相关的基因突变

染色质主要由 DNA 和组蛋白两部分构成,当这些组分发生表观遗传修饰后,会对染色质高级结构的形成和解离产生影响。组蛋白在不同翻译后修饰与其他机制作用的平衡下,决定染色质是否处于活化状态^[6]。因此,在 DLBCL 基因突变研究中,与转录/翻译相关的基因突变均为研究热点。EZH2 编码组蛋白甲基转移酶,热点突变发生于 SET 结构域,以 EZH2 Y641 最常见,发生功能获得性突变的 EZH2 会促使 H3K27 三甲基化,在 GCB-DLBCL 中的突变率较高(15%~20%)^[8,22]。早前的研究发现^[23],EZH2 突变在滤泡淋巴瘤中与 Bcl-2 重排具有相关性,Beguelin 等^[24]也对 DLBCL 与 Bcl-2 的关系进行了研究,发现突变的 EZH2 对 DLBCL 细胞系有更强地分化抑制作用,若与 Bcl-2 协作会促使生发中心 B 细胞的恶性转化,而当联用 Bcl-2 抑制剂可增强 EZH2 抑制剂的效应。随后的研究则发现^[25],Bcl-6 驱动的正常生发中心增生离不开与 EZH2 的相互作用,而突变的 EZH2 Y641 驱动的异常生发中心增生和淋巴瘤的形成也与 Bcl-6 密切相关,且在人类 DLBCL 细胞系中联用两者的抑制剂可以产生更强的肿瘤抑制效应。此外,在 DLBCL 中,该基因突变和亚型分布与 EZH2 蛋白表达之间无显著相关性^[22]。上述研究结果提示,在 DLBCL 中,

EZH2突变产生的效应可能受其他复杂机制的调节。

KMT2D(MLL2)为肿瘤抑制基因,编码与B细胞分化和类别转换相关的组蛋白甲基转移酶的相关蛋白,与H3K4甲基化相关,常见突变位点位于SET结构域,突变率为25%~40%^[26-28],主要为失活性突变。在人群样本研究中^[26],KMT2D突变更常见于GCB-DLBCL,与患者OS、PFS、疾病进展时间(time to progression, TTP)之间无显著相关性。在细胞水平的研究发现^[27],KMT2D发生错义突变会影响催化H3K4甲基化的酶活性,但不影响KMT2D蛋白的稳定性;此外,研究还发现^[27],生发中心B细胞发生KMT2D的缺失并不可驱动其发生恶性转化,但若合并Bcl-2异常则可促使恶性转化的发生。

CREBBP的编码蛋白是一种与H3K27、Bcl-6和p53乙酰化及MHC II表达密切相关的组蛋白乙酰转移酶,突变热点在组蛋白乙酰转移酶(histone-acetyltransferase, HAT)结构域,在GCB-DLBCL中的突变率超过30%^[29-31]。而在生存分析中^[32],仅含CREBBP突变的患者趋向于有较差的OS,但是差异无统计学意义。在小鼠模型和细胞系研究中发现^[33],CREBBP与Bcl-6/SMRT/HDAC3之间存在乙酰化和去乙酰化的平衡,当CREBBP突变后,两者之间的平衡被破坏,出现DLBCL细胞生存和增殖能力增强,同时促使T细胞抑制恶性B细胞扩张的能力受损,进而与生发中心淋巴瘤形成相关。

3 与细胞周期/细胞增殖相关的基因突变

细胞周期为一个受多种因素调节的细胞生长发育的基本过程,涉及遗传物质的复制合成和分配,当调控机制出现异常时,不能正常调控细胞周期,促使细胞出现异常增殖,进而发生异常转化,甚至形成肿瘤。TP53是位于染色体17p13.1的肿瘤抑制基因,其编码蛋白为TP53,DBD结构域为热点突变区,突变率在血液系统不同肿瘤中有所差异,其中,DLBCL中的突变率在20%;异常改变的TP53的抑瘤活性消失,致瘤活性增加,致使细胞周期紊乱、细胞增殖异常^[34-36]。Karube等^[36]的研究发现,TP53变异与DLBCL患者不良OS相关,但仅限于发生截短和DBD结构域的突变类型;此外,研究者还将TP53/CNKD2A作为1个功能组进行单因素和多因素分析,均显示TP53/CNKD2A改变与更短OS相关,并在另一独立队列中得到验证。在“双打击淋巴瘤”(double-hit lymphoma, DHL)的研究中发现^[37],MYC和Bcl-2重排(MYC+/Bcl-2+)的DHL伴发TP53突变频率较MYC和Bcl-6重排(MYC+/Bcl-6+)的DHL高,而在检测到的2例“三打击”(MYC+/Bcl-2+/Bcl-6+)DLBCL中,仅1例TP53突变。另一项对MYC和Bcl-2易位(MYC+/Bcl-2+)的

DHL与TP53异常(删除或突变,TP53+)的研究中发现^[34],无论单因素或多因素分析,仅TP53异常为独立的预后因素,而MYC或Bcl-2单一异常对患者OS无明显影响;进一步综合分析发现,单独MYC异常(MYC+/TP53-/Bcl-2-)的患者OS最佳,而三基因异常(MYC+/TP53+/Bcl-2+)患者的OS较好;相反,MYC+/Bcl-2+或MYC+/TP53+,以及单独TP53+,其OS均较无任何1个基因异常的患者较差。该研究病例数有限且为单中心,DLBCL中的遗传学改变及相互作用较为复杂,DHL的概念尚不充分,亟需发展更为广泛的基于基因组层面的分子诊断。

4 总结与展望

随着研究的不断开展,进一步认识到了基因突变在DLBCL发生发展中的重要作用,但因各项研究结果间的差异性较大,具有较高突变频率的基因在分子亚型的分布与预后的相关性,以及对治疗的指导意义等方面尚未获得一致性定论。因此,在当前及未来对DLBCL的发病分子机制研究中,更应重视研究的多样性。在研究对象方面,除研究基因突变外,还增加对基因拷贝数、单核苷酸多态性等基因异常的研究,完善基因信息的收集,使基因异常信息与患者的临床诊断、治疗及预后更好地结合,通过综合分析发现与恶性肿瘤发生发展机制相关的基因异常,进一步提高诊断水平和治疗精准度。在研究方法上,临床诊断和治疗中广泛开展NGS基因检测,弥补一代测序检测结果不足的同时,获得更加准确的DLBCL基因突变信息,为患者选择更好、更优地治疗方案提供有力的分子病理数据支持;另一方面,进一步探索新的检测手段,如液相活检,这项技术通过对肿瘤发生发展过程及化疗前后相关基因水平变化进行实时监测,以达到DLBCL早期发现、诊断和治疗的目的。相信随着DLBCL基因水平研究的不断深入,研究者们将对上述恶性淋巴瘤的分子发病机理有新的认识,为肿瘤的精准化诊疗提供更为坚实的理论支持。

参考文献

- [1] Morton LM, Wang SS, Devesa SS, et al. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001[J]. Blood, 2006, 107(1):265-276.
- [2] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues[M]. Revised 4th edition. Lyon: IARC, 2017:291-297.
- [3] Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling[J]. Nature, 2000, 403(6769):503-511.
- [4] Ma J, Xing W, Coffey G, et al. Cerdulatinib, a novel dual SYK/JAK kinase inhibitor, has broad anti-tumor activity in both ABC and GCB types of diffuse large B cell lymphoma[J]. Oncotarget, 2015, 6(41): 43881-43896.
- [5] Pasqualucci L, Dalla-Favera R. The genetic landscape of diffuse large

- B-cell lymphoma[J]. *Semin Hematol*, 2015, 52(2):67-76.
- [6] Lunning MA, Green MR. Mutation of chromatin modifiers; an emerging hallmark of germinal center B-cell lymphomas[J]. *Blood Cancer J*, 2015, 5(5):e361.
 - [7] Dubois S, Jardin F. The role of next-generation sequencing in understanding the genomic basis of diffuse large B cell lymphoma and advancing targeted therapies[J]. *Expert Rev Hematol*, 2016, 9(3):255-269.
 - [8] Dobashi A. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma [J]. *J Clin Exp Hematop*, 2016, 56(2):71-78.
 - [9] Ren W, Li W, Ye X, et al. Distinct subtype distribution and somatic mutation spectrum of lymphomas in East Asia[J]. *Curr Opin Hematol*, 2017, 24(4):367-376.
 - [10] Reddy A, Zhang J, Davis NS, et al. Genetic and functional drivers of diffuse large B cell lymphoma[J]. *Cell*, 2017, 171(2):481-494.
 - [11] Kim Y, Ju H, Kim DH, et al. CD79B and MYD88 mutations in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(3):556-564.
 - [12] Takeuchi T, Yamaguchi M, Kobayashi K, et al. MYD88, CD79B, and CARD11 gene mutations in CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Cancer*, 2017, 123(7):1166-1173.
 - [13] Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Nature*, 2010, 463(7277):88-92.
 - [14] Xu PP, Zhong HJ, Huang YH, et al. B-cell function gene mutations in diffuse large B-cell lymphoma: a retrospective cohort study[J]. *E Bio Med*, 2017, (16):106-114.
 - [15] Dubois S, Viailly PJ, Bohers E, et al. Biological and clinical relevance of associated genomic alterations in MYD88 L265P and non- L265P-mutated diffuse large B-cell lymphoma: analysis of 361 cases[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9):2232-2244.
 - [16] Wilson WH, Young RM, Schmitz R, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma[J]. *Nat Med*, 2015, 21(8):922-926.
 - [17] Nagel D, Bogner M, Eitelhuber AC, et al. Combinatorial BTK and MALT1 inhibition augments killing of CD79 mutant diffuse large B cell lymphoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39):42232-42242.
 - [18] Lenz G, Davis RE, Ngo VN, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma[J]. *Science*, 2008, 319(5870):1676-1679.
 - [19] Knies N, Alankus B, Weilemann A, et al. Lymphomagenic CARD11/BCL10/MALT1 signaling drives malignant B-cell proliferation via cooperative NF-kappaB and JNK activation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(52):E7230-7238.
 - [20] Lee JH, Jeong H, Choi JW, et al. Clinicopathologic significance of MYD88 L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):1785.
 - [21] Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, et al. B-cell-specific conditional expression of Myd88p. L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice[J]. *Blood*, 2016, 127(22):2732-2741.
 - [22] Zhou Z, Gao J, Popovic R, et al. Strong expression of EZH2 and accumulation of trimethylated H3K27 in diffuse large B-cell lymphoma independent of cell of origin and EZH2 codon 641 mutation[J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(10):2895-2901.
 - [23] Guo S, Chan JK, Iqbal J, et al. EZH2 mutations in follicular lymphoma from different ethnic groups and associated gene expression alterations[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(12):3078-3086.
 - [24] Beguelin W, Popovic R, Teater M, et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(5):677-692.
 - [25] Beguelin W, Teater M, Gearhart MD, et al. EZH2 and BCL6 cooperate to assemble CBX8-BCOR complex to repress bivalent promoters, mediate germinal center formation and lymphomagenesis[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(2):197-213.
 - [26] Ortega-Molina A, Boss IW, Canela A, et al. The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development[J]. *Nat Med*, 2015, 21(10):1199-1208.
 - [27] Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis[J]. *Nat Med*, 2015, 21(10):1190-1198.
 - [28] Juskevicius D, Lorber T, Gsponer J, et al. Distinct genetic evolution patterns of relapsing diffuse large B-cell lymphoma revealed by genome-wide copy number aberration and targeted sequencing analysis [J]. *Leukemia*, 2016, 30(12):2385-2395.
 - [29] Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma[J]. *Nat*, 2011, 471(7337):189-195.
 - [30] Morin RD, Assouline S, Alcaide M, et al. Genetic landscapes of relapsed and refractory diffuse large B-cell lymphomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(9):2290-2300.
 - [31] Hashwah H, Schmid CA, Kasser S, et al. Inactivation of CREBBP expands the germinal center B cell compartment, down-regulates MHC II expression and promotes DLBCL growth[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(36):9701-9706.
 - [32] Juskevicius D, Jucker D, Klingbiel D, et al. Mutations of CREBBP and SOCS1 are independent prognostic factors in diffuse large B cell lymphoma: mutational analysis of the SAKK 38/07 prospective clinical trial cohort[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1):70.
 - [33] Jiang Y, Ortega-Molina A, Geng H, et al. CREBBP inactivation promotes the development of HDAC3-dependent lymphomas[J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(1):38-53.
 - [34] Schiefer AI, Kornauth C, Simonitsch-Klupp I, et al. Impact of single or combined genomic alterations of TP53, MYC, and BCL2 on survival of patients with diffuse large B-cell lymphomas: a retrospective cohort study[J]. *Medi (Baltimore)*, 2015, 94(52):e2388.
 - [35] Lu TX, Young KH, Xu W, et al. TP53 dysfunction in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, (97):47-55.
 - [36] Karube K, Enjuanes A, Dlouhy I, et al. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets[J]. *Leukemia*, 2018. [Epub ahead of print].
 - [37] Gebauer N, Bernard V, Gebauer W, et al. TP53 mutations are frequent events in double-hit B-cell lymphomas with MYC and BCL2 but not MYC and BCL6 translocations[J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(1):179-185.

(2017-12-15 收稿)

(2018-01-30 修回)

(编辑:孙喜佳 校对:邢颖)

作者简介

陈舒 专业方向为肿瘤病理学。

E-mail: m13100662421@163.com

