

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2008)04-0361-05

# GPI 锚定修饰的慢粒白血病 bcr/abl 和鼠 IL-12 真核双表达质粒的构建及表达

陶 崑<sup>1</sup>, 王 东<sup>2</sup>, 曾建明<sup>2</sup>, 黄世峰<sup>2</sup>, 陈新敏<sup>2</sup>, 曹唯希<sup>2</sup>, 黄宗干<sup>3</sup>, 冯文莉<sup>2</sup>(重庆医科大学:<sup>1</sup> 免疫学教研室,<sup>2</sup> 临床血液学教研室,<sup>3</sup> 附属第一医院血液科 重庆 400016)

## Construction and expression of eukaryotic co-expression plasmid of bcr/abl anchored GPI and murine IL-12

TAO Kun<sup>1</sup>, WANG Dong<sup>2</sup>, ZENG Jian-Ming<sup>2</sup>, HUANG Shi-Feng<sup>2</sup>, CHEN Xin-Min<sup>2</sup>, CAO Wei-Xi<sup>2</sup>, HUANG Zong-Gan<sup>3</sup>, FENG Weng-Li<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Immunology, <sup>2</sup>Department of Clinical Hematology, <sup>3</sup>Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China

**【Abstract】** AIM: To construct the eukaryotic co-expression plasmid of bcr/abl anchored GPI and murine IL-12 and to identify the expressed product in cos-7 cells. METHODS: The gene fragment encoding bcr/abl was amplified by PCR using the plasmid containing the DNA sequence of P210 as template and was inserted into eukaryotic expression vector pBudCE4.1. The constructed recombinant plasmid pBudCE4.1-bcr/abl was identified by restriction analysis and DNA sequencing. The lymphocytes from human peripheral blood were separated and the total RNA was extracted. The gene fragment encoding GPI was amplified by RT-PCR using the RNA as template and was inserted into the constructed plasmid pBudCE4.1-bcr/abl, and anchored GPI and bcr/abl fragment to construct recombinant plasmid pBudCE4.1-bcr/abl-GPI. The mIL-12 gene fragment was also amplified by PCR using the mIL-12 plasmid as template and was subcloned in restriction enzyme sites of another promoter in the constructed plasmid pBudCE4.1-bcr/abl-GPI to construct recombinant plasmid pBudCE4.1-bcr/abl-GPI-mIL12. The constructed recombinant plasmid pBudCE4.1-bcr/abl-GPI-mIL12 was transfected into Cos-7 cells with liposome. The expressed bcr/abl genes and bcr/abl proteins were analyzed by RT-PCR and Western Blot, and the expressed mIL-12 was detected by ELISA. RESULTS: The results of restriction analysis, PCR and DNA sequencing proved

that bcr/abl fragment anchored GPI and mIL-12 gene fragment were all correctly inserted into vector pBudCE4.1. The expressions of bcr/abl gene and bcr/abl protein were identified in transfected cos-7 cells and their membranes, the expression of mIL-12 was also proved in culture supernatant of cos-7 cells. CONCLUSION: The recombinant vector pBudCE4.1-bcr/abl-GPI-mIL12 is successfully constructed and expressed in eukaryotic cells, which lays a basis for further study on tumour specific cellular immunity with bcr/abl fusional gene vaccine.

**【Keywords】** bcr/abl fusional gene; glycosylphosphatidylinositols; interleukin-12; eukaryotic co-expression

**【摘要】**目的:构建由糖基化磷脂酰肌醇(GPI)锚定修饰的 bcr/abl 和鼠 IL-12(mIL-12)真核双表达质粒,在 COS-7 细胞中检测其基因和膜蛋白表达。方法:以含有慢粒白血病(b3a2型)migP210 全长序列的质粒为模板,通过 PCR 扩增获得 654 bp 的 bcr/abl 融合基因片段,酶切后插入 pBudCE4.1 空载中,经鉴定获得重组质粒 pBB。同时 RT-PCR 扩增人外周血淋巴细胞 CD24 分子中的 GPI 锚定序列,酶切后克隆入 pBB 质粒中与 bcr/abl 基因片断羧基端相连,获得重组质粒 pBBG 并鉴定。然后扩增 mIL-12 基因片段并亚克隆入 pBBG 另一多克隆位点,构建重组质粒 pBBGI。在多聚阳离子介导下将 pBBGI 质粒转染 COS-7 细胞,采用 RT-PCR, Western Blot 检测 bcr/abl 融合基因及其蛋白的表达,ELISA 检测 mIL-12 的表达。结果:经酶切和测序鉴定证实,由 GPI 锚定连接的 bcr/abl 及 mIL-12 基因插入片段正确,转染细胞中有 bcr/abl 融合基因,转染细胞膜上有 bcr/abl 融合蛋白的表达,细胞培养上清中也有 mIL-12 的表达。结论:成功构建能在真核细胞中表达 bcr/abl 和 mIL-12 的重组质粒 pBBGI,为进一步研究 bcr/abl 基因疫苗诱导肿瘤特异性细胞免疫奠定了基础。

**【关键词】** bcr/abl 融合基因;糖基磷脂酰肌醇类;白细胞介素-12;真核双表达

**【中图分类号】** R733.72 **【文献标识码】** A

收稿日期 2007-09-03; 接受日期 2007-11-06

基金项目 国家自然科学基金(30670901)

通讯作者:冯文莉。Tel:(023)68485938 Email:fengwlcqmu@sina.com

作者简介:陶 崑,博士生(导师冯文莉),副教授。Tel:(023)68485813 Email:taokun68@sina.com

## 0 引言

慢性粒细胞白血病(CML)的细胞遗传学特征是具有 Ph 染色体,即 t(9;22)(q34.1;q11.2),形成 bcr/abl 融合基因并表达具有强烈酪氨酸激酶活性的 bcr/abl 融合蛋白,后者使造血干细胞异常转化而导

致 CML 发生。p210 融合蛋白属于肿瘤特异性抗原,其抗原性由 bcr/abl 基因的融合区域决定。然而 bcr/abl 融合蛋白是 CML 细胞的胞内蛋白,如何将其有效递呈到 CML 细胞膜表面从而持续诱导特异性细胞免疫并成为效应 CTL 细胞的靶向分子,一直是国内外研究的热点。人外周血淋巴细胞表面 CD24 分子中含有一种特定的 GPI 锚定序列,它能够通过其糖基化磷脂酰肌醇结构将重组蛋白锚定于细胞膜上<sup>[1-2]</sup>。而 IL-12 是目前最强的诱导细胞免疫活性和调节作用的细胞因子<sup>[3]</sup>。本研究旨在构建一种真核双表达质粒使 bcr/abl 融合蛋白通过 GPI 的锚定修饰作用表达于细胞膜上而持续刺激机体产生免疫应答,同时利用 mIL-12 增强细胞免疫效应,为下一步应用该核酸疫苗诱导肿瘤特异性免疫应答奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

真核双表达载体 pBudCE4.1 购自 Invitrogen 公司,含有编码慢粒白血病 bcr/abl 融合蛋白全长序列(b3a2 型)的 migP210 质粒为本室保存;小鼠单链 IL-12 质粒(Elasti)由本室曾建明博士赠送;COS-7 细胞由重庆医科大学感染性疾病分子生物学实验室赠送。质粒抽提纯化、胶回收、PCR 产物纯化试剂盒购自上海华舜生物公司;限制性内切酶、cDNA 逆转录试剂盒、快速连接试剂盒、Primstar 酶及其他 PCR 试剂购自 TaKaRa 公司;RNA 提取试剂、琼脂糖等购自上海生工生物工程公司;RPMI1640 和胎牛血清购自杭州四季青生物技术公司;DAB 显色试剂盒和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自 Santa Cruz 生物技术有限公司;NC 膜购自北方同正生物技术发展公司;膜蛋白提取试剂盒为南京凯基生物技术有限公司产品;转染试剂 jetpEI<sup>TM</sup> 为 POLYplus transfection 公司产品;小鼠 IL-12 P70ELISA 检测试剂盒为美国 R&D 公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 pBudCE4.1-bcr/abl 重组质粒的构建及鉴定

根据登录 GenBank Granulysin 编码序列 NM005157,设计引物扩增 bcr/abl 融合基因片段,约 654 bp。上游引物 P1:5'-GCAAGCTTACCATGGACATCCGTGG-3';下游引物 P2:5'-GTCGACCTTGCATCAGAAGC-3'。引物由上海生工生物工程公司合成。以含有编码 bcr/abl 融合蛋白全长序列的 migP210 质粒为模板,进行 PCR 扩增。反应体系如下:模板 1.5  $\mu$ L,5 $\times$ 缓冲液 6  $\mu$ L,dNTP 2.4  $\mu$ L,P1,P2 各 2  $\mu$ L,Primstar 酶 0.3  $\mu$ L,灭菌去离子水 15.8  $\mu$ L,共 30  $\mu$ L。扩增条件 94 $^{\circ}$ C 5 min 98 $^{\circ}$ C 10 s 55 $^{\circ}$ C

10 s 72 $^{\circ}$ C 55 s,共 32 个循环,72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。Hind III/Sal I 双酶切 PCR 产物和空载体 pBudCE4.1,并回收片段。然后将 bcr/abl 融合基因片段定向克隆入空载体中,构建重组质粒 pBudCE4.1-bcr/abl,命名为 PBB。将 PBB 质粒转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,再用含 40 mg/L Zeocin 抗菌素的低盐 LB 培养基进行菌落筛选。抽提 PBB 质粒进行 PCR 及酶切鉴定,并送 TaKaRa 生物技术公司测序。

#### 1.2.2 pBudCE4.1-bcr/abl-GPI 重组质粒的构建及鉴定

根据登录 GenBank Granulysin 编码序列 X69397,设计并合成引物扩增人外周血淋巴细胞 CD24 分子中的糖基化磷脂酰肌醇锚定基序(GPI),约 243 bp。上游引物 P3:5'-GTCCACATGGGCAGACAAT-3';下游引物 P4:5'-GGATCCTTAAGAGTAGAGATGCAGAA-3'。抽取人外周血 5 mL Ficoll 液分离出淋巴细胞,提取总 RNA 进行逆转录,并以逆转录 cDNA 为模板,P3,P4 为引物进行 PCR 扩增,扩增产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。Sal I/BamH I 双酶切 RT-PCR 产物和重组质粒 PBB,并回收。经连接、转化及 Zeocin 抗生素筛选,再通过 PCR 及酶切、测序鉴定后,命名为 PBBG。

#### 1.2.3 pBudCE4.1-bcr/abl-GPI-mIL-12 重组质粒的构建及鉴定

以鼠单链 IL-12 质粒为模板,设计引物用于扩增 mIL-12 基因片段,约 1625 bp。上游引物 P5:5'-GCGCGCCGCACCATGGGTCAATCAGCTAC-3',下游引物 P6:5'-AGATCTCTAGGATCGGACCTGCAGG-3'。PCR 反应体系为:模板 1  $\mu$ L,5 $\times$ 缓冲液 4  $\mu$ L,dNTP 1.6  $\mu$ L,P5,P6 各 2  $\mu$ L,Primstar 酶 0.3  $\mu$ L,灭菌去离子水 9.1  $\mu$ L,共 20  $\mu$ L。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 10 min 98 $^{\circ}$ C 10 s 60 $^{\circ}$ C 15 s 72 $^{\circ}$ C 90 s,共 32 个循环,72 $^{\circ}$ C 8 min。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。Bgl II/Not I 双酶切 PCR 产物和 PBBG 质粒,经连接转化筛选,再通过酶切、测序鉴定后命名为 PBBGI。

#### 1.2.4 抗血清制备与收集

PBBG 重组质粒免疫 BALB/c 小鼠,接种时 PBBG 质粒(100  $\mu$ g)与 7.5 g/L 的步比卡因以 1:4 的体积比混合,多点注射小鼠后大腿肌肉,每隔 10 d 注射 1 次,共计 3 次。末次免疫后 30 d 摘取小鼠眼球,收集血液、分离血清,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

#### 1.2.5 细胞转染

将真核表达细胞 cos-7 接种于含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,待生长至 80% 汇合,将重组质粒 PBB,PBBG,PBBGI 进行转染,并以空载体 pBudCE4.1 转染作为对照。转染

试剂为多聚阳离子转染试剂 jetpEI™, 具体方法参照试剂说明书进行。

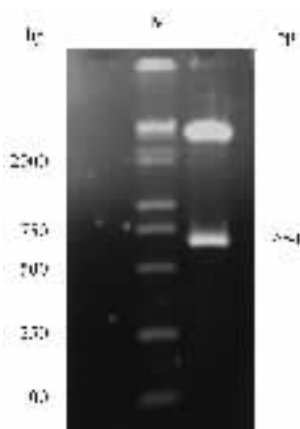
1.2.6 RT-PCR 检测转染细胞的基因表达 分别于转染后 24 h 收集各组细胞, 提取总 RNA 进行逆转录, 并以各自 cDNA 为模板, 分别以 *bcr/abl*, GPI, *mIL-12* 的特异引物按照上述条件进行 PCR 扩增。

1.2.7 Western-Blot 检测转染细胞膜蛋白表达 分别于转染后 72 h 收集各组细胞提取膜蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳。硝酸纤维素膜 (NC 膜) 于半干式电转印仪中 15V 转印 8 min 后, 放入 Tris 缓冲液 (TBS) 中漂洗, 封闭过夜。然后加入免疫小鼠特异抗血清 (1:125) 4°C 结合 8 h, 漂洗后与 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:400) 37°C 结合 1 h, TBS 洗 3 次。DAB 显色 5 min 将 NC 膜移入含 PBS 的平皿中终止反应。

1.2.8 ELISA 检测 *mIL-12* 的表达 根据 ELISA 试剂盒操作说明, 于转染后 72 h 取 100 μL PBBGI 质粒转染组细胞培养上清进行检测, 同时以 pBudCE4.1 空载体和未转染的 COS-7 细胞培养上清作对照, 每组均做复孔。绘制标准曲线, 根据标准曲线计算出实际含量。

## 2 结果

2.1 *bcr/abl* 融合基因片段的 PCR 扩增与鉴定 以 *migP210* 质粒为模板, 经 PCR 扩增得到 *bcr/abl* 融合基因片段, 约 654 bp。用 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切 PBB 质粒, 可切下约 654 bp 的目的条带 (图 1)。PBB 测序结果经与 GenBank 上的编码序列比对后, 显示此克隆的碱基序列正确。

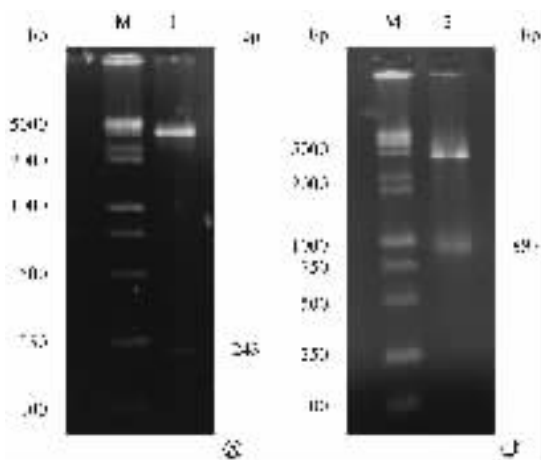


M: DNA marker (D503A); 1: 经 *Hind* III/*Sal* I 酶切的 PBB。

图 1 PBB 酶切鉴定

2.2 GPI 锚定序列的 RT-PCR 扩增与鉴定 分离人外周血淋巴细胞, 通过 RT-PCR 扩增, 获得约 243 bp 大小的 GPI 锚定序列。经 *Sal* I/*Bam* H I 双酶切

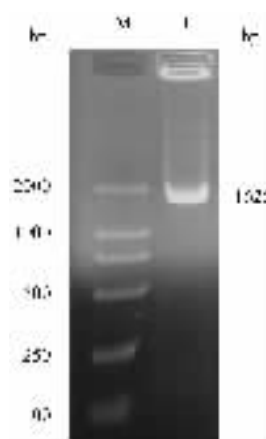
重组质粒 PBBG, 可切下相同大小的目的条带 (图 2A)。测序结果表明基因未发生突变, 其序列与 GenBank 报道相符。同时, 我们用 *Hind* III/*Bam* H I 双酶切 PBBG, 得到约 897 bp 大小的片段, 说明经 *Sal* I 酶切位点连接, PBBG 质粒中的 GPI 锚定序列已与 *bcr/abl* 融合基因片段下游羧基端相连, 实现了我们的锚定要求 (图 2B)。



M: DNA marker (D503A); 1: 经 *Sal* I/*Bam* H I 酶切的 PBBG; 2: 经 *Hind* III/*Bam* H I 酶切的 PBBG。

图 2 PBBG 酶切鉴定

2.3 *mIL-12* 基因片段的 PCR 扩增与鉴定 PCR 扩增单链 *mIL-12* 质粒, 得到 1625 bp 大小的 *mIL-12* 基因片段 (图 3)。采用 *Bgl* II/*Not* I 双酶切重组质粒 PBBGI, 可切下相同大小的目的条带 (图 4)。双向测序结果表明, *mIL-12* 序列有一处碱基突变, 从 ATG 开始, 第 480 位的 t 变为 c (对应的氨基酸无改变)。

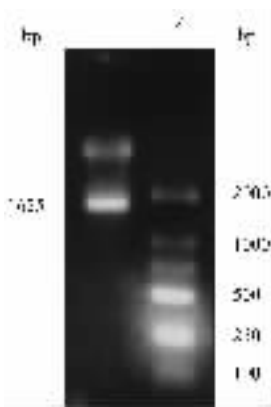


M: DNA marker (DL2000); 1: *mIL-12*。

图 3 PCR 扩增 *mIL-12* 基因片段

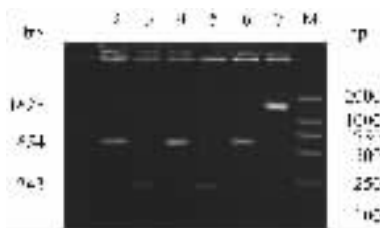
2.4 RT-PCR 检测转染细胞的基因表达 转染细胞 24 h 后提取总 RNA, 通过 RT-PCR, PBB 质粒转染组扩增出 654 bp 大小的 *bcr/abl* 融合基因片段, PBBG

质粒组也扩出 243 bp 的 GPI 锚定序列和 654 bp 的 bcr/abl 片段, PBBGI 质粒组则分别扩出 243 bp, 654 bp 和 1625 bp 的 mIL-12 目的条带, 而 pBudCE4.1 空质粒转染组未扩出相应条带(图 5)。



1: 经 *Bgl* II/*Not* I 酶切的 PBBGI; 2: DNA marker (DL2000)。

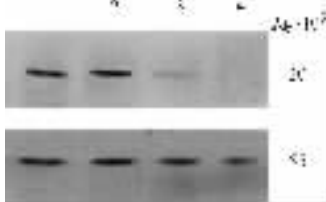
图 4 PBBGI 酶切鉴定



1: pBudCE4.1; 2: PBB; 3: PBBG; 4: PBBG; 5~7: PBBGI; M: DNA marker (DL2000)。

图 5 RT-PCR 检测转染细胞的基因表达

**2.5 Western-Blot 检测转染细胞膜蛋白表达** 转染 72 h 后提取细胞膜蛋白, 经 Western-Blot 检测显示, PBBG 和 PBBGI 质粒转染组有明显的  $M_r$  20 000 大小的 bcr/abl 融合蛋白表达, 而 PBB 质粒组细胞膜上 bcr/abl 融合蛋白表达较弱, pBudCE4.1 空载体组则未表达。PBB 质粒组转染细胞膜上均有  $M_r$  55 000 的内参  $\alpha$ -微管蛋白表达(图 6)。



1: PBBGI; 2: PBBG; 3: PBB; 4: pBudCE4.1 空载体。

图 6 Western-Blot 检测转染细胞膜 bcr/abl 融合蛋白表达

**2.6 ELISA 检测 mIL-12 的分泌表达** 取 PBBGI 质粒转染组 72 h 的细胞培养上清, 用 ELISA 试剂盒检测到 mIL-12 表达, 含量为 164.75 pg/L, pBudCE4.1

空载体转染组和未转染的 COS 细胞培养上清均未检出 mIL-12。

### 3 讨论

CML 具有特征性的 bcr/abl 融合基因, 依据 bcr 断裂点位置不同, 主要存在 b3a2 和 b2a2 两种基因拼接形式。b3a2 型融合基因可编码产生  $M_r$  为 210 000 的 P210 融合蛋白, 该蛋白具有异常增强的酪氨酸激酶活性, 与细胞恶性转化与克隆密切相关。p210 的抗原性限定在 bcr/abl 融合位点内, 这段氨基酸序列在正常细胞中不存在, 因此该序列可作为肿瘤特异性抗原, 这为 CML 的免疫治疗提供了依据。CTL 在 CML 特异性免疫治疗中发挥着重要作用<sup>[4-5]</sup>。T 淋巴细胞不能识别可溶性天然抗原, 而只能识别经过加工并与 MHC-I 类分子结合递呈到细胞表面的抗原片段。然而 P210 融合蛋白为胞内蛋白, 其免疫原性主要在胞内, 虽然极少数 bcr/abl 融合多肽含有与 MHC-I 类分子结合的氨基酸序列, 但仅与其中 HLA-A3, A11, B7 有较好的亲和力<sup>[6]</sup>, 不能持续呈递于细胞膜上而刺激产生持久有效的抗白血病免疫反应, 同时, 体外 CTL 水平检测也需要能在细胞膜上表达肿瘤抗原表位的特异性靶细胞作为实验工具, 因此, 诱导 bcr/abl 融合蛋白由细胞内转到细胞膜上表达十分重要。

糖基化磷脂酰肌醇(GPI)是一种脂性结构, 蛋白质可通过该结构锚定于真核细胞膜表面而形成锚定蛋白。细胞中存在多种锚定蛋白, 如 CD14, CD24, CD48, CD52 等, 它们与传统的跨膜型表面蛋白不同, 不跨越细胞膜脂质双层, 只通过其羧基末端的 GPI 结构锚定于细胞膜上, 在免疫识别、跨膜信号转导及诱导细胞产生应答等方面起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。当 GPI 锚定信号肽与目的基因羧基端连接构成嵌合性 cDNA 并装到合适的真核表达载体后, 可转染真核细胞, 并能筛选出高表达的锚定蛋白细胞株<sup>[7]</sup>。本研究中, 我们将人外周血淋巴细胞表面 CD24 分子中的 GPI 锚定序列通过 RT-PCR 扩增出来, 经 *Sal* I 酶切位点连接到 bcr/abl 融合基因下游羧基端, 构建重组质粒 PBBG, 并转染真核细胞, 通过 RT-PCR 和 Western Blot 鉴定, GPI 锚定修饰的 PBBG 确实在 cos-7 细胞中有 bcr/abl 融合基因, 在细胞膜上有 bcr/abl 融合蛋白的表达, 其表达水平明显高于未用 GPI 连接的 PBB 质粒, 说明 GPI 的锚定修饰作用能够实现 bcr/abl 融合蛋白的膜上表达。而 IL-12 作为一种细胞免疫调节因子, 在促进 IFN- $\gamma$ , IL-2 等细胞因子产生、介导细胞免疫并增强 CTL 的细胞毒性活性方面有重要作

用<sup>[3]</sup>。因此,我们又将 mIL-12 基因片段克隆入 PBBG 质粒的另一多克隆位点,构建重组质粒 PBBGI,以期利用细胞因子本身的生物学活性及其佐剂作用优化宿主特异性免疫反应。实验结果表明该质粒转染组的细胞培养上清中有 mIL-12 表达。

## 【参考文献】

- [1] Ikezawa H. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored proteins [J]. *Bio Pharm Bull*, 2002 25(4) 409-417.
- [2] Sangiorgio V, Pitto M, Palestini P, et al. GPI-anchored proteins and lipid raft [J]. *Ital J Biochem*, 2004 53(2) 98-111.
- [3] 杨莉萍. IL-12 的免疫调节作用及临床应用 [J]. *中国新药杂志*,

2003 12(12) 991-995.

- [4] Schwartz J, Pinilla-Ibarz J, Yuan RR, et al. Novel targeted and immunotherapeutic strategies in chronic myeloid leukemia [J]. *Semin Hematol*, 2003 40 87-96.
- [5] Cathcart K, Pinilla-Ibarz J, Korontsvit T, et al. A multivalent bcr/abl fusion peptide vaccination trial in patients with chronic myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2004 103 1037-1042.
- [6] Bocchia M, Wentworth PA, Southwood S, et al. Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules [J]. *Blood*, 1996 85(10) 2680-2684.
- [7] 于继云,沈信奋. 细胞表面工程与肿瘤疫苗 [J]. *免疫学杂志*, 2003 19(6) 478-481.

编辑 王雪萍

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2008)04-0365-01

## 原发性肺淋巴瘤 2 例的临床诊治

陈昭明,方立德,梁析(上海交通大学医学院附属第九人民医院胸外科,上海 200011)

【关键词】肺肿瘤 肺淋巴瘤 原发性 临床诊治  
【中图分类号】R734.2 【文献标识码】B

**0 引言** 原发性肺淋巴瘤(PPL)是指累及一侧或两侧肺实质和支气管的克隆性淋巴细胞增殖性疾病,且在诊断时或随后的 3 mo 中无可发现的肺外浸润。临床少见且特征性临床表现较少,易与其他肺部肿瘤混淆,误诊率高。我们通过对经治的 2 例病例进行回顾及相关文献复习,探讨 PPL 的临床特点、误诊原因和诊疗方法。

**1 临床资料** 例 1,女性,64 岁。因反复咳嗽 2 mo 余入院,无咯血,无发热,无明显胸痛感。体检未见阳性体征。既往有左上肺结核史,抗痨治疗治愈。胸片显示左上肺上叶 3.5 cm × 6.0 cm 块影,边缘毛糙,呈分叶状,密度均匀,未见钙化影。拟诊“左上肺癌”收治入院。胸部 CT 亦显示左上肺上叶肿块影,纤维支气管镜未发现异常。入院后行左上肺叶切除术,术后病理报告:左肺上叶非霍杰金氏淋巴瘤, B 细胞型,小裂细胞为主。术后再予环磷酰胺 + 长春新碱化疗四周期,随访存活 7 a。

例 2 男性,71 岁。因反复咳嗽、少量咯血及胸闷气促 1 mo 余入院,无发热。外院胸片显示左上肺舌叶 5 cm × 5 cm 肿块影,边缘毛糙,呈分叶状。拟诊“左上肺癌”收治入院。胸部 CT 显示左上肺舌叶肿块影,伴纵隔淋巴结肿大。术前纤维支气管镜示左上肺舌叶段开口处稍狭窄,活检未找到肿瘤细胞。入院后行左上肺叶切除术,术后病理报告:左上肺舌叶非霍杰金淋巴瘤,淋巴浆细胞样及浆细胞性。术后患者拒绝化疗,回原籍后失访。

**2 讨论** PPL 是很少见的病种,慢性炎症、抽烟及自身免疫性疾病等是淋巴瘤产生的可知的危险因素。发病高峰 60~70 岁,男女比例接近 1:1。PPL 的诊断标准<sup>[1]</sup>为:有明确的病理组织学诊断,影像学无明显纵隔或肺门淋巴结肿大,无肺及支气管外其他部位淋巴瘤的证据,确诊后 3 mo 内无肺和支气管外组织或器官淋巴瘤。目前国内文献报道大多仍沿用了此诊断标准。我们收治的 2 例患者术前均误诊为支气管肺癌,国外文献<sup>[1]</sup>也多见术前高误诊率,其中重要原因就是 PPL,无论是临床还是影像学特征都不是很典型,这给临床诊断特

别是术前诊断带来了一定困难。

PPL 的确诊还是要取决于组织病理学的证据。虽然纤维支气管镜检查是肺部疾病诊断检查中常用方法,但实际上它对 PPL 诊断的阳性率是低的。这可能与 PPL 起源于支气管黏膜下组织或动静脉周围的淋巴组织,沿淋巴管浸润性生长及蔓延,较少累及支气管内膜,纤维支气管镜无法获取足够的活检标本有关。本文 2 例患者术前纤维支气管镜检查均未取得有助于 PPL 诊断的依据。目前看来,外科介入包括剖胸手术及胸腔镜外科(VATS)仍是诊断 PPL 的主要方法。手术中行肺部肿瘤楔形或肺叶切除,从而取得足够的标本,借助术中的冰冻切片和术后的免疫细胞化学、免疫组织化学技术检查而得到证实。国内外文献报道中迄今为止较大的一组病例是 Cordier 等<sup>[1]</sup>报道的 70 例,其中 62 例是通过手术病理确诊的。Frederic 等<sup>[2]</sup>也认为在术前和术后的检查中所有患者应该进行包括腹部、头部、颈部 CT 检查及骨髓穿刺,且按照 PPL 的定义,以上这些检查结果均应排除有胸外淋巴瘤的征象。

对于 PPL 的治疗问题虽有一定的争论,但大多数学者还是认为手术是治疗 PPL 的首选方法,尤其是一些局限性的 PPL<sup>[2-4]</sup>。如果有可能完整切除肿瘤的,要积极进行手术治疗。手术既有明确诊断的作用,又能达到治疗目的,同时也为下一步放、化疗提供依据。Frederic 等<sup>[2]</sup>也认为对于 PPL,完整的手术切除后患者的 10 a 生存率可达到 87.5%,他们的生存期要好于进行部分手术切除的患者。但对于双侧病变、肺外浸润、复发的病例则应考虑放、化疗。

PPL 的预后是较好的。这与组织学类型、分期及治疗方式的采用等有关。Cordier 等<sup>[1]</sup>报道的一组 70 例 PPL 病例中 5 a 生存率对于低度恶性者可达 94%,而高度恶性者中位存活时间是 3 a。

总之, PPL 是一种罕见的肺部恶性肿瘤,但其预后较好。许多患者在诊断中症状不典型,误诊率极高,外科介入取得病理学检查结果是确诊的主要手段。对于局限性的 PPL 进行完整的手术切除是首选的治疗手段。而对于已有扩散的或存在多发性病灶者,以及术后复发者则可考虑进行化疗或放疗。

## 【参考文献】

- [1] Cordier JF, Chailleux E, Lauque D, et al. Primary pulmonary lymphomas. A clinical study of 70 cases in nonimmunocompromised patient [J]. *Chest*, 1993, 103 201-208.
- [2] Frederic VE, Fadel E, de Perrot M, et al. Role of surgery in the treatment of primary pulmonary B-cell lymphoma [J]. *Ann Thorac Surg* 2007 83(1) 236-240.
- [3] 张边斌,孙玉鹤,于长海,等. 原发性肺淋巴瘤的临床诊断和外科治疗 [J]. *中华外科杂志* 2006 44(2) 97-99.
- [4] Graham BB, Mathisen DJ, Mark EJ, et al. Primary pulmonary lymphoma [J]. *Ann Thorac Surg*, 2005 80(4) 1248-1253.

编辑 袁天峰

收稿日期 2007-12-20; 接受日期 2008-01-06

作者简介 陈昭明, 本科, 副主任医师。Tel (021) 63138341 Ext. 5146

Email: chenzhao ming@163.com