

· 临床研究 ·

EB 病毒阴性的侵袭性 NK 细胞白血病 1 例报道并文献复习

张萍, 罗云, 陈姝, 娄世锋

(重庆医科大学附属第二医院血液内科 400010)

摘要:目的 通过报道 1 例 EB 病毒阴性的侵袭性 NK 细胞白血病(ANKL)患者诊治,以提高对该病的认识。方法 对 1 例新近诊断的 EB 病毒阴性的 ANKL 患者的临床资料进行分析,并复习国内外相关文献。结果 该病临床表现为持续高热及肝、脾、淋巴结肿大;外周血、骨髓涂片大颗粒淋巴细胞增多;免疫表型 CD2(+),表面 CD3(-)、胞质 CD3(+),CD56(+),CD57(-);TCR 基因、IgH 基因重排均为阴性。结论 ANKL 恶性度高,病情发展呈高度侵袭性,对化学治疗反应差,易并发感染,预后极差,需研究新的治疗方案。

关键词:诊断;鉴别诊断;侵袭性 NK 细胞白血病

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.33.025

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)33-3384-02

Aggressive natural killer cell leukemia with epstein-barr virus negativity: a case report and literature review

Zhang Ping, Luo Yun, Chen Shu, Lou Shifeng

(Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: **Objective** Through one case of aggressive natural killer cell leukemia(ANKL) with epstein-barr virus negativity report to improve the recognition of this disease. **Methods** The clinical datum of one case of aggressive natural killer cell leukemia was analyzed and the related literature was reviewed. **Results** The case presented with persistence ardent fever, hepatosplenomegaly and lymphadenopathy; Increasing large granular lymphocytes could be found in bone marrow and blood; The immunophenotype of abnormal cells :CD2(+), surface CD3(-), cytoplasm CD3(+), CD56(+), CD57(-); Rearrangement of TCR genes and IgH gene was negative. **Conclusion** ANKL is an extremely rare malignancy and progression of disease is high invasion, often complicated infection, usually has no reactive to chemotherapy. It carries very poor prognosis and need to investigate new therapeutic regimen.

Key words: diagnosis; differential diagnosis; aggressive natural killer leukemia; diagnosis

侵袭性 NK 细胞白血病(aggressive natural killer cell leukemia, ANKL)是 NK 细胞系统性增殖的恶性肿瘤,在临床上极为少见。现报道本科新近诊治 1 例患者并进行文献复习,提高对该病认识。

1 临床资料

患者,女,32 岁,已婚,因“发热 5 d”于 2009 年 4 月 20 日入院。入院 5 d 前患者无明显诱因出现发热,体温最高达 42℃,以夜间发热为主。口服解热镇痛药出大汗后可退热,伴有咳嗽、咳黄色或白色黏痰。患者入院前 1 月余曾行剖宫产 1 健康男婴。入院查体:体温 36.2℃,浅表淋巴结未扪及,口腔左侧颊黏膜少许溃烂、红肿,咽无充血,扁桃体无肿大,双肺呼吸音清晰,未闻及干湿啰音,心率 115 次/分,律齐,心瓣膜区无杂音,肝大,下界至肋下 3 cm,脾大,下界肋下平脐平面,肝、脾质中,无压痛,双下肢无水肿。入院后开始出现发热,体温 39℃ 以上,稽留热;血常规示白细胞(WBC)40.36×10⁹/L,中性粒细胞比例 11%,淋巴细胞比例 89%,血小板(PLT)25×10⁹/L;大便常规:黏液(++),隐血(+),大便培养为阴性;肝功能检查:总蛋白(TP)50.2 g/L,清蛋白(ALB)26.9 g/L,丙氨酸转氨酶(ALT)126 U/L,谷草转氨酶(AST)389 U/L,γ-谷氨酰转肽酶(GGT)51 U/L,总胆红素(TBIL)13.1 μmol/L;心肌酶谱:乳酸脱氢酶(LDH)1 285 U/L,C 反应蛋白(CRP)13.13 mg/L,α 羟基丁酸脱氢酶(α-HBDH)894.5 U/L;肾功能、血液生化指标正常,乙肝、丙肝病毒标记物阴性,人免疫缺陷病毒阴性,EB 病毒 DNA 阴性,HTLV-RNA 阴性,IgH 基因重排(-),TCRγδ 基因(-),多次血培养阴性,行腹部彩超示肝大,右叶斜

径 16.6 cm,胆囊结石,脾大 20.0 cm×16.8 cm,脾静脉主干于 1.3 cm;胸部 CT 示左肺下叶基底段及舌叶少许炎症,双下肺间质性改变,纵隔内小淋巴结;腹部 CT 平扫及增强示肝大,肝密度降低考虑脂肪肝,肝右叶外侧段见多个点状高密度影,脾大,脾前缘见结节低密度影,腹膜后小淋巴结显示,盆腔少许积液;骨髓检查:有核细胞增生明显活跃,不明细胞占 19%,细胞质蓝,有空泡,胞体不规则,染色质细,可见核仁;流式细胞仪免疫分析:CD2(+),CD7(+),HLA-DR(+),CD56(+),MPO(-),CyIg(-),CD3(-),CD19(-),CD20(-),CD33(-),CD34(-)。根据患者骨髓及免疫分型检查结果诊断 ANKL 明确。

患者入院后先予左氧氟沙星及头孢米诺钠抗感染治疗,诊断明确后于入院第 4 天开始联合化疗,足叶乙甙 100 mg d₁₋₃,米托蒽醌 10 mg d₁₋₃,长春瑞滨 40 mg d₁,左旋门冬酰胺酶 1 万 U×7 次 d₈,地塞米松 40 mg d₁₋₄;化疗后患者体温正常,肝、脾明显缩小至肋下,化疗后出现骨髓抑制,于化疗后第 12 天再次发热,血培养示大肠埃希菌,ESBL 阳性,予以比阿培南、丁胺卡那抗感染,G-CSF 升白,输血制品,体温升高 2 d 后得以控制,未再发热,化疗后 21 d 复查骨髓未见肿瘤细胞,LDH 降为 221 U/L,白细胞、血小板正常,红细胞(HB)77 g/L,共住院 4 周;出院 10 d 后患者返院巩固化疗,予以同样治疗方案治疗,患者在骨髓抑制期出现肛周感染,肛瘘,建议患者转外科行肛瘘修补,患者自行出院。

两个月后患者再次发热入院,入院后查体:体温 38.9℃,听力有减退,右下肺少许湿啰音,肝肋下 7 cm,脾肋下 6 cm,质中无压痛,肛周无压痛,未见瘘口。血常规:WBC 11.3×10⁹/

L、中性粒细胞比例 18%、淋巴细胞比例 80%、PLT $4 \times 10^9/L$ ；凝血象：凝血酶原时间(PT)19.6 s、部分凝血酶时间(KPTT)91.3 s、凝血酶时间(TT)51.3 s、PT 百分比为 51%、Fib-g1 83 g/L；肝功能：TP 41.4 g/L、ALB 23 g/L、ALT 161 U/L、AST 580 U/L、GGT 127 U/L、TBIL 67.3 $\mu\text{mol/L}$ 、IBIL 60.3 $\mu\text{mol/L}$ 。复查骨髓示瘤细胞偶见，胸、腹部 CT 与前变化不大，头部 CT 无异常。多次血培养阴性，予以保肝、抗感染、补充蛋白和血浆等治疗后给予 CHOP 方案联合化疗，化疗中无发热，化疗后又开始发热，先后予以亚胺培南、替考拉宁、氟康唑、两性霉素等抗感染无效，予以解热镇痛药能退热，2 周后又予以 CHOEP 方案联合化疗，肝功一度好转，但 1 周后再度恶化，并出现反复腹泻，后出现呼吸困难、血压降低，抢救无效于 2009 年 10 月 6 日死亡，死亡前 HB 47 g/L、WBC $25.6 \times 10^9/L$ 、PLT $40 \times 10^9/L$ ，总病程 5 月余。

2 讨论

ANKL 是以 NK 细胞系统性增生为特征，属于大颗粒淋巴细胞白血病(LGLL)中的一型，为 CD3-NK 系 LGLL 增生所致，它高发于东亚人群，主要见于少年和青壮年，中位发病年龄为 39 岁^[1]。目前世界卫生组织 WHO 已将成熟 NK 细胞肿瘤分为两类：结外 NK/T 细胞淋巴瘤(鼻型)和 ANKL。ANKL 发病原因尚不明确，已有研究显示 ANKL 可能与逆转录病毒感染等相关，与 EB 病毒感染高度相关，多数患者可检测到 EB 病毒，但本例患者经核酸检测未发现 EB 病毒及 T 淋巴细胞白血病病毒感染。Ko 等^[2]证 EB 病毒阴性的 ANKL 预后较 EB 病毒阳性的 ANKL 患者预后好，二者的中位生存时间分别为 11.5 个月和 21.5 个月，但例数有限，分别为 2 例和 14 例。本例患者发病处于产褥期，查阅文献仅发现 1 例女性妊娠期患 ANKL 白血病^[3]，因此 ANKL 与女性妊娠及产褥关系有待研究。日本学者研究表明 NK 细胞肿瘤增殖和凋亡与白细胞介素 2(IL-2)和白细胞介素 15(IL-15)信号转导密切相关，IL-15 可以促进 NK 细胞增殖并通过 BCL-XL 减少凋亡^[4]，直接转染 IL-15 基因到小鼠能够形成 NK 细胞肿瘤^[5]。

迄今国内累计报道 10 余例 ANKL，其中数量较大病例为华山医院中美白血病协作组报道的 9 例^[6]。从已有报道看所有 ANKL 病例均有发热、淋巴结、肝、脾大，个别病例出现少见临床表现。国内杨丽云等^[7]报道 1 例以眼球突出就诊 ANKL 患者；梁虹等^[8]报道以皮肤病变为首发症状的 1 例 ANKL 患者；陆沐华等^[9]报道以腰部酸痛、腹胀为首发症状的 1 例 ANKL 患者。ANKL 的免疫表型特征：CD2(+)、CD3(-)、CD4(-)、CD7(+)、CD8(-)、CD16(+)、CD38(-)、CD56(+)、CD117(-)、CD57(-)、HLA(-)、DR(+), 无 TCR 基因重排。需与 ANKL 鉴别的疾病是“惰性 NK 细胞淋巴瘤增生性疾病(INKLPD)”亦称慢性 NK 细胞淋巴瘤增多症、NK 细胞大颗粒淋巴瘤增多症及大颗粒 T 淋巴细胞白血病(T-LGLL)，多见于西方人群，临床过程均为慢性，免疫表型亦与 ANKL 有差异^[10]。本例患者经流式细胞仪检测肿瘤细胞表型符合 NK 细胞的标记，PCR 检测 IgH 基因重排(-)，TCR $\gamma\delta$ 基因(-)，结合患者临床表现诊断为 ANKL。

目前认为 ANKL 临床治疗效果不佳与肿瘤细胞高表达耐药蛋白 P 糖蛋白有关，近年来有研究显示含有左旋门冬酰胺酶的联合化疗方案对于 NK/T 细胞的淋巴瘤和 NK 细胞白血病效果较好。Jaccard 等^[11]采用左旋门冬酰胺酶联合 CHOP 方案治疗 NK/T 细胞淋巴瘤和 NK 细胞白血病总共 15 例，其中 7 例获得完全缓解(CR)，但从该研究可以看出 IV 期的淋巴瘤和 ANKL 效果并不理想，未有获 CR 病例。而 Yamaguchi

等^[12]报道采用地塞米松、甲氨蝶呤、异环磷酰胺、左旋门冬酰胺酶及足叶乙甙组成的方案(SMILE) I 期临床治疗 6 例 NK/T 细胞淋巴瘤和 NK 细胞白血病患者，有 3 例获 CR，但所有患者均出现粒细胞缺乏等不良反应。因此作者初治选用了门冬酰胺酶、足叶乙甙、地塞米松，同时也选用淋巴细胞白血病常用的药物长春瑞滨、米托蒽醌，这些药物与 P 糖蛋白关系均不密切，治疗后按 Cheson 等^[13]的标准，患者症状消失，骨髓未见肿瘤细胞，外周血白细胞、血小板恢复正常，肝、脾不大，LDH 降至正常，应属于 CR，但该方案也显示骨髓抑制较重，血液学毒性已达 4 级，同时 NK 细胞白血病患者因其固有免疫缺陷加之化疗后粒缺，患者两次化疗均并发感染。ANKL 易复发，本例患者 CR 仅持续不到 2 月复发，因凝血象异常及肝功能受损较前加重，故未再选用含门冬酰胺酶方案，改为强化 CHOP 方案，从治疗效果看未获缓解。最近来自日本的研究报道 ANKL 行异基因造血干细胞移植可能取得较长时间生存，但病例仅 3 例^[3]；国内报道病例大都短时间内死亡，死亡原因常为脏器功能衰竭、凝血功能障碍、出血等。由于 ANKL 进展快，患者中位生存时间一般少于 2 个月^[2, 6]，患者配型、移植时间紧迫，还需要进一步探讨有效化疗缓解方案及巩固方案。

参考文献：

- [1] Sokol L, Loughran TP. Large granular lymphocyte leukemia[J]. *Oncologist*, 2006, 11(3):263-273.
- [2] Ko YH, Park S, Kim K, et al. Aggressive natural killer cell leukemia; is Epstein-Barr virus negativity an indicator of a favorable prognosis[J]. *Acta Haematol*, 2008, 120(4):199-206.
- [3] Ito T, Makishima H, Nakazawa H, et al. Promising approach for aggressive NK cell leukaemia with allogeneic haematopoietic cell transplantation[J]. *Eur J Haematol*, 2008, 81(2):107-111.
- [4] Yamasaki S, Maeda M, Ohshima K, et al. Growth and apoptosis of human natural killer cell neoplasms; role of interleukin-2/15 signaling[J]. *Leuk Res*, 2004, 28(10):1023-1031.
- [5] Yokohama A, Mishra A, Mitsui T, et al. A novel mouse model for the aggressive variant of NK cell and T cell large granular lymphocyte leukemia[J]. *Leuk Res*, 2010, 34(2):203-209.
- [6] 王小钦. 侵袭性 NK 细胞白血病的临床表现——附 9 例报告[J]. *中华血液学杂志*, 2006, 27(2):116-119.
- [7] 杨丽云, 郑静晨, 丁琪, 等. 侵袭性 NK 细胞白血病 1 例报告并文献复习[J]. *中国误诊学杂志*, 2007, 7(1):17-18.
- [8] 梁虹, 严红, 陈圣宏. 以皮肤病变为首发症状的侵袭性 NK 细胞白血病 1 例[J]. *临床血液学杂志*, 2008, 21(11):618.
- [9] 陆沐华, 季苏毅, 咸学军, 等. 侵袭性 NK 细胞白血病 1 例报告并文献学习[J]. *中国血液流变学杂志*, 2007, 17(3):393-394.
- [10] Liang X, Graham DK. Natural killer cell neoplasms[J]. *Cancer*, 2008, 112(7):1425-1436.
- [11] Jaccard A, Petit B, Girault S, et al. L-asparaginase-based treatment of 15 western patients with extranodal NK/T-cell lymphoma and leukemia and a review of the literature[J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(1):110-116. (下转第 3388 页)

率 24 h 均超过 65%, 48 h 均超过 77%, 72 h 均超过 85%。

3 讨 论

高效的 miRNA 阻遏物转染是研究 miRNA 生物学作用的基本途径, 故选择最合适的转染方法是整个实验成败的第一步。目前, miRNA 阻遏物转染的方法众多, 但各有优缺点。磷酸钙沉淀法重复性差、转染效率低, 电穿孔法无法避免高水平的细胞毒性, 显微注射法技术要求高、操作繁琐、工作效率低、装置昂贵, 逆转录病毒法耗时且价格昂贵, 尤其不适合于有效片段的筛选实验, 且需考虑安全因素^[4]; 阳离子脂质体试剂可形成微小的(平均大小约 100~400 nm)单层脂质体。这些脂质体带正电, 可以靠静电作用结合到 DNA 的磷酸骨架上以及带负电的细胞膜表面, 故其容易透过细胞膜, 在各种体外培养细胞的 RNA 干扰实验中得到了广泛的应用^[6], 但仍有一定的细胞毒作用, 而且对于原代细胞、悬浮细胞仍存在转染效率低的情况。本实验使用的磁性转染方法将磁性纳米微粒与 miRNA 阻遏物结合成磁性 miRNA 复合物, 在磁力的作用下进行转染, 该方法还可与其他转染方法结合, 提高 miRNA 阻遏物转染效率^[5], 为了探讨最佳的将 miR-221 阻遏物转染至 HepG2 细胞的方法, 本实验对比了 7 种转染试剂的 miRNA-221 敲除率, 结果显示在各个时间段, Magnetofection 联合 lipofectamine 2000(即 combiMAGnetofection)均获得了比其他方法更强的 miRNA 敲除, 为 miRNA 阻遏物转染提供了新的选择。

miRNA 敲除率由多种因素共同支配, 如转染方法、转染细胞状态、miRNA 阻遏物浓度、转染试剂的用量、转染复合物的孵育时间、培养液中血清和抗生素含量等^[4]。转染试剂与转染物使用过量可引起细胞形状改变、脱落、甚至死亡, 直接影响着转染的效率, 故对转染条件进行优化是成功的 miRNA 干扰实验的前提。本实验对比了 combiMAGnetofection 不同的用量以及不同 miRNA 阻遏物浓度的 miRNA 敲除效果。结果显示最佳的实验条件是: 2 μ L combiMAGnetofection/200 nmol/L miRNA 阻遏物/24 孔板/72 h, miRNA 敲除率为 72%。由于 miR-221 本身对细胞增殖有影响^[7], 故本实验使用与细胞增殖无关的 miR-191 阻遏物来检验 combiMAGnetofection 转染系统的细胞活力。结果显示细胞活性高, 证明 combiMAGnetofection 转染系统操作过程对细胞损伤小, 细胞毒性效应低。

反向转染法与传统正向转染法的区别是传统方法需在转染前 1 d 接种细胞铺板, 培养 24 h 后再加转染复合物进行转染; 而反向转染则是先加入转染试剂和 miRNA 阻遏物混合物在培养板上共同温育数 10 min, 然后加入细胞铺板培养, 其优点可节约培养时间^[8]。避免传统正向转染方法培养条件的频繁变化对细胞表达可能产生的影响; 对于某些贴壁重叠生长的细胞, 可使细胞更完全的接触转染混合物, 提高转染效率。本实验发现反向转染法的 miRNA 敲除率明显高于传统正向转

染法, 有可能因为 hepG2 细胞部分可重叠生长, 在传统的正向转染中, 并非所有的细胞都能均匀的接触转染混合物, 从而影响了 miRNA 的敲除效率。反向转染法使用细胞悬液进行转染, 同时在磁力及脂质体的双重作用下, miRNA 阻遏物可以更彻底的接触细胞, 得以高效的转入细胞中。本课题组也对比了正反向转染数个 miRNA 模拟物(miR-221, miR-224, miR-146a 等)的实验, 发现反向转染的效果均优于正向转染(结果未示)。该转染条件可用于后续的 miRNA 在肝癌中生物学作用的研究。

综上所述, 本实验结果提示人肝癌细胞适合应用磁性纳米微粒反向转染法进行化学合成 miRNA 阻遏物及模拟物的转染, miRNA 阻遏物及模拟物浓度、磁性纳米微粒用量、转染时间及反向转染的使用是转染的重要影响因素。

(致谢: 感谢比利时安特卫普大学 Phillippe Delcamte 博士提供相关仪器设备及技术支持。)

参考文献:

- [1] Siegrist F, Singer T, Certa U. MicroRNA expression profiling by bead array technology in human tumor cell lines treated with interferon-alpha-2a[J]. Biol Proced Online, 2009, 11(1): 113-129.
- [2] 刘强, 郑秀峰, 辛永红. miRNA 研究进展[J]. 重庆医学, 2009, 38(15): 1970-1972.
- [3] Hunt EA, Goulding AM, Deo SK. Direct detection and quantification of microRNAs[J]. Anal Biochem, 2009, 387(1): 1-12.
- [4] Lee SH, Sinko PJ. siRNA--getting the message out[J]. Eur J Pharm Sci, 2006, 27(5): 401-410.
- [5] Pickard M, Chari D. Enhancement of magnetic nanoparticle-mediated gene transfer to astrocytes by 'magnetofection': effects of static and oscillating fields[J]. Nanomedicine, 2010, 5(2): 217-232.
- [6] 张园, 李志樑, 邱健, 等. 优化阳离子脂质体介导的组织因子小干扰 RNA 转染 HEK-293 的转染条件[J]. 广西医科大学学报, 2009, 26(2): 176-179.
- [7] Gramantieri L, Fornari F, Ferracin M, et al. MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(16): 5073-5081.
- [8] 杨萍, 严金川, 刘培晶. siRNA 反向转染法提高原代悬浮细胞转染效率的应用[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2010, 20(3): 267-269.

(收稿日期: 2011-06-09 修回日期: 2011-08-12)

(上接第 3385 页)

- [12] Yamaguchi M, Suzuki R, Kwong YL, et al. Phase I study of dexamethasone, methotrexate, ifosfamide, L-asparaginase, and etoposide (SMILE) chemotherapy for advanced-stage, relapsed or refractory extranodal natural killer (NK)/T-cell lymphoma and leukemia[J]. Cancer Sci,

2008, 99(5): 1016-1020.

- [13] Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma[J]. J Clin Oncol, 2007, 25: 579-586.

(收稿日期: 2011-08-24 修回日期: 2011-09-22)