临床研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0415-03

眼眶淋巴瘤患者组织标本中鹦鹉热衣原体的 DNA 检测

熊 炜,魏 欣
(中南大学湘雅二医院眼科,长沙 410011)

【摘 要】目的:检测眼眶淋巴瘤患者组织标本中鹦鹉热衣原体 DNA,探讨鹦鹉热衣原体感染和眼眶淋巴瘤发病的相关性。方法:收集 36 例眼眶淋巴瘤患者的组织标本,以良性淋巴结病患者及眼外伤患者组织作为对照,采用 PCR 检测鹦鹉热衣原体 DNA。结果:眼眶淋巴瘤、良性淋巴结病及眼外伤患者组织的鹦鹉热衣原体 DNA 阳性率分别为 47.2%、5.0%、0.0%(χ^2=24.578, P=0.000 1)。而 ⅠA 期眼眶淋巴瘤组织中 DNA 的阳性率为 52.0%,ⅡA 期为 36.4%(χ^2=0.749, P=0.387)。全部病例的 5、8 年生存率分别为 90.1%、78.5%,鹦鹉热衣原体 DNA 阳性组和阴性组术后生存相当(χ^2=0.163, P=0.687)。结论:眼眶淋巴瘤发病可能和鹦鹉热衣原体感染有关。暂未发现鹦鹉热衣原体感染和疾病的分期及预后有关。

【关键词】眼眶淋巴瘤;鹦鹉热衣原体;PCR;病因学;预后
【中国图书分类法分类号】R739.7+2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-10-14

Detecting chlamydia psittaci DNA in patients with ocular adnexal lymphomas

XIONG Wei, et al
(*Department of Ophtyalmdogy, the Second Affiliated Xiangya Hospital, Central South University*)

【Abstract】*Objective*: To detect the chlamydia psittaci DNA in patients with ocular adnexal lymphomas, and find out the relationship between chlamydia psittaci infection and ocular adnexal lymphomas. *Methods*: Tissue samples from 36 patients with ocular adnexal lymphomas were collected, as well as samples from patients with benign lymph disease and patients with eye trauma as controls. Chlamydia psittaci DNA were detected by PCR. *Results*: The chlamydia psittaci DNA positive rates in patients with ocular adnexal lymphomas, benign lymph diseases and ocular trauma organizations were 47.2%, 5.0%, 0.0% (χ^2 = 24.578, P=0.000 1), respectively. The DNA positive rates in patients with Ⅰ A period were 52.0%, 36.4% of Ⅱ A period(χ^2 =0.749, P=0.387). 5,8-year survival rates of all the cases were 90.1%, 78.5%, which were the same in Chlamydia psittaci DNA positive group and negative group(χ^2 = 0.163, P= 0.687). *Conclusion*: The incidence of ocular adnexal lymphomas may be related with Chlamydia psittaci infection. But there is no evidence of the relationship with Chlamydia psittaci infection and of the ocular adnexal lymphomas stage and prognosis.

【Key words】Ocular adnexal lymphomas; Chlamydia psittaci; PCR; Etiology; Prognosis

眼附属器淋巴瘤(Ocular adnexal lymphomas, OALs)是常见的眼眶肿瘤,在眼附属器肿瘤中占 26%左右[1],而在非霍奇金淋巴瘤(Non-Hodgkin lymphomas, NHLs)中占 5%~10%[2]。并且近年来 OALs 发病率呈上升趋势。OALs 病变可涉及眼眶的任何一部分,包括结膜、眼睑、泪腺及泪囊等,其中大部分是为结外边缘区淋巴瘤(Extranodal marginal zone lymphomas, EMZLs)和黏膜相关淋巴组织淋巴瘤(Mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas, MALTLs),占 90%[3]。

对于 OALs 的病因,目前尚未确定。近年来研究表明 EMZLs 的发生和慢性炎症及感染有关:胃淋巴瘤和幽门螺杆菌感染有关[4],肠淋巴瘤和弯曲菌的感染有关[5]。而 Ferreri AJ 等[6]最初发现 OALs 患者的 Cps(Chlamydia psittaci, Cps)DNA 的阳性率达 80%,提示 OALs 的发病可能跟 Cps 感染有关。本文通过聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)技术检测我院近 10 年来 OALs 住院患者石蜡组织标本中 Cps 的 DNA,探讨 Cps 感染在 OALs 发病中的作用。

作者介绍:熊 炜(1971-),男,主治医师,
研究方向:眼眶病与眼整形。

1 资料与方法

1.1 临床资料

以 2000 年 1 月至 2009 年 6 月入我院治疗的 OALs 患者为研究对象,排除仅经放射治疗而未手术治疗没有病理组织保存者。共入选患者 36 例,所有病例均经病理证实为 NHLs。其中男 22 例,女 14 例,男女之比为 1.6:1;年龄 32~68 岁,中位年龄 56 岁;单侧发病 29 例(右 14 例,左 15 例),双侧发病 7 例,共 43 只患眼;原发部位:结膜 5 例,泪腺 3 例,眼睑及眶内其它部位 28 例;病理类型:B 细胞来源 28例,

T 细胞来源 2 例，未注明细胞来源者 6 例；Ann-Arbor 分期：ⅠA 期 25 例，ⅡA 期 11 例。另取良性淋巴结病患者 20 例及眼外伤患者 27 例的组织样本进行对照。对照组患者在性别、年龄等一般人口学特征上和 OALs 患者相似（P>0.05），具有基线可比性。

1.2　实验材料与方法

1.2.1　支原体阳性对照菌株　Cps B11001 株和 D34 株、沙眼衣原体 L2 株、肺炎衣原体 AR-39 株、肺炎支原体 FH 株均购自中国药品生物制品检定所。

1.2.2　仪器及试剂　Buffer 缓冲液、$MgCl_2$、dNTP、Taq 酶购自日本 TaKaRa 公司，DNA Marker 购自北京天为时代科技有限公司，琼脂糖为 Spanish 分装，酚氯仿抽提液购自中国医学科学院生物医学工程研究所，组织细胞裂解液、蛋白酶 K 购自上海生工公司。UV-1601PC 紫外分光光度计为日本岛津公司产品，Mx3000P 实时定量 PCR 仪为 Stratagene 公司产品，凝胶成像系统为 Bio-Rad 公司产品。

1.2.3　引物的合成　引物以 Cps16SrDNA 基因为模板进行设计，引物由上海生工合成。外套引物为 P15'-GGCATG-CAAGTCGAACGGAA-3' 和 P25'-GCTGGCACGGAGTTAGCCGC-3'，内套引物为 P35'-AGTGGCGGAAGGGTTAGT AA-3' 和 P45'-CAATCCGCCTAGACGTCAAT-3'。

1.2.4　巢式 PCR 检测 ①标本中 DNA 的提取：从蜡块切取 10 μm 切片 5 片，置入 1.5 ml Eppendorf 管内，二甲苯脱蜡，95%~50%（体积分数）乙醇梯度水化，常规组织细胞裂解液、蛋白酶 K 消化，酚氯仿抽取 DNA，Tris- 盐酸缓冲液（TE）溶解保存。②巢式 PCR 扩增：引物 P_1、P_2（或 P_3、P_4）各 0.5 μmol/L，dNTPs 各 200 mmol/L，KCl 10 mmol/L，$(NH_4)_2SO_4$ 8 mmol/L，$MgCl_2$ 2 mmol/L，Tris-HCl（pH 9.0）10 mmol/L，NP_{40} 0.5%。总反应体积 20 μl，其中模板液体积占 5 μl。外套扩增时采用引物 P_1、P_2，内套扩增时采用引物 P_3、P_4。热循环参数均为 93℃预变性 2 min，93℃ 30 s→55℃ 30 s→72℃ 60 s，共循环 35 周期。③琼脂糖凝胶电泳检测：电泳电压 140 V、30 min，紫外检测仪观察结果，凝胶数字成像系统拍照。

1.2.5　结果判断　以 Cps B11001 株为阳性对照，以去离子三蒸水为阴性对照。观察巢式 PCR 凝胶电泳结果，扩增产物在 214 bp 处出现特异性扩增条带，视为 Cps DNA 阳性。如结果为阴性，则取备份标本，重复以上实验步骤，再次进行巢式 PCR 检测，2 次均为阴性结果定为阴性，任 1 次出现特异性阳性条带定为阳性。

1.3　统计学方法

计数资料组间比较采用 χ^2 检验，生存分析采用 Kaplan-Meier 曲线进行描述，比较采用 log-rank 检验。以双侧的 P<0.05 为差异有统计学意义。统计软件为 SPSS 15.0。

2　结　果

2.1　OALs 组织中的支原体 Cps 的阳性率

在 PCR 凝胶成像电泳图上，Cps DNA 阳性表达为 214 bp 处出现特异性扩增条带（图 1）。36 例 OALs 组织标本中，Cps DNA 阳性表达 17 例，阴性表达 19 例，阳性率为 47.2%；20 例良性淋巴结病组织标本中，Cps DNA 阳性表达 1 例，阴性表达 19 例，阳性率为 5.0%；而 27 例眼外伤组织标本中，无 1 例 Cps DNA 阳性表达，阳性率为 0.0%。OALs 组中 Cps DNA 阳性率最高，差异有统计学意义（表 1）。

2.2　不同临床分期 OALs 组织中 Cps 的阳性率

本组 Ann-Arbor 分期ⅠA 期 25 例，ⅡA 期 11 例。ⅠA 期组织中 Cps DNA 的阳性率为 52.0%（13/25），ⅡA 期组织中 Cps DNA 的阳性率为 36.4%（4/11）。2 组阳性率相当，差异无统计学意义（表 2）。

2.3　Cps DNA 表达与 OALs 预后的关系

本组 36 例患者均进行系统随访，其中 5 例失访，随访率为 86.1%。以失访、死于其他疾病、和研究期满作为截尾数据，描述预后可知，全部病例的 5、8 年生存率分别为 90.1%、78.5%（图 2）。并且 Cps DNA 阳性组和 Cps DNA 阴性组术后生存相当，差异无统计学意义（χ^2=0.163，P=0.687）。

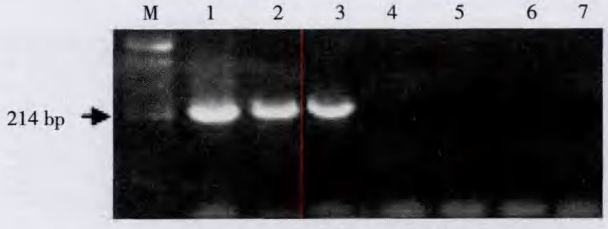


图 1　Cps DNA 的 PCR 凝胶电泳图

表 1　不同组织标本中 Cps 的阳性表达情况

分组	阳性	阴性	χ^2/P
OALs 组（n=36）	17	19	
良性淋巴结病组（n=20）	1	19	24.578/0.000
眼外伤组（n=27）	0	27	

表 2　不同病理分期的 OALs 标本中 Cps 的阳性表达情况

Ann-Arbor 分期	阳性	阴性	χ^2/P
ⅠA 期（n=25）	13	12	0.749/0.387
ⅡA 期（n=11）	4	7	

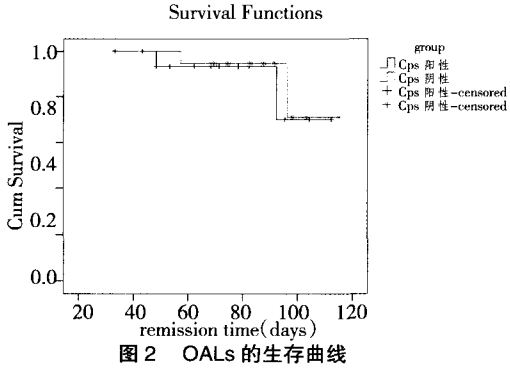


图 2 OALs 的生存曲线

3 讨 论

OALs 疾病早期可无症状，而在生长至一定大小时可出现疼痛，视力减退，眼球突出，移位和转动受限。并且眶缘可扪及较硬的、不活动、无压痛肿块。可有眼睑肿胀，球结膜水肿，眼底有压迫改变。眼眶 X 线平片可见骨质吸收破坏。对于 OALs 的病因，目前尚未确定。本研究通过检测 OALs 患者石蜡组织标本中 Cps 的 DNA，探讨 Cps 感染和 OALs 发病的相关性。

目前 Cps 的检测方法主要包括抗酸染色试验、补体结合试验、ELISA、间接免疫荧光试验、PCR 等方法，其中以 PCR 检测灵敏度和特异度最高[7]。本研究通过 PCR 检测显示，OALs 组织中的 Cps DNA 阳性率明显高于良性淋巴结病和非淋巴系统感染的眼部疾病患者，提示 Cps 的感染和 OALs 的发病存在一定的关系。NHLs 及 EMZLs 的发病和慢性感染有关已经得到证实[4,5]，其主要机制主要是和 C-myc 癌基因激活和表达、抑癌基因 P53 突变、凋亡抑制因子 bcl-2 表达异常和免疫逃逸等因素有关[8]。当然 NHLs 及 OALs 发病是个多因素过程。本组 36 例 OALs 组织标本中，Cps DNA 阳性率仅为 47.2%。

而 Dubovy[9]等的研究却表明 Cps 感染和 OALs 无关。Amina Husain 等对既往的相关研究进行 meta 分析，发现各家报道不一，OALs 中的 Cps 感染率从 0%~78%不等。认为 Cps 感染和 OALs 的关系存在明显的地区差异。国内可查的资料阳性率为 11%，参与研究的医院为南方医院、中山医科大学眼科中心、长征医院眼科及海南省人民医院[11]。本组阳性率稍高于上述资料。

Cps 感染在 OALs 发病中的作用研究既对其发生的病因学进行了探讨，同时也为 OALs 的治疗提供了新的思路，在 Cps 阳性的 OALs 患者中采用抗 Cps 治疗，可能提高疗效，改善预后。当然，本研究没有发现发现 Cps 感染和 OALs 的分期及预后有关，一方面可能是 Cps 感染和病情的进展无关，另外也可能跟本研究样本含量小有关，相关临床资料正在进一步积累中。当然也希望能有更大样本含量的前瞻性研究证实。

总之，本研究表明 OALs 患者组织中的 Cps DNA 阳性率高于良性淋巴结病及眼外伤患者组织中的 Cps DNA 阳性率，在湖南地区 OALs 的发病可能和 Cps 感染有关。对 Cps 感染在 OALs 发病中作用的探讨不仅能明确病因，同时也为OALs 的治疗提供了一条新的思路。

参 考 文 献

[1] Rootman J, Chang W, Jones D. Distribution and differential diagnosis of orbital disease[M].In: Rootman J,ed.Diseases of the Orbit. Philadelphia,PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2003. 53-85.

[2] Sjo, Lene D.Ophthalmic lymphoma: epidemiology and pathogenesis [J]. Acta Ophthalmol,2009,87(1): 1-20.

[3] McKelvie P A, McNab A, Francis I C, et al. Ocular adnexal lymphoproliferative disease: a series of 73 cases[J]. Clin Experiment Ophthalmol,2001,29:387-393.

[4] Suzuki H,Saito Y,Hibi T.Helicobacter pylori and gastric mucosa-associated lymphoid tissue(MALT) lymphoma: Updated review of clinical outcomes and the molecular pathogenesis[J]. Gut and liver,2009,3(2): 81-87.

[5] Lecuit M, Abachin E, Martin A, et al. Immunopro-liferative small intestinal disease associated with Campylobacter jejuni[J]. N Engl J Med, 2004,350: 239-248.

[6] Ferreri A J, Guidoboni M, Ponzoni M, et al. Evidence for an association between Chlamydia psittaci and ocular adnexal lymphomas[J]. J Natl Cancer Inst. 2004,96:586-594.

[7] 张 畅,曹金元,杨君敬,等. 3 种方法对禽鹦鹉热嗜性衣原体疑似病例病原的流行调查[J]. 中国比较医学杂志, 2008,18(4):39-44.

[8] 王国锦,邵宗鸿.病毒感染与非霍奇金淋巴瘤相关性研究进展[J].中华血液学杂志,2007,28(4):278-282.

[9] Dubovy,Gale R W,Arnold M,et al. Ocular adnexal lymphoma: a clinicopathologic study of a large cohort of patients with no evidence for an association with Chlamydia psittaci[J].Blood,2006,107:467 -472.

[10] Amina H,Dianna R, Barbara P,et al. Meta-analyses of the association between chlamydia psittaci and ocular adnexal lymphoma and the response of ocular adnexal lymphoma to antibiotics[J]. Cancer,2007,110: 809-815.

[11] Chanudet E, Zhou Y, Bacon C M, et al. Chlamydia psittaci is variably associated with ocular adnexal MALT lymphoma in different geographical regions[J]. J Pathol. 2006,209:344-351.

(责任编辑:冉明会)