

应用利妥昔单抗治疗弥漫性大B细胞淋巴瘤预后相关标志物的再评估

范艳兰 李小秋

复旦大学附属肿瘤医院病理科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[摘要] 弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是一组在发病机制和细胞起源方面都具有异质性的肿瘤。早期的预后模型(如国际预后指数)着重强调年龄、临床分期、行为状态评分等临床因素对患者预后的影响,并未反映这类疾病生物学异质的特点。虽然曾有研究表明,某些分子标志物与该类肿瘤的预后存在明确相关性,但随着抗CD20的利妥昔单抗日益广泛的应用,DLBCL的治疗策略和疗效均发生了相应的变化。因此,在当前免疫化疗治疗模式下,有必要对DLBCL原有的预后相关分子指标予以重新评估。

[关键词] 弥漫性大B细胞淋巴瘤; 预后; 标志物; 利妥昔单抗

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.06.012

中图分类号: R733.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)06-0467-05

Reevaluation of predictive biomarkers of diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era FAN Yan-lan, LI Xiao-qi (Department of Pathology, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 20032, China)

Correspondence to: LI Xiao-qi E-mail: leexiaoqi@hotmail.com

[Abstract] Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is a heterogeneous disease in terms of molecular pathogenesis and cell of origin. Earlier prognostic models relied mainly on such clinical variables as age, stage of disease, and performance status, which did not display its heterogeneity. Many studies have reported that some biomarkers could be used for prognostication, while older prognostic models need to be revalidated and modified as improved therapeutic options become available. In this review, we discussed pertinent studies on individual biomarkers and pattern-based biomarker models, with an emphasis on markers evaluated in patients treated with rituximab-containing chemotherapy.

[Key words] Diffuse large B-cell lymphoma; Prognosis; Biomarkers; Rituximab

弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是恶性淋巴瘤最常见的亚型之一, 占有非霍奇金淋巴瘤的25%~30%。该类肿瘤在形态学、免疫表型、细胞遗传学与分子生物学、临床表现、治疗反应和预后等方面都存在显著的异质性, 可能包括了不止一种的疾病或亚型。近年来, 应用cDNA微阵列技术研究发现DLBCL按照其基因表达谱特征可以分为3个亚型: 生发中心B细胞样(germinal centre B-cell-like, GCB)、活化B细胞样(activated B-cell-like, ABC)和第三型, 且前者的预后明显优于后两者。检测基因表达谱的技术复杂, 价格昂贵, 并且需要新

鲜组织, 这不利于在日常病理诊断工作中广泛应用, 为了克服这些限制, 人们用免疫组化方法来评价这些基因编码蛋白的预后意义, 并且提出预后模型, 最常用的是Hans法则和Choi法则(图1、2), 可以将DLBCL分为GCB和非GCB免疫亚型, 且和基因表达谱的结果有很好的^[1-2]一致性。

抗CD20的单克隆抗体利妥昔单抗的应用显著改善了DLBCL患者的预后, 同时也改变了一些已知分子预后指标的意义, 对于单克隆抗体治疗的患者而言, 这些标志物的预后意义与以往有所不同, 甚至有一些失去了原有的预后意义, 所以有必要对DLBCL有关预后分子指标进行重新评估。以下对已知部分指标预后意义的变化作一

简述。

1 预后指标

1.1 Bcl-2

Bcl-2是相对分子质量为 25×10^3 的线粒体内膜蛋白,是细胞凋亡蛋白家族成员之一,在组织内广泛存在,可以阻止化学治疗诱导的细胞凋亡。Bcl-2和预后的关系一直是个令人困惑的问题:多数研究认为它是一个不利的预后因素^[3-4];还有研究认为Bcl-2在非GCB亚型中与更差的预后相关,在GCB中却没有预后意义^[5]。在以上这些研究中,Bcl-2阳性率不等,定义Bcl-2阳性的评判标准差异也很大,而且Bcl-2染色结果受实验技术和条件影响。此外,各研究中患者人群、治疗方法和随访时间也存在差异,Bcl-2在不同研究中预后意义不同可能和以上这些因素相关。利妥昔单抗应用后的研究仍没能得到一致的结果:多数学者认为Bcl-2阳性(阳性细胞百分数>50%)可能不再是不利的预后因素^[6-7],其原因可能是利妥昔单抗可以降低Bcl-2表达,从而抵消了Bcl-2对预后的不利影响^[8]。然而Nyman等^[3]却认为Bcl-2表达和非GCB型相关,并且对应于更差的总生存及无复发生存率,此外,Maeshima等^[9]的研究也得到了相同的结果。所以Bcl-2在利妥昔单抗治疗时代的预后意义似乎仍需更多前瞻性的研究及标准化的实验技术来进一步明确。

1.2 Bcl-6

Bcl-6是一种具有锌指样结构的转录抑制因子,具有诱导细胞凋亡的功能,正常表达于滤泡生发中心B细胞和部分CD4⁺T细胞。Bcl-6基因重排在DLBCL中的检出率为16%~37%,但Bcl-6重排与Bcl-6蛋白表达之间并没有相关性^[10]。Bcl-6高表达有抑制生发中心B细胞向浆细胞转化的倾向,Bcl-6与BLIMP1之间形成的相互负性调节平衡的破坏可能是ABC型DLBCL发病机制环节之一。大部分研究结果提示Bcl-6是一个有利的预后因素^[1, 11-12]。对于接受利妥昔单抗治疗的患者,Bcl-6表达与否似与预后不相关,因为R-CHOP方案提高了Bcl-6阴性患者的总生存,但并未改善Bcl-6阳性患者的预

后^[11]。有日本学者认为,Bcl-6阳性(阳性细胞百分数>30%)仍然是一个独立的有利预后因素,且在多变量分析中仍有统计学意义^[13]。其他学者的研究也认为,在利妥昔单抗应用后,Bcl-6仍是有利预后因素^[9,14]。这种不同的结果可能与Bcl-6阳性判断标准不同有关,LLBC(Lunenborg Lymphoma Biomarker Consortium)认为,Bcl-6是DLBCL所有免疫标志物中阳性性别可重复性和染色稳定性最差者之一。

1.3 CD10

CD10亦称共同型急性淋巴细胞性白血病抗原(CALLA),是一种神经肽内切酶,被认为是滤泡中心细胞来源的标志物。大多数研究认为CD10是一个有利的预后因素^[15-16]。有研究认为,应用利妥昔单抗后,CD10阳性(阳性细胞百分数>30%)不再具有预后意义^[9,13]。

1.4 MUM1/IRF4

MUM1即多发性骨髓瘤癌基因1,其编码蛋白是干扰素调节因子(IRF)家族成员之一的一种淋巴特异性转录因子,相对分子质量为 50×10^3 ,可以调节B细胞的增殖及激活T淋巴细胞。MUM1/IRF4正常表达于浆细胞和小部分生发中心B细胞,被认为是非生发中心细胞标志物之一。35%~70%的DLBCL有MUM1/IRF4表达,其阳性表达在免疫母细胞亚型的DLBCL中更为多见^[17]。大部分研究结果均提示,MUM1/IRF4是一个不利的预后因素^[15,18]。对于应用利妥昔单抗治疗的患者,该分子(阳性细胞百分数>30%)不再具有预后意义^[9,13]。

1.5 Ki-67

Ki-67是一种核抗原,主要用于显示细胞的增殖活性,表达于所有活动的细胞周期(G₁、S、G₂和有丝分裂期)中,而在G₀期不表达。Ki-67增殖指数高低与许多肿瘤的分化程度、浸润转移以及预后密切相关。Ki-67在DLBCL中的预后意义也是一个有争议的问题,有研究认为,高Ki-67表达是一个不利的预后因素^[19],也有研究认为,低Ki-67表达才是不利的预后因素^[20]。利妥昔单抗应用后,Ki-67和预后关系的研究比较少,有研究认为,高Ki-67(>85%)仍

是一个不利的预后因素^[21-22]。也有研究者认为, Ki-67指数和预后不相关^[9,23]。

1.6 P53

P53是一种肿瘤抑制基因, 位于17号染色体短臂, 在细胞分化、凋亡及DNA损伤修复等方面都发挥着重要作用, P53突变可使细胞凋亡受阻, 在DLBCL中P53突变率为18%~30%。在利妥昔单抗应用之前, 大部分研究提示P53蛋白的表达是一个不利的预后因素^[4]。在应用利妥昔单抗治疗的患者中, P53突变是不利预后因素之一^[24], P53蛋白高水平表达(阳性细胞百分数>50%) 在单因素和多因素分析中都是不利的预后因素^[25]。

1.7 FOXP1(Forkhead box protein 1)

FOXP1基因位于染色体3p14. 1, 是FOXP亚家族(FOXP1-4)转录因子成员, 其特征为拥有共同的DNA结合域。FOXP1蛋白在正常活化的B细胞中表达, 被认为是非GCB型DLBCL标志物之一。在利妥昔单抗应用之前, 有学者认为FOXP1是一个不利的预后因素^[26-27]。在接受利妥昔单抗治疗的患者中FOXP1(阳性标准: 100%细胞阳性)失去预后意义^[10]。

1.8 LMO2(LIM domain only 2)

LMO2基因位于染色体11p13, 其编码的转录因子在血管生成及胚胎发育方面都发挥着重要作用。LMO2蛋白表达于正常GCB细胞和GCB细胞起源的淋巴瘤。在利妥昔单抗应用之前, LMO2阳性表达被认为是一个有利的预后因素^[28]。单克隆抗体应用后, Yasodha等^[29]认为, LMO2(阳性细胞百分比>30%)仍然是有利预后指标, 且多因素分析也提示该结论有统计学意义。

1.9 c-myc

c-myc基因定位于染色体8q24.1, 其编码的转录因子在细胞核内结合于单链或双链DNA上, 对转录过程实施调控, c-myc的表达活性与细胞生长、分裂速度密切相关, 而且也是细胞凋亡的潜在诱导因子。伯基特淋巴瘤、DLBCL等淋巴瘤中常有c-myc基因重排检出, DLBCL重排阳性率为5%~10%。有研究发现c-myc重

排是一个不利的预后因素^[30]。在接受利妥昔单抗治疗的患者中, 该基因重排仍是不利预后因素且和更高的神经系统复发率相关^[31]。最近也有报道可用免疫组化法方法检测出C-MYC蛋白的表达, 且后者对应于c-myc基因的重排状况^[32]。

由于肿瘤分子发病机制的复杂性, 针对某一种分子标志物的单因素分析往往较难很好地对应于肿瘤的生物特性及患者的预后情况, 联合多种指标的分析(例如前述的Hans法则和Choi法则)在这方面有其独特的优势。

2 分析指标

2.1 Hans法则

利用CD10、BCL6和MUM1(图1)这三个指标的免疫组化结果来判断DLBCL的细胞起源, 其结果和基因表达谱结果一致率达到86%。在利妥昔单抗应用之前, GCB亚型预后明显好于非GCB亚型^[1]。在接受利妥昔单抗治疗的患者中, 相当部分研究认为这两型的预后已无差别^[10, 14, 33]; 但也有研究表明GCB亚型预后仍优于非GCB亚型, 且在多变量分析中也有预后意义^[23-34]。不但如此, 基因表达谱分析也证明在利妥昔单抗治疗时代, GCB亚型的预后仍然比非GCB亚型好^[35]。

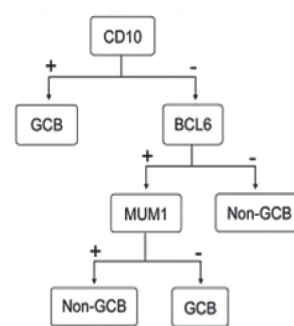


图1 Hans法则

Fig. 1 Hans algorithm

2.2 Choi法则

利用GCET1、CD10、BCL6、MUM1、FOXP1(图2)来区分GCB和非GCB型, 其结果和

基因表达谱结果一致率高达93%。对于接受R-CHOP治疗的病例,应用Choi法则分出的GCB型患者预后仍然优于非GCB型患者^[2]。

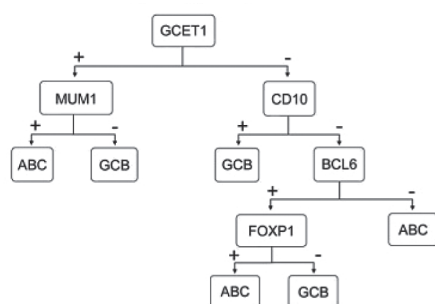


图2 Choi法则

Fig. 2 Choi algorithm

3 总结

利妥昔单抗应用于临床后,改善了DLBCL患者的预后,同时也改变了DLBCL部分原有预后指标的意义。目前多数研究认为,利妥昔单抗部分抵消了Bcl-2的不利影响,使Bcl-2阳性和Bcl-2阴性患者具有相似的预后,从而使得Bcl-2失去预后意义;R-CHOP方案改善了Bcl-6阴性患者的预后,Bcl-6可能不再是一个有利的预后因素;GCB型和非GCB型患者接受单克隆抗体治疗其原有的预后差别缩小或丧失统计学意义;CD10、MUM1、ki-67在单克隆抗体应用后不再有预后价值,但以上这些指标的预后意义仍需要进一步的研究来证实。而LMO2,FOXP1、P53、c-myc这些指标在利妥昔单抗应用后的预后研究相对较少,有待更多的研究来证实它们在单克隆抗体应用后的预后价值。

研究单个预后因子或多因素预后模型意义的最终目标是筛选出高危患者以制订个体化治疗方案,虽然DLBCL预后相关分子标志物方面研究取得了不少进展,但是大部分预后因子及预后模型的确切意义仍有待于更多的前瞻性临床试验予以证实。在这之前,国际预后指数仍然是预测淋巴瘤患者预后情况的最重要指标之一。

[参考文献]

- [1] HANS C P, WEISENBURGER D D, GREINER T C, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray [J]. *Blood*, 2004, 103: 275-282.
- [2] CHOI W W, WEISENBURGER D D, GREINER T C, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5494-5502.
- [3] NYMAN H, JERKEMAN M, KARJALAINEN-LINDSBERG M L, et al. Bcl-2 but not FOXP1, is an adverse risk factor in immunochemotherapy-treated non-germinal center diffuse large B-cell lymphomas [J]. *Eur J Haematol*, 2009, 82(5): 364-372.
- [4] BERGLUND M, THUNBERG U, AMINI R M, et al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis [J]. *Mod Pathol*, 2005, 18: 1113-1120.
- [5] IQBAL J, NEPPALLI V T, WRIGHT G, et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(6): 961-968.
- [6] WILSON K S, SEHN L H, BERRY B, et al. CHOP-R therapy overcomes the adverse prognostic influence of BCL-2 expression in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Leuk Lymphoma*, 2007, 48(6): 1102-1109.
- [7] MOUNIER N, BRIERE J, GISELBRUCHT C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2-associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) [J]. *Blood*, 2003, 101(11): 4279-4284.
- [8] MALONEY D G, SMITH B, ROSE A. Rituximab: mechanism of action and resistance [J]. *Semin Oncol*, 2002, 29 (Suppl 2): 2-9.
- [9] MAESHIMA A M, TANIUCHI H, FUKUHARA S, et al. Bcl-2, Bcl-6, and the International Prognostic Index are prognostic indicators in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-containing chemotherapy [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(10): 1898-1904.
- [10] PASQUALUCCI L, MIGLIAZZA A, BASSO K, et al. Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2003, 101(8): 2914-2923.
- [11] WINTER J N, WELLER E A, HORNING S J, et al. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study [J]. *Blood*, 2006, 107(11): 4207-4213.
- [12] UCCELLA S, PLACIDI C, MARCHET S, et al. Bcl-6 protein expression, and not the germinal centre immunophenotype, predicts favourable prognosis in a series of primary nodal diffuse large B-cell lymphomas: A single centre experience [J]. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49(7): 1321-1328.
- [13] SEKI R, OHSHIMA K, FUJISAKI T, et al. Prognostic impact of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell

- lymphoma in the rituximab era [J] . *Cancer Sci*, 2009, 100(10): 1842–1847.
- [14] WILSON W H, DUNLEAVY K, PITTALUGA S, et al. Phase II study of dose-adjusted EPOCH and rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of germinal center and post-germinal center biomarkers [J] . *J Clin Oncol*, 2008, 26(16): 2717–2724.
- [15] MURIS J J, MEIJER C J, VOS W, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma [J] . *J Pathol*, 2006, 208(5): 714–723.
- [16] SJO L D, POULSEN C B, HANSEN M, et al. Profiling of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry: identification of prognostic subgroups [J] . *Eur J Haematol*, 2007, 79: 501–507.
- [17] SWERDLOW S H, CAMPO E, HARRIS N L, et al. World Health Organization Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press, 2008.
- [18] MURIS J J, MEIJER C J, VOS W, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma [J] . *J Pathol*, 2006, 208(5): 714–723.
- [19] BROUYDE A, BOYCOV O, STRENOV Y, et al. Bairey O. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma [J] . *Am J Hematol*, 2009, 84: 338–343.
- [20] HASSELBLOM S, RIDELE B, SIGURDARDOTTIR M, et al. Low rather than high Ki-67 protein expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma [J] . *Leuk Lymphoma*, 2008, 49: 1501–1509.
- [21] YOON D H, CHOI D R, AHN H J, et al. Ki-67 expression as a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP [J] . *Eur J Haematol*, 2010, 85(2): 149–157.
- [22] LI Z M, HUANG J J, XIA Y, et al. High Ki-67 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients with non-germinal center subtype indicates limited survival benefit from R-CHOP therapy [J] . *Eur J Haematol*, 2012, 88(6): 510–517.
- [23] SAITO B, SHIOZAWA E, YAMOCHI-ONIZUKA T, et al. Efficacy of rituximab plus chemotherapy in follicular lymphoma depends on Ki-67 expression [J] . *Pathol Int*, 2004, 54(9): 667–674.
- [24] STEFANCIKOVA L, MOULIS M, FABIAN P, et al. Prognostic impact of p53 aberrations for R-CHOP-treated patients with diffuse large B-cell lymphoma [J] . *Int J Oncol*, 2011, 39(6): 1413–1420.
- [25] FARINHA P, SEHN L, SKINNIDER B, et al. Strong p53 Expression Is an Independent Predictor of Outcome in De Novo Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) Treated with Either CHOP or CHOP-R [J] . *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), 2006, 108(11): 812.
- [26] BANHAM A H, CONNORS J M, BROWN P J, et al. Expression of the FOXP1 transcription factor is strongly associated with inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma [J] . *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1065–1072.
- [27] BARRANS S L, FENTON J A, BANHAM A, et al. Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome [J] . *Blood*, 2004, 104(9): 2933–2935.
- [28] DURNICK D K, LAW M E, MAURER M J, et al. Expression of LMO2 is associated with t(14;18)/IGH-BCL2 fusion but not BCL6 translocations in diffuse large B-cell lymphoma [J] . *Am J Clin Pathol*, 2010, 134(2): 278–281.
- [29] NATKUNAM Y, FARINHA P, HSI E D, et al. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab [J] . *J Clin Oncol*, 2008, 26(3): 447–454.
- [30] YOON S O, JEON Y K, PAIK J H, et al. MYC translocation and an increased copy number predict poor prognosis in adult diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), especially in germinal centre-like B cell (GCB) type [J] . *Histopathology*, 2008, 53(2): 205–217.
- [31] SAVAGE K J, JOHNSON N A, BEN-NERIAH S, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy [J] . *Blood*, 2009, 114(17): 3533–3537.
- [32] TAPIA G, LOPEZ R, MUNOZ-MARMOL A M, et al. Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with MYC gene status in aggressive B cell lymphomas [J] . *Histopathology*, 2011, 59(4): 672–678.
- [33] NYMAN H, ADDE M, KARJALAINEN-LINDSBERG M L, et al. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy [J] . *Blood*, 2007, 109(11): 4930–4935.
- [34] FU K, WEISENBURGER D D, CHOI W W, et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma [J] . *J Clin Oncol*, 2008, 26(28): 4587–4594.
- [35] LENZ G, WRIGHT G, DAVE S, et al. Gene expression signatures predict overall survival in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab and chop-like chemotherapy [J] . *Blood*, 2007(abstr 348), 110: 209a.

(收稿日期: 2013-03-01 修回日期: 2013-05-20)