

Cereblon/CRBN 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的表达及其与预后的关系

段莹 梁妮 廖成成 谭晓虹 岑洪

广西医科大学附属肿瘤医院淋巴血液肿瘤科, 南宁 530021

通信作者: 岑洪, Email: cenhong@163.com

基金项目: 广西自然科学基金重点项目(2016GXNSFDA380029)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.03.013

Expression of Cereblon/CRBN in diffuse large B-cell lymphoma and its significance for prognosis

Duan Ying, Liang Ni, Liao Chengcheng, Tan Xiaohong, Cen Hong

Department of Hematological Oncology, Guangxi Medical University Cancer Hospital, Nanning 530021, China

Corresponding author: Cen Hong, Email: cenhong@163.com

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)是最常见的非霍奇金淋巴瘤,根据细胞起源(cell of origin, COO), DLBCL 可以分为活化 B 细胞样(ABC)和生发中心 B 细胞(GCB)两种亚型^[1]。通过 R-CHOP(利妥昔单抗+环磷酰胺+阿霉素+长春新碱+泼尼松)方案化疗,约 60% 患者可以治愈,但仍有约 40% 的患者表现为复发难治,预后不佳^[2]。

来那度胺作为一种口服免疫调节药物,在多发性骨髓瘤和骨髓增生异常综合征的治疗中取得了良好的效果,近年来有研究报道对于复发难治或初治 DLBCL 患者,来那度胺单药或者一线联合 R-CHOP 方案治疗均取得了一定的效果^[3-9],且在 ABC 亚型中呈现较高的应答率和较长的存活时间^[10]。这些研究显示来那度胺可能是重要的 DLBCL 治疗药物。目前使用此药物的最大挑战是找到与疗效相关的生物学标志物,筛选临床获益患者。

目前已知来那度胺的作用靶点是 Cereblon 蛋白^[11],编码此蛋白的 CRBN 基因位于 3p26.2 染色体^[12],多发性骨髓瘤中 Cereblon 的表达水平在来那度胺耐药时显著降低^[13]。CRBN 高表达是来那度胺治疗多发性骨髓瘤患者预后较好的独立影响因素^[14-15]。CRBN 基因敲除导致多发性骨髓瘤细胞株对来那度胺产生耐药性^[13],提示 CRBN/Cereblon 表达量的高低可能是来那度胺治疗 DLBCL 的有效生物学标志物,但目前关于 Cereblon 在 DLBCL 疗效中表达量的研究很少,尚不清楚 GCB 和 ABC 亚型中 Cereblon 的表达水平是否有差异, Cereblon 与 DLBCL 预后有无相关性,本研究将对上述问题进行探讨。

病例与方法

1. 病例:收集 2014 年 1 月至 2018 年 8 月在广西医科大学附属肿瘤医院经病理诊断为 DLBCL 的 93 例初治患者的临床病理资料。纳入标准:①年龄≥18 岁;②所有病例经病理组织形态学及免疫组化确诊,诊断标准参照 WHO(2008)淋

巴造血系统肿瘤分类标准;③临床病理资料完整;④排除合并 HIV 感染及第二肿瘤患者。依据 IPI 评分对患者进行分组,0~1 分为低危组,2 分为低、中危组,3 分为中、高危组,4~5 分为高危组。

2. 检测方法:本中心采用 Hans 分型法将 DLBCL 分为 GCB 型和非 GCB(non-GCB)型。采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SP)行免疫组织化学染色检测病理切片中 Cereblon 蛋白的表达,兔抗 Cereblon 多克隆抗体来源于美国 Abacom 公司。Cereblon 主要表达于胞质,染色阳性呈淡黄至棕黄色,细颗粒状或弥漫性分布。参照 Dimopoulos 等^[16]研究的评分标准,每张病理切片在中倍镜(×200)下随机选取 3 个视野,确定固定视野中每个细胞的染色强度(弱强度:+,中强度:++,高强度:+++),计算各染色强度细胞所占百分比(%1+:+细胞所占百分比,%2+:++细胞所占百分比,%3+:+++细胞所占百分比),H 评分=1×(%1+)+2×(%2+)+3×(%3+),将 3 个视野的 H 评分平均值作为综合评分,综合评分>200 定义为表达阳性。所有病理切片均由 2 位高年资的病理科医师独立阅片评分,取评分的平均值作为最后结果。

3. 疗效评价及相关标准:本中心的疗效评价采用基于 PET-CT 的疗效评价标准,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)、疾病进展(PD)。临床分期采用 Lugano 改良的 Ann Arbor 分期系统。

4. 统计学处理:采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,率的比较采用 χ^2 检验。生存曲线采用 Kaplan-Meier 检验,双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 患者一般临床特征:93 例 DLBCL 患者中男 46 例(49.5%),女 47 例(50.5%)。年龄≤60 岁者 61 例(65.6%),>60 岁者 32 例(34.4%)。低危组 30 例(32.2%),低中危组

29例(31.2%),中高危组22例(23.7%),高危组12例(12.9%)。GCB亚型38例(40.9%),non-GCB亚型52例(55.9%),未分类(UC)型3例(3.2%)。使用R-CHOP方案治疗者53例(57%),CHOP方案治疗者40例(43.0%)。达CR者51例(54.8%),达PR者30例(32.3%)。

2. Cereblon蛋白在DLBCL中的表达:本中心共收集93例患者的石蜡切片,行免疫组化染色检测Cereblon蛋白表达,染色结果显示Cereblon表达于胞质,呈淡黄色至棕黄色细颗粒状或弥漫性分布(图1)。GCB亚型39例,其中Cereblon表达阳性者23例,阴性者16例,阳性率59.0%。non-GCB亚型52例,Cereblon表达阳性者42例,阴性者9例,阳性率82.4%。non-GCB亚型较GCB亚型有更高的Cereblon表达阳性率($P=0.01$)。

3. Cereblon蛋白表达水平与DLBCL预后的关系:Cereblon阴性组和阳性组的CR率分别为60.0%(15例)和53.7%(36例)($P=0.42$)。Cereblon阴性组和阳性组DLBCL患者的OS和PFS差异亦无统计学意义(P 值分别为0.57和0.52)(图2、图3)。

讨 论

DLBCL是一种侵袭性和异质性极高的淋巴瘤,随着利妥昔单抗的问世,R-CHOP方案可治愈约60%的DLBCL患者,但仍有约40%的DLBCL患者难治复发。探索更有效的初始治疗方案对于改善DLBCL患者的整体预后至关重要。以来那度胺为代表的免疫调节剂在多发性骨髓瘤和滤泡性淋巴瘤的治疗中取得了良好的效果,已用于一线患者的治疗,来那度胺在DLBCL治疗中的价值是当前研究的热点。

研究发现,在体外动物模型中来那度胺对ABC细胞系的抑制作用高于非ABC细胞系,其机制是来那度胺通过与Cereblon结合诱导IRF4下调和NF- κ B信号通路受抑^[10,17]。在临床中,来那度胺单药或联合利妥昔单抗治疗复发难治性DLBCL患者有效,总有效率约30%,CR率约10%^[3-5,18-19],亚组分析显示其在non-GCB患者中疗效更佳^[10]。

美国梅奥诊所的MC078E研究纳入初治DLBCL成人患者,R2-CHOP(来那度胺+R-CHOP)方案治疗的疗效优于美国梅奥诊所淋巴瘤数据库中具有相同入组标准并接受R-CHOP方案治疗的患者。亚组分析显示,来那度胺对于GCB亚组疗效的改善不显著,在non-GCB亚组则疗效显著,

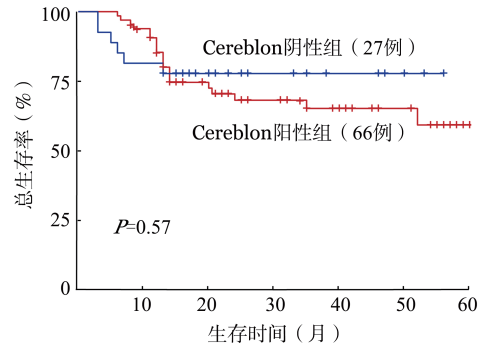


图2 Cereblon阳性组和阴性组弥漫大B细胞淋巴瘤患者的总生存曲线

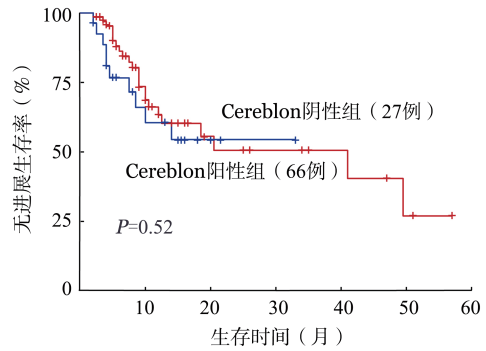


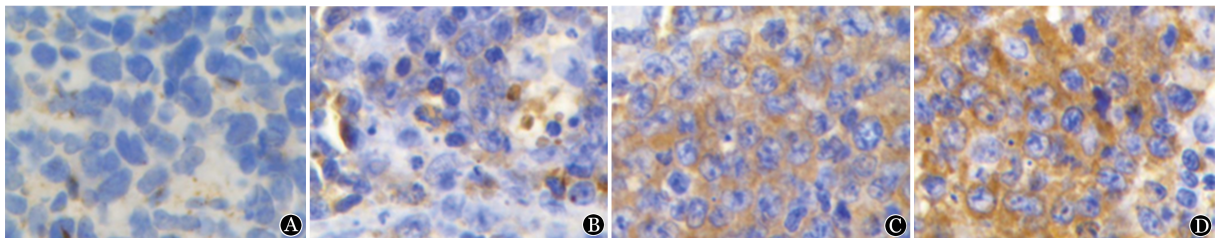
图3 Cereblon阳性组和阴性组弥漫大B细胞淋巴瘤患者的无进展生存曲线

提示加入来那度胺可改善non-GCB亚型的不良预后。另一项研究REAL07旨在评估R2-CHOP方案治疗老年初治DLBCL患者的疗效与安全性,入组患者的CR率为86%,其中GCB亚组的CR率81%,non-GCB亚组的CR率88%,两组的差异无统计学意义^[6,8,20]。

既往未见研究报道Cereblon蛋白在DLBCL中是否表达及其表达水平、GCB和non-GCB中Cereblon蛋白的表达水平有无差异,本研究对上述问题进行了探讨。

本中心通过免疫组化检测Cereblon蛋白表达,发现Cereblon阴性组和阳性组的CR、PFS、OS率差异均无统计学意义。

本研究我们发现non-GCB组中Cereblon蛋白表达阳性率高于GCB组(82.4%对59.0%, $P=0.01$),原因可能与基因



A: Cereblon蛋白表达阴性,染色强度-($\times 400$); B: Cereblon蛋白表达阴性,染色强度+($\times 400$); C: Cereblon蛋白表达阳性,染色强度++($\times 400$); D: Cereblon蛋白表达阳性,染色强度+++($\times 400$)

图1 免疫组化染色检测弥漫大B细胞淋巴瘤患者石蜡切片中Cereblon蛋白表达

转录水平的调控相关。需要注意的是,Cereblon蛋白在GCB亚型中仍然有很高的阳性率(59.0%),仅通过DLBCL的COO亚型筛选来那度胺获益人群在临床研究中已被证实不可行。多发性骨髓瘤的研究显示,来那度胺通过与Cereblon蛋白结合起效,耐药患者此蛋白表达减低。未来的临床研究可尝试对Cereblon表达阳性的患者予来那度胺治疗,进一步明确是否可通过Cereblon表达情况选择获益人群,指导用药。

参考文献

- [1] 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. DOI: 10.1038/35000501.
- [2] Chaganti S, Illidge T, Barrington S, et al. Guidelines for the management of diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Br J Haematol*, 2016, 174(1):43-56. DOI: 10.1111/bjh.14136.
- [3] Zinzani PL, Pellegrini C, Derenzini E, et al. Long-term efficacy of the combination of lenalidomide and rituximab in elderly relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma patients[J]. *Hematol Oncol*, 2013, 31(4):223-224. DOI: 10.1002/hon.2049.
- [4] Wiernik PH, Lossos IS, Tuscano JM, et al. Lenalidomide monotherapy in relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(30):4952-4957. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.3429.
- [5] Wang M, Fowler N, Wagner-Bartak N, et al. Oral lenalidomide with rituximab in relapsed or refractory diffuse large cell, follicular and transformed lymphoma: a phase II clinical trial[J]. *Leukemia*, 2013, 27(9):1902-1909. DOI: 10.1038/leu.2013.95.
- [6] Vitolo U, Chiappella A, Franceschetti S, et al. Lenalidomide plus R-CHOP21 in elderly patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: results of the REAL07 open-label, multicentre, phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7):730-737. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70191-3.
- [7] Reddy NM, Greer JP, Morgan DS, et al. A phase II randomized study of lenalidomide or lenalidomide and rituximab as maintenance therapy following standard chemotherapy for patients with high/high-intermediate risk diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Leukemia*, 2017, 31(1): 241- 244. DOI: 10.1038/leu.2016.255.
- [8] Nowakowski GS, LaPlant B, Macon WR, et al. Lenalidomide combined with R-CHOP overcomes negative prognostic impact of non-germinal center B-cell phenotype in newly diagnosed diffuse large B-Cell lymphoma: a phase II study[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(3):251-257. DOI: 10.1200/JCO.2014.55.5714.
- [9] Feldman T, Mato AR, Chow KF, et al. Addition of lenalidomide to rituximab, ifosfamide, carboplatin, etoposide (RICER) in first-relapse/primary refractory diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Br J Haematol*, 2014, 166(1): 77- 83. DOI: 10.1111/bjh.12846.
- [10] Hernandez-Ilizaliturri FJ, Deeb G, Zinzani PL, et al. Higher response to lenalidomide in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma in nongerminal center B-cell-like than in germinal center B-cell-like phenotype[J]. *Cancer*, 2011, 117(22):5058-5066. DOI: 10.1002/ncr.26135.
- [11] Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, et al. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide[J]. *Leukemia*, 2012, 26(11):2326-2335. DOI: 10.1038/leu.2012.119.
- [12] Higgins JJ, Pucilowska J, Lombardi RQ, et al. A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation[J]. *Neurology*, 2004, 63(10):1927-1931. DOI: 10.1212/01.wnl.0000146196.01316.a2.
- [13] Zhu YX, Braggio E, Shi CX, et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide[J]. *Blood*, 2011, 118(18):4771-4779. DOI: 10.1182/blood-2011-05-356063.
- [14] Broyl A, Kuiper R, van Duin M, et al. High cereblon expression is associated with better survival in patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with thalidomide maintenance[J]. *Blood*, 2013, 121(4):624-627. DOI: 10.1182/blood-2012-06-438101.
- [15] Heintel D, Rocci A, Ludwig H, et al. High expression of cereblon (CRBN) is associated with improved clinical response in patients with multiple myeloma treated with lenalidomide and dexamethasone[J]. *Br J Haematol*, 2013, 161(5):695-700. DOI: 10.1111/bjh.12338.
- [16] Dimopoulos K, Fibiger Munch-Petersen H, Winther Eskelund C, et al. Expression of CRBN, IKZF1, and IKZF3 does not predict lenalidomide sensitivity and mutations in the cereblon pathway are infrequent in multiple myeloma[J]. *Leuk Lymphoma*, 2019, 60(1):180-188. DOI: 10.1080/10428194.2018.1466290.
- [17] Zhang LH, Kosek J, Wang M, et al. Lenalidomide efficacy in activated B-cell-like subtype diffuse large B-cell lymphoma is dependent upon IRF4 and cereblon expression[J]. *Br J Haematol*, 2013, 160(4):487-502. DOI: 10.1111/bjh.12172.
- [18] Witzig TE, Vose JM, Zinzani PL, et al. An international phase II trial of single-agent lenalidomide for relapsed or refractory aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma[J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(7):1622-1627. DOI: 10.1093/annonc/mdq626.
- [19] Zinzani PL, Rigacci L, Cox MC, et al. Lenalidomide monotherapy in heavily pretreated patients with non-Hodgkin lymphoma: an Italian observational multicenter retrospective study in daily clinical practice[J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(6):1671-1676. DOI: 10.3109/10428194.2014.964702.
- [20] Nowakowski GS, LaPlant B, Habermann TM, et al. Lenalidomide can be safely combined with R-CHOP (R2CHOP) in the initial chemotherapy for aggressive B-cell lymphomas: phase I study[J]. *Leukemia*, 2011, 25(12):1877-1881. DOI: 10.1038/leu.2011.165.

(收稿日期:2019-11-11)

(本文编辑:律琦)