

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.03.017

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2021.03.017>

EZH2 对弥漫大 B 细胞淋巴瘤 RCHOP 方案治疗效果的预测价值

刘拥征, 王伟, 李岭, 蒋丽琴, 谢先顺

(南华大学附属第二医院肿瘤/血液内科, 湖南 衡阳 421000)

[摘要] 目的: 探讨Zeste基因增强子(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)对弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)RCHOP方案治疗的效果的预测价值。方法: 纳入2017年1月至2018年5月南华大学附属第二医院80例接受RCHOP方案治疗的DLBCL患者, 分析患者EZH2表达情况与治疗效果的关系, 绘制EZH2预测治疗效果的ROC曲线, 并对患者pCR与病理特征的关系进行讨论。结果: 80例患者中EZH2高表达者49例, EZH2低表达者31例, DLBCL患者RCHOP治疗的pCR率为51.25%, 其中EZH2高表达患者完全缓解(complete response, CR)、客观缓解率(objective response rate, ORR)均明显低于EZH2低表达患者($P<0.05$); EZH2预测治疗效果的曲线下面积为0.874($P<0.05$); pCR与性别、年龄、美国东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG)得分、淋巴瘤国际预后指数(International Prognostic Index, IPI)得分、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)因素无相关关系($P>0.05$); 与Hans分型、EZH2表达水平存在一定的相关性($P<0.05$)。结论: DLBCL患者EZH2低表达是RCHOP治疗后高pCR率的预测因子, 在临床上有助于为DLBCL患者临床治疗提供更好的指导。

[关键词] EZH2; 弥漫大B细胞淋巴瘤; RCHOP方案; 预测价值

Predictive value of EZH2 in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma with RCHOP regimen

LIU Yongzheng, WANG Wei, LI Ling, JIANG Liqin, XIE Xianshun

(Tumor Hematology Department, Second Hospital University of South China, Hengyang Hunan 421000, China)

Abstract **Objective:** To discuss the predictive value of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) with RCHOP regimen. **Methods:** A total of 80 patients with DLBCL treated with RCHOP regimen in our hospital from January 2017 to May 2018 were selected. The relationship between EZH2 expression and therapeutic effect was analyzed. The ROC curve of EZH2 predicting therapeutic effect was made. The relationship between pCR and pathological characteristics was discussed. **Results:** Among 80 patients, 49 had high expression of EZH2, 31 had low expression of EZH2, and 51.25% had pCR in DLBCL patients treated with RCHOP. The complete response (CR) and objective response rate (ORR) in patients with high expression of EZH2 were significantly lower than those in patients with low expression of EZH2 ($P<0.05$). The predictive effect

收稿日期 (Date of reception): 2020-02-12

通信作者 (Corresponding author): 王伟, Email: 490989948@qq.com

of EZH2 was 0.874 ($P<0.05$). There was no correlation between pCR and sex, age, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) score, International Prognostic Index (IPI) score, lactate dehydrogenase (LDH) factor ($P>0.05$), but there was correlation between pCR and Hans typing and EZH2 expression level ($P<0.05$). **Conclusion:** The low expression of EZH2 in DLBCL patients is a predictor of high pCR rate after RCHOP treatment. It is helpful to provide better guidance for clinical treatment of DLBCL patients.

Keywords EZH2; diffuse large B-cell lymphoma; RCHOP regimen; predictive value

弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是临床十分常见的非霍奇金淋巴瘤,占每年新发恶性血液系统、淋巴组织系统恶性肿瘤的30.0%~40.0%。DLBCL患者临床表现、对治疗的反应及预后异质性大,具有典型侵袭性,对健康造成严重威胁^[1]。近年来遗传领域的更新发展为DLBCL生物多样性、肿瘤发生信号通路的探索提供了新的研究方向。Zeste基因增强子(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)蛋白是一种转录抑制因子,可通过翻译后的组蛋白修饰参与组蛋白甲基化和基因沉默。此外, EZH2还参与细胞增殖、分化、侵袭^[2-3]。因此,本研究将探讨EZH2对DLBCL力妥昔单抗联合CHOP(RCHOP)方案治疗的效果的预测价值,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 对象

纳入2017年1月至2018年5月南华大学附属第二医院80例接受RCHOP方案治疗的DLBCL患者的淋巴结组织病理标本,纳入标准:1)标本均在患者未进行放疗、化疗及靶向治疗前,经穿刺或手术获取;2)参照2016年世界卫生组织(WHO)关于淋巴瘤的诊断标准^[4],均经病理组织学和免疫组织化学染色明确诊断;3)患者淋巴瘤主要分布于腹膜后、胃周、颈部、肠系膜周围等。排除标准:1)RCHOP方案治疗前曾接受其他抗肿瘤治疗患者;2)治疗前有器官移植病史、慢性疾病、其他肿瘤及合并其他严重心、肝、肾功能异常患者;3)临床资料不齐全患者;4)存在交流障碍、听力障碍患者。患者包括男37例,女43例;年龄 $51.4\pm 15.6(20\sim 82)$ 岁;Hans分型为生发中心样(GCB)者22例,非生发中心样(non-GCB)58例;患者采用美国东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG)评分法进行评分,得分 <2 的65例,得分 ≥ 2 的15例;淋巴瘤国际预后指数(International Prognostic Index, IPI)得分0~2的54例,3~5的26例;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,

LDH)正常31例,升高49例。本研究通过南华大学附属第二医院伦理委员会批准后展开。

1.2 方法

1.2.1 治疗方案

所有患者均采用RCHOP方案治疗,具体如下:利妥昔单抗购自Roche Pharma (Schweiz) Ltd.,国药准字J20170034, 375 mg/m²,静脉滴注,第0天;环磷酰胺购自江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字H32026196, 750 mg/m²,静脉注射,第1天;多柔比星购自辉瑞制药有限公司,国药准字H20100406, 50 mg/m²,静脉滴注,第1天;长春新碱购自瀚晖制药有限公司,国药准字H20043326, 1.4 mg/m²,静脉注射,第1天;醋酸泼尼松购自天津力生制药股份有限公司,国药准字H12020123, 100 mg/d,口服,第1~5天。21 d为1个疗程,患者连续治疗4个疗程。随访时间按病理确诊当天起算,随访时间截止2019年6月1日,生存期计算为病理诊断日至死亡或随访截止日期,治疗后的疗效根据Lugano Classification标准进行。

1.2.2 指标检测

免疫组织化学染色操作:用温箱孵育组织芯片,孵育条件60℃,孵育时间30 min;取二甲苯脱蜡,阶梯乙醇脱二甲苯,高压蒸汽加热抗原修复,0.3%甲醛/双氧水封闭过氧化物酶。常温羊血清孵育1 h,加入EZH2抗体(1:400,购自美国LI-COR公司),于4℃冰箱中过夜。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔IgG,并孵育1 h, 4℃, 30 min。浸于二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)溶液中10 min,采取阶梯浓度乙醇进行脱水,二甲苯透明,上盖玻片,取中性树脂封片。晾干,镜检。

由2名经病理科专科培训的临床医师对上述免疫组织化学染色的样本进行独立阅片。免疫组织化学结果判断方式^[1]如下:免疫反积分法(IRS)=染色强度分值(SI)×阳性细胞比率分值(PP)。SI无着色为阴性,计0分,淡黄色为弱阳性,计1分,棕黄为中强度阳性,计2分,棕褐色为强阳性,计3分;PP按照

阳性率比例给分, 0%~25.0%为1分, >25.0%~50.0%为2分, >50.0%~75.0%为3分, >75.0%~100.0%为4分; 每个病理IRS为2个重复样本得分的均值。以IRS的平均值为指标阈值, 组织样本的IRS积分大于指标阈值为阳性(高表达), 反之为阴性(低表达)。

1.3 疗效评价标准

根据WHO 2007年修订后含有PET-CT的淋巴瘤疗效评定标准^[5], 完全缓解(complete response, CR): 所有病灶消失。部分缓解(partial response, PR): 部分病灶消失, 且无新发病灶。稳定(stable disease, SD): 未能达到CR或者PR标准。进展(progressive disease, PD): 病灶未见明显消失, 新发病灶增长50.0%及以上。客观缓解率(objective response rate, ORR)=CR+PR; 病理学完全缓解(pCR)一般是指治疗后CT显示结内肿块病灶缩小至正常大小。

1.4 统计学处理

采用SPSS 22.0对所有数据进行统计学分析, 病理因素、pCR等计数资料结果采用率(%)表示, 行 χ^2 检验; 采用ROC曲线下面积(AUC)评估EZH2对DLBCL患者疗效的预测价值, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗效果与EZH2的关系

80例DLBCL患者中EZH2高表达者49例(61.25%), EZH2在生发中心B细胞(GCB)型和非生发中心B细胞(non-GCB)型DLBCL中高表达率分别为30.61%和69.39%, 差异无统计学意义($\chi^2=0.614$, $P=0.433$); EZH2低表达者31例(38.75%)。DLBCL患者RCHOP方案治疗的pCR率为51.25%(41/80), EZH2高表达患者CR、ORR均明显低于EZH2低表达患者($P<0.05$, 图1, 表1~2)。

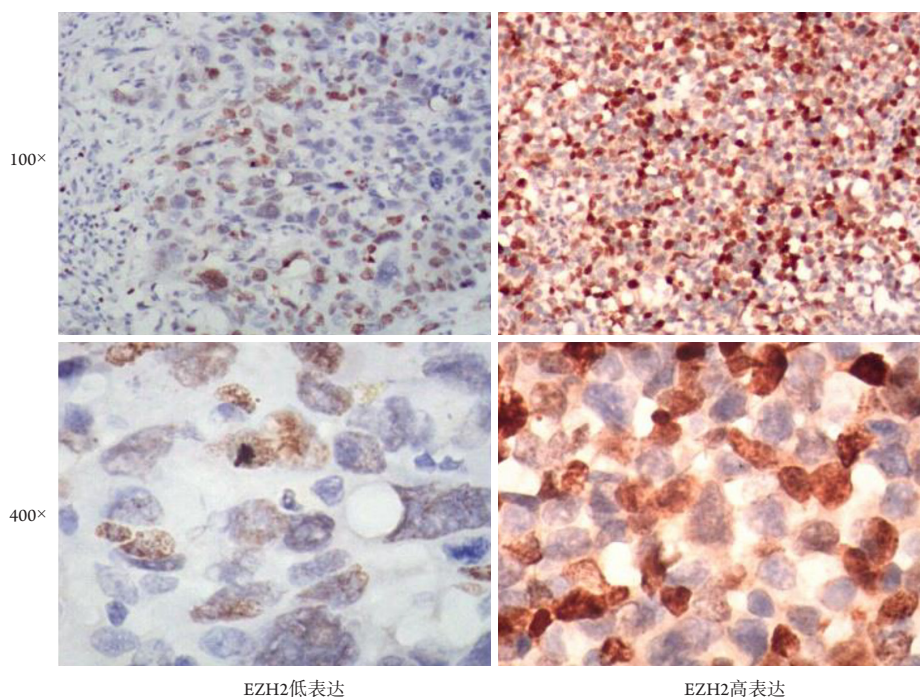


图1 EZH2染色结果(免疫组织化学, $\times 100$, $\times 400$)

Figure 1 EZH2 staining results (immunohistochemistry, $\times 100$, $\times 400$)

表1 EZH2在GCB和non-GCB中的表达

Table 1 Expression of EZH2 in GCB and non-GCB

免疫类型	例数	高表达 ($n=49$)/[例 (%)]	低表达 ($n=31$)/[例 (%)]	χ^2	P
GCB	22	15 (30.61)	7 (22.58)	0.614	0.433
Non-GCB	58	34 (69.39)	24 (77.42)		

表2 治疗效果与EZH2的关系

Table 2 Relationship between treatment effect and EZH2

组别	pCR/[例(%)]		ORR/[例(%)]	
	是	否	是	否
EZH2 高表达 (n=49)	17 (34.69)	32 (65.31)*	30 (61.22)	19 (38.78)*
EZH2 低表达 (n=31)	24 (77.42)	7 (22.58)	29 (93.55)	2 (6.45)

与EZH2低表达比较, *P<0.05。

Compared with EZH2 low expression, *P<0.05.

2.2 EZH2预测治疗效果的ROC曲线

根据已知DLBCL患者RCHOP治疗效果, 以EZH2为指标采用ROC曲线下面积(AUC)评估EZH2对DLBCL患者RCHOP方案治疗pCR疗效的预测价值。EZH2预测治疗效果的AUC为0.874(P<0.05, 图2)。

2.3 pCR与临床参数的关系

pCR与性别、年龄、ECOG得分、IPI得分、LDH无相关(P>0.05); 与Hans分型、EZH2表达水平存在一定相关性(P<0.05, 表3)。

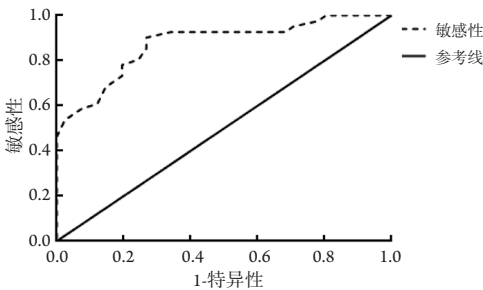


图2 EZH2预测治疗效果的ROC曲线

Figure 2 ROC curve of EZH2 in predicting treatment effect

表3 pCR与临床参数的关系

Table 3 Relationship between PCR and pathological characteristics

临床参数	组别	总计(n=80)	达到pCR (n=41)	χ^2	P
性别	男	37	15	1.033	0.309
	女	43	26		
年龄/岁	≤40	29	13	0.247	0.619
	>40	51	28		
Hans分型	GCB	22	20	5.417	0.020
	Non-GCB	58	21		
ECOG得分	<2	65	28	2.559	0.110
	≥2	15	13		
IPI得分	0~2	54	29	0.131	0.717
	3~5	26	12		
LDH	正常	31	14	0.246	0.620
	升高	49	27		
EZH2	高表达	49	17	4.280	0.039
	低表达	31	24		

3 讨论

DLBCL为高度异质性、侵袭性肿瘤, 近年来其发病率、病死率逐年升高, 对人们生命健康

造成严重威胁^[6]。化疗是一种能改善患者肿瘤进展, 帮助延长DLBCL患者生存时间的治疗方式, 但仍有部分患者因病情的进展而死亡。RCHOP方案对患者骨髓抑制较小, 是对侵袭性淋巴瘤效果

显著的化疗方案,在淋巴瘤、B细胞免疫异常性疾病中应用广泛^[5]。RCHOP方案疗效的预测指标对指导DLBCL患者个体化治疗、预后预测等具有重要意义。EZH2基因位于染色体的7p36.1,包含20个外显子和19个内含子,其编码产物为PcG蛋白的催化活性中心,为发挥组蛋白赖氨酸N-端甲基转移酶功能的主要区域^[7]。研究^[8]发现:EZH2在原发性肝细胞癌组织中表达水平升高,可作为原发性肝细胞癌的辅助诊断手段,提高甲胎蛋白诊断的准确度。研究^[9]表明:细胞周期调控机制紊乱导致细胞失控性生长是恶性肿瘤发生的共同特征,EZH2高表达可促进细胞G1-S期转化,使细胞过度增殖,从而导致恶性肿瘤的发生发展。本研究结果发现:80例DLBCL患者中EZH2高表达者49例,占61.25%,EZH2低表达者31例,占38.75%。提示EZH2在DLBCL患者中呈高表达。

DLBCL细胞中存在组蛋白甲基化修饰,EZH2能通过甲基化作用修饰转录因子、调控邻近基因的转录活性的蛋白,引起转录抑制,沉默抑癌基因^[10],加上转甲酶EZH2 Tyr641杂合错义突变在22.0%的GCB DLBCL、7.0%的non-GCB DLBCL中可见,提示其在GCB DLBCL中具有特异性,或能作为DLBCL的预后指标或者治疗靶点^[11]。马世荣等^[12]研究表示:EZH2蛋白在睾丸原发性DLBCL中过表达,有望成为DLBCL临床诊断与治疗的新靶点。本研究结果显示:DLBCL患者RCHOP方案治疗的pCR率为51.25%,EZH2高表达患者CR、ORR均明显低于EZH2低表达患者($P<0.05$)。EZH2表达情况与疗效的关系与Zhou等^[13]研究的结果一致,提示EZH2低表达DLBCL患者RCHOP治疗效果明显优于EZH2高表达患者,EZH2可能可以为DLBCL患者个体化治疗提供线索。

Liu等^[14]报道:肾癌患者EZH2表达水平与TNM分期具有同样的预后预测价值,对预后的区分、患者个体化治疗指导具有积极意义。因此,本研究根据DLBCL患者RCHOP治疗效果,以EZH2为指标采用AUC评估EZH2表达对DLBCL患者RCHOP方案治疗疗效的预测价值。结果显示EZH2预测AUC为0.874($P<0.05$);提示EZH2用于DLBCL患者RCHOP治疗效果的预测价值高。然而,存在许多对pCR率造成一定影响的因素,不同患者对化疗的敏感性、预后均存在较大差异。因此,本研究对pCR与临床参数的关系进行了研究,按照患者是否达到pCR分组,结果发现:pCR与性别、年龄、ECOG得分、IPI得分、LDH无相关关系($P>0.05$);与Hans分型、EZH2表达水平存在一

定相关性($P<0.05$)。说明Hans分型、EZH2表达水平均为影响患者pCR的相关因素,提示EZH2表达水平能作为DLBCL预后预测指标,EZH2可能可以作为提高DLBCL治疗效果的靶向指标。

综上所述,DLBCL患者EZH2低表达是RCHOP治疗后高pCR率的预测因子,在临床上有助于为DLBCL患者临床治疗提供更好的指导。关于EZH2基因如何促进DLBCL的发生发展的作用机制有待进一步动物及细胞实验研究。另一方面,按照2016版WHO淋巴肿瘤分类修订标准,C-MYC、BCL-2、BCL-6是重要参考指标,但本文未纳入C-MYC、BCL-2、BCL-6等指标进行联合研究,因而未能比较不同因子间的优势及联合检测对DLBCL治疗效果的诊断,这也是本文的不足之处,有待深入研究。

参考文献

1. 邓玉洁,陈刚,朱伟峰,等. H3K27me3和EZH2在弥漫大B细胞淋巴瘤疗效预测中的意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(1): 159-165.
DENG Yujie, CHEN Gang, ZHU Weifeng, et al. Significance of H3K27me3 and EZH2 in predicting the therapeutic efficacy of diffuse large B-cell lymphoma[J]. Journal of Experimental Hematology, 2018, 26(1): 159-165.
2. 党杰,张永刚. EZH2蛋白表达预测食管癌术后中远期生存率的价值研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2018, 15(1): 45-48.
DANG Jie, ZHANG Yonggang. Prognostic value of EZH2 protein expression in post-operative patients with esophageal carcinoma[J]. Journal of Medical Molecular Biology, 2018, 15(1): 45-48.
3. Zhang Q, Han Q, Zi J, et al. Mutations in EZH2 are associated with poor prognosis for patients with myeloid neoplasms[J]. Genes Dis, 2019, 6(3): 276-281.
4. 易树华,邹德慧,Young KH,等. 2016版WHO淋巴肿瘤分类修订解读[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(42): 3365-3369.
YI Shuhua, ZOU Dehui, Yong KH, et al. Interpretation of who's classification of lymphomas in 2016[J]. National Medical Journal of China, 2016, 96(42): 3365-3369.
5. 朱利峰. 参麦联合RCHOP方案治疗CD20阳性的弥漫大B细胞淋巴瘤的临床观察[J]. 临床医药实践, 2014, 23(12): 909-911.
ZHU Lifeng. Clinical observation on shenmai injection combined RCHOP chemotherapy on CD20 positive diffuse large B-cell lymphoma patients[J]. Proceeding of Clinical Medicine, 2014, 23(12): 909-911.
6. Rutherford SC, Fachel AA, Li S, et al. Extracellular vesicles in DLBCL

- provide abundant clues to aberrant transcriptional programming and genomic alterations[J]. Blood, 2018, 132(7): e13-e23.
7. Suri T, Dixit A. The phenotype of EZH2 haploinsufficiency-1.2-Mb deletion at 7q36.1 in a child with tall stature and intellectual disability[J]. Am J Med Genet A, 2017, 173(10): 2731-2735.
 8. 曾东, 冯艳玲, 郑叶, 等. β -catenin及EZH2阳性表达在原发性肝细胞肝癌中的诊断价值[J]. 癌症进展, 2019, 17(10): 1178-1180. ZENG Dong, FENG Yanling, ZHENG Ye, et al. Diagnostic value of β -catenin and EZH2 positive expression in primary hepatocellular carcinoma[J]. Oncology Progress, 2019, 17(10): 1178-1180.
 9. 郭兴巧, 魏璇, 杜秀英. 通过子宫颈组织中EZH2的表达预测子宫颈高级别病变的价值[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(9): 1965-1967. GUO Xingqiao, WEI Xuan, DU Xiuying. Predictive value of EZH2 expression in cervical tissue for high-grade cervical intraepithelial neoplasia[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2016, 31(9): 1965-1967.
 10. Rinke J, Müller JP, Blaess MF, et al. Molecular characterization of EZH2 mutant patients with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms[J]. Leukemia 2017, 31(9): 1936-1943.
 11. Datta MW, Kajdacsy-Balla AA. Tissue microarrays from biopsy specimens[J]. Methods Mol Biol, 2010, 664: 103-111.
 12. 马世荣, 王映梅, 刘杨, 等. 睾丸原发性弥漫大B细胞淋巴瘤中EZH2蛋白的表达及其意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(5): 485-489. MA Shirong, WANG Yingmei, LIU Yang, et al. Expression and significance of EZH2 protein in primary testicular diffuse large B cell lymphoma[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2017, 33(5): 485-489.
 13. Zhou Z, Gao J, Popovic R, et al. Strong expression of EZH2 and accumulation of trimethylated H3K27 in diffuse large B-cell lymphoma independent of cell of origin and EZH2 codon 641 mutation[J]. Leuk Lymphoma, 2015, 56(10): 2895-2901.
 14. Liu L, Xu Z, Zhong L, et al. Prognostic value of EZH2 expression and activity in renal cell carcinoma: a prospective study[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e81484.

本文引用: 刘拥征, 王伟, 李岭, 蒋丽琴, 谢先顺. EZH2对弥漫大B细胞淋巴瘤RCHOP方案治疗效果的预测价值[J]. 临床与病理杂志, 2021, 41(3): 596-601. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.03.017

Cite this article as: LIU Yongzheng, WANG Wei, LI Ling, JIANG Liqin, XIE Xianshun. Predictive value of EZH2 in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma with RCHOP regimen[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2021, 41(3): 596-601. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.03.017