

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.05.010

ercc1、rrm1 基因在侵袭性非霍奇金淋巴瘤中的表达及临床意义

许英君,刘艳艳,姚志华,褚俊锋,杨树军

Expression of ercc1 and rrm1 Genes in Invasive Non-hodgkin's Lymphoma and Clinical Significance

XU Yingjun, LIU Yanyan, YAO Zhihua, CHU Junfeng, YANG Shujun

Department of Oncology, Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

Corresponding Author: YANG Shujun, E-mail: NKyang@126.com

Abstract: Objective To investigate the relations between the expression of the ercc1 and rrm1 genes in invasive non-hodgkin's lymphoma and the clinical features and prognosis. **Methods** The Taqman RT-PCR method was used to detect the expressions of rrm1 and ercc1 genes existed in the invasive non-hodgkin's lymphoma from 65 cases patients' tumor tissues. Then the χ^2 test, Fisher's precise inspection, Kaplan-Meier survival analysis methods were performed to analyze the relationships between the clinical features of patients, PFS and OS. **Results** (1) The high expression of ercc1 gene was only appeared in the invasive non-hodgkin's lymphoma patients, the incidence was 18%, mainly expressed in T lymphoblastoid cells and peripheral T cells; the high expression of rrm1 gene was appeared both in the aggressive B and T-cell lymphoma, and much higher in the B cells (8/31 vs. 2/33, $P=0.044$). (2) The high expression of ercc1 gene and rrm1 gene in the invasive non-hodgkin's lymphoma patients were concerned with shorter progression-free survival ($\chi^2=4.323, P=0.038$) and overall survival time ($\chi^2=5.728, P=0.017$). **Conclusion** (1) This study prompts that the aggressive lymphoma is sensitive to platinum and gemcitabine. (2) The expressions of ercc1 and rrm1 are significant to the aggressive non-Hodgkin's lymphoma's prognosis and forecast.

Key words: Invasive non-hodgkin's lymphoma; Excision repair cross complementation1 (ercc1) genes; Ribonucleotide reductase m1 (rrm1) genes; Prognosis

摘要:目的 探讨 ercc1、rrm1 基因在侵袭性非霍奇金淋巴瘤中的表达及其与患者临床特征和预后的关系。**方法** 采用 Taqman RT-PCR 法检测 65 例侵袭性非霍奇金淋巴瘤患者肿瘤组织中 ercc1 和 rrm1 基因的表达情况,分析其与患者临床特征及无进展生存、总生存的关系。**结果** (1) ercc1 基因高表达仅出现于侵袭性 T 细胞淋巴瘤患者,发生率 18%,主要表达在 T 淋巴母细胞性和外周 T 细胞性; rrm1 基因在侵袭性 B 和 T 细胞淋巴瘤中均有高表达, B 细胞性表达率较 T 细胞性淋巴瘤高 (8/31 vs. 2/33, $P=0.044$)。 (2) ercc1、rrm1 基因高表达在侵袭性 B 和 T 细胞淋巴瘤中均与患者较短的无进展生存期 ($\chi^2=4.323, P=0.038$) 和总生存期 ($\chi^2=5.728, P=0.017$) 有关。**结论** (1) 侵袭性淋巴瘤对铂类与吉西他滨药物敏感。 (2) ercc1、rrm1 基因的表达对侵袭性非霍奇金淋巴瘤预后的预测均有意义。

关键词: 侵袭性非霍奇金淋巴瘤; ercc1 基因; rrm1 基因; 预后

中图分类号: R733.1 **文献标识码:** A

0 引言

非霍奇金淋巴瘤 (non-hodgkin's lymphoma,

NHL) 是原发于淋巴结或淋巴组织的恶性肿瘤,具有很强的异质性,根据 NCCN 指南,对于弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL), 靶向药物利妥昔单抗联合标准的 CHOP 方案已作为标准的一线治疗方案,其临床治愈率可达 60% 左右,但仍有 50%~60% 的患者出现复发耐药^[1]。T 细胞性淋巴瘤较 B 细胞性淋巴瘤的复发或原发耐药情况更为常见,死亡率较高。国内大综

收稿日期:2012-12-18;修回日期:2013-02-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071938)

作者单位:450000 郑州,郑州大学附属肿瘤医院内科

通信作者:杨树军, E-mail: NKyang@126.com

作者简介:许英君(1986-),女,硕士在读,主要从事淋巴瘤的临床与基础研究

文献显示,采用铂类及吉西他滨联合方案作为治疗侵袭性淋巴瘤的二线方案取得良好疗效。在肺癌相关研究中显示,铂类及吉西他滨分别与 *ercc1* (excision repair cross complementation1, *ercc1*) 基因及 *rrm1* (ribonucleotide reductase m1, *rrm1*) 基因有着密切的联系,但未见其在侵袭性淋巴瘤中的研究报道。本研究旨在从基因水平讨论 *ercc1* 及 *rrm1* 基因的表达对吉西他滨与铂类用于非霍奇金淋巴瘤患者临床疗效的影响,及其对非霍奇金淋巴瘤患者预后的意义。

1 资料与方法

1.1 病例选择

选择 2003-2012 年在河南省肿瘤医院首诊治疗的侵袭性非霍奇金淋巴瘤患者 65 例,均经我院病理会诊证实,弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者 32 例,其中一线方案采用标准 R-CHOP 方案化疗患者 30 例, R-CVP 患者 2 例; T 细胞性淋巴瘤患者 33 例,包括 T 淋巴瘤母细胞性 19 例、外周 T 细胞性 10 例及鼻腔 NK/T 型 4 例;一线方案采用标准 CHOP 患者 16 例,采用 Hyper CVAD 患者 9 例,采用 ATT 患者 2 例,仅行手术切除患者 6 例。对 65 例患者的末次随访时间均为 2012 年 10 月。选近期手术患者 10 例,择其肿瘤周围组织清扫的非肿瘤侵袭的炎性增生性淋巴结作为阴性对照。选取组织均为 4% 甲醛固定,石蜡包埋。本研究已获得伦理委员会批准,且入组患者均已签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 含有 miRNA 的总 RNA 提取 将上述选取好的组织蜡块 2~3 μm 连续切片,二甲苯熔蜡,使用 QIAGEN 公司提取 RNA 试剂盒 (货号为 73504),严格按照试剂盒内手册操作说明进行提取。提取后用 Thermo 公司 NANODROP2000 测得 RNA 浓度集中在 100~200 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 。

1.2.2 cDNA 转录 应用反转录 cDNA 试剂盒 (北京雅康博公司人 ERCC1/RRM1 基因表达量绝对定量检测试剂盒,货号:V. 110819),使用 Excel Biology 公司 Thermocycler 仪器,反应程序为:25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,39 $^{\circ}\text{C}$ 60 min。反转录结束后测得 cDNA 浓度集中在 400~700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

1.2.3 Taqman RealTime-PCR(RT-PCR)法检测基因表达 反转录完成后立即将 cDNA 置于冰上,进行加样配置反应液,用 Agilent Technologies 公司 Stratagene MX3000P 进行实时定量 PCR,内参为绝对定量试剂盒中内带, *ercc1* 引物序列为 F:5'-TCCCTATT GATGGCTTCTGC-3', R: 5'-GAGCTCACCTGAG-

GAACAGG-3';全长 151 bp, *rrm1* 的引物序列为:F: 5'-TCCATCCTACCTCCACAAG G-3', R: 5'-TTA-GATCGGCCAGAGGACTG-3',全长 196 bp。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15s,60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,35 个循环,选择 FAM 通道。剩余 cDNA 放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS 18.0 软件系统进行统计学处理,计数资料采用 χ^2 检验与 Fisher's 精确检验方法,预后的判断运用 Kaplan-Meier 生存分析方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *ercc1*、*rrm1* 基因正常值范围的确定

根据 10 例反应性增生淋巴结检测的耐药基因结果,用 χ^2 检验得出, *ercc1* 均数为 0.0146,标准差为 0.0023,正常值范围是:0.0146 \pm 0.0023 (95% CI), *rrm1* 均数为 0.0452,标准差为 0.0109,正常表达范围为 0.0452 \pm 0.0109 (95% CI)。

2.2 *ercc1*、*rrm1* 基因在侵袭性非霍奇金淋巴瘤中的表达情况

65 例侵袭性非霍奇金淋巴瘤中, *ercc1* 基因高表达 6 例 (9%),低表达 59 例 (91%); *rrm1* 高表达 10 例 (15%),低表达 55 例 (85%),具体在弥漫大 B 细胞淋巴瘤及 T 细胞性淋巴瘤的表达情况,见表 1。

表 1 *ercc1*、*rrm1* 在弥漫大 B 及 T 细胞性淋巴瘤中的表达
Table 1 The expression of *ercc1* and *rrm1* in DLBCL and T-cell lymphoma

Lymphoma	n	<i>ercc1</i> 's expression		P	<i>rrm1</i> 's expression		P
		High	Low		High	Low	
DLBCL	32	0	32		8	24	0.044
T-cell lymphoma	33	6	27	0.024	2	31	0.044

Note:DLBCL:diffuse large B-cell lymphoma

2.3 *ercc1*、*rrm1* 基因的表达在 B、T 细胞淋巴瘤中的差异

ercc1 基因在 B、T 细胞淋巴瘤中的高表达率分别为 0、18%, *rrm1* 基因在 B、T 淋巴瘤中的高表达率分别为 25%、6%。运用卡方检验及 Fisher's 精确检验分别统计 *ercc1*、*rrm1* 基因在 T、B 淋巴瘤中的表达差异,得出 *ercc1* 仅在 T 细胞淋巴瘤中出现高表达, $P = 0.024$; *rrm1* 在 B、T 细胞淋巴瘤中均有高表达, B 细胞中的表达率较 T 细胞高, $P = 0.044$ 。

2.4 *ercc1*、*rrm1* 基因的表达与临床特征及疗效的关系

因在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中 *ercc1* 高表达为 0,

其与临床特征及疗效的关系无法进一步探讨。以下仅对 T 细胞淋巴瘤中 ercc1 的表达以及 B、T 细胞淋巴瘤中 rrm1 的表达与临床特征及疗效运用 χ^2 检验与 Fisher's 精确检验方法进行统计学分析,得出 ercc1 与 rrm1 的表达与 T 细胞淋巴瘤的临床特征及疗效差异均无统计学意义, rrm1 的表达与弥漫大 B 细胞淋巴瘤的临床特征及疗效间差异均无统计学意义,见表 2、3。

表 2 ercc1 基因与 T 细胞淋巴瘤临床特征及疗效的相关性
Table 2 The correlation of ercc1 gene and the clinical features and effect of T-cell lymphoma with clinical pathologic factors

Clinical features	ercc1 high expression	ercc1 low expression	P	rrm1 high expression	rrm1 low expression	P
Gender			1.000			0.477
Male	4	20		1	23	
Female	2	7		1	8	
Age(years)			0.464			1.000
≤60	5	25		2	28	
>60	1	2		0	3	
Stage			0.375			0.489
I-II	2	16		2	16	
III-IV	4	11		0	15	
LDH			0.398			1.000
Normal	2	15		1	16	
Elevate	4	12		1	15	
ECOG			1.000			1.000
0-1	6	24		2	28	
≥2	0	3		0	3	
Node involvement outside			0.295			1.000
0-1	4	23		2	25	
≥2	2	4		0	6	
Curative effect			0.616			1.000
CR+PR	2	6		0	8	
SD+PD	4	21		2	23	

Note: CR; complete response; PR; partial response; SD; stable disease; PD; progress disease; the Fisher's exact probability method for P value

2.5 ercc1、rrm1 基因的表达与患者的预后

2.5.1 rrm1 的表达与弥漫大 B 细胞淋巴瘤的预后关系

在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中,疗效评价均按 Resist 1.0 标准判定,死亡 7 例,生存 25 例,无进展生存率为 66%,总生存率为 88%。中位无进展生存期(PFS)4 月,中位总生存期(OS)10 月, rrm1 基因高表达中死亡 4 例,中位 PFS 3 月,中位 OS 6 月;低表达中死亡 3 例,中位 PFS 4 月,中位 OS 10 月。运用 Kaplan-Meier 方法分析,得到 rrm1 基因低表达患者 OS($\chi^2 = 5.728, P = 0.017$)、PFS($\chi^2 = 4.323, P = 0.038$)长于高表达患者,提示 rrm1 基因高表达患者预后不良,见图 1。

表 3 rrm1 与 B 细胞淋巴瘤临床特征及疗效的相关性

Table 3 The correlation of rrm1 and the clinical features and effect of B cell lymphoma with clinical pathologic factors

Clinical features	n	rrm1 high expression	P
Gender			
Male	15	2	0.229
Female	17	6	
Age(years)			
≤60	17	4	1.000
>60	15	4	
Stage			
I-II	10	4	0.218
III-IV	22	4	
LDH			
Normal	10	3	0.681
Elevate	22	5	
ECOG			
0-1	27	6	1.578
≥2	5	2	
Node involvement outside			
0-2	27	6	0.556
≥2	5	2	
Curative effect			
CR+PR	8	24	-
SD+PD	0	0	

Note: the Fisher's exact probability method for P value; "-":insignificance

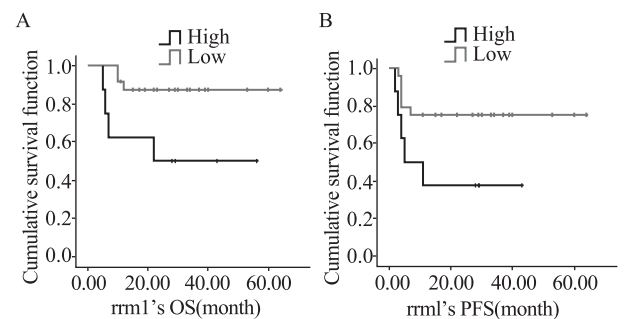


图 1 侵袭性非霍奇金淋巴瘤患者 rrm1 基因中位总生存期 (A) 和中位无进展生存期 (B)

Figure 1 Diagram diffuse large B cell lymphoma patients rrm1 gene overall survival(OS)(A)and progression-free survival(PFS)(B)

2.5.2 ercc1、rrm1 的表达与 T 细胞淋巴瘤预后的关系

在 T 细胞性淋巴瘤中,疗效评价均按 Resist 1.0 标准判定,生存 4 例,死亡 29 例,总生存率为 12%,无进展生存率为 9%。中位 OS 21 月,中位 PFS 16 月。ercc1 基因高表达患者中死亡 6 例,中位 OS 8 月,中位 PFS 4 月,低表达中死亡 23 例,中位 OS 23 月,中位 PFS 19 月。 rrm1 基因高表达患者 2 例,中位 OS 为 9 月,中位 PFS 6 月,低表达 31 例,中位 OS 23 月,中位 PFS 19 月。运用 Kaplan-Meier 方法分析,得到 ercc1 基因低表达患者 OS(χ^2

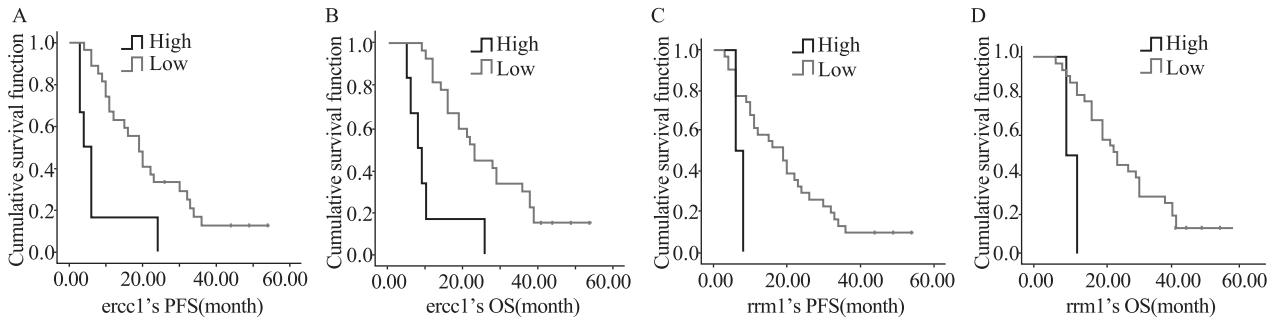


图 2 ercc1、rrm1 的表达与 T 细胞淋巴瘤预后

Figure 2 ercc1, rrm1 expression and T cell lymphoma prognosis

= 14.714, $P = 0.000$)、PFS($\chi^2 = 9.267, P = 0.002$)长于高表达患者, rrm1 基因低表达患者 OS($\chi^2 = 7.143, P = 0.008$)、PFS($\chi^2 = 4.354, P = 0.037$)长于高表达患者,提示 rrm1 基因的表达与患者的总生存和无病生存呈负相关,与疾病的预后密切相关,见图 2。

3 讨论

铂类药物主要是通过通过与 DNA 上的位点结合形成铂类-DNA 加合物,引起 DNA 复制障碍,从而诱导细胞凋亡。ercc1 基因可清除顺铂诱导的 DNA 络合物并将其迅速修复,因此,在癌症患者中,ercc1 基因的高表达是导致肿瘤细胞对铂类耐药的重要原因^[2-3]。rrm1 基因是核苷酸及核苷类似结构化疗药物的作用结合位点,控制结合底物的特异性及整个酶的活性。当修复基因将 DNA 链中受损的部分切除后,由 rrm1 提供的核苷酸来填补其造成的 DNA 链上的空缺,吉西他滨的作用靶点即为 rrm1,其进入细胞后,经过核苷激酶的作用转化成具有活性的二磷酸核苷(dFdCDP)及三磷酸核苷(dFdCTP),从而抑制 DNA 合成,导致肿瘤细胞凋亡。因此,rrm1 基因的表达与吉西他滨耐药密切相关,其高表达可导致吉西他滨耐药^[4],低表达常对吉西他滨药物敏感^[5]。本研究提示,铂类药物、吉西他滨用于侵袭性非霍奇金淋巴瘤患者是敏感有效的,尤其是吉西他滨联合奥沙利铂方案用于其二线治疗有着积极的临床意义,而在应用铂类药物或吉西他滨之前检测 ercc1 或 rrm1 基因的表达对肿瘤个体化治疗是必要的。ercc1、rrm1 基因与侵袭性非霍奇金淋巴瘤患者的 PFS 及 OS 均密切相关,为临床提供了预后预测指标的新方向,基因高表达预示患者预后多较差,需要更加积极的治疗。通过本实验基因在两

种淋巴瘤中表达的差别可发现其内在分子机制有所不同,临床表现对于疾病的发生发展也有其独特的机制,但具体机制有待进一步研究探讨。

ercc1 基因及 rrm1 基因与铂类及吉西他滨的药物敏感度有着密切联系,现广泛用于肺癌患者,作为铂类及吉西他滨药物疗效和预后的预测指标。本研究提示,在侵袭性非霍奇金淋巴瘤中,ercc1、rrm1 同样可以为肿瘤个体化治疗提供临床依据,并可作为预后的预测指标,对于制定个体化治疗方案,尤其是复发耐药患者,提高生存率,延长生存时间,有着积极意义,因此研究标本量较少,有待扩大样本进一步研究证实,使患者从中更多的获益。

参考文献:

- [1] Li L, Li ZM. A clinical study of rituximab combined with CHOP in treatment of B cell non-hodgkins lymphoma[J]. Zhong Liu Ji Chu Yu Lin Chuang, 2009, 22(1): 36-7. [李岭,李志铭. 利妥昔单抗联合 CHOP 治疗弥漫大 B 细胞性非霍奇金淋巴瘤的临床观察[J]. 肿瘤基础与临床, 2009, 22(1): 36-7.]
- [2] Siddik ZH. Cisplatin mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance[J]. Oncogene, 2003, 22(47): 7265-79.
- [3] Bellmunt J, Paz-Ares L, Cuello M, et al. Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy[J]. Ann Oncol, 2007, 18(3): 522-8.
- [4] Jordheim LP, Sève P, Trédan O, et al. The ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) as a predictive factor in patients with cancer[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(7): 693-702.
- [5] Zhou CC, Xu CR. Gemcitabine-based chemotherapy with in situ RRM1 and ERCC1 protein levels for response prediction in non-small cell lung cancer[J]. Xun Zheng Yi Xue, 2010, 10(1): 26-31. [周彩存,徐崇锐. 原位 RRM1 和 ERCC1 蛋白表达水平预测吉西他滨为基础化疗方案对非小细胞肺癌的疗效[J]. 循证医学, 2010, 10(1): 26-31.]

[编辑校对: 黄园玲]