

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.014

· 临床研究 ·

利妥昔单抗联合 CHOP 化疗上调钙网蛋白表达提高对 NHL 的疗效

岑海燕¹, 施文瑜², 徐梦麒² (1. 南通大学附属医院分院血液科, 江苏南通 226001; 2. 南通大学附属医院血液科, 江苏南通 226001)

[摘要] **目的:**探讨利妥昔单抗(rituximab)联合 CHOP 化疗治疗 B 细胞非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)的临床疗效及其对钙网蛋白(calreticulin, CRT)表达的影响。**方法:**选取南通大学附属医院 2008 年 7 月至 2011 年 2 月期间 48 例初治 B 细胞 NHL, 分为利妥昔单抗联合 CHOP 化疗组(R-CHOP 组, 25 例)和 CHOP 组(23 例)两组, 6 个疗程后比较两组患者的临床疗效、不良反应, 以及外周血中 CD20⁺ B 细胞表面 CRT 的表达。**结果:**R-CHOP 组 B 细胞 NHL 患者完全缓解率为 80.0%, 总有效率为 92.0%; CHOP 组完全缓解率为 56.5%, 总有效率为 69.6%; R-CHOP 组患者完全缓解率以及总有效率高于 CHOP 组($P < 0.05$)。两组间不良反应相似, R-CHOP 联合治疗没有增加 NHL 患者治疗后的不良反应。R-CHOP 组患者治疗后外周血中 CD20⁺ B 细胞表面 CRT 的表达明显高于 CHOP 组(255.00 ± 5.57) vs (216.00 ± 3.61), $P < 0.05$ 。**结论:**利妥昔单抗联合 CHOP 化疗治疗 B 细胞 NHL 较常规 CHOP 化疗效果好, 可能与联合治疗上调 CRT 表达有关。

[关键词] B 细胞非霍奇金淋巴瘤; 利妥昔单抗; CHOP 化疗; 钙网蛋白

[中图分类号] R733.4; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)05-0535-04

Up-regulation of calreticulin expression improves the efficacy of rituximab combined CHOP treatment for B-cell non-Hodgkin's lymphoma

CEN Hai-yan¹, SHI Wen-yu², XU Meng-qi² (1. Department of Hematology, Branch of Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China; 2. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the clinical efficacy of rituximab (R) combined CHOP (R-CHOP) treatment on B-cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and its influence on the expression of calreticulin (CRT). **Methods:** Totally 48 patients (From Jul. 2008 to Feb. 2011 in Affiliated Hospital of Nantong University) with previously untreated B-cell lymphoma were divided into R-CHOP group (25 cases) and CHOP group (23 cases). R-CHOP group was treated with R-CHOP chemotherapy and CHOP group was treated with CHOP chemotherapy. After 6 treatment courses, the clinical efficacy, adverse effect and the expression of CRT on CD20⁺ B cells were compared between these two groups. **Results:** The complete remission rate was 80.0% and the total effective rate was 92.0% in the R-CHOP group. The complete remission rate was 56.5% and the total effective rate was 69.6% in the CHOP group. There was a significant difference in the complete remission rate and the total effective rate between the two groups ($P < 0.05$). There was no significant difference in adverse events between the two groups ($P > 0.05$). The expression of CRT on CD20⁺ B cells in the R-CHOP group was higher than the CHOP group ($[255.00 \pm 5.57]$ vs $[216.00 \pm 3.61]$, $P < 0.05$). **Conclusion:** Rituximab can improve the clinical efficiency of CHOP in the treatment of B-cell NHL, which may be related with the expression of CRT induced by combined treatment.

[Key words] B-cell non-Hodgkin's lymphoma; rituximab; CHOP chemotherapy; calreticulin

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(5): 535-538]

非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)是一种起源于淋巴组织的恶性肿瘤,其发病率和死亡率占恶性肿瘤的第 5 位。NHL 绝大多数起

[作者简介] 岑海燕(1972-),女,江苏南通人,副主任医师,主要从事血液病临床治疗工作。Email: cenhaiyan90@yahoo.com.cn

[通信作者] 岑海燕(CEN Hai-yan, corresponding author), E-mail: cenhaiyan90@yahoo.com.cn

源于 B 淋巴细胞, 其中 90% 以上为 B 细胞性 NHL。目前 NHL 的治疗方案是以 CHOP 方案为主的常规根治性化疗, 但长期缓解率不到 50%^[1]。利妥昔单抗(rituximab)是人源化 CD20 单克隆抗体, 利妥昔单抗单药用于临床治疗惰性淋巴瘤获得较好的效果, 但其联合 CHOP 化疗能否取得更好的效果尚未十分明确。钙网蛋白(calreticulin, CRT)是存在于内质网中的钙结合蛋白, 在内质网应激情况下, 能诱导免疫原性细胞凋亡, 引发肿瘤免疫应答。新近研究^[2]发现, 某些化疗药物如蒽环类药物能诱导 CRT 快速地转移到肿瘤细胞膜上, 诱导特异性细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)产生, 分泌高水平 INF- γ , 杀伤肿瘤细胞。本研究观察利妥昔单抗联合 CHOP 治疗 B 细胞性 NHL 的疗效, 及其与 CRT 表达的可能关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2008 年 7 月至 2011 年 2 月南通大学附属医院共 48 例 B 细胞性 NHL 患者。根据患者不同治疗方案分为两组: 利妥昔单抗联合 CHOP 组(简称 R-CHOP 组)及单用 CHOP 组(简称 CHOP 组)。R-CHOP 组患者 25 例, 其中男 15 例、女 10 例, 平均年龄(51.3 \pm 7.1)岁。CHOP 组患者 23 例, 男 14 例、女 9 例, 平均年龄(52.1 \pm 6.7)岁。患者化疗前均有客观观察指标, 心电图及肝肾功能正常, 血常规正常, KPS > 70 分, 预计生存期 > 6 个月。患者在治疗前均签署知情同意书, 治疗方案报伦理委员会审批。

1.2 治疗方法

CHOP 组具体治疗用法: 第 1 天环磷酰胺 750 mg/m², 吡柔比星 40 ~ 50 mg/m², 第 1 天长春新碱 1.4 mg/m², 第 1 ~ 5 天泼尼松 60 mg/m²; 每 3 周为 1 个疗程, 共 6 个周期。R-CHOP 组 NHL 患者均接受 6 个周期的利妥昔单抗联合 CHOP 化疗方案, 具体治疗方法: 利妥昔单抗 375 mg/m² 于生理盐水中稀释至 1 mg/ml, 静脉滴注, 首次输注开始速度为 50 mg/h, 最大可达 400 mg/h, 每周化疗前 1 d 应用; 利妥昔单抗应用前 30 min 静脉注射地塞米松(dexamethasone, DXM) 5 mg、肌内注射非那根 25 mg, CHOP 化疗方案同 CHOP 组, 6 个周期后评价疗效。

1.3 疗效判断标准

按照 NHL 国际疗效判断标准^[3]进行评价。完全缓解(complete remission, CR): 无可触及的淋巴结, 或淋巴结活检和细针穿刺阴性, CT 扫描可见的淋巴结直径 \leq 1 cm, 骨髓形态学或组织学检查正常,

至少稳定 28 d; 部分缓解(partial remission, PR): 全部可测的病灶较原先缩小 50% 以上; 稳定(stable disease, SD): 病灶的增大不超过 25% 以上或缩小不超过 50%; 进展(progression disease, PD): 全部可测病灶较原先增大 25% 以上, 或出现新的病灶。药物不良反应按照 WHO 分度标准分为 0 ~ IV 度, III 或 IV 度为严重反应^[4]。

1.4 流式细胞术检测 CD20⁺ B 淋巴细胞表面 CRT 的表达

治疗后流式细胞术检测患者外周血 CD20⁺ B 细胞表面 CRT 的表达。取外周静脉血 1 ml, 加入荧光标记 CD20 单抗(上海蓝基生物科技有限公司产品)和 CRT 单抗(Miltenyibiotec 公司产品), 室温孵育 30 min, PBS 洗涤细胞, 流式细胞术检测, System II 软件进行分析。分析时先对 CD20⁺ B 细胞设门, 然后分析不同组 CD20⁺ 细胞表面 CRT 的表达。

1.5 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 SPSS15.0 统计软件, 率和构成比的比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 利妥昔单抗联合 CHOP 治疗 B 细胞性 NHL 的疗效

B 细胞性 NHL 患者经不同方案治疗 6 个疗程后进行疗效评价。R-CHOP 组(25 例)完全缓解率为 80.0%, 部分缓解率为 12.0%, 总有效率为 92.0%; 稳定 1 例, 进展 1 例; CHOP 组(23 例)完全缓解率为 56.5%, 部分缓解率为 13.1%, 总有效率为 69.6%; 稳定 5 例, 进展 2 例。两组患者完全缓解率(80.0% vs 56.5%, $P < 0.05$)以及总有效率的差异有统计学意义(92.0% vs 69.6%, $P < 0.05$), 但两组患者部分缓解率差异无统计学意义($P > 0.05$)。因此, 利妥昔单抗联合 CHOP 治疗可提高 B 细胞性 NHL 的完全缓解率和总有效率。

2.2 利妥昔单抗联合 CHOP 治疗 B 细胞性 NHL 的不良反应

R-CHOP 组 B 细胞性 NHL 患者治疗后轻至中度发热 3 例(占患者总数的 12%), 伴畏寒、寒战、高热 1 例(4%), 血压下降 1 例(4%), 胸闷 2 例(8%), 以上反应均在首次输注利妥昔单抗时产生, 停输或减慢输注速度即可缓解, 第二次使用时不良反应少见。I、II 度骨髓抑制 2 例(8%), III、IV 度骨髓抑制 2 例(8%), 粒细胞减少者人粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-

CSF) 治疗后改善。I ~ II 度恶心、呕吐 3 例 (12%), 无 III ~ IV 度恶心呕吐。1 例于骨髓抑制期间出现上呼吸道感染, 1 例有心悸、心动过速, 后自行缓解。CHOP 组 I、II 度骨髓抑制 2 例 (8.7%), III、IV 度骨髓抑制 2 例 (8.7%), 粒细胞减少者 G-CSF 治疗后改善。I ~ II 度恶心、呕吐 2 例 (8.7%), 无 III ~ IV 度恶心呕吐。总之, 因此联合治疗没有增加患者治疗后的不良反应。

2.3 利妥昔单抗联合 CHOP 组治疗上调 CD20⁺ B 细胞表面 CRT 的表达

流式细胞术检测结果(图 1)显示, R-CHOP 组

患者外周血中 CD20⁺ B 细胞表面 CRT 的表达为 (255.00 ± 5.57) , 其中完全缓解组为 (266.00 ± 6.32) , 部分缓解组为 (247.00 ± 2.51) , 稳定组为 205.78, 进展组为 192.61; CHOP 组患者治疗后, 外周血中 CD20⁺ B 细胞表面 CRT 的表达为 (216.00 ± 3.61) , 其中完全缓解组为 (228.00 ± 5.23) , 部分缓解组为 (209.00 ± 2.16) , 稳定组为 (193.00 ± 4.12) , 进展组为 (189.00 ± 3.47) 。因此, R-CHOP 组 NHL 患者治疗后 CD20⁺ B 细胞表面 CRT 的表达显著升高 ($P < 0.05$), 其中以完全缓解组最为明显 ($P < 0.05$)。

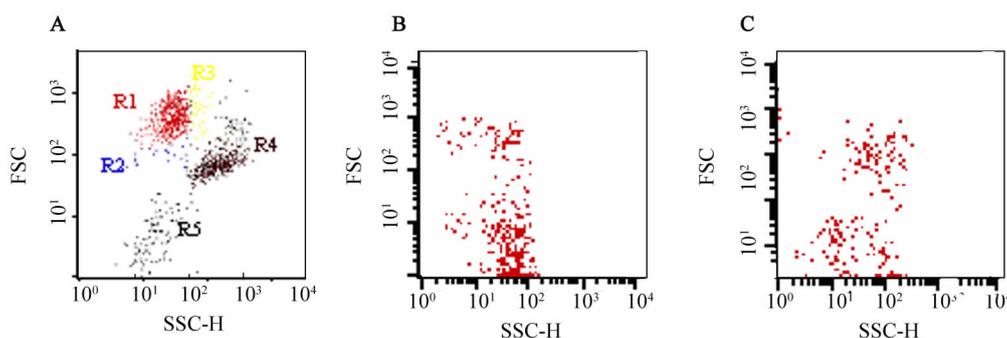


图 1 不同方案治疗后 NHL 患者外周血 CD20⁺ B 细胞表面 CRT 的表达

Fig. 1 CRT expression on peripheral CD20⁺ B cells of NHL patients after different therapy strategies

A: Control; B: R-CHOP; C: CHOP

3 讨论

CHOP 方案是治疗 B 细胞性 NHL 的常规化疗方案, 其治疗的近期疗效为 50% ~ 63%, 但容易复发和耐药^[5]。而复杂的第二代和第三代化疗方案其 3 年无病生存率和 3 年总生存率方面并不优于传统的 CHOP 方案。因此, 应用传统化疗药物进一步提高恶性淋巴瘤疗效的空间有限。肿瘤免疫治疗在肿瘤治疗中起了独特的作用, 如单克隆抗体特异性结合细胞上的靶抗原来特异性杀伤肿瘤细胞, 因其机制不同于化疗药, 可能克服肿瘤细胞对化疗的抗性。利妥昔单抗是针对 B 细胞 CD20 研制的一种人鼠嵌合的单克隆抗体, 进入人体后能与 B 细胞表面 CD20 结合, 抑制 B 细胞增生, 诱导 B 细胞凋亡^[6]。研究^[7]表明, 利妥昔单抗单药治疗 NHL 的总有效率为 43%, 单药治疗复发或难治的 CD20⁺ 侵袭性 NHL 的总有效率在 30% 左右。近年来单抗与常规化疗、超大剂量化疗的联合应用, 取得了明显的进展。有研究^[8-10]报道, 复发的 B 细胞 NHL 采用利妥昔单抗

联合化疗可使 64% 的病例达到完全缓解。所以本研究尝试应用利妥昔单抗联合 CHOP 化疗方案, 以期提高患者的治疗效果并探讨其可能的机制。

本研究中 48 例初治 B 细胞 NHL 患者根据治疗方案不同分成利妥昔单抗联合 CHOP 组和 CHOP 治疗组。联合组 NHL 患者完全缓解率为 80.0%, 总有效率为 92.0%, 明显优于 CHOP 组的 56.5% 和 69.6%。此外, 利妥昔单抗联合 CHOP 化疗与单用 CHOP 化疗相比, 未增加骨髓毒性, 也未增加肝肾功能损害。利妥昔单抗的不良反应和其他抗肿瘤药不同之处在于有时出现输注相关性反应, 常在第 1 个疗程的利妥昔单抗输注时出现, 主要为发热, 如在用药前进行恰当的处理其安全性较好, 多数患者可以耐受, 这与文献报道基本一致^[11], 但 HBsAg⁺ 的患者需慎用利妥昔单抗^[12-13]。

CRT 存在于哺乳动物体内的内质网腔中, 具有调节细胞凋亡、应激、炎症反应等多种生理和病理过程的功能。研究^[14]发现, 当细胞发生凋亡时, 膜表面 CRT 分子增多、聚集成簇, 成为凋亡细胞的“吞噬

我”信号(eat-me signal),被吞噬细胞表面的相应受体识别后,启动吞噬、清除凋亡细胞的过程。某些化疗药物可诱导凋亡肿瘤细胞表达肿瘤抗原和抗原提呈相关分子,如 CRT、热激蛋白和 NKG2D 配体,以及诱导凋亡细胞释放内源性危险信号。Tesniere 等^[15]发现,蒽环类药物和草酸铂使肿瘤细胞内质网中的 CRT 转运至细胞外膜,增强 DC 对肿瘤细胞的识别和对肿瘤相关抗原的加工和提呈,由此激发机体的特异性抗肿瘤免疫应答^[16-17]。Obeid 等^[18]也证实,CRT 在免疫原性凋亡时大量出现在细胞膜上。Basu 等^[19]发现,从肿瘤中纯化的 CRT 能激发机体的抗肿瘤免疫应答,其可能的机制是 CRT 分子结合肿瘤的抗原多肽,CRT 在外翻到细胞膜的过程中,同时将与之结合的肿瘤抗原肽带到细胞膜上并传递给抗原提呈细胞,从而激发机体的抗肿瘤免疫效应。最近研究^[20-21]还发现,CRT 可能抑制肿瘤的血管生成来增强肿瘤组织的抗原提呈和敏感性。

本研究中利妥昔单抗联合 CHOP 方案治疗后,患者 CD20⁺ B 细胞淋巴瘤表面 CRT 表达上调,其中以完全缓解患者最为明显。CRT 可能促进免疫细胞的识别和吞噬,由此激发机体产生抗肿瘤免疫效应。但 CRT 介导抗肿瘤免疫发生的确切机制还有待进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Marcus R. Current treatment options in aggressive lymphoma [J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44(Suppl 4): S15-S27.
- [2] Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death [J]. *Nat Med*, 2007, 13(1): 54-61.
- [3] Grillo lopeza J, Cheson BD, Homing S J, et al. Response criteria for NHL: Important of 'nomal' lymph node size and correlations with response rates [J]. *Ann Oncol*, 2000, 11(4): 399-408.
- [4] 顾康生. 肿瘤内科诊治手册 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2006: 64-67.
- [5] 鲁明骞, 黄慧强, 徐光川, 等. DHAP 方案治疗复发难治性 NHL 的临床疗效观察 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13(8): 624-625.
- [6] Maloney DG, Smith B, Rose A. Rituximab: Mechanism of action and resistance [J]. *Semin Onod*, 2002, 29(1/2): 2-9.
- [7] Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: A multicenter phase II study [J]. *Blood*, 1998, 92(6): 1927-1932.
- [8] Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(4): 235-242.
- [9] Wilson WH, Gutierrez M, O'Connor P, et al. The role of rituximab and chemotherapy in aggressive B-cell lymphoma: A preliminary report of dose-adjusted EPOCH-R [J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(1/2): 41-47.
- [10] Kewalramani T, Zelenetz AD, Nimer SD, et al. Rituximab and ICE as second-line therapy before autologous stem cell transplantation for relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2004, 103(10): 3684-3688.
- [11] Rossi D, Rasi S, Franceschetti S, et al. Analysis of the host pharmacogenetic background for prediction of outcome and toxicity in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP [J]. *Leukemia*, 2009, 23(6): 1118-1126.
- [12] Dervite I, Hober D, Morel P. Acute hepatitis B in a patient with antibodies to hepatitis B surface antigen who was receiving rituximab [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(1): 68-69.
- [13] Ng HJ, Lim LC. Fulminant hepatitis B virus reactivation with concomitant listeriosis after fludarabine and rituximab therapy: Case report [J]. *Ann Hematol*, 2001, 80(9): 549-552.
- [14] Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte [J]. *Cell*, 2005, 123(2): 321-334.
- [15] Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin [J]. *Oncogene*, 2010, 29(4): 482-491.
- [16] Kimt G, Kim CH, Park JS, et al. Immunological factors relating to the antitumor effect of temozolomide chemioimmunotherapy in a murine glioma model [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2010, 17(1): 143-153.
- [17] Sonnemann J, Gressmann S, Becker S, et al. The histone deacetylase inhibitor vorinostat induces calreticulin exposure in childhood brain tumour cells *in vitro* [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 66(3): 611-616.
- [18] Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death [J]. *Nat Med*, 2007, 13(1): 54-61.
- [19] Basu S, Binder RJ, Suto R, et al. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway [J]. *Int Immunol*, 2000, 12(11): 1539-1546.
- [20] Tamura Y, Hirohashi Y, Kutomi G, et al. Tumor-produced secreted form of binding of immunoglobulin protein elicits antigen-specific tumor immunity [J]. *J Immunol*, 2011, 186(7): 4325-4330.
- [21] López NC, Valck C, Ramírez G, et al. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* calreticulin [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4(7): e730.

[收稿日期] 2012 - 05 - 13

[修回日期] 2012 - 07 - 28

[本文编辑] 韩丹, 周玲琳