

• 论 著 •

弥漫大 B 细胞淋巴瘤中 SENEX 基因与 Rb/E2F1 通路的相关性及临床病理意义

孔 锦¹, 胡东玉¹, 孙 谦², 冯 蕾³

济宁医学院附属医院:1. 肿瘤科;2. 静脉用药调配中心;3. 药剂科, 山东济宁 272000

摘 要:目的 探讨弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)中 SENEX 基因表达与 Rb/E2F1 通路的相关性及临床病理意义。方法 选择 2016 年 1 月至 2019 年 12 月该院首次确诊的 84 例 DLBCL 患者作为 DLBCL 组,选择经病理诊断为淋巴结反应性增生的 40 例患者作为对照组,检测 SENEX、pRb、E2F1 的表达水平,分析 SENEX、pRb、E2F1 与 DLBCL 病理特征、预后的关系。结果 DLBCL 组患者肿瘤组织中 SENEX、pRb、E2F1 表达水平均高于对照组($P<0.05$),且三者之间均呈正相关($P<0.05$);肿瘤最大径 ≥ 5 cm、有 B 症状、国际预后指数(IPI)为 3~5、Ann Arbor 分级为 III~IV 级的患者肿瘤组织中 SENEX、pRb、E2F1 表达水平均高于肿瘤最大径 <5 cm、无 B 症状、IPI 为 0~2、Ann Arbor 分级为 I~II 级的患者($P<0.05$);DLBCL 组中 SENEX、pRb、E2F1 表达水平 $\geq$ 中位数的患者累积生存率均低于 SENEX、pRb、E2F1 表达水平 $<$ 中位数的患者($P<0.05$)。结论 DLBCL 中 SENEX 表达水平增加与疾病进展及预后不良有关,激活下游 Rb/E2F1 通路是 SENEX 发挥作用的可能分子机制。

关键词:弥漫大 B 细胞淋巴瘤; SENEX 基因; Rb/E2F1 通路; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.12.023

中图法分类号:R733.7

文章编号:1673-4130(2022)12-1512-04

文献标志码:A

Relationship between SENEX gene expression and Rb/E2F1 pathway in diffuse large B-cell lymphoma and its clinicopathological significance

KONG Jin¹, HU Dongyu¹, SUN Qian², FENG Lei³

1. Department of Oncology; 2. Intravenous Medicine Dispensing Center; 3. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining, Shandong 272000, China

Abstract: **Objective** To study the relationship between SENEX gene expression and Rb/E2F1 pathway in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and its clinicopathological significance. **Methods** DLBCL patients diagnosed for the first time in our hospital from January 2016 to December 2019 were selected as DLBCL group, and patients with reactive hyperplasia of lymph nodes diagnosed by pathology were selected as control group. The expression levels of SENEX, pRb and E2F1 were detected, and the correlation between SENEX, pRb, E2F1 and its relationship with the pathological characteristics and prognosis of DLBCL were analyzed. **Results** The expression levels of SENEX, pRb and E2F1 in DLBCL group were significantly higher than those in control group ($P<0.05$), and there was a positive correlation among them. The expression levels of SENEX, pRb and E2F1 of patients with tumor diameter higher than 5 cm, B symptoms, International Prognostic Index (IPI) 3-5 and Ann Arbor III-IV were higher than those of patients with tumor diameter lower than 5 cm, no B symptoms, IPI 0-2 and Ann Arbor I-II ($P<0.05$). In DLBCL group, the cumulative survival rate of patients with SENEX, pRb, E2F1 expression level higher than median were lower than those of patients with SENEX, pRb, E2F1 expression level lower than median ($P<0.05$). **Conclusion** The increased expression of SENEX gene in DLBCL is associated with pathological progression and poor prognosis, activation of downstream Rb/E2F1 pathway is the possible molecular mechanism of SENEX.

Key words: diffuse large B-cell lymphoma; SENEX gene; Rb/E2F1 pathway; prognosis

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)是最常见的 B 细胞性非霍奇金淋巴瘤(NHL),具有较强的异质性和侵袭性。近年来 DLBCL 的治疗取得了较大进步,由环磷酰胺、阿霉素、长春新碱、泼尼松组成的标准化疗及利妥昔单抗靶向治疗等方案使 DLBCL 的治疗效果明

显改进,尽管如此,仍有 30%~40% 的患者复发并最终死亡^[1-2]。因 DLBCL 的异质性,其发病机制尚未完全阐明,临床上也缺乏评估病情及预后的分子标志物。SENEX 基因是新发现的一类促癌基因,DLBCL 相关的细胞实验证实,沉默 SENEX 基因能够抑制

DLBCL 细胞中 Rb/E2F1 通路介导的增殖效应^[3]。基于此,本研究将以 DLBCL 患者为对象,分析 SENEX 基因表达与 Rb/E2F1 通路及预后的关系,旨在为阐明 SENEX 在 DLBCL 发病中的作用及机制积累临床研究数据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 1 月至 2019 年 12 月本院收治的 84 例 DLBCL 患者作为 DLBCL 组,纳入标准:(1)经病理学确诊 DLBCL^[4];(2)首次确诊;(3)临床病理资料完整;(4)临床样本按要求保存。排除标准:(1)接受过放化疗;(2)既往有其他恶性肿瘤、自身免疫性疾病病史。参照王静等^[5]的研究,选择在本院诊断为淋巴结反应性增生的 40 例患者作为对照组。DLBCL 组中男 44 例、女 40 例,年龄 16~85 岁、平均(59.44±11.32)岁;对照组中男 22 例、女 18 例,年龄 23~75 岁、平均(57.23±10.06)岁。两组一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究获得医院伦理委员会批准、取得患者知情同意。

1.2 SENEX、pRb、E2F1 表达水平的检测 取 DLBCL 组的肿瘤组织及对照组的淋巴结组织适量,加入组织裂解液并匀浆,得到的匀浆液在离心机中按照条件 4℃、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液进行 Western blot 检测:首先在聚丙烯酰胺凝胶内电泳分离不同相对分子质量的蛋白,而后电转移至硝酸纤维素膜,将膜放入 5%脱脂牛奶中室温孵育 1 h,洗膜后放入 SENEX 一抗(美国 Abcam 公司,1:1 000 稀释)、pRb 一抗(美国 CST 公司,1:1 000 稀释)、E2F1 一抗(美国 Abcam 公司,1:1 000 稀释)或 β -actin 一抗(美国 Abcam 公司,1:5 000 稀释)中、4℃孵育,洗膜后放入 1:2 000 稀释的二抗中室温孵育 1 h,在凝胶分析系统(上海天能公司)中显影得到蛋白条带,根据条带的灰度值、以 β -actin 为内参对 SENEX、pRb、E2F1 的蛋白表达水平进行定量分析。

1.3 DLBCL 患者临床病理特征的记录 查阅 DLBCL 患者的病历资料,记录以下临床病理特征:年龄、性别、肿瘤最大径、B 症状、国际预后指数(IPI)、GCB 亚型、Ann Arbor 分期。

1.4 DLBCL 预后的随访 采用门诊复诊、电话或网

络回访的方式对 DLBCL 的预后进行随访,随访终点为死亡,随访截止时间为 2021 年 3 月 31 日。

1.5 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行统计学处理,计量资料经正态性检验、符合正态分布则以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;相关性分析采用 Pearson 相关;预后的累积生存率采用 K-M 曲线表示,两组间比较采用 Log-rank 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DLBCL 组与对照组 SENEX、pRb、E2F1 表达水平的比较 与对照组比较,DLBCL 组患者肿瘤组织中 SENEX、pRb、E2F1 表达水平增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1、表 1。

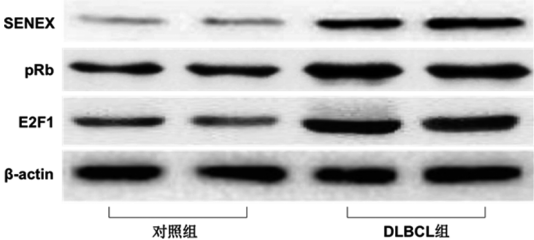


图 1 DLBCL 组与对照组 SENEX、pRb、E2F1 表达的 Western blot 检测结果

表 1 DLBCL 组与对照组 SENEX、pRb、E2F1 表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	SENEX	pRb	E2F1
DLBCL 组	84	0.72±0.19	1.01±0.17	1.18±0.26
对照组	40	0.30±0.12	0.75±0.15	0.47±0.09
<i>t</i>		12.802	8.259	16.768
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 DLBCL 组中不同临床病理特征患者 SENEX、pRb、E2F1 表达水平的比较 DLBCL 组中不同年龄、性别、GCB 亚型的患者,肿瘤组织中 SENEX、pRb、E2F1 表达水平的比较,差异无统计学意义($P>0.05$);肿瘤最大径 ≥ 5 cm、有 B 症状、IPI 为 3~5、Ann Arbor 分级为Ⅲ~Ⅳ级的患者肿瘤组织中 SENEX、pRb、E2F1 表达水平均高于肿瘤最大径 <5 cm、无 B 症状、IPI 为 0~2、Ann Arbor 分级为Ⅰ~Ⅱ级的患者($P<0.05$)。见表 2。

表 2 DLBCL 组中不同临床病理特征患者 SENEX、pRb、E2F1 表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)

临床病理特征	分组	<i>n</i>	SENEX	pRb	E2F1
年龄(岁)	<60	37	0.70±0.18	0.99±0.18	1.13±0.24
	≥ 60	47	0.75±0.25	1.05±0.25	1.26±0.32
性别	男	40	0.74±0.18	0.98±0.16	1.20±0.24
	女	44	0.69±0.25	1.06±0.24	1.14±0.32
肿瘤最大径(cm)	<5	38	0.62±0.22	0.87±0.25	1.02±0.34
	≥ 5	46	0.79±0.17 [*]	1.12±0.19 [*]	1.31±0.23 [*]
B 症状	无	47	0.60±0.18	0.91±0.21	1.07±0.27
	有	37	0.80±0.21 [#]	1.10±0.22 [#]	1.28±0.35 [#]

续表 2 DLBCL 组中不同临床病理特征患者 SENEX、pRb、E2F1 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

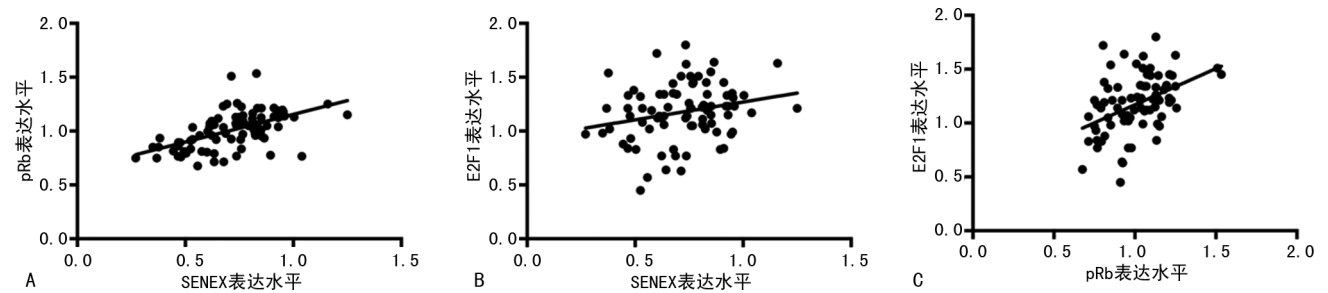
临床病理特征	分组	n	SENEX	pRb	E2F1
IPI	0~2	48	0.58±0.17	0.90±0.16	1.08±0.24
	3~5	36	0.81±0.22 [▲]	1.14±0.24 [▲]	1.30±0.37 [▲]
GCB 亚型	否	39	0.67±0.31	0.97±0.30	1.14±0.32
	是	45	0.74±0.20	1.04±0.22	1.21±0.28
Ann Arbor 分级	I~II 级	51	0.68±0.19	0.92±0.20	1.09±0.24
	III~IV 级	33	0.82±0.24 [△]	1.19±0.25 [△]	1.33±0.36 [△]

注:与肿瘤最大径<5 cm 比较,* $P<0.05$;与无 B 症状比较,[#] $P<0.05$;与 IPI 为 0~2 比较,[▲] $P<0.05$;与 Ann Arbor 分级为 I~II 级比较,[△] $P<0.05$ 。

2.3 DLBCL 组 SENEX、pRb、E2F1 表达水平的相关性 DLBCL 组患者肿瘤组织中 SENEX 的表达水平与 pRb、E2F1 的表达水平呈正相关($r=0.553$ 、 0.236 , $P<0.05$);pRb 的表达水平与 E2F1 的表达水平也呈正相关($r=0.442$, $P<0.05$)。见图 2。

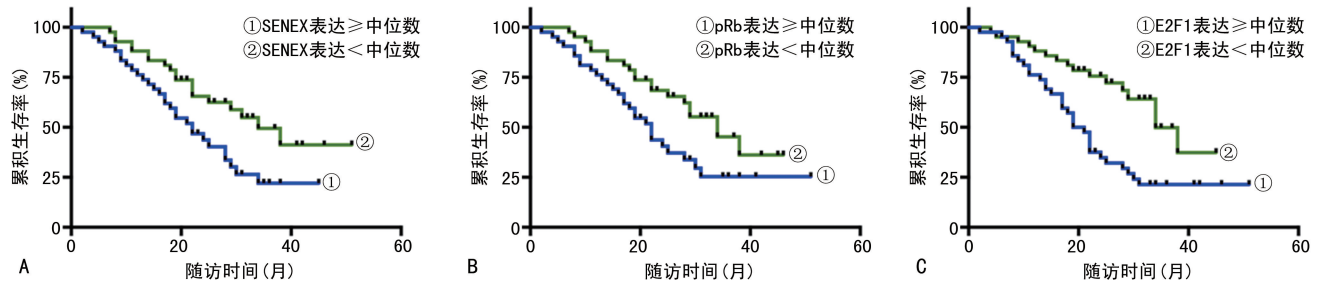
2.4 DLBCL 组中不同 SENEX、pRb、E2F1 表达水

平患者预后的比较 DLBCL 组中不同 SENEX、pRb、E2F1 表达水平患者累积生存率的 K-M 曲线见图 3,经 Log-rank 检验,SENEX、pRb、E2F1 表达水平 $\geq$ 中位数患者的累积生存率均低于 SENEX、pRb、E2F1 表达水平<中位数的患者($P<0.05$)。



注:A 为 SENEX 表达水平与 pRb 表达水平的相关性分析;B 为 SENEX 表达水平与 E2F1 表达水平的相关性分析;C 为 pRb 表达水平与 E2F1 表达水平的相关性分析。

图 2 DLBCL 组 SENEX、pRb、E2F1 表达水平的相关性



注:A 为 SENEX 不同表达水平患者的累积生存率;B 为 pRb 不同表达水平患者的累积生存率;C 为 E2F1 不同表达水平患者的累积生存率。

图 3 DLBCL 组中不同 SENEX、pRb、E2F1 表达水平患者预后的比较

3 讨 论

DLBCL 被认为是一种侵袭性淋巴瘤,具有较强的异质性,形态学及免疫分型复杂且发病的分子机制未完全阐明。目前,治疗 DLBCL 的方案包括环磷酰胺、阿霉素、长春新碱、泼尼松化疗及利妥昔单抗靶向治疗,但部分患者容易出现耐药、预后不佳,相关的流行病学资料显示 DLBCL 的 5 年生存率为 30%~40%^[6-7]。因此,研究 DLBCL 的发病机制、发现 DLBCL 发病过程中起关键作用的基因,不仅有助于发现疾病早期诊断、病情评估的分子标志物,也有助于发现新的治疗靶点。

近年来,越来越多的基础研究发现了不同基因表

达异常与 DLBCL 的发病有关^[5,8],完颜智翔等^[3]通过细胞实验证实 SENEX 基因参与 DLBCL 细胞增殖的调控,敲低 SENEX 基因显著抑制 DLBCL 细胞增殖。SENEX 是参与细胞生长、衰老、增殖、凋亡调控的新型基因,LOVELACE 等^[9]在内皮细胞中证实,SENEX 定位于微管、通过维持微管稳定性的方式促进内皮细胞生长。另有两项细胞实验均证实 SENEX 参与 DLBCL 细胞增殖的调控^[10-11]。本研究在上述细胞实验中 SENEX 基因促增殖的基础上以 DLBCL 患者为对象,分析了 SENEX 基因在 DLBCL 发病中的作用,结果显示,与对照组比较,DLBCL 组织中 SENEX 的表达水平明显升高并且随着肿瘤最大径、

IPI、Ann Arbor 分级增加及 B 症状的出现, SENEX 的表达水平呈升高的趋势, 表明 SENEX 表达增加与 DLBCL 的发病及病理进展有关, 其可能机制是高表达的 SENEX 促进了肿瘤细胞的增殖。

根据完颜智翔等^[3]的细胞实验结果, SENEX 促进 DLBCL 细胞增殖的分子机制是激活下游 Rb/E2F1 通路。Rb/E2F1 是经典的细胞周期调控通路, Rb 通过磷酸化和去磷酸化的方式调控下游 E2F1 的激活, 去磷酸化的 Rb 与 E2F1 结合并阻碍 E2F1 发挥生物学作用, Rb 磷酸化为 pRb 后与 E2F1 解离, E2F1 通过激活细胞周期蛋白的方式促进细胞生长^[12-13]。为了进一步验证 SENEX 在 DCBCL 发病中的作用, 本研究对 SENEX 下游 Rb/E2F1 通路进行了分析, 结果发现 DCBCL 中 Rb/E2F1 通路的表达与 SENEX 表达的变化一致, 即 DLBCL 组织中 pRb、E2F1 的表达增加且与病理进展有关; 相关性分析证实, SENEX 的表达与 pRb、E2F1 的表达呈正相关($P < 0.05$)。以上结果表明 SENEX 下游 Rb/E2F1 通路的激活与 DCBCL 的发病及病理进展有关, 高表达的 SENEX 可能在 DLBCL 的发病中通过激活 Rb/E2F1 通路发挥促进细胞增殖的作用。

DLBCL 患者的预后不佳, 目前的临床研究认为 IPI、Ann Arbor 分级等病理特征是 DLBCL 患者预后的独立影响因素^[14-16]。本研究已经在 DLBCL 中证实 SENEX 基因及其下游 Rb/E2F1 通路与疾病进展有关, 在此基础上进一步分析其与 DLBCL 患者预后的关系, 随访 DLBCL 患者的生存情况并通过 K-M 曲线比较累积生存率的差异可知, DLBCL 中 SENEX、pRb、E2F1 表达增加与累积生存率降低有关, 由此表明 SENEX 及其下游 Rb/E2F1 通路不仅与 DLBCL 的发病及病理进展有关, 还与疾病的预后有关。

综上所述, DLBCL 中 SENEX 基因表达增加与疾病进展及预后不良有关, 激活下游 Rb/E2F1 通路是 SENEX 发挥作用的可能分子机制。SENEX 有望成为发现 DLBCL 评估标志物、治疗靶点的新基因, 而且有必要以 SENEX 基因为切入点研究 DLBCL 发病的分子机制。

参考文献

- [1] YIN X, XU A, FAN F, et al. Incidence and Mortality Trends and Risk Prediction Nomogram for Extranodal Diffuse Large B-Cell Lymphoma: An Analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database[J]. Front Oncol, 2019, 12(9): 1198.
- [2] LUO H, YI P, WANG W, et al. Clinicopathological Features, Treatment, and Prognosis in Primary Diffuse Large B Cell Lymphoma of the Breast: A Retrospective Study of 46 Patients[J]. Med Sci Monit, 2019, 17(25): 8671-8682.
- [3] 完颜智翔, 王极宇, 潘莹, 等. SENEX 基因通过活化 Rb/E2F 通路促进弥漫大 B 细胞淋巴瘤增殖与复发[J]. 安徽

医科大学学报, 2020, 55(3): 432-437.

- [4] 中华医学会血液学分会, 中国抗癌协会淋巴瘤专业委员会. 中国弥漫大 B 细胞淋巴瘤诊断与治疗指南(2013 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(9): 816-819.
- [5] 王静, 李馨筱, 吴琳娜, 等. 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤组织 NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 表达及意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(1): 33-38.
- [6] BILGIN Y M, CASTEL R. MYC-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Leukemic Phase at Presentation: A Diagnostic and Therapeutic Challenge[J]. J Hematol, 2021, 10(2): 80-82.
- [7] DÜHRSEN U, TOMETTEN M, KROSCHINSKY F, et al. Phase I / II trial of lenalidomide, methotrexate, leucovorin, cytarabine, and rituximab (LeMLAR) in relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma[J]. Blood Cancer J, 2021, 11(5): 95.
- [8] 杨萍, 吴楚, 唐运莲. 长链非编码 RNA 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2019, 47(1): 81-84.
- [9] LOVELACE M D, POWTER E E, COLEMAN P R, et al. The RhoGAP protein ARHGAP18/SENEX localizes to microtubules and regulates their stability in endothelial cells[J]. Mol Biol Cell, 2017, 28(8): 1066-1078.
- [10] WANG J, TAO Q, PAN Y, et al. Stress-induced premature senescence activated by the SENEX gene mediates apoptosis resistance of diffuse large B-cell lymphoma via promoting immunosuppressive cells and cytokines[J]. Immun Inflamm Dis, 2020, 8(4): 672-683.
- [11] WANG J, WANG Z, WANG H, et al. Stress-Induced Premature Senescence Promotes Proliferation by Activating the SENEX and p16 (INK4a)/Retinoblastoma (Rb) Pathway in Diffuse Large B-Cell Lymphoma[J]. Turk J Haematol, 2019, 36(4): 247-254.
- [12] XU H, XU K, HE H H, et al. Integrative Analysis Reveals the Transcriptional Collaboration between EZH2 and E2F1 in the Regulation of Cancer-Related Gene Expression[J]. Mol Cancer Res, 2016, 14(2): 163-172.
- [13] PEI Y, WONG J H, JHA H C, et al. Epstein-Barr Virus Facilitates Expression of KLF14 by Regulating the Cooperative Binding of the E2F-Rb-HDAC Complex in Latent Infection[J]. J Virol, 2020, 94(22): e01209-20.
- [14] WANG M, MA S, SHI W, et al. Surgery shows survival benefit in patients with primary intestinal diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study[J]. Cancer Med, 2021, 10(10): 3474-3485.
- [15] PILERI S A, TRIPODO C, MELLE F, et al. Predictive and Prognostic Molecular Factors in Diffuse Large B-Cell Lymphomas[J]. Cells, 2021, 10(3): 675.
- [16] HE H, TAN F, XUE Q, et al. Clinicopathological characteristics and prognostic factors of primary pulmonary lymphoma[J]. J Thorac Dis, 2021, 13(2): 1106-1117.

(收稿日期: 2021-11-13 修回日期: 2022-01-31)