

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.19.007

文章编号: 1005-8982(2018)19-0034-07

## MicroRNA-125a-5p 表达对弥漫大 B 细胞淋巴瘤耐药及临床预后的影响\*

韩莹<sup>1</sup>, 杨文秀<sup>2</sup>, 濮珍红<sup>1</sup>, 万琰<sup>1</sup>

(1. 贵州医科大学 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属医院 病理科, 贵州 贵阳 550004)

**摘要:** **目的** 检测 microRNA-125a-5p (miR-125a-5p) 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 组织中的表达情况, 探讨其对肿瘤耐药及预后的影响。 **方法** 收集 DLBCL 石蜡标本及其临床病理资料并随访; 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测组织中 miR-125a-5p 的 mRNA 相对表达量; 用免疫组织化学染色检测肿瘤组织中 P 糖蛋白 (P-gp)、细胞增殖核抗原 (Ki-67) 蛋白的表达; 分析 miR-125a-5p 与耐药蛋白 P-gp 表达的关系, 以及该表达对 DLBCL 肿瘤细胞增殖和临床病理特征及预后的影响。 **结果** MiR-125a-5p 在 DLBCL 组中的表达高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 其表达量与患者乳酸脱氢酶 (LDH)、免疫表型相关 ( $P < 0.05$ ), 与年龄、性别、原发部位、临床分期、国际预后指数 (IPI) 均无相关 ( $P > 0.05$ ); miR-125a-5p 高表达组 P-gp 蛋白阳性率高于低表达组; Kaplan-Meier 及 Log-rank 生存分析显示低表达 miR-125a-5p 患者的总生存期 (OS) 及无复发生存期 (RFS) 均高于高表达组, COX 风险比例模型分析显示 Ann Arbor 分期 III、IV 期及 miR-125a-5p 高表达均可作为 DLBCL 患者预后不良的因素。 **结论** miR-125a-5p 与 DLBCL 耐药蛋白 P-gp 表达相关, miR-125a-5p 高表达及 Ann Arbor 分期 III、IV 提示 DLBCL 患者预后较差, 可作为潜在的 DLBCL 预后预测分子。

**关键词:** 大 B 细胞淋巴瘤; miR-125a-5p; P-gp; 实时荧光定量聚合酶链反应; 预后

**中图分类号:** R361; R733.4

**文献标识码:** A

## Effect of miR-125a-5p expression on drug resistance and clinical prognosis of diffuse large B cell lymphoma\*

Ying Han<sup>1</sup>, Wen-xiu Yang<sup>2</sup>, Zhen-hong Pu<sup>1</sup>, Long Wan<sup>1</sup>

(1. Department of Pathology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China;

2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

**Abstract: Objective** To detect the expression of miR-125a-5p in the tissue of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), and to explore its effect on tumor drug resistance and prognosis. **Methods** DLBCL paraffin specimens and their clinical data were collected, and the patients were followed up to complete the survival data. qRT-PCR was used to detect the relative expression of miR-125a-5p mRNA. Immunohistochemical staining was used for detection of P-gp and Ki67 protein expressions in the tumor tissue. The correlation between miR-125a-5p and resistant protein P-gp expression was statistically analyzed, and the influence of miR-125a-5p expression level on DLBCL cell proliferation and the prognosis was explored. **Results** miR-125a-5p expression was significantly higher in

收稿日期: 2017-12-20

\* 基金项目: 贵州省自然科学基金 (No.: TJ2014-2)

[ 通信作者 ] 杨文秀, E-mail: ypq1964@163.com; Tel: 0851-6752735

DLBCL than the reactive hyperplasia group ( $P < 0.05$ ); its expression quantity was related to LDH level and the immunophenotype of the patients, but not correlated with age, gender, primary site, clinical stage or IPI score ( $P > 0.05$ ). The positive expression rate of P-gp protein in the miR-125a-5p high-expression group was higher than that in the miR-125a-5p low-expression group. Kaplan-Meier and Log-rank survival analyses showed that the overall survival and recurrence-free survival of the patients with low expression of miR-125a-5p were higher than those of the high-expression group. COX risk proportion model analysis showed that Arbor stages III and IV and miR-125a-5p high expression are the independent factors of poor prognosis of the patients with DLBCL. **Conclusions** The expression of miR-125a-5p is associated with the expression level of drug resistant protein P-gp in DLBCL. High expression of miR-125a-5p and Arbor stages III and IV indicate poor prognosis of the patients with DLBCL. And miR-125a-5p can be used as a potential molecule for prediction of the prognosis of DLBCL.

**Keywords:** DLBCL; mir-125a-5p; P-gp; quantitative real-time PCR; prognosis

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 是成人最常见的非霍奇金淋巴瘤, 其发病占非霍奇金淋巴瘤的 30% ~ 40%<sup>[1]</sup>。由于分子遗传学、临床过程和预后、形态学及免疫表型等方面的差异, DLBCL 是一组异质性的淋巴瘤。目前, 利妥昔单抗 +CHOP 方案为 DLBCL 的标准治疗方案, 只能使 50% 的患者得到持续缓解, 约 45% 患者则表现出原发耐药和缓解后复发<sup>[2]</sup>。肿瘤的临床分期、国际预后指数 (international prognosis index, IPI) 和增殖活性等是恶性肿瘤常用的预后评估因素, DLBCL 的遗传学改变和肿瘤细胞的免疫表型对其临床预后和治疗效果有明显影响, 但发现 IPI 同分值的 DLBCL 患者预后差异较大<sup>[3]</sup>。因此, 寻找 DLBCL 的新型预后评估因素很有意义。MiRNA 是非编码调控型 RNA 分子, 可影响肿瘤发生、发展及临床进程。MicroRNA-125a (miR-125a) 在 DLBCL 细胞群中能靶向抑制肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 3 基因 (the tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 gene, TNFAIP3, A20), 进而激活 NF- $\kappa$ B 通路而影响肿瘤细胞的增殖和凋亡, 肿瘤的侵袭性和耐药性等<sup>[4-6]</sup>。有研究证明<sup>[7]</sup>, 多药耐药基因 1 (multi-drugs resistance gene, MDR1) 启动子上存在一个 NF- $\kappa$ B 结合位点, 同时在预后不良的 DLBCL 患者中 miR-125b 表达上调。据此, 本研究通过检测 DLBCL 患者肿瘤组织中 miR-125a-5p 的 mRNA 水平以及 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 表达、细胞增殖核抗原 (nuclear-associated antigen, Ki-67) 蛋白表达对预后的影响, 探讨 miR-125a-5p 表达在 DLBCL 临床过程和预后评估中的意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2006 年 1 月 -2016 年 12 月于贵州医科大学

附属医院病理科诊断的弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者和档案石蜡标本, 按照 WHO 2016 年淋巴瘤分类更新的标准, 筛选出非特指的 DLBCL 患者, 将肿瘤组织大小超过 0.5 cm 直径的 90 例 DLBCL 纳入研究 (DLBCL 组), 并以 8 例淋巴结反应性增生患者作为研究对照 (对照组)。

### 1.2 方法

**1.2.1 试剂与仪器** P-gp 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司), Ki67 单抗、二抗及其他免疫组织化学检测试剂 (北京中杉金桥公司), Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), DEPC 水 (日本 Sigma 公司), miRNA 逆转录试剂盒 (美国 Gene Copoeia 公司)。紫外分光光度计 (Nano Drop1000, 美国 Thermo Scientific 公司), CFX Connect Real-time PCR 检测系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

**1.2.2 苏木素-伊红染色** 按照常规病理操作规范进行<sup>[8-9]</sup>。

**1.2.3 免疫组织化学染色** 采用 PV 二步法, 以枸橼酸盐 (pH=6.0) 进行高压热修复。一抗稀释度: P-gp 单克隆抗体 1 : 50, Ki67 单抗 1 : 100。二抗及其他免疫组织化学检测试剂遵循实验步骤, 按照说明书依次添加。P-gp 阳性对照为心肌组织, Ki67 阳性对照为反应性增生淋巴结, 空白对照以 0.01 mol PBS (pH=7.2) 代替一抗。

判读标准: 随机选择 10 个高倍镜视野 ( $\times 400$ ) 计数 1 000 个细胞中的阳性细胞数, 取 10 个高倍镜视野均数为其阳性率。P-gp 阳性信号定位在细胞膜和细胞浆, 以肿瘤细胞阳性率  $>20\%$  为阳性,  $<20\%$  为阴性。

**1.2.4 miR-125a-5p 检测** ①总 RNA 提取: 石蜡组织切片、脱蜡、组织消化, 采用 Trizol 试剂盒提取 DLBCL 及淋巴结反应性增生石蜡组织的总 RNA, 将提取的总 RNA 溶解至 0.1% 的 DEPC 水中, 采用紫外分光

光度计测定 RNA 浓度和纯度,在 260~280 nm 波长范围检测光密度值,控制在 1.8 ~ 2.0 之间以满足检测所需 RNA 质量;② RNA 逆转录:将模板总 RNA 置于冰上溶解,采用 miRNA 逆转录试剂盒进行逆转录,严格按照说明书操作。在冰上配制反应体系:1  $\mu$ l 205 u/ $\mu$ l poly A polymerase、1  $\mu$ l RTase Mix、5  $\mu$ l 5 $\times$  PAP/RT Buffer、不同体积总 RNA,以 ddH<sub>2</sub>O 补足反应体系,总体积达到 25  $\mu$ l。轻柔混匀,12 000 r/min 离心 2 min 后将反应液置于 PCR 仪,37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min,然后 85 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 终止反应,置入 4 $^{\circ}$ C 保存;③ 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR):选用 All-in-One<sup>TM</sup> miRNA qPCR Mix 试剂盒,内参基因选用 U6,按照试剂盒说明书操作。内参 U6 引物和目的 has-miR-125a-5p 引物购自美国 Gene Copoeia 公司,严格遵照试剂盒操作说明书,每个样本设置 3 个复孔,于八联管中配制反应体系:10  $\mu$ l All-in-One qPCR Mix、2  $\mu$ l All-in-one<sup>TM</sup> miRNA qPCR Primer、2  $\mu$ l Universal Adaptor PCR Primer、2  $\mu$ l cDNA、4  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O,总体积达 20  $\mu$ l;轻柔混匀,12 000 r/min 离心 2 min,CFX Connect real-time PCR 检测系统中进行,设置反应程序:95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C (收集荧光信号) 10 s 45 个循环,95 $^{\circ}$ C 10 s,熔解曲线温度:65 ~ 95 $^{\circ}$ C,每 5 秒升高 0.5 $^{\circ}$ C;④ 分析每个样本的 Ct 值,以 U6 作为内参,由公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 miR-125a-5p 的相对表达量。 $\Delta Ct = \text{miR-125a-5p Ct 平均值} - \text{U6 Ct 平均值}$ , $\Delta\Delta Ct = \text{DLBCL 组 } \Delta Ct - \text{对照组 } \Delta Ct$ 。以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  中位数作为分界值,将 DLBCL 患者组分为 miR-125a-5p 高表达组和低表达组。

### 1.3 随访

主要采用电话随访、门诊及住院病例复查及随访。随访开始时间为首次明确病理诊断,随访截止时间为 2016 年 12 月 31 日,总生存期 (overall survival, OS) 时间计算从诊断确立到 DLBCL 引起的死亡或随访终止,无复发生存期 (relapse free survival, RFS) 时间计算从诊断确立到 DLBCL 复发、死亡或随访终止,与本病不相关的死亡算为截尾。

### 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件,两组间独立样本采用 Mann-Whitney *U* 检验,miR-125a-5p 表达与临床病理特征参数统计采用  $\chi^2$  检验,生存分析采用 Kaplan-Meier 法及 Log-rank 检验,采用 COX 风险比例模型对各个协变量进行效应分析, $P < 0.05$  为差异有统

计学意义。

## 2 结果

### 2.1 临床病理特征

90 例 DLBCL 中,男性 55 例,女性 35 例,男女比为 1.6 : 1.0;发病年龄 20 ~ 85 岁,中位年龄 64 岁;原发于淋巴结内 41 例,淋巴结外 49 例;non-GCB DLBCL 型 64 例,GCB-DLBCL 型 26 例;Ann Arbor 临床分期 I 期 27 例,II 期 33 例,III 期 6 例,IV 期 24 例;乳酸脱氢酶 (LDH) 109 ~ 245 u/L 68 例,<245 u/L 22 例;IPI 评分 0 ~ 1 分 25 例,2 分 32 例,3 分 26 例,4 ~ 5 分 7 例。

### 2.2 miR-125a-5p 在 DLBCL 组和对照组中的表达

在 DLBCL 组和对照组中 miR-125a-5p 表达量分别为 3.532 (0.230, 10.960) 和 1.015 (0.340, 2.540),与对照组比较,miR-125a-5p 在 DLBCL 组中高表达,差异有统计学意义 ( $U = 113.00, P = 0.001$ ),见图 1。

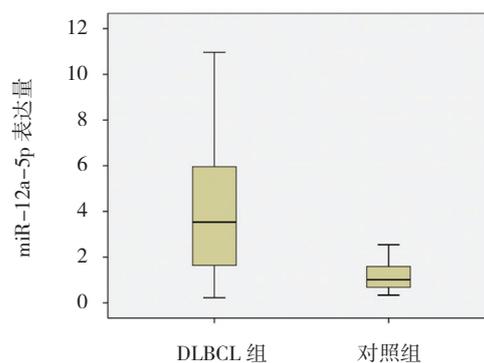


图 1 两组 miR-125a-5p 相对表达量

### 2.3 miR-125a-5p 表达与 DLBCL 患者临床病理特征的关系

根据 miR-125a-5p 的表达水平,以中位数值为界,将 90 例 DLBCL 患者分为 miR-125a-5p 高表达组 ( $n = 47$ )、miR-125a-5p 低表达组 ( $n = 43$ )。结果发现,miR-125a-5p 的表达在正常 LDH 与 LDH 升高患者之间差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 5.427, P = 0.020$ ),在 GCB 与 non-GCB 患者中差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 6.744, P = 0.009$ ),而在不同年龄 (<60 岁 vs >60 岁)、性别、原发部位、Ann Arbor 临床分期和 IPI 评分差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

### 2.4 miR-125a-5p 表达对 P-gp 蛋白表达的影响

在 miR-125a-5p 高表达组中 P-gp 蛋白阳性表达

表 1 DLBCL 患者中 miR-125a-5p 表达与临床病理相关性

组别	年龄 例 (%)		男 / 女 / 例	原发部位 例 (%)		LDH / (u/L)	
	<60 岁	>60 岁		淋巴结内	淋巴结外	109~245	>245
miR-125a-5p 高表达组 (n=47)	16 (41.0)	31 (60.8)	27/20	21 (51.2)	26 (53.1)	29 (44.6)	18 (72.0)
miR-125a-5p 低表达组 (n=43)	23 (59.0)	20 (39.2)	28/15	20 (48.8)	23 (46.9)	36 (55.4)	7 (28.0)
$\chi^2$ 值	3.458		0.056	0.030		5.427	
P 值	0.050		0.299	0.862		0.020	

组别	IPI				免疫表型 例 (%)		Ann Arbor 临床分期 例 (%)			
	低危组 (0~1)	中低危组 (2)	中高危组 (3)	高危组 (4~5)	GCB	Non-GCB	I	II	III	IV
miR-125a-5p 高表达组 (n=47)	12 (48.0)	15 (46.9)	17 (65.4)	3 (42.9)	18 (69.2)	29 (45.3)	18 (66.7)	13 (39.4)	4 (66.7)	12 (50.0)
miR-125a-5p 低表达组 (n=43)	13 (52.0)	17 (53.1)	9 (34.6)	4 (57.1)	8 (30.8)	35 (54.7)	9 (33.3)	20 (60.6)	2 (33.3)	12 (50.0)
$\chi^2$ 值	2.597				6.744		4.932			
P 值	0.458				0.009		0.175			

率为 61.7% (29/47), 而低表达组 P-gp 蛋白阳性率为 39.5% (17/43), 两组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且高表达组高于低表达组。见图 2 和表 2。

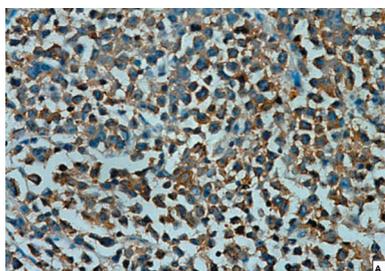


图 2 DLBCL 中 P-gp 表达情况 (PV × 400)

表 2 miR-125a-5p 与 P-gp 的表达 例

组别	P-gp 表达		$\chi^2$ 值	P 值
	阳性	阴性		
miR-125a-5p 高表达组 (n=47)	29	18	4.416	0.036
miR-125a-5p 低表达组 (n=43)	17	26		

### 2.5 miR-125a-5p 表达水平对患者预后的影响

在 90 例 DLBCL 患者中, 完整随访资料的有 51 例, 随访率达到 56.7%, 随访时间 0.5 ~ 120.5 个月 (中位随访时间 58 个月)。本研究以 51 例患者 miR-125a-5p 表达水平的中位数值为界, 分为 miR-125a-5p 的 mRNA 的高表达组和低表达组, Kaplan-Meier 及 Log-

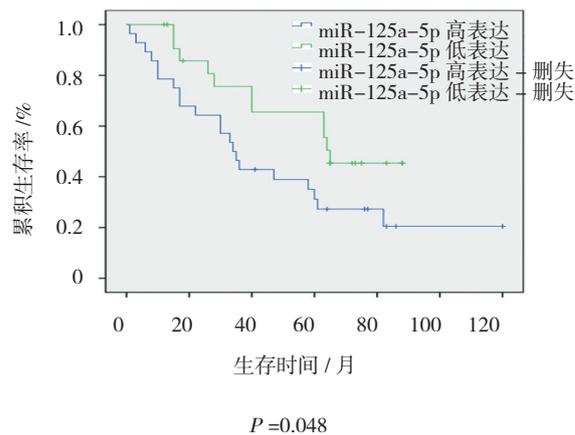


图 3 两组生存曲线图

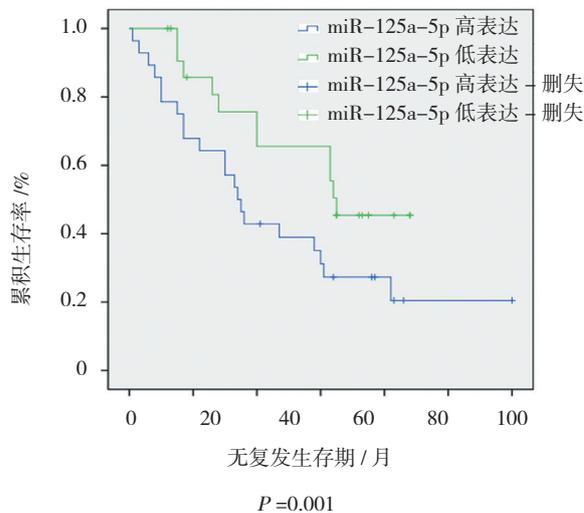


图 4 两组生存曲线图

rank 检验分析结果显示, miR-125a-5p 低表达组的中位生存时间 65 个月高于高表达组 34 个月, 低表达组中位无复发生存时间 60 个月高于高表达组 36 个月, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (见图 3、4)。单因素 COX 回归分析显示: Ann Arbor 分期 III、IV 期、miR-

125a-5p 高表达与不良预后相关; 多因素 COX 风险模型分析显示, Ann Arbor 分期 III、IV 期和 miR-125a-5p 高表达均可作为 DLBCL 患者评估预后的因素 (见表 3、4)。

表 3 总生存期单因素 COX 风险模型回归分析

临床特征	b	S <sub>e</sub>	Wald $\chi^2$	$\hat{HR}$	95%CI		P 值
					下限	上限	
年龄							
>60 岁 vs <60 岁	0.628	0.571	1.209	1.873	0.612	5.735	0.271
性别							
女 vs 男	-0.473	0.512	0.853	0.623	0.228	1.700	0.356
原发部位							
结外 vs 结内	0.355	0.458	0.601	1.426	0.581	3.500	0.438
免疫表型							
non-GCB vs GCB	0.363	0.534	0.461	1.437	0.504	4.094	0.497
Ann Arbor 分期							
III、IV vs I、II	1.481	0.544	7.405	4.399	1.514	12.788	0.007
LDH							
高表达 vs 正常	-0.458	0.530	0.748	0.632	0.224	1.786	0.387
IPI							
>3 vs <3	-0.406	0.578	0.493	0.667	0.215	2.068	0.482
Ki67 表达							
<50% vs >50%	0.413	0.396	1.086	1.512	0.695	3.288	0.297
miR-125a-5p 表达							
高表达 vs 低表达	1.208	0.450	7.212	3.347	1.386	8.084	0.007

表 4 总生存期多因素 COX 风险模型回归分析

临床特征	b	S <sub>e</sub>	Wald $\chi^2$	$\hat{HR}$	95%CI		P 值
					下限	上限	
Ann Arbor 分期							
III、IV vs I、II	1.108	0.364	9.286	3.028	1.485	6.176	0.002
miR-125a-5p 表达							
高表达 vs 低表达	0.922	0.388	5.647	2.515	1.175	5.383	0.017

### 3 讨论

DLBCL 是一组生长迅速、侵袭性高、预后具有高度异质性的恶性非霍奇金淋巴瘤。近年来, IPI 评分已经成为评价 DLBCL 患者预后的金标准, 尽管 IPI 评分能够预测某些特定免疫亚型患者的病情进展, 但

是对于患病早期就需要了解病情变化以便进行早期治疗的患者却受到很多限制<sup>[10-11]</sup>。根据基因表达谱分型发现, 相对 non-GCB DLBCL、GCB-DLBCL 患者有更好的预后, 但是检测价格过于昂贵不利于临床上广泛应用和开展<sup>[12]</sup>。因此, 对于能够真正指导个体化治疗

和影响临床进程的指标, 需要进一步探索和发现。

miRNA 分子在转录后水平作用于靶标 mRNA, 调控细胞的增殖凋亡及耐药等生物学特征, 同时作为抑癌基因或者癌基因影响肿瘤发生、发展<sup>[13]</sup>。多种 miRNA 分子在 DLBCL 中都有异常表达, 其表达水平直接影响 DLBCL 的预后。LAWRIE 等<sup>[14]</sup>曾经分析 80 例 DLBCL 患者中 464 种不同 miRNA 分子, 发现 miRNA 能够相对准确地预测淋巴瘤的分型, 有效地表明 miRNA 与淋巴瘤分化之间存在着密切的关系, 为疾病早期诊断提供依据。miR-125 家族包括 miR-125a 和 miR-125b, WANG 等<sup>[15]</sup>研究发现, 高表达 miR-125b 的 DLBCL 患者预示复发、不良预后, 它的失调先于临床表现的出现和影像学诊断, 可作为评价治疗效果的新型预后靶向分子。

有报道认为<sup>[16-17]</sup>, 早期非小肺癌患者和肺癌细胞株中 miR-125a-5p 的表达量降低, 在肺癌细胞中的表达水平可影响 P53 的表达和细胞凋亡。目前, miR-125a 在 DLBCL 中的表达及其在药物抵抗和风险评估等方面中的作用少见报道。

NF- $\kappa$ B 通路是本课题组研究 DLBCL 的发生、耐药及预后等临床进程中涉及的最重要的通路, A20 基因 *TNFAIP3*, 是一个新的肿瘤抑制基因, 它编码的 A20 蛋白是一种具有双重功能的锌指蛋白, 它通过裂解 MALT1 泛素链 (一种 NF $\kappa$ B 活化相关因子) 或通过抑制 I $\kappa$ B 的磷酸化而抑制 NF $\kappa$ B 的活化<sup>[18]</sup>。国内外和本课题组前期的研究都发现, 部分 DLBCL 中存在 A20 基因的缺失突变、错义突变和甲基化, 且 ABC-DLBCL 中 A20 甲基化发生率高于 GCB-DLBCL, 还发现 A20 的突变和甲基化与 NF- $\kappa$ B 活化及其下游靶基因 MDR1 编码的 P-gp 蛋白表达上调有关, A20 突变的 DLBCL 中 MDR1 编码的产物 P-gp 蛋白表达增多<sup>[19]</sup>。有研究报道<sup>[4]</sup>A20 基因是 miR-125a 和 miR-125b 的直接靶标, 后两者经常在 DLBCL 中获得和/或过表达, 这种异常表达抑制 A20 而导致 NF- $\kappa$ B 异常活化。本研究通过检测 DLBCL 肿瘤组织发现, DLBCL 中 miR-125a-5p 的表达水平升高, 且 miR-125a-5p 与肿瘤免疫表型之间存在相关性, 推测 miR-125a-5p 在 DLBCL 中的上调表达也通过抑制 A20 的表达而促进 NF $\kappa$ B 的活化, 异常活化的 NF $\kappa$ -B 通过调节其下游靶基因而影响 DLBCL 的发生和发展。本研究发现, 90 例非特指 DLBCL 病例中, miR-125a-5p 上调表达病例的耐药蛋白 P-gp 的表达明显升高, 推测这可能是 miR-125a-

5p 抑制 A20 表达而间接活化 NF- $\kappa$ B 的结果, 并可能与 DLBCL 耐药有关。

近年来, 在 CHOP 方案和利妥昔单抗 +CHOP 方案治疗 DLBCL 过程中, miRNA 分子所发挥的预后潜在诊断价值越来越受到关注<sup>[20-21]</sup>, 本研究通过追踪 51 例 DLBCL 患者 10 年以上的生存及复发等情况, 以 miR-125a-5p 表达的中位数为阈值, 发现高表达组患者的 OS 和 RFS 均低于低表达组, 且差异有统计学意义; 单因素及多因素 COX 生存分析: 患者的性别、年龄、免疫分型、原发部位、LDH、IPI 评分及 Ki67 表达高低均与 DLBCL 预后没有相关性, 而高表达 miR-125a-5p、Ann Arbor 分期 III、IV 可作为预后危险指标。本研究发现, miR-125a-5p 表达与 Ann Arbor 临床分期不存在相关性, 而两者均与不良预后相关可能原因是, 淋巴瘤 Ann Arbor 分期是按照病变累及的部位和范围进行划分, miR-125a-5p 表达与 DLBCL 累及的部位和范围无相关, 而它们对预后的影响可能分别各自存在着一定的机制和原因, 等待进一步去探索和发现。同本实验结果不同的是, 黄然欣等<sup>[22]</sup>发现, 血清 LDH 水平可影响非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 预后, 正常血清 LDH 组比高 LDH 组药物治疗的有效率高。有研究发现<sup>[23]</sup>, 将 miRNA 分子与 IPI 结合来建立存活率模型进行肿瘤的临床结局评判会比单个模型更有利, 而本实验中并未发现 IPI 评分与 DLBCL 患者预后存在相关性, 联合评判到底取决于 miRNA 分子类别, 还是与 miRNA 与 IPI 评分之间建立的关系模型有关, 有待进一步研究。

综上所述, miR-125a-5p 在 DLBCL 中发挥着类似癌基因的作用, 且可能靶向作用于 A20 基因, 活化 NF- $\kappa$ B 通路介导 MDR1/P-gp 途径, 使患者对化疗药物产生抵抗影响预后, 同时 miR-125a-5p 可作为评判 DLBCL 预后的分子标志物, 未来的实验研究可一步步证实该结果的可靠性。

#### 参 考 文 献:

- [1] ARESUL L. Canine lymphoma, more than a morphological diagnosis: what we have learned about diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00077>.
- [2] FRIEDBERG J W. Relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Hematology. american Society of Hematology. education Program*, 2011, 2011(1): 498.
- [3] 宋国齐, 顾玲, 何帮顺, 等. miR-224 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者中的表达及其临床意义 [J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(7): 619-621.

- [4] KIM S W, RAMASAMY K, BOUAMAR H, et al. MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF- $\kappa$ B pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(20): 7865-7870.
- [5] TURTURRO F. Constitutive NF- $\kappa$ B Activation underlines major mechanism of drug resistance in relapsed refractory diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Biomed Research International*, 2015, 2015: 1-5.
- [6] COORNAERT B, BAENS M, HEYNINCK K, et al. T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20[J]. *Nature Immunology*, 2008, 9(3): 263-271.
- [7] 朱皓峰, 杜丽英, 熊敦勇, 等. E2F-1、NF- $\kappa$ B/P65、P-gp 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的表达及意义 [J]. *实用癌症杂志*, 2013, 28(2): 150-154.
- [8] 王德田, 董建强. 实用现代病理学技术 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2012: 4-5.
- [9] 范玲丽. 病理制片质量控制的探讨及体会 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32(7): 823-824.
- [10] ZIEPERT M, HASENCLEVER D, KUHN E, et al. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, 28(14): 2373.
- [11] LENZ G, STAUDT L M. Aggressive lymphomas[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(15): 1417-1429.
- [12] BEA S, ZETTL A, WRIGHT G, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction[J]. *Blood*, 2005, 106(9): 3183.
- [13] INADA K, OKOSHI Y, CHO Y, et al. Availability of circulating MicroRNAs as a biomarker for early diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Open Journal of Blood Diseases*, 2015, 5(4): 48-58.
- [14] LAWRIE C H, GAL S, DUNLOP H M, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *British Journal of Haematology*, 2008, 141(5): 672-675.
- [15] YUAN W X, GUI Y X, NA W N, et al. Circulating microRNA-125b and microRNA-130a expression profiles predict chemoresistance to R-CHOP in diffuse large B-cell lymphoma patients[J]. *Oncology Letters*, 2016, 11(1): 423.
- [16] ZHU W Y, LUO B, AN J, et al. Differential expression of miR-125a-5p and let-7e predicts the progression and prognosis of non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Investigation*, 2014, 32(8): 394-401.
- [17] JIANG L, HUANG Q, CHANG J, et al. MicroRNA HSA-miR-125a-5p induces apoptosis by activating p53 in lung cancer cells[J]. *Experimental Lung Research*, 2011, 37(7): 387.
- [18] 李逸, 陈琴, 李品浩, 等. A20 基因甲基化对弥漫性大 B 细胞性淋巴瘤的影响 [J]. *诊断病理学杂志*, 2015, 22(12): 772-776.
- [19] 虞樱篮, 陈琴, 杨文秀. A20 突变与弥漫大 B 细胞淋巴瘤临床病理特征及预后的关系 [J]. *中国肿瘤临床*, 2015, 42(20): 1018-1024.
- [20] JØRGENSEN L K, POULSEN M Ø, LAURSEN M B, et al. MicroRNAs as novel biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma-a systematic review[J]. *Danish Medical Journal*, 2015, 62(5): PMID: 26050834.
- [21] LIM E L, TRINH D L, SCOTT D W, et al. Comprehensive miRNA sequence analysis reveals survival differences in diffuse large B-cell lymphoma patients[J]. *Genome Biology*, 2015, 16(1): 1-19.
- [22] 黄然欣, 李晓林, 黄晓春, 等. 非霍奇金淋巴瘤血清乳酸脱氢酶和  $\beta_2$  微球蛋白水平及其临床意义 [J]. *中国现代医学杂志*, 2008, 18(10): 1357-1359.
- [23] MONTESMORENO S, MARTINEZ N, SANCHEZESPIRIDIÓN B, et al. miRNA expression in diffuse large B-cell lymphoma treated with chemoimmunotherapy[J]. *Blood*, 2011, 118(4): 1034-1040.

(张蕾 编辑)