

非霍奇金淋巴瘤患者 *MS4A1* 基因多态性与利妥昔单抗血药浓度及疗效的相关性研究^Δ

石凤^{1,2*}, 刘韬¹, 黄河¹, 房财富¹, 管少兴², 张璋¹, 王钊¹, 方小洁¹, 陈卓佳¹, 刘澍^{1#}(1. 中山大学肿瘤防治中心药学部, 广州 510060; 2. 中山大学药学院, 广州 510006)

中图分类号 R969.4; R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)13-1641-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.13.15



摘要 目的 探索非霍奇金淋巴瘤患者 *MS4A1* 基因多态性对利妥昔单抗血药浓度及疗效的影响。方法 选择2016年1月至2020年12月在中山大学肿瘤防治中心接受R-CHOP方案的新确诊非霍奇金淋巴瘤患者160例进行前瞻性观察性研究,最短随访时间约5年。以酶联免疫吸附试验测定患者利妥昔单抗血药浓度。采用Haploview 4.2软件挑选 *MS4A1* 基因位点:rs1051461、rs17155034、rs4939364、rs10501385,以基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱法分析患者的基因型。采用单因素线性回归分析患者各因素(人口统计学、临床指标与基因型)与第1个疗程利妥昔单抗稳态谷浓度的相关性,并进行多元线性回归分析。绘制Kaplan-Meier曲线以评估患者的无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)。以 *MS4A1* 基因型和肿瘤分期为自变量,采用Cox回归模型评估影响患者预后的因素。**结果** 携带 *MS4A1* rs10501385 CC基因型患者的利妥昔单抗血药浓度为15.20 μg/mL,显著低于AA+AC型患者的21.95 μg/mL ($P < 0.05$)。以患者肿瘤分期和 *MS4A1* rs10501385 基因多态性建立的利妥昔单抗血药浓度多元线性回归模型能解释7.3%的个体差异。与携带 *MS4A1* rs1051461 CC基因型患者比较,CT+TT基因型患者的PFS和OS均显著延长 ($P < 0.05$)。Cox回归模型显示, *MS4A1* rs1051461 CC基因型(HR=4.406, 95%CI为1.743~11.137, $P < 0.05$)和肿瘤分期Ⅲ或Ⅳ期(HR=3.233, 95%CI为1.413~7.399, $P < 0.05$)是影响患者PFS的独立危险因素。**结论** 非霍奇金淋巴瘤患者的肿瘤分期和 *MS4A1* rs10501385 位点多态性是利妥昔单抗血药浓度的关键影响因素,而肿瘤分期和 *MS4A1* rs1051461 位点多态性能显著影响非霍奇金淋巴瘤患者的PFS。

关键词 利妥昔单抗;非霍奇金淋巴瘤; *MS4A1* 基因;基因多态性;血药浓度;疗效

Study on relationships of *MS4A1* gene polymorphism with blood concentration and efficacy of rituximab in patients with non-Hodgkin's lymphoma

SHI Feng^{1,2}, LIU Tao¹, HUANG He¹, FANG Caifu¹, GUAN Shaoxing², ZHANG Zhang¹, WANG Zhao¹, FANG Xiaojie¹, CHEN Zhuojia¹, LIU Shu¹(1. Dept. of Pharmacy, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effects of CD20 coding gene (*MS4A1*) polymorphism on the blood concentration and efficacy of rituximab in patients with non-Hodgkin's lymphoma. **METHODS** A prospective observational study was conducted on 160 newly diagnosed non-Hodgkin's lymphoma patients who received the R-CHOP regimen at the Sun Yat Sen University Cancer Center from January 2016 to December 2020, with a minimum follow-up period of approximately 5 years. The blood concentration of rituximab was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *MS4A1* tagSNPs were selected by Haploview4.2 software, including rs1051461, rs17155034, rs4939364, and rs10501385. The genotype of *MS4A1* was detected by Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Univariate linear regression analysis was employed to examine the correlation between various factors (demographic, clinical, and genotypic variables) in patients and the steady-state trough concentration of

rituximab during the first course of treatment, followed by multivariate linear regression analysis. Kaplan-Meier curves were drawn to evaluate progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). Using *MS4A1* genotype and tumor stage as independent variables, Cox regression model was employed to evaluate the factors influencing patient prognosis. **RESULTS** The blood concentration of rituximab in *MS4A1* rs10501385 CC carriers was 15.20 μg/mL, which was significantly lower than 21.95 μg/mL in AA+AC carriers ($P <$

Δ 基金项目 国家自然科学基金项目(No.82204532, No.82373440); 广东省基础与应用基础研究基金项目(No.2022A1515012549, No.2023A1515012667); 广州市科技基础与应用基础研究专题(No.2023A04J1794); 中山大学肿瘤防治中心“青年优创”计划项目(No.PT21060101, No.PT21060201)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向: 临床药学。E-mail: shif23@mail2.sysu.edu.cn

通信作者 副主任药师, 硕士生导师, 博士。研究方向: 药代动力学、药物基因组学。E-mail: liushul@sysucc.org.cn

0.05). The multivariate linear regression model incorporating tumor stage and *MS4A1* rs10501385 polymorphism explained 7.3% of the interindividual variability in rituximab concentrations. Compared with *MS4A1* rs1051461 CC carriers, CT+TT carriers had significantly prolonged PFS and OS ($P<0.05$). The Cox proportional hazards regression model showed that the *MS4A1* rs1051461 CC genotype (HR=4.406, 95%CI: 1.743-11.137, $P<0.05$) and tumor III & IV (HR=3.233, 95%CI: 1.413-7.399, $P<0.05$) were independent risk factors for PFS. **CONCLUSIONS** The tumor staging and *MS4A1* rs10501385 polymorphism are key influencing factors for blood concentration of rituximab, and *MS4A1* rs1051461 polymorphism significantly affects PFS in non-Hodgkin's lymphoma patients.

KEYWORDS rituximab; non-Hodgkin's lymphoma; *MS4A1*; genetic polymorphism; blood concentration; efficacy

淋巴瘤根据组织病理学改变可分为霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤两大类。在我国,非霍奇金淋巴瘤病例数约占淋巴瘤总病例数的90%以上^[1]。非霍奇金淋巴瘤由发育异常的淋巴细胞(通常为B淋巴细胞)引起,而CD20是B淋巴细胞的标志物,在正常B淋巴细胞和约95%的恶性B淋巴细胞表面表达^[2],因此,CD20被认为是一个治疗B细胞淋巴瘤的理想靶点。利妥昔单抗是第1个研发上市的靶向B淋巴细胞CD20抗原的嵌合单克隆抗体,其在淋巴瘤的治疗中处于基石地位。直到今天,CD20-CHOP方案仍然是权威指南推荐的众多非霍奇金淋巴瘤的一线治疗选择^[3]。

CD20是一种具有高度保守的四次跨膜结构域的跨膜蛋白,由*MS4A1*基因编码^[2]。目前,*MS4A1*基因多态性与利妥昔单抗疗效的相关性已被广泛探讨。例如韩国有研究报道,弥漫大B细胞淋巴瘤患者的CD20表达水平个体差异很大,且低表达者与不良预后相关^[4]。国内研究通过对弥漫大B淋巴瘤患者进行测序,发现*MS4A1* rs17155019、rs2070770与CD20的表达水平有相关性^[5]。但中国患者的类似研究并不多见,能够影响利妥昔单抗疗效的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)还未被确认。

近年来,不断有国内外研究报道,利妥昔单抗的血药浓度是非霍奇金淋巴瘤治疗响应的决定性因素之一。例如美国一项针对166例非霍奇金淋巴瘤患者的研究显示,在整个治疗过程中,利妥昔单抗的中位谷浓度(c_{trough})与临床响应显著相关^[6]。本课题组前期研究也发现,达到利妥昔单抗有效血药浓度是良好预后的重要保障——在滤泡淋巴瘤中达到有效血药浓度(18.4 $\mu\text{g/mL}$)可显著降低化疗失败的风险($P=0.012$);在弥漫大B细胞淋巴瘤中达到有效血药浓度也与更优的无进展生存期(progression-free survival, PFS)($P<0.0001$)、总生存期(overall survival, OS)($P=0.0038$)显著相关;但现实中有超过1/3的患者都未能达到有效血药浓度^[7-8]。利妥昔单抗的代谢途径包括靶标CD20介导的清除和非靶标介导的清除。因此,进一步通过药物基因组学研究,确定患者血药浓度个体差异的来源,将有助于临床制定精准的给药剂量。

由上可知,CD20作为利妥昔单抗治疗的靶点,其表达水平对药物疗效及药物清除过程的影响均不可忽视。有鉴于此,本研究通过Haploview4.2软件挑选CD20编码基因*MS4A1*的标签SNP(tagSNP),以非霍奇金淋巴瘤患者为研究对象,开展前瞻性观察性临床研究,并通过5年的长期随访,考察tagSNP的基因多态性对利妥昔单抗血药浓度以及疗效的影响,以期为利妥昔单抗个体化给药剂量的设计和治疗方案的优选提供理论依据。

1 研究对象

本研究纳入了160例于2016年1月至2020年12月在中山大学肿瘤防治中心新确诊为CD20+的非霍奇金淋巴瘤,并接受R-CHOP方案(利妥昔单抗+环磷酰胺+多柔比星+长春新碱+泼尼松)治疗的患者作为研究对象。在医院电子病历系统登记患者的年龄、性别、瘤种、用药情况、不良反应、疗效评估结果、随访信息等资料。本研究经中山大学肿瘤防治中心伦理委员会审批并在中国临床试验注册中心注册(临床试验注册号为ChiCTR1800017001),患者均签署知情同意书。

本研究的纳入标准为:(1)具有可获取的新鲜或固定肿瘤组织标本,根据临床表现、血液检查、骨髓细胞学检查、淋巴结或骨组织病理结果,符合《中国恶性淋巴瘤诊疗规范(2015年版)》^[9]中CD20+的非霍奇金淋巴瘤的诊断标准;(2)既往未接受过化疗或放疗等抗肿瘤治疗;(3)影像学上至少有1个可测量的病灶;(4)年龄大于14岁;(5)心电图正常,心肌射血分数 $\geq 50\%$ 。

本研究的排除标准为:(1)各种先天性或者获得性免疫缺陷(包括获得性免疫缺陷综合征、Wiskott-Aldrich综合征、肾移植术后长期口服抗排斥药物等免疫功能缺陷等)患者;(2)其他恶性肿瘤化疗或放疗后发生的继发性淋巴瘤患者;(3)存在需要接受系统性抗生素或抗病毒药物治疗的活动性感染者;(4)失代偿性心功能衰竭、扩张性心肌病和最近6个月内发生过心肌梗死的患者;(5)伴有乙型肝炎病毒感染并处于活动期的患者;(6)严重的精神性疾病患者;(7)哺乳期或妊娠期女性;(8)治疗期间依从性差、数据收集不全、无法评价疗效和安全性的患者。

2 方法

2.1 血样采集及 DNA 提取

因多项药代动力学研究表明,利妥昔单抗的 c_{trough} 与药-时曲线下面积(area under the curve, AUC)显著相关^[10-11],且文献推荐检测第1个疗程的 c_{trough} 进行预后分析^[12],故本研究检测了第1个疗程利妥昔单抗的 c_{trough} ,即在第2个疗程给药前采集患者血样2 mL,用乙二胺四乙酸抗凝管收集。所有血样采集后于6 h内以5 000 r/min离心10 min,分离出血浆和血细胞,将血浆冻存于-80 °C超低温冰箱,3个月内完成血药浓度检测;剩余血细胞按TIANamp[®]血液DNA试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]说明书操作提取DNA,于-80 °C超低温冰箱冻存,用于后续基因型检测。

2.2 基因型检测

采用Haploview 4.2软件挑选 $MS4A1$ 基因tagSNP: rs1051461、rs17155034、rs4939364、rs10501385;取“2.1”项下血样分离后的冻存血细胞,以基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)法进行基因型检测。首先采用Assay Designer 3.1软件设计PCR引物并进行PCR扩增,然后进行虾碱性磷酸酶消化反应和单碱基延伸反应,最后采用MALDI-TOF-MS法,以Typer 4.0软件检测质谱峰,根据质谱峰图判读各样本目标位点的基因型。

2.3 利妥昔单抗血药浓度检测

采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[13]检测利妥昔单抗血药浓度。取“2.1”项下冻存血浆,通过建立“捕捉抗体-利妥昔单抗-检测抗体”的夹心法进行血药浓度定量。方法的特异性、选择性、准确度、精密性、稀释线性、稀释平行性、样品稳定性均符合要求。

所用仪器、药品及试剂有:Veriti梯度PCR仪(美国ABI公司)、DNA质谱阵列基因分析系统(美国Agena Bioscience公司)、酶标仪/全波长读数仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)、利妥昔单抗注射液(瑞士Roche Pharma Ltd公司,国药准字J20170034,规格100 mg/10 mL,批号分别为H0224/SH0123、H0242/SH0132、H0235/SH0129)、注射用环磷酰胺(德国Baxter Oncology GmbH公司,国药准字H20160467,规格0.2 g,批号分别为7F167A、7F172A、8A210A)、注射用盐酸多柔比星(瀚晖制药有限公司,国药准字H33021980,规格10 mg,批号分别为18007113、18019811、1900611)、盐酸多柔比星脂质体注射液(石药集团欧意药业有限公司,国药准字H20113320,规格为10 mL:20 mg,批号分别为

691161211、691171210、691180701)、注射用硫酸长春新碱[深圳万乐药业有限公司,国药准字H44021772,规格1 mg(按 $C_{46}H_{56}N_4O_{10}\cdot H_2SO_4$ 计),批号分别为1706V2、1809V1、1810V1]、醋酸泼尼松片(天津力生制药股份有限公司,国药准字H12020689,规格5 mg,批号分别为CP180511A、CP190602A、CP190615A)、利妥昔单抗ELISA试剂盒(美国BioVision公司)。

2.4 临床治疗方法

登记入组患者确诊时及治疗过程中的身高、体重、合并用药情况、一般健康状态、生化指标、血常规指标等资料。患者根据病情并遵照《中国恶性淋巴瘤诊疗规范(2015年版)》^[9],接受4~6个疗程R-CHOP方案治疗,每21 d为1个疗程。R-CHOP化疗方案的用法用量为:利妥昔单抗375 mg/m²缓慢静脉注射、环磷酰胺750 mg/m²静脉注射、多柔比星50 mg/m²(或多柔比星脂质体20 mg/m²)静脉注射、长春新碱2 mg静脉注射,第1~5天;另每天口服泼尼松100 mg,每21 d为1个疗程。一般达到完全缓解后巩固2个疗程,共进行6~8个疗程。若期间发生肿瘤进展或控制不佳,则更换其他化疗方案,视为患者出组。

2.5 疗效评价

在患者治疗结束后,每3个月对其进行1次电话随访,建立电子管理档案,随访日期截至2024年12月31日。在随访期内,基于患者的PFS和OS绘制生存曲线(PFS是指患者从接受治疗至观察到疾病进展或因任何原因死亡之间的时间;OS是指从随机化分组开始至因任何原因死亡或到随访截止的时间),探讨 $MS4A1$ 基因多态性与利妥昔单抗疗效的相关性。

2.6 统计学处理

应用SPSS 24.0软件对数据进行统计分析。采用单因素线性回归分析患者人口统计学(性别、年龄、体重等)、临床指标、基因型与第1个疗程利妥昔单抗稳态 c_{trough} 的相关性;再将具有统计学意义($P<0.05$)的因素作为自变量,第1个疗程利妥昔单抗稳态 c_{trough} 作为因变量进行多元线性回归分析。绘制Kaplan-Meier曲线以评估患者的PFS和OS。以 $MS4A1$ 基因型和肿瘤分期为自变量,采用Cox回归模型评估影响患者预后的因素,数据以风险比(hazard ratio, HR)及其95%置信区间(confidence interval, CI)表示。

符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用 t 检验;偏态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,使用非参数检验。计数资料用频数或率(%)表示,采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 患者一般资料

共纳入160例患者,其中男性87例、女性73例;初诊时骨髓侵犯者12例,肿瘤分期达Ⅲ或Ⅳ期者84例;利妥昔单抗的给药剂量为说明书推荐的375 mg/m²,大部分患者的给药剂量为500~800 mg,平均给药剂量为(639.91±65.03)mg。患者的一般资料见表1。

表1 患者的一般资料(n=160)

| 项目 | 数值($\bar{x} \pm s$ 或M(P ₂₅ ,P ₇₅)) | 项目 | 数值($\bar{x} \pm s$ 或M(P ₂₅ ,P ₇₅)) |
|--------------------------|--|---|--|
| 年龄/岁 | 50.14±13.05 | ALB/(g/L) | 40.70(37.10,43.40) |
| 身高/cm | 164.95±7.58 | A/G | 1.42±0.25 |
| 体重/kg | 61.67±10.54 | TP/(g/L) | 68.83±7.63 |
| BSA/m ² | 1.64±0.17 | CRP/(mg/L) | 5.60(1.12,17.43) |
| BMI/(kg/m ²) | 22.58±3.02 | PLT/(×10 ⁹ L ⁻¹) | 270.43±84.40 |
| LDH/(U/L) | 343.10±435.69 | HGB/(×10 ⁹ L ⁻¹) | 126.05±21.19 |
| TBIL/(μmol/L) | 8.90(6.20,11.90) | WBC/(×10 ⁹ L ⁻¹) | 7.53±2.44 |
| ALT/(U/L) | 18.80(12.30,28.50) | LY/(×10 ⁹ L ⁻¹) | 1.50(1.04,1.94) |
| AST/(U/L) | 17.60(14.30,24.40) | MO/(×10 ⁹ L ⁻¹) | 0.49(0.39,0.62) |
| CRE/(μmol/L) | 67.45±21.71 | NE/(×10 ⁹ L ⁻¹) | 4.84(3.30,6.87) |
| UA/(μmol/L) | 314.63±109.87 | NLR | 2.92(1.90,6.30) |
| CYSC/(mg/L) | 0.96±0.27 | LMR | 3.07(1.96,4.67) |
| GLOB/(g/L) | 28.70±4.83 | PLR | 174.81(126.28,255.71) |

BSA:体表面积;BMI:体重指数;LDH:乳酸脱氢酶;TBIL:总胆红素;ALT:丙氨酸转氨酶;AST:天冬氨酸转氨酶;CRE:肌酐;UA:尿酸;CYSC:胱抑素C;GLOB:球蛋白;ALB:白蛋白;A/G:球蛋白/白蛋白;TP:总蛋白;CRP:C反应蛋白;PLT:血小板;HGB:血红蛋白;WBC:白细胞;LY:淋巴细胞绝对值;MO:单核细胞绝对值;NE:中性粒细胞绝对值;NLR:中性粒细胞与淋巴细胞的比值;LMR:淋巴细胞与单核细胞的比值;PLR:血小板与淋巴细胞的比值。

3.2 MS4A1 基因型检测结果

160例患者中,MS4A1的4个位点rs1051461、rs17155034、rs4939364、rs10501385的基因型分布频率见表2,其均符合Hardy-Weinberg平衡(P>0.05),具有群体代表性。其中,rs10501385等位基因频率与美国国家生物技术信息中心数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中纳入的东亚患者人群的统计数据差异有统计学意义(P<0.05)。

表2 MS4A1 基因型及其分布

| SNP | 基因型 | 基因型分布 频率/% | 等位基因 | 等位基因 频率/% | 美国国家生物技术信息中心数据 | |
|------------|-----|---------------|------|--------------------|----------------|--------------|
| | | | | | 东亚人群/例 | 东亚人群等位基因频率/% |
| rs17155034 | AA | 0.80 | A | 9.40 | 86 | 6.00 |
| | AT | 17.20 | T | 90.60 | | 94.00 |
| | TT | 82.00 | | | | |
| rs4939364 | AA | 14.20 | A | 34.06 | 574 | 33.60 |
| | AG | 39.40 | G | 65.94 | | 66.40 |
| | GG | 46.50 | | | | |
| rs1051461 | CC | 7.90 | C | 24.69 | 546 | 26.60 |
| | CT | 33.10 | T | 75.31 | | 73.40 |
| | TT | 59.00 | | | | |
| rs10501385 | AA | 55.20 | A | 73.44 ^a | 140 | 88.60 |
| | AC | 36.80 | C | 26.56 ^a | | 11.40 |
| | CC | 8.00 | | | | |

a:与对应东亚人群等位基因频率比较,P<0.05。

3.3 利妥昔单抗的血药浓度检测结果

160例患者利妥昔单抗的c_{trough}均值为(20.29±9.83)μg/mL,范围为0.07~49.49 μg/mL。

3.4 MS4A1 基因型与利妥昔单抗血药浓度的相关性分析

rs10501385AA+AC基因型患者利妥昔单抗的c_{trough}均值为(21.95±9.33)μg/mL,CC基因型患者为(15.20±7.92)μg/mL,两组c_{trough}均值比较的差异有统计学意义(P=0.038)。而rs17155034、rs4939364、rs1051461不同基因型组间利妥昔单抗的c_{trough}比较的差异无统计学意义(P>0.05)。结果见表3。

表3 不同MS4A1 基因型患者的利妥昔单抗c_{trough}检测结果

| SNP | 基因型 | 利妥昔单抗c _{trough} ($\bar{x} \pm s$)/(μg/mL) | P |
|------------|-------|--|-------|
| rs17155034 | AA+AT | 22.50±6.22 | 0.297 |
| | TT | 19.75±10.47 | |
| rs4939364 | AA | 21.53±7.52 | 0.435 |
| | AG | 18.86±7.94 | |
| | GG | 20.80±11.74 | |
| rs1051461 | CC | 17.63±11.27 | 0.362 |
| | CT | 18.62±10.56 | |
| | TT | 21.04±9.57 | |
| rs10501385 | AA+AC | 21.95±9.33 | 0.038 |
| | CC | 15.20±7.92 | |

MS4A1 基因型与利妥昔单抗c_{trough}相关性的单因素分析结果见表4。由表4可知,rs10501385位点对非霍奇金淋巴瘤患者利妥昔单抗c_{trough}的影响有统计学意义(F=4.415,P=0.038),回归方程为利妥昔单抗c_{trough}=21.948-6.746×rs10501385位点赋值(若患者rs10501385位点基因型为CC则赋值为1,AA或AC则赋值为0);由R²值可知,MS4A1 rs10501385基因多态性能解释3.8%的利妥昔单抗血药浓度个体差异。

表4 MS4A1 基因型对利妥昔单抗c_{trough}影响的单因素回归分析结果

| SNP | 基因型 | 偏回归系数(B) | 标准误(SE) | P | Exp(B)(95%CI) | R ² |
|------------|--------|----------|---------|-------|----------------------|----------------|
| rs10501385 | CC | -6.746 | 3.211 | 0.038 | 0.001(0~0.681) | 0.038 |
| | AA+AC | 0 | | | 1 | |
| | 常量 | 21.948 | 0.906 | | | |
| rs1051461 | CC | -3.404 | 3.732 | 0.363 | 0.033(0~53.678) | 0.017 |
| | CT | -2.414 | 1.923 | 0.212 | 0.089(0.002~4.023) | |
| | TT | 0 | | | 1 | |
| rs4939364 | 常量 | 21.036 | 1.166 | | | |
| | AA | 0.734 | 2.563 | 0.775 | 2.083(0.013~330.630) | 0.012 |
| | AG | -1.939 | 1.777 | 0.277 | 0.144(0.004~4.836) | |
| GG | 0 | | | 1 | | |
| rs17155034 | 常量 | 20.801 | 1.241 | | | |
| | TT | -1.375 | 1.312 | 0.297 | 0.253(0.019~3.401) | 0.010 |
| | AA+AT | 0 | | | 1 | |
| 常量 | 23.879 | 3.663 | | | | |

3.5 非霍奇金淋巴瘤患者人口统计学及临床指标与利妥昔单抗血药浓度的相关性分析

将患者人口统计学指标(性别、年龄、体重等)以及临床指标作为自变量,利妥昔单抗 c_{trough} 作为因变量进行单因素回归分析。结果显示,患者的性别、肿瘤分期、初诊时骨髓侵犯、TBIL、ALT、AST、A/G 与利妥昔单抗 c_{trough} 相关($P < 0.05$),其中 A/G 与其呈正相关,其余因素呈负相关。结果见表5。

表5 患者人口统计学及临床指标对利妥昔单抗 c_{trough} 影响的单因素回归分析结果

| 变量 | B | SE | P | Exp(B)(95%CI) | R ² |
|-----------------------------|---------|-------|--------|--------------------------------|----------------|
| 男性 | -3.282 | 1.620 | 0.045 | 0.038(0.002~0.923) | 0.028 |
| 年龄/岁 | 0.002 | 0.064 | 0.979 | 1.002(0.882~1.138) | <0.001 |
| 身高/cm | -0.163 | 0.108 | 0.133 | 0.850(0.686~1.052) | 0.016 |
| 体重/kg | -0.016 | 0.081 | 0.846 | 0.984(0.839~1.156) | <0.001 |
| BSA/m ² | -2.823 | 5.095 | 0.580 | 0.059(0~1.409.514) | 0.002 |
| BMI/(kg/m ²) | 0.198 | 0.279 | 0.480 | 1.219(0.702~2.115) | 0.004 |
| LDH(U/L) | -0.003 | 0.002 | 0.114 | 0.997(0.993~1.001) | 0.030 |
| 肿瘤分期IV期 | -5.607 | 1.594 | 0.001 | 0.004(0~0.086) | 0.081 |
| 大包块 | 0.411 | 2.484 | 0.869 | 1.508(0.011~204.588) | <0.001 |
| 初诊时骨髓侵犯 | -11.105 | 2.824 | <0.001 | 0(0~0.004) | 0.098 |
| TBIL(μmol/L) | -0.074 | 0.035 | 0.035 | 0.929(0.867~0.995) | 0.053 |
| ALT(U/L) | -0.144 | 0.051 | 0.006 | 0.866(0.783~0.958) | 0.088 |
| AST(U/L) | -0.081 | 0.035 | 0.022 | 0.922(0.862~0.988) | 0.061 |
| CRE(μmol/L) | -0.030 | 0.040 | 0.454 | 0.970(0.897~1.050) | 0.007 |
| UA(μmol/L) | -0.003 | 0.008 | 0.715 | 0.997(0.981~1.013) | 0.002 |
| CYSC(mg/L) | -3.086 | 3.215 | 0.340 | 0.046(0~27.358) | 0.011 |
| GLOB(g/L) | -0.192 | 0.180 | 0.289 | 0.825(0.577~1.181) | 0.014 |
| ALB(g/L) | 0.015 | 0.022 | 0.495 | 1.015(0.971~1.062) | 0.006 |
| A/G | 7.247 | 3.474 | 0.040 | 1.403.877(1.399~1.408.449.483) | 0.050 |
| TP(g/L) | 0.084 | 0.115 | 0.472 | 1.088(0.864~1.368) | 0.006 |
| CRP(mg/L) | -0.035 | 0.029 | 0.228 | 0.966(0.913~1.022) | 0.018 |
| PLT($\times 10^9 L^{-1}$) | -0.005 | 0.011 | 0.662 | 0.995(0.974~1.016) | 0.002 |
| HGB($\times 10^9 L^{-1}$) | 0.003 | 0.041 | 0.946 | 1.003(0.924~1.089) | <0.001 |
| WBC($\times 10^9 L^{-1}$) | -0.322 | 0.360 | 0.374 | 0.725(0.354~1.483) | 0.010 |
| LY($\times 10^9 L^{-1}$) | -1.230 | 1.071 | 0.254 | 0.292(0.035~2.462) | 0.016 |
| MO($\times 10^9 L^{-1}$) | -6.254 | 3.478 | 0.076 | 0.002(0~1.943) | 0.037 |
| NE($\times 10^9 L^{-1}$) | -0.103 | 0.366 | 0.778 | 0.902(0.436~1.866) | 0.001 |
| NLR | 0.055 | 0.205 | 0.789 | 1.057(0.703~1.590) | 0.001 |
| LMR | 0.622 | 0.386 | 0.110 | 1.863(0.865~4.011) | 0.030 |
| PLR | -0.001 | 0.006 | 0.874 | 0.999(0.987~1.011) | <0.001 |

3.6 多元线性回归分析利妥昔单抗血药浓度的影响因素

根据“3.4”“3.5”项下结果,对单因素回归分析中差异有统计学意义的指标进一步进行多元线性回归分析,最终得到以肿瘤分期和 *MS4A1* rs10501385 基因多态性建立的利妥昔单抗血药浓度预测方程: $c_{trough} = 26.800 - 3.502 \times$ 肿瘤分期赋值 $- 3.217 \times$ rs10501385 位点赋值(肿瘤分期 III 或 IV 期赋值为 1, I 或 II 期则赋值为 0; rs10501385 位点基因型为 CC 赋值为 1, AA 或 AC 则赋值为 0),结果见表6。由 R^2 值可知,该回归模型能解释 7.3% 的利妥昔单抗血药浓度个体差异。其中,rs10501385 CC 型的偏回归系数为 -3.217 ,提示在其他因素不变的

情况下,与携带 rs10501385 AA+AC 基因型患者比较,携带 rs10501385 CC 基因型患者的 c_{trough} 下降了 3.217 $\mu g/mL$ (95%CI 为 $-6.377 \sim -0.058$)。

表6 利妥昔单抗 c_{trough} 影响因素的多元线性回归分析结果

| 变量 | 未标准化系数 | | 标准化系数 | | t | P | Exp(B)(95%CI) | | R ² | Durbin-Watson |
|------------------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|---------------|-------|----------------|---------------|
| | B | SE | (β) | | | | 下限 | 上限 | | |
| rs10501385 CC | -3.217 | 1.594 | -0.187 | -2.019 | 0.046 | -6.377 | -0.058 | | | |
| rs10501385 AA+AC | 0 | | 0 | | | | | | | |
| 肿瘤分期 III 或 IV 期 | -3.502 | 1.741 | -0.187 | -2.012 | 0.047 | -6.953 | -0.051 | 0.073 | 1.882 | |
| 肿瘤分期 I 或 II 期 | 0 | | 0 | | | | | | | |
| 常量 | 26.800 | 2.185 | | 12.264 | <0.001 | 22.468 | 31.131 | | | |

3.7 *MS4A1* 基因多态性与非霍奇金淋巴瘤患者预后的相关性分析

截至随访日期,160 例患者的中位 PFS 为 66.82 个月,中位 OS 为 69.42 个月。携带 rs1051461 CT+TT 基因型患者的中位 PFS 为 67.37 个月,CC 基因型患者的中位 PFS 为 47.53 个月,Log-rank 检验显示二者差异有统计学意义($\chi^2 = 4.520, P < 0.05$)。携带 rs1051461 CT+TT 基因型患者的中位 OS 为 70.55 个月,CC 基因型患者的中位 OS 为 65.83 个月,Log-rank 检验显示二者差异有统计学意义($\chi^2 = 4.321, P < 0.05$)。位于 *MS4A1* 的其他 3 个 SNP,即 rs17155034、rs4939364 和 rs10501385 均未被发现与非霍奇金淋巴瘤患者预后具有显著相关性($P > 0.05$)。结果见图1、表7。

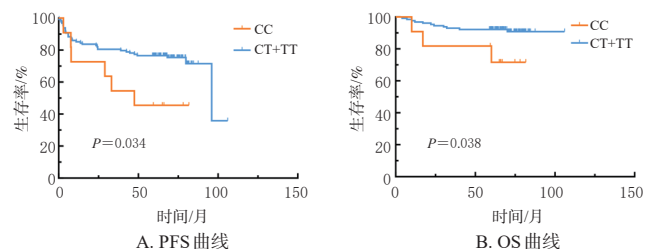


图1 非霍奇金淋巴瘤患者 *MS4A1* rs1051461 不同基因型患者的生存曲线

表7 *MS4A1* 基因多态性与非霍奇金淋巴瘤患者 PFS、OS 的相关性分析结果

| SNP | 基因型 | PFS/月 | | OS/月 | |
|------------|-------|---------------------------------------|-------|---------------------------------------|-------|
| | | M(P ₂₅ , P ₇₅) | P | M(P ₂₅ , P ₇₅) | P |
| rs17155034 | AA+AT | 71.87(60.48, 80.43) | 0.245 | 71.87(60.48, 80.43) | 0.820 |
| | TT | 66.10(49.30, 75.87) | | 68.53(62.97, 77.17) | |
| rs4939364 | AA | 64.75(43.79, 72.06) | 0.437 | 70.80(61.40, 77.23) | 0.735 |
| | AG | 67.23(59.53, 74.60) | | 67.97(61.77, 75.07) | |
| | GG | 67.55(41.75, 77.47) | | 71.58(63.72, 77.60) | |
| rs1051461 | CC | 47.53(18.44, 65.54) | 0.034 | 65.83(59.68, 70.92) | 0.038 |
| | CT+TT | 67.37(59.40, 77.04) | | 70.55(63.34, 77.51) | |
| rs10501385 | AA | 63.47(47.53, 71.43) | 0.617 | 66.60(60.67, 74.23) | 0.560 |
| | AC | 69.36(33.34, 77.88) | | 72.24(65.00, 78.64) | |
| | CC | 65.52(25.74, 69.68) | | 68.77(62.24, 71.88) | |

因肿瘤分期是已知的疗效影响因素,故本研究将 *MS4A1* 基因型、肿瘤分期作为因变量,将 PFS 和 OS 分别

作为自变量,进行单因素Cox回归模型分析,然后将分析结果中差异有统计学意义的指标作为自变量,进一步进行多因素Cox回归模型分析,以评估影响患者预后的因素。结果发现,MS4A1 rs1051461 CC基因型(HR=4.406,95%CI为1.743~11.137, $P<0.05$)和肿瘤分期Ⅲ或Ⅳ期(HR=3.233,95%CI为1.413~7.399, $P<0.05$)是影响患者PFS的独立危险因素(表8),但两因素对患者OS无显著影响(具体数据略)。

表8 MS4A1基因型和肿瘤分期对非霍奇金淋巴瘤患者预后的Cox回归分析结果

| Cox回归分类 | 变量 | PFS | | |
|-----------------|------------------|--------------|-------------|--------------|
| | | HR | 95%CI | P |
| 单因素 | rs17155034 TT | 1.360 | 0.803~2.303 | 0.253 |
| | rs17155034 AA+AT | 1 | 1 | |
| | rs4939364 AG | 0.610 | 0.255~1.456 | 0.256 |
| | rs4939364 GG | 0.878 | 0.392~1.966 | 0.752 |
| | rs4939364 AA | 1 | 1 | |
| | rs1051461 CC | 2.494 | 1.041~5.978 | 0.040 |
| | rs1051461 CT+TT | 1 | 1 | |
| | rs10501385 AC | 0.903 | 0.444~1.838 | 0.779 |
| | rs10501385 CC | 1.579 | 0.539~4.625 | 0.405 |
| | rs10501385 AA | 1 | 1 | |
| | 肿瘤分期Ⅲ或Ⅳ期 | 2.787 | 1.472~5.276 | 0.002 |
| | 肿瘤分期Ⅰ或Ⅱ期 | 1 | 1 | |
| | 多因素 | rs1051461 CC | 4.406 | 1.743~11.137 |
| rs1051461 CT+TT | | 1 | 1 | |
| 肿瘤分期Ⅲ或Ⅳ期 | | 3.233 | 1.413~7.399 | 0.005 |
| 肿瘤分期Ⅰ或Ⅱ期 | | 1 | 1 | |

4 讨论

4.1 MS4A1基因多态性与利妥昔单抗血药浓度的相关性

本研究首先分析了非霍奇金淋巴瘤患者MS4A1基因多态性对利妥昔单抗血药浓度的影响。CD20作为靶点介导了利妥昔单抗的体内代谢消除过程,即利妥昔单抗通过自身的Fab段与B淋巴细胞膜表面的CD20抗原结合,被内吞至细胞内,然后被转运至溶酶体内,最终被降解成肽片段和氨基酸^[13]。本研究结果发现,MS4A1 rs10501385突变与利妥昔单抗的 c_{trough} 显著相关,rs10501385 CC基因型的 c_{trough} 为15.20 $\mu\text{g/mL}$,显著低于AA+AC型的21.95 $\mu\text{g/mL}$ 。单因素分析结果显示,MS4A1 rs10501385基因多态性能解释3.8%的利妥昔单抗血药浓度个体差异;以患者肿瘤分期和MS4A1 rs10501385基因多态性建立的利妥昔单抗血药浓度多元线性回归模型能解释7.3%的个体差异。综上,MS4A1 rs10501385基因多态性是影响利妥昔单抗血药浓度的重要因素。本研究随后通过在线网站3DSNP v2.0(<https://omic.tech/3dSNPv2/>)、HaploReg v4.2(<https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>)

以及RegulomeDB v2.2(<https://www.regulomedb.org/regulome-search/>)进一步分析了该位点的功能,结果显示,rs10501385可结合转录因子POLR2A,其突变可能对Bcl6b、STAT的基因组结合基序产生影响,这提示该位点可能通过影响转录因子与靶基因的结合能力,调控MS4A1基因表达,最终影响了利妥昔单抗的血药浓度。

近年来,不断有国外研究报道,较高的利妥昔单抗血药浓度是治疗非霍奇金淋巴瘤成功的关键因素之一^[7-8]。一项在美国慢性淋巴细胞白血病患者中进行的利妥昔单抗群体药动力学研究结果显示,治疗响应组患者在每个疗程中的利妥昔单抗 c_{trough} 均高于非响应组,且在第3、6个疗程与非响应组比较的差异有统计学意义^[14]。另一项惰性复发/难治性B细胞性非霍奇金淋巴瘤研究结果显示,长期维持利妥昔单抗 $c_{trough}>25 \mu\text{g/mL}$ 才能保证疗效^[6]。在与我国汉族人群相对接近的日本人群中,一项侵袭性B细胞淋巴瘤研究检测了治疗响应组7例、非响应组5例患者的血药浓度,发现治疗响应组患者的 c_{trough} 为(59.7±11.4) $\mu\text{g/mL}$,显著高于非响应组的(43.0±6.4) $\mu\text{g/mL}$ ($P=0.021$)^[15]。以上研究提示,利妥昔单抗必须在体内达到一定浓度才能发挥疗效。基于本研究结果,推荐MS4A1 rs10501385基因多态性作为利妥昔单抗个体化给药剂量设计的参考依据之一。

4.2 MS4A1基因多态性与利妥昔单抗疗效的相关性

本研究进一步评估了非霍奇金淋巴瘤患者MS4A1基因多态性对利妥昔单抗疗效的影响,发现MS4A1 rs1051461突变与非霍奇金淋巴瘤的预后相关。携带rs1051461 CT+TT基因型患者的中位PFS为67.37个月,显著长于携带CC基因型患者的47.53个月;同样,rs1051461 CT+TT基因型患者的中位OS为70.55个月,显著长于携带CC基因型患者的65.83个月。本研究还通过Cox回归模型分析得出MS4A1 rs1051461 CC基因型(HR=4.406,95%CI为1.743~11.137, $P<0.05$)和肿瘤分期Ⅲ或Ⅳ期(HR=3.233,95%CI为1.413~7.399, $P<0.05$)是影响患者PFS的独立危险因素。随后,本研究通过在线网站3DSNP v2.0、HaploReg v4.2和RegulomeDB v2.2进一步分析该位点的功能,可知rs1051461的功能注释为3'-UTR突变,有结合转录因子CTCF的实验证据,提示该位点可能通过影响转录因子与靶基因的结合能力,调控MS4A1基因表达;同时,由于rs1051461位于3'-UTR端,因此其也可能通过多腺苷酸化状态、翻译、降解等影响CD20 mRNA的表达^[16](但其具体机制仍需进一步研究),从而影响利妥昔单抗的预后。

4.3 本研究的局限性

本研究存在如下不足:一是纳入样本量较为有限,在某些基因突变频率低的亚组存在患者例数少的情况,且为探索性研究,在初步分析阶段未进行多重比较校正,未来需要在更大规模的样本中验证这些发现。二是关于利妥昔单抗血药浓度的分析,因单抗类药物的体内消除还受非特异性胞饮作用、Fc γ 受体等因素的影响,故需要在未来的研究中继续探索更多导致其血药浓度个体差异的因素。

综上,本研究探究了非霍奇金淋巴瘤患者*MS4A1*基因多态性与利妥昔单抗血药浓度及疗效的相关性,发现*MS4A1* rs10501385 CC基因型携带者的利妥昔单抗血药浓度较低,推荐将该位点作为个体化给药剂量设计的参考依据;同时,本研究还发现*MS4A1* rs1051461 CC基因型携带者的中位PFS和OS均较短,且*MS4A1* rs1051461 CC基因型和肿瘤分期为III或IV期是影响患者PFS的独立危险因素,故建议加强上述几类人群治疗过程中的疗效监测并提高随访频率。

参考文献

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3):229-263.

[2] PAVLASOVA G, MRAZ M. The regulation and function of CD20: an “Enigma” of B-cell biology and targeted therapy[J]. *Haematologica*, 2020, 105(6):1494-1506.

[3] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会(CSCO)淋巴瘤诊疗指南2024[M]. 北京:人民卫生出版社, 2024;23-219.

[4] CHOI C H, PARK Y H, LIM J H, et al. Prognostic implication of semi-quantitative immunohistochemical assessment of CD20 expression in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *J Pathol Transl Med*, 2016, 50(2):96-103.

[5] ZHANG L N, WANG L, FANG C, et al. The significance of single nucleotide polymorphism rs2070770 in CD20 gene in Chinese patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(3):676-681.

[6] BERINSTEIN N L, GRILLO-LÓPEZ A J, WHITE C A, et al. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of re-

current low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Ann Oncol*, 1998, 9(9):995-1001.

[7] LIU S, HUANG H, CHEN R X, et al. Low initial trough concentration of rituximab is associated with unsatisfactory response of first-line R-CHOP treatment in patients with follicular lymphoma with grade 1/2[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(4):641-647.

[8] LIU S, WANG Z, CHEN R X, et al. Rituximab exposure-response in triweekly R-CHOP treatment in DLBCL: a loading dose is recommended to improve clinical outcomes[J]. *Clin Transl Sci*, 2022, 15(3):680-690.

[9] 石远凯, 孙燕, 刘彤华. 中国恶性淋巴瘤诊疗规范:2015年版[J]. *中华肿瘤杂志*, 2015, 37(2):148-158.

[10] JÄGER U, FRIDRIK M, ZEITLINGER M, et al. Rituximab serum concentrations during immuno-chemotherapy of follicular lymphoma correlate with patient gender, bone marrow infiltration and clinical response[J]. *Haematologica*, 2012, 97(9):1431-1438.

[11] GOLAY J, SEMENZATO G, RAMBALDI A, et al. Lessons for the clinic from rituximab pharmacokinetics and pharmacodynamics[J]. *MAbs*, 2013, 5(6):826-837.

[12] TOUT M, CASASNOVAS O, MEIGNAN M, et al. Rituximab exposure is influenced by baseline metabolic tumor volume and predicts outcome of DLBCL patients: a Lymphoma Study Association report[J]. *Blood*, 2017, 129(19):2616-2623.

[13] KAMATH A V. Translational pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies[J]. *Drug Discov Today Technol*, 2016, 21/22:75-83.

[14] LI J, ZHI J G, WENGER M, et al. Population pharmacokinetics of rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia[J]. *J Clin Pharmacol*, 2012, 52(12):1918-1926.

[15] TOBINAI K, IGARASHI T, ITOH K, et al. Japanese multicenter phase II and pharmacokinetic study of rituximab in relapsed or refractory patients with aggressive B-cell lymphoma[J]. *Ann Oncol*, 2004, 15(5):821-830.

[16] CONNE B, STUTZ A, VASSALLI J D. The 3' untranslated region of messenger RNA: a molecular “hotspot” for pathology [J]. *Nat Med*, 2000, 6(6):637-641.

(收稿日期:2025-02-17 修回日期:2025-06-29)

(编辑:胡晓霖)