

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.32.014

PTEN/PI3K/AKT/mTOR 信号通路在结外 NK/T 细胞淋巴瘤中的表达及临床意义*

马涛¹, 邢宏运^{1△}, 卞铁荣², 李晓明¹, 陈燕¹, 黄娟³

(1. 西南医科大学附属医院血液内科, 四川泸州 646000; 2. 西南医科大学中心实验室, 四川泸州 646000; 3. 西南医科大学附属医院病理科, 四川泸州 646000)

[摘要] 目的 探讨 PTEN/PI3K/AKT/mTOR 信号通路在鼻型结外 NK/T 细胞淋巴瘤(ENKTCL-N)中的发病机制。方法 通过免疫组织化学 EnVision 法检测 PTEN、p-AKT、p-4EBP1、p-mTOR 在 51 例 ENKTCL-N 及 20 例反应性增生淋巴结患者中的表达。收集患者临床资料, 回顾性分析其临床特征、疗效及预后, 采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析。结果 PTEN 在 ENKTCL-N 患者中的阳性率低于反应性增生淋巴结患者, p-AKT、p-4EBP1 的阳性率高于反应性增生淋巴结患者, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); p-mTOR 在 ENKTCL-N 患者中的阳性率高于反应性增生淋巴结患者, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。PTEN 阳性患者生存率高于 PTEN 阴性者, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 PTEN/PI3K/AKT/mTOR 信号通路在 ENKTCL-N 中存在异常激活, 可能与其发病机制相关; PTEN 阳性患者预后可能较佳。

[关键词] 淋巴瘤, 结外 NK/T 细胞, 鼻型; mTOR 信号通路; 发病机制; 预后

[中图分类号] R551.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)32-4514-03

Expression and significance of PTEN/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in extranodal NK/T cell lymphoma*

Ma Tao¹, Xing Hongyun^{1△}, Bian Tierong², Li Xiaoming¹, Chen Yan¹, Huang Juan³

(1. Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Center Laboratory of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 3. Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the pathogenesis of PTEN/PI3K/AKT/mTOR signaling pathways in nasal type extranodal NK/T cell lymphoma(ENKTCL-N). **Methods** The expression of PTEN, p-AKT, p-4EBP1 and p-mTOR in 51 patients with ENKTCL-N and 20 patients with reactive proliferative lymph nodes was detected by immunohistochemistry EnVision. The clinical data were collected and the clinical features, curative effect and prognosis were analyzed retrospectively. Survival analysis was performed by Kaplan-Meier method. **Results** The positive rate of PTEN in ENKTCL-N patients was lower than that in patients with reactive hyperplastic lymph nodes, and the positive rates of p-AKT and p-4EBP1 were higher than those in patients with reactive hyperplastic lymph nodes, and the difference was statistically significant($P < 0.05$); The positive rate of p-mTOR in ENKTCL-N patients was higher than that in patients with reactive hyperplastic lymph nodes, but the difference was not statistically significant($P > 0.05$). The survival rate of PTEN-positive patients was higher than that of PTEN-negative patients, and the difference was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** PTEN/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway is abnormally active in ENKTCL-N, which may be related to its pathogenesis; PTEN-positive patients may have better prognosis.

[Key words] lymphoma, extranodal NK-T-cell; nasal type; mTOR signaling pathway; pathogenesis; prognosis

结外 NK/T 细胞淋巴瘤(extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type, ENKTCL-N)的发病率低, 主要累及鼻腔、扁桃体、上颌、皮肤等结外器官, 在欧美国家少见, 而亚洲及拉丁美洲多见, 尤以日本、中国多见^[1]。早期临床表现不典型, 以坏死性病变为主, 具有高度侵袭性, 病程进展快, 生存期短, 预后较差。目前 ENKTCL-N 精确的发病机制尚不完全清楚, 仍需要进一步研究, 对其有效的治疗措施及预后的判断标准也在不断探讨之中。PTEN/PI3K/AKT/mTOR 信号传导通路是一种 Ser/Thr 蛋白激酶, 广泛存在于恶性肿瘤中, 控制着许多肿瘤相关的生物进程, 如细胞生长、生存, 蛋白质翻译, 调控细胞周期及血管生成等, 在胃癌、膀胱癌等多种肿瘤存在该通路的异常活化^[2-3]。在淋巴瘤的研究表明, 其与弥漫大 B 细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤等淋巴瘤的发病密切相关^[4-5]。但其与 ENKTCL-N 的发病关系尚不明确, 本试验拟探讨 PTEN/PI3K/AKT/mTOR 信号通路在 ENKTCL-N 中的发病机制及 PTEN 基因对 ENKTCL-N 预后的影响, 旨在为 ENKTCL-N 的研究

及判断 ENKTCL-N 的预后提供一定实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 收集西南医科大学附属医院病理科 2010 年 6 月至 2015 年 3 月确诊的 51 例 ENKTCL-N 为观察组, 其中男 36 例, 女 15 例; 年龄 21~82 岁, >60 岁者 14 例, ≤60 岁者 37 例, 平均年龄 50.76 岁; 发生于鼻腔者 29 例, 其他部位 22 例; 按照 Ann Arbor 分期, 其中 I 期 8 例, II 期 18 例, III 期 15 例, IV 期 10 例; 无症状(A)者 26 例, 出现无原因的发热超过 38℃, 连续 3 d 以上, 盗汗, 6 个月内无原因的体质量下降 10% 等症状(B)者 25 例; 乳酸脱氢酶(LDH)升高者 21 例(LDH>245 U/L), LDH 正常者 30 例; 根据 IPI 评分将其分为 0~2 分组 26 例, 3~5 分组 25 例。另收集反应性增生淋巴结标本 20 例为对照组。

1.1.2 主要试剂 兔抗人 PTEN 单克隆抗体、兔抗人 p-4EBP1 单克隆抗体、兔抗人 p-AKT 单克隆抗体、兔抗人 p-mTOR

单克隆抗体购自 Bioworld technology, Envision 试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法 PTEN、p-AKT、p-4EBP1、p-mTOR 采用免疫组织化学 EnVision 法,用已知阳性组织作为阳性对照,已知阴性组织作为阴性对照,PBS 代替一抗作为空白对照,免疫组织化学步骤按试剂说明书进行。

1.2.2 结果判断 PTEN 主要表达于细胞质,p-AKT、p-4EBP1、p-mTOR 主要表达于细胞核或细胞质,呈黄色或棕褐色表达,参照 Fromowitz 评分方法综合细胞质染色强度及阳性细胞数量进行半定量分析。染色强度判定:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。每张切片在高倍镜下随机选取 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,阳性细胞百分率判定:<5% 为 0 分,5%~25% 为 1 分,>25%~50% 为 2 分,>50%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分;半定量综合得分:两项结果相加小于 2 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),4~5 分为中度阳性(++),6~7 分为强阳性(+++)。

1.2.3 随访 随访采用电话询问、患者住院病历资料查阅等方式,随访时间为 4 年。

1.3 统计学处理 用 SPSS19.0 统计软件统计分析数据,计数资料采用率表示,比较采用 χ^2 检验,采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PTEN、p-AKT、p-4EBP1、p-mTOR 在观察组及对照组中的免疫组织化学检测 PTEN、p-AKT、p-4EBP1、p-mTOR 的表达主要集中在细胞核或细胞质,呈棕黄色或棕褐色细颗粒状,在 ENKTCL-N 中着色比较均匀,而在反应性增生淋巴结中着色分散。p-AKT 在 ENKTCL-N 及反应性增生淋巴结中的阳性率分别为 82.35% 及 25.00%,差异有统计学意义($\chi^2=21.11, P<0.05$);p-4EBP1 在 ENKTCL-N 及反应性增生淋巴结中的阳性率分别为 84.31% 及 35.00%,差异有统计学意义($\chi^2=16.77, P<0.05$);p-mTOR 在及反应性增生淋巴结中的阳性率分别为 60.78% 及 40.00%,差异无统计学意义($\chi^2=2.5, P>0.05$),PTEN 在 ENKTCL-N 及反应性增生淋巴结中阳性率分别为 39.21% 及 85.00%,差异有统计学意义($\chi^2=12.06, P<0.05$),见表 1、图 1~4。

表 1 两组患者中 PTEN、p-AKT、p-4EBP1 及 p-mTOR 的表达情况							
项目	n	-	+	++	+++	阳性率(%)	χ^2 P
p-AKT							21.11 <0.05
观察组	51	9	18	15	9	82.35	
对照组	20	15	4	1	0	25.00	
p-4EBP1							16.77 <0.05
观察组	51	8	10	21	12	84.31	
对照组	20	13	5	2	0	35.00	
p-mTOR							2.50 >0.05
观察组	51	20	6	11	14	60.78	
对照组	20	12	3	5	0	40.00	
PTEN							12.06 <0.05
观察组	51	31	11	7	2	39.21	
对照组	20	3	7	6	4	85.00	

2.2 观察组中 PTEN 的表达及与临床参数关系 PTEN 的表达主要集中在细胞质,呈棕黄色或棕褐色细颗粒状,在 ENKTCL-N 中散在分布,在反应性增生淋巴结中分布均匀,见图 5。PTEN 在 ENKTCL-N 中的表达率为 39.21%。PTEN 的表达率与患者年龄、性别、分组、体能评分、结外侵犯个数、LDH

及发病部位之间的差异无统计学意义($P>0.05$);在 I+II 期组与 III+IV 期组 PTEN 阳性率差异有统计学意义($\chi^2=7.60, P<0.05$),在 IPI 评分为 0~2 分组与 3~5 分组之间 PTEN 阳性率差异有统计学意义($\chi^2=4.76, P<0.05$),见表 2。

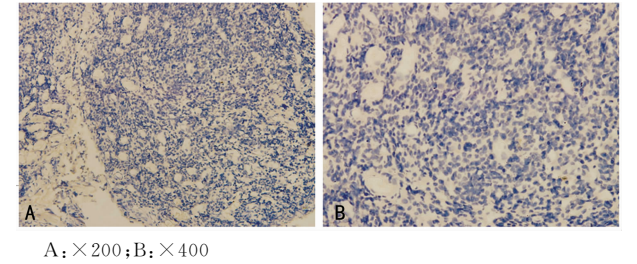


图 1 阴性对照的免疫组织化学表达

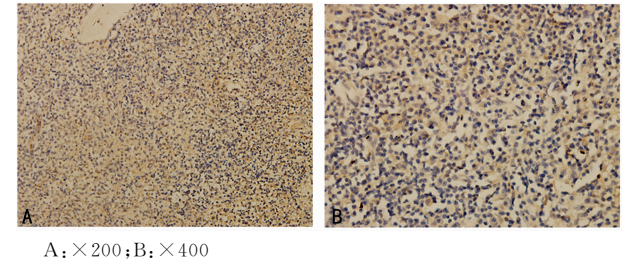


图 2 p-AKT 在 ENKTCL-N 中的免疫组织化学表达

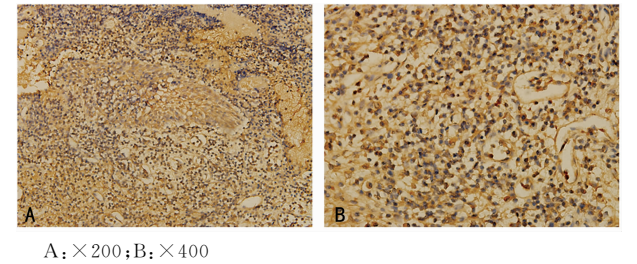


图 3 p-4EBP1 在 ENKTCL-N 中的免疫组织化学表达

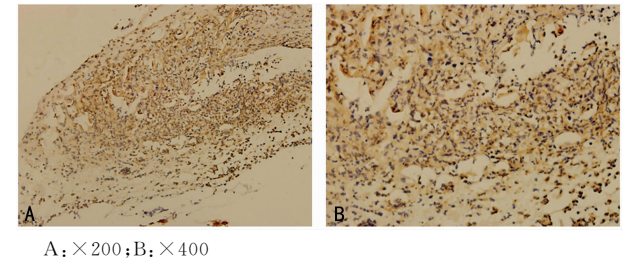


图 4 p-mTOR 在 ENKTCL-N 中的免疫组织化学表达

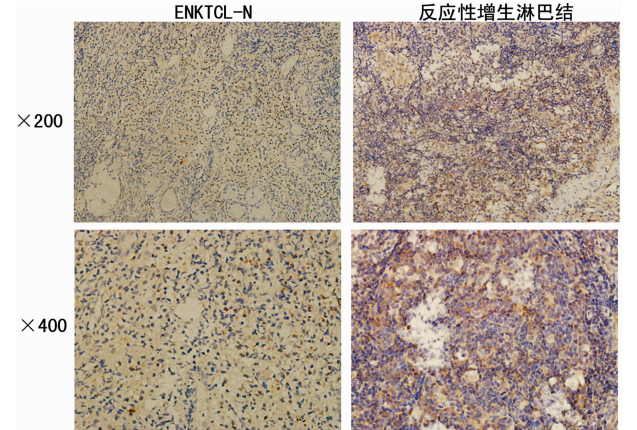


图 5 PTEN 的免疫组织化学表达

2.3 PTEN 阳性者与 PTEN 阴性者生存情况 使用 Kaplan-

Meier 法做生存曲线(图 6),PTEN 阴性及 PTEN 阳性 ENK-TCL-N 患者 1 年生存率分别为 70.8%、87.8%,2 年生存率分别为 47.5%、80.2%。PTEN 阴性患者生存率较 PTEN 阳性患者低,PTEN 阴性患者组中位生存时间为 23 个月,95%CI 为 17~28 个月;PTEN 阳性患者组中位生存时间为 31 个月,95%CI 为 28~34 个月。PTEN 阴性患者与 PTEN 阳性患者的生存时间行 Log-Rank 检验,差异有统计学意义($\chi^2=4.204$, $P<0.05$)。

表 2 PTEN 与 ENKTCL-N 临床特征的关系							
项目	n	-	+	++	+++	阳性率(%)	χ^2 P
性别							1.78 >0.05
男	36	24	6	5	1	33.33	
女	15	7	5	2	1	53.33	
年龄(岁)							2.56 >0.05
>60	14	11	1	2	0	21.43	
≤60	37	20	10	5	2	45.95	
症状							0.21 >0.05
A	26	15	8	3	0	42.31	
B	25	16	3	4	2	36.00	
分期							7.60 <0.05
I+II	26	11	9	5	1	57.69	
III+IV	25	20	2	2	1	20.00	
LDH							3.55 >0.05
正常	30	17	8	6	1	50.00	
升高	21	14	3	1	1	23.81	
体能评分(分)							0.89 >0.05
<2	29	16	7	5	1	44.83	
≥2	22	15	4	2	1	31.82	
结外侵犯(个)							0.66 >0.05
<2	27	15	7	4	1	44.44	
≥2	24	14	4	3	1	33.33	
部位							1.89 >0.05
腔内	29	20	5	4	0	31.03	
腔外	22	11	6	3	2	50.00	
IPI 评分(分)							4.76 <0.05
0~2	26	12	8	5	1	53.85	
3~5	25	19	3	2	1	24.00	

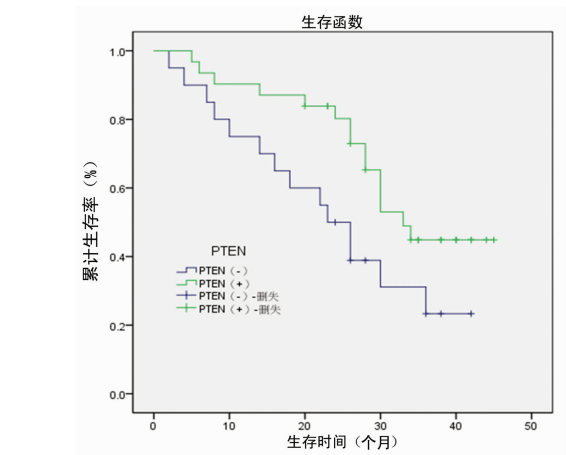


图 6 ENKTCL-N 中 PTEN 阳性与 PTEN 阴性患者生存曲线

3 讨 论

PI3K/Akt/mTOR 信号传导通路广泛存在于细胞中,其调控着细胞周期进程蛋白质的翻译,在细胞生长、增殖、调控细胞周期进程及血管生成等多方面发挥重要作用。PTEN 定位于

10 号染色体 q23.3,是至今发现的第 1 个具有脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶双重活性的抑癌基因,是 PI3K/AKT 途径的负向调控因子[6]。PTEN 可抑制 mTOR 信号通路,而 mTOR 信号通路下游效应分子 P70S6K 及 4EBP-1 启动后可促进蛋白质翻译。PTEN 的主要生物学功能为抑制细胞迁移及局部的黏附、抑制细胞的增殖生长及诱导细胞凋亡,PTEN 表达水平的降低、缺失及突变均可影响其功能[7-8]。

Xu 等[4]对 73 例弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)进行研究,发现在 DLBCL 中可能存在 PI3K/AKT/mTOR 信号通路活化,p-AKT 占 54.8%,p-p70S6K 占 46.6%,p-4E-BP1 占 45.2%,存在 mTOR 信号通路激活的 DLBCL 患者病情进展快,疗效差。p-AKT 在外周 T 细胞淋巴瘤中高表达,达 49%,且提示着预后较差[9]。Witzig 等[10]在 II 期临床试验中利用 mTOR 信号通路抑制剂治疗 35 例套细胞淋巴瘤(MCL),使用替西罗莫司每周 250 mg,完全缓解率(CR)为 3%,部分缓解率(PR)为 35%,联合利妥昔单抗治疗缓解率达 59%。Coiffier[11]在 III 期临床试验中使用替西罗莫司每周 175 mg,共 3 周治疗 MCL,OR 为 22%、CR 为 2%、PR 为 20%。以上研究均证实 mTOR 信号通路在淋巴瘤中存在活化。

本研究采用免疫组织化学法检测 PTEN、p-AKT、p-4EBP1、p-mTOR 在 ENKTCL-N 及反应性增生淋巴结组织中的表达。结果显示:与对照组相比,ENKTCL-N 患者 p-AKT、p-4EBP1 的表达率在观察组中明显增高,PTEN 的表达率在观察组中则明显降低,差异有统计学意义;p-mTOR 的表达率观察组的阳性率明显高于对照组,但差异无统计学意义($\chi^2=2.5$, $P>0.05$),考虑可能与样本数量及实验室误差相关;综上所述,提示 mTOR 信号通路在 ENKTCL-N 中可能存在异常活化。

对患者临床资料及 PTEN 基因表达进行分析,发现 PTEN 的表达与患者年龄、性别、发生部位、临床分期、LDH 水平无相关性,而 PTEN 阳性多为 Ann Arbor 分期 I+II 期及 IPI 评分为 0~2 分患者,与 PTEN 阴性患者相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。生存分析显示 PTEN 阳性患者生存率较 PTEN 阴性患者明显延长,差异有统计学意义($P<0.05$),提示 PTEN 阳性患者预后较佳。

高金莉等[12]采用相同研究方法,发现 PTEN 在 ENK-TCL-N 中的阳性率为 32%,在反应性增生淋巴结组织中的阳性率为 86.7%,差异有统计学意义,与本研究的结论基本一致。但其统计患者临床资料发现 PTEN 的表达与患者年龄、性别、发生部位、临床分期、LDH 水平均无相关性($P>0.05$)[12],与本文的结果不完全一致,考虑因为:PTEN 的免疫组化检测是客观指标,但患者一般资料与实验人员所选取的观察组例数有密切关系,若进行更大的实验统计可能会得出更为准确的结果。

综上所述,本研究显示 PTEN/PI3K/AKT/mTOR 信号通路在 ENKTCL-N 中存在异常激活,可能与其发病相关,可为靶向治疗结外 NK/T 细胞淋巴瘤提供新的靶点;PTEN 阳性患者预后较佳,生存时间较长,PTEN 阳性可能为 ENKTCL-N 预后良好因素。

参考文献

[1] Suzuki R. NK/T-Cell Lymphomas: pathobiology, prognosis and treatment paradigm[J]. Curr Oncol Rep, 2012, 14 (5): 395-402.
[2] Ching CB, Hansel DE. Expanding therapeutic targets in bladder cancer: the PI3K/Akt/mTOR (下转第 4519 页)

短,介入耗材节省,造影剂用量减少,从而降低了患者的医疗费用支出,降低患者的就医成本。(3)拘禁球囊技术对预后的影响:采取拘禁球囊技术保护边支血管,减少边支血管狭窄加重程度和边支闭塞的发生率,从而保护缺血心肌,降低了围术期心绞痛、心肌梗死的发生率,从而改善即刻预后。这一发现与 Depta 等^[10]及盖鲁粤等^[11]研究一致:拘禁球囊技术能很大程度减少边支的丢失率,并且明显降低心脏不良事件的发生率。Singh 等^[12]研究表明,拘禁球囊技术不仅可以改善冠脉分叉病变的即刻预后,还可以改善其长期预后。由于本研究仅仅围绕围术期进行,尚未完善长期随访,因此拘禁球囊技术对于长期预后的影响,尤其对于远期心脏不良事件的发生率的改善还有待观察。

目前对冠状动脉分叉病变主张采取简单处理的原则,尤其建议单支架治疗,由此导致边支血管狭窄加重甚至闭塞,所以对于边支血管的保护就显得尤为重要。而拘禁球囊技术作为处理冠脉分叉病变的新技术,采取单支架植入主支血管,球囊保护分支,既做到了简单处理病变,又保护了边支血管。由于本研究入选病例数较少,随访时间不够长,对于远期心血管不良时间的发生率缺乏充足证据,但是短期随访发现安全有效,可以减少心脏不良事件的发生。因此,拘禁球囊技术安全有效,是一项可以临床推广应用的处

参考文献

[1] Lassen JF, Holm NR, Stankovic G, et al. Percutaneous coronary intervention for coronary bifurcation disease: consensus from the first 10 years of the European Bifurcation Club meetings[J]. Euro Interv, 2014, 10(5): 545-560.

[2] Hahn JY, Chun WJ, Kim JH, et al. Predictors and outcomes of side branch occlusion after main vessel stenting in coronary bifurcation lesions results from the COBIS II registry(Coronary Bifurcation Stenting)[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(18): 1654-1659.

[3] 罗建方,何鹏程,杨峻青,等.拘禁闭陷球囊技术在冠状动

脉分叉病变介入治疗中的应用[J]. 岭南心血管病杂志, 2014, 20(5): 687-690.

[4] 胡学俊,高文俊,刘文洁,等.冠脉分叉病变的介入治疗现状[J]. 中华全科医学, 2009, 7(6): 641-643.

[5] Lucisano L, Calcagno S, Pennacchi M, et al. Results of the self-expandable BA9 stent for treatment of large angle coronary bifurcation[J]. Minerva Cardioangiol, 2014, 62(1): 19-27.

[6] Sukhija R, Mehta JL, Sachdeva R. Present status of coronary bifurcation stenting[J]. Clin Cardiol, 2008(31): 63-66.

[7] Aminian A, Dolatabadi D, Lalmand J. Small balloon inflation over a jailed wire as a bailout technique in a case of abrupt side branch occlusion during provisional stenting[J]. J Invasive Cardiol, 2010(22): 449-452.

[8] 王满庆,马振晶,吉巧莲,等.21例真性分叉病变患者边支球囊保护技术的疗效和安全性[J]. 临床荟萃, 2014, 29(7): 786-788.

[9] 张雨虹,贺铿,袁国军.拘禁球囊技术在冠心病介入治疗分叉病变分支保护中的即刻及近期临床疗效观察[J]. 江西医药, 2014, 49(12): 1377-1381.

[10] Depta JP, Patel Y, Patel JS, et al. Long-term clinical outcomes with the use of a modified provisional jailed-balloon stenting technique for the treatment of nonleft main coronary bifurcation lesions[J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2013, 82(5): 637-646.

[11] 盖鲁粤,金琴花.预留微球囊保护重要对角支[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2013, 21(1): 59-60.

[12] Singh J, Patel Y, Depta JP, et al. A modified provisional stenting approach to coronary bifurcation lesions: clinical application of the "jailed-balloon technique"[J]. J Interv Cardiol, 2012(25): 289-296.

(收稿日期:2017-04-22 修回日期:2017-06-21)

(上接第 4516 页)

pathway[J]. Lab Invest, 2010, 90(10): 1406-1414.

[3] Houede N, Pourquier P. Targeting the genetic alterations of the PI3K-AKT-mTOR pathway: its potential use in the treatment of bladder cancers[J]. Pharmacol Ther, 2015, 145(33): 1-18.

[4] Xu ZZ, Xia ZG, Wang AH, et al. Activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway in diffuse large B cell lymphoma: clinical significance and inhibitory effect of rituximab[J]. Ann Hematol, 2013, 92(10): 1351-1358.

[5] Go H, Jang JY, Kim PJ, et al. MicroRNA-21 plays an oncogenic role by targeting FOXO1 and activating the PI3K/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Oncotarget, 2015, 6(17): 15035-15049.

[6] Wang X, Huang H, Young KH. The PTEN tumor suppressor gene and its role in lymphoma pathogenesis[J]. Aging(Albany NY), 2015, 7(12): 1032-1049.

[7] Ciuffreda L, Falcone I, Incani UC, et al. PTEN expression and function in adult cancer stem cells and prospects for therapeutic targeting[J]. Adv Biol Regul, 2014(56): 66-

80.

[8] Blind RD. Disentangling biological signaling networks by dynamic coupling of signaling lipids to modifying enzymes[J]. Adv Biol Regul, 2014, 54(1): 25-38.

[9] Cai Q, Deng H, Xie D, et al. Phosphorylated AKT protein is overexpressed in human peripheral T- cell lymphomas and predicts decreased patient survival[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2012, 12(2): 106-112.

[10] Witzig TE, Geyer SM, Ghobrial I, et al. Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(23): 5347-5356.

[11] Coiffier B. Clinical efficacy and management of temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2013, 13(4): 351-359.

[12] 高金莉,张明智. PTEN 在结外鼻型 NK/T 细胞淋巴瘤中的表达及意义[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(21): 9471-9474.

(收稿日期:2017-04-26 修回日期:2017-06-19)