

Syk、PI3K、Akt 在外周 T 细胞淋巴瘤中的表达及其意义

代 群^{1,2}, 詹鹤琴^{1,2}, 曹立宇^{1,2}, 陈 聪^{1,2}, 陈顺华^{1,2}

摘要 目的 探讨脾酪氨酸激酶(Syk)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt) 在外周 T 细胞淋巴瘤(PTCL)组织中的表达及意义。方法 应用免疫组织化学法检测 84 例 PTCL 组织及 30 例反应性淋巴组织增生(RLH)中的表达。结果 Syk、PI3K、Akt 在 84 例 PTCL 组织中阳性表达率分别是 73.81%、41.67% 和 36.90%, 在 30 例 RLH 中的阳性表达率是 13.33%、33.33% 和 23.33%, Syk 蛋白在 PTCL 中的表达明显高于 RLH ($P < 0.05$), PI3K 与 Akt 蛋白在 PTCL 及 RLH 中的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Syk 表达与血清乳酸脱氢酶(LDH)水平、临床分期相关 ($P < 0.05$), 与患者性别、年龄、肿块大小、B 症状、一般状况(PS)评分和国际预后指数(IPI)评分无关 ($P > 0.05$); PI3K 及 Akt 表达与患者性别、年龄、肿块大小、B 症状、PS 评分、临床分期、LDH 水平和 IPI 指数均无关 ($P > 0.05$)。Syk 与 PI3K 在 PTCL 中的表达有相关性 ($r = 0.229, P < 0.05$)。结论 Syk 在 PTCL 的发生发展中具有重要作用, 可能与 PI3K 信号通路有关, 与 Akt 的表达无直接关系。

关键词 外周 T 细胞淋巴瘤; Syk; PI3K; Akt; 免疫组织化学中图分类号 R 733.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)08-1141-05

外周 T 细胞淋巴瘤(peripheral T-cell lymphoma, PTCL)来源于成熟 T 细胞或胸腺后 T 细胞及自然杀伤(natural killer, NK)细胞, 其生物学行为及临床表现具有明显异质性, 是最具侵袭性的非霍奇金淋巴瘤, 其发病机制尚未明确, 现无标准的治疗方案, 治疗反应差, 易复发。探讨新的基因功能改变与 PTCL 发生、发展的关系, 有助于研究其发病机制, 为治疗及预后判断提供理论依据。脾酪氨酸激酶(spleen

tyrosine kinase, Syk) 是一种非受体型酪氨酸激酶, 参与许多信号转导途径^[1-2], 能催化底物蛋白酪氨酸残基磷酸化, 控制细胞分化、增殖和扩散, 与人类多种肿瘤密切相关^[3-4]。Syk 在磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 激活的过程中起关键的作用^[5]。蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, Akt) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 与 T 细胞淋巴瘤中的逆转录病毒癌基因 V-Akt 高度同源, 与蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 在结构上相似, 其 PH 结构域可与被激活的 PI3K 结合, 活化的 Akt 由细胞膜释放到细胞质内, 参与细胞的分化、增殖和凋亡等功能^[6]。该实验采用免疫组织化学方法检测 Syk、PI3K、Akt 在 PTCL 组织中的表达, 探讨其在 PTCL 组织中的表达意义及相互关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 收集安徽医科大学第一附属医院病理科 2001 年 1 月~2010 年 12 月诊断及分型均明确的 PTCL 84 例, 其中男 63 例, 女 21 例, 发病年龄在 14~85 岁, 中位年龄为 52 岁。切片均经 2 位以上病理专家重新阅读, 并按照 2008 版《WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues》^[7] 进行组织形态学分型, 其中外周 T 细胞淋巴瘤, 非特指型(peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, PTCL-NOS) 34 例, 血管免疫母细胞性 T 细胞淋巴瘤(angioimmunoblastic T-cell lymphoma, AITL) 21 例, 间变性大细胞淋巴瘤(anaplastic large cell lymphoma, ALCL) 7 例, 结外 NK/T 细胞淋巴瘤, 鼻型(extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type, ENKTL) 22 例。另选 30 例反应性淋巴组织增生(reactive lymphoid hyperplasia, RLH) 作为对照。标本均经 10% 中性福尔马林液固定, 石蜡包埋, 3 μm 连续切片, 分别作 HE 染色和免疫组化染色。

1.1.2 主要试剂 兔抗人 Syk (C-20) 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 兔抗人 PI3K (C73F8) 单克隆抗体及兔抗人 Akt (C67E7) 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司; 免疫组织化学二步法染色试剂盒、EDTA 修复液(1 mmol, pH 8.0) 及柠檬酸修复

2014-03-20 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目(编号:1208085MH175); 安徽医科大学博士科研基金资助项目(编号:XJ201101); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(编号:81202006)

作者单位: ¹安徽医科大学病理学教研室, 合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院病理科, 合肥 230022

作者简介: 代 群, 女, 硕士研究生;

詹鹤琴, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: heqinzh@163.com;

曹立宇, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: caoliyuhf@163.com

液(pH 6.0)购自北京中杉金桥生物技术有限公司; DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。

1.2 实验方法 免疫组织化学染色(EnVision 二步法)按试剂盒说明书操作,用已知阳性切片作阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判定标准 Syk、PI3K、Akt 免疫组化染色表达主要定位于细胞质,部分定位于细胞核,细胞质及细胞核呈棕黄色者为阳性。Syk 按在 10×40 倍镜下肿瘤区域随机选取 10 个视野,计算 1 000 个肿瘤细胞中的阳性细胞数(%),30% 以上的肿瘤细胞出现阳性染色判为阳性^[8]。PI3K、Akt 的结果判读采用半定量方法^[9],①按细胞染色强弱评分:0 分,不着色;1 分,浅黄色;2 分,棕黄色;3 分,棕褐色;②选取 5 个高倍视野(10×40),计数阳性细胞百分比:0 分, $< 25\%$;1 分, $26\% \sim 50\%$;2 分, $51\% \sim 75\%$;3 分, $> 75\%$;按①、②相加判断结果: ≤ 1 为阴性(-), ≥ 2 为阳性(+).

1.4 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计数资料采用 χ^2 检验或校正的 χ^2 检验及 Fisher 精确概率法比较各组间的差异,相关性分析

采用 Pearson 检验,设检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Syk、PI3K、Akt 蛋白在 PTCL 和 RLH 中的表达 Syk、PI3K、Akt 主要着色部位在细胞质,部分可伴有细胞核着色,三者 84 例 PTCL 中的阳性表达率分别是 73.81%、41.67%、36.90%;在 34 例 PTCL-NOS 中的阳性表达率分别是 79.41%、50.00%、38.24%,在 21 例 AITL 中的阳性表达率分别是 71.43%、47.62%、33.33%,在 22 例 ENKTL 中的阳性表达率分别是 63.64%、22.73%、27.27%,在 7 例 ALCL 中的阳性表达率分别是 85.71%、42.86%、71.43%;在 30 例 RLH 中的阳性表达率分别是 13.33%、33.33%、23.33%。Syk 蛋白在 PTCL 及各类型中的表达明显高于 RLH,差异有统计学意义($P < 0.05$),PI3K 蛋白在各类型 PTCL 及 RLH 中表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。Akt 蛋白在 ALCL 中的表达明显高于 RLH($P < 0.05$)。见图 1,表 1。

2.2 PTCL 中 Syk、PI3K、Akt 蛋白表达与临床病

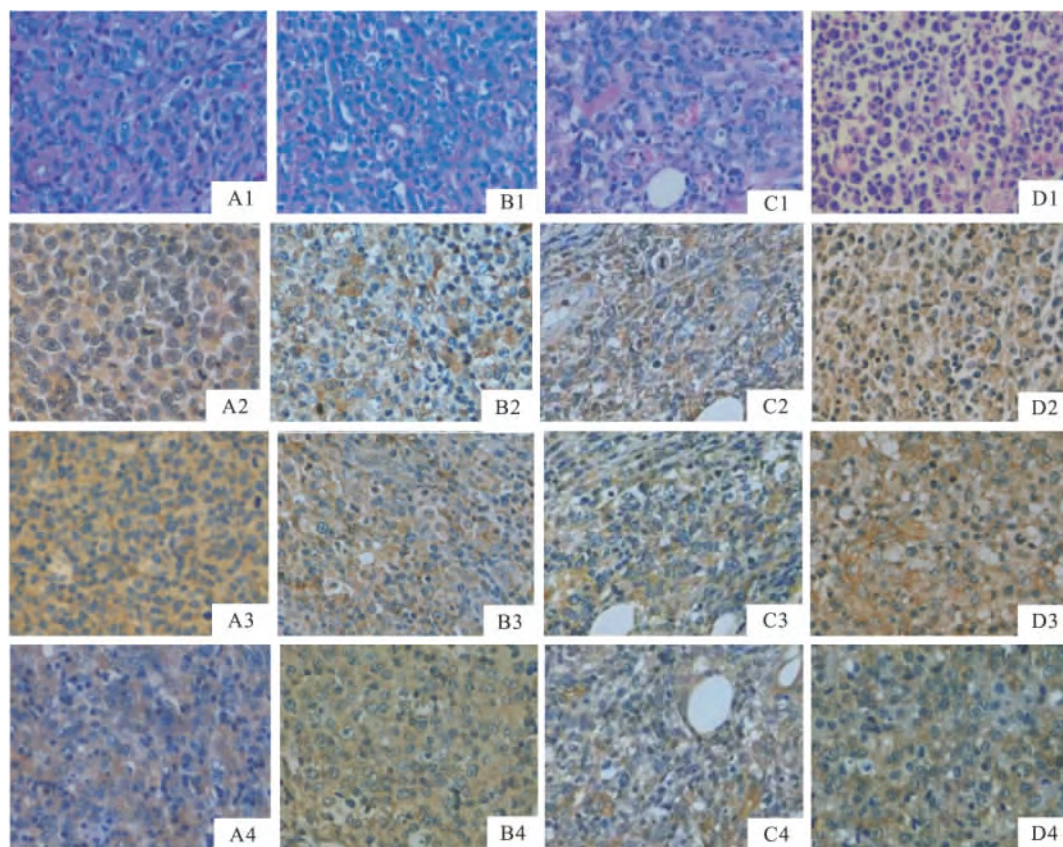


图 1 Syk、PI3k、Akt 在 PTCL 中的表达 $\times 400$

1:HE 染色;2~4:EnVision 染色;2:Syk;3:PI3K;4:Akt;A:PTCL-NOS;B:AITL;C:ENKTL; D:ALCL

表1 Syk、PI3K、Akt 在 PTCL 及 RLH 中的表达

类型	n	Syk			PI3K			Akt		
		+	阳性率 (%)	P 值	+	阳性率 (%)	P 值	+	阳性率 (%)	P 值
PTCL	84	62	73.81	0.000	35	41.67	0.423	31	36.90	0.176
PTCL-NOS	34	27	79.41	0.000	17	50.00	0.178	13	38.24	0.199
AITL	21	15	71.43	0.000	10	47.62	0.304	7	33.33	0.431
ENKTL	22	14	63.64	0.000	5	22.73	0.404	6	27.27	0.746
ALCL	7	6	85.71	0.001	3	42.86	0.678	5	71.43	0.025
RLH	30	4	13.33		10	33.33		7	23.33	

理因素间的关系 Syk 表达与临床分期、血清乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)水平有关($P < 0.05$),与患者性别、年龄、肿块大小、B 症状、一般状况(performance status, PS)评分、国际预后指数(international prognostic index, IPI)评分无关($P > 0.05$);PI3K 和 Akt 表达与临床病理因素均无关($P > 0.05$),见表 2。

表2 PTCL 中 Syk、PI3K、Akt 的表达与临床病理因素之间的关系

项目	n	Syk			PI3K			Akt		
		-	+	P 值	-	+	P 值	-	+	P 值
性别										
男	63	18	45	0.390	38	25	0.523	40	23	0.896
女	21	4	17		11	10		13	8	
年龄(岁)										
<52	40	11	29	0.795	25	15	0.460	22	18	0.143
≥52	44	11	33		24	20		31	13	
肿块大小(cm)										
<7	81	21	60	1.000	46	35	0.371	52	29	0.632
≥7	3	1	2		3	0		1	2	
B 症状*										
无	11	2	9	0.994	5	6	0.596	7	4	1.000
有	46	11	35		25	21		29	17	
Ann Arbor 分期*										
I ~ II	10	5	5	0.019	7	3	0.194	7	3	1.000
III ~ IV	37	4	33		15	22		25	12	
LDH(U/L)*										
<250	11	5	6	0.018	4	7	0.976	4	7	0.052
≥250	35	3	32		15	20		26	9	
PS 评分*										
0 ~ 1	30	7	23	0.380	13	17	0.679	17	13	0.121
≥2	14	1	13		7	7		12	2	
IPI 指数*										
0 ~ 1	12	2	10	1.000	6	6	0.488	6	6	0.274
2 ~ 5	25	5	20		9	16		18	7	

* 有部分相关资料缺失

2.3 PTCL 中 Syk 蛋白的表达与 PI3K、Akt 蛋白表达的相关性 Pearson 检验结果显示, Syk、PI3K 在 PTCL 中的表达有相关关系($r = 0.229, P < 0.05$),见表 3; Syk、Akt 在 PTCL 中的表达未见相关关系($r = -0.049, P > 0.05$),见表 4; PI3K、Akt 在

PTCL 中的表达未见相关关系($r = 0.154, P > 0.05$),见表 5。

表3 PTCL 中 Syk 和 PI3K 蛋白表达之间的关系

Syk	n	PI3K	
		-	+
-	22	17	5
+	62	32	30

表4 PTCL 中 Syk 和 Akt 蛋白表达之间的关系

Syk	n	Akt	
		-	+
-	22	13	9
+	62	40	22

表5 PTCL 中 PI3K 和 Akt 蛋白表达之间的关系

PI3K	n	Akt	
		-	+
-	49	34	15
+	35	19	16

3 讨论

PTCL 是我国常见的淋巴瘤类型之一,恶性程度高,治疗效果不理想,预后较差,其发生、发展是一个涉及多基因和多步骤的复杂过程,其中癌基因的激活和(或)抑癌基因的失活起着关键作用。Syk 最早由日本学者^[14]1991 年从猪脾 cDNA 中克隆出来的,该基因位于人类染色体 9q22,分子量为 72×10^3 ,由 629 个氨基酸组成,含 1 个内含子和 2 个外显子,与猪 Syk 基因具有最大的同源性,93% 的氨基酸序列相同。

Syk 基因在正常的乳腺上皮细胞、消化道上皮细胞、肝细胞等部位广泛表达。近年来一些研究^[2-4]表明, Syk 是控制多种细胞生理功能的关键分子,与肿瘤的生长、转移、复发等有关,在人类肿瘤的发病机制和治疗等方面的研究中起着重要的作用。2000 年 Coopman et al^[5]首次研究发现,在侵袭性的乳腺癌细胞中 Syk 是低表达或不表达的,在正

常乳腺组织和非侵袭性的乳腺癌组织中是高表达的,其表达的缺失与乳腺癌细胞的侵袭性呈负相关。后来的一些研究^[2-4]也显示 Syk 在乳腺癌、胃癌、胰腺癌等的表达是降低或缺失,Syk 在上皮性肿瘤中可能起抑癌基因的作用。研究^[1]显示 Syk 在 B 细胞淋巴瘤中高表达,通过选择性的抑制阻断 Syk 的表达,可以抑制小鼠和人 B 细胞淋巴瘤的生长。Chen et al^[12]研究发现,Syk 抑制剂 R406 可以抑制 B 细胞淋巴瘤细胞株中肿瘤细胞的增殖和凋亡。Fruchon et al^[13]实验得出在滤泡性淋巴瘤中基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 为高表达,Syk 可以通过 PI3K 的介导参与 MMP-9 和 VEGF 的表达,应用 Syk 抑制剂 R788 (fostamatinib) 可以抑制 MMP-9 表达、抗血管的生成,从而对抗肿瘤的侵袭。口服 Syk 抑制剂已经投入了治疗 B 细胞淋巴瘤 I / II 期临床实验,治疗效果显著^[14]。

目前关于 Syk 在 PTCL 中表达的研究较少;Syk、PI3K 及 Akt 在 PTCL 中的表达及与临床病理因素的关系,国内外未见报道。Feldman et al^[8]应用免疫组化、Western blot 和流式细胞术方法发现 Syk 在 PTCL 中呈高表达,阳性率为 93% (133/144),后应用流式细胞仪检测部分 PTCL 病例发现 Syk 表达在肿瘤细胞和反应性增生的 B 细胞中,在外周血、淋巴结和脾反应性增生的 T 细胞中不表达。这与上述上皮性肿瘤中的抑癌作用相反。本研究采用免疫组织化学方法检测 Syk、PI3K、Akt 在 PTCL 组织中的表达,本实验数据显示 Syk 在 84 例 PTCL 组中阳性表达显著高于对照组,提示 Syk 在 PTCL 的发生发展中可能起重要作用,与 Feldman et al^[8]报道结果一致。Syk 在 PTCL 中的表达与临床因素的关系还不清楚,本研究结果显示 Syk 的表达与临床分期及 LDH 水平有关,与患者性别、年龄、肿块大小、B 症状、PS 评分、IPI 指数无关,提示 Syk 可能与 PTCL 的预后有关。近期研究^[15]显示抑制 T 细胞淋巴瘤细胞株中的 Syk 的表达可以诱导细胞的凋亡并阻滞细胞的增殖,推测可能是通过下游的丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK)、PI3K、磷脂酶 C- γ (phospholipase C- γ , PLC- γ) 起作用的。本研究中 PI3K、Akt 在 PTCL 和 RLH 中的表达差异均无统计学意义,Syk 与 PI3K 在 PTCL 中的表达呈正相关,提示 Syk 在 PTCL 的发生发展中可能与 PI3K 的表达有关;Syk 和 PI3K 在 PTCL 中的表

达与 Akt 均无明显相关性,Syk 在 PTCL 中的作用机制还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Turner M, Mee P J, Costello P S, et al. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk [J]. *Nature*, 1995, 378(6554): 298-302.
- [2] Coopman P J, Do M T, Barth M, et al. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells [J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 742-7.
- [3] Zou X P, Zhang B, Zhang X Q, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions [J]. *Hum Pathol*, 2009, 40(11): 1534-42.
- [4] Layton T, Stalens C, Gunderson F, et al. Syk tyrosine kinase acts as a pancreatic adenocarcinoma tumor suppressor by regulating cellular growth and invasion [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(6): 2625-36.
- [5] Moon K D, Post C B, Durden D L, et al. Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(2): 1543-51.
- [6] Vivanco I, Sawyers C L. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(7): 489-501.
- [7] Swerdlow S H, Campo E, Harris N L, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues [M]. Lyon: IARC Press, 2008:269-319.
- [8] Feldman A L, Sun D X, Law M E, et al. Overexpression of Syk tyrosine kinase in peripheral T-cell lymphomas [J]. *Leukemia*, 2008, 22(6): 1139-43.
- [9] 邢传平, 刘斌, 董亮. 免疫组织化学标记结果的判断方法 [J]. *中华病理学杂志*, 2001, 30(4): 318.
- [10] Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, et al. Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(24): 15790-6.
- [11] Gururajan M, Jennings C D, Bondada S. Cutting edge: constitutive B cell receptor signaling is critical for basal growth of B lymphoma [J]. *J Immunol*, 2006, 176(10): 5715-9.
- [12] Chen L, Monti S, Juszczynski P, et al. SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2008, 111(4): 2230-7.
- [13] Fruchon S, Kheirallah S, Al Saati T, et al. Involvement of the Syk-mTOR pathway in follicular lymphoma cell invasion and angiogenesis [J]. *Leukemia*, 2012, 26(4): 795-805.
- [14] Friedberg J W, Sharman J, Sweetenham J, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2010, 115(13): 2578-85.
- [15] Wilcox R A, Sun D X, Novak A, et al. Inhibition of Syk protein tyrosine kinase induces apoptosis and blocks proliferation in T-cell non-Hodgkin's lymphoma cell lines [J]. *Leukemia*, 2010, 24(1): 229-32.

慢性淋巴细胞性甲状腺炎与甲状腺恶性肿瘤的临床相关性

张 懿,邓福生,刘政溶,韦后清,王锡宏,马小鹏,陈 浩

摘要 目的 探讨慢性淋巴细胞性甲状腺炎 (CLT) 与甲状腺恶性肿瘤之间的临床相关性。方法 回顾性分析 647 例进行手术的甲状腺患者,研究 CLT 与甲状腺恶性肿瘤的关系,分析 44 例合并有 CLT 的甲状腺恶性肿瘤患者的临床资料。结果 CLT 患者中甲状腺恶性肿瘤发病率为 40.7%,非 CLT 患者中发病率为 18.7%,两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。甲状腺恶性肿瘤中 CLT 和非 CLT 患者 TNM 分期无明显差异。结论 CLT 合并甲状腺癌的比例较高,当 B 超提示甲状腺肿块有微小钙化、边界不清或颈部淋巴结肿大时,应积极诊治并谨慎评估恶性的可能性。CLT 对甲状腺恶性肿瘤分期无影响。

关键词 甲状腺炎;甲状腺恶性肿瘤;相关性

2014-04-18 接收

基金项目:安徽省卫生厅科研基金资助项目(编号:13ZC007)

作者单位:安徽医科大学附属医院普通外科,合肥 230001

作者简介:张 懿,男,硕士研究生,主治医师;

邓福生,男,主任医师,责任作者,E-mail: dengfusheng2010@163.com

中图分类号 R 581.4;R 736.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)08-1145-03

慢性淋巴细胞性甲状腺炎 (chronic lymphocytic thyroiditis, CLT) 是一种甲状腺自身免疫性疾病,近年来发病率明显增高,且临床上许多甲状腺恶性肿瘤常合并 CLT。Pearce et al^[1] 发现 CLT 与许多甲状腺其他自身免疫性疾病以及甲状腺恶性肿瘤共存,CLT 可增加原发性甲状腺淋巴瘤的发病概率^[2],CLT 是否有转化为其他甲状腺恶性肿瘤的倾向目前尚有争议。该研究将调查 CLT 和甲状腺恶性肿瘤之间的关系,并评估 CLT 对甲状腺恶性肿瘤的影响。

1 材料与方法

1.1 病例资料 回顾性分析 2012 年在安徽医科大学附属医院甲乳外科进行手术的 647 例甲状腺

Expression and relationship of Syk, PI3K and Akt in peripheral T-cell lymphoma

Dai Qun^{1,2}, Zhan Heqin^{1,2}, Cao Liyu^{1,2}, et al

(¹Dept of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Pathology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression of spleen tyrosine kinase (Syk), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (Akt) in patients with peripheral T-cell lymphoma (PTCL) and their clinical significance. **Methods** Immunohistochemical staining for Syk, PI3K and Akt protein was used in 84 PTCL and 30 reactive lymphoid hyperplasia (RLH). **Results** The positive rates of Syk, PI3K and Akt were 73.81%, 41.67%, 36.90% in 84 PTCL, and 13.33%, 33.33%, 2.33% in 30 RLH. The expression of Syk protein in PTCL was significantly higher than that in RLH ($P < 0.05$). The expression of PI3K and Akt had no significant difference in PTCL and RLH ($P > 0.05$). Syk expression was correlated with serum lactic dehydrogenase level (LDH) and clinic stage. PI3K and Akt expression showed no significant correlation with sex, age, bulky disease, B symptom, performance status (PS) score, clinic stage, serum LDH level, and international prognostic index (IPI) score. Syk protein was positively correlated with the expression of PI3K protein in PTCL. **Conclusion** The Syk protein plays an important role in the carcinogenesis of PTCL. It may be associated with PI3K signaling pathway, but not directly related to the expression of Akt.

Key words peripheral T-cell lymphoma; Syk; PI3K; Akt; immunohistochemistry