

# PTEN 和 mTOR 蛋白在 IDH1 基因分型胶质母细胞瘤及 P13K/Akt/mTOR 信号通路中的表达及其相关性<sup>①</sup>

潘斌才,梁颖雯,王春华,黄桂芳,黄嘉裕,徐伟玲,伏慧

(广东同江医院病理科,广东 佛山 528300 E-mail: pbc1980@163.com)

**摘要:**目的 研究 P13K/Akt/mTOR 信号通路中 PTEN 和 mTOR 蛋白在 IDH1 基因分型-突变型与野生型胶质母细胞瘤中的表达及意义。方法 采用免疫组化方法检测胶质母细胞瘤手术后组织标本共 52 例(其中 IDH1 突变型胶质母细胞瘤 10 例, IDH1 野生型胶质母细胞瘤 42 例),检测 PTEN 和 mTOR 蛋白在这两种不同基因分型胶质母细胞瘤中的表达情况及相关性。结果 PTEN 蛋白在 IDH1 突变型与野生型胶质母细胞瘤的表达率分别为 20.00%(2/10)和 73.81%(31/42), mTOR 蛋白的表达率分别为 70.00%(7/10)及 35.71%(15/42), PTEN 和 mTOR 蛋白在 IDH1 两种基因分型的胶质母细胞瘤的表达差异均有统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。PTEN 和 mTOR 的表达呈负相关关系( $r = -0.724, P < 0.01$ )。结论 P13K/AKT/mTOR 信号转导通路中两个位点调节因子 PTEN 及 mTOR 在 IDH1 突变型与野生型 GBM 中分别表达降低及增高,且两种蛋白表达呈负相关的关系,提示 PTEN 和 mTOR 在 IDH1 突变型与野生型胶质母细胞瘤的分子通路中扮演着重要的调控作用。

**关键词:** PTEN; mTOR; IDH1 基因; 胶质母细胞瘤; P13K/Akt/mTOR 信号转导通路

**中图分类号:** R730.264 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2018)02-0108-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.02.003

## The expression and correlation of PTEN and mTOR proteins in IDH1 genotypic glioblastoma and P13K/Akt/mTOR signaling pathway

Pan Bincai, Liang Yingwen, Wang Chunhua, Huang Guifang, Huang Jiayu, Xu Weiling, Fu Hui

(Department of Pathology, Guangdong Tongjiang Hospital, Foshan 528300, Guangdong  
E-mail: pbc1980@163.com)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression and significance of PTEN and mTOR proteins in IDH1 genotype-mutant and wild-type glioblastoma in P13K/Akt/mTOR signaling pathway. **Methods** Fifty-two post-operative tissue specimens (including 10 cases of IDH1 mutant type glioblastoma and 42 cases of IDH1 wild type glioblastoma) from patients with glioblastoma were determined by immunohistochemical method so as to detect the expression and correlation of PTEN and mTOR proteins in these two different genotyping glioblastomas. **Results** The expression rates of PTEN protein in IDH1 mutant and wild-type glioblastoma were 20.00% (2/10) and 73.81% (31/42) respectively. The expression rates of mTOR protein were 70.00% (7/10) and 35.71% (15/42) respectively. The expression of PTEN and mTOR protein in glioblastoma with two genotypes of IDH1 were significantly different ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). There was a negative correlation between the expression of PTEN and mTOR ( $r = -0.724, P < 0.01$ ). **Conclusion** The expressions of PTEN and mTOR in the P13K/AKT/mTOR signal transduction pathway are respectively decreased and increased in IDH1 mutant and wild-type glioblastoma, and the PTEN expression has negative correlation with mTOR expression, suggesting that PTEN and mTOR play an important role in the regulation of molecular pathways of IDH1 mutant and wild type glioblastoma.

**Key words:** PTEN; mTOR; IDH1 gene; glioblastoma; P13K / Akt / mTOR signal transduction pathway

① 基金项目:广东省佛山市医学类科技攻关项目资助(2016AB003733)

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是最常见的成人原发颅脑恶性肿瘤,约占原发性颅脑肿瘤的一半<sup>[1]</sup>,由于胶质母细胞瘤侵袭能力较强,复发率很高,尽管当前临床上综合应用了手术、放疗、化疗等治疗方法,GBM患者的预后及生存率仍然不理想,中位生存期仅14.6个月,5年生存率少于10%<sup>[2-3]</sup>。研究显示<sup>[4]</sup>,胶质母细胞瘤具有明显的肿瘤异质性和复杂的分子遗传学改变,包括各种抑癌基因的失活和原癌基因的异常活化。异柠檬酸脱氢酶(Isocitrate Dehydrogenase, IDH)基因突变是脑胶质瘤早期发生的现象,目前被认为是低级别(WHO I~II级)胶质瘤和继发性胶质母细胞瘤最重要的分子生物学标记,在2016年最新版的WHO分类中,胶质母细胞瘤根据IDH基因状态被分为“胶质母细胞瘤, IDH野生型”、“胶质母细胞瘤, IDH突变型”和“胶质母细胞瘤, 非特指”<sup>[5]</sup>。IDH主要包括NADP依赖型的IDH1和IDH2及NAD依赖型的IDH3<sup>[6]</sup>,其中最常见突变是IDH1 132位点精氨酸取代组氨酸和IDH2 172位点精氨酸取代组氨酸,而几乎在90%以上的IDH突变型胶质瘤中都能检测到IDH1 R132H突变特异性抗体,因此该抗体可以作为胶质瘤分型诊断的重要依据<sup>[7-9]</sup>。IDH1存在于胞质和过氧化物酶体中,癌症基因组图谱计划(TCGA)发现12%胶质母细胞瘤发生IDH1体细胞突变,其中年轻患者和继发性胶质母细胞瘤患者占了很大比重, IDH1突变者整体存活期明显长于未突变者<sup>[10]</sup>, IDH野生型原发性胶质母细胞瘤预后差、病死率高。

随着肿瘤分子生物学的研究进展,逐步揭示了胶质母细胞瘤发生的分子机制是多基因改变多步骤发展的过程<sup>[11]</sup>,其中IDH1突变与肿瘤抑制基因PTEN调控PI3K/AKT/mTOR信号转导通路在胶质母细胞瘤形成和发展的关系是当前研究的热点,本研究主要检测IDH1基因分型-突变型与野生型胶质母细胞瘤中mTOR和PTEN蛋白表达情况及相互关系,探讨这两种蛋白在这两种基因分型胶质母细胞瘤发展过程中的作用,以期对胶质母细胞瘤发病机制的研究提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 病例标本 收集广东同江医院病理科2010—2016年手术切除的胶质母细胞瘤52例,根据2016年WHO中枢神经系统肿瘤最新分类标准并行免疫组化IDH1检测,分为IDH1突变型胶质母细胞瘤10例, IDH1野生型胶质母细胞瘤42例。所有病例中男性33例,女性19例,平均年龄为(52.35±2.45)岁,术前均未行放疗或免疫治疗。

1.2 主要试剂 兔抗人mTOR多克隆抗体购自武汉

博士德生物科技公司,鼠抗人抗体IDH1单克隆抗体、鼠抗人PTEN单克隆抗体、SP免疫组化试剂盒及DBA染色剂均购自北京中杉金桥试剂公司。

1.3 实验方法 采用免疫组化染色法,所有组织标本石蜡切片脱蜡、水化,并用蒸馏水冲洗,用3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>灭活内源性过氧化氢酶10 min, PBS漂洗,枸橼酸钠进行抗原修复。加入一抗(IDH1、mTOR及PTEN的抗体),4℃冰箱过夜;PBS缓冲液冲洗3次,5分钟/次;加入二抗,室温孵育1 h, PBS缓冲液冲洗3次,5分钟/次;DAB显色,显微镜下观察;蒸馏水洗涤终止显色反应,苏木素复染、脱水、透明、封片,显微镜下观察。

1.4 结果判读 IDH1及mTOR定位于胞质,而PTEN主要定位于胞核,也可在胞质表达,阳性染色为淡黄色、棕黄色或棕褐色。着色评分标准:不着色0分,淡黄色1分,棕黄色2分,棕褐色3分。每张切片观察500个细胞数,阳性细胞所占比例评分标准:≤5%者为0分,6%~25%者为1分,26%~50%者为2分,>50%者为3分。染色强度评分与阳性细胞评分相加:≤1分为阴性,≥2分为阳性。所有标本免疫组化染色时均设立阳性对照和阴性对照。免疫组化染色结果由两位有经验的临床病理医师在不知道诊断结果的情况下独立阅片判断。

1.5 统计学方法 应用统计学软件SPSS 16.0进行统计学处理。分类数据变量的比较采用 $\chi^2$ 检验,相关性分析采用Spearman相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 PTEN在胶质母细胞瘤中的表达情况 PTEN阳性蛋白主要位于肿瘤细胞的胞核,也可表达在胞质中(见图1)。PTEN在IDH1突变型GBM中的阳性率为20.00%(2/10),远低于其在IDH1野生型GBM中表达的阳性率73.81%(31/42),两种不同基因类型GBM中PTEN的表达差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。而不同性别、年龄、肿瘤大小及发生部位中的PTEN表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表1。

2.2 mTOR在胶质母细胞瘤中的表达情况 mTOR阳性蛋白主要表达在肿瘤细胞的胞质中,为淡黄色至棕黄色颗粒物质(见图2)。mTOR在不同基因类型的胶质母细胞瘤的表达不一致,mTOR在IDH1突变型GBM中的阳性表达率为70.00%(7/10);而在IDH1野生型的GBM中,mTOR的阳性率为35.71%(15/42),mTOR在两种不同基因类型GBM的表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而不同性别、年龄、肿瘤大小及发生部位中的mTOR表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表1。

表1 胶质母细胞瘤患者中 PTEN 及 mTOR 的表达情况

病理特征	n	PTEN		$\chi^2$	P	mTOR		$\chi^2$	P
		+	-			+	-		
性别									
男性	33	20	13	0.318	0.573	14	19	0.001	0.982
女性	19	13	6			8	11		
年龄(岁)									
>55	25	15	10	0.249	0.618	10	15	0.105	0.746
≤55	27	18	9			12	15		
肿瘤大小(cm)									
>5	24	15	9	0.018	0.894	9	15	0.422	0.516
≤5	28	18	10			13	15		
部位									
额颞叶	32	19	13	0.599	0.439	15	17	0.711	0.399
非额颞叶	20	14	6			7	13		
IDH1 基因分型									
突变型	10	2	8	10.086	0.001	7	3	3.890	0.049
野生型	42	31	11			15	27		

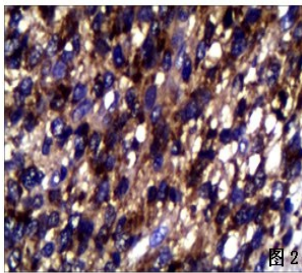
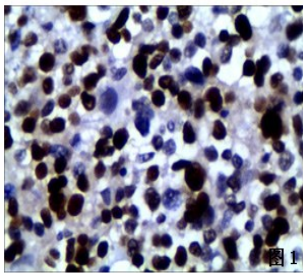


图1 PTEN在胶质母细胞瘤中的阳性表达(SP×400)

图2 mTOR在胶质母细胞瘤中的阳性表达(SP×400)

2.3 胶质母细胞瘤中 PTEN 和 mTOR 表达的相关性分析 Spearman 相关检验显示 PTEN 和 mTOR 两种蛋白在胶质母细胞瘤中的表达呈负相关关系( $r = -0.724, P < 0.01$ )。见表 2。

表2 在胶质母细胞瘤中 PTEN 与 mTOR 表达的相关性

PTEN	n	mTOR	
		+	-
+	33	5	28
-	19	17	2

### 3 讨论

P13K/Akt/mTOR 信号通路广泛存在于细胞中,通过调节细胞周期、蛋白质合成、细胞能量代谢等多种途径发挥重要的生理功能,在细胞的增殖、生长、分化过程中起着中心调控点的作用。同时,此信号转导通路活化可以促进细胞的生存、增殖及参与血管形成,在肿瘤的形成中扮演重要角色,并参与肿瘤的侵袭和转移<sup>[12]</sup>。有研究提示<sup>[13]</sup>,P13K/Akt/mTOR 信号通路在大脑胶质母细胞瘤的发生发展的过程中也起着关键

作用。而在这条转导通路中,PTEN 和 mTOR 的调控有着非常特殊及重要的作用。PTEN 是迄今为止发现的第一种具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因,定位于人类第 10q23.3 染色体上。PTEN 基因编码蛋白具有磷酸酯酶活性,可通过催化 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇脱磷酸还原为 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇实现对 P13K/Akt/mTOR 信号转导通路的负性调节,从而诱导细胞凋亡<sup>[14]</sup>。PTEN 基因作为 P13K/Akt/mTOR 信号通路上游的位点,通过对该信号途径的负性调控而抑制肿瘤的形成,而 PTEN 基因的失活则会降低对该途径的负性调控作用而引起细胞的恶变。本研究显示 PTEN 蛋白在不同 IDH1 基因分型的 GBM 中的表达不一致,在 IDH1 野生型 GBM 病例中的表达率远高于 IDH1 突变型 GBM,两者表达的差异有显著的统计学意义,说明 IDH1 野生型 GBM 中 PTEN 的突变率明显高于 IDH1 突变型 GBM,可能与 PTEN 参与了 RTK/PI3K 通路相关,因为 GBM 患者的 RTK/PI3K 通路中往往出现 PTEN 基因的缺失和突变,而 PTEN 杂合性缺失很可能导致肿瘤的发生<sup>[15]</sup>。Yang 等<sup>[16]</sup>研究证实,PTEN 突变是高级别胶质瘤进展的晚期事件,PTEN 突变与患者的短生存期显著相关,此结论与本研究结果比较一致。同时,我们的研究结果显示,PTEN 与 mTOR 的表达与 GBM 患者的年龄、性别、肿瘤的大小和发生部位等临床病理参数无明显关系,而在胶质母细胞瘤中 PTEN 与 mTOR 蛋白的表达呈负相关的关系,提示 PTEN 基因的抑制或突变所引起 P13K/Akt/mTOR 信号通路的激活及其所产生的作用可能在两种基因分型的 GBM 中起着重要的作用。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)是近年来研究发现的进化上非常

保守的蛋白激酶,属于磷酸肌醇激酶族成员,控制着细胞周期的进程,对细胞的分化、凋亡起重要调控作用。mTOR 位于 P13K/Akt/mTOR 信号转导通路的下游,一方面,mTOR 接受转导通路上游的信息,如细胞外生长因子及营养素等的刺激;在另一方面,mTOR 将信息进一步传递给下游位点,影响细胞周期的进展,导致细胞分化<sup>[17]</sup>,最近研究发现<sup>[18-19]</sup> mTOR 在肺癌、胶质瘤等多种肿瘤中有异常表达。在本研究中,有高达 70.00% 的 IDH1 突变型 GBM 的病例表达 mTOR 蛋白,而与之相对应的是,在 IDH1 野生型 GBM 中,只有约 35.71% 的病例表达 mTOR 蛋白,结果显示 mTOR 蛋白在 IDH1 突变型 GBM 的发生演变中可能起着重要的作用,因为 IDH1 突变型 GBM 多为由低级别的胶质瘤演变而来的继发性胶质母细胞瘤,而 Zhao S 等<sup>[20]</sup> 研究提示 mTOR 蛋白通过调控缺氧诱导因子 1a(hypoxia inducible factor-1a, HIF-1a) 通路与 IDH1 突变促进胶质瘤发生演变为继发性胶质母细胞瘤的机制密切相关,具体的机制通路仍需进一步的研究。

综上所述,胶质母细胞瘤的发生发展中存在着众多基因及染色体的变异,GBM 的分子分型更能反映这些分子特征,而这些基因多属于信号转导通路中的重要成分。PTEN 调控的 P13K/Akt/mTOR 信号通路在胶质母细胞瘤的发生发展中起着非常重要的作用,蛋白因子 PTEN 与 mTOR 分别在 IDH1 突变型及 IDH1 野生型 GBM 的分子通路中扮演者重要的调控角色,我们相信通过进一步的研究,PTEN 与 mTOR 将在胶质母细胞瘤的诊断、判断预后及治疗中发挥更重要的作用。

#### 参考文献:

[1] Chakrabarti I, Cockburn M, Cozen W, et al. A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974-1999[J]. *Cancer*, 2005, 104(12): 2798-2806.

[2] 《中国中枢神经系统胶质瘤诊断和治疗指南》编写组. 中国中枢神经系统胶质瘤诊断与治疗指南(2015)[J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(7): 485-509.

[3] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial[J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(5): 459-466.

[4] Toedt G, Barbus S, Wolter M, et al. Molecular signatures classify astrocytic gliomas by IDH1 mutation status[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(5): 1095-1103.

[5] 李智. 2016 版世界卫生组织中枢神经系统肿瘤分类实践解读 I (胶质源性肿瘤部分) [J]. *广东医学*, 2017; 38(1): 3-8.

[6] Alexander BM, Mehta MP. Role of isocitrate dehydrogenase in glioma[J]. *Expert Rev Neurother*, 2011, 11(10):

1399-1409.

[7] Hartmann C, Meyer J, Balss J, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas[J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 118(4): 469-474.

[8] Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(8): 765-773.

[8] Gorovets D, Kannan K, Shen R, et al. IDH mutation and neuroglial developmental features define clinically distinct subclasses of lower grade diffuse astrocytic glioma[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(9): 2490-2501.

[9] Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme[J]. *Science*, 2008, 321(5897): 1807-1812.

[11] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary[J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131(6): 803-820.

[12] Chan SM, Weng AP, Tibshirani R, et al. Notch signals positively regulate activity of the mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 2007, 110(1): 278-286.

[13] Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, et al. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(10): 1926-1933.

[14] Davidson L, Maccario H, Perera NM, et al. Suppression of cellular proliferation and invasion by the concerted lipid and protein phosphatase activities of PTEN[J]. *Oncogene*, 2010, 29(5): 687-697.

[15] Wiencke JK, Zheng S, Jelluma N, et al. Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma[J]. *Neuro Oncol*, 2007, 9(3): 271-279.

[16] Yang Y, Shao N, Luo G, et al. Mutations of PTEN gene in gliomas correlate to tumor differentiation and short-term survival rate[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(3): 981-985.

[17] Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(5): 335-348.

[18] Panagiotou I, Tsiambas E, Lazaris AC, et al. PTEN expression in non small cell lung carcinoma based on digitized image analysis[J]. *J BUON*, 2012, 17(4): 719-723.

[19] Moon SH, Kim DK, Cha Y, et al. PI3K/Akt and Stat3 signaling regulated by PTEN control of the cancer stem cell population, proliferation and senescence in a glioblastoma cell line[J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(3): 921-928.

[20] Zhao S, Lin Y, Xu W, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha[J]. *Science*, 2009, 324(5924): 261-265.

收稿日期: 2018-03-28; 修回日期: 2018-04-16