

# 环磷酰胺作用 B 细胞非霍奇金淋巴瘤对抑癌基因 PTEN 的影响

何伟<sup>1</sup>, 葛自力<sup>2</sup>, 刘世杰<sup>1</sup>, 祝华琚<sup>2</sup>

(1. 青海省人民医院颌面外科, 青海 西宁 810007; 2. 苏州大学第一附属医院口腔科, 江苏 苏州 215106)

**摘要:**目的 探索环磷酰胺作用非霍奇金淋巴瘤对抑癌基因 PTEN 的影响, 为治疗 B 细胞非霍奇金淋巴瘤寻找新治疗途径提供实验依据。方法 免疫沉淀(IP)技术提取细胞中的 PTEN 蛋白, 采用高效液相色谱(HPLC)法分别检测不同时间(10、30、60 min)不同浓度的环磷酰胺(0、25、50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )作用 Namalwa 细胞株时 PTEN 基因的活性; Western-blot 技术检测 PTEN, 磷酸化 PTEN, Akt 及磷酸化 Akt 的表达; 基因芯片技术筛选环磷酰胺作用 Namalwa 细胞后基因表达谱的改变; q-PCR 技术检验基因谱表达的改变。结果 不同浓度的环磷酰胺作用 Namalwa 细胞后 PTEN 活性降低; Western-blot 结果显出磷酸化 PTEN 及磷酸化 Akt 表达降低; 基因芯片筛选发现上调的基因有 13 个, 下调的基因有 16 个。环磷酰胺作用 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 Namalwa 细胞后引起基因表达谱广泛改变。对差异基因的分析得出环磷酰胺作用 Namalwa 细胞引起基因表达谱重要信号通路上的改变。结论 环磷酰胺治疗 B 细胞非霍奇金淋巴瘤具有较低的缓解率, 可能与环磷酰胺作用细胞使 PTEN 基因活性减弱, 同时引起信号通路上基因表达改变有关。

**关键词:**环磷酰胺; B 细胞非霍奇金淋巴瘤; PTEN 基因; 活性

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2017.10.031

## Cyclophosphamide role B cell non-Hodgkin's lymphoma effects on tumor suppressor gene PTEN

HE Wei<sup>1</sup>, GE Zili<sup>2</sup>, LIU Shijie<sup>1</sup>, ZHU Huajun<sup>2</sup>

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Qinghai Provincial People's Hospital, Xi'ning, Qinghai 810007, China;

2. Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215106, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of tumor suppressor gene PTEN on cyclophosphamide treat non Hodgkin lymphoma and to provide experimental evidence for the treatment of B cell non-Hodgkin's lymphoma. **Methods** IP technology extracted the PTEN protein from cells. The activity of PTEN gene in Namalwa cells were detected by HPLC at different time (10, 30, 60 min) and different concentrations of cyclophosphamide (0, 25, 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Western blot was used to detect the expressions of phosphorylate PTEN and Akt. Gene chip screening the gene expression change of cyclophosphamide effect in Namalwa cells. q-PCR examined the gene expression profile changes about the result of gene chip. **Results** PTEN activity decreased after different concentration of cyclophosphamide in Namalwa cell. Western blot showed the phosphorylation of PTEN and Akt reduced. Microarray screening revealed that there were 13 genes up-regulated and 16 down regulated. **Conclusions** Cyclophosphamide induces B cell non-Hodgkin's lymphoma Namalwa cells caused by gene expression widely changes.

**Key words:** Cyclophosphamide; B cell non-Hodgkin's lymphoma; PTEN gene; Activity

非霍奇金淋巴瘤是一组多源化淋巴瘤增值性疾病, 约占免疫系统实体瘤的 90%<sup>[1]</sup>。最近 WHO 造血和淋巴细胞组织肿瘤定义: 非霍奇金淋巴瘤的

主要亚型起源于 B 淋巴细胞<sup>[2]</sup>。B 细胞性非霍奇金淋巴瘤有侵袭性, 发展迅速的特点, 目前常用的治疗方案为 CHOP(环磷酰胺、吡柔比星、长春新碱、地塞米松), 但完全缓解率约为 40%<sup>[3]</sup>。

环磷酰胺为一种常用的抗肿瘤烷化剂, 对肿瘤

基金项目: 江苏省杰出青年基金(BK2012009)

[6] 王志永. 阿司匹林联合小剂量氯吡格雷双联抗血小板治疗在 PCI 术 1 年后长期随访观察[D]. 天津: 天津医科大学, 2014.

[7] MURPHY SA, ANTMAN EM, WIVIOTT SD, et al. Reduction in recurrent cardiovascular events with prasugrel compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes from the TRITON-TIMI 38 trial[J]. European Heart Journal, 2008, 29(20): 2473-2479.

[8] LI JJ, REN Y, CHEN KJ, et al. Impact of C-reactive protein on in-stent restenosis: a meta-analysis[J]. Tex Heart Inst J, 2010, 37(1): 49-57.

[9] KALANTZI KI, DIMITRIOU AA, MILIONIS HJ, et al. Clopidogrel differentially affects platelet-mediated thrombosis and inflammatory response in patients with acute coronary syndromes[J]. J Thromb Haemost, 2011, 9(4): 875-878.

[10] CASAS JP, SHAH T, HINGORANI AD, et al. C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review[J]. J Intern Med, 2008, 264(4): 295-314.

(收稿日期: 2017-01-26, 修回日期: 2017-03-09)

细胞有抑制作用,在肿瘤细胞中药物能分解酰胺氮芥及丙烯醛,其中酰胺氮芥对肿瘤细胞毒性较显著。环磷酰胺还具有干扰 DNA 及 RNA 的功能<sup>[4]</sup>。

PTEN 基因是磷酸酶与张力蛋白同源产物,其主要功能为编码磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 3-磷酸酯酶,通过其磷酸酶蛋白产物及负性调控 Akt/PKB 信号通道发挥抑癌基因作用<sup>[5]</sup>,但在胶质母细胞瘤<sup>[6]</sup>和肺癌<sup>[7]</sup>等疾病中存在 PTEN 基因的突变,同时化疗药物如环磷酰胺联合其他药物治疗肿瘤时可引起急性粒细胞白血病<sup>[8]</sup>,但环磷酰胺与 PTEN 基因在 B 细胞非霍奇金淋巴瘤的作用尚未有报道。

本研究通过不同的实验技术及其对通路的分析来探索环磷酰胺及 PTEN 基因在 B 细胞非霍奇金淋巴瘤中作用影响,对 B 细胞非霍奇金淋巴瘤的治疗及风险评估提供有效的治疗方案和实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂 PTEN 抗体,pPTEN 抗体,AKT 抗体,pAKT 抗体,Abcom 公司;二抗(山羊抗鼠),北京碧云天生物公司;EE5,DTT 相对分子量,环磷酰胺 相对分子量为 279.01, Sigma 公司;TRIZOL 试剂,Primer 引物,dNTP,TaKaRa 公司。

1.2 细胞培养 Namalwa 细胞培养于 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,放置于 37 ℃,5% 的 CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中,约 3 d 传代一次,取对数期生长细胞实验。细胞需按不同药物浓度及时间分组。

1.3 提取目的蛋白 应用免疫沉淀(IP)技术提取 PTEN 蛋白。细胞裂解液(含 PBS,1% Triton,PMSF)加入细胞,冰上裂解 20 min,4 ℃,13 000 g 离心 20 min,吸取上清。在 500 mg 体积下加入 PTEN 及 NAT-1 抗体,4 ℃ 孵育过夜,次日加入 proteinG 于 4 ℃ 下孵育 2 h,洗涤留取沉淀,分别提取药物浓度为 0、25、50 μmol · L<sup>-1</sup>;作用时间 10、30、60 min<sup>[9]</sup>的各组蛋白。

1.4 蛋白活性检测 将 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> EE5,1 mmol · L<sup>-1</sup> DTT,Trisbuffer pH 8(30 mmol · L<sup>-1</sup> Tris,100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl,pH 8)加入 IP 所得沉淀中,室温孵育 1 h 30 min,加入 0.5% HClO<sub>4</sub> 上机检测。

1.5 Western-blot 检测蛋白表达 IP 所得沉淀加入蛋白沉淀,100 ℃ 煮 10 min 行吸取液体行 SDS-PAGE 电泳,后用 PVDF 膜转膜,5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1 h。按 1:1 000 稀释的一抗,在 4 ℃ 下孵育 PVDF 膜过夜。次日用 PBST 洗 3 次每次 8 min,按 1:100 000 比例稀释的二抗,37 ℃ 下,孵育 PVDF 膜 1 h 后 PBST 洗膜。最后 ECL 显影。

1.6 基因芯片技术 各组细胞中加入 TRIZOL 试

剂,每孔加入 12.5 μL Taq,1 μL 上下游引物(10 μmol · L<sup>-1</sup>),2 μL cDNA 反应液(50 μg · L<sup>-1</sup>),以及 8.5 μL ddH<sub>2</sub>O,总体积为 25 μL。根据说明书操作。

1.7 Real-Time PCR 根据试剂盒说明书,使用 BI PRISM 7500 Real-Time PCR 系统分析所得数据。反应体系共为 25 μL: SYBR Premix EX Taq II (12.5 μL),1 μL 引物(10 μmol · L<sup>-1</sup>)和 2 μL cDNA(50 μg · L<sup>-1</sup>),8.5 μL ddH<sub>2</sub>O。引物序列见表 1。

表 1 引物序列表

| 基因    | 上/下游引物                                   | 引物长度/bp |
|-------|------------------------------------------|---------|
| AFM   | F:5'-AATAATGAGAATTGAAAATAC-CATAG-3'      | 133     |
|       | R:5'-TATTCTACACATTGATGTAAAA-TGC-3'       |         |
| AKT1  | F:5'-TATATTCCTCCAATTCAGGACC-CA-3'        | 112     |
|       | R:5'-GGAAGACAAGTTCATGTAC-3'              |         |
| NT5C2 | F: 5'-TGATTCATTCTTGTTTAAAC-AAGA-3'       | 184     |
|       | R:5'-GTGATTTCGACTTGGGATTGGG-A-3'         |         |
| TP73  | F: 5'-GTGTCACATGCCAAGGAATAT-GCCT-3'      | 142     |
|       | R: 5'-CGGAAGCAGGAGAGGACGGG-GAGGT-3'      |         |
| MLKL  | F: 5'-CTCATTCTCCAGCATGCTCACT-CAACATGT-3' | 152     |
|       | R: 5'-ATGGCTGGGTAAAGGTTCCAAC-AGACATTT-3' |         |
| ATM   | F: 5'-AAACATCTAGATCGGCATTCA-GATT-3'      | 126     |
|       | R: 5'-CAAACAAGGAAAATATTTGAA-TTG-3'       |         |

1.8 统计学方法 所得数据经过 GraphPad Prism5 统计软件分析,定量数据描述用以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,均数间两两比较采用  $q$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度及时间药物作用后基因活性改变 HPLC 检测显示随着药物浓度的增加(0、25、50 μmol · L<sup>-1</sup>)及作用时间(10、60 min)的延长,见图 1。PTEN 的基因活性随时间的延长及药物浓度的增加而降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.2 药物作用后蛋白表达改变 在 60 min 50 μmol · L<sup>-1</sup> 的药物作用后,磷酸化 PTEN 及磷酸化 AKT 的蛋白表达较非磷酸化蛋白表达减少。见图 2。

**2.3 基因表达谱分析药物作用后的基因改变** 在 60 min  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的环磷酰胺作用下,如图 3 所示上调的基因有 13 个,下调的基因有 16 个。

**2.4 基因芯片结果验证各组基因 mRNA 表达的改变** 依据基因表达谱结果基因的结果改变,检测 AFM, AKT1, NT5C2 下调, TP73, MLKL, ATM 的 mRNA 表达增高,见图 4。

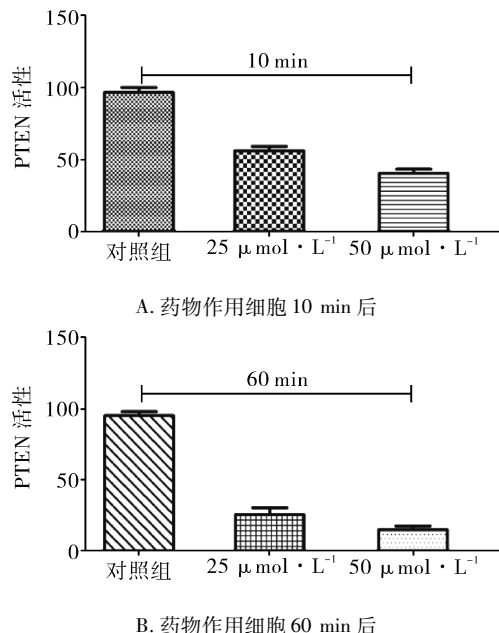


图 1 不同时间不同浓度下 PTEN 的活性

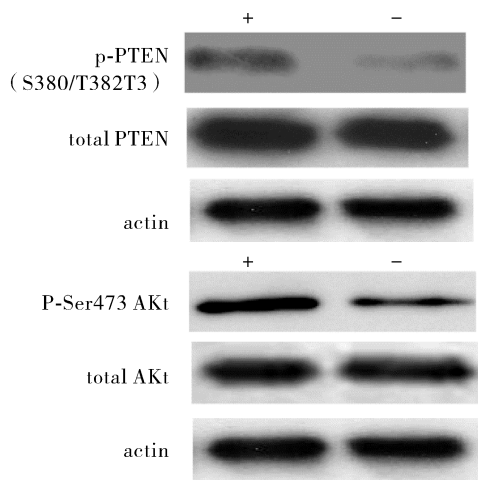


图 2  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  药物作用 60 min 后磷酸化和总蛋白的表达

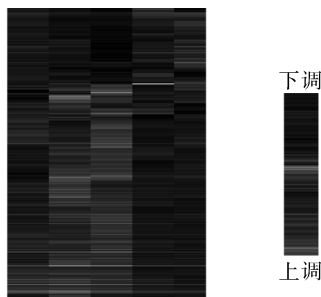


图 3  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  环磷酰胺作用 60 min 后基因芯片结果

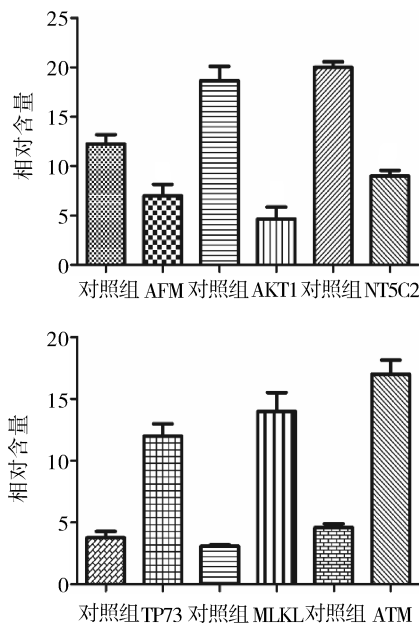


图 4 Real-Time PCR 检测芯片表达结果  
各基因 mRNA 水平的改变

### 3 讨论

PTEN 基因被证实是一个抑癌基因,其主要负性调控 AKT 信号通路。PTEN 蛋白产物含有一个酪蛋白磷酸酶的功能区和约 175 个氨基酸与骨架蛋白 tensin、auxilin 同源的区域<sup>[10]</sup>同时 PTEN 调节肿瘤细胞的生长凋亡,因此 PTEN 基因在肿瘤细胞中有重要的作用<sup>[11]</sup>,但在黑色素瘤,肺癌及肝癌<sup>[12-13]</sup>等肿瘤中该基因表达突变。

PTEN 作为一个 PIP3-磷酸酶,可通过去磷酸化将 PIP3 转变成 PIP2,阻碍 Akt 激活从而调节细胞的生长,抑制肿瘤细胞的生长。Akt 的活性可被 PTEN 负向调节,通过调节 PIP2 和 PIP3 使其表达减低,抑制细胞的增殖、生长<sup>[14]</sup>。

环磷酰胺是被广泛使用的化疗药物,目前有研究指出化疗药物可引起抑癌基因的突变<sup>[15]</sup>。其中顺铂治疗卵巢肿瘤导致 PTEN 基因表达突变,细胞凋亡减少<sup>[16]</sup>。本研究环磷酰胺作用与 Namalwa 细胞后,HPLC 结果显示 PTEN 基因活性明显减弱,由此说明环磷酰胺可诱导 PTEN 基因改变。Western-blot 显示 PTEN 磷酸化表达增强,同时 Akt 磷酸的表达也增强,说明环磷酰胺减弱 PTEN 的去磷酸化,使其磷酸化活性增强。

基因芯片结果中 AFM, NT5C2, AKT1 基因表达降低, TP73, MLKL, ATM 表达增高。维生素 E 主要作用是抗氧化,延缓衰老的作用,而 AFM 的改变影响维生素 E 的作用<sup>[17-18]</sup>,影响细胞的凋亡。

NT5C2, AKT1 是 PTEN 基因信号通路上的基

因,调控细胞增殖,PTEN 基因活性改变,则 NT5C2, AKT1 基因表达受影响。而 TP73,MLKL,ATM 属于 Akt 的下游基因,受 Akt 的信号调控,Akt 基因表达在 PTEN 基因磷酸化活性激活后增多,同时也激活该信号通路上其他基因如 TP73,MLKL,ATM,它们的激活可损坏 DNA 的表达以及可促进细胞增殖<sup>[19]</sup>。

通过本研究得出,药物作用诱导 PTEN 蛋白活性的改变,激活了 PTEN 基因的磷酸化活性,同时引起信号通路上基因表达改变,影响了药物本身应对肿瘤产生的抑制作用,阐明了环磷酰胺治疗 B 细胞非霍奇金淋巴瘤较低的缓解率。有研究表明强力霉素<sup>[20]</sup>可抑制 Akt 基因活性,且靶向治疗的方案也可直接与化疗药物作用相结合。这对非霍奇金淋巴瘤及其他肿瘤疾病的治疗提供了多样的治疗方案提供了依据。

### 参考文献

- [1] BREWER JD, SHANAFELT TD, CERHAN JR, et al. Effect of Non-Hodgkin Lymphoma on Survival in Patients With Malignant Fibrous Histiocytoma, Kaposi Sarcoma, and Sebaceous Carcinoma: A SEER Population-Based Study[J]. Dermatol Surg, 2016, 42 ( Suppl 1 ): S32-S39.
- [2] CABANILLAS ME, LU H, FANG S, et al. Elderly patients with non-Hodgkin lymphoma who receive chemotherapy are at higher risk for osteoporosis and fractures[J]. Leuk Lymphoma, 2007, 48 (8): 1514-1521.
- [3] JUNPAPARP P, BUPPAJARNTHAM S, MADUENO FV, et al. Concomitant typhilitis and Clostridium difficile colitis developed after first R-CHOP chemotherapy in a non-Hodgkin lymphoma patient[J]. Case Reports, 2013, 2013 (17): bcr2013008894.
- [4] PORTLOCK CS, QIN J, SCHAINDLIN P, et al. The NHL-15 protocol for aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a sequential dose-dense, dose-intense regimen of doxorubicin, vincristine and high-dose cyclophosphamide [J]. Ann Oncol, 2004, 15 (10): 1495-1503.
- [5] AUGELLO G, PULEIO R, EMMA MR, et al. A PTEN inhibitor displays preclinical activity against hepatocarcinoma cells[J]. Cell Cycle, 2016, 15 (4): 573-583.
- [6] GONT A, HANSON JE, LAVICTOIRE SJ, et al. PTEN loss represses glioblastoma tumor initiating cell differentiation via inactivation of Lgl1 [J]. Oncotarget, 2013, 4 (8): 1266-1279.
- [7] NORO R, GEMMA A, MIYANAGA A, et al. PTEN inactivation in lung cancer cells and the effect of its recovery on treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors [J]. Int J Oncol, 2007, 31 (5): 1157-1163.
- [8] KAGAN VE, YALOWICH JC, BORISENKO GG, et al. Mechanism-based chemopreventive strategies against etoposide-induced acute myeloid leukemia: free radical/antioxidant approach [J]. Mol Pharmacol, 1999, 56 (3): 494-506.
- [9] FAN Y, SCHREIBER EM, GIORGIANNI A, et al. Myeloperoxidase-catalyzed metabolism of etoposide to its quinone and glutathione adduct forms in HL60 cells [J]. Chem Res Toxicol, 2006, 19 (7): 937-943.
- [10] 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.
- [11] BASSI C, STAMBOLIC V. PTEN, here, there, everywhere [J]. Cell Death Differ, 2013, 20 (12): 1595-1596.
- [12] MIKHAIL M, VELAZQUEZ E, SHAPIRO R, et al. PTEN expression in melanoma: relationship with patient survival, Bcl-2 expression, and proliferation [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11 (14): 5153-5157.
- [13] KANG-PARK S, LEE YI, LEE YI. PTEN modulates insulin-like growth factor II (IGF-II)-mediated signaling; the protein phosphatase activity of PTEN downregulates IGF-II expression in hepatoma cells [J]. FEBS Lett, 2003, 545 (2/3): 203-208.
- [14] PULIDO R. A rapid guide to PTEN function [J]. Methods, 2015, 77-78: 1-2.
- [15] TÓTHOVÁ E, KAFKOVÁ A, FRICOVÁ M, et al. Fludarabine combined with cyclophosphamide is highly effective in the treatment of chronic lymphocytic leukemia [J]. Neoplasma, 2003, 50 (6): 433-437.
- [16] SINGH M, CHAUDHRY P, FABI F, et al. Cisplatin-induced caspase activation mediates PTEN cleavage in ovarian cancer cells: a potential mechanism of chemoresistance [J]. BMC Cancer, 2013, 13 (1): 88-89.
- [17] HUBALEK M, BUCHNER H, MÖRTL MG, et al. The vitamin E-binding protein afamin increases in maternal serum during pregnancy [J]. Clin Chim Acta, 2014, 434: 41-47.
- [18] JOHNSON EJ. Age-related macular degeneration and antioxidant vitamins: recent findings [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2010, 13 (1): 28-33.
- [19] YU ZH, CAI M, XIANG J, et al. PI3K/Akt pathway contributes to neuroprotective effect of Tongxinluo against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 181: 8-19.
- [20] SHI Y, WANG J, CHANDARLAPATY S, et al. PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS1 [J]. Nat Struct Mol Biol, 2014, 21 (6): 522-527.

(收稿日期:2017-03-17,修回日期:2017-04-09)