

转录因子 T-bet 在外周 T 细胞淋巴瘤患者中的表达及其预后意义初探

王孜 周道斌 张薇

【摘要】 目的 观察转录因子 T-bet (T-box expressed in T cells) 在外周 T 细胞淋巴瘤 (PTCL) 患者中的表达并分析其与预后的相关性。方法 收集 2007 年至 2013 年间由北京协和医院病理科诊断的 109 例初治 PTCL 患者的石蜡包埋病理标本及临床资料。对患者标本进行免疫组化染色, 观察转录因子 T-bet 的表达并分析其与患者临床特征及预后的关系。结果 109 例初治 PTCL 患者中 PTCL 非特指型 (PTCL-NOS) 60 例, NK-T 细胞淋巴瘤 (NKT) 18 例, 血管免疫母细胞性 T 细胞淋巴瘤 11 例, ALK 阳性及阴性间变大细胞淋巴瘤各 4 例, 其他 12 例。109 例患者中 T-bet 总体阳性率为 42.2%, 在 PTCL-NOS 组患者中为 43.3%, 在 NKT 组患者中为 44.4%。Kaplan-Meier 生存曲线法结果显示, T-bet 表达水平与 PTCL 患者总生存期无相关性 ($P=0.586$)。病理亚型分层研究发现, T-bet 表达水平与 PTCL-NOS 组患者总生存期无相关性 ($P=0.309$), 与 NKT 组患者总生存期呈正相关 ($P=0.004$)。多因素分析提示 ECOG 评分 ≥ 2 分为影响 PTCL 患者预后的独立危险因素 ($HR=5.907$, 95% CI 2.399~14.549, $P<0.001$)。结论 转录因子 T-bet 在几类 PTCL 病理亚型患者中均有阳性表达, 其表达水平与 NKT 患者总生存期呈正相关。

【关键词】 淋巴瘤, T 细胞, 外周; T-bet; 预后

T-bet in peripheral T-cell lymphoma Wang Zi, Zhang Wei, Zhou Daobin. Department of Hematology, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China
Corresponding author: Zhang Wei, Email: vv1223@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To evaluate the expression of transcription factor T-bet (T-box expressed in T cells) and explore its effects on prognosis in peripheral T-cell lymphoma (PTCL). **Methods** This study included 109 previously untreated patients diagnosed with PTCL in the pathology system at Peking Union Medical College Hospital from 2007 to 2013. Formalin-fixed, paraffin-embedded blocks and clinical information of these patients were collected. T-bet expression was examined by immunohistochemical stain, while its relationship with clinical feature and prognosis was analyzed. **Results** 109 PTCL patients included 60 PTCL-not other specified (PTCL-NOS) cases and 18 NK/T-cell lymphoma. The positive rate of T-bet was 42.2% overall, 43.3% in PTCL-NOS and 44.4% in NK/T lymphoma. T-bet high expression wasn't correlated with OS in PTCL patients ($P=0.586$) by Kaplan-Meier analysis. Further stratification by pathological subgroup implied a correlation of T-bet high expression with better survival in NK/T lymphoma ($P=0.004$), but not in PTCL-NOS ($P=0.309$). Multivariate analysis confirmed that high ECOG score (≥ 2) was an independent predictor of overall survival ($HR=5.907$, 95% CI 2.399~14.549, $P<0.001$). **Conclusion** T-bet was detected in several PTCL subgroups with diversities, which is positively correlated with overall survival in NK/T-cell lymphoma.

【Key words】 Lymphoma, T-cell, peripheral; T-box expressed in T cells; Prognosis

外周 T 细胞淋巴瘤 (peripheral T-cell lymphoma, PTCL) 是一组侵袭性强、异质性高的非霍奇金

淋巴瘤, 亚洲人群的发病率显著高于欧美^[1-2]。PTCL 起源于胸腺后 (或成熟) T 细胞, 为一类异质性肿瘤^[3]。目前分型体系仍主要依赖临床表现与细胞形态学, 体现了 PTCL 研究领域的局限性, 即分子层面的致病机制研究有待深入, 肿瘤细胞来源有待进一步探索。目前 PTCL 尚缺乏公认的化疗方案, 对传统 CHOP 方案等应答效果差, 患者总体预后不佳,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.09.010

作者单位: 100730 中国医学科学院、北京协和医学院北京协和医院血液内科

通信作者: 张薇, Email: vv1223@vip.sina.com

5年总生存(OS)率尚不足20%^[4]。在NCCN指南中,除ALK阳性间变大细胞淋巴瘤(ALK⁺ALCL)外,PTCL的治疗首推临床试验^[5]。研究者与临床医师也将目光投向了新兴的生物治疗领域,如生物单抗Brentuximab^[6]、免疫调节药物Lenalidomide^[7]、表观遗传学调控药物Romidepsin^[8]、抗代谢药物Pralatrexate^[9]等。转录因子T-bet(亦称为Tbx21)为1型T辅助细胞(Th1)的关键调控因子,对于Th1的分化至关重要^[10]。在成熟NK细胞和T细胞中,T-bet表达与细胞毒性细胞因子表达相关^[11]。本研究中我们观察PTCL患者肿瘤细胞中T-bet的表达水平并分析其与预后和临床特征的相关性,旨在寻找新的药物靶点,以延长患者生存,提高生存质量。

病例和方法

1. 研究对象:纳入2007年1月1日至2013年12月31日经我院病理科诊断为PTCL的患者。入选标准:年龄>19岁、病案资料和个人信息完整、经福尔马林固定石蜡包埋的组织标本充足、尚未接受正规化疗者。排除标准:经复核后与原诊断不一致、艾滋病抗体(HIV-Ab)阳性、无法获得预后数据者。

2. 免疫组化染色:T-bet兔IgG单克隆抗体为美国Abcam公司产品(抗体批号:Ab150440),抗原决定簇:N末端氨基酸,工作浓度为1:50。对福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤组织标本进行切片和常规脱蜡处理,抗原修复方法选择高压修复。结果判断:两位病理科专业医师在不知晓临床预后信息的情况下进行独立判读,有分歧的标本由两位医师在双头显微镜下进行复议。阳性细胞比例10%~<30%定义为弱阳性(+),阳性细胞比例≥30%定义为强阳性(++)。

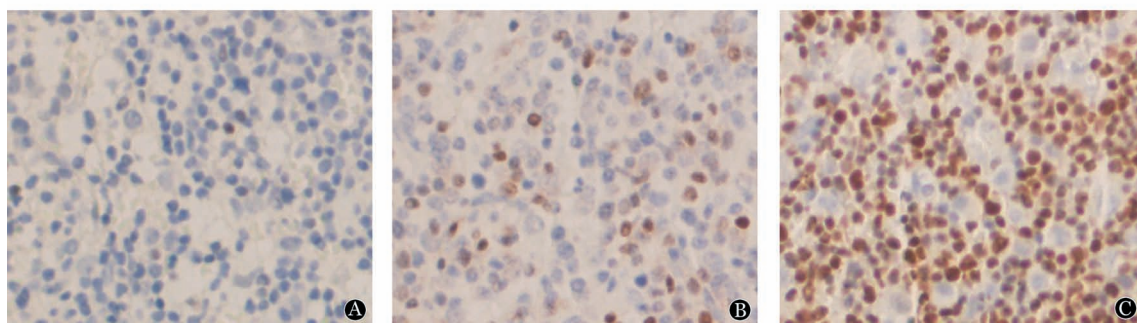
3. 采用荧光原位杂交技术和荧光定量PCR方法检测EBV表达:EBV表达阳性定义:①肿瘤组织切片EBER原位杂交阳性;②EBER原位杂交阴性者外用血EBV-DNA拷贝数>10 000/ml。

4. 统计学处理:应用SPSS 17.0软件进行统计学分析。OS期定义为第一次正式化疗到死亡或末次随访之间的时间。随访方式包括门诊随访和电话随访。在末次随访时仍然存活的患者为删失数据。采用Kaplan-Meier法进行生存曲线绘制。应用双侧检验的Log-rank法对不同组间生存函数的差异进行分析。应用Pearson卡方检验分析EBV表达和T-bet表达的相关性。如R×C列联表理论数T<5的格子数大于总格子数的25%,则用Fisher精确概率法。P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. 病例资料:入选的109例PTCL患者中,男75例,女34例,中位年龄为46(13~79)岁,>60岁29例(26.6%)。病程中出现B症状90例(82.6%),血LDH升高68例(62.4%),美国东部肿瘤合作组(ECOG)评分>1分50例(45.9%),结外器官受累>1个57例(52.3%),骨髓受累25例(22.9%)。Ann Arbor分期:I期1例(0.9%),II期5例(4.6%),III期23例(21.1%),IV期80例(73.4%);IPI评分>2分(高中危+高危)65例(59.6%)。应用CHOP(环磷酰胺、长春地辛、表柔比星、泼尼松)方案治疗42例(38.5%)。所有患者的治疗均符合2010年版NCCN非霍奇金淋巴瘤临床实践指南。

2. T-bet在不同病理亚型PTCL中的表达:T-bet在肿瘤细胞中定位于细胞核,染色强度在淡黄色至褐色不等(图1)。在109例PTCL患者中,T-bet染色



A: 肿瘤组织中T-bet表达阴性;B: 肿瘤组织中10%~<30%的肿瘤细胞被染色,为弱阳性(+)表达;C: 肿瘤组织中≥30%的肿瘤细胞被染色,为强阳性(++)表达

图1 采用免疫组化染色法检查外周T细胞淋巴瘤患者肿瘤组织中转录因子T-bet的表达

阴性 63 例(57.8%),弱阳性 35 例(32.1%),强阳性 11 例(10.1%)。

对几类构成比较高的 PTCL 进行病理亚型分层分析,结果详见表 1。结果显示 PTCL 非特指型 (PTCL-NOS) 患者组 T-bet 阳性率为 43.3% (26/60); NK-T 细胞淋巴瘤 (NKT) 患者组为 44.4% (8/18)。

表 1 T-bet 在不同亚型外周 T 细胞淋巴瘤患者中的表达分布 [例(%)]

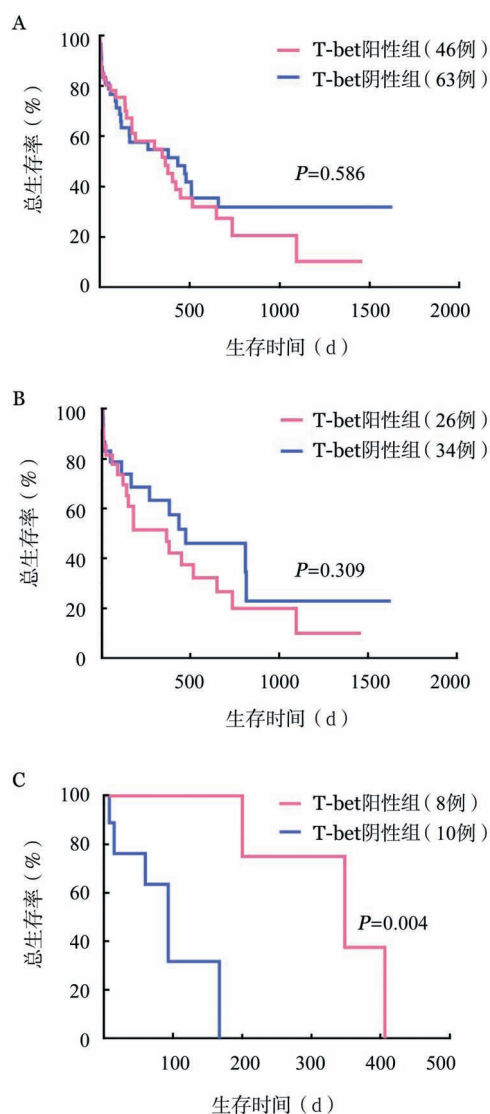
病理亚型	例数	阴性表达	弱阳性表达	强阳性表达
PTCL-NOS	60	34(56.7)	21(35.0)	5(8.3)
NKT	18	10(55.6)	4(22.2)	4(22.2)
AITL	11	8(72.7)	3(27.3)	0
ALK ⁺ ALCL	4	2(50.0)	2(50.0)	0
ALK ⁻ ALCL	4	2(50.0)	1(25.0)	1(25.0)
其他	12	7(58.3)	4(33.3)	1(8.3)
合计	109	63(57.8)	35(32.1)	11(10.1)

注:PTCL-NOS:外周 T 细胞淋巴瘤非特指型;NKT:NK-T 细胞淋巴瘤;AITL:血管免疫母细胞性 T 细胞淋巴瘤;ALK⁺ ALCL:ALK 阳性间变大细胞淋巴瘤;ALK⁻ ALCL:ALK 阴性间变大细胞淋巴瘤;其他:包括肠病相关 T 细胞淋巴瘤、肝脾 T 细胞淋巴瘤、皮下脂膜炎样 T 细胞淋巴瘤、 $\gamma\delta$ T 细胞淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤

3. T-bet 表达与预后相关性分析:选取 T-bet 为分组变量,绘制 Kaplan-Meier 曲线,对 109 例 PTCL 患者进行生存分析。结果显示,109 例患者中 T-bet 阳性组与阴性组患者的中位 OS 期分别为 482 d 和 668 d,差异无统计学意义 ($P=0.586$) (图 2A)。60 例 PTCL-NOS 患者中 T-bet 阳性组与阴性组患者的中位 OS 期分别为 482 d 和 819 d,差异无统计学意义 ($P=0.309$) (图 2B)。18 例 NKT 患者中 T-bet 阳性组与阴性组患者的中位 OS 期分别为 333 d 和 93 d,差异有统计学意义 ($P=0.004$) (图 2C)。

对可能影响患者 OS 的预后因素进行单因素分析,并对其中 $P<0.05$ 的因素纳入 Cox 比例风险模型进入多因素分析,结果详见表 2。结果显示,出现 B 症状 ($P=0.007$)、LDH 升高 ($P=0.026$)、ECOG 评分 ≥ 2 分 ($P<0.001$)、IPI 评分 >2 分 ($P=0.001$) 均为影响 OS 的预后不良因素,而 ECOG 评分 ≥ 2 分是 PTCL 患者预后不良的唯一独立危险因素 ($HR=5.907$, 95% CI 2.399~14.549, $P<0.001$)。

4. NKT 患者中 T-bet 表达与 EBV 表达的相关性分析 (表 3): 18 例 NKT 患者中 T-bet 阳性者 8 例,其中有 5 例 (62.5%) EBV 表达阳性;阴性者 10 例,其中



A: 109 例 PTCL 患者的总生存曲线; B: 60 例 PTCL 非特指型患者的总生存曲线; C: 18 例 NK-T 细胞淋巴瘤患者的总生存曲线

图 2 T-bet 表达对外周 T 细胞淋巴瘤 (PTCL) 患者总生存的影响

有 5 例 (50.0%) EBV 表达阳性。应用 Fisher 精确概率法进行相关性分析,结果显示 T-bet 表达与 EBV 表达不存在相关性 ($P=0.660$)。

讨 论

PTCL 的临床表现多样,异质性强,部分病理亚型侵袭性极高 (如 NKT、肠病相关 T 细胞淋巴瘤、肝脾 T 细胞淋巴瘤^[2]), 大部分患者预后差,缺乏有效的化疗方案与靶向药物为 PTCL 目前的治疗困境。近年来,几项基于蛋白质组学与芯片技术的国际大数据研究首次筛选出若干影响 PTCL 患者 OS 期或无病生存期的蛋白分子^[12]、microRNA^[13]或基因点突变^[14]。这些预后因素如能进一步在大规模患者群

表2 影响外周T细胞淋巴瘤患者总生存期的单因素和多因素分析

影响因素	单因素分析		多因素分析	
	P值	HR	95% CI	P值
年龄(>60岁/≤60岁)	0.353			
性别(男/女)	0.337			
B症状(有/无)	0.007	0.877	0.317~2.424	0.801
LDH(升高/正常)	0.026	1.824	0.891~3.736	0.100
ECOG评分(≥2分/<2分)	0.000	5.907	2.399~14.549	0.000
Ann Arbor分期(Ⅲ~Ⅳ/ I~Ⅱ期)	0.300			
骨髓受累(有/无)	0.063			
IPI评分(>2分/≤2分)	0.001	0.641	0.263~1.566	0.329
Ki-67(>70%/≤70%)	0.954			
T-bet表达(阳性/阴性)	0.623			

注: B症状: 发热、盗汗、体重减轻; LDH 正常值: 0~250 U/L; ECOG评分: 美国东部肿瘤合作组体能状态评分; IPI评分: 国际预后指数评分系统

表3 NK-T细胞淋巴瘤患者T-bet表达与EBV表达的相关性分析(例)

EBV表达	T-bet表达		P值
	阴性	阳性	
无	5	3	0.660
有	5	5	

中被验证,将对探索PTCL恶性转化机制和研发新药均有重大指导意义。

转录因子T-bet作为Th1细胞的分化标志,在T细胞的分化中起到关键节点调节作用^[15];同时作为细胞毒性T与NK细胞终末成熟的主导转录调控因子,对于细胞毒相关细胞因子的分泌亦有调节作用^[16]。2014年,Iqbal等^[12]采用基因芯片技术对PTCL尝试进一步分型,发现PTCL-NOS可进一步划分为GATA3高表达组(33%)与T-bet高表达组(49%),T-bet高表达组患者的预后显著优于GATA3高表达组($P=0.010$)。与Iqbal的大数据研究结论不一致,本研究中我们并未发现T-bet与PTCL患者的总体预后相关性。考虑可能的原因为:①我们的研究例数较少,仅为109例,抽样偏倚有可能造成相关性未检出。②我们的研究着眼于T-bet在蛋白水平的表达,而Iqbal等的研究着眼于其在mRNA水平的表达,T-bet在翻译时可能发生其他方面的复杂调控,以致于其mRNA和蛋白表达水平不一致。③进一步挖掘文献^[12]的数据,T-bet高表达组的总体基

因表达谱与正常Th1细胞基因表达谱相关性比较低,且T-bet组内部似乎异质性依然较强,甚或能够区分出类似细胞毒性T细胞的表达谱亚群。提示Th1细胞来源或许不能仅仅依赖T-bet的表达区分,尚需结合其他免疫分化指标一起鉴别。

需要指出的是,不同病理亚型的PTCL患者之间预后差异较大。皮肤T细胞淋巴瘤患者的预后最佳,原发性皮肤间变大细胞淋巴瘤患者的5年OS率高达90%,皮下脂膜炎样T细胞淋巴瘤患者为64%。相比之下,肠病相关T细胞淋巴瘤和肝脾T细胞淋巴瘤患者预后极差,报道的5年OS率仅为20%和7%^[17]。本研究中的109例患者包括多种病理亚型,不同病理亚型之间的OS异质性可能造成T-bet影响效应无法检出,需要进一步依据病理亚型进行分层研究。限于例数,本研究只对例数相对多的PTCL-NOS与NKT进行了分层研究。我们并没有发现PTCL-NOS与T-bet之间的关系,但发现T-bet为NKT患者的预后保护性因素。这与2012年Ren等^[18]的研究结论相吻合,该课题组收集了50例NKT患者的肿瘤组织并进行免疫组化研究,发现T-bet高表达与NKT预后良好显著相关($P=0.031$)。几项基础研究揭示了这一现象背后的可能机制。T-bet能够上调NK-T细胞系中的p53表达,进而使得肿瘤细胞对化疗药物反应更敏感^[19]。EBV感染在NKT患者中也相对常见,这种病毒可以编码miR-BART20-5p,抑制T-bet翻译,进而在体内促进患者对传统细胞毒性化疗药物的抗药性。临床工作中确实观察到合并EBV感染的T细胞淋巴瘤与NKT患者预后不佳。我们在本研究中亦分析了NKT患者中T-bet表达与EBV表达的相关性,但并未发现两者相关。因NKT患者仅18例,限制了这一结论的可靠性。未来,我们期待能够增加NKT患者例数,在更大的人群中进一步确证T-bet的预后保护性效应,并且分析T-bet表达水平与EBV载量之间的相关性。

综上,转录因子T-bet在几类PTCL病理亚型患者中均有不同比例的阳性表达,其表达水平与NKT患者的OS期呈正相关。本研究并非独创性研究,而是在前人研究的基础上,在中国患者群中做的验证与拓展。在今后的工作中,我们期望能够在更大规模的NKT患者群中,前瞻性地验证T-bet与其预后的关系。我们希望看到这项研究在PTCL患者危险分层和新药研发中的转化应用,这才是转化医学的真谛。

参 考 文 献

- [1] Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project [J]. *Ann Oncol*, 1998, 9(7): 717-720.
- [2] Tang T, Tay K, Quek R, et al. Peripheral T-cell lymphoma: review and updates of current management strategies [J]. *Adv Hematol*, 2010, 2010: 624040. doi: 10.1155/2010/624040.
- [3] Jaffe ES, Nicolae A, Pittaluga S. Peripheral T-cell and NK-cell lymphomas in the WHO classification: pearls and pitfalls [J]. *Mod Pathol*, 2013, 26 Suppl 1: S71-87. doi: 10.1038/modpathol.2012.181.
- [4] Vose J, Armitage J, Weisenburger D. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(25): 4124-4130. doi: 10.1200/JCO.2008.16.4558.
- [5] Zelenetz AD, Gordon LI, Wierda WG, et al. Non-Hodgkin's lymphomas, version 4.2014 [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2014, 12(9): 1282-1303.
- [6] Horwitz SM, Advani RH, Bartlett NL, et al. Objective responses in relapsed T-cell lymphomas with single-agent brentuximab vedotin [J]. *Blood*, 2014, 123(20): 3095-3100. doi: 10.1182/blood-2013-12-542142.
- [7] Toumshay E, Prasad A, Dueck G, et al. Final report of a phase 2 clinical trial of lenalidomide monotherapy for patients with T-cell lymphoma [J]. *Cancer*, 2015, 121(5): 716-723. doi: 10.1002/cncr.29103.
- [8] Coiffier B, Pro B, Prince HM, et al. Results from a pivotal, open-label, phase II study of romidepsin in relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma after prior systemic therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(6): 631-636. doi: 10.1200/JCO.2011.37.4223.
- [9] O'Connor OA, Pro B, Pinter-Brown L, et al. Pralatrexate in patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: results from the pivotal PROPEL study [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(9): 1182-1189. doi: 10.1200/JCO.2010.29.9024.
- [10] Hoyler T, Connor CA, Kiss EA, et al. T-bet and Gata3 in controlling type 1 and type 2 immunity mediated by innate lymphoid cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25(2): 139-147. doi: 10.1016/j.coi.2013.02.007.
- [11] Lin TC, Chen SU, Chen YF, et al. Intramucosal variant of nasal natural killer (NK)/T cell lymphoma has a better survival than does invasive variant: implication on loss of E26 transformation-specific sequence 1 (ETS-1) and T-box expressed in T cells (T-bet) with invasion [J]. *Histopathology*, 2012, 60(2): 287-295. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04086.x.
- [12] Iqbal J, Wright G, Wang C, et al. Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2014, 123(19): 2915-2923. doi: 10.1182/blood-2013-11-536359.
- [13] Liu C, Iqbal J, Teruya-Feldstein J, et al. MicroRNA expression profiling identifies molecular signatures associated with anaplastic large cell lymphoma [J]. *Blood*, 2013, 122(12): 2083-2092. doi: 10.1182/blood-2012-08-447375.
- [14] Odejide O, Weigert O, Lane AA, et al. A targeted mutational landscape of angioimmunoblastic T-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2014, 123(9): 1293-1296. doi: 10.1182/blood-2013-10-531509.
- [15] Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, et al. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility [J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 607-656. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115821.
- [16] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment [J]. *Cell*, 2000, 100(6): 655-669.
- [17] William BM, Armitage JO. International analysis of the frequency and outcomes of NK/T-cell lymphomas [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2013, 26(1): 23-32. doi: 10.1016/j.beha.2013.04.003.
- [18] Ren YL, Nong L, Zhang S, et al. Analysis of 142 Northern Chinese patients with peripheral T/NK-Cell lymphomas: subtype distribution, clinicopathologic features, and prognosis [J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 138(3): 435-447. doi: 10.1309/AJCPWKJ3GPFRT7GA.
- [19] Lin TC, Liu TY, Hsu SM, et al. Epstein-Barr virus-encoded miR-BART20-5p inhibits T-bet translation with secondary suppression of p53 in invasive nasal NK/T-cell lymphoma [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(5): 1865-1875. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.025.

(收稿日期:2016-03-31)

(本文编辑:刘志红)