·临床研究·

14-3-3-zeta在Ⅲ/Ⅳ期套细胞淋巴瘤患者中的表达及其临床意义

朱米娜[1]，王健红[2]，郝彩霞[2]，王文勇[3]，张　娜[2]，贾卫静[2]，唐海龙[2]，董宝侠[2]，顾宏涛[2]，张　涛[2]，杨　岚[2]，高广勋[2]，陈协群[2]，王　哲[3]，梁　蓉[2]*

（[1]西安市第一医院急诊科，西安 710002；第四军医大学西京医院：[2]血液科，[3]病理科，西安 710032）

【摘　要】 **目的**　探讨14-3-3zeta蛋白表达与套细胞淋巴瘤（MCL）患者疗效和预后的关系。**方法**　收集2007年3月至2012年3月期间于第四军医大学病理科确诊、血液科住院治疗的12例MCL患者的临床资料，采用免疫组织化学染色方法检测14-3-3zeta蛋白在12例MCL患者中的表达情况，分析其与MCL预后的关系。**结果**　与淋巴结反应性增生相比，12例MCL患者中8例细胞浆中表达14-3-3zeta阳性，阳性表达率为66.7%。14-3-3zeta阳性表达患者总反应率（ORR）、2年总生存（OS）率、2年无进展生存（PFS）率（62.5%，50.0%，37.5%）均低于14-3-3zeta阴性表达患者（75.0%，100.0%，75.0%），有待扩大样本量深入研究。**结论**　MCL中存在14-3-3zeta蛋白的异常高表达，其表达强弱可能与预后相关。

【关键词】 14-3-3zeta蛋白；淋巴瘤，套细胞；预后

【中图分类号】 R733.4　　【文献标识码】 A　　【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.11.192

Expression of 14-3-3-zeta in patients with stage Ⅲ/Ⅳ mantle cell lymphoma and its clinical significance

ZHU Mi-Na[1], WANG Jian-Hong[2], HAO Cai-Xia[2], WANG Wen-Yong[3], ZHANG Na[2], JIA Wei-Jing[2], TANG Hai-Long[2], DONG Bao-Xia[2], GU Hong-Tao[2], ZHANG Tao[2], YANG Lan[2], GAO Guang-Xun[2], CHEN Xie-Qun[2], WANG Zhe[3], LIANG Rong[2]*

([1]Department of Emergency, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, China; [2]Department of Hematology, [3]Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the relationships of 14-3-3zeta protein expression with the therapeutic efficacy and prognosis of the patients with mantle cell lymphoma (MCL). **Methods**　Clinical data of 12 MCL patients who were confirmed pathologically and treated in the Department of Hematology of Xijing Hospital between March 2007 and March 2012 were collected and analyzed. The protein expression of 14-3-3zeta in the patients was detected immunohistochemically, and its correlation with the prognosis of the patients was analyzed. **Results**　Compared with reactive lymphoid hyperplasia, 8 cases showed positive expression of 14-3-3zeta in the cytoplasm, accounting for 66.7%. The overall response rate (ORR), and 2-year overall survival (OS) and 2-year progression-free survival (PFS) were 62.5%, 50.0% and 37.5% respectively in the patients with positive expression of 14-3-3zeta, significantly lower than those in the negative expression patients (75.0%, 100.0 and 75.0%). Our results need in-depth study with larger samples. **Conclusion**　MCL patients have abnormally high expression of 14-3-3zeta protein, and its expression level may be correlated with the patients' prognosis.

【**Key words**】 14-3-3zeta protein; lymphoma, mantle cell; prognosis

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81370641).

Corresponding author: *LIANG Rong*, *E-mail*: *rongliang1017@yahoo.com*

套细胞淋巴瘤（mantle cell lymphoma, MCL）是一种B细胞非霍奇金淋巴瘤（non-Hodgkin's lymphoma, NHL），约占NHL的3%～10%，异质性强，好发于老年男性，患者就诊时常为Ⅲ～Ⅳ期，易复发，预后差[1-4]。目前多采用淋巴瘤国际预后指数（international prognostic index, IPI）和MCL国际

收稿日期：2016-5-23；**修回日期**：2016-08-21

基金项目：国家自然科学基金（81370641）

通信作者：梁　蓉，E-mail：rongliang1017@yahoo.com

预后指数(MIPI)进行风险分层[5,6],但仍难以准确指导MCL临床治疗和预后评估,亟需探讨新的预后判断指标。

14-3-3zeta属14-3-3蛋白家族成员,可通过结合蛋白发挥对多种网络信号的调控,如Bax、Bad与14-3-3zeta结合后定位在胞浆内,通过阻断它们与线粒体Bcl-2的结合发挥抗细胞凋亡作用,在肿瘤发生、发展中扮演重要角色[7-9]。有研究表明14-3-3zeta与弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)的发病机制有关[10],目前未出现其在MCL表达的研究报道。本研究旨在探讨14-3-3-zeta的表达及其与MCL患者预后的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集2007年3月至2012年3月期间于第四军医大学西京医院取材、病理科确诊、血液科住院标准治疗的,并取得完整2年随访资料的12例MCL患者的临床资料,包括:性别、发病年龄、发病部位、全身症状、美国东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Group, ECOG)评分、肿大淋巴结、脾脏及骨髓侵犯、其他结外侵犯、临床分期、发病时的白细胞数、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、β_2-微球蛋白(β_2-microglobulin, β_2-GM)、病理结果、治疗方案。所有患者均接受1个疗程以上CHOP(E)方案{多柔比星(doxorubicin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、长春新碱(vincristine)、泼尼松[prednisone;依托泊苷(etoposide)]}±R[利妥昔单抗(rituximab)]联合化疗,2例同时行局部放疗。1例经化疗+局部放疗达完全缓解(complete remission, CR)后行自体造血干细胞移植(autologous stem-cell transplantation, ASCT);1例选用PAD方案[硼替佐米(bortezomib)、多柔比星、地塞米松(dexamethasone)]联合化疗,达CR后采用美罗华(利妥昔单抗注射液)1次/月维持治疗。所有方案药物剂量均参照美国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)指南MCL治疗方案的标准剂量,按体表面积计算得出。患者完成2~6个疗程正规化疗后,评定短期疗效总反应率(overall response rate, ORR),包括CR和部分完全缓解(partial remission, PR);随访2年,观察总生存(overall survival, OS)率及无进展生存(progression free survival, PFS)率。

调取患者存档蜡块,重新切片、固定,经免疫组化检测蛋白表达,以15份淋巴结反应性增生标本作为对照。

1.2 主要试剂与仪器

14-3-3zeta,兔抗人多克隆抗体(Abcam公司,英国);CD20、CD10、CD79α、Bcl-2、GTVision™Ⅲ抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒(DAKO公司,丹麦);CD5、CD3、PAX5、Cyclin D1(迈新生物技术开发有限公司,福州)。显微镜及成像系统(Olympus公司,日本)。

1.3 常规HE染色及免疫组织化学染色

12例患者病理活检标本经HE染色、光镜下观察。采用抗原抗体反应原理,用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶二步法检测免疫表型:一抗14-3-3zeta浓度为1∶50,开始免疫组织化学染色前抗原经微波修复10 min。采用磷酸缓冲液代替一抗作为阴性对照,并采用试剂盒建议的阳性对照片作阳性对照。

1.4 结果判定

兼顾阳性染色强度与数量进行免疫组织化学染色结果判定。以细胞内出现棕黄色颗粒为阳性标记。(1)根据染色强度分为0分(无色)、1分(浅黄色)、2分(棕黄色)、3分(棕褐色);(2)根据肿瘤阳性细胞百分比分为0分(无阳性)、1分(≤25%)、2分(26%~50%)、3分(51%~75%)、4分(>75%);(3)染色强度积分与数量积分相加后判定结果:0分为-,1分为±;2~3分为+,4~5分为++,6~7分为+++。

1.5 统计学处理

结果数据用SPSS17.0统计软件进行分析。组间比较采用Fisher确切概率法。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者一般情况

12例患者中男性9例,女性3例,男∶女=3∶1,中位年龄57.5(45~74)岁,病理类型均为弥散性。临床特点具体见表1。

2.2 14-3-3zeta在MCL中的表达及临床意义

14-3-3zeta在反应性增生淋巴结中弱表达。12例MCL患者中8例细胞浆中14-3-3zeta阳性表达,阳性表达率为66.7%(表1,图1)。

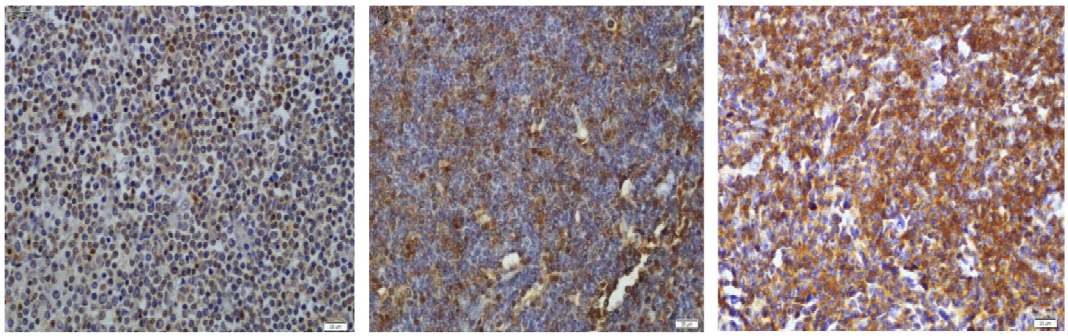
14-3-3zeta阳性表达患者ORR(62.5%,8例患者中5例缓解)与阴性表达患者(75.0%,4例患者中3例缓解)相比,无明显差异;14-3-3zeta阳性表达患者2年PFS率(37.5%,8例患者中3例无进展)低于阴性表达患者(75.0%,4例患者中3例无进展);14-3-3zeta阳性表达患者2年OS率(50.0%,

表1 12例MCL患者14-3-3zeta的表达

Table 1 14-3-3zeta expression in 12 patients with MCL

Patient	Gender	Age (years)	Onset site	14-3-3zeta	Bcl-2	IPI	MIPI	Ann Arbor stage	B-symptom	Spleen(S)/ marrow(M)	LDH (U/L)
1	F	57	Colon	+	*ND	2	5.10	ⅣB	+	M	207
2	F	63	Parotid	+ + +	*ND	3	5.42	ⅢB	+	S	168
3	M	45	▲N	+ +	+	1	5.12	ⅣB	−	S	204
4	M	74	▲N	+ +	+	2	*ND	Ⅲ	−	−	*ND
5	M	65	▲N	+ +	+	3	6.7	ⅣA	+	S&M	400
6	M	58	▲N	+ +	*ND	2	6.58	ⅣB	+	S&M	417
7	M	45	Spleen	−	*ND	1	4.94	ⅣB	+	S&M	202
8	M	70	▲N	+	+	3	5.99	ⅣA	−	S&M	221
9	M	50	▲N	+ + +	+	1	5.32	ⅢA	−	S	305
10	M	50	Spleen	− +	−	1	5.06	ⅣB	−	S&M	121
11	F	46	▲N	− +	+	2	5.33	ⅣA	−	S&M	258
12	M	63	▲N	−	+	3	5.83	ⅣA	−	−	252

MCL: mantle cell lymphoma; IPI: international prognostic index; MIPI: mantle cell lymphoma international prognostic index; LDH: lactate dehydrogenase; F: female; M: male; *ND: not done; ▲N: lymph node



A B C

图1 免疫组织化学检测14-3-3zeta在MCL的表达

Figure 1 14-3-3zeta expression in MCL determined immunohistochemically (SABC ×100)

MCL: mantle cell lymphoma. A: 14-3-3zeta +; B: 14-3-3zeta + +; C: 14-3-3zeta + + +

8例患者中4例存活)低于阴性表达患者(100%,4例患者全部存活)。由于样本量太小,上述结果差异均无统计学意义(均$P>0.05$)。

8例14-3-3zeta阳性患者中5例Bcl-2阳性;7例Bcl-2阳性患者中5例14-3-3zeta阳性(71.4%),两者表达有相关性(表1)。14-3-3zeta与Bcl-2均表达阳性者5例,4例治疗有效(ORR),2例达2年PFS,2例达2年长生存;14-3-3zeta与Bcl-2其中之一表达阳性者2例,均治疗有效(ORR),1例达2年PFS,2例达2年长生存。8例14-3-3zeta阳性患者中3例行R+CHOP(E)方案化疗,2例治疗有效(ORR),2例达2年PFS,3例达2年长生存;5例行CHOP(E)方案化疗,3例治疗有效(ORR),1例达2年PFS,1例达2年长生存。结果提示,14-3-3zeta与Bcl-2表达均阳性者疗效较单一阳性表达者差,R+CHOP(E)方案组疗效优于CHOP(E)方案组,有临床意义,但样本量少,尚无统计学意义,需扩大样本量进一步研究。

3 讨 论

MCL是一种相对少见的、具有高度异质性的特殊类型NHL,兼有侵袭性淋巴瘤和惰性淋巴瘤的特征,还具有特征性的遗传学易位特点t(11;14)(q13;q32),并导致细胞周期蛋白(cyclin)D1过度表达。MCL中位生存期3~5年,预后受多种因素影响,目前多采用IPI和MIPI进行预后评估[5,6],但仍难以准确地指导临床治疗和预后评估,亟需探讨新的预后判断指标。本研究旨在初步探讨新的分子14-3-3zeta蛋白在MCL表达中的意义,指导临床诊疗。

本研究12例患者中男性9例,女性3例,男:女=3:1,中位年龄57.5(45~74)岁。Ann Arbor临床分期均为Ⅲ~Ⅳ期;淋巴结起病8例(占66.7%);脾脏受累9例(占75.0%);骨髓侵犯7例(占58.3%);伴随全身症状者5例(占41.7%);所有患者病理类型均为弥散型;IPI 0~2分(中低危)

的患者约占66.7%；MIPI <5.7（中低危）的患者约占63.6%。

14-3-3zeta是14-3-3蛋白家族的一个亚型，可通过Bad、Bax和Noxa、细胞骨架蛋白、CDC25C、HDACs和组蛋白等结合蛋白发挥对多种网络信号的调控，如Noxa与Mcl-1蛋白结合能促进Mcl-1蛋白降解，导致细胞凋亡；14-3-3zeta/Noxa结合可能通过Mcl-1而抑制凋亡。14-3-3 zeta与Bax和Bad结合后定位在胞浆内，通过阻断它们与线粒体Bcl-XL和Bcl-2的结合发挥抗细胞凋亡作用[7,8]。14-3-3zeta参与多种癌症细胞的增殖、周期调控、黏附、生长和凋亡等，在肿瘤的发生、发展中起重要作用[9,11-13]。研究显示下调14-3-3zeta表达可诱导肿瘤细胞凋亡并增加肿瘤细胞对化疗敏感性，可能是潜在的未来肿瘤治疗的新靶点[9,14,15]。Maxwell等[10]的研究表明14-3-3zeta与DLBCL的发病机制有关，并且提出了针对耐药性DLBCL使用14-3-3抑制剂这样一种有前景的综合治疗方案。目前未出现14-3-3zeta在MCL表达的临床意义的体内外研究报道。

我们研究表明，12例患者14-3-3zeta表达阳性8例（66.7%），71.4%的Bcl-2表达阳性者14-3-3zeta表达阳性，符合正相关，且两者均表达阳性者的ORR、2年PFS/ OS率均较单一阳性表达者差。进行预后因素分析结果如下。（1）14-3-3zeta阳性表达患者ORR、2年OS率、2年PFS率（62.5%、50.0%、37.5%）均低于14-3-3zeta阴性表达患者（75.0%、100.0%、75.0%）。（2）8例14-3-3zeta阳性患者中3例行R+CHOP（E）方案化疗，2例治疗有效（ORR），2例达2年PFS，3例达2年长生存；5例行CHOP（E）方案化疗，3例治疗有效（ORR），1例达2年PFS，1例达2年长生存。提示R+CHOP（E）方案组的ORR、2年PFS/ OS率均优于CHOP（E）方案组，表明利妥昔单抗联合化疗可提高疗效，与国内外报道一致[16,17]。两个方案的疗效差异虽有临床意义，但样本量少，尚无统计学意义，需扩大样本量进一步研究。

以上结果提示，14-3-3zeta蛋白可能与MCL预后有一定关系；而14-3-3zeta与Bcl-2表达符合正相关，推测14-3-3zeta与MCL预后相关性原因与Bcl-2有关，可能是MCL治疗的新靶点。

【参考文献】

[1] Goy A. Update in the management of mantle cell lymphoma[J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2013, 11(5): 297-299.

[2] Skarbnik AP, Smith MR. Therapies for mantle cell lymphoma: current challenges and a brighter future[J]. Discov Med, 2013, 15(82): 177-187.

[3] Brett K, Williams ME. Current and emerging therapies in mantle cell lymphoma[J]. Curr Treat Options Oncol, 2013, 14(2): 198-211.

[4] Dreyling M, Geisler C, Hermine O, *et al*. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2014, 25 (suppl 3): iii83-iii92.

[5] Hoster E, Dreyling M, Klapper W, *et al*. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma[J]. Blood, 2008, 111(2): 558-565.

[6] McKay P, Leach M, Jackson R, *et al*. Guidelines for the investigation and management of mantle cell lymphoma[J]. Br J Haematol, 2012, 159(4): 405-426.

[7] Gardino AK, Yaffe MB. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis[J]. Semin Cell Dev Biol, 2011, 22(7): 688-695.

[8] Tromp JM, Geest CR, Breij EC, *et al*. Tipping the Noxa/Mcl-1 balance overcomes ABT-737 resistance in chronic lymphocytic leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(2): 487-498.

[9] Yang X, Cao W, Zhang L, *et al*. Targeting 14-3-3zeta in cancer therapy[J]. Cancer Gene Ther, 2012, 19(3): 153-159.

[10] Maxwell SA, Li Z, Jaye D, *et al*. 14-3-3zeta mediates resistance of diffuse large B cell lymphoma to an anthracycline-based chemotherapeutic regimen[J]. J Biol Chem, 2009, 84(33): 22379-22389.

[11] Matta A, Siu KW, Ralhan R. 14-3-3 zeta as novel molecular target for cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(5): 515-523.

[12] Chen M, Liu T, Xu L, *et al*. Direct interaction of 14-3-3ζ with ezrin promotes cell migration by regulating the formation of membrane ruffle[J]. J Mol Biol, 2014, 426(18): 3118-3133.

[13] Uhart M, Bustos DM. Protein intrinsic disorder and network connectivity. The case of 14-3-3 proteins[J]. Front Genet, 2014, 5: 10.

[14] Bergamaschi A, Katzenellenbogen BS. Tamoxifen down regulation of miR-451 increases 14-3-3ζ and promotes breast cancer cell survival and endocrine resistance[J]. Oncogene, 2012, 31(1): 39-47.

[15] Toyo-Oka K, Wachi T, Hunt RF, *et al*. 14-3-3ε and ζ regulate neurogenesis and differentiation of neuronal progenitor cells in the developing brain[J]. J Neurosci, 2014, 34(36): 12168-12181.

[16] Armand P, Redd R, Bsat J, *et al*. A phase 2 study of Rituximab-Bendamustine and Rituximab-Cytarabine for transplant-eligible patients with mantle cell lymphoma[J]. Br J Haematol, 2016, 173(1): 89-95.

[17] Bao WY, Wang Y, Hu XM, *et al*. Clinical features and prognostic analysis of mantle cell lymphoma[J]. Chin J Hematol, 2012, 33(10): 814-818.[包维莺，王 焰，胡喜梅，等. 套细胞淋巴瘤的临床特点及预后分析[J]. 中华血液学杂志，2012，33(10)：814-818.]

（编辑：周宇红）