

医学论著 | 基础研究

ZFX 蛋白在胃癌组织中的表达与病理和预后关系的研究

崔纪芳¹, 王宏磊², 赵永捷², 刘艳迪¹

摘要 目的: 探讨胃癌组织中 X 染色体连锁锌指蛋白 (ZFX) 的表达, 评价其与患者临床病理特征及预后的关系。**方法:** 选取 2013 年 1 月—2015 年 12 月经手术切除的胃癌组织标本, 并收集其癌旁组织标本作为对照组。采用 qRT-PCR 方法检测 43 例胃癌组织及其对应癌旁组织中 ZFX mRNA 的表达, 免疫组织化学 (IHC) 方法进一步检测 114 例胃癌及其癌旁组织中 ZFX 蛋白的表达情况, 观察并探讨其与临床病理参数之间的关系, 采用 Kaplan-Meier 对胃癌患者生存情况进行分析。**结果:** qRT-PCR 结果显示 ZFX mRNA 在胃癌组织中的表达异常升高, 明显高于癌旁组织; 进一步 IHC 结果表明, ZFX 蛋白的表达位于细胞核, 胃癌组织中的表达阳性率约为 76.3%, 而癌旁组织中的阳性率仅有 19.3%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。进一步分析显示, 胃癌组织中 ZFX 蛋白的表达与患者的年龄、性别、肿瘤部位及 TNM 分期无关 ($P > 0.05$), 而与肿瘤分化程度、淋巴结转移、肿瘤的浸润深度密切相关 ($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 生存曲线显示 ZFX 蛋白阴性表达组的总生存期高于阳性表达组 ($P < 0.05$)。**结论:** ZFX 在胃癌组织中于基因水平和蛋白水平均呈现异常高表达, 并与患者临床病理参数和预后密切相关, 提示 ZFX 参与胃癌的发生发展, 有望成为胃癌潜在的预后指标。

关键词: 胃癌; ZFX; 临床病理参数; 预后

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1007-6948(2019)03-0276-05

doi: 10.3969/j.issn.1007-6948.2019.03.005

Expression of ZFX Protein and its Relationship with Pathology and Prognosis in Gastric Cancer CUI Ji-fang, WANG Hong-lei, ZHAO Yong-jie, et al. *Department of Gastroenterology, Tianjin People's Hospital, Tianjin (300122), China*

Abstract: Objective To explore the relationship between the expression of zinc finger X-linked protein (ZFX) and clinicopathological parameters and prognosis in gastric cancer (GC). **Methods** Surgical GC tissue samples and paired paracancerous tissues from patients undergoing resection were selected from January 2013 to December 2015. The mRNA expression of ZFX in 43 cases of GC tissues and corresponding paracancerous tissue were determined by quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Immunohistochemistry (IHC) technology was adopted to measure the expression of ZFX protein in 114 cases of GC tissue and corresponding paracancerous tissue. The relationship between ZFX expression and clinicopathological parameters were explored. Kaplan-Meier was used to further analyze the overall survival (OS) of GC patients. **Results** qRT-PCR results showed that the mRNA level of ZFX was significantly up-regulated in GC tissues than that in paired paracancerous tissues. As for the IHC consequence, ZFX protein was located in cell nucleus. The positive expression rate of ZFX protein in GC group was about 76.3%, while that in the control group was only 19.3%, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The expression of ZFX protein was closely related to tumor differentiation, lymph node metastasis and tumor infiltration depth ($P < 0.05$), but not associated with age, gender, tumor location and TNM stage ($P > 0.05$). Kaplan-Meier survival curve showed that OS in ZFX negative expression group were higher than those in the ZFX positive group ($P < 0.05$). **Conclusion** ZFX is highly expressed in GC tissues both on gene level and protein level and closely related to clinicopathological parameters and prognosis of patients, which strongly suggests that ZFX is related to the initial and development of gastric cancer, and it is considered as a potential predictor for prognosis of

天津市人民医院 1. 消化科; 2. 普外科 (天津 300122)

通信作者: 刘艳迪, E-mail: liuyandi66@163.com

GC patients.

Key words: Gastric cancer; ZFX; clinicopathological parameters; prognosis

胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤,以亚洲人群发病率最高,我国每年新发胃癌患者 40 万例,约占世界总发病例数的 42%^[1]。胃癌病情隐匿,发现时往往已处于中晚期,治疗方案有限且预后较差,对患者的身体健康及生命安全造成严重威胁。因此,寻找一个有效的分子标记物来评价胃癌患者的预后具有重要意义。

X 染色体连锁锌指蛋白(zinc finger protein X-linked, ZFX)位于 X 染色体,属于锌指蛋白家族,ZFX 在胚胎期和成年期的造血干细胞进行自我更新过程中扮演转录调节的角色^[2]。最新研究表明,ZFX 在多种恶性肿瘤中呈现异常高表达,如乳腺癌、口腔癌、肾细胞癌、胰腺癌、前列腺癌等^[3-7]。然而 ZFX 表达与胃癌患者的临床各项指标及预后的关系尚不清楚。本研究检测了胃癌及其癌旁组织中 ZFX 的表达情况,并探讨其作为胃癌患者预后生物标志物的可能性。

1 资料与方法

1.1 临床材料 标本取自天津市人民医院普外科于 2013 年 1 月—2015 年 12 月手术切除的胃癌样本。其中收集新鲜的胃癌标本及其癌旁对照标本(据原发灶边缘至少 5 cm)各 43 例,置于 RNA 保护液中,液氮速冻后转入 -80 ℃超低温冰箱保存,用于 qRT-PCR 检测。另收集手术切除胃癌石蜡标本及其对应癌旁组织标本各 114 例,用于 IHC 检测。

收集患者临床病理资料包括肿瘤部位、肿瘤大小、分化程度、浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期等。患者年龄 39~78 岁,平均年龄(69.98 ± 13.21)岁。其中男性 88 例,女性 26 例;胃底肿瘤 60 例,胃体 23 例,胃窦 31 例。肿瘤小于 6 cm 的 76 例,大于 6 cm 的 38 例。根据组织分化分类,其中高/中分化 33 例,低/未分化 81 例。根据浸润深度分类,T1/T2 者 48 例,T3/T4 者 66 例。无淋巴结转移 36 例,有淋巴结转移 78 例。根据国际抗癌联盟标准分期,I~II 期 45 例,III 期 69 例。所有肿瘤组织均经病理证实为胃癌,组织类型均为腺癌。所有患者均未接受术前化疗和放疗。

对所有胃癌患者进行随访调查,每三个月通过电话或问卷调查的方式进行一次随访,并将所得临床参数记录在数据库中。随访起点为病理确诊日期,末次随访时间为 2018 年 8 月 31 日。本

研究通过医院伦理委员会批准,患者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂与仪器 RNA 提取试剂盒、逆转录合成试剂盒购自北京天根,引物购自上海生工,ZFX 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司,辣根过氧化物标记二抗、DAB 显色试剂盒购置北京中杉金桥。实时荧光定量 PCR 仪为 illumina Ero,光学显微镜为日本 OLYMPUS。

1.2.2 胃癌和癌旁组织中 ZFX mRNA 的表达水平检测 采用 qRT-PCR 的方法。依据 RNA 提取试剂盒说明书提取组织中的总 RNA。测量浓度后,按照逆转录合成试剂盒说明合成 cDNA。然后以该 cDNA 为模板,qRT-PCR 检测评估 ZFX mRNA 的表达程度。反应过程:95 ℃ 3 min,随后 95 ℃ 6 s、40 个循环,60 ℃ 35 s。通过 $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方式计算。ZFX 及内参照 GAPDH 引物序列见表 1。进行三次独立的实验。

表 1 ZFX 及 GAPDH 引物序列

| Gene | Primer sequence |
|-------|--------------------------------|
| ZFX | 5' -GGCAGTCCACAGCAAGAAC-3' |
| | 5' -TTGGTATCCGAGAAAGTCAGAAG-3' |
| GAPDH | 5' -GGAAGGACTCATGACCACAGTCC-3' |
| | 5' -TCGCTGTGAAGTCAGAGGAGACC-3' |

1.2.3 胃癌和癌旁组织中 ZFX 蛋白的表达水平分析 采用免疫组化的方法。样本均切成 4 微米厚的切片,常规脱蜡后梯度乙醇水化;柠檬酸缓冲液进行抗原修复,滴加 ZFX 一抗,4 ℃孵育过夜。次日 PBS 缓冲液洗涤后,滴加二抗,37 ℃孵育 30 min。最后 DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片。ZFX 阳性切片可见细胞核呈棕黄色,部分病例可见胞浆着色。染色结果由细胞的染色百分比表示(0~100%)。细胞染色百分比 0~10%为阴性表达,10~20%为中等表达,大于 20%为强表达,其中中等表达与强表达都认定为阳性表达。

1.2.4 统计学方法 采用 SPSS18.0 统计软件。ZFX 组间表达差异采用 *t* 检验,评估 ZFX 表达与胃癌患者临床参数之间的关系采用卡方检验。通过 Kaplan-Meier 分析来评价胃癌患者总生存率与

阳性 ZFX 表达和阴性 ZFX 表达的关系。 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZFX mRNA 在胃癌及癌旁组织的表达比较 如表 2 和图 1 所示, ZFX mRNA 在胃癌组织中的相对表达量为 6.36 ± 2.30^a , 而相应癌旁组织仅为 1.50 ± 0.88 , 胃癌组织明显高于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

表 2 ZFX mRNA 在胃癌及其癌旁组织中的表达量

| 分组 | mRNA |
|------|-------------------|
| 胃癌 | 6.36 ± 2.30^a |
| 癌旁组织 | 1.50 ± 0.88 |

注: ^a与癌旁组织相比, $P<0.01$

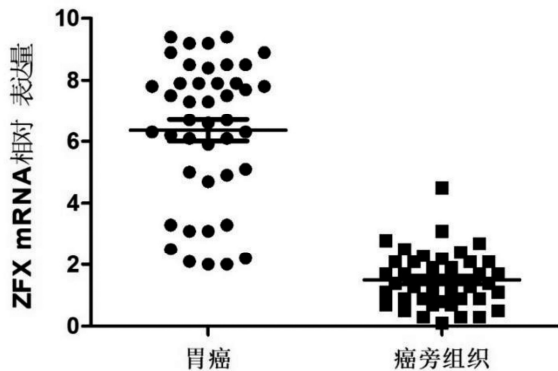


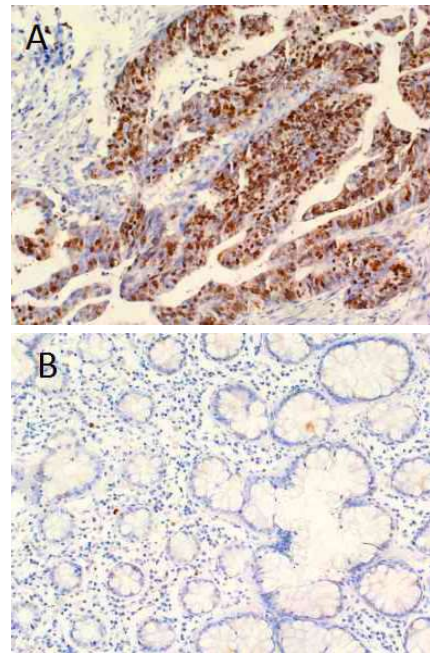
图 1 ZFX mRNA 在胃癌及其癌旁组织中的表达

2.2 ZFX 蛋白在胃癌及癌旁组织的表达比较 通过 IHC 检测 ZFX 蛋白的表达, 结果表示 ZFX 在胃癌组织中的阳性表达率为 76.3%, 而在正常组织中仅为 19.3%, 胃癌组织中 ZFX 的表达水平显著高于正常组织 ($P<0.01$), 见表 3, 图 2。

表 3 胃癌与癌旁组织中 ZFX 蛋白的表达情况

| 组织 | 病例数 | 表达 | | 阳性率 |
|------|-----|----|----|------------|
| | | 阳性 | 阴性 | |
| 胃癌 | 114 | 87 | 27 | $76.3\%^a$ |
| 癌旁组织 | 114 | 22 | 92 | 19.3% |

注: ^a与癌旁组织相比, $P<0.01$



注: A: 胃癌组织 B: 癌旁组织

图 2 免疫组化法检测 ZFX 蛋白在胃癌及其癌旁组织中的表达 (SP, $\times 400$)

2.3 ZFX 表达与胃癌患者临床指标相关性 运用卡方检验评价 ZFX 蛋白表达与胃癌患者的临床参数之间的关系。结果显示: ZFX 表达与胃癌分化程度、淋巴结转移、肿瘤的浸润深度密切相关 ($P<0.05$), 与患者的年龄、性别、肿瘤部位及 TNM 分期无明显相关性 ($P>0.05$), 见表 4。

2.4 ZFX 与胃癌患者预后的关系 根据 IHC 检测结果, 将胃癌患者预后与 ZFX 表达水平进行生存分析并绘制 Kaplan-Meier 生存曲线, 探讨 ZFX 蛋白表达与预后之间的关系, 见图 3。结果显示 ZFX 蛋白高表达胃癌患者的总生存期仅为 38.68 ± 2.74 月, 相较于 ZFX 蛋白低表达的胃癌患者的 53.31 ± 4.43 月明显偏低 ($\chi^2=3.944$, $P=0.047$), 差异有统计学意义。

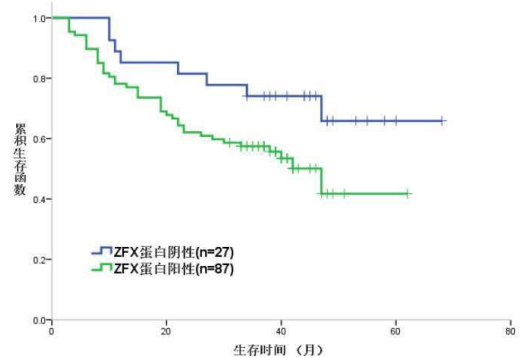


图 3 ZFX 表达与胃癌患者总生存率的关系

表 4 ZFX 表达与胃癌临床病理参数的关系

| 临床病理参数 | 病例数 | 蛋白表达 | | χ^2 | P |
|------------|-----|------|----|----------|--------------------|
| | | 阳性 | 阴性 | | |
| 年龄 (岁) | | | | 0.013 | 1.000 |
| < 60 | 56 | 43 | 13 | | |
| \geq 60 | 58 | 44 | 14 | | |
| 性别 | | | | 0.007 | 1.000 |
| 男 | 88 | 67 | 21 | | |
| 女 | 26 | 20 | 6 | | |
| 肿瘤部位 | | | | 5.528 | 0.062 |
| 胃底 | 60 | 41 | 19 | | |
| 胃体 | 23 | 18 | 5 | | |
| 胃窦 | 31 | 28 | 3 | | |
| 肿瘤大小 (cm) | | | | 1.527 | 0.217 |
| < 6.0 | 76 | 45 | 31 | | |
| \geq 6.0 | 38 | 27 | 11 | | |
| 分化程度 | | | | 6.909 | 0.015 ^a |
| 高 / 中分化 | 33 | 16 | 17 | | |
| 低 / 未分化 | 81 | 60 | 21 | | |
| 浸润深度 | | | | | |
| T1/T2 | 48 | 22 | 26 | 4.948 | 0.035 ^a |
| T3/T4 | 66 | 44 | 22 | | |
| 淋巴结转移 | | | | | |
| 无 | 36 | 16 | 20 | 5.515 | 0.024 ^a |
| 有 | 78 | 54 | 26 | | |
| TNM 分期 | | | | 3.231 | 0.086 |
| I~II | 45 | 19 | 26 | | |
| III | 69 | 41 | 28 | | |

注: ^a两亚组相比较, $P < 0.05$

3 讨论

胃癌恶性程度高, 早期症状不明显且进展迅速, 发现时往往为时已晚。尽管胃癌的诊治技术取得了很大的进步, 但其预后仍不乐观。最新调查证明, 胃癌患病率呈明显上升趋势^[1]。而单纯依靠临床和病理分期来评价胃癌患者的预后是不够准确的。因此, 迫切需要发现新的分子标记物用来评价胃癌患者的预后。

锌指蛋白 (zinc finger protein) 是一类含有短的稳定的能与 Zn_2^+ 结合并自我折叠形成“手指”结构的蛋白质, 他们广泛分布于真核基因组并发挥重要的调控作用。锌指蛋白与人类肿瘤发

生发展紧密相关, 如锌指蛋白 280B 能够促进前列腺癌细胞的生长, 锌指蛋白 703 促进胃癌的进展^[8-9]。X 染色体连锁锌指蛋白 (zinc finger protein, X-linked, ZFX) 作为锌指蛋白超家族中一员, 在多种干细胞的自我更新和抗凋亡机制中发挥作用^[2]。近年的研究显示 ZFX 在多种恶性肿瘤中如结肠癌、肝癌、骨肉瘤、白血病等中异常表达, 并参与恶性肿瘤的发生发展^[10-14]。ZFX 基因在胆囊癌中高表达, 沉默 ZFX 的表达能够显著地抑制胆囊癌细胞的迁移^[15]。在肾细胞癌中, ZFX 基因和蛋白的表达阳性率均明显升高, 且与肾癌的 TNM 分期、肿瘤大小等因素密切相关^[5]。

在本研究中, ZFX mRNA 和蛋白在胃癌组织中的表达均高于相应的癌旁组织, 差异有统计学意义, 提示 ZFX 在胃癌的发生发展中发挥着促癌基因的作用。为了进一步了解 ZFX 在胃癌发生发展中的作用, 我们探讨了 ZFX 表达与临床参数之间的关系。结果显示, ZFX 表达与胃癌分化程度、淋巴结转移、肿瘤的浸润深度密切相关, 与患者的年龄、性别、肿瘤部位及 TNM 分期无明显相关性, 提示 ZFX 的异常表达增高与胃癌的恶性程度、疾病的进展及转移均密切相关。结合既往的研究报道, ZFX 有可能通过修改下游某些基因, 如胱天蛋白酶 1, 蛋白激酶存活素和 Ki-67 的表达来调控肿瘤细胞的增殖和凋亡^[16]; ZFX 或作为转录活化因子通过结合 CpG 岛启动子的转录起始位点调节细胞增殖与肿瘤发生; ZFX 也可能通过调节癌症相关的多个重要信号通路通如 ERK-MAPK、MAPK 等促进肿瘤细胞的增值、侵袭和转移^[17]。但关于 ZFX 在胃癌发生发展中的分子机制还需要进一步研究。进一步的 Kaplan-Meier 生存分析显示, ZFX 阳性表达的胃癌患者的生存期明显低于表达阴性的患者, 提示 ZFX 表达可作为评价胃癌患者预后的潜在分子标志物之一。

综上所述, ZFX 在胃癌组织中的表达明显上调, 结合 ZFX 表达与胃癌患者临床病理参数及预后的关系, 提示 ZFX 蛋白可能参与了胃癌的发生发展过程, 对于判断胃癌的进展及预后具有重要的价值。本研究结果有望为基于 ZFX 研究胃癌的预后判断提供一点的理论基础和依据。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1):7-30.
- [2] Galan-Caridad JM, Harel S, Arenzana TL, et al. Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells [J]. *Cell*, 2007, 129(2):345-357.
- [3] Ganji-Arjenaki M, Emadi-Baygi M, Teimori H, et al. ZFX Overexpression in Breast Cancer Positively Correlates with Metastasis [J]. *Res Mol Med*, 2016, 4(1): 45-49.
- [4] Ma H, Yang F, Lian M, et al. Dysregulation of zinc finger protein, X-linked (ZFX) impairs cell proliferation and induces apoptosis in human oral squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(8): 6103-6112.
- [5] Li C, Li H, Zhang T, et al. ZFX is a Strong Predictor of Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma[J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21:3380-3385.
- [6] Cai L, Tsai YH, Wang P, et al. ZFX Mediates Non-canonical Oncogenic Functions of the Androgen Receptor Splice Variant 7 in Castrate-Resistant Prostate Cancer[J]. *Mol Cell*, 2018, 72(2):341-354.
- [7] 岳斌, 岳佳胜, 苏忠, 等. X 染色体耦联锌指蛋白在胰腺癌中的表达及其机制研究 [J]. *广东医学*, 2018, 39(13):1966-1970.
- [8] Gao S, Hsieh CL, Zhou J, et al. Zinc Finger 280B regulates sGAlpha1 and p53 in prostate cancer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e78766.
- [9] Yang G, Ma F, Zhong M, et al. ZNF703 acts as an oncogene that promotes progression in gastric cancer[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(4):1877-1882.
- [10] Yan X, Shan Z, Yan L, et al. High expression of Zinc-finger protein X-linked promotes tumor growth and predicts a poor outcome for stage II/III colorectal cancer patients[J]. *Oncotarget*. 2016, 7(15):19680-19692.
- [11] Wu J, Xiao L, Zhou H, et al. ZFX modulates the growth of human leukemic cells via B4GALT1 [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016, 48(12): 1120-1127.
- [12] Zhang S, Shu R, Yue M, et al. Effect of Over-Expression of Zinc-Finger Protein (ZFX) on Self-Renewal and Drug-Resistance of Hepatocellular Carcinoma[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22:3025-3034.
- [13] 郝国兵, 马丙涛, 乔林, 等. ZFX 基因在骨肉瘤中的表达及其作用机制 [J]. *肿瘤药学*, 2017, 7(1):23-27.
- [14] Wu S, Lao XY, Sun TT, et al. Knockdown of ZFX inhibits gastric cancer cell growth in vitro and in vivo via downregulating the ERK-MAPK pathway[J]. *Cancer Lett*, 2013, 337(2):293-300.
- [15] Weng H, Wang X, Li M, et al. Zinc finger X-chromosomal protein(ZFX) is a significant prognostic indicator and promotes cellular malignant potential in gallbladder cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(10): 1462-1470.
- [16] Fang J, Yu Z, Lian M, et al. Knockdown of zinc finger protein, X-linked (ZFX) inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 360(1-2):301-307.
- [17] Song X, Zhu M, Zhang F, et al. ZFX Promotes Proliferation and Metastasis of Pancreatic Cancer Cells via the MAPK Pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018; 48(1):274-284.

(收稿: 2019-03-15 修回: 2019-05-31)

(审稿专家: 孔 隽)