

网络出版时间: 2019-9-19 10:05 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190917.1059.025.html>

◇临床医学研究◇

X 染色体耦联锌指蛋白在胰腺癌组织中的表达及与患者预后的关系研究

秦学潜¹, 翁 皖¹, 郭晶晶¹, 吴 钢²

摘要 目的 探讨 X 染色体耦联锌指蛋白(ZFX)在胰腺癌组织中的表达及与胰腺癌预后的关系。方法 采用免疫组化和 Western blot 方法检测 60 例胰腺癌组织及相应癌旁组织中 ZFX 蛋白的表达情况,并分析其与胰腺癌临床病理因素之间的关系。结果 ZFX 蛋白的表达主要定位于组织细胞的胞核,在胰腺癌组织中总的阳性表达率为 63.3%,明显高于相应癌旁组织($P < 0.001$); Western blot 分析结果显示 ZFX 蛋白在胰腺癌组织(0.61 ± 0.05)表达水平高于癌旁组织(0.25 ± 0.08)。ZFX 蛋白的表达水平与胰腺癌的 TNM 分期及淋巴转移相关性具有统计学意义($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 生存曲线及 Log-rank 分析显示 ZFX 表达阳性的患者预后较差。结论 ZFX 的异常表达与胰腺癌的发生、发展密切相关,可作为判断患者预后的指标。

关键词 胰腺癌; X 染色体耦联锌指蛋白; 免疫组化; Western blot

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)11-1786-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.025

胰腺癌是一种恶性程度极高的肿瘤,约 90% 的胰腺癌为起源于胰腺上皮的导管腺癌,5 年生存率不足 5%,预后极差^[1]。尽管在过去的 20 年间人们付出很大努力,其发病率和病死率近年来仍明显上升。预计到 2030 年,胰腺癌将成为全球第 2 位癌相关的死因^[2]。胰腺癌的病因尚不十分清楚,其发生可能与吸烟、饮酒、高脂及高蛋白饮食等有关,又由于早期没有特殊症状易被忽视而导致没有被及时诊断。因此,从分子水平探究胰腺癌发生、发展机制,在胰腺癌的诊治与预后过程中寻找一种高特异性的

诊断及预后指标,对提高胰腺癌患者生存率至关重要。X 染色体耦联锌指蛋白(Zinc-finger protein X-linked ZFX)是锌指蛋白家族的一员,在调控基因表达、细胞分化及胚胎发育等过程中扮演着重要角色^[3]。最新研究^[4]表明,ZFX 不仅参与细胞的自我更新,而且可以促进恶性肿瘤的增殖、凋亡和迁移。但其与胰腺癌的相关性报道较少,这可能是由于对 ZFX 和胰腺癌之间的认知和研究依然在起步的阶段。为此,该研究采用免疫组化和 Western blot 检测 ZFX 蛋白在胰腺癌中的表达,发现其在生物学特性上对胰腺癌的影响,探讨其在胰腺癌发生、发展中的作用及临床意义,评价 ZFX 作为胰腺癌患者预后指标的临床价值。

1 材料与方法

1.1 病例资料 60 例配对的胰腺癌组织及癌旁无瘤组织均为上海市宝山区仁和医院普外科 2008 年 1 月~2012 年 12 月手术切除标本,均经病理学证实。所有患者术前均未化疗或放疗,有完整的临床病理资料。男 28 例,女 32 例,年龄 ≥ 60 岁的 33 例, < 60 岁的 27 例,平均年龄为 70.6 岁;按 AJCC7 胰腺癌 TNM 分期标准:0 期 2 例,I 期 8 例,II 期 18 例,III 期 20 例,IV 期 12 例;病理证实均为胰腺癌,按 Edmondson's 标准^[5]:高分化 20 例,中分化 24 例,低分化 16 例。所有标本的收集均经患者知情同意,并在手术切除后立即采集 2 份,1 份置于灭活 RNA 酶的冻存管中液氮冷冻保存,另 1 份经 10% 甲醛固定后石蜡包埋。

1.2 主要试剂 鼠抗人 ZFX 单克隆试剂抗体购自美国 Abcam 公司(稀释浓度 1:200);鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(稀释浓度 1:500)、全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司;山羊抗鼠 IgG(稀释浓度 1:100)、通用型 SP 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒和 supersignal 发光试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2019-06-12 接收

基金项目:上海市宝山区科委科技创新专项资金项目(编号:13-E-29)

作者单位:¹ 上海市宝山区仁和医院普外科,上海 200431

² 复旦大学附属华山医院普外科,上海 200040

作者简介:秦学潜,男,副主任医师;

吴 钢,男,主任医师,教授,责任作者,E-mail: 20949869@qq.com

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组化和结果判定 ZFX 蛋白阳性信号定位于细胞核,因此以细胞核染色呈棕黄色为阳性,对染色的程度进行评分。细胞染色程度:阴性为0分,轻度为1分,中度为2分,重度为3分;在高倍镜下对切片进行观察并记录着色细胞的比例,着色细胞占计数细胞的百分率 $\leq 5\%$ 为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~100%为3分,将每张切片染色程度得分与染色细胞百分率得分各自相加为其最后得分:0分为阴性(-),1~2分为弱阳性(+),3分为阳性(++),4~6分为强阳性(+++)。为统计方便,最终将++~+++定义为阳性,而其他定义为阴性^[6]。

1.3.2 Western blot 分析 称取100 mg 胰腺癌组织,按组织和细胞裂解液1:10的比例加入全细胞裂解液,于冰上匀浆器充分匀浆后12 000 r/min、4℃离心10 min,取上清液提取总蛋白,用酶标仪于592 nm 波长行 Bin-choninic Acid (BCA 法)蛋白定量。煮沸(使蛋白变性)8 min后,按每孔60 μ g 蛋白量上样,以12%聚丙烯酰胺凝胶电泳,浓缩胶80 V 恒压跑至分离胶后,电压调至120 V 直至分离胶底部,后经半干转膜法以1~1.5 mA/cm² 恒电流转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭1 h, PVDF膜置于一抗稀释液(1:1 000稀释)中4℃过夜, PBST 及 PBS 洗膜10 min $\times$ 3次,再置于二抗稀释液(1:1 000稀释)中室温孵育2 h, PBST 及 PBS 洗膜10 min $\times$ 3次,加入化学发光底物(super signal west),显影, β -actin 作为内参照,用 Quantity One 4.3.1 凝胶图象分析系统扫描 ZFX 蛋白灰度值,取不同泳道蛋白的灰度值与相应内参 β -actin 的比值代表各蛋白的相对表达水平,进行统计学分析。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),两组之间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化检测 ZFX 蛋白在胰腺癌组织及癌旁组织中的表达情况 ZFX 蛋白的表达位于组织细胞的细胞核。胰腺癌组织中 ZFX 蛋白的阳性反应呈染色均一的棕黄色或棕褐色颗粒,阳性率为63.3% (38/60);而癌旁组织也可见 ZFX 蛋白的阳性表达,但反应颜色较浅,呈浅黄色,阳性率为36.7% (22/60),明显低于相应癌组织($P < 0.001$)。见图1A-C。

2.2 Western blot 方法检测 ZFX 蛋白在胰腺癌及癌旁组织中的表达情况 ZFX 蛋白在胰腺癌组织和癌旁组织中的相对表达量分别为(0.61 ± 0.05)和(0.25 ± 0.08),两组之间蛋白的相对表达量差异有统计学意义($F = 8.311$, $P < 0.05$)。见图2。

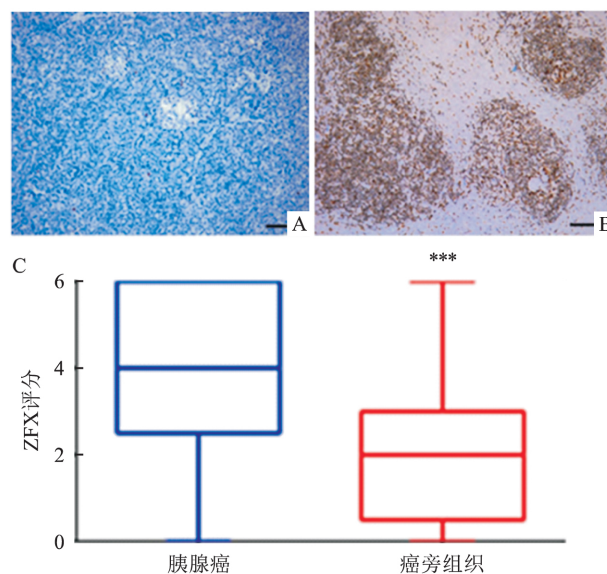


图1 ZFX 蛋白在胰腺癌组织及癌旁组织中的表达

A: 癌旁组织中 ZFX 蛋白阴性表达; B: 胰腺癌组织中 ZFX 蛋白阳性表达(+++); C: 胰腺癌及癌旁组织中 ZFX 蛋白表达强度评分;与胰腺癌组织比较:*** $P < 0.001$

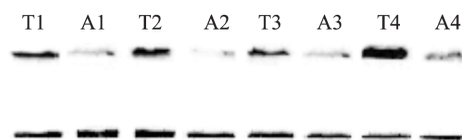


图2 Western blot 法检测 ZFX 蛋白在部分胰腺癌及癌旁组织中的表达

T: 胰腺癌组织; A: 癌旁组织; 1~4: 任意选取4对胰腺癌组织及癌旁组织

2.3 ZFX 蛋白表达与胰腺癌临床病理参数的关系

胰腺癌组织中 ZFX 蛋白的表达水平与胰腺癌患者的年龄、性别、分化程度和肿瘤大小、部位等临床病理指标均不相关($P > 0.05$),而与肿瘤的 TNM 分期和淋巴转移有关($P < 0.01$),见表1。

2.4 胰腺癌 ZFX 表达与预后的关系 60 例获得随访患者中, ZFX 蛋白阴性的胰腺癌患者的总生存中位时间为16.5个月(95% CI: 10.83~22.17), ZFX 阳性表达患者总生存中位时间为7.0个月(95% CI: 5.87~8.13),两者比较,差异有统计学意义(Log-rank 值=17.784, $P < 0.001$)。见图3。

表1 ZFX 蛋白表达与胰腺癌临床病理参数的关系

病理参数	n	ZFX 阳性率[n(%)]	χ^2 值	P 值
年龄(岁)				
<60	27	14 (51.9)	2.787	0.113
≥60	33	24 (72.7)		
性别				
男	28	15(53.6)	2.154	0.183
女	32	23(71.9)		
TNM 分期				
0 ~ I	28	12(42.9)	9.479	0.003
II ~ IV	32	26(81.3)		
淋巴转移				
有	30	13(43.3)	10.335	0.003
无	30	25 (83.6)		
分化程度				
高分化	20	13(65.0)	0.036	0.982
中分化	24	15 (62.5)		
低分化	16	10 (62.5)		
肿瘤大小(cm)				
<3	30	19 (63.3)	0.000	1.000
≥3	30	19 (63.3)		
肿瘤部位				
头	37	21(56.7)	1.798	0.271
体/尾	23	17 (73.9)		

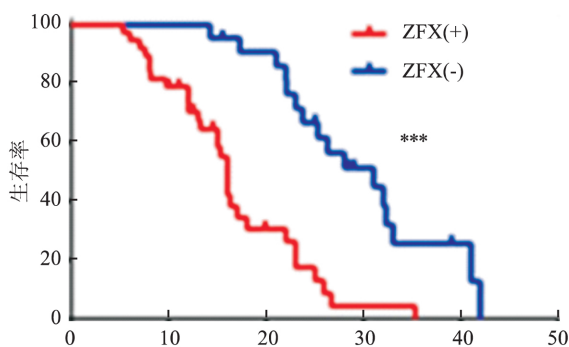


图3 ZFX 阳性表达与阴性表达胰腺癌患者的生存曲线

3 讨论

ZFX 是锌指蛋白家族的一员,其含有 13 个 C2H2 的锌指结构。ZFX 基因位于哺乳动物的 X 染色体上,其表达在哺乳动物中呈高度保守性,其结构包含一个酸性转录激活区、一个核定位序列及一个 DNA 结合位点。由于其自身的结构特点,锌指蛋白可以选择性地结合特异的靶结构,在基因的表达调控、细胞分化、胚胎发育等生命过程中发挥重要作用^[7]。ZFX 在多种干细胞的自我更新和抗凋亡机制中起着重要作用^[8]。近来研究^[9-11]发现 ZFX 在前列腺癌、脑癌、脑胶质细胞瘤、喉癌、胃癌、淋巴瘤等多种人类恶性肿瘤中过表达,在致癌转化中起重

要作用。如在非小细胞肺癌中,ZFX 可以通过调节 MMP2 的表达促进肺癌细胞的侵袭转移,而此过程需要 PI3K/Akt 和 STAT3 的参与^[11]。在胆囊癌中,miR-101 通过直接作用于 ZFX 的启动子,抑制 ZFX 的表达,从而阻断 TGF- β /Smad 诱导的上皮间质转化^[9]。

本研究免疫组化和 Western blot 结果均显示胰腺癌组织中存在 ZFX 蛋白的异常高表达,即 ZFX 蛋白在胰腺癌组织中的表达率(63.3%)显著高于癌旁组织(36.7%),其在胰腺癌组织中的表达量(0.61 ± 0.05)也显著高于癌旁组织(0.25 ± 0.08),提示 ZFX 可能在胰腺癌的发生过程中发挥作用。在与胰腺癌临床病理相关性研究发现 ZFX 蛋白的过表达与胰腺癌的 TNM 分期及淋巴转移密切相关,TNM 分期中 II ~ IV 期的 ZFX 阳性率明显高于 0 ~ I 期,提示 ZFX 的表达与胰腺癌的发生发展密切相关,即 ZFX 可能参与了胰腺癌的恶性进展过程。

另有研究^[4]发现 ZFX 可促进胆囊癌细胞的增殖和侵袭转移,临床资料显示 ZFX 是胆囊癌独立预后因素。ZFX 作为 miR-144 下游一个重要效应分子参与胃癌的骨转移,并且体外实验提示上调 miR-144 还可以抑制 ZFX 来促进胃癌细胞对 5-氟尿嘧啶的敏感性^[12]。细胞功能实验表明 ZFX 可以通过调控 ERK-MAPK 信号通路促进胃癌细胞株 SGC7901 和 MGC803 的增殖和抑制其凋亡^[12-13]。Lai et al^[14]发现在肝细胞肝癌组织中,ZFX 蛋白和信使 RNA 的水平显著高于癌旁非肿瘤组织。ZFX siRNA 抑制人肝癌细胞的增殖,诱导细胞周期发生 G0/G1 期阻滞,促进细胞的凋亡。这些研究体现了 ZFX 在恶性肿瘤中的重要功能。在胰腺癌研究领域,该分子与胰腺癌临床病理特征及预后的关系鲜有报道^[15]。本研究中 Kaplan-Meier 生存曲线分析结果提示 ZFX 表达阳性的患者的总体生存率明显低于阴性患者,提示 ZFX 是胰腺癌预后影响因素,因此一定程度上可以作为胰腺癌预后的预测指标。

综上所述,研究中 ZFX 蛋白在胰腺癌中高表达,与胰腺癌侵袭转移密切相关。胰腺癌组织中 ZFX 表达阴性者预后优于表达阳性者,或许可作为胰腺癌预后独立预测指标,有助于对预后作出指导和预后情况的及时了解。然而对于 ZFX 作用、分子机制仍需进一步研究,以为探讨胰腺癌发病的分子机制提供帮助,也为胰腺癌的靶向治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] 杨旭东, 陈炯, 赵金钱, 等. 胰腺癌中 KLK11 的表达及其临床意义[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(11): 128 – 33.
- [2] Fan J H, Zhang Y Q, Shi S S. A nation-wide retrospective epidemiological study of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms in China[J]. *Oncotarget* 2017 8(42): 71699 – 708.
- [3] Zhu Z, Li K, Xu D et al. ZFX regulates glioma cell proliferation and survival *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Neuro-oncol*, 2013, 112(1): 17 – 25.
- [4] 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 – 70.
- [5] Edmondson H A, Steiner P E. Primary cancer of liver: a study of 100 cases among 48 900 necropsies[J]. *Cancer*, 1954 7(3): 462 – 503.
- [6] Li M, Lu J, Zhang F et al. Yes-associated protein 1 (YAP1) promotes human gallbladder tumor growth *via* activation of the AXL/ MAPK pathway[J]. *Cancer Lett* 2014 355(2): 201 – 9.
- [7] 赵楠, 赵飞, 李玉花. 锌指蛋白结构及功能研究进展[J]. 生物技术通讯 2009 20(1): 131 – 4.
- [8] 闫磊磊, 彭佳远, 汪昱. X 染色体耦联锌指蛋白在肿瘤发生发展中的研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志 2014 41(12): 890 – 3.
- [9] Bao R F, Shu Y J, Hu Y P, et al. MiR-401 targeting ZFX suppresses tumor proliferation and metastasis by regulating the MAPK/ Erk and smad pathways in gallbladder carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016 7(16): 22339 – 54.
- [10] Akiyoshi S, Fukagawa T, Ueo H, et al. Clinical significance of miR-144-ZFX axis in disseminated tumour cells in bone marrow in gastric cancer cases[J]. *Brit J Cancer* 2012 107(8): 1345 – 53.
- [11] 王东涛, 邢丽菲, 孙美凤, 等. X 染色体耦联锌指蛋白在非小细胞肺癌患者血清及病理学类型中的表达[J]. 中国综合临床, 2017 33(12): 1116 – 21.
- [12] Wu S, Lao X Y, Sun T T, 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.
- [13] 武帅. 锌指蛋白 ZFX 在胃癌发生发展中的作用及机制研究[D]. 上海: 上海交通大学 2013.
- [14] Lai K P, Chen J, He M et al. Overexpression of ZFX confers self-renewal and chemoresistance properties in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2014 135(8): 1790 – 9.
- [15] 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 – 70.

Expression of X – chromosome – associated ZFX in pancreatic carcinoma and its relationship with prognosis carcinoma

Qin Xueqian, Weng Wan, GuoJingjing, et al

(Dept of General Surgery, Renhe Hospital of Baoshan District, Shanghai 200431)

Abstract Objective To explore the expression of zinc finger protein X-linked (ZFX) proteins in pancreatic carcinoma tissue and the correlation between the level of ZFX expression and the patients' prognosis. **Methods** The expressions of ZFX were detected in 60 specimens of pancreatic carcinoma and neighboring cancer tissue using immunohistochemistry and Western blot. The correlations of the expressions of ZFX proteins with the clinicopathologic features of pancreatic carcinoma were also analyzed. Survival curves were generated by the Kaplan-Meier method and verified by Log-rank test. **Results** ZFX protein was predominantly detected in the nuclei of tumor cells. The positivity rates of ZFX proteins were 66. 3% in pancreatic carcinoma tissue, showing significant differences to those in neighboring cancer tissue ($P < 0. 001$). Western blot analysis showed that the expression level of ZFX protein in pancreatic carcinoma ($0. 61 \pm 0. 05$) was stronger than that in corresponding adjacent tissues ($0. 25 \pm 0. 08$). Moreover, it was found that the positivity rates and relative expressions of ZFX showed a significant correlations with TNM stage and lymphatic metastasis ($P < 0. 05$). Kaplan-Meier method showed that patients with positively expression of ZFX had worse prognosis than others ($P < 0. 05$). **Conclusion** The extraordinary expression of ZFX may be associated with the malignant progression of pancreatic carcinoma. ZFX could be a biomarker of the prognosis in pancreatic carcinoma patients.

Key words pancreatic neoplasm; Zinc finger protein X-linked; immunohistochemistry; Western blot