

网络出版时间: 2019-5-9 10:21 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190506.1438.033.html>

## ZFX 在肝内胆管癌中的表达及临床意义

林 群, 刘付宝, 余孝俊, 谢 坤, 赵义军

**摘要** 目的 探讨 X 染色体耦联锌指蛋白(ZFX)在肝内胆管癌(ICC)组织中的表达及其临床意义。方法 免疫组织化学检测 60 例 ICC 组织、50 例癌旁组织及 15 例肝内胆管结石组织标本中 ZFX 的表达情况,分析 ZFX 表达与患者临床病理特征及预后的关系。结果 ICC 组织中 ZFX 表达率为 73.3%,明显高于癌旁组织(38.0%)和肝内胆管结石组织(26.7%)( $P < 0.001$ )。在血清癌胚抗原(CEA)升高、肿瘤分化程度低、有淋巴结转移、TNM 分期高的患者 ICC 组织中 ZFX 高表达率较高,在淋巴结转移和 TNM 分期中表达差异无统计学意义,在血清 CEA 和肿瘤分化程度中的表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。生存分析表明 ZFX 高表达组患者术后总体生存率明显低于 ZFX 低表达组( $P = 0.006$ )。Cox 比例风险回归模型分析表明 ZFX 是 ICC 患者的独立预后因子( $HR = 2.635$ , 95%  $CI$ : 1.044 ~ 6.651,  $P = 0.040$ )。结论 ZFX 在 ICC 组织中表达增加,且 ZFX 高表达与 ICC 患者恶性病理特征及不良预后密切相关。

**关键词** X 染色体耦联锌指蛋白; 肝内胆管癌; 预后

**中图分类号** R 735.7

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2019)05-0813-04

**doi**: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.033

肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)是原发性肝癌中的第二常见的恶性肿瘤,其发病率在世界范围内差异比较大,其中东南亚最高,西方国家发病率偏低,并且逐年上升<sup>[1-2]</sup>。ICC 发生可能是一个多因素过程,缺乏明确的风险因素,长期存在的如肝内胆管结石、肝胆吸虫感染、胆道囊肿、原发性硬化性胆管炎等被认为是 ICC 的诱发因素<sup>[2]</sup>。由于其发病隐匿、淋巴转移早、对放、化疗不敏感、根治性手术切除率低等特点,大部分患者治疗预后很差<sup>[3]</sup>。

X 染色体耦联锌指蛋白(zinc-finger protein X-linked ZFX)是在哺乳动物 X 染色体上编码的转录因子。在细胞分化、胚胎及成人干细胞的自我更新

中扮演着重要角色<sup>[4]</sup>。研究表明 ZFX 不仅参与干细胞的自我更新,而且在结直肠癌<sup>[5]</sup>、肝细胞癌<sup>[6]</sup>、胆囊癌<sup>[7]</sup>、肾癌<sup>[8]</sup>等多种恶性肿瘤细胞中表达升高,但 ZFX 在 ICC 中的表达及其临床意义国内外未见类似报道。该研究通过免疫组化技术检测 ZFX 蛋白在 ICC 组织中的表达水平,并和癌旁组织及肝内胆管结石组织做比较,探讨其与 ICC 患者临床病理学特征和预后的关系。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 回顾性收集安徽医科大学第一附属医院肝胆胰外科 2012 年 2 月~2017 年 2 月行手术治疗且临床病理资料完整的 ICC 患者的组织蜡块,共选取 60 例 ICC 肿瘤组织、50 例邻近的癌旁正常胆管组织以及 15 例肝内胆管结石的胆管组织标本(经病理学检测为无癌组织)。60 例 ICC 患者均无全身远处转移,术前均未进行放疗和化疗,其中男 38 例,女 22 例;年龄 34~76(56.5 ± 9.4)岁;血清糖链抗原 19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA19-9) ≥ 37 ng/ml 者 34 例,CA 19-9 < 37 ng/ml 者 26 例;血清癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA) ≥ 5 ng/ml 者 20 例,CEA < 5 ng/ml 者 40 例。TNM 分期参考美国癌症联合委员会的标准,Ⅰ+Ⅱ期 45 例,Ⅲ+Ⅳ期 15 例。肿瘤低分化者 29 例,中高分化者 31 例。根据术前检查、术中所见及术后淋巴结病理检查,有淋巴结转移者 11 例,无淋巴结转移者 49 例。

**1.2 主要试剂** 兔抗人 ZFX 多克隆抗体(bs-12306R 稀释度 1:200)购自北京博奥森生物公司;PV-9001 检测试剂盒(兔二步法检测试剂盒)及 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.3 实验方法** 应用免疫组化方法检测 ICC 组织、癌旁组织及正常肝内胆管结石组织中 ZFX 蛋白的表达。将病理科收集所得病例的石蜡包埋组织制作成厚度 4 μm 的切片。将所有的石蜡切片放入 90℃ 的烤箱中烤片 20 min,经二甲苯溶液浸泡 3 次各 10 min 脱蜡,在依次不同浓度乙醇(100%、95%、75%)溶液各 5 min,蒸馏水水化,适量的内源性过氧化物酶阻断剂孵育 10 min,抗原修复采用柠檬酸

2019-01-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81702829)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肝胆胰外科,合肥 230022

作者简介: 林 群,男,硕士研究生;

刘付宝,男,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: liufubao88@163.com

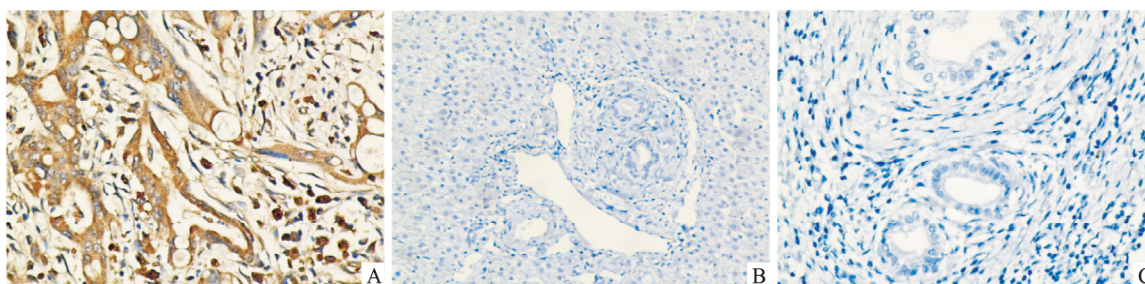


图1 胆管组织中 ZFX 的表达 PV × 200

A: ICC 组织; B: 癌旁组织; C: 肝内胆管结石组织

微波高火加热 10 min ,加热后冷却 1 min ,在加热 1 min ,反复 5 次 ,然后室温自然冷却 30 min 孵育一抗兔抗人 ZFX 抗体 4 ℃ 过夜 ,PBS 洗 3 次 ,滴加增强酶标山羊抗兔 IgG 聚合物室温 20 min ,PBS 洗 3 次后 DAB 显色 ,显微镜下控制 ,苏木精复染 ,脱水 ,封片 ,最后镜检采集数据。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

**1.4 结果判定** 染色结果评估由对临床病理资料不知情的两位病理科医师进行。应用普通光学显微镜在高倍镜( × 200) 下随机挑选 5 个视野 ,观察阳性细胞染色程度和阳性细胞百分比 ,并进行评分。染色强度评分从 0 到 3 ,依次为 0( 阴性 ,无色) ,1( 弱 ,浅黄色) ,2( 中 ,棕黄色) 和 3( 强 ,棕褐色) ; 阳性细胞百分比评分从 0 到 4 ,依次为 0( < 5% ) 、1( ≥ 5% ~ 25% ) 、2( > 25% ~ 50% ) 、3( > 50% ~ 75% ) 和 4( > 75% ) 。最终结果为两项评分相加 ,总分 ≥ 3 分认为是高表达 , < 3 分认为是低表达<sup>[5]</sup>。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 软件进行分析。计数资料采用  $\chi^2$  检验 ,癌、癌旁及肝内胆管结石组织的 ZFX 表达比较采用配对  $t$  检验; 采用 Kaplan-Meier 方法绘制 ZFX 高表达和低表达患者的生存曲线 ,并用 Cox 回归分析模型确定 ICC 患者预后的独立影响因素 ,检验水准  $\alpha = 0.05$  , $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ZFX 蛋白在三种组织中的表达** 免疫组化染色( PV-9001 兔二步法检测试剂盒) 检测三种组织中 ZFX 的表达 ,镜下观察可见 ZFX 蛋白表达主要定位在细胞核内 ,部分细胞质内可见表达 ,呈棕黄色染色颗粒 ,见图 1。结果表明 ZFX 蛋白在 ICC 组织、癌旁组织及肝内胆管结石组织中高表达率差异有统计学意义(  $\chi^2 = 18.662$  , $P < 0.001$ ) ,且肿瘤组织中的高表达率明显高于癌旁组织(  $\chi^2 = 13.914$  , $P < 0.001$ ) 和正常肝内胆管结石组织(  $\chi^2 = 11.343$  , $P =$

0.001) ,差异有统计学意义 ,见表 1。

**2.2 ICC 组织中 ZFX 蛋白表达与其临床病理特征的关系** ICC 组织中 ZFX 的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、血清 CA19-9、有无脉管癌栓差异无统计学意义(  $P > 0.05$ ) ;在血清 CEA 升高、肿瘤分化程度低、有淋巴结转移、TNM 分期高的患者 ICC 组织中 ZFX 高表达率较高 ,且在血清 CEA、肿瘤分化程度的表达差异有统计学意义(  $P < 0.05$ ) ,见表 2。

表1 三种胆管组织中 ZFX 的表达 [n( % )]

组别	n	高表达	低表达	$\chi^2$ 值	P 值
ICC	60	44( 73.3)	16( 26.7)	18.662	< 0.001
癌旁	50	19( 38.0)	31( 62.0)		
肝内胆管结石	15	4( 26.7)	11( 73.3)		

表2 ZFX 表达与 ICC 患者临床病理特征的关系分析 [n( % )]

参数	n	高表达	低表达	$\chi^2$ 值	P 值
性别				1.279	0.258
男	38	26( 68.4)	12( 31.6)		
女	22	18( 81.8)	4( 18.2)	0.135	0.713
年龄( 岁)					
≥ 60	21	16( 76.2)	5( 23.8)	4.261	0.039
< 60	39	28( 71.8)	11( 28.2)		
血清 CEA( μl/L)				0.002	0.969
≥ 5	20	18( 90.0)	2( 10.0)		
< 5	40	26( 65.0)	14( 35.0)	0.016	0.899
血清 CA19-9( U/ml)					
≥ 37	34	25( 73.5)	9( 26.5)	4.757	0.029
< 37	26	19( 73.1)	7( 26.9)		
肿瘤大小( cm)				1.818	0.178
≥ 5	42	31( 73.8)	11( 26.2)		
< 5	18	13( 72.2)	5( 27.8)	0.496	0.481
肿瘤分化					
中高分化	31	19( 61.3)	12( 38.7)	0.273	0.602
低分化	29	25( 86.2)	4( 13.8)		
TNM 分期				0.496	0.481
I + II	45	31( 68.9)	14( 31.1)		
III + IV	15	13( 86.7)	2( 13.3)	0.273	0.602
淋巴结转移					
有	11	9( 81.8)	2( 18.2)	0.273	0.602
无	49	35( 71.4)	14( 28.6)		
脉管癌栓				0.273	0.602
有	10	8( 80.0)	2( 20.0)		
无	50	36( 72.0)	14( 28.0)		

**2.3 ZFX 蛋白表达与 ICC 生存预后的关系** 将有完整随访资料的 46 例 ICC 患者分为高表达组(31 例)和低表达组(15 例),总体随访时间 2~40 个月,中位随访时间为 12 个月。结合免疫组化的结果,分析两组总体生存率的差异,生存曲线见图 2,结果显示 ZFX 高表达患者总体生存率明显低于 ZFX 低表达患者,差异有统计学意义( $P=0.006$ )。单因素 Kaplan-Meier 总体生存率分析结果表明淋巴结转移、TNM 分期以及 ZFX 表达与 ICC 患者预后显著相关( $P<0.05$ )。多因素 Cox 回归模型分析结果表明 ZFX 表达是 ICC 患者不良预后的独立影响因素( $HR=2.635$ ,  $95\% CI: 1.044 \sim 6.651$ ,  $P=0.040$ ) 见表 3。

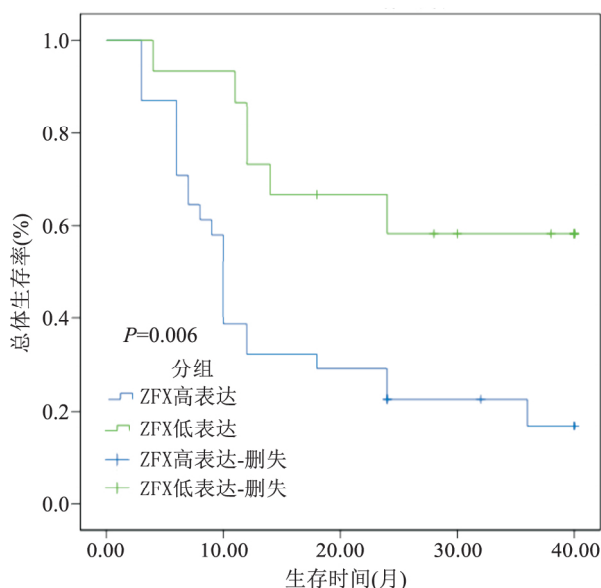


图 2 ZFX 高表达与低表达患者的生存曲线

表 3 ICC 患者总体生存率的 Cox 回归分析

因素	HR	95% CI	P 值
单因素			
年龄(≥60 岁 vs <60 岁)	1.030	0.987~1.074	0.173
性别(男 vs 女)	1.127	0.540~2.353	0.750
肿瘤分化(中高分化 vs 低分化)	1.198	0.592~2.424	0.616
淋巴结转移(有 vs 无)	2.756	1.242~6.115	0.013
TNM 分期(I/II vs III/IV)	2.149	1.025~4.505	0.043
CA19-9(≥37 U/ml vs <37 U/ml)	1.741	0.816~3.715	0.151
CEA(≥5 μl/L vs <5 μl/L)	1.913	0.925~3.955	0.080
ZFX(高表达 vs 低表达)	3.165	1.290~7.765	0.012
多因素			
淋巴结转移(有 vs 无)	2.045	0.425~9.833	0.372
TNM 分期(I/II vs III/IV)	1.063	0.246~4.587	0.934
CEA(≥5 μl/L vs <5 μl/L)	1.464	0.695~3.086	0.316
ZFX(高表达 vs 低表达)	2.635	1.044~6.651	0.040

### 3 讨论

ZFX 属于锌指蛋白家族,由 X 染色体编码,全

长蛋白含有酸性转录激活域,核定位序列和由 13 C2H2 型锌指组成的 DNA 结合域。研究<sup>[4,9]</sup>表明 ZFX 为胚胎干细胞和成人造血干细胞的共同转录调节因子,在胚胎和成人干细胞自我更新中发挥重要作用。另外对于成人造血干细胞功能长期稳定的维护,一定功能水平的 ZFX 是必须的。许多研究<sup>[10]</sup>表明 ZFX 不仅参与干细胞的自我更新,而且与多种恶性肿瘤的发生相关,可以促进肿瘤的增殖、转移,影响癌症患者预后。Weng et al<sup>[7]</sup>研究表明在胆囊癌组织中经常检测到 ZFX 蛋白过表达,ZFX 的表达与侵袭性临床病理学显著相关,并且导致胆囊癌患者的预后显著较差,进一步通过体外细胞功能实验,敲低 ZFX 的表达能显著抑制胆囊癌细胞侵袭、增殖和转移。Wu et al<sup>[11]</sup>研究证实了敲低 ZFX 基因的表达可通过下调细胞外信号调节激酶/丝裂原活化蛋白激酶通路在体外和体内抑制胃癌细胞增殖。

本研究通过免疫组化检测 60 例 ICC 组织中 ZFX 的表达水平,结果显示癌组织中 ZFX 表达明显高于邻近的癌旁组织( $P<0.05$ )及肝内胆管结石组织( $P<0.05$ )。这表明 ZFX 可能在 ICC 的发病机制中起重要作用。然后继续分析 ZFX 表达与患者临床病理特征的相关性,结果显示在肿瘤组织分化低、TNM 分期高、有淋巴结转移及血清 CEA 升高的患者癌组织中 ZFX 高表达率较高。因此推测 ZFX 可能参与 ICC 的发生,过表达的 ZFX 可能促进肿瘤细胞的侵袭和转移。这也为肿瘤分子靶向治疗提供新的作用位点。

在随访资料中,对 ZFX 基因表达水平与 ICC 患者的临床预后意义进行研究,结果表明 ZFX 的表达与 ICC 生存预后显著相关,高表达 ZFX 的 ICC 患者术后总体生存率较低。单因素生存分析结果表明有无淋巴结转移、TNM 不同分期以及 ZFX 表达高与低的 ICC 患者其生存时间差异有统计学意义,多因素 Cox 回归模型分析结果表明 ZFX 可作为预测 ICC 患者预后不良的独立因素,这一结果与 ZFX 在其他肿瘤中的随访结果类似。Li et al<sup>[8]</sup>报道了 53 例肾癌的临床随访研究,结果表明 ZFX 预测较差的预后,可作为预后指标。Li et al<sup>[12]</sup>研究显示 ZFX 可作为鼻咽癌患者的有效预后生物标志物,而且还表明针对 ZFX 的靶向治疗可能是预防鼻咽癌进展和转移的新型治疗策略。

综上所述,ZFX 在 ICC 中常常表现为高表达,ZFX 的表达可能参与肝内胆管的发生发展。高表达的 ZFX 与肿瘤恶性病理特征相关,是 ICC 不良预后

的独立因子。因此 ZFX 可能成为 ICC 的潜在新型生物治疗靶点,但具体的分子作用机制仍需进一步探索。

### 参考文献

- [1] Gupta A, Dixon E. Epidemiology and risk factors: intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2017, 6(2): 101–4.
- [2] Bridgewater J, Galle P R, Khan S A, et al. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *J Hepatol* 2014, 60(6): 1268–89.
- [3] 谭永辉,吕品,聂盛丹等.肝内胆管癌中 ErbB4 的表达及临床意义[J]. *中国普通外科杂志* 2015, 24(2): 180–4.
- [4] Galan-Cardad J M, Harel S, Arenzana T L, et al. Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells[J]. *Cell* 2007, 129(2): 345–57.
- [5] 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): 19680–92.
- [6] Wang C, Fu S Y, Wang M D, et al. Zinc finger protein X-linked promotes expansion of EpCAM+ cancer stem-like cells in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Oncol* 2017, 11(5): 455–69.
- [7] 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.
- [8] 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: 3380–5.
- [9] Harel S, Tu E Y, Weisberg S, et al. ZFX controls the self-renewal of human embryonic stem cells[J]. *PLoS One* 2012, 7(8): e42302.
- [10] Rhie S K, Yao L, Luo Z, et al. ZFX acts as a transcriptional activator in multiple types of human tumors by binding downstream of transcription start sites at the majority of CpG island promoters[J]. *Genome Res* 2018, 28(3): gr.228809. 117.
- [11] 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.
- [12] Li Y, Yan X, Yan L, et al. High expression of Zinc-finger protein X-linked is associated with reduced E-cadherin expression and unfavorable prognosis in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol* 2015, 8(4): 3919–27.

## Expression and clinical significance of ZFX in intrahepatic cholangiocarcinoma

Lin Qun, Liu Fubao, Yu Xiaojun et al

(Dept of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the expression and clinical significance of zinc-finger protein X-linked (ZFX) in intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC). **Methods** The ZFX expression were detected by immunohistochemical technique in 60 cases of ICC tissue, 50 cases of adjacent tissue and 15 cases of hepatolithiasis tissue, and the relations of ZFX expression with the clinicopathologic characteristics and prognosis of the patients were statistically analyzed. **Results** The high expression rate of ZFX in ICC tissues was 73.3%, which were significantly higher than those in adjacent tissues (38.0%) and hepatolithiasis tissue (26.7%) ( $P < 0.001$ ). The high expression rate of ZFX was higher in ICC tissues with elevated serum CEA, low tumor differentiation, lymph node metastasis, and high TNM stage. There was no statistically significant difference in lymph node metastasis and TNM staging. The expression of carcinoembryonic antigen (CEA) and tumor differentiation was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Kaplan-Meier survival analysis showed that the postoperative overall survival was lower in patients with high ZFX expression compared with those with low expression ( $P = 0.006$ ). Multivariate analysis further demonstrated that ZFX was an independent prognostic factor for ICC patients ( $HR = 2.635$ , 95%  $CI$ : 1.044 ~ 6.651,  $P = 0.040$ ). **Conclusion** ZFX expression is increased in ICC tissue, and its overexpression is closely related to malignant pathological profiles and dismal prognosis of the ICC patients.

**Key words** zinc-finger protein X-linked; intrahepatic cholangiocarcinoma; prognosis