

锌指蛋白 545 在结直肠癌中的表达及其临床意义

潘烽平 李彦 张明明 陈一鹏

【摘要】 目的 探讨锌指蛋白 545(ZNF545)在结直肠癌组织中的表达及临床意义。方法 采用 qRT-PCR 法检测 32 对结直肠癌组织及癌旁正常组织中(来自本院行结直肠癌根治术的 32 例患者)ZNF545 mRNA 相对表达量;进一步采用免疫组化法检测 136 对结直肠癌组织及配对癌旁正常组织(来自组织芯片)中 ZNF545 蛋白表达,并分析这一表达与患者临床特征及生存预后的关系。结果 结直肠癌组织中 ZNF545 mRNA 相对表达量明显低于配对癌旁正常组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结直肠癌组织中 ZNF545 蛋白低表达(免疫组化评分 ≤ 3 分)率为 65.4%,明显高于配对癌旁正常组织的 25.7%($P < 0.05$);ZNF545 蛋白低表达与患者肿瘤直径、浸润深度、TNM 分期相关(均 $P < 0.05$),与患者性别、年龄、肿瘤位置、分化程度、淋巴结转移无关(均 $P > 0.05$)。Kaplan-Meier 生存分析结果显示,与 ZNF545 蛋白高表达的结直肠癌患者比较,ZNF545 蛋白低表达患者的 5 年生存率明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 ZNF545 在结直肠癌组织中呈低表达,与患者肿瘤直径、浸润深度、TNM 分期及生存预后有关。

【关键词】 结直肠癌 锌指蛋白 545 基因表达 蛋白表达 预后

Expression of zinc finger protein 545 in colorectal cancer tissues and its clinical significance PAN Fengping, LI Yan, ZHANG Mingming, et al. Department of Anorectal Surgery, the First Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314001, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of zinc finger protein 545(ZNF545) in colorectal cancer tissues and its clinical significance. Methods Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed to examine the expression level of ZNF545 mRNA in colorectal cancer tissues and corresponding normal tissues from 32 patients with colorectal cancer. Immunohistochemical staining was also performed with tissue chips to detect the expression of ZNF545 protein in 136 pairs of colorectal cancer tissues and corresponding normal tissues. The relationship of ZNF545 protein expression with the clinical characteristics and prognosis were analyzed. Results The relative expression of ZNF545 mRNA in colorectal cancer tissues was significantly lower than that in adjacent normal tissues ($P < 0.05$). Immunohistochemical staining of tissue chip revealed that the low expression rate of ZNF545 protein in colorectal cancer tissues was 65.4%, which was significantly higher than that in the adjacent normal tissues (25.7%, $P < 0.05$). The low expression of ZNF545 protein was significantly correlated with tumor size, invasion depth and TNM stage ($P < 0.05$), while not correlated with gender, age, tumor location, differentiation and lymph node metastasis($P > 0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that the 5-year survival rate of colorectal patients with low expression of ZNF545 protein was significantly lower than that with high expression of ZNF545 protein ($P < 0.05$). Conclusion The low expression of ZNF545 in colorectal cancer tissues is significantly associated with tumor size, invasion depth, TNM stage and poorer prognosis of colorectal cancer patients.

【Key words】 Colorectal cancer ZNF545 Gene expression Protein expression Prognosis

锌指蛋白 545(ZNF545)是 ZFP 转录因子家族中的新成员之一,位于染色体 19q13.1,该区域在肿瘤中频发杂合性缺失^[1]。ZNF545 在肿瘤中的表达沉默受其启动子

区的甲基化调控,相关研究发现在原发性结直肠癌^[2]、胃癌^[3-4]、肝癌^[5-6]、乳腺癌^[7]、多发性骨髓瘤^[8]中均能检测到 ZNF545 的启动子区频繁发生甲基化,但在正常组织中甲基化发生率极低。ZNF545 可以通过抑制肿瘤细胞的增殖来诱导其凋亡,继而抑制肿瘤的发生、发展^[1-2,7]。目前关于 ZNF545 在结直肠癌中的表达及其临床意义的报道较少。笔者观测了 ZNF545 在结直肠癌组织及配对癌旁正常组织中的蛋白表达,并分析了其与结直肠癌患者临床特征及生存预后的关系,现将结果报道如下。

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.7.2018-2073

基金项目:浙江省医药卫生科技项目(2018KY797);嘉兴市科技计划项目(2017AY3305)

作者单位:314001 嘉兴市第一医院肛肠外科

通信作者:潘烽平, E-mail: panhnjx@163.com

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2017 年 3 月至 2018 年 2 月在本院接受结直肠癌根治术的 32 例患者为研究对象,收集其结直肠癌组织及配对癌旁正常组织标本(均经术后病理检查证实);所有患者术前未接受过放化疗,组织标本的使用取得患者或家属的知情同意,本研究经医院伦理委员会审查通过。另购买 1 份组织芯片(包含 136 例结直肠癌组织及配对癌旁正常组织,上海芯超生物有限公司)。

1.2 总 RNA 的抽提、反转录和 qRT-PCR 按照 Trizol 试剂盒说明书抽提 32 例结直肠癌组织及癌旁正常组织的总 RNA。采用 Invitrogen 公司的 Reverse Transcription System 试剂盒反转录合成 cDNA。使用 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒进行 qRT-PCR。按以下条件上机反应:95℃预变性 10min;95℃变性 10s,退火 60℃1min,共 45 个循环。以 GAPDH 为参照,计算 ZNF545 在结直肠癌组织及癌旁正常组织中的 mRNA 相对表达量。

1.3 免疫组化 组织芯片用 ZNF545 抗体(Abcam, 1:200, ab228946)于 4℃孵育过夜;用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗于室温孵育 30min。由 2 位病理科医生根据染色强度和阳性细胞比例进行独立评分。染色强度的评分标准:无染色为 0 分,弱染色为 1 分,中度染色为 2 分,强染色为 3 分;阳性细胞比例的评分标准:0%为 0 分,>0%~5%为 1 分,>5%~30%为 2 分,>30%~60%为 3 分,>60%为 4 分。染色强度与阳性细胞比例的评分之和为免疫组化评分,>3 分为高表达,≤3 为低表达。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 25.0 统计软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对样本 *t* 检验;计数资料用率表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,计算 ZNF545 蛋白高、低表达患者的 5 年生存率,并采用 log-rank 法比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌组织与癌旁正常组织中 ZNF545 mRNA 相对表达量比较 32 例结直肠癌组织中 ZNF545 mRNA 相对表达量为 0.43 ± 0.16 ,明显低于癌旁正常组织的 1.02 ± 0.35 ,差异有统计学意义($t = -9.19, P < 0.05$),见图 1。

2.2 结直肠癌组织与癌旁正常组织中 ZNF545 蛋白表达比较 对组织芯片进行免疫组化染色,可见 ZNF545 蛋白主要存在于正常结直肠黏膜细胞质和细胞核中,呈弥漫性棕黄色,见图 2(插页)。结直肠癌组织中 ZNF545

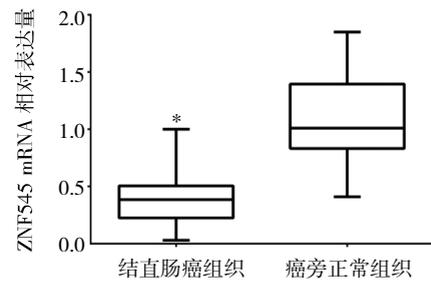


图 1 结直肠癌组织与癌旁正常组织中 ZNF545 mRNA 相对表达量比较(与癌旁正常组织比较,* $P < 0.05$)

蛋白低表达率为 65.4%(89/136),高于配对癌旁正常组织的 25.7%(35/136),差异有统计学意义($\chi^2 = 43.2, P < 0.05$)。

2.3 结直肠癌组织中 ZNF545 蛋白表达与患者临床特征的关系 ZNF545 蛋白低表达与患者肿瘤直径、浸润深度、TNM 分期相关(均 $P < 0.05$),与患者性别、年龄、肿瘤位置、分化程度、淋巴结转移无关(均 $P > 0.05$),见表 1。

表 1 ZNF545 蛋白表达与患者临床特征的关系[例(%)]

临床特征	n	ZNF545		χ^2 值	P 值
		低表达	高表达		
年龄					
<60 岁	54	33(24.3)	21(15.4)	0.74	>0.05
≥60 岁	82	56(41.2)	26(19.1)		
性别					
男	75	48(35.3)	27(19.9)	0.15	>0.05
女	61	41(30.1)	20(14.7)		
肿瘤直径					
≤4cm	67	49(36.0)	17(12.5)	4.39	<0.05
>4cm	70	40(29.4)	30(22.1)		
肿瘤位置					
结肠	54	38(27.9)	16(11.8)	0.96	>0.05
直肠	82	51(37.5)	31(22.8)		
分化程度					
高、中分化	62	39(28.7)	23(16.9)	0.32	>0.05
低分化	74	50(36.8)	24(17.6)		
浸润深度					
T ₁ -T ₂	63	35(25.7)	28(20.6)	5.07	<0.05
T ₃ -T ₄	73	54(39.7)	19(14.0)		
淋巴结转移					
无	60	38(27.9)	22(16.2)	0.21	>0.05
有	76	51(37.5)	25(18.4)		
TNM 分期					
I~II 期	52	25(18.4)	27(19.9)	11.2	<0.05
III~IV 期	84	64(47.1)	20(14.7)		

2.4 ZNF545 蛋白表达与结直肠癌患者生存预后的关

系 ZNF545 蛋白低表达患者的 5 年生存率为 53.6%，明显低于 ZNF545 蛋白高表达者的 76.5%，差异有统计学意义($\chi^2=8.75, P<0.05$)，见图 3。

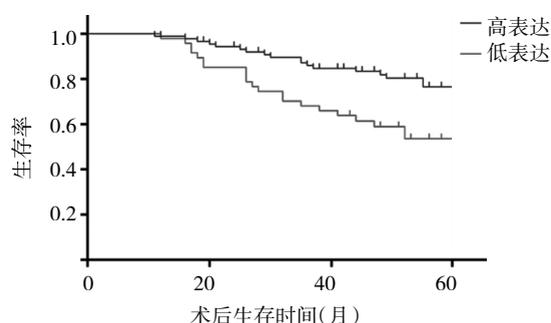


图 3 ZNF545 蛋白高、低表达结直肠癌患者生存曲线

3 讨论

结直肠癌是全球范围内高发病率、高病死率的恶性肿瘤之一^[9]。在我国恶性肿瘤中，结直肠癌发病率居第 3 位，病死率居第 4 位^[10]。现有的生物标志物仍不能有效地预测早期结直肠癌，中晚期结直肠癌患者的 5 年生存率不容乐观^[11]。早期发现，结直肠癌是提高患者生存的关键。因此，进一步深入探讨结直肠癌发生和发展的分子机制，将有助于寻找到特异度、灵敏度更高的生物标志物，以提高早期结直肠癌的诊断率。

ZFP 是真核生物中最大的转录因子家族，广泛参与肿瘤的发生、发展。其中约三分之一在其保守结构域上含有 Krüppel-associated box(KRAB)，称为 KRAB-ZFP，是 ZNF 家族中最经典的一类^[12]。正是由于 KRAB-ZFP 这种特殊的结构特点，即 KRAB 结构域能与其协同蛋白的氨基端相结合，而 C2H2-锌指结构可与基因启动子区相结合，使其在细胞增殖、分化、凋亡、正常细胞向恶性细胞转化等过程中发挥着重要的调节作用^[13]。ZNF545 是 KRAB-ZFP 家族的新成员之一，位于染色体 19q13.1，该区域在多种肿瘤中频发杂合性缺失。已有研究报道，在胃癌、肝癌及乳腺癌等实体肿瘤中，ZNF545 基因启动子区 CpG 岛频发甲基化，使其在癌组织中呈低表达或缺失表达。ZNF545 可以通过抑制肿瘤细胞的增殖来诱导其凋亡，继而抑制肿瘤的发生、发展。在结直肠癌中，ZNF545 同样存在甲基化，并在结直肠癌细胞中发挥着抑癌基因的生物作用^[2]。

为研究 ZNF545 在结直肠癌组织及其癌旁正常组织中的表达情况，笔者首先收集并检测了 32 例结直肠癌组织及其癌旁正常组织标本 ZNF545 mRNA 表达情况，结果显示结直肠癌组织中 ZNF545 mRNA 相对表达量低于癌旁正常组织。为进一步验证 ZNF545 蛋白在结

直肠癌组织中是否呈异常低表达，笔者购买了结直肠癌组织芯片并进行免疫组化检测，结果发现在结直肠癌组织及其配对癌旁正常组织中，ZNF545 蛋白均主要定位于细胞核及细胞质中；与癌旁正常组织比较，结直肠癌组织中 ZNF545 蛋白呈低表达，差异有统计学意义；进一步分析 ZNF545 蛋白表达与患者临床资料的关系，结果发现结直肠癌组织中 ZNF545 蛋白低表达率与肿瘤直径、浸润深度、TNM 分期有关，与患者性别、年龄、肿瘤位置、淋巴结转移无关。此外，结直肠癌患者 ZNF545 蛋白低表达者 5 年生存率较表达者明显下降。可见，ZNF545 在结直肠癌组织中呈异常低表达，与结直肠癌患者的不良预后有关。

综上所述，ZNF545 在结直肠癌组织中呈低表达，与患者肿瘤直径、浸润深度、TNM 分期及生存预后有关。关于 ZNF545 在结直肠癌发生、发展中发挥的调控作用及其分子机制，有待进一步深入研究。

4 参考文献

- [1] Cheng Y, Liang P, Geng H, et al. A novel 19q13 nucleolar zinc finger protein suppresses tumor cell growth through inhibiting ribosome biogenesis and inducing apoptosis but is frequently silenced in multiple carcinomas[J]. *Molecular cancer research*, 2012, 10(7): 925-936. DOI:10.1158/1541-7786.mcr-11-0594.
- [2] Xiang S, Xiang T, Xiao Q, et al. Zinc-finger protein 545 is inactivated due to promoter methylation and functions as a tumor suppressor through the Wnt/beta-catenin, PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways in colorectal cancer[J]. *International journal of oncology*, 2017, 51(3): 801-811. DOI:10.3892/ijo.2017.4064.
- [3] Deng J, Liang H, Ying G, et al. Poor survival is associated with the methylated degree of zinc-finger protein 545 (ZNF545) DNA promoter in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(6): 4482-4495. DOI:10.18632/oncotarget.2916.
- [4] WANG S, CHENG Y, DU W, et al. Zinc-finger protein 545 is a novel tumour suppressor that acts by inhibiting ribosomal RNA transcription in gastric cancer[J]. *Gut*, 2013, 62(6): 833-841. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301776.
- [5] Yu J, Li X, Tao Q, et al. Hypermethylation of ZNF545 is associated with poor prognosis in patients with early-stage hepatocellular carcinoma after thermal ablation[J]. *Gut*, 2015, 64(11): 1836-1837. DOI:10.1136/gutjnl-2015-310258.
- [6] Yang W, Yang S, Zhang M, et al. ZNF545 suppresses human hepatocellular carcinoma growth by inhibiting NF- κ B signaling[J]. *Genes & cancer*, 2017, 8 (3-4): 528-535. DOI:10.18632/gene-sandcancer.137.
- [7] Xiao Y, Xiang T, Luo X, et al. Zinc-finger protein 545 inhibits cell proliferation as a tumor suppressor through inducing apoptosis and is disrupted by promoter methylation in breast cancer[J].

(下转第 648 页)

笔者发现,体外实验中消癌平注射液对伊马替尼代谢表现出明显的抑制作用;但在大鼠体内实验中消癌平注射液对伊马替尼代谢未表现出明显的抑制作用,考虑与体内生理环境复杂且影响因素(吸收、分布、排泄等)较多有关。相关研究结果显示,血浆伊马替尼浓度与慢性粒细胞白血病^[14]、胃肠间质瘤^[15]的疗效息息相关,而个体间伊马替尼的 CL_z/F 又有 40% 的差异^[16],药物相互作用对伊马替尼血药浓度的影响在个体间可能被放大,进而导致治疗失败和不良反应发生。由于消癌平注射液和伊马替尼均为肿瘤科常用药物,此实验结果具有潜在的临床意义。本实验为消癌平注射液与伊马替尼合用的初步结果,且伊马替尼为单次给药。由于甲磺酸伊马替尼临床常用剂量为 400~600mg/d,最大剂量可加至 800mg/d,且需要长期给药,长期联合用药的结果可能会产生更大的影响。

总之,本研究在人与大鼠肝微粒体体外孵育药物的体系中,以伊马替尼为底物,加入消癌平注射液,结果显示其在相应微粒体孵育体系中对伊马替尼的代谢过程有明显的抑制作用。结合消癌平注射液对伊马替尼在大鼠体内的药代动力学的影响,在临床同时应用消癌平注射液和伊马替尼时,应密切关注患者的临床症状及伊马替尼血药浓度 T_{max}。

4 参考文献

- [1] 于绍帅,陈明苍,李志雄,等. 通关藤的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(21):279-283.
- [2] 杨宗艳,胡传国. 消癌平注射液治疗老年晚期非小细胞肺癌 121 例疗效观察[J]. 安徽医药, 2010,14(12):1470-1471.
- [3] 贾军梅,赵和平,郭亚荣. 消癌平联合奥曲肽对原发性肝癌患者免疫功能的影响[J]. 中国药物与临床, 2011,11(10):1130-1132.
- [4] 傅柏涵,郭放,韩涛,等. 消癌平注射液联合化疗治疗转移性三阴性乳腺癌临床疗效观察[J]. 解放军医药杂志, 2016,28(6):23-26.
- [5] 周卫兵,何凤姣,姜武忠,等. 消癌平联合同步放化疗治疗局部晚期鼻咽癌的临床观察[J]. 临床肿瘤学杂志, 2009,14(11):1029-1031.
- [6] 李妮,冉建波. 消癌平联合 CPT-11 化疗方案治疗老年晚期胃癌的临床疗效观察[J]. 河北医学, 2016, 22(2):198-201.
- [7] 董平. 消癌平注射液联合 CIK 细胞治疗老年多发性骨髓瘤临床观察[J]. 中医学报, 2015, 30(12):1712-1717. DOI:10.16368/j.issn.1674-8999.2015.12.592.
- [8] 佟丽,董军杰,王茂生,等. 消癌平注射液联合化疗治疗初发非 M3 型急性髓细胞白血病 60 例临床观察[J]. 河北中医, 2015,37(1):95-97.
- [9] 刘宏明,张叶,宋滨. 中药注射剂产生不良反应的原因分析及应对策略探讨[J]. 药学研究, 2016, 35(7):431-434. DOI:10.13506/j.cnki.jpr.2016.07.019.
- [10] 张师,王明霞,冯章英,等. 靶向抗肿瘤药物的药理学相互作用研究进展[J]. 中国药房, 2016,27(20):2871-2874.
- [11] 杨旭平,赖丹,黄毅岚. 5 种抗肿瘤中药注射液对 CYP3A4 酶代谢的影响[J]. 华西药理学杂志, 2014,29(5):550-552. DOI:10.13375/j.cnki.wcjs.2014.05.022.
- [12] 刘丽雅,韩永龙,余奇,等. 消癌平注射液等 4 种抗肿瘤中药注射剂对人肝微粒体中 CYP450 酶 7 种亚型的体外抑制作用研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014,19(5):522-527.
- [13] 周静雅. 抗肿瘤药物体内测定方法及与消癌平注射液的相互作用研究[D]. 上海:第二军医大学, 2012.
- [14] 徐泽宽,徐皓. 甲磺酸伊马替尼血药浓度监测对指导胃肠间质瘤治疗及评估预后临床意义[J]. 中国实用外科杂志, 2015, 35(4):387-390.
- [15] 刘晓蕾,姚海英,刘永建. 伊马替尼治疗慢性粒细胞白血病期间谷浓度与疗效的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2012,22(10):42-44.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床应用须知化学药和生物制品卷[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2011:945-947.

(收稿日期:2018-11-03)

(本文编辑:陈丹)

(上接第 642 页)

PloS one, 2014, 9(10): e110990. DOI:10.1371/journal.pone.0110990.

- [8] Fan Y, Zhan Q, Xu H, et al. Epigenetic identification of ZNF545 as a functional tumor suppressor in multiple myeloma via activation of p53 signaling pathway[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2016, 474(4):660-666. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.04.146.
- [9] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2014, 64(1): 9-29. DOI:10.3322/caac.21208.
- [10] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2016, 66(2):115-132. DOI:10.3322/caac.21338.
- [11] Mathonnet M, Perraud A, Christou N, et al. Hallmarks in colorec-

tal cancer: angiogenesis and cancer stem-like cells[J]. World journal of gastroenterology, 2014, 20(15): 4189-4196. DOI:10.3748/wjg.v20.i15.4189.

- [12] Wang W, Cai J, Lin Y, et al. Zinc fingers function cooperatively with KRAB domain for nuclear localization of KRAB-containing zinc finger proteins[J]. PloS one, 2014, 9(3): e92155. DOI:10.1371/journal.pone.0092155.
- [13] Zhang C, Xiang T, Li S, et al. The novel 19q13 KRAB zinc-finger tumour suppressor ZNF382 is frequently methylated in oesophageal squamous cell carcinoma and antagonises Wnt/beta-catenin signalling[J]. Cell death & disease, 2018, 9(5):573. DOI:10.1038/s41419-018-0604-z.

(收稿日期:2018-08-14)

(本文编辑:陈丹)