

ZFX在小细胞肺癌组织中的表达及临床意义

苏文媚 武奋萍 罗亮 许贝 杨志雄 赖振南

广东医学院附属医院肿瘤中心, 广东 湛江 524000

[摘要] **背景与目的:** 小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 约占全部肺癌的15%, 化疗是其主要的治疗方法之一, 虽然早期对一线化疗方案敏感, 但极易出现多药耐药而导致治疗失败。前期基因芯片发现X染色体耦联锌指蛋白 (zinc finger protein X-linked, ZFX) 在SCLC细胞中异常高表达, 本研究进一步检测SCLC患者组织中ZFX的表达, 并分析其与患者临床病理特征的关系, 为SCLC的治疗提供依据。**方法:** 收集在广东医学院附属医院肿瘤中心行支气管镜活检及手术切除的SCLC组织标本98例, 采用QRT-PCR方法从基因水平检测其中临床资料完整的78例SCLC标本中ZFX的表达。**结果:** 在78例SCLC组织标本中, ZFX在广泛期的SCLC组织中的表达较局限期患者的表达明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。ZFX的表达与患者性别、年龄无关 (均 $P > 0.05$); 而与肿瘤的分期、对化疗药物的敏感性 & 总生存时间相关 (均 $P < 0.001$)。**结论:** ZFX的表达可能和SCLC发生、发展相关, ZFX的检测有望作为SCLC的预后指标。

[关键词] SCLC; X染色体耦联锌指蛋白; 临床病理参数

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.06.004

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)06-0418-05

Expression and clinical significance of ZFX in tissues from small cell lung cancer patients SU Wen-mei, WU Fen-ping, LUO Liang, XU Bei, YANG Zhi-xiong, LAI Zhen-nan (Department of Oncology of Affiliated Hospital Guangdong Medical College, Zhanjiang Guangdong 524000, China)

Correspondence to: LAI Zhen-nan E-mail: laizhenn@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths worldwide. Approximately 15% of all histological types consist of small cell lung cancer (SCLC). Chemotherapy is one of the major treatment methods. Though the current front-line standard chemotherapy regimen for SCLC is active in most SCLC cases, however, the disease recurs shortly after the first successful treatment with multi-drug resistance phenotype. Our previously study showed that zinc finger protein X-linked (ZFX) was overexpressed in SCLC cells. This study aimed to investigate the expression of ZFX in SCLC tissues, and to clear their possible associations with clinical parameters and provide basis for therapy of SCLC. **Methods:** A total of 98 surgical specimens of small cell lung cancer were collected. The expression of ZFX was examined by quantificational real-time polymerase chain reaction in 78 specimens taken from patients with complete clinical data. **Results:** The expression of ZFX was significantly increased in extensive stages than in limited stages. The expression of ZFX was associated with tumor stage, the sensitivity of chemotherapy, and survival times (all $P < 0.05$), no data was found correlated with gender and ages ($P > 0.05$). **Conclusion:** ZFX expression might be associated with the development of SCLC, and may be a potential prognosis predictor.

[Key words] Small cell lung cancer; Zinc finger protein X-linked; Clinicopathological parameters

小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 是一种以生长迅速、早期转移、高度侵袭性为特点的肺癌类型, 其发病率约占原发性肺癌的15%~20%^[1-2]。SCLC的肿瘤细胞对化疗和放疗都非常敏感, 但几十年来多方案的临床试验

并没能找到彻底治愈SCLC的有效方法, 多数患者在一线治疗以后仍会复发或转移, 临床预后差^[3-4]。X染色体耦联锌指蛋白 (zinc finger protein X-linked, ZFX) 是锌指蛋白家族中的一员, 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^[5]。早期研究认为ZFX基因与哺乳动物的性别决定有关,目前研究发现ZFX基因在多种类型的干细胞和肿瘤细胞中表达增高^[6],其与肿瘤的关系已经成为国内外普遍关注的热点。在肿瘤学研究中已经发现ZFX在前列腺癌、乳腺癌、白血病等人常见恶性肿瘤中出现异常表达^[7-9]。然而关于ZFX在SCLC中的作用目前国内外尚未见相关报道。

1 材料和方法

1.1 一般资料

收集2008年1月—2013年8月在广东医学院附属医院肿瘤中心行手术切除或支气管镜活检的SCLC组织标本98例,选择资料完整的SCLC患者78例进行研究,其中男性36例,女性42例;患者年龄30~82岁,中位年龄53岁,53岁以下患者43例,53岁以上患者35例;广泛期43例,局限期35例;化疗敏感者(化疗5~6个周期后肿瘤完全缓解或部分缓解)35例,化疗耐药者(化疗5~6个周期后疾病稳定或进展者)43例,组织标本放入液氮冷冻后,用锡纸包裹,在研钵中充分研磨,研磨后用TRIzol反复洗涤研磨的碎末,用经DEPC水处理后的冻存管收集,放入液氮,用时提取RNA进行检测。所有患者术前均未行放疗,临床资料完整,患者未并发其他系统疾病。所有患者均经过病理学检查确诊为SCLC,78例患者均接受EP方案化疗。本研究经本院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。全部78例患者出院后均随访,随访方式为电话和门诊随访,随访内容包括一般情况、临床症状和影像学检查。随访起点为病理确诊日期,末次随访时间为2013年8月31日,截止随访终止时,存活患者22例(21.74%),死亡患者56例(78.26%),无失访患者。

1.2 总RNA的提取及实时荧光定量PCR

按照试剂说明书,通过TRIzol提取试剂盒从SCLC组织标本中提取总RNA;测量总RNA浓度,取1 μg RNA按逆转录合成试剂盒说明合成cDNA,然后以该cDNA为模板,PCR仪中扩增从SCLC组织标本中提取的总RNA进行逆转录和实时荧光定量PCR。ZFX及内参照GAPDH的引物序列见表1。逆转录反应及PCR扩增参照试剂盒说明进行,以ZFX基因的上下游引物进行PCR扩增,PCR反应在实时定量PCR反应仪上进行;3次独立实验后得到的数据运用公式 $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行分析。 $\Delta\Delta Ct=(待测样品的目的基因的Ct的平均值-待测样本的管家基因的Ct的平均值)-(对照样品的目的基因的Ct的平均值-对照样本的管家基因的Ct的平均值)$ 。

表1 ZFX及内参照GAPDH的引物序列

Tab. 1 The primer sequence of ZFX and GAPDH	
Gene	Primer sequence
ZFX	5'-GGCAGTCCACAGCAAGAAC-3'
	5'-TTGGTATCCGAGAAAGTCAGAAG-3'
GAPDH	5'-GGAAGGACTCATGACCACAGTCC-3'
	5'-TCGCTGTGAAGTCAGAGGAGACC-3'

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件进行数据分析。ZFX在小细胞肺癌组织中的表达差异采取t检验进行分析,ZFX的表达与各临床病理参数之间的关系使用Chi-Square检验;采用Kaplan-Meier法分析ZFX的表达与生存期的关系, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZFX基因在SCLC组织中的表达

实时荧光定量PCR法检测ZFX基因在SCLC组织(SCLC局限期患者组织标本和广泛期组织标本)中的表达,结果提示ZFX基因在SCLC局限期组织标本中的表达水平较广泛期患者明显降低,差异有统计学意义($P<0.001$,图1)。

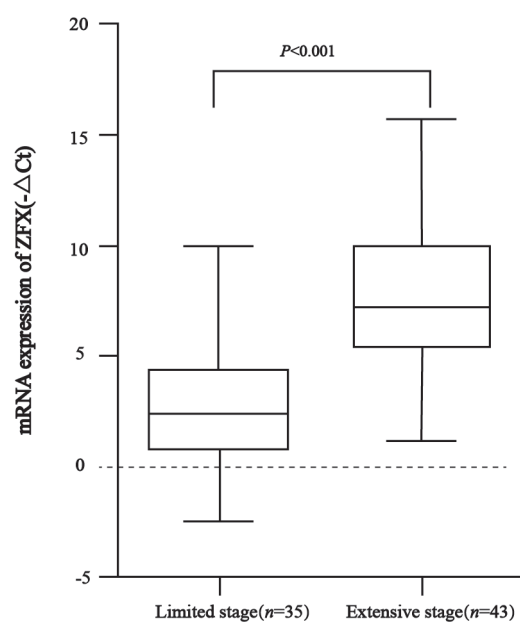


图1 实时荧光定量PCR检测ZFX基因在SCLC局限期和广泛期组织标本中的差异表达

Fig. 1 The differential expression of ZFX gene was presented in the limited stage tissues and extensive stage SCLC tissues by QRT-PCR

2.2 ZFX蛋白在SCLC组织中的表达及其与临床病理特征的关系

ZFX的表达与患者的性别无关, 差异无统

表2 ZFX的阳性表达与患者临床病理特征的关系

Tab. 2 Association of ZFX with clinicopathological parameters

Patients characteristics	ZFX expression		χ^2 value	P value*
	High	Low#		
All cases (n=78)	47	31		
Age/year			0.179	0.672
≤53	25	18		
>53	22	13		
Gender			2.474	1.116
Male	18	18		
Female	29	14		
Disease stage			20.539	<0.001
Limited disease	11	24		
Extensive-stage disease	36	8		
Response to chemotherapy			15.84	<0.001
Response	11	24		
Refractory	34	9		
Median Survival			18.022	<0.001
Survival	5	17		
Death	42	14		

#: The median expression level was used as the cutoff. Low expression of ZFX in 31 patients was classified as values of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ below 1.0. High expression of ZFX in 47 patients was classified as values of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ above 1.0. *: For analysis of correlation between of ZFX levels and clinical features, *Chi-square* Test was used. Results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

计学意义($\chi^2=0.179$, $P=0.672$)。ZFX的表达与患者的年龄无关, 差异无统计学意义($\chi^2=2.474$, $P=1.116$)。ZFX在局限期患者中的表达较广泛期患者低, 两者的ZFX表达率差异有统计学意义($\chi^2=20.539$, $P < 0.001$)。ZFX在化疗敏感患者中的表达较耐药患者低, 差异有统计学意义($\chi^2=15.84$, $P < 0.001$)。ZFX在存活患者中的表达较死亡患者低, 差异有统计学意义($\chi^2=18.022$, $P < 0.001$, 表2)。

2.3 SCLC患者生存分析

采用Kaplan-Meier法估计患者生存时间, 结果发现患者的生存时间与性别和年龄无相关性, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 疾病的分期、患者对化疗的敏感性及ZFX的表达与患者的生存时间相关。对化疗敏感者的生存时间长于耐药患者, 差异有统计学意义($\chi^2=4.585$, $P=0.032$, 图2A); 局限期患者的生存时间长于广泛期患者, 差异有统计学意义($\chi^2=9.921$, $P=0.002$, 图2B); ZFX低表达患者的生存时间长于高表达患者, 差异有统计学意义($\chi^2=19.841$, $P=0.000$, 图2C)。

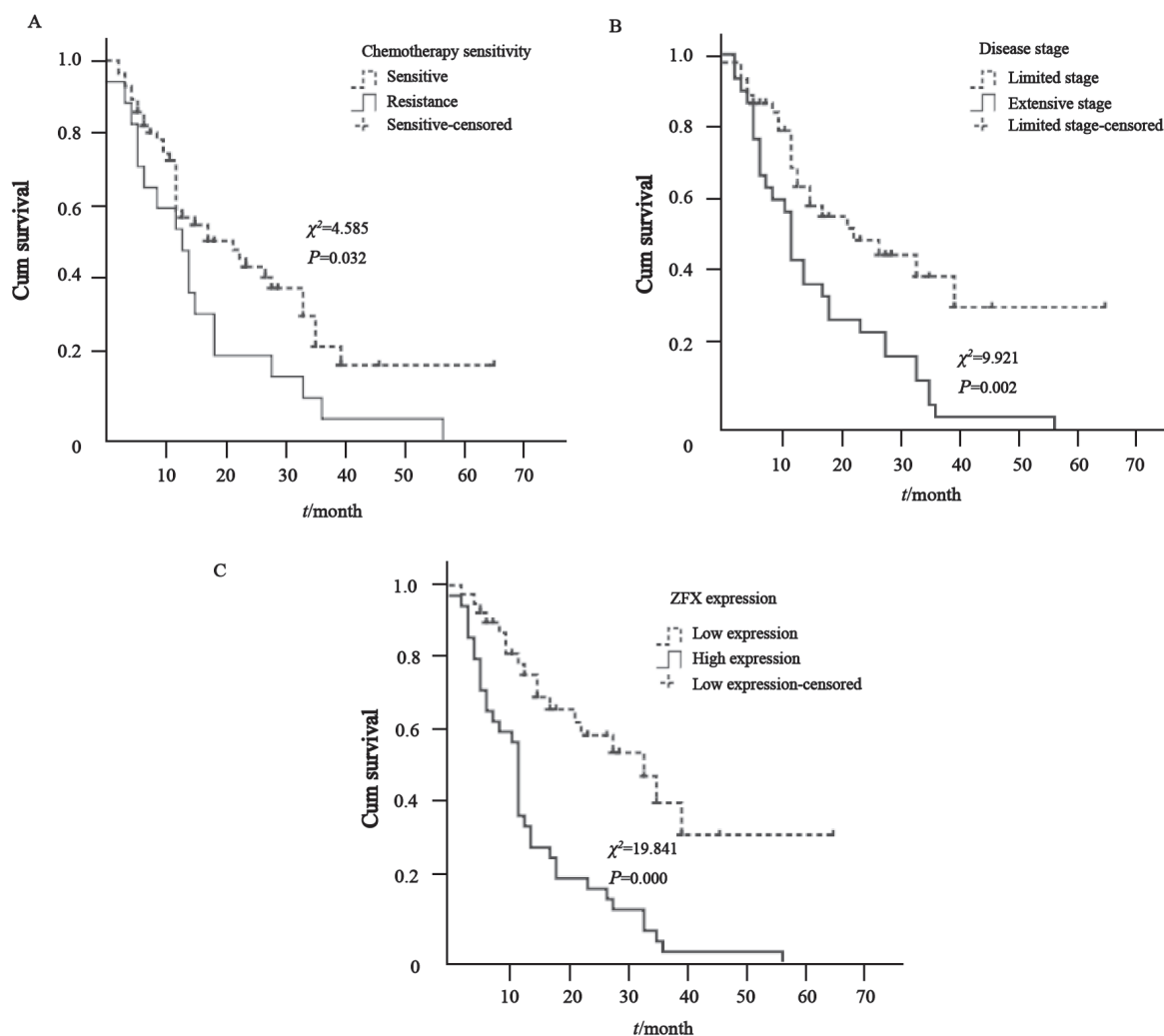


图2 Kaplan-Meier法估计患者生存时间

Fig. 2 Survival times was evaluated by Kaplan-Meier assay

Compare of survival times considering chemotherapy sensitivity (A), disease stage (B) and ZFX expression(C).

3 讨 论

肺癌是当今世界对人类健康危害最大的恶性肿瘤之一，我国肺癌发病率增长迅速，多数学者把更多的研究目光集中在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)治疗上，而SCLC的发病率却悄然增长，由于研究的关注度和力度明显不及前者，多年来治疗无明显突破^[10-11]。SCLC的治疗以全身化疗为主，联合放疗和手术为主要治疗手段。目前临床上化疗一般采取顺铂为基础的两药联合治疗方案，尽管SCLC患者对化疗敏感，但很快出现的多药耐药现象导致化疗失败，极易复发^[12]。复发

后对任何细胞毒药物均无作用。因此，如何克服SCLC的耐药性，成为临床上治疗SCLC及提高生活质量、延长生存时间的急需解决的重要问题。

锌指蛋白是指含有短的稳定的能与 Zn^{2+} 结合并自我折叠形成“手指”结构的一类蛋白质。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^[13-14]。近年来Galan-Caridad等^[15]报道ZFX是胚胎干细胞和成体干细胞自我更新的基础。Arenzana等^[16]报道在B淋巴细胞中ZFX调控BCR介导的细胞增殖。研究者发

现ZFX在胚胎干细胞和成体造血干细胞中高表达; ZFX基因敲除的胚胎干细胞和成体造血干细胞出现大量Annexin V 阳性的凋亡细胞, 而ZFX基因过表达的干细胞自我更新良好、生长迅速, 且维持未分化状态。这表明ZFX蛋白在多种干细胞的自我更新和抗凋亡机制中起着重要作用。还有研究发现ZFX沉默并不影响Oct4、Sox2、Nanog等经典的干细胞自我更新通路^[17]。然而关于ZFX蛋白在SCLC中的研究目前国内外尚未见相关报道。本研究通过发现ZFX基因在SCLC局限期组织标本中的表达较广泛期患者明显降低, 且与患者的疾病分期、对化疗药物的敏感性及生存时间相关。然而影响SCLC临床预后的因素很多, 本研究结果可能为基于ZFX研究SCLC治疗及预后的研究提供一定的理论基础和治疗靶点。

[参 考 文 献]

- [1] CALIFANO R, ABIDIN A Z, ZPECK R, et al. Management of small cell lung cancer: recent developments for optimal care [J] . *Drugs*, 2012, 72(4): 471-490.
- [2] KALEMKERIAN G P, AKERLEY W, BOQNER P, et al. Small cell lung cancer [J] . *J Natl Compr Canc Netw*, 2013, 11(1): 78-98.
- [3] LOPEZ-CHAVEZ A, SANDLER A. Systemic issues in small cell lung cancer [J] . *Curr Probl Cancer*, 2012, 36(3): 131-155.
- [4] METRO G, DURANTI S, FISCHER M J, et al. Emerging drugs for small cell lung cancer--an update [J] . *Expert Opin Emerg Drugs*, 2012, 17(1): 31-36.
- [5] LAI W S, PERERA L, HICKS S N, et al. Mutational and structural analysis of the tandem zinc finger domain of tristetraprolin [J] . *J Biol Chem*, 2014, 289(1): 565-580.
- [6] JIANG R, GAO Z L, SUN M, et al. Zinc finger X-chromosomal protein promotes growth and tumorigenesis in human osteosarcoma cells [J] . *Pak J Med Sci*, 2013, 29(4): 997-1002.
- [7] DONG S, ZHANG P, LIANG S, et al. The role of the retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene 1 tumor suppressor gene in human esophageal squamous cell carcinoma cells [J] . *Oncol Lett*, 2013, 6(6): 1656-1662.
- [8] AHMED S, WANG A, CELIUS T, et al. Zinc finger nuclease-mediated knockout of AHR or ARNT in human breast cancer cells abolishes basal and ligand-dependent regulation of CYP1B1 and differentially affects estrogen receptor alpha transactivation [J] . *Toxicol Sci*, 2014, 138(1): 89-103.
- [9] HU R, WANG E, PENG G, et al. Zinc finger protein 668 interacts with Tip60 to promote H2AX acetylation after DNA damage [J] . *Cell Cycle*, 2013, 12(13): 2033-2041.
- [10] LI D, ZHANG Y, XIE Y, et al. Enhanced tumor suppression by adenoviral PTEN gene therapy combined with cisplatin chemotherapy in small-cell lung cancer [J] . *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(4): 251-259.
- [11] OLSZEWSKI U, DEALLY A, TACKE M, et al. Alterations of phosphoproteins in NCI-H526 small cell lung cancer cells involved in cytotoxicity of cisplatin and titanocene Y [J] . *Neoplasia*, 2012, 14(9): 813-822.
- [12] MICHAELSEN S R, CHRISTENSEN C L, SEHESTED M, et al. Single agent- and combination treatment with two targeted suicide gene therapy systems is effective in chemoresistant small cell lung cancer cells [J] . *J Gene Med*, 2012, 14(7): 445-458.
- [13] CHANDRASEKHARAN S, KUMAR S, VALLEY C M, et al. Proprietary science, open science and the role of patent disclosure: the case of zinc-finger proteins [J] . *Nat Biotechnol*, 2009, 27(2): 140-144.
- [14] SCHNIDAR H, EBERL M, KLINGLER S, et al. Epidermal growth factor receptor signaling synergizes with Hedgehog/GLI in oncogenic transformation via activation of the MEK/ERK/JUN pathway [J] . *Cancer Res*, 2009, 69(4): 1284-1292.
- [15] GALAN-CARIDAD 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): 345-357.
- [16] ARENZANA T L, SMITH-RASKA M R, REIZIS B. Transcription factor Zfx controls BCR-induced proliferation and survival of B lymphocytes [J] . *Blood*, 2009, 113(23): 5857-5867.
- [17] HU G, KIM J, XU Q, et al. A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal [J] . *Genes Dev*, 2009, 23(7): 837-848.

(收稿日期: 2014-01-21 修回日期: 2014-04-04)