

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.10.010
文章编号: 1005-8982(2018)10-0055-05

锌指蛋白 217 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义

常世川¹, 李涛², 李刚³, 任必勇³, 朱川³, 邓超³, 黄小平³,
刘良忠³, 贾茜³, 谭建军³, 王伟³

(1. 西南医科大学附属医院 肿瘤科, 四川 泸州 646000; 2. 四川省肿瘤医院 放疗中心, 四川 成都 610041; 3. 重庆三峡中心医院 肿瘤防治中心, 重庆 404000)

摘要: 目的 检测锌指蛋白 217 (ZNF217) 在非小细胞肺癌组织中的表达, 探讨其与非小细胞肺癌患者临床病理特征的关系, 并分析其与非小细胞肺癌患者生存及预后的关系。**方法** 利用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测非小细胞肺癌组织及对应癌旁组织中 ZNF217 的表达水平, 并利用统计学软件分析 ZNF217 的临床相关性。**结果** ZNF217 在非小细胞肺癌组织中的表达水平高于癌旁组织。非小细胞肺癌组织中 ZNF217 的表达水平与非小细胞肺癌患者 TNM 分期及淋巴结转移情况呈正相关, 与其他临床病理特征无相关。Kaplan-Meier 生存曲线结果发现 ZNF217 表达与患者术后 5 年总体生存率及无进展生存率均呈负相关。Cox 风险比例模型结果发现 ZNF217 可作为判断非小细胞肺癌预后独立的预测指标。**结论** ZNF217 在非小细胞肺癌组织中表达升高, 并可作为判断非小细胞肺癌患者生存及预后的指标。

关键词: 锌指蛋白 217; 表达; 生存; 预后; 非小细胞肺癌

中图分类号: R734.2

文献标志码: A

Expression of zinc finger protein 217 in non-small cell lung cancer and clinical significance

Shi-chuan Chang¹, Tao Li², Gang Li³, Bi-yong Ren³, Chuan Zhu³, Chao Deng³,
Xiao-ping Huang³, Liang-zhong Liu³, Xi Jia³, Jian-jun Tan³, Wei Wang³

(1. Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Radiation Therapy Center, Sichuan Cancer Hospital, Chengdu, Sichuan 610041, China; 3. Center of Tumor Prevention and Treatment, Three Gorges Central Hospital of Chongqing, Chongqing 404000, China)

Abstract: Objective To explore the expression of zinc finger protein 217 (ZNF217) in tissues of non-small cell lung cancer (NSCLC), investigate the relationships between ZNF217 expression and clinicopathological features of NSCLC patients, and analyze the associations of ZNF217 with survival time after surgery and prognosis of NSCLC patients. **Methods** Expression of ZNF217 was analyzed by qRT-PCR in 77 NSCLC patients. SPSS 22.0 software was used to analyze the clinical relevance of ZNF217 in NSCLC. **Results** qRT-PCR revealed that the mRNA level of ZNF217 in the NSCLC tissues was significantly higher than that in the adjacent tissues. Chi-square analysis revealed that ZNF217 level was positively associated with TNM stage and lymph node metastasis of NSCLC patients. Kaplan-Meier curves revealed that ZNF217 level was negatively associated with postoperative 5-year overall survival rate and progression-free survival rate in the NSCLC patients after surgery. Cox proportional hazards risk analysis revealed that ZNF217 was an independent prognostic factor for NSCLC. **Conclusions** ZNF217 expression

收稿日期: 2017-06-03

[作者简介] 常世川, 现单位为重庆三峡中心医院防治中心

is upregulated in NSCLC, and could be used as a survival and prognosis predictor for NSCLC patients.

Keywords: zinc finger 217 (ZNF217); expression; survival; prognosis; NSCLC

肺癌是在全球范围内导致肿瘤相关死亡的最主要的原因之一，其发病率高，恶性程度高，且缺少有效的治疗手段^[1]。近年来，肺癌的诊断和治疗领域取得了巨大的进展，然而肺癌的预后依旧不容乐观，肺癌患者的术后 5 年总体生存率仍不足 15%^[2-3]。约 85% 的肺癌患者分型为非小细胞型肺癌，这类患者在就诊时大多已处于进展期，且复发率和死亡率居高不下^[4]。因此，为了提供更好的治疗手段及改善患者生存及预后的水平，目前急需鉴定有效的非小细胞肺癌诊断及治疗靶点。

锌指蛋白 217 (Zinc-finger 217, ZNF217) 定位于人染色体 20q13.2。研究显示^[5]ZNF217 在多种人类肿瘤中发挥着致癌基因的作用。作为核转录调控因子，ZNF217 可特异地与 DNA 结合而抑制某些抑癌基因的转录，如 TGF- β 、P53^[6]。在乳腺癌中，ZNF217 被证实可促进肿瘤的增殖及转移，且与乳腺癌患者的总体生存率和无进展生存率负相关^[7]。此外，研究表明 ZNF217 在胰腺癌^[8]、恶性胶质瘤^[9]及食管癌^[10]等肿瘤中均作为癌基因发挥作用。然而，ZNF217 在非小细胞肺癌中的表达和功能仍未得到充分研究。

本研究通过实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测非小细胞肺癌组织及癌旁组织中 ZNF217 的表达水平，并利用多种统计学方法分析了 ZNF217 在非小细胞肺癌中的临床相关性，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 资料

收集重庆三峡中心医院肿瘤防治中心 2007 年 1 月 -2011 年 1 月手术切除并经病理诊断为非小细胞肺癌且随访资料完整的肿瘤组织及癌旁组织标本 77 例。入组患者临床病理资料见表 1。手术中取非小细胞肺癌肿瘤组织及相应的癌旁组织，冷冻保存于液氮之中，待用。本研究经重庆三峡中心医院伦理委员会批准，所有入选本研究的患者均同意使用其组织标本用于科研之中，并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取 RNA 提取步骤参照 TIANGEN 公司动物组织总 RNA 提取试剂盒所述步骤，简要步骤

表 1 非小细胞肺癌患者癌组织 ZNF217 表达与各临床病理因素的关系

临床病理特征	例数	ZNF217 表达水平		P 值
		高表达	低表达	
年龄				
≤ 50 岁	37	21	16	0.877
> 50 岁	40	22	18	
性别				
男	52	31	21	0.336
女	25	12	13	
淋巴结转移				
有	49	32	17	0.034 [†]
无	28	11	17	
肿瘤分期				
I、II	32	12	20	0.006 [†]
III、IV	45	31	14	
吸烟				
是	33	21	12	0.233
否	44	22	22	
组织分型				
腺癌	55	29	26	0.384
鳞状细胞癌	22	14	8	

注：[†]P < 0.05

如下：将组织中加入裂解液 RL，充分研磨，而后加入匀浆液 590 μ l 去离子水及 10 μ l 蛋白酶 K，56 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。12 000 r/min 离心 5 min，取上清。加入上清 0.5 倍体积的无水乙醇，混匀，加入吸附柱，12 000 r/min 离心 30s，弃去废液。向吸附柱中加入 350 μ l RW1 液，12 000 r/min 离心 30s，弃去废液。向吸附柱中加入 80 μ l Dnase I 液，室温放置 15 min。向吸附柱中加入 350 μ l RW1 液，12 000 r/min 离心 30s，弃去废液。向吸附柱中加入 500 μ l RW 液，12 000 r/min 离心 30s，弃去废液。再次 12 000 r/min 离心 2 min，弃去废液。向吸附柱加入 50 μ l 去离子水，室温放置 2 min，12 000 r/min 离心 2 min，所得溶液即为 RNA 溶液。

1.2.2 逆转录 逆转录步骤参照 TIANGEN 公司 Quant cDNA 第一链合成试剂盒所述步骤。检验步骤如下：配置逆转录体系混合液，其中含 10 \times RT Mix 1 μ l，dNTPs 1 μ l，Oligo-(dT) 151 μ l，Quant 逆转录酶 1 μ l，RNA 1 μ l，去离子水 5 μ l。充分混匀，37 $^{\circ}$ C

孵育 60 min。

1.2.3 qRT-PCR qRT-PCR 实验步骤参照 TIANGEN 公司生产的 SYBR Green I 试剂盒所述步骤, 简要步骤如下: 将 20×SYBR 溶液室温下平衡并混匀。将 125 μl 20×SYBR 溶液加入 1.0 ml 2.5×RealMaster Mix 中, 得到试剂 A。配置 20 μl 反应体系, 试剂 A 9 μl, 正向引物及反向引物各 1 μl, cDNA 模板 2 μl, 去离子水 7 μl。反应条件为: 95℃ 2 min; 而后进行 30 个循环的 95℃ 15 s, 55℃ 15 s, 68℃ 15 s。ZNF217 正向引物为: 5'-GAGAAGCGAATGGTGAAG C-3', 反向引物为: 5'-CAGCGCTCAAGTATGCAAAA -3'; β-actin 正向引物为: 5'-CTCCATCCTGGCCTCG CTGT-3', 反向引物为: 5'-GCTGTCACCTTCACCGT CC-3'。

1.3 统计学方法

本研究所有实验数据均通过 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验分析癌组织与癌旁组织间 ZNF217 的表达水平差异, 采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法分析 ZNF217 表达水平与非小细胞肺癌患者临床病理特征之间的关系, 采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线及 Log-rank 检验分析 ZNF217 表达水平与非小细胞肺癌患者生存周期之间的关系, 采用 Cox 风险比例模型分析 ZNF217 的表达水平与非小细胞肺癌患者预后的关系, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZNF217 在非小细胞肺癌组织及癌旁组织中的表达

提取非小细胞肺癌组织及癌旁组织总 RNA, 逆转录为 cDNA, 利用 qRT-PCR 技术检测两组中 ZNF217 的表达水平。结果显示: 癌旁组织中 ZNF217 的相对表达水平为 (0.928 ± 0.725), 非小细胞癌组织中 ZNF217 相对表达水平为 (3.495 ± 1.793), 经 *t* 检验, ZNF217 在非小细胞癌旁组织及癌组织间表达差异有

统计学意义 ($t=5.181, P=0.015$), 非小细胞肺癌中的 ZNF217 表达水平高于癌旁组织。见图 1。

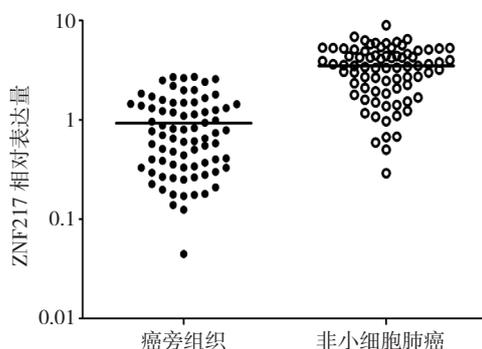


图 1 ZNF217 在非小细胞肺癌及癌旁组织中的 mRNA 表达水平

2.2 ZNF217 的表达水平与非小细胞肺癌患者临床病理特征的关系

根据 ZNF217 在非小细胞肺癌表达水平的均值 3.495, 将非小细胞肺癌分为 ZNF217 高表达组与 ZNF217 低表达组。根据非小细胞临床病理特征及 ZNF217 表达水平将非小细胞肺癌分组, 利用 χ^2 检验分析 ZNF217 表达水平与非小细胞肺癌临床病理特征的关系。结果显示: ZNF217 表达水平与肿瘤分期 ($\chi^2=7.472, P=0.006$) 和淋巴结转移情况 ($\chi^2=4.892, P=0.034$) 密切相关, 而与其他病理特征无关。ZNF217 低表达组的非小细胞肺癌患者肿瘤分期及淋巴结转移情况均优于 ZNF217 高表达组。

2.3 ZNF217 的表达水平与非小细胞肺癌患者术后生存期的关系

根据 ZNF217 相对表达水平将非小细胞肺癌患者分为 ZNF217 阳性组及 ZNF217 阴性组, 绘制 Kaplan-Meier 生存曲线, 利用 Log-rank 检验分析两组非小细胞肺癌患者生存周期的差异。结果显示, ZNF217 阴性组的 5 年总体存活率 (Log-rank 检验: $P=0.012$) 及无进展存活率 (Log-rank 检验: $P=0.013$) 均高于 ZNF217 阳性组。见图 2。

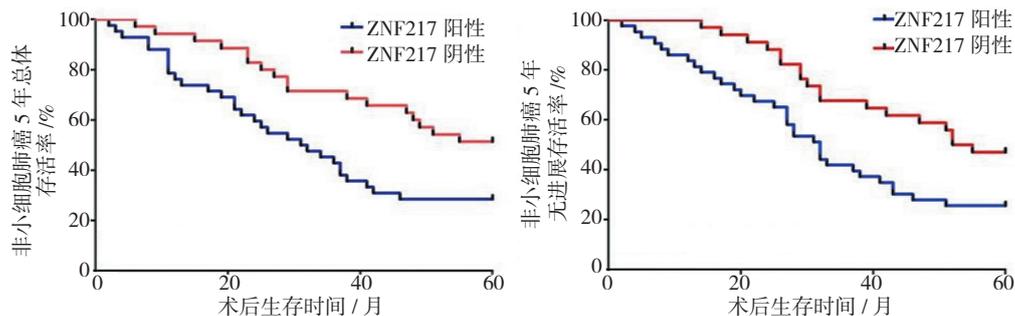


图 2 ZNF217 与非小细胞肺癌患者术后生存期的关系

2.4 ZNF217 的表达水平与非小细胞肺癌患者预后关系

利用 Cox 风险比例模型评估 ZNF217 表达水平及其他临床病理特征对非小细胞肺癌患者生存预期的影响。单因素分析结果显示：临床分期、淋巴结转移情况及 ZNF217 的表达水平与总体生存预期及无进

展生存预期相关。而后，进一步利用多因素分析评估在的单因素分析中与非小细胞肺癌生存预期相关的指标的可靠性。结果显示：TNM 分期、淋巴结转移情况及 ZNF217 表达水平均为非小细胞肺癌患者总体生存预期及无进展生存预期的独立的判断预后指标。见表 2、3。

表 2 非小细胞肺癌患者总体生存预期的单因素分析及多因素分析

因素	单因素分析				多因素分析			
	\hat{HR}	95% 可信区间		P 值	\hat{HR}	95% 可信区间		P 值
		下限	上限			下限	上限	
ZNF217 的表达水平	3.157	1.319	5.933	0.014 [†]	1.791	1.183	2.987	0.029 [†]
临床分期	4.019	1.569	7.815	0.008 [†]	2.315	1.349	4.171	0.021 [†]
淋巴结转移情况	1.917	1.128	3.914	0.024 [†]	1.774	1.117	2.517	0.032 [†]

注：†P < 0.05

表 3 非小细胞肺癌患者无进展生存预期的单因素分析及多因素分析

因素	单因素分析				多因素分析			
	\hat{HR}	95% 可信区间		P 值	\hat{HR}	95% 可信区间		P 值
		下限	上限			下限	上限	
ZNF217 的表达水平	3.007	1.534	4.889	0.019 [†]	2.016	1.241	3.197	0.031 [†]
临床分期	4.981	1.503	6.911	0.014 [†]	2.419	1.474	4.566	0.024 [†]
淋巴结转移情况	2.107	1.059	3.097	0.042 [†]	1.314	1.117	2.129	0.047 [†]

注：†P < 0.05

3 讨论

在本研究中，通过 qRT-PCR 检测非小细胞肺癌组织及癌旁组织中 ZNF217 的表达水平，结果发现，ZNF217 在非小细胞肺癌组织中表达上调。结合既往文献和前期结果，本研究利用 χ^2 检验、K-M 生存曲线及 Cox 风险比例模型进一步分析了 ZNF217 在非小细胞肺癌中的临床相关性。结果显示，ZNF217 与非小细胞肺癌患者淋巴结转移及肿瘤分期密切相关。更为重要的是，ZNF217 与非小细胞肺癌 5 年总体生存率、无进展生存率及预后呈负相关。本研究结果提示，ZNF217 在非小细胞肺癌中发挥癌基因的作用，且与非小细胞肺癌的发生及进展密切相关。

既往研究发现^[11]，在卵巢癌中高表达的 ZNF217 可活化 PI3K/Akt 信号通路而促进肿瘤细胞的增殖。此外，ZNF217 可促进乳腺癌中有丝分裂中重要激酶 Aurora-A 的表达而调控乳腺癌细胞有丝分裂。更为重要的是，ZNF217 可通过促进 Bcl-2 的降解而抑制紫杉醇诱导的细胞凋亡^[12]。在本研究中，ZNF217 被发现与非小细胞的淋巴结转移及 TNM 分期密切相关。

在 AJCC 的分级系统中，TNM III 期 & IV 期的非小细胞肺癌均伴有淋巴结转移或远处转移。结合既往文献，笔者认为 ZNF217 可能在非小细胞肺癌肿瘤侵袭转移过程中同样发挥着重要的作用。既往研究显示^[13]，ZNF217 定位于染色体 20q13.2，而 20q13.2 的拷贝数与肺癌的易感性密切相关。更为重要的是 20q13.2 (rs4809957G) 位点的基因多态性与非小细胞肺癌患者的生存周期及预后密切相关^[14]。此外，研究显示，内皮间质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肿瘤转移的重要机制之一，其通常表现为肿瘤细胞内 E-cadherin 表达下调^[15]。EMT 在非小细胞肺癌的发生发展过程中，同样起着非常重要的作用。miRNAs 可通过直接或间接调控 E-cadherin 或 EMT 相关分子的表达而参与调控非小细胞肺癌的发生及进展^[16-17]。另有研究显示^[18]，ZNF217 可在 mRNA 转录层面抑制 E-cadherin 的表达，从而促进细胞发生 EMT，最终导致肿瘤转移。因此，ZNF217 可能通过参与调控 EMT 进程中的关键分子，从而进一步影响非小细胞肺癌的侵袭和转移。更为确切的分子机制，需

进一步的细胞水平实验证实。

本研究发现 ZNF217 的表达水平与非小细胞肺癌的生存及预后密切相关。根据 qRT-PCR 结果, 本研究将非小细胞肺癌患者分为 ZNF217 阳性组及 ZNF217 阴性组, 通过 K-M 生存曲线分析, 研究发现 ZNF217 阳性组患者的 5 年总体生存率及无进展生存率均低于 ZNF217 阴性组。利用 Cox 风险比例模型, 单因素及多因素分析结果均显示, ZNF217 为非小细胞肺癌预后的独立预测指标。既往研究显示, 在胃癌中, ZNF217 阴性患者的无进展生存率及总体生存率均优于 ZNF217 阳性患者, 多因素分析结果证实 ZNF217 是无进展生存预期的独立判断指标^[19]。在卵巢癌中, ZNF217 可促进肿瘤细胞的侵袭及转移, 并与患者的不良预后密切相关^[20]。结合本研究前期研究结果及既往文献, 笔者认为 ZNF217 可能通过促进肿瘤细胞的侵袭和转移能力, 而导致非小细胞肺癌发生淋巴结转移或远处转移, 最终影响患者的生存及预后。

综上所述, ZNF217 在非小细胞肺癌组织中表达高于对应癌旁组织, ZNF217 的表达与非小细胞肺癌患者恶性病理特征、不良生存及预后密切相关。ZNF217 在非小细胞肺癌的发生及进展中发挥着重要的作用, 为非小细胞肺癌潜在的治疗靶点。

参 考 文 献:

- [1] TORRE L A, SIEGEL R L, JEMAL A. Lung Cancer Statistics[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016(893): 1-19.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
- [3] DA CUNHA SANTOS G, SHEPHERD F A, TSAO M S. EGFR mutations and lung cancer[J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 49-69.
- [4] JUERGENS R, BRAHMER J. Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer: who, which, when, and how[J]. *Curr Oncol Rep*, 2007, 9(4): 255-264.
- [5] RAHMAN M T, NAKAYAMA K, RAHMAN M, et al. Prognostic and therapeutic impact of the chromosome 20q13.2 ZNF217 locus amplification in ovarian clear cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2012, 118(11): 2846-2857.
- [6] THILLAINADESAN G, CHITILIAN J M, ISOVIC M, et al. TGF-beta-dependent active demethylation and expression of the p15ink4b tumor suppressor are impaired by the ZNF217/CoREST complex[J]. *Mol Cell*, 2012, 46(5): 636-649.
- [7] LITTLEPAGE L E, ADLER A S, KOUROS-MEHR H, et al. The transcription factor ZNF217 is a prognostic biomarker and therapeutic target during breast cancer progression[J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(7): 638-651.
- [8] LETESSIER A, SIRCOULOMB F, GINESTIER C, et al. Frequency, prognostic impact, and subtype association of 8p12, 8q24, 11q13, 12p13, 17q12, and 20q13 amplifications in breast cancers[J]. *BMC Cancer*, 2006, 6(1): 245.
- [9] MAO X G, YAN M, XUE X Y, et al. Overexpression of ZNF217 in glioblastoma contributes to the maintenance of glioma stem cells regulated by hypoxia-inducible factors[J]. *Lab Invest*, 2011, 91(7): 1068-1078.
- [10] GEPPERT C I, RUMMELE P, SARBIA M, et al. Multi-colour FISH in oesophageal adenocarcinoma-predictors of prognosis independent of stage and grade[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(12): 2985-2995.
- [11] HUANG H N, LIN M C, HUANG W C, et al. Loss of ARID1A expression and its relationship with PI3K-Akt pathway alterations and ZNF217 amplification in ovarian clear cell carcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2014, 27(7): 983-990.
- [12] THOLLET A, VENDRELL J A, PAYEN L, et al. ZNF217 confers resistance to the pro-apoptotic signals of paclitaxel and aberrant expression of Aurora-A in breast cancer cells[J]. *Mol Cancer*, 2010(9): 291.
- [13] DONG J, HU Z, WU C, et al. Association analyses identify multiple new lung cancer susceptibility loci and their interactions with smoking in the Chinese population[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(8): 895-899.
- [14] LI D, WEI L, XU B, et al. Association of GWAS-identified lung cancer susceptibility loci with survival length in patients with small-cell lung cancer treated with platinum-based chemotherapy[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113574.
- [15] WANG W S, YU S L, YANG X S, et al. Expression and significance of twist and E-cadherin in ovarian cancer tissues[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(2): 669-672.
- [16] GAO H X, YAN L, LI C, et al. miR-200c regulates crizotinib-resistant ALK-positive lung cancer cells by reversing epithelial-mesenchymal transition via targeting ZEB1[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4135-4143.
- [17] YE Z, YIN S, SU Z, et al. Downregulation of miR-101 contributes to epithelial-mesenchymal transition in cisplatin resistance of NSCLC cells by targeting ROCK2[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(25): 37524-37535.
- [18] BAI W D, YE X M, ZHANG M Y, et al. MiR-200c suppresses TGF-beta signaling and counteracts trastuzumab resistance and metastasis by targeting ZNF217 and ZEB1 in breast cancer[J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(6): 1356-1368.
- [19] SHIDA A, FUJIOKA S, KURIHARA H, et al. Prognostic significance of ZNF217 expression in gastric carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(9): 4813-4817.
- [20] LI J, SONG L, QIU Y, et al. ZNF217 is associated with poor prognosis and enhances proliferation and metastasis in ovarian cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(6): 3038-3047.

(张西倩 编辑)