文章编号:1000-5404(2011)12-1237-03

论著

不同生物学行为非小细胞肺癌组织中 ZNF266 基因的差异表达及意义

赵晓龙,葛明建,黎 力 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院胸心外科)

【摘要】 **目的** 观察 zinc finger protein 266(ZNF266)基因在不同生物学行为非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma,NSCLC)组织中的表达水平并探讨其在 NSCLC 发生、发展及淋巴结转移中的意义。**方法** 选取 30 例不伴有淋巴结转移的 NSCLC 原发灶及癌旁正常组织标本和 30 例伴有淋巴结转移的 NSCLC 原发灶及淋巴结转移灶标本,采用 SABC 免疫组织化学三步法检测各组标本中 ZNF266 基因的蛋白表达水平。**结果** ZNF266 蛋白表达在 NSCLC 组织中阳性表达率显著高于癌旁正常肺组织(40% *vs* 7%,$P<0.01$);在伴有淋巴结转移的原发灶中的表达明显高于不伴有淋巴结转移的原发灶(67% *vs* 40%,$P<0.05$);淋巴结转移灶中 ZNF 蛋白表达水平明显高于原发灶(93% *vs* 40%,$P<0.05$)。**结论** ZNF266 基因可能参与了 NSCLC 的发生、发展及淋巴结转移。

【关键词】 癌,非小细胞肺;锌指;肿瘤转移;免疫组织化学
【中图法分类号】 R734.2;R394.2;R730.23 【文献标志码】 A

Differential expression of zinc finger protein 266 gene in non-small cell lung carcinoma tissue with different biological behaviors and its significance

Zhao Xiaolong, Ge Mingjian, Li Li (Department of Cardiothoracic Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the significance of occurrence, development and lymphatic metastasis of non-small cell lung carcinoma (NSCLC) by observing the expression level of zinc finger protein 266 (ZNF266) in NSCLC tissue with differential biological behaviors. **Methods** Expression levels of ZNF266 in 30 samples of primary NSCLC tissue without lymphatic metastasis and its adjacent normal tissue, and in 30 samples of primary NSCLC tissue with lymphatic metastasis, were measured with the 3-step SABC immunohistochemistry method. **Results** The positive expression rate of ZNF266 was significantly higher in primary NSCLC tissue samples than in its adjacent normal tissue samples (40% *vs* 7%, $P<0.01$), and in primary NSCLC tissue samples with lymphatic metastasis than in those without lymphatic metastasis (67% *vs* 40%, $P<0.05$). The expression level of ZNF266 was significantly higher in primary NSCLC tissue samples with lymphatic metastasis than in those without lymphatic metastasis (93% *vs* 67%, $P<0.05$). **Conclusion** ZNF266 gene is involved in the occurrence, development and lymphatic metastasis of NSCLC.

【**Key words**】 carcinoma, non-small cell lung; zinc fingers; neoplasm metastasis; immunohistochemistry

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972961) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSCT2008BB5210).
Corresponding author: Ge Mingjian, Tel: 86-23-89011131, E-mail: mingjian_ge@hotmail.com

肺癌是当今世界发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,其中85%为非小细胞肺癌(non-smallcell lung carcinoma,NSCLC)[1]。远处转移是影响肺癌治疗及预后的主要因素之一。目前肺癌转移的确切机制不明,阐明肺癌转移的机制具有重要意义。有研究表明,锌指蛋白与肿瘤的发生、发展密切相关。ZNF266 基因是锌指蛋白家族中的一员,我们的前期研究[2-3]通过收集大量的 NSCLC 组织及区域淋巴结组织,对其进行激光显微切割以获得纯净癌细胞,T7RNA 线性扩增获取足够量的 RNA,实验通道和参照通道分别标记以后与含 6 000 个已知人类基因或表达序列标签的 cDNA 基因芯片杂交,扫描荧光信号以后进行数据分析,发现该基因可能与肺癌的淋巴结转移相关。本实验采用免疫组化 SABC 法分别检测并比较 NSCLC 原发灶、淋巴结转移病灶及癌旁组织中 ZNF266 蛋白的表达水平,探讨其在 NSCLC 发生、发展中的意义。

【基金项目】 国家自然科学基金(30972961);重庆市自然科学基金(CSCT2008BB5210)
【通信作者】 葛明建,电话:(023)89011131,E-mail:mingjian_ge@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取本院2007年7月至2009年7月NSCLC患者手术切除的标本，患者临床资料完整，石蜡标本保存完好，共60例，其中男性35例，女性25例；组织学类型分为：鳞癌30例（12例高分化；15例中分化；3例低分化），腺癌30例（9例高分化；14例中分化；7例低分化）；年龄45～72岁，中位年龄58岁。按2010年第7版国际肺癌TNM分期方法，Ⅰ～Ⅱ期30例，Ⅲ～Ⅳ期30例。本组病理学证实30例伴有区域淋巴结（包括肺门和纵隔）转移，30例不伴有淋巴结转移。选30例不伴有淋巴结转移的癌旁正常肺组织作为阴性对照，所取组织距离病灶边缘5 cm以上。组织标本经10%中性福尔马林液固定，石蜡包埋，4～5 μm连续切片，包括癌旁正常组织及淋巴结转移灶。

1.2 试剂

ZNF266一抗为兔抗人多克隆抗体，购自英国Abcam公司。SABC试剂盒、DAB显色液及PBS、枸橼酸盐等均为北京中杉金桥生物技术公司产品。

1.3 实验方法

切片常规脱蜡，水化后，pH=6.0的枸橼酸微波炉热修复20 min，山羊血清封闭，加一抗4 ℃冰箱过夜，次晨切片复温，按照SABC法说明书步骤进行。以已知肺癌组织为阳性对照，以PBS代一抗作阴性对照。实验中，ZNF266抗体稀释度为1∶500。

细胞核内出现棕褐色染色为ZNF266蛋白阳性细胞。采用半定量积分法判定结果，根据阳性细胞所占百分比进行评分并记录，0分：无阳性细胞或阳性细胞＜10%；1分：阳性细胞10%～30%；2分：阳性细胞30%～50%；3分：阳性细胞50%～70%；4分：70%以上。显色强度按阳性细胞着色深浅计分，0分：无着色；1分：弱强度阳性；2分：中等强度阳性；3分：强阳性。2种分值相加：若2种积分之和＞2，则为表达阳性；≤2，则为表达阴性。染色结果由2名专门从事免疫组化研究的技师采用双盲原则评定。

1.4 统计学分析

应用SPSS 18.0统计软件，组间的比较采用χ^2检验或Fisher确切概率法。

2 结果

30例不伴有淋巴结转移的NSCLC组织中，原发灶与癌旁组织的ZNF266阳性表达分别为12例与2例（40% *vs* 7%，$\chi^2=9.317$，$P=0.005$）。ZNF266蛋白表达棕黄色颗粒位于细胞核（图1）。

30例伴有淋巴结转移的NSCLC组织中，原发灶及相应淋巴结转移灶中，ZNF266蛋白阳性表达为20例与28例（67% *vs* 93%，$\chi^2=6.667$，$P=0.021$）。

比较30例不伴有淋巴结转移的NSCLC组织中原发灶与30例伴有淋巴结转移的NSCLC组织中原发灶，ZNF266阳性表达分别为12例与20例（40% *vs* 67%，$\chi^2=4.286$，$P=0.038$）。

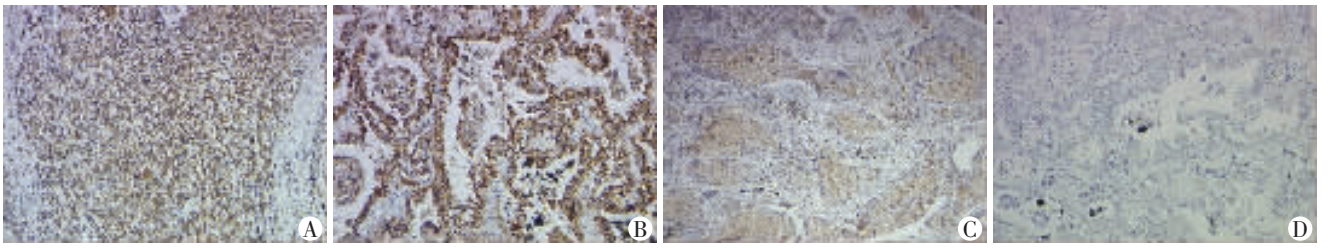
ZNF266蛋白表达与临床病理因素的关系：ZNF266蛋白表达率在NSCLC不同的分期、分化程度及是否伴有淋巴结转移比较中差异有统计学意义（$P<0.05$），而在患者的不同年龄、不同性别、不同组织学类型的比较中，ZNF266蛋白阳性表达率无显著性差异（表1）。

表1 ZNF266在NSCLC组织表达与临床病理参数的关系

临床及病理学指标	*n*	阳性	阴性	χ^2	*P*
性别					
男	35	18	17	0.122	0.726
女	25	14	11		
年龄（岁）					
＞50	37	22	15	1.455	0.228
≤50	23	10	13		
组织学类型					
鳞癌	30	18	12	1.071	0.301
腺癌	30	14	16		
淋巴结转移					
有	30	20	10	4.286	0.038
无	30	12	18		
分化程度					
高	21	6	15	8.920	0.012
中	29	18	11		
低	10	8	2		
TNM分期					
Ⅰ	12	2	10	8.661	0.013
Ⅱ	18	10	8		
Ⅲ	30	20	10		

3 讨论

锌指蛋白（zinc finger protein）基因家族是人类最大的基因家族之一，其蛋白产物主要通过与DNA相互作用来调控靶基因的表达，以适应生物体发育、分化及成熟过程的需要[4]。有研究表明，锌指蛋白是一类重要的转录调控因子，其突变与人类肿瘤发生密切相关[5]。



A：肺鳞癌；B：肺腺癌；C：转移淋巴结；D：阴性对照

图1 免疫组化检测ZNF266在不同组织学类型NSCLC中的阳性表达 （SABC ×200）

根据蛋白质与锌离子不同的结合方式,锌指蛋白可分为多种亚型:如C2H2型、C2HC型、GATA-1型、GAL4型和LIM型等。ZNF266基因是锌指蛋白基因家族中的一员,别名zinc finger protein HZF1,它属于C2H2型,可能是一种转录因子,主要在细胞核表达[6-7]。

有关锌指蛋白家族其他的C2H2型基因报道较多,且有很多与肿瘤的发生及侵袭转移有关。ZNF191基因是一个多效性的基因,它在人类造血、脑的发育及肿瘤的发生中扮演着一个重要的角色[8];Zhao等[9]比较ZNF268 mRNA在正常人及白血病患者的外周血的表达,发现有显著差异,ZNF268基因的突变可能导致白血病的发生;有研究[10]认为ZNF165基因在头颈部鳞状细胞癌中是一个肿瘤的相关抗原。本研究结果也显示,非小细胞肺癌组织中ZNF266基因的表达明显高于癌旁组织,提示同属锌指蛋白家族的ZNF266基因可能参与了非小细胞肺癌的发生。其具体参与非小细胞的发生机制是否与以上基因参与肿瘤发生的机制相同或相近,有待进一步的研究。

本研究还比较了伴有淋巴结转移的原发灶与不伴有淋巴结转移的原发灶,结果显示,前者明显高于后者,这说明ZNF266基因可能与非小细胞肺癌的发展、演进有关;同时我们还做了伴有淋巴结转移的原发灶与相应的淋巴结转移灶的分析,结果发现淋巴结转移灶的表达要显著高于原发灶,提示ZNF266基因可能参与非小细胞肺癌的淋巴转移或者说参与非小细胞肺癌细胞生物学行为。研究报道,同家族同型基因ZNF217很可能是一个致癌基因[11],与乳腺癌[12]、卵巢癌[13]、胃腺癌[14]等的发生、发展及侵袭转移有密切关系;Dong等[15]研究也表明ZNF165基因在肝癌患者中,可以刺激体液免疫反应并涉及肿瘤的生物学行为。

此外,通过分析ZNF266基因的表达与临床病理参数的关系,我们发现该基因的表达与患者的年龄、性别、肺癌的组织学类型无相关性;而与肺癌的临床分期及分化程度有关系,分化程度越低,临床分期越晚,该基因的阳性表达率越高,提示该基因与NSCLC的发展及其恶性程度有关。

研究[5]表明,锌指蛋白基因家族与不同生物学行为的肿瘤的发生、发展及侵袭转移密切相关。本研究研究了ZNF266基因在NSCLC中的表达情况,实验结果表明,它可能是一个新的癌相关基因,可能与NSCLC的发生、发展及淋巴结转移有密切的关系,但是其机制非常复杂,今后有必要对该基因在NSCLC转移中的确切机制进行深入研究,这将有助于进一步的阐明肺癌侵袭转移的机制,为制定针对癌转移的治疗策略提供新的线索。

参考文献:

[1] Maione P, Rossi A, Sacco P C, *et al*. Advances in chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer[J]. Expert Opin Pharmacother, 2010, 11(18):2997-3007.

[2] Ge M, Wang M, Wu Q, *et al*. Genetic fingerprint concerned with lymphatic metastasis of human lung squamous cancer[J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2009, 12(9):945-950.

[3] 葛明建, 王梅, 吴庆琛, 等. 肺腺癌患者淋巴转移的分子指纹鉴定[J]. 癌症, 2009, 28(3):262-267.

[4] Beerli R R, Barbas C F 3rd. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors[J]. Nat Bioteehnol, 2002, 20(3):135-141.

[5] Collins T, Stone J R, Williams A J. All in the family:the BTB/POZ, KRAB, and SCAN Domains[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(11):3609-3615.

[6] Peng H, Du Z W, Zhang J W. Identification and characterization of a novel zinc finger protein (HZF1) gene and its function in erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells[J]. Leukemia, 2006, 20(6):1109-1116.

[7] Deng M J, Li X B, Peng H, *et al*. Identification of the trans-activation domain and the nuclear location signals of human zinc finger protein HZF1 (ZNF16)[J]. Mol Biotechnol, 2010, 44(2):83-89.

[8] Li J, Chen X, Gong X, *et al*. A transcript profiling approach reveals the zinc finger transcription factor ZNF191 is a pleiotropic factor[J]. BMC Genomics, 2009, 10:241.

[9] Zhao Z, Wang D, Zhu C, *et al*. Aberrant alternative splicing of human zinc finger gene ZNF268 in human hematological malignancy[J]. Oncol Rep, 2008, 20(5):1243-1248.

[10] Atanackovic D, Blum I, Cao Y, *et al*. Expression of cancer-testis antigens as possible targets for antigen-specific immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(9):1218-1225.

[11] Banck M S, Li S, Nishio H, *et al*. The ZNF217 oncogene is a candidate organizer of repressive histone modifiers[J]. Epigenetics, 2009, 4(2):100-106.

[12] Krig S R, Miller J K, Frietze S, *et al*. ZNF217, a candidate breast cancer oncogene amplified at 20q13, regulates expression of the ErbB3 receptor tyrosine kinase in breast cancer cells[J]. Oncogene, 2010, 29(40):5500-5510.

[13] 孙桂芹, 钟梅, 丁彦青, 等. ZNF217基因在卵巢癌中的表达及意义[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(4):685-688.

[14] Buffart T E, van-Grieken N C, Tijssen M, *et al*. High resolution analysis of DNA copy-number aberrations of chromosomes 8, 13, and 20 in gastric cancers[J]. Virchows Arch, 2009, 455(3):213-223.

[15] Dong X Y, Yang X A, Wang Y D, *et al*. Zinc-finger protein ZNF165 is a novel cancer-testis antigen capable of eliciting antibody response in hepatocellular carcinoma patients[J]. Br J Cancer, 2004, 91(8):1566-1570.

(收稿:2010-11-24 修回:2011-01-04)

(编辑 张 维)