

ZNF268在肝细胞癌中的表达及临床诊断价值探讨

吴坤亮¹, 郑 根², 王能乙¹, 刘 瑞^{1*}

¹海南医科大学第二附属医院感染病与热带病科, 海南 海口

²海南医科大学第二附属医院肾内科, 海南 海口

收稿日期: 2024年6月23日; 录用日期: 2024年7月16日; 发布日期: 2024年7月25日

摘 要

目的: 分析ZNF268在肝细胞癌(HCC)与正常肝脏中的表达差异, 探讨ZNF268在HCC中的临床诊断价值。方法: 实时荧光定量PCR法(qRT-PCR)分别检测人肝癌细胞株HepG2、Huh7与人正常肝细胞株LO2中ZNF268 mRNA的表达情况; 免疫组织化学技术(IHC)检测64例HCC及其癌旁对照组织中ZNF268的表达情况。结果: 人肝癌细胞株HepG2、Huh7中ZNF268 mRNA的表达均明显低于人正常肝细胞株LO2 ($P < 0.0001$, $P < 0.0001$); HCC组织中ZNF268的表达明显低于癌旁组织($P < 0.05$)。结论: ZNF268在HCC中的表达低于正常肝脏, ZNF268有望作为HCC鉴别诊断和治疗的潜在生物标志物。

关键词

ZNF268, 肝细胞癌, 临床, 诊断

The Expression and Clinical Diagnostic Value of ZNF268 in Hepatocellular Carcinoma

Kunliang Wu¹, Gen Zheng², Nengyi Wang¹, Rui Liu^{1*}

¹Department of Infectious and Tropical Diseases, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou Hainan

²Department of Nephrology, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou Hainan

Received: Jun. 23rd, 2024; accepted: Jul. 16th, 2024; published: Jul. 25th, 2024

Abstract

Objective: To analyze the differential expression of ZNF268 in Hepatocellular carcinoma (HCC)

*通讯作者。

文章引用: 吴坤亮, 郑根, 王能乙, 刘瑞. ZNF268 在肝细胞癌中的表达及临床诊断价值探讨[J]. 临床医学进展, 2024, 14(7): 1235-1240. DOI: 10.12677/acm.2024.1472137

and normal liver, and to explore the value of ZNF268 in the clinical diagnosis of HCC. Methods: qRT-PCR was used to detect the expression of ZNF268 mRNA in HepG2, Huh7 and LO2, respectively; IHC was used to detect the expression of ZNF268 in 64 HCC and paracancerous tissues. Results: The expression of ZNF268 mRNA in HepG2 and Huh7 was significantly lower than that in LO2 ($P < 0.0001$, $P < 0.0001$); The expression of ZNF268 in HCC tissue was significantly lower than that in paracancerous tissues ($P < 0.05$). Conclusion: The expression of ZNF268 in HCC is lower than that in normal liver, making it a potential biomarker for differential diagnosis and treatment of HCC.

Keywords

ZNF268, HCC, Clinical, Diagnosis

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

原发性肝癌是一种进展迅速, 预后极差的恶性肿瘤, 是最常见的严重危害全球人类健康的恶性肿瘤之一, 目前也是我国最常见的恶性肿瘤和肿瘤致死病因之一, 造成了严重的社会经济负担[1], 每年新发病例约 70 万人, 其中中国患者占 50%以上[2]。其中肝细胞肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是肝癌的常见病理类型, 占有病例的 75%~85%, 其发生与酒精性/非酒精性脂肪肝、病毒性肝炎等多种肝脏疾病相关[3]。HCC 高死亡率与其容易侵袭和转移密切相关[4] [5], 故积极寻找能够早期预测 HCC、判断预后以及指导治疗的肿瘤标志物, 对肝癌精准治疗及提高患者生存率均具有十分重要的意义[6]。

随着肿瘤分子生物学的发展, 人们在 HCC 中发现了许多异常分子, 转录因子的异常也涉及其中。比如, 许多过量表达的癌基因即为转录因子, 它们的功能异常与发育过程的紊乱有关, 最终会引起疾病的发生。锌指蛋白是真核生物中最常见的转录因子, 其中, C2H2 型锌指蛋白是最常见的。除了 C 端的锌指结构域外, C2H2 型锌指蛋白的 N 端含有一些保守的效应结构域。根据效应结构域的特点, C2H2 型锌指蛋白可分为如下四类: KRAB (Kruppel-associated box)、FAX (Finger-associated box)、FAR (Finger-associated repeat)和 POZ (Pox virus and zinc finger)。其中, 以 KRAB 型锌指蛋白最为常见, 数目最多, 约占 1/3。ZNF268 是一个典型的 KRAB 型锌指蛋白。有研究表明 ZNF268 不仅参与了人胚胎肝脏的发育[7], 血细胞的分化[8], 还与白血病发生过程[9]有关。近期有文献报道, ZNF268 在宫颈癌[10]-[12]及卵巢癌[13] [14]的发生发展中也有所涉及, 这提示 ZNF268 的表达水平可能与肿瘤的发生、进展、侵袭和转移密切相关。

故本研究通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)、免疫组织化学技术(IHC)检测肝癌细胞及肝癌组织中 ZNF268 的表达情况, 并探讨 ZNF268 在 HCC 中的诊断价值。

2. 资料与方法

2.1. 一般资料

收集 2016 年 1 月 1 日至 2021 年 12 月 31 日海南医科大学第二附属医院经病理检查确诊的 HCC 患者 64 例, 其中男性 56 例, 女性 8 例; 年龄 24~77 岁, 中位年龄 48 岁; 以 64 例 HCC 组织的配对远癌旁组织(距癌组织边缘大于 5 cm)作为对照。本研究通过海南医科大学第二附属医院伦理委员会审批(伦理编号: LW2021611)。

2.2. 纳入排除标准

1) 纳入标准：研究对象为经病理组织学确诊为 HCC 的连续性选择病例；影像学检查排除其他肿瘤肝转移；未合并其他重大疾病；病例资料完整；接受手术治疗前未接受过抗肿瘤治疗。

2) 排除标准：合并其他重大疾病；病例资料不完整；Aipathwell 软件读取报告异常或脱落；术前已接受抗肿瘤治疗。

2.3. 方法

2.3.1. 实时荧光定量 PCR 检测

HepG2、Huh7 与 LO2 细胞株购置于中科院上海细胞库。ZNF268 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(ZNF268-F: 5'-TACCAACACACCAAACCTGATA-3', ZNF268-R: 5'-CATTCAAAGCTTTTTGCCGTAC-3')。逆转录、荧光定量试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司。美国 ABI 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪进行检测, 设定反应条件如下: 95℃ 3 min; 95℃ 5 s; 60℃ 10 s; 72℃ 15 s, 40 个循环。

2.3.2. 免疫组织化学技术染色及结果判断

所有组织样本经石蜡包埋后予常规切片(厚度 4 μm)。ZNF268 免疫组织化学试剂盒购自英国 Abcam 公司, 严格按说明书流程进行操作。结果判定: 应用 Aipathwell 软件经循迹、选色、运算、分析得出结果。IRS = SI (阳性强度) $\times$ PP (阳性细胞比率)。阳性细胞比率 = 阳性细胞数/细胞总数[15]。SI 可分为 0~3 级, 0 级为无阳性着色, 1 级为淡黄色弱阳性, 2 级为棕黄色中阳性, 3 级为棕褐色强阳性; PP 可分为 0~4 级, 0 级为 0~5%, 1 级为 6~25%, 2 级为 26~50%, 3 级为 51~75%, 4 级为 > 75% [16]。最终按 IRS 评分高低进行分级: 0~6 分为低表达, 7~12 分为高表达。以上结果由两位专业病理医师独立阅片并作记录。

2.4. 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行统计学分析。率的比较采用 χ^2 检验, 组间比较采用 t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. ZNF268 在 HepG2、Huh7 及 LO2 细胞株中 mRNA 的表达情况

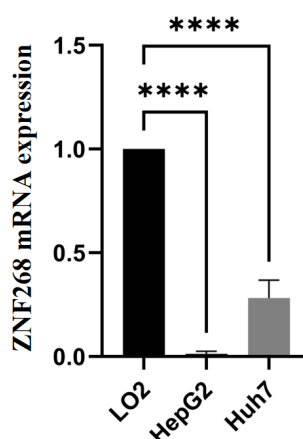


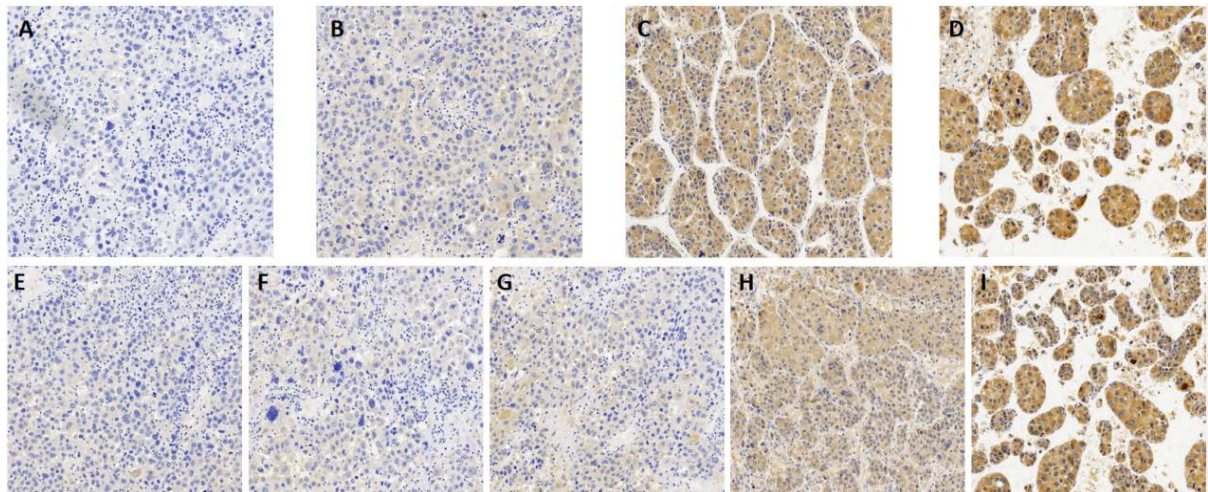
Figure 1. mRNA expression of ZNF268 in HepG2, Huh7 and LO2

图 1. ZNF268 在 HepG2、Huh7 及 LO2 细胞株中 mRNA 的表达情况

ZNF268 在人肝癌细胞株 HepG2、Huh7 中 mRNA 的表达均明显低于人正常肝细胞株 LO2, P 均 < 0.0001 , 见图 1。

3.2. ZNF268 在 HCC 及其癌旁对照组织中的表达情况

ZNF268 在 HCC 组织中的表达主要位于细胞浆, 间质细胞有少量表达, 呈不同染色程度的棕黄色颗粒。癌旁组织中 ZNF268 的 IRS 明显高于 HCC 组织, HCC 组织的 ZNF268 高表达率为 18.8% (12/64), 癌旁对照组织的 ZNF268 高表达率为 34.4% (22/64), 两组差异有统计学意义。 $P < 0.05$, 见图 2。



SI 分级: A: 0 级无阳性着色, B: 1 级淡黄色弱阳性, C: 2 级棕黄色中阳性, D: 3 级棕褐色强阳性; PP 分级: E: 0 级为 0~5%, F: 1 级为 6~25%, G: 2 级为 26%~50%, H: 3 级为 51%~75%, I: 4 级为 >75%。

Figure 2. Staining score of ZNF268 in HCC and paracancerous control tissues ($\times 100$)

图 2. ZNF268 在 HCC 及癌旁对照组织中的染色评分($\times 100$)

4. 讨论

HCC 是临床常见的恶性肿瘤, 其发病率在世界范围内居恶性肿瘤的第六位, 死亡率排第四位[17] [18], HCC 发病率仍呈上升趋势, 是全球医疗卫生事业面临巨大挑战的重要原因, 世界卫生组织预计在 2030 年将有 100 多万人死于肝癌[19]。HCC 的治疗方式包括外科手术、经肝动脉栓塞化疗法、消融治疗、肝脏移植以及放射治疗, 早期肝癌行手术治疗可治愈, 但多数患者在确诊时已属中晚期失去外科手术机会, 五年总生存率仅为 10%~18% [20]。

锌指蛋白是真核生物中最常见的转录因子, 转录因子的异常参与了肿瘤的发生发展。ZNF268 作为一个典型的 KRAB 型锌指蛋白, 在不同的组织中发挥着不同的功能。研究显示, ZNF268 在癌组织(宫颈癌、膀胱癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、食道癌)中的表达高于癌旁组织, 表明 ZNF268 在这些恶性肿瘤的发生发展中发挥着促进作用。然而, 在胃、胰腺、睾丸以及皮肤癌组织中的表达低于相应的癌旁组织, 提示 ZNF268 可能抑制这些组织的癌变。除此以外, ZNF268 在直肠、甲状腺、肾、淋巴结、脑和软组织中的表达与其对应的癌组织中的表达无明显变化。但是 ZNF268 在肝癌中的研究, 国内外未见相关报道, ZNF268 是否参与肝癌的发生发展尚未可知, 其在肝癌中的生物学作用机制也需深入研究。

本研究在细胞学及人体组织学层面研究 ZNF268 在 HCC 及正常肝脏中的表达。初步表明人肝癌细胞株 HepG2、Huh7 中 ZNF268 mRNA 的表达均明显低于人正常肝细胞株 LO2 (P 均 < 0.0001)。HCC 组织中 ZNF268 的表达明显低于癌旁组织($P < 0.05$)。这提示 ZNF268 的表达可能与 HCC 的恶性程度负相关,

有望作为肝癌鉴别诊断和治疗的潜在生物标志物。

5. 结论

综上所述, ZNF268 在 HCC 中表达降低, 但 ZNF268 在 HCC 中发挥抗癌作用的分子机制尚需进一步深入研究。ZNF268 是一个可用来设计新的治疗策略去管理肿瘤的潜在靶标, 未来可望在肿瘤的诊断、治疗及预后评估等方面展示广阔的应用前景, 同时也将有望推动个体化精准治疗的发展。

基金项目

海南省卫生健康行业科研项目(海南省卫生健康委员会)(21A200282); 海南省自然科学基金青年基金项目(823QN351); 海南省临床医学研究中心项目(LCYX202408)。

参考文献

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Jin, H., Wang, H., Li, G., Hou, Q., Wu, W. and Liu, F. (2020) Risk Factors for Early Postoperative Recurrence in Single and Small Hepatitis B Virus-Associated Primary Hepatocellular Carcinoma. *Journal of International Medical Research*, **48**, 1-12. <https://doi.org/10.1177/0300060520961260>
- [3] Pinheiro, P.S., Jones, P.D., Medina, H., Cranford, H.M., Koru-Sengul, T., Bungum, T., *et al.* (2024) Incidence of Etiology-Specific Hepatocellular Carcinoma: Diverging Trends and Significant Heterogeneity by Race and Ethnicity. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **22**, 562-571.E8. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2023.08.016>
- [4] Kim, H. and El-Serag, H.B. (2019) The Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in the USA. *Current Gastroenterology Reports*, **21**, Article No. 17. <https://doi.org/10.1007/s11894-019-0681-x>
- [5] Piñero, F., Dirchwolf, M. and Pessôa, M.G. (2020) Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis, Prognosis and Treatment Response Assessment. *Cells*, **9**, Article 1370. <https://doi.org/10.3390/cells9061370>
- [6] Shibue, T. and Weinberg, R.A. (2017) EMT, Cscs, and Drug Resistance: The Mechanistic Link and Clinical Implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **14**, 611-629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>
- [7] Sun, Y., Shao, H., Li, Z., Liu, J., Gao, L., Peng, X., *et al.* (2004) ZNF268, a Novel Krüppel-Like Zinc Finger Protein, Is Implicated in Early Human Liver Development. *International Journal of Molecular Medicine*, **14**, 971-975. <https://doi.org/10.3892/ijmm.14.6.971>
- [8] Krackhardt, A.M., Witzens, M., Harig, S., Hodi, F.S., Zauls, A.J., Chessia, M., *et al.* (2002) Identification of Tumor-Associated Antigens in Chronic Lymphocytic Leukemia by SEREX. *Blood*, **100**, 2123-2131. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0513>
- [9] Wang, D., Guo, M., Hu, H., Zhao, Z., Qiu, H., Shao, H., *et al.* (2008) Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Onco-protein Tax Represses ZNF268 Expression through the Camp-Responsive Element-Binding Protein/Activating Transcription Factor Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 16299-16308. <https://doi.org/10.1074/jbc.m706426200>
- [10] Yao, Z., Shu, L., Yi, Y. and Qiao, L. (2021) Hsa_circRNA_000543 Predicts Poor Prognosis and Promotes Cervical Cancer Cell Progression through Regulating miR-567/ZNF268 Axis. *Cancer Management and Research*, **13**, 5211-5222. <https://doi.org/10.2147/cmar.s302201>
- [11] Wang, W., Guo, M., Hu, L., Cai, J., Zeng, Y., Luo, J., *et al.* (2012) The Zinc Finger Protein ZNF268 Is Overexpressed in Human Cervical Cancer and Contributes to Tumorigenesis via Enhancing NF- κ B Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 42856-42866. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.399923>
- [12] Wang, W., Cai, J., Wu, Y., Hu, L., Chen, Z., Hu, J., *et al.* (2013) Novel Activity of KRAB Domain That Functions to Reinforce Nuclear Localization of KRAB-Containing Zinc Finger Proteins by Interacting with KAP1. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **70**, 3947-3958. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1359-4>
- [13] Hu, L., Wang, W., Cai, J., Luo, J., Huang, Y., Xiong, S., *et al.* (2013) Aberrant Expression of ZNF268 Alters the Growth and Migration of Ovarian Cancer Cells. *Oncology Letters*, **6**, 49-54. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1318>
- [14] Toledo-Leyva, A., Villegas-Pineda, J.C., Encarnación-Guevara, S., Gallardo-Rincón, D. and Talamás-Rohana, P. (2018) Effect of Ovarian Cancer Ascites on SKOV-3 Cells Proteome: New Proteins Associated with Aggressive Phenotype in Epithelial Ovarian Cancer. *Proteome Science*, **16**, Article No. 3. <https://doi.org/10.1186/s12953-018-0133-9>

- [15] Benonisson, H., Altıntaş, I., Sluijter, M., Verploegen, S., Labrijn, A.F., Schuurhuis, D.H., *et al.* (2019) CD3-Bispecific Antibody Therapy Turns Solid Tumors into Inflammatory Sites but Does Not Install Protective Memory. *Molecular Cancer Therapeutics*, **18**, 312-322. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-18-0679>
- [16] Xie, P., Zhang, M., He, S., Lu, K., Chen, Y., Xing, G., *et al.* (2014) The Covalent Modifier Nedd8 Is Critical for the Activation of Smurf1 Ubiquitin Ligase in Tumorigenesis. *Nature Communications*, **5**, Article No. 3733. <https://doi.org/10.1038/ncomms4733>
- [17] Kulik, L. and El-Serag, H.B. (2019) Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, **156**, 477-491.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.065>
- [18] Giannelli, G., Koudelkova, P., Dituri, F. and Mikulits, W. (2016) Role of Epithelial to Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Hepatology*, **65**, 798-808. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.007>
- [19] Li, X., Ramadori, P., Pfister, D., Seehawer, M., Zender, L. and Heikenwalder, M. (2021) The Immunological and Metabolic Landscape in Primary and Metastatic Liver Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **21**, 541-557. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00383-9>
- [20] Norman, J.S., Li, P.J., Kotwani, P., Shui, A.M., Yao, F. and Mehta, N. (2023) AFP-L3 and DCP Strongly Predict Early Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Liver Transplantation. *Journal of Hepatology*, **79**, 1469-1477. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.08.020>