

Exploration on the Expression and Clinical Significance of ZRF1 in Hepatocellular Carcinoma

Yulan Yi Shasha Chen Tanlun Zeng Xijun Liang*

Clinical Cancer Institute, Center for Translational Medicine, Naval Medical University, Shanghai, 200433, China

Abstract

Objective: To investigate the expression of ZRF1 in hepatocellular carcinoma (HCC) and analyze its prognostic value. **Methods:** The expression of ZRF1 in tumor tissues and paracancerous tissues of 243 HCC patients was measured by immunohistochemical staining. Kaplan-meier was used to analyze the relationship between ZRF1 and prognosis of HCC. **Results:** The positive expression rate of ZRF1 in tumor tissues was lower than that in the corresponding adjacent tissues ($P=0.015$). In addition, the expression of ZRF1 was not significantly different from clinical case characteristics such as age, gender, portal vein tumor thrombus, tumor size, and liver cirrhosis ($P > 0.05$). Finally, in the cohort of HCC patients treated with sorafenib, the prognosis of patients with low ZRF1 expression was significantly better than that of patients with high ZRF1 expression ($P=0.020$). **Conclusion:** The expression of ZRF1 was lower in hepatocellular carcinoma tissues than in its adjacent tissues. And the expression level of ZRF1 is negatively correlated with the prognosis of patients with liver cancer taking sorafenib treatment. Finally, ZRF1 is expected to be used as a predictor of the efficacy of sorafenib treatment for HCC patients.

Keywords

ZRF1; hepatocellular carcinoma; Sorafenib; prognosis

探索 ZRF1 在原发性肝癌组织中的表达及临床意义

衣玉兰 陈莎莎 曾蕾伦 梁喜俊*

海军军医大学, 转化医学研究中心临床肿瘤研究所, 中国·上海 200433

摘要

目的: 研究ZRF1在原发性肝癌患者肿瘤组织中的表达情况, 分析其与肝癌患者临床病理特征及预后的相关性。**方法:** 收集243例经术后病理明确诊断为原发性肝癌患者的肿瘤组织样本, 通过免疫组织化学法检测原发性肝癌肿瘤组织及相应癌旁组织中ZRF1的表达情况, 采用Kaplan Meier生存分析法分析ZRF1的表达水平与原发性肝癌患者预后的相关性。**结果:** ZRF1在肝癌患者肿瘤组织中的阳性表达率显著低于对应的癌旁组织 ($P=0.015$); 此外, ZRF1的表达与年龄、性别、门脉癌栓和肝硬化等临床病理特征均无统计学差异 ($P>0.05$), 但与肿瘤大小呈现负相关趋势 ($P=0.056$); 最后, 在接受索拉非尼治疗的肝癌患者队列中, ZRF1低表达患者的预后显著优于ZRF1高表达的患者 ($P=0.020$)。**结论:** ZRF1在原发性肝癌肿瘤组织中的表达水平低于其癌旁组织, 且ZRF1的表达水平与原发性肝癌患者接受索拉非尼治疗的预后相关, 有可能成为原发性肝癌患者接受索拉非尼治疗的疗效预测标志物。

关键词

ZRF1; 原发性肝癌; 索拉非尼; 预后

1 引言

原发性肝癌是全球性常见恶性肿瘤之一, 其发病率在世界范围内不断上升^[1,2], 其中新发的肝癌病例以及死亡病例有一半以上发生在中国^[3]。肝癌在中国癌症发病率中居第四位, 癌症死亡中居第二位^[4], 严重威胁国民身体健康。原发性肝

癌目前以手术治疗为主, 多种方式联合治疗。但肝癌患者术后复发率极高, 且很多患者就诊时就已经失去手术机会。索拉非尼 (Sorafenib) 是目前公认的有效治疗中晚期肝癌的分子靶向药之一, 主要通过抑制肿瘤细胞增殖和阻断新生血管形成等方式来发挥作用^[5]。索拉非尼自2007年问世以来, 改变了肝癌无药可用的状态。但是, 目前仍然缺乏有效地预测 Sorafenib 疗效的生物标志物。

【作者简介】 衣玉兰 (1986-), 女, 中国山东烟台人, 硕士, 研究实习员, 从事肿瘤研究。

【通讯作者】 梁喜俊 (1990-), 男, 中国江西高安人, 博士, 助理研究员, 从事肿瘤靶向治疗研究。

zuotin 相关因子 1 (ZRF1), 也被称为 DnaJ 热休克蛋白家族 (Hsp40) 成员 C2, 被认为是参与调控干细胞功能的表观遗传调节因子^[6]。有研究报道 ZRF1 可以通过参与调控

多种细胞学功能影响肿瘤的增殖与迁移功能^[7]。ZRF1 位于 7q22-31.1 的关键区域, 据报道该基因的异常突变参与多种癌症的进展, 如前列腺癌、生殖细胞癌、胶质母细胞瘤、头颈部鳞状细胞癌和胃癌^[8,9], 但在原发性肝癌中该基因的功能却鲜有报道。本研究探讨了 ZRF1 在肝癌组织中的表达水平, 并进一步通过分析其与临床病理特征、患者预后及索拉非尼疗效的相关性, 探究其临床意义。

2 材料与方法

2.1 临床材料

收集 2003 年 4 月至 2009 年 9 月于海军军医大学附属东方肝胆外科医院治疗并术后病理明确诊断为原发性肝癌的 88 例患者的肿瘤组织及对应癌旁组织标本作为未接受索拉非尼治疗队列。88 例原发性肝癌患者的年龄在 10~79 岁之间, 其中男性 71 例, 女性 16 例; 末次随访时间为 2012 年 3 月。另收集 2008 年 10 月至 2015 年 6 月在海军军医大学附属东方肝胆外科医院治疗并术后病理明确诊断为原发性肝癌的 155 例患者的肿瘤组织及对应癌旁组织标本作为接受索拉非尼治疗队列。155 例肝癌患者的年龄在 16~74 岁之间, 其中男性 139 例, 女性 16 例; 末次随访时间为 2017 年 1 月。统计患者的生存状况, 记录肝癌的大小、是否存在门脉癌栓等临床特征。

2.2 免疫组织化学检测原发性肝癌肿瘤组织与癌旁组织中 ZRF1 的表达

组织芯片制备后, 石蜡切片 37℃ 烤箱过夜, 60℃ 烤箱烤 60min, 常规脱蜡至水后覆盖 3% H₂O₂ 溶液, 室温放置 20min 用于内源性过氧化物酶的灭活。双蒸水洗 5min × 3 次, 用酸性修复液沸水浴 15min 进行抗原修复, 自然冷却至室温, 双蒸水洗 5min × 2 次, 37℃ 下用 1% BSA 封闭 30min, 吸弃封闭液, 加兔抗人 ZRF1 一抗, 置入湿盒中 4℃ 冰箱过夜。取出后室温复温 15min, 然后用 0.01M PBS 洗 5min × 4 次。滴加兔二抗, 置入湿盒中 30min, 37℃。PBS 缓冲液洗涤 4 次, 然后 DAB 显色 10~15min, 镜下观察出现明显砖红色置于双蒸水终止显色, 双蒸水再洗 2 次, 苏木素复染 10min, 1% 盐酸分化后自来水流水冲洗返蓝, 沥干, 双蒸水洗 5min, 常规脱水。滴加中性树脂, 干净的盖玻片覆盖, 彻底干燥后即可封固, 显微镜下观察阳性染色。免疫组织化学评分方法: 采用 Image Scope Count 程序对每个芯片点进行“阳性 Pixel”计算, 每个组织芯片点的组化评分计算方法为 Log₁₀[255/平均强度], 其中平均强度 = (弱阳性像素总强度 + 阳性像素总强度 + 强阳性像素总强度) / (弱阳性像素数量 + 阳性像素数量 + 强阳性像素数量)。

2.3 统计学处理

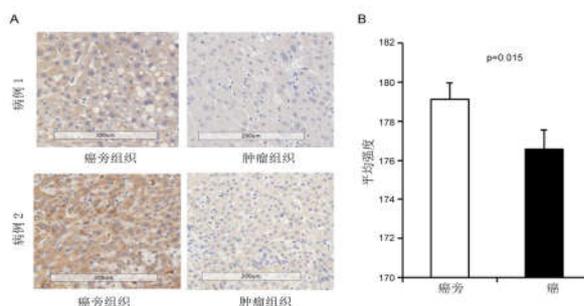
应用 SPSS 25.0 统计软件进行分析。计数资料以频数(百分比)表示, 采用 χ^2 检验。卡方检验时, 若样本总量 $n \geq 40$ 且 0 单元格的理论数 T 少于 5, 采用卡方检验, 但其中一个

格子理论数 $1 \leq T < 5$ 时, 采用连续性校正卡方检验; 若有理论数 $T < 1$, 则用 Fisher 确切概率法进行统计学分析。采用 Kaplan-Meier 曲线分析 ZRF1 的表达与原发性肝癌患者预后的关系。定义 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 ZRF1 在肝癌组织及相应癌旁组织中的表达情况

为研究 ZRF1 在 HCC 患者肿瘤组织芯片中的表达情况, 通过免疫组化分析患者肿瘤组织及癌旁组织中 ZRF1 的染色信号和定位情况。如图 1A 所示, ZRF1 在肿瘤组织中的阳性表达率低于相应癌旁组织, 且主要是胞浆着色。我们进一步对免疫组化染色结果进行统计, 发现 ZRF1 在肿瘤组织中的阳性表达率显著低于癌旁组织(图 1B)。



A: 免疫组织化学检测原发性肝癌肿瘤组织及癌旁组织中 ZRF1 的蛋白表达情况

B: ZRF1 在原发性肝癌患者肿瘤组织及癌旁组织中的表达评分统计 (n=155)

图 1 ZRF1 在肝癌组织中表达情况

3.2 ZRF1 与原发性肝癌患者临床病理特征的相关性

为进一步探究 ZRF1 的表达水平与肝癌临床病理特征的相关性, 我们统计了接受索拉非尼治疗队列中, ZRF1 的表达与年龄、性别、门脉癌栓以及肿瘤大小等临床病理特征的相关性, 发现 ZRF1 的表达水平与上述几个病理特征均无统计学差异(表 1)。值得注意的是, ZRF1 的表达水平与肿瘤大小呈现负相关趋势 ($P=0.056$), 提示我们 ZRF1 低表达肝癌患者的肿瘤恶性程度或许更高。

3.3 ZRF1 表达与肝癌预后的关系

为研究 ZRF1 的表达水平与肝癌预后及索拉非尼疗效的关系, 我们分别收集了索拉非尼治疗肝癌患者队列和未接受索拉非尼治疗队列的样本及其预后相关信息。我们将两个队列的肝癌患者肿瘤组织的组织芯片进行 ZRF1 的免疫组化染色, 利用 Aperio Image Scope 对组织芯片位点评分并计算平均染色强度, 通过计算约登指数, 确定最佳 cutoff 值, 进一步将患者分为 ZRF1 高表达组和 ZRF1 低表达组。

图 2 表示未接受索拉非尼治疗队列 (A, n=88) 或者接受索拉非尼治疗队列 (B, n=155) 的 Kaplan-meier 生存分析结果。88 例未接受索拉非尼治疗肝癌患者队列中, ZRF1 低

表 1 ZRF1 的表达与肝癌患者临床病理特征的关系 (n=155)

临床病理参数	例数	ZRF1 表达 [n(%)]		P
		低表达	高表达	
性别				0.793
男	139	91(65.5)	48(34.5)	
女	16	11(68.8)	5(31.2)	
年龄				0.199
≤ 50	104	72(70.6)	32(30.8)	
> 50	51	30(58.8)	21(41.2)	
门脉癌栓				0.490
无	101	65(64.4)	36(35.6)	
有	50	35(70.0)	5(30.0)	
肝硬化				0.489
无	82	56(68.3)	26(31.7)	
有	73	46(45.1)	27(50.9)	
BCLC 分期				0.336
1 级	99	62(62.6)	37(37.4)	
2、3 级	54	38(70.4)	16(29.6)	
肿瘤大小				0.056
≤ 5	68	39(57.4)	29(42.6)	
> 5	86	62(72.1)	24(27.9)	
AFP				0.727
< 20	41	25(61.0)	16(39.0)	
20-400	36	25(69.4)	11(30.6)	
> 400	77	51(66.2)	26(3.8)	

表达患者与 ZRF1 高表达患者的总体生存率无显著差异 (图 2A); 值得注意的是, 在 155 例接受索拉非尼治疗肝癌患者队列中, ZRF1 低表达患者的总体生存率显著高于 ZRF1 高表达的患者 (图 2B, $P=0.020$)。以上结果提示我们选择 ZRF1 低表达患者接受索拉非尼治疗或许可以取得更好的治疗效果。

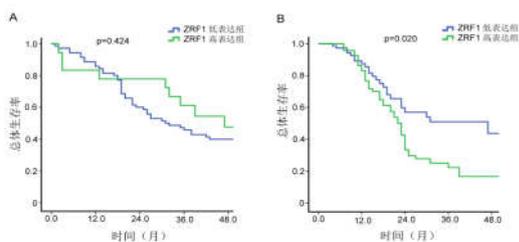


图 2 肝癌组织中 ZRF1 表达与预后之间的关系

4 讨论总结

恶性肿瘤的发生发展过程中多伴随原癌基因的活化或抑癌基因的失活。已有研究表明 ZRF1 在多种肿瘤中表达异常, 其所在的 7 号染色体区域 (即 7q22-31) 常发生突变^[10]。最近有研究报道, 在急性髓系白血病 (AML) 和癌基因诱导衰老 (OIS) 过程中, ZRF1 既可以作为肿瘤抑制因子, 也可以诱导癌变^[9, 11]。调控机制上, ZRF1 可能通过调控 Polycomb 复合物影响肿瘤进展^[12-16], 有研究发现 Polycomb 复合物干预肝癌组织新生血管生成, 与肝癌病人的生存期密切相关^[17]。但 ZRF1 在肝癌中, 尤其是索拉非尼辅助治疗原发性肝癌的研究鲜有报道。

为了进一步探索 ZRF1 在原发性肝癌中的功能, 我们通过免疫组织化学染色的方法检测肝癌组织及其对应的癌旁组

织中 ZRF1 的表达情况。我们发现,与原发肝癌肿瘤组织相比,ZRF1 在癌旁组织中的阳性表达率更高。通过分析 155 例肝癌患者的临床病理资料,我们发现 ZRF1 的表达与年龄、性别、BCLC 分级等均无相关性,但与肿瘤大小呈负相关趋势。进一步分析肝癌患者队列 ZRF1 的表达与总体生存率的关系,发现在接受索拉非尼治疗肝癌患者队列中,ZRF1 低表达组的总体生存率显著高于 ZRF1 高表达组 ($P=0.020$),我们推测 ZRF1 可能成为预测索拉非尼疗效的生物学标志物。

综上,本研究初步探索了肝癌组织中 ZRF1 的表达及其临床意义,发现 ZRF1 的异常表达可能参与了肝癌的发生发展,有望成为接受索拉非尼靶向治疗的肝癌患者的疗效预测标志物。

参考文献

- [1] Llovet J M, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2016,14(2):16018.
- [2] Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma[J]. N Engl J Med, 2019,11(15):1450-1462.
- [3] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015,65(2):87-108.
- [4] Zheng R, Qu C, Zhang S, et al. Liver cancer incidence and mortality in China: Temporal trends and projections to 2030[J]. Chin J Cancer Res, 2018,30(6):571-579.
- [5] Abdelgalil A A, Alkahtani H M, Al-Jenoobi F I. Sorafenib[J]. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol. 2019,44:239-266.
- [6] Aloia L, Demajo S, Di Croce L. ZRF1: a novel epigenetic regulator of stem cell identity and cancer[J]. Cell Cycle, 2015,14(4):510-515.
- [7] Liu H, Li J, Zhao H, et al. DNAJC2 is reversely regulated by miR6273p, promoting the proliferation of colorectal cancer[J]. Mol Med Rep, 2021,24(2):589.
- [8] Imamura T, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Overexpression of ZRF1 is related to tumor malignant potential and a poor outcome of gastric carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2018,39(2):263-271.
- [9] Demajo S, Uribealago I, Gutiérrez A, et al. ZRF1 controls the retinoic acid pathway and regulates leukemogenic potential in acute myeloid leukemia[J]. Oncogene, 2014,33(48):5501-5510.
- [10] Resto V A, Caballero O L, Buta M R, et al. A putative oncogenic role for MPP11 in head and neck squamous cell cancer[J]. Cancer Res, 2000,60(19):5529-5535.
- [11] Ribeiro J D, Morey L, Mas A, et al. ZRF1 controls oncogene-induced senescence through the INK4-ARF locus[J]. Oncogene, 2013,32(17):2161-2168.
- [12] Richly H, Rocha-Viegas L, Ribeiro J D, et al. Transcriptional activation of polycomb-repressed genes by ZRF1[J]. Nature, 2010,468(7327):1124-1128.
- [13] Kang M K. Polycomb group proteins: New targets of anti-cancer therapy[J]. Cell Cycle, 2010,9(14):2704.
- [14] Müller J, Verrijzer P. Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes[J]. Curr Opin Genet Dev, 2009,19(2):150-158.
- [15] Mills A A. Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins[J]. Nat Rev Cancer, 2010,10(10):669-682.
- [16] Richly H, Di Croce L. The flip side of the coin: role of ZRF1 and histone H2A ubiquitination in transcriptional activation[J]. Cell Cycle, 2011,10(5):745-750.
- [17] Li J, Xu Y, Long X D, et al. Cbx4 governs HIF-1 α to potentiate angiogenesis of hepatocellular carcinoma by its SUMO E3 ligase activity[J]. Cancer Cell, 2014,25(1):118-131.