

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.18.010

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220517.1143.002.html\(2022-05-17\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220517.1143.002.html(2022-05-17))

ZIC5 及 KLF5 在结肠癌的表达与临床特征和预后的关系*

冷 玥^{1,2}, 张 涛¹, 赵津璋¹, 刘 洋², 王柏欣^{1△}

(1. 佳木斯大学, 黑龙江佳木斯 154000; 2. 北京市石景山医院肿瘤科, 北京 100042)

[摘要] **目的** 分析结直肠癌组织小脑锌指结构 5(ZIC5)和 Krüppel 样因子 5(KLF5)的表达情况及与患者临床病理特征和预后的关系。**方法** 采用免疫组织化学法和 Western blot 检测北京市石景山医院 2015 年 2 月至 2017 年 8 月收治的 74 例结直肠癌患者的结直肠癌组织及癌旁正常组织 ZIC5 及 KLF5 蛋白的表达情况, 分析患者结直肠癌组织 ZIC5 及 KLF5 蛋白的表达水平与临床病理特征的关系, 并进一步探讨两种蛋白表达水平与患者无病生存期(DFS)和总生存期(OS)之间的关系。**结果** 免疫组织化学法和 Western blot 检测结果均显示结直肠癌组织 ZIC5 和 KLF5 阳性率和高表达率均明显高于癌旁组织($P < 0.05$)。结直肠癌组织 ZIC5 表达情况与肿瘤分化程度、Duke's 分期、浸润深度和淋巴结转移有相关性($P < 0.05$), KLF5 表达情况与肿瘤分化程度、Duke's 分期和浸润深度明显相关($P < 0.05$)。ZIC5 和 KLF5 蛋白阴性表达的结直肠癌患者 DFS 和 OS 均明显长于阳性表达患者($P < 0.05$)。**结论** ZIC5 和 KLF5 表达与结直肠癌病理特征相关且能提示不良预后。

[关键词] 结直肠癌; 小脑锌指结构 5; Krüppel 样因子 5; 免疫组织化学; 病理特征; 预后**[中图法分类号]** R737.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)18-3111-05**Expression of ZIC5 and KLF5 protein in colon cancer and its relationship with clinical features and prognosis***LENG Yue^{1,2}, ZHANG Tao¹, ZHAO Jinzhang¹, LIU Yang², WANG Baixin^{1△}

(1. Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154000, China; 2. Department of Oncology, Beijing Shijingshan Hospital, Beijing 100042, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the expression of cerebellum zinc finger structure 5 (ZIC5) and Krüppel like factor 5 (KLF5) in colon cancer tissues and its relationship with clinical features and prognosis. **Methods** The colon cancer tissues and adjacent normal tissues of 74 patients with colon cancer admitted to Beijing Shijingshan Hospital from February 2015 to August 2017 were collected, and the expression of ZIC5 and KLF5 proteins were detected by immunohistochemistry and Western blot. The relationship between the expression levels of ZIC5 and KLF5 proteins and clinical features were analyzed, and the relationship between the expression levels of ZIC5 and KLF5 proteins and the disease free survival (DFS) and overall survival (OS) were further analyzed. **Results** Immunohistochemistry and Western blot results showed that the positive and high expression rates of ZIC5 and KLF5 in colon cancer were significantly higher than those in adjacent tissues ($P < 0.05$). The expression of ZIC5 was significantly correlated with tumor differentiation, Duke's stage, depth of invasion and lymph node metastasis, while the expression of KLF5 was significantly correlated with tumor differentiation, Duke's stage, and depth of invasion ($P < 0.05$). DFS and OS were significantly longer in ZIC5 and KLF5 negative colon cancer patients than in ZIC5 and KLF5 positive colon cancer patients ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of ZIC5 and KLF5 are correlated with clinical features and can predict poor prognosis in colon cancer patients.

[Key words] colon cancer; cerebellum zinc finger structure 5; krüppel like factor 5; immunohistochemistry; clinical features; prognosis

* 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12531663); 佳木斯大学重大培育项目(Szq201201)。 作者简介: 冷玥(1989—), 住院医师, 硕士, 主要从事结直肠癌转移的分子调控机制研究。 △ 通信作者, E-mail: Phat_ly@126.com。

结直肠癌是一种临床常见恶性肿瘤,我国结直肠癌发病率和病死率在近年来一直呈上升趋势,给人民健康和生活方式造成严重威胁^[1]。已有研究报道表明结直肠癌的发生、进展、转移等过程是由多种因素共同造成的病理过程,多种基因、信号通路及蛋白质在其中发挥重要的作用^[2]。小脑锌指结构(zinc finger protein of the cerebellum, ZIC)家族包括 ZIC1、ZIC2、ZIC3、ZIC4、ZIC5,各自编码锌指转录因子,组成 5 个 Cys2His 锌指结构域^[3]。越来越多的研究显示,ZIC5 蛋白参与前列腺癌、肺癌、子宫内膜癌等多种恶性肿瘤的发生、发展^[4-6]。Krüppel 样因子 5 (Krüppel like factor 5, KLF5)是人体内重要的转录调控因子,与肿瘤细胞增殖、凋亡和迁移有密切关系^[7]。既往有关结直肠癌组织 ZIC5 和 KLF5 蛋白表达的研究报道较少且研究结论不一致,本研究采用免疫组织化学法和 Western blot 检测结直肠癌组织 ZIC5 和 KLF5 表达水平,分析其与患者病理特征相关性并初步探讨其对预后的判断价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 2 月至 2017 年 8 月北京市石景山医院收治的 74 例结直肠癌患者的血液标本和结直肠癌组织、癌旁组织(距离肿瘤组织外缘>5 cm)作为研究材料。纳入标准:(1)经手术切除组织病理学检查诊断为结直肠癌;(2)术前未接受放疗、化疗、靶向治疗或免疫治疗;(3)临床和随访资料完整。排除标准:(1)合并其他恶性肿瘤;(2)既往有结直肠手术史;(3)临床资料不完整者;(4)失访或因结直肠癌以外原因死亡者。本研究通过医院医学伦理委员会审核,所有患者对本研究均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学

本研究中所有的组织石蜡切片均由北京市石景山医院病理科切片制备,厚度 4 μm 。研究采用 S-P 免疫组织化学法检测结直肠癌组织和癌旁组织 ZIC5 和 KLF5 蛋白的表达情况,实验操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。阴性和阳性对照分别为磷酸盐缓冲液和已知的 ZIC5 和 KLF5 阳性标本。ZIC5 主要定位于细胞质,同时在细胞核中也有少量表达;KLF5 主要表达在细胞质和细胞核中,以特定部位出现淡黄色至棕褐色判断为阳性。以染色强度和视野内阳性细胞百分比综合评判 ZIC5 和 KLF5 蛋白表达强度。(1)染色强度:0 分,无着色;1 分,浅黄色;2 分,棕黄色;3 分,棕褐色。(2)阳性细胞百分比:0 分,未见阳性细胞;1 分,阳性细胞百分比<10%;2 分,阳性细胞百分比 10%~<50%;3 分,阳性细胞百分比 50%~<75%;4 分,阳性细胞百分比 \geq 75%。染色强度和阳性细胞百分比评分乘积作为最后结果,其中 0

分为阴性,1~3 分为低表达,>3 分为高表达。本研究所使用的 S-P 免疫组织化学法试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,鼠抗人 ZIC5 抗体和鼠抗人 KLF5 抗体购自美国 Abcam 公司。

1.2.2 Western blot

第 1 步,取石蜡切片脱水后称取 50 mg 组织,冰浴研磨后超声破碎,于 4 $^{\circ}\text{C}$,18 000 r/min 离心 30 min,取上清液。第 2 步,采用 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度。第 3 步,取 50 μg 蛋白进行 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,并转移至硝酸纤维素膜上。第 4 步,TBST 缓冲液洗膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h 后加入一抗(ZIC5 和 KLF5 一抗稀释度均为 1:15 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。第 5 步,TBST 洗膜 30 min,1:1 000 二抗孵育 2 h 后加入碱性磷酸酶底物,显色液显色。第 6 步,使用 UPV 扫描仪进行扫描,ZIC5 蛋白分子量为 66×10^3 ,KLF5 蛋白分子量为 52×10^3 ,以 β -actin 为内参。

1.2.3 随访

对患者进行随访,末次随访时间为 2021 年 4 月,记录无病生存期(disease-free survival,DFS)和总生存期(overall survival,OS)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS26.0 软件进行数据分析,不符合正态分布的计量资料以 $M(Q1, Q3)$ 表示,比较采用秩和检验;计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验;等级资料组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验。采用 Kaplan-Meier 法制作生存曲线并进行 Log-Rank 比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学结果

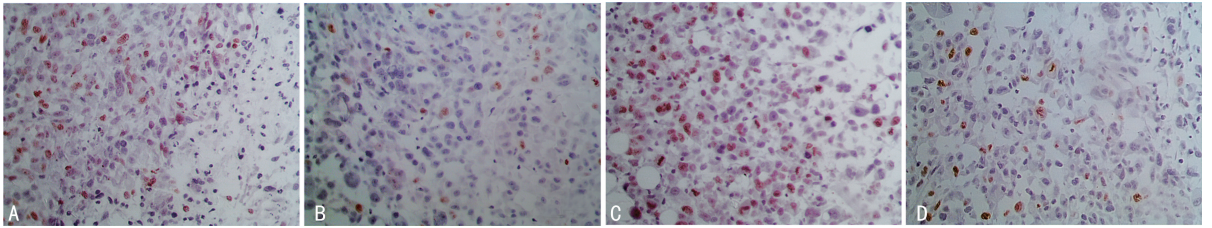
与癌旁组织比较,结直肠癌组织 ZIC5 和 KLF5 的阳性率及高表达率更高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、图 1。

2.2 Western blot 结果

结直肠癌组织 ZIC5 和 KLF5 表达强度高于癌旁组织,见图 2。

表 1 ZIC5 和 KLF5 在结直肠癌组织和癌旁组织的表达情况 [$n=74, n(\%)$]

项目	结直肠癌组织	癌旁组织	χ^2	P
ZIC5			65.513	<0.001
阳性	62(83.78)	16(21.62)		
低表达	20(27.03)	13(17.57)		
高表达	42(56.76)	3(4.05)		
KLF5			83.878	<0.001
阳性	65(87.84)	15(20.27)		
低表达	15(20.27)	14(18.92)		
高表达	50(67.57)	1(1.35)		



A. ZIC5 在结肠直肠癌组织表达阳性;B. ZIC5 在癌旁组织表达阴性;C. KLF5 在结肠直肠癌组织表达阳性;D. KLF5 在癌旁组织表达阴性。

图 1 S-P 免疫组织化学染色法检测组织 ZIC5 和 KLF5 蛋白的表达水平(200×)

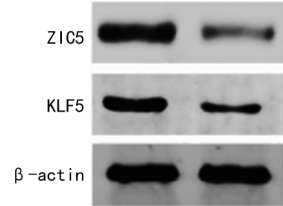
2.3 结肠直肠癌组织 ZIC5 和 KLF5 表达与病理特征关系

结肠直肠癌组织 ZIC5 的表达情况与肿瘤分化程度、Duke's 分期、浸润深度和淋巴结转移有相关性, KLF5 表达情况与肿瘤分化程度、Duke's 分期和浸润深度有相关性($P < 0.05$), 见表 2。

2.4 结肠直肠癌组织 ZIC5 和 KLF5 表达水平与患者预后关系

ZIC5 和 KLF5 蛋白阴性的结肠直肠癌患者的

DFS、OS 长于阳性患者($P < 0.05$), 见表 3, 图 3。



结肠直肠癌组织 癌旁组织

图 2 Western blot 检测组织 ZIC5 和 KLF5 蛋白的表达水平

表 2 结肠直肠癌组织 ZIC5 和 KLF5 蛋白表达与病理特征关系(n)

项目	n	ZIC5				KLF5			
		阳性	阴性	χ^2	P	阳性	阴性	χ^2	P
年龄				0.538	0.463			0.196	0.658
<50 岁	36	29	7			31	5		
≥50 岁	38	33	5			34	4		
性别				0.095	0.758			0.381	0.537
男	34	28	6			29	5		
女	40	34	6			36	4		
肿瘤部位				1.329	0.249			0.633	0.426
结肠	32	25	7			27	5		
直肠	42	37	5			38	4		
肿瘤直径				0.380	0.537			0.436	0.509
≤2 cm	24	18	6			19	5		
>2 cm	50	34	16			36	14		
肿瘤分化程度				20.638	<0.001			23.296	<0.001
低级分化	18	9	9			10	8		
中级分化	36	33	3			35	1		
高级分化	20	20	0			20	0		
Duke's 分期				6.092	0.048			11.084	0.004
A 期	17	11	6			11	6		
B 期	34	31	3			32	2		
C 期	23	20	3			22	1		
浸润深度				5.629	0.018			7.538	0.007
突破浆膜层	47	43	4			45	2		
未突破浆膜层	27	19	8			20	7		
淋巴结转移				3.981	0.046			1.331	0.248
是	36	27	9			30	6		
否	38	35	3			35	3		

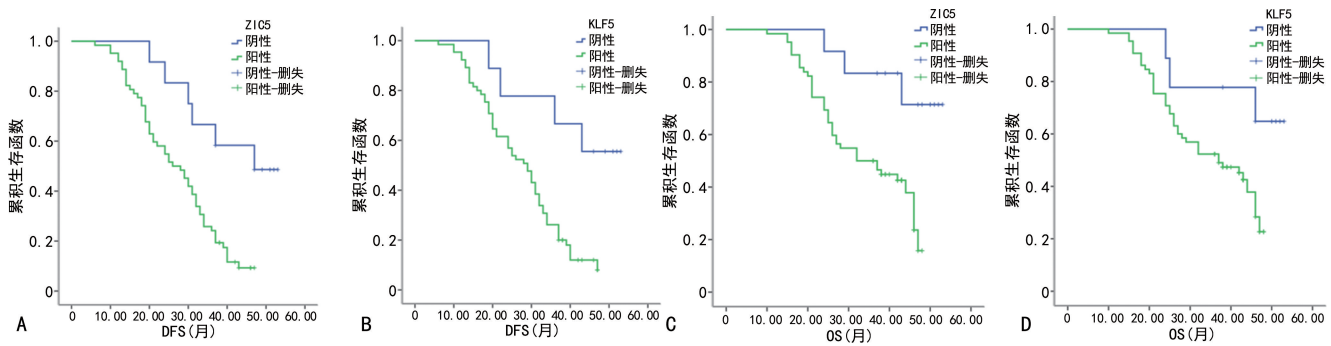


图3 DFS和OS生存曲线比较

表3 ZIC5和KLF5表达与结直肠癌患者DFS、OS关系分析[M(Q1,Q3),月]

项目	阴性	阳性
ZIC5		
DFS	42.167(35.163,49.170)	27.136(24.342,29.930)
OS	45.759(38.158,53.360)	34.544(31.493,37.594)
KLF5		
DFS	42.778(34.161,51.395)	27.651(24.875,30.427)
OS	47.397(41.653,53.133)	33.875(30.756,36.993)

3 讨论

随着世界医疗水平的不断完善,人类的平均寿命得以延长,但恶性肿瘤的发病率却随之不断攀升,其中结直肠癌已经成为影响人类生命健康的重要疾病之一。我国结直肠癌发病率和病死率较高,这与我国居民健康和体检筛查意识较弱及结直肠癌临床症状不特异有关^[8-9],成为限制结直肠癌预后的因素。近年来,随着肠镜和分子生物学等技术的进步和深入应用,结直肠癌的检出率明显提高,然而大多数患者在确诊时已经为中晚期^[10-11]。因此,有必要对结直肠癌的发病、进展及预后影响因素和机制进行深入研究,探索结直肠癌的诊断、预后评估新指标,治疗新靶点,为改善结直肠癌患者整体预后提供新的思路 and 方向。

当前外周血血清中癌胚抗原、癌抗原(CA)125、CA199等肿瘤标志物对结肠癌患者手术根治后随访和评估的价值已得到广泛认可^[12-13]。然而,受限于上述血清标志物的灵敏度及特异度较低^[14],仍然有部分结肠癌复发病例术后血清学未能检测出上述标志物的升高,从而延误术后复查影响远期生存,急需新的预后标志物早期识别术后复发高危人群以进行术后分层管理。通过文献检索发现,目前已有大量研究发现ZIC5在前列腺癌、肺癌和胶质瘤等多种恶性肿瘤中呈高表达状态^[15-16],同时杨丽等^[17]研究证实ZIC5在肝癌中的表达水平升高且与疾病进展及肝硬化有相关性,但MA等^[18]通过研究发现胃癌与ZIC1相关,但与ZIC5无关,这说明ZIC5的表达存在着组织特异性。目前已掌握的研究认为ZIC5可能通过以下几个机制在肿瘤的发生和进展过程中发挥作用:(1)

ZIC5通过血小板源性生长因子D(PDGFD)激活FAK和STAT3,从而促进肿瘤增殖和侵袭^[19]; (2) ZIC5能够调节Wnt- β -catenin信号通路进而促进肿瘤增殖、侵袭和迁移^[20]; (3) ZIC5蛋白抑制CCNB1基因的表达并促进Ki67基因表达,从而促进肿瘤进展^[5]。在本次研究中,经过研究人员对比分析结直肠癌组织ZIC5的阳性率和高表达率均明显高于癌旁组织,ZIC5表达情况与肿瘤分化程度、Duke's分期、浸润深度和淋巴结转移具有明显关系,ZIC5蛋白阴性表达的结直肠癌患者预后明显优于阳性表达患者。

KLF5能够促进细胞的正常生长与分化,目前对于KLF5在肿瘤中的作用已有广泛研究,通过文献调研显示KLF5在不同肿瘤中的作用不同,如在乳腺癌中KLF5能够促进肿瘤进展和侵袭^[21],而在食管癌中KLF5则表现为抑癌基因的特点^[22]。在本研究中,结直肠癌组织KLF5的阳性表达率和高表达率均明显高于癌旁组织。KLF5的表达情况与肿瘤分化程度、Duke's分期、浸润深度和淋巴结转移有明显关系,KLF5蛋白阴性表达的结直肠癌患者的OS和DFS明显长于阳性表达患者。王文韬等^[23]研究中也发现结直肠癌肿瘤组织KLF5蛋白呈高表达,且与肿瘤的浸润深度、临床分期、淋巴结转移等病理特征有关,其还认为KLF5蛋白可能通过调节金属基质蛋白酶(MMP)-2、MMP-9而促进肿瘤侵袭转移。

综上所述,结直肠癌组织ZIC5和KLF5的表达增强,与肿瘤的分化程度、TNM分期、浸润深度和淋巴结转移等病理学特征相关,ZIC5和KLF5或可作为结直肠癌患者的预后标志物及潜在的治疗靶点,但具体机制有待深入研究。

参考文献

- [1] 吴毅凌,杨鹏,李志媛,等.重复实施结直肠癌筛查服务的效率分析[J].中国肿瘤,2020,29(3):172-176.
- [2] 杨海鸥,王欣怡,左梦思,等.结直肠癌相关miRNA及其信号通路调控网络综合分析[J/CD].肿瘤综合治疗电子杂志,2020,6(2):102-108.
- [3] ALI R G,BELLCHAMBERS H M,WARR N,

- et al. WNT responsive SUMOylation of ZIC5 promotes murine neural crest cell development via multiple effects on transcription[J]. *J Cell Sci*, 2021, 134(9):256792.
- [4] 张瑜, 奚雪滔, 赵雪. ZIC5 在前列腺癌中的表达及意义[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2018, 39(2):67-71.
- [5] QI S, SHI R, XIN W, et al. Overexpression of ZIC5 promotes proliferation in non-small cell lung cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479(3):502-509.
- [6] 闫丽明, 杨敏, 王媛, 等. MAP2K4、PKG1 及 ZIC1 在子宫内膜癌患者组织中表达及预后价值[J]. *中国计划生育学杂志*, 2020, 28(3):374-377.
- [7] JIANG B C, ZHANG W W, TIAN Y, et al. Demethylation of G-protein-coupled receptor 151 promoter facilitates the binding of Krüppel-like factor 5 and enhances neuropathic pain after nerve injury in mice[J]. *J Neurosci*, 2018, 38(49):702-718.
- [8] 中华医学会肿瘤学分会早诊早治学组. 中国结直肠癌早诊早治专家共识[J]. *中华医学杂志*, 2020, 100(22):1691-1698.
- [9] 陈宏达, 代敏. 中国结直肠癌预防和控制的思考[J]. *中华流行病学杂志*, 2020, 41(10):1627-1632.
- [10] 徐增豪, 杨金华, 李其龙, 等. 肠镜检查对结直肠癌发病风险影响的前瞻性评价研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2020, 41(10):1662-1667.
- [11] 中国临床肿瘤学会结直肠癌专家委员会, 中国抗癌协会大肠癌专业委员会遗传学组, 中国医师协会结直肠肿瘤专业委员会遗传专委会. 结直肠癌及其他相关实体瘤微卫星不稳定性检测中国专家共识[J]. *中华肿瘤杂志*, 2019, 41(10):734-741.
- [12] GAO Y, WANG J, ZHOU Y, et al. Evaluation of serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and ferritin as diagnostic markers and factors of clinical parameters for colorectal cancer[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):2732.
- [13] NIKOLAOU S, QIU S, FIORENTINO F, et al. Systematic review of blood diagnostic markers in colorectal cancer [J]. *Tech Colo-proctol*, 2018, 22(7):481-498.
- [14] BAASSIRI A, NASSAR F, MUKHERJI D, et al. Exosomal non coding RNA in LIQUID biopsies as a promising biomarker for colorectal cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4):1398.
- [15] WANG Z Y, DUAN Y, WANG P. SP1-mediated upregulation of lncRNA SNHG4 functions as a ceRNA for miR-377 to facilitate prostate cancer progression through regulation of ZIC5 [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4):3916-3927.
- [16] DONG C, LI X, LI K, et al. The expression pattern of ZIC5 and its prognostic value in lung cancer[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2021, 36(5):407-411.
- [17] 杨丽, 刘永桥, 刘彬. 小脑锌指蛋白 5 与肝细胞癌临床病理特征及预后的关系[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2021, 40(4):494-499.
- [18] MA G, DAI W, SANG A, et al. Roles of ZIC family genes in human gastric cancer[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(1):259-266.
- [19] SATOW R, NAKAMURA T, KATO C, et al. ZIC5 drives melanoma aggressiveness by PDGF-mediated activation of FAK and STAT3 [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(2):366-377.
- [20] ZHAO Z, WANG L, BARTOM E, et al. β -Catenin/Tcf7l2-dependent transcriptional regulation of GLUT1 gene expression by Zic family proteins in colon cancer[J]. *Sci Adv*, 2019, 5(7):eaax0698.
- [21] 侯永强, 王新征, 刘金彪, 等. 转录因子 KLF5 介导乳腺癌细胞获得性耐药的作用机制[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2019, 40(3):367-371.
- [22] JIANG Y, JIANG Y, LI C, et al. TP63, SOX2, and KLF5 establish a core regulatory circuitry that controls epigenetic and transcription patterns in esophageal squamous cell carcinoma cell lines[J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(4):1311-1327.
- [23] 王文韬, 刘凯军, 魏婷. KLF5 在结肠癌组织中表达的意义及与肿瘤侵袭转移的关系[J]. *河北医科大学学报*, 2013, 34(10):1183-1186.