

锌指蛋白84基因促进宫颈癌细胞增殖的初步研究

石海燕, 胡维维, 张鑫, 吕晋, 杨秀媚, 颜菲 (广东省佛山市第一人民医院, 广东佛山 528000)

摘要: **目的** 探讨锌指蛋白84基因(ZNF84)在宫颈病变组织中的表达及其对肿瘤细胞增殖的影响。**方法** 收集某院2015年1月至2016年5月正常宫颈组织15例和宫颈癌组织45例, 应用免疫组织化学法检测组织中ZNF84蛋白的表达; 培养宫颈癌Hela细胞和C33a细胞, 合成ZNF84 RNA干扰序列siZNF84, 并将siZNF84转染宫颈癌细胞检测ZNF84基因的表达; CCK-8法检测siZNF84对宫颈癌细胞增殖的影响。**结果** ZNF84在宫颈正常组织不表达, 在宫颈癌组织的表达率为77.8%(35/45), 差异有统计学意义($P<0.01$)。ZNF84蛋白表达与肿瘤大小、HPV感染有关($P<0.01$ 或 0.05)。siZNF84显著下调了ZNF84的mRNA表达, 抑制了宫颈癌Hela细胞和C33a细胞的体外增殖能力($P<0.05$)。**结论** ZNF84在宫颈癌组织中表达, 与肿瘤大小、HPV感染有关, 能够促进肿瘤细胞增殖, 可能对宫颈癌的发生、发展有一定的影响。

关键词: 宫颈癌; ZNF84; 增殖; 免疫组化

中图分类号: R 446.8

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2019)03-0246-05

Preliminary study on ZNF84 gene in promoting the proliferation of cervical cancer cells

SHI Hai-yan, HU Wei-wei, ZHANG Xin, LV Jin, YANG Xiu-mei, YAN Fei (The First People's Hospital of Foshan, Foshan 528000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of zinc finger protein 84 (ZNF84) in cervical lesion tissues and the effect of ZNF84 in promoting the proliferation of cancer cells. **Methods** Fifteen cases of normal cervical tissues and 45 cases of cervical cancer tissues in a hospital from January 2015 to May 2016 were collected. The expression of ZNF84 protein in cervical cancer tissues was detected by immunohistochemistry. Hela cells and C33a cells were cultured. ZNF84 RNA interference sequence, siZNF84, was synthesized. The siZNF84 was transfected into cervical cancer cells to detect the expression of ZNF84 gene. The effect of siZNF84 in promoting the proliferation of cervical cancer cells was detected by CCK-8 method. **Results** ZNF84 was not expressed in normal cervical tissues, but had an expression rate of 77.8% (35/45) in cervical cancer tissues, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The expression of ZNF84 protein was correlated to tumor size and HPV infection ($P<0.01$ or 0.05). SiZNF84 significantly downregulated the mRNA expression of ZNF84 and significantly inhibited the in vitro proliferation capacity of cervical cancer Hela cells and C33a cells ($P<0.05$). **Conclusion** The ZNF84 is expressed in cervical cancer tissues, which is correlated to tumor size and HPV infection. ZNF84 can promote the proliferation of cancer cells and may have certain effect on the incidence and development of cervical cancer.

Key words: cervical cancer; ZNF84; proliferation; immunohistochemistry

锌指蛋白(ZNF)发现于非洲爪蟾卵母细胞的转录因子TFⅢA中^[1], 是真核生物基因组中分布最广的蛋白之一, 约占人类基因组编码蛋白数量的1%^[2]。ZNF在基因表达调控、细胞分化等方面发挥了重要作用, 具有广阔的临床诊断和治疗前景^[3]。目前, 只有少数的ZNF基因在宫颈癌中做过相关研究, 如ZNF582、ZNF1、ZNF268和ZNF516等^[4-7]。而ZNF84基因在宫颈癌中对肿瘤发展的关系未见有相关报

道。ZNF84位于人类12号染色体q24-q33区^[8], 编码区有4个外显子, 其中两个专用于编码KRAB/FPB-A和KRAB/FPB-B模块, 剩余的分别编码锌指单元的N末端氨基酸和C末端阵列。目前有关ZNF84的报道较少, Assou等^[9]发现ZNF84在胚胎干细胞和卵巢中高表达; Zhang等^[10]则认为ZNF84与脓毒症转录因子的表达有关。因肿瘤发展中的基因表达部分再现了胚胎发育中的基因特征, 我们推测宫颈癌中可能存在ZNF84的异常表达, 因此本研究初步探讨了ZNF84基因在宫颈病变组织中的表达以及ZNF84对肿瘤细胞增殖的影响。

收稿日期: 2019-01-02; 修订日期: 2019-04-12

作者简介: 石海燕(1973-), 女, 硕士, 副主任医师

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈癌细胞系Hela细胞和C33a细胞为本单位保存。ZNF84抗体购买自Abcam。内参兔抗人GAPDH多克隆抗体为杭州贤至公司产品。siZNF84的RNA片段由吉玛生物技术有限公司合成。PCR引物委托上海生工合成和测序, ZNF84引物F: 5'-CCCTTTGGATGTAGTGATTGTAGA-3', R: 5'-ACTCGACCTCTCT CTAAATGCTT-3'; GAPDH引物F: 5'-TGA CTTCAACAGCGACACCCA-3', R: 5'-CACCTGTGCTGTAGCCA AA-3'。PVDF膜、羊抗兔或羊抗鼠二抗购买自碧云天生物技术有限公司。反转录试剂盒、PCR试剂购买自大连Takara公司。胎牛血清、细胞培养基(DMEM)和胰蛋白酶-EDTA消化液购自Life technologies公司。双抗(青霉素、链霉素)、Trizol、三氯甲烷、异丙醇、DEPC H₂O、蛋白酶抑制剂和RIPA裂解液、SP二步法免疫组化试剂盒(带DAB显色液)、柠檬酸缓冲液(IHC抗原修复液, 100×)和蛋白印迹试剂盒均购自碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 组织来源 宫颈组织均来自本院病理科2015年1月至2016年5月手术切除和活检的60例标本。其中15例正常宫颈组织, 患者年龄为42~56岁, 平均年龄(50.0±4.1)岁。45例宫颈癌组织, 患者年龄为30~73岁, 平均(50.1±5.3)岁; 其中高分化癌10例, 中分化癌24例, 低分化癌11例; FIGO(Federation International of Gynecology and Obstetrics) I 期21例, II~IV期24例; 鳞癌22例, 其中高分化2例, 中分化17例, 低分化3例; FIGO I 期12例, II~IV期10例; 腺癌23例, 其中高分化8例、中分化7例、低分化8例, FIGO I 期9例, II~IV期14例。所有纳入对象均未接受过放疗和化疗。

1.2.2 免疫组化 组织标本采用免疫组化SP法检测。ZNF84一抗稀释浓度为1:100, 以PBS代替一抗作为空白对照。选取癌细胞较多的5个高倍视野(×400), 每个视野计100个细胞。染色强度分级: 无着色0分, 淡黄色1分, 棕黄色2分, 棕褐色3分。阳性细胞百分比分级: 阳性细胞<30% 1分, 阳性细胞数在30%~60% 2分, 阳性细胞数>60% 3分。结果判断: 两项得分相加 0分为阴性(-), 1~3分为弱阳性(+), 4~5分为中阳性(++), 6分为强阳性(+++)^[11]。

1.2.3 细胞培养 人宫颈癌细胞系Hela细胞和C33a

细胞分别用含有10%(体积分数)胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素的DMEM培养基, 置37℃、含5%(体积分数)CO₂的恒温细胞培养箱中培养。

1.2.4 细胞转染 转染前1 d取对数生长期的细胞, 经0.25%胰酶消化后显微镜下进行细胞计数, 按每孔 3×10^5 个细胞的密度铺于6孔板中, 按不同的实验目的进行分组, 检测siZNF84对细胞的影响。每种细胞株设对照组和siZNF84组。细胞完全培养基培养, 待细胞汇合度达60%~80%时, 按照1 μg质粒: 2 μL Lipo2000的比例进行空载体质粒和siZNF84质粒的转染, 4 h后换液继续培养。

1.2.5 CCK-8法检测细胞增殖 将转染后各实验组6孔板细胞以每孔 5×10^3 细胞密度铺板于96孔板中, 每组细胞设5个复孔, 并设3孔培养基作空白组, 于1、2、3 d时分别加入CCK8, 每孔10 μL, 1~2 h后采用酶标仪检测450 nm处吸光度值。细胞增殖抑制率计算公式为: (对照组实际吸光度值/干扰组实际吸光度值-1)×100%。

1.2.6 Real-time PCR 采用TRIzol(Invitrogen)法提取总RNA。cDNA的合成是用随机六聚体引物iScript cDNA合成试剂盒(BioRad)和500 ng总RNA按说明书制作而成。反应生成的cDNA置于-80℃保存。取1 μL cDNA作为模板, 加入5 μL SYBR Green Mix、0.2 μL 10 mmol/L上游引物、0.2 μL 10 mmol/L下游引物, 5.6 μL ddH₂O, 混匀后进行定量PCR反应。反应条件为95℃预变性10 min, 95℃变性15 s, 58℃退火30 s, 60℃延伸30 s, 共40个循环。每种样本的siZNF84和GAPDH设3个复孔, 反应结束后样品置于4℃保存。定量PCR检测人宫颈癌细胞系Hela细胞、C33a细胞对照组以及实验组RNA的表达差异。

1.3 统计学处理

运用SPSS19.0软件分析实验结果, 计量资料以均数±标准差表示, 采用 t 检验, 计数资料采用(校正) χ^2 检验或确切概率法, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZNF84在宫颈癌组织和正常宫颈组织中的表达

ZNF84在宫颈癌组织有表达, 而在正常宫颈组织无表达, 差异有统计学意义($P<0.01$), 详见表1。镜下观察发现ZNF84蛋白在肿瘤细胞中主要表达于细胞核及核周位置, 见图1。

表1 宫颈癌组织和正常宫颈组织中ZNF84的表达情况

组别	n	例(%)	
		阳性	阴性
正常宫颈组织	15	0	15(100.0)
宫颈癌组织	45	35(77.8)	10(22.2)

两组间比较: $P<0.01$

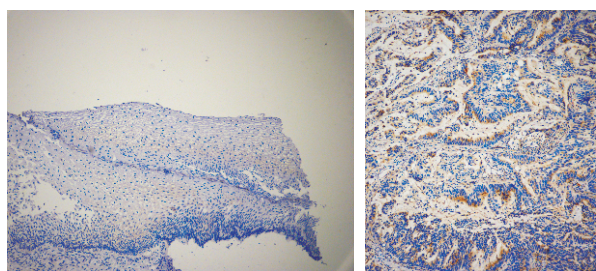


图1 ZNF84在正常宫颈(左图)和宫颈癌组织(右图)中的表达($\times 10$)

2.2 ZNF84的表达与患者临床病理特征的关系

ZNF84表达与肿瘤大小、HPV感染有关($P<0.01$ 或 0.05),而与其他临床病理特征无关($P>0.05$),详见表2。鳞癌中ZNF84的表达与患者的临床病理特征均无关系($P>0.05$),详见表3。腺癌组织中ZNF84的表达与肿瘤大小、HPV感染有关($P<0.05$),而与其他临床病理特征无关($P>0.05$),详见表4。

2.3 ZNF84 RNA干扰序列转染宫颈癌细胞对ZNF84表达的作用

表2 ZNF84的表达与宫颈癌患者临床病理特征的关系

组别	n	阳性	阴性
病理类型			
鳞癌	22	17(77.3)	5(22.7)
腺癌	23	18(28.3)	5(21.7)
组织分化			
高分化	10	6(60.0)	4(40.0)
中分化	24	20(83.3)	4(16.7)
低分化	11	9(81.8)	2(18.2)
年龄			
≤ 45 岁	15	11(73.3)	4(26.7)
>45 岁	30	24(80.0)	6(20.0)
肿瘤大小 ^b			
<2 cm	3	0	3(100.0)
≥ 2 cm	42	35(83.3)	7(16.7)
TNM分期			
T1	21	18(85.7)	3(14.3)
T2~M1	24	17(70.8)	7(29.2)

接上表

组别	n	阳性	阴性
淋巴结转移			
阴性	14	10(71.4)	4(28.6)
阳性	31	25(80.6)	6(19.4)
血管浸润			
阴性	31	23(74.2)	8(25.8)
阳性	14	12(85.7)	2(14.3)
HPV ^a			
阴性	6	2(33.3)	4(66.7)
阳性	39	33(84.6)	6(15.4)

组间比较: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$

表3 ZNF84表达与鳞癌患者临床病理特征的关系

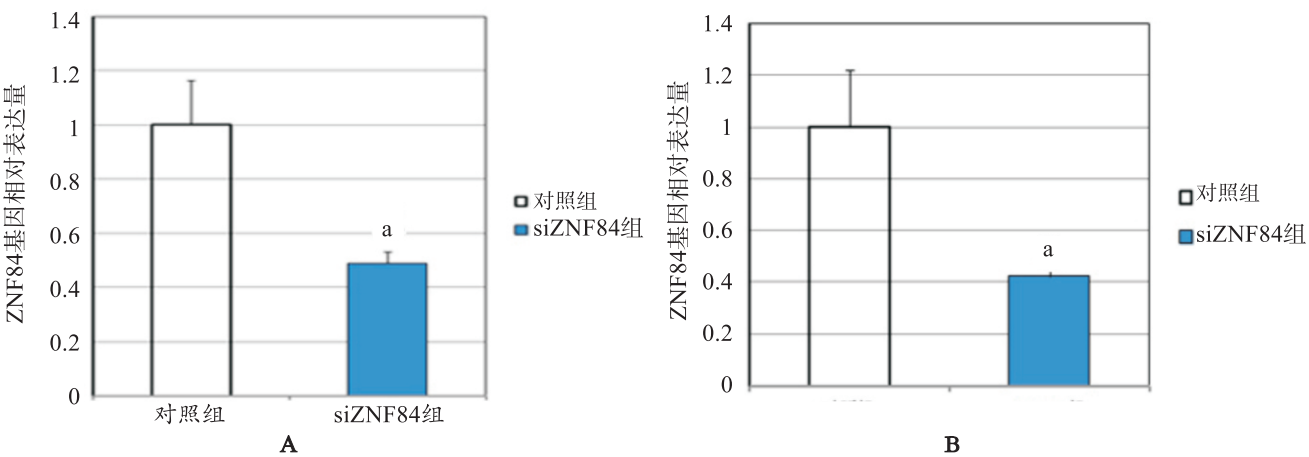
组别	n	阳性	阴性
组织分化			
高分化	2	2(66.7)	1(33.3)
中分化	17	14(82.4)	3(17.6)
低分化	3	1(50.0)	1(50.0)
年龄			
≤ 45 岁	6	5(83.3)	1(16.7)
>45 岁	16	12(75.0)	4(25.0)
肿瘤大小			
<2 cm	1	0	1(100.0)
≥ 2 cm	21	17(81.0)	4(19.0)
TNM分期			
T1	12	11(91.7)	1(8.3)
T2~M1	10	6(60.0)	4(40.0)
淋巴结转移			
阴性	15	12(80.0)	3(20.0)
阳性	7	5(71.4)	2(28.6)
血管浸润			
阴性	15	11(73.3)	4(26.7)
阳性	7	6(85.7)	1(14.3)
HPV			
阴性	3	3(100.0)	0
阳性	19	14(73.7)	5(26.3)

组间比较均 $P>0.05$

与对照组相比, Hela和C33a组的siZNF84 mRNA分别下降51.1%和57.6%, 差异均有统计学意义($P<0.01$), 见图2。

2.4 干扰ZNF84的表达对宫颈癌细胞的影响

Hela细胞在24、48、72 h分别抑制了32.74%、



A. HeLa细胞ZNF84 mRNA表达; B. C33a细胞ZNF84 mRNA表达; a表示与对照组比较 $P<0.01$

图2 siZNF84转染Hela细胞和C33a细胞后检测其RNA及蛋白表达

31.17%和23.54 %，C33a细胞在24、48、72 h分别抑制了22.13%、32.26%和24.32%。siZNF84组细胞数均明显少于对照组($P<0.05$)，见图3。

表4 ZNF84表达与腺癌患者临床病理特征的关系

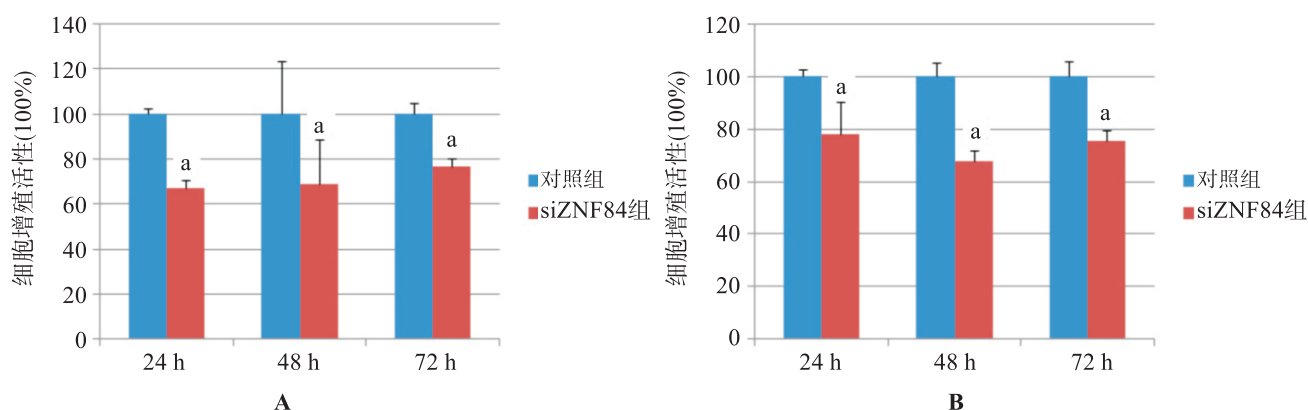
分组	n	阳性	阴性
组织分化			
高分化	8	5(62.5)	3(37.5)
中分化	7	6(85.7)	1(14.3)
低分化	8	7(87.5)	1(12.5)
年龄			
≤45 岁	9	6(66.7)	3(33.3)
>45 岁	14	12(85.7)	2(14.3)
肿瘤大小 ^a			
<2 cm	2	0	2(100.0)
≥2 cm	21	18(85.7)	3(14.3)
TNM分期			
T1	9	7(77.8)	2(22.2)
T2~M1	14	11(78.6)	3(21.4)
淋巴转移			
阴性	16	13(81.2)	3(18.8)
阳性	7	5(71.4)	2(28.6)
血管浸润			
阴性	16	12(75.0)	4(25.0)
阳性	7	6(85.7)	1(14.3)
HPV ^a			
阴性	3	1(33.3)	2(66.7)
阳性	20	17(85.0)	3(15.0)

组间比较: ^a $P<0.05$

3 讨论

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤，位居世界第3位，严重危害女性的生命健康。研究提示宫颈癌与HPV感染密切相关^[11-13]。本研究免疫组化结果表明ZNF84在宫颈癌组织有表达，而在正常宫颈组织中则无表达。45例宫颈癌石蜡切片中有35例ZNF84表达阳性，表达率为77.8%。ZNF84在人类胚胎干细胞和卵母细胞中呈高水平表达^[8]，在体内多种器官和组织中均有不同程度的表达，在子宫和宫颈组织中无表达，与本实验正常宫颈组织中无ZNF84表达的结果一致。ZNF84的表达与宫颈癌患者的肿瘤大小有关($P<0.01$)，在3例肿瘤直径<2 cm的肿瘤组织中未见ZNF84蛋白表达，而在直径≥2 cm的肿瘤组织中ZNF84的表达率为83.3%，提示宫颈癌组织中出现了ZNF84蛋白亚群。ZNF84表达与宫颈癌组织的HPV感染有关($P<0.05$)，HPV感染患者的ZNF84阳性的表达率比非HPV感染患者高。在23例宫颈腺癌组织中ZNF84表达亦与肿瘤大小、HPV感染有关($P<0.05$)，而与其他临床病理特征无关系($P>0.05$)，提示ZNF84参与了宫颈癌的发生和发展，或对宫颈癌细胞的增殖能力有一定的影响。

为了探讨ZNF84基因对宫颈癌细胞增殖的影响，及其与腺癌和HPV的关系，我们选用了Hela和C33a两种宫颈癌细胞株进一步研究。Hela细胞为腺癌细胞且HPV18阳性，C33a细胞为HPV阴性。实验通过干扰该基因mRNA的表达检测细胞增殖能力的变化。结果表明，siZNF84转染后，宫颈癌细胞Hela和C33a的ZNF84 mRNA明显降低，基因表达的差异有统计学意义($P<0.05$)，表明本实验通过RNA干扰技术在宫颈癌细胞中成功干扰了ZNF84的表达。CCK8细胞增殖结果亦表明，两种细胞株经



A. HeLa细胞在24、48、72 h增殖能力的改变；B. C33a细胞在24、48、72 h增殖能力的改变；a表示与对照组比较 $P < 0.05$

图3 siZNF84转染抑制宫颈癌细胞的增殖能力

ZNF84干扰后与对照组比较，其细胞增殖能力均显著下降($P < 0.05$)，提示ZNF84在体外可以促进Hela和C33a的细胞增殖。

参考文献：

- [1] MILLER J, MCLACHLAN A D, KLUG A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor III A from *Xenopus* oocytes[J]. EMBO J, 1985, 4: 1609-1614.
- [2] HOOVERS J M, MANNENS M, JOHN R, et al. High-resolution localization of 69 potential human zinc finger protein genes: a number are clustered[J]. Genomics, 1992, 12(2): 254.
- [3] JAMIESON A C, MILLER J C, PABO C O. Drug discovery with engineered zinc-finger proteins[J]. Nature Rev Drug Discovery, 2003, 2: 361-368.
- [4] HUANG R L, CHANG C C, SU P H, et al. Methylomic analysis identifies frequent DNA methylation of zinc finger protein 582 (ZNF582) in cervical neoplasms[J]. PLoS One, 2012, 7(7): 41060.
- [5] MORANDELL D, KAISER A, HEROLD S, et al. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein targets yc-interacting zinc-finger protein-1[J]. Virology, 2012, 422(2): 242-253.
- [6] WANG W, GUO M, HU L, et al. The zinc finger protein ZNF268 is overexpressed in human cervical cancer and contributes to tumorigenesis via enhancing NF- κ B signaling[J]. J Biol Chem, 2012, 287(51): 42856-42866.
- [7] BREBI P, MALDONADO L, NOORDHUIS M G, et al. Genome-wide methylation profiling reveals zinc finger protein 516 (ZNF516) and FK-506-binding protein 6 (FKBP6) promoters frequently methylated in cervical neoplasia, associated with HPV status and ethnicity in a Chilean population[J]. Epigenetics, 2014, 9(2): 308-317.
- [8] ROSATI M, ROCCHI M, STORLAZZI C T, et al. Assignment to chromosome 12q24.33, gene organization and splicing of the human KRAB/FPB containing zinc finger gene ZNF84[J]. Cytogenet Cell Genet, 2001, 94(3/4): 127-130.
- [9] ASSOUS S, CERECEDO D, TONDEUR S, et al. A gene expression signature shared by human mature oocytes and embryonic stem cells[J]. BMC Genom, 2009, 10: 10-24.
- [10] ZHANG J, CHENG Y, DUAN M, et al. Unveiling differentially expressed genes upon regulation of transcription factors in sepsis[J]. Biotech, 2017, 7(1): 46-53.
- [11] 石海燕, 张鑫, 吕晋, 等. 92例孤立性纤维性肿瘤的临床病理及免疫组化特征分析[J]. 广东医科大学学报, 2018, 36(5): 552-556.
- [12] BAALBERGEN A, SMEDTS F, EWING P, et al. HPV-type has no impact on survival of patients with adenocarcinoma of the uterine cervix [J]. Gynecol Oncol, 2013, 128(3): 530-534.
- [13] ONDIČ O, KAŠPÍRKOVÁ J, MÁJEK O, et al. HPV typing of high-grade dysplasia (CIN III) in cone biopsies of 38 HPV-vaccinated women[J]. Virchows Arch, 2014, 464(1): 79-83.