

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201905012

· 论著 ·

Zwint-1 蛋白在头颈部鳞状细胞癌中表达上调及其与临床特征的相关性

周洁¹, 潘芳名¹, 王晶¹, 李泽文¹, 王玮¹, 刘涛¹, 张清元¹, 杨国强¹, 廖华²

(1. 武汉科技大学附属孝感医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖北孝感 432000; 2. 武汉大学人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖北武汉 430060)

摘要: **目的** 探讨 Zeste white 10 (ZW10) 相互作用着丝粒蛋白 1 (ZW10-interacting kinetochore protein 1, Zwint-1), 在头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 肿瘤组织中的蛋白表达情况, 以及其与临床病理特征之间的关系。**方法** 采用免疫组织化学检测的方法, 对 16 例 HNSCC 患者的肿瘤组织样本, 以及 7 例相应的癌旁正常组织样本中 Zwint-1 蛋白进行检测。同时, 分析 HNSCC 相关组织芯片中 Zwint-1 蛋白表达与 HNSCC 临床特征的相关性。**结果** 临床样本与组织芯片的检测结果显示, Zwint-1 蛋白在 HNSCC 肿瘤组织中的蛋白表达高于正常组织, 其差异具有统计学意义($t=2.399, P<0.05$)。组织芯片的检测结果显示, Zwint-1 蛋白表达量与 HNSCC 患者的肿瘤大小($F=2.889, P<0.05$)、淋巴结转移($t=2.110, P<0.05$)、分化($F=3.667, P<0.05$)以及临床分期($F=2.864, P<0.05$)均具有相关性。但是卡方检验结果显示, Zwint-1 蛋白阳性表达与肿瘤大小($\chi^2=3.236, P>0.05$)、淋巴结转移($\chi^2=1.463, P>0.05$)、分化($\chi^2=1.271, P>0.05$)、临床分期($\chi^2=4.179, P>0.05$), 差异无统计学意义。**结论** Zwint-1 蛋白在 HNSCC 的发生发展过程中发挥有重要作用, 可能是 HNSCC 潜在的靶向治疗目标。

关键词: 头颈部鳞状细胞癌; Zwint-1; 免疫组织化学检测; 组织芯片
中图分类号: R739.91

The correlation between the up-regulation of Zwint-1 and clinicopathological characteristics in head and neck squamous cell carcinoma

ZHOU Jie¹, PAN Fang-ming¹, WANG Jing¹, LI Ze-wen¹, WANG Wei¹, LIU Tao¹,
ZHANG Qing-yuan¹, YANG Guo-qiang¹, LIAO Hua²

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Xiaogan Central Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Xiaogan 432000, China; 2. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protein expression of Zwint-1, and the correlation between Zwint-1 expression and clinicopathological characteristics in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Methods** The expression of Zwint-1 in 16 HNSCC tissues and 7 normal tissues was detected with immunohistochemistry. An HNSCC-related tissue microarray was used to analyze the correlation between Zwint-1 expression and clinicopathological characteristics of this tumor. **Results** Immunohistochemistry showed that the expression of Zwint-1 in HNSCC was higher than that in the normal tissues ($P<0.05$). The results of tissue microarray revealed that Zwint-1 expression level was correlated with the size, lymphatic metastasis, differentiation, clinical stages of HNSCC (all $P<0.05$). However, chi-square tests showed that there were no statistical correlations between Zwint-1 positive expression and above-mentioned parameters (all $P>0.05$). **Conclusion** Zwint-1 plays an important role in the oncogenesis and development of HNSCC, which may be a potential therapeutic target of this tumor.

Key words: Head and neck squamous cell carcinoma; Zwint-1; Immunohistochemistry; Tissue microarray

头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC),是头颈部恶性肿瘤中最常见的病理类型,其发病率约占后者的90%以上^[1]。统计数据表明,HNSCC已经成为第6大常见恶性肿瘤,每年有大约50万的新发病例,其发病部位包括有喉、下咽、口咽、口腔、鼻咽以及鼻旁组织等^[2]。目前,HNSCC的治疗主要是手术与放化疗相结合的综合治疗,尽管近些年来手术技术以及放化疗手段均有所提升,HNSCC的预后依然并不令人十分满意^[3]。早期HNSCC患者的5年生存率为40%~60%,而中晚期患者的中位生存时间为仅6~9个月^[4-5]。因此,对HNSCC相关的分子机制进行研究,并积极寻找其潜在肿瘤标志物与分子治疗靶点,仍然是非常有意义且十分必要的。

近些年来有研究显示,Zeste White 10(ZW10)相互作用着丝粒蛋白1(ZW10-interacting kinetochore protein 1, Zwint-1)在多种恶性肿瘤的发生发展过程中有表达水平的异常,如宫颈癌^[6]、乳腺癌^[7]、卵巢癌^[8]以及肝癌^[9]等,而有关其在HNSCC中的作用研究还较为匮乏。本研究收集了HNSCC的临床组织样本以及相关组织芯片,对Zwint-1在HNSCC肿瘤组织中的蛋白表达水平,以及其与HNSCC临床病理参数的相关性进行研究,以期对HNSCC的早期诊断以及寻找分子治疗靶点提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 临床组织样本

收集2017年7月1日—2018年2月28日在武汉大学人民医院耳鼻喉头颈外科,行手术切除的16例HNSCC患者的肿瘤组织标本,以及7例经病理科医师诊断为鳞状细胞癌,其中男15例,女1例;年龄29~84岁,平均年龄61.3岁;鼻咽癌2例,下咽癌9例,喉癌5例。详细信息见表1。

1.2 组织芯片

从西安艾丽娜生物科技有限公司(Alina Biotechnology co., LTD, Xi'an, China),购买一张HNSCC相关组织芯片,其编号为HN803c。组织芯片中包括有60例HNSCC组织样本,11例正常对照组织样本。60例HNSCC组织样本中,男57例,女14例;年龄15~90岁,平均年龄为53.6岁;组织来

源舌部4例,咽部38例,喉部18例。详细信息见表2。

表1 临床组织样本的基本信息 [例(%)]

临床信息	肿瘤组织	癌旁组织
例数	16	7
性别		
男	15(93.8)	7(100.0)
女	1(6.2)	0(0.0)
部位		
鼻咽	2(12.5)	0(0.0)
下咽	9(56.3)	5(71.4)
喉	5(31.2)	2(28.6)

表2 60例肿瘤组织芯片的基本信息 [例(%)]

临床信息	例数(n=60)
平均年龄(岁)	58.2
年龄范围(岁)	29~90
性别	
男	52(86.7)
女	8(13.3)
肿瘤部位	
舌部	4(6.7)
咽部	38(63.3)
喉部	18(30.0)
T分期	
T1	5(8.3)
T2	31(51.7)
T3	14(23.3)
T4	10(16.7)
淋巴结转移	
无(N0)	41(68.3)
有(N+)	19(31.7)
分化程度	
高分化	15(25.0)
中分化	24(40.0)
低分化	15(25.0)
未知	6(10.0)
肿瘤分期	
I	6(10.0)
II	22(36.7)
III	19(31.7)
IV	13(21.7)

1.3 免疫组织化学检测

采用二步法对样本进行免疫组织化学染色,一抗购买于美国西格玛公司,试剂盒购买于武汉谷歌生物科技有限公司。石蜡包埋切片首先经过二甲苯脱蜡,然后乙醇梯度水化以及柠檬酸钠缓冲液修复。然后加封闭液封闭,一抗4℃孵育过夜,PBS清洗,加二抗。最后DAB显色,苏木素染核后脱水封片,结束后观察染色情况。

1.4 免疫组织化学检测结果评价

以胞膜、胞质和(或)胞核中出现棕黄色染色为阳性,由两位研究人员,采用双盲的方法对结果进行评价。免疫组织化学检测结果采用综合表达评分^[10](composite expression score, CES),把强度(Intensity, 0-3)和面积(Frequency, 0-4)作为评价指标,按照公式 $CES = Intensity \times Frequency$ 进行评分。强度分为:阴性(0),弱阳性(1),阳性(2),强阳性(3)。面积分为:0% (0), 1% ~ 25% (1), 26% ~ 50% (2), 51% ~ 75% (3), 76% ~ 100% (4)。

1.5 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6 统计分析软件,对实验结果进行数据分析及绘制图形,阳性率比较采用卡方检验,表达量两组数据之间差异比较采用 *t* 检验,3组及3组以上数据之间的差异比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Zwint-1 在 HNSCC 肿瘤组织中的表达情况

对所收集的临床样本以及购买的组织芯片中, Zwint-1 蛋白在肿瘤组织和正常组织中的表达情况,进行对比分析。结果显示, Zwint-1 蛋白在肿瘤组织中阳性表达为 94.7% (72/76), 高于其在正常组织中阳性表达 77.8% (14/18), 差异具有统计学意义

($\chi^2 = 5.376, P < 0.05$)。Zwint-1 在 HNSCC 肿瘤组织中的表达上调 $t = 2.399, P < 0.05$, 见图 1。

利用组织芯片,对 Zwint-1 蛋白在不同临床病理参数的肿瘤组织中的表达情况进行对比分析。结果显示,随着肿瘤浸润程度的加深, Zwint-1 蛋白表达水平逐渐升 ($F = 2.889, P < 0.05$)。Zwint-1 蛋白在有颈部淋巴结转移组 (N+) 的表达水平, 高于无颈部淋巴结转移组 (N0) ($t = 2.110, P < 0.05$)。Zwint-1 在低分化肿瘤组织中的表达水平, 高于高分化肿瘤组织 ($F = 3.667, P < 0.05$)。Zwint-1 蛋白在高临床分期肿瘤组织中的表达水平, 明显高于低临床分期 ($F = 2.864, P < 0.05$)。具体见图 2。

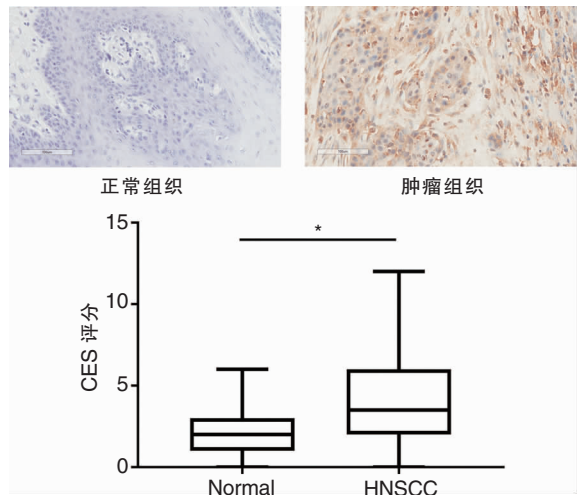


图1 Zwint-1 在肿瘤组织中的蛋白表达高于正常组织

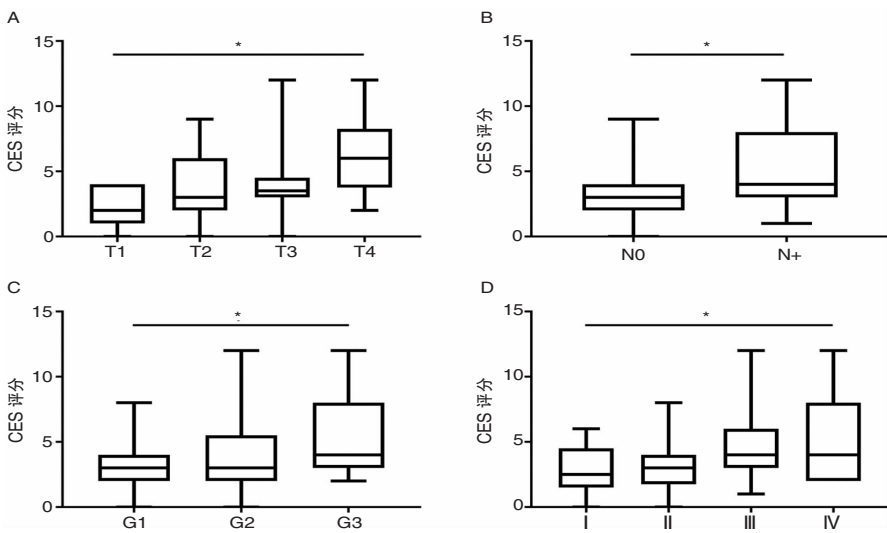


图2 Zwint-1 蛋白在不同临床参数肿瘤组织中的表达 A:肿瘤 T 分期; B:肿瘤有无淋巴结转移; C:肿瘤分化程度; D:肿瘤分期

2.2 Zwint-1 蛋白阳性在 HNSCC 组织中的表达分析

采用 χ^2 检验,对 Zwint-1 蛋白在不同病理参数的表达阳性率进行分析。结果显示,尽管在不同临床病理参数的肿瘤组织中,Zwint-1 蛋白表达量有显著差异,但是其阳性表达与 HNSCC 临床病理参数无统计学相关性,具体见表 3。

表 3 Zwint-1 蛋白在 HNSCC 不同临床病理参数中的表达 [例(%)]

病理参数	阳性	阴性	χ^2	P
T 分期			3.236	>0.05
T1	4(80.0)	1(20.0)		
T2	30(96.8)	1(3.2)		
T3	13(92.9)	1(7.1)		
T4	10(100.0)	0(0.0)		
淋巴结转移			1.463	>0.05
N+	38(92.7)	3(7.3)		
N0	19(100.0)	0(0.0)		
分化程度			1.271	>0.05
高分化	14(93.3)	1(6.7)		
中分化	22(91.7)	2(8.3)		
低分化	15(100.0)	0(0.0)		
临床分期			4.179	>0.05
I	5(83.3)	1(16.7)		
II	20(90.9)	2(9.1)		
III	19(10.0)	0(0.0)		
IV	13(10.0)	0(0.0)		

3 讨论

检查站蛋白是由多种连接染色体着丝粒,与纺锤丝微管蛋白的结合蛋白所形成的一个复合物,其在子代细胞中的染色体精确分配中起着重要作用^[11]。检查站蛋白若出现缺陷,常常会导致染色体的非整数倍性分离甚至癌变^[12]。根据作用部位的不同,检查站蛋白又可以分为外着丝粒蛋白与内着丝粒蛋白。ZW10 是一种外着丝粒蛋白,在不同细胞周期中的定位也不同,主要是分布在细胞质、纺锤体或者着丝粒。在检查信号传递过程中 ZW10 起着不可或缺的作用,其蛋白缺失会使得真核细胞不能进行正常的有丝分裂^[13]。

Zwint-1 由 Zwint 基因编码,总共含有 278 个氨基酸残基^[14]。Zwint-1 蛋白的 N 端能与 ZW10 蛋白 N 端的 80 个氨基酸残基特异性结合,共同定位在着丝粒,附着在纺锤体与染色体的微管间,从而起到对有丝分裂检查站以及染色体运动的重要调控作用^[15-16]。Zwint-1 蛋白的缺失并不会导致真核细胞有丝分裂的中断,但会过早的使染色体分离^[17]。

近些年来越来越多的研究发现,Zwint-1 蛋白在多种恶性肿瘤的发生发展过程中发挥有重要作用。Wang 等^[18]收集了 171 例肝癌肿瘤组织以及 187 例正常对照组织,发现 Zwint-1 在肝癌肿瘤组织中的蛋白表达下调。而 Ying 等^[19]发现 Zwint-1 蛋白与 mRNA 在肝癌肿瘤组织与细胞中均表达上调,且与肿瘤患者的临床特征、低生存期以及高复发率显著相关。Zwint-1 蛋白异位表达促进了肿瘤细胞的增殖,这可能是通过调控某些周期蛋白,比如 PCNA、cyclin B1、Cdc25C 及 CDK1 等来实现的。

而在本研究中发现,Zwint-1 蛋白在 HNSCC 肿瘤组织中也是表达上调,且其蛋白表达水平与 HNSCC 患者的 T 分期、淋巴结转移、分化程度以及临床分期均具有相关性,这与 Li 等^[9]有关肝癌的研究结果相似。Li 等^[9]收集了 50 例肝癌组织及癌旁组织进行研究,结果显示无论是 Zwint-1 蛋白还是 mRNA,其在肿瘤组织中的表达水平均高于癌旁组织。此外,Zwint-1 蛋白表达还与肝癌患者的肿瘤大小、淋巴结转移以及远处转移均显著相关。并且,在接受了肝脏移植的肿瘤患者中,Zwint-1 蛋白高表达患者往往具有更低的总生存率。而在抑制了肝癌细胞 HepG-2 中 Zwint-1 蛋白表达以后,其细胞增殖能力显著下降,细胞周期停滞在 G1 期^[9]。在有关卵巢癌的研究中也发现,Zwint-1 蛋白的高表达与患者的不良预后有关。

此外,在一项有关乳腺癌的研究中发现,从睾丸中提取的 Terf/TRIM17 蛋白,能够对 Zwint-1 蛋白表达进行调节,Terf/TRIM17 蛋白过表达会导致 Zwint-1 蛋白表达下调^[7]。使用乳腺癌细胞 MCF7 进行实验,在转染或干扰 Terf 基因后,细胞增殖能力显著下降或增加,而在转染或干扰 Zwint 基因后细胞的细胞增殖能力显著增加或下降^[7]。这说明 Terf/TRIM17 蛋白,或许能够通过下调 Zwint-1 蛋白表达,从而抑制肿瘤细胞的增殖。能否运用 Zwint-1 相关抑制蛋白,对 HNSCC 肿瘤细胞的生长进行抑制,是笔者下一步研究的方向。另外在本研究中,并没有发现 Zwint-1 蛋白阳性表达与临床病理参数的相关性,这可能与样本量较少有关。

综上所述,本研究发现了 Zwint-1 蛋白在 HNSCC 肿瘤组织中表达上调,且表达水平与患者的临床特征,包括有 T 分期、淋巴结转移、分化程度以及临床分期等,均具有相关性。然而,其具体分子机制以及靶向治疗作用,尚有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Theodoraki MN, Hoffmann TK, Whiteside TL. Separation of plasma-derived exosomes into CD3 (+) and CD3 (-) fractions allows for association of immune cell and tumour cell markers with disease activity in HNSCC patients [J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 192(3):271-283.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1):7-30.
- [3] Wemmert S, Linxweiler M, Lerner C, et al. Combinational chromosomal aneuploidies and HPV status for prediction of head and neck squamous cell carcinoma prognosis in biopsies and cytological preparations [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 144(6):1129-1141.
- [4] Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer [J]. *BMC Med*, 2016, 14:73.
- [5] Gildener-Leapman N, Ferris RL, Bauman JE. Promising systemic immunotherapies in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2013, 49(12):1089-1096.
- [6] 张驰, 李蕊, 李康生. Zwint-1 及其变异体 Zwint-1v 在 HeLa 细胞不同细胞周期中的亚定位 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2011, 23(3):186-189.
- Zhang C, Li R, Li KS. The sublocalization of Zwint-1 and Zwint-1v in different cell cycles of HeLa cells [J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis*, 2011, 23(3):186-189.
- [7] Endo H, Ikeda K, Urano T, et al. Terf/TRIM17 stimulates degradation of kinetochore protein ZWINT and regulates cell proliferation [J]. *J Biochem*, 2012, 151(2):139-144.
- [8] Xu Z, Yu Z, Cao Y, et al. Identification of candidate biomarkers and analysis of prognostic values in ovarian cancer by integrated bioinformatics analysis [J]. *Med Oncol*, 2016, 33(11):130.
- [9] Li H, Wang G, Zheng J, et al. Effect of high expression of Zwint on the proliferation of hepatoma cells and the prognosis of liver transplantation for hepatocellular carcinoma [J]. *Organ Transplantation*, 2018, 9(2):122-129.
- [10] Hu Z, Wang L, Han Y, et al. Ferritin: A potential serum marker for lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1):314-322.
- [11] Alfieri C, Chang L, Barford D. Mechanism for remodelling of the cell cycle checkpoint protein MAD2 by the ATPase TRIP13 [J].

Nature, 2018, 559(7713):274-278.

- [12] Yang Q, Cao W, Wang Z, et al. Regulation of cancer immune escape: The roles of miRNAs in immune checkpoint proteins [J]. *Cancer Lett*, 2018, 431(22):73-84.
- [13] Kops GJ, Kim Y, Weaver BA, et al. ZW10 links mitotic checkpoint signaling to the structural kinetochore [J]. *J Cell Biol*, 2005, 169(1):49-60.
- [14] Su J, Li R, Liu J, et al. Identification of the alternatively spliced variant v7 of Zwint-1 in HeLa cells [J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis*, 2014, 26(2):117-122.
- [15] Woo Seo D, Yeop You S, Chung WJ, et al. Zwint-1 is required for spindle assembly checkpoint function and kinetochore-microtubule attachment during oocyte meiosis [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(15431):1-11.
- [16] Wang HM, Hu XY, Ding X, et al. Human Zwint-1 specifies localization of zeste white 10 to kinetochores and is essential for mitotic checkpoint signaling [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(52):54590-54598.
- [17] Lin Y, Chen Y, Wu G, et al. Hec1 sequentially recruits Zwint-1 and ZW10 to kinetochores for faithful chromosome segregation and spindle checkpoint control [J]. *Oncogene*, 2006, 25(52):6901-6914.
- [18] Wang H, Wang L, Lv J, et al. Decreased expression of Zwint-1 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10(10):10406-10412.
- [19] Ying H, Xu Z, Chen M, et al. Overexpression of Zwint predicts poor prognosis and promotes the proliferation of hepatocellular carcinoma by regulating cell-cycle-related proteins [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11(7):689-702.

(收稿日期:2019-01-03)

本文引用格式:周洁, 潘芳名, 王晶, 等. Zwint-1 蛋白在头颈部鳞状细胞癌中表达上调及其与临床特征的相关性 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2019, 25(5):508-512. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201905012

Cite this article as: ZHOU Jie, PAN Fang-ming, WANG Jing, et al. The correlation between the up-regulation of Zwint-1 and clinicopathological characteristics in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2019, 25(5):508-512. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201905012