

锌指蛋白调控乳腺癌增殖的研究进展

李镠祎¹, 杨红健²

(1. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053; 2. 中国科学院大学附属肿瘤医院(浙江省肿瘤医院), 中国科学院基础医学与肿瘤研究所, 浙江 杭州 310022)

摘要: 锌指蛋白(zinc finger protein, ZNF/ZFP)是一种含锌指结构的蛋白质, 有着广泛的分子功能, 尤其是其对基因表达的调控作用。ZNF 在多种肿瘤组织中表达, 其表达水平与肿瘤的发生和发展明显相关。已有研究表明 ZNF 的表达水平与乳腺癌细胞的增殖密切相关, 这使 ZNF 具有一定潜在的临床应用价值, ZNF 或许可以成为一个调控乳腺癌细胞增殖的治疗靶点。

关键词: 乳腺癌; 增殖; 锌指蛋白

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)11-0991-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.11.B013

Research Progress on Zinc Finger Protein Regulating Breast Cancer Proliferation

LI Liu-yi¹, YANG Hong-jian²

(1. Zhejiang Chinese Medical University, The Second Clinical Medical College, Hangzhou 310053, China; 2. The Cancer Hospital of the University of Chinese Academy of Sciences (Zhejiang Cancer Hospital), Institute of Basic Medicine and Cancer (IBMC), Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310022, China)

Abstract: Zinc finger protein (ZNF or ZFP), a kind of protein containing zinc finger structure, has a wide range of molecular functions, especially its regulatory role in gene expression. ZNF is expressed in various tumor tissues, and its expression level is significantly related to the occurrence and development of tumors. Previous studies have shown that the expression level of ZNF is closely related to the proliferation of breast cancer cells, indicating that ZNF may become a therapeutic target through regulating and controlling tumor cell growth.

Subject words: breast cancer; proliferation; zinc finger protein

分子生物学研究表明, 转录因子的活性对基因表达起着抑制或增强的作用, 是影响癌基因和抑癌基因表达的“关键开关”, 由基因突变、染色体畸变或异常表达引起的转录因子的失调可导致癌症的发生^[1]。以转录因子为靶点的靶向药物, 可通过控制转录因子的活性, 同时作用于细胞内多条信号通路。理论上, 此类靶点的药物在耐药性、疗效等方面将会明显优于目前已有的靶向治疗药物。

锌指蛋白(zinc finger protein, ZNF/ZFP)结构中有一约 30 个氨基酸串联的环, 环上的两个半胱氨酸(cysteine, Cys)和两个组氨酸(histidine, His)残基可与锌离子结合, 并通过 β 折叠和 α 螺旋形成稳定的指样结构^[2]。研究表明 ZNF 是一种短而稳定的蛋白

质, 由于其自身结构的特殊性, 它可以选择性地结合特定的靶结构, 从而在基因的表达调控、细胞分化、胚胎发育等生命过程中发挥重要作用。ZNF 具有广泛的分子功能, 参与 DNA 识别与修复、RNA 包装、转录调控、细胞凋亡调节、信号转导、细胞迁移等过程^[3-4]。其中, X 染色体耦联锌指蛋白(zinc finger protein x-linked, ZFX)是 ZNF 的一种, 与其他 ZNF 不同的是其编码基因位于 X 染色体上^[5], ZFX 在脊椎动物中广泛表达, 其结构包含一个酸性转录激活结构域、一个核定位序及一个 DNA 结合位点^[6]。

1 锌指蛋白的调控作用

研究表明 ZNF 不仅是转录因子家族的成员, 而且可以与其他转录因子结合, 影响转录因子的表达与活性, 此外, 也可以通过影响增强子或者启动子的

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY18H160033)

通信作者: 杨红健, 主任医师, 硕士; 中国科学院大学附属肿瘤医院(浙江省肿瘤医院)乳腺外科, 浙江省杭州市拱墅区半山东路 1 号(310022); E-mail: yanghj@zjcc.org.cn

收稿日期: 2020-05-13; **修回日期:** 2020-08-29

活性来影响基因的表达,发挥调控作用^[7]。ZNF 具有识别 DNA 序列的功能,直接识别 DNA 序列通常需要有 2~4 个 ZNF 串联,当只有 1~2 个 ZNF 串联时,则需要与具有足够特异性和亲和力的特定二级结构结合,才可以识别并结合 DNA 序列,从而作为一些基因的调控因子发挥作用^[8]。ZNF 中还存在着许多的功能结构域,例如 BTB/POZ 结构域、Krüppel 相关盒(Krüppel-associated box, KRAB)结构域和 SCAN 结构域等,这些结构域也可通过调控转录因子或其他细胞成分来影响 ZNF 与 DNA 的结合以及基因的表达。此外,ZNF 可与不同的配体结合发挥相反的功能。例如锌指 E-box 结合蛋白 1 (zinc-finger E-box binding protein 1, ZEB1), 是一种与上皮细胞-间充质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)相关的转录抑制因子,通过与 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)相互作用,反而成为了 ZEB1/YAP 靶基因的转录共激活因子,从而导致恶性肿瘤的发生^[9]。ZNF 还存在着翻译后修饰,尤其是乙酰化和磷酸化,可改变 ZNF 对转录的抑制或激活作用,从而改变了 ZNF 的调控作用。如 YY1 是 Cys2His2 型锌指蛋白的一种,其活性可通过组蛋白乙酰转移酶 P300/CBP 结合蛋白(P300/CBP-associating factor, PCAF) 相关的乙酰化以及组蛋白脱乙酰酶(histone deacetylases, HDAC) 的去乙酰化来调节,YY1 通过选择性地与 PCAF 或 HDAC 结合成为转录活化剂或抑制剂^[10]。研究发现 ZFX 是调控小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的共同转录因子,ZFX 缺失可导致小鼠的 ESC 和 HSC 自我更新能力明显下降,通过结合位点分析法发现并且检验出两种细胞中存在着 ZFX 可直接调控的共同靶基因^[11]。总之,ZNF 可受不同的分子成分的影响改变其调控作用,从而发挥其对基因转录的调控作用。

2 锌指蛋白对肿瘤的影响

ZNF 参与调控细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡及肿瘤相关基因的表达^[12]。EMT 是肿瘤进展和转移期间发生的基本过程,ZNF 作为一种转录因子参与了 EMT^[13]。Jiang 等^[13]实验结果显示 ZFX 在结肠癌组织中表达增高,而且通过下调结肠癌细胞系中 ZFX 的

表达可以明显抑制癌细胞系的增殖和侵袭性。Song 等^[14]研究发现胰腺癌患者 ZFX 过表达与肿瘤 TNM 分期、淋巴结转移等显著性相关,细胞核内的高 ZFX 水平是胰腺癌患者预后不良的独立因素。Ma 等^[15]研究发现舌鳞状细胞癌组织中的 ZFX 表达水平明显高于癌旁正常组织,ZFX 表达水平决定着舌鳞状细胞癌细胞的克隆形成能力,下调 ZFX 表达可阻滞细胞周期从而抑制肿瘤增殖和发展。众多研究的结果显示 ZNF 表达与肾癌^[16]、非小细胞肺癌^[17]、结直肠癌、肝癌^[18]等的发生与发展相关。综上所述,ZNF 在多种肿瘤组织中表达,并且其表达水平与肿瘤的发生和发展明显相关,ZNF 或许是可以影响癌症发生发展的潜在靶点。

3 锌指蛋白影响乳腺癌细胞增殖

大部分的 ZNF 在其 NH₂ 末端含有高度保守的 KRAB 转录抑制结构域,这类 ZNF 即 KRAB 型锌指蛋白(KRAB containing zinc finger protein, KZNF)^[19],其可与它的共抑制因子 KRAB 相关蛋白 1(KRAB-associated protein 1, KAP1)直接结合,增强 KZNF 介导的抑制作用^[20]。Machnik 等^[21]选定了多个 KZNF,并在 9 种不同亚型的乳腺癌细胞系中进行检测发现,与正常乳腺上皮细胞系相比,大多数 KZNF 被下调,只有一小部分被高水平表达。ZNF57 是 KZNF 的成员,可维持 ESC 中的 DNA 甲基化,Chen 等^[22]发现 ZNF57 在乳腺癌中表达较低,并且 ZNF57 过表达可以通过下调中胚层特异转录物(mesoderm specific transcript, MEST)抑制 Wnt/ β -链蛋白(Wnt/ β -catenin)途径来抑制乳腺癌细胞的增殖。ZNF496 是 KZNF 家族成员之一,其 C2H2 结构域可与雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)的 DNA 结合结构域相互作用,这种相互作用减少了 ER α 与染色质 DNA 的结合,从而抑制了 ER α 转录激活,抑制 ER α 阳性乳腺癌细胞的生长^[23]。研究表明,ZNF121 可与 ZBRK1/BRCA1/CtIP 复合物相互作用,敲除 ZNF121 可抑制影响乳腺癌细胞系中高迁移率族蛋白 2 (high mobility group AT-hook 2, HMGA2) 的表达,促进乳腺肿瘤发生^[24]。Cheng 等^[25]发现 ZNF545 是 KZNF 的一种,作为一种肿瘤抑制因子,其可通过抑制核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)和激活蛋

白-1 (activator protein-1, AP-1) 信号通路诱导细胞周期 G₀/G₁ 停滞和凋亡, 从而抑制乳腺肿瘤细胞增殖, 但在部分乳腺癌组织中会发生肿瘤特异性 DNA 甲基化, 导致 ZNF545 的转录沉默, 使其表达水平显著性降低。Li 等^[26]发现 ZNF516 是一种转录抑制因子, 可通过与 CtBP/LSD1/CoREST 复合物结合下调表皮生长因子(epidermal growth factor receptor, EGFR)的表达从而抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭, 并且 ZNF516 低表达与乳腺癌分期较晚与生存率低呈正相关。在不同类型的肿瘤中均观察到 ZNF652 表达水平降低, 并且这在乳腺癌等肿瘤中更明显, ZNF652 位于染色体 17q21.32 上, 而 17 号染色体经常参与乳腺肿瘤特有的染色体杂合性缺失, ZNF652 与 CBFA2/RUNX1 易位伴侣 3 (CBFA2/RUNX1 translocation partner 3, CBFA2T3) 均被证明是乳腺癌中的肿瘤抑制因子^[27], ZNF652 的 COOH 端可与 CBFA2T3 相互作用, 在 CBFA2T3 存在时, ZNF652 对乳腺肿瘤的转录抑制作用可得到增强^[28]。笔者所在课题组前期开展了短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 介导的 ZFX 沉默抑制乳腺癌细胞增殖的研究, 我们采用免疫组化及反转录聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 的方法对 4 种乳腺癌细胞系进行了检测, 与未发生转移的乳腺癌相比, ZFX 在转移性乳腺癌中的表达更高, 4 种乳腺癌细胞系均表达 ZFX 基因, 其中 MDAMB-231、MCF-7 两个细胞系高表达。此外, 我们进一步将含有 ZFX shRNA 或者含有非沉默 shRNA 的慢病毒转染 MDAMB-231、MCF-7 两个细胞系, 通过 RT-PCR 及免疫印迹实验对 ZFX 转录翻译之后产生的 RNA 和蛋白质进行检测, 发现乳腺癌细胞中 ZFX 的下调完全是由于 ZFX shRNA。ZFX 基因表达下调之后, 丝苏氨酸激酶(silk threonine kinase, AKT)磷酸化水平下降, 细胞外信号调节激酶 2 (extracellular signal regulated kinase 2, ERK2) 磷酸化水平及细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 表达水平增高, 细胞增殖速率下降, 克隆集落形成的数目减少及面积变小, 处于 G₀/G₁ 期细胞数量明显增加, S 期细胞数量减少, 由此可见, ZFX 基因的下调可通过影响 ERK2、AKT 以及 Cyclin D1 在乳腺癌中的表达, 使细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期, 从而抑制细胞生长和细胞周期进程的进展^[29]。

4 锌指蛋白临床应用前景

ZNF 对肿瘤的调控作用, 也使 ZNF 本身具有了潜在的临床应用价值。研究表明, ZNF703 能与特定结构结合, 抑制 E-钙黏附素、Wnt 和转化生长因子- β (TGF- β , transforming growth factor- β) 受体, 从而调节乳腺癌细胞的增殖、粘附和迁移。此外, 研究表明非甾体抗炎药具有抗肿瘤活性, Marzbany 等^[30]发现布洛芬和抗 ZNF703 小干扰 RNA (small interfering, RNA, siRNA) 的联合使用与单独使用以上两种疗法相比, 能够使 MCF-7 细胞中 ZNF703 的表达水平明显降低, 诱导细胞凋亡, 更有效地促进癌细胞凋亡。ZNF217 过表达可促进乳腺癌迁移、侵袭和淋巴结转移, ZNF217 可与活化长链非编码 RNA-ATB (long non-coding RNA-ATB, lncRNA-ATB)、TGF- β 共同组成 lncRNA-ATB/ZNF217/TGF- β 信号通路, lncRNA-ATB 可以通过此通路增强曲妥珠单抗的耐药性和促进 EMT 的发生^[31]。

5 结 语

ZNF 作为转录分子中的一员, 具有广泛的分子功能, 在基因调控、细胞增殖、分化等生命过程中发挥着重要作用, 但是其对肿瘤的发生发展等过程的影响, 尤其是在乳腺癌的发生发展等过程中所起的作用仍处于探索阶段。ZNF 可通过以下几个机制影响乳腺癌增殖: (1) KZNF 可与共抑制因子 KAP1 直接结合, 增强其转录抑制作用; (2) ZFP57 是 KZNF 的成员, 在乳腺癌中的表达较低, 并且 ZFP57 过表达可通过下调印迹基因 MEST 抑制 Wnt/ β -catenin 途径来抑制乳腺癌细胞的增殖; (3) ZNF496 可与 ER α 相互作用, 减少 ER α 与染色质 DNA 的结合, 从而抑制 ER α 的转录激活, 抑制 ER α 阳性乳腺癌细胞的生长; (4) ZNF121 可与 ZBRK1/BRCA1/CtIP 复合物相互作用, ZNF121 表达水平的降低, 可抑制乳腺癌细胞系 HMGA2 蛋白的表达, 促进乳腺癌发生; (5) ZNF545 作为一种肿瘤抑制因子, 可通过抑制 NF- κ B 和 AP-1 信号通路诱导细胞周期 G₀/G₁ 停滞和细胞凋亡, 从而抑制乳腺癌的增殖; (6) ZNF516 可通过与 CtBP/LSD1/CoREST 复合物结合并下调 EGFR 表达, 抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭; (7) ZNF652 的

COOH 端可与 CBFA2T3 相互作用,在肿瘤抑制因子 CBFA2T3 的存在下,ZNF652 对乳腺癌的转录抑制作用可得到增强;(8)ZFX 在晚期的肿瘤组织及多种乳腺癌细胞系中表达水平更高,基因的下调可通过影响 ERK2、AKT 以及 cyclin D1 在乳腺癌中的表达,使细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期,从而抑制肿瘤细胞生长和细胞周期进程的进展。ZNF 对乳腺癌增殖的调控作用涉及多方面、多途径,还仍需要进一步的探索。

参考文献:

- [1] Takei H, Kobayashi SS. Targeting transcription factors in acute myeloid leukemia[J]. *Int J Hematol*, 2019, 109(1):28-34.
- [2] Jen J, Wang YC. Zinc finger proteins in cancer progression[J]. *J Biomed Sci*, 2016, 23(1):53.
- [3] Xiao Y, Xiang T, Luo X, et al. Zinc-finger protein 545 inhibits cell proliferation as a tumor suppressor through inducing apoptosis and is disrupted by promoter methylation in breast cancer[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e110990.
- [4] Klug A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation[J]. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79:213-231.
- [5] Ni W, Perez AA, Schreiner S, et al. Characterization of the ZFX family of transcription factors that bind downstream of the start site of CpG island promoters[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(11):5986-6000.
- [6] Schneider-Gadicke A, Beer-Romero P, Brown LG, et al. Putative transcription activator with alternative isoforms encoded by human ZFX gene [J]. *Nature*, 1989, 342(6250):708-711.
- [7] Yang P, Wang Y, Macfarlan TS. The role of KRAB-ZFPs in transposable element repression and mammalian evolution[J]. *Trends Genet*, 2017, 33(11):871-881.
- [8] Dutta S, Madan S, Sundar D. Exploiting the recognition code for elucidating the mechanism of zinc finger protein-DNA interactions[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(Suppl 13):109-125.
- [9] Lehmann W, Mossmann D, Kleemann J, et al. ZEB1 turns into a transcriptional activator by interacting with YAP1 in aggressive cancer types[J]. *Nat Commun*, 2016, 7:10498.
- [10] Yao YL, Yang WM, Seto E. Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(17):5979-5991.
- [11] Teif VB, Vainshtein Y, Caudron-Herger M, et al. Genome-wide nucleosome positioning during embryonic stem cell development[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19(11):1185-1192.
- [12] Alidadiani N, Ghaderi S, Dilaver N, et al. Epithelial mesenchymal transition transcription factor(TF):the structure, function and microRNA feedback loop[J]. *Gene*, 2018, 674:115-120.
- [13] Jiang J, Liu LY. Zinc finger protein X-linked is overexpressed in colorectal cancer and is associated with poor prognosis[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(2):810-814.
- [14] Song X, Zhu M, Zhang F, et al. ZFX promotes proliferation and metastasis of pancreatic cancer cells via the MAPK pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(1):274-284.
- [15] Ma H, Yang F, Lian M, et al. Dysregulation of zinc finger protein, X-linked(ZFX) impairs cell proliferation and induces apoptosis in human oral squamous cell carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(8):6103-6112.
- [16] Fang Q, Fu WH, Yang J, et al. Knockdown of ZFX suppresses renal carcinoma cell growth and induces apoptosis [J]. *Cancer Genet*, 2014, 207(10-12):461-466.
- [17] Wu N, Zhang C, Bai C, et al. MiR-4782-3p inhibited non-small cell lung cancer growth via USP14[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(2):457-467.
- [18] Lai KP, Chen J, He M, et al. Overexpression of ZFX confers self-renewal and chemoresistance properties in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(8):1790-1799.
- [19] Witzgall R, O'leary E, Leaf A, et al. The Krüppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(10):4514-4518.
- [20] Peng H, Begg GE, Harper SL, et al. Biochemical analysis of the Kruppel-associated box (KRAB) transcriptional repression domain[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(24):18000-18010.
- [21] Machnik M, Cylwa R, Kielczewski K, et al. The expression signature of cancer-associated KRAB-ZNF factors identified in TCGA pan-cancer transcriptomic data[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(4):701-724.
- [22] Chen L, Wu X, Xie H, et al. ZFP57 suppress proliferation of breast cancer cells through down-regulation of MEST-mediated Wnt/ β -catenin signalling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3):169.
- [23] Wang J, Zhang X, Ling J, et al. KRAB-containing zinc finger protein ZNF496 inhibits breast cancer cell proliferation by selectively repressing ER α activity [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2018, S1874-9399(18)30048-8.
- [24] Luo A, Zhang K, Zhao Y, et al. ZNF121 interacts with ZBRK1 and BRCA1 to regulate their target genes in mammary epithelial cells[J]. *FEBS Open Bio*, 2018, 8(12):1943-1952.
- [25] Cheng Y, Liang P, Geng H, et al. A novel 19q13 nucleolar zinc finger protein suppresses tumor cell growth through inhibiting ribosome biogenesis and inducing apoptosis but is frequently silenced in multiple carcinomas[J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(7):925-936.
- [26] Li L, Liu X, He L, et al. ZNF516 suppresses EGFR by targeting the CtBP/LSD1/CoREST complex to chromatin[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):691.
- [27] Kochetkova M, McKenzie OL, Bais AJ, et al. CBFA2T3 (MTG16) is a putative breast tumor suppressor gene from the breast cancer loss of heterozygosity region at 16q24.3 [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(16):4599-4604.
- [28] Kumar R, Manning J, Spendlove HE, et al. ZNF652, a novel zinc finger protein, interacts with the putative breast tumor suppressor CBFA2T3 to repress transcription [J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(9):655-665.
- [29] Yang H, Lu Y, Zheng Y, et al. shRNA-mediated silencing of ZFX attenuated the proliferation of breast cancer cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014, 73(3):569-576.
- [30] Marzbany M, Bishayee A, Rasekhan M. Increased expression of ZNF 703 in breast cancer tissue:An opportunity for RNAi-NSAID combinatorial therapy [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2019, 66(5):808-814.
- [31] Shi SJ, Wang LJ, Yu B, et al. LncRNA-ATB promotes trastuzumab resistance and invasion-metastasis cascade in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(13):11652-11663.