

应用肿瘤数据库信息分析 ZBTB16 在肝癌中的表达及其功能初步研究

于玲¹, 于敏²

[1. 思路迪(北京)医药科技有限公司 研发部, 北京 100176; 2. 内蒙古医科大学附属医院 心内科, 呼和浩特 010050]

摘要: Zinc finger and BTB domain containing 16(ZBTB16), 亦称早幼粒细胞白血病锌指蛋白(promyelocytic leukemia zinc finger, PLZF), 作为一种转录抑制因子在调控细胞周期、增殖、分化和凋亡等多种功能中发挥重要作用, 但其在肝癌组织中的表达情况及调控作用仍研究得较少。本研究利用 GEPIA 在线对 TCGA 肿瘤组织数据库和 GTEx 正常组织数据库中 369 例人肝癌组织和 160 例人正常肝组织中 ZBTB16 的表达进行生物信息学分析。结果发现, ZBTB16 在人肝癌组织中表达显著下调; 实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 发现肝癌临床样本和肝癌细胞系中 ZBTB16 mRNA 和蛋白质水平均明显下调; GEPIA 在线分析 ZBTB16 表达水平与肝癌患者的生存率呈正相关。利用 Ad-ZBTB16 腺病毒在肝癌细胞系 HepG2 中过表达 ZBTB16 能显著抑制细胞的增殖、迁移和侵袭能力。进一步机制研究表明, 过表达 ZBTB16 能显著抑制 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平。以上结果表明, 提高 ZBTB16 的表达或可作为肝癌治疗的靶点。

关键词: 肝癌; ZBTB16; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R735.7

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2020)01-0022-06

肝癌是常见的恶性肿瘤, 发病率和死亡率均位列我国恶性肿瘤前五位^[1], 癌细胞异常增殖和转移是造成肝癌患者高死亡率的最主要原因^[2]。因此, 深入探究致病机制, 寻找新的治疗靶点对于治疗或降低肝癌引起的致死风险迫在眉睫。ZBTB16 作为一种转录因子, 在前列腺癌^[3]、胰腺癌^[4]、结肠癌^[5]、肺癌^[6]、甲状腺癌^[7]和胆囊癌^[8]等多种肿瘤的发生发展中至关重要, 但目前关于其在肝癌中的功能研究较少。本研究旨在通过生物信息学数据库分析, 探究 ZBTB16 在肝癌组织中的表达情况, 进而结合肝癌临床样本和肝癌细胞系证实 ZBTB16 在其中的表达变化, 最后通过体外细胞实验明确 ZBTB16 在肝癌中的功能及可能的作用机制。

1 资料与方法

1.1 临床样本 收集内蒙古医科大学附属医院 2018 年原发性肝癌患者手术切除样本及相应的距离肝肿块边缘 2 cm 的癌旁组织, 共 6 例[男女各 3 例, 平均年龄(53.00±2.13)岁]。所有新鲜组织

取下后液氮速冻, 并于一 80 ℃ 冰箱超低温保存。所有病例经病理学诊断确诊, 临床资料完整, 在手术前未行放化疗或免疫治疗等辅助治疗措施。研究获得医院伦理委员会批准且患者均签署知情同意书。

1.2 细胞培养及腺病毒感染 将人正常肝细胞系 HL-7702 及肝癌细胞系 Hep3B、HepG2 和 Bel-7402 接种于含 10% FCS 的高糖 DMEM 培养液中, 在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养。待细胞增殖至铺底率为(80~100)%时, 分别感染腺病毒 Ad-GFP 和 Ad-ZBTB16(上海吉玛制药技术有限公司), 感染 48 h 后进行后续实验。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测 用 TRIzol 裂解液[Life Technologies (AB & Invitrogen)公司]提取细胞总 RNA。用 M-MLV 反转录酶(Promega Corporation公司)将 2 μg RNA 反转录为 cDNA, 反应体系 25 μL。用实时荧光定量 PCR 检测试剂盒(Fermentas 公司)进行相关基因的表达检测, 反应体系如下: SYBR 10 μL、前向引物 1 μL、反向引物 1 μL、cDNA 1 μL, 总反应体系 20 μL。实时荧光定量 PCR(仪器来自 Bio-Rad 公司)程序为 95 ℃ 5 min、95 ℃ 15 s、60 ℃ 30 s(45 个循环)。引物序列如下, 根据 2^{-ΔΔCt} 值计算目的基因的相对表达量

收稿日期: 2019-01-16

作者简介: 于玲(1980—), 女, 硕士, 制药公司研发职员, 主要从事肿瘤药物研发工作

通信作者: 于敏(E-mail: 18504716700@126.com)

变化(表1)。

表1 引物序列

基因		序列(5'→3')
ZBTB16	前向	TCACATACAGGCGACCAACC
	反向	CTTGAGGCTGAACTTCTTGC
GAPDH	前向	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	反向	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

1.4 Western blotting 检测 RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)裂解肝癌组织提取总蛋白, BCA 试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公司)检测蛋白质浓度。用 10% SDS-PAGE 分离总蛋白(20~30 μg), 再将其转印至 0.2 μm PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温条件下封闭 1 h, 分别加入相应的一抗[抗 ZBTB16 抗体(1:1 000, Abcam 公司)、抗 JAK2 抗体(1:5 000, Abcam 公司)、抗 p-JAK2 抗体(1:1 000, Abcam 公司)、抗 STAT3 抗体(1:1 000, Abcam 公司)、抗 p-STAT3 抗体(1:2 000, Abcam 公司)和抗 β -actin 抗体(1:1 000, Abcam 公司)], 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。加入羊抗兔 IgG-HRP 二抗(1:1 000, Abcam 公司), 室温条件下孵育 2 h。最后用 ECL 试剂盒(上海天能科技有限公司)显影并扫描图片。

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖能力 将 2 000 个 HepG2 细胞接种于 96 孔板, 待细胞贴壁生长后, 分别用腺病毒 Ad-GFP 和 Ad-ZBTB16 感染 HepG2 细胞, 每组设 6 个复孔。病毒感染 24、48、72、96 和 120 h 后, 弃去培养液, 每孔加入 90 μL 新鲜培养液和 10 μL CCK-8 试剂。孵育 4 h 后, 于酶联免疫检测仪检测 $D(490\text{ nm})$ 并绘制生长曲线。

1.6 Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭能力

细胞迁移实验: 分别收集病毒感染 48 h 后的 HepG2 细胞, 用无血清高糖 DMEM 培养液漂洗 2 次, 取 200 μL 细胞悬液(2×10^5 个/mL)加入 Transwell 小室的上室, 下室加入 500 μL 含 10% FCS 的培养液; 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h, PBS 漂洗 3 次; 加入 400 μL 甲醛固定 20 min, 再用 PBS 漂洗 3 次; 500 μL 1% 结晶紫染色 15 min,

PBS 冲洗晾干, 显微镜下摄片观察。细胞侵袭实验: 实验前先用 Matrigel 胶包被 Transwell 小室上室, 后续处理同细胞迁移实验。

1.7 生物信息学分析 通过在线软件 GEPIA (<http://gepia.cancerpku.cn/index.html>) 分析 ZBTB16 在人肝癌(TCGA 数据库)和正常肝组织(GTEX 数据库)中的表达情况。应用“survival”选项分析 364 例样本中 ZBTB16 表达与生存时间的 Kaplan-Meier 关系图。搜索 ZBTB16 在不同病理分期肝癌组织中的表达情况, 应用 Log-rank 检验分析 ZBTB16 的表达差异。

1.8 统计学处理 用 SPSS 19.0 统计分析数据, 采用 Graphpad 5.0 软件作图。所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较采用独立样本 t 检验, 每个实验至少独立重复 3 次, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZBTB16 在肝癌组织、肝癌细胞系及正常肝组织中的表达 通过 GEPIA 在线分析 TCGA 和 GTEX 数据库中 369 例人肝癌组织和 160 例正常肝组织中 ZBTB16 的表达。结果发现, 与正常肝组织相比, ZBTB16 在肝癌组织中表达显著降低($P < 0.05$, 图 1A)。同时 ZBTB16 在不同病理分期肝癌组织中的表达情况不同, I 期的表达明显高于 II、III、IV 期($P < 0.05$, 图 1B)。Western blotting 结果同样显示, ZBTB16 在肝癌组织临床样本中的表达明显低于正常肝组织($P < 0.01$, 图 1C)。进一步用实时荧光定量 PCR 检测正常肝细胞系和多种肝癌细胞中 ZBTB16 的表达, 发现相比于正常肝细胞系, 肝癌细胞系中 ZBTB16 的 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, 图 1D)。

2.2 ZBTB16 表达水平与肝癌患者生存率的相关性 为探讨肝癌组织中 ZBTB16 的表达对患者生存率的影响, GEPIA 在线分析 ZBTB16 表达和肝癌患者总生存率的相关性。结果发现, ZBTB16 高表达组肝癌患者的总生存率明显高于低表达组患者, 差异有统计学意义($P=0.046$, 图 2)。

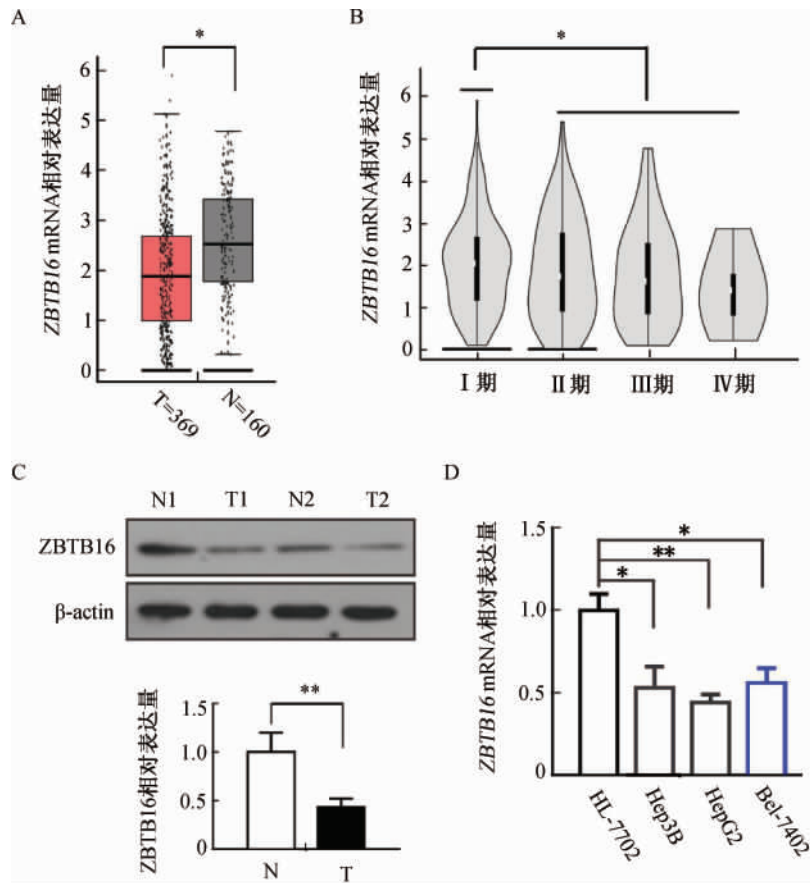


图1 ZBTB16在肝癌组织、肝癌细胞系及正常肝组织中的表达

注：A. ZBTB16在TCGA($n=369$)和GTEx($n=160$)数据库肝癌组织中的表达；B. ZBTB16在不同病理分期肝癌组织中的表达；C. ZBTB16蛋白在肝癌组织中的表达；D. ZBTB16在不同肝癌细胞系中的表达。N:癌旁组织, T:肝癌组织。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

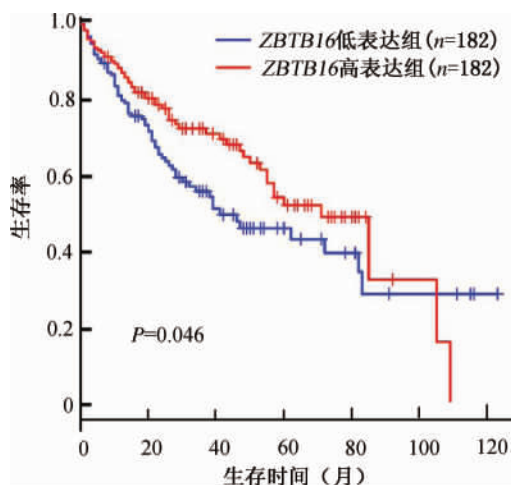


图2 ZBTB16在肝癌组织中的表达和患者生存率的相关性

2.3 ZBTB16过表达对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响 研究发现, ZBTB16在肝癌细胞系HepG2中的表达量最低($P < 0.01$, 图1D)。因此, 为进一步探讨ZBTB16在肝癌中的作用, 研究通过腺病毒Ad-GFP和Ad-ZBTB16在HepG2中过表达ZBTB16。结果发现, 腺病毒感染后ZBTB16的mRNA和蛋白质表达水平明显升高($P < 0.001$, 图3A、3B)。CCK-8实验结果显示, 过表达ZBTB16能明显抑制HepG2细胞的增殖($P < 0.01$, 图3C)。Transwell实验结果表明, 过表达ZBTB16使HepG2细胞的迁移和侵袭能力明显降低($P < 0.01$, 图3D、3E)。

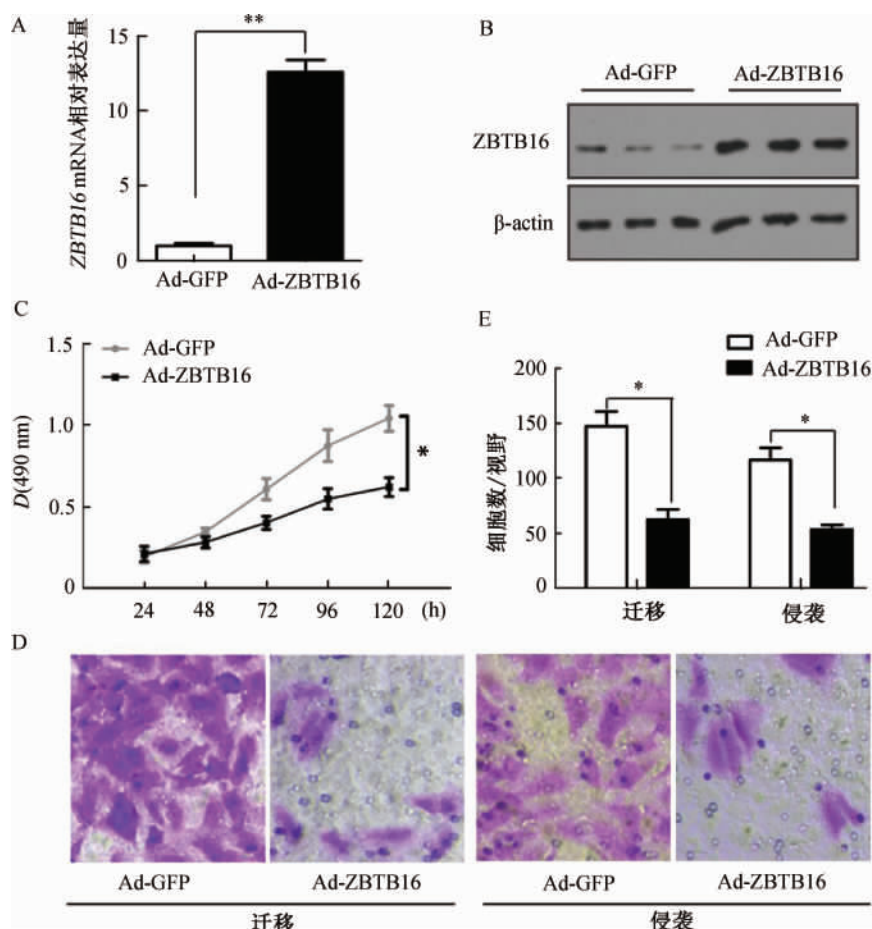


图3 *ZBTB16* 过表达对肝癌细胞系 HepG2 增殖、迁移和侵袭的影响

注：A、B. 实时荧光定量 PCR(A)和 Western blotting(B)检测腺病毒 Ad-ZBTB16 在肝癌细胞系 HepG2 中的过表达效率；C. *ZBTB16* 过表达抑制肝癌细胞系 HepG2 的增殖；D. *ZBTB16* 过表达抑制肝癌细胞系 HepG2 的迁移和侵袭；E. HepG2 迁移和侵袭细胞数量的统计分析。 $*P < 0.01$, $**P < 0.001$

2.4 *ZBTB16* 过表达对 JAK2 和 STAT3 磷酸化水平的影响 为进一步探究 *ZBTB16* 调控肝癌细胞系增殖、迁移和侵袭的潜在分子机制，研究对 JAK2/STAT3 信号通路中 p-JAK2、JAK2、p-STAT3 和 STAT3 4 个关键蛋白的表达水平进行

检测。结果发现，*ZBTB16* 过表达能明显抑制 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平($P < 0.05$, 图4)。因此，*ZBTB16* 过表达抑制肝癌细胞系的增殖、迁移和侵袭可能是通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路中 2 个蛋白的磷酸化水平实现的。

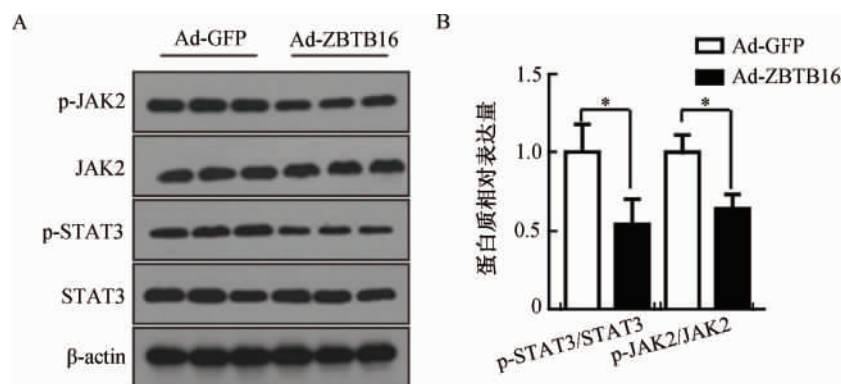


图4 *ZBTB16* 过表达抑制 JAK2、STAT3 的磷酸化水平

注：A. Western blotting 检测腺病毒 Ad-ZBTB16 在肝癌细胞系 HepG2 中过表达 *ZBTB16* 对 JAK2 和 STAT3 磷酸化水平的影响；B. JAK2 和 STAT3 磷酸化水平的相对表达量。 $*P < 0.05$

3 讨论

肝癌已成为全球发病率及死亡率仅次于胃癌的第2大消化系统恶性肿瘤,且发病率与死亡率仍保持逐年上升趋势,但其发病原因及发生发展机制尚未阐明^[2]。研究发现,针对肿瘤细胞增殖、转移等相关分子的靶向治疗在肝癌诊疗中具有重要作用,发现新的靶分子或可改善肝癌疗效及帮助开发新药物。ZBTB16主要由BTB/POZ、RD2和锌指3个结构域组成,常常作为转录抑制因子发挥功能^[9-10]。ZBTB16的活性受转录后修饰调控,如乙酰化^[11-13]、泛素化^[14]和类泛素化修饰^[15]。Felicetti等^[16]研究发现,ZBTB16在黑色素瘤中表达降低,通过转录病毒过表达ZBTB16能够明显抑制黑色素瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。Xiao等^[6]在非小细胞肺癌的研究中发现,ZBTB16的表达水平和肿瘤分期以及淋巴结转移程度呈负相关。Hui等^[17]研究发现,ZBTB16在肝癌组织中表达下调。Li等^[18]研究发现,死亡相关蛋白激酶1(death-associated protein kinase 1, DAPK1)可以作为肝癌的预后指标,ZBTB16在肝癌中的表达与DAPK1呈正相关,提示ZBTB16可能在肝癌发生中起重要作用。以上研究均报道了ZBTB16在肝癌组织中表达下调,但关于其在肝癌中的功能研究并没有得到充分开展。

本研究利用GEPIA在线分析发现ZBTB16在肝癌组织中表达明显降低,提示ZBTB16在其形成、发展及进展中可能发挥重要作用,将来或可作为肝癌治疗的潜在靶点。但目前关于ZBTB16在肝癌中的表达及其作用研究得较少,其表达水平是否与肝癌发生发展相关尚未明确。本研究基于6例肝癌组织与癌旁正常组织对数据库中ZBTB16的表达情况进行验证,发现ZBTB16在肝癌组织中的表达水平确实明显低于癌旁正常组织。实时荧光定量PCR检测发现在肝癌细胞系Hep3B、HepG2和Bel-7402中ZBTB16的表达明显低于正常肝细胞HL-7702,亦与数据库生物信息分析结果一致,提示ZBTB16可能参与肝癌的发生发展。

癌细胞转移是导致肝癌患者疗效及预后不佳的主要原因之一,因此,抑制其转移是抑制肝癌发生发展、改善患者预后的重要途径。为探究ZBTB16在肝癌细胞增殖、迁移和侵袭中的作用,研究利用腺病毒在肝癌细胞系HepG2中过表达ZBTB16。

结果发现,腺病毒感染可明显提高ZBTB16的mRNA和蛋白质表达水平。CCK-8实验结果表明,过表达ZBTB16可明显抑制细胞的增殖。Transwell细胞侵袭和迁移实验结果显示,过表达ZBTB16明显抑制细胞的迁移和侵袭能力。以上提示ZBTB16的表达水平改变可能在肝癌细胞增殖、迁移和侵袭中发挥重要功能。为进一步探究ZBTB16调控肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的潜在分子机制,研究对JAK2/STAT3信号通路中关键分子的表达进行检测,发现过表达ZBTB16能明显抑制JAK2和STAT3的磷酸化水平。因此,ZBTB16过表达抑制肝癌细胞系的增殖、迁移和侵袭可能是通过抑制JAK2/STAT3信号通路中2个蛋白的磷酸化水平实现的。以上结果表明,提高ZBTB16的表达或可作为将来肝癌治疗的靶点。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2018, 391(10127): 1301-1314.
- [3] Stopsack KH, Gerke T, Tyekucheva S, *et al.* Low expression of the androgen-induced tumor suppressor gene PLZF and lethal prostate cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2019, 28(4): 707-714.
- [4] Vincent A, Omura N, Hong SM, *et al.* Genome-wide analysis of promoter methylation associated with gene expression profile in pancreatic adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(13): 4341-4354.
- [5] Jones C, St-Jean S, Fréchette I, *et al.* Identification of a novel promyelocytic leukemia zinc-finger isoform required for colorectal cancer cell growth and survival[J]. Int J Cancer, 2013, 133(1): 58-66.
- [6] Xiao GQ, Li FQ, Findeis-Hosey J, *et al.* Down-regulation of cytoplasmic PLZF correlates with high tumor grade and tumor aggression in non-small cell lung carcinoma[J]. Hum Pathol, 2015, 46(11): 1607-1615.
- [7] Matsuzawa K, Izawa S, Ohkura T, *et al.* Implication of intracellular localization of transcriptional repressor PLZF in thyroid neoplasms[J]. BMC Endocr Disord, 2014, 14: 52.
- [8] Shen H, Zhan M, Zhang Y, *et al.* PLZF inhibits proliferation and metastasis of gallbladder cancer by regulating IFIT2[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 71.
- [9] Koubi M, Poplineau M, Vernerey J, *et al.* Regulation of the positive transcriptional effect of PLZF through a non-canonical EZH2 activity[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(7): 3339-3350.
- [10] Liu TM, Lee EH, Lim B, *et al.* Concise review: Balancing

- stem cell self-renewal and differentiation with PLZF [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(2): 277-287.
- [11] Guidez F, Howell L, Isalan M, *et al.* Histone acetyltransferase activity of p300 is required for transcriptional repression by the promyelocytic leukemia zinc finger protein[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(13): 5552-5566.
- [12] McConnell MJ, Durand L, Langley E, *et al.* Post transcriptional control of the epigenetic stem cell regulator PLZF by sirtuin and HDAC deacetylases[J]. *Epigenetics Chromatin*, 2015, 8: 38.
- [13] Sadler AJ, Suliman BA, Yu L, *et al.* The acetyltransferase HAT1 moderates the NF- κ B response by regulating the transcription factor PLZF[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6795.
- [14] Vasanthakumar A, Xu DK, Lun AT, *et al.* A non-canonical function of Ezh2 preserves immune homeostasis[J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(4): 619-631.
- [15] Chao TT, Chang CC, Shih HM. SUMO modification modulates the transrepression activity of PLZF[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358(2): 475-482.
- [16] Felicetti F, Bottero L, Felli N, *et al.* Role of PLZF in melanoma progression[J]. *Oncogene*, 2004, 23(26): 4567-4576.
- [17] Hui AW, Lau HW, Cao CY, *et al.* Downregulation of PLZF in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(1): 397-402.
- [18] Li L, Guo L, Wang Q, *et al.* DAPK1 as an independent prognostic marker in liver cancer[J]. *PeerJ*, 2017, 5: e3568.

Application of tumor database information to analyze the expression and its potential function of *ZBTB16* in hepatocellular carcinoma

YU Ling¹, YU Min²[1. *Research and Development Department, 3D Medicines (Beijing) Co. Ltd, Beijing 100176, China*; 2. *Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China*]

Abstract: Zinc finger and BTB domain containing 16 (*ZBTB16*), also known as promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF), acts as a transcriptional repressor in regulating cell cycle, proliferation, differentiation and apoptosis. However, there are few studies on its expression pattern and function in hepatocellular carcinoma (HCC). The expression pattern of *ZBTB16* in the 369 HCC tissues from TCGA database and 160 normal liver tissues from GTEx database was analyzed in this study. Compared to normal liver tissues, the expression of *ZBTB16* was found to be significantly down-regulated in HCC tissues. Western blotting and Real-time quantitative PCR analysis confirmed the down-regulation of *ZBTB16* in HCC clinical samples and HCC cell lines. The expression level of *ZBTB16* was positively correlated with the overall survival of HCC patients. Overexpression of *ZBTB16* in the HCC cell line HepG2 by Ad-*ZBTB16* significantly inhibited cell proliferation, migration and invasion. Further mechanistic studies showed that overexpression of *ZBTB16* significantly inhibited the phosphorylation levels of JAK2 and STAT3. These results suggest that increasing the expression of *ZBTB16* may serve as a target for future HCC treatment.

Key words: hepatocellular carcinoma; zinc finger and BTB domain containing 16; proliferation; migration; invasion