



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.01.007
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2017.01.007
Chinese Journal of General Surgery, 2017, 26(1):37-42.

· 基础研究 ·

BTB/POZ 结构域蛋白 7 假基因 1 在肝细胞癌中的表达及功能的初步研究

陶一明¹, 胡宽¹, 汤参娥², 冯铁诚¹, 王志明¹

(中南大学湘雅医院 1. 肝脏外科 2. 医学科学研究中心, 湖南 长沙 410008)

摘要

目的: 探讨 BTB/POZ 结构域蛋白 7 (BTBD7) 假基因 1 (BTBD7P1) 在肝细胞癌 (HCC) 中的表达及功能。
方法: 检测 106 例配对的 HCC 组织与癌旁组织标本中 BTBD7P1 mRNA 的表达, 分析 BTBD7P1 mRNA 表达与 HCC 患者临床病理特征及预后的关系。用 BTBD7P1 过表达慢病毒载体转染 HCC 细胞系 Bel7404 后, 检测细胞增殖率以及 BTBD7 mRNA 与蛋白的表达。

结果: HCC 组织中 BTBD7P1 相对表达量明显低于癌旁组织为 (0.71 vs. 2.14, $P < 0.05$) ; BTBD7P1 mRNA 低表达与肿瘤大小、卫星灶、分化程度、静脉血管侵犯、出血坏死、HCC 分期明显有关 (均 $P < 0.05$) ; BTBD7P1 mRNA 低表达患者的 1、3、5 年总体生存率及无瘤生存率均明显低于 BTBD7P1 mRNA 高表达患者 (均 $P < 0.05$) 。与转染空载体质粒的对照组 Bel7404 细胞比较, 转染 BTBD7P1 过表达慢病毒载体的 Bel7404 细胞, 细胞增殖能力明显减低, BTBD7 mRNA 表达明显下调 (均 $P < 0.05$) , 但 BTBD7 蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$) 。

结论: BTBD7P1 可能在 mRNA 水平对亲本基因 BTBD7 表达进行调控, 从而参与了 HCC 发生与发展。

关键词

癌, 肝细胞; BTB/POZ 结构域蛋白 7; 拟基因; RNA, 长链非编码
中图分类号: R735.7

Preliminary study of expression and function of BTB/POZ domain-containing protein 7 pseudogene 1 in hepatocellular carcinoma

TAO Yiming¹, HU Kuan¹, TANG Can'e², FENG Tiecheng¹, WANG Zhiming¹

(1. Department of Liver Surgery 2. Research Institute of Medical Sciences, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression of BTB/POZ domain-containing protein 7 (BTBD7) pseudogene 1 (BTBD7P1) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its action.

Methods: The BTBD7P1 mRNA expressions in 106 paired specimens of HCC tissue and its adjacent tissue were determined, and the relations of BTBD7P1 mRNA expression with the clinicopathologic features and prognosis of the HCC patients were analyzed. In HCC Bel7404 cells after transfected with BTBD7P1 overexpression

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81372630); 湖南自然科学基金资助项目 (12JJ3118); 湖南省科学技术厅科技计划资助项目 (2013FJ4112); “湘雅医院——北大未名临床与康复研究基金”资助项目 (xywm2015126)。

收稿日期: 2016-11-20; **修订日期:** 2016-12-18。

作者简介: 陶一明, 中南大学湘雅医院助理研究员, 主要从事肝癌临床与基础方面的研究。

通信作者: 王志明, Email: wzmxcysu@hotmail.com

lentiviral vectors, the proliferation and expressions of BTBD7 mRNA and protein were measured.

Results: The relative expression level of BTBD7P1 mRNA in HCC tissue was significantly lower than that in adjacent tissue (0.71 vs. 2.14, $P < 0.05$); lower expression of BTBD7P1 was significantly associated with tumor size, satellite lesions, degree of differentiation, vascular invasion, hemorrhagic necrosis, and stage of HCC (all $P < 0.05$); the 1-, 3- and 5-year overall and tumor-free survival rates in patients with low BTBD7P1 mRNA expression were significantly lower than those in patients with higher BTBD7P1 mRNA expression (both $P < 0.05$). In Bel7404 cells transfected with BTBD7P1 overexpression lentiviral vectors, the cell proliferation was significantly decreased and the BTBD7 mRNA expression was significantly down-regulated (both $P < 0.05$), but BTBD7 protein expression showed no significant change ($P > 0.05$) compared with control Bel7404 cells transfected with empty vectors.

Conclusion: BTBD7P1 may probably regulate the expression of its parental gene BTBD7 at mRNA level and thereby participate in the occurrence and development of HCC.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; BTB/POZ Domain-Containing Protein 7; Pseudogenes; RNA, Long Noncoding

CLC number: R735.7

BTB/POZ结构域蛋白7 (BTB/POZ domain-containing protein 7, BTBD7) 基因定位染色体14q32.12, 是迄今发现的一个新的癌基因, 具有调控肿瘤细胞发生上皮-间质转化和肿瘤血管塑形的潜在重要功能, 是肝细胞癌 (HCC) 新的上皮间质转化和预后标志物^[1]。BTBD7的假基因 (pseudogene) 1、2 (BTBD7P1、BTBD7P2) 分别定位染色体10p13和10q25, 其序列与BTBD7呈高度同源性, 为高度保守的非编码序列, 属于长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA)^[2]。近年来研究^[3-4]表明, 假基因和lncRNA在肿瘤中存在异常表达, 并且在肿瘤发生过程中有重要的调控作用。笔者通过实时定量RT-PCR检测HCC患者组织标本发现BTBD7P2在HCC组织中少见表达, BTBD7P1在HCC组织中表达水平显著下调, 通过其表达水平与HCC临床病理特征及预后的相关性分析, BTBD7P1可能在HCC发生发展中起重要作用。通过构建BTBD7P1的慢病毒过表达载体, 转染HCC细胞系Bel7404, 检测转染对细胞BTBD7 mRNA、蛋白水平以及细胞增殖的影响。旨在为研究发现HCC发生发展相关新基因提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 HCC 组织标本

HCC组织样本共106例, 为2009—2010年间于中南大学湘雅医院肝脏外科行手术切除的HCC

患者, 均已被告知并签署书面知情同意书。本课题研究内容已报中南大学湘雅医院医学伦理委员会审批备案, 同意实施。HCC确诊根据2010年版世界卫生组织 (WHO) 病理诊断标准。

1.2 细胞系和细胞培养

HCC细胞系Bel7404购自美国保藏物中心 (ATCC), 生长于含体积分数为10%小牛血清、青霉素 (10万U/L) 和链霉素 (10万U/L) 的高糖DMEM培养基中, 置于37℃、体积分数为5% CO₂细胞培养箱孵育。

1.3 SYBR 荧光染料法定量 PCR

PCR引物碱基对序列采用美国哈佛大学引物数据库Primer Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>) 在线设计, 扩增产物约100~250 bp大小, 经Blast程序比对确定引物的特异性后, 由大连TaKaRa生物技术公司合成。取TRIzol[®] Reagent (美国Thermo公司) 提取新鲜HCC组织总RNA, 测定浓度后合成cDNA用于PCR扩增, 用 $\Delta\Delta Ct$ 以来计量表示该样本中目的基因的表达水平。反应体系和扩增条件参照文献。目的基因序列见表1。

1.4 慢病毒载体 pLKO.1-BTBD7P1 过表达质粒构建

由上海吉凯生物技术公司完成, 根据BTBD7P1基因序列, 合成其基因过表达序列; 重组病毒包装、收集和病毒浓缩液滴度检测具体方法参照文献。得到病毒浓缩液, 检测滴度约为 1×10^9 TU/mL。分装后-80℃冻存备用。

表 1 定量 PCR 扩增基因序列

Table 2 Oligonucleotide sequences of specific primers for quantitative real-time PCR

基因	上游引物序列	下游引物序列
BTBD7	5'-AGT CAA ATG CCT GGT TAC GG-3'	5'-TGT CTG GCA CAT TGG ACA TT-3'
BTBD7P1	5'-TTA GCG GAG GAA TAT GAG GGA-3'	5'-CCA AAA TGG CAC GAT GAA CAG-3'
BTBD7P2	5'-GAT CAA GAA GAA CTG ATC AGC C-3'	5'-TAG CTT CGC ATA AAG ATC AGC C-3'
GAPDH	5'-TGT CTG GCA CAT TGG ACA TT-3'	5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3'

1.5 慢病毒质粒转染 Bel7404 细胞

选择 Bel7404 细胞为转染靶细胞^[1]。分为两组: (1) 转染 LV-BTBD7P1 的 Bel7404 细胞组 (Bel7404^{LV-BTBD7P1}); (2) 转染空载体的 Bel7404 细胞 (Bel7404^{LV-Control}) 作为对照组。转染条件和实验操作步骤参照文献^[5]。

1.6 MTT 法检测 Bel7404 细胞增殖抑制率

Bel7404 细胞转染 BTBD7P1 过表达质粒和空载体后观察细胞数目, 实验操作步骤参照文献^[1]。每个实验重复 3 次取平均值。

1.7 Western blot 检测 BTBD7 的表达

胰酶消化离心转染后的 Bel7404 细胞, 4 °C 预冷的 PBS 洗涤, 800 r/min, 离心 2 次收集细胞, RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白, 检测蛋白质浓度。电泳、转膜、封闭液实验操作步骤参照文献。BTBD7 抗体工作浓度为 1:1 000。Bio-Rad Scan 软件

计算条带的灰度值和内参 α -tubulin 灰度值的作为蛋白表达量。每个实验重复 3 次取平均值。

1.8 统计学处理

所有计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示方式表示。P < 0.05 为差异有统计学意义。用 GraphPad Prism 7.01 软件分析制图。

2 结果

2.1 HCC 组织中 BTBD7P1 mRNA 表达水平下调

106 例配对 HCC 组织中 BTBD7P1 mRNA 的表达水平明显低于邻近癌旁肝组织中的表达水平 [(0.71 \pm 0.16) vs. (2.14 \pm 1.44), P < 0.05]; HCC 组织及癌旁肝组织中少见 BTBD7P2 mRNA 表达 (图 1)。

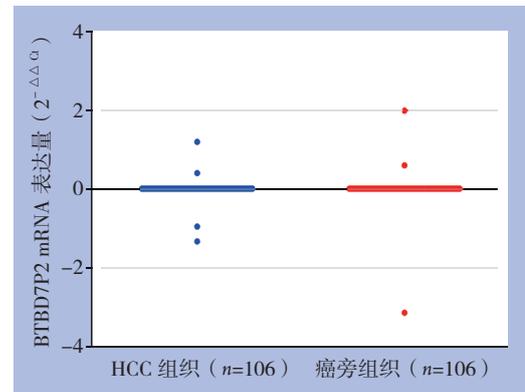
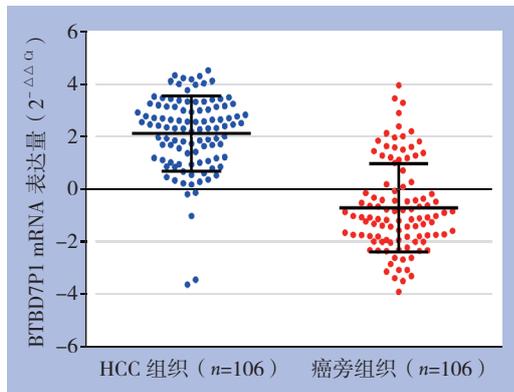


图 1 定量 PCR 检测 BTBD7P1 与 BTBD7P2 的表达

Figure 1 BTBD7P1 and BTBD7P2 expressions detected by real time PCR

2.2 BTBD7P1 表达与 HCC 临床病理特征的关系

根据癌组织中 BTBD7P1 相对表达量低于癌旁肝组织 2 倍为标准分为低表达和高表达。BTBD7P1 低表达与肿瘤大小、卫星灶、分化程度、静脉血管侵犯、出血坏死和 HCC 分期有关 (均 P < 0.05) (表 2)。

2.3 BTBD7P1 mRNA 表达与 HCC 预后的关系

本组 BTBD7P1 mRNA 高表达患者 1、3、5 年总

体生存率分别为 93%、74%、53%, BTBD7P1 mRNA 低表达患者 1、3、5 年总体生存率分别为 77%、44%、18%, 两组间差异有统计学意义 (P < 0.05); BTBD7P1 mRNA 高表达患者 1、3、5 年无瘤生存率分别为 74%、57%、38%, BTBD7P1 mRNA 低表达患者 1、3、5 年无瘤生存率分别为 22%、12%、5%, 两组间差异有统计学意义 (P < 0.05) (图 2)。

表 2 BTBD7P1 mRNA 表达与 HCC 临床病理特征相的关系 [n (%)]

Table 2 Relations of BTBD7P1 mRNA expression with clinicopathologic characteristics of HCC [n (%)]

临床病理特征	n	BTBD7P1		P	临床病理特征	n	BTBD7P1		P
		高表达	低表达				高表达	低表达	
年龄 (岁)					肿瘤包膜				
≤ 60	60	18 (30.0)	42 (70.0)	0.222	无	60	17 (28.3)	43 (71.7)	0.440
> 60	46	9 (19.6)	37 (80.4)		有	46	10 (21.7)	36 (78.3)	
性别					卫星灶				
女	17	7 (37.0)	10 (63.0)	0.105	无	64	9 (14.1)	55 (85.9)	0.001
男	89	20 (22.5)	69 (77.5)		有	42	18 (42.9)	24 (57.1)	
乙肝表面抗原					静脉浸润				
阴性	11	4 (36.3)	7 (63.7)	0.381	无	48	6 (12.5)	42 (87.5)	0.005
阳性	95	23 (24.4)	72 (75.6)		有	58	21 (36.2)	37 (63.8)	
甲胎蛋白 (ng/mL)					分化程度				
≤ 20	31	11 (35.5)	20 (64.5)	0.128	I~II	71	13 (18.3)	58 (81.7)	0.016
> 20	75	16 (21.3)	59 (78.7)		III~IV	35	14 (40.0)	21 (60.0)	
肝硬化					出血坏死				
无	19	7 (36.8)	12 (63.2)	0.209	无	72	12 (16.7)	60 (83.3)	0.002
有	87	20 (22.9)	67 (77.1)		有	34	15 (44.1)	19 (55.9)	
肿瘤大小 (cm)					TNM 分期				
≤ 5	56	9 (16.1)	47 (83.9)	0.019	I	51	8 (15.7)	43 (84.3)	0.026
> 5	50	18 (36.0)	32 (64.0)		II~III	55	19 (34.5)	36 (65.4)	
肿瘤数目					BCLC 分期				
单个	49	15 (30.6)	34 (69.4)	0.260	A	59	10 (16.9)	49 (83.1)	0.024
多个	57	12 (21.1)	45 (78.9)		B~C	47	17 (36.2)	30 (63.8)	

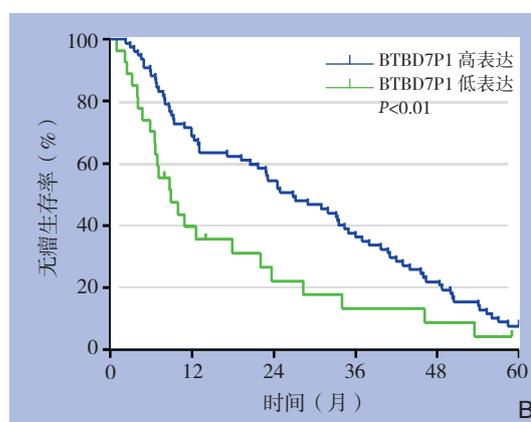
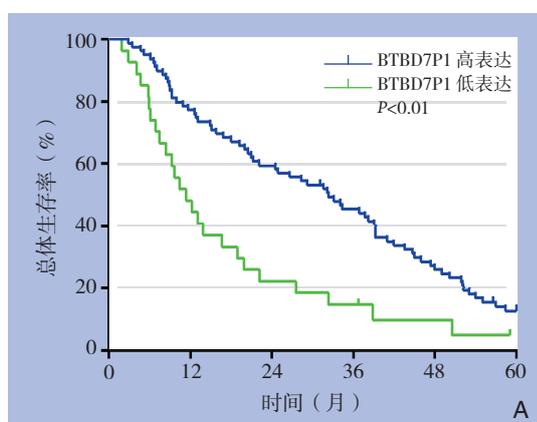


图 2 不同 BTBD7P1 mRNA 表达水平患者生存情况比较 A: 总体生存曲线; B: 无瘤生存曲线

Figure 2 Comparison of the survival conditions between patients with different BTBD7P1 mRNA expression levels A: Overall survival curves; B: Tumor-free survival curves

2.4 过表达 BTBD7P1 抑制 HCC 细胞增殖

活细胞计数检测 Bel7404 细胞增殖的变化 (图 3)。转染 LV-BTBD7P1 的 Bel7404 细胞组 (Bel7404^{LV-BTBD7P1}) 与对照组细胞 (Bel7404^{LV-Control}) 比较, 细胞数明显减少 ($P < 0.05$)。

2.5 BTBD7P1 抑制 HCC 细胞的 BTBD7 mRNA 表达

通过 RT-PCR 方法检测 Bel7404^{LV-BTBD7P1} 和

Bel7404^{LV-Control} 细胞中 BTBD7 mRNA 表达水平, 结果显示, Bel7404^{LV-BTBD7P1} 细胞中 BTBD7 mRNA 表达水平较 Bel7404^{LV-Control} 细胞明显下调 ($P < 0.05$) (图 4)。通过 Western blot 检测两组细胞中 BTBD7 蛋白表达变化, 结果显示, 两组细胞 BTBD7 蛋白表达无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 5)。

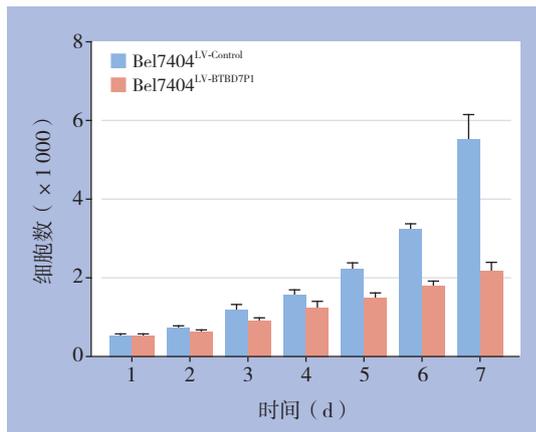


图3 MTT 检测结果

Figure 3 Results of MTT assay

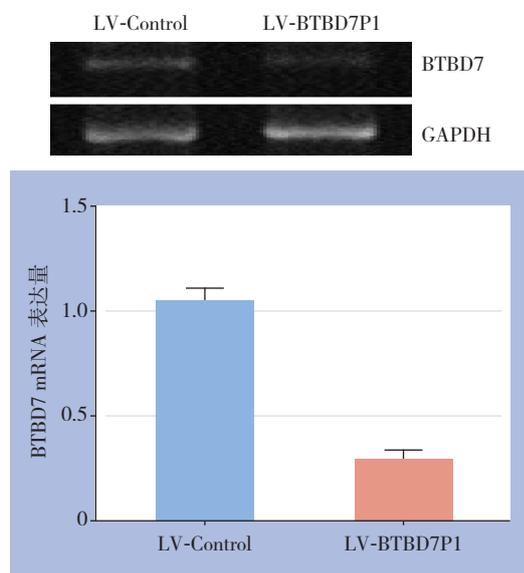


图4 BTBD7 mRNA 表达检测

Figure 4 Measurement of BTBD7 mRNA expression

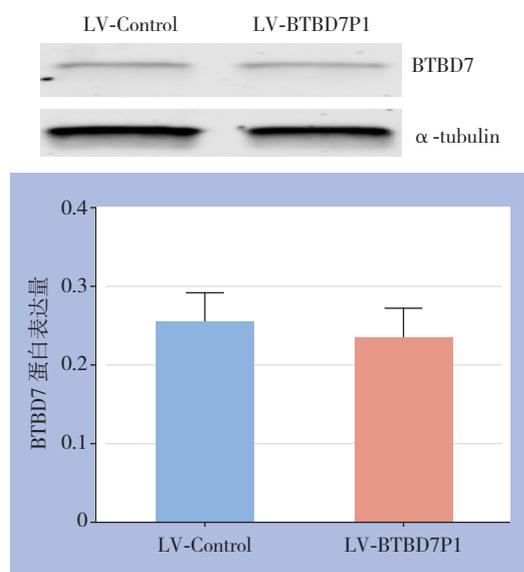


图5 BTBD7 蛋白表达检测

Figure 5 Measurement of BTBD7 protein expression

3 讨论

HCC是我国常见恶性肿瘤之一。进一步探索研究新基因的功能与HCC发生发展的关系,对揭示HCC发生、发展的精确分子机制、设计合理的治疗药物及判断预后,进一步提高我国HCC的治疗水平具有重要意义。

BTBD7基因是近年来新发现的一种上皮间质转化调控关键基因,定位于人类染色体14q32.12区域,约1 233 bp大小,其结构中包括BTB/POZ结构域,CAAT增强蛋白 β (C/EBP- β),GATA和AP-1转录子位点^[6]。BTBD7首次被发现是因其在可引导上皮细胞发生“分支形态”(branching morphogenesis)改变过程中发挥了重要作用^[7]。已有的研究^[8]显示,BTBD7基因也称FUP1,最先是肝脏细胞中克隆发现被鉴定,其在肝脏组织表达有相对特异性,并被证实HCC细胞系中表达上调。笔者^[1]前期研究中证实:BTBD7表达诱导HCC细胞发生上皮间质转化表型,并激活下游RhoC-ROCK2-FAK通路信号,促使HCC细胞分泌较多的基质金属蛋白酶2/9(MMP-2/9)。目前调控BTBD7表达研究鲜见报道。

新近研究^[9]表明,假基因异常表达可能在肿瘤发生中起重要作用。部分假基因对其功能基因有调节作用^[10]。而且特异性假基因表达可作为肿瘤的预测因子,诸如AOC4P^[11]、OCT4^[12]、INTS6P1^[13]等。目前关于BTBD7假基因(BTBD7P1和BTBD7P2)在HCC及其他恶性肿瘤发生发展关系未见报道。本研究结果显示,在HCC患者组织中的BTBD7P1表达水平显著低于癌旁组织,临床病理相关性分析发现BTBD7P1低表达水平与HCC的侵袭转移及预后密切相关,提示BTBD7P1的表达水平与HCC的发生可能存在一定关系。目前BTBD7P1在HCC表达下调的原因尚不清楚,可能涉及缺氧微环境的调节^[14]或表观遗传调控机制^[15]。

本研究发现BTBD7P1可抑制亲本基因BTBD7 mRNA的表达,但对BTBD7蛋白表达无影响,提示BTBD7P1可能扮演了内源性小RNA(esRNA)^[16]或内源性竞争环状RNA(ceRNA)重要角色^[17]。BTBD7P1具有与亲本功能基因BTBD7编码的蛋白质一样的功能,即抑制HCC细胞生长。说明BTBD7P1不需要通过BTBD7蛋白发挥作用,但具体调控机理尚有待进一步探索。

已有研究证据表明,假基因可通过竞争性地结合 miRNA 调控功能基因的表达,从而抑制或者促进肿瘤的发生发展^[18]。提示上述作用分子机制可能是 BTBD7 mRNA 及 BTBD7P1 转录产物竞争某同一种或几种 microRNA,激活不同信号通路发挥功能得以实现,其中哪些是起决定性因素的 microRNA 调节或者可能参与的信号途径值得进一步深入研究^[19-20]。

参考文献

- [1] Tao YM, Huang JL, Zeng S, et al. BTB/POZ domain-containing protein 7: Epithelial-mesenchymal transition promoter and prognostic biomarker of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2013, 57(6):2326-2337. doi: 10.1002/hep.26268.
- [2] Han L, Yuan Y, Zheng S, et al. The Pan-Cancer analysis of pseudogene expression reveals biologically and clinically relevant tumour subtypes[J]. *Nat Commun*, 2014, 5:3963. doi: 10.1038/ncomms4963.
- [3] Polisenio L, Marranci A, Pandolfi PP. Pseudogenes in human cancer[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2015, 2:68. doi: 10.3389/fmed.2015.00068.
- [4] Dickson I. Hepatocellular carcinoma: A role for lncRNA in liver cancer[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(3):122-123. doi: 10.1038/nrgastro.2016.21.
- [5] Tao Y, Hu K, Tan F, et al. SH3-domain binding protein 1 in the tumor microenvironment promotes hepatocellular carcinoma metastasis through WAVE2 pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14):18356-18370. doi: 10.18632/oncotarget.7786.
- [6] Xu L, Wei Y, Reboul J, et al. BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3[J]. *Nature*, 2003, 425(6955):316-321.
- [7] David R. Development: BTBD7 branches out[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(9):605. doi: 10.1038/nrm2963.
- [8] Pan W, Zhang Q, Xi QS, et al. FUP1, a gene associated with hepatocellular carcinoma, stimulates NIH3T3 cell proliferation and tumor formation in nude mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 286(5):1033-1038.
- [9] Kalyana-Sundaram S, Kumar-Sinha C, Shankar S, et al. Expressed pseudogenes in the transcriptional landscape of human cancers[J]. *Cell*, 2012, 149(7):1622-1634. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.041.
- [10] Chen X, Zhu H, Wu X, et al. Downregulated pseudogene CTNNA1 promote tumor growth in human cancer by downregulating its cognate gene CTNNA1 expression[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(34):55518-55528. doi: 10.18632/oncotarget.10833.
- [11] Wang TH, Lin YS, Chen Y, et al. Long non-coding RNA AOC4P suppresses hepatocellular carcinoma metastasis by enhancing vimentin degradation and inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27):23342-23357.
- [12] Wang L, Guo ZY, Zhang R, et al. Pseudogene OCT4-pg4 functions as a natural micro RNA sponge to regulate OCT4 expression by competing for miR-145 in hepatocellular carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(8):1773-1781. doi: 10.1093/carcin/bgt139.
- [13] Peng H, Ishida M, Li L, et al. Pseudogene INTS6P1 regulates its cognate gene INTS6 through competitive binding of miR-17-5p in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8):5666-5677.
- [14] Wang TH, Yu CC, Lin YS, et al. Long noncoding RNA CPS1-IT1 suppresses the metastasis of hepatocellular carcinoma by regulating HIF-1 α activity and inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28):43588-43603. doi: 10.18632/oncotarget.9635.
- [15] Scarola M, Comisso E, Pascolo R, et al. Epigenetic silencing of Oct4 by a complex containing SUV39H1 and Oct4 pseudogene lncRNA [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:7631. doi: 10.1038/ncomms8631.
- [16] Chan WL, Chang JG. Pseudogene-derived endogenous siRNAs and their function[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1167:227-239. doi: 10.1007/978-1-4939-0835-6_15.
- [17] Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition[J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 344-352. doi: 10.1038/nature12986.
- [18] Rutnam ZJ, Du WW, Yang W, et al. The pseudogene TUSC2P promotes TUSC2 function by binding multiple microRNAs[J]. *Nat Commun*, 2014, 5:2914. doi: 10.1038/ncomms3914.
- [19] Schmitt AM, Chang HY. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways[J]. *Cancer cell*, 2016, 29(4):452-463. doi: 10.1016/j.ccell.2016.03.010.
- [20] Shi X, Nie F, Wang Z, et al. Pseudogene-expressed RNAs: a new frontier in cancers[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(2):1471-1478. doi: 10.1007/s13277-015-4482-z.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 陶一明, 胡宽, 汤参娥, 等. BTB/POZ结构域蛋白7假基因1在肝细胞癌中的表达及功能的初步研究[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(1):37-42. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.01.007

Cite this article as: Tao YM, Hu K, Tang CE, et al. Preliminary study of expression and function of BTB/POZ domain-containing protein 7 pseudogene 1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Chin J Gen Surg*, 2017, 26(1):37-42. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.01.007