

过表达 BTF2 对肝癌 Bel-7402 细胞侵袭和迁移的影响

张畅 周浮杨 郑宇航 魏超越 王璎珞 孙艳

【摘要】 目的 探讨碱性亮氨酸拉链转录因子 2 (BTF2) 过表达对肝癌 Bel-7402 细胞侵袭迁移的影响。**方法** 利用 Lipofectamine 3000 Reagent 脂质体转染法进行肝癌 Bel-7402 细胞转染,以转染 pcDNA3.1 空载体的 Bel-7402 细胞和转染 pcDNA3.1-BTF2 的 Bel-7402 细胞为研究对象,利用 Western blot 法检测转染后 Bel-7402 细胞的 BTF2 蛋白表达水平,Transwell 小室检测转染后 Bel-7402 细胞侵袭能力,细胞划痕实验检测转染后 Bel-7402 细胞迁移能力。**结果** 相较于 pcDNA3.1 组,pcDNA3.1-BTF2 组蛋白表达量显著增加,差异具有显著性 ($P<0.05$);pcDNA3.1 组侵袭穿膜的细胞数为 (108.5 ± 27.7) 个,而 pcDNA3.1-BTF2 组侵袭穿膜的细胞数为 (45.6 ± 17.9) 个,pcDNA3.1-BTF2 组细胞穿膜数量明显减少 ($P<0.05$);pcDNA3.1 组迁移距离为 (90.15 ± 27.58) μm ,而 pcDNA3.1-BTF2 组迁移距离为 (51.46 ± 16.17) μm ,pcDNA3.1-BTF2 组细胞迁移距离明显缩短 ($P<0.05$)。**结论** BTF2 过表达能够抑制肝癌细胞 Bel-7402 侵袭和迁移能力。

【关键词】 BTF2; 肝癌; 侵袭; 迁移

[中图分类号] R735.7 [文献标识码] A DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2022.04.001

Effect of over-expression of BTF2 on invasion and migration of hepatoma Bel-7402 cells Zhang Chang, Zhou Fuyang, Zheng Yuhang, Wei Chaoyue, Wang Yingluo, Sun Yan. School of basic medical science (Zhang Chang, Zhou Fuyang, Zheng Yuhang, Wei Chaoyue, Wang Yingluo), school of medical technology (Sun Yan), Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang, 161000, China.

Corresponding author: Sun Yan, Email: 1600501183@qq.com.

【Abstract】 Objective To investigate the effects of over-expression of basic leucine zipper transcription factor 2 (BTF2) on the invasion and migration of hepatoma Bel-7402 cells. **Methods** The Lipofectamine 3000 Reagent liposome transfection method was used to transfect liver cancer Bel-7402 cells. Bel-7402 cells transfected with pcDNA3.1 empty carrier and Bel-7402 cells transfected with pcDNA3.1-BTF2 were taken as research objects. The expression level of BTF2 protein in transfected Bel-7402 cells was detected by Western blot, the invasive ability of transfected Bel-7402 cells was detected by Transwell chamber, and the migration ability of transfected Bel-7402 cells was detected by cell scratch test. **Results** Compared with the pcDNA3.1 group, the histone expression of pcDNA3.1-BTF2 was significantly increased and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The number of cells penetrating the membrane in the pcDNA3.1 group was (108.5 ± 27.7) , while that in the pcDNA3.1-BTF2 group was (45.6 ± 17.9) . The number of cells penetrating the membrane in the pcDNA3.1-BTF2 group was significantly decreased ($P<0.05$). The migration distance in the pcDNA3.1 group was (90.15 ± 27.58) μm , while that in the pcDNA3.1-BTF2 group was (51.46 ± 16.17) μm . The cell migration distance in the pcDNA3.1-BTF2 group was significantly shortened ($P<0.05$). **Conclusions** Over-expression of BTF2 could inhibit the invasion and migration of hepatoma cell Bel-7402.

【Keywords】 BTF2; Liver cancer; Invasion; Migration

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 以其高复发,高病死率等特点排在我国常见恶性肿瘤前列。2012 年全球 HCC 发病人数为 782 500 例,因 HCC 死亡的人数为 745 500 例,而我国 HCC 发病和死亡人数约占全球总人数的 50%^[1]。HCC 患者多数确诊时已经处于中晚期,约有 90% 的确诊患者无法通过手术切除肿瘤,对于手术切除的 HCC 患者术后

复发率仍然高达 70%^[2]。碱性亮氨酸拉链转录因子 2 (BTF2) 属于 AP-1 转录因子家族成员,其被发现多种人体正常组织中广泛表达,而在多种肿瘤组织中表达下降或缺失^[3-4]。我们之前的研究已经证实了过表达 BTF2 能够抑制肝癌 Bel-7402 细胞的增殖能力,但 BTF2 与肝癌细胞侵袭和迁移之间的关系尚未明确。为了进一步探讨 BTF2 在肝癌中的功能,我们利用构建的 BTF2 真核表达质粒,将其转入肝癌 Bel-7402 细胞中,观察其对 Bel-7402 细胞侵袭和迁移的影响。

一、材料与方法

1. 材料、主要仪器和试剂:肝癌细胞株 Bel-7402 (购于中科院上海细胞生物研究所)。电子天平

基金项目:黑龙江省大学生创新创业训练计划项目 (201911230002)

作者单位:161000 黑龙江齐齐哈尔 齐齐哈尔医学院基础医学院 (张畅,周浮杨,郑宇航,魏超越,王璎珞);161000 黑龙江齐齐哈尔 齐齐哈尔医学院医学技术学院 (孙艳)

通信作者:孙艳,Email:1600501183@qq.com

(METTLER TOLEDO)、酶标仪(瑞士 Tecan)、低温离心机(德国 eppendorf)、BATF2 抗体和 GAPDH 抗体(武汉三鹰)、羊抗兔二抗(Abacm)、MTT 粉末(Sigma)、RPMI-1640 培养基和胎牛血清(Hyclone)、6 孔细胞培养板和 96 孔细胞培养板(Corning)、DMSO(Solarbio)。

2.方法:(1)细胞培养:用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI-1640 完全培养基,置于 5% CO₂、37 ℃ 恒温恒湿的培养箱内培养,每天换液 1 次。(2)pcDNA3.1-BATF2 质粒转染 将 5×10^5 个/孔的 Bel-7402 细胞接种于 6 孔板中,每孔加入 2 ml RPMI-1640 完全培养液,待细胞达到 90% 融合度时,弃去培养基,每孔加入 500 μ l Opti-MEM 培养基。依照 Lipofectamine 3000 Reagent 说明书进行 pcDNA 3.1 空载体和 pcDNA3.1-BATF2 质粒的转染。(3)Western blot 检测 BATF2 蛋白的表达 转染 48 h 后收集转染细胞,加入 RIPA 裂解液提取蛋白,应用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。定量后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,5% 脱脂奶粉封闭过夜,然后加一抗 37 ℃ 孵育 5 h, TBST 洗涤 4 次,加二抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤 4 次, ECL 显影,凝胶成像系统拍照。(4)细胞划痕实验 6 孔板中 Bel-7402 细胞融合度达到 90%,用枪头比着直尺垂直划痕,随后弃去培养基再更换含 1% 血清的培养基。48 h 后观察细胞迁移状况,并拍照。(5)transwell 小室实验:用浓度为 400 μ g/ml 的 matrigel 胶稀释液 50 μ l 包被 Transwell 小室,4 ℃ 风干过夜,使用时提前 2 h 将小室置于 37 ℃ 水化。细胞消化后用无血清培养基重悬,上室中加入 200 μ l 细胞悬液(浓度为 2×10^6 个/ml),下室中加入 500 μ l 完全培养基。孵育 48 h 后,4% 多聚甲醛固定,0.1% 结晶紫染色,显微镜观察并拍照,随机选取 5 个视野计算平均值。

3.统计学处理:应用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1.过表达 BATF2 效率检测:Western blot 检测过表达 BATF2 效率,结果显示,与 pcDNA 3.1 组比较,pcDNA3.1-BATF2 组蛋白表达量显著增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

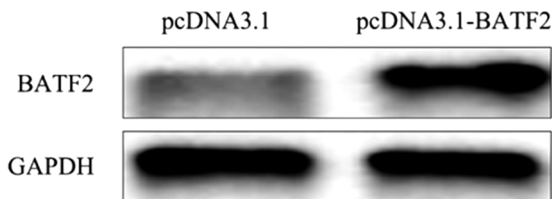


图 1 Western Blot 检测转染后细胞中 BATF2 表达水平

2.过表达 BATF2 对 Bel-7402 细胞侵袭能力的影响:Transwell 小室检测结果显示,pcDNA3.1 组侵袭穿膜的细胞数为 (108.5 ± 27.7) 个,而 pcDNA3.1-BATF2 组侵袭穿膜的细胞数为 (45.6 ± 17.9) 个,pcDNA3.1-BATF2 组细胞侵袭能力明显小于 pcDNA3.1 组,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

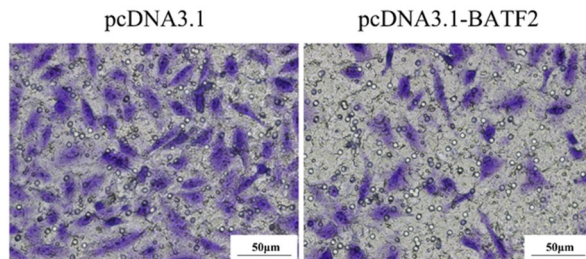


图 2 Transwell 实验检测转染后细胞侵袭能力($\times 100$)

3.过表达 BATF2 对 Bel-7402 细胞迁移能力的影响:划痕结果显示,pcDNA 3.1 组迁移距离为 (90.15 ± 27.58) μ m,而 pcDNA3.1-BATF2 组迁移距离为 (51.46 ± 16.17) μ m,pcDNA 3.1-BATF2 组细胞迁移能力明显小于 pcDNA 3.1 组,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

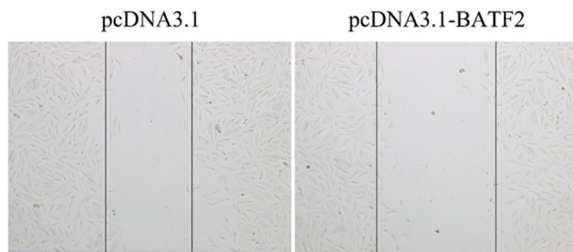


图 3 细胞划痕实验检测转染后细胞迁移能力($\times 100$)

讨论 目前我国原发性肝癌的发病率位居恶性肿瘤第四位,而其致死率更是高达第三位,WHO 根据以往的数据更是预测出 2030 年全世界将有 100 万以上死于肝癌的患者^[5-6]。HCC 作为一种常见的原发性肝癌,其发病率约占所有肝癌的 90%,其病情发展迅速并且预后较差^[7]。侵袭和转移是肿瘤恶性表型的重要标志,同时也是导致肝癌患者死亡的主要原因之一^[8]。目前研究表明,肿瘤侵袭和转移主要分为黏附、降解和迁移三步,这三个过程相互协调,肿瘤细胞在初始阶段通过膜表面受体黏附在基底膜上,接着分泌蛋白酶将基底膜和基质降解,然后运动穿越过基底膜和基质,最后通过淋巴管和血管转移到远处^[9-11]。因此探寻 HCC 的侵袭转移的发病机制并寻找有效的 HCC 的分子标志物,做到早期诊断并及时治疗,可以大大的改善患者的预后及生存状况。

BATF2 基因由三个外显子构成,是一个含有 274 个氨基酸残基的蛋白^[12]。多篇报道显示 BATF2 与口腔鳞状细胞癌、结直肠癌、食管癌、前列腺癌、肝癌

等癌症的发生预后关系密切,且 BATF2 在多种癌症中表达下调或缺失^[13-20]。对多种肿瘤的研究发现,这些肿瘤的临床病理特征(如 TNM 分期、浸润程度、分化程度、淋巴结转移等因素)与 BATF2 的表达水平具有相关性^[21-23]。Wang 等^[24]对肺腺癌的研究发现,BATF2 可能参与了肺腺癌的 EMT 过程。Zhou 等^[25]研究发现,50.26%的非小细胞肺癌组织中存在 BATF2 低表达的情况,且 BATF2 低表达的患者预后明显比 BATF2 高表达的患者要差。Chen 等^[26]研究发现,BATF2 过表达能够抑制前列腺细胞 DU145 的侵袭和迁移能力,而沉默 BATF2 则得到了相反的结果。Liu 等^[27]通过构建结直肠癌 Lovo 细胞的荷瘤鼠模型,发现 BATF2 过表达能够抑制荷瘤鼠肿瘤的生长、侵袭和转移的特性。虽然 BATF2 在恶性肿瘤的侵袭转移中发挥了重要作用,但其对肝癌细胞侵袭和转移的影响和具体机制尚不明确。

本研究通过 PCR 技术成功的从正常人外周血单核细胞中钓取了 BATF2 基因全长编码序列,并连接到了 pcDNA3.1 真核表达载体上,成功构建了 pcDNA3.1-BATF2 重组质粒。并将重组后的质粒转入 Bel-7402 细胞中,Western blot 结果显示转染 pcDNA3.1-BATF2 重组质粒的细胞 BATF2 蛋白表达量显著增加。在侵袭和转移的过程中,肿瘤细胞进入淋巴管和血管之前必须要穿过基底膜,因此,肿瘤细胞穿膜能力是其侵袭和迁移能力的重要考察因素之一。本研究通过 Transwell 小室实验观察发现过表达 BATF2 后,Bel-7402 细胞穿膜的数量明显减少,表明过表达 BATF2 能够抑制 Bel-7402 细胞的侵袭能力。划痕实验结果也显示过表达 BATF2 后,Bel-7402 细胞向划痕中央迁移速度放缓显著,表明过表达 BATF2 能够抑制 Bel-7402 细胞的迁移能力。

综上所述,上调 BATF2 基因表达能够抑制肝癌细胞 Bel-7402 侵袭和迁移的生物学行为,BATF2 有作为肝癌标志物以及治疗靶点的潜能,但其具体的分子机制尚未明确,还有待于进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] 胡啸,王艳杰,陈德.过表达钾离子通道调节蛋白抑制肝癌细胞增殖、迁移及侵袭[J].肿瘤,2018,38(6):535-543.
- [2] Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, et al. Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2008, 134(7): 1908-1916.
- [3] 薛龔,傅晓萌,郑金源,等. SARI 过表达对 CBFL 细胞凋亡的影响及其机制[J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(4): 1020-1025.
- [4] 付晓红,许志臻,钟丹,等.白藜芦醇上调 BATF2 表达及抑制肝癌细胞增殖的研究[J].重庆医学,2016,45(23):3193-3195+3200.
- [5] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [6] 周强,1,6-O, O-二乙酰旋覆花内酯的药代动力学及其诱导 HepG2 肝癌细胞凋亡机制的研究[D]. 吉林大学, 2019.
- [7] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. Lancet [J]. 2018, 391(10127): 1301-1314.
- [8] Lv G, Wu M, Wang M, et al. miR-320a regulates high mobility group box 1 expression and inhibits invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2017, 37(9): 1354-1364.
- [9] Makrilia N, Kollias A, Manolopoulos L, et al. Cell adhesion molecules; role and clinical significance in cancer [J]. Cancer Invest, 2009, 27(10): 102-1037.
- [10] Shin BA, Yoo HG, Kim HS, et al. P38 MAPK pathway is involved in the urokinase plasminogen activator expression in human gastric SNU-638 cells[J]. Oncol Rep, 2003, 5: 1467-1471.
- [11] 刘旺根,张钦宪,王云龙,等. ER-α36 过表达促进人乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭转移能力[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(6): 713-717.
- [12] Su ZZ, Lee SG, Emdad L, et al. Cloning and characterization of SARI (suppressor of AP-1, regulated by IFN) [J]. P Natl Acad Sci USA, 2008, 105(52): 20906 - 20911.
- [13] 周杰. BATF2 的表达与结直肠癌预后相关并介导增殖抑制作用[D]. 第三军医大学, 2014.
- [14] Guler R, Roy S, Suzuki H, Brombacher F. Targeting Batf2 for infectious diseases and cancer [J]. Oncotarget, 2015, 6(29): 26575-26582.
- [15] Han T, Wang Z, Yang Y, et al. The tumor-suppressive role of BATF2 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Oncol Rep, 2015, 34(3): 1353.
- [16] Dash R, Su ZZ, Lee SG, et al. Inhibition of AP-1 by SARI negatively regulates transformation progression mediated by CCN1 [J]. Oncogene, 2010, 29(31): 4412-4423.
- [17] Zhang YX, Yan L, Liu GY, et al. Inhibition of janus kinase2 by compound AG490 suppresses the proliferation of MDA-MB-231 cells via up-regulating SARI (suppressor of AP-1, regulated by IFN) [J]. Iran J Basic Med Sci, 2015, 18(6): 599-603.
- [18] Yang W, Wu B, Ma N, et al. BATF2 reverses multidrug resistance of human gastric cancer cells by suppressing Wnt/β-catenin signaling [J]. In Vitro Cellular Dev-PL, 2019, 55(6): 445-452.
- [19] Wen H, Chen Y, Hu Z, et al. Decreased expression of BATF2 is significantly associated with poor prognosis in oral tongue squamous cell carcinoma [J]. Oncol Rep, 2014, 31(1): 169-174.
- [20] Huang W, Zhang C, Cui M, et al. Inhibition of Bevacizumab-induced Epithelial-Mesenchymal Transition by BATF2 Overexpression Involves the Suppression of Wnt/β-Catenin Signaling in Glioblastoma Cells [J]. Anticancer Res, 2017, 37(8): 4285-4294.
- [21] Liu ZB, Yang Y, Ye XG, et al. Expression and significance of SARI and CCN1 in human colorectal carcinomas [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2011, (9): 2397-2401.
- [22] Yang W, Zhao S, Wu B, et al. BATF2 inhibits chemotherapy resistance by suppressing AP-1 in vincristine-resistant gastric cancer cells [J]. Cancer Chemoth Pharm, 2019, 84(1): 1-10.
- [23] Xie JW, Huang XB, Chen QY, et al. m6A modification-mediated BATF2 acts as a tumor suppressor in gastric cancer through inhibition of ERK signaling [J]. Molecular Cancer, 2020, 19(1): 114.
- [24] Wang C, Su Y, Zhang L, et al. The function of SARI in modulating epithelial-mesenchymal transition and lung adenocarcinoma metastasis [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e38046.
- [25] Zhou RJ, Shi Z, Zhou K, et al. Decreased SARI expression predicts poor prognosis of Chinese patients with non-small cell lung cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(10): 2056-2063.
- [26] Chen Q, Gu Y, Zhang S, et al. Effects and mechanisms of action of SARI on androgen-independent prostate cancer (DU145) cells [J]. Tumor Biology, 2016.
- [27] Liu Z, Wei P, Yang Y, et al. BATF2 Deficiency Promotes Progression in Human Colorectal Cancer via Activation of HGF/MET Signaling: A Potential Rationale for Combining MET Inhibitors with IFNs [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(7): 1752-1763.

(收稿日期: 2021-07-06)