

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2025.01.001

❖ 基础医学研究 ❖

# RNA 结合蛋白 ZCCHC17 对肝细胞癌的增殖、迁移、侵袭能力的影响

梁家东<sup>1</sup>, 刘舂琳<sup>2</sup>, 黄云美<sup>1,2</sup>, 杨伟鹏<sup>1,2</sup>, 罗春英<sup>1,3</sup>

(右江民族医学院, 1. 附属医院病理科; 2. 研究生院; 3. 广西肝胆疾病分子病理学重点实验室, 广西 百色 533000)

**【摘要】目的:** 探讨 RNA 结合蛋白 ZCCHC17 对肝细胞癌增殖、迁移、侵袭能力的影响。**方法:** 采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测所选择不同细胞株 ZCCHC17 的表达水平; 克隆形成实验、CCK-8 实验、划痕实验及 Transwell 侵袭实验检测细胞株增殖、迁移、侵袭能力。**结果:** ZCCHC17 在人正常肝细胞株 L02 中低表达 ( $P > 0.05$ ); 在肝细胞癌 Bel7404 细胞株中高表达 ( $P < 0.05$ ), 在肝细胞癌 MHCC97H 细胞株中低表达 ( $P > 0.05$ )。克隆形成实验及 CCK-8 实验结果显示, 敲低 ZCCHC17 后 Bel7404 细胞株的增殖能力减弱 ( $P < 0.05$ ); 划痕实验结果显示, 敲低 ZCCHC17 后 Bel7404 细胞株的迁移能力减弱 ( $P < 0.05$ ); Transwell 实验结果显示, 敲低 ZCCHC17 后 Bel7404 细胞株的侵袭能力减弱 ( $P < 0.05$ )。**结论:** ZCCHC17 高表达能促进肝细胞癌的增殖、迁移、侵袭能力。

**【关键词】** ZCCHC17; 肝细胞癌; 增殖; 迁移; 侵袭

**【中图分类号】** R735.7 **【文献标志码】** A

## Effect of RNA binding protein ZCCHC17 on the proliferation, migration, and invasion capacity of hepatocellular carcinoma

LIANG Jia-dong<sup>1</sup>, LIU Xi-lin<sup>2</sup>, HUANG Yun-mei<sup>1,2</sup>, YANG Wei-peng<sup>1,2</sup>, LUO Chun-ying<sup>1,3</sup>

(1. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities; 2. Graduate School; 3. The Key Laboratory of Molecular Pathology of Hepatobiliary Diseases, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**【Abstract】Objective:** To explore the effect of RNA binding ZCCHC17 on proliferation, migration and invasion ability of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** RT-qPCR and Western blot were used to detect the expression levels of the cell lines ZCCHC17 selected. Then, the proliferation, migration, and invasion ability of cell lines were examined by clonformation assay, CCK-8 assay, scratch assay and Transwell invasion assay. **Results:** ZCCHC17 was lowly expressed in human normal liver cell line L02 ( $P > 0.05$ ), high expression was observed in the Bel7404 hepatocellular carcinoma cell line ( $P < 0.05$ ), and low expression was observed in the MHCC97H hepatocellular carcinoma cell line was diminished after ZCCHC17 knockdown ( $P > 0.05$ ). The results of clone formation assay and CCK-8 showed that the proliferation of Bel7404 cell lines was diminished after ZCCHC17 knockdown ( $P < 0.05$ ), the scratch test results showed that the migration ability of Bel7404 cell lines decreased ( $P < 0.05$ ), the Transwell experiment showed that the invasion ability of Bel7404 cell lines was weakened ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** High expression of ZCCHC17 can promote the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma.

**【Key words】** ZCCHC17; Hepatocellular carcinoma; Proliferation; Migration; Invasion

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 在致命癌症中仅次于肺癌排名第二。目前临床治疗方法主要有手术切除、化疗和放疗, 或两者的结合<sup>[1]</sup>。最近研究<sup>[2]</sup>表明, 表观遗传变化 (如组蛋白的乙酰化和甲基化及 DNA 甲基化) 参与了 HCC 的发展。同时, 使用免疫检查点抑制剂、CAR-T 及 TCR-T 疗法靶向免疫逃避

的新策略也显示出有希望的结果<sup>[3]</sup>。晚期肝细胞癌中, 部分患者明显收益于索拉非尼、阿霉素、5-氟尿嘧啶和铂类药物等治疗药物。但导致预后不良的主要原因是大多数 HCC 患者最终会产生耐药性, 而耐药性机制复杂且不确定<sup>[4]</sup>。HCC 的病因学研究取得了长足的进展, 但其发生发展的确切分子机制及耐药机制仍未完全阐明。

**基金项目:** 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研项目 (Z-L20220868); 右江民族医学院校级科研项目 (yy2021sk042); 广西壮族自治区百色市区域多发病联合专项 [百科学 (2022) 41 号 - 4]

**作者简介:** 梁家东 (1978 -), 男, 硕士, 副主任技师。E-mail: 80686713@qq.com

**通讯作者:** 罗春英。E-mail: chun2005008@163.com

锌指蛋白是人类基因组中最大的转录因子家族。锌指基序的多种组合和功能使锌指蛋白在生物过程中具有多样性,包括发育、分化、代谢和自噬等<sup>[5]</sup>。ZCCHC17 (zinc finger CCHC-type containing 17 Gene)是阿尔茨海默病(AD)中突触基因功能障碍的推定主调节因子,ZCCHC17 蛋白在 AD 脑组织早期下降,发生在神经胶质增生或神经元丢失之前<sup>[6]</sup>。前期研究<sup>[7]</sup>发现,ZCCHC17 在肝细胞癌组织中呈高表达,在对应癌旁组织中呈低表达,且其表达与临床病理的部分特征存在相关性,高表达提示 HCC 的治疗预后差;DNA 甲基化参与 ZCCHC17 表达的调控;HCC 免疫治疗反应与 ZCCHC17 表达水平相关。本研究旨在探讨 RNA 结合蛋白 ZCCHC17 对肝细胞癌增殖、迁移、侵袭能力的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人正常肝细胞株(LO2)和肝细胞癌细胞株(Bel7404, MHCC97H)购于中科院上海生物化学与细胞生物研究所。DMEM 培养基(8122550)与澳洲胎牛血清(A3161001C)购于 Gibco;即用型 BCA 蛋白定量测定盒(01561050)、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒(02391100P)、三色 Marker(026B12000)、P-ECL 化学发光试剂盒(19072033)购于碧云天;ZCCHC17 抗体(PA5-103989)购于 ThermoFisher;TRIzol Reagent(284910)购于 Ambion;Monad SYBR qPCR Mix(130613)购于武汉莫纳;ZCCHC17 引物序列及 siRNA(E607402)购于上海生工;Molecular 多功能酶标仪 spectraMaxi3x(美国 Molecular Devices);实时荧光定量聚合酶链式反应 LightCycler-96(罗氏)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及 siRNA 转染 人正常肝细胞株(LO2)和肝细胞癌细胞株(Bel7404, MHCC97H)在完全培养基(含 10% 的血清)中于培养箱中培养(5% CO<sub>2</sub>, 37 °C),取对数生长期的细胞接种 6 孔板中,细胞密度达到 50% 进行 siRNA 转染(按上海生工说明书)。培养 24 h 后,提取 RNA,RT-qPCR 检测转染效果。培养 48 h 后,提取蛋白,进行 Western blot 检测转染效果。重复 3 次后进行下一步实验。

1.2.2 Western blot 实验 提前做好总蛋白标准曲线绘制(公式  $Y = aX + b$ ,  $R \geq 0.99$ ),待细胞培养或转染完成后,提取 ZCCHC17 蛋白。变性、还原蛋白样本后进行电泳、转膜、洗膜、封闭、洗膜、孵育一抗过夜(内参 tubulin 按 1:2 000 稀释,ZCCHC17 按 1:1 000 稀释);洗膜、孵育二抗(二抗与脱脂奶粉液

按 1:5 000 配制)、洗膜、显影,保存和收集数据,运用 image J 软件测定条带灰度值,运用 Graphpad Prism 8.0 软件进行数据分析。

1.2.3 RT-qPCR 实验 细胞株(LO2、Bel7404、MHCC97H)培养和 siZCCH17(NC, 763, 216, 444)转染 24 h 后提取 RNA,然后按试剂盒说明书进行反转录。序列 5' ~ 3' 引物:ZCCHC17 前引物为 GTT-TAGTTCAGCGCAGCGAC,ZCCHC17 后引物为 CT-TCCGACAGCCTGGGATTT;Actin 前引物为 CTCTTC-CAGCCTTCCTTCT,后引物为 AGCACTGTGTTG-GCGTACAG。分别加入标记好的八联管中进行 RT-qPCR 反应:预变性(95 °C, 30 s),变性(95 °C, 10 s),退火至延伸(60 °C, 30 s)。熔解曲线,使用仪器默认采集程序,收集和分析数据。

1.2.4 克隆形成实验 转染 Bel7404 细胞株 24 h 后,以 10<sup>3</sup> 个/孔接种于 6 孔板(设置实验组和对照组细胞,每组设 3 个复孔),1 次/3 d 换液,培养两周,显微镜观察到明显的细胞克隆集团后结束培养。吸弃培养基,PBS 洗涤 3 次,加入 4% 的多聚甲醛固定 20 min;PBS 洗涤 3 次,加入 0.1% 结晶紫染色液染色 20 min;PBS 洗涤 3 次,在相机下拍照计数细胞克隆集合数目。

1.2.5 CCK-8 实验 转染 Bel7404 细胞株 6 ~ 8 h 后(设置 siZCCHC17 组和 NC 组),分别加入 96 孔板中,5 × 10<sup>3</sup> 个/孔。8 h 后,吸弃待测孔培养基后,加入 100 μL CCK-8 工作液(CCK-8 占细胞培养体积的 1/10),37 °C 避光孵育 2 h,用酶标仪检测 96 孔板待测孔的吸光度值(波长为 450 nm)记录结果。连续 5 d 在同一时间点进行吸光度值检测(第 3 天,需要对剩余两次实验进行换液),记录结果并分析数据,绘制细胞生长连续天数的曲线。

1.2.6 划痕实验 将 1 × 10<sup>6</sup> 个/孔细胞悬液的细胞数,接种于 6 孔板中(设置 siZCCHC17 组细胞和 NC 组细胞,每组设 3 个复孔),待细胞生长约 80% 后,转染 6 ~ 8 h 换液,置于培养箱中培养 24 h 后,观察 6 孔板是否长满细胞。待长满后用尺子和移液器枪头对 6 孔板划线(等距离划三条线),PBS 洗涤,换液。分别在培养 24、48、72 h 后显微镜观察并在同一位置拍照细胞的迁移图。

1.2.7 Transwell 侵袭实验 将转染后的细胞稀释至 8 × 10<sup>5</sup> 个/mL 悬液。在 24 孔板的下室中各加入完全培养基(含 10% 血清),吸取 100 μL 细胞悬液滴入 Transwell 上室(加入胶质量 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, 60 min)内,培养 48 h 后取出 Transwell 上室,用棉签轻轻擦掉上室内细胞(指未穿过膜的细胞),重复擦拭 3 次。4% 多聚甲醛 600 mL 固定 30 min,双蒸馏

水清洗 Transwell 上室 3 次,晾干 15 min,0.1% 结晶紫染色液 600 mL 染色 15 min。然后,用双蒸馏水清洗 3 次,在显微镜下 ( $\times 20$ ) 观察细胞穿膜情况,并随机拍照 (5 个视野),然后计数染色的穿膜细胞数。重复实验 3 次。

### 1.3 统计学分析

采用 Graphpad Prism 8.0 软件对数据进行处理与分析。计量资料符合正态分布且方差齐性,以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,组间比较行独立样本  $t$  检验,多组间比较使用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ZCCHC17 在人正常肝细胞株和不同肝细胞癌细胞株中的表达情况比较

RT-qPCR 实验结果显示,ZCCHC17 在 Bel7404 细胞株的 mRNA 水平高于正常细胞 LO2,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );在 MHCC97H 细胞株的 mRNA

水平与正常细胞 LO2 比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。Western blot 实验结果显示,ZCCHC17 在 Bel7404 细胞系中的表达高于正常细胞系 LO2,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );ZCCHC17 蛋白在 MHCC97H 细胞株的表达水平与正常细胞 LO2 水平比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 1。

### 2.2 siZCCHC17 在 Bel7404 转染实验的验证

转染实验结果显示,siZCCHC17 (763) 和 siZCCHC17 (216) 转染后,ZCCHC17 的 mRNA 表达均降低 ( $P < 0.05$ )。siZCCHC17 (444) 转染后,ZCCHC17 的 mRNA 表达降低,但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。Western blot 实验中,内参 tubulin 蛋白和目的 ZCCHC17 蛋白条带显影分析结果显示,siZCCHC17 (763) 和 siZCCHC17 (444) 转染后,ZCCHC17 蛋白的表达均降低 ( $P < 0.05$ )。siZCCHC17 (216) 转染后,ZCCHC17 蛋白的表达降低,但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 2。

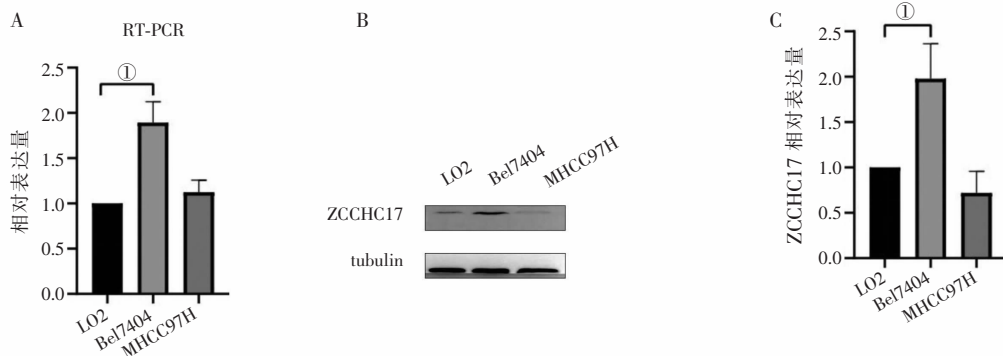


图 1 ZCCHC17 在人正常肝细胞株和不同肝细胞癌细胞株中的表达情况比较

A. ZCCHC17 mRNA 在 Bel7404 细胞株表达水平比较;B. ZCCHC17 蛋白条带图;C. ZCCHC17 蛋白在 Bel7404 细胞株中的表达水平比较。① $P < 0.05$ 。

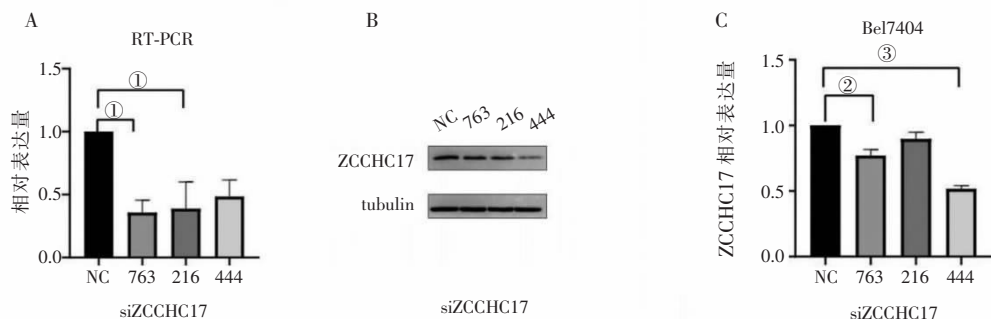


图 2 siZCCHC17 在 Bel7404 转染实验的验证

A. 转染后 ZCCHC17 的 mRNA 表达水平比较;B. 转染后 ZCCHC17 蛋白条带图;C. 转染后 ZCCHC17 蛋白的表达水平比较。① $P < 0.05$ ;② $P < 0.01$ ;③ $P < 0.001$ 。

### 2.3 敲低 ZCCHC17 后 Bel7404 细胞的增殖能力

敲低 ZCCHC17 后,实验组 Bel7404 细胞克隆形成能力弱于 NC 组;siZCCHC17 组 Bel7404 细胞克隆活力弱于 NC 组,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。CCK-8 实验结果显示,siZCCHC17 实验组 Bel7404 细胞的增殖活力弱于 NC 组,差异有统计学意义

( $P < 0.05$ )。见图 3。

### 2.4 敲低 ZCCHC17 后 Bel7404 细胞的迁移能力

划痕实验结果显示,敲低 ZCCHC17 后 Bel7404 细胞的迁移能力弱于 NC 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

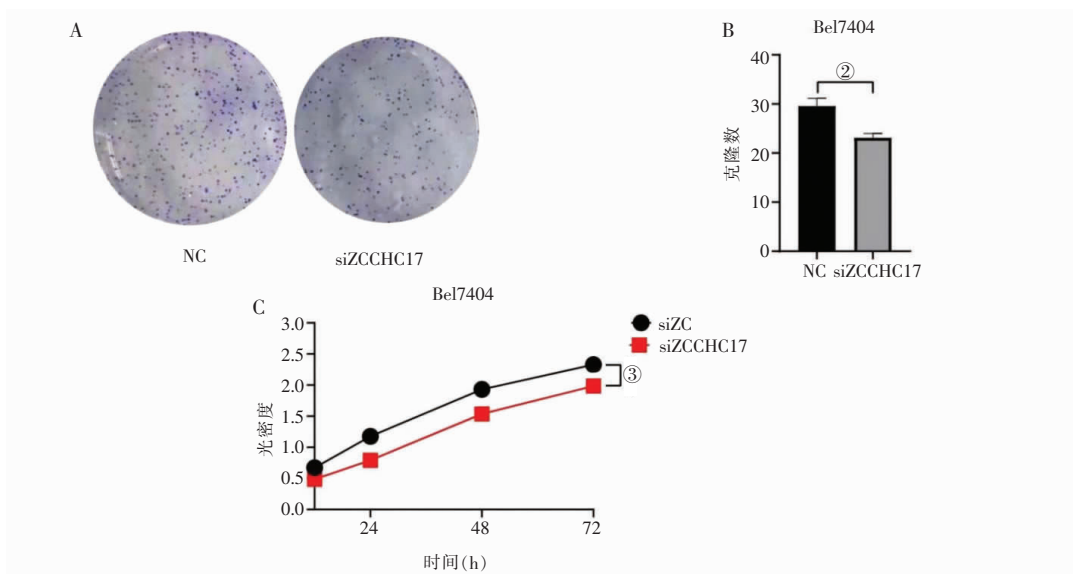


图 3 敲低 ZCCHC17 后 Bel7404 细胞的克隆及增殖能力

A. 克隆形成实验; B. siZCCHC17 组 Bel7404 细胞的克隆形成能力; C. siZCCHC17 组 Bel7404 细胞活性。② $P < 0.01$ ; ③ $P < 0.001$ 。

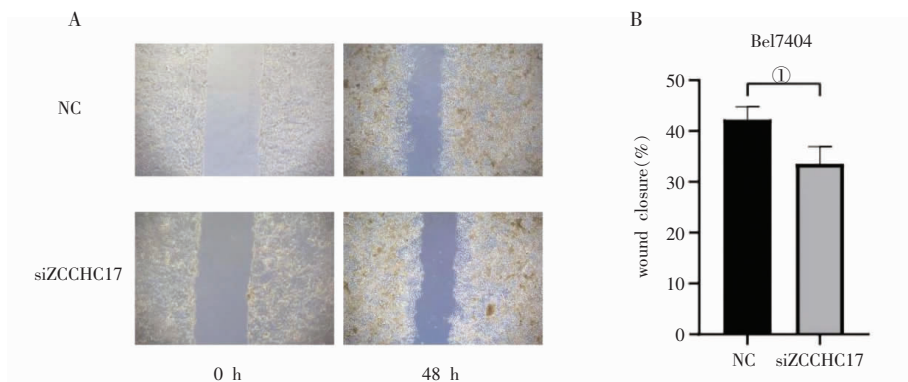


图 4 敲低 ZCCHC17 后 Bel7404 细胞的迁移能力

A. 敲低 ZCCHC17 后 Bel7404 细胞的迁移能力; B. Bel7404 细胞的伤痕愈合率。① $P < 0.05$ 。

### 2.5 敲低 ZCCHC17 Bel7404 细胞的侵袭能力

Tanswell 侵袭实验结果显示,敲低 ZCCHC17 后

Bel7404 细胞的侵袭能力弱于 NC 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 5。

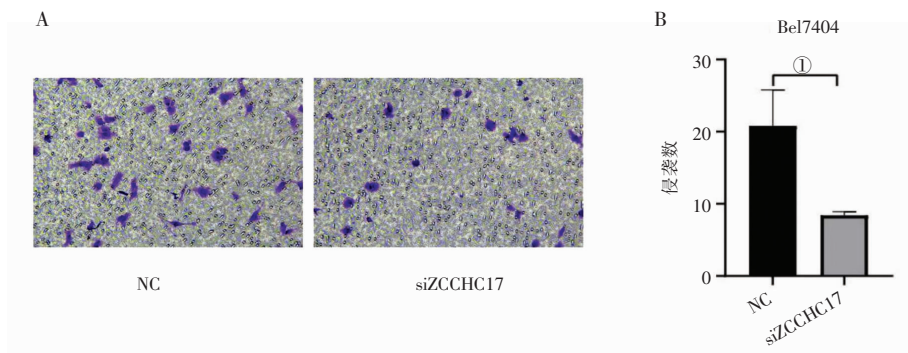


图 5 敲低 ZCCHC17 Bel7404 细胞的侵袭能力

A. 敲低 ZCCHC17 后 Bel7404 侵袭细胞个数( $\times 20$ ); B. 敲低 ZCCHC17 后 Bel7404 细胞的侵袭能力。① $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

尽管已经证明 RNA 结合蛋白(RBPs)是肿瘤发生和肿瘤进展的关键调节剂,但在 HCC 的背景下它们的失调仍有待证实<sup>[8]</sup>。本研究结果显示,ZC-

CHC17 在人正常细胞株 L02 中低表达,在肝细胞癌细胞株 Bel7404 呈高表达,但在肝细胞癌 MHCC97H 中低表达,说明 ZCCHC17 在 HCC 不同细胞系中的表达有所不同,从而可以预测 ZCCHC17 在不同 HCC 患者的发生发展中将起着不同的作用。Gao

等<sup>[9]</sup>在 MHCC97H 细胞株的实验中,证实 HBx-siRNA 减弱了 MHCC97H 细胞增殖和肿瘤生长;miR-137 在 HBx-siRNA 处理的 HCC 细胞中高表达;HBx 敲低降低了 miR-137 甲基化并恢复了 miR-137 表达。Zhu 等<sup>[10]</sup>研究发现,MHCC97H 中 TRPC7-AS1 的表达水平明显高于正常肝细胞 L02,细胞中 TRPC7-AS1 的 N6-腺苷甲基化(m6A)水平也低于 L02 细胞。Wang 等<sup>[11]</sup>研究表明,高转移性 MHCC97H 中的组蛋白脱乙酰酶(HDAC11)表达高于低转移性 MHCC97L;DNA 甲基转移酶抑制剂 5'-Aza-2'-deoxycytidine 的给药促进了 HCC 细胞中 HDAC11 的表达。结合前期的生物信息分析,DNA 甲基化参与 ZCCHC17 表达的调控,ZCCHC17 与 m6A 为同属于锌指蛋白家族成员,推测 ZCCHC17 在 MHCC97H 细胞株中低表达与甲基化存在相关性,这将是进一步实验证实及深入研究的方向。

ZCCHC17 是锌指蛋白家族的成员之一,也被称为 pNO40<sup>[12]</sup>。pNO40 是一个与核仁相关的 60s 核糖体蛋白,作为招募 SR 家族剪接因子到核仁的中介,并证明 pNO40 在招募 SR 剪接因子到核仁中发挥了作用<sup>[13]</sup>。此外,共同免疫沉淀实验表明,异位表达的 pNO40 与 UBF 相互作用,UBF 是参与预初始复合物(PIC)(包含 SL-1 复合物和 RNA 聚合酶 I 复合物)的主转录因子,以激活和促进 RNA 聚合酶 I 介导的转录<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,通过敲低 ZCCHC17 后,Bel7404 细胞的增殖能力、迁移能力以及侵袭能力均明显减弱,说明 ZCCHC17 高表达能促进 HCC 的发生发展。目前,有关 ZCCHC17 在 HCC 中的研究鲜有报道,其影响 HCC 发生发展的机制也未阐明。根据 Khan 等<sup>[15]</sup>研究表明,miRNA 通过靶向关键基因影响包括增殖、侵袭、转移和凋亡在内的生物学行为。杜毅超等<sup>[16]</sup>研究表明,芦荟苷对肝癌 MHCC97H 细胞增殖、迁移及侵袭能力具有明显的抑制作用。

综上,ZCCHC17 在不同细胞系中的表达有所不同,高表达的 ZHCC17 促进 HCC 的增殖、迁移、侵袭能力,为进一步阐明 HCC 的发病机理提供一定的理论和实验基础。

#### 参考文献

[1] Yousef MH, El-Fawal HAN, Abdelnaser A. Hepigenetics: a review of epigenetic modulators and potential therapies in hepatocellular carcinoma [J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 9593254.

[2] Galicia-Moreno M, Silva-Gomez JA, Lucano-Landeros S, et al. Liver cancer: therapeutic challenges and the importance of experimental models [J]. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 2021: 8837811.

[3] Jose A, Bavetta MG, Martinelli E, et al. Hepatocellular carcinoma: current therapeutic algorithm for localized and advanced disease [J]. *Journal of Oncology*, 2022, 2022: 3817724.

[4] Wei L, Wang X, Lv L, et al. The emerging role of microRNAs and long noncoding RNAs in drug resistance of hepatocellular carcinoma [J]. *Molecular Cancer*, 2019, 18(1): 147.

[5] Jen J, Wang YC. Zinc finger proteins in cancer progression [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2016, 23(1): 53.

[6] Bartosch AMW, Youth EHH, Hansen S, et al. ZCCHC17 modulates neuronal RNA splicing and supports cognitive resilience in Alzheimer's disease [J]. *bioRxiv*, 2023; 2023. 03. 21. 533654.

[7] Liu F, Liang J, Long P, et al. ZCCHC17 served as a predictive biomarker for prognosis and immunotherapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 11: 799566.

[8] Wang M, Huang S, Chen Z, et al. Development and validation of an RNA binding protein-associated prognostic model for hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 1136.

[9] Gao Y, Gu J, Wang Y, et al. Hepatitis B virus X protein boosts hepatocellular carcinoma progression by downregulating microRNA-137 [J]. *Pathology, Research and Practice*, 2020, 216(6): 152981.

[10] Zhu S, Ye H, Xu X, et al. Involvement of TRPC7-AS1 expression in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. *Journal of Oncology*, 2021, 2021: 8114327.

[11] Wang W, Ding B, Lou W, et al. Promoter hypomethylation and miR-145-5p downregulation-mediated HDAC11 overexpression promotes sorafenib resistance and metastasis of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8: 724.

[12] Tomljanovic Z, Patel M, Shin W, et al. ZCCHC17 is a master regulator of synaptic gene expression in Alzheimer's disease [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(3): 367-371.

[13] Lin YM, Chu PH, Li YZ, et al. Ribosomal protein pNO40 mediates nucleolar sequestration of SR family splicing factors and its overexpression impairs mRNA metabolism [J]. *Cellular Signalling*, 2017, 32: 12-23.

[14] Lin YM, Chu PH, Ouyang P. Ectopically expressed pNO40 suppresses ribosomal RNA synthesis by inhibiting UBF-dependent transcription activation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 516(2): 381-387.

[15] Khan S, Zhang DY, Zhang JY, et al. The key role of microRNAs in initiation and progression of hepatocellular carcinoma [J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 950374.

[16] 杜毅超, 郑天翔, 石昊, 等. 芦荟苷对肝癌 MHCC97H 细胞增殖、迁移及侵袭的作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(12): 1669-1671.

(收稿日期: 2024-05-18

修回日期: 2024-08-11)