



DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.07.007

· 基础研究 ·

转录因子BATF3通过调控波形蛋白促进肾透明细胞癌细胞的恶性生物学行为

甄超¹,牛云峰²,刘亮²,刘爽²(1. 新乐市医院 病理科,河北 石家庄 050700;2. 中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院 病理科,河北 石家庄 050082)

[摘要] 目的:探讨碱性亮氨酸拉链转录因子ATF样蛋白3(BATF3)在肾透明细胞癌(ccRCC)组织中的表达及其调控ccRCC细胞恶性生物学行为的分子机制。**方法:**收集2019年3月至2022年1月间在中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院手术切除的64例ccRCC组织和相应癌旁组织,qPCR法检测ccRCC组织、癌旁组织和肾癌ACHN、786-O细胞中BATF3 mRNA的表达,免疫组化检测ccRCC组织、癌旁组织中BATF3蛋白的表达,并分析其与临床病理特征的关系。构建BATF3敲减及过表达质粒,分别转染786-O、ACHN细胞,通过MTS法、Transwell实验检测BATF3对786-O或ACHN细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响,qPCR法检测敲减或过表达BATF3对786-O或ACHN细胞EMT相关基因表达的影响,CHIP、双荧光素酶报告基因实验检测BATF3是否与波形蛋白(VIM)启动子区结合并调控其转录,MTS法、Transwell实验检测同时过表达BATF3及敲减VIM对786-O细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响。**结果:**与癌旁组织比较,ccRCC组织中BATF3的mRNA和蛋白均呈高表达(均P<0.01),并且BATF3 mRNA与ccRCC的分化程度和TNM分期密切关联(均P<0.01);与正常肾上皮细胞293T相比,BATF3在ACHN及786-O细胞中均呈高表达(均P<0.01)。敲减BATF3表达均能明显抑制786-O细胞的增殖、迁移、侵袭能力(均P<0.01),过表达BATF3则均能促进ACHN细胞的增殖、迁移和侵袭能力(均P<0.01),敲减或过表达BATF3能抑制786-O细胞或促进ACHN细胞的EMT相关基因的表达(均P<0.01)。BATF3可与VIM启动子区的位点结合,直接调控VIM的转录表达。同时过表达BATF3及敲减VIM可逆转过表达BATF3对786-O细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响。**结论:**BATF3在ccRCC组织中呈高表达,并与其分化程度和TNM分期密切关联;BATF3通过调控VIM的表达影响ACHN、786-O细胞的恶性生物学行为,其可作为临床治疗ccRCC的潜在靶点。

[关键词] 肾透明细胞癌;786-O细胞;ACHN细胞;碱性亮氨酸拉链转录因子ATF样蛋白3;波形蛋白;迁移;侵袭

[中图分类号] R737.11;R730.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)07-0594-09

Transcription factor BATF3 promotes malignant biological behavior of clear cell renal cell carcinoma cells by regulating vimentin

ZHEN Chao¹, NIU Yunfeng², LIU Liang², LIU Shuang² (1. Department of Pathology, Xinle Municipal Hospital, Shijiazhuang 050700, Hebei, China; 2. Department of Pathology, the 980th Hospital of the Joint Logistics Support Force of PLA, Shijiazhuang 050082, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3 (BATF3) in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and the molecular mechanism of its regulation of malignant biological behavior of ccRCC cells. **Methods:** ccRCC tissues and para-cancerous tissues were collected from 64 ccRCC patients who underwent surgical treatment at the 980th Hospital of the Joint Logistics Support Force of PLA from March 2019 to January 2022. The expression of BATF3 mRNA in ccRCC tissues, para-cancerous tissues, renal carcinoma ACHN and 786-O cells was determined by qPCR. The expressions of BATF3 protein in ccRCC tissues and para-cancerous tissues were determined by immunohistochemistry and the relationship between the expressions and the clinicopathologic characteristics was analyzed. BATF3 knockdown and over-expression plasmids were constructed and transfected into 786-O and ACHN cells, and the effects of BATF3 on the proliferation, migration and invasion of 786-O cells or ACHN cells were determined by MTS and Transwell assays. The effects of BATF3 on the expressions of related epithelial-mesenchymal transition (EMT) genes of 786-O and ACHN cells were detected by qPCR. CHIP and dual luciferase reporter assay were performed to detect the binding of BATF3 as a transcription factor to vimentin (VIM) and regulate its transcription. The effects of simultaneous over-expression

[基金项目] 第九八〇医院科学技术孵育计划(No. FYJHZD202302, No. FYJHMS202312)

[作者简介] 甄超(1982—),男,学士,主治医师,主要从事肾癌基础与临床研究,E-mail:xlsyydbs@163.com

[通信作者] 刘爽,E-mail:18633009012@163.com



of BATF3 and knockdown of VIM on the proliferation, migration and invasion ability of 786-O cells were determined by MTS and Transwell assays. **Results:** Compared with para-cancerous tissues, BATF3 mRNA and protein expressions were markedly higher in ccRCC tissues (all $P<0.01$) and the expression level of BATF3 mRNA was closely correlated with the degree of differentiation of ccRCC and its TNM stage (all $P<0.01$). Compared with normal renal epithelial cells 293T, the expression of BATF3 was significantly higher in ccRCC cells ACHN and 786-O (all $P<0.01$). Knockdown of BATF3 expression significantly inhibited the proliferation, migration and invasion ability of 786-O cells (all $P<0.01$). Over-expression of BATF3 significantly promoted the proliferation, migration and invasion ability of ACHN cells (all $P<0.01$). Knockdown or overexpression of BATF3 inhibited the expression of EMT-related genes in 786-O cells or promoted the expression of EMT-related genes in ACHN cells (all $P<0.01$). BATF3 could bind to sites in the upstream promoter region of VIM and directly regulate the transcription expression of VIM. Simultaneous overexpression of BATF3 and knockdown of VIM reversed the effects of over-expression of BATF3 on the proliferation, migration and invasion ability of 786-O cells. **Conclusion:** BATF3 was highly expressed in ccRCC tissues and was closely related to its differentiation degree and TNM stage. BATF3 directly regulated the expression of VIM, which in turn regulated the malignant biological behavior of ACHN and 786-O cells. Therefore, it could be used as a potential target for clinical treatment of ccRCC.

[Key words] clear cell renal cell carcinoma (ccRCC); 786-O cell; ACHN cell; basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3 (BATF3); vimentin (VIM); migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(7): 594-602. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.07.007]

肾细胞癌是起源于肾小管上皮细胞的恶性肿瘤,其病理分型包括肾乳头状瘤、肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)、嫌色性肾细胞癌、肾集合管癌及未分类的肾细胞癌^[1]。ccRCC是最常见的,其发病率和病死率呈逐年上升的趋势^[2]。ccRCC起病隐匿、术后易复发、对放化疗不敏感、预后差^[3]。因此,探索ccRCC的发病机制对临床诊断和治疗非常重要。碱性亮氨酸拉链转录因子ATF样蛋白3(basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3, BATF3)隶属于激活蛋白1(activator protein 1, AP-1)转录因子超家族,被认为是AP-1/ATF转录活性的负调控因子^[4]。BATF家族由3个成员(BATF1~3)组成,在结构上有关联^[5]。BATF3已被证明在DC发育中发挥核心作用,而DC对CD8⁺ T细胞的启动是必不可少的^[6]。研究^[7-9]发现,BATF3参与多种肿瘤的发生与发展。BATF3在结直肠癌、乳腺癌和胶质瘤等肿瘤中发挥促癌基因的作用,但其在ccRCC中的作用机制尚未见报道。上皮-间质转化(EMT)是恶性肿瘤发生侵袭、转移及增强肿瘤细胞干性发生机制的研究热点。研究^[10]表明,EMT与多种恶性肿瘤的侵袭和转移有关。当恶性肿瘤细胞发生EMT时,其基因表达谱会产生相应改变,上皮细胞标志蛋白[如上皮-钙黏蛋白(E-cadherin)]表达下调;间充质细胞标志蛋白[如波形蛋白(vimentin, VIM)和β-连环蛋白(β-catenin)]等表达上调^[11]。本实验利用GEO数据库预测到BATF3在ccRCC中高表达,并进一步在中国患者ccRCC组织和肾癌细胞中进行验证,重点研究BATF3通过VIM对ccRCC细胞恶性生物学行为的影响及其意义。

1 材料与方法

1.1 材料、细胞与试剂

收集2019年3月至2022年1月间在中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院收治的64例ccRCC患者手术切除的ccRCC组织及相应癌旁组织标本。患者在术前未给予任何化放疗及免疫治疗,所有组织标本均由病理医生诊断为ccRCC。64例患者中43例男性、21例女性,年龄范围为23~81岁。肿瘤分化程度:低分化6例,高、中分化58例。TNM分期:I+II期50例,III+IV期14例。有淋巴结转移者5例,无淋巴结转移者59例。本研究方案经中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院伦理委员会批准(批准号:No. 2023-KY-49),所有患者或其家属均知情并签署知情同意书。

人正常肾上皮细胞293T和人肾癌细胞786-O、ACHN均由河北医科大学第四医院生物标本库惠赠。DMEM和胎牛血清(FBS)购自Gibco公司,SP免疫组化试剂盒和DAB显色剂购自中山金桥公司,TRIzol试剂和胰蛋白酶购自Solabao公司,反转录试剂盒购自Roche公司,qPCR试剂盒购自翊圣公司,Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司,Transwell小室和基质胶购自Corning公司,兔抗BATF3抗体购自Proteintech公司,qPCR引物由上海生工公司设计和合成,敲减阴性对照(sh-NC)、sh-VIM和sh-BATF3敲减质粒均由上海Gene Pharma公司设计和合成,过表达阴性对照(pcDNA3.1-NC)、pcDNA3.1-BATF3过表达质粒以及双荧光素酶报告基因载体均由南京金斯瑞公司设计和合成。

1.2 利用数据库分析ccRCC组织及癌旁组织中BATF3 mRNA的表达

在GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中下载ccRCC的芯片数据,获得GSE78179基





因芯片包。以差异倍数>2且 $P<0.01$ 为筛选阈值,分析在ccRCC组织和相应癌旁组织中差异表达的mRNA。GEPIA数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>)是由国内科研机构开发的一种交互式网络服务器,用于分析来自癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)等数据库的肿瘤组织和癌旁组织样本中RNA测序表达数据。GEPIA数据库可以进行差异表达分析、相关性分析和生存分析等。通过GEPIA数据库分析肾癌组织及癌旁组织中BATF3 mRNA的表达水平。

1.3 qPCR法检测ccRCC组织、癌旁组织和786-O、ACHN细胞中BATF3 mRNA的表达

用TRIzol试剂从ccRCC组织、相应癌旁组织和细胞中提取总RNA,并测定其RNA的纯度和浓度,用反转录试剂盒将总RNA反转录成cDNA,并保存在-20℃的冰箱中备用。采用SYBR Master Mix试剂盒进行qPCR,PCR参数:95℃10 min,95℃15 s,60℃30 s,72℃30 s,40个循环。以GAPDH作为内参基因,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算BATF3 mRNA的相对表达量,实验重复3次。引物序列见表1。

表1 qPCR引物

基因名称	引物序列(5'-3')
BATF3	F:GAAAAAAACCGAGTTGCTGCT R:CTTCAGTGCCTCTGTCAAGGTG
VIM	F:CGCCTGCAGGATGAGATTCA R:TCAGGGAGGAAAAGTTGGAAGA
E-cadherin	F:CGAGAGCTACACGTTCACGG R:GGCCTTTGACTGTAATCACACC
β-catenin	F:GGCTACTGTTGGATTGATTC R:CCACAAATTGCTGCTGTGTC
GAPDH	F:AGGTGAAGGTCGGAGTCACCG R:AGGGGTCATTGATGGCAACAA

1.4 免疫组化SP法检测ccRCC组织和相应癌旁组织中BATF3蛋白的表达

组织标本均用10%中性甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,制成5 μm厚切片,脱蜡及梯度乙醇水化,EDTA抗原修复,血清封闭,BATF3一抗(稀释比例为1:1 000)室温下处理过夜,用PBS清洗切片10 min×3次,滴加HRP标记山羊抗兔二抗(稀释比例为1:500),室温下处理30 min,DAB显色,切片经复染、脱水、透明、封片,最后在显微镜下观察、拍照。

结果判定:两位病理医生独立阅片并判读,每个切片随机选择5个高倍视野。BATF3抗体阳性染色分布于核内,呈棕黄色颗粒。(1)根据阳性细胞

染色强度进行评分:0分代表未染色,1分代表浅黄色,2分代表棕色,3分代表棕褐色;(2)根据阳性细胞的百分比评分:0分代表阳性细胞0~<5%,1分代表5%~<25%,2分代表25%~<50%,3分代表50%~<75%,4分代表>75%。两个评分结果相加的和:0分为(-),1至3分为(+),4至5分为(2+),6或以上为(3+)。BATF3高、低表达判断标准:(-~+)为低表达,(2+~3+)为高表达。

1.5 细胞培养、转染与分组

将正常肾上皮细胞293T和肾癌786-O、ACHN细胞置于含10% FBS的DMEM培养基,于37℃、5%CO₂培养箱中进行培养。选择处于对数生长阶段的细胞进行后续实验。肾癌786-O、ACHN细胞以 2×10^5 个/孔接种于6孔板,当细胞汇合度达60%~70%时,根据Lipofectamin 2000操作指南进行细胞转染。转染前,6孔板用PBS洗2次,加入1.5 mL DMEM,然后每孔制备0.5 mL转染体系。每孔对应2个EP管,均加入0.25 mL DMEM,分别加入50 nmol/L的转染质粒和5 μL Lipofectamin 2000脂质体,混合均匀,静置5 min。将DMEM-质粒和脂质体混合,离心20 s,静置20 min形成转染复合物,将复合物加入6孔板中,培养6~8 h,换成含血清的DMEM培养基。敲减实验分为sh-NC组、sh-BATF3-1组、sh-BATF3-2组,过表达实验分为pcDNA3.1-NC组、pcDNA3.1-BATF3组,同时过表达BATF3及敲减VIM实验分为pcDNA3.1-NC组、pcDNA3.1-BATF3组、pcDNA3.1-BATF3+sh-VIM组。

1.6 MTS实验检测转染后各组786-O、ACHN细胞的增殖能力

用胰蛋白酶消化各组转染细胞,然后用无血清的DMEM重新悬浮,制成单细胞悬浮液。将细胞接种于96孔板,每孔200 μL的细胞悬液中含有 1×10^3 个转染细胞,每组6个复孔。细胞培养至0、24、48、72、96 h时向孔内加入20 μL MTS试剂(终质量浓度为5 mg/mL),继续培养2 h。用酶标仪检测各组在492 nm处的光密度(D)值,并绘制生长曲线,比较各组细胞在不同时间段的生长差异。

1.7 Transwell实验检测转染后各组786-O、ACHN细胞的迁移和侵袭能力

将转染后的各组细胞用胰蛋白酶消化后重悬于无血清的DMEM中,制成单细胞悬液。在Transwell上室不加(迁移实验)或加50 μL基质胶(侵袭实验),每孔接种 1×10^5 个细胞,下室加入含10% FBS的培养基。细胞在37℃培养箱中培养过夜,用棉签轻轻擦拭上层未迁移或侵袭的细胞,PBS冲洗3次,用多聚甲醛固定、结晶紫染液染色,流水轻轻冲洗,在倒置显微镜观察、拍照并计算细胞数。实验重复3次。

1.8 双荧光素酶报告基因实验和CHIP实验检测BATF3是否是VIM基因的直接转录因子

JASPAR 和 PROMO 网站预测 VIM 启动子序列可与 BATF3 结合。将 VIM 野生型或突变型的启动子序列插入荧光素酶报告基因质粒(pGl3)构建成野生型载体(pGl3-VIM-WT)或突变型载体(pGl3-VIM-MUT)。用 Lipofectamine 2000 将 pGl3、pGl3-VIM-WT、pGl3-VIM-MUT、pcDNA3.1-NC、pcDNA3.1-BATF3 共转染 786-O 细胞, 分别记为 VIM-WT+NC 组(共转染 pGl3-VIM-WT、pcDNA3.1-NC 质粒)、VIM-WT+BATF3 组(共转染 pGl3-VIM-WT、pcDNA3.1-BATF3 质粒)、VIM-MUT+NC 组(共转染 pGl3-VIM-MUT、pcDNA3.1-NC 质粒)、VIM-MUT+BATF3 组(共转染 pGl3-VIM-MUT、pcDNA3.1-BATF3 质粒)、pGl3+NC 组(共转染 pGl3、pcDNA3.1-NC 质粒)、pGl3+BATF3 组(共转染 pGl3、pcDNA3.1-BATF3 质粒)。转染 48 h 后, 按照双荧光素酶试剂盒说明书检测报告基因的荧光素酶活性。

将各实验组细胞进行交联和溶解得到 Protein/DNA 复合物, 选择最佳的超声条件来打断交联的 DNA, 使其长度为 200~1 000 bp。加入 BATF3

抗体进行免疫共沉淀处理, 洗脱 Protein/DNA 复合物, 对复合物中的 DNA 进行分离纯化, 然后采用 qPCR 法检测免疫沉淀物中是否有 VIM 启动子序列。

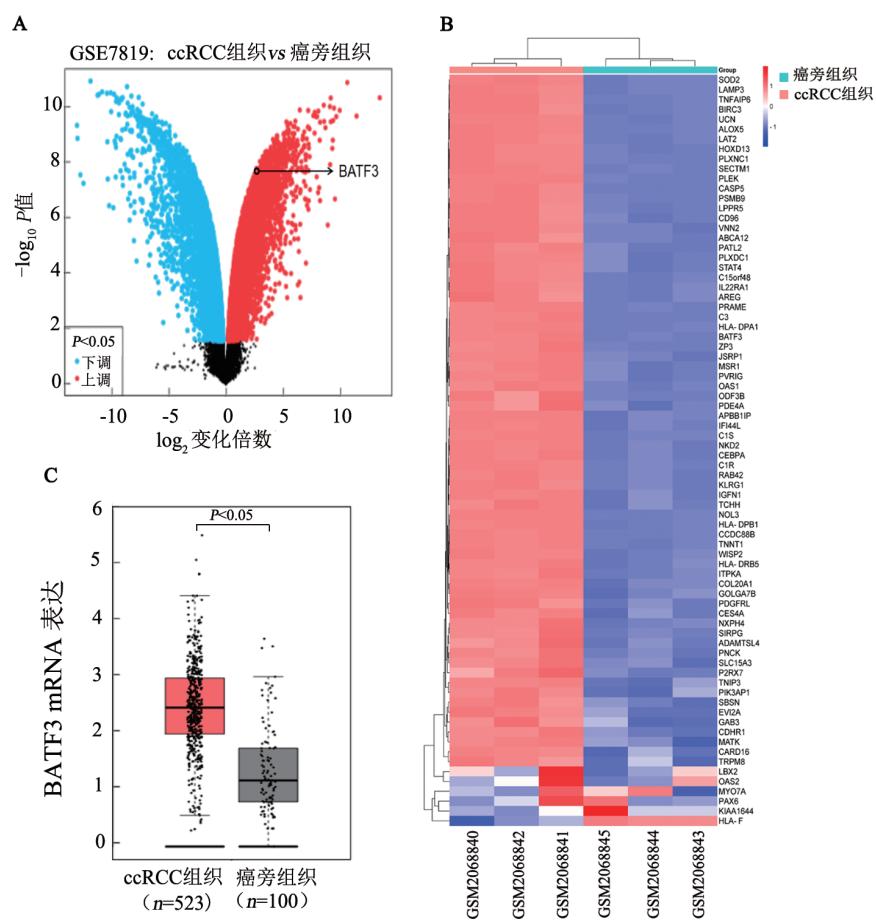
1.9 统计学处理

所有数据均应用 SPSS21.0 和 GraphPad Prism 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 计数数据用例数描述, 采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 数据库分析结果显示 ccRCC 组织中 BATF3 mRNA 呈高表达

在 GEO 数据库检索 ccRCC 的相关芯片发现, GSE78179 符合本实验的设计要求, 结果发现, ccRCC 组织中 BATF3 mRNA 的表达是相应癌旁组织的 3.21 倍(图 1A、B, $P < 0.05$)。GEPIA 数据库分析结果显示, 与癌旁组织相比, ccRCC 组织中 BATF3 mRNA 呈高表达(图 1C, $P < 0.05$)。



A: BATF3 是 GSE78179 芯片中的一个差异表达基因; B: 热图显示 BATF3 在 GSE78179 芯片中存在差异表达;

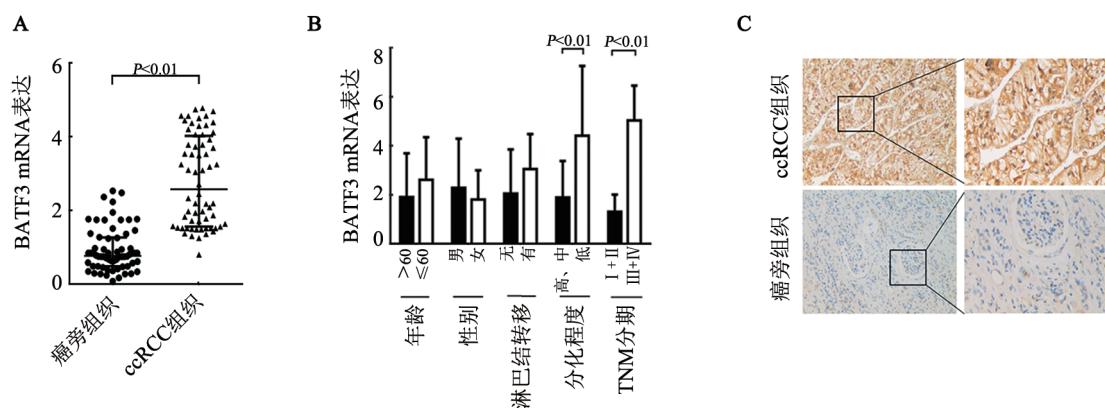
C: 使用 GEPIA 数据库分析 BATF3 mRNA 在 ccRCC 组织中的表达。

图 1 数据库数据分析 BATF3 mRNA 在 ccRCC 组织和相应癌旁组织中的表达

2.2 中国患者 ccRCC 组织中 BATF3 呈高表达且与其分化程度和 TNM 分期密切有关联

qPCR 法检测了 64 例 ccRCC 组织和相应癌旁组织中 BATF3 mRNA 的表达, 结果显示, BATF3 在 ccRCC 组织中平均表达水平显著高于癌旁组织(图 2A, $P<0.01$); 进一步分析 BATF3 mRNA 表达与 ccRCC 患者临床病理特征的关系, 结果(图 2B)显示, BATF3 mRNA 在高、中分化 ccRCC 组的表达水平显著低于低分化组($P<0.01$), TNM 分期 III+IV 期 ccRCC 组中 BATF3 mRNA 的表达水平明显高于 I + II 期

($P<0.01$)。BATF3 mRNA 的表达与在患者年龄、性别及淋巴结是否转移组间差异比较均无统计学意义(均 $P>0.05$)。BATF3 阳性染色主要定位于细胞核, 64 例 ccRCC 组织中 BATF3 高表达 50 例、低表达 14 例, ccRCC 组织中 BATF3 蛋白的表达明显高于癌旁组织($P<0.01$, 图 2C)。统计分析 BATF3 蛋白与临床病理特征的关系, 结果显示, BATF3 蛋白表达与患者性别、年龄、TNM 分期和分化程度组间均无明显的关联(均 $P>0.05$)。



A: BATF3 mRNA 在 ccRCC 组织中的表达水平; B: BATF3 表达与临床病理数据的关系;

C: ccRCC 组织中 BATF3 蛋白质的免疫组织化学染色($\times 100$)。

图 2 BATF3 mRNA 和蛋白在 ccRCC 组织和相应癌旁组织中的表达

2.3 BATF3 mRNA 在肾癌 ACHN、786-O 细胞中呈高表达

采用 qPCR 法检测 BATF3 mRNA 在 293T 细胞、肾癌 ACHN 细胞、肾癌 786-O 细胞中的表达, 结果显示, 与 293T 细胞相比, 肾癌细胞中 BATF3 mRNA 的表达均呈高表达(图 3, 均 $P<0.01$)。本实验选择表达水平较高的 786-O 细胞构建 BATF3 敲减细胞, 选择表达较低的 ACHN 细胞构建 BATF3 过表达细胞, 选择 786-O 细胞构建同时 BATF3 过表达和敲减 VIM 细胞, 然后进行后续实验。

2.4 敲减 BATF3 表达抑制 786-O 细胞的增殖、迁移和侵袭能力

qPCR 法检测结果(图 4A)显示, 与 sh-NC 组相比, sh-BATF3-1、sh-BATF3-2 组 786-O 细胞中 BATF3 mRNA 表达均明显降低(均 $P<0.01$)。挑选出敲减效果最好的 sh-BATF3-1 组细胞进行后续实验。MTS 实验检测结果(图 4B)显示, 转染 72 h 后, 与 sh-NC 组比较, sh-BATF3 组 786-O 细胞的增殖活性明显降低($P<0.01$)。实验结果说明, 敲减 BATF3 表达对 786-O 细胞增殖有抑制作用。Transwell 实验检测结果(图 4C,D)显示, 与 sh-NC 组比较, sh-BATF3 组 48 h 的迁移或侵袭细胞数均显著低于 sh-NC 组[迁移:

(322.667 ± 23.418) vs (842.667 ± 47.229) 个, $P<0.01$; 侵袭: (260.667 ± 14.295) vs (568.333 ± 15.503) 个, $P<0.01$]。结果说明, 敲减 BATF3 可抑制 786-O 细胞的迁移和侵袭能力。

2.5 过表达 BATF3 可促进 ACHN 细胞的增殖、迁移和侵袭能力

qPCR 法检测结果(图 5A)显示, 与 pcDNA3.1-NC 比较, pcDNA3.1-BATF3 组 ACHN 细胞中 BATF3 mRNA 的表达明显升高($P<0.01$)。结果说明, BATF3 在 ACHN 细胞中成功过表达。MTS 实验检测结果(图 5B)显示, 过表达 BATF3 72 h 后, pcDNA3.1-BATF3 组 ACHN 细胞的增殖活性明显升高($P<0.01$), 表明过表达 BATF3 可促进 ACHN 细胞的增殖能力。Transwell 实验检测结果(图 5C,D)显示, 与 pcDNA3.1-NC 组比较, pcDNA3.1-BATF3 组 ACHN 细胞的迁移、侵袭细胞数均明显增多[迁移: (1166.745 ± 28.694) vs (640.857 ± 38.749) 个, $P<0.01$; 侵袭: (852.333 ± 51.582) vs (438.524 ± 22.241) 个, $P<0.01$]。实验结果说明, 过表达 BATF3 可促进 ACHN 细胞的迁移、侵袭能力。

2.6 敲减或过表达 BATF3 能抑制 786-O 细胞或促进 ACHN 细胞的 EMT 进程

qPCR 法检测结果显示, 与 sh-NC 组比较,

sh-BATF3组786-O细胞中E-cadherin mRNA表达显著升高(图6A, $P<0.01$), β -catenin和VIM mRNA表达均明显降低(均 $P<0.01$), 实验结果说明, 敲减BATF3能抑制786-O细胞的EMT进程; 与pcDNA3.1-NC组比较, pcDNA3.1-BATF3组ACHN细胞中E-cadherin mRNA表达显著降低(图6B, $P<0.01$), β -catenin和VIM mRNA表达均显著升高(均 $P<0.01$), 实验结果说明, 过表达BATF3能促进ACHN细胞的EMT进程。

2.7 BATF3是VIM基因的转录因子

生物信息学方法预测BATF3可能是参与VIM调控的转录因子(图7A)。在前面的研究中, 本实验已经证实VIM的表达受BATF3调控, 因此, 推测VIM可能是BATF3的下游靶基因。为证实BATF3可与VIM启动子区结合, 本实验进行了CHIP实验, CHIP检测结果(图6B)显示, 与对照组相比, BATF3抗体免疫共沉淀DNA复合物中存在VIM启动子顺序(GACGTC), 说明BATF3与VIM启动子区的位点有结合活性。双荧光素酶报告基因实验检测结果(图

6C)显示, 过表达BATF3后786-O细胞中荧光素酶活性显著升高, 而VIM-MUT组和pGl3组786-O细胞中荧光素酶活性无显著变化。实验结果说明, BATF3能够通过与VIM上游启动子区的位点结合直接调控VIM的转录表达, 证实了VIM是BATF3的直接靶基因。

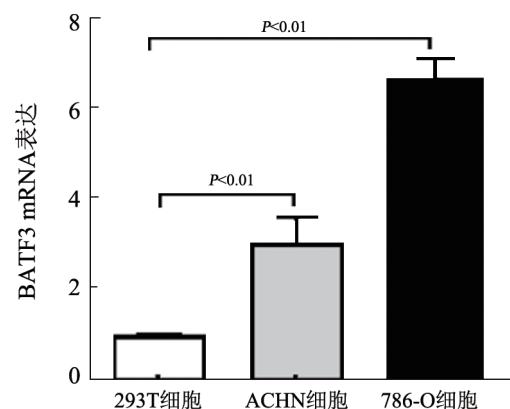
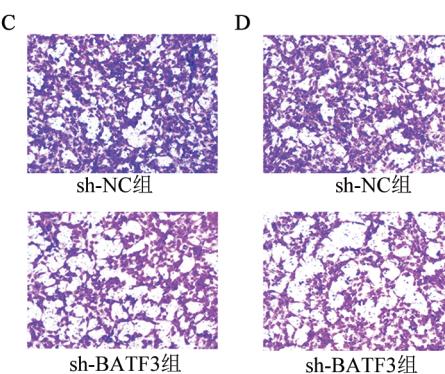
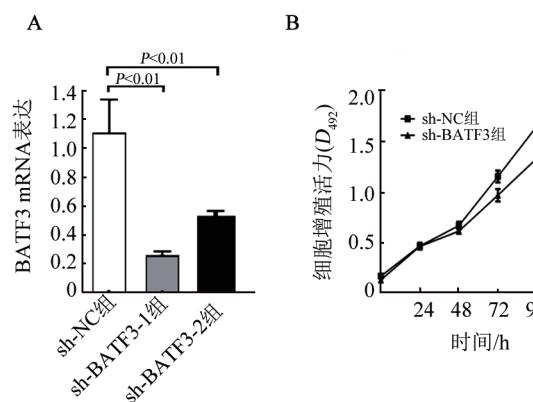
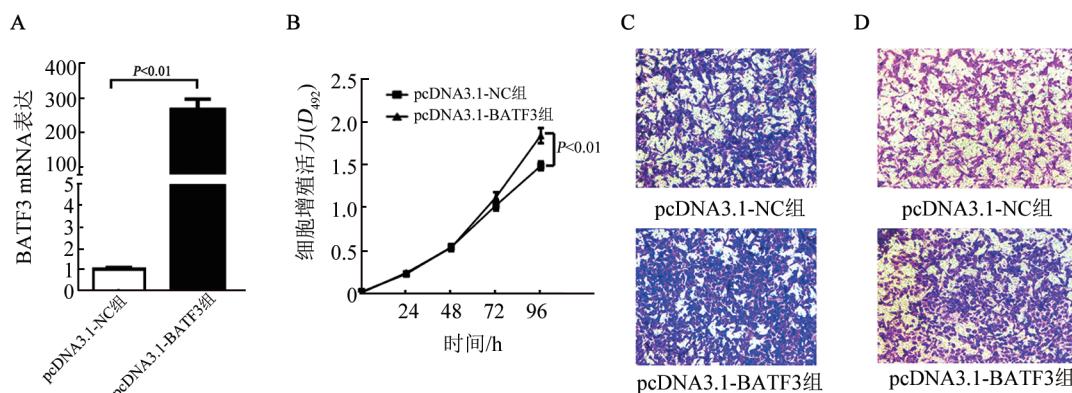


图3 BATF3 mRNA在正常肾细胞293T和肾癌 ACHN、786-O细胞中的表达



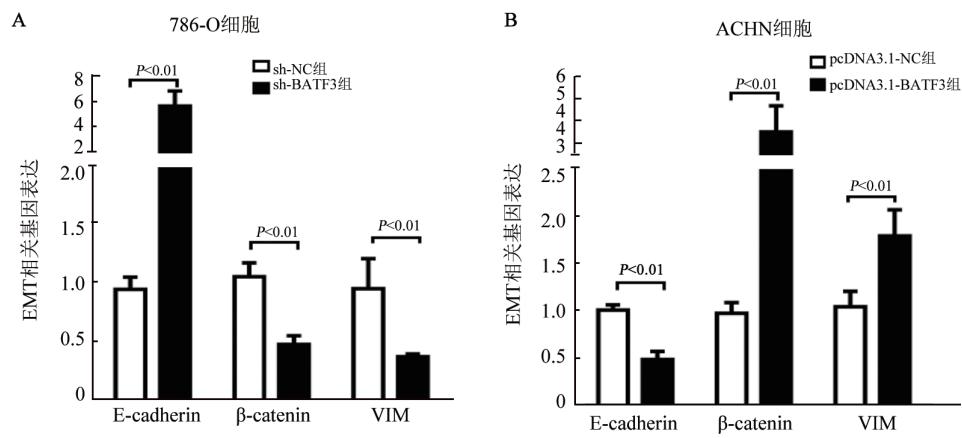
A: BATF3在转染786-O细胞中低表达; B: 敲减BATF3后786-O细胞的增殖能力; C: 敲减BATF3后786-O细胞的迁移能力($\times 200$); D: 敲减BATF3后786-O细胞的侵袭能力($\times 200$)。

图4 敲减BATF3表达对786-O细胞的增殖、迁移及侵袭能力的影响



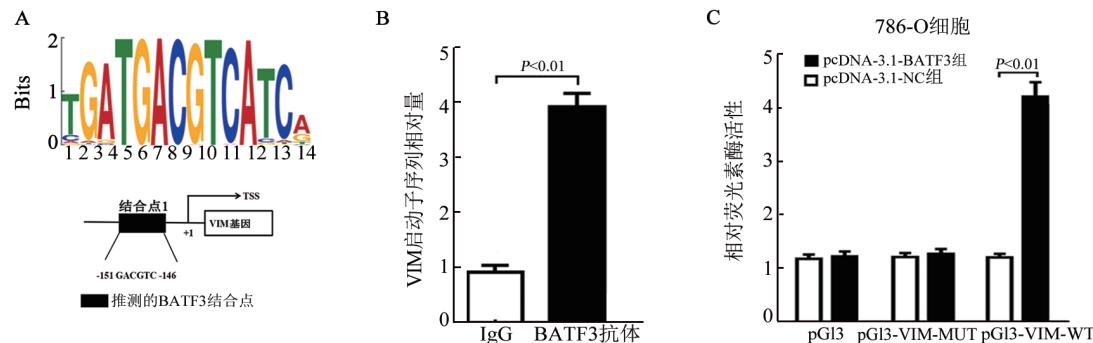
A: BATF3在转染ACHN细胞中过表达; B: BATF3过表达后 ACHN 细胞的增殖能力; C: BATF3过表达后 ACHN 细胞的迁移能力($\times 200$); D: BATF3过表达后 ACHN 细胞的侵袭能力($\times 200$)。

图5 过表达BATF3对ACHN细胞的增殖、迁移及侵袭能力的影响



A: 敲减 BATF3 后 EMT 相关基因的表达; B: 过表达 BATF3 后 EMT 相关基因的表达。

图6 敲减及过表达 BATF3 对 EMT 相关基因表达的影响



A: BATF3 与 VIM 启动子的结合位点; B: CHIP 显示 BATF3 能与 VIM 的启动子区结合;

C: 双荧光素酶报告基因显示 BATF3 可调控 VIM 的表达。

图7 VIM 是 BATF3 的直接结合靶基因

2.8 同时过表达 BATF3 和敲减 VIM 可逆转过表达 BATF3 对 786-O 细胞的增殖、迁移和侵袭的影响

MTS 实验检测结果(图 8A)显示,与 pcDNA3.1-NC 组比较,pcDNA3.1-BATF3 组 786-O 细胞的增殖活性明显升高($P < 0.01$),同时过表达 BATF3 和敲减 VIM 组 786-O 细胞的增殖活性则没有明显变化($P > 0.05$)。实验结果说明,过表达 BATF3 可促进 786-O 的增殖能力,同时敲减 VIM 则可抑制 786-O 细

胞的增殖能力。Tranwell 实验检测结果(图 8B、C)显示,与 pcDNA3.1-NC 组比较,pcDNA3.1-BATF3 组 786-O 细胞的迁移、侵袭细胞数均明显升高(均 $P < 0.01$),过表达 BATF3 同时又敲减 VIM 组的 786-O 细胞的迁移、侵袭细胞数则均无明显变化(均 $P > 0.05$),实验结果说明,表明过表达 BATF3 可促进 786-O 细胞的迁移、侵袭能力,同时敲减 VIM 则可抑制 786-O 细胞的迁移、侵袭能力。

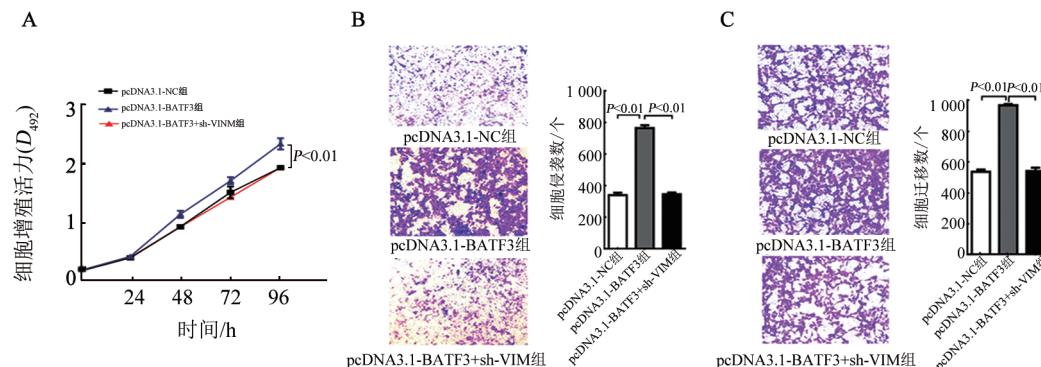
A: 过表达 BATF3 同时又敲减 VIM 后 786-O 细胞的增殖能力; B: 过表达 BATF3 同时又敲减 VIM 后 786-O 细胞的侵袭能力($\times 100$);C: 过表达 BATF3 同时又敲减 VIM 后 786-O 细胞的迁移能力($\times 100$)。

图8 过表达 BATF3 同时又敲减 VIM 对 786-O 细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响



3 讨 论

肾癌是中国常见的恶性肿瘤,其中以ccRCC为主,并且其发病率和病死率最高,许多患者在晚期才被诊断^[12]。目前,肾癌的治疗以手术治疗为主,辅以化疗,但即使在肾癌根治术后,仍有约20%~30%的患者可能出现局部复发或远处转移,导致患者的预后不佳^[13]。因此,提高ccRCC患者早期诊断率和预后效果是一个亟待解决的问题,迫切需要阐明肾癌发生发展的分子机制。

以往的研究^[14]表明,BATF3在Th1细胞中表达,并在常规1型DC(conventional type1 DC,cDC1)发育和功能中起主要作用。由于其亮氨酸拉链基序,BATF3可以与JUN蛋白异二聚化^[15]。另外,BATF3的亮氨酸拉链基序已被证明参与bZIP蛋白的二聚化,形成复合转录因子^[16]。BATF3可以通过与干扰素调节因子家族的成员相互作用来发挥转录激活作用^[17]。在MYC启动子上,BATF3与JUN形成AP-1复合体,控制经典霍奇金淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤细胞中的MYC表达,调节淋巴瘤细胞的增殖活性^[18]。同样BATF3在其他恶性肿瘤中发挥着关键调节作用。LI等^[19]发现,BATF3在胃癌细胞中的表达上调,敲减BATF3通过S1PR1-STAT3途径抑制胃癌细胞增殖和放射抗性。YANG等^[20]发现,Circ_0034642在胶质瘤中上调,并与胶质瘤患者的预后相关。circ_0034642通过miR-1205-BATF3通路促进胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭能力,并抑制细胞凋亡。ZHANG等^[21]发现,LINC01638在喉鳞状细胞癌组织中高表达,并与临床分期及淋巴结转移正相关,LINC01638高表达患者存活率低。LINC01638敲减在体外抑制了喉鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移和侵袭,减弱了体内肿瘤生长,这些作用是通过LINC01638海绵化miR-523-5p促进BATF3表达,在喉鳞状细胞癌发生发展中起着至关重要的作用。TIAN等^[22]发现,组蛋白甲基转移酶在结直肠癌组织中高表达,其通过抑制FOSB介导的miR-22来激活BATF3/PD-L1轴,促进结直肠癌细胞的免疫逃逸。

目前,BATF3在ccRCC中的作用机制尚未见报道。因此,本研究探讨了BATF3对肾癌ACHN和786-O细胞生物学行为的影响及其临床意义,结果显示BATF3 mRNA在ccRCC组织中高表达,且与ccRCC分化程度和临床分期有关联。ccRCC组织中BATF3蛋白阳性表达率显著高于癌旁组织($P<0.01$),但与临床病理特征没有关联,可能是由于组织标本例数较少,导致其差异无统计学意义。与正常肾上皮细胞相比,BATF3在肾癌ACHN、786-O细胞中的

表达量升高,这与文献报道一致^[7-9],提示BATF3在肾癌细胞中可能发挥致癌作用,进而参与ccRCC的发生发展。本研究以肾癌786-O、ACHN细胞为研究对象,采用BATF3在同一细胞中过表达与敲减等手段,通过MTS法、Transwell实验检测结果发现,BATF3可调控786-O、ACHN细胞的增殖、迁移和侵袭能力。因此推断BATF3在肾癌的发生发展过程中发挥致癌作用。

BATF3基因在调控cDC1发育中起关键作用,LIN等^[23]发现,在炎症刺激下,肠上皮细胞BATF3与JunD形成异二聚体直接促进CXCL5的转录,进而通过CXCR2募集嗜中性粒细胞,调节T细胞,最终促进结肠癌的发生发展。这一重要发现将有助于拓宽BATF3作用机制,这意味着BATF3在病理条件下会影响非cDC1的功能,炎症刺激过程中BATF3的上调主要发生在肠上皮细胞而不是免疫细胞中。按照同样的思路,可以推测BATF3在肾癌的发生发展过程中与BATF3调节cDC1发育的机制不同。

综上所述,BATF3在ccRCC组织中高表达,并与ccRCC的分化程度和临床分期密切相关, BATF3可调控肾癌786-O、ACHN细胞的增殖、迁移和侵袭能力,此外,BATF3是VIM的转录因子,促进VIM的转录。BATF3有望成为ccRCC临床治疗的潜在靶点。

[参 考 文 献]

- [1] KIM H, SHIM B Y, LEE S J, et al. Loss of von hippel-lindau (VHL) tumor suppressor gene function: VHL-HIF pathway and advances in treatments for metastatic renal cell carcinoma (RCC)[J/OL]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 9795[2023-02-10]. <https://doi.org/10.3390/ijms22189795>. DOI: 10.3390/ijms22189795.
- [2] ROSS-MACDONALD P, WALSH A M, CHASALOW S D, et al. Molecular correlates of response to nivolumab at baseline and on treatment in patients with RCC[J/OL]. J Immunother Cancer, 2021, 9(3): e001506[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001506>. DOI: 10.1136/jitc-2020-001506.
- [3] GAO S L, YIN R, ZHANG L F, et al. The oncogenic role of MUC12 in RCC progression depends on c-Jun/TGF-β signalling[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(15): 8789-8802. DOI: 10.1111/jcmm.15515.
- [4] ATAIDE M A, KOMANDER K, KNÖPPER K, et al. BATF3 programs CD8⁺T cell memory[J]. Nat Immunol, 2020, 21(11): 1397-1407. DOI: 10.1038/s41590-020-0786-2.
- [5] BENCKENDORFF J, KUCHAR J, LEITHÄUSER F, et al. Usefulness of BATF3 immunohistochemistry in diagnosing classical Hodgkin lymphoma[J/OL]. Diagnostics, 2021, 11(6): 1123[2023-02-10]. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11061123>. DOI: 10.3390/diagnostics11061123.
- [6] QIU Z J, KHAIRALLAH C, ROMANOV G, et al. Cutting edge: Batf3 expression by CD8 T cells critically regulates the development of

- memory populations[J]. *J Immunol*, 2020, 205(4): 901-906. DOI: 10.4049/jimmunol.2000228.
- [7] LI P, WENG Z P, LI P F, et al. BATF3 promotes malignant phenotype of colorectal cancer through the S1PR1/p-STAT3/miR-155-3p/WDR82 axis[J]. *Cancer Gene Ther*, 2021, 28(5): 400-412. DOI: 10.1038/s41417-020-00223-2.
- [8] LIU J, ROZEMAN E A, O'DONNELL J S, et al. Batf3⁺ DCs and type I IFN are critical for the efficacy of neoadjuvant cancer immunotherapy[J/OL]. *Oncotarget*, 2019, 8(2): e1546068[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2018.1546068>. DOI: 10.1080/2162402x.2018.1546068.
- [9] YI C, LI H B, LI D, et al. Upregulation of circular RNA circ_0034642 indicates unfavorable prognosis in glioma and facilitates cell proliferation and invasion via the miR-1205/BATF3 axis[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 13737-13744. DOI: 10.1002/jcb.28646.
- [10] SAITO M. Involvement of partial EMT in cancer progression[J]. *J Biochem*, 2018, 164(4): 257-264. DOI: 10.1093/jb/mvy047.
- [11] DU B W, SHIM J. Targeting epithelial-mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer[J/OL]. *Molecules*, 2016, 21(7): 965[2023-02-10]. <https://doi.org/10.3390/molecules21070965>. DOI: 10.3390/molecules21070965.
- [12] YING Y F, MA X Y, FANG J J, et al. EGR2-mediated regulation of m6A reader IGF2BP proteins drive RCC tumorigenesis and metastasis via enhancing S1PR3 mRNA stabilization[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(8): 750[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04038-3>. DOI: 10.1038/s41419-021-04038-3.
- [13] GU W Y, GONG L J, WU X, et al. Hypoxic TAM-derived exosomal miR-155-5p promotes RCC progression through HuR-dependent IGF1R/AKT/PI3K pathway[J/OL]. *Cell Death Discov*, 2021, 7: 147[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00525-w>. DOI: 10.1038/s41420-021-00525-w.
- [14] SPRANGER S, DAI D, HORTON B, et al. Tumor-residing Batf3 dendritic cells are required for effector T cell trafficking and adoptive T cell therapy[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(5): 711-723. DOI: 10.1016/j.ccr.2017.04.003.
- [15] LIANG H C, COSTANZA M, PRUTSCH N, et al. Super-enhancer-based identification of a BATF3/IL-2R-module reveals vulnerabilities in anaplastic large cell lymphoma[J/OL]. *Nat Commun*, 2021, 12: 5577[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25379-9>. DOI: 10.1038/s41467-021-25379-9.
- [16] IRFAN AFRIDI M, ZHENG Z F, LIU J Q, et al. The bZIP transcription factor BATF3/ZIP-10 suppresses innate immunity by attenuating PMK-1/p38 signaling[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 35(4): 181-196. DOI: 10.1093/intimm/dxac053.
- [17] ARNOLD P R, WEN M, ZHANG L, et al. Suppression of FOXP3 expression by the AP-1 family transcription factor BATF3 requires partnering with IRF4[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 966364[2023-02-10]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.966364>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.966364.
- [18] LOLLIES A, HARTMANN S, SCHNEIDER M, et al. An oncogenic axis of STAT-mediated BATF3 upregulation causing MYC activity in classical Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma[J]. *Leukemia*, 2018, 32(1): 92-101. DOI: 10.1038/leu.2017.203.
- [19] LI Z, WEI Y H, YIN L, et al. Knockdown of BATF3 inhibits gastric cancer cell growth and radioresistance via S1PR1/STAT3 pathway [J/OL]. *Ann Clin Lab Sci*, 2022, 52(5): 772-780[2023-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36261191/>.
- [20] YANG M, LI G, FAN L, et al. Circular RNA circ_0034642 elevates BATF3 expression and promotes cell proliferation and invasion through miR-1205 in glioma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(3): 980-985. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.12.052.
- [21] ZHANG H, ZHAO X D, WANG M M, et al. Long noncoding RNA LINC01638 contributes to laryngeal squamous cell cancer progression by modulating miR-523-5p/BATF3 axis[J]. *Aging*, 2021, 13(6): 8611-8619. DOI: 10.18632/aging.202675.
- [22] TIAN J L, WANG W W, ZHU J C, et al. Histone methyltransferase SETDB1 promotes immune evasion in colorectal cancer via FOSB-mediated downregulation of microRNA-22 through BATF3/PD-L1 pathway[J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 1-14. DOI: 10.1155/2022/4012920.
- [23] LIN Y, CHENG L, LIU Y, et al. Intestinal epithelium-derived BATF3 promotes colitis-associated colon cancer through facilitating CXCL5-mediated neutrophils recruitment[J]. *Mucosal Immunol*, 2021, 14(1): 187-198. DOI: 10.1038/s41385-020-0297-3.

[收稿日期] 2023-04-07

[修回日期] 2023-05-22

[本文编辑] 向正华, 沈志超