

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 7 月 14 日 (14.07.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/148346 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 33/574 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/070120
- (22) 国际申请日: 2022 年 1 月 4 日 (04.01.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
63/199,536 2021年1月7日 (07.01.2021) US
- (71) 申请人: 香港理工大学 (THE HONG KONG POLYTECHNIC UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙红磡, Hong Kong (CN)。
- (72) 发明人: 龚伟强 (KENG, Wee-Keong, Vincent); 中国香港特别行政区九龙红磡, Hong Kong (CN)。
- (74) 代理人: 北京世峰知识产权代理有限公司 (BEIJING PAT SF INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO. LTD); 中国北京市海淀区北

太平庄路 18 号城建大厦 11 层 A1110-11, Beijing 100088 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) Title: ZINC FINGER PROTEIN ZBTB20 AS BIOMARKER FOR DETECTING AND DIAGNOSING HEPATOCELLULAR CARCINOMA

(54) 发明名称: 锌指蛋白ZBTB20作为检测和诊断肝细胞癌的生物标志物

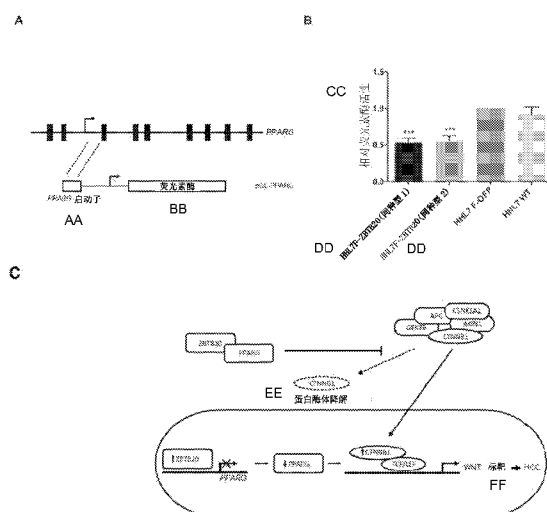


图 5

AA Promoter
BB Luciferase
CC Relative luciferase activity
DD Isotype
EE Proteasome degradation
FF Target

(57) Abstract: The present application provides a mechanism study of ZBTB20 leading to hepatocellular carcinoma. In addition, the present invention proves that ZBTB20 is an oncogene of hepatocellular carcinoma, and can be used for the diagnosis of very early and early hepatocellular carcinoma. The present invention also provides a primer set and a kit for specifically recognizing ZBTB20.

(57) 摘要: 本申请提供ZBTB20导致肝细胞癌的机理研究, 此外, 本发明证实ZBTB20是肝细胞癌的致癌基因, 并且可用于极早期和早期肝细胞癌的诊断。本发明还提供用于特异性识别ZBTB20的引物组和试剂盒。

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

锌指蛋白 ZBTB20 作为检测和诊断肝细胞癌的生物标志物

对相关申请的交叉引用

- 5 本申请要求于 2021 年 1 月 7 日提交的美国临时申请号 63/199,536 的优先权，出于所有目的将其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

本申请涉及肝细胞癌的诊断方法和试剂盒。

背景技术

- 10 锌指蛋白作为转录调控因子活跃在基因调控领域，参与细胞发育、代谢等调控，与许多发育、代谢疾病及癌症发生紧密相关。根据形成锌指结构域保守序列的不同，锌指蛋白主要分为 Cys₂His₂、Cys₄ 和 Cys₆ 三个亚型。其中，ZBTB20 (Zinc finger and BTB domain-containing protein 20)，属于经典 Cys₂His₂ 型锌指蛋白分类下 POK(含有 BTB/POZdomain)蛋白家族。
- 15 ZBTB20 mRNA 的表达水平在胎肝中很难检测到，但在出生后表达逐渐增加[1]。由于具有不同翻译起始位点，ZBTB20 具有两种同种型，均包含 N 端 BTB/POZ 和 C 端锌指结构域[2]。同种型 1 主要表达在出生后早期，而同种型 2 主要表达在出生后后期 [1]。
- 20 基因敲除 *Zbtb20* 可导致发育迟缓、代谢功能障碍和死亡[3]。*Zbtb20* 突变的小鼠肝脏中观察到血清胆红素和丙氨酸转氨酶水平升高，表明引起肝功能障碍[3]。*Zbtb20* 也被认为是小鼠肝脏再生的肝复制正调节因子[4]。*Zbtb20* 的肝脏特异性失活导致整个成年期肝脏中甲胎蛋白 (Afp) 基因的显著去抑制 [5]。虽然 *Afp* 在胎儿肝脏中高度表达，但 *Zbtb20* 表达在出生后才在肝脏中激活。已经表明，ZBTB20 通过特异性抑制 *Afp* 启动子驱动的转录活性，起到 *Afp* 转录抑制因子的作用 [5]。

- 25 肝癌是全世界第五个常见癌，其为引起癌相关死亡的第三个主要原因，其中，肝细胞癌(HCC)占原发性肝癌的 90%以上。目前，已经报道了 ZBTB20 在肝癌和肝细胞癌的

作用 [6-11]。

HCC 的诊断，尤其是极早期、早期诊断，或者在 AFP 缺乏的样品中诊断 HCC 是非常困难的。

本领域需要用于诊断 HCC 尤其是早期 HCC 的诊断标志物。

5

发明内容

本发明首次证实了 *Zbtb20* 是 HCC 的致癌基因。本发明人还证实该致癌机理是 WNT/CTNNB1 通路激活的结果。具体而言，本发明证实了 *ZBTB20* 可抑制 PPARG 表达，导致 CTNNB1 上调并促进 HCC 肿瘤发生。本说明书图 5 简述了 *ZBTB20*、PPARG、
10 CTNNB1、WNT 以及其他因子相互作用的关系。

本发明人还首次提供证据，表明 *ZBTB20* 可用作肝细胞癌例如极早期、早期肝细胞癌的诊断标志物。这在例如 AFP 阴性 HCC 患者中具有重要的早期诊断价值。

附图说明

15 图 1：*Zbtb20* 参与 WNT/CTNNB1 途径相关 HCC 肿瘤发生的致癌基因的体内验证。
(A) *ZBTB20* 的两种主要同种型之间的结构差异。BTB: Broad complex, tramtrack, bric a brac; POZ: 痘病毒和锌指; C₂H₂: Kruppel 型锌指; aa: 氨基酸。(B) 用于流体动力学尾静脉注射的基因递送质粒。(C) 从注射 *ZBTB20/shp53* (左) 和 Empty/*shp53* (右) 的 *Fah/SB11* 动物中取出的 120 天 PHI 肝脏。箭头: 肝脏肿瘤结节; 比例尺: 0.5 厘米。(D)
20 *ZBTB20/shp53* 和 Empty/*shp53* 组中肝脏肿瘤结节的数量。(E) *ZBTB20/shp53* 和 Empty/*shp53* 组中肝脏重量与体重的百分比。(F) 用 *ZBTB20/shp53* 共同注射的 *Fah/SB11* 小鼠肝脏样本中各种基因的 RT-PCR。FVB: 12 天龄野生型 FVB/N 小鼠肝脏; 肿瘤: 肿瘤肝结节; 肝脏: 肉眼观察正常的肝脏。(G) 注射 *ZBTB20/shp53* 的动物中 CTNNB1 的代表性免疫组织化学染色 (左图)。右图, 无一抗对照。比例尺: 250 μ m。(H) 通过
25 qRT-PCR 检测的 WNT/CTNNB1 通路的 *Cttnb1* 和下游靶基因的上调。平均值 $\pm$ 标准差; *P*: 未配对 t 检验; *n*: 动物数量。

图 2 : *ZBTB20* 过表达转染细胞的免疫荧光染色。在野生型 HHL7 细胞系中没有检测到 Flag 标记的信号 (黄色), 而在相同的激发参数下, 在用 *ZBTB20* 同种型 1、同种型 2 和 OFP 转染的细胞中检测到强烈的 Flag 标记信号。在相同的激发参数下, 在 *ZBTB20* 同种型 1 和 2 过表达转染细胞中检测到强集中 CTNNB1 信号 (红色), 而在野生型 HHL7 和 OFP 对照细胞系中仅检测到非常微弱的 CTNNB1 信号。细胞核用 DAPI 染色 (蓝色)。合并图像显示在最右侧的图中。比例尺: 10 μ m。

图 3 : *ZBTB20* 的体外过表达及其对 WNT/CTNNB1 通路的影响。(A) 使用 *piggyBac* 转座子系统将 *ZBTB20* Flag 标记的同种型 1 和 2 稳定整合到各种人肝细胞系中的过表达载体。Flag-标记的橙色荧光蛋白 (OFP) 用作阴性对照。(B) 在转染的 HHL 细胞中 *ZBTB20* 和 AFP 的相对 mRNA 表达水平。****, $P < 0.00005$; **, $P < 0.005$; *, $P < 0.05$ 。(C) 在荧光显微镜下观察转染的 HHL 细胞中绿色荧光蛋白 (GFP) 和 OFP 的荧光。BF: 明视野显微镜。(D) HHL 转染细胞中 *CTNNB1*、*AXIN2*、*CCND1* 和 *PPARG* 的相对 mRNA 表达水平。****, $P < 0.00005$; **, $P < 0.005$ 。(E) *GSK3B* 和 *APC* 在转染细胞中的相对 mRNA 表达水平。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$ 。(F) HHL 转染细胞中活性 CTNNB1、总 CTNNB1、PPARG 和 ACTB 的代表性蛋白质印迹和相对蛋白质水平。****, $P < 0.00005$; **, $P < 0.005$; *, $P < 0.05$ 。

图 4 : *ZBTB20* 的体外破坏及其对 WNT/CTNNB1 通路的影响。(A) 带有 gRNA 的敲除载体示意图, 用于靶向 *ZBTB20* 的 BTB 和锌指结构域。(B) 使用特定的引物检测基因组 DNA 中的敲除区域。提取并测序来自具有缺失 indel 条带 (虚线框) 的 PCR 产物。显示了来自混合和单一细胞培养物的 PCR 结果。(C) 使用 cDNA 的特异性引物对在转录水平上检测到敲除区域。显示了来自混合和单一细胞培养物的 PCR 结果。(D) *ZBTB20* 破坏细胞中 AFP、*CTNNB1*、*AXIN2* 和 *PPARG* 的相对 mRNA 表达水平。****, $P < 0.00005$; **, $P < 0.005$; *, $P < 0.05$ 。(E) 在 *ZBTB20* 破坏的细胞中, 相对于 ACTB, *ZBTB20*、总和活性 CTNNB1 的代表性蛋白质印迹和蛋白质水平。****, $P < 0.00005$; ***, $P < 0.0005$ 。

图 5 : *ZBTB20* 作为 *PPARG* 表达的转录抑制因子。(A) 用于构建 pGL3-PPARG 的 *PPARG* 基因座和启动子序列的示意图。(B) 荧光素酶启动子分析显示, 与转染 OFP 对照

载体的细胞相比，过表达 *ZBTB20* 同种型 1 和 2 的细胞能够分别将 *PPARG* 启动子活性降低 47% 和 45%。HHL7 野生型细胞 (HHL7 WT) 也包括在内用于比较。***, $P < 0.0005$ 。(C) 总结图显示了 *ZBTB20* 在抑制 *PPARG* 表达以及随后激活 WNT/CTNNB1 信号通路及其下游靶基因中的作用。

- 5 图 6：鉴定 *Zbtb20* 作为参与 HCC 肿瘤发生的原癌基因。(A) 突变转座子 (T2/Onc) 插入 *Zbtb20* 基因的示意图。转座子插入谱表明 *Zbtb20* 在 HCC 肿瘤发生中作为致癌基因发挥作用。显示了 T2/Onc 诱变转座子的示意图。灰色三角形：反向重复/同向重复 (IR/DR) 转座子序列，其位于包含功能获得和功能丧失 DNA 成分的盒两侧；SA：剪接受体；polyA：聚腺苷酸信号；MSCV：鼠干细胞病毒的 LTR；SD：剪接供体；空心箭
- 10 头：T2/Onc 相对于 *Zbtb20* 基因的有义定向插入；箭头：T2/Onc 相对于 *Zbtb20* 基因的反义定向插入；黑色和灰色箭头分别表示雄性或雌性动物中的转座子插入。(B) 从雄性和雌性肝脏肿瘤中提取的肝脏中各种基因的 RT-PCR，其中在 *Zbtb20* 中插入了转座子。Afp：甲胎蛋白；Sppl：分泌型磷蛋白 1；SB11：睡美人转座酶；*Zbtb20*：内源性 *Zbtb20*；Actb：肌动蛋白 β ；FVB：取自 12 天大的野生型 FVB/N 小鼠的正常肝脏。(C)
- 15 使用 ImageJ 获得相对于 Actb 的 *Zbtb20* 的表达水平；与反向插入的转座子相比，相对于 *Zbtb20* 翻译起始位点的转座子正向插入的肿瘤中显示出非显著的更高表达。

- 图 7：在流体力学尾静脉注射后 120 天，取自 *ZBTB20/shp53* *Fah*/SB11 小鼠的代表性肝脏肿瘤。(A) *Fah*/SB11 M1582 在 4X (左) 和 20X (右) 放大倍数下的肝肿瘤结节。在组织学上，该肝肿瘤结节可归类为 HCC。(B) *Fah*/SB11 M1584 在 4X (左) 和 20X
- 20 (右) 放大倍数下的肝肿瘤结节。在组织学上，该肝肿瘤结节可归类为分化良好的肝肿瘤。(C) 来自 *Fah*/SB11 M1752 的肝肿瘤结节放大 4X (左) 和 20X (右)。在组织学上，该肝肿瘤结节可归类为分化良好的肝肿瘤。T：肿瘤结节；P：实质肝细胞；比例尺：左侧图为 200 μm ，右侧图为 50 μm 。

- 图 8：*ZBTB20/shp53* 注射 *Fah*/SB11 小鼠的细胞增殖和肝脏肿瘤发生。(A) 在
- 25 *ZBTB20/shp53* 和 *Empty/shp53* 的 *Fah*/SB11 注射的肝脏中观察到显示相似高有丝分裂指数的代表性 HE (左图) 和 Ki67 (右图) 染色。(B) 在注射了 *ZBTB20/shp53* 的 *Fah*/SB11 肝脏肿瘤中观察到了显示不同水平 Ki67 免疫反应性的 HE (顶部图) 和 Ki67 (底部图)

染色。P：实质肝细胞；T：肿瘤结节。HE：苏木精-伊红染色；Ki67：增殖的细胞标志物；所有比例尺：250 μm 。

图 9：在注射 *ZBTB20/shp53* 的动物中观察到的肝肥大。(A) 在 *ZBTB20/shp53* 注射的实验动物中观察到的肥大的证据，每个视野中的细胞计数少于 *Empty/shp53* 注射的对照组。P：未配对 t 检验。(B) 在注射 *ZBTB20/shp53* 的实验动物中证实的增大的肝细胞。P：未配对 t 检验。(C) *ZBTB20/shp53* 和 *Empty/shp53* 注射组的代表性放大图像，显示 *ZBTB20/shp53* 动物中较少但增大的细胞。每个图格为 190 μm 正方形。

图 10：*ZBTB20* 的体外过表达及其对 WNT/CTNNB1 通路的影响。(A) PLC/PRF/5 (PLC5) 转染细胞中活性 CTNNB1、总 CTNNB1、PPARG 和 ACTB 的蛋白质印迹和相对蛋白质水平。(B) Hep3B 转染细胞中活性 CTNNB1、总 CTNNB1、PPARG 和 ACTB 的蛋白质印迹和相对蛋白质水平。***, $P < 0.0005$ ；**, $P < 0.005$ ；*, $P < 0.05$ 。(C) WNT/CTNNB1 信号的 TOP/FOP-Flash 检测显示，在用指定浓度的 *ZBTB20* 同种型转染的 Hep3B (上图) 和 PLC/PRF/5 (下图) 细胞中，TOP/FOP 活性呈剂量依赖性增加。****, $P < 0.00005$ ；***, $P < 0.0005$ 。

图 11：人肝癌细胞系 PLC/PRF/5 (PLC) 中内源性 *ZBTB20* 的体外破坏。使用特定引物对检测 PLC 基因组 DNA 中的敲除区域。测序结果表明，gRNA1 和 gRNA2 以及 gRNA4 和 gRNA5 分别删除了 *ZBTB20* 中的 BTB (上图) 和锌指 (下图) 结构域。WT：野生型 PLC 细胞；序列打乱：用含有非靶向控制 gRNA 序列的 pSpCas9-序列打乱的载体转染的 PLC 细胞；转染的：PLC 细胞用 pSpCas9 载体转染，该载体含有旨在靶向 *ZBTB20* BTB 或 DNA 结合锌指结构域的相关 gRNA。

图 12：*ZBTB20* 在 C3A 人肝癌细胞系中的体外破坏及其对 WNT/CTNNB1 信号通路的影响。(A) *ZBTB20* 破坏的 C3A 细胞中 *ZBTB20*、PPARG 和 CTNNB1 的相对 mRNA 表达水平。(B) *ZBTB20* 破坏的 C3A 细胞中 WNT/CTNNB1 信号通路下游靶基因的相对 mRNA 表达水平。****, $P < 0.00005$ ；***, $P < 0.0005$ 。

图 13：*PPARG* 启动子序列 (染色体 3p25.2, 12392051 至 12393088)，其中突出显示了 *ZBTB20* (12392366 至 12392374) 的推定结合基序 (UCSC 基因组浏览器，

GRCh97/hg1)。

图 14：人 HCC 样本中 *ZBTB20*、*PPARG* 和 *CTNNB1* 靶基因的表达水平，使用在线数据库 Gene Expression Omnibus (GEO) 进行比较。GSE6764 数据集包含来自 HCC 患者的 75 个组织样本的基因表达谱，涵盖四个肿瘤阶段（极早期 HCC、早期 HCC、晚期 HCC 和极晚期 HCC），与作为对照的正常肝脏进行比较。(A) 在 HCC 的极早期阶段检测到 *ZBTB20* 的更高表达，而未检测到 *AFP* 的显著变化。(B) 通过 *CTNNB1* 及其靶基因的上调，在疾病的极早期阶段激活 WNT 信号通路。*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ ；***， $P < 0.001$ 由双尾未配对 t 检验与正常肝组织对照确定。

10 发明详述

除非另有定义，本申请的所有术语具有本领域公知的定义。

按照肝细胞癌发展等级所进行的区分在本领域中为公知的，例如可以参照作为肿瘤分化组织学分级法(histological grade of tumor differentiation)的埃德蒙森-施泰纳分级系统(EdmondsonSteiner grading system)(Pirisi M 等，阿奇病理实验室医学，2010 年 12 月；134(12)：1818-22(Pirisi M et al., Arch Pathol Lab Med.2010Dec；134(12):1818-22))，而且，也可以参照美国癌症联合委员会(AJCC)肝肿瘤 TNM 分期(American Joint Committee on Cancer(AJCC)TNM Staging for Liver Tumors)2010 年第 7 版(7th ed.,2010)或日本肝癌研究组(LCSGJ)-T(Liver Cancer Study Group of Japan(LCSGJ)-T)的最新版 HCC TNM(肿瘤转移)分期(HCC TNM(Tumor node metastasis)staging)。

肝细胞癌按发展阶可分为极早期、早期、晚期或极晚期 HCC。肝细胞癌的筛选检查和监视检查是进行早期诊断及有效治疗的核心。本申请提供对这种效果最合适的标志物及标志物的用途。

在一个实施方案中，本申请用于诊断肝细胞癌的标志物包含以下标志物中的一种或多种：*ZBTB20*、甲胎蛋白 (Afp) 和/或分泌型磷蛋白 1 (*Spp1*)。在优选的实施方案中，本申请用于诊断肝细胞癌的标志物为 *ZBTB20*。

在另一个实施方案中，诊断肝细胞癌的标志物还可以包括选自以下标志物中的一种或多种：高尔基体蛋白 73 (GP73)、甲胎蛋白异质体 3 (AFP-L3)、磷脂酰基醇蛋白聚糖 3 (GPC-3)、骨桥蛋白 (OPN)、血清铁蛋白 (SF)、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)、胰岛素样生长因子 II (IGF-II)、肝细胞生长因子 (HGF)、肿瘤特异性生长因子 (TSGF)、异常凝血酶原 (DCP)、 α -L-岩藻糖苷酶 (AFU)、血清 GGT、基质金属蛋白酶 (MMP)、鳞状细胞癌抗原 (SCCA)、循环肿瘤细胞 (CTC) 或人宫颈癌基因 (HCCR)。

本申请的生物标志物可以如下的形式使用，即以含有能够从组织或血液中检测所述一种以上生物标志物的检测用物质的组合物、试剂盒、或者采用本申请的一种以上生物标志物进行肝细胞癌尤其是极早期、早期肝细胞癌的监视方法或诊断方法。

本申请的标志物可通过定量或定性分析，检测核酸尤其是蛋白质和/或 mRNA 的存在与否，以及/或者，可在该标志物的表达量本身、表达量的变化、表达量差异等水平上检测和/或定量。在本申请中，检测包括定量和/或定性分析，包括对存在及不存在的检测及对表达量的检测，这些方法在本领域中为公知的，为了本申请的实施，本领域技术人员能够选择合适的方法。

在本申请标志物的定量及定性分析中可使用本领域公知的用于定性或定量检测蛋白质或核酸的多种方法。例如，本申请的生物标志物可由 ELISA 分析、试纸快速检测试剂盒(dip stick rapidkit)分析、质谱、微阵列、核酸扩增或免疫分析等方法来执行。

本申请标志物的检测可在标志物的序列特征、功能性特征和/或抗原性特征基础上进行。例如，本申请的标志物可通过编码蛋白质的核酸尤其是 mRNA 和/或蛋白质来检测。

蛋白质水平上的定性或定量检测方法例如可以使用蛋白质印迹(Western blot)、ELISA、放射免疫测定、免疫扩散法、免疫电泳、组织免疫染色、免疫沉淀测定法、补体固定测定法、与溶液/悬浮液中标识的抗体的结合法、采用质谱仪的方法或采用利用抗体的蛋白质阵列等的方法。

核酸水平上的定性或定量检测方法可以使用核酸转印及扩增方法、使用 eTag 系统、将已标记的小珠为基础的系统、如核酸阵列的阵列系统等方法。

在一个方面，本发明涉及特异性识别 *ZBTB20* 的制剂在制备用于诊断受试者生物样品的肝细胞癌 (HCC) 的试剂盒中的用途。

- 5 在前述用途实施方案中，其中所述肝细胞癌是极早期 HCC、早期 HCC、晚期 HCC 或极晚期 HCC。

在前述任一项的用途实施方案中，用于测试的生物样品可以是肝脏组织、全血、血浆或血清，优选肝脏组织。

在前述用途实施方案中，所述生物样品来自哺乳动物，例如人。

- 10 在前述任一项的用途实施方案中，用于检测 *ZBTB20* 的制剂包括特异性结合 *ZBTB20* 的抗体、特异性结合 *ZBTB20* 的引物或特异性结合 *ZBTB20* 的 DNA 探针。

在前述用途实施方案中，所述试剂盒还包含检测其它肝细胞癌标志物的制剂，所述其它肝细胞癌标志物可为任何本文提到的标志物，优选甲胎蛋白和/或分泌型磷蛋白 1 (Spp1)。可用于本发明的试剂盒可为酶联免疫检测试剂盒或 PCR 试剂盒。

- 15 在前述用途实施方案中，特异性结合 *ZBTB20* 的引物包括：正向 5'-ATGAGATTACTCAGCCGGGCGGATC-3' (SEQ ID NO:21) 和反向 5'-AGCTTGTCTTGGAAGAAGGGGCTGC-3' (SEQ ID NO:22)；或正向 5'-CGAGCGCATTACAGCATCAACCTT-3' (SEQ ID NO:23) 和反向 5'-TCTCGATGTCGCTGTAGCCAAGCAG-3' (SEQ ID NO:24)。

- 20 在前述用途实施方案中，检测甲胎蛋白的引物序列包括：正向 5'-CCTGTGAACTCTGGTATCAG-3' (SEQ ID NO:11) 和反向 5'-GCTCACACCAAAGCGTCAAC-3' (SEQ ID NO:12)；检测 Spp1 的引物包括：正向 5'-CTTCACTCCAATCGTCCCTAC-3' (SEQ ID NO:13) 和反向 5'-

GCTCTCTTTGGAATGCTCAAGT-3' (SEQ ID NO:14)。

在另一个实施方案中，本发明涉及一种诊断受试者肝细胞癌 (HCC) 的方法，包括对所述受试者的生物样品中的 *ZBTB20* 进行检测或定量，并将该检测或定量结果与对照试样的 *ZBTB20* 的相应结果相比较；当与所述对照试样相比较，所述受试者的生物样品
5 中存在 *ZBTB20* 或者 *ZBTB20* 表达升高，可将该受试者诊断为肝细胞癌患者。

在前述方法实施方案中，其中所述肝细胞癌是极早期 HCC、早期 HCC、晚期 HCC 或极晚期 HCC。

在前述任一项的方法实施方案中，用于测试的生物样品可以是肝脏组织、全血、血浆或血清。

10 在前述任一项的方法实施方案中，所述生物样品来自哺乳动物，例如人。

在前述任一项的方法实施方案中，用于检测 *ZBTB20* 的制剂包括特异性结合 *ZBTB20* 的抗体、特异性结合 *ZBTB20* 的引物或特异性结合 *ZBTB20* 的 DNA 探针。

在前述方法实施方案中，特异性结合 *ZBTB20* 的引物包括：正向 5'-ATGAGATTACTCAGCCGGGCGGATC-3' (SEQ ID NO:21) 和反向 5'-
15 AGCTTGTCTTGAAGAAGGGGCTGC-3'(SEQ ID NO:22)；或正向 5'-CGAGCGCATTCACAGCATCAACCTT-3' (SEQ ID NO:23) 和反向 5'-TCTCGATGTCGCTGTAGCCAAGCAG-3'(SEQ ID NO:24)。

在前述方法实施方案中，检测甲胎蛋白的引物序列包括：正向 5'-CCTGTGAACTCTGGTATCAG-3' (SEQ ID NO:11) 和反向 5'-
20 GCTCACACCAAAGCGTCAAC-3'(SEQ ID NO:12)；检测 *Spp1* 的引物为：正向 5'-CTTTCACCTCCAATCGTCCCTAC-3' (SEQ ID NO:13) 和反向 5'-GCTCTCTTTGGAATGCTCAAGT-3' (SEQ ID NO:14)。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种试剂盒，包括特异性识别 *ZBTB20* 的引物、

抗体或探针，以及使用所述试剂盒的说明书。在另外一个实施方案中，试剂盒还包含检测其它肝细胞癌标志物的制剂，所述其它肝细胞癌标志物可为本文提到的任何标志物，优选甲胎蛋白和/或分泌型磷蛋白 1 (Sppl)。

5 在另外一个实施方案中，本申请的 ZBTB20 可用于监测受试者的肝细胞癌预后的方法，包括如下步骤：对受试者的样品进行本申请中公开的包括上述标志物或标志物组合检测或定量，并将该检测或定量结果与对照组试样的相应标志物的相应结果相比较；及当与所述对照组试样相比较，所述受试者的试样的蛋白或核酸存在或发生变化时，可判定受试者的预后情况。

10 在一个实施方案中，本发明涉及特异性识别 ZBTB20 的制剂在制备用于预测受试者的肝细胞癌 (HCC) 预后的试剂盒中的用途。

在一个实施方案中，本发明提供引物组，用于检测 ZBTB20，所述引物组包括如下引物：正向 5'-ATGAGATTACTCAGCCGGGCGGATC-3' (SEQ ID NO:21) 和反向 5'-AGCTTGTCTTGGAAGAAGGGGCTGC-3' (SEQ ID NO:22)；或正向 5'-CGAGCGCATTACAGCATCAACCTT-3' (SEQ ID NO:23) 和反向 5'-TCTCGATGTCGCTGTAGCCAAGCAG-3' (SEQ ID NO:24)。

20 在一个实施方案中，本发明提供引物组，用于检测甲胎蛋白和 Sppl，其中检测甲胎蛋白的引物序列包括正向 5'-CCTGTGAACTCTGGTATCAG-3' (SEQ ID NO:11) 和反向 5'-GCTCACACCAAAGCGTCAAC-3' (SEQ ID NO:12)；检测 Sppl 的引物包括：正向 5'-CTTTCACCTCCAATCGTCCCTAC-3' (SEQ ID NO:13) 和反向 5'-GCTCTCTTTGGAATGCTCAAGT-3' (SEQ ID NO:14)。

实施例

流体动力注射

流体力学导入法注射的方法参考文献[24-28]。简言之，制备了雄性 *Fah* 缺陷小鼠（混合遗传背景 C57BL/6 X 129），其携带敲入 *Rosa26* 基因座的遍在表达的 SB 转座酶转基因（*Rosa26-SB11*）（*Fah/SB11*）。按照以前的方法，制备包含双向启动子的空载体对照，该启动子在一个方向上驱动 *Fah* cDNA 和荧光素酶报告基因，在另一个方向上驱动一个空盒，pKT2/GD-Empty [27]。按照以前的方法，制备了 pT2/GD-IRES-GFP 载体，其包含用于克隆酶反应的目标盒 (DEST) (Life Technologies) [28]。在 pCMV6-XL5 载体中的 *ZBTB20* 转录变体 2（同种型 2）获自 OriGene (NM_015642.2)。通过标准限制酶消化从 pCMV6-XL5 中去除 *ZBTB20* 插入片段并克隆到 pENTR 载体（Life Technologies）中，以获得 pENTR-ZBTB20。使用 LR 克隆酶反应将来自 pENTR-ZBTB20 的 ZBTB20 组分克隆到 pT2/GD-IRES-GFP 中以获得 pT2/GD-IRES-GFP-ZBTB20。包含针对 *Trp53* 基因的短发夹的转座子载体(pT2/shp53)的制备方法如前所述[25-28]。用于流体动力学尾静脉注射的所有转基因均使用 EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) 制备。使用先前建立的条件，将 20 微克的每种构建体通过流体动力学注射到 6 周龄的 *Fah/SB11* 雄性小鼠中(n = 11) [24]。这些小鼠通常用 7.5 μg/ml 2- (2-硝基-4-三氟甲基苯甲酰基) -1,3-环己二酮 (NTBC, 瑞典 Swedish Orphan Biovitrum) 饮用水饲喂，但在流体动力学注射转座子载体后用正常饮用水代替。使用肿瘤数量作为致癌作用的输出，10 只注射的实验动物应具有足够的统计功效 (>95%)，置信水平为 95%，假设对照载体不会获得肿瘤（标准偏差 ± 3 背景肿瘤）。所有动物都接受了人类护理，研究方案已获得香港特别行政区香港理工大学动物学科伦理小组委员会的批准。表达转座子载体还共表达 *Fah* 基因，这允许选择性地增殖共表达感兴趣的转基因和 *Fah* 的肝细胞。在流体动力学递送后，观察稳定掺入转基因过表达后肝脏的表型。观察注射的实验动物的体重变化和荧光素酶活性，方法参见[25-28]。本研究使用了 pKT2/GD-Empty 和 pT2/shp53 作为对照 (n = 6)。

肝肿瘤分析

小心从处死的动物身上取出整个肝脏，称重、洗涤并置于冷磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。分离叶并计算表面肝肿瘤结节的数量。使用细镊子小心地从肝叶中取出所有合理大小的肿瘤结节（直径 > 2 mm），并置于新鲜的冷 PBS 中。然后使用无菌刀片将足够大的肝结节分成两半，并分成用于 RNA 提取和组织病理学分析的样品。RNA 的组织样本在

-80°C 下储存在 RNAlater (Sigma) 中, 以防止 RNase 污染和降解。仅对较大的肿瘤结节 (直径 > 2 mm) 进行组织切片。来自各种组织的福尔马林固定石蜡包埋切片使用标准切片机 (Leica) 以 5 微米切片, 并热固定在载玻片上。组织切片载玻片使用标准方案用苏木精-伊红 (HE) 进行处理和染色, 或用于免疫组织化学 (IHC) 分析。组织病理学分析由合

5 资格的专业人员完成。

细胞数量和大小测定

对于细胞数量测定, 对来自两性的实验和对照动物的代表性固定区域中的细胞数量进行计数。对每只动物计数五个代表性区域并表示为细胞数。至于细胞大小的确定, 采用 ImageJ 1.40J 软件 (NIH, 马里兰州, 美国) 测量来自两性的实验和对照动物的肝细胞

10 的较短直径。随机测量十四个代表性肝细胞并显示为细胞大小。

免疫组织化学 (IHC) 分析

玻璃组织切片载玻片通过逐渐降低乙醇浓度进行脱蜡和再水化。使用市售的揭蔽溶液 (Vector Laboratories) 揭蔽组织切片上的抗原表位。然后用 3% 过氧化氢处理组织切片载玻片以去除任何内源性过氧化物酶。使用 M.O.M 小鼠免疫球蛋白阻断试剂 (Vector

15 Laboratories) 在 4°C 下加湿室中放置数小时进行封闭。对于 IHC, 然后使用 1:200 稀释的 Ki67 一抗 (Abcam) 或 1:100 稀释的 CTNNB1 一抗 (Cell Signaling Technology, CST) 在 4°C 的加湿室中孵育切片过夜。初次孵育后, 切片在 PBS 中彻底清洗, 然后与针对使用的一抗的辣根过氧化物酶二抗一起孵育。用 PBS 彻底清洗后, 用新鲜制备的 DAB 底物 (Vector Laboratories) 处理切片, 在停止水中反应之前应产生足够的信号。最后, 切片

20 片用苏木精轻轻复染, 通过逐渐增加乙醇浓度脱水, 在二甲苯中亮片并在 Permount (Thermo Fisher Scientific) 中封片。

逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)

使用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 从肿瘤结节中提取 RNA。将 1 µg 总 RNA 作为模板进行第一链 cDNA 合成 (Roche)。所有样品均包含有 (RT+) 和没有 (RT-) 逆转录酶的反应。随后

以 1 μ l 的 cDNA 为模板，用不同的引物对进行 PCR。甲胎蛋白 (*Afp*) 的引物序列是正向 5'-CCTGTGAACTCTGGTATCAG-3' (SEQ ID NO:11) 和反向 5'-GCTCACACCAAAGCGTCAAC-3'(SEQ ID NO:12) (扩增子 410 bp)；分泌型磷蛋白 1 (*Spp1*) 正向 5'-CTTTCACCTCCAATCGTCCCTAC-3' (SEQ ID NO:13) 和反向 5'-GCTCTCTTTGGAATGCTCAAGT-3' (SEQ ID NO:14) (扩增子 305 bp)；肌动蛋白 β (*Actb*) 正向 5'-GTGACGAGGCCAGAGCAAGAG-3' (SEQ ID NO:15) 和反向 5'-AGGGGCCGGACTCATCGTACTC-3' (SEQ ID NO:16) (扩增子 938 bp)；延胡索酰乙酰乙酸水解酶 (*Fah*) 正向 5'-ATGAGCTTTTATTCCAGTGGCC-3' (SEQ ID NO:17) 和反向 5'-ACCACAATGGAGGAAGCTCG-3' (SEQ ID NO:18) (扩增子 503 bp)；睡美人转座酶 (*SB11*) 正向 5'-ATGGGAAAATCAAAAGAAATCAGCC-3' (SEQ ID NO:19) 和反向 5'-CGCACCAAAGTACGTTTCATCTCTA-3' (SEQ ID NO:20) (扩增子 221 bp)；Zbtb20 正向 5'-ATGAGATTACTCAGCCGGGCGGATC-3' (SEQ ID NO:21) 和反向 5'-AGCTTGCTTTGGAAGAAGGGGCTGC-3'(SEQ ID NO:22) (扩增子 343 bp)；人 *ZBTB20* 同种型 2 正向 5'-CGAGCGCATTCACAGCATCAACCTT-3' (SEQ ID NO:23) 和反向 5'-TCTCGATGTCGCTGTAGCCAAGCAG-3'(SEQ ID NO:24) (扩增子 200 bp)。PCR 条件为 25 到 30 个循环以避免扩增子饱和。使用 ImageJ 软件对非饱和 RT-PCR 扩增子进行半定量分析。简言之，使用 ImageJ 软件将非饱和 RT-PCR 扩增子带的强度检测为相对于 *Actb* 表达水平的值。

体内肝组织的定量 RT-PCR (qPCR)

采用常规方法，从肝脏样品中分离 RNA (PureLink RNA mini, Ambion)。对于每个样品，用 DNase (Turbo DNA-free, Ambion) 处理 10 μ g RNA 以去除污染的基因组 DNA，然后使用 SuperScript III 第一链合成系统 (Invitrogen) 从 1 μ g 模板合成 cDNA。qPCR 使用 FastStart Universal SYBR Green Master mix (Roche) 进行，25 μ L 反应体积中包含 1 μ L cDNA 模板。对照反应在没有 cDNA 模板的情况下或使用在没有逆转录酶的情况下合成的 cDNA 进行。反应在 Bio-Rad qPCR 机器中进行，条件如下：40 个循环：94°C 5 分钟，94°C 15 秒，58°C 10 秒，72°C 30 秒，然后进行熔解-曲线分析。采用 *Actb* 对每个样品的目标基因进行标准化量化。引物序列如下：

Actb 正向 5'-TCCAGCCTTCCTTCTTGGGTATGGA-3' (SEQ ID NO:25); 和反向 5'-CGCAGCTCAGTAACAGTCCGCC-3' (SEQ ID NO:26) (扩增子 365 bp);

axin 2 (Axin2) 正向 5'-ATGAGTAGCGCCGTGTTAGTG-3' (SEQ ID NO:27) 和反向 5'-GGGCATAGGTTTGGTGGACT-3' (SEQ ID NO:28) (扩增子 150 bp);

- 5 细胞周期蛋白 D1 (*Ccnd1*) 正向 5'-CAGAAGTGCGAAGAGGAGGTC -3' (SEQ ID NO:29) 和反向 5'-TCATCTTAGAGGCCACGAACAT-3' (SEQ ID NO:30) (扩增子 130 bp);

Ctnnb1 正向 5'-ATGGAGCCCCGGACAGAAAAGC-3' (SEQ ID NO:31) 和反向 5'-CTTGCCACTCAGGGAAGGA-3' (SEQ ID NO:32) (扩增子 108 bp);

- 10 淋巴增强子结合因子 1 (*Lef1*) 正向 5'-TGTTTATCCCATCACGGGTGG-3' (SEQ ID NO:33) 和反向 5'-CATGGAAGTGTCGCCTGACAG-3' (SEQ ID NO:34) (扩增子 67 bp);

骨髓细胞瘤癌基因 (*Myc*) 正向 5'-ATGCCCCCTCAACGTGAACTTC-3' (SEQ ID NO:35) 和反向 5'-CGGAGTCGTAGTCGAGGTCATA-3' (SEQ ID NO:36) (扩增子 55 bp);

转录因子 7, T 细胞特异性 (*Tcf7*) 正向 5'-AGCTTTCTCCACTCTACGAACA-3' (SEQ ID NO:37) 和反向 5'-AATCCAGAGAGATCGGGGGTC-3' (SEQ ID NO:38) (扩增子 115 bp);

- 15 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (*Gapdh*) 正向 5'-GTGTTCTACCCCCAATGTGT-3' (SEQ ID NO:39) 和反向 5'-GAGACAACCTGGTCCTCAGTGT-3' (SEQ ID NO:40) (扩增子 148 bp)。

qPCR 是本领域公知的, 仪器和条件根据实际情况而定, 并无特殊限制。

转染细胞的 qPCR

- 20 使用 PrimeScript RT Master Mix (Takara) 从转染细胞中提取的 500 ng 总 RNA 合成转染细胞 cDNA。cDNA 在无核酸酶水中以 1:10 的比例稀释, 4 μ L 稀释的 cDNA 用于进行 qPCR, 主混合物 (GoTaq qPCR Master Mix, Promega) 含有 SYBR Green I, 最终每个引物的浓度为 0.2 μ M。反应在 QuantStudio7 Flex 实时 PCR 系统 (Thermo Fisher) 上运行。引物序列如下: *ACTB* 正向 5'-GCCGTCTTCCCCTCCATCGT-3' (SEQ ID NO:41) 和反向 5'-

TGCTCTGGGCCTCGTCGC-3'(SEQ ID NO:42) ;

AXIN2 正向 5'-CTCCCCACCTTGAATGAAGA-3' (SEQ ID NO:43)和反向 5'-TGGCTGGTGCAAAGACATAG-3'(SEQ ID NO:44) ;

AFP 正向 5'-CTTTGGGCTGCTCGCTATGA-3' (SEQ ID NO:45)和反向 5'-

5 GCATGTTGATTTAACAAGCTGCT-3'(SEQ ID NO:46) ;

PPARG 正向 5'-ACCAAAGTGCAATCAAAGTGGA-3' (SEQ ID NO:47)和反向 5'-ATGAGGGAGTTGGAAGGCTCT-3'(SEQ ID NO:48) ;

CTNNB1 正向 5'-AAAGCGGCTGTTAGTCACTGG-3' (SEQ ID NO:49)和反向 5'-CGAGTCATTGCATACTGTCCAT-3'(SEQ ID NO:50) ;

10 *ZBTB20* 正向 5'-CGAGCGCATTACAGCATCAACCTT-3' (SEQ ID NO:51)和反向 5'-TCTCGATGTCGCTGTAGCCAAGCAG-3'(SEQ ID NO:52) ;

CCND1 正向 5'-GCTGCGAAGTGGAACCATC-3' (SEQ ID NO:53)和反向 5'-CCTCCTTCTGCACACATTTGAA-3'(SEQ ID NO:54) ;

15 糖原合酶激酶 3 β (*GSK3B*) 正向 5'-TCGAGAGCCTCCAGATCATGAGAA-3' (SEQ ID NO:55)和反向 5'-CGGAACATAGTCCAGCACCAGA-3'(SEQ ID NO:56) ;

WNT 信号通路 (APC) 的 APC 调节子正向 5'-AAAACGAGCACAGCGAAGAATAGC-3' (SEQ ID NO:57)和反向 5'-TCGTGTAGTTGAACCCTGACCAT-3'(SEQ ID NO:58) ;

GAPDH 正向 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'(SEQ ID NO:59) 和反向 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'(SEQ ID NO:60)。

20 qPCR 是本领域公知的，仪器和条件根据实际情况而定，并无特殊限制。

ZBTB20 在人肝细胞系中的过表达

采用 piggyBac (PB) 转座子系统在永生化人肝细胞系 (HHL7)和人肝癌细胞系—

PLC/PRE/5 和 Hep3B (均来自 ATCC) 中稳定整合和过表达 Flag 标记的 *ZBTB20* 变体[29]。在 *ZBTB20* 转录子变体 1 (同种型 1) (OriGene, NM_001164342) 和转录子变体 2 (同种型 2) (OriGene, NM_015642) 的起始密码子之后添加了 Flag 标记序列 5'-GACTACAAAGACGATGACGACAAG-3'(SEQ ID NO:61)。使用具限制酶将这些带有 Flag 标签的 *ZBTB20* 变体插入到 pENTR 载体中, 以产生 pENTR-Flag-*ZBTB20* (同种型 1) 或 (同种型 2)。表达载体通过将 Flag 标记的 *ZBTB20* 变体从前述克隆导入目标载体 pPB/SB-DEST-GFP [30] 获得, 以产生 pPB/SB-Flag-*ZBTB20* (同种型 1) 或 (同种型 2) -GFP。使用类似的方法生成含有橙色荧光蛋白 (OFP) 的对照表达载体, 以制备 pPB/SB-Flag-OFP。使用 ViaFect 转染试剂 (Promega) [30], 将 1 微克表达载体或对照载体与 1 微克 PB 转座酶载体共转染到细胞中。按照说明书的建议, 将 3:1 的 ViaFect 转染试剂与 DNA 转染到 24 孔板的 5×10^4 细胞中。在培养基中 1 mg/mL 嘌呤霉素下选择转染细胞。转染后约 4 周获得稳定转染的细胞系。然后收集转染的细胞用于 DNA、RNA 和蛋白质提取; 和用于免疫荧光 (IF) 染色。

ZBTB20 在人肝癌细胞系中的靶向破坏

采用 CRISPR/Cas9 系统来破坏 *ZBTB20*。设计了五种不同的引导 RNA (命名为 gRNA1 到 gRNA5) 以靶向 *ZBTB20* 的 BTB 和 DNA 结合锌指结构域。gRNA 序列如表 1 所示。这些 gRNA 被连接到 Cas9 (pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 载体, 由张峰博士惠赠) (Addgene 质粒 #62988; <http://n2t.net/addgene:62988>; RRID:Addgene_62988), 按照其提供的方案制备携带 gRNA 和 Cas9 的敲除载体 [31]。通过 ViaFect 转染试剂 (Promega), 将 200 纳克的每种敲除载体混合并转染到 6 孔板的 15×10^4 PLC/PRE/5 和 C3A (ATCC) 细胞中。含有非靶向对照 gRNA 序列 5'-CATTCTCTCAGTGCTATAGA-3' (SEQ ID NO:62) 的 1 微克 pSpCas9-序列打乱的载体被转染为阴性对照。转染细胞在 0.4 μ g/mL 嘌呤霉素下在培养基中培养 5 天选择。从转染细胞中提取基因组 DNA 和 RNA 用于进一步分析。为了获得单细胞培养物, 将 50 个细胞稀释在 10 mL 培养基中并以 100 μ L/孔接种到 96 孔板中。

表 1: 设计用于靶向 *ZBTB20* 功能域的 gRNA。

gRNA	序列 (5' to 3')	靶结构域
gRNA1	CAGCGACATCGATCCCGT <u>CGG</u> (SEQ ID NO:1)	BTB
gRNA2	CGTGCTACGGGTCTCGCAGT <u>CGG</u> (SEQ ID NO:2)	
gRNA3	AACAGAACTACGTCAAGCA <u>TGG</u> (SEQ ID NO:3)	锌指
gRNA4	AACCGCGAGGAAGAGGAATT <u>AGG</u> (SEQ ID NO:4)	
gRNA5	GTGTAGTATCTGCAACAAGCT <u>TGG</u> (SEQ ID NO:5)	

PAM 序列以粗体加下横线表示。

ZBTB20 破坏细胞的分析

- 5 为了确定转染的 PLC/PRF/5 和 C3A 细胞中 ZBTB20 的破坏,使用不同的引物对来鉴定 ZBTB20 破坏细胞的基因组 DNA 和 cDNA 中的插入缺失(表 2)。对于基因组 DNA,引物对 1 和 2 用于扩增目标 BTB 结构域——野生型 (WT) 和缺失等位基因分别为 515 bp 和 446 bp。引物对 3 和 4 用于扩增目标锌指结构域——WT 和缺失等位基因分别为 275 bp 和 203 bp。对于 cDNA,引物对 1 和 2 用于扩增目标 BTB 结构域——WT 和缺失等位基因分别为 380 bp 和 309 bp。引物对 4 和 5 用于扩增目标锌指结构域——WT 和缺失等位基因分别为 501 bp 和 441 bp。

表 2: 用于识别 ZBTB20 破坏细胞中插入缺失的引物。

引物	靶结构域	序列 (5' to 3')
引物 1	BTB	CGAGCGCATTACAGCATCAACCTT (SEQ ID NO:6)
引物 2		GAACACATCGCCACGTTCT (SEQ ID NO:7)

引物 3	锌指	CCGCCAAACAGAACTACGTC (SEQ ID NO:8)
引物 4		CCAGGAGGGTCTTGTGAGAGA (SEQ ID NO:9)
引物 5		CAGCCCTCTTCACTACCCAG (SEQ ID NO:10)

免疫荧光 (IF) 染色

将稳定转染的细胞接种到 24 孔板中的圆形盖玻片上过夜。弃去培养基并用冷 PBS (1X) 洗涤细胞两次。接下来，在室温下用 4% 甲醛孵育 10 分钟固定细胞，并在室温下用 5% BSA 封闭 1 小时。然后将细胞与一抗在 4°C 下孵育过夜。使用的一抗是 Flag 抗体 (Sigma-Aldrich)、活性 CTNNB1 (CST) 或总 CTNNB1 (CST)，然后按照制造商提供的稀释液进行稀释。然后，将细胞用冷 PBS 冲洗两次，并在室温下与特异性二抗一起孵育 1 小时。最后，用 1:5000 稀释的 DAPI 孵育 5 分钟以染色细胞核。然后使用 Anti-Faded 封固剂将细胞封固在载玻片上。IF 使用 Leica TCS SP8 MP 多光子显微镜进行观察。

10 转染细胞的蛋白质印迹分析

使用 SDS 蛋白质裂解缓冲液从转染的细胞中提取蛋白质。使用标准蛋白质测定法 (Bio-Rad) 检测蛋白质浓度，并将 30 µg 蛋白质加载到 SDS-PAGE 中并转移到 PVDF 膜上。一抗针对活性 CTNNB1 (CST)、总 CTNNB1 (CST)、PPARG (CST)、ACTB (TransGen Biotech) 和 Flag (Sigma-Aldrich) 在 5% BSA 中以 1:1000 的浓度稀释。二抗 (抗小鼠或抗兔) 在 5% BSA 中以 1:2000 的浓度稀释。膜用 5% 脱脂牛奶封闭，然后与一抗在 4°C 下孵育过夜，随后在室温下孵育二抗 1 个小时。在 10 分钟的间隔内用 1X TBST 洗涤膜 3 次。最后，使用 Immobilon Western 化学发光 HRP 底物 (Millipore) 使膜显色。使用 ImageJ 软件对蛋白质条带进行半定量分析。ACTB 表达水平作为参照对蛋白质条带的强度进行测量。

20 启动子活性分析

构建 pGL3-PPARG 报告质粒以研究 ZBTB20 对 PPARG 启动子的转录作用。ZBTB20 的假定结合基序先前已确定为以下序列 - GATGTATA [32]。有趣的是，该结合基序也存在于 PPARG 的启动子区域。因此，包含 ZBTB20 的推定结合位点的 PPARG 的 1038 bp 启动子区域[33]，通过高保真 Taq 聚合酶从 HHL7 基因组 DNA 使用以下引物对进行 PCR 扩增：正向 5'- GGTACCCACTCATGTGACAAGACCTGCTCC-3' (SEQ ID NO:63)和反向 5'- GCTAGCAGCATGGAATAGGGGTTTGCTGTAATTC-3'(SEQ ID NO:64)。然后将 1038bp 的启动子片段定向克隆到 pGL3 基本载体(Promega)的 KpnI 和 NheI 位点，得到表达载体 pGL3-PPARG。DNA 测序以确保在 PCR 扩增过程中没有引入突变。将先前用 ZBTB20 同种型或 OEP 对照转染的 HHL7 细胞 (6×10^4 个细胞) 接种到 12 孔板上过夜，用 1 μ g pGL3-PPARG 和作为内源转染对照的 0.1 μ g pRL-TK (Promega)转染细胞。转染 24 小时后，使用 Glomax 20/20 Luminometer (Promega)测定荧光素酶活性。

TOP/FOP-Flash 荧光素酶报告基因检测

CTNNB1 报告子质粒，由 M50 Super 8x TOP-Flash (Addgene 质粒 #12456 ; <http://n2t.net/addgene:12456> ; RRID:Addgene_12456) 及其突变对照，M51 Super 8x FOP-Flash (Addgene 质粒 #12457; <http://n2t.net/addgene:12457>; RRID:Addgene_12457) 组成由 Randall Moon 博士惠赠[35]。TOP/FOP-Flash 报告基因、pRL-TK (Promega) 和 pPB/SB-Flag-ZBTB20 以 6×10^4 细胞的密度共转染到 12 孔板上的 PLC/PRF/5 和 Hep3B 细胞中。转染 24 至 48 小时后，收集细胞，使用双荧光素酶报告基因检测系统 (Promega) 进行荧光素酶测量，并通过 Glomax 20/20 Luminometer (Promega) 测量荧光素酶活性。相对荧光素酶活性表示为 TOP-flash/FOP-flash 荧光素酶活性的比率，并针对 pRL-TK 荧光素酶活性进行标准化。

ZBTB20 作为 HCC 的检测标志物

GSE6764 数据集包括来自 38 名 HCV 感染患者的 75 个组织样本，其中 13 个样本来自肝硬化组织、17 个来自发育不良的结节和 35 个来自 HCC 的样本。正常组织样本取自 10 名患者的健康肝脏 [Wurmbach, E., et al., *Genome-wide molecular profiles of HCV-induced*

dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2007. **45**(4): p. 938-47.].

根据以下条件在 35 个 HCC 样本中定义了四个 HCC 病理阶段：(i) 极早期 HCC (8 例)，包括直径 ≤ 2 cm 的分化良好的肿瘤，没有血管浸润/卫星结节（大小范围：8 - 20 毫米）；(ii) 早期 HCC (10 例)，包括小于 2 cm 的肿瘤，伴有微血管浸润/卫星结节；
5 2-5 cm 高至中度分化的肿瘤，无血管浸润/卫星结节；或 2-3 个小于 3 厘米的分化良好的结节（大小范围：3-45 毫米）；(iii) 晚期 HCC (7 例)，包括分化差的 >2 cm 肿瘤，伴微血管浸润/卫星结节，或 >5 cm 的肿瘤；(iv) 极晚期 HCC (10 例)，包括大血管浸润或肝脏弥漫性病变（Wurmbach, E., et al., 同上）。

收集组织标本进行 RNA 提取，使用人 U133 plus 2.0 阵列 (Affymetrix) 进行微阵列杂
10 交。微阵列数据分析后，获得基因表达谱，并公布在 GSE6764 数据集（Wurmbach, E., et al., 同上）。本发明人从中提取 ZBTB20 和 AFP 的表达值，并比较它们在正常肝组织样本和不同肿瘤阶段的 HCC 组织样本中的表达。

统计分析

本发明的值以平均值 $\pm$ SD 给出。使用具有 p 值的双尾未配对 student's t-test（Prism
15 软件）评估统计显著性。 $P < 0.05$ 的值被认为具有统计学意义。

结果

证实 *Zbtb20* 是 HCC 的癌基因

当前的癌症基因组图谱数据库（肝细胞癌，TCGA，临时）中证据表明，*ZBTB20* 拷
20 贝数和 mRNA 表达在 22 例（6%）人类 HCC（ $n = 360$ ）中发生了改变。在这些改变的测序患者（ $n = 22$ ）中，1 名患者表现出基因扩增，3 名患者表现出深度缺失，1 名患者出现意义不明的截断突变，16 名患者表现出 mRNA 上调，1 名患者同时表现出基因扩增和 mRNA 上调。这些结果暗示 *ZBTB20* 作为潜在肝脏癌基因的作用。两种已知 *ZBTB20* 同

种型的示意图如图 1A 所示，两种同种型都包含 BTB/POZ 和锌指结构域。根据先前使用 SB 转座子插入诱变系统对候选肝癌基因的正向遗传筛选，基于 65% 诱变转座子载体的插入谱在具有翻译起始位点的外显子之前处于正向，*Zbtb20* 被鉴定为潜在的原癌基因（图 6A）[8, 9]。使用半定量 RT-PCR 在肝脏肿瘤中量化内源性 *Zbtb20*，其中包含相对于内源性基因的两个方向的诱变转座子插入（图 6B）。这些肝脏肿瘤都表达 *Afp* 和/或 *Spp1* 这两种已知的肝癌标志物，并且 SB 转座酶（SB11）呈阳性，表明转座事件很可能是肝脏肿瘤发生的原因（图 6B）。与具有反向插入的肝肿瘤相比，相对于内源性 *Zbtb20* 基因具有正向转座子插入的肝肿瘤倾向于显示更高的表达水平（图 6B 和图 6C）。

***ZBTB20* 作为一种新型原癌基因参与肝脏肿瘤发生**

由于 *Zbtb20* 在 *Trp53* 缺乏遗传背景下被鉴定为候选肝脏原癌基因 [8]，基于 SB 转座子的 *ZBTB20* 表达载体 (pT2/GD-IRES-GFP-ZBTB20) 和针对 *Trp53* 基因的短发夹 RNA 载体 (pT2/shp53) 通过高容量快速流体动力学尾静脉注射共同递送至 *Fah/SB11* 小鼠（图 1B）。作为对照，共同给与基于 SB 转座子的空载体 (pKT2/GD-Empty) 与 pT2/shp53 (Empty/shp53)（图 1B）。在流体动力学注射 (PHI) 后 120 天，处死 pT2/GD-IRES-GFP-ZBTB20 和 pT2/shp53 (*ZBTB20/shp53*) 共同注射的实验动物。与注射 Empty/shp53 ($n = 6$) 的 *Fah/SB11* 动物相比，注射 *ZBTB20/shp53* ($n = 8$) 的实验 *Fah/SB11* 动物出现了明显更多的肝脏肿瘤结节 ($P < 0.0001$, Student's t-test)（图 1C 和 1D）。表 3 示出注射组中分离出的肝结节数。

在注射 *ZBTB20/shp53* 的 *Fah/SB11* 组中观察到的肝脏表型

与注射 Empty/shp53 ($5.233\% \pm 0.367$) 的对照组相比，注射 *ZBTB20/shp53* 的 *Fah/SB11* 动物的肝脏相对于整体体重显著增大 ($6.625\% \pm 0.306$, w/w 百分比 $\pm$ 标准偏差)（图 1E）。这些结果表明 *ZBTB20* 过表达，连同 *Trp53* 失活，可以诱导肝肿大。注射组的肝脏重量百分比如表 3 所示。有趣的是，仅注射 *ZBTB20* 过表达载体的 *Fah/SB11* 小鼠 ($n = 3$) 显示出明显高于仅空过表达对照的肝脏体重百分比 ($P = 0.0098$)。仅空对照和仅 *ZBTB20* 组的肝脏与体重百分比分别为 $5.27\% \pm 0.26$ 和 $7.03\% \pm$

1.45 (表 3)。在 Empty 对照动物中没有观察到肿瘤, 但只有 1 只动物在仅 ZBTB20 组中显示出单个肝脏结节 (表 3)。

表 3: 注射组的肿瘤数量和肝脏重量百分比。

ZBTB20/shp53	PHI	肝重量 (%)	结节数
Fah/SB11 M1582	120	7.2	5
Fah/SB11 M1584	120	6.4	7
Fah/SB11 M1751	120	6.5	5
Fah/SB11 M1752	120	7	5
Fah/SB11 M1753	120	6.4	4
Fah/SB11 M1761	120	6.4	3
Fah/SB11 M1762	120	6.6	5
Fah/SB11 M1764	120	6.5	2
ZBTB20	PHI	肝重 (%)	结节数
Fah/SB11 M1971	122	8.7	0
Fah/SB11 M1982	143	6.3	0
Fah/SB11 M1983	143	6.1	1
Empty/shp53	PHI	肝重 (%)	结节数
Fah/SB11 M982	130	5.2	0
Fah/SB11 M983	130	5.5	0
Fah/SB11 M984	131	4.7	0

Fah/SB11 M1991	157	5.6	0
Fah/SB11 M1992	157	4.9	0
Fah/SB11 M1993	160	5.5	0

PHI：注射后天数；肝重(%)：肝脏重量和小鼠总重量的百分比；结节数：在整个肝脏中计数的全部肝肿瘤结节。

共注射 *ZBTB20* 和针对 *Trp53* 基因的短发夹的 120 天 PHI *Fah/SB11* 小鼠的肝脏都表达 *ZBTB20* 和 *GFP* (在 pT2/shp53 载体中出现的绿色荧光报告基因) (图 1F)。正如预期的那样，野生型 FVB 对照不表达 *GFP* 或 *ZBTB20* 转基因 (图 1F)。由于 FVB 肝脏对照取自 12 天龄的年轻小鼠，*Afp* 表达呈阳性，但未发现可检测水平的 *Spp1*，表明肝脏生理机能正常 (图 1F)。来自 *Fah/SB11* M1582 的肝脏肿瘤有一个界限清楚的结节，由组织结构丧失的多形性肝细胞片组成，一些表现出大的不规则奇异细胞核。此外，在大多数细胞中观察到不同程度的微小和大泡脂肪滴 (脂肪变性)。在形态学上，该肿瘤与中度至低分化的 HCC 最相容 (图 7A)。来自 *Fah/SB11* M1584 和 M1752 的肝肿瘤都有明显的由肝细胞组成的结节，表现出非常轻微的异型性，没有明显的脂肪变性。在形态学上，这些肿瘤最适合被描述为分化良好的肝肿瘤 (图 7B 和图 7C)。

进行免疫组织化学分析以确定在实验 (*ZBTB20/shp53*) 和对照 (空/*shp53*) 注射组中细胞增殖是否增加 (图 8A)。有趣的是，相对于注射了对照质粒 (Empty/*shp53*) ($5.233\% \pm 0.364$)，注射了实验质粒 (*ZBTB20/shp53*) 的 *Fah/SB11* 动物 ($n = 8$) 的具有显著更大的肝脏 ($6.625\% \pm 0.306$ ，肝脏与全身的百分比) (图 1E)，($P < 0.0001$)。然而，通过吸收 Ki67 染色确定的有丝分裂活性未显示两个不同组之间的染色有任何可检测的增加 (图 8A)。与组织病理学结果一致 (图 7)，由 *ZBTB20/shp53* 在实验动物中诱导的肝脏肿瘤显示出不同程度的有丝分裂活性增加，表明不同的 HCC 肿瘤阶段或分级 (图 8B)。

由于细胞增殖不被认为是在注射 *ZBTB20/shp53* 的 *Fah/SB11* 动物中观察到的肝肿大表型的原因，因此对固定区域中的任意细胞数进行计数以确定细胞面积数密度是否降低，其表明细胞肥大。对实验组和对照组计算固定视野内的细胞数。在对照和实验注射动物

之间观察到非常显著的差异 ($P < 0.0001$) (图 9A)。这些结果表明 *ZBTB20* 诱导肥大作为肝脏表型。为了确认肥大表型, 使用 NIH ImageJ 软件对实验和对照肝细胞进行细胞测量。在对照和实验注射动物之间观察到非常显著的差异 ($P < 0.0001$) (图 9B 和图 9C)。这些结果表明明显的肝肥大可以解释在实验注射动物中看到的肝肿大表型。

5 在注射 *ZBTB20/shp53* 的 *Fah/SB11* 组中激活的 WNT/CTNNB1 信号通路

以前研究表明, 由于 WNT/CTNNB1 通路的激活与肝肿大有关 [14], 因此在实验和对照组中都进行了 CTNNB1 免疫组织化学染色。有趣的是, 根据 *Cttnb1* 免疫组织化学染色的阳性结果, 在所有注射 *ZBTB20/shp53* 的实验动物中都观察到 WNT/CTNNB1 通路的激活 (表 4 和图 1G)。为了确认注射了 *ZBTB20/shp53* 的动物中 WNT/CTNNB1 通路的激活, 通过 qRT-PCR 评估了 WNT 靶基因。与注射 Empty/*shp53* 的对照动物相比, *Tcf7*、*Lef1*、*Axin2* 和 *Myc* 等几个下游基因显著上调, 证实了 WNT/CTNNB1 通路的激活 (图 1H)。

ZBTB20 和 CTNNB1 的共定位

为了确认 *ZBTB20* 和 *CTNNB1* 之间是否存在任何相互作用关系, 对 *ZBTB20* 过表达转染的细胞进行了 IF 染色。Flag 标记的 *ZBTB20* 和 *CTNNB1* 的定位使用特异性抗体确定, 与 OEP 对照和未转染的细胞相比, 两种蛋白质均显示集中在细胞核中 (图 2)。有趣的是, 与 OEP 对照和非转染细胞相比, 在 *ZBTB20* 同种型 1 和 2 过表达的转染细胞中检测到更高的 *CTNNB1* 荧光信号 (图 2)。该 IF 结果与 *ZBTB20* 过表达可诱导 *CTNNB1* 信号通路的体内数据一致。*CTNNB1* 的核染色还表明, 在 *ZBTB20* 过表达两种同种型的转染细胞中都检测到其活性形式。

在人肝细胞系中验证 *ZBTB20* 对 *CTNNB1* 的影响

为了进一步研究 *ZBTB20* 对 *CTNNB1* 的影响, 两种 *ZBTB20* 同种型在人肝细胞系中过表达 (图 3) 或被破坏 (图 4)。

PB 转座子系统用于将两种同种型各自稳定转染到各种人肝细胞系中 (图 3A), 通

过 qPCR 确定成功过表达 (图 3B) 并检测培养物中的 GFP 信号 (图 3C)。为了确定 ZBTB20 在人细胞中的功能, 通过 qPCR 评估了 ZBTB20 的负靶标 AFP 的 mRNA 表达水平。与 OFP 对照载体相比, 在同种型 1 和同种型 2 ZBTB20 过表达转染的 HHL 细胞中检测到 AFP 的表达降低 (图 3B)。这证实了 ZBTB20 在转染的 HHL 细胞系中过表达的效率和功能。有趣的是, 在 ZBTB20 过表达转染的细胞系中 CTNNB1 的 mRNA 表达水平没有显著差异, 但在同种型 1 和同种型 2 ZBTB20 过表达转染的 HHL 细胞中检测到显著更高的 AXIN2 和 CCND1 表达 (图 3D)。与 OFP 对照载体相比, 在 ZBTB20 过表达 HHL 细胞中, 经典 WNT/CTNNB1 破坏复合物的成分 (例如糖原合酶激酶 3 β (GSK3B) 和 WNT 信号通路的 APC 调节子 (APC)) 也显著减少 (图 3E)。在蛋白质水平上, ZBTB20 过表达转染的 HHL 细胞导致显著更高的活性 CTNNB1 水平 (图 3F), 这与免疫荧光染色一致 (图 2)。由于 PPARG 被认为是与 ZBTB20 和 CTNNB1 相互作用的中间蛋白[15], 因此还研究了其表达水平。有趣的是, ZBTB20 过表达转染的 HHL 细胞确实反映了这种相互作用, 因为在 mRNA (图 3D) 和蛋白质水平 (图 3F) 均检测到显著较低的 PPARG, 与 CTNNB1 结果一致。在用 ZBTB20 的两种同种型稳定转染的 PLC/PRF/5 和 Hep3B 细胞系中也重现了类似的结果。ZBTB20 过表达转染的 PLC/PRF/5 (图 10A) 和 Hep3B (图 10B) 细胞系导致通过蛋白质印迹分析确定的更高的 CTNNB1 水平和降低的 PPARG 水平。此外, 还对 Hep3B 和 PLC/PRF/5 细胞系进行了 TOP/FOP-Flash 荧光素酶报告基因检测, 以确认 WNT/CTNNB1 信号通路的激活。用两种 ZBTB20 同种型转染的细胞系显示出 TOP/FOP 荧光素酶活性的剂量依赖性增加 (图 10C)。

为了研究 ZBTB20 在 HCC 肿瘤发生中的作用, 基因编辑破坏其功能。在 PLC/PRF/5 细胞系中使用 CRISPR/Cas9 系统 (图 4A), 使用位于 gRNA 靶区域侧翼约 50 bp 的特定引物对, 通过 PCR 确定在混合培养和单一细胞培养中成功敲除 ZBTB20。在基因组水平上, gRNA1 和 gRNA2 成功地在 BTB 域中产生了缺失 indel, 而 gRNA4 和 gRNA5 在锌指域中产生了缺失 indel (图 4B 和图 11)。此外, 还可以使用 cDNA 在转录水平检测这些插入缺失 (图 4C)。正如预期的那样, 与序列打乱的对照相比, ZBTB20 破坏的细胞表现出显著增加的 AFP 水平 (图 4D)。然而, 与 ZBTB20 过表达结果一致 (图 3D), 缺乏 ZBTB20 的细胞中的 AXIN2 水平降低 (图 4D)。相反, 在 ZBTB20 破坏的细胞中检

测到显著较低的活性 CTNNB1 水平，而总 CTNNB1 水平不变（图 4E）。与 ZBTB20 过表达结果一致（图 3D），与序列打乱的对照相比，ZBTB20 破坏的细胞显示出显著增加的 PPARG 水平（图 4D）。还对人肝癌细胞系 C3A 进行了类似的基因破坏实验（图 12）。在两个 C3A 细胞池中都证明了 ZBTB20 mRNA 水平的显著降低（图 12A）。与 PLC/PRF/5 结果（图 4D）一致，ZBTB20 破坏的 C3A 细胞池显示出 PPARG 水平与乱序对照相比显著增加（图 12A）。虽然 ZBTB20 破坏的 C3A 细胞池与乱序对照相比，CTNNB1 水平没有显著变化（图 12A），但 WNT/CTNNB1 信号通路的下游靶基因，如 CCND1 和 MYC，显著减少（图 12B）。

pGL3-PPARG 报告质粒包含 1038 bp PPARG 启动子序列，用于确定 ZBTB20 是否充当 PPARG 表达的转录阻遏物（图 5A）。1038 bp PPARG 启动子序列位于染色体 3p25.2 12392051 至 12393088，而 ZBTB20 的推定结合基序位于 12392366 至 12392374（UCSC 基因组浏览器，GRCh37/hg19）（图 13）。利用包含 ZBTB20 假定结合位点的 PPARG 启动子荧光素酶活性分析（图 5A），与 GFP 对照转染或 HHL7 野生型细胞相比，ZBTB20 同种型 1 和 2 过表达细胞分别能够使 PPARG 启动子活性降低 47% 和 45%（图 5B）。综上，本发明证实了 ZBTB20 可抑制 PPARG 表达而激活 WNT/CTNNB1 信号通路，导致了 HCC 的肿瘤发生。

ZBTB20 用作肝细胞癌的早期检测标志物

本发明人使用在线数据库 Gene Expression Omnibus（GEO）进行比较。GSE6764 数据集包含来自 HCC 患者的 75 个组织样本的基因表达谱，涵盖四个肿瘤阶段（极早期 HCC、早期 HCC、晚期 HCC 和极晚期 HCC），与作为对照的正常肝脏进行比较。在 HCC 的极早期阶段检测到 ZBTB20 的更高表达，而未检测到 AFP 的显著变化（图 14A）。PPARG 表达在疾病的极早期阶段也被下调，尽管统计学不显著，而 WNT 信号通路的激活在疾病的极早期阶段通过 CTNNB1 及其靶基因（如 LEF1、TCF7 和 CCND1）的上调而明显（图 14B）。

本发明人首次用实验数据证实 ZBTB20 是 HCC 的致癌原癌基因，并证实了其致癌的

作用机理。此外，该基因在例如上述和图 14 的结果中明确表明，*ZBTB20* 可作为肝细胞癌例如极早期肝细胞癌的检测标志物，尤其在 AFP 缺乏的组织样本中检测肝细胞癌中具有重要意义。

讨论

5 *Zbtb20* 对肝脏发育至关重要，缺乏该基因的小鼠表现出肝功能障碍 [3]。*AFP* 目前是公认的 HCC 肿瘤标志物，其水平通常在患病阶段升高 [16]。已使用基因靶向研究显示 *Zbtb20* 是 *Afp* 的转录抑制因子 [3, 5]。最近也有报道称 *POK* 转录因子家族的另一个成员 *Zbtb7a* 在某些情况下可以作为原癌基因，但在其他情况下也具有原癌抑制活性 [17]。由于 TP53 突变是人类 HCC 中最常见的分子异常之一，并且由于 *ZBTB20* 在肝脏肿瘤发生
10 中的作用存在差异，因此将 *ZBTB20* 与针对 *Trp53* 的短发夹 RNA (*ZBTB20/shp53*) 共同引入到 *Fah/SB11* 小鼠的肝脏进行功能验证。本研究的结果表明 *ZBTB20* 是一种原癌基因，与共同注射空载体和 *shp53* (*Empty/shp53*) 的对照 *Fah/SB11* 小鼠相比，引起的肝脏肿瘤明显更多 (图 1D)。这些肿瘤已被归类为分化良好的肝肿瘤至 HCC (图 7)。有趣的是，与 *Empty/shp53* 对照相比，注射 *ZBTB20/shp53* 的 *Fah/SB11* 小鼠肝脏也显示出肝肿大
15 (图 1E)。虽然单独的 *ZBTB20* 过表达可诱导肝肿大，但 *Trp53* 缺乏似乎与 *ZBTB20* 过表达在 HCC 肿瘤发生中协同作用。

因此，这项体内研究表明 *ZBTB20* 在 HCC 发展中的原癌致癌作用。在注射 *ZBTB20/shp53* 的动物中发展的肝肿瘤具有不同水平的 Ki67 强度，表明肿瘤发展或分级的不同阶段 (图 7 和图 8B)。虽然注射 *ZBTB20/shp53* 的动物中细胞数量密度似乎降低
20 (图 9A)，但肝肥大可能是实验动物中观察到的肝肿大表型的一个促成因素。与注射对照载体的动物相比，注射 *ZBTB20/shp53* 的动物具有显著增大的肝细胞 (图 9B 和图 9C)。*ZBTB20* 作为转录抑制因子，可能靶向参与肥大反馈调节的下游基因。即使已经开始增殖，这些转基因肝细胞也可能保持组成性肥大。因此，增高的肥大和增殖效应的结合可能促进了肝脏肿瘤的发生。有趣的是，在注射 *ZBTB20/shp53* 的所有实验动物中都观察到
25 WNT/CTNNB1 通路的激活 (表 4)。体内验证还证明了 *ZBTB20/shp53* 激活了 WNT/CTNNB1 信号通路的下游基因，例如 *Axin2*、*Lef1*、*Myc* 和 *Tcf7* (图 1H)。综上

所述，这表明 WNT/CTNNB1 和 Zbtb20 在肝癌的发病机制中协同作用。

表 4：实验组和对照注射组的 CTNNB1 免疫组织化学染色。

ZBTB20/shp53	PHI	核染色	细胞质染色
Fah/SB11 M1582	120	Pos	Neg
Fah/SB11 M1584	120	Pos	Neg
Fah/SB11 M1751	120	Pos	Neg
Fah/SB11 M1752	120	Pos	Neg
Fah/SB11 M1753	120	Pos	Neg
Fah/SB11 M1761	120	Pos	Neg
Fah/SB11 M1762	120	Pos	Neg
Fah/SB11 M1764	120	Pos	Pos
Empty/shp53	PHI	核染色	细胞质染色
Fah/SB11 M1991	157	Neg	Pos
Fah/SB11 M1992	157	Neg	Pos
Fah/SB11 M1993	160	Neg	Pos

Neg：在多个视野中没有检测到染色。Pos：在多个视野中可检测到阳性染色。

通过在人肝细胞系中过表达和破坏 *ZBTB20*，可以证实 *ZBTB20* 和 CTNNB1 之间的正相关关系。本发明的新颖的结果表明 CTNNB1 的活性可以受 *ZBTB20* 调节，进一步证实 *ZBTB20* 作用于 WNT/CTNNB1 信号通路，而参与 HCC 的致癌作用。此外，通过免疫荧光染色 *ZBTB20* 和 CTNNB1 在细胞核中的共定位和集中化进一步证实了这种相互作用（图 2）。之间的研究已表明 PPARG 和 *ZBTB20* 的相互作用 [15]。*ZBTB20* 和 CTNNB1 的中间蛋白 PPARG 的表达和转录在 *ZBTB20* 过表达转染细胞中下调（图 3D 和 3F）。使

用 *PPARG* 启动子分析, *ZBTB20* 同种型 1 和 2 过表达细胞都能够降低 *PPARG* 启动子活性 (图 5B)。与其他体外结果一致, 这些结果证实了 *ZBTB20* 对 *PPARG* 表达的抑制作用。CTNNB1 激活和 *PPARG* 减少的相反关系先前已在各种疾病和癌症中报道, 例如神经退行性疾病、结直肠癌和乳腺癌 [18-20]。在这些癌症中, *PPARG* 下调而 WNT/CTNNB1 通路上调。先前的研究表明, *PPARG* 可以通过 *PPARG* 的连环蛋白结合域和 CTNNB1 的 TCF 结合域之间的相互作用将磷酸化的 CTNNB1 靶向蛋白酶体 [21]。因此, *PPARG* 的下调可能通过抑制蛋白酶体降解来增加活性 CTNNB1 的积累。几项研究还报告, *PPARG* 的激活可以抑制 HCC 的生长和进展 [22, 23]。此外, 与邻近的非肿瘤肝组织相比, HCC 肿瘤组织中 *PPARG* 的表达显著降低 [22]。总之, 本发明的结果表明 *ZBTB20* 的过表达可以通过抑制 *PPARG* 表达激活 CTNNB1 并诱导其易位到细胞核中 (图 5C)。

总之, *ZBTB20* 在肝脏肿瘤发生中的作用似乎涉及因 TP53 失活而增强的肝肥大和肝肿大。 *ZBTB20*/shp53 共同注射的实验动物具有增加的肿瘤数量和肝肿大, 与 *PPARG* 通过相互作用和抑制 *PPARG* 表达激活 WNT/CTNNB1 通路相关的肝肥大相关。基于用于体内和体外验证的几种反向遗传学方法, *ZBTB20* 作为一种新型致癌基因的作用及其与 HCC 肿瘤发生有关的机制已被证实。

参考文献:

[1] Xie Z, Zhang H, Tsai W, Zhang Y, Du Y, Zhong J, et al. Zinc finger protein *ZBTB20* is a key repressor of alpha-fetoprotein gene transcription in liver. *P Natl Acad Sci USA* 2008;105:10859-10864.

[2] Mitchelmore C, Kjaerulff KM, Pedersen HC, Nielsen JV, Rasmussen TE, Fisker MF, et al. Characterization of two novel nuclear BTB/POZ domain zinc finger isoforms. Association with differentiation of hippocampal neurons, cerebellar granule cells, and macroglia. *J Biol Chem* 2002;277:7598-7609.

- [3] Sutherland AP, Zhang H, Zhang Y, Michaud M, Xie Z, Patti ME, et al. Zinc finger protein Zbtb20 is essential for postnatal survival and glucose homeostasis. *Mol Cell Biol* 2009;29:2804-2815.
- [4] Zhang H, Shi JH, Jiang H, Wang K, Lu JY, Jiang X, et al. ZBTB20 regulates EGFR expression and hepatocyte proliferation in mouse liver regeneration. *Cell Death Dis* 2018;9:462.
- [5] Xie Z, Zhang H, Tsai W, Zhang Y, Du Y, Zhong J, et al. Zinc finger protein ZBTB20 is a key repressor of alpha-fetoprotein gene transcription in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:10859-10864.
- [6] Wang Q, Tan YX, Ren YB, Dong LW, Xie ZF, Tang L, et al. Zinc finger protein ZBTB20 expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. *BMC Cancer* 2011;11:271.
- [7] He Z, Zhu J, Mo J, Zhao H, Chen Q. HBV DNA integrates into upregulated ZBTB20 in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* 2020.
- [8] Keng VW, Villanueva A, Chiang DY, Dupuy AJ, Ryan BJ, Matise I, et al. A conditional transposon-based insertional mutagenesis screen for genes associated with mouse hepatocellular carcinoma. *Nat Biotechnol* 2009;27:264-274.
- [9] Keng VW, Sia D, Sarver AL, Tschida BR, Fan D, Alsinet C, et al. Sex bias occurrence of hepatocellular carcinoma in Poly7 molecular subclass is associated with EGFR. *Hepatology* 2013;57:120-130.
- [10] Kodama T, Bard-Chapeau EA, Newberg JY, Kodama M, Rangel R, Yoshihara K, et al. Two-Step Forward Genetic Screen in Mice Identifies Ral GTPase-Activating Proteins as Suppressors of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2016;151:324-337 e312.
- [11] Bard-Chapeau EA, Nguyen AT, Rust AG, Sayadi A, Lee P, Chua BQ, et al. Transposon mutagenesis identifies genes driving hepatocellular carcinoma in a chronic hepatitis B mouse model. *Nat Genet* 2014;46:24-32.

- [12] Wangenstein KJ, Wilber A, Keng VW, He Z, Matise I, Wangenstein L, et al. A facile method for somatic, lifelong manipulation of multiple genes in the mouse liver. *Hepatology* 2008;47:1714-1724.
- [13] Keng VW, Tschida BR, Bell JB, Largaespada DA. Modeling hepatitis B virus X-induced
5 hepatocellular carcinoma in mice with the Sleeping Beauty transposon system. *Hepatology* 2011;53:781-790.
- [14] Apte U, Zeng G, Muller P, Tan X, Micsenyi A, Cieply B, et al. Activation of Wnt/beta-catenin pathway during hepatocyte growth factor-induced hepatomegaly in mice. *Hepatology* 2006;44:992-1002.
- 10 [15] Ravasi T, Suzuki H, Cannistraci CV, Katayama S, Bajic VB, Tan K, et al. An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell* 2010;140:744-752.
- [16] Di Bisceglie AM. Issues in screening and surveillance for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:S104-107.
- [17] Wang G, Lunardi A, Zhang J, Chen Z, Ala U, Webster KA, et al. Zbtb7a suppresses
15 prostate cancer through repression of a Sox9-dependent pathway for cellular senescence bypass and tumor invasion. *Nat Genet* 2013.
- [18] Shen ZY, Deng HJ, Fang Y, Zhu XJ, Ye GT, Yan L, et al. Identification of the interplay between SOX9 and S100P in the metastasis and invasion of colon carcinoma. *Oncotarget* 2015;6:20672-20684.
- 20 [19] Vallee A, Lecarpentier Y. Crosstalk Between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and the Canonical WNT/beta-Catenin Pathway in Chronic inflammation and Oxidative Stress During Carcinogenesis. *Front Immunol* 2018;9.
- [20] Vallee A, Lecarpentier Y, Guillevin R, Vallee JN. Effects of cannabidiol interactions with Wnt/beta-catenin pathway and PPAR gamma on oxidative stress and neuroinflammation in
25 Alzheimer's disease. *Acta Bioch Bioph Sin* 2017;49:853-866.
- [21] Liu J, Wang H, Zuo Y, Farmer SR. Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin. *Mol Cell Biol* 2006;26:5827-5837.

- [22] Yu J, Qiao L, Zimmermann L, Ebert MP, Zhang H, Lin W, et al. Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Hepatology* 2006;43:134-143.
- [23] Yu J, Shen B, Chu ES, Teoh N, Cheung KF, Wu CW, et al. Inhibitory role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in hepatocarcinogenesis in mice and in vitro. *Hepatology* 2010;51:2008-2019.
- [24] Bell JB, Podetz-Pedersen KM, Aronovich EL, Belur LR, McIvor RS, Hackett PB. Preferential delivery of the Sleeping Beauty transposon system to livers of mice by hydrodynamic injection. *Nature protocols* 2007;2:3153-3165.
- [25] Wangenstein KJ, Wilber A, Keng VW, He Z, Matise I, Wangenstein L, et al. A facile method for somatic, lifelong manipulation of multiple genes in the mouse liver. *Hepatology* 2008;47:1714-1724.
- [26] Keng VW, Villanueva A, Chiang DY, Dupuy AJ, Ryan BJ, Matise I, et al. A conditional transposon-based insertional mutagenesis screen for genes associated with mouse hepatocellular carcinoma. *Nat Biotechnol* 2009;27:264-274.
- [27] Keng VW, Tschida BR, Bell JB, Largaespada DA. Modeling hepatitis B virus X-induced hepatocellular carcinoma in mice with the Sleeping Beauty transposon system. *Hepatology* 2011;53:781-790.
- [28] Keng VW, Sia D, Sarver AL, Tschida BR, Fan D, Alsinet C, et al. Sex bias occurrence of hepatocellular carcinoma in Poly7 molecular subclass is associated with EGFR. *Hepatology* 2013;57:120-130.
- [29] Clayton RF, Rinaldi A, Kandyba EE, Edward M, Willberg C, Klenerman P, et al. Liver cell lines for the study of hepatocyte functions and immunological response. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2005;25:389-402.
- [30] Chiu AP, Tschida BR, Sham TT, Lo LH, Moriarity BS, Li XX, et al. HBx-K130M/V131I Promotes Liver Cancer in Transgenic Mice via AKT/FOXO1 Signaling Pathway and Arachidonic Acid Metabolism. *Mol Cancer Res* 2019;17:1582-1593.

[31] Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc 2013;8:2281-2308.

[32] Yin Y, Morgunova E, Jolma A, Kaasinen E, Sahu B, Khund-Sayeed S, et al. Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. Science
5 2017;356.

[33] Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. J Biol Chem 1997;272:18779-18789.

[34] Veeman MT, Slusarski DC, Kaykas A, Louie SH, Moon RT. Zebrafish prickles, a modulator
10 of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. Current biology : CB 2003;13:680-685.

权 利 要 求 书

1. 一种诊断受试者肝细胞癌 (HCC) 的方法 , 包括对所述受试者的生物样品中的 ZBTB20
5 进行检测或定量 , 并将该检测或定量结果与对照试样的 ZBTB20 的相应结果相比较 ; 当与
所述对照试样相比较 , 所述受试者的生物样品中存在 ZBTB20 或者 ZBTB20 表达升高 , 可
将该受试者样品诊断为肝细胞癌。
2. 根据权利要求 1 所述的方法 , 其中所述肝细胞癌是极早期 HCC、早期 HCC、晚期 HCC
或极晚期 HCC。
- 10 3. 根据权利要求 1 所述的方法 , 其中所述肝细胞癌是极早期 HCC。
4. 根据权利要求 1 所述的方法 , 其中所述生物样品是肝脏组织、全血、血浆或血清。
5. 根据权利要求 1 所述的方法 , 其中特异性结合 ZBTB20 的制剂选自特异性结合 ZBTB20
的抗体或特异性结合 ZBTB20 的引物。
6. 根据权利要求 1 所述的方法 , 其中特异性结合 ZBTB20 的制剂选自特异性结合 ZBTB20
15 的 DNA 探针。
7. 根据权利要求 1 所述的方法 , 其中所述方法还包括检测其它肝细胞癌标志物。
8. 根据权利要求 7 所述的方法 , 其中所述其它肝细胞癌标志物为甲胎蛋白和/或分泌型磷
蛋白 1 (Spp1) 。
9. 根据权利要求 1 所述的方法 , 其中所述受试者是人。

10. 根据权利要求 5 所述的方法，其中特异性结合 ZBTB20 的引物包括：正向 5'-

ATGAGATTACTCAGCCGGGCGGATC-3' (SEQ ID NO:21)和反向 5'-

AGCTTGTCTTGGAAGAAGGGGCTGC-3' (SEQ ID NO:22)；或正向 5'-

CGAGCGCATTACAGCATCAACCTT-3' (SEQ ID NO:23)和反向 5'-

5 TCTCGATGTCGCTGTAGCCAAGCAG-3' (SEQ ID NO:24)。

11. 根据权利要求 8 所述的方法，其中检测甲胎蛋白的引物包括：正向 5'-

CCTGTGAACTCTGGTATCAG-3' (SEQ ID NO:11)和反向 5'-GCTCACACCAAAGCGTCAAC-3' (SEQ ID

NO:12)；检测 *Spp1* 的引物包括：正向 5'-CTTCACTCCAATCGTCCCTAC-3' (SEQ ID NO:13)和反

向 5'-GCTCTCTTTGGAATGCTCAAGT-3' (SEQ ID NO:14)。

10 12. 特异性识别 ZBTB20 的制剂在制备用于监测受试者的肝细胞癌 (HCC) 预后的试剂盒中的用途。

13. 一种试剂盒，包括特异性识别 ZBTB20 的引物、抗体或探针，以及使用所述试剂盒的说明书。

14. 引物组，其特异性结合 ZBTB20，所述引物组包括如下引物：正向 5'-

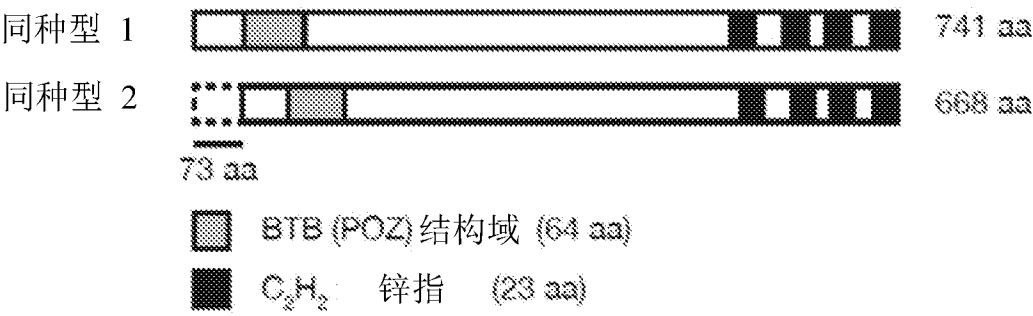
15 ATGAGATTACTCAGCCGGGCGGATC-3' (SEQ ID NO:21)和反向 5'-

AGCTTGTCTTGGAAGAAGGGGCTGC-3' (SEQ ID NO:22)；或正向 5'-

CGAGCGCATTACAGCATCAACCTT-3' (SEQ ID NO:23)和反向 5'-

TCTCGATGTCGCTGTAGCCAAGCAG-3' (SEQ ID NO:24)。

A



B

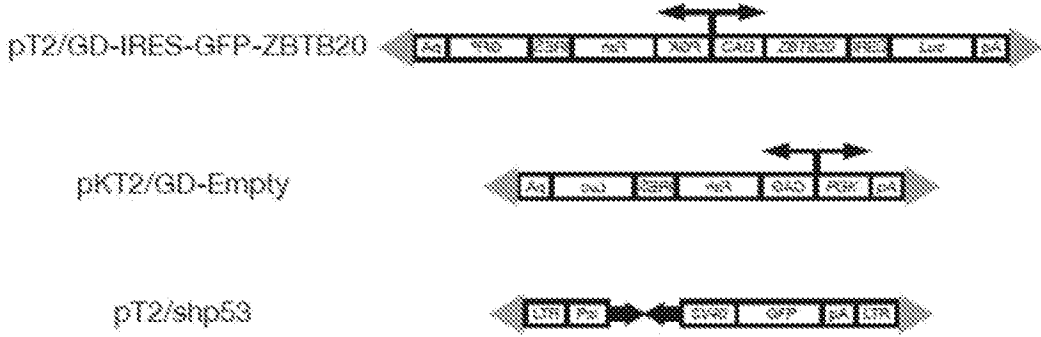
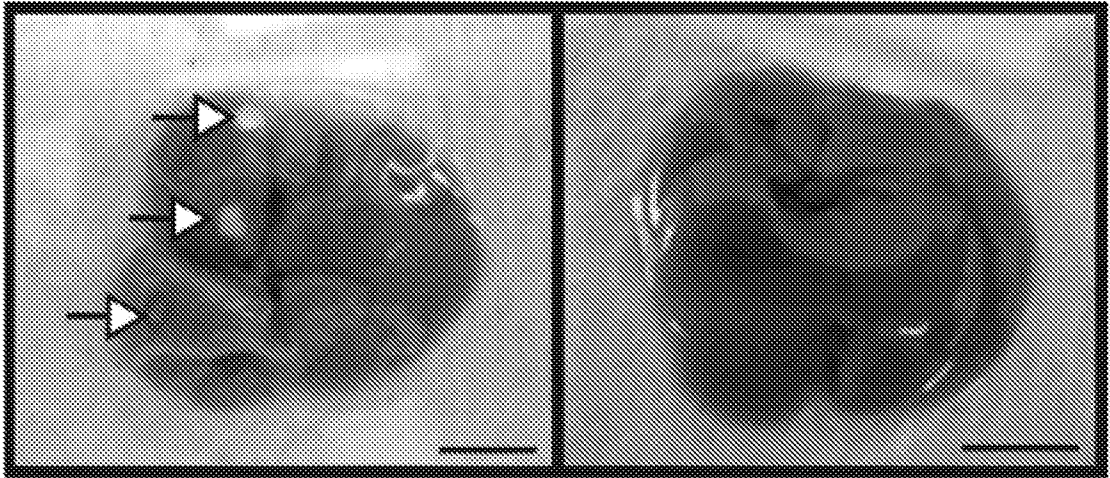
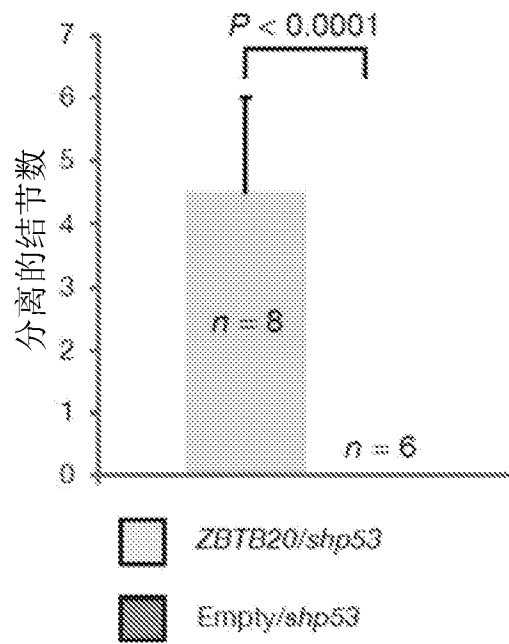


图 1

C



D



E

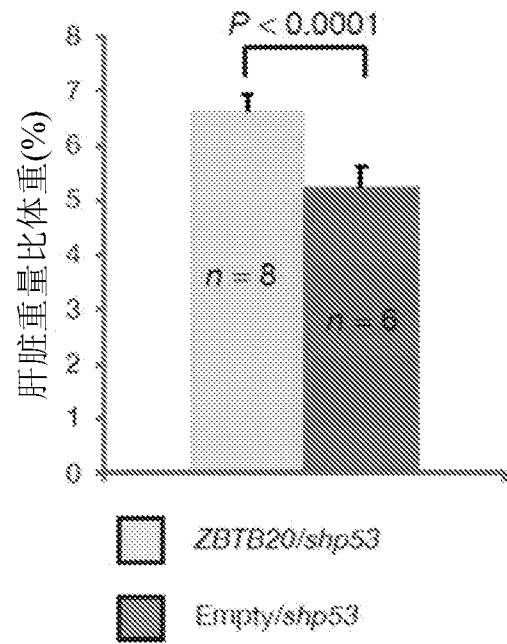
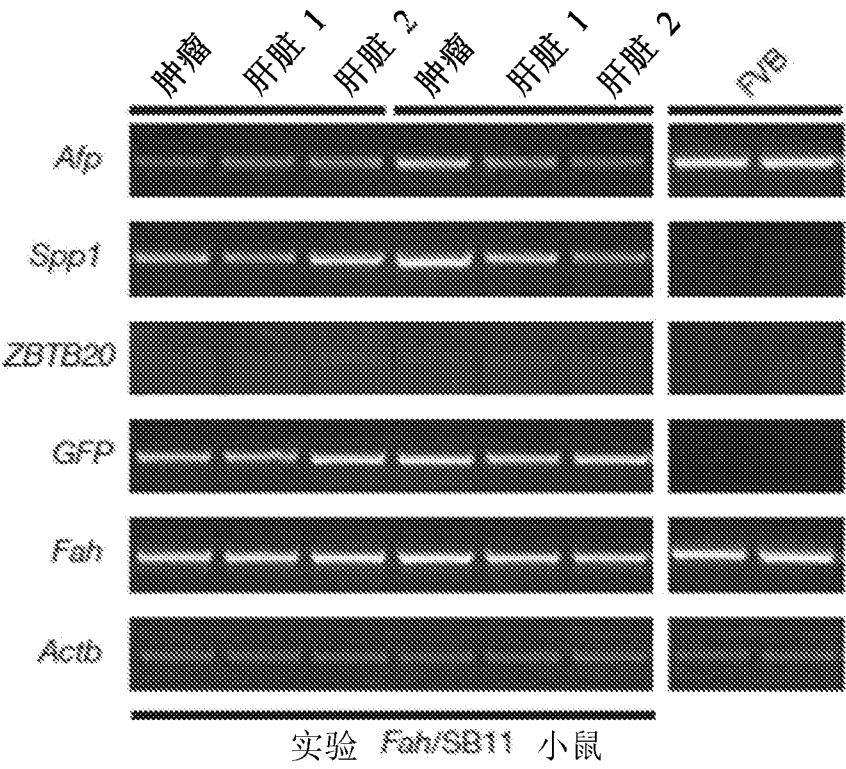


图 1 (续)

F



G

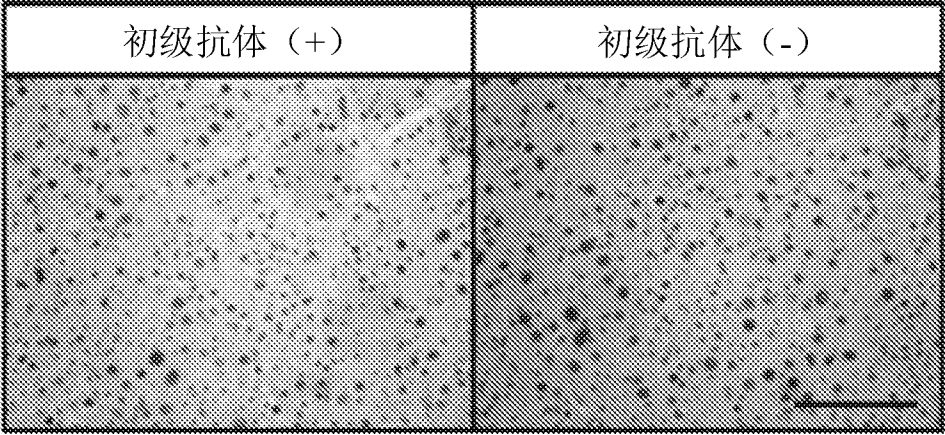


图 1 (续)

2

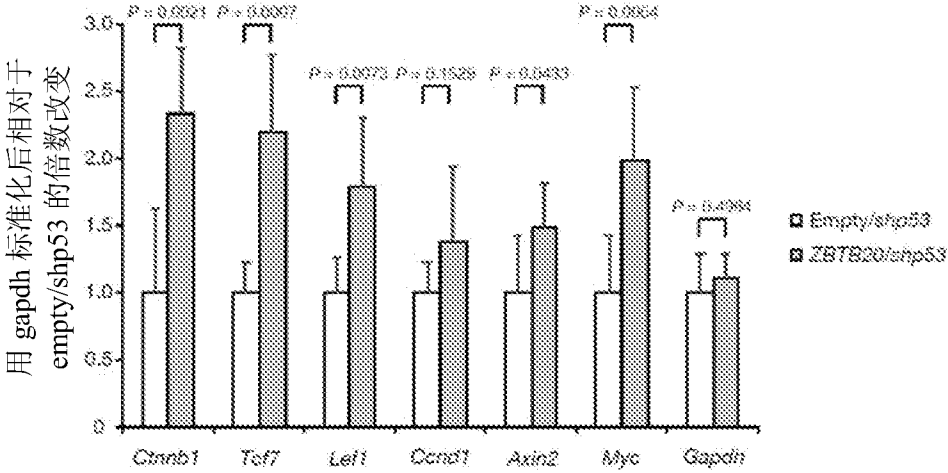


图 1 (续)

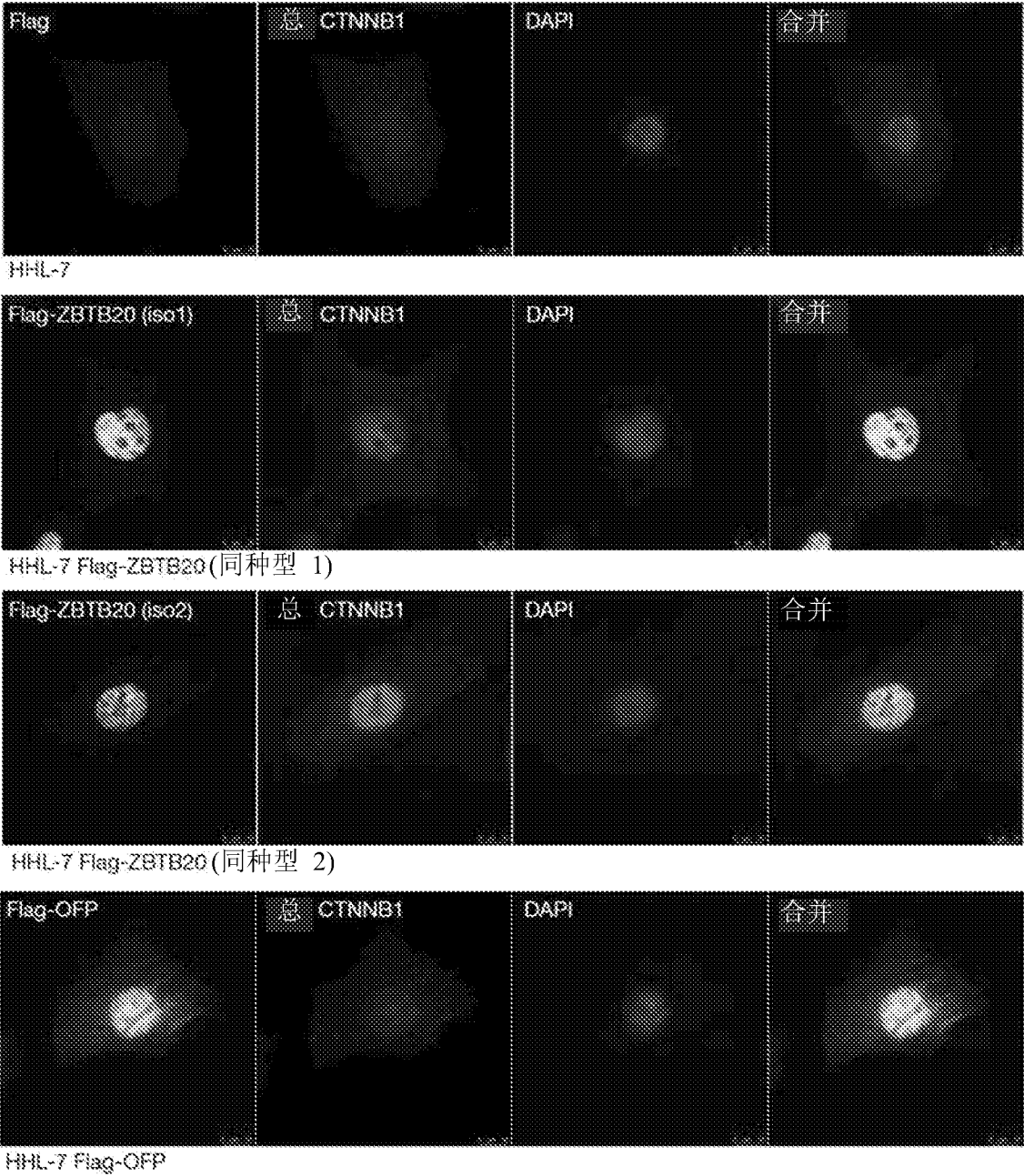
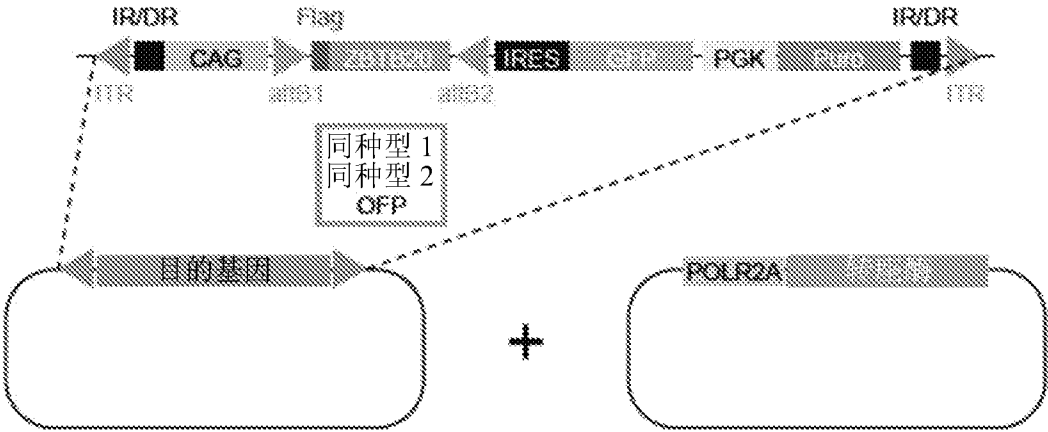


图 2

A



B

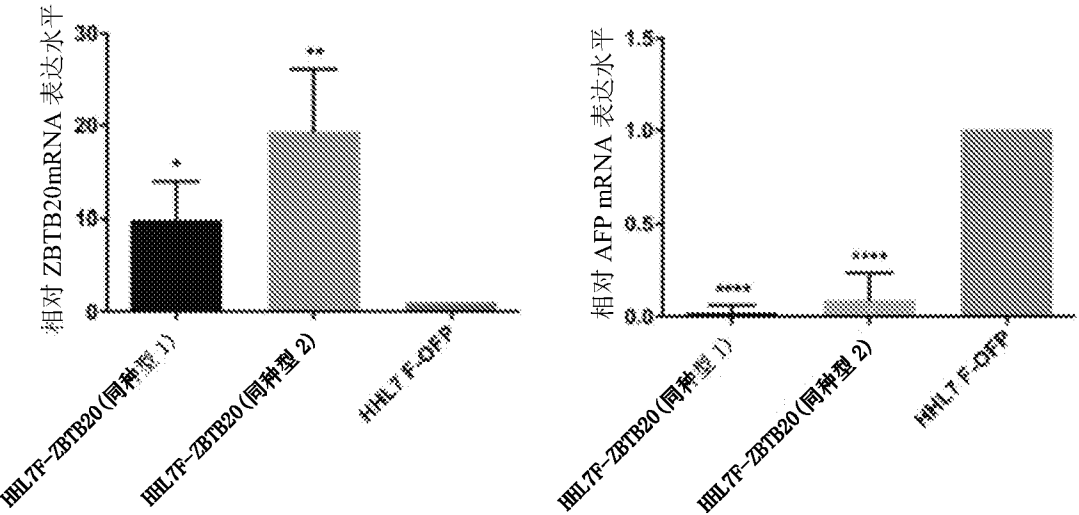


图 3

C

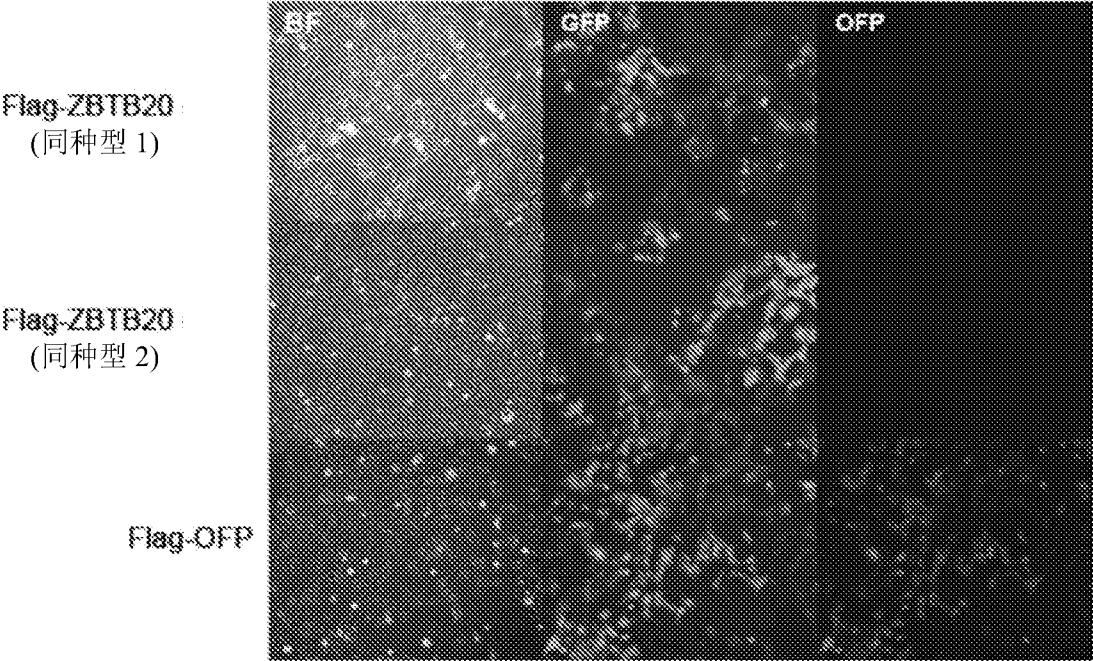


图 3 (续)

D

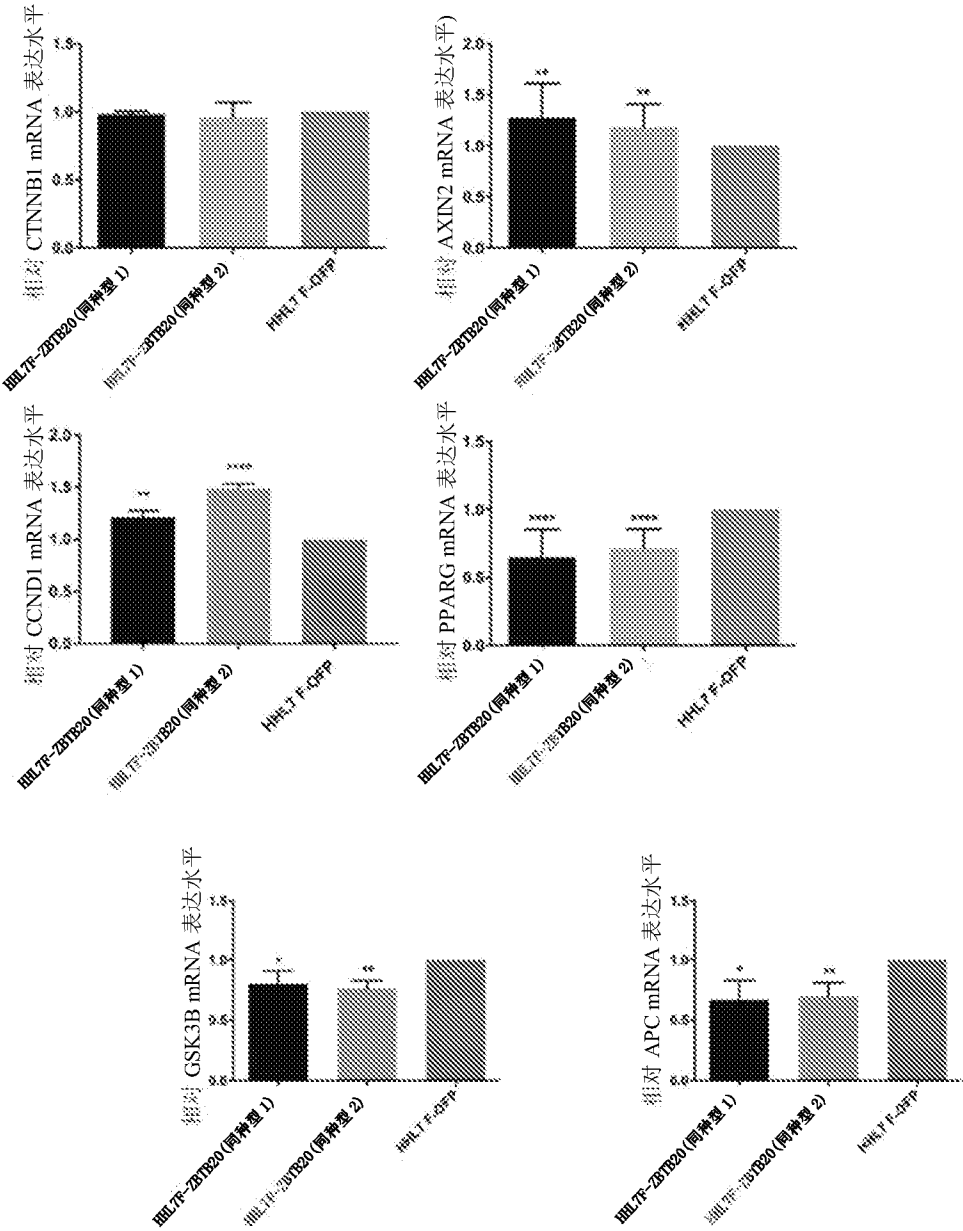


图 3 (续)

F

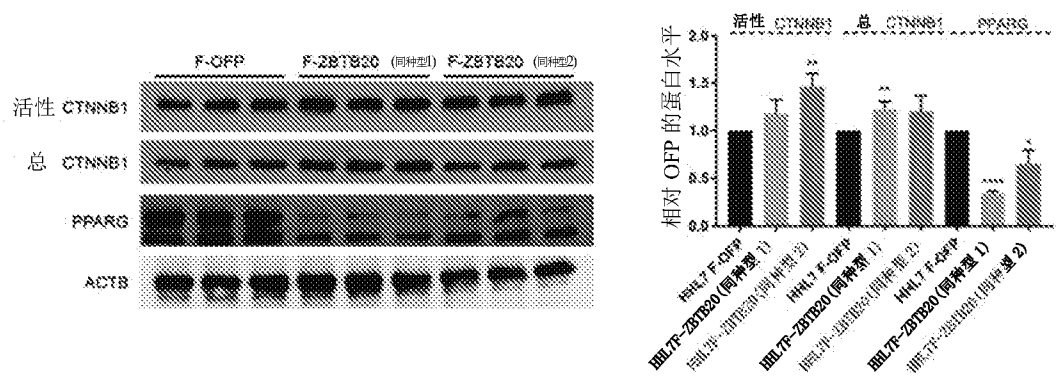
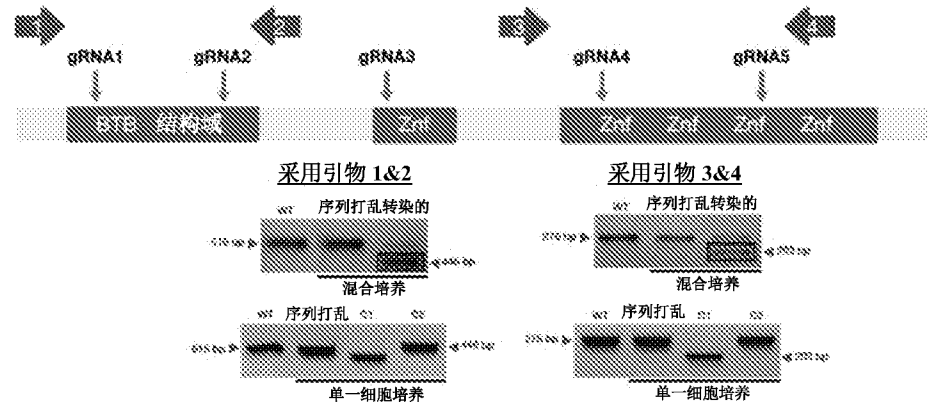


图 3(续)

A



B



C

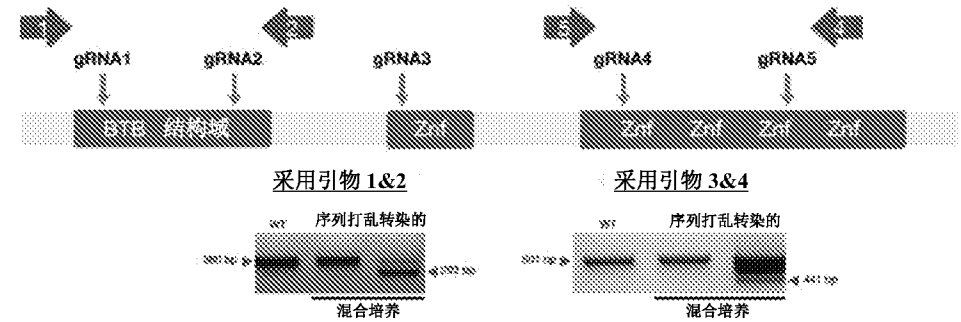
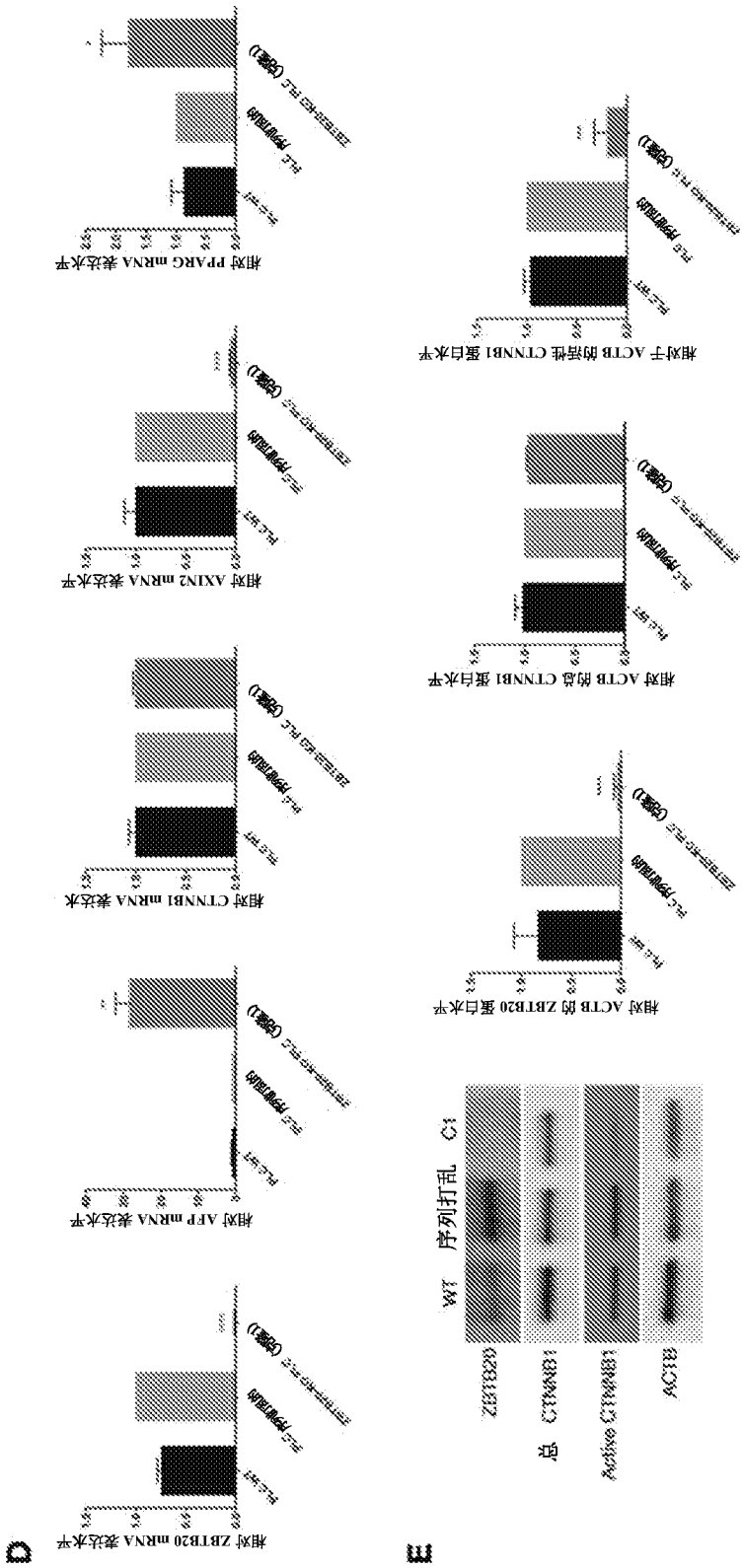


图 4



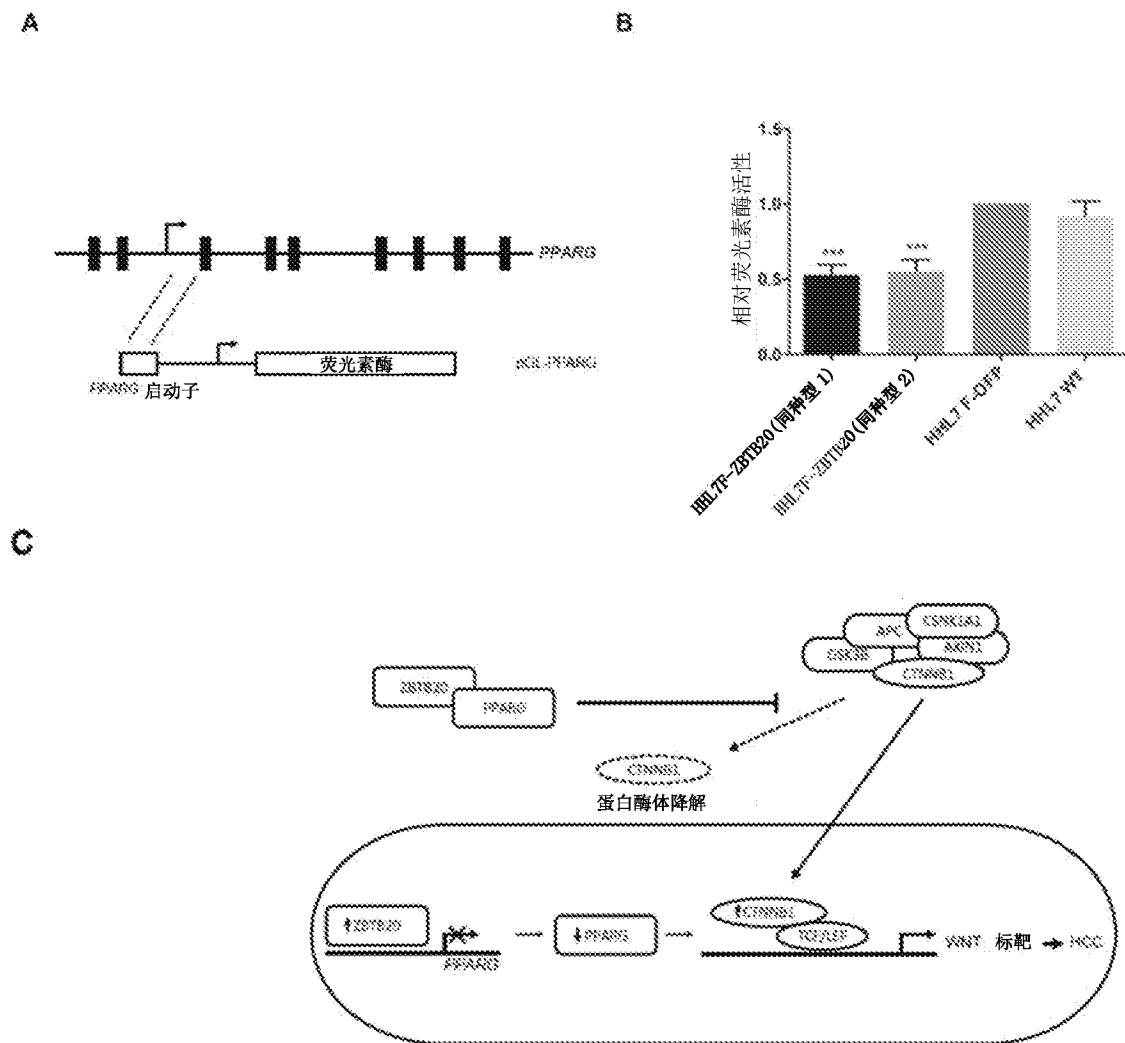


图 5

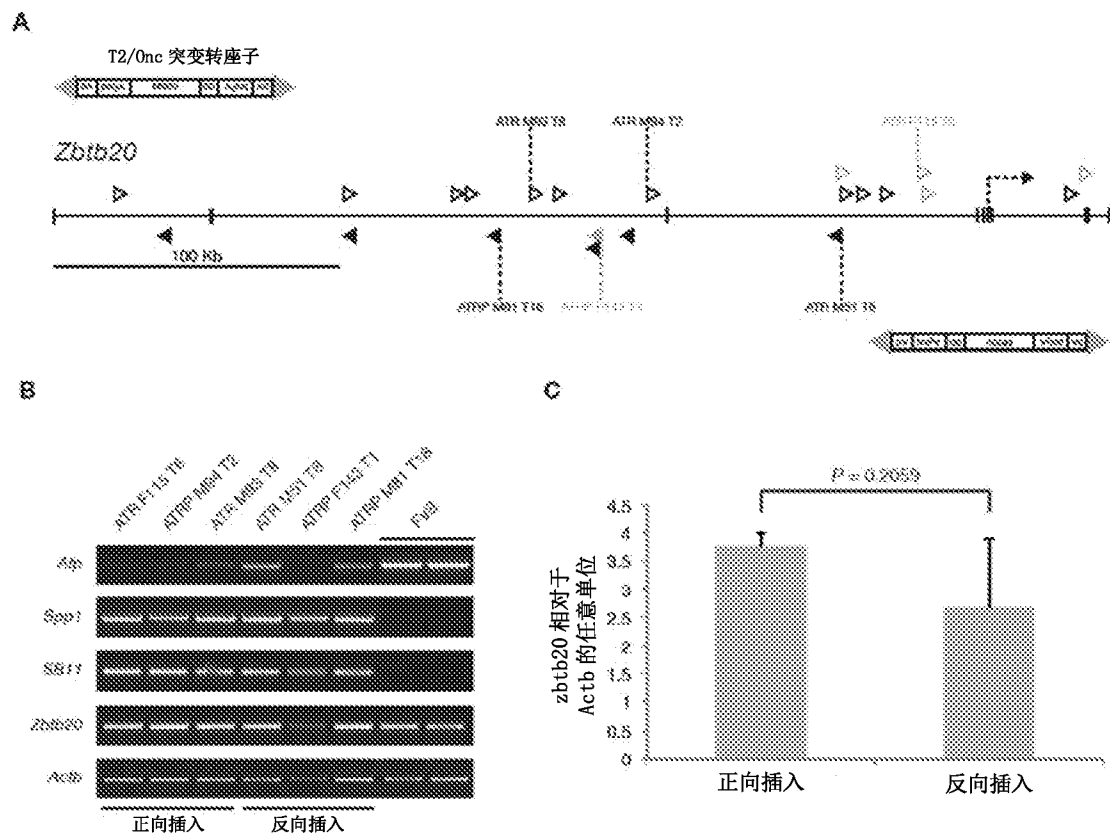


图 6

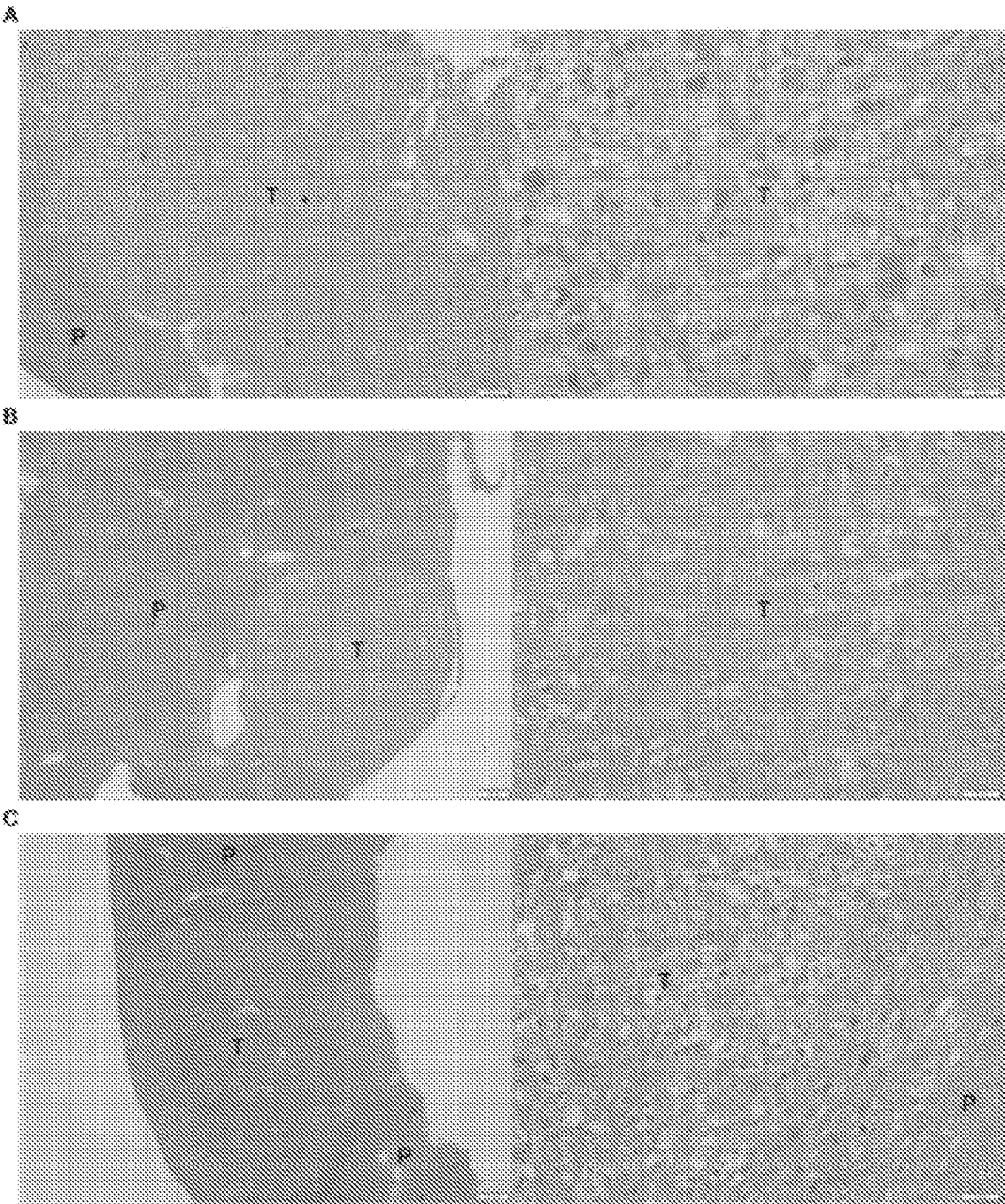
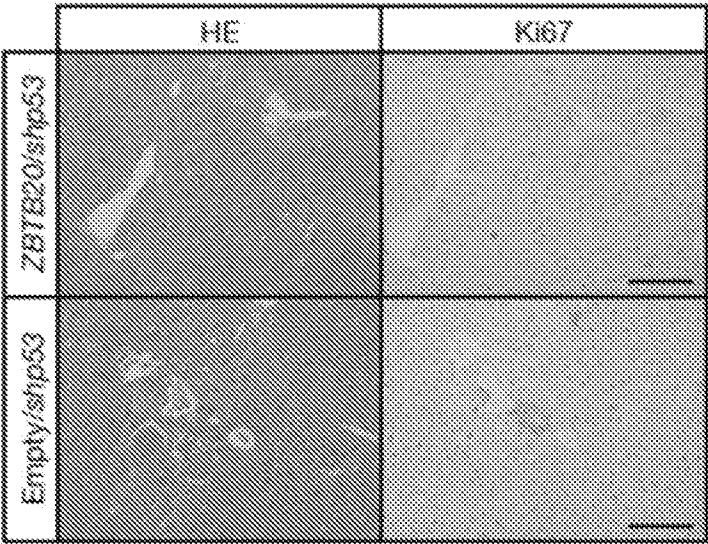


图 7

A



B

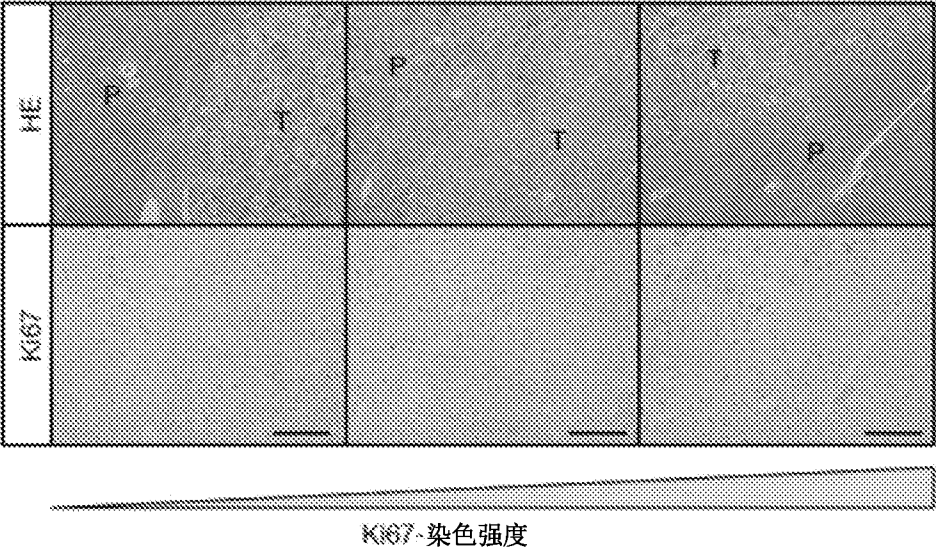


图 8

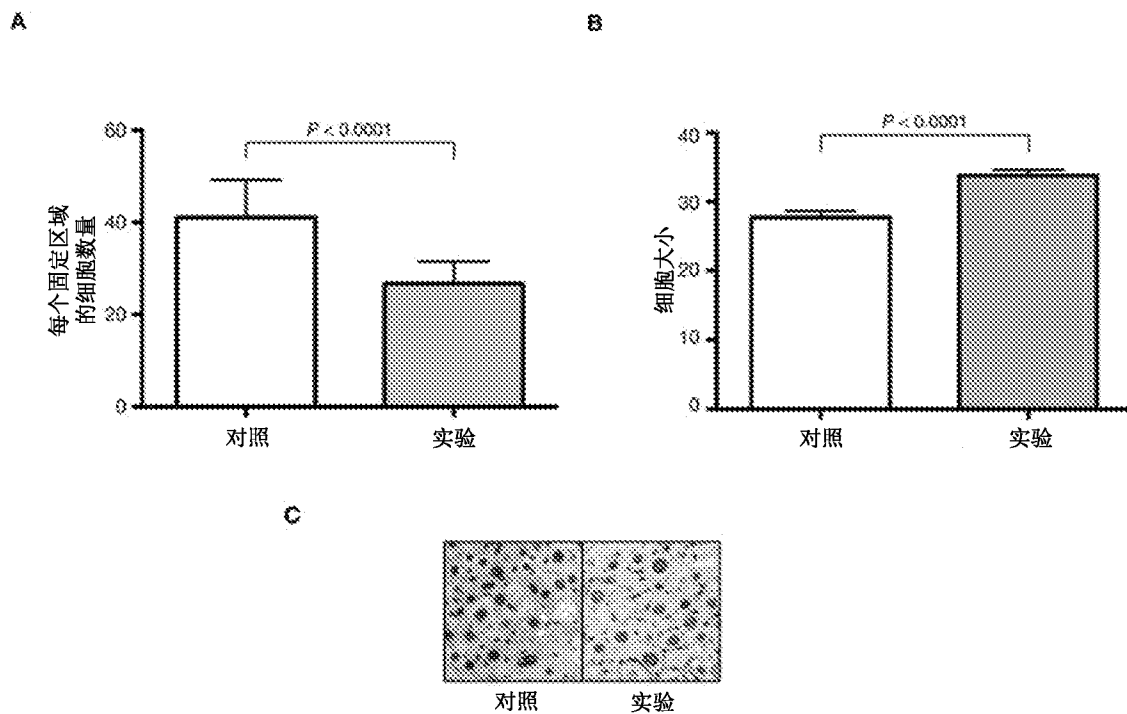


图 9

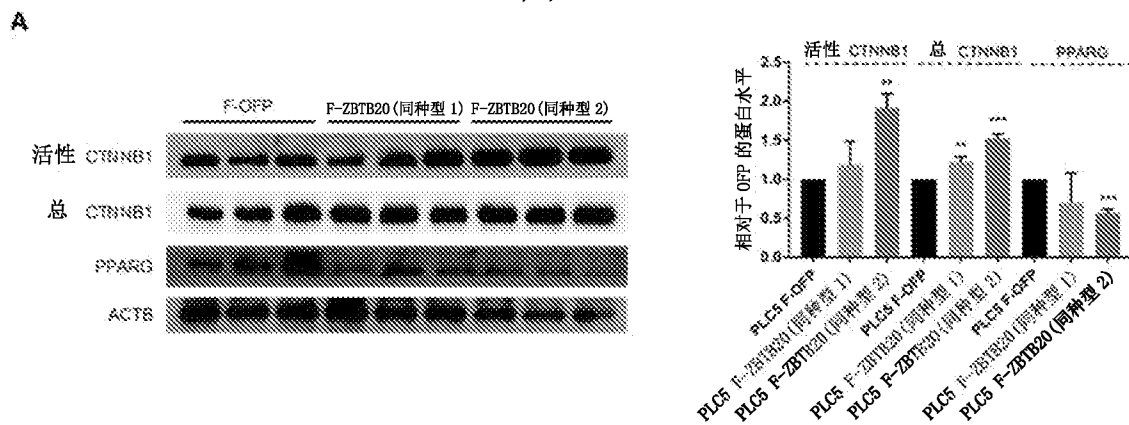
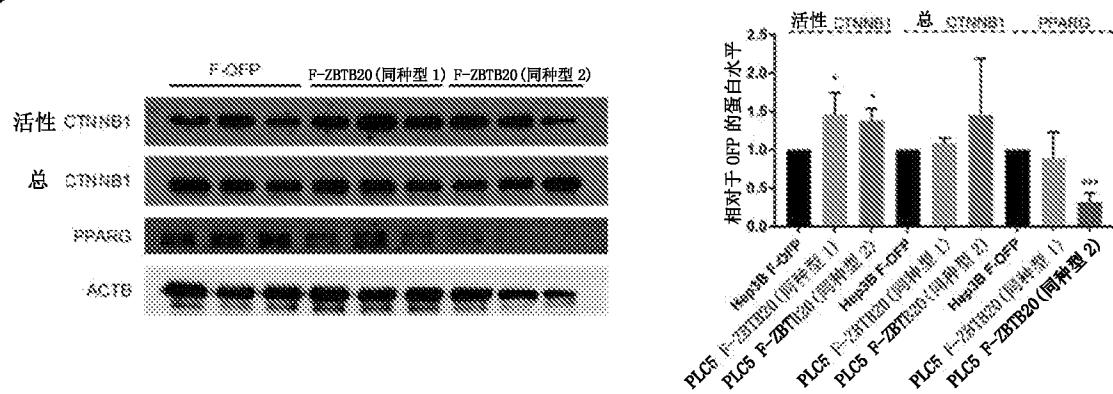


图 10

B



C

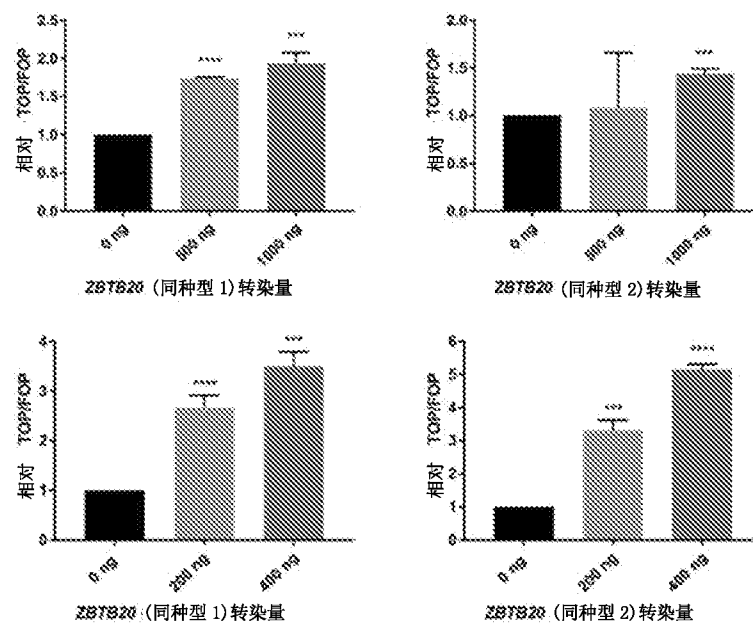


图 10 (续)

BTB 结构域

```

CTCCTTAAAGGATTACCTTATCAAGCACATGGTGACACACACAGGAGTGAAGGACATACCAAGTGTATAT PLC (WT)
CTCCTTAAAGGATTACCTTATCAAGCACATGGTGACACACACAGGAGTGAAGGACATACCAAGTGTATAT PLC (序列打乱)
CTCCTTA.....ATAT PLC (转染的)

```

锌指结构域

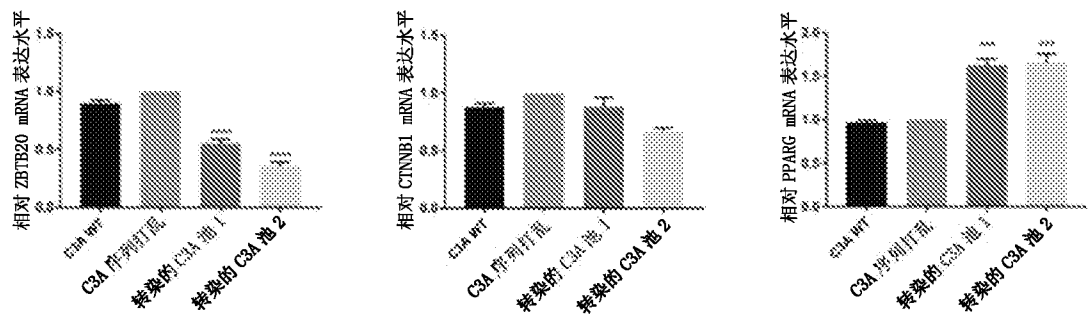
```

CGTCGGTGGTGTCAATGCAGTCAATGCAAAAGCTCATTAAGTTTATGTACAGCGGCTGCTACGGGTCTCGCAGTCGG PLC (WT)
CGTCGGTGGTGTCAATGCAGTCAATGCAAAAGCTCATTAAGTTTATGTACAGCGGCTGCTACGGGTCTCGCAGTCGG PLC (序列打乱)
KNTCG.....AGTGGG PLC (转染的)

```

图 11

A



B

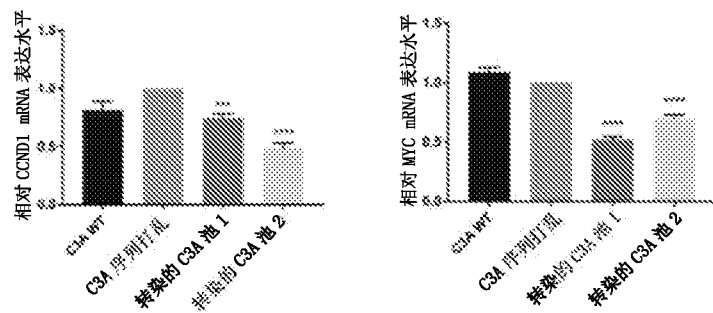


图 12



图 13

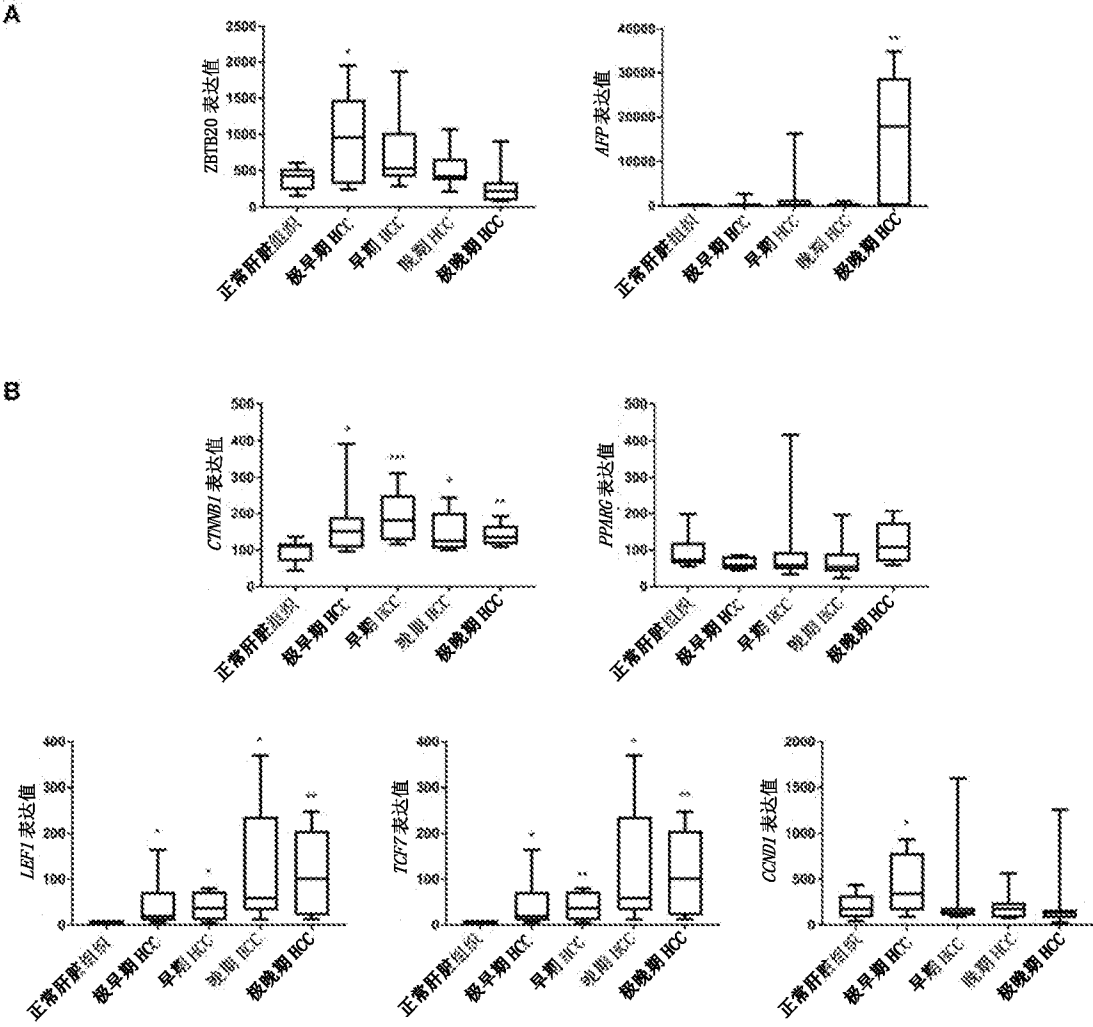


图 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/070120

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/574(2006.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)i; C12N 15/11(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N,C12Q,C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

TW MED; TW TXT; USTXT; DWPI; ENTXTC; KRTXT; CNTXT; WPABSC; JPTXT; CNABS; EPTXT; CNMED; WPABS;
 ENTXT; WOTXT; CJFD; CATXT; VEN, genbank, NCBI, elsevier Science, 中国专利生物序列检索系统: hepa+, 瘤, liver,
 carcinoma, DPZF, ZBTB20, cancer, 癌, 肝, HOF, ZNF288, sequence search for primers of claims

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Jeffrey C et al. "ZBTB20 regulates WNT/CTNNB1 signalling pathway by suppressing PPARG during hepatocellular carcinoma tumorigenesis" <i>JHEP Reports</i> , Vol. 3, No. 2, 19 December 2020 (2020-12-19), abstract, page 3, right-hand column, paragraphs 1, 2, page 8, last paragraph, page 9, left-hand column, paragraph 2 and right-hand column, paragraph 2, Appendix, page 5, RT-PCR section	1-14
A	CN 102234687 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 09 November 2011 (2011-11-09) entire document	1-14
A	Wang, Q et al. "Zinc finger protein ZBTB20 expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis" <i>BMC Cancer</i> , Vol. 11, 25 June 2011 (2011-06-25), number 271, see entire document	1-14
A	Kan, H. et al. "Zinc finger protein ZBTB20 is an independent prognostic marker and promotes tumor growth of human hepatocellular carcinoma by repressing FoxO1" <i>oncotarget</i> , Vol. 7, No. 12, 22 March 2016 (2016-03-22), pp. 14336-14349, see entire document	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 March 2022

Date of mailing of the international search report

08 April 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
 CN)
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
 100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/070120

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	刘淦 等 (LIU, Gan et al.). "锌指蛋白ZBTB20生物学功能的研究进展 (Biological Functions of Zinc Finger Protein ZBTB2: Recent Advance)" 第二军医大学学报 (<i>Academic Journal of Second Military Medical University</i>), Vol. 36, No. 5, 31 May 2015 (2015-05-31), pp. 525-529, see entire document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/070120

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/070120

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	102234687	A	09 November 2011	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/070120

A. 主题的分类

G01N 33/574(2006.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)i; C12N 15/11(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N, C12Q, C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

TWMed; TWXT; USTXT; DWPI; ENTXT; KRTXT; CNTXT; WPABSC; JPTXT; CNABS; EPTXT; CNMED; WPABS; ENTXT; WOTXT; CJFD; CATXT; VEN, genbank, NCBI, elsevier Science, 中国专利生物序列检索系统: hepa+, 瘤, liver, carcinoma, DPZF, ZBTB20, cancer, 癌, 肝, HOF, ZNF288, 权利要求引物序列检索。

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	Jeffrey C等. "ZBTB20 regulates WNT/CTNNB1 signalling pathway by suppressing PPAR γ during hepatocellular carcinoma tumorigenesis" JHEP Reports, 第3卷, 第2期, 2020年12月19日 (2020 - 12 - 19), 摘要, 第3页右栏第1、2段, 第8页最后1段, 第9页左栏第2段和右栏第2段, 附件第5页RT-PCR部分	1-14
A	CN 102234687 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2011年11月9日 (2011 - 11 - 09) 全文	1-14
A	Wang, Q等. "Zinc finger protein ZBTB20 expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis" BMC Cancer, 第11卷, 2011年6月25日 (2011 - 06 - 25), 第271号, 参见全文	1-14
A	Kan, H.等. "Zinc finger protein ZBTB20 is an independent prognostic marker and promotes tumor growth of human hepatocellular carcinoma by repressing FoxO1" oncotarget, 第7卷, 第12期, 2016年3月22日 (2016 - 03 - 22), 第14336-14349页, 参见全文	1-14

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
---	---

国际检索实际完成的日期

2022年3月21日

国际检索报告邮寄日期

2022年4月8日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

杜娟

电话号码 01062411561

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/070120

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	刘淦 等. “锌指蛋白ZBTB20生物学功能的研究进展” 第二军医大学学报，第36卷，第5期，2015年5月31日（2015 - 05 - 31）， 第525-529页， 参见全文	1-14

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/070120

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 102234687 A	2011年11月9日	无	