

KCTD7 基因在肝细胞癌中的表达和作用机制

赵雅^{1,2}, 赵楠^{1,2}, 赵薇^{1,2}, 喻文颖^{1,2}, 房晓^{1,2}

摘要 目的 运用癌症基因组图谱(TCGA)测序数据研究钾离子通道四聚体结构域7(KCTD7)基因在肝细胞癌(HCC)中的表达、作用机制及其临床意义。方法 TCGA数据库中下载HCC患者的RNA测序数据及临床信息。单因素和多因素Cox回归分析探究KCTD7基因在HCC中的表达水平与患者临床信息和预后的相关性。基因富集分析(GSEA)预测KCTD7基因在HCC中可能调控的通路。单样本GSEA(ssGSEA)比较KCTD7高表达组与低表达组患者间的免疫浸润情况。HCC细胞系中敲低KCTD7研究其调控细胞增殖、周期及凋亡的功能和可能机制。结果 与正常组织相比,KCTD7基因在肝癌组织中高表达($P < 0.01$)。KCTD7基因高表达组HCC患者总生存率更差($P < 0.05$)。KCTD7基因的表达水平是影响HCC患者总生存期的独立危险因素。GSEA结果显示,KCTD7基因与细胞周期信号通路相关。在肿瘤微环境中,KCTD7基因的高表达与活化的CD4⁺T细胞、中央记忆CD4⁺T细胞及自然杀伤细胞等呈正相关。HCC细胞系中敲低KCTD7的表达能够抑制细胞增殖,影响细胞周期分布,并促进凋亡。结论 KCTD7基因在HCC中高表达且影响HCC患者的预后生存。敲低KCTD7基因能够通过影响细胞周期而抑制HCC细胞生长并促进其凋亡。

关键词 肝细胞癌;KCTD7;TCGA;预后;细胞周期

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1354-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.018

肝癌是中国常见的肿瘤之一,侵袭性强、预后较差,是病死率仅次于胃癌的恶性肿瘤^[1-2]。肝癌的诱因较多,主要由过量饮酒、乙型肝炎病毒感染、黄曲霉毒素摄入等导致^[1]。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占原发性肝癌的95%,是最常见的肝癌类型^[2]。手术切除作为非移植治疗方法效果较好,但仍有70%的患者在术后5年内复发^[2]。

HCC的发病机制目前尚未研究透彻,因此,进一步明确HCC发生发展的作用机制对于提高肝癌早期诊断率、寻找治疗靶点、改善预后至关重要。

钾离子通道四聚体结构域7(potassium channel tetramerization domain containing 7, KCTD7)是KCTD蛋白家族的成员之一,包含一个与电压门控钾离子通道中T1结构域类似的氨基末端结构域^[3]。已有研究^[3]表明KCTD7基因突变可能是通过调节谷氨酰胺转运体SAT2使神经元功能受损进而影响多种疾病发生发展,如进行性肌阵挛癫痫及神经元蜡样脂褐质沉积症等。但目前,KCTD7与肿瘤相关的研究尚未见报道。该研究运用癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库探索KCTD7在HCC中的表达及其对预后生存的影响,为临床研究提供新线索。

1 材料与方法

1.1 数据来源 从TCGA数据库(<https://tcga-data.nci.nih.gov/>)中获取HCC患者的mRNA表达谱及年龄、性别、生存信息及临床分期等临床数据,共有369例患者参与此次研究,样本中50例肝癌组织样本有配对的正常组织样本。

1.2 表达差异与预后分析 通过Wilcoxon检验比较肝癌组织和正常组织、50例配对肝癌组织及其正常组织中KCTD7的表达情况,分析KCTD7基因与HCC患者年龄、性别及临床分期之间的关系。使用R软件包ggplot2和ggpubr进行绘图和统计学分析^[4]。运用R软件包survival和survminer通过中位数分组和算法优化分组两种分组方法分析KCTD7与HCC患者总生存期(overall survival)之间的关系^[4]。采用单因素和多因素Cox回归分析,研究KCTD7基因、患者年龄、性别及临床分期与患者预后间的关系,使用R软件包forestplot绘制森林图^[4]。

1.3 基因富集分析及免疫浸润分析 为探究KCTD7基因的潜在功能,对基因按照与KCTD7表达的相关性(Spearman方法)排序后使用R软件包clusterProfiler^[5]通过分子标签数据库(Molecular Sig-

2023-06-29 接收

基金项目:江苏省自然科学基金面上项目(编号:BK20201434);江苏省高等学校基础科学(自然科学)重大项目(编号:21KJA180001)

作者单位:扬州大学¹医学院(转化医学研究院)、²江苏省非编码RNA基础与临床转化重点实验室,扬州 225009

作者简介:赵雅,女,副研究员,硕士生导师;

房晓,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail:fangxiaoyu@yzu.edu.cn

natures Database) 的基因集进行基因富集分析 (GSEA)^[6],并用 R 软件包 enrichplot 绘图。为探究 *KCTD7* 对免疫微环境的影响,根据之前报道的 28 种免疫细胞的免疫浸润特征基因表达谱,使用 R 软件包 GSVA^[7] 通过单样本基因富集分析 (ssGSEA) 比较低表达组 (表达量最低的 10% 样本) 和高表达组 (表达量最高的 10% 样本) 的免疫浸润情况,并使用 R 软件包 ggplot2 和 ggpubr 绘图并进行统计分析^[4]。

1.4 细胞培养和细胞系构建 Lenti-X 293T、Hep3B 和 HepG2 细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。使用 Tet-on 诱导表达系统,建立可以使用盐酸强力霉素 (Doxycycline, Dox) 诱导对照 siRNA (siNC) 和 *KCTD7* 敲低 siRNA (siKCTD7) 表达的 Hep3B、HepG2 细胞株。

1.5 细胞增殖检测 将 Dox 诱导 72 h 的 Hep3B、HepG2 对照组和 *KCTD7* 敲低细胞均按 1×10^4 个/ml 接种于 12 孔板中。每种细胞的对照组和敲低组每天设置 3 个复孔。每隔 24 h 分别对孔板中两组细胞的 3 个复孔进行台盼蓝染色计数,连续计数 5 d 并绘制生长曲线。

1.6 Western blot 离心收集 Dox 诱导 72 h 的 Hep3B、HepG2 对照组和 *KCTD7* 敲低细胞,并用尿素超声裂解。SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白,并将蛋白质转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 30 min 后,室温下与 TUBULIN (1:80 000; 诺唯赞)、CDK6 (1:7 500; Proteintech; 14052-1-AP)、P21 (1:1 000; Proteintech; 10355-1-AP)、Cleaved PARP1 (1:1 000; HUABIO; ET1608-10) 抗体孵育 90 min, TBST 洗涤 3 次,用辣根过氧化物酶偶联的抗兔二抗 (1:50 000; HUABIO; HP0112) 或抗鼠二抗 (1:40 000; CWBIO; CW0102S) 室温孵育 60 min。最后用 TBST 洗涤 3 次后,使用 ECL 化学发光试剂盒 (诺唯赞, E412) 显影。使用 Image J 进行灰度分析。

1.7 流式细胞术检测细胞周期 将 Dox 诱导 72 h 的 Hep3B、HepG2 对照组和 *KCTD7* 敲低细胞离心收集在离心管中,用约 5 ml 70% 无水乙醇重悬并置于 -20 ℃ 固定过夜。离心后再用 PBS 洗涤一次,加入 1 ml 含 0.1% Triton X-100 的 PBS 孵育 15 min。再次离心后弃上清液,加入 1 ml PI 染液 (含 0.04 mg/ml PI, 0.5 μg/ml RNase 的 PBS 溶液) 室温孵育 30 min。使用流式细胞仪计数 20 000 个细胞并用 Mod-fit 软件分析数据。

1.8 Caspase 3 酶活性检测 收取 1×10^6 个 Dox 诱导 72 h 的 Hep3B、HepG2 对照组和 *KCTD7* 敲低细胞,使用 Caspase 3 活性检测试剂盒 (上海碧云天公司, C1115) 冰浴裂解,离心收集上清液检测蛋白浓度及 Caspase 3 活性。按试剂盒说明于 37 ℃ 孵育 8 h,通过测定在 405 nm 处的吸光度除以蛋白浓度计算 Caspase 3 的相对活性。

1.9 统计学处理 使用 SPSS 27.0 和 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析并作图,所有数据均来自 3 次独立重复实验。单因素样本两组间比较采用双尾 *t* 检验,多样本组间均值比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *KCTD7* 基因在肝癌组织中表达情况 根据 TCGA 数据库中所得到的 369 例 HCC 患者数据进行分析,肝癌组织 *KCTD7* 的表达量明显高于正常组织,差异有统计学意义 ($W = 1\ 588, P < 0.01$, 图 1A)。对 50 例肝癌组织及其配对的正常组织进行配对差异表达分析,结果显示,相较于配对的正常组织, *KCTD7* 在 HCC 患者的肿瘤组织中表达量升高 ($V = 64, P < 0.01$, 图 1B)。

将 *KCTD7* 与患者临床信息组合分析, *KCTD7* 的表达与 HCC 患者年龄无明显相关性,但女性 HCC 患者中 *KCTD7* 的表达量相较于男性更高,且差异有统计学意义 ($W = 11\ 696, P < 0.01$, 图 1C)。在临床分期上,Ⅲ期样本中 *KCTD7* 的表达量较 I 期更高 ($W = 5\ 586.5, P = 0.004$, 图 1D)。上述结果提示 *KCTD7* 在肝癌组织中高表达,且 *KCTD7* 的表达与性别及临床分期相关。

2.2 *KCTD7* 高表达的 HCC 患者预后比较 对 TCGA 数据库中获取的 HCC 患者 *KCTD7* 表达水平和总体生存期进行生存概率分析,结果表明,与 *KCTD7* 低表达组相比,高表达组的生存时间减少 ($\chi^2 = 5.071, P = 0.024$, 图 2A)。通过软件按算法优化分组计算结果也表明 *KCTD7* 高表达组预后较差 ($\chi^2 = 12.425, P < 0.01$, 图 2B)。单因素 Cox 回归模型表明 *KCTD7* 高表达组患者的总体生存期显著缩短 ($HR = 1.26, 95\% CI$ 为 1.04 ~ 1.52, $P = 0.016$, 表 1)。多因素 Cox 回归分析也同时证实了 *KCTD7* 的高表达对患者预后的不良影响 ($HR = 1.22, 95\% CI$ 为 1.01 ~ 1.48, $P = 0.041$, 表 2)。上述分析结果提示 *KCTD7* 的表达对 HCC 患者的预后具有潜在的指示价值。

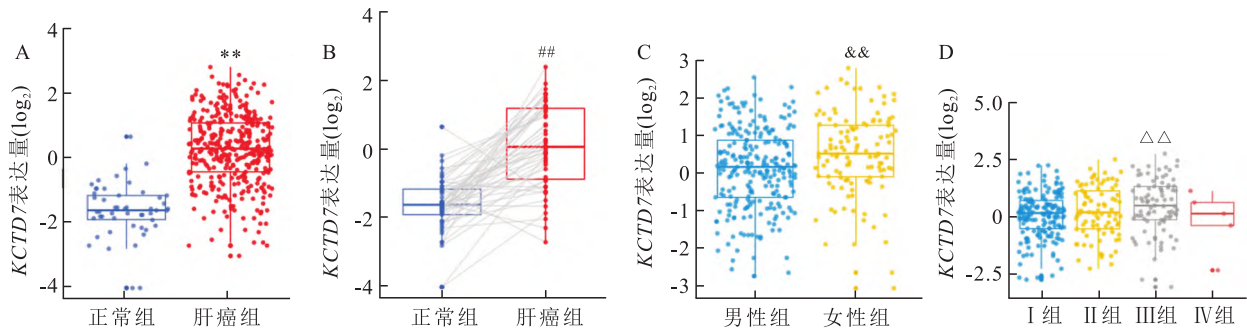


图1 *KCTD7* 在肝癌组织和正常组织中的表达水平及其与临床数据之间的相关性

A:TCGA 数据库 HCC 患者肝癌组织与正常组织中 *KCTD7* 的差异表达;与正常组比较: ** $P < 0.01$; B:肝癌组织及其配对的正常组织中 *KCTD7* 的差异表达;与配对的正常组织比较: ## $P < 0.01$; C:不同性别的 HCC 患者中 *KCTD7* 的差异表达;与男性组比较: && $P < 0.01$; D:不同 HCC 临床分期患者中 *KCTD7* 的差异表达;与 I 期比较: △△ $P < 0.01$

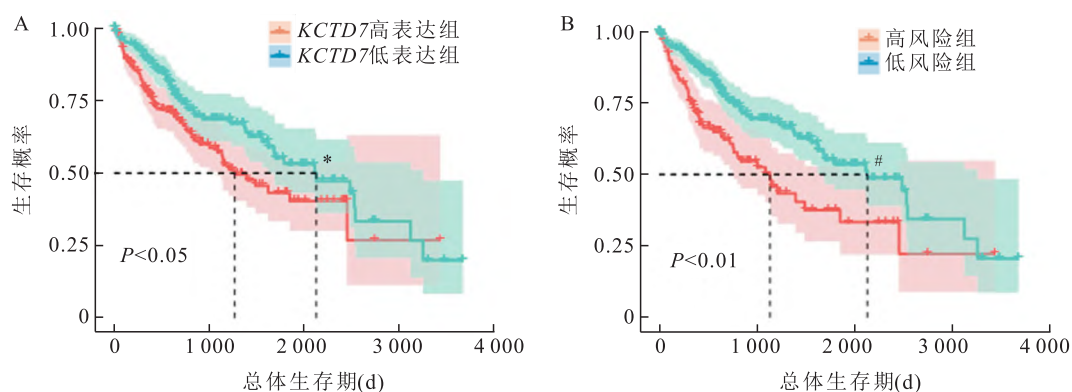


图2 *KCTD7* 与 HCC 患者预后分析

A:运用中位数分组分析 *KCTD7* 表达高低与 HCC 患者预后生存的关系;与 *KCTD7* 高表达组比较: * $P < 0.05$; B:运用算法优化分组分析 *KCTD7* 表达高低与 HCC 患者预后生存的关系;与高风险组比较: # $P < 0.01$

表1 单因素 Cox 回归分析

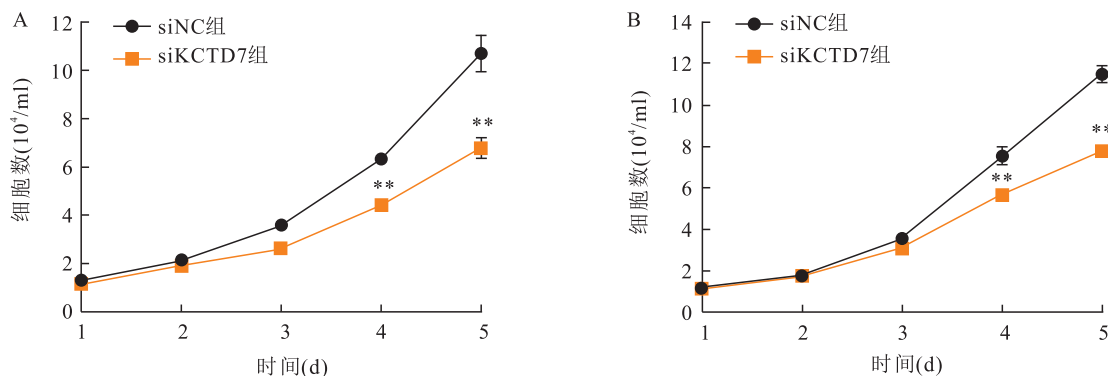
临床资料	患者例数(%)	HR (95% CI)	P 值
年龄	344 (100.00)	1.01 (1.00 ~ 1.02)	0.170
性别			
男	234 (68.02)	1.00 (1.00 ~ 1.00)	1.000
女	110 (31.98)	1.27 (0.87 ~ 1.85)	0.223
临床分期(期)			
I	169 (49.13)	1.00 (1.00 ~ 1.00)	1.000
II	85 (24.71)	1.49 (0.91 ~ 2.45)	0.113
III	85 (24.71)	2.80 (1.83 ~ 4.30)	<0.001
表达量	344 (100.00)	1.26 (1.04 ~ 1.52)	0.016

表2 多因素 Cox 回归分析

临床资料	患者例数(%)	HR (95% CI)	P 值
年龄	344 (100.00)	1.01 (1.00 ~ 1.03)	0.127
性别			
男	234 (68.02)	1.00 (1.00 ~ 1.00)	1.000
女	110 (31.98)	0.98 (0.65 ~ 1.48)	0.940
临床分期(期)			
I	169 (49.13)	1.00 (1.00 ~ 1.00)	1.000
II	85 (24.71)	1.38 (0.84 ~ 2.28)	0.203
III	85 (24.71)	2.69 (1.75 ~ 4.14)	<0.001
表达量	344 (100.00)	1.22 (1.01 ~ 1.48)	0.041

2.3 *KCTD7* 对 HCC 细胞增殖的影响 为探究 *KCTD7* 基因对 HCC 的作用,在 HCC 细胞 Hep3B 和 HepG2 中敲低 *KCTD7*。运用活细胞计数法连续计数 5 d 并绘制生长曲线,结果显示,与 siNC 组比较,敲低了内源 *KCTD7* 表达的 Hep3B 细胞和 HepG2 细胞的 si*KCTD7* 组的增殖速度均下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 3。结果表明 *KCTD7* 能够促进 HCC 细胞增殖。

2.4 *KCTD7* 对 HCC 细胞周期分布的影响 为研究 *KCTD7* 基因影响 HCC 增殖的潜在机制,运用 GSEA 分析 *KCTD7* 基因的潜在调控信号通路。结果显示,*KCTD7* 高表达与多条细胞增殖信号通路正相关:如 G₂M 检查点调控通路、有丝分裂纺锤体调控通路等。这些结果提示,*KCTD7* 可能是通过上述通路影响 HCC 细胞增殖从而发挥促进 HCC 生长的作用。为验证上述可能性,分别构建了对照组和 *KCTD7* 敲低组的 Hep3B 和 HepG2 细胞系,运用流式细胞术检测了它们的细胞周期分布情况,结果显示,敲低 *KCTD7* 后,两株 HCC 细胞系的细胞周期分

图3 敲低 *KCTD7* 对 HCC 细胞增殖的影响

A:活细胞计数法分析 *KCTD7* 敲低对 Hep3B 细胞增殖的影响;B:活细胞计数法分析 *KCTD7* 敲低对 HepG2 细胞增殖的影响;与 siNC 组比较:** $P < 0.01$

布均发生了改变 ($t_{\text{Hep3B-G0/G1}} = 26.78, P = 0.0014$; $t_{\text{HepG2-G0/G1}} = 11.81, P = 0.0071$, 图 4A ~ D)。进一步运用 Western blot 方法检测了细胞周期蛋白的表达情况,在两株 HCC 细胞系中,敲低 *KCTD7* 基因均能导致细胞周期相关蛋白 CDK6 表达量下降 ($t = 13.07, P < 0.01$, 图 4E)、P21 表达量上升 ($t = 6.635, P = 0.005$, 图 4F)。

2.5 *KCTD7* 对 HCC 细胞凋亡的影响 分析 CCLE 数据库中癌症细胞系的基因表达情况, Hep3B 内源的 *KCTD7* 表达量较 HepG2 高, 推测敲低 Hep3B 中的 *KCTD7* 后,其肿瘤细胞生物学效应可能更明显,因此,以 Hep3B 细胞为代表,进一步进行了凋亡相关指标的检测。对对照组和 *KCTD7* 敲低的 Hep3B 细胞中的 Caspase 3 酶活进行检测,发现敲低 *KCTD7* 基因后,细胞中 Caspase 3 活性升高 ($t = 87.67, P < 0.01$, 图 5A)。又运用 Western blot 检测了上述细胞中的 Cleaved PARP1 蛋白的表达情况,发现敲低 *KCTD7* 后, Cleaved PARP1 的蛋白条带由对照组中不可见转变为显著可见(图 5B)。综上,两项实验均提示在 Hep3B 细胞中敲低 *KCTD7* 能够促进细胞凋亡。

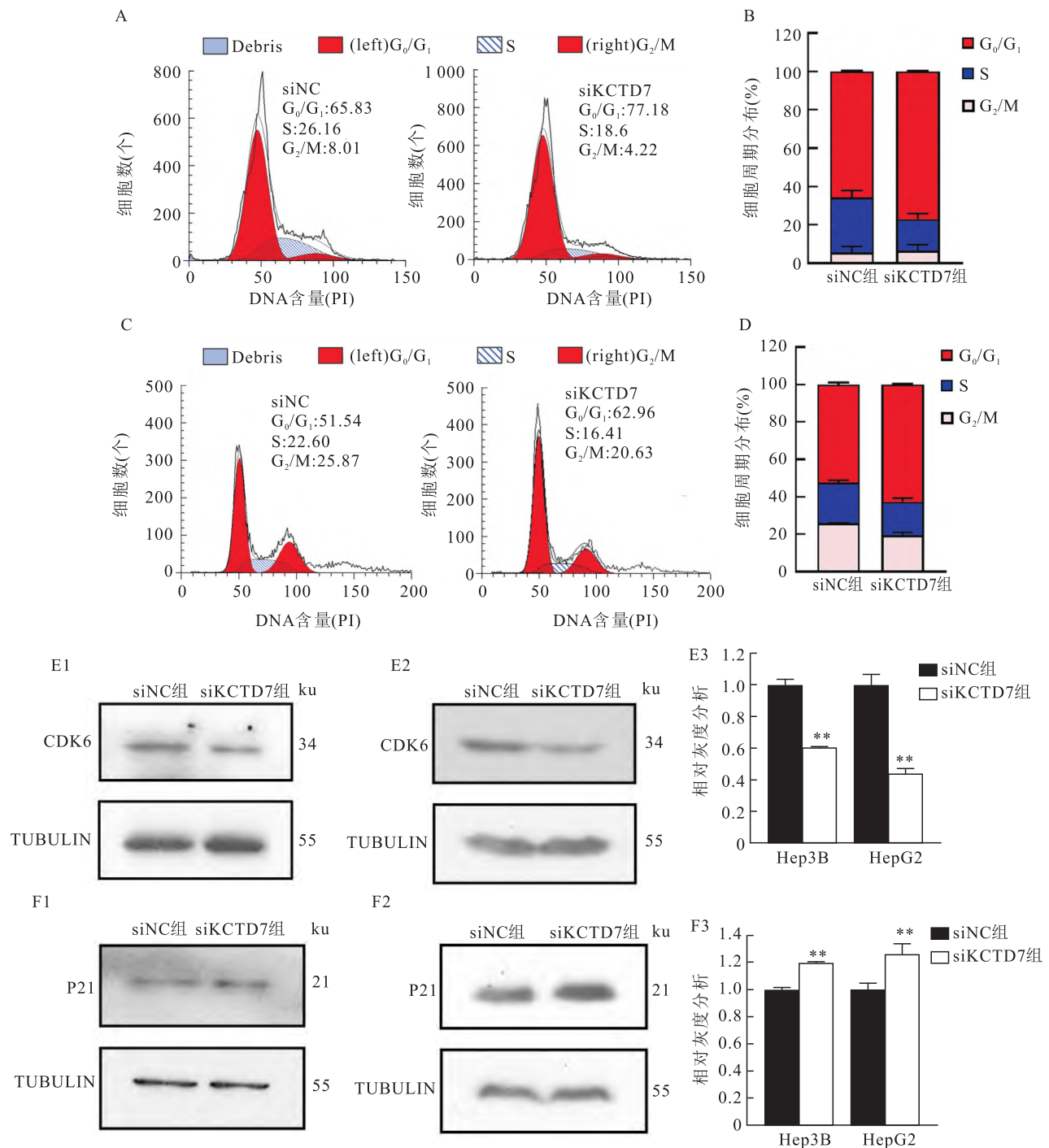
2.6 *KCTD7* 在肝癌中的免疫浸润情况 为探究 *KCTD7* 对免疫微环境的影响,通过 28 种免疫细胞的免疫基因表达图谱,对 *KCTD7* 高表达组和低表达组进行 ssGSEA 方法分析。结果显示,与 *KCTD7* 低表达组相比,高表达组免疫浸润情况出现明显变化,如激活的 CD4⁺T 细胞 ($W = 1085, P < 0.01$)、中枢记忆 CD4⁺T 细胞 ($W = 1156, P < 0.01$)、自然杀伤细胞(NK 细胞) ($W = 971, P = 0.009$)及 2 型辅助 T 细胞(Th2) ($W = 1101, P < 0.01$)的丰度上调,而激

活的 CD8⁺T 细胞 ($W = 378, P < 0.01$)、CD56 自然杀伤细胞 ($W = 429, P = 0.002$)、嗜酸粒细胞 ($W = 246, P < 0.01$)、中性粒细胞 ($W = 413, P = 0.001$)、1 型辅助 T 细胞(Th1) ($W = 465, P = 0.007$)及 17 型辅助 T 细胞(Th17) ($W = 427, P = 0.002$)的丰度下调(图 6)。这些免疫细胞的变化表明, *KCTD7* 对免疫微环境产生干扰可能是导致 HCC 患者预后较差的一个原因。

3 讨论

本研究通过生物信息学方法初步探索了 *KCTD7* 基因在肝癌组织中的表达水平及其预后生存情况。结果显示, *KCTD7* 在肝癌组织中高表达,且 *KCTD7* 表达水平是影响 HCC 患者总生存期的独立危险因素。GSEA 提示 *KCTD7* 可能与细胞周期通路相关,于是本研究构建了两种稳定敲低 *KCTD7* 的 HCC 细胞系,结合活细胞计数、流式细胞分析、Western blot 等多种技术手段,在体外验证了 *KCTD7* 主要通过影响细胞周期分布而调控 HCC 细胞的增殖。

肿瘤免疫微环境是指由肿瘤细胞周围的一些免疫细胞、血管、细胞外基质等组成的微环境。在免疫细胞中, CD8⁺T 细胞是抗肿瘤免疫反应中强大的效应细胞。CD8⁺T 细胞可以通过其 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)与癌细胞表达的 MHC 肽复合物结合来特异性识别癌细胞^[8]。TCR 参与后, CD8⁺T 细胞通过颗粒酶和穿孔素介导的细胞凋亡或通过 FASL-FAS 介导的细胞死亡来破坏靶细胞^[8]。CD4⁺T 细胞的 Th1 亚型通过帮助抗肿瘤细胞毒性 CD8⁺细胞和 B 细胞以及通过产生干扰素- γ (IFN- γ)

图4 敲低 *KCTD7* 对 HCC 细胞周期的影响

A: 流式细胞术分析 Hep3B 细胞的细胞周期 (G₀/G₁、G₂/M); B: Hep3B 细胞中细胞周期分布情况; C: 流式细胞术分析 HepG2 细胞的细胞周期 (G₀/G₁、G₂/M); D: HepG2 细胞中细胞周期分布情况; E: Western blot 检测 Hep3B 和 HepG2 细胞中 CDK6 蛋白表达情况; 1: Hep3B; 2: HepG2; 3: 直方图比较; F: Western blot 检测 Hep3B 和 HepG2 细胞中 P21 蛋白表达情况; 与 siNC 组比较; ** $P < 0.01$

和 TNF- α 直接杀死癌细胞来发挥抗肿瘤发生功能^[8]。另一方面, Th2 亚型可分泌具有抗肿瘤功能的抗炎介质^[8]。嗜酸粒细胞具有通过释放细胞毒性分子直接杀死肿瘤细胞的能力, 但嗜酸性粒细胞还可以调节肿瘤脉管系统并调节 TME 的免疫成分,

因此, 它们可以同时具有促肿瘤和抗肿瘤发生的功能, 具体取决于他们收到的激活信号^[8]。NK 细胞是具有细胞毒性的先天性淋巴样细胞。它们识别并杀死缺乏 MHC I 类表达的应激细胞, 具有强大的抗癌能力^[8]。ssGSEA 结果提示, *KCTD7* 能够对肿瘤

免疫微环境产生干扰进而影响 HCC 细胞生长及患者的预后。

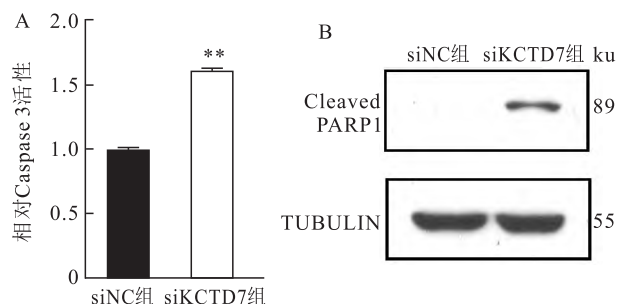


图5 敲低 *KCTD7* 对 Hep3B 细胞凋亡的影响

A: Caspase 3 活性分析检测 Hep3B 细胞中 Caspase 3 的酶活力;
B: Western blot 检测 Hep3B 细胞中 Cleaved PARP1 蛋白表达情况;与 siNC 组比较; * $P < 0.01$

既往研究表明,部分 KCTD 家族成员与神经性及心血管疾病有一定关联,如 KCTD8 和 KCTD12 通过促进胆碱能神经元中 GABAB 受体的轴突表达和突触前兴奋影响大脑功能^[9]、KCTD10 可能通过改变汉族血浆 HDL-C 水平导致冠心病易感性^[10]。但

目前 KCTD 家族与肿瘤相关的研究甚少,如在肺癌中 KCTD11 通过与 β -catenin 结合,调节 Wnt 和 Hippo 通路的活性,从而抑制肿瘤的进展^[11]、在黑色素瘤中通过抑制 KCTD12 的表达增强细胞的干性进而促进黑色素瘤细胞的生长^[12]。而 *KCTD7* 与癌症相关的研究未见报道。本研究探讨了 *KCTD7* 对 HCC 发生发展的作用,研究中发现 *KCTD7* 基因的表达在 GSEA 中富集到了 Wnt/ β -Catenin 信号通路,这与 KCTD11 调控肺癌的信号通路一致,提示 KCTD 家族各成员对肿瘤的影响可能具有相关性。此外, GSEA 结果表明 *KCTD7* 参与了多种生长调控通路,如 G_2/M 检查点调控通路、有丝分裂调控通路等,这提示 *KCTD7* 对 HCC 的影响可能是通过影响其细胞生长及细胞周期导致。

综上所述,该研究运用 TCGA 数据库通过生物信息学分析,发现 *KCTD7* 基因高表达对 HCC 的预后较差,并通过实验验证敲低 *KCTD7* 基因后能够影响细胞周期,进一步抑制 HCC 细胞的增殖,促进细胞凋亡。研究为后续 HCC 的临床治疗提供了可能的思路。

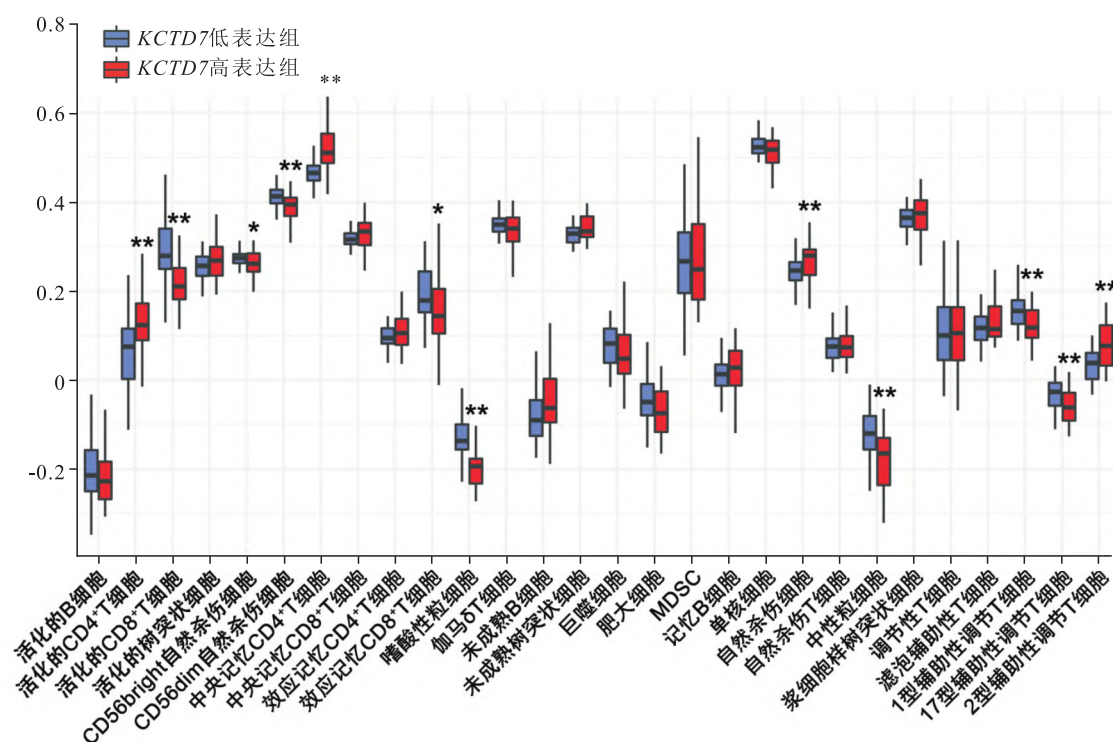


图6 *KCTD7* 低表达组和高表达组中 HCC 肿瘤的免疫浸润情况

与 *KCTD7* 低表达组比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

参考文献

- [1] Verplaetse T L, Roberts W, Peltier M R, et al. Risk drinking levels and sex are associated with cancer and liver, respiratory, and other medical conditions[J]. *Drug Alcohol Depend Rep*, 2021, 1: 100007.
- [2] Clark T, Maximin S, Meier J, et al. Hepatocellular carcinoma: review of epidemiology, screening, imaging diagnosis, response assessment, and treatment[J]. *Curr Probl Diagn Radiol*, 2015, 44(6): 479–86.
- [3] Wang Y L, Cao X T, Liu P, et al. *KCTD7* mutations impair the trafficking of lysosomal enzymes through CLN5 accumulation to cause neuronal ceroid lipofuscinoses[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(31): eabm5578.
- [4] Fang X, Liu Y, Xiao W, et al. Prognostic SLC family genes promote cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2021, 53(8): 1065–75.
- [5] Wu T, Hu E, Xu S, et al. clusterProfiler 4.0: a universal enrichment tool for interpreting omics data[J]. *Innovation (Camb)*, 2021, 2(3): 100141.
- [6] Subramanian A, Tamayo P, Mootha V K, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(43): 15545–50.
- [7] Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14:7.
- [8] de Visser K E, Joyce J A. The evolving tumor microenvironment: from cancer initiation to metastatic outgrowth[J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(3): 374–403.
- [9] Ren Y, Liu Y, Zheng S, et al. *KCTD8* and *KCTD12* facilitate axonal expression of GABA (B) receptors in habenula cholinergic neurons[J]. *J Neurosci*, 2022, 42(9): 1648–65.
- [10] Sun J, Qian Y, Jiang Y, et al. Association of *KCTD10*, *MVK*, and *MMAB* polymorphisms with dyslipidemia and coronary heart disease in Han Chinese population[J]. *Lipids Health Dis*, 2016, 15(1): 171.
- [11] Yang M, Han Y M, Han Q, et al. *KCTD11* inhibits progression of lung cancer by binding to beta-catenin to regulate the activity of the Wnt and Hippo pathways[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(19): 9411–26.
- [12] Shen W, Li Y, Li B, et al. Downregulation of *KCTD12* contributes to melanoma stemness by modulating CD271[J]. *Cancer Biol Med*, 2019, 16(3): 498–513.

Expression and functional mechanism of *KCTD7* gene in hepatocellular carcinoma

Zhao Ya^{1,2}, Zhao Nan^{1,2}, Zhao Wei^{1,2}, Yu Wenying^{1,2}, Fang Xiao^{1,2}

(¹*Institute of Translational Medicine, Medical College, Yangzhou University*, ²*Jiangsu Key Laboratory of Experimental & Translational Non-coding RNA Research, Yangzhou University, Yangzhou 225009*)

Abstract Objective Using RNA sequencing data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) to explore the expression, mechanism, and clinical significance of *KCTD7* in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The RNA sequencing data and clinical information of HCC patients were downloaded from the TCGA database. Univariate and multivariate Cox regression analyses were used to explore the correlation between the expression level of the *KCTD7* gene in HCC and the clinical information and prognosis of patients. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was used to predict possible pathways regulated by the *KCTD7* gene in HCC. Single-sample GSEA (ssGSEA) was used to compare immune infiltration between *KCTD7* high expression group and low expression group. *KCTD7* knock-down HCC cell lines were established to explore its function and possible mechanism in HCC regulation. **Results** *KCTD7* was highly expressed in HCC tissues compared to normal tissues ($P < 0.01$). The overall survival rate of HCC patients with high expression of *KCTD7* gene was worse ($P < 0.05$). The expression level of *KCTD7* was an independent risk factor affecting the overall survival of HCC patients. GSEA results showed that the *KCTD7* gene was related to cell cycle signaling pathways. In the tumor microenvironment, high expression of the *KCTD7* gene was positively correlated with activated CD4⁺T cells, central memory CD4⁺T cells, and natural killer cells. Knocking down *KCTD7* might inhibit HCC cell proliferation, impair cell cycle distribution, and promote apoptosis. **Conclusion** *KCTD7* gene is highly expressed in HCC and affects the prognostic survival of HCC patients. Knocking down *KCTD7* can inhibit the proliferation of HCC cells and promote apoptosis.

Key words hepatocellular carcinoma; *KCTD7*; TCGA; prognosis; cell cycle