

本文引文格式:张懿刚,孟海萍,徐之端,等.沉默PRKCD通过调控上皮-间质转化抑制肝癌Huh-7细胞的增殖和侵袭[J].右江民族医学院学报,2023,45(3):406-412.

【论著与临床报道】

## 沉默PRKCD通过调控上皮-间质转化抑制 肝癌Huh-7细胞的增殖和侵袭

张懿刚<sup>1</sup>,孟海萍<sup>2</sup>,徐之端<sup>1</sup>,赵向阳<sup>1</sup>,江博文<sup>1</sup>,谈焱<sup>1</sup>

(1. 蚌埠医学院第一附属医院肝胆外科,安徽 蚌埠 233000;  
2. 蚌埠医学院第一附属医院检验科,安徽 蚌埠 233000)

**摘要:**目的 探讨蛋白激酶C $\delta$ (protein kinase C $\delta$ ,PRKCD)在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)中的表达水平、临床意义及其潜在的作用机制。方法 从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas,TCGA)数据库中下载HCC的表达数据和临床数据,分析PRKCD在HCC中的表达水平及其临床意义。收集25例HCC患者的肿瘤组织及癌旁组织,采用免疫组化染色检测患者样本中的PRKCD蛋白表达水平。采用Western Blot及qRT-PCR法检测PRKCD在正常肝上皮细胞和肝癌细胞系中的表达水平。通过构建si-PRKCD慢病毒转染到Huh-7肝癌细胞中,采用CCK-8实验评估沉默PRKCD对肝癌细胞增殖活性的影响。采用划痕实验、Transwell侵袭实验明确PRKCD对细胞迁移和侵袭的影响。最后,通过Western Blot法检测PRKCD对上皮-间质转化(epithelial to mesenchymal transition,EMT)关键蛋白(Vimentin、N-cadherin、E-cadherin、Slug)的内在调控作用。结果 TCGA数据库分析及免疫组化染色结果显示,肝癌组织中PRKCD的表达量显著高于癌旁组织( $P < 0.05$ )。Kaplan-Meier曲线分析显示PRKCD低表达患者的总生存率(overall survival,OS)、无病间隔期(disease-free interval,DFI)、无病生存期(disease-free survival,DFS)显著高于PRKCD高表达患者。与正常肝上皮细胞LO2相比,PRKCD在肝癌细胞Huh-7中的蛋白表达水平最高( $P < 0.05$ )。与对照组比较,沉默PRKCD后,PRKCD蛋白表达量显著减少( $P < 0.05$ )。肝癌细胞的增殖、侵袭、迁移能力明显降低( $P < 0.05$ )。此外,沉默PRKCD后,Vimentin、N-cadherin、Slug蛋白表达降低,而E-cadherin蛋白表达升高( $P < 0.05$ )。结论 PRKCD是肝癌的潜在不良预后标志物,沉默PRKCD的表达能够抑制Huh-7肝癌细胞的增殖和侵袭,其机制可能与上皮-间质转化过程有关。

**关键词:**蛋白激酶C;肝肿瘤;癌,肝细胞;上皮-间质转化

中图分类号:R735.7

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)03-0406-07

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.03.006

### Silencing PRKCD inhibits the proliferation and invasion of hepatoma Huh-7 cells by regulating epithelial-mesenchymal transformation

Zhang Yigang<sup>1</sup>, Meng Haiping<sup>2</sup>, Xu Zhiduan<sup>1</sup>, Zhao Xiangyang<sup>1</sup>, Jiang Bowen<sup>1</sup>, Tan Yi<sup>1</sup>

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui, China; 2. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression level, clinical significance, and potential mechanism of protein kinase C $\delta$  (PRKCD) in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The expression data and clinical data of HCC were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database to analyze the expression

基金项目:2022年安徽省高校科研项目(2022AH051416);2021年蚌埠医学院研究生科研创新计划项目(Byycx21076)

第一作者简介:张懿刚(1994-),男,硕士研究生,住院医师,研究方向:肝胆胰肿瘤基础与临床,E-mail:zyg951487219@163.com

通讯作者简介:谈焱(1968-),男,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向:肝胆胰肿瘤基础与临床,E-mail:doctortanyi2007@sina.com

level of PRKCD in HCC and its clinical significance. Tumor and adjacent non-cancerous tissues from 25 HCC patients were collected, and the protein expression level of PRKCD in the samples was detected using immunohistochemical staining. Western Blot and qRT-PCR were performed to measure the expression levels of PRKCD in normal liver epithelial cells and liver cancer cell lines. Hepatoma Huh-7 cells were transfected with si-PRKCD lentivirus to silence the expression of PRKCD, and the effect of PRKCD silencing on the proliferation activity of hepatoma cells was evaluated using the CCK-8 assay. The impact of PRKCD on cell migration and invasion was assessed through scratch and Transwell invasion assays. Finally, the intrinsic regulatory effect of PRKCD on key proteins (Vimentin, N-cadherin, E-cadherin, Slug) involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT) was determined by Western Blot. **Results** Analysis of TCGA database and immunohistochemical staining revealed that the expression level of PRKCD was significantly higher in liver cancer tissues compared to adjacent non-cancerous tissues ( $P < 0.05$ ). Kaplan-Meier curve analysis showed that patients with low PRKCD expression had significantly higher overall survival (OS), disease-free interval (DFI), and disease-free survival (DFS) rates compared to patients with high PRKCD expression. The protein expression of PRKCD in hepatoma Huh-7 cells was found to be the highest among the tested cells ( $P < 0.05$ ) when compared to normal liver epithelial cells (LO2). After silencing PRKCD, the protein expression of PRKCD significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Consequently, the proliferation, invasion, and migration abilities of hepatoma cells were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the silencing of PRKCD led to a decrease in the protein expression of Vimentin, N-cadherin, and Slug, while the protein expression of E-cadherin increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** PRKCD serves as a potential adverse prognostic marker in hepatocellular carcinoma. Silencing the expression of PRKCD can inhibit the proliferation and invasion of Huh-7 hepatoma cells, and this effect may be associated with the process of epithelial-mesenchymal transition.

**Key words:** protein kinase C; liver tumor; cancer, liver cells; epithelial-mesenchymal transformation

肝癌是世界上第七大流行的癌症,每年约有 90 万新发病例和 83 万人死亡<sup>[1]</sup>。大多数肝癌患者诊断时已处于晚期,其治疗手段有限,预后较差<sup>[2]</sup>。目前,尚无有效的肝癌预后评估指标。因此,有必要探索新的肝癌的有效治疗靶点和预后标志物。

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是一种钙依赖性蛋白激酶,其活性与许多细胞功能有关,包括细胞周期、细胞凋亡和分化<sup>[3]</sup>。在小鼠中,PKC 参与控制配子成熟、受精和胚胎发育的各种过程<sup>[4]</sup>。PKC 根据其反应共性和结构相似性可分为 3 个亚家族,即经典 PKC( $\alpha$ 、 $\beta$  I、 $\beta$  II、 $\gamma$ )、新型 PKC( $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ ) 和非典型 PKC<sup>[5]</sup>。在这些成员中,蛋白激酶 C $\delta$  (PRKCD) 活动和表达水平的紊乱是许多肿瘤发生与发展中的关键事件<sup>[6-8]</sup>。然而,既往研究表明,PRKCD 在癌症中的表达具有促进和抑制的双重作用。PRKCD 的表达水平在子宫内膜癌、鳞状细胞癌和膀胱癌、结直肠癌和子宫内膜癌中下调<sup>[9-12]</sup>,但在乳腺癌、胰腺癌和非小细胞肺癌中上调<sup>[13-15]</sup>,表明 PRKCD 在不同肿瘤发生与发展中的调控作用是不同的。虽然 PRKCD 在肿瘤中的作用存在争议,但不可否认的是,PRKCD 的异常表达或激活与肿瘤的发生发展相关。到目前为止,PRKCD 在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 中的表达、功能和作用机制尚不清楚。因此,有必要对 PRKCD 肝癌中的作用及其作用机制进行探索。

本研究通过癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库分析 PRKCD 在肝癌中的表达水平和临床意义。采用免疫组化、Western Blot 和 qRT-PCR 实验明确 PRKCD 在肝癌细胞中表达水平。利用慢病毒构建 PRKCD 的沉默载体,验证沉默 PRKCD 对肝癌细胞生物学行为的影响。采用 Western Blot 法明确沉默 PRKCD 后对肝细胞癌上皮-间质转化的影响。

## 1 材料和方法

1.1 细胞与试剂 从中国科学院上海细胞分子卓越中心研究所购得正常肝上皮细胞 LO2 和人肝癌细胞系 Huh-7、SMCC-7721、BEL-7404、HLE。从赛默飞世尔科技有限公司购置胎牛血清, Materigel 胶, RPMI-1640 培养基, 通过吉满生物科技(上海)有限公司生产对照 NC、PRKCD shRNA-1、PRKCDshRNA-2、PRKCDshRNA-3 所用序列的重组慢病毒液, 上海雅酶生物医药科技有限公司购置 Marker, 青-链霉素及 BCA 定量试剂、TRIzol、qRT-PCR 试剂盒于合肥白鲨生物科技有限公司购置, 一抗 (PRKCD) 从 Abcam 购置, (Vimentin、N-cadherin、E-cadherin、Slug、GAPDH) 及二抗均从江苏亲科生物研究中心有限公司购置, CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 临床样本 本研究纳入的标本组织均来自 2020 ~ 2021 年蚌埠医学院第一附属医院肝胆外科经手术

治疗且病理证实为 HCC 的病人。共收集 25 对肿瘤组织和癌旁组织。所有患者术前均未接受放疗或化疗。该项目得到了蚌埠医学院第一附属医院伦理委员会的批准(伦科批字[2022]第 322 号),所有患者均已签署知情同意书。

**1.3 TCGA 数据的获取和处理** 下载 TCGA 数据库(<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>)中与 HCC 相关的公开 RNA-seq 数据和临床数据。共有 374 个 HCC 样本和 50 个非癌变组织具有详细的 RNA-seq 数据,将 FPKM 格式的 RNAseq 数据转换成了 TPM 格式并进行 log<sub>2</sub> 转化,利用 Limma 软件包(3.8 版,在 R 项目中 <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>)提取 PRKCD 表达数据,对数据进行排序和整理。其中,共有 377 例 HCC 患者的生存信息完整。为了探讨 PRKCD 的临床意义,本研究合并了临床和 RNA-seq 数据,共有 370 例患者有 RNA-seq 和生存数据,311 例患者有上述 RNA-seq 和选定的临床特征数据。以上数据均由 edge R 进行统计学分析与可视化处理。

**1.4 免疫组化染色** 将获取的肝细胞癌肿瘤组织和癌旁组织切片依次于二甲苯和无水乙醇浸泡,随后使用乙醇和蒸馏水脱蜡并进行封闭,4 ℃ 摇床过夜,孵育一抗。磷酸盐缓冲液洗去表面残留一抗,并于二抗中室温孵育 1 h,用 DAB 显色液对组织进行显色,最后脱水封片,分别在 ×40 和 ×200 倍视野下观察并拍照,PRKCD 蛋白的 IHC 评分标准为高倍镜下(×200)随机取 5 个视野,计数 5 个视野内阳性细胞所占平均的百分比。IHC 计算为染色强度与阳性细胞百分比的乘积。染色强度分为 0 分(阴性)、1 分(弱)、2 分(中)、3 分(强);阳性细胞百分比分为 1 分(0%~25%)、2 分(26%~50%)、3 分(51%~75%)、4 分(76%~100%)。总分 > 2 分代表阳性表达,计算二者乘积作为样品染色结果。

**1.5 qRT-PCR 试验** 在肝癌细胞悬液中加入 1 mL Trizol,充分混匀后室温静置 5 min;加入 200 μL BCP,剧烈震荡 15 s,室温静置 2~3 min;12 000 g,4 ℃ 离心 15 min,随后上层水相中加入 500 μL 异丙醇,混匀后室温静置 10 min;12 000 g,4 ℃ 离心 10 min;弃去上清,RNA 沉淀继续加入 75%乙醇混匀,7 500 g,4 ℃ 离心 5 min,小心弃去上清乙醇,充分保留 RNA 沉淀。EP 管开盖晾干,直至 RNA 沉淀完全干燥;干燥后 RNA 产物使用 30 μL DEPC 水溶解,使用核酸蛋白测定仪测定浓度,-80 ℃ 保存。由上海生工生物工程股份有限公司负责合成,引物序列如下:GAPDH:5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3',5'-AGGGCCATCCACAGTCTTC-3';PRKCD:5'-AACCAT

GAGTTTATCGCCACC-3',5'-AGCGTTACATTGCTGCATTT-3'。每个样品重复 3 次实验,各个基因的相对表达水平以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 进行计算及相关统计学分析。

**1.6 细胞转染** 对上述实验中 PRKCD 表达量最高的肝癌 Huh-7 细胞进行慢病毒转染。本研究对其 PRKCD 基因进行了 3 条不同敲除的序列,将实验分为 4 组:NC 组、PRKCD-RNAi1 组、PRKCD-RNAi2 组和 PRKCD-RNAi3 组。NC 组、PRKCD-RNAi1 组、PRKCD-RNAi2 组和 PRKCD-RNAi3 组分别转染到提前种好含有 Huh-7 细胞 6 孔板中,随后进行培养,以备进行后续的表型实验。PRKCD-RNAi 序列具体如下:PRKCDshRNA-1:5'-ACGGUAGAGUUCAAA GCGGCCTT-3';PRKCDshRNA-2:5'-UAGUUGUG AACCUUGAAGCGGTT-3';PRKCDshRNA-3:5'-C GUGUGGACACGCCACAUAUUTT-3'。

**1.7 CCK-8 试验** 使用 CCK-8 法进行细胞增殖实验,以检测沉默 PRKCD 后对肝癌细胞增殖的影响。以每孔 1×10<sup>3</sup> 个细胞的密度将 100 μL Huh7 细胞悬液接种到 96 孔板中,并于 5%CO<sub>2</sub>、37 ℃ 的环境中培养。分别于第 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h 在每个孔内注入 10 μL CCK8 溶液,在 37 ℃ 下孵育 2 h。最后,在酶标仪 450 nm 处测定吸光度,检测 OD 值。

**1.8 划痕试验** 采用划痕实验检测沉默 PRKCD 对细胞迁移能力的影响。以 5×10<sup>4</sup> 个细胞每孔的密度将 Huh7 细胞悬液移入 6 孔板内,待显微镜下观察其生长至 90% 以上时,使用无菌移液管尖端于细胞表面划痕,PBS 洗去漂浮细胞,观察划痕宽度并拍照,继续培养 24~48 h 后,观察划痕宽度并拍照,对比不同组间划痕宽度的差异。

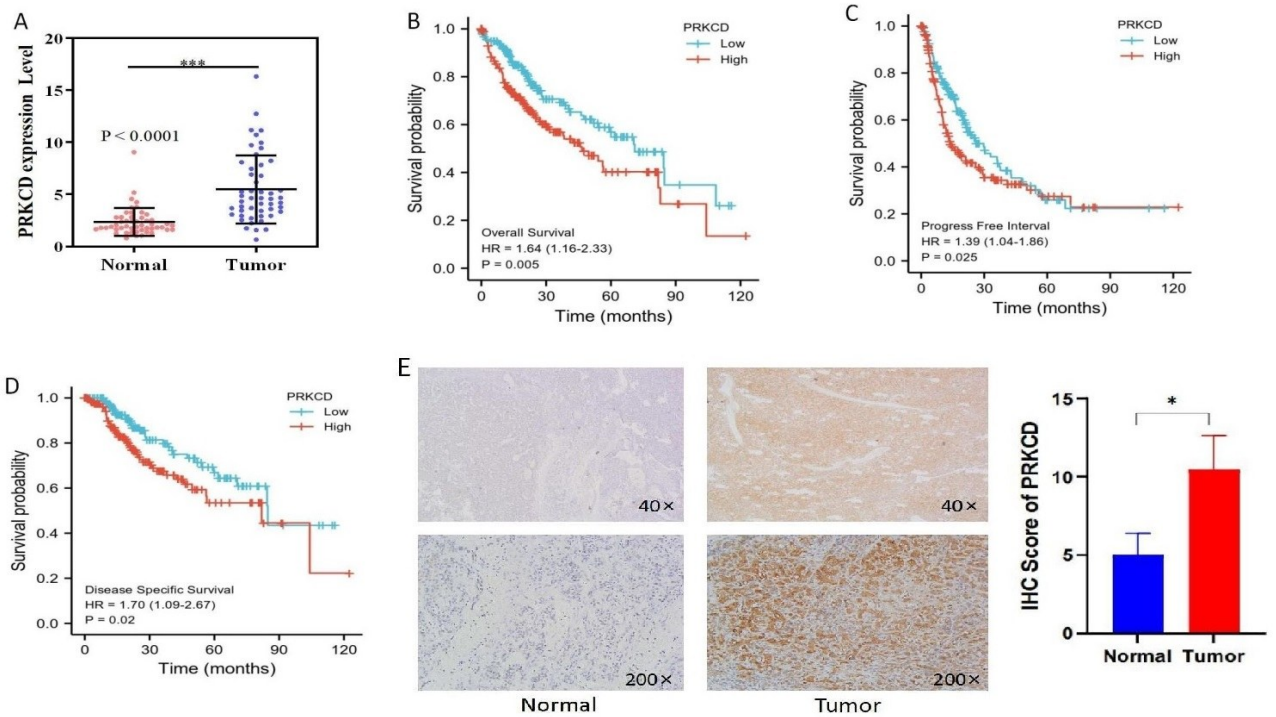
**1.9 Transwell 迁移及侵袭实验** 采用 Transwell 小室实验检测沉默 PRKCD 对细胞迁移、侵袭能力的影响。以 2×10<sup>4</sup> 个细胞每孔的密度将 Huh7 细胞悬液置于 Transwell 小室上室中。将新鲜混入 10%胎牛血清完全培养基添加到下室中,并于 5%CO<sub>2</sub>、37 ℃ 的环境中培养。24 h 后,将小室进行洗涤、固定并用结晶紫染色 20 min,干燥后于荧光倒置显微镜进行拍照、计数,统计学分析各组间差异。

**1.10 Western Blot 法** 将细胞经 RIPA 强裂解缓冲液充分裂解后提取其总蛋白,通过 BCA 蛋白定量法检测蛋白质浓度。随后,取等量蛋白样品 SDS-PAGE 凝胶进行上样,电泳以分离 SDS-PAGE 凝胶上的蛋白质,并转印到 PVDF 膜上,使用 5%牛奶进行封闭 2 h。一抗 PRKCD 以 1:1 000 比例稀释,N-cadherin、DAPDH、Vimentin、Bax、E-cadherin、Slug 以 1:5 000 比例稀释,将蛋白条带置于稀释后的一抗中,于 4 ℃ 环

境下静置一夜。第 2 天再与合适的二抗孵 2 h, 其中二抗以 1 : 5 000 的比例稀释, 最后使用 ECL 法对蛋白质条带进行曝光显影。通过 ImageJ 对条带进行灰度值扫描, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。

1.11 统计学方法 采用 Mann-Whitney U 检验分析 TCGA 数据库中 PRKCD 在肝细胞癌中的表达情况, 利用 GraphPad Prism 8.0 软件分析所有的数据, 实验至少反复进行 3 次, 并以均数 ± 标准差的形式表示。采用单因素方差分析进行差异比较,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果



注: A. PRKCD 分别在癌和癌旁组织中蛋白的表达水平; B. PRKCD 高、低表达组总体生存率; C. PRKCD 高、低表达组无进展生存率; D. PRKCD 高、低表达组无病生存率; E. 通过免疫组化法观察 PRKCD 在癌和癌旁组织中的表达。\*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ 。

图 1 PRKCD 在肝细胞癌中高表达且与预后不良相关

2.2 沉默 PRKCD 抑制 Huh-7 肝癌细胞增殖 Western Blot 结果显示, 相较于人正常肝组织上皮细胞, 肝癌细胞系 (Huh-7、SMCC-7721、BEL-7404 和 HLE) 中 PRKCD 的蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 (见图 2A)。qRT-PCR 结果也证实, 肝癌细胞中 PRKCD 的表达水平显著高于正常肝上皮细胞, 尤其是 Huh-7 细胞 (见图 2B)。为进一步明确 PRKCD 在 HCC 中的作用, 本研究构建了慢病毒载体, 对 Huh7 细胞进行 PRKCD 沉默。Western Blot 证实, 转染慢病毒后 PRKCD 表达水平显著下降 (见图 2C)。CCK-8

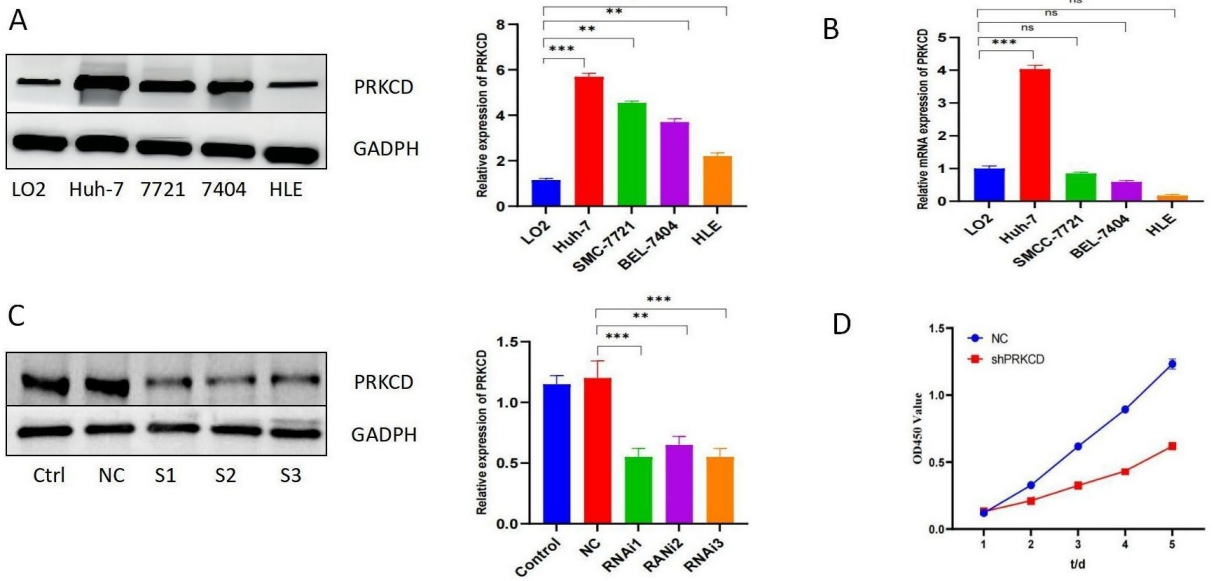
2.1 PRKCD 在肝癌组织中呈高表达 对 TCGA 数据库中 HCC 患者的基因表达分析结果显示, HCC 患者肿瘤组织中 PRKCD 的表达水平显著高于癌旁组织 (见图 1A)。生存分析显示, PRKCD 低表达患者的总生存率 (overall survival, OS)、无病间隔期 (disease-free interval, DFI)、无病生存期 (disease-free survival, DSS) 显著高于 PRKCD 高表达患者 (见图 1B)。对 HCC 患者肿瘤组织及癌旁组织中的 PRKCD 行免疫组化染色分析后, 结果显示: 肿瘤组织中, PRKCD 阳性细胞的阳性率为 64.00% (16/25), 而癌旁组织中 PRKCD 阳性细胞的阳性率为 36.00% (9/25) (见图 1C)。

细胞增殖实验表明, 沉默 PRKCD 可显著抑制肝癌细胞的增殖 (见图 2D)。

2.3 沉默 PRKCD 可通过影响上皮-间质转化过程抑制 Huh-7 肝癌细胞的迁移和侵袭 细胞划痕实验结果如图 3A 所示, 与对照组相比, 沉默 PRKCD 组在 48 h 的划痕宽度明显增宽。Transwell 迁移和侵袭实验则表明, 沉默 PRKCD 后, 肝癌细胞的迁移和侵袭能力明显减弱 (见图 3B)。为了进一步探索沉默 PRKCD 的表达抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的内在机制, 采用 Western blot 对上皮-间质转化过程中分子标志物

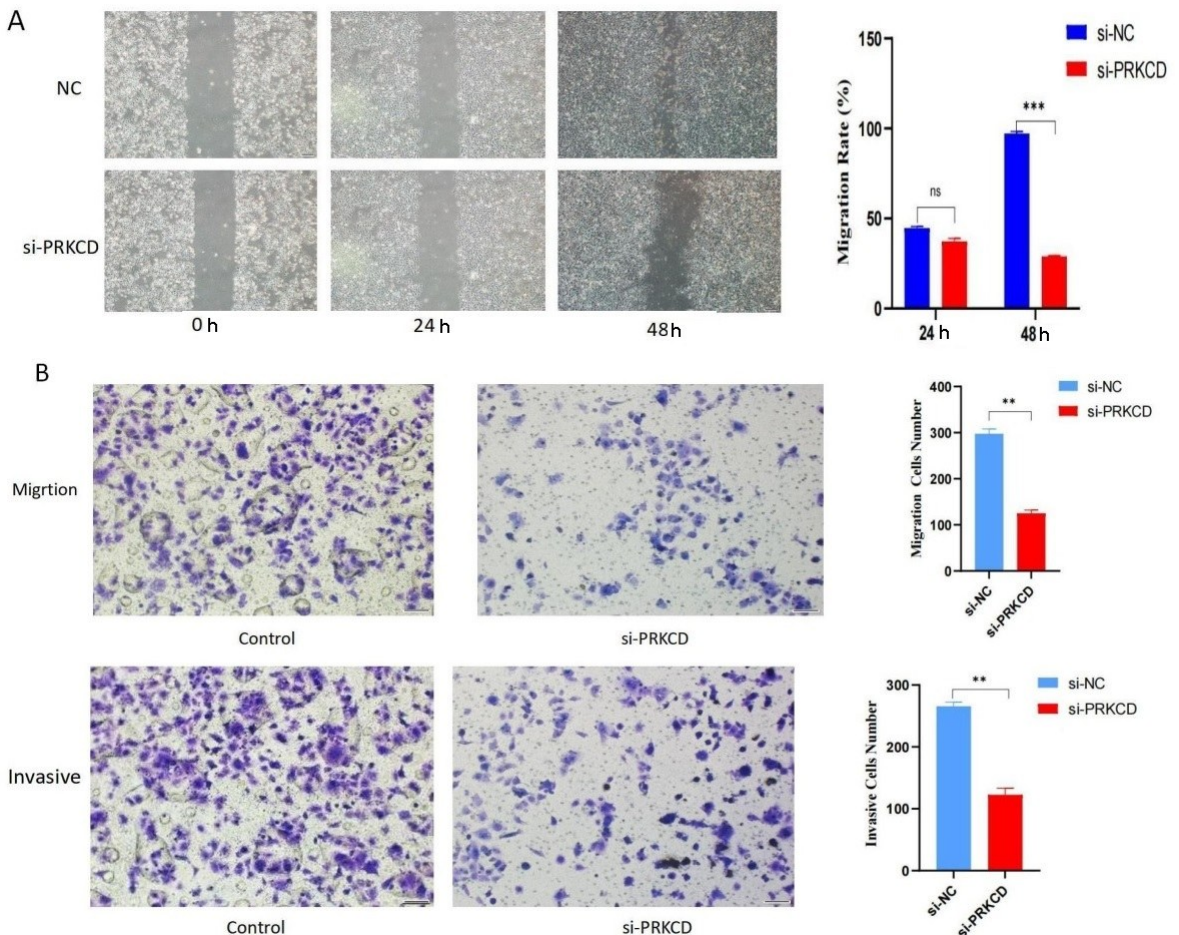
的表达水平进行探究。结果表明,沉默 PRKCD 后,肝癌细胞中 N-cadherin、Slug 和 Vimentin 等的表达水平降低,而 E-cadherin 的表达水平上升(见图 3C),表明

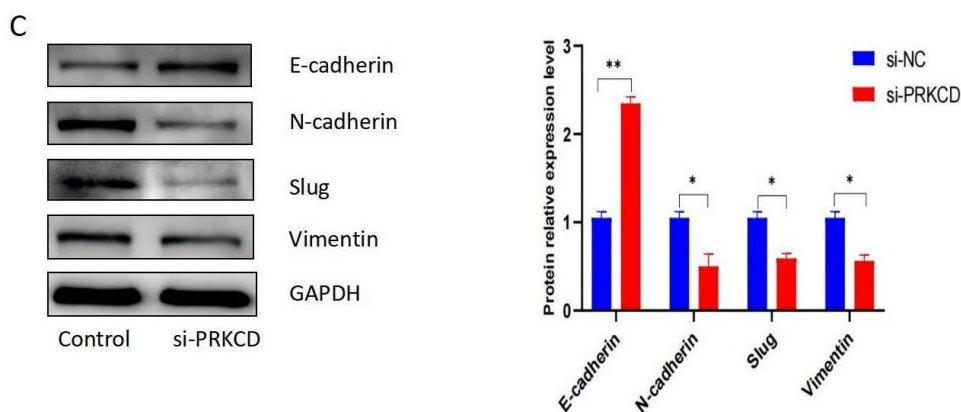
PRKCD 可能通过抑制上皮-间质转化过程而影响 HCC 的发生发展。



注:A. Western Blot 检测 PRKCD 在正常肝细胞和肝癌细胞株中的表达水平;B. qRT-PCR 法检测 PRKCD 在正常肝细胞和肝癌细胞中 mRNA 表达水平;C. Western Blot 观察经慢病毒沉默 PRKCD 后的敲减效率;D. CCK-8 法检测沉默 PRKCD 后对肝癌细胞增殖的影响。\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ 。

图 2 沉默 PRKCD 显著抑制肝癌细胞增殖





注:A. 细胞划痕实验评估沉默 PRKCD 后对肝癌细胞迁移的影响;B. Transwell 实验观察沉默 PRKCD 后对肝癌细胞迁移和侵袭的影响;C. Western Blot 实验探究沉默 PRKCD 后对肝癌细胞上皮-间质转化的影响。\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ 。

图 3 沉默 PRKCD 通过影响上皮-间质转化过程抑制肝癌细胞的迁移和侵袭

### 3 讨论

自 1968 年 Fischer 和 Krebs 首次报告以来<sup>[16]</sup>, 已经确定了 10 多种 PKC 亚型, 根据它们对钙和脂质第二信使激活的依赖性, 可分为 3 个亚组。相关前期研究揭示了 PKC 在影响免疫功能、细胞迁移、存活和代谢以及 DNA 损伤反应和修复方面具有独特作用<sup>[16-17]</sup>。鉴于 PKC 对如此广泛的生物学功能的贡献, PKC 可能还参与了癌症的发生和进展, 这已在许多前期研究中得到明确证实。在 PKC 家族中, PRKCD 是一种丝氨酸-苏氨酸激酶, 可控制肿瘤的细胞周期和细胞凋亡过程<sup>[17]</sup>。然而, PRKCD 在 HCC 中的表达水平、临床意义和内在功能机制尚不清楚。为了揭示 PRKCD 在 HCC 的作用, 本研究首先使用从 TCGA 数据库下载的数据分析了 PRKCD 在 HCC 中的表达水平。随后, 通过免疫组织化学染色法和 Western Blot 法验证 PRKCD 在 HCC 癌组织和癌旁组织中的表达情况。最后, 对 PRKCD 进行沉默, 以探索沉默 PRKCD 蛋白对肝癌细胞生物学行为的影响和内在机制。

基于 TCGA 数据库的生物信息学分析, 本研究发现与癌旁组织相比, PRKCD 在 HCC 肿瘤组织中的表达水平明显增加, 且 PRKCD 高表达与不良预后相关。高表达 PRKCD 患者的 OS、DFI、DSS 生存率显著低于低表达组, 说明 PRKCD 表达水平与肝癌患者预后紧密相关。这些结果在很大程度上表明 PRKCD 在 HCC 中具有增殖或抗凋亡作用。基于此, 又进一步通过 Western Blot 和 qRT-PCR 在肝癌细胞中验证 PRKCD 的表达水平。结果显示, 与人正常肝组织上皮细胞 LO2 相比, 肝癌细胞系 (Huh-7、SMCC-7721、BEL-7404 和 HLE) 中 PRKCD 的蛋白表达水平在 Huh-7 细胞中表达最高。qRT-PCR 法检测 PRKCD

在肝癌细胞中 mRNA 表达水平也呈现类似结果。进一步利用慢病毒转染 Huh-7 细胞后, CCK-8 实验显示, 与对照组相比, 沉默 PRKCD 蛋白后肝癌细胞的生长速率在第 3 天至第 4 天显著下降。细胞划痕实验和 Transwell 实验显示沉默 PRKCD 能够显著抑制肝癌细胞侵袭和迁移过程, 以上结果提示 PRKCD 可能在肝癌的发生发展中发挥癌基因的作用。

上皮-间质转化是一种细胞转移的途径, 可将上皮细胞暂时转化为间质细胞, 该过程使肿瘤细胞的活性增强, 使细胞能够摆脱原发病灶, 最终导致肿瘤细胞的远处转移<sup>[18-19]</sup>。研究表明, EMT 在多种肿瘤的发病过程中发挥着重要的作用, 导致肿瘤细胞表现出高度侵袭性、耐药性、干性和远处器官转移的敏感性, 进而诱导癌症转移和复发<sup>[16, 20-21]</sup>。因此, 抑制肝癌细胞的 EMT 过程能够抑制肝癌的发生与发展<sup>[22]</sup>。为了验证 PRKCD 诱导的 HCC 迁移和侵袭是否与过程有关, 本研究通过 Western Blot 探究了沉默 PRKCD 对 HCC 细胞中上皮-间质转化过程中相关蛋白的影响。结果显示, 沉默 PRKCD 可以导致 E-cadherin 表达增加以及 Vimentin、N-cadherin 和 Slug 的表达降低, 表明沉默 PRKCD 可以抑制肝癌细胞的上皮-间质转化过程。由此可以推测, 沉默 PRKCD 可能通过影响上皮-间质转化过程, 从而抑制肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

但本研究也存在一定的局限性。首先, 本研究纳入的样本数量有限。其次, 仅在一个细胞系中进行了探索 PRKCD 在肝细胞癌中的作用和机制的实验。第三, 目前还缺乏建立小鼠模型来进一步验证 PRKCD 对体内实验的影响。因此, 需要进行进一步的相关实验来完成上述的限制, 从而充分阐述 PRKCD 在肝癌中的潜在价值。

## 4 结论

本研究结果表明,在肝癌中 PRKCD 呈高表达,且与患者预后不良相关。沉默 PRKCD 可能通过影响上皮-间质转化过程抑制肝癌细胞 Huh-7 的增殖、侵袭和迁移能力。

## 参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] KULIK L, EL-SERAG H B. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(2): 477-491. e471.
- [3] STEINBERG S F. Structural basis of protein kinase C isoform function[J]. *Physiol Rev*, 2008, 88(4): 1341-1378.
- [4] KALIVE M, FAUST J J, KOENEMAN B A, et al. Involvement of the PKC family in regulation of early development[J]. *Mol Reprod Dev*, 2010, 77(2): 95-104.
- [5] GRINER E M, KAZANIETZ M G. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(4): 281-294.
- [6] D' COSTA A M, ROBINSON J K, MAUDUDI T, et al. The proapoptotic tumor suppressor protein kinase C-delta is lost in human squamous cell carcinomas[J]. *Oncogene*, 2006, 25(3): 378-386.
- [7] HAUGHIAN J M, JACKSON T A, KOTERWAS D M, et al. Endometrial cancer cell survival and apoptosis is regulated by protein kinase C alpha and delta[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13(4): 1251-1267.
- [8] CASTILLA C, CHINCHÓN D, MEDINA R, et al. PTPL1 and PKC $\delta$  contribute to proapoptotic signalling in prostate cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(4): e576.
- [9] RENO E M, HAUGHIAN J M, DIMITROVA I K, et al. Analysis of protein kinase C delta (PKC delta) expression in endometrial tumors[J]. *Hum Pathol*, 2008, 39(1): 21-29.
- [10] LANGZAM L, KOREN R, GAL R, et al. Patterns of protein kinase C isoenzyme expression in transitional cell carcinoma of bladder. Relation to degree of malignancy[J]. *Am J Clin Pathol*, 2001, 116(3): 377-385.
- [11] YADVA V, YANEZ N C, FENTON S E, et al. Loss of protein kinase C delta gene expression in human squamous cell carcinomas: a laser capture microdissection study[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(3): 1091-1096.
- [12] SU C M, WENG Y S, KUAN L Y, et al. Suppression of PKC $\delta$ /NF- $\kappa$ B signaling and apoptosis induction through extrinsic/intrinsic pathways are associated magnolol-inhibited tumor progression in colorectal cancer in vitro and in vivo[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3527.
- [13] ALLEN-PETERSEN B L, CARTER C J, OHM A M, et al. Protein kinase C $\delta$  is required for ErbB2-driven mammary gland tumorigenesis and negatively correlates with prognosis in human breast cancer[J]. *Oncogene*, 2014, 33(10): 1306-1315.
- [14] EVANS J D, CORNFORD P A, DODSON A, et al. Expression patterns of protein kinase C isoenzymes are characteristically modulated in chronic pancreatitis and pancreatic cancer[J]. *Am J Clin Pathol*, 2003, 119(3): 392-402.
- [15] SYMONDS J M, OHM A M, CARTER C J, et al. Protein kinase C  $\delta$  is a downstream effector of oncogenic K-ras in lung tumors[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(6): 2087-2097.
- [16] SPEIDEL J T, AFFANDI T, JONES D N M, et al. Functional proteomic analysis reveals roles for PKC $\delta$  in regulation of cell survival and cell death: implications for cancer pathogenesis and therapy[J]. *Adv Biol Regul*, 2020, 78: 100757.
- [17] REYLAND M E, JONES D N M. Multifunctional roles of PKC $\delta$ : opportunities for targeted therapy in human disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 165: 1-13.
- [18] ZHANG Y, WEINBERG R A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities [J]. *Front Med*, 2018, 12(4): 361-373.
- [19] 杨楠, 陈天翔, 刘润坤, 等. 长链非编码 RNA LINC00319 在肝细胞癌中表达上调并促进肝癌细胞迁移和侵袭[J]. *蚌埠医学院学报*, 2022, 47(2): 152-156.
- [20] TANAKA Y, GAVRIELIDES M V, MITSUUCHI Y, et al. Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(36): 33753-33762.
- [21] 张露, 杨燕, 苏方. CX26、CX32、CX43 与上皮间质转化相关蛋白在结直肠癌原发癌和肝脏转移之间的相关性[J]. *蚌埠医学院学报*, 2019, 44(12): 1621-1624, 1627.
- [22] 张彩灵, 覃小珊, 黄赞松. 苦参素通过上调 miR-204 对人肝癌 HepG2 细胞的上皮间质转化及细胞生物学特性的影响[J]. *右江民族医学院学报*, 2021, 43(1): 11-16.

收稿日期: 2022-11-22; 修回日期: 2022-12-30