

STX5 对肝细胞癌转移的影响及其机制

郭婷婷 赵梓吟 何明阳 吴天松 徐斌 张斌 吴泽华 韩冰

(青岛大学附属医院肝胆胰外科, 山东 青岛 266003)

[摘要] **目的** 探讨 STX5 对肝细胞癌(HCC)转移的影响及其机制。**方法** 收集 2015 年 1—12 月我院确诊为 HCC 的 36 例患者的临床资料,分析肿瘤组织中 STX5 表达水平与 HCC 患者临床病理特征的相关性。将人肝癌细胞 MHCC97H 分为 A、B 组,分别转染阴性对照质粒、过表达 STX5 质粒,将人肝癌细胞 Huh7 分为 C、D 组,分别转染阴性对照慢病毒、STX5 敲减慢病毒,采用 Western blot 实验检测 A~D 组细胞内 STX5 蛋白表达水平,采用划痕实验检测 A~D 组细胞的迁移能力,采用 Transwell 实验检测 A~D 组细胞的迁移能力。对 A、B 组细胞经转录组学测序分析获得的差异基因进行 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析,实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 A、B 组细胞最显著差异表达基因的水平。将 MHCC97H 细胞分为 E~H 组,分别转染阴性对照质粒、过表达 STX5 质粒、阴性对照质粒+Sarilumab、过表达 STX5 质粒+Sarilumab,采用划痕实验检测 E~H 组细胞的迁移能力,采用 Transwell 实验检测 E~H 组细胞的迁移能力。**结果** 肿瘤组织中 STX5 表达水平与患者的 BMI、有无乙型肝炎病毒感染、肿瘤数量有关($P<0.05$)。Western blot 检测结果显示,B 组与 A 组、C 组与 D 组比较,细胞中 STX5 的表达显著增高($t=48.86,31.09, P<0.05$)。Transwell 实验和划痕实验结果显示,B 组与 A 组、C 组与 D 组比较,细胞迁移能力和划痕愈合百分比显著升高($t=7.95\sim 31.09, P<0.05$)。GO 和 KEGG 富集分析显示,A、B 组细胞差异基因主要富集在细胞迁移、炎症等相关功能和通路上;RT-qPCR 实验结果显示,B 组细胞中 *IL-6* mRNA 的表达水平显著高于 A 组细胞($t=23.69, P<0.05$)。Transwell 和划痕实验结果显示,G 组和 E 组、H 组和 F 组比较,细胞迁移能力和划痕愈合百分比均显著降低($t=2.94\sim 24.39, P<0.05$)。**结论** STX5 可能通过上调 *IL-6* mRNA 表达来促进肝细胞癌细胞的转移。

[关键词] Qa-SNARE 蛋白质类;白细胞介素 6;癌,肝细胞;基因表达调控,肿瘤;肿瘤浸润;肿瘤转移

[中图分类号] R735.7;R730.261

[文献标志码] A

Effect of STX5 on the metastasis of hepatocellular carcinoma and its mechanism GUO Tingting, ZHAO Ziyin, HE Mingyang, WU Tiansong, XU Bin, ZHANG Bin, WU Zehua, HAN Bing (Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of STX5 on the metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC) and its mechanism. **Methods** Clinical data were collected from 36 patients who were diagnosed with HCC in our hospital from January to December 2015, and the correlation between the expression level of STX5 in tumor tissue and the clinicopathological features of HCC patients was analyzed. Human hepatoma cells MHCC97H were divided into groups A and B and were transfected with negative control plasmid and STX5 overexpression plasmid, respectively. Human hepatoma cells Huh7 were divided into groups C and D and were transfected with negative control lentivirus and STX5 knockdown virus, respectively. Western blot was used to measure the protein expression level of STX5 in groups A, B, C, and D, wound healing was used to measure the migration ability of cells in groups A, B, C, and D, and Transwell assay was used to measure the migration ability of cells in groups A, B, C, and D. Gene ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis were performed for the differentially expressed genes in groups A and B obtained by transcriptomic sequencing, and RT-qPCR was used to measure the levels of the most significantly differentially expressed genes in group A and B. MHCC97H cells were divided into groups E, F, G, and H and were transfected with negative control plasmid, STX5 overexpression plasmid, negative control plasmid+Sarilumab, and STX5 overexpression plasmid+Sarilumab, respectively. Scratch assay was used to measure the migration ability of cells in groups E, F, G, and H, and Transwell assay was used to measure the migration ability of cells in groups E, F, G, and H. **Results** The expression level of STX5 in tumor tissue was associated body mass index, presence or absence of hepatitis B virus infection, and the number of tumors ($P<0.05$). Western blot showed that group B had a significantly higher expression level of STX5 than group A, and group C had a significantly higher expression level of STX5 than group D ($t=48.86,31.09, P<0.05$). Transwell test and wound healing showed that compared with group A, group B had significantly higher ability of cell invasion and percentage of scratch healing, and compared with group D, group C had significantly higher ability of cell migration and percentage of scratch healing ($t=7.95\sim 31.09, P<0.05$). The GO and KEGG enrichment analyses showed that the differentially expressed genes between groups A and B were mainly

enriched in the functions and pathways associated with cell migration and inflammation, and RT-qPCR showed that group B had a signifi-

[收稿日期] 2023-12-02; **[修订日期]** 2024-02-18

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(ZR2020MH217)

[通讯作者] 韩冰, Email: hanbing@qduhospital.cn

cantly higher mRNA expression level of *IL-6* than group A ($t=23.69, P<0.05$). Transwell assay and wound healing showed that group G had significantly lower ability of cell migration and percentage of scratch healing than group E, and group H had significantly lower ability of cell invasion and percentage of scratch healing than group F ($t=2.94-24.39, P<0.05$). **Conclusion** STX5 can promote the migration and metastasis of HCC cells by upregulating the mRNA expression level of *IL-6*.

[KEY WORDS] Qa-SNARE proteins; Interleukin-6; Carcinoma, hepatocellular; Gene expression regulation, neoplastic; Neoplasm invasiveness; Neoplasm metastasis

目前,在全球范围内,原发性肝癌中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)约占 90%,因为 HCC 细胞具有高侵袭性和易转移性,致患者的 5 年存活率较低^[1],即使近年来在肝癌的诊断和治疗方法上取得了一定的进展,但患者术后复发率和转移率仍然居高不下^[2]。因此,临床迫切需要开发有效的 HCC 治疗靶点,以改善患者的预后,延长患者的生存期。

STX5 为一种单向 IV 型膜蛋白,几乎在机体的所有的细胞中均有表达,是 syntaxin 家族的重要成员,其主要功能是作为受体,与可溶性 N-乙酰马来酰亚胺敏感因子结合,在细胞内转运囊泡^[3-4]。本课题组先前的研究发现,STX5 可以通过介导 PI3K/mTOR 信号通路抑制 HCC 细胞的黏附,进而促进 HCC 转移^[5]。研究表明,促炎细胞因子如 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 等在肿瘤微环境中有助于肿瘤细胞发生免疫逃逸,促进肿瘤的进展及其转移,尤其是 IL-6 被认为是促进多种恶性肿瘤侵袭转移的慢性炎症细胞因子^[6-8]。然而 STX5 促进 HCC 转移是否有 IL-6 的参与目前尚不明确。本研究拟通过探究 STX5 与 IL-6 之间的调控关系,探讨 STX5 对于 HCC 细胞转移的影响及其机制,并为进一步寻找 HCC 的诊断和治疗靶点奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肝癌细胞系 Huh7 和 MHCC97H 细胞(中国上海科学院细胞库),STX5 敲减慢病毒、阴性对照慢病毒、过表达 STX5 质粒、阴性对照质粒和病毒感染试剂(上海吉凯基因科技有限公司),STX5 抗体(英国 Abcam 公司),GAPDH、 β -actin(美国 CST 公司)。STX5、IL-6、PDL-1、CD36、SLC2A14、GAPDH 引物(上海生工生物工程股份有限公司),全波长多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司),PrimeScrip RT 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)以及沙利鲁单抗(美国 MCE 生物科技公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 肿瘤组织中 STX5 表达水平与 HCC 患者临

床病理特征的相关性分析 选取我院 2015 年 1—12 月确诊为 HCC 行手术治疗的患者 36 例,术前均未进行放化疗治疗,并均签署知情同意书。收集所有患者的临床资料,包括年龄、性别、BMI、甲胎蛋白(AFP)、肿瘤直径、有无肝硬化、有无酒精史、有无乙型肝炎病毒感染以及肿瘤数量等。根据患者 HCC 组织中的 STX5 染色评分结果,将 36 例患者分为 STX5 高表达组 18 例(6~10 分)和 STX5 低表达组 18 例(<6 分)。分析肿瘤组织中 STX5 表达水平与 HCC 患者临床病理特征的相关性。

1.2.2 细胞的培养和转染 在 6 孔板上分别接种 Huh7 细胞和 MHCC97H 细胞,加入全营养培养基(DMEM、10%的胎牛血清和 1%的青霉素/链霉素双抗),于 37 °C、含体积分数 0.05 的 CO₂ 的培养箱当中进行培养。当 MHCC97H 细胞的融合度达到 70%~90%时,分为 A、B 两组,A 组细胞转染阴性对照质粒,B 组细胞转染过表达 STX5 质粒。当 Huh7 细胞的融合度达 30%~50%时,分为 C、D 两组,C 组细胞转染阴性对照慢病毒,D 组细胞转染 STX5 敲减慢病毒。4 组细胞转染完成后,继续培养 48 h 用于后续实验。

1.2.3 蛋白免疫印迹(Western blot)实验检测细胞中 STX5 的相对表达量 提取转染后培养 48 h 的 A~D 组细胞中的总蛋白,并用 RIPA 裂解缓冲液进行分解。用 BCA 试剂盒和酶标仪测定蛋白质浓度。95 °C 下孵育 10 min 后,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离蛋白裂解产物(20 μ g),并转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶封闭后,用特异性一抗在 4 °C 条件下孵育 12 h,然后与二抗在室温下孵育约 1.5 h,用增强型化学发光系统读取蛋白质条带。最后使用 Image J 软件分析目的条带 STX5 及内参 β -actin 灰度值,以 STX5/ β -actin 灰度值表示相对表达水平。实验重复 3 次并计算均值。

1.2.4 Transwell 实验检测 HCC 细胞的迁移能力 将转染后培养 48 h 的 A~D 组细胞中的培养基,更换为无血清 DMEM 培养基继续培养 24 h。然后将各组 5×10^4 个细胞种植于不含血清的 DMEM 培养基的 Transwell 上室(每孔 8 μ m),下室为含有 30%

胎牛血清的 DMEM, 于 37 °C、含体积分数 0.05 的 CO₂ 培养箱中继续培养 24 h。用多聚甲醛将迁移到 下室的细胞在室温下固定 30 min, 然后再用 0.5% 的结晶紫染色 30 min, 最后用 PBS 清洗去除多余的结晶紫。使用光学显微镜对染色细胞进行拍照, 使用 Image J 软件对迁移细胞进行计数。

1.2.5 细胞划痕实验检测 HCC 细胞的迁移能力 将转染完成后培养 48 h 的 A~D 组细胞接种于 6 孔板中, 当细胞融合率达 90% 以上时, 采用 200 μL 滤芯吸头尖端在 6 孔板上划痕, 随后, 更换为含有 2% 胎牛血清的 DMEM 继续培养 48 h。用电子显微镜拍摄划痕区域, 分别于划痕后第 0、48 小时采集图像, 计算划痕愈合百分比。划痕愈合百分比 = (0 h 划痕宽度 - 48 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度。

1.2.6 转录组学测序及富集分析 将转染后培养 48 h 的 A、B 组 MHCC97H 细胞, 委托上海吉凯基因医学科技股份有限公司进行转录组学测序以及富集分析, 每组设置 3 个样本。对两组基因表达的结果进行分析, 获得两组间的差异基因 ($P < 0.05$), 对差异基因进行 GO 功能富集分析 (<http://geneontology.org>) 以及 KEGG 通路富集分析 (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)。将两组的差异基因按照 P 值进行排序, 选取前 5 个基因为最显著差异基因, 为后续实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测的目标基因。

1.2.7 RT-qPCR 检测 IL-6 等 mRNA 表达水平 将转染后培养 48 h 的 A、B 组 MHCC97H 细胞, 用 RNA-easy 分离试剂提取全细胞 RNA 后, 使用紫外分光光度计测定 260、280 nm 波长处的 RNA 样本浓度以及吸光度 (A) 值, 将 RNA 质量在 $1.8 < A_{260} / A_{280} < 2.1$ 间判定为合格。利用 TaKaRa 逆转录试剂盒 (北京宝日生物技术有限公司) 提取 cDNA, 由上海生工生物有限公司构建 STX5、IL-6、PDL-1、CD36、SLC2A14 以及 GAPDH 引物 (表 1), 利用 TaKaRa PCR 试剂盒进行 PCR 反应, 反应条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 20 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 35 个循环, 获得 CT 值; 以 GAPDH 作为内参, 每个样品设置 3 个复孔, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算细胞中 RNA 相对表达水平, 其中 CT 值为循环阈值。实验重复 3 次, 结果取均值。

1.2.8 MHCC97H 细胞回复实验检测抑制剂处理后 HCC 细胞的迁移能力 取融合度达 70%~90% 的 MHCC97H 细胞, 分为 E~H 组, E 组和 G 组细胞分别转染阴性对照质粒, F 组和 H 组细胞分别转

染过表达 STX5 质粒, 转染成功以后均再继续培养 48 h 后, G 组和 H 组细胞弃去原培养基, 加入 IL-6 的抑制剂沙利鲁单抗 6 μmol, 再培养 24 h; E 组和 F 组细胞, 弃去原培养液后, 再培养 24 h。通过 Transwell 迁移实验检测各组细胞的迁移细胞数量 (参照 1.2.4 中的方法), 通过划痕实验观察各组细胞划痕后第 0、48 小时划痕愈合情况, 并计算划痕愈合百分比 (参照 1.2.5 中的方法)。

表 1 引物名称及其序列

名称	序列	长度 (bp)
STX5	F: 5'-GGCTCCATCTTTCAGCAGTTGG-3'	22
	R: 5'-GTTGGAGGTGACAGACTGGAAG-3'	
IL-6	F: 5'-AGACAGCCACTCACCTCTTCAG-3'	22
	R: 5'-TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG-3'	
PDL-1	F: 5'-TGCCGACTACAAGCGAATTACTG-3'	23
	R: 5'-CTGCTTGTCAGATGACTTCGG-3'	
CD36	F: 5'-CAGGTCAACCTATTGGTCAAGCC-3'	23
	R: 5'-GCCTTCTCATCACCAATGGTCC-3'	
SLC2A14	F: 5'-CAATCGGCTCTTCCAGTTTGGC-3'	23
	R: 5'-CAAGGACCAGAGATTCGTGAGC-3'	
GAPDH	F: 5'-CTCAGACACCATGGGGGAAAGGTGA-3'	23
	R: 5'-ATGATCTTGAGGCTGTTGTCATA-3'	

1.3 统计学处理

使用 SPSS 23.0 软件进行数据的统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验。计数资料以例表示, 两组之间的比较用确切概率法, STX5 在肿瘤组织中的表达水平与 HCC 患者的临床病理特征之间的关系使用 Pearson 方法分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肿瘤组织中 STX5 表达水平与 HCC 患者临床病理特征的相关性

肿瘤组织中 STX5 表达水平与患者的性别、年龄及肿瘤直径、血液 AFP 水平、有无肝硬化、有无饮酒史等指标均无关 ($P > 0.05$), 而与患者 BMI、有无乙型肝炎病毒感染以及肿瘤数量等显著相关 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 A~D 组细胞迁移侵袭能力的比较

Western blot 检测的结果显示, A、B 组 MHCC97H 细胞中 STX5 相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 3.60 ± 0.09 , 两组间比较差异有显著意义 ($t = 48.86$, $P < 0.05$); C、D 组 Huh7 细胞中 STX5 相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 0.11 ± 0.03 , 两组间比较差异有显著性 ($t = 31.09$, $P < 0.05$), 见图 1。Transwell 实验检测结果显示, A、B 组细胞迁移数目分

别为(101.00±2.65)、(234.00±10.15)个,两组比较差异有显著性($t=21.96, P<0.05$);C、D组细胞迁移数目分别为(482.70±18.61)、(141.00±4.00)个,两组比较差异有显著性($t=31.09, P<0.05$),见图2。划痕实验检测的结果显示,A、B组细胞的划痕愈合百分比分别达到(29.03±1.76)%、(47.07±3.51)%,两组比较差异具有显著意义($t=7.95, P<0.05$);C、D组细胞划痕愈合百分比分别为(44.37±1.70)%、(27.07±2.80)%,两组比较差异有显著性($t=9.13, P<0.05$),见图3。

表 2 肿瘤组织中 STX5 表达与 HCC 患者临床病理特征的相关性 (n=18, 例)

临床病理特征	STX5 低表达组	STX5 高表达组	P 值
性别			0.500
男	15	16	
女	3	2	
年龄			0.500
<60 岁	9	10	
≥60 岁	9	8	
BMI			0.043
<24 kg/m ²	14	8	
≥24 kg/m ²	4	10	
肿瘤直径			0.733
<5 cm	10	12	
≥5 cm	8	6	
有无肝硬化			0.599
无	6	7	
有	12	11	
有无乙型肝炎病毒感染			0.044
无	6	1	
有	12	17	
血液 AFP 水平			0.671
<400 ng/L	15	15	
≥400 ng/L	3	3	
肿瘤数量			0.030
单个	16	10	
多个	2	8	
有无饮酒史			0.491
无	13	11	
有	5	7	

因显著参与了炎症的调控、细胞黏附等生物学功能。KEGG 通路富集分析结果显示,差异基因主要参与 mTOR、JAK-STAT 等通路的调控。对差异最显著的前 5 个基因进行 RT-qPCR 检测,结果显示,A 组和 B 组细胞中 STX5、IL-6 mRNA 相对表达量比较差异具有显著性($t=24.38, 23.69, P<0.05$),两组间 PDL-1、CD36、SLC2A14 mRNA 相对表达量比较差异无显著性($P>0.05$)。见表 3。

表 3 A 组和 B 组细胞中前 5 个差异基因相对表达量比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

分组	STX5	IL-6	PDL-1	CD36	SLC2A14
A 组	1.06±0.23	1.01±0.16	0.99±0.03	1.00±0.59	1.39±0.33
B 组	4.21±0.41	4.63±0.43	0.98±0.67	0.58±1.33	1.38±1.44

2.4 MHCC97H 细胞的回复实验结果

划痕实验检测的结果显示,E、G 组细胞的划痕愈合百分比分别达到(32.00±2.00)%、(25.00±3.61)%,两组比较差异具有显著意义($t=2.94, P<0.05$);F 组和 H 组划痕愈合百分比分别为(45.33±2.08)%、(35.67±3.22)%,两组比较差异有显著性($t=4.37, P<0.05$),见图 4。Transwell 实验结果显示,E、G 组细胞迁移数目分别为(186.00±6.00)、(102.70±2.52)个,两组比较差异具有显著意义($t=22.18, P<0.05$);F 组和 H 组细胞迁移数目分别为(453.30±14.19)、(235.00±6.25)个,两组比较差异有显著性($t=24.39, P<0.05$),见图 5。

3 讨 论

目前,肝癌常见的治疗方法主要包括手术切除、消融、肝移植、TACE、放化疗、免疫疗法、中药治疗等,但患者的长期存活率仍不理想。主要原因是由于肝细胞癌患者术后的高复发率和高转移率^[9]。因此,降低患者术后的复发和转移,探索导致肝细胞癌复发转移的治疗靶点具有重要的临床和社会意义。

STX5 主要调控真核细胞中的分泌蛋白从内质网到高尔基体的早期运输。内质网中有着严格的质量控制系统,新蛋白质往往在内质网中合成加工,形成具有一定空间功能的蛋白质^[10];而 STX5 的功能主要是保证蛋白分子正确折叠并且离开内质网输送到高尔基体,防止蛋白质功能的异常或失活^[11],而肿瘤主要发病机制多是由于一些促癌分子或抑癌分子的错误折叠和异常转运,致功能异常所致^[12]。由此推测 STX5 可能参与了肿瘤的发生和进展过程。本课题组前期研究发现,STX5 可通过调控 PI3K/

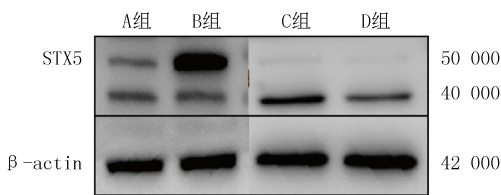


图 1 A~D 组细胞中 STX5 蛋白相对表达量比较

2.3 A、B 组 MHCC97H 细胞差异基因分析和检测

转录组学测序结果显示,A 组与 B 组中的差异基因共 387 个,其中 196 个差异基因上调,191 个差异基因下调。GO 功能富集分析结果显示,差异基

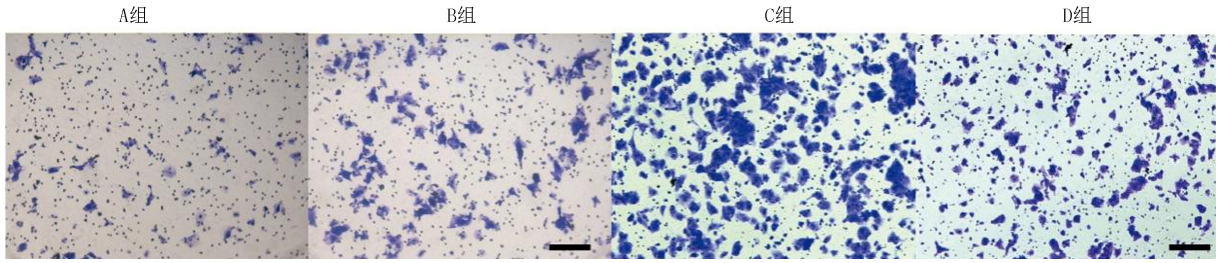


图 2 A~D 组细胞 Transwell 迁移能力比较(结晶紫染色,20 倍)

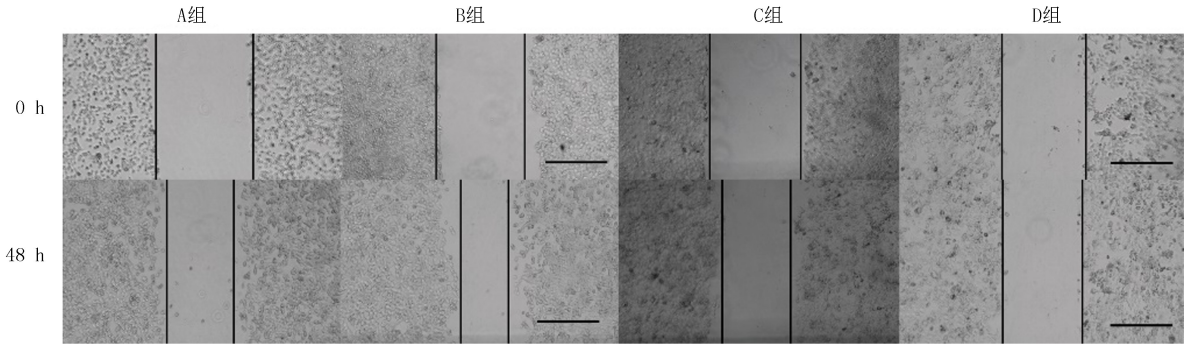


图 3 A~D 组细胞划痕迁移能力比较(4 倍)

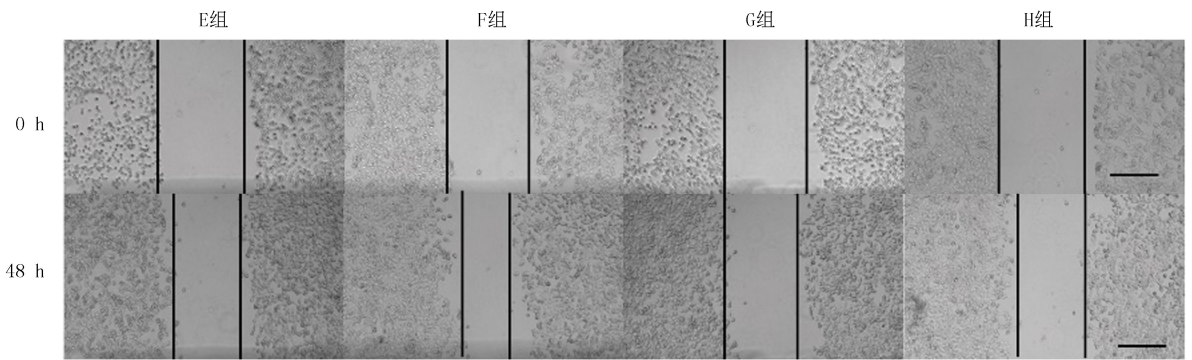


图 4 E~H 组细胞划痕迁移能力比较(4 倍)

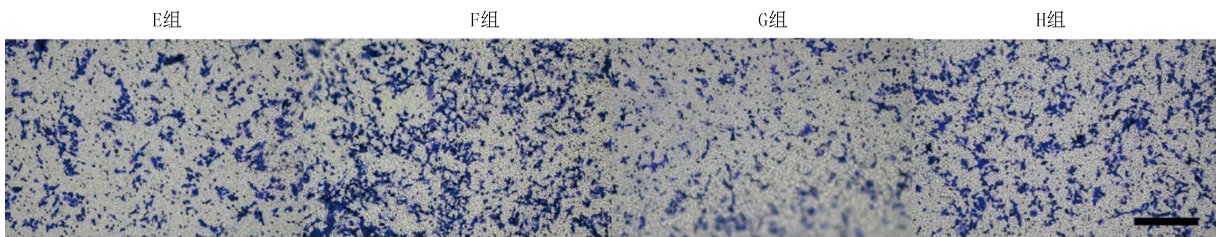


图 5 E~H 组细胞 Transwell 迁移能力比较(结晶紫染色,20 倍)

mTOR 通路降低肝癌细胞与细胞外基质之间的黏附,致肝癌细胞从原发部位脱落,从而促进了肿瘤细胞的转移^[5]。进一步提示 STX5 可能作为促癌基因参与了肿瘤的侵袭和转移过程。

本研究首先收集了我院 HCC 患者的临床病理组织标本,对肿瘤组织 STX5 的表达水平与患者的临床病理特征进行了相关性分析,结果显示肿瘤组织中 STX5 的表达水平与患者的 BMI、有无乙型肝炎病毒感染和肿瘤数量显著相关,提示 STX5 在 HCC 的发生和进展中可能发挥着重要作用。本研

究通过在 MHCC97H 细胞中构建 STX5 过表达质粒,在 Huh7 细胞中构建敲减 STX5 慢病毒,并用 Western blot 实验验证其转染效率,结果显示 B 组细胞中 STX5 的蛋白表达显著高于 A 组细胞,D 组细胞中 STX5 蛋白表达量显著低于 C 组。然后本研究又进一步探究 STX5 对 HCC 细胞迁移的影响,结果显示,上调 STX5 后,B 组细胞比 A 组细胞的迁移能力明显增强,下调 STX5 后,D 组细胞比 C 组细胞的迁移能力明显减弱,进一步提示 STX5 可促进 HCC 细胞的转移。

为了探讨 *STX5* 调控 HCC 细胞转移的机制,通过转录组学测序,本研究 GO 功能富集分析发现, A 组和 B 组细胞的差异基因显著参与了炎症的调控、细胞黏附等生物学功能,提示 *STX5* 可能通过影响炎症的调控,进一步影响 HCC 的进展。通过 KEGG 通路富集分析发现, A 组和 B 组细胞的差异基因主要参与 mTOR、JAK-STAT 等通路的调控,提示 *STX5* 可能通过影响 PI3K/mTOR 等炎症相关通路促进 HCC 的转移。慢性炎症已被公认为是引起肿瘤侵袭转移的重要原因之一^[10], 而其中的细胞因子是肿瘤微环境(TME)的主要调节者,是癌细胞、肿瘤间质和免疫系统之间的主要沟通桥梁^[13-14]。研究发现,PI3K/mTOR 通路不仅参与调节癌细胞的增殖、生长、代谢和运动^[15-16],还参与了炎症因子 IL-6 的调控。因此,对炎症因子的调控可以作为肿瘤治疗的有效介入策略。本研究结果显示, *STX5* 与炎症调控相关,并可能通过这一途径促进 HCC 的转移。

本研究对转录组测序获得的前 5 个最为显著的差异基因进行 RT-qPCR 检测,结果显示 B 组细胞中 *STX5*、*IL-6* mRNA 的表达水平显著高于 A 组细胞,而两组间 *PDL-1*、*CD36*、*SLC2A14* mRNA 的表达水平比较无显著差异,提示 *STX5* 可能参与了调控 *IL-6* mRNA 的表达。*IL-6* 及其相关细胞因子被认为是炎症和肿瘤之间的关键因子^[17]。*IL-6* 家族包含多个成员:*IL-6*、抑癌素 M(OSM)、白血病抑制因子(LIF)、*IL-11*、*IL-27* 以及 *IL-31* 等^[18]。大多数 *IL-6* 家族的细胞因子与肿瘤患者的不良预后显著相关^[19-20]。肿瘤的进展、转移和抗药性的关键环节是上皮间质转化(EMT), *IL-6* 可以通过激活 STAT3 和 Snail 等转录因子来促进 EMT,进一步推动肿瘤的转移^[19]。为了进一步研究 *STX5* 是否通过调控 *IL-6* 的 mRNA 水平促进 HCC 的转移,本研究通过对 G、H 组细胞经沙利鲁单抗处理, E、F 组细胞不处理,进行回复实验,结果显示,加入抑制剂后, G 组细胞比 E 组细胞的迁移能力明显减弱, H 组细胞比 F 组细胞的迁移能力明显减弱。本课题组先前的研究也表明, *STX5* 促进 HCC 转移的作用与促进 EMT 是密切相关的^[5]。结合本研究的结果,提示 *STX5* 可能是通过上调 *IL-6* 的 mRNA 水平促进 EMT,并进一步促进 HCC 细胞的转移。

综上所述, *STX5* 具有促进 HCC 转移的作用,其机制不仅与 EMT 和 PI3K/mTOR 通路相关,还与上调 *IL-6* mRNA 的水平密切相关。未来应进一

步探究 *STX5*、*IL-6* 与肿瘤微环境之间调控的具体机制,为 HCC 的治疗提供新思路。

伦理批准和知情同意: 本研究涉及的所有试验均已通过青岛大学附属医院医学伦理委员会的审核批准(文件号 QYFYWZLL26906)。所有试验过程均遵照《赫尔辛基宣言(1996 版)》和中国有关临床试验研究规范法规进行。受试对象及其亲属已经签署知情同意书。

作者声明: 郭婷婷、韩冰参与了研究设计;赵梓吟、何明阳、吴天松、徐斌、张斌、吴泽华参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] LI X, RAMADORI P, PFISTER D, et al. The immunological and metabolic landscape in primary and metastatic liver cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021,21(9):541-557.
- [2] WANG H B, LU Z M, ZHAO X X. Tumorigenesis, diagnosis, and therapeutic potential of exosomes in liver cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2019,12(1):133.
- [3] LINDERS P T, HORST C V, BEEST M T, et al. Stx5-mediated ER-Golgi transport in mammals and yeast[J]. *Cells*, 2019,8(8):780.
- [4] KAT M, KARAMPINI E, HOOGENDIJK A J, et al. Syntaxin 5 determines Weibel-Palade body size and von Willebrand factor secretion by controlling Golgi architecture[J]. *Haematologica*, 2022,107(8):1827-1839.
- [5] ZHANG B, ZHAO Z Y, WANG Y P, et al. STX5 inhibits hepatocellular carcinoma adhesion and promotes metastasis by regulating the PI3K/mTOR pathway[J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2023,11(3):572-583.
- [6] WEBER R, GROTH C, LASSER S, et al. IL-6 as a major regulator of MDSC activity and possible target for cancer immunotherapy[J]. *Cell Immunol*, 2021,359:104254.
- [7] SCHMIDT-ARRAS D, ROSE-JOHN S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(6):1403-1415.
- [8] ORANGE S T, LESLIE J, ROSS M, et al. The exercise IL-6 enigma in cancer[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2023,34(11): 749-763.
- [9] GE Y, MU W, BA Q, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomes in organotropic metastasis, recurrence and early diagnosis application[J]. *Cancer Lett*, 2020,477:41-48.
- [10] MIYAZAKI K, WAKANA Y, NODA C, et al. Contribution of the long form of syntaxin 5 to the organization of the endoplasmic reticulum[J]. *J Cell Sci*, 2012,125(Pt 23):5658-5666.
- [11] PATMORE S, DHAMI S P S, O'SULLIVAN J M. Von Willebrand factor and cancer; metastasis and coagulopathies[J]. *J Thromb Haemost*, 2020,18(10):2444-2456.
- [12] SUN Y F, WU L, ZHONG Y, et al. Single-cell landscape of the ecosystem in early-relapse hepatocellular carcinoma [J]. *Cell*, 2021,184(2):404-421.e16.

1)。所有实验过程均遵照科技部《实验动物管理条例》进行。

作者声明:白鲁源、王贞丽参与了研究设计;白鲁源、孙光碧、杨丽、王贞丽参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 聂文. 金华火腿中的寡肽和脂肪酸对小鼠酒精性肝损伤的预防作用及其机制研究[D]. 合肥:合肥工业大学, 2022.
- [2] DEVARBHAVI H, ASRANI S K, ARAB J P, et al. Global burden of liver disease; 2023 update[J]. J Hepatol, 2023,79(2):516-537.
- [3] ALBILLOS A, DE GOTTARDI A, RESCIGNO M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy [J]. J Hepatol, 2020,72(3):558-577.
- [4] ZHANG B X, NIU L J, HUANG X W. Lonicera caerulea juice alleviates alcoholic liver disease by regulating intestinal flora and the FXR-FGF15 signaling pathway[J]. Nutrients, 2023,15(18):4025.
- [5] 石俊灵,王若宇,孙克伟. 柴芍六君子汤联合西药对慢性乙型肝炎疗效的 Meta 分析[J]. 实用中医内科杂志, 2023,37(6):41-44,147-149.
- [6] 黄菊芳,李炜,罗茂权,等. 柴芍六君子汤治疗消化系统疾病研究进展[J]. 亚太传统医药, 2020,16(11):159-162.
- [7] 尤红娟. 基于肠道微环境探讨四君子汤“实脾治肝”防治酒精性肝损伤的作用[D]. 青岛:青岛大学,2023.
- [8] 郭子雨,李晨阳,左逸军,等. 睡莲花总黄酮对小鼠酒精肝损伤的防治作用研究[J]. 中国食品添加剂, 2023,34(4):205-211.
- [9] QIAN H, CHAO X J, WILLIAMS J, et al. Autophagy in liver diseases: A review [J]. Mol Aspects Med, 2021,82:100973.
- [10] HAN H, DESERT R, DAS S, et al. Danger signals in liver injury and restoration of homeostasis[J]. J Hepatol, 2020,73(4):933-951.
- [11] 鲍旭. 酒精性肝病的治疗进展[J]. 基层医学论坛, 2019,23(32):4705-4707.
- [12] 孟文文,刘慧茹,张文光,等. 中药防治酒精性肝病作用机制的

研究进展[J]. 中草药, 2022,53(3):868-881.

- [13] LAN Y W, YAN R, SHAN W, et al. Salvianic acid A alleviates chronic alcoholic liver disease by inhibiting HMGB1 translocation via down-regulating BRD4[J]. J Cell Mol Med, 2020,24(15):8518-8531.
- [14] 梁攀,徐基平. 徐基平教授从脾虚论治肝癌经验[J]. 中国中医药现代远程教育, 2021,19(2):93-95.
- [15] 高改娅,白艳艳,康艳,等. 柴芍六君子汤临床应用研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2020,36(2):267-269.
- [16] 黄维. 柴芍六君子汤对肝郁脾虚型慢性乙型肝炎的治疗效果评价[J]. 中外医学研究, 2019,17(5):51-52.
- [17] 王军义. 柴芍六君子汤治疗肝郁脾虚型慢性乙型肝炎临床观察[J]. 光明中医, 2021,36(21):3638-3641.
- [18] 钟锐. 柴芍六君子汤加减方治疗肝纤维化 60 例[J]. 环球中医药, 2012,5(6):453-455.
- [19] KONG X Y, LIANG W, LI X Y, et al. Characterization of an acidic polysaccharides from carrot and its hepatoprotective effect on alcoholic liver injury in mice[J]. Chem Biodivers, 2021,18(8):e2100359.
- [20] GENG Y N, FABER K N, DE MEIJER V E, et al. How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease? [J]. Hepatol Int, 2021,15(1):21-35.
- [21] 温扬敏,田力,王小斐,等. DHA 单酰基甘油酯型藻油对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 中国粮油学报, 2024,10(1):131-140.
- [22] 文永岚,王瑜,万科,等. 刺梨酵素化果醋对小鼠急性酒精性肝损伤的改善作用[J]. 现代食品科技, 2023,39(4):26-32.
- [23] 李国华,李鹤龄,陈智岗,等. 酒精性肝病与肠道微生物群落研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2022,30(3):423-427.
- [24] LI F Y, MCCLAIN C J, FENG W K. Microbiome dysbiosis and alcoholic liver disease[J]. Liver Res, 2019,3(3-4):218-226.
- [25] LIANG H Y, SONG H, ZHANG X J, et al. Metformin attenuated sepsis-related liver injury by modulating gut microbiota [J]. Emerg Microbes Infect, 2022,11(1):815-828.

(本文编辑 耿波)

(上接第 241 页)

- [13] DIAKOS C I, CHARLES K A, MCMILLAN D C, et al. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness[J]. Lancet Oncol, 2014,15(11):e493-e503.
- [14] SOLER M F, ABAURREA A, AZCOAGA P, et al. New perspectives in cancer immunotherapy: Targeting IL-6 cytokine family[J]. J Immunother Cancer, 2023,11(11):e007530.
- [15] GLAVIANO A, FOO A S C, LAM H Y, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer[J]. Mol Cancer, 2023,22(1):138.
- [16] EDIRIWEERA M K, TENNEKOON K H, SAMARAKOON S R. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance[J]. Semin Cancer Biol, 2019,59:147-160.
- [17] RAŠKOVÁ M, LACINA L, KEJÍK Z, et al. The role of IL-6

in cancer cell invasiveness and metastasis-overview and therapeutic opportunities[J]. Cells, 2022,11(22):3698.

- [18] METCALFE R D, PUTOCZKI T L, GRIFFIN M D W. Structural understanding of interleukin 6 family cytokine signaling and targeted therapies: Focus on interleukin 11 [J]. Front Immunol, 2020,11:1424.
- [19] HUANG X K, FANG J, LAI W Q, et al. IL-6/STAT3 axis activates Glut5 to regulate fructose metabolism and tumorigenesis[J]. Int J Biol Sci, 2022,18(9):3668-3675.
- [20] WEI C, YANG C G, WANG S Y, et al. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis[J]. Mol Cancer, 2019,18(1):64.

(本文编辑 耿波)