

上游转录因子 1 在肝细胞癌细胞增殖中的作用

李欢腾¹ 郭灿灿¹ 蔡铎² 宋妤² 贺桂芳² 李鑫³ 王朋⁴ 刘世海²

(1 青岛大学附属医院检验科,山东 青岛 266003; 2 青岛大学附属医院医学研究中心;

3 青岛大学附属医院神经外科重症医学科; 4 山东第二医科大学附属益都中心医院肿瘤科)

〔摘要〕 **目的** 探讨上游转录因子 1(USF1)在肝细胞癌(HCC)细胞增殖中的作用。**方法** 通过基于 TCGA 数据库的泛癌分析探讨 HCC 患者肿瘤组织和癌旁正常肝组织中 USF1 mRNA 相对表达水平的差异,通过免疫组化和免疫荧光染色检测 HCC 患者肿瘤组织和癌旁正常肝组织中 USF1 蛋白表达水平。将人 HCC 细胞系 Hep3B 细胞分为 A1~D1 组,Huh7 细胞分为 A2~D2 组,其中 A1 和 A2 组细胞不加入任何试剂处理,其余细胞分别转染 siNC(B1、B2 组)、siUSF1 # 1(C1、C2 组)和 siUSF1 # 2(D1、D2 组),通过 CCK-8 实验检测各组细胞的细胞活力,通过集落形成实验检测各组细胞的克隆形成能力,通过 EdU 染色检测各组细胞的增殖能力。**结果** 基于 TCGA 数据库的泛癌分析结果显示,与癌旁正常肝组织相比,HCC 患者肿瘤组织中 USF1 mRNA 相对表达水平显著上调($t=6.84,P<0.05$)。免疫组化及免疫荧光染色结果显示,与癌旁正常肝组织相比,HCC 患者肿瘤组织中 USF1 的表达水平显著升高。CCK-8 实验结果显示,培养第 48~96 小时时,C1、D1 组和 C2、D2 组细胞活力均分别显著低于 B1 和 B2 组($F=4.74\sim413.67,q=2.89\sim31.86,P<0.05$)。集落形成实验和 EdU 染色结果显示,C1、C2 组和 D1、D2 组细胞集落数目和 EdU 阳性细胞比例显著低于 B1 和 B2 组($F=113.87\sim390.29,q=18.37\sim34.42,P<0.05$)。**结论** USF1 在 HCC 患者肿瘤组织中表达上调,抑制 USF1 的表达可能抑制 HCC 细胞的增殖。

〔关键词〕 癌,肝细胞;细胞增殖;上游刺激因子类;细胞运动;上游转录因子 1

〔中图分类号〕 R735.7 **〔文献标志码〕** A

Role of upstream stimulatory factor 1 in the proliferation of hepatocellular carcinoma cells LI Huan-teng, GUO Cancan, CAI Duo, SONG Yu, HE Guifang, LI Xin, WANG Peng, LIU Shihai (Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

〔ABSTRACT〕 **Objective** To investigate the role of upstream stimulatory factor 1 (USF1) in the proliferation of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods** A pan-cancer analysis based on the TCGA database was performed to compare the relative mRNA expression levels of USF1 between tumor tissues and adjacent normal liver tissues from patients with HCC. Immunohistochemistry and immunofluorescence staining were used to assess USF1 protein expression in tumor tissues and adjacent normal tissues. Hep3B cells were divided into groups A1–D1, and Huh7 cells into groups A2–D2. Cells in groups A1 and A2 received no treatment; the remaining cells were transfected with siNC (groups B1 and B2), siUSF1 # 1 (groups C1 and C2), or siUSF1 # 2 (groups D1 and D2). Cell viability was measured using the CCK-8 assay, colony-forming ability using the colony formation assay, and proliferation capacity using EdU staining. **Results** Pan-cancer analysis based on the TCGA database showed that the relative mRNA expression level of USF1 was significantly higher in HCC tumor tissues than in adjacent normal liver tissues ($t=6.84,P<0.05$). Immunohistochemistry and immunofluorescence staining similarly showed significantly increased USF1 protein expression in tumor tissues. According to the CCK-8 assay, at 48–96 h of culture, cell viability in groups C1 and D1 and groups C2 and D2 was significantly lower than that in groups B1 and B2, respectively ($F=4.74\sim413.67,q=2.89\sim31.86,P<0.05$). Colony formation and EdU assays showed that the numbers of colonies and the proportions of EdU-positive cells in groups C1 and C2 and groups D1 and D2 were significantly lower than those in groups B1 and B2 ($F=113.87\sim390.29,q=18.37\sim34.42,P<0.05$). **Conclusion** USF1 expression is upregulated in the tumor tissues of patients with HCC, and suppressing USF1 expression may inhibit the proliferation of HCC cells.

〔KEY WORDS〕 Carcinoma, hepatocellular; Cell proliferation; Upstream stimulatory factors; Cell movement; Upstream stimulatory factor 1

肝癌是人类中最致命的癌症之一,其中约 90% 为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[1]。HCC 是癌症致死的第 3 大常见原因^[2]。很多因素都可导致肝癌的发生,主要包括乙型或丙型肝炎病毒感染、吸烟、饮酒、非酒精性脂肪性肝炎和 2 型糖尿病等^[3]。美国食品药品监督管理局已批准了多种口服酪氨酸激酶抑制剂用于晚期 HCC 的治疗,但

〔收稿日期〕 2025-04-17; 〔修订日期〕 2025-09-24
〔基金项目〕 山东省自然科学基金面上项目(ZR2021MH022)
〔通信作者〕 刘世海,Email:shliumed@126.com

这些药物的治疗效果存在局限性,HCC 患者的 5 年生存率仍然很低^[4]。考虑到 HCC 的复杂性和多面性^[5],亟待阐明其潜在发病机制,并确定可能的治疗靶点。上游转录因子 1(USF1)属于碱性螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链转录因子家族^[6],具有双向调节功能,可通过激活或抑制靶基因的启动子区来调节基因表达^[7]。本课题组的先前研究已经证明长链非编码 RNA(lncRNA)TUG1 可能通过与 USF1 蛋白的结合促进 HCC 的进展^[8]。然而,USF1 在 HCC 发展中的作用尚需更加深入的探究。本研究通过探究 USF1 在 HCC 细胞增殖当中的作用以及其潜在的分子调控机制,旨在为 HCC 患者的临床靶向治疗提供新的分子靶点,从而改善患者的治疗响应和预后。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人 HCC 细胞系 Hep3B 细胞和 Huh7 细胞均购买于武汉普诺赛生命科技有限公司;小干扰 RNA siUSF1 # 1(序列:5'-AGACGCACUAUACUUAU-3')、siUSF1 # 2(序列:5'-CGAGACAAGAU-CAACAACU-3')以及空载体 siNC(序列:5'-UU-CUCCGAACGUGUACAGU-3')均购自广州市锐博生物科技有限公司,EdU 试剂盒、细胞总蛋白提取试剂(RIPA)购自上海碧云天生物技术有限公司,Lipofectamine 3000 购自 Biosharp 科技有限公司,USF1 抗体、GAPDH 抗体均购买于英国 Abcam 公司,山羊抗兔 IgG 二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司,ECL 显色试剂盒购买于美国 GIpBio 公司,Click-iT™ EdU 细胞增殖成像试剂盒以及 BCA 试剂盒购自美国赛默飞世尔科技公司;RT-qPCR 试剂盒(SYBR Green PCR Master Mix)购买于日本宝生物工程株式会社,CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所。

1.2 生物信息学分析

在基于仙桃学术平台(<https://www.xiantao.love/>)提供的 TCGA 数据库中,提取目标肿瘤组织 RNA 测序数据。采用 R 语言中 ggplot2(4.0.0)、stats(4.4.1)和 car(3.1.0)等软件包对上述数据进行泛癌分析,并计算 USF1 在肿瘤组织中的相对表达水平。

1.3 免疫组化和免疫荧光染色检测 HCC 患者肿瘤组织与癌旁正常肝组织中 USF1 蛋白表达水平

收集于 2011 年 10 月—2013 年 12 月在青岛大

学附属医院经术后病理学检查确诊为原发 HCC 的 70 例患者的肿瘤组织与癌旁正常肝组织石蜡切片,脱蜡后水化,置于柠檬酸钠缓冲液中 95 °C 水浴加热 10 min,冷却至室温后进行后续染色。

免疫组化染色:切片经 PBS(pH 7.4)洗涤 3 次,滴加 3% 牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 30 min,滴加 USF1 一抗(1:200 稀释)于 4 °C 下孵育 16 h,PBS 洗涤 3 次后滴加山羊抗兔 IgG 二抗(1:200 稀释)室温避光孵育 50 min。切片经 PBS 洗涤 3 次后滴加 DAB 显色液,于显微镜下控制显色程度并及时终止反应。随后以苏木素复染,经分化、返蓝、脱水及透明处理,中性树胶封固后于光学显微镜下观察并采集图像。免疫荧光染色:切片滴加 10% BSA 室温封闭 1 h,再滴加 USF1 一抗(1:200 稀释)4 °C 下孵育 16 h。PBS 洗涤 3 次以后,滴加 0.3% 的 Triton X-100 透化 10 min,再滴加含 5% BSA 和 2% 胎牛血清(FBS)的 PBS 于室温下封闭 20 min,而后滴加山羊抗兔 IgG 二抗(1:200 稀释)室温避光孵育 1 h。最后滴加 DAPI 溶液(1:10 000 稀释)于室温下避光孵育 5 min,PBS 洗涤 3 次后,使用含抗荧光淬灭剂的甘油封片,置于共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.4 细胞分组及转染

Hep3B 细胞和 Huh7 细胞使用 DMEM 完全培养基(含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素),置于培养箱(37 °C、含体积分数 0.05 的 CO₂)内进行培养。当细胞密度约 90%时,接种于 6 孔板中(5×10⁵ 个/孔),将 Hep3B 细胞分为 A1~D1 组,Huh7 细胞分为 A2~D2 组,每组设置 3 个复孔。待各孔内细胞密度约 70%时,A1 和 A2 组细胞不加入任何试剂进行处理,B1~D1 组和 B2~D2 组细胞使用 Lipofectamine 3000 并按照 siRNA 转染说明书分别转染 siNC(B1、B2 组)、siUSF1 # 1(C1、C2 组)和 siUSF1 # 2(D1、D2 组)。将各组细胞置于培养箱中培养 6 h 后换液为新的 DMEM 完全培养基,再置于培养箱中继续培养用于后续实验。

1.5 RT-qPCR 法检测各组细胞中 USF1 mRNA 相对表达水平

将 Hep3B 细胞和 Huh7 细胞接种于 6 孔板中[(2~3)×10⁴ 个/孔],按照 1.4 中分组及转染方法进行处理,培养 24 h 以后使用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA,使用逆转录试剂合成 cDNA,使用 SYBR Green PCR Master Mix,在 LightCycler 480 RT-qPCR 系统中进行反应。其中 USF1 正向引物

序列为 5'-TCCCAGACTGCTCTATGGAGA-3', 反向引物序列为 5'-CGGTGGTTACTCTGCCGAAG-3'; *GAPDH* 正向引物序列为 5'-TCATGGGTGTG-AACCATGAGAA-3', 反向引物序列为 5'-GGCA-TGGACTGTGGTCATGAG-3'。以 *GAPDH* 为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算各组细胞中目标基因相对表达水平。

1.6 Western Blot (WB) 实验检测各组细胞中 USF1 蛋白相对表达水平

将 Hep3B 细胞和 Huh7 细胞接种于 6 孔板中 (1×10^5 个/孔), 按照 1.4 中分组及转染方法进行处理, 培养 48 h 后使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 加入 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液后高温变性处理 6 min, 用含 10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白样品, 然后转移到 $0.45 \mu\text{m}$ 的 PVDF 膜上。将 PVDF 膜置于含有 5% 脱脂牛奶的 TBST 中于 37°C 下封闭 2 h, 再置于 USF1 和 *GAPDH* 一抗 ($1:5\,000$ 稀释) 中于 4°C 下孵育过夜, 使用 TBST 洗膜 3 次, 而后置于山羊抗兔 IgG 二抗 ($1:10\,000$ 稀释) 中于 37°C 下振荡孵育 1 h。使用 TBST 洗膜 3 次后, 使用 ECL 显色试剂盒曝光蛋白条带, 通过 Image Lab 2.0 软件分析蛋白条带灰度值, 而后以 *GAPDH* 为内参计算目的蛋白的相对表达水平。

1.7 CCK-8 实验检测各组细胞的细胞活力

将按照 1.4 中分组及转染方法处理后的各组细胞接种于 96 孔板中 (1×10^4 个/孔), 分别培养 24、48、72 和 96 h。而后严格按照 CCK-8 试剂盒说明书操作进行实验, 通过酶标仪检测各孔在 450 nm 波长下的吸光度值并计算细胞活力。

1.8 集落形成实验检测各组细胞的克隆形成能力

将按照 1.4 中分组及转染方法处理后的各组细胞接种于 6 孔板当中 [$(2 \sim 3) \times 10^3$ 个/孔], 并培养 2 周, 期间每 3 d 更换新鲜培养基 1 次。当有肉眼可

见的细胞集落形成时, 弃去原培养液, 每孔加入无水乙醇固定细胞 30 min, 再加入 0.5% 结晶紫染液染色 20 min, 拍照并使用 ImageJ 软件计算各组细胞的集落数目。

1.9 EdU 染色检测各组细胞的增殖能力

将按照 1.4 中分组及转染方法处理后的各组细胞接种于 24 孔板中 (5×10^4 个/孔), 而后加入含 $10 \mu\text{mol/L}$ EdU 的 RPMI-1640 培养基, 置于培养箱中孵育 2 h。加入 4% 多聚甲醛固定, 严格按照 Click-iT™ EdU 细胞增殖成像试剂盒说明书染色, 置于荧光显微镜下观察并计算 EdU 阳性细胞比例。

1.10 统计学处理

采用 IBM SPSS 27 和 GraphPad Prism 10.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐性时组间两两比较采用独立样本 *t* 检验。多组间比较采用单因素方差分析, 不同时间点各组间比较采用重复测量设计的方差分析, 进一步两两比较采用 Tukey 法检验。所有实验均重复 3 次, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HCC 患者肿瘤组织与癌旁正常肝组织当中 USF1 表达水平比较

基于 TCGA 数据库进行泛癌分析, 结果显示, *USF1* 在肝癌、肺腺癌和膀胱癌等多种癌症患者的肿瘤组织中表达水平显著高于相应癌旁正常组织 ($P < 0.05$), 见图 1; 进一步分析结果显示, HCC 患者肿瘤组织与癌旁正常肝组织中 *USF1* mRNA 的相对表达水平分别为 6.21 ± 0.52 和 5.72 ± 0.41 , HCC 患者肿瘤组织中 *USF1* mRNA 相对表达水平高于癌旁正常肝组织 ($t = 6.84, P < 0.05$)。此外, 免疫组化及免疫荧光染色结果显示, 与癌旁正常肝组织相比, HCC 患者肿瘤组织中 *USF1* 的表达水平显著升高, 见图 2。

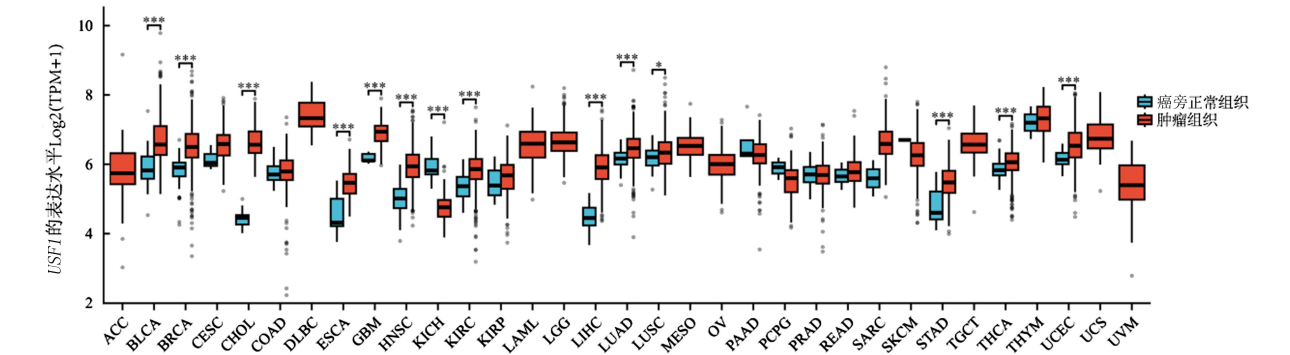
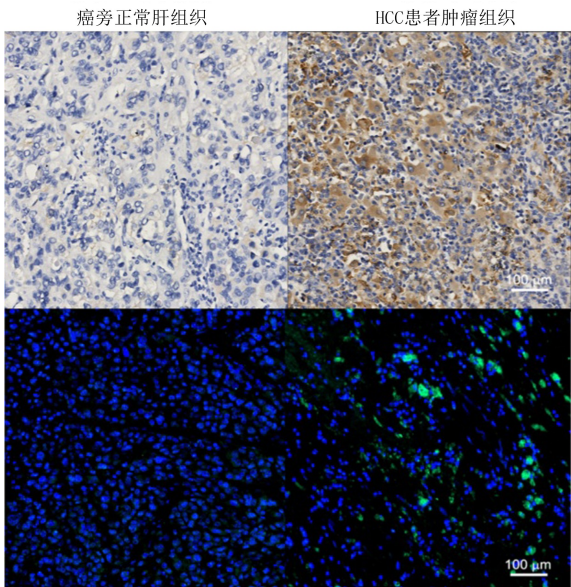


图 1 基于 TCGA 数据库的泛癌分析结果

2.2 各组细胞中 *USF1* mRNA 和蛋白相对表达水平比较

A1~D1 组 Hep3B 细胞当中 *USF1* mRNA 的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.08 、 1.00 ± 0.04 、 0.24 ± 0.03 和 0.24 ± 0.03 , *USF1* 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.05 、 0.98 ± 0.06 、 0.36 ± 0.04 和 0.34 ± 0.05 , 各组间比较有显著性差异 ($F = 242.50$ 、 160.78 , $P < 0.05$); 其中, A1 组与 B1 组细胞中 *USF1* mRNA 和蛋白相对表达水平无显著差异 ($P > 0.05$), C1 组和 D1 组细胞中上述指标显著低于 B1 组 ($q = 21.27 \sim 27.14$, $P < 0.05$), C1 组与 D1 组间无显著差异 ($P > 0.05$)。A2~D2 组 Huh7 细胞中 *USF1* mRNA 相对表达水平分别为 1.01 ± 0.02 、 0.95 ± 0.05 、 0.24 ± 0.03 和 0.22 ± 0.03 , *USF1* 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.05 、 0.96 ± 0.07 、 0.26 ± 0.06 和 0.29 ± 0.04 , 各组之间比较均具有显著性差异 ($F = 522.21$ 、 158.18 , $P < 0.05$); 其中, A2 组与 B2 组细胞中 *USF1* mRNA 和蛋白相对表达水平无显著性差异 ($P > 0.05$), C2 组和 D2 组细胞中上述指标显著低于 B2 组 ($q = 21.60 \sim 38.48$, $P < 0.05$), C2 组与 D2 组间无显著差异 ($P > 0.05$)。见图 3。

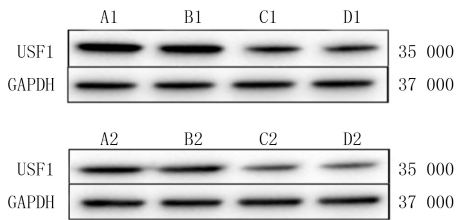


癌旁正常肝组织 HCC患者肿瘤组织
图 2 HCC 患者肿瘤组织与癌旁正常肝组织中 *USF1* 表达水平比较

2.3 各组细胞的细胞活力比较

重复测量设计的方差分析结果显示, 分组、时间及分组与时间的交互作用对 A1~D1 组 Hep3B 细胞和 A2~D2 组 Huh7 细胞的细胞活力均有显著影响 ($F_{\text{分组}} = 85.37$ 、 153.64 , $F_{\text{时间}} = 1\ 083.42$ 、 $1\ 348.29$, $F_{\text{交互}} = 62.14$ 、 105.73 , $P < 0.05$); 培养不同时间点各组细胞活力均有显著性差异 ($F = 4.74 \sim 413.67$,

$P < 0.05$)。进一步两两比较结果显示, 培养第 24 小时时各组细胞活力无显著差异 ($P > 0.05$); 培养第 48~96 小时时, A1 与 B1 组、A2 与 B2 组间细胞活力无显著差异 ($P > 0.05$), C1、D1 组和 C2、D2 组细胞活力均分别低于 B1 和 B2 组 ($q = 2.89 \sim 31.86$, $P < 0.05$), C1 与 D1 组、C2 与 D2 组间细胞活力无显著差异 ($P > 0.05$)。见表 1。



A1~D1 分别表示 A1~D1 组 Hep3B 细胞, A2~D2 分别表示 A2~D2 组 Huh7 细胞

图 3 各组细胞中 *USF1* 蛋白表达水平比较

表 1 各组细胞的细胞活力比较 ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 24 小时	第 48 小时	第 72 小时	第 96 小时
Hep3B 细胞				
A1 组	0.223 ± 0.021	0.423 ± 0.012	0.673 ± 0.021	1.007 ± 0.025
B1 组	0.207 ± 0.006	0.433 ± 0.012	0.653 ± 0.031	1.040 ± 0.044
C1 组	0.223 ± 0.006	0.367 ± 0.055	0.477 ± 0.015	0.693 ± 0.006
D1 组	0.220 ± 0.020	0.347 ± 0.041	0.423 ± 0.006	0.713 ± 0.021
Huh7 细胞				
A2 组	0.223 ± 0.031	0.413 ± 0.006	0.730 ± 0.026	1.130 ± 0.026
B2 组	0.213 ± 0.006	0.423 ± 0.031	0.733 ± 0.021	1.153 ± 0.025
C2 组	0.230 ± 0.010	0.367 ± 0.046	0.513 ± 0.021	0.707 ± 0.021
D2 组	0.213 ± 0.015	0.390 ± 0.036	0.493 ± 0.035	0.707 ± 0.015

2.4 各组细胞的克隆形成能力比较

A1~D1 组的 Hep3B 细胞的集落数目分别为 (245.7 ± 10.0)、(245.3 ± 8.4)、(101.7 ± 15.4)、(103.0 ± 17.7) 个, 各组间比较有显著性差异 ($F = 113.87$, $P < 0.05$); 其中, A1 组与 B1 组间细胞集落数目无显著差异 ($P > 0.05$), C1 组和 D1 组显著低于 B1 组 ($q = 18.54$ 、 18.37 , $P < 0.05$), C1 组与 D1 组间无显著差异 ($P > 0.05$)。

A2~D2 组 Huh7 细胞集落数目分别为 (201.3 ± 6.7)、(197.3 ± 6.1)、(67.7 ± 6.8)、(73.3 ± 6.5) 个, 各组间比较有显著性差异 ($F = 390.29$, $P < 0.05$); 其中, A2 组与 B2 组间细胞集落数目无显著差异 ($P > 0.05$), C2 组和 D2 组显著低于 B2 组 ($q = 34.42$ 、 32.92 , $P < 0.05$), C2 组与 D2 组间无显著差异 ($P > 0.05$)。见图 4。

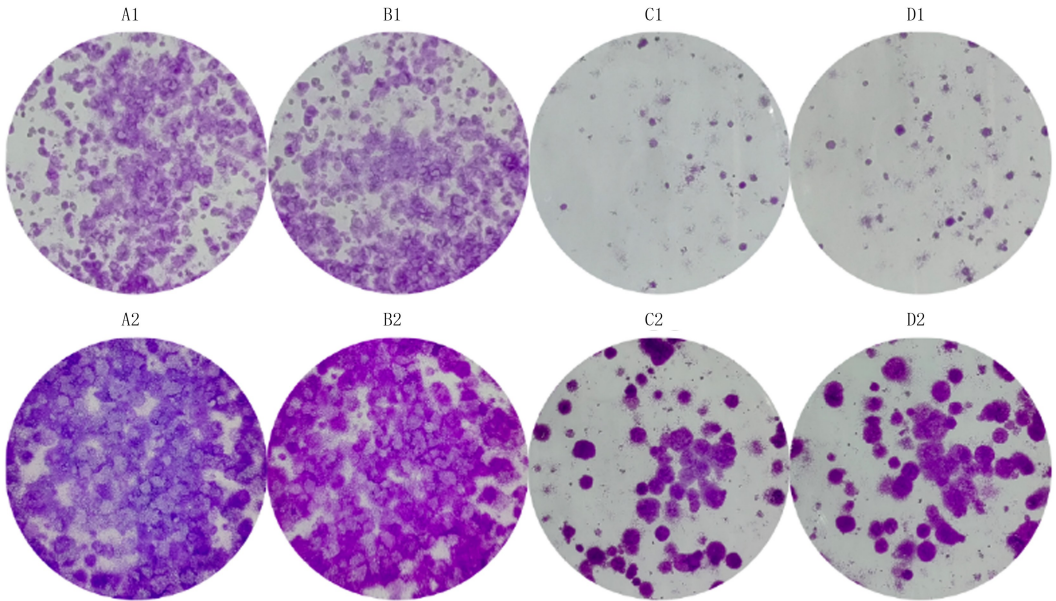
2.5 各组细胞的增殖能力比较

A1~D1 组 Hep3B 细胞的 EdU 阳性细胞比例分别为 (67.09 ± 2.42)%、(66.04 ± 3.29)%、($28.32 \pm$

1.98)%、(26.84±2.71)%，各组间比较有显著性差异($F=217.84, P<0.05$)；其中，A1 组与 B1 组间 EdU 阳性细胞比例无显著差异($P>0.05$)，C1 组和 D1 组 EdU 阳性细胞的比例显著低于 B1 组($q=24.72, 25.69, P<0.05$)，C1 组与 D1 组间无显著差异($P>0.05$)。

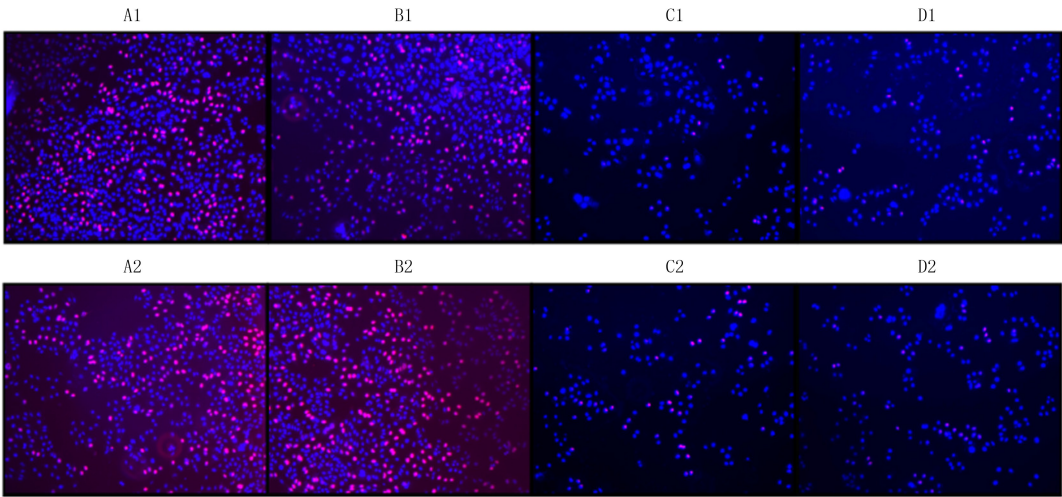
A2~D2 组 Huh7 细胞的 EdU 阳性细胞比例

分别为(65.04±3.65)%、(63.30±2.22)%、(26.19±3.19)%、(26.34±2.05)%，各组间比较有显著性差异($F=176.47, P<0.05$)；其中，A2 组与 B2 组间 EdU 阳性细胞比例无显著差异($P>0.05$)，C2 组和 D2 组 EdU 阳性细胞的比例显著低于 B2 组($q=22.52, 22.43, P<0.05$)，C2 组与 D2 组间无显著差异($P>0.05$)。见图 5。



A1~D1 分别表示 A1~D1 组 Hep3B 细胞，A2~D2 分别表示 A2~D2 组 Huh7 细胞；结晶紫染色，100 倍

图 4 各组细胞的集落数目比较



A1~D1 分别表示 A1~D1 组 Hep3B 细胞，A2~D2 分别表示 A2~D2 组 Huh7 细胞；EdU 染色，100 倍

图 5 各组细胞的增殖能力比较

3 讨 论

原发性肝癌是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一，对患者的生存构成了严重威胁，并带来了沉重的社会负担^[9]。在我国，该疾病位列常见恶性肿瘤第 4 位，肿瘤致死病因第 2 位^[10]。尽管近年来免疫治

疗与外科手术技术取得进展，但 HCC 患者的预后仍普遍较差^[11]。对于早期 HCC 患者，肝脏移植被视为可能实现最佳疗效的首选策略^[12]；对于晚期 HCC 患者，仑伐替尼与索拉非尼等靶向药物已成为较为有效的单药治疗方案^[13-14]。目前，免疫检查点抑制剂与靶向药物或局部消融疗法的联合策略正被

广泛研究^[15-21],这些联合治疗方案有望通过调节肿瘤微环境和增强免疫应答,为 HCC 患者带来更佳疗效^[15]。面对 HCC 发病率持续上升与预后依然严峻的现状,深入探索其发病机制并且明确其潜在治疗靶点,已经成为当前肝癌治疗领域亟待解决的关键问题。

USF1 作为典型转录因子,通过结合启动子或超级增强子区域调控基因转录。其在肝癌中的作用机制与治疗潜力备受关注。研究表明,USF1 可与几丁质酶 3 样蛋白 1(*Chi3L1*)基因的启动子结合并增强其转录活性^[22],但在小鼠肺组织及人肺癌细胞中却呈现对 *Chi3L1* 表达的下调作用,显示其功能具有环境依赖性^[22]。USF(包括 USF1 和 USF2)在人类口腔癌细胞中作为端粒酶逆转录酶(*hTERT*)的负性转录调控因子,可通过直接结合 *hTERT* 启动子的 E-box 位点发挥抑制作用,USF 对 *hTERT* 表达抑制作用的缺失可能促进端粒酶的重新激活和口腔癌的发生^[23]。在胃癌中,USF1 表达缺陷可能促进幽门螺杆菌感染背景下 p53 的降解,参与胃癌发生^[24]。在前列腺癌中,USF1 通过激活 BEX1 转录抑制铁死亡,促进细胞侵袭;其表达沉默可降低铁死亡耐药性,抑制肿瘤进展^[25]。此外,USF1 还可以结合前列腺癌风险位点 rs4519489 的风险等位基因 A,调控核仁蛋白 10 表达,从而发挥促癌作用^[26]。USF1 亦参与 NF- κ B 与炎症信号通路,并且可调控 lncRNA 和 miRNA 等非编码 RNA 的表达,影响癌症及其他疾病进程^[27-28]。尽管已有研究提示 USF1 在肝细胞癌恶性进展中发挥着关键性作用并鉴定出若干下游靶点^[29],其在肝癌中的具体作用机制仍有待系统阐明。

本研究基于 TCGA 数据库的泛癌分析结果显示,USF1 在 HCC、肺腺癌和膀胱癌等多种癌症患者肿瘤组织中表达显著上调;同时选取 HCC 患者的样本,通过免疫组化及免疫荧光染色证实 USF1 在 HCC 患者肿瘤组织中的表达水平显著高于癌旁正常肝组织。本研究进一步通过 siRNA 敲降肝癌细胞系 Hep3B 细胞和 Huh7 细胞中 USF1 的表达,以探讨 USF1 在这两种细胞中的作用。CCK-8 实验结果显示,敲降 USF1 的表达可使 Hep3B 和 Huh7 细胞的细胞活力显著下降;集落形成实验结果显示,敲降 USF1 的表达可使 Hep3B 和 Huh7 细胞的克隆形成能力显著下降;EdU 染色结果显示,敲降 USF1 的表达可使 Hep3B 和 Huh7 细胞的增殖能力显著下降。上述结果表明,下调肝癌细胞中

USF1 的表达可显著抑制其生长和增殖活动,提示 USF1 高表达可促进肝癌细胞增殖,从而在 HCC 的发生发展中发挥重要作用。

本研究的局限性在于,仅仅从表型层面探讨了 USF1 对肝癌细胞增殖的影响,其上游的精细调控网络及下游的具体作用靶点有待进一步研究揭示。在上游调控层面,USF1 的转录活性、蛋白稳定性以及核转位如何受到肝癌相关特异性信号通路(如 MAPK/ERK、PI3K/AKT)或转录后修饰(如磷酸化、乙酰化)的调控,目前尚不明确。在下游效应层面,USF1 作为关键的转录因子,其在肝癌中直接调控的、介导增殖效应的核心靶基因谱仍有待通过 ChIP-seq 等高通量技术进行系统解析。除此之外,USF1 在肿瘤代谢重编程及肿瘤微环境重塑中的作用也是值得深入探索的方向。全面阐明这些多维调控机制,将有助于深入理解肝癌的分子基础,确立 USF1 作为预后生物标志物的潜力,并为开发靶向 USF1 通路的联合治疗策略提供理论依据。

综上所述,USF1 在 HCC 患者肿瘤组织中表达上调,抑制 USF1 的表达可能抑制 HCC 细胞的增殖。本研究结果提示 USF1 在 HCC 发生发展具有潜在重要作用,有望成为 HCC 诊断的新型生物标志物以及治疗策略开发的新靶点。

伦理批准和知情同意:本研究涉及的所有试验均已经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 RECAHQU-20140291)。所有试验过程均遵照《青岛大学附属医院医学伦理委员会标准》的条例进行。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

作者声明:李欢腾、刘世海、蔡铎、宋好、贺桂芳、李鑫、郭灿灿等参与了研究设计;李欢腾、刘世海、王朋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] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024[J]. CA A Cancer J Clin, 2024,74(1):12-49.
- [2] 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.
- [3] YANG X P, YANG C, ZHANG S, et al. Precision treatment in advanced hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell, 2024,42(2):180-197.
- [4] LLOVET J M, PINYOL R, YARCHOAN M, et al. Adjuvant and neoadjuvant immunotherapies in hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2024,21(4):294-311.
- [5] BARON Y, CORRE S, MOUCHET N, et al. USF-1 is critical for maintaining genome integrity in response to UV-in-

- duced DNA photolesions [J]. PLoS Genet, 2012, 8 (1): e1002470.
- [6] RADA-IGLESIAS A, AMEUR A, KAPRANOV P, et al. Whole-genome maps of USF1 and USF2 binding and histone H3 acetylation reveal new aspects of promoter structure and candidate genes for common human disorders [J]. Genome Res, 2008,18(3):380-392.
- [7] LU T C, WANG Z H, FENG X B, et al. Retinoic acid utilizes CREB and USF1 in a transcriptional feed-forward loop in order to stimulate MKP1 expression in human immunodeficiency virus-infected podocytes[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(18):5785-5794.
- [8] LIU S H, QIU J, HE W T, et al. TUG1 long non-coding RNA enlists the USF1 transcription factor to overexpress ROMO1 leading to hepatocellular carcinoma growth and metastasis[J]. MedComm (2020), 2020,1(3):386-399.
- [9] VOGEL A, MEYER T, SAPISOCHIN G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2022,400(10360):1345-1362.
- [10] XIE D Y, ZHU K, REN Z G, et al. A review of 2022 Chinese clinical guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: Updates and insights [J]. Hepatobiliary Surg Nutr, 2023,12(2):216-228.
- [11] LEE J S, CHOI H W, KIM J S, et al. Update on resection strategies for hepatocellular carcinoma: A narrative review[J]. Cancers (Basel), 2024,16(23):4093.
- [12] KRUPA K, FUDALEJ M, CENCELEWICZ-LESIKOW A, et al. Current treatment methods in hepatocellular carcinoma[J]. Cancers (Basel), 2024,16(23):4059.
- [13] LLOVET J M, RICCI S, MAZZAFERRO V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2008, 359(4):378-390.
- [14] KUDO M, FINN R S, QIN S K, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: A randomised phase 3 non-inferiority trial[J]. Lancet, 2018,391(10126):1163-1173.
- [15] SANGRO B, SAROBE P, HERVÁS-STUBBS S, et al. Advances in immunotherapy for hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021,18(8):525-543.
- [16] SU G L, ALTAYAR O, O'SHEA R, et al. AGA clinical practice guideline on systemic therapy for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2022,162(3):920-934.
- [17] REIG M, FORNER A, RIMOLA J, et al. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update[J]. J Hepatol, 2022,76(3):681-693.
- [18] QIN S K, BI F, GU S Z, et al. Donafenib versus sorafenib in first-line treatment of unresectable or metastatic hepatocellular carcinoma: A randomized, open-label, parallel-controlled phase II – III trial[J]. J Clin Oncol, 2021,39(27):3002-3011.
- [19] YAU T, PARK J W, FINN R S, et al. Nivolumab versus sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 459): A randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2022, 23(1):77-90.
- [20] VERSET G, BORBATH I, KARWAL M, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously untreated advanced hepatocellular carcinoma: Data from the open-label, phase II KEYNOTE-224 trial[J]. Clin Cancer Res, 2022, 28 (12): 2547-2554.
- [21] FINN R S, IKEDA M, ZHU A X, et al. Phase Ib study of lenvatinib plus pembrolizumab in patients with unresectable hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2020,38(26):2960-2970.
- [22] KIM K C, YUN J, SON D J, et al. Suppression of metastasis through inhibition of chitinase 3-like 1 expression by miR-125a-3p-mediated up-regulation of USF1 [J]. Theranostics, 2018,8(16):4409-4428.
- [23] CHANG J T, YANG H T, WANG T V, et al. Upstream stimulatory factor (USF) as a transcriptional suppressor of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in oral cancer cells[J]. Mol Carcinog, 2005,44(3):183-192.
- [24] COSTA L, CORRE S, MICHEL V, et al. USF1 defect drives p53 degradation during *Helicobacter pylori* infection and accelerates gastric carcinogenesis[J]. Gut, 2020, 69 (9): 1582-1591.
- [25] GAO L, LI J L. USF1 silencing reduces ferroptosis resistance in prostate cancer cells[J]. Arch Esp Urol, 2024,77(8):865-874.
- [26] DONG D D, WANG Z X, LIU M Q, et al. Combined SNPs sequencing and allele specific proteomics capture reveal functional causality underpinning the 2p25 prostate cancer susceptibility locus[J]. Nat Commun, 2025,16(1):8950.
- [27] WEI G J, ZHANG T W, LI Z G, et al. USF1-mediated upregulation of lncRNA GAS6-AS2 facilitates osteosarcoma progression through miR-934/BCAT1 axis [J]. Aging (Albany NY), 2020,12(7):6172-6190.
- [28] SUN Q, LI J, LI F, et al. LncRNA LOXL1-AS1 facilitates the tumorigenesis and stemness of gastric carcinoma *via* regulation of miR-708-5p/USF1 pathway[J]. Cell Prolif, 2019,52 (6):e12687.
- [29] PENG J Y, CAI D K, ZENG R L, et al. Upregulation of superenhancer-driven LncRNA FASRL by USF1 promotes *de novo* fatty acid biosynthesis to exacerbate hepatocellular carcinoma[J]. Adv Sci (Weinh), 2022,10(1):e2204711.

(本文编辑 李京蔓 厉建强)