

DUSP9 基因对肝母细胞瘤增殖和转移的影响及其机制

周萍萍¹ 吴雄伟² 刘瑶¹ 王朝金¹ 董蓓^{1,3}

(1 青岛大学附属医院小儿外科, 山东 青岛 266003; 2 浙江大学附属儿童医院; 3 青岛大学数字医学与计算机辅助手术研究院)

[摘要] **目的** 探讨 *DUSP9* 基因对肝母细胞瘤 (hepatoblastoma, HB) 增殖和转移的影响及其机制。**方法** 基于公共肿瘤数据库, 进行 HB 单细胞转录组分析及 *DUSP9* 基因的泛癌分析; 采用 RT-qPCR 与免疫组织化学染色方法检测 HB 肿瘤组织及癌旁组织中 *DUSP9* 基因与蛋白的表达水平。将 HepG2 细胞分为 A1、B1 组, 将 Huh6 细胞分为 A2、B2 组, 分别转染 shNC(A1、A2 组)、sh*DUSP9*(B1、B2 组)。通过 CCK-8 实验、平板克隆形成实验、划痕实验及 Transwell 实验, 检测各组细胞的增殖、迁移能力。通过裸鼠成瘤实验评估 *DUSP9* 对 HB 细胞体内增殖与成瘤能力的影响。采用 Western blotting 实验检测各组细胞 *DUSP9* 及 MAPK 通路相关蛋白的表达水平。通过免疫沉淀-质谱(IP-MS)技术筛选 *DUSP9* 潜在互作蛋白, 同时结合功能富集分析探讨其潜在分子机制。**结果** 单细胞转录组分析显示, *DUSP9* 在肝脏恶性上皮细胞中呈显著高表达。泛癌分析显示, *DUSP9* 在膀胱尿路上皮癌、肝细胞肝癌、肺鳞状细胞癌等多种恶性肿瘤组织中均显著高表达。免疫组织化学染色及 RT-qPCR 技术检测结果显示, 相较于癌旁组织, HB 患者肿瘤组织中 *DUSP9* 蛋白和基因表达水平显著上调($t=5.719, 5.273, P<0.05$)。CCK-8 实验结果显示, 细胞培养 48~96 h 时, HepG2 细胞(A1 与 B1 组比较)与 Huh6 细胞(A2 与 B2 组比较)各组细胞增殖率存在显著差异($F=13.64\sim179.23, P<0.05$); 平板克隆形成实验、细胞划痕实验以及 Transwell 实验结果显示, B1、B2 组细胞集落数目以及细胞迁移率显著低于 A1、A2 组($t=5.26\sim20.86, P<0.05$)。裸鼠成瘤实验显示, 与 A 组相比, B 组体内的肿瘤细胞增殖能力与成瘤能力显著下降($P<0.05$)。Western blotting 实验显示, A1 组与 B1 组、A2 组与 B2 组比较, 细胞中 *DUSP9*、p-ERK、p-MEK 蛋白相对表达水平均差异有显著性($t=3.77\sim13.27, P<0.05$)。IP-MS 结果显示, *DUSP9* 可与 PA2G4、AFP、SMARCC1 等蛋白发生相互作用, 其互作蛋白主要参与核糖体功能、翻译调控、细胞黏附等生物学过程。**结论** *DUSP9* 在 HB 中异常高表达, 可通过调控 MAPK 通路及结合多种互作蛋白, 促进 HB 增殖与转移, 是 HB 潜在促癌基因与治疗靶点。

[关键词] 肝胚细胞瘤; 双特异性磷酸酶类; MAP 激酶信号系统; 基因调控网络; 细胞增殖; 细胞运动

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A

Effect of *DUSP9* on the proliferation and metastasis of hepatoblastoma and its mechanism ZHOU

Pingping, WU Xiongwei, LIU Yao, WANG Chaojin, DONG Qian (Department of Pediatric Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of *DUSP9* on the proliferation and metastasis of hepatoblastoma and its mechanism. **Methods** Single-cell transcriptomic analysis for HB and pan-cancer analysis for *DUSP9* were performed based on public tumor databases, and RT-qPCR and immunohistochemical staining were used to measure the mRNA and protein expression levels of *DUSP9* in HB tumor tissue and paracancerous tissue. HepG2 cells were divided into groups A1 and B1, and Huh6 cells were divided into groups A2 and B2. The cells in groups A1 and A2 were transfected with shNC, and those in groups B1 and B2 were transfected with sh*DUSP9*. CCK-8 assay, colony formation assay, wound healing assay, and Transwell assay were used to measure the proliferation and migration abilities of cells in each group. A xenograft nude mouse model was used to observe the effect of *DUSP9* on the proliferation and tumorigenic abilities of HB cells in vivo. Western blotting was used to measure the expression levels of *DUSP9* and MAPK/ERK pathway-related proteins in each group. Immunoprecipitation-mass spectrometry (IP-MS) was used to identify the potential interacting proteins of *DUSP9*, and enrichment analyses were performed to explore their potential molecular mechanisms. **Results** The single-cell transcriptomic analysis showed that *DUSP9* was significantly highly expressed in malignant epithelial cells of the liver, and the pan-cancer analysis showed significantly high expression of *DUSP9* in various malignant tumors such as bladder urothelial carcinoma, hepatocellular carcinoma, and lung squamous cell carcinoma. Immunohistochemical staining and RT-qPCR showed that compared with paracancerous tissue, the expression level of *DUSP9* was significantly upregulated in tumor tissue of HB patients ($t=5.719, 5.273, P<0.05$). CCK-8 assay showed that at 48–96 hours of cell culture, there was a significant difference in proliferation rate between HepG2 cells (groups A1 and B1) and Huh6 cells (groups A2 and B2)

($F=13.64\sim179.23, P<0.05$); the colony formation assay, wound healing assay, and Transwell assay showed that compared with groups A1 and A2, groups B1 and B2 had significantly lower number

of cell colonies and cell migration rate ($t=5.26-20.86, P<0.05$). The xenograft nude mouse model experiment showed that compared with group A, group B showed significant reductions in the proliferative capacity and tumorigenic ability of tumor cells ($P<0.05$). Western blotting showed that there were significant differences in the relative protein expression levels of DUSP9, p-ERK, and p-MEK between groups A1 and B1 and between groups A2 and B2 ($t=3.77-13.27, P<0.05$). The results of IP-MS showed that DUSP9 could interact with various proteins including PA2G4, AFP, and SMARCC1, and such interacting proteins were mainly involved in the biological processes such as ribosomal function, translational regulation, and cell adhesion. **Conclusion** Abnormally high expression of *DUSP9* is observed in HB. DUSP9 can promote tumor proliferation and metastasis by regulating the MAPK pathway and binding to various interacting proteins, it is a potential oncogene and therapeutic target for HB.

[KEY WORDS] Hepatoblastoma; Dual-specificity phosphatases; MAP kinase signaling system; Gene regulatory networks; Cell proliferation; Cell movement

肝母细胞瘤(hepatoblastoma, HB)是儿童最常见的肝脏原发性恶性肿瘤,占儿童所有原发性肝脏恶性肿瘤的 50%~60%^[1]。目前,手术联合辅助化疗的综合治疗模式可显著提升 HB 患儿的总体生存率,但高危患儿仍存在肿瘤复发、远处转移及预后不良等问题^[2]。因此,探寻新型分子标志物及精准治疗靶点,对改善 HB 高危患儿的预后具有重要临床意义^[3]。既往研究结果表明,Wnt/ β -catenin、MYC、MAPK 等多条信号通路的异常激活与 HB 的发生、发展密切相关。其中,MAPK/ERK 信号通路在调控肿瘤细胞增殖、侵袭、转移及介导化疗耐药过程中发挥关键作用^[4],但该通路在 HB 中的具体分子调控机制尚未完全阐明。

双特异性磷酸酶(DUSP)家族是 MAPK 通路的关键调控因子。过去的研究认为,*DUSPs* 主要发挥抑癌基因作用^[5],而近年多项研究发现,其具有显著的肿瘤类型依赖性特征^[6-7]。在成人肝细胞癌中,*DUSP9* 呈异常高表达状态,且与患者不良预后密切相关;敲低 *DUSP9* 可逆转肿瘤化疗耐药,提示 *DUSP9* 在成人肝癌中可发挥致癌作用^[8]。目前关于 *DUSP9* 在 HB 中的相关研究仍较为匮乏,仅少量转录组学研究提示 *DUSP9* 在 HB 不良预后分子亚群中高表达^[9],但其具体生物学功能及分子调控机制尚未明确。基于上述研究背景,本研究结合单细胞转录组分析、临床样本验证及体内外功能实验,系统探讨 *DUSP9* 对 HB 细胞增殖、迁移的调控作用及相关分子机制,旨在为 HB 患儿的精准临床治疗提供新的作用靶点与理论支撑。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人 HB 细胞系 HepG2 细胞以及 Huh6 细胞均购买于北京中源合聚生物科技有限公司,慢病毒 sh-DUSP9(序列:5'-GCATCCGCTACATCCTCAAT-G-3')及其阴性对照慢病毒(shNC)购买于上海吉凯

基因医学科技股份有限公司,CCK8 试剂购自上海皓元生物医药科技有限公司,蛋白提取试剂(RIPA)购自北京索莱宝科技有限公司,ERK、MEK 抗体购买于江苏亲科生物研究中心有限公司,DUSP9 抗体、GAPDH 抗体及山羊抗兔 IgG 二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司,BCA 试剂盒购买于上海碧云天生物技术有限公司,RNA 提取试剂(RNeasy)购自上海博竞生物科技有限公司,ECL 显色试剂盒以及 RT-qPCR 试剂盒(SYBR Green PCR Master-Mix)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

4 周龄雌性 BALB/c 裸鼠购自济南朋悦实验动物科技有限公司,饲养于青岛大学生物医学中心实验室动物平台,饲养条件为室温(22 ± 2)℃、相对湿度(50 ± 5)%、12/12 h 昼夜循环,自由进食饮水。

1.2 *DUSP9* 基因在不同肿瘤组织中的表达水平及其与患者预后的关系

从 GEO 数据库(GSE180665)下载 HB 单细胞转录组数据,分析不同细胞亚群(肝脏恶性上皮细胞、内皮细胞及成纤维细胞)中 *DUSP9* 表达水平的差异。根据 *DUSP9* 在 HB 细胞中的表达水平,以中位值为界将其分为 *DUSP9* 高表达组与低表达组,并对差异表达基因进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析。采用 R 语言 CellChat 包构建各细胞亚群间的通讯网络,分析肝脏恶性上皮细胞与其他各细胞亚群间的配体-受体相互作用关系。从 TCGA 及 GTEx 数据库下载多种人类肿瘤组织及配对正常组织的 RNA-seq 表达数据,以及对应的临床生存信息,分析 *DUSP9* 基因在不同肿瘤组织与对应正常组织中的表达差异;绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,采用 Log-rank 检验比较 *DUSP9* 高、低表达组患者的总生存期(OS)差异。

1.3 HB 患儿的肿瘤组织和癌旁组织的免疫组织化学(IHC)染色

选取 2014 年 6 月—2025 年 6 月于青岛大学附属医院术后组织病理学确诊为 HB 的 45 例患儿的

肿瘤组织和癌旁组织蜡块。患儿年龄为 1~14 岁。将两种组织样本均经切片、脱蜡、水化及抗原修复处理后,使用 5% 血清封闭。将组织切片与一抗于 4℃ 下孵育过夜,次日加入对应二抗。孵育结束后,于光学显微镜下观察 DUSP9 蛋白的染色情况并采集图像。所有 IHC 染色结果均由两位经验丰富的病理医师独立阅片并完成评分。

IHC 综合评分为阳性细胞百分比评分与染色强度评分的乘积。其中阳性细胞百分比 0~10%、11%~25%、26%~50%、51%~75%、>75% 分别对应 0、1、2、3、4 分,染色强度评分标准:无染色、弱染色、中等染色、强染色分别对应 0、1、2、3 分。综合评分≥6 分定义为 DUSP9 蛋白高表达,评分<6 分定义为 DUSP9 蛋白低表达。

1.4 RT-qPCR 技术检测肿瘤组织和癌旁组织中 DUSP9 基因表达水平

选取 2014 年 6 月—2025 年 6 月于青岛大学附属医院术后组织病理学确诊为 HB 的 6 例患儿的冰冻肿瘤组织和癌旁组织,患儿年龄为 1~14 岁。

采用 RNA 试剂盒提取样本总 RNA,使用逆转录试剂盒于 20 μL 反应体系中完成逆转录反应。采用 RT-qPCR 系统检测基因表达水平,PCR 扩增程序为:95℃ 预变性 30 s,随后进行 40 个循环(95℃ 变性 5 s、60℃ 退火及延伸 30 s)。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达量,以对照组样本作为参照进行标准化校正。DUSP9 引物序列正义链:5'-GT-CAGCCGTTCTGTCACCGTC-3',反义链:5'-AC-CAGGTCATAGGCATCGTT-3';β-actin 引物序列正义链:5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3',反义链:5'-CTCCTTAATGTCACGCAGAT-3'。

1.5 细胞分组和转染

将 HepG2 细胞、Huh6 细胞分别接种于 MEM、DMEM 完全培养基(含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素溶液),置于 37℃、含体积分数 0.05 CO₂ 培养箱培养,当细胞密度达 80%~90% 时,接种于 T25 瓶(1.25×10⁶ 个)。将 HepG2 细胞分为 A1、B1 组,将 Huh6 细胞分为 A2、B2 组,待细胞密度培养至 30% 左右时,使用转染试剂并按照 shRNA 转染说明书的步骤分别转染 shNC(A1、A2 组)、shDUSP9(B1、B2 组),继续培养 24 h,更换培养基后置于培养箱中继续培养,用于后续实验。

1.6 各组细胞的细胞增殖率检测

取转染成功且处于对数生长期的各组细胞,经胰酶消化、重悬并计数后,制备成适宜浓度的细胞悬

液,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL。实验设置空白对照组(仅含培养基),各组均设置 3 个复孔。分别于培养第 24、48、72、96 小时时,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,轻柔混匀且避免产生气泡,置于 37℃、含体积分数 0.05 CO₂ 的培养箱中避光孵育 2 h。使用酶标仪检测波长 450 nm 处各孔吸光度(A)值,并计算细胞增殖率。细胞增殖率=(A_{实验组} - A_{空白组})/(A_{对照组} - A_{空白组})×100%。

1.7 平板克隆形成实验检测各组细胞增殖情况

取转染成功且处于对数生长期各组细胞,使用完全培养基制备单细胞悬液,调整细胞浓度至 5×10⁵ 个/L,以 3 000 个/孔接种于 6 孔板中,置于培养箱中培养 14 d,期间每 3 d 更换一次完全培养基。PBS 清洗细胞后,每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定 20 min,加入 0.5% 结晶紫染色 10 min,纯水清洗后倒置晾干。置于光学显微镜下观察拍照,并计算各组细胞的克隆形成集落数量。

1.8 细胞划痕实验检测各组细胞迁移情况

取转染成功且处于对数生长期各组细胞,接种于 6 孔板中,培养至细胞密度达 80%~90% 时,使用 100 μL 无菌移液器吸头于细胞孔底部垂直画直线(每孔划痕尽量保持一致),用 PBS 冲洗细胞,加入培养基(含 5% FBS)后继续进行培养。使用光学显微镜分别于画线后第 0、48 小时时观察并拍照,使用 ImageJ 软件计算各组细胞划痕面积,计算细胞迁移率。细胞迁移率=(W₀ - W₄₈)/W₀×100%。其中 W₀、W₄₈ 分别为第 0、48 小时时的划痕面积。

1.9 Transwell 实验检测各组细胞迁移情况

取转染成功且处于对数生长期各组细胞,使用无血清培养基制备单细胞悬液并调整细胞浓度,以 15×10⁶ 个/孔接种于 Transwell 小室上室中,下室加入完全培养基,置于培养箱常规培养 24 h。取出小室,以 4% 多聚甲醛固定细胞,0.5% 结晶紫溶液染色,擦除小室内侧残留细胞。置于光学显微镜下观察并拍照,然后计算细胞迁移数量。

1.10 Western blotting (WB)实验检测各组细胞中 DUSP9 及 MAPK 信号通路相关蛋白表达水平

取转染成功且处于对数生长期各组细胞,加入含蛋白酶抑制剂的强效 RIPA 裂解液提取总蛋白,辅以超声处理促进细胞充分裂解。将蛋白样品行变性处理后,经 SDS-PAGE 电泳完成蛋白分离,并转印至 PVDF 膜上。室温下采用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h;随后 4℃ 一抗孵育过夜,所用一抗包括 DUSP9 一抗(1:5 000)、ERK 一抗(1:6 000)、p-ERK 一

抗(1:2 000)、MEK 一抗(1:2 000)、p-MEK 一抗(1:1 500)和 β -actin(1:5 000),次日,室温下相应二抗(1:10 000)孵育 1 h。采用 FUJI 激光成像系统显影并获取蛋白条带,使用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以 β -actin 为内参,计算 DUSP9 及 MAPK 信号通路相关蛋白的相对表达量。

1.11 异种移植小鼠肿瘤模型的制备及其肿瘤组织的 IHC 染色

取转染成功且处于对数生长期的 A2、B2 组细胞,采用 PBS 重悬并调整细胞浓度为 5×10^{10} 个/L。将细胞悬液与基质胶 1:1 混匀。按每只裸鼠 5×10^6 个细胞、总体积 200 μ L 的剂量,于裸鼠右侧腋窝皮下接种,接种 A2 组细胞的裸鼠为 A 组,接种 B2 组细胞的裸鼠为 B 组。每 3 d 观察裸鼠一般状况及肿瘤生长情况,采用游标卡尺测量肿瘤长径(L)与短径(W),依据公式 $V = 1/2 \times L \times W^2$ 计算肿瘤体积。接种 4 周后裸鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉并颈椎脱臼法处死,完整剥离瘤体并称重,记录肿瘤体积与质量。分离的肿瘤组织经 4% 多聚甲醛固定、洗涤、修块、常规脱水包埋、切片,行 IHC 染色,观察增殖相关蛋白 Ki-67 染色情况,方法同 1.3。

1.12 DUSP9 互作蛋白的质谱分析及富集分析

通过免疫沉淀-质谱(IP-MS)技术筛选 DUSP9 的潜在互作蛋白。采用 DUSP9 特异性抗体处理 HepG2 细胞和 Huh6 细胞,富集 DUSP9 蛋白复合物,同时以 IgG 抗体作为阴性对照,对富集所得蛋白样本进行 LC-MS/MS 检测。质谱原始数据利用 MaxQuant 软件分析,基于 UniProt 人源蛋白数据库进行蛋白检索与注释。以 IgG 为参照筛选差异互作蛋白,筛选阈值设定为差异倍数(FC) > 1.5 或 $FC < 0.67$ 、 $P < 0.05$,最终得到 DUSP9 的候选互作蛋白数据集。进一步对候选互作蛋白进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析,探究 DUSP9 潜在的生物学功能与分子调控机制。

1.13 统计学处理

使用 GraphPad Prism Version 9.5.0 软件对数据进行统计分析。所有细胞实验均独立重复 3 次。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,不同时间点各组间比较采用重复测量设计的方差分析,生存资料比较采用 Log-rank 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 肿瘤组织中 DUSP9 基因的表达水平及患者

预后分析

单细胞转录组分析显示,相较于内皮细胞及成纤维细胞,DUSP9 在肝脏恶性上皮细胞中呈显著高表达。GO 功能以及 KEGG 通路富集分析显示,DUSP9 低表达细胞主要富集于核糖体生物发生、蛋白质翻译、脂质代谢及 AMPK 信号转导等代谢相关通路;而 DUSP9 高表达细胞显著富集于炎症反应、TNF- α /NF- κ B、IL-6/JAK-STAT3、缺氧、EMT、P53 及 DNA 损伤应答等肿瘤恶性表型相关通路。细胞通讯分析结果显示,DUSP9 可显著调控并增强 MDK 信号通路的通讯活性。在 DUSP9 高表达的肝脏恶性上皮细胞与 T 细胞的互作中,MDK-(ITGA4+ITGB1)、MDK-SDC2 等配体-受体对表现出显著增强的细胞通讯能力,而 DUSP9 低表达细胞的整体细胞间通讯信号相对较弱。泛癌表达分析显示,DUSP9 在膀胱尿路上皮癌、肝细胞肝癌、肺鳞状细胞癌等多种肿瘤组织中呈显著高表达。生存分析显示,在肝癌与肉瘤患者中,DUSP9 高表达患者的总生存期显著缩短($P < 0.05$)。

2.2 HB 患儿肿瘤组织和癌旁组织中 DUSP9 基因和蛋白表达水平比较

IHC 染色的结果显示,HB 患儿的肿瘤组织与癌旁组织当中 DUSP9 评分分别为 (6.500 ± 1.570) 、 (2.833 ± 1.169) 分,两者比较差异具有显著性($t = 5.719$, $P < 0.05$),见图 1。HB 患儿的肿瘤组织与癌旁组织当中 DUSP9 基因的相对表达水平分别为 4.338 ± 1.908 、 0.780 ± 0.383 ,两组比较差异有显著性($t = 5.273$, $P < 0.05$)。

2.3 各组细胞的细胞增殖率比较

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~B1 组和 A2~B2 组细胞的细胞增殖率均有显著影响($F_{\text{分组}} = 66.92$ 、 105.80 , $F_{\text{时间}} = 209.30$ 、 392.50 , $F_{\text{交互}} = 14.57$ 、 29.11 , $P < 0.01$);培养不同时间点各组细胞增殖率均有显著性差异($F = 13.64 \sim 179.23$, $P < 0.05$);进一步两两比较结果显示,培养第 24 小时时各组细胞增殖率无显著差异($P > 0.05$),第 48、72、96 小时时差异有显著性($P < 0.05$)。见图 2。

2.4 A1 与 B1 组、A2 与 B2 组细胞增殖能力比较

A1、B1 组细胞的克隆形成集落数量分别为 (376.00 ± 24.02) 、 (86.67 ± 15.02) 个,两组比较差异具有显著性($t = 20.86$, $P < 0.05$)。A2、B2 组细胞的集落数量分别为 (164.70 ± 14.65) 、 (87.67 ± 11.53) 个,两组比较有显著差异($t = 5.26$, $P < 0.05$)。见图 3。

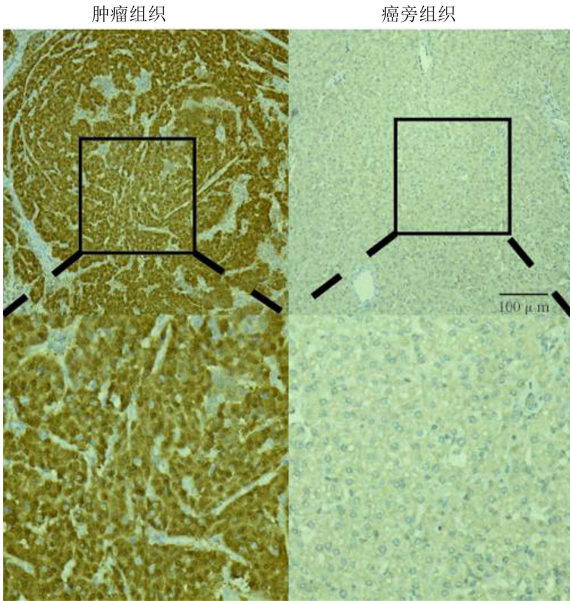


图 1 HB 患儿肿瘤组织与癌旁组织中 DUSP9 表达比较

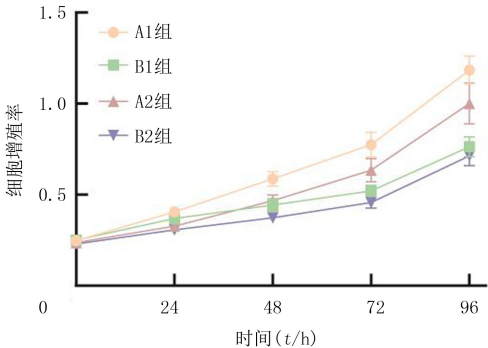


图 2 各组细胞培养不同时间点的细胞增殖率比较

2.5 各组细胞的迁移及侵袭能力比较

细胞划痕实验结果显示, A1、B1 组细胞迁移率分别为(54.90±7.92)%、(25.67±4.04)%, 两组比较差异具有统计学意义($t=6.39, P<0.05$); A2、B2 组细胞的迁移率分别为(42.67±5.03)%、(24.96±3.00)%, 两组间比较差异具有显著性($t=6.08, P<0.05$)。见图 4。Transwell 实验结果显示, A1 组、B1 组细胞的迁移数量分别为(346.00±27.23)、

(101.70±16.50)个, 两组比较差异具有显著统计学意义($t=15.54, P<0.05$); A2 组、B2 组细胞的迁移数量分别为(450.30±43.77)、(132.00±39.66)个, 两组比较差异具有显著统计学意义($t=12.60, P<0.05$)。见图 5。

2.6 各组细胞中 MAPK 信号通路相关蛋白表达水平比较

WB 实验显示, A1 组与 B1 组、A2 组与 B2 组比较, 细胞中 DUSP9、p-ERK、p-MEK 蛋白相对表达水平差异均有显著性($t=3.44\sim13.27, P<0.05$), ERK、MEK 蛋白的相对表达水平比较差异无显著性($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组细胞中 MAPK 信号通路相关蛋白相对表达水平比较($n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	DUSP9	ERK	p-ERK	MEK	p-MEK
A1 组	0.98±0.01	0.83±0.26	0.87±0.06	0.84±0.11	0.86±0.08
B1 组	0.33±0.18	0.82±0.17	0.63±0.04	0.86±0.09	0.57±0.12
A2 组	0.96±0.09	0.83±0.06	0.82±0.05	0.84±0.06	0.76±0.10
B2 组	0.35±0.08	0.84±0.05	0.39±0.03	0.88±0.08	0.49±0.09

2.7 两组裸鼠的肿瘤体积和质量比较

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裸鼠肿瘤体积均有显著影响($F_{\text{分组}}=210.10, F_{\text{时间}}=85.13, F_{\text{交互}}=24.90, P<0.05$); 随接种时间延长, 两组裸鼠肿瘤体积均逐渐增大($F=23.85, 6.67, P<0.05$); 自第 18 天起, A 组裸鼠肿瘤体积显著大于 B 组, 且差异随饲养时间逐渐扩大($t=3.42\sim9.89, P<0.05$)。在第 28 天时, A 组裸鼠平均肿瘤质量为(209.76±42.42)mg, B 组为(77.00±18.47)mg, 差异具有统计学意义($t=6.36, P<0.05$)。见图 6。裸鼠肿瘤组织 IHC 染色检测结果显示, 与 A 组相比, B 组肿瘤组织中增殖相关蛋白 Ki-67 表达量显著降低。见图 7。

2.8 DUSP9 互作蛋白的质谱筛选与功能富集分析

经 IP-MS 技术共筛选出 84 个 DUSP9 的潜在

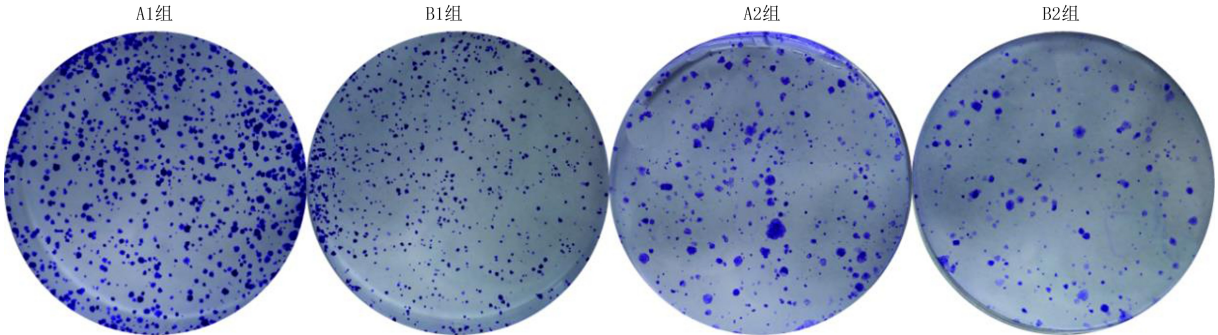


图 3 各组细胞的增殖能力比较(结晶紫染色, 放大 100 倍)

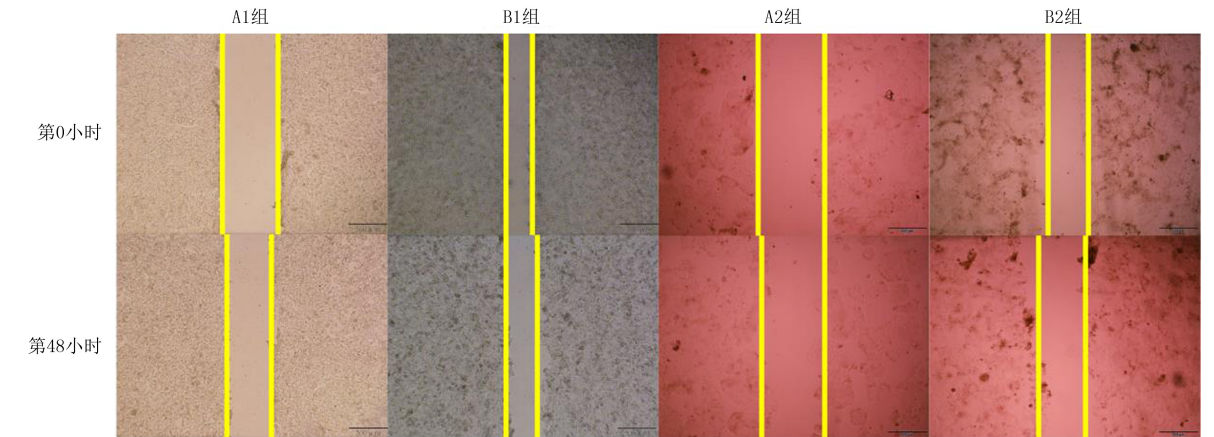


图 4 各组细胞的迁移能力比较(放大 100 倍)

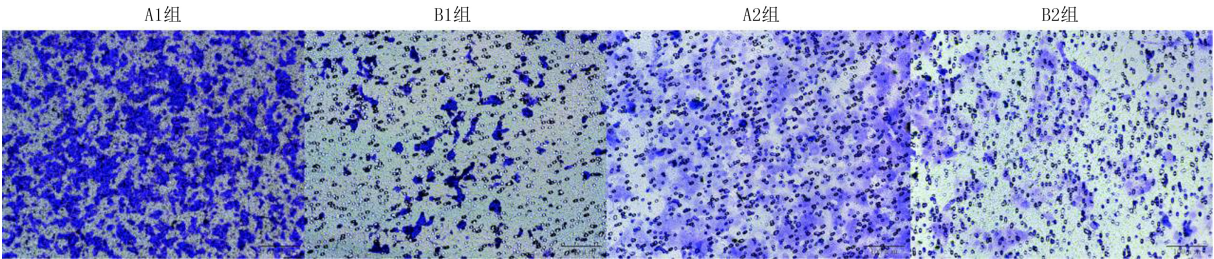


图 5 各组细胞的侵袭能力比较(结晶紫染色,放大 100 倍)

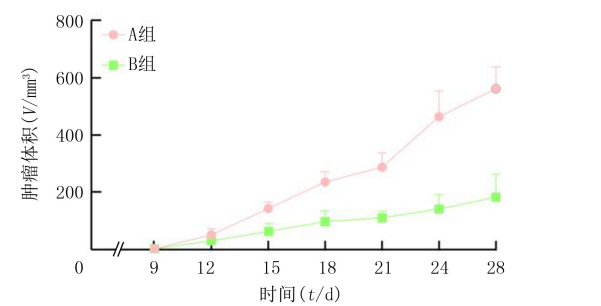
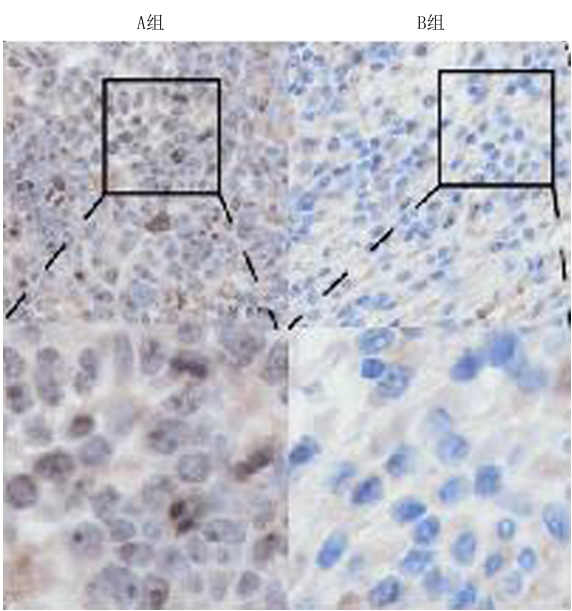


图 6 两组裸鼠肿瘤体积随时间变化曲线

互作蛋白,其中代表性蛋白包括 PA2G4、NCAPD2、AFP、SMARCC1、CTNNB1 等。功能特征分析显示,上述互作蛋白主要参与细胞周期调控、染色质重塑、胚胎程序调控及 Wnt 信号通路等生物学过程。GO 功能显示,细胞组分层面,互作蛋白主要富集于核糖体、细胞-底物黏附连接及黏着斑;生物学过程层面,互相蛋白主要富集于 mRNA 分解代谢、翻译起始及蛋白质内质网靶向过程;分子功能层面,互相蛋白主要富集于 RNA 结合、核糖体结构成分及肌动蛋白结合。KEGG 通路分析显示,互作蛋白显著富集于核糖体、剪接体、核质运输及内质网蛋白加工通路,其次为氨基酸-tRNA 生物合成、DNA 复制等通路。见图 8。

3 讨 论

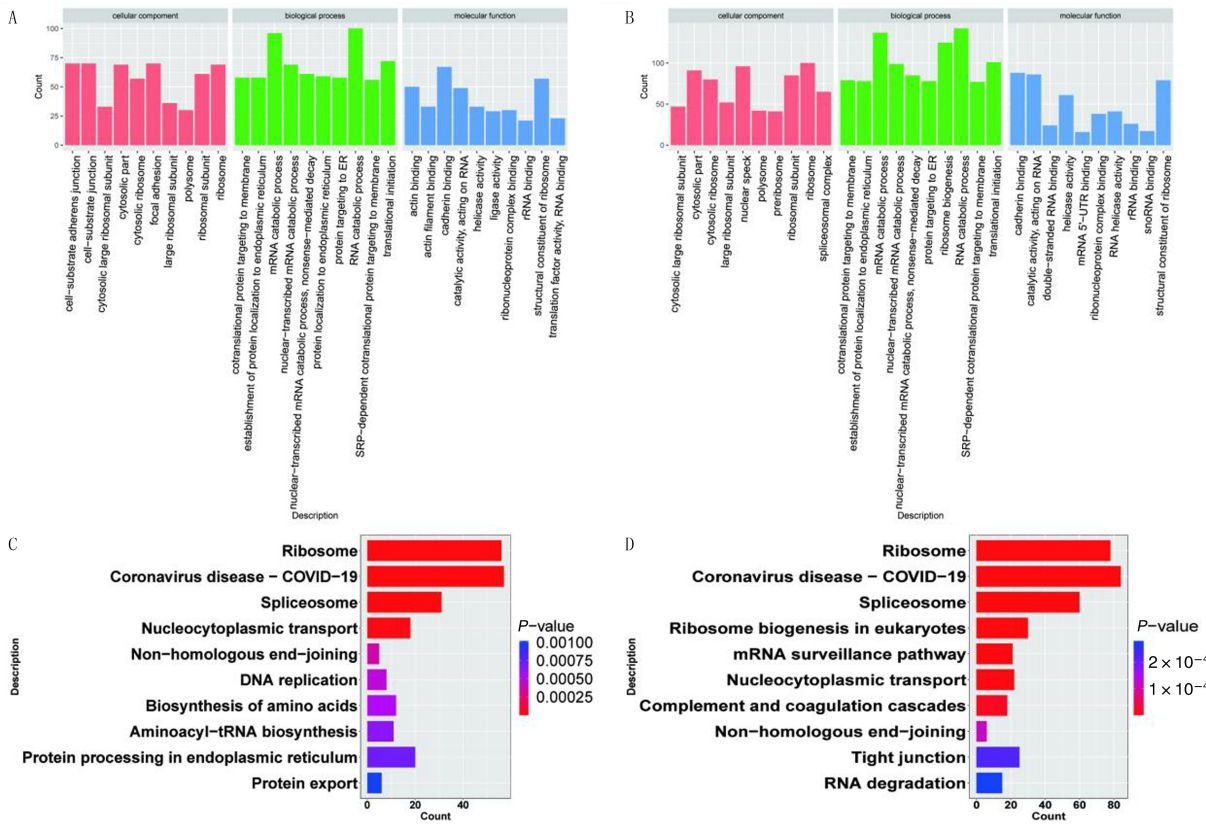
HB 是婴幼儿高发的原发性肝脏恶性肿瘤,近



IHC 染色,上排放大 100 倍,下排为上排所选区域的局部放大,放大 260 倍

图 7 两组裸鼠肿瘤组织中 Ki-67 表达水平比较

年发病率持续上升。目前临床主流的手术联合铂类化疗方案疗效有限,高危 HB 患儿常出现化疗耐药,生存期较短,肿瘤不可切除或转移的患儿肝移植后复发风险依旧极高^[1-3]。HB 发病与胚胎信号通路异常激活相关^[4],而介导其恶性进展与耐药的核心机制尚未阐明,挖掘 HB 靶向治疗靶点对优化高危患儿预后至关重要。



A、B 分别为 HepG2、Huh6 细胞的 GO 功能分析，C、D 分别为 HepG2、Huh6 细胞的 KEGG 通路分析

图 8 交互蛋白的 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

本研究单细胞转录组分析结果显示，*DUSP9* 在 HB 恶性上皮细胞中显著高表达，提示其为 HB 恶性进展内在驱动因子，而非肿瘤微环境广谱调控因子。该结果突破了既往转录组水平 *DUSP9* 泛肿瘤表达的固有认知，明确了其在 HB 恶性细胞中的核心驱动作用^[10]。该结论与肝细胞肝癌中 *DUSP9* 富集于干性细胞亚群的研究结果相符^[8]，且在儿童胚胎性肿瘤 HB 中特征更为显著^[11]。功能富集分析提示，*DUSP9* 高表达可诱导肝细胞发生炎症激活、恶性增殖及肿瘤微环境重塑，发挥促癌作用^[11]。细胞通讯分析显示，*DUSP9* 可显著调控 MDK 信号通路的通讯活性，是肿瘤微环境细胞通讯的核心调控分子。泛癌数据分析显示，*DUSP9* 在膀胱尿路上皮癌、肝细胞肝癌、肺鳞状细胞癌等多种恶性肿瘤中高表达，且与不良预后密切相关。本研究进一步选取了 HB 患儿的组织样本，进行 IHC 染色及 RT-qPCR 检测，结果显示，患儿肿瘤组织中 *DUSP9* 蛋白和基因表达水平显著高于癌旁组织，进一步提示 *DUSP9* 高表达与恶性肿瘤预后不良密切相关。

既往研究显示，*DUSP* 家族在胰腺癌^[12]、黑色素瘤^[13]、胶质母细胞瘤^[14] 等多种人类恶性肿瘤中存在异常表达。目前已鉴定出 40 余种 *DUSP* 家族

成员^[15]，多数成员可通过调控 MAPK 信号通路，参与调节肿瘤细胞增殖、分化及免疫应答等生物学过程^[16-18]。家族成员中，*DUSP22* 可通过靶向 EGFR/ERK 通路抑制前列腺癌细胞增殖^[19]。本研究通过慢病毒感染技术敲低 HB 细胞系 HepG2、Huh6 细胞中 *DUSP9* 的表达，探究其生物学功能。体外实验结果显示，敲低 *DUSP9* 可抑制 HB 细胞增殖、迁移能力，CCK-8 实验、平板克隆形成实验证实细胞增殖能力显著降低，细胞划痕实验与 Transwell 实验显示敲低 *DUSP9* 可使 HepG2、Huh6 细胞迁移能力显著下降。体内裸鼠成瘤实验进一步表明，敲低 *DUSP9* 可显著削弱 Huh6 细胞的体内增殖及成瘤能力。以上结果提示，*DUSP9* 可正向调控 HB 恶性增殖，是维持肿瘤快速生长的关键分子。

MAPK 通路主要包含 ERK、JNK、p38 三大核心组分，在肿瘤发生、进展的不同阶段发挥差异化调控作用^[20]，其中 ERK 信号激活在介导多种肿瘤细胞增殖、迁移中发挥重要作用^[21-22]。结合本研究结果，提示敲低 *DUSP9* 可解除 MAPK 通路抑制，触发细胞内信号负反馈调节；同时 JNK、p38 通路的信号拮抗效应与细胞应激反应互相叠加，最终下调了 p-ERK 蛋白的表达水平，上调 JUN、FOSB 等通路

下游转录因子的表达水平,进而诱导应激及增殖抑制相关基因差异表达^[5]。

本研究通过 IP-MS 筛选获得 DUSP9 的潜在互作蛋白,包括 PA2G4、NCAPD2、AFP、SMARCC1、CTNBL1。GO 功能/KEGG 通路富集分析显示,上述互作蛋白网络主要富集于核糖体通路、剪接体、翻译起始及细胞-底物黏附连接等生物学过程,为 DUSP9 调控 HB 恶性表型的分子机制提供了理论支撑,其中 PA2G4 是 EGFR 通路下游关键调控因子,主要参与细胞转录与翻译过程调控^[23-24]。现有研究尚未证实 PA2G4 与 ERK 存在直接结合关系,同时 MAPK 通路可通过磷酸化 4EBP1 调控翻译起始进程^[25-26],而 PA2G4 作为 RNA 结合蛋白可在此过程中发挥协同调控作用。本研究通过 IP-MS 技术发现,DUSP9 与 PA2G4 存在潜在互作关系,提示 DUSP9 或通过结合 PA2G4 间接调控 MAPK 通路活性^[27-28]。

现研究显示,PA2G4 可能是通过 p38MAPK/HIF1 α 轴促进肝细胞肝癌的增殖与干性维持^[29-30]; SMARCC1 通过参与 SWI/SNF 染色质重塑,调控 HB 干性基因的异常表达^[31]; AFP 是 HB 经典特异性肿瘤标志物^[32],其与 DUSP9 的互作进一步证实,DUSP9 可通过调控胚胎重编程相关通路参与 HB 的发生发展。综上,DUSP 家族的肿瘤调控功能具有高度特异性,可依据肿瘤类型、细胞谱系、肿瘤微环境及下游信号通路差异,发挥促癌或抑癌的双向调控作用^[33-34]。由此推测,DUSP9 的表达特征与 HB 高增殖的胚胎性肿瘤生物学特性高度符合,为阐释 HB 化疗耐药的分子机制提供了全新思路和研究视角。

本研究仍存在一定局限性。本研究通过 IP-MS 筛选鉴定出 DUSP9 与 PA2G4、AFP 等蛋白存在潜在相互作用,但尚未经 Co-IP、GST pull-down 等经典实验进一步验证,DUSP9 蛋白与 PA2G4 蛋白直接结合关系及精准调控机制仍有待明确。此外,本研究重点探究了 DUSP9 对 HB 细胞增殖的调控效应,其在肿瘤代谢重编程、肿瘤微环境重塑中的潜在作用尚未涉及,亦是后续研究的重要方向。未来深入阐明 DUSP9 的多维调控机制,可进一步完善 HB 发病的分子理论体系,明确其作为 HB 预后生物标志物的应用价值,为临床开发 HB 新型联合治疗策略提供可靠的实验与理论依据。

综上所述,DUSP9 在 HB 肿瘤组织中异常高表达,可通过互作蛋白调控 MAPK 信号通路,介导

HB 细胞增殖、迁移等恶性生物学行为,是驱动 HB 发生发展的关键分子。DUSP9 的促癌作用与 HB 胚胎性肿瘤特性及其化疗耐药的特征高度契合,因此具备作为 HB 预后生物标志物与新型治疗靶点的应用潜力。未来应深入解析其多维调控网络,从而为 HB 的机制研究与临床靶向联合治疗提供新的理论依据。

伦理批准和知情同意:本研究涉及的所有试验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 QYFYWZLL29309)。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。

伦理批准和动物权利声明:本研究涉及的所有实验已通过青岛大学实验动物伦理学专业委员会的审核批准(批准号 20240614BALB/cNude1620240712093)。所有实验过程均遵照《实验动物管理条例》及《实验动物福利伦理审查指南》的条例进行。

作者声明:所有作者均参与了研究设计,周萍萍、吴雄伟、董倩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] SHI K, XU C C, ZHANG X Y, et al. Global trends and regional differences of hepatoblastoma: A systematic analysis and predictions to 2035 based on the global burden of disease study 2021[J]. BMC Public Health, 2025,25(1):3227.
- [2] PIO L, O'NEILL A F, WOODLEY H, et al. Hepatoblastoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2025,11:36.
- [3] WU Z H, XIA F N, WANG W J, et al. Worldwide burden of liver cancer across childhood and adolescence, 2000–2021: A systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021[J]. eClinicalMedicine, 2024,75:102765.
- [4] SHEN D, SHEN J, JIAO Q S, et al. The prognostic value of mitogen-activated protein kinase kinase in liver hepatocellular carcinoma by bioinformatics[J]. Medicine, 2025, 104 (26): e42933.
- [5] KHOUBAI F Z, GROSSET C F. DUSP9, a dual-specificity phosphatase with a key role in cell biology and human diseases[J]. Int J Mol Sci, 2021,22(21):11538.
- [6] NITURE S, MOOERS B H M, WU D H, et al. Dual-specificity protein phosphatase 1: A potential therapeutic target in cancer[J]. iScience, 2025,28(11):113706.
- [7] LUO J, LUO X, LIU X, et al. DUSP9 suppresses proliferation and migration of clear cell renal cell carcinoma via the mTOR pathway[J]. OncoTargets Ther, 2020,13:1321-1330.
- [8] CHEN K, GORGEN A, DING A, et al. Dual-specificity phosphatase 9 regulates cellular proliferation and predicts recurrence after surgery in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Commun, 2021,5(7):1310-1328.
- [9] YOUNOSSI Z M, AFENDY A, STEPANOVA M, et al. Development and validation of a primary sclerosing cholangitis-

specific patient-reported outcomes instrument: The PSC PRO [J]. *Hepatology*, 2018,68(1):155-165.

[10] XU Z Y, ZHAI X R, LIU M X, et al. Single-cell multi-omics reveals DUSP9 as a key regulator of cancer stemness and a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma [J]. *J Transl Med*, 2026,24(1):230.

[11] DING M, MAO S, WU H, et al. Malignant hepatoblast-like cells sustain stemness via IGF2-dependent cholesterol accumulation in hepatoblastoma[J]. *Adv Sci (Weinh)*. 2025,12(20): e2407671.

[12] WEI Y J, WANG G, WANG C, et al. Upregulation of DUSP14 affects proliferation, invasion and metastasis, potentially via epithelial - mesenchymal transition and is associated with poor prognosis in pancreatic cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2020,12:2097-2108.

[13] SINGH M K, ALTAMEEMI S, LARES M, et al. Role of dual specificity phosphatases (DUSPs) in melanoma cellular plasticity and drug resistance[J]. *Sci Rep*, 2022,12:14395.

[14] PARK J W, WOLLMANN G, URBIOLO C, et al. Sprouty2 enhances the tumorigenic potential of glioblastoma cells[J]. *Neuro Oncol*, 2018,20(8):1044-1054.13.

[15] GAO P P, QI X W, SUN N, et al. The emerging roles of dual-specificity phosphatases and their specific characteristics in human cancer[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(1):188562.

[16] CHEN M H, CHUANG H C, YEH Y C, et al. Dual-specificity phosphatases 22-deficient T cells contribute to the pathogenesis of ankylosing spondylitis[J]. *BMC Med*, 2023,21(1): 46.

[17] SANDERS B E, YAMAMOTO T M, MCMELLEN A, et al. Targeting DUSP activity as a treatment for high-grade serous ovarian carcinoma[J]. *Mol Cancer Ther*, 2022,21(8):1285-1295.

[18] MARIE-CLAIRE C, BENTURQUIA N, LUNDQVIST A, et al. Characteristics of dual specificity phosphatases mRNA regulation by 3, 4-methylenedioxymethamphetamine acute treatment in mice striatum[J]. *Brain Res*, 2008,1239:42-48.

[19] LIN H P, HO H M, CHANG C W, et al. DUSP22 suppresses prostate cancer proliferation by targeting the EGFR-AR axis [J]. *FASEB J*, 2019;33(12):14653-14667.

[20] MUDA M, BOSCHERT U, SMITH A, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4 [J]. *J Biol Chem*, 1997,272(8):5141-5151.

[21] SHEN Z Y, ZHANG C L, QU L S, et al. MKP-4 suppresses hepatocarcinogenesis by targeting ERK1/2 pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2019,19:61.

[22] ULLAH R, YIN Q, SNELL A H, et al. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022,85:123-154.

[23] STEGMANN M. EBP1: A crucial growth regulator downstream of receptor kinases across Kingdoms[J]. *PLoS Biol*, 2018,16(11):e3000056.

[24] HUANG X, HE M, HUANG S, et al. Circular RNA circERBB2 promotes gallbladder cancer progression by regulating PA2G4-dependent rDNA transcription[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):166.

[25] COHEN J D, GARD J M, NAGLE R B, et al. ERK crosstalks with 4EBP1 to activate cyclin D1 translation during quinol-thioether-induced tuberous sclerosis renal cell carcinoma [J]. *Toxicol Sci*, 2011,124(1):75-87.

[26] UCHIDA K, SCARBOROUGH E A, PRUZINSKY E, et al. mTORC1 and nuclear ERK spatially control translation in cardiomyocytes through 4EBP1 phosphorylation[J]. *Sci Signal*, 2026,19(934):eadu5769.

[27] PENG W, HUANG H, ZHAO Y C, et al. Oncofetal dual-specificity phosphatase 9 drives stem-like properties through ERK1/2-PPARG-SCD axis-mediated lipid metabolism in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Transl Med*, 2025, 15(12): e70550.

[28] BONDOC A, GLASER K, JIN K, et al. Identification of distinct tumor cell populations and key genetic mechanisms through single cell sequencing in hepatoblastoma[J]. *Commun Biol*, 2021,4(1):1049.

[29] SUN S, LIU Y Y, ZHOU M L, et al. PA2G4 promotes the metastasis of hepatocellular carcinoma by stabilizing FYN mRNA in a YTHDF2-dependent manner[J]. *Cell Biosci*, 2022,12(1):55.

[30] BAO Y Q, SUVESH M, LI X B, et al. Ebp1 p48 promotes oncogenic properties in hepatocellular carcinoma through p38 MAPK/HIF1α activation and p53 downregulation [J]. *Mol Carcinog*, 2021,60(4):252-264.

[31] XIAO Z M, LV D J, YU Y Z, et al. SMARCC1 suppresses tumor progression by inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway in prostate cancer [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 678967.

[32] JIAO J J, SAXENA R, MOROTTI R. Hepatoblastoma: Comprehensive review with recent updates [J]. *Adv Anat Pathol*, 2025,32(5):309-316.

[33] BAHAR M E, KIM H J, KIM D R. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: From mechanism to clinical studies[J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2023,8(1): 455.

[34] LOW H B, ZHANG Y L. Regulator roles of MAPK phosphatases in cancer[J]. *Immune Netw*, 2016,16(2):85-98.