

# *HYOU1* 在胰腺癌发生发展中的作用及其调控机制

丁家璐<sup>1</sup> 孙倍成<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探究人低氧上调因子 1 (*HYOU1*) 调控胰腺癌发生发展的机制。方法 生物信息学和免疫组织化学染色分析 *HYOU1* 在胰腺肿瘤组织和正常及癌旁组织中的表达水平以及与患者预后的关系; 实时荧光定量 PCR (qPCR)、蛋白质印迹 (Western blot) 检测 *HYOU1* 在正常胰腺导管上皮细胞和多种胰腺癌细胞系中的表达水平; 利用 CRISPR-Cas9 技术在表达水平最高的细胞系 BXPC-3 和 Panc-1 中敲除 *HYOU1*, 通过细胞计数试剂盒 8 (CCK-8)、集落形成和划痕实验检测细胞存活、增殖和迁移能力, 流式细胞术检测细胞抗凋亡能力; 通过 Western blot 实验在野生型和 *HYOU1* 敲低细胞中检测 PI3K/Akt 通路中指标 PI3K、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 的蛋白水平; 利用 PI3K/Akt 通路激活剂 Recilisib 处理 *HYOU1* 敲低细胞系并检测细胞增殖能力。结果 *HYOU1* 在胰腺肿瘤组织中的表达高于正常组织, *HYOU1* 高表达患者生存期短于低表达患者 ( $P < 0.01$ ); 免疫组化染色显示, *HYOU1* 在胰腺癌患者肿瘤组织中的表达高于癌旁组织 ( $P < 0.01$ ); 胰腺癌细胞系中 *HYOU1* mRNA 和蛋白水平高于正常胰腺导管上皮细胞 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ )。敲低 *HYOU1* 能抑制 BXPC-3 和 Panc-1 细胞存活、增殖和迁移, 促进细胞早期凋亡, 还能抑制 PI3K/Akt 信号通路激活, 而 PI3K/Akt 通路激活剂 Recilisib 能逆转敲低 *HYOU1* 对细胞的作用。结论 *HYOU1* 通过激活 PI3K/Akt 信号通路促进胰腺癌发展。

**关键词** *HYOU1*; 胰腺癌; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)08-1354-08  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.010

胰腺癌是所有癌症种类中病死率最高的一种, 其 5 年生存率仅有 5%~10%<sup>[1]</sup>。据中国国家癌症中心 2021 年统计数据, 胰腺癌位居我国男性恶

性肿瘤发病率第 7 位, 女性第 11 位, 占恶性肿瘤相关病死率的第 6 位<sup>[2]</sup>。目前胰腺癌临床管理的两大支柱仍是手术治疗和化学药物治疗, 但疗效均不佳。因此, 明确胰腺癌的发病机制, 实现胰腺癌患者的早期诊断并选择有效的治疗方式对改善患者预后至关重要。

人低氧上调因子 (hypoxia up-regulation 1, *HYOU1*) 属于 *HSP70* 家族, 表达一种高度保守的分子伴侣蛋白, 在细胞平衡和应激反应中发挥关键作用<sup>[3]</sup>。据报道, 其在多种肿瘤组织中表达上调, 包括甲状腺乳头状癌<sup>[4]</sup>、黏液性卵巢上皮癌<sup>[5]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[6]</sup>、乳腺癌<sup>[7]</sup>、膀胱癌<sup>[8]</sup>等, 通过促进癌细胞增殖、迁移、侵袭和抑制癌细胞凋亡, 对肿瘤细胞发挥保护作用。然而, *HYOU1* 在胰腺癌中的功能很大程度上是未知的。PI3K/Akt 信号通路是在各种癌症中发挥主要作用的主要通路<sup>[9]</sup>, 可调控癌症进展中的各种特征性表现, 包括肿瘤细胞存活、转移和代谢等。该研究旨在探讨了 *HYOU1* 对胰腺癌细胞生物行为和 PI3K/Akt 信号通路的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 GEPIA/GEO 公共数据库分析** 通过 GEPIA 在线数据库分析 *HYOU1* 在胰腺肿瘤组织与正常组织中基因表达水平。在 GEO 公共数据库中, 选择数据集 GSE12417, 将患者分为 *HYOU1* 高表达和低表达两组, 绘制总体生存期曲线 ( $n = 274$ )。

**1.2 细胞系与培养** 人胰腺正常导管上皮细胞 (HPDE)、人胰腺癌细胞 (ASPC-1、BXPC-3、Mia-paca2、Panc-1、SW1990) 以及人肾上皮细胞 HEK293T 均来自中国科学院细胞库。SW1990 细胞在补充有 10% 胎牛血清, 1% 的青链霉素双抗的 PRMI-1640 培养基中培养, 其余细胞均在相同条件下的 DMEM 培养基中培养。培养基、磷酸盐缓冲液 (PBS)、青链霉素双抗、胰酶均购自加拿大文森特公司。

**1.3 慢病毒包装及感染** 将 10 cm 皿的 HEK293T 细胞培养至 80% 左右密度, 转染前 1 h 换 5 ml 新鲜含双抗 DMEM 培养基, 使用 PolyJet 试剂 (上海睿铂赛生物科技有限公司) 包装质粒, 加入 293T 细胞

2024-05-13 接收

基金项目: 安徽省临床医学研究转化专项 (编号: 202204295107020008); 安徽省高校科研项目 (编号: 2022AH010070)

作者单位: <sup>1</sup> 南京中医药大学鼓楼临床医学院肝胆外科, 南京 210008

<sup>2</sup> 安徽医科大学第一附属医院肝胆胰及移植外科, 合肥 230022

作者简介: 丁家璐, 女, 硕士研究生;

孙倍成, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sunbc@ahmu.edu.cn

中 24 h 换含血清含双抗的新鲜培养基, 48 h 补加 10 ml 新鲜培养基, 72 h 收集病毒上清液, 经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤分装,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。准备 3 皿密度相同的细胞, 分别用于构建敲除 *HYOUI* 组, 空载组以及用于嘌呤霉素药筛对照。每个皿中加入 1 ml 病毒液、1 ml 新鲜培养基, Polybrene(北京索莱宝科技有限公司) 辅助感染, 感染 48 h 后用 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的嘌呤霉素进行药筛。

**1.4 免疫组织化学染色** 将玻片放入  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  烘箱中静置 30 ~ 60 min, 取出后经二甲苯、无水乙醇及浓度 95%、90%、85%、80% 乙醇脱蜡水化, 使用枸橼酸钠溶液进行组织抗原修复, 组化笔圈定组织范围, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  降低内源性过氧化物酶造成的非特异性背景染色, 正常非免疫动物血清封闭 30 min, 滴加一抗置于湿盒中  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜。第 2 天取出湿盒, 室温下静置 1 h, 回收一抗, PBS 洗后二抗孵育 30 min。DAB 显色, 苏木精染出细胞核所在位置。经浓度为 80%、85%、90%、95% 乙醇、无水乙醇、二甲苯使组织脱水, 中性树胶封片晾干。

**1.5 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8)** CCK-8 实验用于测定胰腺癌细胞系增殖能力。分别将处于对数生长期的 BXPC-3、Panc-1 转染细胞以 1 000 个/孔接种到 96 孔板中, 待细胞贴壁后将培养基换为 100  $\mu\text{l}$  培养基加 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 试剂(日本同仁化学研究所),  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中避光培养 1 h, 酶标仪测量 450 nm 处吸光度值并记录, 每隔 24 h 重复 1 次, 共重复 3 ~ 5 次。

**1.6 集落形成实验** 计数后接种 500 个上述细胞到 6 孔板中, 每组设置 3 个复孔,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱中孵育 10 ~ 14 d。镜下观察待细胞形成集落(30 ~ 50 个细胞)后, 去除培养基, 甲醛固定细胞, 0.1% 结晶紫(上海碧云天生物技术有限公司)染色 30 min 后 PBS 洗净晾干后拍照。

**1.7 划痕实验** 在 6 孔板中铺  $4 \times 10^5$  个上述细胞后, 镜下观察细胞至均匀分布满培养皿底部但不重叠的程度时, 使用 200  $\mu\text{l}$  枪头划线并更换为无血清培养基, 并找合适的位置拍照记录, 24 h 后重复。

**1.8 流式细胞术** 使用 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 1 h 诱导上述细胞凋亡, 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 收集所有细胞使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(南京诺维赞生物技术有限公司)进行染色, 经流式细胞仪可将细胞分为四群: 死亡细胞(Q1)、早期凋亡细胞(Q3)、晚期凋亡细胞(Q2)、活细胞群(Q4), FlowJo 软件分析结果并绘图统计。

**1.9 蛋白质印迹 (Western blot) 实验** 用裂解液分别提取各类细胞总蛋白, 测定蛋白浓度后用上样缓冲液定量, 金属浴  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 min 使蛋白变性。10% SDS-PAGE 胶分离每个样品中的蛋白质并转膜至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 根据说明书配置抗体(抗 actin 抗体, 1 : 1 000, 上海碧云天生物技术有限公司; 抗 *HYOUI* 抗体, 1 : 1 000, 美国 Abcam 公司; 抗 PI3K 抗体, 1 : 1 000; 抗 p-PI3K 抗体, 1 : 1 000; 抗 Akt 抗体, 1 : 1 000; 抗 p-Akt 抗体, 1 : 2 000, 美国 CST 公司), 按照蛋白 marker(南京诺维赞生物公司)对应位置剪下条带, 于一抗中  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 第 2 天使用 TBST 清洗条带 3 次后再加入相对应的二抗中, 室温孵育 1 h, 再次用 TBST 清洗 3 次, 条带上滴加 ECL 显色液(南京诺维赞生物公司)后 Bio-rad 曝光机中显影并保存原始数据。

**1.10 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) 实验** TRIzol 试剂(法国 invitrogen 生物技术公司)提取细胞 RNA 后使用反转录试剂盒(南京诺维赞生物技术有限公司)逆转录为 cDNA, 将 cDNA 稀释 3 ~ 5 倍后按说明书向 96 孔板中添加荧光染料、引物等体系, 高透光塑料薄膜封口后放入 qPCR 仪中反应, 最后以  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  计算。所使用引物序列如下: actin (正义链) 5'-GTCTTCCCCTCCATCGTG-3'; (反义链) 5'-AGGTGTGGTCCAGATTTTC-3'; *HYOUI*: (正义链) 5'-GAGGAGCCGAGTCTGTGG-3', (反义链) 5'-GCACTCCAGTTTGACAATGG-3'。

**1.11 统计学处理** 使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据统计分析, 组间差异使用 unpaired *t*-tests 检验或者 One-way ANOVA 检验, 数据采用均数  $\pm$  标准差表示。最后结果使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行作图, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 *HYOUI* 在胰腺癌中表达情况及其与预后相关性** GEPIA 数据库提示 *HYOUI* 基因的表达水平在胰腺肿瘤组织中高于正常组织(图 1A)。随后进行 Western blot 和 qPCR 实验(图 1B) 结果显示其蛋白和 mRNA 水平在胰腺癌细胞系中表达均高于胰腺正常导管上皮细胞( $P < 0.01$ ), 且 *HYOUI* 在 BXPC-3、Panc-1 这两个细胞系中表达最高。通过免疫组化染色对患者样本进行检验(图 1C), 结果显示, *HYOUI* 在肿瘤组织中表达高于癌旁组织(图 1D:  $t = 5.404$ ,  $P < 0.01$ ), 且多分布在细胞质中。对 GEO

公共数据库中 GSE12417 数据集分析得 (图 1E): *HYOU1* 高表达组有 195 人, 低表达组 79 人, 高表达 *HYOU1* 的胰腺导管腺癌患者生存率明显低于 *HYOU1* 低表达患者 ( $P < 0.01$ ) 提示 *HYOU1* 高表达与

患者预后不良呈正相关。

**2.2 *HYOU1* 对胰腺癌细胞增殖、迁移的影响** 本研究选择 *HYOU1* 表达量较高的 BXPC-3、Panc-1 细胞系, 对其使用 CRISPR 技术和慢病毒包装感染的

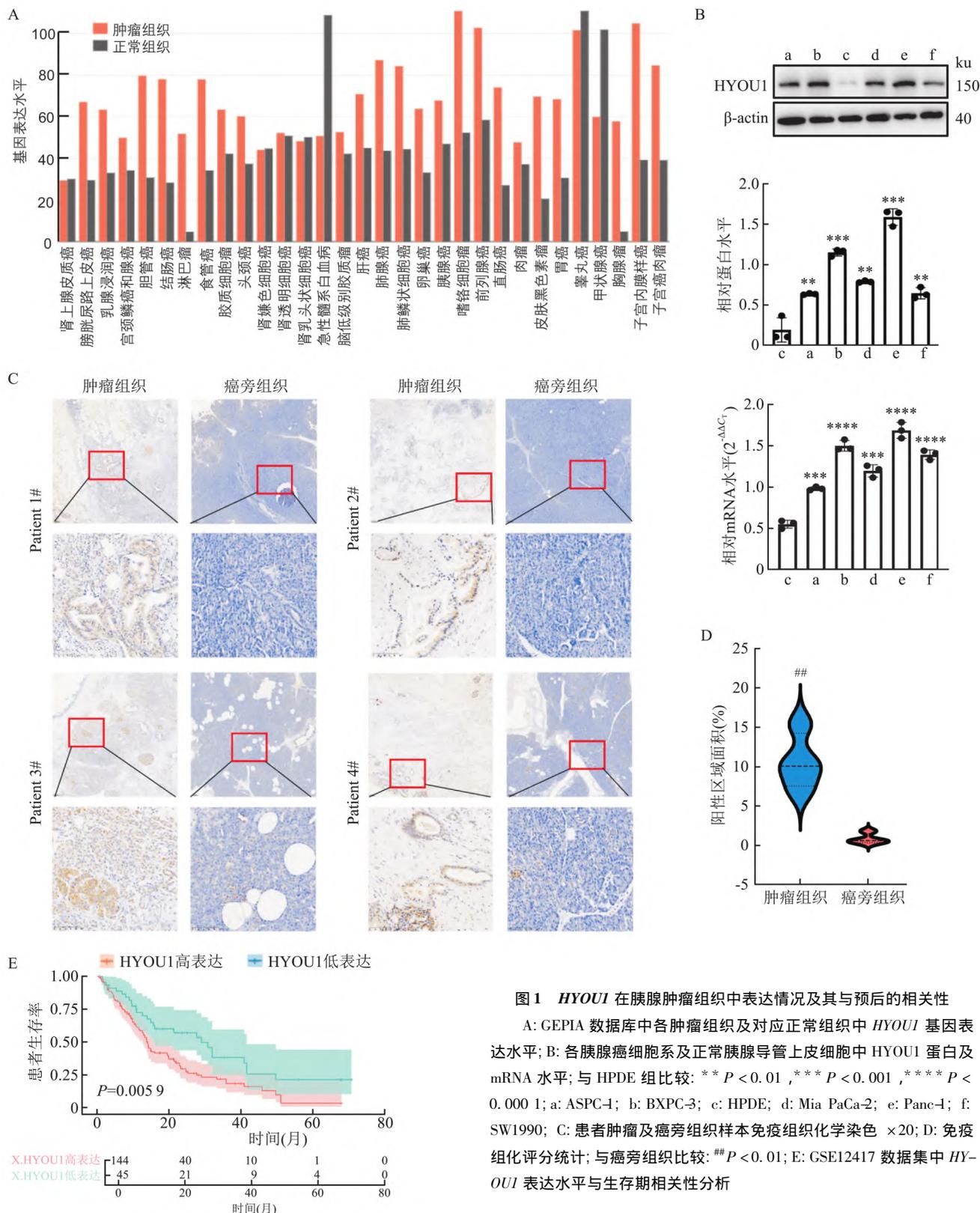


图 1 *HYOU1* 在胰腺肿瘤组织中表达情况及其与预后的相关性

A: GEPIA 数据库中各肿瘤组织及对应正常组织中 *HYOU1* 基因表达水平; B: 各胰腺癌细胞系及正常胰腺导管上皮细胞中 *HYOU1* 蛋白及 mRNA 水平; 与 HPDE 组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ; a: ASPC-1; b: BXPC-3; c: HPDE; d: Mia PaCa-2; e: Panc-1; f: SW1990; C: 患者肿瘤及癌旁组织样本免疫组织化学染色  $\times 20$ ; D: 免疫组化评分统计; 与癌旁组织比较: ##  $P < 0.01$ ; E: GSE12417 数据集中 *HYOU1* 表达水平与生存期相关性分析

方式构建稳转敲低 *HYOU1* 的细胞系及对照细胞系。Western blot 实验显示 ,与对照组相比 ,BXPC-3 KD *HYOU1*、Panc-1 KD *HYOU1* 细胞中 *HYOU1* 蛋白水平下降( 图 2A) ; CCK-8 实验显示 ,与对照组相比 ,敲低 *HYOU1* 组肿瘤细胞增殖数量减少( 图 2B;  $t_{\text{BXPC-3}} = 9.34$   $t_{\text{Panc-1}} = 8.43$  ,均  $P < 0.001$ ) ; 且相同时间内敲低 *HYOU1* 的细胞集落数量减少( 图 2C;  $t_{\text{BXPC-3}} =$

$10.75$   $P < 0.001$ ;  $t_{\text{Panc-1}} = 26.27$   $P < 0.0001$ ) 。两个细胞系中均可见敲低 *HYOU1* 后细胞迁移速度减慢( 图 2D) 。提示 *HYOU1* 可以促进肿瘤细胞的增殖与迁移。

**2.3 *HYOU1* 对胰腺癌细胞早期凋亡的影响** 使用 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导细胞凋亡后通过流式细胞仪检测 ,结果显示 ,与对照组相比 ,敲低 *HYOU1* 后细胞早期凋

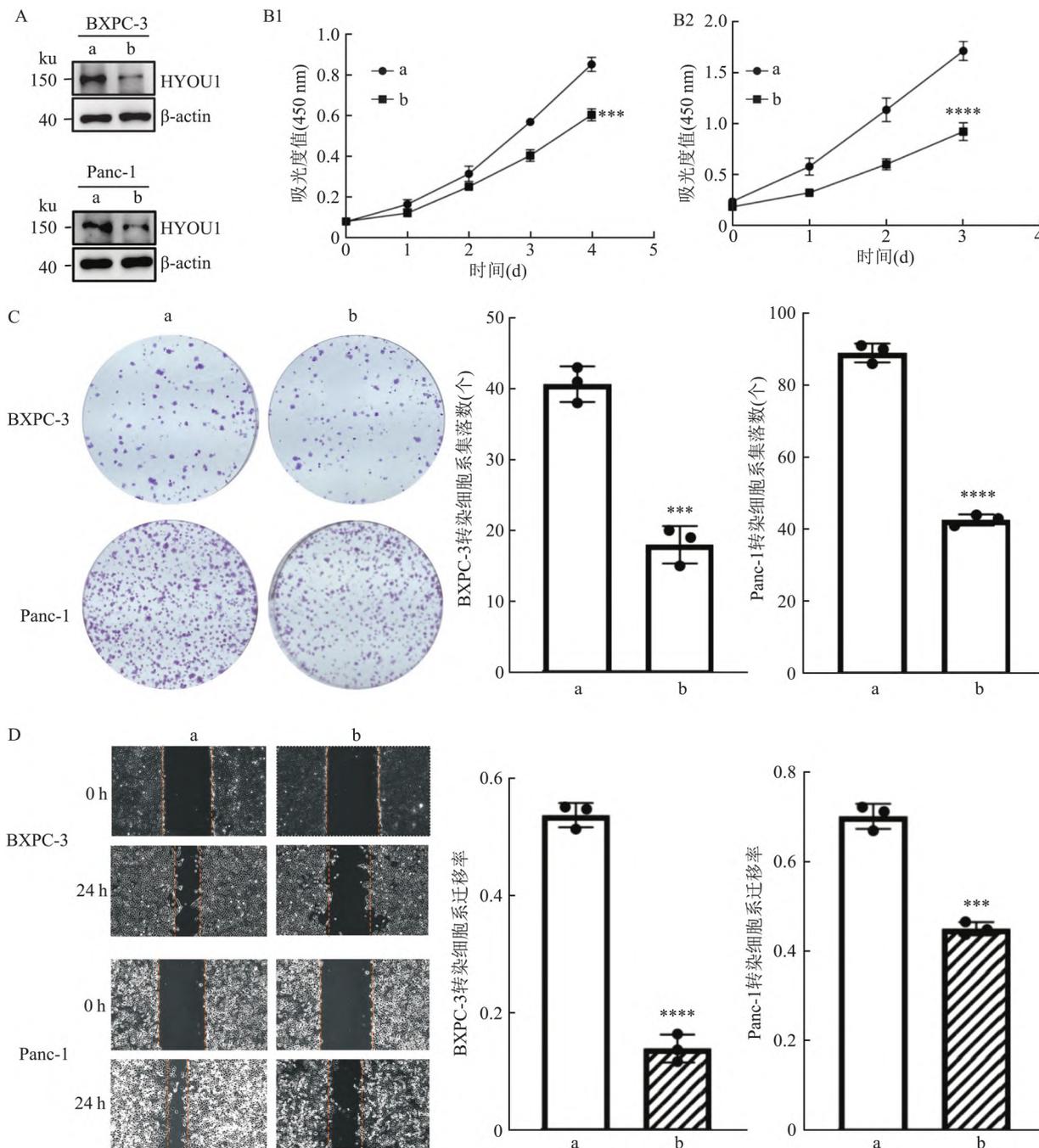


图 2 *HYOU1* 对胰腺癌细胞增殖、迁移的影响

A: Western blot 实验分析 BXPC-3、Panc-1 细胞转染后 *HYOU1* 表达; B: CCK-8 实验测定 BXPC-3、Panc-1 及对应转染细胞增殖活力; 1: BXPC-3; 2: Panc-1; C: 平板克隆实验检测 BXPC-3、Panc-1 及对应转染细胞存活能力; D: 划痕实验检测 BXPC-3、Panc-1 及对应转染细胞迁移能力; a: 对照组; b: KD *HYOU1* 组; 与对照组比较: \*\*\*  $P < 0.001$  , \*\*\*\*  $P < 0.0001$

亡(Q3)数量增多且差异有统计学意义(图3A:  $t = 20.61$   $P = 0.0002$ ; 图3B:  $t = 4.62$   $P = 0.0098$ )。以上结果提示在胰腺癌中 *HYOU1* 也发挥抗早期凋亡作用。

**2.4 *HYOU1* 通过激活 PI3K/Akt 信号通路对胰腺癌细胞增殖的影响** 本研究通过 Western blot 对该通路主要蛋白水平进行检测,结果显示,在总 Akt, PI3K 水平不变的情况下,与对照组相比,敲低 *HYOU1* 组中 p-Akt、p-PI3K 的蛋白表达水平下降 ( $t_{\text{BXPC-3}} = 6.04$   $P = 0.0038$ ;  $t_{\text{Panc-1}} = 7.05$   $P = 0.0072$ ) (图4A、B),提示敲低 *HYOU1* 后该通路活性被抑制。使用通路激活剂 Recilisib 处理敲低 *HYOU1* 的细胞系 48 h 后进行蛋白免疫印迹分析,结果显示,在内参及总 Akt、PI3K 蛋白水平一致情况下,与敲低 *HYOU1* 组相比,通路激活剂 Recilisib 刺激后 p-PI3K、p-Akt 蛋白水平均表达增多 ( $t_{\text{BXPC-3}} = 8.66$   $P = 0.0048$ ;  $t_{\text{Panc-1}} = 9.32$   $P = 0.038$ ) (图4C、D)。使用该通路激活剂 Recilisib 处理后重复细胞表型实验,结果显示,与敲低 *HYOU1* 组相比,使用 Recilisib

的肿瘤细胞的增殖数量、形成集落数量增多 (CCK-8:  $F_{\text{BXPC-3}} = 4.812$   $P = 0.0013$ ;  $F_{\text{Panc-1}} = 5.806$   $P = 0.0004$ ; 平板克隆:  $F_{\text{BXPC-3}} = 39.84$   $P = 0.0003$ ;  $F_{\text{Panc-1}} = 9.504$   $P = 0.0007$ ) (图4E~G)。以上结果提示 *HYOU1* 通过激活 PI3K/Akt 通路促进胰腺癌细胞增殖。

### 3 讨论

由于胰腺癌起病隐匿且无特异性症状,90% 的胰腺癌患者初诊即为晚期阶段、全身转移率高达 50%。近年来新的治疗手段不断出现,如免疫抑制、分子靶向等,但这些临床治疗手段仍不能为患者提供很好的预后。因此对胰腺癌的发病机制进行探索,发现早期诊断或治疗的靶点,为胰腺癌治疗提供新思路非常必要。

*HYOU1* 基因通常表达的一种典型的内质网伴侣蛋白,它可以通过与 GRP78 蛋白协同作用,从而实现 ADP-ATP 交换功能<sup>[10]</sup>。*HYOU1* 还可以增强多种肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭与抗凋亡能力,提高肿

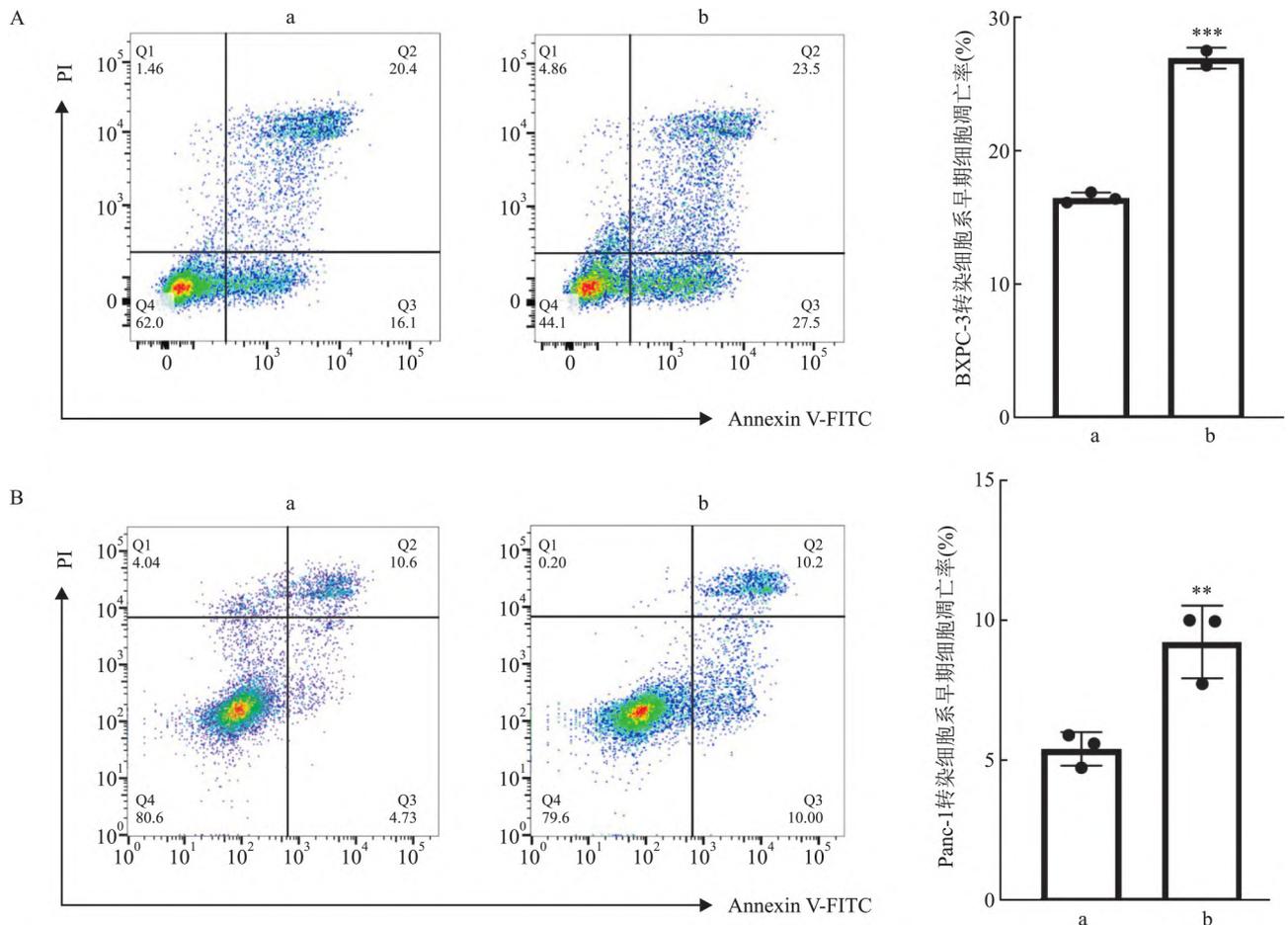


图3 流式细胞术检测 BXPC-3、Panc-1 转染细胞系中细胞早期凋亡情况  
A: BXPC-3; B: Panc-1; a: 对照组; b: KD *HYOU1* 组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

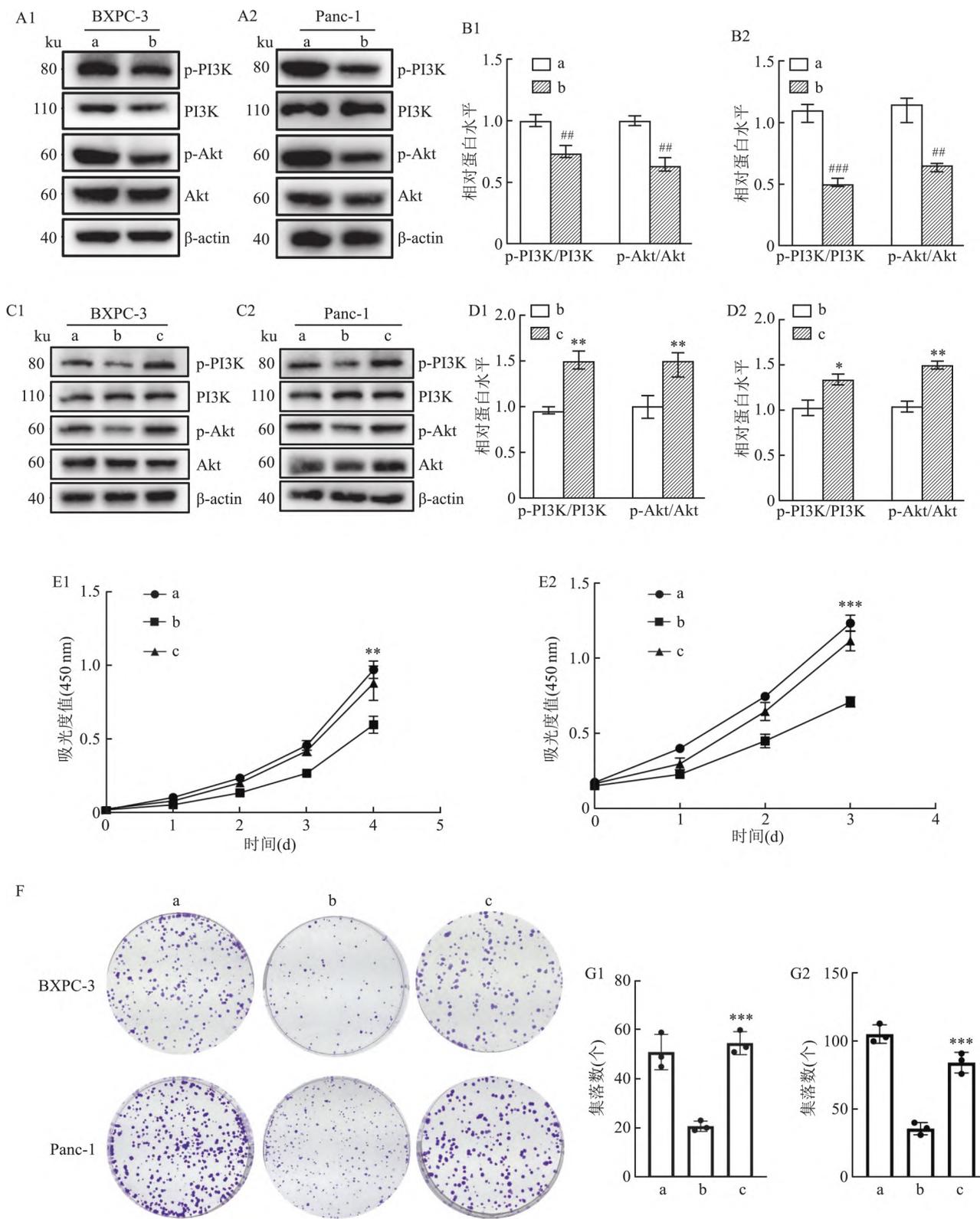


图4 *HYOU1* 通过激活 PI3K/Akt 信号通路影响胰腺癌细胞增殖

A ~ D: Western blot 检测 BXPC-3、Panc-1 转染细胞系各组使用通路激活剂前、后 PI3K/Akt 信号通路蛋白活性及其统计图; E: CCK-8 实验检测各组细胞增殖活力; F、G: 平板克隆实验检测各组细胞形成集落数目图片及统计图; 1: BXPC-3; 2: Panc-1; a: 对照组; b: 敲低(KD *HYOU1*) 组; c: 敲低 + 通路激活剂 Recilisib(KD *HYOU1* + Recilisib) 组; 与对照组比较:  $###P < 0.01$ ,  $####P < 0.001$ ; 与 KD *HYOU1* 组比较:  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$

瘤的化疗耐药性,总的来说它与肿瘤之间存在密不可分的关系。然而,也有研究<sup>[11]</sup>表明 *HYOU1* 在 CD8<sup>+</sup>T 细胞支持下可以发挥抗肿瘤作用,提示它也可成为新疫苗中产生治疗性抗肿瘤反应的有效靶点。鉴于这些相对矛盾的数据,*HYOU1* 的功能仍然存在争议,值得进一步研究。

本研究中,*HYOU1* 在胰腺癌中表达上调,对 GEO 公共数据库中数据集(GSE12417)分析得出 *HYOU1* 高表达与胰腺癌患者的不良预后正相关。细胞分化、增殖、凋亡异常、转移性、浸润性等,是恶性肿瘤的重要生物学特性。因此,对胰腺癌细胞系做敲除 *HYOU1* 处理、进行一系列体外实验检测后,发现敲低 *HYOU1* 显著抑制胰腺癌细胞的存活与增殖能力、迁移能力以及抗凋亡能力。PI3K/Akt 通路是肿瘤进展过程中最常见的异常激活通路,主要负责调控肿瘤细胞生长、远处转移等。通过 Western blot 发现敲低 *HYOU1* 时 PI3K/Akt 信号通路被抑制;对敲低 *HYOU1* 的细胞系使用 PI3K/Akt 通路激活剂 Recilisib 后重复细胞表型实验,*HYOU1* 低表达对细胞存活及增殖能力的抑制被逆转,提示 *HYOU1* 通过促进 PI3K/Akt 信号通路激活进而促进胰腺癌发生发展。但是其通过 PI3K/Akt 通路发挥作用的详细机制尚不明确,这也是本篇研究的局限性所在。

### 参考文献

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394–424.

[2] Chen X, Yi B, Liu Z, et al. Global, regional and national burden of pancreatic cancer, 1990 to 2017: results from the global burden of disease study 2017 [J]. *Pancreatol* 2020, 20(3): 462–9.

[3] Albakova Z, Armeev G A, Kanevskiy L M, et al. HSP70 multifunctionality in cancer [J]. *Cells*, 2020, 9(3): 587.

[4] Wang J M, Jiang J Y, Zhang D L, et al. *HYOU1* facilitates proliferation, invasion and glycolysis of papillary thyroid cancer via stabilizing LDHB mRNA [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(10): 4814–25.

[5] Li X, Zhang N X, Ye H Y, et al. *HYOU1* promotes cell growth and metastasis via activating PI3K/AKT signaling in epithelial ovarian cancer and predicts poor prognosis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(10): 4126–35.

[6] Lee M, Song Y, Choi I, et al. Expression of *HYOU1* via reciprocal crosstalk between NSCLC cells and HUVECs control cancer progression and chemoresistance in tumor spheroids [J]. *Mol Cells*, 2021, 44(1): 50–62.

[7] Hao A, Wang Y, Zhang X, et al. Long non-coding antisense RNA *HYOU1*-AS is essential to human breast cancer development through competitive binding hnRNPA1 to promote *HYOU1* expression [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2021, 1868(4): 118951.

[8] Wang W, Jiang X, Xia F, et al. *HYOU1* promotes cell proliferation, migration, and invasion via the PI3K/AKT/FOXO1 feedback loop in bladder cancer [J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(1): 453–64.

[9] Lawrence M S, Stojanov P, Mermel C H, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types [J]. *Nature*, 2014, 505(7484): 495–501.

[10] Andreasson C, Rampelt H, Fiaux J, et al. The endoplasmic reticulum GRP170 acts as a nucleotide exchange factor of Hsp70 via a mechanism similar to that of the cytosolic HSP110 [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(16): 12445–53.

[11] Wang H, Pezeshki A M, Yu X, et al. The endoplasmic reticulum chaperone GRP170: from immunobiology to cancer therapeutics [J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 377.

## The role and regulation mechanism of *HYOU1* in the pathogenesis and development of pancreatic cancer

Ding Jialu<sup>1</sup>, Sun Beicheng<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Hepatobiliary Surgery, Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210008; <sup>2</sup>Dept of Hepatobiliary, Pancreatic and Transplantation Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the mechanism by which human hypoxia up-regulation 1 (*HYOU1*) regulates pancreatic cancer development. **Methods** Bioinformatic and immunohistochemical staining analyses of *HYOU1* expression level in pancreatic tumor tissues, normal and paracancerous tissues and its correlation with patients' survival. Quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blot were used to clarify the expression level of *HYOU1* in a number of human pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines and a normal human pancreatic ductal cell line. Two cell lines with the highest expression levels of *HYOU1*, BXPC-3 and Panc-1, were selected to knock out *HYOU1* by CRISPR-Cas9, and then cell survival, proliferation and migration of these cells were examined by cell counting kit-8

网络出版时间: 2024-06-06 16:41:52 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240717.1520.005>

## TBC1D5 通过 JAK/STAT 通路对肝细胞癌进展的影响

韦豪伟<sup>1,2</sup> 陶学文<sup>2</sup> 余德才<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨 TBC1 结构域家庭成员 5 (TBC1D5) 在肝细胞癌(HCC) 进展中的作用。方法 利用蛋白质印迹实验(WB)、免疫组化(IHC) 和实时荧光定量 PCR(qPCR) 分析 TBC1D5 在 HCC 肿瘤组织与癌旁组织间的表达量差异, 构建相应的 TBC1D5 稳转肝癌细胞株; 细胞计数试剂盒 8、平板克隆实验和 EdU 实验检测细胞增殖能力变化; 划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力, 流式检测细胞周期变化和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HCC 细胞凋亡, 最后通过 WB 检测敲低和过表达 TBC1D5 后对 JAK/STAT 通路的影响。结果 WB、IHC 和 qPCR 结果提示, HCC 组织中 TBC1D5 在蛋白、mRNA 水平表达量高于其对应癌旁组织 ( $P < 0.0001$ ,  $P < 0.01$ )。与对照组比较, 敲低 TBC1D5 后 HCC 细胞增殖水平降低 ( $P < 0.05$ )、平板克隆集落数形成减少 ( $P < 0.001$ )、EdU 阳性细胞比例下降 ( $P < 0.001$ )。划痕实验与 Transwell 实验结果显示, 敲低 TBC1D5 后 HCC 细胞的迁移和侵袭能力相比于对照组降低 ( $P < 0.01$ )。敲低 TBC1D5 后 HCC 细

胞相比于对照组, 细胞周期减慢、抗凋亡能力降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与对照组相比, 敲低 TBC1D5 使 JAK 与 STAT 蛋白磷酸化水平下降 ( $P < 0.01$ ) 并抑制 JAK/STAT 通路。结论 TBC1D5 在 HCC 中高表达, TBC1D5 敲低后, HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力、细胞周期速率以及抗凋亡能力均降低, 并且可能通过 JAK/STAT 通路影响 HCC 进展。

**关键词** 肝细胞癌; TBC1D5; 增殖; 侵袭; JAK/STAT 通路  
中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)08-1361-09  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.011

原发性肝癌是全球范围内最常见的肿瘤之一, 数据显示, 其在癌症诊断排名中处于第六, 是世界癌症的第三大死亡原因<sup>[1]</sup>, 其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC) 约占上述病例的 85%<sup>[1]</sup>。我国作为肝癌高发国家, 新发病例数量仍在逐年增加<sup>[2]</sup>。目前针对 HCC 的治疗方式主要包括手术切除、肝移植、肿瘤消融、经动脉化疗栓塞、放疗和免疫治疗等<sup>[3]</sup>。

Tre2-Bub2-Cdc16 (TBC) 结构域是在真核生物中普遍存在的由 200 个氨基酸残基组成的保守性蛋白质结构域。TBC1 结构域家族成员 5 (TBC1 domain family 5, TBC1D5) 作为其中一员, 介导靶分子从内体到高尔基体的反向转运。TBC1D5 以多种方

2024-05-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 82372834)

作者单位: <sup>1</sup> 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆与肝移植外科, 南京 210008<sup>2</sup> 安徽医科大学第一附属医院肝胆胰及移植外科, 合肥 230022

作者简介: 韦豪伟, 男, 硕士研究生;

余德才, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yudecai@nju.edu.cn

(CCK-8), colony formation assay and wound healing experiment separately, as well as apoptosis was detected by flow cytometry. Subsequently, the protein levels of the PI3K/Akt signaling including PI3K, p-PI3K, Akt, and p-Akt were detected by Western blot in parental and *HYOU1*-ablated BXPC-3 and Panc-1 cells. Cell proliferation was also examined in *HYOU1*-ablated cells after treatment of recilisib, an activator of the PI3K/Akt pathway. **Results** The expression of *HYOU1* in pancreatic tumor tissues was significantly higher than that in normal tissues, and the patients with high expression of *HYOU1* had a much shorter survival compared to the patients with low *HYOU1* ( $P < 0.01$ ). Immunohistochemical staining of pancreatic cancer specimens showed that the expression of *HYOU1* was higher in tumor tissues than in paracancerous tissues ( $P < 0.01$ ). The mRNA and protein levels of *HYOU1* were higher in all pancreatic cancer cell lines compared to the human normal pancreatic ductal cell ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ). *HYOU1* ablation inhibited BXPC-3 and Panc-1 cells survival, proliferation and migration, and promoted early cell apoptosis. In addition, loss of *HYOU1* decreased PI3K/Akt signaling activity, whereas the PI3K/Akt activator Recilisib reversed the effects of *HYOU1* ablation on cell survival and proliferation. **Conclusion** *HYOU1* promotes pancreatic cancer progression by activating the PI3K/Akt signaling pathway.

**Key words** *HYOU1*; pancreatic cancer; PI3K/Akt signaling pathway