

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^{1,2} 陶学文² 余德才¹

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 H₂O₂ 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^[1], 其中肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 约占上述病例的 85%^[1]。我国作为肝癌高发国家, 新发病例数量仍在逐年增加^[2]。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^[3]。

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: ¹ 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆与肝移植外科, 南京 210008² 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 *HYOUI*-ablated BXPC-3 and Panc-1 cells. Cell proliferation was also examined in *HYOUI*-ablated cells after treatment of recilisib, an activator of the PI3K/Akt pathway. **Results** The expression of *HYOUI* in pancreatic tumor tissues was significantly higher than that in normal tissues, and the patients with high expression of *HYOUI* had a much shorter survival compared to the patients with low *HYOUI* ($P < 0.01$). Immunohistochemical staining of pancreatic cancer specimens showed that the expression of *HYOUI* was higher in tumor tissues than in paracancerous tissues ($P < 0.01$). The mRNA and protein levels of *HYOUI* were higher in all pancreatic cancer cell lines compared to the human normal pancreatic ductal cell ($P < 0.001$, $P < 0.01$). *HYOUI* ablation inhibited BXPC-3 and Panc-1 cells survival, proliferation and migration, and promoted early cell apoptosis. In addition, loss of *HYOUI* decreased PI3K/Akt signaling activity, whereas the PI3K/Akt activator Recilisib reversed the effects of *HYOUI* ablation on cell survival and proliferation. **Conclusion** *HYOUI* promotes pancreatic cancer progression by activating the PI3K/Akt signaling pathway.

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

式参与细胞自噬、线粒体自噬^[4],协调控制葡萄糖转运体(GLUT) 功能及葡萄糖摄取^[5]等。此外, *TBC1D5* 在不同来源的恶性肿瘤中所发挥的作用也不相同。在肾透明细胞癌中, *TBC1D5* 作为肿瘤抑制因子抑制肿瘤进展和脂质积累^[6]; 在胶质母细胞瘤中, *TBC1D5* 可以抑制 EGFR 蛋白的降解从而促进肿瘤进展^[7]; 在结直肠癌中, *TBC1D5* 可以通过 GLUT1 的降解抑制肿瘤生长^[8]。然而 *TBC1D5* 在 HCC 进展中的作用尚未有明确报道, 该文探究 *TBC1D5* 对 HCC 进展的影响, 为寻找新的治疗靶点提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样本收集 随机选取南京大学医学院附属鼓楼医院 2021 年 9 月—2023 年 9 月收治 HCC 患者中的 60 例肝癌组织和癌旁组织进行相关实验检测, 取材要求满足癌旁组织距离肝癌组织 2 cm 以上。所有手术切除的组织样本均立即冷冻并保存在液氮或放入组织固定液中, 直至进行实验。所有患者均提供了参与本研究的书面知情同意。所有实验程序均通过南京鼓楼医院伦理委员会的批准(批准号: 2021-208-01)。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清、DMEM 培养基、0. 25% 胰蛋白酶购自江苏维森特生物技术有限公司; 蛋白质印迹实验(Western blot, WB) 及 IP 裂解液、助病毒感染剂聚凝胺 Polybrene、EdU-594 细胞增殖检测试剂盒购自上海碧云天生物公司; 免疫组化和 DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司; 细胞转染试剂 Lipo2000、HiScript III RT SuperMix 逆转录试剂盒、SYBR Green 试剂、AnniexinV-APC/PI 凋亡检测试剂盒细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司; RNA 提取试剂盒购自(美国 Omega 公司); 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、细胞周期检测试剂盒(美国 MCE 公司); PVDF 膜(美国 Millipore 公司); 细胞培养耗材(广州 BIOFIL 公司)。目标蛋白一抗: JAK2(YT2426), p-JAK2(YP0306), p-JAK1(YP0154) 购自美国 Immunoway 公司, *TBC1D5* (17087-4-AP), JAK1 (66466-4-Ig), STAT3 (9193T), p-STAT3 (9145T) 购自美国 CST 公司, STAT5 (13179-4-AP), p-STAT5 (28951-4-AP), β -actin(66009-4-Ig) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 主要细胞系与培养 人肝癌细胞系 MH-CC97H、Hep3B、人胚肾细胞系 HEK293T 均购买于中国科学院细胞库, 以上细胞系均在含有 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 培养基中培养。培养条件为 37 °C、5% CO₂。

1.2.2 细胞转染 利用 Lipo2000 在 HEK293T 细胞包装过表达及其对照、敲低及其对照的慢病毒, 利用含慢病毒培养基感染 MHCC97H 和 Hep3B 细胞。shRNA 序列信息见表 1。

表 1 shRNA 序列表

名称	引物序列(5'-3')
ShNC	CTGTCACCACAGTAGCTTGG
Sh <i>TBC1D5</i> #1	GCTGATGAAATCAGAAAGCAT
Sh <i>TBC1D5</i> #2	CATGTGCAAATACTGTGCAAA
Sh <i>TBC1D5</i> #3	GAGAACGAAACAGATCACCATT

1.2.3 RNA 提取及实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR) 利用组织研磨仪打磨组织成悬液, 利用 RNA 提取试剂盒提取组织总 RNA, 根据说明书利用逆转录和荧光定量试剂盒配置相应体系并于 QuantStudio 实时荧光定量 PCR 系统中检测, 所用引物见表 2。

表 2 qPCR 基因引物序列表

基因名称	引物序列(5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: ACTTTGGTATCGTGGAAGGACTCAT R: GTTTTCTAGACGGCAGGTCAGG
<i>TBC1D5</i>	F: GCTAGACCACAAGATTTAGC R: CGCACCCACCTTAACCCATA

1.2.4 蛋白提取 用含有蛋白酶及磷酸酶抑制剂的裂解液于 4 °C 裂解细胞或组织 30 min, 以 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min 收集上清液, BCA 测定蛋白浓度, 加入适量蛋白上样缓冲液, 95 °C 金属浴加热变性, 保存于 -20 °C 备后续实验。

1.2.5 WB 通过 SDS-PAGE 电泳将蛋白样品分离后湿转法转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶常温 2 h 封闭后用目标蛋白抗体 4 °C 孵育过夜。TBST 溶液清洗后用对应 HRP 标记二抗常温 2 h 孵育, 再次清洗后行 ECL 显影。

1.2.6 免疫组化 将样本石蜡切片先置于 60 °C 烘片 1~2 h, 然后在二甲苯和不同浓度乙醇中依次浸泡并脱蜡水化, 枸橼酸钠修复液高温蒸煮 15 min 修复抗原。依照说明书常温下阻断内源性过氧化物酶并封闭, 目标抗体 1 : 200 稀释后覆于切片组织并 4

℃ 孵育过夜。第 2 天滴加二抗并进行 DAB 显色。

1.2.7 细胞增殖检测实验 利用 CCK-8、平板克隆实验和 EdU-594 细胞增殖检测试剂盒检测细胞的增殖能力。对于 CCK-8 细胞检测实验,计数每孔 2 000 个细胞并种植到 96 孔板中,间隔固定时间取出孔板更换含有 10% CCK-8 溶液的新培养基。继续孵育 2 h 后过酶标仪(型号:TECAN Spark 购自上海 Tanon 公司)在 450 nm 处测量吸光度并分析。对于平板克隆实验,为了检测 HCC 细胞克隆形成能力,将 1 000 个细胞接种到 6 孔板中,生长 2 周,甲醛溶液固定 30 min,结晶紫染液染色 1 h,流水冲洗干净后拍照。对于 EdU 实验,将细胞以合适密度接种至 12 孔板中,按照说明书进行处理并用倒置荧光显微镜(购自德国 Leica 公司)拍摄。

1.2.8 划痕实验和 Transwell 实验 将合适数量的细胞接种到 6 孔板中,待其长满后用 200 μ l 吸头在孔中划出一条直线,更换低血清(1%)培养基,并在 0、12、24、48 h 拍照记录划痕图片。使用 Transwell 小室进行细胞迁移和侵袭检测,用无血清培养基将细胞以 2×10^5 个/ml 的浓度重悬,取 200 μ l 加入上室中,并用 10% 血清培养基 500 μ l 填充下室,细胞培养箱中孵育一定时间后,将小室取出用细胞固定液固定 30 min 后结晶紫染液染色 1 h,在显微镜下观察并计数。侵袭实验时则在小室膜上提前匀布基质胶并风干,后续步骤同迁移实验。

1.2.9 流式分析细胞凋亡及周期 将用于检测细胞凋亡或周期的细胞以合适密度接种到 6 孔板中并在完全培养基中培养 24 h,适量 0.3% H_2O_2 溶液诱导凋亡后用无 EDTA 胰酶消化细胞用于凋亡检测或直接消化细胞用于周期检测。根据相应说明书操作染色,最后在流式细胞仪(型号:BD FACSAria III 美国 BD bioscience 公司)上进行流式检测。

1.2.10 通路富集分析 利用在线分析工具 LinkedOmics (<https://www.linkedomics.org/admin.php>) 对 TCGA 数据库中肝细胞癌测序数据集($n = 367$)进行了基因富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)并进行 1 000 次置换检验计算统计量,错误发现率 $P < 0.05$ 的通路为显著富集通路,并通过 WB 进行验证。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 9.0 对实验数据进行统计学分析和数据处理。实验均重复 3 次,实验结果均以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较用非配对双侧 t 检验,配对数据用配对 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TBC1D5 在 HCC 组织中的表达水平 通过 WB 和免疫组化染色检测 60 对样本 HCC 及相应癌旁组织中的 TBC1D5 蛋白表达量,结果显示 HCC 组织中的 TBC1D5 蛋白表达量较癌旁组织升高(图 1A~C) ($t = 6.84, P < 0.0001$); qPCR(图 1D) 检测显示 HCC 组织中 TBC1D5 在 mRNA 水平较癌旁组织也升高($t = 3.06, P < 0.01$)。

2.2 敲低 TBC1D5 对 HCC 细胞体外增殖能力的影响 利用 ShRNA 质粒包装慢病毒感染 MHCC97H 和 Hep3B 细胞建立稳定敲低 TBC1D5 的细胞系并检测敲低效率(图 2A) 选取效率较高的 Sh#1 与 Sh#2 用于后续实验。CCK-8 与平板克隆实验结果显示,与 NC 组比较,Sh#1 与 Sh#2 组吸光度值降低($t = 7.78、7.34、26.34、27.15$, 均 $P < 0.05$) 且其集落形成数量减少($t = 21.78、14.40、9.18、9.51$, 均 $P < 0.001$) 提示敲低 TBC1D5 后 HCC 细胞的增殖能力(图 2B) 与集落形成能力(图 2C) 相比于 NC 组明显减弱。EdU 荧光检测结果显示, TBC1D5 敲低后,增殖细胞的比例相比于 NC 组下降(图 2D) ($t = 9.59、11.06、6.94、13.37$, 均 $P < 0.001$) 提示敲低 TBC1D5 在抑制 HCC 细胞增殖方面有着重要作用。

2.3 敲低 TBC1D5 对 HCC 细胞迁移及侵袭能力的影响 利用敲低 TBC1D5 的 MHCC97H 和 Hep3B 细胞进行划痕实验和 Transwell 实验探究细胞迁移和侵袭能力的变化。划痕实验结果显示,经过一定时间后与对照组相比,敲低组 HCC 细胞间的划痕面积较大(图 3A、B) ($t = 4.97、5.84、5.08、6.20$, 均 $P < 0.01$); Transwell 实验结果显示,在一定时间内敲低组穿过 Transwell 小室及基质胶的 HCC 细胞数量相比于对照组也减少(图 3C、D) ($t = 10.21、5.18、6.92、8.92$, 均 $P < 0.01$)。上述结果表明,敲低 TBC1D5 可以抑制 HCC 细胞的迁移和侵袭能力。

2.4 敲低 TBC1D5 对 HCC 细胞的抗凋亡能力与细胞周期的影响 在相同浓度 H_2O_2 条件下对敲低 TBC1D5 的 HCC 细胞及对照组进行刺激并收取细胞进行流式检测,结果显示,敲低 TBC1D5 后,诱导所致凋亡细胞比例较对照组升高(图 4A、B) ($t = 39.49、72.34、32.04、32.37$, 均 $P < 0.001$)。利用流式对正常传代后培养 24 h 的细胞进行细胞周期检测,结果显示,敲低 TBC1D5 后,与对照组相比,处于 G_0/G_1 期的 HCC 细胞比例升高($t = 5.31、7.18、8.09、8.65$, 均 $P < 0.01$) (图 4C、D)。上述结果表明

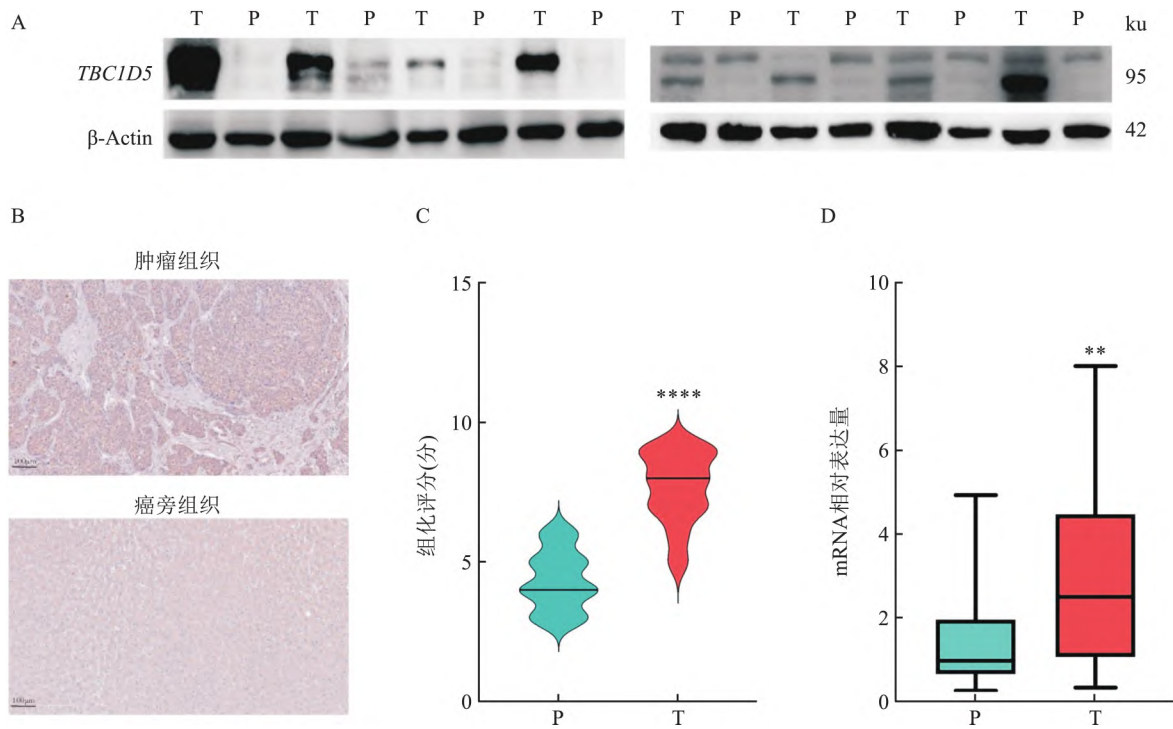


图1 *TBC1D5* 在 HCC 组织中的表达水平

A: WB 检测临床样本中 *TBC1D5* 蛋白表达水平; T: 肿瘤组织; P: 癌旁组织; B: 临床样本免疫组化扫描图片 $\times 10$; C: 免疫组化评分比较; D: qPCR 检测肿瘤组织中 *TBC1D5* 在 mRNA 层面表达水平; 与癌旁组织比较: ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

TBC1D5 表达下降后, HCC 细胞的抗凋亡能力明显减弱, 且细胞周期受到阻滞。

2.5 *TBC1D5* 表达变化对 JAK/STAT 通路的影响

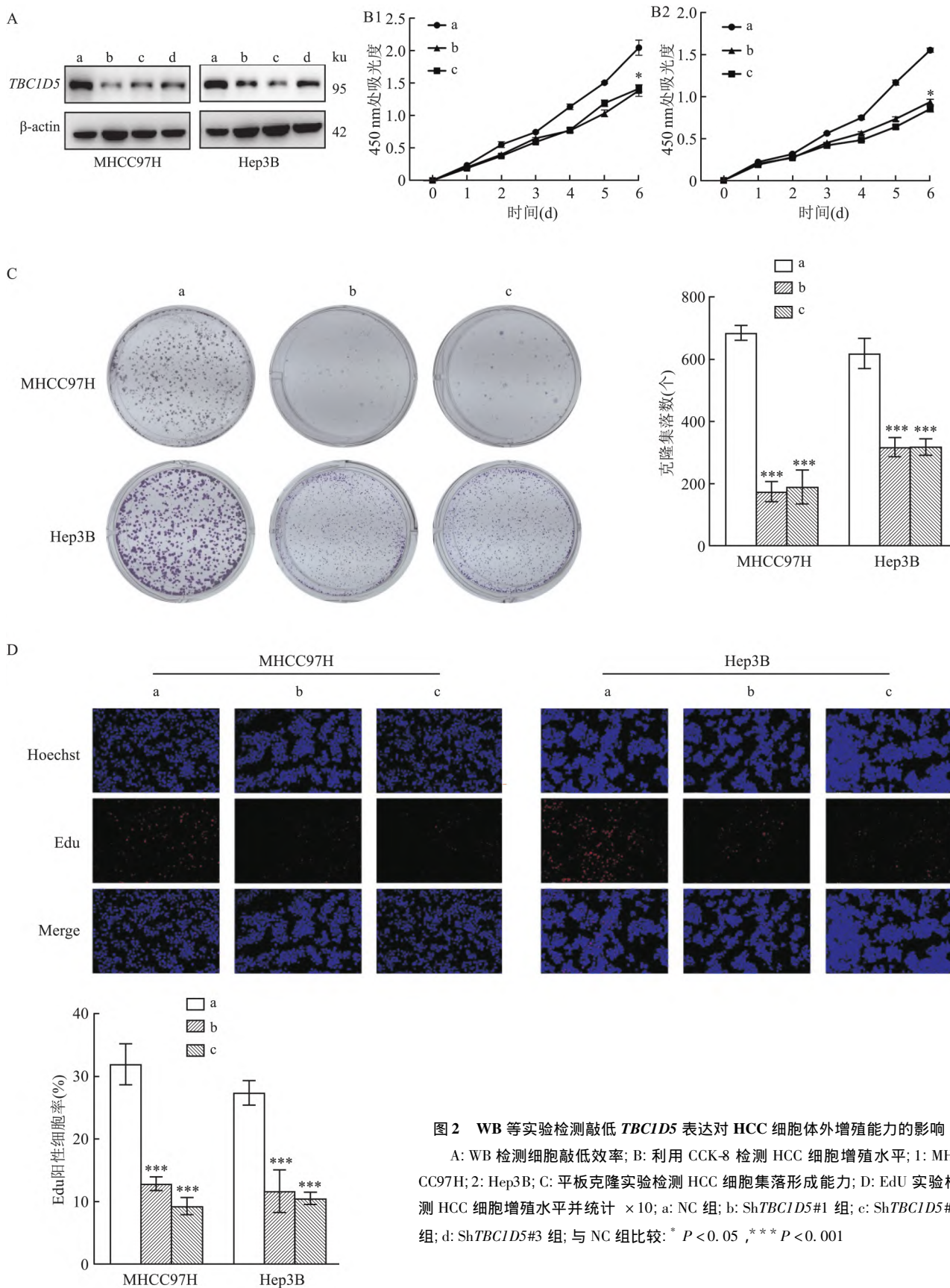
GSEA 通路富集结果显示, *TBC1D5* 与 JAK/STAT 信号通路具有显著相关性 ($P < 0.0001$) (图 5A)。利用 WB 检测 JAK/STAT 通路相关蛋白, 结果显示, *TBC1D5* 敲低后 JAK1/2 蛋白和 STAT3/5 蛋白的磷酸化水平相比于对照组降低, 而过表达 *TBC1D5* 后, JAK1/2 和 STAT3/5 蛋白的磷酸化水平相比于对照组升高 (图 5B、C) ($t = 5.31、13.22、51.67、33.24、35.11、5.89、33.51、11.00$, 均 $P < 0.05$)。提示 *TBC1D5* 可以激活 JAK/STAT 通路, 促进 HCC 进展。

3 讨论

TBC 蛋白是一类具有 TBC 结构域的家庭蛋白, 目前在人类细胞中发现的 TBC 结构域蛋白已经超过 40 种, 多数 TBC 结构域蛋白作为 Rab 蛋白负调控分子促进其水解和失活。此外, TBC 结构域蛋白也参与人体的众多生物学过程, 包括大胞饮、免疫突触的形成、葡萄糖转运蛋白的调节和细胞自噬等^[9]。诸多研究^[10-12]表明, TBC 结构域蛋白在各种人类疾病中发挥重要作用, 尤其是与多种肿瘤的

发生发展密切相关, 并且大多作为促癌基因参与调控细胞的恶性转化、增殖或转移。*TBC1D5* 作为 TBC 结构域蛋白的一员, 在肾透明细胞癌、胶质母细胞瘤以及结直肠癌^[6-8]等多种恶性肿瘤中存在异常表达, 对肿瘤细胞功能发挥不同作用。本研究首先利用 WB、免疫组化和 qPCR 验证临床样本 HCC 组织中 *TBC1D5* 表达量在蛋白水平和 mRNA 水平均明显升高, 因此推断 *TBC1D5* 在肝细胞癌中是一个高表达的促癌基因。通过构建 *TBC1D5* 敲低的 MH-CC97H 和 Hep3B 细胞和对照组进行功能实验, CCK-8、平板克隆、EdU 实验和 Transwell 实验等结果显示, 敲低 *TBC1D5* 后, HCC 细胞的增殖能力和迁移及侵袭能力明显减弱, 证明了 *TBC1D5* 对以上重要的肿瘤生物学行为具有重要的意义。

以往研究^[13]表明 JAK/STAT 通路在许多细胞功能中发挥作用, 包括细胞增殖、干细胞维持和分化以及免疫炎症反应的调节。此外在调节肝脏再生和糖异生方面^[14]也发挥着一定作用。据报道, JAK/STAT 通路关键蛋白 STAT3 在 60% 的 HCC 病例中具有组成活性^[15], 并且异常激活 JAK/STAT 通路是 HCC 发生发展中的重要分子事件。本研究结果表明, *TBC1D5* 表达可以通过影响 JAK 蛋白的磷酸化,



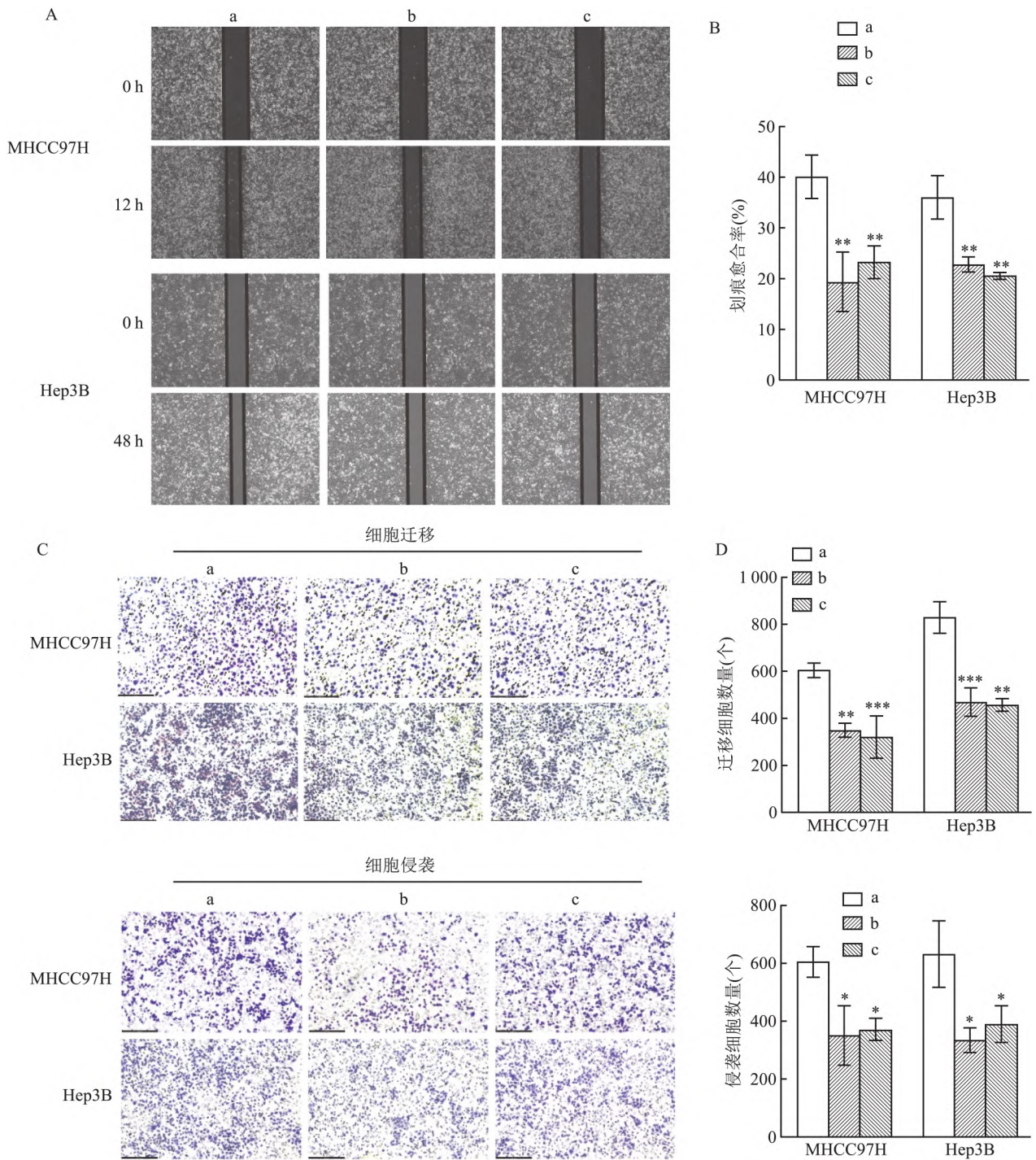


图3 敲低 *TBC1D5* 对 HCC 细胞迁移及侵袭能力的影响

A: 不同时间点拍摄的划痕图片 $\times 4$; B: 划痕实验细胞间面积统计; C: Transwell 实验验证 HCC 细胞的迁移和侵袭能力变化 $\times 10$; D: Transwell 实验结果统计; a: NC 组; b: Sh*TBC1D5*#1 组; c: Sh*TBC1D5*#2 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

进而促进 STAT 蛋白的磷酸化和二聚化,从而改变 HCC 细胞的生物学行为。

然而该研究也具有一定局限性。首先,该研究以体外实验为主,不能完全反映在体内条件下 *TBC1D5* 所发挥的生物学功能。此外,该研究虽然证明了 *TBC1D5* 影响 JAK/STAT 通路的异常激活,

但其具体发挥作用的分子机制尚未明确。

综上所述,该研究证明了 *TBC1D5* 可能通过 JAK/STAT 通路的异常激活在 HCC 细胞增殖、侵袭和周期方面发挥促癌作用。因此,本研究为研究 HCC 发病机制和开发肝癌治疗靶点提供了新的角度,对肝癌治疗具有潜在价值。

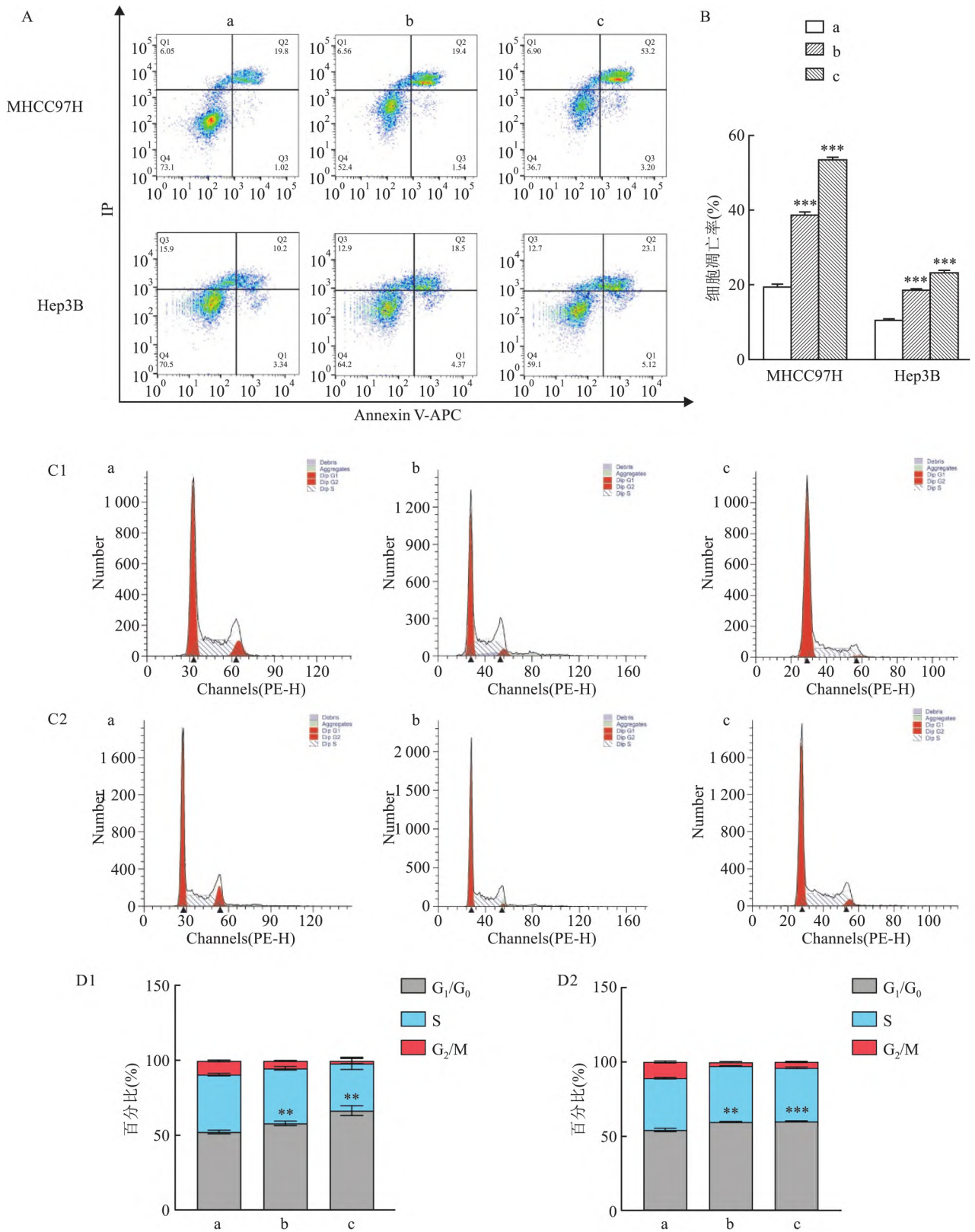


图4 敲低 *TBCID5* 对 HCC 细胞的抗凋亡能力与细胞周期的影响

A: 流式检测诱导处理后 HCC 细胞的凋亡水平; B: 细胞凋亡率统计; C: 流式检测 HCC 细胞的细胞周期; D: 细胞周期分布结果统计; 1: MH-CC97H; 2: Hep3B; a: NC 组; b: Sh*TBCID5*#1 组; c: Sh*TBCID5*#2 组; 与 NC 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

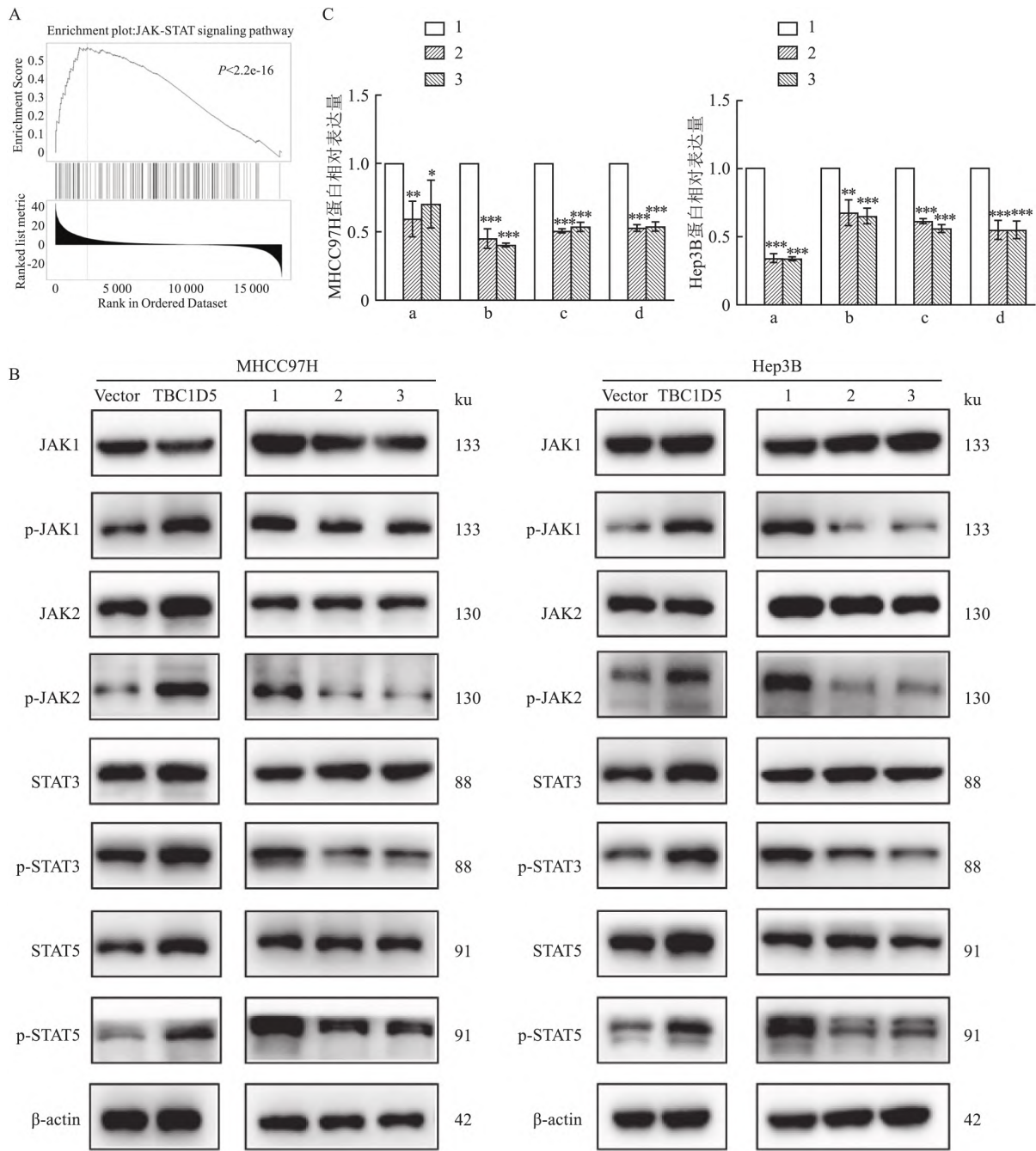


图5 *TBC1D5* 表达变化对 JAK/STAT 通路的影响

A: 对 *TBC1D5* 基因进行 GSEA 通路富集分析; B、C: WB 检测 JAK/STAT 相关蛋白表达变化灰带图、统计直方图; a: pJAK1/JAK1; b: pJAK2/JAK2; c: pSTAT3/STAT3; d: pSTAT5/STAT5; 1: NC 组; 2: Sh*TBC1D5*#1 组; 3: Sh*TBC1D5*#2 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

参考文献

[1] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-14.

[2] Wu J, Yang S, Xu K, et al. Patterns and trends of liver cancer incidence rates in eastern and southeastern asian countries (1983-2007) and predictions to 2030 [J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(6): 1719-28 e5.

[3] Brown Z J, Tsilimigras D I, Ruff S M, et al. Management of hepatocellular carcinoma: a review [J]. *JAMA Surg*, 2023, 158(4): 410-20.

[4] Carosi J M, Hein L K, Sandow J J, et al. Autophagy captures the retromer-*TBC1D5* complex to inhibit receptor recycling [J]. *Autophagy*, 2024, 20(4): 863-82.

[5] Roy S, Debnath J. Autophagy enables retromer-dependent plasma membrane translocation of SLC2A1/GLUT1 to enhance glucose up-

- take [J]. *Autophagy*, 2017, 13(11) : 2013 – 4.
- [6] Huang Y, Xiong Z, Wang J, et al. *TBC1D5* reverses the capability of HIF-2 α in tumor progression and lipid metabolism in clear cell renal cell carcinoma by regulating the autophagy [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1) : 212.
- [7] Martija A A, Krauss A, Bachle N, et al. EMP3 sustains oncogenic EGFR/CDK2 signaling by restricting receptor degradation in glioblastoma [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2023, 11(1) : 177.
- [8] Zhou D, Yao Y, Zong L, et al. TBK1 facilitates GLUT1-dependent glucose consumption by suppressing mTORC1 signaling in colorectal cancer progression [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(8) : 3374 – 89.
- [9] Behrends C, Sowa M E, Gygi S P, et al. Network organization of the human autophagy system [J]. *Nature*, 2010, 466(7302) : 68 – 76.
- [10] Wainszelbaum M J, Charron A J, Kong C, et al. The hominoid-specific oncogene *TBC1D3* activates Ras and modulates epidermal growth factor receptor signaling and trafficking [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(19) : 13233 – 42.
- [11] Falace A, Filipello F, La Padula V, et al. *TBC1D24*, an ARF6-interacting protein, is mutated in familial infantile myoclonic epilepsy [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 87(3) : 365 – 70.
- [12] Sato N, Koinuma J, Ito T, et al. Activation of an oncogenic *TBC1D7* (*TBC1* domain family, member 7) protein in pulmonary carcinogenesis [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010, 49(4) : 353 – 67.
- [13] Thomas S J, Snowden J A, Zeidler M P, et al. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours [J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(3) : 365 – 71.
- [14] Svinka J, Mikulits W, Eferl R. STAT3 in hepatocellular carcinoma: new perspectives [J]. *Hepat Oncol*, 2014, 1(1) : 107 – 20.
- [15] He G, Karin M. NF- κ B and STAT3-key players in liver inflammation and cancer [J]. *Cell Res*, 2011, 21(1) : 159 – 68.

Effect of *TBC1D5* on hepatocellular carcinoma progression via JAK/STAT pathway

Wei Haowei^{1, 2}, Tao Xuewen², Yu Decai¹

(¹Dept of Hepatobiliary and Transplantation Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008; ²Dept of Hepatobiliary, Pancreatic and Transplantation Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the role of Tre2-Bub2-Cdc16 1 domain family member5(*TBC1D5*) in the development of hepatocellular carcinoma (HCC) . **Methods** Western blot (WB) , Immunohistochemistry (IHC) and quantitative real-time PCR(qPCR) were used to verify the difference in *TBC1D5* expression in clinical samples. The HCC cell lines MHCC97H and Hep3B were chosen to construct the knockdown model. The effects on cell proliferation were detected by cell proliferation assay , colony formation assay and EdU assay. Wound assay and Transwell assay were used to detect cell migration and invasion. Flow cytometry was used to detect the changes of cell cycle and H₂O₂-induced apoptosis of HCC cells. Finally , the effects of knockdown and overexpression of *TBC1D5* on JAK/STAT pathway were detected by WB. **Results** The results of WB , IHC and qPCR showed that the expression of *TBC1D5* in HCC tissues was higher at the protein level ($P < 0.0001$) and mRNA level ($P < 0.01$) than that in corresponding adjacent tissues. Compared with the control group , the proliferation level of HCC cells with *TBC1D5* knockdown was decreased ($P < 0.05$) , the formation of plate colony number decreased ($P < 0.001$) , and the proportion of EdU-positive cells decreased ($P < 0.001$) . The results of scratch assay and Transwell assay showed that the migration ($P < 0.01$) and invasion ability ($P < 0.01$) of HCC cells after *TBC1D5* knockdown were significantly lower than those in the control group. After *TBC1D5* knockdown , the cell cycle of HCC cells was slowed down ($P < 0.05$) and the ability to resist apoptosis was reduced ($P < 0.01$) than those in the control group. Compare with the control group , knockdown of *TBC1D5* decreased the phosphorylation level of JAK and STAT proteins and inhibit the JAK/STAT pathway. **Conclusion** *TBC1D5* is highly expressed in HCC. After knocking down *TBC1D5* , the proliferation , migration and invasion ability , cell cycle rate and anti-apoptosis ability of HCC cells decreased and may affect HCC progression through the JAK/STAT pathway.

Key words hepatocellular carcinoma; *TBC1D5*; proliferation; invasion; JAK/STAT pathway