

蛋白激酶 C- β 抑制肝癌细胞增殖的作用及机制研究

成子怡¹, 陈蕴梦², 潘敏刚³, 贾雨萌¹, 冉漫¹, 夏杰¹

(1.重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016; 2.重庆市江北区中医院检验科, 重庆 400016; 3.重庆医科大学第一附属医院医学检验科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探究蛋白激酶 C- β (protein kinase C- β , PRKCB/PKC- β) 在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 中的潜在作用, 揭示 HCC 发生发展的可能分子机制。**方法:**整合 TCGA、GEO 数据库的肝癌相关数据, 分析 PRKCB 在 HCC 中的表达水平与临床预后的关联。在 HCC 细胞系中通过过表达及沉默 PRKCB, 结合细胞增殖实验、克隆形成实验, 明确其对 HCC 增殖能力的影响。利用蛋白质印迹实验检测 HCC 临床样本中肿瘤组织与癌旁组织的 PRKCB 表达水平及 PRKCB 影响 HCC 细胞增殖的分子机制。**结果:**PRKCB 在肝癌细胞系中低表达 ($P < 0.05$) 并与患者的预后不良相关 ($P < 0.05$)。过表达 PRKCB 抑制 HCC 的增殖、沉默 PRKCB 则使 HCC 增殖能力增加 ($P < 0.05$)。PRKCB 表达改变导致 ERK、p38、JNK 磷酸化水平随之明显改变, 进而影响 HCC 发生发展。**结论:**PRKCB 可抑制 HCC 的增殖能力, 该作用可能通过调控 ERK1/2、p38、JNK 磷酸化水平相关的 MAPK 信号通路进行信号传递。

【关键词】肝细胞癌; 蛋白激酶 C- β ; 丝裂原活化蛋白激酶

【中图分类号】R735.7

【文献标志码】A

Role and mechanism of protein kinase C- β in inhibiting the proliferation of hepatocellular carcinoma cells

Cheng Ziyi¹, Chen Yunmeng², Pan Mingang³, Jia Yumeng¹, Ran Man¹, Xia Jie¹

(1. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University; 2. Department of Clinical Laboratory, Jiangbei District Hospital of Traditional Chinese Medicine; 3. Department of Medical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the potential role of protein kinase C- β (PRKCB/PKC- β) in hepatocellular carcinoma (HCC) and reveal the possible molecular mechanisms underlying the occurrence and development of HCC. **Methods:** Liver cancer-related data from the TCGA and GEO databases were integrated to analyze the correlation between PRKCB expression and clinical prognosis in HCC. In HCC cell lines, PRKCB was overexpressed or silenced, and its impact on HCC proliferation was assessed using cell proliferation and colony formation assays. Western blotting was used to detect PRKCB expression levels in tumor tissues and adjacent non-tumor tissues from clinical HCC samples, and to investigate the molecular mechanism by which PRKCB affects HCC cell proliferation. **Results:** PRKCB expression was low in HCC cell lines ($P < 0.05$) and its low expression was associated with poor patient prognosis ($P < 0.05$). Overexpression of PRKCB inhibited HCC proliferation, whereas silencing PRKCB increased the proliferative capacity of HCC cells ($P < 0.05$). Altered PRKCB expression led to significant changes in the phosphorylation levels of ERK, p38, and JNK, thereby affecting the occurrence and development of HCC. **Conclusion:** PRKCB can inhibit the proliferative capacity of HCC. This effect may be mediated by regulating the MAPK signaling pathway related to the phosphorylation levels of ERK1/2, p38, and JNK.

【Key words】hepatocellular carcinoma; protein kinase C- β ; MAPK

作者简介: 成子怡, Email: chengziyi1020@163.com,

研究方向: 肝脏疾病。

通信作者: 夏杰, Email: xiajie@cqmu.edu.cn。

基金项目: 重庆市技术创新与应用发展专项企业科技攻关联合行动计划资助项目 (编号: CSTB2025TIAD-qykjggX0305)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20251225.1636.010>

(2025-12-29)

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 作为一种高死亡率的恶性肿瘤, 是导致癌症相关死亡的重要因素之一, 已对国民健康构成严重威胁^[1-3]。目前, 肝癌的相关危险因素大多已被明确, 包括肝炎病毒感染、黄曲霉素暴露、酗酒史、吸烟史及遗传背景等^[4-6]。然而, 正常细胞发生癌变并最终进展为

HCC 的具体致病机制仍有待深入探究^[7]。

蛋白激酶 C- β (protein kinase C- β , PRKCB/PKC- β) 属于磷脂依赖的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族, 该家族包括经典 PKC (classical PKC, cPKC)、新型 PKC (novel PKC, nPKC)、非典型 PKC (atypical PKC, aPKC) 及 PKN 亚家族。作为 cPKC 家族的一员, PRKCB 的表达受基因转录调控, 其激活与代谢产物 (如二酰甘油、胆固醇、磷脂)、高糖环境及氧化应激等因素密切相关^[8-9]。已知 PKC 家族在多种癌症进程中发挥作用, 与既往普遍认为该家族以促癌基因为主的认知不同, PRKCB 展现出抑制或促进肿瘤的双重功能。在多数血液系统肿瘤中, PRKCB 通常具有促进肿瘤进展作用, 并常伴随耐药现象的发生。例如, 在慢性淋巴细胞白血病中其可通过影响相关肿瘤细胞的转化过程推动白血病进展^[10]; 在慢性粒细胞白血病中其可能与酪氨酸激酶抑制剂的耐药性存在关联^[11]。前列腺癌中也有类似报道, 即特异性抑制 PRKCB 可增强前列腺癌细胞对当前抗雄激素治疗的敏感性^[12]。而 PRKCB 的肿瘤抑制作用, 多通过肿瘤临床样本分析得以证实, 如在结肠癌及早期膀胱癌组织中, PRKCB 的表达水平下调, 且与患者预后不良相关^[13-14]。尽管目前关于 PRKCB 在多种肿瘤中的作用已有相关研究报道, 但其在肝癌发生发展中的具体功能与机制尚未见系统研究。

本研究发现, PRKCB 在 HCC 中明显低表达, 且与患者预后不良密切相关。过表达 PRKCB 可抑制肝癌细胞的增殖能力。初步研究表明, PRKCB 发挥抑制 HCC 发生发展的作用, 其可能机制是通过磷酸化 MAPK 信号通路的相关蛋白实现的。上述发现有望为 HCC 的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

本实验使用了 L02、PLC/PRF/5、Hep3B、MHCC97H、MHCCLM3、Huh7 肝癌细胞株。上述细胞株均购自美国菌种保藏中心 (American type culture collection, ATCC) (位于美国马里兰州洛克维尔), 并储存于实验室液氮罐-196 °C 中。实验采用 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (美国 HyClone 公司), 结合 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Natocor 公司) 和 1% 青霉素/链霉素 (美国 HyClone 公司) 作为添加剂。将细胞在温度为 37 °C 的培养箱中培养, 温度为 37 °C, 在加湿环境中培养。本研究得到了重庆医科大学研究伦理委员会的审查批准 (批准号: 2021020); 并取得患者的知情同意。

1.2 PRKCB 在 TCGA 和 GEO 中差异表达的验证

在 The Cancer Genome Atlas (TCGA) 数据库 (<https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>) 下载肝癌 (TCGA-LIHC) 数据集, 并在 Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 数据库中获取 HCC 转录组数据, 随后使用 R 语言分析 PRKCB 在泛癌及肝癌中的表达差异, 在 HCC 样本与癌旁样本的表达差异情况。使用箱线图中蓝色 (Normal, 正常组织) 和红色 (Tumor, 肿瘤组织) 的箱线, 对比不同类型 (如 ACC、BLCA 等) 组织中 PRKCB 基因的表达情况, 展示 PRKCB 在肝癌组织和癌旁组织中的表达差异。

1.3 构建 PRKCB 过表达质粒

为构建 PRKCB 过表达质粒, 将 PRKCB 的编码序列 (CDs) 插入 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-T2A-Puro 质粒的 MCS 结构域, 载体自带 GFP 荧光仅用于转染效率预验证 (转染效率 > 70%)。使用 pCDH 载体质粒、QuickCut™EcoRI (日本 Takara 公司, 货号: 1611)、QuickCut™BamHI (日本 Takara 公司, 货号: 1605)、QuickCut buffer 10× (日本 Takara 公司, 货号: 1611) 制备线性化载体; 根据诺唯赞无缝克隆试剂盒 (南京诺唯赞公司) 设计 EcoR I 和 BamH I 为酶切位点的上下游扩增引物, Primer (5'~3') (pCDH-PRKCB forward: GATTCTAGAGCTAGCGAATTCATGGCTGACCCGGCTGC; pCDH-PRKCB-reverse: TCCTTCGCGCCGCGGATCCTTAGCTCTTGACTTC) (北京擎科生物科技有限公司), 使用 PrimeStar Max Premix (2×) (日本 Takara 公司, 货号: R045Q) 扩增目的插入片段; 使用糖原、乙酸铵、无水乙醇纯化扩增产物, 1% 核酸胶目的插入片段条带位置鉴定; 使用 5× CE II Buffer、Exnase II 试剂 (南京诺唯赞公司, 货号: C112-01)、线性化载体、目的插入片段、RNase ddH₂O 进行重组反应; 使用 DL-Stb13 感受态 (北京擎科生物科技有限公司, 货号: DLC106) 和含氨苄抗生素的 LB 固体培养基进行重组产物转化; 挑取 LB 固体培养基上的单个菌落进行菌落 PCR 鉴定, 检测条带为阳性后, 将剩余菌落打入已加入氨苄抗生素的 LB 液体培养基中, 37 °C 摇菌 12 h, 最终提取重组 pCDH-PRKCB 质粒。

1.4 siRNA 和细胞转染

本研究中使用的 siRNA (上海生工生物), 包括: PRKCB#1 (siRNA-F-CCGGUAUUAUGAUUGGGAGAA, siRNA-R-UUCUCCAAUCAAUUAACCGG); PRKCB#2 (siRNA-F-GACCAACACUGUCUCCAAAUU, siRNA-R-AAUUUGGAGACAGUGUUGGUC); PRKCB#3 (siRNA-F-CCUGUCAGAUCCCUACGUAAA, siRNA-R-UUUACGUAGGGAUCUGACAGG), 使用 Lipo8000 (上海碧云天公司, 货号: C0533) 试剂对 HCCLM3、MHCC97H 细胞系进行 siRNA 转染、对 PLC/PRF/5、Hep3B 细胞使用 pCDH 载体质粒和 pCDH-PRKCB 过表达质粒转染。

1.5 蛋白质印迹实验

使用 RIPA 裂解缓冲液 (江苏 CWBIO 公司, 货号: CW2334S) 从细胞或组织中提取总蛋白, 随后进行电泳、转膜、封闭, 一抗 4 °C 孵育过夜, 使用兔单克隆抗体 PRKCB

(1:2 000, 美国 Abcam 公司, 货号: ab32026)、p44/42 MAPK (ERK1/2) (1:2 000, 货号: 4695)、Phospho-p44/42 MAPK (1:2 000, 货号: 4370)、p38 MAPK (1:2 000, 货号: 9212)、Phospho-p38 MAPK (1:2 000, 货号: 4511) (均购自美国 Cell Signaling Technology 公司)、JNK1/2/3 (1:2 000, 货号: YT2440)、JNK1/2/3(phospho Thr183) (1:2 000, 货号: YP0156) (均购自美国 Immunoway 公司)、鼠单克隆抗体 GAPDH (1:2 000, 北京 ZSGB-BIO 公司, 货号: TA-08) 对目的条带进行孵育。将膜与辣根过氧化物酶结合的二级抗体 (1:10 000, 北京 ZSGB-BIO 公司) 在室温下孵育 2 h。Western blot 测定使用 Bio-Rad 凝胶分析系统 (美国 Hercules 公司) 进行的。使用 Image J 软件 (美国 Bethesda 公司) 对 Western blot 条带进行定量。代表性 Western blot 结果, 实验独立重复 3 次; 柱状图为 3 次重复实验的灰度值定量。

1.6 细胞生长曲线实验

将 Hep3B、PLC/PRF/5、MHCCLM3 及 MHCC97H 4 种细胞均以 1×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板 (每组接种 3 个复孔), 待细胞贴壁 6~8 h 后, 按照 CCK8 试剂与细胞培养液 1:10 的比例配制混合液, 每孔加入 100 μ L。随后使用酶标仪 (美国 BioTek 公司) 在 450 nm 波长下检测第 1 天的吸光度值, 之后每隔 24 h 重复检测 1 次, 连续监测 6 d。最终根据各时间点测得的吸光度值计算对应细胞数量, 并据此绘制细胞生长曲线。

1.7 克隆形成实验

将 PLC/PRF/5、Hep3B、MHCCLM3 及 MHCC97H 细胞以 1×10^3 个/孔的密度接种于 6 孔板 (每组接种 3 个复孔), 培养 15 d。操作步骤如下: 弃去 6 孔板内的培养基, 用 PBS 清洗; 每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛, 室温固定 20 min; 再次用 PBS 清洗后, 每孔加入 1 mL 结晶紫染液 (上海碧云天公司, 货号: Y268091) 染色 15 min; 回收染色液, 经 PBS 清洗后晾干, 最后进行拍照记录。

1.8 EDU 细胞增殖实验

按照 EDU 检测试剂盒 Alexa Flour 555 (上海碧云天公司, 货号: C0075S) 说明配制 $2 \times$ Edu 工作液 (Edu 终浓度为 10 μ mol/L); 向 6 孔板中经处理的细胞每孔加入 1 mL 上述工作液进行 Edu 标记, 于 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 2 h; 标记结束后, 对 6 孔板内的细胞进行固定; 随后使用 Click 反应液进行 Edu 检测, 并采用 Hoechst 33342 对细胞核进行染色; 最后通过倒置荧光显微镜观察并拍摄。使用 Image J 软件统计 Edu 阳性细胞率 (百分比) (Edu 阳性率计算公式 = 经 Edu 掺入试剂标记阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$)。

1.9 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对实验数据进行统计分析和绘图处理, 计量资料的数据来自 3 次独立重复实验的结果, 并使用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示。组间两两比较采用 Student's *t* 检验; 多组间的比较采用单因素方差分析; 生存分析为 Wilcoxon 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PRKCB 在 HCC 组织中表达下调

根据 TCGA 数据库分析 PRKCB 在各类癌症中的表达情况, 并重点分析 PRKCB 在肝癌中的表达。发现相对于正常组织, PRKCB 在大多数肿瘤中表达均为下调, 如膀胱癌 (正常组织: $n=19$, 2.95 ± 0.29 , 肿瘤组织: $n=414$, 1.00 ± 0.08 , $P<0.001$)、胶质母细胞瘤 (正常组织: $n=5$, 4.57 ± 0.09 , 肿瘤组织: $n=169$, 2.28 ± 0.16 , $P<0.001$)、肺腺癌 (正常组织: $n=59$, 2.90 ± 0.06 , 肿瘤组织: $n=535$, 1.88 ± 0.07 , $P<0.001$)、子宫内膜样腺癌 (正常组织: $n=35$, 1.27 ± 0.13 , 肿瘤组织: $n=552$, 0.61 ± 0.07 , $P<0.001$) 等。而仅在少数肿瘤中, 如头颈部鳞状细胞癌 (正常组织: $n=44$, 0.87 ± 0.16 , 肿瘤组织: $n=502$, 1.13 ± 0.07 , $P<0.001$) 和肾透明细胞癌中表达上调 (正常组织: $n=72$, 1.24 ± 0.17 , 肿瘤组织: $n=539$, 1.65 ± 0.07 , $P<0.001$) (图 1A)。随后对肝细胞肝癌进行生物信息学分析, 数据共有 531 例临床 HCC 样本, 其中包括 371 例肝癌组织样本和 160 例癌旁正常组织样本。结果显示, PRKCB 在肝癌组织中表达明显下调 (正常组织: $n=160$, 0.69 ± 0.06 , 肿瘤组织: $n=371$, 0.58 ± 0.05 , $P<0.001$) (图 1B)。为进一步验证 PRKCB 在 HCC 临床样本中的表达情况, 课题组收集肝癌患者肿瘤及癌旁组织标本, 通过 Western blot 实验在这些样本的蛋白水平上进行验证。发现与癌旁组织相比, 大部分患者肝癌样本蛋白表达水平降低 (图 1C)。同时, 通过验证 PRKCB 在各肝癌细胞系与肝正常细胞系中的表达情况, 可以发现与正常肝细胞系 L02 相比, PRKCB 在肝癌细胞系中表达均降低 (图 1D)。

2.2 PRKCB 低表达与患者的预后不良相关

通过 TCGA 数据库肝癌临床组织样本进行 Kaplan-Meier 生存分析, 包括总生存期 (overall survival, OS) (图 2A)、无复发生存期 (recurrence free survival, RFS) (图 2B)、无进展生存期 (progression-free survival, PFS) (图 2C) 和疾病特异性生存期 (disease free survival, DSS) (图 2D), 结果显示 PRKCB 与患者的预后不良密切相关 (图 2A: $P=0.022$, 图 2B: $P<0.001$, 图 2C: $P<0.001$, 图 2D: $P=0.012$)。PRKCB 高表达组患者的总生存期明显延长, 无复发生存期与无进展生存期亦明显延长, 且疾病特异性生存期同样表现出延长趋势。以上结果提示 PRKCB 可能抑制 HCC 的发生和发展。

2.3 过表达 PRKCB 抑制肝癌细胞增殖

为进一步探究 PRKCB 在肝癌发生发展中起到的抑制作用。本研究通过 Western blot 实验在肝癌细胞系中对 PRKCB 的内源性表达情况进行检测, 结果显示 PRKCB 在 PLC/PRF/5 和 Hep3B 细胞系中表达更低 (图 1D), 因此本课题组构建了 pCDH-PRKCB 过表达质粒, 使用 Lipo8000 将过表达质粒转染至 Hep3B 和 PLC/PRF/5 细胞中通过 Western blot 实验验证转染情况 (图 3A、B), 并在后续实验中进一步探究 PRKCB 过表达对肝癌生物学行为的影响。Edu 细胞增殖实验结果显

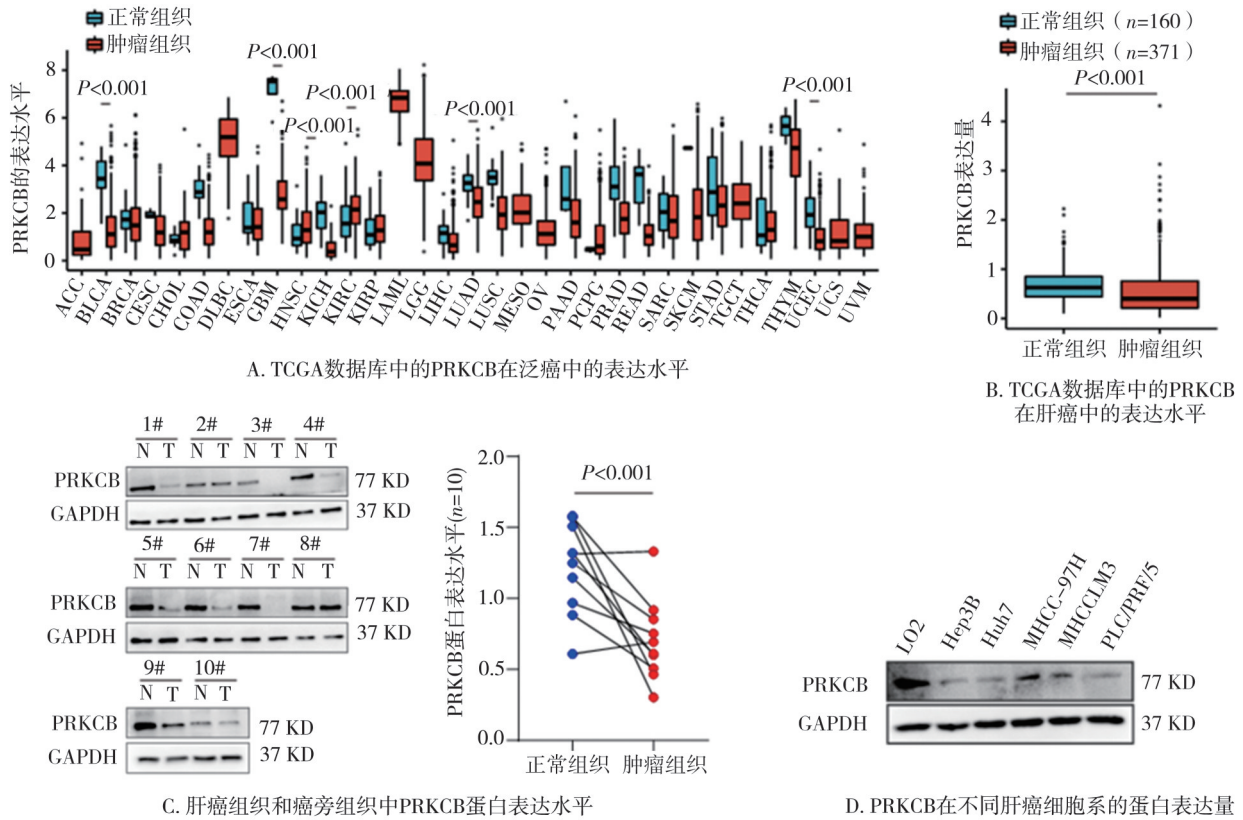


图1 PRKCB在HCC组织中表达下调

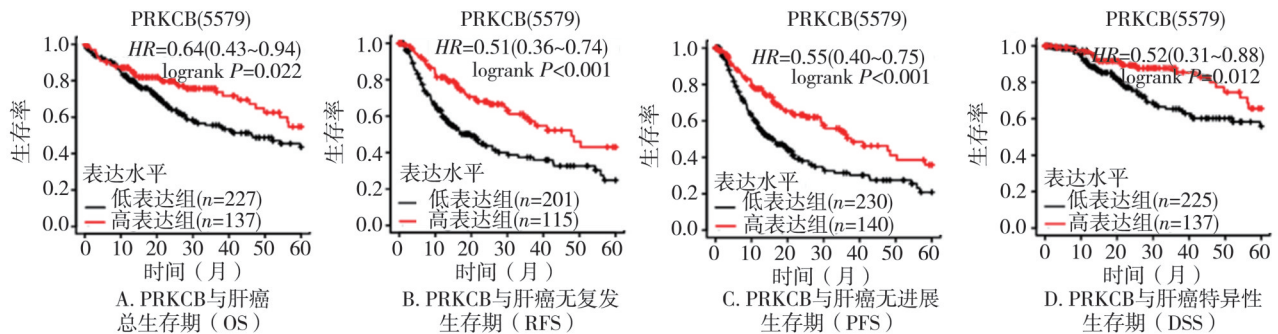


图2 PRKCB与患者的预后不良相关

示,在 Hep3B 和 PLC/PRF/5 细胞中过表达 PRKCB 后,与 Vector 组相比(Hep3B:42.33 ± 1.44,PLC/PRF/5:33.00 ± 6.57),pCDH-PRKCB 组细胞的增殖速率明显减慢(Hep3B:26.33 ± 3.80, PLC/PRF/5:20.33 ± 5.16, $P < 0.001$) (图 3C、D)。细胞生长曲线结果显示,相较于 Vector 组(Hep3B:19.83 ± 18.00, PLC/PRF/5:7.76 ± 6.22),pCDH-PRKCB 组细胞的生长速度明显下降(Hep3B:12.90 ± 11.65, PLC/PRF/5:4.83 ± 4.06, $P < 0.001$) (图 3E、F)。克隆形成实验也得到了类似的结果,过表达 PRKCB 的细胞集落面积百分比(Hep3B:14.942 ± 4.627, PLC/PRF/5:11.754 ± 9.128)明显低于对照组(Hep3B:25.412 ± 5.547, PLC/PRF/5:23.713 ± 12.186, $P < 0.001$) (图 3G、H)。以上结果表明,过表达 PRKCB 明显抑制 HCC 细胞的增殖。

2.4 沉默 PRKCB 促进肝癌细胞增殖

根据 PRKCB 内源性表达情况在 MHCC-97H、MHCCLM3

肝癌细胞系中沉默 PRKCB,并通过 Western blot 实验验证其沉默效果(图 4A、B),选取其中沉默效果更好的 2 条 siRNA (沉默效率 >50%) 进行后续实验。在 MHCC-97H、MHCCLM3 细胞中,与过表达 PRKCB 有着相反的效果。沉默 PRKCB 后,Edu 细胞增殖实验结果显示,与 siCtrl 组相比(MHCC-97H:10.02 ± 7.71, HCCLM3:9.46 ± 7.12),siPRKCB-1 组(MHCC-97H:14.21 ± 11.55, HCCLM3:11.79 ± 9.18, $P < 0.001$),siPRKCB-2 组(MHCC-97H:15.35 ± 12.93, MHCCLM3:11.81 ± 9.81, $P < 0.001$) (图 4C、D)增殖速度明显增加。细胞生长曲线结果显示,与 siCtrl 组相比(MHCC-97H:23.511 ± 0.623, HCCLM3:21.663 ± 0.169),siPRKCB-1 组(MHCC-97H:35.159 ± 1.286, MHCCLM3:29.11 ± 1.39, $P < 0.001$),siPRKCB-2 组(MHCC-97H:39.415 ± 0.744, MHCCLM3:30.628 ± 2.342,

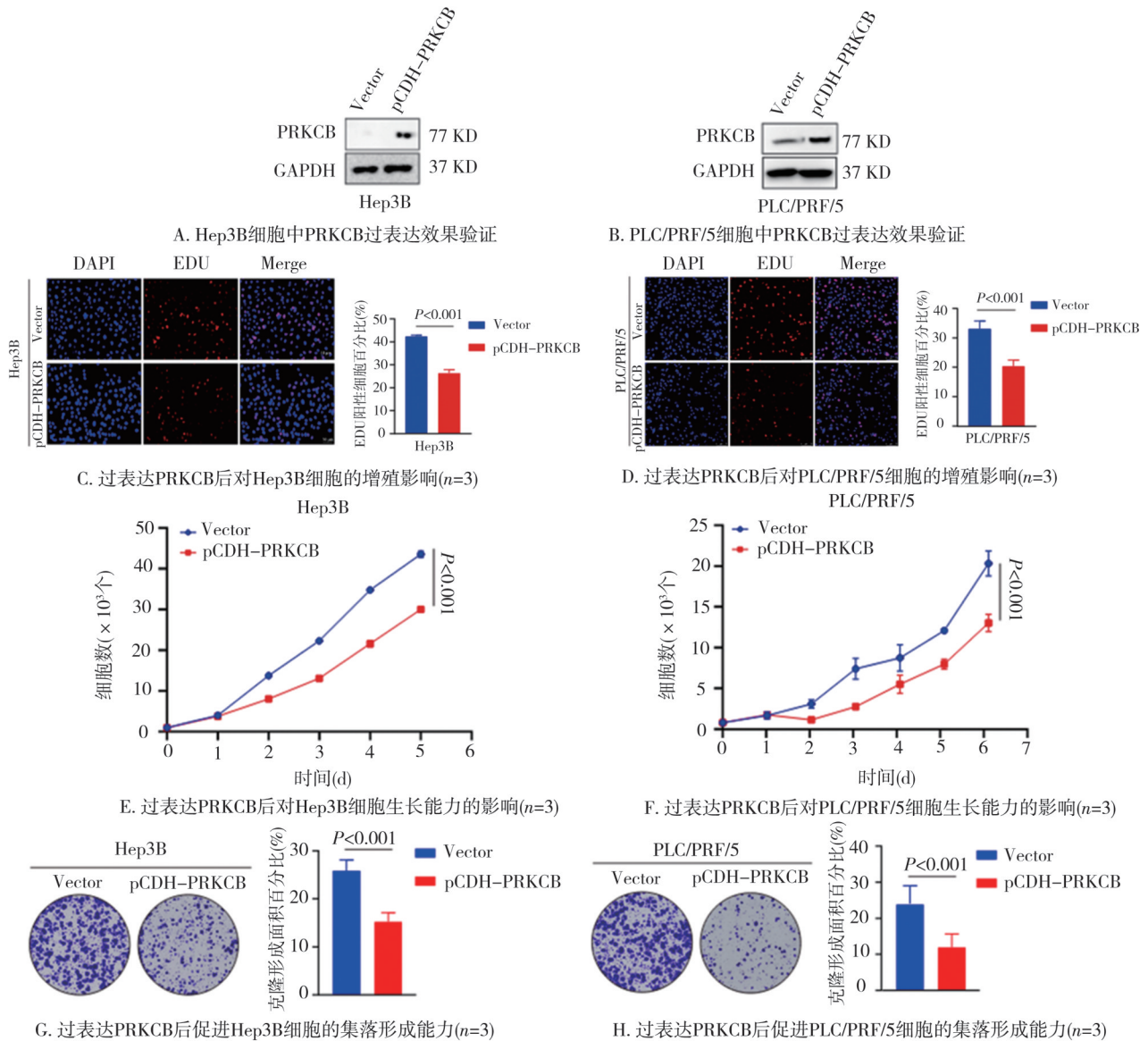


图3 过表达PRKCB抑制肝癌细胞体外增殖

$P < 0.001$) (图4E、F) 细胞生长速度明显增加。克隆形成实验结果显示, 沉默PRKCB后, siPRKCB-1组(MHCC-97H: 32.439 ± 6.175 , HCCLM3: 29.063 ± 1.000 , $P < 0.001$), siPRKCB-2组(MHCC-97H: 32.298 ± 3.614 , HCCLM3: 27.807 ± 2.517 , $P < 0.001$) 细胞集落面积百分比明显高于对照组(MHCC-97H: 11.523 ± 8.869 , HCCLM3: 17.326 ± 6.106) (图4G、H)。以上结果表明, 沉默PRKCB可有效促进细胞的增殖, PRKCB对于肿瘤细胞的抑制作用明显。

2.5 MAPK信号通路可能参与PRKCB调控细胞增殖

作为一种蛋白激酶, PRKCB可以通过磷酸化下游信号分子发挥作用。有文献报道, PKC家族及其同工酶可通过影响MAPK信号通路而发挥作用, PKC-MAPK通路可以通过氧化应激反应与激活信号通路, 调控心血管系统的重构并可能引起功能障碍^[15]。在肝癌中, PKC α 可以刺激双氧化酶2介导的ROS产生, 同时, 双氧化酶2可以阻断PKC α 诱导的

Akt/MAPK通路的激活, 从而影响肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[16]。由此, 本研究检测转染了PRKCB过表达质粒的Hep3B和PLC/PRF/5细胞中MAPK信号通路的关键蛋白分子。可以发现, 在过表达PRKCB后, 实验组细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)[Hep3B: $F = 15.610$, $P < 0.05$; PLC/PRF/5: $F = 374.890$, $P < 0.01$], p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)[Hep3B: $F = 66.4700$, $P < 0.01$; PLC/PRF/5: $F = 146.930$, $P < 0.01$], c-Jun氨基末端激酶(c-Jun kinase, JNK)的磷酸化[Hep3B: $F = 134.580$, $P < 0.01$; PLC/PRF/5: $F = 124.710$, $P < 0.01$]较对照组均有不同程度的降低(图5A、B)。在沉默PRKCB的MHCC97H和HCCLM3细胞中, siPRKCB-1组ERK[MHCC-97H: $F = 28.520$, $P < 0.01$; HCCLM3: $F = 0.610$, $P = 0.470$], p38[MHCC-97H: $F = 182.630$, $P < 0.01$; HCCLM3: $F = 287.630$, $P < 0.01$], JNK[MHCC-97H: $F = 536.210$, $P < 0.01$; HCCLM3: $F =$

348.620, $P < 0.01$]的磷酸化程度较 siCtrl 组增加; siPRKCB-2 组 ERK[MHCC-97H: $F = 15.380, P < 0.05$; HCCLM3: $F = 0.520, P = 0.510$], p38[MHCC-97H: $F = 158.270, P < 0.01$; HCCLM3: $F =$

438.650, $P < 0.01$]、JNK[MHCC-97H: $F = 126.740, P < 0.01$; HCCLM3: $F = 310.480, P < 0.01$]的磷酸化程度较 siCtrl 组也增加(图 5C、D)。

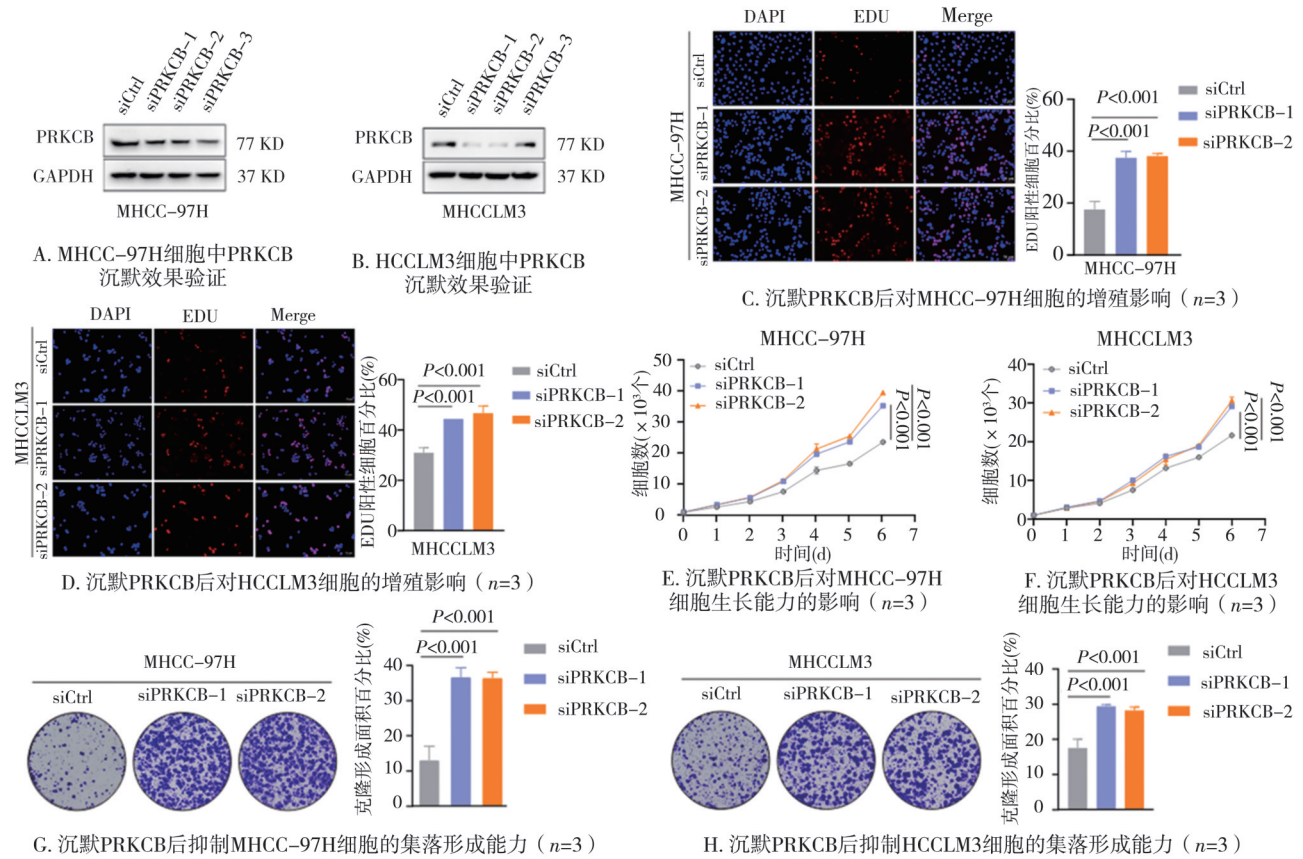


图 4 沉默 PRKCB 促进肝癌细胞体外增殖

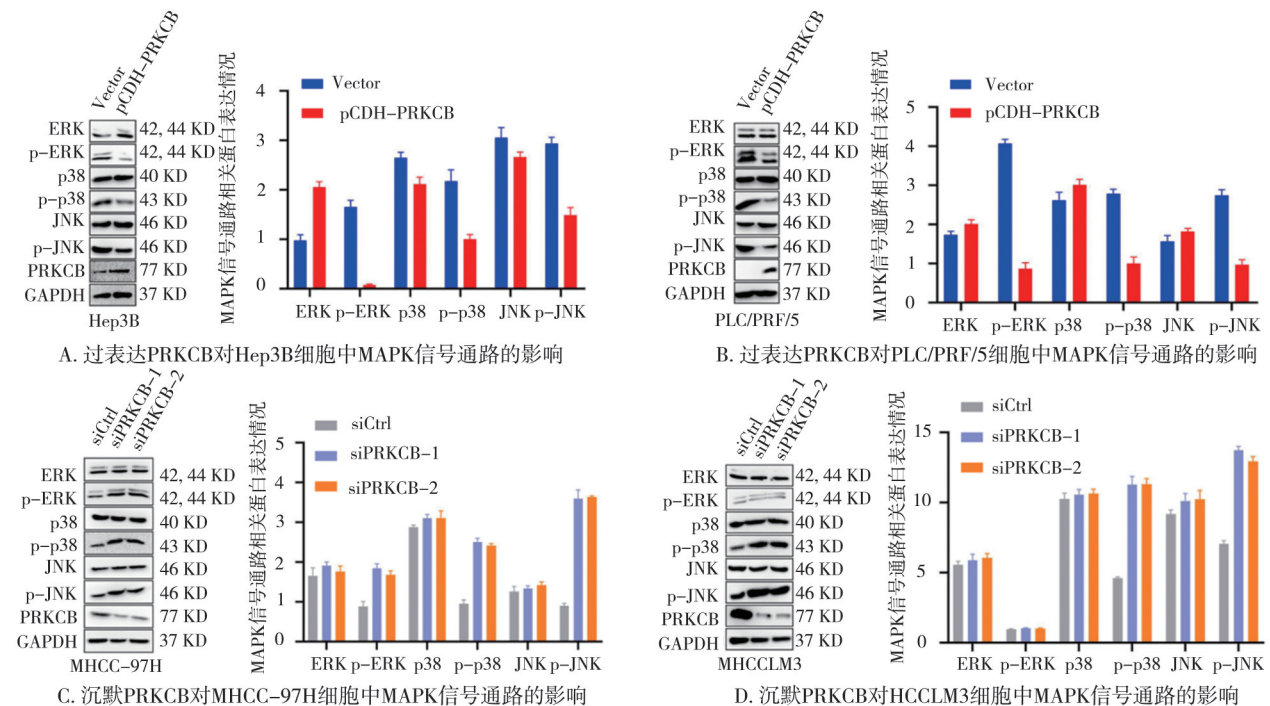


图 5 PRKCB 影响 MAPK 信号通路相关蛋白分子磷酸化

3 讨论

肝癌已成为全球癌症相关死亡的三大主要原因之一,其发生发展与多种遗传及环境因素密切相关^[17]。尽管目前已明确肝炎病毒感染、黄曲霉素暴露、酗酒等是 HCC 的主要危险因素,其具体的分子机制尚未完全阐明。当前的治疗策略,包括早期肝癌的手术切除联合放化疗,以及晚期肝癌的靶向药物治疗,效果均不理想^[18-20]。因此,寻找新的 HCC 治疗靶点以改善患者生存质量,仍是 1 项迫切而艰巨的任务。

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 家族作为细胞内信号转导的关键调节者,包含多达 12 个亚型,根据其结构特征与激活所需的第二信使,可分为传统型[如 PKC α 、PKC β I、PKC β II 和 PKC γ , 依赖 Ca²⁺、二酰基甘油 (DAG) 及磷脂激活]、新型 (如 PKC δ 、PKC ϵ 、PKC η 和 PKC θ , 需 DAG 但不依赖 Ca²⁺) 以及非典型型 (如 PKC ζ 和 PKC ι/λ , 既不依赖 Ca²⁺ 也不依赖 DAG) 3 个亚家族^[21]。各亚型虽共享相似的催化结构域,但在调控结构域存在差异,这赋予它们在细胞内截然不同的功能,广泛参与细胞增殖、分化、凋亡、迁移等重要生理过程,也在肿瘤发生发展中扮演多样角色^[22]。在众多 PKC 亚型中,多数被报道具有促癌活性。例如,PRKCA 编码的 PKC α 作为经典 PKC 家族成员,在乳腺癌中被证实通过激活 MAPK/ERK、PI3K/AKT 等细胞内促增殖、抗凋亡信号通路,有力推动癌细胞增殖、转移,提升肿瘤干细胞特性并诱导耐药^[23]。在基底样乳腺癌组织与细胞系中,PRKCA 转录水平明显上调^[24]。同样,PKC η 在胶质母细胞瘤 U-251 细胞中,经佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 刺激激活后,可激活 AKT 及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路,进而促进细胞增殖^[25]; 在前列腺癌 PC-3 细胞中,PKC η 高表达与肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 耐药紧密关联,敲低 PKC η 可明显增强 TRAIL 诱导的细胞凋亡^[26]。然而,本研究聚焦的 PRKCB 在肝癌中呈现出独特的抑癌作用,与多数 PKC 亚型促癌趋势相悖。在肝癌组织中,PRKCB 表达明显下调,其低表达与肿瘤恶性程度高、预后不良密切相关,恢复 PRKCB 表达可有

效抑制肝癌细胞的增殖能力。本研究表明,PRKCB 在肝癌中的抑癌作用涉及对 MAPK 等关键信号通路的负向调控,这提示 PRKCB 可能作为一种肿瘤抑制因子。

值得注意的是,PRKCB 这种抑癌现象并非肝癌所特有。在结直肠癌中,PRKCB 表达缺失同样伴随肿瘤进展加速、转移风险增加^[27]; 在白血病、卵巢癌、胃癌等多种肿瘤类型研究中,也陆续观察到 PRKCB 发挥抑癌功能^[28-30], 提示其在肿瘤抑制方面具有一定普适性,但具体分子机制在不同肿瘤中可能存在差异,受肿瘤微环境、细胞遗传背景等多种因素影响。

综上所述,本研究系统剖析了 PRKCB 在肝癌中的表达模式与潜在抑癌机制,首次在肝癌背景下明确 PRKCB 作为抑癌因子的关键地位,揭示了 PKC 家族内部功能的多样性与复杂性,为深入理解肝癌发病机制提供全新视角,也为肝癌及其他相关肿瘤的精准治疗开辟新思路。未来,亟待进一步探究 PRKCB 在不同肿瘤类型中的共性与特性调控机制,开发靶向 PRKCB 的创新疗法,提升肿瘤治疗效果,改善患者预后。

尽管本研究初步揭示了 PRKCB 在 HCC 中的抑癌作用及 MAPK 通路参与的潜在机制,仍存在若干局限性。首先,结论主要基于体外实验,尚未在动物模型中进行体内验证; 其次,PRKCB 调控 MAPK 通路的具体分子机制,尤其是其上下游调控关系,尚未完全明确; 此外,是否存在其他信号通路的参与以及 PRKCB 自身的表达调控机制 (如转录及表观遗传水平) 仍有待进一步研究。后续研究将在体内模型和临床样本中进一步验证 PRKCB 的功能,并深入探索其调控网络,以推动 HCC 精准治疗的发展。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 成子怡: 研究方案设计、实施研究、分析数据、论文撰写; 陈蕴梦: 研究方案设计、实施研究; 潘敏刚: 研究方案设计、实验技术指导; 贾雨萌: 实施研究; 冉漫: 实施研究; 夏杰: 研究方案设计、论文修改

参 考 文 献

- [1] Lu ZH, Chen Y, Liu D, et al. The landscape of cancer research and cancer care in China[J]. Nat Med, 2023, 29(12): 3022-3032.
- [2] Zheng RS, Zhang SW, Zeng HM, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. J Natl Cancer Cent, 2022, 2(1): 1-9.
- [3] Xia CF, Dong XS, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chin Med J,

- 2022, 135(5):584–590.
- [4] Huang A, Yang XR, Chung WY, et al. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1):146.
- [5] Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1):31–46.
- [6] Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver[J]. *Curr Biol*, 2017, 27(21):R1147–R1151.
- [7] Mehta D, Mehta KD. PKC β : Expanding role in hepatic adaptation of cholesterol homeostasis to dietary fat/cholesterol[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 312(3):266–273.
- [8] Huang W, Bansode R, Mehta M, et al. Loss of protein kinase C β function protects mice against diet-induced obesity and development of hepatic steatosis and insulin resistance[J]. *Hepatology*, 2009, 49(5):1525–1536.
- [9] Huang W, Bansode RR, Xie Y, et al. Disruption of the murine protein kinase C β gene promotes gallstone formation and alters biliary lipid and hepatic cholesterol metabolism[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(26):22795–22805.
- [10] Park E, Chen JY, Moore A, et al. Stromal cell protein kinase C- β inhibition enhances chemosensitivity in B cell malignancies and overcomes drug resistance[J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(526):eaax9340.
- [11] Khan K, Safi S, Abbas A, et al. Unravelling structure, localization, and genetic crosstalk of KLF3 in human breast cancer[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:1354381.
- [12] Kim JM, Park J, Noh EM, et al. Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase (Btk) regulates TPA-induced breast cancer cell invasion via PLC γ 2/PKC β /NF- κ B/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation[J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(5):76.
- [13] Kim J, Choi YL, Vallentin A, et al. Centrosomal PKC β II and pericentrin are critical for human prostate cancer growth and angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(16):6831–6839.
- [14] Zhu T, Tsuji T, Chen C. Roles of PKC isoforms in the induction of apoptosis elicited by aberrant Ras[J]. *Oncogene*, 2010, 29(7):1050–1061.
- [15] Jubaidi FF, Zainalabidin S, Taib IS, et al. The role of PKC-MAPK signalling pathways in the development of hyperglycemia-induced cardiovascular complications[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15):8582.
- [16] Wang JJ, Shao MM, Liu M, et al. PKC α promotes generation of reactive oxygen species via DUOX2 in hepatocellular carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(4):839–845.
- [17] Rumgay H, Arnold M, Ferlay J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(6):1598–1606.
- [18] Tang WW, Chen ZY, Zhang WL, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1):87.
- [19] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政司. 原发性肝癌诊疗指南(2024年版)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2024, 32(7):581–630. Department of Medical Administration of National Health Commission of the People's Republic of China. Guidelines for the diagnosis and treatment of primary liver cancer (2024 edition) [J]. *Chin J Hepatol*, 2024, 32(7):581–630.
- [20] 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.
- [21] Garg R, Benedetti LG, Abera MB, et al. Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not[J]. *Oncogene*, 2014, 33(45):5225–5237.
- [22] Koivunen J, Aaltonen V, Peltonen J. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression[J]. *Cancer Lett*, 2006, 235(1):1–10.
- [23] Fujii T, Nakamura AM, Yokoyama G, et al. Antineoplaston induces G(1) arrest by PKC α and MAPK pathway in SKBR-3 breast cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2005, 14(2):489–494.
- [24] Bai F, Liu SQ, Liu X, et al. PDGFR β is an essential therapeutic target for BRCA1-deficient mammary tumors[J]. *Breast Cancer Res*, 2021, 23(1):10.
- [25] Aeder SE, Martin PM, Soh JW, et al. PKC- η mediates glioblastoma cell proliferation through the Akt and mTOR signaling pathways[J]. *Oncogene*, 2004, 23(56):9062–9069.
- [26] Sonnemann J, Gekeler V, Sagrauske A, et al. Down-regulation of protein kinase C β potentiates the cytotoxic effects of exogenous tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in PC-3 prostate cancer cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(7):773–781.
- [27] Wang YG, Zheng TY. Screening of hub genes and pathways in colorectal cancer with microarray technology[J]. *Pathol Oncol Res*, 2014, 20(3):611–618.
- [28] Saba NS, Levy LS. Apoptotic induction in B-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines treated with a protein kinase C β inhibitor[J]. *Leuk Lymphoma*, 2011, 52(5):877–886.
- [29] Usha L, Sill MW, Darcy KM, et al. A Gynecologic Oncology Group phase II trial of the protein kinase C- β inhibitor, enzastaurin and evaluation of markers with potential predictive and prognostic value in persistent or recurrent epithelial ovarian and primary peritoneal malignancies[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 121(3):455–461.
- [30] Jiang XH, Tu SP, Cui JT, et al. Antisense targeting protein kinase C α and β 1 inhibits gastric carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(16):5787–5794.

(收稿:2025-09-16;修回:2025-10-19;录用:2025-12-15)

(责任编辑:李青颖)

本文引用格式:

成子怡,陈蕴梦,潘敏刚,等. 蛋白激酶C- β 抑制肝癌细胞增殖的作用及机制研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2026, 51(3):345–352.