

研究论著

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2024.03.013

KRT23 激活 AKT 信号通路促进肝癌细胞增殖

梁杏花 刘佛球 颜蓉 胡娟

【摘要】 目的 探讨角蛋白 23 (KRT23) 高表达促进细胞增殖对肝癌的影响。方法 通过生物信息学分析 KRT23 在肝癌中的表达, 过表达及抑制 KRT23 后采用噻唑兰 (MTT)、克隆形成实验分析 KRT23 对肝癌细胞增殖能力的影响。通过软件预测, 实时荧光定量 PCR (qPCR) 及蛋白免疫印迹法实验分析 KRT23 与 AKT 信号通路的调节关系。结果 肝癌中 KRT23 的表达水平明显高于正常对照组织。MTT、克隆形成实验显示 KRT23 过表达后促进细胞增殖, 而下调 KRT23 后抑制细胞增殖; 通过基因富集分析 (GSEA), qPCR 及蛋白免疫印迹法检测发现 KRT23 可激活 AKT 信号通路进而促进细胞增殖, 同时在过表达 KRT23 细胞中抑制 AKT 信号通路后细胞增殖能力明显下调。结论 KRT23 调控 AKT 信号通路影响肝癌细胞增殖, 提示 KRT23 在肝癌的恶性进程中具有重要的作用, 在肝癌的发生发展中可能扮演重要角色。

【关键词】 KRT23; AKT 信号通路; 肝癌; 增殖

KRT23 promotes the proliferation of liver cancer by activating AKT signaling pathway Liang Xinghua, Liu Foqiu, Yan Rong, Hu Juan. Department of Gastroenterology, the Fourth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 511300, China
Corresponding author, Liang Xinhua, E-mail: 122002858@qq.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of high keratin 23 (KRT23) expression promoting cell proliferation on liver cancer. **Methods** The expression of KRT23 in liver cancer was analyzed by bioinformatics. After overexpression and inhibition of KRT23, the effect of KRT23 on the proliferation of liver cancer cells was analyzed by MTT and clone formation assay. The regulatory relationship between KRT23 and AKT signaling pathway was analyzed by software prediction, qPCR and Western blot. **Results** The expression level of KRT23 in liver cancer was significantly higher than that in normal control tissues. MTT and clone formation assay showed that overexpression of KRT23 promoted cell proliferation, while downregulation of KRT23 inhibited cell proliferation. GSEA analysis, qPCR and Western blot showed that KRT23 could activate the AKT signaling pathway and promote cell proliferation. Meanwhile, inhibition of AKT signaling pathway in overexpressing KRT23 cells significantly reduced cell proliferation. **Conclusions** KRT23 affects the proliferation of liver cancer cells by regulating the AKT signaling pathway. These results suggest that KRT23 exerts significant effects upon the malignant procession of liver cancer and may play an important role in the occurrence and development of liver cancer.

【Key words】 KRT23; AKT signaling pathway; Liver cancer; Proliferation

肝细胞癌 (肝癌, HCC) 是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤。肝癌的发病率在各类肿瘤中排名第五, 是世界上第六大常见病和第三大癌症相关死亡原因^[1,2]。肝癌病死率之高主要由于其复发率较高, 据报道肝癌两年复发率为 50%, 而这种高复发率主要是由于肿瘤的增殖能力和耐药性导致^[3]。因此, 迫切需要了解影响肝癌进展和恶性增殖的潜在机制。从数千个基因中区分促进肝癌恶性进程的关键基因对于抑制这一过程是必不可少的, 但仍然是一个巨大的挑战。角蛋白分为 I

型角蛋白 (含 KRT9~KRT20) 和 II 型角蛋白 (含 KRT1~KRT8), 可作为影响上皮细胞结构完整性的中间丝蛋白^[4]。据报道角蛋白 23 (KRT23) 与肝脏疾病密切相关^[5]。KRT23 是过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPARA) 的靶基因, 被 MYC 扩增, 可能促进肝细胞增殖并导致肝癌^[6]。然而, KRT23 在肝癌中对肿瘤进程的影响及具体机制尚不清楚。本研究旨在观察 KRT23 在肝癌中的表达及其对细胞增殖功能的影响, 探讨其能否作为肝癌预防及治疗靶点。

基金项目: 广州市增城区科技计划项目 (2021049)

作者单位: 511300 广州, 广州医科大学附属第四医院消化内科
通信作者: 梁杏花, E-mail: 122002858@qq.com

材料与方法

一、主要材料

HCCLM3 细胞株购自中国医学科学院细胞资源中心；培养基相关试剂购自美国 Hyclone 公司；Lipo3000™ Transfection Reagent 试剂购自碧云天；双荧光素酶实验试剂盒由美国 Promega 公司生产；GAPDH 抗体、KRT23 抗体均由博士德公司生产；LY294002 购买于 Sigma 公司；实时荧光定量 PCR (qPCR)、逆转录试剂盒均由 Takala 公司生产。KRT23 过表达 pcDNA3.1 质粒 (KRT23) 及空载 pcDNA3.1 质粒，干扰质粒及引物，均由广州艾基生物技术有限公司设计并构建；PCR 仪器为美国 R&D 公司生产；BX43 显微镜为日本奥林巴斯公司生产。肝癌组织样本收集于广州医科大学附属第四医院消化内科，并获得伦理委员会批准（批件号：2023-D-006）。

二、方法

1. 细胞培养

HCCLM3 细胞用含 10% FBS 的 1640 培养基于 37℃、5% CO₂ 条件下进行培养，并加入链霉素和青霉素预防污染。观察细胞状态，待细胞融合长至 70%~80% 时进行传代，取对数生长期细胞用于转染等实验。

2. 细胞处理

将 HCCLM3 细胞接种于 6 孔板，使用 Lipofectamine 3000 转染细胞，细胞分组如下，过表达 KRT23 组 (HCCLM3-KRT23) 及其过表达对照组 (HCCLM3-vector)、干扰 KRT23 组 (HCCLM3-KRT23/RNAi) 及其干扰对照组 (HCCLM3-RNAi-vector)。转染后细胞置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 6 h 后，换为 1640 培养基 (10% FBS) 继续培养 48 h。

3. 噻唑兰 (MTT) 检测细胞活力

收集对数期细胞，将细胞种植于 96 孔板，调整细胞悬液浓度至 2×10^3 个细胞/孔，培养 24 h 后向待测孔中加入 5 mg/mL MTT 溶液，每孔 20 μ L；4 h 后加入 100 μ L 二甲基亚砷，置摇床上振荡 10 min，使结晶物充分溶解；酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的吸光度值。

4. 克隆形成实验

收集对数生长期细胞，调整细胞悬液浓度 500 细胞/mL 接种于 6 孔板持续培养 10~14 d，观察克

隆出现日期及生长情况，大于 50 个细胞的集落算一个克隆，加固定液，1 mL/孔摇床上放置 10 min 后，加 1 mL/孔结晶紫染色，计算每个孔的克隆数并拍照。

5. 实时荧光定量 PCR (qPCR)

采用 Trizol 法提取 HCCLM3 细胞样本中的总 RNA，根据 qPCR 体系说明书检测各组样本中 KRT23 mRNA 相对表达水平。以 GAPDH 为内参，用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算分析各组样本中 KRT23 表达水平。

6. 蛋白免疫印迹法

用蛋白裂解液裂解、提取各组 HCCLM3 细胞总蛋白，浓度测定用 BCA 法测定蛋白浓度。每组各取 30 μ g 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转 PVDF 膜、奶粉封闭、一抗 KRT23 抗体 (1 : 1 500) 和 GAPDH 抗体 (1 : 3 000) 孵育、二抗山羊抗兔 HRP 抗体 (1 : 3 000) 孵育、ECL 发光液显色步骤依次进行实验检测蛋白表达水平。

三、统计学处理

采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计量资料采用 Shapiro-Wilk 进行正态性检验，服从正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，2 组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较用 LSD-*t* 检验，采用配对 *t* 检验分析癌组织和癌旁组织间的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、KRT23 在人类肝癌组织高表达

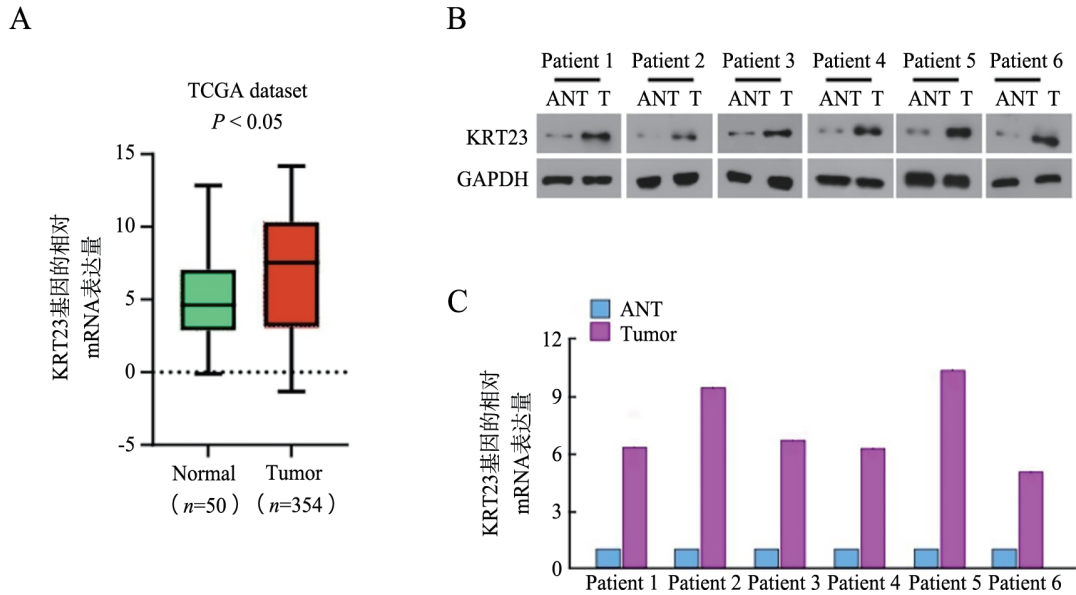
通过 TCGA 数据库分析发现 KRT23 在肝癌中表达高于正常对照 (图 1A)，在组织样本中蛋白免疫印迹法检测 KRT23 蛋白表达高于癌旁对照组织 (图 1B)，且 qPCR 检测 KRT23 mRNA 表达高于癌旁对照组织 (图 1C)，差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

二、KRT23 过表达可促进肝癌细胞增殖能力

细胞转染后通过 qPCR 及蛋白免疫印迹法检测 KRT23 过表达组 (HCCLM3-KRT23) 与载体对照组 (HCCLM3-vector) 及 KRT23 干扰组 (HCCLM3-KRT23/RNAi) 与其干扰对照组 (HCCLM3-RNAi-vector) 中 KRT23 基因 (图 2A) 及蛋白 (图 2B) 表达情况，经过 MTT 检测发现在 HCCLM3 细胞中

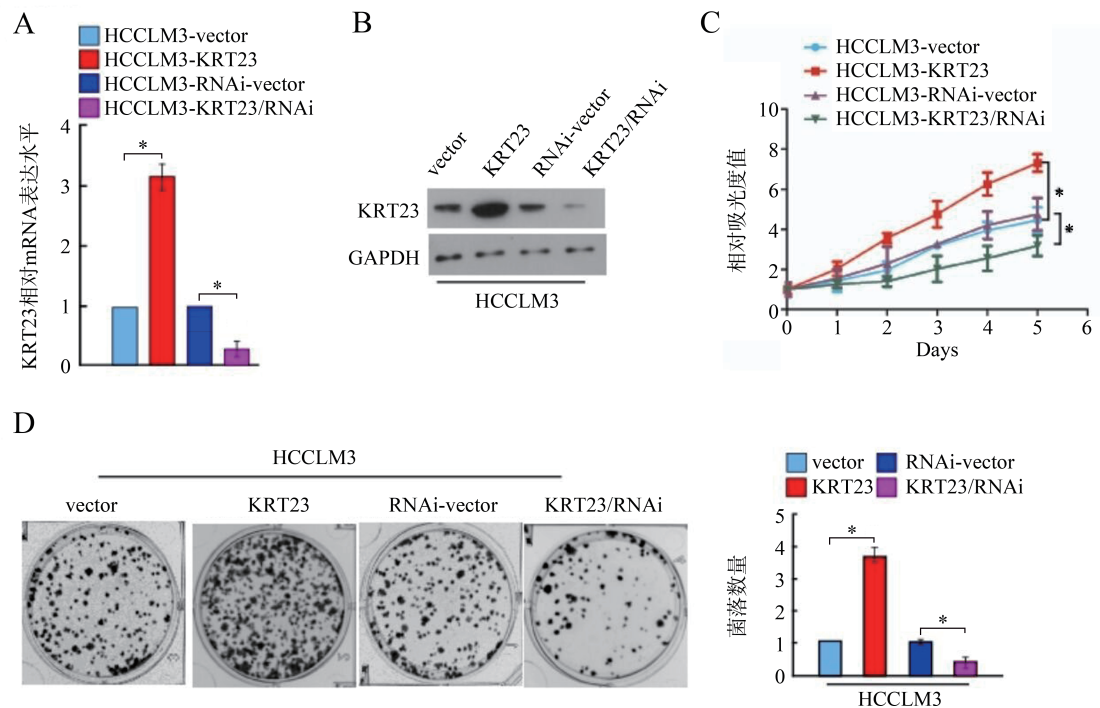
KRT23 过表达组中细胞增殖能力强于过表达对照组, 而 KRT23 干扰后细胞增殖能力弱于干扰对照组 (图 2C); 通过克隆形成实验发现 KRT23 过表达组

中细胞克隆形成能力强于过表达对照组, 而 KRT23 干扰后细胞克隆形成能力低于干扰对照组 (图 2D), 2 组比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。



注: A 为 TCGA 数据库分析 KRT23 的表达; B 为蛋白免疫印迹法检测 KRT23 在组织中表达; C 为 qPCR 检测 KRT23 在组织中表达情况。

图 1 KRT23 在人肝癌组织高表达



注: A 为 qPCR 检测 KRT23 在细胞中表达情况; B 为蛋白免疫印迹法检测 KRT23 在细胞中表达; C 为 MTT 检测 KRT23 过表达后细胞活力变化; D 为克隆形成实验检测 KRT23 过表达后细胞增殖能力; 与对照组比较, $*P < 0.05$ 。

图 2 KRT23 过表达可促进肝癌细胞增殖能力

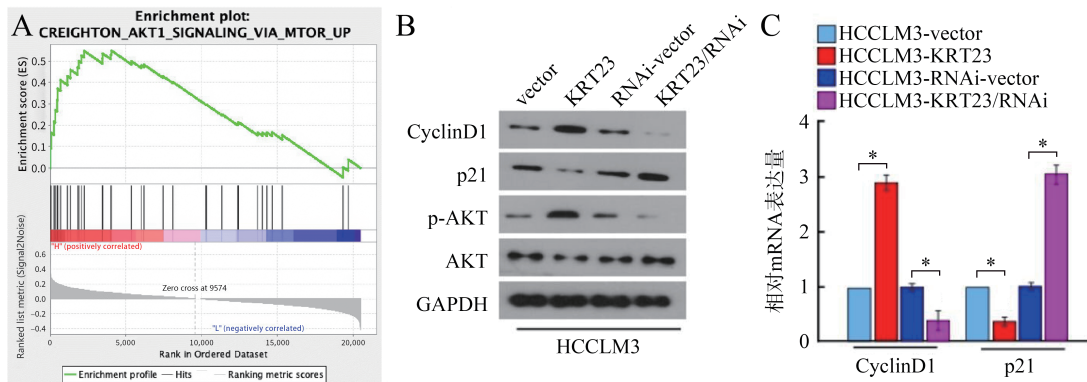
三、KRT23 通过激活 AKT 信号通路促进细胞增殖

通过基因富集分析 (GSEA) 发现 KRT23 富集 AKT 信号通路相关分子, 且与 KRT23 的表达正相关 (图 3A)。通过蛋白免疫印迹法发现载体对照组 (HCCLM3-vector) 相比 KRT23 过表达组 (HCCLM3-KRT23) 中 p-AKT 表达明显增高, 然而 KRT23 的干扰组 (HCCLM3-RNAi-vector) 中 p-AKT 蛋白的表达水平低于干扰对照组 (HCCLM3-RNAi-vector) (图 3B); 通过 qPCR 检测发现与过表达载体对照组 (HCCLM3-ector) 相比, KRT23 过表达组 (HCCLM3-KRT23) 中细胞周期相关分子 CyclinD1 表达增强, 而细胞周期抑制分子 p21 表达降低; 反

之在 KRT23 的干扰组 (HCCLM3-RNAi-vector) 与干扰对照组 (HCCLM3-RNAi-vector) 中细胞周期相关分子 CyclinD1 表达降低, 而细胞周期抑制分子 p21 表达升高 (图 3C)。

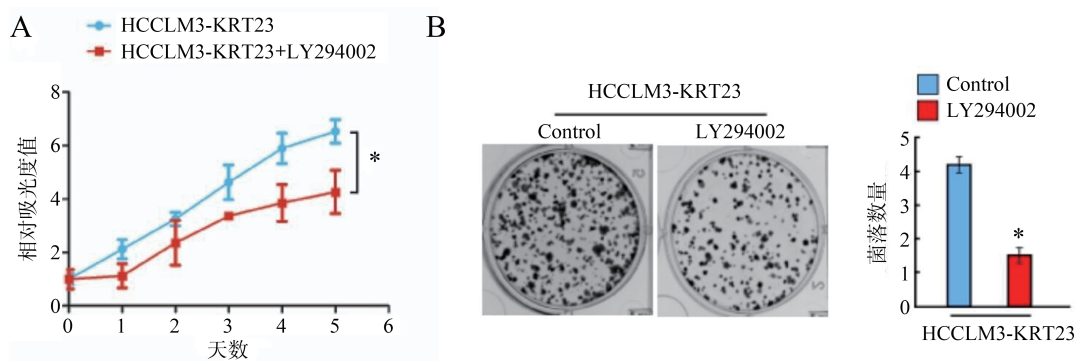
四、KRT23 促进肝癌细胞增殖依赖于 AKT 信号通路

为了进一步验证 KRT23 通过 AKT 信号通路影响细胞增殖能力, 我们在 KRT23 过表达细胞中用 AKT 信号通路抑制剂 (LY294002) 刺激后, 通过 MTT 及克隆形成实验检测发现, AKT 通路抑制剂刺激后细胞活力受到抑制 (图 4A), 同时细胞克隆数明显降低 (图 4B)。



注: A 为 GSEA 预测分析; B 为蛋白免疫印迹法检测增殖相关蛋白的表达; C 为 qPCR 检测增殖相关基因的表达; 与对照组比较, $*P < 0.05$ 。

图 3 KRT23 通过激活 AKT 信号通路促进细胞增殖



注: A 为 MTT 结果; B 为克隆形成实验结果; 与对照组比较, $*P < 0.05$ 。

图 4 KRT23 促进肝癌细胞增殖依赖于 AKT 信号通路

讨论

肝癌是一种常见的恶性肿瘤, 尽管肝切除术、射频消融、肝移植等治疗方法取得了重大进展,

但由于肝癌早期发现较难, 大部分患者发现时已处于晚期, 这使得肝癌成为世界范围内最棘手的肿瘤之一^[7]。越来越多的证据表明, 癌基因和肿瘤抑制因子的异常表达可能在肝癌发展进程中起

着不可或缺的作用^[89]。KRT23引起了我们的注意, 因为有报道证实 KRT23 可作为肝癌诊断和预后的生物标志物^[4]。然而 KRT23 在肝癌中的调节功能尚未有相关报道。在本研究中, 我们发现 KRT23 在肝癌中升高, 通过 MTT 及克隆形成实验表明在肝癌细胞中高表达 KRT23 可促进细胞增殖。

目前已有文献报道, 肿瘤细胞发生发展与 PI3K/AKT 信号通路相关^[10-12]。同时许多研究发现 AKT 信号通路的激活对肿瘤细胞增殖, 自噬调节等具有重要的作用^[13]。与此同时, 许多研究表明 PI3K/AKT 信号通路与肝癌密切相关。上述研究提示在肝癌中 AKT 信号通路的激活对肝癌的进程有重要作用。

本研究通过 GSEA 分析发现 KRT23 高表达与 AKT 信号通路的基因富集正相关。过表达 KRT23 后 p-AKT 活性增强, 且细胞周期蛋白 cyclinD1 表达上调, 细胞周期抑制分子 p21 表达下降。在 KRT23 高表达的基础上联合 AKT 抑制剂处理, 细胞增殖能力降低。本研究证明 KRT23 是肝癌中潜在的癌基因, 并且能通过激活 AKT 信号通路促进肝癌细胞增殖。因此, KRT23 可能成为新的干预和治疗肝癌的潜在靶点。然而, 我们的研究还存在不足, 缺少 KRT23 在体内对肿瘤的影响研究及 KRT23 对 AKT 信号通路调节的机制研究。这也是我们未来研究应侧重于 KRT23 影响肝癌进程的机制。

综上所述, KRT23 可通过调节 AKT 信号通路促进肝癌细胞增殖, 为 KRT23 可以作为肝癌诊断及治疗的潜在靶点提供理论支持。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2018, 391 (10127) : 1301-1314.
- [3] Zhou H Z, Li F, Cheng S T, et al. DDX17-regulated alternative splicing that produced an oncogenic isoform of PXN-AS1 to promote HCC metastasis [J]. Hepatology, 2022, 75 (4) : 847-865.
- [4] Pan X, Hobbs R P, Coulombe P A. The expanding significance of keratin intermediate filaments in normal and diseased epithelia [J]. Curr Opin Cell Biol, 2013, 25 (1) : 47-56.
- [5] Kinast V, Leber S L, Brown R J P, et al. Identification of keratin 23 as a hepatitis C virus-induced host factor in the human liver [J]. Cells, 2019, 8 (6) : 610.
- [6] Kim D, Brocker C N, Takahashi S, et al. Keratin 23 is a peroxisome proliferator-activated receptor alpha-dependent, MYC-amplified oncogene that promotes hepatocyte proliferation [J]. Hepatology, 2019, 70 (1) : 154-167.
- [7] Zhou C, Liu C, Liu W, et al. SLFN11 inhibits hepatocellular carcinoma tumorigenesis and metastasis by targeting RPS4X via mTOR pathway [J]. Theranostics, 2020, 10 (10) : 4627-4643.
- [8] Ye Q H, Zhu W W, Zhang J B, et al. GOLM1 modulates EGFR/RTK cell-surface recycling to drive hepatocellular carcinoma metastasis [J]. Cancer Cell, 2016, 30 (3) : 444-458.
- [9] Yang J, Zhang L, Jiang Z, et al. TCF12 promotes the tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma via upregulation of CXCR4 expression [J]. Theranostics, 2019, 9 (20) : 5810-5827.
- [10] Shariati M, Meric-Bernstam F. Targeting AKT for cancer therapy [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2019, 28 (11) : 977-988.
- [11] Yang X, Feng Y, Liu Y, et al. Fuzheng Jiedu Xiaoji formulation inhibits hepatocellular carcinoma progression in patients by targeting the AKT/CyclinD1/p21/p27 pathway [J]. Phytomedicine, 2021, 87 : 153575.
- [12] 周家田, 尚观胜, 张聪, 等. RSRC1 通过靶向调控 PTEN/PI3K/AKT 通路抑制食管鳞状细胞癌的增殖和转移 [J]. 新医学, 2023, 54 (10) : 749-753.
Zhou J T, Shang G S, Zhang C, et al. RSRC1 inhibits the proliferation and metastasis of ESCC by targeting PTEN/PI3K/AKT pathway [J]. J New Med, 2023, 54 (10) : 749-753.
- [13] Ma L, Zhang R, Li D, et al. Fluoride regulates chondrocyte proliferation and autophagy via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Chem Biol Interact, 2021, 349 : 109659.

(收稿日期: 2023-12-11)

(本文编辑: 杨江瑜)