

# 高表达甲状旁腺激素样激素促进肝细胞癌的进展并与患者预后不良相关

缪祥卓<sup>1</sup>, 朱鹏宇<sup>1</sup>, 区活辉<sup>1,4</sup>, 朱庆<sup>1</sup>, 于林源<sup>1</sup>, 郭柏棠<sup>1</sup>, 廖渭<sup>5</sup>, 黄毓<sup>2</sup>, 相乐阳<sup>3</sup>, 杨定华<sup>1</sup>

南方医科大学南方医院肝胆外科,<sup>2</sup>检验科, 广东 广州 510515;<sup>3</sup>暨南大学附属第一医院肝胆外科, 广东 广州 510630;<sup>4</sup>南方医科大学顺德医院肝胆外科, 广东 顺德 528399;<sup>5</sup>佛山市第一人民医院肝胆外科, 广东 佛山 528000

**摘要:**目的 探究甲状旁腺激素样激素(PTH LH)在肝细胞癌(HCC)中的表达水平,分析其与患者临床预后的关系,并探究其对HCC细胞生物学行为的影响及可能的作用通路。方法 基于癌症基因组图谱(TCGA)和基因表达综合数据库(GEO)的数据,结合本院收治的70例HCC患者的临床样本,分析PTH LH在HCC组织和癌旁组织中的表达水平差异及其与患者临床预后的关系。体外培养HCC细胞,通过敲低和过表达PTH LH,采用CCK-8实验、克隆形成实验、Transwell迁移和侵袭实验评估PTH LH对HCC细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响;Western blotting分析PTH LH可能激活的信号通路。结果 TCGA和GEO数据库分析显示,PTH LH mRNA在HCC组织中显著高表达,且与患者不良预后相关( $P<0.05$ ),PTH LH mRNA高表达可能是Huh7和Hep3B患者的独立预后危险因素( $P<0.05$ )。通过临床样本对数据库结果进行验证,HCC组织中PTH LH mRNA表达水平高于癌旁组织( $P<0.001$ ),免疫组织化学染色分析也显示PTH LH蛋白在HCC组织中的表达水平显著升高( $P<0.01$ )。单因素和多因素Cox回归分析表明,PTH LH mRNA高表达可能是影响HCC患者术后无瘤生存时间的独立危险因素( $P<0.05$ ),且基于PTH LH mRNA表达水平构建的预后预测模型提高了HCC患者术后复发风险的预测准确性。进一步的体外细胞实验结果显示,PTH LH可促进Huh7和Hep3B细胞的增殖( $P<0.01$ )和克隆形成( $P<0.01$ );增强Huh7和Hep3B细胞的迁移和侵袭能力( $P<0.01$ );Western blotting分析显示,PTH LH可能通过激活ERK/JNK信号通路发挥其促癌作用。结论 高表达PTH LH促进肝细胞癌的进展与患者预后不良相关,其促癌效应可能是通过激活ERK/JNK信号通路实现的。

**关键词:**肝细胞癌;甲状旁腺激素样激素;临床预后;生物标志物;ERK/JNK通路

## Overexpression of parathyroid hormone-like hormone facilitates hepatocellular carcinoma progression and correlates with adverse outcomes

MIAO Xiangzhuo<sup>1</sup>, ZHU Pengyu<sup>1</sup>, OU Huohui<sup>1,4</sup>, ZHU Qing<sup>1</sup>, YU Linyuan<sup>1</sup>, GUO Baitang<sup>1</sup>, LIAO Wei<sup>5</sup>, HUANG Yu<sup>2</sup>, XIANG Leyang<sup>3</sup>, YANG Dinghua<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, <sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>3</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China; <sup>4</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, Shunde Hospital, Southern Medical University, Shunde 528399, China; <sup>5</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, Foshan First People's Hospital, Foshan 528000, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression of parathyroid hormone-like hormone (PTH LH) in hepatocellular carcinoma (HCC) and analyze its correlation with clinical prognosis, its regulatory effects on HCC cell behaviors, and the signaling pathways mediating its effects. **Methods** We analyzed the differential expression of PTH LH in HCC and adjacent tissues and its association with patient prognosis based on data from TCGA and GEO databases and from 70 HCC patients treated in our hospital. The effects of PTH LH knockdown and overexpression on proliferation, migration, and invasion of cultured HCC cells were investigated using CCK-8 assay, colony formation assay, Transwell migration and invasion assays, and the signaling pathways activated by PTH LH were detected using Western blotting. **Results** TCGA and GEO database analysis showed significant overexpression of PTH LH mRNA in HCC tissues, which was associated with poor prognosis of the patients ( $P<0.05$ ). High PTH LH mRNA expression was a probable independent prognostic risk factor for HCC ( $P<0.05$ ). In the clinical samples, PTH LH mRNA and protein expressions were significantly higher in HCC tissues than in the adjacent tissues ( $P<0.001$  or  $0.01$ ). Univariate and multivariate Cox regression analyses suggested that high PTH LH mRNA expression was an independent risk factor to affect postoperative disease-free survival of HCC patients ( $P<0.05$ ). The prognostic prediction model based on PTH LH mRNA expression showed an improved accuracy for predicting the risk of postoperative recurrence in HCC patients. In cultured HCC cells, PTH LH overexpression significantly promoted cell proliferation, colony formation, migration and invasion, and caused activation of the ERK/JNK signaling pathway in Huh7 and Hep3B cells. **Conclusion** High PTH LH expression promotes HCC progression and is associated with poor patient prognosis. Its pro-tumor effects may be mediated by activation of the ERK/JNK signaling pathway.

**Keywords:** hepatocellular carcinoma; parathyroid hormone-like hormone; clinical prognosis; biomarker; ERK/JNK pathway

收稿日期:2025-03-25

基金项目:国家自然科学基金(82372851)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82372851).

作者简介:缪祥卓,在读硕士研究生,E-mail: u201712361@163.com;

朱鹏宇,在读硕士研究生,E-mail: zpy0511@126.com。缪祥卓、朱鹏宇共同为第一作者

通信作者:杨定华,教授,博士,E-mail: yangdinghua@smu.edu.cn, E-mail: nfyangdh@163.com;

相乐阳,副教授,博士,E-mail: xly1991@jnu.edu.cn

edu.cn

肝细胞癌(HCC)是原发性肝癌的主要亚型,在全球范围内发病率位居恶性肿瘤第6位,病死率排名第4<sup>[1]</sup>。由于早期HCC缺乏特异性临床症状,70%~80%的患者确诊时已进展至中晚期,导致治疗选择受限且预后不良<sup>[2]</sup>。目前,尽管手术切除、经皮消融、经动脉化疗栓塞和肝移植等治疗手段已广泛应用于临床,但HCC仍具有高复发率和转移率,患者5年总体生存率不足20%<sup>[3,4]</sup>。因此,深入探索HCC进展和转移的分子机制,寻找新的诊断标志物和治疗靶点,对改善HCC患者预后具有重要的临床意义。

甲状旁腺激素样激素(PTHrP)是一种多功能因子,不仅具有类似甲状旁腺激素(PTH)的钙调节功能,还在细胞发育和组织稳态中发挥重要调控作用<sup>[5]</sup>。PTHrP在多种组织中广泛表达,主要通过自分泌和旁分泌机制介导其生物学效应<sup>[6]</sup>。PTHrP通过与甲状旁腺激素/甲状旁腺激素相关蛋白受体(PTH1R)特异性结合,激活cAMP/PKA或IP3/PKC等下游信号通路,从而调控细胞增殖、分化和凋亡等多种生理过程<sup>[6,7]</sup>。近年研究表明,PTHrP在多种恶性肿瘤(如结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌和乳腺癌)的发生、发展和化疗耐药中起关键作用<sup>[8-11]</sup>。在乳腺癌中,TGF- $\beta$ 诱导的PTHrP表达可通过促进破骨细胞成熟来介导肿瘤骨转移<sup>[12]</sup>。自分泌的PTHrP通过激活ERK/JNK-ATF2-cyclinD1信号通路促进肝内胆管癌细胞的增殖<sup>[13]</sup>。这些研究表明PTHrP在肿瘤发生发展中发挥重要作用。然而,PTHrP在HCC中的临床意义、生物学功能及其调控机制仍未完全阐明。因此,本研究旨在探究PTHrP在HCC中的表达情况及与患者预后的相关性,并初步探究其在HCC发生发展中的作用和分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 组织样本收集

HCC组织及配对癌旁组织样本取自2017年1月~2022年12月在南方医科大学南方医院肝胆外科接受根治性切除的HCC患者。所有组织样本在手术切除后立即进行处理:一部分迅速置于液氮中冷冻保存,用于分子生物学检测;另一部分用4%多聚甲醛固定,用于病理学分析。本研究经南方医科大学南方医院伦理委员会审查批准(伦理批号:NFEC-2024-661),所有入组患者均签署知情同意书。术后随访自手术日起至2023年12月31日结束。

### 1.2 RNA提取和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

采用Trizol试剂(Invitrogen)从HCC细胞及临床组织样本中提取总RNA。使用Nanodrop 2000分光光度计(Thermo Fisher Scientific)检测RNA浓度和纯度( $A_{260nm}/A_{280nm}$ 比值)。cDNA合成使用HiScript II Q RT

SuperMix for qPCR试剂盒(诺唯赞)。qRT-PCR反应在LightCycler 480 II实时荧光定量PCR系统(Roche)上进行,采用ChamQ SYBR qPCR Master Mix(诺唯赞)。细胞实验以 $\beta$ -ACTIN作为内参基因,临床组织样本以18S rRNA作为内参基因。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达量。所有qRT-PCR引物序列均由Tsingke Biotechnology合成,具体序列(表1)。

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences for qRT-PCR

Gene name	Primer direction	Primer sequence (5'→3')
$\beta$ -actin	Forward	TGGCACCCAGCACAAATGAA
	Reverse	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA
18S rRNA	Forward	GTAACCCGTTGAACCCCAT
	Reverse	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
PTHrP	Forward	ATTACGCGCAGATTCTTCC
	Reverse	GCTTGGAGTTAGGGGACACC

### 1.3 Western blotting分析

收集细胞或组织样本,使用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液(Beyotime)提取总蛋白。采用BCA蛋白质定量试剂盒(Thermo Fisher Scientific)测定蛋白浓度。将等量蛋白样品与5 $\times$ SDS-PAGE上样缓冲液混合,95 $^{\circ}$ C加热10 min使蛋白质变性。使用10% SDS-PAGE凝胶进行蛋白质分离,随后将蛋白转移至PVDF膜(Millipore)上。转膜完成后,将膜置于含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液中,室温封闭1 h。随后,在4 $^{\circ}$ C条件下与一抗孵育过夜。次日,用TBST洗涤3次(10 min/次),然后与辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗室温孵育1 h。最后,使用ECL化学发光底物试剂盒(Millipore)和FluorChem E成像系统(ProteinSimple)进行信号检测。以 $\beta$ -ACTIN作为内参蛋白进行标准化。

### 1.4 免疫组织化学(IHC)检测

将4%多聚甲醛固定的临床组织样本包埋于石蜡中,使用切片机切成4 $\mu$ m厚的连续切片。石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化。采用柠檬酸钠缓冲液(10 mmol/L,pH 6.0)进行热抗原修复(100 $^{\circ}$ C,10 min)。为减少非特异性结合,切片在含1%牛血清白蛋白(BSA)和0.5% Triton X-100的TBS缓冲液中室温封闭1 h。随后,切片与PTHrP一抗(A3183,Abclonal,中国武汉,1:200稀释)在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日,使用3%过氧化氢/甲醇溶液室温处理15 min以阻断内源性过氧化物酶活性。采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)法(ZSGB-BIO)进行反应增强,DAB显色,操作严格按试剂盒说明书进行。最后,切片经苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

染色评分参考相关文献<sup>[14, 15]</sup>,由两名经验丰富的实验人员采用双盲法独立评估染色结果,根据染色强度评分:无染色=0分;弱染色=1分;中等染色=2分;强染色=3分。根据阳性细胞比例评分:1~25%=1分;26~50%=2分;50%~100%=3分。最终免疫反应评分通过染色强度评分与阳性细胞比例评分相乘得出,评分范围为0~9分。

### 1.5 HCC 细胞培养及基因转染

人HCC细胞系 Huh7 和 Hep3B 购自中国科学院细胞库(上海)。所有细胞均在含 10% 胎牛血清(FBS, Gibco)的DMEM高糖培养基(Gibco)中培养,培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>的恒温恒湿培养箱。细胞传代采用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化,以 1:3 比例进行传代,保持细胞处于对数生长期。

PTHLH 特异性小干扰 RNA (siRNA) 和过表达质粒由广州汉一生物有限公司设计合成。转染前 24 h, 将细胞以适当密度接种于 6 孔板中。待细胞融合度达到 60%~70% 时, 按照制造商说明书, 使用 JetPRIME Versatile DNA/siRNA 转染试剂 (Polyplus) 进行转染实验。

1.5.1 siRNA 转染实验分组 阴性对照组 (siNC): 转染阴性对照 siRNA (100 pmol) 与 JetPRIME 转染试剂 (5 μL) 的复合物; 敲低组 1 (siPTHLH-1): 转染靶向 PTHLH 的小干扰 RNA 序列 1 (100 pmol) 与 JetPRIME 转染试剂 (5 μL) 的复合物; 敲低组 2 (siPTHLH-2): 转染靶向 PTHLH 的小干扰 RNA 序列 2 (100 pmol) 与 JetPRIME 转染试剂 (5 μL) 的复合物。

1.5.2 过表达质粒转染实验分组 阴性对照组 (ovNC): 转染空载对照质粒 (100 pmol) 与 JetPRIME 转染试剂 (5 μL) 的复合物; 过表达组 (ovPTHLH): 转染 PTHLH 过表达质粒 (100 pmol) 与 JetPRIME 转染试剂 (5 μL) 的复合物。

1.5.3 转染操作步骤 (六孔板体系) 复合物制备: 取 125 μL Opti-MEM 培养基, 分别加入 100 pmol siRNA (或质粒) 和 5 μL JetPRIME 转染试剂, 轻柔混匀后室温静置 20 min; 转染处理: 更换细胞新鲜培养基后, 将复合物均匀滴加至对应孔中, 轻柔混匀后置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养; 培养基更换: 转染 8 h 后更换为新鲜完全培养基继续培养。

1.5.4 siRNA 序列 siPTHLH-1: 5'-CUAACAAGGUGGAGACGUATT-3', 5'-UACGUCUCCACCUUGUAGTT-3'; siPTHLH-2: 5'-GAUGAGGGCAGAUACCUAATT-3', 5'-UUAGGUAUCUGCCUCAUCTT-3'。

1.5.5 PTHLH (NM\_198965) 过表达质粒的序列 ATGCAGCGGAGACTGGTTCAGCAGTGGAGCGTCGCGGTGTTCTGCTGAGCTACGCGGTGCCCTCCTGCGGGCGCTCGGTGGAGGGTCTCAGCCGCC

GCCTCAAAGAGCTGTGTCTGAACATCAGCTCC  
TCCATGACAAGGGGAAGTCCATCCAAGATTTAC  
GGCGACGATTCTTCCTTCACCATCTGATCGCAG  
AAATCCACACAGCTGAAATCAGAGCTACCTCGG  
AGGTGTCCCCTAACTCCAAGCCCTCTCCAACA  
CAAAGAACCACCCCGTCCGATTTGGGTCTGATG  
ATGAGGGCAGATACTAACTCAGGAAACTAACA  
AGGTGGAGACGTACAAAGAGCAGCCGCTCAAG  
ACACCTGGGAAGAAAAGAAAGGCAAGCCCG  
GGAAACGCAAGGAGCAGGAAAAGAAAACG  
GCGAACTCGCTCTGCCTGGTTAGACTCTGGAGT  
GACTGGGAGTGGGCTAGAAGGGGACCACCTGT  
CTGACACCTCCACAACGTCGCTGGAGCTCGATT  
CACGGAGGCAT。

### 1.6 细胞增殖检测

采用 CCK-8 检测细胞增殖能力。将转染处理后的细胞以  $2 \times 10^3$  /孔的密度接种于 96 孔板中, 每组设置 3 个复孔。分别在细胞贴壁后 (0 h) 及培养 24、48、72、96 和 120 h 时进行检测。具体步骤: 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 37 °C 孵育 1 h 后, 使用酶标仪 (BioTek) 测定吸光度值 ( $A_{450\text{nm}}$  值)。以 0 h 的  $A_{450\text{nm}}$  值为基准, 计算细胞增殖率。

### 1.7 克隆形成实验

将转染处理后的细胞以 500 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 每组设置 3 个复孔。在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 14 d, 期间每 3 d 更换新鲜培养基。培养结束后, 用预冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.5% 结晶紫溶液染色 15 min。PBS 漂洗后, 拍照获取克隆图像, 并使用 ImageJ 软件 (NIH) 进行克隆计数。

### 1.8 Transwell 细胞迁移和侵袭实验

采用 24 孔 Transwell 小室 (Corning) 进行实验。对于侵袭实验, 上室预先用 Matrigel 基质胶 (Corning, 1:8 稀释) 包被, 37 °C 孵育 1 h 使其凝固。将  $5 \times 10^4$  细胞重悬于 200 μL 无血清培养基中, 接种于上室, 下室加入 600 μL 含 20% 胎牛血清的完全培养基。37 °C 培养 24 h 后, 用棉签轻轻擦去上室未迁移/侵袭的细胞。迁移/侵袭至下室的细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.5% 结晶紫溶液染色 15 min。PBS 漂洗后, 在倒置显微镜 (Olympus) 下随机选取 3 个视野 (100×) 进行细胞计数, 取平均值作为最终结果。

### 1.9 生物信息学分析

本研究下载了 TCGA 数据库肝细胞癌数据集 (LIHC) 分析 PTHLH 的表达水平和对预后的影响。

GEO 收录的数据类型包括高通量基因表达数据、芯片数据、测序数据以及其他相关实验数据。

GSE14520是人肝癌数据集,本研究利用GSE14520验证PTHLH在HCC组织与正常组织的表达差异及对预后的影响。

R包使用R版本4.4.0实现。原始数据整理使用Perl编程语言(版本10.0.22621.3155)。使用的R包如下所示(表2)。

表2 分析中使用的R包

Tab.2 R packages used in the analysis

R package name	Description and Function
survival	Used for survival analysis
survminer	Used for drawing survival curves
ggplot2	Used for drawing graphs or data graphics
pheatmap	Used for drawing heatmaps
limma	Used for difference analysis between groups
ggpubr	Extension of the ggplot2 package
dplyr	Simplify data processing
stringr	String manipulation package
forestplot	Draw forest plots
reshape	Functions for changing array shapes
data.table	Extended R's data frame objects

### 1.10 统计学分析

临床样本实验的分组:在进行临床样本的生存分析、单因素及多因素Cox分析时,本研究提取70例肿瘤组织样本(无需癌旁组织)的RNA进行qRT-PCR检测,以18s RNA作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目标基因(PTHLH)的相对表达量,并以所有样本相对表达量的中位数为临界值,将样本分为PTHLH高表达组(表达量 $\geq$ 中位数)和PTHLH低表达组(表达量 $<$ 中位数)。

所有实验数据均独立重复至少3次,使用IBM SPSS Statistics 20.0和GraphPad Prism 5软件进行统计分析。生存分析采用Kaplan-Meier法,单因素和多因素分析采用Cox比例风险回归模型,基于Cox回归分析结果构建预测预后的列线图。所有统计检验均为双侧检验, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 在TCGA数据库中,PTHLH在HCC组织中高表达且与患者预后不良相关

HCC组织的PTHLH mRNA表达水平显著高于配对的癌旁组织( $P<0.0001$ ,图1A)。Kaplan-Meier生存分析显示,PTHLH mRNA高表达组患者的无瘤生存期(DFS)显著低于低表达组( $P=0.015$ ,图1B)。同时,PTHLH mRNA高表达组患者的总生存期(OS)也显著低于低表达组( $P=0.0066$ ,图1C)。

单因素Cox回归分析显示,T分期( $P<0.001$ )、BCLC分期( $P<0.001$ )、和PTHLH mRNA表达水平( $P=0.040$ )与临床预后相关,进一步的多因素Cox回归分析表明,PTHLH mRNA高表达可能是影响HCC患者预后的独立危险因素( $P=0.032$ ,图1D、E)。

### 2.2 在GEO数据库中,PTHLH在HCC组织中高表达且与患者预后不良相关

在GSE14520数据集中,HCC组织的PTHLH mRNA表达水平显著高于配对的癌旁组织( $P=0.026$ ,图2A)。Kaplan-Meier生存分析显示,PTHLH mRNA高表达组患者DFS和OS显著低于低表达组( $P=0.019$ , $P=0.0018$ ,图2B、C)。

单因素Cox回归分析显示,性别( $P=0.022$ )、肿瘤大小( $P=0.029$ )、BCLC分期( $P<0.001$ )和PTHLH mRNA表达水平( $P=0.007$ )与临床预后相关。进一步的多因素Cox回归分析表明,PTHLH mRNA高表达可能是影响HCC患者预后的独立危险因素( $P<0.001$ ,图2D、E)。

### 2.3 在临床样本中,PTHLH在HCC组织中高表达且与患者预后不良相关

qRT-PCR结果显示,84.3%的HCC组织中PTHLH mRNA表达水平高于配对的癌旁组织( $P<0.001$ ,图3A、B)。免疫组织化学分析也显示,在20对HCC组织及配对癌旁组织中,PTHLH蛋白在HCC组织中的表达水平高于配对的癌旁组织( $P<0.01$ ),且主要定位于细胞质,细胞外基质中也能检测到一定表达,提示PTHLH在HCC细胞中可能通过旁分泌方式发挥作用(图3D)。基于70例HCC患者的临床随访数据,以PTHLH mRNA表达水平的中位数分层的Kaplan-Meier生存分析显示,PTHLH高表达组患者的DFS显著低于低表达组( $P=0.002$ ,图3C)。

PTHLH mRNA高表达( $P=0.004$ )、AFP $>400$   $\mu\text{g/L}$  ( $P=0.039$ )、肿瘤大小( $P=0.012$ )、和分化程度( $P=0.003$ )与HCC患者的DFS相关。进一步的多因素Cox回归分析表明,PTHLH mRNA高表达( $P=0.048$ )、AFP $>400$   $\mu\text{g/L}$  ( $P=0.017$ )和分化程度( $P=0.002$ )可能是影响HCC患者预后的独立危险因素(图4A、B)。

基于多因素COX回归分析后的独立危险因素,本研究构建了预测DFS预后的列线图(图4C)。通过ROC曲线评估,该列线图在预测1年、2年和3年DFS的曲线下面积(AUC)分别为0.739、0.761和0.846,其预测效能显著优于传统的BCLC分期系统的0.580、0.556和0.604(图4D)。

### 2.4 PTHLH调控HCC细胞恶性生物学行为的作用及其可能激活的信号通路

qRT-PCR和Western blotting结果显示PTHLH mRNA和蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$ ,图5A)。

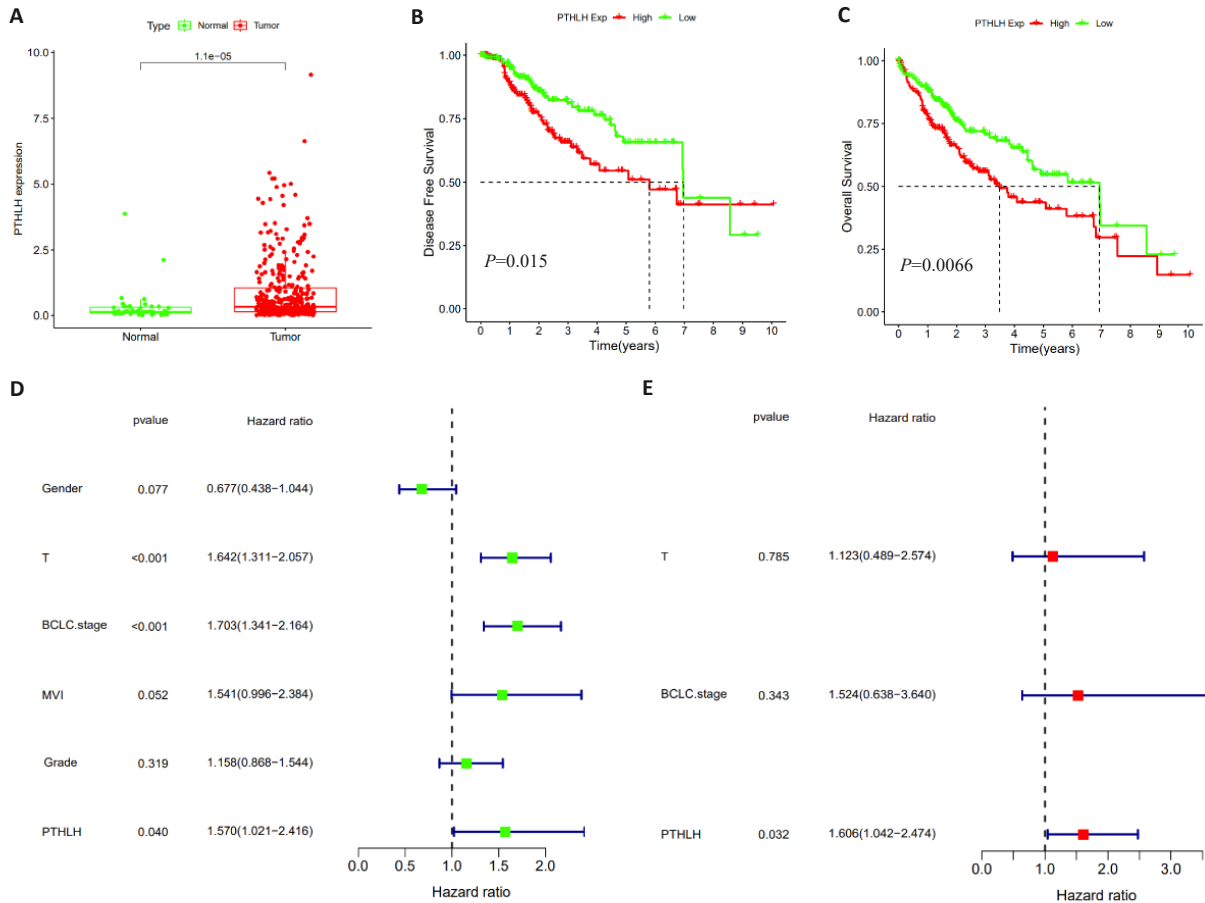


图1 TCGA数据库中PTHLH mRNA的表达水平及预后分析

Fig.1 Analysis of PTHLH mRNA expression levels and prognostic evaluation of HCC patients based on data from the TCGA database. A: Comparison of PTHLH mRNA expression levels between HCC and adjacent normal tissues. B: Kaplan-Meier curves for disease-free survival (DFS) stratified by the median expression level of PTHLH mRNA. C: Kaplan-Meier curves for overall survival (OS) stratified by the median expression level of PTHLH mRNA. D: Forest plot of univariate Cox regression analysis. E: Forest plot of multivariate Cox regression analysis.

CCK-8实验显示,在敲低PTHLH后,Huh7和Hep3B细胞的增殖能力显著降低( $P<0.01$ ,图5B);克隆形成实验显示,PTHLH敲低降低了Huh7和Hep3B细胞的集落形成率( $P<0.01$ ,图5E)。Transwell迁移和侵袭实验显示,PTHLH敲低显著抑制了HCC细胞的迁移和侵袭能力,穿过基质的细胞数显著减少( $P<0.01$ ,图5C、D)。敲低PTHLH的WB分析显示,在PTHLH敲低后,磷酸化ERK1/2(P-ERK1/2)和磷酸化JNK(P-JNK)蛋白水平降低( $P<0.05$ ,图6A、B),而ERK和JNK蛋白水平无明显变化(图6A、B)。

qRT-PCR和Western blotting结果显示PTHLH mRNA和蛋白表达水平均上调( $P<0.01$ ,图7A)。

CCK-8实验显示,在过表达PTHLH后,Huh7和Hep3B细胞的增殖能力提高( $P<0.01$ ,图7B)。Transwell迁移和侵袭实验结果显示,PTHLH过表达显著增强了HCC细胞的迁移和侵袭能力,穿过基质的细胞数增加( $P<0.001$ ,图7C、D)。

### 3 讨论

本研究首先从TCGA和GEO数据库出发,采用生物信息学方法分析了PTHLH在HCC中的表达特征、对临床预后的影响和预后价值,然后通过临床样本验证进行了验证。进一步通过体外细胞功能实验,本研究显示了PTHLH在HCC进展中的重要作用,这些作用可能是通过激活ERK/JNK信号通路实现的。

PTHLH最初被鉴定为恶性肿瘤相关高钙血症的关键致病因子<sup>[16,17]</sup>。其编码的甲状旁腺激素样激素(PTHLH)是一种具有多效性功能的蛋白分子,可通过自分泌、旁分泌和内分泌途径参与细胞增殖、分化的调控,在骨骼发育、牙齿形成和乳腺组织生长等生理过程中发挥重要作用<sup>[18,19]</sup>。本研究的免疫组织化学分析显示,PTHLH蛋白主要定位于细胞质,同时在细胞外基质中也可检测到表达,这一空间分布特征提示PTHLH可能通过旁分泌机制参与HCC的肿瘤微环境调控。近年研究表明,PTHLH在多种恶性肿瘤(包括肺癌、乳腺

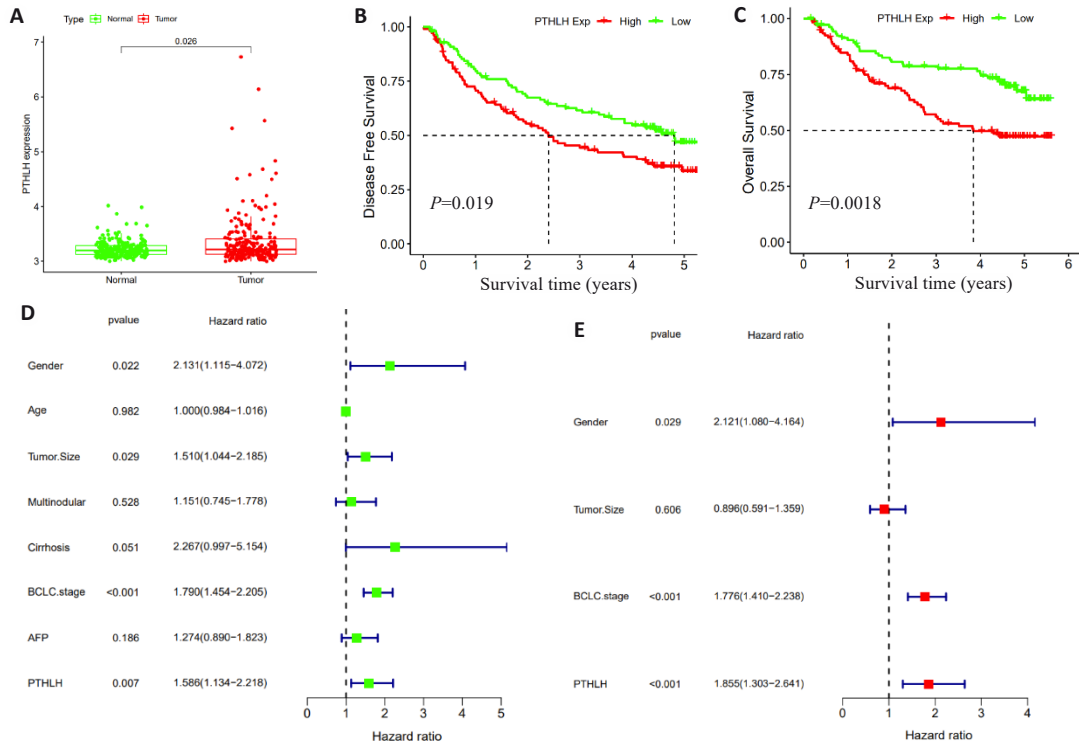


图2 GEO数据库中PTHLH mRNA的表达水平及预后分析

Fig.2 Analysis of PTHLH mRNA expression levels and prognostic evaluation of HCC patients based on data from the GEO database. **A:** Comparison of PTHLH mRNA expression levels between HCC and adjacent normal tissues. **B:** Kaplan-Meier curves for DFS of HCC patients stratified by the median expression level of PTHLH mRNA. **C:** Kaplan-Meier curves for OS of HCC patients stratified by the median expression level of PTHLH mRNA. **D:** Forest plot of univariate Cox regression analysis. **E:** Forest plot of multivariate Cox regression analysis.

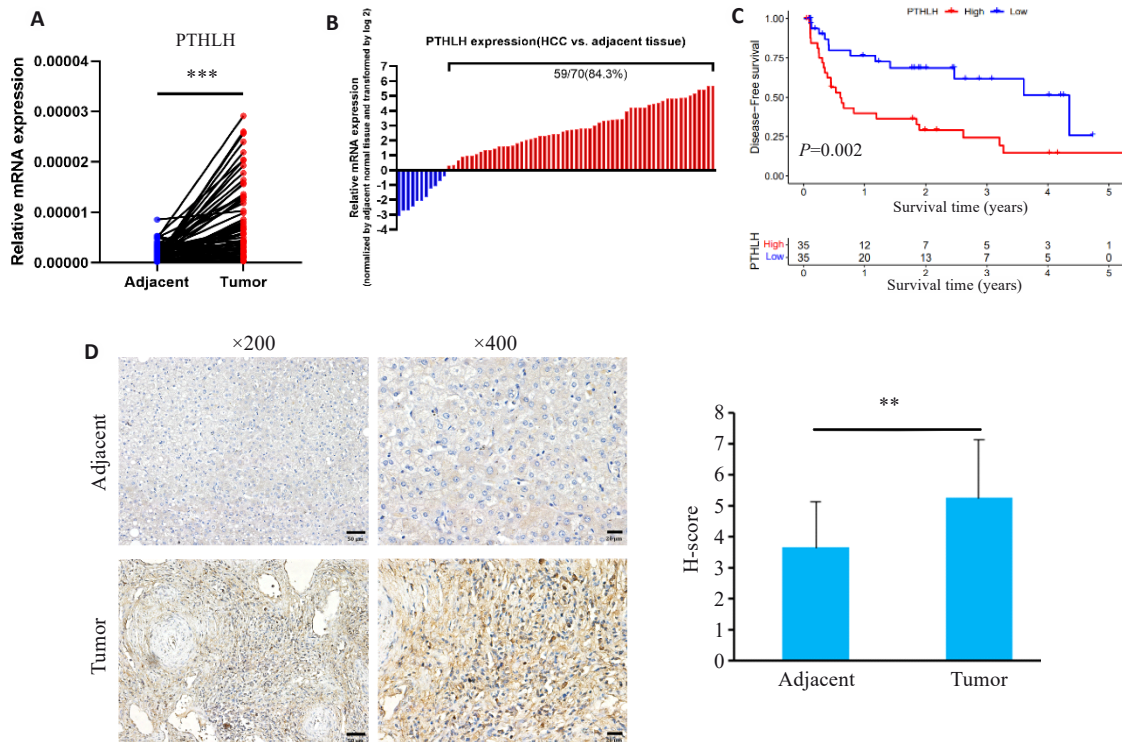


图3 HCC 临床组织样本中PTHLH的表达及预后分析

Fig.3 Expression and prognostic analysis of PTHLH in clinical HCC tissue samples. **A, B:** Relative PTHLH mRNA expression levels in 70 pairs of HCC and adjacent normal tissues. **C:** Kaplan-Meier curves for DFS of the patients stratified by the median expression level of PTHLH mRNA. **D:** Representative immunohistochemical staining of PTHLH in HCC and adjacent normal tissues (Scale bar=50 μm). \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

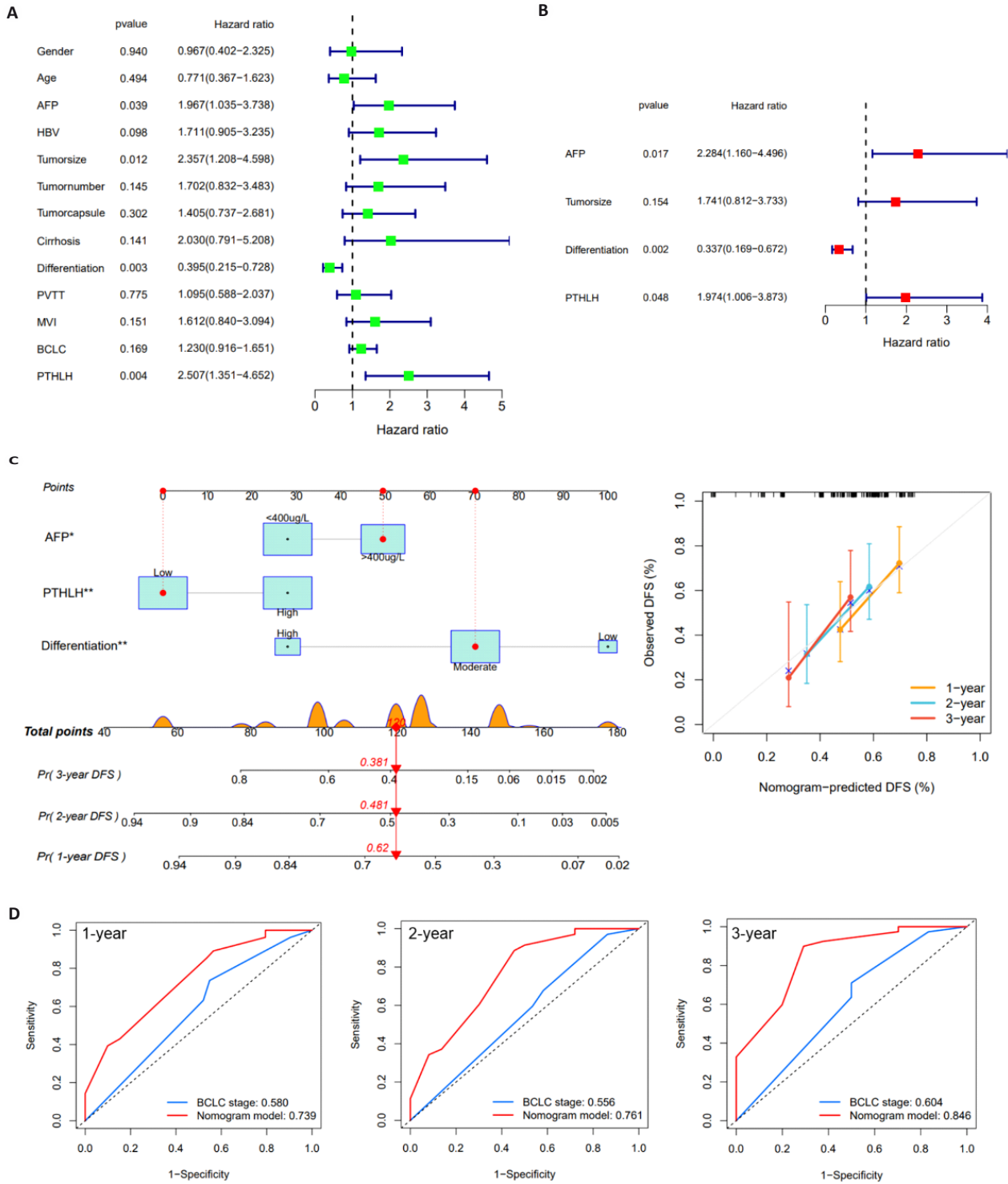


图4 PTHLH的临床预后价值

Fig.4 Clinical prognostic value of PTHLH in HCC patients. A: Forest plot of univariate Cox regression analysis. B: Forest plot of multivariate Cox regression analysis. C: Nomogram for predicting 1-year, 2-year, and 3-year DFS in HCC patients. D: ROC curves comparing the predictive performance of the PTHLH-based nomogram and BCLC staging system.

癌和结肠直肠癌等)中呈现异常高表达,并通过多种途径发挥促癌作用<sup>[10, 13, 19-25]</sup>。通过对TCGA和GEO数据库的生物信息学分析,结合临床组织样本验证,本研究表明PTHLH在HCC中同样存在显著高表达,且其表达水平与患者DFS和OS呈显著负相关。这些发现不仅验证了既往关于PTHLH促癌功能的研究结论<sup>[10, 13, 19-25]</sup>,

更显示了PTHLH可能作为HCC独立预后危险因素的临床价值。

肿瘤细胞的恶性增殖、侵袭和转移能力的激活是恶性肿瘤的重要特征<sup>[26]</sup>。多项研究表明,PTHLH在多种恶性肿瘤(包括肺癌、乳腺癌、肝胆管癌(ICC)、结肠癌、肾癌和前列腺癌等)中通过促进肿瘤生长、侵袭和转

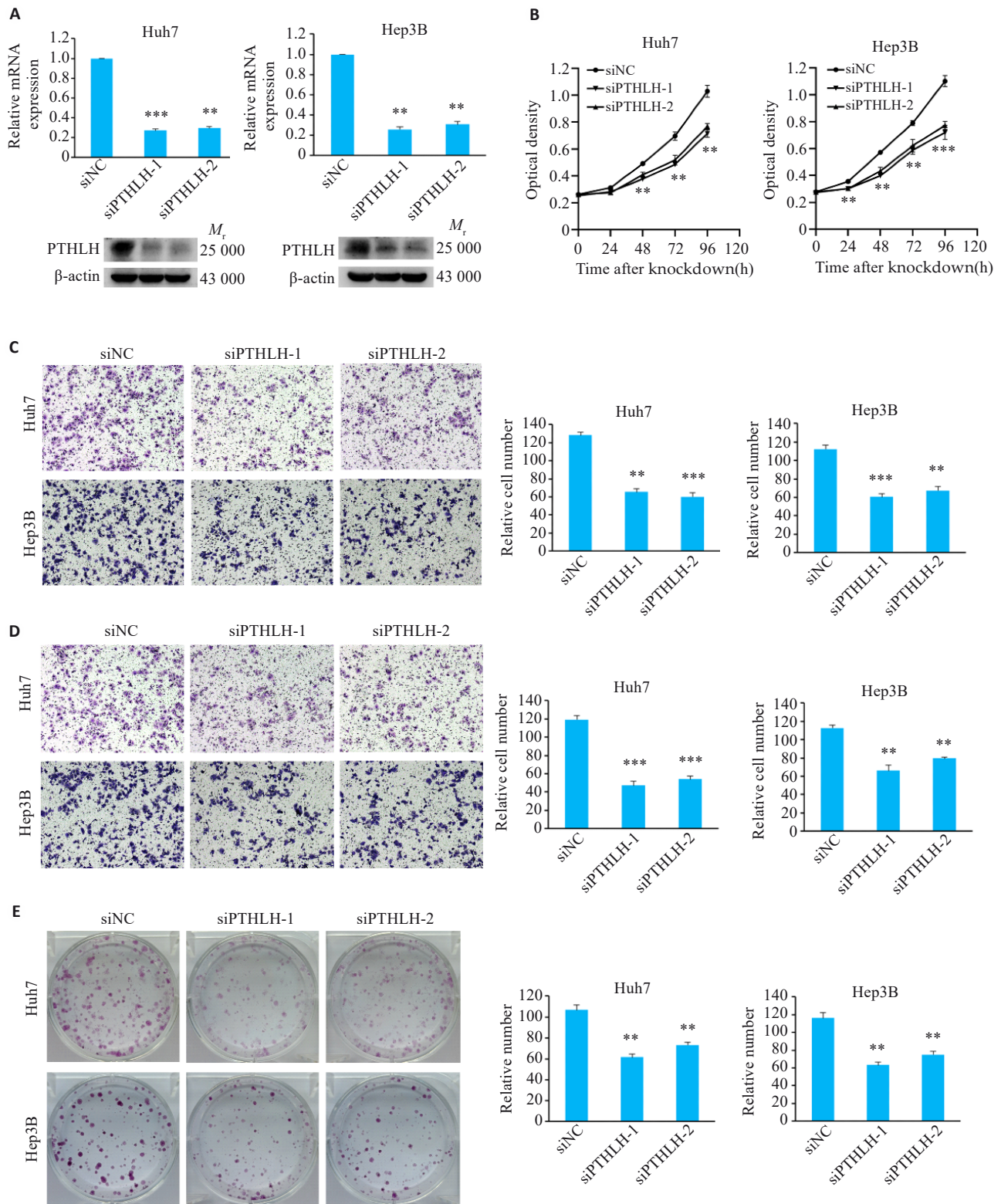


图5 敲低PTHLH可抑制HCC细胞的恶性表型

Fig.5 Knockdown of PTHLH suppresses malignant phenotypes of HCC cells. **A:** Validation of PTHLH knockdown efficiency by qRT-PCR and Western blotting. **B:** CCK-8 assay showing cell proliferation. **C:** Transwell migration assay results (Original magnification:  $\times 100$ ). **D:** Matrigel invasion assay results ( $\times 100$ ). **E:** Colony formation assay results.  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  vs control group (siNC).

移发挥促癌作用<sup>[19-25]</sup>。为探究PTHLH在HCC中的作用,本研究通过siRNA和过表达质粒分别构建了PTHLH敲低和过表达细胞模型。在敲低PTHLH后,HCC细胞的增殖、克隆形成、迁移和侵袭能力受到抑

制,这与PTHLH在其他肿瘤中的促癌作用一致<sup>[19-25]</sup>;而PTHLH过表达使HCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力显著增强,进一步表明了PTHLH对HCC细胞恶性表型的正向调控作用。值得注意的是,PTHLH的生

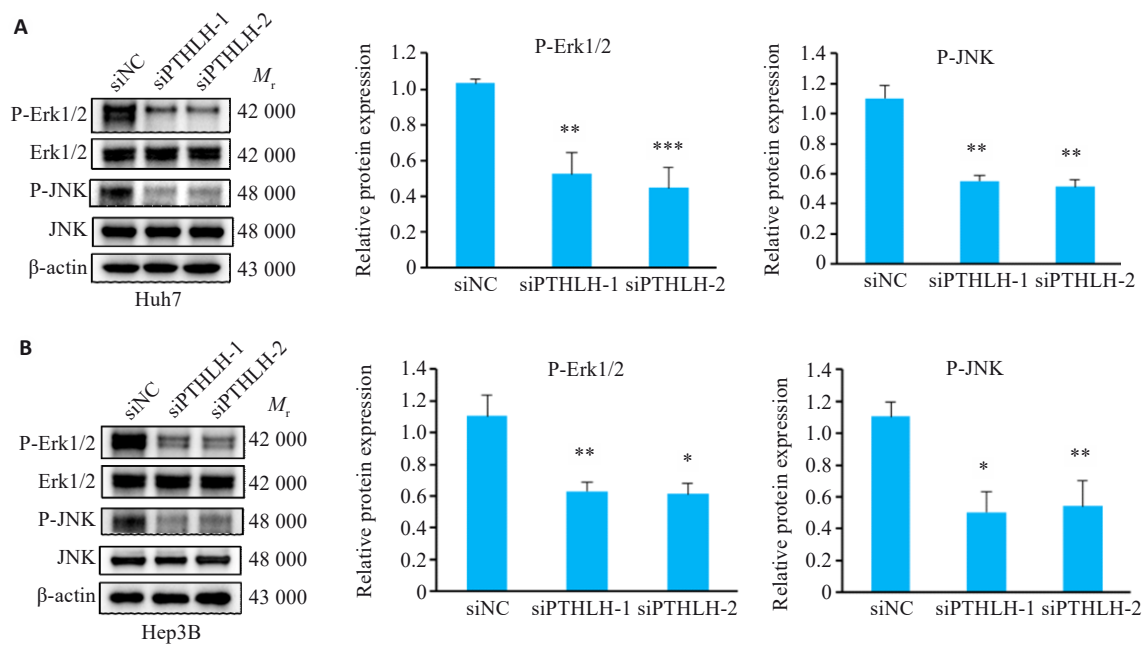


图6 敲低PTHLH后ERK/JNK信号通路的Western blotting分析

Fig.6 Analysis of ERK/JNK signaling pathway in HCC cells by Western blotting following PTHLH knockdown. A: Western blotting of the ERK/JNK signaling pathway in Huh7 cells. B: Western blotting of the ERK/JNK signaling pathway in Hep3B cells. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs siNC.

物学功能可能存在组织特异性。例如,在三阴性乳腺癌中,PTHLH可通过抑制CDK2活性阻滞细胞周期于G1期,从而发挥肿瘤抑制作用<sup>[27]</sup>。在非小细胞肺癌中,PTHLH可抑制肺癌细胞系的生长,在鼠模型中可减缓肺癌的进展并延长生存期<sup>[28]</sup>。这种功能异质性提示PTHLH的调控网络具有显著的肿瘤类型依赖性。

先前的研究表明,PTHLH作为自分泌/旁分泌信号分子,可通过激活多种信号通路,包括cAMP/PKA、IP3/PKC、ERK/JNK、Wnt/ $\beta$ -catenin、Hedgehog和JAK-STAT通路,调控细胞生物学行为<sup>[13, 27, 29-31]</sup>。在肝内胆管癌(ICC)中,PTHLH通过ERK/JNK-ATF2-cyclinD1信号轴促进ICC细胞增殖<sup>[13]</sup>。为探究PTHLH在HCC中的作用通路,本研究检测了ERK/JNK通路关键蛋白的表达变化。在PTHLH敲低后,磷酸化ERK1/2(P-ERK1/2)和磷酸化JNK(P-JNK)水平显著降低,而总ERK/JNK蛋白表达无明显变化,表明PTHLH在HCC中可能通过激活ERK/JNK通路发挥作用,这一发现与Tang等<sup>[13]</sup>在ICC中的研究结果一致,提示PTHLH-ERK/JNK信号轴在原发性肝癌(包括HCC和ICC)中可能具有保守的促癌机制。从分子机制来看,ERK和JNK作为MAPK家族核心成员,通过级联磷酸化调控细胞功能<sup>[32]</sup>。ERK通路通常由Ras-Raf-MEK-ERK信号级联激活,而JNK通路

由MAP3Ks、MKK4/7和JNK激活,ERK/JNK通路在多种细胞过程中起关键作用<sup>[33, 34]</sup>。本研究的结果表明,PTHLH可能通过激活ERK/JNK信号通路驱动HCC进展,这为开发靶向PTHLH-MAPK轴治疗HCC提供了理论依据。

本研究显示了PTHLH在HCC进展中的重要作用,然而本研究仍存在一些局限性。首先,PTHLH在HCC中的具体作用机制仍需进一步探索;其次,PTHLH与其他信号通路的交互作用尚未完全阐明,而且尚未找到靶向PTHLH的小分子化合物以应用于PTHLH的靶向干预研究。未来的研究可探索PTHLH在HCC微环境中的作用,以及其作为治疗靶点的可行性。

本研究初步探究了PTHLH在HCC进展中的临床意义和作用机制。PTHLH在HCC组织中显著高表达,且与患者不良预后密切相关,PTHLH mRNA高表达可能是影响HCC患者术后DFS和OS的独立危险因素;基于PTHLH mRNA表达水平构建的预后预测模型显著提高了HCC患者术后复发风险的预测准确性。体外细胞实验表明,PTHLH可能通过激活ERK/JNK信号通路促进HCC细胞的增殖、克隆形成、迁移和侵袭等恶性生物学行为。这些结果显示了PTHLH在HCC进展中的重要作用,为开发基于PTHLH的新型HCC诊断标志物和治疗靶点提供了理论依据。

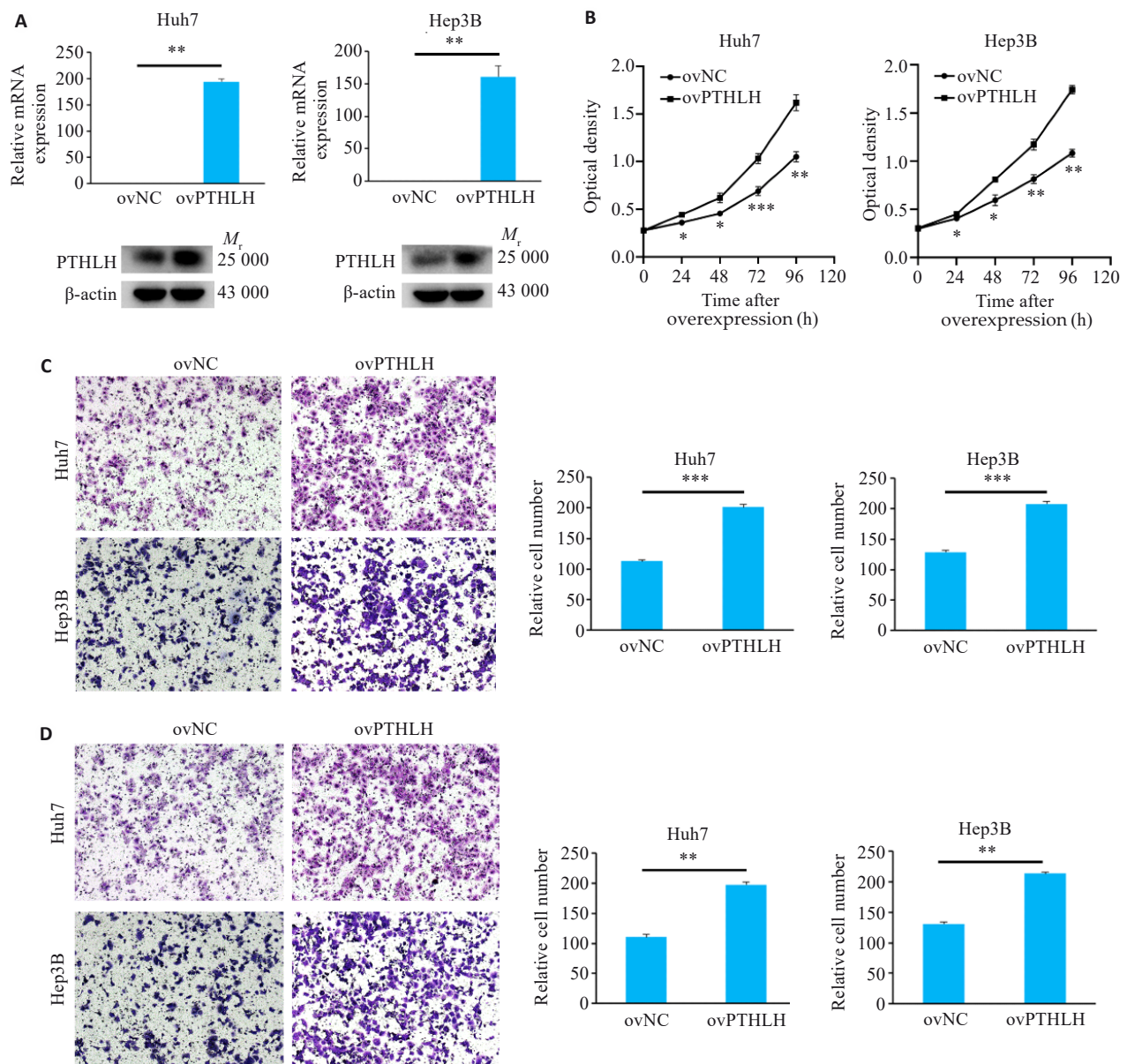


图7 过表达PTHLH增强HCC细胞的恶性表型

Fig.7 Overexpression of PTHLH enhances malignant phenotypes of HCC cells. A: Validation of PTHLH overexpression efficiency by qRT-PCR and Western blotting. B: CCK-8 assay showing cell proliferation. C: Transwell migration assay results (×100). D: Matrigel invasion assay results (×100). \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001 vs ovNC.

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

**参考文献:**

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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): 209-49.

[2] Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7: 6.

[3] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma. reply [J]. N Engl J Med, 2019, 381(1): e2.

[4] Zeng HM, Chen WQ, Zheng RS, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15: a pooled analysis of 17 population-based cancer registries [J]. Lancet Glob Health, 2018, 6(5): e555-67.

[5] Clemens TL, Cormier S, Eichinger A, et al. Parathyroid hormone-

related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets [J]. Br J Pharmacol, 2001, 134(6): 1113-36.

[6] Srisuwarn P, Disthabanchong S. Role of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in protein-energy malnutrition [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2023, 28(8): 167.

[7] Strid H, Care A, Jansson T, et al. Parathyroid hormone-related peptide (38-94) amide stimulates ATP-dependent calcium transport in the Basal plasma membrane of the human syncytiotrophoblast [J]. J Endocrinol, 2002, 175(2): 517-24.

[8] Grinman DY, Boras-Granic K, Takyar FM, et al. PTHrP induces STAT5 activation, secretory differentiation and accelerates mammary tumor development [J]. Breast Cancer Res, 2022, 24 (1): 30.

[9] Pitarresi JR, Norgard RJ, Chiarella AM, et al. PTHrP drives

- pancreatic cancer growth and metastasis and reveals a new therapeutic vulnerability[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(7): 1774-91.
- [10] Urosevic J, Garcia-Albéniz X, Planet E, et al. Colon cancer cells colonize the lung from established liver metastases through p38 MAPK signalling and PTHLH[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(7): 685-94.
- [11] Iddon J, Bundred NJ, Hoyland J, et al. Expression of parathyroid hormone-related protein and its receptor in bone metastases from prostate cancer[J]. *J Pathol*, 2000, 191(2): 170-4.
- [12] Wang YF, Lei R, Zhuang XQ, et al. DLC1-dependent parathyroid hormone-like hormone inhibition suppresses breast cancer bone metastasis[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(4): 1646-59.
- [13] Tang J, Liao Y, He SY, et al. Autocrine parathyroid hormone-like hormone promotes intrahepatic cholangiocarcinoma cell proliferation *via* increased ERK/JNK-ATF2-cyclinD1 signaling[J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 238.
- [14] Fang YH, Xu YY, Liao W, et al. Multiomics analyses and machine learning of nuclear receptor coactivator 6 reveal its essential role in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(1): 75-90.
- [15] Yang Y, Xiao M, Song Y, et al. H-score of 11 $\beta$ -hydroxylase and aldosterone synthase in the histopathological diagnosis of adrenocortical tumors[J]. *Endocrine*, 2019, 65(3): 683-91.
- [16] McCauley LK, Martin TJ. Twenty-five years of PTHrP progress: from cancer hormone to multifunctional cytokine[J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(6): 1231-9.
- [17] Wysolmerski JJ. Parathyroid hormone-related protein: an update[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(9): 2947-56.
- [18] Maioli E, Fortino V. The complexity of parathyroid hormone-related proteinsignalling[J]. *Cell Mol Life Sci CMLS*, 2004, 61(3): 257-62.
- [19] Mangin M, Webb AC, Dreyer BE, et al. Identification of a cDNA encoding a parathyroid hormone-like peptide from a human tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(2): 597-601.
- [20] Assaker G, Camirand A, Abdulkarim B, et al. PTHrP, a biomarker for CNS metastasis in triple-negative breast cancer and selection for adjuvant chemotherapy in node-negative disease[J]. *JNCI Cancer Spectr*, 2019, 4(1): pkz063.
- [21] Lv ZJ, Wu XB, Cao W, et al. Parathyroid hormone-related protein serves as a prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33(1): 100.
- [22] Li JR, Karaplis AC, Huang DC, et al. PTHrP drives breast tumor initiation, progression, and metastasis in mice and is a potential therapy target[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(12): 4655-69.
- [23] Mula RV, Bhatia V, Falzon M. PTHrP promotes colon cancer cell migration and invasion in an integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 4-dependent manner through activation of Rac1[J]. *Cancer Lett*, 2010, 298(1): 119-27.
- [24] Liao JH, Li X, Koh AJ, et al. Tumor expressed PTHrP facilitates prostate cancer-induced osteoblastic lesions[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(10): 2267-78.
- [25] Sourbier C, Massfelder T. Parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2006, 240(2): 170-82.
- [26] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-74.
- [27] Henderson MA, Danks JA, Slavin JL, et al. Parathyroid hormone-related protein localization in breast cancers predict improved prognosis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(4): 2250-6.
- [28] Hastings RH, Montgrain PR, Quintana R, et al. Cell cycle actions of parathyroid hormone-related protein in non-small cell lung carcinoma[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(4): L578-85.
- [29] He SY, Tang J, Diao N, et al. Parathyroid hormone-related protein activates HSCs *via* hedgehog signalling during liver fibrosis development[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1984-94.
- [30] Wang L, Huang JX, Jiang MH, et al. Inhibited PTHLH downstream leukocyte adhesion-mediated protein amino acid N-linked glycosylation coupling Notch and JAK-STAT cascade to iron-sulfur cluster assembly-induced aging network in no-tumor hepatitis/cirrhotic tissues (HBV or HCV infection) by systems-theoretical analysis[J]. *Integr Biol (Camb)*, 2012, 4(10): 1256-62.
- [31] Huang JX, Wang L, Jiang MH, et al. PTHLH coupling upstream negative regulation of fatty acid biosynthesis and Wnt receptor signal to downstream peptidase activity-induced apoptosis network in human hepatocellular carcinoma by systems-theoretical analysis[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2012, 32(5): 250-6.
- [32] Kang N, Zhang XN, Liu K, et al. Roles of ERK/JNK in carbon black induced AP-1 cell signaling pathway changes[J]. *J Hyg Res*, 2021, 50(4): 533-8.
- [33] Zhang ZY, Yang ZH, Wang S, et al. Targeting MAPK-ERK/JNK pathway: a potential intervention mechanism of myocardial fibrosis in heart failure[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 173: 116413.
- [34] Qiu QW, Yu XF, Chen QL, et al. Sema3A inactivates the ERK/JNK signalling pathways to alleviate inflammation and oxidative stress in lipopolysaccharide-stimulated rat endothelial cells and lung tissues[J]. *Autoimmunity*, 2023, 56(1): 2200908.

(编辑:吴锦雅)