



· 论 著 ·

PARP1通过调控POU2F2的表达促进肝细胞癌的进展研究

温自强, 兰军良, 周 博, 许其威

临汾市人民医院, 山西医科大学第七临床医学院肝胆外科, 山西 临汾 041000

[摘要] 背景与目的: 肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是严重威胁人类健康的重大疾病。多腺苷二磷酸核糖聚合酶1 [poly (ADP-ribose) polymerase 1, PARP1] 作为一种腺苷二磷酸核糖转移酶, 能够促进DNA损伤修复进程, 因此, PARP1通常被看作是一种促癌基因, 但其在HCC中的表达和机制尚不明确。本研究旨在探讨PARP1在HCC患者中的表达趋势及其在HCC发生、发展中的作用。方法: 首先, 通过对癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 和临床蛋白质组学癌症分析联盟 (Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium, CPTAC) HCC数据库的分析鉴定PARP1的临床表达情况, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测PARP1在HCC患者癌组织及癌旁组织样本中的表达情况。然后, 借助PARP1的抑制剂PJ34抑制PARP1酶活性, 同时借助小RNA干扰技术下调HCC细胞系中PARP1的表达, 并以此为模型, 采用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 和流式细胞术检测PARP1对细胞活力的影响, 采用RTFQ-PCR检测HCC细胞干性基因的表达变化, 采用细胞迁移和侵袭实验检测HCC细胞迁移和侵袭能力。采用生物信息学方法分析HCC进展中受PARP1调控的靶基因及其参与通路, 并通过回补实验确定PARP1靶基因是否参与HCC细胞恶性表型。结果: 在TCGA和CPTAC数据库中, PARP1的表达均在HCC组中显著上调。RTFQ-PCR和Western blot检测结果表明, 相比癌旁组织, HCC组织中的PARP1在转录和翻译水平均显著上调。生存分析结果表明, PARP1的表达与HCC患者的预后呈显著负相关。CCK-8、流式细胞术、RTFQ-PCR、细胞迁移及侵袭实验结果显示, 在HCC细胞中下调PARP1表达可以抑制HCC细胞增殖, 降低HCC细胞活性及干性, 并减弱HCC细胞迁移和侵袭能力。生物信息学分析提示, PARP1调控基因富集在核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 和 Necroptosis通路中, POU2类同源框2 (POU class homeobox 2, *POU2F2*) 可能是PARP1的潜在靶基因。相关性分析、RTFQ-PCR和Western blot检测一致证实POU2F2的表达受到PARP1的调控, 但PJ34不能抑制POU2F2的表达。CCK-8、流式细胞术和RTFQ-PCR结果显示, 采用共转染的方式在敲低PARP1的HCC细胞系中回补POU2F2可以增强HCC细胞增殖能力, 提高HCC细胞活性, 促进HCC细胞干性。结论: PARP1可以通过非酶活性正向调控POU2F2表达促进HCC细胞恶性表型, 本研究结果有望为HCC的临床治疗和新药开发提供新的思路。

[关键词] 肝细胞癌; 多腺苷二磷酸核糖聚合酶1; POU2类同源框2; 增殖; 活性; 干性

中图分类号: R735.7 文献标志码: A DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2024.09.005

PARP1 promotes the progression of hepatocellular carcinoma by regulating expression of POU2F2 WEN Ziqiang, LAN Junliang, ZHOU Bo, XU Qiwei (Department of Hepatobiliary Surgery, Linfen People's Hospital, The Seventh Clinical Medical College of Shanxi Medical University, Linfen 041000, Shanxi Province, China)

Correspondence to: XU Qiwei E-mail: xuqiwei2689103@yeah.net

[Abstract] **Background and purpose:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is a major disease seriously threatening human health. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) is an enzyme that catalyzes poly ADP-ribosylation. Given the role of PARP1 in DNA damage repair, it is generally considered as an oncogene. However, the expression of PARP1 and its mechanism in HCC are not yet clear. This study aimed to investigate the role of PARP1 in the occurrence and development of HCC and its potential mechanisms. **Methods:** First, we analyzed the expression pattern of PARP1 in The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Clinical Proteomic

基金项目: 临汾市软科学研究项目 (2305)。

第一作者: 温自强 (ORCID: 0009-0001-1621-1692), 硕士, 主治医师。

通信作者: 许其威 (ORCID: 0009-0001-9431-2077), 本科, 主任医师, E-mail: xuqiwei2689103@yeah.net。

Tumor Analysis Consortium (CPTAC) HCC database, and identified the expression trend of PARP1 in our HCC cohort using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) and Western blot. Then, the enzyme activity of PARP1 was inhibited by PJ34, an inhibitor of PARP1 and the expression of PARP1 in HCC cell lines was downregulated with small RNA interference technology. Based on these models, the following experiments were conducted: First, the effect of PARP1 on cell viability was assessed by cell counting kit-8 (CCK-8) assay and flow cytometry; Second, the expression levels of stemness-related genes in HCC cells were identified using RTFQ-PCR; Third, the effect of inhibition of PARP1 on migration and invasion of HCC cells was detected by migration and invasion assay (transwell assay). Finally, bioinformatic analysis was performed to identify new target genes and the pathways regulated by PARP1 in HCC progression. Rescue experiments were performed to determine whether PARP1 target genes were involved in the malignant phenotypes of HCC cells. **Results:** The expression of PARP1 was significantly up-regulated in HCC tissues in both TCGA and CPTAC database. RTFQ-PCR and Western blot assays showed that PARP1 was obviously up-regulated in HCC tissues compared to paracancerous tissues. Survival analysis showed that PARP1 expression was significantly negatively correlated with the prognosis of patients. The results of CCK-8, flow cytometry, RTFQ-PCR and transwell assay indicated that inhibition of PARP1 attenuated proliferation and activity of HCC cells, as well as weakened their stemness, migration and invasion. Bioinformatics analysis suggested that PARP1-regulated genes were enriched in the nuclear factor- κ B (NF- κ B) and necroptosis pathways, with POU class homeobox 2 (*POU2F2*) potentially being a target gene of PARP1. Correlation analysis, along with RTFQ-PCR and Western blot detection, confirmed that the expression of *POU2F2* was regulated by PARP1, while not affected by PJ34, indicating the effect of nonenzymatic function of PARP1 on *POU2F2*. CCK-8, flow cytometry and RTFQ-PCR results showed that the reintroduction of *POU2F2* enhanced proliferative capacity, increased activity, and promoted stemness of HCC cell lines with *PARP1* knockdown. **Conclusion:** By positively regulating the expression of *POU2F2*, PARP1 promotes malignant phenotypes of HCC cells, providing new insights for clinical treatment and drug development for HCC.

[**Key words**] Hepatocellular carcinoma; Poly (ADP-ribose) polymerase 1; POU class homeobox 2; Proliferation; Activity; Stemness

肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 是严重威胁人类健康的重大疾病^[1]。近年来,随着靶向治疗和免疫治疗的发展,多种肿瘤的疗效得到提升,但HCC的疗效却远低于其他肿瘤^[2],主要原因是HCC是一种高异质性肿瘤,目前对于HCC发生、发展过程的研究依然存在很多不足。在HCC的发展过程中,慢性炎症环境和持续的复制压力导致细胞的大量DNA损伤,进而激活DNA损伤修复的关键分子—多腺苷二磷酸核糖聚合酶1 [poly (ADP-ribose) polymerase 1, PARP1]^[3-4]。因此,探索PARP1在HCC进展中发挥的作用具有积极意义。为此,本研究旨在探讨PARP1对HCC细胞表型的影响,并鉴定POU2F2与PARP1的关系,从而为以PARP1为靶点的药物研发提供新思路。

1 材料和方法

1.1 细胞和实验试剂

人HCC细胞系QGY-7703和SMMC-7721均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,

并于2022年通过DNA指纹鉴定后保存于临汾市人民医院实验室。DMEM培养液、10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶、青-链霉素和磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) 均购自美国Gibco公司。PARP1抑制剂PJ34购自美国MedChemExpress公司。实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 相关试剂盒购自日本TaKaRa公司。蛋白定量试剂盒、细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 和别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 膜联蛋白V细胞活性试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。PARP1抗体、POU2F2、GAPDH抗体及辣根过氧化物酶标记二抗均购自英国Abcam公司。PARP1小干扰RNA、POU2F2编码序列和所有引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成,其中POU2F2编码序列插入pcDNA3.1真核表达质粒中。LipofectamineTM3000和TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司。

1.2 临床标本

收集2014—2017年于临汾市人民医院进行手术切除的93例HCC患者的癌组织及相应癌旁组织, 年龄51~74岁。所有患者术前均未接受化疗、放疗或免疫治疗。临汾市人民医院对于2010年后收入组织库中的样本, 均提前请患者签署知情同意书, 其中包含患者的组织及后续随访数据, 因此, 本研究的所有患者均签署了知情同意书。

1.3 生物信息学方法

1.3.1 PARP1表达数据下载

UALCAN网站 (<https://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>) 系统收录了癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) HCC数据库 (mRNA) 和临床蛋白质组学癌症分析联盟 (Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium, CPTAC) HCC数据库 (蛋白) 的信息, 并进行了可视化展示。本研究通过UALCAN网站调取PARP1的表达情况, 并重新进行分析和展示。

1.3.2 PARP1调控基因分析

为了鉴定PARP1调控的基因, 本研究从高通量基因表达 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库中下载了GSE91051数据集, 该数据集包含3个对照组和3个PARP1敲低的转录组数据。本研究以差异倍数大于2.0或小于0.5, $P < 0.05$ 为筛选标准, 鉴定两组有显著差异的基因作为PARP1调控基因。

1.3.3 相互作用网络分析

本研究使用STRING数据库进行差异基因间相互作用分析, 分析结果导入Cytoscape软件进行可视化处理。

1.3.4 京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路分析

KEGG数据库是一个来自日本的开放式信息源, 用于对基因进行通路富集, 本研究使用在线工具DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行差异基因的KEGG通路分析, 以 $P < 0.05$ 作为筛选标准。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养和转染

HCC细胞培养于含10%FBS的DMEM高糖培养基中, 放置于37 °C、CO₂体积分数为5%的培养箱中。取对数生长期的HCC细胞, 借助Lipofectamine™3000进行转染。在回补实验中, 采用PARP1小干扰RNA和pcDNA3.1-POU2F2共转染HCC细胞, 从而在下调PARP1蛋白水平的同时回补POU2F2的表达。siPARP1序列为5'-GAGGAAGGUAUCAACAAAUTT-3'。siCtrl序列为5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。

1.4.2 RTFQ-PCR检测

用TRIzol提取HCC细胞总RNA后, 经日本TaKaRa公司PrimeScript试剂盒反转录后获得cDNA。RTFQ-PCR由美国ABI公司7900HT仪器完成。实验中以GAPDH为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法检测基因的相对表达量。使用的引物序列如下: PARP1基因正义链为5'-AAGGCGAATGCCAGCGTTAC-3', 反义链为5'-GGCACTCTTGGAGACCATGTCA-3'; KLF4基因正义链为5'-CCCACATGAAGCGACTTCCC-3', 反义链为5'-CAGGTCCAGGAGATCGTTGA-3'; OCT4基因正义链为5'-GTGTTTCAGCCAAAAGACCATCT-3', 反义链为5'-GGCCTGCATGAGGGTTTCT-3'; SOX2基因正义链为5'-GCCGAGTGAAACTTTTGTCTG-3', 反义链为5'-GGCAGCGTGTACTTATCCTTCT-3'; NANOG基因正义链为5'-TTTGTGGGCCTGAGAAA-3', 反义链为5'-AGGGCTGTCTGAATAAGCAG-3'; EPCAM基因正义链为5'-AATCGTCAATGCCAGTGTACTT-3', 反义链为5'-TCTCATCGCAGTCAGGATCATAA-3'; CD133基因正义链为5'-TTCAGTGCTAGGAGGCGGA-3', 反义链为5'-AGCTCTTCAAGGTGCTGTTTCAT-3'; MYC基因正义链为5'-GGCTCCTGGCAAAGGTCA-3', 反义链为5'-CTGCGTAGTTGTGCTGATGT-3'; ABCB5基因正义链为5'-ATTGGAGTGGTTAGTCAAGAGCC-3', 反义链为5'-AGTCACATCATCTCGTCCATACT-3'; POU2F2基因正义链为

5'-AGCACACAGACACCGAAAGAA-3'，反义链为5'-GTTGGGGACACGGAGAATGG-3'；*GAPDH*基因正义链为5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'，反义链为5'-GGCTGTTGTCATAC TTTCATGG-3'。

1.4.3 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测

收集提取组织或细胞中的总蛋白，测定蛋白浓度后，取50 μg蛋白进行Western blot实验。首先，将蛋白在10%凝胶中分离，将分离的蛋白电转移至PVC膜上，经5%脱脂奶粉封闭2 h后，采用含有吐温-20三乙醇胺缓冲盐溶液 (tris-buffered saline Tween, TBST) 在摇床上振荡洗膜3次，每次10 min。随后加入1:5 000稀释的一抗，37 °C温育1 h。最后，TBST洗膜3次，加入二抗，室温温育2 h，TBST洗膜3次，用增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂显色。

1.4.4 CCK-8实验

将处于对数生长期的HCC细胞按照 1×10^3 个/孔的密度接种于96孔板上，加入100 μL培养液培养。分别在第1、2、3、4、5天取出加入10 μL CCK-8试剂，通过检测450 nm波长处各孔的吸光度 (*D*) 值确定细胞增殖活力。

1.4.5 流式细胞术

采用APC膜联蛋白V试剂盒检测细胞凋亡。经紫杉醇处理48 h后，收集细胞，并在室温下与膜联蛋白V和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 共同在黑暗中温育15 min。染色后，将300 μL 1×结合缓冲液添加到每个样品中，并立即采用流式细胞术分析细胞 (流式细胞仪购自美国BD公司)。

1.4.6 细胞迁移和侵袭实验

细胞迁移实验：将300 μL的SMMC-7721细胞悬液 (2.5×10^4 个细胞) 分别加入transwell小室的上室，下室中加入700 μL含有20%FBS的完全培养基。培养24 h后，取出小室，吸去上室内液体，将小室放置在4%的多聚甲醛溶液中固定20 min，之后在0.1%结晶紫染液中染色20 min；将染好的小室转移到1×PBS中漂洗3次；在倒置显微镜下拍照，并随机选取5个高倍

镜视野进行计数并取平均值。细胞侵袭实验：首先在transwell小室的上室铺设基质胶 (按1:8稀释)，在37 °C下凝固，其余实验步骤同细胞迁移实验。

1.5 统计学处理

数据处理及展示采用Graphpad 8.0软件进行。计量数据均符合正态分布，并以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间非配对样本比较采用独立样本双边*t*检验，配对样本采用配对样本双边*t*检验。相关性分析采用Spearman相关分析。采用Kaplan-Meier法进行生存分析，组间比较采用log-rank检验。*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PARP1在HCC组织中过表达并与预后显著相关

为了验证PARP1在HCC组织中的表达情况，本研究首先通过UALCAN网站调取了TCGA HCC数据库中PARP1的mRNA表达数据和CPTAC HCC数据库中PARP1的蛋白表达数据，结果显示，PARP1在HCC组织中的mRNA和蛋白表达均显著高于对照组织 (图1A、1B)。为了进一步验证这一发现，本研究随机选取了临汾市人民医院保存的2014—2017年曾在本院首次诊治为HCC且经手术切除的93例HCC患者的肿瘤组织及相应癌旁组织，RTFQ-PCR结果显示，HCC组织中PARP1的表达水平显著高于相应癌旁组织 (图1C)。此结果也通过Western blot实验进行了验证 (图1D)。最后，本研究根据PARP1 mRNA的表达情况，将93例HCC组织分为47例高表达和46例低表达，并结合HCC患者预后数据进行了生存分析，结果显示，高表达PARP1的HCC患者生存期更短，生存率更低 (图1E)，提示PARP1可能是HCC恶性进程的驱动因素。

2.2 PARP1促进HCC细胞的恶性表型

为了探讨PARP1在HCC中的生物学功能，本研究首先在HCC细胞系QGY-7703和SMMC-7721中下调了PARP1的表达水平，同时用PARP1的抑制剂PJ34作为阳性对照。结果显示，PARP1

的小干扰RNA可以显著下调PARP1的表达, 而PARP1的抑制剂PJ34不影响PARP1的表达(图2A)。细胞增殖实验结果显示, 无论在QGY-7703细胞还是SMMC-7721细胞中下调PARP1的表达均可以显著抑制HCC细胞增殖能力, PARP1的抑制剂PJ34也能够达到类似的效果(图2B、2C)。细胞活力实验结果显示, 下调PARP1的表达或抑制PARP1的功能, 可以降低QGY-7703细胞和SMMC-7721细胞的活力, 导致细胞凋亡比例增加(图2D)。干性是肿瘤细胞恶性程度的重要指标, 为此, 本研究检测了Kruppel样因子4(Kruppel-like factor 4, KLF4)等8个代表性的肿瘤细胞干性指标的表达情况, 结果显示, 在QGY-7703细胞和SMMC-7721细胞中下调PARP1的表达水平或抑制PARP1的蛋白功能, 均可以降低HCC细胞干性指标的表达(图2E)。为了进一步验证以上发现, 本研究分别检测了SMMC-7721细胞在下调PARP1或用PJ34处理后的细胞迁移和侵袭能力, 发现两种处理方法均能显著减弱SMMC-7721细胞迁移和侵袭能力。以上结果提

示PARP1可以促进HCC细胞的恶性表型。

2.3 PARP1促进HCC细胞的恶性表型机制分析

为了探索PARP1促进HCC细胞的恶性表型的机制, 本研究从GEO数据库中下载了GSE91051数据集, 该数据集包含3个对照和3个PARP1敲低的转录组数据。经过分析, 共鉴定到64个有显著差异的基因($\text{Log}_2 \text{FC} > 1$ 或 < -1 , $P < 0.05$, 双边 t 检验), 其中表达显著下调的基因18个, 表达显著上调的基因46个(图3A), *POU2F2*作为下调最为显著的基因被用来进行后续的实验验证。随后, 本研究通过String相互作用分析发现, 包括PARP1在内的19个基因存在密切的相互作用关系(图3B), 这些基因显著富集在核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB)和Necroptosis信号通路中(图3C), 提示PARP1可能通过对这些信号通路的调控促进HCC细胞的恶性转化。

2.4 PARP1在转录阶段调控POU2F2的表达

在前面的差异基因分析中(图3A), *POU2F2*在PARP1敲低的细胞中下调最为明显, 因此本研究将*POU2F2*作为PARP1潜在的靶基因

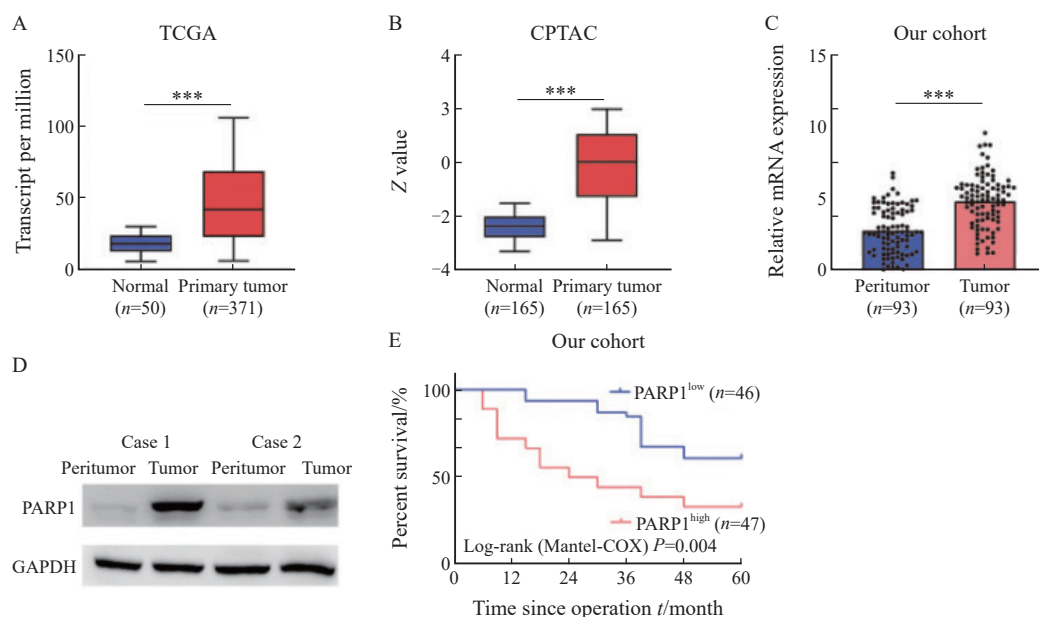


图1 PARP1在HCC组织中过表达并与预后显著相关

Fig. 1 PARP1 is overexpressed in HCC tissues and significantly correlated with prognosis

A: PARP1 is overexpressed in HCC at the mRNA level based on TCGA datasets; B: PARP1 is overexpressed in HCC at the protein level based on CPTAC datasets; C: RTFQ-PCR shows that PARP1 is overexpressed in HCC at the mRNA level in our cohort; D: Western blot shows that PARP1 is overexpressed in HCC at the protein level in our cohort. E: Survival curve shows that high expression of PARP1 is associated with poor prognosis. ***: $P < 0.001$, compared with normal or peritumor.

进行验证。首先，相关性分析显示，在本研究收集的20例HCC样本中，PARP1和POU2F2的mRNA水平存在显著相关性，即随着PARP1表达的升高，POU2F2也呈现上调趋势（图4A）。在PARP1敲低的QGY-7703细胞和SMMC-7721细胞中，POU2F2的表达水平显著降低（图4B）。然而PARP1的抑制剂并不能下调POU2F2的表达（图4B）。Western blot结果也与RTFQ-PCR结果一致（图4C）。以上结果提示PARP1对POU2F2的调控存在于转录阶段，PARP1酶活性不影响POU2F2的表达。

2.5 PARP1通过调控POU2F2表达促进HCC细胞的恶性表型

最后，本研究通过回补实验，探讨了PARP1是否通过调控POU2F2表达促进HCC细胞的恶性表型。细胞增殖实验结果显示，无论在QGY-7703细胞还是SMMC-7721细胞中下调PARP1的表达均可以显著抑制HCC细胞增殖能力，如果在PARP1下调的QGY-7703细胞和SMMC-7721细胞中回补POU2F2的表达，两种HCC细胞的增殖能力显著增强（图5A、5B）。细胞活力实验结果显示，下调PARP1的表达可以降低QGY-7703

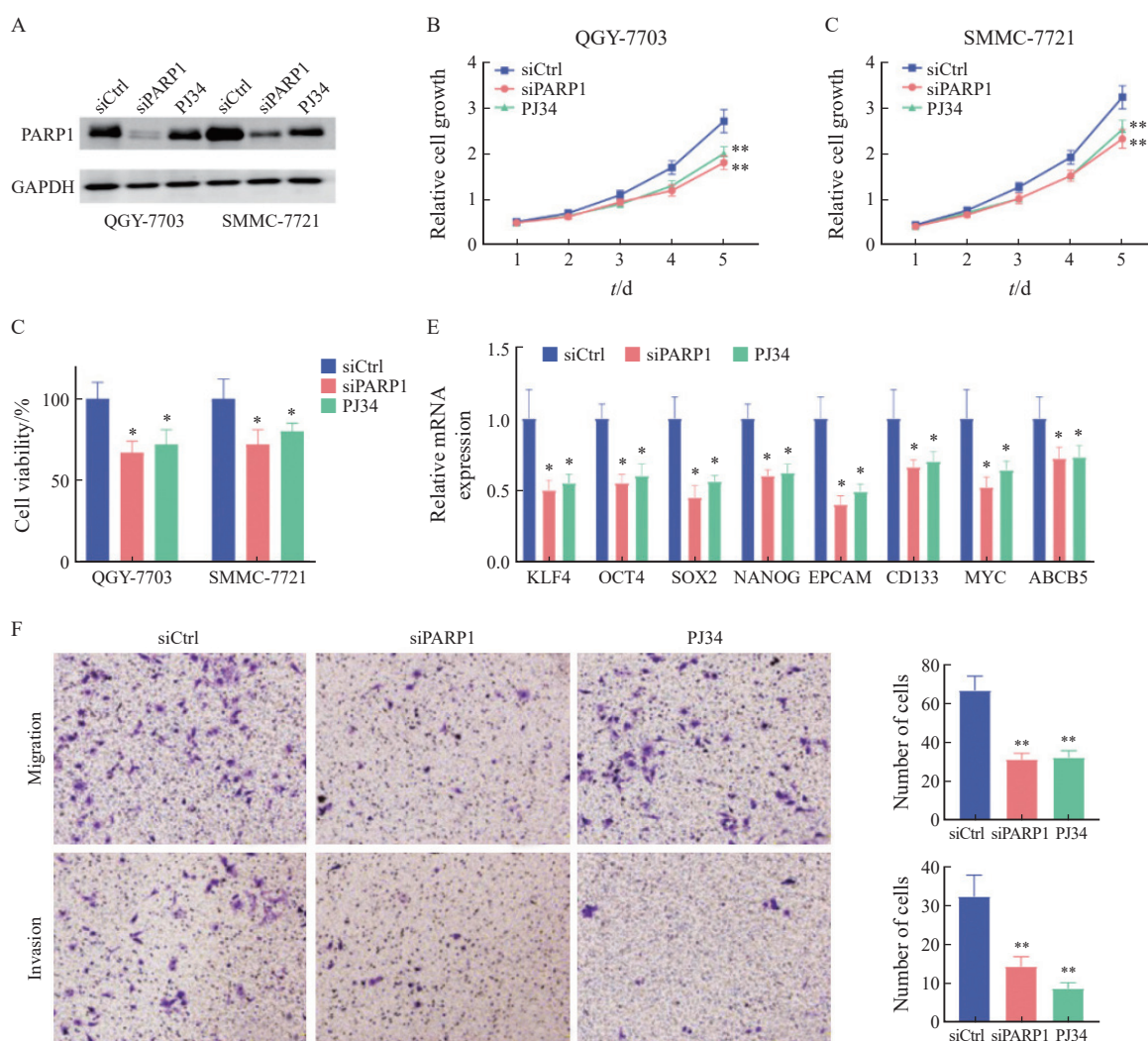


图2 PARP1促进HCC细胞的恶性表型

Fig. 2 PARP1 promotes malignant phenotype of HCC cells

A: Western blot shows the expression of PARP1 is downregulated by siPARP1. B, C: CCK-8 assay shows inhibitions of PARP1 inhibit the growth of QGY-7703 cells and SMMC-7721 cells. D: Flow cytometry examined the activity of QGY-7703 cells and SMMC-7721 cells. E: RTFQ-PCR shows the stemness of QGY-7703 cells. F: Effect of inhibitions of PARP1 on migration and invasion of SMMC-7721 cells ($\times 200$). *: $P < 0.05$, compared with siCtrl; **: $P < 0.01$, compared with siCtrl.

细胞和SMMC-7721细胞活力, 导致凋亡细胞增加, 回补POU2F2可以增强两种HCC细胞的活力(图5C)。细胞干性检测结果显示, 在QGY-7703细胞和SMMC-7721细胞中下调PARP1的表

达水平可以降低HCC细胞干性指标的表达, 回补POU2F2可以提升HCC细胞的干性(图5D)。以上结果提示PARP1通过调控POU2F2表达促进HCC细胞的恶性表型。

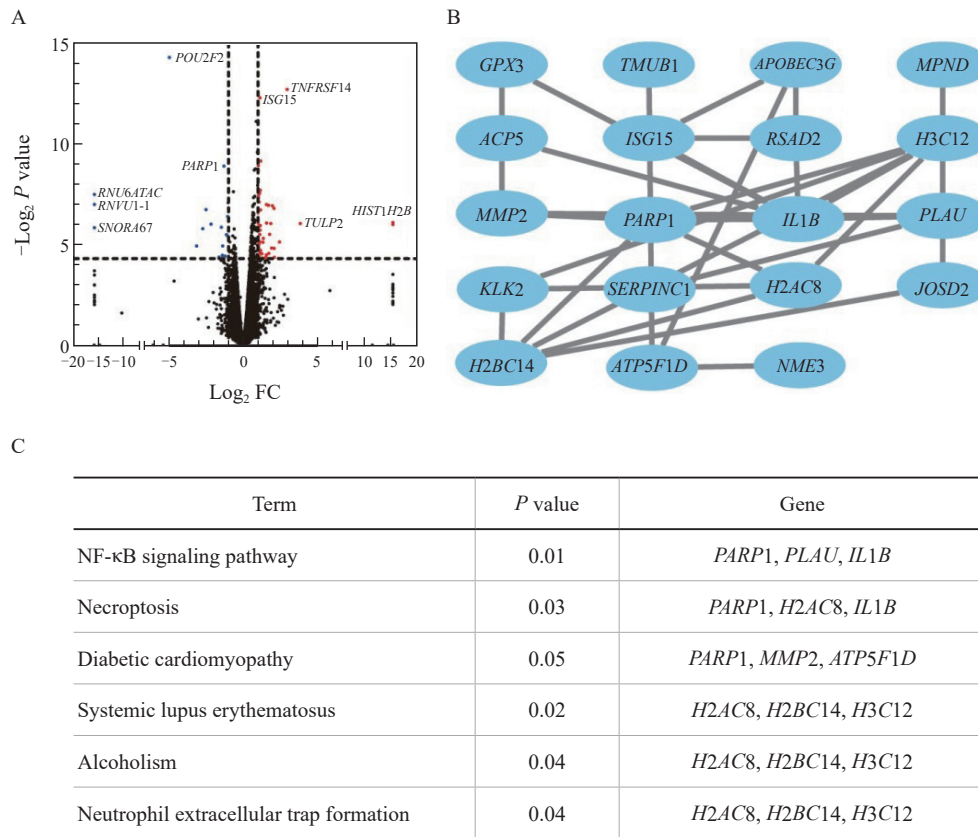


图3 PARP1促进HCC细胞的恶性表型机制分析

Fig. 3 Bioinformatics analysis of PARP1-targeted genes

A: Volcano plot of the DEGs. The red dots and blue dots represent the upregulated and downregulated genes in PARP1-knockdown cells, respectively. B: The network of DEGs. C: The KEGG enrichment analysis of DEGs.

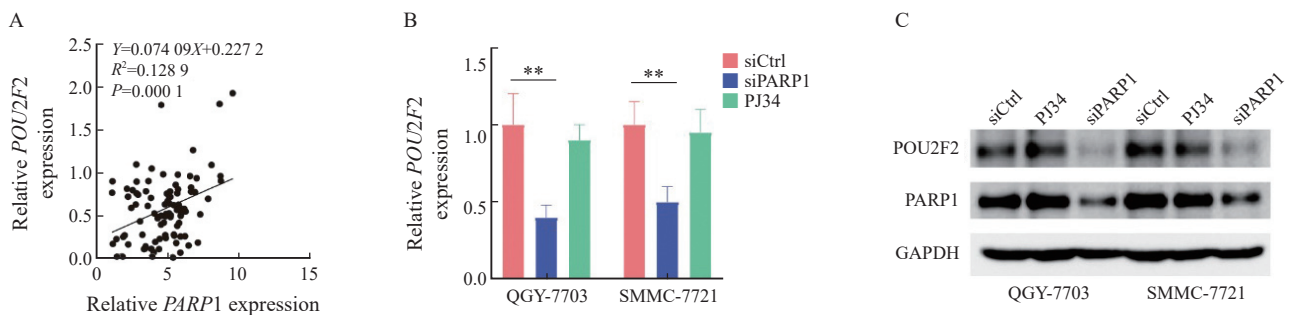


图4 PARP1在转录阶段调控POU2F2的表达

Fig. 4 PARP1 regulates the expression of POU2F2 in the transcriptional phase

A: Spearman correlation analysis showed a positive correlation between PARP1 and POU2F2 gene expression in tumor tissues. B and C: RTFQ-PCR and Western blot show the expression of POU2F2 after the inhibition of PARP1 in QGY-7703 cells and SMMC-7721 cells. **: P<0.01, compared with siCtrl.

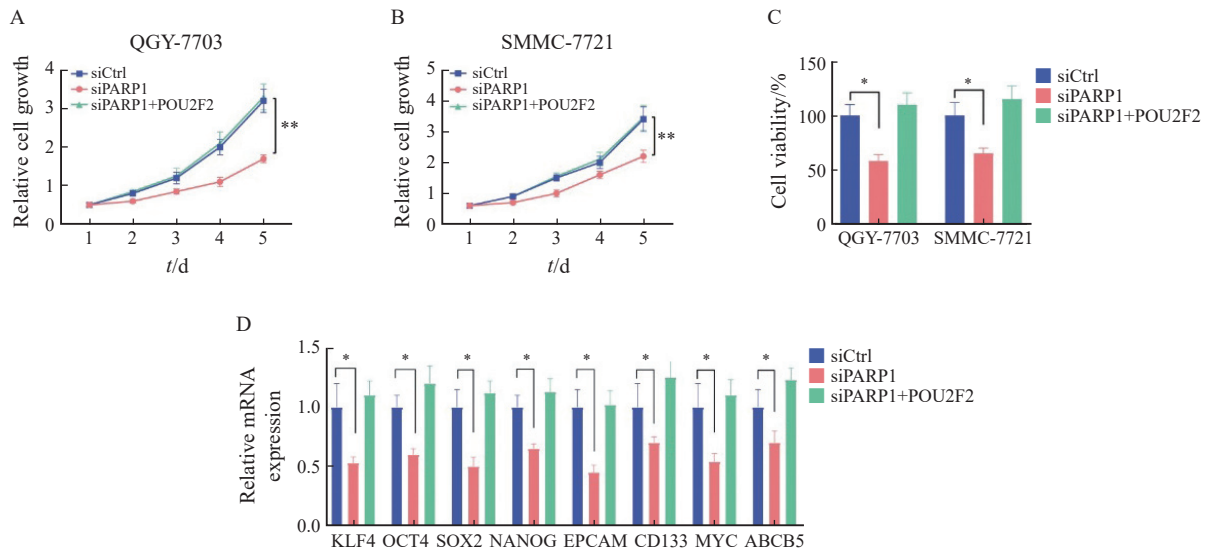


图5 PARP1通过调控POU2F2表达促进HCC细胞的恶性表型

Fig. 5 PARP1 promotes malignant phenotype of HCC cells through its regulation of POU2F2

A, B: CCK-8 assay shows overexpression of POU2F2 in PARP1-knockdown QGY-7703 cells and SMMC-7721 cells promotes the growth of QGY-7703 cells and SMMC-7721 cells. CCK-8 assay shows inhibitions of PARP1 inhibit the growth of QGY-7703 cells and SMMC-7721 cells. C: Flow cytometry examined the activity of QGY-7703 cells and SMMC-7721 cells. D: RTFQ-PCR shows the stemness of QGY-7703 cells. *: $P < 0.05$, compared with siCtrl; **: $P < 0.01$, compared with siCtrl.

3 讨论

原发性HCC的发生是一个复杂的过程，DNA损伤及其修复过程在HCC发生、发展中的作用目前已得到普遍认可^[5]。正常情况下，细胞通过DNA损伤修复过程维持自身的正常功能和存活^[6]。但在肿瘤细胞中，肿瘤细胞可以通过重建或强化DNA损伤修复体系确保其在过度增殖或DNA损伤药物引起的DNA损伤中存活或耐药。因此，DNA损伤修复功能在肿瘤的发生、发展过程中作用巨大^[7]。

PARP1作为PARP家族最重要的成员，对PARP1在DNA损伤修复中的功能已进行了广泛的研究^[7]，其抑制剂主要作为增敏剂来提高抗癌药物疗效。因为很多抗肿瘤药物都是以导致DNA损伤的机制来抑制肿瘤细胞的生长，而PARP1主要参与DNA的损伤修复，使被抗肿瘤药物抑制的细胞产生一定的耐药性，进而会影响抗肿瘤治疗效果。

尽管PARP1在肿瘤中的功能研究已经较多，但其在HCC中的研究尚存在很多不足。PARP1不

仅是一个修饰酶，同时还是RNA结合蛋白^[8]，也参与转录调控，其功能复杂。因此，探讨PARP1在HCC发生、发展中的机制非常重要。本研究发现，无论在转录水平还是翻译水平，PARP1在HCC组织中均显著上调。这一发现与本研究收集的HCC样本中的数据一致，且PARP1高表达与不良预后相关。PARP1受NF- κ B信号通路调控，是其下游效应分子。本研究通过生物信息学分析也富集到NF- κ B信号通路中，提示该通路的激活可能是PARP1表达上调的主要原因。同时，PARP1也在NF- κ B信号通路的激活中发挥作用^[9]。因此，在HCC的发生、发展中，可能存在NF- κ B信号通路和PARP1相互促进激活的放大机制。已有研究^[10]表明，IFNGR-JAK2-STAT1-PARP1信号轴可以提高HCC细胞的干性，但具体分子机制尚不明晰。本研究发现，在HCC细胞中下调PARP1的表达可以抑制HCC细胞增殖，并降低HCC细胞的活性和干性。为了进一步深入探讨PARP1提高HCC细胞干性的分子机制，我们通过生物信息学分析发现POU2F2可能是PARP1的一个下游因子，该假设在随后的分子生物学实验中得到了验证，证实POU2F2受到PARP1的

正向调控。但分子生物学实验显示, PARP1的抑制剂PJ34不能通过抑制PARP1酶活性进而下调POU2F2的表达, 说明PARP1对POU2F2表达的调控不是通过酶活性实现的, 其具体机制有待进一步研究。

POU2F2最早在B细胞中被鉴定到, 并作为B细胞特异性转录因子调控B细胞增殖和分化^[11]。最近有研究^[12]发现, POU2F2是肝细胞癌变的关键因子。在正常的肝细胞中, POU2F2的表达处于沉默状态, 当肝细胞受到持续损伤或癌变时, POU2F2表达被激活。POU2F2可以通过抑制p53的表达来提高NANOG的表达, 并进一步激活其他干细胞相关基因的表达, 从而使肝细胞干性增加。因此, POU2F2对维持HCC细胞干性具有重要作用。这从一定程度上解释了PARP1对HCC细胞干性的调控机制。另外, PARP1抑制剂也能降低HCC细胞干性, 但是不能抑制POU2F2表达, 提示除了通过POU2F2外, PARP1对HCC细胞干性的调控功能还可能存在其他的机制, 这有待后续研究的深入探索。

综上所述, PARP1可以通过非酶活性正向调控POU2F2表达促进HCC细胞恶性表型, 这将为HCC的临床治疗和新药开发提供新思路。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

温自强: 实验操作, 数据分析, 文章撰写;

兰军良: 文章修改;

周博: 实验操作, 数据分析;

许其威: 实验设计, 文章定稿。

[参 考 文 献]

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] MO Z Q, LV L, MAI Q C, et al. Prognostic model for unresectable hepatocellular carcinoma treated with dual PD-1 and angiogenesis blockade therapy [J]. *J Immunother Cancer*, 2024, 12(1): e008191.
- [3] GUO C L, ZHANG F, WU X C, et al. BTH-8, a novel poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) inhibitor, causes DNA double-strand breaks and exhibits anticancer activities *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 150: 238-245.
- [4] HUANG S H, XIONG M, CHEN X P, et al. PJ34, an inhibitor of PARP1, suppresses cell growth and enhances the suppressive effects of cisplatin in liver cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(3): 567-572.
- [5] ZHU H, CHEN K, CHEN Y L, et al. RNA-binding protein ZCCHC4 promotes human cancer chemoresistance by disrupting DNA-damage-induced apoptosis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 240.
- [6] IM J Y, KANG M J, KIM B K, et al. DDIAS, DNA damage-induced apoptosis suppressor, is a potential therapeutic target in cancer [J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55(5): 879-885.
- [7] YANG X D, KONG F N, QI L, et al. PARP inhibitor Olaparib overcomes Sorafenib resistance through reshaping the pluripotent transcriptome in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 20.
- [8] MELIKISHVILI M, CHARIKER J H, ROUCHKA E C, et al. Transcriptome-wide identification of the RNA-binding landscape of the chromatin-associated protein PARP1 reveals functions in RNA biogenesis [J]. *Cell Discov*, 2017, 3: 17043.
- [9] VUONG B, HOGAN-CANN A D J, ALANO C C, et al. NF- κ B transcriptional activation by TNF α requires phospholipase C, extracellular signal-regulated kinase 2 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 [J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 229.
- [10] CHERNG Y G, CHU Y C, YADAV V K, et al. Induced mitochondrial alteration and DNA damage via IFNGR-JAK2-STAT1-PARP1 pathway facilitates viral hepatitis associated hepatocellular carcinoma aggressiveness and stemness [J]. *Cancers*, 2021, 13(11): 2755.
- [11] MALONE C S, PATRONE L, BUCHANAN K L, et al. An upstream Oct-1- and Oct-2-binding silencer governs B29 (Ig beta) gene expression [J]. *J Immunol*, 2000, 164(5): 2550-2556.
- [12] YUAN C W, PANG L J, WANG W J, et al. POU2F2-IL-31 autoregulatory circuit converts hepatocytes into the origin cells of hepatocellular carcinoma [J]. *Adv Sci*, 2021, 8(13): e2004683.

(收稿日期: 2024-06-04 修回日期: 2024-09-06)

(责任编辑: 李广涛)