



· 论 著 ·

# 蛋白激酶C $\beta$ II 通过IL-6自分泌途径促进肝细胞癌侵袭的研究

刘 敏<sup>1,2</sup>, 陈添亮<sup>3</sup>, 郭 娟<sup>4</sup>, 伊 雪<sup>1,2</sup>, 高洪泉<sup>1</sup>, 巫佳翠<sup>1</sup>, 王玉孝<sup>1</sup>

1. 厦门医学院基础医学部, 福建 厦门 361023 ;
2. 机能与临床转化福建省高等学校重点实验室, 福建 厦门 361023 ;
3. 厦门医学院临床医学系, 福建 厦门 361023 ;
4. 厦门医学院附属第二医院病理科, 福建 厦门 361023

**[摘要]** 背景与目的: 肿瘤微环境中存在的炎性因子参与肿瘤的生长及转移, 蛋白激酶C $\beta$  II (protein kinase C $\beta$  II, PKC $\beta$  II) 能否通过调节炎性因子参与肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的侵袭尚不清楚。研究PKC $\beta$  II对HCC侵袭的作用及相关机制, 深入探讨PKC $\beta$  II与肿瘤炎性微环境之间的关系。方法: 收集PKC $\beta$  II高表达细胞的培养液处理HCC细胞, 采用transwell法检测细胞的侵袭情况, 采用细胞因子抗体芯片检测上清液中细胞因子的变化, 采用酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 检测PKC $\beta$  II高表达对白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 上清液中含量及转录的影响, 采用transwell法检测IL-6中和抗体及IL-6受体 (IL-6 receptor, IL-6R) 中和抗体对PKC $\beta$  II高表达诱导HCC细胞侵袭的影响, 采用Western blot检测信号转导与转录激活因子3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、P-STAT3的蛋白表达, 采用非参数Spearman检验分析HCC组织中PKC $\beta$  II和IL-6表达的相关性。结果: 采用PKC $\beta$  II高表达细胞的培养液处理可以提高HCC细胞Huh7 ( $P<0.01$ ) 和Hep3B ( $P<0.05$ ) 的侵袭能力; PKC $\beta$  II高表达显著提高上清液中IL-6的含量 ( $P<0.01$ ) 及IL-6的转录 ( $P<0.01$ ); IL-6中和抗体及IL-6R中和抗体均可以抑制PKC $\beta$  II介导的HCC细胞侵袭能力的增加 ( $P<0.01$ ), P-STAT3蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ); HCC组织中PKC $\beta$  II和IL-6的表达呈正相关 ( $r=0.697$ ,  $P<0.01$ )。结论: PKC $\beta$  II通过IL-6自分泌途径促进HCC细胞的侵袭。

**[关键词]** 蛋白激酶C $\beta$  II; IL-6; 自分泌; 肝细胞癌; 侵袭

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.04.005

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2021)04-0268-09

**Protein kinase C $\beta$  II promotes invasion of hepatocellular carcinoma by modulating autocrine of IL-6** LIU Min<sup>1,2</sup>, CHEN Tianliang<sup>3</sup>, GUO Juan<sup>4</sup>, YI Xue<sup>1,2</sup>, GAO Hongquan<sup>1</sup>, WU Jiacyi<sup>1</sup>, WANG Yuxiao<sup>1</sup> (1. Department of Basic Medicine, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, Fujian Province, China; 2. Key Laboratory of Functional and Clinical Translational Medicine, Xiamen 361023, Fujian Province, China; 3. Department of Clinical Medicine, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, Fujian Province, China; 4. Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Xiamen Medical College, Xiamen 361023, Fujian Province, China)

Correspondence to: WANG Yuxiao E-mail: 1010531340@qq.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Multiple proinflammatory cytokines in tumorigenic microenvironment are involved in the acquired capability for invasive growth and metastasis. It is not clear whether protein kinase C $\beta$  II (PKC $\beta$  II) can modulate the secretion of proinflammatory cytokines to promote the progression of hepatocellular carcinoma (HCC). This study aimed to explore the function and mechanism of PKC $\beta$  II in the invasion of HCC to investigate the relationship between PKC $\beta$  II and tumor inflammatory microenvironment. **Methods:** The effect of conditioned medium from PKC $\beta$  II-overexpressing cells on the invasion of HCC cells was detected by the transwell assay. Serum-free culture supernatants were analyzed by cytokine arrays. The effect of PKC $\beta$  II overexpression on the expression of interleukin-6 (IL-6) in supernatants and at mRNA level was examined by enzyme-

**基金项目:** 福建省教育厅中青年骨干教师教育科研项目 (JAT170712); 福建省大学生创新训练项目 (201812631006); 厦门医学院呼吸疾病研究所课题 (HXJB-03)。

**通信作者:** 王玉孝 E-mail: 1010531340@qq.com

linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) respectively. The effects of IL-6 neutralizing antibody and IL-6 receptor (IL-6R) neutralizing antibody on PKC $\beta$  II overexpression-induced invasion of HCC cells were detected by the transwell assay. The expressions of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and P-STAT3 were detected by Western blot. Correlation of PKC $\beta$  II with the expression of IL-6 in clinical HCC cases was analyzed using the nonparametric Spearman test. **Results:** Conditioned medium obtained from PKC $\beta$  II-overexpressing cells significantly induced the invasiveness of Huh7 ( $P<0.01$ ) and Hep3B ( $P<0.05$ ), and the upregulated secretion of IL-6 ( $P<0.01$ ) and mRNA level ( $P<0.01$ ) upon PKC $\beta$  II overexpression were observed respectively. Administrations of IL-6 neutralizing antibody and IL-6R neutralizing antibody blocked PKC $\beta$  II overexpression-induced invasion of HCC cells ( $P<0.01$ ). The protein level of P-STAT3 increased significantly upon PKC $\beta$  II overexpression ( $P<0.05$ ). Immunohistochemical analysis also presented a strong positive correlation between PKC $\beta$  II and IL-6 expression in clinical HCC samples ( $r=0.697$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** PKC $\beta$  II promotes the invasion of HCC by modulating autocrine of IL-6.

[Key words] Protein kinase C $\beta$  II; Interleukin-6; Autocrine; Hepatocellular carcinoma; Invasion

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球第七大高发和第四大致死性的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 中国是HCC大国, 世界上每年近半数HCC新发和死亡病例均发生在中国<sup>[2]</sup>, 虽然近年来对HCC的基础和临床研究有诸多进展, 但HCC患者预后仍然很差, 5年生存率仅10%<sup>[3]</sup>。HCC的复发转移是导致HCC患者死亡率居高不下的主要原因, 深入研究其转移的机制, 探究更加精确有效的治疗靶点一直是HCC研究的重点和难点。越来越多的证据表明, 在HCC发生、发展的过程中, 肿瘤微环境与肿瘤细胞的增殖、侵袭及转移密切相关<sup>[4]</sup>, 肿瘤细胞或者肿瘤微环境中的细胞分泌的多种促炎因子、趋化因子等参与肿瘤的转移<sup>[5]</sup>, 尤其是肿瘤细胞源性细胞因子可以通过自分泌途径参与肿瘤的生长、存活及转移<sup>[6]</sup>, 或通过旁分泌途径重塑基质<sup>[7]</sup>, 促进肿瘤的发展。蛋白激酶C $\beta$  II (protein kinase C $\beta$  II, PKC $\beta$  II) 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶C家族, 参与细胞增殖、存活、血管新生等生物学过程, PKC $\beta$  II在多种肿瘤中表达上调<sup>[8-10]</sup>, 其高表达提示患者预后不良<sup>[11]</sup>。肺癌细胞高表达PKC $\beta$  II可以提高细胞的增殖、迁移能力<sup>[12]</sup>; 胃癌中PKC $\beta$  II的激活参与斯钙素 (stanniocalcin-1, STC-1)<sup>[13]</sup>介导的血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达, 促进胃癌生长及血管新生, 上述研究均表明PKC $\beta$  II在肿瘤的发展过程中发挥重要的作用。我们前期的研究<sup>[14]</sup>发现, PKC $\beta$  II通过调控上皮-间质转化介导HCC的转移, 然而PKC $\beta$  II能否通过调节炎症因子参与HCC的侵袭尚不清楚。本文通过研

究PKC $\beta$  II对HCC侵袭的影响及相关机制, 探讨PKC $\beta$  II与肿瘤微环境之间的关系, 对深入了解HCC的转移机制、寻找HCC治疗的新靶点具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞系及主要试剂

本实验所用到的HCC细胞Huh7和Hep3B购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, transwell小室 (8  $\mu$ m) 购自美国Costar公司, 基质胶购自美国BD公司, 细胞因子抗体芯片购自美国RayBiotech公司, 人白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、即用型高效免疫组织化学二抗试剂盒购自爱必信 (上海) 生物科技有限公司, 反转录试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, FastStart Essential DNA Green Master购自瑞士Roche公司, IL-6中和抗体、IL-6受体 (IL-6 receptor, IL-6R) 中和抗体购自美国R&D公司, STAT3和p-STAT3购自美国Cell Signaling Technology公司, PKC $\beta$  II和IL-6抗体购自美国Abcam公司。

### 1.2 临床样本

选择2016年5月—2019年12月厦门医学院附属第二医院经病理学检查确诊的HCC患者20例, 所有患者均无抗肿瘤治疗史。本研究符合厦门医

学院伦理委员会相关规定,患者均自愿参与并签署知情同意书,标本切除后放置于-80℃冰箱保存。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 构建稳定高表达PKC $\beta$ II的HCC细胞株

将携带人PKC $\beta$  II基因的pLVX-puro-表达载体与pMDLg、pVSV-G、pRSV-Rev包装质粒在HEK-293T细胞中进行病毒包装,空载体作为对照组。将HCC细胞接种于2 cm细胞培养皿中,细胞密度40%~50%,第2天换液,加入终浓度为5 mg/L的聚凝胺(polybrene),病毒冰上融化后滴加到培养液内,混匀,8~12 h后换液继续培养,以1:5~1:3的比例进行细胞传代,培养过夜,使用1 mg/L的嘌呤霉素(puromycin)对细胞进行筛选,2~3周后得到稳定表达细胞。

#### 1.3.2 收集条件培养基

稳定高表达PKC $\beta$  II的HCC细胞及对照用无血清DMEM培养基培养24 h,收集细胞上清液,于4℃ 300×g离心10 min,去除悬浮细胞及碎片,-20℃保存。

#### 1.3.3 Transwell侵袭实验

用无血清培养基重悬细胞,每孔 $5 \times 10^4$ 个细胞,上室中预先加入按1:6稀释的基质胶,下室加入完全培养基,培养24 h,PBS洗3次,采用4%多聚甲醛室温固定30 min,PBS洗3次,结晶紫染色30 min,PBS洗3次,棉签擦掉上室内的细胞,显微镜下每组随机选取5个视野进行计数,实验重复3次,每组3个复孔。

#### 1.3.4 细胞因子抗体芯片检测

使用细胞因子抗体芯片Human Inflammation Array C3(美国RayBiotech公司)检测细胞上清液中细胞因子的水平,实验步骤参考厂商提供的方案。简述如下:收集无血清条件培养基,每个芯片孔中加入100  $\mu$ L的1×封闭液,室温摇床上温育30 min,抽去封闭液,每孔加入100  $\mu$ L的样品,4℃震荡温育过夜,弃去样品,每孔加入250  $\mu$ L的1×洗液I,清洗6次,每次震荡10 s,每孔加入250  $\mu$ L的1×洗液II,清洗5次,每次震荡10 s,每孔加入70  $\mu$ L生物素标记抗体(事先用1×封闭液稀释),室温温育1~2 h,洗膜,每孔加入70  $\mu$ L荧光剂-链霉亲和素(事先用1×封闭液1:1500稀释),避光室温震荡温育2 h,洗膜,

利用GenePix 4000B Microarray Scanner扫描仪,532 nm激发波长进行扫描,采用AAH-INF-G3的数据分析软件计算各信号点灰度值。

#### 1.3.5 ELISA检测

收集无血清条件培养基,各孔加入100  $\mu$ L标准品和实验样品,盖上贴膜,室温温育2 h,弃去液体,加入400  $\mu$ L洗涤液洗涤,重复3次,拍干,每孔加入100  $\mu$ L IL-6检测抗体,室温温育2 h,加入400  $\mu$ L洗涤液洗涤,重复3次,拍干,每孔加入100  $\mu$ L链霉亲和素-HRP,室温避光温育20 min,加入400  $\mu$ L洗涤液洗涤,重复3次,拍干,每孔内加入100  $\mu$ L显色液,室温避光温育20 min,每孔加入终止液50  $\mu$ L,终止反应,450 nm波长测量各孔的吸光度(D)值,设定540 nm作为校正波长。

1.3.6 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)检测

将稳定高表达PKC $\beta$  II的HCC细胞及对照细胞提取总RNA,采用反转录试剂盒将等量RNA(2  $\mu$ g)反转录成cDNA,应用Light Cycler 96 RTFQ-PCR仪,使用SYBR Green I嵌合荧光法,以比较CT值法( $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法)计算相对定量。所用到的引物序列IL-6有义链为AGACAGCCACTCACCTCTTCAG,反义链为TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG;IL-6R有义链为GACTGTGCACCTTGCTGGTGGAT,反义链为ACTTCCTCACCAGAGCACAGC;GAPDH有义链为5'-GTCAAGGCTGAGAACGGGAA-3',反义链为5'-AAATGAGCCCCAGCCTTCTC-3'。预温育95℃ 600 s,循环条件95℃ 10 s,57℃ 10 s,72℃ 10 s,共45个循环,溶解95℃ 10 s,65℃ 60 s,97℃ 1 s。

#### 1.3.7 抗体中和实验

对数生长期的细胞加入IL-6中和抗体(5  $\mu$ g/mL)或IL-6R中和抗体(5  $\mu$ g/mL)预处理1 h,PBS洗3次,胰酶消化,无血清培养基重悬,用于细胞侵袭实验。

#### 1.3.8 蛋白质印迹法(Western blot)检测

细胞用冷PBS洗3次,加入十二烷基硫

酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 裂解液, 提取细胞总蛋白, 用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒进行蛋白定量。每组取等量蛋白用10%SDS-PAGE分离蛋白后, 以湿转法转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 加入5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 加入一抗4 ℃温育过夜, TBST洗膜后, 加入辣根过氧化物酶标记的对应二抗, 室温温育1 h, 滴加电化学发光 (electrochemical luminescence, ECL) 显影液显影。以GAPDH作为内参。

### 1.3.9 免疫组织化学法检测

取临床HCC患者癌组织石蜡切片, 按照试剂盒说明书进行免疫组织化学染色, DAB工作液显色, 苏木精复染, 盐酸乙醇分化、脱水, 中性树脂封片。光学显微镜观察PKC $\beta$  II、IL-6的表达情况。为了进行PKC $\beta$  II和IL-6的相关性分析, 本研究以免疫组织化学染色评分反映PKC $\beta$  II和IL-6的表达水平, 免疫组织化学染色评分=染色强度 $\times$ 阳性细胞比例 (%)。染色强度评分标准: 不着色, 0分; 黄色, 1分; 棕黄色, 2分; 棕褐色, 3分; 阳性细胞所占观察细胞百分比评分标准: <5%, 0分; 5%~25%, 1分; 26%~50%, 2分;

51%~75%, 3分; >75%, 4分。

### 1.4 统计学处理

所有统计学分析均采用SPSS 22.0软件进行, 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 实验两组间比较采用两个独立样本的 $t$ 检验分析, 方差齐且服从正态分布的组间差异采用单因素方差分析, PKC $\beta$  II和IL-6表达的相关性分析采用非参数Spearman检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PKC $\beta$ II 高表达细胞的条件培养基增强HCC细胞的侵袭能力

本研究采用取自PKC $\beta$  II 稳定高表达HCC细胞组和对照组细胞的条件培养基 (conditioned medium, CM) 处理HCC细胞Huh7和Hep3B 24 h, 通过transwell法检测细胞侵袭能力的变化。结果显示, 与来自对照组的条件培养基比较, PKC $\beta$  II 高表达细胞的条件培养基能够显著增强Huh7的侵袭能力 ( $P<0.01$ , 图1A); 在HCC细胞Hep3B中, PKC $\beta$  II 高表达细胞的条件培养基同样能够增强细胞的侵袭能力 ( $P<0.05$ , 图1B)。上述结果表明, 自分泌途径可能参与了PKC $\beta$  II 的促HCC侵袭作用。

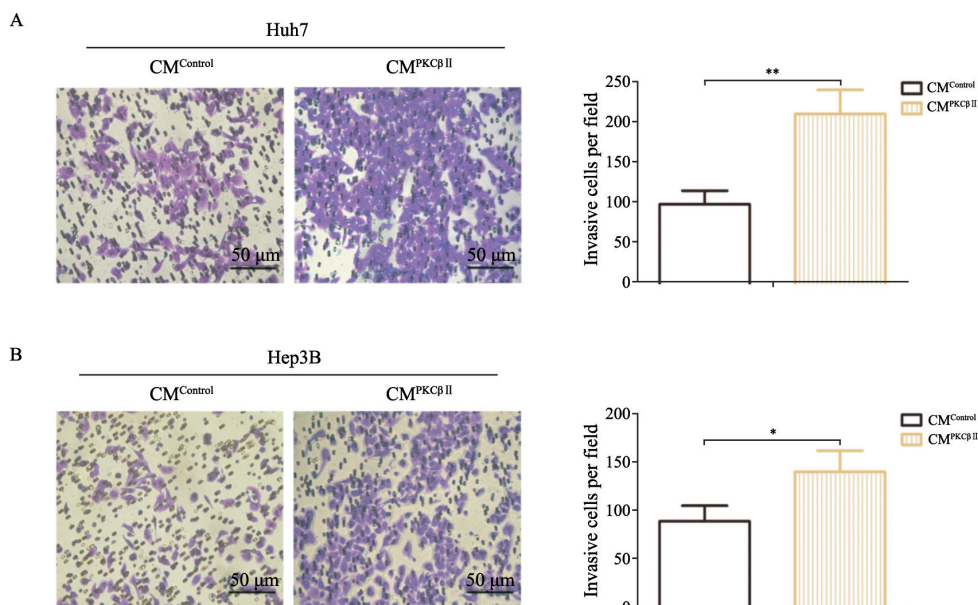


图1 PKC $\beta$  II 高表达细胞的条件培养基提高HCC细胞的侵袭能力

Fig. 1 Conditioned medium from PKC $\beta$  II-overexpressing cells promoted the invasion of HCC cells

A: The invasive ability of Huh7 was tested by transwell assay; B: The invasive ability of Hep3B was tested by transwell assay; \*:  $P<0.05$ , compared with control group; \*\*:  $P<0.01$ , compared with control group

## 2.2 PKC $\beta$ II 促进IL-6的分泌

采用细胞因子抗体芯片检测PKC $\beta$  II 高表达组和对照组细胞因子分泌的变化, 将PKC $\beta$  II 高表达前后细胞因子的相对量进行比较, 结果显示, 在表达水平提高的细胞因子中, IL-6的提高最为显著(图2A)。ELISA结果显示, 在HCC细胞Hep3B中高表达PKC $\beta$  II 可以提高上清液中IL-6

的含量( $P < 0.01$ , 图2B), 在HCC细胞Huh7中高表达PKC $\beta$  II 也观察到了类似的结果( $P < 0.01$ , 图2B); RTFQ-PCR结果显示, 在HCC细胞Hep3B中高表达PKC $\beta$  II 可以上调IL-6的转录( $P < 0.01$ , 图2C), 在HCC细胞Huh7中高表达PKC $\beta$  II 也观察到了类似的结果( $P < 0.01$ , 图2C)。上述结果表明, PKC $\beta$  II 可以促进IL-6的分泌。

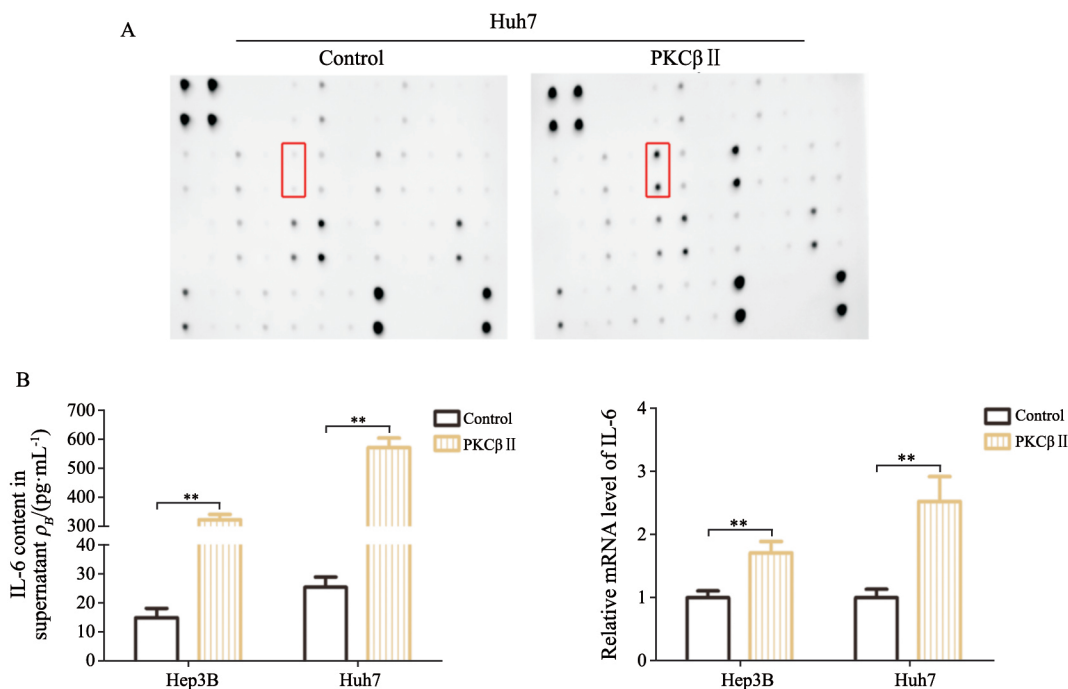


图2 PKC $\beta$  II 促进IL-6的分泌

Fig. 2 PKC $\beta$  II promoted IL-6 secretion

A: The effect of PKC $\beta$  II overexpression on the pattern of cytokines using cytokine antibody arrays, the red box represented the expression of IL-6; B: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the secretion of IL-6 upon PKC $\beta$  II overexpression; C: RTFQ-PCR was used to detect the mRNA level of IL-6 upon PKC $\beta$  II overexpression; \*\*:  $P < 0.01$ , compared with control group

## 2.3 PKC $\beta$ II 通过IL-6自分泌方式介导HCC细胞的侵袭

为了验证IL-6是否参与PKC $\beta$  II 的促HCC侵袭作用, 抗体中和实验结果显示, IL-6中和抗体可以抑制HCC细胞Huh7的侵袭能力( $P < 0.05$ , 图3A), 而对PKC $\beta$  II 高表达的Huh7细胞, IL-6中和抗体可以更加明显地抑制其侵袭能力( $P < 0.01$ , 图3A); 在HCC细胞Hep3B中, IL-6中和抗体对其侵袭能力有所抑制, 但差异并无统计学意义( $P > 0.05$ , 图3B), 而对PKC $\beta$  II 高表达的Hep3B细胞, IL-6中和抗体可以抑制其侵袭能力的增强( $P < 0.01$ , 图3B)。上述结果表明,

PKC $\beta$  II 介导HCC细胞侵袭能力的增强是通过IL-6自分泌方式实现的。

## 2.4 IL-6/STAT3信号通路参与PKC $\beta$ II 的促HCC细胞侵袭

通过RTFQ-PCR检测PKC $\beta$  II 高表达HCC细胞Huh7和对照组细胞中IL-6受体的表达, 结果表明, PKC $\beta$  II 可以提高IL-6受体的转录( $P < 0.01$ , 图4A); 抗体中和实验的结果显示, IL-6受体中和抗体可以抑制HCC细胞Huh7的侵袭能力( $P < 0.05$ , 图4B), 而对PKC $\beta$  II 高表达的Huh7细胞, IL-6受体中和抗体可以显著抑制其

侵袭能力 ( $P<0.01$ , 图4B); 通过Western blot 检测p-STAT3的表达, 高表达PKC $\beta$  II 可以上调STAT3的磷酸化 ( $P<0.05$ , 图4C), 加入IL-6受体中和抗体即可以抑制对照组STAT3的磷酸化 ( $P<0.05$ , 图4C), 又可以抑制高表达PKC $\beta$  II 介导的STAT3磷酸化上调 ( $P<0.01$ , 图4C)。上述结果表明, IL-6/STAT3信号通路参与PKC $\beta$  II 的促HCC细胞侵袭。

### 2.5 HCC临床样本中PKC $\beta$ II 与IL-6表达的相关性分析

通过免疫组织化学法观察临床HCC患者样本中PKC $\beta$  II 和IL-6表达的相关性。相同标本的连续切片染色反映PKC $\beta$  II 和IL-6表达的正相关性, 即随着PKC $\beta$  II 表达的增加, IL-6的表达也增加 (图5A); 通过比较PKC $\beta$  II 与IL-6的免疫组织化学评分, 两者的表达呈正相关 (相关系数 $r=0.697$ ,  $P<0.01$ , 图5B)。

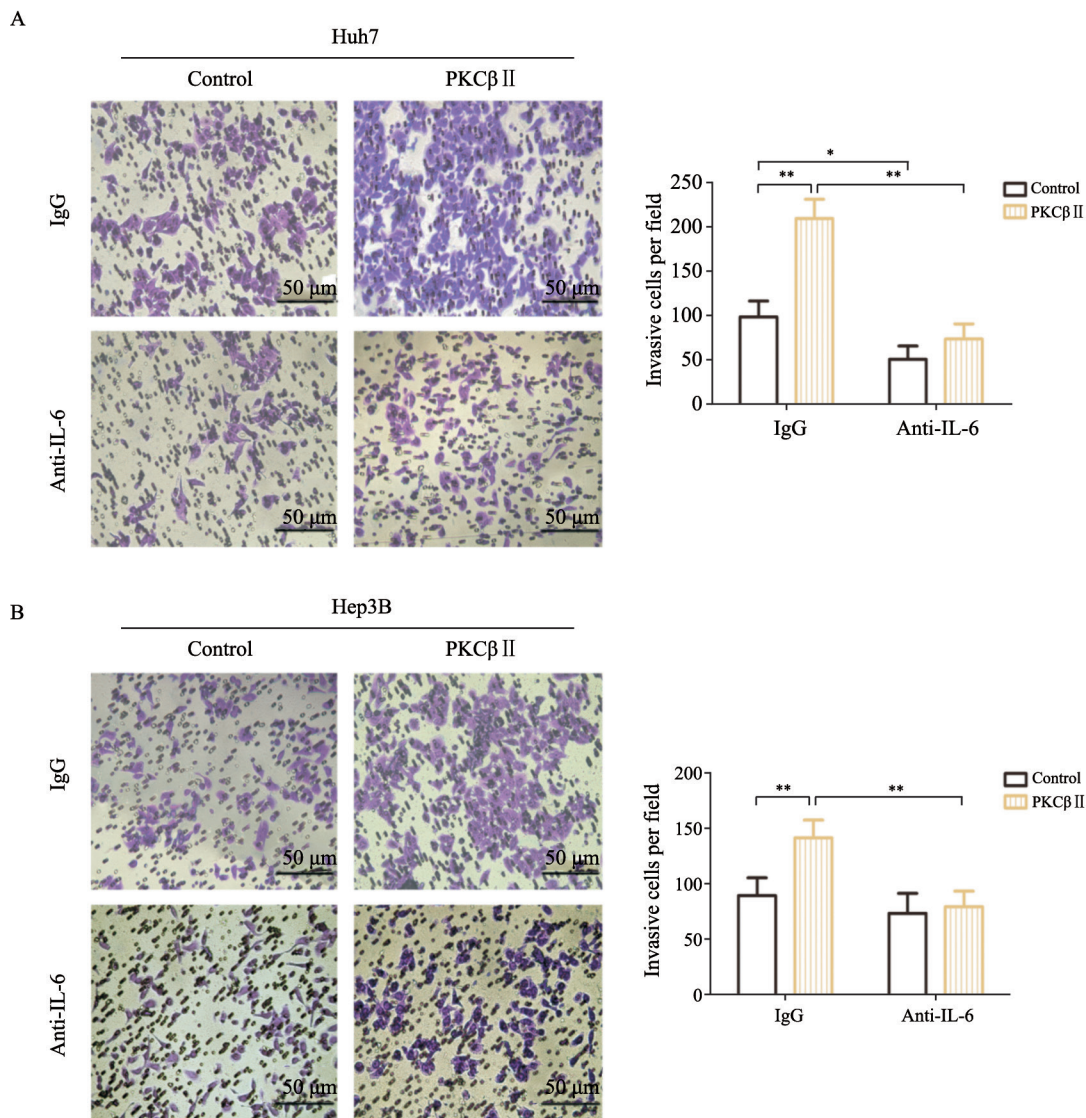


图3 PKC $\beta$  II 通过IL-6自分泌方式介导HCC细胞的侵袭

Fig. 3 PKC $\beta$  II promoted the invasion of HCC cells by modulating the autocrine of IL-6 *in vitro*

A: The invasive ability of Huh7 was tested by transwell assay; B: The invasive ability of Hep3B was tested by transwell assay; \*:  $P<0.05$ , compared with each other; \*\*:  $P<0.01$ , compared with each other

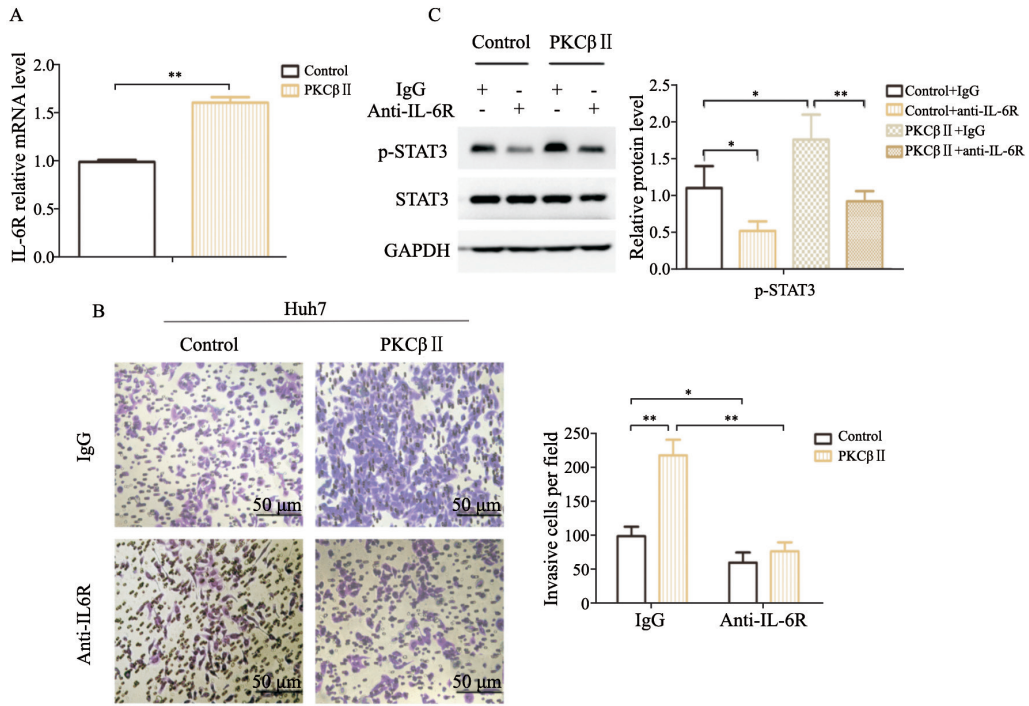


图 4 IL-6/STAT3信号通路参与了PKC $\beta$  II的促HCC细胞侵袭

Fig. 4 IL-6/STAT3 signal pathway played a role in the invasion of HCC cells by PKC $\beta$  II

A: RTFQ-PCR was used to detect the mRNA level of IL-6R; B: The invasive ability of Huh7 was tested by transwell assay; C: The expressions of STAT3 and p-STAT3 were detected by Western blot. \*:  $P < 0.05$ , compared with each other; \*\*:  $P < 0.01$ , compared with each other

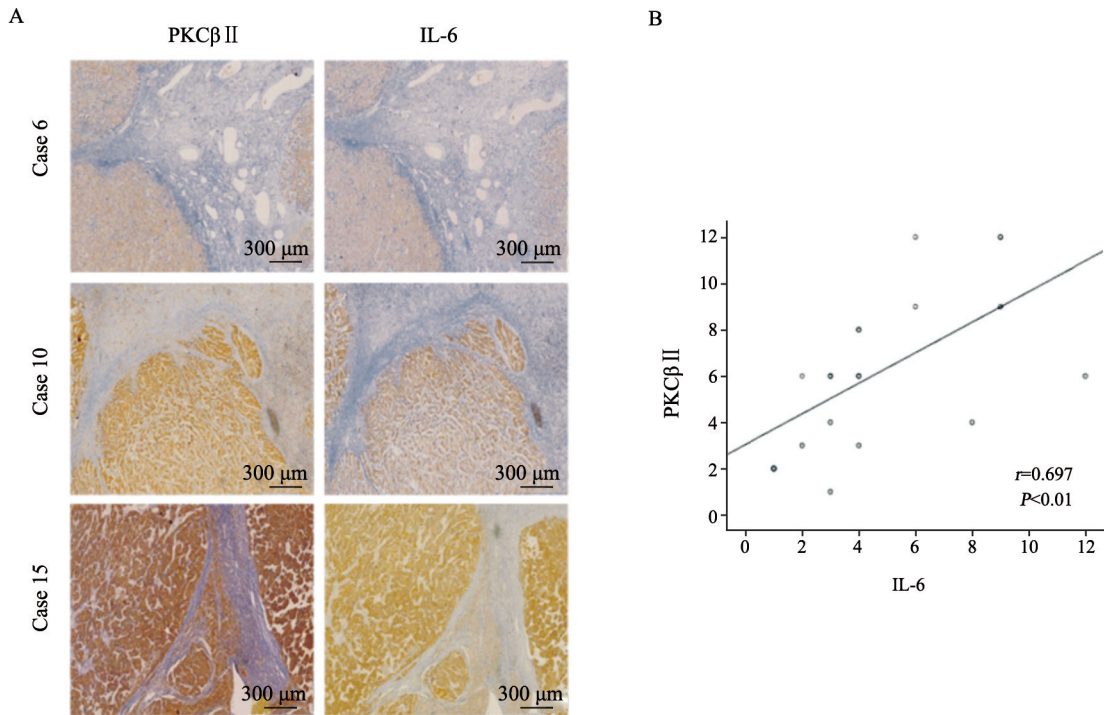


图 5 HCC临床样本中PKC $\beta$  II与IL-6表达的相关性分析

Fig. 5 Correlation of PKC $\beta$  II with the expression of IL-6 in clinical HCC cases

A: The expressions of PKC $\beta$  II and IL-6 were shown in consecutive tumor sections using immunohistochemistry; B: Correlation between PKC $\beta$  II and IL-6 expression was analyzed

### 3 讨 论

HCC的炎性微环境与HCC的进程是互相促进、交织共存的。在肿瘤的发展过程中,包括肿瘤细胞在内的多种细胞通过释放细胞因子,如IL-6、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )以及花生四烯酸类物质等组成肿瘤的炎性微环境,参与肿瘤的增殖、侵袭和血管生成等<sup>[15]</sup>。本研究发现,PKC $\beta$  II通过IL-6自分泌途径促进HCC的侵袭,提示PKC $\beta$  II表达失调可以通过炎症性因子自分泌方式参与HCC的发展过程,揭示了PKC $\beta$  II调控HCC转移的新机制,为PKC $\beta$  II调控肿瘤微环境参与HCC发生、发展提供了依据。

我们前期的研究发现,高表达PKC $\beta$  II可以增强HCC细胞的迁移、侵袭能力<sup>[14]</sup>,本研究收集PKC $\beta$  II高表达HCC细胞的条件培养基处理HCC细胞,可以增强细胞的侵袭能力,提示PKC $\beta$  II促HCC侵袭的能力也可能有自分泌细胞因子的参与。随后,应用细胞因子抗体芯片技术检测PKC $\beta$  II高表达后细胞因子分泌的变化,结果表明,IL-6升高最显著,普遍上调的促炎因子还包括IL-8、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)以及干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )等,由此可见,PKC $\beta$  II促进HCC细胞产生多种促炎因子,招募炎症细胞,参与构成肿瘤炎症微环境,促进HCC的发展。

在各种炎性因子中,IL-6被认为是衔接炎症与肿瘤最核心的因子<sup>[16]</sup>,在结肠癌<sup>[17]</sup>、乳腺癌<sup>[18]</sup>等肿瘤组织及患者血清中均表达升高,其高表达与肿瘤的侵袭及患者的不良预后密切相关<sup>[19]</sup>。抗体芯片检测结果表明,PKC $\beta$  II高表达可以提高IL-6水平至对照组的11倍,ELISA检测也发现,PKC $\beta$  II高表达可以在Huh7和Hep3B中显著提高上清液中IL-6的水平,RTFQ-PCR也得到相同的结果,提示PKC $\beta$  II高表达后IL-6从转录到分泌水平都明显增强。关于PKC $\beta$  II调控

IL-6转录的分子机制,本研究没有深入探究,这是本实验的不足之处。核因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)是对炎症因子具有广泛调节作用的转录因子,静息状态下,NF- $\kappa$ B与其抑制剂I $\kappa$ B结合以无活性形式存在于细胞质中,激活后的NF- $\kappa$ B转位入细胞核,可以与IL-6启动子中的 $\kappa$ B序列结合,调控IL-6的转录<sup>[20]</sup>,同时有研究报道PKC $\beta$  II可以通过经典信号通路激活NF- $\kappa$ B<sup>[21]</sup>,促进慢性淋巴细胞白血病细胞的存活。因此,我们推测PKC $\beta$  II对IL-6转录和分泌的调控可能与NF- $\kappa$ B信号通路有关。

接着我们用IL-6中和抗体预处理HCC细胞,发现可以抑制PKC $\beta$  II高表达介导的HCC细胞侵袭能力的增强,表明PKC $\beta$  II通过IL-6自分泌途径促进HCC细胞的侵袭。IL-6作为肿瘤炎症微环境中的重要成员,通过与IL-6R结合激活不同的信号转导通路,IL-6R在包括肿瘤细胞在内的多种细胞表面表达。本研究发现PKC $\beta$  II可以提高HCC细胞IL-6R的转录,用IL-6R中和抗体预处理HCC细胞,PKC $\beta$  II促HCC细胞侵袭的能力减弱。在IL-6激活的信号通路中,JAK/STAT3信号转导通路最重要,IL-6通过与IL-6R结合,引起STAT3磷酸化并形成二聚体,活化的STAT3二聚体转入细胞核内调控靶基因转录<sup>[22]</sup>,STAT3信号转导途径的异常与血管形成及肿瘤转移关系密切<sup>[23]</sup>,本研究发现高表达PKC $\beta$  II可以提高STAT3的磷酸化,加入IL-6R中和抗体则降低其磷酸化水平,表明PKC $\beta$  II通过IL-6/IL-6R/STAT3自分泌途径调控HCC的转移。

随着医疗水平的不断进步,针对HCC的治疗也取得了长足的发展,手术切除和肝移植仍是目前治疗HCC的主要手段,但仍有超过50%的患者会在5年内出现术后复发和转移<sup>[24]</sup>。目前缺少有效针对HCC的靶向治疗药物,索拉非尼是目前临床上治疗晚期HCC的一线靶向治疗药物,通过阻断肿瘤新生血管的形成,抑制肿瘤的转移和侵袭<sup>[25]</sup>,尽管索拉非尼在晚期HCC的治疗中发挥极为重要的作用,但由于耐药现象的存在限制了其临床应用。因此,研发新型的精准靶向治疗药物,对提高HCC的治疗及患者预后有着重要的意

义。本研究发现, PKC $\beta$  II通过IL-6自分泌途径促进HCC的侵袭, 调控肿瘤炎症微环境参与HCC的发展, 因此靶向PKC $\beta$  II有可能成为HCC治疗中有效的辅助治疗策略。

### [参 考 文 献]

- [ 1 ] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [ J ] . CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394–424.
- [ 2 ] CHEN C, WANG G. Mechanisms of hepatocellular carcinoma and challenges and opportunities for molecular targeted therapy [ J ] . World J Hepatol, 2015, 7(15): 1964–1970.
- [ 3 ] ZENG H M, ZHENG R S, GUO Y M, et al. Cancer survival in China, 2003–2005: a population-based study [ J ] . Int J Cancer, 2015, 136(8): 1921–1930.
- [ 4 ] NAGARSHETH N, WICHA M S, ZOU W P. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy [ J ] . Nat Rev Immunol, 2017, 17(9): 559–572.
- [ 5 ] QUAIL D F, JOYCE J A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis [ J ] . Nat Med, 2013, 19(11): 1423–1437.
- [ 6 ] SANSONE P, STORCI G, TAVOLARI S, et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland [ J ] . J Clin Invest, 2007, 117(12): 3988–4002.
- [ 7 ] LANGLEY R R, FIDLER I J. The seed and soil hypothesis revisited: the role of tumor–stroma interactions in metastasis to different organs [ J ] . Int J Cancer, 2011, 128(11): 2527–2535.
- [ 8 ] AL-SANABRA O, DUCKWORTH A D, GLENN M A, et al. Transcriptional mechanism of vascular endothelial growth factor-induced expression of protein kinase C $\beta$  II in chronic lymphocytic leukaemia cells [ J ] . Sci Rep, 2017, 7: 43228.
- [ 9 ] MURRAY N R, WEEMS J, BRAUN U, et al. Protein kinase C beta II and PKC $\delta$ /lambda: collaborating partners in colon cancer promotion and progression [ J ] . Cancer Res, 2009, 69(2): 656–662.
- [ 10 ] GÖKMEN-POLAR Y, MEHTA R, TUZMEN S, et al. Differential subcellular expression of protein kinase C beta II in breast cancer: correlation with breast cancer subtypes [ J ] . Breast Cancer Res Treat, 2010, 124(2): 327–335.
- [ 11 ] CHU P Y, HSU N C, LIN S H, et al. High nuclear protein kinase C $\beta$  II expression is a marker of disease recurrence in oral squamous cell carcinoma [ J ] . Anticancer Res, 2012, 32(9): 3987–3991.
- [ 12 ] EL OSTA M, LIU M L, ADADA M, et al. Sustained PKC $\beta$  II activity confers oncogenic properties in a phospholipase D- and mTOR-dependent manner [ J ] . FASEB J, 2014, 28(1): 495–505.
- [ 13 ] HE L F, WANG T T, GAO Q Y, et al. Stanniocalcin-1 promotes tumor angiogenesis through up-regulation of VEGF in gastric cancer cells [ J ] . J Biomed Sci, 2011, 18: 39.
- [ 14 ] 刘敏, 曾云, 祝珊珊, 等. 蛋白激酶C $\beta$  II诱导上皮-间质转化及血管新生促进肝癌发展 [ J ] . 解剖学报, 2020, 51(6): 912–918.
- [ 15 ] LIU M, ZENG Y, ZHU S S, et al. Protein kinase C $\beta$  II promoting the development of hepatocellular carcinoma via inducing epithelial–mesenchymal transition and angiogenesis [ J ] . Acta Anat Sin, 2020, 51(6): 912–918.
- [ 16 ] LI Y, JIANG F, LIU Q Q, et al. Inhibition of the cancer stem cells-like properties by arsenic trioxide, involved in the attenuation of endogenous transforming growth factor beta signal [ J ] . Toxicol Sci, 2015, 143(1): 156–164.
- [ 17 ] TANIGUCHI K, KARIN M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer [ J ] . Semin Immunol, 2014, 26(1): 54–74.
- [ 18 ] CHEN L C, WANG S R, WANG Y, et al. IL-6 influences the polarization of macrophages and the formation and growth of colorectal tumor [ J ] . Oncotarget, 2018, 9(25): 17443–17454.
- [ 19 ] YAO X, HUANG J Q, ZHONG H H, et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers [ J ] . Pharmacol Ther, 2014, 141(2): 125–139.
- [ 20 ] ZHAO M, LIU Y H, LIU R, et al. Upregulation of IL-11, an IL-6 family cytokine, promotes tumor progression and correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer [ J ] . Cell Physiol Biochem, 2018, 45(6): 2213–2224.
- [ 21 ] DEVARAJ S, VENUGOPAL S K, SINGH U, et al. Hyperglycemia induces monocytic release of interleukin-6 via induction of protein kinase c- $\alpha$  and - $\beta$  [ J ] . Diabetes, 2005, 54(1): 85–91.
- [ 22 ] LUTZNY G, KOCHER T, SCHMIDT-SUPPRIAN M, et al. Protein kinase c- $\beta$ -dependent activation of NF- $\kappa$ B in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells *in vivo* [ J ] . Cancer Cell, 2013, 23(1): 77–92.
- [ 23 ] HUNTER C A, JONES S A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease [ J ] . Nat Immunol, 2015, 16(5): 448–457.
- [ 24 ] XIU D H, LIU L, QIAO F L, et al. Annexin A2 coordinates STAT3 to regulate the invasion and migration of colorectal cancer cells *in vivo* [ J ] . Gastroenterol Res Pract, 2016, 2016: 3521453.
- [ 25 ] SCHWARTZ M, ROAYAIE S, KONSTADOUAKIS M. Strategies for the management of hepatocellular carcinoma [ J ] . Nat Clin Pract Oncol, 2007, 4(7): 424–432.
- [ 26 ] GADALETA-CALDAROLA G, DIVELLA R, MAZZOCCA A, et al. Sorafenib: the gold standard therapy in advanced hepatocellular carcinoma and beyond [ J ] . Future Oncol, 2015, 11(16): 2263–2266.

(收稿日期: 2020-12-15 修回日期: 2021-02-25)