



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.240281
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.240281
China Journal of General Surgery, 2025, 34(1):96-108.

· 基础研究 ·

肝细胞癌中PD-L1表达与STAT3/PRKDC/MYC信号通路的关系研究

田芳铭, 刘鑫, 唐浩程, 张恺, 郭臣, 施智甜

(昆明医科大学第二附属医院肝胆胰外科二病区, 云南昆明 650000)

摘要

背景与目的: 目前, 肝细胞癌(HCC)的治疗仍面临复发和转移的严峻挑战, 而肿瘤免疫逃逸是导致这些问题的关键机制之一。信号转导与转录激活因子3(STAT3)作为重要的转录因子, 在多种恶性肿瘤中呈现过度激活状态, 不仅参与肿瘤的发生与进展, 还与肿瘤免疫逃逸密切相关。程序性死亡配体1(PD-L1)是关键免疫检查点, 其表达上调能够帮助肿瘤细胞逃避免疫监视, 从而抑制抗肿瘤免疫。研究显示, STAT3可能通过与蛋白激酶DNA激活催化多肽(PRKDC)的相互作用激活骨髓细胞瘤病毒癌基因(MYC)信号通路, 进而促进PD-L1的表达并诱导免疫逃逸。然而, STAT3/PRKDC/MYC轴在HCC中的具体作用机制尚不明确。本研究旨在揭示STAT3通过PRKDC/MYC信号通路调控PD-L1表达并可能诱导HCC免疫逃逸的分子机制, 以期为HCC免疫治疗提供潜在靶点。

方法: 用qRT-PCR和Western blot检测人正常肝细胞(HL-7702)与人HCC细胞(HuH-7、HepG2)中STAT3的表达。构建敲低STAT3(si-STAT3)和过表达PRKDC(oe-PRKDC)质粒, 以及各自的阴性对照(si-NC、oe-NC)质粒, 按实验设计分别转染至HCC细胞(HuH-7)中, 以无处理的HuH-7细胞为空白对照。采用Western blot分析各组细胞STAT3、PRKDC、PD-L1和MYC通路相关蛋白的表达。采用CCK-8、Transwell、划痕试验和流式细胞术评估HCC细胞的增殖、侵袭、迁移和凋亡。将HuH-7细胞与人外周血单个核细胞(hPBMC)共培养后, 采用ELISA法检测免疫调节因子干扰素 γ (IFN- γ)的含量。采用免疫共沉淀和免疫荧光共定位验证STAT3与PRKDC蛋白之间的相互作用。

结果: qRT-PCR和Western blot结果显示, HCC细胞中STAT3的mRNA和蛋白表达水平均明显升高(均 $P < 0.05$)。功能实验结果显示, si-STAT3组HCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显减弱, 细胞凋亡明显升高; PD-L1和MYC通路相关蛋白的表达水平明显下调; 与hPBMC共培养后IFN- γ 的分泌水平明显升高(均 $P < 0.05$)。与oe-PRKDC质粒共培养后, STAT3敲低对HCC细胞的以上影响均被明显逆转(均 $P < 0.05$)。Scansite 4.0数据库分析结果显示, STAT3与PRKDC存在结合位点, 免疫共沉淀与免疫荧光共定位实验表明STAT3与PRKDC蛋白的相互作用。

结论: STAT3在HCC细胞中高表达, 并可通过与PRKDC相互作用促进HCC细胞增殖、迁移和侵袭以及免疫逃逸, 抑制细胞凋亡, 并激活MYC通路, 增加PD-L1表达, STAT3/PRKDC/MYC轴可能是HCC免疫治疗的潜在靶点。

关键词

癌, 肝细胞; 肿瘤免疫逃逸; STAT3转录因子
中图分类号: R735.7

基金项目: 云南省科技厅基础研究专项基金资助项目(202201AU070204)。

收稿日期: 2024-05-27; **修订日期:** 2024-09-27。

作者简介: 田芳铭, 昆明医科大学第二附属医院硕士研究生, 主要从事肝细胞癌基础与临床方面的研究。

通信作者: 施智甜, Email: sztkmmu@163.com

Relationship between PD-L1 expression and the STAT3/PRKDC/MYC signaling pathway in hepatocellular carcinoma

TIAN Fangming, LIU Xin, TANG Haocheng, ZHANG Kai, GUO Chen, SHI Zhitian

(The Second Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, China)

Abstract

Background and Aims: Currently, the treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) faces significant challenges due to recurrence and metastasis, with tumor immune evasion being one of the key mechanisms underlying these issues. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), an important transcription factor, is overactivated in many malignancies and is involved in both tumorigenesis and progression, closely associated with immune evasion. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1), a key immune checkpoint, helps tumor cells evade immune surveillance when its expression is upregulated, thereby suppressing anti-tumor immunity. Studies have shown that STAT3 may activate the MYC signaling pathway through interaction with DNA-activated protein kinase (PRKDC), thereby promoting PD-L1 expression and inducing immune evasion. However, the specific mechanism of the STAT3/PRKDC/MYC axis in HCC remains unclear. This study aims to elucidate the molecular mechanism by which STAT3 regulates PD-L1 expression through the PRKDC/MYC signaling pathway, potentially inducing immune evasion in HCC, with the goal of providing potential targets for HCC immunotherapy.

Methods: The expressions of STAT3 in human normal liver cells (HL-7702) and human HCC cells (HuH-7, HepG2) were detected by qRT-PCR and Western blot. Plasmids with STAT3 knockdown (si-STAT3) and PRKDC overexpression (oe-PRKDC), along with their respective negative controls (si-NC, oe-NC), were constructed and transfected into HCC cells (HuH-7) according to the experimental design, with untreated HuH-7 cells as the blank control. Western blot was used to analyze the expression of STAT3, PRKDC, PD-L1, and MYC pathway-related proteins. Cell proliferation, invasion, migration, and apoptosis of HCC cells were assessed by CCK-8, Transwell, wound healing assay, and flow cytometry. After co-culturing HuH-7 cells with human peripheral blood mononuclear cells (hPBMCs), ELISA was used to detect the secretion of the immune regulatory factor interferon γ (IFN- γ). Co-immunoprecipitation and immunofluorescence co-localization were performed to verify the interaction between STAT3 and PRKDC proteins.

Results: Results of qRT-PCR and Western blot showed that the mRNA and protein levels of STAT3 were significantly elevated in HCC cells (both $P < 0.05$). Functional experiments demonstrated that in the si-STAT3 group, HCC cell proliferation, migration, and invasion were significantly weakened, and cell apoptosis was notably increased; the expression of PD-L1 and MYC pathway-related proteins was significantly downregulated; the secretion of IFN- γ was significantly increased after co-culturing with hPBMCs (all $P < 0.05$). After co-culturing with oe-PRKDC plasmids, the effects of STAT3 knockdown on HCC cells were significantly reversed (all $P < 0.05$). Scansite 4.0 database analysis revealed that STAT3 and PRKDC have binding sites, and co-immunoprecipitation and immunofluorescence co-localization experiments confirmed the interaction between STAT3 and PRKDC proteins.

Conclusion: STAT3 is highly expressed in HCC cells and can promote HCC cell proliferation, migration, invasion, and immune evasion through interaction with PRKDC, suppress cell apoptosis, activate the MYC pathway, and increase PD-L1 expression. The STAT3/PRKDC/MYC axis may serve as

a potential target for HCC immunotherapy.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; Tumor Immune Escape; STAT3 Transcription Factor

CLC number: R735.7

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 作为原发性肝癌的主要类型, 已成为全球病死率和发病率较高的癌症之一^[1]。中国的 HCC 发病率和病死率高于全球平均水平, HCC 的预防和治疗对于中国患者而言更加迫切^[2]。目前 HCC 的治疗包括手术切除、肝移植、介入、放射治疗、化学治疗和靶向免疫治疗等, 但因 HCC 细胞的高侵袭性和易转移能力, 使得治疗效果依旧不佳, 再加上昂贵的费用, 给患者带来了严重的经济负担^[3]。因此, 迫切需要寻找新的诊断和治疗手段。

肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 在肿瘤的进展中发挥着重要作用, TME 内的免疫细胞倾向于在肿瘤发生的早期阶段靶向杀死癌细胞, 但癌细胞可以通过各种机制逃避免疫监视^[4], 即免疫逃逸。免疫逃逸在 HCC 的恶性进展中具有至关重要的作用^[5]。免疫疗法是一种重要的治疗策略, 而免疫逃逸可降低抗肿瘤治疗的疗效^[6]。骨髓细胞瘤病毒癌基因 (MYC) 是一种致癌基因, 与各类癌症的发生、发展和恶性侵袭密切相关^[7]。MYC 作为一种调节各类癌细胞的生长分化、血管生成和免疫反应的转录因子, 越来越多的研究关注其在 TME 和免疫效应过程中的功能机制^[8]。先前研究^[9]已表明, MYC 在抗肿瘤免疫反应中具有重要作用, 其不仅促进癌细胞增殖和分化, 还有助于癌细胞免疫逃逸。伴侣蛋白 2 (CCT2) 和染色盒蛋白同源物 3 (CBX3) 是 MYC 通路的相关蛋白。CCT2 是胞质伴侣蛋白的一个亚基, 调节许多肿瘤相关蛋白和细胞周期, 在 HCC 中发现其升高^[10]。CBX3 是染色体盒结构域蛋白家族中的一种, CBX3 高表达与 HCC 患者预后不良相关, CBX3 过表达可促进肿瘤进展^[11]。程序性细胞死亡蛋白 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 是淋巴细胞表面的一种免疫抑制受体, 在维持免疫自我耐受中起着关键作用。PD-1 受体有 PD-L1 和 PD-L2 两种配体。PD-L1 在肿瘤细胞上表达, 是 PD-1 的主要配体, PD-L1 与 PD-1 结合, 使肿瘤细胞逃避宿主免疫反应^[12]。

信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 已被证实对

大多数癌症具有促癌作用, 可以促进细胞增殖、分化和血管生成^[13]。抑制 STAT3 的激活是抗癌治疗的重要策略之一^[14]。先前研究^[15]已报道, STAT3 在人类 HCC 中具有重要作用, 通过靶向抑制 STAT3 可以促进 HCC 细胞的凋亡, 抑制炎症反应。阻断 STAT3 的激活可改善 HCC 的 TME 和抗肿瘤免疫反应^[16]。STAT3 被证实通过调节各种炎症相关基因而发挥作用, 激活 STAT3 能促进血管内皮生长因子的表达, 进一步介导人胰腺癌血管生成和转移^[17]。蛋白激酶 DNA 激活催化多肽 (protein kinase DNA-activated catalytic polypeptide, PRKDC) 作为一种 DNA 依赖性蛋白激酶, 在维持基因稳定性中具有关键作用^[18]。PRKDC 与 DNA 损伤修复相关, 参与多种癌症的恶性进展和转移, 如前列腺癌^[19]、喉鳞状细胞癌^[20]等。在乳腺癌中发现, PRKDC 高表达通过 p38 MAPK 信号传导促进乳腺癌细胞生长, 并与较低的存活率相关^[21]。然而 STAT3 和 PRKDC 在 HCC 免疫逃逸中的作用尚未阐明。本研究通过 Western blot 分析 STAT3、PRKDC、PD-L1 和 MYC 通路相关蛋白的表达水平, CCK-8、Transwell、划痕试验和流式细胞术评估 HCC 细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡, 免疫共沉淀和免疫荧光验证 STAT3 与 PRKDC 蛋白之间的相互作用, 进一步探讨 STAT3 与 PRKDC 通过激活 MYC 通路、增加 PD-L1 表达及诱导 HCC 免疫逃逸的作用机制, 为 HCC 的免疫治疗寻找新的有效的生物标志物。

1 材料与方法

1.1 细胞与培养

人正常肝细胞 HL-7702 (CL-0111)、人 HCC 细胞 HuH-7 (CL-0120) 和 HepG2 (CL-0103) 均购于武汉普诺赛生命科技有限公司, 人外周血单个核细胞 (hPBMC) SNP-H287 购于武汉尚恩生物技术有限公司, 细胞分别通过含 10% FBS (Gibco, 美国) 和 1% 双抗 (Sigma-Aldrich, 美国) 的 RPMI-1640 和 DMEM 细胞培养液 (Sigma-Aldrich, 美国) 进行培养。并将其置于含 5% CO₂、37 °C 细胞恒温

培养箱内孵育,当细胞生长至培养皿的90%时进行传代培养。

1.2 细胞转染

取出培养好的HuH-7细胞,按照 1×10^5 /孔的浓度转移到24孔板中,构建STAT3特异性siRNA质粒(si-STAT3)与PRKDC过表达(oe-PRKDC)质粒,以及各自的阴性对照(si-NC、oe-NC)质粒(GenePharma,中国),采用Lipofectamine 3000试剂(Invitrogen,美国)将其分别转染到细胞中,参照试剂厂家说明书在无菌环境下进行细胞转染,并将其置于含5% CO₂的细胞恒温(37℃)培养箱内孵育48 h,采用qRT-PCR评估转染效果。

1.3 qRT-PCR检测STAT3、PRKDC、GAPDH表达

收集各组细胞,采用TRIzol试剂(Invitrogen)提取总RNA。按照One Step Prime Script miRNA cDNA Synthesis Kit(Takara,日本)试剂盒操作步骤将RNA反转录合成单链互补DNA(cDNA),采用SYBR Green PCR Master Mix(Life Technologies,美国)试剂盒进行qRT-PCR扩增,并检测mRNA水平。以GAPDH作为基因内参,采用2^{-ΔΔCt}方法^[21]计算STAT3、PRKDC、GAPDH表达水平。本实验所用的所有引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因	序列(5'→3')
STAT3	
正向	5'-CTT GGG TGG AGA AGG ACA-3'
反向	5'-ATC GGC AGG TCA ATG GTA-3'
PRKDC	
正向	5'-CCC CTC ATC AGT GGT TTC-3'
反向	5'-TTC CCA GTT ATT CTT GGT CTCA-3'
GAPDH	
正向	5'-TGA CCA CAG TCC ATG CCA TCA C-3'
反向	5'-CGC CTG CTT CAC CAC CTT CTT-3'

1.4 Western blot检测细胞蛋白

收集各组细胞提取总蛋白,采用10% SDS-PAGE凝胶进行分离后,通过湿转到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上(Millipore,美国)。置于常温下,加入5%脱脂牛奶放于摇床上2 h进行封闭膜,清洗后加入一抗,将其置于4℃冰箱中孵育过夜,于第2天取出加入HRP conjugated二抗(1:2 000, cat.no.ab205718, Abcam,英国),置于常温1 h。使用ECL化学发光液显影(BD Biosciences),化学发光

仪进行曝光和观察,使用Image J分析蛋白条带。以anti-GAPDH抗体(1:1 000, cat.no.ab181602, Abcam,英国)为对照。一抗包括:anti-STAT3(1:1 000, ab68153, Abcam,英国),anti-p-STAT3(1:20 000, ab76315, Abcam,英国),anti-PRKDC(1:1 000, ab32566, Abcam,英国),anti-PD-L1(1:1 000, ab213524, Abcam,英国),anti-c-MYC(1:1 000, ab32072, Abcam,英国),anti-CCT2(1:10 000, ab92746, Abcam,英国),anti-CBX3(1:1 000, ab213167, Abcam,英国)。

1.5 ELISA测定干扰素γ(IFN-γ)含量

将hPBMC与植物血凝素(PHA)(MERCK,美国)共孵育作为PHA组,未与PHA共孵育的hPBMC作为空白对照组。将si-NC和si-STAT3以及oe-PRKDC转染至HuH-7细胞后,与hPBMC共培养,随后与PHA共孵育,分别记作hPBMC+si-NC组,hPBMC+si-STAT3组和hPBMC+si-STAT3+oe-PRKDC组,提取细胞上清液采用人IFN-γ ELISA试剂盒(ml077386,上海酶联生物,中国)检测IFN-γ的含量,检测方法严格按照试剂盒说明书执行。

1.6 STAT3与PRKDC蛋白相互作用预测

应用Scansite 4.0数据库(<https://scansite4.mit.edu/#scanProtein>)预测STAT3与PRKDC的蛋白相互作用。

1.7 免疫共沉淀实验

收获细胞使用IP裂解缓冲液裂解,离心提取上清液。获取蛋白后分别采用含Protein A/G磁珠(Santa Cruz Biotechnology)与第一抗体anti-STAT3和anti-PRKDC在4℃下置于摇床上缓慢振荡孵育60 min,随后加入清洗液冲洗3次。离心管置于磁珠悬架上进行洗脱,收集洗脱液,随后采用Western blot进行检测,以验证STAT3和PRKDC的相互作用。

1.8 免疫荧光共定位实验

收集细胞并将其转移到24孔板(2×10^4 细胞/孔)中培养。24 h后用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤2次,加入4%多聚甲醛固定细胞30 min,0.5% Triton X-100渗透10 min,使用牛血清白蛋白封闭1 h。随后,细胞与抗体STAT3(1:200, ab68153)和PRKDC(1:200, ab32566)进行双染,置于4℃冰箱孵育过夜。第2天,清洗一抗后加入相应的二抗孵育1 h,DAPI染色,在荧光显微镜(400857, NiKon,日本)下观察染色细胞并拍摄图像。

1.9 CCK-8实验

采用CCK-8分析试剂盒（北京碧云天生物技术公司）进行细胞增殖水平检测，按照试剂盒说明进行实验。收集各组处理后的细胞，迅速按 3×10^3 个/孔的浓度分别加入96孔板中，每组设置6个重复孔。弃去原培养液，重新加入100 μ L细胞培养液，再加入10 μ L CCK-8溶液，于37 $^{\circ}$ C避光孵育1~3 h。使用酶标仪在450 nm处测量所有吸光度值。

1.10 Transwell检测细胞侵袭

取各组对数生长期细胞，侵袭实验在Transwell小室（Corning，美国）中进行，各组细胞采用无血清DMEM培养基调整浓度为 1×10^5 个/mL。将Transwell小室上室中均匀涂满Matrigel，然后吸取200 μ L细胞悬液到上室中。吸取600 μ L含10% FBS的DMEM细胞培养液到24孔板下室中，培养24 h，将结晶紫染色液（Solarbio，中国）加入下室细胞进行染色，于倒置显微镜下（CKX53，OLYMPUS，日本）观察每个孔内固定位置的细胞数量，并选取5个视野进行计数拍照，计算平均值。

1.11 细胞划痕试验检测细胞迁移

收集各组处理后细胞，以 2.5×10^5 个细胞/孔的浓度均匀迅速吸取到24孔板中，将其置于细胞恒温（37 $^{\circ}$ C）培养箱内孵育，观察细胞生长到90%以上的密度时，采用1 mL的无菌枪头进行划痕后，加入PBS缓慢清洗多余细胞，加入不含FBS

的DMEM细胞培养液，采用倒置显微镜拍照记录，将24孔板再置于细胞恒温培养箱，24 h后进行拍照记录，采用Image J进行分析。

1.12 流式细胞术检测细胞凋亡

收集各组处理后细胞，采用胰蛋白酶消化的各组细胞。调整细胞浓度为 1×10^5 个细胞/培养皿，使用提前预冷的PBS洗涤2次，采用Annexin-V-FITC/PI凋亡试剂盒（Absin，中国）检测其凋亡率。使用FlowJo-V10软件处理实验结果。

1.13 统计学处理

采用Graphpad Prism 8进行数据分析和绘制统计图，计量资料采用均数 \pm 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，两组间比较采用*t*检验，组间比较采用双向方差分析（two-way ANOVA）。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STAT3在HCC细胞系中表达情况

qRT-PCR和Western blot检测结果显示，与人正常肝细胞HL-7702比较，人HCC细胞中STAT3 mRNA明显上调，STAT3明显活化（p-STAT3/STAT3）（均 $P < 0.05$ ）（图1），上述变化在HuH-7细胞中较HepG2更为明显，因此后续实验选用HuH-7进行研究。

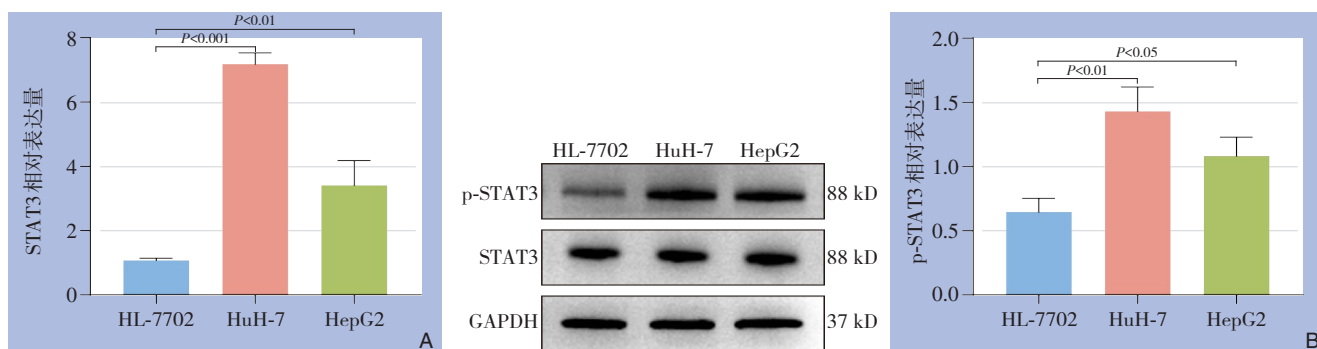


图1 STAT3表达检测 A: qRT-PCR; B: Western blot

Figure 1 STAT3 expression determination A: qRT-PCR; B: Western blot

2.2 STAT3转染效率检测

将si-NC和si-STAT3分别转染至HuH-7细胞后，与空白对照组HuH-7细胞比较，si-NC组HuH-7细胞STAT3 mRNA与蛋白表达差异均无统计学意义（均 $P > 0.05$ ），而si-STAT3组HuH-7细胞STAT3 mRNA与蛋白表达明显降低（均 $P > 0.05$ ）（图2）。

2.3 STAT3对HCC生物学功能的影响

2.3.1 细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡情况 与空白对照组比较，si-NC组细胞增殖能力、细胞侵袭和迁移能力、凋亡率差异均无统计学意义（均 $P > 0.05$ ），而si-STAT3组细胞增殖能力明显减弱、细胞的侵袭和迁移能力明显降低、凋亡明显升高（均 $P < 0.05$ ）（图3）。

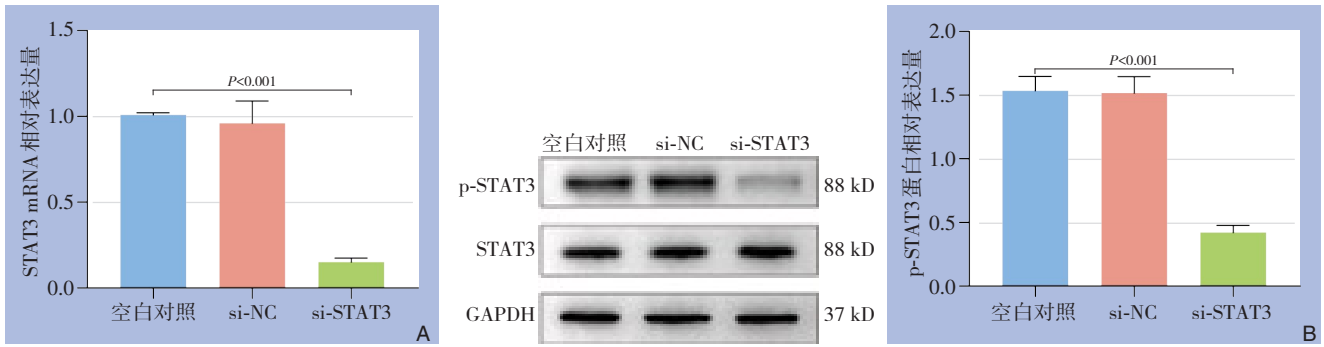


图2 转染效率检测 A: qRT-PCR检测STAT3 mRNA表达; B: Western blot检测STAT3蛋白的表达

Figure 2 Transfection efficiency detection A: Detection of STAT3 mRNA expression by qRT-PCR; B: Detection of STAT3 protein expression by Western blot

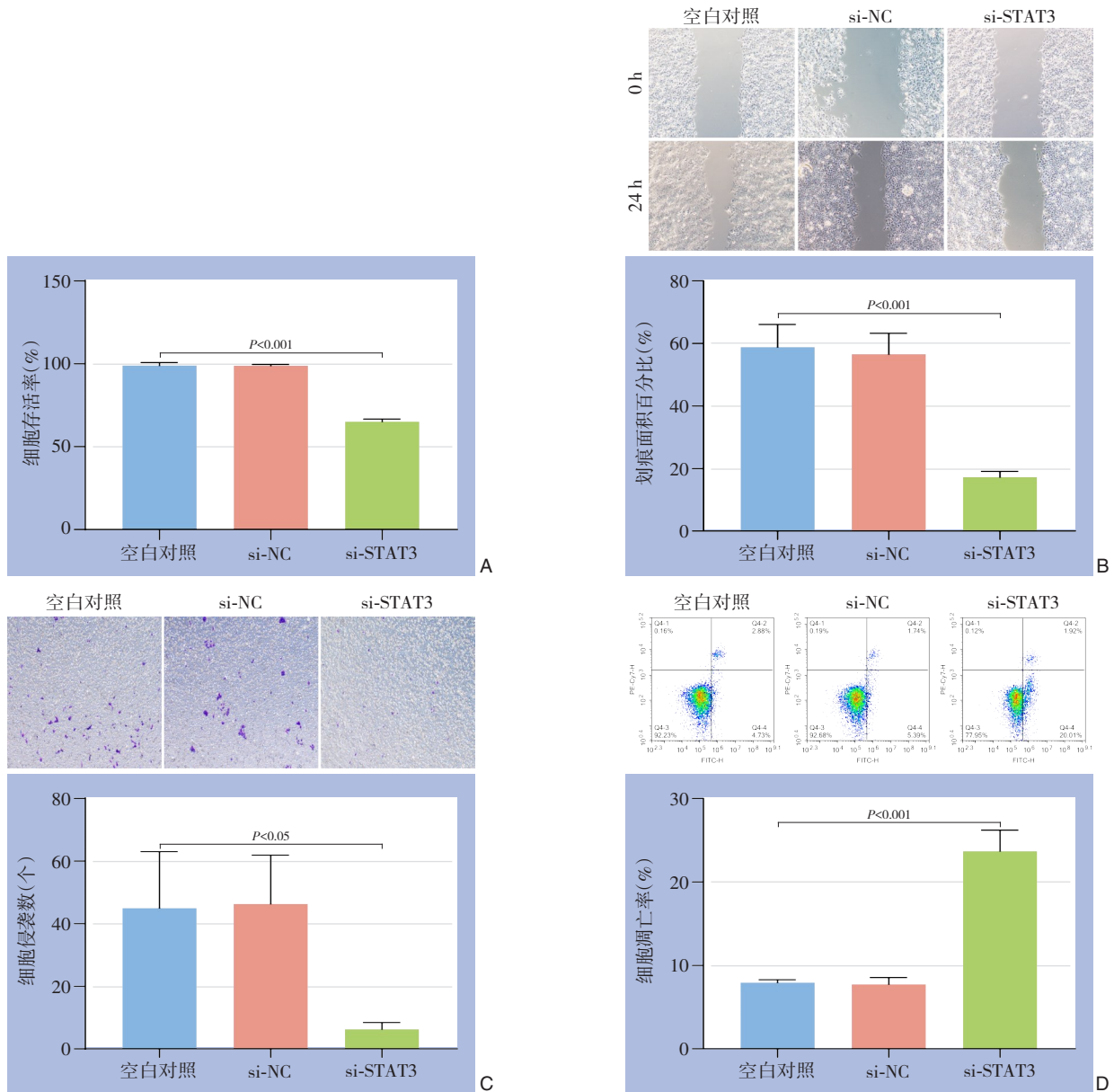


图3 STAT3对HCC细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响 A: CCK-8分析; B: 划痕愈合分析; C: Transwell评估侵袭能力; D: 流式细胞术检测细胞凋亡

Figure 3 Effect of STAT3 on HCC cell proliferation, invasion, migration, and apoptosis A: CCK-8 analysis; B: Wound healing assay; C: Transwell assay to evaluate invasion ability; D: Flow cytometry analysis of cell apoptosis

2.3.2 PD-L1 及 MYC 通路相关蛋白的表达情况

Western blot 检测结果显示, 与空白对照组比较, si-NC 组的各蛋白表达水平差异均无统计学意义

(均 $P>0.05$), 而 si-STAT3 组 PD-L1 以及 c-MYC、CCT2 和 CBX3 的蛋白表达水平均明显降低 (均 $P<0.05$) (图 4)。

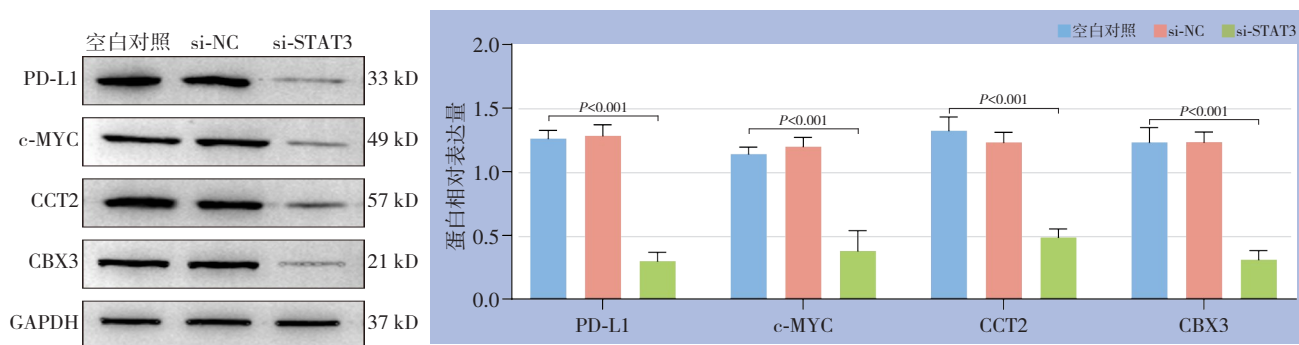


图4 PD-L1和MYC通路相关蛋白表达检测

Figure 4 Detection of expressions of PD-L1 and MYC pathway-related proteins

2.3.3 各组 IFN- γ 分泌量 与未处理的 hPBMC 细胞比较, PHA 组 hPBMC 细胞的 IFN- γ 分泌明显升高 ($P<0.05$), hPBMC+si-NC 组 hPBMC 细胞的 IFN- γ 分泌水平差异无统计学意义 ($P>0.05$), hPBMC+si-STAT3 组 hPBMC 细胞的 IFN- γ 分泌水平明显升高 ($P<0.05$) (图 5)。

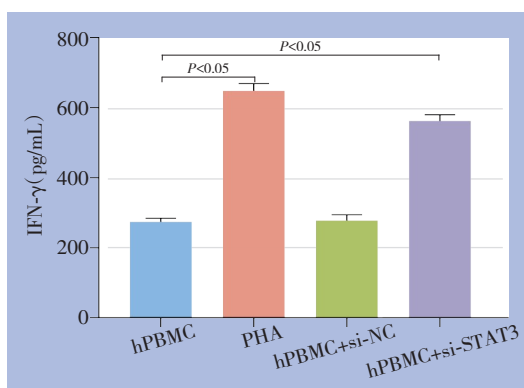


图5 各组 IFN- γ 分泌水平比较

Figure 5 Comparison of IFN- γ secretion levels among different groups

2.4 STAT3 与 PRKDC 蛋白相互作用

Scansite 4.0 数据库分析发现, STAT3 与 PRKDC 蛋白之间存在结合位点 (图 6A)。免疫共沉淀验证结果显示, STAT3 与 PRKDC 存在蛋白相互作用关系 (图 6B)。采用免疫荧光共定位实验检测细胞内

STAT3 与 PRKDC 的表达情况, 结果显示, STAT3 和 PRKDC 均在 HuH-7 细胞表达, 且共定位于细胞核质中, 在 si-STAT3 组中 STAT3 和 PRKDC 的表达均明显减少 (图 6C)。

2.5 STAT3 与 PRKDC 共转染对 HCC 生物学功能的影响

2.5.1 PRKDC 转染效率 为了进一步明确 STAT3 与 PRKDC 在 HCC 的进展中的作用机制, 本研究将 oe-PRKDC 共转染至 HuH-7 细胞中, qRT-PCR 与 Western blot 检测结果显示, 与空白对照组比较, oe-NC 组 PRKDC mRNA 与蛋白表达差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$), 而 oe-PRKDC 组 PRKDC mRNA 与蛋白表达明显升高 (均 $P<0.05$) (图 7)。

2.5.2 细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡情况 检测结果显示, oe-PRKDC 共转染后, STAT3 敲低对细胞增殖、侵袭与迁移能力的抑制以及对细胞凋亡的促进作用被明显逆转 (均 $P<0.05$) (图 8)。

2.5.3 PD-L1 和 MYC 通路相关蛋白表达情况 检测结果显示, oe-PRKDC 共转染后, STAT3 敲低所致的 PD-L1、c-MYC、CCT2 和 CBX3 的蛋白表达水平下调被明显逆转 (均 $P<0.05$) (图 9)。

2.5.4 IFN- γ 的分泌情况 检测结果显示, oe-PRKDC 共转染后, STAT3 敲低所致的 IFN- γ 分泌增加被明显逆转 ($P<0.05$) (图 10)。

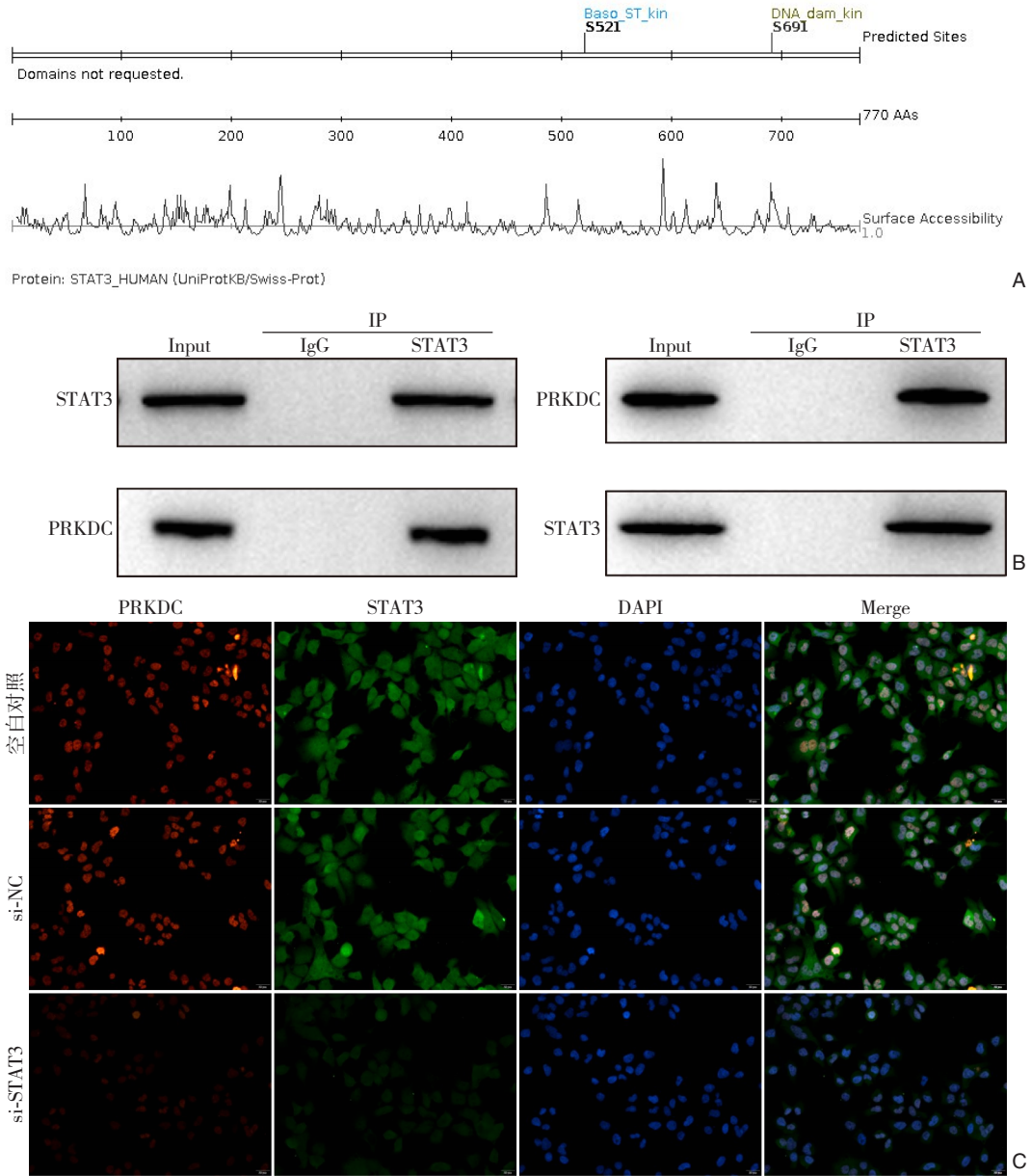


图 6 STAT3 与 PRKDC 蛋白的相互作用 A: 结合位点图; B: 免疫共沉淀实验; C: 免疫荧光共定位 (比例尺=20 μm)
 Figure 6 Interaction between STAT3 and PRKDC proteins A: Binding site map; B: Co-immunoprecipitation assay; C: Immunofluorescence co-localization (scale bar=20 μm)

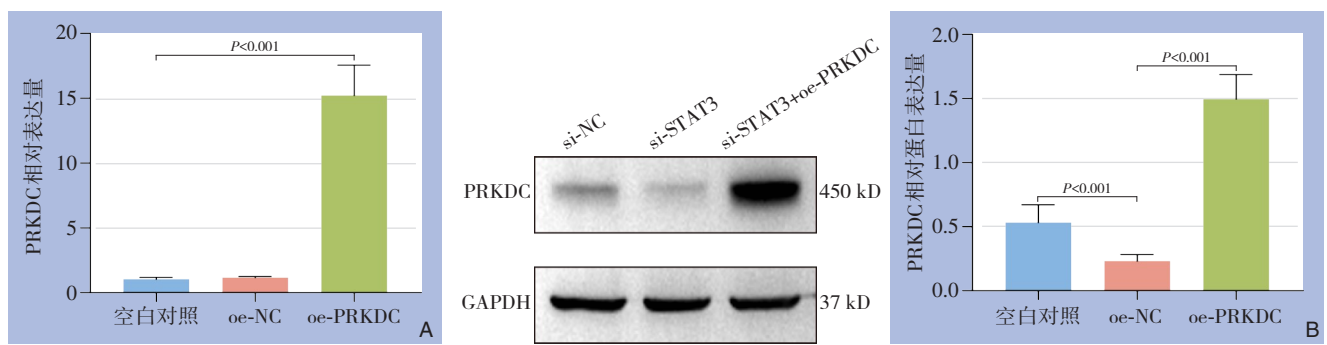


图 7 测转染效率检测 A: qRT-PCR 检测 PRKDC mRNA 表达; B: Western blot 检测 PRKDC 蛋白的表达
 Figure 7 Transfection efficiency detection A: Detection of PRKDC mRNA expression by qRT-PCR; B: Detection of PRKDC protein expression by Western blot

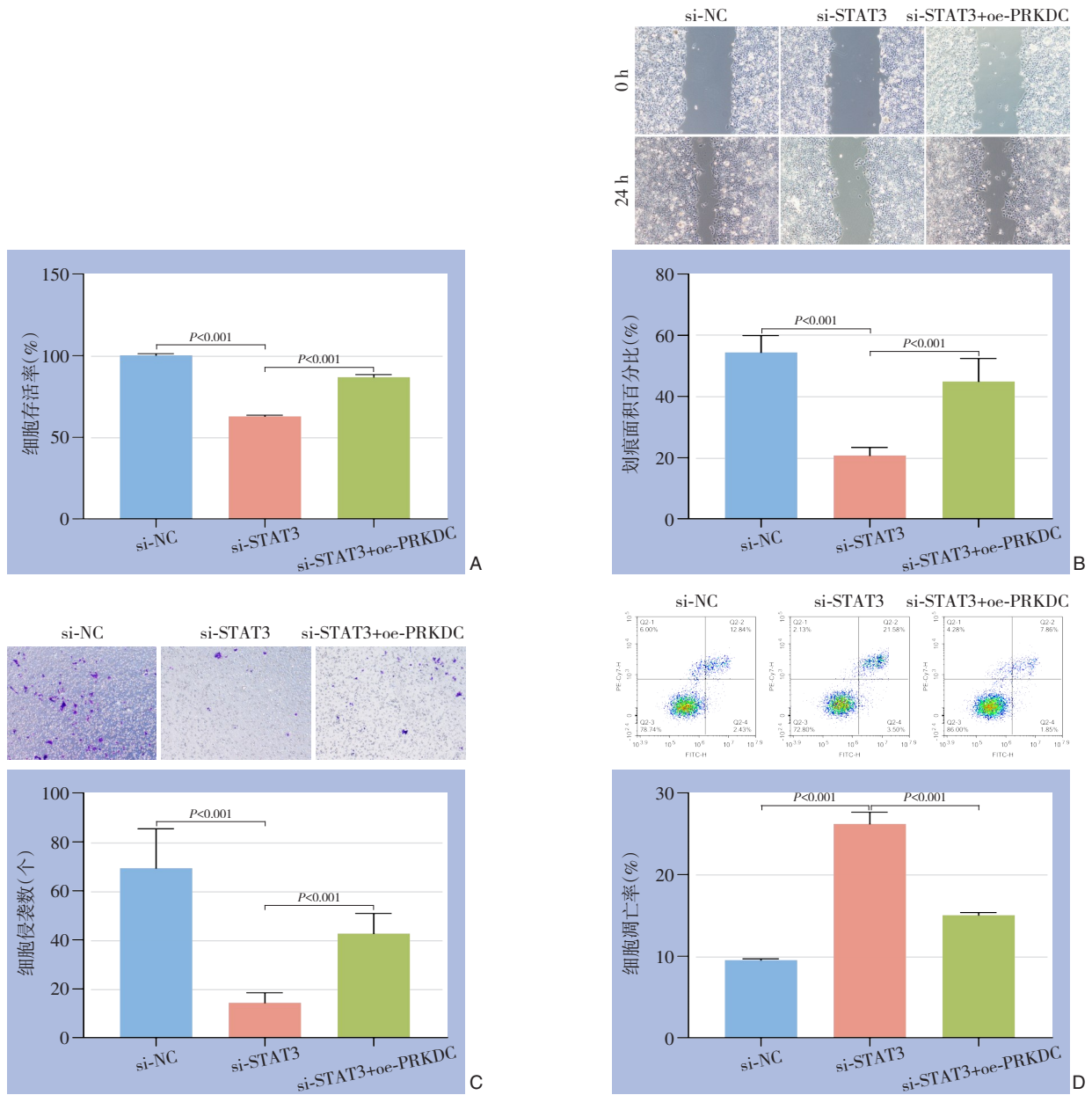


图8 STAT3与PRKDC相互作用对HCC细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响 A: CCK-8分析; B: 划痕愈合分析; C: Transwell评估侵袭能力; D: 流式细胞术检测细胞凋亡

Figure 8 Effect of STAT3 and PRKDC interaction on HCC cell proliferation, invasion, migration, and apoptosis A: CCK-8 analysis; B: Wound healing assay; C: Transwell assay to evaluate invasion ability; D: Flow cytometry analysis of cell apoptosis

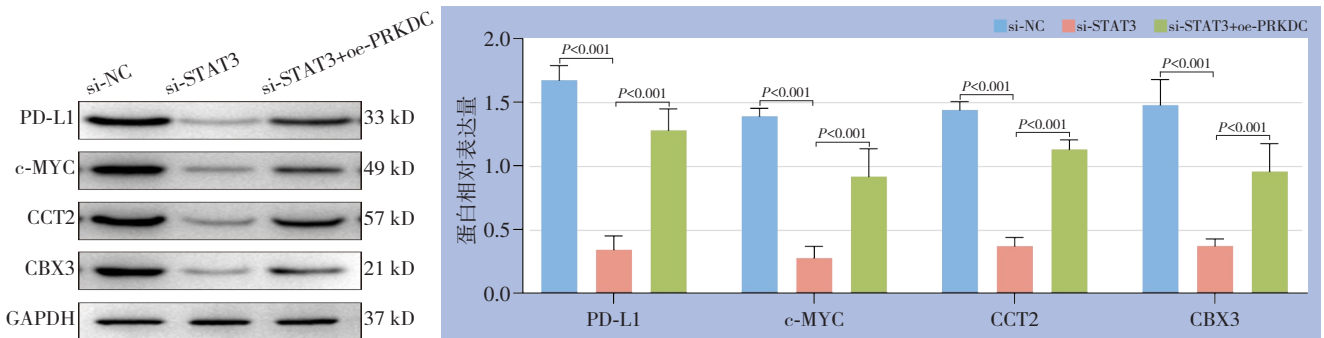


图9 STAT3与PRKDC相互作用对HCC细胞PD-L1和MYC通路相关蛋白表达的影响

Figure 9 Effect of STAT3 and PRKDC interaction on PD-L1 and MYC pathway-related protein expression in HCC cells

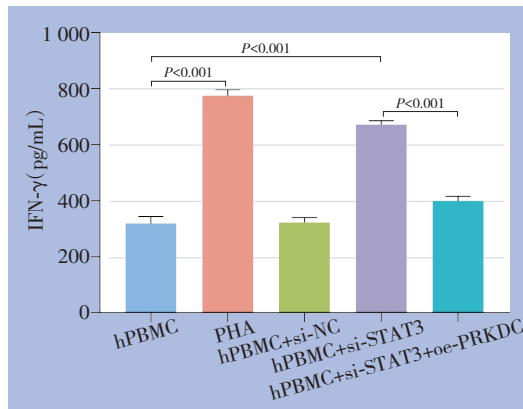


图10 各组IFN- γ 分泌水平比较

Figure 10 Comparison of IFN- γ secretion levels among different groups

3 讨论

HCC是一种发病率和病死率都居高位的恶性肿瘤之一,尤其是在中国,HCC的高发病率和致死率严重威胁着中国人民的生命安全,再加上昂贵的治疗费用带来了严重的经济负担^[23]。HCC的进展是一个复杂的调控过程,包括伴随的炎症损伤,肝细胞坏死和病毒感染等^[24]。目前,HCC的治疗主要是以手术为主的综合治疗,但HCC患者在接受治疗后仍然会发生较大概率复发或癌细胞转移^[25]。研究^[26]证实,癌细胞的免疫逃逸是造成癌症复发和转移的主要原因。因此,寻找新的有效的HCC细胞免疫逃逸生物标志物具有重要意义。

STAT3是激活因子蛋白家族的成员之一,具有介导细胞信号传递,参与各种生物学过程,包括细胞增殖、分化、凋亡和血管形成^[27]。STAT3被发现在各种人类恶性肿瘤中过度激活,与肿瘤发生、转移和耐药机制相关^[28]。在HCC中,STAT3同样被发现在HCC细胞中被激活^[29],并促进肿瘤进展^[30]。本研究也证明STAT3在人HCC细胞系HuH-7和HepG2中被激活,表达显著上调。TME对于癌症的进展和治疗具有至关重要的功能,过度激活的STAT3会影响免疫因子的表达,进而在肿瘤细胞中发挥免疫逃逸作用^[31]。先前研究^[32]表明,STAT3是肿瘤细胞和TME细胞(尤其是肿瘤浸润免疫细胞)的重要信号节点,靶向抑制STAT3是恢复抗肿瘤免疫,改善肿瘤细胞免疫抑制的有效策略。免疫检查点失调是各种癌细胞发生免疫逃逸的关键因素,

进而促进癌症的发展和恶性侵袭。PD-L1是关键的免疫检查点之一^[33],PD-L1在肿瘤细胞逃避宿主免疫系统的能力中起着关键作用,并且PD-L1蛋白在人HCC中表达上调促进细胞免疫逃逸^[34]。STAT3已被证明与PD-L1启动子结合以转录方式调节其表达,进而诱导免疫细胞凋亡,抑制T细胞致死,促进肿瘤免疫逃逸^[35]。STAT3在HCC中被发现是有效的作用靶点,靶向抑制STAT3在体内体外均有效抑制HCC细胞恶性进展,诱导细胞免疫性死亡^[30]。本研究中进一步评估了敲低STAT3后HCC细胞中PD-L1和MYC通路相关蛋白(c-MYC、TCPI1亚基的CCT2^[36]和CBX3^[37])的蛋白表达水平,证明敲低STAT3可下调MYC通路。IFN- γ 是免疫调节因子,在癌细胞免疫逃逸中具有重要作用。Chen等^[38]已证实,抑制表皮生长因子受体(EGFR)或使用替莫唑胺可以降低PD-L1的表达,并进一步增强hPBMC与癌细胞共培养后IFN- γ 的产生,从而促进非小细胞肺癌或多形性胶质母细胞瘤^[39]免疫逃逸。本研究结果显示,敲低STAT3可以显著抑制HCC细胞增殖、迁移和侵袭,以及PD-L1的表达,并下调MYC通路。此外,敲低STAT3进一步增加了HuH-7细胞与hPBMC共培养后IFN- γ 的分泌水平。

MYC在肿瘤的发展和免疫调节中具有重要作用,MYC的过表达促进了癌细胞的增殖和分化,促进了癌症的发生与发展。此外,MYC的激活会对抗原传递、T细胞识别以及T细胞和NK细胞介导的细胞免疫应答产生影响,从而促进了癌细胞免疫逃逸^[9]。在三阴性乳腺癌中发现,MYC过表达导致TME的免疫浸润,抑制T细胞的功能从而促进肿瘤的发展^[40]。研究^[11]证实,MYC与PD-L1之间存在结合位点,低表达的甲基转移酶样5(METTL5)通过抑制MYC通路下调PD-L1的表达,从而抑制HCC细胞的免疫逃逸。本研究发现,STAT3与PRKDC存在结合位点,并在HuH-7细胞中发生蛋白相互作用。DNA修复在癌症中发挥了关键作用,DNA修复基因被证实是恶性肿瘤治疗的潜在靶点^[41]。PRKDC被确定为一种常见的癌症突变DNA修复基因^[42],包括HCC。此外,PRKDC调控了癌细胞的增殖、克隆和分化,在乳腺癌中,PRKDC被证实异常高表达,并促进了细胞的增殖、侵袭和分化^[43]。缺乏PRKDC突变的癌症,会影响蛋白质的功能和免疫疗法的疗效,敲除PRKDC增强了结直肠癌细胞的抗PD-L1抗体作用^[44]。有研

究^[45]报道,发生PRKDC突变的肿瘤患者对免疫治疗具有更为强烈的反应,PRKDC会抑制免疫应答而进一步促进恶性肿瘤的发展,过表达的PRKDC会促使免疫检查点蛋白PD-L1上调,抑制其降解,进而发挥免疫抑制功能,促进癌细胞的免疫逃逸。其次,先前研究发现PRKDC是HCC预后相关的差异表达基因之一^[46],抑制PRKDC可以进一步抑制乙型肝炎病毒转录^[47]。本研究结果进一步表明,STAT3与PRKDC相互作用,PRKDC逆转了STAT3敲低对HCC细胞增殖、迁移和侵袭以及PD-L1的表达和MYC通路的抑制作用。同样,过表达PRKDC逆转了STAT3敲低对IFN- γ 的分泌的促进作用,进一步减少了IFN- γ 的分泌。

综上所述,本研究结果证实,STAT3通过与PRKDC相互作用促进HCC细胞增殖、迁移和侵袭以及免疫逃逸,并与MYC通路有关。STAT3与PRKDC蛋白互作可能是HCC免疫治疗的有效潜在靶点,然而本研究只在细胞层面证实STAT3与PRKDC在HCC细胞进展中的作用,后续研究还应进一步通过体内模型以及临床加以验证,其次还需进一步明确STAT3、PRKDC与MYC通路在HCC中的具体作用机制。

作者贡献声明:田芳铭主要参与实验研究思路构思、实验方法设计、细胞实验、数据整理、实验数据分析及论文撰写等;施智甜主要参与论文研究思路构思、实验方法设计、实验实施、论文审核及修订等;刘鑫、唐浩程、张恺、郭臣主要参与细胞实验,数据整理,实验数据分析等。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Wang PX, Sun YF, Zhou KQ, et al. Circulating tumor cells are an indicator for the administration of adjuvant transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: a single-center, retrospective, propensity-matched study[J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10(3):e137. doi:10.1002/ctm2.137.
- [2] Zheng R, Qu C, Zhang S, et al. Liver cancer incidence and mortality in China: temporal trends and projections to 2030[J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30(6):571-579. doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2018.06.01.
- [3] Chen J, Gingold JA, Su XP. Immunomodulatory TGF- β signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(11):1010-1023. doi:10.1016/j.molmed.2019.06.007.
- [4] Lei X, Lei Y, Li JK, et al. Immune cells within the tumor microenvironment: biological functions and roles in cancer immunotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2020, 470:126-133. doi:10.1016/j.canlet.2019.11.009.
- [5] Han C, Jiang YJ, Wang ZX, et al. Natural killer cells involved in tumour immune escape of hepatocellular carcinoma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 73: 10-16. doi: 10.1016/j.intimp.2019.04.057.
- [6] Li JJ, Wang JH, Tian T, et al. The liver microenvironment orchestrates FGL1-mediated immune escape and progression of metastatic colorectal cancer[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6690. doi:10.1038/s41467-023-42332-0.
- [7] Beaulieu ME, Castillo F, Soucek L. Structural and biophysical insights into the function of the intrinsically disordered myc oncoprotein[J]. *Cells*, 2020, 9(4):1038. doi:10.3390/cells9041038.
- [8] Muthalagu N, Monteverde T, Raffo-Iraolagoitia X, et al. Repression of the type I interferon pathway underlies MYC- and KRAS-dependent evasion of NK and B cells in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(6): 872-887. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0620.
- [9] de Jonge AV, Mutis T, Roemer MGM, et al. Impact of MYC on anti-tumor immune responses in aggressive B cell non-hodgkin lymphomas: consequences for cancer immunotherapy[J]. *Cancers*, 2020, 12(10):3052. doi:10.3390/cancers12103052.
- [10] Cui X, Hu ZP, Li Z, et al. Overexpression of chaperonin containing TCP1, subunit 3 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(28):8588-8604. doi: 10.3748/wjg.v21.i28.8588.
- [11] Xu W, Liu S, Zhang G, et al. Knockdown of METTL5 inhibits the Myc pathway to downregulate PD-L1 expression and inhibits immune escape of hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Chemother*, 2023, 35(5):455-464. doi:10.1080/1120009X.2022.2143614.
- [12] Salama ME, Khairy DA. Immunohistochemical expression of programmed death ligand 1(PDL1) in endometrial carcinoma and its relation to CD4 and CD8 positive immune cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2022, 23(7): 2491-2496. doi: 10.31557/APJCP.2022.23.7.2491.
- [13] Subramaniam A, Shanmugam MK, Perumal E, et al. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1835(1):46-60. doi:10.1016/j.bbcan.2012.10.002.
- [14] Tai WT, Chu PY, Shiao CW, et al. STAT3 mediates regorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*,

- 2014, 20(22):5768–5776. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0725.
- [15] Liu Y, Li PK, Li CL, et al. Inhibition of STAT3 signaling blocks the anti-apoptotic activity of IL-6 in human liver cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(35):27429–27439. doi:10.1074/jbc.M110.142752.
- [16] Sui Q, Zhang J, Sun X, et al. NK cells are the crucial antitumor mediators when STAT3-mediated immunosuppression is blocked in hepatocellular carcinoma[J]. *J Immunol*, 2014, 193(4):2016–2023. doi:10.4049/jimmunol.1302389.
- [17] Wei D, Le X, Zheng L, et al. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis[J]. *Oncogene*, 2003, 22(3):319–329. doi:10.1038/sj.onc.1206122.
- [18] Goodwin JF, Knudsen KE. Beyond DNA repair: dna-PK function in cancer[J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(10):1126–1139. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0358.
- [19] Goodwin JF, Kothari V, Drake JM, et al. DNA-PKcs-mediated transcriptional regulation drives prostate cancer progression and metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(1): 97–113. doi: 10.1016/j.ccell.2015.06.004.
- [20] He SS, Chen Y, Shen XM, et al. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit functions in metastasis and influences survival in advanced-stage laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *J Cancer*, 2017, 8(12):2410–2416. doi:10.7150/jca.20069.
- [21] Cornell L, Munck JM, Alsinet C, et al. DNA-PK-a candidate driver of hepatocarcinogenesis and tissue biomarker that predicts response to treatment and survival[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(4): 925–933. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0842.
- [22] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [23] Zhou M, Wang H, Zeng X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2019, 394(10204): 1145–1158. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30427-1.
- [24] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301–1314. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30010-2.
- [25] 张虹, 晁旭. 肝癌发生免疫逃逸机制的研究进展[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2022, 32(10): 953–956. doi: 10.3969/j.issn.1005-0264.2022.010.025.
- Zhang H, Chao X. Progress of immune escape mechanism in hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases*, 2022, 32(10): 953–956. doi:10.3969/j.issn.1005-0264.2022.010.025.
- [26] Mo Z, Lu H, Mo S, et al. Ultrasound-guided radiofrequency ablation enhances natural killer-mediated antitumor immunity against liver cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7014–7020. doi: 10.3892/ol.2018.8231.
- [27] Hanlon MM, Rakovich T, Cunningham CC, et al. STAT3 mediates the differential effects of oncostatin M and TNF α on RA synovial fibroblast and endothelial cell function[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2056. doi:10.3389/fimmu.2019.02056.
- [28] Wang T, Fahrman JF, Lee H, et al. JAK/STAT3-Regulated Fatty Acid β -Oxidation Is Critical for Breast Cancer Stem Cell Self-Renewal and Chemoresistance[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(1): 136–150. doi: 10.1016/j.cmet.2017.11.001.
- [29] 赵冀安, 刘文聪, 孙会凤, 等. JAK2/STAT3 信号通路在肝细胞性肝癌中表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(1):83–89. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.013.
- Zhao JA, Liu WC, Sun HF, et al. Expression of JAK2/STAT3 signaling pathway in human hepatocellular carcinoma and its significance[J]. *China Journal of General Surgery*, 2016, 25(1):83–89. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.013.
- [30] Li Y, Song Z, Han Q, et al. Targeted inhibition of STAT3 induces immunogenic cell death of hepatocellular carcinoma cells via glycolysis[J]. *Mol Oncol*, 2022, 16(15): 2861–2880. doi: 10.1002/1878-0261.13263.
- [31] Wang TH, Niu GL, Kortylewski M, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells[J]. *Nat Med*, 2004, 10(1):48–54. doi:10.1038/nm976.
- [32] Zou S, Tong Q, Liu B, et al. Targeting STAT3 in cancer immunotherapy[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 145. doi: 10.1186/s12943-020-01258-7.
- [33] Christofi T, Baritaki S, Falzone L, et al. Current perspectives in cancer immunotherapy[J]. *Cancers*, 2019, 11(10): 1472. doi: 10.3390/cancers11101472.
- [34] Zhang F, Hu KS, Liu WF, et al. Oxaliplatin-resistant hepatocellular carcinoma drives immune evasion through PD-L1 up-regulation and PMN-singular recruitment[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2023, 15(3):573–591. doi:10.1016/j.jcmgh.2022.12.002.
- [35] Chen J, Jiang CC, Jin L, et al. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer[J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(3):409–416. doi:10.1093/annonc/mdv615.
- [36] Ghozlan H, Showalter A, Lee E, et al. Chaperonin-containing TCP1 complex (CCT) promotes breast cancer growth through correlations with key cell cycle regulators[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:663877. doi:10.3389/fonc.2021.663877.
- [37] Czerwinska P, Mackiewicz AA. Mining transcriptomic data to uncover the association between CBX family members and cancer stemness[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 13083. doi: 10.3390/

- ijms232113083.
- [38] Chen N, Fang W, Zhan J, et al. Upregulation of PD-L1 by EGFR activation mediates the immune escape in EGFR-driven NSCLC: implication for optional immune targeted therapy for NSCLC patients with EGFR mutation[J]. J Thorac Oncol, 2015, 10(6):910-923. doi:10.1097/JTO.0000000000000500.
- [39] Wang S, Yao F, Lu X, et al. Temozolomide promotes immune escape of GBM cells via upregulating PD-L1[J]. Am J Cancer Res, 2019, 9(6):1161-1171.
- [40] Wu SY, Xiao Y, Wei JL, et al. MYC suppresses STING-dependent innate immunity by transcriptionally upregulating DNMT1 in triple-negative breast cancer[J]. J Immunother Cancer, 2021, 9(7): e002528. doi:10.1136/jitc-2021-002528.
- [41] Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy[J]. Nature, 2005, 434(7035):917-921. doi:10.1038/nature03445.
- [42] Chae YK, Anker JF, Carneiro BA, et al. Genomic landscape of DNA repair genes in cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(17): 23312-23321. doi:10.18632/oncotarget.8196.
- [43] Zhang Y, Yang WK, Wen GM, et al. High expression of PRKDC promotes breast cancer cell growth via p38 MAPK signaling and is associated with poor survival[J]. Mol Genet Genomic Med, 2019, 7(11):e908. doi:10.1002/mgg3.908.
- [44] Tan KT, Yeh CN, Chang YC, et al. PRKDC: new biomarker and drug target for checkpoint blockade immunotherapy[J]. J Immunother Cancer, 2020, 8(1): e000485. doi: 10.1136/jitc-2019-000485.
- [45] Miao Z, Li J, Wang Y, et al. Hsa_circ_0136666 stimulates gastric cancer progression and tumor immune escape by regulating the miR-375/PRKDC Axis and PD-L1 phosphorylation[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1):205. doi:10.1186/s12943-023-01883-y.
- [46] Cai D, Zhao Z, Hu J, et al. Identification of the tumor immune microenvironment and therapeutic biomarkers by a novel molecular subtype based on aging-related genes in hepatocellular carcinoma[J]. Front Surg, 2022, 9: 836080. doi: 10.3389/fsurg.2022.836080.
- [47] Fan Y, Liang Y, Liu Y, et al. PRKDC promotes hepatitis B virus transcription through enhancing the binding of RNA Pol II to cccDNA[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(4):404. doi:10.1038/s41419-022-04852-3.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式:田芳铭,刘鑫,唐浩程,等.肝细胞癌中PD-L1表达与STAT3/PRKDC/MYC信号通路的关系研究[J].中国普通外科杂志,2025,34(1):96-108. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.240281

Cite this article as: Tian FM, Liu X, Tang HC, et al. Relationship between PD-L1 expression and the STAT3/PRKDC/MYC signaling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Chin J Gen Surg, 2025, 34(1): 96-108. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.240281



微信扫一扫
关注该公众号

敬请关注《中国普通外科杂志》官方微信平台

《中国普通外科杂志》官方公众微信正式上线启动(订阅号:ZGPTWKZZ),我们将通过微信平台定期或不定期推送本刊的优秀文章、工作信息、活动通知以及国内外最新研究成果与进展等。同时,您也可在微信上留言,向我们咨询相关问题,并对我们的工作提出意见和建议。《中国普通外科杂志》公众微信号的开通是在移动互联网时代背景下的创新求变之举,希望能为广大读者与作者带来更多的温馨和便利。

欢迎扫描二维码,关注《中国普通外科杂志》杂志社官方微信服务平台。

中国普通外科杂志编辑部