DOI:10.16016/j.2097-0927.202209304

GALNS 蛋白在肝细胞癌中的临床意义及体外生物学功能

刘泽宇,罗袁登,李 勋,谢传明,张雷达 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院全军肝胆外科研究所

[摘要] **目的** 探讨 N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸盐硫酸酯酶(N-acetylgalactosamine-6-sulfatase,GALNS)在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)中的临床意义及体外生物学功能。**方法** 采用回顾性队列研究,对 2008 年 1 月至 2014 年 12 月间在陆军军医大学第一附属医院收治的 72 例肝癌患者的肿瘤组织与癌旁组织,根据免疫组织化学染色(immunohistochemical staining,IHC)结果和临床病理资料,分析 GALNS 在肝细胞癌中的临床意义;通过细胞迁移及增殖实验检测 GALNS 在肝癌细胞中的体外生物学功能。观察指标:①肝癌组织和癌旁组织的 GALNS 表达情况以及其与临床病理特征的关系;②GALNS 对肝癌患者生存分析及危险因素分析;③下调 GALNS 对肝癌细胞增殖与迁移的影响。**结果** ①肝癌组织中 GALNS 蛋白高表达和低表达分别为 32 例和 40 例,GALNS 高表达与肿瘤长径、TNM 分期、肝内转移有关,差异均有统计学意义($\chi^2=20.649,14.849,5.667$,$P<0.05$);②收集陆军军医大学第一附属医院 2008 年至 2014 年间的 72 例患者,GALNS 蛋白低表达和高表达肝癌患者,术后 1、3、5 年生存率分别为 87.50%、42.50%、40.00%和 37.50%、12.50%、3.13%。GALNS 低表达组的生存率优于高表达组,两组比较差异有统计学意义($\chi^2=9.268$,$P<0.05$);③GALNS($HR=2.502$,95%CI:1.369~4.572,$P=0.003$)、远处转移($HR=1.908$,95%CI:1.018~3.573,$P=0.044$)、血管侵犯($HR=2.361$,95%CI:1.267~4.398,$P=0.007$)和病理分期($HR=2.223$,95%CI:1.185~4.171,$P=0.013$)是肝细胞癌的独立危险因素;④下调 GALNS 可显著抑制肝癌细胞增殖与转移($P<0.05$)。**结论** GALNS 在肝癌组织中高表达,是影响肝癌患者预后的独立危险因素,下调 GALNS 可抑制肝癌细胞的增殖与迁移。

[关键词] N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸盐硫酸酯酶;肝细胞癌;生物学功能 ;预后标志物

[中图法分类号] R345; R730.2; R735.7 [文献标志码] A

Clinical significance and *in vitro* biological function of GALNS protein in hepatocellular carcinoma

LIU Zeyu, LUO Yuandeng, LI Xun, XIE Chuanming, ZHANG Leida Institute of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the clinical significance and *in vitro* biological function of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** A retrospective cohort study was conducted on 72 HCC patients in our hospital from January 2008 to December 2014. Their HCC tissues and para-cancerous tissues were collected and detected for GALNS expression with immunohistochemical staining. The clinical significance of GALNS in HCC was analyzed based on the results to immunohistochemical staining and clinicopathological data. The biological function of GALNS in HCC cell lines Huh7 and LM3 was detected by cell migration and proliferation assay after GALNS knockdown. **Results** ①In the 72 HCC tissues, there were 32 samples with high and 40 with low expression of GALNS. Its high level was associated with tumor length, TNM stage and intrahepatic metastasis (*Chi*-square = 20.649, 14.849, 5.667, $P<0.05$); ②The 1-, 3- and 5-year survival rates of the 72 patients after surgical treatment

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81972760)

[通信作者] 张雷达,Email:zld666@aliyun.com

2097-0927/Copyright © 2022,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议( )

were 87.50%, 42.50% and 40.00%, respectively for those with low GALNS level, and 37.50%, 12.50% and 3.13%, for those high expression level. The survival rate was significantly better in the low expression patients than those of high level (*Chi*-square=9.268, $P<0.05$); ③GALNS expression (HR=2.502, 95%*CI*=1.369-4.572, $P=0.003$), distant metastasis (HR=1.908, 95%*CI*=1.018-3.573, $P=0.044$), vascular invasion (HR=2.361, 95%*CI*=1.267-4.398, $P=0.044$) $P=0.007$) and pathological stage (HR=2.223, 95%*CI*=1.185-4.171, $P=0.013$) were independent risk factors for HCC. ④Down-regulation of GALNS significantly inhibited the proliferation and metastasis of HCC cells ($P<0.05$). **Conclusion** GALNS is highly expressed in liver cancer tissues and an independent risk factor for the prognosis of HCC patients. Downregulation of GALNS can inhibit the proliferation and migration of liver cancer cells.

[**Key words**] N-acetylgalactosamine-6-sulfatase; hepatocellular carcinoma; biological function; prognostic markers

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81972760). Corresponding author: ZHANG Leida, E-mail: zld666@aliyun.com

肝癌是一种高度侵袭性的原发性恶性肿瘤,是世界范围内第三大癌症死亡原因,患病率居第六位[1-4]。70%~85%的原发性肝癌为肝细胞癌。虽然检测和检验的技术手段不断发展,但如今肝癌的早期诊断仍具有挑战性,患者诊断出肝癌时往往已是晚期[5-8],而术后5年肿瘤复发的发生率可高达70%[9-14]。因此,为了改善肝癌患者的预后,亟待需要新的生物标志物出现[15],以帮助早期诊断,风险评估和靶向治疗[14,16]。N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸盐硫酸酯酶(N-acetylgalactosamine-6-sulfatase, GALNS)是一种溶酶体酶,能够水解糖胺聚糖,如软骨素-4-硫酸酯和硫酸角蛋白[17-19]。有研究报道称,GALNS基因突变可促进了细胞外基质中硫酸角蛋白的积累[20-21],进而引起肿瘤发生[22]。另外以往的研究中也已发现在几种恶性肿瘤患者的血清中存在高水平的GALNS,并且证明其可作为诊断肺癌的潜在生物标志物[23]。但目前对GALNS与肝细胞癌的临床关系尚不清楚,本研究收集西南医院肝癌术后随访患者的临床病理数据,首次探究GALNS在肝细胞癌的临床意义及体外生物学功能。

1 材料与方法

1.1 一般资料

采用回顾性队列研究,收集陆军军医大学第一附属医院2008年至2014年间的72例肝细胞癌患者,其中男性49例,女性23例;中位年龄为47岁,年龄范围为19~73岁。患者术中取新鲜冰冻肝癌组织及癌旁组织标本。本研究通过中国人民解放军陆军军医大学第一附属医院伦理委员会审批,批件号:KY2020127。

1.2 纳排标准及病例筛选流程图

纳入标准:①肝癌患者行肝癌切除术;②术后组织病理学检查为肝细胞癌;③临床病理资料完整。

排除标准:①非肝癌因素死亡;②围手术期死亡的患者;③合并其他恶性肿瘤;④术前行介入栓塞或其他治疗。

病例筛选流程图见图1,入组72例患者基本资料见表1。

表1 入组病例基本资料表($n=72$)

临床病理特征	病例数	百分比(%)
性别		
男	49	68.06
女	23	31.94
年龄/岁		
≥60	11	15.28
<60	61	84.72
病理分期		
Ⅰ	13	18.06
Ⅱ	37	51.39
Ⅲ	22	30.56
TNM分期		
Ⅰ	31	43.06
Ⅱ	3	4.17
Ⅲ	34	47.22
Ⅳ	4	5.56
肿瘤长径/cm		
≤5	19	26.39
>5+	53	73.61
淋巴结转移		
否	67	93.06
是	5	6.94
血管侵犯		
否	51	70.83
是	21	29.17
肝内转移		
否	61	84.72
是	11	15.28
远处转移		
否	54	75.00
是	18	25.00

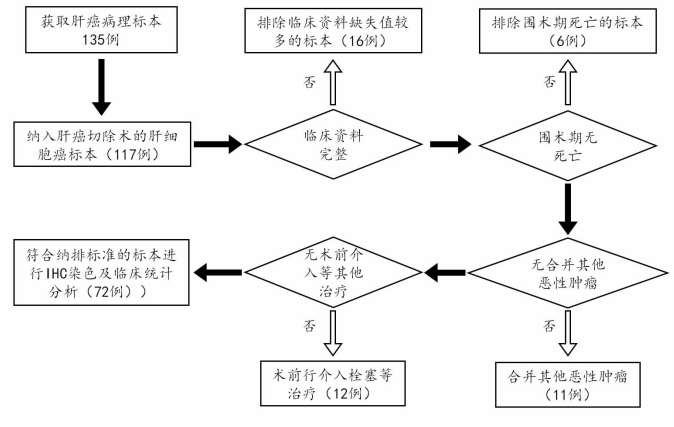


图1 病例筛选流程图

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组织化学染色 将收集的标本以福尔马林溶液固定,石蜡包埋,5 μm 连续切片。采用 DAB 染色方法,操作步骤参照试剂盒说明书进行染色。GALNS 抗体浓度为 1∶150。由两位独立的病理科医师进行双盲阅片,评估染色结果。

1.3.2 RT-qPCR 通过 TRIzol 法提取细胞总 RNA,采用 TaKaRa 公司反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA 后,以 GAPDH 为内参对照,检测 GALNS mRNA 的表达水平,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析定量 PCR 结果。

1.3.3 细胞体外迁移实验 Huh7 细胞和 LM3 细胞分别转染 siGALNS 与 siCtrl,48 h 后将细胞消化接种于 24 孔板的 Transwell 小室内。24 孔板内加入 600 μL 完全培养基,小室内加入 200 μL 无血清培养基重悬的细胞悬液,常规培养 24 h。采用 4%多聚甲醛固定 20 min,结晶紫染色 30 min,擦拭去室内未穿过的肝癌细胞。在 100 倍视野下拍照计数。

1.3.4 细胞增殖实验 Huh7 细胞和 LM3 细胞接种于 96 孔板中,转染 siGALNS 与 siCtrl。培养 72 h 后,用酶标仪检测波长 450 nm 下吸光度(*OD* 值)。

1.4 观察指标和评价标准

1.4.1 观察指标 ①肝癌组织和癌旁组织 GALNS 表达及其与临床病理特征的关系,包括性别、年龄、淋巴结转移、远处转移、肿瘤长径、美国癌症联合会(American Jiont Committee on Cancer, AJCC)TNM 分期、血管侵犯、病理分期和肝内转移。②肝癌患者预后及影响因素分析:GALNS 表达、性别、年龄、淋巴结转移、远处转移、肿瘤长径、血管侵犯、病理分期和肝内转移。③体外实验验证 GALNS 对肝癌细胞迁移与细胞增殖的影响。

1.4.2 评价标准 免疫组织化学染色结果以染色强度及阳性细胞百分比进行评分,0 分为阴性表达,1~4 分为弱表达,5~8 分为中表达,9~12 分为高表达,将阴性表达、弱表达和中表达统一为低表达。

1.5 统计学分析

采用 IBM SPSS Statistics 26 for Windows 和 R4.2.1 统计分析及画图软件。分类计数资料,采用 χ^2 检验来分析 GALNS 表达与临床病理特征之间的关系。采用独立样本 *t* 检验分析连续性变量的差异。Cox 风险回归分析用于单因素和多因素分析肝细胞癌危险因素,并评估风险比(*HR*)和 95%置信区间(*CI*)。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌组织和癌旁组织 GALNS 表达及其与临床病理特征的关系

肝癌组织芯片免疫组织化学染色结果显示:如表 2,GALNS 在 72 例肝癌组织中低表达 40 例(阴性表达、弱表达、中表达分别为 2、12、26 例),高表达 32 例;GALNS 在 72 例癌旁组织中低表达 68 例(阴性表达、弱表达、中表达分别为 44、13、11 例),高表达 4 例。通过卡方检验,较癌旁组织,GALNS 于肝癌组织中高表达,差异有统计学意义($\chi^2=20.250$,$P<0.05$)。免疫组化染色结果显示 GALNS 主要位于细胞质,见图 2。

表 2 肝癌患者癌与癌旁组织 GALNS 蛋白表达的配对四格表

肝癌组织	癌旁组织		合计
	低表达	高表达	
低表达	36	4	40
高表达	32	0	32
合计	68	4	72

肝癌组织中 GALNS 蛋白高表达和低表达分别为 32、40 例,肿瘤长径为≤5 cm 和>5 cm 分别为 19、53 例,TNM 分期为Ⅰ+Ⅱ期和Ⅲ+Ⅳ期分别为 34、38 例,无肝内转移与有肝内转移的分别为 61、11 例。GALNS 蛋白高表达与肿瘤长径、TNM 分期和肝内转移有关,差异均有统计学意义($\chi^2=20.649$,14.849,5.667,$P<0.05$),性别、年龄、淋巴结转移、远处转移、血管侵犯和病理分期与 GALNS 蛋白高表达无关,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

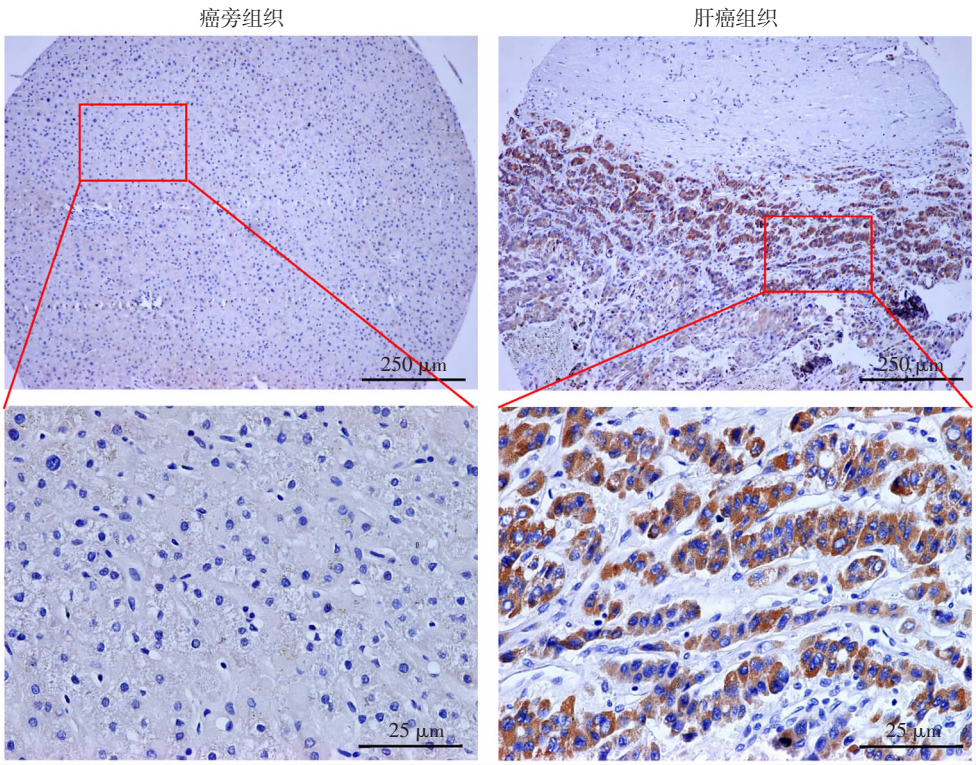


图 2 GALNS 蛋白在 HCC 癌旁组织和肝癌组织中的表达

表 3 GALNS 低表达与高表达肝癌患者临床病理特征比较

临床病理特征	GALNS 低表达（n=40）	GALNS 高表达（n=32）	χ^2	P
TNM 分期				
Ⅰ+Ⅱ期	27	7	14.849	<0.001
Ⅲ+Ⅳ期	13	25		
血管侵犯				
否	30	21	0.756	0.384
是	10	11		
病理分期				
Ⅰ+Ⅱ期	27	7	0.960	0.327
Ⅲ期	13	25		
肝内转移				
否	38	23	5.667	0.017
是	2	9		
性别				
女	13	10	0.013	0.910
男	27	22		
年龄/岁				
<60	32	29	0.067	0.796
≥60	8	3		
淋巴结转移				
否	38	29	0.067	0.796
是	2	3		
远处转移				
否	33	21	2.700	0.100
是	7	11		
肿瘤长径/cm				
≤5	19	0	20.649	<0.001
>5	21	32		

2.2 肝细胞癌患者的预后及危险因素分析

72 例患者均获得门诊或电话随访,术后中位随访时间为 16.9 个月。GALNS 蛋白低表达和高表达肝癌患者,术后 1、3、5 年生存率分别为 87.50%、42.50%、40.00%和 37.50%、12.50%、3.13%。GALNS 低表达组的生存率优于高表达组,两组比较差异有统计学意义(χ^2=9.268,P<0.05),见图 3。

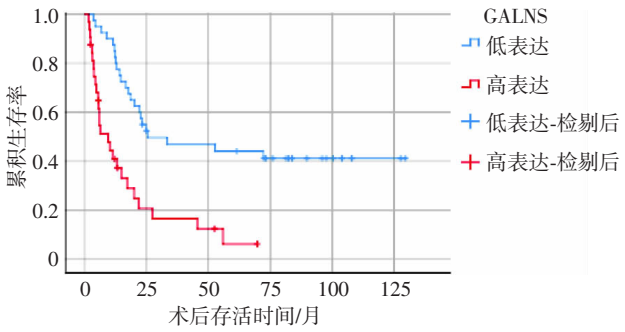


图 3 肝癌患者中 GALNS 低表达与高表达患者术后生存曲线

单因素 Cox 风险分析结果显示:GALNS、远处转移、肿瘤长径、TNM 分期、血管侵犯和病理分期是影响肝癌患者术后总体生存率的相关因素(P<0.05),性别、年龄、淋巴结转移、肝内转移不是影响肝癌患者术后总体生存率的相关因素(P>0.05),见表 4。多因素

Cox 风险回归分析,采用逐步回归法筛选变量,结果提示:GALNS、远处转移、血管侵犯和病理分期均为肝细胞癌患者的独立危险因素,见表 5。

表 4 影响 72 例肝癌患者术后总体生存率的单因素分析

临床病理因素	例数	*HR*(95%*CI*)	*P*
GALNS			
低表达	40	3.288(1.837~5.884)	<0.001
高表达	32		
性别			
女	23	1.436(0.781~2.642)	0.245
男	49		
年龄/岁			
<60	61	0.441(0.174~1.119)	0.085
≥60	11		
淋巴结转移			
否	67	1.144(0.41~3.191)	0.797
是	5		
远处转移			
否	54	1.844(1.001~3.395)	0.049
是	18		
肿瘤长径/cm			
≤5	19	2.212(1.099~4.451)	0.026
>5	53		
TNM 分期			
Ⅰ+Ⅱ期	34	2.447(1.363~4.393)	0.003
Ⅲ+Ⅳ期	38		
血管侵犯			
否	51	2.814(1.527~5.186)	0.001
是	21		
病理分期			
Ⅰ+Ⅱ期	50	2.487(1.367~4.523)	0.003
Ⅲ期	22		
肝内转移			
否	61	1.32(0.591~2.946)	0.498
是	11		

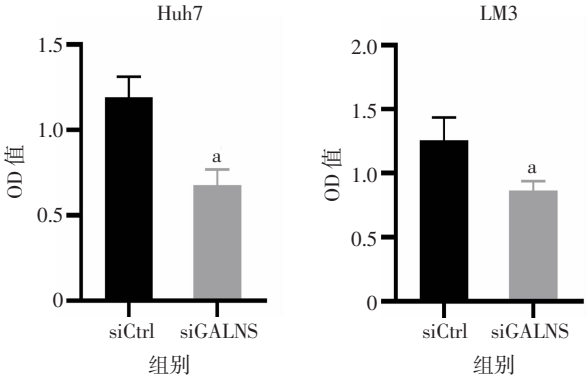
表 5 影响 72 例肝癌患者术后总体生存率的多因素分析

临床病理因素	例数	*HR*(95%*CI*)	*P*
GALNS			
低表达	40	2.502(1.369~4.572)	0.003
高表达	32		
远处转移			
否	54	1.908(1.018~3.573)	0.044
是	18		
TNM 分期			
Ⅰ+Ⅱ期	34	-	0.328
Ⅲ+Ⅳ期	38		
肿瘤长径/cm			
≤5	19	-	0.494
>5	53		
血管侵犯			0.007
否	51	2.361(1.267~4.398)	
是	21		
病理分期			
Ⅰ+Ⅱ期	50	2.223(1.185~4.171)	0.013
Ⅲ期	22		

2.3 抑制 GALNS 表达对肝癌细胞增殖与迁移的影响

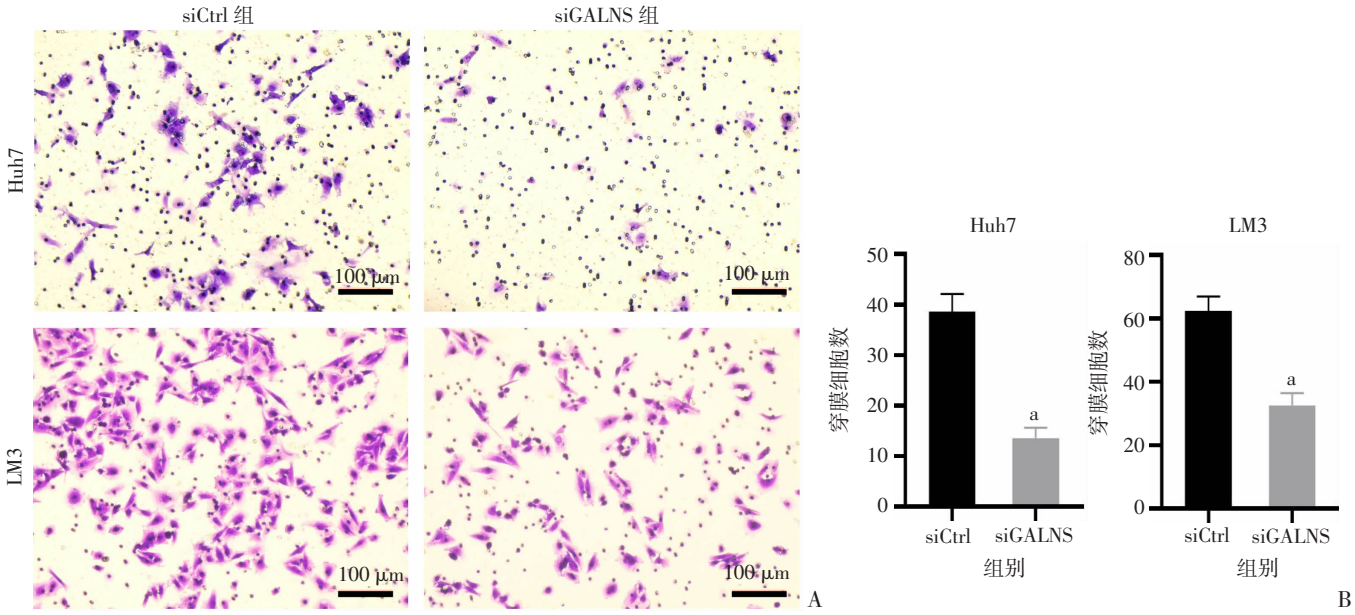
2.3.1 qRT-PCR 检测 siGALNS 敲低 GALNS mRNA 效果 转染 siGALNS 和 siCtrl 的 Huh7 细胞中,GALNS mRNA 的相对表达量分别为(31.35±3.6)%和(100±13.86)%。采用独立样本 *t* 检验比较,siGALNS 可显著敲低 GALNS mRNA 表达水平,差异有统计学意义($t=6.66$,$P<0.05$)。转染 siGALNS 和 siCtrl 的 LM3 细胞中,GALNS mRNA 的相对表达量分别为(27.4±3.53)%和(100±8.25)%,采用独立样本 *t* 检验比较 siGALNS 可显著敲低 GALNS mRNA 表达水平,差异均有统计学意义($t=10.26$,$P<0.05$)。

2.3.2 CCK-8 检测细胞增殖情况 Huh7 细胞分别转染 siGALNS 和 siCtrl 后继续培养 72 h,CCK-8 吸光度值分别为(0.67±0.08)和(1.18±0.12),敲低 GALNS 可显著抑制 Huh7 细胞增殖能力,差异有统计学意义($t=7.05$,$P<0.05$)。LM3 细胞分别转染 siGALNS 和 siCtrl 后继续培养 72 h,CCK-8 吸光度值分别为(0.86±0.07)和(1.25±0.18),敲低 GALNS 可显著抑制 LM3 细胞增殖能力,差异有统计学意义($t=4.51$,$P<0.05$),见图 4。



a:$P<0.05$,与 siCtrl 组比较

图 4 CCK-8 检测敲低 GALNS 后 Huh7、LM3 细胞增殖能力 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)



A:Transwell 检测敲低 GALNS 后对 Huh7 和 LM3 细胞迁移能力的影响(结晶紫);B: Huh7、LM3 细胞迁移能力分析
a:$P<0.05$,与 siCtrl 组比较

图 5 Huh7 细胞和 LM3 细胞迁移实验 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

2.3.3 Transwell 实验检测细胞迁移情况 分别转染 siGALNS 和 siCtrl 的 Huh7 细胞,穿膜细胞数分别为(13.5±1.85)和(38.46±3.25),敲低 GALNS 可显著抑制 Huh7 细胞迁移能力,差异有统计学意义($t=10.61$, $P<0.05$)。分别转染 siGALNS 和 siCtrl 的 LM3 细胞,穿膜细胞数分别为(32.59±3.62)和(62.49±4.5),敲低 GALNS 可显著抑制 LM3 细胞迁移能力,差异有统计学意义($t=8.72$, $P<0.05$)。见图 5。

3 讨论

肝癌是全球第三大癌症死亡原因,患病率居第六位。肝细胞癌占肝癌总数的 75%~85%。其起病隐匿,早期症状不典型,患者确诊时肿瘤常已发生远处转移,失去根治性手术机会导致预后较差。因此研究肝细胞癌预后标志物具有重要意义。

肿瘤微环境是肿瘤发展的细胞环境,除肿瘤细胞本身以外,肿瘤微环境还包括了细胞类型、细胞外基质、生长因子、蛋白水解酶及其他信号分子[24-25]。其中细胞外基质与肿瘤细胞之间的相互作用常常与肿瘤发生、进展和患者预后有着显著关联[26]。异常的胞外基质表达可促进癌细胞的迁移[22, 27]。软骨素-4-硫酸盐是一类糖胺聚糖,可共价连接在蛋白质上形成蛋白聚糖,也是细胞外基质的成分之一。不少研究报道其与胶质瘤[22]、前列腺癌[28]和乳腺癌[29]等恶性肿瘤均有关。既往有报道称致癌性 HRAS 信号通路活化可导致 C4S 减少,促进肿瘤细胞迁移能力增强和患者恶性肿瘤的易感性提高[30]。而 GALNS 是一类硫酸酯酶可去除 C4S 的硫酸盐基团,引起 C4S 水解[31-32],这提示 GALNS 可能与肿瘤发生发展有关。“癌化”的微环境可给肿瘤生长和转移提供“温床”,癌细胞分泌的各种酶类可诱导细胞周围基质的变化[33-34]。相对稳定的细胞外基质是一个成分丰富的大分子网络,为细胞提供机械支架,介导信号分子的传递以维持细胞功能。周围基质的降解导致细胞外基质的重塑有利于肿瘤细胞的侵袭转移[35-36]。而 GALNS 作为消化糖胺聚糖的酶,其表达水平增高导致 C4S 等糖胺聚糖过度水解,引起细胞外基质成分的变化,有助于肿瘤侵袭转移的发生。

因此,本研究通过临床病理资料分析及体外实验验证 GALNS 在肝细胞癌中的临床意义及生物学功能:GALNS 在大部分肝癌患者的肿瘤组织中表达水平升高;进一步分析了肝细胞癌患者临床病理因素与 GALNS 蛋白的关系发现:GALNS 与肿瘤长径、TNM 分期和肝内转移有关,提示 GALNS 的异常高表达与肝细胞癌患者的不良临床病理特征及预后密切相关;多因素 Cox 风险回归分析结果表明:GALNS 表达、远处转

移[37]、血管侵犯[38]和病理分期[39]是影响肝癌患者总体生存率的独立危险因素。由于 GALNS 与肿瘤长径、肝内转移有关,通过体外细胞实验检测发现 GALNS 具有促进肝癌细胞增殖和迁移的能力,敲低 GALNS 可有效抑制肝癌细胞增殖与迁移。今后深入研究 GALNS 在肝癌中的分子作用机制,未来有望作为诊断肝癌及靶向治疗的潜在生物标志物。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] XU X F, XING H, HAN J, *et al*. Risk factors, patterns, and outcomes of late recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: a multicenter study from China [J]. JAMA Surg, 2019, 154(3): 209-217. DOI: 10.1001/jamasurg.2018.4334.

[3] QIU Z X, LI H, ZHANG Z T, *et al*. A pharmacogenomic landscape in human liver cancers[J]. Cancer Cell, 2019, 36(2): 179-193.e11. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.07.001.

[4] 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. DOI: 10.3322/caac.21492.

[5] LOSIC B, CRAIG A J, VILLACORTA-MARTIN C, *et al*. Intratumoral heterogeneity and clonal evolution in liver cancer [J]. Nat Commun, 2020, 11: 291. DOI: 10.1038/s41467-019-14050-z.

[6] LI X X, LIANG L, HUANG L Y, *et al*. High expression of protein phosphatase 4 is associated with the aggressive malignant behavior of colorectal carcinoma[J]. Mol Cancer, 2015, 14: 95. DOI: 10.1186/s12943-015-0356-7.

[7] TSUCHIYA N, SAWADA Y, ENDO I, *et al*. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(37): 10573-10583. DOI: 10.3748/wjg.v21.i37.10573.

[8] BARD-CHAPEAU E A, NGUYEN A T, RUST A G, *et al*. Transposon mutagenesis identifies genes driving hepatocellular carcinoma in a chronic hepatitis B mouse model[J]. Nat Genet, 2014, 46(1): 24-32. DOI: 10.1038/ng.2847.

[9] LIU X R, LIANG Y J, SONG R P, *et al*. Long non-coding RNA NEAT1-modulated abnormal lipolysis via ATGL drives hepatocellular carcinoma proliferation[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 90. DOI: 10.1186/s12943-018-0838-5.

[10] SUN N, LEE Y T, ZHANG R Y, *et al*. Purification of HCC-specific extracellular vesicles on nanosubstrates for early HCC detection by digital scoring[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4489. DOI: 10.1038/s41467-020-18311-0.

[11] KIM S Y, AN J, LIM Y S, *et al*. MRI with liver-specific contrast for surveillance of patients with cirrhosis at high risk of hepatocellular carcinoma[J]. JAMA Oncol, 2017, 3(4): 456-463. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.3147.

[12] YANG P Y, LI Q J, FENG Y X, *et al*. TGF-β-miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell, 2012, 22(3): 291-303. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.07.023.

[13] LLOVET J M, SCHWARTZ M, MAZZAFERRO V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma[J]. Semin Liver Dis, 2005, 25(2): 181-200. DOI: 10.1055/s-2005-871198.

[14] XIA Y, LI J, LIU G H, *et al*. Long-term effects of repeat hepatectomy vs percutaneous radiofrequency ablation among patients with recurrent hepatocellular carcinoma: a randomized clinical trial[J]. JAMA Oncol, 2020, 6(2): 255-263. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.4477.

[15] PENG J M, LIN S H, YU M C, *et al*. $CLIC_1$ recruits PIP5K1A/C to induce cell-matrix adhesions for tumor metastasis[J]. J Clin Invest, 2021, 131(1): 133525. DOI: 10.1172/JCI133525.

[16] TANG B, QI G Y, SUN X Y, *et al*. HOXA7 plays a critical role in metastasis of liver cancer associated with activation of Snail[J]. Mol Cancer, 2016, 15(1): 57. DOI: 10.1186/s12943-016-0540-4.

[17] BERTOLIN J, SÁNCHEZ V, RIBERA A, *et al*. Treatment of skeletal and non-skeletal alterations of Mucopolysaccharidosis type IVA by AAV-mediated gene therapy[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5343. DOI: 10.1038/s41467-021-25697-y.

[18] TOMATSU S, VOGLER C, MONTAÑO A M, *et al*. Murine model (Galns(tm(C76S)slu)) of MPS IVA with missense mutation at the active site cysteine conserved among sulfatase proteins[J]. Mol Genet Metab, 2007, 91(3): 251-258. DOI: 10.1016/j.ymgme.2007.02.009.

[19] RIVERA-COLÓN Y, SCHUTSKY E K, KITA A Z, *et al*. The structure of human GALNS reveals the molecular basis for mucopolysaccharidosis IV A[J]. J Mol Biol, 2012, 423

(5): 736-751. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.08.020.

[20] SHETH H, NAIK P, SHAH M, *et al*. The GALNS p.P77R variant is a probable Gujarati-Indian founder mutation causing Mucopolysaccharidosis IVA syndrome[J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): 458. DOI: 10.1186/s12864-022-08693-4.

[21] TOMATSU S, MONTAÑO A M, NISHIOKA T, *et al*. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A)[J]. Hum Mutat, 2005, 26(6): 500-512. DOI: 10.1002/humu.20257.

[22] PAN H C, XUE W K, ZHAO W J, *et al*. Expression and function of chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate in human glioma[J]. FASEB J, 2020, 34(2): 2853-2868. DOI: 10.1096/fj.201901621RRR.

[23] HO M L, KUO W K, CHU L J, *et al*. N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS), similar to glycodelin, is a potential general biomarker for multiple malignancies[J]. Anticancer Res, 2019, 39(11): 6317-6324. DOI: 10.21873/anticanres.13842.

[24] JUNTTILA M R, DE SAUVAGE F J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response[J]. Nature, 2013, 501(7467): 346-354. DOI: 10.1038/nature12626.

[25] QUAIL D F, JOYCE J A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis[J]. Nat Med, 2013, 19(11): 1423-1437. DOI: 10.1038/nm.3394.

[26] JOYCE J A, POLLARD J W. Microenvironmental regulation of metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(4): 239-252. DOI: 10.1038/nrc2618.

[27] FERRER V P, MOURA NETO V, MENTLEIN R. Glioma infiltration and extracellular matrix: key players and modulators[J]. Glia, 2018, 66(8): 1542-1565. DOI: 10.1002/glia.23309.

[28] FEFERMAN L, BHATTACHARYYA S, DEATON R, *et al*. Arylsulfatase B (N-acetylgalactosamine-4-sulfatase): potential role as a biomarker in prostate cancer[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2013, 16(3): 277-284. DOI: 10.1038/pcan.2013.18.

[29] VADEN R M, GLIGORICH K M, JANA R, *et al*. The small molecule C-6 is selectively cytotoxic against breast cancer cells and its biological action is characterized by mitochondrial defects and endoplasmic reticulum stress[J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(6): 472. DOI: 10.1186/s13058-014-0472-0.

[30] KLÜPPEL M, SAMAVARCHI-TEHRANI P, LIU K L, *et al*. C4ST-1/CHST11-controlled chondroitin sulfation interferes with oncogenic HRAS signaling in costello syndrome[J]. Eur J Hum Genet, 2012, 20(8): 870-877. DOI: 10.1038/ejhg.2012.12.

[31] GLASER J H, CONRAD H E. Chondroitin SO_4 catabolism in chick embryo chondrocytes[J]. J Biol Chem, 1979, 254(7): 2316-2325. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)30223-5.

[32] DE SOUSA J F Jr, NADER H B, DIETRICH C P. Sequential degradation of chondroitin sulfate in molluscs. Desulfation of chondroitin sulfate without prior depolymerization by a novel sulfatase from Anomalocardia brasiliana[J]. J Biol Chem, 1990, 265(33): 20150-20155. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)30482-9.

[33] SUAREZ-CARMONA M, LESAGE J, CATALDO D, *et al*. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression[J]. Mol Oncol, 2017, 11(7): 805-823. DOI: 10.1002/1878-0261.12095.

[34] MAROZZI M, PARNIGONI A, NEGRI A, *et al*. Inflammation, extracellular matrix remodeling, and proteostasis in tumor microenvironment[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 8102. DOI: 10.3390/ijms22158102.

[35] LIU M H, TOLG C, TURLEY E. Dissecting the dual nature of hyaluronan in the tumor microenvironment[J]. Front Immunol, 2019, 10: 947. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00947.

[36] BAHCECIOGLU G, BASARA G, ELLIS B W, *et al*. Breast cancer models: engineering the tumor microenvironment[J]. Acta Biomater, 2020, 106: 1-21. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.02.006.

[37] YANG L Y, LUO Q, LU L, *et al*. Increased neutrophil extracellular traps promote metastasis potential of hepatocellular carcinoma via provoking tumorous inflammatory response[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 3. DOI: 10.1186/s13045-019-0836-0.

[38] CAI Z X, SU X P, QIU L M, *et al*. Personalized neoantigen vaccine prevents postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients with vascular invasion[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 164. DOI: 10.1186/s12943-021-01467-8.

[39] ZHANG R, GAO X M, ZUO J L, *et al*. $STMN_1$ upregulation mediates hepatocellular carcinoma and hepatic stellate cell crosstalk to aggravate cancer by triggering the MET pathway[J]. Cancer Sci, 2020, 111(2): 406-417. DOI: 10.1111/cas.14262.

(收稿:2022-09-30;修回:2022-10-15)

(编辑 邓强庭)