DOI:10.16016/j.2097-0927.202102042

下调 IL35 通过上调自噬相关蛋白表达而抑制肝细胞癌侵袭和迁移

易 言,陈青松,吴忠均 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肝胆外科

[摘要] **目的** 探讨白细胞介素 35(interleukin 35, IL35)在肝癌中的表达及其临床意义、潜在的分子机制。**方法** 收集手术确诊的肝细胞肝癌和癌旁组织 40 对。采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测 IL35 在肝癌和癌旁组织中的表达,并分析 IL35 与各临床指标的相关性。Western blot 检测 IL35 在肝癌细胞中的表达。慢病毒转染下调 IL35。CCK-8 和集落形成检测细胞增殖,Transwell 实验检测侵袭和迁移,Western blot 检测细胞自噬和 EMT 相关指标。**结果** IL35 高表达于肝癌组织中($P<0.01$);与 HL7702 肝细胞相比,IL35 蛋白表达在 Hep3B、Huh7、SMMC7721、Bel7402 细胞中升高,且 Hep3B 表达最高($P<0.01$);高表达与血管侵犯相关($P=0.0033$);Transwell 实验表明下调 L35 能有效抑制肝癌细胞侵袭和转移($P<0.01$);CCK-8 和平板克隆实验表明,下调 IL35 能有效抑制肝癌细胞增殖($P<0.01$);Western blot 结果显示,下调 IL35 能促进 LC3BII、Beclin1 表达,抑制 p62 表达($P<0.01$),同时促进 E-cadherin 表达并抑制 N-cadherin、Vimentin 的表达($P<0.01$)。**结论** IL35 高表达于肝细胞肝癌组织和肝癌细胞中,其表达与肝癌的血管侵犯相关;下调 IL35 能通过诱导自噬达到抑制肝癌细胞的侵袭和迁移的目的。

[关键词] interleukin 35, IL35;肝细胞癌;自噬;侵袭;迁移;上皮间质转化
[中图法分类号] R392.2; R73-37; R735.7 [文献标志码] A

Knockdown of IL35 inhibits migration and invasion of hepatocellular carcinoma by up-regulating autophagy-related proteins in HCC cells

YI Yan, CHEN Qingsong, WU Zhongjun Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression, clinical significance and potential molecular mechanism of interleukin 35 (IL35) in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** A total of 40 pairs of HCC and adjacent tissues were collected. RT-qPCR and Western blotting were used to detect the expression of IL35 in the tissues, and the correlation of IL35 with clinical indicators was analyzed. The expression of IL35 was detected in normal liver cell line LO2 and 4 strains of HCC Huh7, Hep3B, SMMC7721 and Bel7402 cells by Western blotting. Lentiviral infection was used to down-regulate the expression of IL35 in Hep3B cells. Then CCK-8 assay and colony formation were employed to detect cell proliferation, Transwell assay was adopted to detect cell invasion and migration, and Western blotting was performed to detect autophagy and epithelial-mesenchymal transition (EMT) related indicators. **Results** IL35 was highly expressed in HCC tissue ($P<0.01$). Compared with HL7702 cells, IL35 was highly expressed in Hep3B, Huh7, SMMC7721 and BEL7402 cells, with the highest expression in Hep3B cells ($P<0.01$). The high expression was associated with vascular invasion ($P=0.0033$). Transwell assay showed that down-regulation of IL35 effectively inhibited the invasion and metastasis of Hep3B cells ($P<0.01$); CCK-8 assay and plate cloning assay indicated that down-regulation of IL35 effectively inhibited the proliferation of Hep3B cells ($P<0.01$).

[基金项目] 重庆市留学人员创新支持计划(CX2017105,CX2018146)
[通信作者] 吴忠均,E-mail:wzjtcy@126.com

2097-0927/Copyright © 2023, 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(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Western blotting results suggested that down-regulation of IL35 promoted the expression of LC3BII and Beclin1, inhibited the expression of p62 ($P<0.01$), enhanced the expression of E-cadherin and suppressed the expression of N-cadherin and vimentin ($P<0.01$). **Conclusion** IL35 is highly expressed in HCC tissues and cells, and its expression is related to vascular invasion of HCC. Down-regulation of IL35 can inhibit the invasion and migration of HCC cells by inducing autophagy.

[**Key words**] interleukin 35; hepatocellular carcinoma; autophagy; invasion; migration; epithelial-mesenchymal transition

Supported by the Innovation Support Program for Overseas Students of Chongqing (CX2017105, CX2018146). Corresponding author: WU Zhongjun, E-mail: wzjtcy@126.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)在因癌致死的癌症中排名第2,每年会造成大约788 000人病死,其主要由乙肝病毒感染,酒精性肝硬化等引起[1]。近年来,肝癌已经成为我国因癌致死的主要癌症之一,严重影响着人民的健康。肝癌患者确诊时往往处于中晚期并大多伴有肝内外的转移,因而其预后非常差。目前最常用的检测主要是通过影像学的手段和检测甲胎蛋白,有效的治疗手段和检测指标仍然十分有限,尤其是早期的诊断和治疗。转移是导致癌症患者死亡的主要原因之一[2-3],因此,阐明肝癌的侵袭和转移机制,寻找一种有效的抑制侵袭和转移的手段具有重要意义。

白介素35(interleukin 35, IL35)是一种新发现IL12家族的细胞因子,其由EB病毒诱导基因3(epstein barr virus-induced gene3, Ebi3)和白细胞介素12α(interleukin 12 alpha, IL12α)组成[4]。IL35主要与IL12Rβ2和gp130两个受体联接而发挥作用。研究表明,IL35在肝癌中高表达,且与患者肝癌的复发风险呈正相关[5]。在肝癌细胞HepG2中过表达IL35能够通过抑制基质金属蛋白酶2(MMP2)和MMP9表达来抑制肝癌细胞的侵袭和迁移。此外,IL35在其他多种癌症中均有其发挥抑癌作用的报道,例如IL35在结直肠癌中高表达且与疾病的发展和预后密切相关[7],IL35高表达于胰腺癌患者中且是加重胰腺癌进展的主要因素之一[8],IL35通过调控Treg细胞功能加强急性髓性白血病的免疫逃逸[9]。

自噬是一种维持细胞内环境稳定的程序性死亡,主要是通过将需要降解的细胞器和衰老的蛋白输送到溶酶体进行自我消化降解,从而实现细胞器更新和内环境稳态[10]。自噬囊泡是贯穿整个自噬过程的一种重要现象,通过形成自噬体和自噬溶酶体发挥不同作用而达到重复利用的生物学作用。自噬在肝癌中发挥着双刃剑的作用,已有研究表明前列腺素A能够通过诱导自噬发挥抑制肝癌的作用[11]。抑制自噬会导致肝癌组织中p62的聚集而加速肝脏肿瘤的进展[12]。Beciln1是酵母自噬基因Atg6的同源基因,其与LC3B、p62具有协同反映自噬流强弱的作用。研究表明,Beclin1的降低与肝细胞癌的进展密切相关[13]。因此,在肝细胞癌中诱导自噬将是一种可行的抑制肝细胞癌生长的手段,且目前IL35在肝细胞癌中与自噬关系尚不明确。

本研究以肝癌细胞为对象,探讨IL35对肝癌细胞株自噬的影响,进而探讨其通过调节自噬达到抑制HCC的目的。旨在进一步揭示IL35在HCC中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌和癌旁组织来源于重庆医科大学附属第一医院手术切除患者的标本。人正常肝细胞株HL7702和HCC细胞株Hep3B、Huh7、SMMC7721、Bel7402、SK-Hep-1由本课题组和四川大学华西医院肝胆外科实验室长期保存。DMEM高糖培养基和胎牛血清购自以色列BI公司;胰酶消化液购自上海碧云天公司;CCK-8试剂盒购自美国Bimake公司;细胞冻存液购自中国新赛美公司;细胞裂解液购自碧云天公司;蛋白酶抑制剂cocktail购自美国bimake公司;SDS-PAGE凝胶试剂盒购自上海碧云天公司;Ebi3抗体,IL12α抗体购自中国immunoway公司,GAPDH抗体,E-cadherin、N-cadherin和Vimentin抗体V购自上海Abways公司;山羊抗兔辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中杉金桥公司;基质胶和Transwell小室购自康宁公司;IL35低表达慢病毒购自上海汉恒生物科技公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人正常肝细胞系LO2和4株HCC细胞系(Huh7、Hep3B、SMMC7721及Bel7402)培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,并在37 ℃,含5%CO_2的细胞孵育箱中生长。当细胞密度达到90%左右时对细胞进行传代处理。传代时丢弃

旧培养基,使用 1 mL 预热 PBS 缓冲液清洗 2 次,吸除 PBS 缓冲液后加入 1 mL 预热 0.25%胰酶细胞消化液,并放入细胞孵育箱中消化 1~2 min,消化完成后轻拍瓶壁使细胞脱落,加入 1 mL 完全培养基终止消化,将细胞混悬液移至 15 mL 离心管中,使用离心机以 1 000 r/min 离心 5 min,离心结束后弃去上清,加入 3 mL 完全培养基,轻轻吹打混匀,根据实验需要按照 1∶2或 1∶3传代。

1.2.2 细胞慢病毒转染 构建低表达人 IL35 的重组慢病毒载体和空载体。Hep3B 细胞在 5 mg/mL 聚丙烯存在的情况下被慢病毒转染,转染复数(MOI)为 10~100。24 h 后,将含有病毒的培养基替换为新鲜的含有 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基。转染 72 h 后,通过使用 2 μg/mL 嘌呤霉素选择细胞以建立具有稳定低表达 IL 35 的细胞系。

1.2.3 Western blot 检测 收集肝组织和各细胞株,然后进行蛋白质提取。通过 SDS-PAGE 分离后,蛋白质被转移到 PVDF 膜上。将膜在 QuickBlock™ 封闭缓冲液(碧云天,中国)在室温封闭 20 min。将前述一抗与膜在 4 ℃下反应过夜,然后将膜与山羊抗兔二抗在室温下孵育 1 h。将膜用 TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。用增强的化学发光(ECL)试剂盒(Merck Millipore,德国)在 Vilber Fusion FX7 Spectra 仪器上(Fusion,FX7,法国)检测蛋白条带。ImageJ 软件定量蛋白质表达。

1.2.4 透射电镜观察自噬体形成 将 Hep3B 肝癌细胞接种在 6 孔板中,取对数期的细胞,0.25%胰酶消化肝细胞,并在 4 ℃下用 4%戊二醛固定 2 h。然后,将细胞在 4 ℃下固定在 1%四氧化锇中 2 h,用过滤的乙酸铀酰染色,并在分级的乙醇和丙酮系列中脱水。然后,我们在乙氧基树脂中渗透,包埋和聚合样品。制备半薄(0.5 μm)和超薄(60 nm)切片,并用乙酸铀酰和柠檬酸铅染色。用 2.5%戊二醛和 1%四氧化溶液固定,后用 1%四氧化锇固定,在越来越多的醇中脱水并包埋在乙氧基树脂中。用 Hitachi H-7500 型透射电子显微镜(日立,日本东京)对切片进行可视化。使用 Gatan-780 系统获取图像。

1.2.5 CCK-8 检测细胞增殖 根据制造商的规程,使用 CCK-8 细胞增殖测定法测量细胞活力。将细胞以 2×10^4/孔的密度播种到含有 100 μL 完整 DMEM 高糖培养基的 96 孔板中 24 h。检测转染慢病毒的 Hep3B 细胞。除去上清液,并将细胞在含有 20 μL CCK-8 溶液的 DMEM 高糖培养基中于 37 ℃和 5%CO_2 孵育 2 h。酶标仪在 450 nm 波长下测量光密度值D(450)。细胞存活率=[实验组 D(450)值-空白组D(450)值]/[对照组 D(450)值-空白组 D(450)值]×100%。

1.2.6 平板克隆实验 取对数期各组细胞,0.25%胰酶消化制成单细胞悬液,以 500/孔的密度重新接种到 6 板上,随后充分摇动并培养 2 周,以使单个细胞长成肉眼可见的细胞团。PBS 洗涤细胞 2 次,4%多聚甲醛室温固定 15 min;弃去多聚甲醛,PBS 洗涤 2 次。然后用 3.7%的甲醇和 0.1%的结晶紫染色室温染色 30 min。

1.2.7 Transwell 实验 为了评估细胞迁移或侵袭能力,分别使用填充了和没有填充基质胶的(BD biosciences,Franklin Lakes,NJ)的 transwell 小室。取各组对数期细胞,0.25%胰酶消化制备单细胞悬液,将细胞在上室中与无血清培养基一起孵育。同时,将含有 10%FBS 的 DMEM 放入下室。将细胞在 37 ℃下孵育 24 h,并通过棉签小心地清除未侵袭的细胞。同时,用 95%甲醇固定位于膜下侧的侵入细胞,并在室温下用结晶紫染色 30 min。使用卡尔·蔡司显微镜系统随机拍摄 5 张图像。对 5 个随机视野进行计数统计。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism8.0 版进行统计分析。采用 $\bar{x}\pm s$ 表示统计结果。t 检验用于分析 2 组之间的正态分布数据。单因素方差分析(ANOVA)比较 3 组或更多组之间的差异。癌旁和肝癌组织之间的差异使用 χ^2检验。$P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

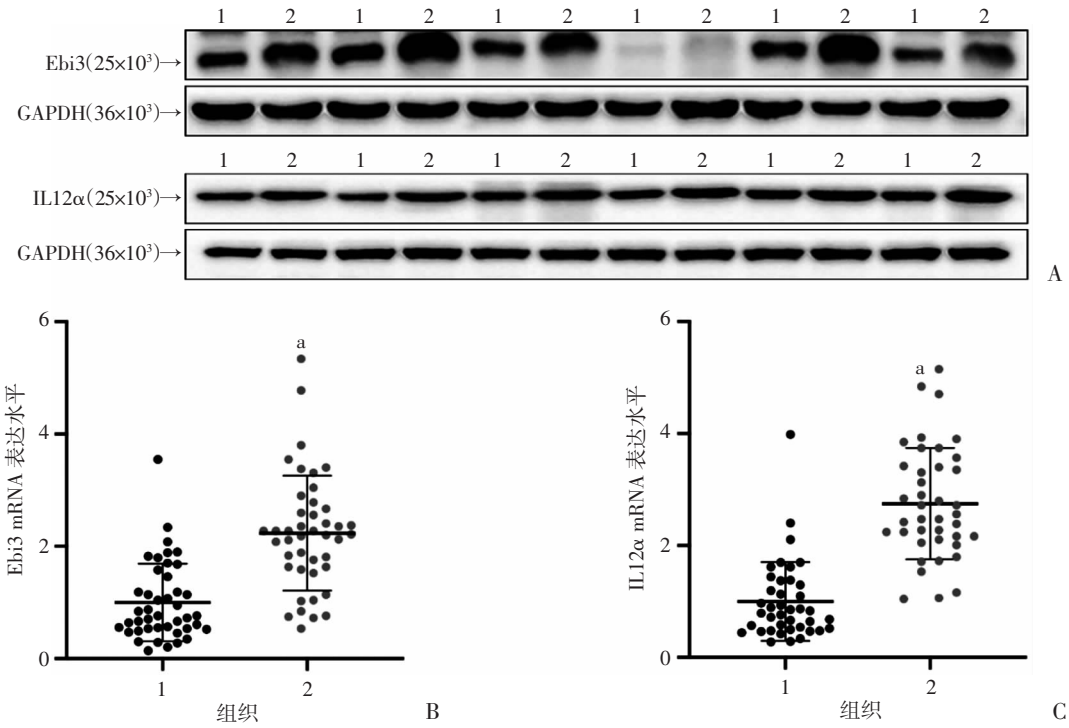
2 结果

2.1 IL35 在肝癌组织中表达高于癌旁组织

采用 RT-qPCR 和 Western blot 技术检测 40 对癌旁和肝癌组织中 IL35 在转录和蛋白水平的表达。结果表明,IL35 在肝癌组织中的表达明显高于癌旁组织,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 1)。

2.2 IL35 的表达与 40 位患者临床数据之间的相互关系

根据 RT-qPCR 和 Western blot 结果,将 40 例 HCC 患者分为高表达($n=28$)和低表达($n=12$)两组,以研究 IL35 表达与 HCC 患者临床特征之间的相关性。在患者的年龄,性别,肿瘤直径,肝硬化,组织分化,血清甲胎蛋白水平,HBV,BCLC 分级和肿瘤转移等这些特征中,我们发现血管侵犯与 IL35 的高表达有关($P<0.05$,表 1)。



1:癌旁组织;2:HCC 组织; a: $P<0.01$, 与癌旁组织比较

A: Western blot 检测 IL35 表达;B: qRT-PCR 检测 Ebi3 mRNA 表达;C:qRT-PCR 检测 IL12α mRNA 表达

图 1 IL35 在肝脏癌旁和 HCC 组织中的表达情况

表 1 IL35 的表达水平与肝癌患者临床病理特征之间的关系($n=40$)

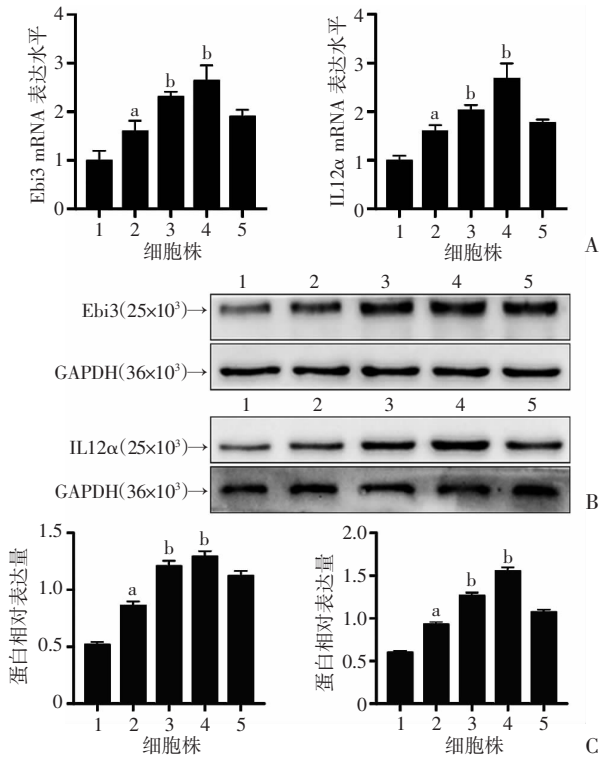
临床特征	病例数		
	高表达($n=28$)	高表达($n=21$)	P
年龄/岁			>0.999 9
<60	20	8	
≥60	8	4	
性别			0.676 7
男	23	9	
女	5	3	
肿瘤大小/cm			0.489 8
≤5	18	6	
>5	10	6	
肝硬化			0.395 5
有	21	11	
无	7	1	
甲胎蛋白(AFP)/ng·mL^{-1}			0.715 9
>400	10	3	
≥400	18	9	
HBsAg			>0.999 9
阳性	21	11	
阴性	3	1	
血管侵犯			
有	25	5	
无	3	7	

2.3 IL35 在肝癌细胞株中的表达水平

采用 RT-qPCR 和 Western blot 技术检测 IL35 在正常肝细胞和肝癌细胞株的表达水平。结果显示,与 HL7702 细胞相比,IL35 在 Hep3B、Huh7、SMMC7721、Bel7402 中的蛋白表达均上调,而且在 Hep3B 细胞中的表达最高,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 2)。基于以上研究结果,选择 Hep3B 细胞作为后续的研究对象进行研究。

2.4 慢病毒转染稳定低表达 IL35 的稳定细胞株

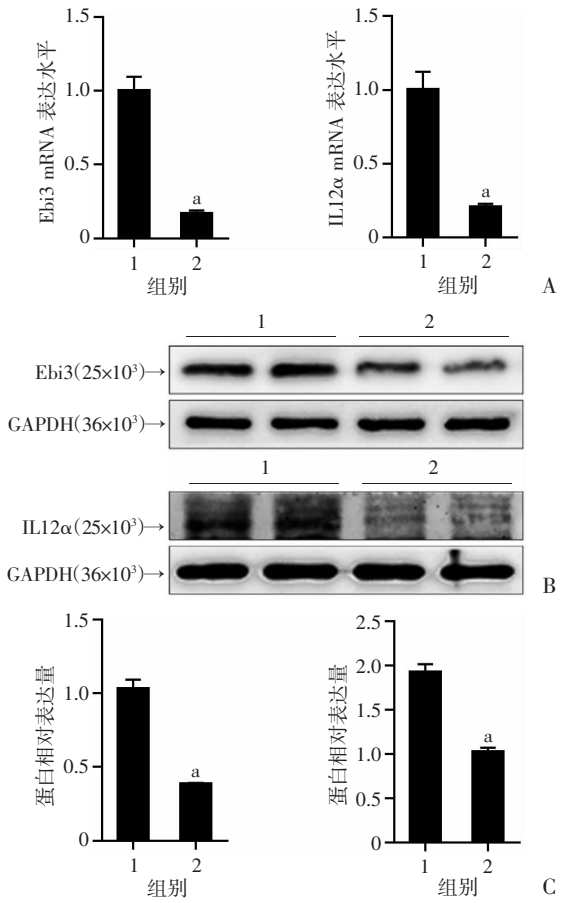
采用下调 IL35 的慢病毒转染 Hep3B 细胞,用以构建稳定低表达 IL35 的细胞株。采用 RT-qPCR 和 Western blot 技术分别从转录和蛋白水平检测慢病毒的转染效率。结果表明,与 sh-NC 组相比,sh-IL35 组中 IL35 的表达水平明显降低,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 3)。表明低表达 IL35 的稳定细胞株构建成功,可以用于后续实验研究。



1:HL7702 细胞株;2:SMMC7721 细胞株;3:Huh7 细胞株;4:Hep3B 细胞株;5:Bel7402 细胞株; a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 HL7702 细胞比较

A: qRT-PCR 检测 IL35 在人正常肝细胞和 HCC 细胞株中的 mRNA 表达;B:Western blot 检测 IL35 在人正常肝细胞和 HCC 细胞株中的蛋白表达;C:半定量分析 IL35 的蛋白表达水平

图 2 IL35 在肝细胞及 HCC 细胞中的表达



1:NC-shRNA;2:IL35-shRNA;a: $P<0.01$, 与 NC-shRNA 组比较

A:qRT-PCR 检测;B:Western blot 检测;C:半定量分析

图 3 慢病毒下调 IL35 效率验证

2.5 下调 IL35 诱导 Hep3B 细胞自噬

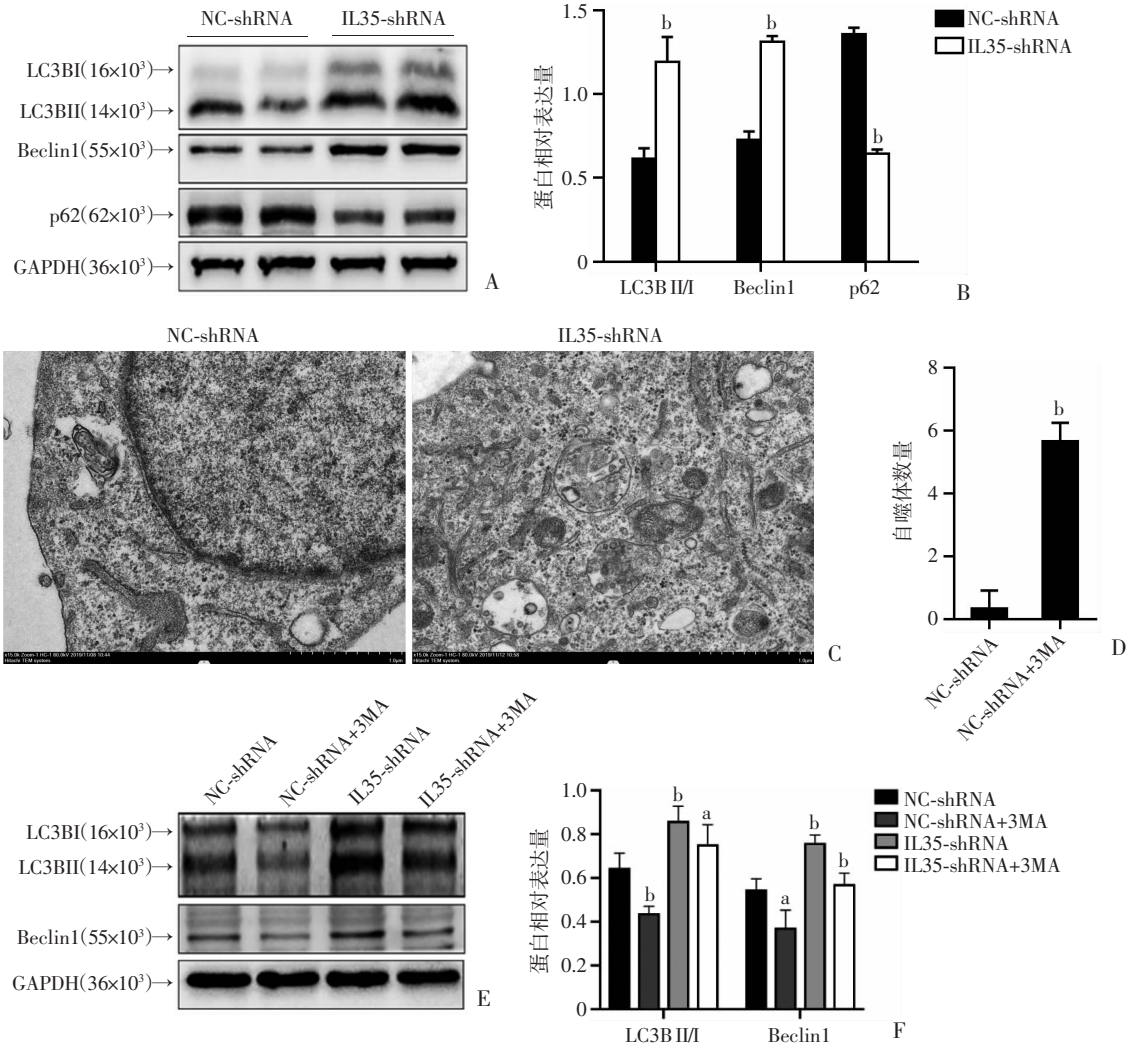
以经慢病毒转染后的 He*p*3B 细胞为研究对象,Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3B、Beclin1 和 p62 的蛋白水平。结果表明,与 NC-shRNA 组相比,IL35-shRNA 组的 LC3BII/I 的比值增加,Beclin1 蛋白水平也同时增加,p62 蛋白水平降低($P<0.01$, 图 4A、B)。透射电子显微镜结果显示,与 NC-shRNA 组相比,IL35-shRNA 组的自噬小体形成数量明显高于 NC-shRNA,差异具有统计学意义($P<0.01$, 图 4C、D)。为了验证下调 IL35 确实能够诱导自噬,应用自噬抑制剂 3-MA (2 μmol/L)[14]处理细胞,发现 IL35-shRNA 联合 3-MA 组中 LC3BII 和 Beclin1 的蛋白水平高于 NC-shRNA 联合 3-MA 组,差异具有统计学意义($P<0.01$, 图 4E、F)。以上结果表明,下调 IL35 能够有效诱导 Hep3B 肝癌细胞发生自噬。

2.6 下调 IL35 能有效抑制 Hep3B 细胞增殖

为探索下调 IL35 对 Hep3B 肝癌细胞增殖的影响,采用 CCK-8 和集落形成实验分别进行探讨。结果表明,在 Hep3B 细胞中,IL35-shRNA 组的细胞克隆形成明显减少,细胞生长受抑($P<0.01$,图 5A、B)。此外,与 NC-shRNA 组相比,IL35-shRNA 组中的细胞增殖受到明显抑制,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 5C)。以上结果表明,下调 IL35 能够有效抑制 Hep3B 细胞增殖。

2.7 下调 IL35 能有效抑制 Hep3B 的侵袭和转移

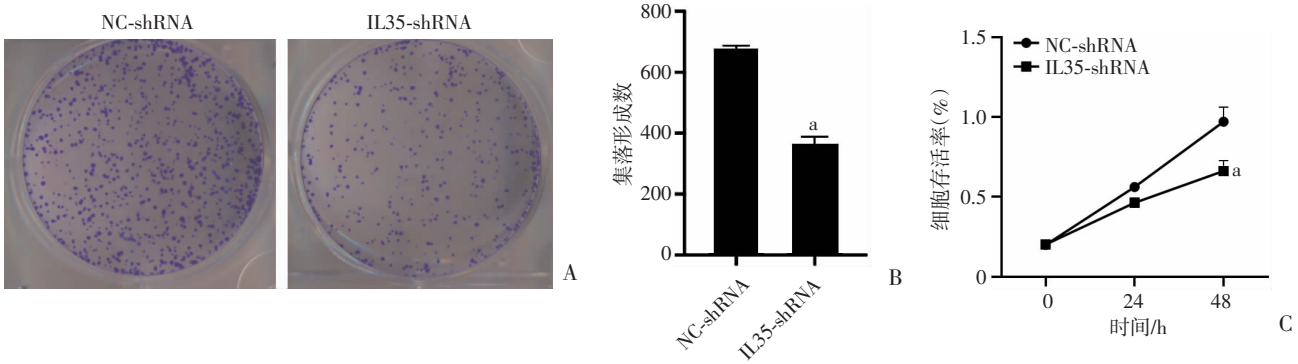
本研究中临床资料表明,IL35 在肝癌组织中的高表达,与肿瘤的转移有着一定的统计学关联。因此,我们进一步对转染了下调 IL35 慢病毒的 HCC 细胞 Hep3B 的转移和侵袭特性进行了初步探讨。Western blot 结果表明,与 NC-shRNA 组相比,IL35-shRNA 组中 E-cadherin 的表达上调,N-cadherin、Vimentin 的表达下调,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 6A、B)。此外,Transwell 实验结果显示,与 NC-shRNA 组相比,IL35-shRNA 组能有效减少 HCC 细胞 Hep3B 的迁移和侵袭的细胞数量,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 6C、D)。



a:$P<0.05$,b: $P<0.01$, 与 NC-shRNA 组比较

A:Western blot 检测下调 IL35 对肝癌细胞 Hep3B 自噬相关蛋白表达的影响;B:半定量分析自噬相关蛋白的表达;C:透射电镜观察下调 IL35 后肝细胞 Hep3B 自噬小体的形成;D:自噬小体数量的定量分析;E: Western blot 检测自噬相关蛋白的表达;F:半定量分析自噬相关蛋白的表达

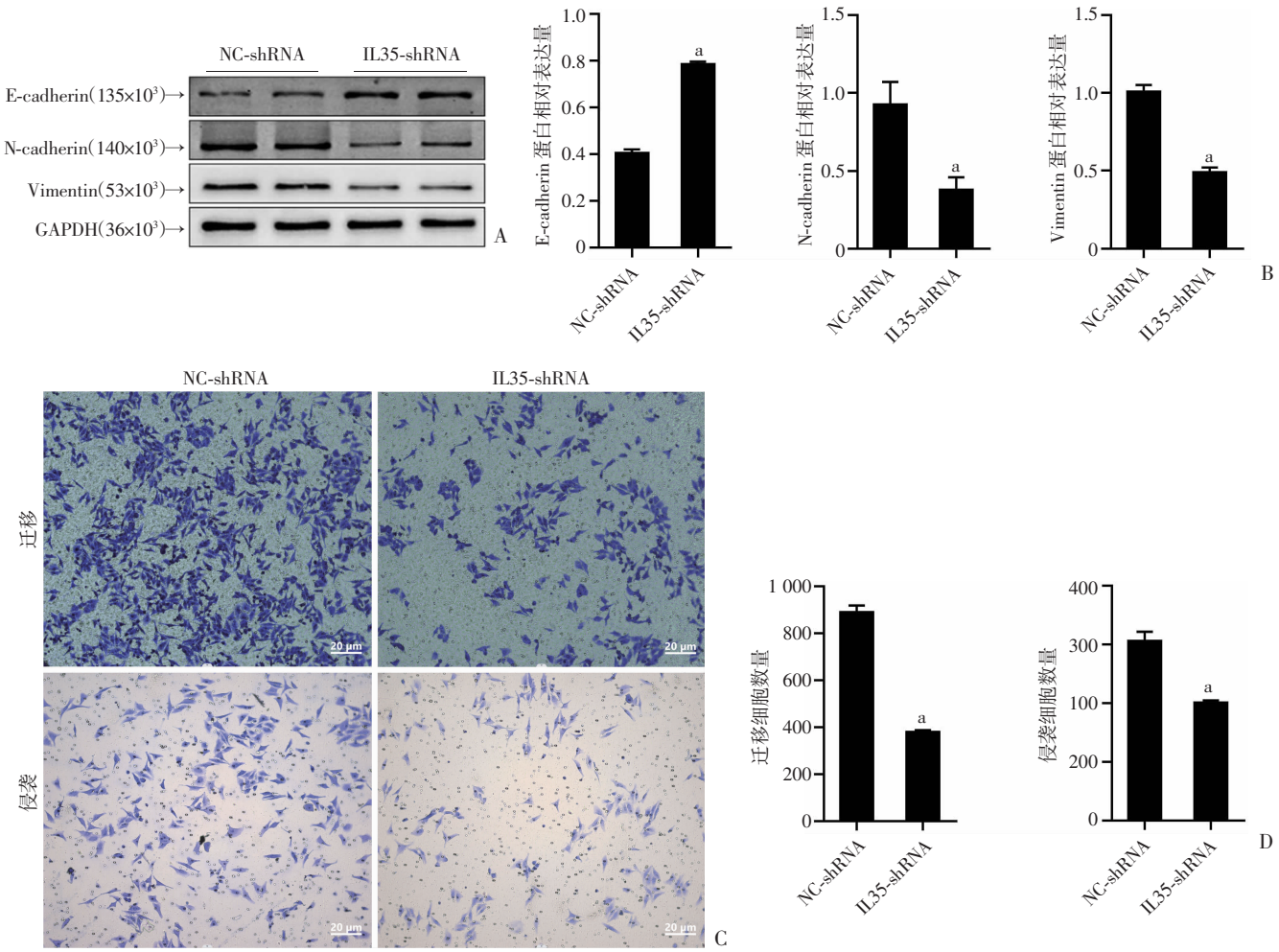
图 4　下调 IL35 诱导 Hep3B 细胞发生自噬



a: $P<0.01$, 与 NC-shRNA 组相比较

A:克隆形成实验检测下调 IL35 对肝癌细胞 Hep3B 克隆形成的影响;B:定量分析克隆形成;C:CCK-8 法检测下调 IL35 对肝细胞 Hep3B 细胞增殖的影响

图 5　下调 IL35 对肝癌细胞 Hep3B 增殖的影响



a: $P<0.01$, 与 NC-shRNA 组比较

A:Western blot 检测下调 IL35 对肝癌细胞 Hep3B 上皮间质转化的相关蛋白表达的影响;B:半定量分析上皮间之转化相关蛋白的表达;C:Transwell 实验检测下调 IL35 对肝癌细胞 Hep3B 迁移和侵袭的影响;D:定量分析迁移和侵袭细胞的数量

图 6 下调 IL35 对 Hep3B 细胞上皮间质转化行为的影响

3 讨论

肝癌作为严重威胁人类健康的一大恶性疾病,具有早期诊断困难,治疗效果差和预后不佳等特点。细胞因子已经被证实具有调节肿瘤微环境,在肿瘤的发生和发展中起着“双刃剑”的作用,IL35 作为 IL12 家族中的一员,最新研究表明其能够有效调控肿瘤微环境、炎症反应和免疫反应的细胞因子,其潜在的应用价值有待进一步的挖掘发现[15-16]。IL35 在多种肿瘤患者或肿瘤细胞中的表达均被证实是上调的,与相应的肿瘤生物学特性密切相关,比如在喉鳞状细胞癌[17]、甲状腺癌[18]和 HCC 等[19]。虽然 IL35 与肝癌的研究已获得一定的成果,但 IL35 在 HCC 中与自噬的关系目前尚未明确,因此本研究从自噬着手,通过探讨 IL35 在肝癌组织和细胞中的表达,通过下调 IL35 来观察其对自噬的影响,并以此为基础探讨下调 IL35 对 Hep3B 肝癌细胞增殖,迁移和侵袭的影响。本研究证实了 IL35 在肝癌组织和肝癌细胞中的表达水平均上调,而 Hep3B 细胞 IL35 表达最高,这与之前的研究结果一致[6]。基于此,我们成功构建了能稳定低表达 IL35 的 HCC 细胞株 Hep3B 用于后续研究。低表达 IL35 能够有效抑制 HCC 细胞 Hep3B 的增殖,初步表明下调 IL35 能发挥抑制 HCC 细胞 Hep3B 增殖的作用。这一结果也表明 IL35 可能作为一个新的肝癌治疗靶点,值得进行进一步的深入研究。

自噬作为一种细胞保护机制,起到维持细胞内环境稳态的作用,但自噬在肝癌细胞中的调节作用却十分复杂,一方面自噬可以通过抑制炎症刺激相关的肝

癌细胞的进展,但另一方面自噬可以抑制缺氧条件下活性氧的产生,减少肝癌细胞的凋亡。LC3BⅡ是自噬的经典标志物,常被用来反应自噬的活性程度,其主要被 Atg7 激活而裂解为 LC3BⅠ,而后通过与磷脂酰乙醇胺的反应形成共轭连接[20]。研究表明,自噬在 HCC 既能被诱导,也能被抑制,例如一氧化氮能通过抑制自噬诱导凋亡发挥调控 HCC 的作用[21],槲皮素能通过部分激活自噬诱导凋亡发挥抑制小鼠 HCC 的作用[22],此外,本课题组的前期研究结果发现,IL37 能通过诱导 HCC 细胞自噬和凋亡而发挥抑制 HCC 的作用[23]。本研究用稳定低表达 IL35 的肝癌细胞 Hep3B 进行研究,采用 Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3B、Beclin1 和 p62 的表达情况,结果表明,下调 IL35 后,LC3BⅡ/Ⅰ比值增加,Beclin1 蛋白表达上调,但 p62 蛋白表达却降低。为了进一步证实下调 IL35 能够诱导 Hep3B 细胞发生自噬,我们还通过应用自噬抑制剂 3-MA 来佐证。结果表明,IL35-shRNA 联合 3-MA 组中 LC3BⅡ、Beclin1 的表达高于 NC-shRNA 联合 3-MA 组中 LC3BⅡ、Beclin1 的蛋白表达。透射电子显微镜的结果也表明,下调 IL35 后,Hep3B 细胞中自噬体数量明显高于空载组。然而 IL35 在肝癌中与自噬的确切机制目前尚未得知,需要进一步的研究加以探讨。

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT),被认为是癌细胞早期转移的重要特征,其主要通过赋予癌细胞更具有侵袭性的特征而被广泛研究[24],在体外研究中通常通过观察 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 等指标加以反应。细胞因子发挥调控肿瘤的作用多种多样,调控上皮间质转化也是被研究的热门课题之一[25],且肿瘤的侵袭和迁移特性是影响患者生存和预后的一大因素。在本研究中,我们通过研究 40 对肝癌患者的 IL35 表达和临床资料的相关性发现,HCC 的转移和 IL35 存在密切的关系。但目前关于 IL35 和 HCC 的侵袭和迁移的研究尚不清楚。在本研究中,Western blot 结果表明,下调 IL35 能够有效升高 E-cadherin 蛋白表达,降低 N-cadherin 和 Vimentin 的蛋白表达。Transwell 实验也进一步在体外证实下调 IL35 能够有效抑制 Hep3B 细胞发生侵袭和迁移,进而抑制 HCC。

综上所述,在 HCC 细胞 Hep3B 中,下调 IL35 能够有效抑制 Hep3B 细胞的增殖,并通过抑制其迁移和侵袭发挥调控 HCC 的作用,而这一过程可能与低表达 IL35 激活的细胞自噬有关,但其确切的分子机制仍不明确,需要进一步的研究加以证实。

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015[J]. CA A Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29. DOI: 10.3322/caac.21254.

[2] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA A Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.

[3] GRANDHI M S, KIM A K, RONNEKLEIV-KELLY S M, *et al*. Hepatocellular carcinoma: from diagnosis to treatment [J]. Surg Oncol, 2016, 25(2): 74-85. DOI: 10.1016/j.suronc.2016.03.002.

[4] SAWANT D V, HAMILTON K, VIGNALI D A A. Interleukin-35: expanding its job profile[J]. J Interferon Cytokine Res, 2015, 35(7): 499-512. DOI: 10.1089/jir.2015.0015.

[5] FU Y P, YI Y, CAI X Y, *et al*. Overexpression of interleukin-35 associates with hepatocellular carcinoma aggressiveness and recurrence after curative resection[J]. Br J Cancer, 2016, 114(7): 767-776. DOI: 10.1038/bjc.2016.47.

[6] LONG J, GUO H Y, CUI S C, *et al*. IL-35 expression in hepatocellular carcinoma cells is associated with tumor progression[J]. Oncotarget, 2016, 7(29): 45678-45686. DOI: 10.18632/oncotarget.10141.

[7] LIANG Y F, CHEN Q Q, DU W J, *et al*. Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3) blocking leads to induce antitumor cytotoxic T lymphocyte response and suppress tumor growth in colorectal cancer by bidirectional reciprocal-regulation STAT3 signaling pathway[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 3214105. DOI: 10.1155/2016/3214105.

[8] HUANG C B, LI N, LI Z X, *et al*. Tumour-derived interleukin 35 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell extravasation and metastasis by inducing ICAM1 expression [J]. Nat Commun, 2017, 8: 14035. DOI: 10.1038/ncomms14035.

[9] TAO Q S, PAN Y, WANG Y P, *et al*. Regulatory T cells-derived IL-35 promotes the growth of adult acute myeloid leukemia blasts[J]. Int J Cancer, 2015, 137(10): 2384-2393. DOI: 10.1002/ijc.29563.

[10] LEVINE B, KROEMER G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective[J]. Cell, 2019, 176(1/2): 11-42. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.048.

[11] LUO M J, LIU Y F, LIU N N, *et al*. Proscillaridin A inhibits hepatocellular carcinoma progression through inducing mitochondrial damage and autophagy[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2021, 53(1): 19-28. DOI: 10.1093/abbs/gmaa139.

[12] TAKAMURA A, KOMATSU M, HARA T, *et al*. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors[J]. Genes Dev, 2011, 25(8): 795-800. DOI: 10.1101/gad.2016211.

[13] OSMAN N A A, ABD EL-REHIM D M, KAMAL I M. Defective Beclin-1 and elevated hypoxia-inducible factor (HIF)-1α expression are closely linked to tumorigenesis, differentiation, and progression of hepatocellular carcinoma [J]. Tumor Biol, 2015, 36(6): 4293-4299. DOI: 10.1007/s13277-015-3068-0.

[14] LI L, LIU J D, GAO G D, *et al*. Puerarin 6″-O-xyloside suppressed HCC via regulating proliferation, stemness, and apoptosis with inhibited PI3K/AKT/mTOR [J]. Cancer Med, 2020, 9(17): 6399-6410. DOI: 10.1002/cam4.3285.

[15] WANG R X, YU C R, DAMBUZA I M, *et al*. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease[J]. Nat Med, 2014, 20(6): 633-641. DOI: 10.1038/nm.3554.

[16] HAO S N, CHEN X, WANG F, *et al*. Breast cancer cell-derived IL-35 promotes tumor progression via induction of IL-35-producing induced regulatory T cells [J]. Carcinogenesis, 2018, 39(12): 1488-1496. DOI: 10.1093/carcin/bgy136.

[17] WU W, JIANG H, LI Y, *et al*. IL-35 expression is increased in laryngeal squamous cell carcinoma and in the peripheral blood of patients[J]. Oncol Lett, 2017, 13(5): 3303-3308. DOI: 10.3892/ol.2017.5858.

[18] 康海岩,杨庭显,张磊. 甲状腺癌患者 Gal-3、IL-17、IL-35、anti-TgAb 的变化及期意义[J]. 西北国防医学杂志, 2017, 38(8): 505-508.
KANG H Y, YANG T X, ZHANG L. Significance of serum Gal-3, IL-17, IL-35 and anti-TgAb in patients with thyroid carcinoma [J]. Med J Natl Defend Forces Northwest China, 2017, 38(8): 505-508.

[19] 刘若时,李慧,吴继周,等. IL-35、IL-22 与广西肝癌家族聚集性的相关性研究[J]. 广西医科大学学报, 2018, 35(2): 170-173.
LIU R S, LI H, WU J Z, *et al*. The relationship between IL-35, IL-22 and familial aggregation of hepatocellular carcinoma in Guangxi [J]. J Guangxi Med Univ, 2018, 35(2): 170-173.

[20] ROSSITER H, KÖNIG U, BARRESI C, *et al*. Epidermal keratinocytes form a functional skin barrier in the absence of Atg7 dependent autophagy[J]. J Dermatol Sci, 2013, 71(1): 67-75. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.015.

[21] ZHANG X G, JIN L, TIAN Z, *et al*. Nitric oxide inhibits autophagy and promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Sci, 2019, 110(3): 1054-1063. DOI: 10.1111/cas.13945.

[22] JI Y, LI L, MA Y X, *et al*. Quercetin inhibits growth of hepatocellular carcinoma by apoptosis induction in part via autophagy stimulation in mice[J]. J Nutr Biochem, 2019, 69: 108-119. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2019.03.018.

[23] LI T T, ZHU D, MOU T, *et al*. IL-37 induces autophagy in hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Mol Immunol, 2017, 87: 132-140. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.04.010.

[24] NIETO M A, HUANG R Y J, JACKSON R A, *et al*. Emt: 2016[J]. Cell, 2016, 166(1): 21-45. DOI: 10.1016/j.cell.2016.06.028.

[25] DONG Y Y, WU Z F, HE M Y, *et al*. ADAM9 mediates the interleukin-6-induced Epithelial-Mesenchymal transition and metastasis through ROS production in hepatoma cells [J]. Cancer Lett, 2018, 421: 1-14. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.02.010.

(**收稿**:2021-02-06;**修回**:2023-01-17)

(编辑 邓强庭)