

基础研究

论 著

DNAJ 热休克蛋白家族成员 C8 对肝癌细胞增殖、凋亡和迁移侵袭能力的影响及其机制

霍艺萱^{1,2}, 范玉纯³, 韦万硕², 蒋利和^{1,2,3,4*}¹广东省中医药研究开发重点实验室, 广东广州 510095; ²右江民族医学院基础医学院, 广西百色 533000; ³广西大学医学院, 广西南宁 530004; ⁴广西医学遗传与基因组学研究重点实验室, 广西南宁 530007

[中图分类号] R735.7 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0091.2025.0716

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 霍艺萱, 范玉纯, 韦万硕, 等. DNAJ 热休克蛋白家族成员 C8 对肝癌细胞增殖、凋亡和迁移侵袭能力的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(6): 920-930.

[收稿日期] 2025-01-14

[录用日期] 2025-04-14

[上线日期] 2025-07-16

[摘要] **目的** 探究 DNAJ 热休克蛋白家族成员 C8(DNAJC8)对肝癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡能力的影响及其机制, 并探讨其作为肝癌潜在药物靶点的可能性。**方法** 从癌症基因组图谱(TCGA)数据库下载肝癌(LIHC)转录组数据, 分析 DNAJC8 在肝癌中的表达情况及其对肝癌患者预后的影响; 获取与 DNAJC8 表达相关的基因集并采用基因本体论(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)、基因集富集分析(GSEA)进行富集分析。将 MHCC97H、Huh7 细胞分为对照组(转染 siNC 序列)与敲低 DNAJC8 组(转染 siDNAJC8 序列), 采用 CCK-8 法、平板克隆实验、细胞划痕实验、Transwell 迁移和侵袭实验评估敲低 DNAJC8 对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 采用 Hoechst 33342 实验、线粒体膜电位(JC-1)实验和流式细胞术评估敲低 DNAJC8 对肝癌细胞凋亡的影响, 采用 Western blotting 实验验证与 DNAJC8 相关蛋白的表达, 采用药物敏感性分析和分子对接实验探究 DNAJC8 作为潜在分子靶点。用不同浓度的索拉非尼处理对照组(对照+索拉非尼组)和敲低 DNAJC8 组(敲低 DNAJC8+索拉非尼组)的肝癌细胞, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖能力, 以探讨 DNAJC8 对索拉非尼治疗的影响。**结果** 肝癌组织中 DNAJC8 mRNA 表达水平明显高于正常组织和癌旁正常组织($P<0.001$)。Kaplan-Meier 生存分析结果显示, 与 DNAJC8 低表达患者相比, DNAJC8 高表达患者的总生存期和无进展生存期明显缩短($P<0.01$ 、 $P<0.05$)。GO 功能富集分析结果显示, DNAJC8 主要参与细胞周期等生物过程, 主要富集于染色体等细胞组分, 揭示了 RNA 结合等分子功能; KEGG 通路富集分析主要包括剪接体等途径; GSEA 富集分析结果显示, 与 E2F 转录因子(E2F)通路、MYC 靶点(MYC)通路等相关。与对照组相比, 敲低 DNAJC8 组肝癌细胞增殖、迁移、侵袭能力明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 凋亡明显增强($P<0.05$ 或 $P<0.001$), 肝癌细胞中蛋白激酶 B(Akt)和 β -catenin 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。药物敏感性分析结果显示, DNAJC8 高表达患者对索拉非尼的敏感性低于 DNAJC8 低表达者($P<0.0001$)。分子对接实验结果显示 DNAJC8 蛋白与索拉非尼的自由结合能为 -6.35 kcal/mol。CCK-8 法检测结果显示, 与对照+索拉非尼组相比, 敲低 DNAJC8+索拉非尼组肝癌细胞活力明显降低($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。**结论** DNAJC8 与肝癌患者的预后有关, 是索拉非尼的潜在分子靶点。敲低 DNAJC8 基因可抑制肝癌细胞的增殖、迁移、侵袭, 并促进其凋亡, 其作用可能与 Akt/ β -catenin 信号通路有关。

[关键词] 肝癌; DNAJ 热休克蛋白家族成员 C8; 潜在靶点; 索拉非尼

Effects of DNAJC8 on proliferation, apoptosis, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma cells and its mechanism

Huo Yi-Xuan^{1,2}, Fan Yu-Chun³, Wei Wan-Shuo², Jiang Li-He^{1,2,3,4*}¹Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong

[基金项目] 广西自然科学基金(2025GXNSFHA069094); 广东省中医药研究开发重点实验室资助(KFKT02-004); 2025年百色市科技项目(科技筑基)(2025ZJ0707); 右江民族医学院高层次人才引进人才项目(yy2021sk002); 广西医学遗传与基因组学研究重点实验室开放课题(GXKMG202201); 右江民族医学院研究生创新计划项目(YXCXJH2023016); 广西壮族自治区区级大学生创新创业训练计划项目(S202310599056)

[作者简介] 霍艺萱, 硕士研究生, 主要从事肿瘤生物学相关研究**[通信作者]** 蒋利和, E-mail: jianglihe@ymun.edu.cn

510095, China

²School of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China

³Medical School of Guangxi University Medical College, Nanning, Guangxi 530004, China

⁴Guangxi Key Laboratory of Medical Genetics and Genomics Research, Nanning, Guangxi 530007, China

*Corresponding author, E-mail: jianglihe@ymun.edu.cn

This work was supported by the Guangxi Natural Science Foundation (2025GXNSFHA069094), the Baise City Science and Technology Plan Project (Science and Technology Infrastructure Support Program) (2025ZJ0707), the Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine (KFKT02-004), the High-Level Talent Introduction Project of Youjiang Medical University Nationalities (yy2021sk002), the Open Project of Guangxi Key Laboratory of Medical Genetics and Genomics Research (GXKMGG202201), the Innovation Project of Youjiang Medical University For Nationalities Graduate Education (YXCXJH2023016), and the Guangxi Zhuang Autonomous Region Regional Student Innovation and Entrepreneurship Training Programme Project (S202310599056)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of DNAJ heat shock protein family member C8 (DNAJC8) on the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of hepatocellular carcinoma (HCC) cells and its mechanism, and to explore the possibility of DNAJC8 as a potential drug target for HCC. **Methods** The transcriptome data of liver hepatocellular carcinoma (LIHC) were downloaded from The Cancer Genomic Atlas (TCGA) database to analyze the expression of DNAJC8 in HCC and its impact on the prognosis of HCC patients. Gene sets related to DNAJC8 expression were obtained and subjected to enrichment analysis using Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). MHCC97H and Huh7 cells were divided into control group (transfected with siNC sequence) and DNAJC8 knockdown group (transfected with siDNAJC8 sequence). CCK-8 assay, colony formation assay, cell scratch assay, and Transwell migration and invasion assays were used to evaluate the effects of DNAJC8 knockdown on the proliferation, migration, and invasion of HCC cells. Hoechst 33342 assay, JC-1 assay and flow cytometry were used to assess the effect of DNAJC8 knockdown on the apoptosis of HCC cells. Western blotting was employed to verify the expression of protein related to DNAJC8. Drug sensitivity analysis and molecular docking experiments were utilized to explore the potential molecular targets of DNAJC8. HCC cells in control group (control+ sorafenib group) and DNAJC8 knockdown group (knockdown+ sorafenib group) were treated with different concentrations of sorafenib, and CCK-8 assay were used to detect cell proliferation ability to investigate the effect of DNAJC8 on sorafenib treatment. **Results** The mRNA expression level of DNAJC8 in HCC tissues was significantly higher than that in normal tissues and adjacent non-tumor tissues ($P < 0.001$). Kaplan-Meier survival analysis revealed that patients with high DNAJC8 expression had significantly shorter overall survival and progression-free survival than those with low DNAJC8 expression ($P < 0.01$, $P < 0.05$). GO functional enrichment analysis indicated that DNAJC8 was primarily involved in biological processes such as cell cycle, enriched in cellular components like gene sets, and associated with molecular functions including RNA binding. KEGG pathway enrichment analysis highlighted pathway such as the spliceosome. GSEA results showed that DNAJC8 correlated with E2F transcription factor (E2F) pathway, MYC target genes (MYC) pathway, and other pathways. Compared with control group, DNAJC8 knockdown group exhibited significantly reduced cell proliferation, migration, and invasion ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), along with significantly enhanced apoptosis ($P < 0.05$ or $P < 0.001$). Moreover, the expression levels of protein kinase B (Akt) and β -catenin in HCC cells were significantly decreased in DNAJC8 knockdown group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Drug sensitivity analysis demonstrated that patients with high DNAJC8 expression were less sensitive to sorafenib than those with low DNAJC8 expression ($P < 0.0001$). Molecular docking experiments indicated a free binding energy of -6.35 kcal/mol between DNAJC8 protein and sorafenib. CCK-8 assay results showed that the viability of HCC cells in the knockdown+ sorafenib group was significantly lower than that in control+ sorafenib group ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). **Conclusions** DNAJC8 is associated with the prognosis of HCC patients and serves as a potential molecular target for sorafenib. Knockdown of the DNAJC8 gene can inhibit the proliferation, migration, and invasion of HCC cells while promoting apoptosis, and this effect may be mediated through the Akt/ β -catenin signaling pathways.

[Key words] hepatocellular carcinoma; DNAJC8; potential target; sorafenib

据中国疾病预防控制中心统计数据显示,肝癌病死率在所有癌症中居第2位^[1]。由于早期检测和临床评估存在局限性,多数肝癌患者在中后期才得以确诊,致使其生存状况不容乐观^[2-3]。肝癌的发生发展由多因素驱动,其核心机制涉及遗传和表观遗传异常导致的癌基因异常激活与抑癌基因功能失活^[4-6],因此,

挖掘预后相关分子标志物,阐明其调控机制,对提高早期诊断率、治疗有效性和改善患者预后具有重要意义。DNAJ热休克蛋白家族可分为DNAJA、DNAJB和DNAJC 3个主要类别,该家族中多个成员被发现可影响机体生理状态、参与细胞代谢,并与多种肿瘤的发生发展相关^[7-9]。其中DNAJ热休克蛋

白家族成员 C8(DNAJ heat shock protein family member C8, DNAJC8)是 DNAJC 热休克蛋白家族的成员之一^[10],其在多种肿瘤中发挥抑癌作用,如在宫颈癌中可通过调节糖代谢发挥抗癌作用^[11],还可与 SRSF 蛋白激酶 1(serine/arginine-rich splicing factor kinase 1)结合,从而影响真核细胞中前 mRNA 的加工^[12]。2020 年 Khan 等^[13]发现 DNAJC8 与食管癌的发生存在一定的关联。2023 年 Zhang 等^[14]提出, DNAJC8 在肝癌样本中的表达较正常组织高,降低 DNAJC8 的表达可显著抑制肝癌细胞的增殖,但其具体作用机制并未详细阐述。本研究基于生物信息学分析 DNAJC8 在肝癌中的表达、预后和药物敏感性,通过实验验证敲低 DNAJC8 对肝癌细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡能力的影响,并探索 DNAJC8 对肝癌的作用机制及其作为索拉非尼潜在靶点的可能性,以期对肝癌的临床诊断和药物开发提供新视野。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 兔抗 DNAJC8 多克隆抗体(英国 Abcam 公司);鼠抗 GAPDH 抗体、兔抗 β -catenin 抗体、兔抗蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠重组二抗、HRP 标记的山羊抗兔重组二抗(武汉三鹰生物技术有限公司);Lipofectamine 3000 和反转录试剂盒(美国赛默飞公司);细胞增殖检测试剂盒(CCK-8;美国 MCE 公司);0.1%草酸铵结晶紫染液、4%多聚甲醛组织固定液、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、胰蛋白酶、1%青链霉素、高效 RIPA 组织/细胞裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、超敏化学发光液(enhanced chemi luminescence, ECL)、索拉非尼(北京索莱宝科技有限公司);Hoechst 33342 和线粒体膜电位(JC-1)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);胎牛血清(foetal bovine serum, FBS;美国 Gemini 公司);DMEM 培养基(美国 Sigma 公司);总 RNA 提取盒(美国 Axygen 公司);SYBR Green(美国罗氏公司);异硫氰酸荧光素标记的膜联素 V/碘化丙啶(annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

1.2 生物信息学分析

1.2.1 DNAJC8 在肝癌中的差异表达分析 癌症基因组图谱(The Cancer Genomic Atlas, TCGA)是全球最大的公开数据库之一,涵盖 30 种以上的癌症^[15],收集样本超过 11 000 例,研究者可在该数据库中查询 DNA 信息、RNA 信息、蛋白质表达以及多种临床信息,可为癌症机制、疾病诊断等相关研究提供必要支持。本研究基于开源数据,严格遵守数据库的

发布指南和访问策略,从 TCGA 数据库下载肝细胞癌(liver hepatocellular carcinoma, LIHC)转录组数据,利用 R 软件与 Perl 软件提取肝癌组织与正常组织中的基因 DNAJC8 mRNA 表达量。基于 R 软件的“limma”包进行 DNAJC8 的差异表达分析及配对样本的差异分析,并通过“ggplot2”包生成箱式图对其表达分布进行可视化。

1.2.2 DNAJC8 表达与肝癌患者预后的相关性分析

从 TCGA 数据库中下载 LIHC 相关临床数据,采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析 DNAJC8 对肝癌患者总生存期和无进展生存期的影响。根据 DNAJC8 表达中位值将肝癌患者分为高表达组与低表达组,通过“survival”包对两组患者的生存时间进行比较。

1.2.3 与 DNAJC8 相关的共表达基因分析

基于 TCGA-LIHC 转录组数据,使用 R 包“limma、ggplot2、ggpubr、ggExtra”在肝癌中筛选与 DNAJC8 共表达的基因,筛选标准为 $r>0.6$, $P<0.001$ 。

1.2.4 DNAJC8 富集分析

Sangerbox 数据库(<http://vip.sangerbox.com/home.html>)由英国剑桥大学 Sanger 研究所基于人类基因组的综合性数据库创立,整理了各种生物信息数据,如人类基因组、蛋白质组、代谢组、表观基因组、转录组等,并提供相关的分析工具和资源^[16]。基因本体论(Gene Ontology, GO)用于对基因和蛋白质的功能特征进行描述,主要由细胞组分(cell components, CC)、生物进程(biological processes, BP)和分子功能(molecular functions, MF)构成。京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)是通过连接并解析不同层次的功能数据来研究特定基因作用机制的一种方法论体系^[17]。下载 DNAJC8 共表达正相关基因数据,并导入 Sangerbox 数据库,通过 Sangerbox 数据库中 GO、KEGG 富集分析模块进行 DNAJC8 共表达正相关基因的功能富集分析。本研究对 KEGG 的丰富度研究仅呈现排名前 10 位的结果。

1.2.5 基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)

Lander 实验室和 Subramanian 实验室建立了 GSEA 软件和 MSigDB 数据库以使用户进行 GSEA 富集分析。研究者可评估预定义基因集在特定表型或条件下是否显著富集,并在 GSEA 软件输入多种格式,包括基因表达矩阵、FASTA 格式的基因序列、GMT 格式的基因集等,即可生成注解详细的 HTML 报告^[18]。为了进一步研究 DNAJC8 在肝癌中的潜在功能和途径,本研究根据 DNAJC8 表达中位值将 TCGA-LIHC 样本分为高表达组与低表达组,并鉴别两组之间的差异基因。将差异基因集导入 GSEA 软件,以“m2.all.v2023.1.Mm.symbols.gmt”为参考基因集进行 GSEA 富集分析,按照错误发现率(false discovery rate,

FDR)<0.25、标准化富集得分(normalized enrichment score, NES)的绝对值>1以及 $P<0.05$ 进行筛选。

1.3 细胞培养 MHCC97H、HepG2、Huh7、LO2细胞由中国科学院上海细胞研究所提供,使用含10% FBS及1%青链霉素混合液的高糖DMEM培养基于5% CO₂、37℃恒温培养箱中培养。采用qRT-PCR和Western blotting检测DNAJC8 mRNA和蛋白在4种细胞中的表达情况确定适合的细胞系。根据DNAJC8在3种肝癌细胞中的表达情况,由于HepG2细胞系起源于肝母细胞瘤,具有低转移潜能特性不适合迁移侵袭相关研究,因此,本研究将HepG2细胞系排除,选用MHCC97H和Huh7细胞进行后续实验。

1.4 细胞转染及分组 在MHCC97H和Huh7细胞生长密度约70%时,随机分为对照组(转染siNC序列)与敲低DNAJC8组(转染siDNAJC8序列),按照Lipofectamine 3000试剂说明书进行转染。siRNA序列由苏州吉玛公司合成,siDNAJC8,正向5'-GGUUUCGGCAGUUAUCCAUTT-3',反向5'-AUGGAUAACUGCCGAAACCTT-3'; siNC,正向5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',反向5'-ACGUGACACGUUCGGA GAATT-3'。转染后48 h采用qRT-PCR验证敲低效率,CCK-8法检测转染24、48、72、96 h后细胞增殖能力;转染24 h后,细胞划痕实验检测细胞迁移能力,Transwell实验检测细胞迁移和侵袭能力;转染48 h后,采用平板克隆实验检测MHCC97H细胞集落形成能力,Hoechst 33342实验观察细胞凋亡情况,JC-1实验测定线粒体膜电位,流式细胞术检测细胞凋亡率;收集转染48 h后的细胞,采用Western blotting检测Akt、 β -catenin蛋白表达水平。

1.4.1 qRT-PCR验证敲低效率 提取细胞总RNA,采用紫外分光光度计检测RNA浓度和质量。取1 μ g总RNA,使用反转录试剂盒反转录为cDNA。采用FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)进行实时定量PCR反应。反应体系:总RNA 1.0 μ g、20 $\times$ RT酶混合物 10 μ l、2 $\times$ RT缓冲液混合物 1.0 μ l,加无酶水补足体系至20 μ l。反应条件:95℃ 30 s; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s,共40个循环;溶解曲线温度按照仪器默认程序进行。以GAPDH为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算DNAJC8 mRNA相对表达水平。引物由生工生物(中国上海)设计合成。引物序列:DNAJC8,正向5'-CTGAGCTGTTCAAACAAGCTGT-3',反向5'-TCTTCCCTTTGTCGTTTCCTTTC-3'; GAPDH,正向5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3',反向5'-GAAGGCTGGGCTCATTT-3'。

1.4.2 CCK-8法检测细胞增殖能力 将细胞接种于96孔板中(5×10^3 个细胞/孔),设置3个复孔。转染

24、48、72、96 h后,弃去培养基,每孔加入110 μ l CCK-8工作液(CCK-8:完全培养基=1:10),37℃恒温孵育1 h后用酶标仪测定450 nm波长处每孔的吸光度(OD)值。

1.4.3 平板克隆实验检测细胞集落形成能力 由于Huh7细胞单个菌落形成能力较差,所以,本实验仅采用MHCC97H细胞进行。将MHCC97H细胞转染48 h后以每孔 1.0×10^3 个接种于6孔板中。14 d后用4%组织细胞固定液固定和0.1%结晶紫染色,ImageJ软件分析,计数克隆形成数。

1.4.4 Hoechst 33342实验观察细胞凋亡情况 细胞转染48 h后,在培养基中加入1 ml Hoechst 33342染料,4℃避光孵育后PBS洗涤,于倒置荧光显微镜下观察。

1.4.5 JC-1实验测定线粒体膜电位 将 6×10^5 个细胞接种于6孔板中,待细胞贴壁后进行转染,转染48 h后,使用线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)进行染色,在培养箱中孵育20 min,于倒置荧光显微镜下观察。

1.4.6 流式细胞术检测细胞凋亡率 转染48 h后收集细胞进行Annexin V-FITC/PI染色。每管中加入1 $\times$ 结合缓冲液重悬细胞,使细胞浓度为 1×10^6 个/ml,每管加入5 μ l Annexin V-FITC和5 μ l PI,4℃下避光孵育30 min,采用流式细胞仪进行分析。

1.4.7 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 待Huh7和MHCC97H细胞转染24 h,且细胞生长密度为80%~90%,在6孔板底部形成致密单层时,进行细胞划痕实验,用10 μ l枪头在6孔板底部画直线,PBS缓冲液清洗并拍照,然后加入不含血清的培养液,24 h后再次拍照。利用ImageJ软件分析。

1.4.8 Transwell实验检测细胞迁移和侵袭能力 将转染24 h后的细胞用无血清DMEM培养基稀释成浓度 1×10^5 个/ml,取200 μ l细胞悬液加入Transwell上室,下室中灌注600 μ l含20% FBS的培养基作为趋化剂;侵袭实验需预先将基质胶与无血清DMEM按1:9的体积比稀释混匀,均匀包被于Transwell小室滤膜表面,37℃孵育2 h形成固化基质胶层,随后按迁移实验相同参数接种细胞。然后置于37℃、5% CO₂条件下培养24 h,用4%组织细胞固定液固定细胞,0.1%结晶紫染色,于显微镜下对迁移或侵袭至下室的细胞进行拍照和计数。

1.4.9 Western blotting检测相关蛋白的表达 使用含1 mmol/L PMSF的细胞裂解液裂解细胞,提取总蛋白,通过BCA试剂盒(标准曲线法)测定蛋白浓度后,将等量蛋白样品(20 μ g)与5 $\times$ SDS-PAGE上样缓冲液混合,95℃煮沸10 min使蛋白变性。采用快速SDS-PAGE凝胶制备法配制10%分离胶与5%浓缩胶,以恒定电压(80 V浓缩胶/120 V分离胶)进行电泳分离。随后通过湿转法(300 mA恒流,90 min)将蛋白转移至

PVDF膜上,经5%脱脂奶粉室温封闭1 h后,分别于4℃孵育一抗DNAJC8(1:5000)、Akt(1:10 000)、 β -catenin(1:9000)、GAPDH(1:20 000)过夜,次日室温孵育HRP标记二抗(1:5000)1 h。采用ECL化学发光系统显影检测信号,利用ImageJ软件对蛋白条带灰度值进行定量分析,以GAPDH作为内参标准化目标蛋白表达量。

1.5 药物敏感性分析和分子对接 使用R包“pRRophetic”分析TCGA-LIHC数据集中DNAJC8高、低表达患者对多种抗肿瘤药物的敏感性。初步分析发现DNAJC8对索拉非尼敏感,使用MOE2022软件进行自动评分,DNAJC8蛋白的PDB号为2DMX,于网站 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/?term=Sorafenib> 下载索拉非尼(CAS:284461-73-0)的结构;以自由结合能 ≤ -5.0 kcal/mol作为评定标准。

1.6 DNAJC8对索拉非尼抑制细胞生长能力的影响 用DMSO溶解索拉非尼,配置成浓度为10 mmol/L的母液,用完全培养基将母液稀释为10 μ mol/L的溶液,分别将10 μ mol/L的索拉非尼溶液稀释为7.5、5、2.5、1.25、0 μ mol/L。将肝癌细胞接种于96孔板中(9×10^3 个细胞/孔),设置对照+索拉非尼组、敲低DNAJC8+索拉非尼组,每组3个复孔。细胞贴壁后进行转染,37℃恒温孵育24 h后更换为

含有不同浓度索拉非尼的DMEM完全培养基,处理48 h后弃去培养基,每孔加入110 μ l CCK-8工作液,37℃恒温孵育1 h后用酶标仪测定450 nm波长处每孔的OD值,并绘制细胞增殖曲线。细胞活力(%)=(实验组OD-空白OD)/(对照组OD-空白OD) $\times$ 100%。

1.7 统计学处理 采用R软件(version 4.0.4)进行生物信息学分析,SPSS 25.0软件进行统计分析,GraphPad Prism 8.0软件制图。计量资料均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD- t 检验。实验至少独立重复3次。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNAJC8在肝癌组织中的表达情况及其与肝癌患者预后的相关性 TCGA数据库分析结果如图1A所示,与正常组织相比,肝癌组织中DNAJC8 mRNA表达水平明显升高($P < 0.001$)。此外,肝癌组织中DNAJC8 mRNA表达水平明显高于癌旁正常组织($P < 0.001$,图1B)。

Kaplan-Meier生存分析结果显示,与DNAJC8低表达患者相比,DNAJC8高表达患者的总生存期和无进展生存期明显缩短($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$,图1C)。

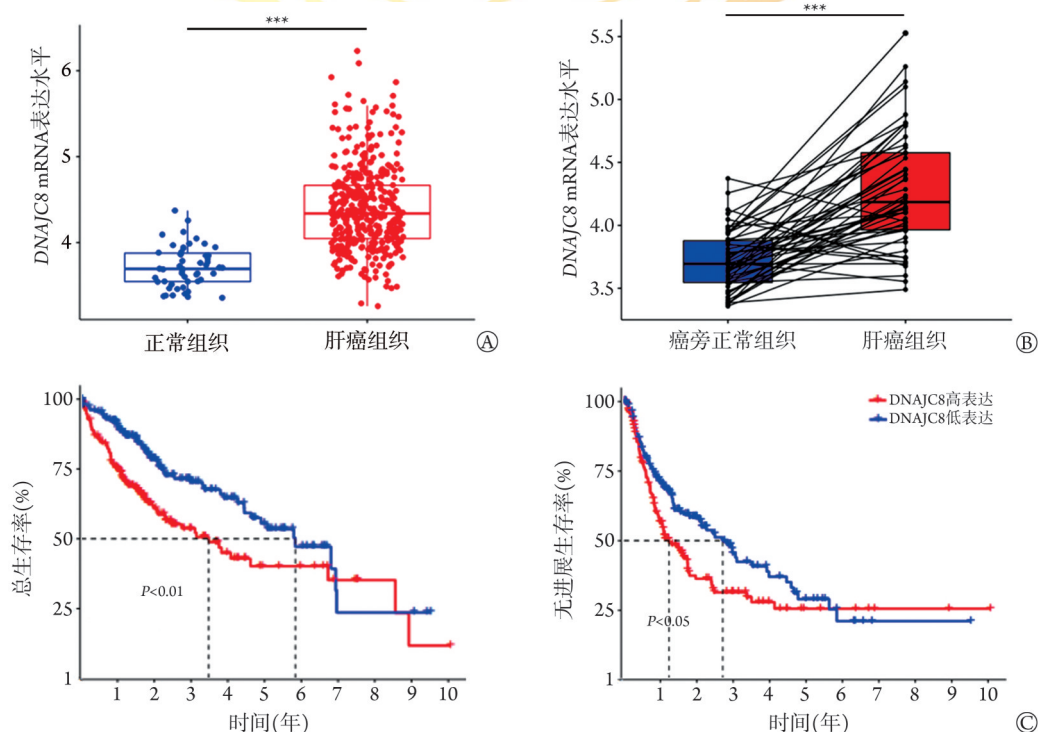


图1 DNAJC8在肝癌中的表达情况及其对肝癌患者预后的影响

Fig.1 Expression of DNAJC8 in hepatocellular carcinoma and its effect on prognosis of hepatocellular carcinoma patients

A. DNAJC8在肝癌组织及正常组织中的表达情况; B. DNAJC8在肝癌组织及癌旁正常组织中的表达情况; C. TCGA数据库中DNAJC8高、低表达对肝癌患者总生存期和无进展生存期的影响。*** $P < 0.001$ 。DNAJC8. DNAJ热休克蛋白家族成员C8; TCGA. 癌症基因组图谱

2.2 肝癌中与DNAJC8相关的共表达基因鉴定 分析TCGA-LIHC队列中与DNAJC8的共表达基因,结果显示,多个基因存在与DNAJC8明显的共表达关系,如含17个基因的锌指CCHC型(zinc finger CCHC-type containing 17 gene, ZCCHC17)、含有17个锌指和Btb结构域(zinc finger and BTB domain containing 17, ZBTB17)、蛋白磷酸酶1调节亚基8(protein phosphatase 1, regulatory subunit 8, PPP1R8)、YTH N⁶-甲基腺苷RNA结合蛋白F2(YTH N⁶-methyladenosine RNA binding protein F2, YTHDF2)等,且这些基因与DNAJC8呈明显的正相关关系($r=0.83$ 、 0.79 、 0.85 、 0.76 , $P<0.0001$; 附图1)。

2.3 肝癌中与DNAJC8相关的基因集富集分析 GO功能富集分析结果显示,在BP部分,与DNAJC8密切关联的基因主要富集于细胞周期及其过程等方面;在CC部分,主要富集于染色体、核蛋白复合物等方面;在MF部分,主要富集于RNA结合、染色质结合等方面。KEGG富集分析结果显示,与DNAJC8密切关联的基因主要富集于剪接体、癌症途径等方面(附图2)。

2.4 DNAJC8在肝癌中发挥作用与多种信号通路的关系 GSEA富集分析共筛选出最优的20条通路,即DNAJC8在肝癌的发展过程中与E2F转录因子(E2F

transcription factor, E2F)通路、MYC靶点(MYC target genes, MYC)通路、G₂/M期细胞周期检查点(G₂/M cell cycle checkpoint, G₂M)通路、磷脂酰肌醇3-激酶/Akt/雷帕霉素(phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mechanistic target of rapamycin, PI3K/Akt/mTOR)通路、Wnt/ β -catenin通路等20条通路密切相关(附图3)。

2.5 DNAJC8在肝癌细胞系中的表达情况 qRT-PCR和Western blotting检测结果显示,相较于正常肝癌细胞系LO2, HepG2、MHCC97H、Huh7细胞中DNAJC8 mRNA和蛋白表达水平明显升高($P<0.05$, 图2A、B),与生物信息学分析结果一致。

2.6 敲低DNAJC8对肝癌细胞增殖能力的影响 qRT-PCR验证结果显示,敲低DNAJC8组MHCC97H、Huh7细胞中DNAJC8 mRNA表达水平明显低于对照组($P<0.01$, 附图4A),表明DNAJC8敲低实验成功。CCK-8法检测结果显示,与对照组比较,转染72、96 h时敲低DNAJC8组的OD值明显降低($P<0.05$, 图2C)。平板克隆实验结果显示,敲低DNAJC8组MHCC97H细胞克隆形成数明显少于对照组($P<0.01$, 图2D; 附图4B)。

2.7 敲低DNAJC8对肝癌细胞凋亡的影响 Hoechst 33342实验结果显示,对照组细胞核为圆形或椭圆形,染色质分布均匀,均匀蓝色荧光较多,而亮蓝

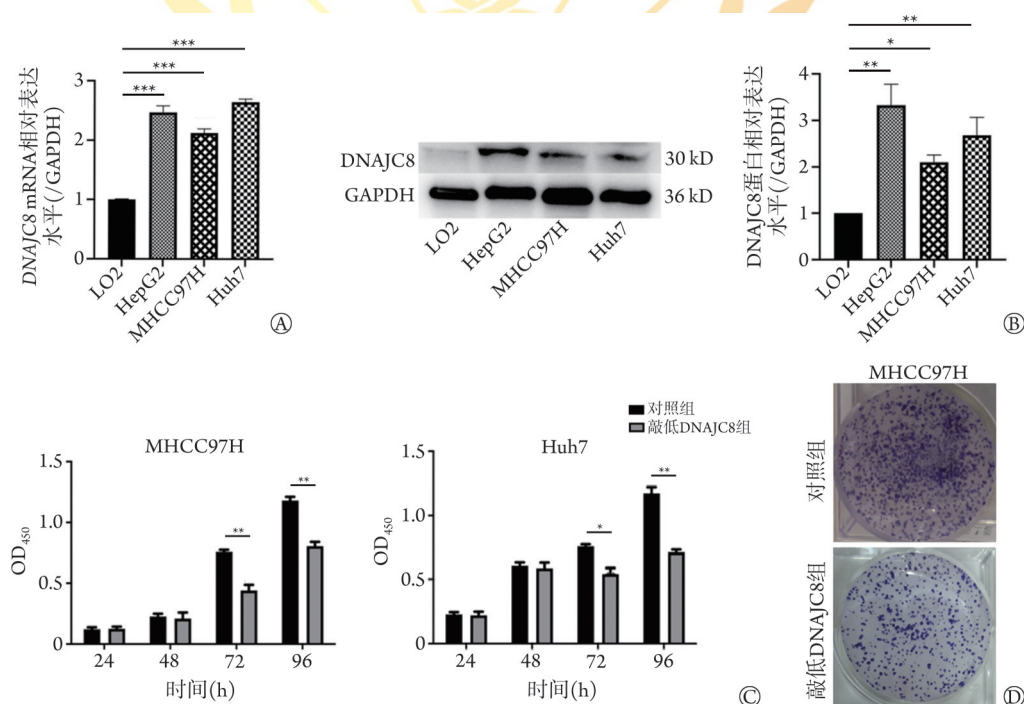


图2 DNAJC8 mRNA和蛋白在肝癌细胞中的表达情况以及敲低DNAJC8对肝癌细胞增殖的影响

Fig.2 mRNA and protein expression of DNAJC8 in hepatocellular carcinoma cells and effect of knockdown DNAJC8 on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells

A. qRT-PCR实验检测LO2、HepG2、MHCC97H和Huh7细胞中DNAJC8 mRNA的表达; B. Western blotting检测LO2、HepG2、MHCC97H和Huh7细胞中DNAJC8蛋白的表达; C. CCK-8法检测细胞增殖能力; D. 平板克隆实验检测MHCC97H细胞集落形成能力。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. DNAJC8. DNAJ热休克蛋白家族成员C8; GAPDH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; OD. 吸光度

色荧光较少;与对照组相比,敲低 DNAJC8 组细胞核皱缩,致密浓染,有亮蓝色荧光小体生成,荧光显微镜下亮蓝色荧光明显增多变密,提示 Huh7 和 MHCC97H 细胞凋亡明显增多(图 3A)。JC-1 实验检测结果显示,对照组红光最多、红/绿比最高;敲低 DNAJC8 组绿色荧光增多,即红/绿比较对照组降低(图 3B),表明敲低 DNAJC8 后细胞线粒体膜电位下降,凋亡明显增加。流式细胞术检测结果显示,敲低 DNAJC8 组 MHCC97H、Huh7 细胞凋亡率明显高于对照组($P<0.05$ 、 $P<0.001$,图 3C)。

2.8 敲低 DNAJC8 对肝癌细胞迁移和侵袭能力的影响 细胞划痕实验、Transwell 迁移和侵袭实验结果显示,与对照组比较,敲低 DNAJC8 组 MHCC97H、Huh7 细胞的迁移率明显降低,细胞迁移和侵袭数明显减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图 4A-C)。

2.9 敲低 DNAJC8 对肝癌细胞中 Akt、 β -catenin 表达的影响 Western blotting 检测结果显示,敲低 DNAJC8 组 MHCC97H、Huh7 细胞中 Akt、 β -连接蛋白(β -catenin)蛋白表达水平明显低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图 5)。

2.10 DNAJC8 潜在药物靶点分析 药物敏感性分析结果显示, DNAJC8 高表达组患者对索拉非尼、5-氟尿嘧啶、紫杉醇的药物敏感性明显低于 DNAJC8 低表达组($P<0.0001$,图 6A)。分子对接实验结果显示, DNAJC8 蛋白与索拉非尼的自由结合能为 -6.35 kcal/mol,且索拉非尼与 DNAJC8 蛋白的羧基与氨基端的发夹环之间存在良好的相互作用,从而起到了稳定 DNAJC8 蛋白结构的作用(图 6B)。进一步用不同浓度的索拉非尼处理对照组和敲低 DNAJC8 组的 MHCC97H 和 Huh7 细胞,结果显示,在 5.0、7.5、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 索拉非尼处理下,敲低 DNAJC8+索拉非尼组的细胞活力均明显低于对照+索拉非尼组($P<0.01$ 或 $P<0.0001$,图 6C)。

3 讨论

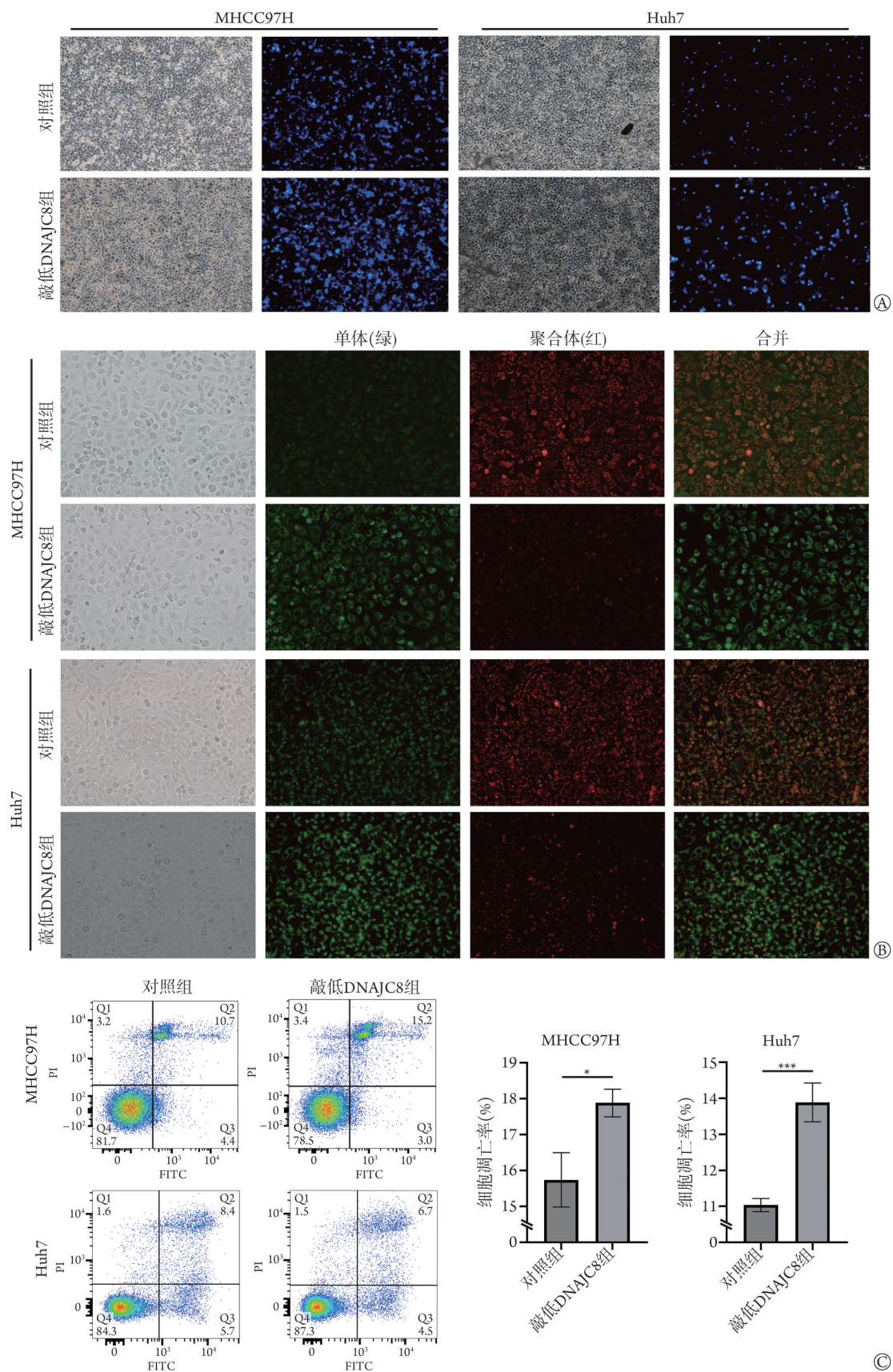
肝癌是全球范围常见的一种恶性肿瘤,也是导致癌症患者死亡的主要原因之一^[19],其发病率逐年上升^[20]。但肝癌的诊断及治疗仍处于瓶颈期,探索基因或蛋白作为其诊断和预后的标志物备受学者关注^[21]。DNAJ 热休克蛋白家族又称 HSP40 蛋白家族,作为 HSP70 的共伴侣,通过调节 HSP70 的 ATP 酶活性,协助蛋白质折叠、转运和降解^[22]。除了作为分子伴侣的功能外, HSP40 蛋白被报道在肿瘤生物学中也发挥重要作用^[10]。DNAJ(HSP40)是热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)家族中最大和最多样化的亚组,由 40 多个成员和 49 个基因组成,但目前其相关研究仍然不足^[23]。DNAJC8 是 DNAJC 亚类中的成

员,该亚类包含 32 个成员,成员结构简单(通常仅含 J 结构域)主要依赖与其他蛋白的协作发挥生物学作用,该亚类成员在癌症中呈现多层面的调控作用^[24-25]。DNAJC8 在肝癌中的研究鲜少,仅在 2023 年被报道可抑制肝癌细胞的增殖,且其表达与 T 分期、病理分期、血管浸润相关^[14]。

本研究发现,敲低 DNAJC8 可显著抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭,促进其凋亡。JC-1 实验发现,敲低 DNAJC8 促进肝癌细胞凋亡可能是通过线粒体途径实现的,但具体机制仍需进一步研究。通过 GSEA 富集分析发现,在肝癌中 DNAJC8 与 PI3K/Akt/mTOR 和 Wnt/ β -catenin 等多条通路明显相关;Western blotting 检测结果显示,敲低 DNAJC8 可影响肝癌细胞中 Akt、 β -catenin 的表达。Akt 是 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的核心分子,在肝癌的发生发展、转移及耐药中发挥关键作用。Akt 异常激活与肝癌患者预后不良密切相关,是肝癌潜在的治疗靶点^[26]。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的核心分子,在肝癌中也发挥着关键作用,细胞质中 β -catenin 的积累和活化是 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键过程^[27-29]。两者可通过糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)进行串联,由此推测, Akt/ β -catenin 信号通路可能在 DNAJC8 调控肝癌的进程中发挥关键作用。

共表达基因在生物学中被广泛应用于基因功能、蛋白质相互作用和信号通路等研究^[30]。本研究通过对 TCGA-LIHC 转录组数据进行分析,筛选出多个在肝癌中与 DNAJC8 共表达的基因,其中最为显著的基因有 ZCCHC17、ZBTB17、PPP1R8、YTHDF2 等。ZCCHC17 属于锌指蛋白家族成员,主要功能为调控转录,从而影响基因的表达和突变^[31]。YTHDF2 属于 m⁶A 结合蛋白中的一员^[32],有研究表明,其可促进胶质瘤、肺癌、胰腺癌等肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[33-34]。以上共表达基因可能是 DNAJC8 影响肝癌生长和转移的潜在响应标志物。通过对与 DNAJC8 相关联的基因进行 GO 和 KEGG 富集分析发现, DNAJC8 与细胞周期、染色体、癌症途径等生物进程高度相关,表明 DNAJC8 可能通过调控细胞分裂、染色体稳定性及致癌通路驱动肝癌的进展,这为机制研究和靶点开发提供了方向。

索拉非尼是一种多靶点的酪氨酸激酶抑制剂,也是晚期肝癌患者的一线治疗药物,其在延长患者总生存期方面仅能带来 2.3~3.0 个月的改善,且许多患者在治疗过程中会出现耐药^[35]。索拉非尼主要通过抑制多种受体酪氨酸激酶的活性,包括 Raf 激酶家族、血管内皮生长因子受体和血小板衍生生长因子受体等,从而抑制肿瘤细胞的增殖和血管生成。PI3K/Akt/mTOR 和 Wnt/ β -catenin 等通路的激活可导



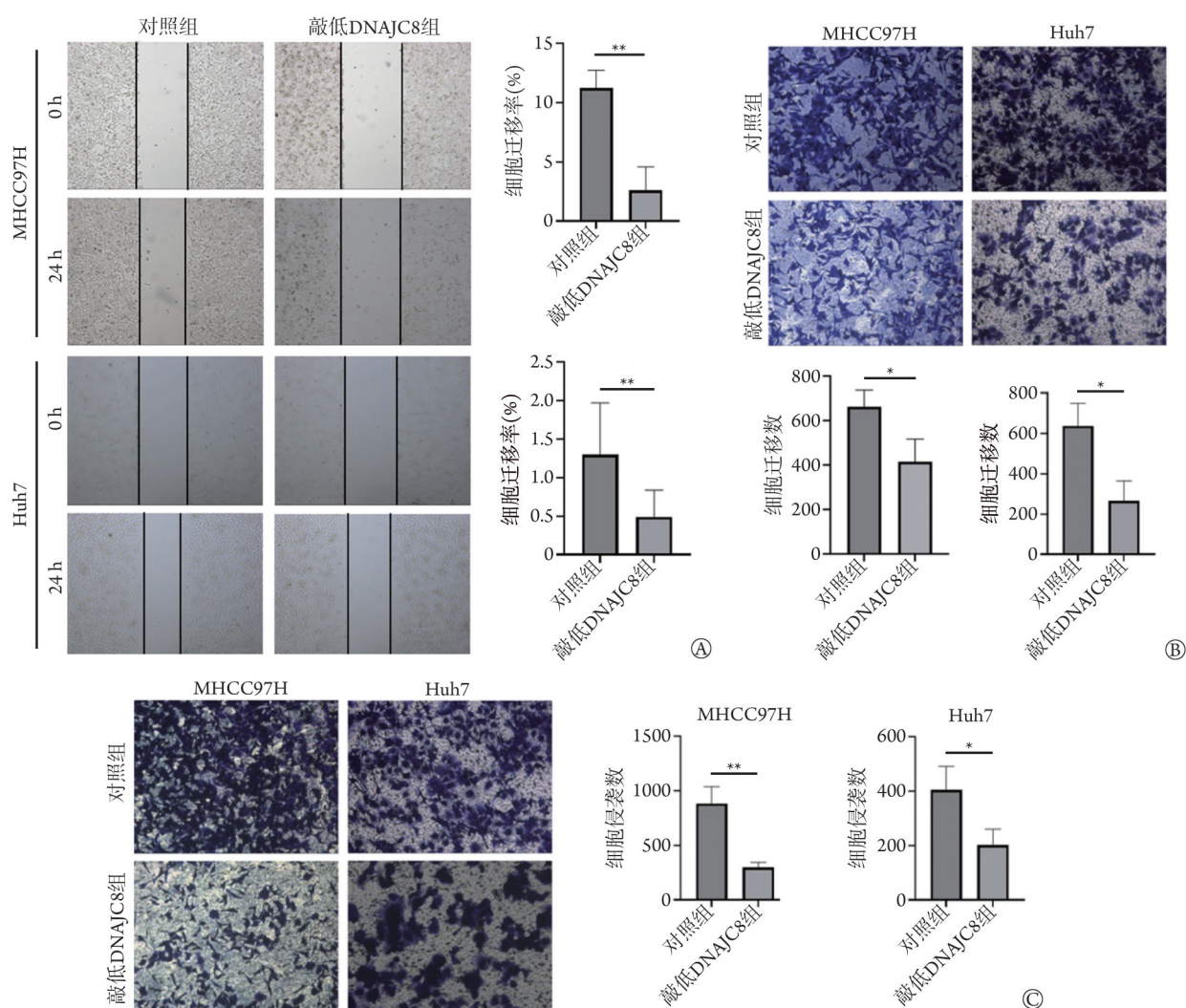


图4 敲低DNAJC8对肝癌细胞的迁移和侵袭能力的影响

Fig.4 Effect of knockdown of DNAJC8 on the migration and invasion ability of hepatocellular carcinoma cells

A. 细胞划痕实验(40×); B. Transwell 迁移实验; C. Transwell 侵袭实验。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。DNAJC8. DNAJ 热休克蛋白家族成员 C8

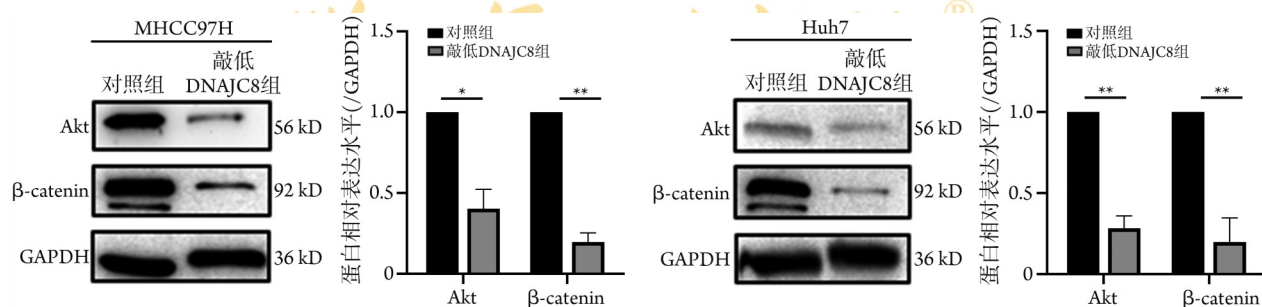


图5 敲低DNAJC8对肝癌细胞中Akt和 β -catenin表达的影响

Fig.5 Effect of knockdown of DNAJC8 on Akt and β -catenin expression in hepatocellular carcinoma cells

* $P<0.05$, ** $P<0.01$. Akt. 蛋白激酶B; β -catenin. β -连接蛋白; GAPDH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; DNAJC8. DNAJ 热休克蛋白家族成员 C8

致肝癌细胞对索拉非尼产生耐药^[36]。本研究发现, DNAJC8可作为索拉非尼潜在的分子作用靶点, 抑制肝癌细胞的增殖, 这为索拉非尼联合靶向治疗提供了新的视野。

综上所述, 本研究结果表明, DNAJC8在肝癌中呈高表达, 且提示患者的预后不良。敲低DNAJC8

的表达不仅可降低肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 且可通过降低线粒体膜电位促进肝癌细胞凋亡; DNAJC8可能是索拉非尼的潜在靶点, 敲低DNAJC8可提高索拉非尼的治疗效果。然而, DNAJC8调控Akt/ β -catenin信号通路的具体机制及其对索拉非尼敏感性的影响尚未明确, 仍需后续深入探索。

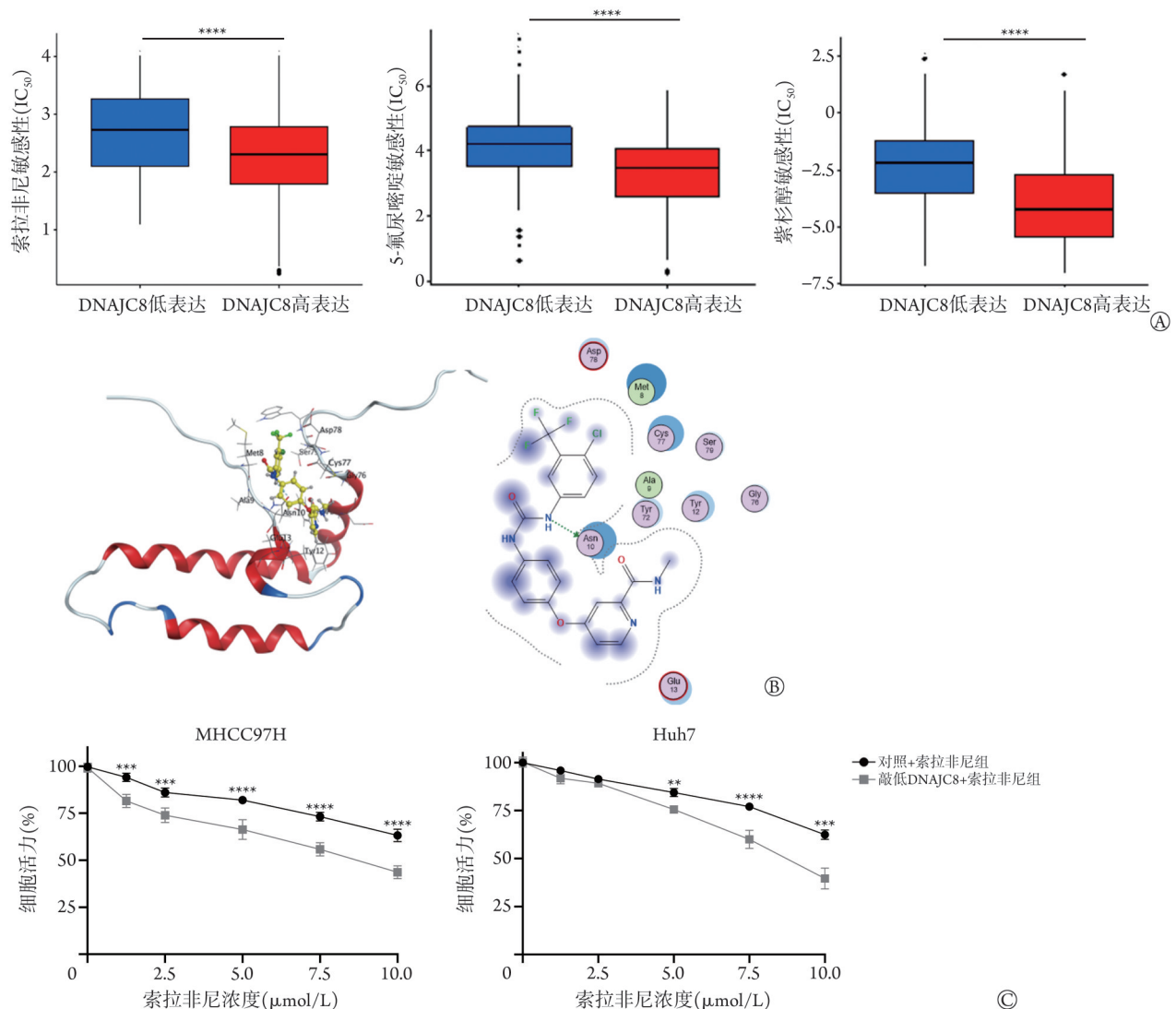


图6 DNAJC8的潜在药物靶点分析

Fig.6 Analysis the potential drug target of DNAJC8

A. 抗肿瘤药物在DNAJC8高、低表达组间的IC₅₀比较; ****P<0.0001; B. DNAJC8蛋白与索拉非尼结合示意图; C. CCK-8法检测敲低DNAJC8联合索拉非尼对细胞活力的影响。与对照+索拉非尼组比较, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001。DNAJC8. DNAJ热休克蛋白家族成员C8

志谢: 感谢广西民族大学鲁家豪博士为本研究开展的分子对接工作。

【附加材料】

附图1—4见 <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0091.2025.0716FJ>。
请扫描右方二维码获取。



【参考文献】

- [1] Qi J, Li M, Wang L, *et al.* National and subnational trends in cancer burden in China, 2005-20: an analysis of national mortality surveillance data[J]. *Lancet Public health*, 2023, 8(12): e943-e955.
- [2] Marengo A, Rosso C, Bugianesi E. Liver cancer: connections with obesity, fatty liver, and cirrhosis[J]. *Annu Rev Med*, 2016, 67: 103-117.
- [3] Dimitroulis D, Damaskos C, Valsami S, *et al.* From diagnosis to treatment of hepatocellular carcinoma: an epidemic problem for both developed and developing world[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(29): 5282-5294.
- [4] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, *et al.* Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2022, 400(10360): 1345-1362.
- [5] 牛艺, 李斌奎, 元云飞. 肝癌转化治疗抵抗机制的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2025, 47(3): 692-701.
- [6] Wu M, Xia X, Hu J, *et al.* WSX1 act as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma by downregulating neoplastic PD-L1 expression[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3500.
- [7] Lee J, Huh J, Lee Y, *et al.* DNAJ-induced miRNA-146a negatively regulates the expression of IL-8 in macrophages[J]. *Microb Pathog*, 2023, 184: 106357.
- [8] 周育儒. DNAJA1在胃癌中的表达情况及其对胃癌细胞生物学行为影响的初步探讨[D]. 泸州: 西南医科大学, 2023.
- [9] Asgharzadeh F, Moradi-Marjaneh R, Marjaneh MM. The role of heat shock protein 40 in carcinogenesis and biology of colorectal

- cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2022, 28(18): 1457-1465.
- [10] Zhong B, Shen F, Chen J. The role of HSP40 in cancer: recent advances[J]. *Histol Histopathol*, 2024, 39(7): 845-851.
- [11] Wang C, Shyu R, Wu C, *et al*. Tazarotene-induced gene 1 interacts with DNAJC8 and regulates glycolysis in cervical cancer cells[J]. *Mol Cells*, 2018, 41(6): 562-574.
- [12] Zhong X, Ding J, Adams JA, *et al*. Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(4): 482-495.
- [13] Khan AA, Patel K, Patil S, *et al*. Multi-omics analysis to characterize cigarette smoke induced molecular alterations in esophageal cells[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1666.
- [14] Zhang Z, Ju M, Tang Z, *et al*. DNAJC8: a prognostic marker and potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1289548.
- [15] Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge[J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2015, 19(1A): A68-A77.
- [16] 江鹏. 基于多数据库分析 GPX7 基因在骨软组织肉瘤中的表达及临床意义[J]. *临床医学研究与实践*, 2024, 9(13): 31-34.
- [17] Chen L, Zhang Y, Wang S, *et al*. Prediction and analysis of essential genes using the enrichments of gene ontology[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0184129.
- [18] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, *et al*. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(43): 15545-15550.
- [19] Ganesan P, Kulik LM. Hepatocellular carcinoma: new developments[J]. *Clin Liver Dis*, 2023, 27(1): 85-102.
- [20] 惠锋, 马守成, 裴霞霞. 信迪利单抗、贝伐珠单抗联合肝动脉化疗栓塞术在中晚期肝癌患者中的临床应用[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(6): 86-91.
- [21] 思兰兰, 许文, 李乐, 等. 斑蝥酸钠维生素 B6 注射液对人肝癌细胞的作用及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2025, 50(6): 747-755.
- [22] 杨雪, 曾彩虹. DNAJ 热休克蛋白家族成员 B9 的研究进展[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2022, 31(4): 368-372.
- [23] Cyran AM, Zhitkovich A. Heat shock proteins and HSF1 in cancer[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 860320.
- [24] Shen M, Cao S, Long X, *et al*. DNAJC12 causes breast cancer chemotherapy resistance by repressing[J]. *Redox Biol*, 2024, 70: 103035.
- [25] Fan Y, Meng Z, Zhang C, *et al*. DNAJ heat shock protein family member C1 can regulate proliferation and migration in hepatocellular carcinoma[J]. *PeerJ*, 2023, 11: e15700.
- [26] Yu L, Wei J, Liu P. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 85: 69-94.
- [27] 陈锦浩, 曹智, 陈家诚, 等. Wnt/ β -catenin 通路调控铁死亡在肝癌中的研究进展[J]. *海南医学院学报*, 2024, 30(14): 1104-1110.
- [28] Xu C, Xu Z, Zhang Y, *et al*. β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(4): e154515.
- [29] Liu J, Xiao Q, Xiao J, *et al*. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 3.
- [30] 王曼曼, 宁文华, 王海明, 等. 基于加权基因共表达网络分析和机器学习算法探究葡萄糖代谢参与缺血性脑卒中的机制及其关键基因[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2024, 32(5): 72-77, 82.
- [31] Liu F, Liang J, Long P, *et al*. ZCCHC17 served as a predictive biomarker for prognosis and immunotherapy in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 799566.
- [32] Yu J, Chai P, Xie M, *et al*. Histone lactylation drives oncogenesis by facilitating m⁶A reader protein YTHDF2 expression in ocular melanoma[J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 85.
- [33] Chen X, Zhou X, Wang X. m⁶A binding protein YTHDF2 in cancer[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2022, 11(1): 21.
- [34] Chen Z, Zan Y, Milesi P, *et al*. Publisher correction: leveraging breeding programs and genomic data in Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) for GWAS analysis[J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 210.
- [35] Gao S, Fan L, Wang H, *et al*. NCOA5 induces sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by inhibiting ferroptosis[J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 215.
- [36] Tang W, Chen Z, Zhang W, *et al*. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 87.

(责任编辑: 纪方方)