

TMEM64在肝癌组织中高表达并促进肝癌细胞的增殖和侵袭

曹丹萍¹, 蔡娟², 李艳娜¹, 董润雨¹, 王智雄¹, 左学良¹

皖南医学院第一附属医院//弋矶山医院¹胃肠外科,²肿瘤内科,安徽 芜湖 241001

摘要:目的 分析TMEM64在肝癌中的表达情况及对肝癌患者预后评估价值,探讨TMEM64对肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响。方法 采用癌症基因组图谱(TCGA)数据库和基因型组织表达项目(GTEX)分析TMEM64在肝癌中表达水平。采用Wilcoxon秩和检验方法比较分析TMEM64基因在肝癌和癌旁组织中的表达差异。利用Kaplan-Meier曲线和Cox回归分析评估TMEM64的表达水平对肝癌患者总生存期的影响及预后预测价值。通过单样本基因富集分析评估TMEM64的表达与免疫细胞浸润水平之间的相关性。依据TMEM64表达水平及相关临床变量构建基于总体生存率的nomogram图并进行验证。细胞实验中,在HCCLM3细胞中敲低TMEM64,分为si-NC(对照组)、si-TMEM64#1(敲低组1)、si-TMEM64#2(敲低组2)3个组;在Huh7细胞中过表达TMEM64,并分为vector(对照组)和TMEM64(过表达组),采用CCK-8、EdU和克隆形成实验检测TMEM64对肝癌细胞增殖的影响,使用Transwell和细胞划痕实验验证TMEM64对肝癌细胞迁移和侵袭能力的改变。结果 TMEM64在肝癌中的表达水平显著高于癌旁组织($P<0.001$)。Kaplan-Meier生存分析显示,TMEM64高表达与肝癌患者不良总生存时间相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。多因素Cox回归分析显示,TMEM64高表达是肝癌患者OS的独立危险因素($P<0.05$)。TMEM64的表达与NK细胞、CD8⁺T细胞和pDCs细胞的免疫细胞浸润水平呈负相关($P<0.05$)。GO、KEGG和GSEA富集分析结果显示TMEM64与信号传递及肿瘤转移相关通路显著富集。列线图 and 校准曲线显示模型预测效能与实际结果相符。敲低TMEM64能抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭($P<0.01$),过表达TMEM64能促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭($P<0.01$)。结论 TMEM64在肝癌中高表达,TMEM64高表达是肝癌患者不良预后的独立危险因素。TMEM64能促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

关键词: TMEM64; 肝细胞癌; 预后; 侵袭

TMEM64 is highly expressed in hepatocellular carcinoma and promotes tumor cell proliferation and invasion

CAO Danping¹, CAI Juan², LI Yanan¹, DONG Runyu¹, WANG Zhixiong¹, ZUO Xueliang¹

¹Department of Gastrointestinal Surgery, ²Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Wannan Medical College (Yijishan Hospital), Wuhu 241001, China

Abstract: Objective To analyze the expression of TMEM64 in hepatocellular carcinoma (HCC) and investigate the effect of TMEM64 expression level on proliferation and invasion of HCC cells *in vitro*. **Methods** We analyzed the expression level of TMEM64 in HCC and adjacent tissues based on data from TCGA and GTEX databases. The prognostic value of TMEM64 for HCC patients was examined using Kaplan-Meier survival analysis and a Cox regression model, and a nomogram was constructed based on TMEM64 expression and clinical characteristics of the patients. Functional enrichment analysis was performed to explore the potential signaling pathways, and immune cell infiltration was assessed using single sample gene set enrichment analysis. We also performed cell experiment to observe the changes in proliferation, migration, and invasion in HCCLM3 cells with TMEM64 knockdown and in Huh7 cells with TMEM64 overexpression using CCK-8, EdU, colony formation, Transwell, and wound healing assays. **Results** The expression level of TMEM64 was significantly higher in HCC than in the adjacent tissues ($P<0.05$). Kaplan-Meier analysis suggested that a high expression of TMEM64 was associated with poor outcomes of the patients ($P<0.05$). Multivariate Cox regression analysis indicated that a high TMEM64 expression was an independent risk factor for overall survival of HCC patients ($P<0.05$). TMEM64 expression level was negatively correlated with the levels of immune cell infiltration by NK cells, CD8⁺T cells, and plasma pDCs cells ($P<0.05$). GO, KEGG, and GSEA enrichment analyses showed that TMEM64 was significantly enriched with tumor invasion and metastasis pathways. The nomogram and calibration curves indicated a moderate prediction reliability of the model. In the cell experiment, TMEM64 knockdown obviously suppressed and TMEM64 overexpression markedly promoted the proliferation, migration, and invasion of HCC cells ($P<0.01$). **Conclusion** A high TMEM64 expression may serve as an independent risk factor for poor prognosis of HCC and promotes proliferation, migration, and invasion of HCC cells *in vitro*.

Keywords: TMEM64; hepatocellular carcinoma; prognosis; invasion

收稿日期:2023-02-06

基金项目:国家自然科学基金(82172651,82103293);安徽省教育厅杰出青年基金(2022AH020074);安徽省教育厅优秀青年基金(2022AH030123);安徽省自然科学基金(2108085MH287);安徽省重点研究与开发计划(202104j07020019);安徽省高校优秀青年人才支持计划(gxyq2021257);芜湖市科技计划(2022jc52)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82172651, 82103293).

作者简介:曹丹萍,在读硕士研究生,E-mail: 1002842359@qq.com

通信作者:左学良,博士,副教授,E-mail: zuoxueliang0202@126.com

肝癌是全球范围内发病率第6和死亡率第3的恶性肿瘤,我国更是肝癌的高发地区^[1,2]。根据2022年我国癌症中心的最新数据,肝癌在恶性肿瘤中的发病率位于第5,死亡率位于第2,5年生存率仅为14.1%^[3]。大多数肝癌患者早期无症状,确诊时已处于中晚期,失去最佳手术机会^[4,5]。肝癌患者手术后复发率仍然较高,预后极差^[6]。挖掘新的诊断标志物和预后预测指标对肝癌患者早期发现,制定个体化治疗方案具有重要临床研究价值。

跨膜蛋白(TMEMs)是一类能够多次跨越细胞膜并参与调控细胞间信号交流和传递的蛋白家族,人类的许多疾病的发生和进展都与跨膜蛋白的功能异常有关^[7]。目前,已发现较多的TMEMs在恶性肿瘤中表达失调^[8-10],参与调控肿瘤侵袭转移相关通路^[11-13]。TMEM64是一个位于8号染色体上的编码基因,属于跨膜蛋白家族的成员。目前对于TMEM64的研究较少,TMEM64在肝癌中的功能未见报道,有待进一步探索。

本研究通过分析癌症基因组图谱(TCGA)和基因型组织表达项目(GTEX)数据库中TMEM64在肝癌中的表达情况和预后预测价值,探究TMEM64对肝癌细胞增殖和侵袭的影响,为肝癌治疗提供新的分子靶标。

1 材料和方法

1.1 数据库分析

从TCGA数据库($n=377$)和GTEX数据库中收集了肝癌患者的mRNA表达谱和临床数据。3级HTSeq FPKM格式数据标准化为每百万次读取的转录本(TPM)。使用UCSC Xena3数据库和GTEX数据库中获取TPM格式的RNA测序数据进行分析。

使用Kaplan-Meier曲线和log-rank检验来比较患者生存差异,并将截止值设置为TMEM64的中位表达水平。单变量和多变量Cox回归分析用于评估临床变量对患者结局的影响。单变量Cox回归分析中的预后变量 $P<0.05$ 被纳入多变量Cox分析。

R软件包DESeq2用于分析和计算差异表达基因(DEGs),并将调整后的P值设置为 <0.05 , $|\log_2$ 倍变化(FC) >1 作为DEG的阈值。使用Spearman相关分析评估前10位DEGs表达与TMEM64之间的相关性。

使用R包GOplot和R包clusterProfiler对DEGs进行了功能富集分析,包括GO、KEGG通路富集分析和GSEA基因集富集分析,调整后的 $P<0.05$ 和错误发现率(FDR) <0.25 被视为统计上显著富集的功能或通路。

R软件包rms用于构建nomogram和calibration曲线。通过Cox比例风险回归模型评估肝癌患者总生存时间(OS)的独立危险因素。结合TMEM64的表达水平与多因素Cox回归模型中的临床变量,构建nomogram来预测1年、3年和5年的肝癌患者总生存率,使用calibration曲线评估列线图的效能。

1.2 实验材料

1.2.1 组织样本 组织标本来自2021年3月~2022年3月在我院行肝癌切除术的患者的肿瘤组织及邻近正常组织共20例。本研究患者纳入标准:术后病理确诊为肝细胞癌;术前均未接受放疗、化疗、靶向或免疫治疗,所有患者均已签署知情同意书。本研究经皖南医学院第一附属医院(弋矶山医院)伦理委员会批准(2021伦审

研12号)。

1.2.2 细胞和试剂 正常肝细胞QSG-7701和肝癌细胞株Hep3B、SMMC-7721、HCCLM3、Huh7来自中国科学院细胞资源中心。总RNA提取试剂TRIzol和转染试剂Lipofectamine™3000(Invitrogen),RT-qPCR试剂盒(北京天根生化科技有限公司)。Transwell小室和实验中使用的6孔板、96孔板均(Corning),基质胶(BD)。Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒(上海贝博生物有限公司),5-Ethynyl-2'-deoxyuridine(EdU)试剂盒(广州锐博生物科技有限公司)。TMEM64的siRNA和过表达TMEM64的质粒委托上海吉玛制药有限公司设计构建,其中敲低TMEM64的siRNA序列为:si-TMEM64#1:5'-GCUAUUGUAGCUUGUGAAATT-3',si-TMEM64#2:5'-CCUACCCAGCUUCUGAAUUTT-3'。Western blot实验中主要的试剂如下:BCA试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)、TMEM64抗体(Abcam)、 β -tubulin(Cell Signaling Technology)以及超敏ECL发光液(Abbkine)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与转染 细胞使用含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养基(含100 U/mL青霉素,100 μ g/mL链霉素),置于恒温培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)中培育。待细胞密度达到60%~70%,按照Lipofectamine™3000说明书步骤,将siRNAs分别转染至HCCLM3中,并分组为si-NC(对照组)、si-TMEM64#1(敲低组1)和si-TMEM64#2(敲低组2);将空质粒载体和过表达TMEM64质粒载体分别转染至Huh7细胞中,并分组为vector(对照组)和TMEM64(过表达组)。转染48 h后,分别使用RT-qPCR和Western blot验证TMEM64敲低和过表达的效率,以及进行后续细胞实验。

1.3.2 RT-qPCR 采用TRIzol试剂从培养的细胞中提取总RNA,接着使用FastKing一步法除基因组cDNA第一链合成预混试剂合成cDNA,采用SuperReal荧光定量预混试剂将合成的cDNA在ABI QuantStudio3系统(Applied Biosystems)上进行实时PCR扩增,使用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}定量方法计算TMEM64与内参GAPDH的相对表达量。其中TMEM64的引物序列如下:Forward primer:5'-GGCGTGGCTGAGGTGAGAAA-3'; Reverse primer:5'-ATGAAGCCACGACGAAGAG-3'。GAPDH的引物序列为:Forward primer:5'-AATCCCATCACCATCTTCC-3'; Reverse primer:5'-CATCACGCCACAGTTCC-3'。

1.3.3 CCK-8 消化并离心转染24 h后的细胞及对照组细胞,按照 2×10^3 /孔种于96孔板中,并于第24、48、72和96 h使用酶标仪检测其在450 nm波长处的吸光度值。在每次检测前2 h在每孔中加入10 μ L的CCK-8试剂,

避光置于培育箱中。最后计算不同时间段细胞的增殖水平。

1.3.4 细胞克隆形成实验 将转染48 h后的每组细胞按照 2×10^3 /孔均匀种植于新的6孔板中,置于培养箱中培育12 d。收集细胞时使用4%多聚甲醛固定30 min,0.1%结晶紫染色1 h,最后拍照并统计分析细胞增殖的水平。

1.3.5 EdU实验 使用锐博生物的EdU试剂盒来检测细胞的增殖能力。将转染48 h后的实验组和对照组细胞按照6000/孔均匀种于96孔板中,加入试剂A孵育2 h后,将细胞固定在4%多聚甲醛中,用Apollo染色液染色30 min,之后用Hoechst33342对细胞核进行30 min染色。最后在荧光显微镜(200 \times)下对增殖的阳性细胞进行拍照和计数。

1.3.6 Transwell实验 细胞侵袭实验需提前将Transwell小室的上室中均匀铺入50 μ L的基质胶,将转染48 h后的细胞及其对照组细胞重悬于无血清培养基中,重新计数,按照 5×10^4 /孔细胞移植到小室的上室,下室中则加入600 μ L含10%胎牛血清的培养基。置于细胞培养箱中继续培育24 h,用含4%多聚甲醛固定,0.1%结晶紫染色1 h。最后在倒置显微镜下拍照,统计分析细胞迁移的百分比。细胞迁移实验则不需铺基质胶,其他步骤同细胞侵袭实验。

1.3.7 细胞划痕实验 将转染24 h后的每组细胞按照一定密度均匀铺入6孔板中(以过夜后贴壁细胞密度达80%左右为宜),第2天使用黄色枪头在六孔板中划出一条直线,PBS清洗后置于电子显微镜下拍照记录0 h划痕的面积。将六孔板中加入2 mL无血清培养基继续培育,48 h后再次在倒置显微镜下拍照记录划痕愈合的面积,分析计算愈合面积的比率并评估两组细胞的迁移能力。

1.3.8 Western blot实验 从分组处理后细胞中裂解并提取总蛋白,采用BCA法检测蛋白浓度,加入适量的上样缓冲液煮沸10 min。每组样本取等量的蛋白进行SDS-PAGE电泳,并湿转到PVDF膜上。用含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液室温封闭2 h后,在4 $^{\circ}$ C下将PVDF膜与按比例稀释的一抗孵育过夜。TBST冲洗3次,继续将PVDF膜与二抗在室温下孵育2 h,最后使用超敏ECL显色液进行曝光和显色。

1.3.9 免疫荧光实验 采用冰冻切片进行双标法免疫荧光实验。将肝癌组织冰冻切片取出后室温晾干15 min,PBS洗3次,每次5 min。使用3% BSA室温封闭1 h,然后加入TMEM64和CD8(Abcam)一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBS清洗3次,10 min/次,分别加入相应的荧光标记二抗室温孵育1 h。细胞核利用DAPI染色。滴加抗荧光淬灭剂封片后在激光共聚焦显微镜下拍照。

1.3.10 CD8⁺T细胞检测分析 将新鲜提取的人外周血

单个核淋巴细胞(PBMC)活化后重新计数,并与转染后的肝癌细胞及其对照组细胞按照10:1的比例共培养。收集细胞后用不同通道荧光标记的CD45、CD3和CD8抗体(BioLegend)对细胞进行染色,并在室温下与细胞一起孵育1 h。通过流式细胞术分析CD8⁺T淋巴细胞比例。

1.3.11 统计学方法 使用GraphPad Prism 8.0软件对实验结果进行统计学分析,实验组和对照组间计数结果采用独立样本 t 检验或单因素方差分析进行分析评估,每组实验重复3次。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TMEM64在肝癌和肝癌细胞系中的表达水平

基于TCGA数据库,分析了TMEM64在泛癌中的表达水平,发现TMEM64在多种恶性肿瘤中均呈现高表达($P < 0.001$,图1A)。此外,TMEM64在肝癌中的表达水平在非配对样本和配对样本中均显著高于邻近的癌旁组织($P < 0.001$,图1B、C)。受试者工作特征曲线(ROC)表明TMEM64具有良好的肝癌诊断价值,ROC曲线下的区域(AUC)为0.723(95% $CI = 0.672-0.773$,图1D)。RT-qPCR结果表明,TMEM64在肝癌细胞系中表达水平也显著高于正常肝细胞系($P < 0.01$,图1E)。

2.2 Kaplan-Meier分析评估肝癌患者TMEM64的表达与预后的价值

根据TMEM64表达的中位数,肝癌患者被分为TMEM64高表达组($n = 187$)和低表达组($n = 186$)。如图2A示,与TMEM64低表达组相比,TMEM64高表达组患者OS较差(OS:危险比[HR]=1.58,95% $CI = 1.11-2.25$, $P = 0.011$)。多因素Cox比例风险回归分析表明,TMEM64的表达水平是肝癌患者总生存时间的独立危险因素(OS:危险比[HR]=1.693,95% $CI = 1.087-2.638$, $P = 0.02$,图2B,表1)。

2.3 Kaplan-Meier方法评估不同亚组肝癌患者中TMEM64表达水平的预后预测价值

与TMEM64低表达相比,TMEM64高表达肝癌患者预后在T1~T3、N0、M0、I~III期、G1~G3、BMI>25 kg/m²、年龄>60岁、体质量>70 kg以及男性亚组中明显更差($P < 0.05$,图3)。

2.4 TMEM64表达水平与肝癌组织中免疫细胞浸润水平的相关性

TMEM64高表达组中肝癌组织中的NK细胞、CD8⁺T细胞和pDCs的富集分数明显低于TMEM64低表达组(图4A~C)。TMEM64的表达与NK细胞($r = -0.138$, $P = 0.007$)、CD8⁺T细胞($r = -0.114$, $P = 0.027$)和pDCs($r = -0.321$, $P < 0.001$)的免疫细胞浸润水平呈负相关(图4D~F)。免疫荧光实验结果表明,与TMEM64

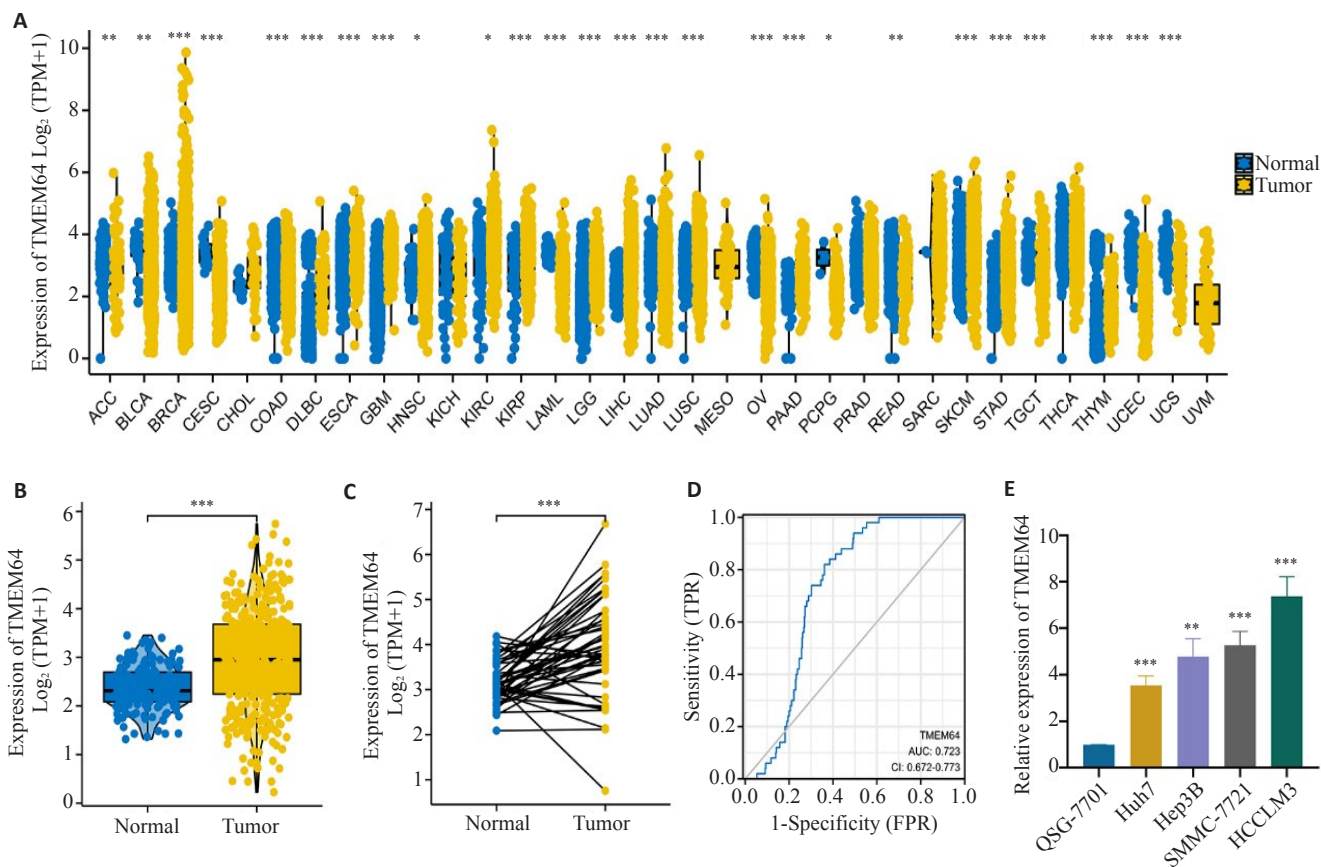


图1 TMEM64在不同类型肿瘤和肝癌中的表达水平

Fig.1 Expression levels of TMEM64 in different tumors types and in hepatocellular carcinoma (HCC). **A:** Expression levels of TMEM64 in different tumors compared with normal tissues in the TCGA and GTEx databases. **B:** Expression levels of TMEM64 in HCC and unpaired normal tissues from the TCGA and GTEx databases. **C:** Expression of TMEM64 in HCC and paired normal tissues in the TCGA database. **D:** ROC curves for classifying HCC versus normal liver tissue in the TCGA database. **E:** Expression levels of TMEM64 in HCC cell lines and normal human hepatocyte line QSG-7701 determined by RT-qPCR. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs QSG-7701 cells.

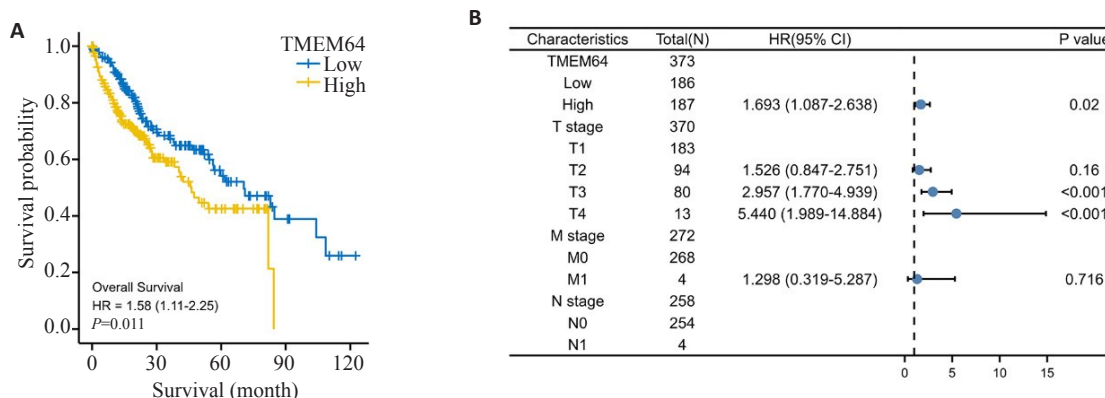


图2 Kaplan-Meier方法评估肝癌患者TMEM64表达的预后价值

Fig.2 Prognostic value of TMEM64 expression in patients with HCC assessed with the Kaplan-Meier method. **A:** Overall survival (OS) of patients with high- and low-expression of TMEM64 in HCC. **B:** Forest map of OS based on multivariate Cox analysis.

低表达的肝癌组织相比, TMEM64高表达的肝癌组织中 CD8⁺ T细胞肿瘤浸润水平显著降低(图4G)。

2.5 TMEM64相关的差异表达基因功能富集分析

比较 TMEM64高表达组和低表达组的相关差异基

因表达情况(图5A), 前10个 DEGs 为 HS3ST4、MAGEA4、AC016717.2、ANKFN1、CYP11B2、SH3GL3、AC062015.1、PPDPFL、CCR3 和 ISM2(图5B)。GO富集分析显示, DEGs显著富集的生物过程包括

表1 肝癌患者总生存期的单因素和多因素Cox比例风险回归分析

Tab.1 Univariate and multivariate analyses of overall survival in patients with Hepatocellular Carcinoma

| Characteristics | Total (n) | Univariate analysis | | Multivariate analysis | |
|-------------------|-----------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|
| | | Hazard ratio (95% CI) | P | Hazard ratio (95% CI) | P |
| TMEM64 expression | 373 | | | | |
| Low | 186 | Reference | | | |
| High | 187 | 1.582 (1.111-2.252) | 0.011 | 1.693 (1.087-2.638) | 0.020 |
| T stage | 370 | | | | |
| T1 | 183 | Reference | | | |
| T2 | 94 | 1.431 (0.902-2.268) | 0.128 | 1.526 (0.847-2.751) | 0.160 |
| T3 | 80 | 2.674 (1.761-4.060) | <0.001 | 2.957 (1.770-4.939) | <0.001 |
| T4 | 13 | 5.386 (2.690-10.784) | <0.001 | 5.440 (1.989-14.884) | <0.001 |
| M stage | 272 | | | | |
| M0 | 268 | Reference | | | |
| M1 | 4 | 4.077 (1.281-12.973) | 0.017 | 1.298 (0.319-5.287) | 0.716 |
| N stage | 258 | | | | |
| N0 | 254 | Reference | | | |
| N1 | 4 | 2.029 (0.497-8.281) | 0.324 | | |

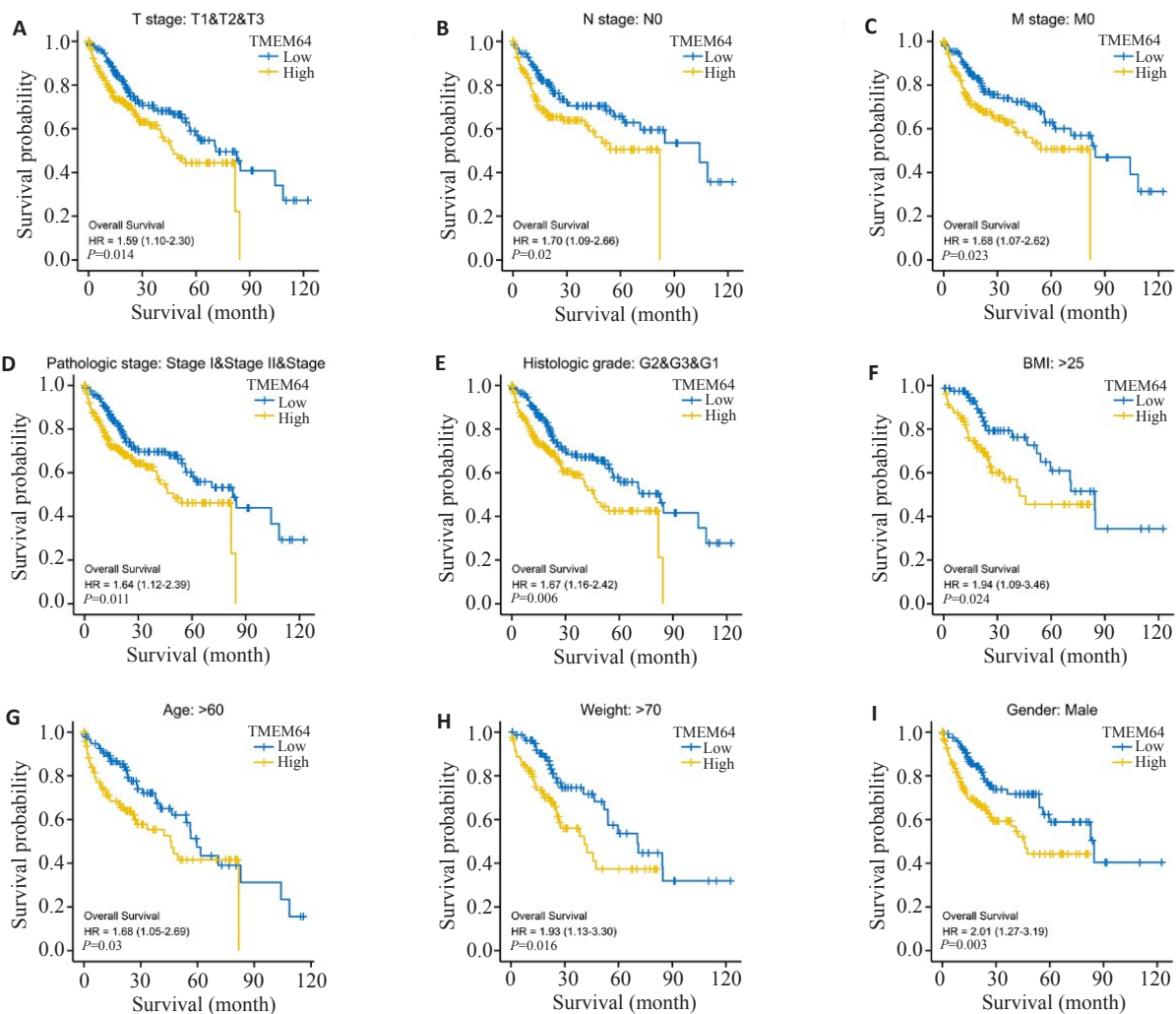


图3 Kaplan-Meier方法评估肝癌患者不同亚组中TMEM64表达的预后预测价值

Fig.3 OS curves of TMEM64 expression levels in different subgroups of liver cancer patients. A-I: OS survival curves of T stage, N stage, M stage, Pathologic stage, Histologic grade, BMI>25 kg/m², Age>60 years, Weight>70 kg, and Gender subgroups between high- and low-TMEM64 patients with HCC.

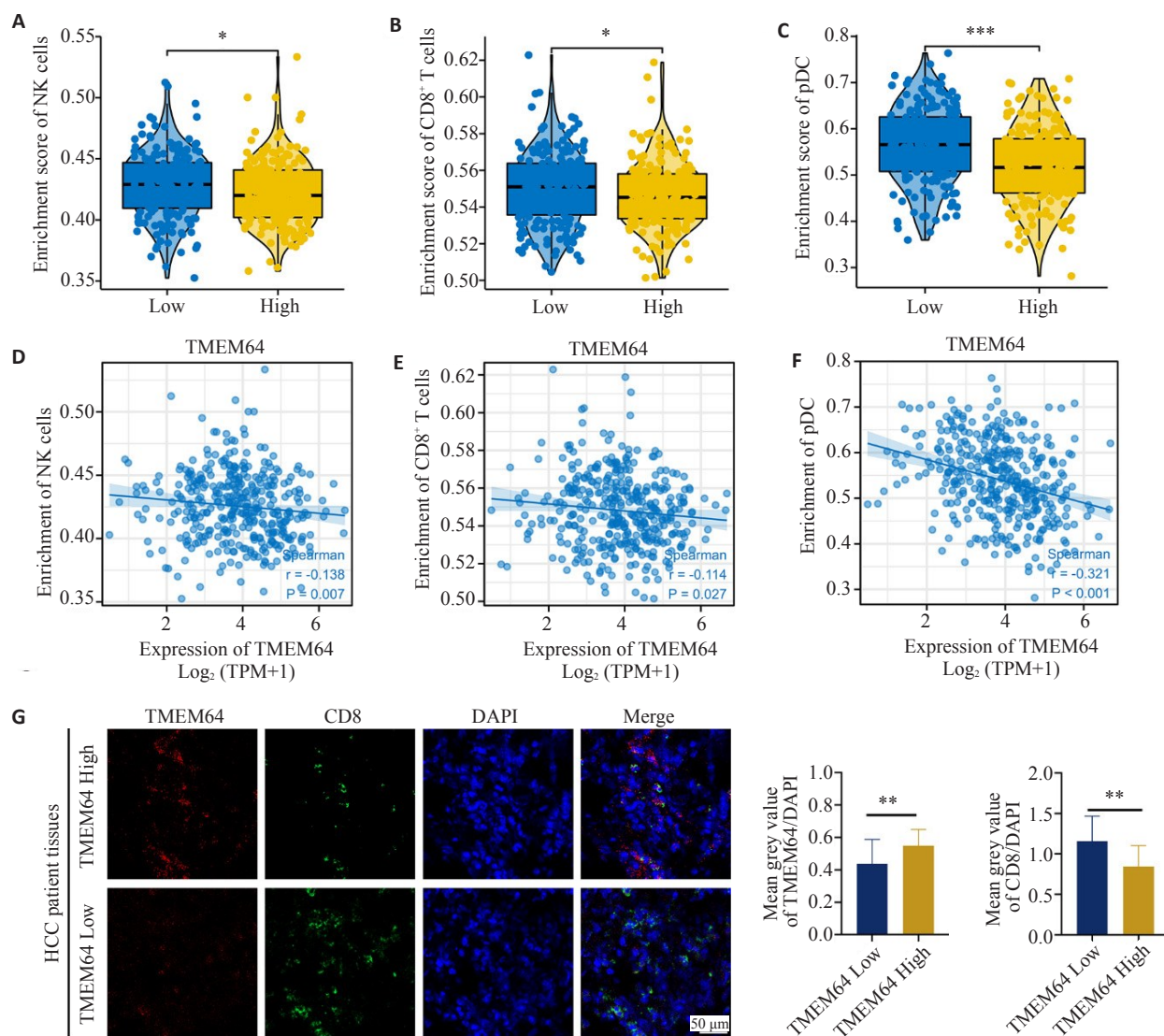


图4 TMEM64的表达与肝癌组织中免疫细胞浸润水平的相关性

Fig.4 Correlation of TMEM64 expression with immune infiltration level in HCC. A-C: Comparison of immune cell infiltration levels between high- and low-TMEM64 groups. D-F: Correlation between the relative enrichment of immune cells (NK cells, CD8⁺ T cells and pDCs cells) and TMEM64 expression. G: Double-labeled immunofluorescence results indicate that the number of infiltrating CD8⁺ T cells is decreased in HCC tissues with high expression of TMEM64. **P*< 0.05, ***P*<0.05, ****P*<0.001 vs low TMEM64 expression group.

化学突触传递的调控、信号释放、受体配体活动和经突触信号传递的调节等(图5C)。KEGG通路富集分析表明,DEGs显著富集的途径包括神经活性配体与受体的相互作用、Wnt信号通路和MAPK信号通路(图5D)。GSEA富集分析发现高TMEM64表达组中Wnt/β-catenin、JAK/STAT3、KRAS和P53信号通路被显著富集(图5E)。

2.6 构建和验证基于TMEM64表达的nomogram和calibration曲线

根据多因素Cox风险回归分析中有关的临床变量(TMEM64的表达水平和T分期),生成了基于OS独立因素的Nomogram来预测患者1年、3年和5年的预后情况。在Nomogram中,总点数越高,预后越差(图6A)。

Nomogram的自举校正C指数为0.644(95% CI=0.618-0.67),该模型对肝癌患者的OS具有中等的预测准确性,其中患者5年OS的模型准确性和一致性预测效能较好(图6B~D)。

2.7 敲低TMEM64能抑制HCCLM3细胞的增殖和侵袭

利用siRNA在TMEM64表达相对较高的肝癌细胞HCCLM3中敲低TMEM64,使用RT-qPCR和Western blots验证si-TMEM64#1和si-TMEM64#2的敲低效率(图7A、B)。细胞克隆形成、CCK-8和EdU实验结果表明,敲低TMEM64能明显抑制HCCLM3细胞的增殖(图7C-E)。细胞划痕和Transwell实验显示,与对照组相比,si-TMEM64#1和si-TMEM64#2组中HCCLM3细胞的迁移和侵袭能力显著降低(图7F、G)。

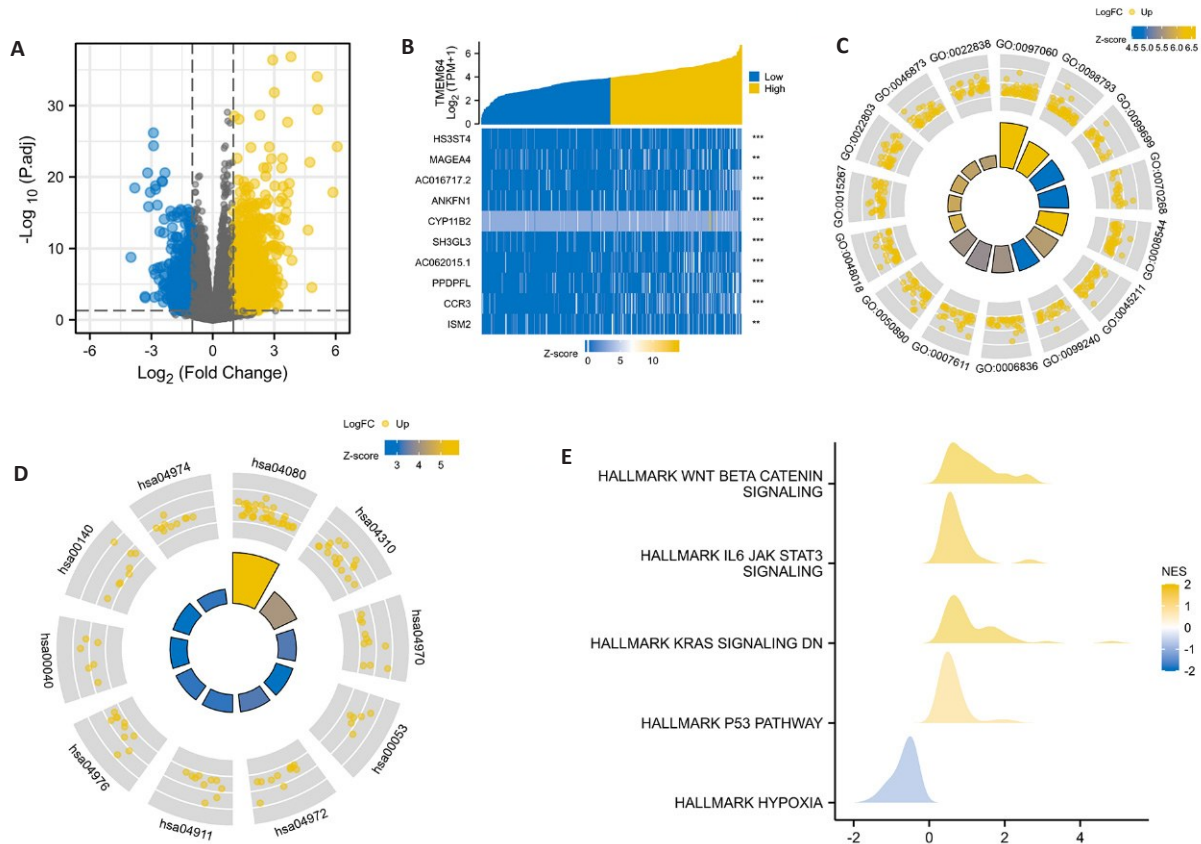


图5 TMEM64相关的差异表达基因及功能富集分析

Fig.5 TMEM64-related differentially expressed genes (DEGs) and functional enrichment analysis of TMEM64 in HCC. A: Volcano map of the DEGs. B: Heat map of the correlation between TMEM64 expression and the top 10 differential genes. C-D: GO enrichment analysis and KEGG enrichment analysis of the DEGs. E: Gene set enrichment analysis (GSEA) of the DEGs.

将转染后的 HCCLM3 细胞与活化的 PBMC 共培养, 利用流式细胞术检测 CD8⁺ T 细胞比例, 结果显示敲低 TMEM64 的肝癌细胞中浸润的 CD8⁺ T 细胞比例增加 (图 7H)。

2.8 过表达 TMEM64 能促进 Huh7 细胞的增殖和侵袭

在 TMEM64 表达相对较低的肝癌细胞 Huh7 中过表达 TMEM64。与对照组相比, 转染 TMEM64 的过表达质粒后, Huh7 细胞中 TMEM64 的表达水平显著增高 (图 8A、B); CCK-8、细胞克隆形成和 EdU 实验结果表明, 过表达 TMEM64 能显著促进 Huh7 细胞的增殖 (图 8C~E)。细胞划痕和 Transwell 实验显示, 与对照组相比, 过表达 TMEM64 组中 Huh7 细胞的迁移和侵袭能力显著增强 (图 8F、G)。流式细胞实验表明, 将转染后的 Huh7 细胞与活化的 PBMC 共培养, 过表达 TMEM64 组的肝癌细胞中浸润的 CD8⁺ T 细胞比例减少 (图 8H)。

3 讨论

TMEMs 的表达失调与肿瘤生长转移^[14]及预后^[15]密切相关, 在肝癌中 TMEM106C 被发现于肝癌组织中高

表达, 可作为肝癌预后预测标志物和潜在的治疗靶点^[16]。有研究报道 TMEM64 可以通过调节 Wnt3a 的分泌调控前列腺癌的进展^[17]。TMEM64 是一种定位于内质网的七次跨膜蛋白, 本研究中首次证实 TMEM64 是肝癌的潜在预后指标。

本研究通过 TCGA 数据库分析了 TMEM64 在肝癌中的表达水平, 发现 TMEM64 在肝癌中的表达水平显著高于癌旁组织, 并且高表达的 TMEM64 与肝癌患者不良总生存时间相关。进一步通过 Cox 回归分析发现 TMEM64 的表达水平是肝癌患者总生存率的独立危险因素。我们得出新的结论, TMEM64 可能是肝癌不良预后和临床转移的预测的指标。近年来, 列线图在恶性肿瘤患者的风险和预后预测中应用较广泛^[18、19]。Nomogram 图可使用现有的临床信息, 将复杂的回归分析结果转变为直观的可视化图形^[18、20]。为了更准确、更科学的计算肝癌患者的总体生存概率, 本研究构建了基于 OS 独立因素列线图预后模型来预测患者 1 年、3 年和 5 年的预后情况, 更直观的展示了肝癌患者的预后风险。本研究中的校准曲线也表明: 预测模型与实际结果

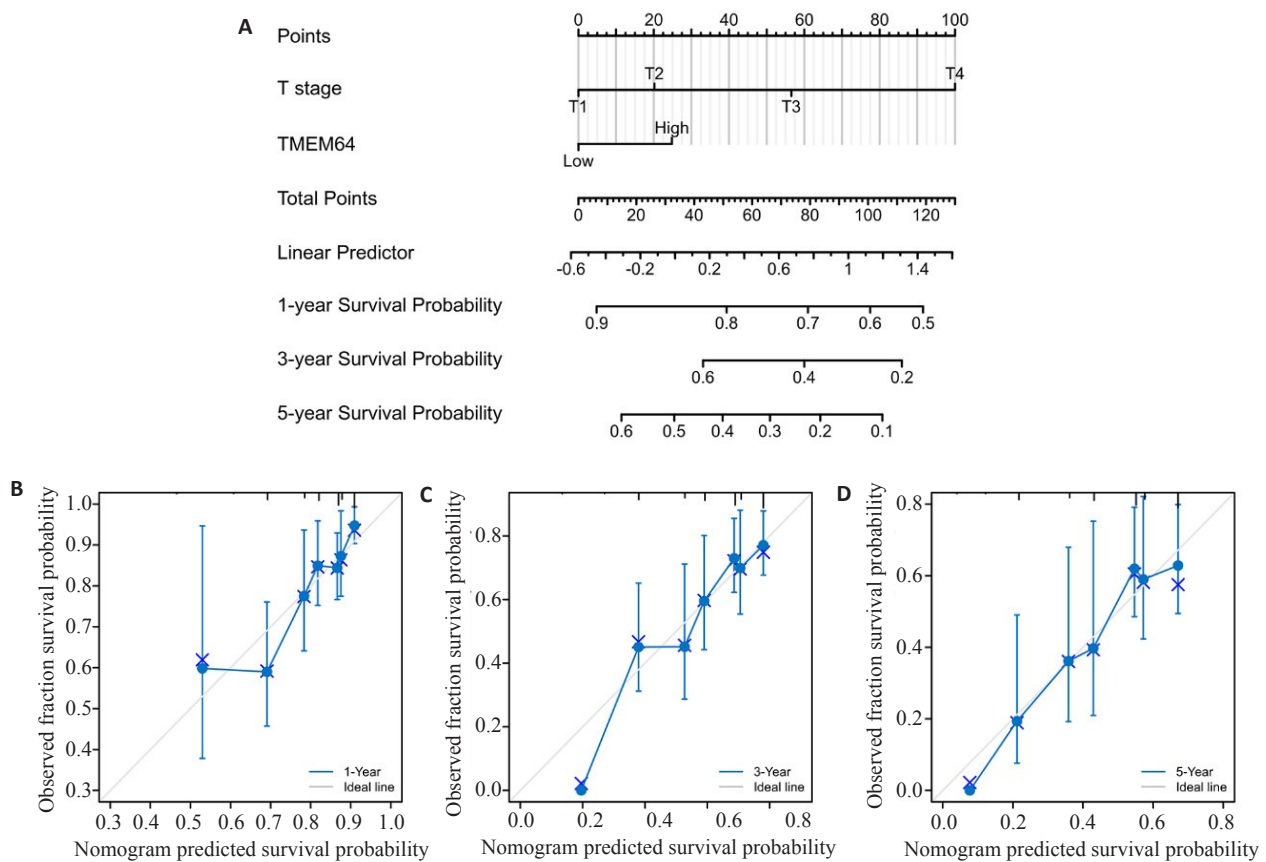


图6 预测肝癌患者1年、3年和5年总生存率的nomogram和calibration曲线

Fig.6 Nomogram and calibration curves for predicting OS at 1, 3 and 5 years in patients with HCC. A: A nomogram for predicting 1-, 3- and 5-year OS of HCC patients. B-D: Calibration curves for 1-, 3- and 5-year nomogram predictions.

相符,其中患者5年的预测风险最接近实际结果。

肿瘤细胞生长被浸润免疫细胞包围的复杂微环境中^[21],肿瘤浸润免疫细胞的预后价值已在实体恶性肿瘤中得到证实^[22,23]。浸润免疫细胞也被证明可以预测对新辅助化疗和免疫检查点抑制(ICI)治疗的反应^[24,25]。因此,筛查肝癌浸润性免疫细胞可辅助ICI治疗,并对ICI治疗有潜在的预测价值。本研究通过GSEA富集分析评估免疫细胞在肝癌中的相对富集分数,并研究TMEM64的表达与免疫细胞浸润水平之间的相关性,结果显示, TMEM64高表达与NK细胞、CD8⁺ T细胞、和pDCs的浸润呈负相关。有研究报道, TMEM205与CD8⁺ T的浸润呈正相关,并通过降低免疫抑制细胞水平和促进细胞毒性T细胞向肿瘤微环境的浸润来改善肝癌患者的预后^[9]。TMEM60的异常高表达影响了巨噬细胞、Tregs等免疫细胞的分布,增加了肿瘤的异质性,促进了肿瘤对治疗的抵抗,导致患者预后不良^[26]。CD8⁺ T细胞通常被认为是抗肿瘤免疫的主要介质^[21]。CD8⁺ T细胞在活化后通常会分化为细胞毒性T细胞渗透到肿瘤核心或侵袭部位,在杀伤癌细胞中起重要作用。作为天然免疫效应细胞,激活的pDCs和NK细胞都被证明可以阻止肝癌细胞的生长^[27]。本研究中采用

双标记免疫荧光法验证肝癌组织中TMEM64的表达与CD8⁺ T细胞浸润关系,发现TMEM64高表达的肝癌组织中CD8⁺ T细胞肿瘤浸润水平显著降低。流式细胞实验表明,将转染后的Huh7细胞与活化的PBMC共培养,过表达TMEM64组的肝癌细胞中浸润的CD8⁺ T细胞比例减少。这些结果表明, TMEM64的过度表达可能通过调节浸润性T细胞的水平来影响肝癌的进展和预后。

Sébastien等^[28]阐述TMEM家族的蛋白是癌细胞传播的潜在贡献者,强调了TMEMs在肿瘤细胞生物学中的影响。Shen等^[29]发现,敲低TMEM45B通过JAK2/STAT3途径抑制胃癌细胞的增殖,迁移和侵袭。Zhang等^[30]发现, TMEM116可通过PDK1/AKT/FOXO3A信号通路促进肺癌细胞的增殖和肿瘤的转移。Chen等^[31]发现, TMEM196通过Wnt/β-catenin信号通路抑制肿瘤的转移和进展。TMEMs已被证实参与多种调控肿瘤转移相关的通路,而TMEM64在肝癌中的潜在机制暂无相关研究,针对TMEM64可能参与调控肝癌转移和复发的信号通路,本研究中进行KEGG和GSEA富集分析发现高TMEM64表达组中Wnt/β-catenin、JAK/STAT3、KRAS和P53信号通路被显著富集,这些结果我

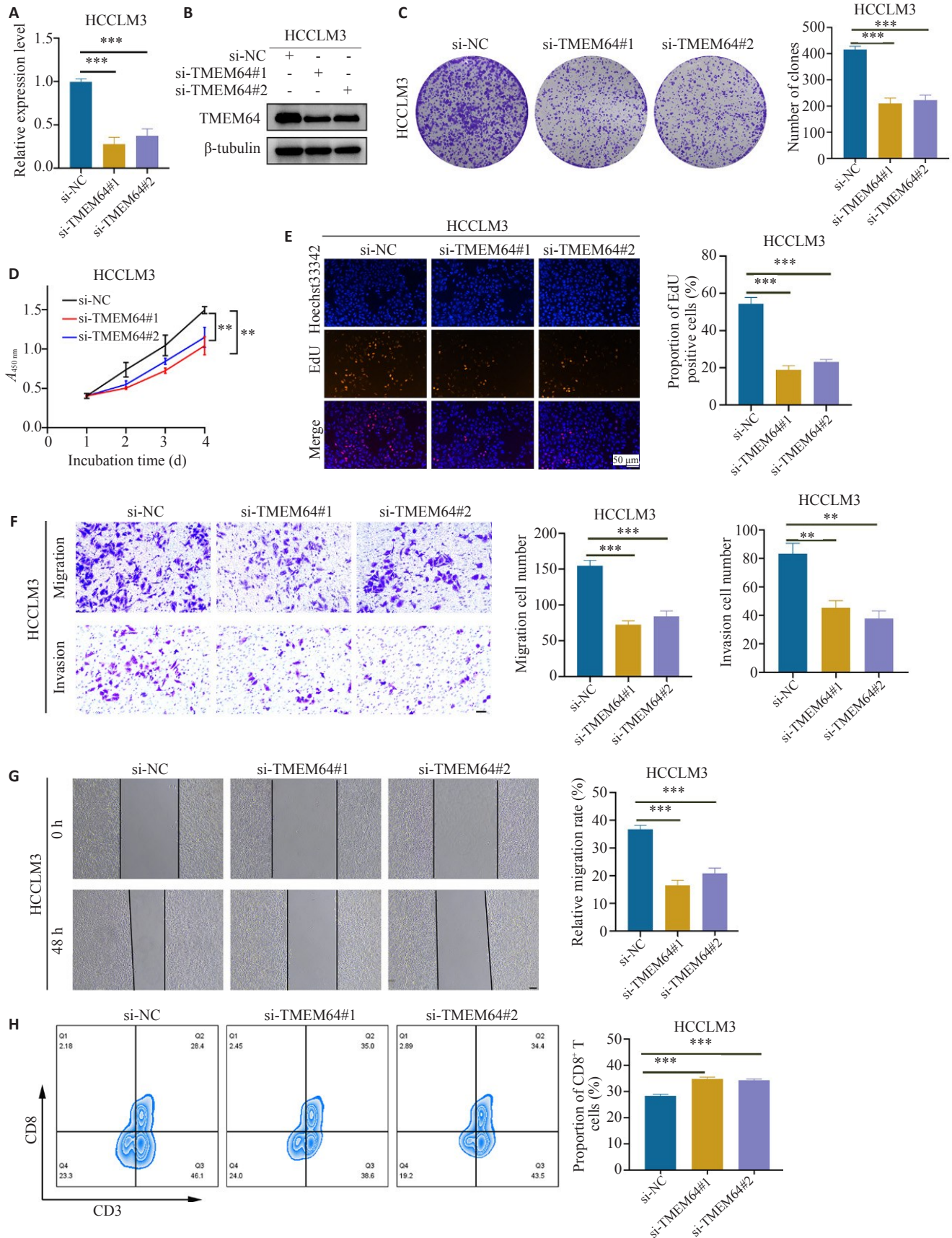


图7 敲低TMEM64能抑制肝癌细胞的增殖和侵袭

Fig.7 TMEM64 knockdown inhibits proliferation and invasion of HCC cells. **A, B**: RT-qPCR and Western blotting for detecting TMEM64 expression levels in HCCLM3 cells transfected with si-TMEM64#1 and si-TMEM64#2. **C, D**: Colony formation assay and CCK-8 assay for assessing the effect of TMEM64 knockdown on HCCLM3 cell proliferation. **E**: EdU assay for assessing the effect of TMEM64 knockdown on proliferation of HCCLM3 cells (×200). **F, G**: Migration and invasion of HCCLM3 cells with TMEM64 knockdown assessed by Transwell assay and wound healing assay (×200). **H**: Flow cytometry for detecting the proportion of infiltrated CD8⁺T cells in PBMC co-cultured with transfected HCCLM3 cells. ***P*<0.01, ****P*<0.001.

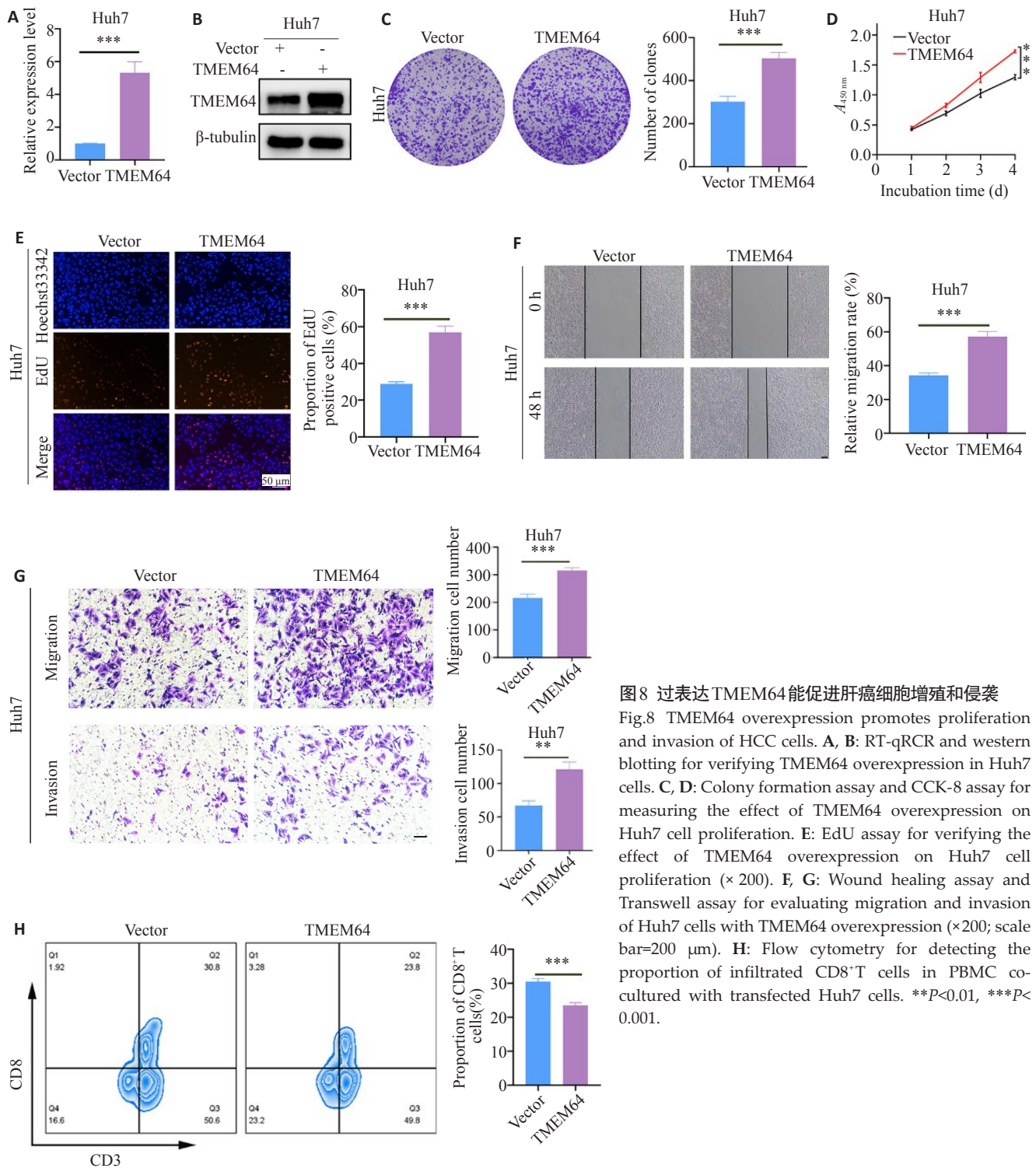


图8 过表达TMEM64能促进肝癌细胞增殖和侵袭

Fig.8 TMEM64 overexpression promotes proliferation and invasion of HCC cells. **A, B**: RT-qPCR and western blotting for verifying TMEM64 overexpression in Huh7 cells. **C, D**: Colony formation assay and CCK-8 assay for measuring the effect of TMEM64 overexpression on Huh7 cell proliferation. **E**: EdU assay for verifying the effect of TMEM64 overexpression on Huh7 cell proliferation ($\times 200$). **F, G**: Wound healing assay and Transwell assay for evaluating migration and invasion of Huh7 cells with TMEM64 overexpression ($\times 200$; scale bar=200 μ m). **H**: Flow cytometry for detecting the proportion of infiltrated CD8⁺T cells in PBMC co-cultured with transfected Huh7 cells. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

们将在后续研究中进行进一步实验验证。为了进一步探究TMEM64在肝癌细胞中是否具有生物学功能,本研究首次从细胞学水平探究TMEM64对肝癌细胞的生物学特性的影响,发现敲低TMEM64能明显抑制HCCLM3细胞的增殖和侵袭;而过表达TMEM64可促进Huh7细胞的增殖和侵袭。本研究通过生物信息学分析和体外实验对TMEM64在肝癌的表达水平、预后及生物学功能进行研究,在后续研究中我们将深入探索其调控肝癌进展的分子机制。

综上所述,本研究发现TMEM64在肝癌组织和细胞系中表达升高,且其高表达水平与患者不良预后相关。TMEM64能够促进肝癌细胞的增殖和侵袭,可能参与调控肝癌的恶性进展,有望成为肝癌诊断和预后的分子标志物和潜在的治疗靶点。

参考文献:

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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): 209-49.
- [2] Duran SR, Jaquiss RDB. Hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(1): e2.
- [3] Zheng R, Zhang S, Zeng H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. *J Natl Cancer Cent*, 2022, 2(1): 1-9.
- [4] Ayuso C, Rimola J, Vilana R, et al. Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma (HCC): current guidelines [J]. *Eur J Radiol*, 2018, 101: 72-81.
- [5] Kanwal F, Singal AG. Surveillance for hepatocellular carcinoma: current best practice and future direction [J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(1): 54-64.
- [6] Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7: 6.
- [7] Schmit K, Michiels C. TMEM proteins in cancer: a review [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1345.
- [8] Zhang TM, Liao L, Yang SY, et al. TOLLIP-mediated autophagic degradation pathway links the VCP-TMEM63A-DERL1 signaling axis to triple-negative breast cancer progression [J]. *Autophagy*, 2023, 19(3): 805-21.
- [9] Rao J, Wu X, Zhou X, et al. TMEM205 is an independent prognostic factor and is associated with immune cell infiltrates in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 575776.
- [10] Ye Z, Xia Y, Li L, et al. Effect of transmembrane protein 100 on prostate cancer progression by regulating SCNN1D through the FAK/PI3K/AKT pathway [J]. *Transl Oncol*, 2023, 27: 101578.
- [11] Shiraishi T, Ikeda K, Tsukada Y, et al. High expression of TMEM180, a novel tumour marker, is associated with poor survival in stage III colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 302.
- [12] Du Y, Zeng X, Yu W, et al. A transmembrane protein family gene signature for overall survival prediction in osteosarcoma [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 937300.
- [13] Koteluk O, Bielicka A, Lemańska Z, et al. The landscape of transmembrane protein family members in head and neck cancers: their biological role and diagnostic utility [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(19): 4737.
- [14] Sakamoto S, Inoue H, Kohda Y, et al. Interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1) promotes distant metastasis of small cell lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14): 4934.
- [15] Zhang L, Liu SY, Yang X, et al. TMEM206 is a potential prognostic marker of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(5): 1.
- [16] Duan J, Qian Y, Fu X, et al. TMEM106C contributes to the malignant characteristics and poor prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Aging*, 2021, 13(4): 5585-606.
- [17] Moon Y, Lim W, Jeong B. Transmembrane protein 64 modulates prostate tumor progression by regulating Wnt3a secretion [J]. *Oncol Lett*, 2019: 283-90.
- [18] 李伟栋, 杨丽, 邹兴文, 等. 基于列线图的肿瘤风险预测及其效果评价 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2019, 32(4): 305-10.
- [19] Yuan K, Chen J, Xu P, et al. A nomogram for predicting stroke recurrence among young adults [J]. *Stroke*, 2020, 51(6): 1865-7.
- [20] Liu Q, Li J, Liu F, et al. A radiomics nomogram for the prediction of overall survival in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy [J]. *Cancer Imaging*, 2020, 20(1): 82.
- [21] Llovet JM, Castet F, Heikenwalder M, et al. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(3): 151-72.
- [22] Wouters MCA, Nelson BH. Prognostic significance of tumor-infiltrating B cells and plasma cells in human cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(24): 6125-35.
- [23] Itoh S, Yoshizumi T, Yugawa K, et al. Impact of immune response on outcomes in hepatocellular carcinoma: association with vascular formation [J]. *Hepatology*, 2020, 72(6): 1987-99.
- [24] Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(8): 807-21.
- [25] Bagchi S, Yuan R, Engleman EG. Immune checkpoint inhibitors for the treatment of cancer: clinical impact and mechanisms of response and resistance [J]. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2021, 16: 223-49.
- [26] Yang F, Zhang X, Wang X, et al. The new oncogene transmembrane protein 60 is a potential therapeutic target in glioma [J]. *Front Genet*, 2023, 13: 1029270.
- [27] Zahran AM, Abdel-Meguid MM, Ashmawy AM, et al. Frequency and implications of natural killer and natural killer T cells in hepatocellular carcinoma [J]. *Egypt J Immunol*, 2018, 25(2): 45-52.
- [28] Marx S, Dal Maso T, Chen JW, et al. Transmembrane (TMEM) protein family members: poorly characterized even if essential for the metastatic process [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 60: 96-106.
- [29] Shen K, Yu W, Yu Y, et al. Knockdown of TMEM45B inhibits cell proliferation and invasion in gastric cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 576-81.
- [30] Zhang S, Dai H, Li W, et al. TMEM116 is required for lung cancer cell motility and metastasis through PDK1 signaling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(12): 1086.
- [31] Chen J, Wang D, Chen H, et al. TMEM196 inhibits lung cancer metastasis by regulating the Wnt/β-catenin signaling pathway [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149(2): 653-67.

(编辑:余诗诗)