

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.11.010

· 基础研究 ·

CXCL5/CXCR2/VEGF 通路在 HBV 相关肝癌血管生成中的作用及其机制

冉小柯¹, 刘旭东², 谭伟强¹, 庞华珍², 袁媛¹, 姜鑫凤¹, 吴铁雄¹, 潘兆权¹(广西中医药大学 研究生院, 广西 南宁 530000; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院 肝病科, 广西 南宁 530000)

[摘要] **目的:**探讨 CXCL5/CXCR2/VEGF 通路在 HBV 相关肝癌血管生成过程中的作用及其机制。**方法:**收集 2022 年 10 月至 2022 年 12 月间在广西中医药大学附属瑞康医院入院的 10 例 HBV-DNA 阳性患者的外周血标本[其中 5 例肝细胞癌(HCC)和 5 例肝硬化(LC)],用高通量 RNA 测序技术检测并筛选差异表达 mRNA,用 GO 富集和 KEGG 通路分析这些差异表达基因的生物学功能和相关信号通路。常规培养 HCC 细胞 HepG2,用转染试剂将 C-X-C 基序趋化因子配体 5(CXCL5)过表达质粒和对照质粒转染至 HepG2 细胞中,分为对照组,空载组,250 ng/mL 和 520 ng/mL CXCL5 过表达质粒组。用 CCK-8 法、ELISA、血管生成实验、qPCR 法、WB 法和免疫荧光染色技术分别检测过表达 CXCL5 对 HepG2 细胞增殖能力、VEGF 分泌、成管能力、CXCL5、CXCR2、VEGF mRNA 及其蛋白表达,以及 VEGF 表达的影响。**结果:**RNA 测序结果显示,HCC 和 LC 患者外周血中 mRNA 表达存在显著差异。GO 富集分析发现,这些差异 mRNA 的相关基因主要参与细胞发育过程的调控、G 蛋白偶联受体活性、细胞外区域的组成和信号受体结合。KEGG 通路分析发现,这些差异表达基因可能参与细胞因子与受体相互作用通路、cAMP 信号通路等与癌症作用机制相关的通路、神经活性配体与受体相关作用的通路、钙相关信号通路。过表达 CXCL5 可明显促进 HepG2 细胞的增殖能力($P < 0.05$)、VEGF 的分泌($P < 0.05$)、人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的成管能力($P < 0.05$)、CXCL5、CXCR2 和 VEGF mRNA 和蛋白的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),以及增强 HepG2 细胞中 VEGF 的表达。**结论:**CXCL5 可能通过 CXCL5/CXCR2/VEGF 轴促进 HepG2 细胞的增殖和 HUVEC 的成管能力。

[关键词] 肝细胞癌;肝硬化;乙型肝炎病毒;血管生成;HepG2 细胞;人脐静脉内皮细胞;C-X-C 基序趋化因子配体-5

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)11-1123-08

Role and mechanism of CXCL5/CXCR2/VEGF pathway in angiogenesis of HBV-related hepatocellular carcinoma

RAN Xiaoke¹, LIU Xudong², TAN Weiqiang¹, PANG Huazhen², YUAN Yuan¹, LOU Xinfeng¹, WU Tiexiong¹, PAN Zhaoquan¹
(1. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi, China; 2. Department of Hepatology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the role and mechanism of CXC chemokine ligand 5/CXC receptor 2/vascular endothelial growth factor (CXCL5/CXCR2/VEGF) pathway in the angiogenesis of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** Peripheral blood samples were collected from 10 HBV-DNA positive patients admitted to Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine between October 2022 and December 2022, including 5 cases of HCC and 5 cases of liver cirrhosis (LC). High-throughput RNA sequencing was used to detect and screen differentially expressed mRNAs. GO enrichment and KEGG pathway analysis were conducted to explore the biological functions and related signaling pathways of these differentially expressed genes. HCC HepG2 cells were conventionally cultured, and CXCL5 overexpression plasmid and control plasmid were transfected into HepG2 cells using transfection reagents. The cells were divided into a control group, an empty load group, and two CXCL5 overexpression groups (250 ng/mL and 520 ng/mL). The effects of CXCL5 overexpression on HepG2 cell proliferation (CCK-8 method), VEGF secretion (ELISA), tube formation ability (angiogenesis assay), mRNA and protein expression of CXCL5, CXCR2, VEGF (qPCR, Western blot), as well as VEGF expression immunofluorescence intensity were analyzed. **Results:** RNA sequencing results showed significant differences in mRNA expression in peripheral blood between HCC and LC patients. GO enrichment analysis revealed that these differentially expressed genes were mainly involved in cell development regulation, G protein-coupled receptor activity, extracellular region components, and receptor-ligand binding. KEGG pathway analysis revealed that these

[基金项目] 广西岐黄学者建设项目;广西中医药大学岐黄工程高层次人才培养项目(No.2021007);广西中医药大学 2023 年研究生教育创新计划项目(No.YCBXJ2023032)

[作者简介] 冉小柯(1997—),女,博士生,主要从事中西医结合肝脏疾病防治的研究,E-mail:229568477@qq.com

[通信作者] 刘旭东,E-mail:lxdlhx@163.com

differentially expressed genes might participate in pathways related to the cytokine-receptor interactions, cAMP signaling and other cancer related pathways, neuroactive ligand-receptor interactions, and calcium signaling pathways. Overexpression of CXCL5 significantly promoted HepG2 cell proliferation ($P < 0.05$), VEGF secretion ($P < 0.05$), tube formation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) ($P < 0.05$), and mRNA and protein expression of CXCL5, CXCR2, and VEGF ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), as well as enhanced the immunofluorescence intensity of VEGF in HepG2 cells. **Conclusion:** CXCL5 may promote the proliferation of HepG2 cells and HUVEC angiogenesis through the CXCL5/CXCR2/VEGF axis.

[Key words] liver cancer; cirrhosis; hepatitis B virus (HBV); angiogenesis; HepG2 cells; human umbilical vein endothelial cell; C-X-C motif chemokine ligand-5 (CXCL5)

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(11): 1123-1130. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.11.010]

肝癌在中国新发恶性肿瘤中居于第4位,病死率居第2位,其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占80%左右^[1],大多数HCC患者是持续感染乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)导致发病,慢性乙型肝炎易演变成肝硬化(liver cirrhosis, LC),若不及时进行治疗则有很大概率进展到肝癌^[2-3]。肿瘤血管生成是一系列高度协调的分子和细胞事件的结果,血管内皮生长因子(VEGF)是血管生成级联的主开关,控制细胞的迁移、增殖和分化形成新生毛细血管^[4-5]。有研究^[6-7]发现,HBV的感染和复制与微血管侵犯有一定相关性,HBV病毒能够促进相关蛋白的表达从而促进血管生成,而且HBV感染也可以减少免疫细胞对肿瘤细胞的攻击,由此引起血管转移,因此HBV感染的肝癌患者比其他病因有关的肝癌患者更易受微血管侵犯,VEGF表达也更高。CXC趋化因子配体-5(CXC chemokine ligand-5, CXCL5)作为趋化因子家族的一员能够通过与其受体2(CXC receptor 2, CXCR2)结合产生生物学效应,共同促进肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭,严重影响恶性肿瘤患者的预后^[8]。研究^[9]表明,临床肝癌组织中CXCL5、CXCR2的高表达与肝癌组织内微血管形成密切相关,两者都高表达的患者复发率与转移率均较高, CXCL5和CXCR2的高表达可能促进了肝癌的发生发展并且促进肝癌内微血管生成。虽然CXCL5与异常血管生成高度相关,且已有研究^[10-11]证实,趋化因子能够直接靶向肿瘤微环境中的血管内皮细胞参与肿瘤血管生成,是影响肿瘤发生发展的关键因素,但CXCL5是否通过与CXCR2受体结合调控VEGF的表达进而影响肿瘤血管生成尚未证实。因此,本研究旨在探讨CXCL5/CXCR2/VEGF轴在HBV相关的肝癌血管生成中的作用机制,为肝癌的诊断与治疗提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收集2022年10月至2022年12月期间在广西中

医药大学附属瑞康医院入院的患者10例,HBV-DNA检测均为阳性,其中HCC患者5例,平均年龄为 52.00 ± 4.00 岁,患者均依据《原发性肝癌诊疗指南(2022年版)》^[12]确诊为HCC;LC患者5例,平均年龄为 55.60 ± 12.38 岁,患者均依据《肝硬化诊治指南》^[13]确诊为LC。收集各位患者的外周血5 mL。本研究经广西中医药大学附属瑞康医院伦理委员会批准(伦理批号:KY2022-26),所有患者均充分知情并签署知情同意书。

1.2 细胞、主要试剂和仪器

人肝癌细胞HepG2购自武汉普诺赛生命科技有限公司,人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自上海葵赛生物科技有限公司。MEM培养基(货号:PM150410)购自武汉普诺赛生命科技有限公司,内皮细胞专用培养基(货号: Pri-8003)购自上海葵赛生物科技有限公司,胎牛血清(货号:FB318)购自澳大利亚Sigma公司, Lipofectamine™ 3000(货号:L3000-015)购自美国Invitrogen公司, VEGF-ELISA检测试剂盒(货号:MM-51129H1)购自江苏酶免实业有限公司,定量PCR试剂盒(货号:MQ00501S)购自莫纳生物科技有限公司,抗CXCR2抗体(货号:20634-1-AP)购自武汉博士德生物工程有限公司,抗CXCL5和VEGF抗体(货号:ab305100、ab214424)均购自英国Abcam生物科技有限公司,基质胶(货号:C0371)购自上海碧云天生物技术有限公司, CXCL5过表达和对照质粒均由生工生物上海股份有限公司构建, PCR引物合成由武汉金开瑞生物工程有限公司合成, 荧光倒置显微镜购自德国Leica公司, MCO-170AICUVDL-PC型CO₂培养箱购自日本PHCbi公司,酶标仪购自美国Bio-ek公司,实时荧光定量PCR仪购自罗氏诊断产品上海有限公司,全自动化学发光凝胶成像系统购自美国BIO-RAD公司。

1.3 RNA测序技术分析HCC和LC患者外周血中mRNA表达的差异

RNA高通量测序用于检测HCC患者与LC患者血液中的RNA,由上海云序生物科技有限公司进行测序工作。实验流程如下:使用GenSeq®rRNA

Removal Kit试剂盒去除样品中的核糖体RNA,通过GenSeq®LowInputRNA Library PrepKit试剂盒构建测序文库,对构建好的测序文库进行质控和定量,然后采用IlluminaNovaSeq6000仪器进行150 bp双端测序。mRNA使用hisat2软件(v2.0.4),将高质量测序片段比对到参考基因组上,使用HTSeq软件(v0.9.1)获得基因水平原始计数作为mRNA表达谱。

使用edgeR(v0.6.9)软件对分界点处的计数数目进行标准化并计算两组样品间的倍数变化(fold change, FC)和P值,筛选差异表达mRNA。以log(FC) ≥ 1.0, P ≤ 0.05作为差异筛选的阈值。使用R包中的函数,以标准化计数进行差异表达mRNA聚类分析。使用BED Tools软件(v2.27.1)对差异表达mRNA进行基因注释,并利用注释的差异基因进行GO(<http://www.geneontology.org>)功能分析和KEGG(<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)通路分析,GO分为生物过程、细胞组分和分子功能3个部分,使用差异表达的mRNA进行GO和KEGG分析,以注释并推测它们的功能, P ≤ 0.05的GO条目被认为具有统计学意义,KEGG信号通路以P ≤ 0.05作为显著富集的阈值。

1.4 细胞培养、转染与分组

常规培养HepG2细胞,用Lipofectamine™ 3000将CXCL5过表达质粒(250 ng/mL与520 ng/mL)和对照质粒(空载组)转染至HepG2细胞中,实验分为CXCL5(250 ng/mL)组、(520 ng/mL)组和空载组。培养48 h后,通过qPCR和WB法检测各组细胞中CXCL5的mRNA和蛋白的表达水平。

1.5 CCK8法检测各组HepG2细胞的增殖能力

将对数生长期的各组HepG2细胞以 2×10^3 个/孔接种于96孔板,每组设置3个复孔,分别在培养至24、48和72 h时,向每孔加入10 μL的CCK-8试剂,在培养箱中继续培养2 h,随后用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的光密度(D)值,以D值代表细胞的增殖能力。

1.6 血管生成实验检测各组HepG2细胞培养液对HUVEC血管形成的影响

基质胶提前放入4℃冰箱过夜缓慢融化,每孔中加入50 μL基质胶,在37℃培养箱中放置30 min固化基质胶,提前24 h加入含0.2%胎牛血清完全培养基培养

HUVEC,消化并重悬后调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,每孔加入50 μL重悬液。加入不同组别的HepG2培养液继续处理,4 h后镜下观察血管形成情况。

1.7 ELISA检测各组HepG2细胞培养液中VEGF蛋白的表达

培养各组HepG2细胞,48 h后收集各组HepG2细胞的培养液,用样本稀释液稀释各组培养液样本,加入辣根过氧化物酶标记的抗体(空白孔除外),设置梯度标准品孔,37℃处理60 min后清洗板孔,分别加入底物A与底物B,37℃避光处理15 min,加入中止液,在全波长酶标仪上检测。

1.8 免疫荧光染色法检测各组HepG2细胞中VEGF蛋白的表达

去除培养皿中的培养基,PBS洗涤3次后4%多聚甲醛固定30 min,用BSA封闭液封闭20 min后加入VEGF的一抗(1:200),37℃处理3 h,PBS洗涤3次后加入荧光二抗(1:200),室温处理1 h。PBS洗涤后用即用型DAPI染核,PBS洗涤3次后在荧光显微镜下观察、拍照。采用Image J软件分析各组细胞的荧光强度。

1.9 WB法检测各组HepG2细胞中CXCL5、CXCR2和VEGF蛋白的表达

收集各组HepG2细胞,加入裂解液和蛋白酶抑制剂,在冰上进行细胞裂解。通过BCA蛋白检测试剂盒进行蛋白浓度定量并调整各个组的蛋白浓度。将样本经SDS-PAGE分离、转膜和封闭后,加入抗CXCL5、CXCR2和VEGF抗体液(均为1:1 000稀释),4℃冰箱处理过夜,TBST洗膜后加入辣根过氧化物酶标记二抗液(1:5 000稀释)室温处理1 h,TBST洗膜后加入超敏显色液进行曝光并采图。

1.10 qPCR法检测各组HepG2细胞中CXCL5、CXCR2和VEGF mRNA的表达

用TRIzol试剂提取各组HepG2细胞中的总RNA,通过微量分光光度仪检测样本中RNA的浓度及纯度。使用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。使用定量PCR试剂盒在实时荧光定量PCR仪上进行PCR,PCR反应参数:95℃ 10min,95℃ 10 s、65℃ 30 s,共40个循环。以β-Actin为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因的相对表达量。qPCR引物序列见表1。

表1 qPCR引物序列(5'-3')

基因名称	正向	反向
CXCL5	ACAGACCACGCAAGGAGTT	TCTTCAGGGAGGCTACCAC
CXCR2	CTGCCTGTCTACTTTTCC	CAGTTTGCTGTATTGTTGC
VEGF	GAGGAGTCCAACATCACC	TGTCCTTGCTCTATCTTTCTTT
β-Actin	TAACACGACCCACGGTCC	CATACTGCTCAGGCCGGG

1.11 统计学处理

本研究的所有统计图和数据处理、分析均在 Graphpad Prism 9.0 和 SPSS 24.0 软件上进行。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析进行检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC 和 LC 组比较外周血中有 274 个 mRNA 上调和 422 个 mRNA 下调

在 5 例 HCC 和 5 例 LC 患者血液中分别检测出 15 585 和 15 970 个 mRNA, 两组间差异表达基因共 696 个, 其中 274 个上调、422 个下调。进一步根据差异性表达绘制散点图, 直观展示基因在两组中表达水平的差异(图 1), 绘制表格(表 2)展示上调与下调

基因中与疾病相关性最强的 5 个基因。

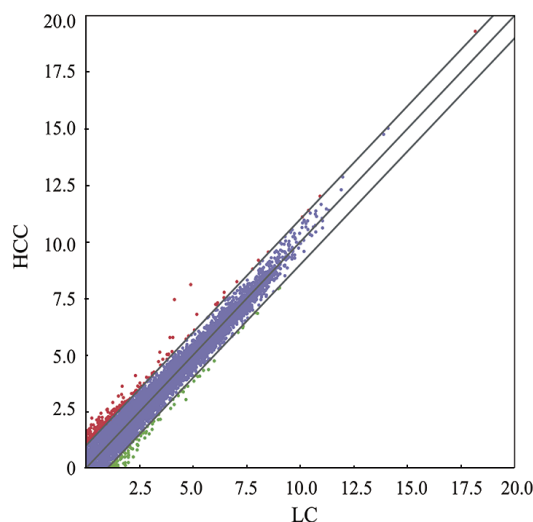


图 1 差异基因分析图

表 2 上调和下调差异表达最显著的前 5 个基因

基因编号	基因名称	P 值	log(FC)	LC vs HCC
ENSG00000163735	CXCL5	0.0025	1.9333	↑
ENSG00000157343	ARMC12	0.0033	6.0211	↑
ENSG00000179965	ZNF771	0.0037	5.5875	↑
ENSG00000118946	PCDH17	0.0040	5.5204	↑
ENSG00000002746	HECW1	0.0041	6.5388	↑
ENSG00000142512	SIGLEC10	0.0006	-1.1419	↓
ENSG00000256229	ZNF486	0.0007	-1.529	↓
ENSG00000143546	S100A8	0.0011	-1.2627	↓
ENSG00000128383	APOBEC3A	0.0016	-1.4545	↓
ENSG00000136244	IL-6	0.0018	-7.0136	↓

2.2 生物信息学分析

GO 分析结果(图 2A、B)显示, 上调的差异基因主要参与机体、细胞发育、分化等生物学过程; 参与细胞膜的主要和固有的组成成分, 以及受体活性和转运体调节等分子功能。下调的差异基因主要参与细胞通信、信号转导等生物学过程; 参与细胞外基质、细胞膜的主要和固有的组成成分, 以及 G 蛋白偶联受体活性、钙离子和 5-羟色胺结合等分子功能。KEGG 通路富集分析结果(图 3)显示, 上调的差异基因主要富集在细胞因子与受体相互作用的通路、cAMP 信号通路等与癌症作用机制相关的通路(图 3A), 下调的差异基因主要集中在神经活性配体与受体相关作用的通路、钙离子相关信号通路等(图 3B)。

2.3 过表达 CXCL5 可促进 HepG2 细胞的增殖能力

CCK-8 法检测结果(图 4)显示, 与对照和 NC 组

比较, CXCL5 过表达组(250 ng/mL 组和 520 ng/mL 组)HepG2 细胞的增殖能力明显增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。实验结果说明, 过表达 CXCL5 可明显促进 HepG2 细胞的增殖能力。

2.4 过表达 CXCL5 后 HepG2 细胞的培养液能明显促进 HUVEC 成管能力和 HepG2 细胞中 VEGF 的表达

HUVEC 血管生成实验检测结果(图 5A)显示, 与对照和 NC 组比较, CXCL5 过表达组(520 ng/mL 组)HepG2 细胞的培养液可明显促进 HUVEC 的成管能力($P < 0.05$)。ELISA 检测结果(图 5B)显示, 与对照和 NC 组比较, CXCL5 过表达组(520 ng/mL 组)HepG2 细胞的培养液可明显促进 HepG2 细胞分泌 VEGF 蛋白($P < 0.01$)。实验结果说明, 过表达 CXCL5 的 HepG2 细胞的培养液能明显提升 HUVEC 的成管能力和促进 HepG2 细胞合成分泌 VEGF 蛋白。

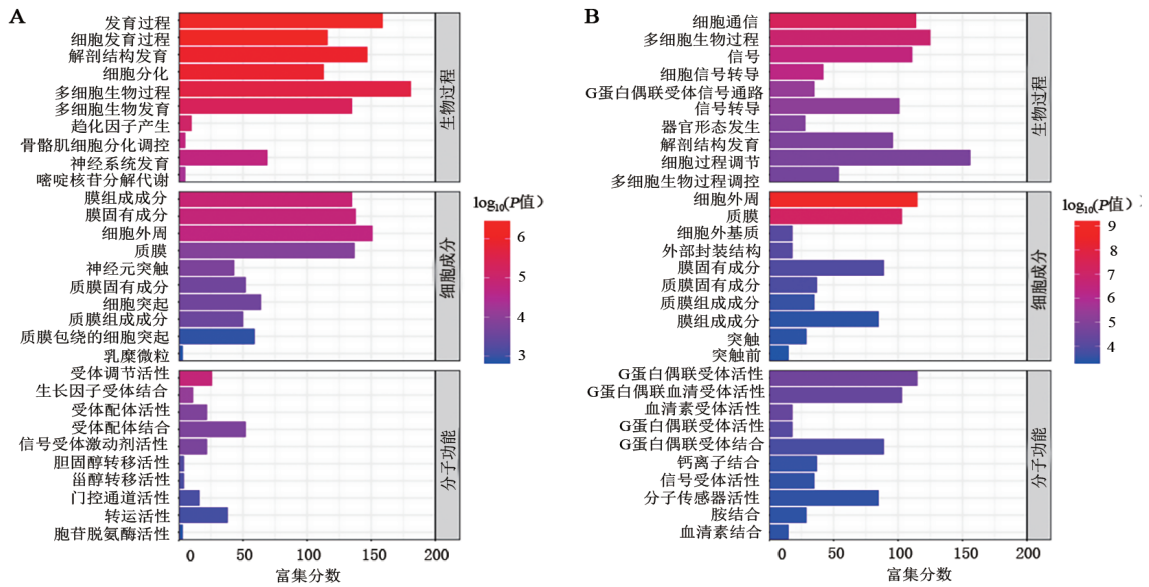


图2 上调(A)和下调(B)差异基因的GO富集分析结果

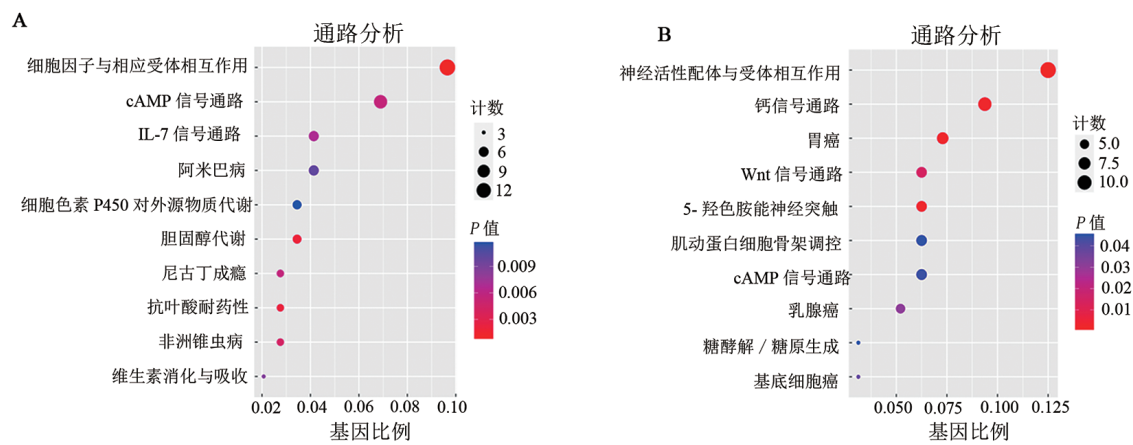
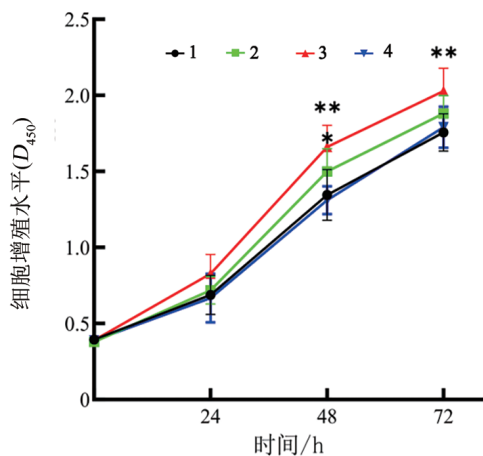


图3 上调(A)和下调(B)差异基因的KEGG通路富集分析结果



1:对照组;2:250 ng/mL过表达质粒组;3:520 ng/mL过表达质粒组;4:NC组。与对照或NC组比较,** $P < 0.01$ 。

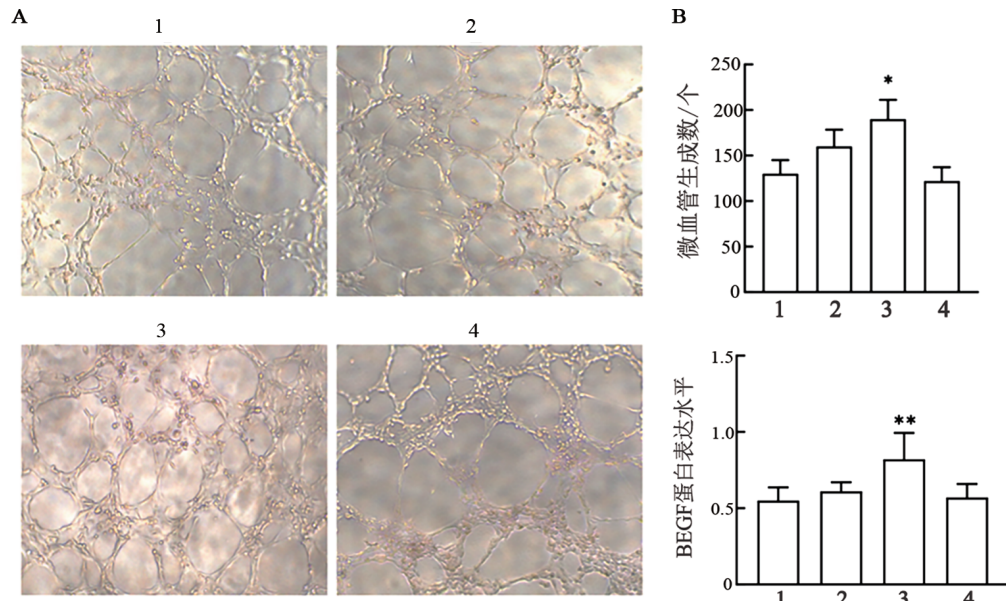
图4 CCK-8法检测各组细胞的增殖活力

2.5 过表达 CXCL5 可明显促进 HepG2 细胞中 CXCL5、CXCR2 和 VEGF mRNA 和蛋白的表达

qPCR 法检测结果(图6)显示,与对照和 NC 组比较,过表达 CXCL5 组 HepG2 细胞中 CXCL5、CXCR2 和 VEGF mRNA 的表达水平均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.6 过表达 CXCL5 可明显促进 HepG2 细胞中 CXCL5、CXCR2 和 VEGF 蛋白的表达

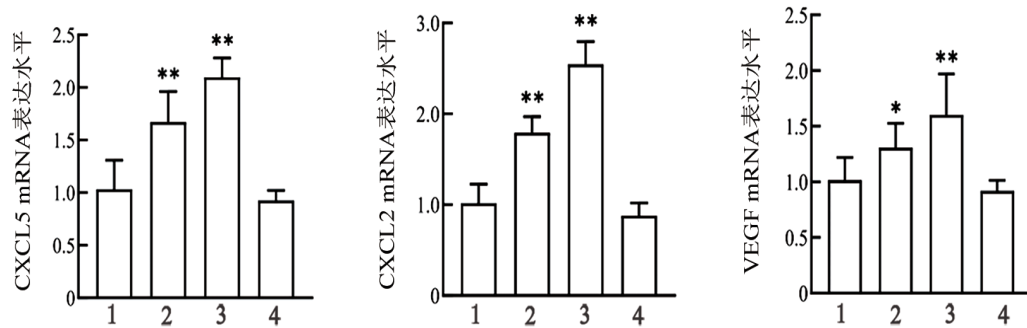
WB 法检测结果(图7A)显示,与对照和 NC 组比较, CXCL5 过表达组 HepG2 细胞中 CXCL5、CXCR2 和 VEGF 蛋白的表达明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);免疫荧光染色法检测结果(图7B)显示,过表达 CXCL5 后 HepG2 细胞中 VEGF 的表达也明显增强($P < 0.05$)。



1:对照组;2:250 ng/mL 过表达质粒组;3: 520 ng/mL 过表达质粒组;4:NC组。

A:HUVEC 血管生成实验检测微血管生成情况($\times 100$);B:酶联免疫法检测 HepG2 细胞分泌物中 VEGF 的表达情况。
与对照或 NC 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图5 HepG2 细胞相关微血管生成及分泌物中 VEGF 的表达



1:对照组;2:250 ng/mL 过表达质粒组;3:520 ng/mL 过表达质粒组;4:NC组。与对照或 NC 组比较,** $P < 0.01$ 。

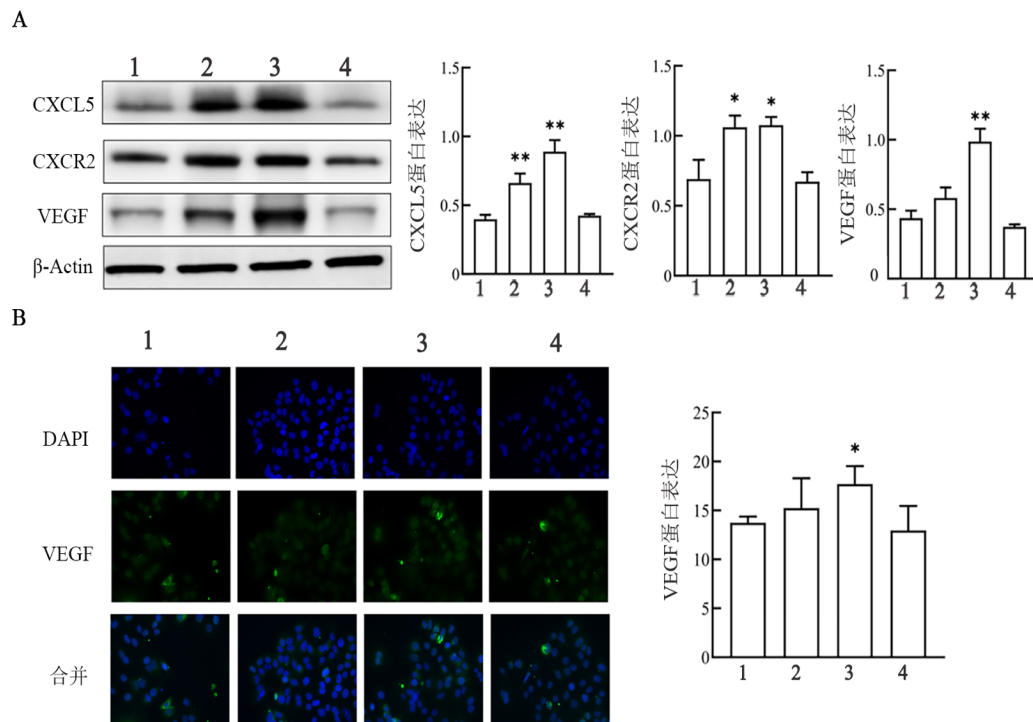
图6 CXCL5、CXCL2 和 VEGF 的 mRNA 表达情况

3 讨论

HCC 大部分是由 LC 进展而来的原发性 HCC, HBV 相关性 LC 进展至 HCC 的主要因素是 HBV 与肝癌基因组合,诱导肝癌发生^[14-15]。越来越多的证据^[16-17]表明,HBV 感染可促进肝癌的发生发展,且 HBV 相关的肝癌具有较高的侵袭性和远处转移能力。还有研究^[18-19]表明,HBV 感染相关的肝癌微血管侵犯更严重且 VEGF 表达更高。新生血管形成是癌症多阶段进程中前期的主要过程,诱导血管生成是维持肿瘤生长和转移的标志^[20-21]。研究^[22-23]表明,肝癌血管生成非常活跃,是典型的富含血管肿瘤,肿瘤血管生成不仅对肿瘤组织生长、侵袭和转移起着重

要的作用,对肿瘤患者的总体预后影响也非常大,早期发现可以预防依赖血管生成的恶性肿瘤的进展,因此探索肝癌血管生成的机制对临床预防与治疗意义重大。本研究通过高通量测序提取 HBV 相关的 LC 与 HCC 患者血液中的 mRNA,发现 HCC 患者与 LC 患者的 mRNA 表达有显著差异。GO 分析结果显示,这些差异基因主要参与调控细胞发育过程、G 蛋白偶联受体活性、细胞外区域的组成和信号受体结合。KEGG 通路分析发现,上调的差异基因主要富集在细胞因子与受体相互作用的通路、cAMP 信号通路等与癌症作用机制相关的通路,下调的差异基因主要集中在神经活性配体与受体相关作用的通路、钙相关信号通路。通过生物信息学分析发现,上调的差异基因与癌症的发展关联性更强,因此选择关联

性最强的上调差异基因 CXCL5 进一步研究, 并结合其受体 CXCR2 开展机制研究。



A: WB 法检测 HepG2 细胞 CXCL5、CXCR2 与 VEGF 的蛋白表达水平; B: 免疫荧光染色法检测 VEGF 的表达情况 ($\times 200$)。

1: 对照组; 2: 250 ng/mL 过表达质粒组; 3: 520 ng/mL 过表达质粒组; 4: NC 组。与对照或 NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 7 CXCL5、CXCR2 与 VEGF 的蛋白表达水平

在多种恶性肿瘤和新生血管性疾病中, 趋化因子是调节血管生成的关键因素之一, 趋化因子调节血管内皮细胞的增殖、迁移, 部分趋化因子与 VEGF 的相互作用影响血管生成^[24]。CXCL5 通过与 CXCR2 结合发挥促癌作用, 一项研究^[25]发现, 激活的 CXCL5/CXCR2 轴通过 c-Jun 氨基末端激酶和 p38 通路加速乳头状甲状腺癌细胞由 G1 至 S 期转变。另一项研究结果^[26]表明, 膀胱癌中内皮细胞和癌细胞之间的相互作用可增强内皮细胞的募集并通过 EGFR/NF- κ B/CXCL5/CXCR2 通路促进癌症发生发展。CHEN 等^[27]研究发现, HUVEC 中过表达 CXCL5 通过与 CXCR2 结合激活 Akt/NF- κ B/FOXD1/VEGF-A 通路而增强细胞的血管生成、增殖和迁移能力。虽然 CXCL5 能促进血管生成以及与异常血管生成高度相关, 但目前为止, CXCL5 如何促进 HCC 血管生成的分子机制并未被充分阐述。本研究发现, CXCL5 在 HCC 患者血液中的表达水平远高于在 LC 患者, 且生物信息学分析结果提示上调的差异基因主要集中在细胞因子与受体相互作用的通路, 因此提出假设, CXCL5 与受体 CXCR2 结合上调 VEGF 的表达, 促进血管生成。通过体外实验, 发现过表达 CXCL5 促进 HepG2 细胞增殖和微血管生成, 过表达 CXCL5 后 HepG2 细胞内的 CXCR2 与 VEGF 表达水平也同样升高, 同时分泌至上

清液中的 VEGF 水平也增加, 进一步证实 CXCL5/CXCR2/VEGF 可能与 HCC 的发生发展相关。

本研究结合 RNA 测序技术预测了 HBV 相关 HCC 的诊断与治疗靶点, 又通过体外实验探讨靶点的作用机制。本研究阐明了 HBV 相关 HCC 中趋化因子 CXCL5 及其受体 CXCR2 能够通过调控 VEGF 影响肝癌血管生成的作用机制, 为 HCC 诊疗提供了潜在的诊断与治疗靶点。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政司. 原发性肝癌诊疗指南(2024 年版)[J/OL]. 中华肝脏外科手术学电子杂志, 2024, 13(4): 407-449[2024-08-10]. <http://www.nhc.gov.cn/zyzygj/s7659/202404/653069140ddb4df28cdeba1ff1b86c66.shtml>.
- [2] TANG Y Q, ZHANG Y Q, HU X. Identification of potential hub genes related to diagnosis and prognosis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma via integrated bioinformatics analysis [J/OL]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 4251761[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33376723/>. DOI: 10.1155/2020/4251761.
- [3] LEVRERO M, ZUCMAN-ROSSI J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2016, 64(1 Suppl): S84-S101. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.02.021.
- [4] JIANG X J, WANG J, DENG X Y, et al. The role of microenvironment

- in tumor angiogenesis[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 204 [2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32993787/>. DOI: 10.1186/s13046-020-01709-5.
- [5] LI Z, LEI Z Q, XIA Y, *et al.* Association of preoperative antiviral treatment with incidences of microvascular invasion and early tumor recurrence in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J/OL]. *JAMA Surg*, 2018, 153(10): e182721[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6233791/>. DOI: 10.1001/jamasurg.2018.2721.
- [6] WANG Z C, DUAN Y J, ZHANG J M, *et al.* Preoperative antiviral therapy and microvascular invasion in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 883: 173382. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173382.
- [7] CHEN H, CAO D, HAN N, *et al.* Hepatitis B virus-encoded microRNA (HBV-miR-3) inhibits FIH-1 expression to promote tumor angiogenesis in HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2023, 10: 2337-2353. DOI: 10.2147/JHC.S436926.
- [8] ZHANG W, WANG H S, SUN M Y, *et al.* CXCL5/CXCR2 axis in tumor microenvironment as potential diagnostic biomarker and therapeutic target[J]. *Cancer Commun*, 2020, 40(2/3): 69-80. DOI: 10.1002/cac2.12010.
- [9] XIA J L, XU X J, HUANG P X, *et al.* The potential of CXCL5 as a target for liver cancer - what do we know so far?[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19(2): 141-146. DOI: 10.1517/14728222.2014.993317.
- [10] NAZEMI M, RAINERO E. Cross-talk between the tumor microenvironment, extracellular matrix, and cell metabolism in cancer[J/OL]. *Front Oncol*, 2020, 10: 239[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7054479/>. DOI: 10.3389/fonc.2020.00239.
- [11] ZENG Z, LAN T X, WEI Y Q, *et al.* CCL5/CCR5 axis in human diseases and related treatments[J]. *Genes Dis*, 2022, 9(1): 12-27. DOI: 10.1016/j.gendis.2021.08.004.
- [12] ZHOU J, SUN H C, WANG Z, *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of primary liver cancer (2022 edition)[J/OL]. *Liver Cancer*, 2023, 12(5): 405-444. DOI: 10.1159/000530495.
- [13] XU X Y, DING H G, LI W G, *et al.* Chinese guidelines on the management of liver cirrhosis (abbreviated version) [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(45): 7088-7103. DOI: 10.3748/wjg.v26.i45.7088.1.008.
- [14] KEW M C. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(Suppl 1): 144-152. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06546.x.
- [15] ZHANG S H, LI N Y, SHENG Y L, *et al.* Hepatitis B virus induces sorafenib resistance in liver cancer *via* upregulation of cIAP2 expression[J/OL]. *Infect Agent Cancer*, 2021, 16(1): 20[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7988944/>. DOI: 10.1186/s13027-021-00359-2.
- [16] ZHANG Y, REN H, LI J, *et al.* Elevated HMGB1 expression induced by hepatitis B virus X protein promotes epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis through STAT3/miR-34a/NF- κ B in primary liver cancer[J]. *Am J Cancer Res*. 2021, 11(2): 479-494. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33575082/>.
- [17] LIN J J, LIAN X, XUE S H, *et al.* HBV promotes the proliferation of liver cancer cells through the hsa_circ_0000847/miR-135a pathway[J/OL]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 7332337[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9499759/>. DOI: 10.1155/2022/7332337.
- [18] SOHN W, PAIK Y H, KIM J M, *et al.* HBV DNA and HBsAg levels as risk predictors of early and late recurrence after curative resection of HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(7): 2429-2435. DOI: 10.1245/s10434-014-3621-x.
- [19] WEI X B, LI N, LI S S, *et al.* Hepatitis B virus infection and active replication promote the formation of vascular invasion in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 304 [2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5414329/>. DOI: 10.1186/s12885-017-3293-6.
- [20] DUAN S L, FU W J, JIANG Y K, *et al.* Emerging role of exosome-derived non-coding RNAs in tumor-associated angiogenesis of tumor microenvironment[J/OL]. *Front Mol Biosci*, 2023, 10: 1220193[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10436220/>. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1220193.
- [21] ZHOU J B, WANG L, PENG C, *et al.* Co-targeting tumor angiogenesis and immunosuppressive tumor microenvironment: a perspective in ethnopharmacology[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 886198[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9242535/>. DOI: 10.3389/fphar.2022.886198.
- [22] LUGANO R, RAMACHANDRAN M, DIMBERG A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(9): 1745-1770. DOI: 10.1007/s00018-019-03351-7.
- [23] JIANG X, XU Y, CHEN D, *et al.* A novel angiogenesis-related prognostic signature associated with the hepatocellular carcinoma immune microenvironment and survival outcome[J]. *Int J Gen Med*, 2022, 15: 311-323. DOI: 10.1007/s00018-019-03351-7.
- [24] SALAZAR N, ZABEL B A. Support of tumor endothelial cells by chemokine receptors[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 147[2024-08-10]. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00147.
- [25] CUI D, ZHAO Y F, XU J C. Activation of CXCL5-CXCR2 axis promotes proliferation and accelerates G1 to S phase transition of papillary thyroid carcinoma cells and activates JNK and p38 pathways[J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(5): 608-616. DOI: 10.1080/15384047.2018.1539289.
- [26] HUANG Z X, ZHANG M Z, CHEN G Q, *et al.* Bladder cancer cells interact with vascular endothelial cells triggering EGFR signals to promote tumor progression[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(5): 1555-1566. DOI: 10.3892/ijo.2019.4729.
- [27] CHEN C, XU Z Q, ZONG Y P, *et al.* CXCL5 induces tumor angiogenesis *via* enhancing the expression of FOXD1 mediated by the AKT/NF- κ B pathway in colorectal cancer[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3): 178[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6385313/>. DOI: 10.1038/s41419-019-1431-6.

[收稿日期] 2024-08-11

[修回日期] 2024-10-13

[本文编辑] 向正华