[文章编号] 1671-587X(2026)04-1034-09 DOI:10.13481/j.1671-587X.20260415

KRT23对肝癌干细胞活性的促进作用及其机制

郭 丹，李雅睿，杨佳卉，张 丹，卢桂芳，任牡丹，和水祥
（西安交通大学第一附属医院消化内科，陕西 西安 710061）

[摘 要] **目的：**探讨角蛋白23（KRT23）对肝癌（HCC）干细胞活性的调控作用，并阐明其作用机制。**方法：**利用网络数据库GEPIA分析KRT23在肝癌组织和正常肝组织中的表达情况；通过Kaplan Meier Plotter生存分析比较KRT23高表达和KPT23低表达肝癌患者的生存期，评估KRT23对肝癌患者预后的影响。通过二代测序分析及京都基因与基因组百科全书（KEGG）信号通路分析发现KRT23可能参与调控的信号通路，最终选择（Wnt/β-catenin）信号通路进行机制研究。采用实时荧光定量PCR（RT-qPCR）法、Western blotting法和免疫组织化学法分别验证KRT23在肝癌细胞及肝癌组织中的表达，通过免疫荧光法明确其定位。利用已验证敲除效率的小干扰RNA（siRNA）构建KRT23低表达慢病毒载体，敲低KRT23的表达水平后，通过干细胞成球实验验证KRT23对肝癌干细胞活性的调控，并通过RT-qPCR法和Western blotting法检测相关干细胞指标的变化。采用免疫荧光法和核浆蛋白分离提取进一步验证KRT23对Wnt/β-catenin信号通路中相关指标的调节作用。**结果：**KRT23在肝癌组织中的表达水平较正常肝组织升高（$P<0.05$）。与永生化肝细胞LO2比较，肝癌细胞中KRT23表达水平升高（$P<0.05$）；与KPT23低表达肝癌患者比较，KRT23高表达肝癌患者预后较差（$P=0.038$）。二代测序和KEGG信号通路分析，KRT23可能调控干细胞活性，参与Wnt/β-catenin信号通路。免疫荧光定位，KRT23主要位于细胞胞浆。验证针对KRT23的siRNA敲除效率后，构建KRT23低表达慢病毒载体，并再次验证转染效率。KRT23表达降低后，与sh-NC组比较，sh-KRT23组干细胞球成球形成率明显降低（$P<0.01$），干细胞相关指标分化簇133（CD133）、分化簇44（CD44）、八聚体结合转录因子4（OCT4）和SRY-盒转录因子2（SOX2）表达水平降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论：**KRT23通过调控Wnt/β-catenin信号通路增强肝癌干细胞活性，其机制与Wnt/β-catenin信号通路的激活有关。

[关键词] 角蛋白23；肝肿瘤；干细胞活性；分化簇133； 八聚体结合转录因子4
[中图分类号] R735.7 [文献标志码] A

Promotion effect of KRT23 on hepatocellular carcinoma stem cell activity and its mechanism

GUO Dan, LI Yarui, YANG Jiahui, ZHANG Dan, LU Guifang, REN Mudan, HE Shuixiang
(Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

ABSTRACT **Objective:** To discuss the regulatory effect of keratin 23 (KRT23) on the stem cell activity in

[收稿日期] 2025-10-15 [录用日期] 20256-12-11
[基金项目] 陕西省科技厅自然科学基金项目（2025JC-YBQN-1207）
[作者简介] 郭 丹（1993—），女，陕西省西安市人，助理研究员，住院医师，医学博士，主要从事肝癌发生发展及其分子机制方面的研究。
[通信作者] 郭 丹，助理研究员，住院医师（E-mail：ydjagd@126.com）

©《吉林大学学报（医学版）》编辑部，开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。
© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

hepatocellular carcinoma (HCC), and to clarify its mechanism. **Methods**: The Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) database was used to analyze the expression of KRT23 in hepatocellular carcinoma tissues and normal liver tissues; Kaplan-Meier Plotter survival analysis was performed to compare the survival of hepatocellular carcinoma patients with high and low expression of KRT23, and to evaluate the impact of KRT23 on the prognosis of hepatocellular carcinoma patients. Second-generation sequencing analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway analysis were conducted to identify the signaling pathways potentially regulated by KRT23, and the Wnt/β-catenin signaling pathway was finally selected for mechanistic study. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR), Western blotting, and immunohistochemistry methods were used to verify the expression of KRT23 in HCC cells and HCC tissue, respectively, and immunofluorescence was used to clarify its subcellular localization. A lentiviral vector for KRT23 knockdown was constructed using a small interfering RNA (siRNA) with verified knockdown efficiency. After knocking down the expression level of KRT23, the stem cell sphere formation assay was performed to verify the regulatory effect of KRT23 on hepatocellular carcinoma stem cell activity, and RT-qPCR and Western blotting methods were used to detect the changes of related stem cell markers. Immunofluorescence and nuclear-cytoplasmic protein extraction were further used to verify the regulation effect of KRT23 on stem cells related indicators in the Wnt/β-catenin signaling pathway. **Results**: The expression level of KRT23 in hepatocellular carcinoma tissues was higher than that in normal liver tissue. Compared with immortalized hepatocyte LO2, the expression levels of KRT23 in hepatocellular carcinoma cells were increased ($P<0.05$); compared with the hepatocellular carcinoma patients with low expression of KR23, the hepatocellular carcinoma patients with high expression of KRT23 had a poorer prognosis ($P=0.038$). The second-generation sequencing and KEGG signaling pathway analysis results showed that KRT23 might regulate stem cell activity and participate in the Wnt/β-catenin signaling pathway. The immunofluorescence localization results showed that KRT23 was mainly located in the cytoplasm. After verification of the knockdown efficiency of siRNA targeting KRT23, a lentiviral vector for KRT23 knockdown was constructed, and the transfection efficiency was re-verified. After KRT23 expression was reduced, compared with sh-NC group, the stem cell sphere formation rate in sh-KRT23 group was significantly decreased ($P<0.01$), and the expression levels of stem cell-related markers cluster of differentiation 133 (CD133), cluster-of-differentiation 44 (CD44), pctamer-blinding transcription factor 4 (OCT4), and SRY-box transcription-factor 2 (SOX2) were also decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion**: KRT23 enhances the stem cell activity in hepatocellular carcinoma by regulating the Wnt/β-catenin signaling pathway, and the mechanism is related to the activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway.

KEYWORDS Keratin 23; Liver neoplasm; Stem cell activity; Cluster of differentiation 133; Pctamer-blinding tramscription factor 4

原发性肝癌（又称肝细胞癌）是全世界第六大常见、病死率位居第三的恶性肿瘤，其在男性肿瘤中发病率位居第四，死亡率位居第三[1-2]。近年来，虽然医疗手段不断发展进步，但原发性肝癌发病率和病死率仍居高不下[3-4]。随着诊治手段的不断提升，通过血清或组织标记物识别肿瘤同时开展靶向治疗，可帮助更多的肝癌患者早期接受相关治疗，改善生命质量[5-6]。角蛋白23（keratin 23，KRT23）作为酸性角蛋白的一员，在多种肿瘤中表达水平偏高，通过多种机制促进肿瘤进展，包括乳腺癌[7]、结肠癌[8-9]、膀胱癌[10]和胃癌[11-12]等。研究[13-18]发现：KRT23与肝脏相关疾病关系密切，KRT23在肝癌组织中表达升高，同时影响肝癌患者的预后[19]。但KRT23在肝癌进展中如何发挥调控作用，目前尚未见相关报道。本研究探讨KRT23调控肝癌进展的分子机制，为临床肝癌分子靶向诊治提供方向和思路。

1　材料与方法

1.1　生物信息学分析　利用GEPIA：Gene

Expression Profiling Interactive Analysis（cancer-pku.cn）网站[20]中肝癌组织369例和正常肝组织160例的数据，分析KRT23在肝癌组织及正常肝组织间的表达差异。将数据进行$\log_2$（TPM+1）转化，通过Kaplan-Meier plotter（kmplot.com）网站分析KRT23的表达与肝癌患者预后的关系；从转染病毒并经过嘌呤霉素筛选后的细胞中提取RNA及蛋白，验证转染效率后，委托数谱（上海）生物科技有限公司进行二代测序分析其下游差异基因的表达。并通过二代测序及京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）信号通路分析探讨KRT23可能参与调控的信号通路。

1.2 细胞和主要试剂 人肝癌细胞Hep3B和HepG2购自美国模式培养物集存库（American Type Culture Collection，ATCC），LO2、MHCC-97H、SMMC-7721、MHCC-97L和Huh7细胞购自中国科学院细胞库。细胞培养基和1%青-链霉素双抗购自美国Hyclone公司，胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购自杭州四季青生物工程材料有限公司，胰酶和转染试剂Lip2000 Transfection Reagent购自美国Geneview公司，TRIzol试剂购自北京天根生化科技有限公司，角蛋白、分化簇133（cluster of differentiation 133，CD133）、（cluster-of-differentiation 44，CD44），八聚体结合转录因子4（octamer-binding transcription foutor 4，OCT4）和SRY-盒转录因子2（SRY-box transcription-factor 2，SOX2）引物购自北京擎科生物公司，小干扰RNA（small interfering RNA，siRNA）购自上海吉玛制药技术有限公司，KRT23抗体一抗购自美国Proteintech公司，GAPDH、β-actin、Lamin B及其二抗购自壮志生物科技有限公司，干细胞相关指标一抗均购自美国CST公司，细胞核蛋白/浆蛋白抽提试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.3 实时荧光定量PCR（real-time fluorescence quantitative PCR，RT-qPCR）法检测肝癌细胞中相关基因mRNA表达水平 当细胞密度达到80%～90%时，弃去培养基，磷酸盐缓冲盐水（phosphate-buffered saline，PBS）清洗2～3次，在生物安全柜内加入TRIzol充分裂解细胞，转移至无酶EP管内加入氯仿充分混匀后静置10 min，4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心15 min，吸取上清400～600 μL转移至另一支无酶EP管中，加入200 μL异丙醇温柔混匀后静置15 min，再次4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心10 min，可见白色沉淀，弃上清，加入1 mL 75%乙醇，将沉淀轻轻吹起，4 ℃、7 500 r·min^{-1}离心10 min，轻轻弃去上清，空气干燥5 min后加入适量的RNA无酶水溶解白色沉淀。通过分光光度计检测RNA的浓度和纯度，按照RT-qPCR试剂盒操作的步骤，先将总RNA反转录成cDNA，反应条件：37 ℃、15 min，85 ℃、5 s，4 ℃；然后利用BioRad PCR仪进行RT-qPCR检测。按照两步法进行PCR扩增，反应条件：预变性（95 ℃、10 min）-变性（95 ℃、15 s）-退火/延伸（60 ℃、1 min），其中变性-退火环节进行35～40个循环。采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算肝癌细胞中目的基因mRNA表达水平，实验均重复3次。引物序列见表1。

表1 引物序列

Tab.1 Sequences of primers

Primer	Sequence
KRT23	Forward: AACTAGCACGTGGCTCCCG
	Reverse: TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCAGC-TAGTGCGGAGTT
CD133	Forward:AGTCGGAAACTGGCAGATAGC
	Reverse:GGTAGTGTTGTACTGGGCCAAT
CD44	Forward:CTGCCGCTTTGCAGGTGTA
	Reverse:CATTGTGGGCAAGGTGCTATT
OCT4	Forward: TATGCAAAGCAGAAACCCTCGTG
	Reverse: CTGGCGCCGTTACAGAACCA
SOX2	Forward:ATGACCAGCTCGCAGACCTAC
	Reverse:TTGACCACCGAACCCATGGAG
β-actin	Forward: ATCGTGCGTGACATTAAGGAGAAG
	Reverse: AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG

1.4 Western blotting法检测肝癌细胞中相关目的蛋白表达水平 当细胞密度达到80%～90%时，弃去培养基，PBS缓冲液清洗2～3次，加入适量含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的放射性免疫沉淀分析（radioimmunoprecipitation assay，RIPA）裂解液充分裂解蛋白，用细胞刮将细胞裂解液转移至EP管中，4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心15 min后将上清转移至新的EP管中，加入1/4体积的5×loading buffer混匀后置于金属浴中100 ℃变性10 min。待蛋白冷却后，加入蛋白样品和蛋白marker进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，

SDS-PAGE），结束后将蛋白转移至0.22 μm或0.45 μm孔径的聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜，5%脱脂牛奶封闭1 h，将一抗按照1∶1 000的比例稀释后，4℃孵育过夜。第2天用TBST缓冲液洗涤3次，每次10 min；然后按照1∶5 000稀释二抗，常温孵育1 h，TBST缓冲液洗涤3次后，利用增强化学发光法（enhanced chemiluminescence，ECL）显影，避光检测条带。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值，计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平＝目的蛋白条带灰度值/内参β-actin蛋白条带灰度值。所有实验均重复3次。

1.5　细胞培养和瞬时转染　肝癌Hep3B细胞和HepG2细胞用含10% FBS、1%青-链霉素双抗的杜尔贝科改良Eagel培养基（Dulbecco's modified Eagle medium，DMEM）培养基，置于含5% CO_2、恒温37 ℃的培养箱进行孵育培养。转染前24 h将细胞接种至培养板中，使其密度达到50%～70%，第2天按照Lip2000 Transfection Reagent实验说明书步骤进行转染。siRNA序列见表2。实验分为阴性对照组和KRT23干预组（siKRT23#1、siKRT23#2及siKRT23#3组）。

表2　*siRNA*序列

Tab. 2　Sequences of *siRNA*

SiRNA	Sequence
SiKRT23#1	5′-3′ GGAUGGCAGUGGAUGACUUTT
	3′-5′ AAGUCAUCCACUGCCAUCCTT
SiKRT23#2	5′-3′ GGACACUUGGUAUAAAGAATT
	3′-5′ UUCUUUAUACCAAGUGUCCTT
SiKRT23#3	5′-3′ CCAAAGAUCAAGGCCAUAATT
	3′-5′ UUAUGGCCUUGAUCUUUGGTT
SiP21	5′-3′ CCUCUGGCAUUAGAAUUAUTT
	3′-5′ AUAAUUCUAAUGCCAGAGGTT
Negative control	5′-3′ UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	3′-5′ ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.6　病毒转染　综合*siRNA*在mRNA和蛋白水平的转染效率，最终选择siKRT23#1构建慢病毒载体。Lentivirus-KRT23-RNAi（sh-KRT23）由上海吉凯基因科技有限公司构建，将siKRT23#1的序列插入到GV248病毒载体中进行构建。在转染24 h前将细胞接种至培养板中，使其密度达到约50%，随后按照说明书进行病毒转染，加入适量病毒及转染试剂。48 h后在含高糖的DMEM培养基中加入嘌呤霉素进行筛选，使其终浓度达到5 mg·L^{-1}，为后期其他功能实验做准备。实验分为对照组（sh-NC组）和sh-KRT23组。

1.7　免疫组织化学法检测肝癌组织和正常肝组织中KRT23蛋白表达水平　本研究征得患者知情同意、且经本院伦理委员会批准（审批号：LLSBPJ-2024）。从本院病理科收集肝癌组织和癌旁组织进行免疫组织化学染色。将组织切片进行脱蜡、水化后，4 ℃孵育一抗过夜；第2天孵育二抗，并用苏木精染细胞核；脱水及透明化，最后用中性树胶进行封片，利用LEICA Aperio GT450智能数字病理扫描仪进行扫片。采用Image J软件对阳性信号进行定量分析；通过阈值设定界定阳性区域后，分别测量目标区的累积光密度值（integrated optical density，IOD）及组织分布面积，以单位面积表达强度（IOD/总面积）代表KRT23蛋白表达水平。

1.8　免疫荧光法检测KRT23的细胞定位　取对数生长期的细胞，重悬后接种于含有无菌圆形玻片的6孔细胞培养板中，保证细胞贴壁后密度为50%～70%，随后用PBS缓冲液清洗2次，甲醛固定细胞15 min；孵育一抗，4 ℃过夜，注意避光；第2天用PBS缓冲液清洗3次后，室温条件下孵育二抗1 h；DAPI对细胞核进行染色后在免疫荧光显微镜下进行拍照观察。实验重复3次。

1.9　干细胞成球实验检测肝癌干细胞球形成率　取对数生长期的肝癌细胞，PBS缓冲液洗涤后用无血清培养基重悬，种植于无血清的DMEM/F12（体积比1∶1）培养基中，加入B27（1∶50稀释）、20 μg·L^{-1}碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）和20 μg·L^{-1}表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）进行常规培养。3～4 d再次添加B27、bFGF和EGF，10 d后计数肿瘤细胞球数，并拍照。干细胞球形成率＝球形结构干细胞数（长径＞30 μm）/初始种植细胞数×100%。实验重复3次。

1.10　核浆蛋白分离提取后细胞中β-catenin蛋白表达检测　当细胞密度达到80%～90%时，弃去培养基，用细胞刮刮下细胞并转移至离心管中，4 ℃、1 600 r·min^{-1}离心10 min，弃掉上清，并加入10 mL预冷的1×PBS缓冲液，1 000 r·min^{-1}离心5 min，重复清洗2次；4 ℃、3 350 r·min^{-1}离心3 min收集细胞，尽量将上清用枪头吸取干净，根据细胞

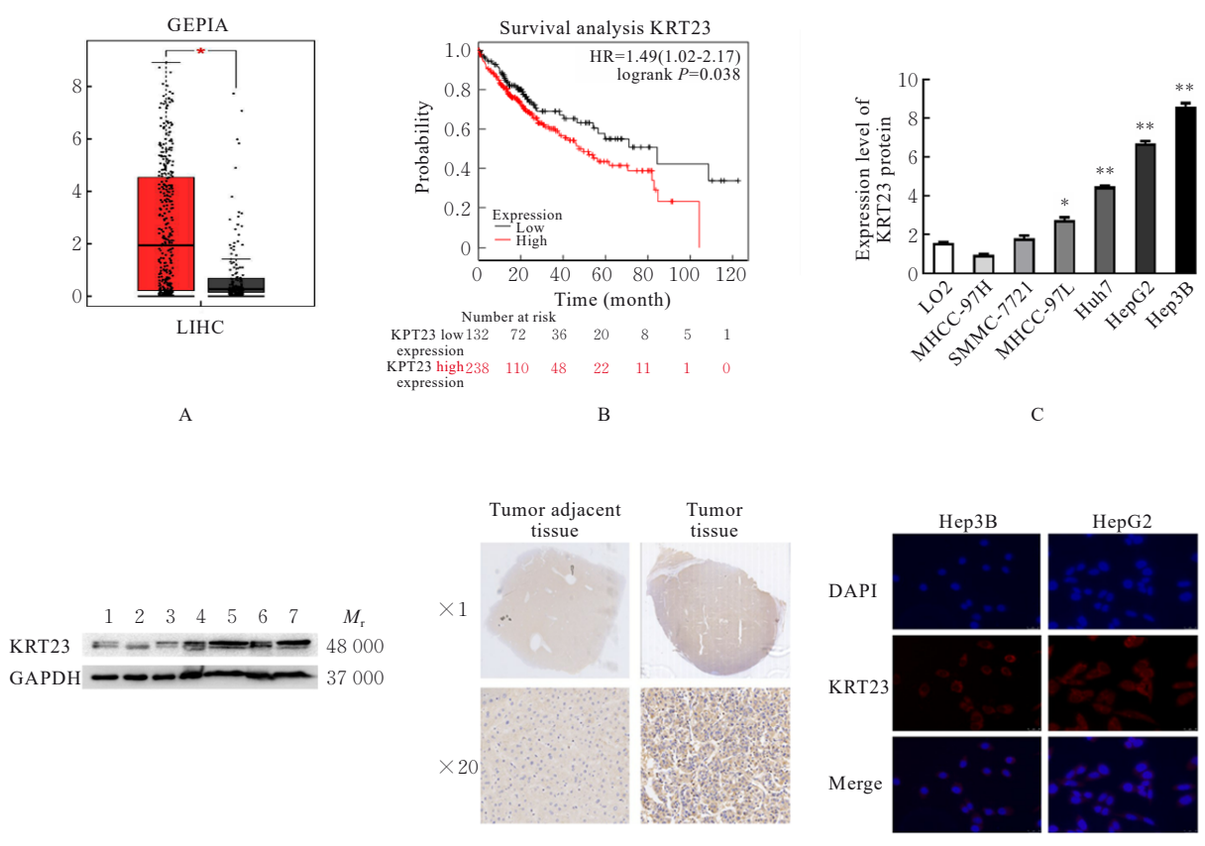
沉淀按照说明书分别加入适量提前配制好的Buffer液进行裂解，分别提取胞浆蛋白及核蛋白后保存。Western blotting法检测细胞中β-catenin蛋白表达水平。目的蛋白表达水平＝目的蛋白条带灰度值/内参β-actin（胞浆）或Lamin B（胞核）蛋白条带灰度值。所有实验均重复3次。

1.11　统计学分析　采用SPSS 23.0软件进行统计学分析。肝癌组织和正常肝组织中*KRT23* mRNA和蛋白表达水平、各细胞中目的基因mRNA表达水平、干细胞球率等符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用LSD-t检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　肝癌组织和细胞中KRT23的表达及与肝癌患者预后的关系　GEPIA网站分析发现：肝癌组织中KRT23表达水平明显高于正常肝组织（$P<0.05$）。KM-Plotter网站分析结果显示：KRT23高表达肝癌患者生存期较KRT23低表达患者缩短（$P<0.05$）。

肝癌细胞中*KRT23* mRNA和蛋白表达水平较永生化肝细胞LO2均明显升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。免疫组织化学法检测结果显示：肝癌组织中KRT23蛋白表达水平高于癌旁组织。免疫荧光法检测结果显示：KRT23主要表达在细胞浆中。见图1。



A：GEPIA analysis revealed higher expression of KRT23 in HCC samples compared with liver normal samples（$^{*}P<0.05$）；B：KM-Plotter analysis indicated that survival of HCC patients with higher expression of KRT23 was shorter（$P=0.038$）；C，D：Expression of KRT23 protein in cells（Lane 1：LO2；Lane 2：MHCC-97H；Lane 3：SMMC-7721；Lane 4：Huh7；Lane 5：MHCOC-97L；Lane 6：HepG2；Lane 7：Hep3B；E：IHC results displayed higher expression of KRT23 in tumor tissue and tumor adjacent tissue；F：KRT23 was mainly expressed in cytoplasm detected by immunofluorescence（$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$）.

图1　肝癌组织和细胞中KRT23表达情况

Fig. 1　Expressions of KRT23 in hepatocellular carcinoma tissues and cells

2.2　二代测序和GO功能富集分析及KEGG信号通路富集分析　通过火山图可以快速地查看基因在2组样品中差异表达的倍数变化（fold charge，FC）与相应统计学显著性之间的关系。应用二代高通量

测序技术对KRT23调控的靶基因进行深入挖掘，即将KRT23稳定敲低细胞和对照细胞进行转录组测序，以$\log_2$（FC）为标准获得表达上调的基因719个，表达下调的基因489个。前期通过数据分析发现KRT23可能在肝癌中发挥正性调控作用，所以重点关注下调组差异基因的KEGG信号通路富集分析，结果显示下调组差异基因与多个干细胞相关通路相关联。将与上述干细胞相关通路相关联的差异基因进行聚类分析，表明在2组间表达差异有统计学意义。使用基因集富集分析（Gene Set Enrichment Analysis，GSEA）富集分析发现KRT23可能参与调控Wnt/β-catenin信号通路。见图2。

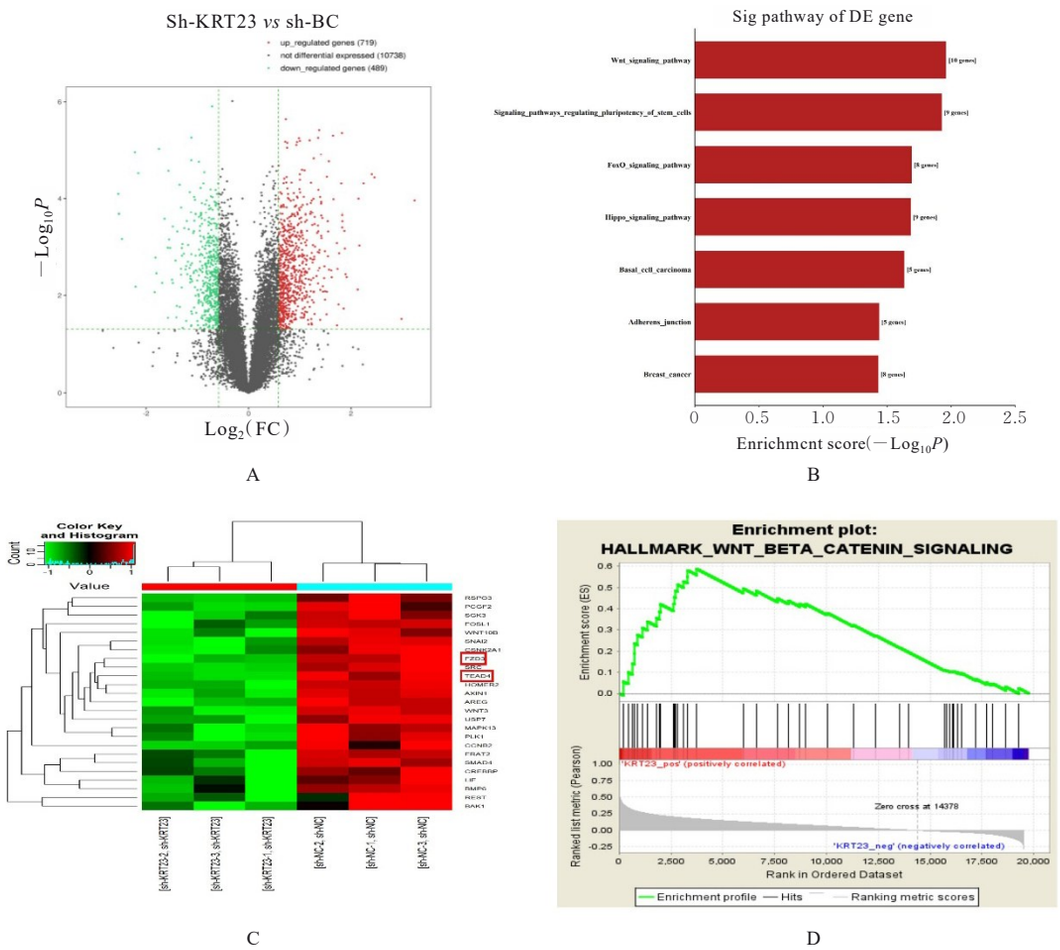
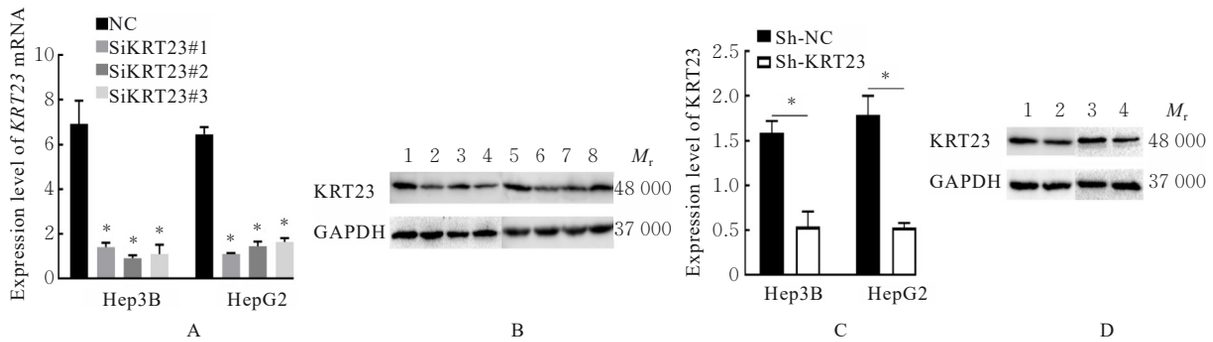


图2　二代测序结果和KEGG信号通路富集分析

Fig. 2　Second-generation sequencing results and KEGG signaling pathway enrichment analysis

2.3　针对*KRT23* mRNA的siRNA瞬时转染和病毒转染后KRT23表达水平　设计针对*KRT23* mRNA序列的3条siRNA，瞬时转染后RT-qPCR法检测，转染了siKRT23的3组细胞中*KRT23* mRNA表达水平较对照组明显降低（$P<0.01$）。Western blotting法检测结果显示：转染siKRT23的3组细胞中KRT23蛋白表达水平较对照组明显降低（$P<0.05$）。选择敲除效率最佳的siKRT23#1构建慢病毒载体。随后利用RT-qPCR法和Western blotting法进一步验证慢病毒转染效率，肝癌细胞转染KRT23低表达慢病毒后，细胞中*KRT23* mRNA和蛋白表达水平比转染sh-NC组均降低（$P<0.01$）。见图3。

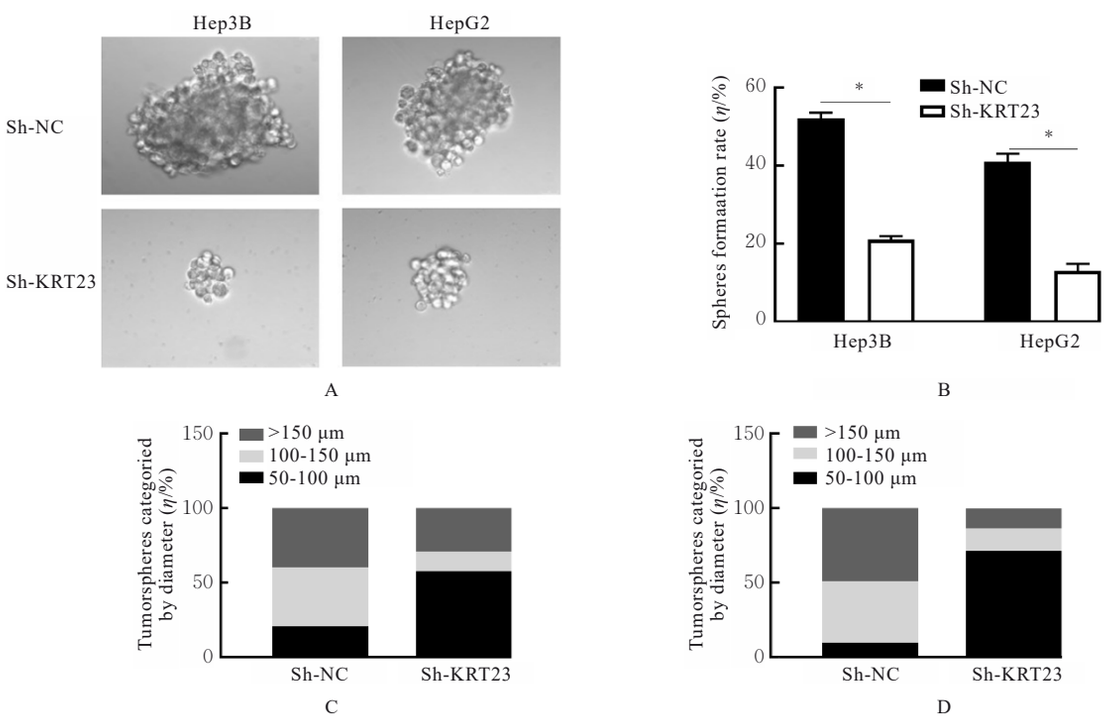
2.4　KRT23表达下调前后肝癌干细胞球形成率　敲低KRT23表达后，与sh-NC组比较，sh-KRT23组干细胞球形成率明显降低（$P<0.01$）。将成球肝细胞按照大小进行分类，sh-KRT23组成球的肝细胞体积较sh-NC组整体偏小。RT-qPCR法和Western blotting法检测KRT23表达下调后干细胞相关指标的变化结果显示：随着KRT23表达水平降低，无论是在mRNA还是蛋白水平，sh-KRT23组干细胞相关指标CD133、CD44、OCT4和SOX2表达水平均低于sh-NC组（$P<0.05$或$P<0.01$）。见图4和5。



A，B：Transient trarsfection efficiency（Lane 1—4：Hep3B cells；Lane 5—8：HepG2 cells；Lane 1，5：Negative control group；Lane 2，6：SiKRT23#1；Lane 3，7：SiKRT23#2；Lane 4，8：SiKRT23#3）；C，D：Lentinirus transfection efficiency(Lane 1，2：Hep3B cells；Lane 3，4：HepG2 cells；Lane 1，3：Sh-NC group；Lane 2，4：Sh-KRT23 group)；A，C：Histogrames；B，D：Electrophoregrams.

图3 针对KRT23的siRNA瞬时效率和病毒转染效率验证

Fig. 3 Verification of transient transfection efficiency of siRNAs and lentivirus transfection efficiency for KRT23



A：Morphology（×　）；B—D：Histograms（$^*P<0.01$）；B：Spheres formaation rate；C：Tumorspheres categoried by diamet（Hep3B cells）；D：Tumorspheres categoried by diameter（HepG2 cells）.

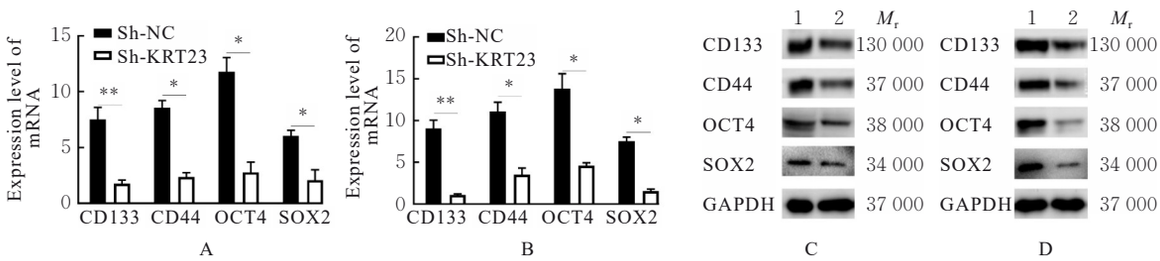
图4 KRT23表达降低前后干细胞成球情况

Fig. 4 Stem cell sphere formation in before and after decreasing expression of KRT23

2.5 KRT23表达下调前后肝癌细胞中β-catenin蛋白表达 免疫荧光实验检测发现：与sh-NC组比较，sh-KRT23组细胞核中β-catenin蛋白表达减少，而胞浆中β-catenin蛋白表达增多。再次通过核浆蛋白分离提取技术进行验证，结果提示：与sh-NC组比较，sh-KRT23组β-catenin总蛋白和细胞核中β-catenin表达降低，而胞浆中β-catenin蛋白表达升高。见图6。

3 讨 论

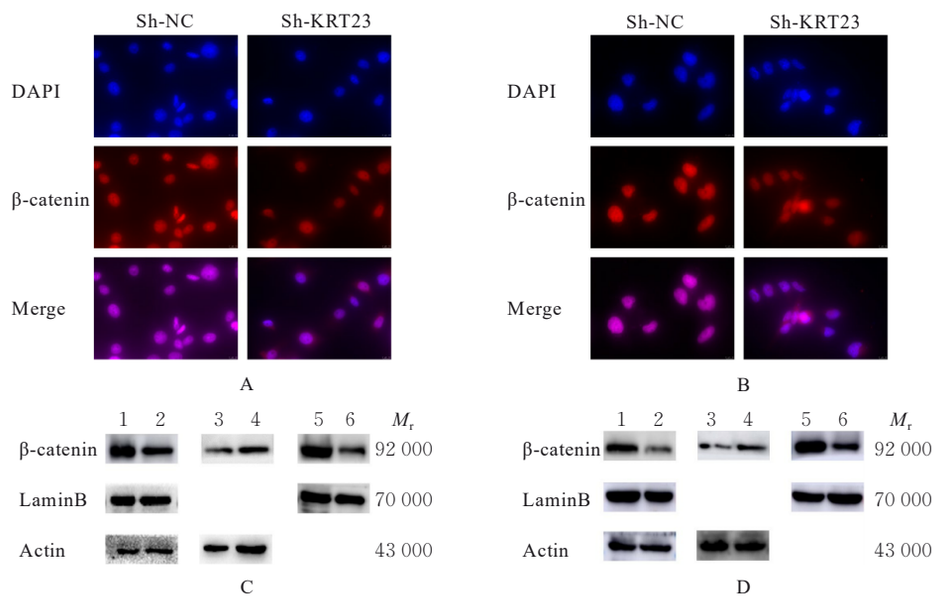
肝癌因其早期不易发现、发现时并发症多和预后差等多重因素备受研究者关注。我国作为肝癌大国，肝癌病源较多，目前针对肝癌的治疗手段多样，包括手术切除、局部射频消融、介入经肝动脉栓塞并放入局部有化疗或放疗作用载药微球、全身化疗联合免疫靶向治疗和肝移植等，但整体患者预后较差，治疗耗费偏大，治疗周期长，病情进展



A，B：Histograms（$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$）；C，D：Electrophoregrams（Lane 1：Sh-NC group；Lane 2：Sh-KRT23 group）；A，C：Hep3B cells；B，D：HepG2 cells.

图5　KRT23表达降低前后干细胞相关指标表达

Fig. 5　Expressions of stem cell-related indicators before and after decreasing of expression KRT23



A，B：Morphology of cells（Immuno fluorescence，×400）；C，D：Electrophoregrams（Lane 1，3，5：Sh-NC group；Lane 2，4，6：Sh-KRT23 group；Lane 1，2：Total；Lane 3，4：Cytoplasm；Lane 5，6：Nucleus）；A，C：Hep3B cells；B，D：HepG2 cells.

图6　KRT23表达下调前后肝癌细胞中β-catenin蛋白表达情况

Fig. 6　Expressions of β-catenin protein in hepatocellular carcinoma cells before and after decreasing expression of KRT23

快，患者及家属经济压力及精神心理压力均较大[5, 22-25]。本研究发现：KRT23在肝癌组织中高表达，同时与肝癌患者预后相关。

本课题组前期研究[26]发现：KRT23参与调控多个肿瘤的进展，本研究通过干细胞成球实验、RT-qPCR法和Western blotting法、免疫荧光及核浆蛋白分离技术揭示了KRT23可能通过参与Wnt/β-catenin信号通路从而提高肝癌干细胞活性，调控肝癌进展。本研究有望为临床肝癌分子的靶向治疗提供新的理论靶点，进一步促进临床肝癌诊疗进展。当然本研究也存在一定不足之处，本文作者拟在后期科研工作中进一步深入研究相关的分子作用机制，推动基础-临床成果转化，为临床肝癌诊治提供新的思路与方向。

利益冲突声明：

所有作者声明无利益冲突。

作者贡献声明：

郭丹参与实验设计、实验操作、实验数据整理和论文撰写，李雅睿参与实验指导及论文修改，杨佳卉负责数据整理和分析，张丹和卢桂芳参与实验设计，任牡丹参与实验设计和实验指导，和水祥参与实验指导及论文修改。

[参考文献]

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA a Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

[2] 宋慧娟，徐振华，何东宁．载脂蛋白C1表达对人肝癌

HepG2细胞增殖和凋亡的影响及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2024, 50(1): 128-135.
[3] ELSAYED M O K. Treatment of recurrent hepatocellular carcinoma: The current standards and future perspectives [J]. World J Gastrointest Oncol, 2025, 17(11): 110735.
[4] LI J T, ZHONG G C, HU F L, et al. Corrigendum to "ASPH dysregulates cell death and induces chemoresistance in hepatocellular carcinoma"[J]. Cancer Lett, 2025, 630: 217892.
[5] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7: 6.
[6] CHAN Y T, ZHANG C, WU J Y, et al. Biomarkers for diagnosis and therapeutic options in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cancer, 2024, 23: 189.
[7] JUNG J, YOO S. Identification of breast cancer metastasis markers from gene expression profiles using machine learning approaches[J]. Genes, 2023, 14(9): 1820.
[8] LIU J F, LI Y Y, LIAO B L, et al. $ZNF_3$84 mediates KRT23 to promote CRC process through the TGF-β/Smad signaling pathway [J]. Cytotechnology, 2025, 77(3): 111.
[9] ZHANG N N, ZHANG R, ZOU K, et al. Keratin 23 promotes telomerase reverse transcriptase expression and human colorectal cancer growth [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(7): e2961.
[10] CHEN D S, CAO H Y, ZHENG X, et al. Immune checkpoint gene signature assesses immune infiltration profiles in bladder cancer and identifies KRT23 as an immunotherapeutic target[J]. BMC Cancer, 2024, 24(1): 1024.
[11] XIE Y, ZHOU F H, LI X L, et al. KRT23 promotes proliferation invasion and metastasis of gastric cancer through epithelial-mesenchymal transition mediated by the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Transl Cancer Res, 2025, 14(10): 6520-6535.
[12] LI L, LIN M F, LUO J H, et al. Loss of keratin 23 enhances growth inhibitory effect of melatonin in gastric cancer[J]. Mol Med Rep, 2024, 29(2): 22.
[13] FAN S C, GAO Y, ZHAO P F, et al. Fenofibrate-promoted hepatomegaly and liver regeneration are PPARα -dependent and partially related to the YAP pathway [J]. Acta Pharm Sin B, 2024, 14(7): 2992-3008.
[14] STARMANN J, FÄLTH M, SPINDELBÖCK W, et al. Gene expression profiling unravels cancer-related hepatic molecular signatures in steatohepatitis but not in steatosis[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46584.
[15] KINAST V, LEBER S L, BROWN R J P, et al. Identification of keratin 23 as a hepatitis C virus-induced host factor in the human liver[J]. Cells, 2019, 8(6): 610.
[16] KIM D, BROCKER C N, TAKAHASHI S, et al. Keratin 23 is a peroxisome proliferator-activated receptor alpha-dependent, MYC-amplified oncogene that promotes hepatocyte proliferation [J]. Hepatology, 2019, 70(1): 154-167.
[17] GULDIKEN N, KOBAZI ENSARI G, LAHIRI P, et al. Keratin 23 is a stress-inducible marker of mouse and human ductular reaction in liver disease[J]. J Hepatol, 2016, 65(3): 552-559.
[18] HAO Y M, ZHANG T, TUERXUNMAIMAITI S, et al. *KRT23* as a potential target for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD): evidence from bioinformatics analysis, human gene polymorphism and animal experiments [J]. Int J Gen Med, 2025, 18: 2807-2821.
[19] WANG K J, XU X Q, NIE Y F, et al. Identification of tumor-associated antigens by using SEREX in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Lett, 2009, 281(2): 144-150.
[20] TANG Z F, LI C W, KANG B X, et al. GEPIA a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W98-W102.
[21] ZHAN T, RINDTORFF N, BOUTROS M. Wnt signaling in cancer[J]. Oncogene, 2017, 36(11): 1461-1473.
[22] 闻 波, 姚 康, 崔 巍. 肝癌转化治疗的研究进展[J]. 现代消化及介入诊疗, 2024, 29(8): 996-1001.
[23] 郑莹莹, 曾达武. 聚乙二醇干扰素治疗降低乙型肝炎病毒相关肝细胞癌研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2025, 45(2): 105-109.
[24] 章赟杰, 杨俊辉, 夏景林. 肝细胞癌国内外临床实践指南的比较与解读[J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(13): 2446-2456.
[25] LI Q R, DING C, CAO M M, et al. Global epidemiology of liver cancer 2022: an emphasis on geographic disparities[J]. Chin Med J, 2024, 137(19): 2334-2342.
[26] 戴大有, 张志刚, 李 慧. CHRNA5在胰腺癌发生发展过程中的作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2025, 51(6): 1518-1531.