

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.08.006

## 过氧化物酶体膜蛋白4通过细胞外信号调节激酶1/2信号通路促进肝细胞癌细胞的上皮间质转化

李巍<sup>a</sup>, 徐梓山<sup>b</sup>, 马柯<sup>b</sup>, 张静雨<sup>b</sup>, 胡晓云<sup>b</sup>, 贺国洋<sup>b,c</sup> (新乡医学院 a. 法医学院 法医物证学教研室; b. 基础医学院 病理学系; c. 第三附属医院 病理科, 河南 新乡 453003)

**[摘要]** **目的:** 探讨过氧化物酶体膜蛋白4(PXMP4)对肝细胞癌(HCC)细胞迁移和侵袭及上皮间质转化(EMT)进程的影响。**方法:** 采用生物信息学和免疫组织化学方法分析HCC组织中PXMP4的表达, 分析其与患者临床病理特征的相关性。在HCCLM3和MHCC97H细胞中干扰PXMP4, 在Huh7和MHCC97L细胞中过表达PXMP4, 利用WB和qPCR法验证干扰/过表达效率。利用CCK-8、划痕愈合实验和Transwell侵袭实验检测干扰/过表达PXMP4对HCC细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响, 采用WB法检测干扰/过表达PXMP4或0、5、10和20 μmol/L U0126处理对HCC细胞中N-cadherin、E-cadherin、vimentin、细胞外信号调节激酶(ERK)、p-ERK表达的影响。**结果:** 生物信息学和免疫组织化学分析显示, HCC组织中PXMP4呈高表达( $P<0.05$ )。临床病理分析发现, PXMP4的表达与肿瘤分化程度有关联( $P<0.05$ )。在HCC细胞中, 干扰PXMP4后抑制细胞增殖、侵袭和EMT进程( $P<0.05$ ); 反之, 过表达PXMP4后促进HCC细胞增殖、侵袭及EMT进程( $P<0.05$ )。此外, PXMP4通过激活ERK1/2信号通路促进HCC细胞EMT进程, U0126处理同样能够抑制HCC细胞EMT进程。**结论:** PXMP4在HCC组织中呈高表达且与HCC细胞分化有关联, PXMP4通过激活ERK1/2信号通路促进HCC细胞EMT进程。

**[关键词]** 肝细胞癌; 过氧化物酶体膜蛋白4; 细胞外信号调节激酶; 迁移; 侵袭; 上皮间质转化

**[中图分类号]** R735.7; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)08-0786-10

## Peroxisomal membrane protein 4 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells through the ERK1/2 signaling pathway

LI Wei<sup>a</sup>, XU Zishan<sup>b</sup>, MA Ke<sup>b</sup>, ZHANG Jingyu<sup>b</sup>, HU Xiaoyun<sup>a</sup>, HE Guoyang<sup>b,c</sup> (a. Department of Forensic Genetics, School of Forensic Medicine, b. Department of Pathology, School of Basic Medicine; c. Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the impact of peroxisomal membrane protein 4 (PXMP4) on the migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods:** A total of 38 pairs of HCC and paracancerous tissue samples were collected from the Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College from January 2018 to December 2022. Bioinformatics and immunohistochemistry were used to analyze PXMP4 expression in HCC tissues and its correlation with clinicopathological features of HCC patients. PXMP4 was silenced in HCCLM3 and MHCC97H cells and overexpressed in Huh7 and MHCC97L cells. The silencing/overexpression efficiency was verified by WB assay and qPCR. CCK-8 assay, wound healing assay, and Transwell invasion assay were used to detect the effects of PXMP4 interference or overexpression on the proliferation, migration, and invasion abilities of HCC cells. WB assay was used to detect the protein expression of N-cadherin, E-cadherin, vimentin, extracellular signal-regulated kinase (ERK), and p-ERK in HCC cells with PXMP4 interference/overexpression or 0, 5, 10, and 20 μmol/L U0126 treatment. **Results:** Bioinformatics and immunohistochemistry showed that PXMP4 was highly expressed in HCC tissues ( $P<0.05$ ). Clinicopathological analysis revealed that PXMP4 expression was correlated with the degree of tumor differentiation ( $P<0.05$ ). In HCC cells, the silence of PXMP4 inhibited cell proliferation, invasion, and EMT process (all  $P<0.05$ ), while overexpression of PXMP4 promoted cell proliferation, invasion, and EMT (all  $P<0.05$ ). Furthermore, PXMP4 promoted EMT in HCC cells by activating the ERK1/2 signaling pathway, which was inhibited by U0126 treatment. **Conclusion:**

**[基金项目]** 河南省高等学校重点科研项目(No. 23B310002); 河南省大学生创新创业训练计划(No.202310472007)

**[作者简介]** 李巍(1979—), 女, 博士, 讲师, 主要从事肿瘤分子病理相关研究。E-mail: lwhn2008@163.com

**[通信作者]** 贺国洋, E-mail: 071014@xxmu.edu.cn

PXMP4 is highly expressed in HCC tissues and is closely related to HCC cell differentiation. PXMP4 promotes EMT in HCC cells by activating the ERK1/2 signaling pathway.

**[Key words]** hepatocellular carcinoma (HCC); peroxisomal membrane protein 4 (PXMP4); extracellular signal-regulated kinase (ERK); migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(8): 786-795. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.08.006]

在全球范围内,肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,其病死率和发病率分别位于第三位和第六位<sup>[1]</sup>。肝癌的局部复发、侵袭邻近器官和广泛的远处器官转移是患者死亡的主要原因<sup>[2]</sup>。肿瘤转移是一个复杂的生物学过程,肿瘤细胞发生上皮间质转化(EMT)被认为是肿瘤转移的第一步,随后肿瘤细胞渗入血液或淋巴循环系统,再从血管外渗至远处器官<sup>[3]</sup>。HCC发生是一个多步骤的生物学进程,有众多信号通路参与了该过程,包括WNT/ $\beta$ -catenin、RAS/RAF/MAPK、PI3K/AKT/mTOR等<sup>[4-6]</sup>,已有研究<sup>[7-8]</sup>表明,激活ERK1/2信号通路可促进肝癌进展,具体的分子机制尚不明确,进一步阐明肝癌EMT过程的分子机制,将对肝癌的干预及治疗具有重要意义。过氧化物酶体膜蛋白4(peroxisomal membrane protein 4, PXMP4)广泛存在于真核细胞中,与细胞内脂质等分子的代谢相关<sup>[9]</sup>,参与前列腺癌<sup>[10]</sup>、胃癌<sup>[11]</sup>、非小细胞肺癌(NSCLC)<sup>[12]</sup>和结直肠癌<sup>[13]</sup>的发展。PXMP4在HCC中的分子作用机制尚少见报道。本研究采用生物信息学和分子生物学方法探索PXMP4在HCC发生、发展中的作用,为开发新的HCC治疗靶点提供实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

2018年1月至2022年12月期间,收集新乡医学院第三附属医院病理科保存的38例HCC及配对癌旁组织标本(癌旁组织于癌组织2 cm以外处取材)。纳入标准:患者术前均未行放、化疗或免疫治疗,且具有手术治疗适应证,经2名病理医师确诊为HCC。本研究获得新乡医学院伦理委员会批准(XYLL-20240288),所有患者均签署知情同意书。4株HCC细胞(MHCC97L、MHCC97H、HCCLM3和Huh7)均来自中国科学院上海细胞库。

PXMP4干扰片段购自上海吉玛制药技术有限公司,蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液和SDS-PAGE凝胶试剂盒均购自上海碧云天公司,PXMP4兔抗购自美国NOVUS公司,Vimentin(鼠源)和鼠二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司,抗兔二抗购自上海泊湾生物技术有限公司,GAPDH兔抗购自南京巴傲得生物技术有限公司,ERK兔抗、p-ERK兔抗购自美国Cell Signaling Technology公司,N-cadherin兔抗、

E-cadherin兔抗购自成都正能生物公司,U0126 MAPK抑制剂购自美国MCE公司,免疫组织化学二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司,DMSO购自美国Sigma试剂公司,DMEM高糖、PBS、胰蛋白酶均购自武汉赛维尔生物科技有限公司,细胞培养器材、冻存管购自美国Thermo Fisher Scientific公司, RNA反转录试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,ECL超灵敏化学发光试剂盒、蛋白Marker均购自上海雅酶生物医药科技有限公司,TRIzol购自日本TaKaRa公司,甘氨酸、Tris-base、SDS均购自北京索莱宝科技有限公司,FBS购自美国Gibco公司,Transwell小室购自康宁生物公司。

### 1.2 生物信息学方法分析PXMP4在HCC组织中的表达

利用cBioPortal(<https://www.cbioportal.org/>)网站分析PXMP4在HCC组织中的扩增率和表达情况。打开GEPIA数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn>)网页,输入“PXMP4”,p-value选择0.05,癌症类型选肝细胞肝癌,点击分析并下载分析结果;从TCGA数据库(<https://www.cancer.gov/tcga>)中获取HCC数据集,进行PXMP4单基因差异分析,然后根据筛选标准 $|\log_{2}FC| > 1$ 、 $P < 0.05$ 进行GSEA富集分析。

### 1.3 免疫组织化学(IHC)染色法检测PXMP4在HCC组织中的表达

取HCC及癌旁组织蜡块,切片后65℃烤片2 h,依次经脱蜡、水化、SP法染色,将切片置于柠檬酸缓冲液中进行抗原修复,自然冷却,PBS洗涤3次,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浸泡10 min,PBS洗涤3次,山羊血清封闭20 min,弃血清,滴加PXMP4抗体(1:150),4℃处理过夜,PBS洗涤3次,滴加二抗(1:200),室温处理30 min,PBS洗涤3次,DAB显色,苏木精复染,常规透明脱水封固。细胞质和细胞核内呈淡黄色、棕黄色或棕褐色颗粒为PXMP4阳性细胞,应用半定量积分法进行染色细胞判读(2名病理医师分别评分)。判断标准:(1)根据阳性细胞所占百分比计分,阳性细胞数<25%为1分,25%~50%为2分,>50%为3分;(2)根据阳性细胞着色程度计分,未着色为0分,浅黄色为1分,棕黄色为2分。将两项得分相乘:0~3分为阴性(低表达),4~6分为阳性(高表达)。采用Image J软件分析IHC染色强度。

### 1.4 细胞培养、分组转染和形态观察

MHCC97L、MHCC97H、HCCLM3和Huh7细胞均用含有10%胎牛血清的DMEM完全培养液,于37℃、

5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。取对数生长期细胞接种至6孔细胞培养板,待生长至70%~80%汇合时,换成1.5 mL optim培养液,每个孔准备2个微量离心管,先在管中各加入250 μL optim,两管分别为4 μL Lipo和2 ng siRNA/质粒,NC(阴性对照)组转入阴性siRNA、MOCK(空白对照)组转入空白质粒,5 min后混合,20 min后加入6孔板。转染6~8 h后,更换为完全培养液,在转染后的36~48 h完全培养液生长期间对6孔板下的各组细胞形态进行观察并拍摄高倍镜视野下的照片,在培养36~48 h后,收集细胞。实验分组:正常对照组(NC组)、siRNA干扰组(si-PXMP4-1组、si-PXMP4-2组),空白对照组(MOCK组)和PXMP4过表达组。PXMP4表达质粒及siRNA序列见图1、表1。

### 1.5 WB法检测相关蛋白质在细胞中的表达

实验步骤参照文献[14],转染48 h后收集细胞,利用含有蛋白酶抑制剂裂解液提取总蛋白,95 °C水浴变性10 min;利用10%的SDS-PAGE分离蛋白,转

膜后用5 g/L牛奶室温封闭2 h,一抗(使用5% BSA稀释,GAPDH稀释倍数为为1:2 000,其余一抗为1:1 000稀释)4 °C处理过夜,TBST洗涤3次,用5%牛奶稀释对应抗兔/抗鼠HRP标记的二抗(1:9 000)室温反应1 h,TBST洗涤3次,ECL发光液显影。Image J软件用于分析蛋白质条带灰度值。

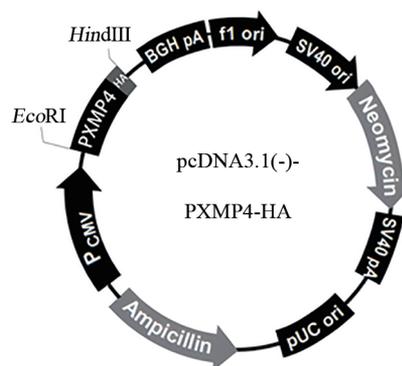


图1 PXMP4表达质粒图谱

表1 PXMP4基因siRNA干扰序列

siRNA	正向序列	反向序列
si-PXMP4-1	5'-CAGACUCCUCGUCUAUAATT-3'	5'-UUAUAGACGAGGAAGUCUGTT-3'
si-PXMP4-2	5'-GCCAGAUCAACAUGUACCUTT-3'	5'-AGGUACAUGUUGAUCUGGCTT-3'
阴性对照(NC)	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

PMXP4(NM\_007238.5, NP\_009169.3)

### 1.6 qPCR法检测PXMP4基因在细胞中的表达

用TRIzol试剂提取细胞总RNA,反转录为cDNA。qPCR引物见表2<sup>[11]</sup>,PCR步骤如下:95 °C 10 min,(90 °C 15 s,60 °C 1 min)40个循环,95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s,60 °C 15 s。PXMP4基因的相对表达量通过2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算,以ACTB基因为内参照,实验独立重复3次。

表2 qPCR引物序列

基因	引物序列
ACTB	F: CGCGAGATGACCCAGAT(5'-3')
	R: TCACCGGATCCATCACGAT(5'-3')
PXMP4	F: ATAACATCAACAGCCAGAT(5'-3')
	R: GGATGTAGCCCTTCTCTA(5'-3')

### 1.7 CCK-8法检测PXMP4表达对HCC细胞增殖的影响

胰酶消化细胞后按2×10<sup>3</sup>个/孔接种至96孔板,设置3个复孔,每孔加入10 μL CCK-8试剂、37 °C、5% CO<sub>2</sub>温箱培养2 h,使用酶标仪测量波长450 nm处的光密度(D)值,连续5d重复上述实验。以D<sub>450</sub>代表细胞增殖水平。

### 1.8 Transwell法和划痕愈合实验检测PXMP4表达

### 对HCC细胞侵袭和迁移的影响

细胞转染24 h后,进行划痕,无血清培养液培养,分别在0 h、24 h和48 h划线处拍照并分析细迁移率,重复3次。细胞迁移率=(0 h时划痕面积-24/48 h时划痕面积)/0 h时划痕面积×100%。

在孔径为8 μm的Transwell上室涂盖50 μL Matrigel,下室加入800 μL含10%胎牛血清培养液。将200 μL含有2×10<sup>5</sup>细胞的无血清培养液加入上室。温箱培养24 h后,弃上室培养液并擦除上室侧的细胞,多聚甲醛固定侵袭细胞并用结晶紫染色,显微镜下观察拍照并计数。

### 1.9 MEK1/2抑制剂U0126处理细胞

用DMSO将U0126粉末稀释至35 mmol/L,并配置成不同药物浓度但同等DMSO体积的培养液,选择对数生长期的细胞接种到含完全培养液的6孔板中。当每孔细胞生长到约70%汇合时,分别更换U0126浓度为0、5、10和20 μmol/L的完全培养液,48 h后收集细胞用于WB法检测。

### 1.10 统计学处理

所有数据采用GraphPad Prism 10.1.0软件进行绘图和统计学分析,双样本采用t检验,多组样本采

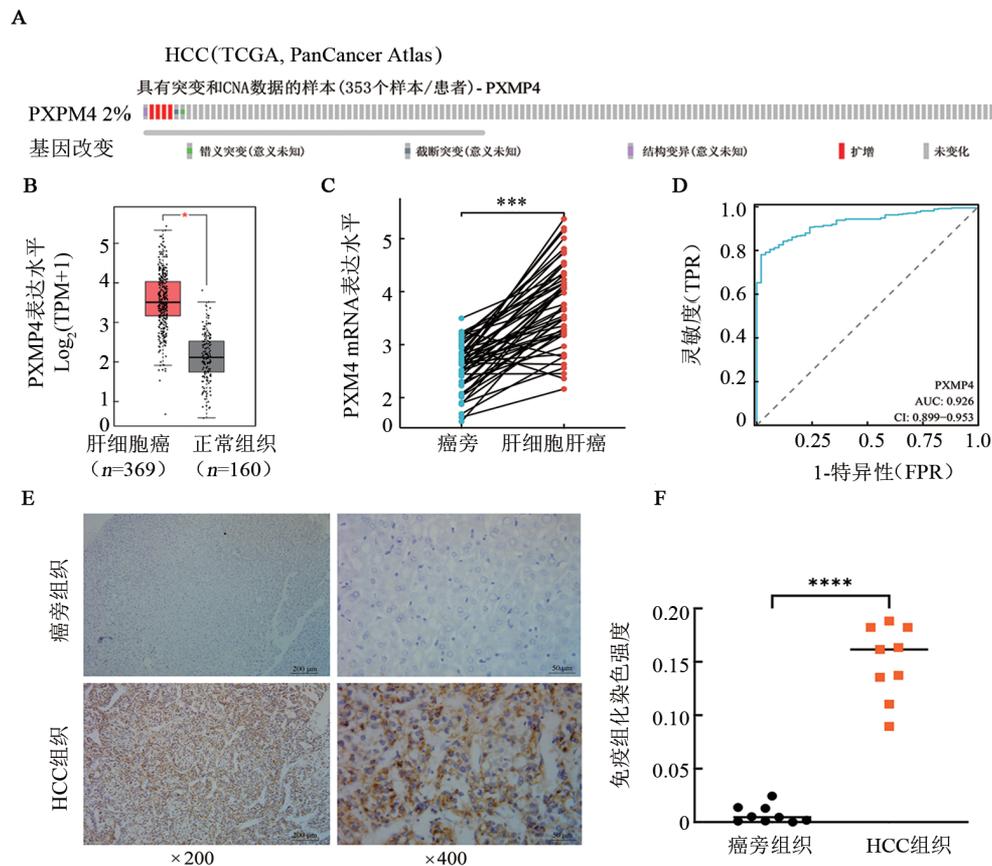
用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HCC组织和细胞中PXMP4的表达

TCGA数据库分析结果显示,HCC组织中PXMP4扩增率为2%(图2A),且HCC中PXMP4

mRNA表达显著高于癌旁组织( $P < 0.05$ ,图2B、C)。ROC曲线下方面积(AUC)为0.926,表明PXMP4在HCC中具有较高的诊断价值(图2D)。IHC法检测结果显示,PXMP4主要位于细胞质和细胞膜,HCC组织中的阳性率68.42%(26/38)显著高于癌旁组织31.58%(12/38)( $P < 0.05$ ,图2E、F)。



A: 利用cBioPortal网站分析HCC组织中PXMP4基因的扩增率;B: 利用TCGA数据库分析非配对HCC和正常肝组织中PXMP4的表达;C: 利用TCGA数据库分析配对HCC和正常肝组织中PXMP4的表达;D: ROC曲线显示PXMP4在HCC中具有较高的诊断准确性;E: 利用IHC法分析HCC组织中PXMP4表达;F: HCC组织中PXMP4染色强度统计结果。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图2 PXMP4在HCC组织中呈高表达

对HCC细胞进行WB和qPCR法检测分析PXMP4的内源性表达水平(图3A、B, $P < 0.05$ ),选取表达量较高的HCCLM3细胞和MHCC97H细胞用于敲低实验(si-PXMP4组),选取表达量较低的MHCC97L细胞和Huh7细胞用于过表达实验(PXMP4组)。对敲低的效率和过表达的效率进行蛋白水平(图3C、D, $P < 0.05$ )和基因水平(图3E, $P < 0.05$ )验证。

### 2.2 PXMP4与HCC患者临床病理特征的关系

IHC分析显示,在HCC中PXMP4的表达与其分化程度密切相关,与高分化HCC相比,PXMP4在低分化HCC中高表达,其差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),而PXMP4的表达与患者的年龄、性别及肿瘤大小没

有差异( $P > 0.05$ ,表3)。

### 2.3 PXMP4对HCC细胞增殖的影响

CCK-8实验结果显示,在HCCLM3和MHCC97H细胞中干扰PXMP4后细胞增殖速率显著降低( $P < 0.05$ ,图4A、B);在Huh7和MHCC97L细胞中过表达PXMP4后细胞增殖速率显著升高( $P < 0.05$ ,图4C、D)。

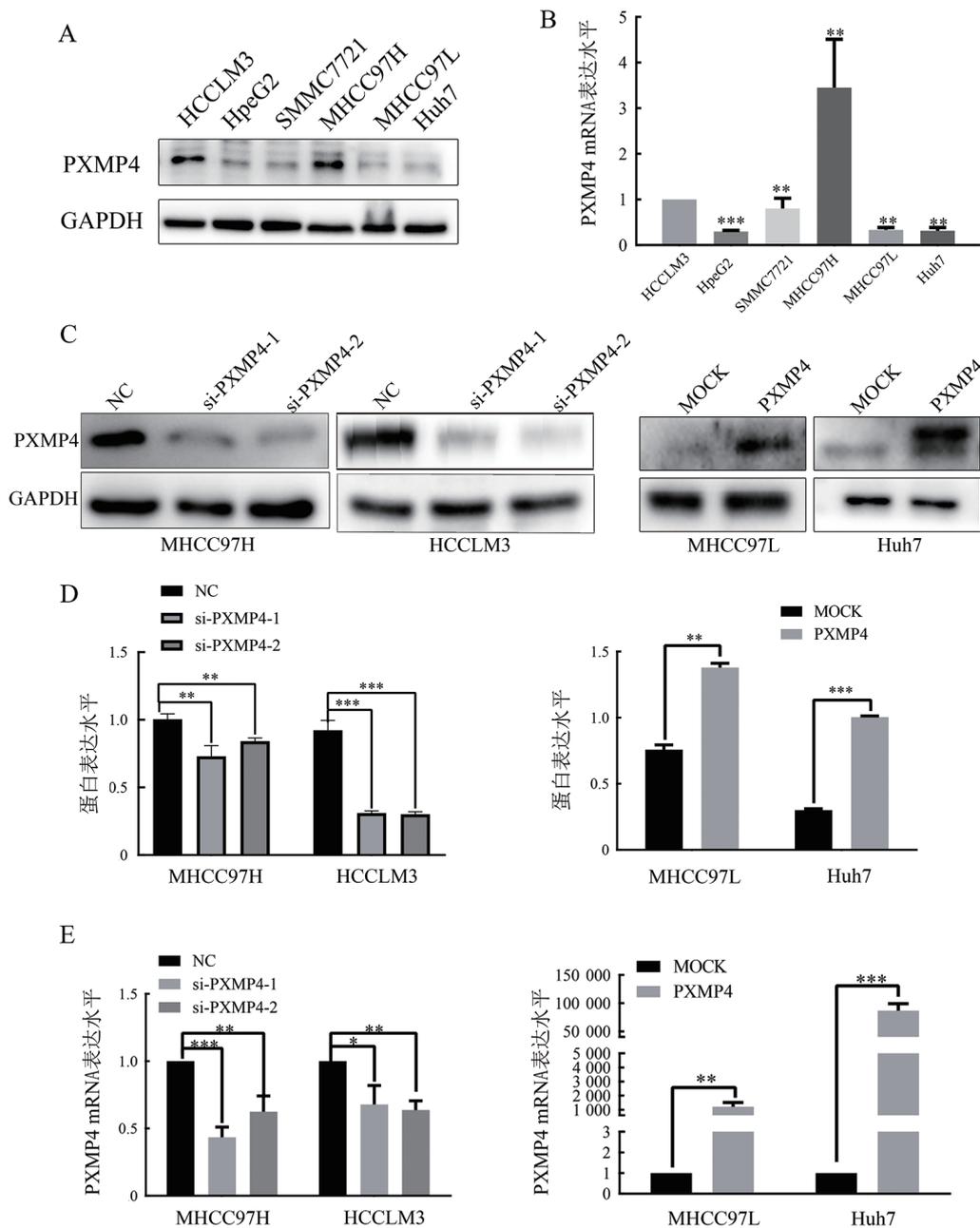
### 2.4 PXMP4对HCC细胞的迁移、侵袭和EMT进程的影响

在HCCLM3和MHCC97H细胞中干扰PXMP4,抑制了细胞由上皮样(卵圆形)向间质样(长梭形)转化的进程(图5A);在Huh7和MHCC97L中过表达PXMP4,促进了Huh7和MHCC97L细胞由上

皮样(卵圆形)向间质样(长梭形)转化的进程(图5B)。

在HCCLM3和MHCC97H细胞中干扰PXMP4的表达后,细胞迁移速率、穿过小室细胞数量显著降低( $P<0.05$ ,图6A、B、E、F)、Vimentin和N-cadherin的表达

显著降低、E-cadherin表达显著升高(图6I、J);在Huh7和MHCC97L细胞中过表达PXMP4后,细胞迁移速率、穿过小室细胞数量显著增加( $P<0.05$ ,图6C、D、G、H)、Vimentin和N-cadherin的表达显著升高E-cadherin表达显著降低(图6K、L)。



A: WB法检测6株HCC细胞中PXMP4的蛋白质表达水平;B:qPCR法检测6株HCC细胞中PXMP4的mRNA表达水平;C:WB检测在HCC细胞中敲低和过表达PXMP4后的蛋白表达水平;D:WB检测结果的灰度值统计分析;E:qPCR法检测在HCC细胞中敲低和过表达PXMP4后的mRNA表达水平。\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ 。

图3 验证在HCC细胞中敲低/过表达PXMP4的效率

2.5 PXMP4能够激活HCC细胞中的ERK1/2信号通路  
为了阐明PXMP4调控HCC细胞EMT的潜在机制,通过GO和KEGG数据库联合富集分析结果显

示,PXMP4通过MAPK/ERK1/2信号通路发挥相关作用(图7A)。在HCCLM3和MHCC97H细胞中干扰PXMP4的表达后,细胞中p-ERK的表达降低而总

ERK蛋白无明显变化, ERK的磷酸化水平显著降低(均 $P < 0.0001$ , 图7B、C); 在Huh7和MHCC97L细胞中过表达PXMP4后, p-ERK的表达升高而总ERK蛋白无明显变化, ERK磷酸化水平显著上调( $P < 0.0001$ 、 $P < 0.001$ 或 $P < 0.05$ , 图7D、E)。

### 2.6 PXMP4通过ERK1/2信号通路影响HCC细胞EMT进程

为了进一步证实ERK1/2信号通路在EMT中的作用, 用4种不同浓度的ERK抑制剂U0126(0、5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ )处理4株HCC细胞, WB法检测结果(图8)显示, 与0  $\mu\text{mol/L}$ 处理组相比, 在U0126组(5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ )中, E-cadherin的表达显著升高( $P < 0.05$ ), p-ERK、N-cadherin和Vimentin的表达显著降低( $P < 0.05$ ), 而PXMP4的表达无明显改变。

总之, 这些结果表明, PXMP4通过激活ERK1/2信号通路促进HCC细胞EMT进程。

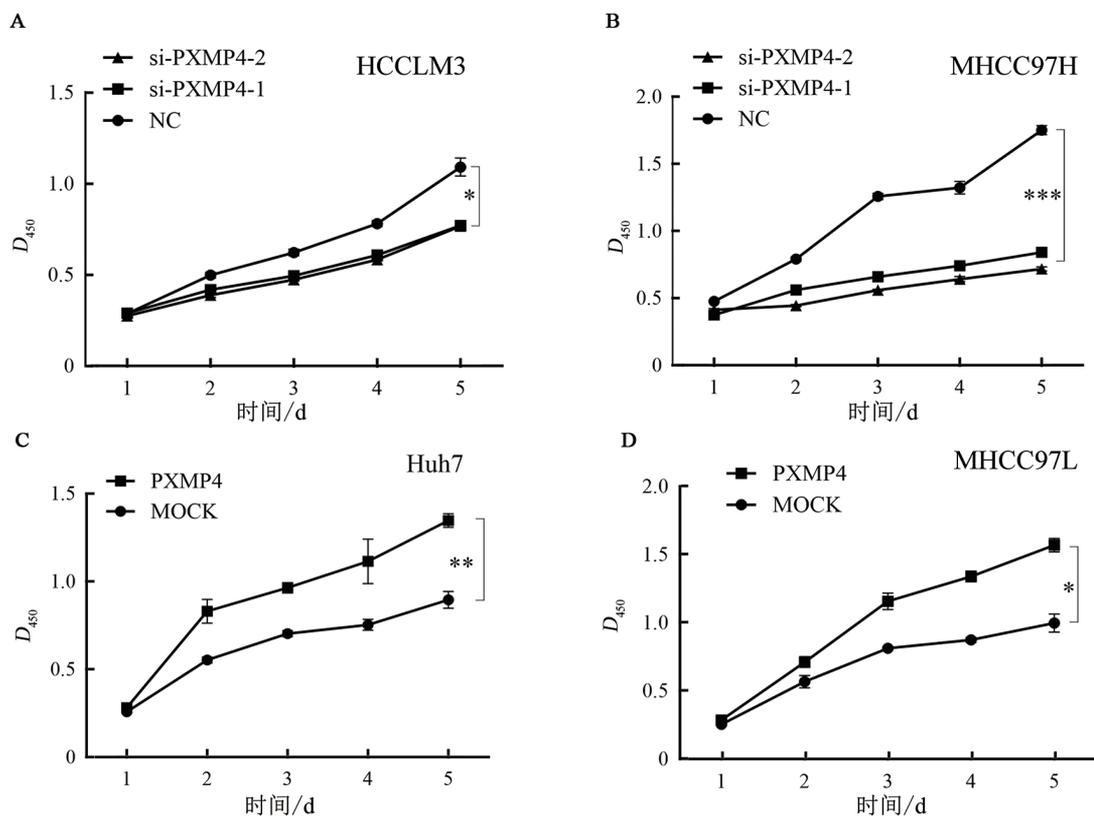
## 3 讨论

过氧化物酶体是一种重要的细胞器, 参与氧化还原反应、脂质代谢、信号转导等多种生物学过程<sup>[15]</sup>。PXMP4是一种过氧化物酶体膜蛋白, 参与过氧化物酶体的形成和功能。近年来, 越来越多的证据表明过氧化物酶体在肿瘤发生、发展中起着重要作用<sup>[16-18]</sup>。目前,

仅有少数研究报道了PXMP4在前列腺癌、胃癌和NSCLC中的作用<sup>[10, 12]</sup>, 且PXMP4可通过PI3K/AKT促进胃癌细胞的EMT进程<sup>[11]</sup>。而PXMP4在HCC中的作用和机制尚不清楚, 生物信息学分析的结果提示, 过氧化物酶体相关基因特征的建立和验证可用于HCC的预后预测和免疫鉴别<sup>[19-20]</sup>。本研究探讨PXMP4对HCC细胞的侵袭、迁移和EMT进程的影响, 希望为HCC的诊疗提供新的分子靶点。

表3 HCC组织中PXMP4的表达与临床病理特征的关系

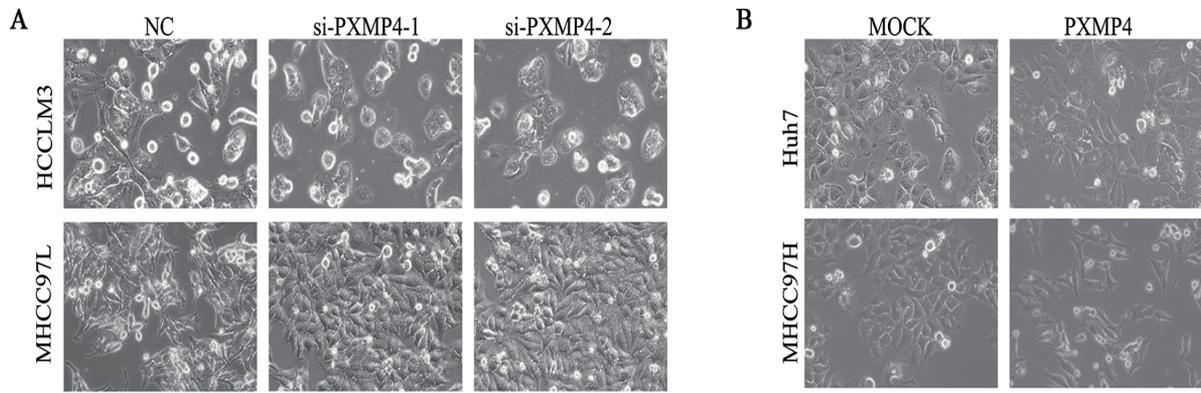
临床病理参数	n (N=38)	PXMP4		P
		高表达	低表达	
性别				
男性	26	18	8	0.715
女性	12	9	3	
年龄/岁				
<60	23	15	8	0.326
≥60	15	12	3	
肿瘤最长径/cm				
<5	12	7	5	0.240
≥5	26	20	6	
肿瘤分化程度				
高	16	8	8	0.015
低	22	19	3	



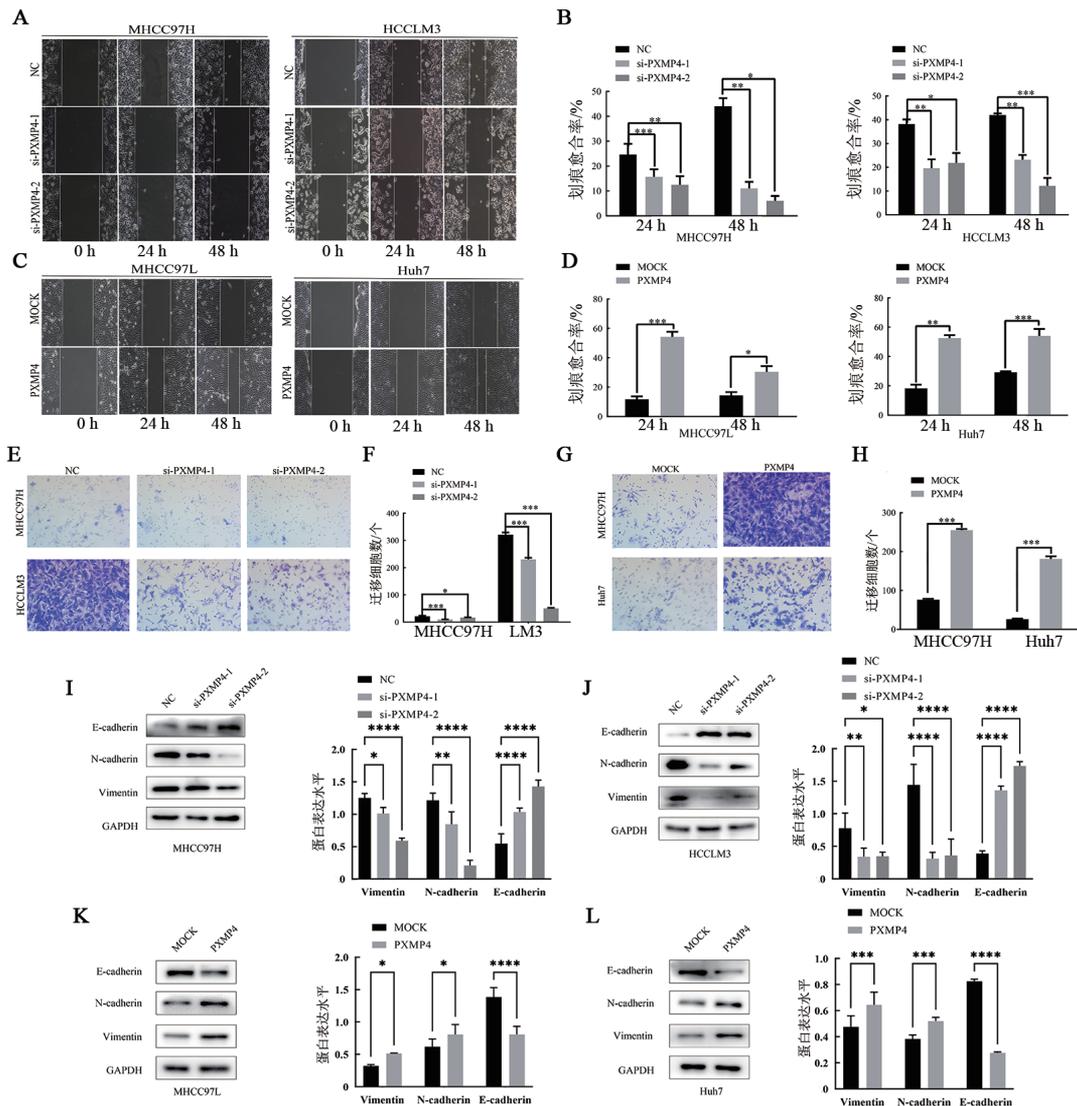
A、B: 干扰PXMP4后HCCLM3和MHCC97H细胞的增殖能力; C、D: 过表达PXMP4后Huh7和MHCC97L细胞的增殖能力。

NC: 阴性对照, MOCK: 空白对照。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图4 干扰/过表达PXMP4对HCC细胞增殖的影响

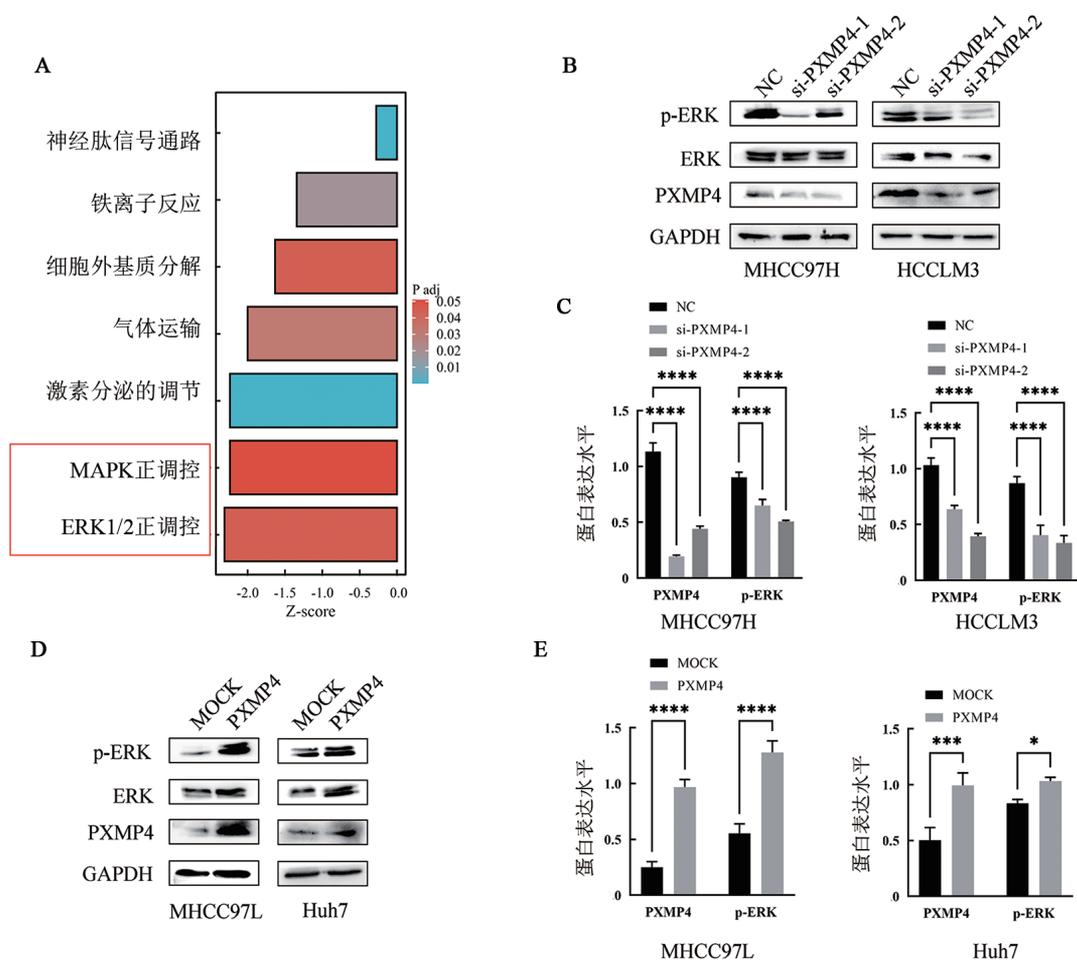


A: 干扰PXMP4后HCCLM3和MHCC97H细胞的形态变化(×200);  
B: 过表达PXMP4后Huh7和MHCC97L细胞的形态变化(×200).  
图5 干扰/过表达PXMP4对HCC细胞形态变化的影响



A、B: 划痕愈合实验检测干扰PXMP4表达后HCCLM3和MHCC97H细胞的划痕愈合率及统计结果(×200); C、D: 划痕愈合实验检测PXMP4过表达后Huh7和MHCC97L细胞的迁移率及统计结果(×200); E、F: Transwell法检测干扰PXMP4表达后HCCLM3和MHCC97H细胞通过腔室的数量及统计结果(×200); G、H: Transwell法检测Huh7和MHCC97L细胞通过腔室的数量及统计结果(×200); I、L: WB法检测干扰/过表达PXMP4后HCC细胞中E-cadherin、Vimentin、N-cadherin的表达。NC: 阴性对照, MOCK: 空白对照。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图6 PXMP4促进HCC细胞的迁移、侵袭和EMT进程



A: 利用GO和KEGG数据库对PXMP4与HCC细胞中的相关通路进行联合富集分析;

B、C: WB法检测干扰PXMP4表达后MHCC97H和HCCLM3细胞中p-ERK、ERK、PXMP4和GAPDH的相对表达量;

D、E: WB法检测过表达PXMP4后MHCC97L和Huh7细胞中p-ERK、ERK、PXMP4和GAPDH的相对表达量。

NC: 阴性对照, MOCK: 空白对照, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

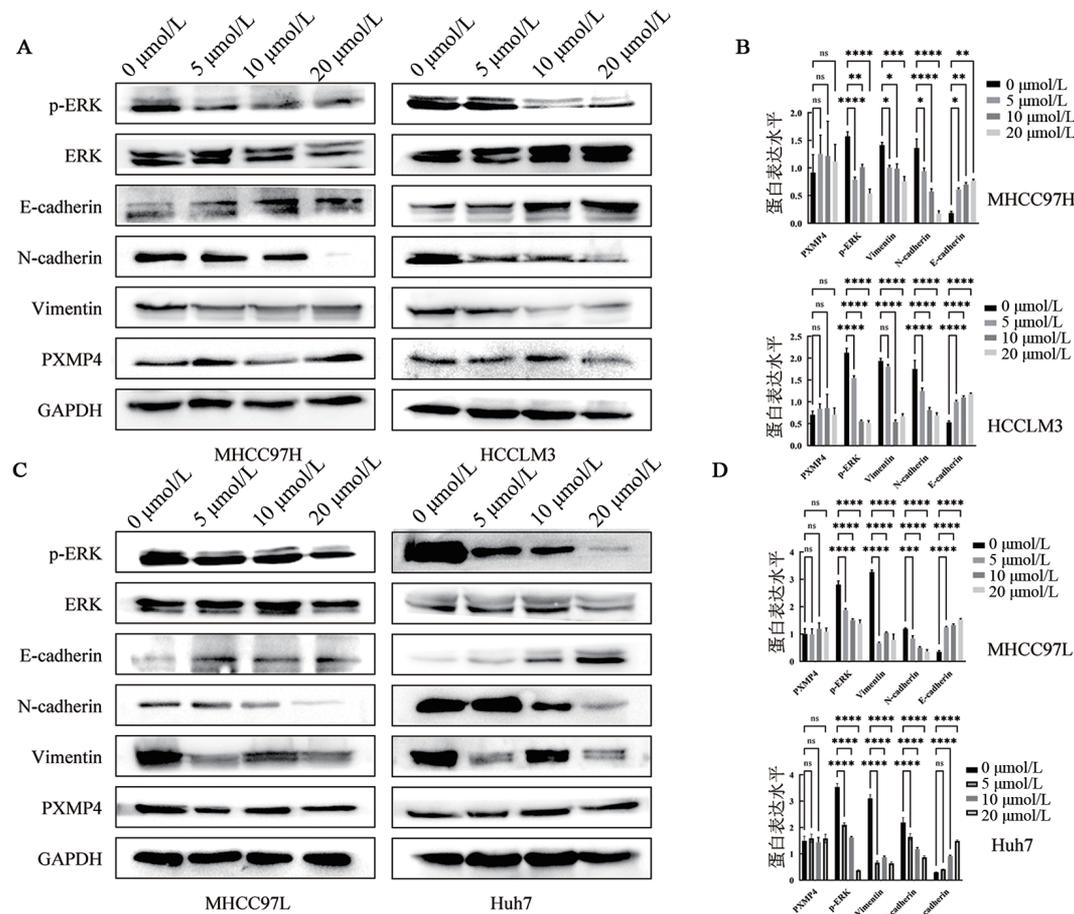
图7 PXMP4在HCC细胞中激活ERK1/2信号通路

本研究发现, PXMP4在HCC组织中呈高表达并与HCC患者的预后有关联, 这与在前列腺癌、NSCLC和胃癌中的研究结果一致。因此推测, PXMP4可能是多种恶性肿瘤中普遍存在的一种促癌因子。EMT是一种细胞生物学现象, 指上皮细胞失去其极性和黏附性, 获得间质细胞的特征和迁移能力<sup>[21]</sup>。识别潜在的EMT相关生物标志物并了解EMT调节分子可能有助于临床实践的有希望的发展, 并将成为预测一般转移, 特别是HCC转移的宝贵工具<sup>[22]</sup>。本研究发现, 在HCC细胞中过表达PXMP4促进细胞增殖、迁移及EMT进程; 反之, 干扰PXMP4抑制HCC细胞增殖、迁移及EMT过程, 这些结果表明PXMP4参与HCC细胞EMT进程。ERK1/2信号通路是一种广泛存在于各种细胞中的信号转导途径, 参

与细胞增殖、分化、迁移、凋亡等多种生理和病理过程<sup>[23]</sup>。已有研究证实, ERK1/2信号通路通过调控E-cadherin、N-cadherin和Vimentin等相关蛋白的表达影响EMT过程<sup>[24]</sup>。本研究进一步探索在HCC细胞中PXMP4对ERK信号通路的影响, 发现PXMP4通过激活ERK1/2信号通路促进HCC细胞的EMT过程, 且U0126能够抑制PXMP4介导的EMT过程。

综上, 本研究初步证实PXMP4通过激活ERK信号通路促进HCC细胞的EMT进程, 而HCC复发和转移的分子机制复杂, 未来需要更多的研究进一步揭示PXMP4在HCC中的作用及其生物学意义。

**利益冲突声明:** 所有作者均声明不存在利益冲突。



A、B:不同浓度U0126(0、5、10、20 μmol/L)处理MHCC97H和HCCLM3细胞后p-ERK、ERK、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、PXMP4和GAPDH的相对表达量;C、D:不同浓度U0126处理MHCC97H和HCCLM3细胞后,p-ERK、ERK、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、PXMP4、GAPDH的相对表达量。ns:无统计学意义,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ,\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图8 PXMP4激活ERK1/2信号通路调控HCC细胞的EMT进程

[参考文献]

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *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): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] CHEN J G, ZHANG S W. Liver cancer epidemic in China: past, present and future[J]. *Semin Cancer Biol*, 2011, 21(1): 59-69. DOI: 10.1016/j.semcancer.2010.11.002.

[3] HEERBOTH S, HOUSMAN G, LEARY M, *et al.* EMT and tumor metastasis[J/OL]. *Clin Transl Med*, 2015, 4: 6[2024-03-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25852822/>. DOI: 10.1186/s40169-015-0048-3.

[4] ZHANG H F, GAO X, WANG X, *et al.* The mechanisms of renin-angiotensin system in hepatocellular carcinoma: From the perspective of liver fibrosis, HCC cell proliferation, metastasis and angiogenesis, and corresponding protection measures[J/OL]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 141: 111868[2024-03-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34328104/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111868.

[5] AKULA S M, ABRAMS S L, STEELMAN L S, *et al.* RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/PTEN/AKT/mTORC1 and TP53 pathways and regulatory miRs as therapeutic targets in hepatocellular carcinoma[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(11): 915-929. DOI: 10.1080/14728222.2019.1685501.

[6] GAJOS-MICHNIEWICZ A, CZYZ M. WNT/ $\beta$ -catenin signaling in hepatocellular carcinoma: The aberrant activation, pathogenic roles, and therapeutic opportunities[J]. *Genes Dis*, 2024, 11(2): 727-746. DOI: 10.1016/j.gendis.2023.02.050.

[7] JIN C G, CHEN Z K, SHI W, *et al.* Tropomodulin3 promotes liver cancer progression by activating the MAPK/ERK signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(5): 3060-3068. DOI: 10.3892/or.2019.7052.

[8] SUH Y, YOON C H, KIM R K, *et al.* Claudin-1 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells[J]. *Oncogene*, 2017, 36(8): 1167-1168. DOI: 10.1038/ncr.2016.294.

[9] BLANKESTIJN M, BLOKS V W, STRUIK D, *et al.* Mice with a deficiency in peroxisomal membrane protein 4 (PXMP4) display mild changes in hepatic lipid metabolism[J/OL]. *Sci Rep*, 2022, 12 (1): 2512[2024-03-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8847483/>. DOI: 10.1038/s41598-022-06479-y.

[10] ZHANG X, WU M C, XIAO H, *et al.* Methylation of a single intronic CpG mediates expression silencing of the PMP24 gene in prostate cancer[J]. *Prostate*, 2010, 70(7): 765-776. DOI: 10.1002/pros.21109.

[11] LI W, DONG X Y, WAN Z D, *et al.* PXMP4 promotes gastric

- cancer cell epithelial-mesenchymal transition *via* the PI3K/AKT signaling pathway[J/OL]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1): 350[2024-03-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/7709871/>. DOI: 10.1007/s11033-024-09312-z.
- [12] ZHANG X Z, YANG H M, ZHANG J Z, *et al.* HSD17B4, ACAA1, and PXMP4 in peroxisome pathway are down-regulated and have clinical significance in non-small cell lung cancer[J/OL]. *Front Genet*, 2020, 11: 273[2024-03-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7103649/>. DOI: 10.3389/fgene.2020.00273.
- [13] 贺国洋, 李巍, 周琳, 等. PXMP4促进结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2021, 37(2): 127-132. DOI: 10.13315/j.cnki.cjcep.2021.02.001.
- [14] 孟倩, 张曼. 膜联蛋白A2质粒的构建及其在膀胱癌pumc-91细胞增殖和迁移中的作用[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2023, 9(4): 511-517.
- [15] KIM J A. Peroxisome metabolism in cancer[J/OL]. *Cells*, 2020, 9(7): 1692[2024-03-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7408135/>. DOI: 10.3390/cells9071692.
- [16] DAHABIEH M S, PIETRO E D, JANGAL M, *et al.* Peroxisomes and cancer: The role of a metabolic specialist in a disease of aberrant metabolism[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2018, 1870(1): 103-121. DOI: 10.1016/j.bbcan.2018.07.004.
- [17] QIU L W, ZHAN K, MALALE K, *et al.* Transcriptomic profiling of peroxisome-related genes reveals a novel prognostic signature in hepatocellular carcinoma[J]. *Genes Dis*, 2020, 9(1): 116-127. DOI: 10.1016/j.gendis.2020.04.010.
- [18] LIU T, YUAN Z H, WANG H, *et al.* Peroxisome-related genes in hepatocellular carcinoma correlated with tumor metabolism and overall survival[J/OL]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2022, 46(10): 101835[2024-03-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34798303/>. DOI: 10.1016/j.clinre.2021.101835.
- [19] MIAO D, XU Q, ZENG Y, *et al.* Establishment and validation of a peroxisome-related gene signature for prognostic prediction and immune distinction in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer*, 2022, 13(5): 1418-1435. DOI: 10.7150/jca.65080.
- [20] SEKINE K, HOCHIN T, NOMIYA H, *et al.* Extraction of genes and transcripts associated with liver cancer using machine learning[J/OL]. *Int J Smart Comput Artif Intell*, 2022, 6(1): 1[2024-03-06]. <https://doi.org/10.52731/ijscav6.i1.628>. DOI: 10.52731/ijscav6.i1.628.
- [21] BRABLETZ T, KALLURI R, NIETO M A, *et al.* EMT in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(2): 128-134. DOI: 10.1038/nrc.2017.118.
- [22] SENGEZ B, CARR B I, ALOTAIBI H. EMT and inflammation: crossroads in HCC[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2023, 54(1): 204-212. DOI: 10.1007/s12029-021-00801-z.
- [23] SAVAGNER P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon[J/OL]. *Ann Oncol*, 2010, 21(Suppl 7): vii89-vii92[2024-03-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3379967/>. DOI: 10.1093/annonc/mdq292.
- [24] LOH C Y, CHAI J Y, TANG T F, *et al.* The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges[J/OL]. *Cells*, 2019, 8(10): 1118[2024-03-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6830116/>. DOI: 10.3390/cells8101118.

[收稿日期] 2024-03-07

[修回日期] 2024-06-13

[本文编辑] 黄静怡