DOI:10.16016/j.2097-0927.202304051

MTMR6 激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进肝癌细胞侵袭

梁 霄[1],陈虹宇[2],彭雪琴[1] 401331 重庆,重庆医科大学附属大学城医院:全科医疗科[1],消化内科[2]

[摘要] **目的** 探究肌微管素相关蛋白 6(myotubularin-related protein 6, MTMR6)对人肝癌细胞(HepG2)侵袭能力的影响及潜在的分子机制。**方法** 在 GEO 数据库中通过分析肝癌组织与非癌肝组织的测序结果,筛选出差异表达基因 MTMR6,随后从癌症基因组图谱(TCGA)数据库中对 MTMR6 与通路相关性评分进行 Spearman 分析,最后通过 Genemania 数据库分析 MTMR6 与信号通路蛋白的互作关系。比较 MTMR6 在人正常肝细胞系(LO-2)和肝癌细胞系(Huh-7 和 HepG2)中的蛋白表达情况;选取 HepG2 作为研究对象,沉默或过表达 MTMR6 基因,运用 Transwell 实验检测细胞侵袭能力,蛋白免疫印迹实验(Western blot)检测 MTMR6、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达。**结果** MTMR6 基因在肝癌组织中的表达明显高于癌旁组织,并且 MTMR6 与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路呈正线性相关($P<0.01$),MTMR6 与 PI3K、AKT、mTOR 蛋白之间存在互作关系。与 LO-2 和 Huh-7 细胞相比,MTMR6 在 HepG2 细胞中的表达水平明显升高($P<0.01$)。将 HepG2 细胞中 MTMR6 基因过表达,细胞侵袭能力明显增强($P<0.01$),而将 HepG2 细胞中 MTMR6 基因沉默,细胞侵袭能力明显下降($P<0.01$)。沉默 MTMR6 基因导致 PI3K、AKT、mTOR 蛋白的磷酸化水平以及 MMP-2 和 MMP-9 表达水平下降($P<0.01$),而过表达 MTMR6 则促进 PI3K、AKT、mTOR 蛋白的磷酸化水平以及 MMP-2 和 MMP-9 表达水平升高($P<0.01$)。使用特异性 PI3K 抑制剂 LY294002 阻断 PI3K/AKT/mTOR 通路下调 MMP-2、MMP-9 表达($P<0.01$),但对 MTMR6 表达无影响。**结论** MTMR6 通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进肝癌细胞发生侵袭。

[关键词] 肌微管素相关蛋白 6;PI3K;AKT;mTOR;HepG2;肿瘤侵袭
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

Myotubularin-related protein 6 promotes invasion of hepatocellular carcinoma cells by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

LIANG Xiao[1], CHEN Hongyu[2], PENG Xueqin[1] [1]Department of General Medicine, [2]Department of Gastroenterology, University Town Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 401331, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of myotubularin-related protein 6 (MTMR6) on the invasion of hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and the potential molecular mechanism. **Methods** By analyzing the sequencing results of liver cancer tissues and adjacent tissues in Gene Expression Omnibus (GEO) database, MTMR6 gene was screened out, and Spearman analysis was used to analyze the correlation of MTMR6 and pathway in the Cancer Genome Atlas (TCGA) database. Finally, the interaction between MTMR6 and signaling pathway proteins was analyzed with Genemania database. Then the expression of MTMR6 in human normal liver cell line LO-2 and hepatoma cell lines Huh-7 and HepG2 were measured and compared among the cell lines. Then HepG2 cells was selected as the study object. After MTMR6 gene was knocked down or over-expressed in HepG2 cells, Transwell assay was employed to observe invasion ability, and Western blotting was adopted to detect the expression of MTMR6, PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, mTOR, p-mTOR MMP-2 and MMP-9. **Results** The expression of MTMR6 was significantly higher in the

[通信作者] 彭雪琴, E-mail: 271354879@qq.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

hepatocellular carcinoma tissues than the paracancer tissues, and it was in a positive linear correlation with PI3K/AKT/mTOR signaling pathway ($P<0.01$), showing interaction with PI3K, AKT and mTOR. The expression level of MTMR6 was significantly higher in the HepG2 cells than the LO-2 and Huh-7 cells ($P<0.01$). Over-expression of MTMR6 obviously enhanced invasion ability ($P<0.01$), while its knockdown decreased the ability ($P<0.01$) in HepG2 cells. Knockdown of MTMR6 gene also resulted in decreased phosphorylation of PI3K, AKT and mTOR, and expression levels of MMP-2 and MMP-9 ($P<0.01$), while over-expression of MTMR6 promoted the phosphorylation of PI3K, AKT and mTOR, and up-regulated the expression of MMP-2 and MMP-9 ($P<0.01$). In addition, LY294002 (a specific PI3K inhibitor) treatment could block the PI3K/AKT/mTOR pathway and down-regulate the expression of MMP-2 and MMP-9 ($P<0.01$), but had no effect on MTMR6 expression. **Conclusion** MTMR6 may promote the invasion of hepatoma cells through activation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

[**Key words**] MTMR6; PI3K; AKT; mTOR; HepG2 cells; neoplasm invasion

Corresponding author: PENG Xueqin, E-mail: 271354879@qq.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌的主要类型,占病例的75%~85%,是全球第三大癌症相关死亡原因[1]。预计到2025年全球肝癌发病率将超过100万[2]。目前肝癌的治疗主要以手术切除、介入治疗、放化疗和靶向药物干预为主[3],这些有效的治疗手段延长了患者的生存时间,改善了患者的生活质量。然而,由于肿瘤的高度异质性,容易发生侵袭、转移等特性,导致这些治疗手段的效果被明显弱化,从而导致治疗失败,患者死亡[4]。因此,探索HCC进展的潜在机制并确定新的分子靶点至关重要。

肌微管素相关蛋白6(myotubularin-related protein 6, MTMR6)是肌微管素相关蛋白(MTMs)家族成员中具有催化活性的一种蛋白[5]。MTMR6能够使磷脂酰肌醇3-磷酸酯(PI3P)和磷脂酰肌醇3,5-二磷酸[PI(3,5)P2]脱磷以及与不具有催化活性的MTMR6形成同聚体或异聚合物[6]。近年来,有研究发现MTMR6与肿瘤的恶性生物行为有关。MTMR6能负性调节$Ca2^+$激活的K^+通道KCa3.1,这与某些肿瘤细胞的增殖活性有关[6]。MTMR6导致卵巢癌细胞增殖,抑制凋亡的发生[7]。此外,也有研究发现MTMR6与肝癌细胞增殖密切相关[8]。然而,MTMR6在肝癌中的表达以及是否参与调控肿瘤细胞的侵袭能力,目前尚不明确。

本研究通过生物信息技术分析,在GEO数据库中通过分析肝癌组织与癌旁组织的测序结果,筛选出差异表达基因MTMR6,随后在癌症基因组图谱(TCGA)数据库中进行MTMR6与通路相关性评分,最后通过Genemania数据库分析MTMR6与信号通路蛋白的互作关系。选取HepG2作为研究对象,沉默或过表达MTMR6基因,观察基因干预对肝癌细胞侵袭能力以及相关信号通路蛋白表达的影响,以期发现干预肝癌侵袭、转移新的分子靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞及培养

人肝癌细胞(HepG2)购买自上海美轩生物科技有限公司;Huh-7细胞购自上海通派生物科技有限公司;LO-2细胞购自上海康朗生物科技有限公司。使用高糖DMEM培养基(Thermo,美国)+10%胎牛血清(GIBICO,澳洲)进行培养。将细胞置于恒温细胞培养箱中进行培育(37 ℃恒温,饱和湿度,5% CO_2),待细胞融合度到达90%,按照1∶3进行传代。选取生长情况良好,处于对数生长期的细胞进行实验。

1.2 实验分组

选取正常肝细胞系(LO-2)和肝癌细胞系(Huh-7和HepG2)为研究对象,分为LO-2细胞组、Huh-7细胞组和HepG2细胞组,比较MTMR6蛋白在各组中的表达差异;选取HepG2作为研究对象,沉默或过表达MTMR6基因,分为对照组、空载质粒转染组、MTMR6过表达质粒转染组、小干扰RNA阴性对照转染组以及小干扰RNA-MTMR6转染组,比较细胞侵袭能力以及MTMR6、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR、MMP-2和MMP-9蛋白表达在各组细胞中的差异。以LY294002(特异性PI3K抑制剂)处理HepG2细胞,分为对照组、DMSO组和LY294002组,比较MTMR6、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR、MMP-2和MMP-9蛋白表达在各组细胞中的差异。

1.3 生物信息学分析

从NCBI(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)中选择GEO数据库,选中数据集GSE146049,通过GEO2R分析获取TOP50差异表达的基因。选定MTMR6基因,随后从癌症基因组图谱(TCGA)数据库(https://portal.gdc.com)获得肝癌的RNAseq数据和相应的临

床信息。收集相应通路中包含的基因,通过 R 软件 GSVA 包进行分析,选择参数 method='ssgsea',通过 Spearman 相关性分析基因与通路得分的相关性。最后在 Genemania 数据库(http://genemania.org/)分析 MTMR6 与相关通路蛋白之间的蛋白互作关系。

1.4 siRNA-MTMR6 转染 HepG2 细胞

取 5 μL 浓度为 10 pmol/μL 的 siRNA-MTMR6(擎科生物技术有限公司,北京)于 125 μL Opti-MEM 培养基(GIBCO,美国)中混匀;另取 5 μL lipofectamine3000(Thermo,美国)于 125 μL Opti-MEM 中混匀,静置于室温下 5 min。将上述两种混匀液充分混匀,于室温下静置 5 min,加入 HepG2 细胞中共培养,转染 6 h 后,使用细胞培养液替换,继续培养 24 h。通过 Western blot 检测 MTMR6 表达情况。

1.5 MTMR6 基因过表达质粒(OE-MTMR6)转染 HepG2 细胞

将 1.5 μL 浓度为 1 μg/μL 无内毒素的 OE-MTMR6 质粒(擎科生物技术有限公司,北京)与 125 μL Opti-MEM、5 μL P3000(Thermo,美国)充分混匀;另取 5 μL lipofectamine3000(Thermo,美国)于 125 μL Opti-MEM 中混匀,静置于室温下 5 min。将上述两种混匀液充分混匀,于室温下静置 20 min,加入 HepG2 细胞中共培养,转染 6 h 后,使用细胞培养液替换,继续培养 48 h。通过 Western blot 检测 MTMR6 表达情况。

1.6 PI3K 抑制剂(LY294002)处理 HepG2 细胞阻断 PI3K/AKT/mTOR 通路

取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板,待细胞融合度达到 80%,加入 PI3K 特异性抑制剂 LY294002(10 μmol/L,200 μL;MedChemExpress,美国)[9]。与 HepG2 共培养 24 h 后提取细胞蛋白进行蛋白免疫印迹实验。

1.7 细胞侵袭实验(Transwell)

将 100% Matrigel 基质胶(Becton, Dickinson and Company,美国)稀释 8 倍,于无菌环境中将基质胶平整地铺于 Transwell 上层小室底部,置于 37 ℃环境中 30 min 促进基质胶凝固。向 Transwell 上层小室中加入不含血清的 DMEM 高糖培养基,使其能没过小室底部,后植入约 5×10^4 个 HepG2 细胞,在 Transwell 下层小室中加入约 600 μL 含 DMEM 高糖培养基+10%胎牛血清的完全培养基。于 37 ℃恒温培养箱中培养 48 h,取出 Transwell 上层小室,用 4%多聚甲醛固定约 5 min,使用 0.5%结晶紫染色 20 min,除去多余的结晶紫染料和未发生侵袭的细胞,在光学显微镜(×200)下随机选择视野观察细胞并计数。

1.8 蛋白质免疫印迹实验(Western blot)

向 HepG2 细胞沉淀中加入 100 μL 细胞裂解液(PIRP 裂解缓冲液:PMSF 蛋白酶抑制剂:磷酸酶抑制剂 Cocktail Ⅰ:磷酸酶抑制剂 Cocktail Ⅱ=100:10:1:1)并于 4 ℃环境中充分反应 30 min。于 4 ℃低温超速离心机中以 13 700×*g* 离心 15 min,取上清液,测定蛋白浓度,加上样缓冲液(碧云天科技公司)于 100 ℃下使蛋白变性。将 40 μg 蛋白样品加入 8%的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳。随后进行转膜,PVDF 蛋白膜封闭。使用抗 MTMR6(Cat. No. ab69875;Abcam;dilution:1:1 000)、PI3K(Cat. No. ab302958;Abcam;dilution:1:1 000)、p-PI3K(Cat. No. ab278545;Abcam;dilution:1:1 000)、AKT(Cat. No. ab38449;Abcam;dilution:1:1 000)、p-AKT(Cat. No. ab192623;Abcam;dilution:1:1 000)、mTOR(Cat. No. ab134903;Abcam;dilution:1:1 000)、p-mTOR(Cat. No. ab137133;Abcam;dilution:1:1 000)、MMP-2(Cat. No. ab92536;Abcam;dilution:1:1 000)、MMP-9(Cat. No. ab76003;Abcam;dilution:1:1 000)、β-actin(Cat. No. ab5694;Abcam;dilution:1:1 000)抗体于 4 ℃冰箱中孵育过夜。清洗 PVDF 蛋白膜,加入抗 HRP 二抗(Cat. No. ab6721;Cat. No. ab6728;Abcam;dilution:1:10 000)于室温下孵育 2 h,滴加 ECL 化学发光液(Millipore 发光底物 HRP)激发荧光,用凝胶成像仪(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)成像。使用 Image J 计算灰度值并进行分析。

1.9 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.3.1 软件对实验数据进行统计学分析,计量结果均使用 $\bar{x}\pm s$ 表示。相关性分析使用 Spearman,多组间采用单因素方差分析,随后采用 Turkey's 检验。当 $P<0.05$ 时,认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTMR6 在肝癌组织中高表达,且与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路呈线性正相关

于 GEO 数据库中,选中数据集 GSE146049,通过 GEO2R 分析获取 TOP50 差异表达的基因,发现 MTMR6 基因在肝癌组织中明显高于非癌肝组织(图 1A、B)。随后从癌症基因组图谱(TCGA)数据库中对 MTMR6 与通路相关性评分进行 Spearman 分析,结果发现,MTMR6 表达水平与 PI3K/AKT/mTOR 通路呈线性正相关调控(图 1C)。最后通过 Genemania 数据库分析 MTMR6 与 PI3K、AKT、mTOR 之间的互作关系,结果发现 MTMR6 与 PI3K、AKT、mTOR 之间存在相互作用关系(图 1D)。

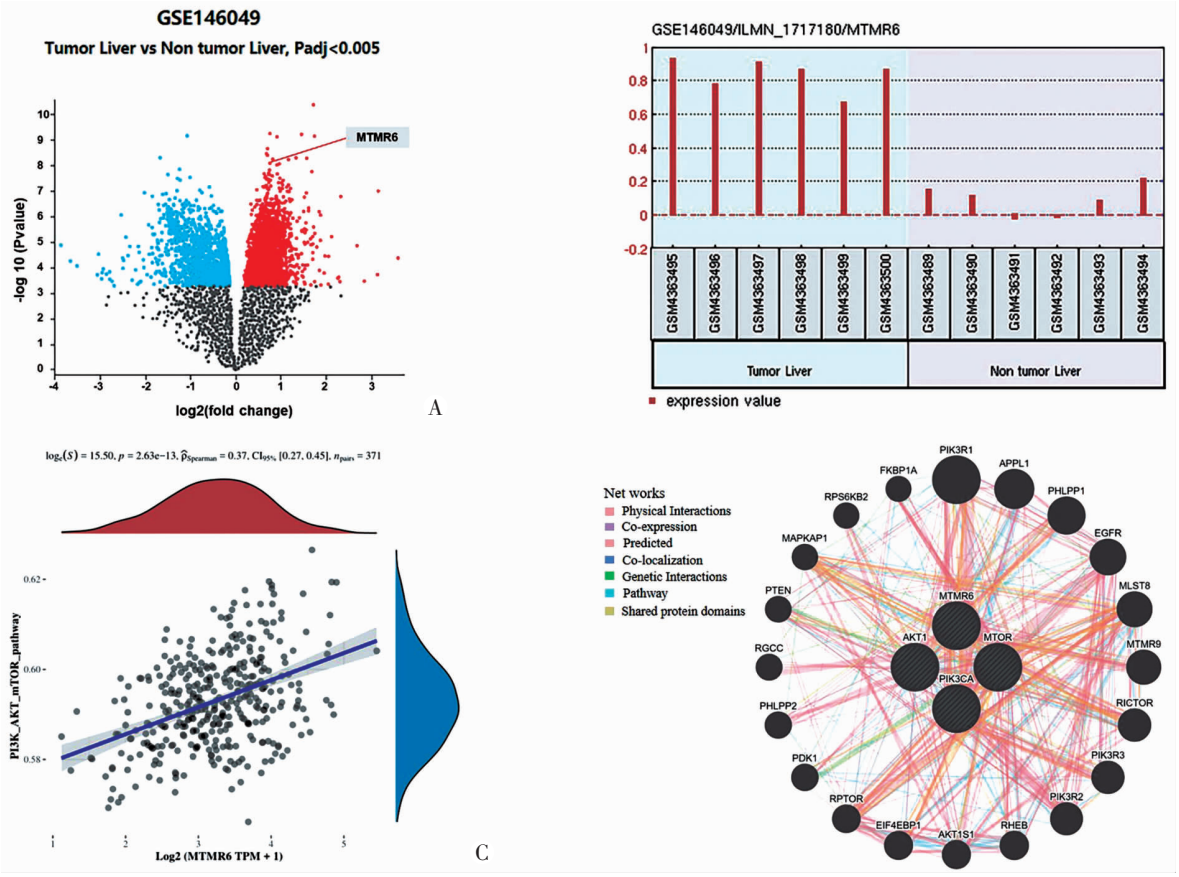
2.2 MTMR6 在肝癌细胞 HepG2 表达水平明显升高

通过生信分析发现 MTMR6 在肝癌中表达升高,为进一步验证这一结果,检测 MTMR6 在人正常肝细

胞系(LO-2)、肝癌细胞系(Huh-7 和 HepG2)的表达情况。结果发现,与正常肝细胞 LO-2 相比,MTMR6 在 Huh-7 肝癌细胞中的表达稍升高,但差异无统计学意义,而 MTMR6 在 HepG2 细胞中的表达水平明显升高,差异有统计学意义(P<0.01,图 2)。

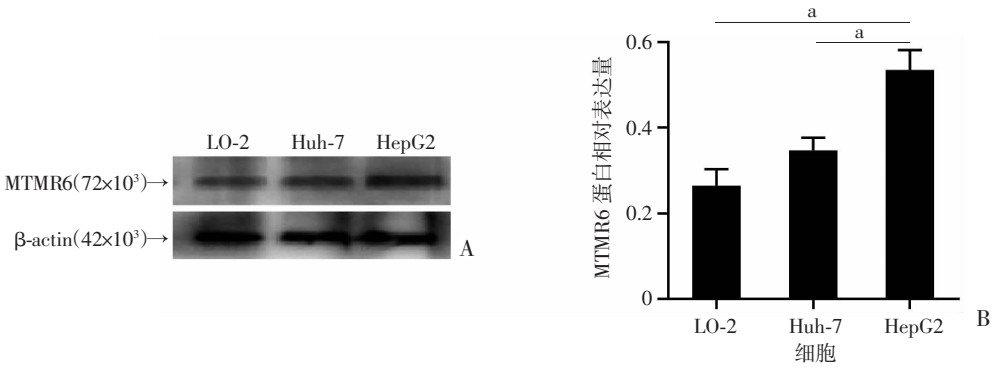
2.3　MTMR6 参与调控 HepG2 细胞侵袭能力

为进一步研究 MTMR6 对肝癌细胞侵袭能力的影响,首先使用 MTMR6 基因过表达质粒(OE-MTMR6)转染 HepG2 细胞,通过 Transwell 实验检验细胞侵袭能力,结果发现,与对照组和空载质粒转染组相比,MTMR6 过表达质粒转染组 HepG2 细胞侵袭能力明显增强,差异有统计学意义(P<0.01);随后使用 siRNA-MTMR6 转染 HepG2 细胞,通过 Transwell 实验检验细胞侵袭能力,结果发现,与对照组和小干扰 RNA 阴性对照转染组相比,小干扰 RNA-MTMR6 转染组 HepG2 细胞的侵袭能力明显下降(P<0.01,图 3)。



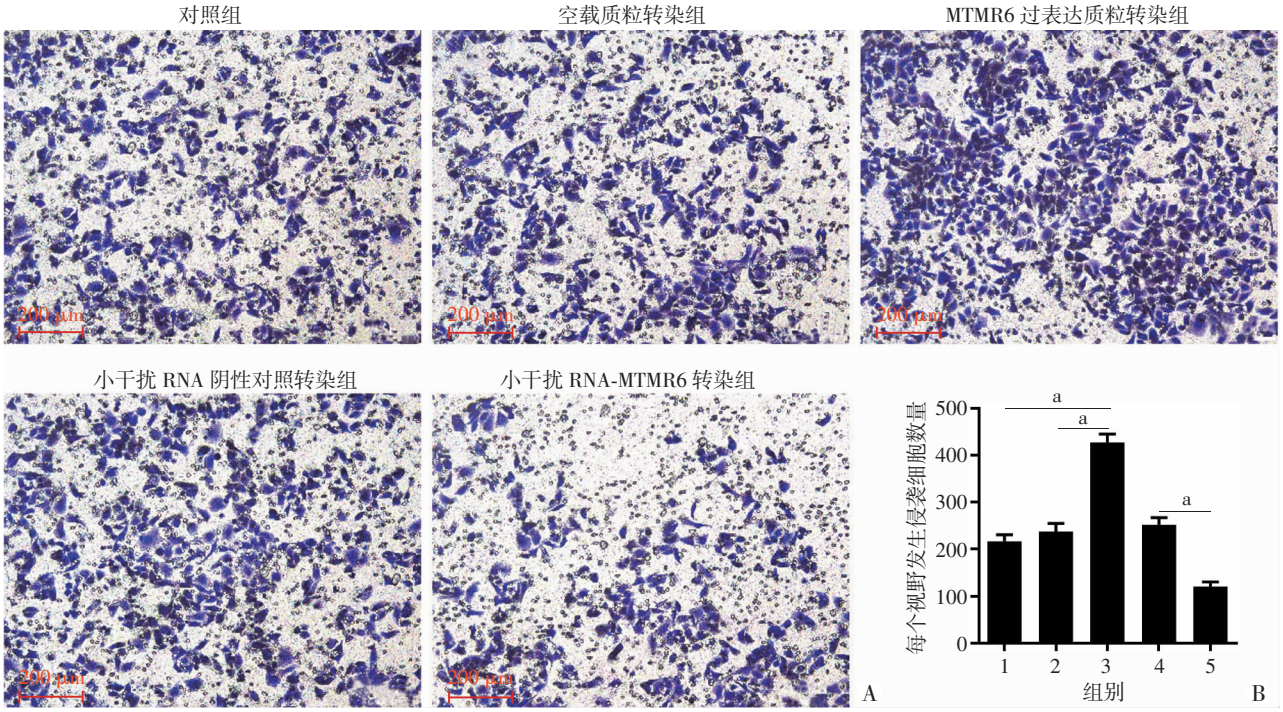
A、B:从 GEO 数据库中获取 MTMR6 基因在肝癌和非癌肝组织中的表达信息;C:从 TCGA 数据库中获取与 MTMR6 相关的信号通路;D:从 Genemania 数据库中分析与 MTMR6 相关的信号通路蛋白之间的互作关系

图 1　生信分析 MTMR6 在肝癌组织中的表达以及相关功能



A:Western blot 检测 MTMR6 蛋白在各细胞系中的表达;B:定量分析蛋白表达水平　a:P<0.01

图 2　MTMR6 在 LO-2、Huh-7 和 HepG2 细胞中的表达差异

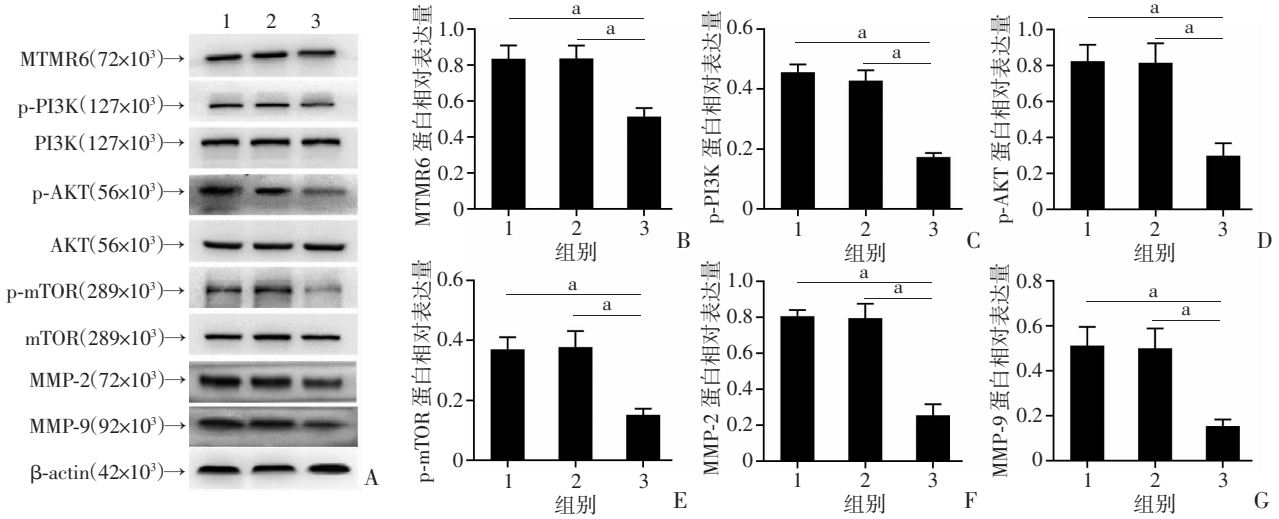


A:Transwell 实验检测细胞侵袭能力;B:统计分析各组细胞侵袭能力的差异　1:对照组;2:空载质粒转染组;3:MTMR6 过表达质粒转染组;4:小干扰 RNA 阴性对照转染组;5:小干扰 RNA-MTMR6 转染组;a:$P<0.01$

图 3　MTMR6 基因对 HepG2 侵袭能力的影响

2.4　沉默 MTMR6 抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路活化以及 MMP-2 和 MMP-9 的表达

使用 siRNA-MTMR6 转染 HepG2 细胞后,使用 Western blot 检测 MTMR6、PI3K、p-PI3K(phospho Y458)AKT、p-AKT(Ser473)、mTOR、p-mTOR(Ser2481)MMP-2 和 MMP-9 的表达水平,结果显示:与对照组和小干扰 RNA 阴性对照转染组相比,小干扰 RNA-MTMR6 转染组 HepG2 细胞 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR、MMP-2 和 MMP-9 的表达明显下降,差异有统计学意义($P<0.01$,图 4)。



1:对照组;2:小干扰 RNA 阴性对照转染组;3:小干扰 RNA-MTMR6 转染组;a:$P<0.01$

A:Western blot 检测 MTMR6、PI3K、p-PI3K(phospho Y458)AKT、p-AKT(Ser473)、mTOR、p-mTOR(Ser2481)、MMP-2、MMP-9 和 β-actin 等蛋白表达水平;B~G:定量分析蛋白表达水平

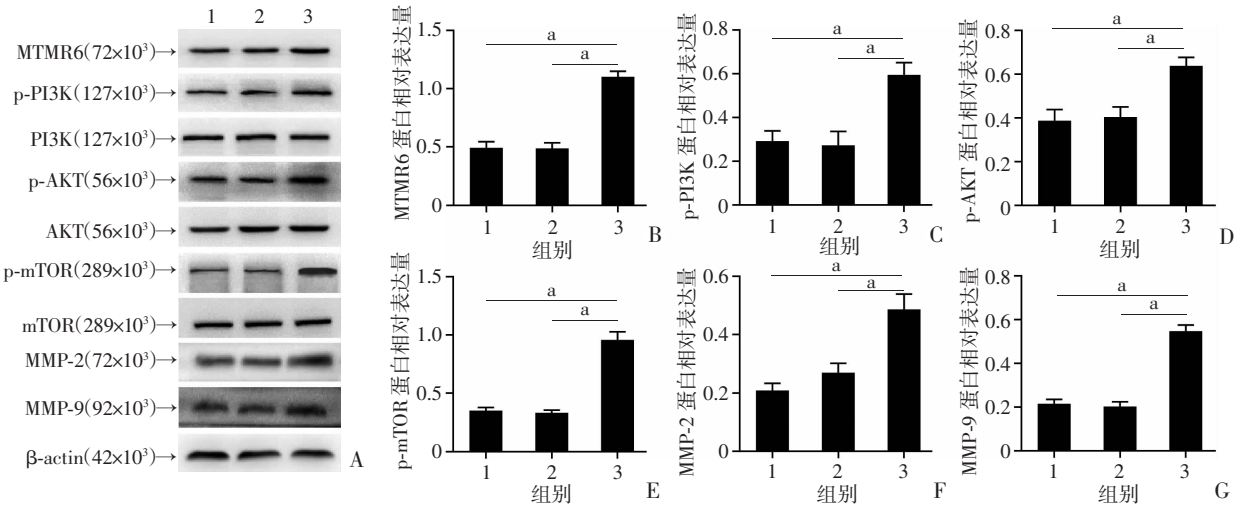
图 4　　沉默 MTMR6 对 PI3K/AKT/mTOR 通路活化及 MMP-2 和 MMP-9 表达的影响

2.5 过表达 MTMR6 促进 PI3K/AKT/mTOR 通路活化以及 MMP-2 和 MMP-9 的表达

使用 MTMR6 基因过表达的质粒转染 HepG2 细胞后,使用 Western blot 检测 MTMR6、PI3K、p-PI3K(phospho Y458)AKT、p-AKT(Ser473)、mTOR、p-mTOR(Ser 2481)、MMP-2 和 MMP-9 的表达水平,结果显示,与对照组和空载质粒转染组相比,MTMR6 过表达质粒转染组 HepG2 细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR、MMP-2 和 MMP-9 表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$,图 5)。

2.6 LY294002 阻断 PI3K/AKT/mTOR 通路下调 MMP-2、MMP-9 表达,但对 MTMR6 表达无影响

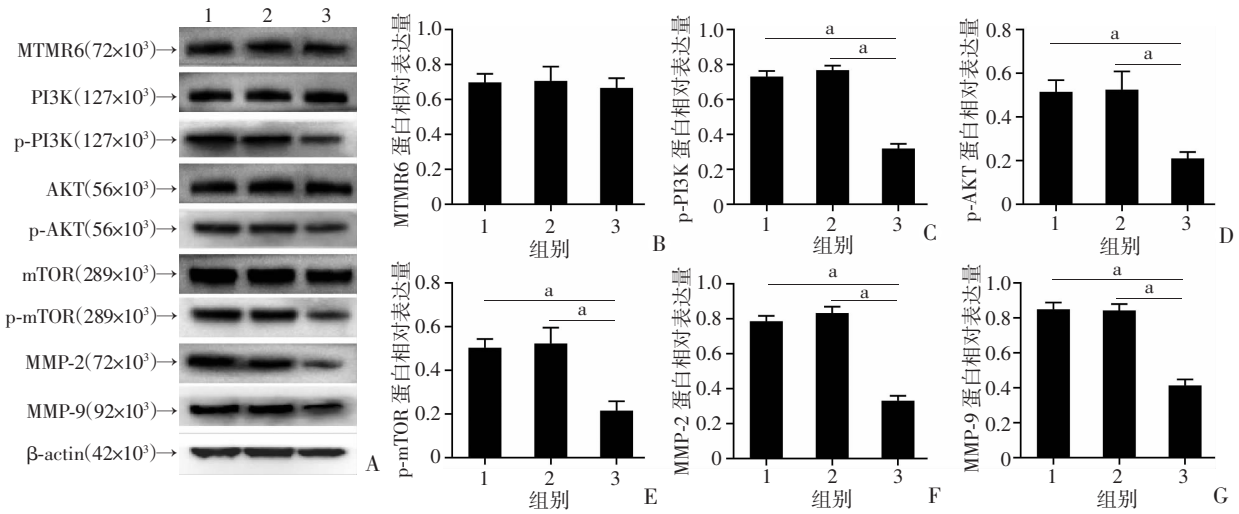
为进一步验证 MTMR6 与 PI3K/AKT/mTOR 通路之间的调控关系,使用特异性 PI3K 抑制剂 LY294002 阻断 PI3K/AK/mTOR 通路,使用 Western blot 检测 MTMR6 的表达水平,结果显示,与对照组和 DMSO 组相比,LY294002 处理组明显下调 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 的比值以及 MMP-2 和 MMP-9 的表达水平($P<0.01$);而 LY294002 阻断 PI3K/AKT/mTOR 通路对 MTMR6 表达的影响差异无统计学意义(图 6)。



1:对照组;2:空载质粒转染组;3:MTMR6 过表达质粒转染组;a:$P<0.01$

A:Western blot 检测 MTMR6、PI3K、p-PI3K(phospho Y458)AKT、p-AKT(Ser473)、mTOR、p-mTOR(Ser2481)、MMP-2、MMP-9、β-actin 等蛋白表达水平;B~G:定量分析蛋白表达水平

图 5 过表达 MTMR6 对 PI3K/AKT/mTOR 通路活化和 MMP-2、MMP-9 表达的影响



1:Control 组;2:DMSO 组;3:10 μmol/L LY294002 组;a:$P<0.01$

A:Western blot 检测 MTMR6、PI3K、p-PI3K(phospho Y458)AKT、p-AKT(Ser473)、mTOR、p-mTOR(Ser2481)、MMP-2、MMP-9、β-actin 等蛋白表达水平;B~G:定量分析蛋白表达水平

图 6 LY294002 对 MTMR6、PI3K/AKT/mTOR 通路以及 MMP-2、MMP-9 表达的影响

3 讨论

侵袭、转移是肿瘤细胞的恶性生物行为之一,也是导致患者不良预后及死亡的主要原因[10-12]。大约90%的肿瘤患者最终死于原发灶以外的转移性肿瘤的生长[13]。这种转移的形成是肿瘤细胞离开原发灶,沿着身体内的血管和淋巴管在全身寻找新的部位并重新生长形成细胞克隆的结果[14]。肿瘤细胞的散播是肿瘤发展过程中最具危险性的过程,当肿瘤细胞在远处器官形成克隆时,往往会对机体产生严重的破坏[15]。

MTMR6是磷酸肌醇脂质磷酸酶家族的成员,参与许多细胞生物学过程的调节,如内吞作用、膜运输、胞质分裂、细胞增殖和分化[16]。已有文献报道,MTMR6参与肿瘤细胞的恶性生物行为,如促进肿瘤细胞增殖以及凋亡逃逸[7,16]。而MTMR6是否参与肿瘤细胞侵袭能力的调控,尚无文献报道。有文献报道,与MTMR6同为MTMs家族成员的MTMR2通过灭活IFNγ/STAT1信号促进胃癌侵袭转移[17];MTMR3及其产物PtdIns5P通过激活Rac1调节癌细胞的迁移和侵袭[18]。PtdIns5P也是MTMR6的产物[19]。这些证据表明,MTMR6可能参与调控肿瘤细胞的侵袭。本研究发现,MTMR6在肝癌细胞HepG2细胞中异常高表达沉默MTMR6表达,抑制HepG2的侵袭能力,而过表达MTMR6,则促进HepG2发生侵袭。

大量的研究表明,PI3K/AKT/mTOR信号通路调控肿瘤细胞的转移和侵袭[20-22]。磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)主要存在于细胞质中,具有蛋白激酶和磷脂激酶的双重活性,可参与膜肌醇脂质的磷酸化,从而介导细胞信号转导[23]。PI3K蛋白在许多肿瘤中被激活[20]。PI3K被激活后导致3,4-二磷酸磷酰肌醇(PIP2)转变为3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3),而PIP3作为第二信使与细胞内含有PH结构的AKT信号蛋白相互结合,导致AKT被募集到细胞膜,驱动构象变化,并导致苏氨酸308处和在丝氨酸473处发生磷酸化,进而导致AKT被激活[20]。活化的AKT再易位到细胞质和细胞核内,进而继续靶向调控下游信号分子mTOR,并参与调控增殖、细胞周期、血管生成、侵袭和迁移等生物过程[20]。有研究表明PI3K/AKT/mTOR信号通路参与调控肝癌细胞的侵袭能力[24]。LI等[25]发现,SOS1可能通过激活PI3K/AKT/mTOR通路诱导上皮-间质转化,从而增强肝癌细胞的侵袭、迁移和转移。ZHAO等[26]发现,NAP1L5抑制PI3K/AKT/mTOR信号传导,进而抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭。此外,基质金属蛋白酶(MMPs)参与细胞外基质(ECM)的分解,是与癌细胞侵袭相关的重要酶[27]。在MMPs家族蛋白成员中,MMP-2和MMP-9被认为在肿瘤细胞转移中起重要作用[28]。TSAI等[29]报道,Stellettin B通过PI3K/AKT/mTOR通路下调MMP-2和MMP-9表达,防止肝癌细胞发生侵袭和转移。与本研究相似的是,我们通过TCGA数据库发现PI3K/AKT/mTOR信号通路与MTMR6表达水平呈正线性相关,并且在HepG2细胞中也证实了沉默MTMR6抑制了PI3K/AKT/mTOR信号通路的活化以及MMP-2和MMP-9的表达,而过表达MTMR6则促进PI3K/AKT/mTOR信号通路的活化以及MMP-2和MMP-9的表达。此外,我们抑制了PI3K/AKT/mTOR信号通路,发现MMP-2和MMP-9的表达下调,而MTMR6的表达不受影响。这些结果证明,MTMR6可能是PI3K/AKT/mTOR信号通路的上游调控分子,通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路调控MMP-2和MMP-9来介导肝癌细胞的侵袭。

综上所述,MTMR6在肝癌组织中异常高表达,通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路促进肝癌细胞侵袭。通过研究MTMR6对肝癌细胞侵袭能力的调控以及潜在的分子机制,可以为防治肝癌转移提供新的治疗靶点。

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] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, *et al*. Hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 6. DOI: 10.1038/s41572-020-00240-3.

[3] 朱玉婉, 解英俊, 张学文. 二氧化硅纳米材料在肝癌治疗中应用进展[J]. 中国实用外科杂志, 2021, 41(6): 710-713, 718. DOI: 10.19538/j.cjps.issn1005-2208.2021.06.17.
ZHU Y W, XIE Y J, ZHANG X W. Progress in the application of silica nano-materials in the treatment of liver cancer[J]. Chin J Pract Surg, 2021, 41(6): 710-713, 718. DOI: 10.19538/j.cjps.issn1005-2208.2021.06.17.

[4] LIU X, HU Y, LI C R, *et al*. Overexpression of YEATS2 remodels the extracellular matrix to promote hepatocellular carcinoma progression *via* the PI3K/AKT pathway[J]. Cancers, 2023, 15(6): 1850. DOI: 10.3390/cancers15061850.

[5] CHOUDHURY P, SRIVASTAVA S, LI Z, *et al*. Specificity of the myotubularin family of phosphatidylinositol-3-phosphatase is determined by the PH/GRAM domain[J]. J Biol Chem, 2006, 281(42): 31762-31769. DOI: 10.1074/jbc.m606344200.

[6] SRIVASTAVA S, CHOUDHURY P, LI Z, *et al*. Phosphatidylinositol 3-phosphate indirectly activates $KCa_{3.1}$ *via* 14

amino acids in the carboxy terminus of $KCa_{3.1}$[J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(1): 146-154. DOI: 10.1091/mbc.e05-08-0763.

[7] WANG Y, LEI X, GAO C Y, *et al*. MiR-506-3p suppresses the proliferation of ovarian cancer cells by negatively regulating the expression of MTMR6[J]. J Biosci, 2019, 44(6): 1-11. DOI: 10.1007/s12038-019-9952-9.

[8] SÁNCHEZ-GARCÍA A, RÍOS-IBARRA C P, RINCÓN-SÁNCHEZ A R, *et al*. Use of proteomic analysis tools to identify HCV-proteins down-regulated by acetylsalicylic acid [J]. Ann Hepatol, 2013, 12(5): 725-732. DOI: 10.1016/S1665-2681(19)31313-4.

[9] WU M, CAI Y L, YANG Y, *et al*. Vitamin D ameliorates insulin resistance-induced osteopenia by inactivating the nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome[J]. Heliyon, 2023, 9(2): e13215. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e13215.

[10] LOPEZ J I, CAMENISCH T D, STEVENS M V, *et al*. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression[J]. Cancer Res, 2005, 65(15): 6755-6763. DOI: 10.1158/0008-5472.can-05-0863.

[11] LI Y, LIU H, HUANG Y Y, *et al*. Suppression of endoplasmic reticulum stress-induced invasion and migration of breast cancer cells through the downregulation of heparanase[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(5): 1234-1242. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1292.

[12] LI Y W, LI Y, LIU J H, *et al*. Expression levels of microRNA-145 and microRNA-10b are associated with metastasis in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2016, 17(3): 272-279. DOI: 10.1080/15384047.2016.1139242.

[13] CREE I A. Cancer biology [M]//Methods in Molecular Biology. Totowa: Humana Press, 2011: 1-11. DOI: 10.1007/978-1-61779-080-5_1.

[14] HANAHAN D, WEINBERG R A. The hallmarks of cancer [J]. Cell, 2000, 100(1): 57-70. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

[15] EFFERTH. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (Review)[J]. Int J Oncol, 2009, 34(4): 881-895. DOI: 10.3892/ijo_00000214.

[16] SRIVASTAVA S, LI Z, LIN L, *et al*. The phosphatidylinositol 3-phosphate phosphatase myotubularin-related protein 6 (MTMR6) is a negative regulator of the Ca^{2+}-activated K^+ channel $KCa_{3.1}$[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(9): 3630-3638. DOI: 10.1128/MCB.25.9.3630-3638.2005.

[17] JIANG L, LIU J Y, SHI Y, *et al*. MTMR2 promotes invasion and metastasis of gastric cancer *via* inactivating IFNγ/STAT1 signaling[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 1-16. DOI: 10.1186/s13046-019-1186-z.

[18] OPPELT A, HAUGSTEN E, ZECH T, *et al*. PIKfyve, MTMR3 and their product PtdIns5*P* regulate cancer cell migration and invasion through activation of Rac1 [J]. Biochem J, 2014, 461(3): 383-390. DOI: 10.1042/bj20140132.

[19] SCHALETZKY J, DOVE S K, SHORT B, *et al*. Phosphatidylinositol-5-phosphate activation and conserved substrate specificity of the myotubularin phosphatidylinositol 3-phosphatases[J]. Curr Biol, 2003, 13(6): 504-509. DOI: 10.1016/S0960-9822(03)00132-5.

[20] WEN X F. The PI3K AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer[J]. Front Biosci, 2016, 21(5): 1084-1091. DOI: 10.2741/4443.

[21] KHAN K, QUISPE C, JAVED Z, *et al*. Resveratrol, curcumin, paclitaxel and miRNAs mediated regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway: go four better to treat bladder cancer[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(1): 1-19. DOI: 10.1186/s12935-020-01660-7.

[22] GASPARRI M L, BESHARAT Z M, AHMAD FAROOQI A, *et al*. MiRNAs and their interplay with PI3K/AKT/mTOR pathway in ovarian cancer cells: a potential role in platinum resistance[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2018, 144(12): 2313-2318. DOI: 10.1007/s00432-018-2737-y.

[23] FANG Y K, JI W J, YAN C. Research progress of PI3K/PTEN/AKT signaling pathway associated with renal cell carcinoma[J]. Dis Markers, 2022, 2022: 1-4. DOI: 10.1155/2022/1195875.

[24] LU S M, LIU Y H, TIAN S, *et al*. $KIFC_3$ regulates progression of hepatocellular carcinoma *via* EMT and the AKT/mTOR pathway[J]. Exp Cell Res, 2023, 426(1): 113564. DOI: 10.1016/j.yexcr.2023.113564.

[25] LI Y H, YIN Y L, HE Y, *et al*. SOS_1 regulates HCC cell epithelial-mesenchymal transition *via* the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 637: 161-169. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.11.015.

[26] ZHAO R, GE Y Z, GONG Y J, *et al*. NAP1L5 targeting combined with MYH9 inhibit HCC progression through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Aging, 2022, 14(22): 9000-9019. DOI: 10.18632/aging.204377.

[27] CHANG M. Matrix metalloproteinase profiling and their roles in disease[J]. RSC Adv, 2023, 13(9): 6304-6316. DOI: 10.1039/d2ra07005g.

[28] GIALELI C, THEOCHARIS A D, KARAMANOS N K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting[J]. FEBS J, 2011, 278(1): 16-27. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x.

[29] TSAI T C, WU W T, LIN J J, *et al*. Stellettin B isolated from *Stelletta sp.* reduces migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells through reducing activation of the MAPKs and FAK/PI3K/AKT/mTOR signaling pathways [J]. Int J Cell Biol, 2022, 2022: 1-9. DOI: 10.1155/2022/4416611.

(收稿:2023-04-12;修回:2023-09-19)

(编辑 邓强庭)