DOI:10.16016/j.2097-0927.202203004

HMMR 通过 MEK/ERK 信号通路促进肝细胞癌侵袭转移

李 逊[1],严 娇[2],蔡顺礼[1],陈华剑[1] 400016 重庆,重庆市急救医疗中心:检验科[1],肝胆外科[2]

[摘要] **目的** 探讨透明质酸介导的细胞游走受体(hyaluronan-mediated motility receptor,HMMR)对肝细胞癌侵袭转移的影响及潜在机制。**方法** 采用 qRT-PCR 和 Western blot 法检测肝癌细胞系和肝癌组织,以及免疫组化检测肝癌组织中 HMMR 的表达;通过划痕实验、Transwell 小室观察沉默/过表达 HMMR 对肝癌细胞迁移和侵袭能力的影响;通过小鼠肝癌肺转移模型观察沉默 HMMR 对肝癌肺转移的影响;采用 Western blot 检测 HMMR 对 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、p-MEK、p-ERK 等蛋白水平的影响。**结果** 肝癌细胞系中 HMMR 呈高表达。肝癌组织中 HMMR 的表达水平显著高于癌旁组织($P<0.05$),并且转移组癌组织中 HMMR 的水平明显高于非转移组($P<0.05$)。沉默 HMMR 后细胞的迁移侵袭能力明显低于对照组($P<0.01$),并且 E-cadherin 表达上调,N-cadherin、Vimentin 表达下调($P<0.01$);而过表达 HMMR 后细胞迁移侵袭能力显著增强($P<0.01$),并且 N-cadherin、Vimentin 表达上调,E-cadherin 表达下调($P<0.01$)。体内实验结果显示基因敲减 HMMR 的肝癌细胞导致的肺转移病灶数显著低于对照组($P<0.05$);过表达 HMMR 后 p-MEK 和 p-ERK 表达上调($P<0.01$),而 MEK、EKR 无明显变化($P>0.05$)。MEK 抑制剂削弱了过表达 HMMR 介导的细胞的迁移侵袭($P<0.01$)。**结论** HMMR 在肝癌中高表达并且可能通过调控 MEK/ERK 信号通路从而促进肝细胞癌侵袭转移。

[关键词] 肝细胞癌;透明质酸介导的细胞游走受体;上皮-间质转化;转移;MEK/ERK 信号通路
[中图法分类号] R394.3; R73-37; R735.7 [文献标志码] A

HMMR promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma *via* activating MEK/ERK signaling pathway

LI Xun[1], YAN Jiao[2], CAI Shunli[1], CHEN Huajian[1] [1]Department of Clinical Laboratory, [2]Department of Hepatobiliary Surgery, Chongqing Emergency Medical Center, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of hyaluronan-mediated motility receptor (HMMR) on the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods** The expression levels of HMMR in HCC cell lines and tissues were detected by qRT-PCR, Western blotting and immunohistochemical assay. The effects of silencing/overexpression of HMMR on the migration and invasion of HCC cells were observed by wound healing test and Transwell assay. Control HMMR cells and shRNA targeting HMMR cells were respectively injected into nude mice *via* tail vein to construct a mouse model of lung metastasis. Western blotting was used to detect the effect of HMMR expression on the protein levels of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, p-MEK and p-ERK. **Results** HMMR was highly expressed in liver cancer cell lines, and was generally up-regulated in HCC tissues than adjacent normal tissues ($P<0.05$), and the mRNA and protein levels of HMMR were significantly higher in the metastatic HCC tissues than the non-metastatic HCC tissues ($P<0.05$). Silencing HMMR weakened the migration and invasion abilities of cells ($P<0.01$), down-regulated E-cadherin protein level and up-regulated N-cadherin and Vimentin levels ($P<0.01$). While overexpression of HMMR promoted the motility and migration and invasion abilities of HCC cells ($P<0.01$), enhanced the expression of N-cadherin and Vimentin, and down-regulated the level of E-cadherin ($P<0.01$).

[通信作者] 陈华剑,E-mail:chenhuajian2205@126.com

2097-0927/Copyright © 2022,陆军军医大学(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/)

In vivo study showed that knockdown of HMMR resulted in significantly less lung metastases than the control group ($P<0.05$), while, overexpression of HMMR enhanced the levels of p-MEK and p-ERK ($P<0.01$), but had no effect on MEK and ERK levels ($P>0.05$). Furthermore, MEK inhibitor U1026 significantly reduced the migration and invasion abilities of HMMR-overexpressed Huh7 cells ($P<0.01$). **Conclusion** HMMR is highly expressed in HCC cells, and may promote the migration and invasion of HCC cells *via* MEK/ERK signaling pathway.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; hyaluronan-mediated motility receptor; epithelial-mesenchymal transition; metastasis; MEK/ERK signaling pathway

Corresponding author: CHEN Huajian, E-mail: chenhuajian2205@126.com

据最新全球癌症统计数据报告,肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)的发病率居所有恶性肿瘤第6位,但致死率高居第3位[1]。侵袭与转移是导致肝癌高死亡率的主要原因,然而当前关于肝癌侵袭转移的分子机制仍没有完全阐明。透明质酸介导的细胞游走受体(hyaluronan-mediated motility receptor,HMMR)作为细胞外基质重要组成成分透明质酸的相关膜受体之一,在胶质瘤、乳腺癌、胃癌、结直肠癌、膀胱癌等多种人类恶性肿瘤中高表达[2-6],提示 HMMR 可能作为一个重要的肿瘤相关抗原参与并调控肿瘤的发生发展。相关研究还发现 HMMR 在 HCC 中的表达水平也显著增高,并且与 HCC 患者预后不良密切相关[7],进一步还发现 HMMR 高表达与 HCC 患者的临床分期和病理分级呈明显的正相关关系[8],这些结果揭示了 HMMR 可能在 HCC 的侵袭转移中发挥着作用。但截至目前,HMMR 在 HCC 侵袭转移过程中发挥的具体作用及其分子机制仍不明了。因此本文旨在探究 HMMR 对 HCC 侵袭转移的作用及其可能的生物学机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 肝癌及癌旁组织样本 12例肝癌及对应癌旁组织的冻存样本用于检测 HMMR 的表达水平。样本来源于2013年8月至2015年8月于重庆市急救医疗中心肝胆外科接受肝癌肝切除术的患者。肝癌组织样本经病理诊断证实为肝细胞癌。癌旁肝组织的获取参照《原发性肝癌规范化病理诊断指南》(2015年版),取自距离肿瘤组织1 cm以上的肝脏组织。术后3年内连续每年对患者进行追踪随访,经 B 超、CT、MRI 等影像学检查发现肝内外转移者即诊断为肝癌伴转移。

1.1.2 细胞和动物 肝癌细胞株 MHCC97H 购自复旦 IBS 细胞资源中心。细胞株 L02、SK-Hep-1、Huh7 和 PLC/PRF/5 由本实验室传代及保存。12只6周龄健康雄性裸鼠,体质量(20.6±1.2)g,购买并代养于重庆医科大学实验动物中心。

1.1.3 试剂 高糖 DMEM 培养液、胎牛血清购自 Gibco 公司。Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Thermo Fisher 公司。Transwell 小室购自美国 Corning。HMMR 抗体、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 和 GAPDH 抗体购自 Proteintech 公司。MEK、p-MEK、ERK、p-ERK 抗体购自 Bioworld 公司。靶向 HMMR 的慢病毒购自吉凯基因公司。MEK 抑制剂 U1026 购自 MCE 公司。靶向 HMMR 的 siRNA 由吉玛基因公司设计并合成;相关引物均由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染和感染 常规用高糖 DMEM、10%胎牛血清和1%青链霉素双抗于37 ℃,5%CO_2孵箱中培养细胞。参照吉玛公司提供的说明书溶解 siRNA,采用 lipofectamine 2000 转染试剂将靶向 HMMR 的 siRNA 转染至肝癌细胞构建沉默 HMMR 的细胞模型(siHMMR-1组、siHMMR-2组),同时转染与 HMMR 的序列无同源性的 siRNA 作为阴性对照(siNC 组)。利用 lipofectamine 2000 转染试剂将携带 HMMR 的 pcDNA3.1 质粒转染至肝癌细胞构建 HMMR 过表达细胞模型(HMMR 组),同时转染空白质粒作为阴性对照(pcDNA3.1 组)。另一方面,稳定敲减 HMMR 细胞株(shHMMR 组)的构建则根据吉凯基因提供的慢病毒感染手册进行操作,病毒感染后72 h在细胞中加入终浓度1.5 μg/mL的嘌呤霉素进行筛选,筛选7 d后将嘌呤霉素浓度减至1/4继续维持。同时构建空白敲减的细胞株作为阴性对照(shNC 组)。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 适量 TRIzol 裂解细胞或组织样本,利用天根公司 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。取1 μg所提 RNA,通过逆转录试剂盒获得相应 cDNA。利用 TaKaRa 公司的 SYBR Green 试剂盒检测 HMMR 的 mRNA 水平。HMMR 上游引物为:5′-AGCAACAGGAGGAAGACT-3′,下游引物为:5′-ATAGAGGAGACGCCACTT-3′。GAPDH 上游引

物为:5′-TATGACAACAGCCTCAAGAT-3′,下游引物为:5′-AGTCCTTCCACGATACCA-3′。PCR 程度为:95 ℃,2 min;95 ℃,15 s,60 ℃,20 s,72 ℃,20 s,40 个循环;72 ℃,5 min。相对定量 PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析。关于组织样本,以癌旁组织为对照,癌组织中 HMMR 的 mRNA 水平升高大于 1.5 倍的定义为 HMMR 高表达,而降低大于 1.5 倍的则定义为 HMMR 低表达。

1.2.3 Western blot 检测 取 30 μg 细胞或组织总蛋白经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,后转膜至 PVDF 膜,5%牛奶封闭 2 h,TBST 洗膜 3 次后加入一抗(抗 HMMR 1∶2 000,抗 E-cadherin 1∶1 000,抗 N-cadherin;1∶1 000,抗 Vimentin 1∶2 000,抗 p-MEK 1∶1 000,抗 MEK 1∶2 000,抗 p-ERK 1∶1 000,抗 ERK 1∶2 000,GAPDH 1∶5 000),4℃摇床孵育过夜。次日洗膜后室温孵育抗兔或抗鼠二抗,ECL 显影。

1.2.4 免疫组化实验 石蜡包埋肝癌及癌旁组织切片,55 ℃烤箱过夜。次日,取出切片,再置于 95 ℃烤箱,10 min。然后依次经历脱蜡、抗原修复、透膜,内源性过氧化物酶阻断剂室温封闭 10 min。接着山羊工作血清室温封闭 1 h。滴加一抗(1∶100,TBS 稀释)后于 4 ℃暗盒孵育过夜。次日,TBS 清洗 3 次后滴加生物素标记二抗孵育 1 h。DAB 显色后,苏木精复染,梯度酒精、二甲苯脱水后中性树脂封片。显微镜下观察并拍照。

1.2.5 细胞划痕实验 采用 1 mg/mL 丝裂霉素预处理细胞 2 h,去除细胞增殖对迁移侵袭的影响。然后以 30×10^4/孔接种至 6 孔板,次日细胞铺满整孔。10μL 枪头垂直并均匀的横过细胞,造成“创口”。PBS 清洗 3 次去除划下的细胞,加入无血清培养基培养,置于 37 ℃,5%CO_2 培养箱中培养。按 0、24 h 取样,随机取 5 个视野拍照。根据公式计算:细胞迁移率 =(0 h 划痕宽度−24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度×100%。

1.2.6 Transwell 实验 沉默 HMMR 的 MHCC97H 细胞取 8×10^4/小室,过表达 HMMR 以及 10 μmol/L U1026 处理 48 h 后的 Huh7 细胞分别取 20×10^4/小室进行实验。接种至小室前细胞经丝裂霉素预处理,方法同前。①迁移:细胞用 300 μL 无血清培养基重悬后加入普通 Transwell 小室内,小室外加入 800 μL 常规培养基,置于孵箱中孵育;②侵袭:提前从−20 ℃冰箱取出含基质胶的 Transwell 小室置于 24 孔板中,小室内外加入适量无血清培养基后于孵箱中预热小室 30 min。吸弃孔内外培养基,按照细胞迁移实验的操作步骤加入细胞。24 h 后从孵箱中取出小室,PBS 清洗 2 次,轻柔地用棉签擦净小室内膜的细胞,然后小室置于 4%多聚甲醛中固定 15 min。双蒸水清洗 2 次后,用 0.1%结晶紫溶液染色 30 min。双蒸水冲洗、晾干后,显微镜下拍照并随机选取 5 个视野计数穿过小室的细胞数。

1.2.7 裸鼠尾静脉肝癌肺转移模型 12 只裸鼠随机分为 2 组,每组 6 只。稳定敲减 HMMR 的 MHCC97H 细胞和空白敲减细胞,分别以灭菌生理盐水重悬后以 2×10^6/300 μL 经尾静脉注射入裸鼠体内。每 3~5 天观察小鼠存活情况。8 周后处死裸鼠,取出肺组织,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片和 HE 染色。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 进行统计学分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间比较采用 Student-t 检验,两组以上比较采用单因素方差分析。采用卡方检验分析患者临床病理特征与 HMMR 表达的相关性。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌患者不同临床病理特征中 HMMR 的表达

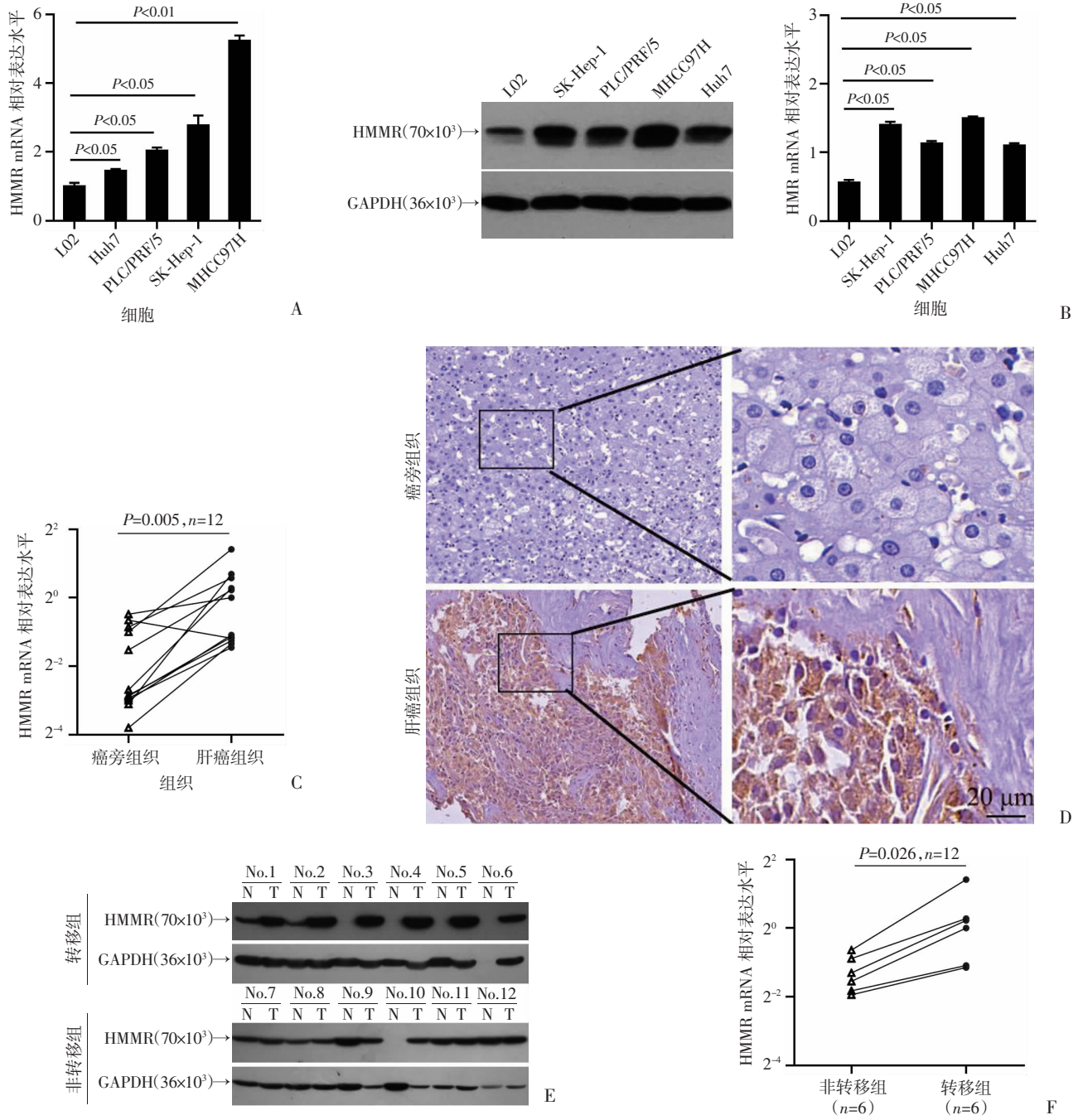
采用卡方检验分析 12 例肝癌患者临床病理特征与 HMMR 表达水平的关系,发现 HMMR 的表达水平与肝癌 TNM 分期存在显著的相关性(表 1)。虽然 5 例伴有肺转移患者癌组织中 HMMR 的表达均增高,但数据分析并未检测到 HMMR 表达水平与肝癌肺转移之间的相关性,考虑可能与样本数偏少有关。

表 1 12 例肝癌患者不同临床病理特征中 HMMR 的表达情况

基本信息	数量	HMMR 的表达		P 值
		高(n=9)	低(n=3)	
性别				
男	8	7	1	0.157
女	4	2	2	
年龄/岁				
≤50	2	1	1	0.371
>50	10	8	2	
AFP/μg·mL^{-1}				
≤400	6	4	2	0.505
>400	6	5	1	
肿瘤大小/cm				
≤5	5	3	2	0.311
>5	7	6	1	
肺转移				
有	5	5	0	0.091
无	7	4	3	
TNM 分期				
Ⅰ+Ⅱ	6	3	3	0.046
Ⅲ+Ⅳ	6	6	0	

2.2　HMMR 在肝癌细胞系和肝癌组织中高表达

采用 qRT-PCR 和 Western blot 法检测正常人肝细胞 L02 和 4 种肝癌细胞系,以及 12 对肝癌和癌旁组织中 HMMR 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果显示肝癌细胞中 HMMR 的表达水平均明显高于 L02 细胞(图 1A、B),并且 HMMR 的 mRNA 水平在高侵袭性肝癌细胞系 MHCC97H 的表达量最高,在低侵袭性肝癌细胞 Huh7 中的表达最低。此外,临床样本检测结果也发现肝癌组织中 HMMR 的相对表达水平高于癌旁组织($P<0.05$,图 1C、D),并且转移组肝癌组织中 HMMR 的相对表达水平明显高于非转移组($P<0.05$,图 1E、F)。以上结果提示 HMMR 可能在肝癌中发挥了促癌转移的作用。



A:qRT-PCR 检测正常肝细胞和肝癌细胞中 HMMR mRNA 的表达;B:Western blot 检测正常肝细胞和肝癌细胞中 HMMR 蛋白表达及半定量分析;C:肝癌和癌旁组织中 HMMR mRNA 的表达;D:免疫组化观测肝癌和癌旁组织中 HMMR 的蛋白表达和定位;E:肝癌和癌旁组织中 HMMR 蛋白的表达　N:癌旁组织;T:癌组织;F:转移组和非转移组肝癌组织中 HMMR mRNA 的表达($n=6$)

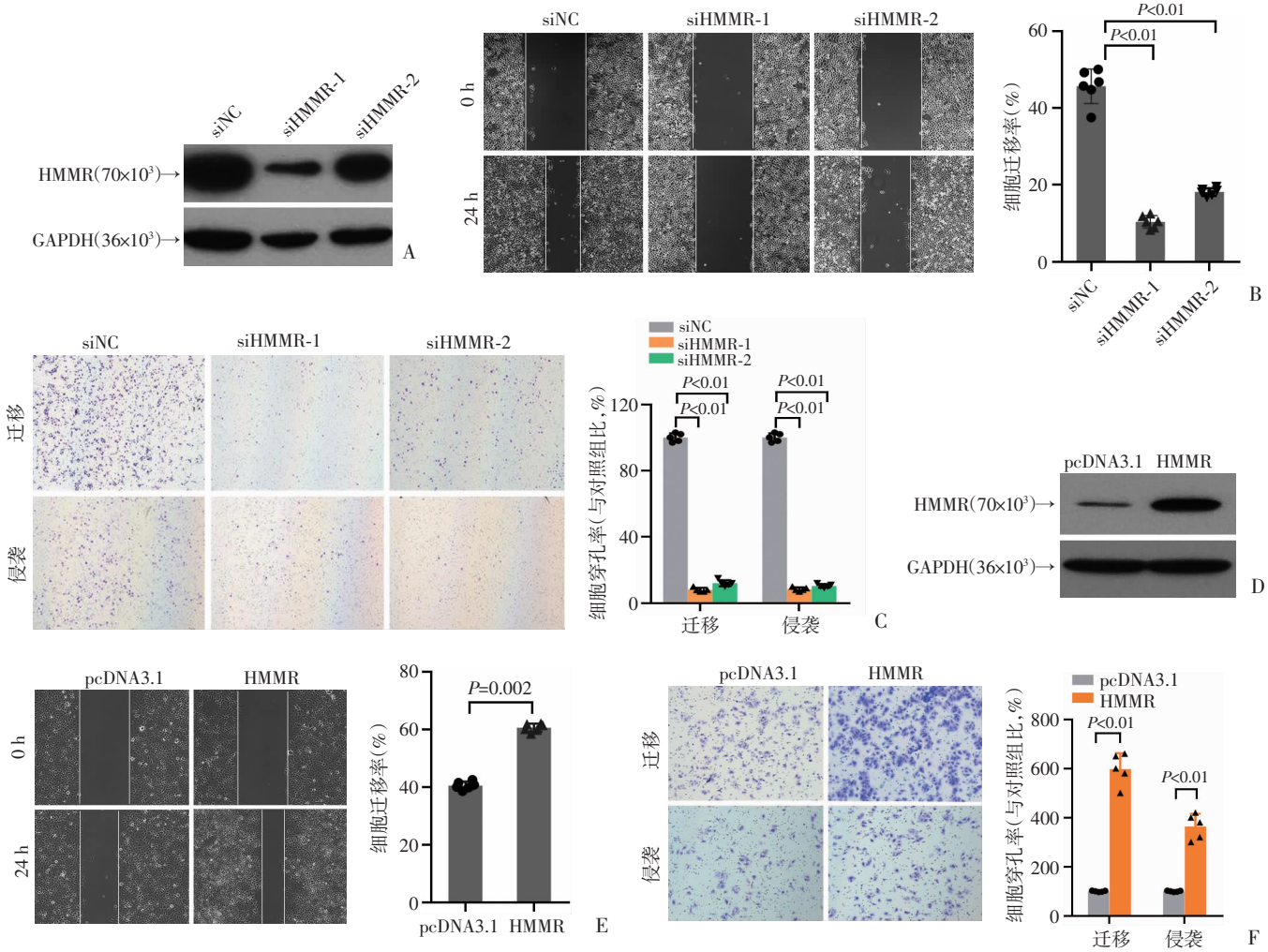
图 1　HMMR 在肝癌细胞系和肝癌组织中的 mRNA 和蛋白表达水平

2.3　HMMR 的表达对肝癌细胞迁移侵袭能力的影响

利用 siRNA 沉默 MHCC97H 细胞中 HMMR 的表达(图 2A),划痕实验结果表明,siHMMR-1 组、siHMMR-2 组沉默 HMMR 表达后,细胞的"愈合"能力明显低于 siNC 组($P<0.01$,图 2B),Transwell 实验也显示 siHMMR-1 组和 siHMMR-2 组细胞在有或无基质胶小室底滤膜上的数量较 siNC 组减少($P<0.01$,图 2C)。提示 HMMR 表达降低后细胞迁移和侵袭能力减弱。另一方面,过表达 HMMR 后(图 2D),HMMR 组 Huh7 细胞的"愈合"率明显高于 pcDNA3.1 组($P<0.01$,图 2E),Transwell 实验也显示 HMMR 组细胞穿透小室底膜的数量明显多于 pcDNA3.1 组($P<0.01$,图 2F),提示 HMMR 过表达后细胞迁移及侵袭能力增强。

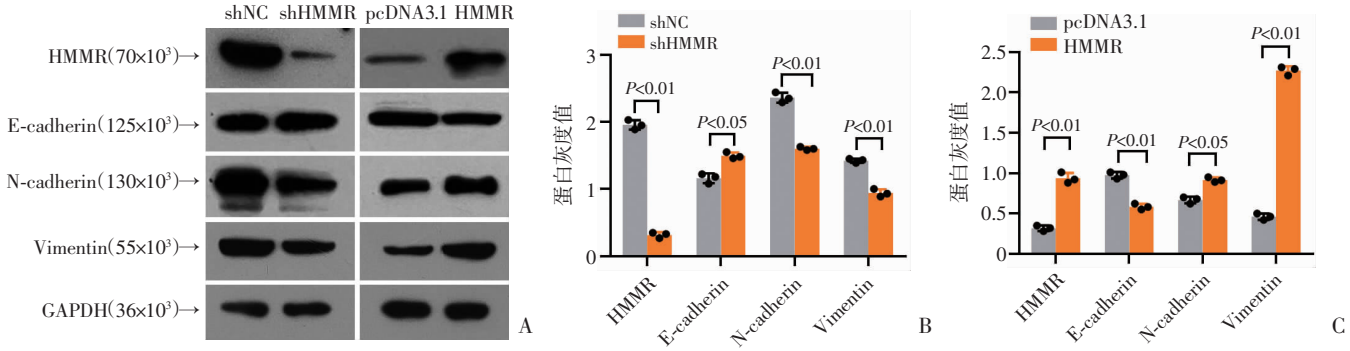
2.4　HMMR 的表达对肝癌细胞 EMT 的影响

采用 Western blot 检测沉默/过表达 HMMR 之后细胞中上皮间质转化(epithelialm-esencFhymal transition,EMT)相关蛋白 E-cadherin、Vimentin 和 N-cadherin 的表达变化。结果显示,与对照组比较,沉默 HMMR 后 N-cadherin 和 Vimentin 的表达下调,E-cadherin 表达上调;而过表达 HMMR 后 N-cadherin 和 Vimentin 的表达上调,E-cadherin 表达下调,差异均有统计学意义($P<0.05$,图 3)。



A、D: Western blot 检测沉默或过表达 HMMR 后细胞中 HMMR 的表达;B:沉默 HMMR 后划痕实验结果(100×);C:沉默 HMMR 后 Transwell 实验结果(200×);E:HMMR 过表达后划痕实验结果(100×);F:HMMR 过表达后 Transwell 实验结果(200×)

图 2　HMMR 对肝癌细胞迁移侵袭能力的影响



A:Western blot 检测沉默/过表达 HMMR 后细胞中 EMT 相关蛋白的表达;B:沉默 HMMR 后细胞中 EMT 相关蛋白表达的灰度值;C:过表达 HMMR 后细胞中 EMT 相关蛋白表达的灰度值

图 3 沉默/过表达 HMMR 后 EMT 相关蛋白表达水平的变化

2.5 HMMR 表达变化对肝癌肺转移的影响

通过尾静脉注射 HMMR 稳定沉默的 MHCC97H 细胞和对照组细胞(图 4A),结果显示,稳定沉默 HMMR 的肝癌细胞引起的小鼠肺转移病灶的数量明显低于 shNC 对照组($P<0.05$,图 4B、C)。

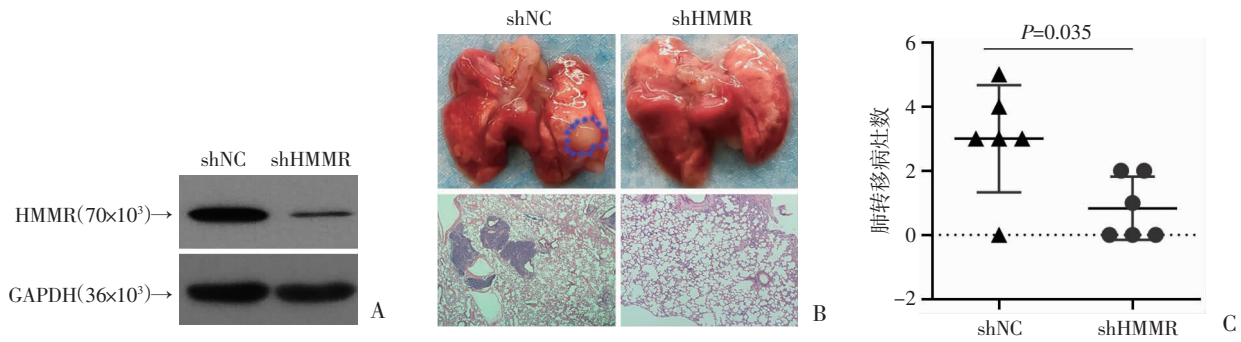
2.6 HMMR 表达变化对 MEK/ERK 信号通路的影响

通过 Western blot 检测 HMMR 对细胞中 MEK、ERK、p-MEK 以及 p-ERK 的蛋白水平的影响,结果见图 5A,过表达 HMMR 后,细胞中 p-MEK 和 p-ERK 的表达水平显著上调($P<0.01$),但 MEK 和 ERK 的蛋白表达水平无明显变化($P>0.05$)。采用 MEK 抑制剂 U1026 处理细胞 48 h,结果发现处理后的细胞中上调的 p-MEK 和 p-ERK 的蛋白表达水平明显下调($P<0.01$),但 MEK 和 ERK 的蛋白表达水平无明显变化($P>0.05$)。并且抑制剂处理后的细胞其迁移侵袭能力也显著降低($P<0.01$,图 5B),证实 MEK/ERK 信号通路介导了 HMMR 对肝癌细胞迁移侵袭的促进作用。

3 讨论

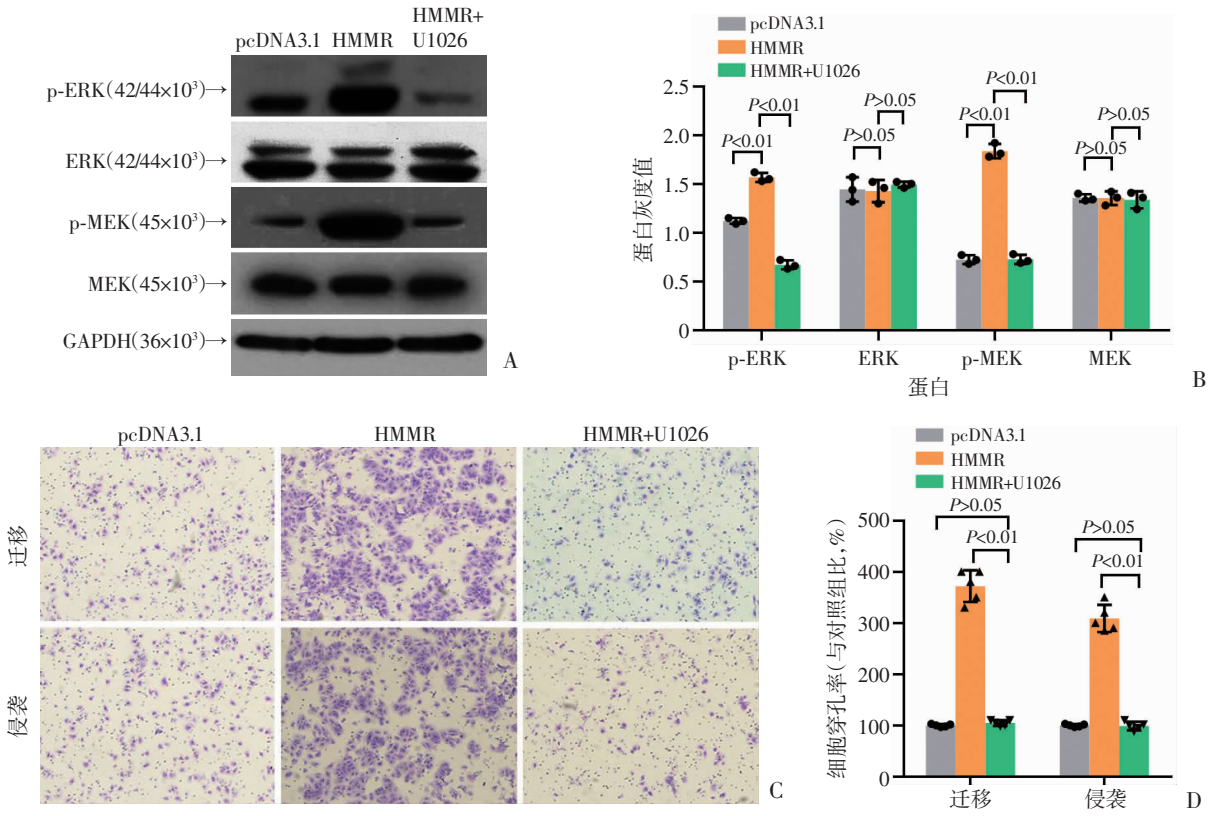
肝细胞癌是我国人民因癌症死亡的主要病因之一,而导致 HCC 高致死率的最主要原因就是转移和术后复发。现有的分子靶向药物索拉菲尼等虽可一定程度延长晚期肝癌患者的生命,但仍无法防治肝癌复发和转移。因此,深入研究 HCC 侵袭转移的发生机制,探索能够预测、监测 HCC 转移的潜在标记物,甚至找到能够有效延缓或终止肝癌转移的方法,是解决目前肝癌治疗难题的关键措施,对实现个体化治疗,延长患者生存时间具有重要意义。

研究报道 HMMR 通过参与细胞运动从而在多种恶性肿瘤的发生、发展中发挥关键作用[10]。在 HCC 中,王敏等[11]和黄晨阳等[12]均报道 HMMR 在肝癌组织的表达水平显著高于癌旁正常组织,并且高表达 HMMR 的肝癌患者预后较差。同时,细胞水平的研究还发现 HMMR 可以促进肝癌细胞的增殖[12]。然而,HMMR 在 HCC 转移中的作用尚不清楚。本研究首先在细胞层面证实 HMMR 在肝癌细胞系中高表达,并且发现高侵袭性肝癌细胞中 HMMR 的表达量显著高于低侵袭性肝癌细胞。接着,在临床样本中检测发现 HMMR 与转移性 HCC 之间的潜在关系,提示 HMMR 可能在HCC的侵袭转移中具有重要作用。鉴于肝癌



A:Western blot 检测稳定沉默 HMMR 的细胞株中 HMMR 的表达;B:HE 染色观察裸鼠肝癌细胞肺转移(200×);C:肺转移计数

图 4 HMMR 对肝癌细胞肺转移的影响



A:Western blot 检测 MEK、p-MEK、ERK、p-ERK 蛋白的表达及半定量分析;B:Transwell 实验检测细胞迁移侵袭能力的变化(×200)

图 5 过表达 HMMR 经 MEK 抑制剂 U1026 处理后对各组细胞 MEK/ERK 信号通路的影响

的侵袭深度和远处转移是导致患者预后差的关键因素,为了明确 HMMR 在 HCC 侵袭转移中的作用,本研究分别以 MHCC97H 和 Hun7 细胞为研究对象进行一系列体内外实验,结果发现沉默 HMMR 可以抑制肝癌细胞的迁移侵袭和肺转移,而过表达 HMMR 可以增强肝癌细胞的迁移侵袭能力。另有研究发现 HMMR 在伤口愈合过程中增加并促进细胞迁移,这一过程可能与 EMT 密切相关[13]。ZHANG 等[14]研究发现 HMMR 通过激活 TGF-β/Smad2 信号通路诱导 EMT 并增强胃癌细胞的干细胞特性。LU 等[15]报道在头颈癌中高表达 HMMR 后下游富集最显著的通路依次是 KRAS 信号路径、EMT 相关通路等。然而,在肝细胞癌中 HMMR 与 EMT 的关系尚不明确。本研究结果发现沉默 HMMR 可以上调 E-cadherin 的表达,同时下调 N-cadherin 和 Vimentin 的表达;而过表达 HMMR 后 E-cadherin 的表达却下降,N-cadherin 和 Vimentin 表达增高,提示 HMMR 表达变化可以调控 EMT,HMMR 可能通过 EMT 进程参与调控 HCC 的侵袭转移。

透明质酸与其受体相互作用引发的细胞内一系列复杂的信号通路是透明质酸参与细胞运动调节的主要机制。CD44 和 HMMR 是细胞表面两种主要的透明质酸受体。既往研究围绕 CD44 开展的比较多,已有报道透明质酸结合 CD44 可以通过激活 SRC/MEK/ERK,PI3K/AKT/mTOR,以及 PI3K-4EBP1-SOX2 等信号通路调控肿瘤细胞的干性、增殖、迁移和侵袭[16-17]。而作为透明质酸的主要受体之一的 HMMR,现有研究对于其发挥生物学功能的分子机制却报道极少。ASSMANN 等[18]发现 HMMR 可以与细胞内的激酶、钙调蛋白和细胞骨架微管蛋白结合,提示 HMMR 可能参与细胞骨架重组。MISSINATO 等研究[19]发现透明质酸与 HMMR 结合后可通过激活 SRC/FAK 信号通路最终引起心外膜细胞 EMT 和迁移。以上这些研究提示 HMMR 被激活后可能也是通过细胞内信号的级联放大反应来发挥生物学功能的。在前人研究的基础上[9],本研究还发现在肝癌细胞内 HMMR 的表达变化可以引起 MEK/ERK 信号通路活性的改变;且 MEK 抑制剂可以明显减弱高表达 HMMR 所引起的细胞迁移侵袭能力的增加,以及 MEK 和 ERK 磷酸化水平的升高,证实 HMMR 可通过调控 MEK/ERK 信号通路参与调控肝癌细胞的迁移侵袭。MEK/ERK 信号通路是丝裂原活化蛋白激酶级联反应的经典通路,也是研究最多的激酶通路,其在肿瘤细胞的迁移和转移过程中有

着不可或缺的作用。本研究结果证实 HMMR 在肝癌侵袭转移中的关键作用,同时也揭示 HMMR 促进肝癌细胞转移的潜在分子机制,为探索肝癌新型分子标记物以及预防肝癌侵袭转移新方法提供一定的理论依据。

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] LI J Y, JI X J, WANG H D. Targeting long noncoding RNA HMMR-AS1 suppresses and radiosensitizes glioblastoma[J]. Neoplasia, 2018, 20(5): 456-466. DOI:10.1016/j.neo.2018.02.010.

[3] LU X Q, ZHANG J Q, ZHANG S X, *et al*. Identification of novel hub genes associated with gastric cancer using integrated bioinformatics analysis[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 697. DOI:10.1186/s12885-021-08358-7.

[4] KANG H G, KIM W J, KANG H G, *et al*. Galectin-3 interacts with C/EBPβ and upregulates hyaluronan-mediated motility receptor expression in gastric cancer[J]. Mol Cancer Res, 2020, 18(3): 403-413. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-19-0811.

[5] CHEN W G, GAO C, LIU Y, *et al*. Bioinformatics analysis of prognostic miRNA signature and potential critical genes in colon cancer[J]. Front Genet, 2020, 11: 478. DOI:10.3389/fgene.2020.00478.

[6] YANG D, MA Y, ZHAO P C, *et al*. Systematic screening of protein-coding gene expression identified HMMR as a potential independent indicator of unfavorable survival in patients with papillary muscle-invasive bladder cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120: 109433. DOI:10.1016/j.biopha.2019.109433.

[7] SHEN S, KONG J J, QIU Y W, *et al*. Identification of core genes and outcomes in hepatocellular carcinoma by bioinformatics analysis[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 10069-10081. DOI:10.1002/jcb.28290.

[8] DAI Q H, LIU T, GAO Y C, *et al*. Six genes involved in prognosis of hepatocellular carcinoma identified by Cox hazard regression[J]. BMC Bioinformatics, 2021, 22(1): 167. DOI:10.1186/s12859-021-04095-7.

[9] ZHANG S, CHANG M C, ZYLKA D, *et al*. The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase[J]. J Biol Chem, 1998, 273(18): 11342-11348. DOI:10.1074/jbc.273.18.11342.

[10] HE Z C, MEI L, CONNELL M, *et al*. Hyaluronan mediated motility receptor (HMMR) encodes an evolutionarily conserved homeostasis, mitosis, and meiosis regulator rather than a hyaluronan receptor[J]. Cells, 2020, 9(4): E819. DOI:10.3390/cells9040819.

[11] 王敏, 陈泽峰, 韩志伟, 等. 基于 TCGA 数据库分析肝细胞肝癌组织中 HMMR 表达与患者临床特征及预后的相关性[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(7): 1173-1178. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2021.07.015.
WANG M, CHEN Z F, HAN Z W, *et al*. The correlation between the expression of HMMR and clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma based on TCGA database[J]. J Mod Oncol, 2021, 29(7): 1173-1178. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2021.07.015.

[12] 黄晨阳, 李强, 程斌. HMMR 促进原发性肝癌细胞增殖且与不良预后的相关性[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(7): 861-866. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.07.021.
HUANG C Y, LI Q, CHENG B. Clinical significance of HMMR expression in liver cancer patients and its influence on proliferation of liver cancer cell[J]. Int J Lab Med, 2020, 41(7): 861-866. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.07.021.

[13] YE S, LIU Y, FULLER A M, *et al*. TGFβ and hippo pathways cooperate to enhance sarcomagenesis and metastasis through the hyaluronan-mediated motility receptor (HMMR)[J]. Mol Cancer Res, 2020, 18(4): 560-573. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-19-0877.

[14] ZHANG H Z, REN L L, DING Y, *et al*. Hyaluronan-mediated motility receptor confers resistance to chemotherapy via TGFβ/Smad2-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer[J]. FASEB J, 2019, 33(5): 6365-6377. DOI:10.1096/fj.201802186R.

[15] LU T Z, ZHENG Y H, GONG X C, *et al*. High expression of hyaluronan-mediated motility receptor predicts adverse outcomes: a potential therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma[J]. Front Oncol, 2021, 11: 608842. DOI:10.3389/fonc.2021.608842.

[16] YANG C X, SHENG Y M, SHI X X, *et al*. CD44/HA signaling mediates acquired resistance to a PI3Kα inhibitor[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(10): 831. DOI:10.1038/s41419-020-03037-0.

[17] GOMEZ K E, WU F L, KEYSAR S B, *et al*. Cancer cell CD44 mediates macrophage/monocyte-driven regulation of head and neck cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2020, 80(19): 4185-4198. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-20-1079.

[18] ASSMANN V, JENKINSON D, MARSHALL J F, *et al*. The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments[J]. J Cell Sci, 1999, 112(Pt 22): 3943-3954. DOI:10.1242/jcs.112.22.3943.

[19] MISSINATO M A, TOBITA K, ROMANO N, *et al*. Extracellular component hyaluronic acid and its receptor Hmmr are required for epicardial EMT during heart regeneration[J]. Cardiovasc Res, 2015, 107(4): 487-498. DOI:10.1093/cvr/cvv190.

(**收稿**:2022-03-01;**修回**:2022-05-09)

(编辑 汪勤俭)