

网络出版时间:2025-05-12 16:30:17 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250509.1630.022

PLVAP 通过 PI3K/AKT 通路促进肝细胞癌增殖、迁移和侵袭

王菊琴¹,何淋玲¹,沈钰娜²,王晓楠^{1,3}(安徽医科大学¹基础医学院病理学教研室、²法医学系、³病原与免疫学实验室,合肥 230032)

摘要 **目的** 探讨质膜囊泡相关蛋白(PLVAP)在肝细胞癌(HCC)进展中的作用及其机制。**方法** 分别使用生物信息学分析、实时荧光定量 PCR、Western blot 及免疫组化检测 PLVAP 在 HCC 和癌旁非肿瘤组织中的表达水平及其与临床病理特征的关系;分别构建敲低和过表达 PLVAP 的 HCC 稳转细胞系,通过 CCK-8、克隆形成、划痕实验和 Transwell 实验检测 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭能力;通过 Western blot 检测 PLVAP 敲低和过表达后 PI3K/AKT 通路中磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、磷酸化 PI3K(p-PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)和磷酸化 AKT(p-AKT)的蛋白水平;利用 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002 处理 PLVAP 过表达细胞系并检测细胞增殖、迁移和侵袭能力的改变。**结果** PLVAP 在 HCC 组织中的表达高于癌旁非肿瘤组织($P < 0.05$),并与肿瘤 Stage 分期、T 分期、M 分期和微血管侵犯呈正相关($P < 0.05$);敲低 PLVAP 能够抑制 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭能力($P < 0.001$),而过表达 PLVAP 能够促进 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭能力($P < 0.01$);Western blot 检测结果显示敲低 PLVAP 能够降低 p-PI3K 和 p-AKT 的蛋白表达水平,过表达 PLVAP 能够增加 p-PI3K 和 p-AKT 的蛋白表达水平,而 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002 能消除 PLVAP 对细胞增殖、迁移和侵袭的作用($P < 0.01$)。**结论** PLVAP 在 HCC 中高表达,可能通过 PI3K/AKT 通路促进 HCC 的恶性进展。

关键词 PLVAP;肝细胞癌;增殖;迁移;侵袭;PI3K/AKT 信号通路

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)05-0860-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.05.012

原发性肝癌是世界上第六大常见的恶性肿瘤,也是恶性肿瘤死亡的第三大常见原因^[1]。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是肝癌的主要组织学亚型,占原发性肝癌的 85% 以上,因其耐化疗、易复发、转移及预后较差,5 年生存率仅为 15% ~ 38%^[2]。因此,探究 HCC 恶性进展的分子机制并寻找新的治疗策略对于 HCC 的早期诊断和治疗至关重要。

质膜囊泡相关蛋白(plasmalemma vesicle-associated protein, PLVAP)是一种内皮细胞特异性蛋白,参与形成血管的气孔和隔膜,并能够调节基底通透性、白细胞迁移和血管生成^[3]。大量研究^[4-6]表明,PLVAP 的表达水平与多种恶性肿瘤的预后和血管生成密切相关。据报道^[7],PLVAP 是 HCC 血管内皮细胞中特异性表达的基因,但 PLVAP 在 HCC 中的生物学功能尚不明确。该研究旨在探究 PLVAP 对 HCC 细胞生物学行为的影响及其潜在的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人正常肝细胞系 MIHA, HCC 细胞系 HCCLM3、Hep3B、Huh7、PLC/PRF/5、SK-hep1,人肾上皮细胞 HEK293T 从美国 ATCC 公司获得,于 10% 胎牛血清,1% 青-链霉素双抗溶液的高糖 DMEM 培养基中培养,培养条件为 37 °C、5% CO₂ 恒温箱。

1.1.2 临床样本 收集 2019 年 8 月至 2021 年 2 月在安徽医科大学第一附属医院病理科档案室存档的 111 例 HCC 及癌旁非肿瘤石蜡样本,每例组织标本对应的病理切片都经两位高年资病理医师确诊,同时收集每例组织标本对应的临床相关资料;另收集 2020 年 2 月至 2020 年 12 月期间 10 例新鲜的 HCC 及癌旁非肿瘤组织(距离癌边缘大于 2 cm)放入液氮中保存,用于提取组织 RNA 和蛋白质。本实验经安徽医科大学伦理委员会的批准(批准号:20210525)。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清、DMEM 培养基(货号:085-150、319-005)购自南京维森特生物技术有限公司;CCK-8 试剂盒(货号:C0005)购自上海陶术

2025-01-08 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82103572)

作者简介:王菊琴,女,硕士研究生;

王晓楠,女,高级实验师,硕士生导师,通信作者,E-mail:aydwxn@126.com

生物科技有限公司;蛋白裂解液 RIPA、蛋白酶抑制剂、结晶紫染液(货号:P0013C、ST2573-25g、C0121)购自上海碧云天生物技术公司;TRIzol 试剂(货号:15596018CN)购自上海赛默飞世尔仪器有限公司;反转录试剂盒(货号:AT101-03)购自北京全式金生物技术有限公司;免疫组化试剂盒、柠檬酸盐修复液、DAB 显色试剂盒和苏木精染液(货号:KIT-9720、MVS-0101、DAB-1031、CTS-1090)均购自福州迈新生物技术开发有限公司;敲低及过表达 PLVAP 质粒购自武汉森灵生物科技有限公司;LY294002(货号:S1105)购自美国 Selleck 公司;PLVAP 兔抗人多克隆抗体(货号:GB113141)购自武汉赛维尔生物技术有限公司;GAPDH 鼠抗人单克隆抗体(货号:60004-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司;磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-Kinase, PI3K)兔抗人单克隆抗体、磷酸化 PI3K(phosphorylated PI3K, p-PI3K)兔抗人单克隆抗体、蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)兔抗人单克隆抗体、磷酸化 AKT(phosphorylated AKT, p-AKT)兔抗人单克隆抗体(货号:4257s、17366s、4691s、4060s)购自美国 CST 公司。

1.1.4 主要仪器 CO₂ 恒温恒湿培养箱(型号:ICO50)购自德国 memmert 公司;细胞计数仪(型号:JIMBIO FIL)购自江苏卓微生物科技有限公司;掌上离心机(型号:S1010E)、漩涡混合仪(型号:SCI-VS)、翘板摇床(型号:SCI-RPro)、圆盘旋转混匀仪(型号:SCI-RD-E)、加热迷你金属浴(型号:SCI-100MiniH)购自美国赛洛捷克公司;电子天平(型号:BS 124)购自德国赛多利斯公司。

1.2 方法

1.2.1 公共数据库生信分析 通过 GEO 数据集(GSE121248、GSE60502、GSE12941、GSE76427)和 TCGA 数据集分析 HCC 癌组织与癌旁组织中差异表达的上调基因,基于在线数据库 UALCAN 分析和 GEO 数据集分析 PLVAP 在 HCC 组织与癌旁组织中的基因表达水平。

1.2.2 慢病毒包装和稳转细胞系构建 购买敲低质粒 shPLVAP(shPLVAP-1 和 shPLVAP-2)、过表达质粒 PLVAP(扩增编码 PLVAP 的 cDNA 序列,并将其克隆到 pcDNA3.1 载体)和阴性对照质粒。shPLVAP 序列如下,shPLVAP-1:5'-GCTGGTATTAC-CTGCGCTACT-3'; shPLVAP-2:5'-GGTGAGAACAG-GAAGCCATTC-3'。将 11.25 μg 目的质粒、3.75 μg pMD2G 和 7.5 μg psPAX2 混合均匀后加入 330 μl 0.1 × TE 溶液,56.5 μl 氯化钙溶液,加无菌水定容

至 570 μl;再缓慢逐滴加入 570 μl HBS 溶液,室温静置 15 min;最后将混合液缓慢逐滴加入 293T 细胞并摇匀。收集病毒上清液并使用 0.22 μm 滤膜过滤后分别感染 Hep3B 细胞和 Huh7 细胞,接着加入嘌呤霉素筛选表达目的质粒的稳转细胞系。最后收集上述稳转细胞系的蛋白,检测转染效率,构建成功后用于后续实验。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) TRIzol 试剂提取细胞或组织 RNA 后使用反转录试剂盒逆转录为 cDNA,按说明书向八联管中添加荧光染料、引物体系后置于 qPCR 仪中。引物序列如下: GAPDH, (正义链) 5'-AATGGCA-CAACTGGTCGTGGAC-3', (反义链) 5'-CCCTC-CAGGGGATCTGTTTG-3'; PLVAP, (正义链) 5'-CCGGGTCATCTACACGAACAA-3', (反义链) 5'-CCTTGAATTGATCTCTGCATTGC-3'。

1.2.4 蛋白质印迹(Western blot, WB)实验 配制含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液,提取细胞或组织总蛋白。10% SDS-PAGE 凝胶电泳,恒流 225 mA 转膜 90 min,1 × 快速封闭液室温封闭 20 min,一抗(按鼠抗 GAPDH 1 : 7 000,兔抗 PLVAP 1 : 1 000,兔抗 PI3K、兔抗 p-PI3K、兔抗 AKT、兔抗 p-AKT 均 1 : 500 的一抗稀释液稀释)4 °C 孵育过夜。次日 TBST 洗膜 3 次(10 min/次),二抗(鼠或兔二抗均按 1 : 10 000 的 TBST 稀释)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次(5 min/次),ECL 显影。

1.2.5 免疫组化(immunohistochemistry, IHC) 将石蜡样本切成 3 ~ 4 μm 的白片。采用 EnVision 两步法检测 PLVAP 在 HCC 切片组织中的表达水平,操作遵循以下步骤:脱蜡水化、柠檬酸盐高压修复、过氧化氢酶阻断剂封闭、滴加兔抗 PLVAP(1 : 400)孵育过夜、次日复温后 PBS 冲洗滴加山羊抗兔 IgG 二抗(1 : 500)孵育 30 min、DAB 显色、苏木精染色、脱水透明、中性树胶固定。结果判断:每张切片在镜下选取组织结构良好、背景清晰的阳性细胞最密集的 5 个区域,计数 100 个细胞中的阳性细胞数,将 5 个区域阳性细胞数的平均值作为计数指标。根据百分比大小计数指标可分为 4 级:10% ~ 25% 为 I 级(记为 1 分),26% ~ 50% 为 II 级(记为 2 分),51% ~ 75% 为 III 级(记为 3 分),76% ~ 100% 为 IV 级(记为 4 分)。染色强度评分:阴性(0 分),浅棕色(1 分),棕色(2 分),深棕色(3 分)。每张切片最后的表达强度为两种评分之乘积,< 4 分为低表达,≥ 4 分为高表达^[8]。

1.2.6 CCK-8 实验 将处于对数生长期的 HCC 细胞接种至 96 孔板(2 500 个/孔),细胞贴壁后更换新鲜培养基,加入 10 μ l CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 培养箱中避光培养 1 h,酶标仪测量 450 nm 处吸光度值,每隔 24 h 重复 1 次,共重复 5 次。

1.2.7 克隆形成实验 将处于对数生长期的 HCC 细胞接种至 6 孔板(500 个/孔),37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育 14 d。镜下观察待细胞形成集落后,去除培养基,4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,0.1% 结晶紫染色 30 min 后 PBS 洗净晾干后拍照。

1.2.8 细胞划痕实验 将处于对数生长期的 HCC 细胞接种至 6 孔板,镜下观察细胞密度达到 90% 以上,使用 10 μ l 枪头划线并更换为无血清培养基,拍照记录,48 h 后重复。

1.2.9 Transwell 实验 将处于对数生长期的 HCC 细胞计数后,无血清培养基重悬至 5×10^4 个/ml,取 200 μ l 加入 Transwell 上室(侵袭实验的小室提前用 60 μ l 稀释的基质胶包被),下室中加入 800 μ l 完全培养基。培养 24 h 后,4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,0.1% 结晶紫染色 30 min,用棉签将上室中的细胞轻轻擦去,显微镜观察并拍照统计。

1.2.10 药物处理 将处于对数生长期的 HCC 细胞按一定比例接种至 6 孔板,待细胞密度至 50% 时,使用 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002(工作浓度为 20 μ mol/L)处理 HCC 细胞 24 h 后,收集细胞用于后续功能实验。

1.2.11 统计学处理 所有实验独立重复 3 次后,使用 GraphPad Prism 9.0 软件统计分析,统计结果使用均数 $\pm$ 标准差表示。采用 *t* 检验对两组间数据进行分析,采用单因素方差分析对多组间数据进行分析,事后两两比较采用 Dunnett-*t* 检验,采用双因素方差分析对两组或多组间多个时间点数据进行分析,采用卡方检验对临床病理特征进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PLVAP 在 HCC 中的表达及其与临床病理特征的关系 分别对 GEO 数据集(包括 GSE121248、GSE60502、GSE12941、GSE76427)和 TCGA 数据库的 HCC 测序数据进行差异表达基因分析和上调基因的筛选,结果显示 10 个基因在数据集 HCC 组织中共同上调,其中包括 PLVAP(图 1A),由于 PLVAP 在 HCC 中的生物学功能尚无研究报道,因此选择 PLVAP 作为研究对象。UALCAN 数据库和 GEO 数

据集均显示 PLVAP 基因的表达水平在 HCC 组织中明显高于癌旁组织($t = 31.33, 28.20, 10.61, 23.25, 14.23$, 均 $P < 0.001$, 图 1B、1C)。基于 TCGA 的临床数据分析 PLVAP 表达水平与临床病理特征之间的关系,结果显示:高表达水平的 PLVAP 与肿瘤 stage 分期和 T 分期均具有正相关性(均 $P < 0.05$, 表 1)。

表 1 不同 PLVAP 水平 HCC 患者临床病理参数的差异性分析(TCGA) [n (%)]

Tab.1 Differential analysis of clinical pathological parameters in HCC patients with different levels of PLVAP (TCGA) [n (%)]

Patient	<i>n</i>	PLVAP expression		χ^2 value	<i>P</i> value
		Low	High		
Gender				0.41	0.52
Male	245	122 (68.54)	123 (71.51)		
Female	105	56 (31.46)	49 (28.49)		
Age (years)				3.34	0.07
≤ 60	170	95 (53.37)	75 (43.60)		
> 60	180	83 (46.63)	97 (56.40)		
Grade				3.71	0.29
G1	55	28 (15.73)	27 (15.70)		
G2	160	79 (44.38)	81 (47.09)		
G3	122	61 (34.27)	61 (35.47)		
G4	13	10 (5.62)	3 (1.74)		
Stage				15.00	< 0.01
I	161	95 (53.07)	66 (38.37)		
II	87	47 (26.40)	40 (23.26)		
III	97	35 (19.66)	62 (36.05)		
IV	5	1 (0.56)	4 (2.33)		
T stage				11.02	0.01
T1	175	102 (57.30)	73 (42.44)		
T2	85	31 (17.42)	54 (31.40)		
T3	77	39 (21.91)	38 (22.09)		
T4	13	6 (3.37)	7 (4.07)		
N stage				0.22	0.64
N0	238	119 (66.48)	119 (69.19)		
N1	112	59 (33.15)	53 (30.81)		
M stage				1.07	0.30
M0	251	132 (74.16)	119 (69.19)		
M1	99	46 (25.84)	53 (30.81)		

2.2 PLVAP 在 HCC 组织和细胞系中的表达及其与临床病理特征的相关性 IHC 结果显示:PLVAP 主要定位在胞膜和胞质;在 HCC 细胞中表达较高,间质中少量表达;PLVAP 在 HCC 组织中的表达水平高于癌旁组织(图 2A)。临床石蜡样本($n = 111$)中 PLVAP 的表达水平与临床病理特征的相关性分析显示:PLVAP 高表达与 T 分期、M 分期和微血管侵犯均呈正相关(均 $P < 0.05$, 表 2)。qPCR 和 WB 结果显示:HCC 组织中 PLVAP 的 mRNA 水平和蛋白水平均明显高于癌旁组织($t = 4.60, 5.01$, 均 $P <$

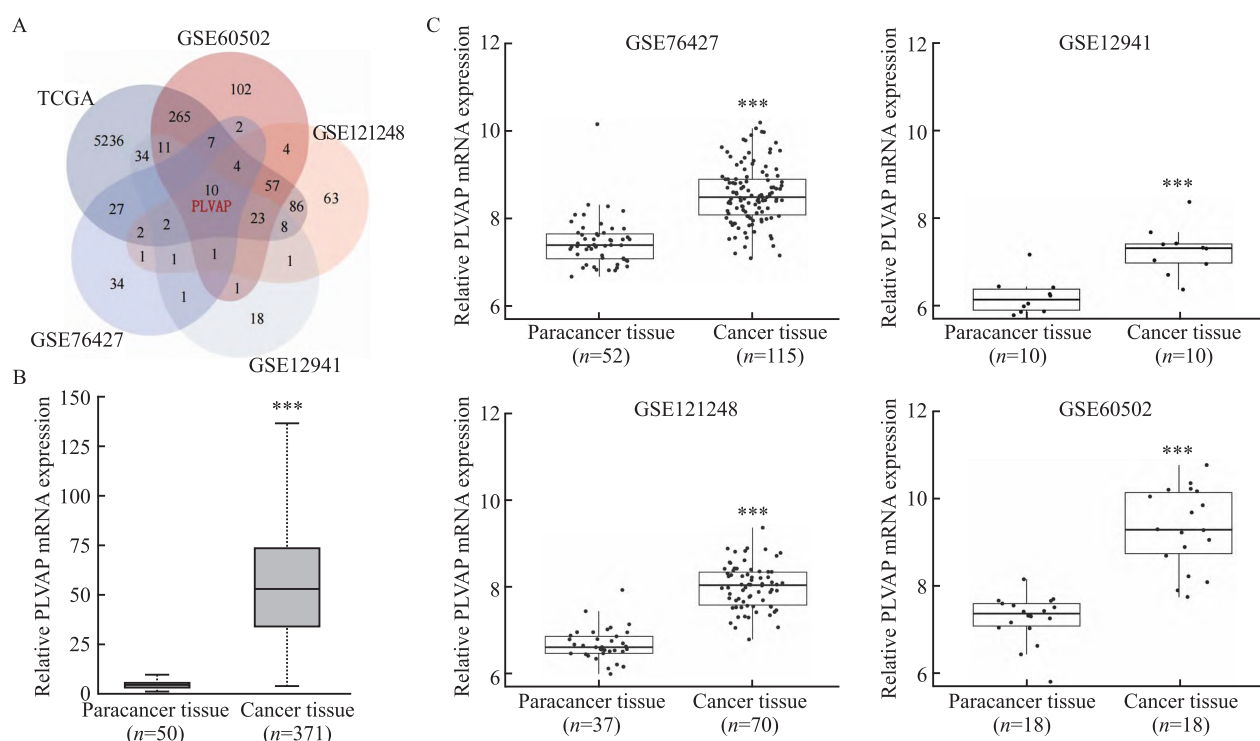


图1 PLVAP在HCC组织中的表达及其和临床病理特征相关性分析

Fig.1 Correlation analysis between PLVAP expression and clinicopathological characteristics in HCC tissue

A: Venn diagram showing the differential genes screened in HCC and paracancer tissues from the TCGA dataset and GEO datasets (GSE121248, GSE60502, GSE76427, GSE12941); B: The mRNA levels of PLVAP in HCC and paracancer tissues from the UALCAN database; C: The mRNA levels of PLVAP in HCC and paracancer tissues from the GEO database; *** $P < 0.001$ vs Paracancer tissue.

0.001,图2B、2C)。此外,检测人正常肝细胞系 MIHA 和 HCC 细胞系 HCCLM3、Hep3B、Huh7、PLC/PRF/5 和 SK-Hep1 中 PLVAP 的 mRNA 和蛋白表达水平,结果显示:HCC 细胞系中 PLVAP 的 mRNA 和蛋白表达水平均高于正常肝细胞系 MIHA ($t_{\text{mRNA}} = 3.59、18.03、11.19、17.63、12.54$, $t_{\text{蛋白}} = 3.11、27.06、13.42、19.43、19.21$, 均 $P < 0.05$, 图 2D、2E)。

2.3 PLVAP 对 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响 分别在 PLVAP 表达水平低的 Hep3B 细胞进行过表达、PLVAP 表达水平高的 Huh7 进行敲低稳转细胞株的构建, WB 验证转染效率显示:与对照组相比,转染 shPLVAP-1 质粒和 shPLVAP-2 质粒后 PLVAP 蛋白表达水平明显下降,而转染 PLVAP 过表达质粒后 PLVAP 蛋白水平明显上升 ($t = 9.75、8.93、14.94$, 均 $P < 0.001$, 图 3A)。CCK-8 实验显示:在第 5 天,敲低 PLVAP 组细胞的增殖能力较对照组降低,而过表达 PLVAP 组细胞的增殖能力较对照组增强 ($t = 5.75、9.22、4.90$, 均 $P < 0.001$, 图 3B)。克隆形成实验显示:敲低 PLVAP 组细胞的克隆形成能力较对照组能力降低,而过表达组细胞克

隆形成能力较对照组增强 ($t = 15.12、14.63、12.88$, 均 $P < 0.001$, 图 3C)。细胞划痕试验显示:敲低 PLVAP 组细胞划痕愈合能力较对照组减弱,过表达 PLVAP 组细胞划痕愈合能力较对照组增强 ($t = 12.64、13.36、8.11$, 均 $P < 0.01$, 图 3D)。Transwell 实验结果显示:敲低 PLVAP 组细胞迁移和侵袭能力较对照组降低,而过表达 PLVAP 组细胞的迁移和侵袭能力较对照组增强 ($t = 32.64、35.54、28.21、28.13、19.09、6.57$, 均 $P < 0.01$, 图 3E)。

2.4 PLVAP 通过激活 PI3K/AKT 通路促进 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭 为阐明 PLVAP 调控 HCC 细胞恶性表型的潜在分子机制,使用 R 语言的“stat”包分析 TCGA 的 HCC 数据集中与 PLVAP 表达相关的共表达基因,结果显示 871 个基因与 PLVAP 的表达呈正相关 ($P < 0.05$, $r > 0.4$, 图 4A)。进一步对共表达基因进行 KEGG 富集分析,结果显示与 PLVAP 表达相关的基因在 PI3K/AKT 信号通路中显著富集 ($P < 0.05$, 图 4B)。WB 检测 PLVAP 对 PI3K/AKT 通路中关键蛋白水平的影响,结果显示:与对照组相比,过表达 PLVAP 细胞中的 p-PI3K 和 p-AKT 水平明显升高 ($t = 9.46、1.93$, 均 $P < 0.001$),

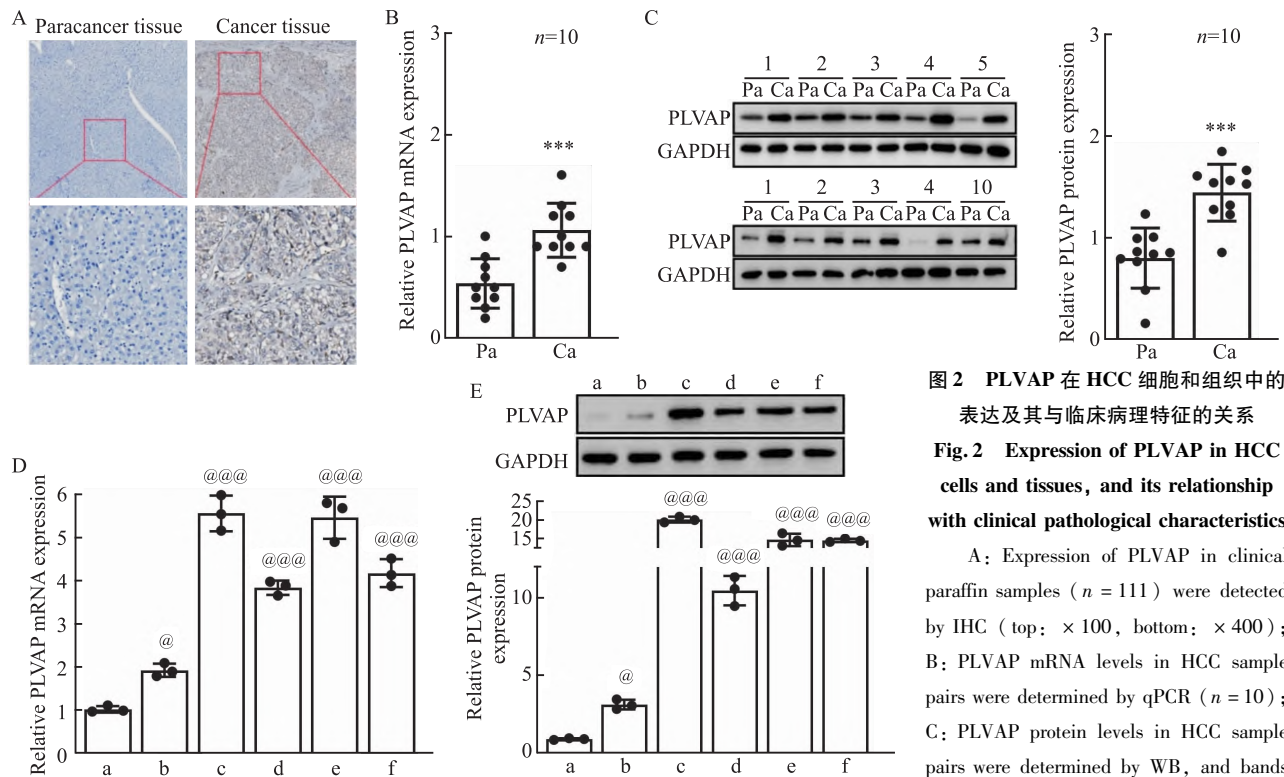


图2 PLVAP在HCC细胞和组织中的表达及其与临床病理特征的关系

Fig. 2 Expression of PLVAP in HCC cells and tissues, and its relationship with clinical pathological characteristics

A: Expression of PLVAP in clinical paraffin samples ($n = 111$) were detected by IHC (top: $\times 100$, bottom: $\times 400$); B: PLVAP mRNA levels in HCC sample pairs were determined by qPCR ($n = 10$); C: PLVAP protein levels in HCC sample pairs were determined by WB, and bands

in WB images were quantified ($n = 10$); D: PLVAP mRNA levels in normal liver cell line MIHA and HCC cell lines were determined by qPCR; E: PLVAP protein levels in normal liver cell line MIHA and HCC cell lines were determined by WB, and bands in WB images were quantified; a: MIHA; b: Hep3B; c: Huh7; d: HCCLM3; e: SK-Hep1; f: PCL/PRF/5; Pa: Paracancer tissue; Ca: HCC cancer tissue; *** $P < 0.001$ vs Paracancer tissue; @ $P < 0.05$, @@@ $P < 0.001$ vs MIHA.

表2 不同PLVAP水平HCC患者临床病理参数的差异性分析(HCC样本) [n (%)]

Tab. 2 Differential analysis of clinical pathological parameters in HCC patients with different levels of PLVAP (HCC samples) [n (%)]

Patient	n	PLVAP expression		χ^2 value	P value
		Low	High		
Gender				0.53	0.47
Male	89	40 (83.33)	49 (77.78)		
Female	22	8 (16.67)	14 (22.22)		
Age (years)				0.01	0.93
≤ 60	48	21 (43.75)	27 (42.86)		
> 60	63	27 (56.25)	36 (57.14)		
Liver cirrhosis				3.47	0.06
No	57	27 (56.25)	30 (47.62)		
Yes	54	21 (43.75)	33 (52.38)		
Grade				1.26	0.26
G1-G2	76	36 (75.00)	40 (63.49)		
G3-G4	35	12 (25.00)	23 (36.51)		
T stage				7.59	0.01
T1-T2	72	38 (79.17)	34 (53.97)		
T3-T4	39	10 (20.83)	29 (46.03)		
N stage				2.04	0.15
N0	90	36 (75.00)	54 (85.71)		
N1	21	12 (25.00)	9 (14.29)		
M stage				8.14	< 0.01
M0	82	42 (87.50)	40 (63.49)		
M1	29	6 (12.50)	23 (36.51)		
Microvascular invasion				4.81	0.03
No	73	37 (77.08)	36 (57.14)		
Yes	38	11 (22.92)	27 (42.86)		

而PI3K和AKT水平不变(均 $P > 0.05$);与对照组相比,敲低PLVAP细胞中的p-PI3K和p-AKT水平明显降低($t_{p-PI3K} = 10.95$ 、 10.67 , $t_{p-AKT} = 12.78$ 、 12.48 ,均 $P < 0.001$),而PI3K和AKT水平不变(均 $P > 0.05$),见图4C。为明确PI3K/AKT通路的激活对PLVAP介导的HCC恶性表型的作用,使用PI3K/AKT通路抑制剂LY294002($20 \mu\text{mol/L}$)处理PLVAP过表达的Hep3B细胞24 h,结果显示:过表达PLVAP诱导的细胞增殖能力、克隆形成能力、迁移和侵袭能力的增强效应被LY294002抵消($t_{\text{CCK-8}} = 7.14$ 、 4.90 , $t_{\text{克隆}} = 21.28$ 、 21.69 , $t_{\text{划痕}} = 9.70$ 、 10.46 , $t_{\text{迁移}} = 14.98$ 、 20.09 , $t_{\text{侵袭}} = 11.59$ 、 6.56 ,均 $P < 0.01$,图4D-4G)。

3 讨论

PLVAP是一种内皮细胞的特异性蛋白,属于高度糖基化的II型整合膜糖蛋白,在维持血管通透性、血液及组织稳态和免疫功能方面发挥作用^[3]。据报道^[9],PLVAP与肿瘤的血管生长相关并在肿瘤组织中广泛表达。Ma et al^[6]通过生物信息学分析显示PLVAP在间充质亚型神经胶质瘤患者中显著上

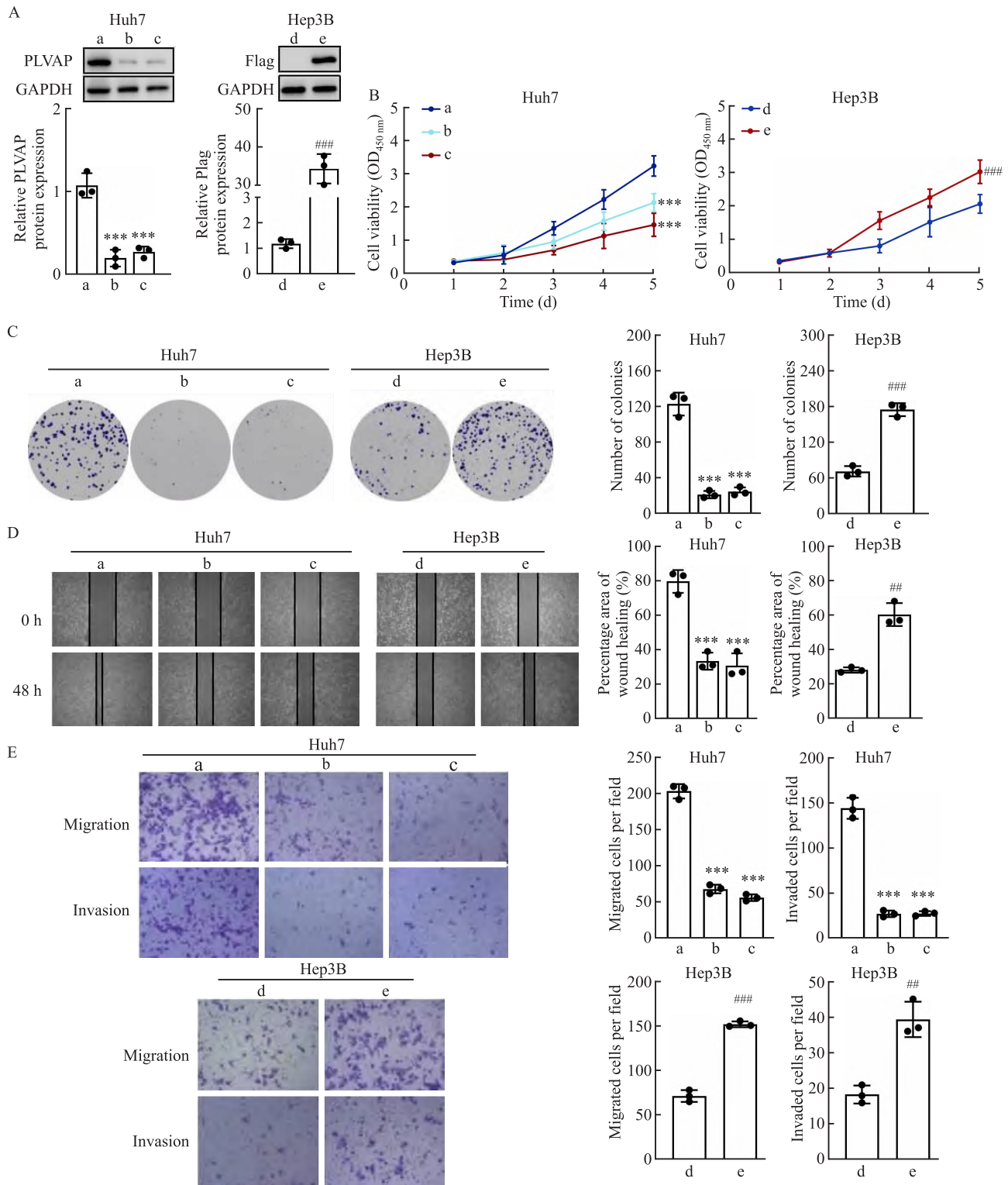


图3 PLVAP对HCC细胞增殖、迁移和侵袭的影响

Fig.3 Effects of PLVAP on HCC cell proliferation, migration and invasion

A: Efficiency of knockdown and overexpression of PLVAP were detected by WB, and bands in WB images were quantified; B: Effects of knockdown and overexpression of PLVAP on the cell viability of HCC cells were measured by CCK-8 assays; C: Effects of knockdown and overexpression of PLVAP on the cell viability of HCC cells were measured by foci formation assays; D: Effects of knockdown and overexpression of PLVAP on the cell motility of HCC cells were measured by wound healing assays; E: Effects of knockdown and overexpression of PLVAP on the migration and invasion of HCC cells were measured by transwell assays; a: shCtrl group; b: shPLVAP-1 group; c: shPLVAP-2 group; d: Vector group; e: PLVAP group; *** $P < 0.001$ vs shCtrl group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs Vector group.

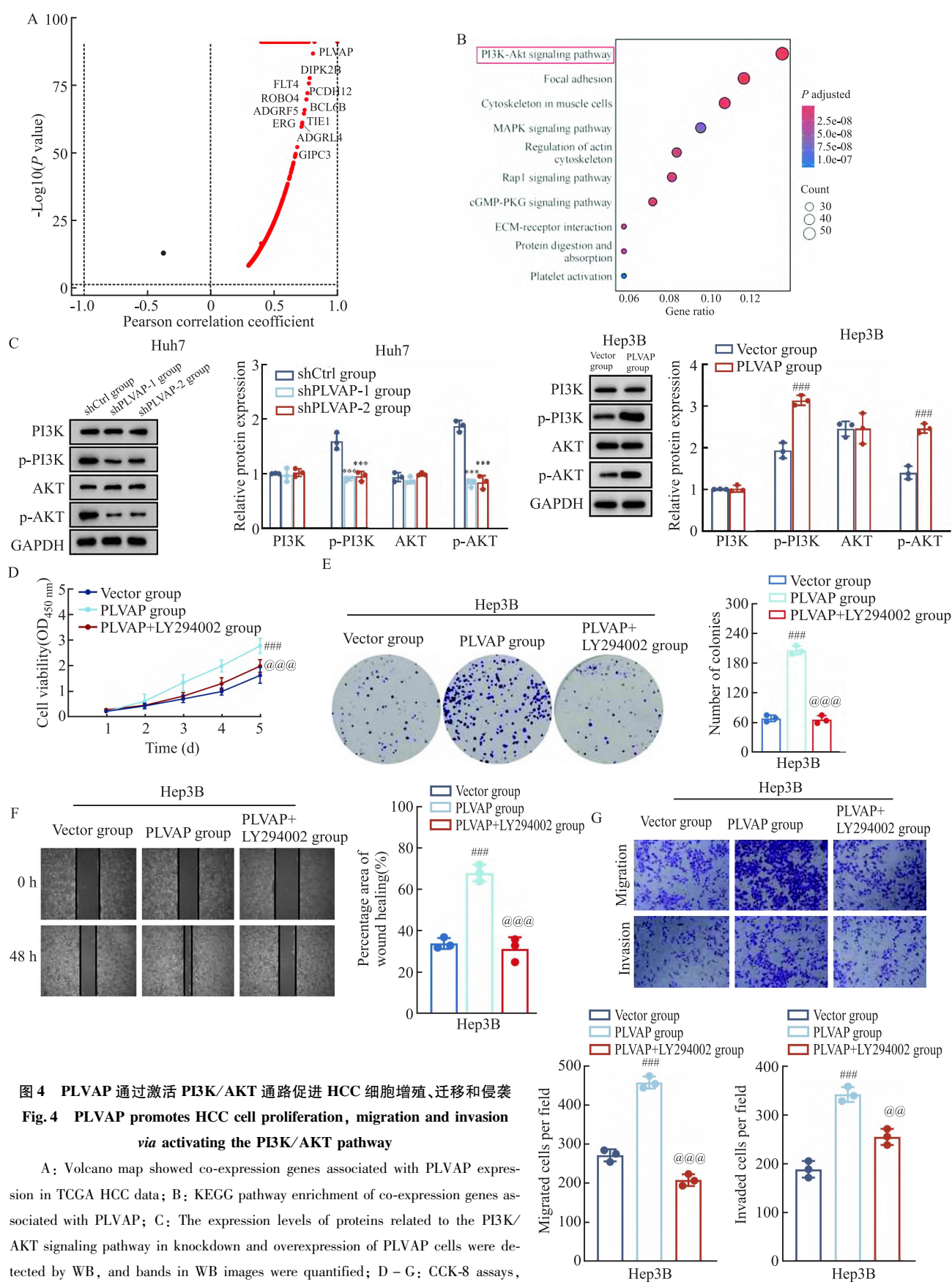


图4 PLVAP通过激活PI3K/AKT通路促进HCC细胞增殖、迁移和侵袭
Fig. 4 PLVAP promotes HCC cell proliferation, migration and invasion via activating the PI3K/AKT pathway

A: Volcano map showed co-expression genes associated with PLVAP expression in TCGA HCC data; B: KEGG pathway enrichment of co-expression genes associated with PLVAP; C: The expression levels of proteins related to the PI3K/AKT signaling pathway in knockdown and overexpression of PLVAP cells were detected by WB, and bands in WB images were quantified; D - G: CCK-8 assays, Foci formation assays, Wound healing assays and Transwell assays performed in the overexpression of PLVAP cells treated with or without LY294002;

*** $P < 0.001$ vs shCtrl group; ### $P < 0.001$ vs Vector group; @ $P < 0.01$, @@@ $P < 0.001$ vs PLVAP group.

调,且与不良预后相关;进一步功能富集分析提示 PLVAP 高表达与胶质瘤相关免疫反应及炎症活动相关。Wang et al^[10]对与脐血管内皮细胞或肝窦内皮细胞共培养的胆管癌细胞进行分子分析显示,胆管癌细胞分泌的 Dickkopf 相关蛋白 1 与其受体细胞骨架相关蛋白 4 结合后激活 PI3K/AKT 通路,导致 PLVAP 上调,提示 PLVAP 是一个潜在的抗肿瘤血管生成靶点。Wang et al^[7]通过组织切片的 IHC 染色发现 PLVAP 是 HCC 血管内皮细胞中特异性表达的基因,但在非肿瘤性肝组织中不特异性表达;将共表达人组织因子细胞外结构域的重组单克隆抗 PLVAP Fab 片段输注到主要肿瘤供血动脉中,发现能诱导肿瘤血管血栓形成和广泛的肿瘤坏死,提示 PLVAP 可能是 HCC 治疗的潜在靶点。本研究首先基于生物信息学发现 PLVAP 的 mRNA 水平在 HCC 中表达显著上调,进一步通过临床样本的检测发现 PLVAP 在 HCC 中表达上调且与肿瘤大小、远处转移及微血管侵犯显著相关;构建敲低和过表达 PLVAP 的 HCC 稳转细胞系并进行体外功能实验,结果显示 PLVAP 能够促进 HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。本研究的实验结果结合上述文献报道,提示 PLVAP 可能具有促进 HCC 细胞多种恶性生物学行为的功能。

PI3K/AKT 信号通路在多种细胞生物学过程中起着至关重要的作用,包括细胞生长、存活、代谢和运动^[11-12]。Zhang et al^[13]通过 PAS 染色和透射电子显微镜等实验揭示高糖处理的永生化人足细胞中 Sirt6 重组质粒通过激活 PI3K/AKT 信号通路能够改善高糖诱导的足细胞骨架重塑和凋亡作用。PI3K/AKT 信号级联反应的异常激活在 HCC 中非常普遍^[14]。Han et al^[15]研究发现纤维蛋白原 α (fibrinogen alpha, FGA) 在 HCC 中下调,且 FGA 敲除激活 PI3K/AKT 通路从而促进 HCC 细胞的迁移、侵袭和 EMT,提示 FGA 通过 PI3K/AKT 通路影响 HCC 的侵袭和转移。Chi et al^[16]通过生物信息学分析显示 TEA 结构域 4 (TEA domain 4, TEAD4) 在膀胱癌中表达上调并与肿瘤分期和分级相关;TEAD4 高表达组与 TEAD4 低表达组间差异基因的 KEGG 富集分析显示,差异基因在 PI3K/AKT 通路中显著富集;通过使用 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002 阻断 TEAD4 诱导的细胞迁移和侵袭增强以及 EMT 相关标志物的表达上调,而激动剂 740Y-P 能恢复 TEAD4 敲低诱导的细胞迁移、侵袭和 EMT 相关标志物表达降低,提示 TEAD4 通过 PI3K/AKT 通路调节

EMT,介导膀胱癌转移。本研究通过 TCGA 中与 PLVAP 共表达相关的基因的 KEGG 富集分析,发现 PLVAP 及其共表达基因显著富集在 PI3K/AKT 通路,推测 PLVAP 可能通过 PI3K/AKT 通路调控 HCC 进展。为验证生物信息学预测结果,本研究通过 WB 实验检测 PI3K/AKT 通路关键蛋白的表达,发现 PLVAP 能够促进 PI3K 和 AKT 蛋白的磷酸化,提示 PLVAP 可能通过激活 HCC 细胞中的 PI3K/AKT 通路发挥生物学功能。进一步使用 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002 处理过表达 PLVAP 的 HCC 细胞后发现 LY294002 能够阻断 PLVAP 诱导的 HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力的增强。这些结果提示 PLVAP 能够通过激活 PI3K/AKT 通路促进 HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭等恶性生物学行为。

参考文献

- [1] Alawiyia B, Constantinou C. Hepatocellular carcinoma: a narrative review on current knowledge and future prospects[J]. Curr Treat Options Oncol, 2023, 24(7): 711–24. doi: 10.1007/s11864-023-01098-9.
- [2] Xie D, Shi J, Zhou J, et al. Clinical practice guidelines and real-life practice in hepatocellular carcinoma: a Chinese perspective [J]. Clin Mol Hepatol, 2023, 29(2): 206–16. doi: 10.3350/cmh.2022.0402.
- [3] Guo L, Zhang H, Hou Y, et al. Plasmalemma vesicle-associated protein: a crucial component of vascular homeostasis[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(3): 1639–44. doi: 10.3892/etm.2016.3557.
- [4] 郭文惠, 雷皓月, 潘友卓, 等. 质膜膜泡关联蛋白的生物学功能研究进展[J]. 临床荟萃, 2023, 38(7): 647–53. doi: 10.3969/j.issn.1004-583X.2023.07.011.
- [4] Guo W H, Lei H Y, Pan Y Z, et al. Research progress on biological functions of plasma membrane vesicle associated proteins[J]. Clin Focus, 2023, 38(7): 647–53. doi: 10.3969/j.issn.1004-583X.2023.07.011.
- [5] Wen Y, Wang Y, Huang Y, et al. PLVAP protein expression correlated with microbial composition, clinicopathological features, and prognosis of patients with stomach adenocarcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2023, 149(10): 7139–53. doi: 10.1007/s00432-023-04607-3.
- [6] Ma K, Chen X, Zhao X, et al. PLVAP is associated with glioma-associated malignant processes and immunosuppressive cell infiltration as a promising marker for prognosis [J]. Heliyon, 2022, 8(8): e10298. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10298.
- [7] Wang Y H, Cheng T Y, Chen T Y, et al. Plasmalemmal vesicle associated protein (PLVAP) as a therapeutic target for treatment of hepatocellular carcinoma[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 815. doi: 10.1186/1471-2407-14-815.
- [8] Chen J, Ning D, Du P, et al. USP11 potentiates HGF/AKT signaling and drives metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. On-

- cogene, 2024, 43(2): 123–35. doi: 10.1038/s41388-023-02847-8.
- [9] Denzer L, Muranyi W, Schrotten H, et al. The role of PLVAP in endothelial cells[J]. *Cell Tissue Res*, 2023, 392(2): 393–412. doi: 10.1007/s00441-023-03741-1.
- [10] Wang Y, Yu H, Xie X, et al. Plasmalemma vesicle-associated protein promotes angiogenesis in cholangiocarcinoma *via* the DKK1/CKAP4/PI3K signaling pathway[J]. *Oncogene*, 2021, 40(25): 4324–37. doi: 10.1038/s41388-021-01844-z.
- [11] Deng S, Leong H C, Datta A, et al. PI3K/AKT signaling tips the balance of cytoskeletal forces for cancer progression[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(7): 1652. doi: 10.3390/cancers14071652.
- [12] 高 丝, 李 青, 高丽丽. SETD7 通过 PI3K-AKT 信号通路调节胰腺癌细胞的增殖和迁移[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2024, 40(12): 1287–92, 1299. doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2024.12.009.
- [12] Gao S, Li Q, Gao L L. SETD7 regulates the proliferation and migration of pancreatic cancer cells *via* the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Chin J Clin Exp Pathol*, 2024, 40(12): 1287–92, 1299. doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2024.12.009.
- [13] Zhang Z, Huang H, Tao Y, et al. Sirt6 ameliorates high glucose-induced podocyte cytoskeleton remodeling *via* the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Ren Fail*, 2024, 46(2): 2410396. doi: 10.1080/0886022X.2024.2410396.
- [14] Narayanankutty A. Natural products as PI3K/Akt inhibitors: implications in preventing hepatocellular carcinoma[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2021, 14(5): 760–9. doi: 10.2174/1874467214666210120152657.
- [15] Han X, Liu Z, Cui M, et al. FGA influences invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma through the PI3K/AKT pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2024, 16(19): 12806–19. doi: 10.18632/aging.206011.
- [16] Chi M, Liu J, Mei C, et al. TEAD4 functions as a prognostic biomarker and triggers EMT *via* PI3K/AKT pathway in bladder cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 175. doi: 10.1186/s13046-022-02377-3.

PLVAP promotes proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma *via* PI3K/AKT pathway

Wang Juqin¹, He Linling¹, Shen Yuna², Wang Xiaonan^{1,3}

(¹Dept of Pathology, School of Basic Medicines, ²Forensic Sciences, ³Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the role and mechanism of plasmalemma vesicle-associated protein (PLVAP) in the progression of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Bioinformatic analysis, quantitative real-time PCR, Western blot and immunohistochemistry were used to analyze the expression level of PLVAP in HCC and paraneoplastic tissues, and its correlation with clinicopathological characteristics. Stable HCC cell lines with knockdown and overexpression of PLVAP were constructed, then cell proliferation, migration and invasion of HCC cells were examined by CCK-8, foci formation assays, wound-healing assays and Transwell assays. Western blot was used to detect the protein levels of phosphatidylinositol 3-kinase PI3K, phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase p-PI3K, protein kinase B AKT and phosphorylated protein kinase B p-AKT in the PI3K/AKT pathway after PLVAP knockdown and overexpression. Cell proliferation, migration and invasion were also examined in PLVAP-overexpressed cells after treatment of LY294002, an inhibitor of the PI3K/AKT pathway. **Results** The expression of PLVAP was significantly higher in HCC tissues than that in adjacent non-tumor tissues ($P < 0.05$), and was positive correlated with tumor stage, T stage, M stage, and microvascular invasion ($P < 0.05$). Knockdown of PLVAP significantly reduced the proliferation, migration and invasion of HCC cells ($P < 0.001$), while overexpression of PLVAP significantly increased the proliferation, migration and invasion of HCC cells ($P < 0.01$). Western blot analysis revealed that knockdown of PLVAP decreased the protein expression levels of p-PI3K and p-AKT, overexpression of PLVAP increased the protein expression levels of p-PI3K and p-AKT, whereas the PI3K/AKT inhibitor LY294002 eliminated the effects of PLVAP on cell proliferation, migration and invasion ($P < 0.01$). **Conclusion**

PLVAP is highly expressed in HCC and may promote HCC progression by activating the PI3K/AKT signaling pathway.

Key words PLVAP; hepatocellular carcinoma; proliferation; migration; invasion; PI3K/AKT signaling pathway

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 82103572)

Corresponding author Wang Xiaonan, E-mail: aydwxn@126.com