

# 血管相关迁移细胞蛋白在肝细胞癌中高表达并促进肝癌细胞侵袭转移

李超<sup>1</sup>, 殷国志<sup>2</sup>, 程萧<sup>3</sup>, 姜业臻<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>首都医科大学附属北京朝阳医院普外科, 北京 100024; <sup>2</sup>西安交通大学第一附属医院肝胆外科, 陕西 西安 710061; <sup>3</sup>通用环球西安北环医院普通外科, 陕西 西安 710032

**摘要:**目的 研究血管相关迁移细胞蛋白(AAMP)异常高表达在肝细胞癌(HCC)中的临床意义和对肝癌细胞侵袭转移的影响。方法 基于网络数据库中HCC队列资料分析AAMP基因在肝癌和癌旁组织中的表达差异以及与临床分期和预后的关系。免疫组化检测60对HCC及癌旁组织标本中AAMP表达,分析AAMP表达与患者临床病理特征的相关性。通过慢病毒转染下调HCC细胞(Mahlavu和Huh-7)内AAMP表达水平。EdU掺入实验、流式细胞仪、划痕愈合实验、transwell迁移/侵袭小室和裸鼠肺转移瘤模型分别检测敲低AAMP表达对HCC细胞体外增殖、凋亡、迁移、侵袭和体内肺转移能力的影响。Western blotting和免疫荧光检测上皮间质转化标志物E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail表达情况。RT-qPCR和Western blotting检测敲低AAMP对RhoA mRNA和蛋白表达的影响。分别使用MG-132和CHX处理敲低AAMP的HCC细胞,Western blotting检测细胞内RhoA蛋白表达变化。免疫组化染色分析HCC组织中AAMP和RhoA蛋白的表达相关性。**结果** 生物信息学分析显示,AAMP基因表达水平在HCC组织中升高( $P<0.05$ ),AAMP高表达与患者临床分期较晚和不良预后相关( $P<0.05$ )。免疫组化结果显示,HCC组织的AAMP染色评分高于对应癌旁组织( $P<0.05$ ),AAMP高表达与Edmondson-Steiner分级(III+IV)、血管侵犯及TNM分期(III+IV期)相关( $P<0.05$ )。敲低AAMP对HCC细胞增殖和凋亡无显著影响( $P>0.05$ ),但能抑制HCC细胞的迁移、侵袭和体内肺转移能力( $P<0.05$ )。敲低AAMP后HCC细胞内E-cadherin蛋白表达升高而N-cadherin、Vimentin和Snail的表达水平降低( $P<0.05$ ),相应蛋白的免疫荧光染色强度变化趋势与Western blotting检测结果一致。敲低AAMP对RhoA基因mRNA表达水平无显著影响( $P>0.05$ ),但降低了RhoA蛋白的表达量( $P<0.05$ ),并且MG-132处理阻断了敲低AAMP导致的RhoA蛋白表达下调( $P<0.05$ )。相关性分析显示,HCC组织内AAMP和RhoA蛋白的表达水平呈正相关关系( $P<0.05$ )。**结论** AAMP高表达与HCC恶性临床特征密切相关,AAMP可能通过维持RhoA蛋白稳定表达来促进HCC细胞发生上皮间质转化,进而增强HCC的侵袭转移能力。**关键词:**血管相关迁移细胞蛋白;肝细胞癌;上皮间质转化;侵袭;转移;RhoA

## Angio-associated migratory cell protein is highly expressed in hepatocellular carcinoma and promotes tumor cell invasion and metastasis

LI Chao<sup>1</sup>, YIN Guozhi<sup>2</sup>, CHENG Xiao<sup>3</sup>, JIANG Yezhen<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of General Surgery, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100024, China; <sup>2</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; <sup>3</sup>Department of General Surgery, Genertec Universal Xi'an Beihuan Hospital, Xi'an 710032, China

**Abstract: Objective** To investigate the clinical significance of abnormal expression of angio-associated migratory cell protein (AAMP) in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Bioinformatics analyses were used to analyze AAMP expression level in HCC and its prognosis value. In 60 pairs of HCC and adjacent tissues, AAMP expression was detected immunohistochemically and its correlation with clinicopathological characteristics of the patients was analyzed. In cultured Mahlavu and Huh-7 cells with lentivirus-mediated AAMP knockdown, the changes in cell proliferation, apoptosis, migration and invasion were observed, and their lung metastasis following tail vein injection in nude mice were assessed. In HCC cells with AAMP knockdown, Western blotting, immunofluorescence staining or RT-qPCR were used to examine the changes in expression levels of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and Snail and the effects of MG-132 and CHX on RhoA expression. The correlation between the expressions of AAMP and RhoA in HCC tissues was analyzed by immunohistochemistry. **Results** Bioinformatics analysis showed that AAMP expression was elevated in HCC tissues ( $P<0.05$ ) in correlation with advanced clinical stage and poor prognosis ( $P<0.05$ ). Immunohistochemistry results confirmed significant correlations of high AAMP expression with Edmondson-Steiner grade (III+IV), venous infiltration and TNM stage (III+IV) of HCC ( $P<0.05$ ). In cultured HCC cells, AAMP knockdown did not significantly affect cell proliferation or apoptosis, but obviously suppressed cell migration and invasion *in vitro* and lung metastasis in nude mice. AAMP knockdown significantly increased E-cadherin expression, decreased N-cadherin, Vimentin and Snail expressions, and reduced RhoA protein levels without obviously affecting RhoA mRNA levels. MG-132 treatment blocked the inhibitory effect of AAMP knockdown on RhoA protein expression. The expressions of AAMP and RhoA showed a significant positive correlation in HCC tissues ( $P<0.05$ ). **Conclusion** AAMP overexpression is associated with malignant clinical features of HCC and promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of HCC cells partly by stabilizing RhoA expression.

**Keywords:** angio-associated migratory cell protein; hepatocellular carcinoma; epithelial-mesenchymal transition; invasion; metastasis; RhoA

收稿日期:2025-05-29

基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划资助项目(2021JQ-397);北京市医院管理中心“青苗人才”计划专项经费资助(QML20210903)

作者简介:李超,博士,主治医师,E-mail: doctorchaoli@163.com

通信作者:姜业臻,在读博士研究生,副主任医师,E-mail: jyzbhh@163.com

肝细胞癌(HCC)是一种全球范围内发病率和死亡率很高的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。HCC并发肝内外转移是导致患者失去根治性手术机会的主要原因。因此,探究HCC侵袭转移的生物学机制,对于开发新的靶向治疗药物和改善患者预后都具有重要意义。血管相关迁移细胞蛋白(AAMP)是免疫球蛋白超家族的成员之一,有研究在筛选与黑色素瘤细胞运动有关的蛋白时首次鉴定出AAMP的存在<sup>[2]</sup>。AAMP蛋白通过特有的WD40结构域和肝素结合结构域发挥调节细胞运动和粘附的功能<sup>[3]</sup>。研究证实<sup>[4,5]</sup>,AAMP能够促进血管内皮细胞和血管平滑肌细胞的迁移和增殖,在有利于血管损伤修复的同时也能导致动脉粥样硬化的发生。关于AAMP在人类肿瘤中的研究较少,TCGA数据库分析发现AAMP与胃癌转移风险相关的关键基因,可用于胃癌患者的预后评估<sup>[6]</sup>,通过CRISPR-Cas9系统筛选发现AAMP可能通过与肿瘤细胞表面PD-L1结合协助淋巴瘤细胞发生免疫逃逸<sup>[7]</sup>。肿瘤细胞侵袭转移能力的增强与其形态可塑性改变密切相关,所涉及的分子过程主要受Rho家族成员(包括RhoA,B和C)调控<sup>[8]</sup>。在HCC中,RhoA一方面诱导肌球蛋白的磷酸化来增强肿瘤细胞阿米巴样迁移能力<sup>[9]</sup>,另一方面通过稳定上皮间质转化(EMT)相关转录因子Snail/Slug的表达来促进肿瘤细胞发生间质样迁移<sup>[10]</sup>。在血管平滑肌细胞<sup>[11]</sup>和脐血管内皮细胞<sup>[12]</sup>中的分别证实使用siRNA敲低AAMP后仅出现RhoA表达水平下调,而其他家族成员的表达无显著改变,表明AAMP对RhoA具有特异性调控作用。但是,目前尚无研究解析AAMP在HCC生长转移中的作用及其分子机制。

本研究通过生物信息学、组织学和体内外功能学实验,证实AAMP在HCC中异常高表达并与患者恶性临床病理特征和不良预后密切相关,阐明下调AAMP表达通过诱导RhoA蛋白降解在体内外抑制HCC细胞的迁移和侵袭能力,以便为AAMP成为HCC新的治疗靶点提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

收集2018年1月1日~2021年12月31日于西安交通大学第一附属医院肝胆外科行手术切除的HCC组织及对应癌旁组织标本60例,包括男性49例,女性11例,年龄54~76岁。所有患者术前均未接受过新辅助治疗,术前签署手术知情同意书,实验方案由西安交通大学第一附属医院伦理委员会审核批准[伦理批号:2020伦审科字第(G-75)号]。

HCC细胞系Hep3B、Huh-7、Li-7、Mahlavu(武汉赛维尔生物科技有限公司)。5周龄雄性BALB/c-nu裸鼠

(北京斯贝福生物技术有限公司),实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。裸鼠饲养于恒温恒湿无特定病原体屏障环境中,自由觅食及饮水,昼夜交替比例为12 h:12 h。实验动物研究及使用计划经斯贝福实验动物福利伦理委员会审核批准(伦理批号:AWE2023102502)。

DMEM培养基、青霉素-链霉素双抗混合液、胎牛血清(Gibco);Cycloheximide, MG-132 (MedChem Express);EdU标记试剂盒(广州锐博生物科技有限公司);Annexin V-PE/7-AAD双染细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);Transwell小室,基质胶(康宁公司);AAMP敲除慢病毒颗粒及阴性对照慢病毒颗粒( $1 \times 10^8$  TU/mL)由上海吉凯基因科技有限公司合成提供;免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。检测一抗:AAMP、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail、RhoA及GAPDH,检测二抗:FITC标记山羊抗兔抗体、HRP标记山羊抗兔抗体及HRP标记山羊抗鼠抗体(proteintech);通用型抗体稀释液(上海碧云天生物技术有限公司);ECL发光试剂盒(Millipore);RNA提取试剂Trizol,RT-PCR试剂盒(Invitrogen);一步法逆转录实时荧光定量PCR(RT-qPCR)试剂盒(Invitrogen)。RhoA引物(上游5'-GAGCACACAAGGCGGGAG-3';下游5'-TGCCATATCTCTGCCTTCTCA-3')、GAPDH引物(上游5'-CCAGGGCTGCTTTTAACTCT-3';下游5'-GGACTCCACGACGTACTCA-3')由上海生工生物有限公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 通过UCSC Xena网站下载TCGA数据库肝癌队列中AAMP基因表达数据,使用HCCDB网站下载GEO数据库和ICGC数据库多个肝癌队列中AAMP基因表达数据。分析AAMP基因在HCC组织和癌旁组织中的表达差异及在肝癌人群中的预后指导价值。

1.2.2 免疫组化染色 将福尔马林固定并石蜡包埋的人肝癌、癌旁及裸鼠皮下瘤组织标本制作4  $\mu$ m病理切片。经脱蜡和水化后将切片置入枸橼酸盐缓冲液中进行高温抗原修复。切片冷却至室温后用纯水清洗切片,再用3%过氧化氢孵育阻断内源性过氧化物酶10 min。PBS溶液清洗切片后向对应组织上分别滴加100  $\mu$ L使用PBS溶液按1:100比例稀释的AAMP或RhoA一抗工作液,37  $^{\circ}$ C摇床孵育60 min。PBS溶液洗净多余一抗,分别滴加100  $\mu$ L酶标羊抗小鼠/兔IgG聚合物覆盖组织,在37  $^{\circ}$ C摇床孵育20 min。PBS溶液清洗切片后在显微镜观察下滴加DAB溶液显色,显色合适后以自来水阻断。苏木素复染细胞核。切片逐次脱水、透明,中性树脂封片晾干。每张切片在400倍放大下随机采集

10张图象,用染色强度联合阳性细胞百分比进行评分:染色强度分为4等级:阴性=0分;弱阳性=1分;中度=2分;强阳性=3分;阳性细胞百分比分4等级: $\leq 25\%$ =1分; $26\% \sim 50\%$ =2分; $51\% \sim 75\%$ =3分; $> 75\%$ =4分,染色强度和阳性细胞百分比评分相乘计算最终免疫组化染色得分。基于免疫组化评分的中位数,将60例HCC患者分为AAMP高表达组和AAMP低表达组( $n=30$ )。

1.2.3 细胞培养与传代 肝癌细胞Hep3B、Huh-7、Li-7、Mahlavu细胞株培养于含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM培养基中。细胞置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 及饱和湿度环境培养箱中培养传代。稳定传代2~3代后,取对数生长期细胞进行后续实验。

1.2.4 慢病毒转导 取生长状态良好的Huh-7或Mahlavu细胞,使用完全培养基制备单细胞悬液,取适量细胞悬液接种于6孔板中,使过夜培养后细胞融合度达到40%。将Huh-7和Mahlavu细胞分别进行分组:阴性对照组(sh-NC)、AAMP敲除组(sh-AAMP)。在1 mL感染体系内加入20  $\mu\text{L}$ 慢病毒液,充分混匀,感染24 h后更换新鲜完全培养基。扩增感染后的HCC细胞,利用最低有效浓度嘌呤霉素筛选出稳定转染细胞株后传代扩增用于后续实验。

1.2.5 EdU掺入实验 将细胞以 $1 \times 10^4$ /孔的密度接种于96孔板。过夜培养至贴壁后更换为含0.1%的EdU溶液的完全培养基,继续避光孵育3 h。PBS清洗细胞后用4%的多聚甲醛固定30 min。PBS洗净固定液,加入Apollo染色复合物与EdU避光反应30 min。弃去多余染液后使用Hoechst 33342标记细胞核。利用荧光显微镜记录荧光染色情况,通过Image J软件计算EdU阳性细胞百分比。

1.2.6 流式细胞凋亡检测 转染72 h后的HCC细胞用无EDTA的胰酶轻柔消化,计数 $1 \times 10^5$ 个细胞后用Binding Buffer工作液制备单细胞悬液,每个测试管内依次加入500  $\mu\text{L}$ 细胞悬液、1  $\mu\text{L}$  Annexin V-PE和5  $\mu\text{L}$  7-AAD。轻柔涡旋混匀后室温避光反应10 min,于流式细胞仪上机检测。

1.2.7 划痕愈合实验 取转染24 h后的HCC细胞,以过夜培养达80%~90%密度接种于6孔板中。过夜培养后用无菌200  $\mu\text{L}$ 移液器枪头沿培养孔中线划过制作初始划痕。以无血清DMEM培养基清洗培养孔以洗净悬浮细胞。再次加入无血清DMEM培养基2 mL/孔,将6孔板置于培养箱中继续培养48 h。在显微镜下拍照记录划痕剩余距离,计算细胞迁移情况。

1.2.8 Transwell迁移或侵袭小室 取转染48 h后的HCC细胞用无血清DMEM培养基重悬,调整细胞密度为 $2 \times 10^5$ /mL。Transwell小室套件下室内加入700  $\mu\text{L}$ /孔含10%胎牛血清的DMEM培养基,上室内加入100  $\mu\text{L}$

的细胞悬液,建立细胞迁移检测模型。培养24 h后,PBS清洗小室、4%多聚甲醛固定,并用0.1%的结晶紫染色10 min。擦除上室内侧面未成功穿过小室膜的细胞,显微镜下观察并计数上室外侧面迁移细胞数目。相似地,用无血清DMEM培养基按1:8比例稀释50 mg/L的基质胶100  $\mu\text{L}$ /孔覆盖transwell小室上室内侧面,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内风干1 h制成侵袭小室模型,重复上述实验步骤,建立细胞侵袭模型,统计上室外侧面侵袭细胞数目。

1.2.9 裸鼠肺转移瘤模型 取对数期生长细胞,胰酶轻柔消化后低速离心,吸净上清液,细胞沉淀用 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 无菌生理盐水重悬制备密度为 $1 \times 10^5$ /mL的单细胞悬液。20只裸鼠随机平均分成4组:sh-ctrl组、sh-AAMP组(Mahlavu细胞),sh-ctrl组、sh-AAMP组(Huh-7细胞),5只/组。选择裸鼠尾静脉为注射部位,每只裸鼠注射150  $\mu\text{L}$ 细胞悬液。接种后裸鼠自由活动与觅食。第28天处死裸鼠,获取肺组织并制作石蜡切片用于HE染色,统计转移结节数目。

1.2.10 细胞免疫荧光染色 将细胞以 $1 \times 10^4$ /孔的密度接种于96孔板,培养至融合度达50%。PBS清洗细胞后用4%的多聚甲醛固定30 min。PBS洗净固定液后再使用0.1%的Triton X-100通透细胞15 min。PBS清洗细胞后加入5%山羊血清封闭1 h。使用抗体稀释液按1:200比例稀释E-cadherin、N-cadherin和Vimentin一抗。弃去封闭液后,添加80  $\mu\text{L}$ /孔一抗溶液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS洗净多余一抗,用抗体稀释液按1:200比例稀释FITC标记山羊抗兔二抗,添加80  $\mu\text{L}$ /孔二抗工作液,室温孵育1 h。PBS洗去未结合二抗后使用DAPI标记细胞核。利用荧光显微镜记录荧光染色情况,通过Image J软件计算目标蛋白表达强度。

1.2.11 RT-qPCR 使用Trizol试剂按操作指南提取细胞中的总RNA。定量后,每份样品取等量RNA配制20  $\mu\text{L}$ 的逆转录反应体系合成cDNA。cDNA稀释10倍后取5  $\mu\text{L}$ 配制实时荧光定量PCR体系,按如下条件进行PCR反应: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s,1循环; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火延伸30 s,40循环。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算RhoA mRNA的相对表达量。

1.2.12 Western blotting 体外培养细胞经RIPA液提取总蛋白。SDS-PAGE凝胶垂直电泳法分离蛋白,整胶湿转法将目标蛋白转移至活化的PVDF膜上。5%脱脂奶粉室温封闭PVDF膜1 h,使用抗体稀释液按1:1000比例稀释AAMP、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail RhoA及GAPDH一抗,PBS清洗后将PVDF膜分别浸入相应一抗工作液中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。用抗体稀释液按1:3000比例稀释HRP标记山羊抗兔二抗,PBS清洗条带后使用对应二抗工作液室温孵育PVDF膜1 h。

ECL试剂暗室曝光条带。通过Image J软件分析条带灰度强度来间接计算蛋白相对表达差异。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS22.0统计软件进行数据分析。运用Kaplan-Meier生存分析绘制生存曲线。非连续性变量以频数(百分比)表示,组间比较采用Pearson卡方检验。符合正态分布的连续性变量以均数±标准差表示,两组间比较采用配对或成组 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析;不符合正态分布的连续性变量以中位数(四分位间距)表示,组间比较采用秩和检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 生物信息学分析AAMP在HCC中的表达

GEO和ICGC数据库的HCC队列数据分析显示,AAMP的转录本丰度在多个国家的HCC患者肿瘤组织中呈上调趋势( $P<0.001$ ,图1A~C)。TCGA数据库HCC队列数据分析显示,HCC组织中AAMP的基因表达水平高于癌旁组织( $P<0.001$ ,图1D)。AAMP高表达的HCC患者临床分期(III+IV)较晚( $P<0.01$ ,图1E)、5年总生存期缩短( $HR=2.027$ , $95\%CI=1.417\sim 2.899$ , $P<0.001$ ,图1F)。

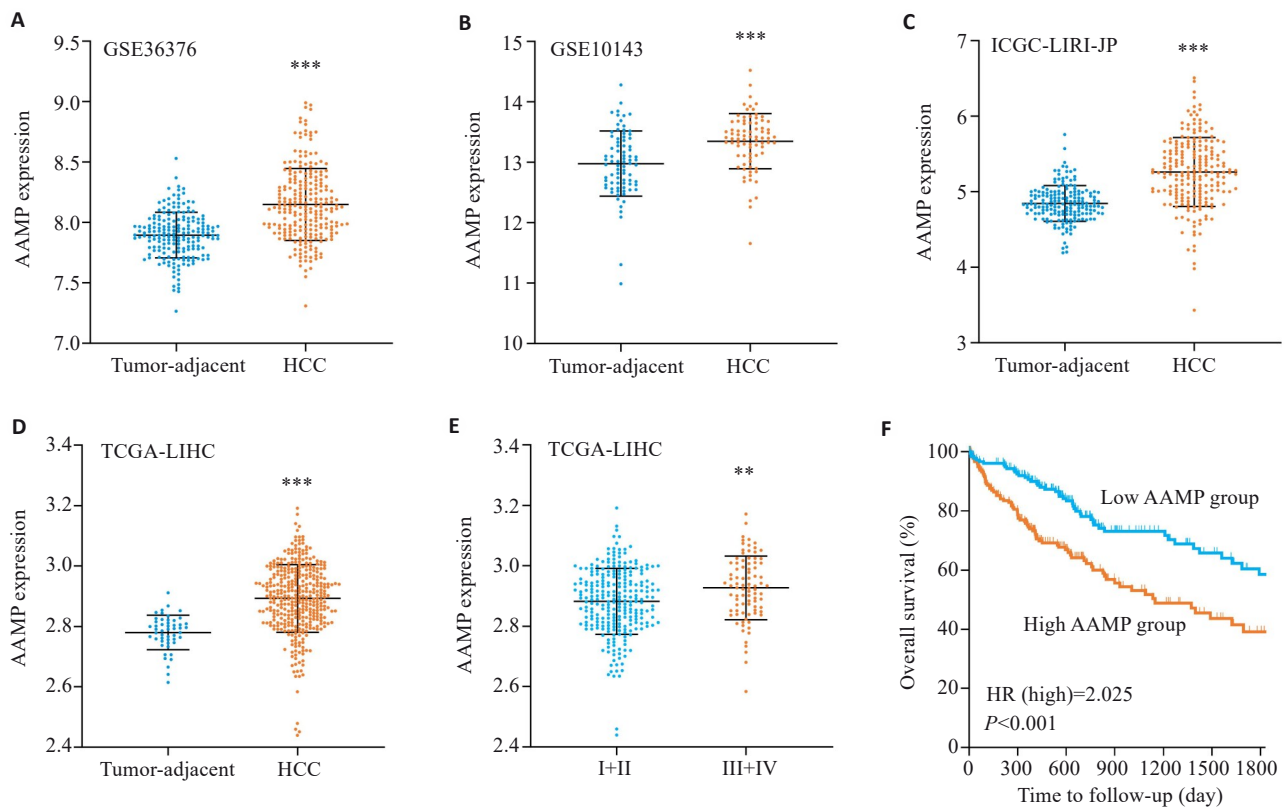


图1 分析AAMP在HCC公共数据库中的表达及临床意义

Fig.1 Bioinformatics analysis of AAMP expression in HCC. A-D: Data from different HCC datasets from GEO (A, B), ICGC (C) and TCGA (D) databases all show up-regulated AAMP expression in HCC. \*\*\* $P<0.001$  vs tumor-adjacent tissues. E: AAMP expression is higher in advanced TNM stages. \*\* $P<0.01$  vs I+II. F: High expression of AAMP predicted unfavorable prognosis.

### 2.2 AAMP在HCC临床标本中的表达及临床意义

免疫组化染色发现,与癌旁组织相比,HCC组织中AAMP蛋白的免疫组化评分上调( $P=0.004$ ,图2)。临床病理数据分析显示,AAMP高表达与血管侵犯( $P=0.02$ )、Edmondson-Steiner分级(III+IV, $P=0.02$ )及TNM分期(III+IV期, $P=0.037$ )相关(表1)。

### 2.3 慢病毒转导敲低HCC细胞中AAMP表达

Western blotting检测结果显示,AAMP在Hep3B、Li-7、Huh-7和Mahlavu细胞中均有表达(图3A)。选取AAMP蛋白表达相对较高的HCC细胞系Huh-7和Mahlavu进行AAMP敲除,用以后续功能学实验研究。

结果显示,sh-AAMP慢病毒转导组Mahlavu和Huh-7细胞中AAMP蛋白表达量较sh-NC组均下降( $P<0.05$ ,图3B、C)。

### 2.4 敲低AAMP不影响HCC细胞体外增殖与凋亡

EdU标记法和流式细胞仪检测结果显示,sh-NC组和sh-AAMP组的HCC细胞EdU阳性标记率差异无统计学意义( $P>0.05$ ,图4A、B)。sh-NC组和sh-AAMP组的HCC细胞凋亡细胞占比差异也无统计学意义( $P>0.05$ ,图4C、D)。

### 2.5 敲低AAMP抑制HCC细胞体外迁移与侵袭

划痕愈合实验结果显示,与sh-NC组细胞相比,sh-

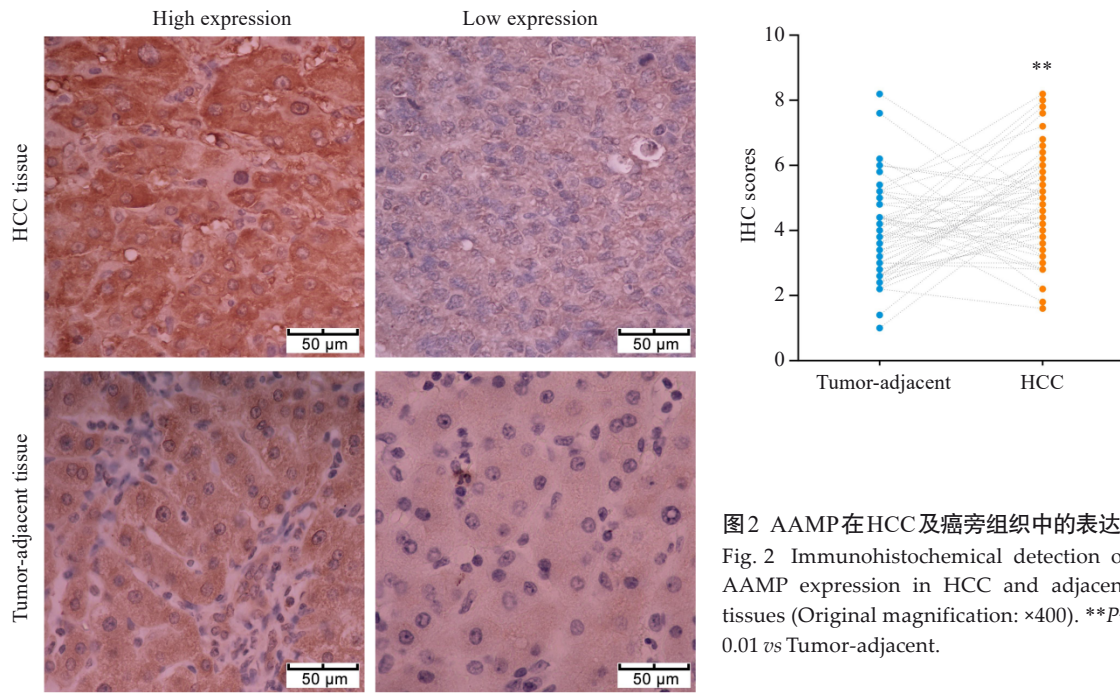


图2 AAMP在HCC及癌旁组织中的表达  
Fig. 2 Immunohistochemical detection of AAMP expression in HCC and adjacent tissues (Original magnification:  $\times 400$ ).  $**P < 0.01$  vs Tumor-adjacent.

表1 AAMP高表达在肝细胞癌中的临床意义  
Tab.1 Clinical significance of high AAMP expression level in HCC

Clinical features	AAMP expression		$\chi^2$	P	
	Low (n=30)	High (n=30)			
Gender	Male	21	22	0.082	0.774
	Female	9	8		
Age (year)	<60	5	3	0.144	0.704
	$\geq 60$	25	27		
HBsAg	Negative	5	7	0.417	0.519
	Positive	25	23		
Liver cirrhosis	Absent	10	8	0.317	0.573
	Present	20	22		
Tumor size(cm)	$\leq 5$	15	10	1.714	0.190
	$> 5$	15	20		
Venous infiltration	No	18	9	5.455	0.020
	Yes	12	21		
Edmondson-steiner grading	I+II	19	10	5.406	0.020
	III+IV	11	20		
Serum AFP level (ng/mL)	$< 400$	16	9	3.360	0.067
	$\geq 400$	14	21		
TNM stage	I+II	17	9	4.344	0.037
	III+IV	13	21		

AAMP组的HCC细胞迁移距离缩短( $P < 0.05$ ,图5A、B)。Transwell迁移小室结果发现,sh-AAMP组能够迁移至Transwell上室外侧面的HCC细胞数量少于sh-NC组细胞( $P < 0.01$ ,图5C、D)。利用基质胶构建的Transwell侵袭小室模型证实,sh-AAMP组成功穿过基质胶的

HCC细胞数量均少于sh-NC组细胞( $P < 0.05$ ,图5E、F)。

### 2.6 敲低AAMP抑制HCC细胞裸鼠体内肺转移

HE染色结果显示,与sh-NC组相比,sh-AAMP组HCC细胞形成的肺转移瘤形成数量减少( $P < 0.05$ ,图6A、B),下调AAMP表达抑制了HCC细胞的体内转移能力。

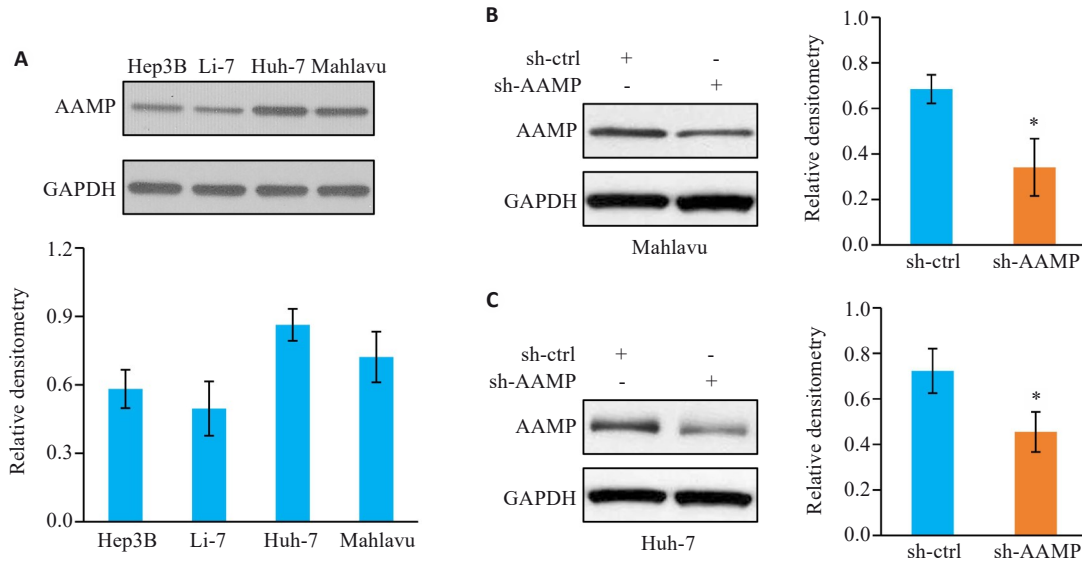


图3 慢病毒转染敲低HCC细胞中AAMP表达

Fig.3 Knockdown of AAMP in HCC cells by lentivirus transduction. A: Expression of AAMP in 4 HCC cell lines (Hep3B, Li-7, Huh-7, and Mahlavu). B, C: Lentivirus-mediated knockdown of AAMP in Mahlavu (B) and Huh-7 (C) cells, \* $P < 0.05$  vs sh-ctrl group.

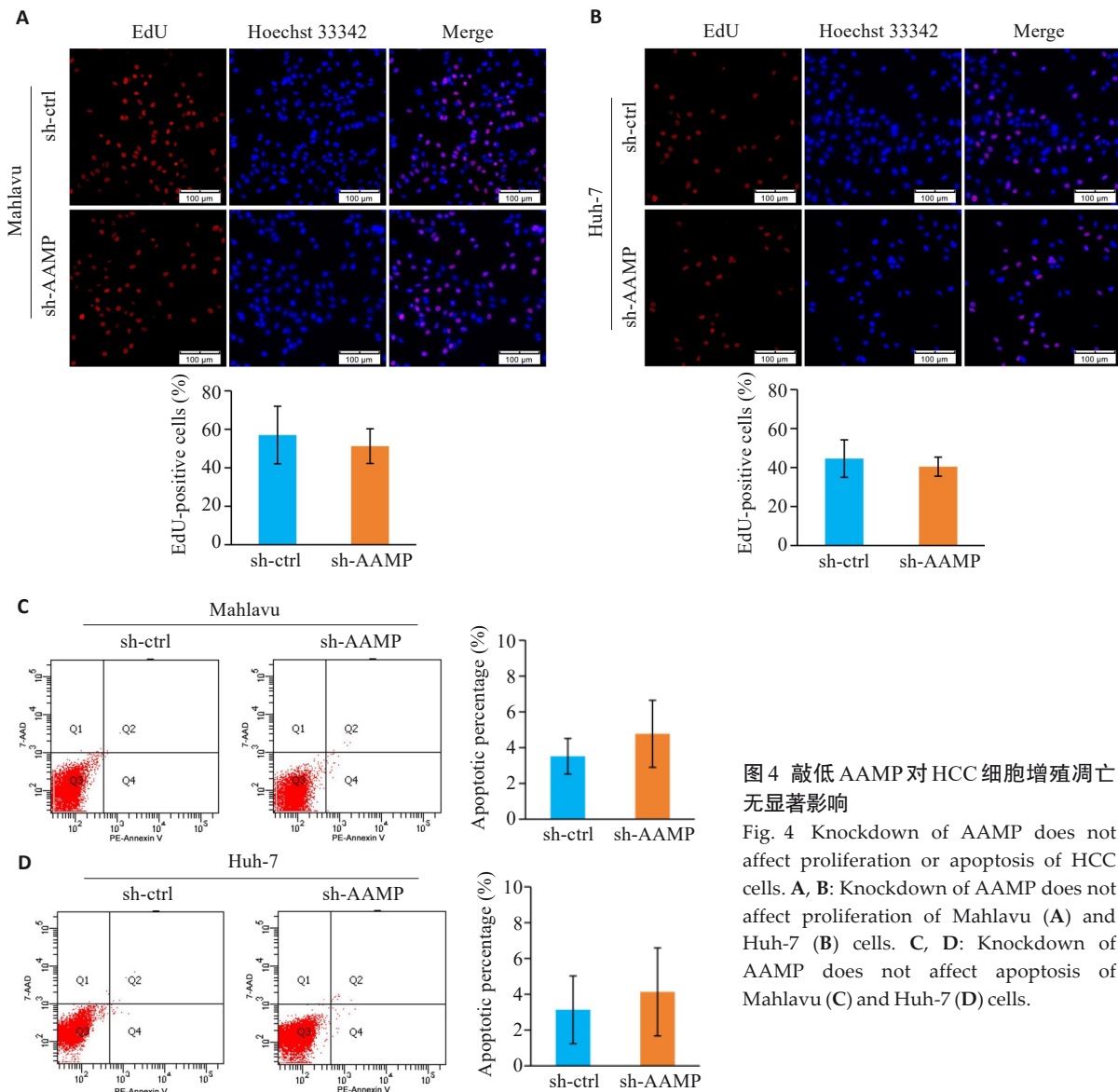


图4 敲低AAMP对HCC细胞增殖凋亡无显著影响

Fig. 4 Knockdown of AAMP does not affect proliferation or apoptosis of HCC cells. A, B: Knockdown of AAMP does not affect proliferation of Mahlavu (A) and Huh-7 (B) cells. C, D: Knockdown of AAMP does not affect apoptosis of Mahlavu (C) and Huh-7 (D) cells.

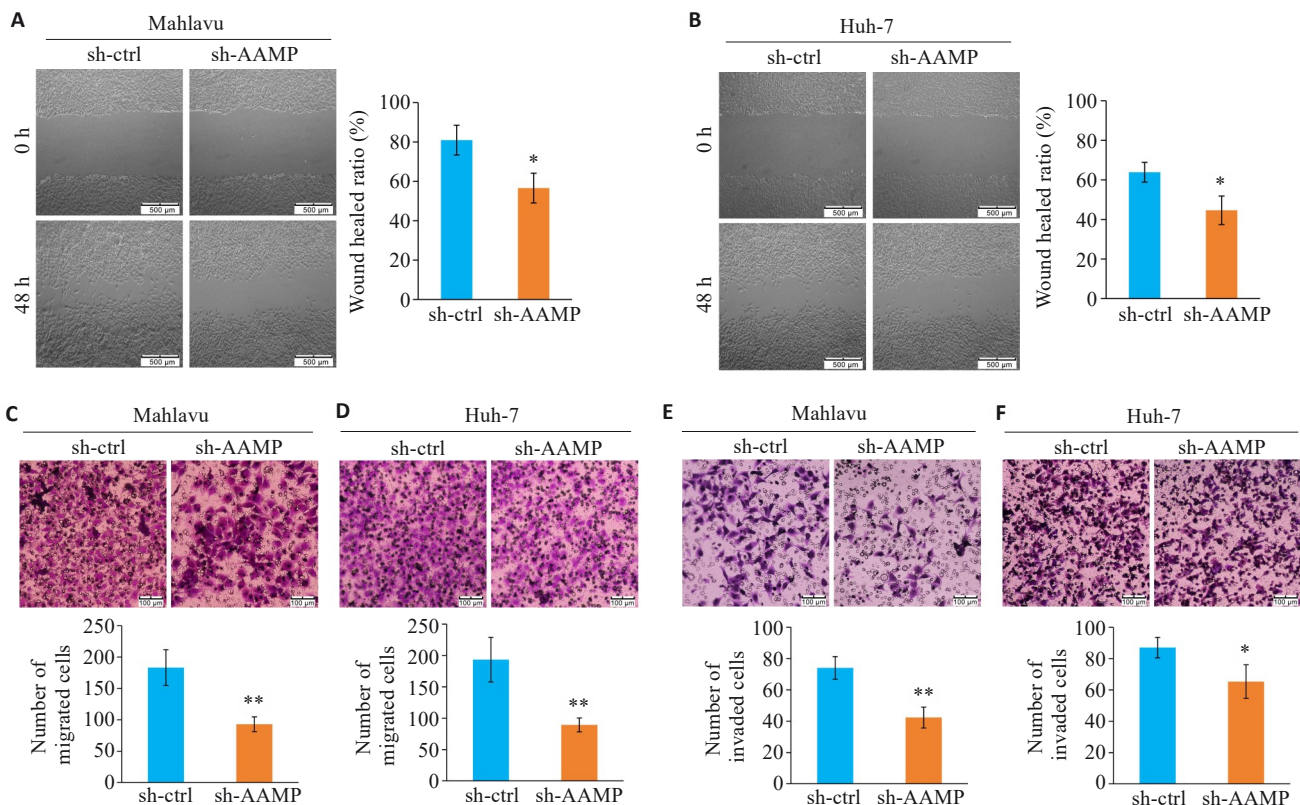


图5 敲低 AAMP 抑制 HCC 细胞迁移和侵袭

Fig. 5 Knockdown of AAMP inhibits migration and invasion of HCC cells. **A, B:** Knockdown of AAMP inhibits wound healing of Mahlavu (**A**) and Huh-7 (**B**) cells (\* $P < 0.05$  vs sh-ctrl group). **C, D:** Knockdown of AAMP attenuates Transwell migration ability of Mahlavu (**C**) and Huh-7 (**D**) cells (\*\* $P < 0.01$  vs sh-ctrl group). **E, F:** Knockdown of AAMP suppresses Transwell invasion ability of Mahlavu (**E**) and Huh-7 (**F**) cells (\* $P < 0.05$  vs sh-ctrl group, \*\* $P < 0.01$  vs sh-ctrl group).  $n = 3$  per group.

### 2.7 敲低 AAMP 抑制 HCC 细胞发生 EMT

Western blotting 检测显示,与 sh-NC 组相比,sh-AAMP 组细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ ),但是 N-cadherin、Vimentin 和 Snail 蛋白表达水平均降低 ( $P < 0.05$ ,图 7A,C)。免疫荧光染色检测发现,与 sh-NC 组相比,sh-AAMP 组细胞中 E-cadherin 的荧光增强,而 N-cadherin 和 Vimentin 的荧光减弱(图 7B,D)。

### 2.8 敲低 AAMP 促进 HCC 细胞内 RhoA 蛋白降解

RT-qPCR 检测显示,敲低 AAMP 表达并不影响 HCC 细胞中 RhoA mRNA 的表达水平 ( $P > 0.05$ ,图 8A)。但 Western blotting 检测发现,敲低 AAMP 表达抑制了 RhoA 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ,图 8B)。蛋白酶体抑制剂 MG-132 处理 HCC 细胞阻断了 AAMP 敲低导致的 RhoA 蛋白表达下调,sh-ctrl 和 sh-AAMP 两组 HCC 细胞间 RhoA 蛋白的表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ,图 8C)。使用蛋白合成抑制剂 CHX 处理 HCC 细胞后 sh-AAMP 组 HCC 细胞内 RhoA 蛋白的表达水平仍低于 sh-ctrl 组细胞 ( $P < 0.01$ ,图 8D)。免疫组化染色分析显示,二者表达水平呈现正相关关系 ( $r = 0.535, P = 0.009$ )。

## 3 讨论

尽管 HCC 治疗方式不断进步,但在改善转移性

HCC 患者的生存率方面尚未取得显著进展。因此,临床迫切需要更好地了解高转移性 HCC 的生物学特性。细胞的运动性增强、粘附性减弱是导致肿瘤发生侵袭转移的生物学基础<sup>[13,14]</sup>。AAMP 是一个对细胞运动功能具有促进作用的重要基因。利用 TIMER、TCGA、GTEx 等数据库的泛癌组学分析研究证实,AAMP 在多种人类恶性实体瘤中表达升高并于患者不良预后密切相关<sup>[15]</sup>。但关于 AAMP 在 HCC 中的临床价值和生物功能目前罕有报道。

本研究首先利用 TCGA、GEO 和 ICGC 数据库中多个 HCC 队列测序数据进行生物信息学分析,结果发现 HCC 组织中 AAMP 呈现一致的高表达趋势,并且 AAMP 高表达的患者临床分期更晚、总生存期更差。非酒精性脂肪肝炎是西方人群发生 HCC 的主要危险因素。有研究发现,AAMP 高表达与非酒精性脂肪肝炎相关 HCC 的发生密切相关<sup>[16]</sup>。我国约 84% 的 HCC 是由 HBV 感染导致<sup>[17]</sup>。本研究收集的 HCC 临床标本中 HBsAg 阳性率高达 80%,免疫组化染色证实,AAMP 在 HCC 组织中的表达水平高于癌旁组织。相关性分析表明,AAMP 高表达与血管侵犯、Edmondson-Steiner 分级 (III+IV) 及 TNM 分期 (III+IV 期) 等特征显著相关。上述结果表明 AAMP 参与了多种疾病背景下 HCC 的恶

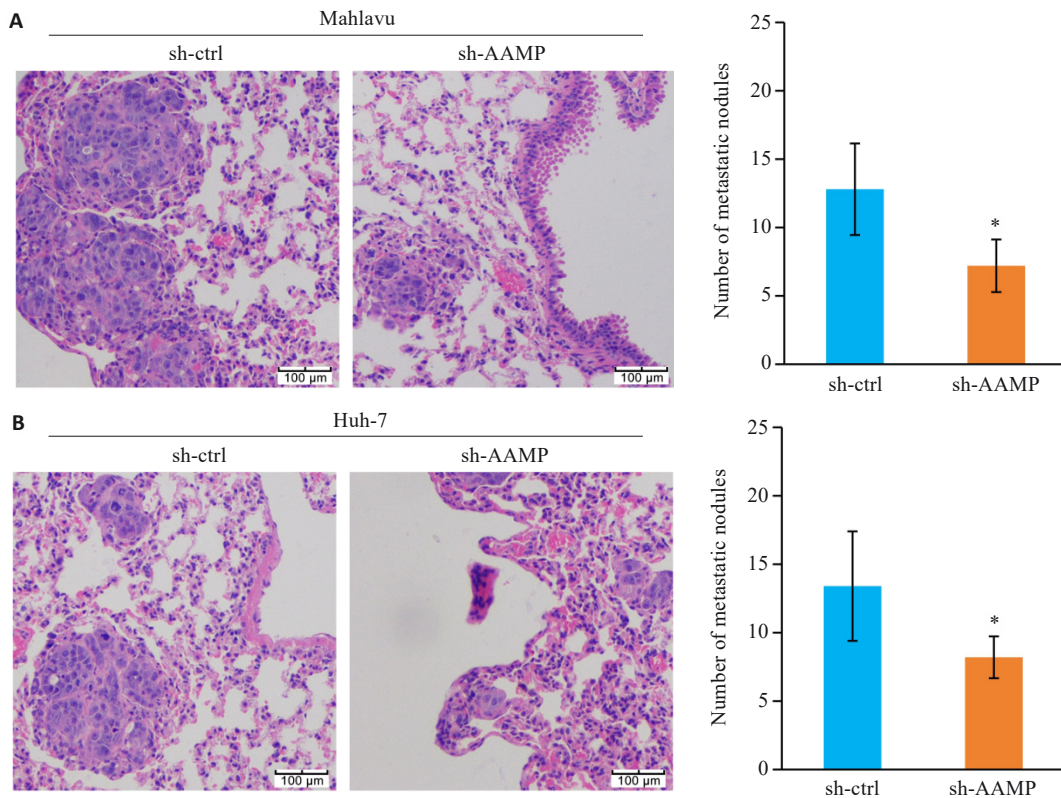


图6 敲低AAMP抑制HCC细胞裸鼠肺转移瘤形成

Fig.6 Knockdown of AAMP suppresses HCC lung metastasis in nude mice. **A, B:** Knockdown of AAMP decreases lung metastatic nodule numbers formed by Mahlavu (**A**) and Huh-7 (**B**) cells in nude mice ( $\times 100$ ). \* $P < 0.05$  vs sh-ctrl group ( $n=5$ ).

性进展过程,但其具体途径仍待探索。

既往针对乳腺癌细胞的增殖侵袭的研究发现,敲低AAMP能够抑制MCF-7的增殖能力和MDA-MB-231的侵袭能力,却并不影响MCF-7的侵袭和MDA-MB-231的增殖能力<sup>[18]</sup>。与之不同,本研究体外实验证实敲低AAMP显著抑制了HCC细胞的体外迁移侵袭能力和体内肺转移瘤形成能力,并且敲低AAMP对两种HCC细胞的增殖凋亡均无明显影响。有研究报道AAMP在肺癌中的功能机制更为复杂:一方面,AAMP增强EGFR二聚体化和磷酸化来激活下游ERK信号通路,在促进肺癌细胞增殖的同时提高了其对埃克替尼和阿霉素等化疗药物的耐药性<sup>[19]</sup>;另一方面AAMP通过抑制ARHGAP1与CDC42的结合来保持CDC42的持续激活,促进肺癌细胞的迁移和侵袭<sup>[20]</sup>。上述结果不仅证实AAMP能够通过增强细胞侵袭转移能力驱动HCC进展,同时也提示AAMP具有高度的肿瘤异质性,其通过与特异性信号蛋白相互作用展示出多样的生物学功能。

EMT为肝癌细胞获得侵袭转移能力的重要途径<sup>[21]</sup>。本研究发现,在HCC细胞内敲低AAMP后,上皮标志物E-cadherin的表达水平显著升高,而间质标志物N-cadherin、Vimentin以及转录因子Snail的表达水平明显下调,证实AAMP敲低抑制了HCC细胞EMT的发

生。针对骨肉瘤的研究也表明<sup>[22]</sup>,AAMP在肺转移灶中的表达水平高于原发病灶,在143B和MG63细胞中敲低AAMP通过抑制细胞伪足形成和细胞骨架蛋白F-actin表达来抑制肿瘤细胞迁移、侵袭和EMT的发生。HCC中RhoA的表达异常升高<sup>[23]</sup>,并促进肿瘤侵袭转移<sup>[24]</sup>和EMT的发生<sup>[25]</sup>。本研究发现,敲低AAMP能够下调RhoA蛋白的表达,但对RhoA mRNA的表达水平无明显影响,这表明AAMP对RhoA基因表达的调控发生在转录后过程。因此,我们进一步利用蛋白降解抑制剂MG-132和蛋白合成抑制剂CHX,以解析AAMP调控RhoA蛋白表达的具体机制。Western blotting结果显示,利用MG-132破坏蛋白酶体复合物形成能有效阻断下调AAMP导致的RhoA蛋白表达降低,而用CHX处理则对RhoA蛋白表达的变化无明显影响。由此证实,AAMP的缺失导致RhoA蛋白的稳定性受损,最终引起蛋白降解而出现表达量下调。据文献报道,包括Fbxw7<sup>[26]</sup>、Cullin3<sup>[27]</sup>及Smurf1/2<sup>[28]</sup>等在内的多种E3连接酶均能够对RhoA蛋白进行泛素化修饰,导致RhoA进入26S蛋白酶体途径发生降解,在结肠癌中已证实AAMP能够通过RhoA捆绑结合进而阻碍SMURF2介导的泛素化降解过程<sup>[29]</sup>。因此我们推测:在敲低AAMP的HCC细胞内,RhoA蛋白失去了AAMP的结

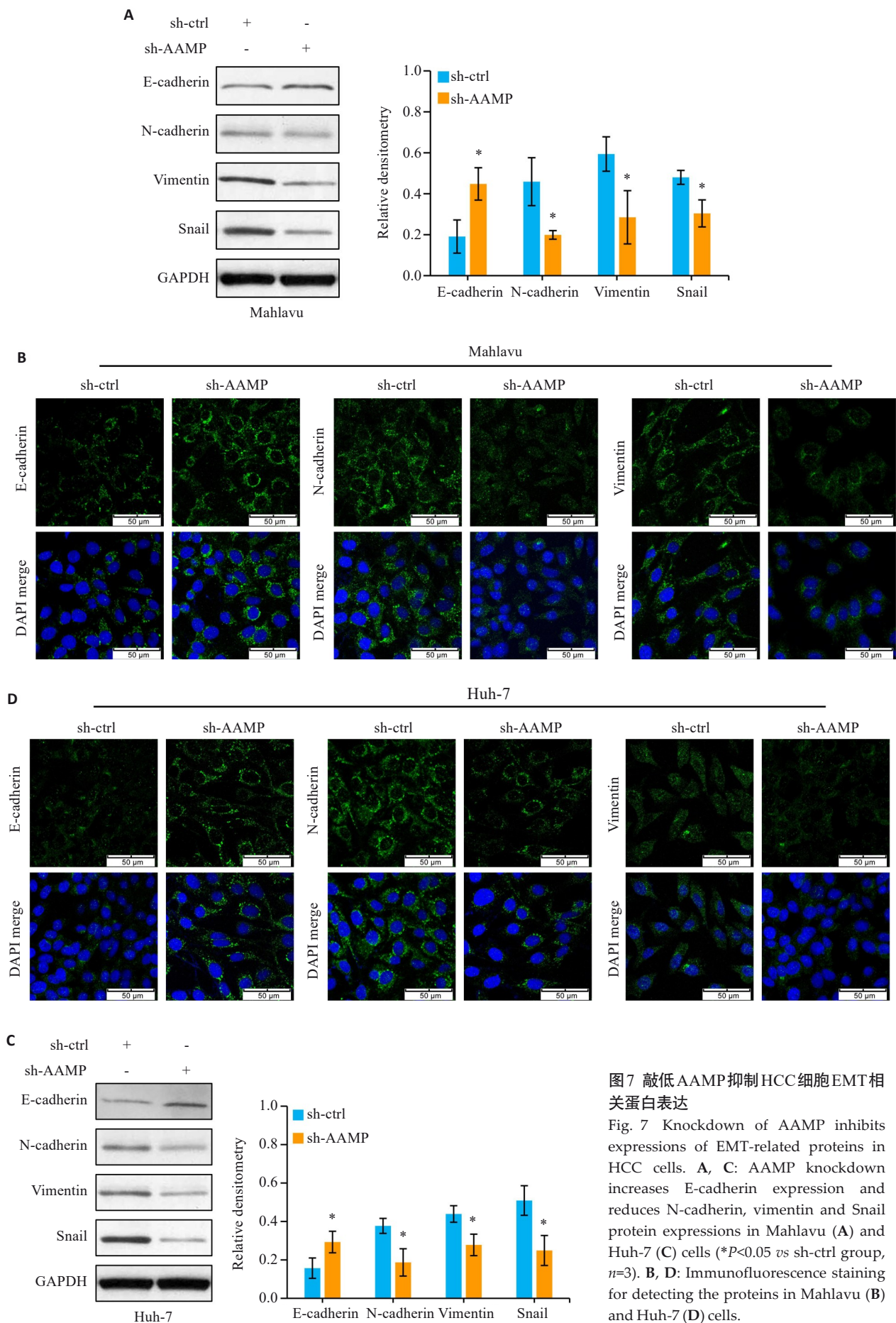


图7 敲低AAMP抑制HCC细胞EMT相关蛋白表达

Fig. 7 Knockdown of AAMP inhibits expressions of EMT-related proteins in HCC cells. **A, C:** AAMP knockdown increases E-cadherin expression and reduces N-cadherin, vimentin and Snail protein expressions in Mahlavu (**A**) and Huh-7 (**C**) cells (\* $P < 0.05$  vs sh-ctrl group,  $n = 3$ ). **B, D:** Immunofluorescence staining for detecting the proteins in Mahlavu (**B**) and Huh-7 (**D**) cells.

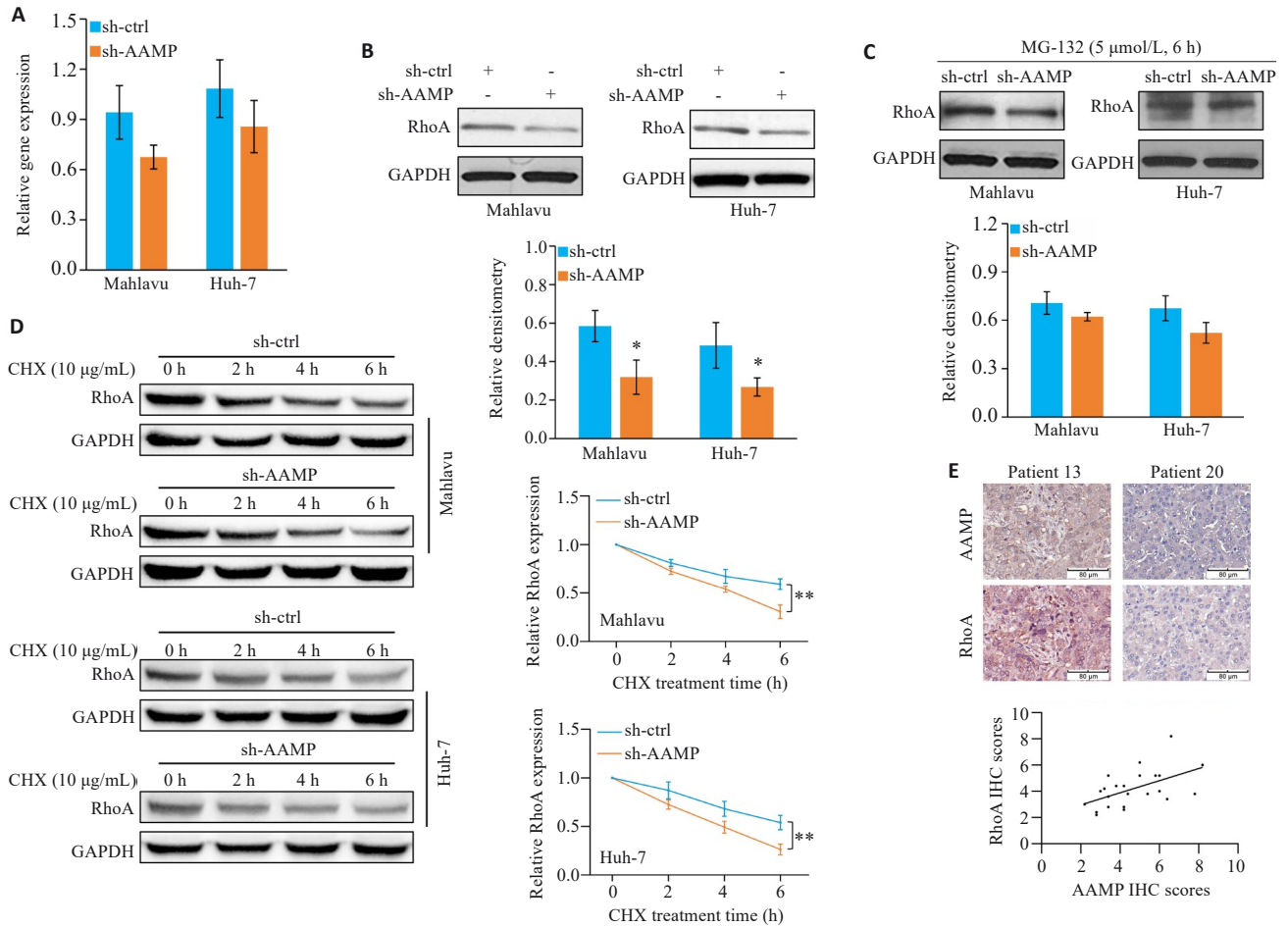


图8 敲低AAMP促进HCC细胞内RhoA蛋白降解

Fig.8 Knockdown of AAMP promotes degradation of RhoA protein in HCC cells. **A:** Knockdown of AAMP does not affect mRNA expression levels of RhoA in Mahlavu or Huh-7 cells. **B:** Knockdown of AAMP down-regulates protein expression levels of RhoA in Mahlavu and Huh-7 cells (\* $P < 0.05$  vs sh-ctrl group). **C:** MG-132 treatment restores protein expression levels of RhoA in Mahlavu and Huh-7 cells with AAMP knockdown. **D:** CHX treatment does not rescue RhoA protein expression in Mahlavu or Huh-7 cells with AAMP knockdown (\*\* $P < 0.01$  vs sh-ctrl group,  $n = 3$ ). **E:** RhoA and AAMP expressions are positively correlated in HCC tissues.

合保护,导致泛素连接位点暴露,多种E3泛素连接酶对其进行泛素化修饰后引发蛋白酶解,最终引起RhoA基因在蛋白质水平的表达下调。

本研究具有一定的局限性。临床研究方面,对纳入研究的HCC患者未能进行长期随访,尚不能评价AAMP表达状态对HCC患者长期预后的影响。分子机制方面,有研究报道,在内皮细胞中下调AAMP对膜定位的RhoA蛋白表达抑制作用为更明显<sup>[30]</sup>,但本研究仅在总体水平发现了RhoA蛋白的下调,因此未来仍需要通过成分蛋白提取分析、激光共聚焦亚细胞定位等技术进一步揭示AAMP调控RhoA表达具体的分子过程。

综上,本研究通过多维度实验体系揭示了AAMP在HCC中的表达和调控肝癌细胞侵袭转移的潜在分子机制,这些发现为深入理解HCC的分子调控网络提供了不同视角,同时也提示AAMP可能成为新的HCC诊疗潜在靶点。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

**参考文献:**

- [1] Siegel RL, Kratzer TB, Giaquinto AN, et al. Cancer statistics, 2025 [J]. CAA Cancer J Clinicians, 2025, 75(1): 10-45.
- [2] Beckner ME, Krutzsch HC, Stracke ML, et al. Identification of a new immunoglobulin superfamily protein expressed in blood vessels with a heparin-binding consensus sequence[J]. Cancer Res, 1995, 55(10): 2140-9.
- [3] Wang X, Chen S, Gao Y, et al. microRNA-125b inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells induced by platelet-derived growth factor BB[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(2): 791-8.
- [4] Reid HM, Wikström K, Kavanagh DJ, et al. Interaction of angio-associated migratory cell protein with the TP $\alpha$  and TP $\beta$  isoforms of the human thromboxane A<sub>2</sub> receptor[J]. Cell Signal, 2011, 23(4): 700-17.
- [5] Xu Y, Tian J, Wang M, et al. Co-regulated *CeRNA* network mediated by circRNA and lncRNA in patients with gouty arthritis[J]. BMC

- Med Genomics, 2024, 17(1): 264.
- [6] 陈奇, 武惠韬, 孙金秀, 等. 胃癌转移的分子特征分析及预后评估[J]. 解放军医学院学报, 2019, 40(8):745-9.
- [7] Oreskovic E, Wheeler EC, Mengwasser KE, et al. Genetic analysis of cancer drivers reveals cohesin and CTCF as suppressors of PD-L1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119(7): e2120540119.
- [8] Ning Y, Zheng M, Zhang Y, et al. RhoA-ROCK2 signaling possesses complex pathophysiological functions in cancer progression and shows promising therapeutic potential[J]. Cancer Cell Int, 2024, 24(1): 339.
- [9] Zhang X, Zhao YY, Li M, et al. A synergistic regulation works in matrix stiffness-driven invadopodia formation in HCC[J]. Cancer Lett, 2024, 582: 216597.
- [10] 牛小行, 蒋立柱, 罗胜勇, 等. RNF8调控肝细胞癌增殖和迁移的作用及机制[J]. 中国药理学通报, 2025, 41(7): 1305-11.
- [11] Podieh F, Overboom MC, Knol JC, et al. AAMP and MTSS1 are novel negative regulators of endothelial barrier function identified in a proteomics screen[J]. Cells, 2024, 13(19): 1609.
- [12] Vogt F, Zerneck A, Beckner M, et al. Blockade of angio-associated migratory cell protein inhibits smooth muscle cell migration and neointima formation in accelerated atherosclerosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 52(4): 302-11.
- [13] 李超, 陈双江, 姜业臻. 过表达 miR-607 通过下调 TRPC5 表达抑制肝细胞癌的生长和转移[J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(11): 1587-93.
- [14] 陈芊伊, 尚书涵, 鲁欢, 等. 金盏花苷 E 通过自噬途径下调 GPX4 和 SLC7A11 抑制肝癌细胞的增殖和迁移[J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(7): 1327-35.
- [15] Wang Y, Liu T, Zhang K, et al. Pan-cancer analysis from multi-omics data reveals AAMP as an unfavourable prognostic marker[J]. Eur J Med Res, 2023, 28(1): 258.
- [16] Ghosh S, Datta R, Thakur S. Network-based meta-analysis of gene expression reveals novel prognostic biomarkers for the progression of hepatocellular carcinoma from non-alcoholic fatty liver disease[J]. Hum Gene, 2024, 42: 201357.
- [17] 国际肝胆胰协会中国分会, 中国抗癌协会肝癌专业委员会, 中国研究型医院学会肝胆胰外科专业委员会, 等. 乙型肝炎病毒相关肝细胞癌抗病毒治疗中国专家共识(2023版)[J]. 中华消化外科杂志, 2023, 22(1): 29-41.
- [18] Yin Y, Sanders AJ, Jiang WG. The impact of angio-associated migratory cell protein (AAMP) on breast cancer cells *in vitro* and its clinical significance[J]. Anticancer Res, 2013, 33(4): 1499-509.
- [19] Yao S, Shi FF, Wang YY, et al. Angio-associated migratory cell protein interacts with epidermal growth factor receptor and enhances proliferation and drug resistance in human non-small cell lung cancer cells[J]. Cell Signal, 2019, 61: 10-9.
- [20] Yao S, Shi FF, Mu N, et al. Angio-associated migratory cell protein (AAMP) interacts with cell division cycle 42 (CDC42) and enhances migration and invasion in human non-small cell lung cancer cells[J]. Cancer Lett, 2021, 502: 1-8.
- [21] 林杰, 区活辉, 王卫东, 等. 过表达 CLECSA 基因抑制肝细胞癌增殖和转移并逆转上皮-间质转化[J]. 南方医科大学学报, 2023, 43(1): 85-91.
- [22] 邓乾蓉, 占方彪, 谢朝政, 等. AAMP 通过调节 YAP 信号通路促进骨肉瘤细胞转移的机制研究[J]. 肿瘤防治研究, 2024, 51(6):440-7.
- [23] Wang T, Rao D, Yu C, et al. RHO GTPase family in hepatocellular carcinoma[J]. Exp Hematol Oncol, 2022, 11(1): 91-102.
- [24] Yan Z, Guo D, Tao R, et al. Fluid shear stress induces cell migration *via* RhoA-YAP1-autophagy pathway in liver cancer stem cells[J]. Cell Adh Migr, 2022, 16(1): 94-106.
- [25] Gao JH, He AD, Liu LM, et al. Direct interaction of platelet with tumor cell aggravates hepatocellular carcinoma metastasis by activating TLR4/ADAM10/CX3CL1 axis[J]. Cancer Lett, 2024, 585: 216674.
- [26] Li H, Wang ZW, Zhang W, et al. Fbxw7 regulates tumor apoptosis, growth arrest and the epithelial-to-mesenchymal transition in part through the RhoA signaling pathway in gastric cancer[J]. Cancer Lett, 2016, 370(1): 39-55.
- [27] Guo DF, Rahmouni K. The Bardet-Biedl syndrome protein complex regulates cell migration and tissue repair through a Cullin-3/RhoA pathway[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2019, 317(3): C457-65.
- [28] Niu H, Bi F, Zhao W, et al. Smurf1 regulates ameloblast polarization by ubiquitination-mediated degradation of RhoA[J]. Cell Prolif, 2023, 56(4): e13387.
- [29] Wu Y, Liu B, Lin W, et al. AAMP promotes colorectal cancer metastasis by suppressing SMURF2-mediated ubiquitination and degradation of RhoA[J]. Mol Ther Oncolytics, 2021, 23: 515-30.
- [30] Hu JJ, Qiu JH, Zheng YM, et al. AAMP regulates endothelial cell migration and angiogenesis through RhoA/rho kinase signaling[J]. Ann Biomed Eng, 2016, 44(5): 1462-74.

(编辑:林萍)