

·基础研究·

## PAGE5 调控 PI3K/AKT/MMP1 轴促进乳腺癌侵袭和肝转移

刘增慧<sup>1</sup>, 卢颖<sup>2</sup>, 梁小立<sup>1</sup>, 陈玩娜<sup>1</sup>, 徐向东<sup>1</sup>, 徐洪彪<sup>1</sup>, 单臻<sup>1</sup>

(1. 中山大学附属第一医院甲状腺外科, 广东 广州 510080; 2. 中山大学附属第一医院超声科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】本研究旨在揭示 PAGE5 通过调控 PI3K/AKT 信号通路及其下游效应分子基质金属蛋白酶 1 (MMP1) 促进乳腺癌细胞侵袭和肝脏转移的具体分子机制。【方法】利用 TCGA 数据库进行生物信息学分析, 评估 PAGE5 在转移性乳腺癌组织中的表达。采用 CCK-8、EdU、Transwell 和划痕实验, 分析 PAGE5 对乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响。采用 NOD-SCID 小鼠脾注射建立乳腺癌肝转移动物模型验证 PAGE5 对乳腺癌肝转移的影响。通过转录组测序和 KEGG 富集分析, 鉴定 PAGE5 调控的潜在信号通路。Western blot 检测 AKT 磷酸化水平; 采用实时定量聚合酶链反应 (qPCR) 对 PAGE5 的下游靶分子进行筛选和验证。【结果】生物信息学分析显示, PAGE5 在乳腺癌远处转移组织中的表达明显上调。体外、体内实验证实, PAGE5 过表达显著增强了乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力, 并可促进乳腺癌肝转移病灶的形成, 而 PAGE5 敲低可抑制乳腺癌肝转移 ( $P < 0.0001$ )。转录组测序和 KEGG 富集分析显示, PAGE5 显著激活了 PI3K-AKT 信号通路 ( $P = 0.0285$ )。Western blot 证实 PAGE5 上调了 p-AKT 水平, 并可被 AKT 抑制剂 MK2206 逆转。qPCR 证实, MMP1 是 PAGE5 的关键下游效应因子, 并可被 MK2206 抑制 ( $P < 0.0001$ )。【结论】本研究初步证实 PAGE5 可促进 PI3K/AKT 信号通路活化, 并通过 MMP1 介导乳腺癌侵袭和肝转移。

**关键词:** 乳腺癌; 前列腺相关基因 5; 乳腺癌肝转移; 基质金属蛋白酶 1; PI3K-AKT 信号通路

**中图分类号:** R737.9

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-3554(2026)05-0833-10

**DOI:** 10.11714/jssu.med.YX20260123

### PAGE5 in Promoting Breast Cancer Invasion and Hepatic Metastasis via Regulation of the PI3K/AKT/MMP1 Axis

LIU Zenghui<sup>1</sup>, LU Ying<sup>2</sup>, LIANG Xiaoli<sup>1</sup>, CHEN Wanna<sup>1</sup>, XU Xiangdong<sup>1</sup>, XU Hongbiao<sup>1</sup>, SHAN Zhen<sup>1</sup>

(1. Department of Thyroid Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Department of Ultrasound, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: XU Hongbiao, E-mail: xuhongbiao123456@163.com; SHAN Zhen, E-mail: szsysu@126.com

**Abstract:** 【Objective】 This study aimed to elucidate the specific molecular mechanism by which PAGE5 promotes breast cancer cell invasion and hepatic metastasis through regulating the PI3K/AKT signaling pathway and its downstream effector, matrix metalloproteinase 1 (MMP1). 【Methods】 Bioinformatics analysis using the TCGA database was performed to evaluate PAGE5 expression in metastatic breast cancer tissues. The effects of PAGE5 on the proliferation, migration, and invasion capabilities of breast cancer cells were analyzed using CCK-8, EdU, Transwell, and wound healing assays. A splenic injection hepatic metastasis model in NOD-SCID mice was employed to validate the impact of PAGE5 on breast cancer liver metastasis. Transcriptome sequencing and KEGG enrichment analysis were conducted to identify potential signaling pathways regulated by PAGE5. Western blot was used to detect AKT phosphorylation levels. Quantitative real-

收稿日期: 2026-08-03

录用日期: 2026-09-02

基金项目: 柯麟新星人才计划 (Y50178)

作者简介: 刘增慧, 第一作者, 研究方向: 乳腺肿瘤, E-mail: liuzh373@163.com; 卢颖, 共同第一作者, 研究方向: 甲状腺、乳腺疾病, E-mail: luying814228@163.com; 徐洪彪, 共同通信作者, E-mail: xuhongbiao123456@163.com; 单臻, 通信作者, 副主任医师, E-mail: szsysu@126.com

time polymerase chain reaction (qPCR) was applied to screen and validate downstream target molecules of *PAGE5*. **【Results】** Bioinformatic analysis revealed that *PAGE5* expression was significantly upregulated in distant metastasis of breast cancer. Both in vitro and in vivo experiments confirmed that *PAGE5* overexpression markedly enhanced the migration and invasion abilities of breast cancer cells and promoted the formation of liver metastatic lesions, whereas *PAGE5* knockdown suppressed breast cancer liver metastasis ( $P<0.000\ 1$ ). Transcriptome sequencing and KEGG enrichment analysis indicated that *PAGE5* significantly activated the PI3K-AKT signaling pathway ( $P=0.028\ 5$ ). Western blot confirmed that *PAGE5* upregulated p-AKT levels, which could be reversed by MK2206. The qPCR results confirmed that *MMP1* is a key downstream effector of *PAGE5*, and its expression can be inhibited by MK2206 ( $P<0.000\ 1$ ). **【Conclusions】** This study preliminarily demonstrates that *PAGE5* can activate the PI3K/AKT signaling pathway and mediate the invasion and liver metastasis of breast cancer through *MMP1*.

**Key words:** breast cancer; prostate-associated gene 5; breast cancer liver metastasis; matrix metalloproteinase 1; PI3K-AKT signaling pathway

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2026, 47(5): 833-842]

乳腺癌是女性中发病率最高的恶性肿瘤,是女性癌症死亡的第二大病因<sup>[1-2]</sup>。乳腺癌一旦发生转移,5年生存率仅为25%<sup>[3]</sup>,肝脏是乳腺癌转移的常见器官,乳腺癌肝转移预后更差,5年总体生存率仅为8.5%<sup>[4]</sup>,中位生存期仅为3~15个月<sup>[5]</sup>。目前,临床上针对乳腺癌肝转移治疗效果仍不理想,对于乳腺癌肝转移的发生机制仍有待深入研究。癌-睾丸抗原(cancer-testis antigens, CTAs)是一类表达模式独特的蛋白家族,在多种肿瘤中会异常激活并表达升高<sup>[6]</sup>。前列腺相关基因(prostate-associated gene, PAGE)家族是CTAs的一个重要亚群,现有研究表明它在黑色素瘤、前列腺癌和非小细胞肺癌等多种实体瘤中呈高表达<sup>[7]</sup>。由于睾丸组织缺乏主要组织相容性复合体I类分子(major histocompatibility complex class I molecule, MHC I)的表达,属于免疫豁免部位,因此CTAs在正常体细胞中不表达或极低表达,不会诱导免疫耐受<sup>[8]</sup>。然而,当它们在肿瘤细胞中重新表达时,会被免疫系统识别为“非己”抗原,从而激发强烈的免疫反应。这一特性使得CTAs成为极具潜力的肿瘤诊断生物标志物和免疫治疗靶点<sup>[9]</sup>。然而,PAGE5在乳腺癌中的表达模式、临床意义及其在肿瘤转移发生过程中的功能和机制,仍缺乏系统深入的研究。PI3K/AKT信号通路是调控多种肿瘤发生发展的关键通路<sup>[10-13]</sup>。研究表明,肿瘤组织中PI3K-AKT通路相关分子的异常活化可增加乳腺癌患者的淋巴结转移和远处转移发生风险<sup>[14]</sup>。肿瘤细胞突破细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜的屏障是

肿瘤细胞离开原发部位发生远处转移的起始步骤。*MMP1*可通过破坏组织学屏障、释放储存在ECM中的生长因子、并激活特定的信号通路,为肿瘤细胞的迁移和定植创造有利的微环境<sup>[15]</sup>。PI3K/AKT通路能上调基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)等蛋白水解酶的活性,为肿瘤细胞的迁移和远处定植创造条件<sup>[16]</sup>。基于以上研究背景,本研究通过TCGA数据库筛选出在转移性乳腺癌组织中表达显著上调的基因PAGE5,并探究其对于乳腺癌肝转移的影响,以及其发挥作用的具体机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织样本

研究中所涉及的患者组织标本均来源于近10年内在中山大学附属第一医院进行乳腺癌及转移治疗的患者。每一对样本均取自同一乳腺癌患者,即从患者手术切除的原发灶标本和穿刺或切除的肝转移灶标本中,分别获取组织,并标注唯一的患者编号。本研究方案经过中山大学附属第一医院临床科研和实验动物伦理委员会审查(伦审[2020]169号)并免除患者知情同意。

### 1.2 动物实验

实验选用6~8周龄雌性NOD-SCID免疫缺陷小鼠,均购自于江苏集萃药康生物技术有限公司,于SPF级环境中适应性饲养。收集处于对数生长期的MDA-MB-231空载对照细胞组(PCDH)、

PAGE5过表达组(OE)和PAGE5敲除组(sg),用无血清培养基重悬并调整细胞密度至 $1 \times 10^6$ 个/ $50 \mu\text{L}$ 。腹腔注射 $10 \text{ g/L}$ 戊巴比妥钠对小鼠进行全身麻醉,于脾脏下极缓慢注入细胞。小鼠在标准条件下继续饲养31 d,到达预定观察终点后,以脱颈法处死小鼠,完整摘取肝脏。本研究方案经过中山大学附属第一医院临床科研和实验动物伦理委员会审查并严格按照医学伦理规范和要求进行(伦审动[2026]128号)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 细胞构建 PAGE5小干扰RNA(siRNA)使用瞬转;PAGE5过表达(OE)、敲低(KD/sh)、敲除(KO/sg)使用慢病毒包装转染MDA-MB-231及MDA-MB-415乳腺癌细胞系,转染24 h后加入含 $1 \mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的完全培养基筛选48 h。对于敲除细胞系挑取单克隆后扩大培养。

1.3.2 蛋白质印迹实验 将细胞提取总蛋白后煮沸变性进行免疫印迹法分析。加入相应I抗(PAGE5、MMP1、PI3K、p-PI3K、AKT和p-AKT抗体, $1:2\,000$ 稀释; $\beta$ -actin、GAPDH抗体, $1:5\,000$ 稀释) $4^\circ\text{C}$ 摇床孵育过夜。用TBST清洗后室温孵育相应的抗兔、抗鼠II抗,最后使用ELC发光液显影拍照。通过Image J软件对目标条带进行灰度值分析。

1.3.3 CCK-8细胞增殖实验 采用CCK-8试剂盒对MDA-MB-231、MDA-MB-415过表达或敲低细胞系进行细胞增殖检测,使用酶标仪在 $450 \text{ nm}$ 波长下测定各孔的吸光度(optical density, OD)。通过比较实验组与对照组在特定时间点的吸光度值差异来评估细胞增殖活力的变化。

1.3.4 EdU细胞增殖实验 采用EdU-555细胞增殖检测试剂盒对MDA-MB-231、MDA-MB-415过表达或敲低细胞系进行检测。使用Zeiss倒置荧光显微镜,使用对应通道(Alexa Fluor 555、Hoechst 33342对应激发/发射波长)观察并采集图像。计算荧光阳性细胞核占总细胞核数的比例。

1.3.5 划痕实验 当MDA-MB-231、MDA-MB-415过表达或敲低细胞单层铺满六孔板后,用 $200 \mu\text{L}$ 移液器枪头尖端,垂直于板底,平稳、力道均匀地划过细胞,形成一道直线划痕。分别于划痕后0、24、48和72 h,在相同位置拍摄图像。最后,使用Image J等图像分析软件测量各时间点划痕的宽度,通过比较0 h与后续时间点的划痕宽度百分比,定量分析细胞的迁移能力。

1.3.6 Transwell 迁移/侵袭实验 取MDA-MB-231、MDA-MB-415过表达或敲低细胞系接种于不含血清培养液的上室中(对于侵袭实验在上室中预先加入含 $200 \text{ mL/L}$ 基质胶的基础培养基),在下室中加入 $700 \mu\text{L}$ 含 $200 \text{ mL/L}$ 胎牛血清培养液,放入培养箱培养24 h或48 h后,将小室取出固定染色。在倒置显微镜下随机选取多个视野进行拍照计数,通过比较各组间穿透膜的细胞总数来定量分析细胞的迁移或侵袭能力。

1.3.7 免疫组化染色 对临床组织样本进行免疫组化(immunohistochemistry, IHC)染色,滴加适当比例稀释的一抗(PAGE5  $1:200$ 稀释)。染色结果使用全自动数字病理切片扫描仪进行扫描。使用Image J图像分析软件对PAGE5阳性区域进行统计。

1.3.8 逆转录定量聚合酶链反应 取MDA-MB-231、MDA-MB-415过表达或敲低细胞系使用Trizol法提取RNA,并进行逆转录。采用SYBR Green试剂盒进行实时荧光定量PCR检测。引物序列见附表1。最终,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目标基因相对于内参基因(18s rRNA)的相对表达量,并进行统计分析。

1.3.9 生物信息学分析 使用R语言下载并使用DESeq2 R包分析TCGA-BRCA数据集中非转移与转移组差异基因,TCGA样本数据均为乳腺癌原发灶测序结果。对差异基因进行基因本体(Gene Ontology, GO)注释和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析。对PCDH细胞及OE细胞转录组测序结果进行差异分析,并对差异基因进行GO和KEGG富集分析。

### 1.4 统计学方法

本研究所有实验均使用生物学重复3次。使用Graphpad Prism 10.1.2软件进行统计学分析。两组比较采用未配对 $t$ 检验;三组及以上组间比较采用单因素方差分析,并继以Tukey's多重比较检验进行事后两两比较;参数间的相关性采用Pearson相关分析,相关系数 $r$ 为正值表示正相关。均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

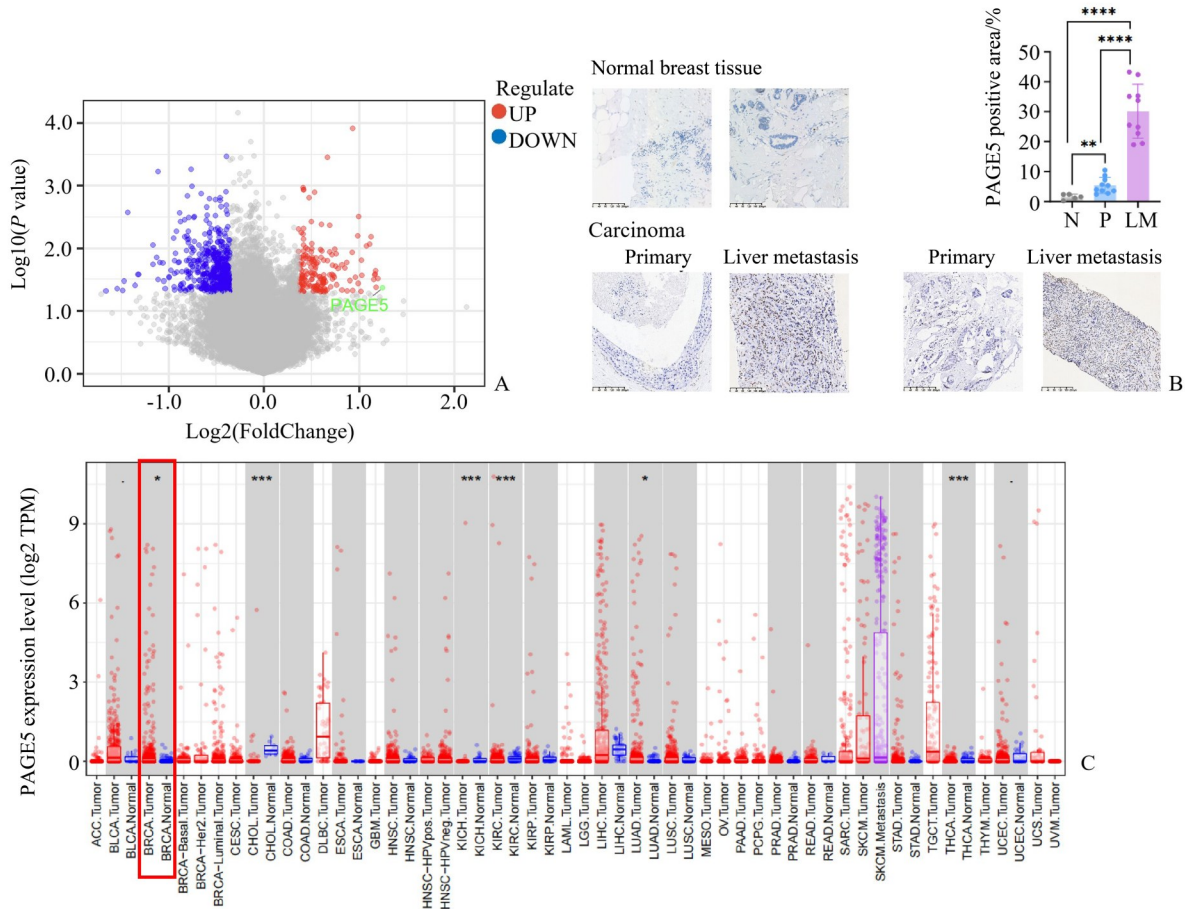
## 2 结果

### 2.1 PAGE5在乳腺癌转移灶中高表达

基于TCGA数据库中乳腺癌样本的临床信息,

根据是否发生远处转移将样本分为无转移组(M0)与转移组(M1)。TCGA数据库中的M1组样本来源于原发灶,其结果反映具备远处转移潜能的原发灶中PAGE5的表达特征。通过对TCGA数据库中样本进行基因差异分析显示PAGE5是M1组中表达上调最为显著的基因之一(图1A)。为进一步明确PAGE5在

肝转移灶中的表达,我们对临床配对的原发灶与肝转移灶标本进行了IHC检测,发现PAGE5在正常乳腺组织、乳腺癌原发组织和乳腺癌肝转移病灶中表达水平呈递增趋势(图1B;  $F=26.603$ ,  $P<0.0001$ )。泛癌分析发现PAGE5在乳腺癌、肾透明细胞癌、甲状腺癌等肿瘤中表达均较正常组织增高(图1C)。



A: Analysis of differentially expressed genes in TCGA database. B: Representative IHC images and statistical analysis of PAGE5-positive areas in clinical samples. N: normal breast tissue( $n=5$ ), P: primary breast cancer tissues ( $n=10$ ), LM: breast cancer liver metastatic tissues ( $n=10$ ). Scale bar=200  $\mu$ m. C: PAGE5 expression in pan-cancers. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ .

图1 PAGE5在乳腺癌原发灶及肝转移灶中的表达模式

Fig. 1 Expression patterns of PAGE5 in breast cancer and liver metastatic tissues

## 2.2 PAGE5不影响乳腺癌细胞增殖能力

选用MDA-MB-231、MDA-MB-415两种乳腺癌细胞系构建PAGE5过表达及敲低细胞模型(图2A)。CCK-8与EdU增殖实验证实,PAGE5过表达与敲低组细胞增殖能力均无统计学差异(图2B-C),说明PAGE5可能并不直接参与调控乳腺癌细胞的增殖能力。

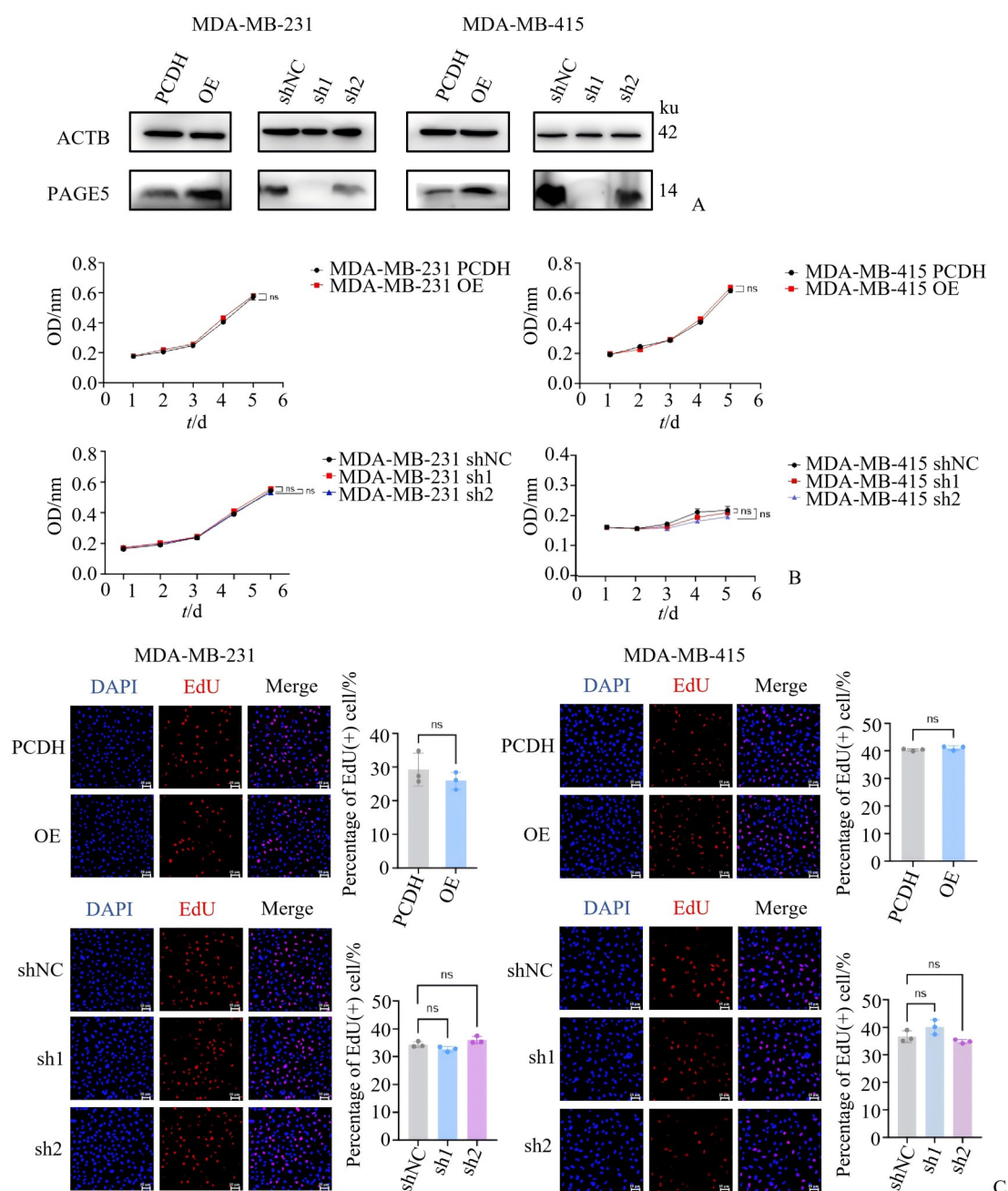
## 2.3 PAGE5显著影响乳腺癌细胞迁移侵袭能力

Transwell 迁移实验(图3A-B)、Transwell 侵袭实验(图3C-D)以及划痕实验(图3E-H)证实,

PAGE5过表达明显增强乳腺癌细胞的迁移与侵袭能力( $t=16.830$ ,  $P<0.0001$ ),而敲低PAGE5能显著降低乳腺癌细胞的迁移与侵袭能力( $t=8.923$ ,  $P=0.0009$ )。以上实验结果证明,PAGE5能促进乳腺癌细胞的迁移与侵袭能力,并在乳腺癌转移进程中发挥重要作用。

## 2.4 PAGE5过表达促进小鼠乳腺癌肝转移

对NOD-SCID小鼠进行脾脏注射建立了乳腺癌肝转移模型(图4A)。结果显示,与PCDH相比,



A: Western blot analysis of knockdown and overexpression efficiency in MDA-MB-231 and MDA-MB-415 cells. B: CCK-8 assay for cell proliferation after knockdown and overexpression of *PAGE5* in MDA-MB-231 and MDA-MB-415 cells.  $n=3$ . C: EdU assay for cell proliferation after knockdown and overexpression of *PAGE5* in MDA-MB-231 and MDA-MB-415 cells.  $n=3$ . Scale bar=50  $\mu\text{m}$ .

图2 *PAGE5*对乳腺癌细胞增殖能力的影响

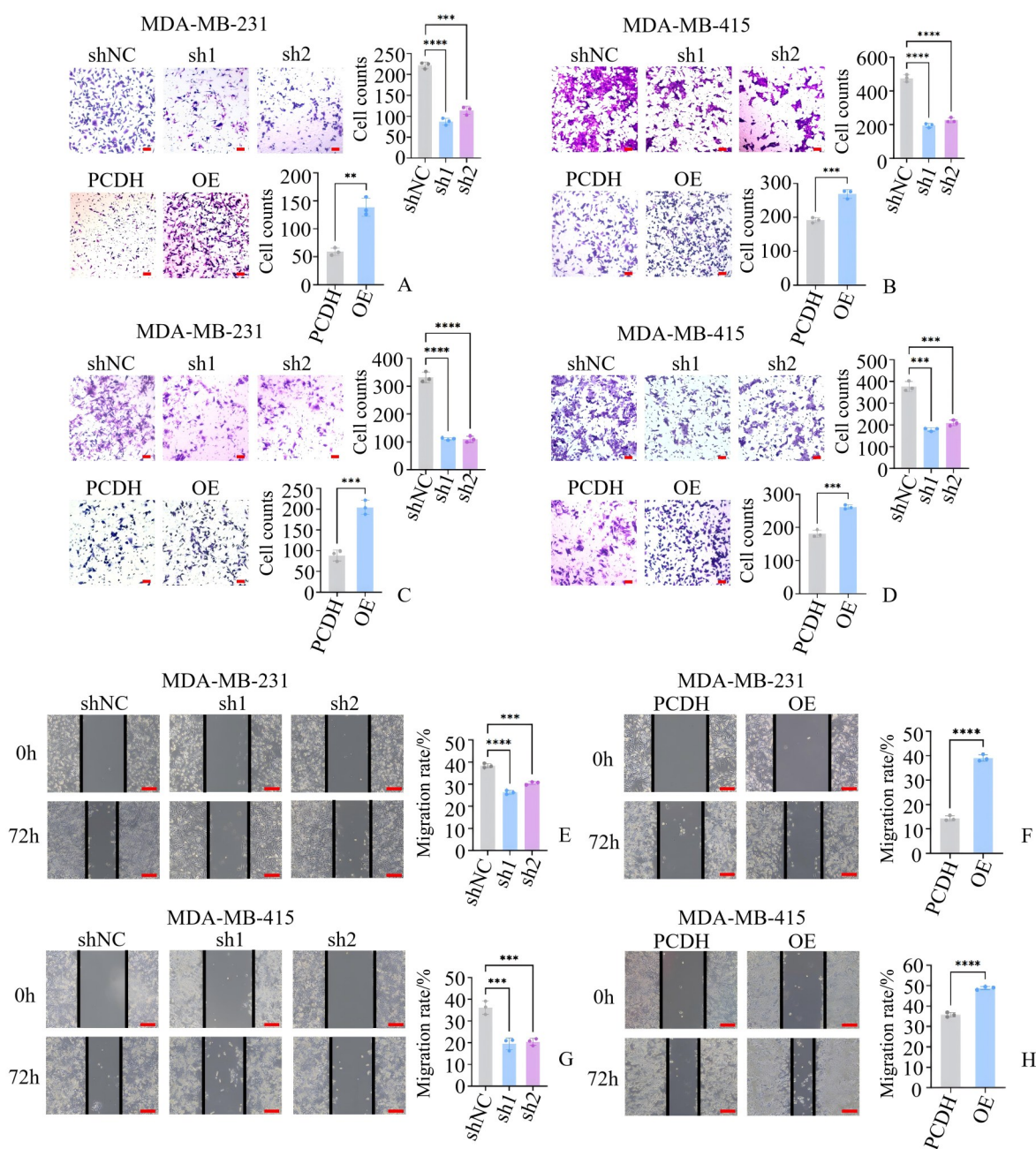
Fig. 2 Impact of *PAGE5* on breast cancer cell proliferation

OE小鼠肝脏内转移灶的数量明显增多;相反,sg小鼠肝脏转移灶的数量显著减少(图4B;  $F=22.585$ ,  $P<0.0001$ )。动物实验证实*PAGE5*在体内同样具有促进乳腺癌在肝内定植及转移灶形成的作用。

## 2.5 *PAGE5*可激活PI3K/AKT信号通路

使用PCDH细胞及OE细胞进行转录组测序

后,对差异表达的基因进行KEGG通路富集分析与GSEA分析,结果显示PI3K-AKT信号通路显著富集(图5A-B)。蛋白质表达水平分析证实,过表达*PAGE5*可显著上调磷酸化PI3K(p-PI3K)和磷酸化AKT(p-AKT)的表达水平,而敲低*PAGE5*则使p-PI3K和p-AKT表达下调(图5C),说明*PAGE5*能够



A-B: Assessment of cell migration via Transwell migration assay after knockdown or overexpression of *PAGE5* in MDA-MB-231 and MDA-MB-415 cells. Scale bar=100  $\mu$ m. C-D: Assessment of cell invasion via Transwell invasion assay after knockdown or overexpression of *PAGE5* in MDA-MB-231 and MDA-MB-415 cells. Scale bar=100  $\mu$ m. E-F: Evaluation of cell migration and invasion by wound healing assay in MDA-MB-231 cells following knockdown(E) or overexpression(F) of *PAGE5*. Scale bar=200  $\mu$ m. G-H: Evaluation of cell migration and invasion by wound healing assay in MDA-MB-415 cells following knockdown(G) or overexpression(H) of *PAGE5*. Scale bar=200  $\mu$ m. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .  $n=3$ .

图3 *PAGE5*对乳腺癌细胞迁移及侵袭能力的影响

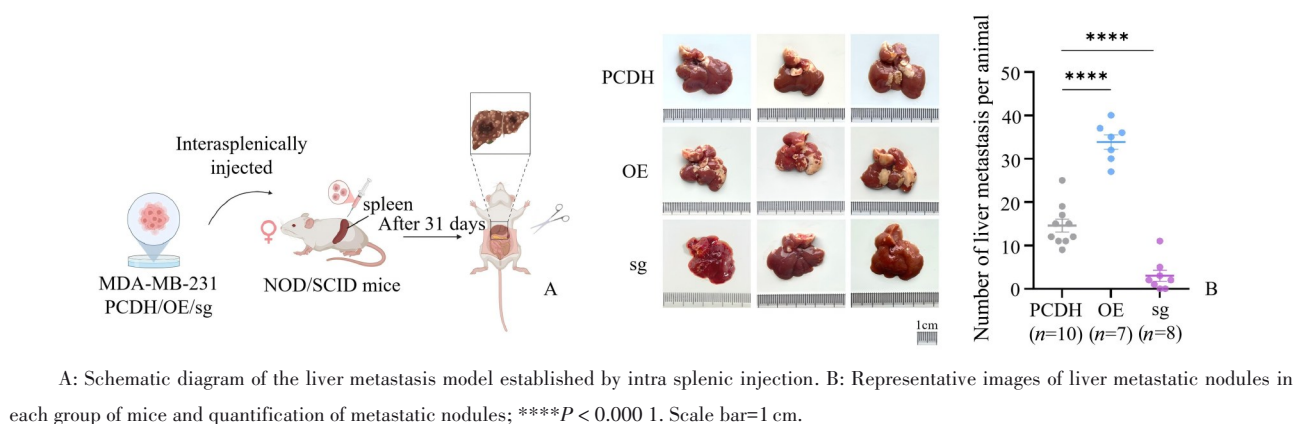
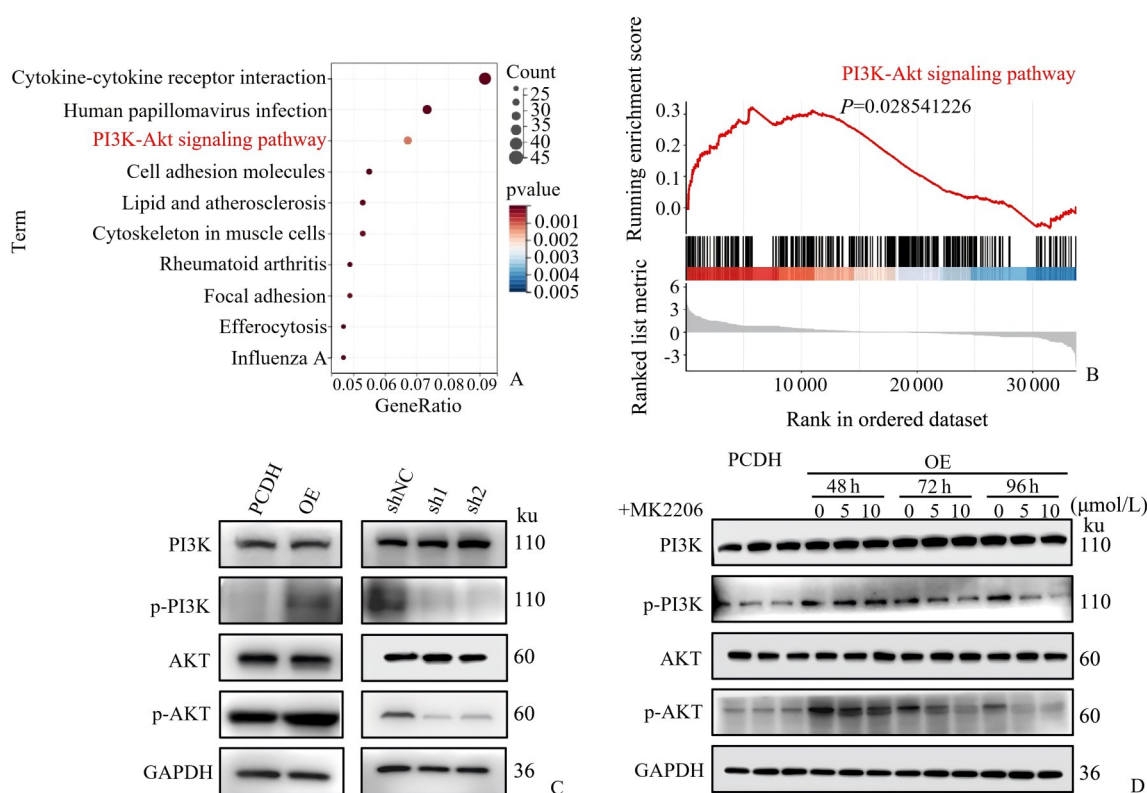
Fig. 3 Impact of *PAGE5* on breast cancer cell migration and invasion abilities

促进PI3K、AKT磷酸化,从而激活PI3K/AKT通路。使用AKT特异性抑制剂MK2206处理MDA-MB-231细胞后发现,随着MK2206处理时间的延长和浓度的增加,p-PI3K、p-AKT的表达水平呈时间与

浓度依赖性下降(图5D)。

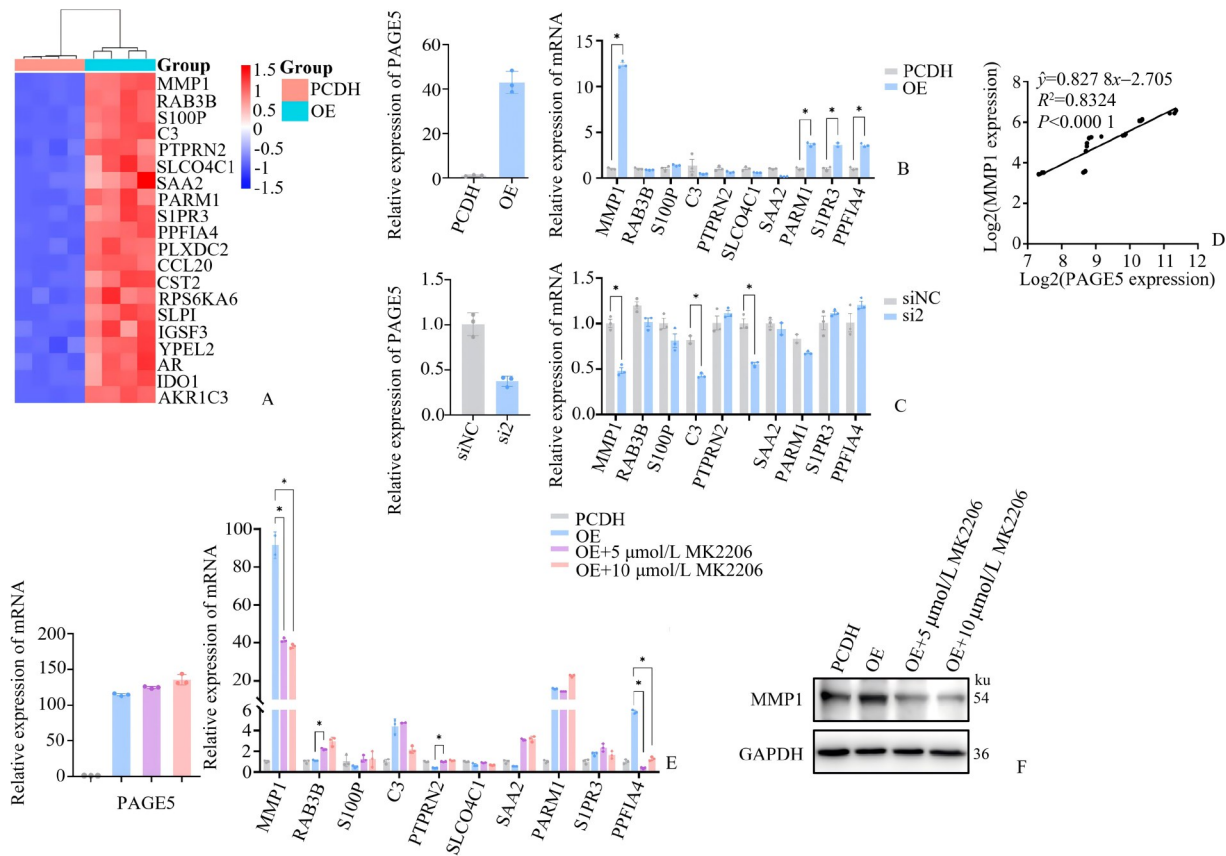
## 2.6 *PAGE5*通过激活PI3K/AKT信号通路上调MMP1

对转录组测序数据的进一步分析,筛选出

图4 小鼠乳腺癌肝转移模型评估 *PAGE5* 对转移的影响Fig. 4 Evaluation of *PAGE5* on metastasis using a mouse model of breast cancer liver metastasis图5 *PAGE5* 激活 PI3K/AKT 通路Fig. 5 *PAGE5* Activates the PI3K/AKT pathway

*PAGE5*可能调控的下游分子(图6A),对其中10个表达差异最显著的候选基因进行qPCR验证。结果显示,在*PAGE5*过表达或敲低的细胞中,仅有*MMP1*的表达水平与*PAGE5*的变化趋势一致(图6B-C),且具有显著相关性(图6D)。在*PAGE5*过表达MDA-MB-231细胞系中分别采用不同浓度的

MK2206(AKT抑制剂)处理细胞48h,随后提取RNA及蛋白检测*MMP1*的变化情况。结果显示,随着MK2206浓度升高,*MMP1*的表达呈逐渐下降趋势(图6E-F)。该结果进一步证实*MMP1*位于*PAGE5*的下游,并且其表达受到PI3K-AKT信号通路的调控。



A: Heatmap showing the top 20 genes whose expression changes are significantly positively correlated with *PAGE5* expression. B-C: qPCR validation of the correlation between *PAGE5* expression and the expression of the top 10 candidate genes.  $n=3$ . D: Correlation between *PAGE5* expression and *MMP1* expression.  $n=21$ . E: qPCR results showing the expression levels of *PAGE5* and the top 10 candidate genes after treatment with MK2206.  $n=3$ . \* $P < 0.05$ . F: Western blot showing the changes in *MMP1* expression in *PAGE5*-overexpressing MDA-MB-231 cells following MK2206 treatment at the indicated concentrations and time points.

图6 *MMP1* 为 *PAGE5* 的下游靶基因

Fig. 6 *MMP1* is a downstream target gene of *PAGE5*

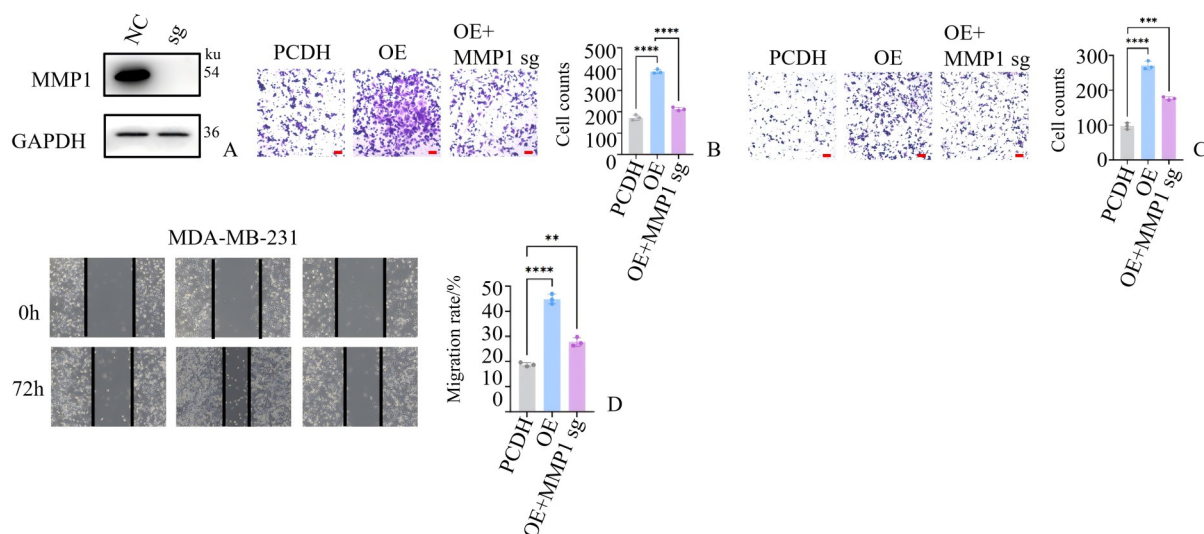
## 2.7 *MMP1* 敲除可抑制 *PAGE5* 促进乳腺癌细胞迁移和侵袭的能力

在 *PAGE5* 过表达的 MDA-MB-231 细胞系中敲除 *MMP1*, 通过嘌呤霉素筛选获得稳定转染细胞系后, 利用 Western blot 验证 *MMP1* 的敲除效率 (图 7A)。Transwell 迁移侵袭实验及细胞划痕实验证实, 与 *PAGE5* 单独过表达组相比, *MMP1* 缺失后乳腺癌细胞迁移、侵袭能力显著下降 ( $P < 0.05$ ), 几乎恢复至对照组细胞水平 (图 7B-D)。上述实验结果表明, *MMP1* 缺失可有效抑制 *PAGE5* 过表达所介导的促迁移、促侵袭效应, 提示 *MMP1* 是 *PAGE5* 介导乳腺癌细胞迁移、侵袭所需的下游效应分子。

## 3 讨论

肿瘤转移是恶性肿瘤最具破坏性的生物学特征, 也是造成患者死亡的主要原因<sup>[17]</sup>。肿瘤细胞首先离开原发部位, 通过降解细胞外基质和基底膜获得侵袭能力; 随后侵入血管或淋巴管, 在循环系统中存活并抵抗失巢凋亡和免疫清除; 最终在远处器官的微血管处滞留, 并在适宜的组织微环境中适应、定植、形成转移灶<sup>[18]</sup>。

*PAGE5* 在乳腺癌肝转移中的研究鲜见报道。本研究首先通过生物信息学分析与临床组织样本验证, 发现 *PAGE5* 在乳腺癌肝转移组织中表达上调, 且其表达水平在原发灶与肝转移灶中呈现递增趋势, 这提示 *PAGE5* 很可能与乳腺癌的转移密切



A: Western blot showing the *MMP1* protein knockout efficiency in *PAGE5*-overexpressing MDA-MB-231 cells. B: Transwell migration assay in *PAGE5*-overexpressing MDA-MB-231 cells in combination with/without *MMP1* knockout. Scale bar=100  $\mu$ m. C: Transwell invasion assay in *PAGE5*-overexpressing MDA-MB-231 cells in combination with/without *MMP1* knockout. Scale bar=100  $\mu$ m. D: Wound healing assay in *PAGE5*-overexpressing MDA-MB-231 cells in combination with/without *MMP1* knockout. Scale bar=200  $\mu$ m. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .  $n=3$ .

图7 *MMP1* 敲除可抑制 *PAGE5* 过表达乳腺癌细胞系的迁移、侵袭能力

Fig. 7 *MMP1* knockout can inhibit migration and invasion ability of *PAGE5* overexpression breast cancer cells

相关。进一步通过体外实验证明,*PAGE5*过表达并不影响乳腺癌细胞的增殖,但能增强乳腺癌细胞迁移与侵袭能力,动物体内实验也进一步证实*PAGE5*过表达可促进乳腺癌细胞在肝内定植和转移灶的形成与发展。

PI3K/AKT通路是调控细胞存活、代谢和运动的核心枢纽,其在乳腺癌中的异常激活与不良预后密切相关<sup>[19]</sup>。转录组测序及KEGG通路富集分析显示,PI3K-AKT信号通路可能在*PAGE5*促进乳腺癌肝转移过程中起重要作用,进一步实验证实,*PAGE5*过表达可显著上调p-PI3K、p-AKT的水平,而敲低*PAGE5*则可下调p-PI3K、p-AKT的水平,说明*PAGE5*是PI3K/AKT通路上游的一个重要调控因子。为进一步探索PI3K/AKT通路下游的效应分子,本研究通过对测序数据的筛选和qPCR验证,发现*MMP1*是该信号通路下游的关键效应分子。

已有大量研究证实,*MMP1*能够特异性降解I型、II型和III型胶原,而这些胶原正是ECM和基底膜的主要结构成分<sup>[20]</sup>,*MMP1*是肿瘤细胞突破基底膜和组织屏障、实现远处定植的重要执行者。然而,*MMP1*促进肿瘤细胞的功能不仅依赖于其对ECM物理屏障的直接降解作用,还涉及更为复杂的信号调控网络。ECM中胶原纤维被*MMP1*切割

后产生的可溶性片段或新生表位,可作为趋化信号分子,通过激活整合素(integrin)或某些受体酪氨酸激酶,促进肿瘤细胞的定向运动与侵袭伪足形成<sup>[21]</sup>,ECM的降解会释放其中储存的多种促侵袭生长因子,如:转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor-beta, TGF- $\beta$ )、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)等,间接重塑肿瘤细胞与微环境的相互作用,进一步驱动恶性表型<sup>[22]</sup>。本研究通过实验进一步证实*MMP1*位于*PAGE5*的下游,并且*MMP1*缺失可有效抑制*PAGE5*过表达所介导的促进乳腺癌细胞迁移、侵袭的能力。结合已有报道,我们推测*PAGE5*可能是通过调控*MMP1*破坏ECM结构完整性并释放隐匿的促迁移信号,从而赋予乳腺癌细胞更强的运动能力和组织穿透力。

综上所述,本研究通过体内、体外实验初步证明,*PAGE5*是乳腺癌肝转移过程中的重要调控基因,*PAGE5*可通过调控PI3K/AKT信号通路上调*MMP1*的表达,从而促进乳腺癌细胞的迁移、侵袭能力,促进乳腺癌肝转移的发生、发展。*PAGE5*的表达水平可能作为一个新的生物标志物,用于评估乳腺癌患者的肝转移风险。此外,本研究所揭示的“*PAGE5*-PI3K/AKT-*MMP1*”轴为开发靶向治疗提供了新的思路。针对*PAGE5*本身或其下游关键分

子(如 *MMP1*)的抑制剂,为探索乳腺癌转移治疗策略提供潜在理论依据,为改善乳腺癌肝转移患者预后提供新的治疗思路。

本研究也存在一定的局限性。本研究主要基

于特定细胞系, *PAGE5* 在不同分子亚型乳腺癌中的普适性功能有待在更多细胞模型中进一步验证。此外, *PAGE5* 调控 PI3K/AKT 通路以及 *MMP1* 作为下游因子与通路的具体分子机制还需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Giaquinto AN, Sung H, Newman LA, et al. Breast cancer statistics 2024[J]. CA, 2024, 74(6): 477-495.
- [2] 余煜, 姚燕丹. 腔镜在乳腺癌外科治疗应用的研究进展[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2024, 45(3): 361-369.  
Yu Y, Yao YD. Research progress on the application of endoscopy in the surgical treatment of breast cancer[J]. J Sun Yat-sen Univ (Med Sci), 2024, 45(3): 361-369.
- [3] Valastyan S, Weinberg Robert a. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms [J]. Cell, 2011, 147 (2): 275-292.
- [4] Pentheroudakis G, Fountzilias G, Bafaloukos D, et al. Metastatic breast cancer with liver metastases: a registry analysis of clinicopathologic, management and outcome characteristics of 500 women [J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 97(3): 237-244.
- [5] Tsilimigras DI, Brodt P, Clavien PA, et al. Liver metastases [J]. Nat Rev Dis Prim, 2021, 7(1): 27.
- [6] Vaziri C, Forker K, Zhang X, et al. Pathological modulation of genome maintenance by cancer/testes antigens (CTAs) [J]. DNA Repair, 2025, 147: 103818.
- [7] Scanlan MJ, Gordon CM, Williamson B, et al. Identification of cancer/testis genes by database mining and mRNA expression analysis [J]. Int J Cancer, 2002, 98(4): 485-492.
- [8] Fan C, Qu H, Wang X, et al. Cancer/testis antigens: from serology to mRNA cancer vaccine [J]. Semin Cancer Biol, 2021, 76: 218-231.
- [9] Abou Kors T, Meier M, Mühlenbruch L, et al. Multi-omics analysis of overexpressed tumor-associated proteins: gene expression, immunopeptide presentation, and antibody response in oropharyngeal squamous cell carcinoma, with a focus on cancer-testis antigens [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1408173.
- [10] Amancio C, Carmen BA, Oliver R, et al. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(3): 187-198.
- [11] 周家田, 尚观胜, 张聪, 等. RSRC1 通过靶向调控 PTEN/PI3K/AKT 通路抑制食管鳞状细胞癌的增殖和转移 [J]. 新医学, 2023, 54(10): 749-753.  
Zhou JT, Shang GS, Zhang C, et al. RSRC1 inhibits the proliferation and metastasis of ESCC by targeting PTEN/PI3K/AKT pathway [J]. J New Med, 2023, 54(10): 749-753.
- [12] 凌晓辉, 陈佳鸿, 陈志云, 等. NRCAM-PI3K-AKT 信号通路影响 miR-505 对前列腺癌细胞的增殖抑制作用 [J]. 中华腔镜泌尿外科杂志(电子版), 2020, 14(2): 145-148.
- [13] Ling XH, Chen JH, Chen ZY, et al. NRCAM-PI3K-AKT pathway is involved in the miR-505 induced proliferative suppression of prostate cancer cells [J]. Chin J Endourol (Elect Ed), 2020, 14(2): 145-148.
- [14] 陈凤菊, 鲜佳, 南立静, 等. 大黄素干预 PI3K/Akt/mTOR 信号通路影响肝癌前病变大鼠铁死亡的作用机制 [J]. 联勤军事医学, 2024, 38(5): 361-366; +375.  
Chen FJ, Xian J, Nan LJ, et al. Mechanism of emodin intervening PI3K/Akt/mTOR signaling pathway affecting ferroptosis in rats with pre-hepatocellular carcinoma lesions [J]. Mil Med Jnt Log, 2024, 38(5): 361-366; +375.
- [15] Pascual J, Turner NC. Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer [J]. Ann Oncol, 2019, 30(7): 1051-1060.
- [16] Overall CM, Kleinfeld O. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(3): 227-239.
- [17] Shoari A, Coban MA, Radisky ES. Therapeutic potential of inhibitors of gelatinases MMP-2 and MMP-9 for the treatment of breast cancer [J]. FEBS J, 2026, 293(13): 4014-4042.
- [18] Park M, Kim D, Ko S, et al. Breast cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(12): 6806.
- [19] Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework [J]. Cell, 2006, 127(4): 679-695.
- [20] Kim MY. Breast Cancer Metastasis [M]//Noh DY, Han W, Toi M. Translational research in breast cancer. Singapore: Springer Singapore, 2021: 183-204.
- [21] Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors [J]. Arthritis Res, 2002, 4(3): 157-164.
- [22] Niland S, Riscanevo AX, Eble JA. Matrix metalloproteinases shape the tumor microenvironment in cancer progression [J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1): 146.
- [23] Kim DJ. Molecular and immune mechanisms governing cancer metastasis, including dormancy, microenvironmental niches, and tumor-specific programs [J]. Int J Mol Sci, 2026, 27 (2): 875.

(编辑 余菁)