



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.10.015
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.10.015
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(10):1455-1460.

· 基础研究 ·

基质硬度对 PKN3 表达及肝细胞癌侵袭转移的影响

欧阳锡武, 陶一明, 王志明

(中南大学湘雅医院 肝脏外科, 湖南 长沙 410008)

摘要

目的: 探讨蛋白激酶 C 相关激酶 N3 (PKN3) 表达与肝细胞癌 (HCC) 细胞侵袭转移的关系及机制。
方法: 检测 72 例出血坏死表型 HCC (HN-HCC) 与 32 例无出血坏死表型 HCC (NHN-HCC) 组织标本中胶原纤维含量与 PKN3 的表达; 将肝癌 HCCLM3 细胞在不同硬度的聚丙烯酰胺水凝胶培养后, 检测 HCCLM3 细胞的运动侵袭能力、PKN3 基因与蛋白的表达, 以及 RhoC 活性。通过 PKN3 干扰以及 PKN3 干扰同时加 RhoC 过表达, 观察 HCCLM3 细胞运动侵袭能力以及 FAK、ROCK2、E-cadherin、Fibronectin 蛋白表达的变化。
结果: 与 NHN-HCC 组织比较, HN-HCC 组织胶原纤维含量与 PKN3 蛋白表达明显增加 (均 $P < 0.05$); 与软基质中培养的 HCCLM3 细胞比较, 在硬基质中培养的 HCCLM3 细胞 PKN3 的基因与蛋白表达明显增加、侵袭运动能力明显增强、RhoC 活性明显升高 (均 $P < 0.05$), 后者活性随 PKN3 表达的抑制而抑制。与对照组细胞比较, 干扰 PKN3 表达后, HCCLM3 细胞运动侵袭能力明显降低, FAK、ROCK2、Fibronectin 蛋白表达明显下调, E-cadherin 蛋白表达明显下调 (均 $P < 0.05$), 而 PKN3 干扰同时增加 RhoC 表达, HCCLM3 细胞以上变化不明显 (均 $P > 0.05$)。
结论: 基质硬度增加能上调 PKN3-ROCK2 信号通路活性, 从而促进 HCC 侵袭转移, 该机制可能是 HN-HCC 侵袭转移能力较高的重要原因。

关键词

癌, 肝细胞; 出血; 坏死; 蛋白激酶类; 肿瘤侵袭
中图分类号: R735.7

Influence of matrix stiffness on PKN3 expression and invasion/metastasis in hepatocellular carcinoma

OUYANG Xiwu, TAO Yiming, WANG Zhiming

(Department of Liver Surgery, Xiangya Hospital, Central South University; Changsha 410008, China)

Abstract

Objective: To investigate the relationship between expression of PKC-related kinase N3 (PKN3) and the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC) cells and the mechanism.
Methods: The collagen fiber content and PKN3 expression in the specimens of 72 HCC tissues with hemorrhagic/necrotic phenotype (HN-HCC) and 32 HCC tissues without hemorrhagic/necrotic phenotype (NHN-HCC) were determined. HCC HCCLM3 cells were cultured in polyacrylamide hydrophilic gels of different stiffness, and then, the migration and invasion abilities and the PKN3 gene and protein expressions as

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (81372630, 81372631); 湖南自然科学基金资助项目 (12JJ3118); 湖南省科学技术厅科技计划资助项目 (2011SK3228)。

收稿日期: 2016-07-15; **修订日期:** 2016-09-10。

作者简介: 欧阳锡武, 中南大学湘雅医院硕士研究生, 主要从事肝癌临床与基础方面的研究。

通信作者: 王志明, Email: wzmxcysu@hotmail.com

well as RhoC activity were measured. After PKN3 interference or PKN3 interference with concomitant RhoC overexpression, the changes in migration and invasion abilities and protein expressions of ROCK2, E-cadherin, Fibronectin in HCCLM3 cells were analyzed.

Results: Compared with NHN-HCC tissue, collagen fiber content and PKN3 protein expression were significantly increased in HN-HCC (both $P < 0.05$); in HCCLM3 cells cultured in firm matrix compared with HCCLM3 cells cultured in soft matrix, both gene and protein expressions of PKN3, and the migration and invasion abilities as well as the RhoC activity were significantly increased (all $P < 0.05$), while the RhoC activity was suppressed with inhibition of PKN3 expression. Compared with control HCCLM3 cells, the migration and invasion abilities and the protein expressions of FAK, ROCK2 and Fibronectin were significantly decreased, and E-cadherin protein expression was significantly increased in HCCLM3 cells after PKN3 interference (all $P < 0.05$), while the above changes were not obvious in HCCLM3 cells after PKN3 interference with concomitant RhoC overexpression (all $P > 0.05$).

Conclusion: Increased matrix stiffness can up-regulate the activity of PKN3-ROCK2 signaling pathway, and thereby promote the invasion and metastasis of HCC, which may be an important mechanism for the high invasion and metastasis ability of HN-HCC.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; Hemorrhage; Necrosis; Protein Kinases; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.7

恶性实体瘤发生瘤内出血坏死和肿瘤细胞的 分化程度低和增殖活性高密切相关, 通常提示肿瘤微环境失衡和肿瘤进展^[1]。笔者肝细胞癌 (HCC) 的研究^[3]中发现并证实, 出血坏死表型 HCC (HN-HCC) 的微血管形态结构紊乱^[2], 而且频发卫星结节、包膜或血管侵犯, 临床预后差。同时与其相对应的, 临床上尚存在无出血坏死表型 HCC (NHN-HCC), 少见肝内转移, 手术切除后往往能获得长期生存。笔者运用 Masson 染色观察到, HN-HCC 具有较硬的细胞外基质硬度属性, 而 NHN-HCC 表现较软细胞基质硬度特征。一些实验证据表明, 细胞外基质蛋白大量沉积, 细胞外基质硬度 (matrix stiffness) 发生改变, 导致力学-弹性物理信号的变化, 参与肿瘤的发生和侵袭转移^[4]。蛋白激酶 C 相关激酶 N3 (PKC-related kinase N3, PKN3) 作为 Ras 同源 C (Ras homologous C, RhoC) 的效应器, 通过与 RhoC 的相互作用在肿瘤细胞生长、细胞迁移及肿瘤血管生成中发挥作用^[5-6]。但细胞外基质硬度调控 PKN3 表达促进 HCC 侵袭转移机理目前尚不十分清楚。本实验通过免疫组化方法检测了 PKN3 表达情况, 应用聚丙烯酰胺水凝胶不同基底硬度细胞培养平台, 处理高侵袭潜能肝癌细胞株 HCCLM3 后, 观察了 PKN3 表达水平及介导的下游信号通路分子事件, 旨从肿瘤微环境物理力学角度诠释 HCC 侵袭转移作用机制提供新理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

HCC 组织样本共 104 例, 其中 HN-HCC 72 例, NHN-HCC 32 例, 为 2009—2010 年间于中南大学湘雅医院肝脏外科行手术切除的 HCC 患者, 其临床病理特征参照笔者^[2]以往方法。

1.2 实验方法

1.2.1 Masson 三色染色 Masson 染色试剂盒购自美国 Sigma 公司, 染色操作步骤按试剂盒说明书。结果判读参照文献^[7]报道: 胶原纤维显示蓝色, 细胞核显示灰色。

1.2.2 HCCLM3 细胞培养 人高侵袭潜能 HCC 细胞系 HCCLM3 购自上海复旦大学中山医院肝癌研究所。HCCLM3 细胞培养条件参照笔者以往方法^[8]。

1.2.3 聚丙烯酰胺水凝胶体外培养系统^[9] 不同硬度的聚丙烯酰胺凝胶溶液配方 (% 丙烯酰胺 : % N, N' - 亚甲基双丙烯酰胺) 对应凝胶硬度: 5 kPa (5.5 : 0.15)、12 kPa (7.5 : 0.15)、16 kPa (8 : 0.264)。取制备 SDS-PAGE 胶装置, 将溶液混匀后注入玻璃板之间的空隙; 移入 37 °C 细胞培养箱中, 静置 3 h; 在无菌超净工作台中, 将凝胶分割成 1.5 cm × 1.5 cm 大小, 放于六孔板培养皿中; 在凝胶表面滴加 50 μL I 型胶原包被 (0.1 mg/mL), 常温静置 1.5 h 后备用。

1.2.4 荧光定量 PCR 将高侵袭转移潜能的肝癌细

胞 HCCLM3 接种不同硬度水凝胶基底硬度细胞培养系统上培养 48 h。提取细胞总 RNA 合成 cDNA, 荧光定量 PCR 试剂盒购自大连宝生物公司, PKN3 上游引物: 5'-GGC TGT GCT AAA GGT GGA CAA-3', 下游引物: 5'-TCC AGT GGG ATG ACA AAG GTC-3'; GAPDH 上游引物: 5'-TGT CTG GCA CAT TGG ACA TT-3', 下游引物: 5' -GCA CCG TCA AGG CTG AG AAC-3'。PCR 扩增条件参照文献^[10]报道。

1.2.5 RhoC 过表达质粒和慢病毒载体 pLKO.1-PKN3 干扰质粒构建 RhoC 过表达质粒由本课题组保存^[10]。根据 PKN3 基因序列, 合成其基因, 其干扰序列重组病毒包装、收集和病毒浓缩液滴度检测具体方法参照文献^[11]。

1.2.6 GTPase Pull-Down 实验 收集 5 kPa 和 16 kPa 培养条件下的 HCCLM3^{Si-对照} 和 HCCLM3^{Si-PKN3} 各组细胞。RhoC Activation Assay Kit 购自 Cell Biolabs 公司。按笔者^[10]以往方法检测小 GTPase RhoC 的活性状态。

1.2.7 肌动蛋白微丝荧光染色检测细胞骨架 细胞骨架 (肌动蛋白微丝) 荧光染色试剂盒购自上海杰美公司。操作步骤方法参照笔者^[10]以往方法。抗 F-Actin 单克隆抗体, 工作浓度 1:50。阴性对照组为不加抗 F-Actin 单克隆抗体, 加 PBST 缓冲液, 其他步骤同上。

1.2.8 侵袭小室实验检测 HCCLM3 细胞侵袭运动 采用 Transwell 法, 侵袭小室购自法国 Millipore

公司。具体方法参照文献^[10]。

1.2.9 Western blot 实验操作步骤 参照笔者^[8]以往方法。PKN3 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司; FAK、ROCK2 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; RhoC、E-cadherin 和 Fibronectin 抗体购自英国 Abcam 公司, 工作浓度为 1:500~1:1 000。Image J 软件计算条带的灰度值和内参 β -actin 单克隆抗体 (美国 Sigma-Aldrich 公司) 灰度值的作为蛋白表达量。

1.3 统计学处理

所有计数资料数据均以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的方式表示, 用组间均数比较采用双尾非配对 *t* 检验。对多组细胞学实验数据采用方差分析。采用 SPSS 18.0 统计软件分析结果。P<0.05 为差异有统计学意义。用 GraphPad Prism Version 6.02 软件分析制图。

2 结果

2.1 HN-HCC 肿瘤基质硬度特征

HCC 组织细胞外基质软硬程度与炎症微环境、肿瘤细胞分化程度及肿瘤细胞转移能力密切相关^[9, 12]。利用 Masson 三色染色方法检测 HN-HCC 和 NHN-HCC 肿瘤区域的纤维胶原染色情况 (图 1)。和 NHN-HCC 比较, 纤维胶原在 HN-HCC 肿瘤中数量 [(46.27 \pm 9.35) / 视野] 高于 NHN-HCC [(13.6 \pm 5.63) / 视野], 差异有统计学意义 (P<0.05)。

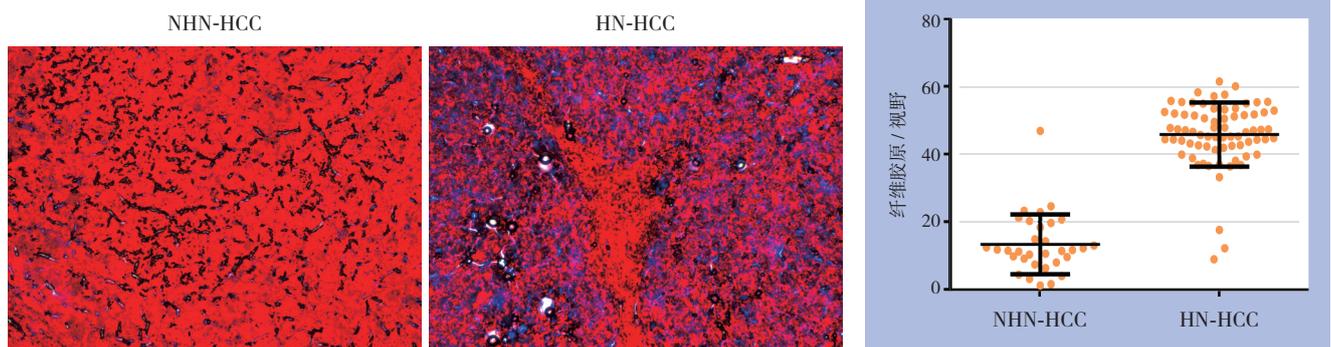


图 1 HN-HCC 与 NHN-HCC 组织胶原纤维含量检测

Figure 1 Determination of the collagen fiber contents in HN-HCC and NHN-HCC tissues

2.2 PKN3 在 HN-HCC 中表达水平高于 NHN-HCC

免疫组化的方法分析发现 PKN3 蛋白阳性表达定位细胞浆 (图 2A)。和 NHN-HCC 的肿瘤邻近出血坏死区、肿瘤中心到肿瘤边缘中间区、肿瘤边缘区和邻近非癌肝组织比较, PKN3 蛋白在 HN-HCC 组的 4 个区域均表达水平上调。HN-HCC 组的

PKN3 免疫组化评分 (IS) 中位数为高于 NHN-HCC 组 (3.23 vs. 2.14, P<0.05) (图 2B)。

2.3 细胞基质硬度介导 PKN3 表达上调

HCCLM3 细胞接种不同基质硬度水凝胶 (5、12、16 kPa), 玻璃培养皿培养条件为对照组。随着基质硬度的增加, 荧光定量 PCR (图 3A) 和

Western blot (图3B) 检测发现, HCCLM3细胞中的PKN3 mRNA和蛋白的表达水平增高, 部分差异

有统计学意义 ($P < 0.05$)。

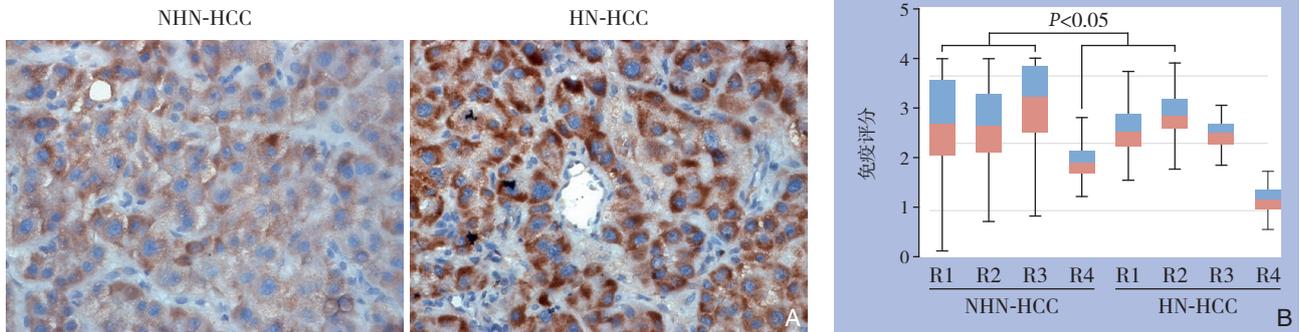


图 2 PKN3 免疫组化检测 (×200) A: 切片染色结果; B: PKN3 蛋白在 4 个不同区域的免疫评分 R1: 邻近出血坏死区; R2: 出血坏死区和肿瘤边缘中间区; R3: 肿瘤边缘区; R4: 邻近非癌肝组织

Figure 2 Immunochemical staining for PKN3 (×200) A: Immunochemical staining of the sections; B: Immunochemical staining scores at four different regions of tumor specimen R1: Surrounding region of the hemorrhagic/necrotic area; R2: Intermediate zone between the hemorrhagic/necrotic and peritumoral region; R3: Peritumoral region; R4: Adjacent non-tumorous liver tissue

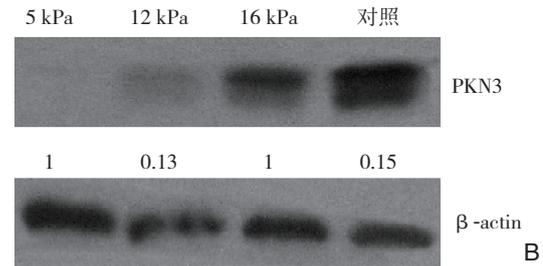
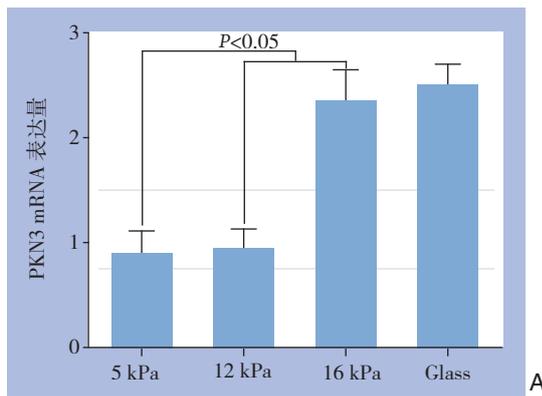


图 3 基质硬度处理对 HCCLM3 细胞 PKN3 表达的影响

A: 荧光定量 PCR 检测结果; B: Western blot 检测结果

Figure 3 Influence of matrix stiffness on PKN3 expression using real time PCR A: Results of RT-PCR; B: Results of Western blot analysis

2.4 PKN3 表达上调活化 HCC 细胞 RhoC 活性

GTPase Pull-Down实验分析 (图4), 活化 RhoC蛋白在硬基质 (16 kPa) 组软基质 (5 kPa) 组 HCCLM3 细胞中上调约 2.61 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。但无论基质硬度如何, 干扰 PKN3 表达后, RhoC 活性均被明显抑制。

干扰 PKN3 再回复 RhoC 表达促进了 HCCLM3 细胞侵袭能力 (图 5B)。

2.5 PKN3 表达上调促进 HCC 细胞侵袭运动

在较硬细胞基质 (16 kPa) 培养条件下, 通过 F-actin 荧光染色观察到, 较 HCCLM3^{Si-PKN3} 组, HCCLM3^{Si-PKN3+RhoC} 组细胞 (重组质粒 pcDNA3.1-RhoC 过表达质粒转染稳定表达 PKN3 siRNA 片断的 HCCLM3 细胞) 伪足运动明显增多, 细胞骨架重组明显增强, 与 HCCLM3^{Si-对照} 组细胞骨架重组基本相一致 (图 5A), 回复 RhoC 表达促进了 HCCLM3 细胞迁移运动能力。Transwell 实验检测结果显示,

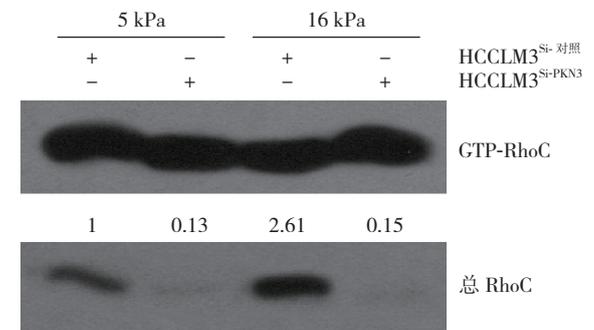


图 4 GTPase Pull-Down 实验检测各实验组 HCCLM3 细胞中 RhoC 活性

Figure 4 GTPase Pull-Down analysis of RhoC activity in matrix stiffness treated HCCLM3 cells

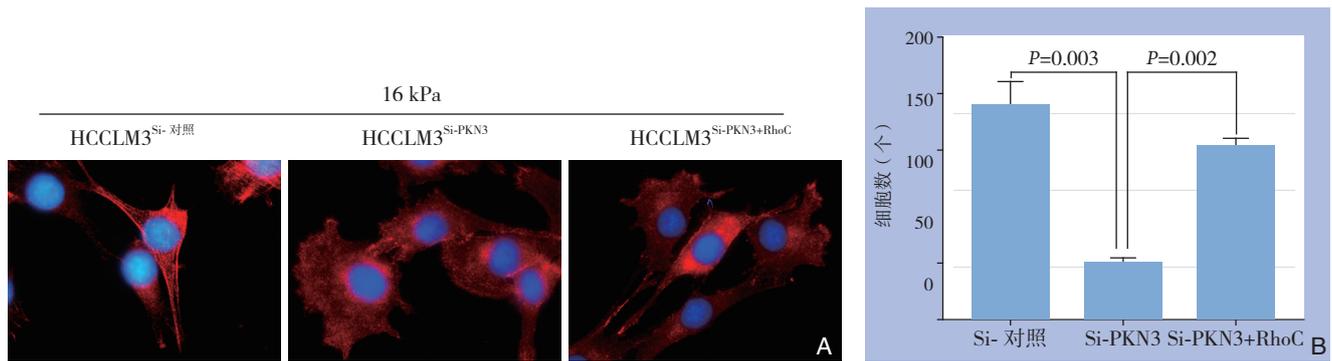


图 5 细胞骨架与细胞侵袭运动检测 A: F-actin 荧光染色; B: 侵袭小室检测

Figure 5 Determination of cell cytoskeleton and cell invasion ability A: F-actin fluorescence staining; B: Transwell migration assay

2.6 PKN3 影响肝癌细胞的 FAK、ROCK2、E-cadherin 和 Fibronectin 蛋白表达

Western blot方法检测HCCLM3^{Si-对照}组、HCCLM3^{Si-PKN3}组、HCCLM3^{Si-PKN3+RhoC}组HCCLM3细胞中蛋白表达水平。结果显示, FAK、ROCK2和Fibronectin蛋白表达在HCCLM3^{Si-PKN3}组中明显下调, E-cadherin蛋白表达上调, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。干扰PKN3再回复RhoC表达促进了FAK、ROCK2和Fibronectin蛋白表达上调(图6)。

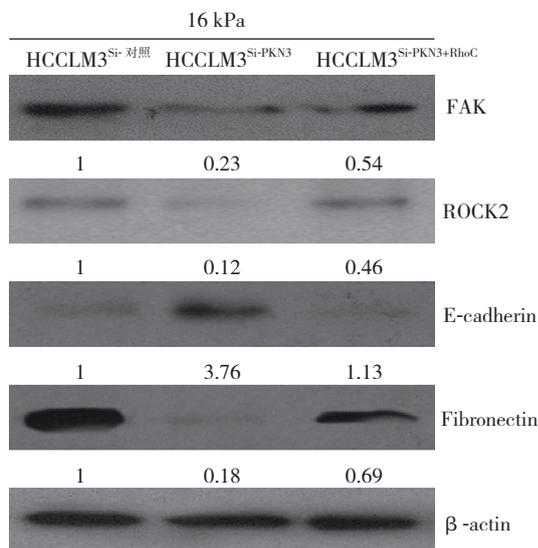


图 6 FAK、ROCK2、E-cadherin 和 Fibronectin 蛋白表达检测

Figure 6 Determination of protein expressions of FAK, ROCK2, E-cadherin and Fibronectin

3 讨论

有或者无出血坏死病理表型是HCC肿瘤微环境和肿瘤异质性的一种重要病理学标志^[3]。但

HCC合并出血坏死现今尚有很多问题并未阐明。从病理层面可以观察到, HN-HCC具有较硬的细胞外基质硬度属性。与此同时, HN-HCC发生出血坏死导致细胞变软, 这似乎是一个矛盾现象。Plodinec等^[13]利用原子力学显微镜(atomic force microscope, AFM)研究肿瘤组织不同阶段和不同空间位置的力学分布图谱异质性, 证实在肿瘤发展过程中的肿瘤基质硬化和细胞软化是可以同时存在的。通常完整的胞外固态基质结构可以抑制肿瘤细胞侵袭转移^[4, 14], NHN-HCC内部细胞外基质硬度较为软且细胞外基质分布较为均匀, 导致细胞间力学保持相对平衡, 这可能是不容易发生侵袭转移的原因之一。而HN-HCC细胞外基质刚性变硬, 一旦发生出血坏死势必会造成HCC肿瘤内局部微环境软化, 细胞外基质(ECM)发生犹如“矿山塌方式”的改变, 导致细胞外基质之间支撑力学平衡破坏, 肿瘤细胞表面和细胞外基质之间的黏附力学改变, 使癌细胞表面力学平衡破坏。ECM重构可能是有利于HN-HCC发生侵袭转移的重要原理。

肿瘤微环境在HCC侵袭转移过程中至关重要^[15]。以往学术界大多关注于肿瘤微环境炎症、缺氧、糖酵解、pH值等生化因素调控HCC侵袭转移^[16]。新近研究^[17]表明, 细胞外基质高硬度和发生机械力学平衡的改变不但调节HCC肿瘤干细胞, 而且参与HCC肿瘤血管生成^[18], 已成为肿瘤微环境中促进侵袭转移一个不容忽视的物理因素^[14, 19-20]。本研究采用免疫组化方法观察到HN-HCC不同区域也存在PKN3蛋白表达上调, 提示HN-HCC的确具有较强侵袭转移潜能。同时PKN3表达水平与HN-HCC基质硬度密切相关, 因而, 笔者认为: 有可能基质硬度力学介导PKN3参与了HCC侵袭转移的过程。为弄清楚PKN3是否在高基质硬度力学调节

下也可出现表达上调。本研究采用荧光定量PCR和Western blot方法检测了不同基底膜的硬度培养下的HCCLM3细胞中PKN3表达情况存在差异。此外发现PKN3小RNA干扰处理高侵袭转移潜能的肝癌细胞HCCLM3后, 细胞骨架改变特征和侵袭运动能力显著下降, 而且RhoC活性水平下调。在稳定表达PKN3 siRNA片断的HCCLM3细胞回复RhoC表达后证实了PKN3和RhoC间存在相互调控作用。同时在蛋白水平上对ROCK2、部粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)和Fibronectin进行了探讨。结果发现, FAK、ROCK2和Fibronectin表达显著性上调^[21]。故推测本实验中由于PKN3的作用抑制降低了FAK的磷酸化水平, 解除了细胞间的黏附力, 使肝癌细胞的侵袭运动力增强。

上述临床标本和体外细胞实验研究结果提示, HN-HCC表现较硬细胞基质力学特征, 高基质硬度上调PKN3具有明显的促进HCC侵袭转移的功能。

参考文献

- [1] Anderson AR, Weaver AM, Cummings PT, et al. Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment[J]. *Cell*, 2006, 127(5):905-915.
- [2] 陶一明, 王志明. 出血坏死型肝细胞癌肿瘤微血管特征研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(7): 985-990.
Tao YM, Wang ZM. Features of intratumoral microvessels in hepatocellular carcinoma with hemorrhagic/necrotic phenotype[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25 (7):985-990.
- [3] 陶一明, 王志明. 出血坏死型肝细胞癌病理特征及预后的前瞻性初步研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(1): 6-11.
Tao YM, Wang ZM. Pathologic features and prognosis of hepatocellular carcinoma with hemorrhagic/necrotic phenotype: a prospective preliminary study[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(1):6-11.
- [4] Chaudhuri O, Koshy ST, Branco da Cunha C, et al. Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium[J]. *Nat Mater*, 2014, 13(10):970-978.
- [5] Unsal-Kacmaz K, Ragunathan S, Rosfjord E, et al. The interaction of PKN3 with RhoC promotes malignant growth[J]. *Mol Oncol*, 2012, 6(3):284-298.
- [6] Mukai H, Muramatsu A, Mashud R, et al. PKN3 is the major regulator of angiogenesis and tumor metastasis in mice[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:18979.doi:10.1038/srep18979
- [7] Zhang Y, Xu N, Xu J, et al. E2F1 is a novel fibrogenic gene that regulates cholestatic liver fibrosis through the Egr-1/SHP/EID1 network[J]. *Hepatology*, 2014, 60(3):919-930.
- [8] Tao Y, Hu K, Tan F, et al. SH3-domain binding protein 1 in the tumor microenvironment promotes hepatocellular carcinoma metastasis through WAVE2 pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14):18356-18370.
- [9] Schrader J, Gordon-Walker TT, Aucott RL, et al. Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Hepatology*, 2011, 53(4):1192-1205.
- [10] Tao YM, Huang JL, Zeng S, et al. BTB/POZ domain-containing protein 7: epithelial-mesenchymal transition promoter and prognostic biomarker of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2013, 57(6):2326-2337.
- [11] Leenders F, Möpert K, Schmiedeknecht A, et al. PKN3 is required for malignant prostate cell growth downstream of activated PI 3-kinase[J]. *EMBO J*, 2004, 23(16):3303-3313.
- [12] Ho DH, Lo RL, Chan LK, et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Cancer*, 2016, 5(4):290-302.
- [13] Plodinec M, Loparic M, Monnier CA, et al. The nanomechanical signature of breast cancer[J]. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7(11):757-765.
- [14] Wei SC, Fattet L, Tsai JH, et al. Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(5):678-688.
- [15] Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(6):430-439.
- [16] Hernandez-Gea V, Toffanin S, Friedman SL, et al. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(3):512-527.
- [17] You Y, Zheng Q, Dong Y, et al. Matrix stiffness-mediated effects on stemness characteristics occurring in HCC cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22):32221-32231.
- [18] Dong Y, Xie X, Wang Z, et al. Increasing matrix stiffness upregulates vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma cells mediated by integrin $\beta 1$ [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 444(3):427-432.
- [19] Seewaldt V. ECM stiffness paves the way for tumor cells[J]. *Nat Med*, 2014, 20(4):332-333.
- [20] Giancotti FG. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation[J]. *Cell*, 2013, 155(4):750-764.
- [21] Kubow KE, Vukmirovic R, Zhe L, et al. Mechanical forces regulate the interactions of fibronectin and collagen I in extracellular matrix[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:8026.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 欧阳锡武, 陶一明, 王志明. 基质硬度对PKN3表达及肝细胞癌侵袭转移的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(10):1455-1460. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.10.015

Cite this article as: Ouyang XW, Tao YM, Wang ZM. Influence of matrix stiffness on PKN3 expression and invasion/metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(10):1455-1460. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.10.015