

# EMP3 抑制肝癌细胞异质性细胞叠套结构的形成

张揚易<sup>1,2</sup>, 王晨曦<sup>2</sup>, 冯鹏飞<sup>2</sup>, 刘辰瑜<sup>1</sup>, 任禾<sup>1</sup>, 杨亚蓝<sup>1</sup>, 黄一诺<sup>1</sup>, 孙强<sup>2</sup>, 黄红艳<sup>1\*</sup>

1 首都医科大学附属北京世纪坛医院 肿瘤内科, 北京 100038

2 军事医学研究院北京生物工程研究所 中国医学科学院细胞死亡机制创新单元, 北京 100071

张揚易, 王晨曦, 冯鹏飞, 刘辰瑜, 任禾, 杨亚蓝, 黄一诺, 孙强, 黄红艳. EMP3 抑制肝癌细胞异质性细胞叠套结构的形成[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2223-2234.

ZHANG Yangyi, WANG Chenxi, FENG Pengfei, LIU Chenyu, REN He, YANG Yalan, HUANG Yinuo, SUN Qiang, HUANG Hongyan. EMP3 inhibits the formation of heterotypic cell-in-cell structures in hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2223-2234.

**摘要:** 异质性细胞叠套(heterotypic cell-in-cell, heCIC)结构是细胞间一种独特的相互作用方式, 其中肿瘤细胞可内化免疫细胞形成 heCIC 结构, 从而提升免疫细胞的杀伤效率。然而, 调节 heCIC 结构形成的机制尚未阐明。本研究聚焦于上皮膜蛋白 3 (epithelial membrane protein 3, EMP3), 一种在肝癌患者组织表达增加并伴随不良预后的 PMP-22/EMP/MP20 蛋白家族成员, 探讨了其在调节自然杀伤细胞-肝癌细胞形成 heCIC 结构中的作用。通过分析课题组前期分选出的具有不同 heCIC 形成能力的单克隆肝癌细胞株, 发现 heCIC 形成能力高的细胞株中 EMP3 表达较低, 而 heCIC 形成能力低的细胞株中 EMP3 表达较高。利用基因编辑技术敲低 EMP3 表达可以促进 heCIC 结构的形成, 而 EMP3 的过度表达则显著抑制了这一过程。通过检测与 heCIC 结构形成相关的分子表达水平发现, EMP3 通过调节肿瘤细胞的黏附能力和细胞骨架来抑制肝癌细胞 heCIC 结构的形成。本研究为靶向 EMP3 促进肝癌细胞 heCIC 结构介导的肿瘤免疫增强提供了研究基础。

**关键词:** 上皮膜蛋白 3; 肝细胞癌; 肿瘤免疫治疗; 异质性细胞叠套结构

资助项目: 国家自然科学基金(82273184, 32100608)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82273184, 32100608).

\*Corresponding author. E-mail: Hhongy1999@126.com

Received: 2024-02-28; Accepted: 2024-04-17

## EMP3 inhibits the formation of heterotypic cell-in-cell structures in hepatocellular carcinoma

ZHANG Yangyi<sup>1,2</sup>, WANG Chenxi<sup>2</sup>, FENG Pengfei<sup>2</sup>, LIU Chenyu<sup>1</sup>, REN He<sup>1</sup>, YANG Yalan<sup>1</sup>, HUANG Yinuo<sup>1</sup>, SUN Qiang<sup>2</sup>, HUANG Hongyan<sup>1\*</sup>

1 Department of Oncology, Beijing Shijitan Hospital of Capital Medical University, Beijing 100038, China

2 Research Unit of Cell Death Mechanism, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

**Abstract:** Heterotypic cell-in-cell (heCIC) structures represent a unique intercellular interaction where tumor cells internalize immune cells to enhance the killing efficiency of immune cells. However, the mechanism of heCIC structure formation remains to be fully elucidated. In this study, we explored the role of epithelial membrane protein 3 (EMP3), a PMP-22/EMP/MP20 protein family member highly expressed in the patients with hepatocellular carcinoma and poor prognosis, in the formation of the heCIC structure formed by natural killer cells and hepatocellular carcinoma cells. The analysis of monoclonal hepatocellular carcinoma cell lines revealed that EMP3 presented low expression in the cells with high capability to form heCIC structure and high expression in those with low capability. Knocking down the expression of EMP3 by gene editing promoted the formation of heCIC structures, while overexpression of EMP3 significantly inhibited this process. Additionally, the expression of factors involved in the heCIC structure formation suggested that EMP3 inhibited the formation of heCIC structures by modulating the adhesion ability and cytoskeleton of tumor cells. The findings lay a foundation for enhancing the heCIC-mediated tumor immunotherapy by targeting EMP3.

**Keywords:** epithelial membrane protein 3; hepatocellular carcinoma; tumor immunotherapy; heterotypic cell-in-cell structure

细胞叠套(cell-in-cell, CIC)结构最早在肿瘤中作为一种独特的细胞间相互作用被发现<sup>[1]</sup>, 根据形成 CIC 结构细胞来源的不同, 分为同种来源的同质性细胞叠套(homotypic cell-in-cell, hoCIC)结构以及不同细胞来源形成的异质性细胞叠套(heterotypic cell-in-cell, heCIC)结构<sup>[2-7]</sup>。HoCIC 结构中进入内部的细胞可能出现存活或逃逸, 但最常见的细胞命运是死亡<sup>[8]</sup>。HoCIC 结构中内部细胞会发生溶酶体途径介导的非凋亡性死亡, 这属于细胞非自主性死亡, 与经典的细胞死亡方式如凋亡、焦亡等有明显区别,

这种特殊的死亡方式被命名为 entosis, 并且在 2012 年正式被国际细胞死亡命名协会纳入细胞死亡名录中<sup>[4,9]</sup>。与 hoCIC 介导的内化同类细胞诱导 entosis 不同, heCIC 结构中由于细胞来源不同, 细胞效应也多种多样<sup>[10]</sup>。本课题组近期的研究表明, 肿瘤组织中这种内化免疫细胞所形成的 heCIC 结构占 CIC 结构的半数以上<sup>[11]</sup>。肝癌细胞内化自然杀伤细胞形成的 heCIC 结构能够显著提升肿瘤免疫杀伤效率, 提示 heCIC 结构可能是肿瘤免疫调节过程中的一个重要组成部分。并且在 heCIC 结构形成的过程中, 细

胞骨架和细胞黏附的相关分子发生了变化,其中细胞黏附增加或细胞刚性降低都能有效促进 heCIC 结构的形成<sup>[12]</sup>,这为后续开展 heCIC 的机制研究奠定了基础。

上皮膜蛋白 3 (epithelial membrane protein 3, EMP3)属于 PMP-22/EMP/MP20 蛋白质家族,该基因编码的蛋白含有 4 个跨膜结构域和 2 个 N-连接糖基化位点。研究显示 EMP3 是肿瘤中重要的抑癌因子,神经母细胞瘤中由 EMP3 基因甲基化水平升高导致的翻译水平下降与不良结局相关,过表达 EMP3 能够显著抑制神经胶质母细胞瘤增殖<sup>[13]</sup>。研究发现 EMP3 能够抑制胆囊癌、食管鳞状细胞癌的进展,并可以抑制乳腺癌中 DNA 同源重组修复改善肿瘤细胞化疗敏感性<sup>[14-16]</sup>。与此同时,研究人员发现 EMP3 可以促进胃癌、肺癌细胞增殖和上皮-间充质转化诱导肿瘤干性的形成;并且在胶质母细胞瘤中 EMP3 作为免疫抑制因子,通过驱动巨噬细胞 M2 极化并减少其分泌趋化因子,从而抑制 T 细胞浸润<sup>[17-19]</sup>。这些研究结果表明 EMP3 具有肿瘤组织选择特异性。

本研究中,我们发现 EMP3 在肝癌患者组织中表达显著升高,并且其高表达与患者不良预后相关。应用分子生物学相关手段阐明 EMP3 在肝癌细胞 heCIC 结构形成过程的调节作用和机制,为深入认识 heCIC 结构介导肿瘤免疫调节提供新的切入点,并为临床肝癌肿瘤的治疗提供新的靶点。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞培养

所用细胞均由中国医学科学院细胞死亡创新单元保存提供。肝细胞癌单克隆细胞株由人肝癌亚历山大细胞 PLC/PRF/5 (PLC)分选,人类

胚胎肾细胞系 HEK-293T,使用包含 1%链-青霉素(北京索莱宝生物科技有限公司)、10%胎牛血清(苏州伊科赛生物科技股份有限公司)的 DMEM 培养基(北京中科迈晨科技有限公司)于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中进行培养。人恶性非霍奇金淋巴瘤患者的自然杀伤细胞 NK92MI 细胞系使用包含 10%胎牛血清及 10%马血清的 RPMI-1640 培养基进行培养。所有细胞在进行实验前均使用支原体检测试剂盒(上海翌圣生物科技股份有限公司)检测,确认无支原体污染后开展相关细胞及分子生物学实验。

### 1.2 主要仪器及相关试剂

实验仪器主要包括:艾本德公司的高速低温离心机、赛默飞世尔公司的 NanoDrop2000 及酶标仪、伯乐公司的电泳-转印系统、天能公司的化学发光成像仪、耶拿实时定量荧光 PCR 仪、艾利泰克公司甩片机、尼康宽场荧光显微镜等。

相关试剂主要包括:赛默飞世尔公司的蛋白 BCA 定量试剂盒及细胞染料 cell tracker green 和 cell tracker orange、诺维赞生物技术公司的 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)逆转录试剂盒、赛多利斯公司的 PEI 转染试剂 jetPRIME<sup>®</sup> Versatile DNA/siRNA transfection reagent 等。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 病毒包装、EMP3 稳定敲低细胞系的构建及瞬转转染过表达 EMP3

取生长状态良好的 HEK-293T 细胞按照  $5 \times 10^5$ /孔铺于含有胶原的 6 孔细胞培养板中过夜培养,确认细胞铺匀贴壁。吸取 EMP3 敲低质粒、pMD2.G 及 psPAX2 包装质粒各 1  $\mu$ g,在含有 4  $\mu$ L jetPRIME reagent 的 buffer 中稀释,室温下孵育 15 min,而后加入含有培养基的细胞培养板中,6 h 后更换为含有 10%血清的培养

基, 继续培养 48 h, 收集上清即为病毒液。应用 0.45  $\mu\text{m}$  滤器过滤病毒液后备用。将肝癌细胞单克隆细胞株 F6FT、I1FT 按照  $4 \times 10^5$ /孔铺至 6 孔板, 待细胞贴壁后, 按照 1:1 的比例将病毒液加入含有 polybrene 的培养基中至总体积为 2 mL 进行病毒感染, 24 h 后更换为完全培养基并在 48 h 后更换为含有 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  嘌呤霉素的培养基继续培养 2–3 d 以筛选稳定细胞株。

**EMP3 瞬时过表达:** 将肝癌单克隆细胞株 A4S、C1FT 按照  $5 \times 10^5$ /孔提前铺至 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 根据 Polyplus 公司 PEI 转染试剂说明书按每孔 2  $\mu\text{g}$  pcDNA3.1-EMP3 和 4  $\mu\text{L}$  jetPRIME reagent 转染至总体积为 2 mL 的完全培养基中, 6 h 后换液, 培养 48 h 后开展相关实验。

### 1.3.2 RNA 提取和荧光实时定量 PCR 试验

弃培养基并使用 PBS 润洗细胞后, 加入 TaKaRa 公司的 TRIzol 溶液裂解细胞并收集于 1.5 mL EP 管中, 经过三氯甲烷萃取、异丙醇及 75%乙醇洗脱提纯后获得 RNA, 上述过程均在冰浴条件下完成。待晾干后加入焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水溶解, 并使用微量分光光度计检测 RNA 浓度及  $OD_{260}/OD_{230}$ 、 $OD_{260}/OD_{280}$  比值确认纯度。

根据南京诺维赞生物技术公司逆转录试剂盒的说明书, 取 1  $\mu\text{g}$  RNA 逆转录为 cDNA 后加入 80  $\mu\text{L}$  DEPC 水稀释 5 倍至终体积 100  $\mu\text{L}$ , 而后将 2 $\times$ SYBR Green Master Mix、Primer-Forward、Primer-Reverse、cDNA 及 DEPC 水按表 1 内体系配比配制为混合溶液, 利用实时定量荧光 PCR 仪检测 mRNA 表达水平变化。RT-PCR 的 *AGR2*、*ANXA13*、*EMP3* 及 *GAPDH* 引物序列 (5'→3') 参照表 2。

### 1.3.3 蛋白提取及蛋白质印迹检测

按 100:1:1 的比例混合 RIPA、磷酸化蛋白酶抑制剂 (100 $\times$ ) 及蛋白酶抑制剂 (100 $\times$ ) 配制细

表 1 RT-PCR 反应体系

Table 1 RT-PCR reaction buffers

Buffer	Volume ( $\mu\text{L}$ )
2 $\times$ SYBR Green Master Mix	5.0
Primer-Forward	0.5
Primer-Reverse	0.5
cDNA	2.0
DPEC H <sub>2</sub> O	2.0

表 2 RT-PCR 引物序列

Table 2 RT-PCR primers

Primer name	Primer sequence (5'→3')
<i>EMP3-F</i>	GGAGGTCTCTTCTATGCCACC
<i>EMP3-R</i>	AGGATCTCCTCGGCGTGAAT
<i>AGR2-F</i>	CGACTCACACAAGGCAGAGT
<i>AGR2-R</i>	TTGGCTCCAGGTTTGACTGT
<i>ANXA13-F</i>	TGGGCAATCGTCATAGCCAG
<i>ANXA13-R</i>	CTCTGGCTCTCCATTCCGTG
<i>GAPDH-F</i>	ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG
<i>GAPDH-R</i>	GCCATCACGCCACAGTTTC

胞蛋白裂解液, 使用超声破碎仪对裂解液进行破碎裂解后离心, 取得裂解液上清并应用 BCA 定量试剂盒检测蛋白浓度。按 1/4 体积加入 loading buffer (5 $\times$ ) 并于 100  $^{\circ}\text{C}$  金属浴放置 10 min。而后根据蛋白浓度按照等质量蛋白质体积依次进行电泳、电转, 转膜完成后用 5% 脱脂牛奶对 PVDF 膜封闭 1 h, 一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 第 2 天用 1 $\times$ TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。室温下进行二抗孵育 1 h 后再次使用 1 $\times$ TBST 洗涤, 而后用化学发光法对蛋白质进行曝光检测。

### 1.3.4 异质性细胞叠套结构形成率检测

用细胞绿色追踪器按照 1:1 000 比例与不含血清的 DMEM 培养基混合配制肿瘤细胞染色液, 将重悬后的细胞悬液放置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中孵育 15 min 后, 去除染色液并用 PBS 润洗 2 次, 而后消化并离心细胞沉淀, 用含血清的

DMEM 培养基将沉淀重悬后,按照  $2 \times 10^5$ /孔将细胞铺于 12 孔细胞培养板中,过夜培养,待细胞展开贴壁后,用细胞橙色追踪器按 1:1 000 比例与不含血清的 RPMI-1640 培养基配制的染色液将 NK92MI 重悬后放置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养箱内孵育 15 min 进行染色处理,离心并使用 PBS 润洗 2 次后,使用含有 10%胎牛血清、10%马血清的 RPMI-1640 培养基重悬并加入到 12 孔板中与肿瘤细胞共同培养 10 h。共孵育结束后,消化并收集细胞沉淀,用 PBS 重悬细胞沉淀后,用细胞甩片仪甩片处理,用 4%多聚甲醛固定处理,并使用含 DAPI 的封片剂进行封片过夜。采用共聚焦荧光显微镜进行观察和计数。

### 1.3.5 数据统计分析

所有统计分析均使用 GraphPad Prism 9.0 (GraphPad software)进行。数据以 3 个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。使用学生  $t$  检验或双向方差分析检验分析统计显著性。所有数据均被认为具有统计显著性,统计显著性阈值用\*表示。\*代表  $P < 0.05$ ; \*\*代表  $P < 0.01$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达谱分析系统筛选与 heCIC 结构形成能力相关的基因

课题组前期通过有限稀释法结合免疫细胞共培养,筛选到多株 heCIC 结构形成率有显著差异的、遗传背景相近的同源(isogenic)肝癌细胞单克隆细胞株,并根据 heCIC 结构形成率分成 heCIC<sup>low</sup>、heCIC<sup>high</sup> 两组细胞,用表达谱芯片检测 heCIC<sup>low</sup>、heCIC<sup>high</sup> 两组细胞中和 heCIC 结构形成密切相关的差异基因组(图 1)。本研究结合 TCGA 数据库筛选到与 heCIC 形成相关的有表达差异的基因 *AGR2*、*ANXA13* 及 *EMP3*, 同时有临床表达及预后差异。如图 2A 所示,

*AGR2* 虽然在肝癌细胞患者中无明显差异,但低表达 *AGR2* 的肝癌患者有更长的总生存期(overall survival)。*ANXA13* 和 *EMP3* 基因在肿瘤患者组织中表达升高并且与预后不良相关(图 2B、2C)。

### 2.2 EMP3 在不同 heCIC 形成率的细胞株中有表达差异

按表 1 配制混合溶液后用 qRT-PCR 技术检测 *AGR2*、*ANXA13* 及 *EMP3* (引物序列见表 2)的表达水平,我们发现, *AGR2* 基因在 F1f 及 E18f 单克隆细胞株中表达水平过低,无法检测到  $C_t$  值(图 3A); 而 *ANXA13* 基因在 heCIC<sup>low</sup> 细胞株中的 F6ft 及 I1ft 细胞株中呈现出高表达趋势,而在其余两种细胞株的表达水平与 heCIC<sup>high</sup> 组细胞株相比无明显差异,与 heCIC<sup>high</sup> 组细胞株 *ANXA13* 表达也无明显差异(图 3B); 如图 3C、3D 所示, *EMP3* 基因在 heCIC<sup>low</sup> 组别的各个细胞株中均表现出较高的 mRNA 表达水平。Western blotting 实验进一步证实了 *EMP3* 在 heCIC<sup>low</sup> 组细胞株中表达水平显著高于 heCIC<sup>high</sup> 组细胞株,提示 *EMP3* 可能参与调节肝癌细胞和 NK92MI 细胞间 heCIC 结构形成过程。

### 2.3 敲低 EMP3 显著促进肝癌细胞-NK92MI 细胞间 heCIC 结构形成

为了解析 *EMP3* 在肝癌细胞形成 heCIC 结构中的调节作用,在 F6ft 及 I1ft 细胞株中对 *EMP3* 进行敲低,并检测了敲低效率(图 4A)。与 NK92MI 共培养后,细胞甩片结果显示, F6ft 细胞株 heCIC 结构形成率由敲低前的约 3% 升高至 9%, I1ft 细胞株在 *EMP3* 敲低后 heCIC 结构形成率由约 4% 升高至 8%, 提示敲低 *EMP3* 能够有效增加肝癌细胞和免疫细胞间 heCIC 结构的形成(图 4B、4C)。

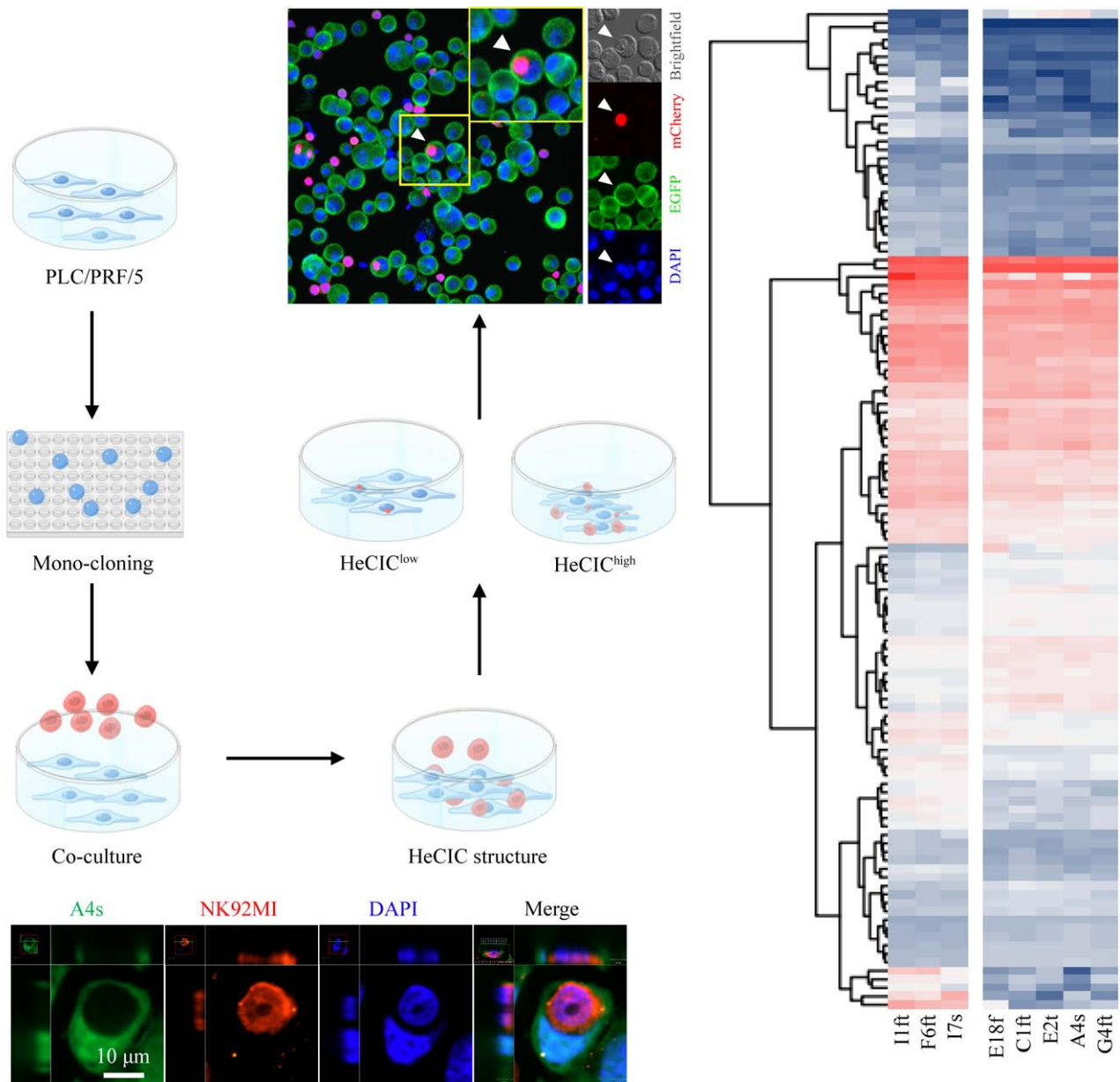


图1 差异 heCIC 细胞株模型的筛选和表达谱分析

Figure 1 Establishment of differentiated heCIC mono-cloning cell lines and RNA-Seq. HeCIC<sup>low</sup> group: 17s, F6ft and I1ft cell lines. HeCIC<sup>high</sup> group: C1ft, E18F, E2t, A4s and G4ft cell lines. 3D reconstruction image of heCICs formed between NK92MI (orange) and A4s (green) cells. Scale bar: 10 μm.

## 2.4 过表达 EMP3 抑制 heCIC<sup>high</sup> 组细胞株 heCIC 结构形成

向 C1ft 和 A4s 细胞中瞬时转染 pcDNA3.1-EMP3 过表达质粒及对照质粒并检测转染效率, 其中 C1ft 细胞中 EMP3 表达水平升高近 15 倍,

A4s 细胞中 EMP3 表达水平升高约 12 倍(图 5A)。用绿色细胞追踪器染色肿瘤细胞后, 检测用橙色细胞追踪器染色后的 NK92MI 细胞共培养后的 heCIC 结构形成变化。结果显示, 过表达 EMP3 后 C1ft 和 A4s 的 heCIC 结构形成分别

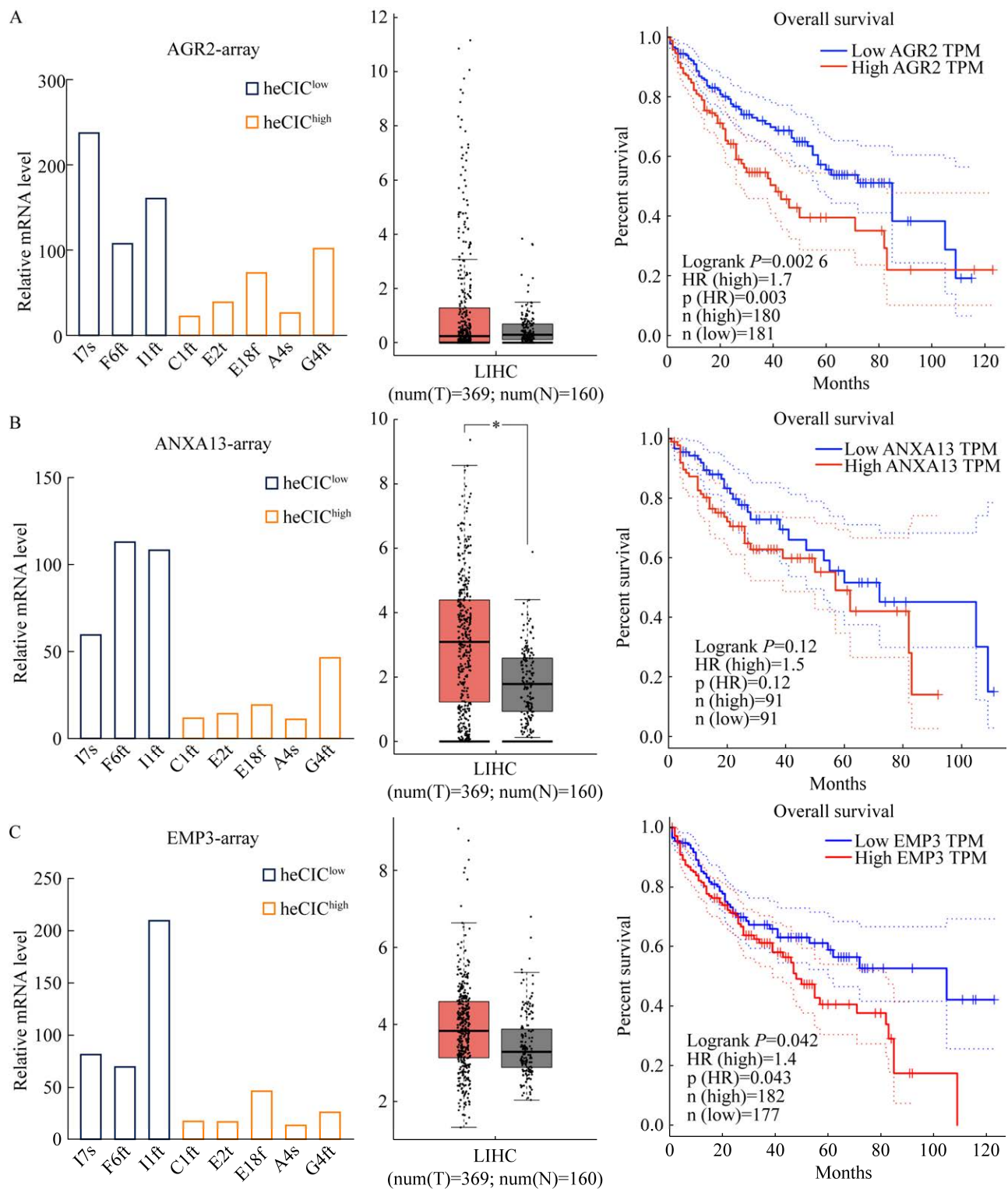


图2 HeCIC RNA-Seq 差异基因筛选和临床预后分析

Figure 2 Screen the relationship among differential genes of heCIC structures RNA-Seq and clinical outcomes of liver cancer patients. The expression in heCIC structures screening data and clinical patients of *AGR2*, *ANXA13*, and *EMP3* (A–C) with the overall survival data.

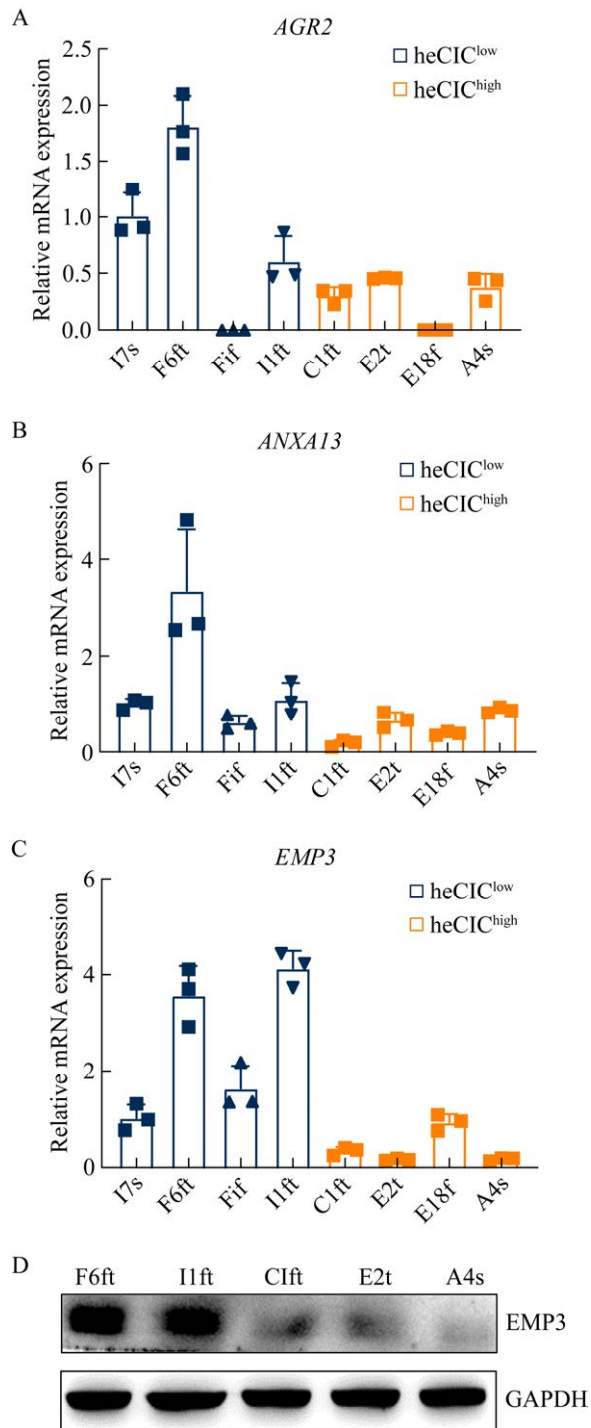


图3 验证筛选差异基因

Figure 3 Verification screening of differential genes by qRT-PCR assays. A–C: The expression of *AGR2*, *ANXA13*, and *EMP3* in differential heCIC ability cell lines. D: Protein expression level of *EMP3* in above cell lines.

下降约 7%和约 9%，提示 *EMP3* 基因具有抑制肝癌细胞内化 NK92MI 细胞形成 heCIC 结构的作用(图 5B、5C)。

### 2.5 *EMP3* 通过调节细胞黏附能力及细胞骨架影响 heCIC 形成

为了解析 *EMP3* 抑制 heCIC 结构形成的机制，检测了与 heCIC 结构形成相关分子的表达水平。结果显示(图 6)，敲低 *EMP3* 能够显著促进 F6ft 细胞表达 E-cadherin、N-cadherin 及  $\beta$ -catenin，增加细胞黏附能力。同时，ROCK1 的表达明显下降。与之对应的是，过表达 *EMP3* 后，A4s 细胞的 N-cadherin 和  $\beta$ -catenin 表达出现不同程度的下降，Rac1 及 pMLC 表达升高，提示细胞刚性增加。上述结果进一步支持了 *EMP3* 对于肝癌细胞 heCIC 结构形成的抑制作用。

## 3 讨论与结论

HeCIC 结构介导免疫细胞内化是机体免疫调节中的重要组成部分。研究显示，近 1/3 的自身免疫性肝炎患者的组织病理切片中发现了 heCIC 结构的形成；同时，研究人员在小鼠肝炎模型中也发现了这种现象，炎性组织中 heCIC 结构形成率远高于对照组并与炎症的严重程度正相关<sup>[20-21]</sup>。课题组近期有关于 COVID-19 病毒性肺炎的研究发现，被病毒刺突蛋白诱导产生的肺上皮细胞合胞体，可以很容易通过 heCIC 结构内化免疫细胞，造成淋巴细胞减少症<sup>[22]</sup>。以上研究表明 heCIC 结构在机体炎症及感染过程中扮演不同角色，既参与了肝细胞对抗损伤的免疫自稳过程，也参与了病毒感染诱导机体免疫缺陷的进程。同样地，heCIC 结构在肿瘤免疫调节中也发挥了多重作用。早在 20 世纪 80 年代，我国学者王小宁教授就曾发现了 NK 细胞能够“钻入”到肿瘤细胞中形成“cell-in-cell”结构的现像<sup>[23]</sup>。近年的研究对此现象的机制进行了进一步



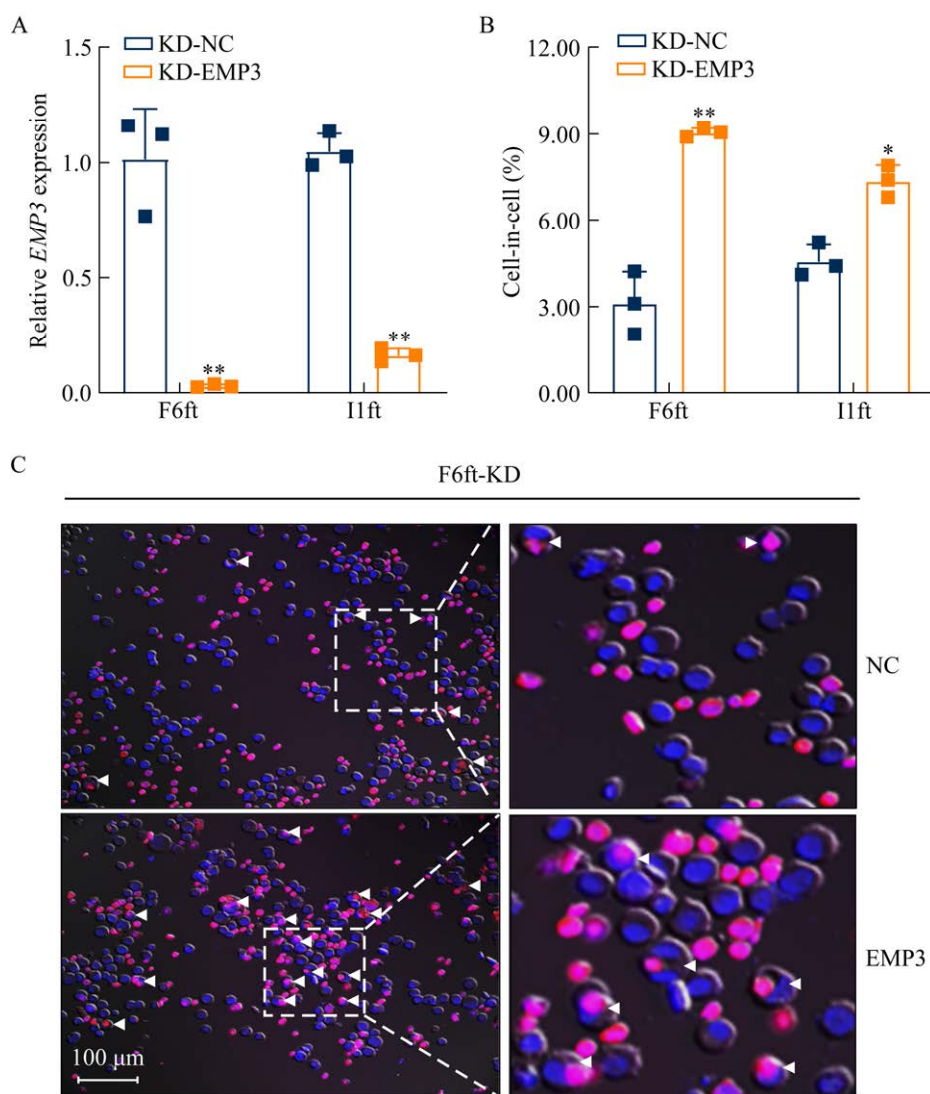


图 4 敲低 EMP3 能够促进 heCIC<sup>low</sup> 组细胞株 heCICs 形成

Figure 4 Knockdown of *EMP3* promotes the formation of heCIC structures formation in heCIC<sup>low</sup> group cell lines. A: The efficiency of *EMP3*-knockdown in F6ft and I1ft cell lines. B–C: Quantification of percentage of heCIC structures formation. Tumor cells (green), NK92MI cells (orange) and DAPI for nuclear staining. Scale bar: 100  $\mu$ m. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

阐述：肿瘤细胞可以内化 NK 细胞及细胞毒性 T 细胞并促进其内部的颗粒酶释放进而杀死免疫细胞，并将此过程命名为“emperitosis”<sup>[3]</sup>。近期也有研究团队发现白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6) 具有调节 heCIC 结构形成并促进结肠癌免疫逃逸的作用<sup>[24]</sup>。与上述研究结果不同的

是，有研究人员发现源自脐带血的单核细胞也能够通过 heCIC 结构杀死肿瘤细胞<sup>[25]</sup>。这些研究表明 heCIC 结构在肿瘤免疫调节作用中的机制复杂，解析 heCIC 结构形成过程的关键分子对于阐明其介导的肿瘤免疫调节作用具有重要意义。

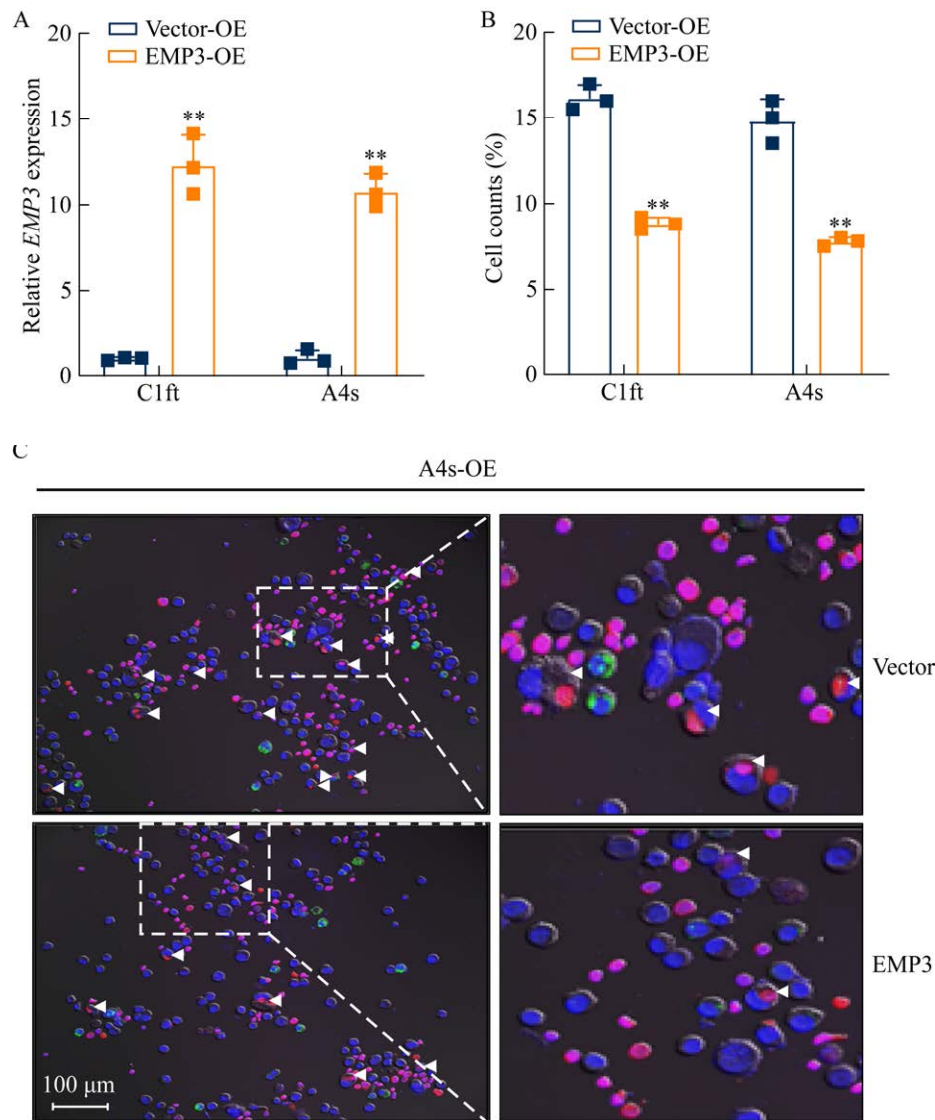


图 5 过表达 *EMP3* 抑制  $\text{heCIC}^{\text{high}}$  组细胞株  $\text{heCIC}$  结构形成

Figure 5 Overexpression of *EMP3* inhibits the formation of  $\text{heCIC}$  structures in cell lines of the  $\text{heCIC}^{\text{high}}$  group. A: The efficiency of *EMP3*-overexpression in C1ft and A4s cell lines. B: Quantification of percentage of  $\text{heCIC}$  structures formation. C: Representative images of increased  $\text{heCIC}$  in A4s *EMP3*-OE cell lines. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

本研究发现，与肝癌患者不良预后有关的 *EMP3* 分子在不同  $\text{heCIC}$  形成能力的细胞株中具有表达差异。研究中应用的 F6ft 细胞株为异质性 cell-in-cell 结构形成能力低的肝癌细胞株，A4s 细胞株为异质性 cell-in-cell 结构形成能力高的肝癌细胞株。包括上述两株细胞在内的多株

单克隆细胞株均从遗传背景相同的 PLC/PRF/5 中采用有限稀释法分选，并经过  $\text{heCIC}$  结构形成能力验证后分为  $\text{heCIC}^{\text{low}}$ 、 $\text{heCIC}^{\text{high}}$  细胞。各组中单克隆细胞株在  $\text{heCIC}$  结构形成方面虽然具有相似的细胞生物学行为，但各组细胞中表现遗传调控的信号通路及蛋白表达情况并不

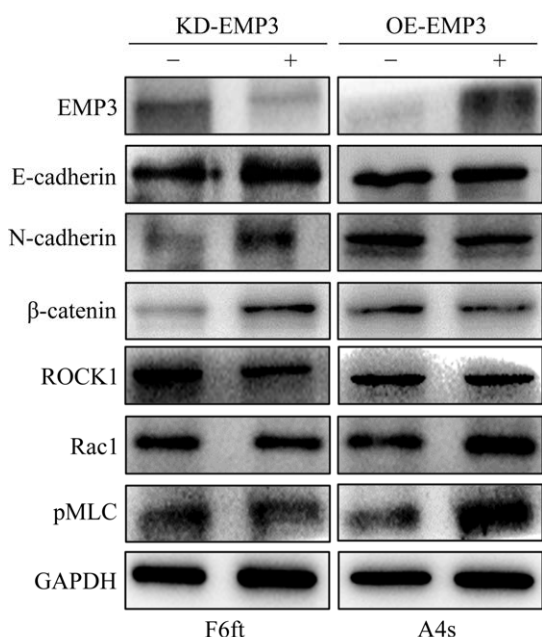


图 6 EMP3 通过调节细胞黏附能力及细胞骨架影响 heCIC 结构形成

Figure 6 EMP3 is involved in the formation of heCIC structures through its modulation of cell adhesion and cytoskeletal organization. Western blotting analysis of the protein level of heCIC related genes in EMP3-knockdown of F6ft and EMP3-overexpression of A4s cell lines.

完全相同。课题组前期研究表明，细胞黏附增加、细胞刚性下降均能促进肝癌细胞 heCIC 结构的形成。将 NK92MI 细胞分别与敲低/过表达 EMP3 的细胞株进行共培养发现，敲低 EMP3 能够促进 heCIC<sup>low</sup> 组细胞 heCIC 结构形成，而过表达 EMP3 则显著抑制了 heCIC<sup>high</sup> 组细胞 heCIC 结构形成。进一步检测 heCIC 结构形成相关分子的蛋白水平，我们发现抑制 F6ft 细胞 EMP3 的表达能够促进细胞黏附相关分子的表达水平，提示细胞黏附能力升高；而在 A4s 细胞中过表达 EMP3 虽然对黏附相关分子的表达水平无显著影响，但细胞骨架相关蛋白表达水平升高，提示细胞刚性增强。鉴于 cell-in-cell 结构是两个细胞间的复杂生物学行为，其调控

机制还需要在未来的研究中进一步得到明确。综上所述，本研究证明了 EMP3 是 heCIC 结构形成的负调控因子，可以通过靶向 EMP3 提高 heCIC 结构形成促进肝癌肿瘤免疫。

## REFERENCES

- [1] CHEMNITZ J, SKAARING P. Tumour cell interactions *in vitro*[J]. Virchows Archiv B Cell Pathology, 1978, 28(1): 87-91.
- [2] CARUSO RA, MUDA AO, BERSIGA A, RIGOLI L, INFERRERA C. Morphological evidence of neutrophil-tumor cell phagocytosis (cannibalism) in human gastric adenocarcinomas[J]. Ultrastructural Pathology, 2002, 26(5): 315-321.
- [3] WANG S, GUO Z, XIA P, LIU TT, WANG JF, LI S, SUN LH, LU JX, WEN Q, ZHOU MQ, MA L, DING X, WANG XN, YAO XB. Internalization of NK cells into tumor cells requires ezrin and leads to programmed cell-in-cell death[J]. Cell Research, 2009, 19(12): 1350-1362.
- [4] GALLUZZI L, VITALE I, ABRAMS JM, ALNEMRI ES, BAEHRECKE EH, BLAGOSKLONNY MV, DAWSON TM, DAWSON VL, EL-DEIRY WS, FULDA S, GOTTLIEB E, GREEN DR, HENGARTNER MO, KEPP O, KNIGHT RA, KUMAR S, LIPTON SA, LU X, MADEO F, MALORNI W, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012[J]. Cell Death and Differentiation, 2012, 19(1): 107-120.
- [5] OVERHOLTZER M, BRUGGE JS. The cell biology of cell-in-cell structures[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9: 796-809.
- [6] FAIS S, OVERHOLTZER M. Cell-in-cell phenomena in cancer[J]. Nature Reviews Cancer, 2018, 18: 758-766.
- [7] SONG JL, XU RY, ZHANG H, XUE XM, RUZE R, CHEN Y, YIN XP, WANG CC, ZHAO YP. Cell-in-cell-mediated entosis reveals a progressive mechanism in pancreatic cancer[J]. Gastroenterology, 2023, 165(6): 1505-1521.e20.
- [8] HUANG H, CHEN Z, SUN Q. Mammalian cell competitions, cell-in-cell phenomena and their biomedical implications[J]. Current Molecular Medicine, 2015, 15(9): 852-860.
- [9] OVERHOLTZER M, MAILLEUX AA, MOUNEIMNE G, NORMAND G, SCHNITT SJ, KING RW, CIBAS

- ES, BRUGGE JS. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 966-979.
- [10] BORENSZTEJN K, TYRNA P, GAWEL AM, DZIUBA I, WOJCIK C, BIALY LP, MLYNARCZUK-BIALY I. Classification of cell-in-cell structures: different phenomena with similar appearance[J]. *Cells*, 2021, 10(10): 2569.
- [11] HUANG HY, CHEN A, WANG T, WANG MN, NING XK, HE MF, HU YZ, YUAN L, LI SC, WANG QW, LIU H, CHEN ZL, REN J, SUN Q. Detecting cell-in-cell structures in human tumor samples by E-cadherin/CD68/CD45 triple staining[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(24): 20278-20287.
- [12] SU Y, HUANG HY, LUO TZ, ZHENG Y, FAN J, REN H, TANG M, NIU ZB, WANG CX, WANG YQ, ZHANG ZR, LIANG JQ, RUAN BZ, GAO LH, CHEN ZL, MELINO G, WANG XN, SUN Q. Cell-in-cell structure mediates in-cell killing suppressed by CD44[J]. *Cell Discovery*, 2022, 8: 35.
- [13] ALAMINOS M, DÁVALOS V, ROPERO S, SETIÉN F, PAZ MF, HERRANZ M, FRAGA MF, MORA J, CHEUNG NK V, GERALD WL, ESTELLER M. EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(7): 2565-2571.
- [14] FUMOTO S, HIYAMA K, TANIMOTO K, NOGUCHI T, HIHARA J, HIYAMA E, NOGUCHI T, NISHIYAMA M. EMP3 as a tumor suppressor gene for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Letters*, 2009, 274(1): 25-32.
- [15] ZHOU KL, SUN Y, DONG D, ZHAO CH, WANG W. EMP3 negatively modulates breast cancer cell DNA replication, DNA damage repair, and stem-like properties[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12: 844.
- [16] MA Q, ZHANG YJ, LIANG HB, ZHANG F, LIU FT, CHEN SL, HU YP, JIANG L, HAO YJ, LI ML, LIU YB. EMP3 as a key downstream target of miR-663a regulation interferes with MAPK/ERK signaling pathway to inhibit gallbladder cancer progression[J]. *Cancer Letters*, 2023, 575: 216398.
- [17] WANG YW, LI WM, WU WJ, CHAI CY, LIU HS, LAI MD, CHOW NH. Potential significance of EMP3 in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma: crosstalk with ErbB2-PI3K-Akt pathway[J]. *The Journal of Urology*, 2014, 192(1): 242-251.
- [18] MARTIJA AA, KRAUß A, BÄCHLE N, DOTL L, CHRISTIANS A, KRUNIC D, SCHNEIDER M, HELM D, WILL R, HARTMANN C, HEROLD-MENDE C, von DEIMLING A, PUSCH S. EMP3 sustains oncogenic EGFR/CDK2 signaling by restricting receptor degradation in glioblastoma[J]. *Acta Neuropathologica Communications*, 2023, 11(1): 177.
- [19] CHEN Q, JIN J, HUANG X, WU F, HUANG HG, ZHAN RY. EMP3 mediates glioblastoma-associated macrophage infiltration to drive T cell exclusion[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 2021, 40(1): 160.
- [20] OHIRA H, TAKAHASHI A. Current trends in the diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis in Japan[J]. *Hepatology Research*, 2012, 42(2): 131-138.
- [21] CHEN YH, WANG S, HE MF, WANG YY, ZHAO H, ZHU HY, YU XM, MA J, CHE XJ, WANG JF, WANG Y, WANG XN. Prevalence of heterotypic tumor/immune cell-in-cell structure *in vitro* and *in vivo* leading to formation of aneuploidy[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59418.
- [22] ZHANG ZR, ZHENG Y, NIU ZB, ZHANG B, WANG CX, YAO XH, PENG HR, FRANCA DN, WANG YY, ZHU YC, SU Y, TANG M, JIANG XY, REN H, HE MF, WANG YQ, GAO LH, ZHAO P, SHI HP, CHEN ZL, et al. SARS-CoV-2 spike protein dictates syncytium-mediated lymphocyte elimination[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2021, 28: 2765-2777.
- [23] 王小宁, 肖建国, 李文简. 用改进的单个细胞细胞毒试验观察自然杀伤细胞的杀伤动态[J]. *第一军医大学学报*, 1984(4): 282-286.
- [24] WANG S, LI LM, ZHOU YG, HE Y, WEI YS, TAO AL. Heterotypic cell-in-cell structures in colon cancer can be regulated by IL-6 and lead to tumor immune escape[J]. *Experimental Cell Research*, 2019, 382(1): 111447.
- [25] TAKEUCHI M, INOUE T, OTANI T, YAMASAKI F, NAKAMURA S, KIBATA M. Cell-in-cell structures formed between human cancer cell lines and the cytotoxic regulatory T-cell line HOZOT[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2010, 2(3): 139-151.

(本文责编 陈宏宇)