DOI:10.16016/j.1000-5404.202108038

C 型尼曼-匹克蛋白 2 在胃癌组织中的表达及其功能初步研究

唐 焘[1,2],武 敏[1,2],王 君[1,2],王 迪[1,2],余时沧[1,2] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院:干细胞与再生医学科[1],全军临床病理学研究所,西南癌症中心[2]

[**摘要**] **目的** 观察 C 型尼曼-匹克蛋白 2(Niemann-Pick protein C2,NPC2)在胃癌中的表达情况,分析其预后意义,初步探讨 NPC2 对胃癌的调控作用。**方法** 利用胃癌数据库和组织芯片,比较 NPC2 在胃癌与正常胃黏膜中的表达差异;列联表分析 NPC2 表达与胃癌患者临床病理参数的相关性;Kaplan-Meier 分析和 COX 回归分析 NPC2 表达在胃癌中的预后判断意义;通过 GSEA 挖掘 NPC2 调控胃癌细胞的可能分子机制;利用 Transwell 试验检测下调 NPC2 后胃癌细胞迁移能力的变化。**结果** 相较于正常胃黏膜,NPC2 在胃癌中高表达[GSE33335:(7.917±0.077) *vs* (7.601±0.074),$P=0.009\ 6$;GSE63089:(9.083±0.123) *vs* (8.435±0.148),$P=0.000\ 1$;组织芯片:(4.596±0.230) *vs* (3.336±0.176),$P<0.000\ 1$];其表达水平与胃癌患者的 AJCC 临床分期(GSE15459:$P=0.009$;组织芯片:$P=0.04$)、区域淋巴结转移(组织芯片:$P=0.04$)等临床病理参数相关;NPC2 高表达者预后不良(TCGA:$P<0.000\ 1$;GSE15459:$P=0.002\ 3$;组织芯片:$P=0.003\ 2$),其表达水平是胃癌的独立预后预测因素(TCGA:风险比为 2.140,95%*CI* 为 1.523~3.006,$P<0.000\ 1$;组织芯片:风险比为 1.926,95%*CI* 为 1.108~3.348,$P=0.02$);细胞黏附分子相关基因在 NPC2 高表达胃癌中显著富集,提示其或与胃癌细胞的侵袭迁移相关;下调胃癌细胞中的 NPC2 表达后,显著抑制其迁移能力(NC 组 *vs* si-1 组:$P=0.000\ 04$;NC 组 *vs* si-2 组:$P=0.000\ 449$)。**结论** NPC2 表达与胃癌患者预后密切相关,并在细胞迁移中发挥重要调控作用,可作为胃癌的潜在诊疗靶标。

[**关键词**] C 型尼曼-匹克蛋白 2;胃癌;临床病理参数;预后;迁移

[**中图法分类号**] R341;R730.23;R735.2 [**文献标志码**] A

Expression and function of Niemann-Pick disease type C2 protein in gastric cancer

TANG Tao[1,2], WU Min[1,2], WANG Jun[1,2], WANG Di[1,2], YU Shicang[1,2] [1]Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, [2]PLA Institute of Pathology, Southwest Cancer Center, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To observe the expression profile of Niemann-Pick disease type C2 (NPC2) protein in gastric cancer, analyze its prognostic significance, and explore its regulatory function in the disease. **Methods** Expression difference of NPC2 in gastric cancer and normal gastric tissue was explored based on the Gene Expression Omnibus (GEO) database (GSE15459, GSE33335, GSE63089, GSE54129, GSE62254 and GSE84437), the Cancer Genome Atlas (TCGA) database and the tissue gastric cancer (GSE15459, GSE33335, GSE63089, GSE54129, GSE62254 and GSE84437) and the tissue chip of gastric cancer. The correlation between the expression of NPC2 and clinicopathological characteristics of gastric cancer was analyzed by contingency table analysis. Kaplan-Meier survival analysis and multivariate Cox regression analysis were performed to explore the prognostic significance of NPC2 expression in the cancer. The possible molecular mechanism of NPC2 regulating gastric cancer was analyzed by gene set enrichment analysis (GSEA). Transwell assay was carried out to measure the migration ability of gastric cancer cell line SGC7901

[**基金项目**] 国家重点研发计划(2016YFA0202104);国家自然科学基金重大研究计划重点项目(92059204);国家自然科学基金青年科学基金项目(81903009)

[**通信作者**] 余时沧,E-mail:yushicang@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

after down-regulation of NPC2. **Results** NPC2 was highly expressed in gastric cancer (GSE33335: 7.917±0.077 *vs* 7.601±0.074, $P=0.009\ 6$; GSE63089: 9.083±0.123 *vs* 8.435±0.148, $P=0.000\ 1$; the tissue chip: 4.596±0.230 *vs* 3.336±0.176, $P<0.000\ 1$). Its expression level was correlated to the clinical stage of American Joint Committee on Cancer (AJCC) (GSE15459: $P=0.009$; the tissue chip: $P=0.04$) and number of nearby lymph nodes (pN, the tissue chip: $P=0.04$). Gastric cancer patients with high NPC2 level had a poor prognosis (TCGA: $P<0.0001$; GSE15459: $P=0.002\ 3$; the tissue chip: $P=0.0032$), and the protein was an independent prognostic predictor of gastric cancer (TCGA: $HR=2.140$, 95% CI: 1.523~3.006, $P<0.000\ 1$; the tissue chip: $HR=1.926$, 95% CI: 1.108~3.348, $P=0.02$). Cell adhesion molecules-related genes were was significantly enriched in the gastric cancer tissue with high expression of NPC2, suggesting it may be involved in the invasion and migration of gastric cancer cells. Down-regulation of NPC2 significantly reduced the migration ability of SGC7901 cells (NC *vs* si-1: $P=0.000\ 04$; NC *vs* si-2: $P=0.000\ 449$). **Conclusion** The expression of NPC2 is closely associated with the prognosis of gastric cancer and plays an important regulatory role in cell migration. NPC2 might serve as a potential biomarker for the diagnosis and treatment of gastric cancer.

[**Key words**] Niemann-Pick disease type C2; gastric cancer; clinicopathological characteristics; prognosis; migration

Supported by the National Key R&D Program of China (2016YFA0202104), the Key Project for Major Research Plan of National Natural Science Foundation of China (92059204), and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81903009). Corresponding author: YU Shicang, E-mail: yushicang@163.com

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤,其发病率位居恶性肿瘤的第5位,是第3大癌症致死病因[1-2]。目前,胃癌的治疗方式主要包括手术、化疗和靶向治疗等。在过去几十年里,随着诊疗水平的提高,胃癌的发病率逐步下降,但对于进展期胃癌而言,预后仍不乐观,其中位生存期尚不足1年[3]。因此,寻找胃癌全新的诊疗靶标具有十分重要的临床意义。C型尼曼-匹克蛋白2(niemann-pick protein C2,NPC2)是一种在进化上十分保守的蛋白,其在各类组织和器官中均有分布,主要定位于晚期内体和溶酶体,并在胆固醇转运中发挥作用[4-5]。随着研究的深入,人们发现,NPC2与肿瘤的发生进展密切,其在肿瘤细胞分化、增殖和肿瘤微环境调控中均发挥重要作用[6-9]。The Human Protein Atlas显示,NPC2的表达水平与胃癌患者预后相关($P<0.001$),NPC2高表达者生存期更短。为了研究NPC2与胃癌的关系,我们通过分析数据库基因表达信息和胃癌组织芯片免疫组化染色结果,探讨了NPC2在胃癌组织中的表达情况、其表达水平与胃癌患者临床病理参数及预后的关系。在胃癌细胞系SGC7901中干预NPC2表达后,通过Transwell试验检测迁移能力的改变。

1 资料与方法

1.1 胃癌相关数据集、临床样本和胃癌细胞系

TCGA数据集和GEO数据集均下载自官网。在本研究中,应用了TCGA胃癌数据集的406例胃癌组织基因表达矩阵及临床信息、GSE15459数据集的192例胃癌组织基因表达矩阵及临床信息、GSE33335数据集的25例胃癌组织和50例正常胃组织基因表达矩阵、GSE63089数据集的45例胃癌及其癌旁组织基因表达矩阵、GSE54129数据集的111例胃癌组织基因表达矩阵、GSE62254数据集的300例胃癌组织基因表达矩阵、GSE84437数据集的433例胃癌组织基因表达矩阵。胃癌组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司,其中包含98例胃癌组织(其中82例胃癌组织样本含配对的癌旁组织)及临床病理预后信息。胃癌细胞系SGC7901购自中国科学院上海细胞库。

1.2 数据集分析

提取GSE33335数据集和GSE63089数据集中胃癌组织和正常胃组织/癌旁组织的NPC2 mRNA表达量,统计分析其表达差异。提取GSE15459数据集中NPC2 mRNA表达量和临床信息,通过绘制受试者工作曲线(Receiver operating characteristic curve,ROC曲线),以约登指数最大时所对应的表达量为临界值,将样本分为高、低表达两组,绘制生存曲线,进行生存分析,利用临床信息和NPC2表达分组进行列联表分析。提取TCGA胃癌数据集中NPC2 mRNA表达量和临床信息,通过绘制ROC曲线,以约登指数最大时所对应的表达量为临界值,将样本分为高、低表达两组,绘制生存曲线,进行生存分析,利用临床信息和NPC2表达

分组进行单因素和多因素回归分析。以 NPC2 mRNA 表达量中位数为临界值,以 NOM $P \leqslant 0.05$、FDR $\leqslant 0.25$ 为富集标准,在 GSE54129 数据集、GSE62254 数据集和 GSE84437 数据集中进行基因集富集分析(gene set enrichment analysis,GSEA),并绘制韦恩图求交集,得到 NPC2 高表达胃癌组织中的主要富集通路。

1.3 免疫组织化学染色、结果判定及分析

将胃癌组织芯片置于 65 ℃恒温孵箱中烤片 30 min,二甲苯、梯度酒精标准脱蜡处理;使用枸橼酸抗原修复工作液进行抗原修复,PBS 缓冲液震荡清洗 3 次,每次 5 min;滴加 3% 过氧化氢溶液,避光处理 30 min,用以阻断内源性过氧化物酶;使用山羊封闭血清封闭 30 min;以 1∶2000 的浓度滴加 NPC2 抗体(Abcam 公司,美国),置于湿盒内 4 ℃孵育过夜;使用 PBS 缓冲液震荡清洗 3 次,每次 5 min,滴加鼠兔通用二抗工作液(DAKO),室温孵育 30 min;使用 PBS 缓冲液震荡清洗 3 次,每次 5 min,DAB 显色,苏木精复染;梯度酒精脱水后,使用二甲苯透明,中性树胶封片。使用光学显微镜采集芯片中全部 180 点的镜下图像,使用 Image Pro Plus 软件分别测定各点的积分光密度(IOD 值),作为 NPC2 的表达强度,用于后续分析。提取胃癌组织及相应癌旁组织的 IOD 值进行统计分析,比较 NPC2 表达水平差异。提取胃癌组织 IOD 值及临床信息,通过绘制 ROC 曲线,以约登指数最大时所对应的表达量为临界值,将样本分为高、低表达两组,绘制生存曲线,进行生存分析。利用临床信息和 NPC2 表达分组进行列联表分析、单因素和多因素回归分析。

1.4 胃癌细胞系 SGC7901 的培养和 NPC2 表达干预

使用含 10%胎牛血清(Giboco)的 RPMI1640 培养基(HyClone)在 37 ℃、5% CO_2 恒温孵箱中培养胃癌细胞系 SGC7901。在胃癌细胞系 SGC7901 中干预 NPC2 表达前,将细胞种于 6 孔板中,待细胞生长约 50%时开始转染。si-NPC2 RNA 购自广州锐博生物技术有限公司(siNPC2-1:CTACCTGAATAAACTACCA,siNPC2-2:AGTGGCAACTTCAGGATGA)。每孔所需体系:将 4 μL(10 μmol/L)的 si-NPC2 RNA 和 4 μL 转染试剂 RNA iMax(Thermo)分别置于 100 μL Opti-MEM(Giboco)中混匀,静置 5 min 后将两者混匀,室温孵育 15 min 后转染,60 h 后收取细胞行后续检测。

1.5 Western blot 检测

在收取的细胞沉淀中添加适量 M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent(Thermo)和蛋白酶抑制剂,混匀后置于冰上裂解 30 min,以 4 ℃、15 000 r/min 离心 10 min 后留取上清液,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。加入适量蛋白上样缓冲液(5×),将样品置于 100 ℃水浴锅中变性 15 min。配制电泳凝胶,每孔加样量为 5 μL,使用 80 V 电泳 30 min 后,改为 120 V 继续电泳 90 min。使用 PVDF 膜进行转膜,转膜条件为 100 V、120 min。使用 5%脱脂牛奶室温封闭 60 min 后,4 ℃过夜孵育 NPC2 抗体(Abcam,1∶1 000)和 GAPDH 抗体(CST,1∶2 000)。室温孵育兔二抗(中杉金桥,1∶4 000)60 min。使用 SuperSignaling™ West Femto Substrate(Thermo)和自动化凝胶成像仪曝光显影。

1.6 Transwell 试验

实验前,将转染的细胞在无血清培养基中培养 24 h,进行细胞周期同步化。按照 4×10^4 个/孔将细胞种于 Transwell 上室中,并加入 200 μL 无血清培养基,下室中加入 600 μL 含 20% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基。将小室置于 37 ℃、5% CO_2 恒温孵箱中培养。培养 48 h 后,使用预冷的 PBS 缓冲液轻柔漂洗小室,并使用 4 %多聚甲醛固定 30 min。固定结束后,将小室置于室温风干,并使用结晶紫染液染色 30 min。将小室置于光镜下采图,计数并分析。

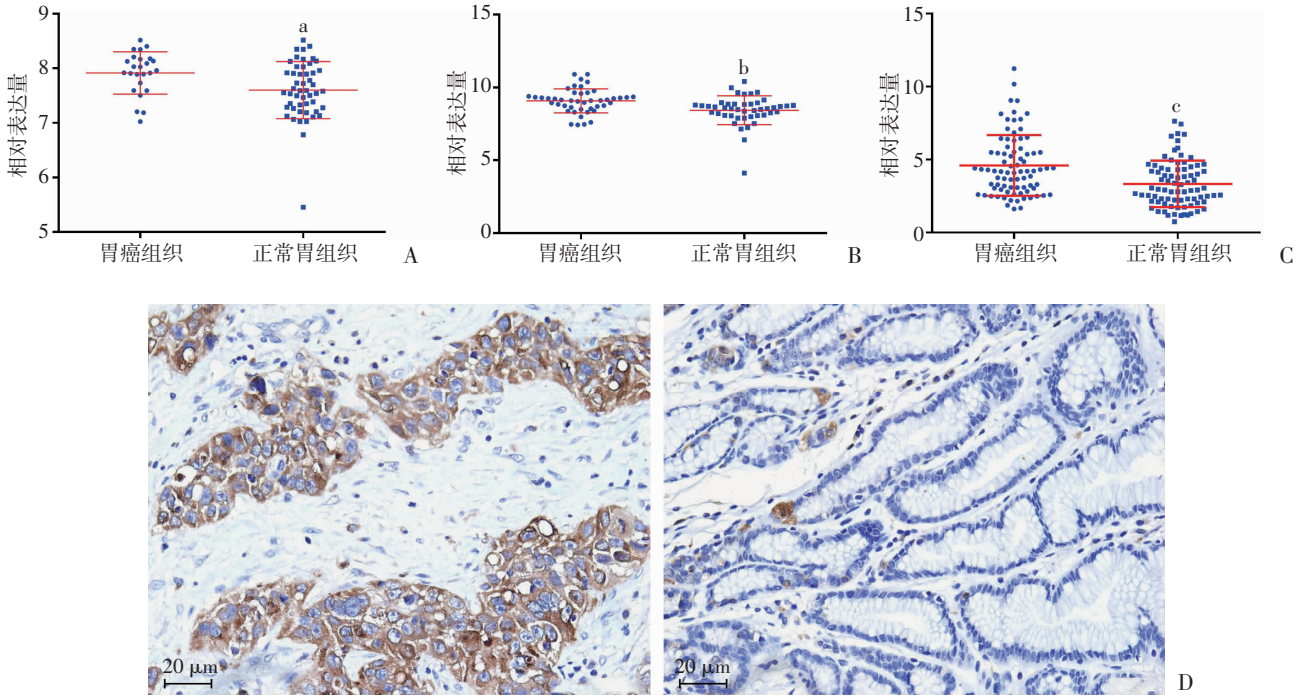
1.7 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件和 GraphPad Prism 6.01 处理实验数据。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。独立样本采用独立样本 t 检验,配对样本采用配对样本 t 检验。计数资料列联表分析采用卡方检验。Kaplan-Meier 生存分析采用 Log-rank 检验。单因素回归分析采用 Kaplan-Meier 法 Log-rank 检验。多因素回归分析采用 Cox 比例风险回归模型。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 NPC2 在胃癌组织中高表达

GSE33335 数据集分析结果显示:与正常胃组织[(7.601 ± 0.074),$n=50$]相比,胃癌组织[(7.917 ± 0.077),$n=25$]的 NPC2 mRNA 表达水平显著升高(独立样本 t 检验,双侧检验,$P=0.0096$,图 1A)。GSE63089 数据集分析结果也显示:与癌旁组织[(8.435 ± 0.148),$n=45$]相比,胃癌组织[(9.083 ± 0.123),$n=45$]的 NPC2 mRNA 表达水平显著升高(配对样本 t 检验,双侧检验,$P=0.0001$,图 1B)。对胃癌组织芯片进行免疫组化染色,并利用 IPP 软件对表达情况进行量化分析,计算 IOD 值,分析结果显示:与癌旁组织[(3.336 ± 0.176),$n=82$]相比,胃癌组织[(4.596 ± 0.230),$n=82$]的 NPC2 表达水平显著升高(配对样本 t 检验,双侧检验,$P<0.0001$,图 1C、D)。上述研究结果均表明,NPC2 在胃癌组织中的表达水平显著升高。



A:GSE33335 数据集中胃癌(n=25)和正常胃组织(n=50)的 NPC2 表达　a:P=0.0096;B:GSE63089 数据集中胃癌(n=45)和癌旁组织(n=45)的 NPC2 表达　b:P=0.0001;C:组织芯片中胃癌(n=82)和癌旁组织(n=82)的 NPC2 表达　c:P<0.0001;D:胃癌组织芯片中胃癌(左)与癌旁组织(右)的 NPC2 表达(典型图片)

图 1　NPC2 在胃癌组织和正常胃组织/癌旁组织中的表达差异

2.2　NPC2 表达与胃癌患者临床病理参数相关

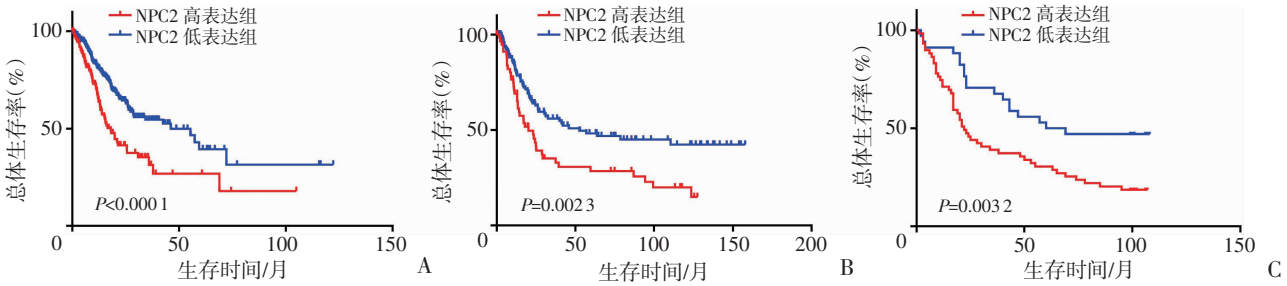
GSE15459 数据集分析结果显示:NPC2 的 mRNA 表达水平与胃癌的美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer,AJCC)临床分期相关(P=0.009,表 1)。利用胃癌组织芯片进行免疫组化染色,分析结果显示:NPC2 的表达水平与胃癌患者的区域淋巴结转移(pN)(P=0.04)、AJCC 临床分期(P=0.04)密切相关(表 2)。

表 1　GSE15459 中 NPC2 表达与临床病理参数的关系(n=192)

临床病理参数	NPC2 表达水平		卡方检验
	高表达	低表达	
性别			
男	41	84	P=0.527
女	19	48	
年龄			
≥66 岁	28	68	P=0.533
<66 岁	32	64	
AJCC 分期			
Ⅰ~Ⅱ	11	49	P=0.009
Ⅲ~Ⅳ	49	83	

表 2　组织芯片中 NPC2 表达与临床病理参数的关系(n=98)

临床病理参数	NPC2 表达水平		卡方检验
	高表达	低表达	
性别			
男	35	27	P=0.14
女	25	11	
年龄			
<65 岁	27	20	P=0.46
≥65 岁	33	18	
pT			
T1~T2	11	7	P=0.99
T3~T4	49	31	
pN			
N0	12	15	P=0.04
N1~N3	48	23	
pM			
M0	53	36	P=0.48
M1	7	2	
AJCC 分期			
Ⅰ~Ⅱ	19	20	P=0.04
Ⅲ~Ⅳ	41	18	



A:TCGA 胃癌数据集中 NPC2 表达水平和预后的关系(P<0.000 1);B:GSE15459 数据集中 NPC2 表达水平和预后的关系(P=0.002 3);C:胃癌组织芯片中 NPC2 表达水平和预后的关系(P=0.003 2)

图 2 胃癌组织中 NPC2 表达水平和预后的关系

2.3 NPC2 高表达的胃癌患者预后不良

TCGA 胃癌数据集分析结果显示:较之于 NPC2 mRNA 低表达的胃癌患者,NPC2 mRNA 高表达者预后不良(中位生存时间:$NPC2^{低表达}$ *vs*. $NPC2^{高表达}$ = 46.22 月 *vs* 18.13 月,Log-rank 检验,P<0.000 1,图 2A)。GSE15459 数据集分析结果也显示:NPC2 mRNA 高表达的胃癌患者预后不良(中位生存时间:$NPC2^{低表达}$ *vs* $NPC2^{高表达}$ = 52.63 月 *vs* 20.27 月,Log-rank 检验,P = 0.002 3,图 2B)。同样,胃癌组织芯片分析结果也显示:NPC2 高表达胃癌患者的预后不良(中位生存时间:$NPC2^{低表达组}$ *vs* $NPC2^{高表达组}$ = 64.50 月 *vs* 22.00 月,Log-rank 检验,P = 0.003 2,图 2C)。结果显示,NPC2 高表达的胃癌患者生存期显著缩短。

2.4 NPC2 表达水平是胃癌患者的独立预后预测因素

利用 TCGA 胃癌数据集进行单因素和多因素回归分析,结果显示:NPC2 mRNA 表达水平与胃癌患者预后密切相关(P<0.000 1),且 NPC2 mRNA 表达水平是胃癌患者的独立预后预测因素(风险比为 2.140,95% 置信区间为 1.523~3.006,P<0.000 1,表 3)。同样,胃癌组织芯片分析结果也表明:NPC2 表达水平与胃癌患者预后密切相关(P = 0.003),且 NPC2 表达水平是胃癌患者的独立预后预测因素(风险比为 1.926,95% 置信区间为 1.108~3.348,P = 0.02,表 4)。

表 3 TCGA 胃癌数据集单因素和多因素回归分析

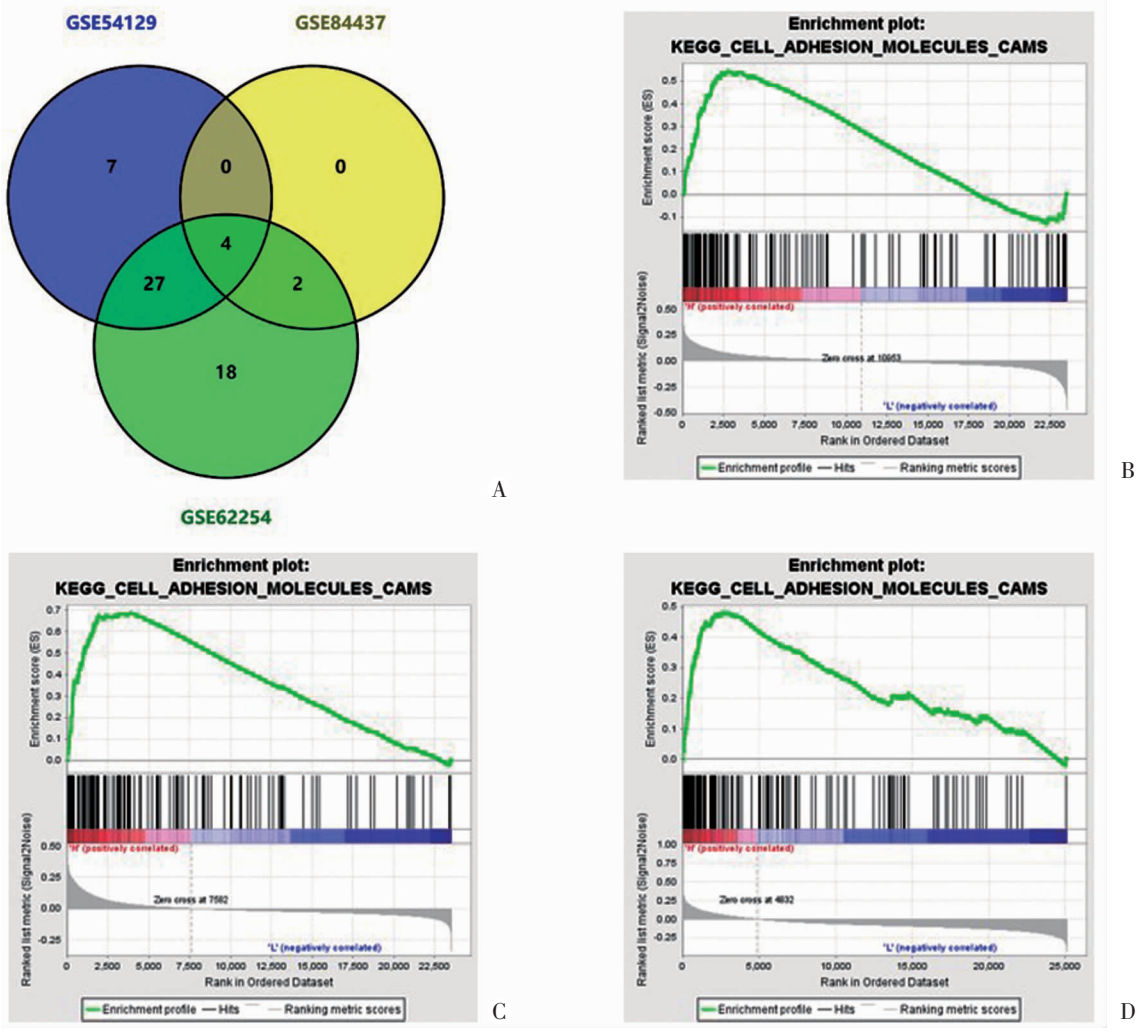
临床病理参数	例数	单因素分析		多因素分析	
		生存时间	P	HR(95%CI)	P
性别					
女性	134	65.3	0.142		
男性	228	49.9			
pT					
T1~T2	93	66.8	0.003	1	0.060
T3~T4	296	51.7		1.583(0.981~2.554)	
pN					
N0	114	58.7	0.001	1	0.276
N1-N2	248	52.2		1.356(0.784~2.346)	
pM					
M0	336	55.4	0.003	1	0.138
M1	26	27.3		1.546(0.869~2.750)	
AJCC 分期					
Ⅰ~Ⅱ	164	64.3	9.3×10^{-5}	1	0.198
Ⅲ~Ⅳ	198	47.2		1.393(0.841~2.308)	
NPC2 表达					
低表达	240	61.7	2.4×10^{-5}	1	1.1×10^{-5}
高表达	122	36.7		2.140(1.523~3.006)	

表 4 胃癌组织芯片单因素和多因素回归分析

临床病理参数	例数	单因素分析		多因素分析	
		生存时间	P	HR(95%CI)	P
性别					
男性	62	53.3	0.415		
女性	36	47.5			
年龄					
<65 岁	47	58.7	0.054		
≥65 岁	51	44.6			
pT					
T1-T2	18	69.3	0.045	1	0.408
T3-T4	80	46.7		1.393(0.635~3.054)	
pN					
N0	27	66.8	0.071		
N1-N2	71	45.7			
pM					
M0	89	54.7	0.001	1	0.010
M1	9	14.3		2.835(1.288~6.242)	
AJCC 分期					
Ⅰ~Ⅱ	39	68.3	0.002	1	0.028
Ⅲ~Ⅳ	59	39.6		1.837(1.067~3.164)	
NPC2 表达					
低表达	38	67.0	0.003	1	0.020
高表达	60	41.9		1.926(1.108~3.348)	

2.5 细胞黏附分子基因在 NPC2 高表达胃癌中显著富集

上述研究结果显示,NPC2 表达与胃癌关系密切。那么,NPC2 究竟影响了胃癌细胞的何种生物学行为呢?在 GSE54129 数据集、GSE62254 数据集和 GSE84437 数据集中,我们利用 GSEA 对 NPC2 高表达胃癌中的富集通路进行了挖掘,在 GSE54129 数据集中得到 38 条富集通路,在 GSE62254 数据集中得到 51 条富集通路,在 GSE84437 数据集中得到 6 条富集通路。通过绘制韦恩图(图 3A)求交集,得到 4 条富集通路,分别是:KEGG LEISHMANIA INFECTION(利什曼原虫感染)、KEGG LYSOSOME(溶酶体)、KEGG ASTHMA(哮喘)和 KEGG CELL ADHESION MOLECULES(细胞黏附分子)。其中,与肿瘤细胞生物学行为关系最为直接的是 KEGG CELL ADHESION MOLECULES(CAMS),其在 NPC2 高表达胃癌中显著富集(GSE54129 数据集:富集分数=1.61,NOM P=0.006,FDR=0.074;GSE62254 数据集:富集分数=1.85,NOM P<0.001,FDR=0.045;GSE84437 数据集:富集分数=1.62,NOM P=0.049,FDR=0.208,图 3B~D)。上述分析结果表明:NPC2 或在调控胃癌细胞迁移中发挥重要作用。



A:GSE54129 数据集、GSE62254 数据集和 GSE84437 数据集中 NPC2 高表达胃癌富集通路韦恩图;B:GSE54129 数据集中 KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS 富集情况(富集分数=1.61,NOM P=0.006,FDR=0.074);C:GSE62254 数据集中 KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS 富集情况(富集分数=1.85,NOM P<0.001,FDR=0.045);D:GSE84437 数据集中 KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS 富集情况(富集分数=1.62,NOM P=0.049,FDR=0.208)

图 3 NPC2 高表达胃癌中 GSEA 结果

2.6　下调 NPC2 表达,胃癌细胞迁移能力显著降低

在胃癌细胞系 SGC7901 中成功敲低 NPC2 表达(图 4)后,通过 Transwell 试验检测其迁移能力。结果显示,在胃癌细胞系 SGC7901 中下调 NPC2 表达后,其迁移能力显著下降(图 5)。3 次独立重复试验[NC 组 *vs* si-1 组:(676.7±48.2) *vs* (106.3±15.0),独立样本 *t* 检验,双侧检验,P = 0.000 04;NC 组 *vs* si-2 组:(676.7±48.2) *vs* (183.7±64.6),独立样本 *t* 检验,双侧检验,P=0.000 449]。

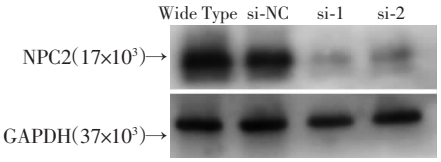
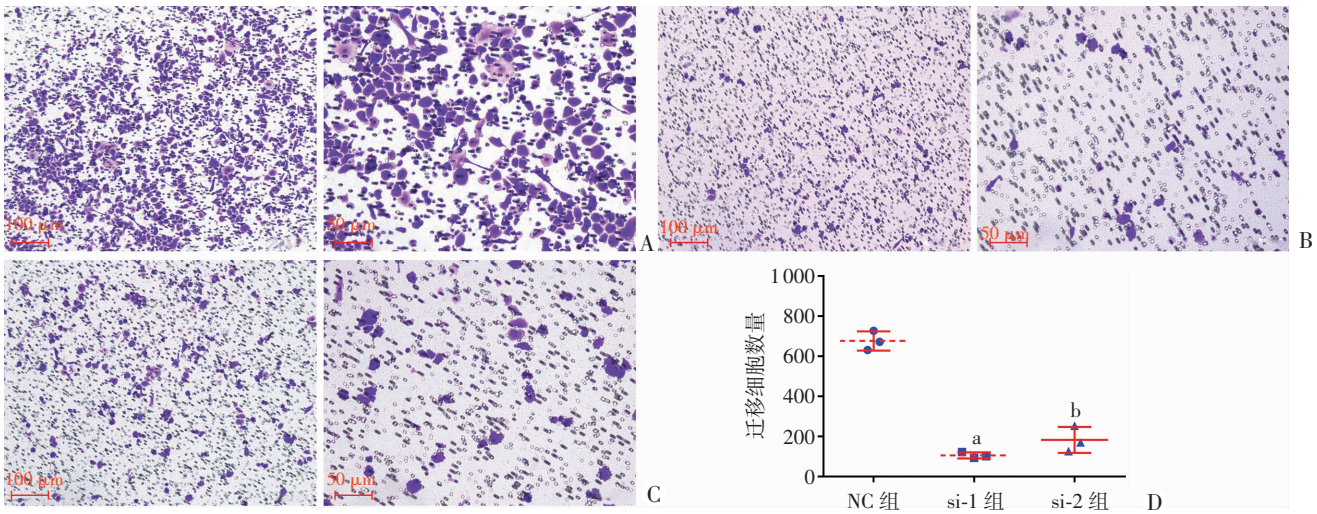


图 4　在 SGC7901 中使用 siRNA 敲低 NPC2 表达

3　讨论

全球癌症数据显示,全球现有胃癌病例数超 100 万例,其发病率在恶性肿瘤中居第 5 位,致死率居第 3 位,每年因胃癌死亡的人数约占因癌致死病例数的 8.2%。现有治疗方法对于进展期胃癌患者而言疗效不佳。因此,寻找新的诊疗靶标,对于改善胃癌患者(特别是进展期胃癌患者)的预后,具有十分重要的意义。NPC2 是一种定位于晚期内体和溶酶体的胆固醇转运蛋白,既往研究也多围绕其胆固醇转运功能展开,关于 NPC2 与肿瘤关系的研究较少。近年来,随着研究深入,人们逐渐发现,除了“转运胆固醇”这一经典功能外,NPC2还可能在肿瘤的发生进展中发挥重要作用。生物信息学分析结果表明,NPC2 表达与乳腺癌、肝癌等肿瘤的临床病理参数密切相关,其高表达与结直肠癌、胃癌、肝癌的不良预后相关,其低表达与甲状腺癌的不良预后相关。此外,已有研究结果也显示,NPC2 在多种肿瘤中表达水平发生改变,参与调控了肺癌、乳腺癌、肝癌等肿瘤细胞的增殖,通过细胞凋亡途径促进了甲状腺乳头状癌、肺腺癌等肿瘤组织中乳头状结构的形成,并参与调控了肺癌肿瘤微环境中巨噬细胞的招募[6-9]。由此可见,NPC2 或在多种肿瘤的发生进展中发挥调控作用,值得深入研究。如前所述,The Human Protein Atlas 数据库显示,NPC2 的表达水平与胃癌患者预后相关(P<0.001),NPC2 高表达者生存期更短。那么,NPC2 在胃癌的发生进展中究竟扮演着怎样的角色呢?目前尚无相关研究。

为了回答这一科学问题,本研究首先从生物信息学分析入手,利用数据库分析和胃癌组织芯片免疫组化染色分析,发现与正常胃组织和癌旁组织相比,NPC2 在胃癌组织中的表达水平显著升高,其表达水平与胃癌患者的 AJCC 分期、区域淋巴结转移等临床病理参数密切相关,NPC2 高表达的胃癌患者预后不良,其表达水平是胃癌患者的独立预后预测因素。上述生物信息学分析结果初步揭示了 NPC2 与胃癌的密切关系。当然,这些结果也并非最终论断。受限于操作误差、纳入样本量等因素,不同数据集的分析结果也会存在出入,甚至出现截然相反的情况。例如,在 TCGA 胃癌数据集和胃癌组织芯片中进行单因素和多因素回归分析时,尽管 NPC2 的分析结果是一致的,但 pT、pN、pM 和 AJCC 分期的分析结果则不完全相同。



A:不同倍数观察 SGC7901 NC 组迁移能力;B:不同倍数观察 SGC7901 si-1 组迁移能力;C:不同倍数观察 SGC7901 si-2 组迁移能力;D:3 组 SGC7901 迁移能力的统计分析(a:P=0.000 04,si-1 *vs* NC;b:P=0.000 449,si-2 *vs* NC)

图 5　在 SGC7901 中干预 NPC2 表达后,其迁移能力改变

这表明,生物信息学分析的结果无法得到肯定结论,必须通过体外实验、体内实验加以验证。我们利用GSEA,发现NPC2高表达胃癌组织中,细胞黏附分子相关基因显著富集,大量研究结果均已证实,细胞黏附分子与肿瘤侵袭迁移关系密切[10-11]。基于此结果,我们在胃癌细胞系SGC7901中干预NPC2表达后,发现其迁移能力显著降低。上述研究结果提示我们,NPC2或在胃癌的发生进展中发挥着重要作用,并调控胃癌细胞的迁移能力,NPC2可能是胃癌的潜在全新诊疗靶标。

当然,NPC2在胃癌中的具体作用机制仍不清楚,现有研究表明,NPC2可能通过调控MAPK、mTOR等信号通路发挥作用,但相关研究仍然有限,没有回答其具体作用机制。今后,围绕NPC2和肿瘤的研究,或许可以从其最基础的功能——胆固醇转运来入手。我们知道,信号转导异常是导致肿瘤发生的关键分子生物学事件[12]。稳定的生物膜系统是保证有序细胞信号转导的物质基础,而胆固醇在细胞内的有序分布,对于维持生物膜系统稳定的重要性不言而喻[13]。在细胞膜上,存在着富含胆固醇、鞘脂类和特殊蛋白质的微区,又名"脂筏",一些重要的信号转导分子也定位于此,稳定的脂筏结构对于其行使信号转导功能十分必要。另有研究结果表明,脂筏与前列腺癌、卵巢癌等多种肿瘤的发生及治疗关系密切[14,15]。而胆固醇则参与了维持脂筏结构的稳定性,如果去除细胞膜中的胆固醇,脂筏结构将出现形变,甚至解构。那么,作为胆固醇转运分子的NPC2,是否通过改变胆固醇的分布状态和脂筏结构的稳定,进而影响了生物膜上信号分子的正确定位与功能行使,从而影响了肿瘤的发生和进展呢?这值得进一步深入研究,解答上述科学问题,将具有重要的临床意义。

参考文献:

[1] EUSEBI L H, TELESE A, MARASCO G, *et al*. Gastric cancer prevention strategies: a global perspective[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2020, 35(9): 1495-1502. DOI:10.1111/jgh.15037.

[2] THRIFT A P, EL-SERAG H B. Burden of gastric cancer[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020. 18(3): p. 534-542. DOI: 10.1016/j.cgh.2019.07.045.

[3] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, *et al*. Gastric cancer[J]. Lancet,2020,396(10251):635-648. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31288-5.

[4] XU Y, ZHANG Q, TAN L, *et al*. The characteristics and biological significance of NPC2: Mutation and disease[J]. Mutat Res Rev Mutat Res, 2019, 782: 108284. DOI:10.1016/j.mrrev.2019.108284.

[5] COLOGNA S M, ROSENHOUSE-DANTSKER A. Insights into the molecular mechanisms of cholesterol binding to the NPC1 and NPC2 proteins[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1135: 139-160. DOI:10.1007/978-3-030-14265-0_8.

[6] CHEN K J, JIN R M, SHI C C, *et al*. The prognostic value of Niemann-Pick C1-like protein 1 and Niemann-Pick disease type C2 in hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer, 2018, 9(3): 556-563. DOI:10.7150/jca.19996.

[7] WU C C, LIN J D, CHEN J T, *et al*. Integrated analysis of fine-needle-aspiration cystic fluid proteome, cancer cell secretome, and public transcriptome datasets for papillary thyroid cancer biomarker discovery[J]. Oncotarget, 2018, 9(15): 12079-12100. DOI:10.18632/oncotarget.23951.

[8] ADACHI T, MATSUMOTO Y, INAGAKI Y, *et al*. Niemann-Pick disease type C2 protein induces autophagy and inhibits growth in FM3A breast cancer cells[J]. Drug Discov Ther, 2015, 9(4): 282-288. DOI:10.5582/ddt.2015.01014.

[9] KAMATA T, JIN H, GIBLETT S, *et al*. The cholesterol-binding protein NPC2 restrains recruitment of stromal macrophage-lineage cells to early-stage lung tumours[J]. EMBO Mol Med, 2015, 7(9): 1119-1137. DOI: 10.15252/emmm.201404838.

[10] JANISZEWSKA M, PRIMI M C, IZARD T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells[J]. J Biol Chem, 2020, 295(8): 2495-2505. DOI: 10.1074/jbc.rev119.007759.

[11] HARJUNPÄÄ H, LLORT ASENS M, GUENTHER C, *et al*. Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1078. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01078.

[12] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

[13] SUNSHINE H, IRUELA-ARISPE M L. Membrane lipids and cell signaling[J]. Curr Opin Lipidol, 2017, 28(5): 408-413. DOI:10.1097/mol.0000000000000443.

[14] DAMBAL S, ALFAQIH M, SANDERS S, *et al*. 27-hydroxycholesterol impairs plasma membrane lipid raft signaling as evidenced by inhibition of IL6-JAK-STAT3 signaling in prostate cancer cells[J]. Mol Cancer Res, 2020, 18(5): 671-684. DOI:10.1158/1541-7786.mcr-19-0974.

[15] LI G, HU X, NIE P, *et al*. Lipid-raft-targeted molecular self-assembly inactivates YAP to treat ovarian cancer[J]. Nano Lett, 2021, 21(1): 747-755. DOI:10.1021/acs.nanolett.0c04435.

(收稿:2021-08-07;修回:2021-09-15)

(编辑 邓强庭)