



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.007
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.007
China Journal of General Surgery, 2023, 32(3):378-389.

· 基础研究 ·

胰腺癌关键基因CTTNBP2NL的筛选与功能验证

宰红艳^{1,2}, 陈锦龙^{1,2}, 朱勤^{1,2}, 姜炜^{1,2}, 段艳坤^{2,3}, 欧政林^{1,2}

(中南大学湘雅医院 1. 普通外科 2. 国家老年疾病临床医学研究中心 3. 感染病科, 湖南 长沙 410008)

摘要

背景和目的: 胰腺癌是一种常见的恶性消化系统疾病, 其难以诊断和治愈。多数患者在确诊时已经错过了手术机会, 寻找胰腺癌的早期诊断和治疗靶标具有重要意义。因此, 本研究使用生物信息学筛选与胰腺癌进展相关的关键基因, 并鉴定其影响肿瘤进展的具体作用机制。

方法: 选用GEO的GSE15471、GSE16515和GSE132956数据集, 使用R语言“limma”包对3个GEO数据集进行差异基因分析, 筛选胰腺癌中差异基因并用Venn图取交集。通过Metascape富集分析差异基因的功能, KMPLOT生存分析差异基因与患者预后生存的相关性, GEPIA数据库验证差异表达情况。选择其中关键基因, 用Linkedomics分析其与胰腺癌临床病理信息的相关性, KEGG、GO富集分析其相互作用因子的生物学功能, 用Cytoscape软件构建PPI网络并分析相关信号通路。随后在胰腺癌组织样本和细胞系中验证关键基因的表达, 细胞功能实验验证其功能。

结果: 在3个GEO数据集中共筛选了177个基因上调, 104个基因下调。Metascape富集分析发现上调基因富集在组织形态发生、血管形成、细胞运动和细胞增殖等过程, 下调基因富集在代谢、胰腺分泌等过程。KMPLOT生存分析发现, 差异基因中有6个因子(CTTNBP2NL、FGD6、ITGA2、KRT19、S100P、TMPPRS4)与胰腺癌明显相关, 且都是胰腺癌患者生存的危险因素(均 $P<0.05$), GEPIA验证亦显示其均在胰腺癌中显著上调(均 $P<0.05$)。其中, CTTNBP2NL在胰腺癌中的功能不明, 故选择其为研究对象, 其后, 临床相关性分析显示CTTNBP2NL与胰腺癌TNM分型中的N分期明显相关, 且随分期增加而上调。PPI分析得到17个与CTTNBP2NL互作蛋白, KEGG富集分析发现其相互蛋白与PI3K/Akt、TGF- β 等通路相关, GO富集分析也发现其与细胞分离和凋亡相关。3个GEO数据芯片显示CTTNBP2NL在胰腺癌中高表达, 且在胰腺癌组织和细胞系, CTTNBP2NL的mRNA和蛋白表达也均上调(均 $P<0.05$)。细胞功能实验结果显示, 沉默CTTNBP2NL后, 胰腺癌细胞增殖, 迁移和侵袭明显抑制, 凋亡明显增加, 同时, PI3K/Akt信号通路活性明显抑制(均 $P<0.05$)。

结论: CTTNBP2NL在胰腺癌中高表达, 并与胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭密切相关, 其作用机制可能与活化PI3K/Akt信号通路有关。CTTNBP2NL可以作为胰腺癌的潜在预后生物标志物和诊断靶点。

关键词

胰腺肿瘤; 肿瘤浸润; CTTNBP2NL; PI3K/Akt通路

中图分类号: R735.9

基金项目: 湖南省科技创新计划基金资助项目(2021RC2025); 湖南省自然科学基金资助项目(2022JJ40808); 湖南省长沙市自然科学基金资助项目(kq2202383)。

收稿日期: 2023-01-31; **修订日期:** 2023-03-06。

作者简介: 宰红艳, 中南大学湘雅医院副主任医师, 主要从事消化道疾病基础与临床方面的研究。

通信作者: 欧政林, Email: zhenglinou@csu.edu.cn; 段艳坤, Email: ykduan@csu.edu.cn

Screening and functional validation of key gene CTTNBP2NL in pancreatic cancer

ZAI Hongyan^{1,2}, CHEN Jinlong^{1,2}, ZHU Qin^{1,2}, JIANG Wei^{1,2}, DUAN Yankun^{2,3}, OU Zhenglin^{1,2}

(1. Department of General Surgery 2. National Clinical Research Center for Geriatric Disorders 3. Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract

Background and Aims: Pancreatic cancer is a common malignant digestive system disease that is difficult to diagnose and treat. Most patients have missed the opportunity for surgery at the time of diagnosis. Developing new targets for early diagnosis and treatment of pancreatic cancer is of great significance. Therefore, this study was conducted to screen key genes related to the progression of pancreatic cancer using bioinformatics approach and identify their specific mechanisms that affect tumor progression

Methods: The GEO datasets GSE15471, GSE16515, and GSE132956 were selected, and differential gene analysis was performed on these three datasets using the R limma package to identify differentially expressed genes in pancreatic cancer. The Venn diagram was used to determine the intersection of these genes. Metascape was used to perform functional enrichment analysis on the differentially expressed genes, KMPLLOT was used to analyze the correlation between these genes and patient survival, and GEPIA was used to validate the differential expressions. The key gene was selected, and its correlation with clinical and pathological information of pancreatic cancer was analyzed using Linkedomics. The biological functions of the interaction factors of the key gene were analyzed using KEGG and GO enrichment analysis. A PPI network was constructed using Cytoscape software to analyze related signaling pathways. The expression of the key gene was subsequently verified in pancreatic cancer tissue samples and cell lines, and cellular functional experiments were conducted to validate its function.

Results: A total of 177 upregulated genes and 104 downregulated genes were identified in the three GEO datasets. Metascape enrichment analysis revealed that the upregulated genes were enriched in tissue morphogenesis, angiogenesis, cell movement, and cell proliferation, while the downregulated genes were enriched in processes such as metabolism and pancreatic secretion. KMPLLOT survival analysis identified six factors (CTTNBP2NL, FGD6, ITGA2, KRT19, S100P, TMPRSS4) that were significantly associated with pancreatic cancer and all of them were risk factors for the survival of pancreatic cancer patients (all $P < 0.05$). GEPIA validation also showed that these genes were significantly upregulated in pancreatic cancer (all $P < 0.05$). Among them, CTTNBP2NL was of unknown function in pancreatic cancer, so it was selected for further study. Clinical correlation analysis showed that CTTNBP2NL was significantly correlated with the N stage of TNM classification in pancreatic cancer and was upregulated with the increase of the stage. PPI analysis revealed 17 proteins that interacted with CTTNBP2NL, and KEGG enrichment analysis found that these proteins were related to the PI3K/Akt and TGF- β pathways. GO enrichment analysis also found that these proteins were related to cell separation and apoptosis. The three GEO datasets showed that CTTNB2NL was highly expressed in pancreatic cancer, and both mRNA and protein expressions of CTTNB2NL were upregulated in pancreatic cancer tissues and cell lines (all $P < 0.05$). Functional experiments showed that in pancreatic cancer cells after CTTNBP2NL silencing, the proliferation, migration and invasion were significantly inhibited while the apoptosis was significantly increased, and meanwhile, the activity of the PI3K/Akt signaling pathway was significantly inhibited (all $P < 0.05$).

Conclusions: CTTNBP2NL is highly expressed in pancreatic cancer and closely associated with the proliferation, migration, and invasion of pancreatic cancer cells. Its mechanism of action may be related to the activation of the PI3K/Akt signaling pathway. CTTNBP2NL can potentially serve as a prognostic biomarker and diagnostic target for pancreatic cancer.

Key words

Pancreatic Neoplasms; Neoplasm Invasiveness; CTTNBP2NL; PI3K/Akt Pathway

CLC number: R735.9

胰腺癌是世界上常见的消化道癌症，具有高侵入性，患者预后极差，是癌症相关死亡的第五大原因^[1]。常见的风险因素包括吸烟、特定的遗传性遗传综合征和胰腺癌家族史^[2]。近年来，胰腺癌的发病率及病死率呈逐年上升的趋势，已经严重影响了人们的健康生活^[3]。外科手术切除是胰腺癌最有效的治疗手段，然而由于大多数胰腺癌患者在确诊时已经属于晚期，手术处理仅有10%~20%，且预后较差^[4]。

以吉西他滨为基础的化疗方案是胰腺癌的一线治疗方案，但治疗后患者的5年生存率仍然低于10%^[5]。有研究^[6]表明，一些癌基因的表达改变可能会影响胰腺癌的进展，通过抑制这些突变的基因的表达变化可能是治疗胰腺癌的一种策略。

因此，寻找一种胰腺癌早期诊断和治疗靶点对提高胰腺癌患者的生存率至关重要。通过对过去文献的整理和筛选得到了其他癌症致癌的基因，进一步在胰腺癌中进行验证其功能是目前常用的研究方法^[7-8]。这能够筛选得到与癌症高度相关的癌基因。然而，对于胰腺癌特异性的癌基因无法通过此方法筛选得到。随着基因微阵列技术的发展，围绕疾病患者基因微阵列样本开展分析研究，是致病基因发现、早筛、基因表达个体差异研究的有力工具^[9]。近年来，已有多项研究^[10-12]报道通过微阵列工具筛选胰腺癌的差异表达基因和差异表达 miRNA。

本研究利用多个不同的胰腺癌基因表达微阵列数据，通过从基因表达层面系统挖掘胰腺癌进展相关的候选基因集，并基于临床组织和细胞模型两个不同层面初步核实验证相关基因表达。研究鉴定了6种 mRNA，即 CTTNBP2NL、FGD6、ITGA2、KRT19、S100P 和 TMPRSS4。其中，CTTNBP2NL在胰腺癌的发生和发展的功能和机制尚不清楚，CTTNBP2NL在肿瘤发生和演进中的作用也鲜有报道。因此，本研究对 CTTNBP2NL 的功

能及其发挥作用的分子机制进行了深入探讨。

1 材料与方法

1.1 数据源和处理

从基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 中获取了3个独立的微阵列数据集 (GSE15471、GSE16515 和 GSE132956) ^[13]。使用 R 语言 “limma” 包对该数据集进行差异基因分析，设置筛选参数为 $\log_2FC > 1$ ，校正 $P < 0.05$ 。使用 Venny 2.1 在线工具 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 绘制韦恩图。

1.2 PPI网络和模块分析

在线数据库 STRING (<https://cn.string-db.org>) ^[14] 用于蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 识别，使用 Cytoscape 软件构建 PPI 网络并分析 CTTNBP2NL 的相互作用。

1.3 功能基因富集分析

利用 KMPLOT 数据库 (<http://kmpplot.com/analysis>) ^[15] 进行目的基因的生存分析，Metascape 数据库 (<http://metascape.org>) 对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 功能富集分析，筛选 GO 和 KEGG 通路分析 $P < 0.05$ 。

1.4 临床样本收集

选取2020年7月—2021年7月中南大学湘雅医院收治的胰腺癌患者3例。纳入标准：(1) 病理确诊为胰腺癌；(2) 未经任何放疗、化疗等治疗。排除标准：(1) 未获得胰腺癌病理学确诊者；(2) 合并其他恶性肿瘤病史；(3) 合并其他器官严重性病变患者^[16]。在化疗和放疗之前收集组织，所有组织标本立即在液氮中冷冻并储存在-80℃。本研究通过我院伦理委员会批准，所有研究对象均签署知情同意书[受审编号：科审(2022020208)]。

1.5 细胞培养

人胰腺癌细胞系 (PANC-1、CFPAC-1 和 MIA PaCa-2) 购买于美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 人正常胰腺导管上皮细胞系 HPDE6-C7 购买于浙江宁波明舟生物科技有限公司。PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞在 DMEM 培养基 (美国 Gibco) 中培养; CFPAC-1 细胞在 IMDM 培养基 (Gibco) 中培养; HPDE-C7 细胞在 RPMI-1640 培养基 (Gibco) 中培养。所有培养基中均补充有 10% 胎牛血清 (Gibco) 和 1% 青霉素/链霉素 (Gibco), 并在 37 °C 5%CO₂ 的培养箱中培养。

1.6 细胞转染

特异性靶向 CTTNBP2NL 的小干扰 RNA (si-CTTNBP2NL#1 和 si-CTTNBP2NL#2) 以及相应的阴性对照 (si-NC) 由上海吉玛制药有限公司合成。si-CTTNBP2NL#1 序列: 5'-GAC CUU GUU AUA GAA GCC UUA TT-3', si-CTTNBP2NL#2 序列: 5'-CGU UUG ACA UUC CAU CAG AUU TT-3'; si-NC: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'; 序列并使用 Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen) 进行转染。无特殊说明, 在细胞转染 48 h 后, 进行功能实验及细胞 RNA、总蛋白提取。

1.7 qRT-PCR 检测

使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 从分离总 RNA, PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒 (日本 Takara) 将 RNA 逆转录为 cDNA。使用 ABI Prism 7900HT sequence detector (美国 Applied Biosystems) 和 SYBR Green PCR 试剂盒 (Takara) 检测目的基因的表达, 以 GAPDH 作为内参。PCR 在 95 °C 下预变性 2 min; 然后在 95 °C 下进行变性 15 s; 在 60 °C 下退火延伸 30 s; 共进行 40 个循环。数据分析采用 2^{-ΔΔCt} 法, ΔΔCt=实验组 (Ct 目标基因-Ct 内参)-对照组 (Ct 目标基因-Ct 内参)。引物序列见表 1。

1.8 Western blot 检测

将收集的组织和培养的细胞用 RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术) 提取总蛋白, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术) 测定总蛋白浓度, 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 随后转移到 PVDF 膜上。用抗 CTTNBP2NL (1:500; # PA5-46134; Thermo Fisher Scientific), 抗 p-PI3K (1:1000; ab191606; Abcam), 抗 PI3K (1:1000; ab32089; Abcam), 抗 p-AKT (1:1000; ab38449; Abcam), 抗 AKT (1:500;

ab8805; Abcam) 和抗 GAPDH (1:2500; ab9485; Abcam) 在 4 °C 下过夜孵育。用辣根过氧化物酶偶联的抗 IgG (1:2000; ab6721; Abcam) 在 37 °C 下孵育 2 h。使用增强型化学发光试剂盒 (美国 Millipore) 进行可视化, GAPDH 作为内参。

表 1 qRT-PCR 引物列表
Table 1 qRT-PCR primers

名称	序列(5'→3')
CTTNBP2NL	
正向	CAG GCA CCG AAA GGT GAT CC
反向	TCC TTC TCT AGC ATG TAG GTG AC
GAPDH	
正向	ACA GCC TCA AGA TCA TCA GC
反向	GGT CAT GAG TCC TTC CAC GAT

1.9 CCK-8 实验

将 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞以 1×10³ 个/孔的密度接种到 96 孔板中, 在 siRNA 转染后 0、24、48、72 h, 每孔中加入 10 μL CCK-8 溶液 (上海碧云天生物技术) 处理, 将 96 孔板放入培养箱中在 37 °C 下孵育 2 h。随后, 取出 96 孔板, 通过酶标仪 (美国 Bio-Tek) 检测各种在 450 nm 处测量 OD 值, 空白孔为参照^[3]。

1.10 流式细胞术分析

使用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物技术) 评估细胞凋亡。简言之, 分别将 1×10⁶ 个 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞接种到 6 孔板中, 转染 48 h 后, 收集细胞, 洗涤细胞并重悬于结合缓冲液中。然后, 将细胞与 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 碘化丙啶在室温黑暗中孵育 20 min。在 1 h 内使用 FACS Calibur 流式细胞仪 (BD Biosciences) 评估细胞凋亡。

1.11 划痕实验

将转染后的 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞接种在 6 孔板上生长 48 h 后。取出培养液, 用移液枪管在接种细胞表面刮擦并标记。用 PBS 轻轻洗涤 2 次后, 加入 1 mL DMEM 培养基。在 0 h 和 24 h 拍摄划痕。

1.12 Transwell 实验

Transwell 测定通过使用涂有基质胶的 Transwell 膜进行 (BD Biosciences)。收获转染 48 h 后的 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞, 重悬于 200 μL 无血清 DMEM 培养基中并接种到上室。下腔室中加入 600 μL DMEM 和 10% FBS。孵育 24 h 后, 将穿过膜

的细胞固定在4%甲醛中，用0.1%结晶紫染色，在显微镜下随机选取5个视野并计数。

1.13 统计学处理

所得实验数据均用以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示，采用Graphpad Prism 8.0软件进行独立t检验，两组间采用t检验，多组间采用One-Way ANOVA进行比较， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺癌微阵列芯片中的差异基因筛选及功能富集分析

对GSE15471、GSE16515和GSE132956数据集的分析显示，GSE15471中有297个基因在胰腺癌中下调，1113个基因上调；GSE16515中有419个基因下调，1175个基因上调；GSE132956中有1081个基因下调，880个基因上调。通过对3套芯片交叉得到共同上调的基因177个（图1A），共同下调的基因104个（图1B）。对差异基因进行Metascape富集分析，结果显示，上调基因富集在组织形态发生、血管形成、细胞运动和细胞增殖等过程（图1C）。下调基因富集在代谢和胰腺分泌等过程（图1D）。

2.2 胰腺癌差异基因的生存分析和表达

通过KM PLOT生存分析发现，CTTNBP2NL、FGD6、ITGA2、KRT19、S100P、TMPRSS4等6个差异基因与胰腺癌患者具有生存相关性，并均为生存的危险因素（均 $P < 0.05$ ）（图2A）。GEPIA数据库验证亦证实上述6个基因在胰腺癌中均明显上调（均 $P < 0.05$ ）（图2B）。文献验证发现TMPRSS4^[7]、S100P^[18]、KRT19^[19]、ITGA2^[20]、FGD6^[21]的促癌作用已较为明确，而CTTNBP2NL在胰腺癌中的功能尚不明晰，因此，后续研究对CTTNBP2NL的功能作用进行了深入探讨。

2.3 CTTNBP2NL与胰腺癌的临床相关性及其功能分析

Linkedomics (<http://www.linkedomics.org>) 分析CTTNBP2NL与胰腺癌患者的临床相关性显示，CTTNBP2NL表达与胰腺癌TNM分型中的N分期有关，其水平随分期增加而上调（均 $P < 0.05$ ）（图3A）。PPI网络分析显示CTTNBP2NL的互作因子（图3B），并通过KEGG分析发现其互作因子在PI3K/Akt、TGF- β 等通路富集（图3C）。GO富集分析也发现上述因子与细胞分裂以及凋亡相关（图3D）。这些结果均提示CTTNBP2NL与胰腺癌的形成有密切关联。

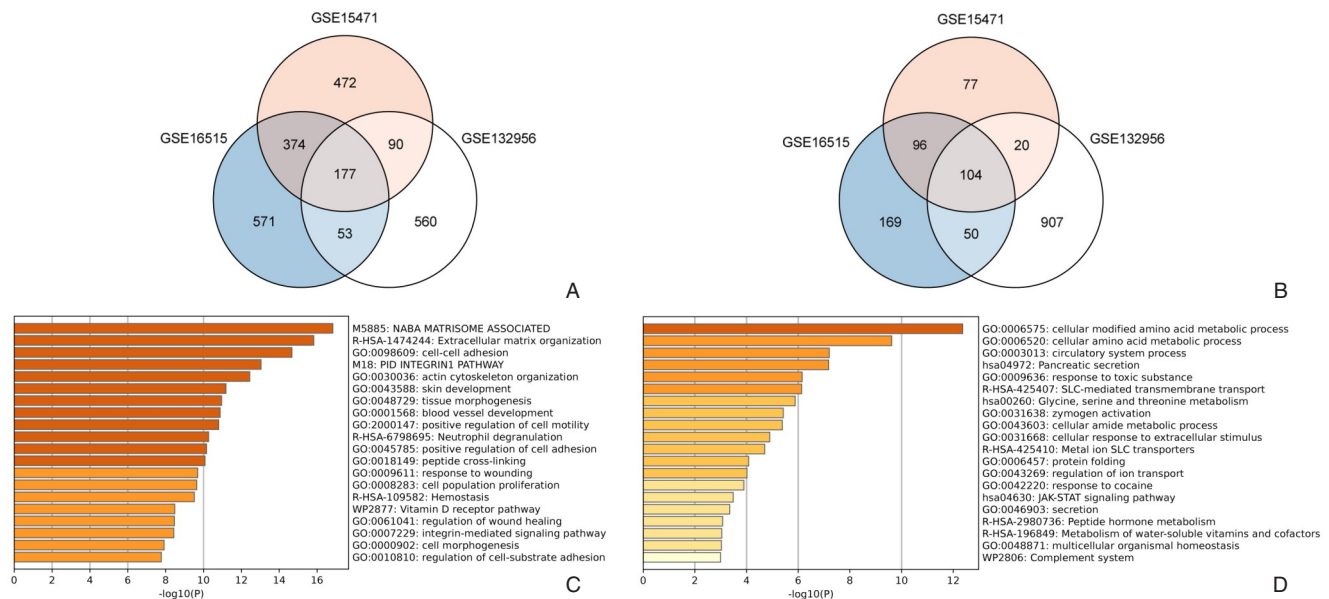


图1 胰腺癌肿瘤标本和正常标本的差异基因及功能富集基因的功能；D：共下调差异基因的功能

Figure 1 The differentially expressed genes and functional enrichment between pancreatic cancer tumor specimens and normal specimens A: The co-upregulated differential genes; B: The co-downregulated differential genes; C: Functions of co-upregulated differential genes; D: Functions of co-downregulated differential genes

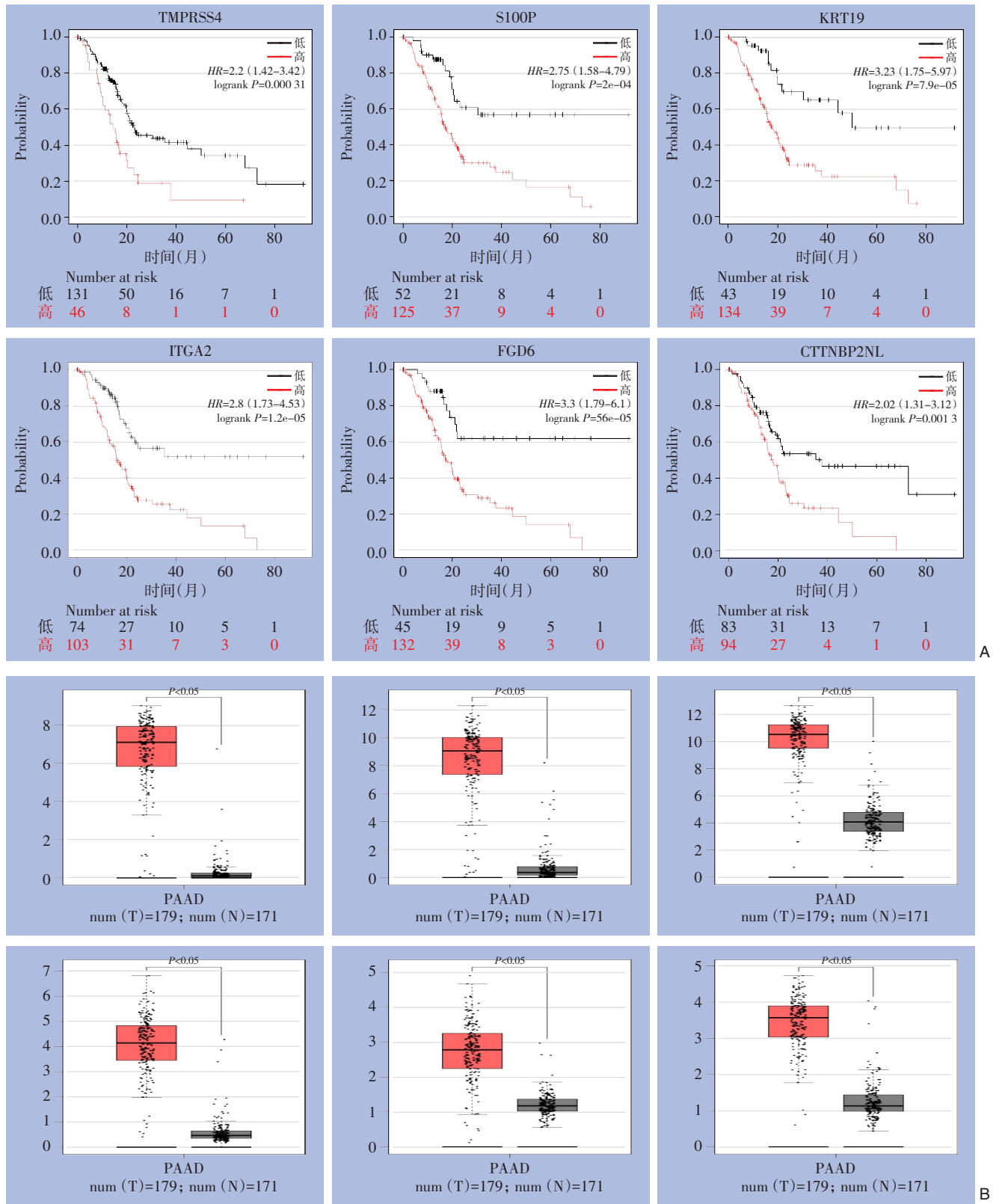


图2 胰腺癌差异基因的生存分析和表达 A: KMPLLOT分析差异基因与胰腺癌患者总生存率的关联; B: GEPIA数据库中相关基因在胰腺癌中的表达情况

Figure 2 Survival analysis and expression of differential genes in pancreatic cancer A: KMPLLOT analysis of the relationship between differential genes and the overall survival rate of pancreatic cancer patients; B: The expressions of related genes in pancreatic cancer in GEPIA database

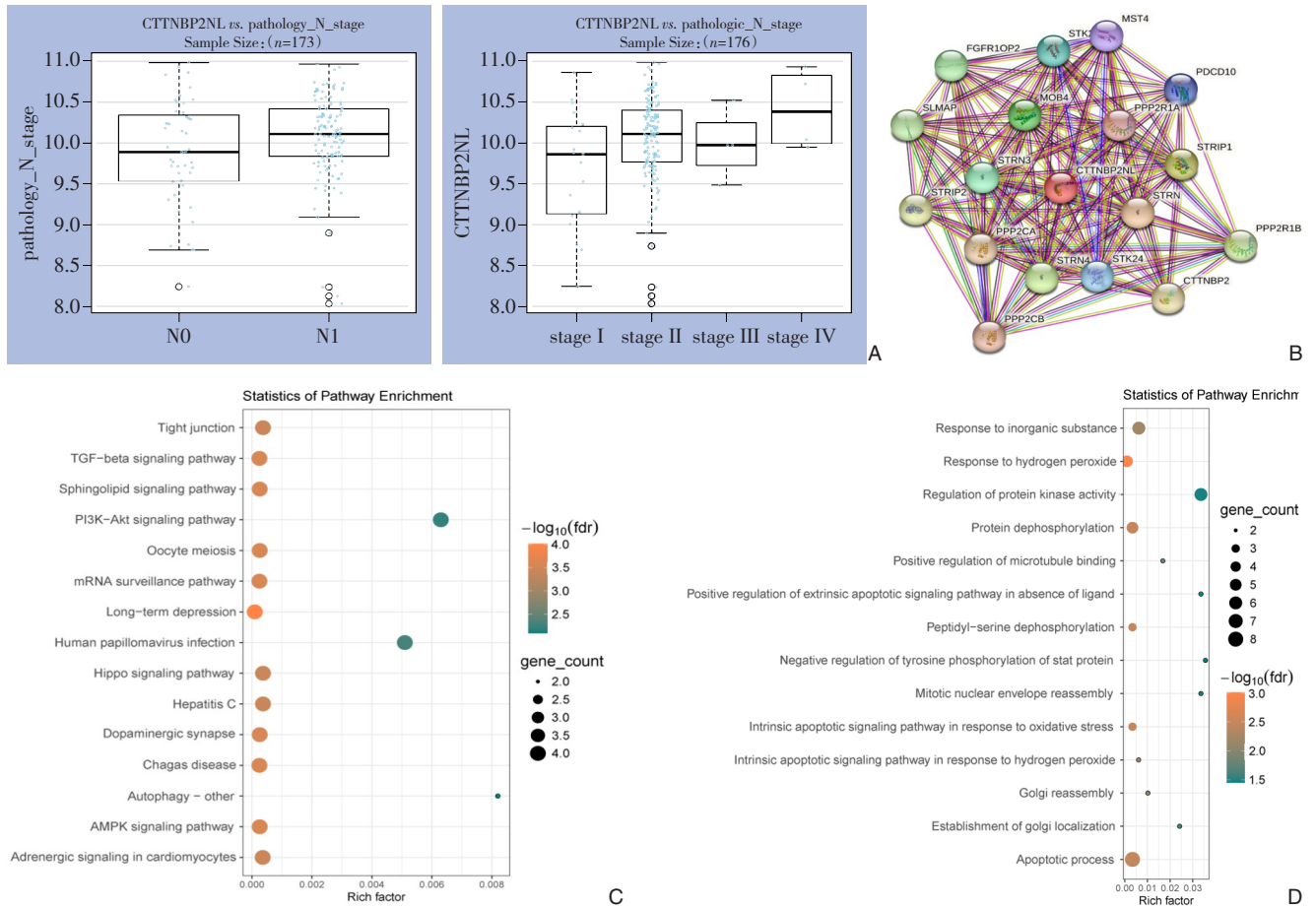


图3 CTTNBP2NL与胰腺癌的临床相关性及其功能富集 A: Linkedomics分析CTTNBP2NL与胰腺癌临床特征的相关性; B: PPI分析CTTNBP2NL的互作基因; C: KEGG分析CTTNBP2NL的互作基因功能; D: GO分析CTTNBP2NL的互作基因功能

Figure 3 Clinical relevance and functional enrichment of CTTNBP2NL in pancreatic cancer A: Linkedomics analysis of the correlation between CTTNBP2NL and clinical features of pancreatic cancer; B: PPI analysis of CTTNBP2NL interaction genes; C: Functional analysis of CTTNBP2NL's interacting genes using KEGG analysis; D: Functional analysis of CTTNBP2NL's interacting genes using GO analysis

2.4 CTTNBP2NL在胰腺癌组织和细胞系中的表达

在 GSE132956、GSE15471 和 GSE16515 数据集中均显示 CTTNBP2NL 在胰腺癌中高表达 (图 4A)。对人类蛋白图谱数据库 HPA (<https://www.proteinatlas.org>) 含有的 12 个胰腺癌样本进行分析亦显示 CTTNBP2NL 在其中 7 个样本中高表达, 5 个中表达。通过 Western blot 检测胰腺癌患者癌组织及配对癌旁正常组织中 CTTNBP2NL 的表

达 (图 4B), 同样发现胰腺癌患者癌组织中 CTTNBP2NL 蛋白水平显著高于癌旁正常组织。对商品化细胞系的检测结果与组织检测相一致, 胰腺癌细胞系 PANC-1、CFPAC-1、MIA PaCa-2 中的 CTTNBP2NL mRNA 和蛋白水平均高于正常胰腺导管上皮细胞 (图 4C-D)。以上结果表明, CTTNBP2NL 在胰腺癌中高表达。

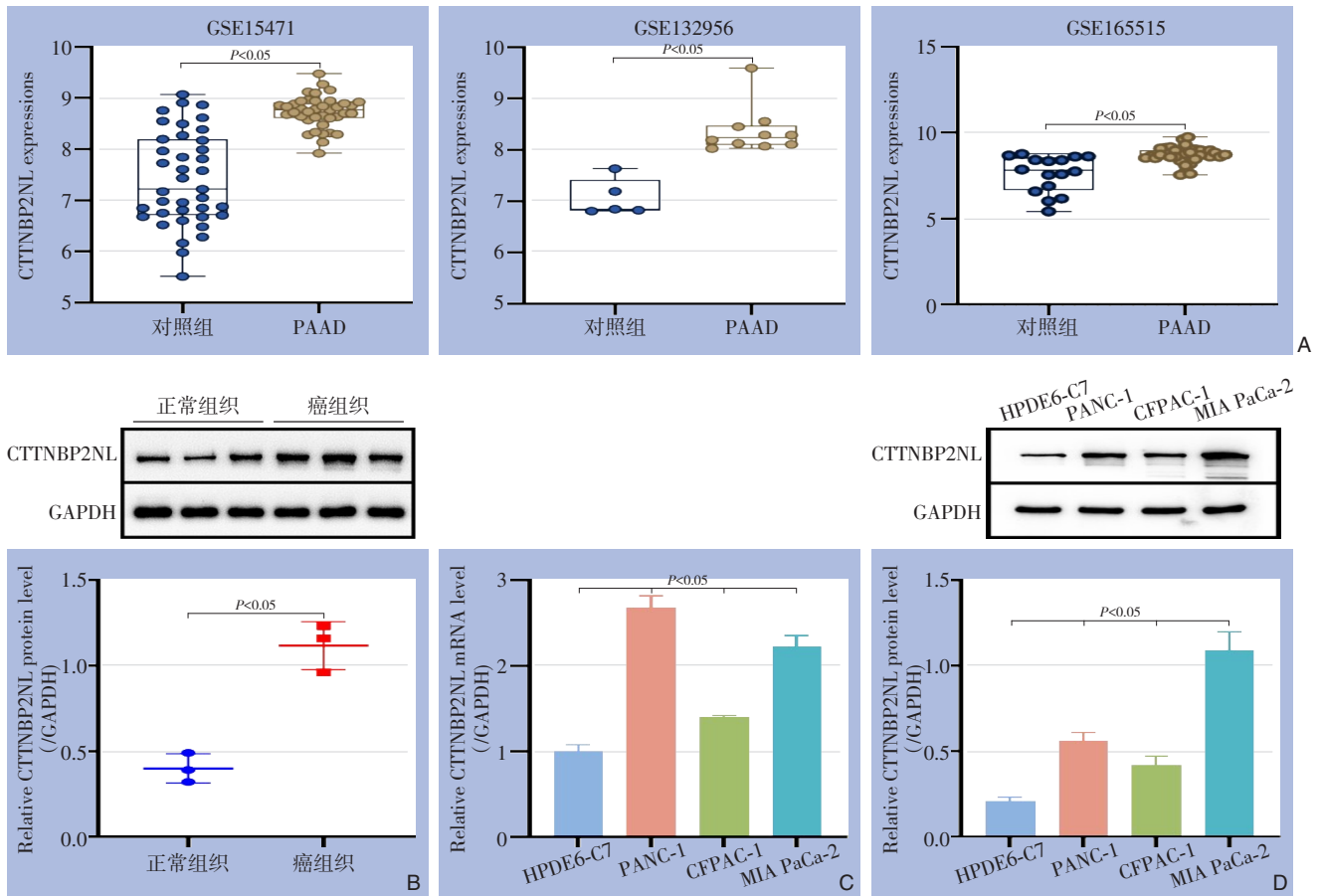


图4 CTTNBP2NL在胰腺癌中的表达 A: GSE132956、GSE15471、GSE16515数据集中CTTNBP2NL的表达; B: Western blot检测胰腺癌组织和配对癌旁组织中CTTNBP2NL的表达; C: qRT-PCR检测胰腺癌细胞系中CTTNBP2NL的表达; D: Western blot检测胰腺癌细胞系中CTTNBP2NL的表达

Figure 4 Expression of CTTNBP2NL in pancreatic cancer A: The expression of CTTNBP2NL in GSE132956, GSE15471, and GSE16515 datasets; B: Western blot detection of the expression of CTTNBP2NL in pancreatic cancer tissues and paired paracancerous tissues; C: qRT-PCR detection of CTTNBP2NL expression in pancreatic cancer cell lines; D: Western blot detection of CTTNBP2NL expression in pancreatic cancer cell lines

2.5 敲低CTTNBP2NL对胰腺癌细胞恶性表型的影响

为探究CTTNBP2NL在胰腺癌细胞中的生物学功能,通过si-CTTNBP2NL#1和si-CTTNBP2NL#2在胰腺癌细胞中抑制CTTNBP2NL的表达并通过qRT-PCR和Western blot进行验证(图5A-B)(均 $P < 0.05$)。CCK-8检测结果显示,沉默CTTNBP2NL后,胰腺癌细胞增殖活性明显降低(均 $P < 0.05$)(图5C);流式细胞术检测显示,沉默CTTNBP2NL后促进了胰腺癌细胞凋亡(均 $P < 0.05$)(图5D);通过划痕实验和Transwell分别检测细胞的迁移和侵袭,结果显示,沉默CTTNBP2NL明显抑制了胰腺癌细胞的

迁移和侵袭能力(均 $P < 0.05$)(图5E-F)。以上结果说明,敲低CTTNBP2NL能够促进胰腺癌细胞凋亡,抑制其增殖、迁移和侵袭。

2.6 CTTNBP2NL对胰腺癌中PI3K/Akt通路活性的影响

KEGG分析发现CTTNBP2NL与增殖相关信号通路PI3K/Akt相关。因此,研究进一步探究CTTNBP2NL是否能够调控PI3K/Akt通路。Western blot检测结果显示,沉默CTTNBP2NL后,PANC-1和MIA PaCa-2细胞中p-PI3K/PI3K和p-Akt/Akt的水平明显降低(均 $P < 0.05$)(图6)。说明沉默CTTNBP2NL能够抑制PI3K/Akt信号通路的激活。

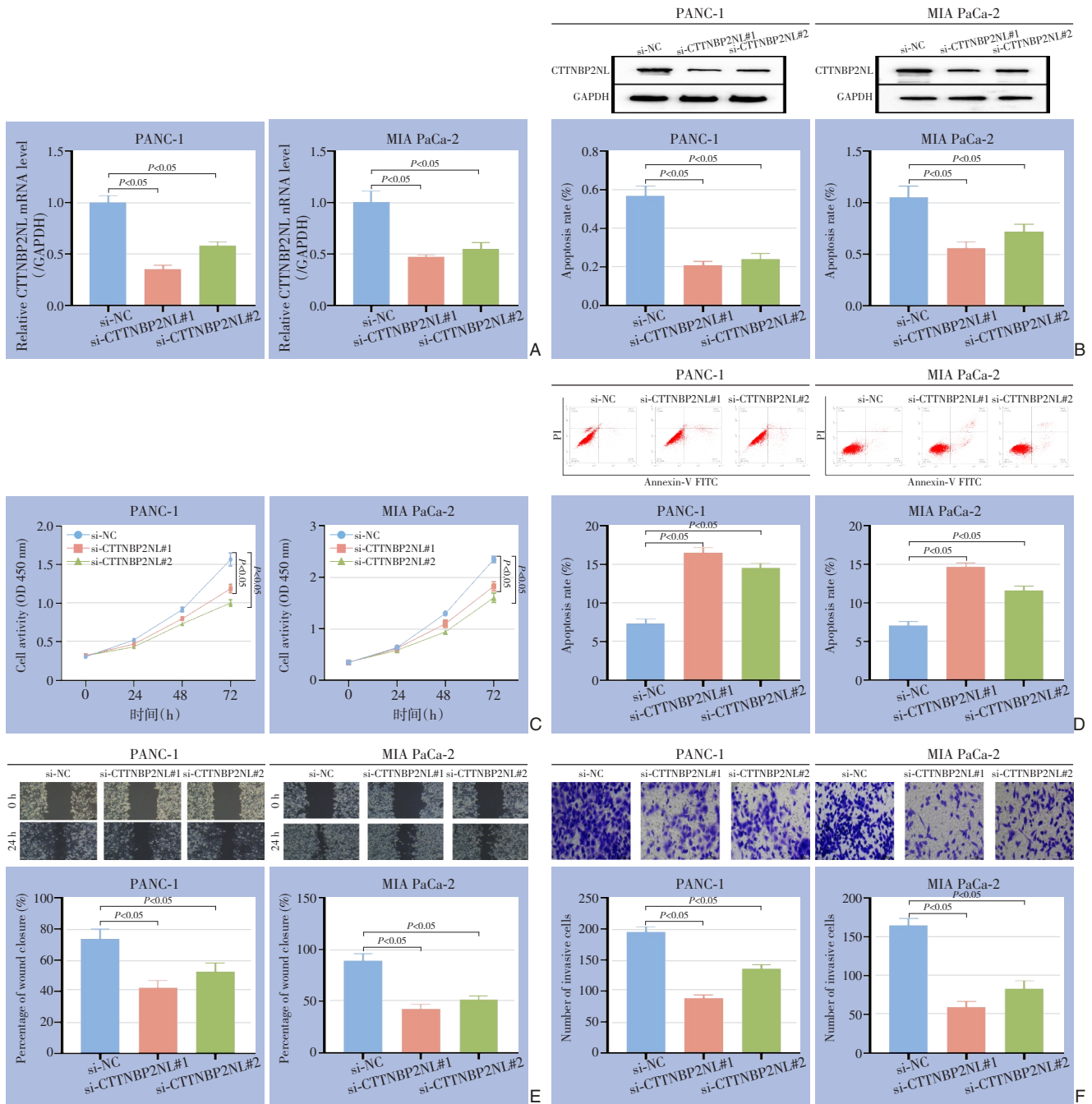


图5 敲低CTTNBP2NL对胰腺癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响 A-B: qRT-PCR、Western blot检测转染si-CTTNBP2NL及其对照的PANC-1细胞系中CTTNBP2NL的表达; C: CCK-8检测细胞增殖; D: 流式细胞术检测细胞凋亡; E: 平板划痕检测细胞迁移; F: Transwell检测细胞侵袭

Figure 5 The effect of CTTNBP2NL knockdown on proliferation, invasion and migration of pancreatic cancer cells A-B: qRT-PCR and Western blot detection of CTTNBP2NL expression in si-CTTNBP2NL transfected and control PANC-1 cell line; C: CCK-8 detection of cell proliferation; D: Flow cytometry analysis of cell apoptosis; E: Scratch assay for cell migration detection; F: Transwell assay for cell invasion

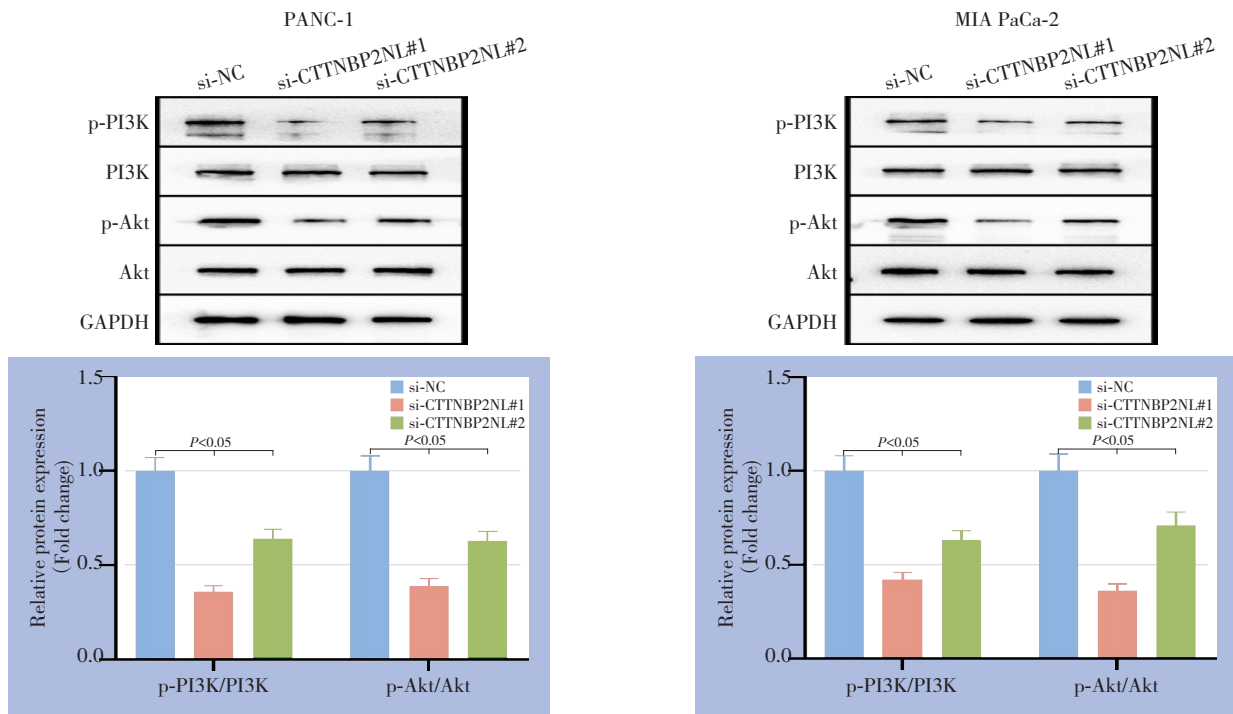


图6 敲低CTTNBP2NL对胰腺癌细胞中PI3K/Akt通路活性的影响

Figure 6 The effect of CTTNBP2NL knockdown on the activity of PI3K/Akt pathway in pancreatic cancer cells

3 讨论

胰腺癌的预后极差,因此,了解胰腺癌发病机制可能有助于产生新的生物标志物用于早期发现和治疗^[22]。近年来,许多报道表明,通过靶向胰腺癌的生物标志物能够减轻胰腺癌的进展。例如,通过敲低在胰腺癌中高表达的ABCA12能够有效地抑制胰腺癌细胞的生物学行为^[23];COL17A1与胰腺癌的预后不良高度相关,通过敲低COL17A1能够抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[24-25]。然而,胰腺癌的发病率和病死率仍然很高。因此,阐明胰腺癌的发病机制,鉴定具有高敏感度和特异度的相关分子生物标志物具有重要意义。

本研究通过整合3个基因表达数据集探索胰腺癌组织和正常组织之间差异基因,得到了177个共上调基因和104个共下调基因。功能富集分析发现差异基因富集于组织形态发生、血管形成、细胞运动、细胞增殖、代谢等肿瘤进展的关键过程。生存分析进一步揭示其中CTTNBP2NL、FGD6、ITGA2、KRT19、S100P、TMPRSS4等6个基因是胰腺癌患者生存的危险因素。此前的研究已证实TMPRSS4可在体外和体内促进胰腺癌细胞增殖并抑制细胞的凋亡^[17];S100P能够诱导上皮间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)并

激活Akt信号通路促进胰腺癌进展^[18];KRT19过表达与胰腺癌患者的癌变、进展和不良预后有关^[19];ITGA2过表达能够激活STAT3信号通路上调PD-L1从而促进胰腺癌进展^[20];FGD6被证明能够在体内外促进胰腺导管腺癌细胞增殖^[21],这些报道与生信分析的结论相印证,但CTTNBP2NL在胰腺癌中还未见报道。

CTTNBP2NL基因位于人染色体1p13.2,可编码含639个氨基酸的N末端样皮肌动蛋白结合蛋白2(CTTNBP2N-terminal like, CTTNBP2NL),与CTTNBP2同源,被证明与神经系统发生和儿童自闭症有关^[25]。有研究通过亲和纯化偶联质谱法分析,CTTNBP2NL和CTTNBP2可以和细胞骨架中的皮质肌动蛋白Cortactin直接相互作用^[26],参与促进细胞骨架actin的聚合和重排,而细胞骨架重排是肿瘤恶性行为发生的必要条件^[27]。因此,研究进一步探讨了CTTNBP2NL与胰腺癌临床病理特征的关联,通过在线分析结合临床、细胞样本验证发现CTTNBP2NL的mRNA和蛋白水平在胰腺癌组织和细胞系显著上调,并与胰腺癌TNM分型中的N分期及AJCC分级中的病理分期呈正相关性。这些结果提示CTTNBP2NL有望成为胰腺癌的新型分子生物标志物。

为揭示CTTNBP2NL与胰腺癌关联的生物学本

质, 研究又利用 PPI、GO、KEGG 分析等发现 CTTNBP2NL 的互作基因与增殖、侵袭相关通路 PI3K/Akt 通路及 TGF- β 相关, 而上述过程和通路均与癌症进展密切相关^[28]。功能测定结果表明, 利用 siRNA 敲低 CTTNBP2NL 表达显著抑制了胰腺癌细胞系 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞的增殖、迁移和侵袭, 促进了其凋亡, 说明 CTTNBP2NL 能够促进胰腺癌的进展。

机制上, 由于 KEGG 分析结果表明 CTTNBP2NL 的互作基因与 PI3K/Akt 通路相关。而 PI3K/Akt 信号通路是肿瘤中最常激活的通路之一^[29], 参与肿瘤细胞的存活、增殖、代谢、生长、转移和耐药性调控^[30-31]。有研究^[32]表明, 激活 PI3K/Akt 信号通路能够促进胰腺癌进展。因此, 研究又观察了 CTTNBP2NL 对胰腺癌中 PI3K/Akt 信号通路活性的影响, 结果显示敲低 CTTNBP2NL 的表达能够抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活。因此, CTTNBP2NL 可能是通过 PI3K/Akt 通路调节胰腺癌的进展。

然而, 本研究也存在不足之处。首先, 临床样本的选取数量较少, 这需要更多的临床样本对 CTTNBP2NL 的表达进行验证; 其次, 关于 CTTNBP2NL 在胰腺癌中的功能还进一步需要在动物模型中进行实验证实。

综上所述, 研究通过生物信息学分析筛选得到胰腺癌新型分子生物标志物 CTTNBP2NL, 并首次在胰腺癌中探究了 CTTNBP2NL 的功能, 并发现了 CTTNBP2NL 能够介导 PI3K/AKT 信号传导促进胰腺癌增殖、侵袭、迁移。提示 CTTNBP2NL 可能成为今后胰腺癌治疗的潜在靶点。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明: 欧政林、宰红艳负责实验设计与实施及论文撰写; 段艳坤、陈锦龙、朱勤、姜炜负责技术、材料、数据整合和统计学分析。

参考文献

- [1] Rebelo A, Molpeceres J, Rijo P, et al. Pancreatic cancer therapy review: from classic therapeutic agents to modern nanotechnologies[J]. *Curr Drug Metab*, 2017, 18(4): 346-359. doi: 10.2174/1389200218666170201151135.
- [2] Thomas C. Risk factors, biomarker and imaging techniques used for pancreatic cancer screening[J]. *Chin Clin Oncol*, 2017, 6(6): 61. doi: 10.21037/cco.2017.12.06.
- [3] 邓家琦, 钱保林, 张丽云, 等. 长链非编码 RNA 909 靶向调控 miR-194-5p/DACH1 轴对胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(3): 340-350. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.007.
Deng JQ, Qian BL, Zhang LY, et al. Effect of long non-coding RNA 909 on proliferation, migration, and invasion of pancreatic cancer cells by targeting regulation of miR-194-5p/DACH1 axis[J]. *China Journal of General Surgery*, 2022, 31(3): 340-350. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.007.
- [4] 杨洋, 鲍媛, 吴新华, 等. miR-526b 在胰腺癌中的表达及作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2019, 28(9): 1095-1102. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2019.09.010.
Yang Y, Bao Y, Wu XH, et al. Expression of miR-526b in pancreatic cancer and its function[J]. *China Journal of General Surgery*, 2019, 28(9): 1095-1102. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2019.09.010.
- [5] Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, et al. Pancreatic cancer[J]. *Lancet*, 2016, 388(10039): 73-85. doi: 10.1016/s0140-6736(16)00141-0.
- [6] 刘涛, 周磊, 肖晶晶, 等. 泛素/ISG15 结合酶 E2L6 在胰腺癌中的作用及其临床价值分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(3): 319-328. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.005.
Liu T, Zhou L, Xiao JJ, et al. Analysis of the function of ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2L6 in pancreatic cancer and its clinical value[J]. *China Journal of General Surgery*, 2022, 31(3): 319-328. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.005.
- [7] 臧龙军, 陈东杰, 高文哲, 等. 长链非编码 RNA SOX21-AS1 调控 miR-31-5p/MMP-16 轴对胰腺癌细胞活性与增殖的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(3): 329-339. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.006.
Zang LJ, Chen DJ, Gao WZ, et al. Effect of long non-coding RNA SOX21-AS1 on viability and proliferation of pancreatic cancer cells via modulating miR-31-5p/MMP-16 axis[J]. *China Journal of General Surgery*, 2022, 31(3): 329-339. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.006.
- [8] Qin Y, Hu QS, Xu J, et al. PRMT5 enhances tumorigenicity and glycolysis in pancreatic cancer via the FBW7/cMyc axis[J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 30. doi: 10.1186/s12964-019-0344-4.
- [9] Kulasingam V, Diamandis EP. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies[J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2008, 5(10): 588-599. doi: 10.1038/ncononc1187.
- [10] Almeida PP, Cardoso CP, de Freitas LM. PDAC-ANN: an artificial neural network to predict pancreatic ductal adenocarcinoma based on gene expression[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 82. doi: 10.1186/s12885-020-6533-0.
- [11] Yang CK, Liu ZQ, Zeng XM, et al. Evaluation of the diagnostic ability of laminin gene family for pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(11): 3679-3703.

- doi: [10.18632/aging.102007](https://doi.org/10.18632/aging.102007).
- [12] Long NP, Jung KH, Anh NH, et al. An integrative data mining and omics-based translational model for the identification and validation of oncogenic biomarkers of pancreatic cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(2):155. doi: [10.3390/cancers11020155](https://doi.org/10.3390/cancers11020155).
- [13] Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets: update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D991–995. doi: [10.1093/nar/gks1193](https://doi.org/10.1093/nar/gks1193).
- [14] Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605–612. doi: [10.1093/nar/gkaa1074](https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074).
- [15] Lániczky A, Gyórfy B. Web-based survival analysis tool tailored for medical research (KMplot): development and implementation[J]. *J Med Internet Res*, 2021, 23(7): e27633. doi: [10.2196/27633](https://doi.org/10.2196/27633).
- [16] 张莉娜, 张霁雯, 罗酩, 等. 胰腺癌组织CTTN和miR-545-3p表达水平及其与临床病理和预后的相关性研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(6): 99–103. doi: [10.3969/j.issn.1671-7414.2022.06.018](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-7414.2022.06.018).
Zhang LN, Zhang JW, Luo M, et al. Expression levels of CTTN and miR-545-3p in pancreatic cancer tissues and their correlation with clinicopathology and prognosis[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(6): 99–103. doi: [10.3969/j.issn.1671-7414.2022.06.018](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-7414.2022.06.018).
- [17] Gu JY, Huang WJ, Zhang JF, et al. TMPRSS4 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma by activating ERK1/2 signaling pathway[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:628353. doi: [10.3389/fonc.2021.628353](https://doi.org/10.3389/fonc.2021.628353).
- [18] Shen Q, Zheng G, Zhou Y, et al. CircRNA circ_0092314 induces epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via elevating the expression of S100P by sponging miR-671[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:675442. doi: [10.3389/fonc.2021.675442](https://doi.org/10.3389/fonc.2021.675442).
- [19] Yao HL, Yang ZL, Liu ZR, et al. Glypican-3 and KRT19 are markers associating with metastasis and poor prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer Biomark*, 2016, 17(4): 397–404. doi: [10.3233/CBM-160655](https://doi.org/10.3233/CBM-160655).
- [20] Ren DY, Zhao JY, Sun Y, et al. Overexpressed ITGA2 promotes malignant tumor aggression by up-regulating PD-L1 expression through the activation of the STAT3 signaling pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 485. doi: [10.1186/s13046-019-1496-1](https://doi.org/10.1186/s13046-019-1496-1).
- [21] Zhang YF, Li Q, Huang PQ, et al. A low amino acid environment promotes cell macropinocytosis through the YY1-FGD6 axis in Ras-mutant pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Oncogene*, 2022, 41(8):1203–1215. doi: [10.1038/s41388-021-02159-9](https://doi.org/10.1038/s41388-021-02159-9).
- [22] Prassas I, Chrystoja CC, Makawita S, et al. Bioinformatic identification of proteins with tissue-specific expression for biomarker discovery[J]. *BMC Med*, 2012, 10: 39. doi: [10.1186/1741-7015-10-39](https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-39).
- [23] Zheng SY, Liu DY, Wang FF, et al. ABCA12 promotes proliferation and migration and inhibits apoptosis of pancreatic cancer cells through the AKT signaling pathway[J]. *Front Genet*, 2022, 13: 906326. doi: [10.3389/fgene.2022.906326](https://doi.org/10.3389/fgene.2022.906326).
- [24] Yang J, Li YZ, Sun ZW, et al. COL17A1 facilitates tumor growth and predicts poor prognosis in pancreatic cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 632: 1–9. doi: [10.1016/j.bbrc.2022.09.049](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.09.049).
- [25] Chen YK, Chen CY, Hu HT, et al. CTTNBP2, but not CTTNBP2NL, regulates dendritic spinogenesis and synaptic distribution of the striatin-PP2A complex[J]. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(22):4383–4392. doi: [10.1091/mbc.E12-05-0365](https://doi.org/10.1091/mbc.E12-05-0365).
- [26] O'Connell ME, Sridharan D, Driscoll T, et al. The Drosophila protein, Nausicaa, regulates lamellipodial actin dynamics in a Cortactin-dependent manner[J]. *Biol Open*, 2019, 8(6): bio038232. doi: [10.1242/bio.038232](https://doi.org/10.1242/bio.038232).
- [27] Li XC, Wang JL. Mechanical tumor microenvironment and transduction: cytoskeleton mediates cancer cell invasion and metastasis[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(12):2014–2028. doi: [10.7150/ijbs.44943](https://doi.org/10.7150/ijbs.44943).
- [28] Zhang H, Zhu CH, He ZW, et al. LncRNA PSMB8-AS1 contributes to pancreatic cancer progression via modulating miR-382-3p/STAT1/PD-L1 axis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 179. doi: [10.1186/s13046-020-01687-8](https://doi.org/10.1186/s13046-020-01687-8).
- [29] Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30(2): 193–204. doi: [10.1016/j.ctrv.2003.07.007](https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.07.007).
- [30] Yang H, Liu JX, Shang HX, et al. Qingjie Fuzheng Granules inhibit colorectal cancer cell growth by the PI3K/AKT and ERK pathways [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2019, 11(5):377–392. doi: [10.4251/wjgo.v11.i5.377](https://doi.org/10.4251/wjgo.v11.i5.377).
- [31] Gu JF, Fu W, Qian HX, et al. TBL1XR1 induces cell proliferation and inhibit cell apoptosis by the PI3K/AKT pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(25): 3586–3602. doi: [10.3748/wjg.v26.i25.3586](https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i25.3586).
- [32] Xu XD, Yu Y, Zong K, et al. Up-regulation of IGF2BP2 by multiple mechanisms in pancreatic cancer promotes cancer proliferation by activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):497. doi: [10.1186/s13046-019-1470-y](https://doi.org/10.1186/s13046-019-1470-y).

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 宰红艳, 陈锦龙, 朱勤, 等. 胰腺癌关键基因CTTNBP2NL的筛选与功能验证[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(3):378–389. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.007](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.007)

Cite this article as: Zai HY, Chen JL, Zhu Q, et al. Screening and functional validation of key gene CTTNBP2NL in pancreatic cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2023, 32(3): 378–389. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.007](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.007)