



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.011
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.011
China Journal of General Surgery, 2023, 32(7):1061-1070.

· 临床研究 ·

磷脂酰肌醇转运蛋白胞质1在肝细胞癌中表达及临床意义

张赛¹, 胡宽², 朱占伟¹, 张鹏飞³

(中南大学湘雅医院 1. 医学科学研究中心 2. 普通外科 3. 卫健委肿瘤蛋白质组学重点实验室, 湖南 长沙 410008)

摘要

背景和目的: 肝细胞癌(HCC)侵袭性强, 极易发生复发转移, 临床预后差。目前HCC发生发展分子机制仍然不清楚。磷脂酰肌醇转运蛋白胞质1(PITPNC1)是一种脂质代谢相关基因, 表现出促癌作用。然而, PITPNC1是否在HCC发展中发挥作用仍然未知。因此, 本研究探讨PITPNC1在HCC中的表达及其作用。

方法: 招募2015年1月—2018年12月间中南大学湘雅医院行肝切除手术的HCC患者116例进行前瞻性队列研究, 收集患者的病历资料和组织标本, 并进行规律随访。通过免疫组化方法检测患者组织标本PITPNC1蛋白的表达, 分析PITPNC1表达和临床病理特征预后之间的关系。通过LCCLD数据库分析PITPNC1在人HCC细胞系中的表达, 利用慢病毒包装小RNA干扰PITPNC1在高侵袭转移性HCC细胞系MHCC97H中表达, 利用集落形成和皮下成瘤实验观察PITPNC1表达与HCC生长的关系, 并对皮下移植瘤行油红O染色。利用生物信息学方法分析PITPNC1作用的分子机制。

结果: PITPNC1蛋白阳性染色定位于细胞浆, 在癌组织阳性表达率为76.7% (88/116), 在癌旁组织阳性表达率为21.5% (24/116), 差异有统计学意义 ($P<0.001$)。PITPNC1高表达与卫星结节 ($P=0.041$)、血管侵犯 ($P<0.001$)、肿瘤分化 ($P=0.027$)、BCLC分期 ($P=0.009$)、TNM分期 ($P=0.028$) 明显有关。Kaplan-Meier生存分析表明, PITPNC1高表达HCC患者总体生存(OS)率与无复发生存(RFS)率均明显降低 (均 $P<0.001$); PITPNC1表达是OS率与RFS率的独立影响因素 ($HR=11.775$, 95% $CI=1.462\sim 4.082$, $P=0.006$; $HR=1.928$, 95% $CI=1.306\sim 4.889$, $P=0.004$)。PITPNC1沉默后, MHCC97H细胞体内和体外生长均明显抑制 (均 $P<0.05$)。油红O染色显示, PITPNC1表达下调后, 皮下移植瘤的脂质积累明显减少 ($P<0.05$)。数据库分析结果显示, PITPNC1过表达涉及脂质代谢相关的PPAR信号通路活性。

结论: PITPNC1是HCC新的癌基因和不良预后标志物。PITPNC1可能通过调控脂质代谢途径而在促进HCC生长过程中可能起重要作用。

关键词

癌, 肝细胞; 磷脂酰肌醇转运蛋白胞质1; 脂类代谢
中图分类号: R735.7

Expression of phosphatidylinositol transfer protein cytoplasmic 1 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

ZHANG Sai¹, HU Kuang², ZHU Zhanwei¹, ZHANG Pengfei³

(1. Institute of Medical Sciences 2. Department of Surgery 3. NHC Key Laboratory of Cancer Proteomics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82073008); 湖南省自然科学基金资助项目 (2015JJ2159); 湖南省重点研发计划资助项目 (2020SK2071)。

收稿日期: 2023-02-15; **修订日期:** 2023-03-23。

作者简介: 张赛, 中南大学湘雅医院博士研究生, 主要从事消化道肿瘤基础方面的研究。

通信作者: 张鹏飞, Email: zhangpf690421@csu.edu.cn

Abstract

Background and Aims: Hepatocellular carcinoma (HCC) is characterized by high invasiveness, frequent recurrence, and poor clinical prognosis. The molecular mechanisms underlying the occurrence and development of HCC remain unclear. Phosphatidylinositol transfer protein cytoplasmic 1 (PITPNC1) is a lipid metabolism-related gene shown to promote cancer. However, the role of PITPNC1 in the development of HCC remains unknown. Thus, this study aimed to investigate the expression and function of PITPNC1 in HCC.

Methods: A prospective cohort study was conducted on 116 patients with HCC who underwent liver resection surgery at Xiangya Hospital, Central South University, from January 2015 to December 2018. Patient medical records and tissue specimens were collected, and regular follow-ups were performed. Immunohistochemistry was used to detect PITPNC1 protein expression in patient tissue samples, and the relations of PITPNC1 expression with clinicopathologic features and prognosis were analyzed. The expression of PITPNC1 in human HCC cell lines was analyzed using the LCCLD database. Lentivirus-mediated small RNA interference was utilized to silence PITPNC1 expression in the highly invasive and metastatic HCC cell line MHCC97H. Colony formation and subcutaneous tumor experiments were performed to observe the relationship between PITPNC1 expression and HCC growth, and Oil Red O staining was conducted on the subcutaneous xenografts. Bioinformatics analysis was used to investigate the molecular mechanisms of PITPNC1 action.

Results: The PITPNC1 protein was positively stained in the cytoplasm, with a positive expression rate of 76.7% (88/116) in tumor tissues and 21.5% (24/116) in adjacent non-tumor liver tissues, and the difference was statistically significant ($P<0.001$). High PITPNC1 expression was significantly associated with satellite nodules ($P=0.041$), vascular invasion ($P<0.001$), tumor differentiation ($P=0.027$), BCLC stage ($P=0.009$), and TNM stage ($P=0.028$). Kaplan-Meier survival analysis revealed that HCC patients with high PITPNC1 expression had significantly lower overall survival (OS) and recurrence-free survival (RFS) rates (both $P<0.001$); PITPNC1 expression was an independent factor influencing OS and RFS ($HR=11.775$, 95% $CI=1.462-4.082$, $P=0.006$; $HR=1.928$, 95% $CI=1.306-4.889$, $P=0.004$). After PITPNC1 silencing, both in vitro and in vivo growth of MHCC97H cells were significantly suppressed (both $P<0.05$). Oil Red O staining showed a significant reduction in lipid accumulation in the subcutaneous xenografts following PITPNC1 downregulation ($P<0.05$). Database analysis indicated that PITPNC1 overexpression was associated with lipid metabolism-related PPAR signaling pathway activity.

Conclusion: PITPNC1 is a novel oncogene and adverse prognostic marker in HCC. It may play a significant role in promoting HCC growth by regulating the lipid metabolism pathway.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; Phosphatidylinositol Transfer protein Cytoplasmic 1; Lipid Metabolism

CLC number: R735.7

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球第六大常见癌症, 也是癌症相关死亡的第三大原因。HCC 的发病率和病死率仍在增加, 目前已成为全球最引人注目的健康问题^[1]。HCC 具有恶性程度高, 侵袭性强, 复发率高, 肿瘤细胞表型耐药等特点。由于缺乏有效的治疗方法, 5 年整体生存率仅为 10%, 但其预后仍然很差, 治疗方法的效果仍有待改进。因此, 深入了解 HCC 肿瘤发生

和进展的分子机制, 确定新的治疗靶点, 可能有助于治疗干预和预测患者预后^[2-3]。

肿瘤的发生发展是由代谢重编程驱动, 癌细胞高度依赖不同的代谢途径来维持其生存、生长和增殖^[4]。HCC 肿瘤生存、生长和转移与代谢密切相关^[5]。针对葡萄糖、脂肪酸、氨基酸和谷氨酰胺代谢中关键环节靶点, 可能有效抑制 HCC 进展^[5]。研究表明, 脂质主要在肝脏中加工, 脂质代谢不

仅提供细胞的能量需求,还提供细胞生长的原料和许多致癌途径的信号分子^[6]。肝脏脂质代谢缺陷会导致基因表达异常,并重新连接许多与肿瘤发生和转移有关的细胞通路^[7]。脂质代谢在肝代谢综合征和HCC的病理进展中起着至关重要的作用,这意味着干扰肿瘤和周围微环境中的脂质代谢可能是治疗肝癌患者的一种新型治疗方法^[8]。

磷脂酰肌醇转移蛋白胞质1(phosphatidylinositol transfer protein cytoplasmic 1, PITPNC1)具有结合和转移磷脂酸的特征,是参与多种细胞过程(包括脂质代谢)的磷脂酰肌醇转移蛋白(PITP)家族的成员^[9]。PITPNC1通过促进肿瘤血管生成、转移和恶性分泌发挥促癌作用^[10],PITPNC1还促进了胃癌的网膜转移^[11],促进了直肠癌的放疗抵抗^[12]。尽管如此,PITPNC1是否参与了HCC的发展仍然未知。本研究旨在探讨PITPNC1在HCC中的表达及其对HCC进展的影响与机制。

1 资料(材料)与方法

1.1 HCC队列建立与随访

招募中南大学湘雅医院普通外科2015年1月—2018年12月间接受肝切除治疗的116例HCC患者进入队列,其中男性88例,女性28例。患者纳入标准:(1)患者HE染色常规病理组织检查为HCC,并经2名病理医师确认,且未合并其他恶性肿瘤;(2)患者有完整的临床资料;(3)患者自愿加入队列研究进行规律随访,术后有完整随访数据。排除标准:(1)患者术前进行了放化疗、介入、射频消融术及免疫治疗;(2)肝转移癌;(3)合并心、肾等其他重要器官重大疾病以及自身免疫性疾病。收集患者临床资料并进行规律随访5年,随访间隔为6个月,随访终止时间2022年12月31日,中位随访时间38个月。队列患者配对癌与癌旁组织石蜡样本存放于中南大学湘雅医院医学科学研究中心人类重大疾病生物样本库(伦理委员会批准号:201103768)。

1.2 细胞系

人肝癌MHCC97H细胞系购自中国科学院上海细胞库。细胞接种于含有10%胎牛血清(FBS,购自美国Gibco公司)和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基(购自美国Gibco公司),并于37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养。对数生长期MHCC97H,

利用胰蛋白酶消化处理后传代、扩增、培养。

1.3 免疫组化

将HCC和邻近的癌旁组织切片脱石蜡并再水化。内源性过氧化物酶活性用3%浓度过氧化氢(H₂O₂)孵育30 min。使用微波炉热介导的抗原修复和柠檬酸钠缓冲液(pH=6.0),对切片进行热修复30 min,并在4℃下与兔多克隆抗PITPNC1抗体(购自英国Abcam公司)(工作浓度1:1 000)。PBS缓冲液漂洗后,二抗(工作浓度1:4 000)孵育1 h,并用3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)染色。切片用苏木精复染,并在显微镜下观察。用IgG代替一抗制备阴性对照。染色强度由湘雅医院病理科医生完成评分,染色强度分为弱(1分)、中(2分)和强(3分)三个等级。阳性细胞数量占切片中所有细胞数量的百分数由Image J软件测量完成。综合阳性细胞数量所占百分数乘以染色强度,使用H组织化学评分(H-Score)系统对蛋白质表达进行半定量评估^[13],H评分范围为0~300,以中位值将PITPNC1表达分为高表达组和低表达组。

1.4 细胞培养和慢病毒RNA干扰质粒转染

用慢病毒质粒pLKO.1-puro plasmid包装PITPNC1干扰RNA(shPITPNC1)或阴性对照(shNC)转染人肝癌MHCC97H细胞系。shPITPNC1与shNC购自上海GenePharma公司,根据说明书进行转染。shPITPNC1干扰序列:5'-GTT GAG ATA CAC CCG CTT CT-3';shNC干扰序列:5'-ACA ACA GCT CTA GCC CAA CT-3'。

1.5 平板克隆形成实验检测细胞集落形成能力

MHCC97H细胞以每孔1×10³个细胞密度接种至6孔板内,24 h后各组对应培养液培养,每3 d换液1次,培养2周。PBS洗涤2次,4%多聚甲醛溶液室温固定15 min,0.1%结晶紫溶液染色10 min,PBS洗涤2次,室温晾干,镜下观察集落形成情况,计数含有超过50个细胞的集落。

1.6 MHCC97细胞裸鼠皮下种植成瘤实验

裸鼠皮下种植成瘤实验参照文献^[14]。稳定转染的MHCC97H细胞扩增后,进行常规消化、离心和计数。然后将5×10⁶/mL细胞重悬于磷酸盐缓冲液中。用注射器将200 μL细胞悬液注射到裸鼠右前肢附近的皮下区域。12只裸鼠分为shPITPNC1和shNC2组。记录裸鼠的状态,称重。当皮下可触及小硬结时,每3 d用游标卡尺测量肿瘤的长度和宽

度，并以此测量值计算肿瘤的体积。饲养36 d后，注射全麻采用颈椎脱臼法处死小鼠。将肿瘤解剖、拍照并称重。所有动物实验均经中南大学动物使用伦理委员会批准(No201803664)。

1.7 油红O染色

油红O染色试剂盒购自杭州碧云天生物技术有限公司，染色操作步骤参照文献^[15]。将MHCC97H细胞皮下成瘤组织置于包埋盒中，30%浓度蔗糖脱水，然后加入适量OCT，切片10 μm厚度。PBS切片再水化并用甲醛-钙固定。然后用蒸馏水清洗切片，用60%异丙醇分化，苏木精染色。最后用甘油明胶封片。

1.8 数据库分析

LCCL数据库分析：参照LCCLD数据库(<https://lcll.zucmanlab.com/hcc/home>)^[16]，进行人肝癌细胞系中的PITPNC1 mRNA表达水平分析。STRING数据库分析：参照STRINGV11数据库(<https://cn.string-db.org>)^[17]，进行PITPNC1表达PPI网络分析。使用DAVID数据库在线工具对PITPNC1基因进行GO功能富集分析和KEGG信号通路富集分析。UALCAN数据库分析：参照UALCAN(<http://ualcan.path.uab.edu>)^[18]，用于分析癌症OMICS数据(TCGA和MET500)开放的数据库，PITPNC1共表达基因在癌组织和癌旁组织的差异表达使用UALCAN分析。

1.9 统计学处理

采用SPSS软件(版本号23.0)对本研究数据进行统计分析，计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)

表示，组间差异比较采用独立样本t检验；计数资料用例数(百分率)[$n(\%)$]表示，组间差异比较采用 χ^2 检验。生存分析用Kaplan-Meier法统计分析整体生存率，Cox比例风险模型分析影响患者预后的危险因素。用GraphPad Prism Version 9.02件分析制图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PITPNC1蛋白表达与HCC患者临床病理特征及预后的关系

116例HCC标本进行了免疫组织化学染色，PITPNC1蛋白阳性染色定位于细胞浆；对免疫组化染色进行评分统计，PITPNC1蛋白在肿瘤组织阳性表达率为76.7%(88/116)，在癌旁组织阳性表达率为21.5%(24/116)，差异有统计学意义($P < 0.001$) (图1)。根据H评分中位值(113.12)，将PITPNC1表达分为高表达组(89例)和低表达组(27例)，分析PITPNC1表达与HCC临床病理特征的相关性，结果显示，PITPNC1高表达与卫星结节($P = 0.041$)、血管侵犯($P < 0.001$)、肿瘤分化($P = 0.027$)、BCLC分期($P = 0.009$)、TNM分期($P = 0.028$)密切相关(表1)。Kaplan-Meier生存分析表明，PITPNC1表达与总体生存(overall survival, OS)率和无复发生存(relapse free survive, RFS)率降低有关(均 $P < 0.001$) (图2)，PITPNC1高表达预测HCC患者临床预后较差。

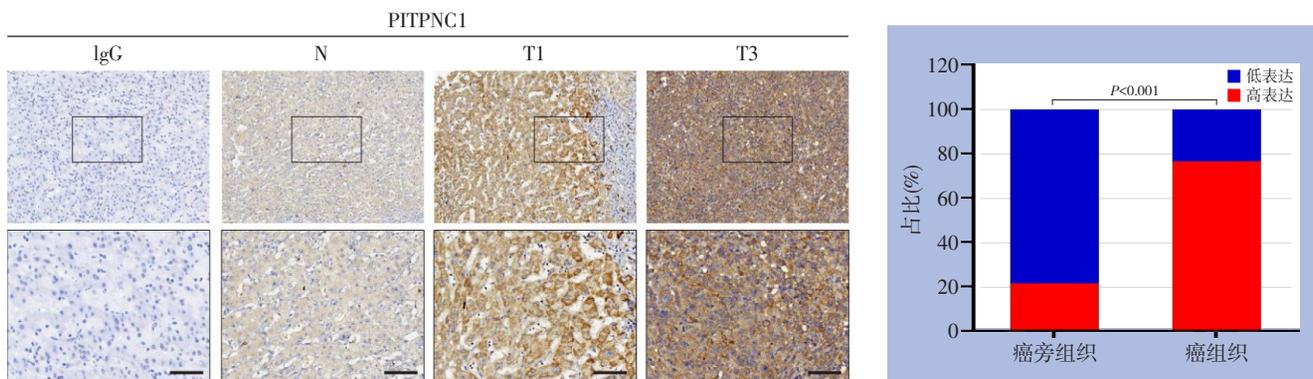


图1 免疫组化检测PITPNC1在HCC患者癌组织与癌旁组织中的表达(×200)

Figure 1 Immunohistochemical staining for expression of PITPNC1 in tumor tissues and adjacent normal tissues of HCC patients (×200)

表1 PITPNC1蛋白表达与HCC临床病理特征的关系[n (%)]

Table 1 The relationship between PITPNC1 protein expression and clinicopathologic features of HCC [n (%)]

资料	低表达组(n=27)	高表达组(n=89)	P	资料	低表达组(n=27)	高表达组(n=89)	P
年龄(岁)				肿瘤数目			
≤60	15(55.6)	52(58.4)	0.791	单个	18(66.7)	44(49.4)	0.116
>60	12(44.4)	37(41.6)		多个	9(33.3)	45(50.6)	
性别				肿瘤包膜			
男	18(66.7)	70(78.7)	0.202	有	12(44.4)	29(32.6)	0.259
女	9(33.3)	19(21.3)		无	15(55.6)	60(67.4)	
肝功能 Child-Pugh 分级				卫星结节			
A	17(63.0)	69(77.5)	0.130	无	16(59.3)	33(37.1)	0.041
B	10(37.0)	20(22.5)		有	11(40.7)	56(62.9)	
白蛋白(g/L)				血管侵犯			
≤35	5(18.5)	8(9.0)	0.169	无	20(74.1)	22(24.7)	<0.001
>35	22(81.5)	81(91.0)		有	7(25.9)	67(75.3)	
甲胎蛋白(ng/mL)				肿瘤分化			
≤200	13(48.1)	32(36.0)	0.255	I/II	19(70.4)	41(46.1)	0.027
>200	14(51.9)	57(64.0)		III/IV	8(29.6)	48(53.9)	
肝硬化				BCLC 分期			
无	6(22.2)	8(9.0)	0.064	A	16(59.3)	28(31.5)	0.009
有	21(77.8)	81(91.0)		B/C	11(40.7)	61(68.5)	
肿瘤大小(cm)				TNM 分期			
≤5	13(48.1)	27(30.3)	0.088	I	13(48.1)	23(25.8)	0.028
>5	14(51.9)	62(69.7)		II/III	14(51.9)	66(74.2)	

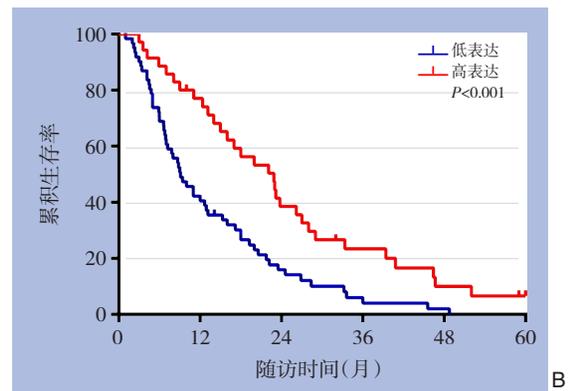
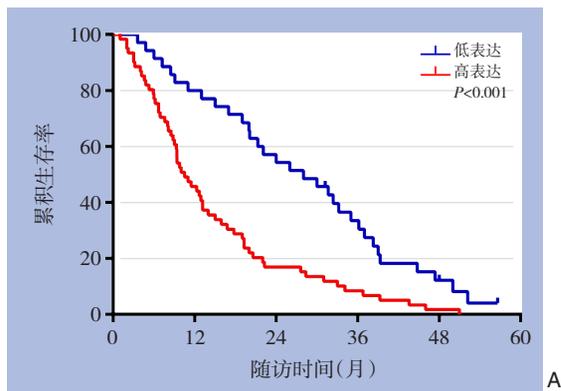


图2 不同PITPNC1表达水平患者生存曲线 A: PITPNC1高表达和低表达组OS曲线; B: PITPNC1高表达和低表达组RFS曲线

Figure 2 Survival curves of patients with different levels of PITPNC1 expression A: OS curves of patients with high and low PITPNC1 expression; B: RFS curves of patients with high and low PITPNC1 expression

2.2 HCC患者预后影响因素分析

单变量Cox回归分析表明,肝功能Child-Pugh分级(P=0.041)、肝硬化(P=0.036)、甲胎蛋白(P=0.022)、肿瘤大小(P=0.015)、肿瘤包膜(P=0.031)、肿瘤数目(P=0.010)、血管侵犯(P<0.001)、卫星结节(P=0.020)、BCLC分期(P=0.009)、TNM分期(P=0.011)和PITPNC1表达(P=0.004)与HCC患者OS明显有关;肿瘤分化(P=0.035)、甲胎蛋白

(P=0.042)、肿瘤大小(P=0.028)、肿瘤包膜(P=0.010)、肿瘤数目(P=0.031)、血管侵犯(P=0.002)、卫星结节(P=0.007)、BCLC分期(P=0.016)、TNM分期(P=0.027)和PITPNC1表达(P=0.003)与HCC患者RFS明显有关(表2)。

多变量Cox回归分析证实,肿瘤数目(HR=1.382, 95% CI=1.106~2.862, P=0.038),血管侵犯(HR=2.572, 95% CI=1.467~5.372, P<0.001),卫星

结节 ($HR=1.365$, $95\% CI=1.086\sim 2.957$, $P=0.042$), BCLC 分期 ($HR=1.566$, $95\% CI=1.127\sim 3.279$, $P=0.010$), TNM 分期 ($HR=1.489$, $95\% CI=1.108\sim 2.962$, $P=0.021$), PTPNC1 表达 ($HR=1.775$, $95\% CI=1.462\sim 4.082$, $P=0.006$) 是 HCC 患者 OS 的独立影响因素; 肿瘤包膜 ($HR=1.236$, $95\% CI=1.086\sim 2.132$, $P=0.036$), 肿瘤数目 ($HR=1.467$, $95\% CI=1.127\sim$

2.352 , $P=0.020$), 血管侵犯 ($HR=2.738$, $95\% CI=1.455\sim 7.021$, $P<0.001$), 卫星结节 ($HR=1.544$, $95\% CI=1.102\sim 2.215$, $P=0.014$), BCLC 分期 ($HR=1.562$, $95\% CI=1.186\sim 2.427$, $P=0.010$), TNM 分期 ($HR=1.416$, $95\% CI=1.105\sim 2.221$, $P=0.027$), PTPNC1 表达 ($HR=1.928$, $95\% CI=1.306\sim 4.889$, $P=0.004$) 是 HCC 患者 RFS 的独立影响因素 (表 3)。

表 2 HCC 患者 OS 与 RFS 影响因素的单变量 Cox 回归分析

Table 2 Univariate Cox regression analysis of factors influencing OS and RFS in HCC patients

变量	OS		RFS	
	HR(95% CI)	P	HR(95% CI)	P
性别(男性 vs. 女性)	1.028(0.724~1.257)	0.522	1.108(0.816~1.468)	0.302
年龄(>60岁 vs. ≤60岁)	1.136(0.852~1.521)	0.314	1.079(0.728~1.356)	0.469
乙肝表面抗原(阳性 vs. 阴性)	1.204(0.921~1.672)	0.165	1.054(0.625~1.347)	0.511
白蛋白(≤35 g/L vs. >35 g/L)	1.238(0.944~1.836)	0.082	1.168(0.957~1.544)	0.207
肿瘤分化(III/IV vs. I/II)	1.218(0.907~2.037)	0.073	1.407(1.092~2.426)	0.035
肝功能 Child-Pugh 分级(B vs. A)	1.286(1.052~1.933)	0.041	1.204(0.974~1.682)	0.076
肝硬化(有 vs. 无)	1.307(1.079~1.874)	0.036	1.195(0.893~2.035)	0.118
甲胎蛋白(>20 ng/mL vs. ≤20 ng/mL)	1.335(1.165~2.178)	0.022	1.356(1.057~2.372)	0.042
肿瘤大小(>5 cm vs. ≤5 cm)	1.467(1.251~3.096)	0.015	1.425(1.108~2.135)	0.028
肿瘤包膜(无 vs. 有)	1.395(1.086~2.318)	0.031	1.648(1.216~2.534)	0.010
肿瘤数目(单个 vs. 多个)	1.524(1.294~3.543)	0.010	1.382(1.095~2.263)	0.031
血管侵犯(有 vs. 无)	2.827(1.642~6.522)	<0.001	3.426(1.857~8.637)	0.002
卫星结节(有 vs. 无)	1.478(1.164~2.413)	0.020	1.754(1.235~3.244)	0.007
BCLC 分期(B+C vs. A)	1.603(1.152~2.757)	0.009	1.527(1.165~2.952)	0.016
TNM 分期(II/III vs. I)	1.533(1.107~2.471)	0.011	1.456(1.108~2.623)	0.027
PTPNC1 表达(高 vs. 低)	1.867(1.256~4.821)	0.004	2.105(1.422~5.755)	0.003

表 3 HCC 患者 OS 与 RFS 影响因素的多变量 Cox 回归分析

Table 3 Multivariate Cox regression analysis of factors influencing OS and RFS in HCC patients

变量	OS		RFS	
	HR(95% CI)	P	HR(95% CI)	P
性别(男性 vs. 女性)	—	—	—	—
年龄(>60岁 vs. ≤60岁)	—	—	—	—
乙肝表面抗原(阳性 vs. 阴性)	—	—	—	—
白蛋白(≤35 g/L vs. >35 g/L)	—	—	—	—
肿瘤分化(III/IV vs. I/II)	—	—	1.247(0.963~1.762)	>0.05
肝功能 Child-Pugh 分级(B vs. A)	1.055(0.779~1.308)	>0.05	—	—
肝硬化(有 vs. 无)	1.104(0.824~1.576)	>0.05	—	—
甲胎蛋白(>20 ng/mL vs. ≤20 ng/mL)	1.212(0.966~1.931)	>0.05	1.052(0.894~1.827)	>0.05
肿瘤大小(>5 cm vs. ≤5 cm)	1.173(0.891~1.853)	>0.05	1.113(0.905~1.691)	>0.05
肿瘤包膜(无 vs. 有)	1.126(0.983~1.965)	>0.05	1.236(1.086~2.132)	0.036
肿瘤数目(单个 vs. 多个)	1.382(1.106~2.862)	0.038	1.467(1.127~2.352)	0.020
血管侵犯(有 vs. 无)	2.572(1.467~5.372)	<0.001	2.738(1.455~7.021)	<0.001
卫星结节(有 vs. 无)	1.365(1.086~2.957)	0.042	1.544(1.102~2.215)	0.014
BCLC 分期(B+C vs. A)	1.566(1.127~3.279)	0.010	1.562(1.186~2.427)	0.010
TNM 分期(II/III vs. I)	1.489(1.108~2.962)	0.021	1.416(1.105~2.221)	0.024
PTPNC1 表达(高 vs. 低)	1.775(1.462~4.082)	0.006	1.928(1.306~4.889)	0.004

2.3 PITPNC1表达敲减对HCC细胞生长的影响

通过肝癌细胞系 LCCLD 数据库分析, 显示 PITPNC1 mRNA 表达水平在人类肝癌细胞系中普遍上调, 其中高侵袭转移潜能的 MHCC97H 表达上调较为明显 (图 3A)。因此, 本研究选择了 MHCC97H 细胞开展了进一步分析。鉴于 PITPNC1 的高表达水平, 选择使用 shRNA 来敲低 PITPNC1。当用 shPITPNC1 特异性转染 MHCC97H 细胞时, 集落形成结晶紫染色测定观察到与阴性对照 (shNC)

相比, PITPNC1 的沉默抑制了 HCC 的细胞体外生长 ($P<0.05$) (图 3B)。将用 shPITPNC1 或阴性对照构建体转染的 MHCC97H 皮下植入 12 只雄性裸鼠体内。36 d 后发现 MHCC97H 组的肿瘤体积值明显高于 shPITPNC1 组 ($P<0.01$) (图 3C)。进一步支持 PITPNC1 促进 HCC 增殖的作用。两组皮下瘤组织油红 O 染色显示有明显差异 ($P<0.01$), 表明 PITPNC1 表达较高的肿瘤脂质积累增加 (图 3D)。

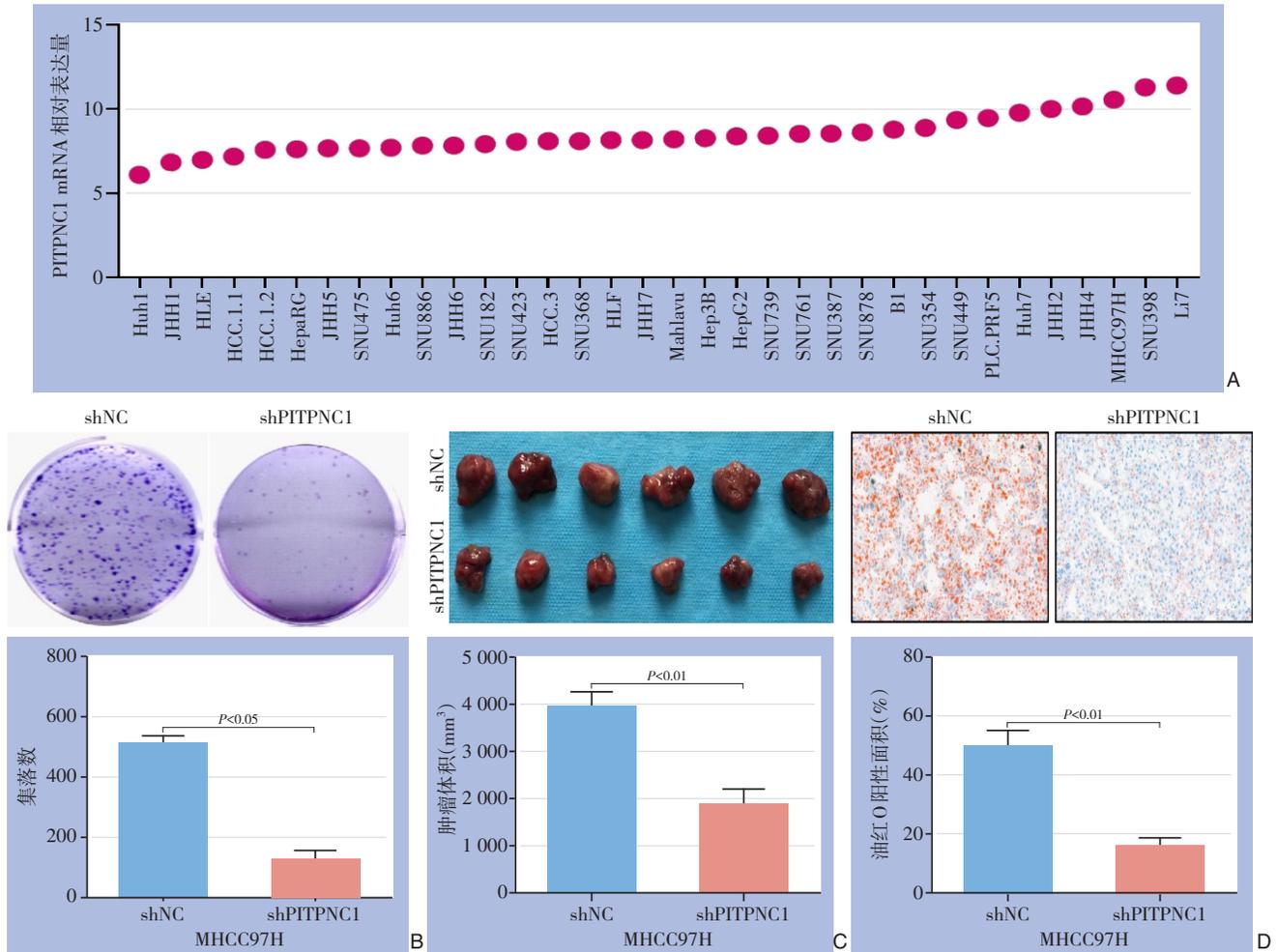


图3 PITPNC1表达对HCC细胞生长和脂质积累的影响 A: HCC细胞系LCCLD数据库分析; B: 集落形成测定; C: HCC细胞裸鼠皮下成瘤; D: 油红O染色

Figure 3 The impact of PITPNC1 expression on HCC cell growth and lipid accumulation A: Analysis of HCC cell lines in the LCCLD database; B: Colony formation assay; C: Subcutaneous tumor growth in nude mice using HCC cells; D: Oil Red O staining

2.4 PITPNC1表达调控相关信号通路及功能的预测分析

KEGG 通路分析 (图 4A) 和 GO 富集分析 (图 4B) 发现, PITPNC1 过表达涉及蛋白质翻译后修饰 (post-translational protein modification)、PPAR signaling pathway、组氨酸代谢 (histidine

metabolism)、胆固醇代谢 (cholesterol metabolism)、脂肪的消化吸收 (fat digestion and absorption)、类固醇分解代谢过程 (steroid catabolic process)、萜类代谢 (terpenoid metabolic process)。为了进一步研究 PITPNC1 在 HCC 中的分子作用基础, 将 PITPNC1 引入 STRING 数据库以获得功能性蛋白质相关网络

(图 4C)。PITPNC1 蛋白表达 PPI 网络包含血管紧张素 II 受体相关蛋白 (AGTRAP)^[19]、Ras 相关蛋白 Rab-1B (RAB1B)^[20]、脂质转移蛋白 TMEM24 (C2CD2L)、上皮膜蛋白 3 (EMP3)^[21]、锌指结构域 (HELZ)^[22]、Mer 酪氨酸激酶 (MERTK)^[23]、

胰岛素样生长因子结合蛋白 2 (IGFBP2)^[24]。由 TCGA 肝癌患者数据进行差异比较分析, 结果显示, AGTRAP、RAB1B、C2CD2L、EMP3、HELZ、ZNF385D、MERTK 在 HCC 组织中表达水平高于癌旁组织 (图 4D)。

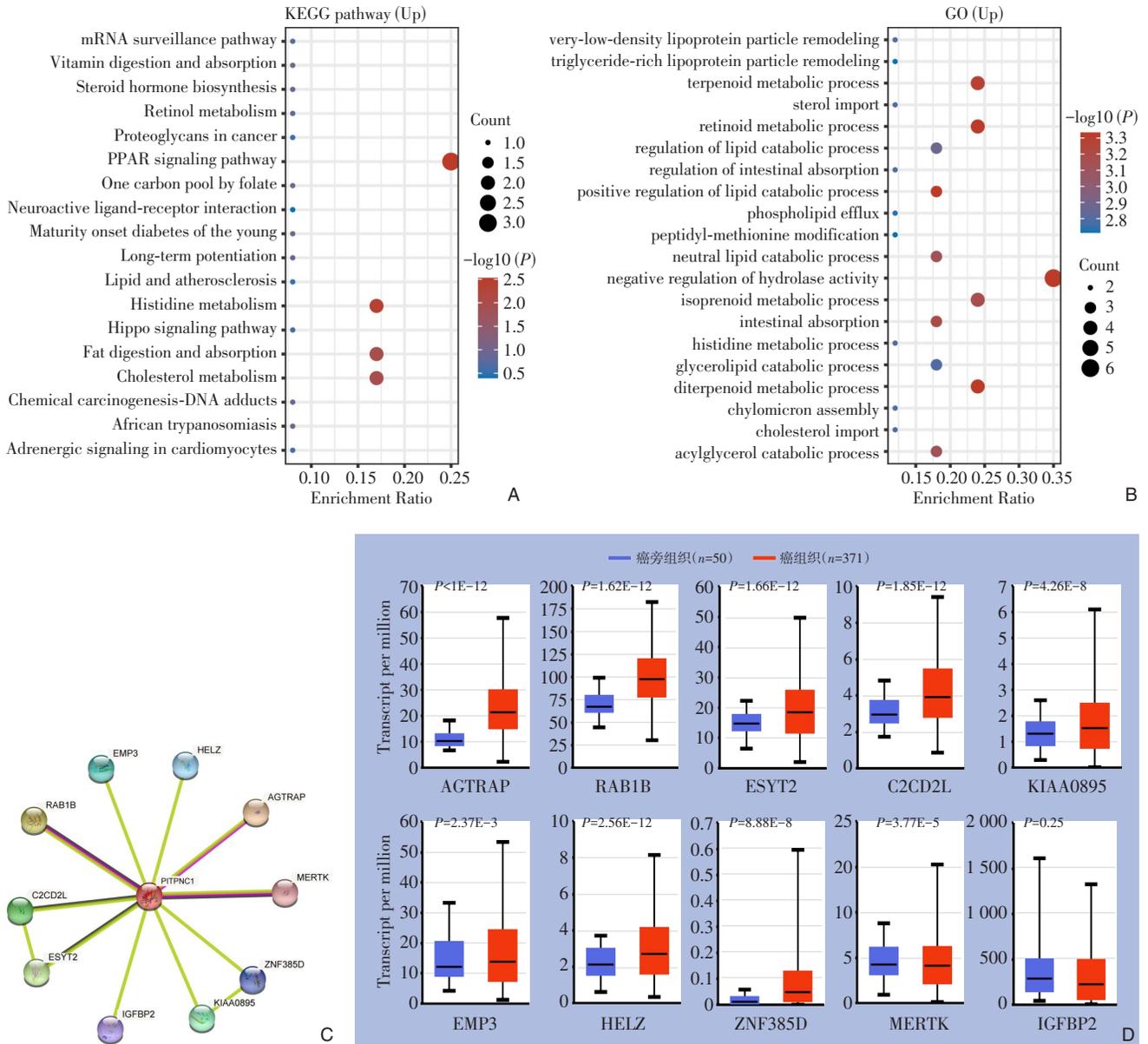


图 4 HCC 中 PITPNC1 表达的富集分析和相互作用分子的分析 A: PITPNC1 高表达组改变的 KEGG 通路图; B: PITPNC1 高表达组改变的 GO 富集图; C: 来自 STRING 数据库的 PITPNC1 相关蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络; D: TCGA 队列 HCC 患者 PITPNC1 相互作用基因的差异表达分析

Figure 4 Enrichment analysis of PITPNC1 expression and interaction molecules in HCC A: KEGG pathway altered in the high PITPNC1 expression group; B: GO enrichment plot altered in the high PITPNC1 expression group; C: Protein-protein interaction (PPI) network of PITPNC1-associated proteins from the STRING database; D: Differential expression analysis of PITPNC1 interacting genes in the TCGA cohort of HCC patients

3 讨论

本研究结果揭示了该基因的 PITPNC1 与 HCC

患者预后密切相关。PITPNC1 在 HCC 患者癌组织中显著上调, PITPNC1 水平还与肿瘤分级、大小、分期和血管侵犯程度以及 HCC 患者的 OS 和 RFS 相关。

HCC细胞中PITPNC1的敲低在一定程度上损害了癌细胞增殖能力,PITPNC1可能作为致癌因子发挥着重要作用。在本研究中,证据支持PITPNC1在HCC进展中发挥的关键作用。本研究发现PITPNC1与多种关键的癌症相关活动有关,包括脂质代谢。敲除PITPNC1在HCC细胞中表达明显抑制肿瘤细胞生长。因此,PITPNC1可能是HCC的治疗干预的可行靶点。

既往研究^[25]表明,脂质代谢是肿瘤细胞增殖的基础和必要条件。脂质代谢失调是癌症中最显著的代谢改变之一。癌细胞利用脂质代谢获取能量、生物膜成分,恶性表型以及对肿瘤微环境影响和癌症治疗作出反应所需的信号分子。越来越多的证据^[26-27]表明,调节细胞代谢可能是改善癌细胞增殖的良好策略。因此,当癌细胞转向不受控制地增殖时,阐明癌细胞中出现的复杂代谢适应性非常重要。多种脂质相关代谢基因丰度的变化与人类HCC的发生和进展有关^[28]。癌细胞中的大部分脂质重编程也在肝脏再生和直接肝增生的小鼠模型中得到了概括,这表明这些机制不一定是癌症特异性的,与肝细胞增殖更广泛相关^[29]。这对于理解脂质代谢在NASH-肝硬化与HCC相关的病理生理中的作用具有重要意义^[30]。

代谢途径的改变是癌症的标志,更深入地了解不同代谢物在致癌中的作用,对于阐明肿瘤发生和发展的机制至关重要。人类HCC脂质组的表征揭示了甘油磷脂、鞘脂、胆固醇和胆汁酸代谢的反复变化模式。这些广泛的改变包括无数的脂质种类,它们具有影响癌症的多种作用,包括异常生长信号、转移、逃避细胞死亡和免疫抑制^[31]。越来越多的证据表明免疫相关成分是癌症诊断和预后判断中有价值的标志物^[32]。本研究发现PITPNC1基因与脂质代谢和PPAR信号通路具有相关性。研究^[33]表明,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)是一种配体激活的核受体,可调节肝组织、脂肪组织和骨骼肌组织中的胰岛素敏感性、葡萄糖代谢和炎症。与PPAR γ 结合的配体会触发PPAR γ 和类视黄醇X受体异二聚化,这可能会在PPAR γ 靶基因启动子内募集共激活因子或共抑制因子至PPAR反应元件并调节其转录。过表达和敲低HCC细胞研究^[34]证实了PPAR γ 在细胞增殖、迁移和血管生成中的作用。此外PPAR信号通路与HCC肿瘤中的免疫细胞浸润程度高度相关,特别是PPAR与肝脏自然杀伤细胞和巨噬细胞水平相关^[35]。PITPNC1基因是否与

肿瘤免疫治疗的易感性之间存在联系,PITPNC1是否与肿瘤免疫标签组合更好地预测HCC预后,尚需后续研究予以证实。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:张赛负责课题设计实施、文稿撰写、提供基金资助;胡宽负责分析临床病理相关性和生物信息学;朱占伟负责收集临床组织标本;张鹏飞负责审校稿件和指导课题实施。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1):17-48. doi: 10.3322/caac.21763.
- [2] Llovet JM, Pinyol R, Kelley RK, et al. Molecular pathogenesis and systemic therapies for hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(4):386-401. doi: 10.1038/s43018-022-00357-2.
- [3] Yang SS, Cai CW, Wang HQ, et al. Drug delivery strategy in hepatocellular carcinoma therapy[J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1):26. doi: 10.1186/s12964-021-00796-x.
- [4] Faubert B, Solmonson A, DeBerardinis RJ. Metabolic reprogramming and cancer progression[J]. *Science*, 2020, 368(6487):eaaw5473. doi: 10.1126/science.aaw5473.
- [5] Du DY, Liu C, Qin MY, et al. Metabolic dysregulation and emerging therapeutical targets for hepatocellular carcinoma[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(2): 558-580. doi: 10.1016/j.apsb.2021.09.019.
- [6] Lewinska M, Santos-Laso A, Arretxe E, et al. The altered serum lipidome and its diagnostic potential for Non-Alcoholic Fatty Liver (NAFL)-associated hepatocellular carcinoma[J]. *EBioMedicine*, 2021, 73:103661. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103661.
- [7] Tan SLW, Israeli E, Ericksen RE, et al. The altered lipidome of hepatocellular carcinoma[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86(Pt 3): 445-456. doi: 10.1016/j.semcancer.2022.02.004.
- [8] Alannan M, Fayyad-Kazan H, Trézéguet V, et al. Targeting lipid metabolism in liver cancer[J]. *Biochemistry*, 2020, 59(41): 3951-3964. doi: 10.1021/acs.biochem.0c00477.
- [9] Tang GQ, Ma CX, Li LK, et al. PITPNC1 promotes the thermogenesis of brown adipose tissue under acute cold exposure[J]. *Sci China Life Sci*, 2022, 65(11): 2287-2300. doi: 10.1007/s11427-022-2157-y.
- [10] Halberg N, Sengelaub CA, Navrazhina K, et al. PITPNC1 recruits RAB1B to the Golgi network to drive malignant secretion[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(3): 339-353. doi: 10.1016/j.ccell.2016.02.013.
- [11] Tan YJ, Lin KL, Zhao Y, et al. Adipocytes fuel gastric cancer omental metastasis via PITPNC1-mediated fatty acid metabolic reprogramming[J]. *Theranostics*, 2018, 8(19): 5452-5468. doi:

- 10.7150/thno.28219.
- [12] Tan YJ, Shao RY, Li JY, et al. PTPN13 fuels radioresistance of rectal cancer by inhibiting reactive oxygen species production[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(4):126. doi: 10.21037/atm.2020.02.37.
- [13] Bitirim CV. The role of zinc transporter proteins as predictive and prognostic biomarkers of hepatocellular cancer[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e12314. doi: 10.7717/peerj.12314.
- [14] Yang XM, Cao XY, He P, et al. Overexpression of rac GTPase activating protein 1 contributes to proliferation of cancer cells by reducing hippo signaling to promote cytokinesis[J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(4): 1233–1249. doi: 10.1053/j.gastro.2018.07.010.
- [15] Ruan Y, Chen WP, Gao C, et al. REXO4 acts as a biomarker and promotes hepatocellular carcinoma progression[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2021, 12(6):3093–3106. doi: 10.21037/jgo-21-819.
- [16] Caruso S, Calatayud AL, Pilet J, et al. Analysis of liver cancer cell lines identifies agents with likely efficacy against hepatocellular carcinoma and markers of response[J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(3):760–776. doi: 10.1053/j.gastro.2019.05.001.
- [17] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607–613. doi: 10.1093/nar/gky1131.
- [18] Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses[J]. *Neoplasia*, 2017, 19(8): 649–658. doi: 10.1016/j.neo.2017.05.002.
- [19] Liu SS, Zhao W, Li XM, et al. AGTRAP is a prognostic biomarker correlated with immune infiltration in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:713017. doi: 10.3389/fonc.2021.713017.
- [20] Cavieres VA, Cerda-Troncoso C, Rivera-Dictter A, et al. Human Golgi phosphoprotein 3 is an effector of RAB1A and RAB1B[J]. *PLoS One*, 2020, 15(8): e0237514. doi: 10.1371/journal.pone.0237514.
- [21] Hsieh YH, Hsieh SC, Lee CH, et al. Targeting EMP3 suppresses proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells through inactivation of PI3K/Akt pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33): 34859–34874. doi: 10.18632/oncotarget.5414.
- [22] Dai HJ, Zeng W, Zeng WJ, et al. HELZ2 promotes K63-linked polyubiquitination of c-Myc to induce retinoblastoma tumorigenesis[J]. *Med Oncol*, 2022, 39(1):11. doi: 10.1007/s12032-021-01603-w.
- [23] Liu YZ, Lan LH, Li YJ, et al. N-glycosylation stabilizes MerTK and promotes hepatocellular carcinoma tumor growth[J]. *Redox Biol*, 2022, 54:102366. doi: 10.1016/j.redox.2022.102366.
- [24] Guo Q, Yu DY, Yang ZF, et al. IGF2BP2 upregulates ZEB1 expression and promotes hepatocellular carcinoma progression through NF- κ B signaling pathway[J]. *Dig Liver Dis*, 2020, 52(5): 573–581. doi: 10.1016/j.dld.2019.10.008.
- [25] Bian XL, Liu R, Meng Y, et al. Lipid metabolism and cancer[J]. *J Exp Med*, 2021, 218(1):e20201606. doi: 10.1084/jem.20201606.
- [26] Liu T, Wang Z, Ye L, et al. Nucleus-exported CLOCK acetylates PRPS to promote de novo nucleotide synthesis and liver tumour growth[J]. *Nat Cell Biol*, 2023, 25(2): 273–284. doi: 10.1038/s41556-022-01061-0.
- [27] Sun J, Ding J, Shen Q, et al. Decreased propionyl-CoA metabolism facilitates metabolic reprogramming and promotes hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2023, 78(3): 627–642. doi: 10.1016/j.jhep.2022.11.017.
- [28] Sangineto M, Villani R, Cavallone F, et al. Lipid metabolism in development and progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancers*, 2020, 12(6):1419. doi: 10.3390/cancers12061419.
- [29] Paul B, Lewinska M, Andersen JB. Lipid alterations in chronic liver disease and liver cancer[J]. *JHEP Rep*, 2022, 4(6): 100479. doi: 10.1016/j.jhepr.2022.100479.
- [30] Hall Z, Chiarugi D, Charidemou E, et al. Lipid remodeling in hepatocyte proliferation and hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2021, 73(3):1028–1044. doi: 10.1002/hep.31391.
- [31] Hu B, Lin JZ, Yang XB, et al. Aberrant lipid metabolism in hepatocellular carcinoma cells as well as immune microenvironment: a review[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(3): e12772. doi: 10.1111/cpr.12772.
- [32] Hu B, Yang XB, Sang XT. Construction of a lipid metabolism-related and immune-associated prognostic signature for hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(20): 7646–7662. doi: 10.1002/cam4.3353.
- [33] Zuo QZ, He J, Zhang S, et al. PPAR γ coactivator-1 α suppresses metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting Warburg effect by PPAR γ -dependent WNT/ β -catenin/pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1 axis[J]. *Hepatology*, 2021, 73(2): 644–660. doi: 10.1002/hep.31280.
- [34] Hsu HT, Sung MT, Lee CC, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ expression is inversely associated with macroscopic vascular invasion in human hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8):1226. doi: 10.3390/ijms17081226.
- [35] Lefere S, Puengel T, Hundertmark J, et al. Differential effects of selective- and pan-PPAR agonists on experimental steatohepatitis and hepatic macrophages [J]. *J Hepatol*, 2020, 73(4): 757–770. doi: 10.1016/j.jhep.2020.04.025.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:张赛,胡宽,朱占伟,等. 磷脂酰肌醇转运蛋白细胞质1在肝细胞癌中表达及临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(7): 1061–1070. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.011

Cite this article as: Zhang S, Hu K, Zhu ZW, et al. Expression of phosphatidylinositol transfer protein cytoplasmic 1 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2023, 32(7):1061–1070. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.011