

COX6B2在胃癌组织中高表达并影响患者的远期预后:基于抑制p53信号调控胃癌细胞的增殖及细胞周期

沈梦迪^{1,2}, 赵娜^{1,2}, 邓晓晶¹, 邓敏¹

¹蚌埠医学院第一附属医院消化内科, 安徽蚌埠 233004; ²蚌埠医学院, 安徽省生化药物研究工程中心, 安徽蚌埠 233030

摘要:目的 分析COX6B2在胃癌组织中的表达对患者远期预后的影响及其作用机制。方法 基于公共数据库、患者病历资料分析COX6B2在胃癌和癌旁组织中表达量及其对患者预后的影响;富集分析COX6B2在胃癌中可能发挥的作用;应用慢病毒转染技术干预COX6B2的表达;通过CCK-8、流式细胞术及免疫印迹实验验证其生物学功能。结果 TCGA数据库、免疫组化、免疫印迹和荧光定量PCR检测显示,COX6B2在胃癌组织中高表达($P<0.05$);Kaplan-Meier plotter数据库和K-M曲线显示,COX6B2高表达组生存期短($P<0.05$);统计分析发现COX6B2在胃癌组织高表达与临床病理分期、CEA及CA19-9密切相关($P<0.05$),COX6B2高表达、CEA ≥ 5 $\mu\text{g/L}$ 及CA19-9 ≥ 37 kU/L 均是影响患者术后5年生存率的独立危险因素($P<0.05$)且COX6B2表达量对患者远期预后有一定预判价值($P<0.05$);GO及KEGG富集结果显示,COX6B2主要参与细胞周期的调控等;CCK-8和流式检测显示,上调COX6B2促进细胞增殖,通过增加G1/S期细胞比例调控细胞周期($P<0.05$)。免疫印迹结果显示,COX6B2抑制胃癌细胞中p53和p21的表达($P<0.05$)。结论 COX6B2在胃癌组织中高表达且影响患者远期预后,其可能通过调控细胞周期而影响胃癌恶性增殖的过程。

关键词:胃癌;COX6B2;细胞周期;细胞增殖;远期预后;p53

High expression of COX6B2 in gastric cancer is associated with poor long-term prognosis and promotes cell proliferation and cell cycle progression by inhibiting p53 signaling

SHEN Mengdi^{1,2}, ZHAO Na^{1,2}, DENG Xiaojing¹, DENG Min¹

¹Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China; ²Anhui Provincial Biochemical Drug Research Engineering Center, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China

Abstract: Objective To investigate the effect of COX6B2 expression in gastric cancer tissues on the patients' long-term prognosis and its underlying mechanism. **Methods** Based on the public databases and the medical records of patients, we analyzed the expression level of COX6B2 in gastric cancer and adjacent tissues and its influence on long-term prognosis of the patients. Enrichment analysis were used to predict the possible role of COX6B2 in gastric cancer. The effects of lentivirus-mediated COX6B2 knockdown on biological behaviors of gastric cancer cells were examined using CCK-8 assay, flow cytometry, and Western blotting. **Results** TCGA database and the results of immunohistochemistry, Western blotting and real-time PCR all demonstrated a significantly higher expression of COX6B2 in gastric cancer tissues ($P<0.05$). Kaplan-Meier plotter database and Kaplan-Meier curves showed that the patients with high COX6B2 expression had significantly shorter postoperative survival ($P<0.05$). A high expression of COX6B2 in gastric cancer tissues was closely correlated with clinicopathologic stage, CEA and CA19-9 ($P<0.05$). A high expression of COX6B2, CEA level ≥ 5 $\mu\text{g/L}$ and CA19-9 level ≥ 37 kU/L were independent risk factors affecting postoperative 5-year survival rate of gastric cancer patients ($P<0.05$), and COX6B2 expression level had a predictive value for long-term prognosis of the patients ($P<0.05$). GO and KEGG enrichment analyses showed that COX6B2 was mainly involved in the regulation of cell cycle. In the *in vitro* cell experiment, COX6B2 overexpression significantly promoted gastric cancer cell proliferation, increased the percentage of G1/S phase cells and inhibited the cellular expressions of p53 and p21 ($P<0.05$). **Conclusions** COX6B2 is highly expressed in gastric cancer and is closely correlated with a poor long-term prognosis of the patients possibly by promoting gastric cancer cell proliferation and regulating cell cycle.

Keywords: gastric cancer; COX6B2; cell cycle; cell proliferation; long-term prognosis; p53

胃癌是严重危害人类健康的消化道肿瘤之一^[1-3]。据世界卫生组织统计2020年我国胃癌新发病例数47.9万,死亡病例数37.9万,分别占全球胃癌发病和死亡的

44.0%和48.6%^[4]。目前胃癌的治疗方式以外科手术和放化疗为主,患者5年生存期限低于30%^[5,6],这可能与肿瘤的失控性增殖、细胞周期紊乱等恶性行为有关^[7-9],深入研究调控这些行为的潜在机制,对胃癌进行靶向治疗尤为重要。细胞色素C氧化酶6B2亚基(COX6B2)又称COXVIIB2,是线粒体呼吸复合物IV的编码亚基,可以加速肿瘤细胞氧化磷酸化和NAD⁺的生成^[10,11]。研究显示COX6B2在甲状腺癌、肺腺癌、胰腺癌等组织中

收稿日期:2023-08-30

基金项目:安徽省自然科学基金(2008085MH282);2020年度高校优秀人才支持计划项目(gxyq2020023)

作者简介:沈梦迪,硕士,E-mail:shenmengdi1998@163.com

通信作者:邓敏,硕士,主任医师,E-mail:dm8558@yeah.net

表达上调可促进肿瘤的增殖和远处转移,与患者远期预后不良有关^[12-15]。然而,COX6B2在胃癌中的潜在作用尚未有相关文献报道。

本研究利用TCGA和Kaplan-Meier plotter公共数据库、本机构患者病历资料尝试分析COX6B2在胃癌组织中的表达对患者远期生存的影响,采用生物信息学预测其影响预后的潜在机制并进行体外实验验证,旨在探讨COX6B2在胃癌中的表达与患者远期预后之间的关系并分析其对胃癌细胞增殖及周期的影响。

1 资料和方法

1.1 TCGA数据收集和远期预后在线分析

从美国癌症基因组图谱计划(TCGA, <https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载407例胃癌患者的表达谱信息,其中包括胃癌组织标本375例,正常组织标本32例,用R语言“limma”工具包提取COX6B2基因表达数据并分析其在胃癌和正常胃组织中的表达情况;在Kaplan-Meier plotter在线数据分析平台检索COX6B2基因并绘制高低表达组的生存曲线。

1.2 组织标本及临床资料采集

经患者知情同意后采集胃癌和其毗邻癌旁组织,将组织标本一分为二,一份固定于中性福尔马林液中,用于病理学检测;另一份保存于液氮中,用于分子生物学检测。收集2014年6月~2017年7月在我院行胃癌根治术的100例患者临床病理资料,纳入标准:患者术后病理诊断为原发性胃癌;患者临床病历和病理资料完整;术后随访过程完整。排除标准:死于胃癌以外其他因素的患者;合并其他组织起源的恶性肿瘤的患者;因各种原因造成的失访者。依据以上标准收集患者如下疾病相关资料:住院期间临床资料:性别、年龄、术后病理诊断、肿瘤分期、肿瘤大小、肿瘤类型等;生存资料:通过电话随访确定患者肿瘤相关性死亡是否发生及时间;肿瘤标志物:癌胚抗原(CEA)及糖抗原19-9(CA19-9)。本研究已获得蚌埠医学院伦理委员会批准(2019KY030)。

1.3 检测方法

1.3.1 细胞培养和基因干预 用含10%胎牛血清和1%双抗的RPMI 1640完全培养基培养胃癌细胞(国家生物医学实验细胞资源库),培养条件为37℃、5%CO₂。取生长至对数期的胃癌细胞,调整细胞密度为1×10⁵个/mL接种至6孔板中,继续培养24h至细胞融合度达到80%后,根据细胞病毒感染复数(MOI)和病毒滴度加入相应体积COX6B2特异性干扰siRNA(CAGTGTCTAAGCCACGAATAATG)和过表达慢病毒载体感染细胞,感染3d后用1μg/mL嘌呤霉素(上海碧云天)筛选稳定沉默和过表达COX6B2的胃癌细胞,收集细胞并用免疫印迹法检测基因干预效果,当细胞转染效率达90%以上时可用于后续实验。

1.3.2 免疫组化检测 将中性福尔马林液固定后的胃癌组织进行脱水、浸蜡、石蜡包埋和制成4μm厚度切片,并置于60℃烤片3h后用二甲苯脱蜡、乙醇水化、枸橼酸钠缓冲液抗原修复、阻断剂阻断内源性过氧化物酶和5%山羊血清封闭。再将一抗COX6B2(1:200, Proteintech)滴加切片上于4℃孵育过夜,PBS洗涤3次后孵育二抗,经DAB显色、苏木素染核和中性树脂封片后于400倍显微镜下选择每张切片的5个不重复视野拍照观察,最后用Image-Pro Plus软件计算COX6B2蛋白相对积分光密度(IOD)值。以COX6B2相对表达量IOD值的中位数(4.47)为界将随访的100例患者分为COX6B2高表达组($n=50$)和低表达组($n=50$)。

1.3.3 免疫印迹检测 取冰冻的胃癌组织和基因干预后的MGC-803细胞以及SGC-7901细胞,经RIPA裂解液裂解提取总蛋白。总蛋白经BCA试剂盒蛋白定量、100℃变性10min和SDS-PAGE凝胶电泳后将蛋白转移至PVDF膜上,然后用含5%脱脂牛奶的TBST室温封闭1h,4℃过夜孵育一抗COX6B2(兔抗人多克隆抗体;1:1000;Proteintech)和GAPDH(鼠抗人多克隆抗体;1:1000;Abcam),室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗1h后用ECL发光试剂盒和化学发光成像系统(BioRad)进行曝光,最后用ImageJ软件测量目标条带灰度值。

1.3.4 qRT-PCR检测 将冰冻的胃癌组织经Trizol裂解和匀浆处理用氯仿、异丙醇和乙醇抽提总RNA,总RNA经NanoDrop™ One/OneC微量紫外-可见分光光度计测定浓度和纯度后使用RNA反转试剂盒(TaKaRa)将RNA逆转录为cDNA,以GAPDH为内参在QuantStudio DX系统进行荧光定量PCR反应,采用2^{-ΔΔCt}法计算胃癌组织中COX6B2的mRNA相对表达量。使用的引物均由上海生工公司提供,序列如下:GAPDH-forward(5'-3'): CTGGGCTACACTGAGCA CC, GAPDH-reverse(5'-3'): AAGTGGTCGTTGAGG GCAATG; COX6B2-forward(5'-3'): CCCCAAGGGG AAATGGTTCG, COX6B2-reverse(5'-3'): TCTGGTAG CAGTTACGGATCTG。

1.3.5 COX6B2基因富集分析 基于cBio-Portal数据库(<https://www.cbioportal.org>)共筛选到478例胃癌标本,其中与COX6B2共表达的基因数有22301个,以Spearman相关性系数绝对值>0.4为筛选标准,最终获得与胃癌共表达基因482个,通过DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行基因本体论分析(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集,并将分析结果可视化。

1.3.6 细胞增殖检测 按照实验分组将转染成功的MGC-803和SGC-7901细胞接种于96孔板(2×10³个/孔),在37℃、5%CO₂培养箱中继续培养24h后每孔加

入10 μL CCK-8试剂(索莱宝),孵育3 h,最后用酶标仪检测450 nm处吸光度值。

1.3.7 流式细胞术检测 根据实验分组使用胰酶消化收集转染成功的MGC-803和SGC-7901细胞于15 mL离心管,经磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,1000 g离心5 min,去上清,预冷的PBS重悬并再次沉淀细胞后加入1 mL预冷的70%乙醇固定过夜,离心并用PBS重悬,根据细胞周期检测试剂盒(上海碧云天)说明书,用0.5 mL碘化丙啶染色液重悬沉淀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min后立即采用BD流式细胞仪(FACSCanto)检测细胞,并使用Flowjo软件进行细胞周期分析。

1.4 统计学处理

数据分析采用SPSS Statistics 26.0软件,计量资料以均数 \pm 标准差表示,两组间比较采用 t 检验;计数资

料以率表示两个及以上总体率的比较采用 χ^2 检验;K-M生存分析采用Log-rank χ^2 检验;通过Cox比例风险回归模型分析影响患者术后总生存期的独立危险因素;采用受试者工作曲线(ROC)分析COX6B2预判胃癌术后患者5年癌性致死的诊断价值; $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 COX6B2在胃癌中表达上调且与患者预后不良相关

TCGA在线数据库分析结果显示,COX6B2基因在胃癌组织中的表达高于癌旁组织($P<0.05$,图1A);Kaplan-Meier plotter数据库分析显示,COX6B2高表达患者预后较差($P<0.05$,图1B)。

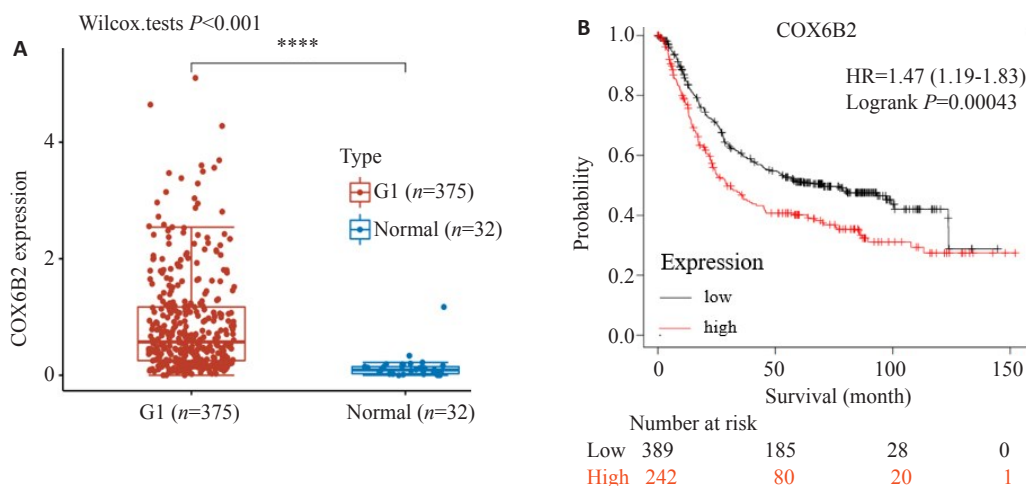


图1 TCGA数据库(A)及Kaplan-Meier plotter数据库(B)

Fig.1 Expression of COX6B2 in gastric cancer tissues and its correlation with long-term prognosis of the patients analyzed using TCGA database (A) and Kaplan-Meier plotter database (B).

2.2 COX6B2蛋白在胃癌组织中高表达

免疫组化、qRT-PCR和免疫蛋白印迹检测结果显示,胃癌组织中COX6B2的表达高于癌旁组织(图2, $P<0.05$)

2.3 胃癌组织中COX6B2表达量与外周血CEA、CA19-9正相关

胃癌组织中COX6B2相对表达量与外周血肿瘤标记物CA19-9($r=0.655$, $P<0.05$,图3A)、CEA($r=0.592$, $P<0.05$,图3B)均呈现正相关。

2.4 胃癌组织中COX6B2表达量与临床病理指标相关

COX6B2表达量与患者性别、年龄、肿瘤大小和癌细胞类型间的差异均无统计学意义($P>0.05$)。与COX6B2低表达组相比,COX6B2高表达患者比例在CEA $\geq 5 \mu\text{g/L}$ 、CA19-9 $\geq 37 \text{ kU/L}$ 、T分期为3~4期及N分期为2~3期的胃癌患者中更高($P<0.01$,表1)。

2.5 COX6B2蛋白表达量影响患者远期预后

K-M生存曲线显示,COX6B2高表达组患者5年生存率低于COX6B2低表达组($P<0.01$,图4)。

2.6 COX6B2是胃癌根治术5年生存期的独立危险因素

COX6B2高表达、CEA $\geq 5 \mu\text{g/L}$ 、CA19-9 $\geq 37 \text{ kU/L}$ 、T分期为3~4期和N分期为2~3期是胃癌根治术5年生存期的影响因素($P<0.05$,表2)。以单因素分析的阳性结果为自变量,5年生存情况为因变量进行多因素COX比例风险回归分析显示,以上因素均为预测患者术后5年生存期的独立危险因素($P<0.05$,表2)。

2.7 COX6B2蛋白表达量可预判患者术后5年生存期

ROC分析结果显示,以COX6B2相对表达量4.55为截点值预判胃癌患者术后5年生存期的敏感性为86.96%,特异性为72.22%,曲线下面积为0.816($P<0.01$,图5)。

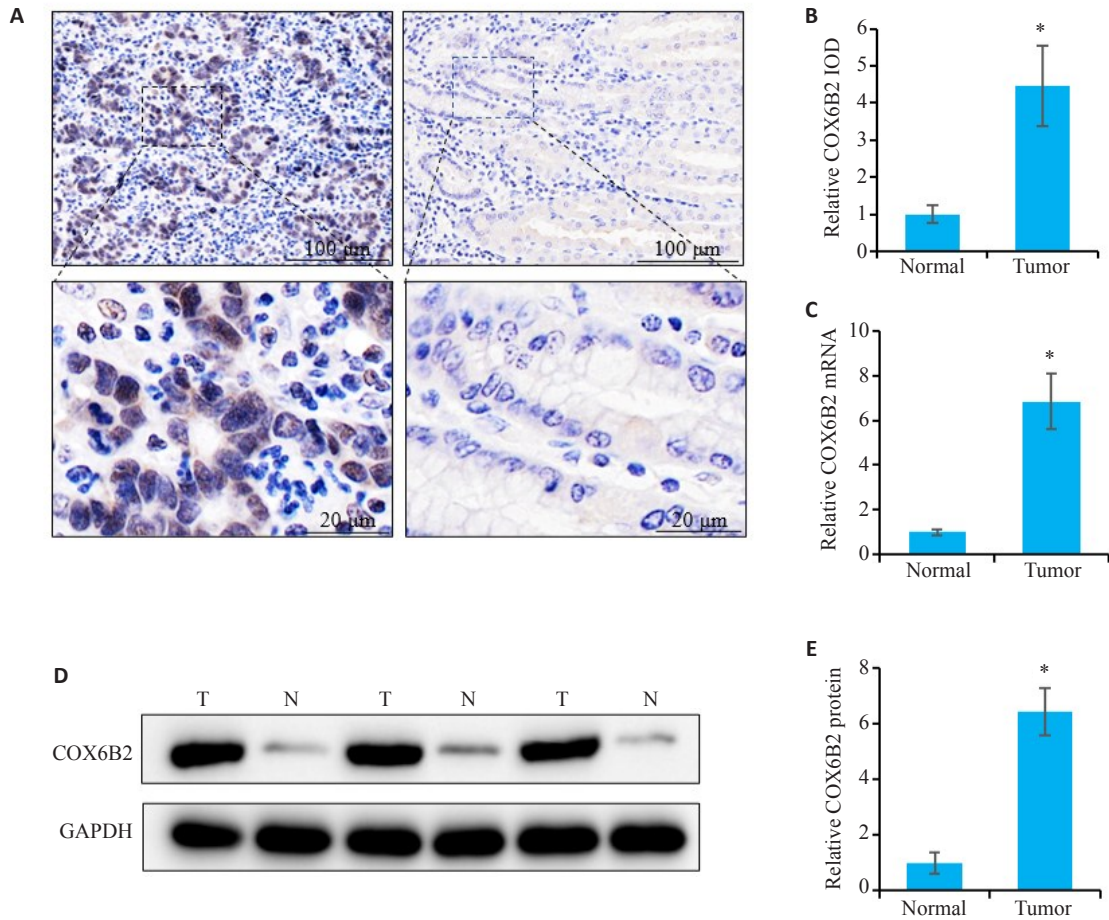


图2 COX6B2在胃癌组织中的表达

Fig.2 Expression of COX6B2 in gastric cancer tissues. A: Immunohistochemical staining of COX6B2. B: Relative IOD value of COX6B2. C: mRNA level of COX6B2 detected by RT-qPCR. D: Protein level of COX6B2 detected by Western blotting. E: Quantitative analysis of relative expression of COX6B2. * $P < 0.05$ vs Normal.

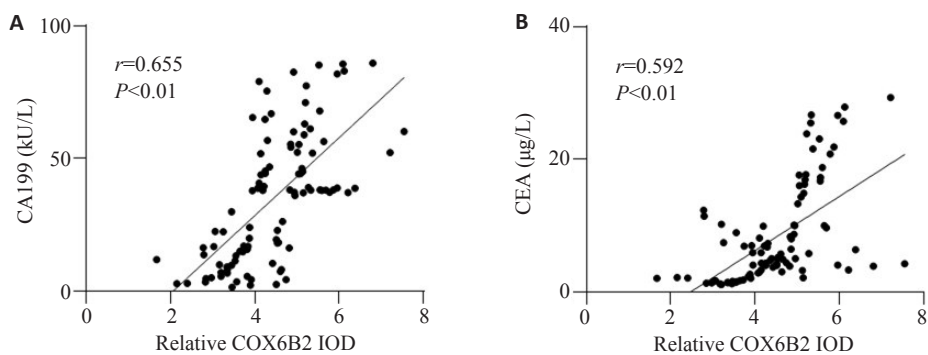


图3 胃癌组织中COX6B2表达量与外周血CEA、CA19-9的相关性

Fig.3 Correlation of the expression level of COX6B2 in gastric cancer tissues with CEA (A) and CA19-9 in peripheral blood (B).

2.8 COX6B2共表达基因富集并通路分析

KEGG-pathway和GO富集分析显示,COX6B2可能参与细胞周期的调节过程,并可能与p53信号通路相关(图6)。

2.9 COX6B2参与调控胃癌细胞周期并促进其增殖

免疫印迹实验结果显示,胃癌细胞MGC-803转染成功(图7A、B, $P < 0.05$);流式细胞术结果显示,与Control组相比,下调COX6B2后胃癌细胞周期发生G1

表1 胃癌组织中COX6B2表达量与临床病理指标间关系

Tab.1 Correlations of COX6B2 expression level with clinicopathological indexes of patients with gastric cancer [n (%)]

Characteristic	n	COX6B2		χ^2	P
		Low expression (n=50)	High expression (n=50)		
Age (year)				0.364	0.546
<60	55	29 (52.7%)	26 (47.3%)		
≥60	45	21 (46.7%)	24 (53.3%)		
Gender				0.040	0.841
Male	55	28 (50.9%)	27 (49.1%)		
Female	45	22 (48.9%)	23 (51.1%)		
Tumor size (cm)				0.164	0.685
<5	42	22 (52.4%)	20 (47.6%)		
≥5	58	28 (48.3%)	30 (51.7%)		
Cancer cell type				0.379	0.538
Adenocarcinoma	12	7 (58.3%)	5 (41.7%)		
Other	88	43 (48.9%)	45 (51.1%)		
CEA (μg/L)				25.010	<0.01
<5	49	37 (75.5%)	12 (24.5%)		
≥5	51	13 (25.5%)	38 (74.5%)		
CA19-9 (kU/L)				19.643	<0.01
<37	44	33 (75.0%)	11 (25.0%)		
≥37	56	17 (30.4%)	39 (69.6%)		
T stage				31.410	<0.01
1-2	48	38 (79.2%)	10 (20.8%)		
3-4	52	12 (23.1%)	40 (76.9%)		
N stage				17.647	<0.01
0-1	51	36 (70.6%)	15 (29.4%)		
2-3	49	14 (28.6%)	35 (71.4%)		

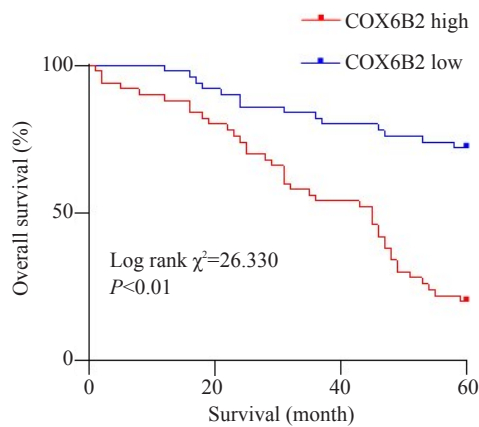


图4 胃癌组织中COX6B2表达量与患者远期预后之间的关系

Fig.4 Correlation of the expression level of COX6B2 in gastric cancer tissues with long-term prognosis of the patients.

期阻滞,上调后则相反(图7C、D, $P<0.05$);CCK-8检测结果显示,COX6B2可以显著促进胃癌细胞的增殖能力(图7E, $P<0.05$)。结果在胃癌细胞株SGC-7901细胞中同样适用(图7F~J)。

2.10 COX6B2参与调控胃癌细胞周期并促进其增殖

免疫印迹分析显示,与Control组相比,上调COX6B2抑制胃癌细胞中p53和p21的表达,下调COX6B2则促进胃癌细胞中p53和p21的表达(图8, $P<0.05$)。

3 讨论

胃癌是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤^[16],由于缺乏早期诊断指标,一旦被确诊时大多处于中晚期,导致大多数患者预后欠佳^[17,18]。因此明确胃癌的发生发展机制,寻找特异性评估远期预后的生物指标,对优化患者治疗方案,提高5年生存期有重大意义^[19]。研究发现,COX6B2在多种类型肿瘤组织中高表达,并与肿瘤细胞的恶性生物学行为(增殖、侵袭、迁移及凋亡等)息息相关。例如COX6B2可以通过促进细胞氧化磷酸化,从而加速胰腺癌细胞转移进程^[13];同时,COX6B2在肺癌中高表达,并可以促进人肺腺癌细胞的氧化磷酸化、增殖等恶性行为^[20]。以上研究初步证实了以COX6B2为靶点可能是肿瘤早期诊断以及肿瘤后期治疗的可行策略。然而,COX6B2在胃癌中的表达情况以及对胃癌细

表2 影响胃癌根治术5年生存期的单因素和多因素分析

Tab.2 Univariate and multivariate analyses of the factors affecting 5-year survival of gastric cancer patients after radical gastrectomy

Variables	Univariate analysis		Multivariate analysis		
	Log rank χ^2	P	HR	95% CI	P
Age (<60 years vs \geq 60 years)	0.309	0.578			
Gender (Male vs Female)	0.431	0.511			
Tumor size (<5 cm vs \geq 5 cm)	0.262	0.609			
Cancer cell type (Adenocarcinoma vs other)	1.126	0.289			
COX6B2 expression (high vs low)	26.335	<0.01	2.405	1.097-5.271	0.028
CEA (<5 μ g/L vs \geq 5 μ g/L)	24.368	<0.01	2.471	1.226-4.980	0.011
CA19-9 (<37 kU/L vs \geq 37 kU/L)	18.240	<0.01	2.042	1.049-3.977	0.036
T stage (T ₁ -T ₂ vs T ₃ -T ₄)	5.361	0.021	0.470	0.223-0.988	0.046
N stage (N ₀ -N ₁ vs N ₂ -N ₃)	15.984	<0.01	2.228	1.135-4.372	0.020

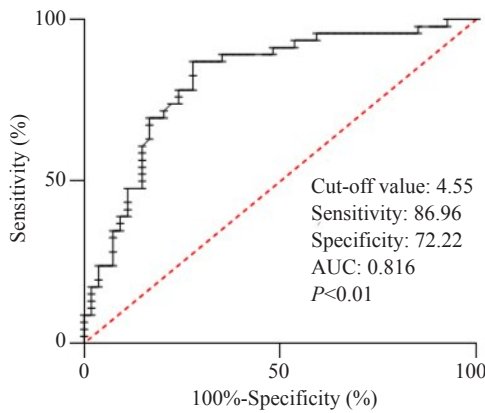


图5 COX6B2表达量对预判患者术后5年生存期的价值

Fig.5 Value of COX6B2 expression for predicting 5-year survival of gastric cancer patients after gastrectomy.

胞的可能调控作用目前尚无研究报道。本研究通过收集本机构病例信息以及患者标本组织进行分析,发现COX6B2在胃癌组织中高表达且与胃癌患者预后不良有关。并进一步采用生物信息学工具挖掘TCGA和Kaplan-Meier plotter公共数据库弥补本机构数据量偏小的局限性,同时应用生物信息学分析COX6B2影响胃癌患者预后的可能机制并在细胞水平上加以验证,初步探明了COX6B2影响胃癌患者预后的分子机理。

为探究COX6B2在胃癌中表达水平,我们对TCGA数据库中患者表达谱信息进行分析,并采用免疫组化、免疫印迹等分子生物学方法验证,发现COX6B2在胃癌组织中表达增高。目前尚未有研究阐明COX6B2表达量与胃癌病理指标间关系,CEA是出现在胎儿时期的含糖复合物,CA19-9是一种黏蛋白型

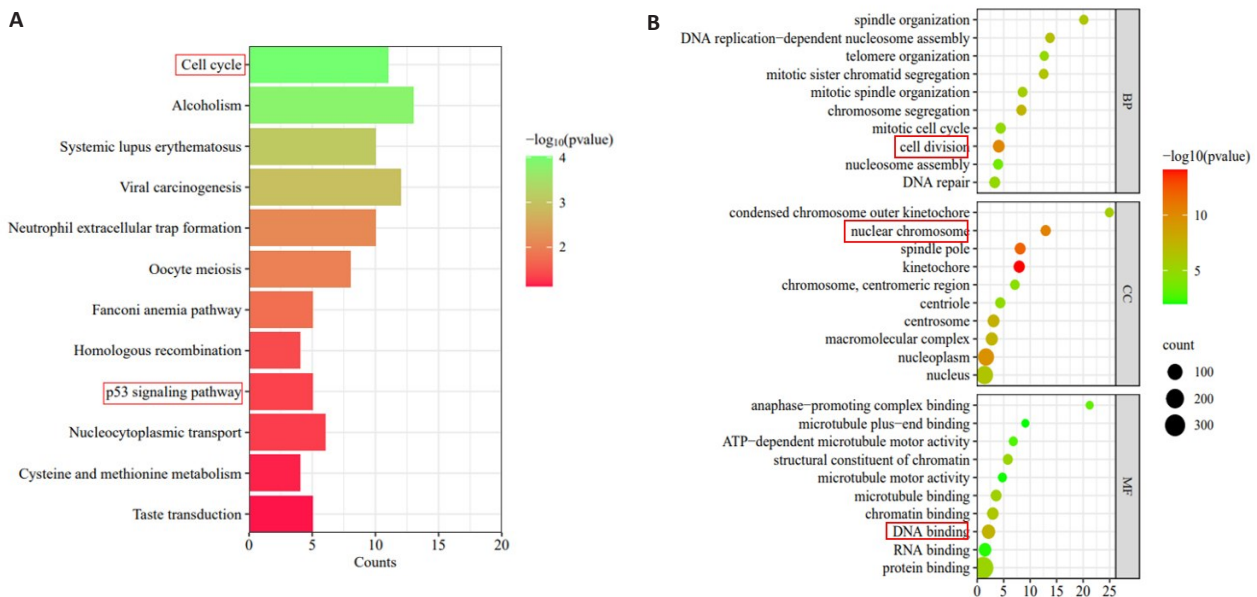


图6 COX6B2基因KEGG和GO的富集分析

Fig.6 KEGG and GO enrichment analysis of COX6B2. A: GO enrichment analysis of COX6B2 in gastric cancer; B: KEGG enrichment analysis of COX6B2 in gastric cancer.

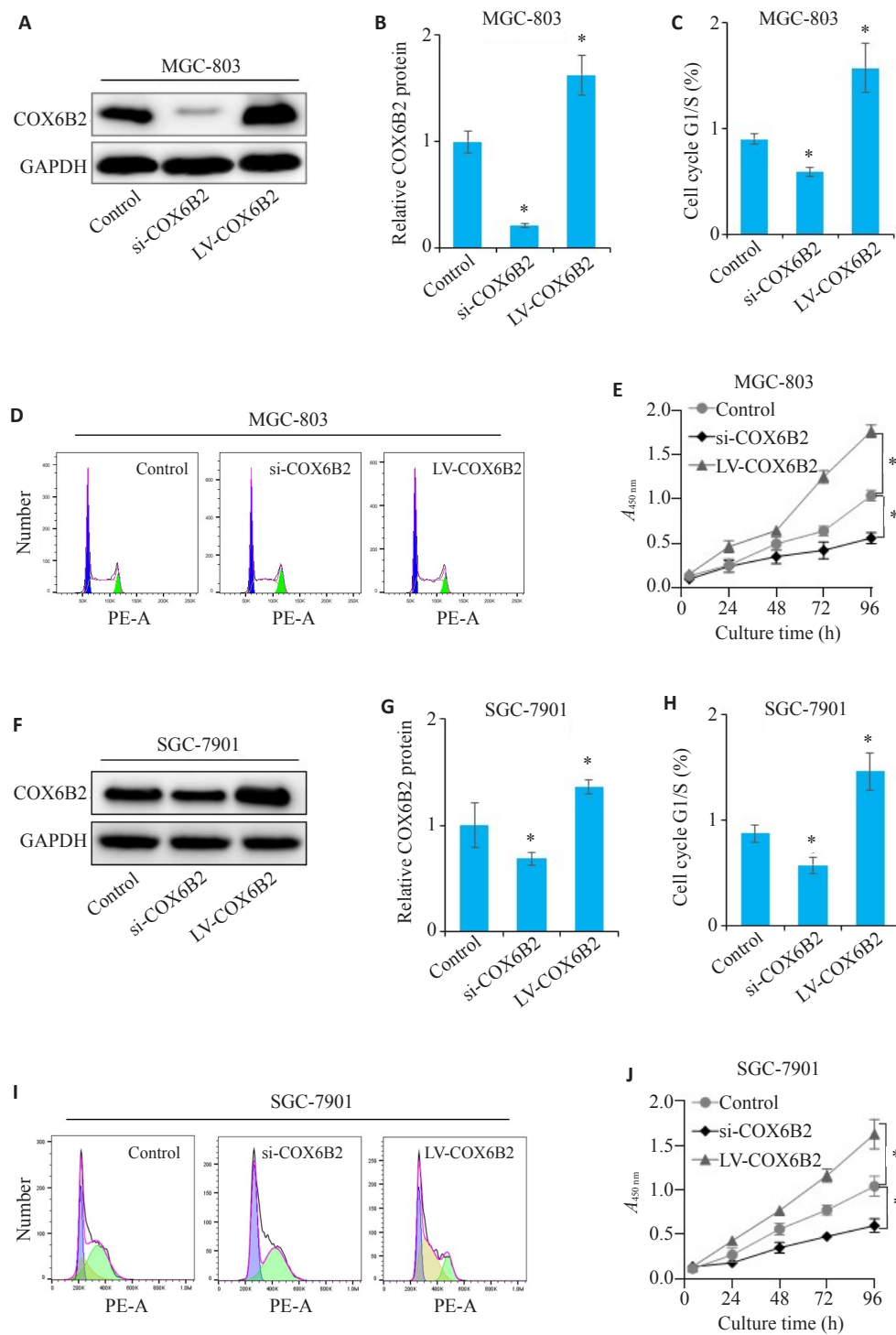


图7 COX6B2对胃癌细胞增殖和周期的影响

Fig.7 Effect of COX6B2 on proliferation and cell cycle of MGC-803 cells. **A, B:** Expression of COX6B2 detected by Western blotting in MGC-803 cells. **C, D:** Flow cytometric analysis of percentage of G1/S phase cells in MGC-803 cells. **E:** CCK-8 assay of the proliferation of MGC-803 cells. **F, G:** Expression of COX6B2 detected by Western blotting in SGC-7901 cells. **H, I:** Percentage of G1/S phase cells detected by flow cytometry in SGC-7901 cells. **J:** CCK-8 assay of proliferation of SGC-7901 cells. **P*<0.05 vs control.

的糖类蛋白,二者在消化系统肿瘤的诊疗、预后等多个方面有重要指示作用^[21,22],本研究结果显示COX6B2在胃癌组织中高表达促进肿瘤进展且与CEA和CA19-9正相关。此外,COX6B2高表达患者生存率明显低于

COX6B2低表达患者,提示COX6B2高表达可能与胃癌患者预后不良相关。研究显示COX6B2影响胰腺癌患者总生存期和无病生存期^[13],这在胃癌的研究中也得到了证实。最后,多因素COX回归分析证实COX6B2

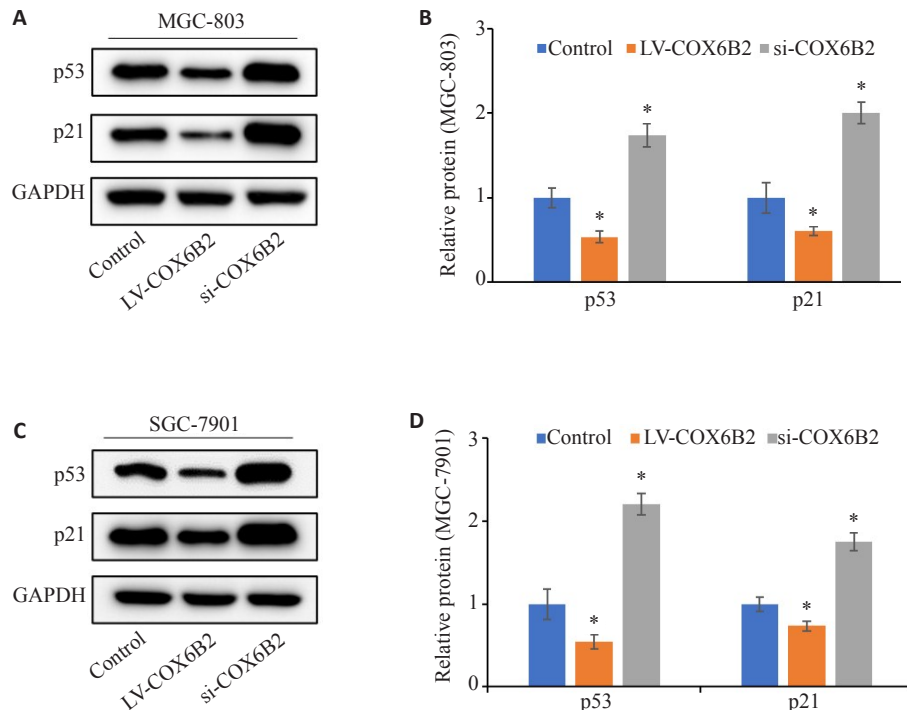


图8 COX6B2对胃癌细胞p53信号的影响

Fig.8 Effect of COX6B2 on p53 signaling in gastric cancer cells. **A, B:** Expression of p53 and p21 in MGC-803 cells. **C, D:** Expression of p53 and p21 in SGC-7901 cells. * $P < 0.05$ vs control.

是影响胃癌患者预后不良的独立因素。胃癌早期症状不典型,进展较快,寻找评估及监测患者病情进展的生物标志物尤为重要^[23,24],而本研究结果提示COX6B2可能具备作为肿瘤标志物的能力,并为胃癌的临床干预提供了新的靶点。

以上研究结果证明COX6B2在胃癌组织中的高表达参与胃癌的病理过程并影响患者远期预后。新近研究发现细胞色素c氧化酶与其他核编码蛋白构成氧化还原反应活性中心,其功能缺陷会导致线粒体的功能障碍,促进神经退行性病变的发生^[25,26],还可以通过调节PPAR信号通路促进脂肪代谢,抑制肥胖^[27]。另外,COX6B2被证实与一些肿瘤的恶性进展相关,可以通过靶向ATP/purinergic受体调节线粒体功能来促进胰腺癌的转移,是分化型甲状腺癌远处转移的新型生物标志物^[13,15],但其对胃癌的作用尚且不知。我们对公共数据库富集发现COX6B2可以调控胃癌细胞周期。接下来采用慢病毒转染方式干扰MGC-803和SGC-7901中COX6B2表达,CCK-8和细胞周期检测显示过表达COX6B2可促进细胞增殖且G1/S期细胞比例显著增加,提示COX6B2可能通过调控细胞周期影响胃癌恶性增殖过程。这一结果开辟了COX6B2调控肿瘤进展的途径,为日后COX6B2功能研究提供了新视角。为进一步阐释COX6B2作用于胃癌细胞的机制,我们通

过KEGG富集分析COX6B2作用于胃癌细胞可能于p53信号通路相关。p53是一种肿瘤抑制蛋白,可调节多种基因的表达,这些基因参与细胞凋亡、生长停滞、抑制细胞周期进程、分化和加速DNA修复或衰老,以应对基因毒性或细胞应激^[28,29]。作为转录因子,p53可激活上百种基因表达,这些靶基因直接参与细胞周期的调控、DNA损伤的修复,也与细胞衰老、分化及细胞凋亡有关^[30,31]。而p21是P53的靶点,它依赖于P53的活性。故我们检测了胃癌细胞中p53及p21的蛋白水平,研究结果显示COX6B2可以显著抑制p53信号通路的活化,提示COX6B2可能是通过抑制p53信号通路发挥作用。

本研究存在以下不足之处:本文为回顾性研究,胃癌患者样本量有限,后期还需纳入大量患者临床病历资料进行统计分析。纳入研究患者的特征具有异质性。本研究发现COX6B2可能通过调控细胞周期影响胃癌的恶性增殖,但COX6B2功能复杂,日后还需要对其进行更加深入全面的研究。

综上所述,COX6B2可能是新型的肿瘤标记物,其在胃癌组织中的高表达可能通过调控细胞周期来影响肿瘤的失控性增殖,进而影响患者远期预后。因此监测血清COX6B2的水平对评估患者远期预后具有重要临床意义。

参考文献:

- [1] Wang R, Wang YM, Wu JM, et al. Resveratrol targets AKT1 to inhibit inflammasome activation in cardiomyocytes under acute sympathetic stress[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 818127-36.
- [2] Dong YZ, Zhao QL, Wang YG. Network pharmacology-based investigation of potential targets of astragalus membranaceous-angelica sinensis compound acting on diabetic nephropathy[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 19496.
- [3] 王宁, 王一哈, 姜朋涛, 等. DNAM-1通过IL-2/STAT-5通路调节I型调节性T细胞的增殖和功能[J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(9): 1288-95.
- [4] 杨罡, 赵峻, 邓峥, 等. 基于网络药理学及分子对接研究参芪扶正注射液抗非小细胞性肺癌的作用机制[J]. *世界中医药*, 2021, 16(20): 2957-65, 2974.
- [5] Wirtz S, Popp V, Kindermann M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation[J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(7): 1295-309.
- [6] Fu GT, Xu Q, Qiu YJ, et al. Suppression of Th17 cell differentiation by misshapen/NIK-related kinase MINK1[J]. *J Exp Med*, 2017, 214(5): 1453-69.
- [7] Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(2): 93-115.
- [8] Javed A, Yarmohammadi M, Korkmaz KS, et al. The regulation of cyclins and cyclin-dependent kinases in the development of gastric cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2848-53.
- [9] Ding LD, Yang L, He YQ, et al. CREPT/RPRD1B associates with Aurora B to regulate Cyclin B1 expression for accelerating the G2/M transition in gastric cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12): 1172-9.
- [10] Chen Y, Wang YS, Liu M, et al. Diosmetin exhibits anti-proliferative and anti-inflammatory effects on TNF- α -stimulated human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through regulating the Akt and NF- κ B signaling pathways[J]. *Phytother Res*, 2020, 34(6): 1310-9.
- [11] Lee DH, Park JK, Choi J, et al. Anti-inflammatory effects of natural flavonoid diosmetin in IL-4 and LPS-induced macrophage activation and atopic dermatitis model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89: 107046-56.
- [12] Feng F, Tian YZ, Xu GH, et al. Diagnostic and prognostic value of CEA, CA19-9, AFP and CA125 for early gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 737-45.
- [13] Zhang ZY, Bao ZQ, Gao PL, et al. Diverse roles of F-BoxProtein3 in regulation of various cellular functions[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 802204-12.
- [14] Duff D, Long A. Roles for RACK1 in cancer cell migration and invasion[J]. *Cell Signal*, 2017, 35: 250-5.
- [15] Yu Y, Cai WW, Zhou J, et al. Anti-arthritis effect of berberine associated with regulating energy metabolism of macrophages through AMPK/HIF-1 α pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 87: 106830-8.
- [16] Chen J, Chen YQ, Shi YJ, et al. VX-765 reduces neuroinflammation after spinal cord injury in mice[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(9): 1836-47.
- [17] Shen MJ, Duan CC, Xie CH, et al. Identification of key interferon-stimulated genes for indicating the condition of patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 962393-8.
- [18] Li J, Zuo LG, Geng ZJ, et al. Pygopus2 ameliorates mesenteric adipocyte poor differentiation to alleviate Crohn's disease-like colitis via the Axin2/GSK3 β pathway[J]. *Cell Prolif*, 2022, 55(10): e13292-303.
- [19] Duan FX, Shi YJ, Chen J, et al. The neuroprotective role of morroniside against spinal cord injury in female rats[J]. *Neurochem Int*, 2021, 148: 105105-13.
- [20] Li JY, Chang XR, Shang MT, et al. The crosstalk between DRP1-dependent mitochondrial fission and oxidative stress triggers hepatocyte apoptosis induced by silver nanoparticles[J]. *Nanoscale*, 2021, 13(28): 12356-69.
- [21] Wen HX, Zhang XF, Li QQ, et al. Ruscogenins improve CD-like enteritis by inhibiting apoptosis of intestinal epithelial cells and activating Nrf2/NQO1 pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 4877275-87.
- [22] Qi Q, Wang XX, Li JL, et al. Neuroprotective effects of the pannexin-1 channel inhibitor: probenecid on spinal cord injury in rats[J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 848185-93.
- [23] Roy S, Kanda M, Nomura S, et al. Diagnostic efficacy of circular RNAs as noninvasive, liquid biopsy biomarkers for early detection of gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 42-50.
- [24] Chen PC, Lu YR, Kang YN, et al. The accuracy of artificial intelligence in the endoscopic diagnosis of early gastric cancer: pooled analysis study[J]. *J Med Internet Res*, 2022, 24(5): e27694-705.
- [25] Han YC, Bian ZH, Yang SY, et al. Single-cell characterization of hepatic CD8⁺T cells in a murine model of primary biliary cholangitis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 860311-9.
- [26] Liu J, Yao L, Huang SG, et al. AMG487 inhibits PRRSV replication and ameliorates lung injury in pig lung xenografts by down-regulating the expression of ANXA2[J]. *Antiviral Res*, 2022, 202: 105314-23.
- [27] Bao ZQ, Zhu RZ, Fan HG, et al. Aberrant expression of SPAG6 and NM23 predicts poor prognosis of human osteosarcoma[J]. *Front Genet*, 2022, 13: 1012548-56.
- [28] Müller W, Borchard F. Prognostic influence of p53 expression in gastric cancer[J]. *J Pathol*, 1996, 178(3): 255-8.
- [29] Yi SY, Lee WJ. A p53 genetic polymorphism of gastric cancer: difference between early gastric cancer and advanced gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(40): 6536-9.
- [30] Baek SY, Hwang UW, Suk HY, et al. Hemistepsin A inhibits cell proliferation and induces G0/G1-phase arrest, cellular senescence and apoptosis via the AMPK and p53/p21 signals in human hepatocellular carcinoma[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(5): 713-21.
- [31] Chen GP, Burger MM. p150 overexpression in gastric carcinoma: the association with p53, apoptosis and cell proliferation[J]. *Int J Cancer*, 2004, 112(3): 393-8.

(编辑:林萍)