

·ARTICLES·

·论 著·

NPLOC4通过增强 Wnt/ β -catenin 介导的线粒体自噬促进 肝细胞癌细胞增殖、侵袭和迁移

梁帅¹, 逯子川², 朱忠成¹, 唐甜甜³, 叶轲²

(1. 中南大学湘雅医院胰胆外科, 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅医院肝脏外科, 长沙 410008;
3. 湘雅博爱康复医院福源院区肿瘤科, 长沙 410199)

[摘要] 目的: 线粒体自噬失调可导致肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生与发展。核蛋白定位4同源物(nuclear protein localization 4 homolog, NPLOC4)是多种细胞过程中的必需蛋白质, 与多种肿瘤有关。研究表明 NPLOC4 参与线粒体自噬的调节, 但其在 HCC 中的作用仍不清楚。本研究旨在探究 NPLOC4 在 HCC 线粒体自噬中的作用及调控机制。方法: 对来源于基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)的 GSE277232 和 GSE251942 数据集中的 RNA 测序数据和来源于 GeneCards 数据库的线粒体自噬相关基因进行分析, 筛选出 HCC 中与线粒体自噬相关的差异表达基因, 并对 NPLOC4 的表达进行分析, 同时通过蛋白质印迹法进行验证。采用干扰小 RNA(small interfering RNA, siRNA)敲低 HCC 细胞中 NPLOC4 的表达以进行功能缺失试验。采用线粒体自噬相关蛋白质表达分析、透射电子显微镜、免疫荧光染色方法来分析线粒体自噬水平。结果: 通过生物信息学筛选发现, NPLOC4 是一种关键的线粒体自噬相关差异表达基因。NPLOC4 在 HCC 中显著高表达, 并与不良临床预后相关(均 $P < 0.05$)。敲低 NPLOC4 抑制了 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭, 并促进了细胞凋亡(均 $P < 0.05$)。此外, 敲低 NPLOC4 还抑制了 HCC 细胞线粒体自噬和 Wnt/ β -catenin 信号通路(均 $P < 0.05$)。使用 Wnt 激动剂 BML-284 后, NPLOC4 敲低对线粒体自噬的抑制作用被抵消($P < 0.05$), 这表明 NPLOC4 敲低通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路调控线粒体自噬。使用线粒体自噬诱导剂羰基氰化物间氯苯腙(carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone, CCCP)后, 也逆转了 NPLOC4 敲低对 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用(均 $P < 0.05$), 这表明 NPLOC4 敲低通过调节线粒体自噬抑制 HCC 进程。结论: NPLOC4 在 HCC 中呈高表达。下调 NPLOC4 表达可抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活, 进而抑制线粒体自噬, 最终抑制 HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭。NPLOC4 可能作为 HCC 潜在的生物标志物及治疗靶点。

[关键词] 肝细胞癌; NPLOC4; 线粒体自噬; 增殖; 迁移; 侵袭

NPLOC4 promotes proliferation, invasion, and migration of hepatocellular carcinoma cells via enhancing Wnt/ β -catenin-mediated mitophagy

Liang Shuai¹, Lu Zichuan², Zhu Zhongcheng¹, Tang Tiantian³, Ye Ke²

收稿日期(Date of reception): 2026-04-21

第一作者(First author): 梁帅, Email: doctorbach@csu.edu.cn, ORCID: 0009-0009-8796-4606

通信作者(Corresponding author): 叶轲, 副教授, Email: 404479@csu.edu.cn, ORCID: 0009-0005-5743-6723

基金项目(Foundation item): 湖南省自然科学基金(2023JJ30910, 2025JJ90293)。This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province, China (2023JJ30910, 2025JJ90293).

开放获取(Open access): 本文遵循知识共享许可协议, 允许第三方用户按照署名-非商业性使用-禁止演绎 4.0(CC BY-NC-ND 4.0)的方式, 在任何媒介以任何形式复制、传播本作品(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)。

- (1. Department of Biliary and Pancreatic Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;
2. Department of Hepatology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;
3. Department of Oncology, Fuyuan Campus, Xiangya Boai Rehabilitation Hospital, Changsha 410199, China)

ABSTRACT

Objective: Dysregulation of mitophagy contributes to the initiation and progression of hepatocellular carcinoma (HCC). Nuclear protein localization 4 homolog (NPLOC4) is an essential protein involved in various cellular processes and has been implicated in multiple cancers. Recent studies have suggested that NPLOC4 participates in the regulation of mitophagy; however, its role in HCC remains unclear. This study aims to investigate the role of NPLOC4 in mitophagy and its underlying regulatory mechanisms in HCC.

Methods: RNA sequencing data from the GSE277232 and GSE251942 datasets obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database were analyzed together with mitophagy-related genes collected from the GeneCards database to identify differentially expressed mitophagy-related genes in HCC. NPLOC4 expression was further analyzed and validated by Western blotting. Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of *NPLOC4* was performed in HCC cells for functional loss-of-function assays. Mitophagy levels were evaluated by analyzing the expression of mitophagy-related proteins, transmission electron microscopy, and immunofluorescence staining.

Results: Bioinformatics analysis identified *NPLOC4* as a key differentially expressed mitophagy-related gene. NPLOC4 was significantly upregulated in HCC tissues and was associated with poor clinical prognosis (all $P < 0.05$). Knockdown of *NPLOC4* inhibited HCC cell proliferation, migration, and invasion, while promoting apoptosis (all $P < 0.05$). In addition, *NPLOC4* knockdown suppressed mitophagy and the Wnt/ β -catenin signaling pathway in HCC cells (all $P < 0.05$). Treatment with the Wnt agonist BML-284 abolished the inhibitory effect of *NPLOC4* knockdown on mitophagy ($P < 0.05$), indicating that NPLOC4 regulates mitophagy through activation of the Wnt/ β -catenin pathway. Furthermore, treatment with the mitophagy inducer carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) reversed the inhibitory effects of *NPLOC4* knockdown on HCC cell proliferation, migration, and invasion (all $P < 0.05$), suggesting that *NPLOC4* silencing suppresses HCC progression by regulating mitophagy.

Conclusion: NPLOC4 is highly expressed in HCC. Downregulation of NPLOC4 inhibits activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, thereby inhibiting mitophagy and ultimately inhibiting HCC cell proliferation, migration, and invasion. These findings suggest that NPLOC4 may serve as a potential biomarker and therapeutic target for HCC.

KEY WORDS

hepatocellular carcinoma; NPLOC4; mitophagy; proliferation; migration; invasion

原发性肝癌是第六大常见的癌症类型,也是癌症相关死亡的第三大原因^[1]。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌的主要组织学类型,在肝癌诊断和死亡病例中占绝大多数。尽管进行了广泛的努力,晚期HCC的治疗选择仍然有限,5年生

存率仍然很低^[2]。因此,识别和了解导致肿瘤发生与发展的分子机制至关重要。

线粒体自噬是一种选择性的自噬形式,其通过去除受损的线粒体,从而维持线粒体和细胞的稳态^[3]。近年来,线粒体自噬因其在肿瘤发生和进展中

的双重作用而受到更多关注。在癌症的早期阶段, 线粒体自噬通过消除受损的线粒体, 减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生, 从而维持细胞内稳态^[4]。例如, PTEN 诱导的假定激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1) 和 Parkin 是泛素依赖性线粒体自噬途径中的关键蛋白质^[5], 已被证明在肿瘤抑制中至关重要^[6]。相反, 在晚期肿瘤阶段, 线粒体自噬通过调节肿瘤微环境中的代谢需求、细胞存活和炎症状态来促进肿瘤侵袭和转移^[4]。例如, 铁氧还蛋白 1 (ferredoxin 1, FDX1) 通过下调线粒体自噬和 PI3K/Akt 信号通路, 诱导 ROS 产生, 从而促进 HCC 进展^[7]。然而, 线粒体自噬在 HCC 中的失调机制尚不完全清楚。

核蛋白定位 4 同源物(nuclear protein localization 4 homolog, NPLOC4)是多种细胞过程中的必需蛋白质, 特别是与内质网相关的细胞过程。它作为含缬酪蛋白[valosin-containing protein (p97), p97/VCP]复合物的辅助因子, 通过泛素-蛋白酶体系统对蛋白质的质量控制和降解至关重要^[8]。NPLOC4 已被证实与多种肿瘤有关^[9], 还可通过 β -catenin/糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)通路调节线粒体自噬, 加重心力衰竭^[10]。此外, Wnt/ β -catenin 信号通路 with 细胞功能和疾病进展中的线粒体自噬有着密切关系。例如, 沉默驱动蛋白家族成员 23 (kinesin family member 23, KIF23) 通过 Wnt/ β -catenin 通路调节线粒体自噬, 抑制甲状腺乳头状癌转移^[11]。然而, 关于 NPLOC4 是否通过 Wnt/ β -catenin 通路调节线粒体自噬参与 HCC 进展的研究较少。

本研究旨在探究 NPLOC4 在 HCC 进程中的关键作用, 明确其与线粒体自噬的关联及潜在机制, 以期为 HCC 的诊断和靶向治疗提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 数据来源

使用基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 中的 GSE277232 和 GSE251942 数据集来确定差异表达的 mRNA, 并分析 NPLOC4 mRNA 的表达。通过 R 软件包 survminer 绘制 NPLOC4 相关的 Kaplan-Meier 生存分析曲线。

1.2 细胞培养

本研究使用人正常肝细胞 THLE-2 (购自长沙艾碧维生物科技有限公司) 和 HCC 细胞 HepG2 (购自武汉普诺赛生命科技有限公司)、Huh7 (购自武汉普诺赛生命科技有限公司)、Huh6 (购自武汉普诺赛生命科技有

限公司)、MHCC-97H (购自长沙艾碧维生物科技有限公司)。细胞在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。HepG2、Huh7、Huh6 细胞使用含 1% 抗生素和 10% 胎牛血清 (均购自美国 Sigma-Aldrich 公司) 的 DMEM 培养基。MHCC-97H 细胞使用含 1% 抗生素和 10% 胎牛血清的 MEM 培养基。定期观察细胞生长状态, 细胞进入对数生长期后可进行后续实验操作。

1.3 细胞处理

采用干扰小 RNA (small interfering RNA, siRNA) 敲低 HCC 细胞中 NPLOC4 的表达以进行功能缺失试验。使用 Lipofectamine 2000 转染试剂 (购自美国 Thermofisher 公司), 严格按照说明书操作流程, 将靶向敲低 NPLOC4 的质粒 (si-NPLOC4) 及其空白对照质粒 (si-NC) 转染至 Huh7 和 MHCC-97H 细胞。si-NPLOC4 的具体序列如下: si-NPLOC4#1, 5'-GACA-ATATCATGTTTGAGAAT-3'; si-NPLOC4#2, 5'-GAGCTTCTTGAGGATCCAAAA-3'; si-NPLOC4#3, 5'-GACACCTATTCCTAAGTTCA-3'。

为探究 Wnt/ β -catenin 信号通路是否介导 NPLOC4 对线粒体自噬的调控作用, 在 Huh7 和 MHCC-97H 细胞中转染 si-NPLOC4 后加入 0.5 μ mol/L BML-284 (Wnt 激动剂, 购自美国 MedChemExpress 公司) 处理 24 h^[12]。

为探究线粒体自噬是否介导 NPLOC4 的促 HCC 作用, 在 Huh7 和 MHCC-97H 细胞中加入 10 μ mol/L 羰基氰化物间氯苯腙(carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone, CCCP; 线粒体自噬诱导剂, 购自美国 MedChemExpress 公司) 处理 6 h^[13] 后转染 si-NPLOC4。

1.4 细胞转染

将 5 μ L si-NPLOC4 或 200 nmol/L si-NC 与 5 μ L Lipofectamine 2000 分别加入含有 95 μ L 无血清 DMEM/F12 培养基的试管中。轻轻混匀内容物, 室温孵育 5 min。随后, 小心合并 2 管内容物, 总体积约为 200 μ L。将混合液在室温下再静置 20 min。最后, 将混合液均匀加入第 3 代 Huh7 和 MHCC-97H 细胞中。细胞在培养箱中于 37 °C 孵育 6 h 后, 更换为新鲜的完全培养基。

1.5 蛋白质印迹法

使用放射免疫沉淀测定 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液 (购自长沙艾碧维生物科技有限公司) 从上述处理细胞中提取蛋白质。通过 BCA 蛋白质检测试剂盒 (购自长沙艾碧维生物科技有限公司) 进行蛋白质定量。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

electrophoresis, SDS-PAGE)分离后,将蛋白质通过电转移至硝酸纤维素膜上。将膜与一抗一起孵育,于4℃中过夜,随后用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗处理,与膜共同室温孵育90 min。最后使用增强化学发光(enhanced

chemiluminescence, ECL)液与膜孵育1 min,用滤纸吸尽液体,用塑封膜将膜包裹,凝胶成像系统成像。定量归一化采用 β -actin作为内参。抗体的详细信息见表1。

表1 抗体信息

Table 1 Information of antibodies

抗体名称	抗体货号	抗体来源	稀释比例	分子量/kD	抗体公司
NPLOC4	11638-1-AP	兔	1:1 000	68	美国 Proteintech
PINK1	ab216144	兔	1:1 000	62	英国 Abcam
p-Parkin	PA1-4735	兔	1:1 000	55	美国 Thermofisher
Parkin	AWA41194	兔	1:1 000	52	中国 Abiowell
LC3	14600-1-AP	兔	1:3 000	14~18	美国 Proteintech
p62	66184-1-Ig	鼠	1:10 000	62	美国 Proteintech
β -catenin	51067-2-AP	兔	1:20 000	92	美国 Proteintech
c-Myc	AWA01259	鼠	1:2 000	51	中国 Abiowell
β -actin	66009-1-Ig	鼠	1:5 000	42	美国 Proteintech

1 D=1 u. NPLOC4: 核蛋白定位4同源物; PINK1: PTEN诱导的假定激酶1; p-Parkin: 磷酸化的Parkin; LC3: 微管相关蛋白1轻链3。

1.6 实时荧光定量PCR

使用TRIzol试剂(购自美国Thermofisher公司)提取总RNA。随后,使用HiFiScript试剂盒(购自江苏泰州康为世纪公司)将分离出的RNA转化为cDNA(complementary DNA, cDNA)。选用反转录试剂盒(购自江苏泰州康为世纪公司)进行mRNA反转录。采用ABI Prism 7900HT序列检测系统对定量实时PCR结果进行分析,使用 β -actin作为内参。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对基因表达水平进行量化。引物序列详情见表2。

表2 引物序列

Table 2 Sequence of primers

序列名称	引物序列(5'-3')
NPLOC4	GTGCATCACTGCAGGAGACT CAGGACCACCTGCAAGAGAG
β -actin	ACCCTGAAGTACCCCATCGAG AGCACAGCCTGGATAGCAAC

1.7 细胞活力检测

采用细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)

检测细胞活性。将处于对数生长期的细胞用完全培养基调整密度至 1×10^4 个/mL,以每孔300 μ L的体积接种于24孔细胞培养板。将培养板置于37℃、5% CO₂的恒温培养箱中预培养24 h,待细胞完全贴壁后,按照上述方法对细胞进行处理,去除含药培养基,每孔加入300 μ L含有CCK-8的培养基,将培养板放回培养箱继续孵育4 h后,在450 nm波长处测定吸光度值,通过吸光度值变化反映细胞活性的改变。

1.8 细胞凋亡检测

将经以上处理的细胞使用不含乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)的胰酶消化收集后,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤2次(每次以1 500 r/min离心5 min),随后加入500 μ L Binding buffer悬浮细胞,并依次加入5 μ L别藻蓝蛋白标记的膜联蛋白V(Annexin V APC)与5 μ L碘化丙啶混匀,于室温避光条件下反应10 min,在1 h内采用流式细胞仪进行观测分析。

1.9 细胞侵袭试验

实验于操作前一天将无菌枪头、EP管、人工基膜(Matrigel)及Transwell小室置于4℃预冷;正式实

验时, 每孔加入 100 μ L 预冷的无血清 DMEM 培养基稀释的 Matrigel(终浓度 200 μ g/孔), 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后吸弃上清, 并在小室下层加入 500 μ L 含 10% 胎牛血清的完全培养基。随后, 将前述处理的细胞经胰酶消化为单细胞悬液, 用无血清培养基重悬至浓度为 2×10^6 个细胞/mL, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 48 h。培养结束后, 取出小室移至装有 PBS 的新孔中, 使用 PBS 清洗上室 3 遍, 用棉球轻轻擦净上室内表面细胞。接着用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 取出 Transwell 膜, 以 0.1% 结晶紫染色 5 min 并水洗 5 次。最后, 将膜置于载玻片上, 于倒置显微镜下观察上室外表面侵袭的细胞, 随机选取 3 个视野进行计数分析。

1.10 细胞迁移试验

Transwell 小室下层加入 500 μ L 含 10% Gibco 胎牛血清的完全培养基后, 将上述处理的细胞用胰酶消化为单细胞悬液, 以无血清培养基重悬至密度为 2×10^6 个/mL, 取 100 μ L 细胞悬液加入上室, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 48 h。余下步骤同细胞侵袭试验。最后于倒置显微镜下观察上室外表面迁移的细胞, 随机选取 3 个视野进行计数分析。

1.11 透射电子显微镜

样本采用双重固定法处理: 首先使用 2.5% 的戊二醛进行初步固定, 随后通过四氧化锇蒸汽进行二次固定。采用超薄切片机将样本切成 50~70 nm 的超薄切片, 之后使用醋酸铀和柠檬酸铅溶液进行重金属染色。染色后的载网需用三蒸水冲洗, 随后置于铜网上进行支撑固定。采用 Tecnai G2 Spirit 型透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM; 购自美国 FEI 公司)进行形态学评估, 在 80 kV 电压下操作, 成像放大倍数范围为 5 000 至 10 000 倍。病理医师通过数字图像分析, 对病理特征进行标注, 包括线粒体嵴断裂和双层膜自噬泡等。

1.12 免疫荧光染色

将细胞样本用 4% 的多聚甲醛固定 30 min, 再用 0.3% 的曲拉通于 37 $^{\circ}$ C 处理 30 min。随后, 加入 3% 过氧化氢溶液, 室温避光孵育 15 min。用 5% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶液 37 $^{\circ}$ C 封闭 60 min。加入一抗微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3; 购自美国 Proteintech 公司), 于 4 $^{\circ}$ C 过夜, 并于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。加入 50 μ L HRP 二抗, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。加入第

一种 520 荧光染料反应 10 min。滴加适量完全溶解的抗体洗脱液覆盖样本, 于 37 $^{\circ}$ C 放置 10 min。再次依次加入 3% 过氧化氢溶液和 5% BSA 溶液处理相应时间, 孵育一抗线粒体外膜转位酶 20(translocase of outer mitochondrial membrane 20, TOM20; 购自美国 Proteintech 公司)及二抗。然后用另一种 620 荧光染料反应 10 min。最后, 用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)对细胞核进行染色。用缓冲甘油封片, 在荧光显微镜下观察。

1.13 统计学处理

使用 GraphPad 8.0 软件进行统计与分析。实验重复 ≥ 3 次。实验结果均以均数 $\pm$ 标准差表示。2 组间比较采用非配对或配对双尾 Student *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析或双因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NPLOC4 在 HCC 中高表达且与不良预后有关

对 GSE277232 和 GSE251942 队列中 HCC 患者的肿瘤组织与邻近的慢性肝病组织的全基因组 RNA 测序数据进行分析, 筛选出了差异表达的基因(图 1A)。GSE277232 队列的结果显示, 804 个基因在 HCC 中上调, 1 971 个基因下调。GSE251942 队列的结果显示, 5 510 个基因在 HCC 中上调, 1 591 个基因下调。对 GeneCards 数据库中的线粒体自噬相关基因进一步分析显示, 820 个线粒体自噬相关基因在 HCC 中上调, 1 439 个线粒体自噬相关基因在 HCC 中下调。对 GSE277232、GSE251942、HCC 中上调的线粒体自噬相关基因取交集, 得到 17 个共有差异基因: *SQSTM1*、*FASN*、*USP36*、*HSPA1A*、*NPLOC4*、*FZD5*、*UGDH*、*TCHP*、*RPTOR*、*SCD*、*IKBK*、*MOV10*、*SMAD3*、*AGO2*、*PUS1*、*RANGAP1*、*TRMU*(图 1B)。本研究选择 NPLOC4 作为重点研究对象。NPLOC4 在 GSE277232 和 GSE251942 队列中的 HCC 患者肿瘤组织中均显著高表达(均 $P < 0.05$, 图 1C)。Kaplan-Meier 生存分析表明 NPLOC4 高表达与 HCC 不良预后有关($P < 0.001$, 图 1D)。此外, 蛋白质印迹法结果也显示, 与人正常肝细胞 THLE-2 相比, NPLOC4 在 HCC 细胞 HepG2、Huh7、MHCC-97H、Huh6 中表达均显著上调(均 $P < 0.05$), 且在 Huh7 和 MHCC-97H 细胞中表达最高(图 1E)。这些结果表明, NPLOC4 在 HCC 中高表达, 且与不良预后有关。

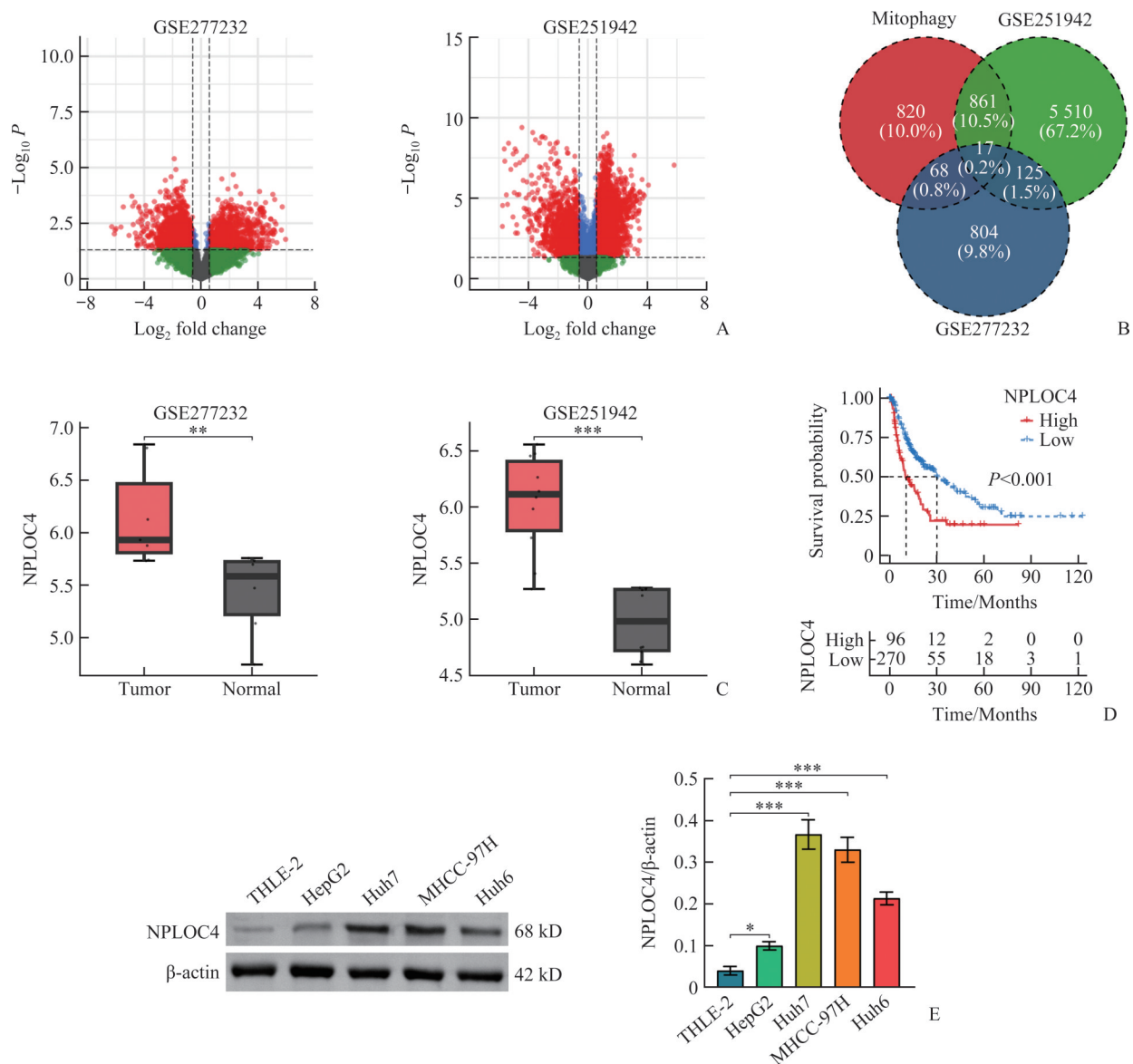


图1 NPLOC4在HCC中高表达且与HCC不良预后有关

Figure 1 NPLOC4 is highly expressed in HCC and is associated with poor prognosis of HCC

A: Volcano plot of DEGs in the GSE277232 and GSE251942 datasets. B: Venn diagram of upregulated DEGs in the GSE277232 and GSE251942 datasets and mitophagy-related genes. C: Expression of NPLOC4 is elevated in HCC tumor tissues compared with adjacent liver tissues from GSE277232 and GSE251942 datasets. D: Analysis of overall survival of HCC patients using Kaplan-Meier plots. E: Western blotting analysis showed that NPLOC4 protein levels were increased in HCC cells compared with normal hepatocytes. Data are presented as mean±standard deviation. Statistical significance was determined using one-way ANOVA. $n=3$. NPLOC4: Nuclear protein localization 4 homolog; HCC: Hepatocellular carcinoma; DEG: Differentially expressed gene. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

2.2 敲低NPLOC4可抑制HCC细胞增殖、迁移、侵袭并促进细胞凋亡

向Huh7和MHCC-97H细胞转染si-NPLOC4质粒构建了NPLOC4敲低的HCC细胞系,其中si-NPLOC4#1的敲低效率最高,因此用于后续实验(图2A)。随后检测了NPLOC4敲低后对HCC细胞功能的影响,CCK-8结果显示,si-NPLOC4处理明显降低了

HCC细胞的细胞活力(均 $P<0.05$,图2B)。同时,si-NPLOC4还提高了HCC细胞的凋亡率(均 $P<0.05$,图2C)。此外,敲低NPLOC4后,HCC细胞的侵袭和迁移能力减弱(均 $P<0.05$,图2D和2E)。综上,敲低NPLOC4抑制了HCC细胞增殖、迁移、侵袭并促进细胞凋亡。

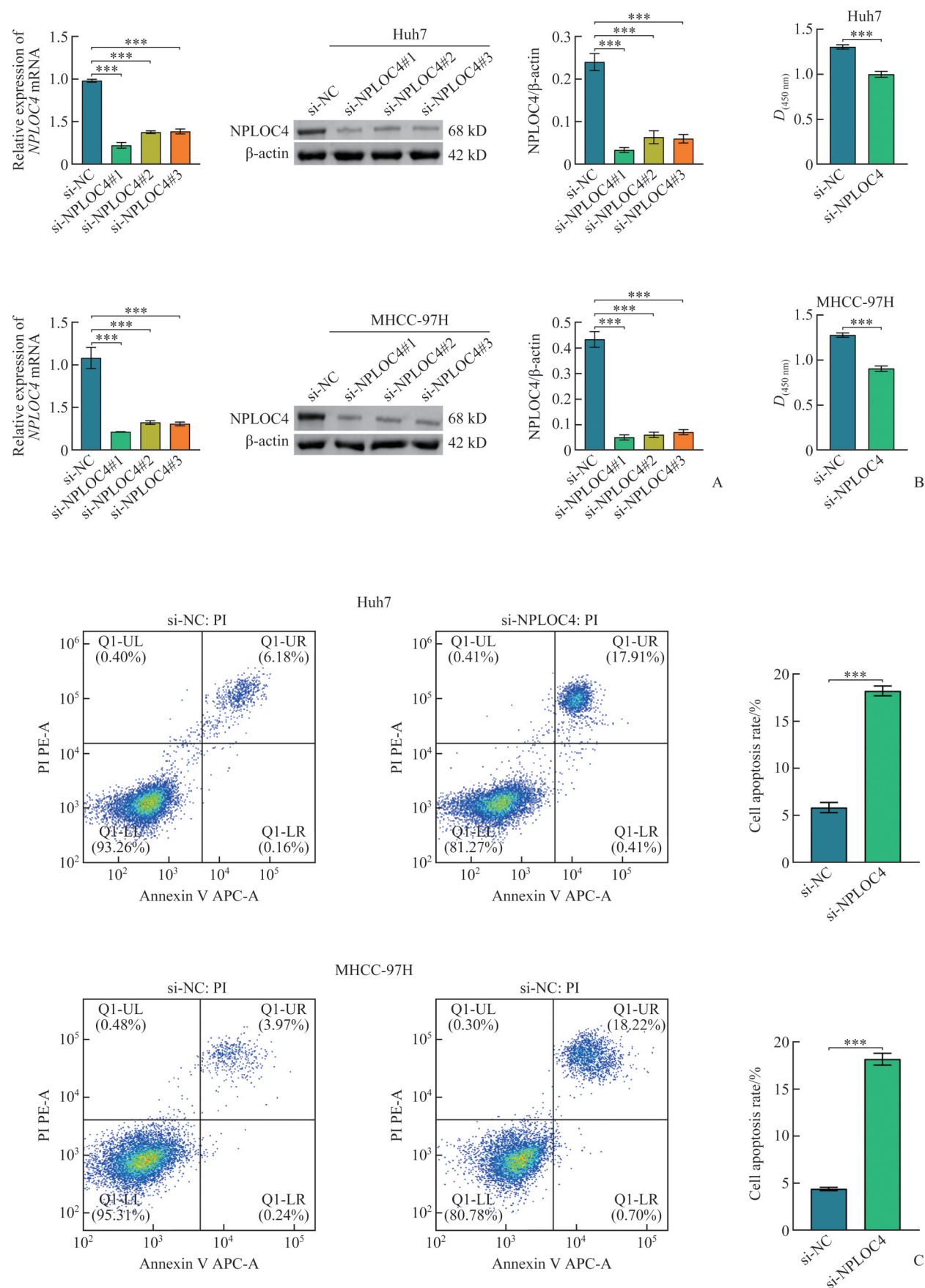


图2 敲低NPLOC4可抑制HCC细胞增殖、迁移、侵袭并促进细胞凋亡

Figure 2 Knocking down NPLOC4 can inhibit the proliferation, migration, and invasion of HCC cells and promote cell apoptosis

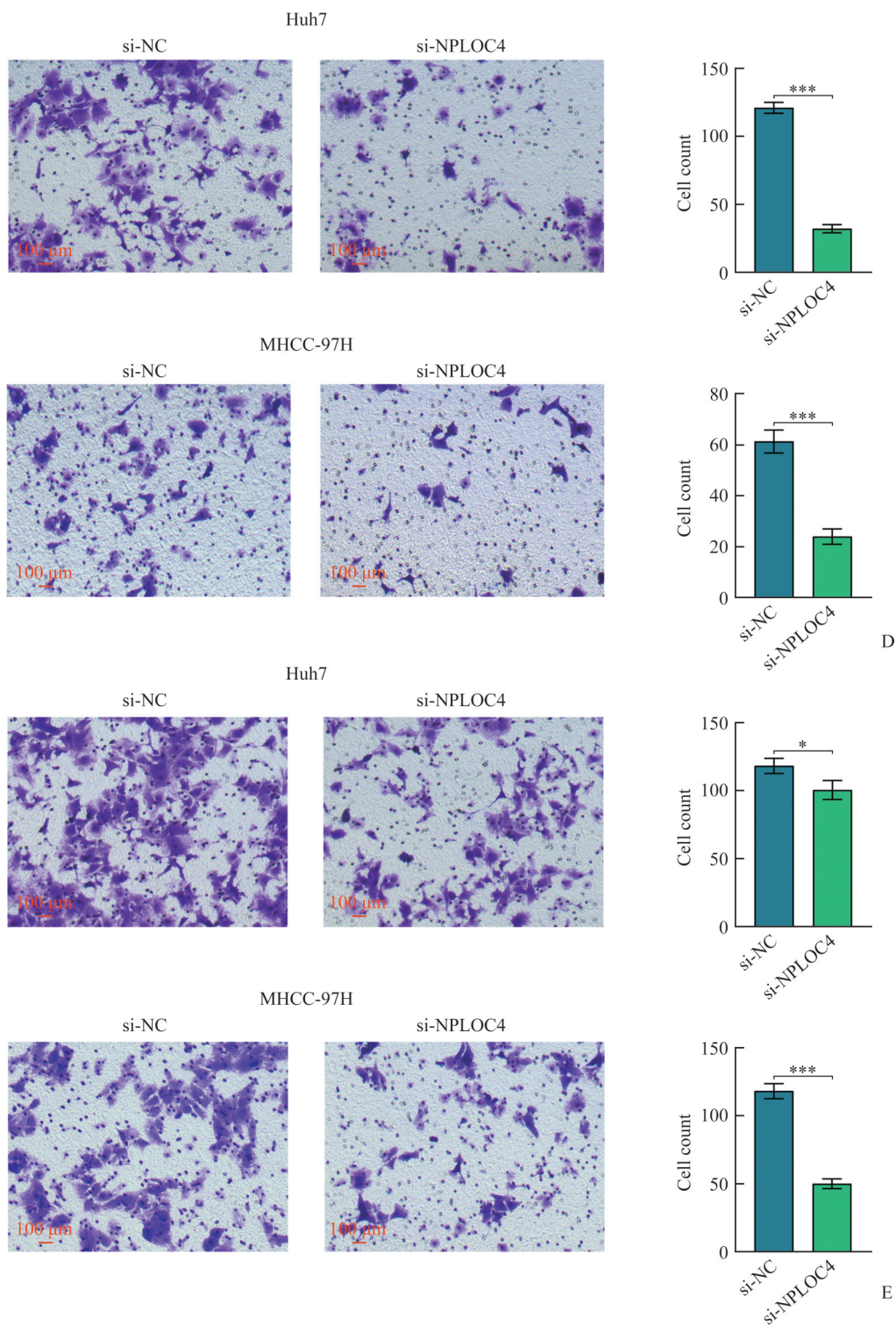


图2 敲低 *NPLOC4* 可抑制 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭并促进细胞凋亡(续)

Figure 2 Knocking down *NPLOC4* can inhibit the proliferation, migration, and invasion of HCC cells and promote cell apoptosis (continued)

A: Detection of the knockdown efficiency of *NPLOC4* by real-time RT-PCR and Western blotting. B: CCK-8 experiment demonstrated that knockdown of *NPLOC4* inhibited the viability of HCC cells. C: Flow cytometry analysis revealed that knocking down *NPLOC4* facilitated the apoptosis of HCC cells. D and E: Transwell assays demonstrated that knocking down *NPLOC4* inhibited the invasion (D) and migration (E) of HCC cells. Data are presented as mean±standard deviation. Statistical significance was determined using Student's *t*-test or one-way ANOVA. *n*=3. **P*<0.05, ****P*<0.001. CCK-8: Cell counting kit-8; PI: Propidium iodide; PE-A: Phycoerythrin-area; Annexin V APC-A: Annexin V conjugated with allophycocyanin-alexa fluor; UL: Upper left; UR: Upper right; LL: Lower left; LR: Lower right.

2.3 敲低 *NPLOC4* 可抑制 HCC 细胞线粒体自噬和 Wnt/ β -catenin 信号通路

与 si-NC 组相比, si-NPLOC4 组中线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin、p-Parkin、LC3 II/I 的表达下调, p62 的表达均上调(均 $P < 0.05$, 图 3A)。同时, 敲低 *NPLOC4* 后 HCC 细胞的自噬体数量也明显减少(均 $P <$

0.05, 图 3B)。si-NPLOC4 组显示出较少的 LC3/TOM20 共定位(图 3C)。这表明敲低 *NPLOC4* 抑制了 HCC 细胞线粒体自噬。敲低 *NPLOC4* 后, β -catenin 和 c-Myc 的表达均下调(均 $P < 0.05$, 图 3D), 表明 Wnt/ β -catenin 通路被抑制。综上, 敲低 *NPLOC4* 抑制了 HCC 细胞线粒体自噬和 Wnt/ β -catenin 信号通路。

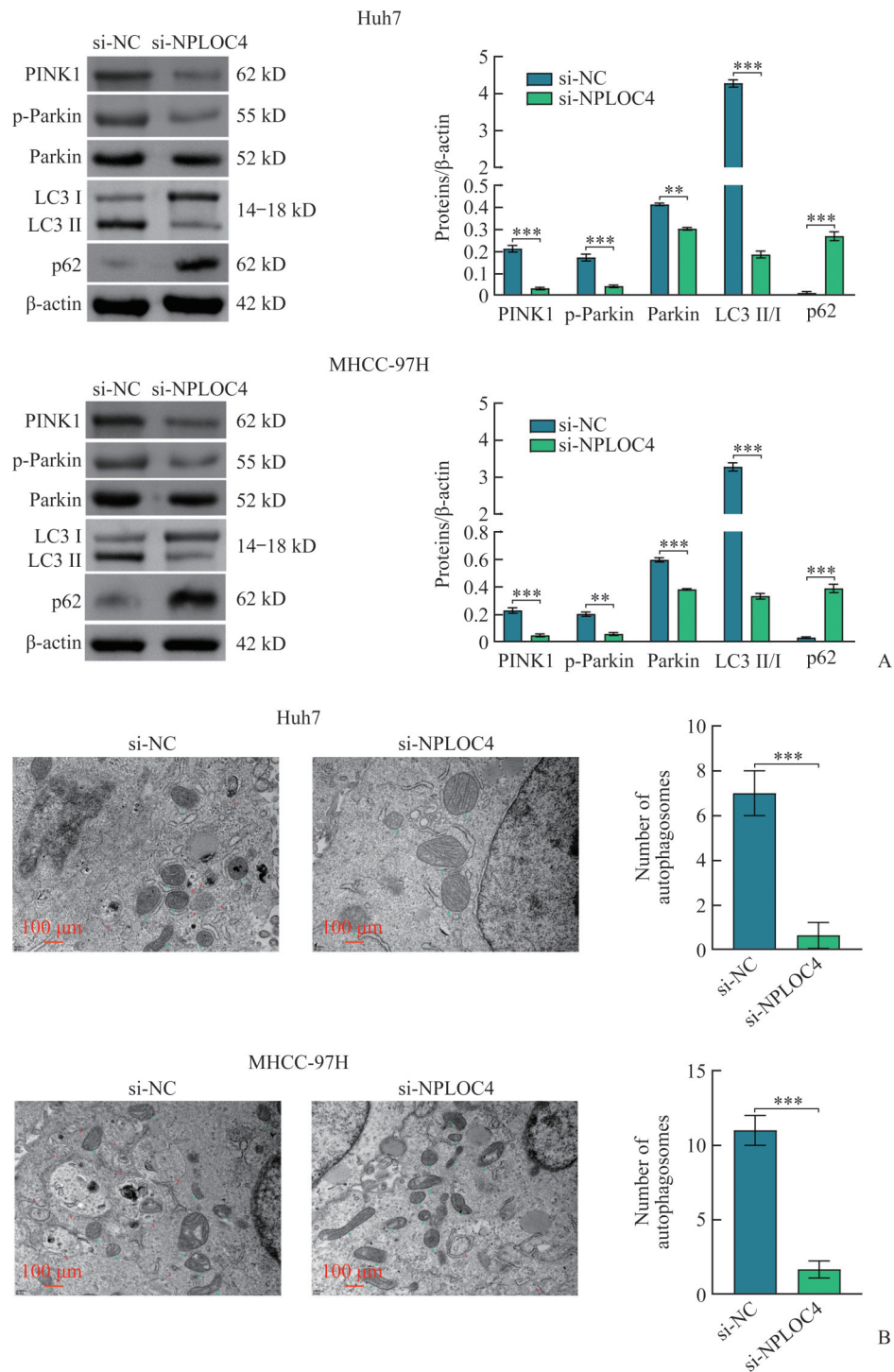


图3 敲低 *NPLOC4* 可抑制 HCC 细胞线粒体自噬和 Wnt/ β -catenin 信号通路

Figure 3 Knocking down *NPLOC4* can inhibit mitophagy and the Wnt/ β -catenin signaling pathway in HCC cells

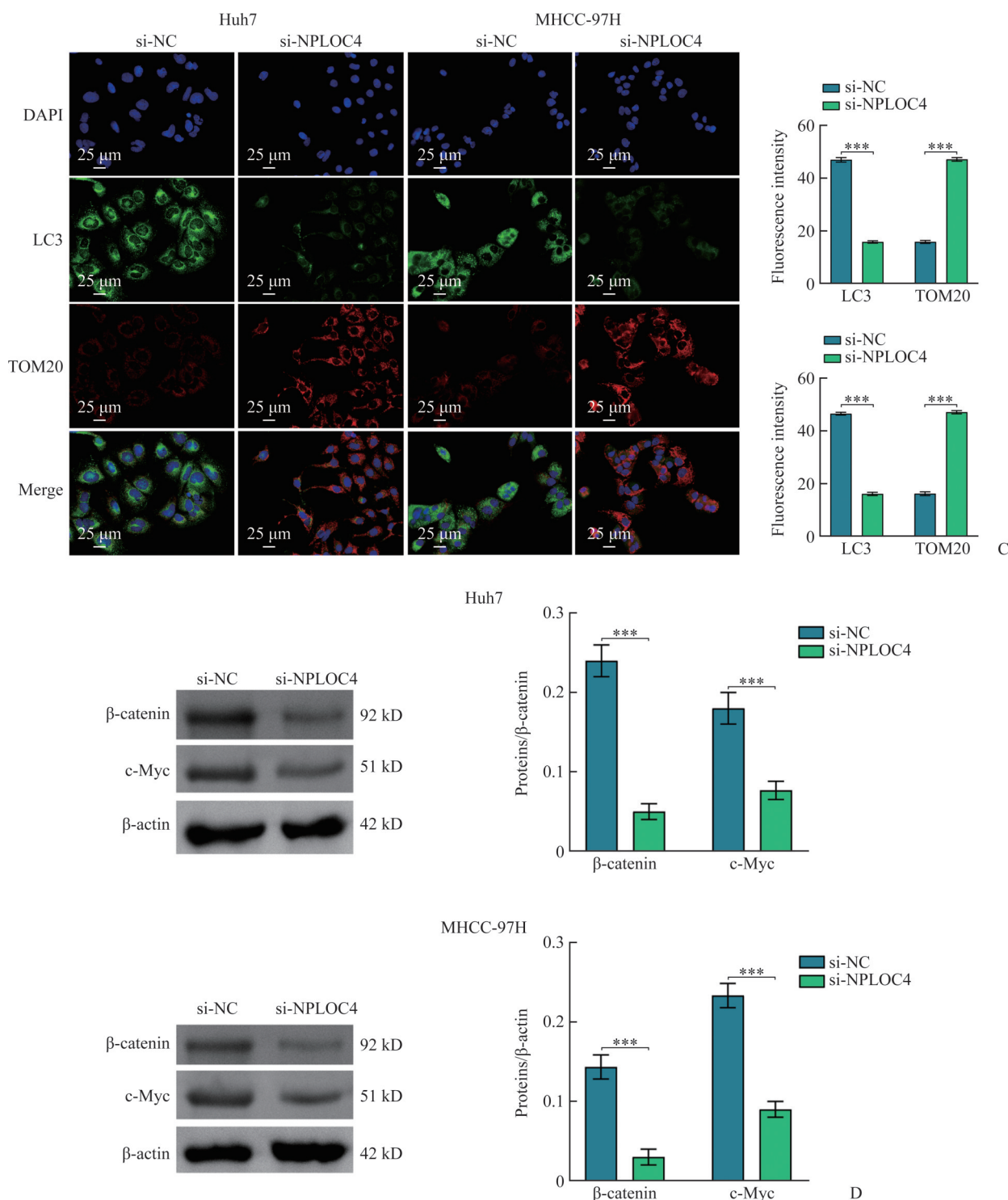


图3 敲低 *NPLOC4* 可抑制 HCC 细胞线粒体自噬和 Wnt/β-catenin 信号通路(续)

Figure 3 Knocking down *NPLOC4* can inhibit mitophagy and the Wnt/β-catenin signaling pathway in HCC cells (continued)

A: Western blotting analysis showed that the levels of mitophagy-related proteins (PINK1, Parkin, p-Parkin, and LC3 II/I) were decreased, and the p62 level was increased in HCC cells after *NPLOC4* knockdown. B: TEM results showed that the number of autophagosomes was decreased in HCC cells after *NPLOC4* knockdown. C: Spatial co-localization of mitochondrial protein TOM20 (red) and LC3 (green) in HCC cells showed that LC3/TOM20 co-localization was reduced after *NPLOC4* knockdown. D: Western blotting analysis showed that the protein levels of β-catenin and c-Myc were decreased in HCC cells after *NPLOC4* knockdown. Data are presented as mean±standard deviation. Statistical significance was determined using Student's *t*-test or two-way ANOVA. *n*=3. ***P*<0.01, ****P*<0.001. PINK1: PTEN-induced putative kinase 1; TEM: Transmission electron microscope; LC3: Microtubule-associated protein 1 light chain 3; TOM20: Translocase of outer mitochondrial membrane 20; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

2.4 敲低 *NPLOC4* 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路调控线粒体自噬

蛋白质印迹法结果显示, 敲低 *NPLOC4* 抑制了 Wnt/ β -catenin 信号通路, 而 BML-284 重新激活了 Wnt/ β -catenin 信号通路 (均 $P < 0.05$, 图 4A)。与 si-NPLOC4 组相比, si-NPLOC4+BML-284 组中线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin、p-Parkin、LC3 II/I 的

表达均上调, p62 的表达下调 (均 $P < 0.05$, 图 4B)。同时, 应用 BML-284 后 HCC 细胞的自噬体数量也明显增加 (均 $P < 0.05$, 图 4C)。此外, 与 si-NPLOC4 组相比, si-NPLOC4+BML-284 组显示出较多的 LC3/TOM20 共定位 (图 4D)。综上, 敲低 *NPLOC4* 可通过阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路来抑制线粒体自噬。

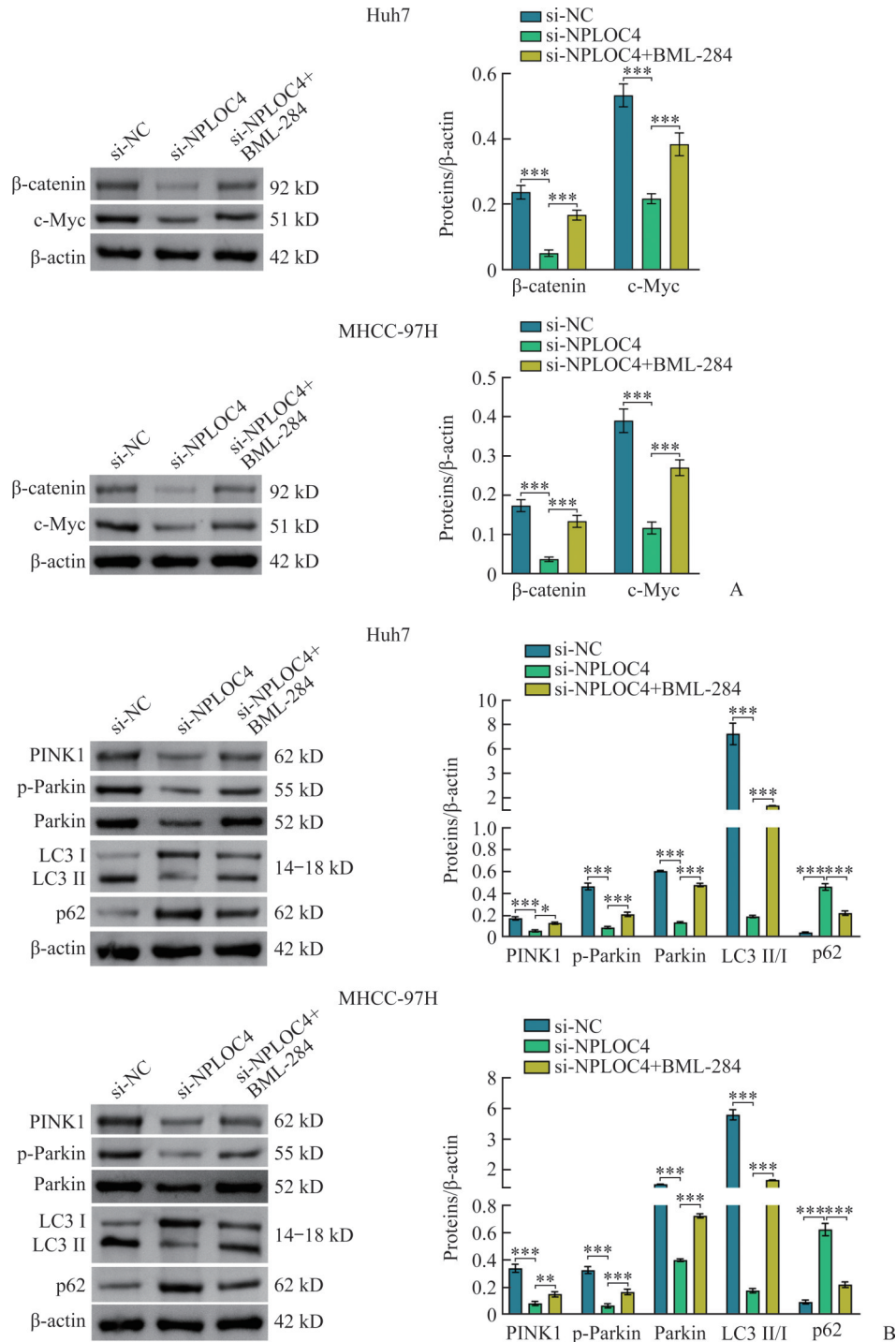


图4 敲低 *NPLOC4* 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路调控线粒体自噬

Figure 4 Knockdown of *NPLOC4* regulates mitophagy by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway

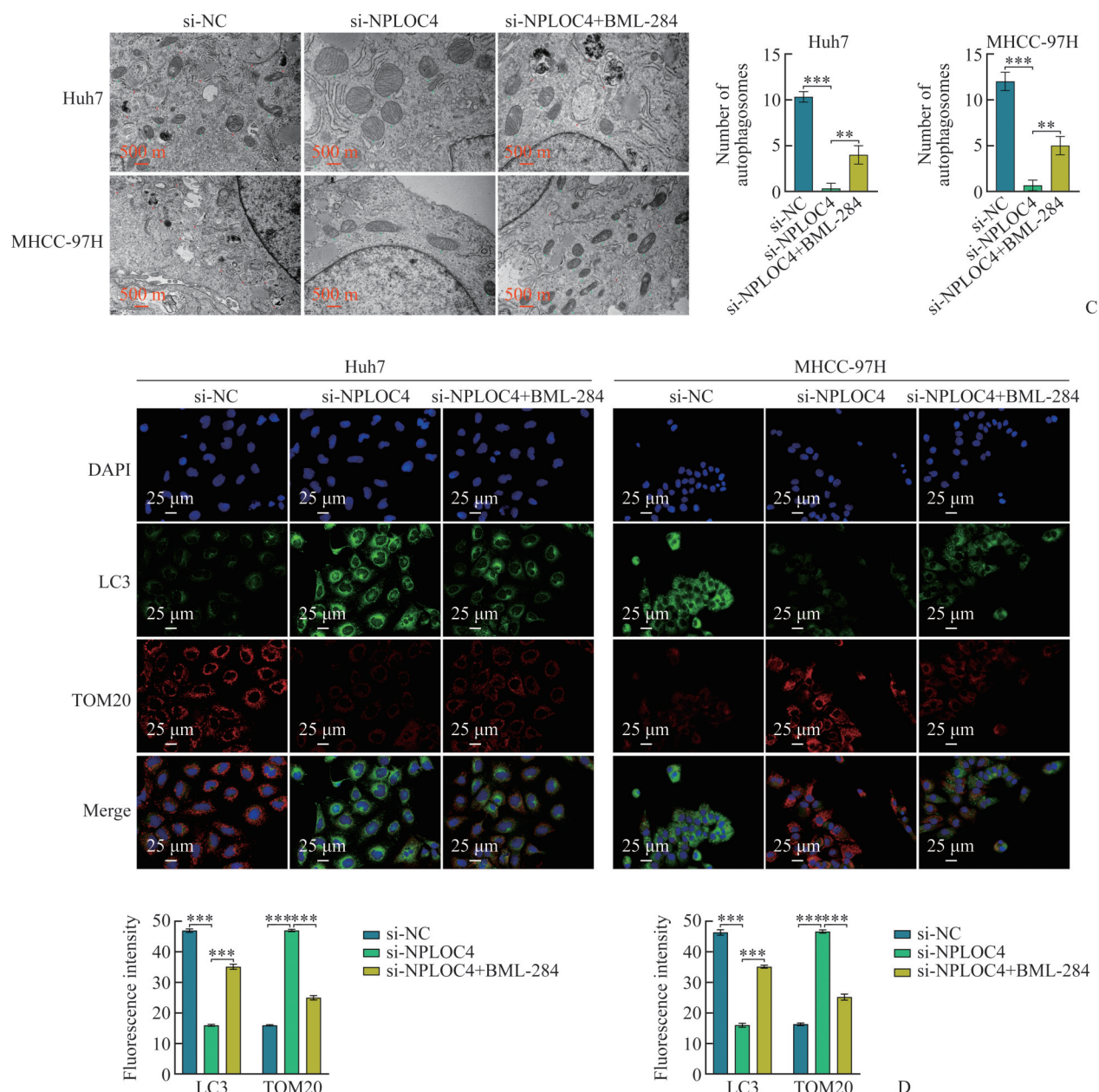


图4 敲低 *NPLOC4* 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路调控线粒体自噬(续)

Figure 4 Knockdown of *NPLOC4* regulates mitophagy by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway (continued)

A: Western blotting analysis showed that the protein levels of β -catenin and c-Myc were increased in HCC cells after BML-284 treatment. B: Western blotting analysis showed that the levels of mitophagy-related proteins (PINK1, Parkin, p-Parkin, LC3 II/I) were increased, and the p62 level was decreased in HCC cells after BML-284 treatment. C: TEM results showed that the number of autophagosomes was increased in HCC cells after BML-284 treatment. D: Spatial co-localization of mitochondrial protein TOM20 (red) and LC3 (green) in HCC cells showed that LC3/TOM20 co-localization was increased after BML-284 treatment. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. Statistical significance was determined using one-way or two-way ANOVA. $n=3$. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

2.5 敲低 *NPLOC4* 通过抑制线粒体自噬进而抑制 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭并促进凋亡

CKK-8 结果显示, CCCP 处理明显增加了 HCC 细胞的细胞活力(均 $P<0.05$, 图 5A)。同时, CCCP 还

降低了 HCC 细胞的凋亡率(均 $P<0.05$, 图 5B)。应用 CCCP 后, HCC 细胞的侵袭和迁移能力增强(均 $P<0.05$, 图 5C 和 5D)。综上, 敲低 *NPLOC4* 通过阻断线粒体自噬, 进而抑制 HCC 细胞的增殖。

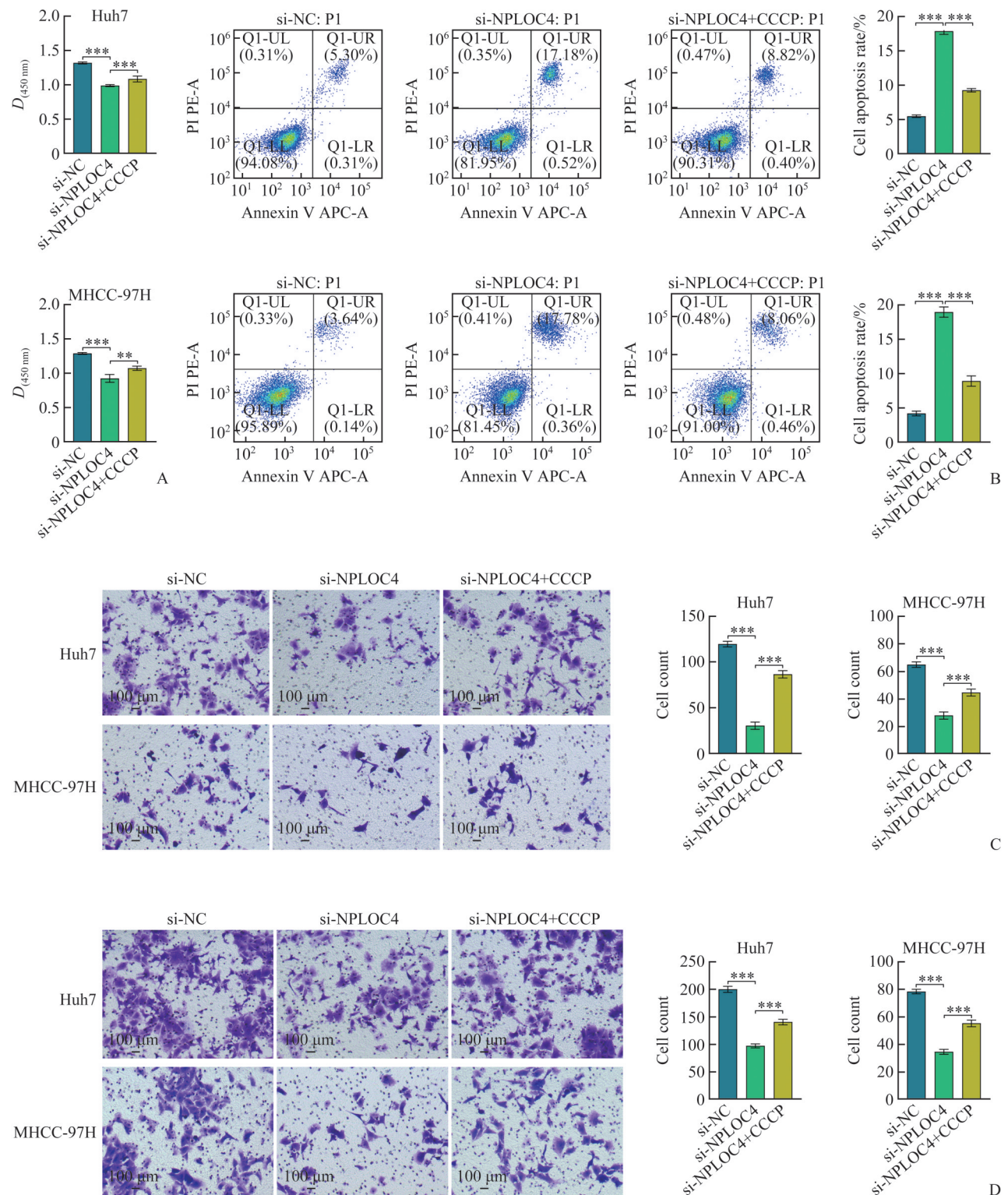


图5 敲低 *NPLOC4* 通过抑制线粒体自噬而抑制 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭并促进凋亡

Figure 5 Knockdown of *NPLOC4* inhibits HCC cell proliferation, migration, and invasion and promotes apoptosis by inhibiting mitophagy

A: CCK-8 experiment demonstrated that CCCP increased the viability of HCC cells. B: Flow cytometry analysis revealed that CCCP inhibited the apoptosis of HCC cells. C and D: Transwell assays demonstrated that CCCP promoted the invasion (C) and migration (D) of HCC cells. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. Statistical significance was determined using one-way ANOVA. $n=3$. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. CCCP: Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone.

3 讨论

HCC是人类最常见的恶性肿瘤之一,且患者预后不佳,迫切需要新的HCC治疗策略^[14]。本研究表明,NPLOC4在HCC的发展过程中起促癌作用。从机制上讲,NPLOC4可通过激活Wnt/ β -catenin通路增强线粒体自噬。更重要的是,通过向HCC细胞转染si-NPLOC4抑制NPLOC4,可抑制HCC细胞增殖、迁移、侵袭并促进细胞凋亡,这为治疗HCC的新策略提供了依据。

线粒体的灵活性有助于HCC细胞在面对诸如缺氧、饥饿以及持续的化疗和靶向治疗等不利环境条件时维持生存^[15]。线粒体自噬导致的线粒体清除是对线粒体损伤的一种反应,有助于细胞适应微环境中的压力变化。该过程的失调已被证实是肿瘤进展的重要介导因素^[16]。因此,迫切需要深入理解HCC发展中调节线粒体自噬的因素。本研究通过生物信息分析筛选出了线粒体自噬相关的HCC差异表达基因NPLOC4。研究^[9]表明,NPLOC4与肿瘤的更高恶性潜能密切相关。在既往研究^[17]中NPLOC4已被证实在HCC中上调,且与肿瘤免疫微环境有关。类似地,本研究在HCC和正常肝细胞系中的表达验证,证明了NPLOC4在HCC中高表达,是一个独立的预后预测因子。敲低NPLOC4显著抑制了HCC的生长和侵袭。此外,敲低NPLOC4还抑制了HCC细胞线粒体自噬。并通过应用线粒体自噬诱导剂CCCP,证实了线粒体自噬介导了NPLOC4的促癌功能。值得注意的是,既往研究^[10]表明,敲低NPLOC4可通过调节 β -catenin/GSK3 β 通路增强线粒体动力学和线粒体自噬,这与本研究中NPLOC4敲低抑制HCC细胞线粒体自噬的结论相反。这一差异可能源于以下原因:首先,细胞类型与疾病背景不同,既往研究^[10]基于血管紧张素II诱导的H9c2心肌细胞模型,而本研究聚焦于HCC。其次,下游作用靶点可能存在差异。尽管均涉及 β -catenin通路,但不同细胞背景下NPLOC4调控的具体下游分子(如PINK1/Parkin轴或其他自噬相关基因)及信号交互网络可能截然不同,从而导致NPLOC4敲低对线粒体自噬产生相反调控效应。除线粒体自噬外,NPLOC4敲低还被发现增加内质网氧化酶1 α (ERO1-like protein alpha, ERO1 α)表达并破坏线粒体相关膜(mitochondria-associated membranes, MAMs)^[10],而MAMs是调控线粒体形态、钙信号及动力学的重要结构平台,进一步支持其与分裂/融合过程的关联^[18]。

Wnt/ β -catenin信号通路是一种在进化上具有高度保守性的通路,它在胚胎发育以及组织稳态的维持

中起着关键作用^[19]。Wnt/ β -catenin信号通路的失调与多种严重疾病的发生与发展有关,包括各种恶性肿瘤。例如,跨膜4L六家族成员1(transmembrane 4 L six family member 1, TM4SF1)通过上调Wnt/ β -catenin信号通路来维持肿瘤干细胞特性并促进上皮-间充质转化,从而提高结直肠癌的复发和转移率^[20]。丝氨酸蛋白酶抑制剂家族H成员1(serpin family H member 1, SERPINH1)通过激活该通路来促进胃癌细胞的增殖和转移^[21]。在HCC中,Wnt/ β -catenin通路被异常激活,以促进HCC细胞的增殖和迁移,并重塑肿瘤微环境,从而通过重编程肿瘤代谢来驱动HCC的进展^[22-23]。此外,在肿瘤微环境中,Wnt/ β -catenin通路的异常激活不仅促进肿瘤发生,还通过诱导线粒体生物合成和调控线粒体功能影响细胞代谢。研究^[24]指出,非磷酸化 β -catenin可驱动Wnt信号传导并引发代偿性线粒体生物发生,同时与线粒体自噬过程相联系,提示Wnt/ β -catenin通路可能通过协调线粒体生成与清除来维持细胞能量稳态。例如,百里香酚酮能够调节Wnt/ β -catenin信号通路,并通过其对线粒体自噬相关机制的影响,影响人类结肠癌HT-29细胞的生长动态^[25]。Wnt/ β -catenin通路对线粒体自噬的调节作用也可能涉及 β -catenin进入细胞核后对下游靶基因的转录激活,从而影响线粒体质量监控系统。例如,高表达Wnt/ β -catenin通路下游靶基因c-Myc显著增强了线粒体的分裂和p62的聚集,从而促进了线粒体自噬^[26]。本研究发现,在HCC细胞中沉默NPLOC4会导致Wnt/ β -catenin通路相关蛋白质(包括 β -catenin和c-Myc)的表达下调。值得注意的是,使用Wnt激动剂能够逆转NPLOC4基因敲除所导致的线粒体自噬标志物表达的增加。此外,加入线粒体自噬诱导剂CCCP能够部分恢复NPLOC4基因敲除所引起的HCC细胞增殖、迁移和侵袭能力的下降。这些研究结果表明,NPLOC4可能通过调节线粒体自噬,并借助Wnt/ β -catenin信号通路,来影响HCC的形成。

然而,本研究仍存在一定局限性。目前的结论主要基于体外细胞实验,尚未在动物模型中验证NPLOC4对HCC肿瘤生长及转移的体内调控作用,也缺乏基于临床组织样本的回顾性或前瞻性队列分析。此外,NPLOC4与线粒体自噬之间的上下游因果关系及具体分子互作机制有待进一步阐明。未来研究将构建体内移植瘤及基因敲除动物模型,并结合临床HCC组织芯片进行验证,以推动NPLOC4从基础发现向临床应用的转化。

综上所述,在HCC的发生与发展过程中,NPLOC4基因的异常高表达通过介导线粒体自噬失调,促进HCC细胞的增殖、侵袭及转移。其潜在机

制与 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活密切相关。在临床转化方面, NPLOC4 在 HCC 组织中的显著高表达提示其具有作为液体活检标志物的潜力。由于 NPLOC4 的表达变化可通过外周血外泌体或循环肿瘤 DNA 等非侵入性手段检测, 未来有望将其开发为 HCC 早期筛查及术后复发监测的辅助指标。此外, 鉴于 NPLOC4 在驱动 HCC 恶性表型中的关键作用, 靶向 NPLOC4 或其下游 Wnt/ β -catenin 通路的小分子抑制剂研发具有可行性, 可为晚期 HCC 患者提供新的治疗策略。

作者贡献声明: 梁帅 实验构思和设计, 数据采集, 数据分析/解释, 论文起草, 论文修改, 研究经费的获取; 逯子川 研究实施, 数据采集, 数据分析/解释, 统计分析, 支持性贡献; 朱忠成 研究实施, 数据采集, 数据分析/解释, 统计分析; 唐甜甜 研究实施, 数据分析/解释, 支持性贡献; 叶柯 实验构思和设计, 数据分析/解释, 论文修改, 对文章的知识性内容作批评性审阅, 研究经费的获取, 指导。所有作者阅读并同意最终的文本。

利益冲突声明: 作者声称无任何利益冲突。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [2] Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7: 6. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>.
- [3] Rugarli EI, Langer T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons[J]. *EMBO J*, 2012, 31(6): 1336-1349. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.38>.
- [4] Panigrahi DP, Praharaj PP, Bhol CS, et al. The emerging, multifaceted role of mitophagy in cancer and cancer therapeutics[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 66: 45-58. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.015>.
- [5] 许允, 李昇. PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬在异烟肼诱导的肝细胞损伤中的作用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2022, 47(9): 1200-1207. <https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2022.210407>.
Xu Yun, Li Yi. Regulatory effect of PINK1/Parkin axis on mitophagy in isoniazide-induced hepatocellular injury[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2022, 47(9): 1200-1207. <https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2022.210407>.
- [6] Drake LE, Springer MZ, Poole LP, et al. Expanding perspectives on the significance of mitophagy in cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 47: 110-124. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.008>.
- [7] Sun B, Ding P, Song Y, et al. FDX1 downregulation activates mitophagy and the PI3K/AKT signaling pathway to promote hepatocellular carcinoma progression by inducing ROS production[J]. *Redox Biol*, 2024, 75: 103302. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103302>.
- [8] Körner M, Müller P, Das H, et al. p97/VCP is required for piecemeal autophagy of aggresomes[J]. *Nat Commun*, 2025, 16: 4243. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-59556-x>.
- [9] Wang N, Zhu D, Liu Y, et al. NPLOC4 is a potential target and a poor prognostic signature in lung squamous cell carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2023, 13: 20430. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47782-6>.
- [10] Ren K, Luan Y, Sun Y, et al. NPLOC4 aggravates heart failure by regulating ROS and mitochondrial function[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 142: 113199. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.113199>.
- [11] Liu Y, Zhang J, Chen Y, et al. KIF23 silencing suppresses papillary thyroid carcinoma metastasis by regulating mitophagy via Wnt/ β -catenin pathway[J/OL]. *Endocr Connect*, 2025, 14(10): e250090[2026-04-02]. <https://doi.org/10.1530/ec-25-0090>.
- [12] Wei J, Zheng X, Li W, et al. Sestrin2 reduces cancer stemness via Wnt/ β -catenin signal-ing in colorectal cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 75. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02498-x>.
- [13] Park YS, Choi SE, Koh HC. PGAM5 regulates PINK1/Parkin-mediated mitophagy via DRP1 in CCCP-induced mitochondrial dysfunction[J]. *Toxicol Lett*, 2018, 284: 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.004>.
- [14] Llovet JM, Pinyol R, Yarchoan M, et al. Adjuvant and neoadjuvant immunotherapies in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2024, 21(4): 294-311. <https://doi.org/10.1038/s41571-024-00868-0>.
- [15] Zong W, Rabinowitz JD, White E. Mitochondria and cancer[J]. *Mol Cell*, 2016, 61(5): 667-676. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.011>.
- [16] Chourasia AH, Boland ML, MacLeod KF. Mitophagy and cancer[J]. *Cancer Metab*, 2015, 3(1): 4. <https://doi.org/10.1186/s40170-015-0130-8>.
- [17] Zhang W, Liu C, Zhou X. NPLOC4 constructs tumor immunosuppressive microenvironment in pan-cancer and hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Curr Med Chem*(2025-06-17) [2026-04-18]. <https://doi.org/10.2174/0109298673344143250604061421>.
- [18] Liu J, Song X, Yan Y, et al. Role of GTPase-dependent mitochondrial dynamins in heart diseases[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 720085. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.720085>.
- [19] Liu J, Xiao Q, Xiao J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 3. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>.

- [20] Tang Q, Chen J, Di Z, et al. TM4SF1 promotes EMT and cancer stemness via the Wnt/ β -catenin/SOX2 pathway in colorectal cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 232. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01690-z>.
- [21] Tian S, Peng P, Li J, et al. SERPINH1 regulates EMT and gastric cancer metastasis via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Aging*, 2020, 12(4): 3574-3593. <https://doi.org/10.18632/aging.102831>.
- [22] Tian W, Li J, Wang Z, et al. HYD-PEP06 suppresses hepatocellular carcinoma metastasis, epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties by inhibiting PI3K/AKT and WNT/ β -catenin signaling activation[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(6): 1592-1606. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.040>.
- [23] Huang Y, Sheng H, Xiao Y, et al. Wnt/ β -catenin inhibitor ICG-001 enhances the antitumor efficacy of radiotherapy by increasing radiation-induced DNA damage and improving tumor immune microenvironment in hepatocellular carcinoma [J]. *Radiother Oncol*, 2021, 162: 34-44. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2021.06.034>.
- [24] Denk D, Petrocelli V, Conche C, et al. Expansion of T memory stem cells with superior anti-tumor immunity by Urolithin A-induced mitophagy[J]. *Immunity*, 2022, 55(11): 2059-2073. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.09.014>.
- [25] Moulana MS, Haiaty S, Bazmani A, et al. Tumorcidal properties of thymoquinone on human colorectal adenocarcinoma cells *via* the modulation of autophagy[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2024, 24(1): 132. <https://doi.org/10.1186/s12906-024-04432-2>.
- [26] Yang K, Zhang X, Yang K, et al. Overexpression of c-Myc triggers p62 aggregation-mediated mitochondrial mitophagy in cabozantinib resistance of hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Med*, 2025, 31(1): 209. <https://doi.org/10.1186/s10020-025-01263-w>.
- (责任编辑 田朴)