

基于生物信息学分析 *NPC1L1* mRNA 在结肠癌中的表达及临床意义

戴宇飞, 张炜

(江苏大学附属医院消化内科, 江苏 镇江 212001)

[摘要] **目的:** 基于生物信息学方法分析尼曼-匹克 C1 型类似蛋白 1(Niemann-Pick C1 like-1, *NPC1L1*) mRNA 在结肠癌中的表达及其临床价值。**方法:** 收集 TIMER2.0、TCGA、GEO 公共数据库中结肠癌患者的 *NPC1L1* mRNA 数据、临床病理特征数据及生存数据, 比较 *NPC1L1* mRNA 在结肠癌组织与癌旁组织中的差异; 根据 *NPC1L1* mRNA 最佳截断值将结肠癌患者分为 *NPC1L1* mRNA 高表达组和低表达组, 结合临床数据分析两组临床病理特征差异。采用 Kaplan-Meier 生存曲线、Log-rank 检验分析 *NPC1L1* mRNA 高表达组与低表达组患者 5 年生存率差异; Cox 回归分析结肠癌患者预后的影响因素; 通过 R 软件 Cluster Profiler 包输出 GSEA 图。选择两株人结肠癌细系 HCT116、SW620 进行细胞培养、传代, 分别分为阴性对照组、si-*NPC1L1*-1、si-*NPC1L1*-2、si-*NPC1L1*-3、si-*NPC1L1*-4 组, 用对应小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 进行瞬时转染, 采用蛋白质印迹法在蛋白质水平进行验证, 筛选敲减效率最高的序列进行后续实验; 将 HCT116、SW620 细胞分别分为 si-NC 组 (对照) 和 si-*NPC1L1* 组 (敲减 si-*NPC1L1*), 采用平板克隆形成实验计算细胞克隆形成数。**结果:** 结肠癌组织中 *NPC1L1* mRNA 相对表达显著高于癌旁组织 ($P < 0.001$)。 *NPC1L1* mRNA 高表达与结肠癌患者淋巴结转移显著相关 ($\chi^2 = 2.126, P = 0.034$)。ROC 曲线下面积为 0.785 (95%CI: 0.728~0.839)。 *NPC1L1* mRNA 高表达组 5 年生存率显著低于低表达组 ($P = 0.003$); 单因素及多因素 Cox 回归分析结果显示, *NPC1L1* mRNA 可能为影响结肠癌患者预后的独立因素 ($P < 0.05$)。GSEA 结果显示, *NPC1L1* mRNA 高表达组含有包括 Wnt 信号通路在内的 10 条信号通路 ($P < 0.05$)。细胞实验结果显示, si-*NPC1L1*-3 序列对 HCT116、SW620 细胞中 *NPC1L1* 敲减效率最高, 达 65% 以上; 平板克隆形成实验结果显示, si-*NPC1L1* 组 HCT116、SW620 细胞克隆形成数显著低于阴性对照组 ($P < 0.001$)。**结论:** *NPC1L1* mRNA 在结肠癌中呈高表达, 且与结肠癌患者预后呈负相关, 可作为结肠癌诊治的生物学标志物。

[关键词] 结肠癌; *NPC1L1*; 生物信息学; 基因表达; 预后

[中图分类号] R735.35 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-7783(2026)04-0277-08

DOI: 10.13312/j.issn.1671-7783.y250058

[引用格式] 戴宇飞, 张炜. 基于生物信息学分析 *NPC1L1* mRNA 在结肠癌中的表达及临床意义[J]. 江苏大学学报(医学版), 2026, 36(4): 277-284.

Bioinformatic analysis of *NPC1L1* mRNA expression in colon cancer and its clinical significance

DAI Yufei, ZHANG Wei

(Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu 212001, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the expression of Niemann-Pick C1 like-1 (*NPC1L1*) mRNA in colon cancer and its clinical significance based on bioinformatics methods. **Methods:** *NPC1L1* mRNA expression data, clinicopathological characteristics, and survival data of colon cancer patients were collected from public databases including TIMER2.0, TCGA and GEO. Differences in *NPC1L1* mRNA expression between tumor and adjacent non-tumor tissues were analyzed using R software. Patients were stratified into high- and low-expression groups based on the optimal cutoff value of *NPC1L1* mRNA data. The correlation between *NPC1L1* expression and clinicopathological features was assessed. Kaplan-Meier

[基金项目] 江苏省老年健康科研项目 (LKM2022031)

[作者简介] 戴宇飞 (1997—), 男, 硕士研究生; 张炜 (通信作者), 教授, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: zw8839200@163.com

survival curves and Log-rank tests were used to compare 5-year survival rates between groups. Cox regression analysis was performed to identify prognostic factors for colon cancer. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was performed using the Cluster Profiler package in R. Two human colon cancer cell lines, HCT116 and SW620, were cultured and passaged. Cells were divided into negative control, si-NPC1L1-1, si-NPC1L1-2, si-NPC1L1-3, and si-NPC1L1-4 groups, transiently transfected with corresponding small interfering RNAs (siRNAs). Protein levels were verified by Western blotting, and the most effective siRNA sequence was selected for further experiments. HCT116 and SW620 cells were then divided into si-NC (control) and si-NPC1L1 (knockdown) groups, and colony formation assays were performed to assess clonogenic potential. **Results:** *NPC1L1* mRNA expression was significantly higher in colon cancer tissues than that in adjacent normal tissues ($P<0.001$). High *NPC1L1* mRNA expression was significantly associated with lymph node metastasis in colorectal cancer patients ($\chi^2=2.126, P=0.034$). The area under the ROC curve was 0.785 (95% CI: 0.728–0.839). The 5-year survival rate in the high-expression of *NPC1L1* mRNA group was significantly lower than that in the low-expression group ($P=0.003$). Univariate and multivariate Cox regression analyses indicated that *NPC1L1* mRNA may be an independent prognostic factor for colorectal cancer patients ($P<0.05$). GSEA revealed that the high-expression group was enriched in 10 signaling pathways, including the Wnt pathway ($P<0.05$). Cell experiments showed that the si-NPC1L1-3 sequence achieved the highest knockdown efficiency ($>65\%$) in both HCT116 and SW620 cells. Colony formation assays demonstrated that the number of colonies formed by si-NPC1L1-treated HCT116 and SW620 cells was significantly lower than those in the negative control group ($P<0.001$). **Conclusion:** *NPC1L1* mRNA is significantly overexpressed in colon cancer and negatively correlated with patient prognosis, suggesting its potential as a biomarker for diagnosis and treatment.

[**Key words**] colon cancer; NPC1L1; bioinformatics; gene expression; prognosis

据 WHO 报道,全球每年超过 120 万人确诊结肠癌,其已成为恶性肿瘤中仅次于肺癌的第二大常见死因,是消化道最常见的恶性肿瘤之一^[1]。结肠癌的诊断主要依靠临床症状、结肠镜检查及实验室检查,但现有研究提示这些诊断方法存在患者耐受度低、准确性与敏感性不足等一系列问题^[2-4]。结肠癌的治疗主要包括外科手术治疗、化学治疗及免疫治疗,但由于结肠癌往往在晚期出现症状,治疗效果常不理想^[5-6]。因此,亟需开展生物信息学相关研究,发掘新型结肠癌诊断、治疗、预后相关的分子标志物,为结肠癌诊治提供临床参考。现有研究发现,胆固醇代谢与结肠癌的发生和发展密切相关,其中,尼曼-匹克 C1 型类似 (Niemann-Pick C1-like 1, NPC1L1) 蛋白在胆固醇代谢中发挥重要作用,其通过囊泡内吞噬作用摄取食物中的胆固醇,是肠道胆固醇吸收所的关键性转运蛋白^[7-8]。目前,关于 NPC1L1 与结肠癌的诊断、治疗、预后以及基因表达的潜在通路尚不清楚。因此,本研究基于生物信息学方法分析 NPC1L1 在结肠癌中的表达及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂与仪器

人结肠癌细胞系 HCT116、SW620 均购自上海中乔新舟生物科技有限公司;10%胎牛血清、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、苯甲基磺酰胺 (PMSF)、5×蛋白上样缓冲液均购自北京索莱宝生物科技有限公司;蛋白 Marker、快速高分辨电泳缓冲液、快速转膜液、快速封闭液、TBST、通用型抗体稀释液均购自武汉塞维尔生物科技有限公司;胰酶消化液购自苏州新赛美生物科技有限公司;PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (7.5%) 购自上海雅酶生物医药科技有限公司;小鼠抗人 NPC1L1 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;小鼠抗人 GAPDH 抗体、HRP 标记亲和纯山羊抗小鼠均购自武汉三鹰生物科技有限公司;GP-Transfect-Mate 转染试剂购自苏州吉玛基因股份有限公司;ECL 显影液购自南京诺维赞生物科技有限公司;细胞培养箱、常温离心机、高速低温离心机购自美国 Thermo Fisher 公司;超净细胞台购自山东博科医疗器械有限公司;倒置显微镜购自日本

奥林巴斯公司;SDS-PAGE 电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司;Tanon 成像仪购自上海天能科技有限公司。siRNA 序列由苏州吉玛基因股份有限公司合成,分别为(5'→3') si-阴性对照:UUCUCCGAACGUGUCA-CGUTT; si-NPC1L1-1: GGUGAUCACCUGAUCCUAU-TT; si-NPC1L1-2: CCCAAGAACUUCAGCGGAATT; si-NPC1L1-3: GCAACUUCUUGCCAACAATT; si-NPC1L1-4: GCAGUUGCAUAAGUAUCUUTT。

1.2 分析 *NPC1L1* mRNA 在结肠癌组织中的表达

收集 TIMER2.0 数据库 (<http://timer.cistrome.org>), 分析 33 种不同肿瘤组织与癌旁组织中 *NPC1L1* mRNA 表达差异,对 *NPC1L1* mRNA 进行泛癌分析。

从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库官网(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载结肠癌数据包,包括 mRNA 数据、临床病理特征数据及预后数据,进行整理,共有 456 例结肠癌患者。其中,包括 483 例结肠癌组织 mRNA 数据(部分患者癌组织不止一个)和 41 例癌旁组织 mRNA 数据,据此分析结肠癌组织与癌旁组织以及结肠癌组织与配对癌旁组织中 *NPC1L1* mRNA 表达差异。

1.3 分析 *NPC1L1* mRNA 表达与临床特征的相关性

整理 TCGA 中 456 例结肠癌患者临床数据,通过 R 软件自动计算 *NPC1L1* mRNA 表达最佳截断值,并据此将患者分为 *NPC1L1* mRNA 高表达组和低表达组;将 mRNA 数据与临床病理特征数据(包括性别、年龄、临床分期、T 分期、N 分期、M 分期等)合并,比较 *NPC1L1* mRNA 高、低表达组临床病理特征的差异。

1.4 分析 *NPC1L1* mRNA 表达对结肠癌的诊断价值

根据 *NPC1L1* mRNA 最佳截断值,绘制诊断 ROC 曲线,通过计算曲线下面积(area under curve, AUC)来明确 *NPC1L1* mRNA 表达差异与诊断结肠癌的准确性,以 AUC>0.7 说明准确性较高^[9]。

1.5 分析 *NPC1L1* mRNA 表达与结肠癌患者生存预后的关系

合并 *NPC1L1* mRNA 表达数据和预后数据,绘制结肠癌患者生存曲线,比较 *NPC1L1* mRNA 高、低表达组 5 年生存率。同时,从基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)下载结肠癌数据集 GSE41258 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),以同样方法比较 *NPC1L1* mRNA 高、低表达组生存

差异。采用 Cox 回归分析结肠癌患者预后的影响因素。

1.6 分析 *NPC1L1* mRNA 表达的潜在通路

将 *NPC1L1* mRNA 表达矩阵进行整理分析,将数据标准化处理后进行排序,分别取 *NPC1L1* mRNA 高、低表达的前 50 数据进行基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA),参数设置 log₂(倍数变化)>0, P<0.05, 错误发现率(false discovery rate, FDR)<0.25, 通过 R Studio 4.3.2 软件中的 Cluster Profiler 包输出 GSEA 图,输出富集最高的 10 条通路,分析 NPC1L1 参与结肠癌发生发展的潜在机制。

1.7 细胞培养与转染

将人结肠癌 HCT116、SW620 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,于 37℃、5% CO₂ 条件下培养;取对数生长期细胞接种于 6 孔板中,每孔密度 5×10⁵ 个,设置 5 组,分别为阴性对照、si-NPC1L1-1、si-NPC1L1-2、si-NPC1L1-3、si-NPC1L1-4 组;当细胞密度达 60%时,更换为无血清 RPMI 1640 培养基。以阴性对照组为例,按照转染说明书要求,取 8 μL siRNA、8 μL GP-Transfect-Mate 转染试剂,分别加至含 200 μL 无血清 RPMI 1640 培养基的 EP 管中,两者分别静置 5 min;将 siRNA-RPMI 1640 混合液与 GP-Transfect-Mate-RPMI 1640 混合液混合,静置 20 min;加至 6 孔板中对应的组别,其他序列转染步骤同阴性对照序列。转染 6 h 后将无血清 RPMI 1640 培养基更换为含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。

1.8 蛋白质印迹法检测细胞中 NPC1L1 表达

当“1.7”HCT116、SW620 转染细胞密度达 90% 时,提取蛋白。6 孔板每孔加入 150 μL 细胞裂解混合液(RIPA 裂解液:蛋白酶抑制剂:磷酸酶抑制剂:PMSF=97:1:1:1),轻轻晃动,冰上裂解 10 min;每孔加入 30 μL 5×蛋白上样缓冲液,收集细胞裂解产物,加至 1.5 mL EP 管;95℃金属浴加热 10 min,使蛋白变性;4℃,12 000 r/min 离心 10 min;取上清液即蛋白样品。分别取 10 μL 样品行 SDS-PAGE,150 V 90 min 分离蛋白;400 mA 45 min 冰上转 PVDF 膜;快速封闭液室温封闭 25 min;TBST 洗膜 3 次,10 min/次;加入相应的用抗体稀释液稀释的小鼠抗人 NPC1L1 抗体(稀释比 1:500)、小鼠抗人 GAPDH 抗体(稀释比 1:1 000),4℃孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,10 min/次;用 PBS 稀释的酶标亲和纯山羊抗小鼠二抗(稀释比 1:5 000)室温孵

育 2 h;TBST 洗膜 3 次,10 min/次;ECL 显影液进行暗室曝光,Image J 软件进行条带半定量分析。通过内参 GAPDH 调整蛋白上样量,重复实验,直至 GAPDH 灰度基本一致;筛选出敲减序列最高的 siRNA 设置为 si-NPC1L1 并进行后续平板克隆形成实验。

1.9 平板克隆形成实验检测结肠癌细胞克隆数

用 60 mm 培养皿分别对 HCT116、SW620 细胞培养与转染(具体方法同“1.7”),分为对照组(si-NC)及敲减组(si-NPC1L1)。当细胞密度达 90%时,胰酶消化,1 500 r/min 离心 5 min,行细胞计数;每个培养皿中加入 800 个细胞,于 5%CO₂、37 ℃培养箱中培养 14 d,期间每隔 3 d 换液并观察细胞状态;直至能肉眼可见细胞菌落时终止培养;弃培养基,PBS 洗涤;每个培养皿中加入适量 4%多聚甲醛固定约 30 min;PBS 洗 3 遍;加入结晶紫水溶液染色约 30 min;PBS 洗涤数次,晾干、拍照并用 Image J 计数。

1.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism10.1.2 进行数据统计及绘图。计数资料以例数(*n*)和百分比(%)表示,两组间比较采用 χ^2 检验;计量资料(近似正态分布)以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用配对 *t* 检验或独立样本 *t* 检验,非正态计量资料采用 Mann-

Whitney *U* 检验;采用 ROC 曲线和 AUC 值分析 NPC1L1 mRNA 在结肠癌诊断中的应用价值;绘制 Kaplan-Meier 生存曲线并采用 Log-rank 检验比较两组 5 年生存率差异;分别采用单因素和多因素 Cox 回归分析结肠癌患者的预后影响因素。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

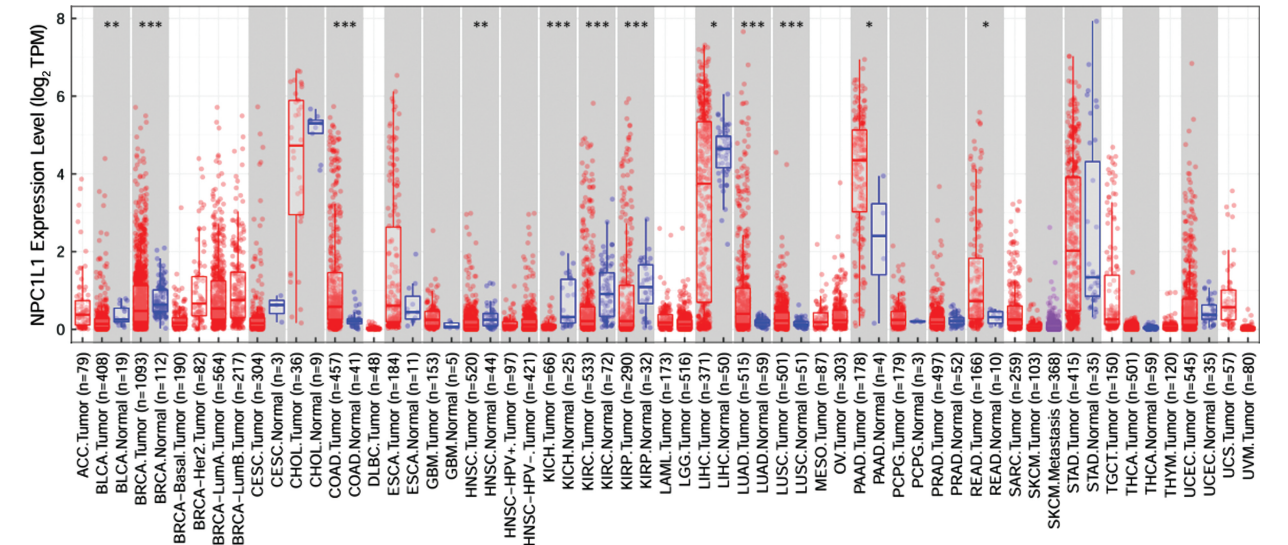
2 结果

2.1 NPC1L1 mRNA 在结肠癌组织及癌旁组织中表达

TIMER2.0 数据库分析结果显示,与癌旁组织相比,NPC1L1 mRNA 在结肠癌组织中表达明显升高(*P*<0.001),见图 1。TCGA 数据库分析结果显示,结肠癌组织中 NPC1L1 mRNA 表达明显高于癌旁组织(图 2A,*P*<0.001);结肠癌组织中 NPC1L1 mRNA 表达明显高于配对癌旁组织(图 2B,*P*<0.001)。由此说明,NPC1L1 在结肠癌组织中呈高表达。

2.2 NPC1L1 mRNA 在结肠癌组织中表达与临床特征的相关性

与 NPC1L1 mRNA 低表达组相比,NPC1L1 mRNA 高表达组 N 分期即淋巴结转移显著升高($\chi^2=2.126,P=0.034$),其余指标比较未见明显统计学差异(*P*>0.05)。见表 1。



* :*P*<0.05, ** :*P*<0.01, *** :*P*<0.001;ACC:肾上腺皮质癌;BLCA:膀胱尿路上皮癌;BRCA:乳腺浸润癌;CESC:宫颈鳞癌和腺癌;CHOL:胆管癌;COAD:结肠癌;DLBC:弥漫性大 B 细胞淋巴瘤;ESCA:食管癌;GBM:多形性胶质母细胞瘤;HNSC:头颈鳞状细胞瘤;KICH:肾嫌色细胞瘤;KICH:肾透明细胞瘤;KIRC:肾透明细胞瘤;KIRP:肾乳头状细胞瘤;LAML:急性髓系白血病;LGG:低级别胶质瘤;LIHC:肝细胞肝癌;LUAD:肺腺癌;LUSC:肺鳞癌;MESO:间皮瘤;OV:卵巢癌;PAAD:胰腺癌;PRAD:前列腺癌;PCPG:嗜铬细胞瘤和副神经节瘤;READ:直肠癌;SARC:肉瘤;SKCM:皮肤黑色素瘤;STAD:胃癌;TGCT:睾丸癌;THCA:甲状腺癌;THYM(胸腺癌);UCEC:子宫内膜癌;UCS:子宫内瘤;UVM:葡萄膜黑色素瘤。红色示肿瘤组织,蓝色示癌旁组织。TPM:每千个碱基的转录每百万映射读取的转录本

图 1 NPC1L1 mRNA 在肿瘤组织与癌旁组织中表达比较

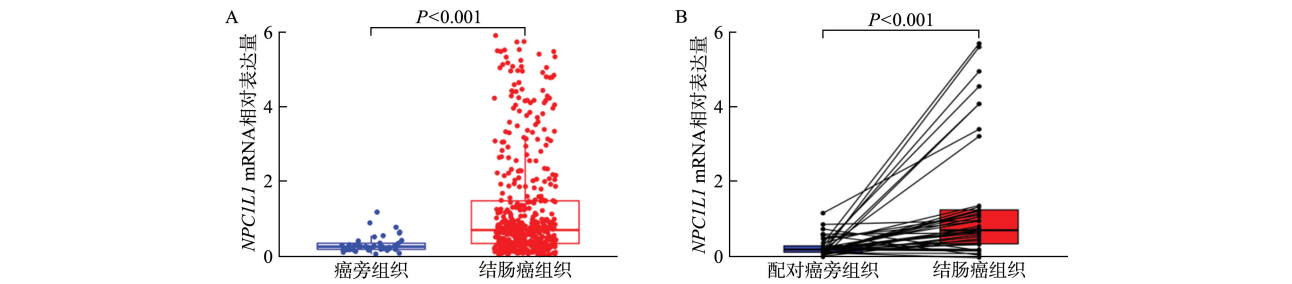


图 2 *NPC1L1* mRNA 在结肠癌组织与癌旁组织中的表达比较

表 1 *NPC1L1* mRNA 高表达组与低表达组临床病理特征比较

临床特征		<i>NPC1L1</i> mRNA 表达		χ^2 值	<i>P</i> 值
		低表达 (<i>n</i> = 226)	高表达 (<i>n</i> = 230)		
年龄	≤60 岁	70 (30.97%)	67 (29.13%)	0.184	0.668
	>60 岁	156 (69.03%)	163 (70.87%)		
性别	男	122 (53.98%)	117 (50.87%)	0.443	0.506
	女	104 (46.02%)	113 (49.13%)		
临床分期	I 期	44 (19.47%)	31 (13.48%)	6.796	0.147
	II 期	92 (40.71%)	85 (36.96%)		
	III 期	59 (26.11%)	69 (30.00%)		
	IV 期	28 (12.39%)	37 (16.09%)		
	未知	3 (1.33%)	8 (3.48%)		
T 分期	T1	7 (3.10%)	4 (1.74%)	6.552	0.162
	T2	40 (17.70%)	37 (16.09%)		
	T3	158 (69.91%)	153 (66.52%)		
	T4	20 (8.85%)	36 (15.65%)		
	未知	1 (0.44%)	0 (0.00%)		
M 分期	M0	172 (76.11%)	162 (70.43%)	1.949	0.377
	M1	28 (12.39%)	37 (16.09%)		
	未知	26 (11.50%)	31 (13.48%)		
N 分期	N0	144 (63.72%)	124 (53.91%)	2.126	0.034
	N1-3	82 (36.28%)	106 (46.09%)		

2.3 *NPC1L1* mRNA 表达对结肠癌的诊断价值

经计算 *NPC1L1* mRNA 表达的最佳截断值为 0.66, ROC 曲线结果显示, AUC 为 0.785 (95% CI: 0.728~0.839), 见图 3。由此说明, 通过 *NPC1L1* mRNA 差异表达来诊断结肠癌的准确性较高。

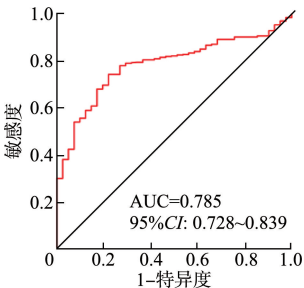


图 3 *NPC1L1* mRNA 的 ROC 诊断曲线

2.4 结肠癌患者 *NPC1L1* mRNA 表达与生存预后的相关性

生存分析结果显示, *NPC1L1* mRNA 高表达组 5 年生存率显著低于 *NPC1L1* mRNA 低表达组 ($P = 0.003$); GEO 数据库分析结果显示, *NPC1L1* mRNA 高表达组患者生存率显著低于 *NPC1L1* mRNA 低表达组 ($P < 0.001$)。见图 4。由此说明, *NPC1L1* mRNA 高表达与结肠癌患者不良预后相关。

单因素 Cox 回归分析结果显示, *NPC1L1* mRNA 高表达 ($P = 0.003$)、临床分期越晚 ($P < 0.001$) 与患者的总体预后较差相关; 多因素 Cox 回归分析结果显示, *NPC1L1* mRNA 高表达 ($P = 0.006$)、年龄越大 ($P < 0.001$) 及临床分期越晚 ($P < 0.001$) 与患者预

后较差相关。见表 2。由此说明,NPC1L1 mRNA 可能为结肠癌患者预后的独立影响因素。

2.5 结肠癌患者 NPC1L1 mRNA 功能富集分析

通过 GSEA 富集分析 NPC1L1 mRNA 参与结肠癌发生发展的潜在机制,在 NPC1L1 mRNA 高表达组中输出 10 条具有显著性差异的通路($P<0.05$,

$FDR<0.25$),分别为扩张型心肌病通路、药物代谢酶细胞色素 P450 通路、其他代谢酶通路、细胞色素 P450 对外源物的代谢通路、神经活性配体—受体相互作用通路、肾素—血管紧张素系统通路、视黄醇代谢通路、核糖体通路、类固醇激素生物合成通路和 Wnt 通路。见图 5。

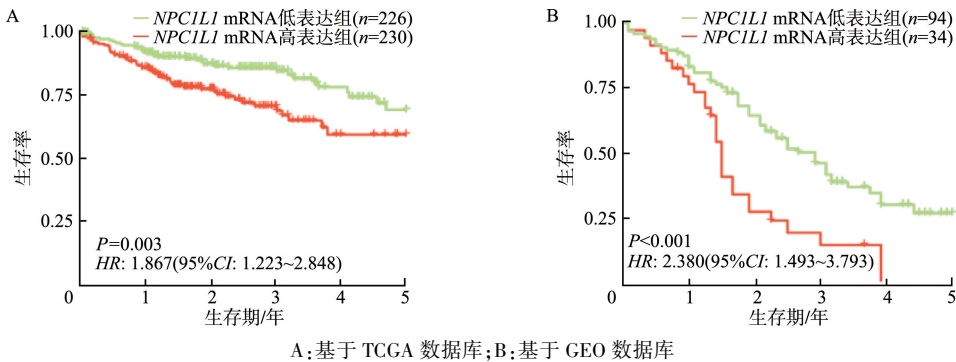


图 4 结肠癌患者 NPC1L1 mRNA 高、低表达生存期比较

表 2 结肠癌患者 NPC1L1 mRNA 表达与预后的 Cox 回归分析

临床特征	单因素 Cox 回归分析			多因素 Cox 回归分析		
	HR	95%CI	P 值	HR	95%CI	P 值
性别	1.017	0.666~1.554	0.937	0.924	0.602~1.420	0.720
年龄	1.027	1.007~1.046	0.006	1.040	1.020~1.060	<0.001
临床分期	2.158	1.693~2.750	<0.001	2.305	1.803~2.948	<0.001
NPC1L1 mRNA	1.927	1.247~2.976	0.003	1.867	1.201~2.902	0.006

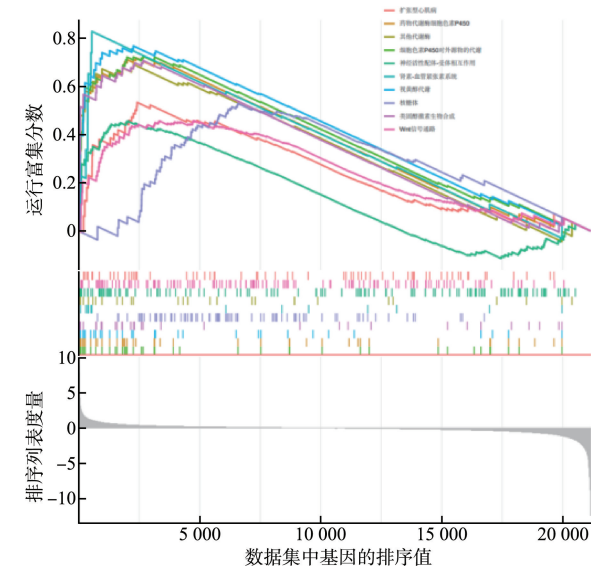
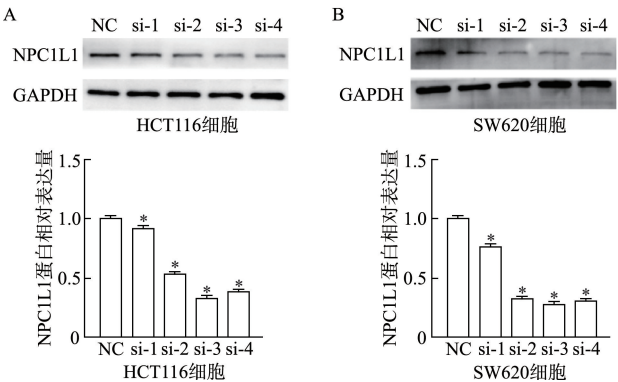


图 5 GSEA 富集分析

2.6 蛋白质印迹验证 siRNA 敲减 HCT116、SW620 细胞中 NPC1L1 蛋白表达

蛋白质印迹结果显示(图 6),在 HCT116 细胞中,与阴性对照组相比,si-NPC1L1-1 组、si-NPC1L1-2 组、si-NPC1L1-3 组及 si-NPC1L1-4 组 NPC1L1 蛋白表达明显降低(P 均 <0.001),其敲减效率分别为

8%、47%、67%、62%;在 SW620 细胞中,与阴性对照组相比,si-NPC1L1-1 组、si-NPC1L1-2 组、si-NPC1L1-3 组及 si-NPC1L1-4 组 NPC1L1 蛋白表达明显降低(P 均 <0.01),其敲减效率分别为 24%、68%、73%、70%。其中,si-NPC1L1-3 对 HCT116、SW620 中的 NPC1L1 敲减效率最高,达 65%以上。因此,选用 si-NPC1L1-3 序列进行后续实验。



A: HCT116 细胞;B: SW620 细胞;NC: 阴性对照组;si-1: si-NPC1L1-1 组;si-2: si-NPC1L1-2 组;si-3: si-NPC1L1-3 组;si-4: si-NPC1L1-4 组;*: $P<0.001$,与阴性对照组比较

图 6 siRNA 敲减后结肠癌 HCT116、SW620 细胞中 NPC1L1 蛋白表达水平比较

2.7 *NPC1L1* mRNA 影响结肠癌细胞增殖

平板克隆形成实验结果显示(图 7),当培养 14 d 时,与 si-NC 组相比,si-NPC1L1 组 HCT116、SW620 细胞克隆形成数显著降低(P 均 <0.001),表明敲减 *NPC1L1* 表达可抑制人结肠癌 HCT116、SW620 细胞增殖。

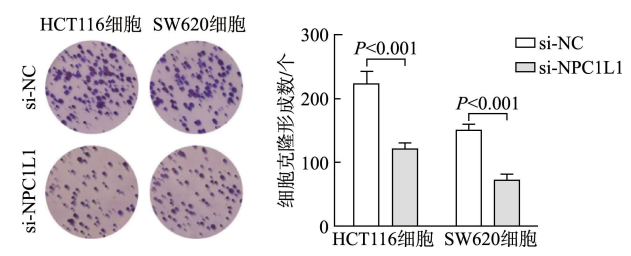


图 7 siRNA 敲减后 HCT116、SW620 细胞增殖能力比较

3 讨论

目前,研究显示 *NPC1L1* mRNA 在各恶性肿瘤中的表达不同。Zi 等^[10]研究表明,胰腺癌细胞过表达 *NPC1L1*,从而抑制 CD8⁺ T 细胞活化及耗竭 CD8⁺ T 细胞中的胆固醇,促进胰腺癌发展;而当抑制 *NPC1L1* 后,可有效增强机体免疫力,形成抗肿瘤作用。Chen 等^[11]研究发现,*NPC1L1* 在肝癌组织中的表达低于癌旁组织,且 *NPC1L1* 低表达与肝细胞癌的低分化、血管侵袭及较晚的临床分期相关,表明 *NPC1L1* 在肝细胞癌中表现为抑癌作用。本研究基于生物信息学分析,结果显示,*NPC1L1* mRNA 在结肠癌组织中呈高表达。*NPC1L1* 蛋白作为肠道胆固醇吸收的关键调控蛋白,其高表达可能通过促进肿瘤细胞对胆固醇的过度摄取,导致细胞内胆固醇水平升高,从而激活 PI3K/AKT 和 MAPK 等促癌信号通路,驱动结肠癌细胞增殖与侵袭^[12-13]。

本研究结果显示,淋巴结转移(N1-3 期)患者中 *NPC1L1* mRNA 表达显著高于无淋巴结转移者(N0 期),可能反映肿瘤细胞对胆固醇的依赖性逐步增强,以满足其向深层组织侵袭的能量和结构需求^[10]。结肠癌细胞可能通过 *NPC1L1* 蛋白介导的胆固醇摄取,耗竭微环境中的游离胆固醇,导致 CD8⁺ T 细胞功能抑制(如 T 细胞受体信号通路和免疫突触形成障碍),从而促进转移灶的形成^[14-15]。*NPC1L1* mRNA 表达与淋巴结转移显著关联,表明其可作为结肠癌进展的潜在生物标志物,通过联合检测 *NPC1L1* mRNA 表达与影像学特征可能有助于预测局部侵袭和转移风险。

此外,本研究通过 ROC 曲线分析发现,*NPC1L1* mRNA 表达对结肠癌的诊断效能较高($AUC =$

0.785),表明其在区分肿瘤组织与癌旁组织中的潜在诊断价值。相较于癌旁组织,结肠癌细胞通过 *NPC1L1* 蛋白介导的胆固醇摄取可能形成独特的代谢特征,从而在基因表达谱中呈现显著差异,这为基于 *NPC1L1* 的诊断模型提供了生物学基础^[16-17]。此外,AUC 值(>0.7)提示 *NPC1L1* mRNA 表达水平可能在早期筛查中具有辅助意义,尤其是对于内镜或影像学不典型的结肠癌病例。

NPC1L1 mRNA 高表达通过增加外源性胆固醇摄取,导致肿瘤细胞内胆固醇水平异常升高,而高胆固醇微环境可进一步诱导氧化应激反应,促进 DNA 损伤修复缺陷和基因组不稳定性,加速肿瘤恶性转化^[18-19]。本研究生存分析结果显示,*NPC1L1* mRNA 高表达组结肠癌患者 5 年生存率显著低于 *NPC1L1* mRNA 低表达组。此外,已证实胆固醇代谢产物可通过激活雌激素受体或肝 X 受体通路,调控细胞周期相关基因,驱动肿瘤细胞增殖并抑制凋亡^[20]。这些机制可能共同导致 *NPC1L1* mRNA 高表达患者对传统化疗的耐受性增强,从而显著降低长期生存率。*NPC1L1* mRNA 高表达可能标志着一类具有“代谢成癌”特征的结肠癌亚型,这类肿瘤更依赖外源性胆固醇供给,且对靶向代谢通路的治疗敏感^[21]。本研究 Cox 回归分析结果显示 *NPC1L1* mRNA 为影响结肠癌患者预后的独立因素,提示其不受年龄、TNM 分期等干扰,可能反映肿瘤内在的代谢侵袭特性。

此外,本研究通过 GSEA 发现 *NPC1L1* mRNA 高表达的结肠癌组织中显著富集 10 条通路,且与 *NPC1L1* 蛋白介导的胆固醇代谢重编程、肿瘤免疫逃逸及侵袭转移密切相关,进一步揭示 *NPC1L1* mRNA 在结肠癌中的多维度调控作用。以 Wnt 通路为例,该通路是结肠癌发生发展的核心驱动因素,其异常激活可诱导 β -catenin 核转位,同时抑制 CD8⁺ T 细胞浸润,而 *NPC1L1* mRNA 通过劫持 T 细胞胆固醇进一步加剧免疫抑制,形成“代谢—免疫—干细胞”恶性循环^[10,22]。*NPC1L1*、Wnt 信号通路及结肠癌三者之间是否存在关联后续有待进一步研究。

本研究通过细胞实验进一步验证 *NPC1L1* 在结肠癌中高表达且具有促癌功能。但是,不同 siRNA 序列对 *NPC1L1* 干扰效率存在显著差异,这可能与 siRNA 靶向位点及细胞系的表现遗传背景有关。其中,si-NPC1L1-3 可能靶向 *NPC1L1* mRNA 的高保守区域或开放染色质区,从而更高效地抑制其翻译^[23]。此外,*NPC1L1* 敲低后 HCT116 和 SW620 细胞的克隆形成能力显著降低,提示靶向 *NPC1L1* 可

能通过抑制肿瘤干细胞特性或细胞周期进程发挥抗增殖作用^[24]。

综上所述,本研究通过生物信息学分析结果表明,*NPC1L1* mRNA在结肠癌中呈高表达,且与结肠癌患者预后呈负相关,其有可能成为结肠癌诊治的生物学标志物。

[参考文献]

- [1] Samuel SM, Varghese E, Büsselberg D. Complexity of insulin resistance in early-onset colorectal cancer[J]. *Cancer Cell*, 2025, 43(5): 797–802.
- [2] Rutter MD, Beintaris I, Valori R, et al. World endoscopy organization consensus statements on post-colonoscopy and post-imaging colorectal cancer[J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(3): 909–925. e3.
- [3] Downing A, Morris EJA, Richards M, et al. Health-related quality of life after colorectal cancer in England: a patient-reported outcomes study of individuals 12 to 36 months after diagnosis[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(6): 616–624.
- [4] Yao C, Nash GF, Hickish T. Management of colorectal cancer and diabetes[J]. *J R Soc Med*, 2014, 107(3): 103–109.
- [5] Hunger R, Kowalski C, Paasch C, et al. Outcome variation and the role of caseload in certified colorectal cancer centers—a retrospective cohort analysis of 90 000 cases[J]. *Int J Surg*, 2024, 110(6): 3461–3469.
- [6] Eng C, Yoshino T, Ruíz-García E, et al. Colorectal cancer[J]. *Lancet*, 2024, 404(10449): 294–310.
- [7] Xu C, Fu F, She Y, et al. NPC1L1 plays a novel role in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *ACS Omega*, 2023, 8(51): 48586–48589.
- [8] Ge L, Wang J, Qi W, et al. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1[J]. *Cell Metab*, 2008, 7(6): 508–519.
- [9] Zou KH, O'Malley AJ, Mauri L. Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models[J]. *Circulation*, 2007, 115(5): 654–657.
- [10] Zi R, Shen K, Zheng P, et al. NPC1L1 on pancreatic adenocarcinoma cell functions as a two-pronged checkpoint against antitumor activity[J]. *Innovation*, 2025, 6(3): 100783.
- [11] Chen KJ, Jin RM, Shi CC, et al. The prognostic value of Niemann-Pick C1-like protein 1 and Niemann-Pick disease type C2 in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer*, 2018, 9(3): 556–563.
- [12] Zhang R, Liu W, Zeng J, et al. Recent advances in the screening methods of NPC1L1 inhibitors[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113732.
- [13] Zhang R, Zeng J, Liu W, et al. The role of NPC1L1 in cancer[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 956619.
- [14] Ontsouka CE, Burgener IA, Mani O, et al. Polyunsaturated fatty acid-enriched diets used for the treatment of canine chronic enteropathies decrease the abundance of selected genes of cholesterol homeostasis[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2010, 38(1): 32–37.
- [15] Tang X, Yang Y, Peng W, et al. *Platyodon* D reduces obesity and non-alcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet through inhibiting intestinal fat absorption[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1412453.
- [16] Ferrari A, Whang E, Xiao X, et al. *Aster*-dependent nonvesicular transport facilitates dietary cholesterol uptake[J]. *Science*, 2023, 382(6671): ead0966.
- [17] Filippatos TD, Elisaf MS. Role of ezetimibe in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *World J Hepatol*, 2011, 3(10): 265–267.
- [18] Liu Y, Chen D, Li J, et al. *NPC1L1*-targeted cholesterol-grafted poly(β -amino ester)/pDNA complexes for oral gene delivery[J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(8): e1800934.
- [19] Krycer JR, Brown AJ. Cholesterol accumulation in prostate cancer: a classic observation from a modern perspective[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1835(2): 219–229.
- [20] Nelson ER, Wardell SE, Jasper JS, et al. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology[J]. *Science*, 2013, 342(6162): 1094–1098.
- [21] Guo Y, Liu B, Geng Y, et al. Fisetin, a dietary flavonoid, promotes transintestinal cholesterol excretion through the activation of PPAR δ [J]. *Food Res Int*, 2024, 175: 113783.
- [22] Hu M, Yang F, Huang Y, et al. Structural insights into the mechanism of human NPC1L1-mediated cholesterol uptake[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(29): eabg3188.
- [23] Mokhtar FBA, Plat J, Mensink RP. Genetic variation and intestinal cholesterol absorption in humans: a systematic review and a gene network analysis[J]. *Prog Lipid Res*, 2022, 86: 101164.
- [24] Zhang Z, Qin S, Chen Y, et al. Inhibition of NPC1L1 disrupts adaptive responses of drug-tolerant persister cells to chemotherapy[J]. *EMBO Mol Med*, 2022, 14(2): e14903.