

# 幽门螺杆菌上调 ADAMTS14 激活 Hippo 信号通路对胃癌进展的影响及其机制

张博<sup>1</sup>, 米阳<sup>1</sup>, 刘斌<sup>1,2</sup>, 鲁彦文<sup>1,2</sup>, 郑鹏远<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>郑州大学第五附属医院消化内科, 河南郑州 450052; <sup>2</sup>郑州大学医学科学院, 河南郑州 450052

[中图分类号] R735.2; R37 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0934.2024.0527

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 张博, 米阳, 刘斌, 等. 幽门螺杆菌上调 ADAMTS14 激活 Hippo 信号通路对胃癌进展的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(9): 1045-1054.

[收稿日期] 2023-07-12 [录用日期] 2023-12-15 [上线日期] 2024-05-27

**[摘要]** 目的 研究 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 14 基因(ADAMTS14)对幽门螺杆菌(Hp)感染相关胃癌进展的影响及其机制, 探讨 ADAMTS14 作为胃癌生物治疗新靶点的可能性。方法 利用癌症基因组图谱(TCGA)及高通量基因表达数据库(GEO)分析胃癌组织及 Hp 阳性胃黏膜中差异表达的基因, 筛选可能的靶点; 对于选定的靶点 ADAMTS14, 分析其在胃癌及 Hp 阳性胃黏膜中的表达模式; 对胃癌中与 ADAMTS14 共表达的基因进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库分析; 利用 Kaplan-Meier Plotter 数据库分析 ADAMTS14 高低表达与胃癌患者预后的相关性; 利用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和免疫组化方法分析 30 例胃癌患者的 ADAMTS14 表达水平, 采用  $\chi^2$  检验分析 ADAMTS14 蛋白表达与临床病理特征之间的关系; 利用 GEO 数据库分析 Hp 感染与 ADAMTS14 表达的关系, 并通过细胞系感染实验验证; 利用小干扰 RNA 沉默胃癌细胞系 NCI-N87 中 ADAMTS14 的表达, 分析其对胃癌细胞功能的影响; 利用 RT-qPCR 和 Western blotting 分析敲低 ADAMTS14 对 Hippo 信号通路下游靶基因表达的影响。结果 通过分析 TCGA 和 GEO 数据库, 共得到 16 个与 Hp 感染及胃癌密切相关的基因; 在 TCGA 数据库中, ADAMTS14 在胃癌组织中的表达水平高于健康人胃黏膜 ( $P<0.001$ ); RT-qPCR 及免疫组化结果也显示, ADAMTS14 在胃癌组织中的表达水平高于癌旁组织 ( $P<0.01$ ); 生存分析显示 ADAMTS14 高表达患者的预后不良 ( $P<0.001$ ); GSE60427 的数据显示 ADAMTS14 在 Hp 感染的胃黏膜及细胞系中表达上调 ( $P<0.001$ ); Hp P12 菌株感染 NCI-N87 细胞后 ADAMTS14 表达高于未感染组 ( $P<0.0001$ ); 敲低胃癌细胞系 NCI-N87 中 ADAMTS14 明显抑制了胃癌细胞的增殖及迁移 ( $P<0.05$ ), 以及 Hippo 信号通路靶基因 BMP7、BMP2、FZD4、PARD3、SAV1 的表达 ( $P<0.05$ )。结论 ADAMTS14 在 Hp 感染的胃黏膜及胃癌组织中高表达, 可能通过调控 Hippo 信号通路促进胃癌进展, 有望作为 Hp 感染相关胃癌的新标志物及治疗靶点。

**[关键词]** 胃癌; 幽门螺杆菌; I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 14; Hippo 信号通路

## Effects of *Helicobacter pylori* on gastric cancer progression by upregulating ADAMTS14 and activating Hippo signaling pathway and its underlying mechanisms

Zhang Bo<sup>1</sup>, Mi Yang<sup>1</sup>, Liu Bin<sup>1,2</sup>, Lu Yan-Wen<sup>1,2</sup>, Zheng Peng-Yuan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China

<sup>2</sup>Academy of Medical Science, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China

\*Corresponding author, E-mail: medp7123@126.com

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFC2006101), and the Key Project for Discipline Construction of Zhengzhou University (XKZDJC202001)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the effects and mechanisms of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 14 (ADAMTS14) gene in gastric cancer associated with *Helicobacter pylori* (Hp) infection and explore the potential of

**[基金项目]** 国家重点研发计划(2020YFC2006101); 郑州大学学科建设重点专项(XKZDJC202001)

**[作者简介]** 张博, 硕士研究生, 主要从事胃肠道肿瘤及免疫微生态方面的研究

**[通信作者]** 郑鹏远, E-mail: medp7123@126.com

*ADAMTS14* as a novel target for biological therapy of gastric cancer. **Methods** The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Gene Expression Omnibus (GEO) databases were utilized to analyze differentially expressed genes in gastric cancer tissues and Hp-positive gastric mucosa, and to screen potential targets. For the selected target *ADAMTS14*, its expression pattern in gastric cancer and Hp-positive gastric mucosa was analyzed. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis was performed on the genes co-expressed with *ADAMTS14* in gastric cancer. Kaplan-Meier Plotter database was used to analyze the correlation between high- and low-*ADAMTS14* expression and prognosis of gastric cancer patients. The expression of *ADAMTS14* and its relationship with clinicopathological features in 30 patients with gastric cancer were analyzed using real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) and immunohistochemistry. The relationship between Hp infection and *ADAMTS14* expression was analyzed using GEO database, and confirmed by cell line infection experiment. *ADAMTS14* expression in gastric cancer cell line NCI-N87 was silenced by small interfering RNA to analyze its effect on the function of gastric cancer cells; The effect of *ADAMTS14* knockdown on downstream target genes of Hippo signaling pathway was analyzed by RT-qPCR and Western blotting. **Results** A total of 16 genes closely related to Hp infection and gastric cancer were identified by analyzing the TCGA and GEO databases. According to TCGA database, the *ADAMTS14* expression in gastric cancer tissues was higher than that in healthy gastric mucosa ( $P<0.0001$ ). RT-qPCR and immunohistochemistry results also showed higher *ADAMTS14* expression in gastric cancer tissues compared to adjacent tissues ( $P<0.01$ ). Survival analysis demonstrated poor prognosis in patients with high *ADAMTS14* expression ( $P<0.001$ ). Data from GSE60427 showed that *ADAMTS14* expression was upregulated in Hp-infected gastric mucosa and cell lines ( $P<0.001$ ). After Hp P12 infection, the *ADAMTS14* expression in NCI-N87 cells was higher than that in uninfected group. *ADAMTS14* knockdown significantly inhibited the proliferation and migration of NCI-N87 cells ( $P<0.05$ ), and it also significantly inhibited the expression of Hippo signaling pathway target genes, including *BMP7*, *BMPR2*, *FZD4*, *PARD3* and *SAVI* ( $P<0.05$ ). **Conclusion** *ADAMTS14* is highly expressed in Hp-positive gastric mucosa and gastric cancer tissues, which may accelerate gastric cancer progression by regulating Hippo signaling pathway, and holds potential as a new marker and therapeutic target for Hp infective gastric cancer.

**[Key words]** gastric cancer; *Helicobacter pylori*; *ADAMTS14*; Hippo signaling pathway

胃癌是一种高度恶性的肿瘤，也是全球癌症相关死亡的第三大原因<sup>[1-3]</sup>，幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染是胃癌最主要的致病因素<sup>[4]</sup>。Hp感染引起胃癌的机制复杂多样，可能引起一系列信号通路的激活及分子改变<sup>[5]</sup>，如Hippo信号通路等，诱发从炎症、萎缩性胃炎、肠上皮化生甚至到胃癌的病程<sup>[6]</sup>。因此，探索Hp感染过程中的分子改变有助于治疗Hp感染导致的胃癌<sup>[7]</sup>。

I型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 14(a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 14, *ADAMTS14*)基因编码一种蛋白酶，在胶原蛋白的代谢及修饰中发挥重要作用，在多种肿瘤组织中表达上调，并与多种恶性肿瘤如结直肠癌、肝细胞癌等的发生、发展及预后有关<sup>[8]</sup>，但*ADAMTS14*在胃癌中的作用机制少有报道。Hippo信号通路在多种癌症中响应于Hp感染而激活<sup>[9]</sup>，从而促进胃癌的发生，与胃癌的预后不良有关<sup>[10-12]</sup>。本研究分析Hp感染后胃癌细胞中*ADAMTS14* mRNA和蛋白表达水平的变化，进而探讨其在Hp感染及胃癌进展中的作用及其可能机制，旨在为*ADAMTS14*应用于胃癌的临床治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞系和菌株 人正常胃上皮细胞系 GES-1，

以及人胃癌细胞系 SGC7901、MGC803、MKN45、AGS、NCI-N87 购自中科院上海细胞库，培养于含 10% 胎牛血清及 1% 青/链霉素混合液的 RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司)中，置于温度 37 ℃、饱和湿度的培养箱中。所有细胞均经过短串联重复序列(short tandem repeat, STR)鉴定。Hp 标准菌株 P12 由德国柏林 Max Planck 感染生物研究所 Thomsa F. Meyer 教授馈赠，培养于巧克力琼脂培养平板，置于温度 37 ℃、饱和湿度，且含有 5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub> 及 70% N<sub>2</sub> 的培养箱中，每 3 d 传代 1 次。

1.1.2 胃癌样本 胃癌组织样本取自 2021 年 2 月—2022 年 1 月在郑州大学第五附属医院行胃全或次全切除术的 30 例胃癌患者，其中男 17 例，女 13 例，年龄(61.3±10.6)岁，所有患者术前均未接受放疗及化疗。同时取距离癌组织 10 cm 以上的正常胃黏膜作为癌旁组织，置于冰冷的 RPMI 1640 培养基中，用于后续实验。本研究获郑州大学第五附属医院伦理委员会审批(KY2020029)，所有患者均签署知情同意书。

### 1.2 实验方法

1.2.1 公共数据分析 通过突变分析与可视化(cBioPortal)数据库下载经过标准化处理的胃腺癌癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)表达数据及临床信息，包含 402 例胃癌组织及 34 名健康志愿者胃黏膜的转录组测序(RNA-seq)数据。通过高通量基因表达数据库(Gene Expression Omnibus,

GEO)下载 GSE60427、GSE154127 的表达数据, 包含 Hp 感染患者的胃黏膜, 以及 Hp 阴性志愿者胃黏膜和胃癌类器官的 RNA-seq 数据, 并进行标准化处理。使用桑格助手在线平台 (<http://vip.sangerbox.com/>) 进行差异基因分析及可视化, 并通过韦恩图工具进行共有差异基因的归类<sup>[13]</sup>。

**1.2.2 基因集功能富集分析** 使用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)rest API(<https://www.kegg.jp/kegg/rest/keggapi.html>)获取最新的 KEGG Pathway 基因注释, 并采用 R 软件包 clusterProfiler(version 3.14.3)进行富集分析, 以获得基因集富集的结果。设定最小基因集为 5, 最大基因集为 5000, 阈值为  $P < 0.05$  及错误发现率(FDR)  $< 0.25$ 。

**1.2.3 转染** 将  $2 \times 10^5$  个细胞均匀接种到 6 孔板中, 待细胞融合达 70%~80% 时, 更换不含抗生素的培养基; 然后配置转染复合体: 在 200  $\mu$ l jetPRIME<sup>®</sup> buffer (Polyplus, 114-07/15) 中加入 12.5  $\mu$ l si-RNA-ADAMTS14 或 si-NC(苏州吉玛基因股份有限公司), 使其终浓度为 100 nmol/L, 再加入 4  $\mu$ l 转染试剂 jetPRIME<sup>®</sup>, 轻轻混匀后静置 10 min, 室温下将转染复合物滴加至细胞培养基, 置于培养箱中 48 h, 然后收集细胞用于后续实验。敲低序列如下, siADAMTS14-1: 5'-CU GGGAUCAACUACUCAAUTT-3', siADAMTS14-2: 5'-G CACCGACUUCUUCUUGATT-3', siADAMTS14-3: 5'-CCUCAUGAAUAUCGUAGAUTT-3'。

**1.2.4 细胞迁移** 将  $1 \times 10^5$  个细胞用 200  $\mu$ l 无血清培养基重悬后, 加入 Transwell 培养板(美国 Corning 公司)的上室, 下室中加入 600  $\mu$ l 完全培养基, 置于培养箱孵育 48 h。移除培养基, 用棉签擦去上室未迁移的细胞, 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 30 min, 用 0.1% 结晶紫染色液(北京索莱宝科技有限公司)染色 30 min, 再用 PBS 充分洗去染色液。置于显微镜下, 任意选取 5 个 400 倍视野观察并拍照。

**1.2.5 Hp 菌液制备及感染细胞** 将  $2 \times 10^5$  个细胞均匀接种到 6 孔板中, 待细胞生长融合至 70% 时更换无血清培养基, 过夜以增加感染效率。准备 Hp 菌液, 用棉签在巧乐力琼脂培养平板上刮下生长 2~3 d 的 Hp 菌落, 重悬至液体培养基(BHI+10% FBS+1% 抗生素)中, 调整培养基用量, 使细菌悬液在 460 nm 波长处光密度(OD)值为 0.15, 然后置于厌氧工作站中培养 24 h。Hp 感染细胞: 取在厌氧工作站培养 24 h 后的细菌悬液, 检测 OD 值并计算细菌数量, 然后以 4500 r/min 离心 8 min 收集 Hp, 用 RPMI 1640 培养基将细菌稀释到  $1 \times 10^8$  菌落形成单位(colony-forming units, CFU)/ml, 按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)=100 的比例加入细胞中进行感染。

在分别感染 24、48、72 h 后, 弃上清, PBS 洗 3 次, 然后更换含 200  $\mu$ g/ml 庆大霉素(大连美仑生物技术有限公司)的无血清 RPMI 1640 培养基处理 1 h, 以杀死未感染细胞的细菌, 随后用 PBS 清洗, 并用于后续的 RNA 提取及蛋白检测。

**1.2.6 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 ADAMTS14 及 Hippo 信号通路相关基因 mRNA 的表达量** 用 Trizol 法提取 RNA 后, 按反转录试剂盒说明书于 37  $^{\circ}$ C 下反转录 15 min, 并在 98  $^{\circ}$ C 下行酶失活反应 5 min, 得到 cDNA, 稀释 10 倍后作为模板配置荧光定量 PCR 体系。分别加入 10  $\mu$ l 2 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix(南京诺唯赞科技公司)、2.8  $\mu$ l 引物混合物(上、下游引物均为 5  $\mu$ mol/L)及 5.2  $\mu$ l 无酶水, 最后加入 2  $\mu$ l cDNA 模板进行 RT-qPCR 反应。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 活化 2 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火/延伸 10 s, 循环 40 次。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算相对表达量。引物由中国生工生物工程有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 的引物序列

Tab.1 Primer sequences of RT-qPCR analysis

基因	引物序列(5'-3')
GAPDH	上游: CAGCGACACCCACTCCTC
	下游: TGAGGTCCACCACCCTGT
ADAMTS14	上游: CAGCACAGACTTTCGGGGAC
	下游: GGAGTGTCTGGTAGTGTGG
BMP7	上游: GGAACGCTTCGACAATGAGAC
	下游: GCAGGAAGAGATCCGATTCCC
BMPR2	上游: GCAGACAGAGCCGATGGTAG
	下游: CCATATCGACCTCGGCCAATC
FZD4	上游: GTGTCCTCTGTGGGAACCAA
	下游: GGCTGTATAAGCCAGCATCAT
PARD3	上游: GCCTTTCAGCCTTACCAAGCA
	下游: GGTCCTACTGCGTCGAACAT
SAV1	上游: CTCTTGAGCGAGAAGGACTTCC
	下游: GAGGTACTAGGAGCACAGG

GAPDH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; ADAMTS14. I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 14; BMP7. 骨形态发生蛋白 7; BMPR2. 骨形态发生蛋白 2 型受体; FZD4. 卷曲类蛋白受体 4; PARD3. 分离缺陷基因 3; SAV1. 人同源重组蛋白 1

**1.2.7 Western blotting 检测 ADAMTS14 蛋白表达量** 使用一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒(10%)制备 SDS-PAGE 凝胶, 电泳按照 80 V、30 min, 100 V、60 min 两步法进行, 结束后取出凝胶, 制作转膜三明治结构, 按 300 mA、90 min 恒流电转。取出硝酸纤维素膜, 置于含 5% 脱脂奶粉封闭液中封闭 1 h, 加入鼠 ADAMTS14(1:500; 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司), 兔源人同源重组蛋白 1(SAV1)抗体(1:1000)、

兔源骨形态发生蛋白7(BMP7)抗体(1:5000)、兔源卷曲类蛋白受体4(FZD4)抗体(1:800)、鼠GAPDH(1:10 000;英国Abcam公司)一抗,4℃孵育过夜。次日取出回收一抗,充分清洗后加入二抗,室温孵育1h,结束后充分清洗,并采用Bio-Rad曝光仪曝光及拍照分析。

**1.2.8 ADAMTS14表达水平与胃癌患者生存预后分析** 采用Kaplan-Meier Plotter(<https://kmpplot.com>)数据库分析ADAMTS14表达水平与胃癌患者生存预后的数据。

**1.2.9 免疫组化检测ADAMTS14蛋白表达水平** 收集胃癌患者的肿瘤组织及其癌旁组织,其中Hp阳性12例,阴性18例,将组织切片分别置于二甲苯、无水乙醇中脱蜡、脱苯;柠檬酸钠抗原修复15 min。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和山羊血清依次封闭15 min,鼠ADAMTS14一抗(1:100)4℃孵育过夜。次日洗去一抗,依次加入50 μl生物素化二抗及辣根酶标记链霉卵白素孵育20 min;二氨基联苯胺(3,3'-diamino-benzidine, DAB)染色2 min,苏木精复染细胞核1 min,脱水、透明、中性树脂封片。采用德国半定量评分法对结果进行评分<sup>[4]</sup>。具体评分方法:视野内阳性细胞数占总细胞数的比例<5%计为0分,5%~25%计为1分,50%~75%计为3分,>75%计为4分;然后按照多数细胞的染色程度进行评分:未着色计为0分,浅黄色计为1分,棕黄色计为2分,棕褐色计为3分。综合得分为阳性细胞百分比得分与染色强度得分之积,并作为半定量差异性分析;再根据以下标准统计阳性表达例数以分析ADAMTS14蛋白表达水平与患者临床病理特征的相关性:0~2分记为阴性(-),3~5分记为弱阳性(+),6~8分记为阳性(++),9~12分记为强阳性(+++)。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS 25.0软件进行统计分析,采用GraphPad 9.0软件作图。计量资料采用Shapiro-Wilk检验及方差齐性检验分析,方差齐且符合正态分布时以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验;不符合正态分布时,两组间比较采用Mann-Whitney  $U$ 检验。计数资料以例(%)表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验。生存率分析采用log-rank检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Hp感染对胃黏膜及胃癌组织中ADAMTS14表达的影响** 对TCGA数据库中胃癌组织及数据集GSE60427、GSE154127中Hp感染患者的胃黏膜行RNA-seq,得到16个共有的上调基因:ADAMTS14、NOX1、IDO1、MMP7、CXCL6、UBD、CXCL1、CXCL5、PLA2G7、CCL20、LAMP3、TNFRSF9、

CXCL3、IFITM1、TLR2、ICAM1(图1A)。胃癌组织与健康胃黏膜间有2933个差异表达基因(图1B);在Hp感染患者的胃黏膜数据集GSE60427中,Hp阳性与Hp阴性胃黏膜间有770个差异表达基因(图1C);而胃癌类器官与健康胃黏膜间有689个差异表达基因(图1D)。

在TCGA数据集中,胃癌组织中ADAMTS14 mRNA表达水平高于健康志愿者的胃黏膜组织( $P<0.001$ ,图2A)。同一患者的胃癌组织中ADAMTS14 mRNA表达水平明显高于癌旁组织( $P<0.01$ ,图2B)。

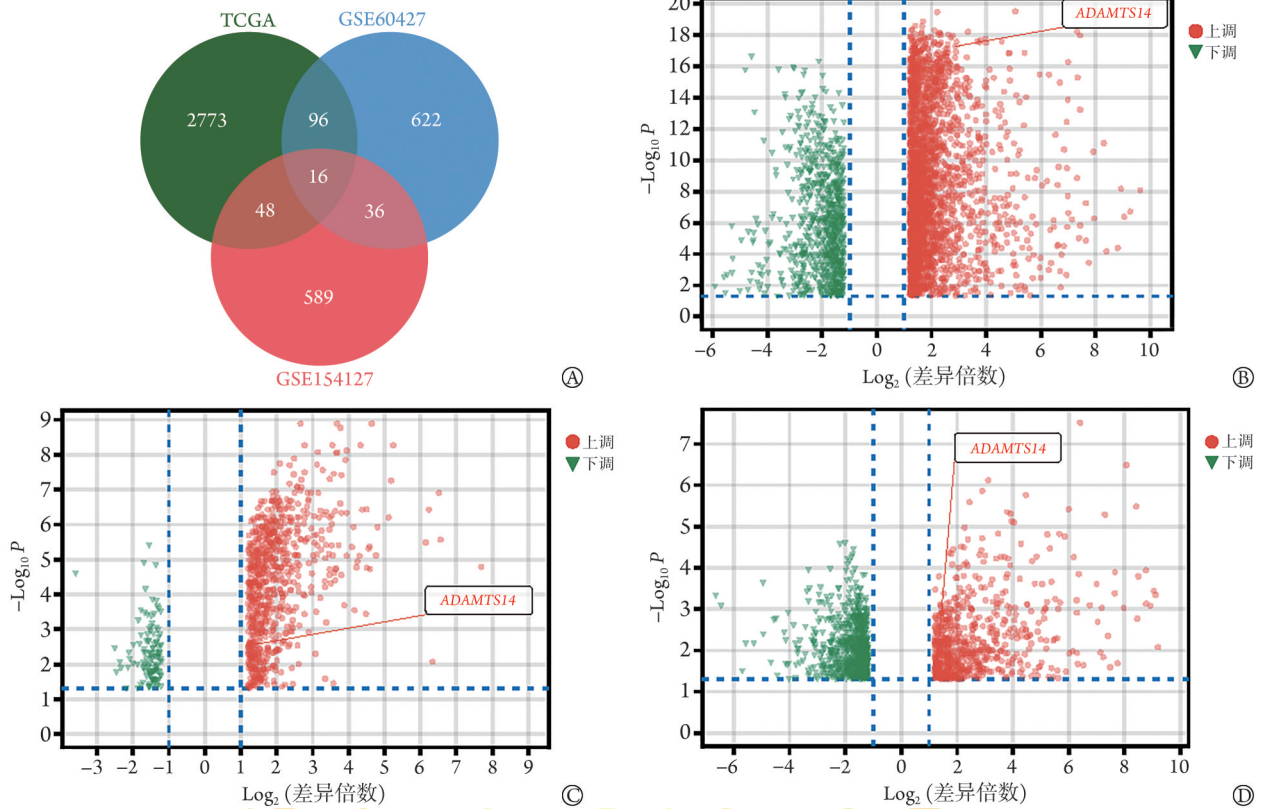
**2.2 ADAMTS14在胃癌中表达共聚类分析** 在TCGA数据库的胃癌患者中,ADAMTS14与COCL18A1、INHBB、CHST15、KIAA1199、SLCO3A1等基因共表达水平较高,相关系数分别为0.57、0.44、0.44、0.42、0.40(图3)。

**2.3 ADAMTS14功能富集分析** 将2.2共聚类分析中获得的与ADAMTS14表达相关性最强的前300个基因进行KEGG通路富集分析,结果显示,ADAMTS14基因参与乳腺癌、胃癌、轴突导向及Hippo信号通路等(图4)。

**2.4 ADAMTS14敲低对细胞功能的影响** 5种胃癌细胞系AGS、MGC803、SGC7901、MKN45、NCI-N87中ADAMTS14 mRNA表达水平高于正常胃上皮细胞系GES-1( $P<0.05$ ,图5A)。选择表达水平最高的NCI-N87细胞系进行敲低实验,首先利用siRNA沉默细胞中ADAMTS14 mRNA的表达;选定的3条干扰序列中有2条(siADAMTS14-1、siADAMTS14-2,分别简称为siRNA1、siRNA2)显示出明显的敲低效果( $P<0.001$ ,图5B)。CCK-8法检测结果显示,24、48、72 h时siRNA1组、siRNA2组的NCI-N87细胞活力均低于对照组( $P<0.01$ ,图5C)。细胞迁移实验结果显示,siRNA1组、siRNA2组的细胞迁移数量均少于对照组( $P<0.01$ ,图5D)。

**2.5 Hp与ADAMTS14 mRNA表达的相关性** 公共数据集GSE60427显示Hp阳性组织中ADAMTS14 mRNA表达水平升高( $P<0.0001$ ,图6A)。RT-qPCR检测结果显示,在MOI=200时,Hp感染以时间依赖的方式上调NCI-N87细胞中ADAMTS14 mRNA的表达( $P<0.001$ ,图6B);而在感染12 h时,随着MOI增加,ADAMTS14 mRNA表达水平也逐渐升高( $P<0.001$ ,图6C)。

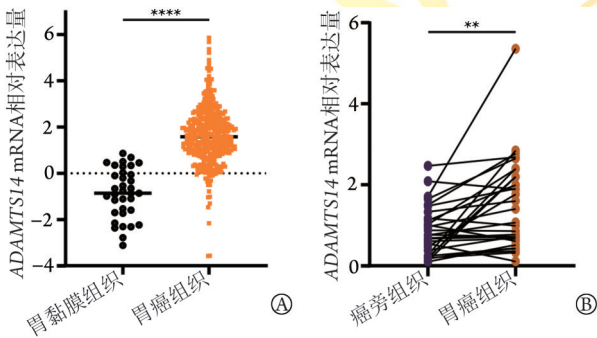
**2.6 Hp感染对ADAMTS14 mRNA和蛋白表达的影响** 为证实Hp对ADAMTS14 mRNA和蛋白表达的影响,本研究对NCI-N87细胞系增加了Hp感染处理组和siRNA1+Hp处理组,Hp的处理条件是MOI 100/12 h,并分别通过RT-qPCR和Western blotting证实,Hp感染可上调NCI-N87细胞中ADAMTS14 mRNA和



TCGA. 癌症基因组图谱; GEO. 基因表达数据库; ADAMTS14. I型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶14; Hp. 幽门螺杆菌; A. 分析TCGA数据库中胃癌组织及Hp感染患者的GSE60427和GSE154127胃黏膜的RNA-seq数据, 得到16个上调基因; B. 胃癌组织与健康胃黏膜间的差异表达基因; C. Hp阳性胃黏膜与Hp阴性胃黏膜的差异表达基因; D. 胃癌类器官与健康胃黏膜间的差异表达基因

图1 TCGA及GEO数据库中ADAMTS14 mRNA在胃癌中的表达情况

Fig.1 Expression of ADAMTS14 mRNA in gastric cancer in TCGA and GEO datasets



TCGA. 癌症基因组图谱; ADAMTS14. I型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶14; A. 在TCGA数据库中, 胃癌组织与健康者胃黏膜组织中ADAMTS14 mRNA表达水平比较; B. 胃癌组织与癌旁组织中ADAMTS14 mRNA表达水平比较; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$

图2 ADAMTS14在TCGA数据库中的分析结果( $n=30$ )

Fig.2 Analysis results of ADAMTS14 in TCGA dataset ( $n=30$ )

蛋白表达水平( $P < 0.0001$ , 图7)。

**2.7 ADAMTS14对Hippo信号通路的影响** RT-qPCR检测结果显示, ADAMTS14敲低可下调Hippo信号通路靶基因BMP7、BMP2、SAV1、PARD3、FZD4 mRNA的表达水平( $P < 0.0001$ , 图8A); 且Western blotting检测结果显示, SAV1、BMP2和

FZD4蛋白表达水平也明显降低( $P < 0.05$ , 图8B)。

**2.8 ADAMTS14表达与胃癌患者不良预后的相关性** 采用Kaplan-Meier Plotter数据库分析ADAMTS14表达水平与胃癌患者预后的数据, 生存曲线结果显示, ADAMTS14高表达患者的总生存期短于低表达者( $P < 0.05$ , 图9)。

**2.9 ADAMTS14蛋白高表达与胃癌患者临床病理特征的关系** 免疫组织化学检测结果显示, ADAMTS14蛋白在胃癌组织中呈高表达, 其中Hp阳性胃癌组织中ADAMTS14蛋白表达水平高于Hp阴性胃癌组织, 差异有统计学意义( $Z = -2.036$ ,  $P < 0.05$ , 图10)。

通过临床数据库进一步分析ADAMTS14蛋白表达与胃癌患者临床病理特征之间的关系发现, ADAMTS14蛋白表达与患者年龄相关( $P < 0.05$ ), 而与患者性别、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、肿瘤分期、Hp感染状态等无相关性( $P > 0.05$ , 表2)。

### 3 讨论

胃癌是一种高度恶性的肿瘤, 也是全球癌症相关死亡的第三大原因<sup>[1-2]</sup>, Hp感染被认为是胃癌的直接致癌因素<sup>[6]</sup>。Hp感染胃黏膜上皮细胞后, 利用其

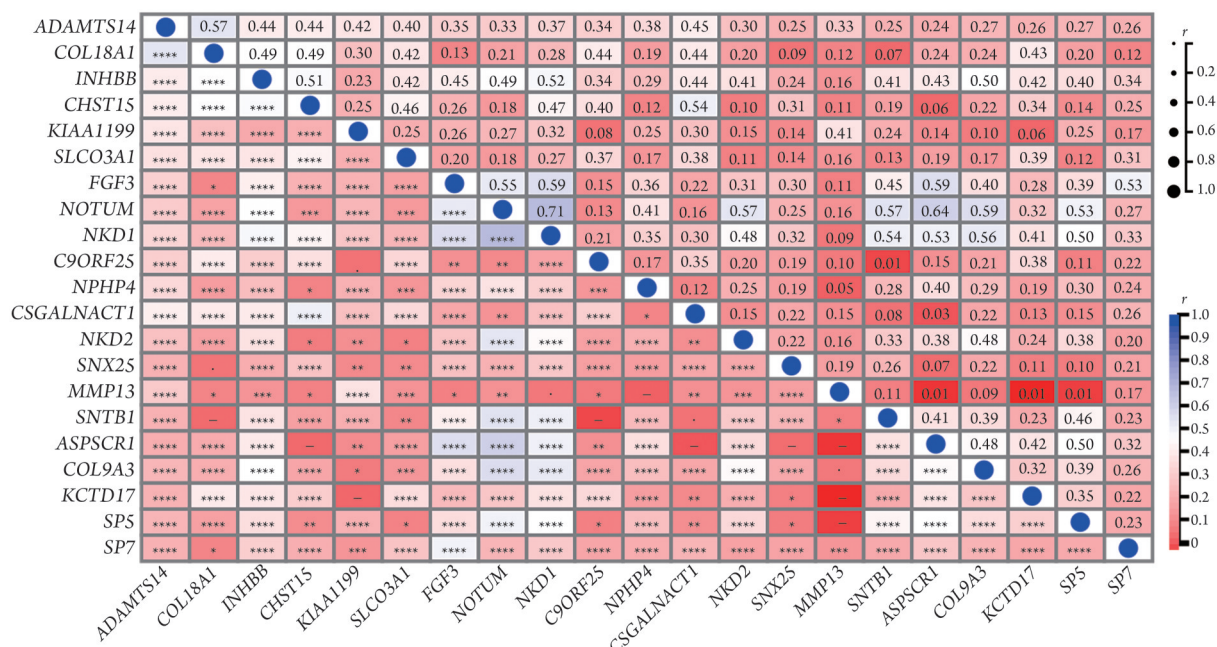
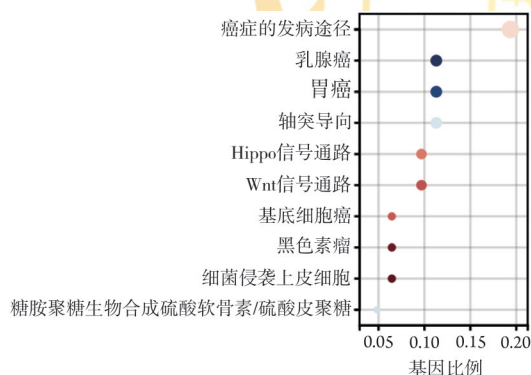


图3 胃癌组织中与ADAMTS14基因表达相关的共聚类分析

Fig.3 Cocluster analysis of ADAMTS14 gene expression in gastric cancer tissues



ADAMTS14. I型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶14

图4 胃癌组织中与ADAMTS14表达相关通路的功能富集分析

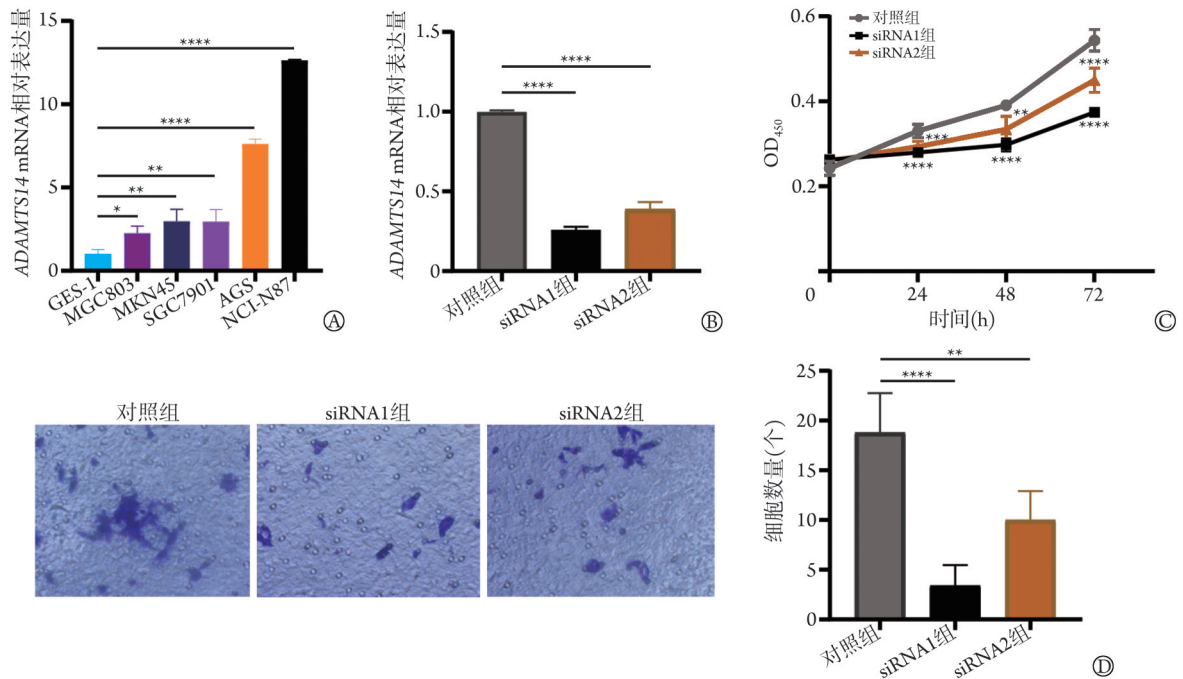
Fig.4 Functional enrichment analysis of ADAMTS14 expression in gastric cancer tissues

cagPAI编码产物形成细菌4型分泌系统(T4SS),这是一种大分子转运蛋白,可以结合宿主细胞表面分子(如整合素和磷脂酰丝氨酸)<sup>[15]</sup>,进而将Hp的细菌效应子CagA等易位到宿主细胞的细胞质中<sup>[16]</sup>,引起一系列的分子及表观遗传改变,从而启动肿瘤发生。因此,探索Hp感染引起的分子改变将加深对胃癌发病机制的理解,有助于胃癌的诊断和治疗。本研究通过分析TCGA和几项GSE测序数据发现,ADAMTS14在胃癌组织及Hp感染患者的胃黏膜中表达上调,是胃癌患者不良预后的标志物。

ADAMTS14属于ADAMTS家族,该家族编码一类包含特定结构域的酶蛋白。这些酶蛋白通过对细

胞黏附、迁移、蛋白水解和信号传导等功能的影响,在调节细胞功能方面发挥着重要作用<sup>[17]</sup>。ADAMTS家族的部分成员在正常组织与肿瘤组织中具有不同的表达模式。其中ADAMTS4、ADAMTS6及ADAMTS14在肿瘤中的表达明显上调<sup>[8]</sup>。近来许多研究表明,ADAMTS14与恶性肿瘤发生、发展及预后有关。例如,ADAMTS14在肾透明细胞癌发生过程中起到了致癌作用<sup>[18]</sup>。其还是口腔肿瘤发生的危险因素,且与口腔鳞状细胞癌患者的不良预后有关<sup>[19]</sup>。ADAMTS14的表达受启动子DNA甲基化调节,与结肠癌预后不良有关<sup>[20]</sup>。ADAMTS14表达下调可对肝癌起到抑制作用<sup>[21]</sup>,但在胃癌中ADAMTS14的作用及其机制尚未报道。

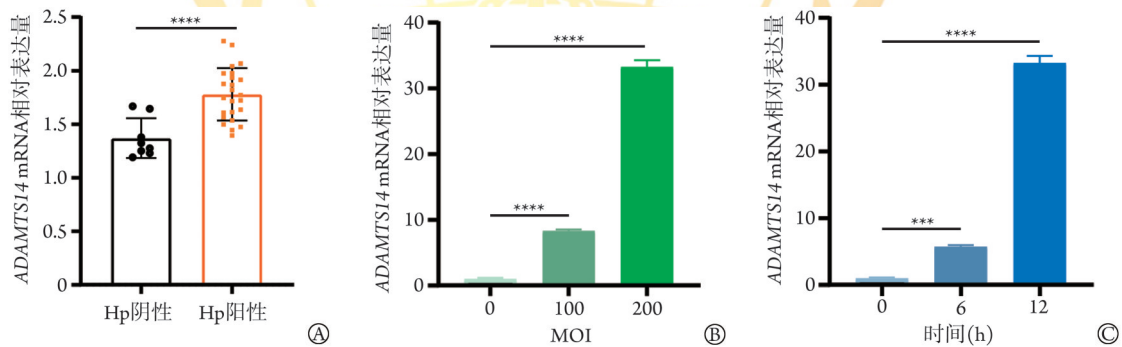
Hippo通路是一种在生物体中保守的信号通路,通过传递来自上游的各种信号以调节细胞行为、生长、增殖及组织稳态<sup>[22]</sup>。Hippo信号通路失调会导致细胞及器官不受控制地过度生长<sup>[23]</sup>,进而可能促进肿瘤的发生<sup>[24]</sup>。大量研究表明,Hippo通路靶基因的过表达会导致癌细胞增殖、侵袭、转移,以及癌症干细胞特性出现及耐药性增加<sup>[25-26]</sup>。有研究发现,在小鼠中敲除Hippo上游调节因子或过表达Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)会导致肝组织过度生长,肝脏肿大,进而发展为肝癌<sup>[27]</sup>。还有大量研究表明,Hippo通路在非小细胞肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌等的进展中发挥重要作用。如Hippo通路在Hp介导的胃癌发生中发挥作用,并与胃癌的预后不良有关<sup>[10-12]</sup>。Hp感染可激活Hippo通路,这



A. 5种胃癌细胞系中ADAMTS14 mRNA的表达水平; B. siRNA沉默对NCI-N87细胞中ADAMTS14 mRNA表达的影响; C. siRNA沉默对NCI-N87细胞活力的影响(与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ); D. siRNA沉默对NCI-N87细胞迁移能力的影响(结晶紫染色 $\times 400$ ); \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

图5 ADAMTS14基因表达影响胃癌细胞NCI-N87的功能( $n=3$ )

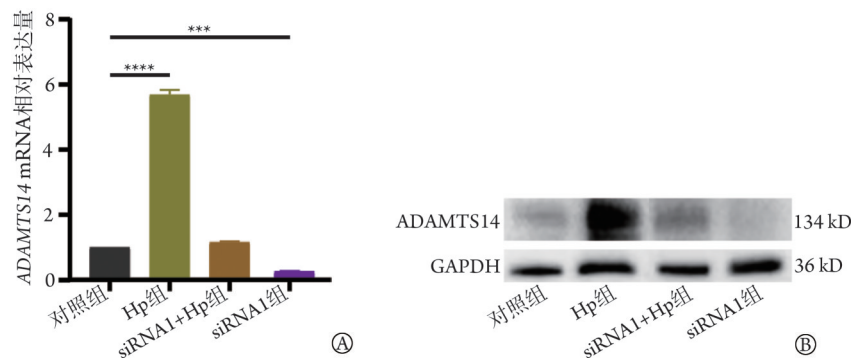
Fig.5 Effect of ADAMTS14 gene expression on the function of NCI-N87 ( $n=3$ )



Hp. 幽门螺杆菌; A. 在GSE60427公开数据集中, ADAMTS14 mRNA在Hp感染的胃黏膜中异常高表达; B. 在感染复数(MOI)=200时, NCI-N87细胞Hp感染不同时间时的ADAMTS14 mRNA表达情况( $n=3$ ); C. Hp感染12 h时, 不同MOI的NCI-N87细胞中的ADAMTS14 mRNA表达水平( $n=3$ ); \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

图6 Hp感染与ADAMTS14 mRNA表达的相关性

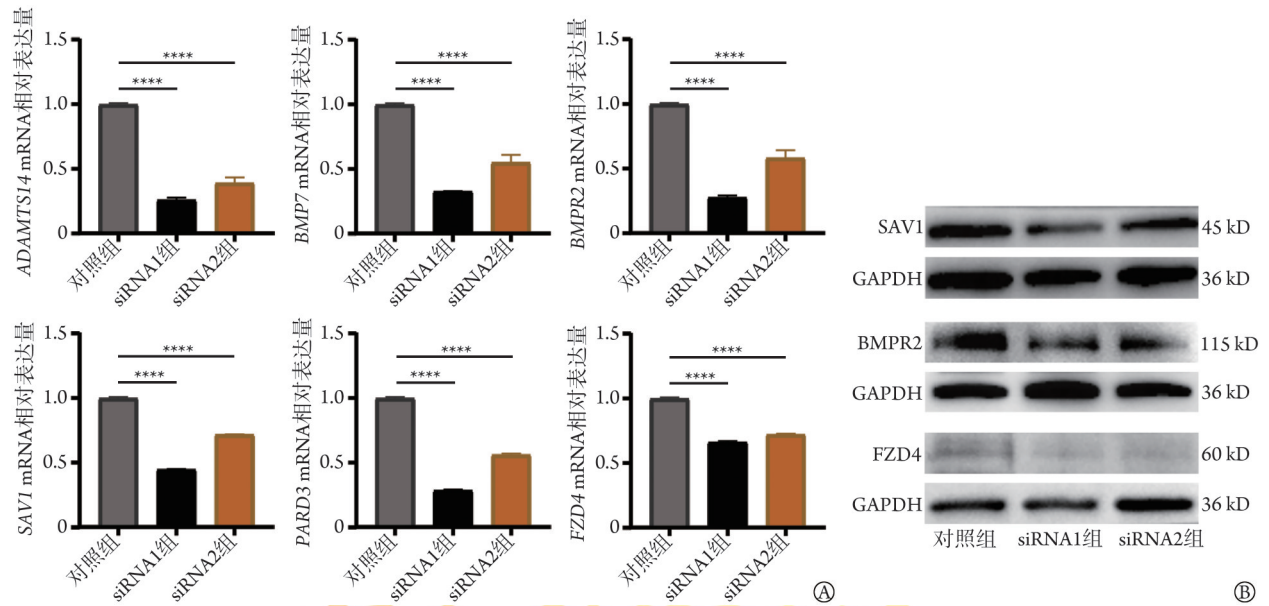
Fig.6 Correlation between Hp infection and ADAMTS14 mRNA expression



Hp. 幽门螺杆菌; A. RT-qPCR检测( $n=3$ ); B. Western blotting检测( $n=3$ ); \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

图7 Hp感染对NCI-N87细胞中ADAMTS14 mRNA和蛋白表达的影响

Fig.7 Effect of Hp infection on ADAMTS14 mRNA and protein expression in NCI-N87 cells



A. RT-qPCR 检测 Hippo 信号通路靶基因 *BMP7*、*BMPR2*、*SAV1*、*PARD3* 和 *FZD4* mRNA 的表达情况；B. Western blotting 检测验证 Hippo 信号通路靶基因 *SAV1*、*BMPR2* 和 *FZD4* 蛋白的表达情况；\*\*\*\* $P<0.0001$

图 8 ADAMTS14 敲低对 Hippo 信号通路下游靶基因及蛋白的影响( $n=3$ )

Fig.8 Effect of ADAMTS14 knockdown on target genes and proteins of Hippo signaling pathway ( $n=3$ )

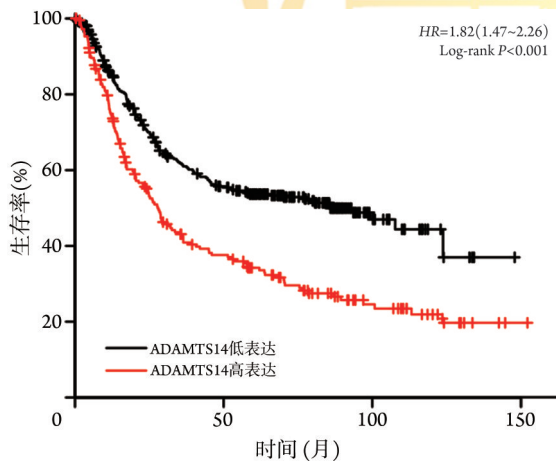


图 9 ADAMTS14 表达与胃癌患者不良预后相关

Fig.9 ADAMTS14 expression is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer

一过程在 Hp 感染的胃上皮细胞转录组学分析中得到证实<sup>[6]</sup>。几乎所有的 Hippo 靶基因均与胃癌的淋巴转移及肿瘤 TNM 分期密切相关<sup>[28]</sup>。因此靶向 Hippo 通

路的药物对治疗胃癌具有重要意义<sup>[29]</sup>。

本研究发现了与 Hp 感染相关的关键基因 *ADAMTS14*，并探究了其在胃癌中的意义。通过 TCGA 数据库分析结果，结合 RT-qPCR 及免疫组化验证，证实胃癌组织中 *ADAMTS14* mRNA 及蛋白表达水平明显高于癌旁组织。GSE60427 的数据显示，*ADAMTS14* 在 Hp 感染的胃黏膜及细胞系中表达上调；Hp P12 菌株感染 NCI-N87 细胞后，*ADAMTS14* 表达也高于未感染组。本研究发现，Hp 感染可上调 *ADAMTS14* 的表达，推测 *ADAMTS14* 可能是胃癌的驱动因子，在 Hp 感染及胃癌进展中发挥重要作用。在 TCGA 数据库的胃癌患者中，*ADAMTS14* 与 *COCL18A1*、*INHBB*、*CHST15*、*KIAA1199*、*SLCO3A1* 等 20 个基因共表达水平较高，提示 *ADAMTS14* 可能与这些基因在功能上具有相似性。*ADAMTS14* 的功能富集结果提示 *ADAMTS14* 参与了 Hippo 信号通路。通过敲低胃癌细胞系 NCI-N87 中的 *ADAMTS14*，增殖及迁移实验结果证实，

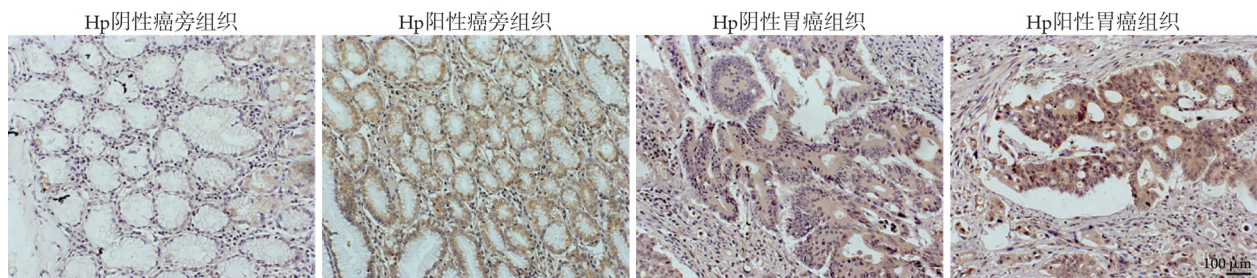


图 10 ADAMTS14 蛋白在正常胃黏膜及胃癌组织中的表达情况(免疫组化  $\times 200$ ,  $n=30$ )

Fig.10 Protein expression of ADAMTS14 in paracancerous tissue and tumor tissue (Immunohistochemistry  $\times 200$ ,  $n=30$ )

表2 ADAMTS14蛋白表达与胃癌患者临床病理特征之间的关系[例(%)]

Tab.2 The relationship between ADAMTS14 protein expression and clinicopathological features of gastric cancer patients [n(%)]

临床特征	ADAMTS14蛋白相对表达量		$\chi^2$	P
	低	高		
Lauren分型			0.133	0.716
胃型(n=213)	108(50.7)	105(49.3)		
肠型(n=172)	84(48.8)	88(51.2)		
性别			1.826	0.177
男(n=252)	119(47.2)	133(52.8)		
女(n=136)	74(54.4)	62(45.6)		
年龄(岁)			5.513	0.019
<65(n=168)	95(56.5)	73(43.5)		
≥65(n=218)	97(44.5)	121(55.5)		
T分期			0.761	0.383
T <sub>0-2</sub> (n=101)	47(46.5)	54(53.5)		
T <sub>3-4</sub> (n=283)	146(51.6)	137(48.4)		
淋巴结转移			0.143	0.706
有(n=262)	132(50.4)	130(49.6)		
无(n=116)	56(48.3)	60(51.7)		
M分期			0.023	0.880
M <sub>0</sub> (n=25)	12(48.0)	13(52.0)		
M <sub>1</sub> (n=347)	172(49.6)	175(50.4)		
肿瘤分期			0.198	0.656
I或II(n=172)	85(49.4)	87(50.6)		
III或IV(n=203)	105(51.7)	98(48.3)		
Hp感染			0.147	0.885
阳性(n=20)	10(50.0)	10(50.0)		
阴性(n=154)	84(54.5)	70(45.5)		

ADAMTS14低表达能明显抑制胃癌细胞的增殖及迁移,这种作用可能是由于ADAMTS14对Hippo信号通路的调控作用实现的。本研究还发现,敲低胃癌细胞系NCI-N87中ADAMTS14后,Hippo信号通路靶基因BMP7、BMP2、FZD4、PARD3、SAVI表达水平也降低,提示ADAMTS14的存在对Hippo信号通路的激活起着关键作用。

结合临床数据,生存分析显示ADAMTS14高表达患者的预后不良,提示ADAMTS14与胃癌不良预后相关。本研究通过数据库分析ADAMTS14表达与Hp感染状态的相关性,但由于该数据库中大量样本缺乏Hp感染的信息,因而仅分析了少量Hp阳性样本,这可能是造成本研究统计结果无相关性的原因。因此,ADAMTS14可能是Hp感染相关胃癌的潜在治疗靶点,但该结论仍需要更多的理论依据支持。未来应着眼于寻找调控ADAMTS14的小分子药物,收

集更多的基础实验数据,以提高ADAMTS14作为胃癌治疗靶点的可靠性。

综上所述,本研究证实,Hp感染能够上调ADAMTS14的表达,且可促进胃癌细胞的增殖与迁移,进而促进胃癌的进展,并导致患者的预后不良,因此ADAMTS14有望成为Hp感染相关胃癌的新的治疗靶点。但目前尚缺少体内实验数据的支持,后续拟进行体内实验,以进一步为ADAMTS14应用于Hp感染相关胃癌的临床治疗提供更多的理论依据。

#### 【参考文献】

- [1] Ajani JA, D'Amico TA, Bentrem DJ, et al. Gastric cancer, version 2.2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2022, 20(2): 167-192.
- [2] 郑荣寿,张思维,孙可欣,等.2016年中国恶性肿瘤流行情况分析[J].中华肿瘤杂志,2023,45(3):212-220.
- [3] 杨易成,曹佳.早期胃印戒细胞癌研究现状与进展[J].临床军医杂志,2023,51(9):896-900.
- [4] Yan LJ, Chen Y, Chen F, et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastric cancer prevention: updated report from a randomized controlled trial with 26.5 years of follow-up[J]. Gastroenterology, 2022, 163(1): 154-162. e3.
- [5] 宋俊良,林强,梁世洋,等.胆汁反流与胃黏膜肠上皮化的关系及其分子机制研究进展[J].解放军医学杂志,2023,48(3):360-366.
- [6] Duan Y, Kong P, Huang M, et al. STAT3-mediated up-regulation of DAB2 via SRC-YAP1 signaling axis promotes *Helicobacter pylori*-driven gastric tumorigenesis[J]. Biomark Res, 2024, 12(1): 33.
- [7] 蔡迎彬,张玉俊,王岩,等.胃腺体组织癌变过程中CD44和survivin表达与幽门螺杆菌感染的相关性及其在胃癌浸润和转移中的作用[J].新乡医学院学报,2023,40(8):729-735.
- [8] Zhou J, Li T, Chen H, et al. ADAMTS10 inhibits aggressiveness via JAK/STAT/c-MYC pathway and reprograms macrophage to create an anti-malignant microenvironment in gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2022, 25(6): 1002-1016.
- [9] Fu T, Amoah K, Chan TW, et al. Massively parallel screen uncovers many rare 3' UTR variants regulating mRNA abundance of cancer driver genes[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 3335.
- [10] Talukdar PD, Chatterji U. Transcriptional co-activators: emerging roles in signaling pathways and potential therapeutic targets for diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 427.
- [11] Seenevassen L, Bessède E, Mégraud F, et al. Gastric cancer: advances in carcinogenesis research and new therapeutic strategies [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3418.
- [12] Varon C, Azzi-Martin L, Khalid S, et al. Helicobacters and cancer, not only gastric cancer? [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86(Pt 2): 1138-1154.
- [13] Bhattacharjee R, Jolly LA, Corbett MA, et al. Compromised transcription-mRNA export factor THOC2 causes R-loop accumulation, DNA damage and adverse neurodevelopment[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 1210.
- [14] Pan X, Zhou T, Tai YH, et al. Elevated expression of CUEDC2 protein confers endocrine resistance in breast cancer[J]. Nat Med, 2011, 17(6): 708-714.
- [15] Tran SC, Bryant KN, Cover TL. The *Helicobacter pylori* cag

- pathogenicity island as a determinant of gastric cancer risk[J]. *Gut Microbes*, 2024, 16(1): 2314201.
- [16] Bhattacharjee A, Sahoo OS, Sarkar A, *et al.* Infiltration to infection: key virulence players of *Helicobacter pylori* pathogenicity[J]. *Infection*, 2024,52(2): 345-384.
- [17] Rubina A, Patel M, Nightingale K, *et al.* ADAM17 targeting by human cytomegalovirus remodels the cell surface proteome to simultaneously regulate multiple immune pathways[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(33): e2303155120.
- [18] Chen YH, Ji H, Liu SY, *et al.* Survival prognosis, tumor immune landscape, and immune responses of ADAMTS14 in clear cell renal cell carcinoma and its potential mechanisms[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 790608.
- [19] Chen Y, Ji H, Liu S, *et al.* Survival prognosis, tumor immune landscape, and immune responses of ADAMTS14 in clear cell renal cell carcinoma and its potential mechanisms[J]. *Front Immunol*, 2022,13:790608.
- [20] Wang Y, Zhou J, Zhang J, *et al.* The expression of ADAMTS14 is regulated by promoter DNA methylation and is associated with poor prognosis in colorectal cancer[J]. *Exp Cell Res*, 2022, 410(1): 112953.
- [21] Wang HM, Fu LL, Cui YX. MiR-30a serves as a tumor suppressor for hepatocellular carcinoma by downregulating ADAMTS14[J]. *Clin Lab*, 2022, 68(5). doi: 10.7754/Clin.Lab.2021.210819.
- [22] Seo G, Yu C, Han H, *et al.* The Hippo pathway noncanonically drives autophagy and cell survival in response to energy stress[J]. *Mol Cell*, 2023, 83(17): 3155-3170. e8.
- [23] 刘迁, 祁国萍, 于华裔, 等. 结肠癌核心基因和独立预后因子筛选的生物信息学分析[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(3): 755-765.
- [24] Mohajan S, Jaiswal PK, Vatanmakarian M, *et al.* Hippo pathway: regulation, deregulation and potential therapeutic targets in cancer [J]. *Cancer Lett*, 2021, 507: 112-123.
- [25] Benmelech S, Le T, McKay M, *et al.* Biophysical and biochemical aspects of immune cell-tumor microenvironment interactions[J]. *APL Bioeng*, 2024, 8(2): 021502.
- [26] Qian H, Ding CH, Liu F, *et al.* SRY-box transcription factor 9 triggers YAP nuclear entry *via* direct interaction in tumors[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 96.
- [27] Conti S, Venturini V, Cañellas-Socias A, *et al.* Membrane to cortex attachment determines different mechanical phenotypes in LGR5<sup>+</sup> and LGR5<sup>-</sup> colorectal cancer cells[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 3363.
- [28] Yan C, Yang H, Su P, *et al.* OTUB1 suppresses Hippo signaling *via* modulating YAP protein in gastric cancer[J]. *Oncogene*, 2022, 41(48): 5186-5198.
- [29] Wang T, Wang D, Sun Y, *et al.* Regulation of the Hippo/YAP axis by CXCR7 in the tumorigenesis of gastric cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 297.

(责任编辑: 张小利)

解放军医学杂志®