

· 临床研究 ·

凝缩蛋白复合物亚基 NCAPG 增强非小细胞肺癌铂类药物敏感性的机制研究

朱荔丰¹, 丁晓芬¹, 郭玛丽¹, 苏标华¹, 樊燕丹¹, 孙英明^{1,2}, 李智军³(1. 福建医科大学附属三明第一医院 肿瘤内科, 福建 三明 365001;
2. 美国俄亥俄州立大学 Wexner 医学中心 放射医学系; 3. 内蒙古自治区人民医院 放射治疗科)

摘要: **目的:** 研究凝缩蛋白复合物亚基 NCAPG 在肺癌中表达情况, 探讨其在临床运用前景。 **方法:** 运用 Oncomine、KM PLOTTER、TCGA、GTEX 数据库了解 NCAPG 在非小细胞肺癌与正常组织表达情况。采用不同分层预测 NCAPG 影响非小细胞肺癌的因素。WB 法检测 NCAPG、BCLAF1 表达, IF 检测 DNA 损伤情况。 **结果:** 根据多个数据库比对, NCAPG 在非小细胞肺癌肿瘤组织表达明显高于癌旁组织。其高表达提示预后不良。在多因素分析中, 接受化疗患者高表达 NCAPG 患者预后明显优于低表达患者。在未接受化疗患者中, 则结果相反。放疗患者未发现 NCAPG 表达与预后关系。体外实验表明, NCAPG 过表达细胞株对顺铂敏感, 经过基因相关性分析, 发现顺铂耐药关键基因 BCLAF1 与 NCAPG 表达呈正相关。 **结论:** 本研究表明 NCAPG 是影响非小细胞肺癌肺癌预后因素, 其表达与化疗疗效相关, 提示对于 NCAPG 高表达的患者更容易从化疗中获益。

关键词: NCAPG; 非小细胞肺癌; 顺铂 BCLAF1**中图分类号:** R734.1**文献标识码:** B**文章编号:** 2095-512X(2020)06-0586-05

肺癌是我国乃至全世界发病率及死亡率最高的恶性肿瘤, 其中非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 约占 90%^[1]。由于肺癌早期症状不明显, 约 40%~60% 患者就诊时已发生局部或远处转移。尽管随着肺癌的治疗进入靶向时代和免疫时代, 但仅仅约 20%~40% 患者能从中获益, 总体而言肺癌预后仍较差, 五年生存率只有 16.8%^[2]。化疗是目前延长晚期肺癌患者生存期及提高生活质量有效的方式, 而含铂两药方案是晚期肺癌治疗的基石。顺铂于 1978 年被美国 FDA 批准用于恶性肿瘤治疗, 目前仍为肺癌化疗的一线用药。其作用机理为铂原子与 DNA 形成交联反应 (crosslink), 使其发生 DSB 导致细胞凋亡。虽然铂类药物给肺癌患者带来了一部分临床获益, 但以铂类为基础的肺癌化疗仅仅只有 7~9 个月的中位生存期, 克服顺铂耐药一直是全世界科研人员追踪的热点^[3]。

NCAPG 是一种有丝分裂相关的染色体凝缩蛋白, 是由 1015 个氨基酸组成 114.5KDa 的蛋白。目前研究表明, NCAPG 在前列腺、肝癌等肿瘤中异常表达^[4,5]。NCAPG 参与有丝分裂染色体凝聚, 与细胞

周期有关, 其主要功能使染色体重组为棒状有丝分裂染色体, 确保细胞分裂过程中姐妹染色单体的分离。Chengwu Gong 等报道, 其可以影响肝细胞肝癌增殖、迁移, 并促进其凋亡^[4-6]。然而, NCAPG 在肺癌中功能研究甚少, 本研究通过生物信息学结合体外实验, 探索 NCAPG 在非小细胞肺癌中的功能。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料及试剂

NCAPG 过表达质粒委托上海吉玛公司合成, NCAPG 抗体 (Abcam 公司 Cat No.226805), BCLAF1/BTF 抗体 (Abcam 公司 Cat No.ab226830), BCL2 抗体 (Abcam 公司 Cat No.ab32124), Cleave-PARP 抗体 (CST 公司 Cat No.#9548), γ -H2AX (Ser139) CST 公司 Cat No.#5438)。主要仪器: ECO2150 型二氧化碳细胞培养箱 (德国梅特勒公司), FACS Calibur 型流式细胞仪 (美国 BD 公司), 全自动酶标仪 ELX800NB (美国 BIOTEK 公司), PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), 激光共聚焦显微镜 (日本尼康公司)。

收稿日期: 2020-07-11; 修回日期: 2020-11-23

基金项目: 福建医科大学起航基金 (2019QH1164)

作者简介: 朱荔丰 (1976-), 女, 福建医科大学附属三明第一医院肿瘤内科副主任医师。

通讯作者: 李智军, 主任医师, E-mail: 1430597588@qq.com 内蒙古自治区人民医院放射治疗科, 010017

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养 HT-1975 细胞 10%胎牛血清、10%青霉素链霉素双抗的 PRMI-1640 完全培养基培养于 37℃、5%CO₂、90%湿度的培养箱中,常规换液传代。转染质粒参考 lipofectmin3000 protocol。

1.2.2 Western Blot 检测蛋白表达 60~100mm 细胞培养皿培养 NCI-H1975 细胞,药物处理前 PRMI-1640 饥饿 6h,用 PIPA buffer 收集细胞,提取总蛋白,样品进 7.5%~10% SDS-PAGE 凝胶电泳后,转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉 TBST 封闭 1h,一抗 4℃ 过夜, TBST 洗膜,加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 1h, ECL 发光液显影。

1.2.3 免疫荧光 将多聚赖氨酸包被 24mm 玻片置入 6 孔板中, 5 × 10⁵ 接种于 6 孔板中,药物处理完成后,使用 4%多聚甲醛固定 20min, 曲拉通 100 通透后,以 5%BSA 封闭 1h,一抗 4℃ 过夜, PBST 洗 5 次,加入不同荧光标记的二抗,室温孵育 1h, Hoechst33342 染核 5min, PBST 洗 5 次后,上机检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 软件进行统计处理,各指标数据

采用均数 ± 标准差表示,各组均数比采用单因素方差分析(One-way ANOVA),多组比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NCAPG 在肺癌组织中高表达、与肺癌分期及分化呈正相关

通过 Oncomine 数据库来自 Hou 等提供数据库(见图 1A),其中肺癌组织 45 例,癌旁组织 65 例(见图 1A),其余为 Oncomine 数据(见表 1)。我们发现 NCAPG 肺癌组织中高表达(见图 1B),在 TCGA 数据库中无论腺癌组织(腺癌 483 例,癌旁 347 例)还是鳞癌组织组织(鳞癌 486 例,癌旁 338 例)中 NCAPG 表达均较癌旁组织表达升高($P < 0.05$),免疫组化标本中可以明显观察到肿瘤组织 NCAPG 高表达(见图 1C),其表达定位于细胞核中。通过 Gepia 网站分析,NCAPG 表达与肺癌分期及分化呈正相关(见图 1D、1E),综上所述,我们可以认为 NCAPG 作为一个癌基因参与了肺癌发生、发展的过程。

表 1 Oncomin 数据库中肺癌组织与癌旁组织 NCAPG 表达情况

对比组织类型	差异倍数	P 值	t 检验	阵列来源
肺鳞状细胞癌 vs. 癌旁组织	6.017	2.70E-31	20.795	Hou
肺腺癌 vs. 癌旁组织	3.490	1.86E-15	10.088	Hou
大细胞肺癌 vs. 癌旁组织	7.315	6.86E-9	8.990	Hou
肺腺癌 vs. 癌旁组织	2.747	5.80E-10	7.476	Su
肺腺癌 vs. 癌旁组织	2.693	5.68E-12	9.029	Okayama

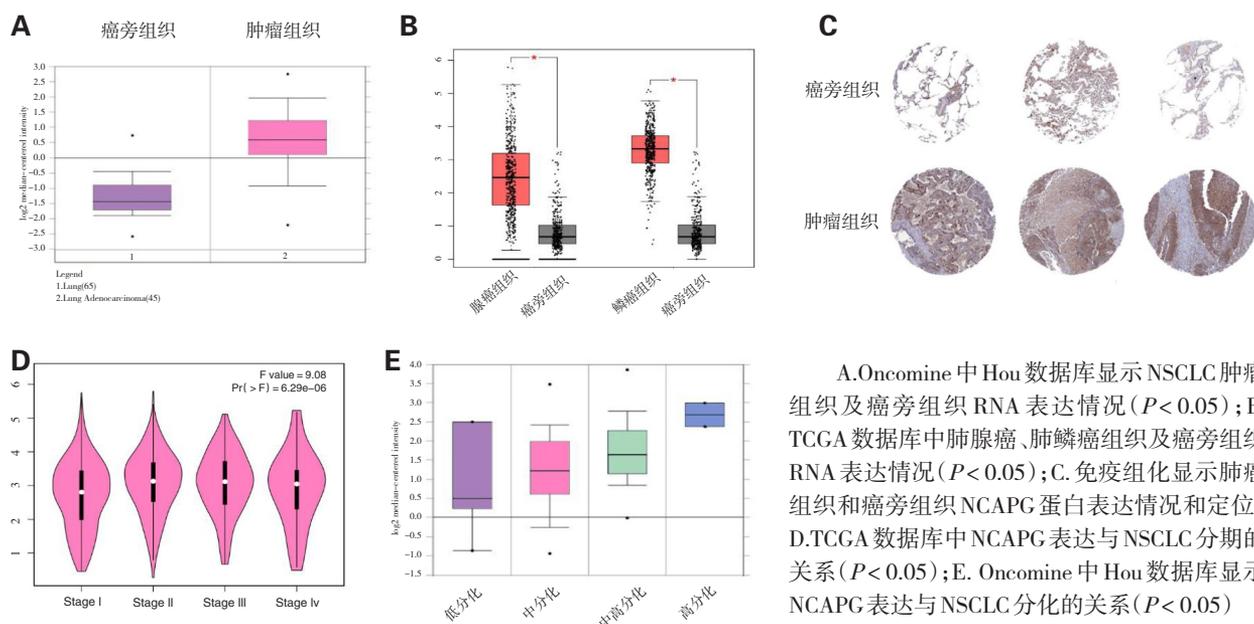


图 1 NCAPG 在肺癌组织中高表达、与肺癌分期及分化呈正相关

2.2 NCAPG 高表达与预后呈负相关,与化疗疗效正相关而与放疗疗效无关

我们用TCGA数据库和KM PLOTTER数据库评估了NCAPG与非小细胞肺癌预后的关系,TCGA数据库(见图2A)及KM PLOTTER数据库(见图2B)均提示其表达与患者预后负相关。同时我们在KM PLOTTER数据库分析NCAPG表达与放化疗的关系(见图2C)。患者接受化疗后,NCAPG高表达患者

预后明显优于NCAPG低表达患者($P < 0.05$)(见图2D、2E)。对于未接受化疗患者,NCAPG高表达预后不佳($P < 0.05$)。令人意外的是,即使患者接受放疗,NCAPG表达如何与预后无关($P > 0.05$),然而在未接受放疗患者中,NCAPG高表达的患者预后依然较差($P < 0.05$)(见图2F)。该结果预示着NCAPG表达与患者化疗敏感性有关,提示NCAPG高表达患者更能从化疗中获益。

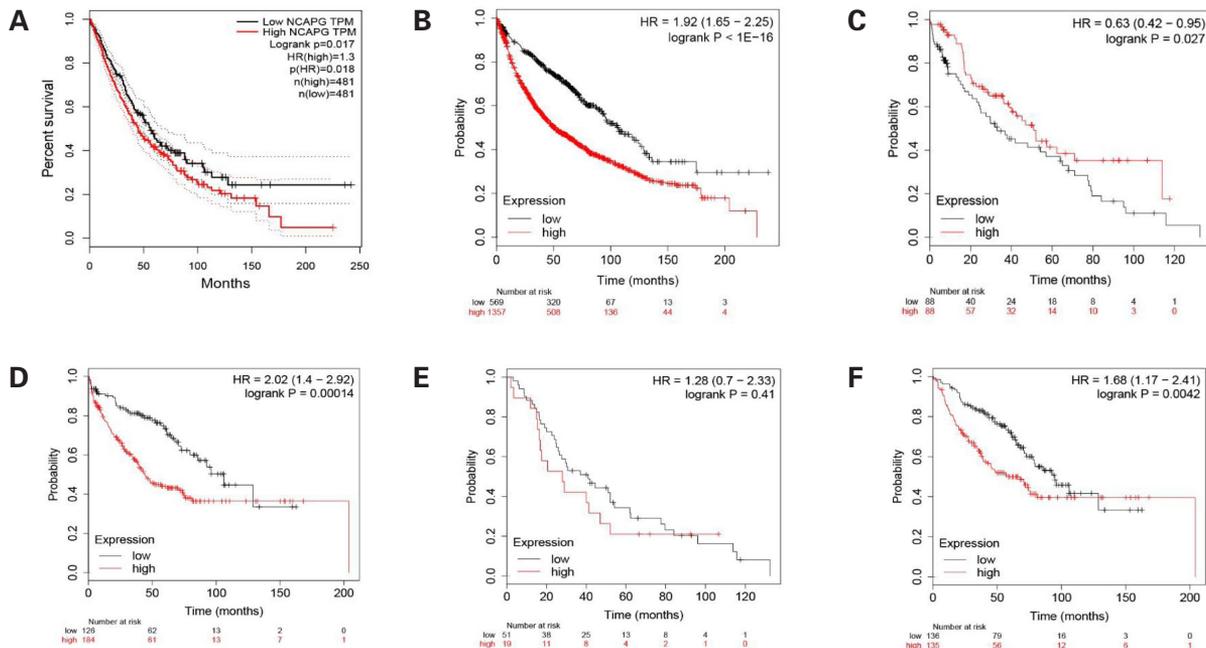


图2 NCAPG高表达与预后呈负相关,与化疗疗效正相关而与放疗疗效无关

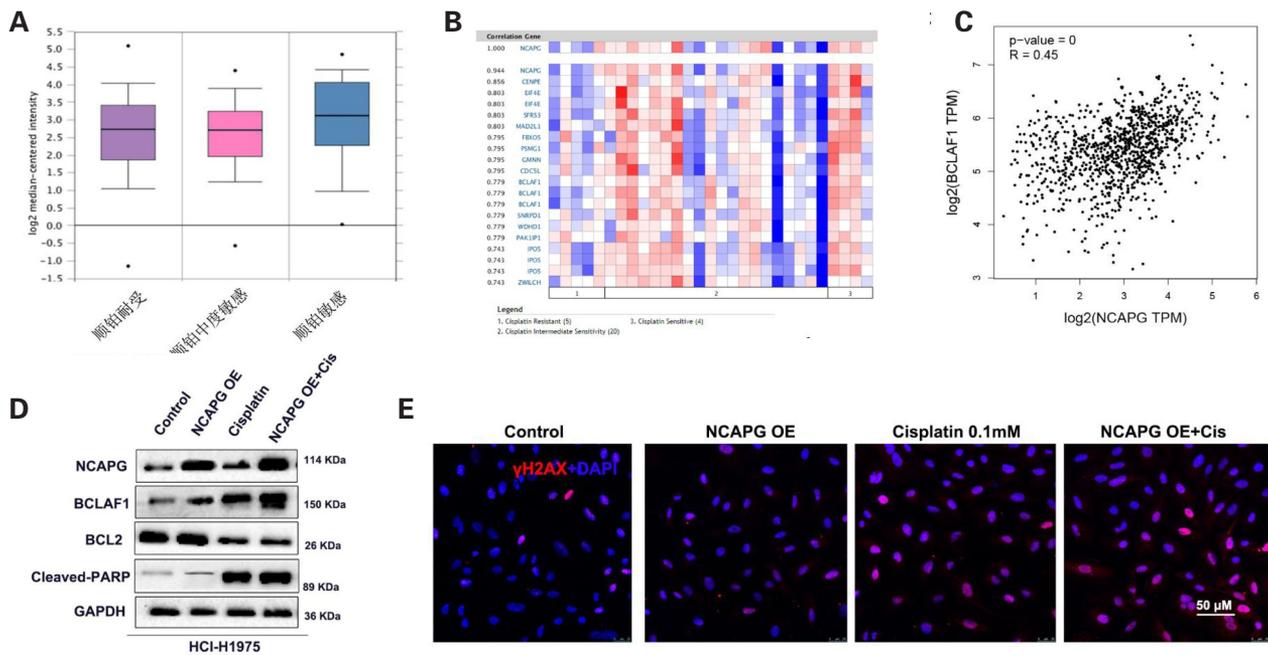
2.3 NCAPG 通过调节 BCLAF1 增强肺癌细胞对顺铂敏感性

我们在 Oncomine 数据库探索 NCAPG 表达量与顺铂敏感性的关系,发现在顺铂敏感的肺癌患者中,NCAPG 表达量升高(见图3A)。进一步分析 NCAPG 在肺癌不同顺铂敏感性相关基因,我们发现无论在顺铂是否敏感患者中,BCLAF1 与 NCAPG 表达均呈正相关,其表达相关性 $R=0.779$,表明 BCLAF1 与 NCAPG 表达高度一致(见图3B)。为了进一步验证上述结果,使用TCGA数据库再一次验证 BCLAF1 与 NCAPG 之间相关性,呈明显正相关, $R=0.45$, $P < 0.05$ (见图3C)。接着我们构建了 NCAPG 过表达质粒,其随着 NCAPG 表达升高,

BCLAF1 也随之升高,并且顺铂能诱导 BCLAF1 表达,同时抑制了 BCL2 表达(见图3D)。我们又检测了 PARP 剪切体,过表达 NCAPG 对细胞凋亡作用不明显,但是表明 NCAPG 过表达与顺铂具有协同作用。我们再一次用免疫荧光法验证 DNA 损伤程度,我们发现过表达 NCAPG 能略微造成 DNA 损伤,但与对照组比无明显差别,过表达 NCAPG 依然能显示出和顺铂的协同作用(见图3E)。

3 讨论

NCAPG 编码染色体凝集蛋白复合体的一个亚单位,负责有丝分裂和减数分裂过程中染色体的凝



A. Oncomine 中 Hou 数据库显示 NCAPG 与顺铂敏感性的关系; B. Oncomine 数据库 Gemma cellline 数据库中根据不同顺铂敏感性与 NCAPG 相关性基因 (TOP20)。C. TCGA 数据库分析 NCAPG 与 BCLAF1 相关性; D. WB 法检测 NCAPG、BCLAF1、BCL-2、Cleaved-PARP 表达, GAPDH 作为内参; E. 免疫荧光检测 γ H2ax (Ser139)

图3 NCAPG 通过调节 BCLAF1 增强肺癌细胞对顺铂敏感性

聚和稳定。先前研究表明 NCAPG 参与包括前列腺癌、儿童胶质瘤、肾癌、多发性骨髓瘤、黑色素瘤等多种肿瘤的发生、发展^[7,8]。我们运用生物信息学分析,研究发现 NCAPG 是肺癌发生发展的关键基因。此外,近年来越来越多的证据表明,NCAPG 的异常表达与肿瘤发展有关。有学者通过加权基因共表达网络分析,NCAPG 是一种肿瘤生物标志物^[9]。同时,我们通过分析来自 Oncomine 数据库的 5 个微阵列数据,均发现 NCAPG 在 NSCLC 中上调。目前国内外对 NCAPG 对肿瘤增殖、迁移等影响较多,本研究首次发现 NCAPG 与化疗患者预后相关,从另一个行的角度剖析 NCAPG 的作用。由于铂类为主的化疗是目前 NSCLC 治疗的标准方案,我们推测 NCAPG 表达高患者能从化疗获益可能与其能增加化疗敏感性有关。我们通过数据库分析,得到 BCLAF1 可能是 NCAPG 作用的关键因子。

BCLAF1 是一个该基因编码一个转录抑制因子,与 BCL-2 蛋白家族的几个成员相互作用。该蛋白过表达可诱导细胞凋亡, bcl2 蛋白共表达可抑制凋亡^[10]。该蛋白定位于整个细胞核的点状结构,并在经历凋亡的细胞中重新分布到核膜附近的区域。文献报道 BCL-2 的抗凋亡作用是顺铂耐药关键基因^[11]。

我们的研究表明,过表达 NCAPG 即使能诱导 BCLAF1 表达,但是没有明显促进凋亡作用, Cleaved PARP 并没有明显升高,表明这种促凋亡作用可能被其他抗凋亡蛋白对其有拮抗作用,当用顺铂处理后,这种拮抗作用对抵消, NCAPG 过表达很好显示了与顺铂的协同作用。

我们虽然初步讨论了 NCAPG 化疗增敏的机制,当也在一定缺陷,未进行 BCLAF1 的挽救实验,只能间接直接证明 NCAPG 通过 BCLAF1 调节非小细胞肺癌化疗敏感性。本研究结果表明, NCAPG 高表达患者预示着更容易从化疗中获益,并能逆转其高表达带来的预后不良因素,为个体化治疗提供了理论基础。

参考文献

[1]Wanqing Chen, Changfa a, Jie He, et al. Disparities by province, age, and sex in site-specific cancer burden attributable to 23 potentially modifiable risk factors in China: a comparative risk assessment. *Lancet Glob Health* 2019; 7:e257-69
 [2]Cortes J, Perez- Garcia JM, Llombart- Cussac A, et al. Enhancing global access to cancer medicines. *CA Cancer J Clin.* 2020; 2(18):22-33

- [3]Giacomini I, Ragazzi E, Pasut G, et al. The Pentose Phosphate Pathway and Its Involvement in Cisplatin Resistance. *Int J Mol Sci.* 2020; **21**(3): 31
- [4]Liu W, Liang B, Liu H, et al. Overexpression of non-SMC condensin I complex subunit G serves as a promising prognostic marker and therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med.* 2017; **40**(3):731-738
- [5]Liu K, Li Y, Yu B, et al. Silencing non-SMC chromosome-associated polypeptide G inhibits proliferation and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018; **96**(12):1246-1254
- [6]Arai T, Okato A, Yamada Y, et al. Regulation of NCAPG by miR-99a-3p (passenger strand) inhibits cancer cell aggressiveness and is involved in CRPC. *Cancer Med.* 2018; **7**(5):1988-2002
- [7]Chengwu Gong, Jiyuan Ai, Yun Fan, et al. NCAPG Promotes The Proliferation Of Hepatocellular Carcinoma Through PI3K/AKT Signaling. *Oncotargets Ther.* 2019; **12**: 8537-8552
- [8] Jager D, Stockert E, Jager E, et al. Serological cloning of a melanocyte rab guanosine 5' -triphosphate-binding protein and a chromosome condensation protein from a melanoma complementary DNA library. *Cancer Res.* 2000; **60**(13):3584-3591
- [9]Goto Y, Kurozumi A, Arai T, et al. Impact of novel miR-145-3p regulatory networks on survival in patients with castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer.* 2017; **117**(3):409-420
- [10]Sarras H, Alizadeh Azami S, McPherson JP. In search of a function for BCLAF1. *ScientificWorldJournal.* 2010; **20**(10): 1450-61
- [11] J. Vohhodina, E.M. Barros, A.L. Savage. Liberante. The RNA processing factors THRAP3 and BCLAF1 promote the DNA damage response through selective mRNA splicing and nuclear export. *Nucleic Acids Res.*, 2017; **45**(22): 12816-12833

(上接第 580 页)

参考文献

- [1]黄定明, 谭学莲, 张岚, 等. 根管治疗工作长度确定之惑及解决之道[J]. *华西口腔医学杂志*, 2016; **34**(2):109-114
- [2] Kim YJ, Chandler NP. Determination of working length for teeth with wide or immature apices: a review[J]. *Int Endod J.* 2013; **46**(6):483-491
- [3] Ponce EH, Vilar Fernández JA. The cemento-dentino-canal junction, the apical foramen, and the apical constriction: evaluation by optical microscopy[J]. *J Endod.* 2003; **29**(3): 214-219
- [4] Martins JN, Marques D, Mata A, et al. Clinical efficacy of electronic apex locators: systematic review[J]. *J Endod.* 2014; **40**(6):759-777
- [5] Frank AL, Bakland LK. Nonendodontic therapy for supraosseous extracanal invasive resorption[J]. *J Endod.* 1987; **13**(7):348-355
- [6] 樊鹭娟. 根管冠部预处理后行根管工作长度测量的临床相关研究[D]. 山西医科大学, 2016:1-25
- [7] 严广斌. 视觉模拟评分法[J]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2014; **8**(2):273
- [8] 李斌, 贺小宁, 高原, 等. 2种根管预备终止点对术后疼痛的影响[J]. *口腔疾病防治*, 2016; **24**(1):40-43
- [9] 戴德华, 王璇, 代婧, 等. 根管充填质量的临床评价. *口腔医学研究*, 2015; **31**(1):69-71
- [10] Boucher Y, Matossian L, Rilliard F, et al. Radiographic evaluation of the prevalence and technical quality of root canal treatment in a French subpopulation[J]. *Int Endod J.* 2002; **35**(3): 229 - 338
- [11] 樊明文, 周学东. 牙体牙髓病[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2013:316-317
- [12] Dummer PM, McGinn JH, Rees DG. The position and topography of the apical canal constriction and apical forame[J]. *International Endodontic Journal*, 1984; **17**(4):192-198
- [13] Meder-Cowherd Lindsey, Williamson Anne E, Johnson William T, et al. Apical morphology of the palatal roots of maxillary molars by using micro-computed tomography[J]. *The Journal of Endodontics*, 2011; **37**(8):1162-1165
- [14] Paras Mull, Gehlot, Vinutha, et al. An in vitro evaluation of the accuracy of four electronic apex locators using stainless-steel and nickel-titanium hand files[J]. *Restorative dentistry & endodontics*, 2016; **41**(1):6-11
- [15] 李阅, 娄颖昕, 彭一纯. 根管治疗期间急症的临床分析[J]. *中国校医* 2007; **15**(04): 448-449+ 451