

· 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 Wenxer 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

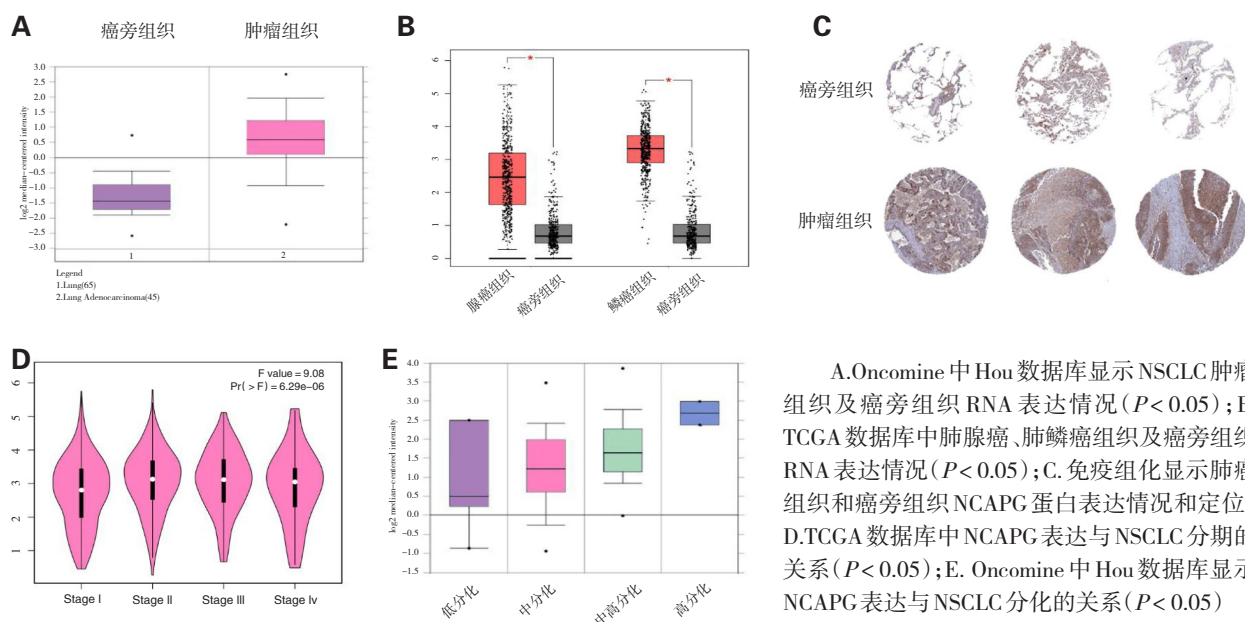


图 1 NCAPG 在肺癌组织中高表达、与肺癌分期及分化呈正相关

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。

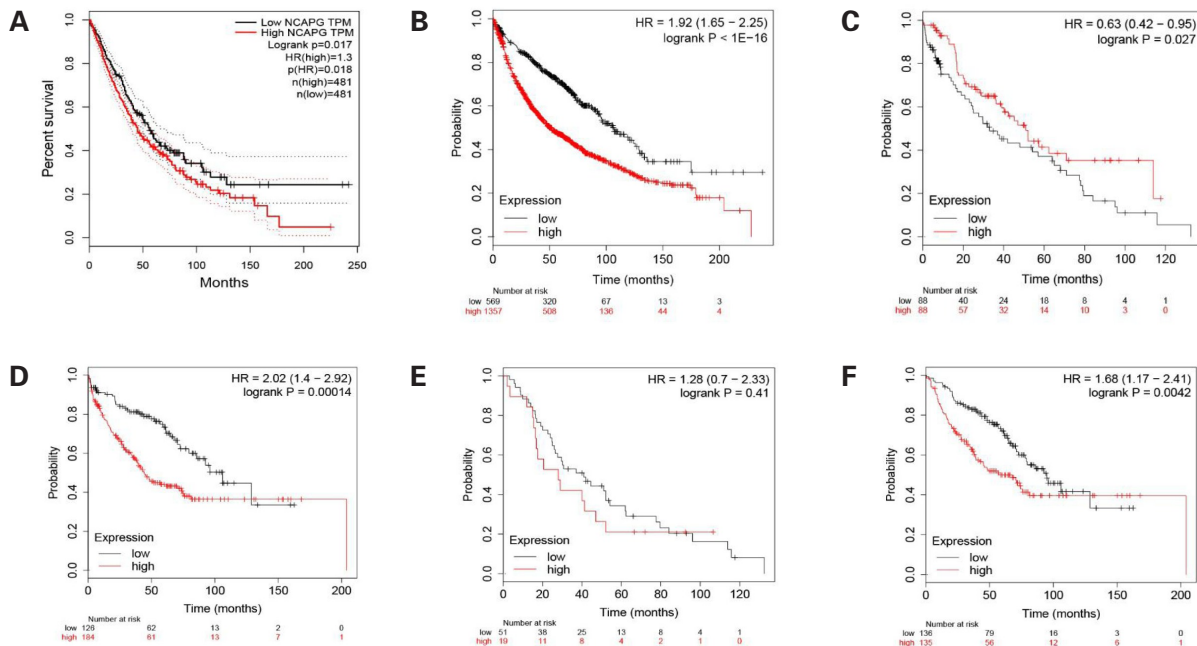


图2 NCAPG高表达与预后呈负相关,与化疗疗效正相关而与放疗疗效无关

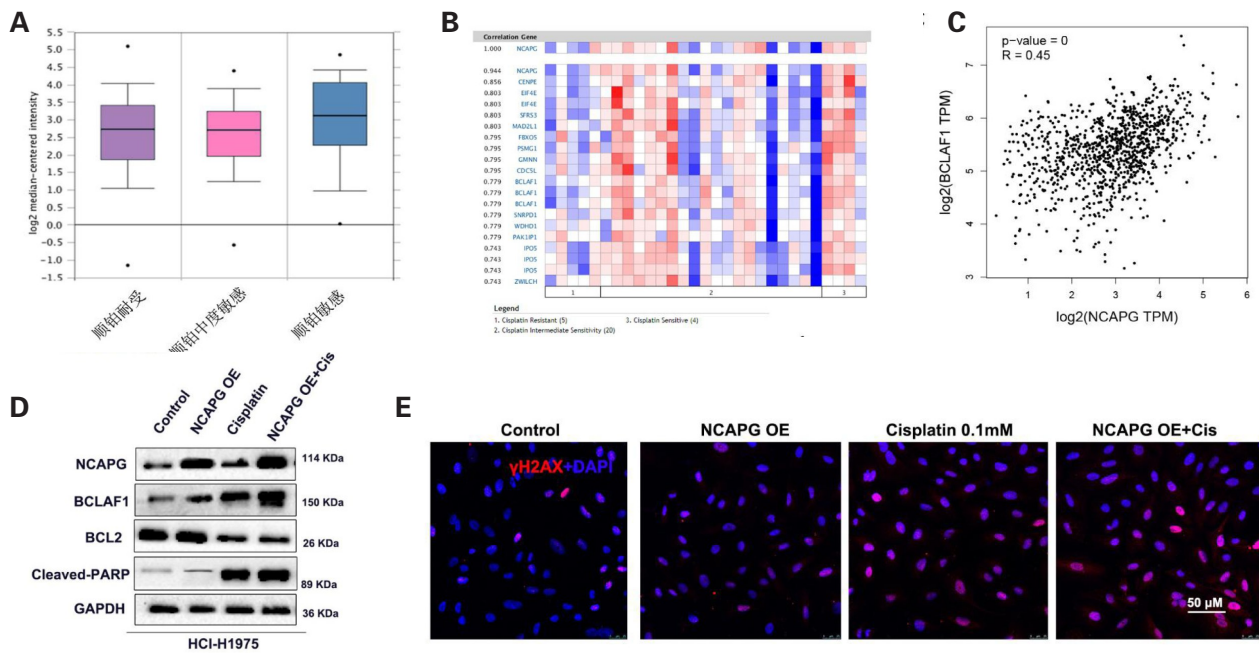
2.3 NCAPG 通过调节 BCLAF1 增强肺癌细胞对顺铂敏感性

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