

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003219

NUSAP1 在食管癌中与肿瘤细胞增殖和免疫细胞浸润相关性 ——基于数据库的研究

刘 洋, 孙 雪, 李忠诚, 白成云, 李文军
(青海大学附属医院胸外科, 西宁 810001)

【摘要】目的:探讨核仁纺锤体相关蛋白 1(nucleolar and spindle-associated protein 1, NUSAP1)在食管癌(esophageal carcinoma, ESCA)中的表达情况、临床意义及功能机制,为 ESCA 的早期诊断和治疗提供新思路。**方法:**从 GEPIA2 和 TIMER 数据库下载 ESCA 样本与癌旁样本,进行 NUSAP1 的表达分析,STRING 和 Cytoscape 软件进行 NUSAP1 相关基因的 PPI 网络构建,并进行 GO、KEGG 及 GSEA 富集分析。TIMER 数据库被用来分析 NUSAP1 与免疫细胞的相关性。最后通过 RT-PCR、Western blot 和免疫组化验证 NUSAP1 在 ESCA 组织和细胞中的表达,使用慢病毒包被的小干扰 RNA 转染 ESCA 细胞,进行 NUSAP1 的表达敲减。通过 CKK-8 和 Ki67 免疫荧光评估 NUSAP1 对 ESCA 细胞增殖的影响。**结果:**NUSAP1 在 ESCA 组织和细胞中高表达。NUSAP1 的表达与 CDK1、B 细胞和巨噬细胞浸润正相关,而与 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、中性粒细胞和树突状细胞浸润负相关。GSEA 分析发现 NUSAP1 的高表达组主要富集于 Wnt/β-catenin 信号通路、过氧化物酶通路、PI3K/Akt/mTOR 信号通路。在体外,敲减 NUSAP1 后抑制了 ESCA 细胞增殖。**结论:**NUSAP1 在 ESCA 中高表达,并与 ESCA 细胞增殖和免疫细胞浸润密切相关。因此,NUSAP1 可能有助于 ESCA 的诊断和治疗。

【关键词】食管癌;核仁纺锤体相关蛋白 1;免疫细胞浸润;增殖

【中图分类号】R735.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2021-06-29

Association of NUSAP1 with tumor cell proliferation and immune cell infiltration in esophageal carcinoma: database based research

Liu Yang, Sun Xue, Li Zhongcheng, Bai Chengyun, Li Wenjun

(Department of Thoracic Surgery, Affiliated Hospital of Qinghai University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression, clinical significance and functional mechanism of nucleolar and spindle-associated protein 1 (NUSAP1) in esophageal carcinoma (ESCA), and to provide new ideas for the early diagnosis and treatment of ESCA. **Methods:** ESCA samples and paracancerous samples were downloaded from GEPIA2 and TIMER databases to analyze the expression of NUSAP1, STRING and Cytoscape software were used to construct the PPI network of NUSAP1 related genes, and GO, KEGG and GSEA enrichment analysis were performed. The TIMER database was used to analyze the correlation between NUSAP1 and immune cells. Finally, the expression of NUSAP1 in ESCA tissues and cells was verified by RT-PCR, Western blot and immunohistochemistry, and ESCA cells were transfected with lentivirus-coated small interfering RNA to knock down the expression of NUSAP1. The effect of NUSAP1 on ESCA cell proliferation was evaluated by CKK-8 and Ki67 immunofluorescence. **Results:** NUSAP1 was highly expressed in ESCA tissues and cells. The expression of NUSAP1 was positively correlated with the infiltration of CDK1, B cells and macrophages, but negatively correlated with the infiltration of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, neutrophils and dendritic cells. GSEA analysis found that the high expression group of NUSAP1 was mainly enriched in Wnt/β-catenin signaling pathway, peroxidase pathway, PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *In vitro*, knockdown of NUSAP1 inhibited the proliferation of ESCA cells. **Conclusion:** NUSAP1 is highly expressed in ESCA and closely related to ESCA cell proliferation and immune cell infiltration. Therefore, NUSAP1

may help the diagnosis and treatment of ESCA.

【Key words】 esophageal carcinoma; nucleolar and spindle-associated protein 1; immune cell infiltration; proliferation

作者介绍: 刘 洋, Email: 1002127279@qq.com,

研究方向: 食管癌。

基金项目: 青海地区基金资助项目 (编号: 2020-wjzds-47)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1046.R.20230531.1452.004.html>
(2023-06-01)

食管癌(esophageal carcinoma, ESCA)是全球最常见的消化道恶性肿瘤之一,它的发病率和死亡率在恶性肿瘤中分别位居第7位和第6位^[1]。在全球,约有45万人遭受ESCA的折磨,受其影响的人群还在逐年增加^[2]。在过去几十年中,ESCA的治疗取得了很大的进展。但在食管癌早期,患者缺乏明显症状,临床上也没有高度敏感和特异的诊断标志物,大多数患者发现时已到晚期,错过了最佳治疗时期^[3],其5年生存率只有15%~25%^[4]。因此,探索新的生物标志物对提高ESCA的早期诊断和改善预后至关重要。

核仁纺锤体相关蛋白1(nucleolar and spindle-associated protein 1, NUSAP1)是一种维管结合蛋白,分子质量为55 kD,定位于染色体臂并通过与微管和DNA结构域结合来调节纺锤体组装以及正常有丝分裂的维持^[5]。它的缺失可导致细胞间期核异常、染色体分离异常、染色体不对称、纺锤体组装异常、有丝分裂缺陷和纺锤体中央微管减少^[6-8]。最近,研究人员报道了NUSAP1与肿瘤的关系,在乳腺癌^[9]、肝癌^[10]、结直肠癌^[11]、前列腺癌^[12]及非小细胞肺癌^[13]中NUSAP1差异性上调,并作为这些肿瘤潜在的诊断和预后标志物。然而,NUSAP1在ESCA中的表达及功能尚不清楚。

本研究通过GEPIA2和TIMER数据库研究ESCA样本和癌旁样本中NUSAP1的表达,构建了与之相关的PPI网络,并对其进行功能富集分析。本研究还分析了NUSAP1在肿瘤微环境中与免疫细胞浸润的相关性,并在30例ESCA组织标本和ESCA细胞中进行验证。此外还研究了NUSAP1的表达对ESCA细胞增殖的影响。结果表明,NUSAP1在ESCA组织和细胞中高表达,并与ESCA细胞增殖和肿瘤微环境中免疫细胞浸润密切相关。

1 材料与方法

1.1 NUSAP1在ESCA中差异表达的验证

在GEPIA2(<http://gepia2.cancer-pku.cn/>)和TIMER(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)数据库中进行ESCA样本与癌旁样本的差异表达验证。GEPIA平台包括来自TCGA和GTEx数据库的9 736个肿瘤组织和8 587个正常组织的RNA测序数据,主要提供的功能有基因表达分析、基因相关性分析、生存分析、相似基因预测、降维分析等。用GEPIA和TIMER数据库检测NUSAP1在ESCA及各大癌中的mRNA表达。考虑到数据库更新的时效性问题,从UCSC xena

(<https://xenabrowser.net/datapages/>)下载经过TOIL流程统一处理的TCGA和GTEx的TPM文件,用分裂小提琴图展示NUSAP1在TCGA肿瘤和正常组织中的表达差异。进一步使用gganatomogram包画出感兴趣的基因在各个器官的表达分布。

1.2 NUSAP1的相关基因分析及GO、KEGG分析

STRING(Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes, <http://www.string-db.org/>)是评估蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)的生物学工具,可以对疾病发生或发展机制进行深入了解。使用STRING(version: 11.0)在线软件和Cytoscape软件进行NUSAP1相关基因的PPI网络构建。该工具的主要目的是基于荟萃分析的生存生物标志物的发现和验证。GO是注释基因及其产物的重要方法和工具,有利于生物数据的整合和利用,包括分子功能(molecular function, MF)、生物过程(biological process, BP)和细胞组分(cellular component, CC)3个部分。KEGG是一种整合基因组学、化学和系统功能信息的数据库资源,可提供已知的生物代谢信号通路。为了进一步探究NUSAP1的功能,对所得NUSAP1相关基因进行GO和KEGG分析。

1.3 NUSAP1与CDK1的相关性分析及NUSAP1在组织的表达验证

基于相关基因分析,将从UCSC xena下载经过TOIL流程统一处理的TCGA和GTEx的TPM文件进行预处理,使用相关性图分析展示NUSAP1与CDK1的相关性。人类蛋白质图谱是一个开放存取的数据库,用于绘制器官、组织和细胞中的所有人类蛋白质,并使用各种组学技术的集成。用人类蛋白图谱和TIMER数据库检测NUSAP1在器官、组织及各大癌中的mRNA表达。

1.4 NUSAP1突变及免疫的相关性分析

突变与ESCA的发生发展密切相关,使用maftools包分析展示ESCA突变及NUSAP1的突变情况。免疫细胞浸润与ESCA的预后密切相关,随着靶向治疗的兴起,ESCA发生发展分子机制研究不断深入,ESCA的分子靶向治疗逐渐崭露头角。免疫检查点蛋白在免疫应答中起重要作用,与免疫细胞有多种相互作用。为了进一步探究预后相关基因的潜在治疗靶点,在TIMER数据库对NUSAP1与免疫的相关性进行探究。

1.5 NUSAP1单细胞层面分析

CCLL数据库是由Broad Institute研究所牵头发起的一项肿瘤基因组学研究项目,收集整理1 000多个肿瘤细胞系的组学数据。本研究利用2个数据库对NUSAP1的表达水平在不同层面进行初步验证。为进一步探究NUSAP1在细胞中表达的关系,在TIMER数据库、人类蛋白质图谱数据库及CCLL数据库中对NUSAP1单细胞层面进行探究。

1.6 NUSAP1的GSEA分析

以最佳截取值为标准,将NUSAP1分为高低表达组。双尾检验的统计显著性设为0.05。为了探索2组间富集的重要通路,进行了GSEA分析。GSEA分析以“h.all.v.7.1.symbols.gmt”为参照基因集,使用GSEA软件GSEA 4.0.3进行GSEA富集

分析,并进行 1 000 次基因组置换,以实现每次分析的标准化富集得分;标准化的 $P < 0.05$ 和错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 被认为有显著结果。

1.7 临床标本

标本来源于 2020 年 1 月至 2021 年 1 月青海大学附属医院收集的 30 例接受 ESCA 全切手术的患者新鲜组织样本。将距离原发肿瘤边缘 3 cm 处的正常组织作为对照组。所收集的临床标本的诊断由本院 2 名病理学专家进行诊断。研究实施前,所有患者均签署知情同意书,青海大学附属医院伦理委员会批准本研究。

1.8 RT-PCR

使用 TRIzol (Thermo Fisher, Shanghai, China) 从组织标本和细胞中获得总 RNA。使用分光光度法 (BioTek, 佛蒙特州, 美国) 测定 RNA 样品的纯度和浓度。随后,将 300 ng RNA 样品逆转录成 cDNA,并使用 One Step Super RT-PCR Mix Kit (Solarbo, 上海, 中国) 进行扩增。GAPDH 用作表达对照。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析 NUSAP1 的 mRNA 水平。NUSAP1 引物: F: 5'-TTCTGCTGCTGTTATTAC-3', R: 5'-GTGTGGTTCATAGTTGAG-3'; GAPDH 引物: F: 5'-TCACCAGGGCTGCTTTTA-3', R: 5'-TTCA CACCCATGACGAACA-3'。

1.9 免疫组织化学染色

将石蜡包埋的组织块标本切成 4 μm 厚度的薄片,用载玻片贴覆,随后将载玻片脱蜡、抗原修复后,血清封闭 30 min,一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。二抗常温孵育 2 h,苏木精复染 3~5 min。然后用中性树胶封片。

1.10 Western blot

组织和细胞在 RIPA 裂解缓冲液中裂解以分离蛋白质,随后使用 10% SDS-PAGE 分离样品,转移至 PVDF 膜,并在 5% BSA 中封闭 1 h。膜与一抗一起温育,包括兔单克隆抗体 NUSAP1 (1:1 000, Abcam, CA, USA) 和兔多克隆抗体 GAPDH (1:10 000, Abcam) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜。将膜洗涤 3 次并在室温下用 HRP 偶联的二抗 (1:2 000, Abcam) 标记 1 h。使用 ECL 系统 (Tannon, 北京, 中国) 可视化蛋白质条带。

1.11 细胞培养和慢病毒转染

正常食管细胞系 HEEC 和 ESCA 细胞系 (EC9706、Eca109、TE-13、Kyse170、T.TN) 购自中国科学院上海生命科学研究所细胞资源中心。所有细胞在含有 10% FBS (Gibco, Rockville, USA) 的 RPMI 1640 培养基 (Gibco, Rockville, USA) 中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 培养箱中培养。NUSAP1 敲低慢病毒载体购自 GenePharma (中国上海)。细胞在以感染复数为 10 的慢病毒载体转导 12 h。随后收获细胞并用完全培养基培养用于进一步研究。

1.12 CCK-8 实验

进行 CCK-8 测定以检查细胞活力。将慢病毒感染后的细胞以 2×10^3 个/孔悬浮并接种在 96 孔板中进行 0、24、48 和 72 h 孵育。随后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液 (碧云天, 上海, 中国) 温育 2 h。使用酶标仪 (BioTek, 佛蒙特州, 美国) 测量 450 nm 波长处的光密度值。

1.13 统计学处理

使用 R 4.1.2 或 Graph-Pad 8.0 进行分析并作图,每个实验至少独立重复 3 次,本研究对 2 组样本的比较采用 t 检验,对 3 组或 3 组以上的数据使用采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),采用 Pearson 相关检验进行相关性分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 NUSAP1 在 ESCA 中高表达

从 TCGA 数据库的 33 种癌症中提取 NUSAP1 的 mRNA 水平,并绘制 NUSAP1 在癌组织和癌旁组织中表达的箱式图。如图 1A 所示, NUSAP1 在包括膀胱移行细胞 (bladder urothelial carcinoma, BLCA)、浸润性乳腺癌 (breast invasive carcinoma, BRCA)、宫颈鳞状细胞癌、宫颈内膜腺癌 (cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma, CESC)、胆管癌 (cholangiocarcinoma, CHOL)、结肠腺癌 (colon adenocarcinoma, COAD)、食管癌 (esophageal carcinoma, ESCA)、多形性胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM)、头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSC)、肾透明细胞癌 (kidney renal clear cell carcinoma, KIRC)、肾乳头状细胞癌 (kidney renal papillary cell carcinoma, KIRP)、肝细胞癌 (liver hepatocellular carcinoma, LIHC)、肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD)、肺鳞状细胞癌 (lung squamous cell carcinoma, LUSC)、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤 (pheochromocytoma and paraganglioma, PCPG)、前列腺腺癌 (prostate adenocarcinoma, PRAD)、直肠腺癌 (rectum adenocarcinoma, READ)、肉瘤 (sarcoma, SARC)、胃腺癌 (stomach adenocarcinoma, STAD)、甲状腺癌 (thyroid carcinoma, THCA)、子宫内膜癌 (uterine corpus endometrial carcinoma, UCEC) 和胸腺瘤 (thymoma, THYM) 中表达增加。在肾嫌色细胞癌 (kidney chromophobe, KICH)、胰腺腺癌 (pancreatic adenocarcinoma, PAAD) 和皮肤黑色素瘤 (skin cutaneous melanoma, SKCM) 中表达无明显变化。由于肾上腺皮质癌 (adrenocortical carcinoma, ACC)、淋巴样肿瘤弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (lymphoid neoplasm diffuse large B-cell lymphoma, DLBC)、急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, LAML)、脑低级别胶质瘤 (brain lower grade glioma, LGG)、间皮瘤 (mesothelioma, MESO)、卵巢浆液性囊腺癌 (ovarian serous cystadenocarcinoma, OV)、睾丸生殖细胞瘤 (testicular germ cell tumors, TGCT)、子宫癌肉瘤 (uterine carcinosarcoma, UCS) 和葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma, UVM) 的邻近癌旁组织数据不可用,因此不知道 NUSAP1 在这些组织中的表达变化 (图 1A)。考虑到数据库更新的时效性,从 UCSC xena 下载经过 TOIL 流程统一处理的 TCGA 和 GTEx 的 TPM 文件,用分裂小提琴图展示 NUSAP1 在 ESCA 和正常组织中的表达差异。相比于正常组织, NUSAP1 在 ESCA 组织中高表达 (图 1B、图 2A)。另外, NUSAP1 在这些肿瘤组织的细胞系中也普遍升高 (图 2B)。

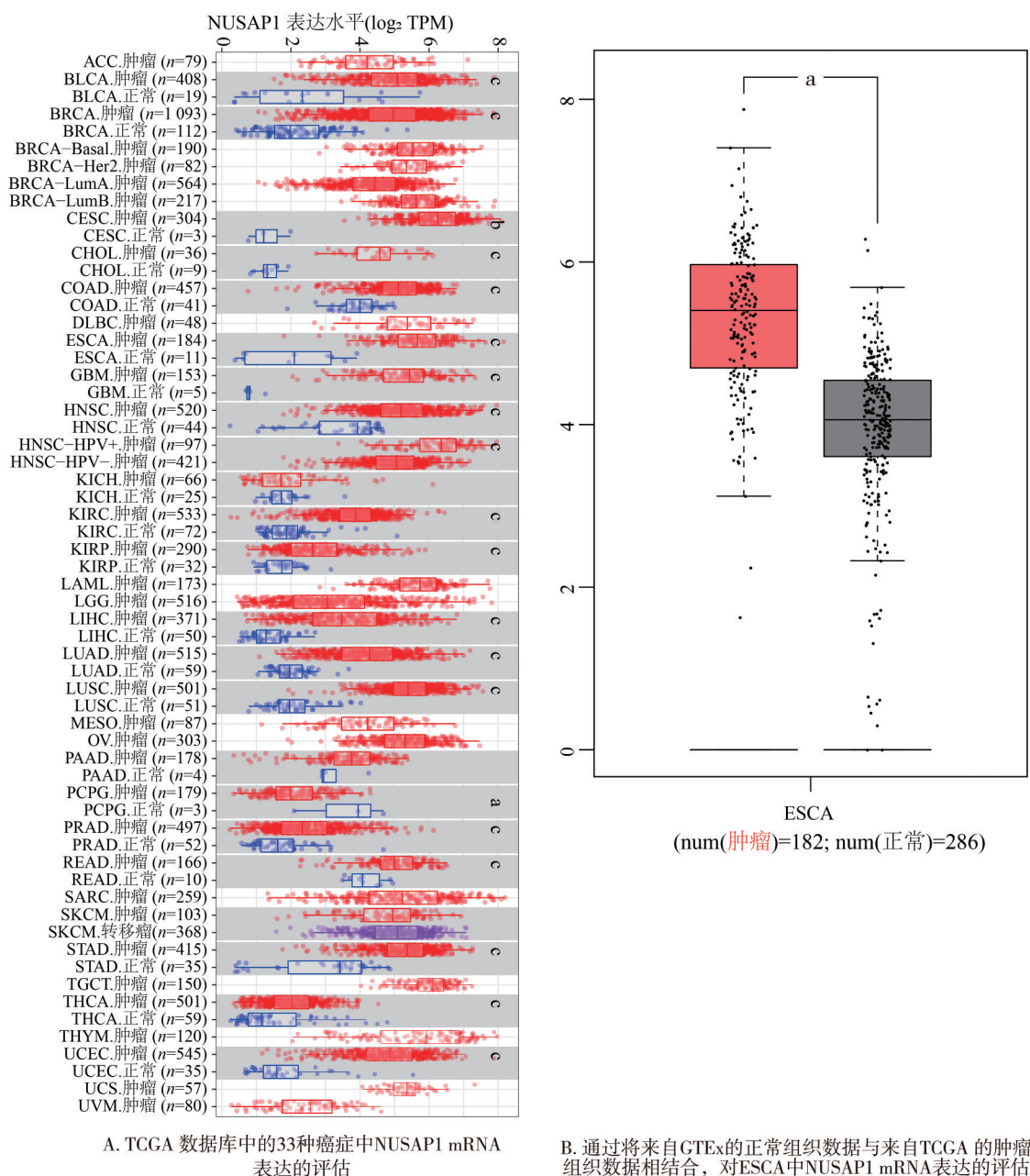


图1 NUSAP1在各种癌症中的差异表达

2.2 NUSAP1相关基因的PPI网络和功能富集分析

为了预测NUSAP1的功能,通过STRING在线工具构建与NUSAP1相关的PPI网络。如图3A所示,NUSAP1与CDK1、CDC20、DLGAP5、KIF11、CDCA8、NCAPC、CCNA2、NDC80、ASPM和TOP2A基因间有很高的相关性。使用clusterProfiler R包进一步探索与NUSAP1相关基因的潜在功能途径。GO分析发现,这些基因包含的生物学过程有细胞器裂变、核分裂、染色体分离、DNA复制和细胞周期等。参与的细胞组分有染色体、纺锤体等(图3B)。涉及的分子功能有ATP酶活性、微管蛋白结合催化活性、旋酶活性及微管运动活性等。KEGG富集分析发现,与NUSAP1相关基因富集的通路有细胞周期、DNA复制和减数分裂等(图3C)。

2.3 NUSAP1与CDK1的关系

将来自TIMER的RNA测序数据集在GEPIA中评估NUSAP1与CDK1之间的相关性。结果显示,不管是在各大肿瘤中,还是单独在ESCA组织中,NUSAP1与CDK1均有较强的相关性。其中,在大部分癌症中NUSAP1与CDK1呈现明显的正相关($r=0.89, P<0.01$)(图4A、C),在ESCA组织中NUSAP1与CDK1同样呈现明显的正相关($r=0.84, P<0.01$)(图4B)。

2.4 NUSAP1的组织及细胞的初步表达验证

NUSAP1在人体组织中表达验证结果显示,在人体正常组织中mRNA层面的表达结果显示,NUSAP1在骨髓、淋巴组织、上消化道及女性特有组织中表达较高,而在人体正常

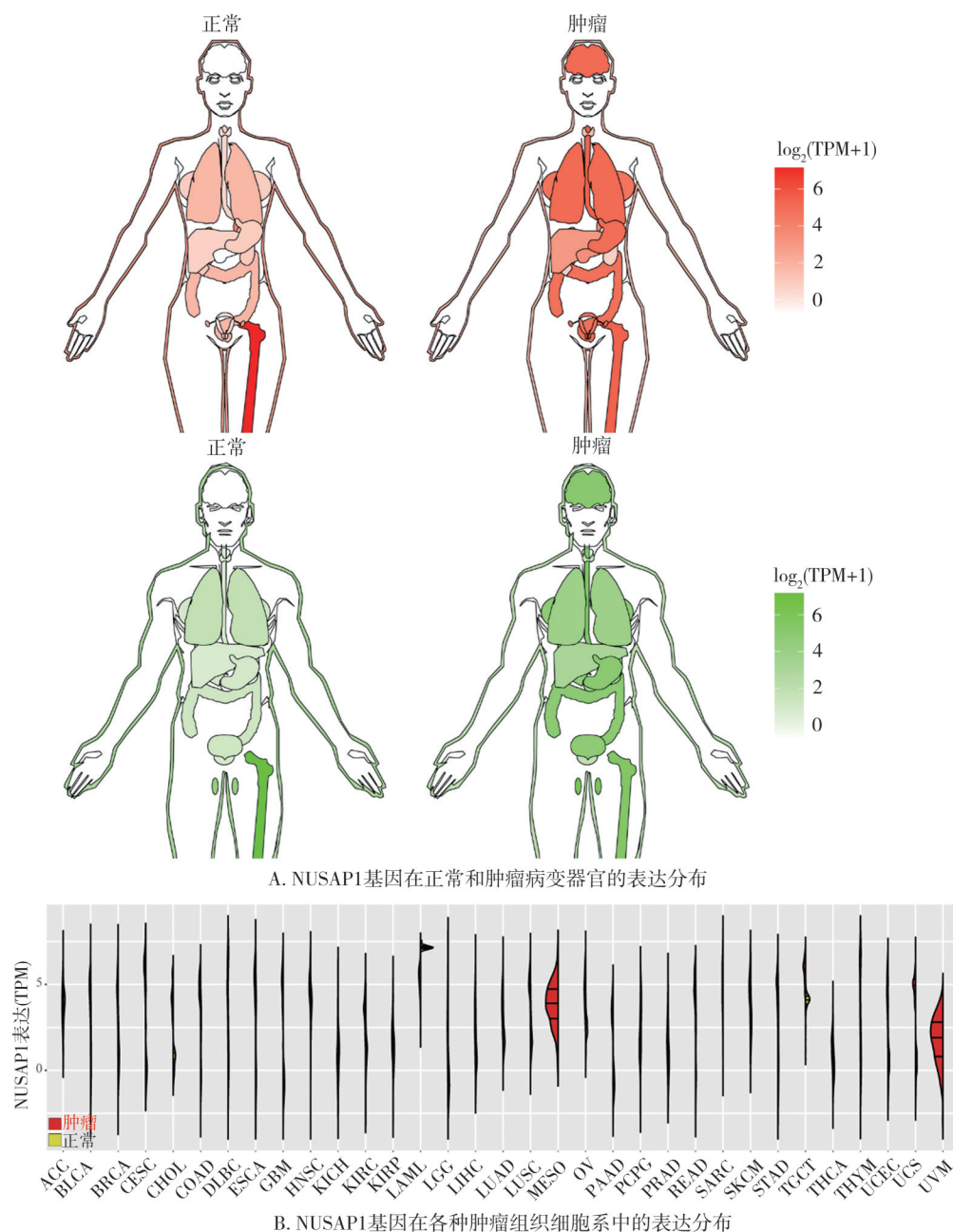


图2 NUSAP1 基因在各个器官里的表达分布

组织中蛋白层面的表达结果与 mRNA 层面的结果基本一致 (图 5)。

2.5 ESCA 组织中基因突变分析

利用 TCGA 队列中体细胞突变变异的数据来阐明 ESCA 的突变格局。其中, 错义突变是最常见的突变, 单核苷酸多态性比缺失或插入多 (图 6A), 点突变类型主要为 C>T 突变。此外还计算了每个患者的突变碱基数量, 并用不同颜色方框图显示突变类别 (图 6B)。水平直方图显示 ESCA 中显著突变的 10 个基因分别为 TP53 (82%)、TTN (40%)、MUC16 (22%)、SYNE1 (18%)、CSMD3 (17%)、DNAH5 (16%)、FLG (16%)、HMCN1 (15%)、LRP1B (15%) 和 PCLO (14%) (图 6C)。而 NUSAP1 在 ESCA 中未发生突变。进一步分析 NUSAP1 的

表达水平与 33 种癌症组织中突变情况的相关性, 结果发现 NUSAP1 的表达水平在包括 ACC、BLCA、ESCA 等多种肿瘤中与以上基因的突变相关, 而在 CESC、PCPG 和 THCA 中无明显相关性。

2.6 NUSAP1 与免疫细胞的相关性

为了探讨 NUSAP1 表达水平与免疫系统的关系, 从 TCGA 队列获取 ESCA 组织的肿瘤纯度数据 (图 7A)。NUSAP1 表达与肿瘤纯度的相关分析表明, NUSAP1 可能影响肿瘤微环境的免疫状态。因此, 进一步通过 TIMER 数据库研究 NUSAP1 表达是否与 ESCA 中的免疫浸润相关。结果表明, NUSAP1 表达与 B 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞浸润均具有一定的相关性。其中,

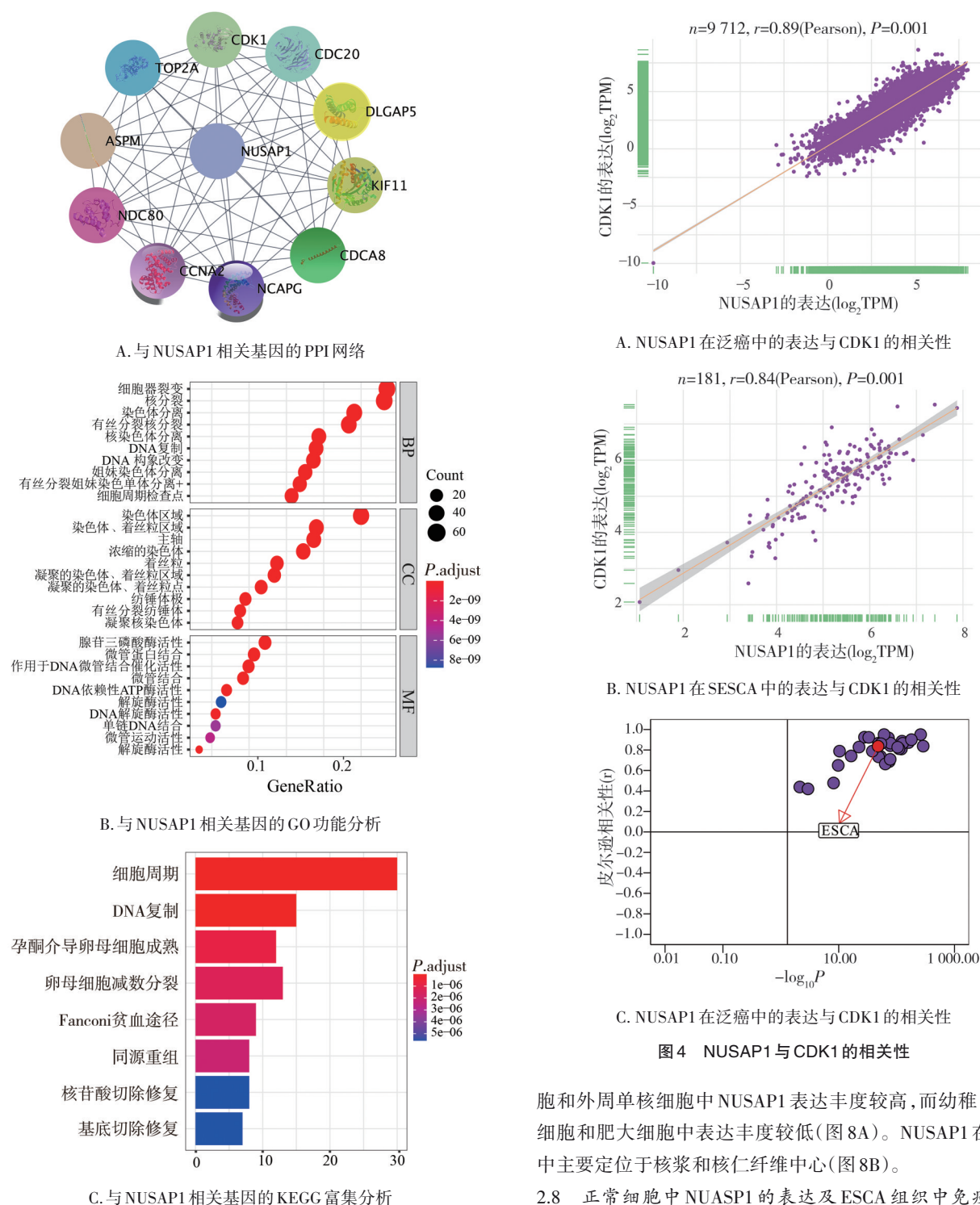


图3 NUSAP1 相关基因的 PPI 以及功能富集分析

NUSAP1 的表达与 B 细胞和巨噬细胞浸润正相关, 而与 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、中性粒细胞和树突状细胞浸润负相关 (图 7B)。NUSAP1 的基因拷贝数与免疫细胞浸润水平没有明显的相关性 (图 7C)。

2.7 免疫细胞中 NUSAP1 的表达及 NUSAP1 的细胞定位

进一步分析 NUSAP1 在免疫细胞中的表达情况, 结果发现在 T 细胞、嗜碱性粒细胞、记忆性 CD4 T 细胞、嗜酸性粒细

胞和外周单核细胞中 NUSAP1 表达丰度较高, 而幼稚 CD4 T 细胞和肥大细胞中表达丰度较低 (图 8A)。NUSAP1 在细胞中主要定位于核浆和核仁纤维中心 (图 8B)。

2.8 正常细胞中 NUSAP1 的表达及 ESCA 组织中免疫细胞浸润情况

通过分析 NUSAP1 在正常组织细胞中的表达情况, 发现 NUSAP1 在血细胞和生殖细胞中表达丰度较高, 在包管细胞、纤毛细胞、集合管细胞和视锥细胞中几乎不表达 (图 9A)。为了了解免疫细胞类型在 ESCA 进展中的作用, 进一步分析 ESCA 组织中免疫细胞浸润情况, 结果发现食管癌组织中 B 细胞、CD8⁺ T 细胞、肥大细胞浸润明显减少, 而巨噬细胞浸润却增加 (图 9B)。

图4 NUSAP1 与 CDK1 的相关性

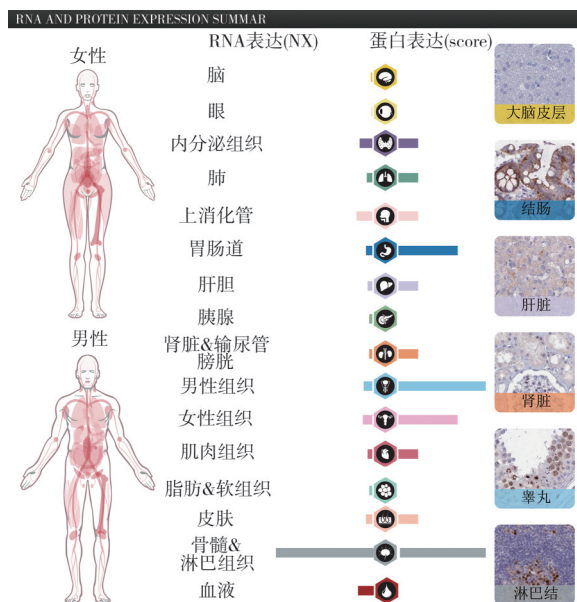


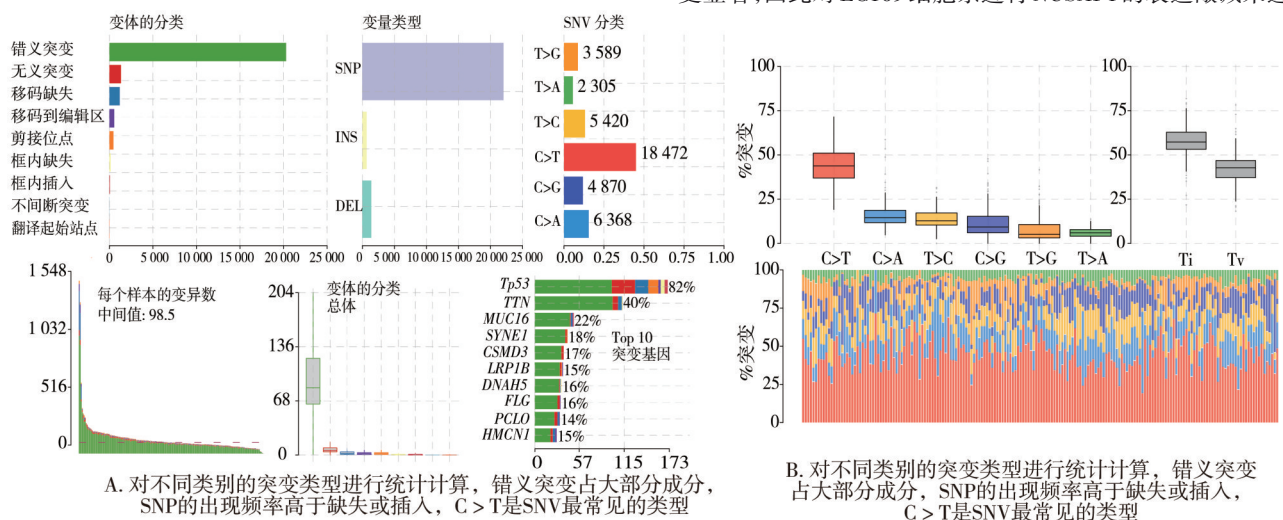
图5 NUSAP1在人体组织中的表达验证

2.9 NUSAP1的GSEA分析

为了进一步探究NUSAP1参与ESCA进展的分子机制,对NUSAP1进行GSEA分析,结果表明NUSAP1的高表达组主要富集于Wnt/ β -catenin信号通路、过氧化物酶通路、PI3K/Akt/mTOR信号通路(图10)。

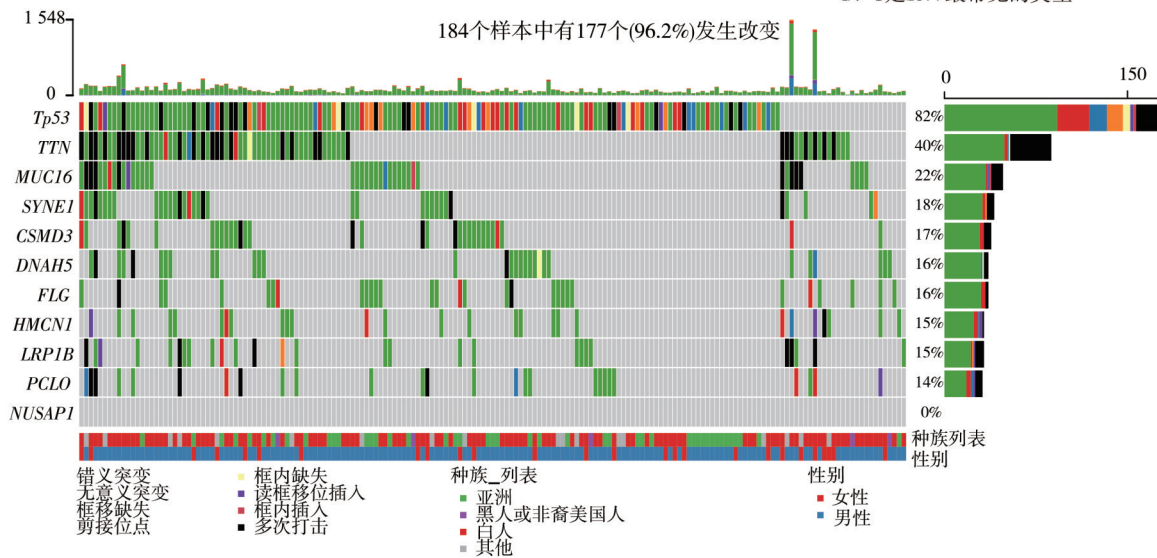
2.10 NUSAP1在ESCA组织和细胞中的表达

为了验证GEPIA数据库分析的NUSAP1在ESCA组织和正常食管上皮组织中的表达水平,对收集的30例ESCA组织标本和配对的癌旁组织进行NUSAP1的mRNA和蛋白表达水平检测。RT-PCR(图11A)、Western blot(图11B、C)及免疫组织化学染色(图11D)结果显示,NUSAP1在ESCA组织中高表达。通过RT-PCR和Western blot进一步检测正常食管细胞系HEEC和3种ESCA细胞系(Kyse170、EC109、EC9706)中NUSAP1的表达。与组织表达结果相似,相比于正常的食管细胞系HEEC,NUSAP1在ESCA细胞系中高表达(图11E、F、G)。NUSAP1在EC109中的表达比其他细胞系更显著,因此对EC109细胞系进行NUSAP1的表达敲减来进



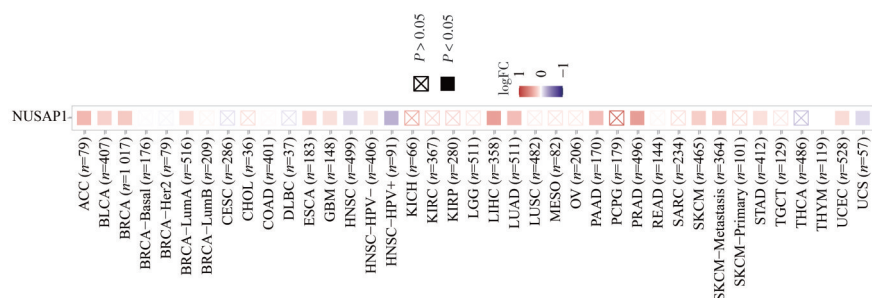
A. 对不同类别的突变类型进行统计计算, 错义突变占大部分成分, SNP的出现频率高于缺失或插入, C>T是SNV最常见的类型

B. 对不同类别的突变类型进行统计计算, 错义突变占大部分成分, SNP的出现频率高于缺失或插入, C>T是SNV最常见的类型

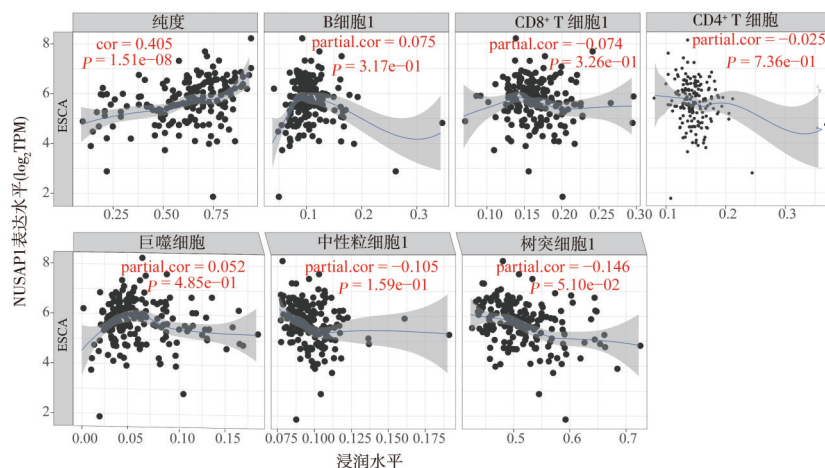


C. ESCA突变前10位基因

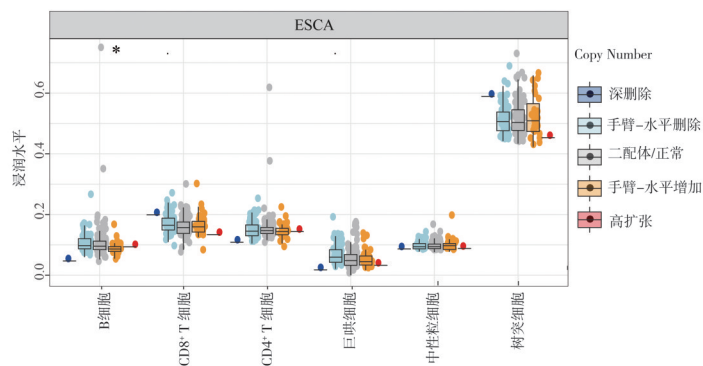
图6 BLCA样本的突变分析



A. NUSAP1 在各种瘤中的表达情况

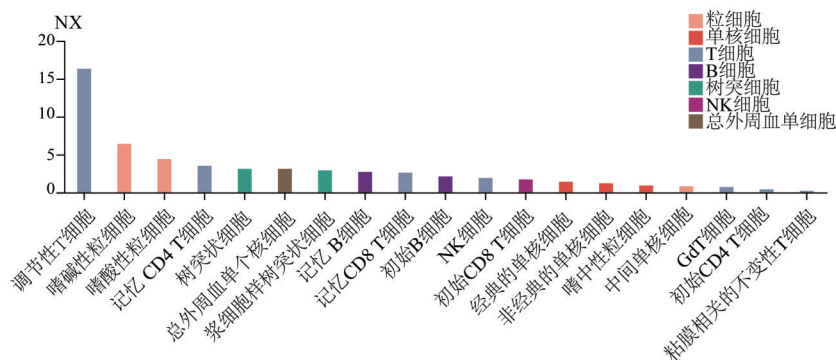


B. NUSAP1 表达与肿瘤纯度及免疫细胞相关性分析

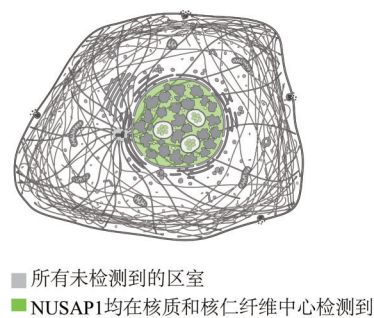


C. ESCA 中 NUSAP1 的拷贝数变异类型与免疫细胞浸润的相关性分析

图7 NUSAP1 与肿瘤纯度及免疫细胞浸润的相关性



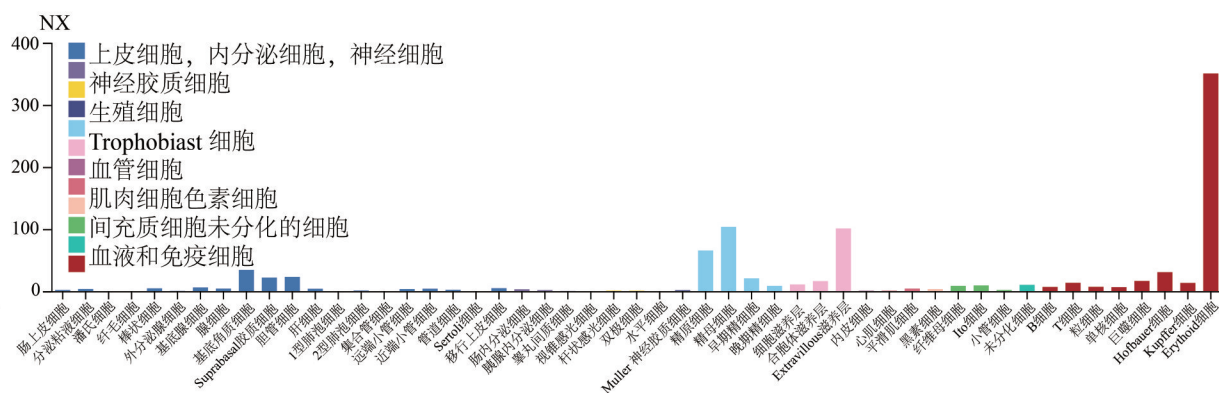
A. NUSAP1 在免疫细胞中的表达柱状图



B. NUSAP1 在细胞中的表达模式图

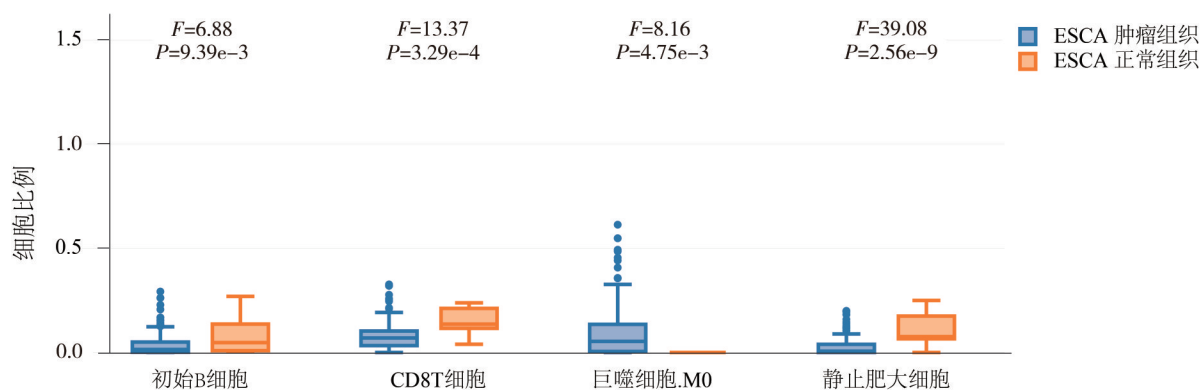
图8 NUSAP1 在免疫细胞中的表达丰度和细胞定位

单细胞类型



A. NUSAP1在正常组织细胞中的表达情况

细胞类型分组



B. ESCA组织中免疫细胞浸润情况

图9 NUSAP1在正常组织细胞中的表达及ESCA组织中的免疫细胞浸润情况

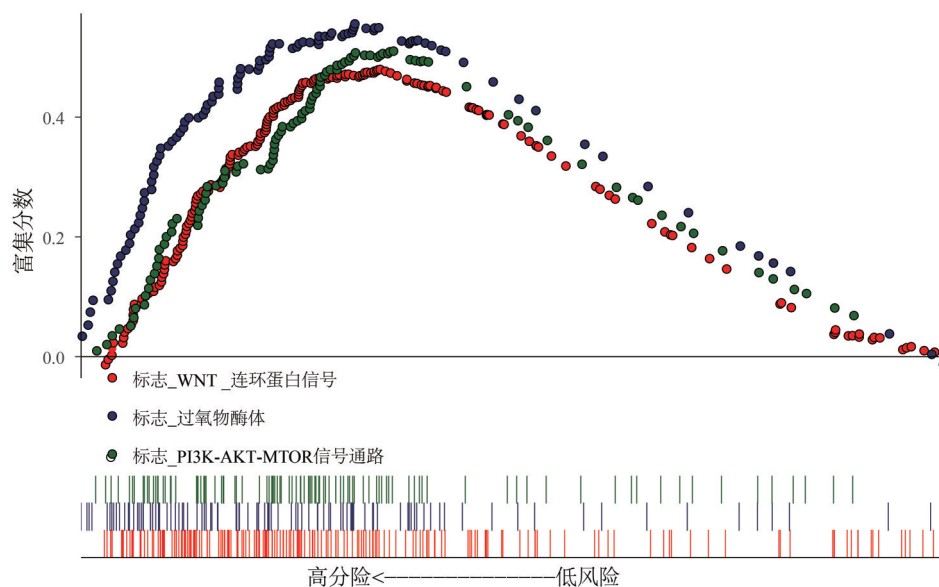
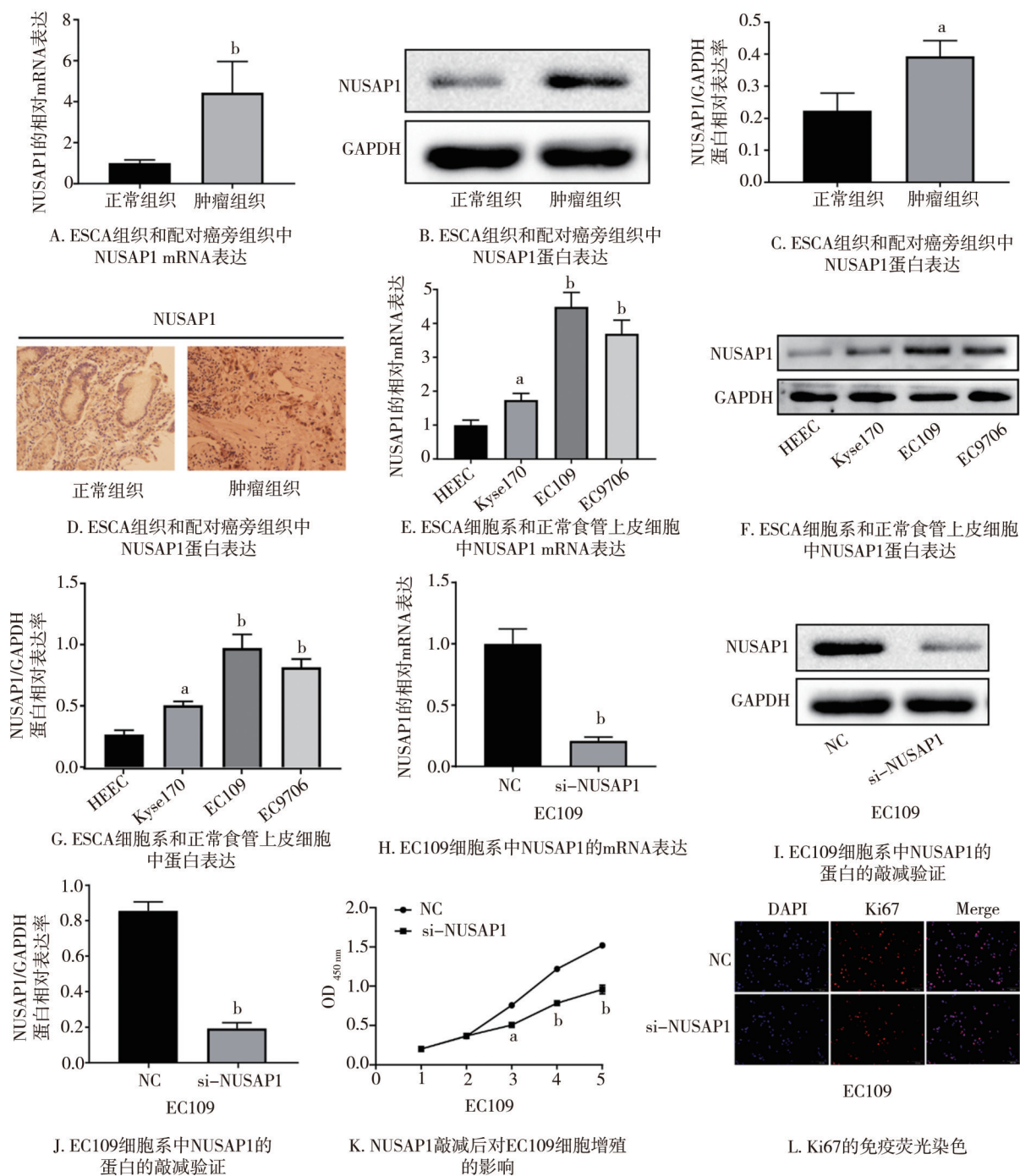


图10 NUSAP1的GSEA分析

一步研究NUSAP1对EC109细胞增殖的影响。使用慢病毒包被的si-NUSAP1转染EC109后,NUSAP1的mRNA和蛋白表达水平明显降低(图11H、I、J)。CKK-8实验结果显示,与

癌旁组织相比,敲减NUSAP1后,细胞增殖明显减慢(图11K)。Ki67免疫荧光染色显示,敲减NUSAP1后Ki67的免疫荧光强度明显减弱(图11L)。



注:a表示 $P < 0.01$, b表示 $P < 0.001$

图 11 NUSAP1 在 ESCA 组织和细胞中的表达

3 讨论

ESCA 是全球最常见的消化道恶性肿瘤,由于早期缺乏明显临床特征和诊断标志物,大多数患者诊断时已发生远处转移,不仅错过了最佳治疗时机,也为后期治疗增加了难度^[14]。因此,寻找特异性

的早期诊断标志物对提高 ESCA 患者的预后显得尤为重要。近些年随着高通量测序,基因芯片技术快速发展,通过生物学技术为疾病的诊断筛选生物标志物成为一种全新的策略。因此,本研究通过生物信息学来鉴定 ESCA 的诊断标志物和治疗靶点,希望为 ESCA 的诊断和治疗提供新见解。

NUSAP1 是一种核仁纺锤体相关蛋白,在乳腺癌^[9]、肝癌^[10]和结直肠癌^[11]中的表达和功能最近已有研究报道。然而,它在 ESCA 中的表达和功能尚不清楚。本研究使用 GEPIA2 和 TIMER 数据库分析了 NUSAP1 在 33 种实体肿瘤中的表达,结果表明 NUSAP1 在包括 ESCA 在内的多种肿瘤中高表达,这也被 RT-PCR、Western blot 及免疫组织染色结果得到证实。进一步构建与 NUSAP1 相关基因的 PPI 网络,结果表明 NUSAP1 与 CDK1、CDC20、DLGAP5、KIF11、CDCA8、NCAPC、CCNA2、NDC80、ASPM 和 TOP2A 基因间有很高的相关性。GO 分析发现,这些基因包含的生物学过程有细胞器裂变、核分裂、染色体分离、DNA 复制和细胞周期等。参与的细胞组分有染色体、纺锤体等。涉及的分子功能有 ATP 酶活性、微管蛋白结合催化活性、解螺旋酶活性及微管运动活性等。KEGG 富集分析发现,与 NUSAP1 相关基因富集的通路有细胞周期、DNA 复制和减数分裂等,说明这些基因与肿瘤细胞的周期和增殖密切相关。体外进一步研究了 NUSAP1 对 ESCA 细胞系增殖的影响,当敲减 NUSAP1 后,ESCA 细胞的增殖能力明显减弱。CDK1^[15]、KIF11^[16]、CCNA2^[17]、ASPM^[18] 和 TOP2A^[19]被认为是 ESCA 的诊断和预后标志物, CDC20^[20]、DLGAP5^[21]、CDCA8^[22] 和 NDC80^[23]在乳腺癌、膀胱癌和胰腺癌中扮演癌基因功能。进一步分析 NUSAP1 与 CDK1 的相关性,不管是在各大肿瘤中,还是在 ESCA 组织中, NUSAP1 与 CDK1 明显正相关。在浸润性乳腺癌细胞中,下调 NUSAP1 通过调节 CDK1 的表达抑制细胞增殖和增加化疗药物敏感性^[24]。

肿瘤微环境特别是免疫细胞在肿瘤的形成、进展、转移及免疫治疗反应中扮演重要角色。将肿瘤微环境从肿瘤友好型改变成肿瘤抑制型被证明是改善癌症预后的有利策略^[25]。因此,研究和阐明免疫浸润细胞与 ESCA 细胞的关系,有助于为 ESCA 患者的免疫治疗提供帮助。本研究分析了 NUSAP1 与免疫浸润细胞的相关性,结果发现 NUSAP1 的表达与肿瘤纯度、B 细胞和巨噬细胞正相关,而与 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、中性粒细胞和树突状细胞负相关。肿瘤相关巨噬细胞能够通过分泌免疫抑制因子如白细胞介素-10 来促进肿瘤的生长和发展^[26]。

由于肿瘤相关巨噬细胞对免疫治疗、化疗和分子靶向治疗有影响,因此也成为治疗肿瘤最有吸引力的靶点^[27]。本研究还发现肿瘤相关巨噬细胞分泌的细胞因子会削弱肿瘤浸润淋巴细胞的抗癌作用,CD8⁺ T 细胞是肿瘤浸润淋巴细胞的一种,其丰度与良好的预后和免疫治疗反应有关^[28],并且 CD8⁺ T 细胞浸润的募集和再活化已经成为免疫治疗的一个主要方向^[29]。在 ESCA 中,CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞可以准确预测新辅助化疗的有效性^[30],中性粒细胞是 ESCA 患者独立的预后因素^[31]。另外,树突状细胞的免疫疗法被用来治疗 ESCA,并且取得了一定的成果^[32]。在 ESCA 组织中,NUSAP1 可能对这些免疫细胞的浸润有影响。

此外,越来越多的证据表明肿瘤特异性突变可产生新抗原,从而引起免疫反应,杀死肿瘤细胞,说明某些特异性基因的修饰可改变肿瘤突变负荷的状态^[33]。因此,本研究分析了 ESCA 组织中突变的基因,其中 TP53 基因突变最为显著。最近研究发现,TP53 基因突变会引起免疫反应,并作为肿瘤免疫治疗的预测因子^[34]。本研究并未发现 NUSAP1 突变,说明 NUSAP1 在 ESCA 组织中通过调节其表达水平来发挥作用。

为了进一步分析 NUSAP1 参与 ESCA 发生发展的分子机制,根据 ESCA 组织中 NUSAP1 的表达分为 NUSAP1 高表达组和低表达组。GSEA 结果发现,NUSAP1 高表达组主要富集于 Wnt/ β -catenin 信号通路、过氧化物酶通路、PI3K/Akt/mTOR 信号通路。最近的研究表明,Wnt/ β -catenin 信号通路的活性增强可促进 ESCA 细胞增殖、转移和侵袭^[35]。谷胱甘肽过氧化物酶丢失会促进 Barrett 向 ESCA 癌变^[36],NUSAP1 通过 PI3K/Akt/mTOR 调节非细胞肺癌生长和转移^[13]。

总之,通过生物信息学发现 NUSAP1 在 ESCA 组织和细胞中表达上调,并促进 ESCA 细胞的增殖活性,提示 NUSAP1 在 ESCA 的发生发展和恶性行为中起至关重要的作用。另外也发现 NUSAP1 可能在免疫细胞浸润中发挥重要作用,并可能作为 ESCA 诊断的生物标志物和治疗靶点。此外,Wnt/ β -catenin 信号通路、过氧化物酶通路、PI3K/Akt/mTOR 可能是 NUSAP1 参与 ESCA 发生发展的有效机制。

参 考 文 献

- [1] He YT, Li DJ, Shan BE, et al. Incidence and mortality of esophagus cancer in China, 2008–2012[J]. *Chung Kuo Yen Cheng Yen Chiu*, 2019, 31(3):426–434.
- [2] Pennathur A, Gibson MK, Jobe PBA, et al. Oesophageal carcinoma[J]. *Lancet*, 2013, 381(9864):400–412.
- [3] Lagergren J, Lagergren P. Recent developments in esophageal adenocarcinoma[J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(4):232–248.
- [4] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893–2917.
- [5] Manning AL, Compton DA. Structural and regulatory roles of non-motor spindle proteins[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(1):101–106.
- [6] Raemaekers T, Ribbeck K, Beaudouin J, et al. NuSAP, a novel microtubule-associated protein involved in mitotic spindle organization[J]. *J Cell Biol*, 2003, 162(6):1017–1029.
- [7] Zhu T, Xie P, Gao YF, et al. Nucleolar and spindle-associated protein 1 is a tumor grade correlated prognosis marker for glioma patients[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018, 24(3):178–186.
- [8] Iyer J, Moghe S, Furukawa M, et al. What's Nu(SAP) in mitosis and cancer?[J]. *Cell Signal*, 2011, 23(6):991–998.
- [9] Xie QQ, Ou-Yang W, Zhang MW, et al. Decreased expression of NUSAP1 predicts poor overall survival in cervical cancer[J]. *J Cancer*, 2020, 11(10):2852–2863.
- [10] Roy S, Hooiveld GJ, Seehawer M, et al. microRNA 193a–5p regulates levels of nucleolar- and spindle-associated protein 1 to suppress hepatocarcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(6):1951–1966. e26.
- [11] Han GD, Wei ZJ, Cui HB, et al. NUSAP1 gene silencing inhibits cell proliferation, migration and invasion through inhibiting DNMT1 gene expression in human colorectal cancer[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 367(2):216–221.
- [12] Gordon CA, Gulzar ZG, Brooks JD. NUSAP1 expression is up-regulated by loss of RB1 in prostate cancer cells[J]. *Prostate*, 2015, 75(5):517–526.
- [13] Xu ZY, Wang Y, Xiong J, et al. NUSAP1 knockdown inhibits cell growth and metastasis of non-small-cell lung cancer through regulating BTG2/PI3K/Akt signaling[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4):3886–3893.
- [14] Alsop BR, Sharma P. Esophageal cancer[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2016, 45(3):399–412.
- [15] Hansel DE, Dhara S, Huang RC, et al. CDC2/CDK1 expression in esophageal adenocarcinoma and precursor lesions serves as a diagnostic and cancer progression marker and potential novel drug target[J]. *Am J Surg Pathol*, 2005, 29(3):390–399.
- [16] Imai T, Oue N, Sentani K, et al. KIF11 is required for spheroid formation by esophageal and colorectal cancer cells[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(1):47–55.
- [17] Chen FF, Zhang SR, Peng H, et al. Integrative genomics analysis of hub genes and their relationship with prognosis and signaling pathways in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4):3649–3660.
- [18] Zhou W, Wu JR, Liu XK, et al. Identification of crucial genes correlated with esophageal cancer by integrated high-throughput data analysis[J]. *Medicine*, 2020, 99(20):e20340.
- [19] Maqani N, Belkhir A, Moskaluk C, et al. Molecular dissection of 17q12 amplicon in upper gastrointestinal adenocarcinomas[J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(7):449–455.
- [20] Wang LX, Zhang JF, Wan LX, et al. Targeting CDC20 as a novel cancer therapeutic strategy[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 151:141–151.
- [21] Zheng RY, Shi ZZ, Li WZ, et al. Identification and prognostic value of DLGAP5 in endometrial cancer[J]. *PeerJ*, 2020, 8:e10433.
- [22] Bi YQ, Chen S, Jiang JZ, et al. CDCA8 expression and its clinical relevance in patients with bladder cancer[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(34):e11899.
- [23] Meng QC, Wang HC, Song ZL, et al. Overexpression of NDC80 is correlated with prognosis of pancreatic cancer and regulates cell proliferation[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(5):1730–1740.
- [24] Zhang X, Pan YL, Fu HQ, et al. Nucleolar and spindle associated protein 1 (NUSAP1) inhibits cell proliferation and enhances susceptibility to epirubicin in invasive breast cancer cells by regulating cyclin D kinase (CDK1) and DLGAP5 expression[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:8553–8564.
- [25] Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(18):4557–4566.
- [26] de Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(3):277–286.
- [27] Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy[J]. *Immunity*, 2014, 41(1):49–61.
- [28] Vassilakopoulou M, Avgeris M, Velcheti V, et al. Evaluation of PD-L1 expression and associated tumor-infiltrating lymphocytes in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(3):704–713.
- [29] Zhang YQ, Velez-Delgado A, Mathew E, et al. Myeloid cells are required for PD-1/PD-L1 checkpoint activation and the establishment of an immunosuppressive environment in pancreatic cancer[J]. *Gut*, 2017, 66(1):124–136.
- [30] Fassan M, Cavallin F, Guzzardo V, et al. PD-L1 expression, CD8⁺ and CD4⁺ lymphocyte rate are predictive of pathological complete response after neoadjuvant chemoradiotherapy for squamous cell cancer of the thoracic esophagus[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(13):6036–6048.
- [31] Wang JB, Jia YB, Wang NN, et al. The clinical significance of tumor-infiltrating neutrophils and neutrophil-to-CD8⁺ lymphocyte ratio in patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Transl Med*, 2014, 12:7.
- [32] Milano F, Krishnadath KK. Novel therapeutic strategies for treating esophageal adenocarcinoma; the potential of dendritic cell immunotherapy and combinatorial regimens[J]. *Hum Immunol*, 2008, 69(10):614–624.
- [33] Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, et al. *STK11/LKB1* mutations and PD-1 inhibitor resistance in *KRAS*-mutant lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(7):822–835.
- [34] Dong ZY, Zhong WZ, Zhang XC, et al. Potential predictive value of *TP53* and *KRAS* mutation status for response to PD-1 blockade immunotherapy in lung adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(12):3012–3024.
- [35] Zhang LN, Zhao L, Yan XL, et al. Loss of G3BP1 suppresses proliferation, migration, and invasion of esophageal cancer cells via Wnt/ β -catenin and PI3K/Akt signaling pathways[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11):20469–20484.
- [36] Peng DF, Hu TL, Soutto M, et al. Loss of glutathione peroxidase 7 promotes TNF- α -induced NF- κ B activation in Barrett's carcinogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(7):1620–1628.

(责任编辑:冉明会)