

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.10.009

· 基础研究 ·

小细胞肺癌组织显著低表达的 *SPIDR* 通过降低血清依赖促进 NCI-H446 细胞增殖

张泽忠¹, 贾玉琳¹, 其力格尔¹, 方一¹, 李春晖¹, 厉建蕾¹, 顾晔^{2a}, 邓子新¹, 张海平^{2b}, 马伟¹ (1. 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240; 2. 同济大学附属肺科医院 a. 内镜科; b. 肿瘤科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 探讨同源重组修复途径关键调控蛋白 *SPIDR* 在小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 中的作用与机制。 **方法:** 收集 2013 年 1 月至 2015 年 1 月上海肺科医院进行肿瘤手术切除、气管镜穿刺的 SCLC 患者癌组织标本 60 例及正常人群肺组织标本 44 例, qRT-PCR 检测临床组织样本 *SPIDR* mRNA 表达水平; 经稳定过表达 *SPIDR* 改变 NCI-H446 细胞表达水平后, 采用 MTT、小鼠荷瘤实验等实验方法, 在体内、体外探究 *SPIDR* 表达水平对 SCLC 细胞增殖等影响。 **结果:** 吸烟与患者 SCLC 的发生显著有关 ($P < 0.01$); *SPIDR* mRNA 在 SCLC 组织样本中的表达显著低于正常肺组织 ($P < 0.01$)。人肺胚成纤维细胞株 MRC-5 中 *SPIDR* mRNA 和蛋白表达水平明显高于 SCLC 细胞株 NCI-H446 (均 $P < 0.05$)。在 10% 胎牛血清常规培养体系中, 过表达 *SPIDR* 对 NCI-H446 细胞增值和化疗药物敏感性无明显影响 (均 $P > 0.05$), 但小鼠荷瘤实验从第 9 天开始, 过表达 *SPIDR* 组 (pMSCV-*SPIDR*) 的瘤体积与原始 NCI-H446 组和空载体组 (pMSCV) 开始出现明显差异, 第 27 天 pMSCV-*SPIDR* 组移植瘤平均体积分别比原始 NCI-H446 组与空载体组缩小 58.99% 和 61.84% (均 $P < 0.01$)。在含 1%~3% 胎牛血清的非常规培养体系中, 过表达 *SPIDR* 的 NCI-H446 细胞增殖速度显著低于原始 NCI-H446 组和空载体组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论:** SCLC 组织中 *SPIDR* 表达水平明显低于正常肺组织, 过表达 *SPIDR* 的 NCI-H446 细胞体内及体外低血清含量培养 (<3%) 生长速度显著低于对照组, 表明 *SPIDR* 以低血清浓度依赖方式影响 SCLC 细胞增殖。

[关键词] 小细胞肺癌; NCI-H446 细胞; 同源重组修复; *SPIDR*; 血清依赖

[中图分类号] R392.11; R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)10-0940-08

SPIDR significantly suppressed in tissues of small cell lung cancer promotes NCI-H446 cells proliferation by reducing serum dependence

ZHANG Zezhong¹, JIA Yulin¹, QILGER Bao¹, FANG Yi¹, LI Chunhui¹, LI Jianlei¹, GU Ye^{2a}, DENG Zixin¹, ZHANG Haiping^{2b}, MA Wei¹ (1. The National Key Laboratory of Microbial Metabolism, Institute of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240; 2a. Department of Endoscopy; 2b. Department of Oncology, Pulmonary Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200433)

[Abstract] **Objective:** The present study was aimed to explore the role and distinctive mechanism of *SPIDR*, the key regulatory protein of homologous recombination pathway, in progression of small cell lung cancer (SCLC). **Methods:** 60 SCLC specimens and 44 normal lung tissues were collected from the patients undergoing tumor resection and bronchoscopic puncture in Shanghai Pulmonary Hospital Affiliated to Tongji University from January 2013 to January 2015. The expression of *SPIDR* in clinical samples and NCI-H446 (SCLC cell line) and MRC-5 (normal cell line) were assayed by Real-time PCR. The role of *SPIDR* in SCLC was investigated *in vivo* and *in vitro* by the expression of *SPIDR* were artificially modified in NCI-H446. **Results:** Smoking was significantly associated with the occurrence of SCLC ($P < 0.01$). The expression of *SPIDR* mRNA in SCLC tissues was lower than that of normal lung tissues ($P < 0.01$), and the *SPIDR* transcriptional and translational levels of NCI-H446 cells were also lower than that of MRC-5. Although there is no significant changes of cell growth rate and susceptibility to cisplatin and etoposide in the NCI-H446 cells overexpressing *SPIDR*.

[基金项目] 国家自然科学基金委中日韩国际合作资助项目 (No.21661140002)。Project supported by the National Natural Science Foundation of International Cooperation of China, Japan and Korea (No.21661140002)

[作者简介] 张泽忠 (1995-), 男, 硕士生, 主要从事肺癌新驱动基因发现与功能的研究, E-mail: zhangzezhong1031@163.com

[通信作者] 马伟 (MA Wei, corresponding author), 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤等重大疾病新治疗靶标发掘与机制研究, E-mail: wma@sjtu.edu.cn; 张海平 (ZHANG Haiping, co-corresponding author), 博士, 副主任医师, 主要从事肺癌临床与基础研究, E-mail: zhp7341@sina.com.cn

However, the volume of xenograft tumors of overexpressed *SPIDR* group decreased by 58.99% ($P < 0.01$) and 61.84% ($P < 0.01$) than that of the original NCI-H446 cells and the NCI-H446 cells transfected with vector (pMSCV) and the average tumor mass decreased by 61.70% ($P < 0.01$) and 70.25% ($P < 0.01$) respectively. When the fetal bovine serum content in the medium was reduced to 3%, the growth rate of NCI-H446 cells overexpressing *SPIDR* was 22.33% ($P < 0.01$) and 20.24% ($P < 0.05$) lower than that of the original NCI-H446 cells and control group, the similar results were obtained from the 1% serum concentration experiment as well. **Conclusion:** The expression of *SPIDR*, the key regulatory protein in the DNA double strand break homologous recombination repair pathway, was significantly suppressed in SCLC tissues, which markedly accelerated the growth of NCI-H446 cells *in vivo* and reduced the reliance of NCI-H446 cells to the serum. The detailed mechanism is worthy of further investigation.

[Key words] small cell lung cancer (SCLC); NCI-H446 cell; homologous recombination repair; *SPIDR*; serum susceptibility

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(10): 1026-1033. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.10.009]

小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 占肺癌总病例数的 10%~15%, 但进展迅速、转移早、复发快, 患者 5 年生存率仅为 6%, 是目前临床恶性肿瘤治疗难题^[1-3]。为破解 SCLC 新药研发一直未取得突破进展的现状, SCLC 发生发展独特分子机制亟待深入。近年来, 相关药物均未在 SCLC 治疗中取得令人满意的疗效, SCLC 发生、发展的独特分子机制有待进一步研究。有研究^[4-8]发现, DNA 损伤修复途径在多数肿瘤细胞中表现异常, 该途径不仅能赋予细胞更强的 DNA 损伤修复能力, 也对放化疗治疗产生耐受性, 最终导致肿瘤复发而导致治疗失败; 同时, DNA 损伤修复途径异常导致肿瘤细胞的基因组不稳定, 为肿瘤发展提供了关键动力。因此, DNA 修复途径是目前肿瘤生物学与肿瘤靶点研究的热点。DNA 双链断裂 (double-strand breaks, DSBs) 是 DNA 最严重、对细胞存活威胁最大的损伤, 同源重组修复途径 (homologous recombination, HR) 是真核生物修复 DNA 双链断裂最准确、最主要途径^[9]。研究^[10-11]发现, 乳腺癌、胰腺癌和前列腺癌等多种肿瘤的同源重组修复途径异常, 且与放化疗抗性、较差的预后等相关。FIGNL1 作为 DNA 双链断裂同源重组修复途径核心功能蛋白和 RAD51 的关键调控蛋白^[12-13]。本课题组前期的研究^[14]发现, FIGNL 在 SCLC 患者中显著异常, 且该基因表达水平决定肿瘤细胞对顺铂等一线化疗药物敏感性。YUAN 等^[15]研究认为, *SPIDR* 通过 FIGNL1 在同源重组中发挥作用; 而 WAN 等^[16]的研究结果则显示, *SPIDR* 通过与解旋酶的相互作用, 促进布鲁姆综合征蛋白 (bloom syndrome protein, BLM) 招募到 DNA 双链断裂位点, 促进同源重组修复的启动。本课题通过检测 *SPIDR* 在 SCLC 组织样本的表达以及体内外实验, 探讨 *SPIDR* 及其所在的同源重组修复途径在 SCLC 发生发展中的作用, 为 SCLC 患者的治疗提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 临床资料和标本的收集

收集上海肺科医院 2013 年 1 月至 2015 年 1 月进行肿瘤手术切除或气管镜穿刺的 60 例 SCLC 患者的癌组织样本和 44 例正常人群肺组织。样本采集后立即保存于 RNASTore 样本保存液, 4 °C 保存, 提取 RNA。吸烟指数定义见参考文献^[17]。患者临床资料见表 1。本研究经同济大学医学研究伦理委员会审核批准 (批准号: A2016094), 参与研究的患者均签署了知情同意书。

表 1 两组人群临床资料比较 (n)
Tab.1 Comparison of clinical data between the 2 groups of people (n)

Variable	Normal group (N=44)	SCLC group (N=60)	P
Gender			0.4676
Male	35	51	
Female	9	9	
Ages (t/a)			0.0617
≤60	25	23	
>60	19	37	
TNM stage			
I-IIa	-	1	
IIb-IIIa	-	15	
IIIb-IV	-	44	
History of smoking			<0.001
Smoker	12	40	
Non-smoker	32	20	

1.2 细胞株、动物和主要试剂

人小细胞肺癌细胞株 NCI-H446 由中科院细胞库提供, 人胚肺成纤维细胞株 MRC-5 (正常细胞)、Plat-A 细胞 (转染用细胞株) 为本实验室保存。4~5 周龄、雌性 BALB/c (nu/nu) 裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 体质量 16~18 g, 实验期间饲养于上海交通大学实验动物中心 SPF 屏障系统中, 动物实验经上海交通大学实验动物伦理委员会批准 (伦理批

准号: IACVCA2016094)。样本保存液RNAStore、总RNA提取、FastQuant cDNA第一链合成试剂盒及无内毒素质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技公司,胎牛血清购自美国Gibco公司,qRT-PCR相关试剂盒购自美国Biomake公司,H1640、MEM培养基购自美国Hyclone;PVDF膜(0.45 μm)购自美国Millipore公司,RIPA裂解液、GADPH抗体、ECL超敏发光试剂盒购自上海威奥公司,SPIDR抗体购自英国Abcam公司,细胞转染采用Hieff Trans™脂质体转染试剂盒购自上海翊圣公司,Matrigel购自美国康宁公司,其他生化试剂购自Sigma-Aldrich公司。

1.3 细胞培养

NCI-H446细胞采用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基于37℃、5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养。细胞传代、冻存等操作按常规方法进行。

1.4 qRT-PCR检测组织样本和细胞株SPIDR mRNA表达水平

采用总RNA提取试剂盒提取SCLC临床样本总RNA,具体操作按试剂盒说明书进行。逆转录采用FastQuant cDNA第一链合成试剂盒逆转录进行,总RNA使用量为1 μg。采用2×SYBR Green qPCR Master Mix配制20 μl的反应体系进行实验,操作按说明书进行。SPIDR等qRT-PCR引物通过Primer 3网站设计、由捷瑞公司合成,引物具体序列见表2。qRT-PCR程序为预变性:95℃、3 min;循环:变性95℃、30 s,退火60℃、20 s,延伸72℃、20 s,共40个循环;最后进行融链曲线分析。内参基因为GADPH,基因表达相对定量采用2^{-ΔΔCt}方法计算。实验重复3次。

表2 qRT-PCR引物序列

Tab. 2 Sequences of qRT-PCR primers

Gene		Primer sequence
SPIDR	F	5'-CAGCCTGGACTCTGCAACAC-3'
	R	5'-CCAATCTCCCGTTGCCACAC-3'
GADPH	F	5'-TCCTGCACCACCAACTGCTT-3'
	R	5'-GGGGCCATCCACAGTCTTCT-3'

1.5 Western blotting检测组织样本和细胞株SPIDR蛋白表达水平

收集培养细胞,采用RIPA裂解液提取蛋白,经BCA法蛋白定量后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。PVDF膜用甲醇浸泡15 s, ddH₂O漂洗2 min后加入转膜缓冲液,在冰水条件下200 mAV恒流转膜90 min,5%BSA室温封闭约2 h后,4℃加入SPIDR一抗

(1:1 000)和GADPH抗体(1:1 000),孵育过夜,TBST洗膜3次,每次5 min HRP标记抗兔/抗小鼠二抗(1:2 000),室温孵育2 h,TBST洗膜3次,每次10 min,暗房显色曝光。使用Gelpro32软件进行定量分析。实验重复3次。

1.6 构建SPIDR过表达载体

根据SPIDR(NCBI基因ID:23514)序列委托优宝生物公司合成全长基因(两端加Bam HI、Eco RI酶切位点)后,将SPIDR片段插入pMSCV-puro载体,经测序验证序列准确后,进行后续实验。用不含内毒素质粒提取试剂盒抽提质粒,测量浓度后用于后续转染实验。

1.7 逆转录病毒感染细胞后建立稳定表达细胞株

采用Platinum-A逆转录病毒包装细胞系进行NCI-H446细胞转染,具体操作按实验说明书进行。采用Hieff Trans™脂质体核酸转染试剂分别转染Platinum-A细胞pMSCV空质粒和pMSCV-SPIDR质粒各2.5 μg,具体操作按实验说明书进行。嘌呤霉素初始筛选浓度为1.0 μg/ml,1周后降为0.5 μg/ml正常培养。经qRT-PCR和Western blotting实验验证确认SPIDR过表达水平的细胞系用于后续实验。

1.8 MTT法检测NCI-H446细胞增殖活性

细胞起始密度为2×10³个/孔,分别按实验设计进行药物等处理后,分成3组:原始NCI-H446组、空载体pMSCV组及pMSCV-SPIDR组,按照设定时间、血清质量分数(1%、3%和5%)及药物浓度继续培养,采用MTT法检测NCI-H446细胞活性。药物敏感实验根据实验结果计算IC₅₀。实验重复3次。

1.9 小鼠荷瘤实验检测NCI-H446细胞体内增殖能力

小鼠分3组,每组5只。各种NCI-H446细胞分别用含50% Matrigel的PBS缓冲液悬浮,皮下注射2×10⁶个细胞/鼠。接种1周后开始测量瘤体积,每3 d测量1次,采用V=0.5×ab²公式计算瘤体积(a和b分别为瘤的长和宽)。27 d后处死实验小鼠,取瘤体并称质量。

1.10 统计学处理

采用SPSS 25.0和GraphPad Prism 5.0统计学分析软件进行相应的统计分析和作图,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验;多组间比较采用单因素方差分析,以P<0.05或P<0.01表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吸烟与患者SCLC的发生有关

纳入本研究60例SCLC患者与44例正常人群,正常人群中有吸烟史的为27.3%,而SCLC患者中吸

烟比例高达 66.7% ($P < 0.01$); SCLC 晚期患者 (IIIb-IV) 比 SCLC 早期患者 (I-IIIa) 的吸烟率高 31.25% ($P < 0.05$), 表明吸烟与 SCLC 的发生存在显著相关性。见表 3。

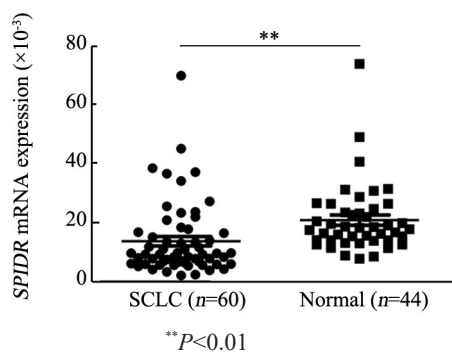
表 3 吸烟史与 SCLC 的相关性分析 (n)Tab. 3 Correlation analysis between smoking history and development of SCLC (n)

Variable	Smoker	Non-smoker	P
Condition			<0.001
Normal	12	32	
SCLC	40	20	
TNM stage			0.0232*
I-IIa	0	1	
IIb-IIIa	7	8	
IIIb-IV	33	11	

*I-IIIa vs IIIb-IV

2.2 SCLC 组织样本中 *SPIDR* mRNA 的表达显著低于正常人肺组织

qPCR 检测结果 (图 1) 显示, SCLC 组织的 *SPIDR* mRNA 相对表达量明显低于正常肺组织 (13.76 ± 12.11 vs 20.90 ± 11.47 , $P < 0.01$)。

图 1 *SPIDR* mRNA 在 SCLC 组织样本中的表达Fig. 1 Expression of *SPIDR* mRNA in SCLC tissue samples

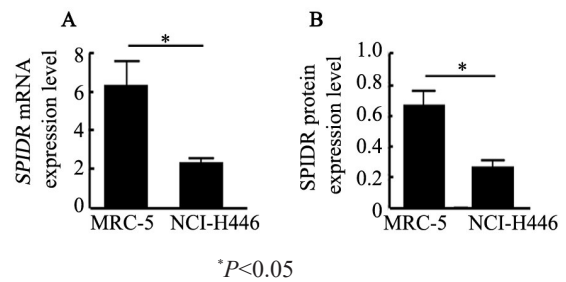
2.3 人胚肺成纤维细胞株 MRC-5 中 *SPIDR* mRNA 和蛋白表达水平明显高于 SCLC NCI-H446 细胞

qRT-PCR 检测结果 (图 2A) 显示, 细胞 MRC-5 中 *SPIDR* mRNA 表达水平明显高于细胞 NCI-H446 (6.30 ± 1.83 vs 2.28 ± 0.37 , $P < 0.05$)。Western blotting 检测结果 (图 2B) 显示, MRC-5 细胞 *SPIDR* 蛋白相对表达量明显高于 NCI-H446 细胞 (0.66 ± 0.14 vs 0.26 ± 0.07 , $P < 0.05$)。

2.4 转染 pMSCV-*SPIDR* 后 NCI-H446 细胞 *SPIDR* mRNA 和蛋白表达水平明显提高

转染过表达 *SPIDR* 载体 (pMSCV-*SPIDR*)、空载体 (pMSCV) 及原始 NCI-H446 细胞后, qRT-PCR 检测结果

(图 3A) 显示, pMSCV-*SPIDR* 组细胞中 *SPIDR* mRNA 表达水平明显高于原始 NCI-H446 组和 pMSCV 组 (4.17 ± 0.15 vs 2.29 ± 0.38 , 2.33 ± 0.34 , $P < 0.01$)。Western blotting 检测结果 (图 3B) 显示, pMSCV-*SPIDR* 组细胞中 *SPIDR* 蛋白表达水平高于原始 NCI-H446 组和 pMSCV 组 (0.59 ± 0.23 vs 0.26 ± 0.07 , 0.39 ± 0.16 , $P < 0.01$)。

图 2 MRC-5 和 NCI-H446 细胞中 *SPIDR* mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达水平比较Fig. 2 Comparison of *SPIDR* mRNA (A) and protein (B) expression levels between MRC-5 and NCI-H446 cell lines

2.5 过表达 *SPIDR* 对 NCI-H446 细胞增殖和化疗药物敏感性无明显影响

采用顺铂、依托泊苷等 DNA 损伤药物分别处理原始 NCI-H446、NCI-H446 pMSCV 及 NCI-H446 pMSCV-*SPIDR* 组细胞 48 h, MTT 法检测结果 (图 4, 表 4) 显示, NCI-H446 pMSCV-*SPIDR* 组与 H446 pMSCV 组、原始 NCI-H446 细胞组的顺铂和依托泊苷 IC_{50} 值无显著差异 ($P > 0.05$), 表明过表达 *SPIDR* 未显著改变 NCI-H446 细胞对顺铂、依托泊苷等 DNA 损伤药物的敏感性。

2.6 常规培养条件下过表达 *SPIDR* 对 NCI-H446 细胞体外增殖能力无明显影响

原始 NCI-H446、NCI-H446 pMSCV 及 NCI-H446 pMSCV-*SPIDR* 组细胞系在含 10% 胎牛血清的常规 RPMI 培养液中培养, MTS 法检测结果 (图 5) 显示, 提高 NCI-H446 细胞中的 *SPIDR* 表达水平并未显著改变体外培养 H446 细胞增殖能力 ($P > 0.05$)。

2.7 过表达 *SPIDR* 显著减慢 NCI-H446 细胞体内增殖能力

移植瘤实验检测结果显示, 第 9 天 NCI-H446 pMSCV-*SPIDR* 组的瘤体积与原始 H446 组和 NCI-H446 pMSCV 组开始出现明显差异 ($P < 0.05$; 图 6A); 第 27 天 NCI-H446 pMSCV-*SPIDR* 组移植瘤平均体积分别比原始 NCI-H446 组与空载体组缩小 58.99% 和 61.84% (均 $P < 0.01$; 图 6A)。第 27 天, 过表达 *SPIDR* 的 H446 pMSCV-*SPIDR* 组瘤体质量明显低于 H446 组和 H446 pMSCV 组 [(144.0 ± 49.2) vs (376.0 ± 62.5)],

(484.0±97.5)mg, $P < 0.01$; 图 6B]。

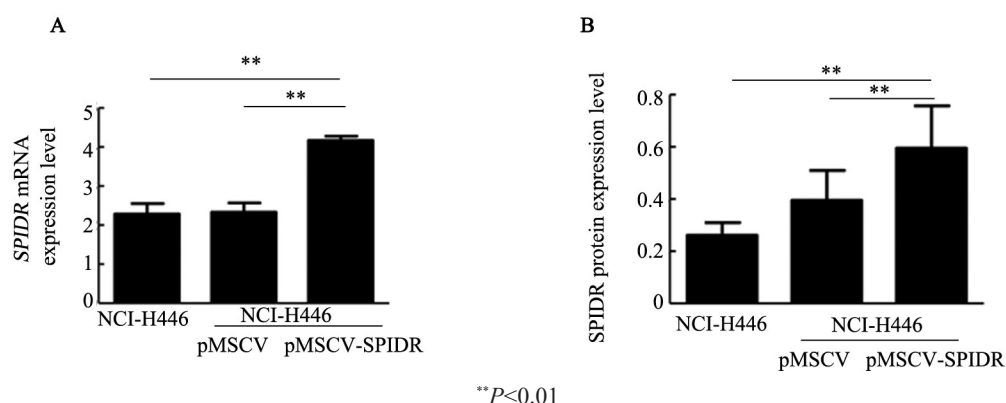
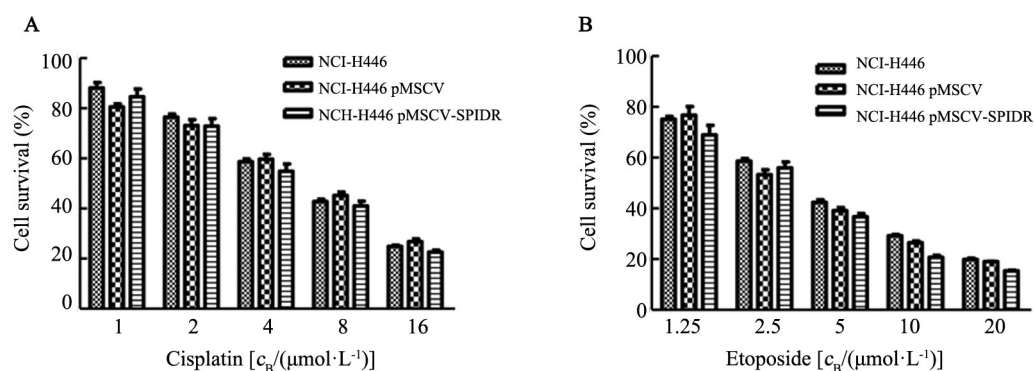


图3 转染pMSCV-SPIDR后 NCI-H446 细胞系中 *SPIDR* mRNA(A)和蛋白(B)的表达水平

Fig.3 Expression level of *SPIDR* mRNA(A) and protein (B) in NCI-H446 cell line after transfection of pMSCV-SPIDR



A: Cisplatin treatment of different NCI-H446 cell lines; B: Etoposide treatment of different NCI-H446 cell lines

图4 过表达 *SPIDR* 对 NCI-H446 细胞株药物敏感性的影响

Fig.4 Effect of over-expression of *SPIDR* on drug sensitivity in NCI-H446 cell lines

表4 原始 NCI-H446 和过表达 *SPIDR* 的 NCI-H446 细胞顺铂和依托泊苷的 IC₅₀ 值 [c_B/(μmol·L⁻¹)]

Tab. 4 IC₅₀ of cisplatin and etoposide for NCI-H446 cell line and *SPIDR* over-expressing NCI-H446 cell line [c_B/(μmol·L⁻¹)]

Cell line	IC ₅₀	
	Cisplatin	Etoposide
NCI-H446	5.86±0.57	3.86±0.36
NCI-H446 pMSCV	7.41±0.68	3.40±0.31
NCI-H446 pMSCV-SPIDR	5.16±0.55	2.94±0.30

2.8 在低血清培养液中过表达 *SPIDR* 以血清浓度依赖方式影响 NCI-H446 细胞增殖

MTS 法检测结果显示, 当培养液中胎牛血清含量在 5% 以上时, 各组细胞增殖未见显著差异 ($P > 0.05$, 图 7A); 胎牛血清含量在 3% 时, NCI-H446 pMSCV-SPIDR 组相对 NCI-H446 pMSCV 组和 NCI-H446 组在第 5 天数量分别降低了 20.24%

和 22.33% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 7B); 胎牛血清在 1% 时, NCI-H446 pMSCV-SPIDR 组较其他两组第 5 天细胞量分别降低了 20.39% 和 27.53% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 7C)。

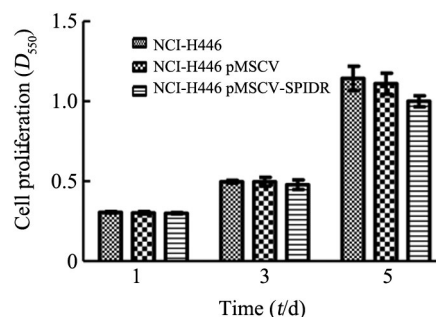
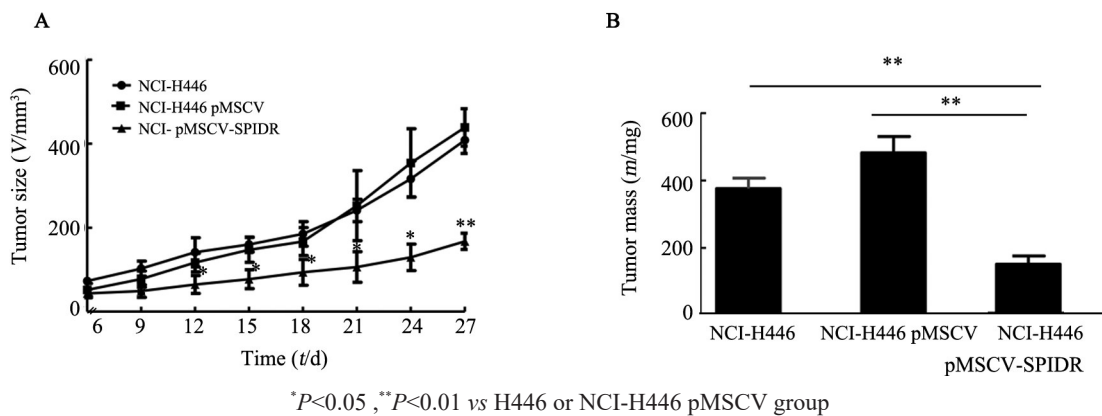


图5 在常规培养液中 *SPIDR* 水平对 NCI-H446 细胞体外增殖能力的影响

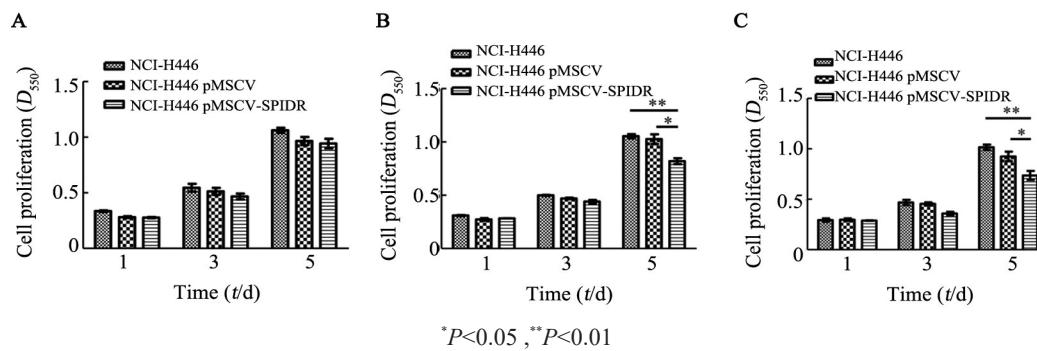
Fig.5 Effect of *SPIDR* expression level on NCI-H446 cells proliferation in the normal culture system



A: Tumor growth curve of volume; B: The average tumor mass of each group by the end of experiment

图6 *SPIDR* 表达水平对 NCI-H446 细胞体内增殖能力的影响

Fig.6 Effect of *SPIDR* expression level on NCI-H446 cell proliferation *in vivo*



A: 5% FBS; B: 3% FBS; C: 1% FBS

图7 在低血清培养体系中过表达 *SPIDR* 以血清浓度依赖方式影响 NCI-H446 细胞增殖

Fig.7 Over-expression of *SPIDR* affects NCI-H446 cell proliferation in a serum concentration-dependent manner in the lower serum culture system

3 讨论

SCLC 是一种低分化癌, 约占肺癌的 20%, 其恶性程度较高、预后较差, 常在重度吸烟者中高发^[1]。SCLC 起源于较大支气管的肺嗜银 (Kulchitsky) 细胞, 属于神经内分泌肿瘤, 常伴有内分泌异常或类癌综合征, 较其他类型肺癌诊断前驱症状期短, 确诊后如不积极治疗患者中位生存期不足 3 个月, 其 5 年生存率小于 5%^[2-3]。近年来, 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (epidermal growth factor receptor-tyrosine kinases inhibitors, EGFR-TKIs) 等靶向药物显著改善了 NSCLC 的治疗效果^[4-5]。但是, 相关药物均未在 SCLC 治疗中取得令人满意的疗效, SCLC 发生、发展的独特分子机制亟待揭示。DNA 损伤修复途径细胞修复外源和内生性 DNA 损伤、保护自身基因组完整和细胞生存的关键^[6]。研究^[7]发现, DNA 损伤修复途径异常能赋予肿瘤细胞较强的 DNA 损伤修复能力, 对放化疗容易产生耐受性, 最终导致肿瘤复发及治疗失败。同时 DNA 损伤修复途径异常导致肿瘤细胞

的基因不稳定, 为肿瘤的发展提供了关键动力。因此, DNA 修复途径是目前肿瘤生物学与肿瘤靶点研究的热点。DSBs 是 DNA 最严重、对细胞存活威胁最大的损伤, HR 是真核生物修复 DNA 的主要途径。鉴于 DNA 双链断裂损伤修复途径在肿瘤发生、发展中的关键作用^[18-21], 开展该途径中的重要调控基因—*SPIDR*^[22]的研究有重要意义。

分析纳入本研究的 60 位 SCLC 患者癌组织与 44 位正常人肺组织临床信息发现, 参与本研究的 SCLC 患者的吸烟率比健康志愿者高 39.4%, SCLC 晚期患者 (IIIb-IV) 比 SCLC 早期患者 (I-IIIa) 的吸烟率高 31.25%, 该结果均指明吸烟是 SCLC 重要风险因素之一, 与大量临床报道相一致^[23-24]。对比 SCLC 的样本与正常肺组织中 *SPIDR* 表达量, SCLC 中 *SPIDR* 表达比正常肺组织要低 34.13%, SCLC 细胞株 NCI-H446 细胞中 *SPIDR* 的转录、蛋白水平分别比正常细胞株 MRC-5 显著低 63.75% 和 60.75%。

有研究^[21]报道, *SPIDR* 通过与 FIGL1 互作参与 DNA 同源重组修复, *SPIDR* 对于提高 FIGL1 活性必

不可少。本课题组前期研究^[14]发现, SCLC 组织样本及 NCI-H446 细胞株均过表达 *FIGNL1*, 抑制 *FIGNL1* 表达显著提高 NCI-H446 细胞对顺铂、依托泊苷的敏感性。在人肾上皮细胞系 293T 细胞^[21]和人骨肉瘤细胞 U2OS 细胞^[22]中, 一旦敲除 *SPIDR*, 细胞同源重组修复活性显著降低。本研究发现, 过表达 *SPIDR* 却未改变 NCI-H446 细胞的增殖速度以及对顺铂、依托泊苷等 DNA 损伤剂的敏感性。

SPIDR 与 *FIGNL1* 是两个存在相互作用的蛋白, 在 SCLC 均发生异常表达, 但改变两个基因表达水平, 结果完全不同。推测可能是由于 *SPIDR* 是作为 *FIGNL1* 的调控蛋白在 DNA 双链断裂中重组修复途径中发挥作用, 因此, 过表达 *SPIDR* 在细胞中的量超过确保细胞双链断裂途径功能最低要求, 从而对细胞 DNA 损伤修复活性无影响。但是, 在 SCLC 中, *SPIDR* 和 *FIGNL1* 为紧密相互作用的蛋白, 一个被显著上调, 一个被显著下调, 表示 2 个蛋白的比例对于双链断裂修复途径以及 SCLC 中具有某种重要作用或意义。在裸鼠移植瘤实验中, 发现过表达 *SPIDR* 的 H446 细胞系在裸鼠体内的生长体积相较于 H446 及转染空载体的细胞系, 分别下降了 58.99% 和 61.84%, 说明 *SPIDR* 的过表达能显著抑制 SCLC 细胞在体内的细胞分裂、生长速度, 但该结果与体外实验结果是矛盾的。进一步的血清敏感实验揭示当血清浓度降至 3% 时, 过表达 *SPIDR* 组细胞培养 5 d 后, 细胞数量分别要比对 H446 及空载体组少 20.24% 和 22.33%, 即 *SPIDR* 表达水平可显著影响 H446 细胞对血清的依赖程度。

有研究^[25-26]显示, 肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 是肿瘤中具有自我更新、分化能力的细胞亚群, 因此, CSC 细胞在放化疗抗性、肿瘤复发、转移过程中起关键作用。在肺癌、神经胶质瘤、骨癌等多种人类肿瘤细胞系中, 利用 CSC 对血清依赖远低于普通肿瘤细胞的特征, 通过血清饥饿富集 CSC 已成为广泛采用的方法^[27-31]。因此, 本研究推测 *SPIDR* 及其所在的 DNA 重组修复途径与细胞的干性途径之间存在相互作用或干扰。*SPIDR* 与 *FIGNL1*、解旋酶 BLM 等多种蛋白存在相互作用^[22], 不仅支持本研究的推测, 更进一步表明 *SPIDR* 是处于较为上游的重要调控蛋白。

分析过表达 *SPIDR* 的 NCI-H446 细胞体内与体外实验结果不相一致的原因是在体内实验时, 随着移植瘤体积增长, 细胞因子等营养供应会逐步恶化, 过表达 *SPIDR* 组 NCI-H446 细胞对细胞因子等依赖程度更高, 导致肿瘤生长速度减慢; 而体外实验时, 高血清浓度培养时 (>5%), 由于细胞因子供应充足,

导致过表达 *SPIDR* 组 NCI-H446 细胞对细胞因子等依赖程度更高的特性无法表现。本研究发现 *SPIDR* 的表达在 SCLC 患者和 SCLC 细胞系中被显著下调, 明确了 *SPIDR* 通过改变 SCLC 细胞的血清依赖性, 显著影响 NCI-H446 细胞体内生长速度。相关实验结果暗示 SCLC 细胞 DNA 重组修复与细胞干性途径存在某种相互作用。

综上, 鉴于 *SPIDR* 在 SCLC 中复杂而重要的作用, 值得深入开展对该基因及其所在的重组修复途径的研究, 以明确 SCLC 独特的发生、发展机制, 发现关键新驱动基因与治疗靶标, 为新治疗方案与新药研发提供关键信息。

[参考文献]

- [1] MILLER K D, SIEGEL R L, LIN C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4): 271-289. DOI:10.3322/caac.21349.
- [2] PIETANZA M C, BYERS L A, MINNA J D, et al. Small cell lung cancer: will recent progress lead to improved outcomes[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(10): 2244-2255. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2958.
- [3] KOINIS F, KOTSAKIS A, GEORGOULIAS V. Small cell lung cancer (SCLC): no treatment advances in recent years[J]. Transl Lung Cancer Res, 2016, 5(1): 39-50. DOI: 10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.03.
- [4] MADHUSUDAN S, MIDDLETON M R. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2005, 31(8): 603-617. DOI: 10.1016/j.ctrv.2005.09.006.
- [5] GOLDSTEIN M, KASTAN M B. The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy[J]. Annu Rev Med, 2015, 66(2): 129-143. DOI: 10.1146/annurev-med-081313-121208.
- [6] JEGGO P A, LÖBRICH M. How cancer cells hijack DNA double-strand break repair pathways to gain genomic instability[J]. Biochem J, 2015, 471(1): 1-11. DOI:10.1042/BJ20150582.
- [7] FOY V, SCHENK M W, BAKER K, et al. Targeting DNA damage in SCLC[J]. Lung Cancer, 2017, 114(1): 12-22. DOI: 10.1016/j.lungcan.2017.10.006.
- [8] PILLAI R N, OWONIKOKO T K. Small cell lung cancer: therapies and targets[J]. Semin Oncol, 2014, 41(1): 133-142. DOI:10.1053/j.seminoncol.2013.12.015.
- [9] LIU T, HUANG J. Quality control of homologous recombination[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(19): 3779-3797. DOI:10.1007/s00018-014-1649-5.
- [10] KUTKOWSKA J, POREBSKA I, RAPAK A. Non-small cell lung cancer-mutations, targeted and combination therapy[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2017, 71(5): 431-445. DOI:10.5604/01.3001.0010.3826.
- [11] TEICHER B A. Targets in small cell lung cancer[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 87(2): 211-219. DOI:10.1016/j.bcp.2013.09.014.
- [12] SRIVASTAVA M, RAGHAVAN S C. DNA double-strand break repair inhibitors as cancer therapeutics[J]. Chem Biol, 2015, 22(1):

- 17-29. DOI:10.1016/j.chembiol.2014.11.013.
- [13] GACHECHILADZE M, ŠKARDA J, SOLTERMANN A, et al. RAD51 as a potential surrogate marker for DNA repair capacity in solid malignancies[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(7): 1286-1294. DOI: 10.1002/ijc.30764.
- [14] MA W, LI J, YAO X, et al. FIGNL1 is overexpressed in small cell lung cancer patients and enhances NCI-H446 cell resistance to cisplatin and etoposide[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(4): 1935-1942. DOI: 10.3892/or.2017.5483.
- [15] YUAN J, CHEN J. FIGNL1-containing protein complex is required for efficient homologous recombination repair[J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2013, 110(26): 10640-10645. DOI:10.1073/pnas.1220662110.
- [16] WAN L, HAN J, LIU T, et al. Scaffolding protein SPIDR / KIAA0146 connects the Bloom syndrome helicase with homologous recombination repair[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(26): 10646-10651. DOI:10.1073/pnas.1220921110.
- [17] 中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会. 算算你的吸烟指数有没有被列入风险人群[D]. 2015-04-12. http://www.jieyanri.com/xiyan/xiyan_12259.html.
- [18] NESIC K, WAKEFIELD M, KONDRASHOVA O, et al. Targeting DNA repair: the genome as a potential biomarker[J]. *J Pathol*, 2018, 244(5): 586-597. DOI:10.1002/path.5025.
- [19] KLEIN H L. The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2008, 7(5): 686-693. DOI: 10.1016/j.dnarep.2007.12.008.
- [20] WOOD R D, DOUBLIÉ S. DNA polymerase θ (POLQ), double-strand break repair, and cancer[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2016, 44(1): 22-32. DOI:10.1016/j.dnarep.2016.05.003.
- [21] BIRNBAUM D J, BERTUCCI F, FINETTI P, et al. Molecular classification as prognostic factor and guide for treatment decision of pancreatic cancer[J]. *BBA Rev Cancer*, 2018, 1869(2): 248-255. DOI: 10.1016/j.bbcan.2018.02.001.
- [22] KENDZIA B, GUSTAVSSON P, POHLABELN H, et al. Cigarette smoking and lung cancer-Risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of European case-control studies[J]. *Das Gesundheitswesen*, 2010, 72(8): 455-459. DOI:10.1055/s-0030-1266688.
- [23] 蔡华荣, 王志强, 江跃全. 长链非编码RNA UCA1 靶向调控 miR-185-5p 对非小细胞肺癌 A549 细胞的作用及其机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(6): 555-561. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.06.002.
- [24] LEMJABBAR-ALAOUI H, HASSAN O U, YANG Y W, et al. Lung cancer: biology and treatment options[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1856(2): 189-210. DOI:10.1016/j.bbcan.2015.08.002.
- [25] MOGHBELI M, MOGHBELI F, FORGHANIFARD M M, et al. Cancer stem cell detection and isolation[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(9): 69. DOI:10.1007/s12032-014-0069-6.
- [26] BATLLE E, CLEVERS H. Cancer stem cells revisited[J]. *Nat Med*, 2017, 23(10): 1124-1134. DOI:10.1038/nm.4409.
- [27] FANG C Y, WU C C, FANG C L, et al. Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178960[2018-04-19]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/article/PMC5462426/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0178960.
- [28] KLOTZSCHE-VON AMELN A, MUSCHTER A, MAMLOUK S, et al. Inhibition of HIF prolyl hydroxylase-2 blocks tumor growth in mice through the antiproliferative activity of TGF β [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(9): 3306-3316. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-3838.
- [29] REYA T, MORRISON S J, CLARKE M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111. DOI: 10.1038/35102167.
- [30] TAVALUC R T, HART L S, DICKER D T, et al. Effects of low confluency, serum starvation and hypoxia on the side population of cancer cell lines[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(20): 2554-2562. DOI:10.4161/cc.6.20.4911.
- [31] FUKAYA R, OHTA S, YAMAGUCHI M, et al. Isolation of cancer stem-like cells from a side population of a human glioblastoma cell line, SK-MG-1[J]. *Cancer Lett*, 2010, 291(2): 150-157. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.10.010.

[收稿日期] 2018-05-13

[修回日期] 2018-07-20

[本文编辑] 王映红