

文章编号 1006-8147(2021)04-0343-07

论著

NAMPT 基因对肾癌细胞增殖和凋亡的影响及其机制研究

王艳辉,柳雅慧,任丽

(天津医科大学肿瘤医院检验科,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市“肿瘤防治”重点实验室,天津市恶性肿瘤临床医学研究中心,天津 300060)

摘要 目的:探讨烟酰胺磷酸核糖转移酶(NAMPT)在肾癌中的表达情况及对肾癌细胞增殖和凋亡的影响。方法:通过TCGA在线数据库 ualcan 分析 NAMPT 在肾癌组织和正常肾组织中的表达,通过 Kaplan-Meier plotter 数据库分析 NAMPT 对肾癌预后的影响。qPCR 检测 NAMPT 基因在肾癌细胞 769P、A704、786-O 及正常化肾小管上皮细胞 HK2 中的表达。分别设计 NAMPT 特异性 shRNA(shNAMPT 组)和对照序列(scramble 组)转染肾癌细胞 786-O,用 NAMPT 抑制剂 FK866 及对照试剂 DMSO 处理肾癌细胞 786-O,分别采用 CCK-8 法、平板克隆实验及流式细胞术检测 NAMPT 对肾癌细胞 786-O 增殖、克隆形成及凋亡的影响,NAD⁺/NADH 检测试剂盒检测细胞内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)的含量,Western 印迹检测 NAMPT 的表达及干扰 NAMPT 对磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)通路的影响。结果:生物信息学分析显示 NAMPT 在肾癌中的表达高于正常肾组织($P<0.05$),NAMPT 高表达组总生存率较低表达组明显降低($P<0.01$);肾癌细胞 769P、A704、786-O NAMPT 的表达均高于肾小管上皮细胞 HK2($t=6.680, P=0.0026, t=14.12, P=0.001, t=13.43, P=0.002$);细胞学实验结果显示,与 DMSO 组相比,FK866 组肾癌细胞 786-O 的增殖能力减弱($t=2.625, P<0.05$),克隆形成能力明显受抑制($t=5.687, P<0.01$),凋亡细胞比例增高($t=6.325, P<0.01$),NAD⁺生成明显下降($t=17.62, P<0.001$)。与 scramble 组相比,shNAMPT 组肾癌细胞 786-O 的增殖能力减弱($t=3.959, P<0.05$),克隆形成能力明显受抑制($t=8.684, P<0.05$),凋亡细胞比例增高($t=14.05, P<0.01$),NAD⁺生成明显下降($t=10.93, P<0.001$),Akt 通路关键蛋白 p-PI3K 及 p-Akt 的表达明显下调($t=7.721, P<0.01, t=14.78, P<0.001$)。结论:NAMPT 在肾癌中高表达,且与患者预后差相关,干扰 NAMPT 的表达,可以通过减少 NAD⁺的生成,抑制 PI3K/Akt 通路的激活,从而降低肾癌细胞的增殖,促进其凋亡。

关键词 肾癌;NAMPT;增殖;细胞凋亡

中图分类号 R737.11

文献标志码 A

The effect of NAMPT on the proliferation and apoptosis of renal cell carcinoma and its mechanism

WANG Yan-hui, LIU Ya-hui, REN Li

(Department of Laboratory, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China)

Abstract Objective: To investigate the expression of nicotinamide phosphoribosyl transferase(NAMPT) in renal cell carcinoma and its effect on the proliferation and apoptosis of renal cell carcinoma. **Methods:** The TCGA online database ualcan was used to analyze the expression of NAMPT in renal cancer tissues and normal renal tissues, the Kaplan-Meier plotter database was used to analyze the influence of NAMPT on the prognosis of renal cancer. qPCR was used to detect the expression of NAMPT gene in renal cancer cell 769P, A704, 786-O and normalized renal tubular epithelial cells HK 2. 786-O cell was transfected with NAMPT specific shRNA (shNAMPT group) and control sequence (scramble group) respectively, and treated with NAMPT inhibitor FK866 and control reagent DMSO. CCK-8 assay, cell colony formation assay and flow cytometry were respectively used to detect cell proliferation, the cloning ability and apoptosis of 786-O cell. NAD⁺/NADH detection kit was used to detect the content of nicotinamide adenine dinucleotide(NAD⁺) in cells. Western blotting assay was used to detect the expression of NAMPT and the effect of interfering with NAMPT on phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway. **Results:** Bioinformatics analysis showed that the expression of NAMPT in renal cell carcinoma was higher than that in normal renal tissues($P<0.05$). The overall survival rate was significantly reduced in patients with high expression of NAMPT group than those in patients with low expression of NAMPT group($P<0.01$); the expression of NAMPT were higher in 769P, A704, 786-O than those in renal tubular epithelial cells HK2 ($t=6.680, P=0.0026, t=14.12, P=0.001, t=13.43, P=0.002$). Cytological experiment results showed that compared with DMSO group, in FK866 group, 786-O cell proliferation and clone formation ability was significantly inhibited($t=2.625, P<0.05, t=5.687, P<0.01$), and the proportion of apoptotic cells was increased($t=6.325, P<0.01$), the production of NAD⁺ was significantly decreased ($t=17.62, P<0.001$). Compared with scramble group, in shNAMPT group, 786-O cell proliferation and

作者简介 王艳辉(1992-),女,硕士在读,研究方向:肿瘤微环境和肿瘤代谢;通信作者:任丽, E-mail:roland-li@163.com。

clone formation ability was significantly inhibited ($t=3.959, P<0.05, t=8.684, P<0.05$), and the proportion of apoptotic cells was increased ($t=14.05, P<0.01$), the production of NAD^+ was significantly decreased ($t=10.93, P<0.001$), and the expression of key proteins p-PI3K and p-Akt of the Akt pathway were significantly down-regulated ($t=7.721, P<0.01, t=14.78, P<0.001$). **Conclusion:** NAMPT is highly expressed in renal cell carcinoma and is related to the poor prognosis of patients. Interfering with the expression of NAMPT can reduce the production of NAD^+ and inhibit the activation of PI3K/Akt pathway, thereby reducing the proliferation and promoting apoptosis of renal cancer cells.

Key words renal cancer; NAMPT; proliferation; apoptosis

肾细胞癌是全球第十大主要发生的恶性肿瘤^[1], 恶性肾脏肿瘤最常见的亚型是肾透明细胞癌(ccRCC), 占有病例的 75%。转移性 ccRCC 患者对靶向疗法反应差, 且容易产生耐药, 5 年生存率不到 10%^[2]。肿瘤细胞无限增殖和抵抗凋亡是导致患者预后不良的主要原因之一。在许多癌症中, 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号均失调, 并且该途径的激活被认为与 ccRCC 肿瘤的侵袭性行为和不良预后相关^[3-4]。mTOR 信号通路的过度活跃被认为可能是介导 PI3K-Akt 信号通路的重要组成部分。因此, PI3K/Akt/mTOR 信号通路的关键节点以及调控因子可能是用于治疗肾细胞癌的一个有效的目标。NAMPT 是一种胞内的酶, 可以催化 NAM 生成 NMN 进而生成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)。NAMPT 可以通过微调细胞内 NAD^+ 的水平, 参与细胞代谢重编程, 控制 NAD^+ 依赖的酶 (包括 Sirtuins、PARP 和 NADase) 的活性^[5]。NAMPT 在多种肿瘤组织中高表达, 广泛参与细胞增殖、凋亡、迁移、上皮间质转化等多种生物学过程^[6]。目前, 有研究发现相对于正常肾细胞, 肾癌细胞比较依赖 NAMPT 合成 NAD^+ ^[7]。但是, NAMPT 对肾癌生物学行为的影响以及机制尚不清楚。本研究旨在探讨 NAMPT 在肾癌组织中的表达及与患者预后的关系, 对肾癌细胞增殖、凋亡的影响及相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料 HK2(人肾小管上皮细胞)、769P(肾透明细胞癌细胞)、A704(人肾腺癌细胞)、786-O(肾透明细胞癌细胞)细胞来自于天津医科大学免疫微环境与疾病省部共建教育部重点实验室。主要试剂: CCK8 检测试剂购自 Sigma(中国上海); 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) Annexin V 凋亡试剂盒购自美国 BD 公司; NAD^+ /NADH 检测试剂盒购自 Abcam 公司; 总蛋白提取试剂盒、逆转录试剂盒均购自 Thermo Fisher; 总 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 BI 公司; NAMPT、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、 β -actin 抗体购自美国 GST 公司; DMSO、FK866 购自 Sigma(中国上

海); 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 购自美国 BI 公司; 载体 PLKO.1 和相应慢病毒载体及 DH5 α 感受态细胞均由天津医科大学免疫微环境与疾病省部共建教育部重点实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HK2、769P、A704、786-O 细胞分别培养于含 10% 胎牛血清、100 mg/L 链霉素和 1×10^5 U/L 青霉素的 DMEM 和 RPMI1640 的培养基中, 置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中常规传代培养, 取对数生长期细胞用于后续实验。

1.2.2 生物信息学分析 (1) 通过 ualcan (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 数据库分析 NAMPT 的表达。(2) 通过 Kaplan-Meier plotter (<http://kmplot.com/analysis/index.php>) 数据库分析 NAMPT 对肾透明细胞癌预后的影响。

1.2.3 敲低细胞系的构建 通过 Sigma 网站设计敲低 NAMPT 的 shRNA 序列。上游序列 5'-CCGGCCA CCTTATCTTAGAGTTATTCTCGAGAATAACTCTAA GATAAGGTGGTTTTTG-3', 下游序列 5'-AATTCAA AAACCACCTTATCTTAGAGTTATTCTCGAGAATAA CTCTAAGATAAGGTGG-3', 并送公司合成, 通过退火的方法将其上下游序列形成发卡结构即 shRNA。通过酶切连接的方法将 shRNA 插入载体 PLKO.1 中, 构建出敲低质粒。将敲低质粒(空载质粒)与包装质粒(PMD, PSP)一起瞬转入 293T 细胞, 进行敲低病毒(空载病毒)的包装。铺 7×10^5 肾癌细胞 786-O 于 6 孔板, 贴壁 12 h 以后, 敲低组和对照组分别用敲低病毒和空载病毒感染 786-O。感染 8 h 以后换成正常培养基, 48 h 以后弃掉原来的培养基, 加入正常培养基与 puro(1:1 000)对细胞进行筛选大约 7 d, 直到正常细胞全部死亡, 得到敲低 NAMPT 的肾癌细胞即 786-O-scramble、786-O-shNAMPT。

1.2.4 细胞增殖实验 将对数生长期的肾癌细胞 786-O、786-O-scramble 和 786-O-shNAMPT 进行消化、计数, 并接种于 96 孔板, 每孔 5 000 个细胞, 每组设置 5 个复孔, 贴壁 24 h 以后, 用 1 nmol/L 的 FK866 和相应计量的 DMSO 处理肾癌细胞 786-O, 即为 FK866 组、DMSO 组。孔内不含细胞的培养基为

空白调零组,分别于0、1、2、3、4、5 d将孔内培养基更换为含10% CCK-8试剂的培养基,37℃、5% CO₂条件下孵育2 h,全自动酶标仪450 nm处测定光密度(OD)值,并绘制细胞增殖曲线。每组细胞设置5个平行复孔,实验重复3次。

1.2.5 细胞克隆形成实验 将对数生长期的786-O、786-O-scramble和786-O-shNAMPT细胞,调整密度为10 000个/mL,按照500个/孔细胞梯度接种于6孔板,每隔2 d更换一次培养基(DMSO组和FK866组更换含DMSO和FK866的培基),37℃、5% CO₂培养1周。待克隆形成后结晶紫染色,统计两组集落形成的个数,实验重复3次。

1.2.6 凋亡实验 用胰蛋白酶将DMSO组、FK866组、786-O-scramble和786-O-shNAMPT细胞消化,收集于干净的离心管中,PBS洗3遍,调整细胞密度为1×10⁶/mL,加入FITC Annexin V和PI染料,避光孵育5~10 min后,上流式细胞仪进行检测,统计凋亡率,凋亡率=Q2区数值+Q3区数值,实验重复3次。

1.2.7 NAD⁺检测 将对数生长期的786-O、786-O-scramble和786-O-shNAMPT细胞消化、计数,并接种于6孔板,用1 nmol/L的FK866和相应计量的DMSO处理786-O细胞,即FK866组、DMSO组。根据NAD⁺检测试剂盒的操作步骤对各组进行NAD检测,大致步骤如下:做标准曲线,准备样品,加入反应混合物并室温孵育5 min,加入显影剂并室温孵育2 h,用全自动酶标仪在490 nm处测定吸光度。根据标准曲线计算NAD⁺的量,将NAD⁺的含量用细胞总蛋白量进行标准化,以得出每个细胞内NAD⁺的含量。

1.2.8 RNA的提取和实时荧光定量PCR 将对数生长期的DMSO组、FK866组、786-O-scramble和786-O-shNAMPT细胞消化、计数,并接种于6孔板,用1 mL Trizol裂解细胞,根据RNA提取试剂盒(北京索莱宝)的具体步骤提取RNA,用Nanodrop测RNA浓度,每个样品逆转2 μg,具体步骤参见逆转录试剂盒操作步骤。将逆转录得到的cDNA进行10倍稀释,按照cDNA 2 μL,引物8 μL,Ultra SYBR Mixture 10 μL的体系加入罗氏实时荧光定量PCR 96孔板中,然后在罗氏实时荧光定量PCR仪上进行逆转。具体的逆转录程序:预变性:95℃,300 s,设置45个循环:变性:95℃,20 s;退火:60℃,20 s;延伸:72℃,20 s;溶解:95℃,10 s,65℃,60 s,97℃,1 s;冷却:37℃,30 s。程序结束后进行数据拷贝。根据qPCR得出的荧光曲线的Ct值,以GAPDH基因为内参,ΔCt=Ct-目的基因-Ct-GAPDH基因,ΔΔCt=

实验组ΔCt值-对照组ΔCt值,用2^{-ΔΔCt}计算结果。实验重复3次。所有用到的引物序列见表1。

表1 扩增反应所需引物序列

Tab 1 Primer sequence for amplification reaction

基因名称	引物序列(5'→3')
NAMPT	上游 CCTCCATGATGCTGCTTACA
	下游 ATCGGCCCTTTTGGACCTT
GAPDH	上游 GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	下游 GCCTGTTGTCATACTTCTCATGG

注:NAMPT:烟酰胺磷酸核糖转移酶

1.2.9 蛋白印迹 将细胞按照1.2.6处理,将处理好的细胞,弃去培养基,PBS洗3遍,每孔加入150 μL含蛋白酶抑制剂的RIPA细胞裂解液,在冰上用细胞刮将细胞刮下,在超声仪上进行超声裂解细胞,12 000 r/min离心10 min,取上清,用BCA蛋白定量试剂盒检测对照组和实验组蛋白浓度。每组上样25 μg蛋白,12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,60 V电压40 min使蛋白进入分离胶,100 V电压电泳1 h。100 V电压4℃湿转80 min将胶上蛋白转至PVDF膜上,用5%脱脂牛奶封闭PVDF膜1 h,加入稀释后的一抗NAMPT(1:1 000稀释)、p-PI3K(1:1 000)、PI3K(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)、Akt(1:1 000)、β-actin(1:1 000)4℃摇床过夜孵育抗体,第二天TBST洗膜3次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000稀释)室温孵育1 h,TBST洗膜3次,使用Immobilon Western化学发光HRP底物和Tanon 6200发光成像仪器检测蛋白的表达水平,以β-actin为内参,计算各组蛋白相对表达量。

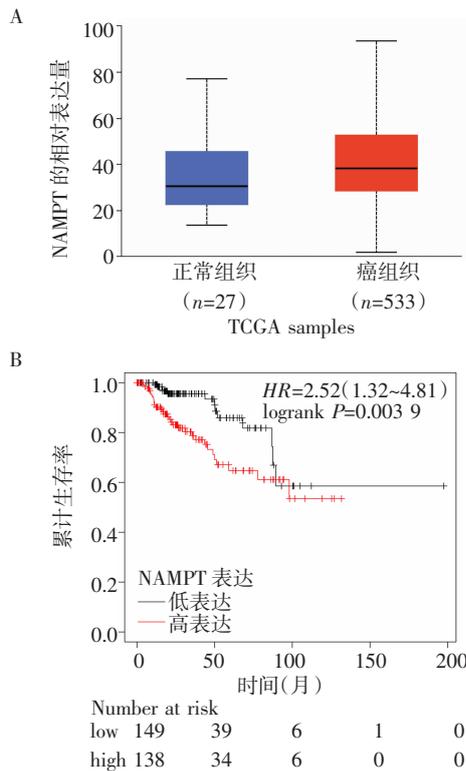
1.3 统计学处理 数据分析采用Graph Pad Prism7.0和FlowJo7.6作图。正态分布计量资料两组间比较采用t检验,以P<0.05作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NAMPT在肾癌中的表达及其对患者生存预后的影响 用TCGA和Kaplan-Meier plotter数据库对TCGA在肾癌中的表达水平以及对预后的影响进行了预测。从TCGA数据库获取533例肾癌患者和72名正常人基因测序数据的基因表达信息,经生物信息学分析显示NAMPT在肾癌组织中明显上调(P<0.05),见图1A。Kaplan-Meier plotter生存曲线分析显示NAMPT高表达组患者总生存率较NAMPT低表达组降低(P<0.01),见图1B。

2.2 肾癌细胞中NAMPT的表达水平 qPCR结果显示,肾癌细胞769P、A704、786-O中NAMPT基因表达水平高于HK2细胞,差异有统计学意义(t=6.68、

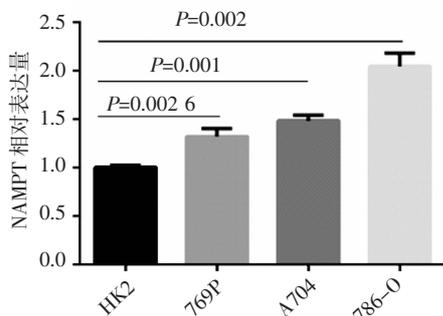
14.12、13.43, 均 $P < 0.01$), 且在肾癌细胞 786-O 中表达量最高, 见图 2, 因此后续细胞实验采用肾癌细胞 786-O。



注:A: NAMPT 在肾癌及癌旁组织中的表达水平比较; B: NAMPT 基因高表达和低表达患者总生存曲线; NAMPT: 烟酰胺磷酸核糖转移酶

图 1 TCGA 数据库中 NAMPT 在肾癌组织中的表达情况及对肾癌预后的影响

Fig 1 The expression of NAMPT in renal cancer and its effect on prognosis analyzed by TCGA database

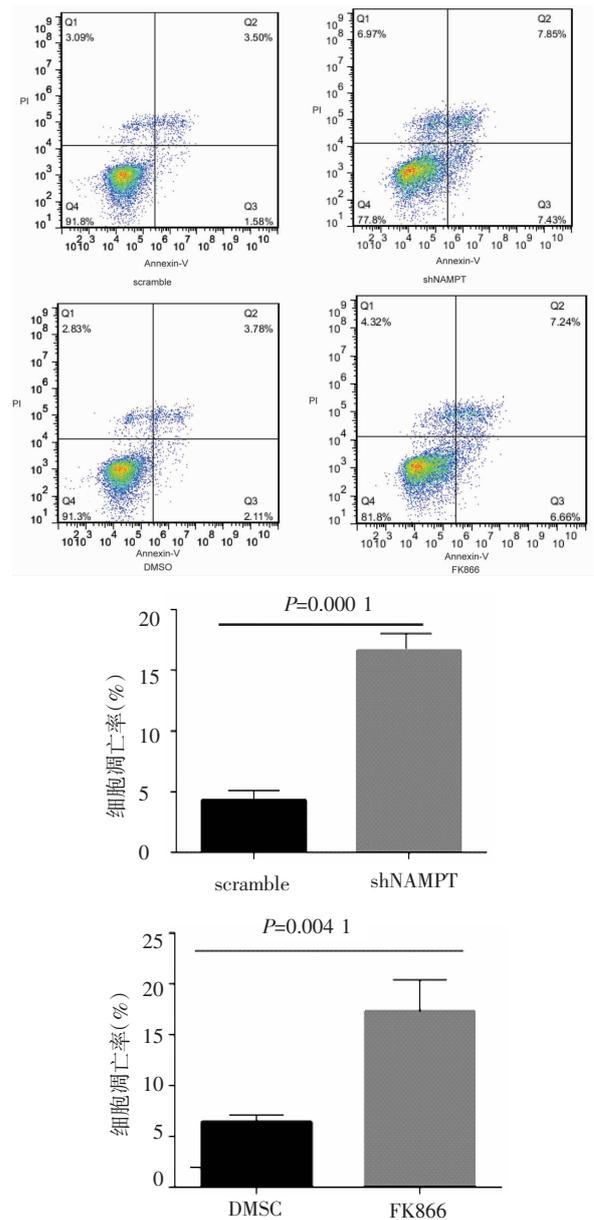


注: HK2: 人肾小管上皮细胞; 769P: 肾透明细胞癌细胞; A704: 人肾癌细胞; 786-O: 肾透明细胞癌细胞; NAMPT: 烟酰胺磷酸核糖转移酶

图 2 NAMPT 在正常细胞 HK2 和肾癌细胞 769P、A704、786-O 中的表达水平

2.3 NAMPT 基因影响肾癌细胞 786-O 的凋亡
scramble 组、sh-NAMPT 组细胞的凋亡率分别为 $(4.270 \pm 0.482)\%$ 和 $(16.630 \pm 0.737)\%$ ($t=14.05, P < 0.01$); 抑制 NAMPT 后肾癌细胞 786-O 的凋亡显著增多,

DMSO 组和 FK866 组凋亡率分别为 $(5.377 \pm 0.577)\%$ 和 $(17.300 \pm 1.795)\%$ ($t=6.325, P < 0.01$), 见图 3A、3B。



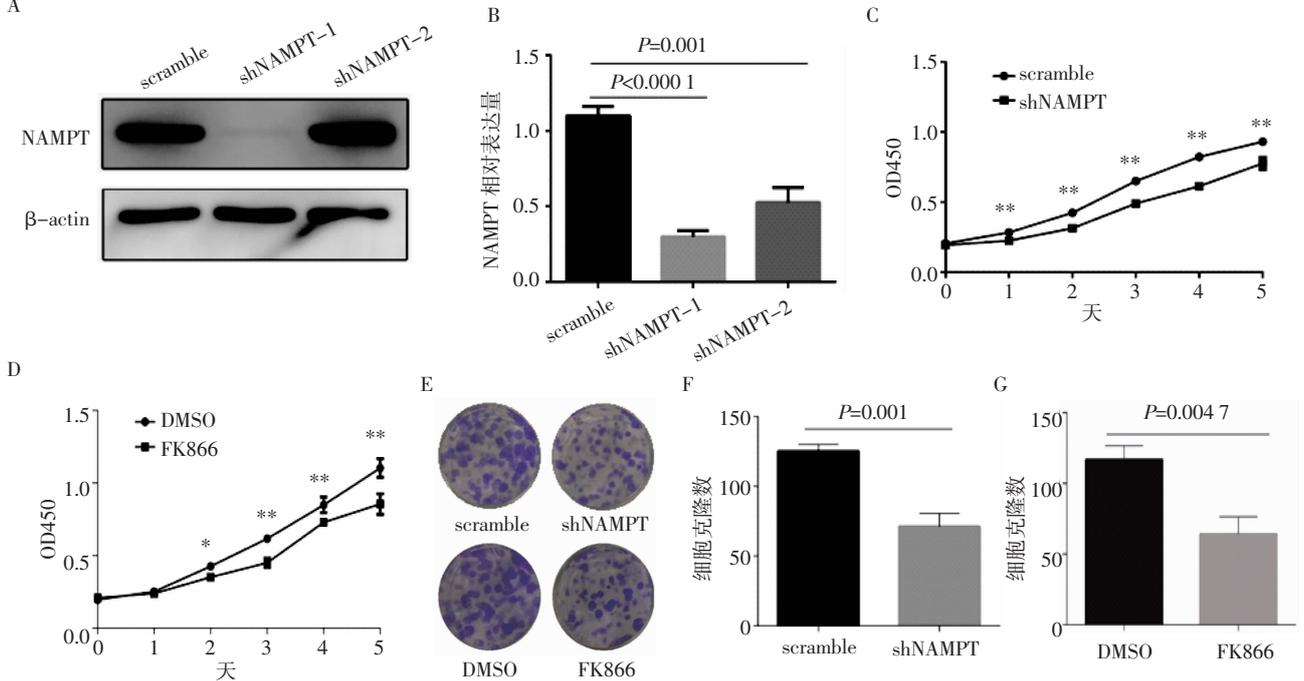
注:A: 流式细胞实验检测各组细胞的凋亡情况; B: 各组细胞凋亡率统计; NAMPT: 烟酰胺磷酸核糖转移酶

图 3 NAMPT 敲低或者抑制对肾癌细胞 786-O 凋亡的影响

2.4 NAMPT 基因影响肾癌细胞 786-O 的增殖和克隆形成能力
构建敲低 NAMPT 的肾癌细胞 786-O-shNAMPT, 用 NAMPT 抑制剂 FK866 处理肾癌细胞 786-O, 通过 CCK8 和平板克隆实验检测 NAMPT 对细胞增殖和克隆形成能力的影响。2 个 NAMPT 特异性 shRNA 序列转染肾癌细胞 786-O 后, qPCR 结果显示 NAMPT mRNA 表达水平显著低于 scramble 组 ($t_{shNAMPT-1}=18.68, P < 0.0001$; $t_{shNAMPT-2}=8.60, P=0.001$)。Western 印迹检测结果显示, NAMPT 蛋白表达水平

显著低于 scramble 组。其中 shRNA-1 的敲低效果最佳,因此采用 shRNA-1 敲低的肾癌细胞即 786-O-shNAMPT 进行后续实验,见图 4A、4B。CCK8 实验结果显示,shNAMPT 组从第 1 天开始肾癌细胞 786-O 的活力显著低于 scramble 组($t=2.168, P<0.01$),且增殖能力弱于 scramble 组 ($t=3.959, P<0.05$)。与

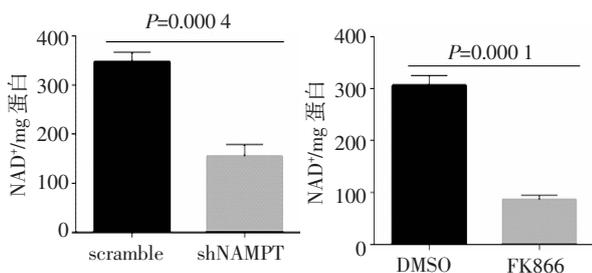
DMSO 组相比,FK866 组细胞增殖能力减弱 ($t=2.625, P<0.05$),见图 4C、4D。细胞克隆形成实验也表明,与 scramble 组相比,shNAMPT 组肾癌细胞 786-O 的克隆形成集落显著减少,与 DMSO 组相比,FK866 组细胞克隆形成集落也显著减少 ($P<0.01$),见图 4E、4F、4G。



注:A、B: NAMPT 在肾癌细胞 786-O 中的敲低效率;C: CCK8 实验验证敲低 NAMPT 对肾癌细胞 786-O 增殖能力的影响(0、1、2、3、4、5 d 组间比较, t 分别 2.168、9.233、27.55、22.44、13.00、2.276, * $P<0.05$, ** $P<0.01$);D: CCK8 实验验证 FK866 抑制 NAMPT 后对肾癌细胞 786-O 增殖能力的影响(0、1、2、3、4、5 d 组间比较, t 分别 3.334、2.729、2.266、10.09、4.517、5.835, * $P<0.05$, ** $P<0.01$);E、F、G: 集落形成实验验证 NAMPT 对肾癌细胞 786-O 增殖能力的影响($t_{shNAMPT}=8.684; t_{FK866}=5.687; P<0.01$);NAMPT: 烟酰胺磷酸核糖转移酶

图 4 NAMPT 基因敲低或抑制后肾癌细胞 786-O 增殖和克隆形成能力的改变
Fig 4 Changes in 786-O cell proliferation and clone formation ability after knockdown or inhibition of NAMPT

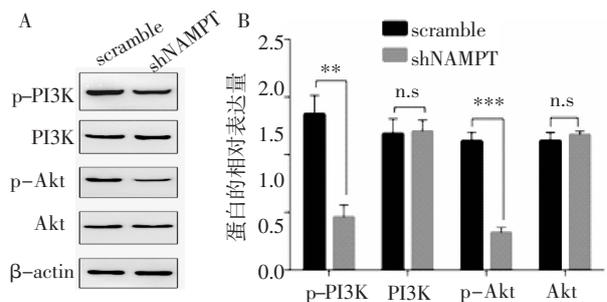
2.5 NAMPT 影响肾癌细胞 786-O 的 NAD⁺产生
shNAMPT 组细胞 NAD⁺的产生量显著低于 scramble 组($t=10.93, P=0.0004$),与 DMSO 组相比,FK866 组 NAD⁺的产生量显著降低($t=17.62, P=0.0001$),见图 5。



注: NAMPT: 烟酰胺磷酸核糖转移酶, NAD⁺: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸

图 5 NAMPT 敲低或者抑制后肾癌细胞 786-O 的 NAD⁺生成
Fig 5 NAD⁺ production in 786-O cells after NAMPT knockdown or inhibition

2.6 NAMPT 对 PI3K/Akt 相关通路的影响 West-ern 印迹结果显示,干扰 NAMPT 的表达后 p-PI3K 和 p-Akt 表达量降低($t_{p-PI3K}=7.721, t_{PI3K}=0.2455, t_{p-Akt}=14.78, t_{Akt}=1.202$,均 $P<0.01$),见图 6A、6B。



注:A: 敲低 NAMPT 后 Akt 通路核心蛋白变化;B: 蛋白相对表达量统计结果(** $P<0.01$, *** $P<0.001$, n.s.表示差异无统计学意义);NAMPT: 烟酰胺磷酸核糖转移酶;PI3K: 磷脂酰肌醇 3 激酶;Akt: 蛋白激酶 B

图 6 NAMPT 敲减后 Akt 通路蛋白表达变化
Fig 6 The expression of key protein of Akt pathway after NAMPT knockdown

3 讨论

NAMPT 是 NAD⁺补救合成途径的限速酶,可以将烟酰胺合成烟酰胺单核苷酸,其是在哺乳动物和低等生物中高度保守的蛋白质,在肿瘤代谢中起关键作用,在肿瘤组织中通常高表达,是有前景的抗癌靶标^[8]。Nacarelli 等^[9]研究发现,抑制 NAMPT 可以在体外和体内均抑制顺铂处理的上皮性卵巢癌细胞的生长。在结肠癌中 NAMPT 被认为是致癌基因,可通过 Sirt1 和 PARP 调节肿瘤干细胞特性和对治疗的抵抗力,而且高水平的 NAMPT 与结肠癌预后不良相关^[10]。Gholinejad 等^[11]认为,细胞外 NAMPT/Visfatin 通过增强乳腺癌细胞中 Akt 和细胞外信号调节激酶(ERK)1/2 的磷酸化,降低了肿瘤坏死因子(TNF)- α 诱导的细胞凋亡。Xin 等^[12]研究认为,在乳腺癌中 NAMPT 高表达通过激活 Akt 信号转导,调控 14-3-3 ζ 的表达,促进 PKM2 的核易位进而介导他莫昔芬耐药。在胰腺癌中 NAMPT 过表达,抑制 NAMPT 会在体外抑制胰腺癌细胞的增殖,在体内抑制胰腺肿瘤的生长^[13]。在胶质母细胞瘤中 NAMPT 高表达,慢病毒敲低 NAMPT 后可抑制细胞增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡。U87 胶质母细胞瘤细胞用于裸鼠皮下肿瘤发生的模型,NAMPT 敲低组肿瘤的生长明显减慢^[14]。然而,NAMPT 在肾癌发生、发展中的机制目前尚不清楚。

本研究利用 TCGA 数据库分析发现 NAMPT 在肾透明细胞癌中高表达,与正常肾上皮细胞 HK2 相比,肾癌细胞 769P、A704、786-O 中 NAMPT 表达水平升高,其中在肾癌细胞 786-O 中表达较高。生存及预后分析结果表明,NAMPT 高表达的肾透明细胞癌患者较低表达患者预后显著较差。以上结果提示 NAMPT 可能作为原癌基因参与肾癌的发生和发展。为进一步证实 NAMPT 在肾透明细胞癌中是功能性的原癌基因,笔者检测了 NAMPT 敲低对肾透明细胞癌增殖、克隆及凋亡的影响。用 shNAMPT 质粒构建慢病毒感染肾癌细胞 786-O,发现沉默 NAMPT 后细胞的增殖和克隆形成能力明显降低,细胞凋亡比例明显增加。

NAD⁺是细胞代谢的关键辅酶,在维持细胞能量代谢,基因组稳定性,线粒体稳态,氧化应激以及细胞存活等方面发挥着关键作用^[15]。NAD⁺有 3 种合成途径即从头合成途径、补救合成途径、P-H 途径,其中补救合成途径是 NAD⁺的主要来源^[16]。NAMPT 是 NAD⁺补救合成途径的关键酶,在细胞增殖和凋亡中起着重要作用^[17]。研究报道,在急性淋巴细胞白血病中,NAMPT 的新型抑制剂 OT-82 通过抑制 NAD⁺的

生成进而抑制细胞凋亡,发挥抗白血病的功能^[18]。NAD⁺及 NAD⁺前体物质 NMN 可保护角膜内皮细胞免受 UVB 诱导的凋亡^[19]。笔者发现敲低 NAMPT 后,细胞内 NAMPT 显著降低。此结果表明肾癌细胞 786-O 确实依赖 NAMPT 来合成 NAD⁺,其生成减少可能影响肾癌细胞 786-O 的增殖和凋亡。

肿瘤细胞的恶性生物学行为与肿瘤细胞内信号转导途径的异常激活密切相关^[20]。其中,PI3K/Akt 信号通路是与肿瘤增殖和凋亡最相关的信号通路之一,Akt 过度激活会促进各种肿瘤的生长与转移^[21]。本实验通路蛋白检测结果显示,NAMPT 下调后 Akt 关键通路蛋白 p-Akt 和 p-mTOR 明显下调,说明 NAMPT 可能通过 Akt 通路促进肾透明细胞癌的增殖和凋亡。

综上所述,肾癌组织中 NAMPT 的表达水平较癌旁正常组织升高,且与患者预后相关。敲低 NAMPT 可以抑制肾透明细胞癌增殖、克隆形成,并促进其凋亡,其潜在机制可能与 NAMPT 激活 PI3K/Akt 通路和影响 NAD⁺的生成有关。NAMPT 可能成为肾癌的潜在临床治疗靶点及预后标志物。

参考文献:

- [1] Singh D. Current updates and future perspectives on the management of renal cell carcinoma[J]. *Life Sci*,2020;118632
- [2] Kowalewski A,Zdrenka M,Grzanka D,et al. Targeting the deterministic evolutionary trajectories of clear cell renal cell carcinoma[J]. *cancers*,2020,12(11):3300
- [3] Thompson M. Polybromo-1: the chromatin targeting subunit of the PBAF complex[J]. *Biochimie*,2009,91(3):309
- [4] Beroukhim R,Brunet J P,Di Napoli A,et al. Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-hippellindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney[J]. *Cancer Res*,2009,69(11):4674
- [5] Audrito V,Messana V G,Deaglio S. NAMPT and NAPRT:two metabolic enzymes with key roles in inflammation[J]. *Front Oncol*,2020,10:358
- [6] Chowdhry S,Zanca C,Rajkumar U,et al. NAD metabolic dependency in cancer is shaped by gene amplification and enhancer remodeling[J]. *Nature*,2019,569(7757):570
- [7] Shackelford R E,Abdulsattar J,Wei E X,et al. Increased nicotinamide phosphoribosyltransferase and cystathionine-beta-synthase in renal oncocytomas,renal urothelial carcinoma,and renal clear cell carcinoma[J]. *Anticancer Res*,2017,37(7):3423
- [8] Garten A,Schuster S,Penke M,et al. Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism[J]. *Nat Rev Endocrinol*,2015,11(9):535
- [9] Nacarelli T,Fukumoto T,Zundell J A,et al. NAMPT inhibition suppresses cancer stem-like cells associated with therapy-induced

(下转第 378 页)

- lymphoma[J]. *Clin Lab*, 2017, 63(11): 1831
- [9] 吕丽,唐颖,张丽,等. Bcl-6、bcl-2、ki-67 蛋白表达与弥漫性大 B 细胞淋巴瘤临床特征及预后相关因素分析[J]. *大连医科大学学报*, 2009, 31(1): 14
- [10] Chao C, Silverberg M J, Chen L H, et al. Novel tumor markers provide improved prediction of survival after diagnosis of human immunodeficiency virus (HIV)-related diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Leuk Lymphoma*, 2018, 59(2): 321
- [11] 胡代宏, 闫文莉, 白晓川. MYC, BCL-2, BCL-6 蛋白共表达弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的临床病理特征分析[J]. *重庆医学*, 2020, 49(4): 548
- [12] Go S I, Park M J, Song H N, et al. Prognostic impact of sarcopenia in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2016, 7(5): 567
- [13] Gu X, Booth C J, Liu Z, et al. AID-associated DNA repair pathways regulate malignant transformation in a murine model of BCL6-driven diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Blood*, 2016, 127(1): 102
- [14] Bajwa A A, Khadim M T, Din H U, et al. Immunohistochemical expression of CD10, BCL6 and MUM1 in differentiating diffuse large B cell lymphoma subtypes[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2017, 27(10): 621
- [15] Ana M P, Rotaru I, Olar L, et al. The prognostic role of Bcl-2, Ki67, c-MYC and p53 in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2017, 58(3): 837
- [16] Ennishi D, Mottok A, Ben-Neriah S, et al. MYC genetic profiling of and in diffuse large B-cell lymphoma determines cell-of-origin-specific clinical impact[J]. *Blood*, 2017, 129(20): 2760
- [17] 王辉, 邓旭, 谢军, 等. CMYC, BCL2, BCL6 蛋白表达与弥漫性大 B 细胞淋巴瘤预后关系的研究[J]. *贵州医药*, 2018, 42(5): 518
(2020-10-19 收稿)

.....

(上接第 348 页)

- senescence in ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(4): 890
- [10] Lucena-Cacace A, Otero-Albiol D, Jimenez-Garcia M P, et al. NAMPT is a potent oncogene in colon cancer progression that modulates cancer stem cell properties and resistance to therapy through sirt1 and PARP[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(5): 1202
- [11] Gholinejad Z, Kheiripour N, Nourbakhsh M, et al. Extracellular NAMPT/V isfatin induces proliferation through ERK1/2 and AKT and inhibits apoptosis in breast cancer cells[J]. *Peptides*, 2017, 92: 9
- [12] Ge X, Zhao Y, Dong L, et al. NAMPT regulates PKM2 nuclear location through 14-3-3zeta: conferring resistance to tamoxifen in breast cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 23409
- [13] Espindola-Netto J M, Chini C, Tarrago M, et al. Preclinical efficacy of the novel competitive NAMPT inhibitor STF-118804 in pancreatic cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49): 85054
- [14] Guo Q, Han N, Shi L, et al. NAMPT: a potential prognostic and therapeutic biomarker in patients with glioblastoma[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(3): 963
- [15] Lautrup S, Sinclair D A, Mattson M P, et al. NAD (+) in brain aging and neurodegenerative disorders[J]. *Cell Metab*, 2019, 30(4): 630
- [16] Canto C, Menzies K J, Auwerx J. NAD (+) Metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus[J]. *Cell Metab*, 2015, 22(1): 31
- [17] Zhao H, Tang W, Chen X, et al. The NAMPT/E2F2/SIRT1 axis promotes proliferation and inhibits p53-dependent apoptosis in human melanoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(1): 77
- [18] Somers K, Evans K, Cheung L, et al. Effective targeting of NAMPT in patient-derived xenograft models of high-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2020, 34(6): 1524
- [19] Zhao C, Li W, Duan H, et al. NAD(+) precursors protect corneal endothelial cells from UVB-induced apoptosis[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 318(4): C796
- [20] Fridman W H, Miller I, Sautes-Fridman C, et al. Therapeutic targeting of the colorectal tumor stroma [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(2): 303
- [21] Mirza-Aghazadeh-Attari M, Ekrami E M, Aghdas S, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by polyphenols: implication for cancer therapy[J]. *Life Sci*, 2020, 255: 117481
(2020-12-07 收稿)