

文章编号 1006-8147(2023)06-0594-05

论著

人着丝粒蛋白 E 在人肾透明细胞癌中的表达及对细胞增殖的影响

刘芬¹,李世宾²,李晓石²

(1.新乡市中心医院,新乡医学院第四临床学院病理科,新乡 453000;2.新乡市中心医院,新乡医学院第四临床学院泌尿外科,新乡 453000)

摘要 目的:探讨人着丝粒蛋白 E(CENPE)在人肾透明细胞癌组织中的表达、临床意义及对细胞增殖的影响。方法:生物信息学分析 GEPIA 数据库中 CENPE 在肾透明细胞癌组织及癌旁组织中的 mRNA 水平,并分析其表达与患者预后之间的关系。回顾性分析来自新乡市中心医院 2014 年 9 月—2021 年 8 月接受手术治疗的 77 例肾透明细胞癌患者的临床病理资料。采用免疫组化法检测肾透明细胞癌组织和癌旁组织中 CENPE 蛋白表达水平,分析其与患者临床病理特征的关系。培养 HTB-47 和 CRL-1932 细胞,通过 CENPE 的 shRNA 质粒转染降低其表达,通过集落形成实验及 CCK-8 实验检测对肾透明细胞癌细胞增殖的影响。结果:生物信息学分析显示肾透明细胞癌患者 CENPE 显著高表达,并与无病生存期显著相关。免疫组化结果显示 CENPE 在肾透明细胞癌组织中显著高表达,而在癌旁组织中则为阴性或低表达,表达水平与肿瘤直径显著相关($P=0.021$),而与患者的年龄、性别、肿瘤分化无关(均 $P>0.05$)。集落形成实验($P=0.0135$ 、 0.0154)及 CCK-8 实验($P=0.0091$ 、 0.0133)证实 CENPE 在细胞表达下调后可以抑制肾透明细胞癌细胞的增殖。结论:肾透明细胞癌组织中 CENPE 显著高表达,且与患者临床病理特征及预后相关,CENPE 蛋白促进肾透明细胞癌细胞的增殖。

关键词 人着丝粒蛋白 E;肾透明细胞癌;免疫组化;细胞增殖

中图分类号 R737.1

文献标志码 A

Expression of human centromere protein E in human renal clear cell carcinoma and its effects on the cell proliferation

LIU Fen¹, LI Shi-bin², LI Xiao-shi²

(1. Department of Pathology, Xinxiang Central Hospital, The Fourth Clinical College of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453000, China; 2. Department of Urology, Xinxiang Central Hospital, The Fourth Clinical College of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453000, China)

Abstract Objective: To investigate the expression and clinical significance of human centromere protein E (CENPE) in human renal clear cell carcinoma and its effect on cell proliferation. **Methods:** The mRNA levels of CENPE in renal clear cell carcinoma and para-carcinoma tissues were analyzed in GEPIA database, and the relationship between CENPE expression and prognosis of patients was analyzed. The clinicopathologic data of 77 patients with renal clear cell carcinoma who received surgical treatment from September 2014 to August 2021 at Xinxiang Central Hospital were retrospectively analyzed. Immunohistochemistry was used to detect the expression of CENPE protein in renal clear cell carcinoma and para-carcinoma tissues, and the relationship between CENPE protein expression and clinicopathologic features of patients was analyzed. HTB-47 and CRL-1932 cells were cultured and transfected with shRNA plasmid of CENPE to reduce the expression of HTB-47 and CRL-1932 cells. The effects on the proliferation of renal clear cell carcinoma cells were detected by colony formation assay and CCK-8 assay. **Results:** Bioinformatics analysis revealed that CENPE was significantly overexpressed in renal clear cell carcinoma patients and was significantly correlated with disease-free survival. Immunohistochemistry revealed significant high expression of CENPE in renal clear cell carcinoma tissues, while negative or low expression in para-carcinoma tissues. The expression level was significantly correlated with tumor size ($P=0.021$), but not with patient age, sex, or tumor differentiation (all $P>0.05$). Colony formation assay ($P=0.0135$, 0.0154) and CCK-8 assay ($P=0.0091$, 0.0133) confirmed that CENPE down-regulation in cell expression inhibited the proliferation of renal clear cell carcinoma cells. **Conclusion:** CENPE is highly expressed in renal clear cell carcinoma, which is related to clinicopathological features and prognosis of patients. CENPE protein promotes the proliferation of renal clear cell carcinoma cells.

Key words human centromere protein E; renal clear cell carcinoma; immunohistochemistry; cell proliferation

作者简介 刘芬(1985-),女,主治医师,硕士,研究方向:肿瘤病理学;通信作者:李晓石, E-mail:lixiaoshi-jj@163.com。

肾细胞癌(RCC)是较常见的恶性肿瘤之一,包括多种组织病理类型及遗传相关亚型。肾透明细胞癌(ccRCC)是肾细胞癌中最常见的组织病理类型,占肾恶性肿瘤的80%以上,也占RCC相关死亡的大部分。局限性和局部进展性RCC患者的治疗方法是手术切除或消融,但晚期患者的治疗选择受到限制^[1-2]。近年来,靶向治疗对于ccRCC的治疗显示出巨大优势,多种靶向治疗药物对于ccRCC患者的预后具有显著改善作用^[3-4]。然而,靶向治疗对ccRCC肿瘤抑制和个体患者的生存有不同的影响,这意味着需要更新的治疗靶点来改善患者的预后。

人着丝粒蛋白E(centromere protein E, CENPE)大小为312 kD,是维持稳定的动点与微管连接、保持纺锤体检查点功能的一个重要分子马达蛋白^[5]。目前发现,CENPE具有多种细胞生物学功能,如调节动粒组装、驱动染色体运动等,进而影响细胞分裂^[6]。已有研究表明,CENPE在很多肿瘤中均显著高表达,如肺癌、乳腺癌、骨肉瘤等,且CENPE表达与肿瘤患者的不良预后及药物的抗药性相关^[7-9]。

许多研究表明CENPE与多种类型肿瘤的发生和发展密切相关。例如,CENPE与骨肉瘤的发生有关^[10]。CENPE的表达与乳腺癌的临床病理参数、分子亚型、临床结果以及内分泌治疗的疗效有关^[11]。虽然CENPE在ccRCC中的作用尚不明确,但鉴于其在肿瘤中的潜在作用,推测CENPE与ccRCC进展相关。

1 材料和方法

1.1 临床资料 收集2014年9月—2021年8月新乡市中心医院77例ccRCC患者手术切除的癌组织及癌旁组织标本,分析其临床病理资料特征。全部病例均经过病理证实,具有完整的病例资料。收集患者的一般临床资料,包括年龄、性别、肿瘤直径、肿瘤分化等。患者平均年龄(52.5±3.75)岁;男性43例,女性34例;肿瘤直径<4 cm的34例,>4 cm的43例;肿瘤低分化的38例,高分化的39例。

1.2 试剂 CENPE的抗体为兔抗人单克隆抗体,购自英国abcam公司(ab133583, abcam, Cambridge),免疫组化稀释浓度为1:100,免疫印迹稀释浓度为1:1 000;β-肌动蛋白(β-actin)抗体(免疫印迹1:1 000稀释, ab8226, abcam)。免疫组化二步法检测试剂盒购于北京中衫金桥生物技术有限公司(PV-6001), DAB显色试剂盒购自北京中衫金桥生物技术有限公司(ZLI-9018); CCK-8试剂盒购自北京碧云天公司。

1.3 方法及免疫组化染色结果的评分标准 ccRCC的肿瘤及癌旁组织进行福尔马林固定,常规取材,

石蜡包埋,将蜡块行切片及免疫组化染色,切片二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,行二步法行免疫组化染色,抗体1:100稀释, CENPE抗体37℃孵育2 h, DAB染色,苏木素复染。切片于蔡司显微镜下观察拍照。CENPE染色评分标准:阳性细胞数<15%为0分;阳性细胞15%~50%记1分;阳性细胞50%~80%记2分;阳性细胞>80%则为3分;同时对阳性着色细胞的染色强度进行评分:阴性表达记0分,弱表达记1分,中等2分,强阳性记为3分;最终计分结果为阳性细胞比例分数加染色强度分数,范围为0~6分。分数0~2分为CENPE低表达,3~6分为CENPE高表达。

1.4 细胞培养及转染 HTB-47和CRL-1932细胞购自美国模式菌种收集中心(ATCC)。shRNA质粒购自Addgene。HTB-47和CRL-1932细胞均于含有10%胎牛血清(FBS,美国Gibco公司)的RPMI-1640培养基(美国Gibco公司)中进行培养。细胞转染采用脂质体转染法进行,分别加入质粒或Lipo 2000和1.5 mL Opti-MEM培养基,室温孵育5 min。随后两者混合后孵育20 min,加入细胞培养基中,6 h后换液,24 h后进行功能实验。CENPE shRNA靶向序列:AAGAATCACTTGGAGAACTGCC。

1.5 Western印迹实验 利用RIPA细胞裂解液提取细胞总蛋白,使用BCA法测量蛋白浓度。总蛋白进行8%SDS-PAGE电泳,随后转膜至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉进行室温固定2 h,室温条件下一抗孵育2 h,随后Tris-HCL缓冲液(TBST)洗脱未结合抗体,共洗5次,每次5 min;随后室温山羊抗兔二抗(1:1 000)孵育45 min,随后TBST洗脱未结合抗体,共洗5次,每次5 min,加入ECL增强显影底物后在曝光仪中检测信号,所得信号使用Image J 7.0软件进行分析。

1.6 实时定量荧光PCR 通过TRIzol试剂提取细胞内总RNA,并进行两步法反转录,条件为42℃,1 h,cDNA使用SYBR荧光探针进行实时定量聚合酶链式反应(PCR),并使用GAPDH作为内参,检测相关mRNA的表达水平。实验结果采用2^{-ΔΔCT}法进行定量。CENPE正向:5'-CCAAGGCTGTGGCAAACG-3',反向:5'-GGATTAGGGATTCCGGTGGTAC-3'。GAPDH:正向:5'-GAGTCAACGGATTTGGTCTCGT-3',反向:5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'。

1.7 CCK-8实验 细胞铺于96孔板中,进行质粒转染处理后于48 h时间点加入20 μL的CCK-8试剂(购自北京碧云天公司),37℃培养箱孵育4 h,随后在450 nm波长下使用多功能酶标仪检测其吸光度值。每组实验设3个重复,统计结果。

1.8 集落形成实验 细胞进行质粒转染处理后于48 h时间点铺于6孔板中,每孔800个细胞,37°C培养箱培养14 d,随后使用0.1%的结晶紫染色30 min,使用4%多聚甲醛室温固定20 min,流水缓慢冲洗,随后奥林巴斯荧光显微镜下观察拍照,使用Image J 7.0软件分析图片。

1.9 统计学处理 所有细胞实验重复3次。使用Graphpad 7.0软件(Graphpad software,LaJolla,CA,USA)进行数据分析。采用Spearman相关分析。细胞实验中,利用Mann-Whitney U检验进行两组之间的比较,正态分布的计量数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

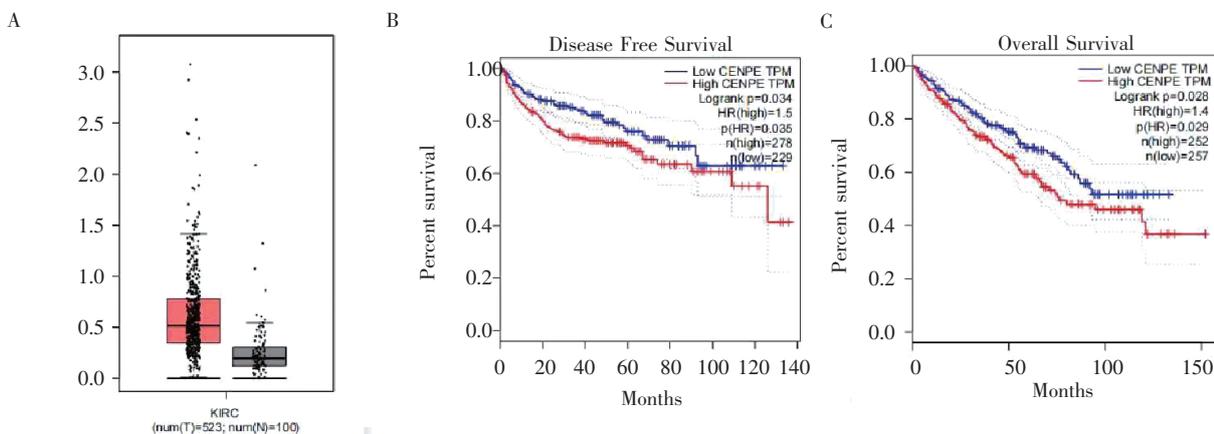
2.1 生信分析揭示CENPE在ccRCC组织的表达及与预后的关系 通过GPEIA数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php?gene=CENPE>)分析CENPE

的mRNA水平在523例ccRCC癌组织及100例癌旁组织中的差异,发现在癌组织中CENPE的mRNA显著上调(图1A, $P<0.05$)。生物信息学分析结果证实,ccRCC患者癌组织CENPE的表达与患者无病生存期与总生存期显著相关(图1B, $P=0.035,0.029$)。

2.2 CENPE蛋白在ccRCC患者肿瘤组织的表达及与患者临床病理特征的相关性 免疫组织化学染色检测结果发现,相对于癌旁组织,CENPE蛋白在ccRCC癌组织中呈显著高表达(图2)。

CENPE的表达水平与ccRCC患者的肿瘤直径($P=0.021$)显著相关,而与其他临床特征如年龄($P=0.429$)、性别($P=0.670$)、肿瘤分化($P=0.575$)等无显著相关性(表1)。

2.3 下调CENPE蛋白抑制ccRCC细胞增殖 与对照组shRNA质粒相比,转染CENPE的shRNA质粒的HTB-47和CRL-1932细胞24 h后,CENPE的



注:A:GPEIA数据库分析CENPE的mRNA在肾透明细胞癌组织及正常组织中的表达差异;B:表达水平与ccRCC患者无病生存期的关系;C:表达水平与ccRCC患者总生存期的关系;ccRCC:肾透明细胞癌

图1 CENPE mRNA水平在ccRCC中显著增加并与患者不良预后相关

Fig 1 mRNA levels of CENPE were significantly increased in ccRCC and were significantly associated with poor prognosis in patients

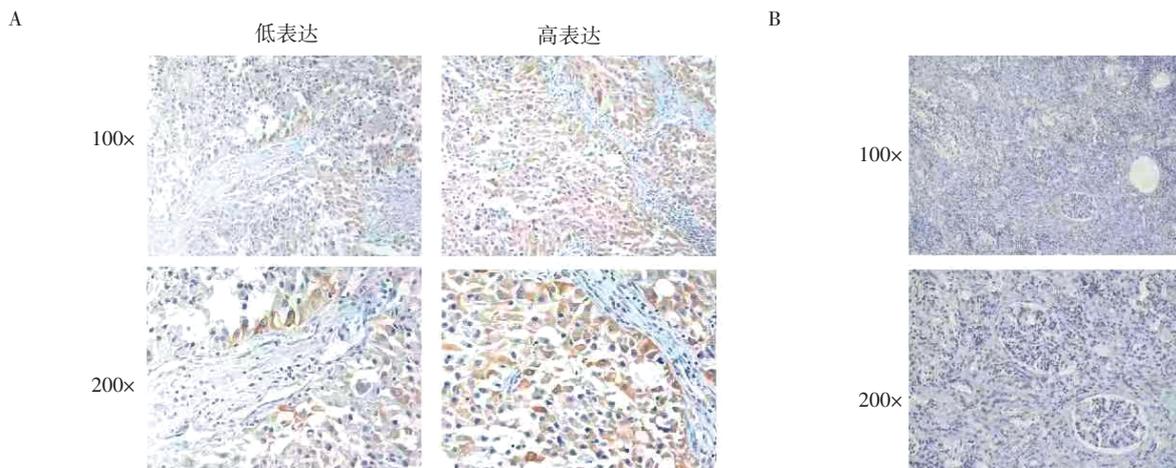


图2 免疫组化检测CENPE在肾透明细胞癌组织及对应癌旁组织中的表达水平

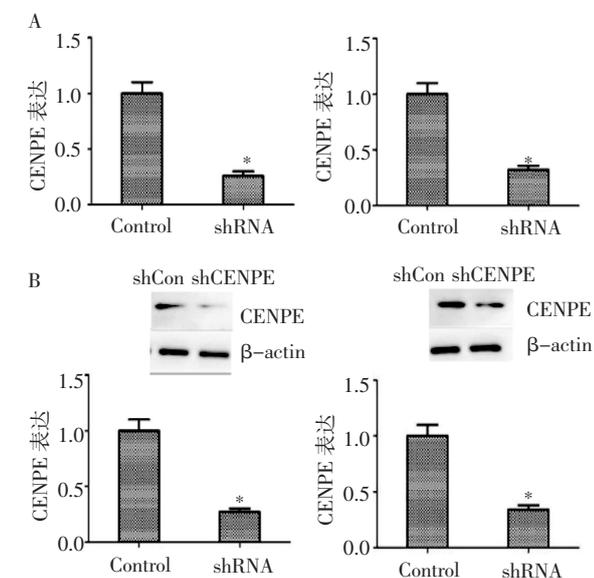
Fig 2 Immunohistochemical results revealed the expression levels of CENPE in ccRCC tissue and para-carcinoma tissue

mRNA 水平及蛋白水平均显著下降(图 3A, $P=0.013\ 8$ 、 $0.010\ 9$;图 3B, $P=0.010\ 9$ 、 $0.014\ 4$)。

表 1 77 例肾透明细胞癌 CENPE 表达与临床病理特征的关系

Tab1 Relationships of CENPE and clinicopathological characteristics in 77 patients with ccRCC

临床病理特征	总例数 (n=77)	CENPE 表达水平		χ^2	P
		低(n=34)	高(n=43)		
年龄(岁)				0.624	0.429
< 55	46	22	24		
≥55	31	12	19		
性别				0.219	0.640
男	43	20	23		
女	34	14	20		
肿瘤分化				0.314	0.575
低	38	18	20		
高	39	16	23		
肿瘤直径				5.312	0.021
< 4 cm	34	20	14		
≥4 cm	43	14	29		

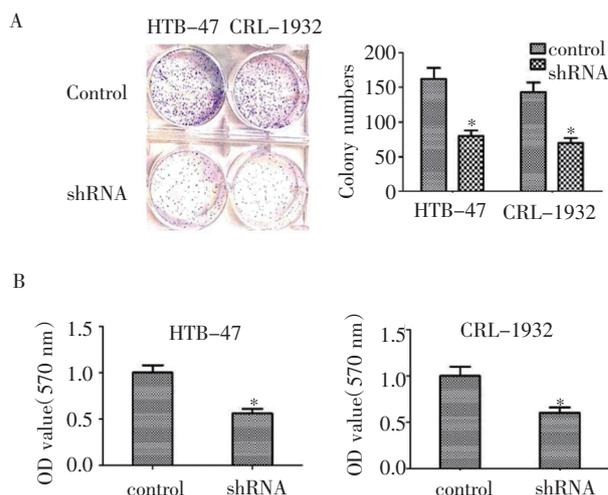


注:A:qPCR 实验证实 CENPE 的 shRNA 质粒转染后 24 h,CENPE 的 mRNA 水平在 HTB-47 和 CRL-1932 细胞中显著降低;B:免疫印迹实验显示 CENPE 的 shRNA 质粒转染后 24 h,CENPE 的蛋白表达在 HTB-47 和 CRL-1932 细胞中显著降低; * $P<0.05$

图 3 CENPE 的 shRNA 在肾透明细胞癌细胞系 HTB-47 和 CRL-1932 中的沉默效率

Fig 3 shRNA silencing efficiency of CENPE in ccRCC cell lines HTB-47and CRL-1932

集落形成实验结果表明,在 HTB-47 和 CRL-1932 细胞中,CENPE 蛋白的下调会导致集落数量下降(图 4A, $P=0.013\ 5$ 、 $0.015\ 4$)。CCK-8 实验结果表明,HTB-47 和 CRL-1932 细胞中,CENPE 蛋白敲低后导致 450 nm 处吸光度值显著下调(图 4B, $P=0.009\ 1$ 、 $0.013\ 3$)。



注:A:集落形成实验检测 CENPE 下调后 HTB-47 和 CRL-1932 细胞集落形成;B:CCK-8 实验检测 CENPE 下调后培养 48 h, HTB-47 和 CRL-1932 细胞在 450 nm 的吸光度值; * $P<0.05$

图 4 CENPE 下调抑制肾透明细胞癌细胞增殖

Fig 4 CENPE down-regulation inhibited the proliferation of ccRCC cell

3 讨论

RCC 是一种常见的泌尿系统恶性肿瘤,在我国居第 2 位,仅次于膀胱癌,过去近 30 年 RCC 发病率在逐年上升^[12]。而 ccRCC 是其中主要的组织学类型^[3]。目前 RCC 的治疗仍以根治性手术为主,但术后复发有一定比例,且放、化疗效果不佳^[3]。研究显示,肿瘤分子靶向治疗的出现,为解决这一问题提供了可能^[4]。PBRM1、BAP1 和 SETD2 是其中常见的高频突变基因,这些突变基因的检出往往与不同的预后和临床疗效相关^[13]。多种靶向治疗药物,如舒尼替尼、培唑帕尼、卡博替尼等,在治疗晚期 ccRCC 中发挥一定的作用。然而为了进一步提高生存率,仍需开发更有效的治疗靶点。本研究发现并证实了 CENPE 在 ccRCC 组织中的高表达,并与患者的不良预后密切相关,因此可作为一个潜在的治疗靶点。

在本研究中,发现 CENPE 在 ccRCC 中的异常表达,表明其与 ccRCC 的进展密切相关。进一步利用两种 ccRCC 的细胞系开展体外实验。通过 CENPE 的 shRNA 质粒转染的手段,下调 CENPE,并通过集落形成实验和 CCK-8 实验检测对细胞增殖的影响,结果表明 CENPE 的下调显著抑制 ccRCC 细胞增殖。因此,本研究初步揭示了 CENPE 在 ccRCC 中的功能。CENPE 也可作为一种新的生物标志物和视网膜母细胞瘤的潜在治疗靶点^[7]。另有研究表明,CENPE 抑制导致髓母细胞瘤细胞有丝分裂突变和 DNA 损伤^[9]。CENPE 的表达也与骨肉瘤和肺癌的进展有关^[10]。这些结果均表明 CENPE 可作为肿瘤的潜在治疗靶点。

染色体的非整倍性与有丝分裂的异常往往会导致肿瘤的发生。CENPE 基因敲除小鼠的肿瘤发生概率显著增加^[15]。而 CENPE 定位在着丝粒上,与染色体功能和有丝分裂进程均密切相关^[15]。有研究证实,CENPE 也参与了有丝分裂后期着丝粒对于微管的捕捉。CENPE 蛋白是一种重要的着丝粒定位的蛋白,其主要存在于着丝粒外部,是有丝分裂中期所必需的蛋白。多项研究证实 CENPE 的表达与定位均受到严格控制。也有研究证实,CENPE 在纺锤体检查点组装与行使功能的机制中至关重要^[16]。CENPF 在着丝粒上的定位受到多种因素的影响,如受到着丝粒组装的上游蛋白的影响。CENPE 主要通过自身结构改变影响 BubR1 蛋白的功能,因而影响纺锤体检查点^[17]。CENPE 蛋白在细胞的有丝分裂 S 期高表达,而在细胞间期基本不表达,进一步揭示其在有丝分裂与肿瘤进展中的重要作用^[18]。然而,CENPE 对于肿瘤,特别是 ccRCC 进展的影响及分子机制尚需进一步研究。

综上,本研究首次发现 CENPE 蛋白在 ccRCC 中显著高表达,并与患者的无病生存期与总生存期显著相关。CENPE 表达水平与 ccRCC 患者的肿瘤直径密切相关,且下调 CENPE 能够抑制 ccRCC 的细胞增殖。因此证实 CENPE 对 ccRCC 进展的影响,表明其可作为 ccRCC 治疗的潜在靶点。

参考文献:

- [1] LIU Z, FAN M, HOU J, et al. Serine hydroxymethyltransferase 2 knockdown induces apoptosis in ccRCC by causing lysosomal membrane permeabilization via metabolic reprogramming[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(2): 144.
- [2] STONE L. Metabolic flexibility in ccRCC[J]. *Nat Rev Urol*, 2023, 20(3): 130.
- [3] CHEN J Y, YIU W H, TANG P M, et al. New insights into fibrotic signaling in renal cell carcinoma[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1056964.
- [4] AMENDOLARE A, MARZANO F, PETRUZZELLA V, et al. The underestimated role of the p53 pathway in renal cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(23): 5733.
- [5] YOSHIZAWA K, MATSURA A, SHIMADA M, et al. Tetraploidy-linked sensitization to CENP-E inhibition in human cells[J]. *Mol Oncol*, 2023, 17(6): 1148-1166.
- [6] CILLUFFO D, CHIAVETTA R F, BIVONA S, et al. Transcriptomic changes following partial depletion of CENP-E in normal human fibroblasts[J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(9): 1322.
- [7] EL-ARABEY A A, SALAMA S A, ABD-ALLAH A R. CENP-E as a target for cancer therapy: where are we now?[J]. *Life Sci*, 2018, 208: 192-200.
- [8] WENG M T, LEE J H, WEI S C, et al. Evolutionarily conserved protein ERH controls CENP-E mRNA splicing and is required for the survival of KRAS mutant cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(52): E3659-E3667.
- [9] CHUNG V, HEATH EI, SCHELMAN W R, et al. First-time-in-human study of GSK923295, a novel antimetabolic inhibitor of centromere-associated protein E (CENP-E), in patients with refractory cancer[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69(3): 733-741.
- [10] WANG F, ZHAO Q, LIU W, et al. CENPE, PRC1, TTK, and PLK4 may play crucial roles in the osteosarcoma progression[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19: 1533033820973278.
- [11] KUNG P P, MARTINEZ R, ZHU Z, et al. Chemogenetic evaluation of the mitotic kinesin CENP-E reveals a critical role in triple-negative breast cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(8): 2104-2115.
- [12] HANNAN R, MCLAUGHLIN M F, POP L M, et al. Phase 2 trial of stereotactic ablative radiotherapy for patients with primary renal cancer[J]. *Eur Urol*, 2023, 84(3): 275-286.
- [13] GU D, DONG K, JIANG A, et al. PBRM1 deficiency sensitizes renal cancer cells to DNMT inhibitor 5-fluoro-2'-deoxycytidine[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 870229.
- [14] YU B, CHEN L, ZHANG W, et al. TOP2A and CENPF are synergistic master regulators activated in cervical cancer[J]. *BMC Med Genomics*, 2020, 13(1): 145.
- [15] LI J, DIAO H, GUAN X, et al. Kinesin family member C1 (KIFC1) regulated by centrosome protein E (CENPE) promotes proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e927869.
- [16] SUBRAMONIAN D, CHEN T A, PAOLINI N, et al. Poly-SUMO-2/3 chain modification of Nuf2 facilitates CENP-E kinetochore localization and chromosome congression during mitosis[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(9): 855-873.
- [17] VITRE B, GUDIMCHUK N, BORDA R, et al. Kinetochore-microtubule attachment throughout mitosis potentiated by the elongated stalk of the kinetochore kinesin CENP-E[J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(15): 2272-2281.
- [18] HUANG Y, WANG W, YAO P, et al. CENP-E kinesin interacts with SKAP protein to orchestrate accurate chromosome segregation in mitosis[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(2): 1500-1509.
- [17] TAURIELLO D V F, SANCHO E, BATLLE E. Overcoming TGF β -mediated immune evasion in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(1): 25-44.
- [18] BATLLE E, MASSAGUÉ J, et al. Transforming growth factor- β signaling in immunity and cancer[J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 924-940.
- [19] BAE J S, JEON Y, KIM S M, et al. Depletion of MOB1A/B causes intestinal epithelial degeneration by suppressing Wnt activity and activating BMP/TGF- β signaling[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11): 1083-1096.
- [20] YANG P, ZHANG D, WANG T, et al. CAF-derived exosomal WEE2-AS1 facilitates colorectal cancer progression via promoting degradation of MOB1A to inhibit the Hippo pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(9): 796-810.

(2023-04-02 收稿)

(上接第 587 页)

(2023-07-06 收稿)