

# Effect of the NBS 1 gene on gene expression in gastric cancer

Xiangxin Meng

Dezhou City Third People's Hospital, Dezhou, Shandong, 253000, China

## Abstract

The dynamic changes of early response genes in gastric cancer (Gastric cancer, GC) were investigated by reducing the expression of NBS 1 in HGC-27 cell lines. Total mRNA was extracted from cell line samples before, 24 hours after, and 48 hours after HGC-27 cell line inhibition. The expression of 48 gastric cancer related genes was monitored using the Fluidigm Biomark platform and functional pathways were analyzed. Compared with pre-inhibition, 12 genes were up-regulated and 6 genes were downregulated after 24h; 16 genes were up-regulated and 8 genes were downregulated after 48h; 10 genes were differentially expressed at both time points. These genes mainly regulate cell migration and angiogenesis, and the functional pathways mainly involved in the regulation include cancer pathway, gastric cancer and MAPK signaling pathway. Inhibition of NBS 1 expression may lead to a reduced rate of cell proliferation and eventually lead to apoptosis, and overexpression of NBS 1 may promote cancer cell proliferation.

## Keywords

gastric cancer; NBS 1; HGC-27 cell line; functional pathways; cell cycle

## NBS1 基因对胃癌基因表达的影响

孟祥鑫

德州市第三人民医院, 中国·山东 德州 253000

## 摘要

通过降低NBS1在HGC-27细胞株中的表达, 研究胃癌(Gastric cancer, GC)早期应答基因的动态变化。分别提取HGC-27细胞株抑制前、抑制24小时后和48小时后细胞株样本的总mRNA。利用Fluidigm Biomark平台对48种胃癌相关基因表达进行监测, 并进行功能通路进行分析。与抑制前相比, 24h后细胞株中12个基因表达量上调, 6个基因表达下调; 48h后, 16个基因表达上调, 8个基因表达下调; 两个时间点同时差异表达的基因有10个。这些基因主要调控细胞迁移及血管生成等功能, 主要参与调控的功能通路包括癌症通路、胃癌和MAPK信号通路等。抑制NBS1的表达可能会导致细胞增殖速率降低最终导致细胞凋亡, NBS1的过表达可能会促进癌细胞增殖。

## 关键词

胃癌; NBS1; HGC-27细胞株; 功能通路; 细胞周期

## 1 引言

NBS1 基因于 1998 年发现, 该基因与 DNA 双链修复相关。NBS1 基因编码的蛋白可与其他蛋白组成包括 MRE11/Rad50 在内的多种蛋白复合物, 在 DNA 双链断裂修复 (DSB)、细胞周期调控等方面发挥重要作用。内外源性因素如代谢副产物、电离辐射和复制过程的错误等会导致人体细胞 DNA 损伤, DNA 损伤修复不及时会导致异常 DNA 积累最终导致肿瘤、衰老等情况的发生<sup>[1]</sup>。NBS1 表达受到抑制后会影响到 DNA 损伤修复功能, 在一定程度上促进肿瘤的发生。研究表明, NBS1 基因缺失会导致胃癌、结直肠癌及乳腺癌等多种恶性肿瘤的发生率增加, 有研究发现, 部

分胃癌组织中 NBS1 基因表达量高于正常胃组织, 同时发现 NBS1 表达量与胃癌的恶性程度成正相关, 但其具体作用机制仍然未知。本研究通过抑制 HGC-27 细胞株中的 NBS1 基因表达, 取得分别取抑制前、抑制 24h 后和抑制 48h 后的 HGC-27 细胞, 基于高通量测序技术观察 NBS1 基因沉默后的不同时间点 HGC-27 细胞株中全部 mRNA 变化情况, 并进一步探究其在胃癌疾病进展中发挥的作用。

## 2 材料与方法

### 2.1 样本收集和保存

研究采购武汉普诺赛生命科技有限公司 (Centre for Cell Culture, Chinese Academy of Science, Shanghai, China) 培养的人源胃癌细胞系 HGC-27。用 RPMI-1640 + 10%FBS 培养基培养 HGC-27 细胞, 按照标准条件来培养 HGC-27 细胞, 当细胞覆盖率达到 80%~90% 时, 用 0.25%

【作者简介】孟祥鑫 (1978-), 男, 中国山东德州人, 本科, 副主任医师, 从事普通外科学研究。

的 TrypLE™ 分解酶处理细胞，根据细胞的生长情况选择传代比例进行传代。

## 2.2 样本 DNA 提取

在进行细胞株 mRNA 提取前，利用质粒转染将 siRNA 加入细胞株中从而沉默 NBS1 基因。从上海吉玛基因购买 NBS1 siRNA 及其阴性对照，以冻干粉的形式进行低温运输。细胞株去除培养基后使用碳酸盐缓冲盐水清洗 3 次，后加入 0.5ml RIPA 裂解液裂解细胞，后转移至 DEPC 处理的离心管中颠倒混匀。后续逐步加入 100ul 预冷氯仿、0.5ml 异丙醇、650ul 75% 乙醇，每次加液后均按照操作规范在特定温度进行离心及移液操作，后按照上述步骤重复一次，加入适量 56°C 水浴 DEPC 充分溶解 RNA 后低温保存备用。

## 2.3 高通量测序

利用 Fluidigm Biomark 高通量测序平台对 46 种胃癌相关基因进行检测，其中包含在 GC 中常见的高低表达基因；在胃癌发生发展过程中相关信号通路的核心基因；与癌症进程相关通路如血管生成、细胞迁移、DNA 复制、上皮细胞转化和细胞周期相关基因。

## 2.4 生物信息学分析

利用 Fluidigm Real-Time PCR Analysis 软件对原始测序数据处理后进行后续分析。以  $\beta$ -Actin 作为内参基因对 3 个时间点的基因表达数据进行标准化，以 FC 值 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) 为变化倍数，获取抑制 NBS1 基因后两个时间点的差异表达基因。采用 cluster 3.0 制作聚类图，对基因的变化趋势进行描述分析。根据两个时间点共有的上下调基因进行功能富集分析，基于 R 包 clusterProfiler 进行以基因本体论 (gene

ontology, GO) 和 KEGG pathway 功能通路为背景基因集的功能富集分析，获取 NBS1 抑制后发生变化的功能通路 [4][5]。

## 3 结果

### 3.1 差异表达分析

本研究提取经 siRNA 抑制 NBS1 表达的 24h 和 48h 两个不同时间点细胞的总 mRNA 后，对基因进行定量检测，其中 RPLP0 和 HPRT1 作为参考基因对表达数据进行标准化。其余 46 个基因均与胃癌相关。这些基因参与调控血管生成、细胞迁移、DNA 复制、上皮细胞转化和细胞周期等功能。

对上述除去 RPLP0 和 HPRT1 其余 46 个基因进行差异分析，其中 14 个基因在不同时间点表达无变化，剩余的 32 个基因至少在 1 个时间点差异表达 ( $P_{adj} < 0.05$  &  $|\log FC| > 1$ )。如图 1 所示，与对照组相比，在 NBS1 表达抑制 24h 后 12 个基因表达上调，6 个基因表达下调；NBS1 表达抑制 48h 后 16 个基因表达上调，8 个基因表达下调。绘制热图展示 3 个时间点的差异基因的表达，对两个时间点的差异基因取交集，有 10 个基因在两个时间点都差异表达，上述基因可能受 NBS1 调控，从而影响胃癌的发生和发展。

### 3.2 富集分析

对上述两个时间点共同出现的差异表达基因进行以 GO 通路为背景基因集进行功能富集分析，将 P 值小于 0.05 的功能通路认定为差异基因参与的功能通路，在富集的结果中主要针对 GO\_BP 进行分析。结果显示上述差异基因不仅参与调控基本的细胞生命活动，在抑制 NBS1 基因表达后，HGC-27 细胞株内差异表达基因主要调控血管生成、细胞迁移和分裂等功能 (表 1)。

表 1 差异基因 GO 功能富集结果

Go Term	Description	P.value	Genes
GO:0016477	细胞迁移	1.52E-04	PTEN, FAT1, CDH13, MET
GO:0008284	细胞群增殖的正向调控	8.52E-04	TGFB1, PTEN, IGF2, TGFB2
GO:0045944	RNA 聚合酶 II 的转录正向调控	9.29E-04	TGFB1, IGF2, E2F1, CDH13, MET
GO:0070723	对胆固醇的响应	4.05E-03	TGFB1, TGFB2
GO:0044331	钙粘蛋白介导的细胞间粘附	1.57E-02	FAT1, CDH13
GO:0051781	细胞分裂的正向调控	1.97E-02	TGFB1, IGF2
GO:0001570	血管生成	2.61E-02	TGFB1, TGFB2
GO:0060070	典型 Wnt 信号通路	4.45E-02	TGFB1, PTEN
GO:0030334	细胞迁移的调控	4.61E-02	TGFB1, MET
GO:0043410	MAPK 级联反应的正向调控	7.37E-02	TGFB1, IGF2

对上述两个时间点共同出现的差异表达基因进行以 KEGG 通路为背景基因集进行功能富集分析，将 P 值小于 0.05 的功能通路认定为差异基因参与的功能通路。结果显示，差异基因主要参与调控的功能通路包括癌症通路、胃癌、MAPK 以及 PI3K-Akt 等信号通路，详细功能注释结果见表 2。

## 4 结论

NBS1 基因可能对 PTEN、IGF2、E2F1、NTRK1、HER2、FAT1 和 MET 具有抑制作用；NBS1 基因可能对 CDH13、TGFB1 和 TGFB2 具有协同作用；在 HGC-27 细胞株中抑制 NBS1 的表达可以对细胞周期产生影响使其停滞在 S 期。

表 2 差异基因 KEGG 功能富集结果

Pathway	Term	P.value	Genes
hsa05225	肝细胞癌	1.47E-08	TGFB1, PTEN, IGF2, E2F1, MET, TGFB2
hsa05225	癌症途径	4.68E-08	NTRK1, TGFB1, PTEN, IGF2, E2F1, MET, TGFB2
hsa04010	MAPK 信号通路	1.85E-05	NTRK1, TGFB1, IGF2, MET, TGFB2
hsa05226	胃癌	9.23E-05	TGFB1, E2F1, MET, TGFB2
hsa04218	细胞衰老	1.06E-04	TGFB1, PTEN, E2F1, TGFB2
hsa05230	癌症中的中心碳代谢	9.34E-04	NTRK1, PTEN, MET
hsa05218	黑色素瘤	9.88E-04	PTEN, E2F1, MET
hsa05220	慢性髓性白血病	1.10E-03	TGFB1, E2F1, TGFB2
hsa04151	PI3K-Akt 信号通路	1.24E-03	NTRK1, PTEN, IGF2, MET

## 5 讨论

本研究中我们对 HGC-27 细胞株分别使用不同浓度的 NBS1-siRNA (100nM、50nM、20nM) 抑制 NBS1 的表达。检测 NBS1 基因在转染后两个时间点上的表达水平 (24h, 48h), 并根据 NBS1 的表达量, 对浓度和抑制效果最佳的时间点进行确认。研究表明, NBS1 的表达水平 ( $P < 0.05$ ) 在使用 NBS1-SiRNA 转染 48h 后可显著降低。进一步研究 NBS1 在胃癌中的作用机理, 对转染后的 HGC-27 细胞株进行 MTT 实验和蛋白质印迹实验, 观察转染前后细胞株的增殖凋亡及具体蛋白的表达。

与对照组相比, 转染后 HGC-27 细胞的植株活力明显降低而凋亡增加 ( $P < 0.05$ )。实验结果表明, 抑制 NBS1 的表达能够抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 同时, 细胞周期分析实验的结果显示, HGC-27 细胞株在抑制 NBS1 表达后 S 期的比例上升。我们推测, 抑制 NBS1 的表达促使细胞在 S 期出现阻滞, 从而起到抑制细胞继续增殖的作用。因此可以将 NBS1 归类为一种“促癌基因”, 但在之前的研究中表明 NBS1 修复 DNA 断裂、抑制细胞癌变<sup>[2]</sup>。

由于 TP53 突变导致其表达量异常增加, 且突变体 TP53 蛋白比原 TP53 蛋白的半衰期更长, 因此早期 TP53 被认定为原癌基因。目前已有共识认定 TP53 作为一种抑癌基因, 其表达异常被认为是肿瘤形成的重要标志。

因此, 假设肿瘤细胞中有大量的突变 NBS1 蛋白, 这些突变蛋白的功能处于缺失状态, 导致肿瘤细胞中 DNA 损伤难以修复<sup>[3]</sup>。有研究表明 NBS1 基因拥有多种突变方式, 如 NBS1 基因第 657 位点的碱基缺失 (即 657del5) 会导致蛋白产物变成 26KD 和 70KD 的两个截短蛋白, 其杂合子突变往往可以导致许多肿瘤的发生。另一个常见的突变为 NBS1 的 511 位点的腺苷酸突变成鸟苷酸 (A > G), 导致第 171 位的异亮氨酸变成缬氨酸<sup>[4]</sup>, 最终导致 NBS1 蛋白无法与损伤 DNA 相结合导致无法行使其正常功能。研究者首次于儿童急性淋巴细胞性白血病患者中发现该突变。

研究表明 NBS1 在许多肿瘤中高表达: Dennis Shin-Shian Hsu 等人的研究对 100 名头颈部鳞状细胞癌进行基因检测, 结果显示有一半患者的 NBS1 蛋白高表达。同时

NBS1 的高表达导致 Snail 蛋白水平提升极大促进癌细胞的上皮间质细胞转化, 最终促进了肿瘤细胞转移这一过程。此外, 在 GC 患者中的肿瘤组织也观察到类似的情况, NBS1 表达水平的高低与肿瘤恶性程度高度相关<sup>[5]</sup>。

此外研究发现 siRNA 抑制突变 NBS1 的表达, 干扰部分功能通路从而促进细胞的癌变。有研究发现 NBS1 蛋白受到抑制后使得核内复合体 MRN 和 ATM 的激活受到抑制。其中 ATM 的活性降低导致其靶蛋白磷酸化水平降低, 使得 DNA 修复、细胞周期监控点和细胞凋亡信号传导通路无法运转, 最终导致肿瘤的发生发展。NBS1 作为抑癌基因其转录蛋白参与多种生物行为, 作用机制复杂需要进一步研究。

为了探究 NBS1 表达抑制后对下游基因和功能通路的影响, 我们通过 100nM 的 siRNA 转染细胞抑制 NBS1 的表达, 并于 24h 和 48h 两个时间点分别提取细胞株总 mRNA。分别对两个时间点与对照组进行差异分析, 获取在两个时间点都差异表达的基因并进行功能富集分析。结果显示上述差异基因参与胃癌相关通路如 MAPK 和 PI3K-Akt 信号通路、血管生成和细胞迁移等通路的调节。

## 参考文献

- 1 王岩, 黄坚. DNA双链修复相关基因NBS1的分子改变与肿瘤发生 [J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(09): 2127-2130.
- 2 LIU W, ZHENG M, ZHANG R, et al. RNF126-Mediated MRE11 Ubiquitination Activates the DNA Damage Response and Confers Resistance of Triple-Negative Breast Cancer to Radiotherapy [J]. Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany), 2023, 10(5): e2203884.
- 3 DASIKA G K, LIN S C, ZHAO S, et al. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis [J]. Oncogene, 1999, 18(55): 7883-7899.
- 4 BUSLOV K G, IYEVLEVA A G, CHEKMARIOVA E V, et al. NBS1 657del5 mutation may contribute only to a limited fraction of breast cancer cases in Russia [J]. International journal of cancer, 2005, 114(4): 585-589.
- 5 WANG Y, LI M, LONG J, et al. Clinical significance of increased expression of Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in human primary liver cancer [J]. Hepatology international, 2014, 8(2): 250-259.