

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.10.009

NARS2 在卵巢癌组织中的表达水平及生物学意义

杨帆,王宇波,张小琦,赵梅平,朱梅[△]

陕西省汉市中心医院产科,陕西汉中 723000

摘要:目的 研究线粒体转运核糖核酸合成酶 2(NARS2)在肿瘤组织中的表达水平及生物学意义。方法 采用免疫组织化学技术比较 244 例卵巢癌及 9 例正常卵巢组织中 NARS2 的表达水平,利用 Kaplan-Meier 模型分析其与患者生存情况的相关性,并进一步利用 Seahorse 细胞能量代谢分析仪检测 NARS2 过表达卵巢癌细胞线粒体呼吸功能,采用流式细胞术和蛋白质免疫印迹法检测线粒体相关凋亡。结果 NARS2 在卵巢癌组织中的表达水平明显高于正常卵巢组织,且卵巢癌组织中 NARS2 高表达的患者预后明显差于低表达组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。高表达 NARS2 可明显促进线粒体的呼吸功能、电子传递链复合体 I 及 IV 的活性,并且明显提高卵巢癌细胞的凋亡抵抗能力。结论 NARS2 有望成为一种新型卵巢癌预后评估标志物及药物治疗靶点。

关键词:卵巢癌; 线粒体转运核糖核酸合成酶 2; 预后; 线粒体呼吸功能; 凋亡抵抗

中图法分类号:R737.31

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)10-1377-04

The expression level and biological significance of NARS2 in human ovarian cancer

YANG Fan, WANG Yubo, ZHANG Xiaoqi, ZHAO Meiping, ZHU Mei[△]

Department of Obstetric, Hanzhong Central Hospital of Shaanxi Province,

Hanzhong, Shaanxi 723000, China

Abstract: **Objective** To study the expression level and biological significance of mitochondrial transfer-RNA synthetase (NARS2) in tumor tissue. **Methods** The expression level of NARS2 in 244 ovarian cancer and 9 normal ovarian tissues was compared by immunohistochemistry, and the correlation between NARS2 expression and survival was analyzed by Kaplan-Meier model. Furthermore, the mitochondrial respiratory function of NARS2 overexpression ovarian cancer cells was detected by Seahorse cell energy metabolism analyzer, and the mitochondrial apoptosis was detected by flow cytometry and Western blot. **Results** The expression level of NARS2 was significantly higher in ovarian cancer tissues than that in normal ovary tissues, the prognosis of patients with higher expression level of NARS2 in ovarian cancer tissues was significantly worse than that of patients with lower level, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Moreover, overexpression of NARS2 significantly promoted mitochondrial respiratory function and the activity of complex I and IV on electron transport chain, and enhanced the ability of apoptosis resistance of ovarian cancer cells. **Conclusion** NARS2 is expected to be a new prognostic marker and drug target for ovarian cancer.

Key words: ovarian cancer; mitochondrial transferRNA synthetase; prognosis; mitochondrial respiration; apoptosis resistant

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,由于其缺乏可靠的早期筛查诊断方法,确诊时多为晚期^[1]。因此,卵巢癌在妇科肿瘤中病死率最高,晚期患者术后 5 年生存率低于 30%。现阶段治疗卵巢癌以外科手术切除病灶为主,辅以紫杉醇类药物及铂类药物化疗、放疗、靶向药物等治疗^[2]。然而,即使化疗药物初期效果明显,但大部分患者仍会出现耐药、复发等情况^[3]。由于线粒体可独立合成电子传递链复合体中的 13 种蛋白,进而与细胞核编码的蛋白共同完成线

粒体相关的多种生命活动,因此,线粒体又是细胞内唯一一种半自主细胞器^[4]。与真核细胞质中翻译体系类似,线粒体基因的翻译系统也包括信使 RNA (mRNA)、转运核糖核酸(tRNA)、核糖体及翻译所需的起始因子等^[5]。氨酰-tRNA 合成酶是生命进化过程中最早出现的一类蛋白质,主要负责将氨基酸结合到其对应的 tRNA 上,进而完成蛋白质的合成^[6]。放疗可增加线粒体翻译,进而增强线粒体的呼吸能力和线粒体三磷酸腺苷(ATP)的产生,从而更有效地修复

作者简介:杨帆,女,主治医师,主要从事产科急危重症、围生医学及妇科内分泌疾病方面的研究。[△] 通信作者,E-mail:yangfan_811_2006@126.com。

本文引用格式:杨帆,王宇波,张小琦,等. NARS2 在卵巢癌组织中的表达水平及生物学意义[J]. 检验医学与临床,2021,18(10):1377-1380.

辐射诱导的 DNA 损伤^[7]。因此,抑制线粒体翻译系统可能是一种有效抑制肿瘤恶性进展的新手段^[8]。本研究以天冬酰胺基-线粒体转运核糖核酸合成酶 2 (NARS2) 为代表,研究其在卵巢癌组织中的表达及生物学意义,进而为开发卵巢癌的新型预后生物标志物及潜在的治疗靶点提供理论线索。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2008—2017 年卵巢癌患者组织标本 244 例,皆为术中取得后立即置于液氮保存。标本纳入标准:(1)初治患者均行手术治疗;(2)组织病理学检查为卵巢癌;(3)病理切片通过 2 位独立的病理医师重新评估。此外,本研究还选取了本科室实验室保存的正常卵巢上皮组织标本 9 例。所有研究对象均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 采用 EnVision™ (K5007, DAKO)免疫组织化学试剂盒开展试验,具体步骤如下:将上述卵巢癌及正常卵巢组织切片,60℃ 烤片后经脱蜡水化,再行柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲液抗原修复,利用 3% H₂O₂ 失活内源过氧化氢酶,随后加正常山羊血清于 28℃ 进行封闭,加入稀释好的兔源 NARS2 多克隆抗体(ab254714, Abcam)于湿盒中 4℃ 过夜。PBS 清洗后加二抗在 37℃ 条件下放置 20 min,滴加 DBA 工作液显色,之后放入苏木精染液中复染 5 min,再次清洗、分化,乙醇脱水。显微镜(CX41,奥林巴斯)下对切片进行观察拍照。免疫组织化学结果量化标准:(1)阳性率,1 分为阳性细胞占细胞总数的 25% 以下,2 分为 25%~50%,3 分为 >50%~75%,4 分为 75% 以上;(2)显色强度评分,0 分为无着色,1 分为浅黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色。最终总评分为(1)、(2)的乘积。

1.2.2 细胞培养 人卵巢癌细胞系 SKOV-3 购于美国 ATCC 细胞库并由本实验室常规液氮保存。培养时采用加入 10% 胎牛血清(四季青生物)的 RPMI-1640 培养液(上海生工生物),培养箱内 CO₂ 浓度为 5%,温度为 37℃。

1.2.3 质粒转染 采用汇合率为 70% 的处于对数期的 SKOV-3 人卵巢癌细胞进行转染。弃去培养皿中的培养液后每皿加入 1.5 mL RPMI-1640 培养液及 0.5 mL pcDNA™3.1-NARS2 质粒(本实验室保存)与 lipofectamine 2000 混合的转染复合物液。轻轻混匀,孵育箱中培养 6 h 后更换培养基。用 G418 筛选稳定细胞株。

1.2.4 蛋白质免疫印迹法(Western blot) 采用 RIPA 蛋白裂解液裂解 SKOV-3 细胞并提取细胞总蛋白,加入上样缓冲液后煮沸 5 min。而后行聚丙烯酰胺凝胶电泳、湿转法将蛋白转印至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,依次加入用 5% 脱脂奶粉稀释过的 NARS2 (ab254714, Abcam)、Cleaved-

Caspase3 (ab2302, Abcam)、Cleaved-Caspase9 (ab2324, Abcam)及 β -actin 抗体于 4℃ 孵育过夜,用 TPBS 洗膜 3 次后加入二抗并在室温下继续 1 h,用 TPBS 洗膜 3 次后采用化学发光法对条带进行发光显色。

1.2.5 线粒体氧耗速率测定 参照使用说明书,在 Seahorse 细胞能量代谢分析仪(Seahorse Bioscience XF-24)测定氧耗速率。线粒体 ATP 合酶抑制剂:寡霉素[Oligomycin(495455)];氧化磷酸化解耦联剂:三氟甲氧基苯胺羰基氰化物[FCCP(C2920)];传递链复合物 I 抑制剂:鱼藤酮[Rotenone(R8875)];电子传递阻断剂:抗霉素 A[A(D8815)]购于默克公司并保存于本实验室。

1.2.6 线粒体复合体活性测定 参照使用说明书,使用 Complex I (ab109721, Abcam)、Complex III (ab109908, Abcam)、Complex IV (ab109911, Abcam)活性检测试剂盒检测各复合体活性。

1.2.7 细胞凋亡测定 消化计数 1×10^5 个细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入 100 μ L PBS 重悬,加入 Annexin-V 染液,室温下避光孵育 20 min,PBS 清洗后,碘化丙啶(PI)染色 10 min,PBS 清洗后,400 μ L PBS 重悬,利用流式细胞仪检测细胞凋亡比例。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

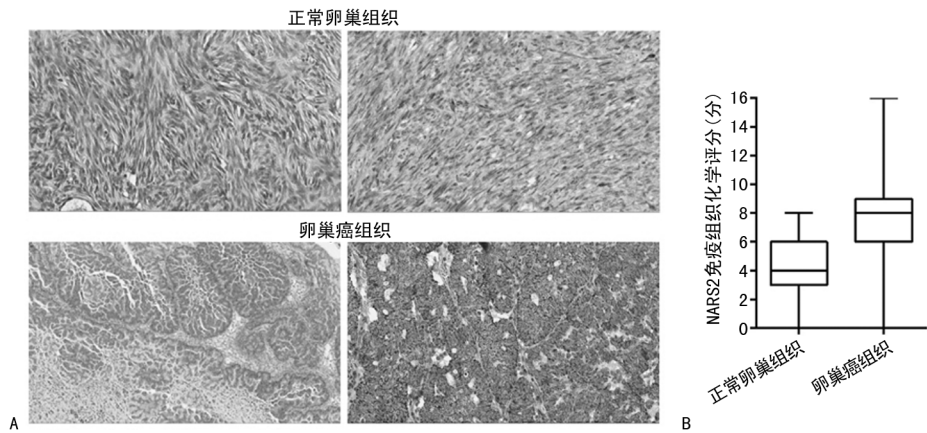
2 结果

2.1 NARS2 在卵巢癌组织中的表达 首先采用免疫组织化学法检测卵巢癌及正常卵巢组织中 NARS2 的表达变化,见图 1A、1B。正常卵巢组织($n=9$)中 NARS2 的免疫组织化学评分最高为 8 分,最低为 0 分,平均(4.40 $\pm$ 0.80)分。而在卵巢癌组织($n=244$)中 NARS2 的免疫组织化学评分最高为 12 分,最低为 0 分,平均(7.95 $\pm$ 0.37)分。卵巢癌组织中 NARS2 的免疫组织化学评分明显高于正常卵巢组织,差异有统计学意义($t=3.08, P=0.0028$)。

2.2 NARS2 表达水平与卵巢癌患者预后的关系 将 244 例卵巢癌组织按 NARS2 免疫组织化学评分分为高表达组和低表达组,并进行 Kaplan-Meier 生存分析,见图 2。高表达组预后明显差于低表达组,差异有统计学意义($P=0.003$)。肿瘤组织中高表达 NARS2 是较差预后因素,高表达与患者生存期缩短明显相关。

2.3 NARS2 高表达明显促进卵巢癌细胞氧化呼吸功能 NARS2 高表达可明显提高卵巢癌细胞线粒体基础呼吸速率、添加寡霉素质子泵抑制剂阻断 ATP 合酶后的质子泄漏耗氧速率及 FCCP 处理后线粒体最大氧耗速率(图 3A)。进一步分析发现,NARS2 的

高表达可明显促进线粒体复合 I 及复合体 IV 的活性(图 3B)。



注:A为H&E染色及免疫组织化学染色结果;B为免疫组织化学评分。

图1 卵巢癌和正常卵巢组织中NARS2的免疫组织化学评分

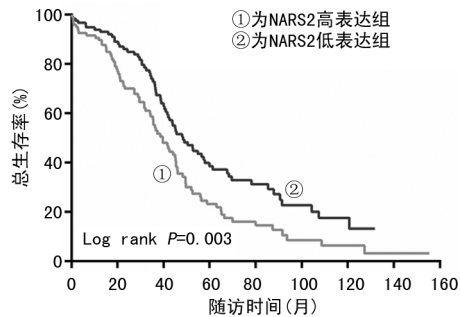
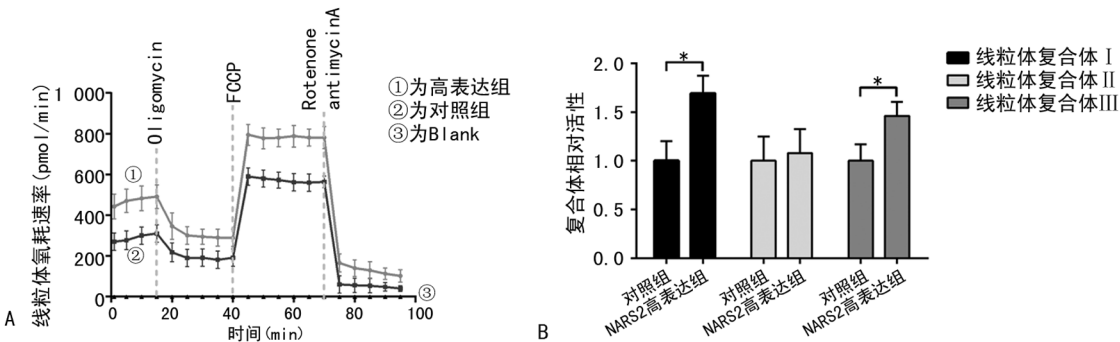


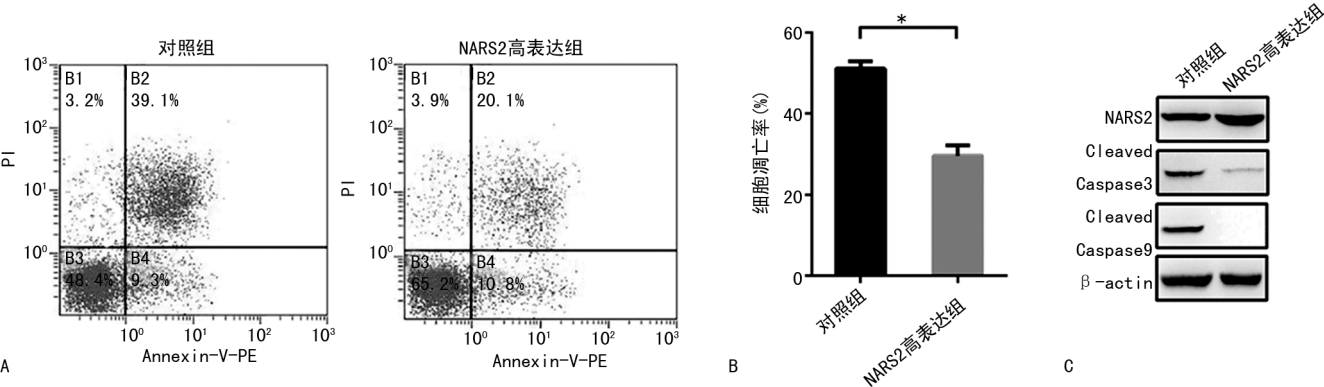
图2 NARS2表达水平与卵巢癌患者预后

2.4 NARS2高表达明显促进卵巢癌细胞凋亡抵抗能力 细胞凋亡检测结果显示(图4A、4B),经氧化磷酸化的解耦联剂 FCCP 处理可诱导卵巢癌细胞的凋亡,而 NARS2 的高表达可明显减少 FCCP 诱导的细胞凋亡[(29.67±1.44)% vs. (51.07±1.10)%, $P=0.0003$]。进一步 Western blot 结果显示(图4C),NARS2 的高表达可明显减少 CCCP 诱导的 Caspase 3 和 Caspase 9 的切割。



注:A为线粒体氧耗速率检测,Oligomycin为寡霉素质子泵抑制剂,FCCP为氧化磷酸化的解耦联剂,Rotenone为鱼藤酮复合体1抑制剂,anti-mycinA为抗霉素A复合体3抑制剂;B为线粒体复合体活性检测;与对照组比较,* $P<0.05$ 。

图3 NARS2高表达对线粒体功能的影响



注:A为流式细胞术检测结果;B为细胞凋亡检测结果;C为Western blot检测结果;与对照组比较,* $P<0.05$ 。

图4 NARS2高表达对卵巢癌细胞凋亡的影响

3 讨 论

线粒体是细胞内能量产生的重要细胞器,并在信号转导、稳态维持和细胞凋亡等方面发挥关键的调控作用^[9]。此外,线粒体还拥有独立于细胞核的 DNA,负责编码对线粒体正常功能至关重要的呼吸链亚基^[10]。大部分肿瘤细胞具有独特的线粒体代谢特征,并依赖线粒体呼吸提供能量。而抑制线粒体翻译功能则可导致线粒体呼吸受损及线粒体功能障碍,并被证实是消除实体瘤及肿瘤干细胞的有效手段^[8]。例如,Tigecycline 是美国食品药品监督管理局批准的具有有效抗癌活性的抗菌药物。Tigecycline 除通过抑制 Wnt/ β -catenin 和诱导自噬外,还可直接与线粒体核糖体结合并抑制线粒体翻译,起杀伤肿瘤细胞的作用^[11]。

NARS2 基因编码 NARS2 是核编码的线粒体酰氨基 tRNA 合成酶之一,对维持线粒体功能至关重要^[6]。NARS2 基因产物可催化特定氨基酸与其相关的 tRNA 的结合,是线粒体蛋白质合成的关键步骤。近年来,越来越多的研究发现,NARS2 基因突变与癫痫、脑萎缩^[12]、阿尔珀斯综合征^[13]、婴儿神经退行性疾病^[14]的发作密切相关。然而,有关 NARS2 基因异常与人类肿瘤的关系少见报道。

本研究发现,NARS2 免疫组织化学评分在卵巢癌组织中明显高于正常卵巢组织,且肿瘤组织中 NARS2 高表达的患者预后明显差于低表达者。进一步分析还发现,过表达 NARS2 可明显促进线粒体的呼吸功能、电子传递链复合体 I 及 IV 的活性,并且明显提高卵巢癌细胞的抗凋亡能力。与本研究结果相类似,SIMON 等^[15]在研究非综合征性耳聋和李氏综合征时发现,在 HEK293T 细胞中敲除 NARS2 可导致线粒体氧耗速率和电子传递链复合体 I、III、IV 活性明显降低,恢复 NARS2 表达则可逆转上述表型。

NARS2 有望成为一种新型卵巢癌患者预后评估标志物及药物治疗靶点,但其致病机制未阐明。因此可预见,探索 NARS2 在包括恶性肿瘤在内的各种人类疾病中的异常状态、关键生物学功能及其潜在分子生物学机制,可能是基础及临床医学的下一个研究热点。

参考文献

- [1] LA VECCHIA C. Ovarian cancer; epidemiology and risk factors[J]. Eur J Cancer Prev, 2017, 26(1): 55-62.
- [2] CHANDRA A, PIUS C, NABEEL M, et al. Ovarian cancer; current status and strategies for improving therapeutic outcomes[J]. Cancer Med, 2019, 8(16): 7018-7031.

- [3] MENON U, KARPINSKYJ C, GENTRY-MAHARAJ A. Ovarian cancer prevention and screening[J]. Obstet Gynecol, 2018, 131(5): 909-927.
- [4] KOWALTOWSKI A J, OLIVEIRA M F. Mitochondria; new developments in pathophysiology[J]. Mol Aspects Med, 2020, 71: 100841.
- [5] VAN DER BLIEK A M, SEDENSKY M M, MORGAN P G. Cell biology of the mitochondrion[J]. Genetics, 2017, 207(3): 843-871.
- [6] FINSTERER J. Management of nars2-related mitochondrial disorder is complex[J]. Pediatr Neurol, 2019, 93: 64.
- [7] YU J, WANG Q, CHEN N, et al. Mitochondrial transcription factor a regulated ionizing radiation-induced mitochondrial biogenesis in human lung adenocarcinoma A549 cells[J]. J Radiat Res, 2013, 54(6): 998-1004.
- [8] SKRTIC M, SRISKANTHADEVAN S, JHAS B, et al. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia[J]. Cancer Cell, 2011, 20(5): 674-688.
- [9] WALLACE D C, FAN W, PROCACCIO V. Mitochondrial energetics and therapeutics[J]. Annu Rev Pathol, 2010, 5: 297-348.
- [10] YASUKAWA T, KANG D. An overview of mammalian mitochondrial DNA replication mechanisms[J]. J Biochem, 2018, 164(3): 183-193.
- [11] LAMB R, OZSVARI B, LISANTI C L, et al. Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types; treating cancer like an infectious disease[J]. Oncotarget, 2015, 6(7): 4569-4584.
- [12] SEAVER L H, DEROOS S, ANDERSEN N J, et al. Lethal nars2-related disorder associated with rapidly progressive intractable epilepsy and global brain atrophy[J]. Pediatr Neurol, 2018, 89: 26-30.
- [13] SOFOU K, KOLLBERG G, HOLMSTROM M, et al. Whole exome sequencing reveals mutations in nars2 and pars2, encoding the mitochondrial asparaginyl-trna synthetase and prolyl-trna synthetase, in patients with alpers syndrome[J]. Mol Genet Genomic Med, 2015, 3(1): 59-68.
- [14] MIZUGUCHI T, NAKASHIMA M, KATO M, et al. Pars2 and nars2 mutations in infantile-onset neurodegenerative disorder[J]. J Hum Genet, 2017, 62(5): 525-529.
- [15] SIMON M, RICHARD E M, WANG X, et al. Mutations of human nars2, encoding the mitochondrial asparaginyl-trna synthetase, cause nonsyndromic deafness and leigh syndrome[J]. PLoS Genet, 2015, 11(3): e1005097.