

Aurora-B 激酶的表达与非小细胞肺癌患者预后及耐药的相关性分析

席俊峰^{1a}, 彭彦才^{1a}, 马兴聪², 郝光军^{1b}

(1. 榆林市第一医院 a. 胸心外科; b 肿瘤科; 陕西榆林 719000;
2. 西安交通大学第二附属医院肿瘤病院, 西安 710004)

摘要: **目的** 检测非小细胞肺癌(NSCLC)患者病理组织中 Aurora-B 激酶的表达情况, 并探讨其对患者预后的影响及与肿瘤耐药的相关性。**方法** 收集 194 例非小细胞肺癌患者肿瘤组织标本, 应用免疫组织化学方法检测 Aurora-B 激酶的表达情况。以 Log-Rank 检验比较 Aurora-B 激酶表达阳性患者与阴性患者总生存时间的差异, 采用 COX 模型探索非小细胞肺癌患者预后的影响因素; 分离患者肿瘤细胞进行耐药性诱导实验, 并通过测量 IC50 的变化初步评价细胞耐药情况。**结果** 非小细胞肺癌组织中 Aurora-B 激酶表达阳性率为 63.92% (124/194)。Aurora-B 激酶阳性患者的总生存时间低于 Aurora-B 激酶阴性患者 ($P < 0.0001$); COX 模型显示 Aurora-B 激酶表达 ($HR=4.03$, 95%CI: 1.80~9.01, $P=0.0007$)、肿瘤病理类型 ($HR=2.11$, 95%CI: 1.17~3.79, $P=0.0357$) 及临床分期 ($HR=0.42$, 95%CI: 0.24~0.74, $P=0.0027$) 是影响患者总生存时间的因素; 经过耐药性诱导, Aurora-B 激酶阳性肿瘤细胞 IC50 显著增加, 且增幅高于 Aurora-B 激酶阴性肿瘤细胞, 其差异有统计学意义 ($P < 0.0001$)。**结论** Aurora-B 激酶在非小细胞肺癌中表达异常增高, 与患者预后呈负相关, 并与非小细胞肺癌耐药性相关, 提示 Aurora-B 激酶可能成为非小细胞肺癌预后的标志物及潜在治疗靶点。

关键词: 非小细胞肺癌; Aurora-B 激酶; 预后; 耐药性

中图分类号: R734.2; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-059-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.015

Study on the Relationship between High Expression of Aurora-B Kinase and Drug Resistance and Prognosis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer

XI Jun-feng^{1a}, PENG Yan-cai^{1a}, MA Xing-cong², HAO Guang-jun^{1b}

(1a. Cardio-Thoracic Surgery; 1b. Department of Oncology, the First Hospital of Yulin City, Shaanxi Yulin 719000, China; 2. Oncology Hospital, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of Aurora-B kinase in pathological tissues from patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), reveal its influence on prognosis of NSCLC patients and the relationship between Aurora-B kinase expression and drug resistance of NSCLC. **Methods** Tumor specimens of 194 patients with NSCLC were collected. The expression of Aurora-B kinase was evaluated by immunohistochemistry. Log-Rank test was used to compare the overall survival of Aurora-B kinase positive and negative patients, and COX model was applied to assess the prognostic factors for NSCLC patients. Cellular drug resistance was simply evaluated by measuring the changes of IC50 post drug resistance induction assay. **Results** The positive rate of Aurora-B expression in NSCLC was 63.92% (124/194). The overall survival of patients with positive Aurora-B kinase expression was lower than that of patients with negative Aurora-B kinase ($P < 0.0001$). COX model showed that expression of Aurora-B ($HR=4.02$, 95%CI: 1.80~9.01, $P=0.0007$), tumor pathological type ($HR=2.11$, 95%CI: 1.17~3.79, $P=0.0357$) and clinical stage ($HR=0.42$, 95%CI: 0.24~0.74, $P=0.0027$) were the influencing factors of overall survival. After drug resistance induction, the increase of IC50 in Aurora-B positive tumor cells was significantly higher than that in Aurora-B negative tumors cells ($P < 0.0001$). **Conclusion** Aurora-B was upregulated in NSCLC and negatively correlated to the prognosis of patients, and overexpression of Aurora-B was related to the drug resistance of NSCLC, suggesting that Aurora-B kinase may become a prognostic biomarker as well as a therapeutic target for NSCLC.

Keywords: non-small cell lung cancer; Aurora-B kinase; prognosis; drug resistance

在我国, 肺癌作为发病率和死亡率均位居首位的恶性肿瘤, 严重影响患者的生命健康^[1]。非小细

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划资助项目 (项目编号 2018JM7068), 榆林市科学技术研究与开发项目 (项目编号 [2019]185 号-35)。

作者简介: 席俊峰 (1978-), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 肺癌、食管癌治疗研究, E-mail: yuxijunf@163.com。

通讯作者: 郝光军 (1979-), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 肺癌、食管癌治疗研究, E-mail: haoguangjun1129@163.com。

胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是最常见的类型, 约占肺癌的 85%。NSCLC 患者的 5 年生存率仅为 15%^[2-4]。目前临床上 NSCLC 治疗方法主要有化疗、放疗、手术、分子靶向治疗和免疫治疗, 但是由于耐药性和以上方法导致的毒副反应时常影响临床疗效和患者的预后。

近年来有研究表明, Aurora-B 激酶对乳腺癌、结直肠癌、肝癌等恶性肿瘤化疗耐药性的产生具有重要调控作用^[5-8], 但其在肺癌中的作用鲜有报道。本研究主要目的是通过对临床 NSCLC 组织的检测, 探究 Aurora-B 激酶在 NSCLC 组织中的表达情况及其与患者预后的相关性, 为发现 NSCLC 新的分子治疗靶点提供理论依据, 另外通过细胞培养方法分析 Aurora-B 激酶的表达与肿瘤细胞耐药性的关系。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 本研究选取 2006 年 2 月 ~ 2012 年 11 月榆林市第一医院收治并术后经病理检查确诊为 NSCLC 的 194 例患者为研究对象, 年龄 37~72 岁, 中位年龄 56 岁。患者均在签署知情同意书后获取其临床样本、病案信息以及远期临床随访资料。本研究经我院伦理委员会批准。

1.2 试剂与仪器 Aurora-B 抗体 (美国 LSBIO 公司); 紫杉醇 (四川协力制药有限公司); 顺铂 (德州德药制药有限公司); DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); 光学显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色检测: Aurora-B 激酶的表达: 应用常规方法进行病理组织脱蜡和水化后, 用 3% (体积分数) 的过氧化氢溶液在室温下处理组织样本 10 min, 然后用 PBS 漂洗病理组织样本, 将样本浸入枸橼酸钠溶液, 水浴中加热至 95℃ ~ 100℃ 20 min。PBS 漂洗 3 次, 5 min/次。加入 10g/ml 山羊血清孵育 30 min。最后加入稀释 200× 兔抗人 Aurora-B 抗体, 37℃ 孵育 2 h。PBS 漂洗后加入二抗 37℃ 孵育 15 min。再次 PBS 漂洗后加入辣根酶标记链霉卵白素工作液 37℃ 孵育 15 min。自来水充分冲洗, 复染, 脱水, 透明, 封片。

1.3.2 免疫组化结果判断标准: 在光学显微镜下用高倍镜 (×400) 进行观察, 随机选取每张切片中的 5 个视野, 并且每个视野计数 200 个细胞。通过观察 NSCLC 细胞核的染色情况评估 Aurora-B 激酶表达。染色阳性的判断标准: NSCLC 细胞核内出现清晰黄色或棕黄色颗粒。每张切片均由两名具有 10 年以上病理科工作经验的执业医师在双盲条件下独立阅读, 评估结果不一致时重新阅片并协商以确

定结果。本次研究中两位读片人读片结果一致率为 96.39%。

1.3.3 耐药性诱导实验: 本研究主要针对 NSCLC 治疗中的两种常用药物, 紫杉醇 (Paclitaxel, PTX) 和顺铂 (Cisplatin, CDDP) 进行耐药性诱导实验。随机选取 60 例 NSCLC 患者的肿瘤组织约 1.0cm³ 大小尽量剔除纤维组织及黑色颗粒, 立即浸入无菌培养瓶中, 并于 10 min 内转运至实验室。在超净台上, 用无菌 PBS 液冲洗 2 次, 无菌切除组织包膜, 结缔组织与坏死组织, 剪成尽可能小的组织碎块, 大小约 1mm³。将组织小块置于 0.25g/dl 胰酶 40ml 中, 装入培养瓶, 置于 37℃ 水浴箱中 30 min, 使其充分消化, 期间在镜下观察, 当细胞变圆接近脱壁时, 弃消化液, 用 10 ml 完全 -1640 终止消化。用 200 目筛网将消化后的细胞悬液过滤收集, 用无菌 PBS 液洗涤 2 次 (离心, 1 500 r/min), 悬于 20ml 完全 -1640 中, 镜下观察细胞。于无菌离心管中依次轻轻加入 100% 及 60% 的淋巴细胞分离液各 10ml, 其上再沿管壁轻轻加入细胞悬液 (离心, 2 000 r/min, 20min), 收集 60% 分离液界面上的细胞, 加 5 倍无菌 PBS 液, 2 000r/min 离心 20 min, 去上清, 加 15 ml 无菌 PBS 液, 离心前进行细胞计数, 再次离心, 2 000r/min, 20min, 去上清, 调整细胞浓度为 1×10⁵/ml~2×10⁵/ml。后经免疫组化染色确认, 其中 Aurora-B 激酶表达阳性患者 41 例, Aurora-B 激酶表达阴性患者 19 例。

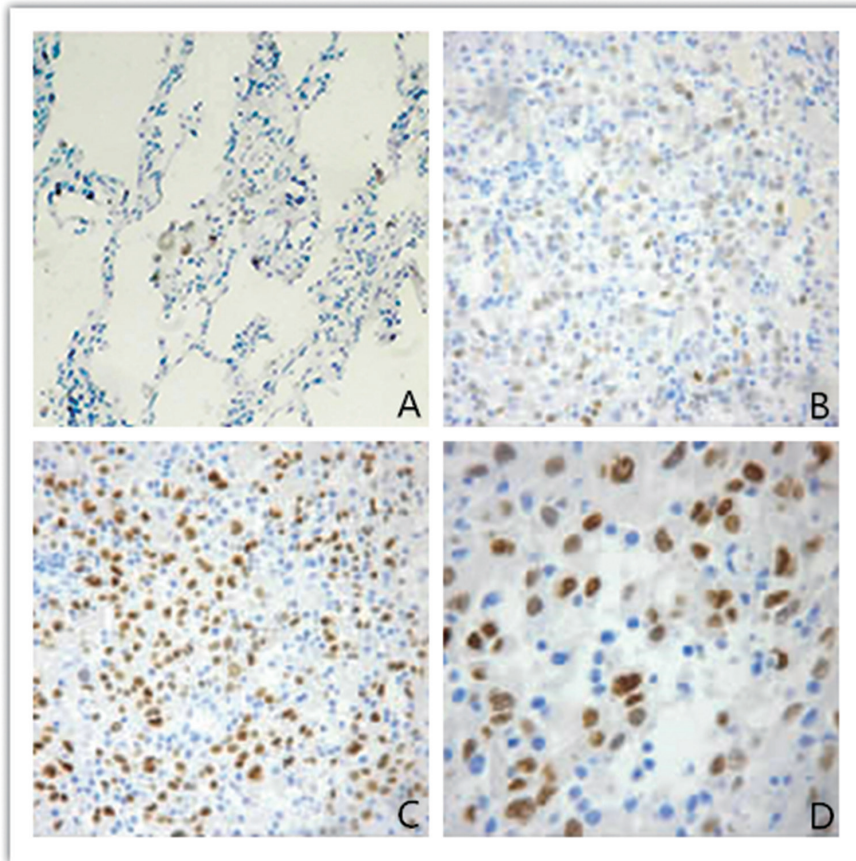
首先将 1×10⁴ 个肿瘤细胞置于 96 孔板中吸附 6 h, 然后加入浓度梯度依次为 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μmol/L 的 PTX 和 CDDP, 孵育 72 h。MTT 实验法测定细胞增殖并计算 IC50 值。耐药性诱导实验以 IC50 值为诱导浓度, 在细胞中加入浓度梯度 (0~100 μmol/L) 的 PTX 和 CDDP 后孵育 72 h, 通过 MTT 实验法确定耐药性诱导后的 IC50 值。

1.4 统计学分析 采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据分析。采用 χ^2 检验分析分类资料组间差异, 定量资料采用两独立样本 *t* 检验比较组间差异。采用 Log-Rank 检验比较患者生存时间的组间差异并绘制 K-M 生存曲线。应用 COX 模型分析影响患者预后的因素。本研究中 I 类错误控制水平 α 取值为 0.05, $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Aurora-B 激酶的表达与 NSCLC 患者临床病理特征的相关性 见图 1 A~D。Aurora-B 激酶表达于 NSCLC 细胞核中, 阳性颗粒染色清晰、对比度强且阳性细胞核较大, 见表 1。Aurora-B 激酶的表达与 NSCLC 患者的组织类型和临床分期显著相关,

并且其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。



A. 正常肺组织 (200 倍); B. 弱阳性表达 (200 倍); C. 强阳性表达 (200 倍); D. 强阳性表达 (400 倍)

图 1 Aurora-B 蛋白在非小细胞肺癌组织中表达情况

表 1 Aurora-B 激酶表达与患者临床病理特征的关系 [n(%)]

临床病理特征	总数	Aurora-B 表达		χ^2	P
		阴性	阳性		
总数	194	70(36.08)	124(63.92)	-	-
年龄 (岁) ≤ 60	118	46(38.98)	72(61.02)	1.098 8	0.294 5
> 60	76	24(31.58)	52(68.42)		
性别 男	158	58(36.71)	100(63.29)	0.144 9	0.703 5
女	36	12(33.33)	24(66.67)		
组织类型 鳞癌	102	27(26.47)	75(73.53)	8.616 2	0.003 3
腺癌及其他类型	92	43(46.74)	49(53.26)		
分化程度 高	21	9(42.86)	12(57.14)	0.468 6	0.493 6
中、低	173	61(35.26)	112(64.74)		
临床分期 I 期	61	40(65.57)	21(34.43)	33.554 5	<0.000 1
II, III 期	133	30(22.56)	103(77.44)		

2.2 Aurora-B 激酶的表达与 NSCLC 患者预后的关系 见图 2。Log-Rank 检验结果提示 Aurora-B 激酶阳性患者较 Aurora-B 激酶阴性患者的总体生存率缩短, 并且其差异具有统计学意义 ($P < 0.000 1$)。

应用 COX 回归模型对 NSCLC 患者的生存时

间进行单因素分析, 结果见表 2。Aurora-B 激酶表达、病理组织类型和临床分期是 NSCLC 患者生存时间的影响因素。多因素分析结果见表 3。Aurora-B 激酶表达、病理组织类型和临床分期均可显著影响 NSCLC 患者的生存时间。其差异均具有统计学意

义 (均 $P < 0.05$)。

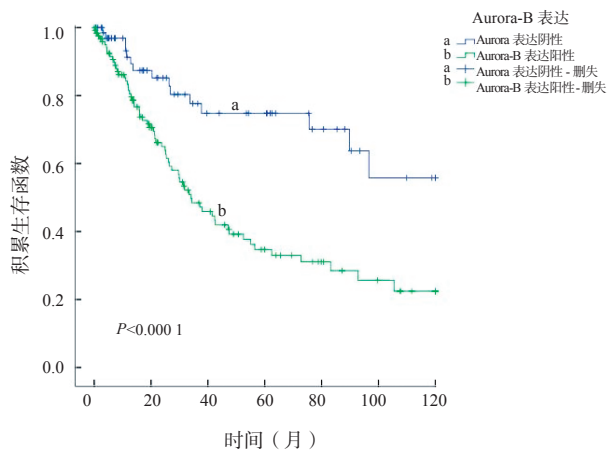


图2 不同 Aurora-B 激酶表达情况患者 K-M 生存曲线

2.3 非小细胞肺癌患者 Aurora-B 激酶与肿瘤细胞耐药的相关性 见图2。Aurora-B 激酶阳性的

表2

NSCLC 患者生存时间的单因素分析

因素	HR 估计值	95%CI	χ^2	P
Aurora-B 激酶表达 (表达阴性为对照)	5.40	1.63~17.87	7.615 8	0.005 8
年龄 (岁, 60 岁以上为对照)	0.82	0.37~1.79	0.493 8	0.483 2
性别 (女性为对照)	1.28	0.64~2.57	0.250 4	0.616 8
病理组织类型 (腺癌及其他类型为对照)	2.19	1.05~4.54	4.412 6	0.035 7
分化程度 (中、低为对照)	1.22	0.59~2.51	0.280 8	0.596 2
临床分期 (II, III 期为对照)	0.50	0.25~0.89	3.896 1	0.048 4

表3

NSCLC 患者生存时间的多因素分析

因素	HR 估计值	95%CI	χ^2	P
Aurora-B 激酶表达	4.03	1.80~9.01	11.520 9	0.000 7
病理组织类型 (腺癌及其他类型为对照)	2.11	1.17~3.79	6.200 9	0.035 7
临床分期 (II, III 期为对照)	0.42	0.24~0.74	9.027 8	0.002 7

表4

NSCLC 患者 Aurora-B 激酶表达与耐药的相关性

药物名称	组别	n	IC50	95%CI	组内比较 t 值	P 值	组间比较 t 值	P 值
CDDP	Aurora-B 阴性	19	15.72 ± 3.94	14.78~16.66	33.3691	<0.0001	-13.748 03*	<0.000 01
	Aurora-B 阳性	41	28.53 ± 8.95	26.94~30.12	35.5024	<0.0001		
PTX	Aurora-B 阴性	19	7.05 ± 8.86	4.94~9.16	6.6587	<0.0001	-5.827 03*	<0.000 01
	Aurora-B 阳性	41	15.89 ± 12.10	13.74~18.04	14.6302	<0.0001		

注: *t' 检验。

已有研究证实 Aurora-A 激酶与人多种实体瘤的发生发展密切相关。而关于 Aurora-B 激酶的研究较少。有研究显示, Aurora-B 激酶在胶质瘤细胞、胃癌细胞、宫颈癌细胞中存在高表达, 并且肿瘤细胞染色体出现成倍增长^[11-13]。本研究发现, 在非小细胞肺癌细胞中 Aurora-B 激酶存在过表达情况, 并且 Aurora-B 激酶异常表达与患者的预后显著相关。生存分析结果显示 Aurora-B 激酶表达阳性是患者预后的重要影响因素。

本次研究还对 Aurora-B 激酶与 CDDP 和 PTX

NSCLC 患者经 CDDP 和 PTX 耐药性诱导后 IC50 值显著升高, 并且差异具有统计学意义 ($P < 0.000 1$)。

3 讨论

Aurora 激酶家族都有相似的催化结构区域^[9], 主要由较短的 C 末端尾部及长度可以不断变化的 N 末端防守侧翼。Aurora-B 激酶可于着丝粒内蛋白 (inner centromere protein, INCENP) 和存活素 (survivin) 共同组成染色体过客蛋白, 并在中心体成熟、分裂、纺锤体组装和稳定等细胞生理过程中起重要作用。染色体过客蛋白在细胞分裂早期随染色体定位, 在中期向内部着丝粒区域聚集, 后期则离开染色体并移动至中心纺锤体。整个过程要求染色体过客蛋白的各组成部分有准确的定位, 一旦任何组成成员缺失或者 Aurora-B 激酶活性不足都能造成定位错误和整体结构不稳定^[10], 最终导致细胞分离异常。

耐药间的关系进行了研究。研究结果提示 Aurora-B 的过度表达与肿瘤细胞对 CDDP 及 PTX 的耐药存在相关关系, 此研究结论与其他实体瘤化疗耐药性研究如卵巢浆液性癌, 乳腺癌中所发现 Aurora-B 与化疗药物耐药性存在相关性的结论一致。在正常情况下, 细胞分裂的过程会触发 p53 的活化以及下游修复和凋亡通路, 清除处于异常增殖状态的细胞。然而, 在 Aurora-B 过表达的情况下, p53 的大部分受到泛素介导的蛋白降解, 这进一步降低了 p21 和 BAX 的表达^[14]。BAX 是一种促凋亡因子, p21 是

DNA 损伤的应答物, 通过在 G1/S 期阻滞细胞周期, 激活细胞凋亡^[15-16]。p21 和 BAX 的缺失使 DNA 损伤和染色体数目异常的细胞绕过增殖异常细胞检查及清除过程, 避开损伤修复, 最终影响针对癌细胞 DNA 和细胞周期的药物疗效, 导致耐药^[16]。

综上, 本研究结果表明, Aurora-B 激酶的过度表达与非小细胞肺癌的病理生理过程密切相关, Aurora-B 激酶可能参与了非小细胞肺癌的发生及恶性进展, 与患者不良预后及耐药相关。以上结论提示 Aurora-B 可能是非小细胞肺癌的新标志物及潜在治疗靶点。后续我们拟从 RNA 水平验证上述结论, 并利用细胞学、分子生物学及形态学等研究方法进一步探究 Aurora-B 激酶对肿瘤生物学行为的影响及其作用机制。

参考文献:

- [1] 陈万青, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 2011 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2015, 24(1):1-10. CHEN Wanqing, ZHENG Rongshou, ZENG Hongmei, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2011 [J]. China Cancer, 2015, 24(1): 1-10.
- [2] 张慧颖, 高全立. 非小细胞肺癌免疫治疗研究进展 [J]. 国际免疫学杂志, 2014, 37(3):218-222. ZHANG Huiying, GAO Quanli. The research progression of immunotherapy for non-small-cell lung cancer [J]. International Journal of Immunology, 2014, 37(3):218-222.
- [3] 廖晓宁, 罗彪, 张倬彬, 等. 非小细胞肺癌放射治疗研究进展 [J]. 医药前沿, 2017, 7(6):6-7. LIAO Xiaoning, LUO Biao, ZHANG Zhuobin, et al. Non-small cell lung cancer radiotherapy were reviewed [J]. Journal of Frontiers of Medicine, 2017, 7(6):6-7.
- [4] 金静思, 贺中钊, 周黎明, 等. 非小细胞肺癌分子靶向治疗药物的现状及进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(17):881-885. JIN Jingsi, HE Jinzhao, ZHOU Liming, et al. The progress of molecular-targeted therapeutic drugs in non-small cell lung cancer [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2015, 42(17):881-885.
- [5] HUMBERTO PÉREZ-OLAIS J, RUIZ-JIMÉNEZ F, CALDERÓN-GARCÍA E J, et al. The activity of Aurora kinase B is required for dengue virus release [J]. Virus Research, 2019, 274: 197777.
- [6] ALAFATE W, WANG Maode, ZUO Jie, et al. Targeting aurora kinase B attenuates chemoresistance in glioblastoma via a synergistic manner with temozolomide [J]. Pathology Research and Practice, 2019, 215(11): 152617.
- [7] DING Lidan, YANG Liu, HE Yuqi, et al. CREPT/RPRDIB associates with aurora B to regulate cyclin B1 expression for accelerating the G2/M transition in gastric cancer [J]. Cell Death & Disease, 2018, P(12):1172.
- [8] CÍCENAS J. The Aurora kinase inhibitors in cancer research and therapy [J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2016, 142(9): 1995-2012.
- [9] TANG Anqun, GAO Keyu, CHU Laili, et al. Aurora kinases: novel therapy targets in cancers [J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 23937-23954.
- [10] WILLIAMS M M, MATHISON A J, CHRISTENSEN T, et al. Aurora kinase B-phosphorylated HP1 α functions in chromosomal instability [J]. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2019, 18(12):1-15.
- [11] HETLAND T E, NYMOEN D A, HOLTH A, et al. Aurora B expression in metastatic effusions from advanced-stage ovarian serous carcinoma is predictive of intrinsic chemotherapy resistance [J]. Human Pathology, 2013, 44(5): 777-785.
- [12] YOON M J, PARK S S, KANG Youjung, et al. Aurora B confers cancer cell resistance to TRAIL-induced apoptosis via phosphorylation of survivin [J]. Carcinogenesis, 2012, 33(3): 492-500.
- [13] GRUNDY M, SEEDHOUSE C, RUSSELL N H, et al. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein in acute myeloid leukaemia cells treated with the Aurora-B Kinase Inhibitor barasertib-hQPA [J]. BMC Cancer, 2011, 11(1): 254.
- [14] GULLY C P, VELAZQUEZ-TORRES G, SHIN J H, et al. Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(24): 9323-9233.
- [15] MATSUMOTO M, NAKAJIMA W, SEIKE M, et al. Cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells is dependent on Bax-and Bak-induction pathway and synergistically activated by BH3-mimetic ABT-263 in p53 wild-type and mutant cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 473(2):490-496.
- [16] GUPTA S, SILVEIRA D A, MOMBACH J C M. ATM/miR-34a-5p axis regulates a p21-dependent senescence-apoptosis switch in non-small cell lung cancer: a Boolean model of G1/s checkpoint regulation [J]. FEBS Letters, 2020, 594(2):227-239.

收稿日期: 2019-12-12

修回日期: 2020-10-13

欢迎来稿 欢迎订阅