

DOI: 10.14188/j.1671-8852.2025.0219

文章编号 1671-8852(2026)03-0321-06

NCSTN 在非小细胞肺癌中的作用及临床意义

邹睿 宋从宽 胡卫东
武汉大学中南医院胸外科 湖北 武汉 430071

摘要 目的:探讨 NCSTN(nicestrin)在非小细胞肺癌(NSCLC)中的作用及其临床意义。方法:构建 A549-NCSTN-KO 细胞系,采用 CCK-8 和 Transwell 实验分别检测细胞增殖和迁移能力,并通过小鼠皮下成瘤实验评估细胞的成瘤生长能力。此外,利用临床样本分析 NCSTN 的表达及其与临床分期的相关性。结果:敲低 NCSTN 显著抑制了 A549 细胞的增殖和迁移,并降低了小鼠皮下移植瘤的生长速度。同时,NCSTN 在肺癌组织中的表达显著高于正常组织,且其高表达与更晚的临床分期相关。结论:降低 NCSTN 的表达可抑制非小细胞肺癌的进展。

关键词 肺癌;NCSTN;A549 细胞

中图分类号 R34

文献标志码 A

Role of NCSTN in the progression of non-small cell lung cancer and its clinical significance

ZOU Rui, SONG Congkuan, HU Weidong

Department of Thoracic Cardiovascular Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To explore the role of NCSTN (nicestrin) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its clinical significance. **Methods:** A549-NCSTN-KO cell line was constructed, and the cell proliferation and migration abilities were detected by CCK-8 and Transwell assays, respectively. The tumorigenic growth ability of cells was evaluated by subcutaneous tumor formation assay in mice. In addition, clinical samples were used to analyze the expression of NCSTN and its correlation with clinical stage. **Results:** Knockdown of NCSTN significantly inhibited the proliferation and migration of A549 cells and reduced the growth rate of subcutaneous transplanted tumors in mice. At the same time, the expression of NCSTN in lung cancer tissues was significantly higher than that in normal tissues, and its high expression was associated with a later clinical stage. **Conclusion:** Reducing the expression of NCSTN can inhibit the progression of non-small cell lung cancer.

Key Words Lung Cancer; NCSTN; A549 Cell

肺癌是全球范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,严重威胁人类健康。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌的主要

组织类型,约占所有肺癌病例的 80%~85%^[1]。尽管近年来靶向治疗和免疫治疗的进展显著改善了部分患者的预后,但 NSCLC 的总体五年生存率仍

课题来源:武汉大学中南医院转化医学与交叉学科研究联合基金资助项目(编号:ZNJC202326)。

作者简介:邹睿,女,1998—,医学硕士生,主要从事肺癌的研究,E-mail:ziran00@whu.edu.cn。

通信作者:胡卫东,E-mail:huwd@whu.edu.cn。

然较低,尤其是晚期患者。因此,深入探索 NSCLC 致病的分子机制并寻找新的治疗靶点具有重要意义。

NCSTN(nicastrin)作为 γ -分泌酶复合体的关键组分,最初因其在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)中的作用而被广泛研究。研究^[2]表明,NCSTN通过调控 γ -分泌酶的活性,影响淀粉样前体蛋白(APP)的切割等途径,参与阿尔茨海默病的病理过程。此外,NCSTN还被发现与化脓性汗腺炎(hidradenitis suppurativa)的发病机制密切相关,其突变可导致 γ -分泌酶功能异常,进而引发皮肤炎症反应^[3]。然而,近年来研究发现,NCSTN在肿瘤发生和发展中也扮演重要角色。2020年的一项研究^[4]表明,NCSTN在肝癌中作为原癌基因发挥作用,通过Notch信号通路促进肝癌细胞的增殖和浸润。同年,一项全面的SMR(Summary-data-based Mendelian Randomization)分析^[5]进一步表明,NCSTN基因被确定为肺鳞状细胞癌的十大重要药物靶点之一。这些研究提示,NCSTN不仅在神经退行性疾病和炎症性疾病中发挥作用,还可能通过调控多种信号通路在肿瘤进展中发挥促癌作用。

由于NCSTN在NSCLC中的作用尚不清楚,故本研究通过非小细胞肺癌细胞中下调NCSTN的表达,探究NCSTN对非小细胞肺癌进展的影响,旨在为NSCLC的治疗提供新的潜在靶点和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人非小细胞肺癌细胞系A549, A549-NCSTN-KO细胞(购于武汉粒曼生物公司)。

1.1.2 小鼠 4周龄裸鼠(nude mice)(购于广东药康生物科技有限公司)。

1.1.3 病理标本 本研究使用的肺癌组织标本及癌旁正常组织标本均来源于武汉大学中南医院。通过手术切除或空芯针活检获得患者的病理诊断。经患者知情同意并获得武汉大学中南医院伦理委员会的批准(伦理批号:2022025)。

1.1.4 主要试剂 PFA(Sigma公司);DMEM、High glucose、Fetal Bovine Serum、Trypsin-EDTA(0.25%)、羊抗兔IgG(H+L)二抗(Thermo Fisher Scientific公司,美国);RIPA裂解液(Servicebio公司,武汉);兔源一抗NCSTN、NADPH(三鹰生物技术有限公司,武汉);结晶紫溶液、SDS-PAGE聚丙烯

酰胺预制胶、CCK-8试剂盒(碧云天,上海);PBS Buffer(生工生物有限公司,上海);BCA试剂盒(Abcam公司,英国);Transwell细胞小室(Labselect公司,北京);PVDF膜(Merck,美国)。

1.1.5 使用的数据库 本研究分析了来自癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库的肺癌RNA-seq数据库(数据集编号:TCGA-LUAD),数据访问日期为2024年3月7日。

1.2 方法

1.2.1 构建A549-NCSTN-KO细胞系 本研究采用CRISPR-Cas9核糖核蛋白(RNP)法进行A549细胞NCSTN基因的敲除。首先,根据NCSTN基因的靶序列设计并合成特异性sgRNA,随后,将sgRNA与Cas9蛋白以5:1(sgRNA:Cas9)的比例混合,室温静置10 min以形成RNP复合物,参照Lonza和Thermo Fisher Neon转染系统的操作说明,使用电转染仪将RNP复合物导入A549细胞。转染后,通过Sanger测序验证NCSTN基因的敲除效率,结果显示KO效率为89%,表明NCSTN基因敲除成功。

1.2.2 细胞培养 A549和A549-NCSTN-KO细胞在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养,置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中。当细胞融合度达到70%~80%时,进行传代或实验。

1.2.3 Western Blot检测NCSTN蛋白表达及定量 使用含有蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液裂解A549细胞。在冰上孵育30 min后,4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min,收集上清液。通过BCA试剂盒测定蛋白浓度,取10 μg蛋白质样品经SDS-PAGE分离后转印至PDVF膜。用含Tween-20的TBST封闭缓冲液孵育PVDF膜1 h。随后用NCSTN和NADPH抗体4℃孵育过夜。次日,TBST清洗3次,室温下二抗孵育1 h,再次清洗3次。最后,使用Bio-Rad系统显影条带。使用Image J软件对蛋白条带进行灰度定量分析,再使用GAPDH归一化进行数据分析作图。

1.2.4 细胞生长速度测试 将A549和A549-NCSTN-KO细胞均稀释至2×10⁴个·mL⁻¹的浓度,按每孔100 μL接种至96孔板中,分别在0、12、24、36、48 h时吸出培养基,加入CCK-8工作液,培养箱中孵育1 h后,于450 nm波长下测定光密度(OD)值,绘制细胞生长曲线。

1.2.5 细胞迁移实验 在12孔板中加入200 μL含有10%胎牛血清的DMEM培养基,放入Tran-

swell小室。小室内分别加入用无血清培养基稀释至 20×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的A549及A549-NCSTN-KO细胞悬液。培养24 h后,PBS清洗,4%多聚甲醛固定15 min,结晶紫溶液染色20 min,拍照记录。

1.2.6 细胞侵袭实验 在12孔板中加入200 μL 含有10%胎牛血清的DMEM培养基后,放入Transwell小室。小室内预先加入稀释的基质胶,培养箱中凝固4 h后,加入 20×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的A549及A549-NCSTN-KO细胞悬液。培养24 h后,PBS清洗,4%多聚甲醛固定15 min,结晶紫溶液染色20 min,拍照记录。

1.2.7 小鼠荷瘤实验 本研究采用12只裸鼠,随机分为两组(每组6只),进行皮下肿瘤细胞接种实验。具体实验步骤为:首先按每克体质量10 μL 腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉小鼠,随后,于小鼠右侧腹股沟区域皮下注射 1×10^6 个肿瘤细胞,观察肿瘤生长情况。于皮下注射后的第25天,颈椎脱臼处死小鼠,切除肿瘤并记录其质量。本研究中使用的小鼠实验获得武汉大学动物伦理委员会的批准(批准号:MR12025-LAC003),并遵循《实验动物福利法》的相关规定。

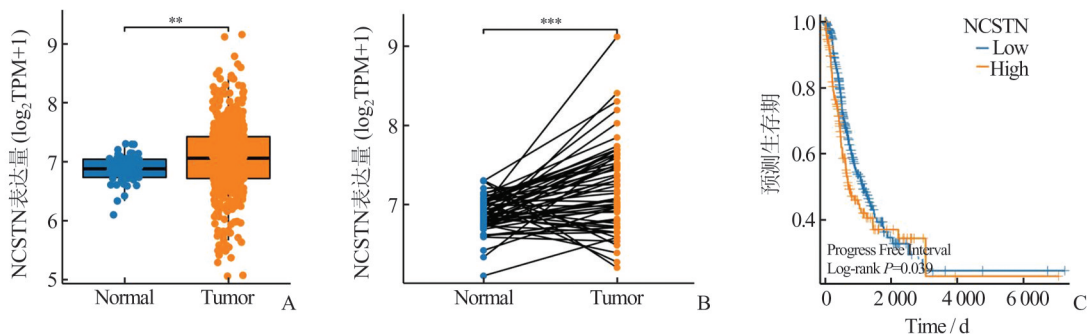
1.2.8 免疫组织化学(IHC)检测肺癌组织中NCSTN表达 本研究采用石蜡包埋的肺癌及正常癌旁组织切片进行。切片经脱蜡、水化后,用柠檬酸

钠缓冲液(pH:6.0)进行抗原修复。随后,用3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性,5%BSA封闭非特异性结合位点。切片与抗-NCSTN一抗(1:500稀释)4℃孵育过夜,随后与HRP标记的二抗(1:2 000稀释)室温孵育1 h。DAB显色后,苏木素复染细胞核,脱水透明并封片。使用Image J软件对染色结果进行定量分析,计算阳性染色百分比。

1.2.9 统计学方法 使用GraphPad 8.0进行统计分析,组间数据比较采用单因素方差分析。计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析提示NCSTN在肺癌组织中高表达且与预后相关 通过对TCGA官方数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)中下载的转录组数据及临床信息进行分析,发现无论是非配对样本还是配对样本,NCSTN基因在肿瘤中的mRNA表达水平均显著高于正常组织(图1A、1B)。进一步通过Kaplan-Meier生存分析和log-rank检验评估NCSTN基因高表达对NSCLC患者无进展生存期(PFS)的影响,结果表明,NCSTN基因表达水平与患者的预后显著相关($P < 0.05$)(图1C)。

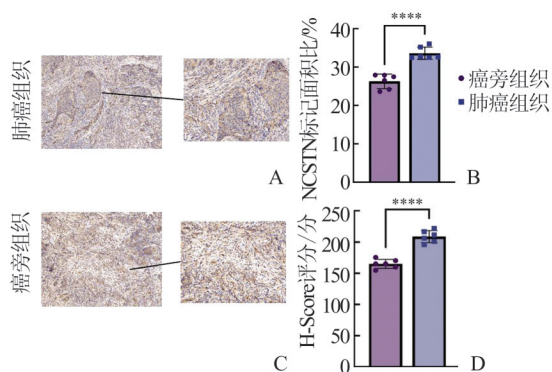


A~B. TCGA数据库评估肺癌及正常组织(A、B分别为配对样本和非配对样本)中NCSTN的表达情况;C. Kaplan-Meier生存曲线:NCSTN的表达与肺癌患者无进展生存期(PFS)之间的关系;实验及其定量数据表示为均数 $\pm$ 标准差($n=6$),** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ (Student's t 检验)。

图1 利用TCGA数据库分析NCSTN在肺癌组织中的表达及对预后的影响

2.2 NCSTN在肺癌组织中的表达量高于癌旁组织 通过对6例肺癌病人的肺癌组织及癌旁组织进行免疫组织化学分析,并通过Image J软件对免疫组化染色结果进行定量分析,计算阳性染色的百分比(图2)。肺癌组织中NCSTN的平均标注面积占比为33.62%,而癌旁组织中NCSTN的平均标记面积占比为26.28%($P < 0.01$)。通过H-Score评分

对免疫组化结果进行定量分析,肺癌组织的H-Score评分平均为202.5,癌旁组织的H-Score评分平均为160.0,和癌组织相比减少了20.99%($P < 0.01$)。上述结果表明NCSTN在肺癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织,且这一结果与基于TCGA数据库的生物信息学分析结果一致,进一步验证了NCSTN在肺癌中的高表达特征。

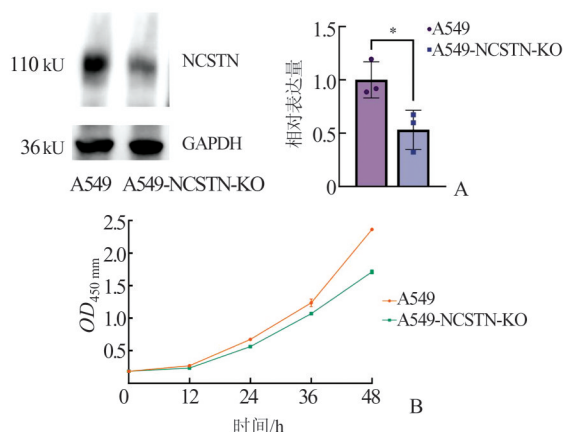


A、C. 肺癌组织和癌旁组织中NCSTN的免疫组化;B、D. 定量分析;实验及其定量数据表示为均数±标准差($n=6$), **** $P<0.0001$ (Student's t 检验)。

图2 NCSTN在肺癌组织及癌旁组织中的表达量

2.3 NCSTN 基因敲除的有效性验证 我们通过 Western Blot 检测细胞中 NCSTN 蛋白的表达水平。蛋白质显影条带及定量分析结果显示, A549-NCSTN-KO 细胞中 NCSTN 的表达水平显著低于 A549 细胞 ($P<0.05$), 验证了 NCSTN 基因敲除的有效性(图 3A)。

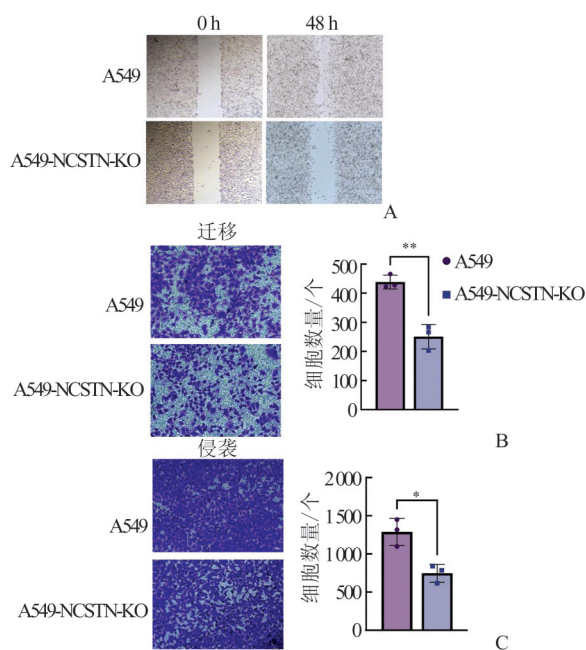
2.4 敲低 NCSTN 抑制 A549 细胞的增殖 采用 CCK-8 实验检测 A549 及 A549-NCSTN-KO 细胞的增殖能力。为确保实验结果的可靠性, 每组实验均独立重复 3 次。结果表明, 在 0 h 时, 两组细胞的活力差异无统计学意义 ($P>0.05$); 然而, 在 12 h ($P<0.01$)、24 h ($P<0.01$)、36 h ($P<0.05$) 和 48 h ($P<0.01$) 时, 两组细胞的活力差异均有统计学意义。这些结果证明, 敲低 NCSTN 能够显著抑制 A549 细胞的增殖能力(图 3B)。



A. Western Blot 检测 A549 及 A549-NCSTN-KO 细胞中 NCSTN 的蛋白表达水平及其定量;B. CCK-8 检测细胞的增殖; * $P<0.05$ 。

图3 NCSTN 敲低的验证及其对 A549 细胞增殖的抑制作用

2.5 敲低 NCSTN 抑制 A549 的迁移与侵袭 为了进一步探讨 NCSTN 对 A549 细胞侵袭和迁移的影响, 我们分别进行了细胞划痕实验和 Transwell 实验。为确保实验结果的可靠性, 每组实验均独立重复 3 次。划痕实验结果显示, 培养 48 h 后, 敲低 NCSTN 显著抑制了 A549 细胞的迁移能力(图 4A)。Transwell 实验中, Transwell 小室的 Matrigel 层用于模拟细胞的基底膜, 通过 Matrigel 的细胞数量代表体内侵入癌细胞基底膜的细胞数, 反应了癌细胞的侵袭能力。在细胞迁移实验中(图 4B), A549 细胞通过 Matrigel 层的平均细胞数为 439 个, 而 A549-NCSTN-KO 细胞的平均细胞数为 251 个, 减少了 42% ($P<0.01$)。在细胞侵袭实验中(图 4C), A549 细胞通过 Matrigel 层的平均细胞数为 1288 个, 而 A549-NCSTN-KO 细胞的平均细胞数为 747 个, 减少了 42% ($P<0.05$)。这些结果表明, NCSTN 能够显著增强 A549 细胞的迁移与侵袭能力。



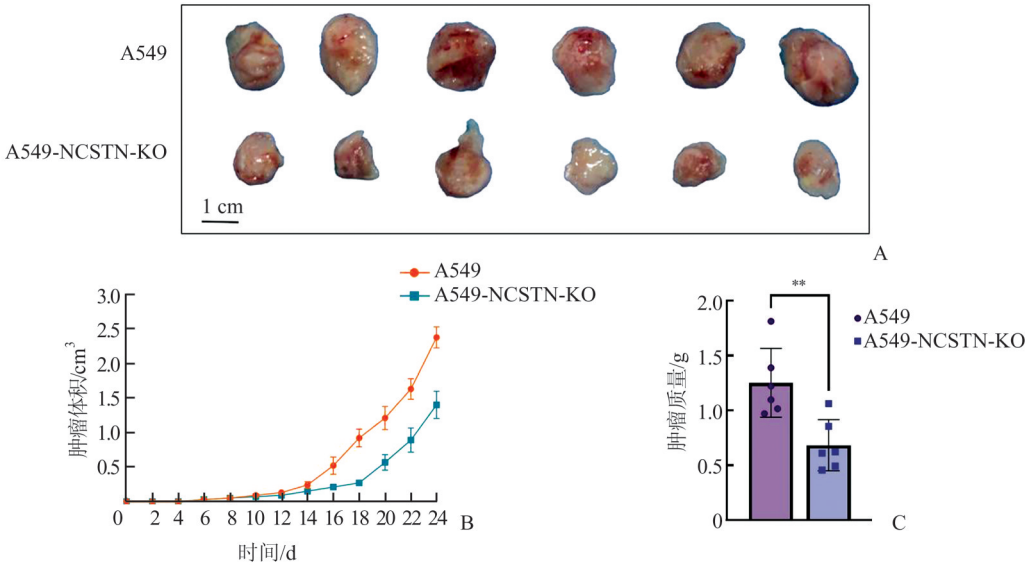
A. 培养 48 h 后 A549 和 A549-NCSTN-KO 细胞的细胞划痕检测结果;B~C. A549 和 A549-NCSTN-KO 细胞的迁移和侵袭实验;实验及其定量数据表示为均数±标准差($n=3$), * $P<0.05$, ** $P<0.01$ (Student's t 检验)。

图4 敲低 NCSTN 抑制 A549 的迁移与侵袭

2.6 敲低 NCSTN 抑制 A549 细胞皮下移植瘤生长 将裸鼠皮下种植瘤子当天记为 0 d, 随后每隔两日测量肿瘤体积并绘制生长曲线(图 5B)。结果显示, 在接种后的前 16 d, A549 组与 A549-NCSTN-KO 组的肿瘤体积差异无统计学意

义,但从第 18 天开始,两组肿瘤体积出现显著差异(18 d、20 d、22 d、24 d, $P<0.05$)。在第 25 天处死小鼠后,完整剥离肿瘤并称重(图 5A、5C),A549 组肿瘤的平均质量为 1.25 g,而 A549-NCSTN-KO 组肿

瘤的平均质量为 0.68 g,减少了 45.6%($P<0.05$)。以上结果表明,A549-KO-NCSTN 细胞形成的皮下肿瘤生长速度显著低于 A549 细胞,证明 NCSTN 基因影响了 A549 细胞的皮下成瘤能力。



A、C. A549 和 A549-NCSTN-KO 皮下种植瘤解剖后的体积比较及最终的肿瘤质量;B. A549 和 A549-NCSTN-KO 皮下种植瘤的生长曲线;实验及其定量数据表示为均数±标准差($n=6$),** $P<0.01$ (Student's t 检验)。

图 5 NCSTN 敲低抑制 A549 细胞皮下抑制瘤生长

2.7 肺癌的分期和肿瘤大小与 NCSTN 表达量相关 通过对 TCGA 数据库中肺癌患者的转录组数据及临床信息进行分析,结果显示,NCSTN 的表达水平与肺癌肿瘤大小呈显著正相关($P<0.01$)。此外,在晚期(Ⅲ期和Ⅳ期)肺癌患者中,NCSTN 高表达的比例显著高于早期(Ⅰ和Ⅱ期)患者($P<0.05$)(表 1)。

3 讨论

本研究首先通过生物信息学分析证明了 NCSTN 在肺癌中高表达且与预后相关,这一证明通过临床标本进一步进行了验证。于是我们通过功能实验探究该基因的作用,结果表明敲低 NCSTN 显著抑制了 NSCLC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并降低了小鼠皮下种植瘤的生长能力。最后通过对肺癌患者的转录组数据及临床信息进行分析,我们发现其高表达与晚期临床分期呈显著正相关。这些结果证明,NCSTN 在 NSCLC 细胞中显著高表达,并通过调控细胞的增殖与侵袭促进肿瘤进展。这一发现与先前在肝癌中的研究^[4]一致,提示 NCSTN 可能在多种肿瘤中发挥促癌作用。

尽管本研究从细胞到小鼠再到临床病理样本

表 1 NCSTN 表达量与临床分期相关 [例(%)]			
变量	NCSTN 低表达组 ($n=269$)	NCSTN 高表达组 ($n=270$)	P
病理 T 分期			0.004
T1	103 (19.2)	73 (13.6)	
T2	135 (25.2)	157 (29.3)	
T3	26 (4.9)	23 (4.3)	
T4	4 (0.7)	15 (2.8)	
病理 N 分期			0.154
N0	181 (34.6)	169 (32.3)	
N1&.N3&.N2	78 (14.9)	95 (18.2)	
年龄			0.664
≤65 岁	129 (24.8)	128 (24.6)	
>65 岁	127 (24.4)	136 (26.2)	
性别			0.027
女性	157 (29.1)	132 (24.5)	
男性	112 (20.8)	138 (25.6)	
吸烟			0.158
否	44 (8.4)	33 (6.3)	
是	217 (41.3)	231 (44.0)	
病理分期			0.045
I	161 (30.3)	135 (25.4)	
II	60 (11.3)	65 (12.2)	
III	36 (6.8)	48 (9.0)	
IV	8 (1.5)	18 (3.4)	

均进行了研究,证明了NCSTN在NSCLC中的作用,但对这些表型的机制研究仍有所欠缺。NCSTN(nicestrin)基因作为 γ -分泌酶复合体的关键组分,在Notch信号通路中发挥重要作用。有研究^[6]证明,Notch信号通路在细胞分化、增殖和凋亡等过程中具有重要的调控功能,而NCSTN通过调节 γ -分泌酶的活性,直接影响Notch受体的切割和激活过程。当NCSTN被阻断时,Notch信号传导通路的功能会受到显著抑制,进而导致下游靶基因的表达异常。此外,还有研究^[7]发现,NCSTN的缺失不仅影响Notch信号通路,还会导致PI3K/AKT信号通路的活性受损。PI3K/AKT通路是细胞存活、增殖和代谢的重要调控途径,其功能异常与多种疾病的发生发展密切相关。因此,NCSTN的阻断在癌症、神经退行性疾病等多种病理过程中发挥重要作用。然而,NCSTN在肺癌中的具体作用机制,特别是其是否通过Notch/NICD1/Hes1或PI3K/AKT/mTOR信号通路调控肿瘤进展,仍需进一步验证。未来的研究可以通过在细胞或者小鼠皮下移植瘤模型中,采用qRT-PCR和Western Blot检测NCSTN干预后Notch通路关键分子(NICD1、Hes1)及PI3K/AKT/mTOR通路相关基因的mRNA和蛋白表达变化,也可通过免疫组织化学染色分析移植瘤组织中上述通路标志物的表达模式,并与NCSTN表达水平进行相关性分析。有研究^[8]证明 γ -分泌酶抑制剂DAPT(24-diamino-5-phenylthiazole)可以阻断Notch信号通路,后续实验可以通过 γ -分泌酶抑制剂DAPT处理肺癌细胞,评估其对NCSTN表达及下游信号通路的抑制作用,或者筛选靶向NCSTN的小分子抑制剂,评估其抗肿瘤效果及对恶病质表型的改善作用,从而为临床诊治提供新可能。

本研究局限于A549这一细胞系,后续会扩展至其他NSCLC细胞系(如H1975、PC-9等)以验证结果的普适性。而且本文的临床数据分析是完全基于TCGA数据库,缺乏实际患者的长期随访资料,未来研究中应结合多中心临床数据,进一步评估NCSTN在NSCLC患者中的预后价值。

总之,本研究通过一系列实验揭示了NCSTN

在NSCLC中的重要作用,这些发现不仅增进了对NSCLC分子机制的理解,也为开发新的治疗靶点提供了有价值的信息。



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021[J]. CA A Cancer J Clinicians, 2021, 71(1): 7-33.
- [2] SHI Q F, SUN X Y, ZHANG H, et al. PLC-CN-NFAT1 signaling-mediated A β and IL-1 β crosstalk synergistically promotes hippocampal neuronal damage[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 134: 112259.
- [3] HE Y, WANG W, MA X, et al. Discovery and potential functional characterization of long noncoding RNAs associated with familial acne inversa with NCSTN mutation[J]. Dermatology, 2024, 240(1): 119-131.
- [4] LI H, LAN T, XU L, et al. NCSTN promotes hepatocellular carcinoma cell growth and metastasis *via* β -catenin activation in a Notch1/AKT dependent manner[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 128.
- [5] WU W, CHEN Z, WEN H, et al. Unveiling potential drug targets for lung squamous cell carcinoma through the integration of druggable genome and genome-wide association data[J]. Front Genet, 2024, 15: 1431684.
- [6] YAN L, SONG Y S, ZHOU J, et al. Expression of nicastrin, NICD1, and Hes1 in NCSTN knockout mice: Implications for hidradenitis suppurativa, Alzheimer's, and liver cancer[J]. Eur J Med Res, 2024, 29(1): 622.
- [7] ZHAI X Y, XIA Z J, DU G, et al. LRP1B suppresses HCC progression through the NCSTN/PI3K/AKT signaling axis and affects doxorubicin resistance[J]. Genes Dis, 2023, 10(5): 2082-2096.
- [8] PENG X C, ZHOU J R, LI B, et al. Notch1 and PI3K/Akt signaling blockers DAPT and LY294002 coordinately inhibit metastasis of gastric cancer through mutual enhancement[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2020, 85(2): 309-320.

(2025-03-14 收稿)

编辑 沈建国