

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003347

敲低 RBX1 通过下调 PHF5A 抑制胰腺癌细胞增殖, 迁移和侵袭并促进凋亡

张 菁¹, 阎优优¹, 徐栋超², 张 博¹

(浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院 1. 转化医学研究中心; 2. 消化内科, 杭州 310000)

【摘要】目的:研究环盒蛋白 1 (ring-finger protein 1, RBX1) 对胰腺癌 (pancreatic adenocarcinoma, PAAD) 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的作用及其潜在的作用机制。**方法:**利用基因表达谱交互分析网站 (gene expression profile interactive analysis website, GEPIA), 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)、Western blot 检测 RBX1 在 PAAD 组织、细胞中的表达和预后价值。使用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、细胞克隆形成能力实验、脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL)、细胞划痕实验、Transwell 实验检测 RBX1 敲低对胰腺癌-1 (pancreatic carcinoma-1, PANC-1) 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。通过 LinkedOmics 网站研究 PAAD 中 RBX1 和 PHD 锌指结构域蛋白 5A (plant homodomain finger-like domain-containing protein 5A, PHF5A) 的相关性。qRT-PCR 和 Western blot 检测 RBX1 敲低后 PHF5A 的表达, 进行功能拯救实验。**结果:**RBX1 在 PAAD 组织和细胞系中高表达, 与不良预后相关 ($P<0.05$)。RBX1 敲低抑制 PANC-1 细胞增殖、迁移和侵袭, 促进细胞凋亡 ($P<0.05$)。RBX1 和 PHF5A 在 PAAD 中具有相关性 ($r=0.692$), 且 RBX1 正向调控 PHF5A 表达 ($P<0.05$)。功能拯救实验表明 PHF5A 过表达部分逆转了 RBX1 敲低对 PANC-1 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的作用 ($P<0.05$)。**结论:**RBX1 敲低通过下调 PHF5A 表达抑制 PANC-1 细胞增殖、迁移和侵袭, 促进凋亡。

【关键词】环盒蛋白 1; PHD 锌指结构域蛋白 5A; 胰腺癌; 增殖; 凋亡; 侵袭迁移**【中图分类号】**R730.23; R735.9**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2023-04-27

Knock-down RBX1 inhibits the proliferation, migration, and invasion of pancreatic cancer cells and promotes cell apoptosis by down-regulating PHF5A

Zhang Jing¹, Yan Youyou¹, Xu Dongchao², Zhang Bo¹

(1. Translational Medicine Research Center; 2. Department of Gastroenterology,

Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine)

【Abstract】Objective: To explore the effect of ring box protein-1 (RBX1) on the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of pancreatic adenocarcinoma (PAAD) cells and the potential mechanism of action. **Methods:** The gene expression profile interactive analysis website, quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), and Western blot were used to measure the expression of RBX1 in PAAD tissues and cells and to determine its prognostic value. Cell Counting Kit-8, colony formation assay, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, wound healing assay, and transwell assay were applied to evaluate the effects of RBX1 knockdown on the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of pancreatic carcinoma-1 (PANC-1) cells. LinkedOmics website was used to investigate the correlation between RBX1 and plant homodomain finger-like domain-containing protein 5A (PHF5A) in PAAD. Functional rescue experiments were performed by measuring the expression of PHF5A after RBX1 knockdown by qRT-PCR and Western blot. **Results:** RBX1 expression was up-regulated in PAAD tissues and cells, which was associated with a poor prognosis ($P<0.05$). RBX1 knockdown inhibited the proliferation, migration, and invasion of PANC-1 cells and promoted cell apoptosis ($P<0.05$). RBX1 was associated with PHF5A in PAAD ($R=0.6918$), and RBX1 positively regulated the expression of PHF5A ($P<0.05$). Functional rescue experiments showed that PHF5A overexpression partially reversed the effects of RBX1 knockdown on the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of PANC-1 cells ($P<0.05$). **Conclusion:** RBX1 knock-

作者介绍: 张 菁, Email: zj663598@163.com,

研究方向: 肿瘤。

通信作者: 张 博, Email: zhangbohzzs@163.com。

基金项目: 浙江省自然科学基金一般资助项目 (编号: LY20H310005)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.r.20231008.1644.012>

(2023-10-11)

down inhibits the proliferation, migration, and invasion of PANC-1 cells and promotes cell apoptosis by down-regulating PHF5A.

[Key words] ring box protein-1; plant homodomain finger-like domain-containing protein 5A; pancreatic adenocarcinoma; proliferation; apoptosis; migration and invasion

胰腺癌(pancreatic adenocarcinoma, PAAD)是一种侵袭性很强的癌症,其发病率不断上升,五年总生存率仅为11%^[1-2]。由于早期没有明显症状,当患者被诊断为PAAD时,通常已发生远端转移^[3]。目前的诊断方法和治疗策略效果甚微,PAAD患者的临床结果仍不够理想^[1]。因此,研究PAAD的发病机制对于探索有效的生物标志物进行早期诊断和治疗策略具有重要意义。

环盒蛋白1(ring box protein-1, RBX1)是S期激酶相关蛋白(S-phase kinase-associated protein 1, SKP1)、Cullin和含有F-box(SCF)的泛素连接酶的重要组成部分。作为泛素-蛋白酶体系统的一部分,这些连接酶在控制蛋白质周转和调节各种信号通路以及细胞过程(包括细胞周期调节蛋白、转录因子和信号转导等方面)发挥着至关重要的作用^[4-7]。SCF泛素连接酶功能障碍会导致各种疾病,包括癌症^[8-9]。据报道, RBX1在肺癌^[10-11]、肝癌^[12]、胃癌^[13]、卵巢癌^[14]、食管癌^[15]等癌症中表达显著上调,并通过调控增殖、凋亡和侵袭迁移发挥促癌作用,但是,目前尚未有研究报道RBX1在胰腺癌中的作用。

通过LinkedOmics网站,课题组发现在胰腺癌中,PHD 锌指结构域蛋白5A(plant homodomain finger-like domain-containing protein 5A, PHF5A)与RBX1相关性最高,因此猜测RBX1可能通过调控PHF5A调节胰腺癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭。本研究旨在揭示新的生物标志物和治疗靶点,为胰腺癌的靶向治疗策略提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 细胞

正常人胰腺导管上皮细胞系HPDE6-C7,人胰腺癌细胞系AsPC-1、SW1990、BxPC-3和PANC-1均购自上海中国科学院细胞库。

1.2 试剂

Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)培养基,10%的胎牛血清和青霉素-链霉素均购自美国Hyclone公司;胰

酶购自美国Hyclone公司;TRIzol试剂盒购自奕杉生物;jetPRIME试剂购自Polyplus Transfection公司;靶向RBX1的小干扰siRNA(si-RBX1-1和si-RBX1-2),靶向PHF5A的过表达pCDNA 3.1及空载体均购自杭州和元生物技术有限公司;RBX1、PHF5A和内参基因GAPDH引物均合成并购自上海铂尚生物技术公司;RBX1(ab133565, 1:5 000)和GAPDH(ab181602, 1:5 000)抗体购自Abcam公司,PHF5A(15554-1-AP, 1:1 000)抗体购自武汉三鹰公司;增强型化学发光试剂(enhanced chemiluminescence, ECL)购自BioSharp公司;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒购自Thermo Scientific公司;放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)裂解液购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 HPDE6-C7、AsPC-1、SW1990、BxPC-3和PANC-1均使用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素的DMEM培养基,37 °C、5% CO₂培养。当细胞融合度达到90%时,进行传代培养,取对数生长期的细胞进行后续实验研究。

1.3.2 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 使用TRIzol试剂提取总的RNA,根据说明书操作步骤进行逆转录和定量,GAPDH作为内参,通过2^{-ΔΔCt}法分别计算RBX1和PHF5A的相对表达量,每个样本独立重复实验3次。引物序列见表1。

表1 实时定量PCR引物序列

基因	序列(5'→3')
RBX1	正向:CTGGCTCAAAACACGACAGG
	反向:AGCATCCGTTCCAGAATCCAA
PHF5A	正向:TGCTGTGCCATCGGAAGAC
	反向:CATAGGAGGACGCCA
GAPDH	正向:CCTGGTATGACAACGAATTTG
	反向:CAGTGAGGCTCTCTCTCTCC

1.3.3 转染 取对数生长期的PANC-1细胞并接种于6孔板中,当细胞汇合度达到70%左右时,按照Lipofectamine™ 2000说明书,加入干扰RBX1和/或过表达PHF5A质粒以及相应阴性对照序列,细胞在不含血清和双抗的DMEM培养基中培养6 h后,更换成完全培养基继续培养,48 h后收取细胞,检测转染效率。

1.3.4 细胞计数试剂盒-8(Cell Counting Kit-8, CCK-8)检

测 PANC-1 细胞密度调整为 2×10^3 个/孔并接种到 96 孔板中,每孔中加入 10 μ L CCK-8 试剂和 90 μ L 培养基,37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h。在 450 nm 处使用酶标仪分别于 24、48、72 h 测量每孔的吸光度(absorbance, A)值,整理数据结果并绘制细胞生长曲线。

1.3.5 克隆形成实验 将 PANC-1 细胞接种于 6 孔板中(200 个/孔),每 3 d 更换 1 次培养液,当培养皿中出现肉眼可见的细胞集落后,去除培养液。使用 4% 甲醛固定细胞 10 min,然后用 0.5% 结晶紫(购自美国 Sigma 公司)染色 3 min,克隆定义为 >50 个细胞,其形成率计算如下:克隆形成率(%)=(克隆数/接种细胞数) \times 100%。

1.3.6 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL) 用 DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统检测细胞凋亡,si-RBX1 和/或 pcDNA 3.1-PHF5A 以及对照转染 PANC-1 细胞 24 h 后,将细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔板中。按照制造商的说明检测细胞凋亡。使用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色计数细胞总数,并计算 TUNEL 阳性细胞的平均比例。

1.3.7 划痕实验 将 PANC-1 细胞接种于 6 孔板中(1×10^4 个/孔)并培养至汇合。使用 200 μ L 移液管在汇合的单层细胞刮 1 条直线。在划痕形成后的 0 h 和 48 h 拍摄 5 个视点。使用 Image ProPlus 6.0 版软件确定和分析平均迁移距离。

1.3.8 Transwell 实验 采用 24 孔 transwell 室和 8 μ m 聚碳酸酯膜分析细胞侵袭能力,用基质凝胶(20 μ g/孔)包被膜上方的小室,然后在 37 $^{\circ}$ C 下风干 2 h。上腔室以 2×10^5 个/孔的密度接种细胞,填充无血清 DMEM,下腔室填充 10% 胎牛血清。孵育 48 h 后,通过膜的细胞用多聚甲醛固定,并用结晶紫染色。随机选取 5 个区域对下腔室的细胞计数,每个条件重复 3 次。

1.3.9 Western blot 检测 利用 RIPA 裂解液提取细胞中的总蛋白并用 BCA 法进行蛋白定量。将待检测蛋白样品(40 μ g/孔)进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),然后运用湿转法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)上,将膜用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h,与一抗(RBX1, 1:5 000; RHF5A, 1:1 000; GAPDH, 1:1 000),在 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。次日用含吐温 20 的三乙醇胺缓冲液(Tris buffer solution Tween, TBST)洗膜 3 次,每次 10 min,然后将膜与二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;最后,在暗室进行 ECL 显影。

1.3.10 生物信息学分析 基因表达谱交互式分析网站(gene expression profile interactive analysis website, GEPIA)用于分析来自癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)和基因型-组织表达(Genotype-Tissue Expression, GTEx)数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)的 9 736 个肿瘤和 8 587 个正常样本的 RNA 测序表达数据。通过 GEPIA 分析

胰腺癌组织和正常胰腺样本中 RBX1 和 PHF5A 的表达水平,以及预后价值。LinkedOmics(<http://www.linkedomics.org/>)^[16]是一个公开的门户网站,包括来自所有 32 种 TCGA 癌症类型和 10 个临床蛋白质组学肿瘤分析联盟(clinical proteomic tumor analysis consortium, CPTAC)癌症队列的多组学数据,利用 LinkedOmics 网站分析 RBX1 和 PHF5A 在胰腺癌组织中的相关性。

1.4 统计学方法

使用社会科学统计软件包 13.0(Statistical Package for the Social Sciences, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)进行统计学分析。数据表示为来自至少 3 个独立实验的平均值 \pm 标准偏差。使用 Kaplan-Meier 分析和 log-rank 检验对生存水平进行统计分析,使用 Pearson 相关分析确定 PAAD 中 RBX1 和 PHF5A 之间的相关性。2 组比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

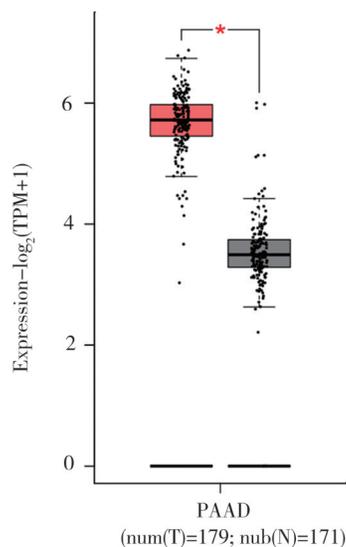
2 结果

2.1 RBX1 在胰腺癌组织和细胞中高表达

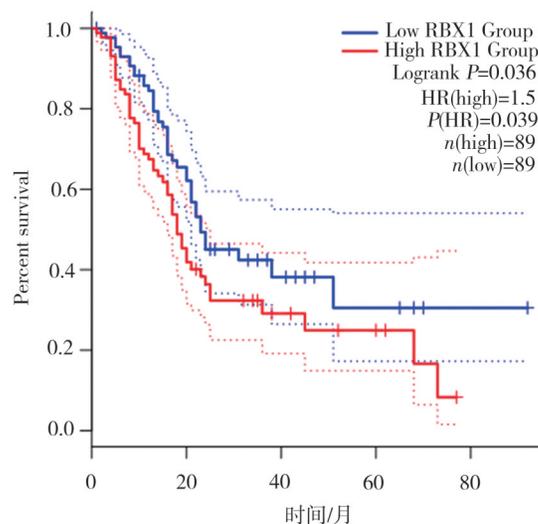
GEPIA 网站中结果显示相较于正常胰腺组织,胰腺癌组织中 RBX1 表达显著上调($P<0.05$,图 1A),且 RBX1 高表达与胰腺癌患者总体生存水平低相关($P<0.05$,图 1B)。qRT-PCR 和 Western blot 检测正常人胰腺导管上皮细胞系 HPDE6-C7(1.000 ± 0.070 ; 1.000 ± 0.080)和人胰腺癌细胞系 AsPC-1(2.233 ± 0.161 ; 2.067 ± 0.157),SW 1990(2.874 ± 0.170 ; 2.540 ± 0.140),BxPC-3(1.947 ± 0.077 ; 1.311 ± 0.122)和 PANC-1(3.485 ± 0.216 ; 2.713 ± 0.223)中 RBX1 mRNA 和蛋白表达水平,结果表明对比 HPDE6-C7 细胞,各胰腺癌细胞中 RBX1 表达明显上调($F=118.600$, $P<0.001$; $F=73.430$, $P<0.001$; 图 1C、D),且在 PANC-1 细胞中表达最高,因此后续实验在 PANC-1 细胞中进行。

2.2 干扰 RBX1 的表达阻碍胰腺癌细胞增殖,促进凋亡并抑制侵袭和迁移

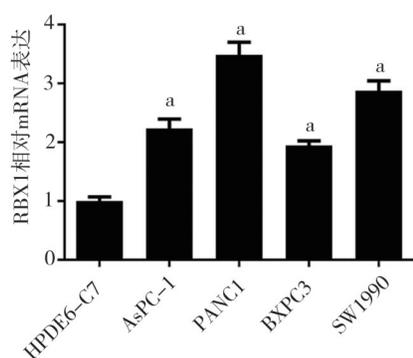
对 PANC-1 细胞进行转染以干扰 RBX1 表达,Western blot 检测 RBX1 siRNA 转染效率,结果显示,与 Control 组(1.000 ± 0.062)比较,siNC 组(0.994 ± 0.073)中 RBX1 表达没有明显变化;与 siNC 组比较,siRBX1-1(0.389 ± 0.041)和 siRBX1-2 组(0.583 ± 0.027)中 RBX1 表达显著降低,显然,siRBX1-1 的转染效果更好,因此选择 siRBX1-1 进行实验($F=96.75$, $P<0.001$,图 2A)。CCK-8 实验和克隆形成实验检测细胞活力和增殖水平,与 siNC 组(0.912 ± 0.330 ; 596.700 ± 37.000)比较,siRBX1 敲低后 PANC-1 细胞活力(0.658 ± 0.172)和增殖水平(284.700 ± 20.000)显著降低($F=3.606$, $P=0.011$; $F=91.70$, $P<0.001$; 图 2B、C)。TUNEL 染色检测细胞凋亡,结果显示,与 siNC 组(2.600 ± 0.361)比较,siRBX1-1 组(8.833 ± 0.874)凋亡水平增加($F=119.500$, $P<0.001$; 图 2D)。划痕实验结果表明,与 siNC 组(100.700 ± 11.870)比较,siRBX1-1 组



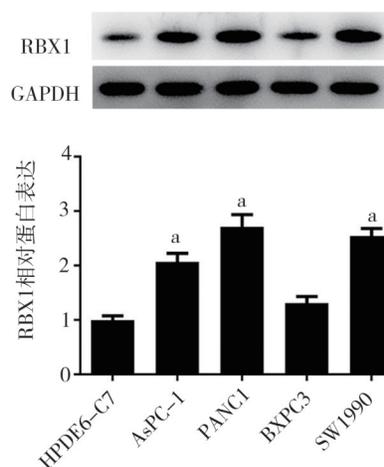
A. GEPIA 数据库中正常胰腺 (灰色框, $n=171$) 和 PAAD 样本 (红色框, $n=179$) 中 RBX1 的 RNA 表达水平



B. GEPIA 数据库中 RBX1 对 PAAD 患者总体生存水平的分析



C. 正常人胰腺导管上皮细胞和各胰腺癌细胞系中 RBX1 的 mRNA 表达水平



D. 正常人胰腺导管上皮细胞和各胰腺癌细胞系中 RBX1 的蛋白表达水平

注: a, 与 HPDE6-C7 组比较, $P < 0.001$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$

图 1 RBX1 在 PAAD 组织和细胞中的表达及其与患者总体生存水平的关系

(41.800 ± 4.616) 中 PANC-1 细胞迁移水平显著降低 ($F=47.900$, $P < 0.001$; 图 2E), Transwell 实验表明, 与 siNC 组 (99.400 ± 7.000) 比较, siRBX1-1 组 (39.700 ± 6.596) 中 PANC-1 细胞侵袭水平显著降低 ($F=82.310$, $P < 0.001$; 图 2F)。以上结果表明干扰 RBX1 可以抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭, 促进细胞凋亡。

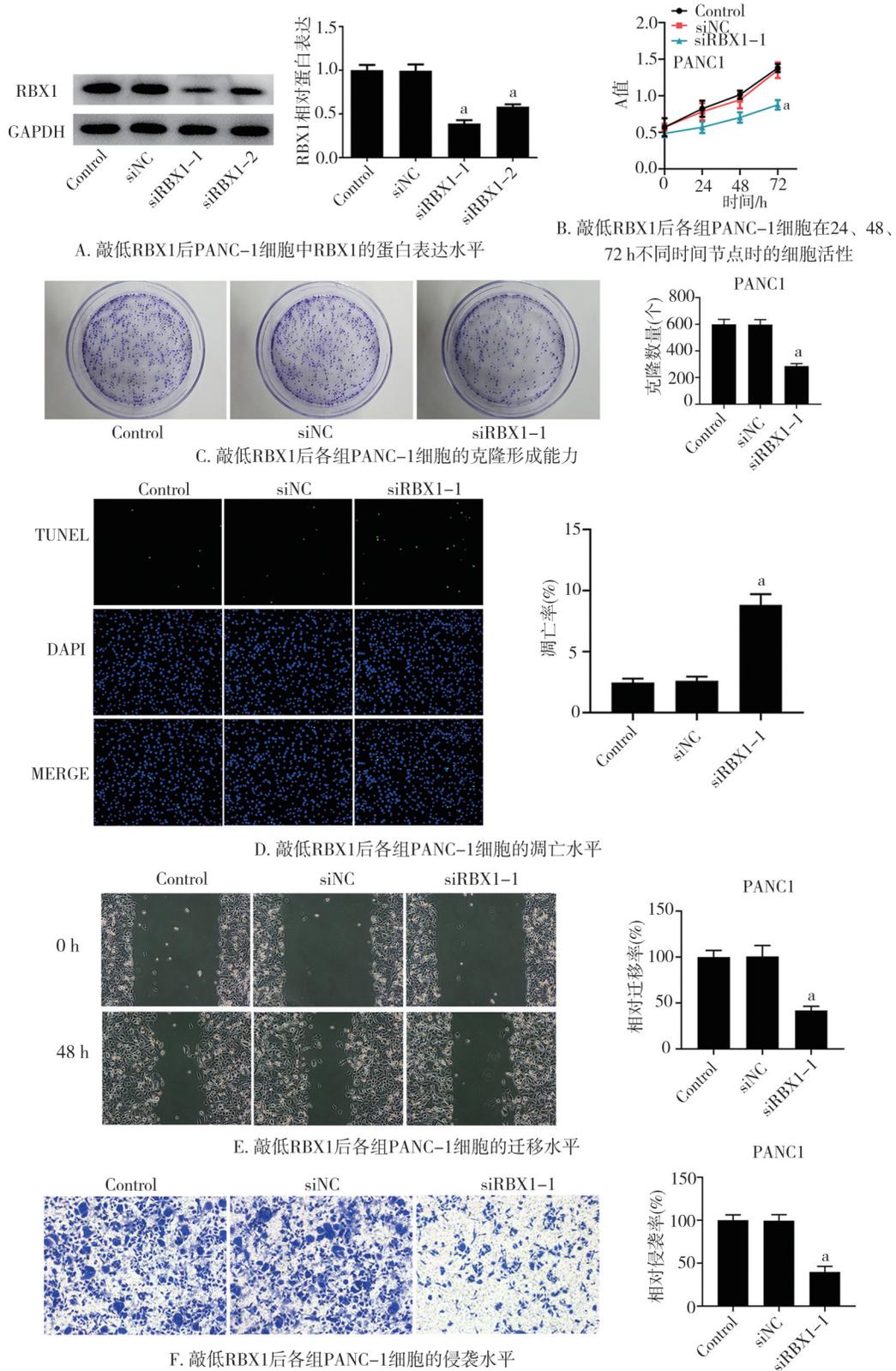
2.3 PHF5A 在胰腺癌中高表达, 并被 RBX1 正向调控

利用 LinkedOmics 网站预测在 PAAD 中与 RBX1 表达相关的基因, 从而发现与其相关性最高的 PHF5A ($r=0.692$, $P < 0.05$, 图 3A)。GEPIA 网站中结果显示相较于正常胰腺组织, 胰腺癌组织中 PHF5A 显著高表达 ($P < 0.05$, 图 3B), 且高表达 PHF5A 与胰腺癌患者总体生存水平低相关 ($P < 0.05$, 图 3C)。qRT-PCR 和 Western blot 检测正常人胰腺导管上皮细胞系和人胰腺癌细胞系中 PHF5A mRNA 和蛋白表达水平, 与

HPDE6-C7 (1.000 ± 0.148 ; 1.000 ± 0.036) 比较, AsPC-1 (1.921 ± 0.094 ; 1.421 ± 0.111), SW1990 (2.322 ± 0.062 ; 1.814 ± 0.048), BxPC-3 (1.397 ± 0.130 ; 1.490 ± 0.096) 和 PANC-1 (2.768 ± 0.084 ; 1.951 ± 0.144) 细胞中 PHF5A 表达显著上调 ($F=128.900$, $P < 0.010$; $F=45.160$, $P < 0.010$; 图 3D、E)。Western blot 检测 RBX1 干扰后 PANC-1 细胞中 PHF5A 的蛋白表达水平, 结果显示, 相较于 siNC 组 (0.987 ± 0.096), siRBX1-1 组 (0.313 ± 0.060) 中 PHF5A 表达显著降低 ($F=82.980$, $P < 0.001$; 图 3F)。以上结果表明, PHF5A 在胰腺癌组织和细胞中高表达, PHF5A 高表达与胰腺癌不良预后相关, 且表达水平受 RBX1 正向调控。

2.4 PHF5A 过表达部分逆转 RBX1 干扰对胰腺癌细胞增殖和凋亡的作用

对 PANC-1 细胞进行 siRBX1 和 pcDNA 3.1-PHF5A 转

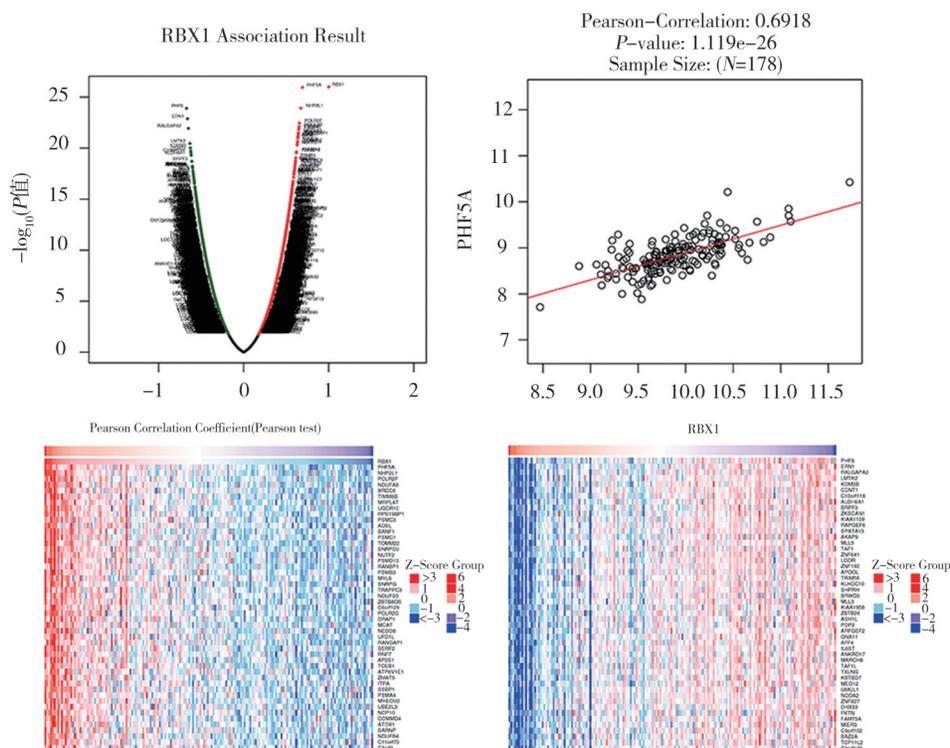


注:a,与siNC组比较, $P < 0.001, \bar{x} \pm s, n=3$

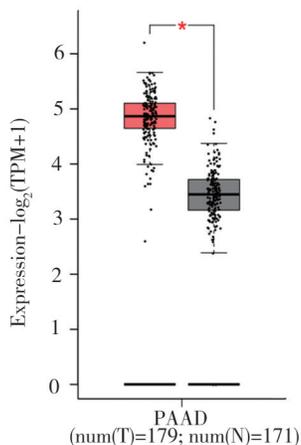
图2 干扰RBX1抑制胰腺癌细胞增殖、侵袭迁移并促进凋亡

染,采用Western blot检测PANC-1细胞中PHF5A表达水平。与siNC组(1.004 ± 0.066)比较,siRBX1-1组(0.286 ± 0.055)中PHF5A表达显著降低,与siRBX1-1+pcDNA3.1组($0.323 \pm$

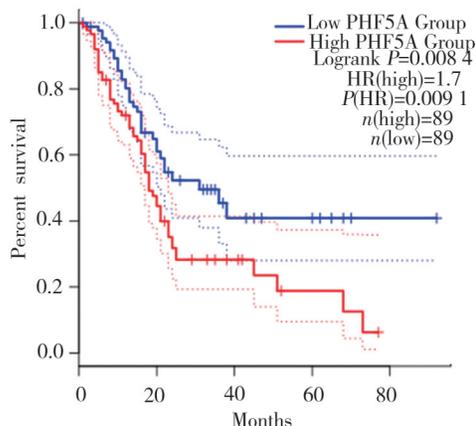
0.061)比较,siRBX1-1+pc-PHF5A组(0.770 ± 0.062)中PHF5A表达显著上调($F=108.100, P < 0.001$;图4A),表明了RBX1对PHF5A的调控作用。CCK-8实验和克隆形成实验用于检测



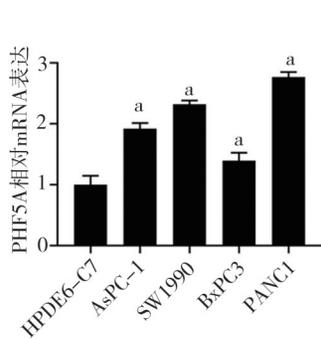
A. LinkedOmics网站中, PAAD中与RBX1表达相关的因子, 以及RBX1和PHF5A在PAAD中的相关性



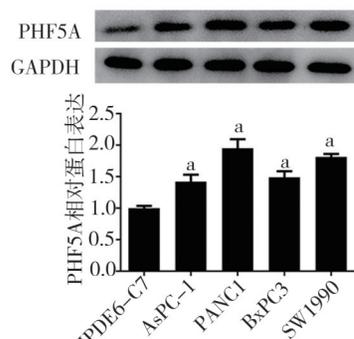
B. GEPIA数据库中正常胰腺 (灰色框, $n=171$) 和 PAAD样本 (红色框, $n=179$) 中PHF5A的RNA表达水平



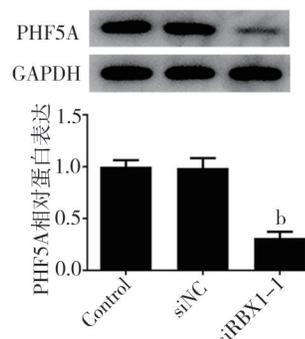
C. GEPIA数据库中 PHF5A对PAAD患者总体生存水平的分析



D. 正常人胰腺导管上皮细胞和各胰腺癌细胞系中PHF5A的mRNA表达水平



E. 正常人胰腺导管上皮细胞和各胰腺癌细胞系中PHF5A的蛋白表达水平



F. 敲低RBX1后PANC-1细胞中PHF5A的蛋白表达水平

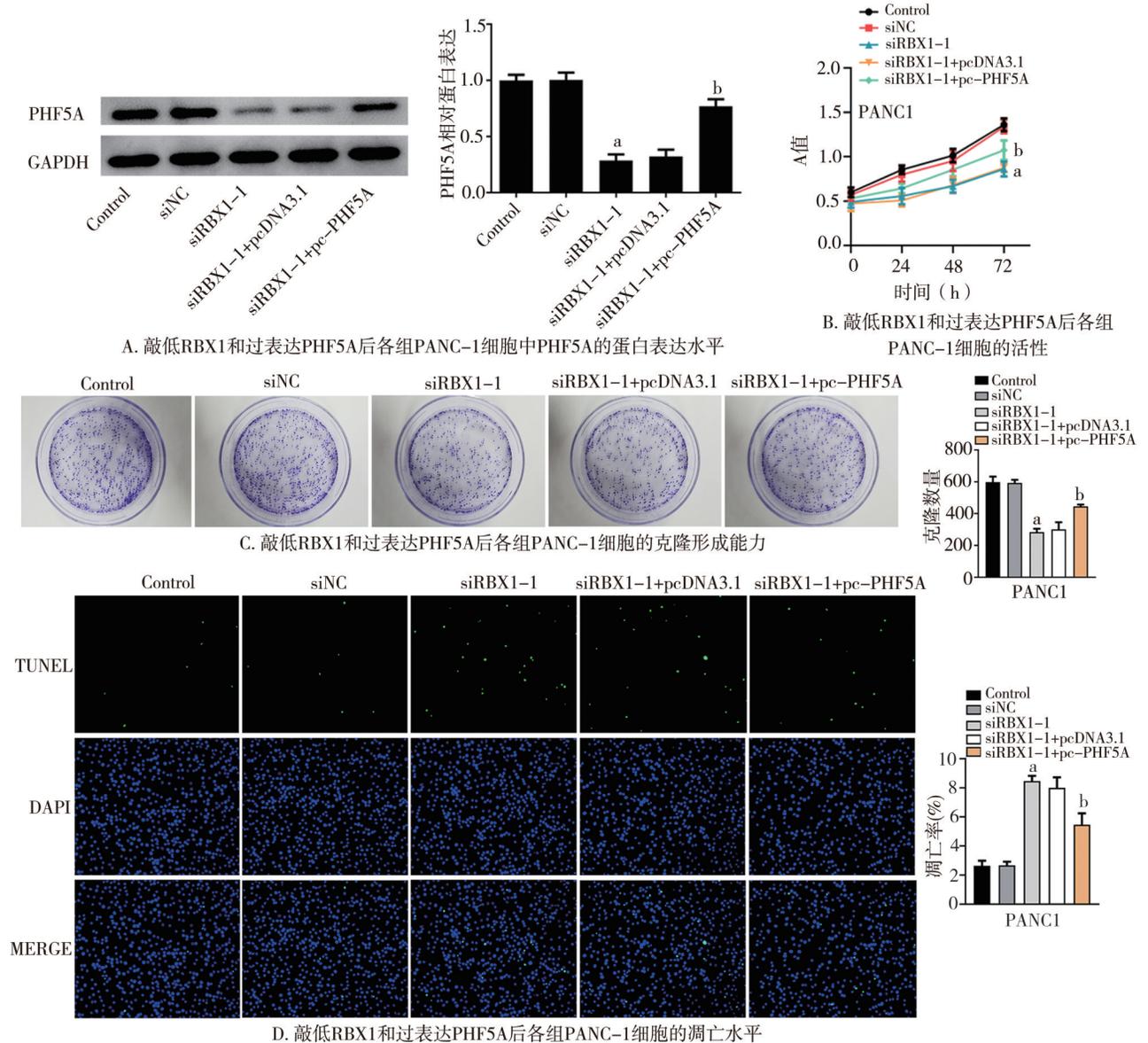
注:a, 与HPDE6-C7组比较, $P < 0.01$; b: 与siNC组比较, $P < 0.001$, $\bar{x} \pm s, n=3$

图3 PHF5A受RBX1正向调控, PHF5A在PAAD组织和细胞中高表达且与不良预后相关

细胞活力和增殖水平。与 siNC 组 ($0.916 \pm 0.324; 593.000 \pm 20.000$) 比较, siRBX1-1 组 ($0.645 \pm 0.163; 283.700 \pm 22.000$) 中细胞活力和增殖水平显著降低; 与 siRBX1-1+pcDNA3.1 组 ($0.634 \pm 0.185; 301.000 \pm 45.000$) 比较, siRBX1-1+pc-PHF5A 组 ($0.775 \pm 0.240; 445.700 \pm 11.000$) 中细胞活力和增殖水平显著增强 ($F=3.262, P=0.002; F=82.140, P<0.001$; 图 4B、C)。TUNEL 染色检测细胞凋亡水平, 结果发现与 siNC 组 (2.667 ± 0.252) 比较, siRBX1-1 组 (8.467 ± 0.351) 中 PANC-1 细胞凋亡水平明显增强, 与 siRBX1-1+pcDNA3.1 组 (8.000 ± 0.721) 比较, siRBX1-1+pc-PHF5A 组 (5.467 ± 0.777) 中 PANC-1 细胞凋亡水平明显降低 ($F=81.850, P<0.001$; 图 4D)。以上结果表明, PHF5A 过表达能够部分逆转 RBX1 干扰对胰腺癌细胞活力、增殖和凋亡的作用。

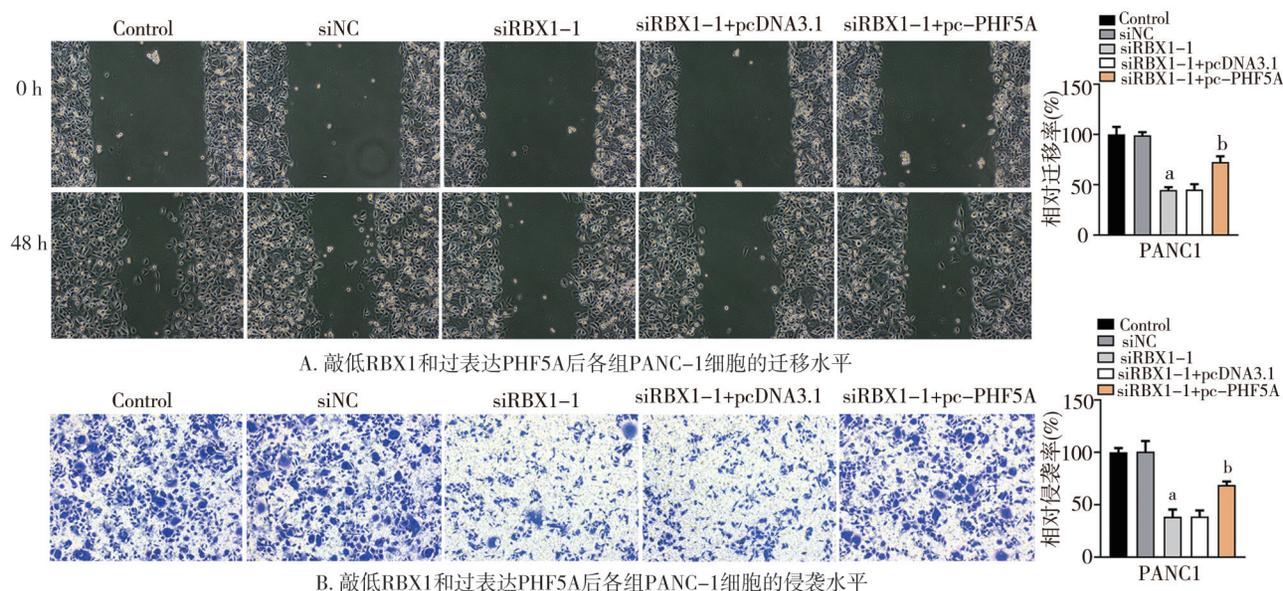
2.5 过表达 PHF5A 能够部分逆转干扰 RBX1 对胰腺癌细胞侵袭迁移的抑制作用

划痕实验结果表明, 与 siNC 组 (99.03 ± 3.301) 比较, siRBX1-1 组 (44.770 ± 2.928) 中 PANC-1 细胞迁移水平显著降低, 与 siRBX1-1+pcDNA3.1 组 (45.230 ± 5.300) 比较, siRBX1-1+pc-PHF5A 组 (72.570 ± 5.793) 中 PANC-1 细胞迁移水平明显上升 ($F=80.080, P<0.001$; 图 5A), transwell 实验结果表明, 与 siNC 组 (100.700 ± 10.180) 比较, siRBX1-1 组 (38.570 ± 6.917) 中 PANC-1 细胞侵袭水平显著降低, 与 siRBX1-1+pcDNA3.1 组 (38.800 ± 5.761) 比较, siRBX1-1+pc-PHF5A 组 (68.870 ± 3.325) 中 PANC-1 细胞侵袭水平明显上升 ($F=67.150, P<0.001$; 图 5B)。以上结果表明 PHF5A 过表达能够部分逆转 RBX1 干扰对胰腺癌细胞迁移和侵袭的抑制作用。



注: a, 与 siNC 组比较, $P<0.001$; b: 与 siRBX1-1+pcDNA3.1 组比较, $P<0.001, \bar{x} \pm s, n=3$

图 4 过表达 PHF5A 部分逆转干扰 RBX1 对胰腺癌细胞增殖、凋亡的作用



注:a,与siNC组比较, $P<0.001$;b;与siRBX1-1+pcDNA3.1组比较, $P<0.01$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$

图5 过表达PHF5A能够部分逆转干扰RBX1对胰腺癌细胞侵袭迁移的抑制作用

3 讨论

胰腺癌是一种消化系统恶性肿瘤,其预后非常差^[17]。尽管近几十年来免疫治疗、放疗、化疗和外科手术取得了巨大进展,但胰腺癌的有效治疗仍然是临床面临的主要挑战,因此探索一种新的胰腺癌治疗方案迫在眉睫。然而,胰腺癌的确切发展和发生机制尚不清楚。

研究表明,RBX1的表达水平与各种肿瘤的深度和大小之间存在显著的相关性。RBX1的表达水平与非肌肉浸润性膀胱移行细胞癌的肿瘤分级和分期呈正相关^[18]。在肝细胞癌中,RBX1表达水平与肿瘤大小和病理分化等级显著相关^[19]。RBX1高表达与晚期肿瘤特征显著相关,包括肿瘤体积更大、浸润深度更深、淋巴结转移、病理分期晚期、淋巴浸润和静脉浸润,表明RBX1可能参与促进食管癌进展和转移^[15]。上述研究表明了RBX1在癌症中的临床意义,本研究也发现RBX1在胰腺癌患者组织中表达显著上调,且RBX1高表达与不良预后相关。大量研究发现RBX1对肿瘤细胞的恶性表型发展具有重要作用。例如,在三阴性乳腺癌中,RBX1表达上调,敲低RBX1可抑制三阴性乳腺癌细胞迁移和侵袭^[20]。在卵巢癌中,天冬氨酰-tRNA合成酶反义RNA 1(aspartyl-tRNA synthetase antisense RNA 1, DARS-AS1)敲低通过靶向RBX1抑制癌细胞的增殖和迁移^[21]。RBX1是癌细胞增殖、侵袭迁移等恶

性表型发展的关键调节因子,本研究结果也再一次证实这一结果。

为进一步探索RBX1的潜在分子机制,本课题组利用LinkedOmics网站预测胰腺癌中与RBX1表达相关的基因,发现与RBX1表达正相关的基因中,PHF5A与RBX1相关性最高。PHF5A是一种高度保守的蛋白质,含有110个氨基酸,在细胞核中广泛表达^[22]。研究表明,PHF5A不仅在染色质重塑^[23]、组织器官形态发育^[24]、维持干细胞多能性^[25]等过程中发挥重要作用,还参与调节细胞周期^[26]以及细胞生长和分化^[27-28]。PHF5A被报道在多种癌症中高度上调,包括胃癌、头颈鳞状细胞癌和非小细胞肺癌等^[29-31]。PHF5A在结直肠癌中表达显著上调,PHF5A敲低可抑制细胞增殖和迁移^[32]。PHF5A在肺腺癌中表达显著上调,PHF5A通过促进肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭,诱导G₀/G₁细胞周期进程并抑制顺铂诱导的细胞凋亡^[33]。本文发现,在胰腺癌中,干扰RBX1可抑制PANC-1细胞增殖、迁移和侵袭,促进凋亡,PHF5A过表达逆转了RBX1敲低对PANC-1细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的作用,这说明,RBX1通过调节PHF5A的表达水平发挥对胰腺癌细胞表型的作用。

综上,本研究结果表明,RBX1在胰腺癌组织和细胞中表达显著上调,且RBX1高表达与胰腺癌患者总体生存水平低相关。RBX1敲低通过下调PHF5A表达抑制胰腺癌细胞增殖、侵袭迁移,促进凋亡,为胰腺癌的治疗提供了一种新策略。

参 考 文 献

- [1] Jiang S, Fagman J B, Ma Y, et al. A comprehensive review of pancreatic cancer and its therapeutic challenges[J]. *Aging (Albany NY)*, 2022,14(18):7635–7649.
- [2] Huang B, Huang H, Zhang S, et al. Artificial intelligence in pancreatic cancer[J]. *Theranostics*, 2022, 12(16):6931–6954.
- [3] Garcia-Carbonero N, Li W, Cabeza-Morales M, et al. New hope for pancreatic ductal adenocarcinoma treatment targeting endoplasmic reticulum stress response: a systematic review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(9):2468.
- [4] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, 67(1):425–479.
- [5] Ohta T, Michel JJ, Schottelius AJ, et al. ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity[J]. *Molecular Cell*, 1999, 3(4):535–541.
- [6] Tan P, Fuchs SY, Chen A, et al. Recruitment of a ROC1 – CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I κ B α [J]. *Molecular Cell*, 1999, 3(4):527–533.
- [7] Kamura T, Conrad M N, Yan Q, et al. The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2[J]. *Genes & Development*, 1999, 13(22):2928–2933.
- [8] Nakayama K I, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6(5):369–381.
- [9] Frescas D, Pagano M. Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and β -TrCP: tipping the scales of cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(6):438–449.
- [10] Xing R, Chen K-B, Xuan Y, et al. RBX1 expression is an unfavorable prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Surgical Oncology*, 2016, 25(3):147–151.
- [11] San Ho C, Noor SM, Nagoor NH. MiR-378 and MiR-1827 regulate tumor invasion, migration and angiogenesis in human lung adenocarcinoma by targeting RBX1 and CRKL, respectively[J]. *Journal of Cancer*, 2018, 9(2):331.
- [12] Yang D, Zhao Y, Liu J, et al. Protective autophagy induced by RBX1/ROC1 knockdown or CRL inactivation via modulating the DEPTOR–MTOR axis[J]. *Autophagy*, 2012, 8(12):1856–1858.
- [13] Migita K, Takayama T, Matsumoto S, et al. Prognostic impact of RING box protein-1 (RBX1) expression in gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2014, 17(4):601–609.
- [14] Zhou M, Cheng H, Fu Y, et al. Long noncoding RNA DARS-AS1 regulates TP53 ubiquitination and affects ovarian cancer progression by modulation miR-194-5p/RBX1 axis[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2021: e22865.
- [15] Kunishige T, Migita K, Matsumoto S, et al. Ring box protein-1 is associated with a poor prognosis and tumor progression in esophageal cancer[J]. *Oncology Letters*, 2020, 20(3):2919–2927.
- [16] Vasaikar SV, Straub P, Wang J, et al. LinkedOmics: analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(D1):D956–D963.
- [17] Yan C, Niu Y, Li F, et al. System analysis based on the pyroptosis-related genes identifies GSDMC as a novel therapy target for pancreatic adenocarcinoma[J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1):455.
- [18] Wang W, Qiu J, Liu Z, et al. Overexpression of RING box protein-1 (RBX1) associated with poor prognosis of non-muscle-invasive bladder transitional cell carcinoma[J]. *Journal of Surgical Oncology*, 2013, 107(7):758–761.
- [19] Yang D, Li L, Liu H, et al. Induction of autophagy and senescence by knockdown of ROC1 E3 ubiquitin ligase to suppress the growth of liver cancer cells[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2013, 20(2):235–247.
- [20] Shao J, Feng Q, Jiang W, et al. E3 ubiquitin ligase RBX1 drives the metastasis of triple negative breast cancer through a FBXO45–TWIST1-dependent degradation mechanism[J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14(13):5493–5510.
- [21] Zhou M, Cheng H, Fu Y, et al. Long noncoding RNA DARS-AS1 regulates TP53 ubiquitination and affects ovarian cancer progression by modulation miR-194-5p/RBX1 axis[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35(10):e22865.
- [22] Wang H, Liu F, Bai C, et al. PHF5A promotes proliferation and migration of non-Small cell lung cancer by regulating of PI3K/AKT Pathway[J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2023, 26(1):10–16.
- [23] Trappe R, Ahmed M, Gläser B, et al. Identification and characterization of a novel murine multigene family containing a PHD-finger-like motif[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 293(2):816–826.
- [24] Trappe R, Schulze E, Rzymiski T, et al. The Caenorhabditis elegans ortholog of human PHF5a shows a muscle-specific expression domain and is essential for C. elegans morphogenetic development[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 297(4):1049–1057.
- [25] Li M, Cheng Q, Wang X, et al. Research progress and therapeutic prospect of PHF5A acting as a new target for malignant tumors[J]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2022, 51(5):647–655.
- [26] Oltra E, Verde F, Werner R, et al. A novel RING-finger-like protein Ini1 is essential for cell cycle progression in fission yeast[J]. *Journal of Cell Science*, 2004, 117(6):967–974.
- [27] Strikoudis A, Lazaris C, Trimarchi T, et al. Regulation of transcriptional elongation in pluripotency and cell differentiation by the PHD-finger protein Phf5a[J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(11):1127–1138.
- [28] Cao Y, Wang Z, Yan Y, et al. Enterotoxigenic bacteroides fragilis promotes intestinal inflammation and malignancy by inhibiting exosome-packaged miR-149-3p[J]. *Gastroenterology*, 2021, 161(5):1552–1566.
- [29] Zhang Z, Peng L, Yang W, et al. PHF5A facilitates the development and progression of gastric cancer through SKP2-mediated stabilization of FOS[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1):5.
- [30] Liu C, Li G, Zheng S, et al. PHF5A regulates the expression of the DOCK5 variant to promote HNSCC progression through p38 MAPK activation[J]. *Biol Direct*, 2023, 18(1):39.
- [31] Yang Y, Li M, Zhou X, et al. PHF5A contributes to the maintenance of the cancer stem-like phenotype in non-small cell lung cancer by regulating histone deacetylase 8[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2022, 52(3):439–451.
- [32] Chang Y, Zhao Y, Wang L, et al. PHF5A promotes colorectal cancer progression by alternative splicing of TEAD2[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 26:1215–1227.
- [33] Mao S, Li Y, Lu Z, et al. PHD finger protein 5A promoted lung adenocarcinoma progression via alternative splicing[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(5):2429–2441.

(责任编辑:冉明会)