

RMP 通过 AMPK 通路调节线粒体稳态和氧化应激诱导卵巢癌细胞增殖与凋亡的机制研究

代晶, 张勇, 潘长清, 王丹, 王君, 杨芳, 王亮

(电子科技大学医学院附属绵阳医院 / 绵阳市中心医院妇产科, 四川绵阳 621000)

摘要: **目的** 探讨 RPB5 调节蛋白 (RBP5-mediating protein, RMP) 对卵巢癌细胞增殖与凋亡的影响以及通过腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK) 通路调节线粒体稳态和氧化应激的作用机制。**方法** 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 法检测人输卵管上皮永生细胞 FTE-187 与人卵巢癌细胞系 SKOV3, A2780 和 HO8910 中 RMP 基因的表达。以 SKOV3 细胞作为研究对象, 利用 siRNA 技术敲低 SKOV3 细胞中 RMP 的表达, 再通过 qRT-PCR 法验证 RNAi 效率。通过平板克隆形成实验和流式细胞技术观察敲低 RMP 表达后对 SKOV3 细胞增殖能力、周期分布及凋亡能力的影响。通过激光共聚焦显微镜观察敲低 RMP 表达后 SKOV3 细胞中线粒体形态的变化。Western blot 进一步证实 RMP 调控线粒体稳态相关蛋白 AMPK 和 p-AMPK 以及凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达。采用 ROS 荧光法检测敲低 RMP 表达后对 SKOV3 细胞内 ROS 水平的影响。**结果** RMP 在 FTE-187 细胞中的表达水平为 1.00 ± 0.13 , 在 A2780, HO8910 和 SKOV3 细胞中的表达水平分别为 1.58 ± 0.19 , 1.88 ± 0.17 , 2.15 ± 0.10 , 较 FTE-187 中的表达显著上升, 差异有统计学意义 ($F=72.035$, $P < 0.001$)。SKOV3 细胞转染后, RMP-siR 组 RMP 表达水平为 0.86 ± 0.20 , 较 control 组 (2.06 ± 0.11) 和 NC-siR 组 (1.92 ± 0.23) 显著下降, 差异有统计学意义 ($F=90.220$, $P < 0.001$)。平板克隆形成实验和流式细胞检测结果表明, 敲低 RMP 可以通过引起 G2/M 期阻滞导致卵巢癌细胞增殖障碍, 促进卵巢癌细胞凋亡。通过激光共聚焦显微镜观察到敲低 RMP 表达后, SKOV3 细胞中点状的线粒体明显增多, 线粒体的碎片化也增多, 导致线粒体稳态失衡。Western blot 结果表明, control 组和 NC-siR 组 p-AMPK 表达水平分别为 0.75 ± 0.12 , 0.77 ± 0.17 , 敲低 RMP 表达后, p-AMPK 表达水平为 1.39 ± 0.33 , 较 control 组和 NC-siR 组升高, 差异有统计学意义 ($F=46.550$, $P < 0.001$)。control 组和 NC-siR 组凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 比值分别为 0.55 ± 0.11 和 0.56 ± 0.08 , 敲低 RMP 表达后, Bax/Bcl-2 比值增加为 1.57 ± 0.22 , 差异亦有统计学意义 ($F=62.027$, $P < 0.001$)。荧光显微镜观察到, control 组和 NC-siR 组荧光强度分别为 $100.24\% \pm 8.76\%$ 和 $103.07\% \pm 7.93\%$, 敲低 RMP 后其荧光强度为 $295.14\% \pm 12.10\%$, 显著高于 control 组和 NC-siR 组, 差异有统计学意义 ($F=392.708$, $P < 0.001$)。**结论** RMP 在卵巢癌细胞中呈高表达, 敲低 RMP 表达后可以通过激活磷酸化 AMPK 通路导致卵巢癌细胞线粒体稳态失衡和氧化应激, 诱导卵巢癌细胞在 G2/M 期发生阻滞, 进而抑制卵巢癌细胞增殖, 促进其凋亡。

关键词: RPB5 调节蛋白; AMPK 通路; 线粒体稳态; 氧化应激; 卵巢癌

中图分类号: R737.31; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 02-057-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2023.02.011

Mechanism of RMP Regulating Mitochondrial Homeostasis and Oxidative Stress-induced Ovarian Cancer Cell Proliferation and Apoptosis Through the AMPK Pathway

DAI Jing, ZHANG Yong, PAN Chang-qing, WANG Dan, WANG Jun, YANG Fang, WANG Liang (Department of Obstetrics and Gynecology, Mianyang Hospital Affiliated to the School of Medicine of University of Electronic Science and Technology/Mianyang Central Hospital, Sichuan Mianyang 621000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of the RPB5-mediating protein (RMP) on the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells and the mechanism of regulating mitochondrial homeostasis and oxidative stress through the AMPK pathway. **Methods** The expression of RMP gene in immortalized human fallopian tube epithelial cells FTE-187 and human ovarian cancer cell lines SKOV3, A2780 and HO8910 was detected by qRT-PCR. Taking SKOV3 cells as the research object, the expression of RMP in SKOV3 cells was knocked down by specific siRNA, and the RNAi efficiency was verified by qRT-PCR method. The effects of knockdown of RMP expression on the proliferation, cycle distribution and apoptosis of SKOV3 cells

基金项目: 医学工程国家重点实验室开放课题, 项目编号: 2020KFKT017。

作者简介: 代晶 (1987-), 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 妇科肿瘤, E-mail: ohh5101@163.com。

通讯作者: 王亮 (1976-), 女, 硕士研究生, 副主任医师。

were observed by plate clone formation assay and flow cytometry. Laser confocal microscopy was used to observe the change in mitochondrial morphology in SKOV3 cells after knockdown of RMP expression. Western blot further confirmed that RMP regulates the expression of mitochondrial homeostasis-related proteins AMPK and p-AMPK as well as apoptosis proteins Bcl-2 and Bax. **Results** The expression level of RMP in FTE-187 cells was 1.00 ± 0.13 , and the expression levels in A2780, HO8910 and SKOV3 cells were 1.58 ± 0.19 , 1.88 ± 0.17 and 2.15 ± 0.10 , respectively, which was significantly higher than that in FTE-187, the difference was statistically significant ($F=72.035$, $P < 0.001$). After transfection of SKOV3 cells, the expression level of RMP in RMP-siR group was 0.86 ± 0.20 , which was significantly lower than that in control group (2.06 ± 0.11) and NC-siR group (1.92 ± 0.23), and the difference was statistically significant ($F=90.220$, $P < 0.001$). The results of plate clone formation assay and flow cytometry showed that knockdown of RMP could induce ovarian cancer cell proliferation disorder and promote ovarian cancer cell apoptosis by causing G2/M phase arrest. It was observed by laser confocal microscopy that after knockdown of RMP expression, the number of punctate mitochondria in SKOV3 cells increased significantly, and the fragmentation of mitochondria also increased, resulting in the imbalance of mitochondrial homeostasis. Western blot results showed that the expression levels of p-AMPK in the control group and NC group were 0.75 ± 0.12 and 0.77 ± 0.17 , respectively. After knocking down the expression of RMP, the expression level of p-AMPK was 1.59 ± 0.33 , which was higher than that in the control group and NC-siR group, the difference was statistically significant ($F=46.550$, $P < 0.001$). The ratio of apoptosis-related protein Bax/Bcl-2 in the control group and NC-siR was 0.55 ± 0.11 and 0.56 ± 0.08 , respectively. After knocking down the expression of RMP, the ratio of Bax/Bcl-2 was significantly increased to (1.57 ± 0.22), and the difference was also statistically significant ($F=62.027$, $P < 0.001$). Fluorescence microscope observed that the fluorescence intensity of control group and NC-siR group were $100.24\% \pm 8.76\%$ and $103.07\% \pm 7.93\%$, respectively. After knockdown of RMP, the fluorescence intensity was $295.14\% \pm 12.10\%$, which was significantly higher than that of control group and NC-siR group ($F=392.708$, $P < 0.001$). **Conclusion** RMP was highly expressed in ovarian cancer cells. Knocking down the expression of RMP can lead to the imbalance of mitochondrial homeostasis and oxidative stress in ovarian cancer cells by activating the phosphorylated AMPK pathway, and induce ovarian cancer cells to block in the G2/M phase, thereby inhibiting ovarian cancer cell proliferation and promoting its apoptosis.

Keywords: RMP; AMPK pathway; mitochondrial homeostasis; oxidative stress; ovarian cancer.

卵巢癌是女性生殖器官最常见的恶性肿瘤之一,其发病率低于宫颈癌和子宫内膜癌,但其死亡率却超过宫颈癌及子宫内膜癌之和,是严重威胁妇女健康的最大疾患^[1]。目前关于卵巢癌的病因及发病机制尚未明确,有研究发现,线粒体作为细胞内重要的信使细胞器,除了给细胞内各种物质提供能量外,同时还参与了调节细胞增殖与代谢、胞内钙平衡、氧化还原等多种生理功能^[2]。线粒体基因组变异与卵巢癌肿瘤细胞的生长加快及代谢密切相关^[3]。此外,关于线粒体异常在人类癌症中的研究也有报道,若线粒体结构和功能遭到破坏,则会引起氧化应激反应,进而促进卵巢癌的发生发展^[4]。因此,寻找具有调节线粒体功能及氧化应激的生物活性因子,并深入探究其作用机制,对后期卵巢癌的临床治疗具有举足轻重的作用。RBP5 调节蛋白(RBP5-mediating protein, RMP)是 RNA 聚合酶 II 第 5 亚基 RPB5 的蛋白,又名 URI,其在基因转录调节方面具有重要作用^[5]。有研究报道,RMP 可定位于线粒体上,并通过调控线粒体途径及氧化应激过程而促进肿瘤的发生发展^[6-7]。此外,腺苷酸激活蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK)是生物能量代谢调节的关键分子,可促进各种组织中 ATP 的产生并

抑制 ATP 的消耗途径,在调控线粒体稳态中起到关键作用^[8]。基于此,本研究通过构建 RMP 慢病毒载体,研究敲低 RMP 表达对卵巢癌细胞增殖、凋亡及周期分布的影响,并且检测了 AMPK 通路蛋白表达和 ROS 水平,进一步阐明 RMP 在卵巢癌细胞线粒体稳态及氧化应激调控中的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 从中国科学院细胞库购买 1 株人输卵管上皮永生化细胞 FTE-187 与 3 株人卵巢癌细胞系 SKOV3, A2780 和 HO8910 作为研究对象。

1.2 仪器与试剂 DMEM 培养液, RPMI 1640 培养液, McCoy's5A 培养液, Medium199 培养液, MCDB105 培养液和胎牛血清(美国 Gibco 公司);青-链霉素(生工生物工程股份有限公司);RNA 逆转录试剂盒(日本 Toyobo 公司);qRT-PCR 引物(由上海生工生物工程公司有限公司设计合成);EDU 试剂盒(锐博生物科技有限公司);Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒(美国 BD 公司);MAPK, p-MAPK 单克隆抗体及 HRP 标记二抗(Cell Signaling Technology 公司);PCR 仪(德国 Biometra);CO₂ 恒温培养箱(美国 Nuair 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养: FTE-187 细胞用含 1:10 胎牛血

清的1:1 Medium199与MCDB105培养液培养; SKOV3细胞用含1:10胎牛血清的McCoy's5A培养液培养; A2780细胞用含1:10胎牛血清的DMEM培养液培养; HO8910细胞用含1:10胎牛血清的RPMI 1640培养液培养,所有培养液均常规加入100 U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素,在37℃孵育箱中培养并传代,待细胞长至取对数生长期后,进行后续实验。

1.3.2 qRT-PCR检测各细胞系中RMP mRNA的表达:取上述对数生长期的细胞,PBS润洗3次后,加入1 ml Trizol裂解液反复吹打后将其转移至无酶PE管,加入200 μ l氯仿,震荡15 s,在4℃12 000 \times g条件下离心15 min,将上清液转移至新的无酶PE管,加入500 μ l异丙醇,上下混匀,4℃12 000 \times g离心取沉淀,用75 ml/dl乙醇洗涤沉淀,用DEPC水溶解沉淀即可得到RNA,吸取2 μ l RNA样品检测其纯度。使用反转录试剂盒合成第一链cDNA,用合成的cDNA作为模板进行PCR扩增,扩增体系为10 μ l,其中SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix 5 μ l, cDNA 1.0 μ l,上下游引物各0.2 μ l, DEPC水3.6 μ l; PCR程序:95℃60s; 95℃10s, 62℃10s, 72℃10s, 循环39次, 4℃保存备用;以GAPDH作为参照,根据反应结果中的 C_t 值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量的方法比较各组细胞中RMP基因的表达水平。PCR引物序列: RMP F: 5'-GCTGTGTCAGTATATCAGGACA-3', R: 5'-CATTGGTCTGTGGATCATATC-3'; GAPDH F: 5'-CAGAACATCATCCCTGCCTCTACC-3', R: 5'-TTGAAGTCAGAGGAGACCACCTG-3'。

1.3.3 细胞转染:用不含血清的McCoy's5A培养基稀释siRNA和LipofectAMINE 2000,并将两者混匀,室温静置20 min后,加入接种有SKOV3细胞的6孔板中,置于37℃恒温培养箱中培养6 h,将不含血清的培养液更换为含1:10胎牛血清的培养液继续培养48 h,同时应设有阴性表达载体(NC-siR组)及空白对照(control组),采用qRT-PCR法比较其转染效率。

1.3.4 平板克隆形成实验:将上述经siRNA转染处理的SKOV3细胞接种于6孔板,调整细胞密度为800个细胞/孔,每孔加入2 ml培养液,设置3个复孔,轻轻晃动后置于37℃恒温培养箱中培养,每隔48 h观察一次细胞生长情况,当其计数多于50个细胞克隆时终止培养,弃去培养液,用PBS润洗3次,用甲醇固定15 min,弃去甲醇,每孔加入浓度为1 g/L的结晶紫染色30 min,弃去结晶紫,PBS洗涤3次后倒扣晾干,置于光学显微镜下拍照计数。

1.3.5 PI染色检测细胞周期:收集经siRNA转染

处理的SKOV3细胞,用含1:10胎牛血清的PBS重悬细胞,混匀后加入提前预冷的乙醇固定细胞,过夜固定后10 000 \times g离心10 min,弃去上清,用预冷的PBS洗涤3次,离心弃去废液后加入500 μ l PI染液室温避光孵育30 min,然后采用流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

1.3.6 Annexin V-PI双染法检测细胞凋亡:收集经siRNA转染处理的SKOV3细胞,弃去培养液,用PBS洗涤2次后,10 000 \times g条件下离心10 min,加入100 μ l 1 \times Binding buffer重悬细胞,然后在每组细胞中各加入5 μ l Annexin V-FITC和5 μ l PI染液,室温避光孵育20 min,离心弃去上清,每管再加入400 μ l 1 \times Binding buffer,混匀后在1 h内通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3.7 细胞线粒体形态观察:使用线粒体染色试剂Mito tracker分别对上述转染NC-siR, RMP-siR及control组的SKOV3细胞线粒体进行染色,然后将各组细胞置于激光共聚焦显微镜下观察线粒体形态变化。

1.3.8 线粒体能量供应相关蛋白AMPK和p-AMPK的表达变化:分别取上述转染后的SKOV3细胞,经PBS洗涤、胰蛋白酶消化后加入细胞裂解液,冰上裂解30 min,离心取上清,即为细胞总蛋白;用BCA试剂盒定量蛋白浓度,并用5 \times SDS缓冲液调整蛋白浓度,使其上样量保持一致。提前配置好凝胶电泳,上样体积15 μ l,先在80 V电泳20 min,随后将电压调整为120 V,当蛋白条带跑至分离胶底部时即可终止电泳,采用湿法转膜法在100 V电压下转膜60 min,结束后将含蛋白的一面朝上,放入封闭液中室温封闭1 h, TBST洗膜3次,加入按1:1 000稀释好的AMPK和p-AMPK一抗4℃孵育过夜, TBST洗膜3次后加入1:2 000稀释的二抗,室温孵育1 h, TBST漂洗3次,采用化学发光法进行显色,凝胶成像仪拍照保存。

1.3.9 细胞内ROS检测:取上述转染后的SKOV3细胞,弃去培养液,用PBS洗涤2次后,加入200 μ l培养液配制的DCFH-DA (20 μ mol/L),在37℃恒温培养箱避光孵育30 min,吸出DCFH-DA工作液,用PBS轻轻洗去未能进入细胞内的DCFH-DA后加入200 μ l培养液,在微孔板读取器上(485 nm激发, 525 nm发射)测量荧光强度,并于荧光显微镜下观察。

1.4 统计学分析 采用SPSS 20.0软件进行结果分析,所有数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间差异比较采用LSD- t 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RMP在输卵管上皮永生化细胞与卵巢癌细

胞系中的表达水平 qRT-PCR 结果表明, RMP 在 FTE-187 细胞中的表达水平为 1.00 ± 0.13 , A2780, HO8910 和 SKOV3 细胞中 RMP 表达水平分别为 1.58 ± 0.19 , 1.88 ± 0.17 和 2.15 ± 0.10 , 较 FTE-187 中 RMP 表达水平显著上升, 差异有统计学意义 ($F=72.035$, $P < 0.001$)。

2.2 细胞转染效率验证 选择上述表达水平最高的 SKOV3 细胞进行脂质体转染, 结果显示, RMP-siR 组 RMP 表达水平为 0.86 ± 0.20 , 较 control 组 (2.06 ± 0.11) 和 NC-siR 组 (1.92 ± 0.23) 显著下降, 差异有统计学意义 ($F=90.220$, $P < 0.001$)。

2.3 敲低 RMP 表达对 SKOV3 细胞增殖能力的影响 平板克隆形成实验结果显示, control 组细胞克隆数为 302.35 ± 19.47 个, NC-siR 组细胞克隆数为 289.55 ± 23.12 个, 而敲低 RMP 表达后显著降低了细胞的克隆形成能力, 其克隆数为 128.68 ± 15.56 个, 三组相比差异有统计学意义 ($F=72.947$, $P < 0.001$)。

2.4 敲低 RMP 表达对 SKOV3 细胞周期分布及凋亡的影响 流式细胞检测结果显示, control 组 G0/G1 期细胞数为 62.80%, NC-siR 组 G0/G1 期细胞数为 61.83%, 敲低 RMP 表达后 G0/G1 期细胞显著减少为 53.81%, 三组间比较差异有统计学意义 ($F=35.813$, $P < 0.001$), control, NC-siR 及 RMP-siR 组 S 期细胞分别为 22.31%, 23.93% 与 20.00%, 差异无统计学意义 ($F=7.609$, $P=0.215$); 而 control 组 G2/M 期细胞为 14.90%, NC-siR 组 G2/M 期细胞为 14.24%, RMP-siR 组 G2/M 期细胞显著增加为 26.19%, 三组间比较差异有统计学意义 ($F=43.615$, $P < 0.001$)。敲低 RMP 表达后细胞凋亡率为 26.31%, 较 control 组凋亡率 (7.36%) 和 NC-siR 组凋亡率 (10.59%) 显著增加, 差异亦有统计学意义 ($F=69.058$, $P < 0.001$), 这说明敲低 RMP 可以通过引起 G2/M 期阻滞导致卵巢癌细胞增殖障碍, 促进卵巢癌细胞凋亡。

2.5 敲低 RMP 表达对 SKOV3 细胞线粒体形态的影响 见图 1。激光共聚焦显微镜下观察到的红色部分为线粒体, 与 control 组和 NC-siR 组相比, 敲低 RMP 表达后, SKOV3 细胞中点状的线粒体明显增多, 线粒体的碎片化也增多, 提示敲低 RMP 表达可能导致线粒体稳态失衡。

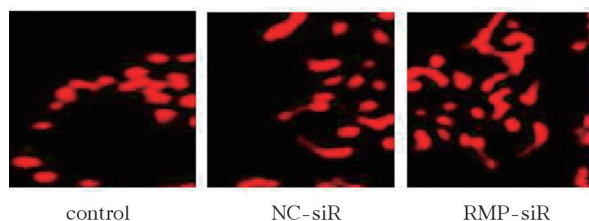


图1 敲低 RMP 表达对 SKOV3 细胞线粒体形态的影响

2.6 敲低 RMP 表达对线粒体能量供应敏感蛋白 AMPK 和 pAMPK 的表达变化 Western blot 结果表明, control 组 AMPK 和 p-AMPK 表达水平为 0.82 ± 0.15 和 0.75 ± 0.12 , NC-siR 组 AMPK 和 p-AMPK 表达水平为 0.80 ± 0.20 和 0.77 ± 0.17 , 敲低 RMP 表达后, p-AMPK 表达水平为 1.39 ± 0.33 , 较 control 组和 NC-siR 组显著升高, 差异有统计学意义 ($F=46.550$, $P < 0.001$), 而 AMPK 蛋白 (0.96 ± 0.28) 表达水平无明显变化, 差异无统计学意义 ($F=17.305$, $P > 0.005$)。control 组和 NC-siR 组凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 比值分别为 0.55 ± 0.11 和 0.56 ± 0.08 , 而敲低 RMP 表达后, Bax/Bcl-2 比值显著增加为 1.57 ± 0.22 , 三组间差异有统计学意义 ($F=62.027$, $P < 0.001$), 进一步证实敲低 RMP 表达可以促进卵巢癌细胞凋亡。

2.7 敲低 RMP 表达对细胞内 ROS 水平的影响 荧光显微镜观察显示, control 组和 NC-siR 组荧光强度分别为 $100.24\% \pm 8.76\%$ 和 $103.07\% \pm 7.93\%$, 敲低 RMP 后 SKOV3 细胞中累积大量 ROS, 其荧光强度为 $295.14\% \pm 12.10\%$, 显著高于 control 组和 NC-siR 组, 差异有统计学意义 ($F=392.708$, $P < 0.001$)。

3 讨论

由于卵巢癌早期缺少症状, 即使有症状也不特异, 筛查的作用又有限, 因此早期诊断比较困难, 就诊时 60% ~ 70% 患者已发展为晚期, 并伴有盆腔转移, 导致治疗效果不佳, 术后易复发、预后差, 严重威胁女性生命健康^[9]。因此, 探究卵巢癌的病因及发病机制, 寻找有效的靶向调控因子是目前科研工作者研究的热点。近年来研究发现, RMP 作为一种支架蛋白, 具有强大的基因调节功能, 在多种癌症中发挥着促肿瘤的作用, 可能是肿瘤生物治疗的一个有希望的靶点^[10]。ZHOU 等^[11]探讨了 RMP 在肝癌细胞 EMT 中的关键作用以及 RMP 促进肝癌细胞侵袭、迁移的机制, 结果表明, RMP 通过激活 NF- κ B/CSN2/Snail 通路促进肝癌细胞转移和 EMT, 提示 RMP 可作为治疗转移性肝癌的潜在候选靶点。XU 等^[12]研究了 RMP 对人宫颈癌细胞系 HeLa 和 C33A 迁移、侵袭的影响, 结果表明, RMP 可能通过调控靶向波形蛋白的表达在人类宫颈癌细胞的迁移和侵袭中发挥重要作用。戴万辉等^[13]探究了癌基因 RMP 沉默后对乳腺癌细胞自噬和凋亡的影响, 结果表明, RMP 基因沉默可导致乳腺癌细胞自噬减弱和凋亡增强, 为探究乳腺癌的治疗手段提供了实验依据。在本研究中发现, RMP 在卵巢癌细胞株中呈高表达, 通过 RNAi 技术敲低 SKOV3 细胞中 RMP 表达后, 可以引起细胞周期在

G2/M 期发生阻滞,进而抑制卵巢癌细胞增殖,促进卵巢癌细胞凋亡,这与前期文献报道的 RMP 在多种癌症中表达上调的结果相一致,说明 RMP 确可作为促癌因子参与癌症的发生发展。

敲低 RMP 表达抑制卵巢癌细胞增殖、促进其凋亡的具体机制是怎样的呢?还需我们更深入地进行探讨。大量研究表明,与细胞增殖直接相关的细胞活动就是 ATP 能量的供应,而线粒体是产生 ATP 的主要细胞结构^[14]。故我们观察了敲低 RMP 对 SKOV3 细胞线粒体的影响,结果显示,敲低 RMP 表达后,SKOV3 细胞中点状的线粒体明显增多,线粒体的碎片化也增多,提示敲低 RMP 表达可能导致线粒体稳态失衡。这与 BIAN 等^[15]报道的敲低 RMP 可以引起胃癌细胞内 DNA 损伤、降低胃癌细胞活力和增殖以及诱导胃癌细胞凋亡的结论相一致。此外,RMP 已被证明是 S6 激酶 1(S6K1)的线粒体底物,其作用是调节线粒体功能,维持线粒体稳态平衡以促进细胞生长和存活^[16],这也能证明本研究结果的可靠性。为了进一步证实敲低 RMP 表达使线粒体能量供应受到了影响,我们通过 Western blot 法检测了对 ATP 含量敏感的 AMPK 及 p-AMPK 的表达水平,结果表明,敲低 RMP 表达后,p-AMPK 表达水平显著升高,与张斌等^[17]报道的 AMPK 相关通路在维持线粒体稳态的过程中发挥重要作用的结论相吻合。

前期有大量文献证实活性氧(ROS)来源于线粒体,并且通常情况下,细胞内的 ROS 处于一个低水平状态,在基因表达调控以及细胞的生长过程中起着非常重要的作用^[18]。故我们又进一步探索了敲低 RMP 对 SKOV3 细胞内 ROS 水平的影响,结果表明,敲低 RMP 导致 SKOV3 细胞中累积了大量 ROS,并且其荧光强度显著高于 control 组和 NC-siR 组,说明 ROS 确实参与了 RMP 调节线粒体稳态的作用过程。该结论与 XIA 等^[19]报道的 ROS 大量累积,导致线粒体代谢紊乱,从而破坏其能量产生,使细胞出现持续的氧化应激,进而诱导其发生凋亡的结论相一致,进一步说明了 RMP 影响卵巢癌细胞中 ROS 水平,参与其氧化应激反应过程。

综上所述,敲低 RMP 表达,可以抑制卵巢癌细胞增殖,诱导卵巢癌细胞在 G2/M 期发生阻滞,促进其凋亡,其作用机制可能是通过激活磷酸化 AMPK 通路导致细胞内线粒体稳态失衡和促进氧化应激反应,为进一步探究卵巢癌发生发展的分子机制提供了全新的视角。但本研究目前只进行了初步的基础研究,后期还需通过更多的临床实验数据进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] 周红,周江洪. 卵巢癌组织中 DR-NM23 的表达及对细胞增殖和转移的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(1): 114-118.
ZHOU Hong, ZHOU Jianghong. Expression of DR-NM23 in ovarian cancer tissue and its effect on cell proliferation and metastasis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(1): 114-118.
- [2] KOCH R E, JOSEFSON C C, HILL G E. Mitochondrial function, ornamentation, and immunocompetence[J]. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 2017, 92(3): 1459-1474.
- [3] TASDOGAN A, MCFADDEN D G, MISHRA P. Mitochondrial DNA haplotypes as genetic modifiers of cancer[J]. Trends Cancer, 2020, 6(12):1044-1058.
- [4] FREYRE-BERNAL S I, SAAVEDRA-TORRES J S, ZÚIGA-CERÓN L F, et al. Cancer and mitochondrial function[J]. Revista De La Facultad De Medicina, 2018, 66(1): 83.
- [5] 陈涵,徐溢,魏文祥. RMP 与肝细胞癌的发生发展[J]. 南昌大学学报(医学版), 2016, 56(4): 91-94.
CHEN Han, XU Yi, WEI Wenxiang. RMP and the occurrence and development of hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Nanchang University (Medical Science), 2016, 56(4): 91-94.
- [6] THOMAS P A, MITA P, HA Susan, et al. Role of the unconventional prefolin proteins URI and UXT in transcription regulation[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2018, 1106: 85-94.
- [7] CHEN Shaomu, FENG Yu, ZHANG Biao, et al. RMP promotes the proliferation and radioresistance of esophageal carcinoma[J]. Journal of Cancer, 2019, 10(16): 3698-3705.
- [8] HE Jianli, SHANGGUAN Xun, ZHOU Wei, et al. Glucose limitation activates AMPK coupled SENP1-Sirt3 signalling in mitochondria for T cell memory development[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 4371.
- [9] ZHANG Jue, XU Meng, GAO Han, et al. Two protein-coding genes act as a novel clinical signature to predict prognosis in patients with ovarian serous cystadenocarcinoma[J]. Oncology Letters, 2018, 15(3): 3669-3675.
- [10] YANG Sijun, WANG Hongmin, GUO Yunlan, et al. RMP plays distinct roles in the proliferation of hepatocellular carcinoma cells and normal hepatic cells[J]. International Journal of Biological Sciences, 2013, 9(6): 637-648.
- [11] ZHOU Wei, WANG Qi, XU Yi, et al. RMP promotes epithelial-mesenchymal transition through NF- κ B/CSN2/Snail pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(25): 40373-40388.
- [12] XU Zhonghai, BIAN Huiqin, ZHANG Fei, et al. URI promotes the migration and invasion of human cervical cancer cells potentially via upregulation of vimentin

- expression[J]. American Journal of Translational Research, 2017, 9(6): 3037-3047.
- [13] 戴万辉, 谢劲松. URI 基因沉默对乳腺癌细胞自噬与凋亡的影响 [J]. 医学研究生学报, 2021, 34(10): 1030-1037.
- DAI Wanhui, XIE Jinsong. Effects of URI gene silencing on autophagy and apoptosis in breast cancer cells[J]. Journal of Medical Postgraduates, 2021, 34(10): 1030-1037.
- [14] LERTSUWAN J, RUCHIRAWAT M. Inhibitory effects of ATP and adenosine on cholangiocarcinoma cell proliferation and motility[J]. Anticancer Research, 2017, 37(7): 3553-3561.
- [15] BIAN Huiqin, LU Yaojuan, GU Yu, et al. Abstract 5914: URI participates in cisplatin-induced DNA damage repair of gastric cancer cells via the ATM/CHK2 pathway[J]. Cancer Research, 2020, 80(Suppl 16): 5914.
- [16] DJOUDER N, METZLER S C, SCHMIDT A, et al. S6K1-mediated disassembly of mitochondrial URI/PP1 γ complexes activates a negative feedback program that counters S6K1 survival signaling[J]. Molecular Cell, 2007, 28(1): 28-40.
- [17] 张斌, 赵鹏, 白利刚. 褪黑素通过 AMPK 通路减轻 H_2O_2 诱导的小鼠神经元线粒体损伤 [J]. 神经解剖学杂志, 2021, 37(5): 569-576.
- ZHANG Bin, ZHAO Peng, BAI Ligang. Melatonin attenuates H_2O_2 -induced neuronal mitochondrial damage through AMPK pathway in mice [J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2021, 37(5): 569-576.
- [18] BILINSKY L M, COLLINS N L, VAN F, et al. Kinetic and thermodynamic regulation of mitochondrial energy metabolism and ROS production[J]. Biophysical Journal, 2022, 121(3): 121-128.
- [19] XIA Shuxian, MIAO Yinglei, LIU Side. Withaferin a induces apoptosis by ROS-dependent mitochondrial dysfunction in human colorectal cancer cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 503(4): 2363-2369.

收稿日期: 2022-07-22

修回日期: 2022-11-28

(上接第51页)

- [3] 张科, 王晓光, 金志明, 等. 胃癌患者组织及血清中 Periostin 的表达情况及其意义探讨 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1): 84-86, 90.
- ZHANG Ke, WANG Xiaoguang, JIN Zhiming, et al. Patients with gastric cancer tissue and serum Periostin expression and its significance[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 84-86, 90.
- [4] WANG Haiyong, DING Yongfeng, CHEN Yanyan, et al. A novel genomic classification system of gastric cancer via integrating multidimensional genomic characteristics[J]. Gastric Cancer, 2021, 24(6): 1227-1241.
- [5] POLOM K, MARANO L, MARRELLI D, et al. Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer[J]. The British Journal of Surgery, 2018, 105(3): 159-167.
- [6] ZHANG Min, FAN Yibo, CHE Xiaofang, et al. 5-FU-induced upregulation of exosomal PD-L1 causes immunosuppression in advanced gastric cancer patients[J]. Frontiers in Oncology, 2020, 10: 492.
- [7] KOUSTAS E, TRIFYLLI E M, SARANTIS P, et al. Immunotherapy as a therapeutic strategy for gastrointestinal cancer-current treatment options and future perspectives[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(12): 6664.
- [8] KWAK Y, SEO A N, LEE H E, et al. Tumor immune response and immunotherapy in gastric cancer[J]. Journal of Pathology and Translational Medicine, 2020, 54(1): 20-33.
- [9] POLOM K, MARANO L, MARRELLI D, et al. Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer[J]. The British Journal of Surgery, 2018, 105(3): 159-167.
- [10] BANG Y J, KANG Y K, CATENACCI D V, et al. Pembrolizumab alone or in combination with chemotherapy as first-line therapy for patients with advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma: results from the phase II nonrandomized KEYNOTE-059 study[J]. Gastric Cancer, 2019, 22(4): 828-837.
- [11] GUAN Wenlong, MA Yue, CUI Yuehong, et al. The impact of mismatch repair status on prognosis of patients with gastric cancer: a multicenter analysis[J]. Frontiers in Oncology, 2021, 11: 712760.
- [12] SERRA O, GALÁN M, GINESTA M M, et al. Comparison and applicability of molecular classifications for gastric cancer[J]. Cancer Treatment Reviews, 2019, 77: 29-34.
- [13] FIORILLO C, LATERZA V, QUERO G, et al. From biology to surgery: One step beyond histology for tailored surgical treatments of gastric cancer[J]. Surgical Oncology, 2020, 34(7517): 86-95.
- [14] PIETRANTONIO F, MICELI R, RAIMONDI A, et al. Individual patient data meta-analysis of the value of microsatellite instability as a biomarker in gastric cancer[J]. Journal of Clinical Oncology, 2019, 37(35): 3392-3400.

收稿日期: 2022-07-17

修回日期: 2022-12-12