[12] 邓荣华. LRP1B 在人胰腺癌细胞中的表达及其意义[D]. 衡阳:南华大学,2012.
DENG Ronghua. Expression and significance of LRP1B in human pancreatic cancer cells[D]. Hengyang: South China University, 2012.
[13] HE M, CHEN GA, ZHANG XJ, et al. Stromal LRP1 in lung adenocarcinoma predicts clinical outcome[J]. Clinical Cancer Research, 2011, 17(8): 2426 - 2433.
[14] 邢培培. 骨肉瘤中 LRP1 - SNRNP25 融合基因促进肿瘤细胞侵袭迁移的分子机制[D]. 天津:天津医科大学,2019.
XING Peipei. The molecular mechanism of LRP1 - SNRNP25 fusion gene promoting tumor cell invasion and migration in osteosarcoma[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2019.
[15] 熊瀚. 基于 ChinaPca 全基因组数据和基因表达量探讨 LRP1 与前列腺癌的关系[D]. 南宁:广西医科大学,2019.
XIONG Han. Exploring the relationship between LRP1 and prostate cancer based on ChinaPca whole genome data and gene expression levels[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2019.
[16] 熊慧姊. YAP 通过激活 LRP1 启动子促进黑色素瘤的发生发展[D]. 苏州:苏州大学,2016.
XIONG Huizi. YAP promotes the occurrence and development of melanoma by activating the LRP1 promoter[D]. Suzhou: Suzhou University, 2016.
[17] 张淑荣. 基于 Hsp90 与 LRP - 1 的 SRL - PFAC 方法建立及多肽筛选[D]. 长春:吉林大学,2020.
ZHANG Shurong. Establishment of SRL - PFAC method and peptide screening based on Hsp90 and LRP - 1[D]. Changchun: Jilin University, 2020.
[18] SNIGIREVA AV, VRUBLEVSKAYA VV, ZHMURINA MA, et al. The mechanisms of stimulation of migration and invasion of tumor cells by extracellular heat shock protein 90(eHsp90) in vitro[J]. Biophysics, 2018, 63(6): 931 - 939.
[19] WONG DS, JAY DG. Emerging roles of extracellular Hsp90 in cancer[J]. Advances in Cancer Research, 2016, 130: 141 - 164.

(编校:李祥婷)

双硫死亡基因 BAK1 在口腔鳞癌细胞中的表达及对细胞增殖、迁移和侵袭的影响

陈寅瑜[1], 郑璐茜[2], 邹子川[2], 杨昊楠[3], 孟 箭[1,4]

[1]徐州医科大学口腔医学院,江苏 徐州 221000;[2]徐州医科大学徐州临床学院,江苏 徐州 221000;[3]山东第二医科大学,山东 潍坊 261000;[4]徐州市中心医院口腔科,江苏 徐州 221000

【摘要】 目的:识别口腔鳞状细胞癌新标志物,探究双硫死亡在口腔鳞状细胞癌增殖、迁移和侵袭中潜在的生物学价值。**方法:**检索相关文献,汇总双硫死亡相关基因。基于 TCGA 数据库,利用生物信息学方法识别具有临床意义的双硫死亡相关基因,并通过细胞生物学实验探究该基因在肿瘤发生发展过程中具有的生物学价值。**结果:**细胞生物学实验显示,BAK1 在口腔鳞状细胞癌中均高表达。此外,BAK1 过表达或敲低对于细胞增殖、迁移和侵袭能力均产生较大影响。**结论:**BAK1 可作为口腔鳞状细胞癌新标志物,具有临床意义。同时,双硫死亡在口腔鳞状细胞癌增殖、迁移和侵袭中具有一定的生物学价值。

【关键词】口腔鳞状细胞癌;双硫死亡;BAK1;细胞实验
【中图分类号】R739.8 **【文献标识码】**A **DOI:**10.3969/j.issn.1672 - 4992.2024.19.004
【文章编号】1672 - 4992 - (2024)19 - 3647 - 07

Expression of disulfidptosis related gene BAK1 in oral squamous cell carcinoma cells and its effect on cell proliferation, migration and invasion

CHEN Yinyu[1], ZHENG Luxi[2], ZOU Zichuan[2], YANG Haonan[3], MENG Jian[1,4]

[1]School of Stomatology, Xuzhou Medical University, Jiangsu Xuzhou 221000, China; [2]Xuzhou Clinical College of Xuzhou Medical University, Jiangsu Xuzhou 221000, China; [3]Shandong Second Medical University, Shandong Weifang 261000, China; [4]Department of Stomatology, Xuzhou Central Hospital, Jiangsu Xuzhou 221000, China.

【收稿日期】 2023 - 12 - 26
【修回日期】 2024 - 05 - 16
【基金项目】 国家口腔疾病临床医学研究中心开放课题(编号:NCRCO - 202101)
【作者简介】 陈寅瑜(1998—),女,江苏无锡人,硕士研究生在读,研究方向:头颈部肿瘤的综合治疗。E - mail:302105120677@stu.xzhmu.edu.cn
【通信作者】 孟箭(1966—),男,江苏徐州人,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:口腔颌面 - 头颈疾病的临床研究。

中国知网 https://www.cnki.net

【Abstract】 **Objective**: To identify novel biomarkers and explore the potential biological value of disulfidptosis in the proliferation, migration, and invasion of oral squamous cell carcinoma. **Methods**: Retrieve relevant literature and summarize disulfidptosis related genes. Based on the TCGA database, bioinformatics methods were used to identify disulfidptosis related genes with clinical significance, and the biological value of this gene in tumor occurrence and development was explored through cell biology experiments. **Results**: BAK1 also involves tumor related pathways. Cell biology experiments had shown that BAK1 was highly expressed in oral squamous cell carcinoma. In addition, overexpression or knockdown of BAK1 had a significant impact on cell proliferation, migration, and invasion ability. **Conclusion**: BAK1 can serve as a new biomarker for oral squamous cell carcinoma and has clinical significance. Meanwhile, disulfidptosis has certain biological value in the proliferation, migration, and invasion of oral squamous cell carcinoma.

【Key words】oral squamous cell carcinoma, disulfidptosis, BAK1, cell experimental

Modern Oncology 2024, 32(19): 3647 – 3653

根据全球癌症数据库统计,头颈癌(head and neck carcinoma, HNC)在发展中国家,尤其是中南亚地区男性中高发,其死亡率在所有癌症中居于第三位[1]。头颈癌是一种异质性疾病,涉及到头颈部区域的多个部位,口腔癌(oral cancer, OC)则在头颈癌临床病例中最为常见,其中有 90% 以上的 OC 是鳞状细胞癌[2]。口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是以鳞状细胞为主的口腔内恶性肿瘤。流行病学调查显示,吸烟、饮酒和人乳头瘤病毒感染均是其致病因素[3-4]。当前,OSCC 的高死亡率主要是由于诊断延误、局部淋巴结转移以及治疗抵抗导致的[5]。虽然手术、放化疗以及其他联合治疗手段极大控制了疾病的进展,提高了患者的生存时间,但是仍有许多毒副作用影响着患者的生存治疗[6]。因此,鉴定 OSCC 预后新标志物,探究 OSCC 增殖、迁移和侵袭新机制,对其临床诊断及治疗具有极其重要的意义。

调节细胞死亡(regulated cell death, RCD)在癌症代谢治疗中起着重要作用[7]。2023 年 02 月,LIU 等人揭示了一种全新的 RCD 方式,并将其命名为双硫死亡(disulfidptosis)。双硫死亡的发现颠覆了之前的研究思维,即存在一类生物标志物不仅能够抑制铁死亡,还能促进双硫死亡,例如溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)。在葡萄糖饥饿的情况下,肿瘤细胞中 SLC7A11 的高表达会加速细胞质中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)的消耗,这往往使得二硫化物逐步积累并诱导二硫化物应激,最终导致双硫死亡的发生[8]。当前,对双硫死亡的研究仍处于初级阶段,仍需进一步了解双硫死亡相关机制及其潜在的病理生理功能,为肿瘤相关研究提供新的见解,同时推进其临床转化[9-10]。

本研究通过生物信息学方法筛选有临床意义的双硫死亡相关基因(disulfidptosis related gene, DRG)作为 OSCC 预后的新标志物,并利用细胞实验手段探究其在 OSCC 增殖、迁移和侵袭中的生物学机制,揭示该基因如何在肿瘤中减少肿瘤细胞来逃避双硫死亡,为靶向药物开发提供新思路,为肿瘤机制研究提供新见解。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

人口腔鳞状细胞癌细胞系 SCC9、SCC15、CAL27、SCC25、HN30(上海酶研生物科技有限公司,中国);正常人口腔角质细胞系 HOK(上海酶研生物科技有限公司,中国);杜氏改良 Eagle 培养基(DMEM, Bological,以色列);胎牛血清(FBS, Bological,以色列),含青霉素(100 units/mL)和链霉素(100 μg/mL);提取试剂盒(Takara,日本);转录试剂盒(Takara,日本);定量试剂盒(Takara,日本);全细胞裂解液(苏州新赛美生物科技有限公司,中国);蛋白酶抑制剂(苏州新赛美生物科技有限公司,中国);蛋白 Marker(ThermoFisher,美国);PVDF 膜(Invitrogen,美国);克隆 GAPDH (AG0766)抗体(Proteintech,美国);兔多克隆 BAK1 抗体(Bioss,中国);DAB 显色液(Gene tech,中国);DMEM 培养基(Sigma aldrich,美国);脂质体转染试剂(上海翌圣生物科技有限公司);CCK-8 试剂盒(南京博研生物科技有限公司);Transwell 小室(Merck Millipore,美国);Matrixgel 基质胶(BDBiosciences,美国);结晶紫染液(Solarbio,中国);Tip 头(ibidi,德国);二氧化碳细胞培养箱(Thermo Scientific,美国);高速台式离心机(ZEISS,德国);Real-time PCR 仪(Applied Biosystem,美国);垂直电泳仪(BIO-RAD,美国);ODYSSEY 双色红外激光成像系统(LI-COR Biosciences,美国);酶联免疫检测仪(上海闪谱生物科技有限公司)。

1.2 生信方法

1.2.1 数据下载和提取

从 PubMed 等数据库中检索截至 2023 年 10 月发表的相关研究文献,整理其中所涉及到的双硫死亡相关基因(DRG)[8,11-19]。从 TCGA 数据库下载 OSCC 相关 RNA-seq 转录组、临床和预后数据作为训练集[20]。病例纳入标准如下:(1)肿瘤发生部位为口腔全区域,包括舌、口底、唇、牙龈及腭等;(2)经组织病理学确认为 OSCC;(3)各项数据完整,排除数据不完整的病例。

1.2.2 生存分析和表达差异分析

提取 DRG 表达矩阵,与临床预后数据整合,单因素 COX 回归分析筛选与 OSCC 患者预后相关的 DRG,并采用 Kaplan-Meier(K-M)法绘制生存曲线[21-22]。Wilcoxon 方法分析 DRG 在肿瘤与正常组织之间表达水平差异,进一步筛选DRG,筛选条件为:(1)|log2(fold change)|>1;(2)FDR<0.05[23]。

1.2.3 蛋白互作网络分析和通路分析

基于具有预后相关 DRG,利用 STRING 在线平台构建这些基因及其相关基因之间的蛋白相互作用(protein-protein interaction networks, PPI)网络[24]。提取 PPI 结果,根据分子特征数据库(molecular signatures database, MSigDB)中的京都基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)基因集,揭示通路信息,筛选与肿瘤发生发展相关的 DRG[25]。

中国知网 https://www.cnki.net

1.3　实验方法

1.3.1　蛋白印迹实验

培养 48 h 后收集细胞,预冷 PBS 清洗后加入含有蛋白酶抑制剂的全细胞裂解液室温离心。调整各样品蛋白浓度一致,取 20 μg 蛋白至新离心管中,按比例加入 SDS 蛋白上样缓冲液吹打均匀,105 ℃干浴中加热 10 min,冷却离心,-20 ℃保存。将样品加载到 SDS 垂直胶进行垂直分离,按分子量转印至 PVDF 膜上。5% 的脱脂奶粉室温孵育 1 h,一抗孵育,4 ℃摇床过夜。回收一抗,PBST 洗膜后加入二抗,室温孵育 1 h,回收二抗后洗膜,再运用 ODYSSEY 双色红外激光成像系统对条带进行扫描、成像、调整并储存。

1.3.2　定量 PCR 实验

提取试剂盒用于细胞总 RNA 的提取,转录试剂盒将总 RNA 进行反转录合成 cDNA,定量试剂盒检测表达情况,根据 ddCT 法对结果进行相对定量分析,计算平均 Ct 值以表示相对表达水平。引物序列为正向 5′-GCACACTCAAGTCAGACCTGCA-3′,反向 5′-ATCACATCTGTGCCAAGACTGGA-3′。

1.3.3　免疫组化实验

用中性福尔马林固定组织标本 48 h,石蜡包埋、切片后进行脱蜡、水化、修复处理。去除内源性过氧化物酶,抗原封闭,一抗孵育过夜、二抗孵育,滴加适量的 DAB 显色液,显微镜观察显色时间。染核、脱水、透明处理后封片,根据染色情况判断蛋白表达水平高低。

1.3.4　细胞质粒转染实验

常规消化计数接种于 6 孔板后,用 PBS 清洗,加入 1.5 mL 无血清无双抗 DMEM 增加细胞转染效率。将 125 μL 无血清无双抗 DMEM 与 5 μL 脂质体转染试剂成分充分混匀,室温孵育 5 min 标记为溶液 1,之后将 125 μL 无血清无双抗 DMEM 与 2.5 μg 质粒 DNA 充分混匀,室温孵育 5 min 标记为溶液 2。将溶液 1 和溶液 2 充分混匀,室温孵育 18 min 使脂质体包裹质粒 DNA。转染 8 h 后更换 10% FBS 的培养基,转染 48 h 后从 mRNA 和蛋白水平检测质粒 DNA 的过表达效果,确保转染体系稳定即可进行后续实验。

1.3.5　CCK-8 细胞增殖实验

将癌细胞消化成单细胞悬液接种于 96 孔板中,每孔接种 1×10^5 个细胞,稀释定容至 100 μL。第 12、24、48、72 小时,各组选 3 个孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,37 ℃恒温孵育 1 h,在 450 nm 波长下(酶联免疫检测仪)检测各孔光密度值(初次 CCK-8 测量前需根据试剂盒说明书制作标准曲线)。在第 0、12、24、48、72 小时,各组选 3 个孔测量 CCK-8 反应后的光密度值至第 4 天,记录数据,对各组进行细胞活力分析。

1.3.6　细胞划痕实验

按比例接种于 6 孔板,用 10 μL 的 Tip 头沿直径在孔底划一横线,刮除沿途细胞,各样本设置 3 个复孔。PBS 清洗后加入 2 mL 无双抗无血清 DMEM 记为零点,倒置显微镜(200×)随机拍摄 5 个不重叠视野。24 h 后 PBS 清洗清除死细胞,加入 2 mL 无双抗无血清 DMEM,倒置显微镜(200×)观察划痕愈合情况及细胞迁移距离。以第 0 h 细胞迁移前沿为基线,利用 ImageJ 软件对第 24 h 越过基线的细胞进行计数并计算其均值。

1.3.7　Transwell 细胞侵袭实验

侵袭实验前,Transwell 小室膜上层预先包裹 Matrixgel 基质胶(50 μL);37 ℃孵育 6 h 至胶冻状,使用前 1 h 加入 DMEM 水化。常规消化计数后制成单细胞悬液,取 2×10^5 个细胞加入 PBS 漂洗,室温离心 5 min。迁移实验取 300 μL 细胞悬液接种于 Transwell 小室上层,侵袭实验取 450 μL 细胞悬液接种于 Matrixgel 基质胶包裹的 Transwell 小室上室,滴加 700 μL 含 20% FBS 的 DMEM 培养基,37 ℃培育 32、56 h。PBS 洗净后 4% 多聚甲醛固定 25 min,用 0.1% 结晶紫染液染色,擦除小室上层细胞后清洗烘干,利用倒置显微镜对各小室中央拍照,ImageJ 软件计数各视野细胞。

1.4　统计学处理

所得数据均通过 R 软件和 ImageJ 软件进行统计学处理、分析和绘图。两组间比较采用 Wilcoxon 检验,生存预后上的统计学差异比较用 Logrank 检验。

2　结果

2.1　双硫死亡相关文献检索和基因汇总

检索相关研究文献,汇总得到 114 个 DRG 纳入本研究。基于预后生存分析、表达差异分析和蛋白通路分析,对这些 DRG 进行进一步筛选。技术路线如图 1 所示。

2.2　生存分析和表达差异分析结果

基于 TCGA 数据库中 OSCC 数据,对这 114 个 DRG 进行逐步筛选,有 14 个基因表达水平与患者的预后相关,并且这些基因的表达水平在肿瘤和正常组织中均具有统计学差异($P<0.05$)(图 2A-B)。

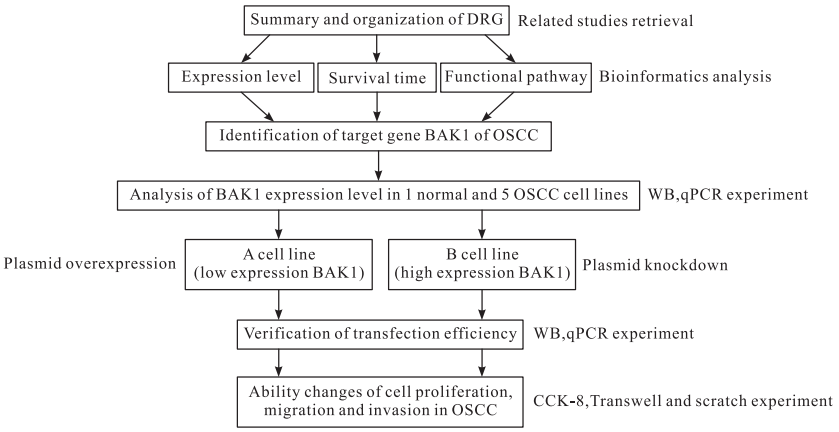

图 1　技术路线图

Fig. 1　Technology roadmap

中国知网　https://www.cnki.net

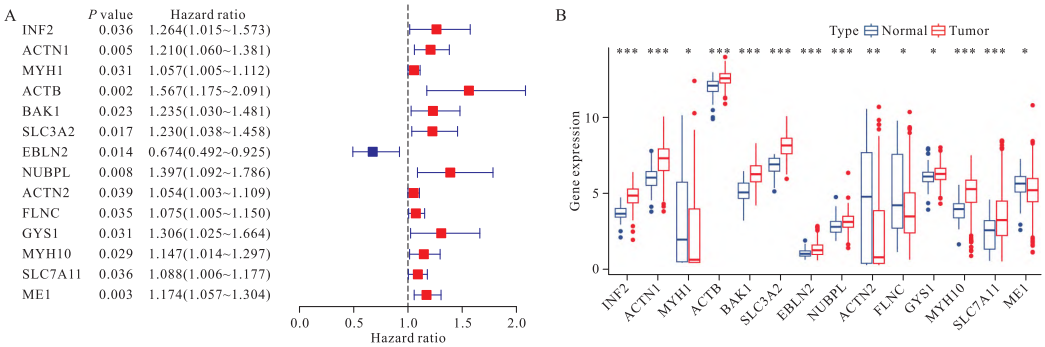

图 2 目标基因筛选

A:预后生存分析;B:表达差异分析,$*P<0.05$,$**P<0.01$,$***P<0.001$。

Fig. 2　Screening of target

A:Prognostic survival analysis. B:Expression difference analysis, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

2.3　蛋白互作分析和通路分析结果

利用 STRING 数据平台对上一步初筛选所得的 14 个基因进行蛋白互作,得到这 14 个基因的相关基因,并对所得结果分别进行富集通路分析(图 3A－B)。结果显示,BAK1 及其相关基因主要富集于肿瘤相关通路。基于预后生存、表达水平、富集通路三个指标,BAK1 确定为目标基因用于后续的实验研究。

2.4　BAK1 基因在 1 个正常、5 个口腔癌细胞系中的表达水平

WB 实验显示正常人口腔角质细胞系 HOK 和人口腔鳞状癌细胞系 SCC9、SCC15、CAL27、SCC25 和 HN30,结果显示 BAK1 基因在口腔鳞状癌细胞中均高表达(图 4A)。qPCR 实验结果与上述一致,BAK1 蛋白在口腔鳞状癌细胞系 SCC9、SCC15、CAL27、SCC25 和 HN30 中较 HOK 均表达增强(图 4B)。

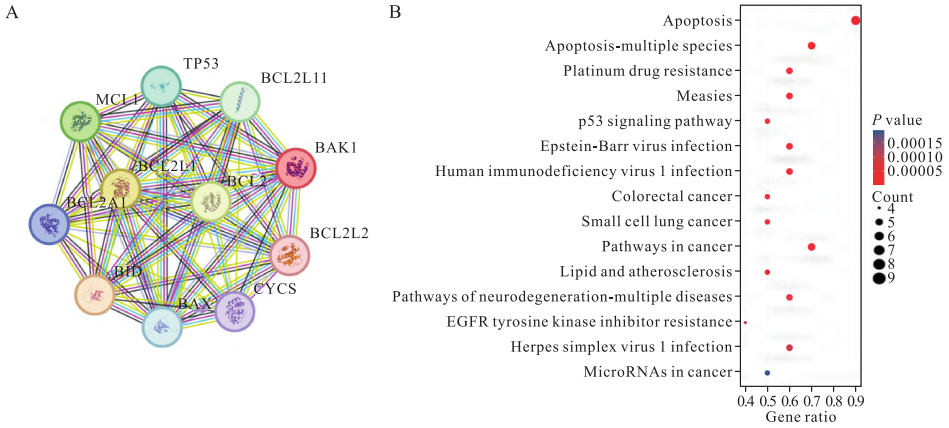

图 3　目标基因 BAK1 识别

A:蛋白互作分析;B:富集通路分析。

Fig. 3　Identification of target genes BAK1

A:Protein interaction analysis. B:Enrichment pathway analysis.

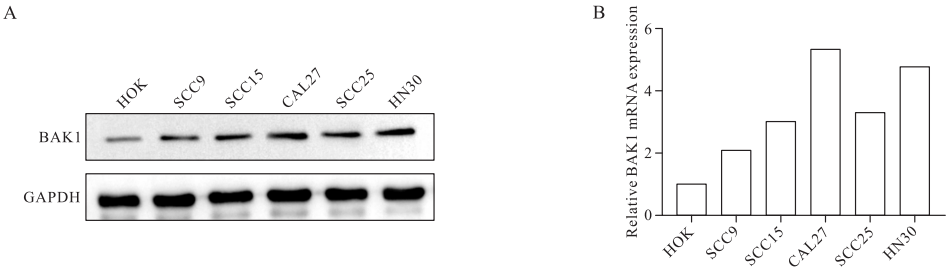

图 4　BAK1 在正常和癌细胞系中表达水平的比较

A:WB 实验;B:qPCR 实验。

Fig. 4　Comparison of BAK1 expression levels in normal and cancer cell lines

A:WB experiment. B:qPCR experiment.

中国知网　https://www.cnki.net

2.5　BAK1 基因过表达对口腔鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

在 BAK1 基因低表达的 SCC9 细胞中过表达 BAK1 基因，PCR 实验显示 BAK1 过表达效果较好，表达增加 30 倍以上（图 5A）。相较于未过表达组，CCK－8 实验发现细胞增殖能力显著提高，划痕实验表明细胞迁移能力增加，Transwell 实验同样验证细胞侵袭能力的增加（图 5B－C）。

2.6　BAK1 基因敲低对口腔鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

在 BAK1 基因高表达的 CAL27 细胞中敲低 BAK1 基因，PCR 实验显示 BAK1 敲低效果较好，表达下降 70% 左右。相较于未敲低组，CCK－8 实验发现细胞增殖能力显著下降，划痕实验表明细胞迁移能力下降，Transwell 实验同样验证细胞侵袭能力的下降（图 6）。

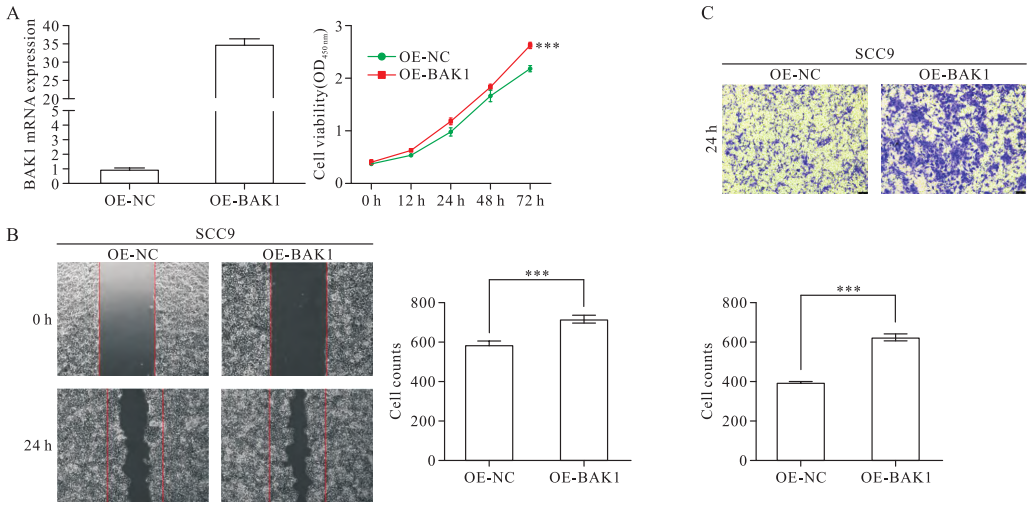

图 5　BAK1 过表达对 OSCC 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

A：CCK－8 细胞增殖实验；B：细胞划痕实验；C：Transwell 细胞侵袭实验（结晶紫染色 ×100），＊＊＊$P<0.001$。

Fig. 5　Impact of BAK1 overexpression on OSCC cell proliferation, migration and invasion

A: CCK－8 cell proliferation experiment. B: Cell scratch experiment. C: Transwell cell invasion experiment (crystal violet staining ×100), ＊＊＊$P<0.001$.

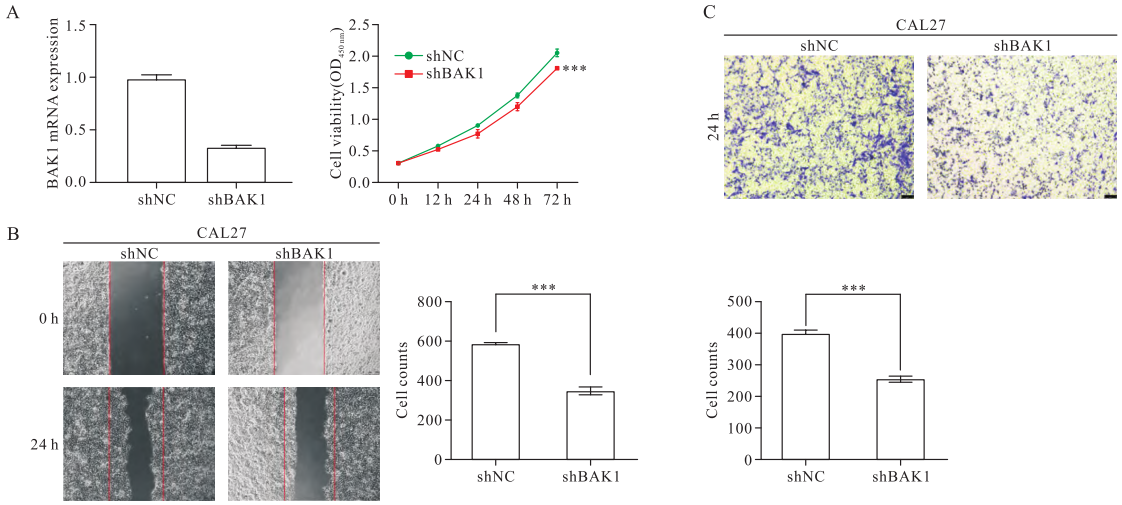

图 6　BAK1 敲低对 OSCC 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

A：CCK－8 细胞增殖实验；B：细胞划痕实验；C：Transwell 细胞侵袭实验（结晶紫染色 ×100），＊＊＊$P<0.001$。

Fig. 6　Impact of BAK1 knockdown on OSCC cell proliferation, migration and invasion

A: CCK－8 cell proliferation experiment. B: Cell scratch experiment. C: Transwell cell invasion experiment (crystal violet staining ×100), ＊＊＊$P<0.001$.

3　讨论

OSCC 是主要的口腔癌类型，其发病率和死亡率逐年增加，严重影响患者的生命健康[26]。由于诊断延误、局部淋巴结转移及药物抵抗，当前 OSCC 死亡率仍较高[27]。近些年，基因组学大大促进了肿瘤研究、精准诊疗的发展[28]。因此，利用生物信息学手段识别肿瘤预后标志物，并通过细胞生物学手段验证新标志物在肿瘤增殖、迁移和侵袭中的生物学机制，具有潜在的临床价值。

作为一种新的细胞死亡类型，双硫死亡（disulfidptosis）的标志物和形态学特征与其他细胞死亡方式有着显著的不同，与肿瘤的进展密切相关。有研究发现，lncRNA ALMS1－IT1 与双硫死亡通路相关，包括 NADPH 和二硫氧化还原酶活性。机制研究表明，lncRNA ALMS1－IT1 可以通过磷酸戊

中国知网　https://www.cnki.net

糖途径依赖的方式调节头颈鳞癌细胞的死亡[28]。因此,基于双硫死亡相关基因(DRG)来探究双硫死亡在 OSCC 增殖、迁移和侵袭中的生物学价值是当前研究的热点[29-30]。

当前,TCGA 等大型公共数据库为全球研究者探索肿瘤相关机制提供了巨大便利,在 OSCC 中的相关研究中也层出不穷[32]。基于 DRG 表达矩阵,利用机器学习方法可以从大量 DRG 中准确识别具有预后价值的 DRG,而本研究中的目标基因 BAK1 就是通过预后生存、表达水平、富集通路三个指标筛选得到的。此外,细胞生物学实验仍是目前最有力的验证手段,本研究对筛选所得双硫死亡相关基因 BAK1 进行一系列实验,可以使得本研究的结论更具有说服力。

本研究查阅了大量双硫死亡的相关文献,并对所涉及的 DRG 进行了汇总,一共得到了 114 个 DRG。基于 TCGA 数据库,筛选得到了 14 个预后相关 DRG。结合蛋白互作网络和通路分析,BAK1 满足筛选条件被认定为目标基因。通过一系列实验,BAK1 确实与 OSCC 增殖、迁移和侵袭相关。已知 BAK1 参与编码多结构域促凋亡效应蛋白 BAK,是凋亡机制中的关键检查点。如发生三级结构分解,促凋亡功能失调,蛋白质稳定性降低,导致恶性肿瘤的发生和不可控[33-34]。BAK1 已被证实在多种类型癌症中具有一定影响,例如在宫颈癌症中存在一种未描述的调节途径,OCT4 通过该途径直接诱导 miR-125b 的表达,抑制其直接靶点 BAK1,从而抑制宫颈癌细胞凋亡[35]。同样在结肠癌研究中 BAK1 是 miR-410 的直接靶向,敲低 BAK1 可以减弱 miR-410 抑制的促凋亡作用[36]。目前 BAK1 在 OSCC 中研究很少,而本研究正好补充了 OSCC 中 BAK1 的相关研究。

综上所述,BAK1 可作为 OSCC 预后的新标志物,其对 OSCC 细胞增殖、迁移和侵袭能力也有一定的影响。基于此,双硫死亡被初步证实在 OSCC 中有潜在的生物学价值,也为其他 OSCC 相关研究提供了新的见解。

【参考文献】

[1] CHENG H,SUN X,JI X,et al. Risk factors and the potential of nomogram for predicting hospital-acquired pressure injuries[J]. Int Wound J,2020,17(4):974-986.

[2] JOHNSON DE,BURTNESS B,LEEMANS CR,et al. Head and neck squamous cell carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers,2020,6(1):92.

[3] LAGERGREN J,LAGERGREN P. Oesophageal cancer[J]. BMJ,2010,341:c6280.

[4] PAI SI,WESTRA WH. Molecular pathology of head and neck cancer:implications for diagnosis,prognosis,and treatment[J]. Annu Rev Pathol,2009,4:49-70.

[5] DA SILVA SD,HIER M,MLYNAREK A,et al. Recurrent oral cancer:current and emerging therapeutic approaches[J]. Front Pharmacol,2012,3:149.

[6] FITCHETT RC,ALDUS EJ,FITCHETT LR,et al. The lived experience of head and neck cancer patients receiving curative radiotherapy:A systematic review and meta-ethnography[J]. Psychooncology,2018,27(9):2077-2086.

[7] PENG F,LIAO M,QIN R,et al. Regulated cell death (RCD) in cancer:key pathways and targeted therapies[J]. Signal Transduct Target Ther,2022,7(1):286.

[8] LIU X,NIE L,ZHANG Y,et al. Actin cytoskeleton vulnerability to disulfide stress mediates disulfidptosis[J]. Nat Cell Biol,2023,25(3):404-414.

[9] ZHENG P,ZHOU C,DING Y,et al. Disulfidptosis:a new target for metabolic cancer therapy[J]. J Exp Clin Cancer Res,2023,42(1):103.

[10] ZHENG T,LIU Q,XING F,et al. Disulfidptosis:a new form of programmed cell death[J]. J Exp Clin Cancer Res,2023,42(1):137.

[11] ZHAO S,WANG L,DING W,et al. Crosstalk of disulfidptosis-related subtypes,establishment of a prognostic signature and immune infiltration characteristics in bladder cancer based on a machine learning survival framework[J]. Front Endocrinol (Lausanne),2023,14:1180404.

[12] QI C,MA J,SUN J,et al. The role of molecular subtypes and immune infiltration characteristics based on disulfidptosis-associated genes in lung adenocarcinoma[J]. Aging (Albany NY),2023,15(11):5075-5095.

[13] LI XM,LIU SP,LI Y,et al. Identification of disulfidptosis-related genes with immune infiltration in hepatocellular carcinoma[J]. Heliyon,2023,9(8):e18436.

[14] WANG Z,DU X,LIAN W,et al. A novel disulfidptosis-associated expression pattern in breast cancer based on machine learning[J]. Front Genet,2023,14:1193944.

[15] HU G,YAO H,WEI Z,et al. A bioinformatics approach to identify a disulfidptosis-related gene signature for prognostic implication in colon adenocarcinoma[J]. Sci Rep,2023,13(1):12403.

[16] NI L,YANG H,WU X,et al. The expression and prognostic value of disulfidptosis progress in lung adenocarcinoma[J]. Aging (Albany NY),2023,15(15):7741-7759.

[17] XU K,ZHANG Y,YAN Z,et al. Identification of disulfidptosis related subtypes,characterization of tumor microenvironment infiltration,and development of DRG prognostic prediction model in RCC,in which MSH3 is a key gene during disulfidptosis[J]. Front Immunol,2023,14:1205250.

[18] ZHANG D,ZHANG X,LIU Z,et al. An integrative multi-omics analysis based on disulfidptosis-related prognostic signature and distinct subtypes of clear cell renal cell carcinoma[J]. Front Oncol,2023,13:1207068.

[19] XIN S,LI R,SU J,et al. A novel model based on disulfidptosis-related genes to predict prognosis and therapy of bladder urothelial carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2023,149(15):13925-13942.

[20] HUTTER C,ZENKLUSEN JC. The cancer genome atlas:Creating lasting value beyond its data[J]. Cell,2018,173(2):283-285.

[21] KOLETSI D,PANDIS N. Survival analysis,part 2:Kaplan-Meier method and the log-rank test[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop,2017,152(4):569-571.

[22] KOLETSI D,PANDIS N. Survival analysis,part 3:Cox regression[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop,2017,152(5):722-723.

[23] DEXTER F. Wilcoxon-Mann-Whitney test used for data that are not normally distributed[J]. AnesthAnalg,2013,117(3):537-538.

[24] SZKLARCZYK D,KIRSCH R,KOUTROULI M,et al. The STRING database in 2023:protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest[J]. Nucleic Acids Res,2023,51(D1):D638-D646.

[25] KANEHISA M,FURUMICHI M,TANABE M,et al. KEGG:new

中国知网 https://www.cnki.net

perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D353 – D361.

[26] OLIVEIRA ML, WAGNER VP, SANT'ANA FILHO M, et al. A 10 – year analysis of the oral squamous cell carcinoma profile in patients from public health centers in Uruguay[J]. Braz Oral Res, 2015, 29: S1806 – 83242015000100270.

[27] CHAMOLI A, GOSAVI AS, SHIRWADKAR UP, et al. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics[J]. Oral Oncol, 2021, 121: 105451.

[28] SUN XY, XIAO M, FU M, et al. ALMS1 – IT1: A key player in the novel disulfidptosis – related LncRNA prognostic signature for head and neck squamous cell carcinoma[J]. Biomolecules, 2024, 14(3): 266.

[29] 苟秋童,谢强,靳文珂,等. 口腔鳞癌中预后相关 miRNA 的生物信息学分析及实验验证[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(16): 2988 – 2995.
GOU QT, XIE Q, JIN WK, et al. Bioinformatic analysis and experimental verification of prognostic miRNA in oral squamous cell carcinoma[J]. Modern Oncology, 2023, 31(16): 2988 – 2995.

[30] 朱良啸,刘万超,王文惠,等. 基于生物信息学筛选胰腺导管腺癌关键基因[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(22): 3862 – 3867.
ZHU LX, LIU WC, WANG WH, et al. Identification key genes of pancreatic ductal adenocarcinoma based on bioinformatics analysis [J]. Modern Oncology, 2020, 28(22): 3862 – 3867.

[31] 满君,宋龙飞,白法瑞,等. 小细胞肺癌差异表达基因的生物信息学分析[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(12): 2057 – 2062.
MAN J, SONG LF, BAI FR, et al. Bioinformatics analysis of differentially expressed genes in small cell lung cancer[J]. Modern Oncology, 2021, 29(12): 2057 – 2062.

[32] GINSBURG O, ASHTON – PROLLA P, CANTOR A, et al. The role of genomics in global cancer prevention[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2021, 18(2): 116 – 128.

[33] GANINI C, AMELIO I, BERTOLO R, et al. Global mapping of cancers: The Cancer Genome Atlas and beyond[J]. Mol Oncol, 2021, 15(11): 2823 – 2840.

[34] SPERL LE, RUHRNOSSL F, SCHILLER A, et al. High – resolution analysis of the conformational transition of pro – apoptotic Bak at the lipid membrane[J]. EMBO J, 2021, 40(20): e107159.

[35] WANG YD, CAI N, WU XL, et al. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR – 125b/BAK1 pathway[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(8): e760.

[36] LIU C, ZHANG A, CHENG L, et al. miR – 410 regulates apoptosis by targeting Bak1 in human colorectal cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1): 467 – 473.

(编校:李祥婷)

NEDD4L 增强 IGF2BP2 的泛素化对结直肠癌细胞 SW620 增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

杨秀莲[1],王 玫[2],董 辉[3],孟繁君[1],王利新[1]

[1]宁夏医科大学总医院心脑血管病医院医学检验科,宁夏 银川 750002;[2]上海市浦东新区公立医院心内科,上海 200000;[3]宁夏医科大学总医院医学科学研究院,宁夏 银川 750004

【摘要】 目的:探讨 NEDD4L 对人转移性结直肠癌细胞 SW620 迁移和侵袭的影响及其可能的作用机制。**方法:**生物信息学分析筛选 IGF2BP2/NEDD4L 泛素化作用轴并构建 NEDD4L 过表达的 SW620 细胞株,实时荧光定量(RT – qPCR)检测 NEDD4L mRNA 表达水平;CCK – 8 法和流式细胞术检测细胞增殖和凋亡;细胞划痕和 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭,CHX 和 MG132 处理 SW620 细胞,Western blot 检测 IGF2BP2 蛋白的表达。同时构建 Flag – IGF2BP2、His – NEDD4L、HA – Ub 重组质粒并在 293T 细胞中采用免疫共沉淀检测 NEDD4L 对 IGF2BP2 的泛素化水平的影响。**结果:**SW620 细胞中成功实现 NEDD4L 过表达,并且导致细胞增殖能力显著降低($P<0.05$),凋亡能力显著上升($P<0.01$);同时抑制细胞周期进程($P<0.05$)。细胞迁移率显著降低($P<0.01$),细胞侵袭数量显著降低($P<0.01$);Western blot 结果显示,过表达 NEDD4L 能够显著降低 IGF2BP2、YAP、VEGFA 的蛋白表达水平,Co – IP 结果显示 NEDD4L 增强 IGF2BP2 与 Ub 的结合能力。**结论:**NEDD4L 在结直肠癌细胞中通过增强 IGF2BP2 的泛素化,进而降低 YAP、VEGFA 的蛋白表达来实现抑癌功能。

【关键词】结直肠癌细胞 SW620;结直肠癌;泛素连接酶;泛素化;细胞周期;迁移和侵袭

【收稿日期】 2023 – 06 – 25
【修回日期】 2024 – 05 – 06
【基金项目】 宁夏自然科学基金(编号:2022AAC03476)
【作者简介】 杨秀莲(1969—),女,宁夏人,主任技师,研究方向:临床检验。E – mail:13895394316@163.com
【通信作者】 王利新(1977—),男,宁夏人,硕士,主任技师,研究方向:临床检验诊断学。E – mail:13895630916@nyfy.com.cn

中国知网 https://www.cnki.net