

研究论著

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2023.10.012

RSRC1通过靶向调控PTEN/PI3K/AKT通路抑制食管鳞状细胞癌的增殖和转移

周家田 尚观胜 张聪 蒋德熊 袁冬冬 汤登尧 周江

【摘要】 目的 探索富含精氨酸和丝氨酸的卷曲螺旋1 (RSRC1) 在食管鳞状细胞癌 (ESCC) 增殖和转移中的作用。方法 通过生信分析检测磷酸酶及张力蛋白同源物 (PTEN) 在 ESCC 中的表达。利用 qRT-PCR 和蛋白免疫印迹法检测 ESCC 细胞中 RSRC1 的表达。通过 CCK-8、细胞迁移和侵袭实验阐明 RSRC1 对 ESCC 细胞增殖和转移的作用。通过蛋白免疫印迹法分析 PTEN/PI3K/AKT 信号通路相关因子的表达。结果 生信分析结果显示 PTEN 在 ESCC 组织中低表达。分子实验显示 RSRC1 在 ESCC 细胞中低表达。细胞实验发现敲低 RSRC1 可促进 ESCC 增殖和转移, 并且可以调节 PTEN/PI3K/AKT 信号通路。结论 RSRC1 通过靶向调控 PTEN/PI3K/AKT 通路抑制 ESCC 的增殖和转移, RSRC1 可能是一种新的 ESCC 诊断标志物和治疗靶点。

【关键词】 RSRC1; PTEN/PI3K/AKT 通路; 食管鳞状细胞癌; 增殖; 转移

RSRC1 inhibits the proliferation and metastasis of ESCC by targeting PTEN/PI3K/AKT pathway Zhou Jiatian, Shang Guansheng, Zhang Cong, Jiang Dexiong, Yuan Dongdong, Tang Dengyao, Zhou Jiang. Department of Thoracic Surgery, Chengdu Seventh People's Hospital (Affiliated Cancer Hospital of Chengdu Medical College), Chengdu 610123, China
Corresponding author, Shang Guansheng, E-mail: 341728594@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the role of arginine-and serine-rich coiled coil 1 (RSRC1) in the proliferation and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** The expression of PTEN in ESCC was detected by biogenic analysis. The expression of RSRC1 in ESCC cells was detected by qRT-PCR and Western blot (WB). The effect of RSRC1 on the proliferation and metastasis of ESCC cells was elucidated by CCK-8, cell migration and invasion tests. The expression of related factors in PTEN/PI3K/AKT signaling pathway was analyzed by WB. **Results** The biogenic analysis showed that PTEN was low in ESCC tissue. Molecular experiments showed low expression of RSRC1 in ESCC cells. Cell experiments showed that RSRC1 knockdown can promote ESCC proliferation and metastasis, and can regulate PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. **Conclusion** RSRC1 inhibits ESCC proliferation and metastasis through targeted regulation of PTEN/PI3K/AKT pathway. RSRC1 may be a new diagnostic marker and therapeutic target for ESCC.

【Key words】 RSRC1; PTEN/PI3K/AKT pathway; Esophageal squamous cell carcinoma; Proliferation; Metastasis

食管癌是世界上最常见的消化道恶性肿瘤之一, 该病被列为第七大最常见的癌症和第六大癌症死亡原因^[1]。食管鳞状细胞癌 (ESCC) 是目前食管癌主要组织学类型, 病死率在全球所有肿瘤中排名第四, 总体 5 年生存率仅为 15%~25%^[24]。由于大多数患者确诊时已处于中晚期, 导致 ESCC 患者的预后不理想, 5 年总生存率较差^[57]。因此, 探索 ESCC 发生转移的潜在机制, 对 ESCC 早期诊断和治疗的新型生物标志物具有重要意义。

富含精氨酸和丝氨酸的卷曲螺旋 1 (RSRC1) 也称 SRrp53, 编码富含精氨酸和丝氨酸家族的蛋白质, 在细胞功能中发挥重要作用^[8-9]。RSRC1 被报道在胶质母细胞瘤、胃癌等癌症中低表达, 发挥肿瘤抑制因子的作用^[8, 10]。如 Teplyuk 等^[10]研究表明在胶质母细胞瘤中, RSRC1 是微小 RNA (miR)-10b 的靶基因, miR-10b 通过调节 RSRC1 的表达促进体内胶质母细胞瘤的恶性进展。RSRC1 还被证明可以通过调节磷酸酶及张力蛋白同源物 (PTEN) 表达

来抑制胃癌细胞的增殖和迁移^[10]。最近,一些研究表明 RSRC1 基因多态性与癌症发病风险有关。如 Tang 等^[11]发现 RSRC1 基因多态性与神经母细胞瘤易感性有关,该研究证实了携带 RSRC1rs6441201A 等位基因的参与者与神经母细胞瘤风险增加密切相关。目前关于 RSRC1 在肿瘤进展中的作用研究较少,且尚未有研究报道 RSRC1 在 ESCC 细胞发展中发挥的作用。因此,本研究将进一步探究 RSRC1 对 ESCC 细胞增殖和转移的影响及其作用机制。本研究拟探讨 RSRC1 在 ESCC 细胞增殖和转移中的作用,揭示 RSRC1 抑制 ESCC 细胞增殖和转移的新作用机制,现将结果报道如下。

材料与方法

一、生信分析

从 TCGA 数据库下载 ESCC mRNA 表达矩阵 (normal: 11, tumor: 81), 利用 edgeR 包进行差异分析。本研究所有实验设置 3 个重复。

1. 细胞培养及转染

人 ESCC 细胞系 (TE-1, Eca-109, EC9706) 和正常食管上皮细胞系 Het-1A, 培养在含 10% FB 的 RPMI-1640 (Corning, 美国) 中, 于 37 °C 和 5% CO₂ 的潮湿培养箱中培养。使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 美国) 进行细胞转染, 并根据试剂盒操作说明书将 blank、NC 和 si-RSRC1 转染到 ESCC 细胞。

2. qRT-PCR

通过 TRIzol 试剂 (Merck, 德国) 从 ESCC 中提取总 RNA。根据试剂盒说明, 利用 Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (Yeasten, 中国) 将总 RNA 反转录。使用 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (Yeasten, 中国) 在 ABI 12K 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 仪 (ThermoFisher, 美国) 上进行 qRT-PCR。基于 Eca-109 细胞构建了以下细胞分组: blank 组; NC 组; si-RSRC1 组, 使用 2^{-ΔΔCt} 方法计算相对 RSRC1 表达水平, 并将 GAPDH 用作内源性对照。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物

基因	方向	引物序列
RSRC1	正向	5'-CAACATCAGGACCAGCATCAG-3'
	反向	5'-GCCCATTAGTCTTTCTTGTCGG-3'
GAPDH	正向	5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3'
	反向	5'-TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3'

3. 蛋白免疫印迹法

通过 RIPALysis buffer (Beyotime, 中国) 从培养的细胞中提取总蛋白质。使用 BCA 蛋白质测定试剂盒 (Beyotime, 中国) 检测蛋白质浓度。对于蛋白质印迹分析, 细胞裂解物通过 SDS-PAGE 电泳, 随后转移到 PVDF。然后将膜在室温下在脱脂牛奶中封闭约 1 h, 然后在 4 °C 下与一抗过夜。用 PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min 后, 将膜与二抗在室温下再孵育 1 h。使用 ECL 底物试剂盒以及凝胶成像系统 ChemiDoc™ XRS+ (Bio-rad, 美国) 检测蛋白表达。

4. 细胞活力测定

取慢病毒感染培养的 Eca-109 细胞接种到 96 孔板中。孵育 0、24、48、72、96 h 后。向每孔中加入 20 μL 的 CCK-8 溶液, 置于 5% CO₂、37 °C 培养箱培养 4 h。多功能微孔板检测仪 (PerkinElmer/envision, 中国) 检测 450 nm 处的吸光度。

5. 迁移和侵袭检测

细胞迁移的检测: Eca-109 细胞 (每孔 1 × 10⁵) 重悬于无血清培养基, 并接种于到上室, 同时在下室加入 10% 的 FBS (Thermo Fisher Scientific, 美国) 细胞培养基。培养 24 h 后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 0.1% 结晶紫进行细胞染色。在显微镜下观察成像情况并用 Image J 软件进行分析。细胞侵袭的检测: 在 Transwell 实验装置 (Corning, 美国) 的上室涂 50 μL 基质凝胶 (BD Biosciences, 美国), 其余步骤与细胞迁移步骤一致。

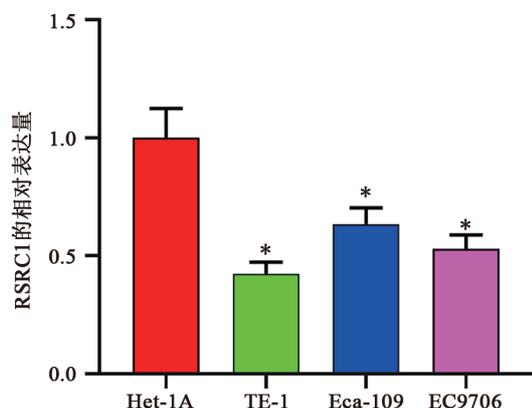
二、统计学处理

采用 SPSS 21.0 进行统计分析, 计量资料采用 Shapiro-Wilk 进行正态性检验, 服从正态分布的资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用 *t* 检验, 重复测量资料采用重复测量方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、RSRC1 在 ESCC 中下调表达

qRT-PCR 结果显示, 与正常食管上皮细胞 Het-1A 组相比, RSRC1 在人 ESCC 细胞系 (TE-1, Eca-109, EC9706) 中的表达均下降 (*P* 均 < 0.05)。见图 1。因此, 我们选择了 RSRC1 表达量相对较高的 Eca-109 细胞进行进一步研究。



注: 与 Het-1A 组比较, $*P < 0.05$ 。

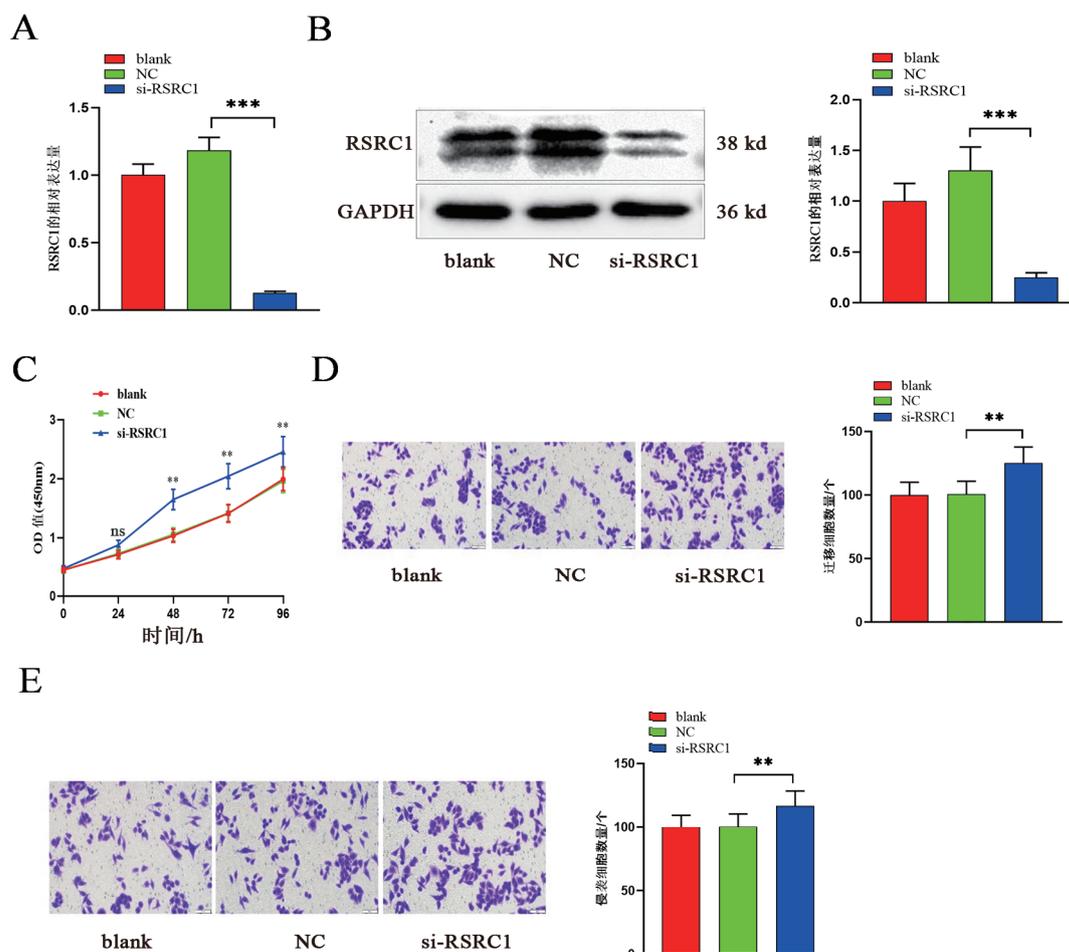
图1 RSRC1 在 ESCC 中的表达

二、RSRC1 抑制 ESCC 细胞的增殖和转移

与 NC 组相比, 敲低 RSRC1 的 Eca-109 细胞中 RSRC1 的 mRNA 和蛋白表达水平均降低 (P 均 < 0.01), 见图 2A 和图 2B。随后, 通过 CCK-8 检测各组细胞活力, 结果表明与 NC 组相比, 敲低 RSRC1 明显促进了 Eca-109 的细胞活力, 见图 2C。最后, 通过 Transwell 实验检测各组细胞的迁移和侵袭能力, 结果显示与 NC 组相比, 敲低 RSRC1 明显增加了 Eca-109 中的迁移和侵袭细胞数量, 见图 2D 和图 2E。

三、RSRC1 可以调控 PTEN/PI3K/AKT 信号通路

生信分析结果表明 PTEN 在 ESCC 组织中明显



注: A 为 qRT-PCR 检测 RSRC1 的 mRNA 表达水平; B 为蛋白免疫印迹法检测 RSRC1 的蛋白表达水平; C 为 CCK-8 法检测 Eca-109 细胞活力; D 为细胞迁移实验检测 Eca-109 细胞的迁移能力 (结晶紫染色, $\times 200$); E 为细胞侵袭实验检测 Eca-109 细胞的侵袭能力 (结晶紫染色, $\times 200$); ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图2 RSRC1 抑制 ESCC 细胞的增殖和转移

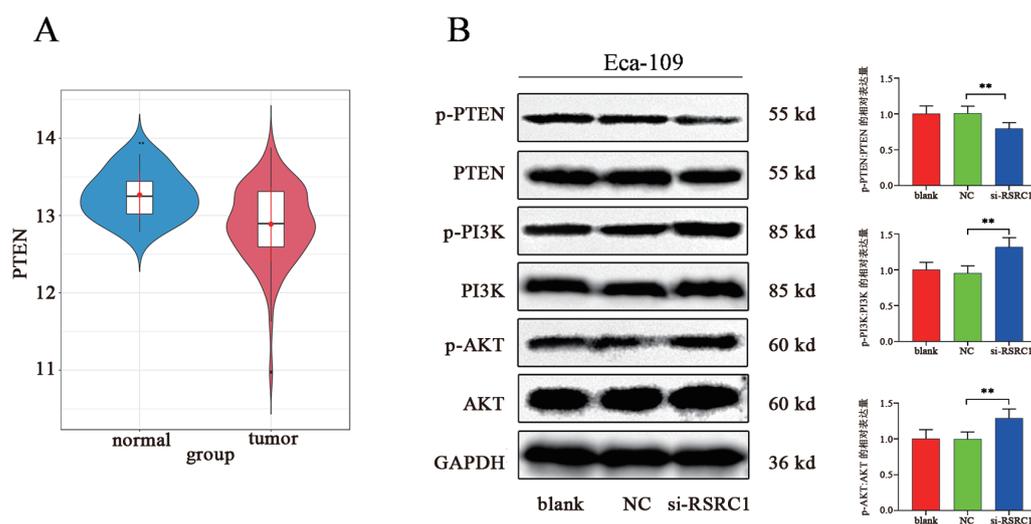
低表达, 见图 3A。以 PTEN/PI3K/AKT 信号通路为研究对象, 基于 Eca-109 细胞构建了以下细胞分组: blank 组; NC 组; si-RSRC1 组, 然后通过蛋白免疫印迹法检测各组细胞中 PTEN/PI3K/AKT 信号通路相关因子的表达, 结果显示敲低 RSRC1 明显抑制了 p-PTEN 的蛋白表达, 而敲低 RSRC1 明显促进了 p-PI3K、p-AKT 的蛋白表达, 见图 3B。

讨 论

ESCC 是一种常见的人类恶性肿瘤, 晚期 ESCC 患者的 5 年总生存率相对较低^[12]。ESCC 的发病机制尚未完全明晰, 这使得难以发现晚期 ESCC 的有效治疗方法。因此, 进一步探索 ESCC 病理生理学的分子机制对于开发 ESCC 的新疗法非常重要。在本研究中, 我们通过分子实验首次证明 RSRC1 在 ESCC 细胞中低表达, 可能是 ESCC 中潜在的肿瘤抑制因子。先前研究发现, RSRC1 通过调节转录因子雌激素受体 β 的 SUMO 化来抑制雌激素受体 β 转录活性。此外, RSRC1 在肿瘤发展中起重要作用。Tang 等^[11]研究发现 RSRC1 基因多态性增加了儿童对神经母细胞瘤的易感性。Yu 等^[8]研究发现 RSRC1 可以抑制胃癌细胞的增殖和转移。然而, RSRC1 在 ESCC 发展中的作用尚未阐明。本研究通过 CCK-8 检测各组细胞活力, 结果表明与对照相比, 敲低 RSRC1 明显促进了 Eca-109 的细

胞活力; 通过 Transwell 实验检测各组细胞的迁移和侵袭能力, 结果显示与对照相比, 敲低 RSRC1 明显增加了 Eca-109 中的迁移和侵袭细胞数量, 首次发现 RSRC1 能够抑制 ESCC 细胞的增殖和迁移, 这与前人研究结果一致, 这一结果丰富了我们对 ESCC 发病机制的进一步认识, 并提示靶向 RSRC1 可能是治疗 ESCC 的新策略。

有学者认为 PTEN 是一种肿瘤抑制基因, 可以通过直接抑制 PI3K/AKT 信号通路来抑制癌症进展^[13]。PTEN 是一种调节细胞生长及存活的脂质和蛋白磷酸酶, 被充分证明为关键的肿瘤抑制因子, 可以在多种癌症 (包括 ESCC) 中发挥肿瘤抑制作用^[14-16]。Kuo 等^[17]研究发现芝麻素能够通过促进 PTEN 表达抑制宫颈癌细胞增殖。Zhang 等^[18]研究发现 miR-155 通过下调 PTEN 促进 ESCC 的迁移和侵袭。更重要的是, PTEN 是 PI3K/AKT 信号通路的负调节因子^[19]。据报道, miR-93-5p 可通过抑制 PTEN 的表达激活 PI3K/AKT 信号通路促进人视网膜母细胞瘤的进展^[20]。蛇床子素通过激活 PTEN 抑制 PI3K/AKT 信号通路诱导 ESCC 细胞的凋亡^[21]。为了确定 RSRC1 抑制 ESCC 细胞增殖和转移的分子机制, 我们通过查阅文献得到 RSRC1 通过促进 PTEN 表达抑制肿瘤进展, 推测 RSRC1 和 PTEN 呈正相关, 本研究通过生信分析发现 PTEN 在 ESCC 组织中表达下调, 进一步通过蛋白免疫印迹法检测各组细胞中 PTEN/PI3K/AKT 信号通路相关因子



注: A 为生信分析 PTEN 在 SCC 组织和癌旁组织中的表达; B 为蛋白免疫印迹法检测 PTEN/PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的表达, ** $P < 0.01$ 。

图 3 RSRC1 可以调控 PTEN/PI3K/AKT 信号通路

的表达,结果显示敲低 RSRC1 明显抑制了 p-PTEN 的蛋白表达,而敲低 RSRC1 明显促进了 p-PI3K、p-AKT 的蛋白表达,进一步研究发现 RSRC1 可以通过调节 PTEN/PI3K/AKT 信号通路抑制 ESCC 细胞的增殖和迁移,这与前人的研究结果一致。

本研究证明 RSRC1 是 ESCC 中潜在的肿瘤抑制基因,并且能够抑制 ESCC 细胞增殖和转移以及调节 PTEN/PI3K/AKT 信号通路。因此,RSRC1 可能是 ESCC 的潜在诊断生物标志物,可以作为 ESCC 治疗的新靶点,并在未来的药物开发中起到作用。然而,我们的研究还存在不足,缺少 RSRC1 在体内的研究,以及这种类型的调控是否与 mRNA 替代剪接有关。这也是我们未来研究的重要方向,我们将在细胞、分子以及动物实验对这一课题进行进一步的探究。

综上所述,RSRC1 可能通过调节 PTEN/PI3K/AKT 信号通路抑制 ESCC 细胞增殖和转移,为丰富 ESCC 的发病机制提供了新的方向,为 RSRC1 可以作为 ESCC 治疗的潜在靶点提供理论支持。

参 考 文 献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J Clin*, 2018, 68 (6): 394-424.
- [2] Li X, Xiao X, Chang R, et al. Comprehensive bioinformatics analysis identifies lncRNA HCG22 as a migration inhibitor in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cell Biochem*, 2020, 121 (1): 468-481.
- [3] Shang Q X, Yang Y S, Yuan Y, et al. Clinical and prognostic effects of adjuvant therapy on less advanced esophageal squamous cell carcinoma patients. *Ann Palliat Med*, 2020, 9 (3): 681-699.
- [4] Zhong S, Yan H, Chen Z, et al. Overexpression of TAF1L promotes cell proliferation, migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer*, 2019, 10 (4): 979-989.
- [5] Tachimori Y, Ozawa S, Numasaki H, et al. Comprehensive registry of esophageal cancer in Japan, 2011. *Esophagus*, 2018, 15 (3): 127-152.
- [6] Kang Z, Zhu J, Sun N, et al. COL11A1 promotes esophageal squamous cell carcinoma proliferation and metastasis and is inversely regulated by miR-335-5p. *Ann Transl Med*, 2021, 9 (20): 1577.
- [7] 陈斯默,张哲源,张家豪,等.具核梭杆菌诱导内质网应激相关蛋白 GRP78 及 XBP1 高表达在食管鳞癌中的临床意义. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2023, 44 (3): 403-415.
- [8] Yu S, Gautam N, Quan M, et al. RSRC1 suppresses gastric cancer cell proliferation and migration by regulating PTEN expression. *Mol Med Rep*, 2019, 20 (2): 1747-1753.
- [9] Perez Y, Menascu S, Cohen I, et al. RSRC1 mutation affects intellect and behaviour through aberrant splicing and transcription, downregulating IGFBP3. *Brain*, 2018, 141 (4): 961-970.
- [10] Teplyuk N M, Uhlmann E J, Gabriely G, et al. Therapeutic potential of targeting micro RNA - 10b in established intracranial glioblastoma: first steps toward the clinic. *EMBO molecular medicine*, 2016, 8 (3): 268-287.
- [11] Tang J, Liu W, Zhu J, et al. RSRC1 and CPZ gene polymorphisms with neuroblastoma susceptibility in Chinese children. *Gene*, 2018, 662 : 83-87.
- [12] Abnet C C, Arnold M, Wei W Q. Epidemiology of esophageal squamous cell carcinoma. *Gastroenterology*, 2018, 154 (2): 360-373.
- [13] Xu T, Rao T, Yu W M, et al. Upregulation of NFKBIZ affects bladder cancer progression via the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Mol Med*, 2021, 47 (6): 109.
- [14] Li C, Li X. circPTEN suppresses colorectal cancer progression through regulating PTEN/AKT pathway. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 26 : 1418-1432.
- [15] Kim Y C, Cutler M L. MicroRNA-dependent targeting of RSU1 and the IPP adhesion complex regulates the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in breast cancer cell lines. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (15): 5458.
- [16] Shou Y, Wang X, Chen C, et al. Exosomal miR-301a-3p from esophageal squamous cell carcinoma cells promotes angiogenesis by inducing M2 polarization of macrophages via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Cancer Cell Int*, 2022, 22 (1): 1-15.
- [17] Kuo T N, Lin C S, Li G D, et al. Sesamin inhibits cervical cancer cell proliferation by promoting p53/PTEN-mediated apoptosis. *Int J Med Sci*, 2020, 17 (15): 2292-2298.
- [18] Zhang J, Meng L, Yu P, et al. MiR-155 promotes the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma via downregulating PTEN. *Minerva Med*, 2021, 112 (1): 155-157.
- [19] Chen C Y, Chen J, He L, et al. PTEN: tumor suppressor and metabolic regulator. *Front Endocrinol*, 2018, 9 : 338.
- [20] Cao Y, Xia F, Wang P, et al. MicroRNA-93-5p promotes the progression of human retinoblastoma by regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Mol Med Report*, 2018 : 5807-5814.
- [21] Zhu X, Li Z, Li T, et al. Osthole inhibits the PI3K/AKT signaling pathway via activation of PTEN and induces cell cycle arrest and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102 : 502-509.

(收稿日期: 2023-05-25)

(本文编辑: 杨江瑜)