

论著·基础研究

RBX1通过STAT1调控葡萄膜黑色素瘤免疫相关基因

周晓雯, 李倩, 张哲, 沈键锋[#], 范先群[#]

上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科, 上海市眼眶病眼肿瘤重点实验室, 上海 200011

[摘要] **目的**·探索RBX1 (ring-box protein 1) 在葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma, UVM) 肿瘤细胞中对免疫相关基因的调控作用。**方法**·通过检索癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库分析 *RBX1* 在肿瘤中的表达水平以及其与临床分期、生存预后的相关性。使用靶向 *RBX1* 的小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) 分别在 UVM 细胞系 92.1、OMM2.3 和 MEL290 中瞬时敲低 *RBX1*, 并对瞬时敲低 *RBX1* 的 92.1 细胞进行转录组测序, 分析 si*RBX1* 转染细胞与对照细胞的差异表达基因, 并采用基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) 对差异基因进行分析, 探究 *RBX1* 与肿瘤免疫相关基因的关系。在分析结果的基础上, 通过实时荧光定量PCR (qPCR) 分别检测瞬时敲低 *RBX1* 的 92.1、OMM2.3 和 MEL290 细胞系中信号转导与转录激活因子 1 (signal transducer and activator of transcription 1, *STAT1*) 及其下游的 CXC 趋化因子配体 9 (C-X-C motif chemokine ligand 9, *CXCL9*) 和 *CXCL10* 的 mRNA 表达水平, 并通过 Western blotting 检测 92.1 细胞中 *STAT1* 及 p-*STAT1* 蛋白表达水平。在瞬时敲低 *RBX1* 的细胞系 OMM2.3 和 MEL290 中, 分别加入 5 nmol/L 或 10 nmol/L 的 *STAT1* 抑制剂 fludarabine, 处理 48 h 后通过 qPCR 检测 *CXCL9* 和 *CXCL10* 的 mRNA 表达水平。**结果**·TCGA 数据库分析表明: 与正常组织相比, *RBX1* 在多种肿瘤中高表达, 在肾上腺皮质癌和 UVM 中显著高表达; 且这 2 种肿瘤分期晚的患者, *RBX1* 表达水平更高, 同时 *RBX1* 表达水平高的患者的总生存期更短 (均 $P < 0.05$)。对瞬时敲低 *RBX1* 的 92.1 细胞和对照细胞进行转录组测序, 获得差异基因, 并且 GSEA 结果显示, *RBX1* 参与调控肿瘤免疫相关通路。热图分析显示 *RBX1* 敲低后 *STAT1* 表达水平上升。在 92.1、OMM2.3 和 MEL290 细胞系中, qPCR 结果显示 *RBX1* 敲低后 *STAT1*、*CXCL9* 和 *CXCL10* 的 mRNA 表达水平上升, Western blotting 结果显示在 92.1 细胞系中敲低 *RBX1* 后 *STAT1* 及 p-*STAT1* 表达水平上升。加入 *STAT1* 抑制剂后, OMM2.3 和 MEL290 细胞系中的 *CXCL9* 和 *CXCL10* mRNA 上调表达被抑制。**结论**·RBX1 在 UVM 细胞中可能通过 *STAT1* 调控 *CXCL9* 和 *CXCL10* 的表达, 参与肿瘤免疫调控。

[关键词] 葡萄膜黑色素瘤; RBX1; 肿瘤免疫; 信号转导与转录激活因子 1**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.06.007 **[中图分类号]** R739.7 **[文献标志码]** A

RBX1 regulates uveal melanoma immune-related genes via STAT1

ZHOU Xiaowen, LI Qian, ZHANG Zhe, SHEN Jianfeng[#], FAN Xianqun[#]

Department of Ophthalmology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Orbital Diseases and Ocular Oncology, Shanghai 200011, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the role of RBX1 (ring-box protein 1) in the regulation of immune-related genes in uveal melanoma (UVM) tumor cells. **Methods**·The Cancer Genome Atlas (TCGA) was searched to analyze the expression levels of *RBX1* in tumors and the correlation with clinical stages and survival prognosis. *RBX1* was transiently knocked down in the UVM cell lines, i. e., 92.1, OMM2.3 and MEL290 by using small interfering RNAs (siRNAs) targeting *RBX1*. RNA sequencing was performed on the 92.1 cells with transient knockdown of *RBX1*, and the differentially expressed genes between the si*RBX1*-transfected cells and control cells were analyzed by gene set enrichment analysis (GSEA) to investigate the relationship between *RBX1* and tumor immune-related genes. Based on the results of the analysis, signal transducer and activator of transcription 1 (*STAT1*) and its downstream CXC chemokine ligand 9 (*CXCL9*) and *CXCL10* mRNA expression levels were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) in 92.1, OMM2.3 and MEL290 cells with transient knockdown of *RBX1*, respectively. The protein expression levels of *STAT1* and p-*STAT1* in 92.1 cells were detected by Western blotting. The cell lines OMM2.3 and MEL290, in which *RBX1* was transiently knocked down, were treated with 5 nmol/L or 10 nmol/L *STAT1* inhibitor fludarabine for 48 h, and the mRNA expression levels of *CXCL9* and *CXCL10* were detected by qPCR. **Results**·TCGA database analysis showed that *RBX1* was highly expressed in a variety of tumors compared to the normal tissues, particularly in adrenocortical carcinoma and

[基金项目] 国家自然科学基金 (81972667); 上海市重点实验室资助项目 (20DZ2270800)。**[作者简介]** 周晓雯 (1997—), 女, 硕士生; 电子信箱: hiuamanchow@163.com。**[通信作者]** 沈键锋, 电子信箱: jfshen@shsmu.edu.cn。范先群, 电子信箱: fanxianqun@126.com。[#]为共同通信作者。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81972667); Program of Shanghai Key Laboratory Funding (20DZ2270800)。**[Corresponding Author]** SHEN Jianfeng, E-mail: jfshen@shsmu.edu.cn. FAN Xianqun, E-mail: fanxianqun@126.com. [#]Co-corresponding authors.

UVM. In addition, the patients with late stage of these two kinds of tumors had higher expression level of *RBX1*, and the patients with higher expression level of *RBX1* had shorter overall survival time ($P < 0.05$). RNA sequencing of 92.1 cells with transiently knocked down *RBX1* and control cells revealed differential genes, and GSEA showed that *RBX1* was involved in the regulation of tumor immune-related pathways. Heat map analysis showed an increase in *STAT1* expression after *RBX1* knockdown. In the 92.1, OMM2.3 and MEL290 cell lines, qPCR showed increases in *STAT1*, *CXCL9* and *CXCL10* mRNA expression after transient knockdown of *RBX1*, and Western blotting showed that *STAT1* and p-*STAT1* expression increased after knockdown of *RBX1* in 92.1 cell lines. The increases of *CXCL9* and *CXCL10* mRNA in OMM2.3 and MEL290 cell lines were suppressed by *STAT1* inhibitors.

Conclusion *RBX1* may regulate *CXCL9* and *CXCL10* expression via *STAT1* in UVM cells and is involved in tumor immune regulation.

[Key words] uveal melanoma (UVM); ring-box protein 1 (*RBX1*); tumor immunity; signal transducer and activator of transcription 1 (*STAT1*)

先天免疫系统是人类机体免疫防御的重要组成部分。微生物核酸被一系列宿主编码的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 识别后, 触发细胞内信号级联反应, 激活 I 型干扰素 (interferon, IFN) 以及促炎细胞因子, 如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 (interleukin-1, IL-1)、IL-6 等, 这一系列过程是引发即时抗病毒反应和适应性免疫的先决条件^[1-2]。蛋白质泛素化修饰在调节先天免疫的过程中起关键作用, 如抗原呈递、细胞分化、免疫防御和炎症反应等^[3]。E3 泛素连接酶能够特异性识别靶蛋白, 在泛素化途径中具有重要作用, 并且参与细胞内的多种免疫调控, 如: 通过诱导髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 降解和 TANK 结合激酶 1 (TANK binding kinase 1, TBK1) 活化, 抑制 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) /核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 信号转导^[4]; 与 NF- κ B P65 亚基结合, 促进 P65 发生泛素化并降解, 抑制 NF- κ B 活化^[5]; 促进干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING) 在 K150 处的泛素化及其降解, 抑制干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 依赖性抗病毒信号转导等^[6]。

RBX1 (ring-box protein 1) 是一种 RING 结构蛋白, 与 S 期激酶相关蛋白 1 (S-phase kinase-associated protein 1, SKP1)、CUL1 (cullin 1) 和 F-box 蛋白一起组成 SCF (SKP1-CUL1-F-box) 复合体。SCF 复合体是一种重要的 E3 泛素化连接酶^[7]。研究^[8-12]表明, *RBX1* 在多种肿瘤中表达异常, 包括肝癌、胃癌、食管癌、乳腺癌、膀胱癌、肺癌和结肠癌, 且与临床不良预后相关。如 *RBX1* 的高表达可促进三阴性乳腺癌的转移^[13], 也是小细胞肺癌患者不良预后的相关因素^[14]; *RBX1* 低表达促进高级别浆液性卵巢癌

前体细胞转变为卵巢癌细胞^[15]; *RBX1* 可调控细胞周期, 在神经胶质瘤细胞中, 沉默 *RBX1* 可使细胞停滞在 G₂/M 期, 并导致细胞衰老和凋亡, 从而抑制肿瘤细胞生长^[9]。E3 泛素化连接酶在免疫调控中发挥着重要作用, 但 *RBX1* 作为 E3 泛素化连接酶的重要组成部分, 对于肿瘤免疫相关基因的调控作用鲜有报道。

葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma, UVM) 是人最常见的眼内恶性肿瘤, 极易发生复发、转移, 患者预后差, 且目前 UVM 的靶向治疗效果不佳, 需要寻找新的治疗靶点^[16]。本研究旨在探索 *RBX1* 在 UVM 中对免疫相关基因的调控作用及可能的机制, 为改善 UVM 肿瘤免疫治疗提供新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞来源 本研究使用的人 UVM 细胞系, 包括 92.1 细胞系 (上海雅吉生物科技有限公司)、MEL290 细胞系和 OMM2.3 细胞系 (2 种细胞系均来自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)。所有细胞系均用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养。

1.1.2 主要试剂和仪器 RPMI 1640 培养液、Opti-MEM 培养液、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶、青霉素-链霉素 (美国 Gibco), Lipofectamine™ 2000 (美国 Thermo Fisher), 荧光定量 PCR 预混液 ChamQ SYBR qPCR Master Mix (中国诺唯赞), *RBX1* 抗体 (11922S, 美国 CST), β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (66009, 美国 Proteintech), 信号转导与转录激活因子 1 (signal transducer and activator of transcription 1, *STAT1*) 抗体 (14994S, 美国 CST), p-*STAT1* 抗体 (9167S, 美国 CST), 荧光二抗 (A21206, 美国

Invitrogen), RNA 抽提试剂盒 (美国 EZBioscience), STAT1 活化抑制剂 fludarabine (美国 Selleck)。

CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher), 电泳装置、ChemiDoc 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad), 离心机 (德国 Eppendorf), Light Cycler 480 II 定量 PCR 仪 (美国 Roche)。

1.2 实验方法

1.2.1 数据库分析 使用 GEPIA 数据库 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) 和 UALCAN 网站 (<http://ualcan.path.uab.edu/>) 完成癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库中肿瘤患者的预后分析及各类肿瘤中 *RBX1* 基因表达情况分析。

1.2.2 小干扰 RNA 转染 转染前 24 h 提前将状态良好的细胞均匀接种到 6 孔板中, 使转染时细胞密度为 50%, 转染时使用无抗生素培养液。在 50 μ L Opti-MEM 培养液中加入 200 μ mol 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 轻轻吹打混匀; 在 50 μ L Opti-MEM 培养液中加入 5.0 μ L Lipofectamine™ 2000 试剂, 轻轻吹打混匀, 并且室

温静置 5 min。将含有转染试剂和 siRNA 的培养液混合, 轻轻吹打混匀, 并室温静置 15~20 min。将静置后的转染培养液加入 6 孔细胞板中, 轻摇混匀。将细胞板置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 6~8 h 后更换新鲜培养液, 继续培养 48 h 后进行验证。所用 siRNA 序列见表 1, 序列设计及合成由吉满生物科技 (上海) 有限公司完成。

表 1 siRNA 序列

Tab 1 siRNA sequences

Primer name	Sequence (5'→3')
siRBX1-1	GGGAUAAUUGUGGUUGAUAAtt
siRBX1-2	CAGACCGUGUGUUUCCAAAtt

1.2.3 实时荧光定量 PCR 用 RNA 抽提试剂盒提取细胞 RNA, 取 1 μ g RNA 进行反转录, 得到 cDNA。10 μ L PCR 反应体系: ChamQ SYBR qPCR Master Mix 5 μ L, cDNA 模板 5 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L。每个样本设置 3 个复孔。上样结束后贴上透明膜并刮除气泡, 离心 60 s 后放入定量 PCR 仪中按照设定程序扩增。以 β -actin 作为内参计算 mRNA 相对表达量。实时荧光定量 PCR (qPCR) 的引物序列见表 2。

表 2 qPCR 检验的引物序列

Tab 2 Primer sequences for qPCR analysis

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
β -actin	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
<i>RBX1</i>	TTGTGGTTGATAACTGTGCCAT	GACGCCTGGTTAGCTTGACAT
<i>STAT1</i>	CAGCTTGACTCAAAATTCCTGGA	TGAAGATTACGCTTGCTTTTCCT
<i>CXCL9</i>	TGAGAAAGGGTCGCTGTTCC	TCAAAGCTTGCTGGCTACCA
<i>CXCL10</i>	GCTTCCAAGGATGGACCACA	GCAGGGTCAGAACATCCACT

Note: *CXCL9*—C-X-C motif chemokine ligand 9; *CXCL10*—C-X-C motif chemokine ligand 10.

1.2.4 Western blotting 用胰酶消化细胞, 在 4 $^{\circ}$ C 离心机中离心收集细胞沉淀, 经 PBS 缓冲液清洗后用 Urea 蛋白裂解液在冰上裂解 30 min, 在 4 $^{\circ}$ C 下离心获得蛋白上清液, 用酶标仪进行蛋白定量后与十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 一起煮沸, 获得蛋白样品。取 30 μ g 的蛋白样品上样后行蛋白凝胶电泳 100 min, 然后将蛋白质转膜到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。用 5% 牛血清白蛋白溶液室温封闭 1 h, 洗膜后滴加一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日洗膜后滴加二抗, 在室温下孵育 30 min, 洗膜后在凝胶成像仪中成像并记录。

1.2.5 转录组测序 转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 由上海派森诺生物科技股份有限公司完成, 每组设置 2 个生物学重复。使用 TRIzol 法提取 siRBX1 干预组 (转染 siRBX1-1 或 siRBX1-2) 和对照组 (转染

siNC) 92.1 细胞的 RNA, 每个样品约需要 1 μ g 的总 RNA。在转录组文库构建完成并质检合格后上机测序, 对各组样本进行基因表达水平定量。计算每个基因的每千个碱基的转录每百万映射读取的片段数 (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM) 值, 对差异表达的基因进行基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)。

1.2.6 药物干预 用 fludarabine 抑制细胞 STAT1 活性。以 DMSO 为溶剂, 分别按 fludarabine 终浓度 5 nmol/L 和 10 nmol/L 加入细胞培养液, 培养 48 h 后进行检测。对照组加入等体积 DMSO。

1.3 统计学分析

应用 GraphPad Prism 8 软件进行数据的分析和处

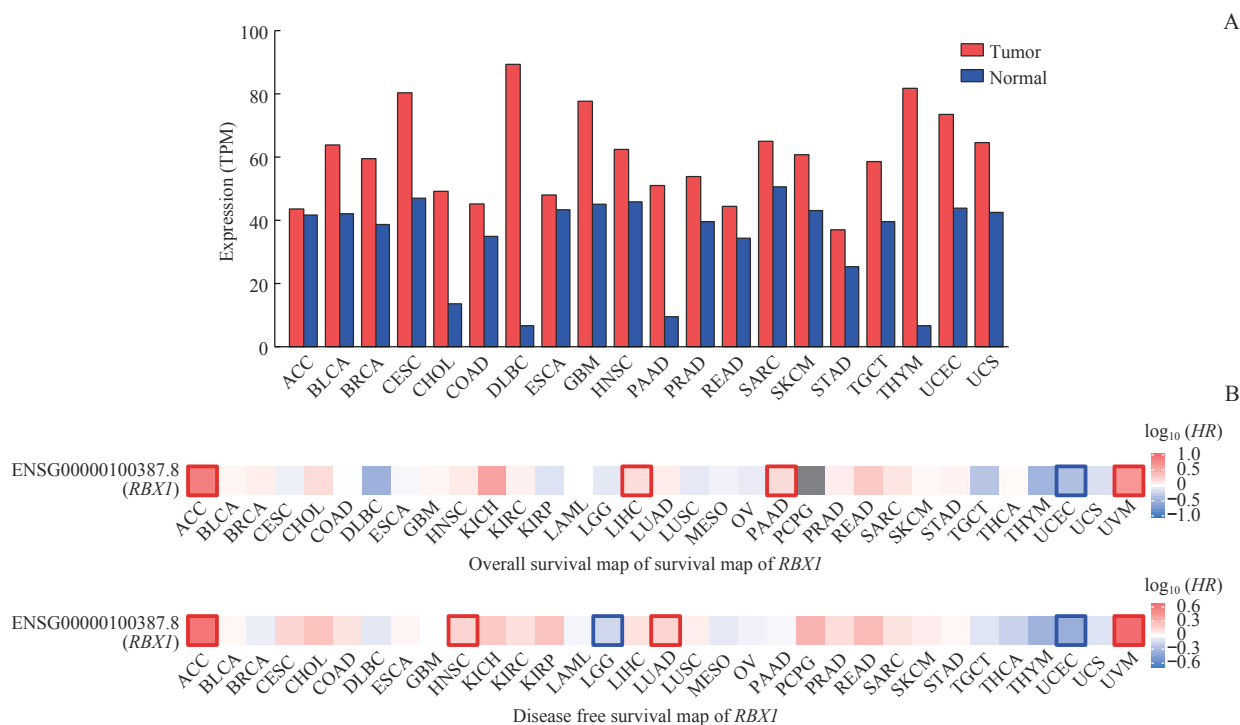
理。符合正态分布、方差齐性的定量资料的多组间比较采用方差分析, 两两比较采用双尾非配对 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RBX1 在肿瘤中的临床意义

为探索 RBX1 在肿瘤免疫中的作用, 我们首先在 GEPIA 数据库中检索了 *RBX1* 基因在各种肿瘤中的表达情况。图 1A 显示 *RBX1* 基因在多种肿瘤中高表达。

分析 *RBX1* 基因的表达与各种肿瘤患者总生存率 (overall survival) 和无病生存率 (disease free survival) 的关系, 结果 (图 1B) 显示 *RBX1* 的高表达是 UVM 和肾上腺皮质癌 (adrenocortical carcinoma, ACC) 患者生存的显著不利因素。为探索 RBX1 与肿瘤的关系, 我们通过 UALCAN 网站检索了 TCGA 数据库并进行分析, 结果 (图 2) 显示 UVM 和 ACC 临床分期较晚的患者, *RBX1* 表达水平相对更高, 且 *RBX1* 高表达的患者总生存期更短。



Note: A. Search for *RBX1* expression in different tumors in GEPIA database. B. Overall survival heat map (above) and disease free survival heat map (below) of *RBX1* in patients with various tumors. TPM—transcript per million; ACC—adrenocortical carcinoma; BLCA—bladder urothelial carcinoma; BRCA—breast invasive carcinoma; CESC—cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma; CHOL—cholangiocarcinoma; COAD—colon adenocarcinoma; DLBC—lymphoid neoplasm diffuse large B-cell lymphoma; ESCA—esophageal carcinoma; GBM—glioblastoma multiforme; HNSC—head and neck squamous cell carcinoma; PAAD—pancreatic adenocarcinoma; PRAD—prostate adenocarcinoma; READ—rectum adenocarcinoma; SARC—sarcoma; SKCM—skin cutaneous melanoma; STAD—stomach adenocarcinoma; TGCT—testicular germ cell tumor; THYM—thymoma; UCEC—uterine corpus endometrial carcinoma; UCS—uterine carcinosarcoma; PCPG—pheochromocytoma and paraganglioma; KICH—kidney chromophobe; KIRC—kidney renal clear cell carcinoma; KIRP—kidney renal papillary cell carcinoma; LAML—acute myeloid leukemia; LGG—brain lower grade glioma; LIHC—liver hepatocellular carcinoma; LUAD—lung adenocarcinoma; LUSC—lung squamous cell carcinoma; MESO—mesothelioma; OV—ovarian serous cystadenocarcinoma; THCA—thyroid carcinoma; UVM—uveal melanoma.

图1 *RBX1* 在肿瘤中的表达水平及对患者生存的影响

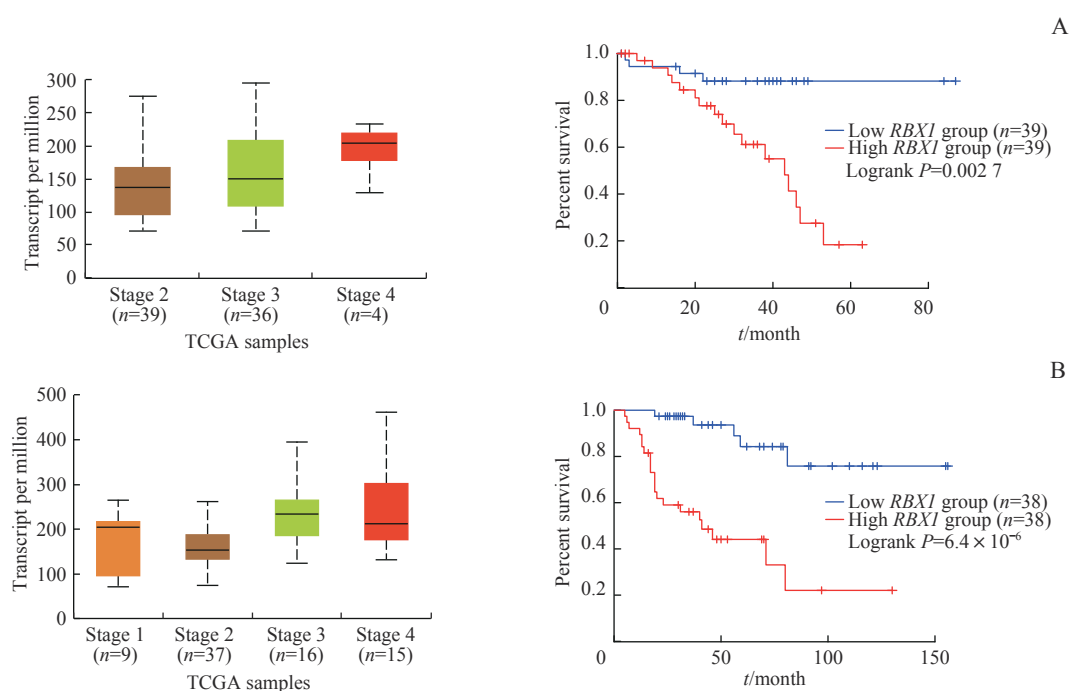
Fig 1 Expression of *RBX1* in tumors and its effect on patients' survival

2.2 细胞系转染 siRNA 后 *RBX1* 的表达变化

为探索 RBX1 在肿瘤免疫中的调控作用, 我们选用了人 UVM 92.1 细胞、OMM2.3 细胞和 MEL290 细胞为研究体系, 转染 siRNA, 瞬时敲低 *RBX1*。qPCR 和 Western blotting 验证结果显示, si*RBX1*-1 和 si*RBX1*-2 转染后 92.1 细胞、OMM2.3 细胞和 MEL290 细胞中 *RBX1* 的 mRNA 及蛋白质表达水平均下降 (图 3)。

2.3 RBX1 对免疫相关基因表达的调控

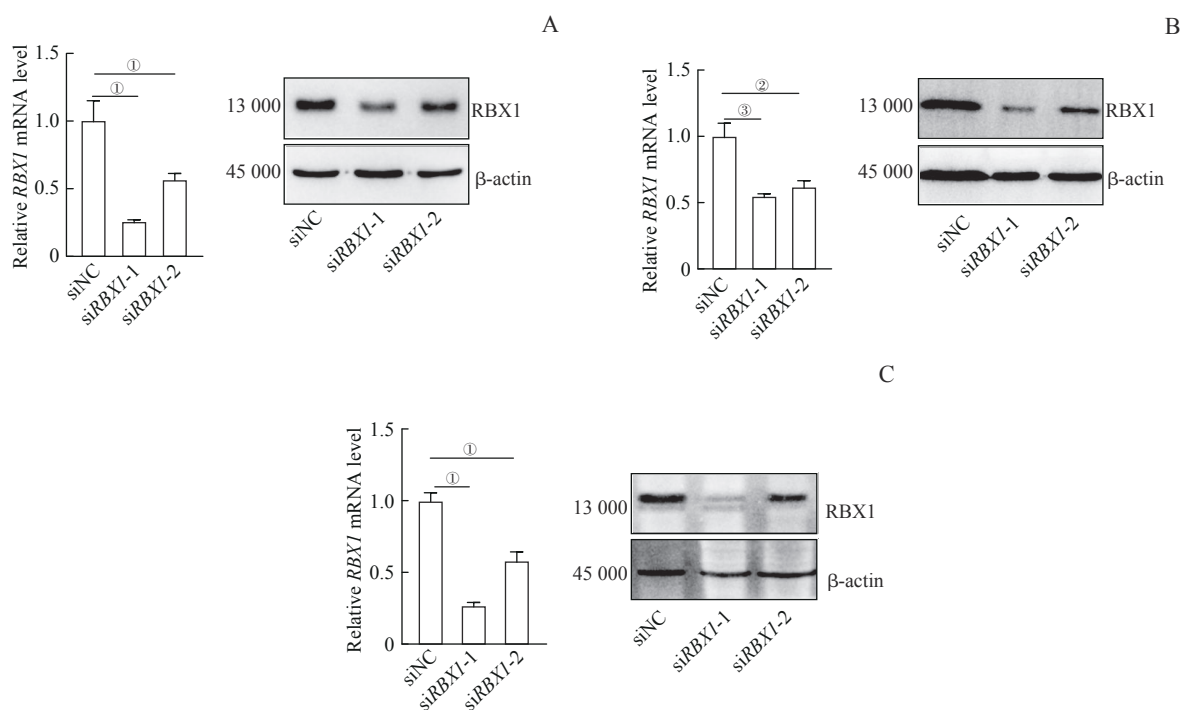
为进一步探索 RBX1 在 UVM 细胞中的功能, 我们选取 si*RBX1* 干预组 and 对照组 92.1 细胞进行 RNA-seq。GSEA 分析发现: si*RBX1*-1 干预组 and 对照组相比存在 608 个差异基因集, 其中 301 个基因集在 si*RBX1*-1 干预组细胞中上调; si*RBX1*-2 干预组 and 对照组相比也有 608 个差异基因集, 其中 252 个基因集在 si*RBX1*-2 干预组细胞中



Note: A. *RBX1* expression levels in different stages of UVM patients (left) and overall survival curves of high expression and low expression patients (right). B. *RBX1* expression levels in different stages of ACC patients (left) and overall survival curves of high expression and low expression patients (right).

图2 *RBX1* 表达水平与 UVM 和 ACC 患者分期及总生存期的关系

Fig 2 Relationships of *RBX1* expression level with stages and overall survivals of UVM and ACC patients



Note: A. Expression of RBX1 in 92.1 cell line. B. Expression of RBX1 in OMM2.3 cell line. C. Expression of RBX1 in Mel290 cell line. ① $P=0.011$, ② $P=0.016$, ③ $P=0.020$.

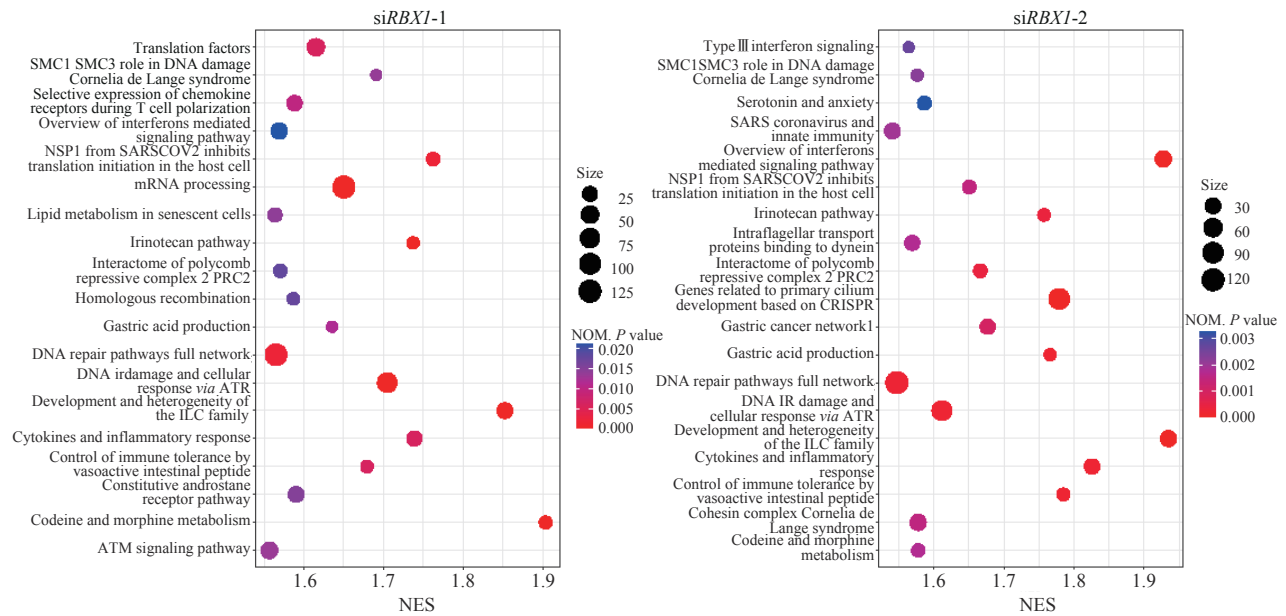
图3 转染 siRNA 后 UVM 细胞系中 *RBX1* mRNA 及蛋白的表达变化

Fig 3 Expression changes of *RBX1* mRNA and protein in UVM cell lines transfected with siRNA

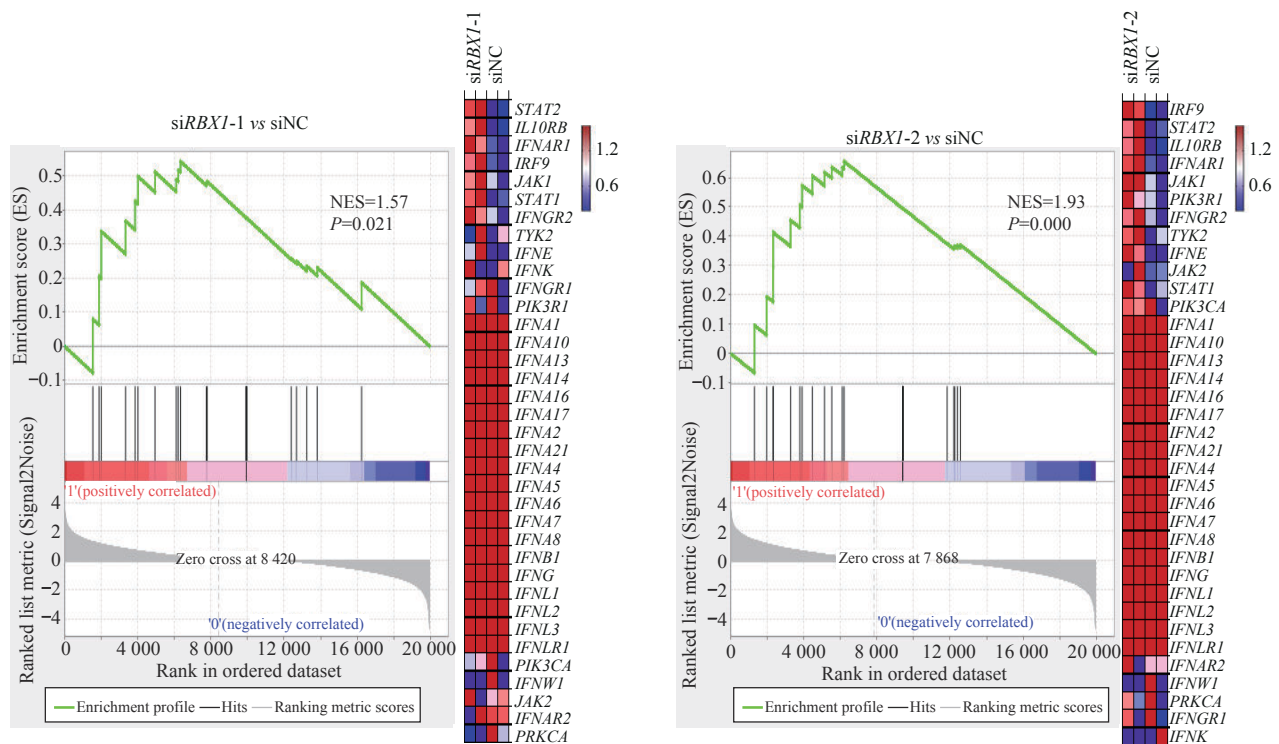
上调。分析结果显示,除了之前报道过的细胞周期调控、DNA 损伤修复相关通路外,我们还观察到部分差异基

因富集到一些免疫相关通路(图4A);差异基因在干扰素介导的信号通路上富集,且 *STAT1* 表达上调(图4B)。

A



B



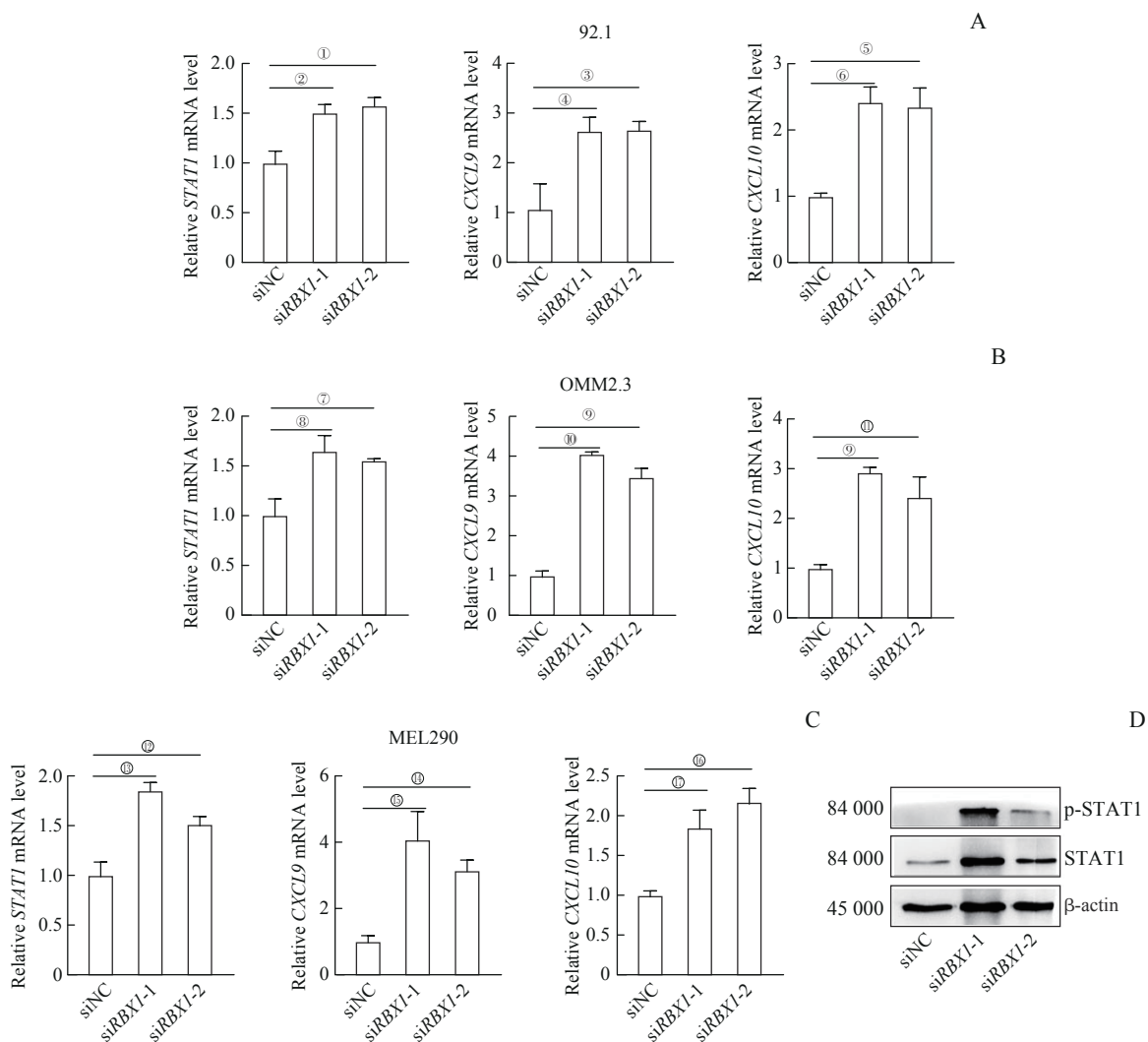
Note: A. Differential gene enrichment analysis after siRBX1-1 (left) or siRBX1-2 (right) intervention compared with siNC. B. Differential genes enriched in the interferon-mediated signaling pathway after siRBX1-1 (left) or siRBX1-2 (right) intervention compared with siNC, and the associated differential genes heatmap. NES—normalized enrichment score; STAT2—signal transducer and activator of transcription 2; IL10RB—interleukin 10 receptor subunit β ; IFNAR1—interferon α and β receptor subunit 1; IRF9—interferon regulatory factor 9; JAK1—Janus kinase 1; IFNGR2—interferon γ receptor 2; TYK2—tyrosine kinase 2; IFNE—interferon ϵ ; IFNK—interferon κ ; IFNGR1—interferon γ receptor 1; PIK3R1—phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1; IFNA1—interferon α 1; IFNA10—interferon α 10; IFNA13—interferon α 13; IFNA14—interferon α 14; IFNA16—interferon α 16; IFNA17—interferon α 17; IFNA2—interferon α 2; IFNA21—interferon α 21; IFNA4—interferon α 4; IFNA5—interferon α 5; IFNA6—interferon α 6; IFNA7—interferon α 7; IFNA8—interferon α 8; IFNB1—interferon β 1; IFNG—interferon γ ; IFNL1—interferon λ 1; IFNL2—interferon λ 2; IFNL3—interferon λ 3; IFNLR1—interferon λ receptor 1; PIK3CA—phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α ; IFNW1—interferon ω 1; JAK2—Janus kinase 2; IFNAR2—interferon α and β receptor subunit 2; PRKCA—protein kinase C α .

图4 92.1细胞系中敲低RBX1对免疫相关通路的影响

Fig 4 Effect of RBX1 knockdown on immune-related pathways in 92.1 cell line

已有研究报道, STAT1是由 IFN- γ 激活的转录调节因子^[17-18], 可调控 CXCL9 和 CXCL10 的表达^[19-20]。qPCR 检测结果(图 5A、B、C)显示, 敲低 RBX1 后 92.1、OMM2.3 和 MEL290 细胞系的

STAT1、CXCL9 和 CXCL10 的 mRNA 表达均显著上调。Western blotting 检测结果(图 5D)显示, 92.1 细胞系中敲低 RBX1 后, STAT1 蛋白表达和活化的 p-STAT1 蛋白表达水平上调。



Note: A. mRNA expression of *STAT1*, *CXCL9*, and *CXCL10* in 92.1 cell line after siRBX1 intervention detected by qPCR. B. mRNA expression of *STAT1*, *CXCL9*, and *CXCL10* in OMM2.3 cell line after siRBX1 intervention detected by qPCR. C. mRNA expression of *STAT1*, *CXCL9*, and *CXCL10* in MEL290 cell line after siRBX1 intervention detected by qPCR. D. STAT1 and p-STAT1 protein expression levels in 92.1 cell line after siRBX1 intervention detected by Western blotting. ① $P=0.029$, ② $P=0.009$, ③ $P=0.048$, ④ $P=0.045$, ⑤ $P=0.017$, ⑥ $P=0.006$, ⑦ $P=0.028$, ⑧ $P=0.047$, ⑨ $P=0.001$, ⑩ $P=0.000$, ⑪ $P=0.018$, ⑫ $P=0.043$, ⑬ $P=0.019$, ⑭ $P=0.002$, ⑮ $P=0.025$, ⑯ $P=0.012$, ⑰ $P=0.033$.

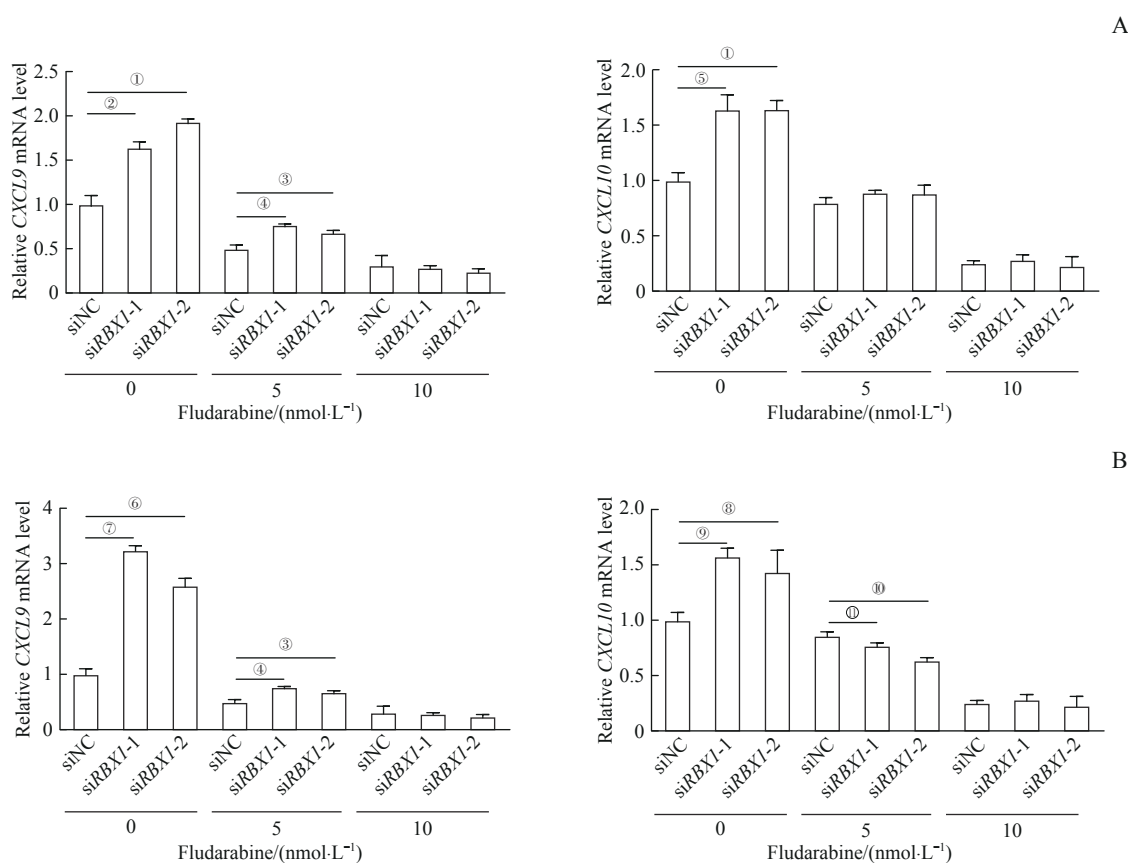
图5 RBX1对UVM细胞中STAT1及相关基因的表达调控作用

Fig 5 Regulation of RBX1 on STAT1 and related genes expressions in UVM cell lines

2.4 抑制STAT1后CXCL9和CXCL10的表达下降

为进一步探索 RBX1 是否通过 STAT1 来调控 CXCL9 和 CXCL10 的表达, 使用 STAT1 抑制剂 fludarabine 进行研究。在 6 孔板中分别接种相同数量的 OMM2.3 细胞和 MEL290 细胞并转染 siRNA 干扰 RBX1 表达, 干扰 24 h 后加入 fludarabine (终浓度分别为 5 nmol/L 和 10 nmol/L), 并设置 DMSO 组作为对照组, 处理 48 h 后通过 qPCR 检测 STAT1 下游基因

CXCL9 和 CXCL10 的 mRNA 表达。结果(图 6)显示, 加入 STAT1 抑制剂后, siNC 组的 CXCL9 和 CXCL10 的表达被抑制, 而 siRBX1 干预组的 CXCL9 和 CXCL10 被抑制程度更加显著, 且在高浓度 fludarabine (10 nmol/L) 处理下, siRBX1 干预组与 siNC 组的 CXCL9 和 CXCL10 表达水平基本一致。表明 RBX1 可能通过调控 STAT1 影响 CXCL9 和 CXCL10 的表达。



Note: The *RBX1* knockdown cell lines of OMM2.3 (A) and MEL290 (B) were treated with 5 nmol/L and 10 nmol/L fludarabine. The samples were collected after 48 h of dosing and qPCR was performed. ^①*P*=0.002, ^②*P*=0.003, ^③*P*=0.041, ^④*P*=0.006, ^⑤*P*=0.004, ^⑥*P*=0.007, ^⑦*P*=0.000, ^⑧*P*=0.027, ^⑨*P*=0.012, ^⑩*P*=0.008, ^⑪*P*=0.035.

图6 STAT1抑制剂对*RBX1*敲低后的UVM细胞中*CXCL9*和*CXCL10* mRNA表达的影响

Fig 6 Effect of STAT1 inhibitor on the mRNA expression of *CXCL9* and *CXCL10* in UVM cell lines after *RBX1* knockdown

3 讨论

由于肿瘤的异质性, *RBX1*在不同类型的肿瘤中发挥不同的作用。*RBX1*作为SCF E3泛素化连接酶的重要组成部分,参与多种肿瘤发生发展。在高级别浆液性卵巢癌 (high-grade serous ovarian cancers, HGSOC) 中, *RBX1*表达的减少诱导细胞染色体不稳定,低表达的*RBX1*与HGSOC患者的不良预后相关^[15];在肺癌细胞中,沉默*RBX1*基因能够诱导细胞衰老^[9];在肝癌细胞中,沉默*RBX1*可诱导细胞G₂/M期停滞、细胞衰老和细胞自噬^[8]。而*RBX1*在葡萄糖瘤中的作用尚未见文献报道。

在本研究中,对TCGA数据库的分析结果显示*RBX1*在UVM中高表达,且显著影响患者的总生存期和无病生存期,在晚期的UVM患者中表达水平更高,因此推测*RBX1*在UVM中可能起重要作用。沉

默92.1细胞的*RBX1*基因后,对RNA-seq结果进行GSEA分析,结果发现*RBX1*除了参与细胞周期和DNA损伤修复相关通路外,在免疫相关通路上也存在调控作用。研究^[4-6]表明,E3泛素化连接酶参与多种免疫调控,鉴于*RBX1*是E3泛素化连接酶的重要组成部分,我们推测*RBX1*在肿瘤免疫调节中也可能发挥重要功能。分析显示,92.1细胞中的*RBX1*被沉默后,STAT1的表达水平升高,qPCR和Western blotting的结果与RNA-seq的结果一致,提示STAT1的活性增强。在Janus激酶 (Janus kinase, JAK) / STAT信号通路中,转录因子STAT1是IFN的关键效应因子,参与多种免疫反应^[17]。在经典免疫通路中IFN-γ通过JAK使STAT1活化,激活下游免疫通路^[21]。趋化因子*CXCL9*、*CXCL10*是介导T淋巴细胞迁移的最重要的趋化因子,已有研究^[19-20]表明STAT1可调控*CXCL9*和*CXCL10*的表达。但*RBX1*沉

默后 *CXCL9* 和 *CXCL10* 的 mRNA 表达升高的机制仍不清楚。为进一步证实 RBX1 是否通过 STAT1 调控 *CXCL9* 和 *CXCL10* 的表达,我们利用 STAT1 的活化抑制剂 fludarabine 进行验证,结果显示在 *RBX1* 沉默的细胞中,原本升高的 *CXCL9* 和 *CXCL10* mRNA 在 fludarabine 的作用下 mRNA 表达被抑制,表明 RBX1 可通过 STAT1 调控 *CXCL9* 和 *CXCL10* 的表达。由于本研究仅在转录水平上进行验证,因此仍不能确定 RBX1 是否通过其泛素化作用调控 STAT1,未来仍需进一步研究。另外,本研究为体外细胞实验, RBX1 在体内对免疫相关基因的调控作用仍需进一步验证。

综上所述, RBX1 在 UVM 细胞中可能通过 STAT1 调控 *CXCL9* 和 *CXCL10* 的表达,在免疫调控中有重要作用,为 UVM 的靶向治疗提供了潜在的选择。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

作者贡献/Authors' Contributions

周晓雯、李倩负责实验操作,张哲负责数据分析,沈键锋负责实验设计,周晓雯、沈键锋、范先群参与论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The experiments were completed by ZHOU Xiaowen and LI Qian. Data was analyzed by ZHANG Zhe. The study was designed by SHEN Jianfeng. ZHOU Xiaowen, SHEN Jianfeng and FAN Xianqun drafted and revised the manuscript. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

• Received: 2023-03-16

• Accepted: 2023-05-15

• Published online: 2023-06-28

参·考·文·献

- [1] GÜRTLER C, BOWIE A G. Innate immune detection of microbial nucleic acids[J]. Trends Microbiol, 2013, 21(8): 413-420.
- [2] WU J X, CHEN Z J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids[J]. Annu Rev Immunol, 2014, 32: 461-488.
- [3] JIANG X M, CHEN Z J. The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 12(1): 35-48.
- [4] LEI C Q, ZHONG B, ZHANG Y, et al. Glycogen synthase kinase 3 β regulates IRF3 transcription factor-mediated antiviral response via activation of the kinase TBK1[J]. Immunity, 2010, 33(6): 878-889.
- [5] ARTHUR J S C, LEY S C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(9): 679-692.
- [6] LIU J, QIAN C, CAO X T. Post-translational modification control of innate immunity[J]. Immunity, 2016, 45(1): 15-30.
- [7] ENCHEV R I, SCHULMAN B A, PETER M. Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015, 16(1): 30-44.
- [8] 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 Differ, 2013, 20(2): 235-247.
- [9] JIA L J, SOENGAS M S, SUN Y. ROC1/RBX1 E3 ubiquitin ligase silencing suppresses tumor cell growth via sequential induction of G2-M arrest, apoptosis, and senescence[J]. Cancer Res, 2009, 69(12): 4974-4982.
- [10] ZHANG J Y, LI S, SHANG Z Y, et al. Targeting the overexpressed ROC1 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis in esophageal cancer cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 29125-29137.
- [11] CHEN P, LUO X T, CHE Z H, et al. Targeting of the C-Jun/BCL-XL/P21 axis accelerates the switch from senescence to apoptosis upon ROC1 knockdown in gastric cancer cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 48(3): 1123-1138.
- [12] WU Q, ZHOU X Q, LI P, et al. ROC1 promotes the malignant progression of bladder cancer by regulating p-IkBa/NF- κ B signaling[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 158.
- [13] SHAO J, FENG Q, JIANG W F, et al. E3 ubiquitin ligase RBX1 drives the metastasis of triple negative breast cancer through a FBXO45-TWIST1-dependent degradation mechanism[J]. Aging, 2022, 14(13): 5493-5510.
- [14] 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]. Surg Oncol, 2016, 25(3): 147-151.
- [15] BUNGSY M, PALMER M C L, JEUSSET L M, et al. Reduced RBX1 expression induces chromosome instability and promotes cellular transformation in high-grade serous ovarian cancer precursor cells[J]. Cancer Lett, 2021, 500: 194-207.
- [16] JAGER M J, SHIELDS C L, CEBULLA C M, et al. Uveal melanoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1): 24.
- [17] TOLOMEO M, CAVALLI A, CASCIO A. STAT1 and its crucial role in the control of viral infections[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(8): 4095.
- [18] STARK G R, DARNELL J E Jr. The JAK-STAT pathway at twenty[J]. Immunity, 2012, 36(4): 503-514.
- [19] JANDL K, MARSH L M, MUTGAN A C, et al. Impairment of the NKT-STAT1-CXCL9 axis contributes to vessel fibrosis in pulmonary hypertension caused by lung fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2022, 206(8): 981-998.
- [20] SHANG S, YANG Y W, CHEN F, et al. TRIB3 reduces CD8⁺ T cell infiltration and induces immune evasion by repressing the STAT1-CXCL10 axis in colorectal cancer[J]. Sci Transl Med, 2022, 14(626): eabf0992.
- [21] BACH E A, AGUET M, SCHREIBER R D. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling[J]. Annu Rev Immunol, 1997, 15: 563-591.

[本文编辑] 瞿麟平

