

肿瘤基础专题

SFXN3在头颈部鳞状细胞癌中的表达及其对细胞增殖的影响

安俊伊, 陈必颖, 陈循睿, 尹姗姗, 边洲亮, 刘 峰

上海交通大学医学院附属第九人民医院肿瘤科, 上海 201999

[摘要] **目的**·分析线粒体相关基因 *SFXN3* (sideroflexin 3) 在头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 中的表达及其对细胞增殖的影响。**方法**·从公共数据库获取与线粒体相关的基因和TCGA-HNSCC数据集, 使用生物信息学方法筛选出目标基因 *SFXN3*。使用UALCAN数据库分析 *SFXN3* 在HNSCC患者样本中的表达, 并根据TCGA-HNSCC队列和GEO队列 (GSE65858、GSE41613和GSE27020) 对不同 *SFXN3* 表达水平的患者进行生存分析, 使用TCGA-HNSCC队列和GEO队列 (GSE40020、GSE210287) 在治疗有应答和无应答的患者之间比较 *SFXN3* 表达水平差异。通过实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 在收集的HNSCC癌和癌旁组织验证 *SFXN3* 的表达情况, 并检测 *SFXN3* 在人正常口腔上皮细胞和HNSCC肿瘤细胞系中的表达水平。构建稳定敲低 *SFXN3* 的HNSCC细胞株, 使用Incucyte活细胞成像分析系统和平板克隆形成实验观察 *SFXN3* 对HNSCC细胞增殖能力的影响。将稳定敲低 *SFXN3* 的细胞和对照组细胞的总RNA进行转录组测序, 对敲低组相比对照组差异表达下调的基因进行通路富集分析。**结果**·*SFXN3* 在HNSCC患者肿瘤组织中高表达 ($P=0.000$), *SFXN3* 高表达组患者预后较差 (均 $P<0.05$); 治疗无应答者 *SFXN3* 表达水平高于有应答者 ($P=0.008$), 提示不良预后。并且在收集的HNSCC肿瘤组织和HNSCC细胞系上验证了 *SFXN3* 的高表达 (均 $P<0.05$)。 *SFXN3* 的表达水平敲低后, HNSCC细胞的增殖能力下降, 平板克隆形成数目减少 (均 $P<0.05$)。RNA测序显示, *SFXN3* 敲低组的HNSCC细胞差异表达下调的基因在DNA复制、细胞周期、线粒体翻译、线粒体RNA代谢过程、线粒体基因表达等通路富集。**结论**·*SFXN3* 在HNSCC中高表达, 与患者预后负相关。HNSCC细胞敲低 *SFXN3* 后增殖能力和平板克隆形成能力受到抑制, 可能通过影响线粒体功能发挥作用。

[关键词] *SFXN3*; 头颈部鳞状细胞癌; 线粒体; 细胞增殖**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.04.002 **[中图分类号]** R34 **[文献标志码]** A

SFXN3 expression in head and neck squamous cell carcinoma and its effect on cell proliferation

AN Junyi, CHEN Biying, CHEN Xunrui, YIN Shanshan, BIAN Zhouliang, LIU Feng

Department of Oncology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201999, China

[Abstract] **Objective**·To analyze the expression of mitochondrial related gene *SFXN3* (sideroflexin 3) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and its effect on cell proliferation. **Methods**·Mitochondrial related genes and TCGA-HNSCC dataset were obtained from public databases to identify the target gene *SFXN3* by using bioinformatic methods. The expression of *SFXN3* in HNSCC patient samples was analysed by using the UALCAN database, and survival analyses of patients with different *SFXN3* expression levels were performed according to TCGA-HNSCC cohort and GEO cohorts (GSE65858, GSE41613 and GSE27020). By using TCGA-HNSCC cohort and GEO cohorts (GSE40020, GSE210287), the differences in *SFXN3* expression levels between therapeutic responders and non-responders were compared. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to verify the expression of *SFXN3* in the collected HNSCC tumor and para-tumor tissues, and the expression level of *SFXN3* in human normal oral epithelial cells and HNSCC tumor cell lines was detected. With the construction of stable-*SFXN3*-knockdown HNSCC cell lines, the effect of *SFXN3* on the proliferation ability of HNSCC cells was observed by using the Incucyte live-cell imaging analysis system and plate colony formation assay. Transcriptome sequencing was performed on the total RNA of stably-*SFXN3*-knockdown cells and control cells, and pathway enrichment analysis was performed on the genes with differentially down-regulated expression in knockdown group compared with control group. **Results**·*SFXN3* was highly expressed in tumor tissues of HNSCC patients ($P=0.000$), and the prognosis of patients in the *SFXN3*-high-expression group was poor (all $P<0.05$). The expression level of *SFXN3* in

[基金项目] 上海交通大学医学院附属第九人民医院临床研究助推计划 (JYLJ202019)。**[作者简介]** 安俊伊 (1998—), 女, 硕士生; 电子信箱: anjunyi1998@163.com。**[通信作者]** 刘 峰, 电子信箱: nuanliu@126.com。**[Funding Information]** Clinical Research Promotion Program of Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (JYLJ202019).**[Corresponding Author]** LIU Feng, E-mail: nuanliu@126.com.

the non-responders was higher than that in the responders ($P=0.008$), indicating an unfavorable prognosis. High expression of *SFXN3* was verified in the collected HNSCC tumor tissues and HNSCC cell lines (all $P<0.05$). After the knockdown of *SFXN3* expression, the proliferation ability of HNSCC cells decreased, and the number of plate clones decreased (all $P<0.05$). RNA sequencing showed that the differentially expressed down-regulated genes in HNSCC cells in the *SFXN3*-knockdown group were enriched in DNA replication, cell cycle, mitochondrial translation, mitochondrial RNA metabolic process and mitochondrial gene expression pathways. **Conclusion** *SFXN3* is highly expressed in HNSCC and it has negative correlation with the prognosis of patients. The proliferation ability and plate colony formation ability are inhibited in *SFXN3*-knockdown HNSCC cells, and these may work by affecting mitochondria function.

[Key words] *SFXN3*; head and neck squamous cell carcinoma; mitochondria; cell proliferation

头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)又称头颈鳞癌,起源于口腔、咽部以及喉部的黏膜上皮细胞,发病率高,是头颈部肿瘤最常见的病理类型^[1-2]。虽然HNSCC治疗具有手术、放射治疗、化学治疗、免疫治疗以及靶向治疗等综合治疗手段,但是HNSCC患者的5年生存率在过去几十年中仍然仅维持在50%左右^[3-4]。目前,靶向表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的西妥昔单抗和免疫检查点抑制剂对HNSCC靶向治疗的应用取得了一定的进展。推动各类靶向药物的转化应用和设计新的生物标志物成为当前研究的热点^[5],因此探索新的潜在治疗靶点可以为HNSCC的有效治疗提供新的思路。

线粒体是细胞产生ATP和活性氧的重要部位,参与肿瘤细胞能量代谢,对于调节肿瘤细胞生长和肿瘤进展有着重要意义^[6]。基于此,本研究使用公共数据库和生物信息学分析获得线粒体相关基因和HNSCC肿瘤组织差异表达上调和下调的基因,将HNSCC肿瘤组织差异表达上调的基因和线粒体相关基因取交集,并筛选得到导致HNSCC不利预后的目标基因,后续验证该基因在HNSCC的高表达,探索其与HNSCC患者预后的相关性,并行体外实验研究该基因对HNSCC细胞增殖能力的影响,旨在为寻找HNSCC新型治疗靶点提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂仪器

HNSCC细胞系SCC9、CAL27、HN30、SCC25,人正常口腔上皮细胞HOK和293T细胞均源自本实验室保存。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于上海传秋生物科技有限公司和美国Gibco。DMEM高糖培养基和DMEM/F12培养基购于美国Hyclone。RNAiso Plus、反转录试剂盒和实时荧光定量PCR试

剂购于Takara。磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)和一抗稀释液购于北京索莱宝科技有限公司。慢病毒空载质粒pGreenPuro-Dual和辅助包装质粒均源于本实验室保存。*SFXN3*抗体(#15156-1-AP)购于美国Proteintech。 β -tubulin抗体(#A01030)和ECL发光液购于美国Abbkine。Lipofectamine 3000转染试剂购于美国Invitrogen。Trans5 α 感受态购于北京全式金生物公司。限制性内切酶购于美国ThermoFisher。RNA测序服务由上海旭燃生物科技有限公司提供。Nanodrop分光光度计和Incucyte活细胞成像分析系统等仪器由上海精准医学研究院提供。

1.2 公共数据来源

从MitoCarta 3.0和GSEA(gene set enrichment analyses)数据库下载与线粒体相关的基因^[7]。使用R语言TCGAbiolinks包下载TCGA-HNSCC数据集中546例HNSCC患者的转录组数据,其中包含502例癌组织和44例正常组织样本,并下载相关临床信息。利用UALCAN数据库分析*SFXN3*在HNSCC肿瘤组织和正常组织中的表达。从GEO数据库中下载GSE65858、GSE41613、GSE27020、GSE40020和GSE210287表达矩阵以及患者临床信息。

1.3 数据分析和处理

1.3.1 目的基因*SFXN3*的筛选 根据TCGA-HNSCC表达矩阵,使用R语言limma包对肿瘤组织和正常组织进行差异表达基因分析,得到肿瘤组织较正常组织上调和下调的差异表达基因(differentially expressed gene, DEG),筛选标准为差异倍数(fold change, FC)的对数的绝对值 $|\log_2 FC|>1$, $P_{\text{adjust}}<0.01$ 。使用肿瘤组织相比于正常组织上调的线粒体相关基因进行Logrank检验筛选出 $P<0.01$ 的基因,获取显著影响患者预后的差异基因,之后对所得基因进行单因素Cox回归分析,筛选出风险比(hazard ratio, HR) >1 的基因。

1.3.2 SFXN3 mRNA 和蛋白水平的表达及预后分析 使用UALCAN数据库分析SFXN3在HNSCC患者肿瘤组织和正常组织中的表达差异。根据TCGA-HNSCC、GSE65858、GSE41613以及GSE27020队列中的表达矩阵和患者临床信息，运用R语言survminer包和survival包依据SFXN3表达量的最佳截断点将患者分为高、低表达2组，绘制5年Kaplan-Meier生存曲线分析SFXN3表达水平和患者预后的相关性。将TCGA-HNSCC、GSE40020以及GSE210287数据集合并，使用R语言sva包的ComBat函数消除批次效应，根据治疗有无应答分为有应答组和无应答组，比较2组之间SFXN3的表达差异。

1.4 样本收集

收集上海交通大学医学院附属第九人民医院的20例HNSCC患者的癌和癌旁配对组织样本，样本采集后于液氮中保存。

表1 qRT-PCR引物序列(5'→3')
Tab 1 Primer sequences for qRT-PCR (5'→3')

Primer	Forward	Reverse
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
ACTB	TGACGTGGACATCCGCAAAG	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG
SFXN3	GGGTGAATTGCCTTTAGACATCA	GCAGCAGATTTGAGGATCAGT

1.7 Western blotting检测

收集细胞裂解蛋白后使用Nanodrop仪器进行蛋白定量。SDS-PAGE电泳分离后，转至PVDF膜上。使用5%脱脂牛奶室温封闭2 h，4 °C摇床孵育一抗过夜，SFXN3抗体工作浓度为1：1 000，β-tubulin抗体工作浓度为1：10 000。次日TBST洗膜3次后二抗（工作浓度为1：5 000）孵育1 h，TBST洗膜3次，之后使用ECL发光液显影。

表2 shRNA引物序列(5'→3')
Tab 2 Primer sequences of shRNA (5'→3')

Primer	Forward	Reverse
sh-SFXN3-1	GATCCGGCTGGGACCAAAGTACTTTCCCTCGAGGGAAAGTACTTTGGTCCCAGCCTTTTTTG	AATTCAAAAAAGCTGGGACCAAAGTACTTTCCCTCGAGGGAAGTACTTTGGTCCCAGCCG
sh-SFXN3-2	GATCCGACGCGTTGAAGTGGTCTACTACTCGAGTAGTAGACCTTCAACGCTGCTTTTTTG	AATTCAAAAAAGCAGCGTTGAAGTGGTCTACTACTCGAGTAGACCACTTCAACGCTGCG

1.9 慢病毒包装、转染及稳转细胞株的构建

使用Lipofectamine 3000将空载质粒（sh-Ctrl）、sh-SFXN3质粒与辅助包装质粒（pMD2.G，pCMV-dR8.2）转染至293T细胞。48 h后收集上清液。将处于对数生长期的SCC9、CAL27和HN30细胞消化下

1.5 细胞培养

用含10% FBS和1%青链霉素双抗的DMEM高糖培养基培养HOK、SCC9、CAL27、HN30和293T细胞，用含10% FBS和1%青链霉素双抗的DMEM/F12培养基培养SCC25细胞，于37 °C恒温、5% CO₂、95%湿度的细胞培养箱中进行常规培养。

1.6 qRT-PCR

提取HNSCC肿瘤细胞系SCC9、CAL27、HN30、SCC25和人正常口腔上皮细胞HOK的总RNA，以及HNSCC患者癌和癌旁配对组织的总RNA，反转录生成cDNA后进行实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qRT-PCR）检测。检测HNSCC细胞中SFXN3表达量使用GAPDH或ACTB作为内参；检测HNSCC患者配对组织中SFXN3表达量使用ACTB为内参。所用引物序列见表1。

1.8 shSFXN3慢病毒质粒构建

设计并合成SFXN3的2条shRNA引物序列，分别为sh-SFXN3-1和sh-SFXN3-2，选取pGreenPuro-Dual作为慢病毒载体，使用BamH I和EcoR I双酶切，将载体和目标序列连接，经trans5α感受态细胞转化后使用氨苄青霉素筛选菌落，进行测序鉴定，鉴定成功后抽提质粒。shRNA引物序列见表2。

来，以合适密度接种于六孔板，待细胞贴壁后加入病毒液进行感染，同时加入聚凝胺提高感染效率，感染48 h后使用嘌呤霉素筛选，获得稳定敲低SFXN3的HNSCC细胞株，使用qRT-PCR和Western blotting验证敲低效率。

1.10 Incucyte活细胞成像分析系统检测细胞增殖

将处于对数生长期的细胞消化后,以 2.5×10^3 个/孔的密度均匀接种于96孔板,随后放置在Incucyte系统的培养箱中连续观测5 d。根据仪器的数据绘制生长曲线,检测细胞增殖的变化。

1.11 平板克隆形成实验

将处于对数生长期的细胞消化后,以 1×10^3 个/孔的密度均匀接种于六孔板,随后放置在培养箱中,每隔3 d更换新鲜培养基,当出现肉眼可见克隆后终止培养。之后小心弃掉培养基,用PBS清洗2次,加入预冷的无水甲醇固定15 min,弃去甲醇后进行结晶紫染色,染色完成后弃去结晶紫,清水轻轻冲洗并烘干,将各孔拍照并使用ImageJ软件统计分析克隆数。

1.12 HNSCC细胞RNA测序及分析

将SCC9的sh-*SFXN3*和sh-Ctrl组细胞用RNAiso Plus处理,重复3份,于 -80°C 冰箱冻存,样品送至上海旭燃生物科技有限公司进行RNA测序和数据清洗。使用VAHTS Total RNA-seq (H/M/R) Library Prep Kit构建测序文库,测序平台为Illumina Novaseq 6000。使用R语言软件(4.2.3版本)对RNA测序清洗后的数据进行分析,使用R语言DESeq2包进行DEG分析,筛选标准为 $|\log_2\text{FC}| > 1$, $P_{\text{adjust}} < 0.05$ 。将SCC9细胞sh-*SFXN3*组相比于sh-Ctrl组下调的基因进行KEGG和GSEA富集分析。

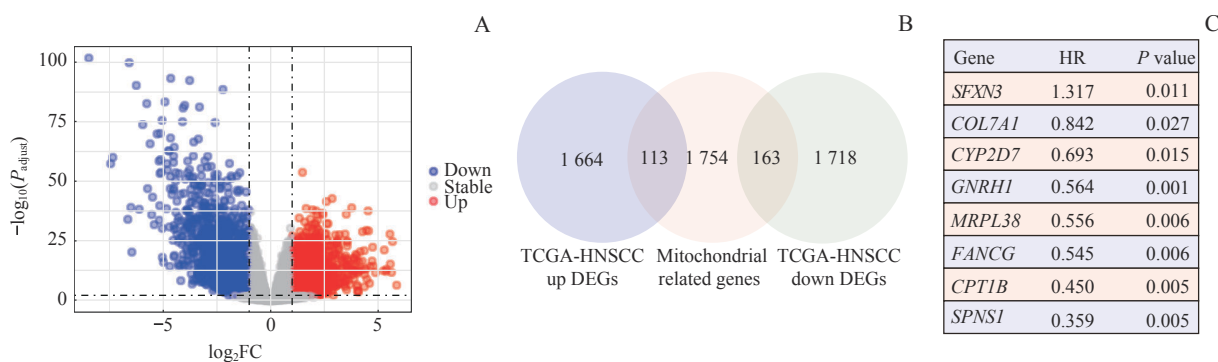
1.13 统计学方法

使用GraphPad Prism 9.5软件和R语言软件(4.2.3版本)进行作图以及统计分析。每组数据均进行3次独立重复。2组内比较采用Student *t*检验(2组均满足正态分布时)或非参数检验(任1组为偏态分布时)。多组比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基于生物信息学筛选得到目标基因*SFXN3*

根据TCGA-HNSCC数据集的mRNA表达矩阵,在肿瘤组织和正常组织之间使用limma包进行差异表达基因分析,筛选条件为 $|\log_2\text{FC}| > 1$, $P_{\text{adjust}} < 0.01$,共筛选出1 777个上调基因和1 881个下调基因(图1A)。使用MitoCarta 3.0和GSEA数据库下载与线粒体相关的基因。将肿瘤组织相比于正常组织上调、下调的基因同2 030个线粒体相关基因取交集,分别得到113个、163个线粒体相关的差异基因,并绘制韦恩图(图1B)。为了筛选出与HNSCC患者不良预后相关的促癌基因,对113个肿瘤组织较正常组织上调的线粒体相关基因进行Logrank检验,筛选得到 $P < 0.01$ 的8个基因。对这8个基因进一步进行单因素Cox回归分析,结果(图1C)显示*SFXN3*是唯一HR大于1的基因,因而本研究选择*SFXN3*作为目标基因。



Note: A. The identification of DEGs between the tumor and normal tissues in TCGA-HNSCC dataset. The red dots represent up-regulated DEGs of tumor tissues and the blue dots represent down-regulated DEGs of tumor tissues, compared with the normal tissues. $|\log_2\text{FC}| > 1$, $P_{\text{adjust}} < 0.01$. B. Venn plot of the common genes between TCGA-HNSCC DEGs (up-regulated DEGs/down-regulated DEGs) and the mitochondrial related genes. C. The result of univariate Cox regression.

图1 目标基因*SFXN3*的鉴定

Fig 1 Identification of targeted gene *SFXN3*

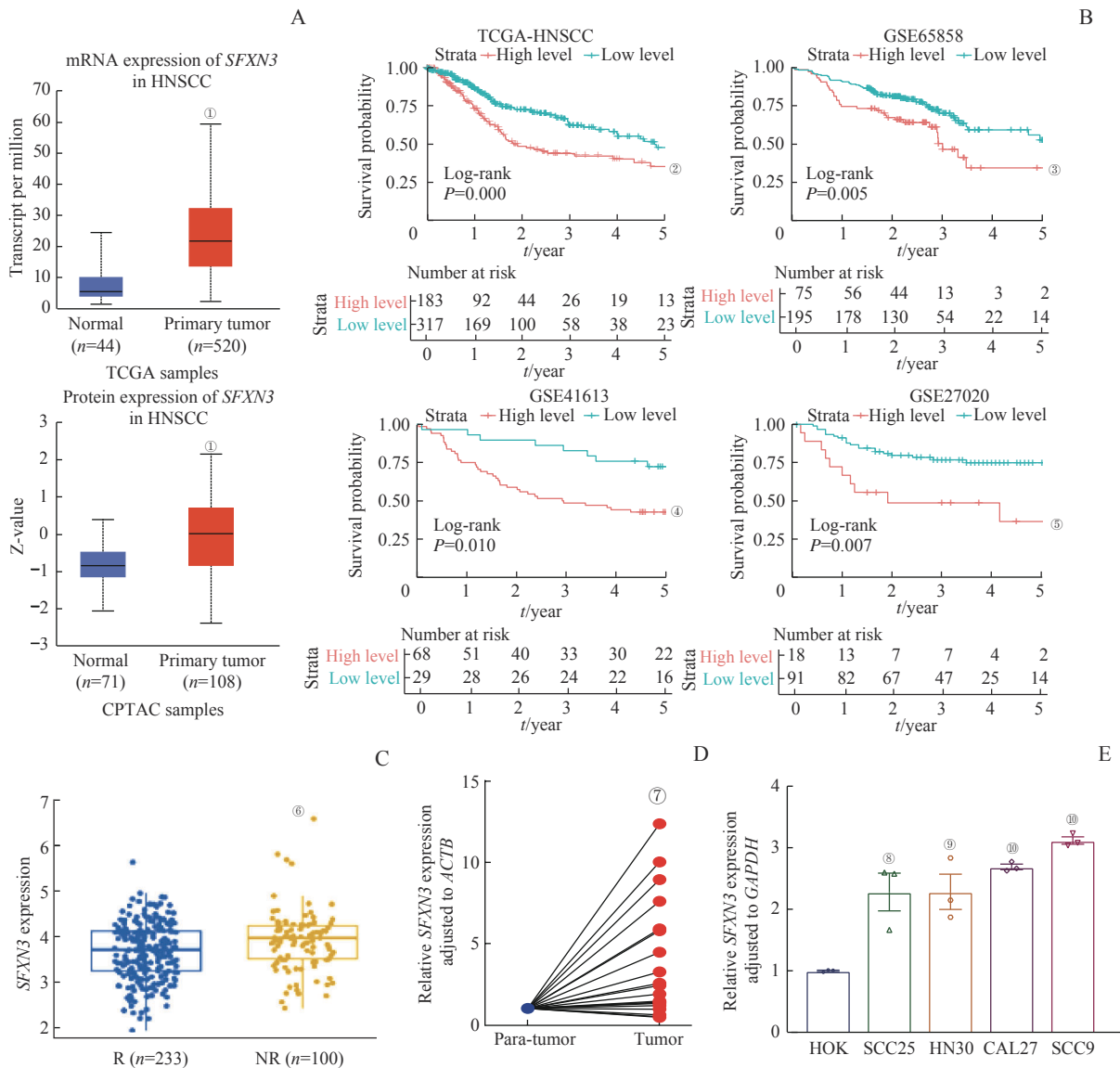
2.2 *SFXN3*在HNSCC中的表达和预后

使用UALCAN数据库分析*SFXN3*在HNSCC肿瘤组织和正常组织中的mRNA和蛋白表达水平,结

果显示*SFXN3*在HNSCC肿瘤组织中高表达(均 $P=0.000$,图2A)。此外,使用TCGA-HNSCC和GEO多个数据集进行生存分析。根据*SFXN3*表达量

的最佳截断点将患者分为高表达组和低表达组,5年生存分析结果显示,*SFXN3*的mRNA表达水平和患者预后显著相关,*SFXN3*高表达组生存期缩短、预后不良(均 $P<0.05$,图2B)。在TCGA-HNSCC队列、GSE40020队列和GSE210287队列中确定了100例肿瘤治疗无应答和233例有应答的病例,比较两者之间*SFXN3*的表达。结果显示,治疗无应答组*SFXN3*的表达水平高于有应答组($P=0.008$,图2C),提示患者预后不良。本研究收集了20例HNSCC患者的癌和

癌旁组织,液氮速冻后研磨,抽提RNA,使用qRT-PCR检测*SFXN3*表达水平,结果显示*SFXN3*在大多数HNSCC患者中肿瘤组织的mRNA表达水平高于癌旁组织(16/20, $P=0.003$,图2D)。同时本研究使用不同的HNSCC细胞系:SCC9、SCC25、CAL27和HN30,以及正常口腔细胞HOK,通过qRT-PCR实验检测*SFXN3*的mRNA表达水平,结果显示*SFXN3*在HNSCC细胞系中的表达水平均高于正常口腔细胞(均 $P<0.05$,图2E)。



Note: A. *SFXN3* mRNA and protein expression between HNSCC tumor tissues and normal tissues analysed by the UALCAN database. B. Five-year survival curves of HNSCC patients with high *SFXN3* expression and low *SFXN3* expression in TCGA-HNSCC cohort and GEO cohorts (GSE65858, GSE41613 and GSE27020). C. Differences in *SFXN3* expression between therapeutic responders (R) and non-responders (NR) based on TCGA-HNSCC cohort, GSE40020 cohort and GSE210287 cohort. D. Relative *SFXN3* expression in para-tumor and tumor tissues from HNSCC patients detected by qRT-PCR. E. Relative *SFXN3* expression in different HNSCC cell lines detected by qRT-PCR. Mean \pm SEM. ① $P=0.000$, compared with the normal tissues. ② $P=0.000$, ③ $P=0.005$, ④ $P=0.010$, ⑤ $P=0.007$, compared with the *SFXN3*-low-expression patients. ⑥ $P=0.008$, compared with the R group. ⑦ $P=0.003$, compared with the para-tumor tissues. ⑧ $P=0.014$, ⑨ $P=0.011$, ⑩ $P=0.000$, compared with the HOK cells.

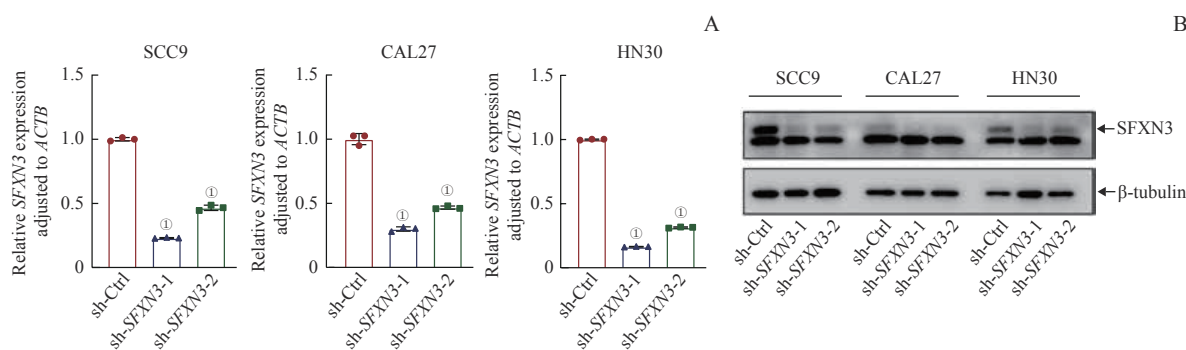
图2 *SFXN3*在HNSCC中高表达且与不良预后显著相关

Fig 2 High expression of *SFXN3* in HNSCC and its significant association with poor prognosis

2.3 构建稳定敲低 *SFXN3* 的 HNSCC 细胞株

为进一步分析 *SFXN3* 在 HNSCC 发生发展中的生物学功能, 本研究使用 SCC9、CAL27 和 HN30 细胞构建稳定敲低 *SFXN3* 的 HNSCC 细胞株, 并通过 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 *SFXN3* 在 mRNA 和蛋白水平的表达, 验证敲低效率。结果表明, 在 SCC9、

CAL27 和 HN30 细胞中, 相比于 sh-Ctrl 组, sh-*SFXN3*-1 和 sh-*SFXN3*-2 组细胞的 *SFXN3* mRNA 水平显著下降 (均 $P=0.000$, 图 3A), 且 sh-*SFXN3*-1 组细胞敲低效果较好; Western blotting 结果也证实了敲低组 *SFXN3* 蛋白水平的下降 (图 3B)。本研究使用 sh-*SFXN3*-1 组作为 *SFXN3* 敲低组细胞进行后续实验。



Note: A. Detection of relative *SFXN3* expression in SCC9, CAL27 and HN30 cells after *SFXN3* knockdown by qRT-PCR. B. Detection of *SFXN3* expression in SCC9, CAL27 and HN30 cells after *SFXN3* knockdown by Western blotting. Mean±SD. ^① $P=0.000$, compared with the sh-Ctrl group.

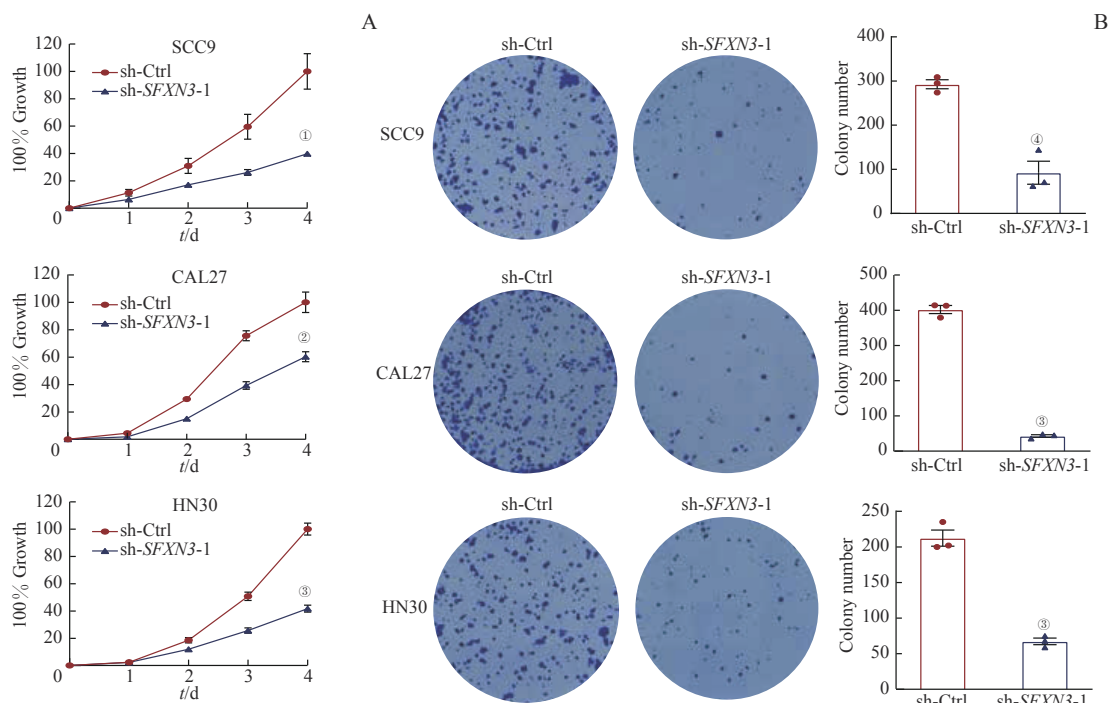
图3 稳定敲低 *SFXN3* HNSCC 细胞株的构建和验证

Fig 3 Establishment and verification of stable-*SFXN3*-knockdown HNSCC cell lines

2.4 敲低 *SFXN3* 对 HNSCC 细胞增殖的影响

为探究 *SFXN3* 对 HNSCC 细胞增殖的影响, 本研究使用 Incucyte 活细胞成像分析系统实时动态记录 HNSCC 细胞的生长情况并进行平板克隆形成实验,

结果 (图 4A、B) 显示, 与 sh-Ctrl 组相比, SCC9、CAL27 和 HN30 的 *SFXN3* 敲低组细胞增殖能力显著下降 (均 $P<0.05$), 平板克隆形成数目显著减少 (均 $P<0.05$)。



Note: A. Growth curves of SCC9, CAL27 and HN30 cells after *SFXN3* knockdown detected by Incucyte system. B The results and statistical analysis of plate colony formation assay in SCC9, CAL27 and HN30 cells after *SFXN3* knockdown. Mean±SEM. ^① $P=0.010$, ^② $P=0.009$, ^③ $P=0.000$, ^④ $P=0.002$, compared with the sh-Ctrl group.

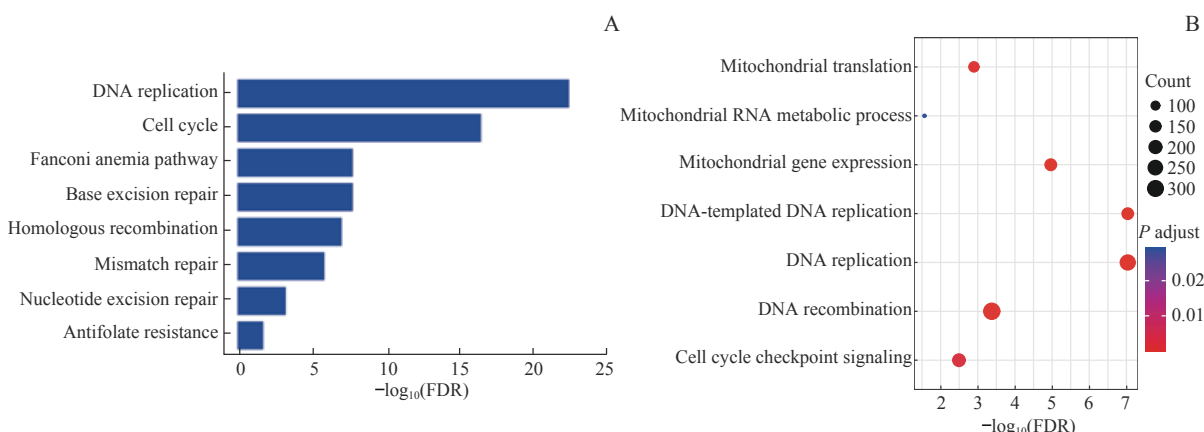
图4 敲低 *SFXN3* 对 HNSCC 细胞增殖的影响

Fig 4 Effect of *SFXN3* knockdown on the proliferation of HNSCC cells

2.5 SFXN3影响HNSCC细胞增殖的机制探讨

为了探索SFXN3影响HNSCC细胞增殖的机制,对稳定敲低SFXN3的SCC9细胞和对照组细胞进行RNA-seq,使用R语言DESeq2包做差异基因分析,以 $|\log_2FC| > 1$ 、 $P_{\text{adjust}} < 0.05$ 的标准得到SCC9细胞敲低SFXN3后有709个基因上调和542个基因下调。KEGG通路富集分析

析的结果(图5A)显示,SCC9细胞敲低SFXN3后下调的基因主要富集在DNA复制通路、细胞周期通路、Fanconi贫血通路、碱基切除修复通路、同源重组通路等;GSEA富集分析的结果(图5B)显示,SCC9细胞敲低SFXN3后下调的基因主要富集在线粒体翻译、线粒体RNA代谢过程、线粒体基因表达等通路。



Note: A/B. KEGG (A) and GSEA enrichment analysis (B) of differentially expressed down-regulated genes in SCC9 cells after SFXN3 knockdown.

图5 敲低SFXN3后SCC9细胞差异下调基因的通路富集分析

Fig 5 Pathway enrichment analysis of differentially expressed down-regulated genes in SFXN3-knockdown SCC9 cells

3 讨论

HNSCC是最常见的恶性肿瘤之一,尽管在HNSCC的治疗上投入了巨大的努力,但许多患者仍预后不佳,因而,探索新的治疗靶点和治疗策略具有重要意义^[8-9]。线粒体作为能量供应的主要细胞器,对细胞的增殖分化和死亡起重要作用,它和肿瘤的发生、进展以及耐药等方面密切相关^[10-11]。SFXN3属于SFXN(sideroflexin)家族,该家族均为高度保守的线粒体跨膜蛋白,在氨基酸转运和铁稳态中发挥重要作用^[12-13]。研究^[14]报道称SFXN3能够介导丝氨酸从胞质到线粒体的转运,参与线粒体内一碳单位代谢过程,这可能与肿瘤的发生发展有一定的关系。有研究^[15]表明SFXN3敲低可在体外抑制甲状腺乳头状癌细胞的增殖能力和肿瘤生长。MURASE等^[16]曾报道在口腔鳞状细胞癌中SFXN3的血清自身抗体升高并和临床肿瘤负荷相关,表明血清SFXN3自身抗体是口腔鳞状细胞癌的新型肿瘤标志物。有研究^[17-18]使用公共数据库分析表明LINC01270/hsa-miR-29c-3p/SFXN3以及MIR193HG-miR-29c-3p-SFXN3可能是HNSCC潜在的生物调控途径。

我们通过公共数据库分析发现线粒体相关基因SFXN3在HNSCC肿瘤患者尤其是治疗无应答人群中

高表达,且高表达组患者预后较差,之后我们应用内部HNSCC配对组织及肿瘤细胞系验证了SFXN3在HNSCC肿瘤组织及肿瘤细胞系上的高表达。同时我们发现敲低SFXN3能够抑制HNSCC细胞的增殖能力和平板克隆形成能力,表明SFXN3在HNSCC发生发展中发挥着重要作用;并且转录组分析显示敲低SFXN3影响线粒体相关信号通路,提示SFXN3可能通过影响线粒体的功能进而实现促进头颈部鳞状细胞癌发生发展。SFXN3作为位于线粒体内膜的丝氨酸转运蛋白,调控线粒体内一碳单位的代谢;而一碳单位是核酸包括嘧啶、嘌呤合成代谢的重要前体,并通过S-腺苷甲硫氨酸参与DNA、RNA和蛋白质的甲基化反应。因而,SFXN3将丝氨酸转运到线粒体内,为线粒体内核苷酸合成和甲基化反应提供重要的一碳来源,可能影响到线粒体RNA代谢,例如RNA合成和甲基化修饰,线粒体翻译进程,以及线粒体基因编码蛋白的表达,从而影响肿瘤细胞中线粒体的功能。据报道,线粒体翻译与肿瘤发生发展相关。例如,参与线粒体翻译的线粒体核糖体蛋白S23(MRPS23)、线粒体翻译延伸因子4(mtEF4)等能够促进肿瘤细胞增殖^[19-21];此外,线粒体RNA修饰在头颈部肿瘤的侵袭转移中也起到重要作用^[22]。所以我们推测SFXN3有可能通过调控线粒体内一碳代谢影响线粒体

RNA、线粒体翻译等过程, 从而影响线粒体功能, 进而影响HNSCC的发生发展。

综上所述, 本研究发现 *SFXN3* 在HNSCC中高表达, 其表达水平和患者预后呈负相关, 敲低 *SFXN3* 显著抑制HNSCC细胞的增殖能力和平板克隆形成能力。*SFXN3* 可能通过影响线粒体功能发挥生物学作用, 是HNSCC潜在的新型生物标志物。

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.

伦理批准和知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究涉及的所有实验均已通过上海交通大学医学院附属第九人民医院医学伦理委员会的审核批准 (SH9H-2019-T279-5)。所有实验过程均遵照《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》的条例进行。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

All experimental protocols in this study were reviewed and approved by the Medical Ethics Committee of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (SH9H-2019-T279-5), and all experimental protocols were carried out by following the guidelines of *Measures for Ethical Review of Biomedical Research Involving Humans*. Consent letters have been signed by the research participants or their relatives.

作者贡献/Authors' Contributions

刘峰、安俊伊参与了实验设计, 陈必颖、陈循睿、尹姗姗、边洲亮参与了实验指导, 安俊伊参与了论文撰写。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was designed by LIU Feng and AN Junyi. The research was guided by CHEN Biying, CHEN Xunrui, YIN Shanshan and BIAN Zhouliang. The manuscript was drafted by AN Junyi. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2023-11-04
- Accepted: 2024-01-26
- Published online: 2024-04-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] MODY M D, ROCCO J W, YOM S S, et al. Head and neck cancer[J]. *Lancet*, 2021, 398(10318): 2289-2299.
- [2] JOHNSON D E, BURTNES B, LEEMANS C R, et al. Head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 92.
- [3] LEEMANS C R, BRAAKHUIS B J M, BRAKENHOFF R H. The molecular biology of head and neck cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(1): 9-22.
- [4] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [5] KORDBACHEH F, FARAH C S. Current and emerging molecular therapies for head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancers*, 2021, 13(21): 5471.
- [6] PORPORATO P E, FILIGHEDDU N, PEDRO J M B S, et al. Mitochondrial metabolism and cancer[J]. *Cell Res*, 2018, 28(3): 265-280.
- [7] CHANG J J, WU H, WU J, et al. Constructing a novel mitochondrial-related gene signature for evaluating the tumor immune microenvironment and predicting survival in stomach adenocarcinoma[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 191.
- [8] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: globocan sources and methods[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-1953.
- [9] ALSAFAFI E, BEGG K, AMELIO I, et al. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 540.
- [10] ABATE M, FESTA A, FALCO M, et al. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 98: 139-153.
- [11] KIM H K, NOH Y H, NILIUS B, et al. Current and upcoming mitochondrial targets for cancer therapy[J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 47: 154-167.
- [12] FLEMING M D, CAMPAGNA D R, HASLETT J N, et al. A mutation in a mitochondrial transmembrane protein is responsible for the pleiotropic hematological and skeletal phenotype of *flexed-tail (ft)* mice[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(6): 652-657.
- [13] TIFOUN N, DE LAS HERAS J M, GUILLAUME A, et al. Insights into the roles of the sideroflexins/SLC56 family in iron homeostasis and iron-sulfur biogenesis[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(2): 103.
- [14] KORY N, WYANT G A, PRAKASH G, et al. SFXN1 is a mitochondrial serine transporter required for one-carbon metabolism[J]. *Science*, 2018, 362(6416): eaat9528.
- [15] JIN T F, GE L Q, CHEN J Q, et al. Identification of iron metabolism-related genes as prognostic indicators for papillary thyroid carcinoma: a retrospective study[J]. *PeerJ*, 2023, 11: e15592.
- [16] MURASE R, ABE Y, TAKEUCHI T, et al. Serum autoantibody to sideroflexin 3 as a novel tumor marker for oral squamous cell carcinoma[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2008, 2(4): 517-527.
- [17] CHEN K L, GONG S, FANG X L, et al. Non-coding RNA-mediated high expression of *SFXN3* as a prognostic biomarker associated with paclitaxel resistance and immunosuppressive microenvironment in head and neck cancer[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 920136.
- [18] ZHENG D Y, LUO S W, WANG S, et al. Construction of a competing endogenous RNA network in head and neck squamous cell carcinoma by pan-cancer analysis[J]. *Transl Cancer Res*, 2022, 11(9): 3050-3063.
- [19] CRISCUOLO D, AVOLIO R, MATASSA D S, et al. Targeting mitochondrial protein expression as a future approach for cancer therapy[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 797265.
- [20] PU M, WANG J L, HUANG Q K, et al. High MRPS23 expression contributes to hepatocellular carcinoma proliferation and indicates poor survival outcomes[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(7): 1010428317709127.
- [21] ZHU P, LIU Y Z, ZHANG F L, et al. Human elongation factor 4 regulates cancer bioenergetics by acting as a mitochondrial translation switch[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(11): 2813-2824.
- [22] DELAUNAY S, PASCUAL G, FENG B H, et al. Mitochondrial RNA modifications shape metabolic plasticity in metastasis[J]. *Nature*, 2022, 607(7919): 593-603.

[本文编辑] 徐 敏

