论著·基础医学

氟伐他汀通过抑制PHF8增强肾透明细胞癌对舒尼替尼敏感性

王子乾[1,2],解晓都[1],汪 泽[1],唐 朋[1],张俊英[3],徐 静[1],郑崇亮[1],肖海阳[1],金俊豪[1],王洛夫[1],江 军[4],兰卫华[1],刘秋礼[1] [1]陆军军医大学(第三军医大学)大坪医院泌尿外科,重庆;[2]联勤保障部队第988医院泌尿外科,河南郑州;[3]重庆医药高等专科学校,重庆;[4]浙江大学医学院附属第二医院泌尿外科,浙江杭州

[摘要] **目的** 舒尼替尼耐药是影响肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma,ccRCC)靶向治疗疗效的重要因素,其分子机制及有效干预策略尚未完全明确。本研究旨在探讨组蛋白去甲基化酶PHF8在ccRCC舒尼替尼耐药中的作用,并评价氟伐他汀靶向PHF8、增强耐药ccRCC对舒尼替尼敏感性的效果。**方法** 构建舒尼替尼耐药细胞株(786-O-R)及患者来源异种移植瘤(patient-derived xenograft, PDX)耐药模型,采用Western blotting、免疫组织化学染色检测模型中PHF8的表达水平。构建PHF8稳定过表达的786-O和A498细胞株及细胞源性异种移植瘤(cell line-derived xenograft, CDX)模型,通过体外增殖测定、体内肿瘤体积、Ki-67及CD31免疫组织化学染色,探究PHF8对舒尼替尼治疗反应性的影响。转录组测序及Western blotting、免疫组织化学染色分析PHF8调控舒尼替尼耐药的具体分子机制。分析陆军军医大学大坪医院泌尿外科46例接受舒尼替尼治疗的ccRCC患者肿瘤病理标本,评估PHF8表达与病理分级及无进展生存期(progression-free survival, PFS)的相关性。基于FDA批准的小分子药物库进行虚拟筛选,并结合RT-qPCR、放线菌酮追踪、MG132和氯喹补救、细胞热迁移实验(cellular thermal shift assay,CETSA)、表面等离子共振(surface plasmon resonance,SPR)及分子对接,分析氟伐他汀调控PHF8蛋白稳定性的作用。采用CCK-8及体内实验评价氟伐他汀联合舒尼替尼对耐药细胞的增敏作用。**结果** 构建舒尼替尼耐药细胞及PDX模型。与敏感对照组相比,PHF8蛋白在786-O-R细胞及耐药PDX模型(Su-P8)中表达均显著上调,提示PHF8可能参与ccRCC舒尼替尼耐药。进一步功能实验显示,*PHF8*过表达显著降低786-O(IC_{50}:5.406 *vs* 15.920 μmol/L)和A498(IC_{50}:5.186 *vs* 16.300 μmol/L)细胞对舒尼替尼的敏感性;敲除*PHF8*后,耐药细胞对舒尼替尼的敏感性明显恢复(IC_{50}:13.470 *vs* 6.355 μmol/L)。体内实验进一步证实,舒尼替尼治疗后,*PHF8*过表达组的肿瘤体积(*P*<0.000 1)、肿瘤质量(*P*=0.001 3)、Ki-67表达(*P*<0.000 1)及CD31表达(*P*<0.000 1)均显著高于对照组,表明PHF8可促进ccRCC对舒尼替尼的治疗抵抗。临床样本分析显示,PHF8高表达与ccRCC患者较高的病理分级显著相关(*P*=0.000 3),并与较短的靶向治疗PFS相关(*P*=0.04)。基于PHF8蛋白结构的虚拟筛选获得潜在小分子抑制剂氟伐他汀可抑制PHF8蛋白表达并升高H3K9me1/2水平,同时显著缩短PHF8蛋白半衰期(*P*=0.000 7),且该作用可被蛋白酶体抑制剂MG132明显逆转,提示氟伐他汀促进PHF8蛋白酶体降解。CETSA显示,氟伐他汀可提高PHF8蛋白的热稳定性;SPR进一步证实氟伐他汀可直接与PHF8结合(K_D=23.8 μmol/L),分子对接揭示了二者潜在的分子结合模式。氟伐他汀与舒尼替尼联合处理使786-O-R细胞的舒尼替尼IC_{50}显著下降(IC_{50}:17.460 *vs* 4.601 μmol/L),细胞抑制作用显著强于舒尼替尼单药组(*P*<0.000 1);而敲除*PHF8*后,联合用药与单药处理之间差异无统计学意义,表明氟伐他汀对舒尼替尼的增敏作用具有PHF8依赖性。体内实验进一步显示,联合氟伐他汀可显著提高耐药PDX模型对舒尼替尼的治疗敏感性。**结论** PHF8是促进ccRCC舒尼替尼耐药的重要因子,其高表达与较高病理分级及较差预后相关。氟伐他汀可通过靶向PHF8并促进其蛋白降解,提高耐药ccRCC细胞对舒尼替尼的敏感性。

[关键词] 肾细胞癌;PHF8;舒尼替尼耐药;氟伐他汀
[中图法分类号] R345;R737.11;R979.19 [文献标志码] A

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82473441);重庆市中青年医学高端人才项目(YXGD202519)
[通信作者] 刘秋礼, E-mail: liuqiuli900827@163.com
兰卫华, E-mail: doclan@yeah.net

2097-0927/Copyright © 2026, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
引用格式:王子乾,解晓都,汪泽,等. 氟伐他汀通过抑制PHF8增强肾透明细胞癌对舒尼替尼敏感性[J]. 陆军军医大学学报,2026,48(19):2719-2732. DOI:10.16016/j.2097-0927.202606076.

Citation: Wang Z Q, Xie X D, Wang Z, *et al*. Fluvastatin enhances the sensitivity of clear cell renal cell carcinoma to sunitinib by inhibiting PHF8[J]. J Army Med Univ, 2026, 48(19): 2719-2732. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202606076.

Fluvastatin enhances the sensitivity of clear cell renal cell carcinoma to sunitinib by inhibiting PHF8

Wang Ziqian[1,2], Xie Xiaodu[1], Wang Ze[1], Tang Peng[1], Zhang Junying[3], Xu Jing[1], Zheng Chongliang[1], Xiao Haiyang[1], Jin Junhao[1], Wang Luofu[1], Jiang Jun[4], Lan Weihua[1], Liu Qiuli[1] [1]Department of Urology, Daping Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing; [2]Department of Urology, No. 988 Hospital of Joint Logistic Support Force, Zhengzhou, Henan; [3]Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing; [4]Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang, China

[**Abstract**] Objective Sunitinib resistance is an important factor affecting the efficacy of targeted therapy for clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), and its underlying molecular mechanisms and effective intervention strategies have not been fully elucidated. This study aims to investigate the role of histone demethylase PHF8 in sunitinib resistance and to evaluate the effect of fluvastatin in targeting PHF8 and enhancing the sensitivity to sunitinib in ccRCC. Methods A sunitinib-resistant ccRCC cell line (786-O-R) and a patient-derived xenograft (PDX) resistant model were established. The expression of PHF8 in these resistant models was validated with Western blotting and immunohistochemical staining. Then 786-O and A498 cell lines with stable *PHF8* overexpression and their corresponding cell line-derived xenograft (CDX) models were constructed. The regulatory effect of PHF8 on sunitinib responsiveness was evaluated through *in vitro* cell proliferation assay, *in vivo* tumor volume monitoring, and immunohistochemical detection of Ki-67 and CD31 expression. Transcriptome sequencing, Western blotting, and immunohistochemical staining were performed to elucidate the molecular mechanisms by which PHF8 mediates sunitinib resistance. Tumor specimens from 46 ccRCC patients who received sunitinib treatment in Department of Urology of Daping Hospital were analyzed to evaluate the correlations of PHF8 expression with pathological grade and progression-free survival (PFS). An FDA-approved small-molecule drug library was used for virtual screening. RT-qPCR, cycloheximide chase assay, MG132/chloroquine rescue experiments, cellular thermal shift assay (CETSA), surface plasmon resonance (SPR), and molecular docking were conducted to verify the regulatory effect of fluvastatin on PHF8 protein stability. CCK-8 assay and *in vivo* animal experiments were performed to evaluate the synergistic sensitizing effect of fluvastatin combined with sunitinib on sunitinib-resistant ccRCC cells. Results Stable sunitinib-resistant cell lines and PDX models were successfully constructed. Compared with sunitinib-sensitive control counterparts, the protein expression of PHF8 was markedly upregulated in 786-O-R cells and resistant PDX tumors (Su-P8), indicating that PHF8 may be involved in sunitinib resistance in ccRCC. Further functional experiments demonstrated that *PHF8* overexpression significantly reduced the sensitivity of 786-O (IC_{50}: 5.406 *vs* 15.920 μmol/L) and A498 cells (5.186 *vs* 16.300 μmol/L) to sunitinib. Conversely, *PHF8* knockout substantially restored the sensitivity of resistant cells to sunitinib (IC_{50}: 13.470 *vs* 6.355 μmol/L). Consistent with *in vitro* findings, *in vivo* experiments showed that after sunitinib treatment, the *PHF8*-overexpression group exhibited significantly larger tumor volume ($P<0.000\ 1$), higher tumor weight ($P=0.001\ 3$), and elevated Ki-67 and CD31 expression levels (both $P<0.000\ 1$) compared with the control group, confirming that PHF8 drives sunitinib resistance in ccRCC. Clinical sample analysis revealed that high PHF8 expression was significantly correlated with advanced pathological grade ($P=0.000\ 3$) and shorter PFS after targeted therapy ($P=0.04$). Virtual screening targeting PHF8 identified fluvastatin as a potential candidate inhibitor. Fluvastatin downregulated PHF8 expression, increased H3K9me1/2 level, and significantly shortened the half-life of PHF8 ($P=0.000\ 7$), this effect could be significantly reversed by the proteasome inhibitor MG132, indicating that fluvastatin facilitates proteasome-dependent degradation of PHF8. CETSA results verified that fluvastatin enhanced the thermal stability of PHF8, and SPR analysis further confirmed the direct binding between fluvastatin and PHF8 (K_D= 23.8 μmol/L), with molecular docking predicting their potential binding pattern. Combination treatment with fluvastatin and sunitinib reduced the IC_{50} value of sunitinib in 786-O-R cells (from 17.460 to 4.601 μmol/L) and exerted a significantly stronger inhibitory effect on cell viability than sunitinib monotherapy ($P<0.000\ 1$). Notably, no significant difference was observed between combination therapy and sunitinib monotherapy after *PHF8* knockout, demonstrating that the sunitinib-sensitizing effect of fluvastatin is PHF8-dependent.

Moreover, *in vivo* PDX model experiments further validated that fluvastatin supplementation effectively restored the sensitivity of resistant PDX models to sunitinib. **Conclusion** PHF8 is a critical driver of sunitinib resistance in ccRCC, and its high expression is correlated with advanced pathological grade and poorer prognosis in ccRCC patients receiving sunitinib treatment. Fluvastatin enhance the sensitivity of sunitinib-resistant ccRCC cells to sunitinib by directly targeting PHF8 and promoting its proteasomal degradation.

[**Key words**] renal cell carcinoma; PHF8; sunitinib resistance; fluvastatin

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82473441), and the Project of High-Level Young and Middle-Aged Medical Talents of Chongqing (YXGD202519). Corresponding authors: Liu Qiuli, E-mail: liuqiuli900827@163.com; Lan Weihua, E-mail: doclan@yeah.net

肾癌(renal cell carcinoma, RCC)是泌尿系统中常见的恶性肿瘤,我国每年约有7.3万例新发病例和2.4万例死亡病例[1]。肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)是肾癌最主要的病理亚型,占全部肾细胞癌的70%~80%[2]。研究表明,超过90%的ccRCC存在*VHL*基因相关的遗传或表观遗传异常,包括基因突变、杂合性缺失及启动子甲基化等改变[3]。其功能失活导致VHL-HIF信号解偶联被认为是ccRCC发生发展重要的分子基础[3]。在过去的肾癌治疗药物开发中,针对VHL-HIF通路下游血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)的酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs),如舒尼替尼等,在转移性肾癌治疗中取得了显著疗效[4-5],已成为晚期肾癌的一线标准治疗方案。然而,临床研究表明,大多数患者在治疗9~11个月后出现疾病进展,即产生获得性耐药[4-6]。因此解析耐药ccRCC的肿瘤脆性并探索逆转或增强TKIs疗效的新策略,对于改善晚期肾癌患者预后具有重要的临床意义。

PHF8作为组蛋白去甲基化酶,可通过特异性去除组蛋白靶位点的甲基化修饰(H3K9me1、H3K9me2等)[7],参与细胞周期调控、细胞骨架重排与细胞迁移等生物学过程,在维持细胞生长、增殖与分化中发挥重要作用[8]。近年来研究表明,PHF8在前列腺癌、乳腺癌、食管鳞状细胞癌及胃癌等多种恶性肿瘤中呈显著高表达[9-11],且其表达丰度与肿瘤的恶性表型及患者不良预后密切相关[12-16]。本课题组前期研究证实,PHF8作为VHL-HIF信号通路的关键下游因子,可参与调控ccRCC细胞的增殖与脂质沉积等恶性进程[17]。基于此,本研究通过构建舒尼替尼耐药的ccRCC细胞系和患者来源异种移植瘤(patient-derived xenograft, PDX)模型,鉴定出PHF8是介导ccRCC对舒尼替尼耐药的重要因子。在此基础上,基于分子对接与虚拟筛选策略发现氟伐他汀可作为PHF8的潜在抑制剂,进而证实靶向PHF8能有效增敏耐药ccRCC对舒尼替尼的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

NCG(NOD/ShiltJGpt-Prkdc^{em26Cd52}Il2rg^{em26Cd22}/Gpt)免疫缺陷小鼠(成都药康生物科技有限公司);BALB/c无胸腺裸小鼠(北京维通利华实验动物科技有限公司);胰蛋白酶-EDTA消化液、高糖DMEM培养基、最小必须MEM培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司;舒尼替尼(美国AdooQ公司);氟伐他汀、普拉曲沙、甲羟戊酸、MG132和氯喹(美国MCE公司);CCK-8(WST-8-based colorimetric assay kit)试剂盒(中国博士德公司);PHF8抗体、Ki-67抗体和β-actin抗体(美国Cell signaling公司);GAPDH抗体(中国武汉三鹰公司);CD31抗体(美国abcam公司)。

1.2 人类肿瘤样本

收集陆军军医大学大坪医院泌尿外科46例ccRCC患者术后肿瘤组织石蜡包埋样本,用于后续免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)检测及相关分析。本研究所用临床样本均经陆军军医大学大坪医院伦理委员会批准(WZ 2026-23)。

1.3 实验动物

实验小鼠共50只,均为雄性,4~6周龄,其中BALB/c裸鼠10只(体质量20~25 g)和NCG小鼠40只(体质量25~30 g)。均饲养于陆军特色医学中心动物实验中心SPF级动物房,环境温度25 ℃,相对湿度45%~60%,12 h/12 h昼夜交替光照,自由摄食标准饲料及无菌水。所有手术及处理均在异氟烷麻醉下进行,并采取规范镇痛措施以减少动物痛苦与应激反应。实验过程中未出现严重不良事件,仅观察到少量动物短暂体质量下降及活动减少,均未影响实验进行。设定人道终点标准为:肿瘤直径>15 mm、体质量下降>20%或出现明显痛苦/活动能力下降等,一旦达到即实施安乐死处理。实验期间每日观察动物状态,并每2~3天测量肿瘤体积。所有动物实验均经陆军军医大学大坪医院伦理审查委员会批准[医研伦审(2026)第233号],并遵循国际动物实验伦理规范。

1.4 方法

1.4.1 786-O细胞舒尼替尼耐药株构建及药物敏感性验证 采用肾透明细胞癌786-O细胞建立舒尼替尼耐药细胞株。将786-O细胞在37 ℃、5%CO_2恒温培养箱中常规培养于含10%胎牛血清的DMEM完全培养基中。待细胞生长至对数期后,加入舒尼替尼进行长期、低剂量逐步诱导筛选。初始药物浓度设置为接近亲本786-O细胞IC_{50}的低浓度范围(1/4~1/2 IC_{50}),在该浓度下持续培养。待细胞适应并稳定增殖后,逐步递增药物浓度(每次增加10%~20%),持续施加选择压力。在整个诱导过程中,定期更换含药培养基,并密切观察细胞形态及生长状态变化。该诱导过程共持续约12个月。最终在较高浓度舒尼替尼持续作用下,细胞仍可稳定传代生长超过5代且增殖状态稳定时,判定耐药细胞株构建成功。随后去除药物,在无药培养基中恢复培养2周,以消除短期药物应激效应,获得稳定耐药细胞系用于后续实验。采用CCK-8法检测亲本细胞与耐药细胞对舒尼替尼的IC_{50},以验证耐药性建立情况。

1.4.2 ccRCC患者来源肿瘤组织舒尼替尼耐药PDX模型构建 将来源于ccRCC患者的新鲜肿瘤组织切割为约1~2 mm^3的小块,在无菌条件下将组织碎片植入NCG小鼠肾包膜下,以建立原代移植瘤(P0代)。待肿瘤体积生长至约200 mm^3后进行传代扩增。将P1小鼠随机分为舒尼替尼治疗组与对照组。舒尼替尼采用口服灌胃给药,剂量为40 mg/kg。给药方案为“4周用药+2周停药”为一个完整周期,并在每一周期结束后进行肿瘤组织传代,逐代筛选耐药表型,直至第8代(Su-P8)建立稳定耐药模型。在模型建立完成后,比较第P0与Su-P8肿瘤的药物反应差异,并通过肿瘤生长抑制率评估耐药程度变化。

1.4.3 PDX模型中舒尼替尼抗肿瘤效应及肿瘤生长抑制率检测 选用4~6周龄NCG免疫缺陷小鼠用于体内肿瘤抑制效果评价。当肿瘤体积生长至约100~200 mm^3时,将P0组及Su-P8组小鼠分别随机分为对照组和给药组。给药组采用口服灌胃方式给予药物干预,剂量为40 mg/kg,每日1次;对照组给予等体积溶媒处理。连续给药2周后处死小鼠,完整剥离肿瘤组织并测量体积,用于计算肿瘤抑制效果。

1.4.4 BALB/c裸鼠异种移植瘤模型评价PHF8对舒尼替尼治疗响应的影响 收集对数生长期的786-O细胞(分属Vector对照组与OE-*PHF8*组),以单只5×10^6个细胞的密度接种至BALB/c裸鼠右侧腋中线皮下。采用随机数字表法将小鼠均分为Vector组与OE-*PHF8*组(n=5)。随后,2组小鼠统一以40 mg/kg的剂量经口灌胃舒尼替尼进行干预。给药期间每隔3天记录肿瘤体积。连续干预16 d,将小鼠麻醉并采用颈椎脱臼法实施安乐死。手术完整剥离肿瘤组织,称定其最终质量。剥离的标本经4%多聚甲醛固定处理后,用于后续常规石蜡切片及免疫组化染色。

1.4.5 786-O和A498细胞*PHF8*稳定过表达及敲除模型构建与验证 所有细胞均培养于37 ℃、5%CO_2恒温培养箱中,培养基为含10%胎牛血清的DMEM或MEM完全培养基。PHF8过表达慢病毒(OE-*PHF8*)及其对应空载对照病毒,以及PHF8敲除慢病毒(*PHF8*-sgRNA)及其对应对照病毒均由成都月涌大江科技有限公司构建并提供。将相应慢病毒颗粒分别感染786-O和A498细胞,感染24 h后更换为新鲜完全培养基继续培养。随后采用含1 μg/mL嘌呤霉素(puromycin)的培养基进行持续筛选,约6周后获得稳定表达PHF8过表达或敲除的细胞株及相应对照细胞株。稳定株构建完成后,采用Western blotting检测PHF8蛋白表达水平,以验证过表达及敲除效率。

1.4.6 CCK-8法检测细胞活力及舒尼替尼药物敏感性 收集处于对数生长期的786-O细胞及A498细胞,并以3 000个/孔的密度接种于96孔板中,将培养板置于37 ℃、5%CO_2的标准恒温培养箱中常规培养过夜。待观察到细胞牢固贴壁后,吸除旧培养基,PBS缓冲液漂洗2遍。随后进行药物干预:使用含10%胎牛血清(FBS)的新鲜培养基,将舒尼替尼设定为梯度浓度(0、5、10、20、30、40 μmol/L)单独处理细胞;联合用药组则在此基础上统一添加30 μmol/L氟伐他汀进行共孵育。各实验组均持续干预48 h。药物作用期满后,移除孔内含药液体并再次使用PBS洗涤2遍,随后每孔避光加入100 μL预先配制的CCK-8检测试剂,放回原培养箱中显色30 min。反应结束后,利用多功能酶标仪读取450 nm检测波长下各孔的*OD*值。

1.4.7 Western blotting检测相关蛋白表达水平

将细胞在相应实验处理条件作用后收集,按照实验分组提取总蛋白。采用RIPA裂解液提取细胞蛋白,并于低温条件下离心取上清,测定蛋白浓度后用于后续实验。取等量蛋白样品进行SDS-PAGE电泳分离,随后将蛋白转移至PVDF膜上。转膜完成后,使用5%脱脂奶粉室温封闭1 h,以减少非特异性结合。封闭结束后加入一抗(PHF8、AKT、ERK及β-actin稀释比例均为1∶1 000,P-AKT及P-ERK稀释比例为1∶2 000,GAPDH稀释比例为1∶5 000),于4 ℃条件下孵育过夜。次日使用TBST洗膜3次,每次10 min。随后加入山羊抗兔IgG二抗(稀释比例1∶5 000),室温孵育2 h,再次用TBST洗膜3次,每次10 min。最后向膜上滴加

ECL显色液,于凝胶成像系统中进行信号采集与分析。

1.4.8 免疫组织化学染色检测肿瘤组织相关蛋白表达 将预先包埋的病理石蜡标本制备成厚度为4 μm的连续组织薄片。切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇复水后,置于特异性修复缓冲液(柠檬酸钠或EDTA)中进行高温煮沸加热。待标本自然冷却至室温,滴加3% H_2O_2溶液并避光静置10 min。经洗涤后,应用匹配的正常动物血清覆盖切片表面。甩去多余封闭液,分别滴加适宜浓度的特异性第一抗体(抗PHF8、抗AKT及抗Ki-67),置于4 ℃湿盒内作用过夜。次日,标本经PBS缓冲液充分漂洗后,滴加二抗试剂并于室温环境中常规孵育。随后应用DAB显色系统进行靶向显色定位,并以苏木精溶液完成细胞核复染。切片最终经梯度脱水、透明处理及中性树脂封片后,置于光学显微镜下进行图像采集。IHC结果由两名具有经验的病理学专家在双盲条件下独立评估。PHF8采用"染色强度×阳性细胞比例(阳性面积)"的半定量评分方法进行分析:染色强度按如下标准评分:0分为无着色,1分为弱着色,2分为中度着色,3分为强着色。阳性细胞百分比按如下标准评分:0分为阳性细胞占比<5%,1分为5%~25%,2分为26%~50%,3分为51%~75%,4分为>75%。Ki-67采用计算高倍镜视野下核内出现阳性着色的肿瘤细胞占计数肿瘤细胞总数的百分比的方法进行分析。

1.4.9 转录组测序分析差异表达基因及相关信号通路 使用Trizol试剂(Invitrogen)提取各组细胞总RNA,经Agilent 2200检测完整性(RIN 7.0)后,取1 μg总RNA使用VAHTS Universal V6试剂盒(Vazyme)完成mRNA纯化、随机片段化、cDNA合成及文库构建,并在DNBSEQ-T7平台进行双端测序(150 bp)。过滤接头和低质量读段获取Clean reads,利用STAR软件比对至人参考基因组(GRCh38_Ensembl104),通过HTSeq和FPKM分别统计Counts与计算基因表达量。以$|\log_2FC|>1$且$P<0.05$为标准筛选差异表达基因,结合KEGG数据库并采用Fisher精确检验(以$P<0.05$为显著性阈值)完成显著通路富集分析。

1.4.10 基于PHF8蛋白结构的药物虚拟筛选及分子对接分析 PHF8蛋白晶体结构从RCSB Protein Data Bank(PDB,https://www.rcsb.org/)数据库中获取(PDB ID:3K3O)。小分子化合物库选自DrugBank数据库(https://go.drugbank.com/)中已上市药物,共计2 474种化合物。所有配体分子在对接前采用Schrödinger软件(2021-4)中的LigPrep模块进行预处理,包括三维结构生成、质子化状态预测(Epik工具)及能量最小化(OPLS4力场),并去除盐离子及重复结构。基于结构的分子对接采用Schrödinger中的Virtual Screening Workflow完成,以PHF8活性口袋为受体位点,使用Glide模块依次进行标准精度及高精度分级筛选。最终筛选获得98个候选化合物,并选取排名前4的小分子用于后续实验验证。分子对接结果采用PyMOL(v4.6.0)进行可视化分析。为排除药物强细胞毒性引发的非特异性凋亡相关蛋白降解干扰[18],首先通过CCK-8实验评估了候选化合物的细胞生物学毒性,并确定了各自的亚致死浓度。

1.4.11 放线菌酮追踪实验检测PHF8蛋白稳定性及半衰期 将786-O-R细胞接种于培养皿中,待细胞贴壁并生长至适宜密度后,分别给予DMSO或氟伐他汀处理。随后加入终浓度为70 μmol/L的放线菌酮(cycloheximide,CHX)以抑制蛋白质合成,并于设定时间点(0h、2h、4h、8h)[19]收集细胞。提取总蛋白,采用Western blotting检测PHF8蛋白表达,以0 h时PHF8蛋白水平为基准进行归一化,绘制蛋白降解曲线并计算PHF8蛋白半衰期。

1.4.12 甲羟戊酸回补实验评价甲羟戊酸途径对PHF8蛋白表达的影响 将786-O-R细胞分为DMSO对照组、氟伐他汀组及氟伐他汀联合甲羟戊酸(mevalonic acid,MVA)组。MVA终浓度为120 μmol/L,各组按设定条件处理后收集细胞并提取总蛋白。采用Western blotting检测PHF8蛋白表达,评价外源补充MVA能否逆转氟伐他汀引起的PHF8蛋白下调。

1.4.13 表面等离子共振(surface plasmon resonance,SPR)技术检测氟伐他汀与PHF8的直接结合及亲和力 采用SPR技术检测氟伐他汀(fluvastatin)与PHF8蛋白之间的直接结合能力。实验基于Biacore系统(Cytiva,USA)进行,采用氨基偶联法将人源PHF8蛋白固定于CM5芯片表面。以PBS-P缓冲液(pH=7.4)作为偶联及运行缓冲液,并在缓冲体系中加入5%DMSO用于配制待测化合物。不同浓度梯度的氟伐他汀溶液以流速30 μL/min流经固定有PHF8蛋白的芯片表面,记录结合和解离过程。所得传感信号通过Biacore Insight分析软件进行处理,并采用1∶1 Langmuir结合模型进行拟合,计算氟伐他汀与PHF8的结合动力学参数及平衡解离常数K_D。

1.4.14 细胞热迁移实验(cellular thermal shift assay,CETSA)检测氟伐他汀对PHF8蛋白热稳定性的影响 将786-O-R细胞分别给予DMSO或氟伐他汀处理,收集细胞后用预冷PBS洗涤并重悬。将细胞悬液等量分装,于42~58 ℃的设定温度梯度下分别加热3 min,随后迅速冷却。细胞裂解后离心收集上清,采用Western blotting检测不同温度下可溶性PHF8蛋白

水平。以各组最低温度下的PHF8蛋白水平为基准进行归一化，绘制PHF8热稳定性曲线。

1.5　统计学分析

所有数据采用GraphPad Prism 10.1.2软件进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。符合正态分布的两组间比较采用独立样本t检验，不符合正态分布采用Mann-Whitney U检验；多组间比较采用one-way ANOVA，组间两两比较采用Tukey法。肿瘤组织中PHF8表达与病理分级之间的关系采用χ^2检验或Spearman相关分析进行评估。生存分析采用Kaplan-Meier法绘制无进展生存期(progression-free survival，PFS)曲线，并通过log-rank检验比较组间差异。IC_{50}值采用非线性回归模型进行拟合计算。所有实验均至少重复3次，P<0.05认为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　ccRCC舒尼替尼耐药模型构建成功且对舒尼替尼治疗抵抗

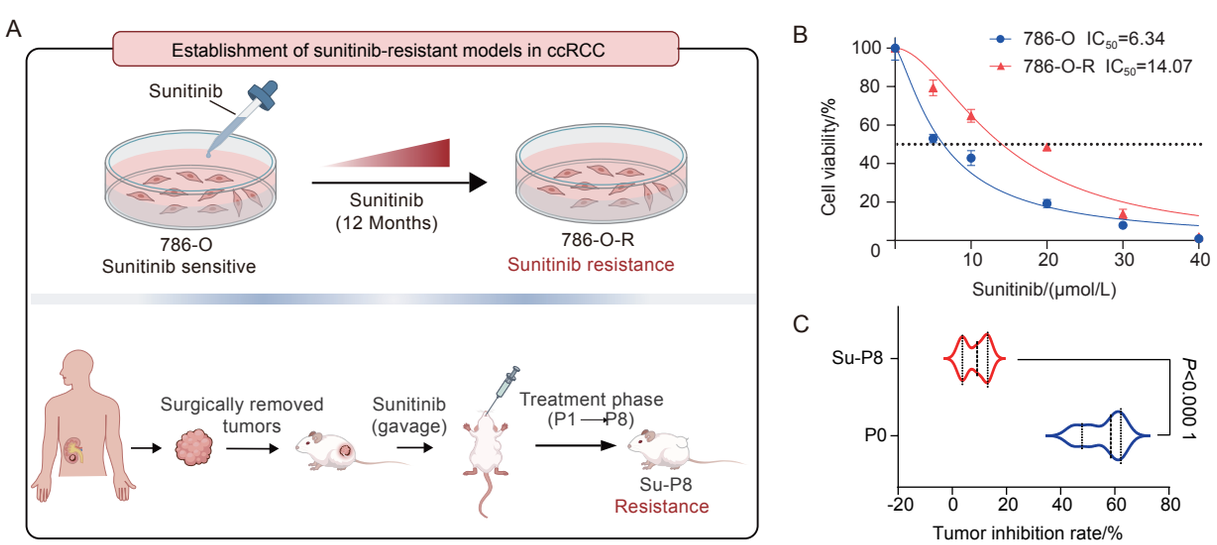
为了探索ccRCC舒尼替尼耐药的发生机制，本研究成功构建了舒尼替尼耐药细胞模型及PDX模型，图1A展示了耐药模型构建的整体流程示意图。CCK-8检测结果显示，与亲本786-O细胞相比，786-O-R细胞对舒尼替尼的IC_{50}显著升高，增加2~3倍(图1B)，同时在PDX模型中发现，Su-P8肿瘤抑制率较P0著降低(P<0.000 1，图1C)，提示耐药模型构建成功。

2.2　PHF8在ccRCC舒尼替尼耐药模型中表达升高

课题组前期研究成果发现，PHF8是VHL-HIF的重要下游因子，参与ccRCC的脂质沉积及肿瘤生长等恶性进展过程。为探究PHF8在ccRCC舒尼替尼治疗反应性中的作用，首先采用Western blotting检测舒尼替尼耐药细胞786-O-R及耐药PDX模型中PHF8蛋白的表达水平，结果显示，与亲本786-O细胞相比，耐药细胞及PDX模型中PHF8蛋白表达均显著上调(图2A、B)。同时，IHC结果进一步验证，PHF8在Su-P8组织中显著高表达(P<0.000 1，图2C)，且在舒尼替尼治疗后，Su-P8组织中血管标志物CD31表达显著高于对照组(P=0.000 2，图2D)。上述结果提示PHF8与ccRCC舒尼替尼耐药密切相关。

2.3　PHF8过表达降低ccRCC对舒尼替尼的敏感性，敲除PHF8恢复其敏感性

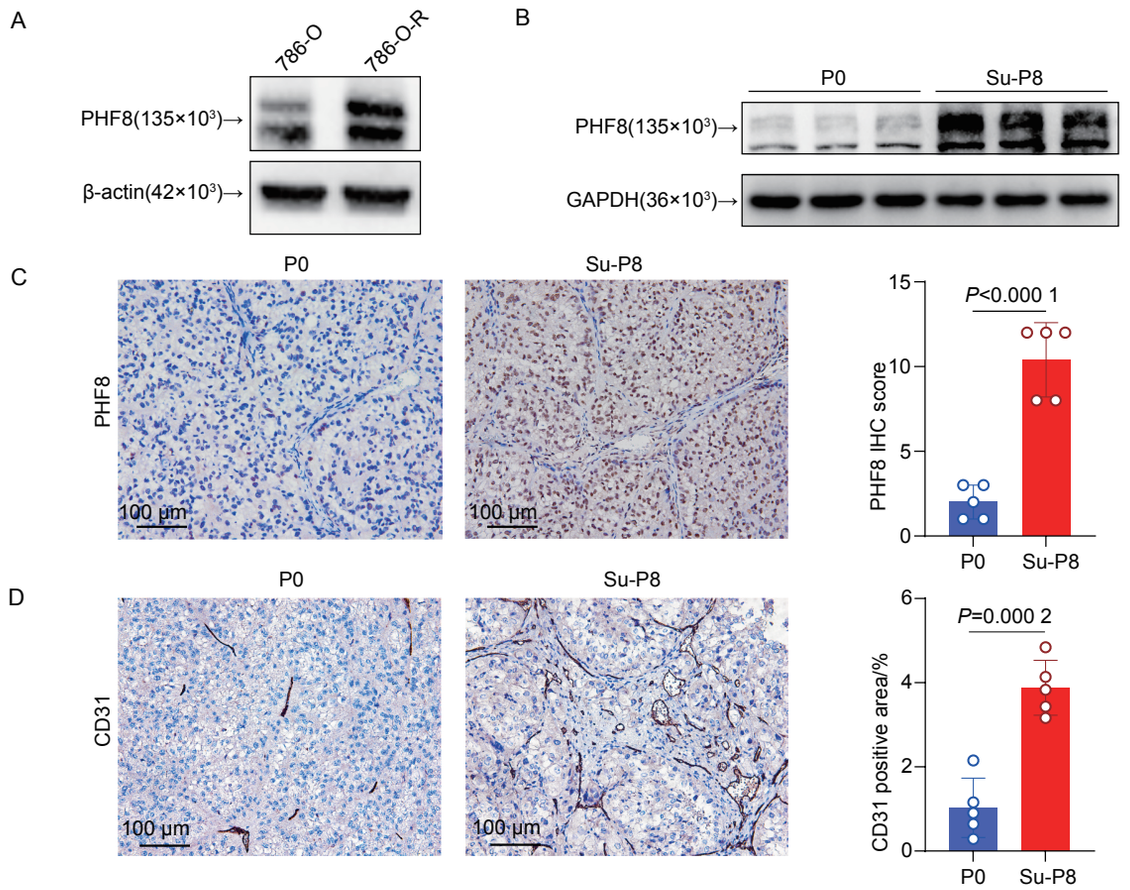
为进一步探讨PHF8对ccRCC舒尼替尼治疗反应性的影响，本研究构建了*PHF8*过表达的786-O和A498细胞株(图3A)。体外CCK8实验显示，过表达*PHF8*后，786-O和A498细胞对舒尼替尼的治疗响应性明显降低(图3B)。相反，在耐药细胞株786-O-R中敲除*PHF8*后，细胞对舒尼替尼的敏感性明显恢复(图3C)。在基于野生型和*PHF8*过表达的786-O细胞构建的小鼠皮下移植瘤模型(图3D)中，发现与对照组相比，过表达*PHF8*(OE-*PHF8*)组小鼠移植瘤对舒尼替尼治疗具有显著的抵抗性，其肿瘤生长体积(P<0.000 1，图3E)及最终肿瘤质量(P=0.001 3，图3F)均显著高



A：Schematic diagram of the establishment process of the sunitinib-resistant cell model and patient-derived xenograft (PDX) model; B：Sunitinib IC_{50} values in parental 786-O and sunitinib-resistant 786-O-R cells (n=4)；C：Rates of tumor growth inhibition after sunitinib treatment in the ccRCC PDX model (n=5)

图1　ccRCC舒尼替尼耐药模型的构建及舒尼替尼敏感性特征

Figure 1　Establishment and sunitinib-response characteristics of sunitinib-resistant ccRCC models



A: PHF8 protein levels in parental and sunitinib-resistant ccRCC cells by Western blotting; B: PHF8 protein levels in P0 and sunitinib-resistant Su-P8 PDX tumor tissues by Western blotting; C and D: PHF8(C) and CD31(D) expression in P0 and Su-P8 PDX tumor tissues by immunohistochemical staining (n=5)

图2 ccRCC舒尼替尼耐药模型中PHF8和CD31的表达特征

Figure 2 PHF8 and CD31 expression patterns in sunitinib-resistant ccRCC models

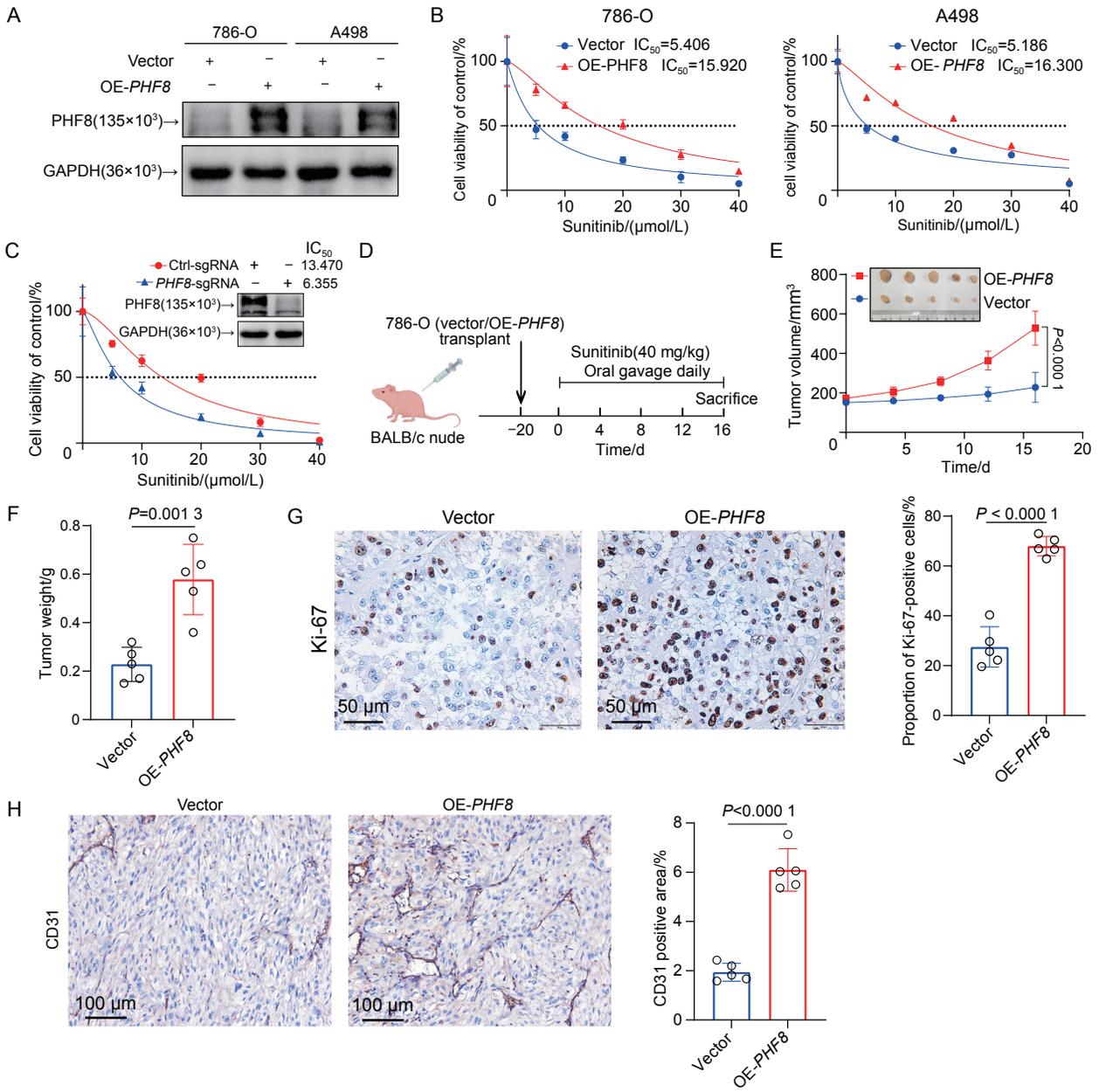
于对照组。此外,IHC结果表明,OE-*PHF8*组肿瘤组织中细胞增殖标志物Ki-67(P<0.000 1,图3G)及CD31(P<0.000 1,图3H)的表达水平显著高于对照组。综上,PHF8促进ccRCC的舒尼替尼治疗抵抗。

2.4 PHF8通过激活PI3K-AKT信号通路促进ccRCC舒尼替尼耐药

为进一步探讨PHF8介导ccRCC舒尼替尼耐药的下游分子机制,对*PHF8*过表达的786-O细胞(OE-*PHF8*组)及其对照细胞进行转录组测序。差异表达基因的KEGG通路富集分析结果显示,PI3K-AKT信号通路显著富集(图4A、B),提示该通路可能参与PHF8介导的舒尼替尼耐药过程。为验证上述分析结果,首先通过IHC结果表明,舒尼替尼耐药PDX肿瘤组织中P-AKT表达显著升高(P<0.001,图4C)。采用Western blotting检测不同细胞中AKT的磷酸化水平。结果显示,在786-O和A498细胞中过表达*PHF8*后,P-AKT蛋白水平显著升高,而总AKT蛋白水平无明显变化(图4D)。相反,在舒尼替尼耐药细胞株786-O-R中敲除*PHF8*后,P-AKT蛋白水平显著降低(图4E)。同样,IHC结果进一步显示,OE-*PHF8*细胞来源的皮下移植瘤组织中P-AKT表达水平均显著升高(P<0.001,图4F)。上述结果表明,PHF8与AKT信号活化密切相关,提示PHF8可能通过促进PI3K-AKT信号通路活化,增强ccRCC对舒尼替尼的耐药性。

2.5 PHF8高表达与ccRCC高病理分级及较短靶向治疗PFS相关

为探究PHF8在ccRCC中的临床意义,本研究检测了陆军军医大学大坪医院泌尿外科46名接受舒尼替尼治疗的ccRCC患者组织样本中PHF8的表达水平(图5A)。结合患者病理分级发现,PHF8 IHC评分与高病理分级具有显著相关性(P=0.000 3,图5B)。进一步利用患者随访数据进行预后分析,发现PHF8高表达预示着ccRCC患者在接受舒尼替尼治疗下更快疾病进展(P=0.04,图5C)。



A: Expression PHF8 levels in 786-O and A498 cells stably overexpressing PHF8 by Western blotting; B: Effect of *PHF8* overexpression on sunitinib IC_{50} in ccRCC cells (n=4); C: Determination of the sunitinib IC_{50} in *PHF8*-knockout 786-O-R cells (n=4); D: Schematic diagram of the mouse subcutaneous xenograft model and sunitinib treatment protocol; E: Tumor volume growth curves of mouse xenografts in different groups under sunitinib treatment (n=5); F: Final weights of the excised xenograft tumors at the experimental endpoint (n=5); G and H: Representative immunohistochemical images and quantitative analysis of Ki-67(G) and CD31(H) expression in xenograft tissues (n=5)

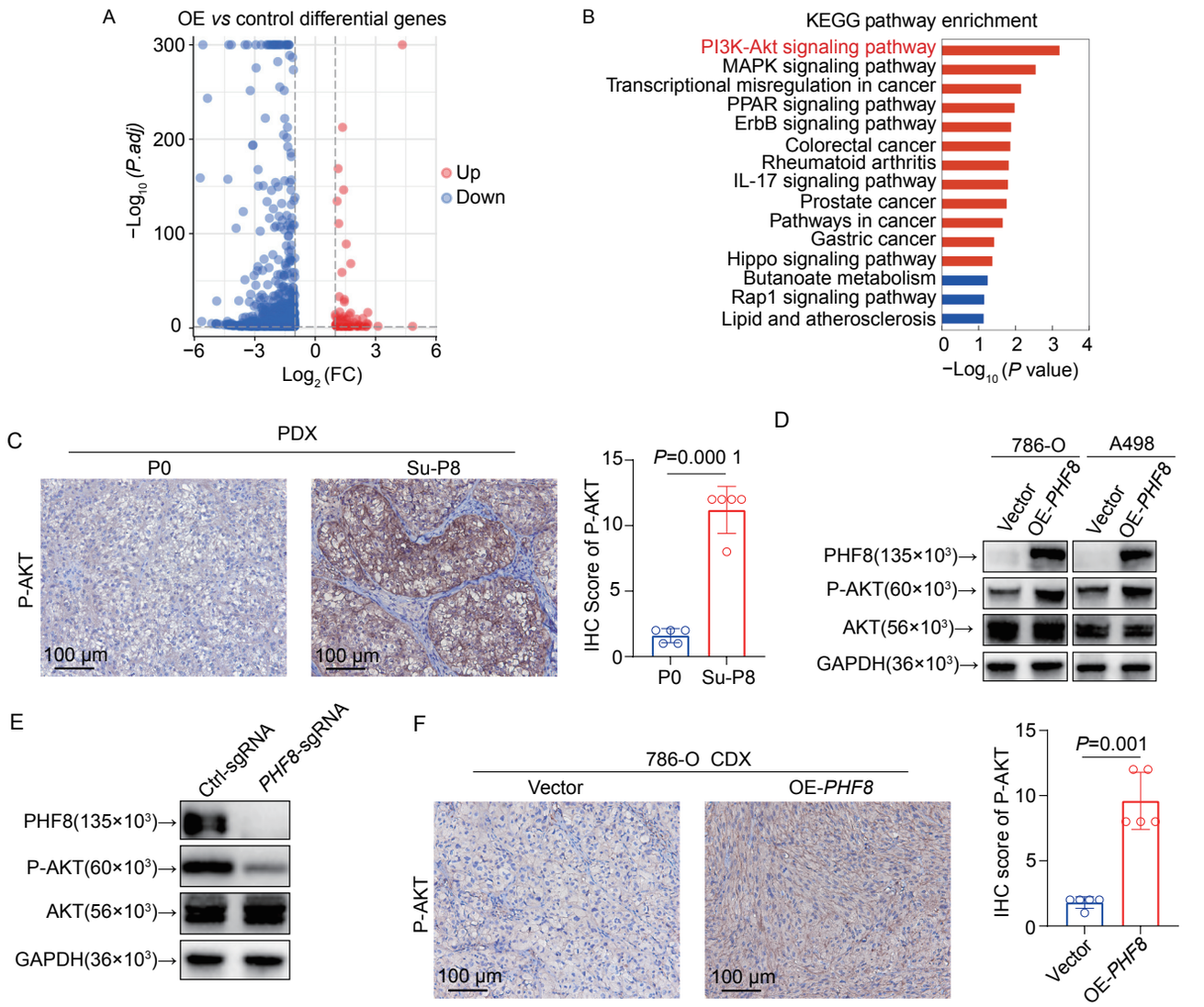
图3 PHF8表达改变的ccRCC细胞及移植瘤模型的舒尼替尼响应特征

Figure 3 Sunitinib response characteristics of ccRCC cells and xenograft models with altered PHF8 expression

2.6 氟伐他汀直接结合PHF8并促进其蛋白降解

由于目前尚无获批上市的靶向PHF8特异性小分子抑制剂,本研究基于PHF8的催化活性口袋结构,对FDA批准的小分子化合物库进行了虚拟筛选(图6A)。在排除无明确药理活性的化合物后,鉴定出普拉曲沙与氟伐他汀为潜在的PHF8结合分子(图6B)。在确定两者的亚致死浓度后(图6C),发现以此剂量的氟伐他汀处理细胞可显著下调PHF8蛋白表达,而普拉曲沙对PHF8表达无明显影响(图6D)。与此一致,氟伐他汀处理后,细胞内总体H3K9me1和H3K9me2修饰水平均显著升高(图6E)。

氟伐他汀是一种HMG-CoA还原酶抑制剂,可阻断甲羟戊酸的合成。然而,外源补充甲羟戊酸(mevalonate,MVA)不能恢复氟伐他汀处理后降低的



A: DEGs between PHF8-overexpressing 786-O cells (OE-*PHF8*) and control cells identified by RNA sequencing (n=4); B: KEGG pathway enrichment analysis of DEGs between OE-*PHF8* and control 786-O cells; C: p-AKT expression in sunitinib-resistant PDX tumor tissues determined by immunohistochemical staining (n=5); D: Protein levels of PHF8, AKT, and p-AKT in *PHF8*-overexpressing 786-O and A498 cells determined by Western blotting; E: Protein levels of PHF8, AKT, and p-AKT in sunitinib-resistant 786-O-R cells with *PHF8* knockout determined by Western blotting; F: p-AKT expression in subcutaneous xenograft tumors derived from OE-*PHF8* and corresponding control cells determined by immunohistochemical staining (n=5). DEGs: differentially expressed genes

图4 PHF8表达改变的ccRCC模型中PI3K-AKT通路富集及AKT磷酸化特征

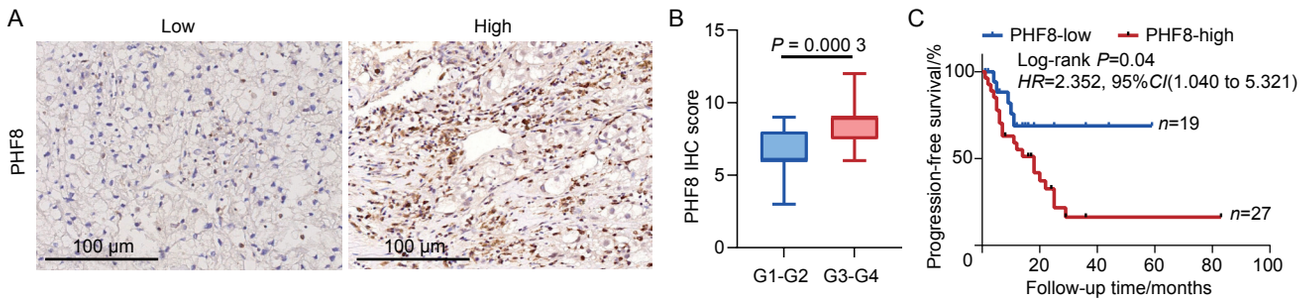
Figure 4 PI3K-AKT pathway enrichment and AKT phosphorylation characteristics in ccRCC models with altered PHF8 expression

PHF8蛋白水平(图6F),提示氟伐他汀对PHF8的调控可能不依赖经典的甲羟戊酸代谢通路。此外,氟伐他汀处理对*PHF8*的mRNA水平无明显影响(图6G),提示其可能主要在翻译后水平调控PHF8蛋白表达。CHX追踪实验进一步显示,氟伐他汀处理可明显缩短PHF8的蛋白半衰期(P=0.000 7,图6H)。尽管自噬-溶酶体抑制剂(CQ)可一定程度逆转氟伐他汀导致的PHF8降解,但泛素-蛋白酶体抑制剂MG132逆转效果更为明显(图6I)。结合上述结果及既往文献提示,氟伐他汀诱导的PHF8降解可能主要依赖泛素-蛋白酶体系统。

CETSA显示,氟伐他汀可提高PHF8蛋白的热稳定性(图6J);SPR进一步证实氟伐他汀可直接与PHF8结合(K_D=23.8 μmol/L,图6K),分子对接揭示了二者潜在的分子结合模式(图6L)。

2.7 氟伐他汀通过靶向PHF8提高ccRCC对舒尼替尼的治疗敏感性

为评估氟伐他汀靶向PHF8在改善舒尼替尼耐药



A: PHF8 expression in ccRCC tumor tissues determined by immunohistochemical staining; B: PHF8 expression levels in ccRCC tumors with different pathological grades; C: Progression-free survival of ccRCC patients stratified by PHF8 expression level

图5 接受舒尼替尼治疗的ccRCC患者PHF8表达、病理分级及无进展生存期

Figure 5 PHF8 expression, pathological grade, and progression-free survival in ccRCC patients receiving sunitinib treatment

中的治疗潜力,本研究开展了体内体外联合用药实验。结果显示,氟伐他汀可显著提高舒尼替尼耐药细胞株786-O-R对舒尼替尼的敏感性(P<0.000 1,图7A、B)。然而,在*PHF8*敲除后的786-O-R细胞中无显著效果(图7C),表明氟伐他汀逆转舒尼替尼耐药的作用主要依赖PHF8。

进一步在舒尼替尼耐药PDX模型中验证氟伐他汀的体内治疗效果(图7D),结果显示,与舒尼替尼单药治疗相比,联合氟伐他汀治疗可显著抑制肿瘤生长(P=0.004 5,图7E),并降低终末肿瘤质量(P=0.023 4,图7F)。综上,氟伐他汀可在体内外增强ccRCC对舒尼替尼的治疗响应,其作用可能通过靶向PHF8实现。

3 讨论

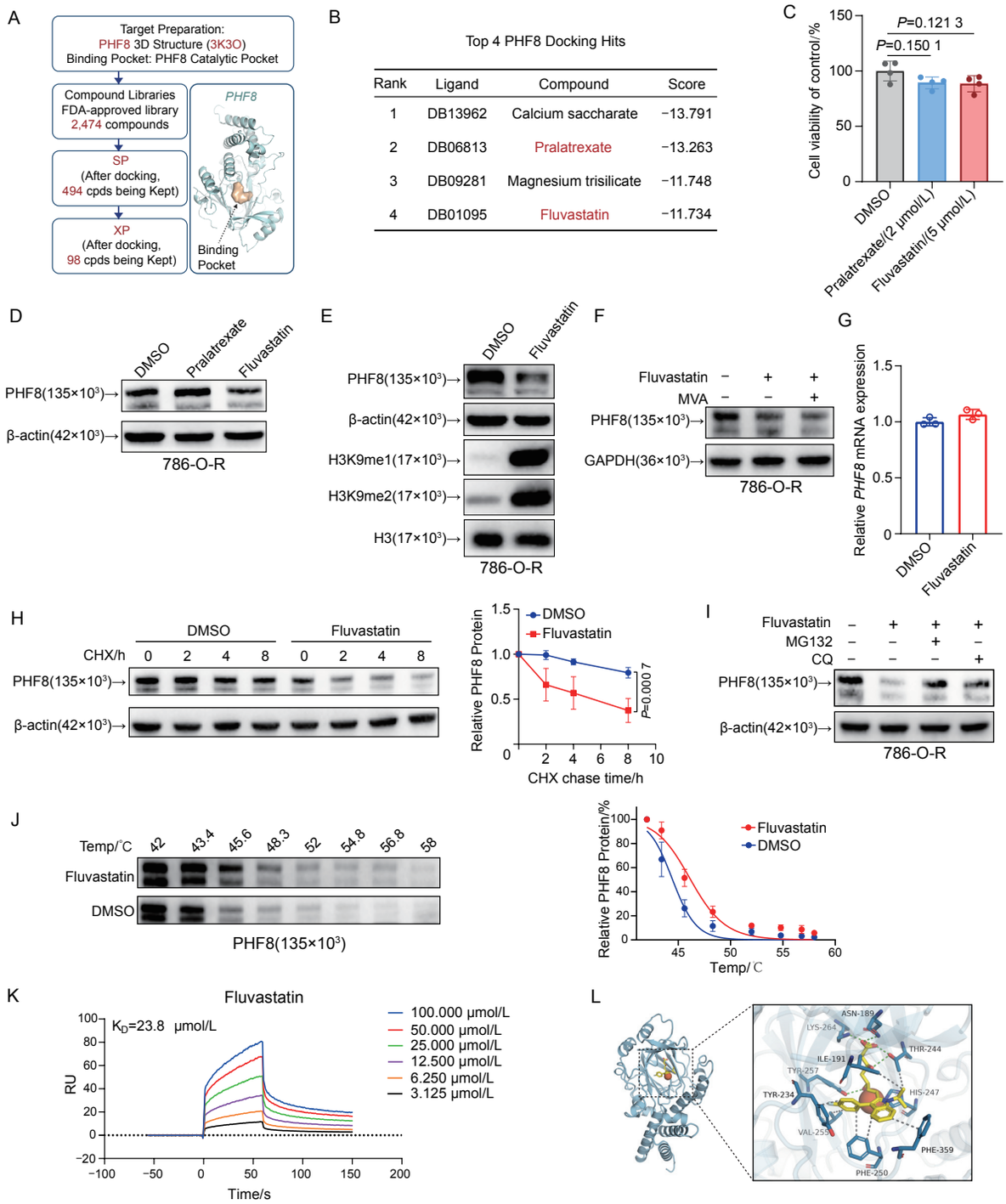
3.1 PHF8高表达可能成为ccRCC恶性进展及舒尼替尼疗效不佳的预测标志

以舒尼替尼为代表的TKIs类药物是晚期ccRCC的一线治疗基石。尽管多数患者初始治疗反应良好,但研究表明,个体间对舒尼替尼的应答程度及缓解持续时间存在显著异质性[20]。因此,早期发掘能够可靠预测TKI治疗响应性的生物标志物,对于优化临床干预决策具有重要价值。既往文献报道,USP20、IKBKE及SLC27A3的高表达与ccRCC对TKIs治疗反应较差密切相关[21-23],而PRKAB2、OTUD1及ACE2的低表达预示更快的TKIs治疗进展[24-26]。本研究通过免疫组化染色发现,在接受舒尼替尼治疗的ccRCC患者肿瘤组织中,PHF8高表达与更高的病理分级呈显著正相关,且其表达水平与接受舒尼替尼治疗患者较短的无进展生存期显著相关,提示PHF8有望成为预测ccRCC患者舒尼替尼治疗反应性的潜在标志物。此外,本团队前期研究证实,PHF8与ccRCC患者对依维莫司(mTOR抑制剂)的治疗反应性密切相关[17]。综上,上述结果提示PHF8可作为肾癌靶向治疗中具有重要临床意义的预测性生物标志物,对于PHF8高表达的ccRCC患者,在舒尼替尼治疗期间应加强随访监测,或可考虑提前进行联合干预。

需指出的是,本研究基于接受舒尼替尼治疗患者的肿瘤组织样本,主要揭示了PHF8表达水平与舒尼替尼治疗结局之间的相关性,由于缺乏患者治疗前后配对样本,目前并不能进一步区分PHF8高表达预示着原发性耐药还是治疗压力诱导的获得性耐药。未来研究将进一步收集患者舒尼替尼治疗前后的配对肿瘤样本,进行动态分析,明确PHF8在耐药发生和演进过程中的变化特征,进一步阐明其作为耐药预测标志物及治疗干预靶点的临床应用价值。

3.2 PHF8驱动的PI3K-AKT信号活化可能是ccRCC舒尼替尼耐药的重要机制

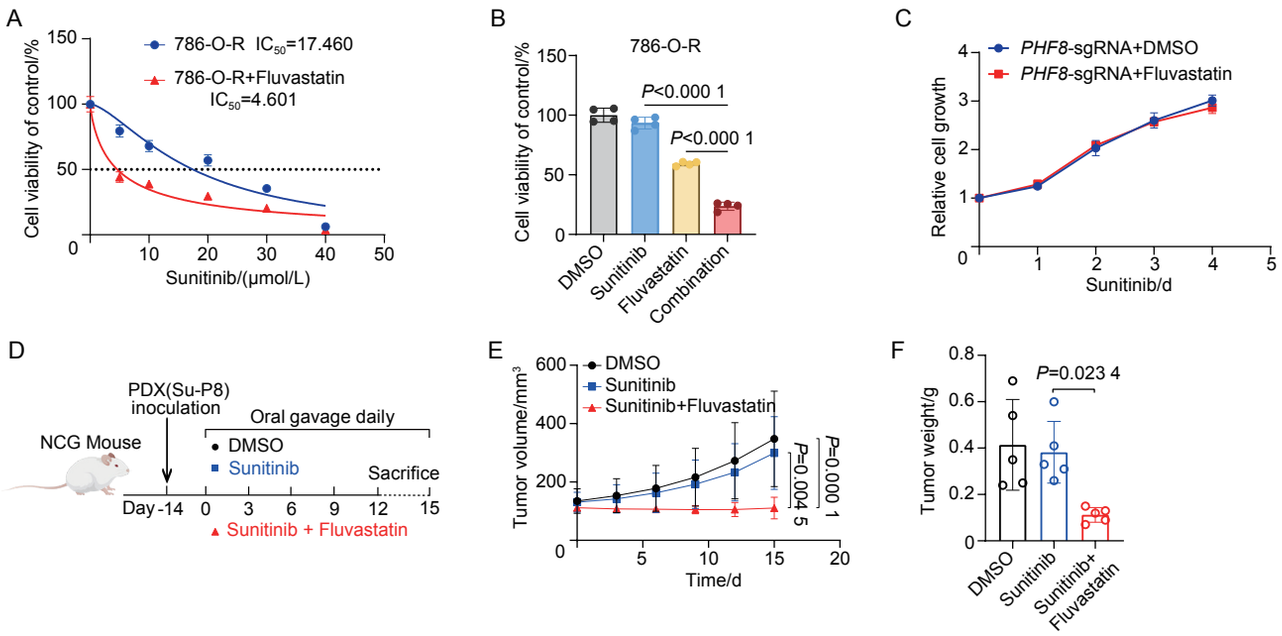
在肿瘤中,PHF8的表达受到缺氧、非编码RNA及泛素化修饰等多方面调控。其中缺氧是最为重要的途径[27]。在本团队前期研究已证实,ccRCC中异常活化的VHL-HIF信号轴可转录上调PHF8,进而促进肾癌脂质沉积[17]。提示PHF8是ccRCC中VHL-HIF的关键下游效应分子。此外,在前列腺癌研究中发现PHF8是响应去势治疗的HIFs重要下游表观因子,在治疗抵抗中具有重要作用[28]。基于上述证据推测,在发生耐药的ccRCC中,PHF8的高表达可能由VHL-HIF轴的活化与TKI靶向药物治疗压力共同介导和维持。此外,作为转录共刺激因子,PHF8通常与转录因子蛋白互作,通过其去甲基化功能调控下游分子表达。既往研究已揭示PHF8可与c-MYC,E2F1,YY1等转录因子互作,调控*TEAD1*、*GLUL*等下游基因进而参与调控肿瘤干性、转移及耐药等多方面的恶性表型[11,17,29]。同时,PHF8参与多个肿瘤的TKI耐药过程。在肝细胞癌中,PHF8可促进细胞自噬,诱导肝癌



A: Virtual screening workflow and molecular docking strategy based on the catalytic binding pocket of PHF8; B: Representative PHF8-targeting candidate compounds identified by virtual screening; C: Sublethal concentrations of the 2 candidate compounds in ccRCC cells (n=4); D: PHF8 protein levels in ccRCC cells treated with the 2 candidate compounds determined by Western blotting; E: H3K9me1 and H3K9me2 levels in ccRCC cells following fluvastatin treatment determined by Western blotting; F: PHF8 protein levels in fluvastatin-treated ccRCC cells with or without mevalonate (MVA) supplementation determined by Western blotting; G: PHF8 mRNA levels in ccRCC cells treated with DMSO or fluvastatin determined by RT-qPCR (n=3); H: Degradation kinetics and half-life of PHF8 protein in ccRCC cells treated with DMSO or fluvastatin determined by cycloheximide (CHX) chase assay (n=3); I: PHF8 protein levels in fluvastatin-treated ccRCC cells following MG132 or chloroquine (CQ) treatment determined by Western blotting; J: Thermal stability of PHF8 in the presence of DMSO or fluvastatin determined by cellular thermal shift assay (CETSA), with quantitative analysis (n=3); K: Binding affinity between fluvastatin and PHF8 determined by surface plasmon resonance (SPR); L: Molecular docking model of the interaction between fluvastatin and PHF8

图6 PHF8候选靶向化合物筛选及氟伐他汀与PHF8的直接结合验证

Figure 6 Screening of candidate PHF8-targeting compounds and validation of the direct interaction between fluvastatin and PHF8



A: Sunitinib IC_{50} values in 786-O-R cells treated with or without fluvastatin determined by CCK-8 assay (n=4); B: Cell viability of 786-O-R cells following treatment with fluvastatin (30 μmol/L) and/or sunitinib (10 μmol/L) determined by CCK-8 assay (*n*=4); C: Relative cell growth of *PHF8*-knockout 786-O-R cells following treatment with sunitinib combined with DMSO or fluvastatin measured by CCK-8 assay (*n*=4); D: Schematic workflow of the combination treatment protocol in the sunitinib-resistant PDX model; E: Tumor volume changes in sunitinib-resistant PDX models receiving different treatments (*n*=5); F: Tumor weights of sunitinib-resistant PDX models in different treatment groups at the experimental endpoint (*n*=5)

图7 ccRCC舒尼替尼耐药模型对氟伐他汀联合舒尼替尼治疗的响应性检测

Figure 7 Response of sunitinib-resistant ccRCC models to combined fluvastatin and sunitinib treatment

索拉非尼耐药[16]。在慢性髓系白血病中,PHF8作为转录辅助因子直接结合BCR::ABL1融合基因启动子,通过改变H3K9me1/2及H3K27me1甲基化水平促进BCR::ABL1转录,从而介导伊马替尼耐药[30]。然而,PHF8在ccRCC舒尼替尼耐药中的具体分子机制及其关键下游靶基因尚不清楚。

在本研究中,本课题组发现PHF8参与ccRCC舒尼替尼耐药过程,并进一步证实PHF8可促进PI3K-AKT信号通路活化,为其介导舒尼替尼耐药提供了新的机制线索。PI3K-AKT信号通路是肿瘤细胞适应靶向治疗压力的重要调控网络,其异常激活已被证实与ccRCC细胞存活、治疗抵抗密切相关。既往研究显示,舒尼替尼耐药RCC细胞中AKT信号可持续活化,而AKT或PI3K/mTOR通路抑制剂能够部分恢复肿瘤细胞对舒尼替尼的敏感性,提示PI3K-AKT信号持续激活是耐药的重要机制之一[31]。进一步研究发现,RRM2可通过稳定ANXA1并激活AKT信号促进RCC细胞舒尼替尼耐药[32],ZDHHC2则可通过增强PI3K-AKT-mTOR信号活性降低ccRCC对舒尼替尼的敏感性[33],结合本研究转录组测序及蛋白水平验证结果,推测PHF8可能通过调控PI3K-AKT信号通路,增强ccRCC在舒尼替尼治疗压力下的生存能力。然而,PHF8激活PI3K-AKT信号的具体分子机制尚未完全明确,其直接结合的染色质区域及关键靶基因仍需进一步通过ChIP-seq、ATAC-seq等技术进行系统解析。

3.3 氟伐他汀靶向PHF8为逆转ccRCC舒尼替尼耐药提供潜在联合治疗策略

他汀类药物作为临床经典的HMG-CoA还原酶抑制剂,主要通过阻断内源性胆固醇合成通路,在高胆固醇血症及心血管疾病的治疗中占据核心地位[34]。近期研究发现,他汀类药物在肿瘤治疗方面具有重要潜力。在乳腺癌、肺癌及胃癌等多个肿瘤中,他汀类药物能够有效抑制肿瘤细胞的干性、增殖、迁移与侵袭,展现出显著的抗肿瘤活性[35-36]。然而在肾癌中,他汀类药物的抗肿瘤效果证据尚存争议。部分临床研究报道,应用他汀类药物可有效抑制肾癌生长,并显著延长患者的无进展生存期[37],但有回顾性队列研究指出,他汀类药物的使用与肾癌患者的临床预后并无显著相关性[38]。这种差异提示,他汀在ccRCC中的疗效可能依赖于特定的分子背景或联合治疗策略。本研究发现,氟伐他汀可促进PHF8蛋白通过泛素-蛋白酶体途径降解,同时,分子对接、SPR及CETSA实验

进一步证实,氟伐他汀可与PHF8蛋白发生直接结合,提示PHF8可能是氟伐他汀发挥抗肿瘤作用的重要直接靶点之一。鉴于PHF8在肾癌中受VHL-HIF轴调控并参与舒尼替尼耐药,进一步验证氟伐他汀与舒尼替尼联合治疗,可增敏耐药ccRCC对舒尼替尼的治疗响应性,而在*PHF8*敲除后,氟伐他汀未表现出明显的增敏作用,提示其逆转舒尼替尼耐药的效应具有PHF8依赖性。由此推断,氟伐他汀可能通过靶向PHF8,削弱其对舒尼替尼耐药的促进作用,从而发挥增敏效应。然而,目前研究结果主要支持氟伐他汀通过与PHF8结合并促进其蛋白降解发挥作用,其是否进一步影响PHF8催化活性及下游转录调控网络仍需深入解析。未来可通过PHF8酶活性检测、结构功能分析及多组学联合研究,进一步明确氟伐他汀对PHF8功能的调控机制。同时,考虑到氟伐他汀可能存在其他潜在作用靶点,其脱靶效应是否参与舒尼替尼增敏过程,仍需结合代谢组学分析及体内验证加以明确。进一步明确氟伐他汀作为PHF8靶向干预策略在ccRCC中的适用条件、安全性,具有重要的临床转化价值。

综上,本研究通过构建舒尼替尼耐药的肾癌PDX及细胞系模型,明确PHF8在耐药肿瘤中显著高表达,并证实其可能通过PI3K-AKT信号通路参与舒尼替尼耐药的调控过程。进一步,通过虚拟筛选联合分子对接技术,发现并鉴定氟伐他汀为PHF8的潜在靶向抑制剂。功能实验表明,氟伐他汀与舒尼替尼联合用药可有效恢复耐药ccRCC对舒尼替尼的敏感性,提示靶向PHF8可能是逆转舒尼替尼耐药的潜在策略。综上所述,本研究揭示PHF8是肾癌舒尼替尼耐药关键调控因子,并为PHF8作为预测舒尼替尼疗效的生物标志物及联合治疗潜在靶点提供了实验依据。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] Han B F, Zheng R S, Zeng H M, *et al*. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47-53. DOI:10.1016/j.jncc.2024.01.006.

[2] Bex A, Abu Ghanem Y, Albiges L, *et al*. European Association of Urology guidelines on renal cell carcinoma: the 2025 update[J]. Eur Urol, 2025, 87(6): 683-696. DOI: 10.1016/j.eururo.2025.02.020.

[3] Richard A G, W. Marston Linehan, Margaret M, *et al*. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma[J]. Nature, 2013, 499(7456): 43-49. DOI: 10.1038/nature12222.

[4] Motzer R J, Hutson T E, Tomczak P, *et al*. Sunitinib versus interferon Alfa in metastatic renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 2007, 356(2): 115-124. DOI: 10.1056/nejmoa065044.

[5] Makhov P, Joshi S, Ghatalia P, *et al*. Resistance to systemic therapies in clear cell renal cell carcinoma: mechanisms and management strategies[J]. Mol Cancer Ther, 2018, 17(7): 1355-1364. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-17-1299.

[6] Jin J, Xie Y H, Zhang J S, *et al*. Sunitinib resistance in renal cell carcinoma: From molecular mechanisms to predictive biomarkers[J]. Drug Resist Updat, 2023, 67: 100929. DOI: 10.1016/j.drup.2023.100929.

[7] Qi H H, Sarkissian M, Hu G Q, *et al*. Histone H4K20/H3K9 demethylase PHF8 regulates zebrafish brain and craniofacial development[J]. Nature, 2010, 466(7305): 503-507. DOI: 10.1038/nature09261.

[8] Liu Q L, Pang J, Wang L A, *et al*. Histone demethylase PHF8 drives neuroendocrine prostate cancer progression by epigenetically upregulating FOXA2[J]. J Pathol, 2021, 253(1): 106-118. DOI:10.1002/path.5557.

[9] Liu Q, Borcherding N C, Shao P, *et al*. Contribution of synergism between PHF8 and HER2 signalling to breast cancer development and drug resistance[J]. EBioMedicine, 2020, 51: 102612. DOI:10.1016/j.ebiom.2019.102612.

[10] Hu Y, Mu H S, Yang Y. Histone demethylase PHF8 promotes cell growth and metastasis of non-small-cell lung cancer through activating Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Histol Histopathol, 2021, 36(8): 869-877. DOI: 10.14670/HH-18-349.

[11] Wang Z, Tang P, Xiao H Y, *et al*. Histone demethylase PHF8 promotes prostate cancer metastasis *via* the E2F1-SNAI1 axis[J]. J Pathol, 2024, 264(1): 68-79. DOI: 10.1002/path.6325.

[12] Moubarak R S, de Pablos-Aragoneses A, Ortiz-Barahona V, *et al*. The histone demethylase PHF8 regulates TGFβ signaling and promotes melanoma metastasis[J]. Sci Adv, 2022, 8(7): eabi7127. DOI:10.1126/sciadv.abi7127.

[13] Feng R, Li Z X, Ge G C, *et al*. NEDD4L represses prostate cancer cell proliferation *via* modulating PHF8 through the ubiquitin-proteasome pathway[J]. Clin Transl Oncol, 2023, 25(1): 243-255. DOI:10.1007/s12094-022-02933-5.

[14] Cai M Z, Wen S Y, Wang X J, *et al*. MYC regulates PHF8, which promotes the progression of gastric cancer by suppressing miR-22-3p[J]. Technol Cancer Res Treat, 2020, 19: 1533033820967472. DOI:10.1177/1533033820967472.

[15] Lv Y, Shi Y, Han Q L, *et al*. Histone demethylase PHF8 accelerates the progression of colorectal cancer and can be regulated by miR-488 *in vitro*[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4): 4437-4444. DOI:10.3892/mmr.2017.7130.

[16] Tao H S, Zhang Y X, Li J, *et al*. Oncogenic lncRNA BBOX1-AS1 promotes PHF8-mediated autophagy and elicits sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Ther Oncolytics, 2023, 28: 88-103. DOI: 10.1016/j.omto.2022.12.005.

[17] Peng S, Wang Z, Tang P, *et al*. PHF8-GLUL axis in lipid deposition and tumor growth of clear cell renal cell carcinoma[J]. Sci Adv, 2023, 9(31): eadf3566. DOI: 10.1126/sciadv.adf3566.

[18] Lin A, Giuliano C J, Palladino A, *et al*. Off-target toxicity is a common mechanism of action of cancer drugs undergoing clinical trials[J]. Sci Transl Med, 2019, 11(509): eaaw8412. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaw8412.

[19] Wang Q, Ma S, Song N, *et al*. Stabilization of histone demethylase PHF8 by USP7 promotes breast carcinogenesis[J]. J Clin Invest, 2016, 126(6): 2205-2220. DOI: 10.1172/JCI85747.

[20] Wang Y X, Liu X L, Gong L Y, *et al*. Mechanisms of sunitinib resistance in renal cell carcinoma and associated opportunities for therapeutics[J]. Bri J Pharmacol, 2023, 180(23): 2937-2955. DOI: 10.1111/bph.16252.

[21] Wang Y Z, Liu B, Zhuang Y X, *et al*. USP20 governs tyrosine kinase inhibitors resistance through ferroptosis evasion by targeting GPX4 in cancers[J]. Redox Biol, 2026, 92: 104086. DOI: 10.1016/j.redox.2026.104086.

[22] Liu S W, Li J H, Zhang J Y, *et al*. IKBKE regulates renal cell carcinoma progression and sunitinib resistance through the RRM2-AKT pathway[J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(15): 6146-6161. DOI: 10.7150/ijbs.102666.

[23] Lu D H, Li Y X, Niu X Y, *et al*. STAT2/SLC27A3/PINK1-mediated mitophagy remodeling lipid metabolism contributes to pazopanib resistance in clear cell renal cell carcinoma[J]. Research (Wash D C), 2024, 7: 0539. DOI: 10.34133/research.0539.

[24] Liu W T, Yan B, Yu H X, *et al*. OTUD1 stabilizes PTEN to inhibit the PI3K/AKT and TNF-alpha/NF-kappaB signaling pathways and sensitize ccRCC to TKIs[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(4): 1401-1414. DOI: 10.7150/ijbs.68980.

[25] Chen K L, Zhang Y P, Ruan H L, *et al*. PRKAB2 as a tumor suppressor in renal cell carcinoma: inhibiting mitophagy *via* the LRPPRC-PRKN/parkin interaction and cardiolipin biosynthesis[J]. Autophagy, 2026, 22(5): 982-1002. DOI: 10.1080/15548627.2026.2623985.

[26] Khanna P, Soh H J, Chen C H, *et al*. ACE2 abrogates tumor resistance to VEGFR inhibitors suggesting angiotensin-(1-7) as a therapy for clear cell renal cell carcinoma[J]. Sci Transl Med, 2021, 13(577): eabc0170. DOI: 10.1126/scitranslmed.abc0170.

[27] Maina P K, Shao P, Jia X F, *et al*. Histone demethylase PHF8 regulates hypoxia signaling through HIF1α and H3K4me3[J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2017, 1860(9): 1002-1012. DOI: 10.1016/j.bbagrm.2017.07.005.

[28] Tong D, Liu Q, Liu G, *et al*. The HIF/PHF8/AR axis promotes prostate cancer progression[J]. Oncogenesis, 2016, 5(12): e283. DOI: 10.1038/oncsis.2016.74.

[29] Wu X N, Li J Y, He Q, *et al*. Targeting the PHF8/YY1 axis suppresses cancer cell growth through modulation of ROS[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2024, 121(2): e2219352120. DOI: 10.1073/pnas.2219352120.

[30] Feng H M, Fu Y, Cui Z L, *et al*. Histone demethylase PHF8 facilitates the development of chronic myeloid leukaemia by directly targeting BCR: : ABL1[J]. Br J Haematol, 2023, 202(6): 1178-1191. DOI: 10.1111/bjh.18983.

[31] Makhov P B, Golovine K, Kutikov A, *et al*. Modulation of Akt/mTOR signaling overcomes sunitinib resistance in renal and prostate cancer cells[J]. Mol Cancer Ther. 2012 Jul; 11(7): 1510-7. pii: 1535-7163.MCT-11-0907. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0907.

[32] Xiong W, Zhang B, Yu H, *et al*. RRM2 Regulates sensitivity to sunitinib and PD-1 blockade in renal cancer by stabilizing ANXA1 and activating the AKT pathway[J]. Adv Sci (Weinh). 2021 Sep; 8(18): e2100881. DOI: 10.1002/advs.202100881.

[33] Sun Y, Zhu L, Liu P, *et al*. ZDHHC2-mediated AGK palmitoylation activates AKT-mTOR signaling to reduce sunitinib sensitivity in renal cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2023, 83(12): 2034-2051. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-22-3105.

[34] Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, *et al*. Fluvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction[J]. Circulation, 2002, 105(7): 868-873. DOI: 10.1161/hc0702.104164.

[35] Di Bello E, Zwergel C, Mai A, *et al*. The innovative potential of statins in cancer: new targets for new therapies[J]. Front Chem, 2020, 8: 516. DOI: 10.3389/fchem.2020.00516.

[36] Budman D R, Tai J L, Calabro A. Fluvastatin enhancement of trastuzumab and classical cytotoxic agents in defined breast cancer cell lines *in vitro*[J]. Breast Cancer Res Treat, 2007, 104(1): 93-101. DOI: 10.1007/s10549-006-9395-5.

[37] McKay R R, Lin X, Albiges L, *et al*. Statins and survival outcomes in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. Eur J Cancer, 2016, 52: 155-162. DOI: 10.1016/j.ejca.2015.10.008.

[38] Nayan M, Finelli A, Jewett M A S, *et al*. Statin use and kidney cancer outcomes: a propensity score analysis[J]. Urologic Oncol Semin Orig Investig, 2016, 34(11): 487.e1-487.e6. DOI: 10.1016/j.urolonc.2016.06.007.

(收稿:2026-06-18;修回:2026-08-28)

(编辑 严 涵)