DOI:10.16016/j.2097-0927.202408106

DNA 解旋酶 PIF1 调控卵巢癌细胞增殖和 DNA 损伤

周琦银[1],郭佳林[2],孙晴晴[2],王晓敏[2],胡紫薇[2],潘巍巍[2] 310053 杭州,浙江中医药大学基础医学院[1];314001 浙江 嘉兴,嘉兴大学医学院[2]

[摘要] **目的** 探究 DNA 解旋酶 PIF1 在卵巢癌细胞增殖和 DNA 损伤中的作用及机制。**方法** 通过基因表达谱交互式分析平台(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)和 Kaplan-Meier Plotter 公共数据库分析 *PIF*1 基因在正常卵巢组织和卵巢癌组织中的相对表达量,以及 *PIF*1 表达量和卵巢癌患者总生存率的关系。通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 PIF1 敲除的卵巢癌细胞。构建 Rad51 重组酶(Rad51 recombinase, Rad51)过表达的反转录病毒载体,进行 PIF1 敲除的 ES-2 卵巢癌细胞转染。采用 Western blot 评估 PIF1 敲除和 Rad51 过表达的效果;通过细胞计数、克隆形成实验和 CCK-8 评估细胞的增殖能力。选取 32 只 6~8 周龄 BALB/c 雌性裸鼠(体质量 20~25 g),按随机数字表法分为 4 组($n=8$):ES-2 对照组、ES-2 敲除组、OVCAR-3 对照组和 OVCAR-3 敲除组,建立小鼠荷瘤模型评估卵巢癌细胞在体内的增殖能力。通过流式细胞术评估细胞的凋亡率和细胞周期;采用 β-半乳糖苷酶活性检测评估卵巢癌细胞的衰老情况。应用 Western blot 和免疫荧光检测磷酸化组蛋白 H2AX(phosphorylated histone H2AX, γ-H2AX)的变化,评估 PIF1 敲除以及过表达 Rad51 对 DNA 损伤的影响,并检测 PIF1 和 Rad51 在卵巢癌细胞中的定位。**结果** 公共数据库分析结果显示,*PIF*1 过表达与患者的总体生存率呈负相关($P<0.001$);且相比较正常卵巢组织,*PIF*1 在卵巢癌组织中过表达($P<0.05$)。CRISPR/Cas9 技术介导的 PIF1 敲除可显著抑制卵巢癌细胞的增殖($P<0.01$)和克隆能力($P<0.001$),且在小鼠体内也得到验证($P<0.05$)。流式细胞术显示,PIF1 敲除促进卵巢癌细胞凋亡($P<0.01$),阻滞细胞周期($P<0.01$)。此外,β-半乳糖苷酶活性检测结果显示,PIF1 敲除促进卵巢癌细胞衰老($P<0.001$)。Western blot 和 CCK-8 结果进一步显示,PIF1 敲除促进卵巢癌细胞 γ-H2AX 蛋白表达增加($P<0.05$),并且抑制顺铂处理后的卵巢癌细胞的增殖能力($P<0.05$)。在 PIF1 敲除的卵巢癌细胞中,Rad51 表达减少。而在 PIF1 缺失的细胞中过表达 Rad51 蛋白后 PIF1 表达增加,γ-H2AX 蛋白表达减少($P<0.05$),并且挽救细胞增殖($P<0.01$)。免疫荧光显示,EGFP-PIF1 和 Rad51 在细胞核内共定位。**结论** PIF1 和 Rad51 共同调控卵巢癌细胞的 DNA 损伤和细胞增殖。

[关键词] 卵巢癌; PIF1; DNA 损伤; 抗药性; Rad51 重组酶
[中图法分类号] R345; R730.23; R737.31 [文献标志码] A

DNA helicase PIF1 regulates cell proliferation and DNA damage in ovarian cancer

ZHOU Qiyin[1], GUO Jialin[2], SUN Qingqing[2], WANG Xiaomin[2], HU Ziwei[2], PAN Weiwei[2] [1]School of Basic Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang Province, 310053; [2]School of Medicine, Jiaxing University, Jiaxing, Zhejiang Province, 314001, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and mechanism of the DNA helicase PIF1 in the proliferation of ovarian cancer cells and its response to DNA damage. **Methods** The relative expression of the *PIF*1 gene in normal ovarian tissue compared to ovarian cancer tissue, as well as the relationship between

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31871402);浙江省自然科学基金(LGD22H030004);"创新嘉兴·优才支持计划"先锋型创新团队资助的课题(2021-08)

[通信作者] 潘巍巍,E-mali: wwpan@mail.zjxu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

*PIF*1 expression and overall survival in ovarian cancer patients, was analyzed using the Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) and Kaplan-Meier Plotter public databases. PIF1 knockout ovarian cancer cells were established using CRISPR/Cas9 gene-editing technology. A retroviral vector overexpressing Rad51 recombinase was constructed, and then transfected into PIF1 knockout ES-2 ovarian cancer cells. Western blot analysis was used to determine the effects of PIF1 knockout and Rad51 overexpression in the transfected cells. Cell proliferation was assessed with cell counting, colony formation assay and CCK-8 assay. A total of 32 female BALB/c nude mice (6~8 weeks old, weighing 20~25 g) were randomly divided into ES-2 control group, ES-2 knockout group, OVCAR-3 control group, and OVCAR-3 knockout group, with 8 mice in each group. A mouse xenograft model was established to assess the *in vivo* proliferative capacity of ovarian cancer cells. Apoptotic rate and cell cycle were assessed using flow cytometry. The senescence of ovarian cancer cells was evaluated through a β-galactosidase activity assay. Western blotting and immunofluorescence assay were applied to determine the changes in phosphorylated histone H2AX (γ-H2AX) protein were measured with to evaluate the effects of PIF1 knockout and Rad51 overexpression on DNA damage and to observe the localization of PIF1 and Rad51 in ovarian cancer cells. **Results** The analysis of public databases revealed that *PIF*1 overexpression was negatively correlated with the overall survival of patients ($P<0.001$), and *PIF*1 was found to be overexpressed in the ovarian cancer tissues than the normal ovarian tissues ($P<0.05$). CRISPR/Cas9-mediated knockout of PIF1 significantly inhibited the proliferation ($P<0.01$) and clonogenic ability ($P<0.001$) of ovarian cancer cells, which was also validated in mouse model ($P<0.05$). Flow cytometry indicated that PIF1 knockout promoted apoptosis ($P<0.01$) and induced cell cycle arrest ($P<0.01$) in ovarian cancer cells. In addition, β-galactosidase activity assay demonstrated that PIF1 knockout enhanced cellular senescence ($P<0.001$). Western blot and CCK-8 assays further revealed that PIF1 knockout increased the expression of γ-H2AX protein ($P<0.05$) and suppressed the proliferative capacity of ovarian cancer cells following cisplatin treatment ($P<0.05$). In PIF1 knockout ovarian cancer cells, Rad51 expression was diminished. However, overexpression of Rad51 in PIF1-deficient cells restored PIF1 expression, decreased γ-H2AX protein level ($P<0.05$), and rescued cell proliferation ($P<0.01$). Immunofluorescence assay demonstrated that EGFP-PIF1 and Rad51 were co-localized in the nucleus. **Conclusion** PIF1 and Rad51 collaboratively regulate DNA damage and cell proliferation in ovarian cancer cells.

[**Key words**] ovarian canser; PIF1; DNA damage; drug resistance; Rad51 recombinase

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31871402), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LGD22H030004), and the Pioneer Innovation Team Project of *Innovative Jiaxing · Talent Support Plan* (2021-08). Corresponding author: PAN Weiwei, E-mail: wwpan@mail.zjxu.edu.cn

卵巢癌是常见的妇科恶性肿瘤,早期无特异症状且缺乏有效筛查的方法[1],因此,卵巢癌的发病率和病死率居高不下。根据世界卫生组织的数据,2022 年全球约有 324 603 新发病例和 206 956 死亡病例。卵巢癌的传统治疗方法包括手术干预和辅助化疗,化疗通常使用含铂药物(如卡铂)和紫杉醇类药物(如紫杉醇)。然而,卵巢癌治疗过程中出现的药物耐药性常限制各种治疗方法的疗效。耐药产生的原因较多,包括药物外排蛋白介导的细胞内药物积累的减少、凋亡途径的改变、DNA 修复能力的增强,以及肿瘤干细胞的诱导作用等[2],其中 DNA 损伤修复能力增强可能是主要原因[3-4]。因此,许多研究将 DNA 修复缺陷作为治疗卵巢癌的关键靶点[5]。

DNA 解旋酶 PIF1 是解旋酶超家族 1 的成员,沿单链 DNA 从 5′-3′方向解旋双链 DNA[6],具有促进复制叉进展的作用[7]。此外,PIF1 促进冈崎片段的合成[8],在维持线粒体基因组稳定性[9]和 DNA 损伤修复中起关键作用。PIF1 参与断裂诱导复制[7]和 DNA 双链断裂的同源重组修复过程,并通过与乳腺癌 1 号基因(breast cancer 1, BRCA1)相互作用,以增强 G4 链体结构的去除[10]。PIF1 在多种生物体中调控端粒酶活性[11-13]。在人体中,PIF1 与端粒酶反转录酶的相互作用促进了宫颈癌细胞的增殖[14]。PIF1 在多种癌症中表达上调,如肾透明细胞癌[15]和胰腺癌[16]。并且,PIF1 低表达与神经母细胞瘤患者的良好预后相关[17]。PIF1 敲低促进肺腺癌中的铁死亡[18],其缺失

显著增加了肿瘤细胞对许多化疗药物的敏感性[16, 19-20]。因此,我们推测,PIF1 在卵巢癌中可能起着重要作用,或可作为潜在的化疗靶点。但 PIF1 在卵巢癌增殖及耐药中的作用尚不明确,因此,本研究探讨 PIF1 对卵巢癌细胞增殖和顺铂耐药的影响及其调控机制,以及 PIF1 与构建 Rad51 重组酶(Rad51 recombinase, Rad51)之间的相互作用,旨在揭示 PIF1 在卵巢癌细胞增殖和 DNA 损伤修复中的作用,为开发新的卵巢癌治疗策略提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

将 32 只 6~8 周龄 BALB/c 雌性裸鼠,体质量 20~25 g,按随机数字表法分为 4 组(n=8):ES-2 对照组、ES-2 敲除组、OVCAR-3 对照组和 OVCAR-3 敲除组。所有裸鼠购自中国江苏集萃药康生物科技公司,按照国家动物福利条例饲养在 SPF 级动物房中,实验操作严格遵循《国际动物实验指南》,并得到了嘉兴大学医学院实验动物伦理委员会的伦理批准(JUMC2020-069)。乙醚麻醉小鼠后,皮下注射卵巢癌细胞(单次注射 5×10^6 个细胞)至小鼠右侧背部为对照组,皮下注射敲除 PIF1 的卵巢癌细胞(单次注射 5×10^6 个细胞)至小鼠右侧背部为敲除组。使用游标卡尺每 2 天测量 1 次肿瘤体积。当肿瘤直径超过 15 mm 时,通过麻醉后,以颈椎脱臼法处死小鼠。

1.2 实验材料

人卵巢癌组织芯片购自中国桂林泛谱有限公司,芯片详细信息见 Pantomics 网站(https://www.pantomics.com/tissue-arrays-product/ovc1021);于 2020 年 5 月至 2023 年 5 月在嘉兴大学附属医院妇科采集 7 例浆液性卵巢癌组织[年龄(54.9±12.3)岁]和 3 例癌旁组织[年龄(52.7±12.2)岁],其中,编号 NT-1、NT-2、NT-3 为癌旁组织,编号 CT-1、CT-2、CT-3、CT-4、CT-5、CT-6、CT-7 为浆液性卵巢癌组织(表 1),研究方案已由嘉兴大学附属医院伦理委员会批准(LS2020-148);人类卵巢癌细胞系(A2780、HO-8910、ES-2、SKOV3 和 OVCAR-3)及人类胚胎肾细胞系(293T)均购自美国标准生物品收藏中心;人类卵巢上皮细胞系 IOSE 由浙江大学的范衡宇博士提供;siRNA 由中国吉玛基因生物公司合成;细胞周期蛋白 B1(cyclin B1)、Ki-67 抗原(Ki-67 antigen, Ki-67)、周期素依赖激酶抑制剂 p21(cyclin-dependent kinase inhibitor p21, p21)、周期素依赖激酶抑制剂 p27(cyclin-dependent kinase inhibitor p27, p27)、聚 ADP 核糖聚合酶类(poly ADP-ribose polymerase, PARP)、p-Chk1(Ser317)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、磷酸化组蛋白 H2AX(phosphorylated histone H2AX, γ-H2AX)、周期检测点激酶 2(checkpoint kinase 2, Chk2)、周期检测点激酶 1(checkpoint kinase 1, Chk1)、共济失调性毛细血管扩张突变蛋白质类(ataxia telangiectasia mutated proteins, ATM)、H2AX、溴脱氧尿苷(bromodeoxyuridine, BrdU)和 p-ATM(Ser1981)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;PIF1、Rad51、p-Chk2(Thr68)和乳腺癌 2 号基因(breast cancer 2, BRCA2)抗体购自英国 Abcam 公司;GAPDH 和 β-actin 抗体购自中国 BIOKER 公司;纤溶酶原激活物抑制因子-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)和层粘连蛋白 B1(lamin B1)抗体购自美国 Proteintech 公司。

1.3 细胞培养和 CRISPR/Cas9 基因编辑技术

细胞在 10% FBS 和 1%青-链霉素的 DMEM 高糖培养基中培养。通过 CRISPR/Cas9 技术生成 PIF1 部分缺失的卵巢癌细胞。中国上海生工生物公司合成靶向人类 PIF1 的向导 RNA。使用慢病毒介导的转染法将质粒导入 ES-2 和 OVCAR-3 卵巢癌细胞。转染 24 h 后,用 2 μg/mL 的嘌呤霉素处理细胞 3 d。在转染后的 ES-2 和 OVCAR-3 卵巢癌细胞中各筛选 2 个 PIF1 部分敲除的克隆,分别命名为 ES-2 敲除-1、ES-2 敲除-2、OVCAR-3 敲除-1 和 OVCAR-3 敲除-2,未敲除 PIF1 的卵巢癌细胞作为对照,使用 Western blot 验证敲除效率。

表 1 临床病例的基本信息 [$\bar{x}\pm s$,例(%)]

指标	浆液性卵巢癌组(n=7)
年龄/岁	54.9±12.3
病理分级	
Ⅰ	2(28.6)
Ⅱ	1(14.3)
Ⅱ~Ⅲ	3(42.9)
Ⅲ	1(14.3)
T 分期	
T1	3(42.9)
T2	3(42.9)
T3	1(14.3)
N 分期	
N0	7(100.0)
N1	0(0)
M 分期	
M0	7(100.0)
M1	0

1.4 细胞计数和克隆形成实验

将细胞以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种在 6 孔板中。种板后的 24、48 和 72 h 对每孔细胞计数 3 次。

在克隆形成实验中,6孔板各孔中加入1.5 mL的下层琼脂(浓度为0.5%)和1.5 mL的上层琼脂(浓度为0.35%),每孔接种2 500个细胞,每2天换1次培养基。细胞培养21 d后,使用溶于PBS的结晶紫溶液(浓度为0.5%)染色以定量分析克隆数。

1.5 Western blot实验

Western和IP裂解缓冲液裂解细胞,裂解产物以4 ℃、12 000×*g*离心20 min,通过BCA试剂盒(中国碧云天公司)测定蛋白浓度。蛋白质在95 ℃下变性5 min。随后,使用SDS-PAGE凝胶分离20 μg的蛋白样品,然后凝胶上的蛋白转移到PVDF膜上。膜在室温下用5%牛奶封闭1 h,孵育一抗于4 ℃过夜(除PIF1抗体浓度为1∶1 000外,其余一抗浓度均为1∶2 000),然后在室温下用辣根过氧化物酶偶联的二抗孵育1 h(浓度1∶5 000)。PVDF膜使用ECL化学发光液后曝光成像,使用Image J软件进行灰度分析。

1.6 免疫组化实验

组织被保存在4%的多聚甲醛溶液中过夜。固定后,组织用浓度梯度增加的乙醇进行脱水处理。使用二甲苯替换乙醇,最后将组织包埋在石蜡中。石蜡包埋的组织块被切成5 μm厚的切片。脱蜡后的切片在0.3%的过氧化氢中处理10 min以抑制内源性过氧化物酶活性。抗原修复使用pH值为6.0的10 mmol/L柠檬酸钠缓冲液孵育15 min。切片分别在4 ℃下过夜孵育PIF1(浓度1∶150)、γ-H2AX(浓度1∶400)、BrdU(浓度1∶200)和Rad51(浓度1∶125)一抗。生物素标记和过氧化物酶偶联的二抗(浓度1∶200)孵育切片30 min。使用Vectastain ABC试剂盒和3,3'-二氨基联苯胺过氧化物酶底物试剂盒对切片进行染色。

1.7 BrdU标记实验

配制30 mg/mL的BrdU无菌溶液(溶于无菌水),对裸鼠进行腹腔注射(注射浓度为100 mg/kg),1 h后麻醉裸鼠,以颈椎脱臼法处死,取出待检测的组织进行后续的免疫组化实验。

1.8 卵巢癌组织芯片分析

对人卵巢癌组织芯片进行免疫组化分析以评估PIF1表达(PIF1蛋白表达得分=阳性细胞比例×染色强度)。阳性细胞比例的评分标准:0分表示无阳性细胞,1分表示0%~25%的阳性细胞,2分表示>25%~50%的阳性细胞,3分表示>50%~75%的阳性细胞,4分表示>75%~100%的阳性细胞。染色强度的评分为:0分表示无染色,1分表示弱染色,2分表示中等染色,3分表示强染色。根据上述条件计算得到的最终分数分为4个等级:0分为无表达,1~3分为弱表达,4~7分为中等表达,8~12分为高表达。

1.9 RT-qPCR实验

收集细胞后使用TRIzol试剂提取总RNA,然后使用PrimeScript RT试剂盒(日本TaKaRa公司)反转录RNA为cDNA,最后使用TB Green Master Mix试剂盒(日本TaKaRa公司)在Realplex2 PCR设备(德国Eppendorf公司)上进行RT-qPCR。以*GAPDH*作为管家基因使用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算*p*53、*MDM*2和*Rad*51 mRNA的相对表达,引物由中国上海生工生物公司合成。

1.10 流式细胞术

对于细胞凋亡检测,收集1×10^6个细胞,细胞和FITC-Annexin V凋亡检测试剂在暗处共同孵育15 min,然后使用流式细胞仪分析细胞的凋亡率。对于细胞周期分析,收集1×10^6个细胞,并在4 ℃下用70%乙醇孵育过夜。随后,细胞通过离心后弃上清,并用PBS洗涤2次。之后,将细胞置于500 μL PI/RNase染色缓冲液中,在37 ℃避光孵育30 min,然后使用流式细胞仪进行分析,数据分析使用ModFit软件。

1.11 衰老相关β-半乳糖苷酶活性的检测

细胞分别以1×10^5个/孔接种在12孔板中过夜培养。细胞贴壁后用PBS洗涤细胞,按照β-半乳糖苷酶染色试剂盒(中国碧云天公司)的说明书,使用衰老试剂染色。使用倒置显微镜获取图像,计算这些区域内染成蓝色的衰老细胞数量,其占总体细胞数的比例为衰老率。

1.12 免疫荧光和共定位实验

为进行免疫荧光分析,细胞以5×10^4个/孔接种在24孔板中。PBS洗涤细胞后,用4%多聚甲醛孵育30 min固定细胞。再用5%牛血清白蛋白溶液封闭1 h。γ-H2AX(浓度1∶200)、Ki-67(浓度1∶400)和Rad51(浓度1∶80)抗体在4 ℃下孵育过夜。洗涤后,与Alexa488或Alexa594偶联的二抗(浓度1∶200)在室温孵育1 h,并用DAPI染色细胞核。为了进行免疫荧光共定位分析,将携带增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的PIF1质粒和EGFP空载体分别转染到细胞中。孵育36 h后,按照上述方法固定细胞并用DAPI染色。使用激光共聚焦扫描显微镜采集数字图像,应用Image J软件进行定量分析。

1.13 Rad51过表达细胞的构建

使用特定引物从卵巢癌细胞系ES-2中克隆的人Rad51 cDNA插入pQCXIH空载体,并由中国上海生工生物公司测序验证。为构建Rad51过表达细胞,将293T细胞分别与pQCXIH空载体或pQCXIH-Rad51、Retro VSVG和Retro GPE质粒共同使用PolyJet™转染试剂在无血清培养基中转染。48 h后,收集反转录病毒上清液,加入5 μg/mL Polybrene,经孔径为0.45 μm

的过滤器过滤后,用于感染 PIF1 部分缺失的 ES-2 细胞。感染 48 h 后,用 200 μg/mL 潮霉素培养基筛选细胞 3 d。Rad51 过表达的卵巢癌细胞为过表达组,通过 Western blot 检测过表达效果。

1.14　CCK-8 检测

将 3 000 个细胞重悬于 200 μL 培养基中,接种至 96 孔板。细胞贴壁后,用梯度浓度顺铂处理 24 h。每孔加入 10 μL CCK-8 试剂和 100 μL 培养基,在培养箱内孵育 1~4 h,450 nm 波长下测光密度值[D(450)]。

1.15　数据库分析

使用 Kaplan-Meier plotter 数据库(http://kmplot.com/analysis)在线分析卵巢癌患者中 *PIF1* mRNA 表达与生存率的关系,结果以风险比(hazard ratio, HR)和对数秩检验(logrank test)P 值表示。通过基因表达谱交互式分析平台(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)数据库(http://gepia.cancer-pku.cn/)分析 *PIF1* 基因在卵巢癌组织(n=426)与正常卵巢组织(n=88)中的相对表达量。使用 UALCAN 数据库(http://ualcan.path.uab.edu/)分析 *PIF1* 基因在病理分级Ⅲ级(n=262),病理分级Ⅱ级(n=32)和病理分级Ⅰ级(n=1)的卵巢癌组织中的相对表达量。

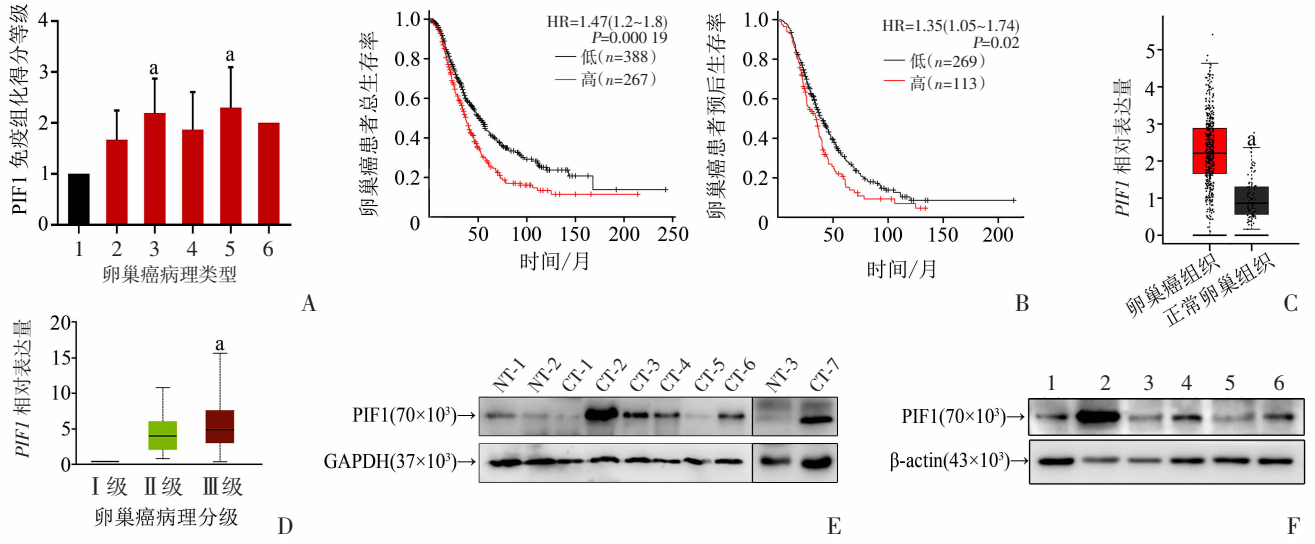
1.16　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,非正态分布的数据采用非参数检验分析。多组比较采用单因素方差分析,两组比较采用独立样本 t 检验。使用 GraphPad Prism 9.0 软件统计分析,P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　PIF1 的过表达与卵巢癌的病理分级呈正相关,并与总体生存率呈负相关

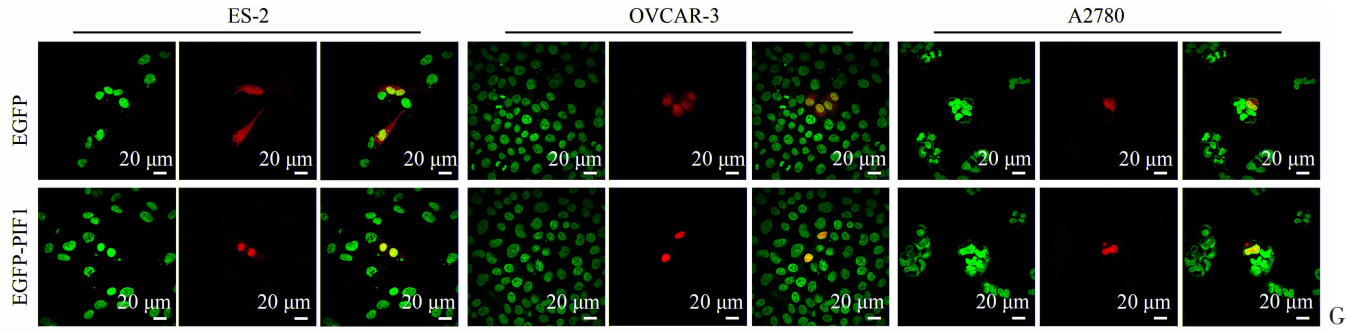
免疫组化检测 PIF1 在人卵巢癌组织芯片中的表达水平。结果显示,浆液性囊腺癌和子宫内膜样癌中 PIF1 的表达显著高于正常卵巢组织中 PIF1 的表达(P<0.05,图 1A)。Kaplan-Meier 分析显示,*PIF1* 高表达与患者总体生存率和预后呈负相关(P<0.05,图 1B)。GEPIA 数据库分析结果显示,卵巢癌组织中 *PIF1* 表达相对于正常组织显著上调(P<0.05,图 1C)。此外,UALCAN 数据库结果发现,随着卵巢癌病理分级增加,*PIF1* 表达量也增多(P<0.001,图 1D)。Western blot 检测进一步验证了卵巢癌组织中 PIF1 表达量明显高于卵巢癌癌旁组织(图 1E)。Western blot 检测结果显示,人卵巢癌细胞系(SKOV3、A2780、OVCAR-3 和 ES-2)中 PIF1 的表达量明显高于人类卵巢上皮细胞 IOSE 中 PIF1 的表达量(图 1F)。此外,免疫荧光分析显示,EGFP-PIF1 定位于卵巢癌细胞核中(图 1G)。以上结果提示,PIF1 在人卵巢癌组织和卵巢癌细胞中高度表达,并且其表达水平与卵巢癌病理分级和患者生存率密切相关。



A: PIF1 在人卵巢癌组织芯片中的免疫组化得分等级　1:正常卵巢;2:良性腺瘤;3:浆液性囊腺癌;4:黏液性囊腺癌;5:子宫内膜样癌;6:透明细胞癌;a: P<0.05,与正常卵巢组比较; B: *PIF1* 基因高表达组与 *PIF1* 基因低表达组的总生存率、预后生存率比较; C: GEPIA 数据库分析 *PIF1* 基因在正常卵巢组织和卵巢癌组织中的相对表达量　a: P<0.05,与卵巢癌组织比较; D: UALCAN 数据库分析 *PIF1* 与卵巢癌病理分级的相关性　a: P<0.001,与病理分级Ⅱ级比较;E: Western blot 检测临床卵巢癌组织和癌旁组织中 PIF1 蛋白的表达; F: Western blot 检测人类卵巢癌细胞和人类卵巢上皮细胞中 PIF1 蛋白的表达　1:IOSE;2:SKOV3;3:A2780;4:ES-2;5:HO-8910;6:OVCAR-3

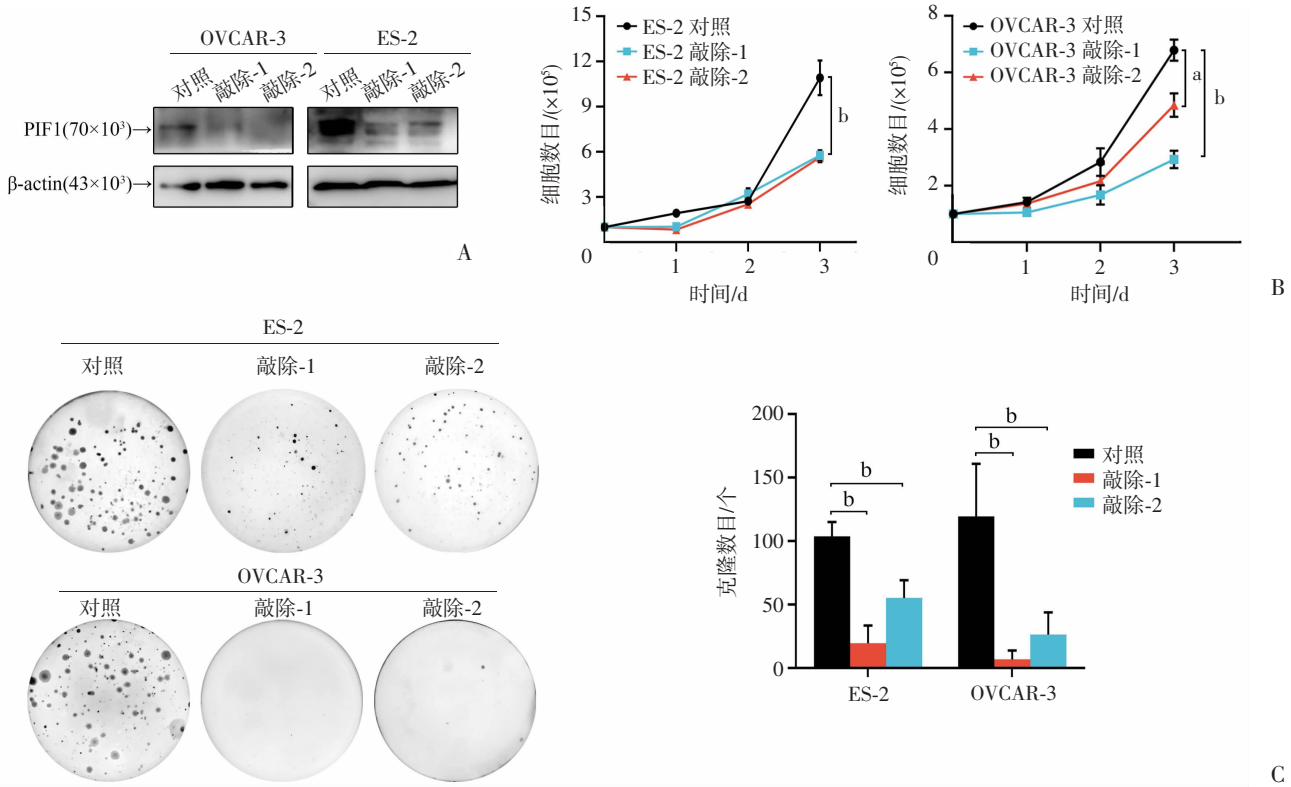
图 1　PIF1 在卵巢癌组织和细胞中的表达水平

(图 1G 续下页)



G:免疫荧光检测 EGFP-PIF1 在人类卵巢癌细胞中的定位 蓝色:细胞核, 绿色:EGFP 或 EGFP-PIF1

续图 1 PIF1 在卵巢癌组织和细胞中的表达水平



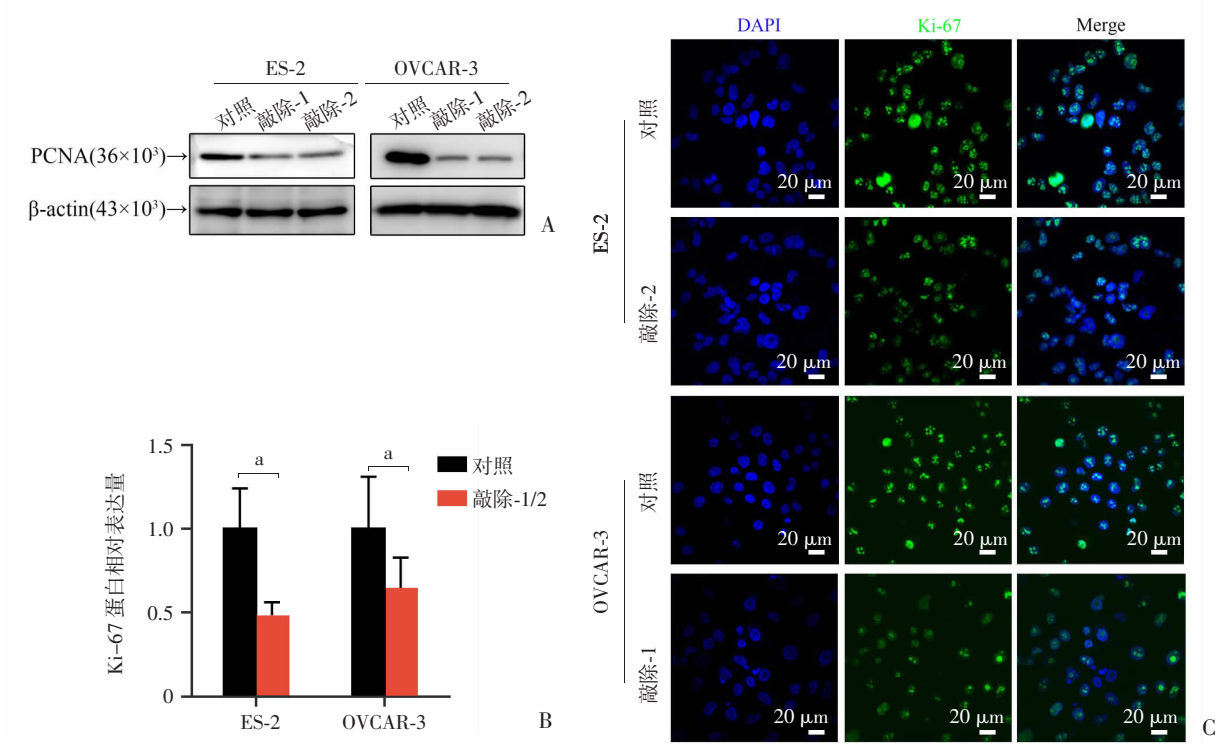
a: $P<0.01$, b: $P<0.001$

A: Western blot 检测各组卵巢癌细胞中 PIF1 敲除效果; B: 细胞计数实验检测各组卵巢癌细胞的增殖能力; C:克隆形成实验检测各组卵巢癌细胞的增殖能力

图 2 PIF1 对卵巢癌细胞增殖的影响

2.2 敲除 PIF1 抑制卵巢癌细胞的增殖和克隆形成

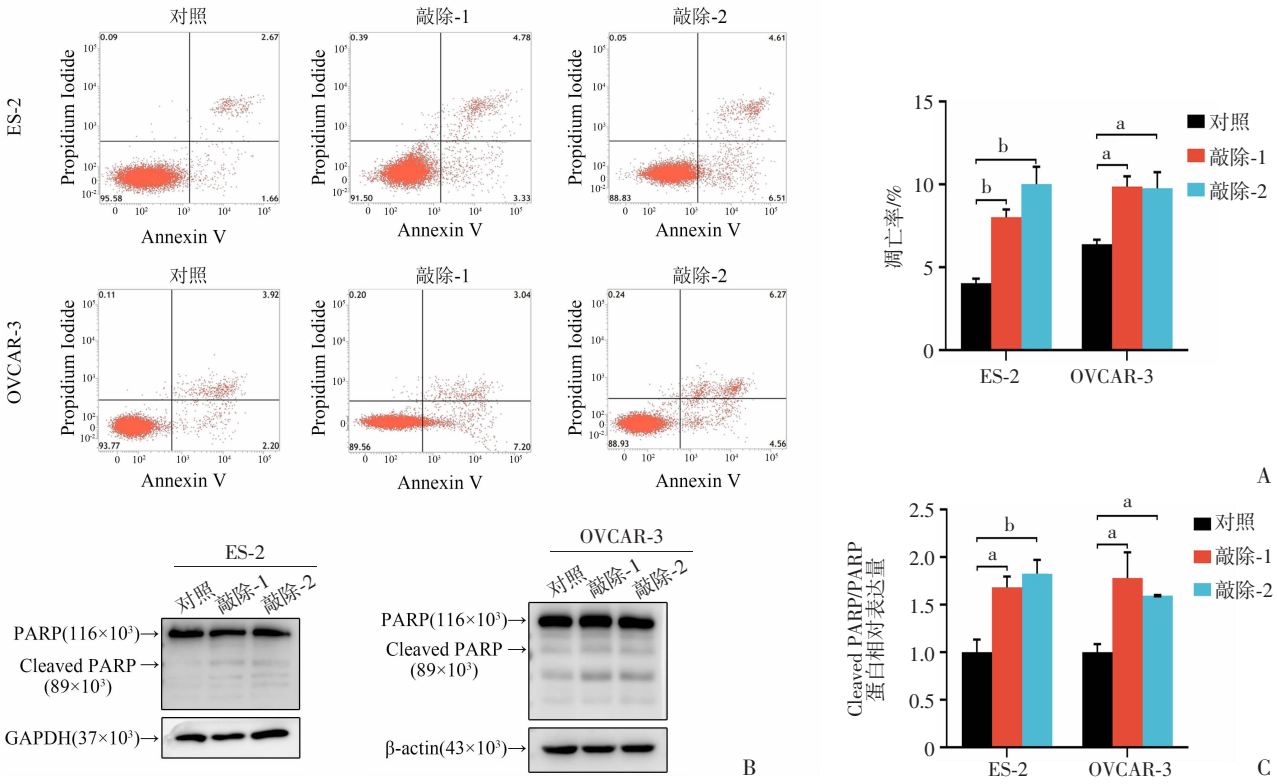
为研究 PIF1 对卵巢癌细胞增殖的影响,使用 CRISPR/Cas9 技术敲除卵巢癌细胞系 ES-2 和 OVCAR-3 中的 PIF1(图 2A)。实验结果表明,PIF1 敲除明显抑制细胞增殖($P<0.01$,图 2B)和克隆形成($P<0.001$,图 2C)。Western blot 和免疫荧光检测发现,PIF1 敲除下调 PCNA(图 3A)和 Ki-67 的表达($P<0.01$,图 3B、C)。流式细胞术检测发现,细胞凋亡率增加($P<0.01$,图 4A),且 PIF1 敲除后 Cleaved PARP/PARP 表达上调($P<0.01$,图 4B、C)。这些结果表明,PIF1 敲除抑制卵巢癌细胞的增殖,并促进凋亡。



a：$P<0.01$

A：Western blot 检测各组卵巢癌细胞中 PCNA 蛋白的表达；B、C：免疫荧光检测各组卵巢癌细胞中 Ki-67 蛋白的表达和定量分析

图 3　PIF1 对卵巢癌细胞中增殖蛋白表达的影响



a：$P<0.01$，b：$P<0.001$

A：流式细胞术检测各组卵巢癌细胞的凋亡率；B：Western blot 检测各组卵巢癌细胞中 Cleaved PARP 和 PARP 蛋白的表达；C：各组卵巢癌细胞中 Cleaved PARP/PARP 蛋白相对表达的定量分析

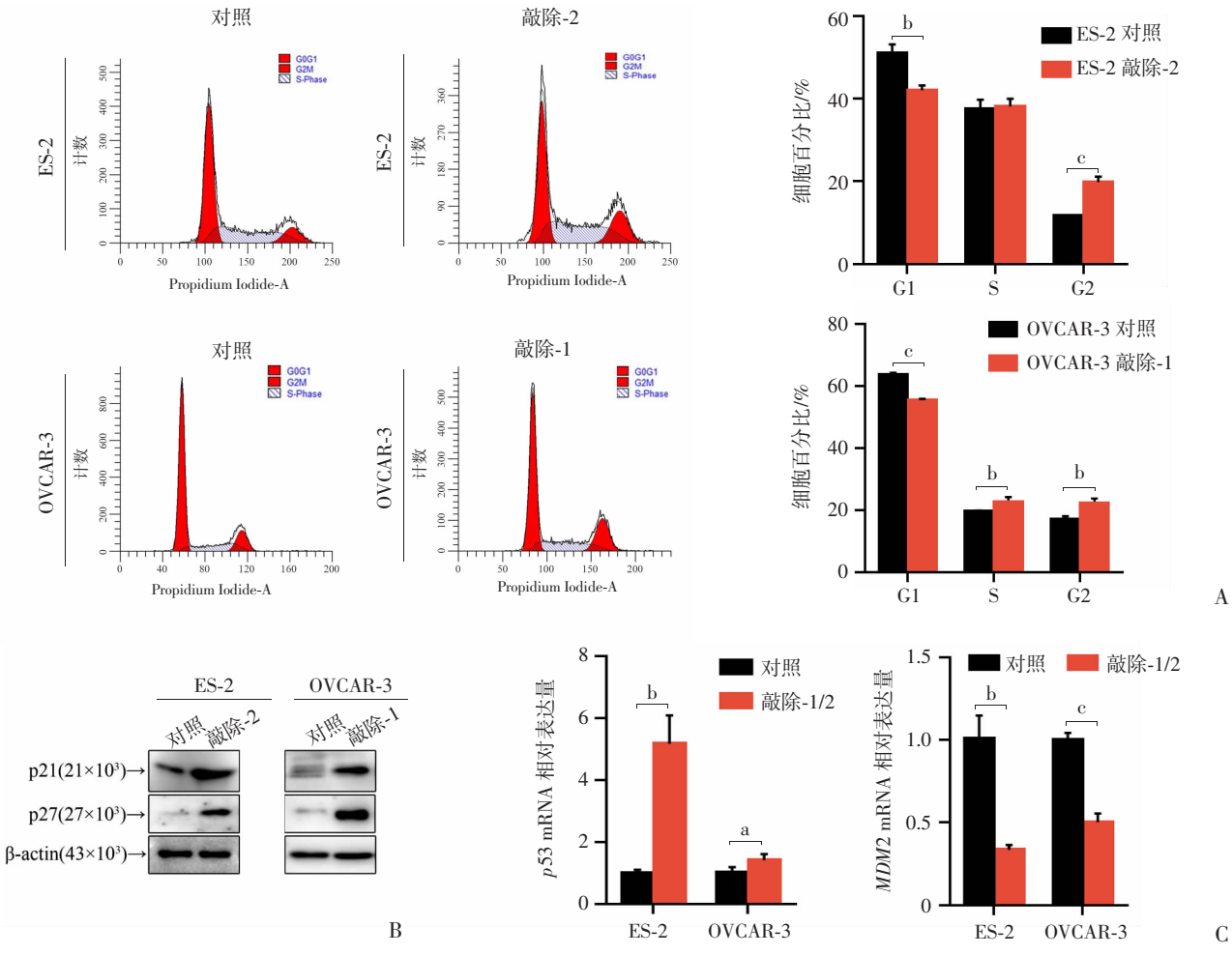
图 4　PIF1 对卵巢癌细胞凋亡的影响

2.3　PIF1 敲除阻滞卵巢癌细胞周期和促进细胞衰老

通过流式细胞术检测发现,PIF1 敲除的卵巢癌细胞 G2 期被阻滞($P<0.01$,图 5A),且 p21 和 p27 的表达增高(图 5B)。RT-qPCR 结果显示,PIF1 敲除的卵巢癌细胞中抑癌基因 *p53* 的转录上调($P<0.05$),而原癌基因 *MDM2* 的转录下调($P<0.01$,图 5C)。β-半乳糖苷酶活性检测结果显示,PIF1 敲除促进细胞衰老($P<0.001$,图 6A)。Western blot 检测显示,PAI-1 的表达在 PIF1 敲除的卵巢癌细胞中明显增加,而 lamin B1 的表达减少($P<0.05$,图 6B、C)。这些结果表明,PIF1 敲除导致 G2 期阻滞并促进卵巢癌细胞衰老。

2.4　PIF1 缺失促进卵巢癌细胞 DNA 损伤

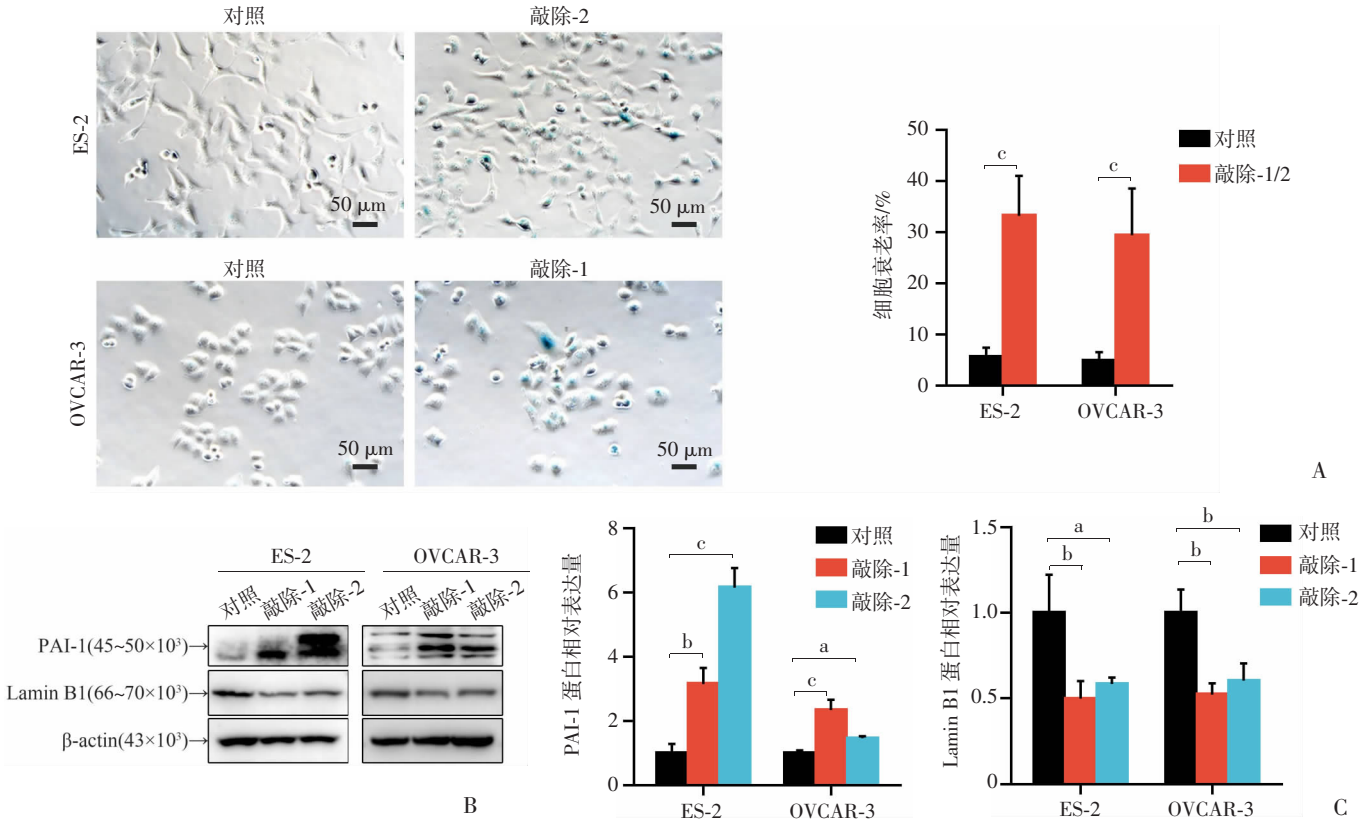
CCK-8 检测显示,在同样浓度的顺铂处理后,相比对照组 PIF1 敲除的卵巢癌细胞的增殖能力受到抑制($P<0.05$,图 7A),这表明 PIF1 敲除增强了卵巢癌细胞对顺铂的敏感性。Western blot 结果表明,PIF1 敲除促进 γ-H2AX、p-Chk1 (Ser317)和 p-Chk2 (Thr68)的表达上调,而磷酸化的 ATM 的表达水平显著降低($P<0.05$,图 7B、C)。免疫荧光结果显示,相比于对照组,PIF1 敲除的卵巢癌细胞中 γ-H2AX 蛋白表达更高($P<0.05$),且在 1 μg/mL 浓度的顺铂给药 24 h 后,对照组和敲除组的 γ-H2AX 蛋白表达差异增加(图 8)。这些结果表明 PIF1 缺失促进卵巢癌细胞的 DNA 损伤,从而增强细胞对顺铂的敏感性。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, c: $P<0.001$

A: 流式细胞术检测各组卵巢癌细胞的细胞周期; B: Western blot 检测各组卵巢癌细胞中 p21 和 p27 蛋白的表达;C: RT-qPCR 检测各组卵巢癌细胞中 *p53* 和 *MDM2* 的 mRNA 相对表达量

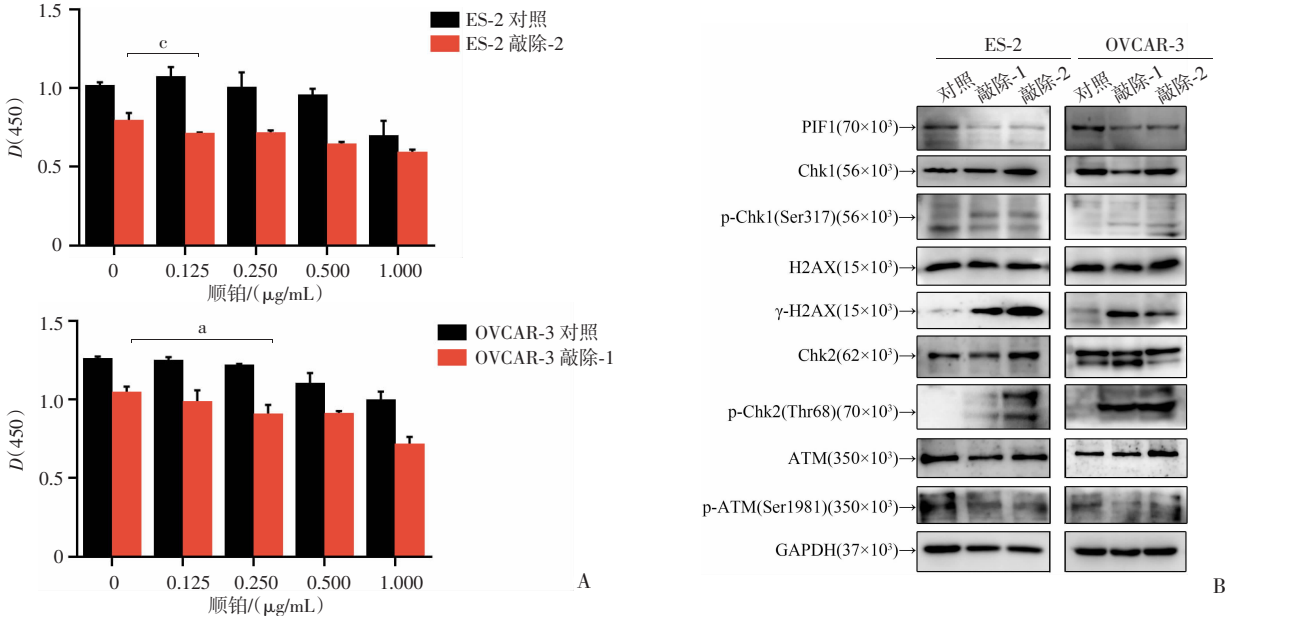
图 5　PIF1 对卵巢癌细胞周期的影响



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, c: $P<0.001$

A: β-半乳糖苷酶活性检测评估各组卵巢癌细胞的衰老情况;B: Western blot 检测各组卵巢癌细胞中 lamin B1 和 PAI-1 蛋白的表达; C:各组卵巢癌细胞中 lamin B1 和 PAI-1 蛋白相对表达的定量分析

图 6 PIF1 对卵巢癌细胞衰老的影响

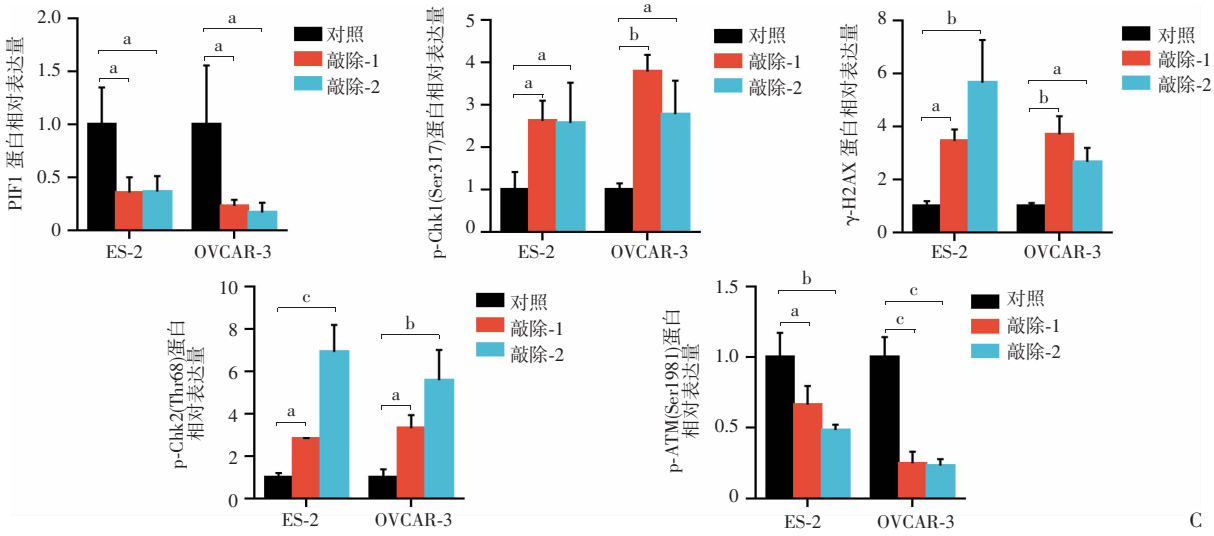


a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, c: $P<0.001$

A: CCK-8 实验检测各组卵巢癌细胞的增殖能力; B: Western blot 检测各组卵巢癌细胞中 PIF1, γ-H2AX, p-Chk1 (Ser317), p-Chk2(Thr68)和 p-ATM(Ser1981)蛋白的表达

图 7 PIF1 敲除促进 DNA 损伤

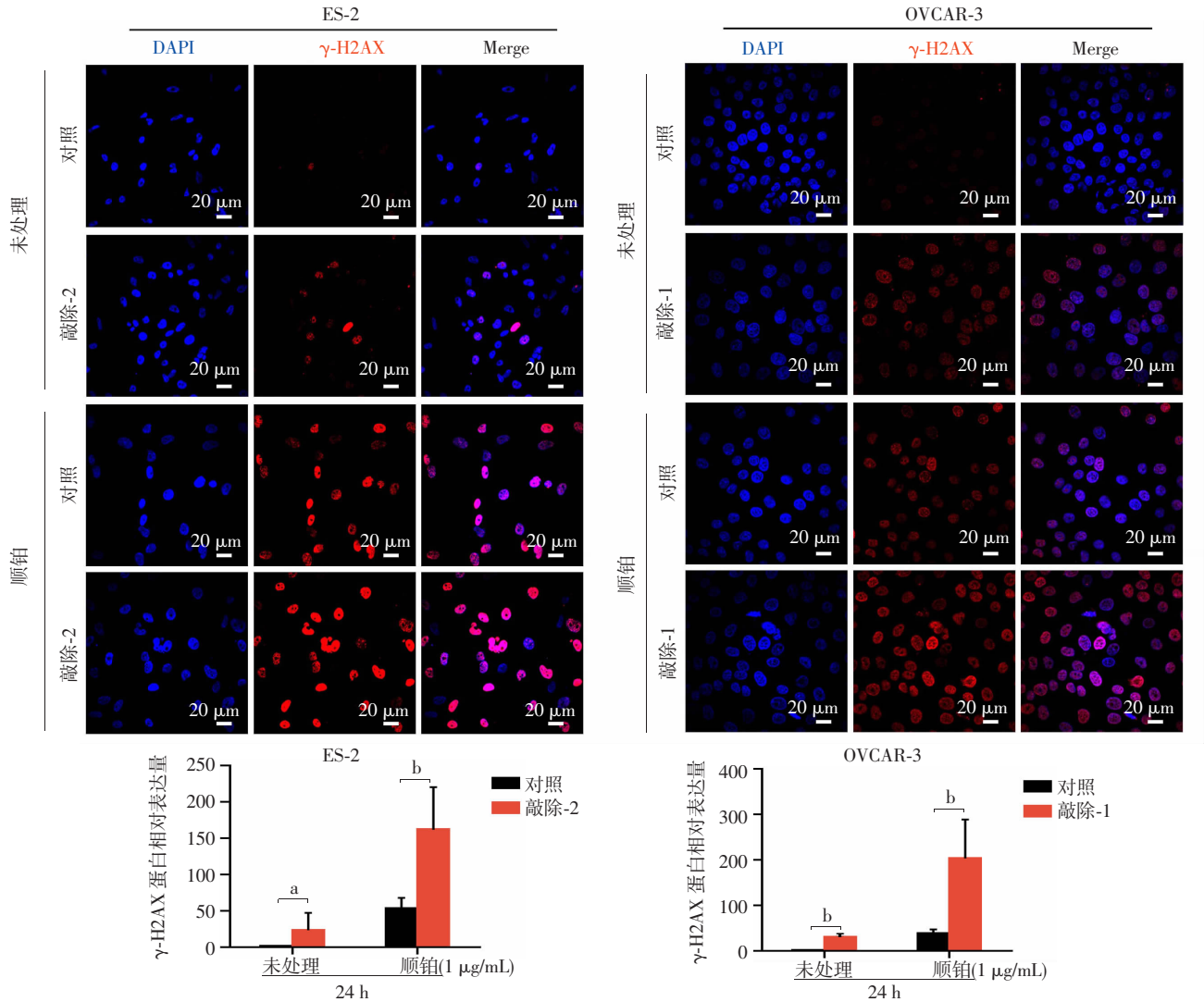
(图 7C 续下页)



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，c：$P<0.001$

C：各组卵巢癌细胞中 PIF1，p-Chk1（Ser317），γ-H2AX，p-Chk2(Thr68)和p-ATM(Ser1981)蛋白相对表达的定量分析

续图 7　PIF1 敲除促进 DNA 损伤

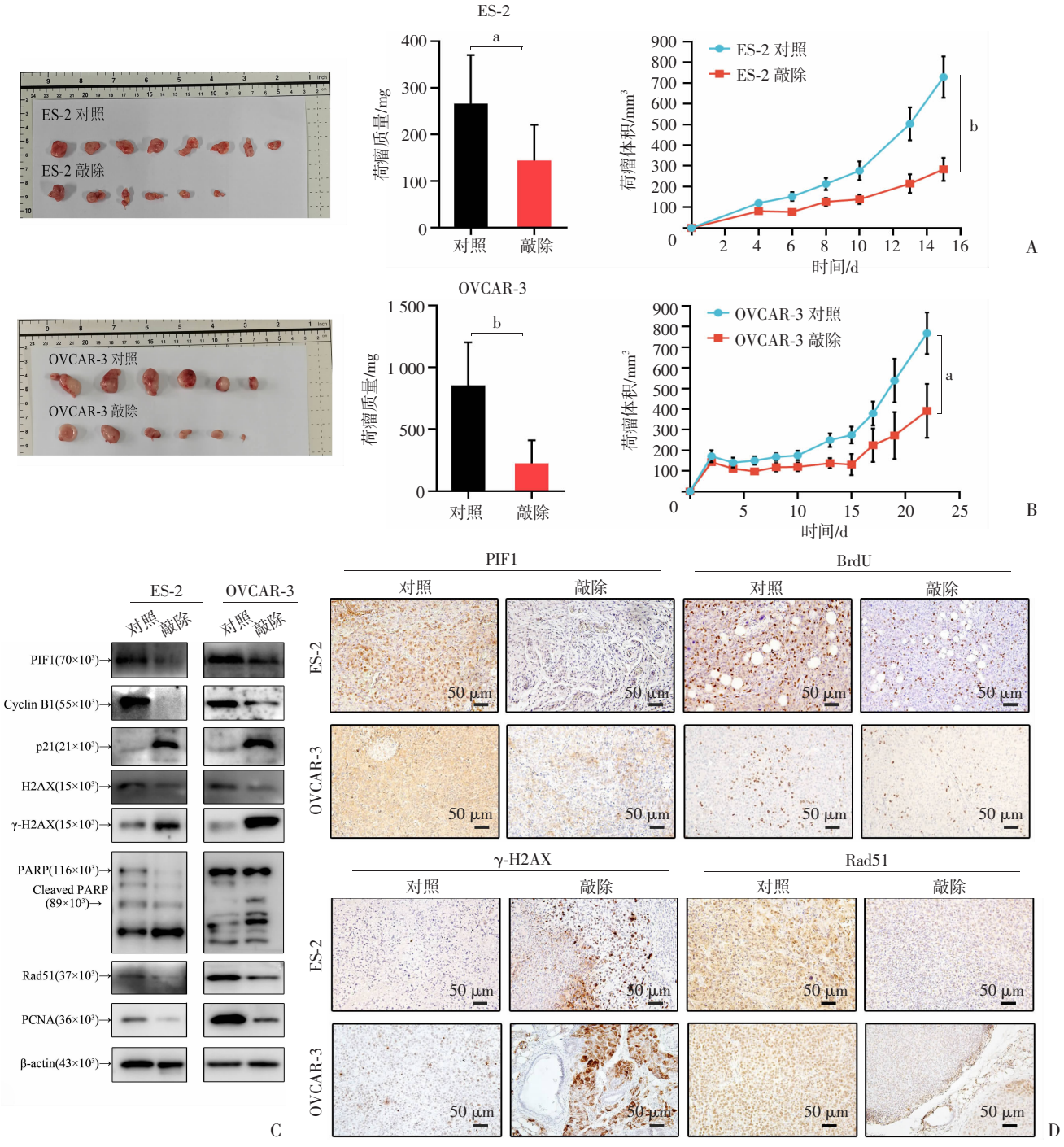


蓝色：细胞核，红色：γ-H2AX；a：$P<0.05$，b：$P<0.001$

图 8　免疫荧光检测各组卵巢癌细胞中 γ-H2AX 的表达

2.5　PIF1 敲除抑制体内肿瘤生长

为了进一步验证 PIF1 蛋白影响体内卵巢癌细胞增殖,构建了对照组和 PIF1 敲除组的卵巢癌细胞荷瘤模型。敲除 PIF1 抑制卵巢癌细胞在裸鼠体内生长($P<0.05$,图 9A、B)。Western blot 和免疫组化结果表明,PIF1 敲除的肿瘤组织中 γ-H2AX、Cleaved PARP 和 p21 的表达增加,而 BrdU、PCNA、PARP 和 cyclin B1 的表达降低(图 9C、D)。这些发现提示敲除 PIF1 抑制体内肿瘤细胞的增殖。



a:$P<0.05$, b:$P<0.01$

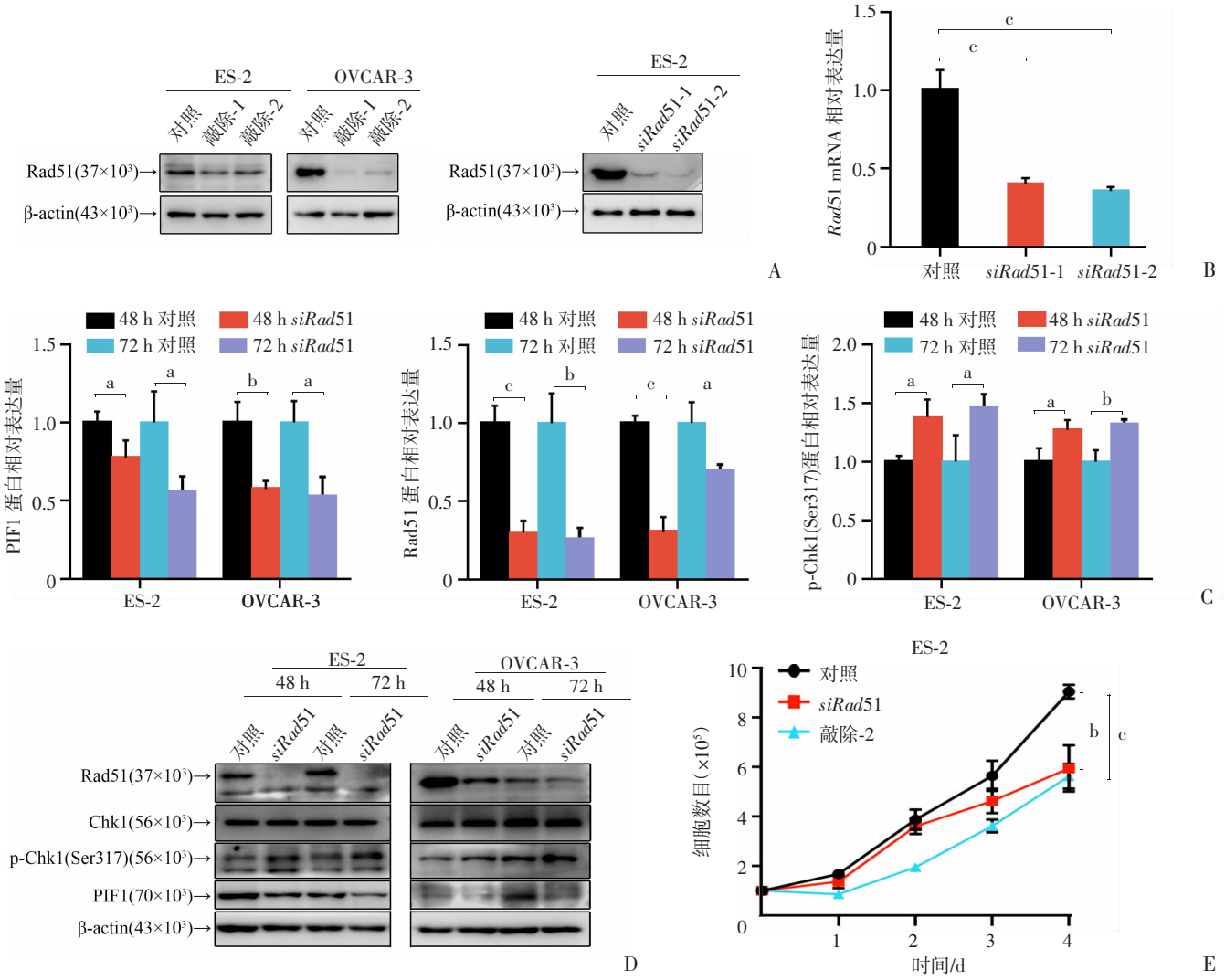
A:裸鼠体内 ES-2 卵巢癌细胞和 PIF1 敲除的 ES-2 卵巢癌细胞的肿瘤体积、质量和生长曲线;B:裸鼠体内 OVCAR-3 卵巢癌细胞和 PIF1 敲除的 OVCAR-3 卵巢癌细胞的肿瘤体积、质量和生长曲线;C:Western blot 检测裸鼠肿瘤组织中 PIF1, Cyclin B1, p21, γ-H2AX, PARP, Cleaved PARP, Rad51 和 PCNA 蛋白的表达;D:免疫组化检测裸鼠肿瘤组织中 PIF1, BrdU, γ-H2AX 和 Rad51 蛋白的表达

图 9　PIF1 敲除抑制裸鼠体内肿瘤形成

2.6 PIF1 与 Rad51 蛋白相互作用调控卵巢癌细胞的增殖和 DNA 损伤

Rad51 蛋白作为同源重组修复的关键蛋白,其表达在 PIF1 敲除的卵巢癌细胞中明显降低(图 9C、D,图 10A)。为进一步验证 PIF1 和 Rad51 之间的关系,通过 siRNA 干扰 *Rad*51,结果表明 p-Chk1(Ser317)表达增加,并且 PIF1 表达减少($P<0.05$,图 10B~D)。细胞计数实验表明,干扰 *Rad*51 抑制卵巢癌细胞增殖($P<0.01$,图 10E),这一结果与 PIF1 敲除抑制卵巢癌细胞增殖一致。

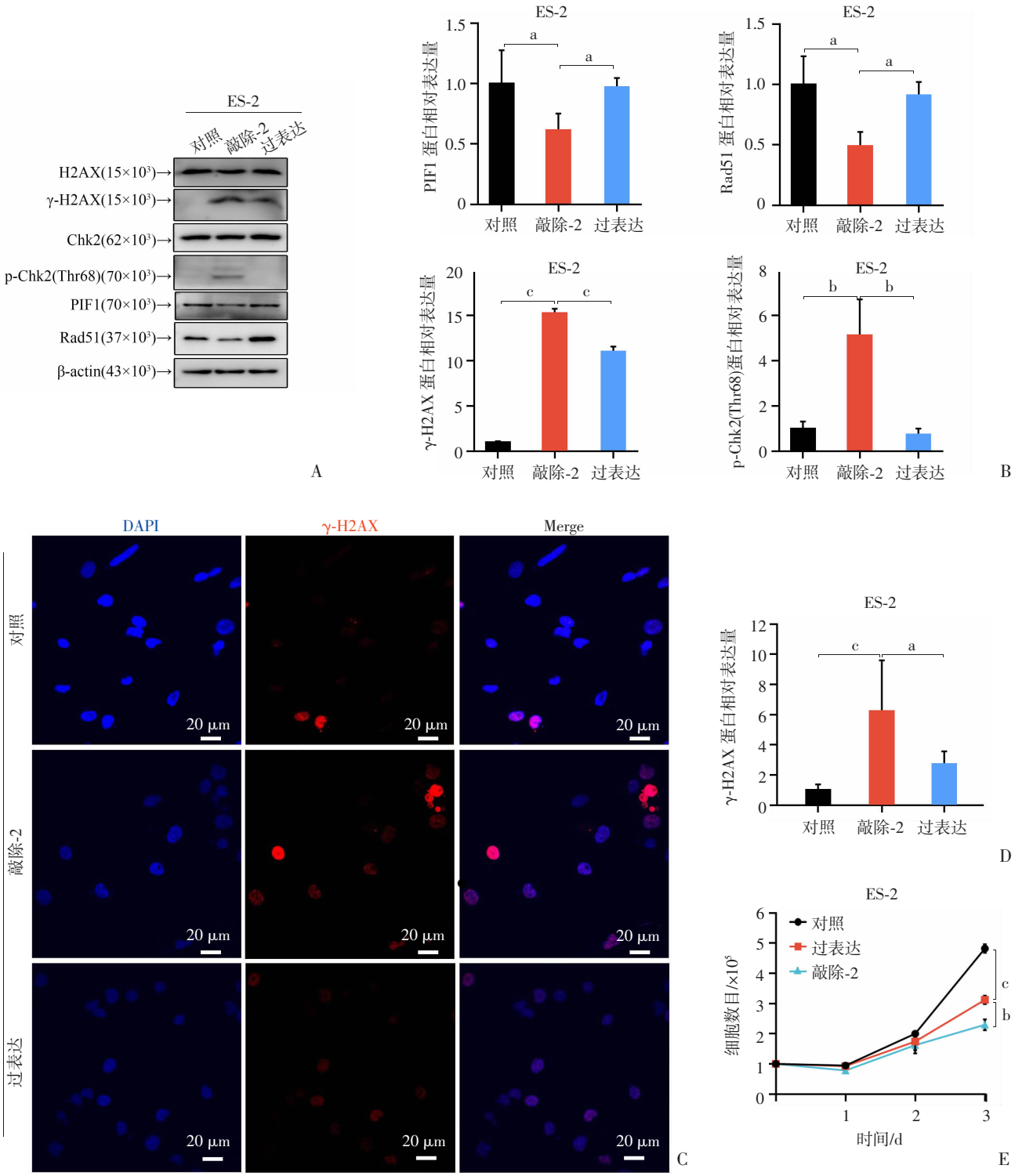
为进一步探讨 PIF1 和 Rad51 与卵巢癌细胞增殖及 DNA 损伤的关系,在 PIF1 敲除的卵巢癌细胞中过表达了 Rad51。Western blot 结果显示,Rad51 蛋白过表达后,与 ES-2 敲除-2 组比较,PIF1 蛋白表达增加,而 γ-H2AX 和 p-Chk2(Thr68)蛋白表达减少($P<0.05$,图 11A、B)。免疫荧光实验和细胞计数实验进一步显示,Rad51 过表达能挽救因 PIF1 敲除引起的 DNA 损伤($P<0.05$,图 11C、D),并恢复细胞增殖($P<0.01$,图 11E)。在过表达 Rad51 后,与 ES-2 敲除-2 组比较,BRCA2 蛋白表达显著增加($P<0.01$,图 11F)。免疫荧光共定位显示,在卵巢癌细胞中,Rad51 蛋白与 EGFP-PIF1 蛋白共定位(图 11G)。这些结果表明,PIF1 和 Rad51 协同调控卵巢癌细胞的增殖和 DNA 损伤。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, c: $P<0.001$

A: Western blot 检测各组卵巢癌细胞中 Rad51 蛋白的表达;B: RT-qPCR 检测 ES-2 卵巢癌细胞中 *Rad*51 的干扰效率;C、D: Western blot 检测干扰 *Rad*51 基因 48 h 和 72 h 后 ES-2 和 OVCAR-3 卵巢癌细胞中 p-Chk1(Ser317)、PIF1 和 Rad51 蛋白的表达和定量分析;E: 细胞计数实验检测干扰 *Rad*51 和 PIF1 敲除的卵巢癌细胞的增殖能力

图 10 干扰 *Rad*51 影响卵巢癌细胞增殖和 DNA 损伤

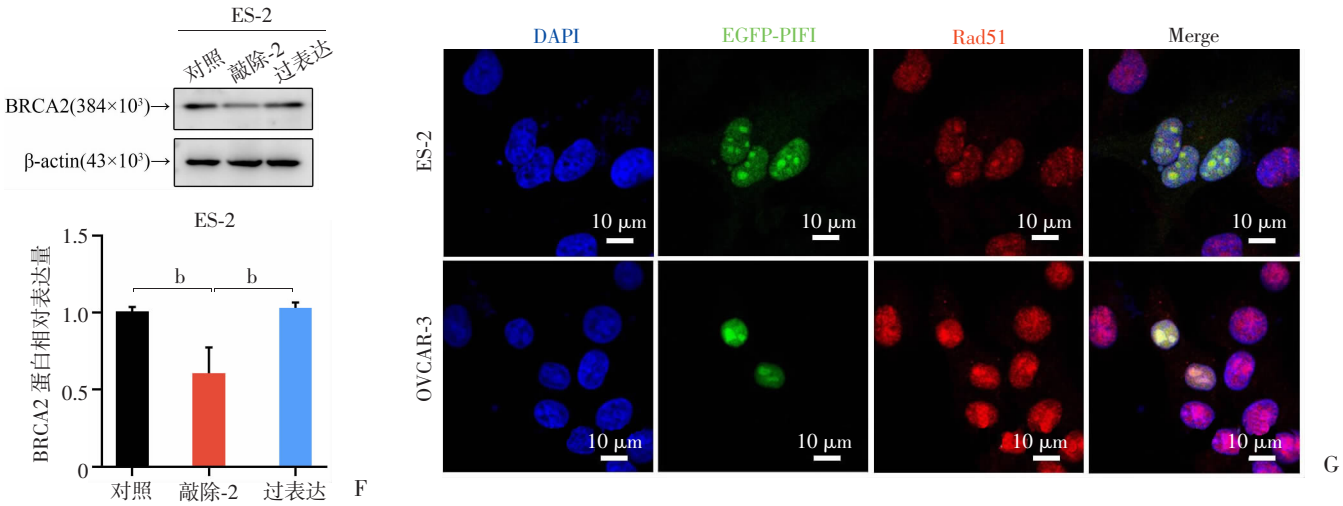


a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, c: $P<0.001$

A: Western blot 检测各组卵巢癌细胞中 γ-H2AX, p-Chk2(Thr68), Rad51 和 PIF1 蛋白的表达; B: 各组卵巢癌细胞中 γ-H2AX, p-Chk2(Thr68), Rad51 和 PIF1 蛋白相对表达的定量分析; C: 免疫荧光检测各组卵巢癌细胞中 γ-H2AX 蛋白的表达; D: 定量分析各组卵巢癌细胞中 γ-H2AX 蛋白的相对表达; E: 细胞计数实验检测各组卵巢癌细胞的增殖能力

图 11 PIF1 与 Rad51 共定位影响卵巢癌细胞增殖和 DNA 损伤

(图 11F、G 续下页)



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, c: $P<0.001$

F: 各组卵巢癌细胞中 BRCA2 蛋白的表达和定量分析; G: 免疫荧光检测 EGFP-PIF1 和 Rad51 的定位

续图 11 PIF1 与 Rad51 共定位影响卵巢癌细胞增殖和 DNA 损伤

3 讨论

3.1 PIF1 影响卵巢癌的发展

在本研究中,PIF1 在卵巢癌组织和卵巢癌细胞中的高表达与患者生存率负相关,且敲除 PIF1 可以抑制卵巢癌细胞的增殖。此外,敲除 PIF1 促进卵巢癌细胞凋亡可能是增殖减缓的原因之一。癌细胞不受限制的增殖依赖于细胞周期调控的失调[21],而敲除 PIF1 会导致卵巢癌细胞周期阻滞在 G2 期,细胞周期阻滞也是细胞衰老的特征[22],本研究发现敲除 PIF1 会促进卵巢癌细胞衰老,这进一步抑制卵巢癌细胞的增殖。这些结果与之前在宫颈癌[14]和神经母细胞瘤[17]中发现的一致。这表明它可能在促进卵巢癌的发展中发挥作用,以及可作为潜在卵巢癌预后标志物。此外,MATEYAK 等[23]通过建立过表达 FLAG-hPIF 的克隆细胞系,发现人类 PIF1 在细胞核中定位。后来有学者发现 PIF1 还分布于线粒体中,PIF1 的 N 端区域决定 PIF1 蛋白进入细胞核,而其 C 端区域则与线粒体的定位有关[24]。位于核 PIF1 具有多种功能,可负调控端粒和双链断裂处的端粒酶,参与冈崎片段加工,抑制 G-四链体基序处的基因组不稳定性,双链断裂的修复等[7, 25]。位于线粒体的 PIF1 能够维持线粒体 DNA 的完整性[9]。在本研究中,免疫组化也检测到卵巢癌组织细胞质中存在 PIF1 的表达,很可能是定位于细胞质线粒体中的 PIF1,这提示 PIF1 也可能通过调控线粒体 DNA 的完整性影响卵巢癌的恶性进程。

3.2 敲除 PIF1 增强卵巢癌细胞化疗敏感性

GAGOU 等[19]在 PIF1 敲除的 HCT116 细胞中检测到 γ-H2AX 水平略有增加,但没有观察到 p-ATM(Ser1981)或 p-Chk1(Ser345)的显著激活。本研究结果表明,PIF1 敲除促进 γ-H2AX、p-Chk1(Ser317)和 p-Chk2(Thr68)表达上调。Chk1 是共济失调毛细血管扩张和 Rad3-相关激酶(ataxia telangiectasia and Rad3-related, ATR)级联反应的关键组成部分,它通过中断在 DNA 复制过程中形成的单链 DNA 快速激活,以抑制不适当的启动,促进复制重启,并防止细胞凋亡[26]。ATM/ATR 对 Chk1 在不同位点的磷酸化使 Chk1 发挥不同的功能[27-28]。Chk1 在 Ser317 位点的磷酸化允许细胞在 DNA 复制停滞后重新进入细胞周期[28]。此外,PIF1 敲除引起卵巢癌细胞周期阻滞在 G2 期,以及在由 p53 和 MDM2 形成的自反馈回路中,MDM2 的减少和 p53 的增加同时发生,p53 的激活同样引发细胞周期停滞和凋亡[29]。因此,我们推测由 PIF1 敲除引起的 DNA 复制停滞导致 Chk1 在 Ser317 位点处磷酸化。既往研究表明,PIF1 的下调可以增强胰腺癌细胞对吉西他滨的敏感性[16],同时也可以使其他肿瘤细胞对化疗药物如羟基脲和阿非迪霉素敏感[19-20]。在本研究中,暴露于少量顺铂时,PIF1 敲除抑制卵巢癌细胞增殖。免疫荧光结果也显示,在顺铂处理后,PIF1 敲除的卵巢癌细胞中 DNA 损伤显著增加。因此,我们认为 PIF1 敲除引起卵巢癌细胞 DNA 损伤和复制停滞,从而增加了卵巢癌细胞对顺铂药物的敏感性。这提示通过靶向 PIF1 的策略可能为卵巢癌等肿瘤的治疗提供新方向,特别是对于化疗耐药的肿瘤,PIF1 可能成为一个潜

在的治疗靶点。

3.3 PIF1 与 Rad51 共定位合作调控卵巢癌细胞的增殖和 DNA 损伤

在本研究中,PIF1 敲除抑制 ATM 在 Ser1981 位点磷酸化,ATM 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在 DNA 双链断裂期间被激活,并增强同源重组修复途径[30]。同源重组是修复 DNA 双链断裂和复制叉的一种机制[31]。Rad51 作为同源重组修复的中心蛋白,对于精确修复 DNA 至关重要[31]。PIF1 容易定位到与复制相关的脆弱位点,通过断裂诱导复制途径进行同源重组修复[20]。酿酒酵母 Pif1(saccharomyces cerevisiae Pif1, ScPif1)的特定序列突变会导致断裂诱导复制缺陷[7]。此外,在真核生物中典型的断裂诱导复制途径依赖于 Rad51[32]。在本研究中,卵巢癌细胞 PIF1 缺失引起 Rad51 蛋白表达下调。因此,我们推断 PIF1 敲除可能会干扰同源重组修复途径。干扰卵巢癌细胞的 *Rad*51 基因后,PIF1 蛋白表达减少,细胞 DNA 损伤增加,增殖减慢。而 Rad51 过表达部分反转了 PIF1 缺失引起的 DNA 损伤和增殖表型。此外,染色质免疫沉淀测序实验表明 PIF1 突变细胞中靠近 DNA 双链断裂处的 Rad51 丰度无显著变化[8]。而本研究免疫荧光共定位分析显示,卵巢癌细胞的内源性 Rad51 与 EGFP-PIF1 蛋白共定位,表明两者在空间上接近,尽管缺乏直接的物理结合,但这暗示了可能有功能性相互作用。因此,我们推测 PIF1 和 Rad51 在卵巢癌中的功能性相互作用或依赖于同源重组,特别是断裂诱导复制通路,未来研究将进一步探讨这一机制。

综上所述,本研究发现 PIF1 在卵巢癌组织和卵巢癌细胞中高表达,且 PIF1 的过表达与卵巢癌患者的生存率负相关,同时 PIF1 敲除抑制卵巢癌细胞的增殖,促进细胞衰老、凋亡、细胞周期阻滞和 DNA 损伤。免疫荧光和过表达 Rad51 实验发现,PIF1 与 Rad51 共定位合作,互相影响从而调控卵巢癌细胞的增殖和 DNA 损伤。这些发现为寻找治疗卵巢癌的分子靶点提供了理论依据,为揭示卵巢癌顺铂耐药的分子机制奠定了基础。

参考文献:

[1] TORRE L A, TRABERT B, DESANTIS C E, *et al*. Ovarian cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(4): 284-296. DOI: 10.3322/caac.21456.

[2] ALATISE K L, GARDNER S, ALEXANDER-BRYANT A. Mechanisms of drug resistance in ovarian cancer and associated gene targets[J]. Cancers, 2022, 14(24): 6246. DOI: 10.3390/cancers14246246.

[3] DAMIA G, BROGGINI M. Platinum resistance in ovarian cancer: role of DNA repair[J]. Cancers, 2019, 11(1): 119. DOI: 10.3390/cancers11010119.

[4] BOUBERHAN S, BAR-PELED L, MATOBA Y, *et al*. The evolving role of DNA damage response in overcoming therapeutic resistance in ovarian cancer[J]. Cancer Drug Resist, 2023, 6(2): 345-357. DOI: 10.20517/cdr.2022.146.

[5] MURAI J. Targeting DNA repair and replication stress in the treatment of ovarian cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2017, 22(4): 619-628. DOI: 10.1007/s10147-017-1145-7.

[6] DING L, LIU Y L. Borrowing nuclear DNA helicases to protect mitochondrial DNA[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(5): 10870-10887. DOI: 10.3390/ijms160510870.

[7] MALONE E G, THOMPSON M D, BYRD A K. Role and regulation of Pif1 family helicases at the replication fork[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7): 3736. DOI: 10.3390/ijms23073736.

[8] WILSON M A, KWON Y, XU Y Y, *et al*. Pif1 helicase and Polδ promote recombination-coupled DNA synthesis *via* bubble migration[J]. Nature, 2013, 502(7471): 393-396. DOI: 10.1038/nature12585.

[9] LAHAYE A, STAHL H, THINES-SEMPOUX D, *et al*. PIF1: a DNA helicase in yeast mitochondria[J]. EMBO J, 1991, 10(4): 997-1007. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb08034.x.

[10] JIMENO S, CAMARILLO R, MEJIAS-NAVARRO F, *et al*. The helicase PIF1 facilitates resection over sequences prone to forming G4 structures[J]. Cell Rep, 2018, 25(12): 3543. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.12.029.

[11] ZHOU J, MONSON E K, TENG S C, *et al*. Pif1p helicase, a catalytic inhibitor of telomerase in yeast[J]. Science, 2000, 289(5480): 771-774. DOI: 10.1126/science.289.5480.771.

[12] MCDONALD K R, SABOURI N, WEBB C J, *et al*. The Pif1 family helicase Pfh1 facilitates telomere replication and has an RPA-dependent role during telomere lengthening[J]. DNA Repair, 2014, 24: 80-86. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.09.008.

[13] GERONIMO C L, ZAKIAN V A. Getting it done at the ends: Pif1 family DNA helicases and telomeres[J]. DNA Repair, 2016, 44: 151-158. DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.05.021.

[14] WANG J C, ZHU X Y, YING P, *et al*. PIF1 affects the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells by influencing TERT[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 7827-7835. DOI: 10.2147/CMAR.S265336.

[15] CAI T, WANG N, MENG P, *et al*. Up-regulated PIF1 predicts poor clinical outcomes and correlates with low immune infiltrates in clear cell renal cell carcinoma[J]. Front Genet, 2022, 13: 1058040. DOI: 10.3389/fgene.2022.1058040.

[16] WANG K, HUA X D, FU X B, *et al*. Petite integration factor 1

knockdown enhances gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cells *via* increasing DNA damage[J]. J Appl Toxicol, 2023, 43(10): 1522-1532. DOI: 10.1002/jat.4494.

[17] CHEN B, HUA Z Y, GONG B C, *et al*. Downregulation of PIF1, a potential new target of MYCN, induces apoptosis and inhibits cell migration in neuroblastoma cells[J]. Life Sci, 2020, 256: 117820. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117820.

[18] ZHANG T, WU D M, LUO P W, *et al*. CircNEIL3 mediates pyroptosis to influence lung adenocarcinoma radiotherapy by upregulating PIF1 through miR-1184 inhibition[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(2): 167. DOI: 10.1038/s41419-022-04561-x.

[19] GAGOU M E, GANESH A, THOMPSON R, *et al*. Suppression of apoptosis by PIF1 helicase in human tumor cells[J]. Cancer Res, 2011, 71(14): 4998-5008. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4404.

[20] LI S B, WANG H L, JEHI S, *et al*. PIF1 helicase promotes break-induced replication in mammalian cells[J]. EMBO J, 2021, 40(8): e104509. DOI: 10.15252/embj.2020104509.

[21] EVAN G I, VOUSDEN K H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer[J]. Nature, 2001, 411(6835): 342-348. DOI: 10.1038/35077213.

[22] CALCINOTTO A, KOHLI J, ZAGATO E, *et al*. Cellular senescence: aging, cancer, and injury[J]. Physiol Rev, 2019, 99(2): 1047-1078. DOI: 10.1152/physrev.00020.2018.

[23] MATEYAK M K, ZAKIAN V A. Human PIF helicase is cell cycle regulated and associates with telomerase[J]. Cell Cycle, 2006, 5(23): 2796-2804. DOI: 10.4161/cc.5.23.3524.

[24] FUTAMI K, SHIMAMOTO A, FURUICHI Y. Mitochondrial and nuclear localization of human Pif1 helicase[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(9): 1685-1692. DOI: 10.1248/bpb.30.1685.

[25] ONONYE O E, SAUSEN C W, BALAKRISHNAN L, *et al*. Lysine acetylation regulates the activity of nuclear Pif1[J]. J Biol Chem, 2020, 295(46): 15482-15497. DOI: 10.1074/jbc.RA120.015164.

[26] ZOU L E, ELLEDGE S J. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes[J]. Science, 2003, 300(5625): 1542-1548. DOI: 10.1126/science.1083430.

[27] JIANG K C, PEREIRA E, MAXFIELD M, *et al*. Regulation of Chk1 includes chromatin association and 14-3-3 binding following phosphorylation on *Ser*-345[J]. J Biol Chem, 2003, 278(27): 25207-25217. DOI: 10.1074/jbc.M300070200.

[28] MARTIN S A, OUCHI T. Cellular commitment to reentry into the cell cycle after stalled DNA is determined by site-specific phosphorylation of Chk1 and PTEN[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(8): 2509-2516. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0199.

[29] FREEDMAN D A, WU L, LEVINE A J. Functions of the MDM2 oncoprotein[J]. Cell Mol Life Sci, 1999, 55(1): 96-107. DOI: 10.1007/s000180050273.

[30] JIN M H, OH D Y. ATM in DNA repair in cancer[J]. Pharmacol Ther, 2019, 203: 107391. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2019.07.002.

[31] WRIGHT W D, SHAH S S, HEYER W D. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks[J]. J Biol Chem, 2018, 293(27): 10524-10535. DOI: 10.1074/jbc.TM118.000372.

[32] LIU L P, MALKOVA A. Break-induced replication: unraveling each step[J]. Trends Genet, 2022, 38(7): 752-765. DOI: 10.1016/j.tig.2022.03.011.

(收稿:2024-08-25;修回:2024-09-05)

(编辑 严 涵)