肿瘤精准医学与转化研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003738

m5C阅读器YBX1通过调节铁死亡抑制因子MS4A15的稳定性促进结直肠癌生长

夏术森[1],朱彦斌[2],刘礼鑫[3],蒙长远[3],彭　洪[4]

（1.成都医学院第一附属医院胃肠外科,成都　610500;2.川北医学院附属医院血管外科,南充　637000;
3.川北医学院附属医院胃肠外科二,南充　637000;4.川北医学院第二临床医学院肛肠外科,南充　637000）

【摘　要】目的:探讨5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine,m5C)阅读器Y-框结合蛋白1(Y-box binding protein1,YBX1)通过调节铁死亡抑制因子人跨膜结构域4亚家族成员15(Membrane-spanning 4-domains subfamily A 15,MS4A15)的稳定性参与结直肠癌发生发展的分子机制。**方法:**通过生物信息学数据库分析YBX1 mRNA和蛋白在结肠癌中的表达。RT-qPCR法检测结直肠癌细胞中YBX1的表达水平。LC-MS法检测结直肠癌细胞和正常结直肠黏膜细胞中m5C修饰水平。CCK8法检测YBX1对结直肠癌细胞增殖的影响,Transwell法检测对结直肠癌细胞迁移能力的影响,流式细胞仪检测对结直肠癌细胞凋亡的影响。通过生物信息学方法分析可与YBX1相互作用的铁死亡抑制因子MS4A15和潜在m5C修饰位点。通过GEPIA2分析YBX1表达与MS4A15的相关性。抑制YBX1表达并分析MS4A15 mRNA的表达水平及MS4A15的m5C修饰水平。通过catRAPID数据库寻找YBX1蛋白和MS4A15 mRNA的结合位点。抑制YBX1表达并用放线菌素D(actinomycinD)处理结直肠癌细胞,RT-qPCR法检测MS4A15 mRNA的稳定性。抑制MS4A15表达并检测细胞增殖活性,细胞迁移能力和细胞凋亡率,抑制MS4A15表达,检测铁死亡关键指标MDA、ROS和Fe^{2+}的表达水平。**结果:**YBX1 mRNA和蛋白在结直肠癌中高表达并且YBX1在结直肠癌细胞中高表达。结直肠癌细胞的m5C修饰水平明显高于正常结直肠黏膜细胞。YBX1可促进结直肠癌细胞增殖,迁移及抑制细胞凋亡。生物信息学分析证实YBX1与铁死亡抑制因子MS4A15表达水平呈正相关,并且MS4A15上存在多个潜在m5C修饰位点。抑制YBX1表达可降低MS4A15 mRNA表达水平及MS4A15基因的m5C修饰水平,并可降低MS4A15 mRNA的稳定性。抑制MS4A15表达后细胞增殖活性和细胞迁移能力明显降低,细胞凋亡率增高,MDA、ROS和Fe2+含量均明显增高。**结论:**上述结果表明YBX1通过m5C修饰稳定MS4A15促进结直肠癌的发生和发展,为结直肠癌患者提供有前景的靶向治疗策略。

【关键词】结直肠癌;5-甲基胞嘧啶;Y-框结合蛋白1;铁死亡;人跨膜结构域4亚家族成员15

【中图分类号】R735.3　　**【文献标志码】**A

The 5-methylcytosine reader Y-box binding protein 1 promotes the growth of colorectal cancer by regulating the stability of the ferroptosis inhibitor membrane-spanning 4-domains subfamily A 15

Xia Shusen[1],*Zhu Yanbin*[2],*Liu Lixin*[3],*Meng Changyuan*[3],*Peng Hong*[4]

(*1. Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College;*
2. Department of Vascular Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College;
3. Second Department of Gastrointestinal Surgery, The Affiliated Hospital of the North Sichuan Medical College;
4. Department of Anorectal Surgery, The Second Clinical Medical School of North Sichuan Medical College)

【Abstract】*Objective*: To investigate the molecular mechanism of the 5-methylcytosine(m5C) reader Y-box binding protein 1(YBX1) in participating in the development and progression of colorectal cancer(CRC) by regulating the stability of the ferroptosis inhibitor membrane-spanning4-domains subfamily A 15(MS4A15). ***Methods*:** Bioinformatics databases were used to investigate the mRNA and protein expression levels of YBX1 in CRC. RT-qPCR was used to measure the expression level of YBX1 in CRC cells. LC-MS was used to measure the level of m5C modification in CRC cells and normal colorectal mucosal cells. CCK-8 assay was used to observe the

作者介绍:夏术森,Email:xsx0639@163.com,
研究方向:消化道肿瘤的基础与临床。

通信作者:彭　洪,Email:1041910523@qq.com。

基金项目:四川省科技厅面上资助项目(编号:2024NSFSC0737);四川省中医药管理局课题资助项目(编号:2024MS590);四川省临床重点专科经费资助项目(编号:ZX-2428-1);成都医学院第一附属医院科研启动基金(编号:CYFY-GQ71);2024年医学影像四川省重点实验室开放课题(编号:MIKL202407)。

优先出版:https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250117.1144.012(2025-01-17)

effect of YBX1 on the proliferation of CRC cells, Transwell assay was used to observe its effect on the migration ability of CRC cells, and flow cytometry was sued to observe its effect on the apoptosis of CRC cells. Bioinformatics methods were used to identify the ferroptosis inhibitors that can interact with YBX1 and potential m5C modification sites. GEPIA2 was used to analyze the association between the expression of YBX1 and MS4A15. The expression of YBX1 was inhibited, and then the mRNA expression level and m5C modification level of MS4A15 were analyzed. The catRAPID database was used to find the binding sites between YBX1 protein and MS4A15 mRNA. CRC cells were treated with actinomycin D after inhibition of YBX1 expression, and RT-qPCR was used to measure the stability of MS4A15 mRNA. The expression of MS4A15 was inhibited, and then the proliferative activity, migration ability, and apoptosis rate of cells were measured, as well as the expression levels of the key indicators for ferroptosis, including MDA, ROS, and Fe^{2+}. ***Results***: High mRNA and protein expression levels of YBX1 were observed in CRC, and YBX1 was highly expressed in CRC cells. The m5C modification level of CRC cells was significantly higher than that of normal colorectal mucosal cells. YBX1 could promote the proliferation and migration of CRC cells and inhibit the apoptosis of CRC cells. The bioinformatics analysis showed that YBX1 was positively correlated with the expression level of the ferroptosis inhibitor MS4A15, and there were multiple m5C modification sites on MS4A15. Inhibition of YBX1 expression could reduce the mRNA expression level and m5C modification level of MS4A15 and the stability of MS4A15 mRNA. There were significant reductions in the proliferative activity and migration ability of CRC cells and a significant increase in the apoptosis rate of CRC cells after inhibition of MS4A15 expression, with significant increases in the content of MDA, ROS, and Fe^{2+}. ***Conclusion***: These results show that YBX1 promotes the development and progression of CRC by stabilizing MS4A15 via m5C modification, which provides a promising targeted therapeutic strategy for CRC patients.

【Key words】 colorectal cancer; 5-methylcytosine; Y-box binding protein 1; ferroptosis; membrane-spanning 4-domains subfamily A 15

结直肠癌（colorectal cancer CRC）是常见的消化道恶性肿瘤之一，在全球范围内每年可导致60多万人死亡[1]。在过去的10年里，由于息肉切除术、化疗、外科手术、靶向治疗和免疫治疗等治疗方法的改进，结直肠癌的发病率和死亡率大幅下降。然而耐药和远处转移明显降低了结直肠癌治疗的疗效，已成为结直肠癌治疗的主要挑战[2]。因此进一步研究结直肠癌的发病机制可为结直肠癌的诊疗提供新的生物标志物及治疗靶点。

5-甲基胞嘧啶（5-methylcytosine，m5C）修饰指来自供体的活性甲基（通常为S-腺苷甲硫氨酸，S-adenosylmethionine，SAM）被添加到RNA中胞嘧啶碱基的碳5位置上[3]。m5C修饰的研究最初集中在tRNA和rRNA上，然而随着检测方法的进步，对mRNA m5C修饰的研究逐渐增加。mRNA m5C修饰异常通常与多种疾病的病因有关，包括动脉硬化、自身免疫性疾病和癌症[4]。阅读器Y-框结合蛋白1（Y-box binding protein1，YBX1）是m5C修饰阅读器（reader），可募ELAVL1以维持其靶mRNA的稳定性[5]。并且既往研究发现YBX1在结直肠癌中高表达，并与结直肠癌患者的预后相关[6]。然而YBX1介导的m5C修饰参与结直肠癌发生发展作用机制尚无报道。

铁死亡是一种非凋亡性细胞死亡方式，是由大量脂质过氧化介导的膜损伤引起的铁依赖性细胞程序性死亡。因此生物体内的脂质代谢可通过控制磷脂过氧化以及与磷脂过氧化相关的各种其他细胞过程来调节铁死亡[7]。铁死亡与结直肠癌的发生密切相关，比如顺铂可抑制结直肠癌细胞中铁死亡的中心调控分子GPX4的表达，诱导细胞铁死亡的发生进而抑制结直肠癌的进展[8]。人跨膜结构域4亚家族成员15（Membrane-spanning 4-domains subfamily A 15，MS4A15）是一种铁死亡抑制基因，属于跨膜4结构域亚家族A（membrane-spanning 4-domains subfamily A，MS4A），MS4A蛋白家族成员作为寡聚体可形成离子通道并促进Ca^{2+}运动，然后介导各种细胞过程，包括细胞存活和死亡[9]。但是MS4A15是否通过m5C修饰促进结直肠癌的增殖和转移尚不明确。

本研究发现了一种新的m5C阅读器YBX1的调控机制，它通过稳定铁死亡抑制因子MS4A15促进CRC肿瘤发生和进展。本研究的结果可能有助于了解YBX1稳定的MS4A15-m5C表观遗传修饰和相关的铁死亡在CRC肿瘤发生和进展中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人结直肠癌细胞SW480、SW620、DLD1、HCT116和FHC细胞购自美国种质保藏中心（ATCC，Manassas，VA）。1640培养基和FBS购自美国Lonza公司（Walkersville，MD，USA）。Lipofectamine 3000购自美国Life Technologies公司（Gaithersburg，MD）。PrimeScript RT试剂盒购自中国TaKaRa公司。CCK8试剂盒购自美国Abcam公司。Transwell试剂盒购自加拿大BD生物科技公司。细胞凋亡试剂盒购自加拿大BD生物科技公司。MDA检测试剂盒购自日本DOJINDO公司。ROS检测试剂盒购自美国Thermo Fisher公司。Fe^{2+}试剂盒购自上海COIBO BIO公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 SW480、SW620、DLD1、HCT116和FHC细胞在含有10%胎牛血清的RPMI1640培养基中培养，并且培养箱温度为37 ℃并含有5%CO_2。由GenePharma（中国上海）合成并构建YBX1 siRNA和MS4A15 siRNA，按照制造商的说明用Lipofectamine 3000将YBX1 siRNA和MS4A15 siRNA转染到CRC细胞中。YBX1 siRNA序列如下：5′-UUUGCUGGUAAUUGCGUGGAGGACC-3′，MS4A15 siRNA序列如下：5′-AGUUCUUAGACAAUUUCAGCU-3′。

1.2.2 生物信息学分析 通过GEPIA2数据库（http://gepia2.cancer-pku.cn/#index）分析CRC组织中YBX1 mRNA表达，使用UALCAN portal（http://ualcan.path.uab.edu/analysis-prot.html）数据库分析YBX1蛋白在结肠癌中的表达。通过GEPIA2数据库获得与YBX1基因表达相关的前100个基因，然后在铁死亡相关数据库FerrDB V2（http://www.zhounan.org/ferrdb/current/#）中下载铁死亡抑制基因共238个并与之取交集。通过RNA m5C甲基化位点预测工具RNAm5Cfinder（http://www.rnanut.net/rnam5cfinder/）寻找MS4A15上的m5C修饰位点，通过GEPIA2数据库分析结直肠癌中YBX1与MS4A15表达的相关性。通过catRAPID数据库（http://s.tartaglialab.com/page/catrapid_group）分析YBX1蛋白序列与MS4A15 RNA序列的结合位点。

1.2.3 Real time-quantitative PCR 根据制造商的方案，使用RNA分离试剂盒从细胞中提取RNA。使用PrimeScript RT试剂盒将总RNA逆转录为cDNA。然后在含有cDNA、引物和SYBR Premix Ex Taq的反应溶液中进行RT-qPCR。GAPDH作为内参，并使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法评估基因相对表达水平。YBX1引物序列如下：F：GGGTGCAGGAGAACAAGGTA，R：TCTTCATTGCCGTCCTCTCT；MS4A15引物序列如下：F：TGTGGACAGGGGCTATCTGG，R：GAAGTGCATGGCAATGACCG。

1.2.4 CCK8 根据制造商的说明书，使用细胞计数试剂盒-8（CCK-8）评估细胞增殖活性。将细胞接种在96孔板中（10^4个细胞/孔），并用erastin、RSL3、二甲基亚砜处理12 h。每个孔用100 μL含有10 μL CCK-8溶液的新鲜完全培养基代替，并在37 ℃下含有5%CO_2的培养箱中培养1 h。在450 nm处检测每个孔的吸光度。

1.2.5 Transwell 将细胞接种在24孔室中，使用8 μm孔隙插入物用于细胞迁移测定。孵育24 h后，用4%多聚甲醛固定细胞10 min。去除非侵袭性细胞，用结晶紫对侵袭性细胞进行染色，并在明视野显微镜下进行检测。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集处理好的细胞，用流式细胞仪检测细胞凋亡。用Annexin Vand碘化丙啶对细胞进行染色后上机检测。采集流式细胞仪分析数据，并使用FlowJo软件进行分析。

1.2.7 RNA稳定性测定实验 在6孔板中用针对YBX1的siRNA或对照转染细胞。siRNA转染后（24 h），用5 μg/mL放线菌素D进行处理并在指定的时间点收集。提取总RNA并通过qRT-PCR分析MS4A15表达水平。GAPDH被用作内部控制。

1.2.8 LC-MS 以总量200 ng样品RNA，孵育高核酸亲和力板上，随后洗涤去除未结合的RNA后，向其中加入m5C检测复合物溶液，室温下孵育50 min。孵育结束后，倾倒复合物溶液，并洗涤3次。向孔中加入荧光显色溶液，待溶液变红，随即置于荧光分光光度计下检测，在530ex/590em nm条件下收集荧光信号。以m5C标准品绘制标准曲线，计算样品中m5C修饰水平。

1.2.9 Elisa检测MDA、ROS和Fe^{2+}含量 将结直肠癌细胞接种于6孔板中，每孔约5×10^5个细胞，待细胞融合度为40%左右时，将细胞按照要求进行分组。处理24 h后，用PBS（pH7.2~7.4）稀释细胞悬液，细胞浓度达到100万/mL左右。通过反复冻融，以使细胞破坏并放出细胞内成分。离心20 min左右（2 000~3 000转/分），仔细收集上清。然后按照Elisa试剂盒说明书测定各组MDA、ROS和Fe^{2+}含量。

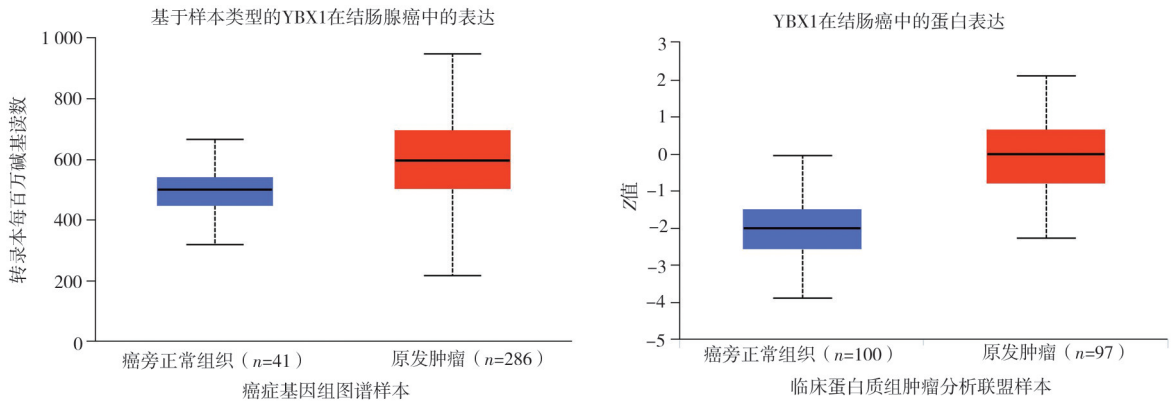
1.3 统计学方法

采用SPSS 25.0统计软件进行数据分析。正态定量资料采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）形式表示。平均值采用单因素方差分析和两独立样本t检验进行比较，检验水准α=0.05。所有实验重复3次。

2 结 果

2.1 YBX1 mRNA和蛋白在结肠癌中高表达

UALCAN portal数据库分析结果表明YBX1 mRNA和蛋白在结肠癌组织中的表达水平明显高于癌旁正常组织（图1）。

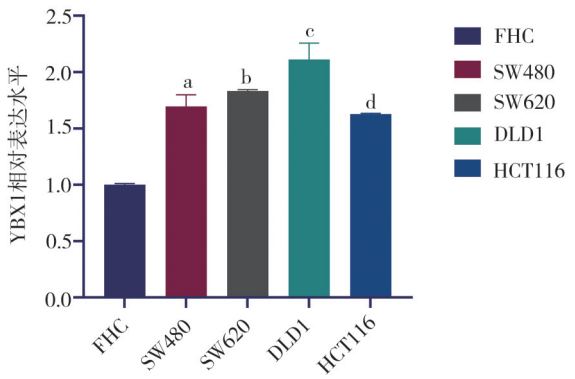


A. YBX1 mRNA在结肠癌组织中的表达　　B. YBX1蛋白在结肠癌组织中的表达

图1　YBX1 mRNA和YBX1蛋白在结肠癌中的表达

2.2　YBX1在结直肠癌细胞系中表达水平增高

通过RT-qPCR检测SW480、SW620、DLD1、HCT116和FHC细胞中YBX1的表达水平，结果表明YBX1在SW480、SW620、DLD1和HCT116细胞中的表达水平明显高于FHC细胞（图2）。因为既往研究表明YBX1在DLD1细胞中表达稳定，所以后续实验选择DLD1细胞[6]。



注：a，YBX1在SW480细胞中的表达水平，$P<0.001$；b，YBX1在SW620细胞中的表达水平，$P<0.001$；c，YBX1在DLD1细胞中的表达水平，$P<0.001$；d，YBX1在HCT116细胞中的表达水平，$P<0.001$

图2　YBX1在结直肠癌细胞中的表达

2.3　LC-MS mRNA修饰检测结直肠癌细胞和正常结直肠黏膜细胞中m5C修饰水平

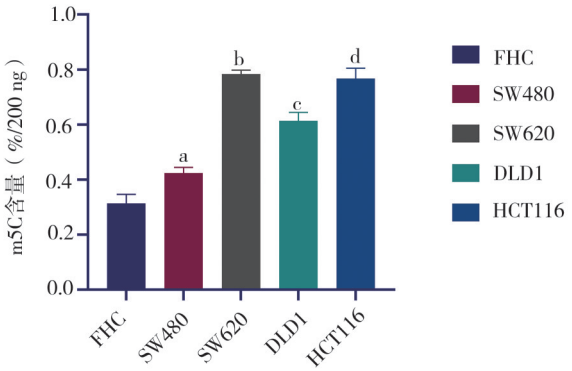
LC-MS分析结果表明，与正常结直肠黏膜FHC细胞相比，结直肠癌SW480、SW620、DLD1和HCT116细胞中m5C修饰水平均明显增高（图3）。

2.4　CCK8检测YBX1对细胞增殖的影响

CCK8检测结果表明，与空白对照组和阴性对照组相比，YBX1 siRNA组CRC细胞增殖活性明显降低，证实YBX1可促进CRC细胞增殖（图4）。

2.5　Transwell检测YBX1对细胞迁移能力的影响

通过Transwell检测YBX1对细胞迁移的影响，结果表明与空白对照组（146.67 ± 5.03）及阴性对照组（138.67 ± 3.06）相比，YBX1 siRNA组中细胞迁移水平为72.33 ± 6.66（均$P<0.05$），结果表明YBX1可促进结直肠癌细胞迁移（图5）。



注：a，SW480细胞中m5C修饰水平，$P<0.01$；b，SW620细胞中m5C修饰水平，$P<0.001$；c，DLD1细胞中m5C修饰水平，$P<0.001$；d，HCT116细胞中m5C修饰水平，$P<0.001$

图3　结直肠癌细胞中m5C修饰水平

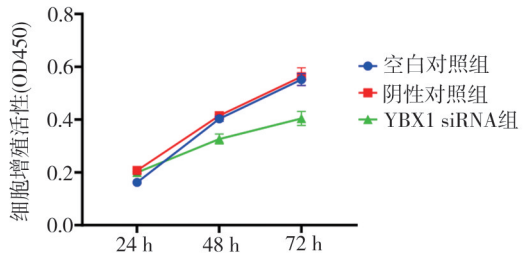


图4　YBX1对细胞增殖的影响

2.6　流式细胞仪检测细胞凋亡水平

通过流式细胞仪检测YBX1对细胞凋亡的影响，结果表明与空白对照组（5.10 ± 0.93）及阴性对照组（5.72 ± 2.63）相比，YBX1 siRNA组中细胞凋亡水平为23.00 ± 1.79（均$P<0.05$），结果表明YBX1可抑制结直肠癌细胞凋亡（图6）。

2.7　YBX1与铁死亡抑制因子相关

为探讨YBX1是否通过m5C修饰调控铁死亡抑制基因

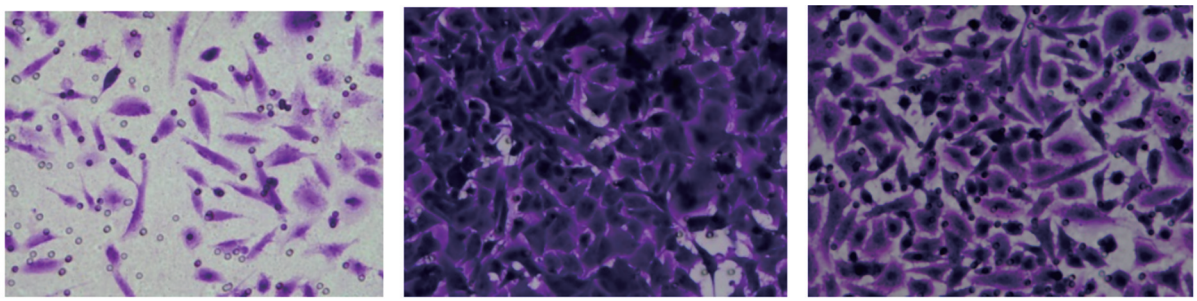


图5　YBX1对CRC细胞迁移的影响

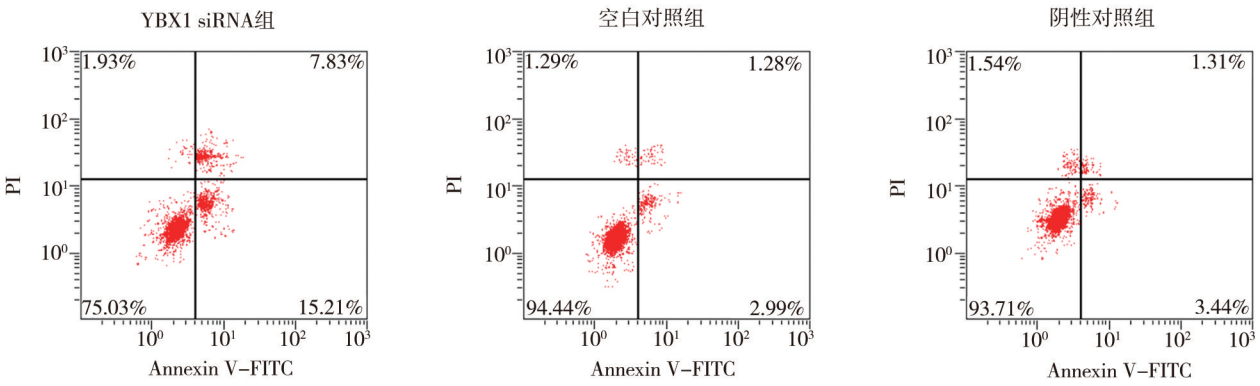


图6　YBX1对CRC细胞凋亡的影响

参与结直肠癌的发生发展，通过GEPIA2数据库获得与YBX1基因表达相关的前100个基因，然后在铁死亡相关数据库FerrDB V2中下载铁死亡抑制基因共238个并与之取交集，发现PRDX1和MS4A15这两个铁死亡抑制基因与YBX1基因表达明显相关（图7）。本研究选择MS4A15进行研究，进一步通过GEPIA2数据库分析结直肠癌中YBX1与MS4A15的相关性，结果表明YBX1与MS4A15的相关性R=0.46，P<0.001（图8）。

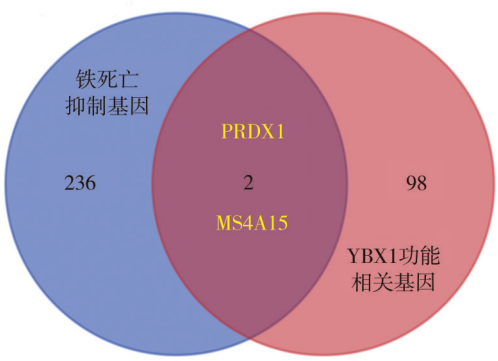


图7　与YBX1基因表达相关的铁死亡抑制基因

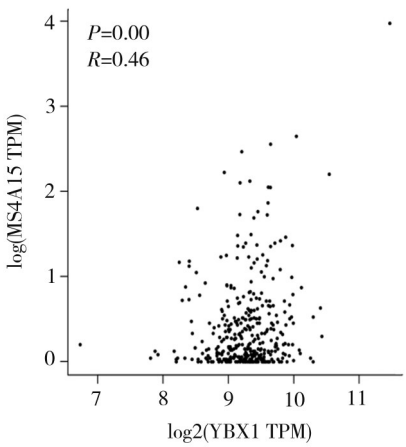


图8　YBX1与MS4A15表达的相关性

表1　MS4A15上的m5C修饰位点

位点：	随机森林概率评分（分值越高表示预测置信度越高）
seq0：	
653	0.21
654	0.18
787	0.17
911	0.2166667
2552	0.3033333
4719	0.1933333
6338	0.1666667
7942	0.2066667
9414	0.2366667
10610	0.1966667
11226	0.2066667

2.8　MS4A15上存在m5C修饰位点

接下来通过RNA m5C甲基化位点预测工具RNAm5Cfinder对MS4A15上的m5C修饰位点进行预测，发现MS4A15上存在多个潜在m5C修饰位点（表1）。

2.9 YBX1 蛋白与 MS4A15 有多个结合位点

进一步通过 catRAPID 数据库分析 YBX1 蛋白与 MS4A15 mRNA 是否可以直接结合，结果表明 YBX1 蛋白序列与 MS4A15 mRNA 序列上有多个结合位点，表明 YBX1 蛋白可与 MS4A15 直接结合（表 2）。

2.10 YBX1 对 MS4A15 mRNA 和 m5C 修饰水平的影响

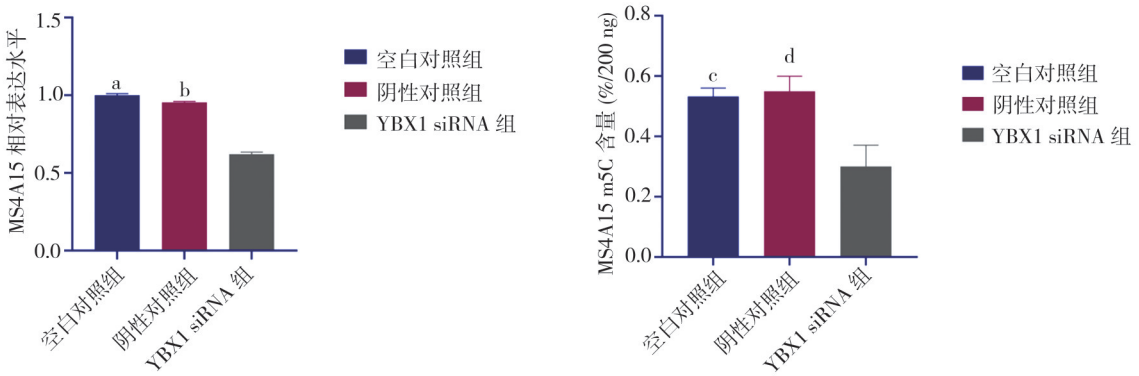
通过 siRNA 抑制 YBX1 表达，检测 MS4A15 mRNA 的表达水平及 MS4A15 基因的 m5C 修饰水平，结果发现下调 YBX1 表达后 MS4A15 mRNA 的表达水平明显降低，MS4A15 的 m5C 修饰水平也出现明显下降（图 9）。

2.11 YBX1 对 MS4A15 mRNA 稳定性的影响

RNA 稳定性分析发现 YBX1 敲低后，用放线菌素 D（actinomycinD）处理结直肠癌细胞，与空白对照组及阴性对照组相比，在不同时间点（0，2，4，6 h）RTPCR 检测，进行处理会缩

表 2 YBX1 蛋白与 MS4A15 mRNA 结合位点

#	蛋白质区域	RNA 区域	相互作用倾向性	判别能力
1	74–125	17866–18661	90.88	99
2	74–125	17882–18677	90.46	99
3	76–127	17866–18661	84.95	99
4	76–127	17882–18677	84.02	99
5	249–300	17866–18661	80.84	99
6	99–150	17866–18661	79.89	98
7	249–300	17882–18677	79.56	98
8	101–152	17866–18661	78.60	98
9	99–150	17882–18677	78.06	98
10	101–152	17882–18677	76.62	98
11	49–100	17866–18661	72.66	98
12	49–100	17882–18677	71.62	98
13	51–102	17866–18661	70.11	98
14	174–225	17882–18677	69.74	98
15	174–225	17866–18661	68.88	98
16	51–102	17882–18677	68.28	98
17	126–177	17882–18677	66.59	98
18	126–177	17866–18661	65.73	97
19	176–227	17882–18677	64.62	97
20	176–227	17866–18661	63.65	97



A. YBX1 对 MS4A15 mRNA 表达水平的影响　　B. YBX1 对 m5C 修饰水平的影响

注：a，下调 YBX1 表达组与空白对照组 MS4A15 表达水平比较，$P<0.001$；b，下调 YBX1 表达组与阴性对照组 MS4A15 表达水平比较，$P<0.001$；c，下调 YBX1 表达组与空白对照组 MS4A15 m5C 含量比较，$P<0.01$；d，下调 YBX1 表达组与阴性对照组 MS4A15 m5C 含量比较，$P<0.01$

图 9 YBX1 对 MS4A15 mRNA 表达水平和 m5C 修饰水平的影响

短MS4A15 RNA的半衰期，表明YBX1可促进MS4A15 mRNA的稳定性（图10）。

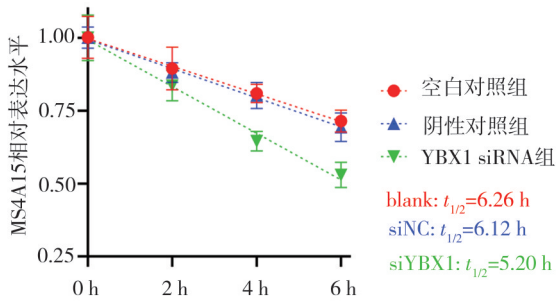


图10　YBX1促进MS4A15 mRNA的稳定性

2.12　MS4A15促进结直肠癌细胞增殖

为了验证MS4A15对结直肠癌细胞增殖的影响，在结直肠癌细胞中敲除MS4A15后检测细胞增殖活性，结果发现在结直肠癌细胞中抑制MS4A15表达后细胞增殖活性降低，说明MS4A15能够促进结直肠癌细胞增殖（图11）。

2.13　MS4A15促进结直肠癌细胞迁移

为了验证MS4A15可促进结直肠癌细胞迁移，在结直肠癌细胞中敲除MS4A15表达并检测细胞迁移能力，结果发现与空白对照组（92.33 ± 3.06）和阴性对照组（90.33 ± 1.53）相比，MS4A15 siRNA组（53.00 ± 9.54，均P<0.05）中细胞迁移能力明显降低（图12）。

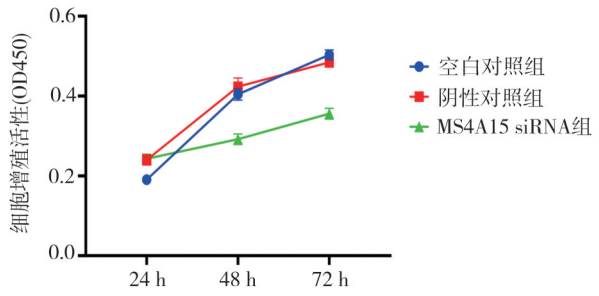


图11　MS4A15促进结直肠癌细胞增殖

2.14　MS4A15抑制结直肠癌细胞凋亡

为了验证MS4A15对结直肠癌细胞凋亡能力的影响，通过siRNA敲除MS4A15表达后对检测细胞凋亡水平，结果表明与空白对照组（5.64 ± 0.33）和阴性对照组（5.33 ± 1.04）相比，MS4A15 siRNA组（17.95 ± 1.37，均P<0.05）细胞凋亡水平明显增高（图13）。

2.15　MS4A15抑制铁死亡的发生

为了验证MS4A15在结直肠癌细胞铁死亡中的作用，在结直肠癌细胞中敲除MS4A15后，然后检测铁死亡关键指标MDA、ROS和Fe^{2+}的表达水平，结直肠癌细胞抑制MS4A15表达后MDA、ROS和Fe^{2+}含量均明显增高，说明敲除MS4A15能够促进铁死亡的发生（图14）。

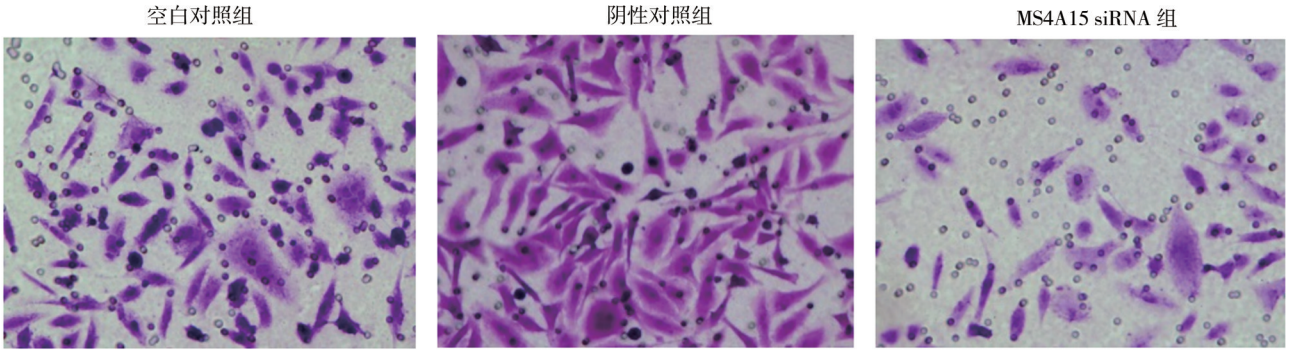


图12　MS4A15促进结直肠癌细胞迁移

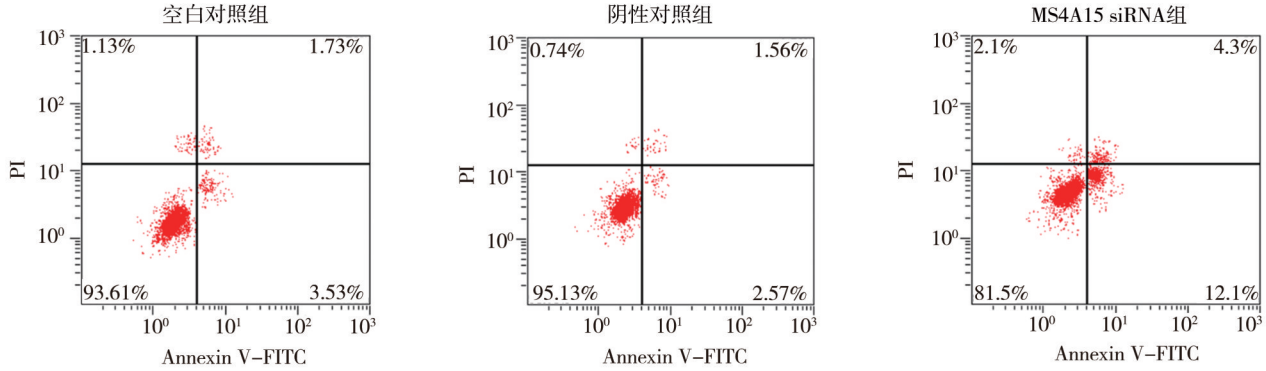
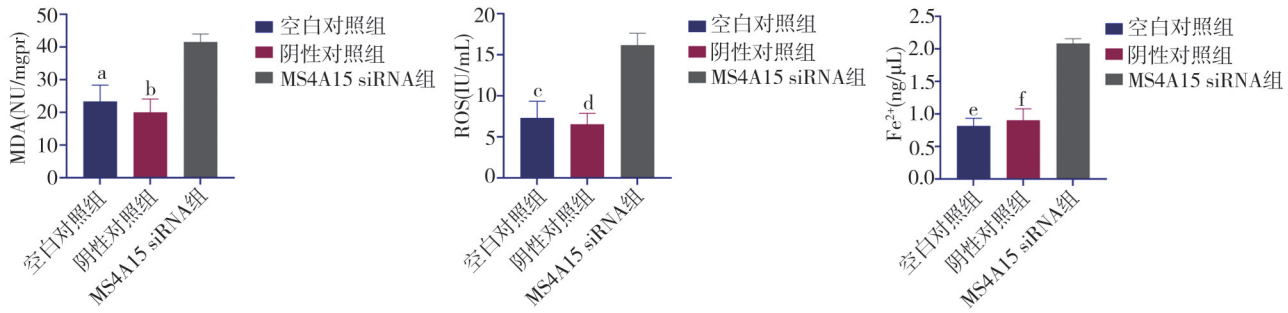


图13　MS4A15抑制结直肠癌细胞凋亡



A. 抑制MS4A15表达对MDA的影响　B. 抑制MS4A15表达对ROS的影响　C. 抑制MS4A15表达对Fe^{2+}的影响

注：a，下调 MS4A15 表达+Erastin 组与空白对照组 MDA 含量比较，$P<0.01$，b，下调 MS4A15 表达+Erastin 组与阴性组对照组 MDA 含量比较，$P<0.01$，c，下调 MS4A15 表达+Erastin 组与空白对照组 ROS 含量比较，$P<0.01$；d，下调 MS4A15 表达+Erastin 组与阴性对照组 ROS 含量比较，$P<0.01$，e，下调 MS4A15 表达+Erastin 组与空白对照组 Fe^{2+} 含量比较，$P<0.001$；f，下调 MS4A15 表达+Erastin 组与阴性对照组 Fe^{2+} 含量比较，$P<0.001$

图 14　MS4A15 抑制铁死亡的发生

3　讨　论

结直肠癌是全球第三大常见癌症，也是癌症相关死亡的第二大原因。CRC 占所有恶性肿瘤的 10%，其死亡率仍然居高不下[10]。超过一半的 CRC 患者在确诊时已有转移。目前 CRC 治疗方案包括手术、化疗、放射治疗和靶向治疗，CRC 患者的 5 年相对生存率为 65%，而Ⅲ期 CRC 患者的 5 年生存率则下降至 12%[11]。因此需要进一步探索结直肠癌发生发展的机制，以便为其提供新的生物标志物及靶点。

近年来另一种重要的 RNA 修饰 5-甲基胞嘧啶（m5C）引起了人们越来越多的关注。越来越多的证据证实，m5C 修饰调节多种 RNA 代谢和生物过程，如 RNA 稳定性、RNA 输出、RNA 翻译和 RNA 加工[12]。m5C 也有自己的甲基转移酶（writers，写入器）、去甲基酶（erasers，擦除器）和结合蛋白（readers，阅读器）。Aly/REF 输出因子（ALYREF）和 Y-box 结合蛋白 1（YBX1）是两种 m5C 阅读器，分别介导 RNA 核输出和增强 RNA 稳定性[13]。既往研究发现 YBX1 在结直肠癌组织中高表达并与患者预后相关，并且结直肠癌免疫细胞的 m5C 水平明显增高，结直肠癌患者血液中 m5C 修饰的调节因子 YBX1 的表达也明显增加[14]，证实 mRNA 的 m5C 修饰参与结直肠癌的发生发展，然而 m5C 阅读器 YBX1 参与结直肠癌发生发展的具体作用机制并不明确。前期通过生物信息学分析本课题组发现 YBX1 mRNA 和 YBX1 蛋白在结直肠癌组织中高表达，不仅如此 4 种结直肠癌细胞系中（SW480、SW620、DLD1 和 HCT116）中的 YBX1 表达也高于正常结直肠上皮细胞（FHC）的表达。LC-MS mRNA 修饰检测结果表明，CRC 细胞系的总 m5C 水平也高于正常结直肠上皮细胞，这也与 YBX1 的功能一致，即稳定 RNA 表达，从而提高总 RNA 的 m5C 水平。除此之外下调 YBX1 表达可抑制 CRC 细胞增殖和迁移，促进细胞凋亡，说明 YBX1 可通过调控 RNA m5C 修饰参与结直肠癌进展，其可能是结直肠癌潜在的治疗靶点。

铁死亡是一种新的调节性细胞死亡方式，其特征是细胞内 Fe^{2+} 水平增高而还原型谷胱甘肽水平降低，在形态学上和生物学上铁死亡与坏死、细胞凋亡和自噬均明显的区别。许多研究表明诱导铁死亡的发生可成功消除对其他死亡模式产生耐药性的结直肠癌细胞。因此研究铁死亡的发生及机制为 CRC 的治疗提供了新的思路[15]。为探讨 YBX1 是否通过 m5C 修饰调控铁死亡参与结直肠癌的发生发展，本研究通过 GEPIA2 数据库获得与 YBX1 基因表达相关的前 100 个基因，然后在铁死亡相关数据库 FerrDB V2 中下载铁死亡抑制基因共 238 个并与 YBX1 功能相关的 100 个基因取交集，发现 PRDX1 和 MS4A15 这 2 个铁死亡抑制基因与 YBX1 基因表达明显相关，并且 GEPIA2 数据库显示结直肠癌中 YBX1 的表达水平与 MS4A15 呈正相关（$R=0.46$）。本课题组选择 MS4A15 进行研究。通过 RNA m5C 甲基化位点预测工具 RNAm5Cfinder 本研究发现 MS4A15 上存在多个潜在 m5C 修饰位点，接下来通过 catRAPID 数据库本课题组发现 YBX1 蛋白序列与 MS4A15 RNA 序列有多个结合位点，表明 YBX1 蛋白可与 MS4A15 RNA 直接结合。为了探究 YBX1 介导的 m5C 稳定性及其相关 MS4A15 表达在结直肠癌发生和发展中的关键生物学特性，在结直肠癌细胞系中干扰 YBX1 表达，然后检测 MS4A15 mRNA 的

表达水平及MS4A15基因的m5C修饰水平。结果表明，YBX1敲除抑制了MS4A15 mRNA的表达及下调了MS4A15的m5C修饰水平，说明MS4A15的m5C修饰水平与MS4A15 mRNA的表达水平呈正相关。更重要的是，RNA稳定性分析发现YBX1敲除会缩短MS4A15 RNA的半衰期，这些结果初步确信，作为m5C阅读器的YBX1对MS4A15具有稳定作用。

MS4A15是一种铁死亡抑制基因，既往研究证实其在胃癌、卵巢癌和结肠癌中高表达，并且MS4A15高表达的结肠癌患者预后较差[16]。为了验证MS4A15在结直肠癌中的生物学功能，在结直肠癌细胞中敲除MS4A15后检测细胞增殖活性，迁移功能及凋亡水平，结果发现抑制MS4A15表达后细胞增殖活性和迁移能力明显降低，细胞凋亡水平明显增高。这些研究都揭示了MS4A15可能是结直肠癌治疗的一个有前途的靶点，然而其潜在机制几乎是未知的。为了验证MS4A15在结直肠癌细胞铁死亡中的作用，在结直肠癌细胞中敲除MS4A15后并用铁死亡诱导剂Erastin处理细胞，然后检测铁死亡关键指标MDA、ROS和Fe^{2+}的表达水平，结果发现抑制MS4A15表达后MDA、ROS和Fe^{2+}含量均明显增高，说明敲除MS4A15能够促进铁死亡的发生。既往研究表明抑制细胞铁死亡可促进肿瘤生长和转移，而诱导铁死亡可抑制肿瘤生长和减少转移[17]，并且铁死亡还可促进细胞凋亡进而导致SLC7A11和GPX4下调[18]。综合上述研究结果证实MS4A15通过抑制铁死亡从而促进结直肠癌细胞增殖和迁移，并抑制结直肠癌细胞凋亡。

综上，本研究结果表明m5C阅读器YBX1在结直肠癌过表达，其中可直接与铁死亡抑制基因MS4A15的m5C位点结合，增强MS4A15 mRNA的稳定性并提高MS4A15的表达水平。高表达的MS4A15通过抑制铁死亡并促进结直肠癌细胞的增殖和迁移，并抑制结直肠癌细胞凋亡。本研究揭示了结直肠癌发生和进展过程m5C阅读器YBX1与MS4A15介导的铁死亡抑制之间的关键联系，为结直肠癌的治疗提供新的作用靶点。

参 考 文 献

[1] Kanth P, Inadomi JM. Screening and prevention of colorectal cancer[J]. BMJ, 2021, 374: n1855.

[2] Biller LH, Schrag D. Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review[J]. JAMA, 2021, 325(7): 669-685.

[3] Zhang YX, Zhang LS, Dai Q, et al. 5-methylcytosine (m5C) RNA modification controls the innate immune response to virus infection by regulating type I interferons[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119(42): e2123338119.

[4] Guo GQ, Pan K, Fang S, et al. Advances in mRNA 5-methylcytosine modifications: Detection, effectors, biological functions, and clinical relevance[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 26: 575-593.

[5] Chen X, Li A, Sun BF, et al. 5-methylcytosine promotes pathogenesis of bladder cancer through stabilizing mRNAs[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(8): 978-990.

[6] Kim A, Shim S, Kim YH, et al. Inhibition of Y Box Binding Protein 1 Suppresses Cell Growth and Motility in Colorectal Cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2020, 19(2): 479-489.

[7] Liang DG, Minikes AM, Jiang XJ. Ferroptosis at the intersection of lipid metabolism and cellular signaling[J]. Mol Cell, 2022, 82(12): 2215-2227.

[8] Guo JP, Xu BF, Han Q, et al. Ferroptosis: A Novel Anti-tumor Action for Cisplatin[J]. Cancer Res Treat, 2018, 50(2): 445-460.

[9] Lu QR, Guo P, Wang XH, et al. MS4A3-HSP27 target pathway reveals potential for haematopoietic disorder treatment in alimentary toxic aleukia[J]. Cell Biol Toxicol. 2023, 39(1): 201-216.

[10] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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.

[11] Poturnajova M, Furielova T, Balintova S, et al. Molecular features and gene expression signature of metastatic colorectal cancer (Review)[J]. Oncol Rep, 2021, 45(4): 10.

[12] Hu YB, Chen CB, Tong XY, et al. NSUN2 modified by SUMO-2/3 promotes gastric cancer progression and regulates mRNA m5C methylation[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(9): 842.

[13] Chen YS, Yang WL, Zhao YL, et al. Dynamic transcriptomic m5C and its regulatory role in RNA processing[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2021, 12(4): e1639.

[14] Yin HF, Huang ZJ, Niu SQ, et al. 5-Methylcytosine (m5C) modification in peripheral blood immune cells is a novel non-invasive biomarker for colorectal cancer diagnosis[J]. Front Immunol, 2022, 13: 967921.

[15] Yang L, Zhang YW, Zhang YY, et al. Mechanism and application of ferroptosis in colorectal cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 158: 114102.

[16] Liang YG, Su Q, Wu X. Identification and Validation of a Novel Six-Gene Prognostic Signature of Stem Cell Characteristic in Colon Cancer[J]. Front Oncol, 2021, 10: 571655.

[17] Lee S, Hwang N, Seok BG, et al. Autophagy mediates an amplification loop during ferroptosis[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(7): 464.

[18] Lou JS, Zhao LP, Huang ZH, et al. Ginkgetin derived from Ginkgo biloba leaves enhances the therapeutic effect of cisplatin via ferroptosis-mediated disruption of the Nrf2/HO-1 axis in EGFR wild-type non-small-cell lung cancer[J]. Phytomedicine, 2021, 80: 153370.

（收稿：2024-06-25；修回：2024-08-29；录用：2024-09-18）

（责任编辑：李青颖）

本文引用格式：

夏术森，朱彦斌，刘礼鑫，等. m5C阅读器YBX1通过调节铁死亡抑制因子MS4A15的稳定性促进结直肠癌生长[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(11)：1506-1514.