

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250107.003

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250107.1724.006>

靶向 HMGCS1 探讨对宫颈癌细胞线粒体基因表达调控的作用机制

尚丹丹¹, 张晓敏¹, 杨雯萱¹, 陈博涵¹, 刘萍²✉, 周超¹✉

(1. 滨州医学院附属医院妇科, 山东 滨州 256603; 2. 海南西部中心医院生殖医学科, 海南 儋州 571799)

[摘要] **目的:**探讨 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 1 (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase 1, HMGCS1) 对宫颈癌 (cervical cancer, CC) 细胞线粒体基因表达的调控作用机制。**方法:**利用生物信息学分析、亚细胞结构分离定位法、shRNA 慢病毒载体的构建及细胞转染、Western blot、实时荧光定量 PCR、RNA 合成与降解动力学分析、线粒体 DNA 免疫沉淀-定量 PCR 分析, 探索靶向 HMGCS1 调控 CC 细胞线粒体基因表达的作用机制。**结果:**HMGCS1 在 CC 中表达上调, 预示预后不良; HMGCS1 主要差异表达于线粒体中; HMGCS1 的敲低导致 CC 细胞线粒体基因表达水平普遍下调; HMGCS1 的敲低可能通过降低线粒体 mRNA 合成水平来抑制线粒体基因表达; HMGCS1 可能通过促进 CC 细胞线粒体基因转录调控因子与线粒体 DNA (mtDNA) 的结合来保障线粒体基因的正常转录。**结论:**HMGCS1 在 CC 中高表达, 并与不良预后相关。下调的 HMGCS1 通过降低 CC 细胞线粒体 mRNA 合成水平来抑制线粒体基因表达, 并且 HMGCS1 可通过促进 CC 细胞线粒体基因转录调控因子与 mtDNA 的结合来保障线粒体基因的正常转录。因此, 靶向抑制 HMGCS1 调控线粒体基因表达可能是一种很有前景的 CC 治疗新策略。

[关键词] 宫颈癌; HMGCS1; 线粒体基因; 表达调控

[中图分类号] R737.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2026)02-0137-11

Targeting HMGCS1 to explore the mechanism of action on the regulation of mitochondrial gene expression in cervical cancer cells

SHANG Dandan¹, ZHANG Xiaomin¹, YANG Wenxuan¹, CHEN Bohan¹, LIU Ping²✉, ZHOU Chao¹✉

(1. Department of Gynecology, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, China; 2. Department of Reproductive Medicine, Western Hainan Center Hospital, Danzhou 571799, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the Shandong Province Medicine and Health Science and Technology Project (202405010551); Natural Science Foundation of Hainan Province (821RC732); Shandong Province Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project (2020M085); Binzhou Medical University "Clinical+X" Project (BY2021LCX26)

[Author]: SHANG Dandan, E-mail: bzyxysdd@163.com; ZHANG Xiaomin, Attending Physician, E-mail: byfcbfyc@163.com.

[Correspondence to]: ZHOU Chao, Ph.D., Master's Supervisor, Associate Chief Physician, E-mail: zhouchao1114@163.com; LIU Ping, Master's Supervisor, Chief Physician, E-mail: mxcz2011@163.com.

Received: 2024-09-17 Revised: 2024-12-30

JHMu, 2026;32(2):137-147

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of the regulatory effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase 1 (HMGCS1) on mitochondrial gene expression in cervical cancer (CC) cells. **Methods:** Bioinformatics analysis, subcellular structure isolation and localization method, construction of shRNA lentiviral vector and cell transfection, Western blot, real-time fluorescence quantitative PCR, kinetic analysis of RNA synthesis and degradation, and mitochondrial DNA immunoprecipitation-quantitative PCR analysis were utilized to explore the mechanism by which targeting HMGCS1 regulates mitochondrial gene expression in CC cells by exploring the mechanism of action of targeting HMGCS1. **Results:** HMGCS1 expres-

[基金项目] 山东省医药卫生科技项目(202405010551); 海南省自然科学基金高层次人才基金项目(821RC732); 山东省中医药科技项目(2020M085); 滨州医学院“临床+X”项目(BY2021LCX26)

[作者简介] 尚丹丹, E-mail: bzyxysdd@163.com; 张晓敏, 主治医师, E-mail: byfcbfyc@163.com。

[通讯作者] 周超, 博士, 硕士研究生导师, 副主任医师, E-mail: zhouchao1114@163.com; 刘萍, 硕士研究生导师, 主任医师, E-mail: mxcz2011@163.com。

[收稿日期] 2024-09-17 **[修回日期]** 2024-12-30 **网络出版时间:** 2025-01-08 09:36:21

sion is up-regulated in CC and predicts poor prognosis; HMGCS1 is mainly differentially expressed in mitochondria; knockdown of HMGCS1 leads to a general down-regulation of the mitochondrial gene expression level in CC cells; knockdown of HMGCS1 may inhibit mitochondrial gene expression by decreasing the level of mitochondrial mRNA synthesis; HMGCS1 may promote the mitochondrial gene transcription of CC cells by regulator binding to mitochondrial DNA (mtDNA) to safeguard the normal transcription of mitochondrial genes. **Conclusion:** HMGCS1 is highly expressed in CC and is associated with poor prognosis. Down-regulated HMGCS1 inhibits mitochondrial gene expression by decreasing the level of mitochondrial mRNA synthesis in CC cells, and HMGCS1 can safeguard the normal transcription of mitochondrial genes by promoting the binding of mitochondrial gene transcriptional regulators to mtDNA in CC cells. Therefore, targeted inhibition of HMGCS1 to regulate mitochondrial gene expression may be a promising new strategy for CC treatment.

[Key words] Cervical cancer; HMGCS1; Mitochondrial gene; Expression regulation

宫颈癌(cervical cancer, CC)是最常见的妇科恶性肿瘤之一,起源于子宫颈上皮细胞。在中国,每年约有 98 900 新发病例和 30 500 死亡病例^[1,2]。最新报道显示,CC 的 5 年相对生存率约为 67%,是年轻女性癌症相关死亡的第三大原因^[2]。尽管化疗、免疫治疗、放疗和手术等现有治疗手段被广泛采用,但 CC 患者的预后仍然不佳。大多数 CC 与人乳头瘤病毒(HPV)感染密切相关,尤其是 HPV 的高危型^[1,3]。但 CC 的确切发病机制尚未阐明,改善 CC 患者的预后已成为我国社会发展中亟需解决的重大医学和科学问题之一^[1-3]。因此,寻找与 CC 发生、发展密切相关的生物标志物,对于改善患者预后具有重要意义。

研究表明,线粒体基因组的稳定性、拷贝数及其表达水平对于维持正常的线粒体呼吸和代谢功能具有至关重要的作用^[4]。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 1(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase 1, HMGCS1)是胆固醇生物合成途径中的关键酶,负责催化乙酰乙酰辅酶 A 转化为 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)^[5]。本课题组前期研究发现^[6],HMGCS1 作为一种新兴的调节因子,调控 CC 细胞的放射敏感性,并建立了胆固醇代谢、线粒体呼吸与放射敏感性之间的分子桥梁。然而,目前尚不清楚 HMGCS1 是否能够调控 CC 细胞的线粒体基因表达,以及其潜在的作用机制尚待探究。因此,本研究将探讨 HMGCS1 对 CC 细胞线粒体基因表达的调控作用,从而为靶向 HMGCS1 的 CC 治疗策略提供创新性的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

人 CC 细胞系(Hela、HT-3)、宫颈原代上皮细胞(PCS-480-01)及其专用培养基以及用于转染的 HEK 293T 细胞系购于美国全球生物资源中心(ATCC),DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素购于美国 Gibco 公司,Mc-

Coy's 5A 培养基购于美国 Sigma-Aldrich 公司,亚细胞组分分离试剂盒购于美国 Thermo Scientific 公司,线粒体分离试剂盒购于美国 MedChemExpress 公司,RIPA 裂解液、SDS-PAGE 试剂、BCA 试剂盒、ECL 化学发光试剂盒、 α -Tubulin 抗体、Lamin B1 抗体、Tomma20 抗体、HMGCS1 抗体及山羊抗兔单克隆二抗、POLRMT 抗体、TFB2M 抗体及所用缓冲液购于美国 Abcam 公司,TFAM 抗体购于 Cell Signaling Technology 公司,Click-&-Go® 点击化学反应缓冲液试剂盒购于美国 Vector Laboratories 公司,5-乙炔尿嘧啶(5-EU)购于美国 MedChemExpress 公司,链霉亲和素磁珠(Pierce™ Streptavidin Magnetic Beads)购于美国 Thermo Scientific 公司,TRIzol 试剂购于美国 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒及 SYBR GreenPCR Master Mix 试剂盒购于 Applied Biosystems 公司。所有引物由锐博生物公司构建。

1.2 生物信息学分析

首先为探讨 HMGCS1 在泛癌中的表达,利用通过 TIMER(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)和 GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)在线数据库的数据进行分析。其次为探讨 HMGCS1 在 CC 中的相关表达,利用 UALCAN(<http://ualcan.path.uab.edu/>)在线数据库中的肿瘤基因组图谱(TCGA)数据进行分析,并从 HPA(<https://www.proteinatlas.org/>)数据库获取 HMGCS1 在 CC 及正常宫颈组织切片免疫组化染色图像。为探索 HMGCS1 的亚细胞分布,利用 HPA 数据库(<https://www.proteinatlas.org/>)进行亚细胞预测分析。

1.3 细胞培养

Hela 细胞和 HEK 293T 细胞采用含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基,HT-3 采用含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 McCoy's 5A 培养基,宫颈原代上皮细胞(PCS-480-01)采用宫颈原

代上皮细胞专用培养基,以上细胞均在 37 ℃、5% CO₂条件下培养,定期更换培养基并传代,以维持细胞的生长状态。

1.4 亚细胞结构分离定位法

首先按照试剂盒说明,使用亚细胞组分分离试剂盒获得 HeLa、HT-3 以及宫颈原代上皮细胞的细胞核和细胞质部分。再按照试剂盒说明,使用线粒体分离试剂盒将上述细胞进行线粒体分离。将收集细胞核、细胞质以及线粒体沉淀进行进一步评估。

1.5 shRNA 慢病毒载体的构建及细胞转染

本研究采用两个针对人 *HMGCS1* 基因(NM_001098272.3)的 MISSION® Lentiviral shRNA 克隆。克隆 TRCN000218729 靶向 CDS 区域(5'-GATCTTTCACTCACCATATTG-3'),克隆 TRCN 000230558 靶向 3'UTR 区域(5'-AGGTACTAATCTCCAATTAAA-3'),构建于 pLKO.005 载体中。采用钙磷酸共沉淀法将慢病毒包装质粒 psPAX2、包膜质粒 pMD2.G 与 shRNA 表达质粒按质量比 5:2:3 共转染 HEK 293T 细胞。转染 48~72 h 后收集病毒上清,经 0.45 μm 滤膜过滤。将过滤后的病毒上清与聚凝胺(polybrene)(终浓度 8 μg/mL)混合后用于感染靶细胞。感染 24 h 后更换完全培养基,48 h 后加入嘌呤霉素(Puromycin)(终浓度 2 μg/mL)进行筛选。稳定筛选 5~7 d 后,获得稳定表

达 shRNA 的细胞株。后续实验中,稳定转染的细胞在含有 2 μg/mL Puromycin 的完全培养基中维持培养。对照组(shCtrl)使用慢病毒载体转染的空白对照。

1.6 Western blot

首先将每个样品中等量的蛋白质通过 SDS-PAGE 进行分离,之后转移至 PVDF 膜上。接着将膜在室温下用含有 0.1% Tween 20 和 5% 牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 阻断缓冲液封闭 1 h。封闭后,将膜与特定的一抗在 4 ℃下孵育过夜。次日,使用含有 0.1% Tween 20 的 PBS 洗涤缓冲液对膜进行 3 次洗涤,随后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温下孵育 1 h。再次洗涤 3 次后,上机显影。

1.7 实时荧光定量 PCR(qPCR)

消化离心收集各组细胞,从细胞中提取总 RNA,按试剂盒说明书操作,利用逆转录试剂盒将 RNA 转录成 cDNA。然后在实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增,反应体系包括:2×PCR Master Mix、特定基因的上下游引物以及 cDNA 模板。PCR 程序为 95 ℃预变性 3 min,随后 95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 进行 40 个循环。数据使用 18s rRNA 作为细胞核基因阳性对照,ACTB 作为内参基因进行标准化。按 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算各组细胞表达的变化量。各引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab 1 Primer sequences

引物名称	引物序列
MT-ND1	F: 5'-TCCTACTCCTCATTGTACCCA-3' R: 5'-TTTCGTTTCGGTAAGCATTAGG-3'
MT-ND4	F: 5'-CCCTTCCTTGTACTATCCCT-3' R: 5'-TTTGTCGTAGGCAGATGGAG-3'
MT-ND5	F: 5'-TCTTAGTTACCGCTAACAACC-3' R: 5'-ATAATTCCTACGCCCTCTCAG-3'
MT-ND6	F: 5'-GCTTTGTATGATTATGGGCGT-3' R: 5'-CACCAACAAACAATGTTCAACC-3'
MT-TN	F: 5'-AGATTGAAGCCAGTTGATTAGG-3' R: 5'-GGACTTAAACCCACAAACAC-3'
MT-CYB	F: 5'-ATCACTTTATTGACTCCTAGCC-3' R: 5'-TGGTTGTCCTCCGATTTCAG-3'
MT-ATP6	F: 5'-TCCCTCTACACTTATCATCTTCAC-3' R: 5'-GACAGCGATTTCTAGGATAGTC-3'
MT-ATP8	F: 5'-TAAATACTACCGTATGGCCAC-3' R: 5'-GTGATGAGGAATAGTGTAAGGAG-3'
D-Loop_1	F: 5'-CCATTAGCACCCAAAGCTAAGA-3' R: 5'-CATAGCGTTGTTGATGGGTG-3'
D-Loop_2	F: 5'-CACCCCTCACCCACTAGGATAC-3' R: 5'-TCCATGGGGACGAGAAGGGATT-3'
D-Loop_3	F: 5'-ATCACCTATTAACCACTCACGG-3' R: 5'-GACATAGGGTGCTCCGGCTC-3'
D-Loop_4	F: 5'-GAGCACCTATGTCGCAGTAT-3' R: 5'-ACACTTTAGTAAGTATGTTTCGCCT-3'
D-Loop_5	F: 5'-GCTTCTGGCCACAGCACTTA-3' R: 5'-GTGCATACGCCAAAAAGATAAA-3'
ACTB	F: 5'-GATTCTATGTGGGCGACGA-3' R: 5'-TGTAGAAGGTGTGGTGCCAG-3'
18s rRNA	F: 5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3' R: 5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3'

1.8 RNA 合成与降解动力学分析

将稳定转染对照(shCtrl)组和实验(shHMGCS1)组的 HeLa 细胞接种于 10 cm 培养皿,细胞

密度达 70%~80% 时进行实验。移除正常培养基,用预热的 PBS 轻柔洗涤细胞。在 RNA 合成实验中,向培养皿中加入含 0.2 mmol/L 5-EU 的完全培

培养基,分别标记4 h(T0)和5 h(T1),期间不更换培养基。RNA降解实验中,细胞经3 h 5-EU标记后,用预热的PBS清洗3次,再加入正常培养基。立即收集部分细胞作为T0样本,其余细胞继续培养24 h后作为T24样本。样品收集后,加入1 mL Trizol试剂裂解细胞,提取总RNA。取500 ng总RNA进行Cu(I)介导的点击化学反应,25℃下反应2 h。随后,用MyOne T1链霉亲和素磁珠纯化100 ng生物素化RNA,并采用qPCR分析磁珠上的RNA。

1.9 线粒体DNA免疫沉淀-定量PCR(mtDIP-qPCR)分析

收集稳定转染对照组和实验组的Hela细胞(约 2×10^7 个),使用线粒体分离试剂盒分离完整线粒体。将纯化线粒体在37℃下与1%甲醛交联10 min,随后加入0.125 mol/L甘氨酸终止反应。用线粒体裂解缓冲液裂解线粒体,并通过超声破碎将DNA片段化至200~500 bp。离心 $13\,000 \times g$ 10 min去除碎片,取部分上清液作为Input对照,其余上清液与预偶联Protein A/G磁珠的特异性抗体(anti-HMGCS1、anti-TFAM、anti-POLRMT或anti-TFB2M)在4℃下旋转孵育过夜。依次用低盐、高盐和LiCl洗涤缓冲液各洗涤1次,最后用TE缓冲液洗涤2次。65℃孵育4 h逆转交联,加入蛋白酶K(终浓度200 $\mu\text{g/mL}$)消化2 h。用酚:氯仿:异戊醇混合液(25:24:1)抽提,离心后转移水相,重复抽提1次。加入醋酸钠和无水乙醇沉淀DNA,−20℃沉淀2 h或过夜。离心收集DNA沉淀,用75%乙醇洗涤2次,晾干后用30 μL 核酶水重悬,用于qPCR分析目标区域的富集。

1.10 统计学处理

本研究使用GraphPad Prism 10.3软件进行数据分析,使用Adobe Photoshop CS6软件进行图片编辑,每个实验包含3个生物学重复($n=3$),定量分析结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并显示了具有代表性的图像。两组数据比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HMGCS1在CC中表达上调,预示预后不良

首先为探讨HMGCS1在泛癌中的表达,利用TIMER和GEPIA在线数据库的数据分析,发现HMGCS1 mRNA在包括CC在内的多种肿瘤中的表达上调(图1A、B)。为进一步分析HMGCS1在CC中的具体表达情况,利用UALCAN在线数据库中的TCGA数据,发现与正常患者相比,CC患者中HMGCS1 mRNA表达上调(图1C)。相应的,HPA

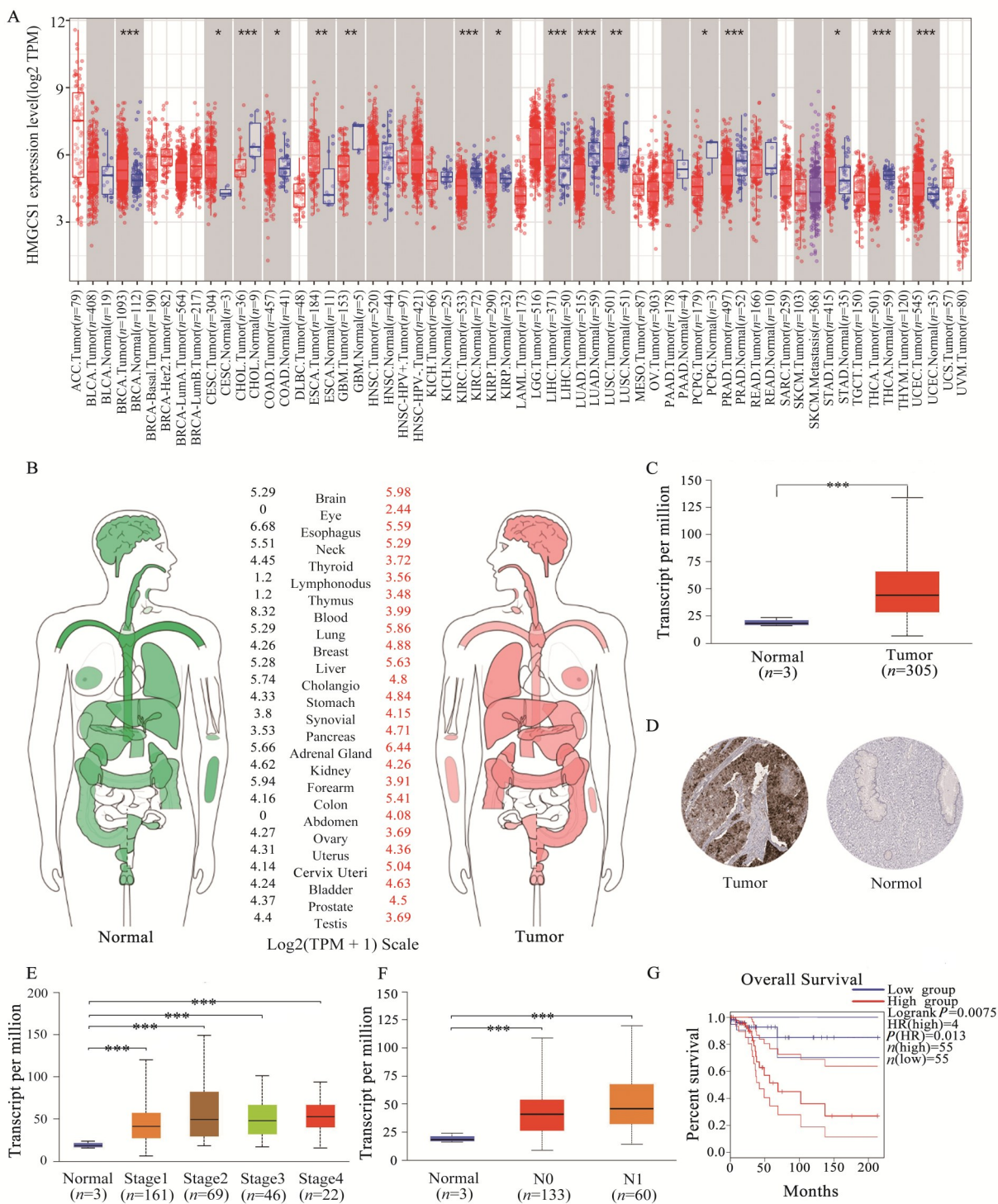
数据库中免疫组织化学结果显示,HMGCS1在CC组织中的表达高于正常宫颈组织(图1D)。接下来,本研究同样利用UALCAN在线数据库分析了CC患者中的HMGCS1 mRNA表达水平与临床肿瘤分期以及淋巴结转移状态的关系,发现HMGCS1表达升高与临床晚期以及淋巴结转移明显相关($P<0.001$)(图1E、F)。为了进一步分析HMGCS1与CC患者生存时间的关系,通过GEPIA中的Kaplan-Meier Plotter在线生存分析结果显示,HMGCS1高表达和CC患者的生存时间降低明显相关($P<0.05$),HMGCS1高表达患者的总生存期(overall survival)比HMGCS1低表达患者短(图1G)。以上结果表明,HMGCS1在CC中高表达,并且其高表达与CC患者癌症进展和较短的生存时间相关,预示预后不良。

2.2 HMGCS1主要差异表达于线粒体中

为探究HMGCS1在CC细胞中的作用机制,首先需要明确HMGCS1的亚细胞分布。利用HPA数据库进行亚细胞预测分析,结果提示HMGCS1在人体正常细胞中主要分布在细胞核和细胞质中(图2A)。选用人CC Hela、HT-3细胞系和宫颈原代上皮细胞系,通过亚细胞结构分离定位法将这3种细胞系分离成细胞核、细胞质和线粒体3部分,对这3部分进行Western blot检测,以评估内源性HMGCS1蛋白水平和细胞定位。Western blot结果提示,在宫颈原代上皮细胞中,HMGCS1只在细胞核和细胞质中表达(图2B),这与HPA数据库分析结果一致,然而在人CC Hela、HT-3细胞中,HMGCS1除了在细胞核和细胞质中表达,还在线粒体中表达(图2C、D)。以上结果说明,HMGCS1主要差异表达于线粒体中。

2.3 HMGCS1的敲低导致CC细胞线粒体基因表达水平普遍下调

由于HMGCS1仅在分离出的线粒体中的表达水平存在明显差异,后续实验主要探讨HMGCS1在CC细胞线粒体中的作用机制。首先使用慢病毒介导的shRNA敲低HMGCS1来产生稳定的Hela和HT-3细胞系,并验证其敲除效率(图3A~C)。在构建好稳定的shHMGCS1载体后,选取Hela细胞系检测对照组(shCtrl)和实验组(shHMGCS1)中线粒体转录物的相对水平。结果显示,与shCtrl组相比,shHMGCS1转导的Hela细胞中线粒体转录物(MT-ND1、MT-ND4、MT-ND5、MT-ND6、MT-TN、MT-CYB、MT-ATP6、MT-ATP8)的表达水平降低(图3D~K),表明HMGCS1的敲低导致CC细胞线



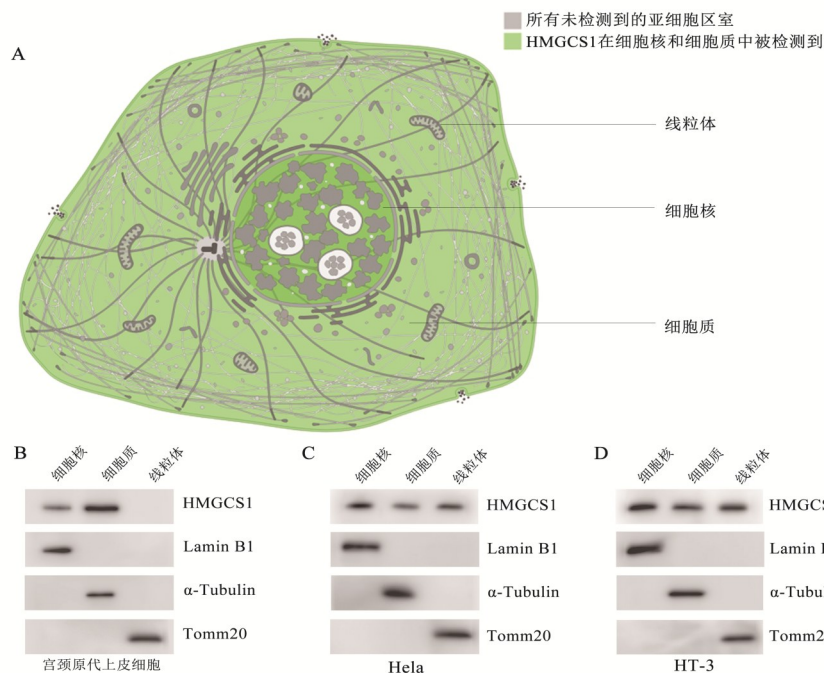
A:TIMER数据库获取的HMGCS1在泛癌中的表达水平;B:GEPIA数据库获取的HMGCS1在肿瘤和正常样本中的表达中位数的交互式身体结构图;C:UALCAN数据库获取的HMGCS1在正常样本和CC中的表达水平;D:HPA数据库获取的HMGCS1在CC及正常宫颈组织切片免疫组化染色图像;E:UALCAN数据库获取的CC患者不同临床分期中HMGCS1的表达水平;F:UALCAN数据库获取的CC患者不同淋巴结转移状态中HMGCS1的表达水平;G: GEPIA数据库获取的K-M曲线展示HMGCS1在CC中表达水平与总生存期(Overall survival)关系(TCGA数据库);* $P<0.05$;** $P<0.01$;*** $P<0.001$

图1 HMGCS1在不同肿瘤类型中的表达及与CC患者预后的关系

Fig 1 Expression of HMGCS1 in different tumor types and its relationship with prognosis of CC patients

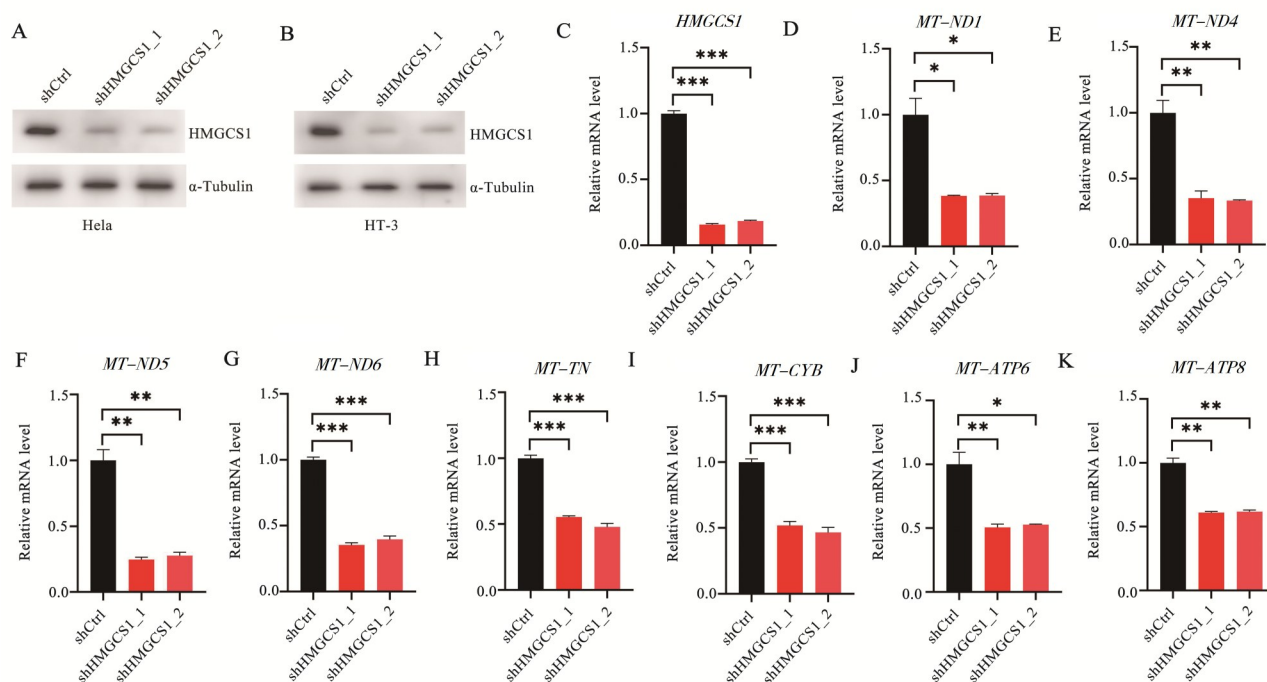
粒体基因表达水平普遍下调。体mRNA合成水平来抑制线粒体基因表达

2.4 HMGCS1的敲低可能通过降低CC细胞线粒为进一步探究敲低HMGCS1导致CC细胞线粒体基因表达水平普遍下调的具体调控机制,本研



A: HPA 数据库获取的 HMGCS1 亚细胞分布预测分析结果; B-D: Western blot 分析 HMGCS1 在宫颈原代上皮细胞、HeLa 和 HT-3 细胞的细胞核、细胞质以及线粒体的蛋白表达情况 (Lamin B1、 α -Tubulin、Tomm20 为内参)

图 2 HMGCS1 的亚细胞定位
Fig 2 Subcellular localization of HMGCS1



A、B: Western blot 验证转染后 HeLa 和 HT-3 细胞中 HMGCS1 的蛋白表达情况 (α -Tubulin 为内参); C: qPCR 验证转染后 HeLa 细胞 HMGCS1 mRNA 的表达水平; D-K: qPCR 检测转染后 HeLa 细胞中线粒体转录物 (*MT-ND1*、*MT-ND4*、*MT-ND5*、*MT-ND6*、*MT-TN*、*MT-CYB*、*MT-ATP6*、*MT-ATP8*) mRNA 的相对表达情况。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

图 3 HMGCS1 的敲低导致 CC 细胞线粒体基因表达水平普遍下调

Fig 3 Knockdown of HMGCS1 leads to a generalized downregulation of mitochondrial gene expression levels in CC cells

究采用 5-EU 标记法,在相同时间间隔(T0 至 T1)内,对 shCtrl 组和 shHMGCS1 组的 HeLa 细胞中新合

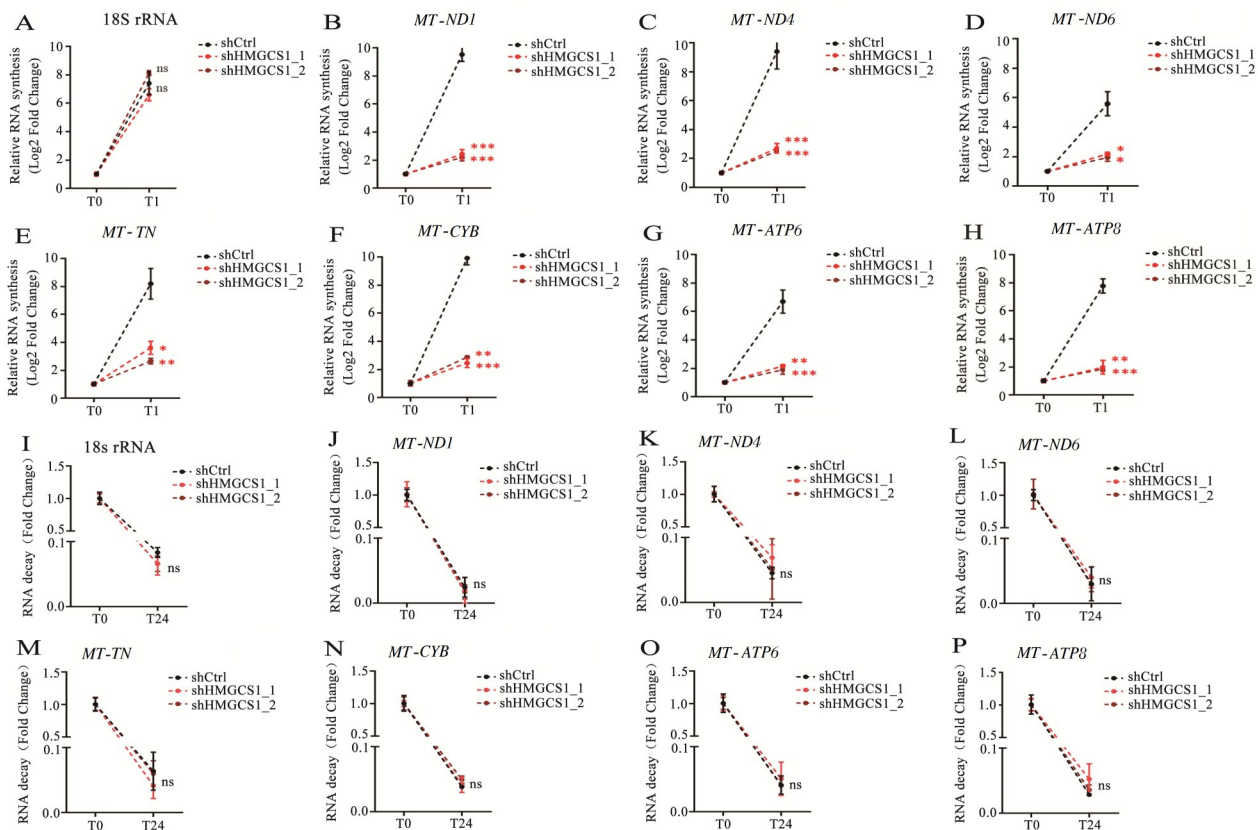
成 mRNA 进行标记。通过点击化学反应,将 5-EU 标记的 mRNA 生物素化,随后使用链霉亲和素磁珠

进行分离和纯化。最后,通过qPCR技术对纯化后的新合成mRNA进行定量分析。结果显示,与shCtrl组相比,HMGCS1的敲低下调了Hela细胞中线粒体 mRNA (*MT-ND1*、*MT-ND4*、*MT-ND6*、*MT-TN*、*MT-CYB*、*MT-ATP6*、*MT-ATP8*)的表达水平(图4A~H)。接下来,为验证敲低HMGCS1对Hela细胞线粒体mRNA的稳定性是否存在影响,利用5-EU标记法标记shCtrl组和shHMGCS1组的Hela细胞中新合成的mRNA。将标记好的细胞继续培养24 h,通过比较24 h前后(从T0到T24)5-EU标记的mRNA水平变化来评价mRNA的稳定性。结果显示,敲低HMGCS1对Hela细胞线粒体mRNA的稳定性无影响(图4I~P)。以上结果表明,敲低HMGCS1可能通过降低CC细胞线粒体mRNA合成水平来抑制线粒体基因表达。

2.5 HMGCS1可能通过促进CC细胞线粒体基因转录调控因子与线粒体DNA(mtDNA)的结合来保

障线粒体基因的正常转录

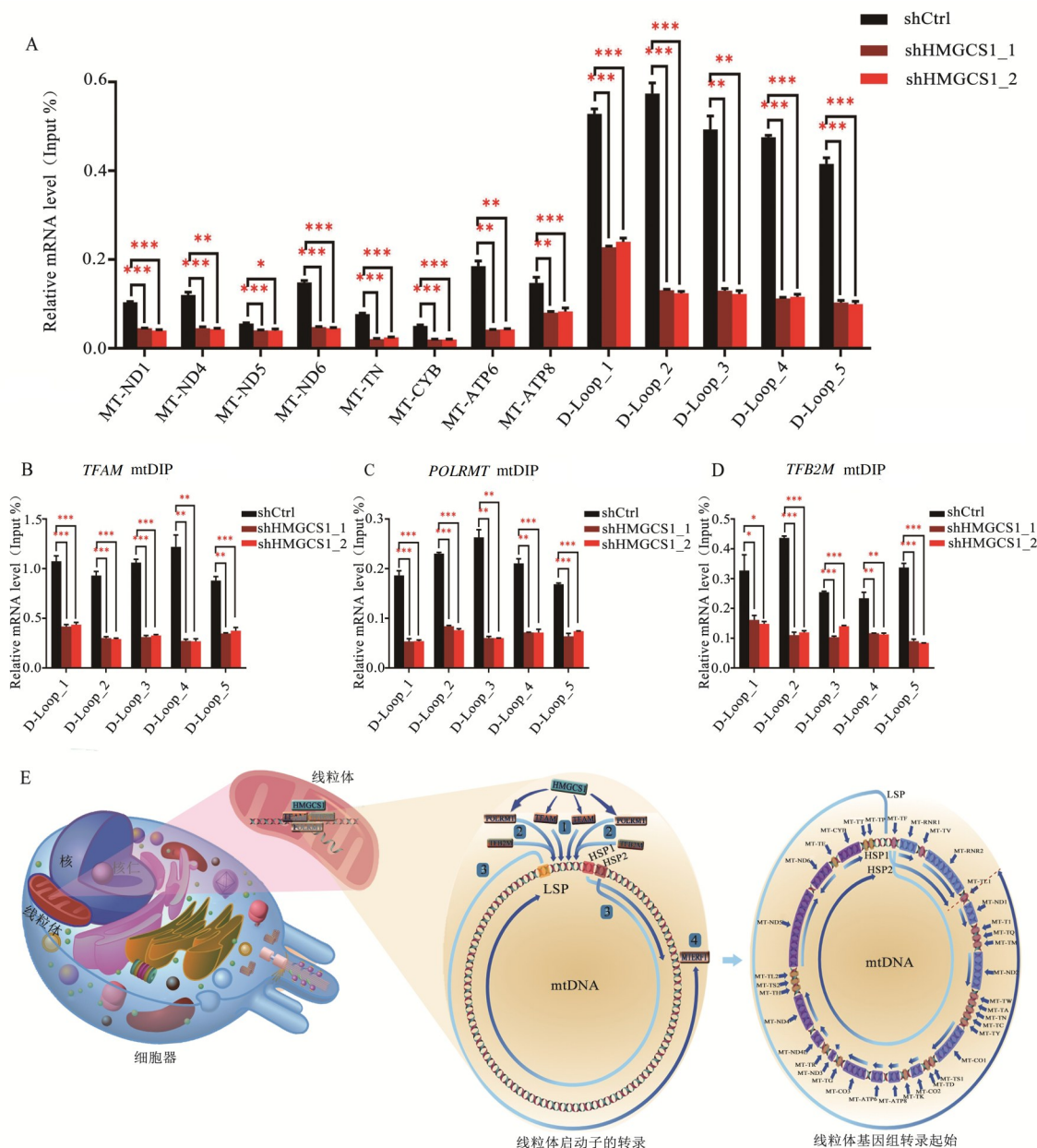
研究表明,转录起始是线粒体基因表达的关键调控步骤^[7]。为阐明HMGCS1在线粒体基因表达的转录起始阶段是否存在调控作用,首先利用mtDIP-qPCR检测HMGCS1与mtDNA的相互作用,明确了HMGCS1主要富集于mtDNA的D-Loop转录调控区域(图5A)。利用mtDIP-qPCR检测HMGCS1敲低对位于D-Loop转录调控区域的转录调控因子(*TFAM*、*POLRMT*、*TFB2M*)和mtDNA转录调控区域相互作用的影响。mtDIP-qPCR结果显示,在Hela细胞中敲低HMGCS1导致*TFAM*、*POLRMT*和*TFB2M*在mtDNA的D-Loop调控区域的结合丰度明显降低(图5B~D)。以上结果表明,HMGCS1可能通过促进CC细胞线粒体基因转录调控因子与mtDNA的结合来保障线粒体基因的正常转录。相关作用机制图见图5E。



A~H: qPCR 检测 5-EU 标记的相同时间内(从 T0 到 T1)shCtrl 组和 shHMGCS1 组敲低的 Hela 细胞中纯化后新合成 mRNA 的表达水平; I~P: qPCR 检测 5-EU 标记的 24 h 前后(从 T0 到 T24)shCtrl 组和 shHMGCS1 组敲低的 Hela 细胞中新合成 mRNA 的降解水平变化; 18s rRNA 为阳性对照; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, : 差异无统计学意义

图4 HMGCS1的敲低可能通过降低CC细胞线粒体mRNA合成水平来抑制线粒体基因表达

Fig 4 Knockdown of HMGCS1 may inhibit mitochondrial gene expression by decreasing the level of mitochondrial mRNA synthesis in CC cells



A: mtDIP-qPCR 检测 Hela 细胞中 shCtrl 组和 shHMGCS1 组 HMGCS1 与 mtDNA 的相互作用情况; B~D: mtDIP-qPCR 检测在 Hela 细胞中 shCtrl 组和 shHMGCS1 组 HMGCS1 影响 *TFAM*、*POLRMT* 和 *TFB2M* 在 mtDNA 的 D-Loop 调控区域的结合丰度情况; E: HMGCS1 调控 CC 细胞线粒体基因转录调控因子的作用机制图; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

图5 HMGCS1 可能通过促进 CC 细胞线粒体基因转录调控因子与 mtDNA 的结合来保障线粒体基因的正常转录

Fig 5 HMGCS1 may safeguard the normal transcription of mitochondrial genes by promoting the binding of mitochondrial gene transcription regulators to mtDNA in CC cells

3 讨论

CC 作为全球范围内女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率居高不下。尽管有效的筛查措施和预防性高危 HPV 疫苗的开发与应用已取得进展,但 CC 依旧是对公共卫生构成重大挑战的疾病^[1,3]。因此,寻找与 CC 发生、发展密切相关的生物标志物,对于改善患者预后具有重要意义。HMGCS1 是调控胆固醇代谢的关键酶,在多种疾病

中发生突变,其表达在肿瘤中普遍失调^[5]。TCGA 数据集显示,HMGCS1 在胃癌^[8]、乳腺癌^[9]和肺癌^[10]等多种癌症中表达上调。在本研究中,通过生信分析发现 HMGCS1 在 CC 组织和细胞中表达上调,HMGCS1 高表达与肿瘤进展相关,并且其高表达与 CC 患者较短的生存时间相关,预示预后不良。

亚细胞定位是研究基因功能不可或缺的一种技术手段,可将某种蛋白或者表达产物定位于细胞

中的具体位置,如细胞核、各种细胞器以及质膜上,从而为理解基因的作用机制提供研究方向^[11]。为了揭示HMGCS1在CC细胞中的具体作用机制,本研究首先探究了HMGCS1的亚细胞分布。通过生物信息学预测与亚细胞结构分离定位技术,发现HMGCS1在线粒体中明显差异表达。据此,本研究将重点聚焦于线粒体,进行后续的实验探究。

线粒体被誉为细胞内的“能量工厂”,它通过氧化磷酸化过程,将摄入的食物转化为细胞维持正常运作所必需的ATP。这一关键功能依赖于mtDNA的准确表达^[12]。mtDNA是位于线粒体基质中的双链闭环结构,长度大约为16 kb,它包含一个非编码调控区(D-Loop)和37个基因。这些基因分别负责编码2种线粒体rRNA、22种线粒体tRNA以及13种线粒体mRNA。其中这13种线粒体mRNA编码的蛋白亚基涵盖了呼吸链复合物I(包括ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6)、复合物III(CYB)、复合物IV(COX1、COX2、COX3)以及复合物V(ATP6、ATP8),这些亚基是线粒体能量生产的关键组成部分。与细胞核基因组不同,线粒体基因组属于多拷贝基因组。在每一个真核细胞中,平均含有数百甚至上千个线粒体,而每一个线粒体又含有5~10个拷贝的mtDNA^[12, 13]。研究表明,线粒体基因组的拷贝数、稳定性以及表达水平对维持正常的线粒体呼吸和代谢具有不可或缺的关键意义^[4]。研究发现,mtDNA的拷贝数增加是癌细胞增殖和转移的关键驱动因素^[14]。特别是在CC的发展过程中,mtDNA拷贝数的上升被认为可能与细胞对HPV持续感染的敏感性及其发展有关^[15]。然而,本课题组前期研究已证实^[6],敲低HMGCS1对CC细胞mtDNA拷贝数并无明显影响。因此,本研究的焦点转向探讨敲低HMGCS1对CC细胞线粒体基因表达调控机制的影响。

线粒体不仅是真核细胞的能量代谢中心,也是信号转导的关键枢纽,涉及凋亡、细胞周期、线粒体自噬、能量代谢、氧化应激、钙稳态、炎症等多个生物学过程,在癌症的发生与发展中扮演着至关重要的角色^[12]。研究显示,线粒体基因表达水平的异常变化会导致线粒体呼吸和代谢功能紊乱,从而诱发包括肿瘤在内的多种疾病^[4]。多项研究揭示,在肿瘤细胞中,线粒体基因的表达普遍上调^[16, 17]。韩琤波等^[16]通过逆转录PCR技术检测了42对胃癌及相应癌旁正常胃黏膜组织的线粒体编码基因(MT-ND4、MT-ND5、MT-CYB和MT-ATP6)的转录表达差异,发现胃癌组织中MT-COX I和

MT-ND4的转录水平明显高于正常胃黏膜组织;Wallace等^[17]也发现,在结直肠癌组织中,MT-RNR1、MT-ND1、MT-COX I、MT-ATP6、MT-ND6和MT-CYB的转录水平高于正常结肠黏膜,特别是MT-COX I在晚期患者中表现出过表达现象。为了探究HMGCS1是否影响CC细胞的线粒体基因表达,本研究采用慢病毒介导的shRNA技术成功构建了稳定敲减HMGCS1的shHMGCS1载体。首先通过qPCR方法,检测了对照组(shCtrl)和实验组(shHMGCS1)中线粒体转录物的相对表达水平,结果发现在shHMGCS1转导的Hela细胞中,线粒体转录物的表达普遍降低。然后进一步研究敲低HMGCS1对线粒体mRNA合成和降解的影响,发现敲低HMGCS1能够降低Hela细胞中线粒体mRNA的合成水平,但不影响其降解水平,表明对其稳定性无影响。本研究结果揭示,HMGCS1的敲低可能通过减少CC细胞线粒体mRNA的合成,从而抑制线粒体基因的表达,导致CC细胞线粒体基因表达水平的普遍降低。这一发现为未来针对CC的治疗策略提供了潜在的临床应用价值。

尽管线粒体拥有独立于细胞核的遗传系统,但其基因的转录过程却依赖于众多由细胞核编码的调控因子。这些调控因子与所有细胞核基因一样,在细胞核内完成转录,并在细胞质的核糖体上翻译,随后被转运至线粒体基质中行使功能^[7]。研究表明,细胞核基因编码的线粒体转录因子A(TFAM)在进入线粒体基质后,能够与mtDNA的D-Loop调控区结合,进而招募线粒体RNA聚合酶(POLRMT)和线粒体转录因子B2(TFB2M)等关键转录调控因子,共同启动mtDNA的转录过程^[12, 18]。研究指出,转录起始是线粒体基因表达中的关键调控环节。位于D-Loop转录调控区域的关键转录因子,包括POLRMT、TFAM和TFB2M,它们的相互作用对于转录起始过程是必不可少的^[7]。研究揭示,这3种转录调控因子在促进肿瘤发生与发展过程中表现出过表达现象。在乳腺癌^[19]、肺癌^[20]、子宫内膜癌^[21]和结直肠癌^[22]等多种癌症中,POLRMT的mRNA和蛋白质水平明显升高。TFAM在促进肿瘤生长与侵袭方面发挥作用,特别是在结直肠癌^[23]、胰腺癌^[24]、卵巢癌^[25]等肿瘤的转移患者中,TFAM的高表达成为影响患者生存预后的一个不利因素。此外,基于TCGA数据的生物信息学分析显示,TFB2M在肝癌中存在异常的过表达现象^[26]。本研究通过mtDIP-qPCR技术检测了Hela细胞中shHMGCS1与mtDNA的相互作用,证

实了 shHMGCS1 在 mtDNA 的 *D-Loop* 转录调控区域富集。进一步检测了 shHMGCS1 对位于 *D-Loop* 转录调控区域的转录调控因子 (*TFAM*、*POLRMT*、*TFB2M*) 与 mtDNA 相互作用的影响,发现敲低 HMGCS1 导致这些调控因子在 mtDNA 的 *D-Loop* 区域的结合丰度明显下降。因此,本研究认为, HMGCS1 可能通过促进 CC 细胞线粒体基因转录调控因子与 mtDNA 的结合,确保线粒体基因的正常转录,这可能为 CC 治疗提供新的希望。未来,针对 HMGCS1 的基因治疗或药物干预策略有望改善 CC 患者的预后。

在过去半个世纪的研究中,控制 mtDNA 转录以及线粒体 mRNA 稳定性、加工、修饰和翻译的分子机制已逐步得到阐明,并持续成为科研探索的热点。尽管如此,研究人员对线粒体 mRNA 的折叠景观或结构组的认识仍然十分有限,这一知识空白限制了对 mtDNA 基因表达及其调控机制的深入理解^[27]。未来本课题组将致力于进一步研究,以阐明 HMGCS1 是否作为支架蛋白,维持线粒体转录调控复合体的结构稳定性,从而确保线粒体基因的正常转录。

综上所述,本研究发现 HMGCS1 在 CC 中高表达,并与不良预后相关。进一步研究表明, HMGCS1 主要在线粒体中差异表达,其下调能够通过减少 CC 细胞线粒体 mRNA 的合成水平来抑制线粒体基因的表达。同时, HMGCS1 通过促进线粒体基因转录调控因子与 mtDNA 的结合,确保线粒体基因的正常转录。据此,针对 HMGCS1 进行靶向抑制,以调控线粒体基因表达,可能是一种很有前景的 CC 治疗新策略。

作者贡献度说明:

尚丹丹:实验设计、数据收集与整理、实验操作及论文撰写;张晓敏:数据分析、实验操作及论文撰写;杨雯萱:数据分析及论文修改;陈博涵:数据收集及论文修改;刘萍:全面指导研究及指导论文修改;周超:全面指导研究及指导论文修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- 1 Abu-Rustum NR, Yashar CM, Arend R, et al. NCCN Guidelines® Insights: Cervical cancer, version 1.2024 [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2023, 21(12): 1224-1233.
- 2 Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024 [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(1): 12-49.
- 3 Bedell SL, Goldstein LS, Goldstein AR, et al. Cervical cancer screening: Past, present, and future [J]. Sex Med Rev, 2020, 8(1): 28-37.
- 4 Russell OM, Gorman GS, Lightowers RN, et al. Mitochondrial diseases: Hope for the future [J]. Cell, 2020, 181(1): 168-188.
- 5 Xu H, Zhou S, Tang Q, et al. Cholesterol metabolism: New functions and therapeutic approaches in cancer [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1874(1): 188394.
- 6 Zhang X, Sun C, Wan J, et al. Compartmentalized activities of HMGCS1 control cervical cancer radiosensitivity [J]. Cell Signal, 2023, 101: 110507.
- 7 Goovaerts Q, Shen J, De Wijngaert B, et al. Structures illustrate step-by-step mitochondrial transcription initiation [J]. Nature, 2023, 622(7984): 872-879.
- 8 Wang IH, Huang TT, Chen JL, et al. Mevalonate pathway enzyme HMGCS1 contributes to gastric cancer progression [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(5): 1088.
- 9 Walsh CA, Akrap N, Garre E, et al. The mevalonate precursor enzyme HMGCS1 is a novel marker and key mediator of cancer stem cell enrichment in luminal and basal models of breast cancer [J]. PLoS One, 2020, 15(7): e0236187.
- 10 倪银芸, 杨瑛, 张立. 抑制肺鳞癌靶点 HMGCS1 促进细胞铁死亡[J]. 中国肺癌杂志, 2024, 27(5): 330-336.
- 11 Ni YY, Yang Y, Zhang L. Inhibition of lung squamous cancer target HMGCS1 promotes cellular ferroptosis [J]. Chin J Lung Cancer, 2024, 27(5): 330-336.
- 12 Gillani M, Pollastri G. Protein subcellular localization prediction tools [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2024, 23: 1796-1807.
- 13 Pearce SF, Rebelo-Guimaraes P, D'Souza AR, et al. Regulation of mammalian mitochondrial gene expression: Recent advances [J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(8): 625-639.
- 14 Kotrys AV, Szczesny RJ. Mitochondrial gene expression and beyond-novel aspects of cellular physiology [J]. Cells, 2019, 9(1): 17.
- 15 Mauro-Lizcano M, Di Pisa F, Larrea Murillo L, et al. High mitochondrial DNA content is a key determinant of stemness, proliferation, cell migration, and cancer metastasis *in vivo* [J]. Cell Death Dis, 2024, 15(10): 745.
- 16 Al-Awadhi R, Alroomy M, Al-Waheeb S, et al. Altered mitochondrial DNA copy number in cervical exfoliated cells among high-risk HPV-positive and HPV-negative women [J]. Exp Ther Med, 2023, 26(5): 521.
- 17 韩琤波, 李凡, 毛晓韵, 等. 线粒体 DNA 转录表达与胃癌发生关系的研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2006, (21): 1205-1209.

- Han CB, Li F, Mao XY, et al. The studies on relationship between expression of mitochondrial DNA transcription and gastric carcinogenesis [J]. *Chin J Clin Oncol*, 2006, 33(21): 1205-1209.
- 17 Wallace L, Mehrabi S, Bacanamwo M, et al. Expression of mitochondrial genes *MT-ND1*, *MT-ND6*, *MT-CYB*, *MT-CO I*, *MT-ATP6*, and *12S/MT-RNR1* in colorectal adenopolyps [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9): 12465-12475.
- 18 Kummer E, Ban N. Mechanisms and regulation of protein synthesis in mitochondria [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(5): 307-325.
- 19 Velasco-Ruiz A, Nuñez-Torres R, Pita G, et al. POLRMT as a novel susceptibility gene for cardiotoxicity in epirubicin treatment of breast cancer patients [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(11): 1942.
- 20 Zhou T, Sang YH, Cai S, et al. The requirement of mitochondrial RNA polymerase for non-small cell lung cancer cell growth [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(8): 751.
- 21 Li SP, Ou L, Zhang Y, et al. A first-in-class POLRMT specific inhibitor IMT1 suppresses endometrial carcinoma cell growth [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(2): 152.
- 22 Wang H, Liu Y, Lu XS, et al. Targeting POLRMT by IMT1 inhibits colorectal cancer cell growth [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(9): 643.
- 23 Zhao Y, Wang Y, Zhao J, et al. PDE2 inhibits PKA-mediated phosphorylation of TFAM to promote mitochondrial Ca^{2+} -induced colorectal cancer growth [J]. *Front Oncol*, 2021, 11:663778.
- 24 Wang W, Jiang CF, Yin HS, et al. Targeting mitochondrial transcription factor A sensitizes pancreatic cancer cell to gemcitabine [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2023, 22(5): 519-527.
- 25 Kleih M, Böpple K, Dong M, et al. Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that dictates cell fate of ovarian cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(11): 851.
- 26 Geng X, Geng Z, Li H, et al. Over-expression of TFB2M facilitates cell growth and metastasis *via* activating ROS-Akt-NF- κ B signalling in hepatocellular carcinoma [J]. *Liver Int*, 2020, 40(7): 1756-1769.
- 27 Santonoceto G, Jurkiewicz A, Szczesny RJ. RNA degradation in human mitochondria: The journey is not finished [J]. *Hum Mol Genet*, 2024, 33(R1): R26-R33.

[本文编辑] 朱金月