

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.08.003

· 基础研究 ·

RNF8通过ATM/CHK2轴促进DNA损伤应答并影响子宫内膜癌细胞顺铂抵抗性

蔡菲菲, 杨婷婷, 邵洋, 马新, 强萍, 赵芳, 奚星澍(苏州大学附属张家港医院 妇产科, 江苏 张家港 215600)

[摘要] **目的:**探讨环指蛋白8(RNF8)对子宫内膜癌(EC)细胞顺铂(CDDP)敏感性的影响及可能机制。**方法:**基于在线数据库分析RNF8在EC组织中的表达及拷贝数变异;采用慢病毒介导shRNA稳定敲低Ishikawa细胞中RNF8表达并进行CDDP处理,按sh-NC+溶剂对照、sh-RNF8+溶剂对照、sh-NC+CDDP、sh-RNF8+CDDP分组处理,并设置sh-RNF8+CDDP+KU60019抑制实验。采用CCK-8、克隆形成、Annexin V-FITC/PI流式细胞术、Hoechst 33258/PI染色、WB及 γ -H2AX免疫荧光检测细胞活力、克隆形成、凋亡、DNA损伤累积及ATM/CHK2通路相关蛋白表达。**结果:**RNF8在EC组织和细胞中表达升高。RNF8敲低降低细胞存活率和IC₅₀,抑制克隆形成,并进一步增强CDDP诱导的凋亡;同时BAX、Cleaved-Caspase-3和 γ -H2AX表达升高,BCL-2、p-ATM、p-CHK2和RAD21表达降低。KU60019处理进一步促进DNA损伤累积和细胞凋亡,并降低细胞活力。**结论:**RNF8可能通过ATM/CHK2轴促进DNA损伤应答并降低EC细胞对CDDP的敏感性;敲低RNF8可增加DNA损伤累积并增强CDDP敏感性。

[关键词] 环指蛋白8;DNA损伤应答;ATM/CHK2信号通路;顺铂

[中图分类号] R737.33;R730.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2026)08-0830-10

RNF8 promotes DNA damage response through the ATM/CHK2 axis and affects cisplatin resistance in endometrial cancer cells

Cai Feifei, Yang Tingting, Shao Yang, Ma Xin, Qiang Ping, Zhao Fang, Xi Xingshu (Department of Obstetrics and Gynecology, Zhangjiagang Hospital Affiliated to Soochow University, Zhangjiagang 215600, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of RING finger protein 8 (RNF8) in cisplatin (CDDP) sensitivity in endometrial cancer (EC) and its possible mechanism. **Methods:** The expression level of RNF8 in endometrial cancer tissues and its copy number variation profile were analyzed using an online database. Lentivirus-mediated shRNA was used to stably knock down RNF8 expression in Ishikawa cells, followed by CDDP treatment. The cells were grouped: sh-NC + solvent control, sh-RNF8 + solvent control, sh-NC + CDDP, and sh-RNF8 + CDDP. An inhibition experiment was conducted using the sh-RNF8 + CDDP + KU60019 combination. CCK-8 assays, colony formation assays, Annexin V-FITC/PI flow cytometry, Hoechst 33258/PI staining, WB, and γ -H2AX immunofluorescence were used to assess cell viability, colony formation, apoptosis, DNA damage, and the expression of proteins related to the ATM/CHK2 pathway. **Results:** RNF8 was significantly overexpressed in endometrial cancer tissues and cells. RNF8 knockdown reduced cell viability and IC₅₀, inhibited colony formation, and further enhanced CDDP-induced apoptosis. Meanwhile, the expression of BAX, Cleaved-Caspase-3, and γ -H2AX increased, while the expression of BCL-2, p-ATM, p-CHK2, and RAD21 decreased. Treatment with KU60019 further promoted DNA damage and apoptosis, and reduced cell viability. **Conclusion:** RNF8 may promote DNA damage response and reduce the sensitivity of endometrial cancer cells to CDDP via the ATM/CHK2 axis. Knocking down RNF8 increases DNA damage and enhances sensitivity to CDDP.

[Key words] RING finger protein 8 (RNF8); DNA damage response; ATM/CHK2 pathway; cisplatin (CDDP)

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(8): 830-839. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2026.08.003]

近年来,子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)发病率持续上升,晚期、复发及转移性患者治疗选择有限、预后较差^[1-2]。顺铂(cisplatin, CDDP)是EC常用化疗药物,通过诱导DNA双链断裂发挥抗肿瘤作用,但CDDP耐药严重制约其疗效,亟需阐明其耐药机制并寻找增敏靶点^[3-5]。DNA损伤应答(DNA damage response, DDR)是细胞应对基因毒损伤的重要防御机制,其中ATM/CHK2信号通路是感知和修复DNA双链断裂的核心通路,其

活化可削弱CDDP的杀伤效果^[6-8]。环指蛋白8(ring finger protein 8, RNF8)作为DDR早期关键E3泛素连接酶,可通过泛素化组蛋白H2A促进53BP1、BRCA1等修复蛋白在损伤位点的募集,并参与ATM/CHK2下游信

[基金项目] 江苏省妇幼健康科研项目(F202167)

[作者简介] 蔡菲菲(1987—),女,学士,主治医师

[通信作者] 奚星澍(扫码获取作者通信方式)



号传导^[9-10]。已有研究显示RNF8在多种肿瘤中高表达并与化疗耐药相关,但其在EC细胞CDDP敏感性调控中的作用机制尚不明确^[11-13]。本研究基于TCGA数据库分析RNF8在EC中的表达,通过敲低RNF8联合CDDP或ATM特异性抑制剂KU60019干预,探讨RNF8是否通过ATM/CHK2轴调控DNA损伤应答从而影响EC细胞CDDP敏感性,以期为逆转耐药提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人EC细胞Ishikawa、HEC-1A、AN3CA及人永生化子宫内膜异位症患者在位内膜间质细胞hEM15A均购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。

10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和1%青-链霉素溶液均购自美国Gibco公司,DMEM/F-12培养基(SH30023.01)和MEM培养基(SH30024.01)均购自美国HyClone公司,0.25%胰酶-EDTA(25200072)及DAPI(D9542)均购自美国Thermo公司,Triton X-100(T8200),牛血清白蛋白(BSA, A8020)购自北京索莱宝科技有限公司,二甲基亚砜(DMSO, D2650)、CDDP(232120,纯度 $\geq 98\%$)、聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(ISEQ00010)购自美国Sigma-Aldrich公司,ATM抑制剂KU60019(S1570,纯度 $\geq 98\%$)购自美国Selleck公司,RNF8 shRNA(sh-RNF8)及阴性对照shRNA(sh-NC)均购自中国上海吉玛基因科技有限公司,CCK-8试剂盒(C0037)、BCA蛋白定量试剂盒(P0012)、RIPA裂解液(P0013B)、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)蛋白酶抑制剂(ST2573-5g)、Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(C1383S)、Hoechst 33258/PI双染液(S0006-100T)、免疫荧光封片剂(P0126-25ml)、ECL化学发光检测试剂盒(P0018AS)均购自中国上海碧云天生物技术股份有限公司。

RNF8抗体(ab70156, 1:1 000)及RAD21抗体(ab992, 1:1 000)均购自英国Abcam公司,ATM抗体(2873, 1:1 000)、p-ATM(Ser1981)抗体(5883, 1:1 000)、CHK2抗体(2662, 1:1 000)、p-CHK2(Thr68)抗体(2197, 1:1 000)、 γ -H2AX(Ser139)抗体(9718, WB 1:1 000, IF 1:200)、BAX抗体(5023, 1:1 000)、BCL-2抗体(15071, 1:1 000)及Cleaved-Caspase-3抗体(9664, 1:1 000)均购自美国CST公司, β -actin抗体(66009-1-Ig, 1:5 000)、HRP标记山羊抗兔IgG(SA00001-2, 1:5 000)及HRP标记山羊抗鼠IgG(SA00001-1, 1:5 000)均购自美国Proteintech公司。

1.2 数据库分析

从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载泛癌及EC的RNA-seq表达数据和相应临床信息。采用TIMER 2.0在线工具(<http://timer.cistrome.org/>)分析RNF8在EC肿瘤组织与正常组织间的差异表达,筛选条件为 $|\log_2FC| > 1$ 且 $P < 0.05$ 。利用cBioPortal平台(<https://www.cbioportal.org/>)的OncoPrint模块分析RNF8基因拷贝数变异类型及其与mRNA表达水平的关联。

1.3 细胞培养

Ishikawa、AN3CA、hEM15A置于DMEM/F-12培养基,HEC-1A置于MEM培养基,均补充10% FBS和1%青-链霉素混合液,在37℃、5% CO₂恒温培养箱中维持培养。传代用0.25%胰酶-EDTA消化,传代比例为1:3。细胞每日于倒置显微镜下观察,汇合度达80%~90%且状态良好时用于实验。

1.4 shRNA慢病毒感染构建RNF8稳定敲低模型

靶向人RNF8的shRNA慢病毒颗粒及阴性对照慢病毒颗粒,分别记为sh-RNF8和sh-NC,所用载体骨架为pLKO.1-puro。sh-RNF8携带靶向人RNF8的shRNA表达序列,其靶序列位于RNF8 mRNA编码区第1 285至1 305位,GenBank登录号为NM_003958.3。sh-RNF8正义链序列为5'-TGGAACCTTAAAGGGTCTATT-3',反义链序列为5'-AATAGACCCTTAAAGGTTCCA-3'。shRNA表达框由靶序列、发夹环序列TTCAAGAGA、靶序列反向互补序列及RNA聚合酶III终止信号TTTTT组成。阴性对照慢病毒sh-NC携带不靶向人类已知基因的乱序shRNA序列,其正义链序列为5'-CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG-3',反义链序列为5'-CGAGGGCGACTTAACCTTAGG-3'。

取对数生长期Ishikawa细胞,以 1.5×10^5 个/孔接种于6孔板。待细胞汇合度达50%~60%时,更换为含8 μ g/mL polybrene的完全培养基,并按MOI = 10加入相应慢病毒颗粒,实际加入量为10 μ L/孔。感染12~16 h后更换新鲜完全培养基。感染48 h后,采用嘌呤霉素进行稳定细胞筛选。筛选前先进行嘌呤霉素杀伤曲线实验,分别以0、0.5、1、2、3、4和5 μ g/mL嘌呤霉素处理未感染Ishikawa细胞7 d,确定2 μ g/mL为能够杀死全部未感染细胞的最低有效浓度。因此,正式实验中以2 μ g/mL嘌呤霉素连续筛选1~2周,直至未感染对照细胞全部死亡,获得稳定敲低细胞。以1 μ g/mL嘌呤霉素维持培养,WB法验证RNF8蛋白下调>70%后冻存保种并用于实验。

(1)基础分组(4组):① sh-NC + 溶剂对照组;转

导携带阴性对照 shRNA 的慢病毒后加入等体积 0.9% NaCl; ② sh-RNF8 + 溶剂对照组: 稳定表达 sh-RNF8 后加入等体积 0.9% NaCl; ③ sh-NC + CDDP 组: 转导携带阴性对照 shRNA 的慢病毒后加入 8 μ mol/L CDDP 处理; ④ sh-RNF8 + CDDP 组: 稳定表达 sh-RNF8 后加入 8 μ mol/L CDDP 处理。

(2) 抑制实验分组(3组): ① sh-NC + CDDP 组: 转导携带阴性对照 shRNA 的慢病毒后加入 8 μ mol/L CDDP 处理, 并加入等体积 DMSO 作为 KU60019 的溶剂对照; ② sh-RNF8 + CDDP 组: 稳定表达 sh-RNF8 后加入 CDDP 处理, 并加入等体积 DMSO 作为 KU60019 的溶剂对照; ③ sh-RNF8 + CDDP + KU60019 组: 稳定表达 sh-RNF8 后以 10 μ mol/L KU60019 预处理 2 h, 再加入 8 μ mol/L CDDP 联合处理 24 h。

1.5 CDDP 及 ATM 抑制剂 KU60019 配制与细胞给药处理

CDDP 以 0.9% 氯化钠现配现用, 固定浓度实验用 8 μ mol/L, 24 h; 剂量-反应实验用 0~32 μ mol/L 梯度(0、1、2、4、8、16、32 μ mol/L), 24 h。溶剂对照为等体积 0.9% 氯化钠。

ATM 抑制剂 KU60019 以 DMSO 配制 10 mmol/L 母液, 使用时稀释至 10 μ mol/L。在加药前预处理 2 h, 随后与 CDDP 联合 24 h。溶剂对照为含 DMSO 终体积分数 $\leq 0.1\%$ 的培养基。

1.6 CCK-8 法检测 EC 细胞相对存活率

将细胞接种于 96 孔板(5×10^3 个/孔), 过夜贴壁。处理细胞后每孔加入 10 μ L CCK-8 工作液, 37 $^{\circ}$ C 处理 1~2 h, 于 450 nm 处读取光密度(D)值。计算相对存活率 = $(D_{\text{实验孔}} - D_{\text{空白孔}}) / (D_{\text{对照孔}} - D_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。每组设 ≥ 3 个技术复孔, 独立重复 ≥ 3 次。

1.7 克隆形成实验检测 RNF8 敲低联合 CDDP 对 EC 细胞长期增殖能力的影响

取常规实验分组处理的 Ishikawa 细胞进行克隆形成实验。将细胞以 500 个/孔的密度接种 6 孔板中, 待贴壁后按分组使用 8 μ mol/L CDDP 或等体积 0.9% NaCl 处理 24 h; 随后更换新鲜完全培养基继续培养 10 d。采用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min。清洗并晾干后拍照。以含 ≥ 50 个细胞的细胞团定义为克隆, 在光学显微镜下计数克隆数量, 并计算克隆形成率。相对克隆形成率 = 各处理组克隆数/对照组克隆数 $\times 100\%$ 。

1.8 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测 EC 细胞凋亡率

收集常规实验分组处理后的 Ishikawa 细胞, PBS 洗涤, 按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书加入 Annexin V-FITC 和 PI 染液避光反应 15 min。

随后使用流式细胞仪采集不少于 1×10^4 个事件, FlowJo 软件分析总凋亡率。总凋亡率 = $[(\text{Annexin V-FITC}^+/\text{PI}^- \text{细胞数} + \text{Annexin V-FITC}^+/\text{PI}^+ \text{细胞数}) / \text{总检测细胞数}] \times 100\%$ 。

1.9 Hoechst 33258/PI 荧光染色检测细胞死亡率

取按常规实验分组处理后的 Ishikawa 细胞, PBS 洗涤, 按说明书依次进行 Hoechst 33258 与 PI 染色。荧光显微镜随机取 ≥ 10 个视野/组, 累计 ≥ 100 个细胞/组计数, 计算 PI 阳性率(%) = PI 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.10 γ -H2AX 免疫荧光法检测 Ishikawa 细胞 DNA 损伤累积

将无菌细胞爬片置于培养板内, 接种 Ishikawa 细胞使其贴壁生长。按照 ATM 抑制剂验证实验分组处理后, 弃去培养液, PBS 洗涤细胞, 使用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.2~0.3% Triton X-100 通透 10 min, 5% BSA 封闭 30 min; 兔抗 γ -H2AX 一抗(1:200)4 $^{\circ}$ C 反应过夜, 荧光标记山羊抗兔二抗(1:200)室温反应 1 h, 随后用 DAPI 复染细胞核。使用激光共聚焦显微镜采像, ImageJ 软件分析平均荧光强度。

1.11 WB 法检测各组细胞中 RNF8 及相关蛋白的表达

收集各处理组 Ishikawa 细胞, 用含 PMSF 的 RIPA 裂解液在冰上反应 30 min, 12 000 $\times g$ 离心 10~15 min 后收集上清, BCA 法定量蛋白浓度。取 20~30 μ g 蛋白样品, 经 8%~12% SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜, 室温 5% BSA 封闭 1 h。分别加入一抗(RNF8、ATM、p-ATM、CHK2、p-CHK2、 γ -H2AX、BAX、BCL-2、Cleaved-Caspase-3、RAD21)于 4 $^{\circ}$ C 反应过夜, TBST 洗膜后加入 HRP 标记的二抗, 室温反应 1 h。ECL 化学发光显影, ImageJ 软件分析条带灰度值。

1.12 RT-qPCR 检测 RNF8 mRNA 表达水平

采用 RNeasy Mini Kit 提取总 RNA, 通过超微量分光光度计检测 RNA 浓度。mRNA 检测则使用逆转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA, 并使用 SYBR Premix EX Taq 进行 RT-qPCR, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 34 s, 连续进行 40 个循环。引物序列: RNF8(正向 5'-ATGGGTGCGAGGTGACTGTA-3', 反向 5'-GTTGTCCATAATTGTCCATTGGC-3'), 扩增长度 137 bp; ACTB(正向 5'-CTCGACACCAGGGCGTTATG-3', 反向 5'-CCACTCCATGCTCGATAGGAT-3'), 扩增长度 114 bp。以 ACTB 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对基因进行定量检测。

1.13 统计学处理

统计分析采用 GraphPad Prism9.5 软件进行, 所有实验均独立重复 ≥ 3 次, 计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间比较采用双侧 t 检验, 3 组及以上比较采用

单因素方差分析(one-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

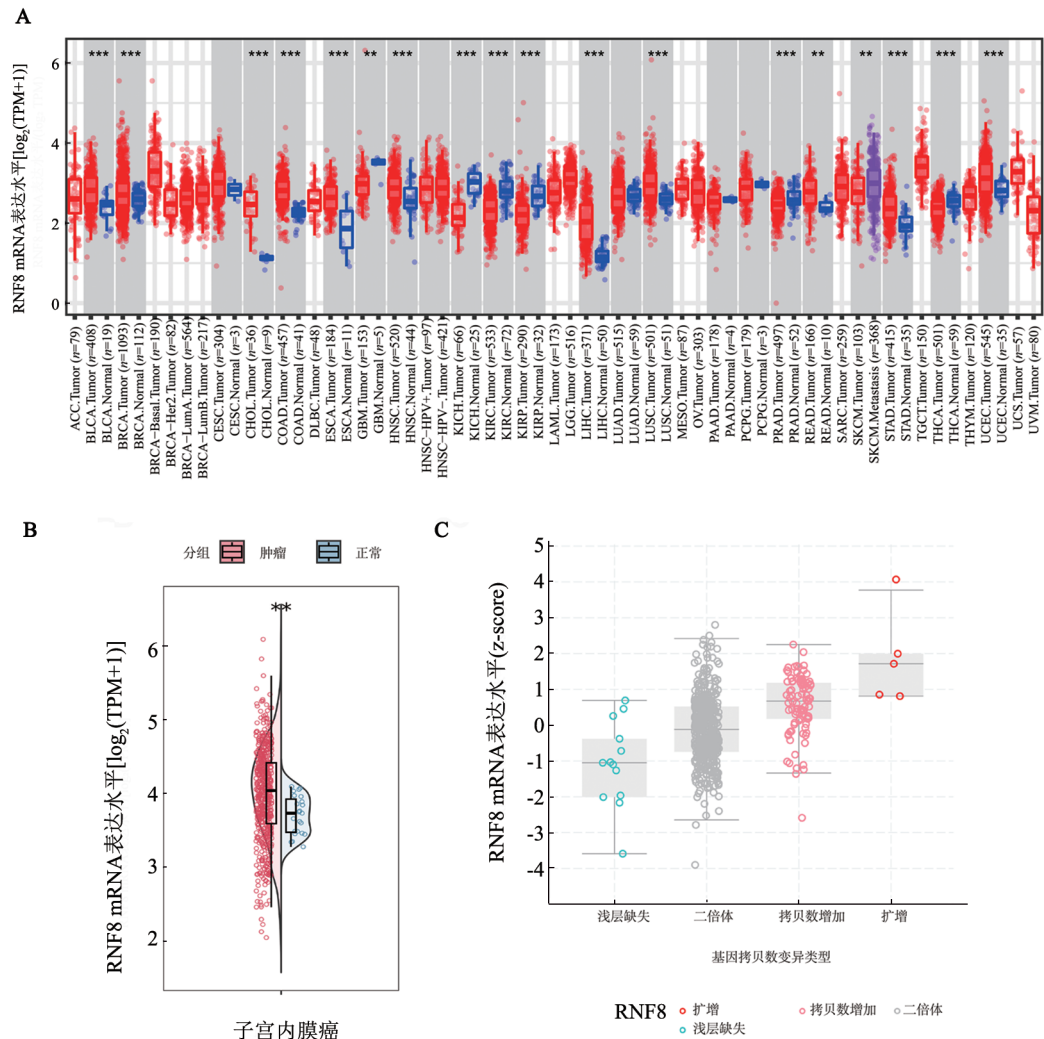
2 结果

2.1 RNF8 在 EC 中的异常表达及细胞筛选

通过 TCGA 数据库对泛癌进行分析, 结果(图 1A)显示, RNF8 在多种肿瘤中均存在明显的表达差异($P < 0.01$), 如膀胱癌、乳腺癌、食管癌、头颈鳞癌、肝细胞癌、肺腺癌、EC 等。TIMER 数据分析显示(图 1B), RNF8 在 EC 肿瘤组织中的 mRNA 表达水平显著高于正常组织($P < 0.001$)。OncoPrint 分析结果(图 1C)显示, RNF8 在 EC 患者中存在多种基因拷贝数变异形式, 包括扩增、拷贝数增加和浅层缺失等, 且

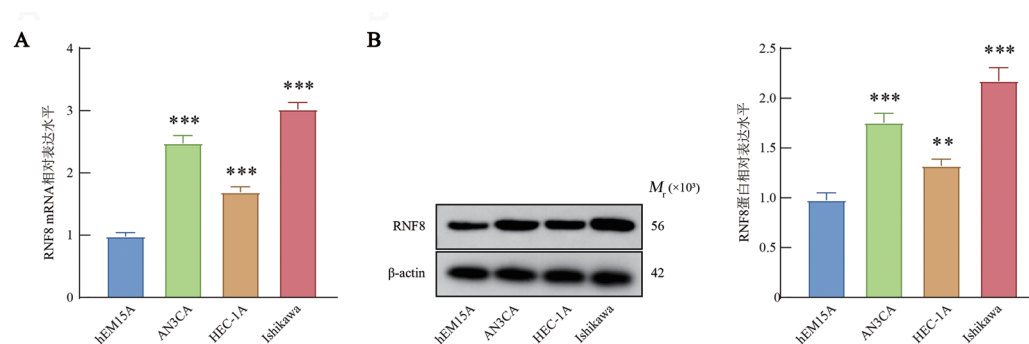
RNF8 的 mRNA 表达水平与其拷贝数变异呈正相关, 其中 RNF8 扩增组的 mRNA 表达水平较高, 而浅层缺失组的表达水平较低。

为了进一步验证以上数据库分析的结果, 本研究检测了 3 种 EC 细胞中 RNF8 的表达水平。以 hEM15A 细胞为对照, RT-qPCR 和 WB 结果显示, RNF8 在 EC 细胞(Ishikawa、HEC-1A、AN3CA)中表达均显著增加($P < 0.01$), 其中 RNF8 在 Ishikawa 细胞中的 mRNA 和蛋白相对表达量最高, 在 HEC-1A 细胞中表达最低(图 2A、B)。综合 RT-qPCR 和 WB 结果选取 Ishikawa 细胞作为后续实验的研究对象。



A: TCGA 数据库分析 RNF8 在多种肿瘤类型中的 mRNA 表达水平差异, 红色箱线图示肿瘤组织, 蓝色示正常组织; B: TIMER 2.0 数据分析 RNF8 在 EC 中的表达; C: OncoPrint 分析 RNF8 在不同拷贝数变异状态下的 mRNA 表达水平; 与正常组织相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 RNF8 在泛癌及 EC 中的表达与变异



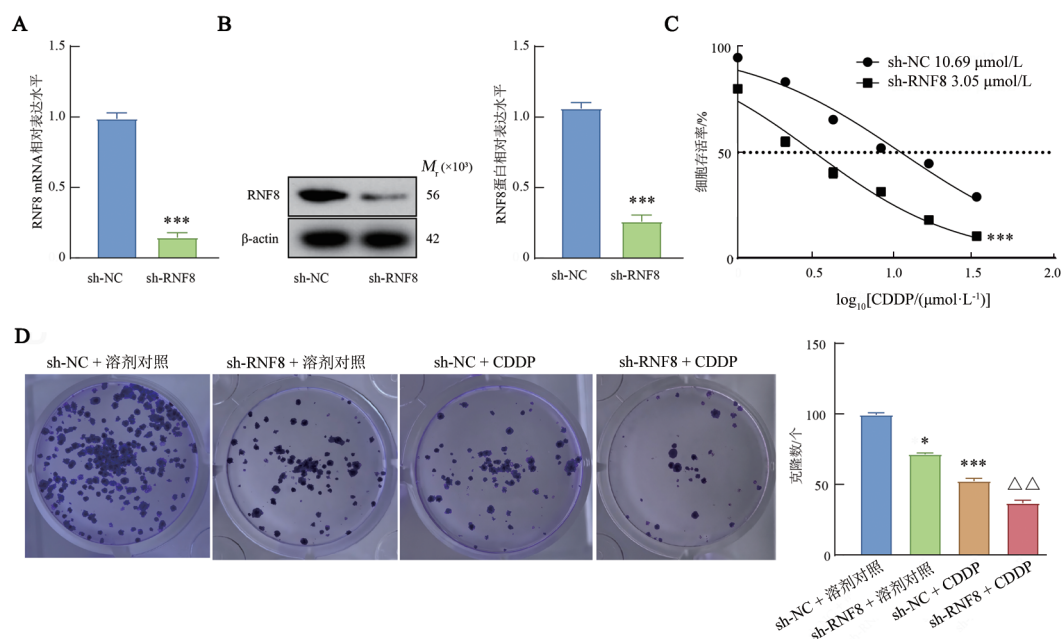
A: RT-qPCR 检测不同 EC 细胞 (Ishikawa、HEC-1A、AN3CA) 及 hEM15A 中 RNF8 mRNA 表达水平; B: WB 法检测不同细胞系中 RNF8 蛋白表达水平。与 hEM15A 组相比, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ 。

图2 RNF8在不同EC细胞系中的表达

2.2 RNF8 敲低增强 CDDP 对 EC 细胞活力的抑制作用

通过慢病毒介导 shRNA 稳定敲低 RNF8 后, 与 sh-NC 组相比, sh-RNF8 组 RNF8 mRNA 和蛋白表达水平均显著下降 (图 3A、B, 沉默效率 $> 80\%$, $P < 0.01$), 提示 RNF8 敲低模型构建成功。将 sh-RNF8 或 sh-NC 细胞分别给予溶剂对照或不同浓度 CDDP (0、1、2、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h。CCK-8 结果 (图 3C) 显示, 8 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 可降低 Ishikawa 细胞活力; 在相同 CDDP 浓度下, sh-RNF8 + CDDP 组细胞存活

率显著低于 sh-NC + CDDP 组 ($P < 0.01$)。剂量-反应曲线进一步表明, RNF8 敲低能够使 CDDP 的剂量-反应曲线整体左移, 其 IC_{50} 低于 sh-NC 组 (3.05 $\mu\text{mol/L}$ vs 10.69 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.001$), 提示 RNF8 敲低可增强 CDDP 敏感性。后续实验采用 8 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 作为处理浓度。克隆形成实验 (图 3D) 显示, sh-RNF8 + CDDP 组克隆数较 sh-NC + CDDP 组减少 ($P < 0.05$), 提示 RNF8 敲低可进一步削弱 CDDP 处理后细胞的长期增殖能力。



A: RT-qPCR 检测 RNF8 mRNA 表达水平; B: WB 法检测 RNF8 蛋白表达水平; C: CCK-8 检测不同浓度 CDDP 处理后细胞活力; D: 克隆形成实验检测长期增殖能力。与 sh-NC + 溶剂对照组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与 sh-NC + CDDP 组相比, △△ $P < 0.01$ 。

图3 RNF8 敲低增强 CDDP 对 EC 细胞的抑制作用

2.3 RNF8 敲低联合 CDDP 可促进 EC 细胞凋亡

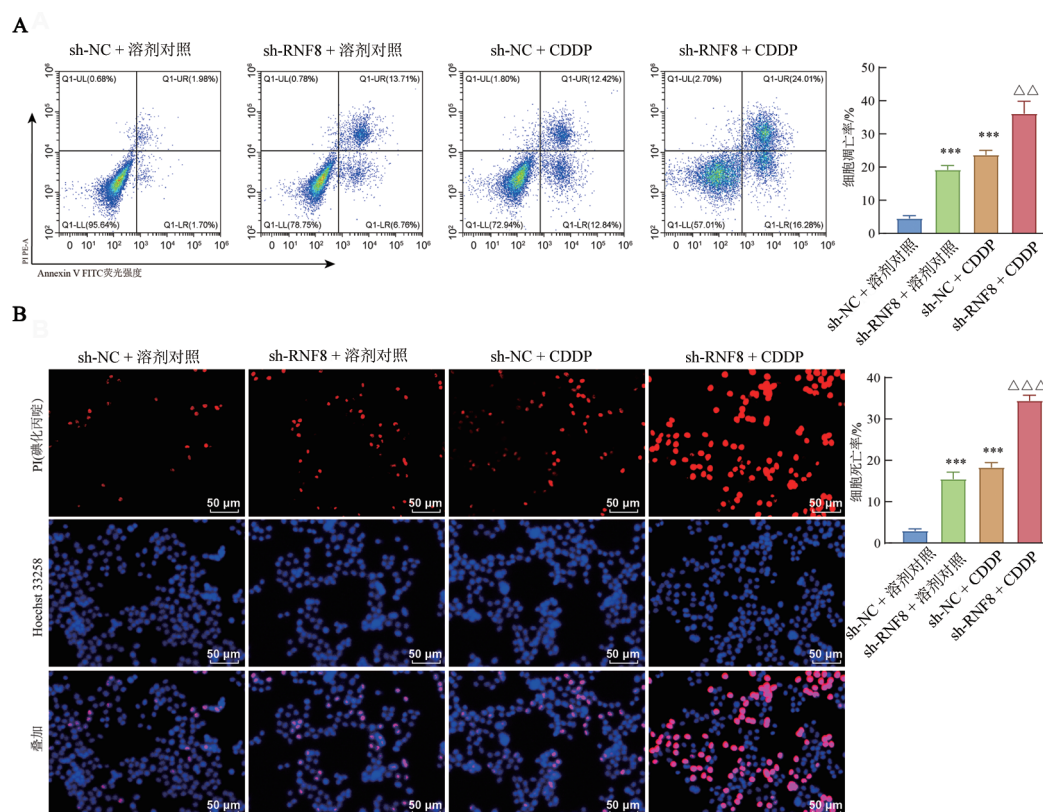
Annexin V-FITC/PI 双染流式检测结果 (图 4A) 显示, sh-NC + CDDP 组凋亡率较 sh-NC + 溶剂对照组显著升高 ($P < 0.01$); 在 CDDP 处理下, sh-RNF8 +

CDDP 组凋亡率进一步高于 sh-NC + CDDP 组 ($P < 0.01$)。Hoechst 33258/PI 染色检测结果 (图 4B) 与之相符, sh-NC + CDDP 组死亡率较 sh-NC + 溶剂对照组显著升高 ($P < 0.01$), sh-RNF8 + CDDP 组则较

sh-NC + CDDP 组进一步升高($P < 0.01$)。

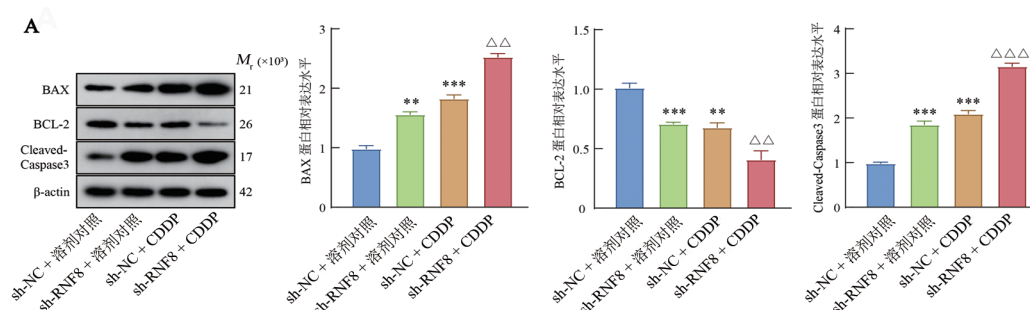
WB 检测结果显示(图 5A), sh-NC + CDDP 组较 sh-NC + 溶剂对照组 BAX、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达上调, BCL-2 表达下调(均 $P < 0.01$); 在 CDDP 处理

条件下, sh-RNF8 + CDDP 组 BAX 与 Cleaved-Caspase-3 表达进一步上调, BCL-2 表达进一步下调(均 $P < 0.01$)。以上结果表明敲低 RNF8 可显著增强 CDDP 诱导的 EC 细胞凋亡。



A: Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡率; B: Hoechst 33258/PI 染色检测细胞死亡情况。与 sh-NC + 溶剂对照组相比, $***P < 0.001$; 与 sh-NC + CDDP 组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

图4 RNF8 敲低联合CDDP促进EC细胞凋亡



A: WB 法检测凋亡相关蛋白 BAX、BCL-2 与 Cleaved-Caspase-3 的表达水平; 与 sh-NC + 溶剂对照组相比, $***P < 0.001$; $**P < 0.01$; 与 sh-NC + CDDP 组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$; $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

图5 RNF8 敲低联合CDDP对EC细胞凋亡相关蛋白表达的影响

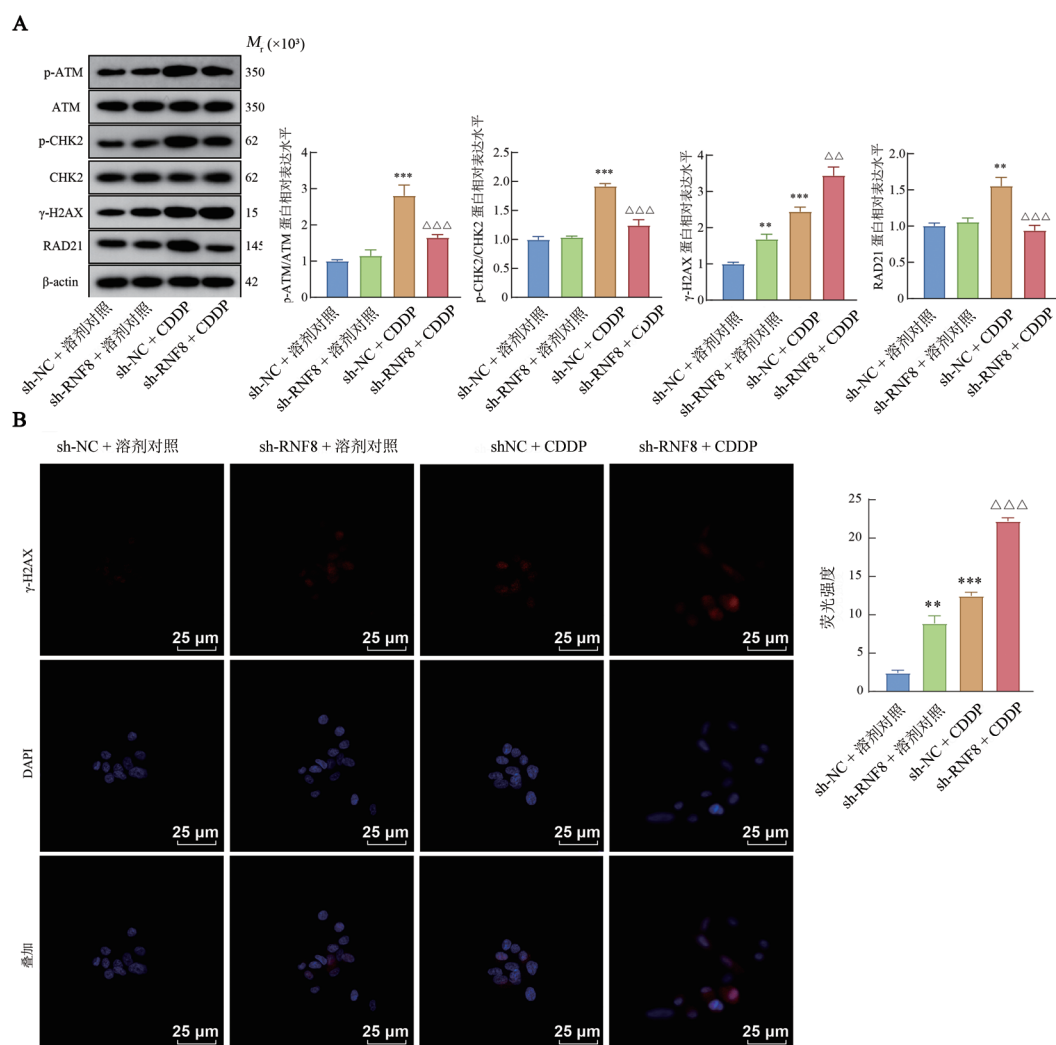
2.4 RNF8 调控 ATM/CHK2 信号轴, 影响 DNA 损伤应答

WB 检测结果(图 6A)显示, 与 sh-NC + 溶剂对照组相比, sh-NC + CDDP 组 p-ATM/ATM 与 p-CHK2/CHK2 表达显著升高, γ -H2AX 表达升高, 提示 DNA 损伤增加; RAD21 表达增加(均 $P < 0.01$), 提示 CDDP 可激活 ATM/CHK2 信号并引发 DNA 损伤反

应。在 CDDP 处理条件下, sh-RNF8 + CDDP 组 p-ATM/ATM 与 p-CHK2/CHK2 表达较 sh-NC + CDDP 组显著下降($P < 0.01$), γ -H2AX 表达进一步升高($P < 0.01$), RAD21 表达进一步下降($P < 0.01$)。 γ -H2AX 免疫荧光检测结果(图 6B)与之相符, sh-NC + CDDP 组 γ -H2AX 荧光强度较 sh-NC + 溶剂对照组显著增加($P < 0.01$), 而 sh-RNF8 + CDDP 组较 sh-NC +

CDDP 组进一步增加 ($P < 0.01$)。以上结果提示, RNF8 敲低可显著抑制 ATM/CHK2 介导的 DNA 损伤

修复通路, 导致 DNA 双链断裂积累并增加 CDDP 敏感性。



A: WB法检测 ATM、p-ATM、CHK2、p-CHK2、γ-H2AX 和 RAD21 蛋白表达水平; B: γ-H2AX 免疫荧光检测 DNA 损伤相关指标 γ-H2AX 的平均荧光强度。与 sh-NC + 溶剂对照组相比, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$; 与 sh-NC + CDDP 组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

图6 RNF8敲低对EC细胞ATM/CHK2信号及DNA损伤相关指标的影响

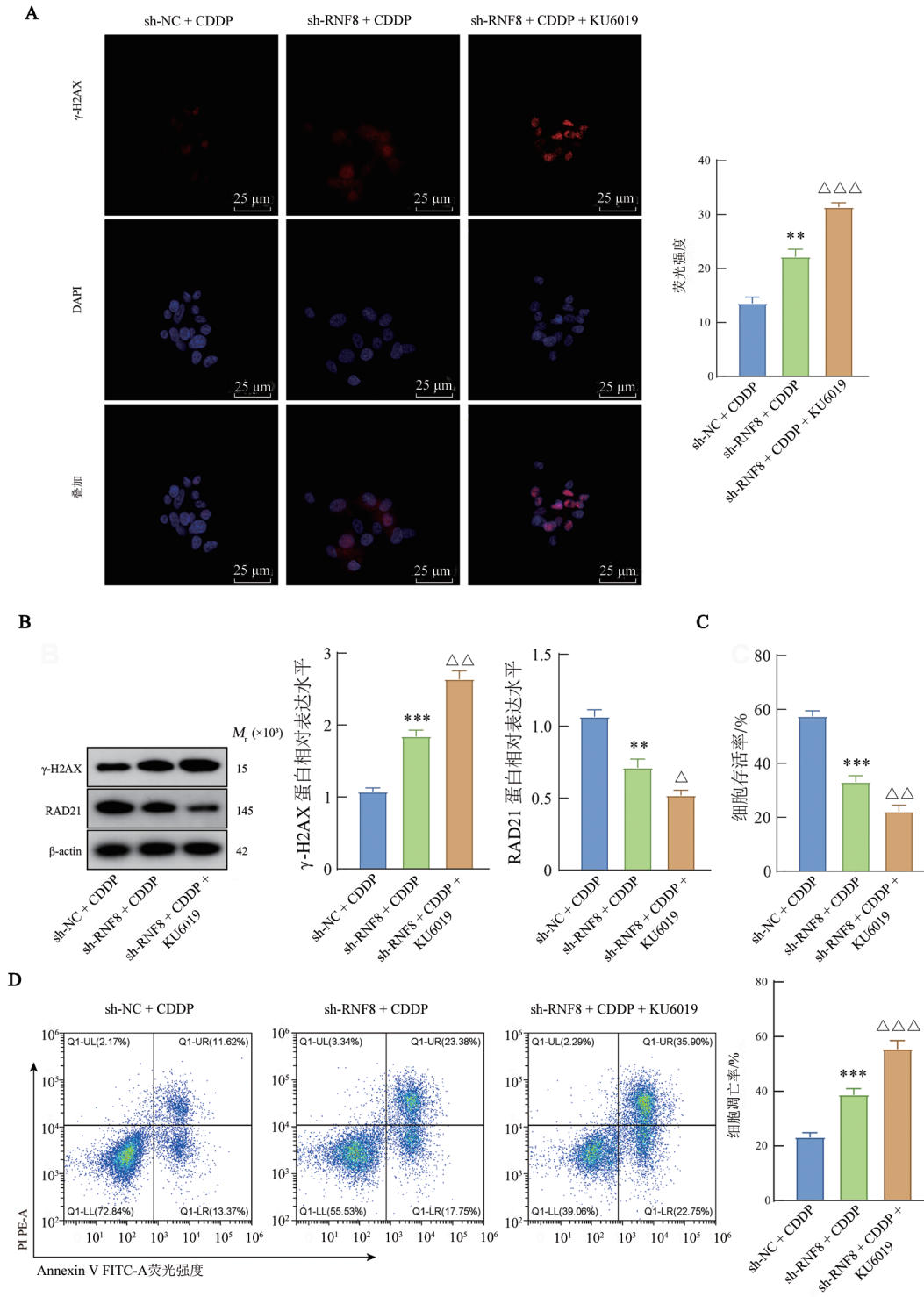
2.5 ATM信号抑制增强 RNF8 敲低对CDDP的致敏作用

进一步采用 ATM 抑制剂 KU60019 干预后, γ-H2AX 免疫荧光检测(图 7A)显示,与 sh-NC + CDDP 组相比,sh-RNF8 + CDDP 组 γ-H2AX 荧光强度显著增加 ($P < 0.01$); 而 sh-RNF8 + CDDP + KU60019 组中 γ-H2AX 荧光强度较 sh-RNF8 + CDDP 组进一步升高 ($P < 0.01$)。WB 结果(图 7B)与之相符,sh-RNF8 + CDDP 组 γ-H2AX 表达高于 sh-NC + CDDP 组 ($P < 0.01$),RAD21 表达降低 ($P < 0.01$); KU60019 处理后, γ-H2AX 进一步升高, RAD21 进一步下降 ($P < 0.05$) (图 7B)。CCK-8 检测和 Annexin V-FITC/PI 流式分析结果(图 7C、D)一致,sh-RNF8 + CDDP 组细胞活力低于 sh-NC + CDDP 组,凋亡率更高(图 7C、D,均 $P < 0.01$),

而 KU60019 处理可在 sh-RNF8 + CDDP 基础上进一步降低细胞活力、增加凋亡率(均 $P < 0.01$)。

3 讨论

CDDP 是 EC 临床治疗中常用的化疗药物,但其耐药显著限制了其疗效。CDDP 可通过诱导 DNA 加合物、DNA 交联及继发性 DNA 双链断裂等损伤激活 DDR,而 DDR 通路的增强可能促进肿瘤细胞修复损伤并逃避细胞死亡^[3]。ATM/CHK2 信号通路是 DNA 双链断裂应答和修复调控的重要通路^[14], RNF8 作为 DDR 早期关键因子,已被证实参与 DNA 损伤位点的识别及修复蛋白招募^[15]。然而, RNF8 在 EC 细胞 CDDP 耐药中的具体作用及其机制仍有待阐明。



A: γ -H2AX 免疫荧光检测 DNA 损伤; B: WB 法检测 γ -H2AX、RAD21 蛋白表达水平; C: CCK-8 检测不同处理组细胞存活率; D: Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡率。与 sh-NC + CDDP 组相比, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$; 与 sh-RNF8 + CDDP 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$, $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.001$ 。

图7 ATM 信号抑制增强 RNF8 敲低对 CDDP 的致敏作用

本研究通过对公共数据库的分析,发现 RNF8 在 EC 组织中呈现显著高表达,且存在着多种基因拷贝数变异形式,提示 RNF8 可能成为 EC 潜在的预后生物标志物。在 Ishikawa 细胞中,下调 RNF8 可以增强 CDDP 诱导的癌细胞抑制作用,如细胞活力明显下降、克隆形成能力下降,细胞凋亡率升高。这些结果

和其他研究结果一致,表明 RNF8 在 EC 细胞中不仅不能保护细胞抵抗癌变,还可能会促进癌症进展,提高癌细胞的耐药性^[16]。此外,在 CDDP 处理下细胞的 p-ATM/ATM 和 p-CHK2/CHK2 升高,但敲低 RNF8 后 p-ATM/ATM 和 p-CHK2/CHK2 均明显下降,同时伴有 γ -H2AX 表达升高。以上结果说明 RNF8 可能通

过调控 ATM/CHK2 通路影响 DNA 损伤修复,其缺失导致 DSB 积累,修复能力受损^[17-18]。以往研究^[19]表明 γ -H2AX 表达升高是 DNA 损伤积累的表现之一,本研究结果也从侧面说明 RNF8 可能参与 EC 细胞 DDR 的调控。ATM 抑制实验结果表明,在 RNF8 敲低基础上进一步抑制 ATM 信号,增加 DNA 损伤累积并促进细胞凋亡,进而导致细胞死亡。和之前的研究类似,结果说明了 RNF8 可能在 EC 中是 ATM/CHK2 轴启动的必要条件,会进一步提高肿瘤细胞的耐药性^[17]。

进一步研究发现 RNF8 的作用似乎并不局限于 ATM/CHK2 通路。本实验观察到 RNF8 下调后, RAD21 表达水平也降低,这可能提示 RNF8 也参与了同源重组 (homologous recombination, HR) 修复过程^[20]。有研究^[21]发现 RNF8 可以通过泛素化修饰组蛋白 H2A,从而促进 BRCA1、53BP1 等分子的招募,进而促进 HR 修复。因此, RNF8 可能在 EC 中不仅激活了 ATM/CHK2 信号,还激活了 HR 修复过程^[22]。

EC 的临床治疗中, CDDP 耐药的预测与逆转是亟待解决的问题。本研究结果提示了潜在的探索方向。(1) RNF8 可作为逆转 CDDP 耐药的治疗靶点。目前, EC CDDP 耐药的逆转策略多集中于“联合 DDR 抑制剂”(如 PARP 抑制剂),但存在适用人群局限(仅 BRCA 突变患者有效)、毒性较大等问题^[23-24]。(2) RNF8 可作为 CDDP 疗效的预测标志物。临床中,部分 EC 患者对 CDDP 化疗无应答,但目前缺乏有效的预测指标^[25]。本研究结果显示,敲低 RNF8 可显著增强 CDDP 敏感性, RNF8 的表达水平可能与 CDDP 敏感性负相关,这提示 RNF8 表达水平与 CDDP 敏感性的关联值得进一步验证,可能有助于识别潜在获益人群;(3) 通过开发 RNF8 特异性抑制剂(如小分子抑制剂或 RNA 干扰药物),与 CDDP 联合使用可以为个体化化疗方案的制定提供参考,有望逆转现有耐药现象,提高化疗应答率,为 EC 的临床治疗带来新的方向。

尽管本研究明确了 RNF8-ATM/CHK2 轴在 EC CDDP 耐药中的作用,但仍存在一定的局限性。当前研究中未使用 CDDP 耐药细胞模型,未能直接验证 RNF8 在获得性耐药中的作用;其次,本研究缺乏体内实验数据,未在小鼠模型中评估 RNF8 敲低对 CDDP 疗效的增强效应;最后,由于未收集临床患者的肿瘤标本与随访数据,本研究缺乏临床样本支撑,无法验证 RNF8 表达与 CDDP 疗效、预后的相关性。针对上述不足,本团队将在后续研究中按以下方向推进:首先通过建立 EC CDDP 耐药细胞系,比较其与敏感细胞中 RNF8 的表达差异,进一步验证 RNF8 敲低对耐药表型的逆转作用;其次,构建 RNF8 稳定敲

低的 EC 移植瘤模型,在体内水平评估 RNF8 调控对 CDDP 疗效的影响;最后,通过收集接受 CDDP 化疗的 EC 患者组织样本及随访数据,分析 RNF8 表达与客观缓解率及无进展生存期之间的相关性,推动其向临床标志物转化。

综上,本研究结果提示, RNF8 可能通过 ATM/CHK2 相关 DDR 调控并影响 CDDP 敏感性;而敲低 RNF8 可有效抑制 DNA 损伤应答,增加 DNA 损伤累积,提升 CDDP 敏感性。这一发现为临床提供了“RNF8 作为预测标志物与治疗靶点”的新方向。后续需通过体内实验与临床样本验证,进一步推动该机制向临床转化,为改善 EC 患者的化疗疗效提供新策略。

[参考文献]

- [1] 李芳, 张果, 王建六. EC 筛查研究进展[J]. 中国妇产科临床杂志, 2025, 26(2): 152-155. DOI: 10.13390/j.issn.1672-1861.2025.02.015.
- [2] 冯征, 郭勤浩, 朱俊, 等. 2023 年度妇科恶性肿瘤治疗进展及展望[J]. 中国癌症杂志, 2024, 34(4): 340-360. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2024.04.002.
- [3] 贾哲, 曾广言, 邹鹏, 等. BCCIP 通过调节 DNA 损伤修复途径增强胃癌对顺铂的耐药性[J]. 中国病理生理杂志, 2025, 41(5): 871-881.
- [4] 黄钧伟, 邓晗薇, 杨美丽, 等. 鼻咽癌顺铂耐药机制的研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(1): 163-168.
- [5] 李晶, 郑磊, 高钰. 曲妥珠单抗辅助改良 DOF 双周方案对顺铂耐药的胃癌患者血清肿瘤标志物及生存率的影响分析[J]. 中国癌症杂志, 2024, 34(3): 286-292. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2024.03.006.
- [6] Carusillo A, Mussolino C. DNA damage: from threat to treatment[J]. Cells, 2020, 9(7): 1665. DOI: 10.3390/cells9071665.
- [7] Smith H L, Southgate H, Tweddle D A, et al. DNA damage checkpoint kinases in cancer[J]. Expert Rev Mol Med, 2020, 22: e2. DOI: 10.1017/erm.2020.3.
- [8] Yan S, Sorrell M, Berman Z. Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(20): 3951-3967.
- [9] Ma T, Keller J A, Yu X C. RNF8-dependent histone ubiquitination during DNA damage response and spermatogenesis[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2011, 43(5): 339-345. DOI: 10.1093/abbs/gmr016.
- [10] Yan J, Jetten A M. RAP80 and RNF8, key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites[J]. Cancer Lett, 2008, 271(2): 179-190. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.04.046.
- [11] Zhi H J, Guo X, Ho Y K, et al. RNF8 dysregulation and down-regulation during HTLV-1 infection promote genomic instability in adult T-cell leukemia[J]. PLoS Pathog, 2020, 16(5): e1008618. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008618.
- [12] Liu C Y, Kuang J Y, Wang Y X, et al. A functional reference map of the RNF8 interactome in cancer[J]. Biol Direct, 2022, 17(1): 17. DOI: 10.1186/s13062-022-00331-z.
- [13] Zhou T T, Yi F, Wang Z, et al. The functions of DNA damage factor

- RNF8 in the pathogenesis and progression of cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(5): 909-918. DOI:10.7150/ijbs.31972.
- [14] Gachechiladze M, Skarda J, Bouchalova K, et al. Predictive and prognostic value of DNA damage response associated kinases in solid tumors[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 581217. DOI: 10.3389/fonc.2020.581217.
- [15] 张卿义, 张樱子, 沈凯, 等. 组蛋白泛素化修饰及其在DNA损伤应答中的作用[J]. *遗传*, 2019, 41(1): 29-40. DOI:10.16288/j.ycz.18-112.
- [16] Yang B, Ke W, Wan Y C, et al. Targeting RNF8 effectively reverses cisplatin and doxorubicin resistance in endometrial cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 545: 89-97. DOI:10.1016/j.bbrc.2021.01.046.
- [17] Wang L L, Yang L, Wang C, et al. Inhibition of the ATM/Chk2 axis promotes cGAS/STING signaling in ARID1A-deficient tumors[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(11): 5951-5966. DOI:10.1172/jci130445.
- [18] Xu Y J, Hu Y M, Xu T, et al. RNF8-mediated regulation of Akt promotes lung cancer cell survival and resistance to DNA damage[J]. *Cell Rep*, 2021, 37(3): 109854. DOI:10.1016/j.celrep.2021.109854.
- [19] Rai R, Li J M, Zheng H, et al. The E3 ubiquitin ligase Rnf8 stabilizes Tpp1 to promote telomere end protection[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(12): 1400-1407. DOI:10.1038/nsmb.2172.
- [20] Wu C, Shi W, Zhang S. ZEB1 promotes DNA homologous recombination repair and contributes to the 5-Fluorouracil resistance in colorectal cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2023, 13(9): 4101-4114.
- [21] Walser F, Mulder M P C, Bragantini B, et al. Ubiquitin phosphorylation at Thr12 modulates the DNA damage response[J]. *Mol Cell*, 2020, 80(3): 423-436.e9. DOI:10.1016/j.molcel.2020.09.017.
- [22] Li Y H, Yuan J. Role of deubiquitinating enzymes in DNA double-strand break repair[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2021, 22(1): 63-72. DOI:10.1631/jzus.b2000309.
- [23] Qiu F H, Liu L F, Lin Y, et al. Corilagin inhibits esophageal squamous cell carcinoma by inducing DNA damage and down-regulation of RNF8[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2019, 19(8): 1021-1028. DOI:10.2174/1871520619666190307120811.
- [24] Alexandre J, Ray-Coquard I, Joly F. PARP inhibitor in advanced endometrial carcinoma Beyond *BRCA* and related genetic mutations[J]. *JCO Precis Oncol*, 2020, 4: 1025-1026. DOI:10.1200/po.20.00177.
- [25] 刘艺芳, 谭快玲. 氟尿嘧啶联合顺铂治疗晚期耐药性EC的疗效及对肿瘤标志物水平的影响[J]. *慢性病学杂志*, 2021, 22(1): 127-128. DOI:10.16440/j.cnki.1674-8166.2021.01.046.
- [收稿日期] 2026-03-11 [修回日期] 2026-05-27
[本文编辑] 苏念