DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.10.008

·临床研究·

敲低ZNF326可抑制缺氧和TGF-β1诱导的前列腺癌细胞上皮-间充质转化

张敏[1],杨丽[2],杨涛[1],林静[1],张文倩[2],汪晖[2],楚元奎[1,3](1.宁夏医科大学 检验学院,宁夏 银川 750004;2.宁夏医科大学 实验动物中心,宁夏 银川 750004;3.宁夏医科大学总医院 医学实验中心,宁夏 银川 750004)

[摘 要] **目的:**探讨锌指蛋白326(ZNF326)在前列腺癌(PCa)中的生物学功能及其参与缺氧和转化生长因子β1(TGF-β1)诱导的上皮-间充质转化(EMT)的可能机制。**方法:**利用生物信息学平台分析ZNF326在PCa中的表达、与患者总生存期(OS)的关系及其与潜在调控分子潜伏型转化生长因子β结合蛋白4(LTBP4)的相关性,并结合RT-qPCR和Western blotting法检测PCa组织及细胞中ZNF326的表达。采用siRNA敲低DU145和PC3细胞中的ZNF326,利用CCK-8法、平板克隆形成实验及Transwell实验检测细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭能力;通过慢病毒感染构建稳定敲低ZNF326的细胞,并建立裸鼠皮下移植瘤模型。分别采用氯化钴($CoCl_2$)和重组人TGF-β1建立体外缺氧及EMT模型,进行ZNF326敲低联合处理实验。采用Western blotting法检测EMT及TGF-β/Smad通路相关蛋白的表达,并通过免疫共沉淀(Co-IP)法分析ZNF326与LTBP4的相互作用。**结果:**ZNF326在PCa组织($P<0.05$)和细胞中均呈高表达。ZNF326高表达组患者OS曲线呈下降趋势,但组间差异无统计学意义($P=0.176$)。敲低ZNF326可显著抑制PCa细胞的增殖、克隆形成、迁移和侵袭能力,抑制裸鼠皮下移植瘤生长($P<0.05$或$P<0.01$),并上调E-cadherin表达、下调vimentin和Snail2表达。在缺氧和TGF-β1诱导的EMT模型中,ZNF326表达均上调,而敲低ZNF326可部分逆转上述刺激引起的EMT相关蛋白变化,并减弱细胞迁移和侵袭能力。LTBP4在PCa组织($P<0.01$)和细胞中呈低表达;敲低ZNF326可上调LTBP4蛋白表达,并伴随Smad2/3及p-Smad2/3蛋白表达下降。Co-IP结果提示ZNF326与LTBP4存在相互作用。**结论:**ZNF326在PCa组织和细胞中呈高表达,敲低ZNF326抑制缺氧和TGF-β1诱导的肿瘤细胞EMT、迁移和侵袭,ZNF326有望成为PCa治疗的新靶点。

[关键词] 前列腺癌;锌指蛋白326;缺氧;上皮-间充质转化;潜伏型转化生长因子β结合蛋白4
[中图分类号] R737.25;R730.2 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2026)10-1087-10

Knockdown of ZNF326 can inhibit the epithelial-mesenchymal transition of prostate cancer cells induced by hypoxia and TGF-β1

Zhang Min[1], Yang Li[2], Yang Tao[1], Lin Jing[1], Zhang Wenqian[2], Wang Hui[2], Chu Yuankui[1,3] (1. College of Laboratory Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China; 2. Laboratory Animal Center, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China; 3. Medical Experimental Center, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China)

[Abstract] Objective: To investigate the biological role of zinc finger protein 326 (ZNF326) in prostate cancer (PCa) and its potential involvement in hypoxia- and transforming growth factor-β1 (TGF-β1)-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods:** Bioinformatics analyses were performed to evaluate ZNF326 expression in PCa, its association with overall survival (OS), and its correlation with latent transforming growth factor beta binding protein 4 (LTBP4). The expression of ZNF326 in PCa tissues and cell lines was further examined by RT-qPCR and Western blotting. ZNF326 was knocked down in DU145 and PC3 cells using siRNA, and cell proliferation, colony formation, migration, and invasion were assessed using CCK-8, colony formation, and Transwell assays. Stable ZNF326-knockdown cells were generated by lentiviral transduction and used to establish a subcutaneous xenograft model in nude mice. *In vitro* hypoxia and EMT models were established using cobalt chloride ($CoCl_2$) and recombinant human TGF-β1, respectively followed by combined treatment with ZNF326 knockdown. EMT- and TGF-β/Smad-related proteins were detected by Western blotting, and the interaction between ZNF326 and LTBP4 was examined by co-immunoprecipitation (Co-IP). **Results:** ZNF326 was highly expressed in PCa tissues ($P<0.05$) and cell lines. The OS curve showed a downward trend in patients with high ZNF326 expression, although the difference between groups was not statistically significant ($P=0.176$). Knockdown of ZNF326 significantly inhibited the proliferation, colony formation, migration, and invasion of PCa cells and suppressed subcutaneous xenograft tumor growth

[基金项目] 宁夏自然科学基金(2025AAC030689);宁夏医科大学2024年校级科研项目重点项目(开放课题)(XZ2024004);国家自然科学基金(82160465)
[作者简介] 张敏(2000—),女,硕士生
[通信作者] 楚元奎(扫码获取作者通信方式)

($P < 0.05$ or $P < 0.01$). ZNF326 knockdown was also accompanied by increased E-cadherin expression and decreased vimentin and Snail2 expression. ZNF326 expression was increased in both hypoxia- and TGF-β1-induced EMT models, whereas ZNF326 knockdown attenuated cell migration and invasion and partially reversed the EMT-related protein changes induced by these stimuli. LTBP4 was expressed at low levels in PCa tissues ($P < 0.01$) and cells. Knockdown of ZNF326 increased LTBP4 protein expression and was accompanied by decreased Smad2/3 and p-Smad2/3 protein levels. Co-IP analysis indicated an interaction between ZNF326 and LTBP4. **Conclusion:** ZNF326 is highly expressed in PCa tissues and cells. Knockdown of ZNF326 inhibits hypoxia- and TGF-β1-induced EMT, migration and invasion of tumor cells. ZNF326 is expected to become a new target for the treatment of PCa.

[Key words] prostate cancer; zinc finger protein 326 (ZNF326); hypoxia; epithelial-mesenchymal transition (EMT); latent transforming growth factor beta binding protein 4 (LTBP4)

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(10): 1087-1096. DOI：10.3872/j.issn.1007-385X.2026.10.008]

前列腺癌（prostate cancer, PCa）是全球男性高发恶性肿瘤，死亡风险主要源于肿瘤远处转移[1-2]。晚期及转移性PCa的标准治疗方案为雄激素剥夺疗法（androgen-deprivation therapy, ADT）联合放化疗，但由于肿瘤细胞侵袭性强，且易产生获得性耐药，显著限制了该疗法的临床疗效[3]。因此，深入研究PCa侵袭转移的分子机制、寻找新的治疗靶点，对改善PCa临床治疗具有重要价值。缺氧是肿瘤微环境的早期特征之一[4-6]，在PCa中，缺氧可激活缺氧诱导因子1α（hypoxia-inducible factor-1α, HIF-1α）信号通路，启动肿瘤适应性改变，并协同其他通路促进肿瘤侵袭、转移及治疗耐药[7]。既往研究[4]显示，PCa细胞中雌激素受体β（estrogen receptor β, ERβ）可促进HIF-1α降解，抑制血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）介导的Snail核转位，进而阻断缺氧诱导的上皮-间充质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）。除上述经典调控分子外，多种转录因子也参与调控肿瘤EMT与恶性进展。锌指蛋白（zinc finger protein, ZNF）家族即为一类调控肿瘤发生发展及EMT的关键转录因子[8]，家族成员ZNF326已被证实在多种肿瘤中高表达且与恶性生物学行为进展相关[9-11]。然而，ZNF326在PCa进程中的作用和相关机制尚未明确。课题组前期通过生物信息学分析与组织和细胞样本检测发现，ZNF326在PCa组织及细胞中显著上调；缺氧和转化生长因子β1（transforming growth factor-β1, TGF-β1）处理可显著增强PCa细胞中ZNF326的表达。结合已有文献与前期预实验结果，课题组推测ZNF326参与缺氧及TGF-β1介导的PCa恶性进展。为此，本研究拟探究ZNF326在缺氧与TGF-β1诱导PCa细胞EMT中的作用及其机制，以期为评估ZNF326作为PCa潜在治疗靶点提供理论与实验依据。

1　材料与方法

1.1　主要材料与试剂

12只4～6周龄雄性BALB/c nude小鼠，体质量18～22 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，饲养于无特定病原体（specific pathogen free, SPF）级实验环境。根据随机数字表法，将小鼠分为sh-NC、sh-ZNF326-1组，每组6只。本实验经宁夏医科大学实验动物伦理委员会批准（批准号：IACUC-2025309）。

人正常前列腺上皮细胞RWPE-1及PCa细胞DU145、PC3和22RV1均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库（上海），实验所用细胞均经支原体检测为阴性。回顾性收集2023年8月—12月宁夏医科大学总医院病理科存档的PCa石蜡标本，共纳入18对配对的肿瘤组织及癌旁组织。患者年龄57～79岁，Gleason评分6分者2例，7分者9例，8分者4例，9分者3例。所用标本均为临床诊疗后留存的病理材料，并在交付研究前完成去标识化处理。

纳入标准：（1）经病理确诊为PCa；（2）行PCa根治术或穿刺活检；（3）术前未接受放化疗及内分泌治疗；（4）临床病理资料完整。排除标准：（1）术前接受过放疗、化疗或内分泌治疗者；（2）合并其他恶性肿瘤者；（3）石蜡标本质量不佳或组织量不足者。癌旁组织取材：距癌组织边缘≥2 cm，所有标本均经由病理科主任医师进行阅片，确认肿瘤组织诊断无误，且癌旁组织中无肿瘤细胞浸润，以确保配对标本的准确性，研究经宁夏医科大学总医院伦理委员会批准（批件号：宁医大伦理第2025-N140号）。

RPMI 1640培养基和胎牛血清购自武汉赛维尔生物科技有限公司，RWPE-1细胞专用培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司，ZNF326的siRNA由广州锐博生物科技有限公司合成，Lipofectamine™ 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司，0.1%结晶紫染色液购自北京索莱宝科技有限公司，组织总提取试剂盒购自江苏康为世纪生物科技有限公司，反转录试剂盒和实时荧光定量聚合酶链式反应（reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR）试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司，CCK-8细胞增殖检测试剂购自香港

AbMole Bioscience公司，Matrigel基质胶由美国Corning公司提供，相关引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，蛋白质提取及定量相关试剂购自江苏凯基生物技术股份有限公司，重组人TGF-β1购自美国PeproTech公司，$CoCl_2$购自上海麦克林生化科技股份有限公司，sh-ZNF326慢病毒悬液由上海吉凯基因医学科技股份有限公司提供，Protein A/G磁珠购自苏州海狸生物医学工程有限公司，GAPDH抗体、β-tubulin抗体、HRP标记的山羊抗兔IgG及HRP标记的山羊抗鼠IgG购自上海Abways公司，ZNF326、HIF-1α、Snail2抗体和IgG均购自美国Proteintech公司，波形蛋白（vimentin）和E-钙黏素（E-cadherin）抗体均购自英国Abcam公司，潜伏型转化生长因子β结合蛋白4（latent transforming growth factor beta binding protein 4, LTBP4）抗体均购自美国Santa Cruz Biotechnology公司，Smad2/3抗体购自美国Selleck公司，p-Smad2/3抗体购自美国Cell Signaling Technology（CST）公司。

1.2 数据库分析ZNF326和LTBP4在PCa中的表达、预后价值及相关性

基于UALCAN平台（https://ualcan.path.uab.edu）整合的TCGA数据库对ZNF326和LTBP4在PCa组织及正常前列腺组织中的表达差异进行分析。通过TIMER2.0网站（https://compbio.cn/timer2/）对ZNF326与PCa患者总生存期（overall survival, OS）的关系进行分析，并将患者按中位表达值均分为高表达组和低表达组，随后通过K-M法绘制生存曲线。利用starBase/ENCORI平台（https://rnasysu.com/encori/）对ZNF326与LTBP4之间的相关性进行分析此外，在NCBI（https://www. ncbi. nlm. nih. gov/）的GEO DataSets数据库中，以“prostate cancer”和“hypoxia”为检索词进行联合检索，筛选获得GSE227811数据集，其标题为“Chronic hypoxia favours adoption to a castration-resistant cell state in prostate cancer”。该数据集为高通量测序获得的基因表达谱，实验分为LNCaP细胞对照组和低氧处理LNCaP细胞组，每组3个生物学重复。其中，LNCaP细胞对照组培养于含21% O_2、37 ℃的恒温恒湿培养箱中；低氧处理LNCaP细胞组培养于含1% O_2、37 ℃的恒温恒湿培养箱中，处理时间至少144 h。使用NCBI提供的GEO2R在线分析平台（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/）对GSE227811数据集中上述2组进行分析，下载分析结果，并在结果中检索ZNF326，获得该基因在两组样本间表达差异的P值和$\log_2$FC等统计信息。

1.3 RT-qPCR法检测PCa组织中ZNF326 mRNA的表达水平

收集18对PCa组织及其配对癌旁组织，均为甲醛固定石蜡包埋（formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE）标本。从上述FFPE标本的连续切片中提取总RNA，利用逆转录试剂盒进行逆转录，并进行RT-qPCR实验。反应条件：95 ℃预变性4 min后，94 ℃ 8 s，58 ℃ 8 s，72 ℃ 8 s，共40个循环，72 ℃终延伸10 min。以GAPDH作为内参对照，$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因的表达量。引物序列如表1所示。

表1 引物序列

基因	正向引物（5′→3′）	反向引物（5′→3′）
GAPDH	AAATCCCATCACCATCTTCC	ATGACCCTTTTGGCTCCC
ZNF326	AATGAACCCGAACAAAGCCG	ACCTCCGAAAGAGTCAAGGC

1.4 细胞培养与转染

DU145、PC3及22RV1细胞采用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养，RWPE-1细胞采用专用培养基。所有细胞均置于37 ℃、5% CO_2的恒温培养箱中培养，实验所用细胞均处于支原体阴性状态。

为检测ZNF326在正常前列腺上皮细胞及PCa细胞中的基础表达水平，收集RWPE-1、DU145、PC3和22RV1细胞，提取总蛋白，采用Western blotting法检测ZNF326蛋白表达水平，并以GAPDH作为内参。

为明确ZNF326在PCa细胞增殖、迁移和侵袭中的作用，课题组针对ZNF326设计了3条靶向不同序列的siRNA（表2），以筛选最为合适的片段，降低单条siRNA潜在脱靶干扰。选取处于对数期的DU145、PC3细胞，待细胞汇合度达到40%～50%时，使用Lipofectamine 2000分别转染靶向ZNF326的siRNA及阴性对照si-NC，siRNA终浓度为100 nmol/L。转染操作按照试剂说明书进行，转染4～6 h后更换新鲜完全培养基。转染48 h后，通过Western blotting法检测ZNF326蛋白表达水平以验证敲低效率，并选择有效siRNA用于后续细胞功能实验。

表2 siRNA序列

基因	siRNA靶序列（5′→3′）
si-ZNF326-1	CCATGGATTCCTACCTAAA
si-ZNF326-2	GTCATATGGCATGGACAAT
si-ZNF326-3	TCGTGACTATGGCCATGGA

1.5　CCK-8法检测PCa细胞增殖活力

将不同处理组的细胞以3 × 10^3个/孔接种于96孔板，每组设6个复孔，分别于接种后0、24、48、72和96 h避光加入10 μL/孔CCK-8溶液，37 ℃培养1.5 h，使用酶标仪在450 nm波长下测定光密度（*D*）值，以此反映细胞增殖活力。

1.6　Transwell实验检测细胞迁移和侵袭能力

将不同处理组的细胞以4 × 10^4个/孔接种于Transwell小室上层（侵袭实验预铺Matrigel胶，迁移实验不铺胶），小室上层使用无血清RPMI 1640培养基重悬细胞，下层加入含20%胎牛血清的RPMI 1640培养基作为趋化因子。培养24 h后，取出小室，擦去上层细胞，用4%多聚甲醛固定下层细胞20 min，0.1%结晶紫染色5～7 min，PBS轻轻冲洗后，用棉签清除小室内残留细胞。显微镜下随机选取5个视野拍照，使用ImageJ软件计数迁移或侵袭细胞数量，进行统计学分析。

1.7　平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力

将不同处理组的细胞以3 × 10^2个/孔接种于12孔板，每组设3个复孔，连续培养10～14 d，每3 d更换一次培养液。培养结束后，用4%多聚甲醛固定细胞20 min，0.1%结晶紫染色5～7 min，PBS冲洗后自然晾干，显微镜下拍照并统计每孔克隆数（以细胞数大于100计为1个克隆）。

1.8　慢病毒感染构建ZNF326稳定敲低PCa细胞

将DU145接种于24孔板，待细胞汇合度达到30%时，按照感染复数（multiplicity of infection, MOI）= 10加入sh-ZNF326-1、sh-ZNF326-2、sh-ZNF326-3及阴性对照（sh-NC）慢病毒悬液。病毒感染16～24 h后，弃去含病毒的培养基，更换为完全培养基，48 h后荧光显微镜观察绿色荧光表达情况，评估病毒转导效率。随后，加入嘌呤霉素（2 μg/mL）进行稳转细胞筛选，持续筛选7 d，获得稳定敲低ZNF326的　DU145-sh-ZNF326-1、　DU145-sh-ZNF326-2、DU145-sh-ZNF326-3及相应sh-NC对照稳转细胞。为确定后续实验所用稳转细胞，提取各组细胞蛋白，采用Western blotting法检测ZNF326蛋白表达水平，选择效果最佳的组合用于裸鼠皮下成瘤实验。

1.9　裸鼠皮下成瘤实验评价ZNF326敲低对DU145细胞成瘤的影响

由于DU145细胞具有稳定的皮下成瘤能力，本研究选用DU145稳转细胞进行裸鼠皮下移植瘤实验。收集DU145-sh-ZNF326-1及阴性对照DU145-sh-NC稳转细胞，预冷PBS洗涤并重悬，调整细胞密度至1 × 10^7个/mL。细胞悬液与预冷的Matrigel基质胶按1∶1体积比在冰上混匀。每只小鼠右肩胛骨处皮下注射200 μL细胞-基质胶混合液，两组各接种6只小鼠。接种后，每3 d用游标卡尺测量肿瘤长径（*L*）和短径（*W*），按公式计算肿瘤体积：$V = L \times W^2/2$。实验终点记录各组动物成瘤情况，并根据实际形成移植瘤的动物进行肿瘤体积及瘤质量统计分析。

实验24 d后，异氟烷持续吸入麻醉处死小鼠，剥离皮下移植瘤，称量瘤质量并拍照。分别从sh-ZNF326-1组成瘤样本、sh-NC对照组成瘤样本中各随机选取3例移植瘤组织，研磨后提取总蛋白，采用Western blotting法检测ZNF326、LTBP4及EMT相关标志物（E-cadherin、vimentin）的表达水平。

1.10　缺氧和EMT细胞模型的构建及实验分组处理

分别使用200 μmol/L $CoCl_2$[12]和10 ng/mL TGF-β1[13]建立体外缺氧和EMT细胞模型。$CoCl_2$储存液以基础培养基溶解配制成200 mmol/L母液，实验时用培养基稀释至200 μmol/L；TGF-β1以无菌水复溶至10 μg/mL，加入含0.1% BSA的缓冲液后分装保存，实验时用培养基稀释至10 ng/mL。细胞转染方法同1.4，转染后48 h再给予相应处理。

为验证缺氧模型建立情况，采用200 μmol/L $CoCl_2$分别处理DU145和PC3细胞，分别于处理后的0、6、12和24 h收集细胞总蛋白，采用Western blotting法检测HIF-1α和ZNF326蛋白表达水平，根据HIF-1α及ZNF326表达变化确定后续处理时间。缺氧模型联合处理实验中，细胞分为si-NC、si-ZNF326-2、si-NC + $CoCl_2$和si-ZNF326-2 + $CoCl_2$组，CoCl处理24 h后收集细胞总蛋白，采用Western blotting法检测ZNF326及EMT相关标志物E-cadherin、vimentin和Snail2的表达水平，并检测HIF-1α以验证缺氧模型构建情况。

为确定TGF-β1诱导PCa细胞发生EMT的最佳实验条件，本研究预先在DU145、PC3细胞中进行了浓度梯度筛选实验。将细胞接种于培养板中，待细胞汇合度达到30%时，弃去原培养基，实验时用培养基稀释重组人TGF-β1至0、5、10及20 ng/mL，培养48 h。随后，采用Westernblotting法检测ZNF326蛋白表达，根据检测结果选取适宜的处理浓度进行后续实验。

TGF-β1诱导EMT模型联合处理实验中，细胞分为si-NC、si-ZNF326-2、si-NC + TGF-β1和si-ZNF326-2 + TGF-β1组，采用Western blotting法检测各组细胞中ZNF326及EMT相关标志物E-cadherin、vimentin和Snail2的表达水平。同时，在上述TGF-β1处理组中进一步检测TGF-β/Smad信号通路相关蛋白Smad2/3及p-Smad2/3的表达水平。

1.11 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)法检测PCa细胞中ZNF326与LTBP4的相互作用

收集未经任何处理且处于生长对数期的DU145和PC3细胞，用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液冰上裂解30 min，4 ℃ 12 000 × *g*离心10 min，取蛋白上清。BCA法定量后，留取少量总蛋白作为Input，其余等量蛋白样品分别加入抗LTBP4抗体及IgG对照(依据抗体浓度及蛋白体积，工作浓度调整为25 μg/mL)，4 ℃旋转反应过夜。次日，加入预洗的Protein A/G磁珠，4 ℃继续反应1 h。磁珠经裂解缓冲液洗涤4次后，加入SDS-PAGE上样缓冲液煮沸变性，洗脱蛋白后使用Western blotting法进行检测，使用抗ZNF326抗体(兔抗ZNF326多克隆抗体，1∶500稀释)检测共沉淀复合物中的ZNF326蛋白，并以Input作为总蛋白对照。

1.12 Western blotting法检测PCa细胞及移植瘤组织中蛋白表达水平

本研究所有Western blotting实验均采用以下方法进行。收集各实验组细胞及移植瘤组织，加入适量裂解液提取总蛋白。细胞样本于冰上裂解，移植瘤组织经研磨充分裂解后，离心取上清。采用BCA法进行蛋白定量，加入适量蛋白质上样缓冲液，并以去离子水补足体积，充分混匀。将样品于95 ℃加热10 min，随后经SDS-PAGE转至PVDF膜，5%脱脂奶粉封闭2 h。随后，分别加入对应一抗(兔抗ZNF326多克隆抗体，1∶1 000稀释；兔抗Smad2/3及p-Smad2/3单克隆抗体，1∶1 000稀释；鼠抗HIF-1α单克隆抗体，1∶5 000稀释；兔抗Snail2多克隆抗体，1∶1 000稀释；兔抗vimentin单克隆抗体，1∶4 000稀释；兔抗E-cadherin单克隆抗体，1∶10 000稀释；鼠抗LTBP4单克隆抗体，1∶1 000稀释)，4 ℃处理过夜。

次日，加入相应二抗(1∶5 000稀释)室温反应1 h后，使用ECL液显影。由于目标蛋白分子量接近，本研究选用GAPDH和β-tubulin两种内参(均按1∶10 000稀释，根据目标蛋白分子量及抗体检测条件选择合适内参。Snail2选用β-tubulin作为内参；其余蛋白如ZNF326、Smad2/3、p-Smad2/3、vimentin、E-cadherin和LTBP4等，均选用GAPDH作为内参)。

1.13 统计学处理

采用GraphPad Prism 9.5.1软件进行数据统计与图形绘制。采用Shapiro-Wilk检验评估数据正态性，并通过Levene检验判断方差齐性。符合正态分布的数据以$\bar{x} \pm s$表示，两组间比较采用独立样本*t*检验，对于18对PCa组织及其配对癌旁组织蜡块，按配对设计进行分析：若配对差值满足正态分布，采用配对样本*t*检验；若配对差值不满足正态分布，则采用Wilcoxon符号秩检验。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)，事后多重比较采用Bonferroni校正。若数据不符合正态分布或方差不齐，则两组间比较采用Mann-Whitney *U*检验，多组间比较采用Kruskal-Wallis *H*检验。对于同一批小鼠每3 d反复测量的肿瘤体积数据，采用双因素重复测量方差分析(two-way repeated measures ANOVA)。

生物信息学部分：starBase(ENCORI)基因表达相关性分析采用Pearson相关分析，以*r*值和*P*值评估相关性；TIMER2.0生存分析基于K-M法绘制生存曲线，组间差异比较采用Log-rank检验并计算风险比(hazard ratio, HR)；GEO数据差异表达分析采用GEO2R在线平台，以$\log_2$FC和校正后*P*值评估基因差异表达。以$P < 0.05$或$P < 0.01$表示差异具有统计学意义。

2 结 果

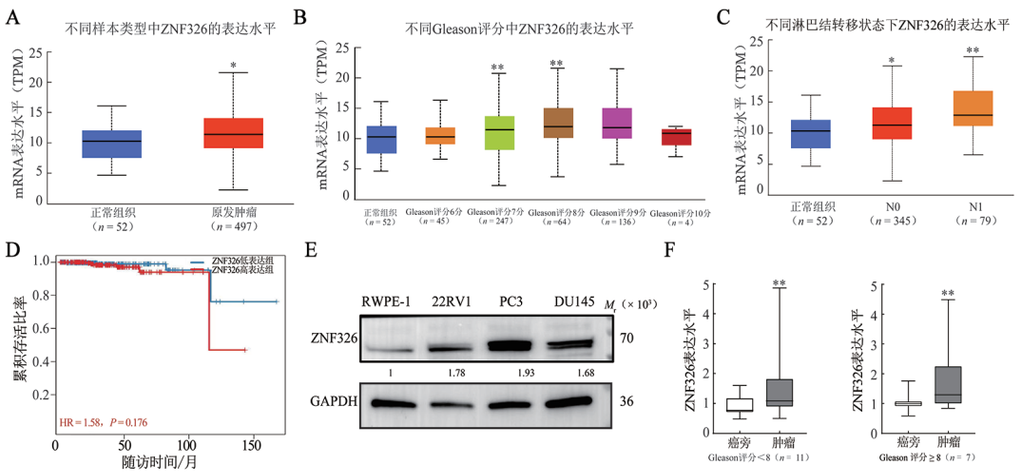
2.1 ZNF326在PCa组织和细胞中呈高表达

TCGA数据库分析(图1A)显示，与正常前列腺组织相比，ZNF326在PCa原发肿瘤组织中的表达水平显著升高($P < 0.05$)。分层分析(图1B)发现，ZNF326表达水平随Gleason评分升高大体呈增加趋势，但在Gleason评分10组中有所回落。淋巴结转移状态分析(图1C)显示，N0和N1组肿瘤组织中ZNF326的表达水平均高于正常前列腺组织，其中N1组表达水平较高，提示ZNF326表达升高可能与PCa恶性程度及淋巴结转移状态相关。TIMER2.0生存分析(图1D)显示，ZNF326高表达组患者OS率呈下降趋势，但与低表达组相比差异无统计学意义($P = 0.176$)。Western blotting法检测结果(图1E)显示，与RWPE-1相比，ZNF326在其余3组PCa细胞中的蛋白表达水平均升高。RT-qPCR检测(图1F)发现，PCa组织中ZNF326 mRNA表达水平显著升高($P < 0.01$)。基于上述结果，后续功能实验选择DU145和PC3细胞作为研究模型。

2.2 敲低ZNF326抑制PCa细胞的增殖、迁移和侵袭能力

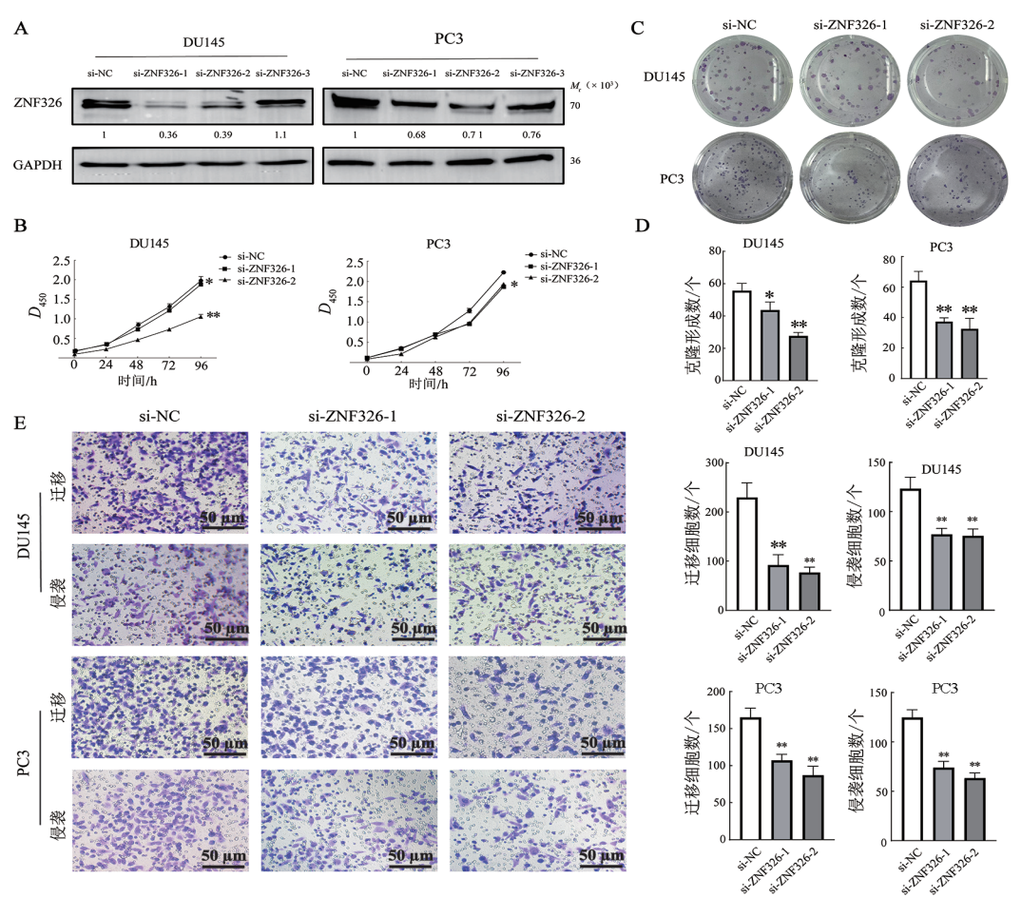
Western blotting法检测结果(图2A)显示，与si-NC组相比，其余3组可不同程度降低ZNF326蛋白表达，其中，si-ZNF326-1和si-ZNF326-2的敲低效率较为明显。因此，后续功能实验选用si-ZNF326-1和si-ZNF326-2。

CCK-8实验结果(图2B)显示，与si-NC组相比，si-ZNF326-1和si-ZNF326-2均能显著抑制DU145和PC3细胞的增殖活力($P < 0.05$)。平板克隆形成实验结果(图2C、D)进一步显示，敲低ZNF326后两种PCa细胞的克隆形成能力均明显下降($P < 0.05$)。Transwell实验结果(图2E)显示，与si-NC组相比，si-ZNF326-1和si-ZNF326-2组DU145和PC3细胞的迁移及侵袭细胞数量均显著减少(均$P < 0.01$)。



A：TCGA数据库分析ZNF326在PCa原发肿瘤组织和正常前列腺组织中的表达水平，与正常组织比较，$^{*}P < 0.05$；B：TCGA数据库分析不同Gleason评分PCa组织中ZNF326的表达水平，与正常组织相比，$^{**}P < 0.01$；C：TCGA数据库分析不同淋巴结转移状态PCa组织中ZNF326的表达水平，与正常组织相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；D：TIMER2.0分析ZNF326基因表达水平与患者生存之间的关系；E：Western blotting法检测正常前列腺上皮细胞RWPE-1及PCa细胞22RV1、PC3和DU145中ZNF326蛋白表达水平；F：RT-qPCR检测18对PCa组织及其配对癌旁组织中ZNF326 mRNA表达水平，与癌旁组织比较，$^{**}P < 0.01$。

图1　ZNF326在PCa组织和细胞中高表达



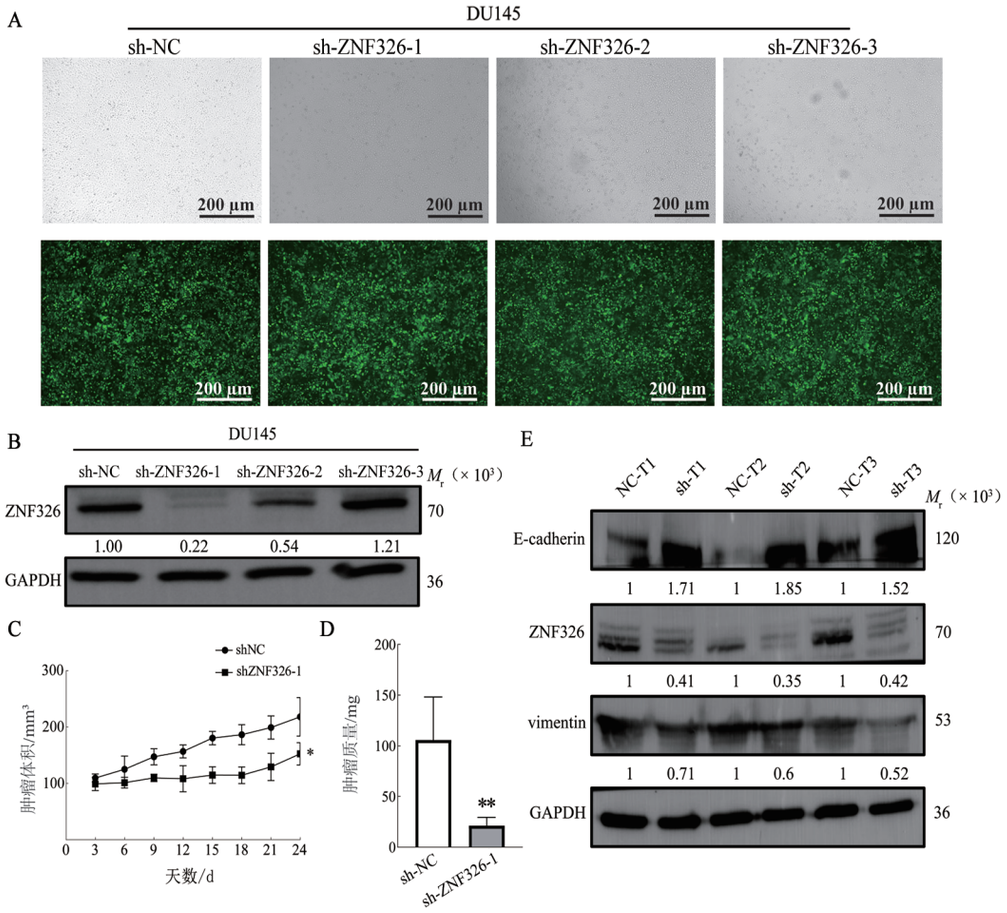
A：Western blotting法检测各组处理后DU145和PC3细胞中ZNF326蛋白表达水平；B：CCK-8法检测敲低ZNF326后DU145和PC3细胞的增殖活力；C、D：平板克隆形成实验检测敲低ZNF326后DU145和PC3细胞的克隆形成能力；E：Transwell实验检测敲低ZNF326后DU145和PC3细胞的迁移和侵袭能力。与si-NC组比较，$^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$。

图2　敲低ZNF326抑制PCa细胞的增殖、迁移和侵袭能力

2.3 敲低ZNF326抑制PCa细胞体内成瘤能力并调控EMT相关蛋白质表达

荧光显微镜观察（图3A）发现，慢病毒感染后3组细胞中GFP表达良好。Western blotting法检测结果（图3B）显示，与sh-NC组相比，sh-ZNF326-1组ZNF326蛋白表达明显降低，表明稳定敲低细胞构建成功。裸鼠皮下移植瘤实验中，实验终点sh-ZNF326-1组有2只动物未形成可检测肿瘤，后续肿瘤体积及瘤质量分析仅纳入已成瘤动物。结果（图3C、D）显示，sh-ZNF326-1组（$n = 6$，$P < 0.05$或$P < 0.01$）移植瘤体积和瘤质量均显著低于sh-NC组（$n = 6$，$P < 0.05$或$P < 0.01$）。

进一步检测移植瘤组织中EMT相关蛋白表达，结果（图3E）显示，与sh-NC组相比，sh-ZNF326-1组中ZNF326和vimentin蛋白表达降低，而E-cadherin表达升高，提示ZNF326可能参与PCa细胞EMT过程调控。



A：荧光显微镜观察sh-ZNF326-1/2/3及sh-NC慢病毒感染DU145细胞后的GFP表达；B：Western blotting法检测sh-ZNF326-1/2/3及sh-NC稳转细胞中ZNF326蛋白表达水平，；C：裸鼠皮下移植瘤体积随时间变化曲线，与sh-NC组比较，$^{*}P < 0.05$；D：实验终点移植瘤质量，与sh-NC组比较，$^{**}P < 0.01$；E：Western blotting法检测ZNF326及EMT相关蛋白E-cadherin、vimentin的表达水平。

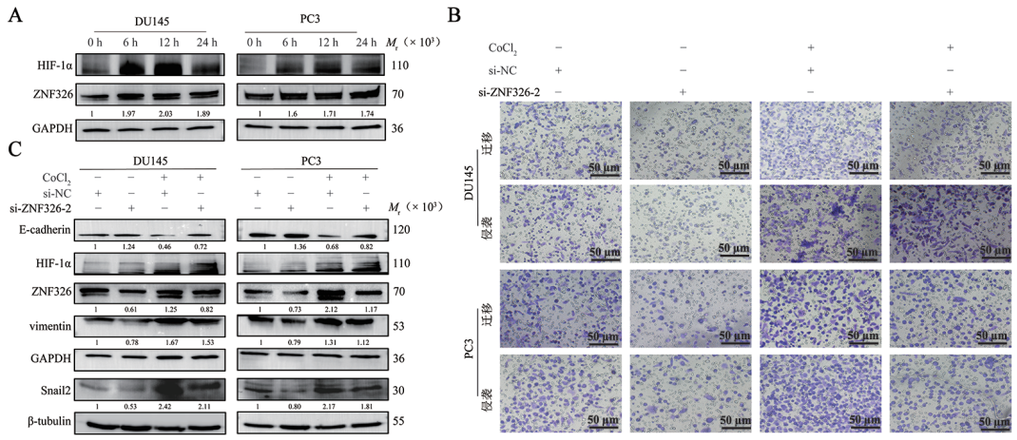
图3 敲低ZNF326抑制裸鼠异种移植瘤生长和EMT

2.4 敲低ZNF326抑制缺氧诱导的PCa细胞EMT

GSE227811数据集分析显示，与常氧对照组相比，低氧处理后LNCaP细胞中ZNF326表达水平升高（$\log_2FC = 0.486$，$P = 0.006\ 85$，校正后$P = 0.023\ 5$）。

在$CoCl_2$诱导的缺氧条件下，Western blotting法检测结果（图4A）显示，缺氧通路关键分子HIF-1α和ZNF326的蛋白表达均明显上调，表明缺氧细胞模型构建成功。

Transwell实验结果（图4B）显示，与常氧组相比，缺氧组DU145和PC3细胞的迁移和侵袭能力明显增强（$P < 0.01$）；敲低ZNF326后，两种细胞在常氧及缺氧条件下的迁移和侵袭能力均显著降低（$P < 0.01$）。进一步检测EMT相关蛋白表达（图4C）发现，与常氧组相比，缺氧条件下vimentin和Snail2表达升高，E-cadherin表达降低；敲低ZNF326后，上述EMT相关蛋白的表达变化得到部分逆转。

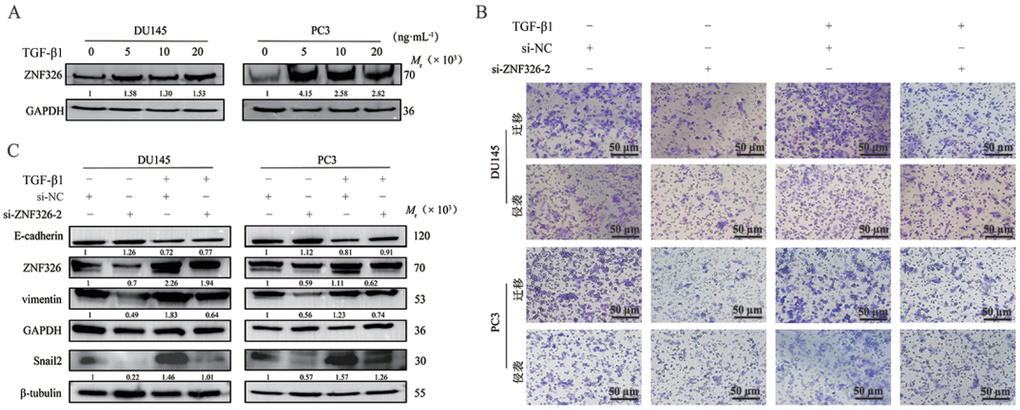


A：Western blotting法检测200 μmol/L $CoCl_2$处理不同时间后DU145和PC3细胞中HIF-1α及ZNF326蛋白表达水平，以GAPDH作为内参；B：Transwell实验检测常氧及$CoCl_2$诱导缺氧条件下敲低ZNF326后DU145和PC3细胞的迁移和侵袭能力；C：Western blotting法检测常氧及缺氧条件下敲低ZNF326后DU145和PC3细胞中ZNF326及EMT相关蛋白E-cadherin、vimentin和Snail2的表达水平（ZNF326、E-cadherin和vimentin以GAPDH作为内参，Snail2以β-tubulin作为内参进行灰度值归一化分析）。

图4　敲低ZNF326抑制缺氧诱导的PCa细胞迁移、侵袭和EMT

2.5　敲低ZNF326抑制TGF-β1诱导的PCa细胞EMT

Western blotting法检测结果（图5A）显示，TGF-β1处理后DU145和PC3细胞中ZNF326蛋白表达水平升高，提示ZNF326可能参与TGF-β1介导的EMT过程。Transwell实验结果（图5B）显示，与对照组相比，TGF-β1处理显著增强DU145和PC3细胞的迁移和侵袭能力（$P < 0.01$）；敲低ZNF326后，TGF-β1诱导的细胞迁移和侵袭能力显著降低（$P < 0.01$）。进一步检测EMT相关蛋白表达（图5C）发现，TGF-β1处理后vimentin和Snail2表达升高，E-cadherin表达降低；敲低ZNF326后，上述EMT相关蛋白的表达变化得到部分逆转。



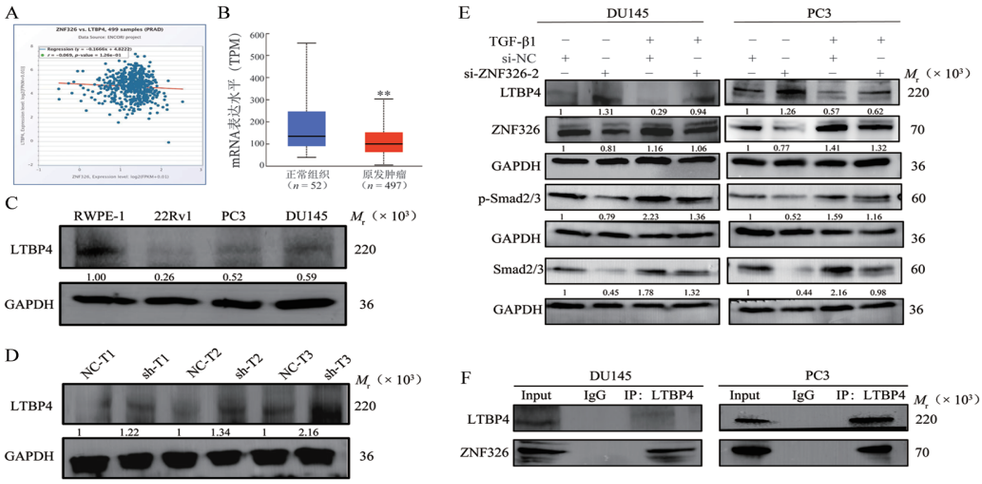
A：Western blotting法检测不同浓度的重组人TGF-β1（0、5、10和20 ng/mL）处理后DU145和PC3细胞中ZNF326蛋白表达水平；B：Transwell实验检测敲低ZNF326联合TGF-β1（10 ng/mL，48 h）处理后DU145和PC3细胞的迁移和侵袭能力；C：Western blotting法检测敲低ZNF326联合TGF-β1处理后DU145和PC3细胞中ZNF326及EMT相关蛋白E-cadherin、vimentin和Snail2的表达水平。

图5　敲低ZNF326抑制TGF-β1诱导的PCa细胞迁移、侵袭和EMT

2.6　ZNF326可能参与LTBP4及TGF-β信号通路调控

starBase分析结果（图6A）显示，ZNF326与LTBP4表达呈弱负相关趋势，但相关性未达到统计学意义（$r = -0.069$，$P = 0.126$）。TCGA数据库分析结果（图6B）显示，与正常前列腺组织相比，LTBP4在PCa原发组织中的表达水平显著下调（$P < 0.01$）。Western blotting法检测结果（图6C~E）显示，与正常前列腺上皮细胞RWPE-1相比，LTBP4在22RV1、DU145和PC3细胞中均呈低表达；与sh-NC组相比，sh-ZNF326-1组移植瘤组织中的LTBP4蛋白质表达明显升高；TGF-β1处理后ZNF326表达升高、LTBP4表达降低，并伴随Smad2/3和p-Smad2/3表达升高，而敲低ZNF326后，LTBP4表达升高，Smad2/3和p-Smad2/3表达降低。上述结果提示，ZNF326可能与LTBP4表

达及TGF-β/Smad信号通路变化相关。Co-IP结果（图6F）显示，抗LTBP4抗体免疫沉淀产物中可检测到ZNF326，提示ZNF326与LTBP4可存在于同一蛋白复合物中，两者可能存在蛋白相互作用。



A：starBase/ENCORI平台分析PCa样本中ZNF326与LTBP4表达的相关性；B：TCGA数据库分析LTBP4在PCa原发肿瘤组织和正常前列腺组织中的表达水平，与正常前列腺组织相比，$^{**}P < 0.01$；C：Western blotting法检测RWPE-1、22Rv1、DU145和PC3细胞中LTBP4蛋白表达水平；D：Western blotting法检测sh-NC组和sh-ZNF326-1组各3例移植瘤组织中LTBP4蛋白表达水平；E：Western blotting法检测si-NC、si-ZNF326、si-NC + TGF-β1和si-ZNF326 + TGF-β1组中ZNF326、LTBP4、Smad2/3及p-Smad2/3蛋白表达水平；F：Co-IP检测ZNF326和LTBP4在DU145和PC3细胞中的相互作用。

图6　LTBP4在PCa中表达下调并与ZNF326相互作用

3　讨　论

PCa是男性最常见的恶性肿瘤之一，全球疾病负担沉重。深入阐明PCa进展的分子机制，发掘特异性诊断标志物与治疗靶点，有助于提升该病临床诊疗水平。ZNF作为人类基因组中最大的转录因子家族，已被证实广泛参与多种肿瘤的调控过程[16-18]，但ZNF326在PCa进展中的生物学功能尚不明确。本研究结合生物信息学分析与实验验证发现，ZNF326在PCa组织及细胞系中呈高表达，且其表达水平总体随Gleason评分升高呈增加趋势，提示ZNF326与PCa恶性进展密切相关。

既往研究[19-20]表明，EMT不仅介导肿瘤细胞迁移侵袭，还参与调控肿瘤细胞致瘤潜能，提示敲低ZNF326可通过抑制EMT削弱PCa细胞的体内致瘤能力。本研究的体外细胞功能实验显示，敲低ZNF326能够显著抑制DU145与PC3细胞的增殖、迁移及侵袭能力。体内裸鼠皮下成瘤实验进一步证实了这一观点，实验结果显示，sh-ZNF326-1组移植瘤体积和质量均低于对照组，同时瘤组织中Vimentin表达下调、E-cadherin表达上调，提示ZNF326可能参与PCa细胞恶性生物学行为及EMT过程的调控。但由于本研究未将成瘤率作为主要终点进行统计，因此目前结果主要支持敲低ZNF326可抑制PCa细胞体内移植瘤生长，其对成瘤能力的影响仍需进一步验证。

缺氧是实体瘤微环境的典型特征，大量证据[5,21-22]表明HIF通路可诱导EMT，增强PCa转移能力。为探讨ZNF326是否参与PCa细胞的缺氧应答，本研究采用$CoCl_2$构建PCa缺氧细胞模型，Western blotting法检测结果显示HIF-1α与ZNF326表达同步上调，提示ZNF326可能是缺氧应答下游效应分子。敲低ZNF326可在常氧及缺氧条件下抑制PCa细胞迁移侵袭，并逆转缺氧诱导的EMT标志物改变，下调vimentin、上调E-cadherin。为进一步验证ZNF326对EMT的调控作用，本研究采用重组人TGF-β1体外诱导PCa细胞EMT；结果显示TGF-β1刺激可上调ZNF326表达，而敲低ZNF326能够逆转TGF-β1介导的vimentin升高。上述结果表明，ZNF326参与缺氧及TGF-β1诱导的PCa细胞EMT，靶向干预ZNF326可有效阻断该EMT表型。

LTBP4是TGF-β1信号通路的关键调控因子[23]，既往研究[24-25]表明，LTBP4参与多种肿瘤的发生发展及TGF-β相关信号调控，但其在PCa中的作用及其与ZNF326的关系尚不明确。本研究基于TCGA数据库及Western blotting检测证实，LTBP4在PCa组织和细胞中显著低表达；TGF-β1处理可进一步下调LTBP4，并上调TGF-β通路关键分子Smad2/3及其磷酸化蛋白p-Smad2/3。敲低ZNF326可逆转TGF-β1对LTBP4的抑制作用，降低Smad2/3与p-Smad2/3表达；移植瘤标本检测同样显示，敲低ZNF326可上调LTBP4蛋白水平。上述结果提示PCa中ZNF326参

与LTBP4及TGF-β/Smad信号的调控。Co-IP实验证实，抗LTBP4抗体可富集ZNF326，提示两者在细胞内存在相互作用。上述结果表明，ZNF326敲低伴随LTBP4表达升高及Smad2/3、p-Smad2/3蛋白表达降低，提示LTBP4及TGF-β/Smad相关蛋白可能参与ZNF326介导的调控过程。

综上所述，本研究证实ZNF326在PCa组织和细胞中高表达，缺氧与TGF-β1均可诱导其表达上调；敲低ZNF326可上调LTBP4、抑制TGF-β1介导的p-Smad2/3激活，进而阻断缺氧及TGF-β1诱导的EMT，抑制PCa细胞迁移侵袭。本研究为ZNF326作为PCa潜在治疗靶点提供实验依据。

[参 考 文 献]

[1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263. DOI: 10.3322/caac.21834.

[2] Xie Q Y, Zhao G Q, Tang H, et al. Recent advances in understanding the role of Wnt5a in prostate cancer and bone metastasis [J]. Discov Oncol, 2025, 16: 880. DOI: 10.1007/s12672-025-02680-3.

[3] Mirzaei S, Paskeh M D A, Okina E, et al. Molecular landscape of lncRNAs in prostate cancer: a focus on pathways and therapeutic targets for intervention [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 214. DOI: 10.1186/s13046-022-02406-1.

[4] Mak P, Leav I, Pursell B, et al. ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading [J]. Cancer Cell, 2010, 17(4): 319-332. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.02.030.

[5] Tang C, Liu T, Wang K, et al. Transcriptional regulation of FoxM1 by HIF-1α mediates hypoxia-induced EMT in prostate cancer [J]. Oncol Rep, 2019, 42(4): 1307-1318. DOI: 10.3892/or.2019.7248.

[6] Santos M, Koushyar S, Dart D A, et al. From hypoxia to bone: reprogramming the prostate cancer metastatic cascade [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(15): 7452. DOI: 10.3390/ijms26157452.

[7] Mohamed O A A, Tesen H S, Hany M, et al. The role of hypoxia on prostate cancer progression and metastasis [J]. Mol Biol Rep, 2023, 50 (4): 3873-3884. DOI: 10.1007/s11033-023-08251-5.

[8] Montorsi L, Guizzetti F, Alecci C, et al. Loss of ZFP36 expression in colorectal cancer correlates to Wnt/β-catenin activity and enhances epithelial-to-mesenchymal transition through upregulation of ZEB1, SOX9 and MACC1 [J]. Oncotarget, 2016, 7(37): 59144-59157. DOI: 10.18632/oncotarget.10828.

[9] Wu J, Zhang X, Han Q, et al. ZNF326 promotes proliferation of non-small cell lung cancer cells by regulating ERCC1 expression [J]. Lab Invest, 2019, 99(2): 169-179. DOI: 10.1038/s41374-018-0148-y.

[10] Yu X, Wang M, Han Q, et al. ZNF326 promotes a malignant phenotype of breast cancer by interacting with DBC1 [J]. Mol Carcinog, 2018, 57(12): 1803-1815. DOI: 10.1002/mc.22898.

[11] Yang Y, Yan T, Han Q, et al. ZNF326 promotes colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition [J]. Pathol Res Pract, 2021, 225: 153554. DOI: 10.1016/j.prp.2021.153554.

[12] Zhang N, Hong B, Zhou C, et al. Cobalt chloride-induced hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition in renal carcinoma cell lines [J]. Ann Clin Lab Sci, 2017, 47(1): 40-46.

[13] 杨晓莹. MiR-3064-5p在前列腺癌细胞增殖和转移中的作用及机制研究 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2023.

[14] Cadena M, DeLuna F, Baryeh K, et al. Prostate cancer epithelial mesenchymal transition by TGF-β1 exposure monitored with a photonic crystal biosensor [C]//Proc SPIE Int Soc Opt Eng. 2020, 11251: 1125126. DOI: 10.1117/12.2544113.

[15] Yang R, Zuo L, Ma H, et al. Downregulation of nc886 contributes to prostate cancer cell invasion and TGFβ1-induced EMT [J]. Genes Dis, 2022, 9(4): 1086-1098. DOI: 10.1016/j.gendis.2020.12.010.

[16] Kamaliyan Z, Clarke T L. Zinc finger proteins: guardians of genome stability [J]. Front Cell Dev Biol, 2024, 12: 1448789. DOI: 10.3389/fcell.2024.1448789.

[17] Tao C, Luo J, Tang J, et al. The tumor suppressor zinc finger protein 471 suppresses breast cancer growth and metastasis through inhibiting AKT and Wnt/β-catenin signaling [J]. Clin Epigenetics, 2020, 12(1): 173. DOI: 10.1186/s13148-020-00959-6.

[18] 杨悦, 谭琦, 李敬岩, 等. ZNF326通过Wnt通路促进结直肠癌细胞的增殖[J]. 解剖科学进展, 2025, 31(3): 318-321, 326. DOI: 10.16695/j.cnki.1006-2947.2025.03.006.

[19] Gao L M, Xu S F, Zheng Y, et al. Long non-coding RNA H19 is responsible for the progression of lung adenocarcinoma by mediating methylation-dependent repression of CDH1 promoter [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(9): 6411-6428. DOI: 10.1111/jcmm.14533.

[20] Ronca R, Di Salle E, Giacomini A, et al. Long pentraxin-3 inhibits epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells [J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(12): 2760-2771. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0487.

[21] Bery F, Figiel S, Kouba S, et al. Hypoxia promotes prostate cancer aggressiveness by upregulating EMT-activator Zeb1 and SK3 channel expression [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(13): 4786. DOI: 10.3390/ijms21134786.

[22] Zhang H, Liang F, Yue J, et al. MicroRNA-137 regulates hypoxia-mediated migration and epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer by targeting LGR4 *via* the EGFR/ERK signaling pathway [J]. Int J Oncol, 2020, 57(2): 540-549. DOI: 10.3892/ijo.2020.5064.

[23] Terradas M, Mur P, Morón-Duran F D, et al. Constitutional epimutations in LTBP4, a component of the TGF-β signaling, and in BRCA1, as potential drivers of early-onset colorectal cancer [J]. Clin Epigenetics, 2025, 17(1): 183. DOI: 10.1186/s13148-025-01924-x.

[24] He W, Zhang J, Wen S, et al. Epigenetic identification of LTBP4 as a putative tumor suppressor in breast cancer [J]. Epigenomics, 2024, 16(14): 999-1012. DOI: 10.1080/17501911.2024.2388017.

[25] 王文娟, 许鑫, 鲍玲玲, 等. LTBP4介导的TGFβ1信号通路在胃腺癌增殖中的作用 [J]. 浙江临床医学, 2024, 26(9): 1285-1288.

[收稿日期] 2026-05-12　　[修回日期] 2026-08-19
[本文编辑] 陈怡宁