

RBM39 通过调控肝细胞癌 ERCC1 表达促进核苷酸切除修复

余苑苑^{1,2}, 刘诗涵^{1,2}, 许柱³, 杜瀛瀛^{1,2}

(¹ 安徽中医药大学第一临床医学院, 合肥 230038; ² 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科, 合肥 230022; ³ 肿瘤免疫微环境研究及治疗安徽省重点实验室, 合肥 230022)

摘要 目的 探讨肝细胞癌(HCC)中核苷酸切除修复(NER)的调控机制。方法 根据 NER 通路中基因的表达水平,使用 TCGA 数据库对 HCC 进行分子分型。通过 siRNA 构建 RNA 结合基序蛋白 39(RBM39)基因敲低的 HCC 细胞株,通过 RBM39 质粒构建 RBM39 过表达的 HCC 细胞株,使用诱导 RBM39 蛋白降解的试剂 Indisulam 处理细胞。实时荧光定量 PCR(qPCR)和 Western blot 分别检测 RBM39、核苷酸切除修复交叉互补组 1(ERCC1)的 mRNA 和蛋白表达水平的变化;流式细胞术检测 NER 效率;细胞计数试剂盒 8(CCK-8)检测细胞活力。结果 HCC 患者根据 NER 活性可以分为 C1、C2 和 C3 三型,其中 C3 分型中 NER 活性最高($P < 0.0001$)。转染 RBM39 siRNA 或 Indisulam 处理组 NER 修复效率较对照组下降($P < 0.01$),细胞存活率降低($P < 0.01$),并且 ERCC1 的 mRNA 和蛋白表达降低($P < 0.01$);RBM39 过表达组 ERCC1 的 mRNA 和蛋白表达较对照组增强($P < 0.01$)。结论 HCC 细胞中 RBM39 可能通过调控 ERCC1 的表达影响 NER 修复效率。

关键词 癌症;肝细胞癌;DNA 损伤;核苷酸切除修复;RBM39;ERCC1

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是导致癌症相关死亡的第三大原因^[1],HCC 患者总生存率(overall survival, OS)较低,无进展生存时间(progress free survival, PFS)较短,尽管近年来 HCC 的治疗策略有所进展,但仍存在不足,例如:早期诊断困难、肿瘤异质性、复发率高、联合治疗策略待优化及晚期患者治疗选择有限等。因此探索新的治疗策略极具意义。细胞在应对各种内源性和外源性因素导致的 DNA 损伤时,存在不同 DNA 修复方式。核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)是 DNA 修复的重要方式之一,主要识别由紫外线(ultraviolet, UV)照射引起的环丁烷嘧啶二聚体和 6-4 光产物、化疗药物或某些致癌物质引起的链内交联等^[2]。研究^[3]表明,NER 通路的缺陷与多种人类综合征的产生以及肿瘤和衰老关系紧密。核苷酸切除修复交叉互补组 1(excision repair cross complementation group 1, ERCC1)基因在修复 DNA 链间交联的 NER 机制中发挥着限速作用^[4]。

RNA 结合基序蛋白 39(RNA binding motif protein 39, RBM39)是一个编码 RNA 结合蛋白的基因,在 RNA 的剪接、稳定性以及翻译后调控方面起到重要作用^[5]。RBM39 通过与 RNA 分子的相互作用,在调控基因表达和细胞生物学过程中发挥重要作用。相关研究^[6]表明 RBM39 在 HCC 中高表达。但目前有关 RBM39 在 DNA 损伤修复机制中的作用鲜有报道,值得去进一步探索。该研究旨在探索 HCC 中 NER 的调控机制,为 HCC 的临床治疗寻找新的方向。

1 材料与方法

1.1 数据收集与分析 从 TCGA 数据库(<http://portal.gdc.cancer.gov>)中获取 371 例 HCC 患者的 mRNA 表达谱和临床信息,绘制总体生存期和无进展生存期曲线。随后从 KEGG 数据库中下载 KEGG-NER 数据集,该数据集包含 44 个基因。为了确定数据集中的最佳聚类数并评估聚类的稳定性,使用 ConsensusClusterPlus(R package 版本为 1.69.0)进行整合共识聚类分析。具体来说,利用了该方法的多次随机重抽样和重新聚类的特性,以评估不同聚类数量下的一致性。每次聚类分析中,样本的 80% 被随机选取,使用全部特征进行分析。并选择了 k-means 算法作为聚类算法,使用欧式距

2025-01-07 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:3200679);安徽省高校自然科学基金重点项目(编号:2022AH051131)

作者简介:余苑苑,女,硕士研究生;

杜瀛瀛,男,教授,博士生导师,通信作者,E-mail: duyinying@ahmu.edu.cn

离作为相似度量标准。聚类数量的可能范围设定为 2~6,每个可能的聚类数都重复进行了多次聚类分析,以确保结果的稳定性和可重复性。最终选择了聚类数 $k=3$,在此数量下聚类结果显示出最高的稳定性和一致性。

1.2 细胞和试剂 人 HCC 细胞系 Hep3B 和 Huh7 购于中国科学院细胞库。DMEM 培养基、胎牛血清和胰酶(货号: C11995500BT、10270-106、25200056,美国赛默飞世尔公司);转染试剂 ExFect Transfection Reagent、RNA 提取、逆转录、qPCR Master Mix 和 AnnexinV-FITC/PI 试剂盒(货号: T101-01、R711-01、R323-01、Q712-02、A211-02,南京诺唯赞公司);ERCC1 兔抗人抗体(货号:12345T,美国 Cell Signaling Technology 公司); β -Actin 鼠抗人抗体、RBM39 兔抗人抗体和相应的二抗(货号:66009-1-Ig、21339-1-AP、SA00001-1、SA00001-2,武汉三鹰生物技术有限公司);蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(货号: B14001、B15001,美国 Selleck 生物技术有限公司);RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒(货号: P0013B、P0010,上海碧云天生物技术公司);0.45 μm 孔径 PVDF 膜(货号: IPVH00010,美国 Millipore 公司);Indisulam、CCK-8 试剂盒和青-链霉素双抗(货号: HY-13650、HY-K0301、HY-K1006,美国 MCE 公司);PBS(货号 41403SE,上海翌圣生物科技股份有限公司)。

1.3 引物和质粒 本文中所用引物、siRNA 均由安徽通用生物科技有限公司合成,序列号如下:
RBM39-siRNA-1: 5'-GGAACAACUAAUGGAUUU TT-3'; *RBM39*-siRNA-2: 5'-GAUUAAGGAUGAUGUGAUUTT-3'; β -Actin, (正义链) CTCCATCCTGGC-CTCGCTGT; (反义链) GCTGCTACCTTCACCGT-TCC;*RBM39*, (正义链) 5'-CAATGCTTGAGGCTCCT-TACA-3'; (反义链) 5'-TCCGTTCTTACTTTTTGCT-TCTC-3'; *ERCC1*, (正义链) CTCCCGGGTGACT-GAATGTC; (反义链) TTCAGAGTCTGGGGAG-GAGG;*RBM39* 质粒、pmax-GFP 和 DsRED 质粒均由本实验室保存。

1.4 主要仪器 CO₂ 培养箱(型号: Heracell VIOS 160i)、酶标仪(型号: Multiskan FC)、紫外交叉仪(型号: CL-1000)购自美国 Thermo Fisher 公司;SDS PAGE 电泳仪(型号: 456-1021)和电转仪(型号: Micro Pulser 1652100)购自美国 Bio Rad 公司;化学发光成像系统(型号: Tanon 4800,上海天能科技有限公司);流式细胞仪(型号: AT1466,无锡厦泰生物科

技有限公司)。

1.5 蛋白提取和免疫印迹实验 将 Hep3B 和 Huh7 细胞用 PBS 洗涤 2 遍,加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,12 000 r/min 离心 15 min 后收集上清液,使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,制取样本,95 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 5 min。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离不同分子量的蛋白后转至 PVDF 膜,快速封闭液封闭后孵育 β -Actin (1:10 000)、RBM39 (1:2 000) 和 ERCC1 (1:1 000) 抗体,放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。次日 TBST 洗涤 3 遍,孵育相应种属来源的鼠二抗(1:4 000)和兔二抗(1:4 000),放置室温摇床 1 h, TBST 清洗 3 遍后显影。

1.6 RNA 提取和 qPCR 实验 按照总 RNA 提取试剂盒步骤说明,提取总 RNA 并测定浓度。将总 RNA 逆转录成 cDNA 后,按照 qPCR Master Mix 试剂盒说明进行 qPCR 实验。

1.7 细胞增殖实验 将处于对数生长期的 Hep3B 和 Huh7 细胞分别以 2 000 个细胞/孔接种到 96 孔板中,待细胞贴壁后,进行 UV 照射。之后在 24、48、72 h 时,分别更换培养基为含 100 μl 培养基和 10 μl CCK-8 试剂的混合液,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中避光孵育 2 h。最后,使用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度并记录数据。

1.8 NER 报告系统建立 利用紫外交叉仪处理 pmaxGFP 质粒(1 200 J),将 UV 照射后的 pmax 绿色荧光蛋白质粒(pmax green fluorescent protein plasmid, GFP) (3 μg /孔)与 DsRED 红色荧光蛋白质粒(DsRED red fluorescent protein plasmid, DsRED) (20 ng/孔)混匀,使用转染试剂 ExFect Transfection Reagent 转入细胞内。转染步骤如下:将 HCC 细胞均匀接种于 6 孔细胞培养板,随机分为对照组和实验组,待细胞密度合适,按照 ExFect Transfection Reagent 试剂盒说明书将目的质粒转染至细胞内。

1.9 细胞转染 *RBM39* siRNA 将 HCC 细胞均匀接种于 6 孔细胞培养板,随机分为对照组和实验组。待细胞密度合适,按照 ExFect Transfection Reagent 试剂盒说明书,对照组细胞转染 siControl,实验组细胞分别转染 si*RBM39*-1 和 si*RBM39*-2。为检测 siRNA 效率,分别使用 50、75 和 100 nmol/L 浓度处理 Hep-3B 细胞,观察 *RBM39* 蛋白表达水平差异,最终选取 100 nmol/L 的 siRNA 浓度进行后续实验。

1.10 Indisulam 诱导 *RBM39* 降解 Indisulam 是一种碳酸酐酶抑制剂,具有抗癌活性,已被证实可以

通过募集 DCAF15 诱导 *RBM39* 降解来靶向剪接^[7]。为明确其诱导 *RBM39* 降解的效率,分别使用 100、250、500、750 和 1 000 nmol/L 的浓度处理 Huh7 细胞,观察 *RBM39* 蛋白表达水平差异,最终选取 500 nmol/L 的浓度进行后续实验。

1.11 流式细胞仪检测 NER 效率 转染 48 h 后,使用预冷 PBS 清洗 2 遍,经 0.25% 胰蛋白酶消化后收集细胞至 1.5 ml 离心管,3 000 r/min 离心 3 min 后弃去上清液,200 μ l PBS 重悬细胞转移至流式管中,上机检测。在流式细胞仪上进行分析之前保存在冰上。每次重复实验至少分析 2 万个细胞。FlowJo 软件分析结果并绘图统计。计算公式:NER 效率 = GFP⁺/DsRED⁺^[8]。

1.12 统计学处理 采用 Kaplan-Meier 法评估各组患者的 OS、PFS 及疾病特异性生存期(disease-specific survival, DSS)。组间生存曲线比较通过 Log-rank 检验进行统计学比较。分析基于 R Studio(R 语言 v4.2.0)平台,利用"survival"包完成。使用 Pearson 相关系数计算两个变量之间的相关性,使用散点图等可视化工具直观展示变量之间的关系,帮助判断正相关或负相关。使用 Graphpad Prism9.0 软件进行统计学分析,实验至少进行 3 次重复。数据采用均数 \pm 标准差表示,正态分布且方差齐的组间均值比较使用 Student's *t* 检验,多组间差异比较使用单因素方差分析,多组间多个时间点数据比较采用重复测量的方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *RBM39* 在 NER 活性高的 HCC 患者中呈高表达 根据 TCGA 公共数据库中 371 例 HCC 患者的基因数据,通过执行 Consensus Cluster Plus 进行整合共识聚类。结果显示:在 $k = 3$ 时,共识矩阵表现出清晰的对角块结构,说明样本在各组中的分配具有高度一致性,聚类结果更具稳定性(图 1A)。在 Delta 区域图中,从 $k = 2$ 到 $k = 3$ 时观察到最大的一致性增幅,表明增加第三个聚类能显著提高整体的聚类一致性。随后的 k 值增加并没有带来同样显著的一致性提升,这意味着 $k = 3$ 提供了最佳的稳定性和区分度(图 1B)。同时在 $k = 2 \sim 6$ 的共识累积分布函数(consensus cumulative distribution function, CCDF)图中,随着 k 增加,CDF 曲线趋于平稳,表明共识性提高。然而,过高的 k 可能导致过拟合。因此,结合 Delta 变化图(图 1C), $k = 3$ 被确

定为最优聚类数,代表将样本聚类成 3 种类型最为合理,因此根据 Consensus Cluster Plus 的自动聚类,将 HCC 患者分为 C1、C2 和 C3 三种分型(图 1D)。其中 C1 代表 NER 活性低的分型,C3 则代表 NER 活性高的分型。随后分析 *RBM39* 在这三种分型中的表达水平差异,结果显示:C3 组的 *RBM39* 表达水平明显高于 C1 组($t = -19.15, P < 0.0001$),C2 组的表达水平明显高于 C1 组($t = -12.162, P < 0.0001$),并且 C3 组的表达水平也明显高于 C2 组($t = -10.109, P < 0.0001$),见图 1E。Kaplan-Meier 生存曲线分析表明,高表达 *RBM39* 的 C3 组 OS 和 PFS 均低于 C1 和 C2 组($\chi^2 = 7.88, 5.86, P < 0.05$),见图 1F。上述结果表明:NER 和 HCC 患者的预后密切相关,*RBM39* 可能参与调控 NER。

2.2 *RBM39* 基因敲低后 HCC 细胞 NER 修复效率降低 为探讨 *RBM39* 和 NER 的关系,本研究采用 *RBM39* siRNA 转染 Hep3B 和 Huh7 细胞进行实验。Western blot 结果显示:不同浓度 *RBM39* siRNA 均降低了细胞中 *RBM39* 蛋白的表达(图 2A)。qPCR 结果显示:与对照组相比,*RBM39* siRNA 处理组的 *RBM39* mRNA 水平明显下降($t = 9.87, 7.94, 5.44, 4.51$,均 $P < 0.05$,图 2B、2C)。在转染 siRNA 24 h 后,对 HCC 细胞进行 UV 照射,并分别在 24、48、72 h 时间点进行 CCK-8 实验,结果显示:*RBM39* 基因敲低的 HCC 细胞活力较对照组下降($F_{\text{重复测量}} = 190.70, 274.70, 36.93, 75.87$,均 $P < 0.01$,图 2D、2E)。为进一步探究 *RBM39* 和 NER 效率之间的关系,在转染 *RBM39* siRNA 24 h 后,将 UV 照射后的 GFP 与 DsRED 质粒混合,共同转入 HCC 细胞内,48 h 后收集细胞,流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞和 DsRED 阳性细胞数(图 2F),结果显示:HCC 细胞内 *RBM39* 基因敲低后,NER 效率较对照组明显下降($t = 6.30, 6.10, 7.65, 5.97$,均 $P < 0.01$,图 2G、2H)。

2.3 *RBM39* 降解剂处理后 HCC 细胞 NER 修复效率降低 Western blot 结果显示:不同浓度的碳酸酐酶抑制剂 Indisulam(图 3A)均降低了 Huh7 细胞中 *RBM39* 的蛋白表达水平(图 3B)。qPCR 结果显示:与对照组相比,Indisulam 处理后的 Hep3B 和 Huh7 细胞 *RBM39* mRNA 水平明显下降($t = 14.62, 6.03$,均 $P < 0.001$),见图 3C、3D。同样条件处理细胞 24 h 后,使用 UV 照射细胞,分别在 24、48、72 h 时间点进行 CCK-8 实验,结果表明:Indisulam 处理组的细胞活力较对照组明显下降($F_{\text{重复测量}} =$

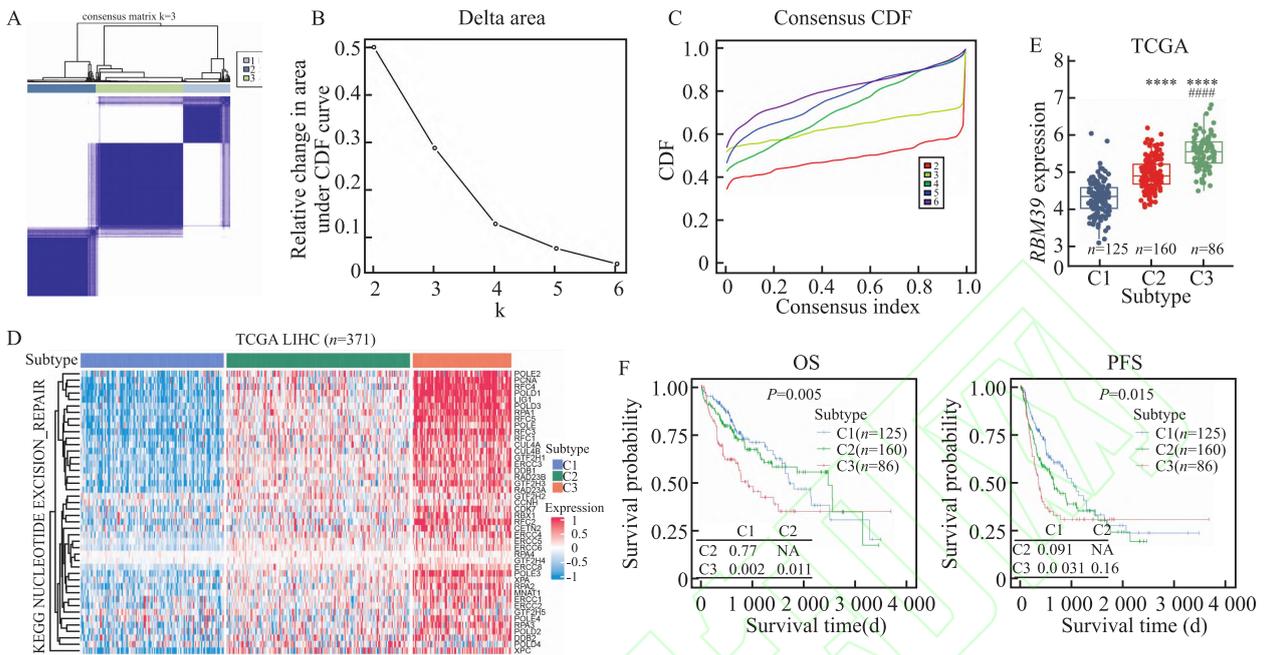


图1 生信分析 *RBM39* 在不同 NER 活性的 HCC 人群中表达情况

Fig. 1 Bioinformatics analysis of *RBM39* expression in HCC populations with different NER ability activity

A: Clustering results of the consensus matrix from Consensus Cluster Plus at $k=3$; B: Delta area plot of Consensus Cluster Plus; C: Evaluation of the area under the cumulative distribution function (CDF) curve for $k=2-6$; D: Expression patterns of NER pathway genes from KEGG in different subtypes; E: Comparison of *RBM39* expression differences among C1, C2, and C3 NER subtypes; F: Kaplan-Meier survival curves for OS and PFS of HCC patients in C1, C2, and C3 NER subtypes; **** $P < 0.0001$ vs C1 group; #### $P < 0.0001$ vs C2 group.

220.00、91.92, 均 $P < 0.001$), 见图 3E、3F。为进一步确认 *RBM39* 与 NER 效率的关系, 同样条件处理细胞 24 h 后, 转染 UV 照射后的 pmaxGFP 质粒和 DsRed 质粒, 48 h 后收集细胞, 流式细胞仪检测 NER 效率。结果显示: 与对照组相比, Indisulam 处理组 NER 效率明显降低 ($t = 8.52、8.79$, 均 $P < 0.001$), 见图 3G、3H。

2.4 *RBM39* 通过调控 *ERCC1* 影响 NER TCGA 数据库探究 *RBM39* 与 NER 通路中 *ERCC1* 表达的相关性, 根据相关系数 $r > 0$ 判断二者呈正相关, 且相关性显著 ($r = 0.16, P < 0.005$; 图 4A - 4B)。qPCR 和 Western blot 结果显示: 与对照组相比, 通过转染 *RBM39* siRNA 和使用 Indisulam 降低 HCC 细胞中 *RBM39* 表达后, 处理组的 *ERCC1* 蛋白 (*RBM39* siRNA: $t_{Hep3B} = 27.73、57.80、10.76、12.59, t_{Huh7} = 54.89、21.77、18.37、15.55$; Indisulam: $t_{Hep3B} = 7.79、7.56, t_{Huh7} = 4.87、14.66$; 均 $P < 0.01$, 图 4C - 4F) 和 mRNA 水平均下降 (*RBM39* siRNA: $t_{Hep3B} = 6.40、9.54, t_{Huh7} = 10.20、4.40$; Indisulam: $t = 18.58、8.48$; 均 $P < 0.05$, 图 4G、4H); 而 *RBM39* 过表达时, *ERCC1* 蛋白 ($t = 17.66、8.19、22.63、5.62$; 均 $P <$

0.01, 图 4I、4J) 和 mRNA 水平 ($t = 99.11、45.80、23.69、5.88$; 均 $P < 0.01$, 图 4K、4L) 均增高。

3 讨论

HCC 已成为全球严重的健康威胁因素, 预计到 2025 年, 每年将有超过 100 万人受到影响^[9]。尽管其发生机制尚未完全阐明, 但有研究^[10]表明 HCC 的发生与 DNA 损伤的积累密切相关, 特别是在 DNA 修复机制的异常方面。Chatterjee et al^[11]发现 HCC 细胞中 DNA 损伤的数量和修复效率与癌旁组织相比显著增加, 且 DNA 损伤修复相关蛋白的表达在肝癌中常常被上调。慢性肝病 (如肝硬化、脂肪肝等) 患者的 DNA 损伤和突变数量显著增加, 尤其是拷贝数变异和结构变异, 这些基因组不稳定性为肝癌的发生提供了“温床”, 并可能导致肿瘤的多样性和耐药性^[12-13]。因此, DNA 修复途径的异常在肝癌的发生与进展中起着至关重要的作用。本研究基于 NER 活性将 HCC 患者进行分型, 有效区分出不同预后的亚型, 发现 NER 通路中关键蛋白 *RBM39* 可能通过调控 *ERCC1* 的表达影响 NER 活性, 并且与 HCC 患者的预后密切相关, 为 HCC 的个

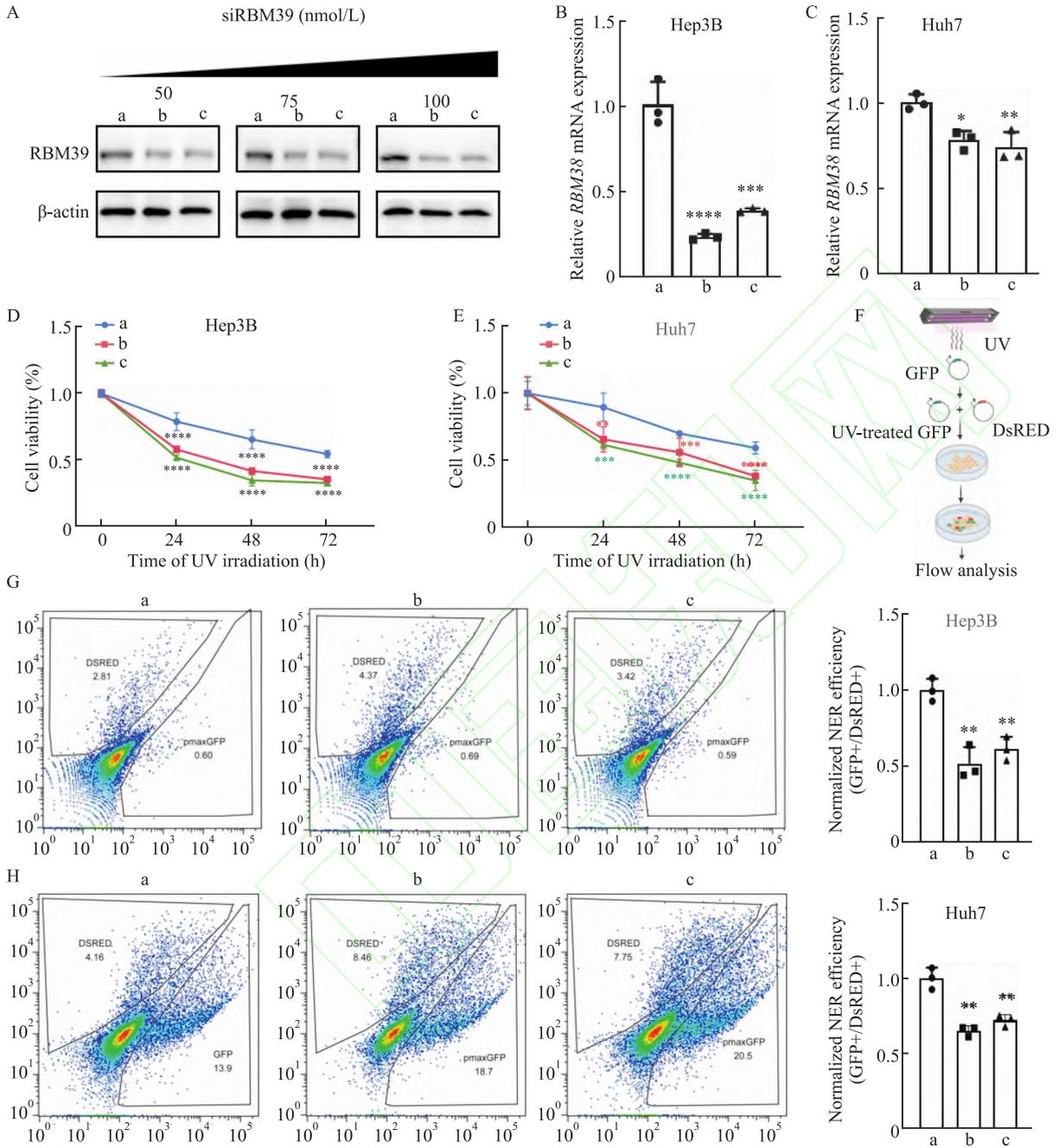


图2 RBM39 基因敲低对肝癌细胞系 NER 效率的影响

Fig. 2 The effect of RBM39 knockdown on NER efficiency in hepatocellular carcinoma cell lines

A: Western blot analysis of RBM39 protein expression levels in HCC cells treated with different concentrations of siRNA; B, C: qPCR analysis of RBM39 mRNA levels in Hep3B and Huh7 cells after siRNA treatment; D, E: CCK-8 assay measurements of cell viability of Hep3B and Huh7 cells with RBM39 knockdown after UV irradiation; F: Schematic diagram of the NER efficiency detection assay; G, H: Flow cytometry analysis of NER efficiency in Hep3B and Huh7 cells after RBM39 knockdown; a: siControl group; b: siRBM39-1 group; c: siRBM39-2 group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs siControl group.

性化治疗提供了新的思路,靶向 RBM39 和其调控的 NER 途径可能成为治疗 HCC 的新策略。

NER 是细胞修复由 UV、射线和某些化疗药物引起的 DNA 损伤的关键机制。NER 修复途径的缺陷会导致基因组不稳定性,进一步促进肝癌的发生。

本研究首次揭示了基于 NER 活性的 HCC 患者分型,并成功区分出了三个具有不同预后的亚型(C1、C2、C3)。C3 亚型患者显示出最高的 NER 活性,并且与较差的预后相关,提示 NER 活性可能与 HCC 的进展密切相关。ERCC5 作为 NER 通路的核心成

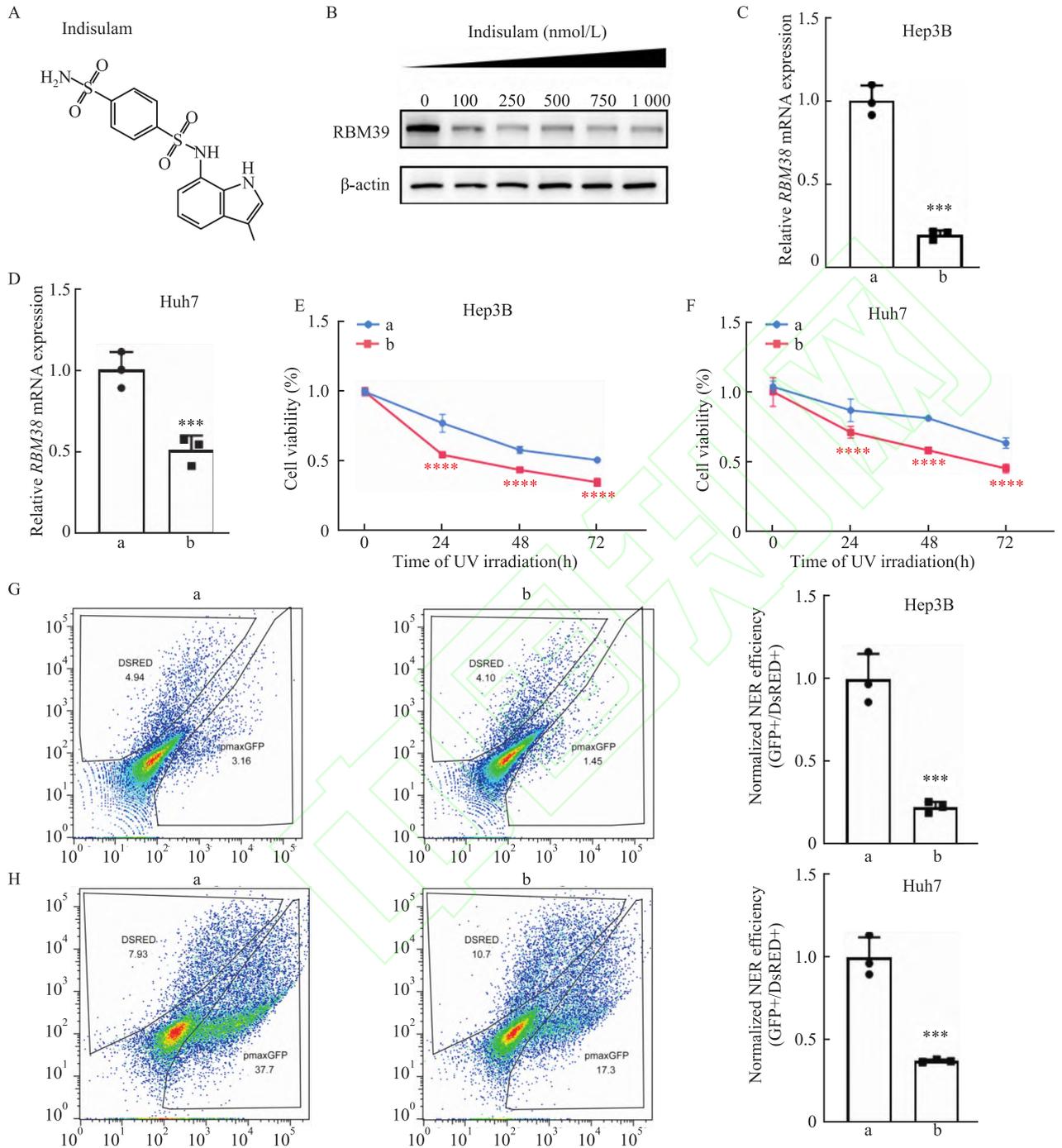


图3 Indisulam 对肝癌细胞系 NER 效率的影响

Fig. 3 The effect of Indisulam on NER efficiency in hepatocellular carcinoma cell lines

A: Chemical structure of Indisulam; B: Western blot was used to detect the protein expression levels of RBM39 in cells treated with different concentrations of Indisulam; C, D: qPCR was performed to measure the mRNA levels of *RBM39* in Hep3B and Huh7 cells after the treatment with Indisulam; E, F: The cell viability of Hep3B and Huh7 cells treated with Indisulam was assessed using the CCK-8 assay following UV irradiation; G, H: Flow cytometry was used to detect the NER efficiency in Hep3B and Huh7 cells after the treatment with Indisulam; a: DMSO group; b: Indisulam group; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs DMSO group.

分,其异位表达与多种癌症的发生密切相关,特别是在 HCC 中,Zheng et al^[14] 的研究发现,ERCC5 蛋白在肝癌肿瘤组织中的表达显著高于癌旁组织,且较

高的 ERCC5 表达与较差的临床预后密切相关。Fautrel et al^[15] 的研究发现,多个 NER 基因(包括 *ERCC1*、*XPC*和*XPA*)在肝癌组织中的表达显著高

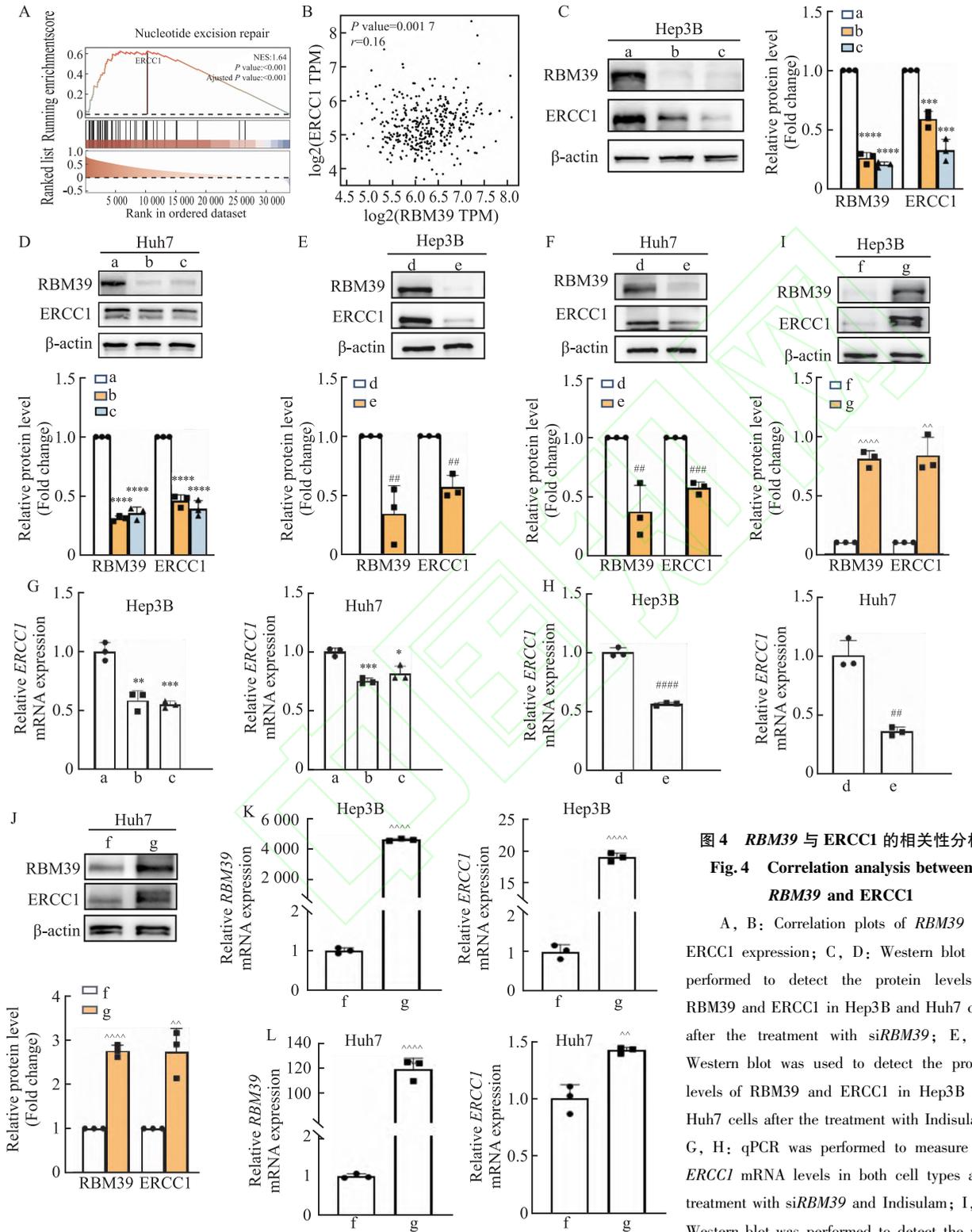


图4 *RBM39* 与 *ERCC1* 的相关性分析
Fig.4 Correlation analysis between *RBM39* and *ERCC1*

A, B: Correlation plots of *RBM39* and *ERCC1* expression; C, D: Western blot was performed to detect the protein levels of *RBM39* and *ERCC1* in Hep3B and Huh7 cells after the treatment with si*RBM39*; E, F: Western blot was used to detect the protein levels of *RBM39* and *ERCC1* in Hep3B and Huh7 cells after the treatment with Indisulam; G, H: qPCR was performed to measure the *ERCC1* mRNA levels in both cell types after treatment with si*RBM39* and Indisulam; I, J: Western blot was performed to detect the protein levels of *RBM39* and *ERCC1* in Hep3B and Huh7 cells after the overexpression of *RBM39*; K, L: qPCR was performed to detect the mRNA levels of *RBM39* and *ERCC1* in Hep3B and Huh7 cells after the overexpression of *RBM39*; a: siControl group; b: si*RBM39*-1 group; c: si*RBM39*-2 group; d: DMSO group; e: Indisulam group; f: Control group; g: OE-*RBM39* group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs siControl group; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs DMSO group; ~ $P < 0.01$, ~~~ $P < 0.0001$ vs Control group.

protein levels of *RBM39* and *ERCC1* in Hep3B and Huh7 cells after the overexpression of *RBM39*; K, L: qPCR was performed to detect the mRNA levels of *RBM39* and *ERCC1* in Hep3B and Huh7 cells after the overexpression of *RBM39*; a: siControl group; b: si*RBM39*-1 group; c: si*RBM39*-2 group; d: DMSO group; e: Indisulam group; f: Control group; g: OE-*RBM39* group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs siControl group; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs DMSO group; ~ $P < 0.01$, ~~~ $P < 0.0001$ vs Control group.

于匹配的非肿瘤组织和正常肝组织;*ERCC1* 和 *XPC* 的过度表达与肝硬化和肝癌的发生密切相关,尤其是在肝硬化肝癌组织中,*XPA*、*XPC*、*hHR23B* 和 *ERCC1* 的 mRNA 水平显著升高;此外,*ERCC1*、*XPC* 和 *XPA* 的 mRNA 表达水平与肝癌的化疗耐药性密切相关。因此,NER 活性不仅能够作为一种生物标志物,也可能在肝癌的耐药性和基因组不稳定性中发挥重要作用。

本研究显示,*RBM39* 在 C3 亚型中的表达最高,提示其在调控 NER 过程中可能发挥关键作用。本研究数据表明,*RBM39* 基因敲低或降解时,*ERCC1* 的表达和 NER 效率降低,增加了 HCC 细胞对 UV 的敏感性;而 *RBM39* 的过表达时,*ERCC1* 的表达和 NER 效率显著增高。这一结果提示 *RBM39* 可能通过调节 NER 关键蛋白 *ERCC1* 的表达,从而影响 NER 效率,参与 HCC 的进展和耐药。Cui et al^[16] 研究发现,*RBM39* 在 HCC 组织中的表达显著上调,并与晚期 T 分期、组织学分级和病理分期显著相关。这进一步揭示了 *RBM39* 在 HCC 中的关键作用。Mossmann^[17] 研究表明,*RBM39* 能与精氨酸结合,调控代谢基因的表达,从而影响细胞代谢,促进肿瘤形成。提示 *RBM39* 不仅在 DNA 损伤修复中发挥作用,也可能在肿瘤代谢过程中扮演重要角色。

本研究发现 HCC 细胞中 *RBM39* 可能通过调控 *ERCC1* 影响 NER 效率,靶向 *RBM39* 可降低 HCC 中 NER 活性,为临床治疗提供了新的思路。然而,本研究仍然存在一些局限性,如缺乏对动物模型的验证等,未来的研究将通过动物模型验证 *RBM39* 在体内对 HCC 的作用,并进一步探讨其在肿瘤免疫逃逸、耐药性和转移中的潜在角色,为临床 HCC 的诊断和治疗提供新的潜在靶点。

参考文献

[1] Fomer A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-14. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30010-2.

[2] 吕鹏飞,周静,朱瑞楠,等. ERCC1 基因 C8092A 多态性与肺癌遗传易感性的关联研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(3): 458-61. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.024.

[2] Lv P F, Zhou J, Zhu R N, et al. Association between ERCC1 C8092A polymorphism and genetic susceptibility to lung cancer [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2021, 56(3): 458-61. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.024.

[3] Sameer A S, Nissar S. XPD-the lynchpin of NER: molecule,

gene, polymorphisms, and role in colorectal carcinogenesis[J]. *Front Mol Biosci*, 2018, 5: 23. doi: 10.3389/fmolb.2018.00023.

[4] 吴梦馨,张丽娜,何敏,等. ERCC1 mRNA 和 X 线修复交叉互补组 1 基因多态性联合检测在局部晚期鼻咽癌患者放疗中的应用价值[J]. *中国医刊*, 2024, 59(1): 86-9. doi: 10.3969/j.issn.1008-1070.2024.01.022.

[4] Wu M X, Zhang L N, He M, et al. Application of combined detection of ERCC1 mRNA and XRCC1 polymorphism in chemoradiotherapy of locally advanced nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chin J Med*, 2024, 59(1): 86-9. doi: 10.3969/j.issn.1008-1070.2024.01.022.

[5] Xu Y, Nijhuis A, Keun H C. RNA-binding motif protein 39 (RBM39): an emerging cancer target [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(12): 2795-812. doi: 10.1111/bph.15331.

[6] 岳琪. CT 基因 LINC01977 结合 RBM39 介导肝细胞癌发生发展的机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2023. doi: 10.27170/d.cnki.gjsuu.2023.001145.

[6] Yue Q. Mechanism of CT gene LINC01977 combined with RBM39 mediating the development of hepatocellular carcinoma [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2023. doi: 10.27170/d.cnki.gjsuu.2023.001145.

[7] Xu Y, Spear S, Ma Y, et al. Pharmacological depletion of RNA splicing factor RBM39 by indisulam synergizes with PARP inhibitors in high-grade serous ovarian carcinoma[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(10): 113307. doi: 10.1016/j.celrep.2023.113307.

[8] Geng A, Tang H, Huang J, et al. The deacetylase SIRT6 promotes the repair of UV-induced DNA damage by targeting DDB2 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(16): 9181-94. doi: 10.1093/nar/gkaa661.

[9] Runggay H, Arnold M, Ferlay J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040 [J]. *J Hepatol*, 2022, 77(6): 1598-606. doi: 10.1016/j.jhep.2022.08.021.

[10] Hong W, Zhang Y, Wang S, et al. Deciphering the immune modulation through deep transcriptomic profiling and therapeutic implications of DNA damage repair pattern in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2024, 582: 216594. doi: 10.1016/j.canlet.2023.216594.

[11] Chatterjee N, Walker G C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2017, 58(5): 235-63. doi: 10.1002/em.22087.

[12] Sertic S, Pizzi S, Lazzaro F, et al. NER and DDR: classical music with new instruments[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(4): 668-74. doi: 10.4161/cc.11.4.19117.

[13] Seebode C, Lehmann J, Emmert S. Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies[J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(3): 1371-8.

[14] Zheng X, Chen K, Liu X, et al. High expression of ERCC5 predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(7): 3664-70.

[15] Fautrel A, Andrieux L, Musso O, et al. Overexpression of the two

nucleotide excision repair genes ERCC1 and XPC in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2005, 43(2): 288–93. doi: 10.1016/j.jhep.2005.02.020.

[16] Cui F, Wang W, Zhuang C, et al. RBM39 is a potential prognostic biomarker with functional significance in hepatocellular carcinoma

[J]. *Transl Cancer Res*, 2024, 13(4): 1606–22. doi: 10.21037/ter-23-2252.

[17] Mossmann D, Müller C, Park S, et al. Arginine reprograms metabolism in liver cancer via RBM39 [J]. *Cell*, 2023, 186(23): 5068–83. e23. doi: 10.1016/j.cell.2023.09.011.

***RBM39* promotes nucleotide excision repair by regulating *ERCC1* expression in HCC**

Yu Yuanyuan^{1,2}, Liu Shihan^{1,2}, Xu Zhu³, Du Yingying^{1,2}

(¹The First Clinical College of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038;

²Dept of Medical Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

³Anhui Key Laboratory of Tumor Immunity Microenvironment Research and Therapy, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the regulatory mechanism of nucleotide excision repair (NER) in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Based on the expression levels of genes in the NER pathway, we performed molecular typing of HCC using the TCGA database. HCC cell lines were constructed through the knockdown of RNA binding motif protein 39 (*RBM39*) using siRNA. HCC cell lines were constructed through the overexpression of *RBM39* using *RBM39* plasmid. Cells were treated with Indisulam, a reagent that induces *RBM39* protein degradation. Western blot and real-time fluorescence quantitative PCR were used to detect the expression levels and changes of mRNA and protein of *RBM39* and excision repair cross complementation group 1 (*ERCC1*); flow cytometry was used to detect NER efficiency; CCK-8 assay was used to detect cell viability. **Results** HCC patients were categorized into three types—C1, C2, and C3—based on NER activity, with the C3 subtype showing the highest NER activity ($P < 0.0001$). In the groups transfected with *RBM39* siRNA or treated with Indisulam, the NER repair efficiency decreased compared to the control group ($P < 0.01$), the cell survival rate decreased ($P < 0.01$), and both the mRNA and protein expression of *ERCC1* were reduced ($P < 0.01$). In contrast, in the *RBM39* overexpression group, the mRNA and protein expression of *ERCC1* were enhanced compared to the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** *RBM39* may influence NER repair efficiency by regulating *ERCC1* expression in HCC.

Key words cancer; hepatocellular carcinoma; DNA damage; nucleotide excision repair; *RBM39*; *ERCC1*

Found programs National Natural Science Foundation of China (No. 32100679); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2022AH051131)

Corresponding author Du Yingying, E-mail: duyinying@ahmu.edu.cn