

原癌基因 *SKI* 突变促进胆管癌细胞发生的功能和机制研究

查丹彤¹, 杨爱清², 曹鹏博², 齐欣³, 周钢桥^{1,2,3}

(¹ 安徽医科大学生命科学学院, 合肥 230032; ² 军事科学院军事医学研究院, 北京 100850;

³ 贵州大学医学院, 贵阳 550025)

摘要 **目的** 研究 *SKI* 基因异常表达及其突变对胆管癌细胞系 QBC939 和 RBE 生物学特性的影响, 并探索其潜在的分子机制。

方法 利用基因表达谱交互分析 2 数据库探究 *SKI* 在胆管癌患者中的表达状况及临床相关性。采用慢病毒感染技术筛选 *SKI* 稳定异常表达及突变的 QBC939 与 RBE 细胞株。采用 CCK-8 实验、平板克隆实验与 EdU 实验检测细胞的增殖能力; 采用流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期; 采用 Transwell 细胞迁移实验与细胞划痕实验检测细胞的迁移能力; 采用 Western blot 技术研究 *SKI* 异常表达及突变对转化生长因子- β (TGF- β)/母源性抗骨形态发生蛋白 (SMAD) 信号通路关键蛋白 (SMAD2、SMAD3、SMAD4) 表达水平的影响。**结果** 相较于 *SKI* 过表达, *SKI* 突变后可显著促进 S 期进程、增殖和迁移能力、抑制细胞凋亡、抑制 SMAD2 和 SMAD3 蛋白的磷酸化, 并降低了 TGF- β 信号通路的转录活性; 而敲低 *SKI* 后则与之相反。**结论** *SKI* 基因突变表现为一种功能获得性变异, 在胆管癌细胞中发挥致癌作用, 主要机制为抑制 TGF- β /SMAD 信号途径, 从而促进 QBC939 与 RBE 细胞的增殖与周期进展, 抑制细胞凋亡, 进而推动肿瘤进展。

关键词 胆管癌; 胆管癌细胞; *SKI*; 细胞周期; 增殖; 凋亡; 迁移

中图分类号 R 735.8; Q 291

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)02-0239-11

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.02.008

胆管细胞癌 (cholangiocarcinoma, CHOL) 发病率较低, 在所有肝脏癌症中所占比例大约为十分之一^[1]。研究^[2]表明由于缺乏有效的早期检测方法以及这种疾病具有强异质性, 常见的化疗、放疗和靶向治疗等手段对 CHOL 的治疗效果较差, 术后 5 年的总生存率低于半数。因此, 对 CHOL 发病机制及其演化过程进行深入探索, 不仅能够促进新型诊断指标的开发, 还有助于设计出更加精准的治疗方案。

SKI 基因位于 1 号染色体的短臂上, 该基因包含三个特定的功能区域: Dachshund 同源域、SAND-L 结构域以及多个卷曲螺旋 (CC) 结构域^[3]。已有研究^[4-5]表明, *SKI* 突变与 Shprintzen-Goldberg 综合征和马方综合征等疾病的发生密切相关。然而, 关于 *SKI* 突变在胆管细胞癌发生过程中的影响及其分子机制, 目前的研究尚不充分, 仍需进一步深入探索^[6]。因此, 本研究旨在深入探讨 *SKI* 异常表达及其突变在胆管癌病理过程中所发挥的具体生物学

功能及其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系与载体 本研究采用的细胞系主要包括源自人类胆管癌 QBC939、RBE 细胞系和人胚肾细胞系 HEK293T (来自本实验室细胞库)。在固定条件为 37 °C、5% 二氧化碳的细胞培养箱中培养。

载体包括用于基因过表达及其突变体的 pLV-3×Flag-mCherry (2A) Puro-*SKI*-WT、pLV-mCherry (2A) Puro-*SKI*-Mut (539C > T) 和对照载体 pLV-3×Flag-mCherry (2A) Puro。干扰 RNA (shRNA) 包括用于 *SKI* 基因敲低的 pLV-shRNA-EGFP (2A) Puro-*SKI*-#1、pLV-shRNA-EGFP (2A) Puro-*SKI*-#4 和对照载体 pLV-shRNA-EGFP (2A)-NC 购自常州锐博生物公司。

1.1.2 主要试剂与仪器 胎牛血清购自美国 Thermo Fisher 公司; Lipo6000 siRNA /DNA 转染试剂与 RIPA 强效细胞裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司。兔源二抗和鼠源二抗购自武汉亚科因生物科技有限公司。实验所需的 Transwell 小室购自美国 BD Biosciences 公司; MonScript™ RTIII All-in-One Mix 试剂购自北京百奥曼技术有限公司。实验所需的 Transwell 小室购自美国 BD Biosciences 公司; *SKI*、母源性抗骨形态发生蛋白同源物 (small

2025-11-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82002573)

作者简介: 查丹彤, 女, 硕士研究生;

杨爱清, 女, 副研究员, 通信作者, E-mail: yan_gaiqing_ok@126.com;

周钢桥, 男, 研究员, 博士生导师, 通信作者, E-mail: zhougq114@126.com

mothers against decapentaplegic homolog, SMAD2)2、SMAD3、SMAD4、磷酸化 SMAD (phosphorylated SMAD, p-SMAD)2、p-SMAD3、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 和 FLAG 标签抗体 (DYKDDDDK epitope tag, FLAG) 抗体 (1:1 000) 购自美国 Proteintech 公司; 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司, 型号: QuantStudio 3); 光学显微镜 (美国 COIC 公司, 型号: XDS-18 型); 流式细胞仪 (美国 Thermo Fisher 公司, 型号: Attune CytPix)。

1.2 实验方法

1.2.1 构建 SKI 稳定异常表达和突变的胆管癌细胞系 慢病毒包装质粒与目标质粒以 1:2:3 的比例共同转染至 HEK293T 细胞中。8 h 后, 换正常培养基培养。于转染后的 24 h 及 48 h 两个时间点收集上清液, 并使用 0.45 μm 孔径的过滤器过滤细胞碎片。随后, 加入 6 倍浓缩的病毒溶液, 并低温超速离心处理 30 min, 富集病毒颗粒。3 天后, 通过添加适量嘌呤霉素 (浓度为 2 mg/L) 进行筛选, 从而获取能够稳定表达目的基因的细胞群体。最终, 从 SKI mRNA 表达水平和蛋白表达水平两个方面来验证 SKI 是否稳定异常表达及突变。

1.2.2 蛋白质免疫印迹 (Western blot, WB) 实验 将含有 10% 蛋白酶抑制剂的细胞裂解液与等量的蛋白上样缓冲液混合, 6 孔板每孔加入 300 μL 该混合液后, 在冰浴条件下进行 30 min 的裂解。之后, 通过沸水处理 10 min 以获取总蛋白样本, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。接着, 在 10% 浓度的 SDS-PAGE 胶上点样并实施电泳及电转步骤。完成电泳后, 使用脱脂乳封闭 1 h, 随后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下用 SKI、SMAD2、p-SMAD2、SMAD3、p-SMAD3、SMAD4、GAPDH 及 FLAG 一抗 (1:2 000) 孵育过夜, 期间需经过 3 次洗涤。接下来, 添加对应一抗的二抗 (1:2 500) 继续孵育 1 h, 洗涤 3 次, 并最终加入显影液进行显影。

1.2.3 免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 首先, 使用细胞刮刀将培养皿底部的 RBE 和 QBC939 稳转株细胞刮下, 并用含有 10% 蛋白酶抑制剂的磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 进行清洗。随后, 在这些细胞中加入适量的裂解缓冲液 (含有 10% 的蛋白酶抑制剂), 并在冰上孵育 30 min 后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 14 000 r/min 离心 15 min, 分离得到上清液, 并从中分出一小部分单独保存。剩余的上清液部分, 则加入适量 Protein A/G 琼脂糖珠, 并在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下过夜孵育。之后, 用裂解缓冲液

洗涤 3 次。接着, 向 IP 和 Input 样品中分别加入适量的蛋白质上样缓冲液 (同样包含 10% 的蛋白酶抑制剂), 并置于沸水中加热 10 min。最后, 通过 WB 技术检测上述样品中的目标蛋白质。

1.2.4 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, q-PCR) 实验 收集细胞沉淀后, 用柱子法提取总的 RNA, 并分光光度法测量其浓度。接着, 选取 500 ng RNA 样本, 向其中加入 2 μL MonScript™ RT III All-in-One Mix 试剂, 并使用无 RNase 水调整至最终体积为 10 μL , 以此来进行逆转录反应生成 cDNA。随后, 以 cDNA 作为模板进行 qPCR 实验, 所用特异性引物靶向 SKI 基因, 并以 Actin 作为内参照, 所有样本均设 3 个重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算其相对表达量, 探究不同处理条件下 SKI 基因的表达变化。

1.2.5 CCK-8 实验检测细胞活力 收集细胞沉淀后进行重悬, 将 2 000 个细胞接种到 96 孔板内, 并设立 3 组平行实验。在细胞培养开始后的第 1、2、3、4、5 天, 按 CCK-8 溶液和无血清培养基以 1:9 的比例配置 CCK-8 混合液, 向每个孔中加入 100 μL 的混合液, 1.5 h 后, 在酶标仪 450 nm 波长下, 振动 5 s 后, 测定吸光度值, 绘制细胞生长曲线图。

1.2.6 细胞平板克隆实验检测细胞增殖 重悬细胞沉淀, 选取 2 000 个细胞铺板, 每组设置 3 个重复。当观察到小皿底部形成肉眼可见的克隆时, 即实验达到预期效果。使用 4% 多聚甲醛溶液在室温条件下固定样本 30 min, 清洗后使用 0.5% 结晶紫溶液在室温下染色 30 min 后, 通过拍照记录结果, 并用 ImageJ 软件对形成的细胞克隆数量进行统计分析。

1.2.7 Transwell 法评估细胞侵袭能力 首先, 利用无血清培养基饥饿细胞 24 h 后, 将 5×10^4 个细胞铺板于 Transwell 迁移小室内; 与此同时, 在小室外侧加入含有血清的培养基。培养 24 h 后, 清洗小室内部。使用 4% 多聚甲醛固定细胞, 并采用 0.5% 结晶紫溶液在室温下染色 30 min 后, 清洗多余的结晶紫溶液。最后, 通过倒置荧光显微镜随机选取多个视野拍摄细胞迁移和侵袭情况的照片, 并统计迁移细胞的具体数量。

1.2.8 细胞伤口愈合实验评估细胞迁移侵袭能力 重悬细胞沉淀, 选取 1.5×10^5 个细胞铺板。当细胞覆盖率接近或达到 90% 时, 在单层细胞上使用适当尺寸的移液管尖端制造一条直线型伤口。之后, PBS 轻轻冲洗去除细胞碎片, 继续培养。在制造伤口后的初始时刻 (即 0 h) 及 24 h 后, 通过光学显微

镜随机选取并拍摄伤口区域的照片。运用 ImageJ 软件对比不同时间点下伤口愈合情况,量化细胞迁移效率。

1.2.9 EdU 法检测细胞增殖 重悬细胞沉淀,选取 1.5×10^5 个细胞铺板,培养 12 h。之后,在每个孔中加入 $1 \mu\text{L}$ 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)工作液,继续孵育 1.5 h。收集细胞,向其中添加无水甲醇,在室温条件下静置 15 min 固定细胞,随后使用 PBS 清洗 2 次。加入 0.3% 的免疫染色通透液,在室温下静置 20 min。PBS 清洗 2 次后,加入 $500 \mu\text{L}$ Click 反应混合液,在避光且室温的环境下静置孵育 30 min,再用 PBS 洗涤 2 次。加入 $2 \mu\text{L}$ Hoechst 33342 活细胞染色液,在室温且避光条件下静置 10 min,再次用 PBS 清洗 2 次。通过流式细胞仪分析来评估细胞增殖情况。

1.2.10 流式细胞术检测细胞周期 重悬细胞沉淀,选取 1.5×10^5 个细胞铺板,培养 24 h 后,收集细胞,使用 $300 \mu\text{L}$ PBS 重悬,接着将其缓慢滴入 $700 \mu\text{L}$ 预冷的无水乙醇中, -20°C 条件下固定过夜。完成固定步骤后, PBS 清洗 2 次,在含有 $20 \mu\text{g/mL}$ 核糖核酸酶 A 与 $40 \mu\text{g/mL}$ 碘化丙啶的 $500 \mu\text{L}$ PBS 溶液中重新悬浮细胞沉淀物,在室温且避光条件下静置 15 min。最后,通过流式细胞仪来测定细胞周期分布情况。

1.2.11 流式细胞术检测细胞凋亡 重悬细胞沉淀,选取 1.5×10^5 个细胞铺板,培养 24 h 后,在避光条件下向每个孔内添加 $1 \mu\text{L}$ H_2O_2 溶液,并持续刺激 24 h。收集细胞样本,用预冷的 PBS 缓冲液清洗,然后将细胞重悬于 $100 \mu\text{L}$ 含有钙离子的缓冲液(即 $1 \times$ Binding Buffer)中。接着,向细胞悬液中加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 与 $10 \mu\text{L}$ 碘化丙啶,再次充分混合后,在室温且避光环境下孵育 15 min。完成孵育后,再向样品中加入 $400 \mu\text{L}$ 含有钙离子的缓冲液。最后,通过流式细胞仪来测定胆管癌细胞的细胞凋亡状况。

1.3 临床相关性分析 本研究从基因表达谱交互分析 2 (gene expression profiling interactive analysis2, GEPIA2) 平台下载获得了来自 TCGA 和 GTEx 项目的 31 种癌组织及癌旁组织的 RNA-seq 表达数据,并比较了 SKI 基因在肿瘤样本与非肿瘤样本间表达水平的差异性。

1.4 统计学处理 本文中所有统计分析和图表绘制均使用 GraphPad Prism9 软件完成,且所有实验均独立重复 3 次。所有统计图(服从正态分布且样本

量较小)均通过 t 检验进行统计分析对照组与实验组之间的差异,确定显著性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SKI 在胆管癌组织中高表达且在多种肿瘤中突变 本研究分析了来自 GEPIA2 的数据资源,该平台整合了 TCGA 与 GTEx 两大项目的 RNA 测序信息,覆盖了 31 种癌症及其对应正常组织。基于此数据集,本研究对 SKI 在多种肿瘤中 mRNA 的表达水平进行了全面评估。结果显示,在 CHOL 病例中,相较于健康肝脏样本,SKI 基因转录产物的丰度显著增加(图 1A)。此外,SKI 在食管癌、胶质母细胞瘤、脑低级别胶质瘤等 11 种肿瘤中的表达也显著高于癌旁组织(图 1B)。进一步地,Human Protein Atlas 数据库的数据显示,在 CHOL 中 SKI 的蛋白水平也明显高于正常肝组织(图 1C)。通过查询 COSMIC 数据库发现 SKI 在多种肿瘤中均发生突变,其中肝脏相关肿瘤 SKI 的突变发生率为 3.12%(图 1D)。在所有突变中, C>T (35.12%) 和 G>A (26.76%) 在肿瘤中的突变最多(图 1E)。综上所述,SKI 在 CHOL 等多种肿瘤中均高表达,并且发生突变。

2.2 SKI 异常表达及突变稳定株的鉴定 通过慢病毒包装,以获得 SKI 基因稳定异常表达及其突变的 QBC939 和 RBE 细胞系。从对照组(pLV-3×Flag)、过表达野生型及突变型 SKI 的实验组(pLV-SKI-WT 与 pLV-SKI-Mut 539C > T)中分别提取了 RNA 和蛋白质,进行了 qRT-PCR 分析和 WB 检测,来验证 SKI 的过表达及突变情况。结果显示,相较于空白对照组而言,SKI 过表达组在 mRNA 和蛋白质表达水平显著提升($t_{\text{蛋白}}=3.127、2.935$, $t_{\text{mRNA}}=3.090、3.802$, 均 $P < 0.05$); SKI 突变组 mRNA 和蛋白质表达水平高于 SKI 过表达($t_{\text{蛋白}}=4.858、3.136$, $t_{\text{mRNA}}=3.004、3.507$, 均 $P < 0.05$)。同样地,也从阴性对照组(shNC)以及两个不同的 SKI 敲低组(shSKI-#1、shSKI-#4)中分离出相应的 RNA 和蛋白,并通过实时荧光定量 PCR 技术和 WB 检测 SKI 表达水平的变化。敲低 SKI 后,观察到了明显的下降趋势($t_{\text{蛋白}}=3.996、7.803、2.898、3.401$, $t_{\text{mRNA}}=3.444、3.082、2.911、3.253$, 均 $P < 0.05$)。数据表明已成功构建了 SKI 稳定异常表达及突变的 QBC939 和 RBE 细胞株,见图 2A。

2.3 SKI 突变可显著促进胆管癌细胞的增殖能力 CCK-8、EdU 掺入法和细胞平板克隆实验结果

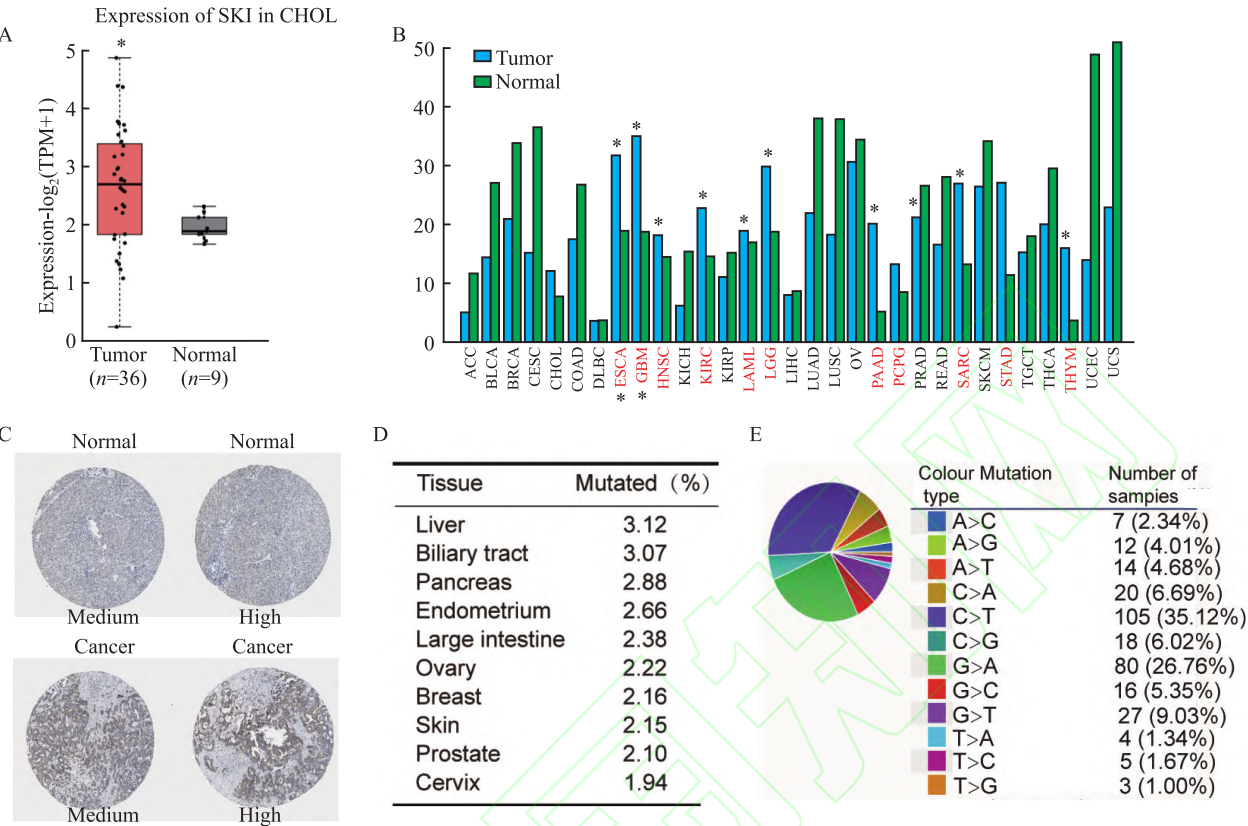


图 1 SKI 在肿瘤组织和正常组织中的表达水平

Fig. 1 Expression levels of SKI in tumor tissues and normal tissues

A: The expression of *SKI* in cholangio carcinoma tissues and adjacent non-tumor nasobiliary tissues from TCGA-CHOL was analyzed using GEPIA database; B: The expression of *SKI* mRNA in the tumor tissues and adjacent non-tumor tissues of 31 types of cancer from TCGA in GEPIA platform; C: Representative immunohistochemical images of *SKI* in cholangio carcinoma and normal nasobiliary tissues (Human Protein Atlas Database) $\times 40$; D-E: The mutation of *SKI* in COSMIC; ACC: Adrenocortical carcinoma; BLCA: Bladder urothelial carcinoma; BRCA: Breast invasive carcinoma; CESC: Cervical squamous cell carcinoma; CHOL: Cholangio carcinoma; COAD: Colon adenocarcinoma; DLBC: Diffuse large B-cell lymphoma; ESCA: Esophageal carcinoma; GBM: Glioblastoma multiforme; HNSC: Head and neck squamous cell carcinoma; KICH: Kidney chromophobe; KIRC: Kidney renal clear cell carcinoma; KIRP: Kidney renal papillary cell carcinoma; LAML: Acute myeloid leukemia; LGG: Brain lower grade glioma; LIHC: Liver hepatocellular carcinoma; LUSC: Lung squamous cell carcinoma; OV: Ovarian serous cystadenocarcinoma; PAAD: Pancreatic adenocarcinoma; PCPG: Pheochromocytoma/paraganglioma; PRAD: Prostate adenocarcinoma; READ: Rectum adenocarcinoma; SARC: Sarcoma; SKCM: Skin cutaneous melanoma; STAD: Stomach adenocarcinoma; TGCT: Testicular germ cell tumors; THCA: Thyroid carcinoma; THYM: Thymoma; UCEC: Uterine corpus endometrial carcinoma; UCS: Uterine carcinosarcoma; * $P < 0.05$ vs Normal group

表明, *SKI* 基因过表达显著增强了 QBC939 和 RBE 两种细胞系的增殖活性 ($t_{\text{CKK-8}}=2.900, 2.966, t_{\text{EdU}}=3.239, 3.723, t_{\text{colony}}=4.714, 4.839$; 均 $P < 0.05$), 且 *SKI* 基因突变表现出的促增殖效果强于 *SKI* 基因过表达组 ($t_{\text{CKK-8}}=2.905, 3.555, t_{\text{EdU}}=3.721, 5.294, t_{\text{colony}}=4.927, 3.625$; 均 $P < 0.05$)。相反, 当 *SKI* 基因被敲低时, 这两种细胞增殖能力的明显下降 ($t_{\text{CKK-8}}=3.406, 3.716, 2.756, 2.637, t_{\text{EdU}}=2.952, 3.865, 3.194, 6.691, t_{\text{colony}}=4.822, 10.230, 10.730, 11.620$; 均 $P < 0.05$), 见图 3。所以 *SKI* 基因过表达后显著促进胆管癌细胞系的增殖, 而其突变后对胆管癌细胞系增殖的促进作用进一步增强; 相反, *SKI* 基因敲低后胆管癌细胞系的增殖能力显著降低。

2.4 SKI 突变可显著抑制胆管癌细胞的细胞凋亡 Annexin V-APC/PI 染色法结合流式细胞术检测实验结果显示, 与对照组相比, *SKI* 基因过表达显著抑制两种细胞的凋亡 ($t=4.645, 3.765$, 均 $P < 0.05$), 且在 *SKI* 突变中这种抑制作用较 *SKI* 过表达组更明显 ($t=2.817, 7.110$, 均 $P < 0.05$)。见图 4A。相反地, 当 *SKI* 敲低时, QBC939 和 RBE 细胞的凋亡水平显著增加 ($t=4.487, 5.897, 3.712, 7.518$, 均 $P < 0.05$)。见图 4B。

2.5 SKI 突变可显著促进胆管癌细胞的细胞周期进程 流式细胞术结果显示, 与对照组相比, *SKI* 过表达后, 胆管癌细胞中 G_1 阶段的细胞比例明显下降 ($t=15.240, 2.892$, 均 $P < 0.05$), 同时 S 期细胞的比例

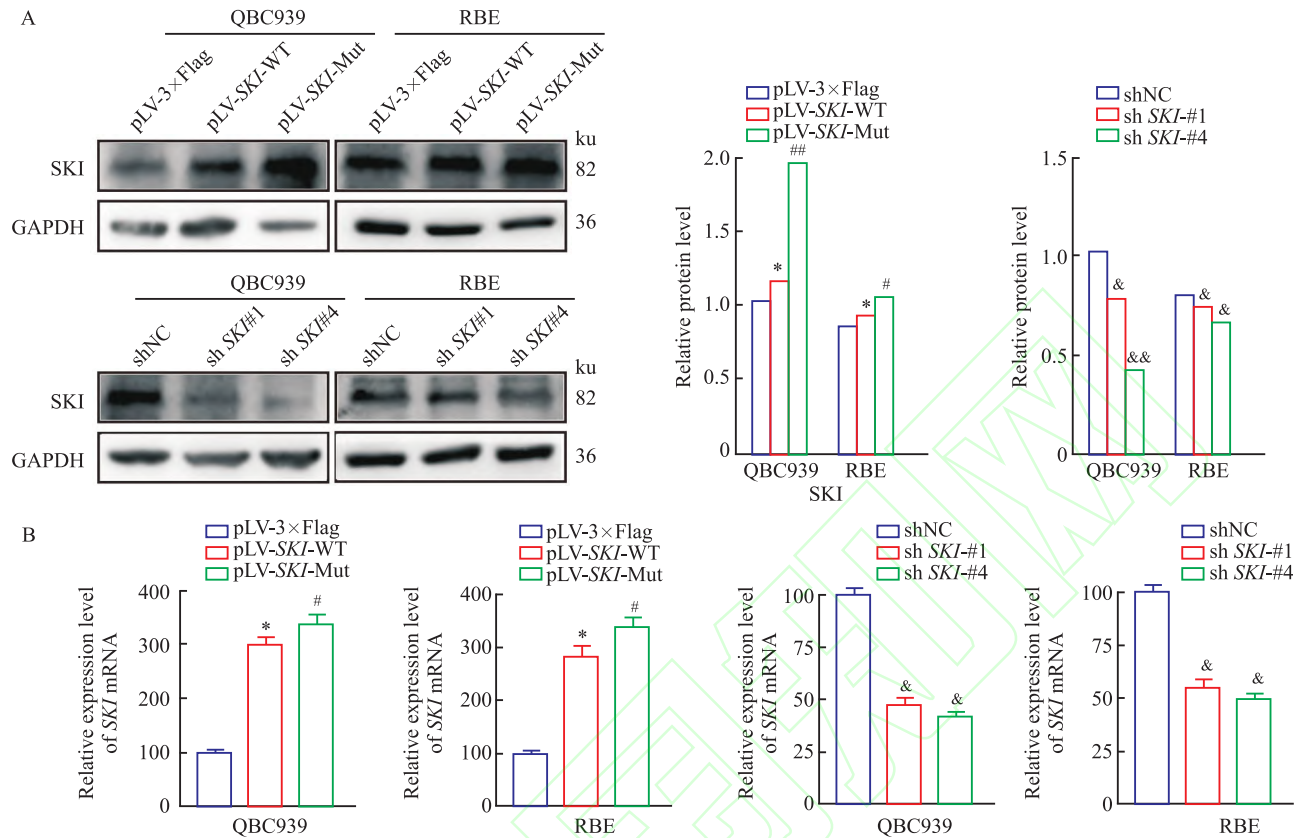


图2 QBC939和RBE细胞中SKI异常表达及突变效果的鉴定

Fig. 2 Identification of the effects of SKI abnormal expression and mutation in QBC939 and RBE cells

A: The protein levels of SKI in the overexpression, mutation and knockdown groups of QBC939 and RBE cells were detected by WB; B: The mRNA expression levels of SKI in the overexpression, mutation and knockdown groups of QBC939 and RBE cells were detected by qRT-PCR; * $P<0.05$ vs pLV-3×Flag group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs pLV-SKI-WT group; & $P<0.05$, && $P<0.01$ vs shNC group.

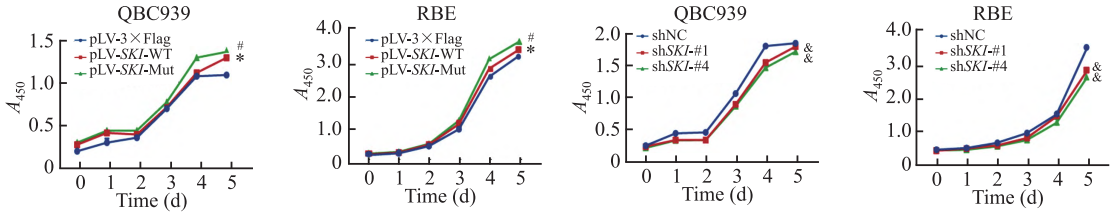
显著上升($t=2.906, 4.564$, 均 $P<0.05$);且在SKI突变中G₁期($t=8.669, 2.772$, 均 $P<0.05$)和S期($t=4.145, 3.548$, 均 $P<0.01$)细胞比例的变化较过表达组更大,但过表达组和突变组G₂期变化差距都不显著($P>0.05$)。见图5A。相反,SKI敲低后,胆管癌细胞中G₁期细胞的数量显著增加($t=3.241, 13.760, 3.728, 4.335$, 均 $P<0.05$),S期的细胞数目减少($t=2.516, 3.029, 3.706, 6.708$, 均 $P<0.05$),但RBE细胞G₂期的细胞数量却增加了,可能是实验过程中细胞状态不好导致了细胞G₂期比例上升($t=3.37, 4.321$, 均 $P<0.05$),与预期相反。见图5B。以上结果提示,SKI过表达后显著促进胆管癌细胞的G₁和S期进程,而突变后对G₁和S期进程的促进作用进一步增强;SKI敲低后,胆管癌细胞的G₁和S期进程显著减慢。

2.6 SKI突变可显著促进胆管癌细胞的迁移能力 Transwell细胞迁移实验与细胞划痕实验结果显示,与对照相比,SKI基因过表达后胆管癌细胞系QBC939和RBE的迁移能力增加($t_{Transwell}=4.724$ 、

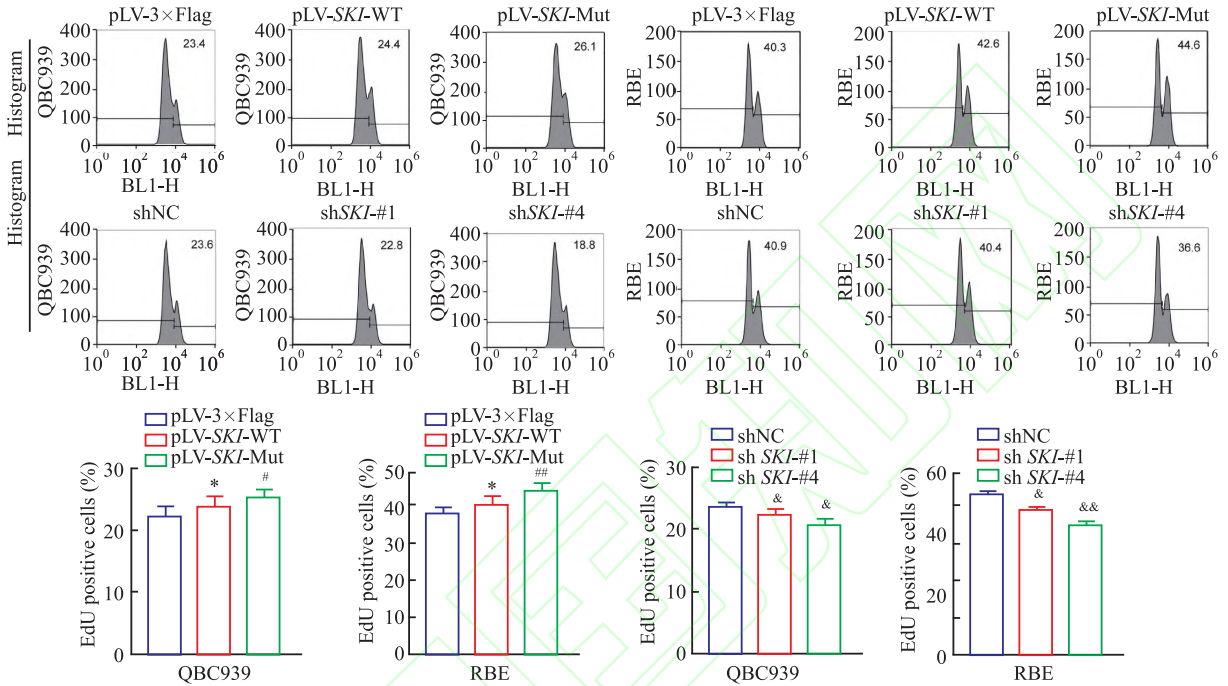
$7.99, t_{Wound\ healing}=3.041, 3.219$; 均 $P<0.05$);跟过表达SKI相比,SKI突变后对胆管癌细胞迁移的促进作用更加显著($t_{Transwell}=4.744, 3.107, t_{Wound\ healing}=3.137, 3.652$; 均 $P<0.05$)。见图6A、6C。相反地,SKI敲低后,胆管癌细胞系的迁移能力显著降低($t_{Transwell}=3.308, 4.425, 3.465, 6.889, t_{Wound\ healing}=3.878, 3.922, 2.906, 5.305$; 均 $P<0.05$)。见图6B、6D。综上所述,SKI促进胆管癌细胞的迁移,而SKI突变表现为一种功能获得性变异,在胆管癌细胞中发挥致癌作用。

2.7 SKI突变通过抑制TGF-β/SMAD4信号通路发挥原癌基因的功能 通过WB实验,本研究在QBC939与RBE细胞系中探讨了SKI基因异常表达及其突变对SMAD2、SMAD3、p-SMAD2、p-SMAD3以及SMAD4蛋白质水平的影响。结果显示,与对照组相比,SKI过表达、突变及敲低后,SMAD2、SMAD3、SMAD4的蛋白表达水平未检测到显著变化。与对照组相比,SKI基因过表达后QBC939与RBE细胞系p-SMAD2和p-SMAD3的表达水平降低($t=4.535$ 、

A



B



C

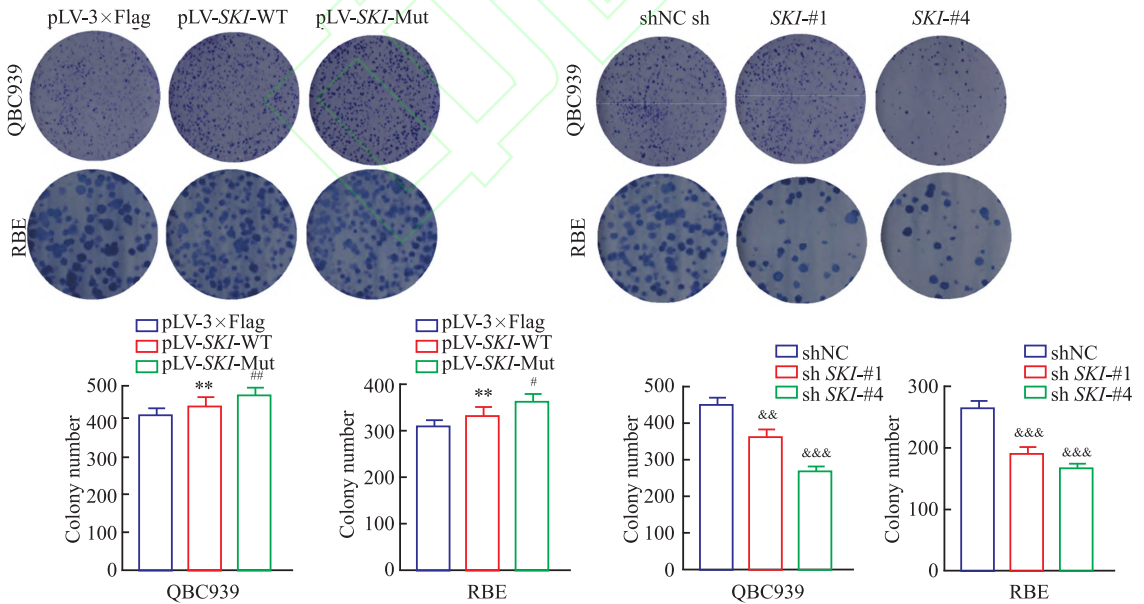


图3 *SKI*异常表达及突变对胆管癌细胞的增殖能力的影响 ×40

Fig. 3 The impact of *SKI* abnormal expression and mutation on the proliferation ability of cholangiocarcinoma cells ×40

A: The proliferation ability of the *SKI* overexpression, mutation and knockdown groups in QBC939 and RBE cells was detected by the CCK-8 assay; B: The proliferation ability of the *SKI* overexpression, mutation and knockdown groups in QBC939 and RBE cells was detected by the EdU assay; C: The proliferation ability of the *SKI* overexpression, mutation, and knockdown groups in QBC939 and RBE cells was detected by the cell colony formation assay; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs pLV-3×Flag group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs pLV-SKI-WT group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$ vs shNC group.

2.959、3.008、2.815, 均 $P < 0.05$); 跟过表达 *SKI* 组相比, *SKI* 突变后 p-SMAD2 和 p-SMAD3 表达水平的

降低更加显著($t = 5.515$ 、 3.548 、 3.252 、 4.122 , 均 $P < 0.05$)。见图 7A。相反地, 与对照组相比, *SKI* 基因

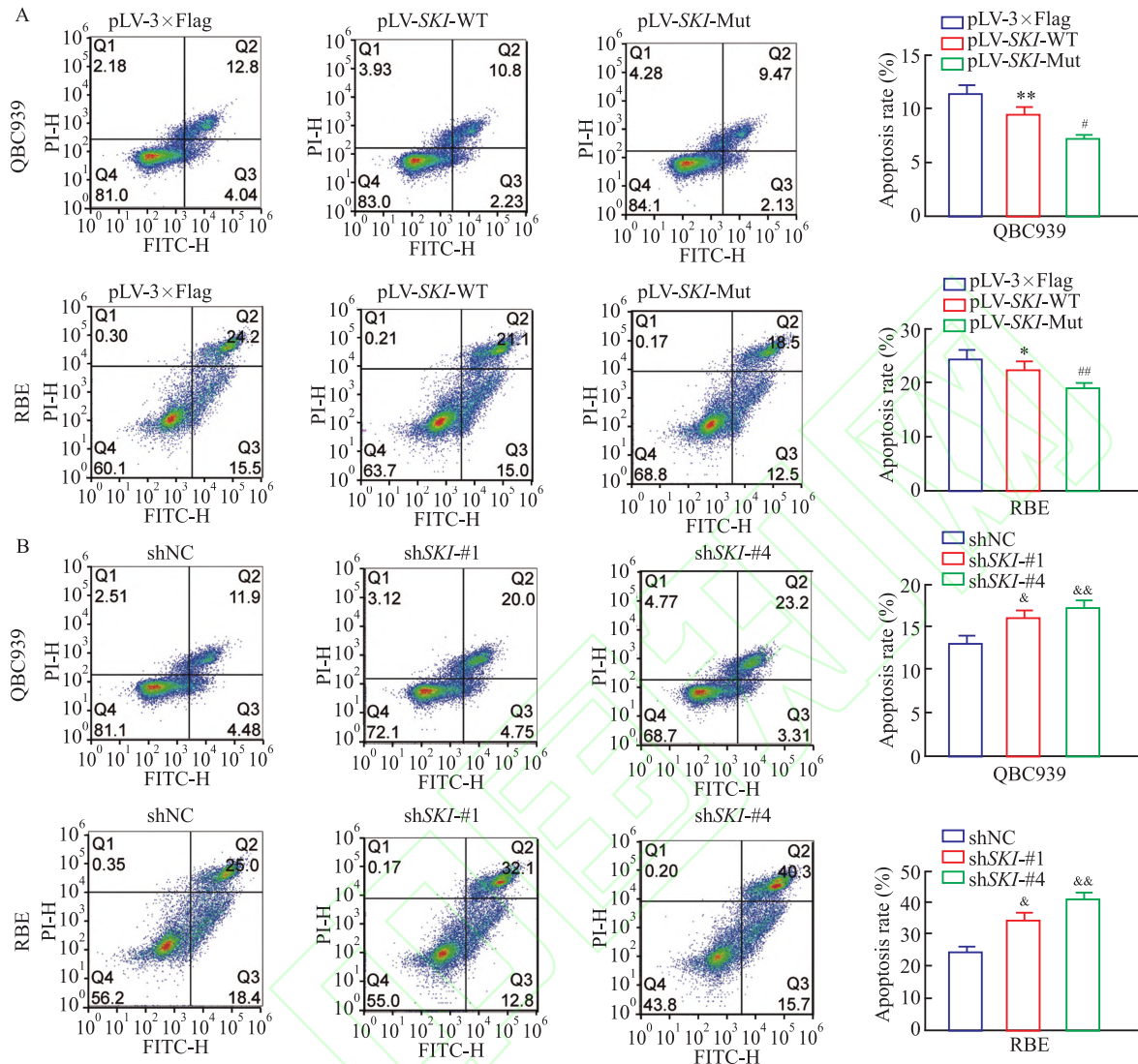


图4 SKI异常表达及突变对胆管癌细胞的凋亡能力的影响

Fig. 4 The impact of SKI abnormal expression and mutation on theapoptosability of cholangiocarcinoma cells

A: The apoptosis ability of the SKI overexpression and mutation groups in QBC939 and RBE cells was analyzed by flow cytometry; B: The apoptosis ability of the SKI knockdown groups in QBC939 and RBE cells was analyzed by flow cytometry; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs pLV-3×Flag group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs pLV-SKI-WT group; & $P<0.05$, && $P<0.01$ vs shNC group.

敲低后 QBC939 与 RBE 细胞系 p-SMAD2 和 p-SMAD3 的蛋白水平升高($t=3.692, 4.155, 3.244, 7.775, 2.891, 3.616, 2.782, 5.126$, 均 $P<0.05$)。见图 7B。为了检测 SKI 突变对 SMAD4/p-SMAD2/p-SMAD3 复合体形成的影响,进行 Co-IP 实验。结果显示(图 7C), SKI 不仅能与 SMAD4 发生相互作用,并且抑制了 SMAD2、SMAD3 的磷酸化($t=2.859, 4.579, 4.336$, 均 $P<0.05$),使 SMAD4 无法与 p-SMAD2/3 结合,抑制了具有转录活性的 SMAD4/p-SMAD2/p-SMAD3 复合体的形成,进而抑制了 TGF- β /SMAD 信号传导。提示 SKI 及其突变体可能通过阻断 TGF- β /SMAD 信号传导途径来促进胆管癌的发展过程。

3 讨论

CHOL 至今仍是世界上最大的健康难题之一,其全球发病率和病死率高居不下。研究^[7]表明,SKI 作为原癌基因,与肿瘤的发生发展关系密切,其高表达于多种恶性肿瘤,如胰腺癌、肺癌、白血病、胃癌等。然而,关于 SKI 基因突变对癌症发展的影响,研究尚不充分,仍需进一步探索。因此,探究 SKI 基因表达异常及其突变与胆管癌细胞发生发展的关联性,并揭示其潜在的生物学功能及相关致病机制,对于改善 CHOL 早期诊断及治疗方案具有重要意义。通过查询 COSMIC 数据库发现 SKI 的突变广泛存在于多种肿瘤中,其中肝脏相关肿瘤 SKI 的突

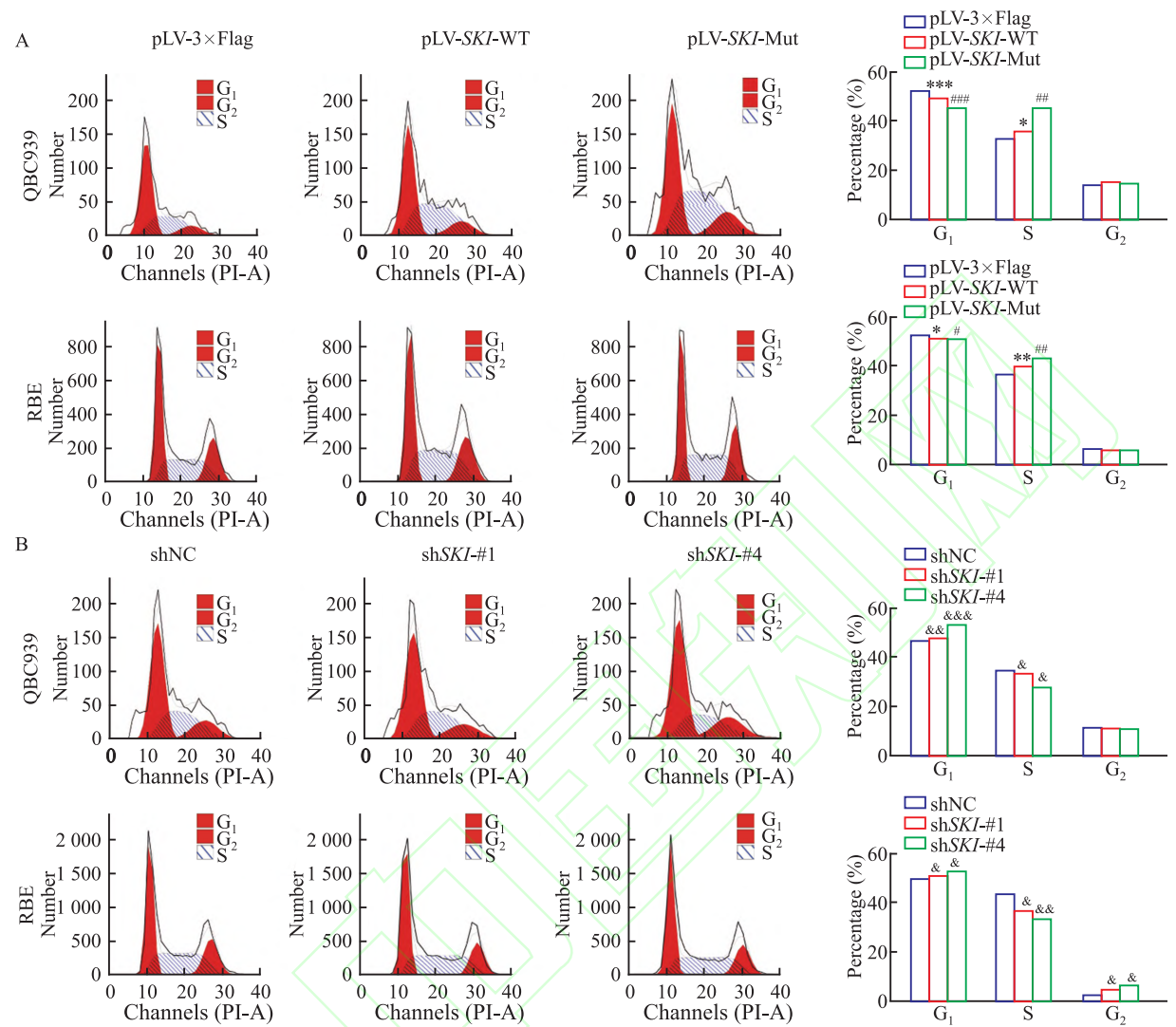


图5 SKI异常表达及突变对胆管癌细胞的细胞周期的影响

Fig. 5 The impact of SKI abnormal expression and mutation on the cell cycle of cholangiocarcinoma cells

A: The cell cycle of the SKI overexpression and mutation groups in QBC939 and RBE cells was analyzed by flow cytometry; B: The cell cycle of the SKI knockdown groups in QBC939 and RBE cells was analyzed by flow cytometry; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs pLV-3×Flag group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs pLV-SKI-WT group; & $P<0.05$, && $P<0.01$, &&& $P<0.001$ vs shNC group.

变发生率最高。在肿瘤样本中,C>T和G>A是最常见的突变类型。同时研究显示,在Shprintzen-Goldberg综合征中存在SKI的99C>T和103C>T两个重要的功能获得型突变^[4],在马方综合征中SKI的539C>T是一个重要的功能获得型突变^[5]。而在肿瘤中主要存在SKI的C>T和G>A的突变。前期对99C>T、103C>T和539C>T三个突变在胆管癌中的作用进行了初步的研究,结果显示SKI的539C>T突变在胆管癌中是一种功能获得型突变^[4-5]。后续对SKI的539C>T突变在胆管癌中的功能和机制进行了详细的研究。

本研究重点关注了SKI过表达、敲低及其突变对于胆管癌细胞发展过程中所起的生物学功能及

其作用机制。实验结果表明,无论是SKI过表达还是突变,均显著增强了QBC939和RBE细胞的增殖和迁移能力,并且抑制了细胞凋亡;反之,敲低SKI后,则与上述结果相反。此外,相比于过表达SKI,SKI突变后,G₁期细胞数量的下降和S期细胞数量的增加都更为明显;而SKI敲低后,抑制了QBC939和RBE细胞的增殖和迁移能力,促进了细胞凋亡,其G₁期细胞比例上升,S期细胞比例相应地下降。以上实验数据提示,与SKI过表达相比,SKI基因突变在胆管癌细胞中的原癌基因功能发挥更为显著。

SKI在调控多种与癌症进展紧密相关的细胞信号通路中扮演着重要角色,这些通路包括TGF-β信号途径、核激素受体信号、P21-P53信号机制、BMP

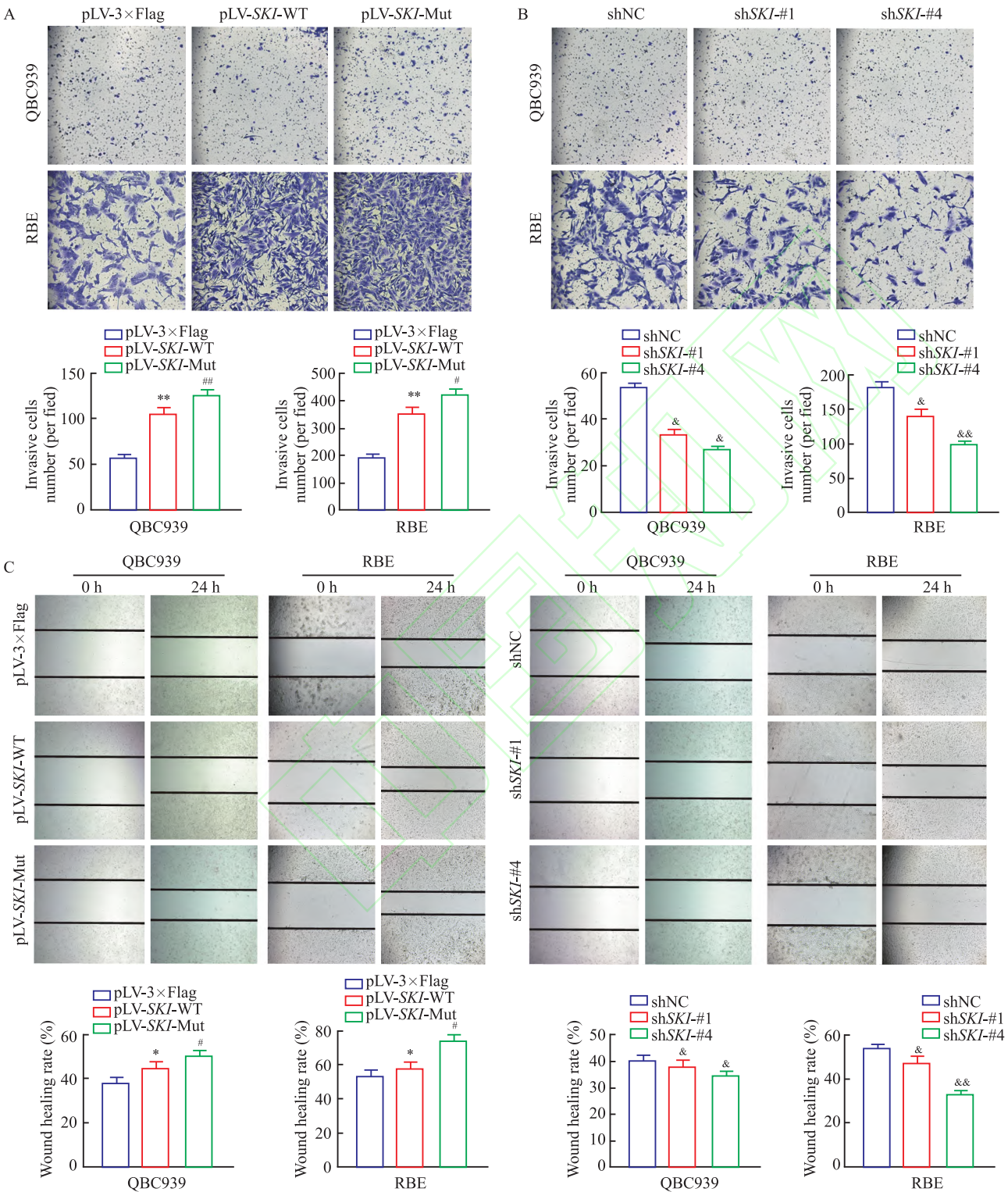


图6 SKI异常表达及突变对胆管癌细胞的细胞迁移侵袭的影响×40

Fig. 6 The impact of SKI abnormal expression and mutation on the migration of cholangiocarcinoma cells ×40

A, C: The migration abilities of the SKI overexpression and mutation groups in QBC939 and RBE cells were detected by Transwell assay and wound healing assay; B, D: The migration abilities of the SKI knockdown groups in QBC939 and RBE cells were detected by Transwell assay and wound healing assay; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs pLV-3×Flag group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs pLV-SKI-WT group; & $P<0.05$, && $P<0.01$ vs shNC group.

信号传导路径、Hippo 信号系统等^[7]。其中 SKI 与 TGF-β 信号通路的相互作用机制是目前最受关注的领域^[4-5, 8]。在多种肿瘤中(如前列腺癌、黑色素瘤、

胶质瘤等), SKI 可以通过抑制 TGF-β 信号通路促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移^[9-11]。

同时多项研究^[12-13]证实, TGF-β 信号通路通过

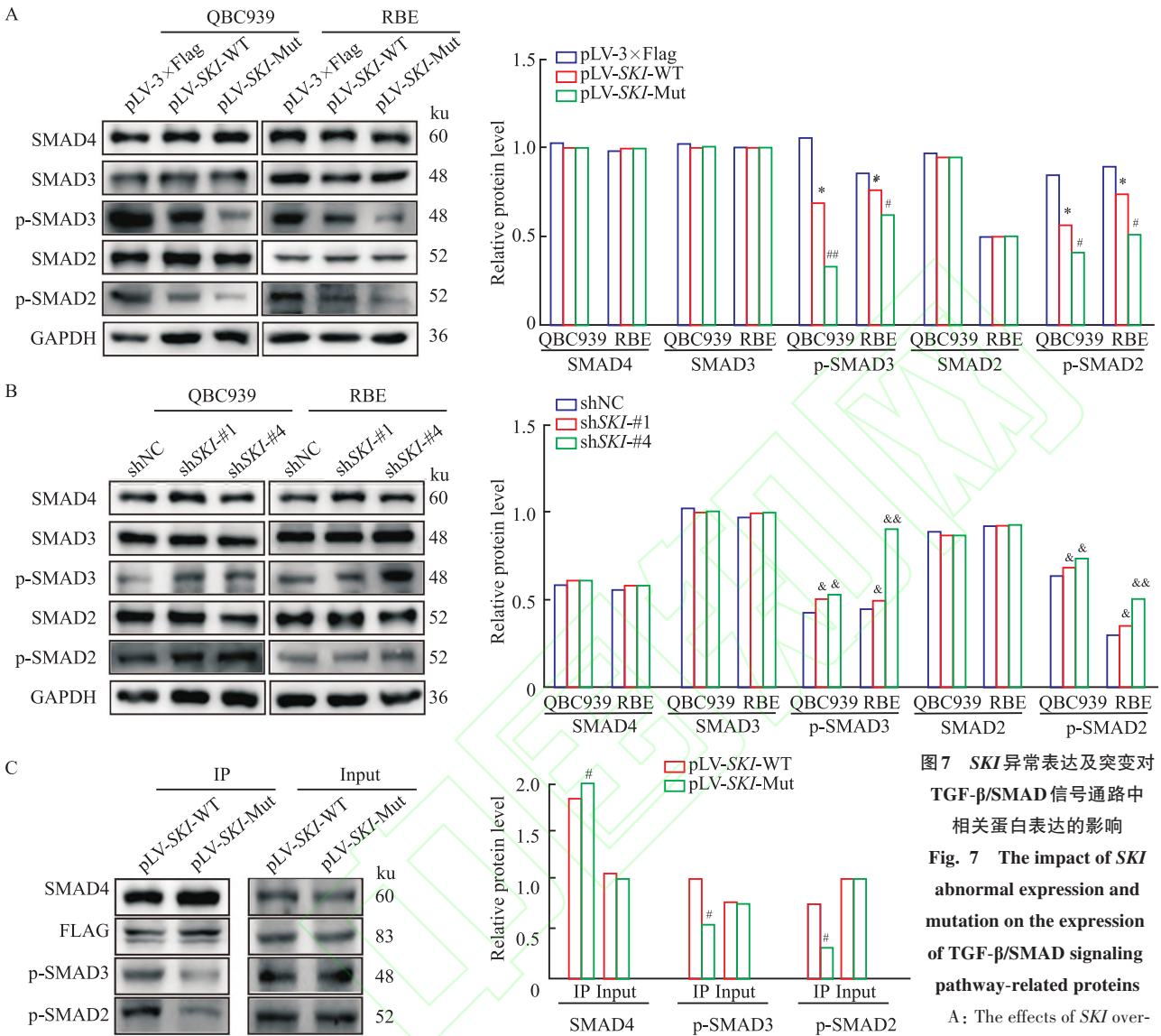


图7 *SKI* 异常表达及突变对 TGF- β /SMAD 信号通路中相关蛋白表达的影响
Fig. 7 The impact of *SKI* abnormal expression and mutation on the expression of TGF- β /SMAD signaling pathway-related proteins

A: The effects of *SKI* over-

expression and mutation on the protein levels of GAPDH, SMAD4, SMAD2, SMAD3 and their phosphorylation (p-SMAD2, p-SMAD3), with densitometric analysis (GAPDH as loading control); B: The effects of *SKI* knockdown on the protein levels of GAPDH, SMAD4, SMAD2, SMAD3 and their phosphorylation (p-SMAD2, p-SMAD3), with densitometric analysis (GAPDH as loading control); C: Co-Immunoprecipitation (Co-IP) assay was used to investigate the impact of *SKI* abnormal expression and mutation on the formation of the p-SMAD2/p-SMAD3/SMAD4 Complex; * $P < 0.05$ vs pLV-3×Flag group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs pLV-SKI-WT group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs shNC group.

调控细胞增殖、迁移及微环境重塑等关键过程,在胆管癌的病理进程中发挥着调节作用。一方面,酪氨酸激酶抑制剂 Lenvatinib 可以通过增加 *AZGP1* 基因启动子区 *H3K27Ac* 的乙酰化水平来增加 *AZGP1* 的表达,降低了磷酸化 SMAD3 的水平来抑制了 TGF- β 1/SMAD3 信号通路,从而抑制 CHOL 细胞中的上皮-间充质转化,抑制了 CHOL 的增殖、迁移侵袭^[14]。另一方面蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 3 (PTPN3) 深度增强 TGF- β 信号传导,促进 TGF- β 诱导的 R-SMAD 磷酸化、转录反应和随后的生理反应,抑制了 CHOL 的发生发展^[15]。为了探究在胆管癌细

胞发展过程中,*SKI* 如何调控 TGF- β 信号通路来促进胆管癌细胞的增殖和迁移,本研究通过 Co-IP 实验验证 *SKI* 与 SMAD 因子之间的关系。结果显示,*SKI* 与 SMAD4 之间存在相互作用,这种相互作用阻碍了 p-SMAD2/p-SMAD3/SMAD4 复合物的形成,进而抑制了 TGF- β /SMAD 信号通路相关蛋白质的功能,促进了胆管癌细胞的发展。

综上所述,本研究初步验证了 *SKI* 过表达及突变后促进了胆管癌细胞的增殖及迁移,抑制其凋亡,促进了 G_1 和 S 期进程,其中 *SKI* 突变后对胆管癌细胞生长的促进作用更强;而敲低 *SKI* 后,结果相

反。此外,*SKI*可以通过与SMAD4相互作用,抑制SMAD2/3的磷酸化,抑制TGF- β /SMAD信号通路,从而发挥原癌基因的作用。本研究为胆管癌的诊疗提供了新的理论依据,可进一步探索其临床应用价值,以期带来更有效的治疗方案。

参考文献

- [1] Brindley P J, Bachini M, Ilyas S I, et al. Cholangiocarcinoma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7: 65. doi: 10.1038/s41572-021-00300-2.
- [2] Hamaoka M, Kozaka K, Matsui O, et al. Early detection of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Jpn J Radiol, 2019, 37 (10): 669-84. doi: 10.1007/s11604-019-00860-0.
- [3] Wang Q, Xiong F, Wu G, et al. SMAD proteins in TGF- β signalling pathway in cancer: regulatory mechanisms and clinical applications [J]. Diagnostics (Basel), 2023, 13 (17): 2769. doi: 10.3390/diagnostics13172769.
- [4] Gori I, George R, Purkiss A G, et al. Mutations in *SKI* in Shprintzen-Goldberg syndrome lead to attenuated TGF- β responses through *SKI* stabilization [J]. eLife, 2021, 10: e63545. doi: 10.7554/eLife.63545.
- [5] Arnaud P, Racine C, Hanna N, et al. A new mutational hotspot in the *SKI* gene in the context of MFS/TAA molecular diagnosis [J]. Hum Genet, 2020, 139 (4): 461-72. doi: 10.1007/s00439-019-02102-9.
- [6] 贺建波, 孙倍成. GPX2在肝内胆管癌中的表达及其进展的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(8): 1330-8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.007.
- [6] He J B, Sun B C. Expression of GPX2 in intrahepatic cholangiocarcinoma and its effect on progression [J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59 (8): 1330-8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.007.
- [7] Liao H Y, Da C M, Wu Z L, et al. *Ski*: double roles in cancers [J]. Clin Biochem, 2021, 87: 1-12. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2020.10.015.
- [8] Fusco C, Nardella G, Morlino S, et al. Nucleotide substitutions at the p. Gly117 and p. Thr180 mutational hot-spots of *SKI* alter molecular dynamics and may affect cell cycle [J]. J Hum Genet, 2024, 69(1): 53-8. doi: 10.1038/s10038-023-01193-7.
- [9] Thompson-Elliott B, Johnson R, Khan S A. Alterations in TGF β signaling during prostate cancer progression [J]. Am J Clin Exp Urol, 2021, 9(4): 318-28.
- [10] Rass M, Gizler L, Bayersdorfer F, et al. The *Drosophila* functional Smad suppressing element fuss, a homologue of the human *Skor* genes, retains pro-oncogenic properties of the *Ski*/Sno family [J]. PLoS One, 2022, 17 (1): e0262360. doi: 10.1371/journal.pone.0262360.
- [11] Tecalco-Cruz A C, Ríos-López D G, Vázquez-Victorio G, et al. Transcriptional cofactors *Ski* and *SnoN* are major regulators of the TGF- β /Smad signaling pathway in health and disease [J]. Signal Transduct Target Ther, 2018, 3: 15. doi: 10.1038/s41392-018-0015-8.
- [12] 魏亦成, 王紫怡, 李 炜, 等. Pirfenidone通过癌相关成纤维细胞抑制胆道肿瘤侵袭[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58 (6): 975-81, 988. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.017.
- [12] Wei Y C, Wang Z Y, Li W, et al. Pirfenidone inhibits the invasion of biliary tract tumors through cancer associated fibroblast [J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58 (6): 975-81, 988. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.017.
- [13] Liu Z, Weng S, Xu H, et al. Computational recognition and clinical verification of TGF- β -derived miRNA signature with potential implications in prognosis and immunotherapy of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Front Oncol, 2021, 11: 757919. doi: 10.3389/fonc.2021.757919.
- [14] Deng L, Bao W, Zhang B, et al. AZGP1 activation by lenvatinib suppresses intrahepatic cholangiocarcinoma epithelial-mesenchymal transition through the TGF- β 1/Smad3 pathway [J]. Cell Death Dis, 2023, 14 (9): 590. doi: 10.1038/s41419-023-06092-5.
- [15] Yuan B, Liu J, Cao J, et al. PTPN3 acts as a tumor suppressor and boosts TGF- β signaling independent of its phosphatase activity [J]. EMBO J, 2019, 38 (14): e99945. doi: 10.15252/embj.201899945.

Functional and mechanistic study of proto-oncogene *SKI* mutations in promoting cholangiocarcinoma cells tumorigenesis

Zha Dantong¹, Yang Aiqing², Cao Pengbo², Qi Xin³, Zhou Gangqiao^{1,2,3}

(¹ School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032; ² Academy of Military Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850; ³ Medical College, Guizhou University, Guiyang 550025)

Abstract Objective To investigate the impact of aberrant *SKI* expression and its mutations on the biological characteristics of cholangiocarcinoma cell lines QBC939 and RBE, and to explore the underlying molecular mechanisms. **Methods** The Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2) database was utilized to analyze *SKI* expression and its clinical relevance in cholangiocarcinoma patients. Lentiviral transduction was employed to establish QBC939 and RBE cell lines with stable *SKI* overexpression, mutation, or knockdown. Cell proliferation was assessed using CCK-8, colony formation, and EdU assays. Apoptosis and cell cycle distribution were analyzed by flow cytometry. Cell migration was evaluated using Transwell and wound healing assays. The effect of *SKI* over-

网络出版时间： 网络出版地址：

视前区正中核注射前列腺素 E₂对雌性小鼠体温的影响及其机制

李 娅¹,宋宜安¹,吉巧凤²,徐 蕾¹,张 洁²,胥建辉²,侯晓钰¹
(¹成都医学院第一附属医院妇产科,成都 610500;²成都医学院体温与炎症
四川省高等学校重点实验室,成都 610500)

摘要 **目的** 研究视前区正中核(MnPO)微量注射前列腺素 E₂(PGE₂)对雌性小鼠体核温度的影响,并阐明其作用机制。**方法** 采用立体定位术在雌性小鼠 MnPO 植入微量注射套管。此后采用多通道温度信号采集系统同步监测 MnPO 注射不同试剂前后小鼠的直肠温度和棕色脂肪(BAT)温度。为观察 MnPO 微量注射 PGE₂的体温调节作用,将 12 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分为生理盐水组(*n*=6)和 PGE₂组(*n*=6),分别注射 0.1 μL 生理盐水和 PGE₂(2.8 mmol/L)。为了确定 E 系列前列腺素受体(EP)1、EP3、EP4 是否介导 PGE₂的体温调节作用,将 15 只雌性 C57BL/6 小鼠均分为 3 组,每组 5 只。往各组小鼠的 MnPO 分别先后注射 0.1 μL PGE₂(2.8 mmol/L),待体温回复至基线水平后,再分别注射 EP1、EP3 或 EP4 拮抗剂(ant)(20 mmol/L) + PGE₂(2.8 mmol/L)混合液。**结果** 与基础水平比较,MnPO 微量注射 PGE₂后,雌性小鼠的直肠温度(*P*<0.01)和 BAT 温度(*P*<0.001)均明显升高。与生理盐水组比较,PGE₂组小鼠直肠温度(*P*<0.001)和 BAT 温度(*P*<0.000 1)的上升幅度明显更大。此外,往 MnPO 注射 PGE₂后,小鼠 BAT 温度的上升幅度明显大于直肠温度的上升幅度(*P*<0.001)。与注射 PGE₂后比较,小鼠 MnPO 注射 EP3 ant + PGE₂后直肠温度的上升幅度(*P*<0.001)和 BAT 温度的上升幅度(*P*<0.001)均更小;而小鼠 MnPO 注射 EP1 ant + PGE₂和 EP4 ant + PGE₂后小鼠直肠温度的上升幅度(*P*>0.05)和 BAT 温度的上升幅度,均差异无统计学意义(*P*>0.05)。**结论** MnPO 注射 PGE₂可经 EP3 受体明显升高雌性小鼠的 BAT 温度和体核温度。

关键词 雌性小鼠;发热;棕色脂肪组织;前列腺素 E₂;视前区正中核;EP3 受体

中图分类号 R 714;R 339.6

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2026)02 - 0250 - 08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2026.02.009

2025 - 10 - 21 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:32100926);四川省老年医学临床医学研究中心开放课题项目(编号:24LHLNYX1-25);四川青年创新科研课题计划项目(编号:Q22010)

作者简介:李 娅,女,硕士,主治医师;

侯晓钰,女,硕士,主治医师,通信作者,E-mail: hxyobstetrics@126.com

发热可导致流产等不良妊娠结局和胎儿出生缺陷的风险明显升高^[1]。但是孕期使用解热镇痛类药物会增加胎儿神经和生殖系统发育障碍的风险^[2-4]。这些发现促使学者们深入研究雌性哺乳动物发热的中枢机制,以寻求新的妊娠期退热方法。既往研究^[5]显示脂多糖等致热源进入机体后可通过

expression, mutation, or knockdown on key proteins (SMAD2, SMAD3, SMAD4) in the transforming growth factor-β (TGF-β)/Small mothers against decapentaplegic (SMAD) signaling pathway was examined by Western blot. **Results** Compared to *SKI* overexpression alone, the introduction of *SKI* mutations significantly promoted S-phase progression, enhanced proliferation and migration, and inhibited apoptosis. Mechanistically, *SKI* mutations suppressed the phosphorylation of SMAD2 and SMAD3 proteins, thereby inhibiting the transcriptional activity of the TGF-β signaling pathway. Conversely, *SKI* knockedown produced the opposite effects. **Conclusion** *SKI* gene mutation acts as a gain-of-function genetic alteration, exerting an oncogenic role in cholangiocarcinoma cells. The primary mechanism involves the inhibition of the TGF-β/SMAD signaling pathway, which in turn promotes proliferation and cell cycle progression, and suppresses apoptosis in QBC939 and RBE cells, ultimately driving tumor progression.

Key words cholangiocarcinoma; cholangiocarcinoma cells; *SKI*; cell cycle; proliferation; apoptosis; migration

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 82002573)

Corresponding authors Yang Aiqing, E-mail: yan_gaiqing_ok@126.com; Zhou Gangqiao, E-mail: zhougq114@126.com