

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.07.005

烯醇化酶1通过调控PKM的可变剪接促进胃癌的进展

王娜¹, 乔慧², 邓成辉³, 杨磊³, 曾苗苗³, 关泉林³ (1. 兰州大学第二医院 肿瘤内科, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州大学第一医院 肿瘤内科, 甘肃 兰州 730000; 3. 兰州大学第一医院 肿瘤外科, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] **目的:** 探讨烯醇化酶1(ENO1)对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响及其分子机制。**方法:** 通过WB法检测ENO1在人胃癌细胞HGC27、MKN-45、N-87、MGC803、BGC-823及人胃黏膜上皮细胞GES-1中的表达水平, 利用CRISPR、过表达等基因编辑工具分别构建ENO1敲低及敲低-恢复表达细胞株, 将MKN-45和BGC-823细胞分别分组为Ctrl组、ENO1 KD组、ENO1 KD-OE组。通过克隆形成实验、EdU染色、划痕实验、Transwell实验、流式细胞术检测敲低或敲低-恢复表达ENO1对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响。构建胃癌细胞裸鼠移植瘤模型, 通过小动物活体成像技术及肿瘤组织块测量观察ENO1对肿瘤生长的影响。在MKN-45细胞中通过RNA干扰技术沉默ENO1, 利用RNA免疫共沉淀-转录组测序(RIP-Seq)结合生物信息学分析技术鉴定ENO1下游的靶基因, 分析ENO1调控胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的分子机制。**结果:** ENO1在胃癌细胞中表达水平均显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。在MKN-45和BGC-823细胞中敲低ENO1可显著降低胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力并促进细胞凋亡($P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$); 回复实验结果显示, 恢复ENO1的表达后, 胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力均显著提高并减少细胞凋亡($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$)。裸鼠荷瘤实验结果表明, 敲低ENO1的表达可以显著抑制裸鼠移植瘤的生长($P < 0.0001$)。与ENO1蛋白具有相互作用的差异基因主要富集于RNA剪切相关通路, 且ENO1蛋白与PKM基因具有相互作用, 胃癌组织中ENO1与PKM2基因表达呈正相关($r = 0.886$)。**结论:** ENO1在胃癌细胞中呈高表达, 其通过与PKM的前体mRNA相互作用影响PKM的RNA剪接过程, 进而调控PKM2的表达水平并促进胃癌的进展。

[关键词] RNA结合蛋白; 烯醇化酶1; 免疫沉淀; 胃癌; 增殖; 迁移; 侵袭; 凋亡

[中图分类号] R735.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)07-0706-10

ENO1 promotes gastric cancer progression by regulating alternative splicing of PKM

WANG Na¹, QIAO Hui², DENG Chenghui³, YANG Lei³, ZENG Miaomiao³, GUAN Quanlin³ (1. Department of Oncology, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China; 2. Department of Oncology, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China; 3. Department of Surgical Oncology, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of enolase 1 (ENO1) on the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells and its underlying molecular mechanisms. **Methods:** The expression levels of ENO1 in human gastric cancer cell lines (HGC27, MKN-45, N-87, MGC803, BGC-823) and human gastric mucosal epithelial cells (GES-1) were detected using WB assay. Gene editing tools such as CRISPR and overexpression system were used to construct ENO1 knockdown and knockdown-rescue cell lines. Both MKN-45 and BGC-823 cells were grouped into control (Ctrl) group, ENO1 knockdown (ENO1 KD) group, and ENO1 knockdown-rescue (ENO1 KD-OE) group. The effects of ENO1 knockdown or ENO1 knockdown-rescue on the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of gastric cancer cells were evaluated using colony formation assay, EdU staining, scratch wound healing assay, Transwell chamber assay and flow cytometry. Additionally, a xenograft model was established in nude mice, and the effects of ENO1 on tumor growth were monitored using small animal *in vivo* imaging and tumor tissue block measurement. ENO1 was silenced in MKN-45 cells employing RNA interference technology, and the downstream target genes of ENO1 were identified using RNA co-immunoprecipitation sequencing (RIP-seq) and bioinformatics analysis. The molecular mechanisms by which ENO1 regulates the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells was also analyzed. **Results:** ENO1 was significantly upregulated in

[基金项目] 甘肃省自然科学基金(No. 24JRRA337, No. 24JRRA364)

[作者简介] 王娜(1985—), 女, 博士, 主任医师, 主要从事恶性肿瘤的内科治疗

[通信作者] 关泉林(扫码获取作者联系方式)



gastric cancer cell lines ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). ENO1 knockdown significantly inhibited proliferation, migration, and invasion while promoting apoptosis in MKN-45 and BGC-823 cells ($P < 0.001$, $P < 0.000 1$). Rescue experiments showed that restoring ENO1 expression significantly enhanced cell proliferation, migration, invasion, and inhibited apoptosis ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.000 1$). *In vivo* experiments demonstrated that ENO1 knockdown significantly inhibited tumor growth in nude mice ($P < 0.000 1$). The differentially expressed genes interacting with ENO1 protein were primarily enriched in pathways related to RNA splicing. Additionally, ENO1 protein was found to interact with the PKM gene, and their expressions showed a positive correlation in gastric cancer tissues ($r = 0.886$). **Conclusion:** ENO1 is highly expressed in gastric cancer cells. ENO1 interacts with precursor mRNA of PKM to influence its RNA splicing process, thereby regulating PKM2 expression and promoting gastric cancer progression.

[Key words] RNA binding protein; enolase 1 (ENO1); immunoprecipitation; gastric cancer; proliferation; migration; invasion; apoptosis
[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(7): 706-715. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.07.005]

胃癌发病位居全球癌症发病谱的第5位与死亡谱的第4位^[1]。晚期胃癌目前仍以化疗为主,但一线治疗的中位总生存期(OS)徘徊在10~13个月^[2-3]。针对HER2阳性表达的进展期胃癌,HER2靶向药物联合治疗可以提高患者OS,但中国胃癌患者HER2阳性率仅为12%~13%^[4-5]。近年来,Claudin18.2作为肿瘤治疗的新靶点,受到了科研人员广泛重视^[6-7],针对其靶向药物的研究还处于临床试验阶段。免疫检查点抑制剂的应用在晚期胃癌的治疗中取得了一定的疗效,但获益人群有限。因此,探索有效的靶点是当前急需解决的问题。本团队前期的研究^[8-9]发现,糖酵解途径中的关键酶——烯醇化酶1(enolase 1, ENO1)可促进胃癌细胞增殖,其表达与胃癌的肿瘤体积大小及分化相关,ENO1高表达胃癌患者的OS率较低。ENO1调控多种基因的表达,包括c-FOS信号网络在内的许多基因与肿瘤进展有关^[10]。本课题组前期研究发现,胃癌组织中ENO1与丙酮酸激酶M2(pyruvate kinase M2, PKM2)表达均上调,且二者表达呈正相关。ENO1不仅是一种糖酵解酶,还是一种RNA结合蛋白^[11]。因此,本实验通过ENO1与其RNA结合性相关的研究,探讨其在胃癌中作用。具体而言,本研究拟探讨ENO1是否通过与PKM2的前体mRNA(PKM)的相互作用,调节PKM的可变剪接,进而影响PKM2的表达,最终调控胃癌的进展。

1 材料与方法

1.1 细胞、实验动物、质粒及主要试剂

人胃癌细胞MKN-45购自武汉普诺赛生命科技有限公司,人胃癌细胞MGC-803、BGC-823均为兰州大学甘肃省胃肠病重点实验室馈赠,人胃癌细胞HGC-27、NCI-N87及正常胃黏膜上皮细胞GES-1均为兰州大学第二医院甘肃省消化系肿瘤重点实验室馈赠。

5~6周、雄性、体质量(18 ± 2)g的BALB/c裸鼠购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2023-0009。裸鼠在兰州

大学基础医学院医学实验中心SPF级动物室中开展实验,实验动物使用许可证号:SYXK(甘)2021-0001。12L-12D进行交替光照,大约3d重新换用饮用水等。实验期间实验动物的管理、照料和伦理福利关怀遵循国家科技部《关于善待实验动物的指导性意见》和国家标准《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T35892-2018)的要求执行。

质粒pLvX-puro与LentiCRISPR V2-lucifer-Hygro均来自兰州大学基础医学院实验中心。

RQ1购自Promega美国普洛麦格公司,Recombinant RNase Inhibitor购自TaKaRa公司,蛋白酶抑制剂Cocktail购自Bimake公司,Micrococcal Nuclease、RNase T1、Protein A/G、Glycogen等购自Thermo Scientific公司,Proteinase K Solution购自生工生物公司,Hieff™ qPCR SYBR® Green Master Mix (Low Rox Plus)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司,RIPA蛋白裂解液、BCA蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒等购自北京索莱宝科技有限公司,GAPDH抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗购自美国Immunoway公司,ENO1抗体购自美国Abcam公司,Lipo 3000转染试剂购自Invitrogen公司,质粒纯化试剂盒购自上海生工公司,Top10大肠杆菌感受态细胞购自擎科生物公司,FastDigest BsmBI、FastAP购自Thermo公司,T4 PINK、Quick Ligase购自美国NEB公司。

1.2 载体构建

通过gRNA序列在线设计工具CRISPR Guide RNAs(thermofisher.cn)选择3条靶向人ENO1基因的gRNA,设计对应的CRISPR引物,同时根据人ENO1基因序列设计过表达引物,通过分子克隆分别构建ENO1基因的CRISPR基因敲除载体(LentiCRISPR V2-lucifer-Hygro-ENO1-gRNA1/2/3)和过表达载体(pLvX-ENO1-puro),Sanger测序验证载体序列。CRISPR靶序列及引物:(1)ENO1-gRNA1靶序列为GCGTTC AATGTCATCAATGG,ENO1-KO1-F为CAC CGCGTTC AATGTCATCAATGG,ENO1-KO1-R为

AAACCCATTGATGACATTGAACGCC; (2) ENO1-gRNA2 靶序列为 TTGGTGCGAACGCCATTCTG, ENO1-KO2-F 为 CACCGTTGGTGCGAACGCCATTCTG, ENO1-KO2-R 为 AAACCAGAATGGCGTTCG CACCAAC; (3) ENO1-gRNA3 靶序列为 GTACCG CCACATCGCTGACT, ENO1-KO3-F 为 CACCGGTA CCGCCACATCGCTGACT, ENO1-KO3-R 为 AAA CAGTCAGCGATGTGGCGGTACC; (4) 过表达扩增引物, ENO1-OE-F 为 AGTACTCGAGCTATTCTCA AGATCCATGCCAGG, ENO1-OE-R 为 TAACGGATC CTTACTTGCCAAAGGGGTTTCTG。

1.3 细胞转染与分组

取 2 μg 的质粒 (LentiCRISPR V2-lucifer-Hygro-ENO1-gRNA1/2/3 质粒或 pLOV-ENO1-puro 质粒 1 μg , psPAX2 packaging plasmid 750 ng 和 pMD2.G envelope plasmid 250 ng), 通过 Lipo3000 转染试剂共转染 293T 细胞, 包装慢病毒, 48 h 后收集病毒上清液, 感染 MKN-45、BGC-823 细胞。感染 72 h 后, 通过对应的嘌呤霉素 (CRISPR 载体) 或者潮霉素 (过表达载体) 连续筛选 2 周, 构建 ENO1 稳定敲低或者过表达的细胞株, 通过 WB 法验证 ENO1 敲低及过表达效果。将 MKN-45 或 BGC-823 细胞分为 Ctrl 组 (LentiCRISPR V2-lucifer-Hygro 空载体病毒液感染的 MKN-45 或 BGC-823 细胞, 即对照组)、ENO1-KD 组 (LentiCRISPR V2-lucifer-Hygro-ENO1-gRNA 病毒液感染的 MKN-45 或 BGC-823 细胞, 即 ENO1 敲低组)、ENO1-KD-OE 组 (pLv_x-ENO1-puro 病毒液感染的 MKN-45-ENO1-KD 细胞或 BGC-823-ENO1-KD 细胞, 即 ENO1 敲低—恢复组)。

1.4 WB 法检测胃癌细胞中 ENO1 蛋白的表达

采用 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白, 按 BCA 蛋白定量检测试剂盒说明书对蛋白进行定量。用 10% SDS-PAGE 分离各样品中的蛋白质, 将蛋白质电转至 PVDF 膜, 在 5% 牛血清白蛋白中封闭 2 h, 摇床上以 $1 \times \text{TBST3}$ 洗涤 3 次 (8 min/次), 加入 ENO1 (1:500 稀释) 和 GAPDH (1:2 000 稀释) 一抗, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应过夜。次日, 洗涤 3 次后, 在 HRP 标记羊抗兔二抗 (1:5 000 稀释) 中室温下反应 1 h, 洗涤后, 加入 ECL 化学发光液显影, 在凝胶成像仪下进行曝光。以 GAPDH 作为内参, 利用 Image J 软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.5 EdU 染色法检测胃癌细胞的增殖能力

将各组密度为 4×10^5 个/mL 的细胞接种于 12 孔板 (0.5 mL/孔) 中培养 36 h, 将 EdU 以 1:500 稀释, 各孔当中均添加 500 μL 稀释的 EdU 溶液, 继续培养 2 h, 按照试剂盒说明书进行 EdU 及 Hoechst 染色。荧光显微镜下获取各组细胞图像, 采用 Image J 软件定

量分析各组中 EdU 阳性细胞数及总细胞数。依据公式“细胞增殖率 = EdU 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ ”计算细胞增殖率。

1.6 克隆形成实验检测胃癌细胞的克隆形成能力

取对数生长期各组细胞, 常规胰酶消化为单细胞悬浮液, 接种到 6 孔板中 (8×10^2 个/孔), 每组设置 3 个复孔, 轻轻摇匀后在细胞培养箱中静置培养, 每 3 d 更换新鲜的完全培养基。10 d 后形成肉眼可见的克隆时即可结束培养, 弃掉孔板中液体, PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min, 弃掉液体, 沥干后在 0.5% 结晶紫溶液中染色 30 min, PBS 洗 3 次, 自然干燥。拍照观察比较克隆大小与数量, 借助 Image J 软件计算克隆形成率。

1.7 流式细胞术检测胃癌细胞的细胞周期和凋亡水平

将各组细胞接种至 6 孔板内, 培养 36~48 h。收集细胞、离心、获取所有细胞沉淀, 向其中加入 1 mL 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 重悬细胞沉淀, 再次洗涤细胞后用 $1 \times$ 结合缓冲液重悬细胞, 调整其密度为 1×10^6 个/mL, 取 100 μL 细胞悬液加入流式管中, 加入 5 μL Annexin V-FITC 与 5 μL PI 染液, 混合均匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下避光作用 15 min。每管加入 400 μL 的 $1 \times$ 结合缓冲液。然后在 1 h 内通过流式细胞仪检测各组细胞的细胞周期和凋亡率。

1.8 划痕实验检测胃癌细胞的迁移能力

取各组对数生长期细胞, 消化、接种到 6 孔细胞培养板。第 2 天待细胞汇合度达到 80% 以上 (约 1×10^6 个/孔) 后, 进行划痕实验。用 200 μL 移液器枪头垂直于 6 孔板背面的标记线进行划痕, 划痕与标记线相交, 划痕完成后, 弃去旧的培养基, 用 PBS 冲洗 3 次, 去除漂浮的细胞, 让间隙更清晰, 并以无血清培养基来培养。分别在 0、6、12、24 h 时间点取出培养板, 用相差显微镜拍照, 观察划痕愈合情况, 计算细胞迁移率。

1.9 Transwell 实验检测胃癌细胞的迁移和侵袭能力

侵袭实验在预铺基质胶的 Transwell 上室中加入 100 μL 含 1×10^5 个细胞悬液, 迁移实验则不需要预铺基质胶, 直接在上室加入 100 μL 含 1×10^5 个细胞悬液, 在下室中加入 600 μL 含 10% 血清的培养基。培养 24 h 后, 取出小室, 用棉签去除上室残留的细胞, 下室的细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 在 0.1% 结晶紫溶液中避光染色 20 min。洗涤去除残留的结晶紫, 于倒置光学显微镜下观察、拍照, 借助 Image J 软件计算细胞的迁移率/侵袭率。

1.10 胃癌细胞裸鼠移植瘤模型的构建及观察

将裸鼠随机分为 6 组 (5 只/组)。将 100 μL 密度为 1×10^6 个/100 μL 细胞悬液注射到裸鼠前胸右侧的皮下。根据注射的细胞实验分为 Ctrl 组、ENO1-KD 组和 ENO1-KD-OE 组。在细胞接种后第 7 天、第

14天,按0.1 mL/只将荧光素注射入裸鼠腹腔,注射后10~30 min内,借助小动物活体成像系统检测荧光信号强度。第14天后处死小鼠,取出移植瘤,拍照观察小鼠肿瘤的大小并测量肿瘤体积。切取部分移植瘤组织标本,经固定、包埋、切片后用WB法检测移植瘤组织中ENO1蛋白的表达(方法同1.4)。

1.11 RNA免疫共沉淀-转录组测序(RIP-Seq)

通过RIP技术捕获与ENO1蛋白质相互作用的RNA并构建高通量测序文库。(1)细胞裂解及酶切。(2)免疫沉淀(immunoprecipitation, IP):取1%裂解液作为输入对照(Input)样本,向剩余裂解液中加入15 μ g ENO1抗体进行IP,以IgG抗体作为阴性对照,4 $^{\circ}$ C过夜孵育。加入protein A/G磁珠,4 $^{\circ}$ C孵育2 h,移除上清液后依次使用裂解液、高盐缓冲液和PNK缓冲液漂洗磁珠各2次,用洗脱缓冲液重悬磁珠,70 $^{\circ}$ C,1 000 rpm洗脱20 min释放磁珠结合的RBP及其结合的RNA。在Input和IP样本中加入蛋白酶K,55 $^{\circ}$ C消解2 h以充分消化蛋白质。用WB法检测Input和IP样本中ENO1蛋白信号,判断IP是否成功。(3)RNA抽提。(4)建库:用KAPA RNA Hyper Prep Kit制备cDNA文库。使用Illumina NovaSeq6000系统进行150 nt成对端测序。

1.12 RIP-Seq数据分析

对样本进行建库和高通量测序。基于Illumina NovaSeq 6000测序系统可实现双端测序。然后,进行测序数据质量评估及与参考基因组序列的比对,获取测序有效读数(reads)在全基因组的分布,Odd探针组与Even探针组基因组上结合峰(peak)分布情况,并进行peak鉴定及基因原件分析,与对照样本相比较分析IP样本特异结合峰(specific peak)。同时,进行差异结合峰相关基因本体论(Gene ontology, GO)功能富集分析,差异结合峰相关基因京都基因与基因组百科全书通路(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)生物通路富集分析及peak可视化和Motif(结合基序)分析。

1.13 统计学处理

主要实验均独立重复不低于3次。利用Prism GRAPH 6.2软件进行统计分析和绘图。呈正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表述,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ENO1在胃癌细胞中呈高表达

WB法检测结果(图1A)显示,ENO1蛋白在胃癌细胞HGC27、MKN-45、N-87、MGC803和BGC-823中的

表达水平显著高于人胃上皮细胞GES-1($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),ENO1在MKN-45和BGC-823细胞中表达较高,因此选择此两种细胞进行后续功能实验。

2.2 成功构建ENO1敲低和恢复表达细胞株

构建了靶向ENO1基因的CRISPR敲低载体,包装慢病毒感染细胞,筛选出ENO1稳定敲低细胞株,设计3个靶点,WB法验证敲低效果,选择最优的靶点进行后续实验。检测结果(图1B)显示,3条gRNA中gRNA2的敲低效率较高($P < 0.001$),因此,选择gRNA2进行后续实验。然后,ENO1稳定敲低细胞分别过表达ENO1进行回复实验,结果(图1C)显示,与Ctrl组比较,ENO1-KD组细胞中ENO1蛋白表达显著降低(均 $P < 0.001$);与ENO1-KD组相比,ENO1-KD-OE组细胞中ENO1蛋白表达水平显著升高(均 $P < 0.001$)。实验结果表明,敲低ENO1显著降低胃癌细胞中ENO1蛋白的表达水平,而恢复ENO1的表达则逆转敲低ENO1对ENO1蛋白的下调作用。

2.3 敲低ENO1降低胃癌细胞的增殖能力

EdU染色和克隆形成实验结果(图2)显示,与Ctrl组相比,ENO1-KD组EdU阳性细胞率和克隆形成率均显著降低(均 $P < 0.001$);与ENO1-KD组相比,ENO1-KD-OE组EdU阳性细胞率和克隆形成率均显著升高(均 $P < 0.001$)。结果表明,敲低ENO1表达显著降低胃癌细胞的增殖能力,而恢复ENO1的表达则可逆转敲低ENO1对细胞增殖的抑制作用而促进细胞增殖。

2.4 敲低ENO1将胃癌细胞周期阻滞于G1期

流式细胞术检测结果(图3A)显示,与Ctrl组相比,ENO1-KD组处于G2+S期的细胞数显著减少($P < 0.0001$);与ENO1-KD组相比,ENO1-KD-OE组处于G2+S期的细胞数显著增加($P < 0.0001$)。结果表明,敲低ENO1可以抑制胃癌细胞增殖并阻滞细胞周期于G1期,而恢复ENO1的表达则可以促进细胞增殖并解除细胞周期阻滞。

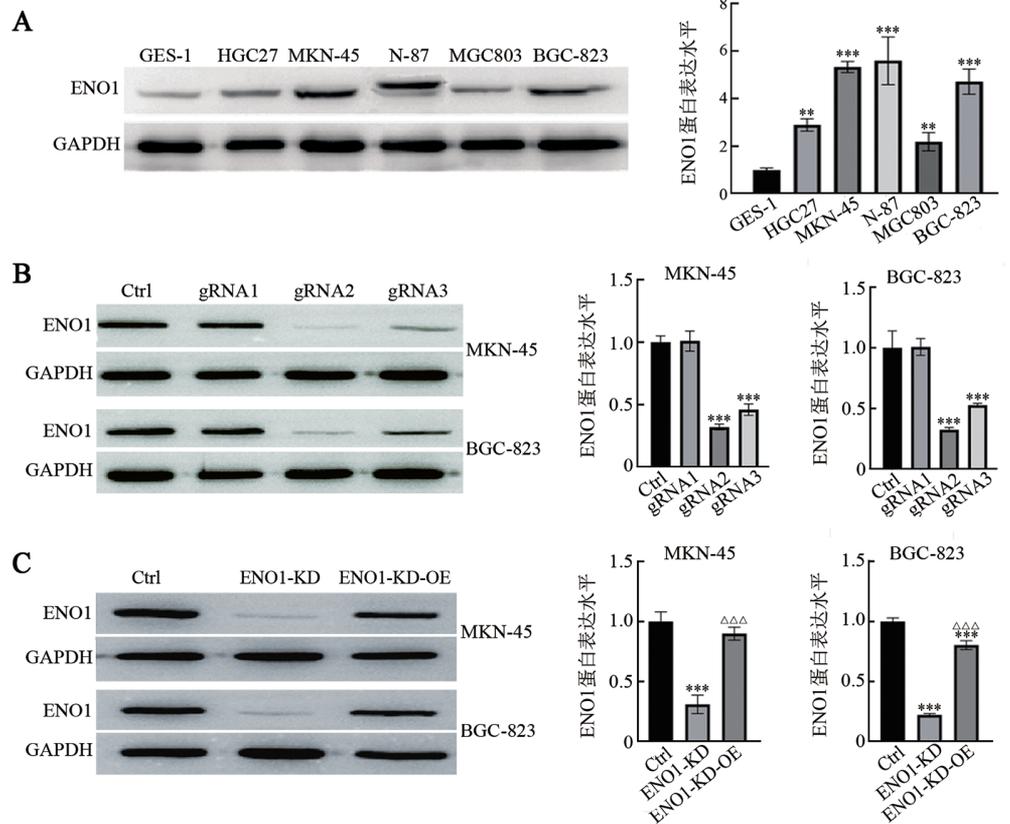
2.5 敲低ENO1促进胃癌细胞的凋亡

流式细胞术检测结果(图3B)显示,与Ctrl组比较,ENO1-KD组细胞的凋亡率显著升高($P < 0.0001$);与ENO1-KD组相比,ENO1-KD-OE组细胞的凋亡率显著降低($P < 0.0001$)。结果表明,敲低ENO1表达促进胃癌细胞凋亡,而恢复ENO1的表达则可以抑制细胞凋亡,进而促进细胞存活。

2.6 敲低ENO1降低胃癌细胞的迁移和侵袭能力

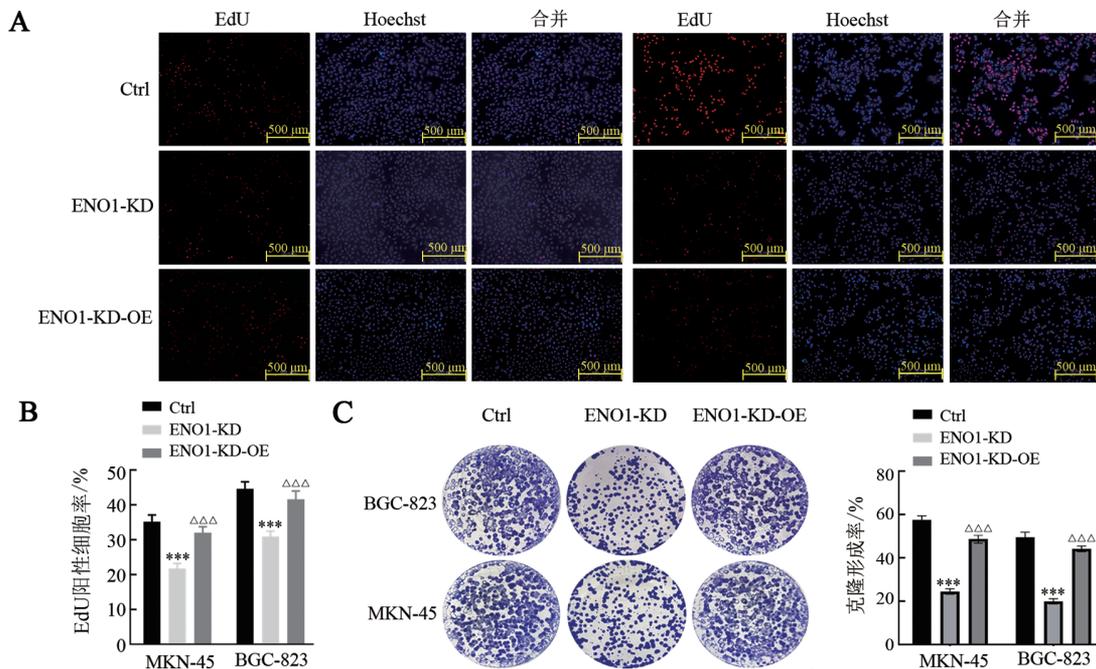
划痕和Transwell实验结果(图4A、B)显示,与Ctrl组相比,ENO1-KD组细胞迁移率和侵袭率均显著降低(均 $P < 0.001$);与ENO1-KD组相比,ENO1-KD-OE组细胞的迁移率和侵袭率均显著升高($P < 0.05$ 、

$P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。结果表明,敲低 ENO1 的表达显著降低胃癌细胞的迁移与侵袭能力,而恢复 ENO1 的表达则可以提高细胞的迁移及侵袭能力。



A: WB法检测胃癌细胞中 ENO1 蛋白的表达; B: WB法验证 3 条 gRNA 敲低 ENO1 的效率; C: WB法检测 ENO1 敲低及敲低一恢复表达细胞株中 ENO1 的表达。与 GES-1 细胞或 Ctrl 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 ENO1-KD 组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

图1 胃癌细胞中 ENO1 蛋白表达及 ENO1 敲低和敲低一恢复表达细胞株的构建



A、B: EdU 染色法检测细胞的增殖能力($\times 200$); C: 克隆形成实验检测细胞的克隆形成能力($\times 40$)。与 Ctrl 组比较, *** $P < 0.001$; 与 ENO1-KD 组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

图2 敲低 ENO1 对胃癌细胞增殖的影响

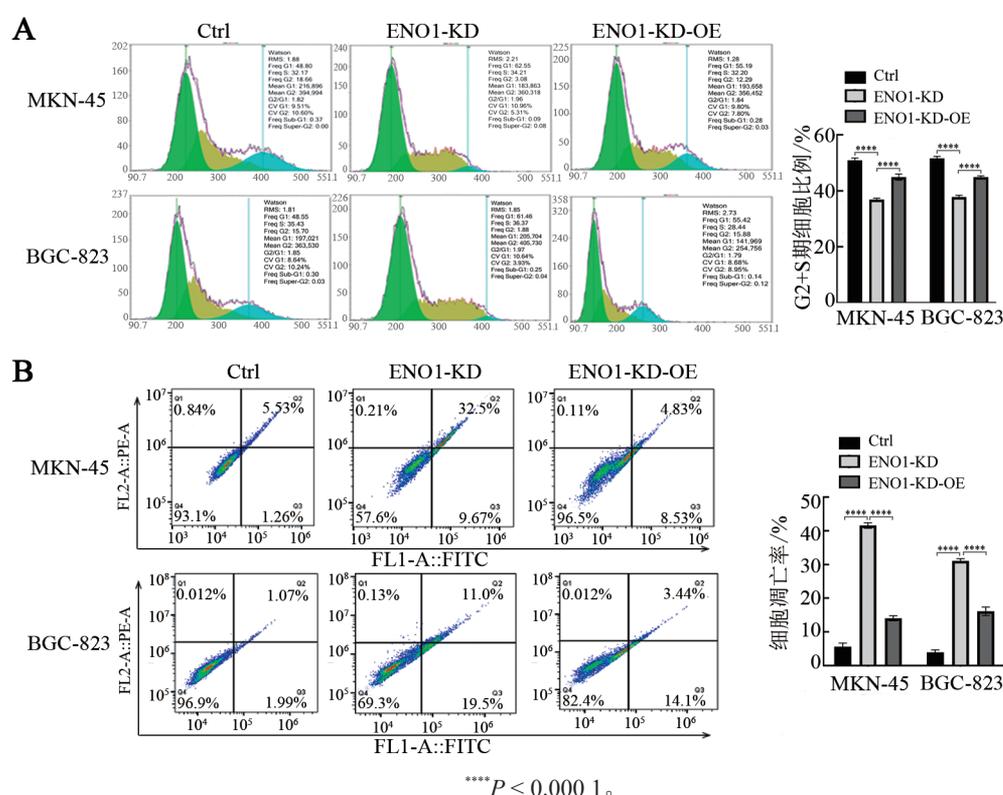


图3 流式细胞术检测敲低ENO1对胃癌细胞周期(A)和凋亡(B)的影响

2.7 ENO1促进胃癌细胞移植瘤的体内生长

2.7.1 敲低ENO1显著降低胃癌细胞的成瘤能力

成功构建胃癌细胞裸鼠移植瘤模型。小动物活体成像检测结果(图5A)显示,模型建立14 d后,与Ctrl组相比,ENO1-KD组小鼠体内荧光面积明显降低;与ENO1-KD组相比,ENO1-KD-OE组小鼠体内荧光面积扩大。与Ctrl组相比,ENO1-KD组移植瘤体积均显著降低(均 $P < 0.000 1$,图5B、C);与ENO1-KD组相比,ENO1-KD-OE组移植瘤体积均显著增加(均 $P < 0.05$)。结果说明,敲低ENO1表达可以抑制裸鼠移植瘤的生长,而恢复ENO1的表达则可以解除对移植瘤生长的抑制作用。

2.7.2 移植瘤组织中ENO1蛋白表达的高低与肿瘤大小趋势一致

WB法检测结果(图5D)显示,与Ctrl组相比,ENO1-KD组移植瘤组织中ENO1蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.01$);与ENO1-KD组相比,ENO1-KD-OE组ENO1蛋白表达均显著增加(均 $P < 0.05$)。结果表明,胃癌细胞成瘤后ENO1蛋白的表达稳定,且肿瘤组织中ENO1表达的高低与肿瘤大小的趋势一致。

2.8 RIP-Seq结合GO、KEGG富集分析证实ENO1的RNA结合功能

通过在MKN-45细胞中沉默ENO1,进行RIP-Seq,结果经GO(图6A)和KEGG(图6B)通路富集分析显示,与ENO1结合的差异基因主要富集于RNA

剪接相关的通路。结果表明,ENO1可以调节细胞的RNA剪接功能。

2.9 ENO1结合PKM的mRNA

通过对RIP-Seq结果的差异基因筛选,发现PKM与ENO1相互作用。进一步通过RIP-qPCR验证PKM的表达,结果(图7)显示,PKM基因与ENO1蛋白之间存在相互作用。结果表明,ENO1可能通过与PKM基因的相互作用,从而调控其RNA剪切与表达。

2.10 ENO1与PKM2 mRNA表达呈正相关关系

进一步利用Oncomine数据库在线分析了胃癌组织中ENO1与PKM2表达的相关性,结果(图8)显示,两者mRNA表达水平呈正相关关系($r = 0.886$, $P < 0.001$)。

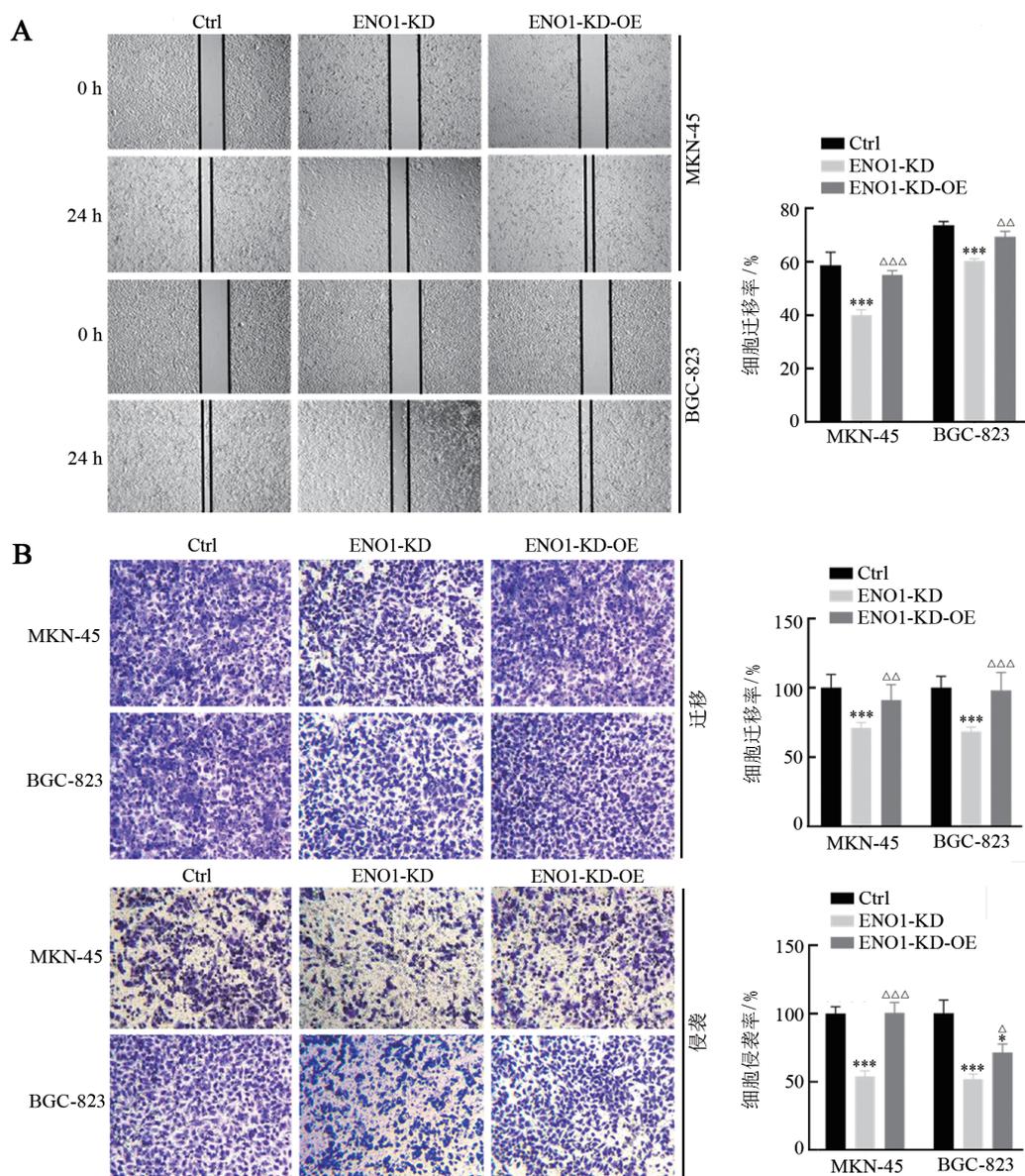
3 讨论

胃癌在中国的发病率和病死率极高,其确切病因尚不清楚。然而,与其他恶性肿瘤一样,胃癌的发病机制是一个多步骤、多因素的复杂过程。因此,探索相应的靶点并实现临床应用,对于提高胃癌患者的治疗效果和OS率具有重要意义。

能量代谢的改变是肿瘤的十大特征之一,糖酵解过程中关键酶ENO1在胃癌有氧糖酵解中能促进肿瘤的发生、发展及侵袭和转移,其高表达与患者预后不良相关。ENO1是一种催化2-磷酸甘油酸在糖酵解途径

中脱水生成磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)的金属酶^[19], ENO1是PEP基因编码在哺乳动物中发现的三种烯醇酶同工酶之一的 α -烯醇酶。每个同工酶是由2个 α 、2个 γ 或2个 β 亚基组成的同型二聚体,并起糖酵解酶的作用^[20]。ENO1在多种肿瘤中作为癌基因研究较多,可调控糖酵解、细胞周期和上皮

间质转化(EMT)相关基因的表达^[21]。尽管ENO1作为糖酵解酶会加速肿瘤进展,但最新研究^[22]发现,其可能作为一种RNA结合蛋白具有兼职功能。ENO1是从“相互作用组捕获”研究中被确定为RNA结合蛋白候选物的第3个酶。在胃癌细胞中,ENO1能广泛调控RNA水平的表达变化,其与lncRNA相互结合参与肿瘤的发生^[23]。



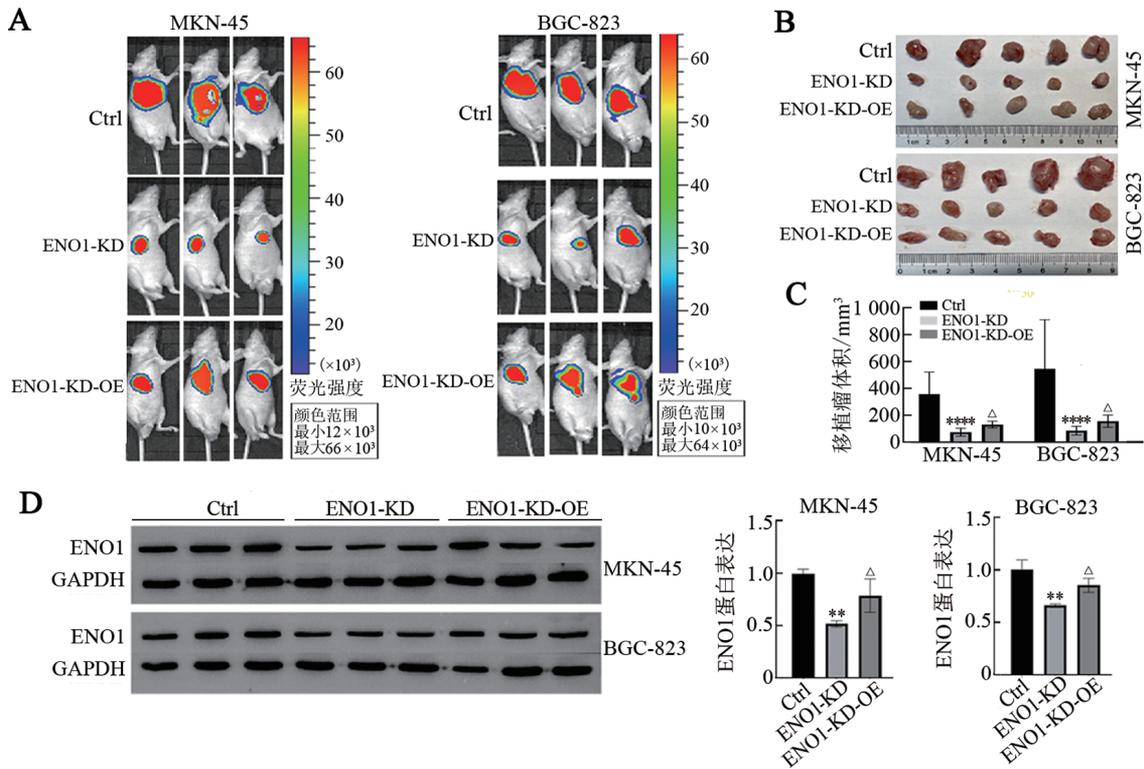
A:划痕实验检测胃癌细胞的迁移能力($\times 100$);B:Transwell实验检测胃癌细胞的迁移与侵袭能力($\times 100$)。与Ctrl组比较,*** $P < 0.001$;与ENO1-KD组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

图4 敲低ENO1对胃癌细胞迁移和侵袭的影响($\times 100$)

目前,ENO1与RNA结合的机制研究较少。本研究试图在现有工作基础上进一步探索ENO1在胃癌进展及糖酵解中的具体调控机制。研究发现,敲低ENO1能够有效降低胃癌细胞的增殖与侵袭能力。在对ENO1进行过表达后,胃癌细胞本来的迁移能力等陆续恢复。克隆形成实验已得到了验证,敲低ENO1后胃癌细胞的克隆形成率显著降低。其次,细胞周期及细胞凋亡实

验结果提示,与对照组相比,ENO1敲低组处于G2期的细胞数减少,细胞增殖率降低,凋亡率升高;ENO1过表达后细胞增殖率增加及凋亡率有所下降。最后,通过划痕实验和Transwell实验验证,结果表明,下调ENO1后,胃癌细胞的迁移和侵袭能力均被显著抑制。在体内实验中,通过胃癌细胞裸鼠移植瘤模型实验,发现裸鼠成瘤率、肿瘤体积及肿瘤组织中的ENO1表达水平在

ENO1 敲低组中均显著小于对照组和过表达ENO1 组。参与肿瘤的恶性进展过程。总之, 本实验结果充分说明ENO1 在胃癌中异常上调并



A: 小动物活体成像术检测敲低或过表达ENO1后裸鼠成瘤情况; B: 裸鼠移植瘤的外形大小; C: 裸鼠移植瘤的体积数据图; D: WB法检测移植瘤组织中ENO1蛋白的表达水平。与Ctrl组比较, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$; 与ENO1-KD组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图5 敲低或过表达ENO1对裸鼠移植瘤生长的影响

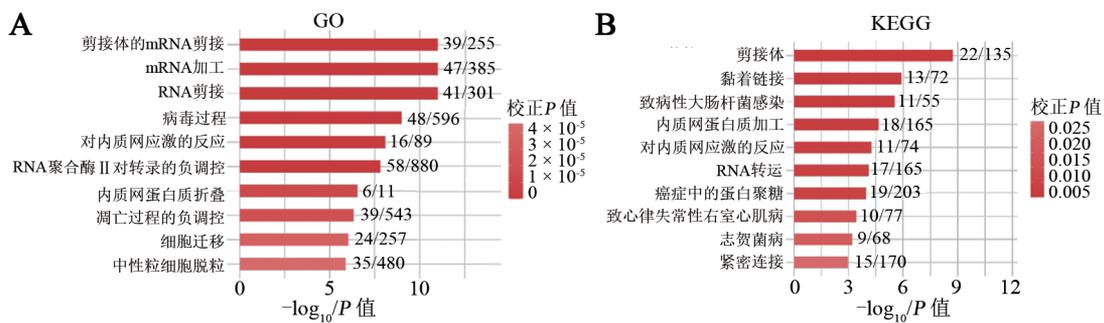


图6 与ENO1结合的基因GO(A)、KEGG(B)分析中重复出现的前10个生物过程

本课题组前期研究^[24]发现, 胃癌组织中ENO1与PKM2表达均上调, 且两者表达呈正相关; 在肺癌、乳腺癌、肾癌、膀胱癌和甲状腺癌中PKM2表达均上调, 参与肿瘤的侵袭和进展。在胃癌中, ENO1是否通过调节PKM2促进糖酵解及肿瘤进展? ENO1调节PKM2的具体调节机制如何? 丙酮酸激酶同工酶有四种, 其中PKM1和PKM2由PKM基因经过选择性的外显子互斥可变剪接产生, 两者仅有22个氨基酸的不同, 是转录过程中同一前体mRNA经不同选择性剪切的产物。PKM2主要以两种形式存在: 高活性的四聚体形式和

低活性的二聚体形式。四聚体形式主要存在于细胞质中, 具有高PKM活性; 与此相反, PKM2二聚体形式经常存在于肿瘤细胞中, 可入核, 具有高蛋白激酶活性, 与核酸和氨基酸的合成密切相关。在胚胎发育过程中, PKM2的表达逐渐消失, 而在肿瘤发生过程中又重新表达, 这对于肿瘤的生长与增殖有重要作用^[25]。研究^[26-28]发现, ENO1可通过AMPK/mTOR、PI3K/AKT、NF- κ B等信号通路激活下游效应因子, 但其在不同实体瘤中主导作用的信号通路有所不同。舒雄等^[29]检测到沉默ENO1后, 胃癌细胞中波形蛋白(vimentin)、snail和神经钙黏素(N-cadherin)的表达

均下调,同时上皮钙黏素(E-cadherin)表达上调,并伴随AKT和PI3K的磷酸化水平降低,提示ENO1可能通过激活PI3K/AKT信号通路影响胃癌细胞的侵袭与转移。另一方面,有研究^[30]提示,PKM2通过调控PI3K/AKT/mTOR信号通路促进胃癌发生。WANG等^[31]研究发现,PKM2过表达使AKT1亚基1的S202/203残基磷酸化,敲低PKM2表达,AKT的磷酸化水平受到明显抑制,使用PI3K抑制剂3-MA后,转染了PKM2-shRNA细胞中AKT的磷酸化水平进一步降低,同时细胞上皮标志物E-cadherin和间质标志物vimentin表达明显受到抑制。因此,敲低PKM2可抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路,激活肿瘤细胞自噬,并降低胃癌细胞的迁移能力。联系到前期实验的结

论,ENO1直接作用于PKM2 mRNA,进一步推测:ENO1可能通过与PKM mRNA结合,影响基因表达或可变剪接,并调控胃癌细胞进程,从而在胃癌发生发展过程中发挥功能。

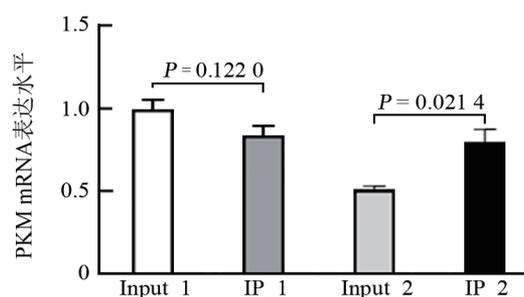


图7 RIP-qPCR法验证ENO1结合PKM mRNA

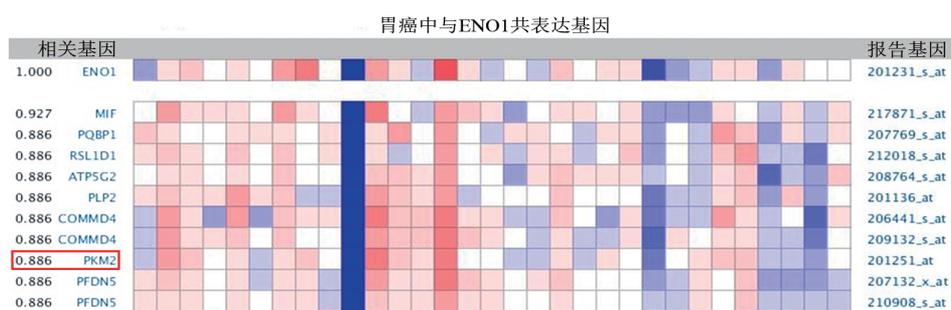


图8 Oncomine数据库分析显示ENO1、PKM2的mRNA表达呈正相关

在本实验中也发现,PKM在ENO1的2次IP重复的数据中,而且结合PEAK基因的信息鉴定ENO1直接结合PKM2。因此,本研究推测ENO1可能通过结合PKM来调控其前体mRNA的可变剪接,引起PKM本身蛋白发生变化,进而发挥功能。结合前期的研究结果,本实验进一步利用Oncomine数据库在线分析了胃癌组织中ENO1与PKM2表达的相关性,结果发现两者mRNA表达的相关系数高达0.886,且两者表达呈正相关关系。结合本实验研究已经证实ENO1是一种RNA结合蛋白,能够靶向直接结合mRNA,基于ENO1与PKM之间的相关性,推测ENO1可能直接与PKM2前体mRNA结合,通过调控PKM2的可变剪接来激活下游信号通路,从而促进肿瘤生长。这也是本课题组后期的一个重要的探索方向。

本研究还存在一定的局限性。尽管已证实ENO1是RNA结合蛋白,但尚未明确其是否直接结合PKM前体mRNA的关键区域(如外显子9侧翼内含子),这可能导致无法排除ENO1通过间接机制调控PKM剪接的可能性。此外,尚未研究ENO1是否与其他剪接因子(如hnRNP、SR蛋白)协同调控PKM剪接。后续实验将采用CLIP-seq/RIP-qPCR方法,在全基因组水平鉴定ENO1结合的RNA靶点,重点关

注PKM pre-mRNA的结合区域。同时,将通过电泳迁移率实验法验证ENO1蛋白与PKM pre-mRNA关键片段的直接结合。总之,本研究初步揭示了ENO1可能通过调控PKM可变剪接影响肿瘤代谢,但仍需进一步提供直接结合证据、深入解析机制以及进行体内功能验证。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI:10.3322/caac.21660.
- [2] JIA X Y, LI Z T, ZHOU R Y, *et al.* Single cell and bulk RNA sequencing identifies tumor microenvironment subtypes and chemoresistance-related IGF1⁺ cancer-associated fibroblast in gastric cancer[J/OL]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2024, 1870(4): 167123[2024-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38484940/>. DOI:10.1016/j.bbadis.2024.167123.
- [3] XIE M L, LIANG L, YU L Y, *et al.* The integration of bulk and single-cell sequencing data revealed the function of FKBP10 in the gastric cancer microenvironment[J]. Transl Cancer Res, 2024, 13(2): 975-988. DOI:10.21037/tcr-23-1484.
- [4] POUS A, NOTARIO L, HIERRO C, *et al.* HER2-positive gastric cancer: the role of immunotherapy and novel therapeutic strategies

- [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(14): 11403[2024-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10380453/>. DOI: 10.3390/ijms241411403.
- [5] 汪浩浩, 陈庆杰, 罗长江. 曲妥珠单抗在HER2阳性胃癌中耐药机制研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(7): 728-732. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.07.013.
- [6] ZHONG G C, ZHANG X M, GUO Z, *et al.* Complete remission of advanced pancreatic cancer induced by claudin18.2-targeted CAR-T cell therapy: a case report[J/OL]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1325860[2024-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38487523/>. DOI:10.3389/fimmu.2024.1325860.
- [7] KUBOTA Y, SHITARA K. Zolbetuximab for Claudin18.2-positive gastric or gastroesophageal junction cancer[J/OL]. *Ther Adv Med Oncol*, 2024, 16: 17588359231217967[2024-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38188462/>. DOI:10.1177/17588359231217967.
- [8] QIAO H, WANG Y F, ZHU B D, *et al.* Enolase1 overexpression regulates the growth of gastric cancer cells and predicts poor survival[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(11): 18714-18723. DOI: 10.1002/jcb.29179.
- [9] QIAO H, WANG Y F, YUAN W Z, *et al.* Silencing of ENO1 by shRNA inhibits the proliferation of gastric cancer cells[J/OL]. *Technol Cancer Res Treat*, 2018, 17: 1533033818784411[2024-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29986635/>. DOI: 10.1177/1533033818784411.
- [10] ZHOU X, YAO K, ZHANG L, *et al.* Identification of differentiation-related proteins in gastric adenocarcinoma tissues by proteomics[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2016, 15(5): 697-706. DOI: 10.1177/1533034615595792.
- [11] HUPPERTZ I, PEREZ-PERRI J I, MANTAS P, *et al.* Riboregulation of Enolase 1 activity controls glycolysis and embryonic stem cell differentiation[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(14): 2666-2680. DOI: 10.1016/j.molcel.2022.05.019
- [12] GAUDET P, LOGIE C, LOVERING R C, *et al.* Gene Ontology representation for transcription factor functions[J/OL]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2021, 1864(11/12): 194752[2024-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34461313/>. DOI:10.1016/j.bbagr.2021.194752.
- [13] GAUDET P, DESSIMOZ C. Gene ontology: pitfalls, biases, and remedies[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1446: 189-205. DOI:10.1007/978-1-4939-3743-1_14.
- [14] KANEHISA M, FURUMICHI M, SATO Y, *et al.* KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D587-D592. DOI:10.1093/nar/gkac963.
- [15] KANEHISA M, SATO Y, KAWASHIMA M, *et al.* KEGG as a reference resource for gene and protein annotation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D457-D462. DOI:10.1093/nar/gkv1070.
- [16] WU J M, MAO X Z, CAI T, *et al.* KOBAS server: a web-based platform for automated annotation and pathway identification[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(Web Server issue): W720-W724. DOI: 10.1093/nar/gkl167.
- [17] ADAMS W T, SKOPEK T R. Statistical test for the comparison of samples from mutational spectra[J]. *J Mol Biol*, 1987, 194(3): 391-396. DOI:10.1016/0022-2836(87)90669-3.
- [18] GLICKMAN M E, RAO S R, SCHULTZ M R. False discovery rate control is a recommended alternative to Bonferroni-type adjustments in health studies[J]. *J Clin Epidemiol*, 2014, 67(8): 850-857. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2014.03.012.
- [19] GU J R, ZHONG K Q, WANG L G, *et al.* ENO1 contributes to 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer cells *via* EMT pathway[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1013035[2024-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36620599/>. DOI:10.3389/fonc.2022.1013035.
- [20] HONG M Q, LI T T, XUE W H, *et al.* Genetic engineering of baculovirus-insect cell system to improve protein production[J/OL]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 994743[2024-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36204465/>. DOI: 10.3389/fbioe.2022.994743.
- [21] DINH D T D, KUHL S, GÖRTZ L, *et al.* Expression of ENO1 is up-regulated in low-grade glioma and positively correlated with meningioma grade[J]. *Anticancer Res*, 2022, 42(5): 2319-2326. DOI:10.21873/anticancer.15711.
- [22] ZHANG T, SUN L C, HAO Y J, *et al.* ENO1 suppresses cancer cell ferroptosis by degrading the mRNA of iron regulatory protein 1[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(1): 75-89. DOI:10.1038/s43018-021-00299-1.
- [23] CASTELLO A, HENTZE M W, PREISS T. Metabolic enzymes enjoying new partnerships as RNA-binding proteins[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(12): 746-757. DOI:10.1016/j.tem.2015.09.012.
- [24] 倪田根, 高晨, 周欣, 等. 胃癌组织中烯醇化酶- α 和肿瘤型丙酮酸激酶蛋白的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(5): 524-527. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.011.
- [25] SUN Q, CHEN X X, MA J H, *et al.* Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(10): 4129-4134. DOI:10.1073/pnas.1014769108.
- [26] ZHAN P P, ZHAO S H, YAN H, *et al.* α -enolase promotes tumorigenesis and metastasis *via* regulating AMPK/mTOR pathway in colorectal cancer[J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(5): 1427-1437. DOI:10.1002/mc.22603.
- [27] SHI Y Q, LIU J, ZHANG R Y, *et al.* Targeting endothelial ENO1 (alpha-enolase) -PI3K-Akt-mTOR axis alleviates hypoxic pulmonary hypertension[J]. *Hypertension*, 2023, 80(5): 1035-1047. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.19857.
- [28] SONG Y, LUO Q, LONG H, *et al.* Correction: Alpha-enolase as a potential cancer prognostic marker promotes cell growth, migration, and invasion in glioma[J/OL]. *Mol Cancer*, 2015, 13: 235[2024-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25600072/>. DOI:10.1186/1476-4598-13-235.
- [29] 舒雄, 刘辉琦, 潘韵芝, 等. ENO1在胃癌干细胞中表达及其与胃癌侵袭转移的相关性研究[J]. *中国肿瘤*, 2019, 28(2): 143-149. DOI:10.11735/j.issn.1004-0242.2019.02.A013.
- [30] OHTSU A, AJANI J A, BAI Y X, *et al.* Everolimus for previously treated advanced gastric cancer: results of the randomized, double-blind, phase III GRANITE-1 study[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(31): 3935-3943. DOI:10.1200/JCO.2012.48.3552.
- [31] WANG C, JIANG J L, JI J, *et al.* PKM2 promotes cell migration and inhibits autophagy by mediating PI3K/AKT activation and contributes to the malignant development of gastric cancer[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2886[2024-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28588255/>. DOI:10.1038/s41598-017-03031-1.

[收稿日期] 2024-09-03

[修回日期] 2025-06-05

[本文编辑] 党瑞山