

POT1对黑色素瘤细胞生物学行为及DNA修复相关分子表达的研究

曾琳茜,姚越,王斌,王冬雪,朱青,张国强*

(河北医科大学第一医院皮肤美容整形学科,河北石家庄050031)

[摘要] 目的 探究端粒保护蛋白1(protection of telomeres 1, POT1)对黑色素瘤细胞生物学行为及DNA修复相关分子表达的影响。方法 使用小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)技术敲低黑色素瘤A2058和A375细胞中POT1的表达。通过细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK8)实验、细胞划痕实验和transwell实验检测细胞增殖、迁移和侵袭能力。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)和蛋白质免疫印迹法验证敲低效率并检测线粒体凋亡相关分子包括B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma 2, Bcl2)、Bcl2相关X蛋白(Bcl2-associated X protein, Bax)、半胱天冬酶3(cysteine-aspartic acid protease 3, Caspase3)及DNA损伤修复相关分子包括DNA连接酶3(DNA ligase 3, LIG3)、磷酸化组蛋白H2A.X(phosphorylated histone H2A.X, γ H2A.X)、剪切型聚ADP核糖聚合酶1[cleaved poly(ADP-ribose) polymerase 1, c-PARP1]的表达水平。结果 与对照组相比, A2058细胞和A375细胞敲低组POT1 mRNA和蛋白表达水平显著下降($P<0.05$)。CCK8结果显示2种细胞的敲低组在24 h、48 h、72 h和96 h的光密度(optical density, OD)值均低于对照组, 组间、时点间、组间·时点间交互作用差异有统计学意义($P<0.05$)。细胞划痕实验显示2种细胞敲低组的划痕愈合率显著低于对照组($P<0.05$)。Transwell实验显示2种细胞的敲低组穿过基底膜的细胞数较对照组均显著降低($P<0.05$)。在敲低POT1后, 2种细胞Bcl2 mRNA表达均显著下调($P<0.05$), Bax mRNA表达显著上调($P<0.05$), 蛋白免疫印迹结果与之一致($P<0.05$), 且敲低组Caspase3蛋白表达量高于对照组($P<0.05$)。2种细胞敲低组LIG3、 γ H2A.X、c-PARP1的蛋白表达均显著上调($P<0.05$)。结论 敲低POT1可使黑色素瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力下降, 激活线粒体凋亡途径并上调DNA修复相关分子的表达。

[关键词] 黑色素瘤; POT1; 细胞增殖; 细胞凋亡 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2026.05.005

[中图分类号] R739.5 **[文献标志码]** AA **[文章编号]** 1007-3205(2026)05-0527-09

Study on the effect of POT1 on biological behavior of melanoma cells and the expression of DNA repair-related molecules

ZENG Lin-xi, YAO Yue, WANG Bin, WANG Dong-xue, ZHU Qing, ZHANG Guo-qiang*

(Discipline of Dermatology and Cosmetic Plastic Surgery, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of protection of telomeres 1 (POT1) on the biological behavior of melanoma cells and the expression of DNA repair-related molecules. **Methods** Small interfering RNA (siRNA) technology was used to knock down POT1 expression in melanoma A2058 and A375 cells. Cell proliferation, migration, and invasion were assessed using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay, wound healing assay, and Transwell assay. The knockdown efficiency was verified, and the expression levels of mitochondrial apoptosis-related molecules including B-cell lymphoma 2 (Bcl2), Bcl2-associated X protein (Bax), and cysteine-aspartic acid protease 3 (Caspase3), as well as DNA damage repair-related molecules including DNA ligase 3 (LIG3), phosphorylated histone H2A.X (γ H2A.X), and cleaved poly(ADP-ribose) polymerase 1 (c-PARP1), were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting. **Results**

[收稿日期]2026-01-27

[基金项目]河北省自然科学基金(H2022206568)

[作者简介]曾琳茜(1998-),女,四川内江人,河北医科大学第一医院医师,医学硕士,从事皮肤疾病诊治研究。

*通信作者。E-mail:57702800@hebm.u.edu.cn



Compared with the control group, the expression levels of POT1 mRNA and protein in the A2058 and A375 cell knockdown groups were significantly decreased ($P < 0.05$). The CCK8 assay showed that the optical density (OD) values of the knockdown groups of both cell lines at 24 h, 48 h, 72 h and 96 h were significantly lower than those of the control groups, and significant differences were found for the between-group effect, time effect, or group-by-time interaction effect ($P < 0.05$). The wound healing assay indicated that the cell migration rate in the knockdown groups of both cell lines was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). Transwell assay demonstrated that the number of cells passing through the basement membrane in the knockdown groups of both cell types was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). After POT1 knockdown, the mRNA expression levels of Bcl2 in A2058 and A375 cells were significantly downregulated ($P < 0.05$), while the Bax mRNA levels were significantly upregulated in both cell lines ($P < 0.05$), which was consistent with the Western blotting results ($P < 0.05$). Meanwhile, the expression levels of Caspase3 protein in the knockdown groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). In addition, the protein expression levels of LIG3, γ H2A.X and c-PARP1 in the knockdown groups of both cell lines were significantly upregulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Knockdown of POT1 can reduce the proliferation, migration and invasion abilities of melanoma cells, activate the mitochondrial apoptotic pathway and affect the expression of DNA repair-related molecules.

[Key words] melanoma; POT1; cell proliferation; apoptosis

黑色素瘤是一种恶性程度高、易转移、预后差的皮肤肿瘤^[1]。尽管靶向与免疫治疗显著改善了患者生存率,但耐药及耐受等问题依然突出^[2-3],探寻新的治疗靶点及机制仍具有重要临床价值。端粒是真核生物染色体末端的保护性结构,其长度的维持与细胞的衰老、凋亡及恶性转化密切相关^[4]。端粒保护蛋白1 (protection of telomeres 1, POT1) 直接结合于端粒单链DNA,在维持端粒稳定性和长度调控中起关键作用^[5]。研究^[6-9]显示POT1种系功能失调性变异与常染色体显性遗传家族性癌症综合征有关,如皮肤黑色素瘤、慢性淋巴细胞白血病、血管肉瘤和胶质瘤等,这些变异多位于寡核苷酸/寡糖结合折叠域,所产生的突变蛋白无法结合端粒DNA,常导致端粒异常延长,从而增加黑色素瘤的发病风险^[10]。DNA双链断裂修复是维持基因组稳定的核心过程。非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 是其核心修复途径之一,可分为经典非同源末端连接和替代性非同源末端连接 (alternative non-homologous end joining, A-NHEJ)。NHEJ通路在黑色素瘤的DNA损伤应答中至关重要^[10]。DNA连接酶3 (DNA ligand 3, LIG3) 是A-NHEJ的关键调节因子^[11],有研究^[12]提示POT1可能通过影响LIG3的蛋白稳定性来调控A-NHEJ效率。磷酸化组蛋白H2A.X (phosphorylated histone H2A.X, γ H2A.X) 是DNA双链断裂的主要组蛋白标志物,当DNA受损时, γ H2A.X会在损伤区域迅速磷酸化,招募其他修复蛋白来修复受损DNA区域^[13]。而当DNA损伤过于严重时,半胱

天冬酶3 (cysteine-aspartic acid protease 3, Caspase3) 活化并切割聚ADP核糖聚合酶1 [poly (ADP-ribose) polymerase 1, PARP1] 为剪切型PARP1 [cleaved poly (ADP-ribose) polymerase 1, c-PARP1], 后者是细胞修复失败走向凋亡的标志^[14]。DNA损伤修复与细胞凋亡间有着紧密关联。当DNA损伤较轻时,细胞会启动修复程序,通过多种修复途径完成损伤修复,保持基因的完整性。当超出修复能力时,细胞则会启动凋亡程序清除受损细胞,防止基因组不稳定性的传递^[15]。这一过程对于肿瘤细胞的存活至关重要,而POT1是否参与其中目前尚缺乏系统研究。本研究在体外水平对POT1在皮肤黑色素瘤细胞中的作用及其对DNA损伤修复的影响进行探索,旨在能为黑色素瘤的靶向治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 主要试剂包括 Lipofectamine 3000 (美国 Invitrogen 公司), 敲低 POT1 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) (上海吉玛制药有限公司), 高糖型 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) (美国 Gibco 公司), 胎牛血清 (武汉 Servicebio 公司), 兔抗人 POT1、LIG3、 γ H2A.X、B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl2)、Bcl2 相关 X 蛋白 (Bcl2-associated X protein, Bax)、Caspase3、c-PARP1 及 GAPDH 抗体 (武汉 Proteintech 公司), Matrigel 胶 (北京 BD 公司),

细胞计数试剂盒8 (cell counting kit-8, CCK8) (上海翊圣生物)。

实验仪器包括低速离心机 (湖南赫西仪器装备有限公司), 低温高速离心机 (德国Eppendorf公司), 细胞培养箱、超净工作台、聚合酶链式反应仪 (美国Thermo公司), 酶标仪 (瑞士帝肯公司), 倒置荧光显微镜 (日本Olympus公司), 蛋白电泳仪、蛋白转膜仪 (美国Bio-Rad公司), Odyssey双色红外激光成像分析仪 (美国LI-COR公司), 实时荧光定量聚合酶链式反应仪 (美国Thermo Fisher公司), Transwell侵袭小室 (美国Corning Costar公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人黑色素瘤细胞系A2058由南京皮肤病研究所馈赠, 人黑色素瘤细胞系A375由中国医学科学院皮肤病医院馈赠。2种细胞均采用含10%胎牛血清和1%青-链霉素的DMEM高糖完全培养基培养, 置于37℃、5% CO₂的恒温培养箱中, 待细胞生长至80%~90%融合时, 用0.25%胰酶消化传代, 按1:2~1:3比例接种至新的培养瓶或培养板中, 并维持稳定的生长状态用于后续实验。

1.2.2 细胞转染与分组 将细胞接种于6孔板, 待密度达70%时进行转染。转染前更换新鲜完全培养基。细胞分为2组: ①小干扰RNA阴性对照 (small interfering RNA negative control, si-NC) 组: 转染阴性对照siRNA; ②小干扰RNA靶向POT1基因 (small interfering RNA targeting protection of telomeres 1, si-POT1) 组: 转染靶向POT1的siRNA。参照Lipofectamine 3000说明书, 将siRNA与转染试剂于无血清DMEM中混合, 室温静置15 min形成复合物。弃去旧培养基, PBS洗涤后加入含复合物的新鲜培养基, 继续培养。分别于转染后24 h、48 h、72 h收集细胞用于后续实验。所用siRNA序列如下: POT1-siRNA: 上游5'-GCUCUGGCUUUGAUCUUTT-3', 下游5'-AAAGAUGCAAAGCCTT-3'; 阴性对照siRNA: 上游5'-UUCUCCGAACGUGUCACG-UUTT-3', 下游5'-ACGUGACACGUUCGGAG-AATT-3'。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 提取细胞总RNA, 逆转录合成cDNA, 以GAPDH为内参基因, 使用SYBR Green法进行检测。引物序列如下: GAPDH上游: 5'-GGGAGCCAAA-

AGGGTCATCA-3', 下游: 5'-GCATGGACT-GTGGTCATGAGT-3'; POT1上游: 5'-AGC-CCCTATCATACCTCGCA-3', 下游: 5'-TGG-TGCCATCCCATACTTTAG-3'; Bcl2上游: 5'-GGGATTCCTGCGGATTGACA-3', 下游: 5'-AGTCTACTTCTCTGTGATGTGTTG-3'; Bax上游: 5'-AAACTGGTGCTCAAGGCC-3', 下游: 5'-GTCTTGAGATCCAGCCCAA-CA-3'; LIG3上游: 5'-GCTACTTCAGCCGC-AGTCTCAA-3', 下游: 5'-GCAGTGGTTTG-CCTGTCTTGTTG-3'。反应体系包括2×SYBR Green Master Mix、上下游引物及cDNA模板, 反应条件为: 95℃预变性30 s, 95℃变性15 s, 60℃退火10 s, 72℃延伸30 s, 共40个循环。采用2^{-ΔΔCt}法计算mRNA相对表达量。

1.2.4 蛋白质免疫印迹实验 收集转染后的A2058和A375细胞, 加入含磷酸化蛋白酶抑制剂的裂解液冰上裂解10 min, 4℃、14 000 g离心5 min, 取上清。加入5×蛋白上样缓冲液, 100℃加热10 min, -20℃保存。配制10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶进行电泳, 转膜至聚偏氟乙烯膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭2 h。分别用兔抗人POT1 (1:800)、LIG3 (1:5 000)、γH2A.X (1:2 000)、c-PARP1 (1:5 000)、Bax (1:10 000)、Bcl2 (1:7 000)、Caspase3 (1:1 500) 及GAPDH (1:7 000) 抗体4℃孵育过夜, TBST洗涤后以相应二抗 (1:1 000) 室温孵育1 h。使用Odyssey CLx成像系统显影, 以GAPDH为内参进行灰度分析。

1.2.5 CCK-8实验 将转染后的A2058及A375细胞以每孔5×10³个密度接种于96孔板, 每组设6个复孔, 孔板周边孔加PBS以减小蒸发影响。分别于0 h、24 h、48 h、72 h、96 h各孔加入10 μL CCK-8试剂, 37℃孵育2 h后, 用酶标仪测定450 nm处光密度 (optical density, OD) 值。实验独立重复3次。

1.2.6 细胞划痕实验 将转染后的黑色素瘤A2058及A375细胞接种于6孔板中培养。待细胞长满单层后, 用200 μL枪头在各孔中央划直线。PBS冲洗2次以去除脱落细胞, 加入不含血清的DMEM培养基继续培养。分别在0 h和24 h于显微镜下观察并拍照, 计算划痕愈合面积变化率。

1.2.7 Transwell侵袭实验 在24孔板小室上室铺20 μL Matrigel胶于37℃过夜包被。收集转染后细胞, 用无血清DMEM重悬并调整浓度为2×

10⁵个/mL。上室加 200 μL 细胞悬液，下室加 600 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基，培养 24 h。取出小室，擦除 Matrigel 胶及未穿膜细胞，PBS 清洗 3 次，甲醛固定 20 min。晾干后结晶紫染色 20 min，显微镜下观察并拍照计数。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析。采用 Image J 软件进行蛋白免疫印迹条带灰度值分析。符合正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，比较采用独立样本 *t* 检验、Dunnett 多重比较检验和重复测量方差分析；不符合正态分布的计量资料以 [M (QR)] 表示，比较采用秩和检验分析。若不满足球形假设，采用 Greenhouse-Geisser 法校正。多重比较采用 Bonferroni 法校正。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 siRNA 转染有效降低黑色素瘤细胞中 POT1 的表达 通过 qRT-PCR 检测 siRNA 转染 48 h 后 A2058 和 A375 细胞中 POT1 mRNA 的表达水平。

结果显示，在 A2058 细胞中，si-POT1 组 POT1 mRNA 表达量低于对照组，差异有统计学意义 (*P* < 0.05)；在 A375 细胞中，si-POT1 组 POT1 mRNA 表达量较对照组降低，差异有统计学意义 (*P* < 0.05)，见表 1。蛋白免疫印迹结果显示，2 种细胞 si-POT1 组 POT1 蛋白表达量均明显低于 si-NC 组，见图 1、表 2。表明 siRNA 转染可有效降低 POT1 的表达。

表 1 si-POT1 转染对黑色素瘤 A2058 和 A375 细胞中 POT1 mRNA 表达水平的影响

Table 1 Effect of si-POT1 transfection on the expression levels of POT1 mRNA in melanoma A2058 and A375 cells (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	A2058 细胞 POT1 mRNA 水平	A375 细胞 POT1 mRNA 水平
si-NC 组	1.000 ± 0.011	1.002 ± 0.073
si-POT1 组	0.248 ± 0.067	0.373 ± 0.019
<i>t</i> 值	19.184	14.443
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

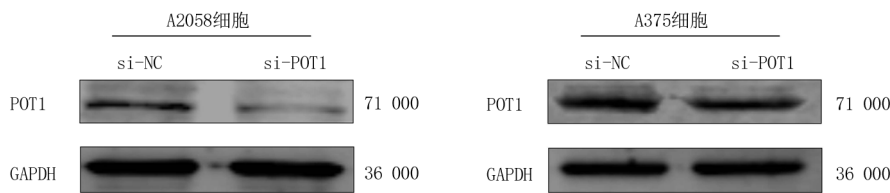


图 1 si-POT1 转染对黑色素瘤 A2058 和 A375 细胞 POT1 蛋白表达水平的影响

Figure 1 Effect of si-POT1 transfection on the protein expression levels of POT1 in melanoma A2058 and A375 cells

表 2 si-POT1 转染对黑色素瘤 A2058 和 A375 细胞 POT1 蛋白表达水平的影响

Table 2 Effect of si-POT1 transfection on the expression levels of POT1 protein in melanoma A2058 and A375 cells (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	A2058 细胞 POT 蛋白水平	A375 细胞 POT 蛋白水平
si-NC 组	0.896 ± 0.019	0.925 ± 0.038
si-POT1 组	0.536 ± 0.051	0.664 ± 0.037
<i>t</i> 值	11.457	8.524
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

2.2 敲低 POT1 显著抑制黑色素瘤细胞的增殖能力 采用 CCK-8 法检测 si-NC 组与 si-POT1 组在 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 的细胞增殖情况。在 A2058 细胞中，随着时间延长，si-NC 和 si-POT1 组的 OD 值均呈升高态势，且 si-POT1 组的 OD 值显著低于 si-NC 组。2 组在组间、时点间及组间·时点间交互作用比较差异均有统计学意义 (*P* < 0.001)，见表 3。在 A375 细胞中亦观察到相同趋

势，si-POT1 组在各时间点的增殖能力均低于对照组 2 组在组间、时点间及组间·时点间交互作用比较差异均有统计学意义 (*P* < 0.001)，见表 4。

2.3 敲低 POT1 显著抑制黑色素瘤细胞的迁移能力 通过划痕实验检测 2 种细胞 si-NC 组与 si-POT1 组在 0 h 和 24 h 的划痕愈合率 (图 2A~B)。结果显示，在 A2058 细胞中，si-POT1 组的迁移率较对照组下降；在 A375 细胞中，si-POT1 组的迁移率低于对照组，差异有统计学意义 (*P* < 0.05)，表明敲低 POT1 可显著抑制黑色素瘤细胞的迁移能力，见表 5。

2.4 敲低 POT1 显著抑制黑色素瘤细胞的侵袭能力 Transwell 侵袭实验显示，在 A2058 细胞中，si-POT1 组穿过基底膜的细胞数显著低于对照组；在 A375 细胞中，si-POT1 组穿过基底膜的细胞数低于对照组的，差异有统计学意义 (*P* < 0.05)，见表 6，图 3，表明敲低 POT1 可显著抑制黑色素瘤细胞的侵袭能力。

表3 敲低POT1基因对黑色素瘤A2058细胞增殖能力的影响

Table 3 Effect of POT1 gene knockdown on the proliferation ability of melanoma A2058 cells

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	OD值				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
si-NC组	0.409±0.015	0.691±0.050	0.794±0.047	1.064±0.040	2.253±0.048
si-POT1组	0.407±0.024	0.525±0.029	0.531±0.033	0.549±0.049	0.771±0.052
组间			F值=15.430	P值<0.001	
时点间			F值=131.200	P值<0.001	
组间·时点间			F值=6.825	P值<0.001	

表4 敲低POT1基因对黑色素瘤A375细胞增殖能力的影响

Table 4 Effect of POT1 gene knockdown on the proliferation ability of melanoma A375 cells

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	OD值				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
si-NC组	0.514±0.020	0.789±0.036	0.902±0.029	1.188±0.046	2.367±0.054
si-POT1组	0.505±0.019	0.641±0.032	0.716±0.034	0.898±0.054	1.077±0.054
组间			F值=5.682	P值=0.044	
时点间			F值=278.900	P值<0.001	
组间·时点间			F值=18.320	P值<0.001	

表5 敲低POT1基因对黑色素瘤A2058与A375细胞迁移能力的影响。

Table 5 Effect of POT1 gene knockdown on the migration ability of melanoma A2058 and A375 cells

(n=3, $\bar{x} \pm s, \%$)

组别	A2058细胞划痕愈合率	A375细胞划痕愈合率
si-NC组	39.280±1.209	44.457±2.347
si-POT1组	23.942±1.802	25.577±2.066
t值	12.243	10.592
P值	<0.001	<0.001

表6 敲低POT1基因对黑色素瘤A2058与A375细胞侵袭能力的影响

Table 6 Effect of POT1 gene knockdown on the invasion ability of melanoma A2058 and A375 cells

(n=3, $\bar{x} \pm s, \text{个}$)

组别	A2058侵袭细胞数目	A375侵袭细胞数目
si-NC组	171.000±9.092	193.667±8.731
si-POT1组	93.333±5.312	105.000±12.675
t值	12.776	9.976
P值	<0.001	<0.001

2.5 敲低POT1调控线粒体凋亡相关分子的表达 qRT-PCR结果显示,在A2058细胞中,si-POT1组Bcl2 mRNA表达低于si-NC组;Bax mRNA表达高于si-NC组,差异有统计学意义

($P<0.05$)。在A375细胞中,si-POT1组Bcl2 mRNA表达低于si-NC组,Bax mRNA表达高于si-NC组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表7。蛋白免疫印迹结果显示2种细胞si-POT1组Bax和

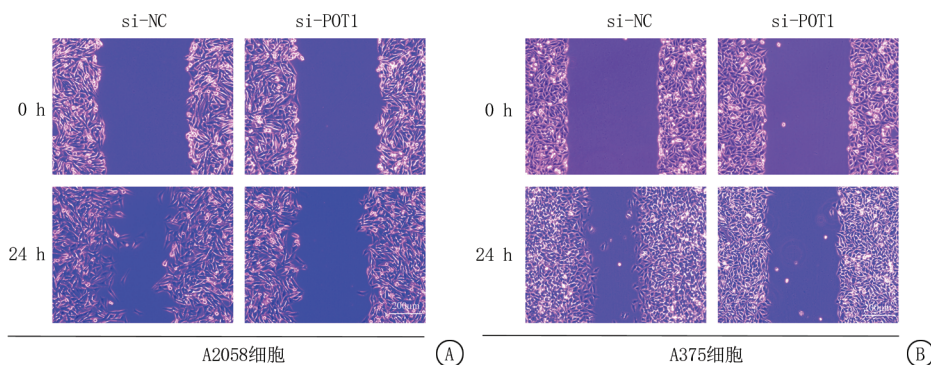


图2 敲低POT1基因对黑色素瘤A2058(A)与A375(B)细胞迁移能力的影响
A. A2058细胞的划痕实验; B. A375细胞的划痕实验

Figure 2 Effect of POT1 gene knockdown on the migration ability of melanoma A2058 (A) and A375 (B) cells

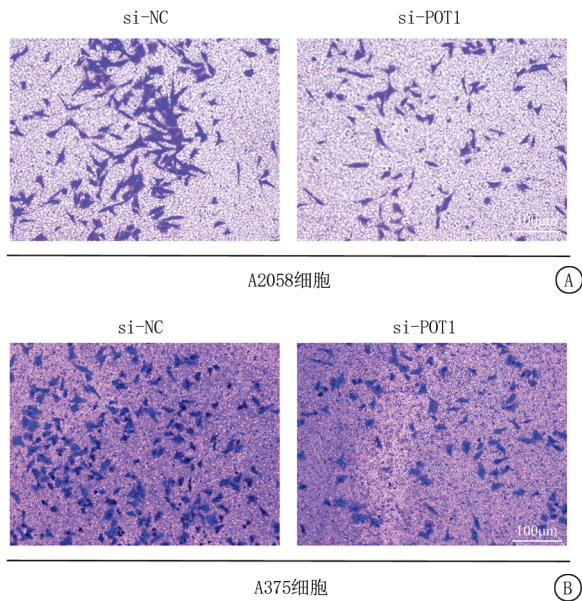


图3 敲低 POT1 基因对黑色素瘤 A2058 与 A375 细胞侵袭能力的影响
A. A2058 细胞; B. A375 细胞

Figure 3 Effect of POT1 gene knockdown on the invasion ability of melanoma A2058 and A375 cells

Caspase3 蛋白表达均显著高于 si-NC 组, Bcl2 蛋白表达相反, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4, 表 8。以上结果提示, 敲低 POT1 可能通过调控 Bcl2/Bax/Caspase3 轴激活线粒体凋亡途径。

2.6 敲低 POT1 影响 DNA 修复相关分子的表达
qRT-PCR 结果显示, 在 A2058 细胞中, si-

表 7 敲低 POT1 基因对黑色素瘤 A2058 与 A375 细胞中 Bcl2 与 Bax 基因 mRNA 表达水平的影响

Table 7 Effect of POT1 gene knockdown on the expression levels of Bcl2 and Bax gene mRNA in melanoma A2058 and A375 cells

组别	A2058 细胞		A375 细胞	
	Bcl2	Bax	Bcl2	Bax
si-NC 组	1.001±0.069	1.007±0.169	1.003±0.105	1.002±0.095
si-POT1 组	0.511±0.046	1.744±0.070	0.469±0.041	1.802±0.022
t 值	10.213	7.042	8.164	14.242
P 值	0.001	0.002	0.001	<0.001

表 8 敲低 POT1 基因对黑色素瘤 A2058 与 A375 细胞中 Bcl-2, Bax 和 Caspase 蛋白表达水平的影响

Table 8 Effect of POT1 gene knockdown on the protein expression levels of Bcl-2, Bax and Caspase3 in melanoma A2058 and A375 cells

组别	A2058 细胞			A375 细胞		
	Bcl2	Bax	Caspase3	Bcl2	Bax	Caspase3
si-NC 组	1.043±0.047	0.775±0.037	0.791±0.052	1.162±0.061	0.864±0.050	0.838±0.057
si-POT1 组	0.817±0.066	1.058±0.064	0.970±0.062	0.747±0.051	1.145±0.044	1.143±0.042
t 值	4.831	6.631	3.831	9.040	7.308	7.461
P 值	0.008	0.003	0.018	0.001	0.002	0.002

POT1 组 LIG3 mRNA 表达高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 在 A375 细胞中, si-POT1 组 LIG3 mRNA 表达高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 9。蛋白免疫印迹实验显示, 敲低 POT1 后 DNA 修复相关蛋白 LIG3、 γ H2A.X 和 c-PARP1 的表达较对照组均升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明敲低 POT1 可能参与 DNA 修复并诱导细胞凋亡, 见图 5, 表 10。

3 讨 论

黑色素瘤是一种黑素细胞来源的高度恶性肿瘤, 发病率和死亡总数每年持续上升^[16]。近年来, 靶向治疗和免疫治疗的进展为黑色素瘤患者带来了新的希望, 但仍面临晚期转移、耐药性等挑战。因此, 识别新的治疗靶点依然至关重要。POT1 作为端粒保护蛋白复合体的成员之一, 近年来越来越多的研究^[17-18] 显示其功能缺失与家族性黑色素瘤的易感性密切相关。Bakr 等^[19] 显示 POT1 p.G95V 变体破坏端粒结合导致功能的丧失。已有研究^[20] 报道小分子抑制剂可干扰 POT1 与端粒 DNA 的结合, 诱导肿瘤细胞凋亡。本研究通过敲低黑色素瘤 A2058 和 A375 细胞中 POT1 的表达, 初步探讨了 POT1 对黑色素瘤细胞恶性表型的影响及其可能涉及的分子机制。

端粒能够保护染色体末端免受降解和不适当的 DNA 损伤反应的影响, 而 POT1 作为保护蛋白

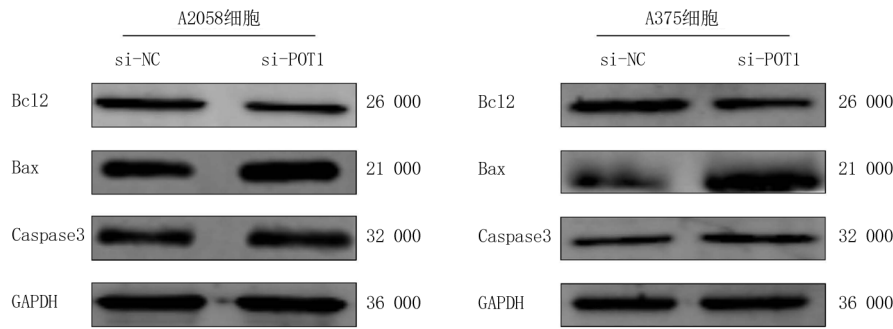


图4 敲低 POT1 基因对黑色素瘤 A2058 与 A375 细胞中 Bcl2、Bax、Caspase3 蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of POT1 gene knockdown on the expression of Bcl2, Bax and Caspase3 protein in melanoma A2058 and A375 cells

表9 敲低 POT1 对黑色素瘤 A2058 和 A375 中 LIG3 mRNA 表达的影响

Table 9 Effect of POT1 gene knockdown on the expression levels of LIG3 mRNA in melanoma A2058 and A375 cells

(n=3, $\bar{x} \pm s$)		
组别	A2058 细胞	A375 细胞
si-NC 组	1.000 ± 0.070	1.000 ± 0.308
si-POT1 组	1.610 ± 0.087	2.314 ± 0.009
t 值	9.462	7.386
P 值	0.001	0.002

复合体的核心成分，会直接与单链端粒 DNA 结合，以防止 DNA 损伤通路的激活。POT1 功能的

丧失与端粒功能障碍和基因组不稳定有关，最终可能导致细胞生长停滞或死亡^[21]。本研究在 POT1 基因敲除后观察到的黑色素瘤细胞增殖、迁移和侵袭的抑制现象，与 POT1 在维持端粒和基因组稳定性方面所发挥的关键作用相一致。POT1 缺失后迁移和侵袭显著减少这一点尤为重要，因为转移仍然是黑色素瘤相关死亡的重要原因之一。

细胞凋亡是一种被严格控制的程序性细胞死亡，线粒体途径介导的内源性凋亡是经典凋亡途径之一。Bcl2 家族蛋白是内在凋亡途径的关键调节因子，而 Bax/Bcl2 比值则决定了细胞对凋亡刺激的敏感性。Caspase3 作为凋亡程序的执行者，意

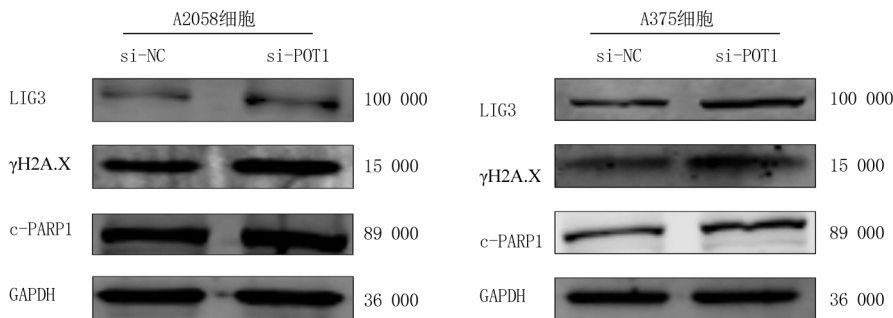


图5 敲低 POT1 基因对黑色素瘤 A2058 与 A375 细胞中 LIG3、γH2A.X 和 c-PARP1 蛋白表达的影响

Figure 5 Effect of POT1 gene knockdown on the expression of LIG3, γH2A.X and c-PARP1 protein in melanoma A2058 and A375 cells

表10 敲低 POT1 基因对黑色素瘤 A2058 与 A375 细胞中 LIG3、γH2A.X 和 c-PARP1 蛋白表达的影响

Table 10 Effect of POT1 gene knockdown on the expression of LIG3, γH2A.X and c-PARP1 protein in melanoma A2058 and A375 cells

(n=3, $\bar{x} \pm s$)						
组别	A2058 细胞			A375 细胞		
	LIG3	γH2A.X	c-PARP1	LIG3	γH2A.X	c-PARP1
si-NC 组	0.415 ± 0.073	0.625 ± 0.078	0.611 ± 0.026	0.662 ± 0.056	0.674 ± 0.050	0.751 ± 0.031
si-POT1 组	0.585 ± 0.035	1.040 ± 0.033	0.858 ± 0.070	1.099 ± 0.027	1.039 ± 0.065	1.057 ± 0.057
t 值	3.627	8.634	5.707	12.172	7.663	8.077
P 值	0.022	0.001	0.005	<0.001	0.002	0.001

味着凋亡进入不可逆的阶段^[22]。本研究显示,在敲低POT1基因后,Bax mRNA及蛋白表达水平升高,Bcl2则降低,Bax/Bcl2比值增加,同时Caspase3蛋白表达水平升高,提示线粒体凋亡途径的激活。此外,本研究还显示敲低POT1后c-PARP1蛋白表达升高。c-PARP1是由激活的Caspase3作用于PARP1产生的裂解产物,也是细胞凋亡执行的证据^[23]。这一显示进一步证实了敲低POT1可诱导黑色素瘤细胞凋亡,同时也提示DNA修复相关蛋白PARP1功能遭到破坏,进入不可逆的凋亡执行程序。

DNA损伤修复对维持基因组稳定性至关重要,同时在癌症中扮演着复杂的角色^[24]。在POT1缺失后观察到 γ H2A.X水平升高提示存在DNA损伤累积,这很可能是由端粒功能障碍引起的。作为核心的保护蛋白,POT1保护端粒免受DNA损伤位点的影响。当POT1缺失时,未受保护的端粒触发DNA损伤信号, γ H2A.X作为DNA双链断裂的标志物表达相应升高。这一解释得到了相关研究的支持:敲低POT1会延缓辐射诱导的端粒DNA损伤的修复,并增强放射敏感性,同时伴随着基因组不稳定性的发生,包括染色体融合和微核。从机制上讲,POT1与磷酸化的共济失调毛细血管扩张症突变蛋白(ataxia telangiectasia mutated, ATM)相互作用,POT1的缺失会降低磷酸化ATM的水平,这表明POT1可能通过ATM调节DNA损伤信号传导^[13]。这些显示进一步巩固了POT1在端粒维持和DNA损伤反应中的地位。

LIG3是一种参与碱基切除修复和A-NHEJ的多功能连接酶^[25],本研究显示敲低POT1后LIG3的mRNA和蛋白表达显著升高,这意味着可能存在一种补偿性的修复尝试。这一显示与Yu等^[12]研究结果一致,即POT1过度表达会抑制LIG3的稳定性,这证实了POT1对LIG3具有负向调节作用。Yu等^[12]研究侧重于NHEJ调控的分子机制,而本研究侧重细胞凋亡和转移障碍在内的生物学后果。这些互补的研究结果表明POT1在DNA修复过程中扮演着重要的角色。同时,c-PARP1的升高表明这些修复尝试最终失败,细胞转而进入凋亡程序。

本研究存在一些局限性。首先,实验仅在体外进行,难以模拟体内复杂的肿瘤微环境。其次,POT1对LIG3的具体调节机制仍需要进一步研究。此外,本研究结果的临床相关性仍有待证实。未来的研究应检测临床黑色素瘤样本中的POT1表达

情况,并将其与肿瘤分期、转移情况以及患者生存率等进行关联分析。还应通过功能修复实验明确POT1对DNA修复合活性的影响,利用裸鼠移植瘤模型验证体内抗肿瘤效应,并深入探究POT1与LIG3之间的调控机制。同时,本研究仅检测线粒体途径部分分子,后续需结合多方法深入验证。

综上所述,本研究证实敲低POT1能显著抑制A2058和A375黑色素瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,诱导线粒体凋亡,并上调DNA损伤反应相关分子,为POT1作为黑色素瘤潜在治疗靶点提供了新的实验依据,也为后续深入研究POT1在黑色素瘤中的分子机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Long GV, Swetter SM, Menzies AM, et al. Cutaneous melanoma[J]. *Lancet*, 2023, 402(10400):485-502.
- [2] Ponzzone L, Audrito V, Landi C, et al. RICTOR/mTORC2 downregulation in BRAF(V600E) melanoma cells promotes resistance to BRAF/MEK inhibition[J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1):105.
- [3] Zheng DX, Bozym DJ, Tarantino G, et al. Overcoming resistance mechanisms to melanoma immunotherapy[J]. *Am J Clin Dermatol*, 2025, 26(1):77-96.
- [4] Tsatsakis A, Oikonomopoulou T, Nikolouzakis TK, et al. Role of telomere length in human carcinogenesis (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2023, 63(1):78.
- [5] Zade NH, Khattar E. POT1 mutations cause differential effects on telomere length leading to opposing disease phenotypes[J]. *J Cell Physiol*, 2023, 238(6):1237-1255.
- [6] López Riquelme I, Martínez García S, Serrano Ordóñez A, et al. Germline mutations predisposing to melanoma and associated malignancies and syndromes: A narrative review[J]. *Int J Dermatol*, 2025, 64(6):1027-1041.
- [7] Abu Shtaya A, Kedar I, Bazak L, et al. A POT1 founder variant associated with early onset recurrent melanoma and various solid malignancies[J]. *Genes*, 2024, 15(3):355.
- [8] Andreotti V, Vanni I, Pastorino L, et al. Germline POT1 variants: A critical perspective on POT1 tumor predisposition syndrome[J]. *Genes*, 2024, 15(1):104.
- [9] Baptista Freitas M, Desmyter L, Badoer C, et al. POT1 tumour predisposition: A broader spectrum of associated malignancies and proposal for additional screening program[J]. *Eur J Hum Genet*, 2024, 32(8):980-986.
- [10] Mansoubi S, Mohsenpour M. Comparison of telomere structure in eukaryotes[J]. *Arch Razi Inst*, 2024, 79(6):1365-1374.
- [11] Medina-Suárez D, Han L, O'Reilly S, et al. Lig3-dependent rescue of mouse viability and DNA double-strand break repair by catalytically inactive Lig4[J]. *Nucleic Acids Res*, 2025, 53(2):gkae1216.

- [12] Yu Y, Tan R, Ren Q, et al. POT1 inhibits the efficiency but promotes the fidelity of nonhomologous end joining at non-telomeric DNA regions[J]. *Aging*, 2017, 9(12):2529-2543.
- [13] Prabhu KS, Kuttikrishnan S, Ahmad N, et al. H2AX: A key player in DNA damage response and a promising target for cancer therapy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 175: 116663.
- [14] Deeksha W, Abhishek S, Giri J, et al. Regulation of PARP1 and its apoptotic variant activity by single-stranded DNA[J]. *FEBS J*, 2023, 290(18):4533-4542.
- [15] 程洪艳, 栾文庆, 昌晓红. DNA损伤修复相关通路的合成致死靶点研究及其在卵巢癌中的应用和前景[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2024, 40(6):740-748.
- [16] Shah M, Schur N, Rosenberg A, et al. Trends in melanoma incidence and mortality [J]. *Dermatol Clin*, 2025, 43 (3) : 373-379.
- [17] Tsoulaki O, Evans DG, Sinha K, et al. UK clinical practice guidelines for the management of patients with constitutional POT1 pathogenic variants [J]. *J Med Genet*, 2025, 62 (9) : 559-565.
- [18] Maas EJ, DeBortoli E, Nathan V, et al. POT1 and multiple primary melanomas: The dermatological phenotype[J]. *J Med Genet*, 2024, 61(9):891-894.
- [19] Bakr F, Kulkarni A, Mounsey S, et al. Identification and functional validation of a novel pathogenic POT1 germline variant p.G95V in familial melanoma[J]. *J EADV Clin Pract*, 2024, 3(4):1236-1239.
- [20] Altschuler SE, Croy JE, Wuttke DS. A small molecule inhibitor of POT1 binding to telomeric DNA [J]. *Biochemistry*, 2012, 51(40):7833-7845.
- [21] Ueno M. Exploring genetic interactions with telomere protection gene Pot1 in Fission Yeast [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(2):370.
- [22] Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, et al. Apoptosis: A comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications[J]. *Cells*, 2024, 13(22):1838.
- [23] Kim M, Ghosh M, Heo Y, et al. PARP-1 prevents osteoarthritis pathogenesis by inhibiting apoptosis in chondrocytes: An animal study[J]. *Arthritis Res Ther*, 2026, 28(1):36.
- [24] Liang Z, Xu Y, Li CY. DNA repair at the crossroads of tumor immunogenicity and cancer therapy: Harnessing innate and adaptive immune pathways for improved therapeutic outcomes [J]. *DNA Repair*, 2025, 152: 103874.
- [25] Kang X, Li X, Zhou J, et al. Extrachromosomal DNA replication and maintenance couple with DNA damage pathway in tumors[J]. *Cell*, 2025, 188(13):3405-3421.

(本文编辑:何祯)