



· 论 著 ·

SUMO2 介导的 RRM1 类泛素化修饰调控胰腺导管腺癌吉西他滨耐药

费庆林, 叶龙云, 吴伟顶, 金凯舟, 虞先濬

复旦大学附属肿瘤医院胰腺外科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海市胰腺肿瘤研究所, 上海市胰腺肿瘤精准诊疗重点实验室, 复旦大学胰腺肿瘤研究所, 上海 200032

[摘要] 背景与目的: 胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 是高度致命的恶性肿瘤, 患者5年生存率不足10%。吉西他滨作为PDAC一线化疗药物, 常因肿瘤细胞获得性耐药而失效。类泛素化修饰在癌症耐药中发挥关键作用, 但其在PDAC吉西他滨耐药中的机制尚未完全阐明。本研究旨在探讨类泛素化修饰在PDAC耐药中的作用, 识别关键SUMO亚型及其靶蛋白。方法: 建立吉西他滨耐药的PANC1细胞系 (PANC1_{GR}), 通过蛋白质印迹法 (Western blot) 检测SUMO1、SUMO2和SUMO3的表达水平。采用SUMO激活酶抑制剂ML-792进行药物干预, 用细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 和流式细胞术分别评估细胞增殖与凋亡情况。通过慢病毒介导敲低SUMO1、SUMO2、SUMO3及RRM1, 检测敲低后细胞对吉西他滨的敏感性 (IC₅₀) 及凋亡变化。利用SUMO2免疫共沉淀结合蛋白质组质谱分析鉴定SUMO2的关键修饰靶蛋白。通过转录组测序分析吉西他滨联合ML-792处理后的差异表达基因, 并进行通路富集分析。统计分析采用 t 检验或单因素方差分析 (ANOVA)。本研究获复旦大学附属肿瘤医院实验中心动物伦理委员会批准 (伦理批准号: FUSCC-IACUC-2023280)。结果: 吉西他滨耐药细胞中SUMO1、SUMO2、SUMO3修饰水平均显著升高, 类泛素化修饰抑制剂ML-792可降低整体SUMO2、SUMO3修饰并增强吉西他滨诱导的凋亡。对比不同类泛素化修饰类型后发现, 仅SUMO2敲低可显著提高吉西他滨敏感性。SUMO2、SUMO3免疫共沉淀结合质谱分析鉴定RRM1为SUMO2的关键修饰靶蛋白, 其SUMO2修饰水平在耐药细胞中明显提升, 而ML-792可显著抑制RRM1的SUMO2修饰。RRM1敲低可模拟SUMO2抑制效应, 加强吉西他滨诱导的凋亡并降低IC₅₀。转录组分析显示, 阻断SUMO2修饰影响DNA复制、错配修复等耐药相关通路, 从而削弱细胞的化疗抵抗。综上, SUMO2介导的RRM1类泛素化修饰在PDAC吉西他滨耐药中发挥调控作用。结论: SUMO2-RRM1轴可能参与PDAC对吉西他滨耐药的形成过程, 靶向干预RRM1的SUMO2修饰有望为改善PDAC化疗耐药提供新的研究思路。

[关键词] 类泛素化修饰; SUMO2; RRM1; 吉西他滨耐药; 胰腺导管腺癌

中图分类号: R735.9 文献标志码: A

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2026.04.002

基金项目: 国家自然科学基金(U21A20374, 82173091)。上海市抗癌协会“雏鹰”计划(SACA-CY23B02)。

利益冲突: 所有作者均声明无利益冲突。

伦理批件: FUSCC-IACUC-2023280。

知情同意: 不需要。

引用本文: 费庆林, 叶龙云, 吴伟顶, 等. SUMO2介导的RRM1类泛素化修饰调控胰腺导管腺癌吉西他滨耐药[J]. 中国癌症杂志, 2026, 36(4): 323-332.

CC协议: CC BY-NC-ND 4.0。

Funding: National Natural Science Foundation of China (U21A20374, 82173091). Shanghai Anticancer Association EYASPROJECT(SACA-CY23B02).

Conflicts of interest: All authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval: FUSCC-IACUC-2023280.

Informed consent: not required.

Cite this article: FEI Q L, YE L Y, WU W D. SUMO2-mediated SUMOylation of RRM1 regulates gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Chin Oncol, 2026, 36(4): 323-332.

CC license: CC BY-NC-ND 4.0.

SUMO2-mediated SUMOylation of RRM1 regulates gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma FEI Qinglin, YE Longyun, WU Weiding, JIN Kaizhou, YU Xianjun (Department of Pancreatic Surgery, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University; Shanghai Pancreatic Cancer Institute; Shanghai Key Laboratory of Precision Medicine for Pancreatic Cancer; Pancreatic Cancer Institute, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: YU Xianjun E-mail: yuxianjun@fudanpci.org

[Abstract] Background and purpose: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most lethal malignancies, with a 5-

year survival rate below 10%. Gemcitabine remains a first-line chemotherapeutic agent for PDAC; however, its efficacy is frequently compromised by the development of acquired drug resistance. SUMOylation, a key post-translational modification, has been implicated in cancer progression and chemoresistance, yet its role in gemcitabine resistance in PDAC remains insufficiently defined. This study aimed to investigate the contribution of SUMOylation to PDAC chemoresistance and to identify the critical SUMO isoform and its downstream substrates. **Methods:** A gemcitabine-resistant PANC1 cell line (PANC1_{GR}) was established, and the expression of SUMO1, SUMO2, and SUMO3 was assessed by Western blot. The SUMO-activating enzyme inhibitor ML-792 was used to suppress global SUMOylation, and cell proliferation and apoptosis were evaluated using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay and flow cytometry, respectively. Lentiviral-mediated knockdown of *SUMO1*, *SUMO2*, *SUMO3*, and *RRM1* was performed to assess changes in gemcitabine sensitivity (IC₅₀) and apoptosis. SUMO2 immunoprecipitation combined with mass spectrometry was employed to identify SUMO2-modified target proteins. Transcriptomic sequencing following gemcitabine plus ML-792 treatment was used to analyze differentially expressed genes and pathway enrichment. Statistical analyses were conducted using Student's *t*-tests or one-way ANOVA. This study was approved by the Animal Ethics Committee of the Experimental Center of Fudan University Shanghai Cancer Center (ethics approval No. FUSCC-IACUC-2023280). **Results:** SUMO1, SUMO2, SUMO3 conjugation levels were markedly elevated in gemcitabine-resistant cells, and ML-792 effectively reduced global SUMO2, SUMO3 modification while enhancing gemcitabine-induced apoptosis. Among the SUMO isoforms, only *SUMO2* knockdown significantly increased gemcitabine sensitivity. SUMO2, SUMO3 Co-IP combined with mass spectrometry identified RRM1 as a major SUMO2-modified substrate, with its SUMOylation markedly enhanced in resistant cells and significantly suppressed by ML-792. *RRM1* knockdown phenocopied the effects of SUMO2 inhibition, promoting apoptosis and reducing the IC₅₀ of gemcitabine. Transcriptomic analysis further revealed that inhibition of SUMO2 modification disrupted key pathways associated with drug resistance, including DNA replication and mismatch repair, thereby diminishing cellular chemoresistance. Collectively, these findings indicate that SUMO2-mediated SUMOylation of RRM1 may play a regulatory role in gemcitabine resistance in PDAC. **Conclusion:** The SUMO2 – RRM1 axis may be associated with the development of gemcitabine resistance in PDAC, and modulation of SUMO2-mediated RRM1 modification could offer a potential direction for further investigation. **[Key words]** SUMOylation; SUMO2; RRM1; Gemcitabine resistance; Pancreatic ductal adenocarcinoma

胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 是全球极具致死性的恶性肿瘤之一, 患者的5年生生存率不足10%^[1]。这主要归咎于疾病的隐匿起病、侵袭性强, 也缺乏有效的治疗手段。吉西他滨作为一种通过抑制DNA合成发挥作用的核苷类似物, 自1997年获批以来一直是PDAC化疗的一线药物^[2-3]。然而, 肿瘤细胞的固有或获得性耐药可显著削弱吉西他滨的治疗效果, 导致多数患者最终治疗失败^[4]。因此, 深入阐明吉西他滨耐药的分子机制, 对于探索克服耐药的新策略并改善PDAC患者的预后具有重要意义。

蛋白质翻译后修饰在调控细胞生物学过程 (包括药物耐受性) 中发挥关键作用。其中, 类泛素化修饰, 即类泛素样修饰蛋白 (SUMO) 可逆地与底物蛋白共价结合的过程, 已被证实是肿瘤发生、转移及多种癌症 (包括PDAC) 治疗耐药的重要调控机制^[5-6]。SUMO家族包括SUMO1、SUMO2和SUMO3, 其中SUMO2和SUMO3具有高度的序列同源性, 常具有功能冗余性, 而SUMO1则通常修饰不同的靶蛋白^[7-9]。在肿瘤中, SUMO化水平的异常调控可导致蛋白稳定性、定位及活性的改变, 从而促进肿瘤对化疗耐药^[10-11]。例如, 早幼粒细胞白血病蛋白的低

类泛素化修饰状态与吉西他滨和奥沙利铂耐药相关, 这一过程通过激活NF- κ B和CREB信号转导通路实现^[12]。此外, 抑制类泛素化修饰通路已被证实能够通过调节肿瘤微环境并增强抗肿瘤免疫反应, 从而提高治疗的敏感性^[13]。

核苷酸还原酶大亚基 (ribonucleotide reductase M1, RRM1) 是核苷酸还原酶的重要组成部分, 在从头合成脱氧核苷酸和DNA修复过程中发挥关键作用^[14-15]。其高表达是PDAC吉西他滨耐药的重要生物标志。然而, 调控RRM1活性的分子机制, 尤其是通过类泛素化修饰等蛋白质翻译后修饰途径的机制, 尚未得到充分研究^[16]。本研究旨在探讨类泛素化修饰在促进PDAC细胞吉西他滨耐药中的作用, 重点识别特定的SUMO亚型及其靶蛋白, 以期揭示逆转耐药的新型治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

吉西他滨 (HY-17026)、ML-792 (HY-108702) 购自美国MedChemExpress公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS; FSD500) 购自苏州依科赛生物科技股份有限公司, 青-链霉素 (双抗) 购自美国赛默飞公司, DMEM培养基、

磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) 购自上海源培生物科技股份有限公司, 细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 细胞活性检测试剂 (B34304) 购自美国 Selleck 公司, 细胞凋亡检测试剂盒 (AD11) 购自上海东仁化学科技有限公司, SUMO1 抗体 (4940S)、SUMO2 抗体 (4971T) 购自美国 CST 公司, RRM1 抗体 (R25625) 购自成都正能生物技术有限公司, ACTB 抗体 (AC026) 购自武汉爱博泰克生物科技股份有限公司, SUMO2/3 IP 试剂盒 (BK162-S) 购自美国 Cytoskeleton 公司, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶快速制备试剂盒 (PG112)、电化学发光 (electrochemical luminescence, ECL) 试剂盒 (SQ202) 购自上海雅酶生物医药科技有限公司。

1.2 细胞培养

人类胰腺癌细胞系 PANC1、MIA PaCa-2 及 HEK-293T 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 所有细胞系均已通过中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库进行基因型鉴定, 并排除了细菌污染。所有细胞均置于含有 10% 的 FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的完全培养基中, 每隔 2~3 d 换液, 上述细胞均在加湿培养箱 (37 $^{\circ}$ C、CO₂ 体积分数为 5%、95% 湿度) 中培养, 保证细胞维持在最佳生长密度。

1.3 病毒感染构建 SUMO1、SUMO2、SUMO3、RRM1 敲除细胞株

根据张锋实验室提供的 sgRNA 文库 (<https://www.zlab.bio/resources>) 中的信息, 设计 SUMO1、SUMO2、SUMO3、RRM1 sgRNA 序列, 运用基因重组技术将其克隆至 lentiCRISPR v2 (Addgene, 52961) 载体中, 构建敲除质粒, 并使用 Sanger 测序进行验证。使用重组质粒和慢病毒包装质粒共转染 HEK-293T 细胞, 收集包含慢病毒的细胞上清液, 过滤离心后感染 PANC1、MIA PaCa-2 细胞, 构建 SUMO1、SUMO2、SUMO3、RRM1 敲除的细胞。使用蛋白质印迹法 (Western blot) 验证 SUMO1、SUMO2、SUMO3、RRM1 表达情况, 明确敲除效率, 选择效果最好的稳转株进行功能实验。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖活力及药物 IC₅₀

取对数生长期细胞, 以 1×10^4 个/孔 (100 μ L) 接种于 96 孔板, 每组设 5 个复孔。贴

壁过夜后加入含不同浓度吉西他滨 (0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100 μ mol/L) 的完全培养基, 继续培养 48 h。每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h 后, 使用多功能酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度 (D) 值。以未加药组存活率为 100%, 计算各浓度组细胞存活率, 使用 GraphPad Prism 9.5.1 线性回归拟合剂量-效应曲线并计算 IC₅₀ 值。

1.5 凋亡检测

根据 Annexin V 633 细胞凋亡检测试剂盒说明, 消化收集不同处理组的细胞, 离心后弃去上清液, 使用 1 mL PBS 洗涤后, 加入 500 μ L 缓冲液, 吹打重悬细胞。在样品中加入 5 μ L Annexin V 633 和 5 μ L PI 染料, 避光室温温育 15 min, 1 h 内进行流式细胞术检测。

1.6 Western blot 检测

使用细胞裂解液提取细胞总蛋白, 蛋白定量后取等量总蛋白进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 350 mA 恒流转膜; 用 5% 脱脂牛奶封闭后, 按照说明书加入配制的一抗, 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜温育, 洗涤后加入对应二抗温育; 使用 ECL 试剂显影后拍照。

1.7 免疫共沉淀实验

收集细胞, 使用裂解液提取细胞总蛋白, 离心后留取裂解上清液。取部分裂解上清液与上样缓冲液混匀, 98 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 作为 Input 样本。在细胞裂解液中加入 40 μ L 抗 SUMO2/3 的琼脂糖珠, 4 $^{\circ}$ C 温育过夜; 离心后弃上清液, 洗涤琼脂糖珠后, 加入上样缓冲液, 98 $^{\circ}$ C 加热 10 min 作为 IP 样本; 使用 Western blot 检测 IP 效率。进一步使用蛋白质谱检测各组 IP 样本中蛋白表达的差异。

1.8 构建裸鼠皮下移植瘤模型

6~8 周龄 BALB/c 裸鼠 (雄性) 购自南京集萃药康生物科技股份有限公司。肿瘤细胞以 200 μ L PBS 重悬, 接种于小鼠背部皮下以构建皮下移植瘤模型。待肿瘤体积达到 500 mm³ 时, 腹腔注射吉西他滨 (400 ng/只) 治疗, 连续给药 2 周。治疗结束后处死小鼠, 完整剥离肿瘤组织并测量肿瘤体积。肿瘤组织进行免疫组织化学染色分析。所有动物实验均严格遵循复旦大学附属肿瘤医院实验中心动物伦理委员会制定的《实验动物饲养和使用指南》, 并获得该伦理委员会批准 (伦理批准号: FUSCC-IACUC-2023280)。

1.9 转录组测序及数据分析

PANC1 细胞经吉西他滨单药或联合 ML-792 处理后, 使用裂解液提取总 RNA 并送北京诺禾致源科技股份有限公司进行文库构建与高通量测序。获得原始表达矩阵后, 利用 R 语言 DESeq2 1.46.0 包筛选组间差异表达基因, 并通过 clusterProfiler 4.14.6 包进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析及火山图绘制; 此外, 从癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库 (<https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>) 下载 PDAC 队列的转录组及临床数据, 利用 survival 3.7-0 和 survminer 0.5.0 R 包进行 Kaplan-Meier 生存分析与 log-rank 检验, 以评估关键基因对患者预后的影响。

1.10 统计学处理

使用 GraphPad Prism 9.5.1 软件对数据进行统计学分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。在进行参数检验前, 首先采用 Shapiro-Wilk 检验对数据的正态性分布进行评估。符合正态分布且方差齐性的数据, 两组间比较采用 Student *t* 检验 (双侧), 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 辅以 LSD 事后检验。所有统计学分析均采用双侧检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 类泛素化修饰促进胰腺癌细胞吉西他滨耐药

通过逐步增加 PANC1 细胞培养基中吉西他滨的浓度, 成功建立了吉西他滨耐药株 PANC1-GR。IC₅₀ 检测结果显示, PANC1-GR 细胞对吉西他滨的耐受性显著增强, 表明耐药模型构建成功 (图 1A)。进一步检测类泛素化修饰水平发现, 耐药细胞中 SUMO1、SUMO2 及 SUMO3 修饰水平均显著升高 (图 1B)。为探讨类泛素化修饰在吉西他滨耐药中的作用, 本研究采用类泛素化修饰抑制剂 ML-792 进行干预。本研究使用 0.001~10 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度的 ML-792 处理细胞, 以评估其对细胞增殖及类泛素化修饰水平的影响。CCK-8 结果显示, 当 ML-792 浓度高于 1 $\mu\text{mol/L}$ 后, 会对细胞增殖产生明显抑制作用; 而 Western blot 检测结果表明, ML-792 在浓度 $\geq 0.1 \mu\text{mol/L}$ 时即可显著降低细胞内整体类泛素化修饰水平。综合考虑在不显著影响细胞活力的前提下实现对 SUMO 修饰的有效抑制, 最终选取

1 $\mu\text{mol/L}$ ML-792 作为后续实验的工作浓度 (图 1C、D)。体外凋亡分析结果显示, ML-792 与吉西他滨联合处理可显著增强 PANC1 和 MIA PaCa-2 细胞的凋亡效应 (图 1E、F)。上述结果表明, 类泛素化修饰的增强可能促进胰腺癌细胞对吉西他滨治疗的耐药性。

2.2 敲低 SUMO2 增强胰腺癌细胞吉西他滨敏感性

为明确具体哪种 SUMO 修饰在吉西他滨耐药中发挥关键作用, 本研究分别在 PANC1 和 MIA PaCa-2 细胞中敲低 SUMO1、SUMO2 和 SUMO3 的表达。Western blot 检测结果显示, 各目标基因表达水平均显著降低 (图 2A、B)。功能实验发现, 敲低 SUMO1 或 SUMO3 并未显著影响吉西他滨诱导的细胞凋亡 ($P > 0.05$), 而敲低 SUMO2 可显著提高吉西他滨诱导的细胞凋亡比例 ($P < 0.01$, 图 2C~H)。IC₅₀ 检测进一步证实, SUMO2 敲低后 PANC1 及 MIA PaCa-2 细胞对吉西他滨的敏感性显著提高, 而 SUMO1 或 SUMO3 敲低对药物敏感性无显著影响 (表 1)。在体内实验中, 将 SUMO2 敲低的 PANC1 和 MIA PaCa-2 细胞接种于裸鼠皮下后, 相较于对照组, 吉西他滨对肿瘤生长的抑制作用更加显著 (图 3A); 免疫组织化学检测结果进一步显示, SUMO2 敲低组肿瘤组织中细胞增殖水平明显降低 (图 3B)。上述结果提示, SUMO2 介导的类泛素化修饰在胰腺癌对吉西他滨耐药的形成中可能具有重要的调控作用。

表 1 胰腺癌细胞 IC₅₀

Tab. 1 IC₅₀ values of pancreatic cancer cells

Item	PANC1	MIA PaCa-2
CON	0.601±0.039	0.032±0.002
SUMO1_KO	0.646±0.065	0.040±0.008
SUMO2_KO	0.260±0.054	0.013±0.002
SUMO3_KO	0.580±0.018	0.039±0.005
RRM1_KO	0.144±0.028	0.007±0.001

2.3 RRM1 是 SUMO2 修饰的关键蛋白

为鉴定 SUMO2 修饰的潜在靶蛋白, 本研究对 PANC1 和 PANC1-GR 细胞进行 SUMO2/3 免疫共沉淀实验。结果显示, 耐药细胞株中 SUMO2/3 修饰蛋白显著富集 (图 4A)。质谱分析提示, RRM1 在 PANC1-GR 细胞中显著上调 (表 2), Western blot 验证结果与之吻合 (图 4B)。同时, 在 PANC1 耐药细胞株中亦观察到 RRM1 表达水平升高 (图 4C)。进一步使用 ML-792 处理后, PANC1 和 PANC1-GR 细胞中整体 SUMO2/3 修饰水平、RRM1 表达及 RRM1 的 SUMO2/3 修饰均明显下降 (图 4D、E)。反向免疫共沉淀实验同样

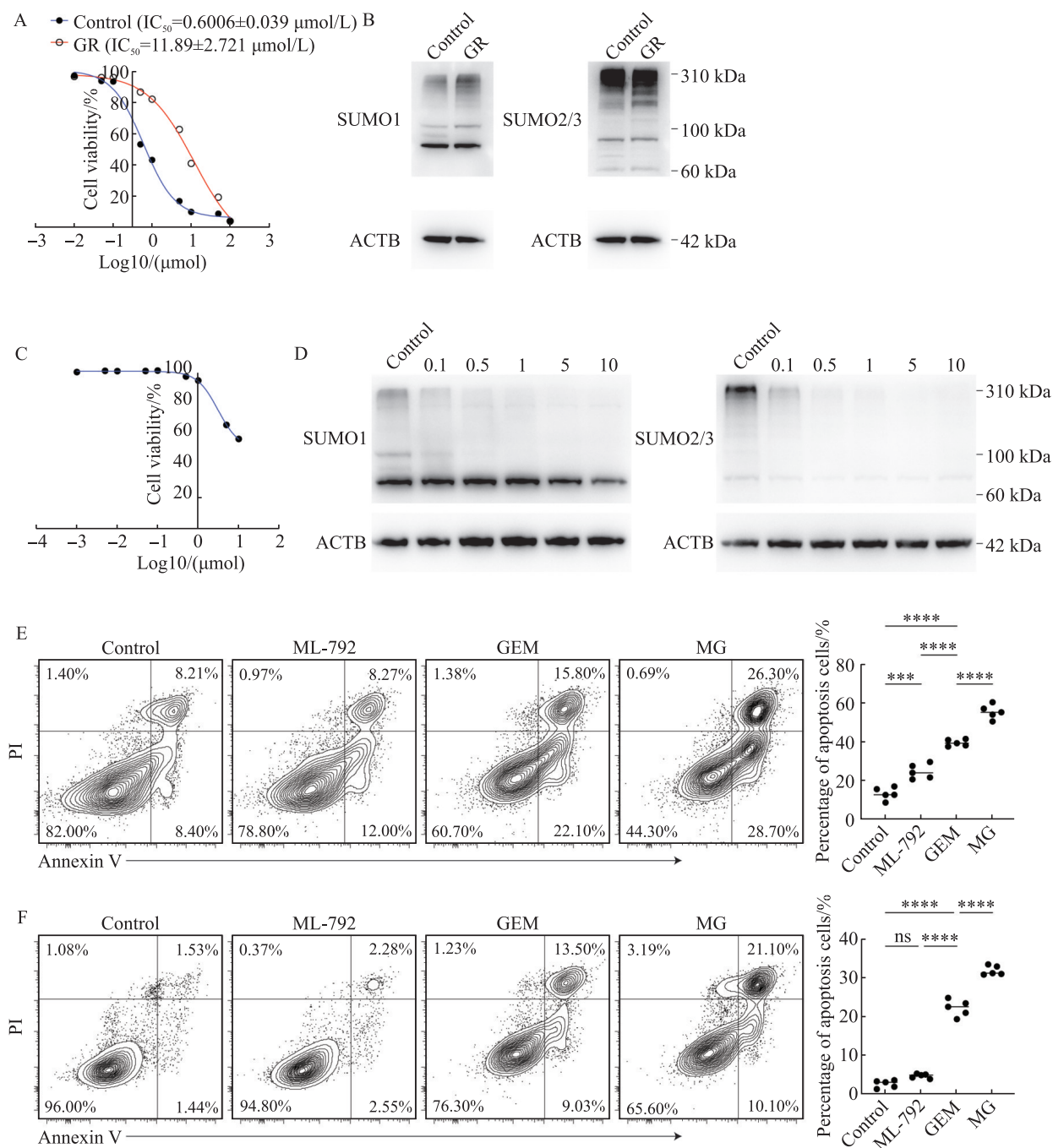


图1 类泛素化修饰对胰腺癌细胞吉西他滨耐药的影响

Fig. 1 SUMOylation effects gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells

A: IC_{50} values of PANC1 gemcitabine-resistant cells. B: Protein expression levels of SUMO1 and SUMO2/3 in resistant versus control cells. C: CCK-8 assay results showing the inhibitory effect of the SUMO-activating enzyme inhibitor ML-792. D: Western blot analysis of SUMO1 and SUMO2/3 expression following treatment with increasing concentrations of ML-792. E-F: Flow cytometry analysis of apoptosis in PANC1 and MIA PaCa-2 cells after combined treatment with ML-792 and gemcitabine. Data were presented as the $\bar{x}\pm s$. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$; ns: Not significant. GR: Gemcitabine-resistant. GEM: Gemcitabine. MG: Combined treatment with ML-792 and gemcitabine.

显示, ML-792可降低RRM1与SUMO2/3的结合水平(图4F)。以上结果表明, RRM1是SUMO2修饰的关键靶蛋白, 其SUMO2/3修饰在吉西他滨耐药细胞中显著增强, 通过该修饰可提高RRM1蛋白稳定性、减少其降解, 从而促进RRM1的累积并参与耐药表型的维持。

2.4 抑制RRM1的SUMO2修饰可影响RRM1功能并增强吉西他滨敏感性

TCGA数据库分析显示, RRM1高表达的胰腺癌患者预后差(图5B、C)。功能实验中, 在PANC1及MIA PaCa-2细胞中敲低RRM1(图5A)可显著增强吉西他滨诱导的凋亡($P<0.01$, 图

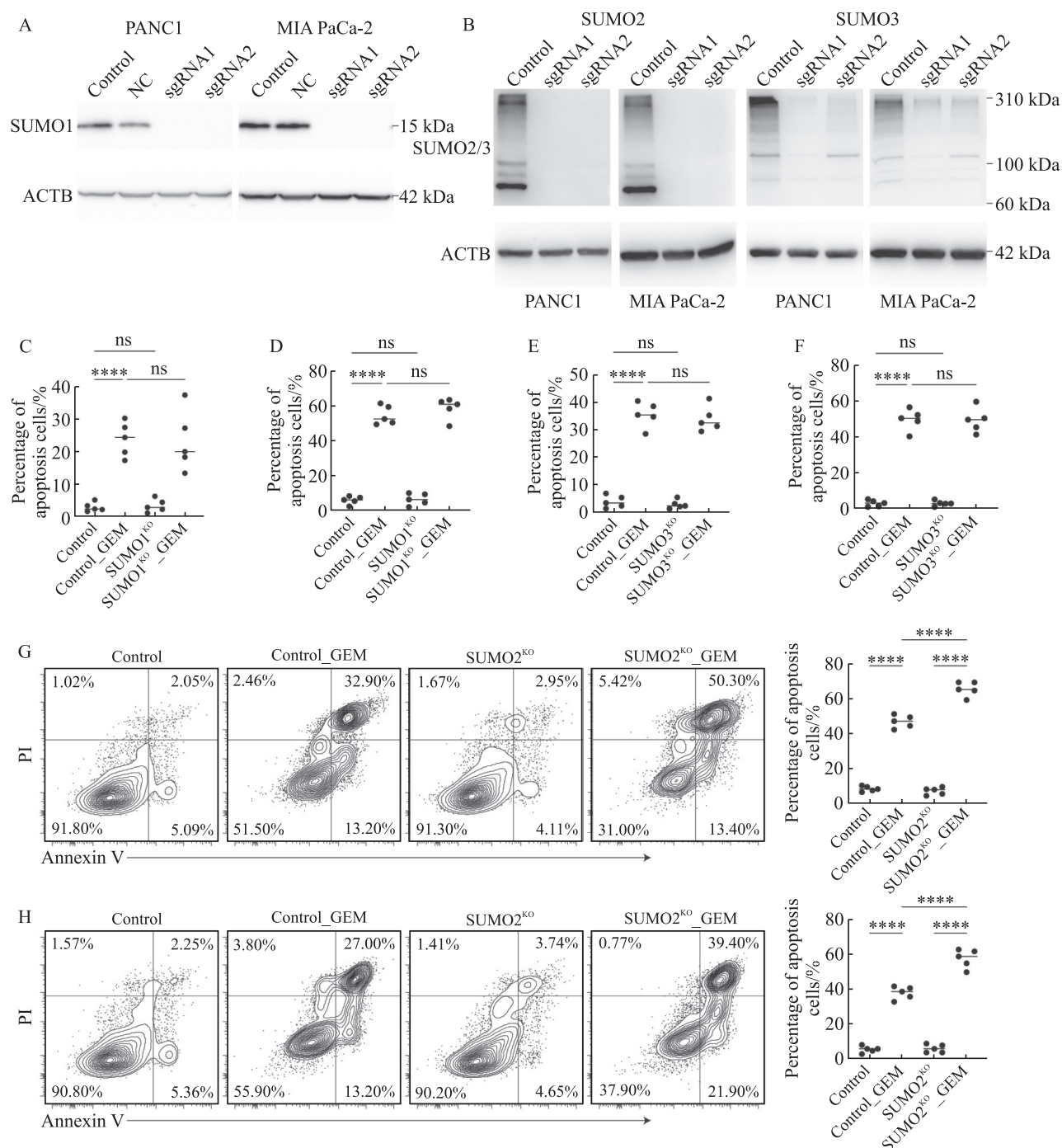


图2 敲低 SUMO2 对胰腺癌细胞吉西他滨敏感性的影响

Fig. 2 Knockdown of SUMO2 modulated gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cells

A-B: Western blot validation of SUMO1, SUMO2, and SUMO3 knockdown in pancreatic cancer cell lines. C-D: Apoptosis analysis of PANC1 and MIA PaCa-2 cells following SUMO1 knockdown. E-F: Apoptosis analysis of PANC1 and MIA PaCa-2 cells following SUMO3 knockdown. G-H: Apoptosis analysis of PANC1 and MIA PaCa-2 cells following SUMO2 knockdown, demonstrating the strongest enhancement of gemcitabine-induced apoptosis. Data were presented as the $\bar{x} \pm s$. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: Not significant. GEM: Gemcitabine.

5D、E), 并降低其 IC_{50} 值 (表 1), 与抑制 SUMO2 修饰的结果一致。为进一步探讨类泛素化修饰对吉西他滨疗效的分子机制, 我们进行了转录组测序。结果显示, 吉西他滨联合 ML-792 处理后, 共有 1 028 个基因上调, 415 个基因下调 (图 5F)。KEGG 富集分析提示, 差异基因主要涉及 MAPK 信号转导通路、DNA 复制及错配修复等关键通路 (图 5G)。联合处理后, 与 DNA 复

制相关的基因 (*RFC2*、*MCM2*、*POLA1*、*MCM4*、*RPA2*、*RPA1*、*PCNA*、*MCM7*、*RPA4*) 及错配修复相关基因 (*RFC2*、*MSH2*、*RPA2*、*RPA1*、*PCNA*、*RFC3*、*RPA4*) 表达均显著上调 (图 5H、I)。鉴于 RRM1 在 DNA 合成与修复中的重要作用, 这些结果提示抑制 RRM1 的 SUMO2 修饰可能削弱其功能, 从而增强胰腺癌细胞对吉西他滨的敏感性。

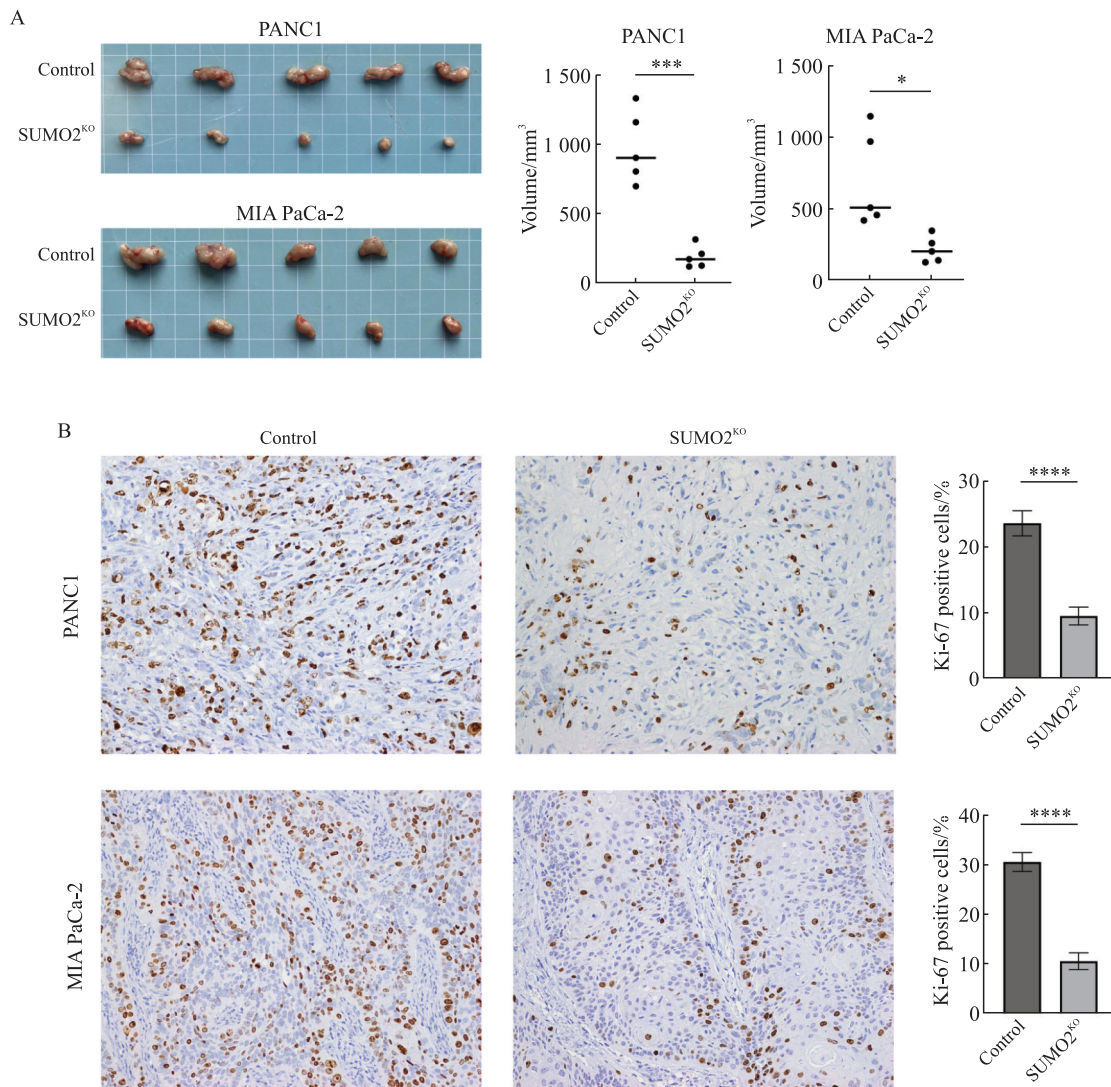


图3 SUMO2敲低增强胰腺癌细胞对吉西他滨敏感性的体内实验研究

Fig. 3 *In vivo* study showed that SUMO2 knockdown enhances the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine

A: Representative images of nude mouse xenografts derived from PANC1 and MIA PaCa-2 cells. Each group contained 5 animals. Tumor volume was measured and compared using Student's *t* test. B: Xenograft tumor tissues were stained for Ki-67 proliferation (×20). Ki-67 proliferation-high cells were quantified and statistically analyzed by Student's *t* test. Data were presented as the $\bar{x} \pm s$. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$; ns: Not significant.

表2 免疫沉淀蛋白质谱结果

Tab. 2 Immunoprecipitation-based proteomic analysis results

Gene symbol	PANC1_GR peptides	PANC1 peptides	Δ Unique peptides
RRM1	7	1	6
PKM	10	5	5
ACTB	7	7	0
TRIM28	12	9	3
FLNA	11	8	3
SUPT5H	6	3	3
RANGAP1	13	11	2
HSPA8	7	6	1
PML	7	5	2
VIM	9	9	0

3 讨 论

本研究揭示了SUMO2介导的SUMO化修饰

在PDAC吉西他滨耐药中的核心作用，这一结论与既往关于PDAC耐药中类泛素化修饰整体失衡的研究结果一致^[6, 8]，但进一步明确了SUMO2亚型的重要地位。既往研究多集中于SUMO化总体水平升高与化疗耐受性的相关性，而本研究通过特异性敲低实验证实，仅抑制SUMO2即可显著逆转吉西他滨耐药表型，而SUMO1或SUMO3的敲低几乎不影响该效应。尽管SUMO2与SUMO3在序列上高度同源、理论上具备一定的功能性补偿，但已有研究表明，在丁酸诱导的耐药细胞模型中，SUMO3修饰发挥主要调控作用^[11]，提示二者在功能上并非完全冗余。在吉西他滨诱导下的应激状态，本研究观察到SUMO2修饰发挥主要作用，这可能与其在应激状态下参与蛋白聚集抑制、RNA代谢调控及蛋白稳定性维持等方面的独特机制有关^[13]。近期研

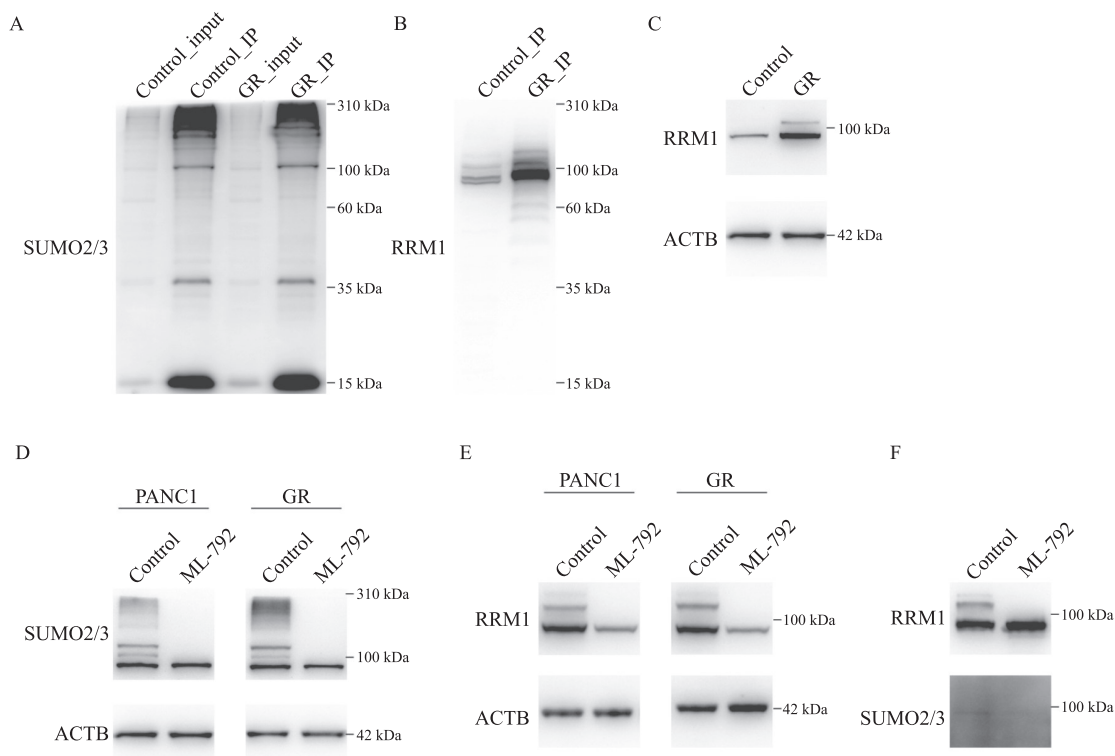


图4 Western blot检测SUMO2、RRM1的蛋白表达结果

Fig. 4 Western blot analysis of SUMO2 and RRM1 protein expression

A: Western blot analysis of SUMO2/3 following immunoprecipitation. B: Western blot analysis of RRM1 following immunoprecipitation. C: Western blot analysis of RRM1 expression in gemcitabine-resistant PANC-1 cells. D-E: Western blot detection of SUMO2/3 and RRM1 after ML-792 treatment. F: Reverse immunoprecipitation showing Western blot results for SUMO2/3 and RRM1. GR: Gemcitabine-resistant. IP: Immunoprecipitation.

究亦从不同角度支持SUMO亚型功能的异质性, 有研究^[17]表明SUMO化抑制可通过多重肿瘤微环境效应诱导PDAC的适应性抗肿瘤免疫, 而2025年的研究^[18]显示, 联合抑制磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K) α/δ 与SUMO信号转导通路能够选择性杀伤PDAC细胞并激活免疫应答。上述证据与本研究结果相互补充, 提示不同化疗药物类型(如吉西他滨与铂类药物)及细胞或微环境上下游环节可能驱动特定SUMO亚型的选择性激活。总体而言, 尽管SUMO化作为广谱肿瘤调控机制已得到广泛认可, 其亚型特异性仍有待系统阐明, 这在一定程度上限制了精准靶向干预策略的临床转化。

选择性SUMO激活酶抑制剂ML-792在低浓度条件下即可显著降低细胞整体SUMO化水平, 并与吉西他滨产生协同效应以增强肿瘤细胞凋亡。这一特性与临床前研究中报道的同类型抑制剂TAK-981高度一致, 后者可通过激活I型干扰素信号、阻滞细胞周期进程并重塑肿瘤微环境发挥多层面的抗肿瘤作用^[12, 18]。既往研究多聚焦于TAK-981的免疫调控功能, 而本研究则凸显了SUMO通路抑制在直接逆转化疗耐药方面的潜在价值, 尤其是在体外PDAC模型中表现出的与吉西他滨协同杀伤效应。近期研究进展亦在不断拓

展该通路的治疗前景, 多项研究证实TAK-981在PDAC模型中可增强T淋巴细胞介导的抗肿瘤免疫、减少调节性T淋巴细胞比例并激活先天免疫反应^[17, 19], 同时与PI3K抑制剂联用可产生选择性的肿瘤杀伤效应^[18]。由此可见, SUMO抑制剂已进入临床研究阶段并展现出多机制抗肿瘤潜力, 但其在吉西他滨耐药背景下的直接体内证据仍相对有限, 主要挑战在于开发亚型特异性药物及优化联合治疗方案, 只有这样才能使治疗效果最大化。

免疫共沉淀联合质谱分析鉴定RRM1为耐药细胞中SUMO2的关键修饰底物, 其SUMO化水平的升高通过增强蛋白稳定性, 促进脱氧核苷酸合成及DNA损伤修复, 从而直接对抗吉西他滨介导的链终止效应。这一发现在既往RRM1与PDAC化疗耐药及不良预后密切相关的研究基础上^[4, 19], 进一步拓展了其分子调控层面的认识。功能实验显示, 敲低RRM1可完全模拟SUMO2抑制所产生的表型, 进一步揭示了SUMO2-RRM1轴作为调控吉西他滨耐药的重要通路。转录组测序结果表明, 联合治疗后MAPK信号转导通路、DNA复制及错配修复相关基因显著上调, 提示RRM1功能受抑后细胞启动代偿性应激与修复反应, 这与既往关于SUMO化在DNA损伤应

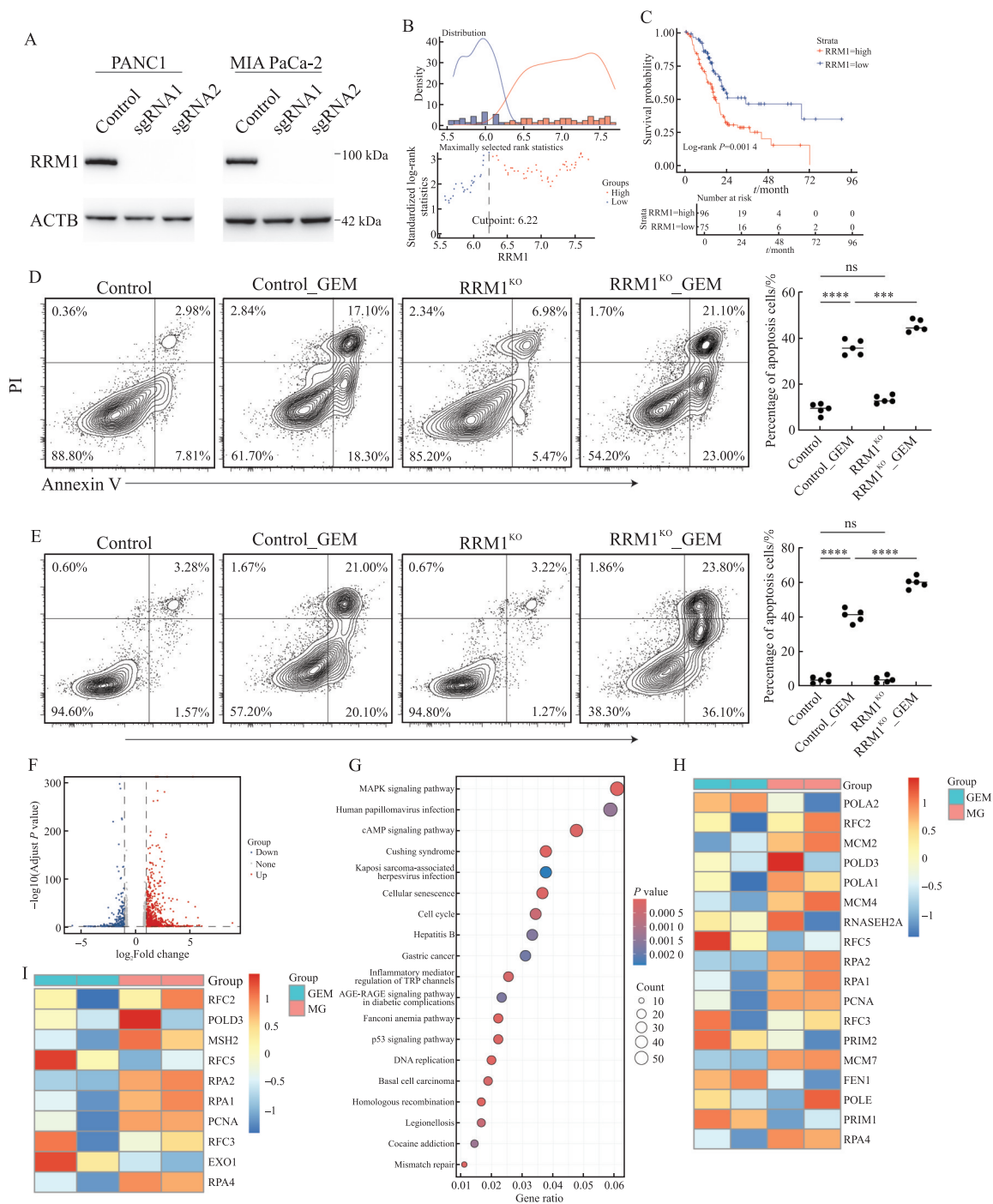


图5 抑制SUMO2修饰对RRM1功能的影响

Fig. 5 Effect of inhibiting SUMO2 modification on RRM1 function

A: Western blot validation of *RRM1* knockdown in pancreatic cancer cell lines. B: Determination of the optimal cutoff value for *RRM1* expression using the Cancer Genome Atlas datasets. C: Kaplan-Meier survival analysis comparing overall survival between *RRM1*-high ($n=96$) and *RRM1*-low ($n=75$) patient cohorts. D-E: Apoptosis analysis following *RRM1* knockdown. F: Volcano plot of differentially expressed genes after combined treatment with gemcitabine and ML-792. G: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway enrichment Dot plot of differentially expressed genes. H-I: Heatmaps showing different gene expression in the mismatch repair and DNA replication pathways. Data were presented as the $\bar{x} \pm s$. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: Not significant. GEM: Gemcitabine. MG: Combined treatment with ML-792 and gemcitabine.

答及核苷酸代谢稳态调控中发挥广泛作用的报道^[13]一致。相较于现有研究主要聚焦于RRM1的转录水平或表观遗传调控,本研究将RRM1与翻译后SUMO化修饰相联系,揭示了其更为上游且精细的调控机制。近期基于TCGA数据库的分析亦提示SUMO底物相关基因可作为PDAC预后标志物^[20],但尚未特异指向RRM1,进一步凸

显了本研究的创新性;同时也暴露出当前研究领域的不足,即SUMO底物谱的系统鉴定、SUMO聚合的动态形式及位点特异性功能仍存在较大研究空白,有待进一步深入探索。

尽管本研究为SUMO2-RRM1轴作为PDAC潜在治疗靶点提供了有力证据,但仍存在一定局限性。首先,研究主要基于体外模型,难以充分

反映体内肿瘤异质性、基质-上皮互作及复杂免疫微环境,可能高估协同效应^[20]。其次,所用细胞系局限于经典PDAC模型,未覆盖不同分子亚型,影响结论的泛化性。此外,Western blot定量偏差、质谱对低丰度/瞬时SUMO化底物的检出能力限制、转录组分析中多重检验控制不足,以及耐药细胞系构建过程中的克隆选择偏倚,均可能影响结果稳健性。未来需在原位移植瘤、PDX及基因工程小鼠模型中进一步验证,并结合临床队列评估该轴的表达异质性。同时,探索SUMO抑制剂(如ML-792/TAK-981)与吉西他滨/白蛋白结合型紫杉醇标准方案的联合应用^[12, 18],并结合纳米递送策略克服耐药屏障^[19],有望促进临床转化;同时,精确解析RRM1的SUMO化位点将为开发位点特异性干预手段奠定基础。总之,本研究通过与现有文献的对比分析,阐明了SUMO2特异性调控在PDAC吉西他滨耐药中的分子机制,补充并拓展了相关证据,为靶向SUMO通路的耐药逆转策略提供了新洞见,颇具临床转化前景。

第一作者:

费庆林 (ORCID: 0000-0002-4170-2215), 硕士研究生。

通信作者:

虞先濬 (ORCID: 0000-0002-6697-7143), 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 复旦大学附属肿瘤医院院长, E-mail: yuxianjun@fudanpci.org。

作者贡献声明:

费庆林: 完成实验, 撰写并修改文章; 叶龙云: 参与实验, 修改文章; 吴伟顶: 实验指导, 修改文章; 金凯舟: 实验方案设计, 实验指导; 虞先濬: 提出研究方案和设计思路, 设计论文框架, 撰写和修改论文。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024[J]. CA A Cancer J Clin, 2024, 74(1): 12–49.
- [2] ZENG S Y, PÖTTLER M, LAN B, et al. Chemoresistance in pancreatic cancer[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4504.
- [3] PARK W, CHAWLA A, O'REILLY E M. Pancreatic cancer: a review[J]. JAMA, 2021, 326(9): 851.
- [4] DU TOIT-THOMPSON T, LECK L, GILLSON J, et al. Overcoming therapy resistance in pancreatic cancer: challenges and emerging strategies[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2025, 224: 115647.
- [5] BIEDERSTÄDT A, HASSAN Z, SCHNEEWEIS C, et al. SUMO pathway inhibition targets an aggressive pancreatic cancer subtype[J]. Gut, 2020, 69(8): 1472–1482.
- [6] SCHNEEWEIS C, HASSAN Z, SCHICK M, et al. The SUMO pathway in pancreatic cancer: insights and inhibition[J]. Br J Cancer, 2021, 124(3): 531–538.

- [7] HU Y B, CHEN C B, TONG X Y, et al. NSUN2 modified by SUMO-2/3 promotes gastric cancer progression and regulates mRNA m5C methylation[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(9): 842.
- [8] LI X, DING R, WANG H, et al. Research advancements on sumoylation in gastrointestinal cancers[J]. Mol Aspects Med, 2025, 106: 101401.
- [9] SANG J, YANG K, SUN Y P, et al. SUMO2 and SUMO3 transcription is differentially regulated by oxidative stress in an Sp1-dependent manner[J]. Biochem J, 2011, 435(2): 489–498.
- [10] HAN Z J, FENG Y H, GU B H, et al. The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (review)[J]. Int J Oncol, 2018, 52(4): 1081–1094.
- [11] ZHU L M, CHEN G, HUANG C J, et al. SUMO3 inhibition by butyric acid suppresses cell viability and glycolysis and promotes gemcitabine antitumor activity in pancreatic cancer[J]. Biol Direct, 2024, 19(1): 74.
- [12] KUMAR S, SCHOONDERWOERD M J A, KROONEN J S, et al. Targeting pancreatic cancer by TAK-981: a SUMOylation inhibitor that activates the immune system and blocks cancer cell cycle progression in a preclinical model[J]. Gut, 2022, 71(11): 2266–2283.
- [13] GU Y R, FANG Y, WU X, et al. The emerging roles of SUMOylation in the tumor microenvironment and therapeutic implications[J]. Exp Hematol Oncol, 2023, 12(1): 58.
- [14] HASSELLUHN M C, SCHLÖSSER D, VERSEMANN L, et al. An NFATc1/SMAD3/cJUN complex restricted to SMAD4-deficient pancreatic cancer guides rational therapies[J]. Gastroenterology, 2024, 166(2): 298–312.e14.
- [15] VENA F, LI CAUSI E, RODRIGUEZ-JUSTO M, et al. The MEK1/2 inhibitor pimasertib enhances gemcitabine efficacy in pancreatic cancer models by altering ribonucleotide reductase subunit-1 (RRM1)[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(24): 5563–5577.
- [16] LAO Y X, JIN Y R, WU S F, et al. Deciphering a profiling based on multiple post-translational modifications functionally associated regulatory patterns and therapeutic opportunities in human hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 283.
- [17] ERDEM S, LEE H J, SHANKARA NARAYANAN J S N, et al. Inhibition of SUMOylation induces adaptive antitumor immunity against pancreatic cancer through multiple effects on the tumor microenvironment[J]. Mol Cancer Ther, 2024, 23(11): 1597–1612.
- [18] KÖSE H, SCHNEEWEIS C, PUTZE P, et al. Targeting mutual dependence of phosphatidylinositol-3-kinase α/δ and small ubiquitin-like modifier signaling in pancreatic cancer[J]. Gastroenterology, 2026, 170(2): 315–329.
- [19] PENG L J, LIANG Y F, GUO X N, et al. Nanomedicine breakthroughs overcoming pancreatic cancer drug resistance through precision nano-interventions[J]. Nanoscale Adv, 2025, 7(19): 5888–5904.
- [20] WANG X J, YANG C X, LIU Y M, et al. SUMOylation substrate encoding genes as prognostic biomarkers in pancreatic ductal adenocarcinoma with functional assessment of SAF-B2[J]. Front Pharmacol, 2025, 16: 1532658.

(收稿日期: 2025-12-03 修回日期: 2026-02-06)

(责任编辑: 王琳辉)