



· 论 著 ·

胞质型SHMT2 α 促进DNA损伤修复和细胞干性维持介导非小细胞肺癌顺铂耐药的体外研究张欣宇¹, 顾 晨², 刘 越¹, 郭长城¹, 曾园园¹

1. 苏州大学附属第一医院呼吸与危重症医学科, 江苏 苏州 215006;
2. 泰兴市第二人民医院呼吸与危重症医学科, 江苏 泰州 225400

[摘要] **背景和目的:** 肺癌的发病率和死亡率长期居高不下, 非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)作为最常见的病理学类型, 顺铂(cisplatin, DDP)耐药是其临床治疗中棘手的难题之一。SHMT2作为催化丝氨酸转化为甘氨酸并产生一碳单位的关键代谢酶, 定位于线粒体和细胞质中, 在多种恶性肿瘤中高表达。本研究旨在探讨胞质型SHMT2 α 在NSCLC DDP耐药中的作用及机制。**方法:** 分别提取A549和A549-DDP细胞中的细胞质和线粒体蛋白, 采用蛋白质印迹法(Western blot)检测SHMT2在上述组分中的表达水平。构建过表达胞质型SHMT2 α 和敲除SHMT2的稳定转染细胞, 通过细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)检测梯度浓度(0.0、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$) DDP作用48 h后的细胞活力。通过Western blot和免疫荧光检测5 $\mu\text{mol/L}$ DDP作用48 h后稳定转染细胞中DNA损伤修复的核心标志物 γ -H2AX的蛋白水平变化。采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)检测肿瘤细胞干性标志物的表达, 采用肿瘤干细胞成球实验检测干细胞维持能力。数据采用GraphPad Prism (v8.0)进行分析, 所有实验均独立重复3次。**结果:** 在A549和A549-DDP细胞中, SHMT2总蛋白表达水平不变($P=0.129\ 6$); 但与A549细胞相比, SHMT2在A549-DDP细胞的细胞质中表达水平更高($P=0.033\ 7$)。过表达胞质型SHMT2 α 的细胞经5 $\mu\text{mol/L}$ DDP刺激48 h后, 半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})增高(A549: $P=0.007\ 7$; H1299: $P<0.001$), γ -H2AX表达减少(A549: $P=0.013\ 6$; H1299: $P=0.024\ 2$); 而敲除SHMT2后, IC_{50} 降低(A549: sg-SHMT2-1 : $P=0.010\ 1$; sg-SHMT2-2 : $P=0.006\ 6$; H1299: sg-SHMT2-1 : $P=0.029\ 0$; sg-SHMT2-2 : $P=0.013\ 7$), γ -H2AX表达增高(A549: sg-SHMT2-1 : $P<0.001$; sg-SHMT2-2 : $P=0.015\ 5$; H1299: sg-SHMT2-1 : $P<0.001$; sg-SHMT2-2 : $P=0.002\ 4$)。同时发现过表达胞质型SHMT2 α 后肿瘤干性标志物的表达升高(A549: SOX2 、 CD133 、 BMI1 : $P<0.001$; OCT4 : $P=0.006\ 8$; Nanog : $P=0.002\ 8$; CD44 : $P=0.043\ 5$; H1299: OCT4 、 Nanog 、 SOX2 、 CD133 、 CD44 : $P<0.001$; BMI1 : $P=0.003\ 4$), 并提高了肿瘤干细胞成球率(A549: $P=0.012\ 8$; H1299: $P<0.001$); 相反, 敲除SHMT2 α 后肿瘤干性标志物表达水平降低(A549: SOX2 、 CD133 : $P<0.001$; OCT4 : sg-SHMT2-1 : $P=0.018\ 4$; sg-SHMT2-2 : $P=0.048\ 5$; Nanog : sg-SHMT2-1 : $P=0.002\ 9$, sg-SHMT2-2 : $P=0.002\ 8$; BMI1 : sg-SHMT2-1 : $P=0.004\ 5$; sg-SHMT2-2 : $P=0.003\ 5$; CD44 : sg-SHMT2-1 : $P=0.003\ 8$; sg-SHMT2-2 : $P=0.002\ 7$; H1299: OCT4 、 Nanog 、 SOX2 、 CD133 、 BMI1 : $P<0.001$; CD44 : sg-SHMT2-1 : $P=0.004\ 0$; sg-SHMT2-2 : $P=0.004\ 3$), 肿瘤干细胞成球率被抑制(A549: $P<0.001$; H1299: $P<0.001$)。**结论:** SHMT2在NSCLC DDP耐药细胞的细胞质中高表达, 可通过促进DNA损伤修复和肿瘤细胞干性维持, 进而降低细胞对DDP的敏感性, 本研究为逆转NSCLC顺铂耐药提供了潜在治疗靶点。

基金项目: 国家自然科学基金(82272648)。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

伦理批件: 不需要。

知情同意: 不需要。

IIT备案: 不需要。

引用本文: 张欣宇, 顾晨, 刘越, 等. 胞质型SHMT2 α 促进DNA损伤修复和细胞干性维持介导非小细胞肺癌顺铂耐药的体外研究[J]. 中国癌症杂志, 2026, 36(9): 872-885.

CC协议: CC BY-NC-ND 4.0。

Funding: National Natural Science Foundation of China (82272648).

Conflicts of interest: Authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval: Not required.

Informed consent: Not required.

IIT registration: Not required.

Cite this article: Zhang X Y, Gu C, Liu Y, et al. Cytoplasmic SHMT2 α promotes DNA damage repair and sustains cancer stemness to confer cisplatin resistance in non-small cell lung cancer: an *in vitro* study [J]. Chin Oncol, 2026, 36 (9): 872-885.

CC license: CC BY-NC-ND 4.0.

[关键词] 非小细胞肺癌; SHMT2 α ; 顺铂; DNA损伤; 细胞干性

中图分类号: R734.2 文献标志码: A

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2026.09.006

Cytoplasmic SHMT2 α promotes DNA damage repair and sustains cancer stemness to confer cisplatin resistance in non-small cell lung cancer: an *in vitro* study ZHANG Xinyu¹, GU Chen², LIU Yue¹, GUO Changcheng¹, ZENG Yuanyuan¹ (1. Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China; 2. Department of Pulmonary and Critical Medicine, Taixing Second People's Hospital, Taizhou 225400, Jiangsu Province, China)

Correspondence to: ZENG Yuanyuan E-mail: zengyuanyuan0921@163.com

[Abstract] Background and purpose: The incidence and mortality of lung cancer have remained persistently high. Non-small cell lung cancer (NSCLC), the most common histological type, presents cisplatin (DDP) resistance as one of the most challenging clinical hurdles. SHMT2, a key metabolic enzyme that catalyzes the conversion of serine to glycine with concomitant generation of one-carbon units, is localized in both mitochondria and the cytoplasm and is highly expressed in various malignancies. This study aimed to investigate the role and molecular mechanism of cytoplasmic SHMT2 α in DDP resistance of NSCLC. **Methods:** Cytoplasmic and mitochondrial proteins were extracted from A549 and A549-DDP cells, and the expression levels of SHMT2 in the respective subcellular fractions were detected by Western blot. Stable cell lines overexpressing cytoplasmic SHMT2 α or knocking out SHMT2 were established. Cell viability following treatment with gradient concentrations of DDP (0.0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h was assessed using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Western blot and immunofluorescence assays were employed to evaluate the alterations in the protein expression of γ -H2AX, a pivotal biomarker for DNA damage repair, in stably transfected cells after treatment with 5 $\mu\text{mol/L}$ DDP for 48 h. The expression of cancer stem cell markers was examined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR), and a tumor stem cell spheroid formation assay was used to evaluate stemness maintenance capacity. Data were analyzed using GraphPad Prism (v8.0), and all experiments were independently repeated three times. **Results:** The total SHMT2 protein expression levels were similar between A549 and A549-DDP cells ($P=0.129\ 6$); however, compared to A549 cells, SHMT2 expression was higher in the cytoplasm of DDP-resistant cells ($P=0.033\ 7$). Overexpression of cytoplasmic SHMT2 α led to an increased half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) (A549: $P=0.007\ 7$; H1299: $P<0.001$) and decreased γ -H2AX expression (A549: $P=0.013\ 6$; H1299: $P=0.024\ 2$) following 5 $\mu\text{mol/L}$ DDP for 48 h, whereas SHMT2 knockout resulted in a decreased IC_{50} (A549: *sg-SHMT2-1*: $P=0.010\ 1$; *sg-SHMT2-2*: $P=0.006\ 6$; H1299: *sg-SHMT2-1*: $P=0.029\ 0$; *sg-SHMT2-2*: $P=0.013\ 7$) and increased γ -H2AX expression (A549: *sg-SHMT2-1*: $P<0.001$; *sg-SHMT2-2*: $P=0.015\ 5$; H1299: *sg-SHMT2-1*: $P<0.001$; *sg-SHMT2-2*: $P=0.002\ 4$). Furthermore, overexpression of the cytoplasmic SHMT2 α promoted the expression of cancer stem cell markers (A549: *SOX2*, *CD133*, *BM1*: $P<0.001$; *OCT4*: $P=0.006\ 8$; *Nanog*: $P=0.002\ 8$; *CD44*: $P=0.043\ 5$; H1299: *OCT4*, *Nanog*, *SOX2*, *CD133*, *CD44*: $P<0.001$; *BM1*: $P=0.003\ 4$) and enhanced the tumorsphere formation efficiency of NSCLC cancer stem cells (A549: $P=0.012\ 8$; H1299: $P<0.001$). Conversely, SHMT2 knockout reduced the levels of cancer stem cell markers (A549: *SOX2*, *CD133*: $P<0.001$; *OCT4*: *sg-SHMT2-1*: $P=0.018\ 4$; *sg-SHMT2-2*: $P=0.048\ 5$; *Nanog*: *sg-SHMT2-1*: $P=0.002\ 9$; *sg-SHMT2-2*: $P=0.002\ 8$; *BM1*: *sg-SHMT2-1*: $P=0.004\ 5$; *sg-SHMT2-2*: $P=0.003\ 5$; *CD44*: *sg-SHMT2-1*: $P=0.003\ 8$; *sg-SHMT2-2*: $P=0.002\ 7$; H1299: *OCT4*, *Nanog*, *SOX2*, *CD133*, *BM1*: $P<0.001$; *CD44*: *sg-SHMT2-1*: $P=0.004\ 0$; *sg-SHMT2-2*: $P=0.004\ 3$) and suppressed sphere formation efficiency (A549: $P<0.001$; H1299: $P<0.001$). **Conclusion:** SHMT2 is highly expressed in the cytoplasm of DDP-resistant non-small cell lung cancer cells. It reduces cellular sensitivity to DDP by promoting DNA damage repair and sustaining tumor cell stemness, thereby providing a potential therapeutic target for reversing DDP resistance in non-small cell lung cancer.

[Key words] Non-small cell lung cancer; SHMT2 α ; Cisplatin; DNA damage; Cell stemness

肺癌是全球发病率和死亡率居高不下的恶性肿瘤之一^[1], 其中非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是主要的病理学类型^[2]。NSCLC 整体预后较差, 患者5年生存率仅约15%^[3]。手术是早期NSCLC的主要治疗手段, 但多数患者在确诊时已经错失最佳手术治疗时机。针对驱动基因阴性的晚期NSCLC患者, 铂类药物顺铂 (cisplatin, DDP) 仍是当前一线标准化疗方案^[4]。DDP可通过诱导DNA加合物的

形成和交联, 造成DNA损伤, 最终诱导肿瘤细胞发生凋亡^[5-6]。尽管DDP初期治疗效果显著, 但长期用药易激活DNA损伤修复途径, 当修复能力大于DNA损伤程度时, 肿瘤细胞产生耐药, 致使疗效下降^[7], 临床上NSCLC患者DDP耐药发生率高达63%^[8]。因此, 克服DDP耐药性, 增强肿瘤细胞对DDP的敏感性, 是迫切需要探究和解决的临床问题。细胞代谢异常是肿瘤的主要特征之一, 丝氨酸/甘氨酸代谢对于维持肿瘤细

胞增殖和存活至关重要^[9]。已有研究^[10]表明, 丝氨酸代谢与DDP耐药性有关, 在胃癌中抑制丝氨酸代谢所产生的组蛋白H3第4位赖氨酸残基(H3K4)去甲基化, 能够增加染色质的致密性, 从而减少DDP诱导的DNA损伤, 进而导致胃癌细胞对DDP产生耐药性。SHMT2是丝氨酸/甘氨酸代谢通路中的关键酶, 催化丝氨酸向甘氨酸的转化, 为细胞的生存提供物质基础^[11-12]。有研究^[13]显示, 作为催化丝氨酸转化为甘氨酸并产生一碳单位的关键酶的SHMT2在多数肿瘤细胞中高表达, 在化疗耐药中扮演着重要角色。雌激素相关受体 α (estrogen-related receptor α , ERR α) 可以与SHMT2基因启动子区结合, 促进其转录表达, 进而提升乳腺癌细胞线粒体代谢适应能力, 导致细胞对拉帕替尼产生耐药。在晚期结直肠癌患者中, 以5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)为基础的化疗是一线治疗方案。有研究^[14]发现, 高表达的SHMT2通过与P53结合, 减少了P53与E3泛素连接酶HDM2的复合物形成, 从而抑制P53蛋白的降解, 导致细胞自噬作用减弱, 进一步促使细胞产生5-FU化疗抵抗。细胞中的SHMT2主要有两种存在形式: 一种定位于线粒体中, 称为线粒体型SHMT2; 另一种由于缺少线粒体定位序列而位于细胞质, 称为胞质型SHMT2 α ^[15]。目前关于明确胞质型SHMT2 α 参与肿瘤化疗耐药过程的研究仍然有限, 其具体作用及分子机制尚有待进一步阐明。

在肿瘤发生、发展过程中, 会产生一类具有干细胞样特性的细胞亚型—肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC), 其通常表达一定的特异性表面标志物, 如OCT4、Nanog、SOX2、CD133、BMI1和CD44等^[16]。尽管化疗在某些情况下能消灭大部分癌细胞, 但CSC常逃避清除, 被认为是肿瘤复发和进展的关键因素^[17]。CSC在治疗后能够再生, 会降低化疗、靶向治疗和免疫治疗的效果^[18]。有研究^[19]发现, DDP耐药后NSCLC细胞的干性特征标志物SOX2、OCT4、Nanog的表达升高, 这些细胞也倾向于形成球状, 并富集CD44⁺CD166⁺群体, 这表明CSC在DDP耐药性NSCLC细胞中更能被富集。非同源末端连接通路相关基因磷酸化的DNA依赖性蛋白激酶催化亚基(DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs)通过p65蛋白磷酸化和乙酰化诱导核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)激活, 而NF- κ B的激活不仅促进DNA修复, 还可增强CSC表型, 促进NSCLC中

的DDP耐药性。当用抑制剂如NU7441靶向DNA-PKcs, 不仅能增强DDP诱导的DNA损伤, 还可降低CSC富集, 逆转DDP耐药^[20]。由此可见, CSC是调节肿瘤耐药性的重要靶点之一, 在NSCLC DDP耐药中发挥重要作用。因此, 深入探究肿瘤干性的调控机制, 寻找调控肿瘤干性的相关基因, 对克服肿瘤细胞的化疗耐药性具有重要意义。本文旨在探索胞质型SHMT2 α 是否能够通过调控DNA损伤修复及细胞干性维持影响NSCLC细胞对DDP的敏感性, 为克服DDP耐药提供潜在治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 细胞系

人NSCLC细胞株A549 (CL-0016)、H1299 (CL-0165)、A549-DDP (CL-0519) 及人胚肾细胞HEK-293T (CL-0005) 均购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 所有细胞株均在购入后的6个月内完成传代使用。A549细胞来源于人肺腺癌组织, H1299细胞来源于人NSCLC淋巴结转移灶。A549-DDP耐药株以A549为亲本细胞, 采用DDP浓度梯度递增法持续诱导培养后筛选建立, 该细胞株已在含1 μ g/mL DDP的培养基中稳定传代培养。所有细胞均通过短串联重复序列(short tandem repeat, STR)基因分型鉴定, 结果与细胞库公布的参考数据库完全匹配, 证实细胞来源可靠且无交叉污染。A549细胞为KRAS突变型(G12S), BRAF和EGFR均为野生型; H1299细胞为BRAF野生型、NRAS野生型, 并伴有TP53基因纯合部分缺失; A549-DDP细胞作为A549的耐药亚系, 其STR图谱、基因突变背景与A549细胞相同。

所有实验所用细胞均为复苏后第5~20代, A549-DDP细胞在实验期间持续以含1 μ g/mL DDP的完全培养基维持耐药特性, 在实验之前于不含DDP的培养基中培养2~3代(约1周)后进行实验。所有细胞经支原体检测阴性; 实验前锥虫蓝染色活力>95%; 细胞于70%~80%融合度且处于对数生长期时收集, 用于后续实验。

1.2 主要试剂和仪器

RPMI-1640细胞培养基(PM150110)、A549-DDP专用培养基(CM-0519)购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 胎牛血清(10099-141)购自美国Gibco公司, DMEM/F12培养基(BL305A)、青霉素-链霉素溶液(C0222)、细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂

(C0040)、线粒体分离试剂 (C3601)、RIPA 裂解液 (BL504A)、Mito-tracker (C1032)、4% 多聚甲醛溶液 (P0099)、TritonX-100 (P0096)、遗传霉素 (ST081) 和嘌呤霉素 (ST551) 均购自上海碧云天生物科技股份有限公司, 胰蛋白酶 (T1320) 购自北京索莱宝科技有限公司, TRIzol 试剂盒 (TCH021)、反转录试剂盒 (638316) 均购自日本 Takara 公司, PCR 引物购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 超低吸附 12 孔板 (11218)、共聚焦小皿 (BS-15-GJM) 均购自北京兰杰柯科技有限公司, 二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒 (FD2001)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) (FD0030) 均购自杭州弗德生物科技有限公司, Flag 抗体 (8146S, 1 : 5 000)、 γ -H2AX 抗体 (9718S, 1 : 1 000)、GAPDH 抗体 (97166S, 1 : 1 000)、山羊抗兔二抗 (98164S, 1 : 5 000)、山羊抗鼠二抗 (91186S, 1 : 5 000) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; SHMT2 抗体 (33443, 1 : 3 000)、TOM20 (11802-1-AP, 1 : 5 000) 抗体均购自武汉三鹰生物科技有限公司, 荧光二抗 Alexa 647 (A0468, 1 : 500) 购自上海碧云天生物科技股份有限公司, β -tubulin (S0B0995, 1 : 5 000) 购自杭州斯达特生物科技有限公司, DDP (HY-17394) 购自美国 MCE 公司, DAPI (564907, 1 : 1 000) 购自美国 BD Bioscience 公司, 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) (AF-100-15-500UG)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) (100-31-5UG) 购自美国 PeproTech 公司, B-27 细胞因子 (17504044) 购自美国 Gibco 公司, 2 $\times$ SYBR Green RTFQ-PCR Master Mix 试剂盒 (B21202) 购自美国 Selleck 公司, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶快速制备试剂盒 (PG112)、增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒 (SQ202) 均购自上海雅酶生物医药科技有限公司, 全波长多功能酶标仪、恒温细胞培养箱均购自美国 Thermo Scientific 公司, 共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司, 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 仪购自美国 ABI 公司, 化学发光成像系统 (5260) 购自上海天能生命科学有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 研究设计及流程

本研究为体外干预性细胞实验, 采用 A549、H1299 两株细胞平行验证, 设过表达对照 (PCDH)、过表达 (Flag-SHMT2 α)、敲除对照 (sg-NC)、敲除 (sg-SHMT2) 4 组; CCK-8 实验采用 DDP 浓度梯度的剂量-效应设计; 每项实验独立生物学重复 3 次、每次设 3 个技术复孔。实验过程中未出现细胞污染或检测失败, 无数据缺失; 所有独立重复的数据均纳入分析, 未剔除任何异常值。各组接种密度严格标准化, 细胞悬液经充分混匀后按随机数字表分配至各处理孔, 并在 96 孔板中随机安排各组孔位以消除边缘效应; 同一指标的各组样本使用同批次试剂、同批平行处理与同时检测、同一次电泳与转膜、同一曝光参数下成像; 酶标仪检测时各组检测条件相同; 共聚焦采集时各组激光强度、增益与曝光时间保持一致。免疫荧光灶计数、蛋白质印迹法 (Western blot) 灰度定量及肿瘤球测量均由 2 名不知晓分组情况的研究者独立完成, 统计分析完成后方揭盲。

通过亚细胞分级分离和 Western blot, 比较 A549 与 A549-DDP 细胞中 SHMT2 的亚细胞分布差异; 利用慢病毒介导的过表达和 CRISPR/Cas9 敲除技术, 在 A549 和 H1299 细胞中构建稳转株, 通过 CCK-8 实验检测 DDP 敏感性变化; 分别从 DNA 损伤修复 (Western blot 及免疫荧光) 和肿瘤干性维持 (干性标志物 RTFQ-PCR 及成球实验) 两个层面, 阐明胞质型 SHMT2 α 调控 DDP 耐药的下游机制 (图 1)。

1.3.2 DDP 配制和储存

按实验所需剂量, 精密称取 DDP 粉末 (纯度 99.30%) 600.1 μ g, 置于 1.5 mL 无菌 Eppendorf 试管中, 加入 1 mL 灭菌纯化水, 涡旋混匀使其充分溶解, 即得 2 mmol/L 的 DDP 母液 (DDP 相对分子质量为 300.05)。母液经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌后分装, 于 -20 $^{\circ}$ C 避光冻存, 临用前解冻并用培养液稀释至目标浓度。

1.3.3 细胞培养

A549、H1299 细胞培养于含 1% 青霉素-链霉素溶液和 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中。A549-DDP 细胞培养于 A549-DDP 专用培养基 (Ham's F-12K, 含 1 μ g/mL DDP、10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素溶液)。A549-DDP 细胞系用 1 μ g/mL DDP 培养以维持 DDP 耐药性。细胞培养于 25 cm² 细胞培养瓶中, 在倒置显微镜下观察细

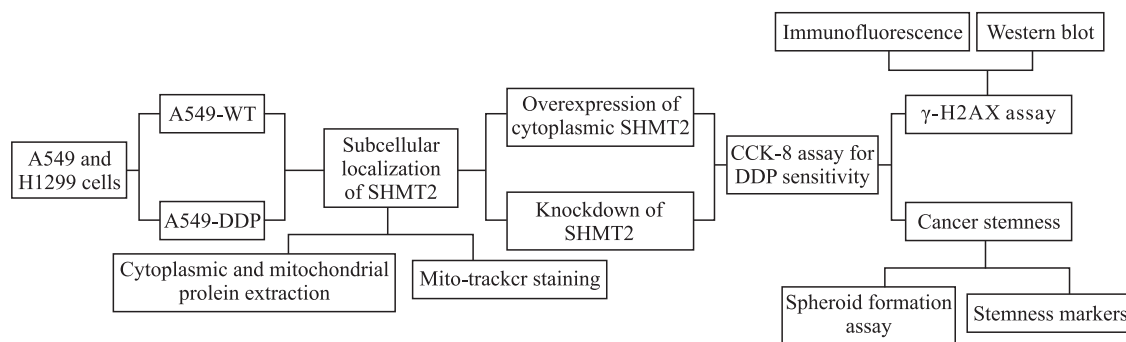


图1 研究流程图

Fig. 1 Flowchart of the study

胞状态, 细胞饱满无拉丝状态且边缘无老化黑点, 密度达80%~90%时可进行传代, 传代比例为1/3, 每3 d传代1次。

1.3.4 *SHMT2* α 过表达质粒构建

针对基因序列, 设计特异性引物, 对*SHMT2* α 基因编码序列(coding sequence, CDS)进行PCR扩增。扩增产物经Nhe I 和EcoR I 限

制性内切酶双酶切并纯化回收后, 亚克隆连接到pCDH-CMV-MCS-EF1-G418载体中。连接产物转化大肠杆菌感受态细胞后筛选出Flag-SHMT2 α 重组质粒。重组质粒由苏州金唯智生物科技有限公司测序鉴定正确后使用。*SHMT2* α 基因CDS区扩增引物见表1, 重组质粒鉴定测序引物见表2。

表1 *SHMT2* α 基因CDS扩增引物序列Tab. 1 Primer sequences for CDS amplification of the *SHMT2* α gene

Primer	Sequence(5'-3')
Forward primer	GTGAACCGTCAGATCCGCTAGCCACCATGATGGCCATTCGGGCTCAGCACAG
Reverse primer	CCGTCATGGTCTTTGTAGTCACGCGTGAATTCATGCTCATCAAACACAGGCATGG

表2 Flag-SHMT2 α 质粒测序引物Tab. 2 Flag-SHMT2 α plasmid sequencing primers

Primer	Sequence(5'-3')
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
PCDH-R	CCTTCTCTAGGCACCCGTTCAAT

1.3.5 *SHMT2* 敲除质粒构建

从NCBI数据库中检索人源*SHMT2*基因序列。靶向*SHMT2*的gRNA由CRISPR gRNA Design Tool设计, gRNA序列见表3。引物经退火后, 亚克隆至LentiCRISPR v2载体(Addgene #52961), 由苏州金唯智生物科技有限公司测序鉴定正确后使用。

表3 靶向*SHMT2*的gRNA序列Tab. 3 gRNA sequences targeting *SHMT2*

Primer	Sequence(5'-3')
<i>SHMT2</i> -gRNA-F1	CACCGTCTCAGGATCACTGTCCGAC
<i>SHMT2</i> -gRNA-R1	AAACGTCGGACAGTGATCCTGAGAC
<i>SHMT2</i> -gRNA-F2	CACCGGACAGGCAGTGTCTGGGCC
<i>SHMT2</i> -gRNA-R2	AAACGCCACGACACTGCCTGTCC

1.3.6 稳定转染细胞株构建

利用慢病毒包装系统[吉满生物科技(上海)有限公司], 联合构建成功的*SHMT2* α 过表

达和敲除质粒, 转染HEK-293T细胞(密度为80%~90%), 48 h后收集病毒, 用来感染A549和H1299细胞。使用200 μ g/mL遗传霉素筛选稳定过表达*SHMT2* α 的A549和H1299细胞(密度为20%~30%); 使用2 μ g/mL嘌呤霉素筛选稳定敲除*SHMT2*的A549和H1299细胞, 再通过RTFQ-PCR和Western blot对过表达和敲除的效果进行验证。

1.3.7 Western blot

A549和H1299稳定转染细胞经5 μ mol/L DDP刺激48 h后, 使用RIPA裂解液裂解细胞(密度为80%~90%), 冰上裂解30 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g离心30 min, 收集上清液, 使用BCA试剂盒定量后, 将样品于95 $^{\circ}$ C加热变性。取等量蛋白样品(20~30 μ g)上样, 经12.5%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后(130 V, 80 min), 湿转法(320 mA, 90 min)转移至硝酸纤维素膜上。随后, 用含5% BSA的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水-吐温20(Tris-buffered saline with Tween 20, TBST)溶液室温封闭2 h。封闭完成后, 将膜与相应的一抗于4 $^{\circ}$ C摇床过夜。第2天, 用TBST缓冲液洗涤3次, 每次5 min, 再与辣根过氧化物酶标记的相应二抗室温温育1 h。再次用TBST缓冲液洗涤3次, 每次5 min。使用

ECL试剂在成像系统下进行曝光,曝光时间设置为自动。使用ImageJ软件对蛋白条带进行灰度值分析。目的蛋白的相对表达量以目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值的比值表示。本研究中总蛋白以GAPDH为内参,线粒体蛋白以TOM20为内参,胞质蛋白以 β -tubulin为内参。各实验组的相对表达量进一步以对照组的均值为1进行归一化处理。每组实验独立重复3次。

1.3.8 线粒体蛋白提取

首先,使用80 μ L线粒体分离试剂重悬细胞。冰上温育15 min后,将匀浆液在4 $^{\circ}$ C下以600 $\times$ g离心5 min。然后将上清液小心转移到新的试管中,并以11 000 $\times$ g进行第二步离心10 min,分离上清液和沉淀。收集的上清液,在4 $^{\circ}$ C下以12 000 $\times$ g离心10 min,取上清液即为去除线粒体的细胞质蛋白。收集的沉淀即为线粒体,磷酸缓冲盐溶液(phosphate-buffered saline, PBS)洗涤后重悬于RIPA裂解液中,得到线粒体蛋白。

1.3.9 CCK-8实验

将对照组以及过表达或敲除SHMT2的A549和H1299稳定转染细胞(密度为80%~90%)经胰蛋白酶消化处理后铺于96孔板中,将细胞悬液密度调整为 3×10^4 个细胞/mL,每孔100 μ L,每组设置3个复孔。铺板24 h待细胞贴壁后,用新鲜培养基配制的、浓度呈梯度设置的DDP(0.0、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 μ mol/L)处理液处理细胞,对照组加入等体积灭菌纯化水。培养48 h后,向每孔中加入10 μ L CCK-8检测试剂,再次放入培养箱中温育2 h后,使用酶标仪分别检测各孔在450和630 nm波长处的吸光度(D)值。每孔最终D值为450 nm处D值与630 nm处D值之差($D=D_{450\text{ nm}}-D_{630\text{ nm}}$),以消除非特异性背景干扰。抑制率计算公式为:抑制率(%) = $[1 - (D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}})] \times 100\%$,其中空白组为不含细胞仅含培养基的孔,对照组为未加DDP处理的细胞孔。以DDP浓度对数为横坐标、抑制率为纵坐标绘制剂量-效应曲线,使用GraphPad Prism(v8.0)中的非线性回归模型“log(inhibitor) vs normalized response-Variable slope”(四参数logistic方程)拟合,计算半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。依据本研究CCK-8实测A549的DDP IC₅₀为4.871 μ mol/L,后续DNA损伤相关实验统一选用接近IC₅₀的5 μ mol/L DDP处理48 h;该浓度与时间参考文献并经预实验验证可稳定诱导 γ -H2AX

表达而不引起大量细胞死亡^[21]。

1.3.10 免疫荧光

将对照组以及过表达或敲除SHMT2的A549和H1299稳定转染细胞(密度为80%~90%)经胰蛋白酶消化后,接种于35 mm共聚焦培养皿中培养,使用5 μ mol/L DDP刺激48 h,控制密度使48 h后细胞融合度达60%~70%,用预冷PBS洗涤。细胞在4%甲醛溶液中固定30 min,然后在室温下用0.1% Triton X-100通透10 min。洗涤后,在5% BSA中封闭2 h,加入经5% BSA稀释的 γ -H2AX一抗,4 $^{\circ}$ C温育过夜。第2天,用预冷的PBS洗涤3次,并与荧光二抗Alexa Fluor 647标记的兔抗二抗常温温育2 h。细胞核用DAPI复染30 min,用共聚焦显微镜采集图像。使用ImageJ软件对细胞核内 γ -H2AX荧光强度进行分析,灶点数定义为细胞核内直径 $\geq 0.3\text{ }\mu\text{m}$ 、荧光强度 $\geq$ 背景荧光强度2倍的离散点状信号。结果以每核灶点数表示。每组实验独立重复3次。

1.3.11 RTFQ-PCR检测稳定转染细胞中干性标志物的mRNA表达水平

使用TRIzol试剂,按照标准方案提取RNA,使用M-MLV逆转录酶通过逆转录合成互补DNA。使用SYBR Green PCR Master Mix作为RTFQ-PCR反应体系,以GAPDH为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量: $\Delta C_t = C_t(\text{目的基因}) - C_t(\text{GAPDH})$, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{实验组}) - \Delta C_t(\text{对照组})$ 。目的基因的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示,对照组均一化为1。每组实验设置3个复孔。引物参考表4。

表4 引物序列

Tab. 4 Primer sequence

Primer	Sequence(5'-3')
SHMT2	Forward Primer: TAAGCTCAACCTGGCACTGAC
	Reverse Primer: TGAGTAGCCTCGCTCTAGCA
OCT4	Forward Primer: GCTGGATGTCAGGGCTCTTT
	Reverse Primer: AACCACACTCGGACCACATC
SOX2	Forward Primer: GCCGAGTGGAACTTTTGTGC
	Reverse Primer: GGCAGCGTGACTTATCCTTCT
Nanog	Forward Primer: AATGGTGTGACGCAGGGATG
	Reverse Primer: ACATTAAGGCCTTCCCCAGC
CD44	Forward Primer: CCTCACATCCAACACCTCCC
	Reverse Primer: AGCAGTGGTGCCATTCTGT
CD133	Forward Primer: CATGCTCTCAGCTCTCCCG
	Reverse Primer: ATAAACAGCAGCCCCAGGAC
BMI1	Forward Primer: GCGCCCTTTGTTGAGAGGAT
	Reverse Primer: ACTGGAGTACTGGGGCTAGG
GAPDH	Forward Primer: AGGTCGGTGTGAACGGATTG
	Reverse Primer: GGGGTCGTTGATGGCAACA

1.3.12 干细胞成球实验

将生长状态良好的细胞(密度为80%~90%)消化处理,用PBS清洗2遍后,使用含2% B27、20 ng/mL EGF和20 ng/mL FGF的无血清DMEM/F12培养基重悬细胞,并对细胞进行计数。以1 000个细胞/孔的密度接种于超低吸附12孔板中,每隔2~3 d添补培养基,培养14 d后记录细胞成球的形态和大小。球体计数标准如下:直径 $\geq 50 \mu\text{m}$ 、形态规则、细胞排列紧密的球形结构计为1个肿瘤球体。成球率计算公式为:成球率(%)=(每孔形成的球体数/每孔接种的细胞数) $\times 100\%$ 。每次实验设置3个复孔,独立重复3次。

1.4 统计学处理

计量资料经Shapiro-Wilk检验符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,方差齐性经Levene检验;柱状图误差线代表标准差。使用GraphPad Prism(v8.0)和ImageJ软件进行图像和数据处理分析,完成数据的统计运算和可视化图表绘制。两组间比较采用 t 检验,配对设计采用配对 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析,事后多重比较采用Bonferroni检验。CCK-8为DDP浓度梯度 $\times$ 分组的双因素设计,直接对拟合所得 IC_{50} 作组间比较。统计量两组比较报告 t 值,多组比较报告 F 值。所有显著性检验均为双侧检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 胞质型SHMT2 α 在DDP耐药细胞系中表达上调

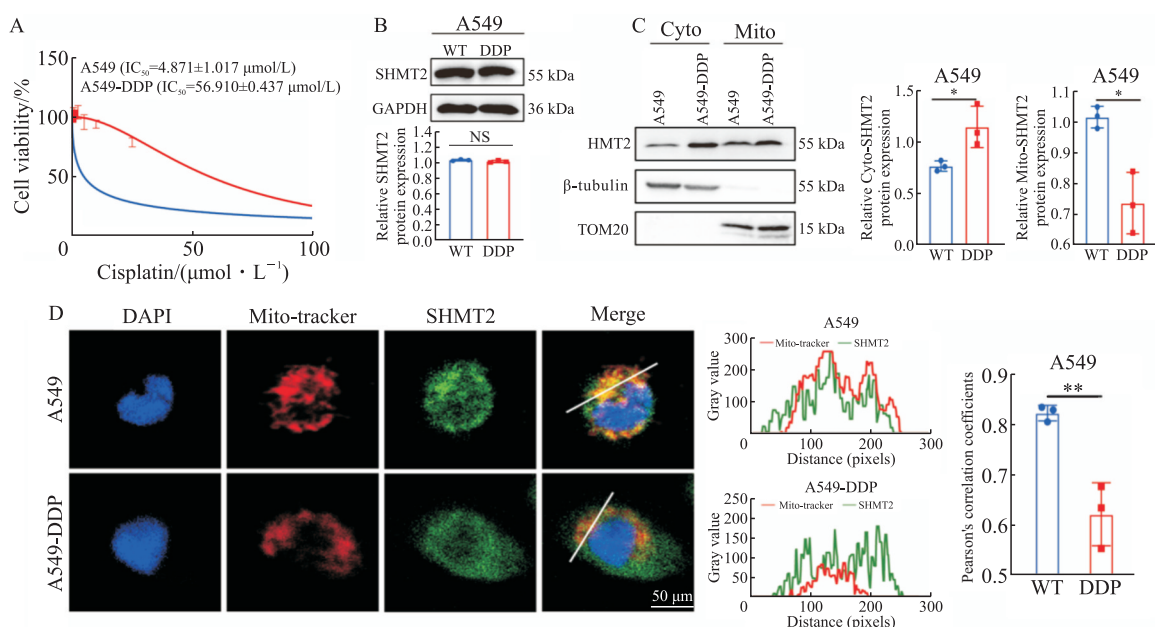
培养A549和A549-DDP细胞株至对数生长期,细胞形态正常,未出现间充质样形态改变,使用浓度梯度DDP(0.0、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞48 h,通过CCK-8法检测不同浓度DDP处理后的细胞活力,并计算 IC_{50} 。结果显示,A549细胞的 IC_{50} 为(4.871 $\pm$ 1.017) $\mu\text{mol/L}$,A549-DDP细胞的 IC_{50} 为(56.910 $\pm$ 0.437) $\mu\text{mol/L}$,耐药指数(耐药细胞株的 IC_{50} /亲本细胞株的 IC_{50})约为11.68($P<0.001$,图2A),表明A549-DDP细胞对DDP具有显著的耐药性,耐药细胞株构建成功。

分别提取A549和A549-DDP细胞蛋白,经Western blot检测发现,在A549和A549-DDP细胞中,SHMT2总蛋白水平无显著差异($P=0.1296$,图2B)。随后,分离A549和A549-DDP细胞的线粒体蛋白和细胞质蛋白,再经Western blot检测发现在A549-DDP细胞中,细胞质中的

SHMT2水平高于A549细胞($P=0.0337$,图2C)。同时利用活细胞线粒体特异性染色荧光探针Mito-tracker染色发现,A549-DDP细胞中SHMT2与Mito-tracker共定位弱于A549细胞,其Pearson's共定位系数低于A549细胞($P=0.0057$,图2D)。结果表明,胞质型SHMT2 α 在A549-DDP细胞系中表达上调,可能参与NSCLC对DDP的耐药进程。

2.2 胞质型SHMT2 α 增强NSCLC细胞对DDP的耐药性

为了进一步明确胞质型SHMT2 α 与NSCLC细胞DDP耐药的关系,首先,利用慢病毒感染技术构建过表达胞质型SHMT2 α 和敲除SHMT2的A549和H1299的稳定转染细胞株。RTFQ-PCR结果显示,Flag-SHMT2 α 组SHMT2 mRNA水平相比PCDH组增加($P<0.001$,图3A)。Western blot结果显示,Flag-SHMT2 α 组SHMT2水平相比PCDH组增加,sg-SHMT2组SHMT2水平相比sg-NC组下降($P<0.001$,图3B、3C)。其次,通过CCK-8实验检测不同浓度DDP刺激后稳定转染细胞的细胞活力变化。结果发现,在A549细胞中,PCDH组经0.0、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$ DDP刺激48 h后, IC_{50} 为(4.049 $\pm$ 0.105) $\mu\text{mol/L}$ (95% CI: 3.952~4.159),Flag-SHMT2 α 组 IC_{50} 升至(8.433 $\pm$ 1.484) $\mu\text{mol/L}$ (95% CI: 6.776~9.738),耐药倍数约为2.08,与PCDH组相比,Flag-SHMT2 α 组细胞对DDP刺激的 IC_{50} 增大($P=0.0077$, $t=4.963$)。在H1299细胞中,PCDH组 IC_{50} 为(6.045 $\pm$ 0.108) $\mu\text{mol/L}$ (95% CI: 5.967~6.169),Flag-SHMT2 α 组 IC_{50} 升至(12.77 $\pm$ 0.546) $\mu\text{mol/L}$ (95% CI: 12.270~13.350),耐药倍数约为2.11,与PCDH组相比,Flag-SHMT2 α 组细胞对DDP刺激的 IC_{50} 增大($P<0.001$, $t=20.90$,图3D);在A549细胞中,sg-NC组 IC_{50} 为(4.987 $\pm$ 0.383) $\mu\text{mol/L}$ (95% CI: 4.554~5.295),sg-SHMT2-1组 IC_{50} 降至(3.396 $\pm$ 0.466) $\mu\text{mol/L}$ (95% CI: 2.971~3.893), IC_{50} 约降至对照组的0.68,对DDP刺激 IC_{50} 减小($P=0.0101$, $t=4.533$)。sg-SHMT2-2组 IC_{50} 为(2.761 $\pm$ 0.622) $\mu\text{mol/L}$ (95% CI: 2.361~3.506), IC_{50} 约降至对照组的0.55,对DDP刺激 IC_{50} 减小($P=0.0066$, $t=5.185$)。在H1299细胞中,sg-NC组 IC_{50} 为(4.373 $\pm$ 0.592) $\mu\text{mol/L}$ (95% CI: 3.735~4.900),sg-SHMT2-1组 IC_{50} 为(3.587 $\pm$ 0.192) $\mu\text{mol/L}$ (95% CI: 3.101~4.052), IC_{50} 约降至对照组的0.82,对DDP刺激 IC_{50} 减小

图2 胞质型SHMT2 α 在A549-DDP细胞系中表达上调Fig. 2 Cytoplasmic SHMT2 α is up-regulated in the A549-DDP cell line

A: IC_{50} values determined by CCK-8 assay. B: Total SHMT2 protein levels detected by Western blot. C: SHMT2 levels in mitochondrial and cytoplasmic fractions of A549 and A549-DDP cells were detected by Western blot. GAPDH and TOM20 served as markers for cytoplasmic and mitochondrial fractions, respectively. D: The co-localization of Mito-tracker (red) and SHMT2 (green) in A549 and A549-DDP cells. Scale bar: 50 μm . Fluorescence intensity profiles along the white lines and Pearson's correlation coefficients are shown. WT: A549-WT; DDP: A549-DDP. Data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$); NS: No significance; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. All experiments were completed without contamination or technical failure. No data was omitted, and no outliers were excluded from the final analysis.

($P=0.029$, $t=3.336$)。sg-SHMT2-2组 IC_{50} 为 (2.740 ± 0.347) $\mu\text{mol/L}$ (95% CI: 2.468~3.110), IC_{50} 约降至对照组的0.63, 对DDP刺激 IC_{50} 减小 ($P=0.013$, $t=4.202$, 图3E)。综上, 过表达胞质型SHMT2 α 可增加NSCLC细胞对DDP的耐药性, 有望成为DDP耐药的潜在肿瘤标志物。

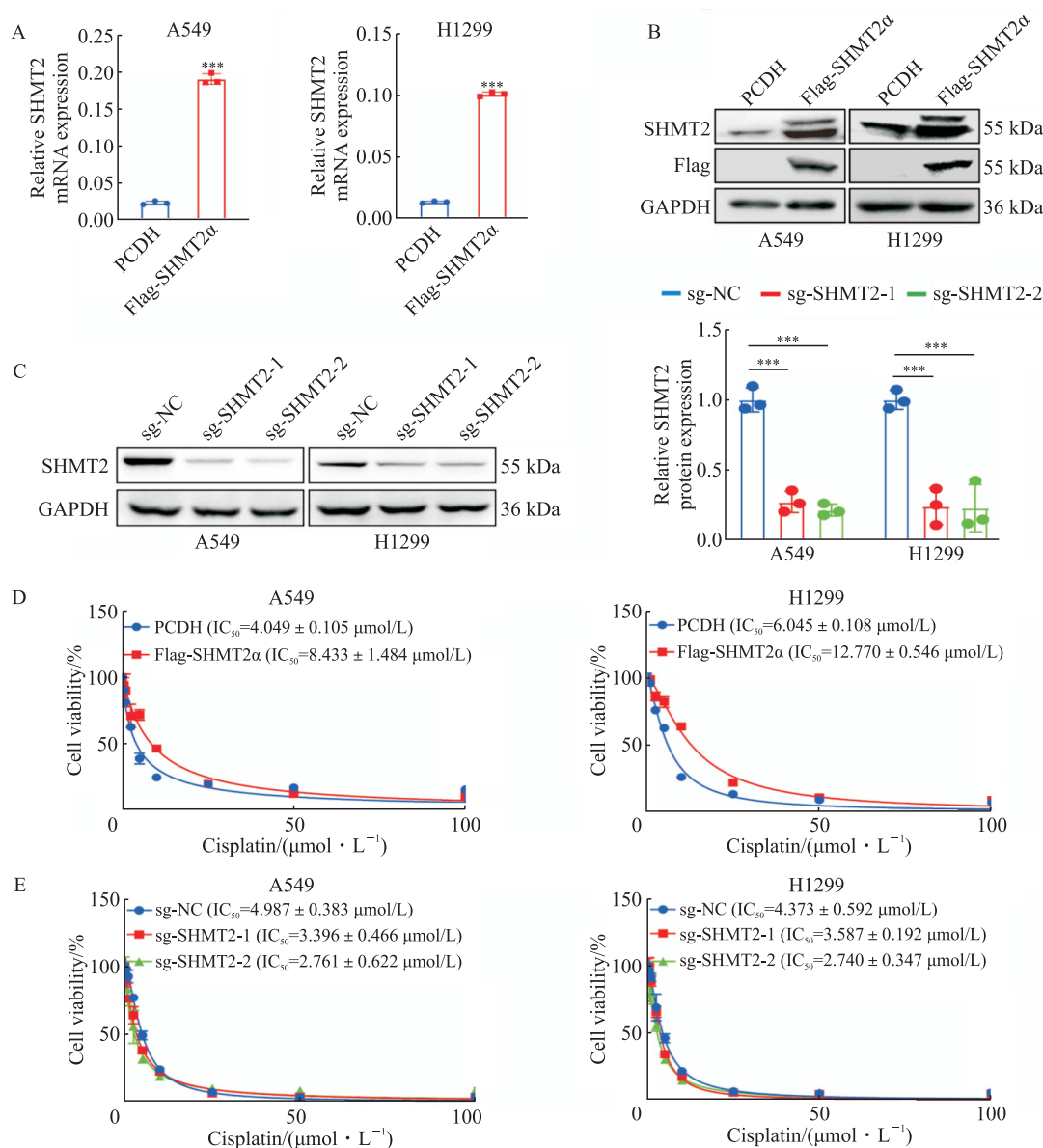
2.3 胞质型SHMT2 α 可拮抗DDP对NSCLC细胞的DNA损伤

为解析胞质型SHMT2 α 促进DDP耐药的作用机制, 使用5 $\mu\text{mol/L}$ DDP作用于稳定转染细胞株48 h后, 收集蛋白通过Western blot检测DNA损伤修复标志物 γ -H2AX的表达水平。结果表明, 与相应的对照组细胞相比, Flag-SHMT2 α 组稳定转染细胞中 γ -H2AX的蛋白水平减少 (A549: $P=0.013$; H1299: $P=0.024$), 而sg-SHMT2组稳定转染细胞中 γ -H2AX蛋白水平增加 (A549和H1299细胞中, sg-SHMT2-1与sg-NC组相比, $P < 0.001$; A549细胞中, sg-SHMT2-2与sg-NC相比, $P=0.015$; H1299细胞中, sg-SHMT2-2与sg-NC相比, $P=0.002$, 图4A、4B)。同时, 免疫荧光实验发现, Flag-SHMT2 α 组细胞核中DNA损伤灶点 (A549: 9.667 ± 1.528 ; H1299: 7.000 ± 1.000) 较PCDH组 (A549: 68.67 ± 9.609 ; H1299: 71.67 ± 7.506) 减少 ($P < 0.001$), 而sg-SHMT2组细胞核中DNA损伤灶点

(A549: sg-SHMT2-1: 28.330 ± 3.055 ; sg-SHMT2-2: 39.670 ± 5.033 ; H1299: sg-SHMT2-1: 55.670 ± 6.505 ; sg-SHMT2-2: 74.330 ± 5.686) 较sg-NC组 (A549: sg-NC: 9.000 ± 3.606 ; H1299: 20.670 ± 6.807) 增加 (A549细胞中, sg-SHMT2-1: $P=0.002$; sg-SHMT2-2: $P < 0.001$; H1299细胞中, sg-SHMT2-1: $P < 0.001$; sg-SHMT2-2: $P < 0.001$, 图4C)。上述结果提示胞质型SHMT2 α 可以通过促进DDP引起的DNA损伤修复来促使NSCLC细胞产生DDP耐药。

2.4 胞质型SHMT2 α 促进肿瘤干性基因的表达

为了验证胞质型SHMT2 α 是否会通过影响细胞干性维持来影响DDP耐药, 通过RTFQ-PCR检测了Flag-SHMT2 α 以及sg-SHMT2的A549、H1299稳定转染细胞中干性相关基因OCT4、Nanog、SOX2、CD133、BMI1和CD44的表达, 发现Flag-SHMT2 α 组中干性基因的表达较对照PCDH组升高 (A549: SOX2、CD133、BMI1: $P < 0.001$; OCT4: $P=0.006$; Nanog: $P=0.002$; CD44: $P=0.043$; H1299: OCT4、Nanog、SOX2、CD133、CD44: $P < 0.001$; BMI1: $P=0.003$), 而sg-SHMT2组中干性基因的表达较对照sg-NC组减少 (A549: SOX2、CD133: $P < 0.001$; OCT4: sg-SHMT2-1: $P=0.018$; sg-SHMT2-2: $P=0.048$; Nanog: sg-SHMT2-1:

图3 胞质型SHMT2 α 促进NSCLC细胞DDP耐药Fig. 3 Cytoplasmic SHMT2 α promotes DDP resistance in NSCLC cells

A, B: Validation of *SHMT2 α* overexpression by RT-qPCR and Western blot, respectively. C: Validation of *SHMT2* knockout efficiency by Western blot. D, E: Cell viability of *Flag-SHMT2 α* and *sg-SHMT2* stable cells, respectively, following DDP treatment at graded concentrations, as determined by the CCK-8 assay. Data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). ***: $P<0.001$, compared with control. All experiments were completed without contamination or technical failure. No data WERE omitted, and no outliers were excluded from the final analysis.

$P=0.002\ 9$; *sg-SHMT2-2*: $P=0.002\ 8$; *BM11*: *sg-SHMT2-1*: $P=0.004\ 5$; *sg-SHMT2-2*: $P=0.003\ 5$; *CD44*: *sg-SHMT2-1*: $P=0.003\ 8$; *sg-SHMT2-2*: $P=0.002\ 7$; H1299: *OCT4*、*Nanog*、*SOX2*、*CD133*、*BM11*: $P<0.001$; *CD44*: *sg-SHMT2-1*: $P=0.004\ 0$; *sg-SHMT2-2*: $P=0.004\ 3$, 图 5A、5B)。上述结果表明, 胞质型SHMT2 α 还可以通过影响细胞干性维持来降低NSCLC细胞对DDP的敏感性。

2.5 胞质型SHMT2 α 增强肿瘤干细胞成球能力

采用肿瘤干细胞成球实验, 在体外模拟肿瘤微环境, 富集和分离肿瘤干细胞, 进一步揭示过表达胞质型SHMT2 α 及敲除SHMT2对肿瘤细胞

干性维持的影响。培养稳定过表达胞质型SHMT2 α 和敲低SHMT2的A549及H1299细胞14 d后, 显微镜下观察显示, 与对照组相比 [A549: 直径: $(80.78 \pm 12.27)\ \mu\text{m}$, 成球率: 6.467 ± 1.436 ; H1299: 直径: $(87.22 \pm 20.41)\ \mu\text{m}$, 成球率: 7.100 ± 1.480], Flag-SHMT2 α 组形成的肿瘤干细胞球体直径显著增大 [A549: $(163.6 \pm 27.51)\ \mu\text{m}$; H1299: $(155.4 \pm 17.06)\ \mu\text{m}$], 成球率显著提高 (A549: 成球率: 11.03 ± 1.159 , $P=0.012\ 8$; H1299: 成球率: 13.13 ± 1.305 , $P<0.001$), 自我更新能力得到增强; 相反, sg-SHMT2组形成的球体直径显著减小 [A549: sg-NC: $(93.01 \pm 7.21)\ \mu\text{m}$; sg-SHMT2-1: $(57.67 \pm 6.11)\ \mu\text{m}$; sg-

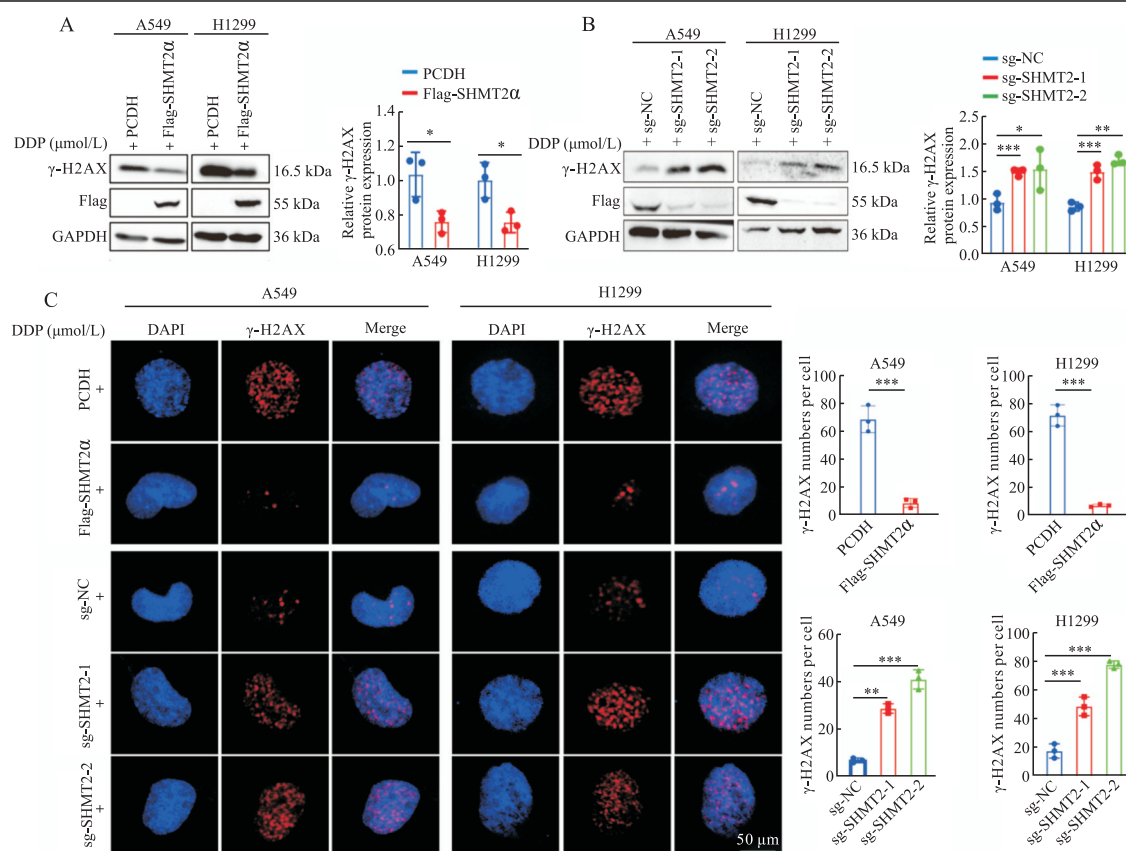


图4 胞质型 SHMT2α 降低 DDP 刺激导致的 NSCLC 的 DNA 损伤

Fig. 4 Cytoplasmic SHMT2α impairs DDP-induced DNA damage in NSCLC cells

A, B: Western blot analysis of γ -H2AX in Flag-SHMT2 α and sg-SHMT2 stable cells after DDP treatment (5 μ mol/L, 48 h). C: Representative immunofluorescence images of γ -H2AX foci (red) with DAPI nuclear counterstaining (blue) and quantitative analysis. Scale bar: 50 μ m. Data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

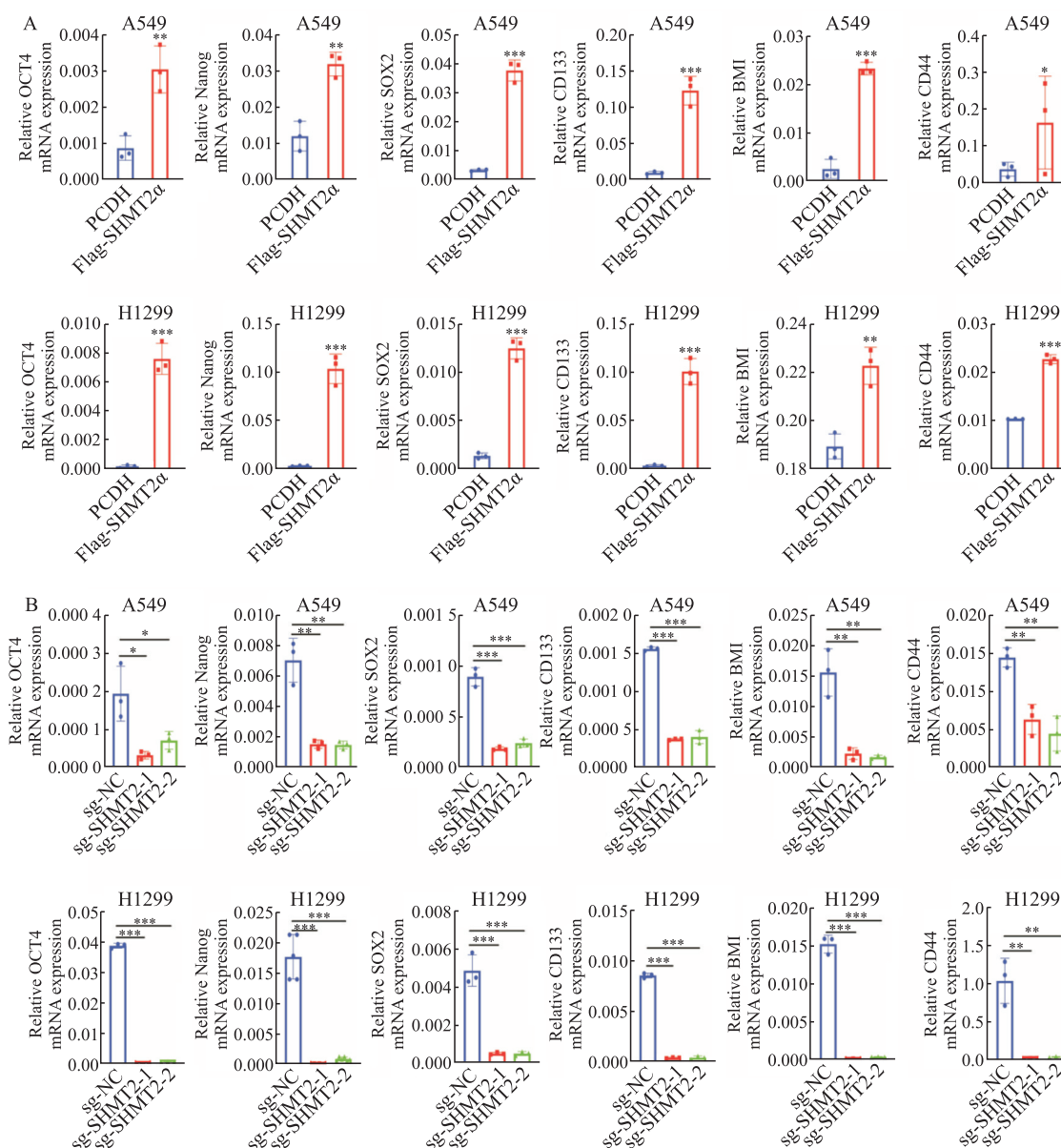
SHMT2-2: (63.33 $\pm$ 8.15) μ m; H1299: sg-NC: (89.070 $\pm$ 10.02) μ m; sg-SHMT2-1: (65.67 $\pm$ 6.03) μ m; sg-SHMT2-2: (56.02 $\pm$ 4.58) μ m], 成球率显著降低 (A549: sg-NC: 5.167 $\pm$ 0.874; sg-SHMT2-1: 1.400 $\pm$ 0.794; sg-SHMT2-2: 2.133 $\pm$ 0.306, $P<0.001$; H1299: sg-NC: 7.100 $\pm$ 0.625; sg-SHMT2-1: 3.067 $\pm$ 1.041; sg-SHMT2-2: 2.600 $\pm$ 1.044, $P<0.001$), 自我更新能力受到抑制 (图 6A、6B)。上述结果表明, 胞质型 SHMT2 α 能够促进 NSCLC 中肿瘤干细胞的干性维持及球体形成能力, 参与 DDP 耐药。

3 讨论

NSCLC 患者的临床结局虽已得到显著改善, 但耐药性问题依然严峻, 是构成当前限制化疗效果的主要瓶颈^[22]。尽管铂类抗癌药物具有毒性且常出现耐药性, 但仍然是应用较广的抗癌化疗药物之一。化疗后存活的 NSCLC 细胞抗药性增加, 是导致复发和耐药的核心原因^[23]。基于此, 阐明化疗耐药性的分子机制, 并寻找能够逆转耐药、增敏化疗的有效靶点和治疗新策略, 对于改善 NSCLC 患者的预后具有重要的临床意义。

SHMT2 是丝氨酸代谢过程中的关键酶, 在催化丝氨酸转化为甘氨酸的过程中会产生一碳单位, 为肿瘤细胞生存提供物质基础^[24]。有研究^[25]利用公共在线数据集发现, SHMT2 是独立的预后因素, 其高表达与肺腺癌患者不良预后相关。在 NSCLC 中, NRF2 对 SHMT2 的转录上调支持谷胱甘肽和核苷酸的产生, 与 NSCLC 患者的不良预后相关^[26]。亦有研究^[11-12]表明, SHMT2 与乳腺癌和结直肠癌细胞的化疗耐药性有关, 目前未见关于 SHMT2 与 NSCLC 化疗耐药相关的研究报道。本研究在与野生型 A549 相比, A549-DDP 耐药细胞株中 SHMT2 总蛋白表达不变的情况下, 创新性地发现 A549-DDP 细胞中的胞质型 SHMT2 α 的表达水平高于野生型 A549 细胞。基于过表达胞质型 SHMT2 α 及敲除 SHMT2 的稳定转染细胞, 发现过表达胞质型 SHMT2 α 可以降低 NSCLC 细胞对 DDP 的敏感性, 提示胞质型 SHMT2 α 可能是 NSCLC 产生 DDP 耐药的一个潜在靶点。

DDP 与嘌呤碱基交联, 破坏 DNA 修复机制并诱导细胞凋亡^[27]。DNA 修复和损伤耐受在

图5 胞质型SHMT2 α 促进肿瘤干性基因的表达Fig. 5 Cytoplasmic SHMT2 α promotes the expression of stemness-related genes in tumors

A: RTFQ-PCR analysis of stemness markers in Flag-SHMT2 α -overexpressing stable cells. B: RTFQ-PCR analysis of stemness markers in sg-SHMT2 stable cells. *: $P < 0.05$, compared with corresponding control group (PCDH or sg-NC); **: $P < 0.01$, compared with corresponding control group (PCDH or sg-NC); ***: $P < 0.001$, compared with the corresponding control group (PCDH or sg-NC).

DDP 治疗应答中发挥关键作用, 这使得 DNA 损伤应答及修复蛋白成为有潜力的治疗靶点^[7]。在喉鳞状细胞癌中敲低 *PFKL* 可增强 DDP 诱导的 γ -H2AX 表达, 促进 DDP 诱导的癌细胞凋亡^[28]。在三阴性乳腺癌中, 敲除 *UBR5* 可促进 γ -H2AX 的表达, 增强癌细胞对 DDP 的敏感性^[29]。在鼻咽癌中发现, *RNF138* 通过促进鼻咽癌细胞增殖、抑制凋亡和减弱 γ -H2AX 介导的 DNA 损伤, 可增强 DDP 的耐药性^[30]。本研究发现, 胞质型 SHMT2 α 可以促进 NSCLC 细胞的 DNA 损伤修复, 进而降低细胞对 DDP 的敏感性。查阅相关文献, 其作用机制可能通过以下两种途径: ① SHMT2 α 过表达时可以提供更多一碳单位, 加速

核苷酸合成, 增强癌细胞 DNA 修复能力^[31]; ② SHMT2 α 介导的代谢通路能产生还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH), 能够协助细胞清除 DDP 刺激后产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 维持氧化还原的稳态, 间接帮助细胞存活, 抵抗 DDP 的杀伤作用^[32-33]。由此可见, 胞质型 SHMT2 α 可能成为逆转 NSCLC 细胞 DDP 耐药的有效生物标志物。

CSC 具有肿瘤起始能力, 被视为极具前景的治疗靶点^[34]。目前, 在胃肠道癌症中, 靶向 CSC 已经可以作为有效的治疗策略^[35]。在乳腺癌中, 化疗药物阿霉素通过上调乳腺癌 CSC 中的

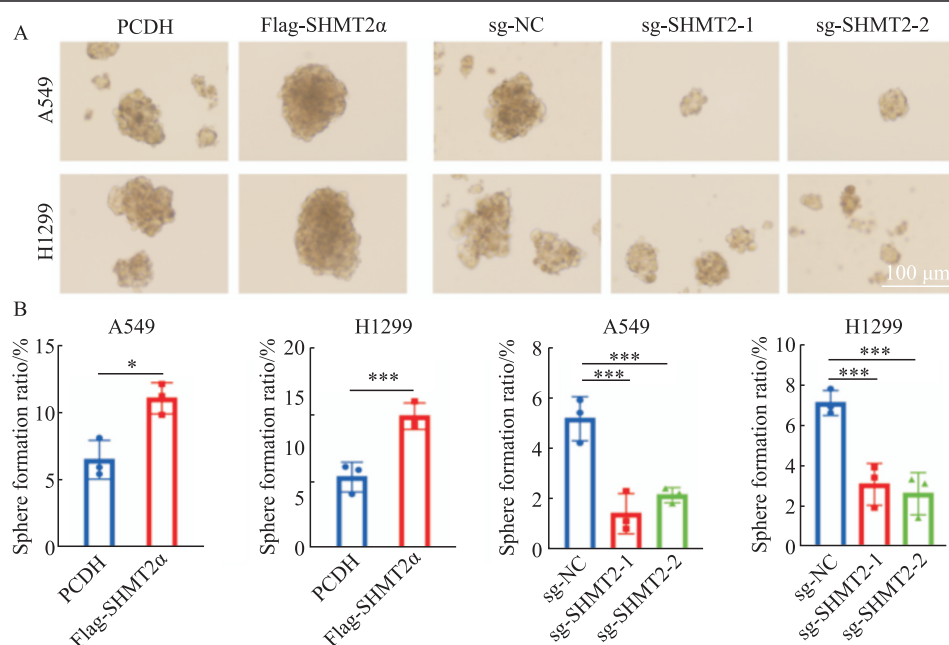


图6 胞质型 SHMT2α 增强肿瘤干细胞成球能力

Fig. 6 Cytoplasmic SHMT2α promotes the sphere-forming capacity of cancer stem cells

A: Sphere formation assay was performed to evaluate the stem cell sphere-forming capacity in *Flag-SHMT2α* and *sg-SHMT2* stable cells. Scale bar: 100 μm. B: Statistical quantitative analysis of the stem cell spheroid formation ratio. Data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). *: $P<0.05$, compared with control group; **: $P<0.01$, compared with control group; ***: $P<0.001$, compared with control group.

FOXC1, 启动 FOXC1-OCT4/SOX2 双向正反馈转录激活环路, 进而增强干性和耐药性, 最终导致肿瘤复发。因此, 敲除 *FOXC1* 可以削弱 CSC 干性和耐药性, 增敏化疗^[36]。在肺癌中, ECE-1 通过触发 CSC 样表型增强 DDP 耐药性和侵袭性^[37]。此外, 干性标志物如 OCT4、SOX2 等多种肿瘤的化疗耐受及患者不良预后密切相关^[38-39]。有研究^[40]表明, CSC 参与癌症的发生、发展, 是癌症治疗失败的重要原因。本研究发现过表达胞质型 SHMT2α 可以增强细胞干性相关标志物的表达, 还可以增强 NSCLC 干细胞成球形成能力。在头颈部恶性肿瘤中, 利用 TCGA 数据进行的通路富集分析显示, SHMT2 与癌症干细胞的调控和维持密切相关。沉默 *SHMT2* 可抑制干性标志物的表达和肿瘤球体形成, 并且会降低与 Notch 和 Wnt 通路相关基因的表达^[41]。该研究结果提示胞质型 SHMT2α 可能通过激活 Notch 和 Wnt 信号通路, 在转录层面驱动干性标志物的表达, 增强 NSCLC 细胞的干性维持能力, 降低了其对 DDP 治疗的响应率。

但是本研究仍存在一些不足: ① 本研究主要集中于体外细胞实验, 缺少体内动物实验; ② 未探及胞质型 SHMT2α 是否直接在转录水平调控干性基因的表达机制, 尚需要通过 ChIP-seq、荧光素酶报告基因等实验来佐证; ③ 需要临床样本评估胞质型 SHMT2α 表达水平与接受 DDP 治疗后

的耐药 NSCLC 患者预后的相关性。本研究的体外发现向临床转化需考虑以下外推性局限。首先, 本研究仅选用 A549 (*p53* 野生型) 和 H1299 (*p53* 缺失型) 两株 NSCLC 细胞, 细胞系模型的代表性有限。虽可对比 *p53* 依赖性 DDR 通路的差异, 但仅依赖两株细胞且耐药模型仅 A549-DDP 一株, 尚不足以全面评估胞质型 SHMT2α 在不同肺癌分子亚型中的功能异质性。其次, DDP 作用浓度的临床可比性与体外模型存在局限。本研究采用的 5 μmol/L DDP 虽为文献常用浓度, 但患者血浆游离药物浓度远低于此值, 且体外培养缺少肿瘤微环境中免疫细胞、成纤维细胞及细胞外基质的调控作用, 可能高估或低估 SHMT2 的实际耐药贡献。最后, 需要考虑向其他 NSCLC 亚型及其他铂类药物的外推可能性。本研究主要基于肺腺癌细胞系进行耐药机制解析, 其他 NSCLC 亚型的代谢特征、DNA 修复能力及肿瘤干细胞调控网络与腺癌存在差异。因此, 本研究结论向其他 NSCLC 亚型的外推需谨慎, 建议后续通过公共数据库分析 SHMT2 在不同 NSCLC 亚型中的表达差异及与铂类化疗结局的关联, 并补充其他亚型细胞系的功能验证。不同铂类药物各自的 DNA 加合物形成速率、修复识别机制及毒性谱存在差异。SHMT2 介导的核苷酸合成增强和 DNA 损伤修复加速理论上可能对不同铂类药物产生交叉耐药, 但具体耐药程度及 SHMT2 调

控的修复通路偏好性是否因铂类药物种类而异, 尚需实验验证。综上, 本研究结论应优先定位于肺腺癌DDP耐药模型, 其普适性需在多细胞系、人源化动物模型及临床队列中进一步验证。

总的来说, SHMT2在NSCLC DDP耐药细胞的胞质中高表达, 可通过增强DNA损伤修复, 促进肿瘤细胞干性维持, 进而降低NSCLC细胞对DDP的敏感性。本研究为逆转NSCLC对DDP的耐药性提供了潜在治疗靶点, 但实现临床转化仍需解决以下关键问题。首先, 在临床标本中精准检测胞质型SHMT2 α 是转化的技术前提。常规免疫组织化学难以区分胞质型SHMT2 α 与线粒体型SHMT2, 亟需开发亚型特异性抗体或采用免疫荧光共定位等替代方案。未来若开发出特异性识别SHMT2 α 剪切异构体的抗体, 将极大地推动该标志物的临床落地。其次, SHMT2抑制剂(如SHIN1、SHIN2)联合DDP的转化潜力值得关注, 需系统评估。最后, 在临床试验层面, 可将晚期驱动基因阴性NSCLC患者作为目标人群, 以基线肿瘤组织中胞质型SHMT2 α /线粒体型SHMT2比值作为分层标志物, 将患者分为高比值组与低比值组, 前瞻性观察DDP为基础化疗的客观缓解率及无进展生存期差异, 同时探索SHMT2抑制剂联合DDP在该人群中的剂量递增方案及耐受性。综上, 本研究所揭示的胞质型SHMT2-DDP耐药关联, 为上述转化路径提供了思路, 未来需从检测方法开发和体内药效验证入手, 以推动该靶点向临床转化。

第一作者:

张欣宇 (ORCID: 0009-0000-8605-7160), 硕士。

通信作者:

曾园园 (ORCID: 0000-0002-2260-4468), 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, E-mail: zengyuanyuan0921@163.com。

作者贡献声明:

张欣宇: 实验设计、实施, 分析、整理、汇总数据, 撰写论文; 顾晨: 实验实施, 数据分析; 刘越: 文献查阅, 修改论文; 郭长城: 分析数据, 修改论文; 曾园园: 指导研究设计, 修改论文。

[参 考 文 献]

- [1] Wang C D, Tan S Y, Li J W, et al. CircRNAs in lung cancer—Biogenesis, function and clinical implication [J]. *Cancer Lett*, 2020, 492: 106–115.
- [2] Wang Z F, Tu K L, Xia L, et al. The open chromatin landscape of non-small cell lung carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(19): 4840–4854.
- [3] Tang X L, Cheng L Z, Li G, et al. A small-molecule compound D6 overcomes EGFR-T790M-mediated resistance in non-small cell lung cancer [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 1391.
- [4] Pan X F, Chen Y, Shen Y Z, et al. Knockdown of TRIM65 inhibits autophagy and cisplatin resistance in A549/DDP cells by regulating miR-138-5p/ATG7 [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 429.
- [5] Xu W, Wang S, Chen Q, et al. TXNL1-XRCC1 pathway regulates cisplatin-induced cell death and contributes to resistance in human gastric cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(2): e1055.
- [6] Jin Y Y, Xu X Y, Li W. Role of cell division cycle associated 2 in ovarian cancer: effects on tumor progression and cisplatin resistance [J]. *Cytojournal*, 2025, 22: 81.
- [7] Rocha C R R, Silva M M, Quinet A, et al. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2018, 73(suppl 1): e478s.
- [8] Shi L, Xu Z Z, Yang Q, et al. IL-7-Mediated IL-7R-JAK3/STAT5 signalling pathway contributes to chemotherapeutic sensitivity in non-small-cell lung cancer [J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(6): e12699.
- [9] Jiao Z S, Zhang M, Ning J Y, et al. The oncoprotein SET promotes serine-derived one-carbon metabolism by regulating SHMT2 enzymatic activity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2025, 122(19): e2412854122.
- [10] Zhao X Y, Fu J F, Tang W F, et al. Inhibition of serine metabolism promotes resistance to cisplatin in gastric cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 4833–4842.
- [11] Xie M, Pei D S. Serine hydroxymethyltransferase 2: a novel target for human cancer therapy [J]. *Invest New Drugs*, 2021, 39(6): 1671–1681.
- [12] Ducker G S, Ghergurovich J M, Mainolfi N, et al. Human SHMT inhibitors reveal defective glycine import as a targetable metabolic vulnerability of diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(43): 11404–11409.
- [13] Li X, Zhang K J, Hu Y, et al. ERR α activates SHMT2 transcription to enhance the resistance of breast cancer to lapatinib *via* modulating the mitochondrial metabolic adaption [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(1): BSR20192465.
- [14] Chen J, Na R S, Xiao C, et al. The loss of SHMT2 mediates 5-fluorouracil chemoresistance in colorectal cancer by upregulating autophagy [J]. *Oncogene*, 2021, 40(23): 3974–3988.
- [15] Walden M, Tian L, Ross R L, et al. Metabolic control of BRISC-SHMT2 assembly regulates immune signalling [J]. *Nature*, 2019, 570(7760): 194–199.
- [16] Deng M H, Zhou Z H, Chen J W, et al. Enhanced oxidative phosphorylation driven by TACO1 mitochondrial translocation promotes stemness and cisplatin resistance in bladder cancer [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(5): e2408599.
- [17] Zeng Z, Fu M Y, Hu Y, et al. Regulation and signaling pathways in cancer stem cells: implications for targeted therapy for cancer [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 172.
- [18] Chu X J, Tian W T, Ning J Y, et al. Cancer stem cells: advances in knowledge and implications for cancer therapy [J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 170.
- [19] Zhao Y S, Zheng R Y, Chen J, et al. CircRNA CDR1as/miR-641/

- HOXA9 pathway regulated stemness contributes to cisplatin resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 289.
- [20] Zhang L Y, Li Q M, Liu C J, et al. Cisplatin-mediated activation of NF- κ B promotes lung cancer stem cell formation *via* DNA repair pathways[J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 1336.
- [21] Zhao X M, Wu X H, Wang H J, et al. Targeted therapy for cisplatin-resistant lung cancer *via* aptamer-guided nano-zinc carriers containing USP14 siRNA [J]. *MedComm*, 2023, 4(2): e237.
- [22] Xie H Y, Yao J, Wang Y X, et al. Exosome-transmitted circVMP1 facilitates the progression and cisplatin resistance of non-small cell lung cancer by targeting miR-524-5p-METTL3/SOX2 axis[J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 1257-1271.
- [23] 张灵玉, 刘春江, 李秋妹, 等. CAPN4调控肿瘤干细胞干性在肺腺癌顺铂耐药中的作用机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2025, 32(7): 681-688.
- Zhang L Y, Liu C J, Li Q M, et al. Mechanism of CAPN4-mediated cancer stem cell stemness in cisplatin resistance in lung adenocarcinoma [J]. *Chin J Cancer Biotherapy*, 2025, 32(7): 681-688.
- [24] 陈宜利, 王培森, 陈显灵, 等. 丝氨酸羟甲基转移酶抑制剂在肿瘤治疗中的研究进展[J]. *中国临床医学*, 2025, 32(1): 125-134.
- Chen Y L, Wang P S, Chen Y L, et al. Research progress of serine hydroxymethyltransferase inhibitors in tumor treatment [J]. *Chin J Clin Med*, 2025, 32(1): 125-134.
- [25] Luo L X, Zheng Y S, Lin Z P, et al. Identification of SHMT2 as a potential prognostic biomarker and correlating with immune infiltrates in lung adenocarcinoma [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 6647122.
- [26] DeNicola G M, Chen P H, Mullarky E, et al. Erratum: NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer [J]. *Nat Genet*, 2016, 48(4): 473.
- [27] Zhang X Y, Zhu B C, He M, et al. Proto-oncogene c-Myb potentiates cisplatin resistance of ovarian cancer cells by downregulating lncRNA NKILA and modulating cancer stemness and LIN28A-let7 axis [J]. *J Ovarian Res*, 2024, 17(1): 102.
- [28] Wang P, Ye Y X, Chen Z Y, et al. PFKL promotes cell viability and glycolysis and inhibits cisplatin chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 730: 150366.
- [29] Zhang H H, Shao X Y, Wang X M, et al. UBR5 antagonizes DNA damage to enhance the doxorubicin resistance of triple-negative breast cancer by p38 signaling[J]. *Int J Surg*, 2025, 111(11): 7798-7813.
- [30] Xu H Y, Yin Q, Fan L N, et al. RNF138 contributes to cisplatin resistance in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Sci Rep*, 2025, 15: 1406.
- [31] Liberati F R, Spizzichino S, Di Russo S, et al. RNA-mediated inhibition of mitochondrial SHMT2 impairs cancer cell proliferation[J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11: 369.
- [32] Zhang Y, Liu Z, Wang X L, et al. SHMT2 promotes cell viability and inhibits ROS-dependent, mitochondrial-mediated apoptosis *via* the intrinsic signaling pathway in bladder cancer cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(10): 1514-1527.
- [33] Chen Y L, Zhang X Y, Pang X D, et al. SHMT2 inhibition triggers mitochondrial apoptosis to suppress lung adenocarcinoma progression [J]. *J Transl Med*, 2026, 24(1): 546.
- [34] Li F S, Li Z P, Wei C, et al. Application of hydrogels for targeting cancer stem cells in cancer treatment [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 180: 117486.
- [35] Xuan S H, Hua M L, Xiang Z, et al. Roles of cancer stem cells in gastrointestinal cancers [J]. *World J Stem Cells*, 2023, 15(4): 209-220.
- [36] Dutta A, Chakraborty S, Bhattacharya A, et al. Hsa-miR-5688 inhibits FOXC1-OCT4/SOX2 feedforward loop that drives chemoresistance in breast cancer stem cells[J]. *Mol Ther Oncol*, 2025, 33(2): 200982.
- [37] Almarza C, Villalobos-Nova K, Toro M A, et al. Cisplatin-resistance and aggressiveness are enhanced by a highly stable endothelin-converting enzyme-1c in lung cancer cells [J]. *Biol Res*, 2024, 57(1): 74.
- [38] Huang Q, Liu L P, Xiao D K, et al. CD44⁺ lung cancer stem cell-derived pericyte-like cells cause brain metastases through GPR124-enhanced trans-endothelial migration [J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(9): 1621-1636.e8.
- [39] Su B H, Wang C T, Chang J M, et al. OCT4 promotes lung cancer progression through upregulation of VEGF-correlated chemokine-1[J]. *Int J Med Sci*, 2025, 22(3): 680-695.
- [40] 杨奔, 秦丽雅, 孙思鹏, 等. 肺癌干细胞特性与靶向治疗[J]. *生命的化学*, 2026, 46(2): 259-271.
- Yang B, Qin L Y, Sun S P, et al. The stemness characteristics and targeted therapy of lung cancer stem cells [J]. *Chem Life*, 2026, 46(2): 259-271.
- [41] Jin Y L, Jung S N, Lim M A, et al. SHMT2 induces stemness and progression of head and neck cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 9714.

(收稿日期: 2026-06-30 修回日期: 2026-09-19)

(责任编辑: 李广涛)