



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.250323
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.250323
China Journal of General Surgery, 2025, 34(9):1975-1986.

· 基础研究 ·

TENT5B上调PRKAA2表达促进胃癌铁死亡的作用与机制研究

林芝¹, 李亮², 朱开宇³, 龙飞^{2, 4}

(中南大学湘雅三医院 1. 儿科 2. 胃肠外科 4. 基础医学博士后流动站, 湖南 长沙 410013; 3. 中山大学附属第一医院 胃肠外科中心, 广东 广州 510080)

摘要

背景与目的: 胃癌是全球高发且预后不良的恶性肿瘤, 现有治疗手段疗效有限。铁死亡作为一种新型细胞死亡方式, 在肿瘤治疗中具有重要潜力。末端核苷酸转移酶5B (TENT5B) 在多种肿瘤中低表达, 但其在胃癌中的作用尚未明确。本研究旨在探讨TENT5B在胃癌中的表达特征及其通过调控铁死亡抑制肿瘤进展的机制。

方法: 通过TCGA和GEO数据库分析TENT5B在胃癌中的表达情况, 并采用qRT-PCR和Western blot检测其在胃癌组织及细胞中的表达水平; 利用CCK-8、克隆形成、划痕愈合和Transwell实验评估TENT5B过表达对胃癌细胞增殖和迁移的影响; 通过细胞活力、脂质活性氧化物和丙二醛水平分析铁死亡情况; 结合生物信息学、mRNA稳定性检测和功能挽救实验探讨其分子机制; 并通过小鼠皮下成瘤实验验证其体内作用。

结果: TENT5B在胃癌组织和细胞中明显下调。过表达TENT5B可抑制胃癌细胞增殖和迁移, 并促进铁死亡。机制研究表明, TENT5B通过增强PRKAA2 mRNA稳定性上调其表达, 进而介导铁死亡的发生。体内实验进一步证实TENT5B过表达可抑制肿瘤生长并提高PRKAA2水平。

结论: TENT5B作为潜在的抑癌基因, 可通过增强PRKAA2 mRNA稳定性促进铁死亡, 从而抑制胃癌进展。本研究为胃癌铁死亡靶向治疗提供了新的分子依据和潜在治疗策略。

关键词

胃肿瘤; 铁死亡; DNA核苷酸外转移酶; AMP活化蛋白激酶类

中图分类号: R735.2

The role and mechanism of TENT5B in upregulating PRKAA2 expression to promote ferroptosis in gastric cancer

LIN Zhi¹, LI Liang², ZHU Kaiyu³, LONG Fei^{2,4}

(1. Department of Pediatrics 2. Department of Gastrointestinal Surgery 4. Postdoctoral Research Station of Basic Medicine, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China; 3. Center for Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract

Background and Aims: Gastric cancer remains a common malignancy worldwide with a poor

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82303255, 82400213)。

收稿日期: 2025-06-09; **修订日期:** 2025-08-01。

作者简介: 林芝, 中南大学湘雅三医院主治医师/助理研究员, 主要从事肿瘤细胞铁死亡方面的研究。

通信作者: 龙飞, Email: xy_feilong@csu.edu.cn

prognosis and limited response to current therapies. Ferroptosis, a novel form of regulated cell death, has emerged as a promising therapeutic target in cancer. Terminal nucleotidyltransferase 5B (TENT5B) is downregulated in various tumors, but its role in gastric cancer and ferroptosis remains unclear. This study aimed to investigate the expression pattern and biological function of TENT5B in gastric cancer and to elucidate its underlying mechanisms in regulating ferroptosis.

Methods: The expression of TENT5B in gastric cancer was analyzed using TCGA and GEO datasets, and further validated in gastric cancer tissues and cell lines by qRT-PCR and Western blotting. CCK-8, colony formation, wound healing, and Transwell assays were performed to evaluate the effects of TENT5B overexpression on cell proliferation and migration. Ferroptosis was assessed by measuring cell viability, lipid ROS, and MDA levels. Bioinformatics analysis, mRNA stability assays, and rescue experiments were conducted to explore the molecular mechanisms. A subcutaneous xenograft mouse model was used to validate the in vivo effects.

Results: TENT5B was significantly downregulated in gastric cancer tissues and cells. Overexpression of TENT5B inhibited cell proliferation and migration while promoting ferroptosis. Mechanistically, TENT5B enhanced PRKAA2 mRNA stability and upregulated its expression, thereby exerting tumor-suppressive effects. In vivo, TENT5B overexpression suppressed tumor growth and elevated PRKAA2 expression.

Conclusion: TENT5B functions as a tumor suppressor in gastric cancer by stabilizing PRKAA2 mRNA, promoting ferroptosis, and inhibiting cancer progression. These findings suggest that TENT5B may serve as a promising molecular target for ferroptosis-based therapeutic strategies in gastric cancer.

Key words

Stomach Neoplasms; Ferroptosis; DNA Nucleotidyltransferase; AMP-Activated Protein Kinases

CLC number: R735.2

胃癌是我国乃至全球最常见的恶性肿瘤之一，但大部分患者对现有治疗手段（如化疗、放疗、靶向治疗、免疫治疗）不敏感，复发转移率高、预后差，导致病死率居高不下^[1-3]。胃癌的防治迫切需要寻找新的靶点，研发新的药物。近年来，铁死亡（ferroptosis）作为一种新型细胞死亡方式，因其在肿瘤治疗中的潜力而受到国内外广泛关注^[4-7]。末端核苷酸转移酶 5B（terminal nucleotidyltransferase 5B, TENT5B），又称为序列相似家族 46 成员 B（FAM46B），是一种重要的 poly（A）聚合酶^[8-9]，在多种肿瘤中被发现表达下调，且与肿瘤的发生发展密切相关^[10-13]。然而，TENT5B 在胃癌中的作用及其对铁死亡的影响尚不清楚。本研究旨在探究 TENT5B 对胃癌细胞增殖、迁移和铁死亡的影响及其作用机制，以期胃癌的精准治疗提供新策略和新方法。

1 材料与方法

1.1 组织标本

收集 2024 年 6 月—2024 年 12 月在中南大学湘雅三医院胃肠外科接受手术治疗的 25 例胃癌患者的癌组织和癌旁正常组织（距癌灶边缘 10 cm 以上的正常胃黏膜组织）标本，利用液氮速冻后冻存于 -80 ℃ 冰箱。所有患者术前均未接受过化疗、靶向治疗、免疫治疗和放疗等抗肿瘤治疗。本研究通过了中南大学湘雅三医院伦理委员会审批（批号：24308）。

1.2 细胞系和细胞培养

人正常胃上皮细胞株（GES-1）和胃癌细胞株（AGS 和 HGC27）均购自美国典型菌种保藏中心（ATCC），并在含 10% 胎牛血清（美国 Sigma-Aldrich 公司）、100 IU/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基（美国 Gibco 公司）中培养。上述细胞均置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养，定期换液和传代。所有细胞均经过短串联重

复序列 (STR) 鉴定, 且没有支原体污染。

1.3 方法

1.3.1 慢病毒转染 TENT5B 的过表达慢病毒和阴性对照慢病毒均由上海吉凯基因公司构建。慢病毒细胞转染和药物筛选过程参照吉凯公司提供的操作步骤进行, 简述如下: 选取处于对数生长期的细胞接种于6孔板中, 根据细胞种类配制病毒感染液, 加入各孔; 病毒感染细胞 12~24 h 后, 予以换液; 细胞培养 48~72 h 后, 予以嘌呤霉素 (浓度为 5~10 $\mu\text{g/mL}$) 进行药物筛选, 存活的细胞即为稳定转染细胞株; 细胞通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测验证过表达效率后, 用于细胞功能实验和分子机制研究。

1.3.2 qRT-PCR 检测 使用 RNA_{fast200} 总 RNA 极速抽提试剂盒 (上海飞捷生物技术有限公司) 提取组织和细胞中的总 RNA, 再利用 NanoDrop™ OneC 微量分光光度计 (美国 Thermo Scientific 公司) 测定 RNA 样品的浓度和纯度。按照 Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒 (含去除 gDNA 试剂) Ver.2 (湖南艾科瑞生物公司) 的操作步骤将 RNA 去除 gDNA 并逆转录为 cDNA 后, 再按照 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (湖南艾科瑞生物公司) 的操作步骤进行 qRT-PCR 扩增。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算倍数变化值 (FC)。引物序列为: TENT5B 正向: CCT GCC TAC TAG ACT TCC TGC, 反向: CTT GCC GCT CTT GTT GGA CA; GAPDH 正向: AGC CAC ATC GCT CAG ACA C, 反向: GCC CAA TAC GAC CAA ATC C。

1.3.3 细胞增殖检测 (CCK-8) 将不同处理的胃癌细胞分别接种至 96 孔板 (1 000~3 000 个/孔) 中培养, 每组设置 5 个复孔。分别于培养 0、24、48 和 72 h, 向每孔加入 100 μL 浓度为 10% 的 CCK-8 检测试剂 (武汉亚科因生物技术有限公司), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 1 h 后, 使用多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek Instruments 公司) 检测 450 nm 波长处的光密度 (OD) 值。

1.3.4 平板克隆形成实验 将不同处理的胃癌细胞分别接种至 6 孔板 (200~500 个/孔) 中培养, 每组设置 3 个复孔。培养 7~10 d 后弃去培养基, 用 PBS 清洗 2 遍, 然后用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 0.25% 结晶紫染色 15 min, 清洗干净后室温下自然干燥。拍照并计数各孔中的细胞克隆球数目。

1.3.5 划痕愈合实验 将不同处理的胃癌细胞接种

至 6 孔板 ($5\sim 8 \times 10^5$ 个/孔) 中, 培养过夜。待其融合密度达到 90%~100% 时, 用移液器枪头在细胞表面划痕, 保证每条划痕粗细均匀一致。用 PBS 清洗 3 次, 去除脱落的细胞, 加入不含血清的培养基继续培养。分别于 0 h 和 24 h 进行拍照, 观察划痕愈合的情况。细胞迁移率 (也称为伤口愈合率), 通过以下公式计算: 细胞迁移率 (%) = $[(0 \text{ h 细胞间距} - 24 \text{ h 细胞间距}) / 0 \text{ h 细胞间距}] \times 100\%$ 。

1.3.6 Transwell 迁移实验 将不同处理的胃癌细胞接种至 Transwell 小室上室 ($3\sim 5 \times 10^5$ 个/孔), 培养基体积为 200 μL , 不含血清; 下室加入 600 μL 含有 20% 胎牛血清的培养基。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后取出小室, 先用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 0.25% 结晶紫染色 15 min, 最后用棉签轻轻拭去小室内表面细胞。在倒置显微镜 (日本 Olympus 公司) 下观察并计算 5 个随机视野中的迁移细胞数。

1.3.7 细胞活力检测 采用 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 试剂盒 (美国 Promega 公司), 通过对三磷酸腺苷进行定量来检测细胞活力。将不同处理的胃癌细胞分别接种至 96 孔板 ($1\sim 2 \times 10^4$ 个/孔) 中培养, 每组设置 3 个复孔。细胞经处理后, 向每孔加入 100 μL Cell Viability 检测试剂; 室温避光孵育 10 min 后, 使用多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek Instruments 公司) 检测生物发光信号强度。细胞活力的计算公式为: 细胞活力 (%) = $(\text{细胞处理组} - \text{空白背景组}) / (\text{细胞对照组} - \text{空白背景组}) \times 100\%$ 。

1.3.8 脂质活性氧化物 (ROS) 和丙二醛 (MDA) 检测 参照文献^[14], 采用 BODIPY 581/591 C11 探针 (美国 Thermo Scientific 公司) 检测胃癌细胞中的脂质 ROS 水平; 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司) 检测胃癌细胞中的 MDA (脂质过氧化的终产物) 浓度。

1.3.9 mRNA 稳定性检测 将不同处理的胃癌细胞接种至 6 孔板 ($3\sim 5 \times 10^5$ 个/孔) 中, 培养过夜。待其融合密度达到 70% 左右时, 用 5 $\mu\text{g/mL}$ 的放线菌素 D (美国 Sigma-Aldrich 公司) 处理细胞以抑制 RNA 的生成。在指定的时间点 (0、1、2、4、8 h) 分别提取细胞总 RNA, 采用 qRT-PCR 检测 PRKAA2 mRNA 的相对剩余量 (%), 并计算其半衰期。

1.3.10 Western blot 实验 使用全蛋白提取试剂盒 (江苏凯基 KeyGEN 生物技术股份有限公司) 从组

织或细胞中提取全蛋白。将等量的蛋白通过10%的SDS-PAGE分离,然后转移到PVDF膜上(美国Millipore公司)。用8%脱脂牛奶室温下封闭PVDF膜1 h后,先用特异性一抗在4℃孵育过夜,然后用相应的二抗在室温孵育1 h。最后,使用ChemiDoc Touch化学发光成像仪(美国Bio-Rad公司)进行膜显影,并使用Image Lab软件进行图片编辑。本研究使用的抗体均购自武汉三鹰(Proteintech)生物技术有限公司:抗TENT5B抗体(货号:23149-1-AP;1:1 000稀释)、抗PRKAA2抗体(货号:18167-1-AP;1:1 000稀释)和抗GAPDH抗体(货号:60004-1-Ig;1:6 000稀释)。

1.3.11 动物实验 6只雌性NOD-SCID小鼠(5~6周龄、体质量18~20 g)购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,并饲养于中南大学实验动物学部。小鼠置于独立通气笼盒内,SPF级环境,自由摄食高压灭菌饲料和饮水。小鼠适应性喂养1周后,随机分成两组(对照组和过表达组),每组3只。对照组于每只小鼠腋部皮下注射 5×10^6 个对照胃癌细胞(重悬于100 μ L PBS中),而过表达组注射等量过表达TENT5B的胃癌细胞。每周观察并记录小鼠饮食活动状态、体质量和肿瘤大小,肿瘤体积按公式 $0.5 \times \text{长} \times \text{宽}^2$ 计算。所有动物实验方案均获中南大学实验动物部伦理委员会批准(批号:XMSB-2024-0220),并遵守国家卫生研究院制定的《实验动物福利和使用指南》。

1.4 统计学处理

使用GraphPad Prism 10.0软件进行数据分析和绘图。本研究中的所有实验(除外动物实验)均进行了至少3次生物学重复,并展示了其中1次代表性实验数据。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;癌组织与癌旁组织中TENT5B表达水平的比较采用配对样本 t 检验,非配对设计两组间均数比较则采用独立样本 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,若组间差异有统计学意义,则采用Dunnett's检验进行多重比较;重复测量数据采用重复测量方差分析。以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TENT5B在胃癌中的表达

TCGA胃癌数据集和GEO胃癌数据集

(GSE66229)差异表达基因分析发现,TENT5B在胃癌中的表达明显下调(图1A-B)。通过qRT-PCR和Western blot检测进一步发现,与癌旁正常组织相比,TENT5B在胃癌组织中的mRNA表达水平和蛋白表达水平均显著降低(图1C-D)。qRT-PCR和Western blot结果还显示:TENT5B在2株胃癌细胞系中的mRNA表达水平和蛋白表达水平均低于正常胃上皮细胞系(图1E-F)。这些结果提示:TENT5B在胃癌中异常低表达。

2.2 过表达TENT5B对胃癌细胞的增殖和迁移的影响

qRT-PCR和Western blot检测结果显示:转染TENT5B过表达慢病毒组(过表达组)AGS细胞的TENT5B mRNA和蛋白表达水平均显著高于空载对照组(对照组)(图2A-B),提示在AGS细胞中过表达TENT5B成功。CCK-8实验和平板克隆形成实验显示:与对照组细胞相比,过表达组AGS细胞的增殖能力明显减弱(图2C-E)。划痕愈合实验和Transwell迁移实验还显示:过表达TENT5B后,AGS细胞的迁移能力明显减弱(图2F-I)。这些结果提示:过表达TENT5B可抑制胃癌细胞的增殖和迁移。

2.3 过表达TENT5B对胃癌细胞铁死亡的影响

细胞活力检测结果显示:过表达TENT5B可明显增加铁死亡诱导剂Erastin诱导的AGS细胞死亡,而且该效应可被铁死亡抑制剂(ferrostatin-1, Fer-1)阻断(图3A)。脂质ROS检测结果显示:过表达TENT5B可升高AGS细胞内的脂质ROS水平,并显著增加Erastin诱导的脂质ROS,而且该效应可被Fer-1阻断(图3B)。MDA检测结果也显示:过表达TENT5B可升高AGS细胞内的MDA水平,并显著增加Erastin诱导的MDA产生,而且该效应可被Fer-1阻断(图3C)。这些结果提示:过表达TENT5B可促进胃癌细胞的铁死亡。

2.4 过表达TENT5B对PRKAA2 mRNA稳定性及PRKAA2表达的影响

将TCGA胃癌数据集中与TENT5B表达呈明显正相关($R > 0.4$, $P < 0.05$)的基因与铁死亡数据库(FerrDb V2)中促进铁死亡的基因取交集后,得到6个重叠基因(图4A)。其中,PRKAA2与TENT5B的表达相关性较高($R = 0.46$, $P < 2.2 \times 10^{-16}$)(图4B),而且PRKAA2在胃癌中的表达也明显下调(图4C)。qRT-PCR和Western blot检测结果显示,在AGS细胞

中过表达TENT5B后,PRKAA2的mRNA和蛋白表达水平均明显上调(图4D-E)。通过mRNA稳定性检测进一步发现,过表达TENT5B后PRKAA2 mRNA的稳定性增加,半衰期明显延长(图4F)。这些结果提示:过表达TENT5B可能通过增加PRKAA2 mRNA稳定性促进PRKAA2的翻译表达。

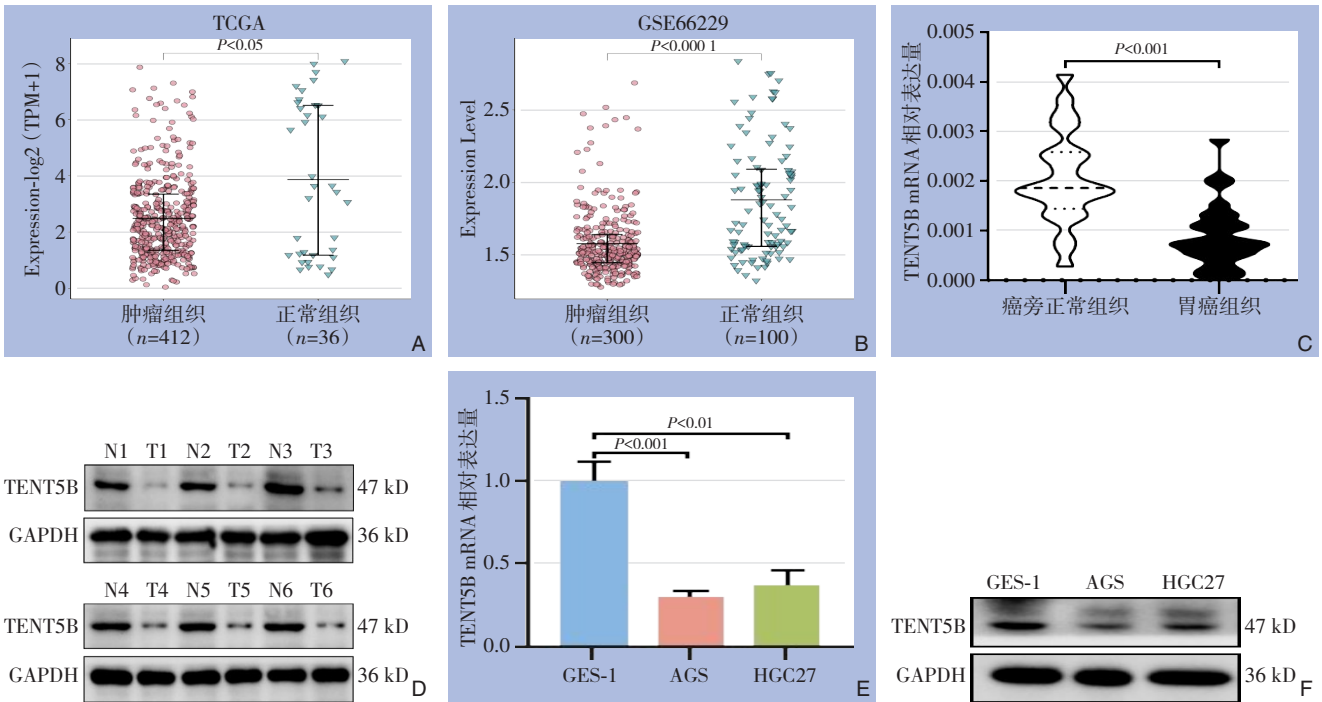


图1 TENT5B在胃癌中表达下调 A: TENT5B在TCGA胃癌数据集中的表达差异; B: TENT5B在GEO胃癌数据集(GSE66229)中的表达差异; C: qRT-PCR检测TENT5B在25对胃癌组织和癌旁正常组织中的mRNA表达差异; D: Western blot检测TENT5B在8对胃癌组织和癌旁正常组织中的蛋白表达差异; E: qRT-PCR检测在人正常胃上皮细胞系和人胃癌细胞系中TENT5B的mRNA表达差异; F: Western blot检测TENT5B在人正常胃上皮细胞系和人胃癌细胞系中的蛋白表达差异

Figure 1 TENT5B is significantly down-regulated in gastric cancer A: Expression differences of TENT5B in the TCGA gastric cancer dataset; B: Expression differences of TENT5B in the GEO gastric cancer dataset (GSE66229); C: qRT-PCR detection of TENT5B mRNA expression in 25 paired gastric cancer and adjacent normal tissues; D: Western blot detection of TENT5B protein expression in 8 paired gastric cancer and adjacent normal tissues; E: qRT-PCR detection of TENT5B mRNA expression in normal gastric epithelial cells and gastric cancer cell lines; F: Western blot detection of TENT5B protein expression in normal gastric epithelial cells and gastric cancer cell lines

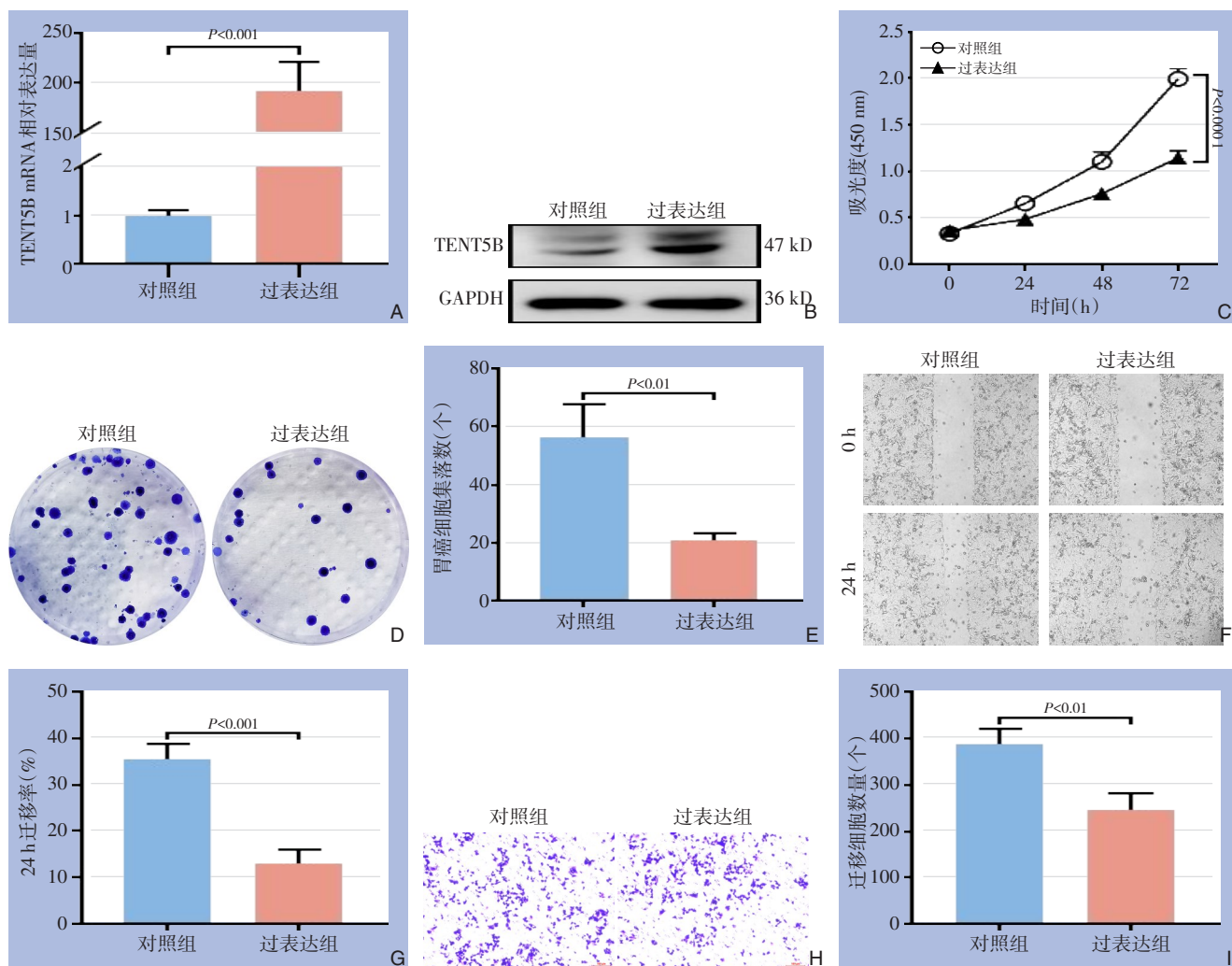


图2 过表达TENT5B抑制胃癌细胞的增殖和迁移 A-B: qRT-PCR与Western blot检测转染效率; C: CCK-8实验观察过表达TENT5B对AGS细胞增殖能力的影响; D-E: 平板克隆形成实验观察过表达TENT5B对AGS细胞成球能力的影响; F-G: 划痕愈合实验观察过表达TENT5B对AGS细胞迁移能力的影响; H-I: Transwell迁移实验观察过表达TENT5B对AGS细胞迁移能力的影响

Figure 2 Overexpression of TENT5B suppresses the proliferation and migration of gastric cancer cells A-B: qRT-PCR and Western blot verification of transfection efficiency; C: Effect of TENT5B overexpression on AGS cell proliferation detected by CCK-8 assay; D-E: Effect of TENT5B overexpression on AGS cell colony formation; F-G: Effect of TENT5B overexpression on AGS cell migration detected by wound healing assay; H-I: Effect of TENT5B overexpression on AGS cell migration detected by Transwell assay; Figure 2 Overexpression of TENT5B suppresses the proliferation and migration of AGS cells

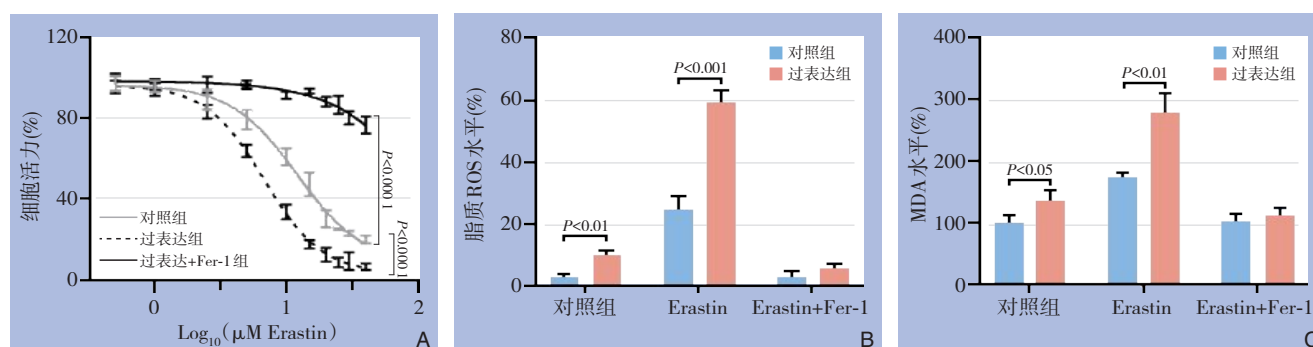


图3 过表达TENT5B促进胃癌细胞铁死亡 A: 细胞活力检测; B: 过表达TENT5B对AGS细胞内脂质ROS水平的影响; C: 过表达TENT5B对AGS细胞内MDA水平的影响

Figure 3 Overexpression of TENT5B promotes ferroptosis in gastric cancer cells A: Cell viability assay; B: Effect of TENT5B overexpression on intracellular lipid ROS levels in AGS cells; C: Effect of TENT5B overexpression on intracellular MDA levels in AGS cells

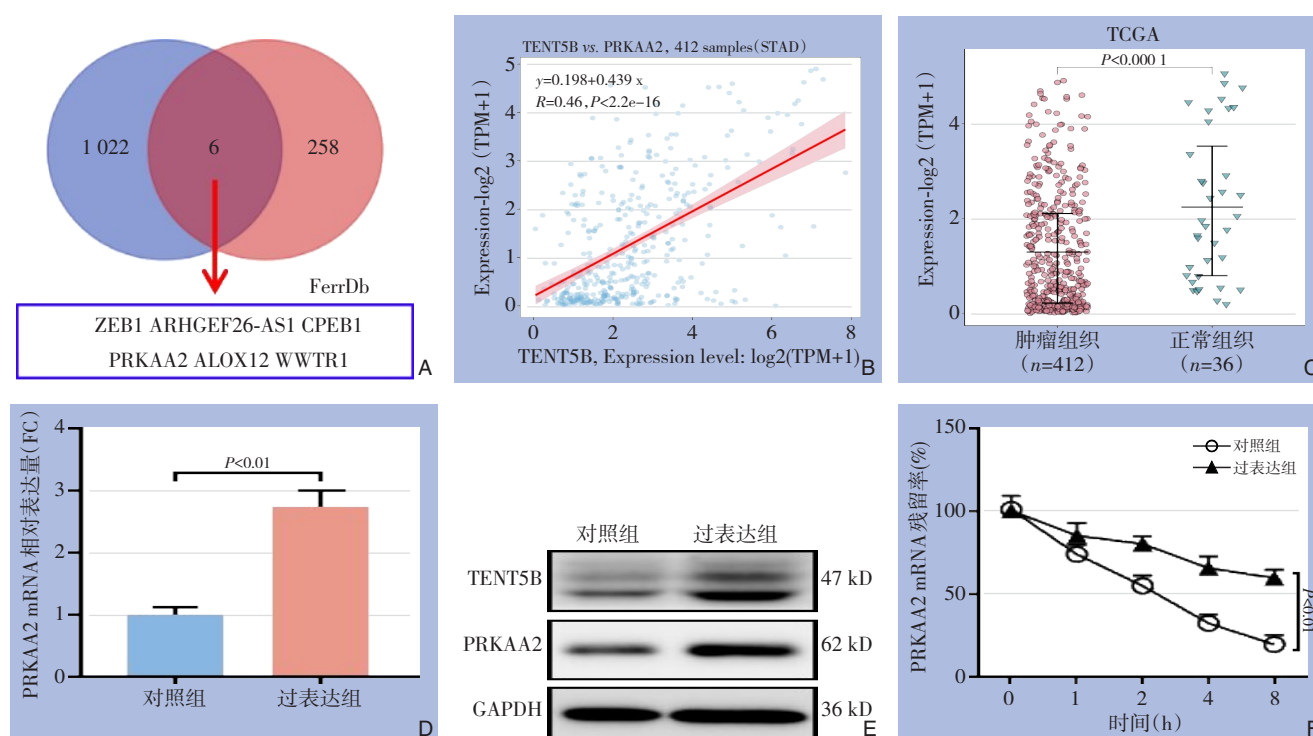


图4 TENT5B通过增强PRKAA2 mRNA稳定性上调PRKAA2的表达 A: TCGA胃癌数据集中与TENT5B表达呈明显正相关的基因与铁死亡数据库中促进铁死亡的基因取交集; B: TCGA胃癌数据集中PRKAA2与TENT5B的表达相关性分析; C: PRKAA2在TCGA胃癌数据集中的表达差异; D: qRT-PCR检测在AGS细胞中过表达TENT5B对PRKAA2 mRNA表达的影响; E: Western blot检测在AGS细胞中过表达TENT5B对PRKAA2蛋白表达的影响; F: 放线菌素D处理AGS细胞后, qRT-PCR检测过表达TENT5B对PRKAA2 mRNA半衰期的影响

Figure 4 TENT5B upregulates PRKAA2 expression by enhancing PRKAA2 mRNA stability A: Overlapping genes between those positively correlated with TENT5B in the TCGA gastric cancer dataset and ferroptosis-promoting genes in the FerrDb database; B: Correlation analysis between PRKAA2 and TENT5B expression in the TCGA gastric cancer dataset; C: Expression differences of PRKAA2 in the TCGA gastric cancer dataset; D: Effect of TENT5B overexpression on PRKAA2 mRNA expression in AGS cells detected by qRT-PCR; E: Effect of TENT5B overexpression on PRKAA2 protein expression in AGS cells detected by Western blot; F: Effect of TENT5B overexpression on PRKAA2 mRNA half-life after actinomycin D treatment in AGS cells

2.5 功能挽救实验结果

qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示：在过表达 TENT5B 的 AGS 细胞中转染 si-PRKAA2，可以逆转 TENT5B 过表达引起的 PRKAA2 表达上调（图 5A-B）。CCK-8 实验和 Transwell 实验显示，敲减 PRKAA2 可以逆转 TENT5B 过表达对 AGS 细胞增殖和迁移的抑

制作用（图 5C-E）。细胞活力检测和 MDA 检测结果显示，敲减 PRKAA2 可以逆转 TENT5B 过表达对 AGS 细胞铁死亡的促进作用（图 5F-G）。这些结果提示：TENT5B 可能通过上调 PRKAA2 表达，促进胃癌细胞铁死亡，并抑制胃癌进展。

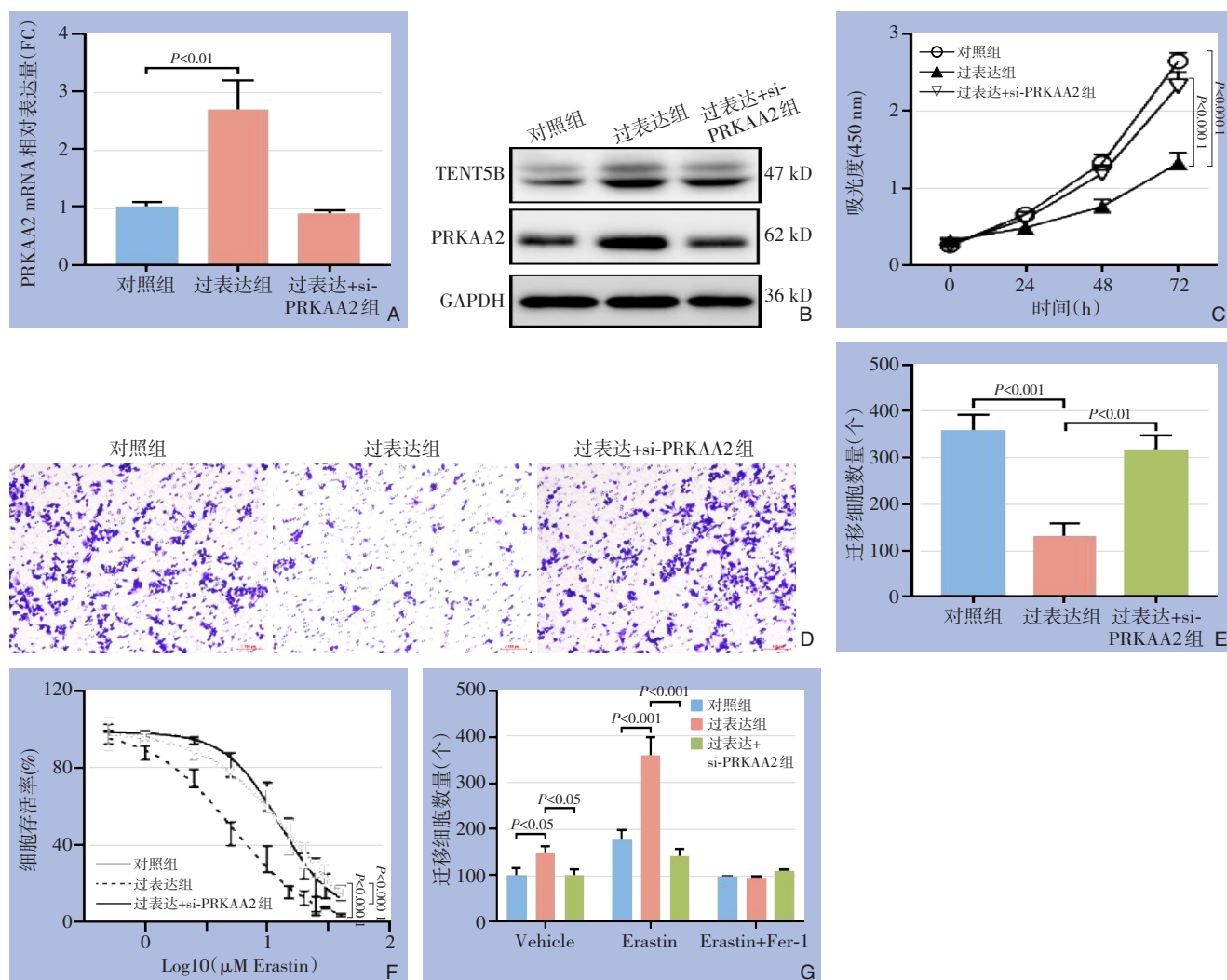


图5 TENT5B 通过 PRKAA2 发挥抑癌作用 A: qRT-PCR 检测在 AGS 细胞中过表达 TENT5B 或同时敲减 PRKAA2 对 PRKAA2 mRNA 表达的影响; B: Western blot 检测在 AGS 细胞中过表达 TENT5B 或同时敲减 PRKAA2 对 PRKAA2 蛋白表达的影响; C: CCK-8 实验观察过表达 TENT5B 或同时敲减 PRKAA2 对 AGS 细胞增殖能力的影响; D-E: Transwell 迁移实验观察过表达 TENT5B 或同时敲减 PRKAA2 对 AGS 细胞迁移能力的影响; F: 细胞活力检测观察过表达 TENT5B 或同时敲减 PRKAA2 对 Erastin 诱导的 AGS 细胞铁死亡的影响; G: 过表达 TENT5B 或同时敲减 PRKAA2 对 AGS 细胞内 MDA 水平的影响

Figure 5 TENT5B exerts its tumor-suppressive effects through PRKAA2 A: Effect of TENT5B overexpression or simultaneous PRKAA2 knockdown on PRKAA2 mRNA expression in AGS cells detected by qRT-PCR; B: Effect of TENT5B overexpression or simultaneous PRKAA2 knockdown on PRKAA2 protein expression in AGS cells detected by Western blot; C: Effect of TENT5B overexpression or simultaneous PRKAA2 knockdown on AGS cell proliferation detected by CCK-8 assay; D-E: Effect of TENT5B overexpression or simultaneous PRKAA2 knockdown on AGS cell migration detected by Transwell assay; F: Effect of TENT5B overexpression or simultaneous PRKAA2 knockdown on Erastin-induced ferroptosis in AGS cells detected by cell viability assay; G: Effect of TENT5B overexpression or simultaneous PRKAA2 knockdown on intracellular MDA levels in AGS cells

2.6 过表达TENT5B胃癌细胞体内生长的影响

小鼠皮下成瘤实验显示:与对照组比较,过表达组细胞成瘤速率明显减慢、成瘤重量明显减轻(图6A-C);而且,过表达组瘤组织中TENT5B

和PRKAA2的mRNA表达水平均明显高于对照组(图6D)。上述结果提示:过表达TENT5B可能通过上调PRKAA2表达在体内抑制胃癌的生长。

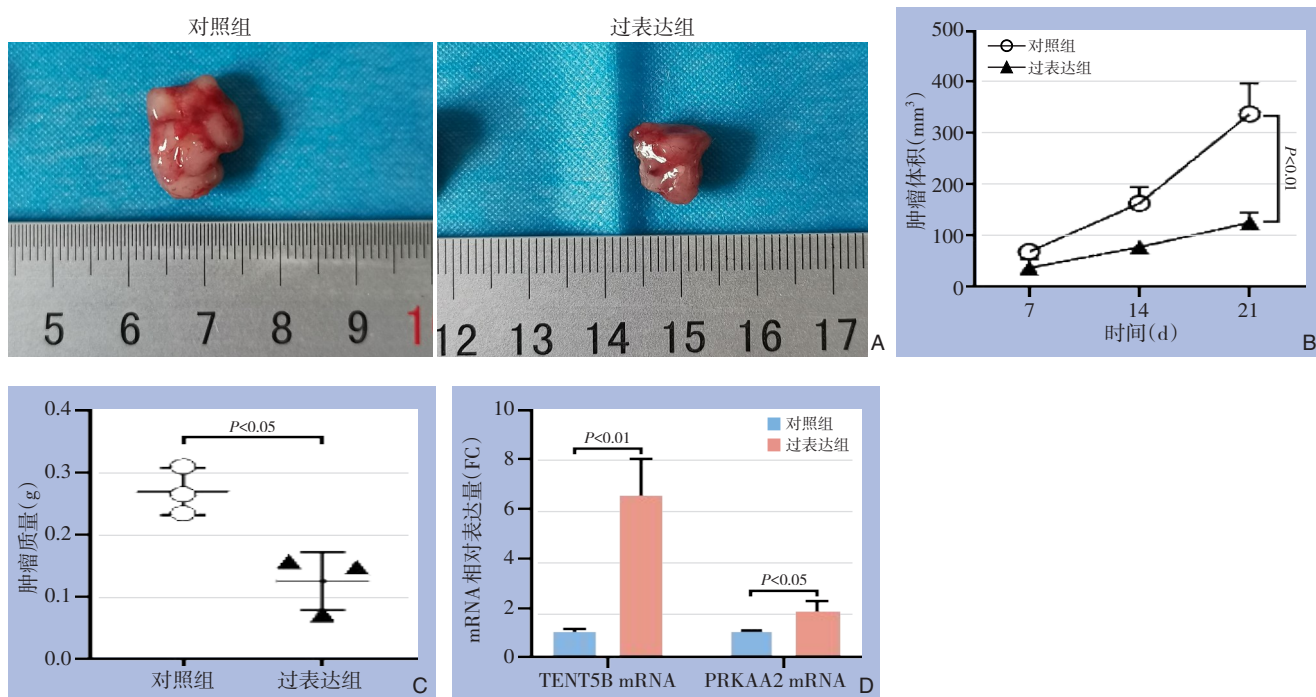


图6 过表达TENT5B在体内抑制胃癌的生长 A: 移植瘤大体标本; B: 两组细胞皮下移植瘤的生长曲线图 ($n=3$); C: 两组移植瘤的重量比较 ($n=3$); D: 两组移植瘤中TENT5B和PRKAA2的mRNA表达水平

Figure 6 Overexpression of TENT5B inhibits gastric cancer growth in vivo A: Gross specimens of xenograft tumors; B: Growth curves of subcutaneous xenograft tumors in two groups ($n=3$); C: Comparison of xenograft tumor weights between the two groups ($n=3$); D: mRNA expression levels of TENT5B and PRKAA2 in xenograft tumors of the two groups

3 讨论

3.1 TENT5B可能是调控胃癌发生发展的抑癌基因

近年来有多项研究报道,非典型poly(A)聚合酶TENT5B在前列腺癌^[10-11]、非小细胞肺癌^[12]、乳腺癌^[13]等多种实体瘤中呈低表达,并与肿瘤发生发展和治疗抵抗密切相关^[15]。然而,TENT5B在胃癌中的表达特征和生物学功能研究尚属空白。本研究首次发现TENT5B在胃癌组织和胃癌细胞中均显著下调;而且,过表达TENT5B可显著抑制胃癌细胞的增殖和迁移,提示TENT5B可能是抑制胃癌发生发展的重要因子。这一发现与Liang等^[10-11]在前列腺癌和Sang等^[12]在非小细胞肺癌中的研究报道互为印证。其中,Liang等^[10]发现过表达TENT5B可促进 β -catenin蛋白的泛素化降解,进而阻碍前列腺癌细胞增殖和细胞周期进程。他们还

发现,TENT5B通过阻断MYC-LDHA轴促进前列腺癌细胞凋亡,并抑制糖酵解^[11]。此外,Sang等^[12]的研究显示:过表达TENT5B可通过阻断 β -catenin/MMP7信号轴,抑制非小细胞肺癌的增殖、迁移和侵袭。本研究的发现结合这些研究结果提示,TENT5B的抑癌作用可能具有跨瘤种共性。

3.2 TENT5B-PRKAA2轴可能是调控胃癌细胞铁死亡的关键通路

近年来,铁死亡在胃癌发生发展中的作用受到越来越多的关注。一些调控胃癌铁死亡的关键因子(如ACTL6A^[16]、SOX13^[17]、HTR2B^[18])也已被鉴定,有望成为胃癌治疗的新兴靶点。但目前报道的铁死亡调控基因绝大多数是抑制铁死亡的,而对于铁死亡促进基因的作用和机制仍知之甚少。本研究发现过表达TENT5B可促进胃癌细胞的铁死亡,并且显著增加胃癌细胞对铁死亡诱导剂

(Erastin) 的敏感度, 提示 TENT5B 可能是促进胃癌细胞铁死亡的关键基因。更重要的是, 本研究发现 TENT5B 可能通过延长 PRKAA2 mRNA 的 poly (A) 尾, 增加其稳定性, 进而增加 PRKAA2 的翻译表达; 而且, 敲减 PRKAA2 可以完全逆转 TENT5B 过表达的抑癌作用, 提示 PRKAA2 是介导 TENT5B 功能发挥的关键因子。

PRKAA2 (又称为 AMPK α 2) 作为 AMPK 合酶的核心组分, 在调节细胞能量代谢中起关键作用^[19]。PRKAA2 (AMPK) 的表达下调或活性降低与多种肿瘤的发生、生长、转移、耐药和免疫密切相关^[20-23]。最新研究^[24-27]显示, PRKAA2 (AMPK) 还参与肿瘤细胞铁死亡的调控; 而且, PRKAA2 通过磷酸化不同的底物, 在不同的肿瘤细胞中或不同的应激条件下发挥不同的生物学效应。例如, Song 等^[24]发现 PRKAA2 介导的 BECN1 磷酸化可通过直接结合 SLC7A11, 抑制胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白系统 (简称 system Xc⁻) 的活性, 促进肿瘤细胞铁死亡。相反, Lee 等^[26]发现能量应激介导的 PRKAA2 激活可通过促进乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 磷酸化, 阻断多聚不饱和脂肪酸 (PUFA) 的生物合成, 抑制肿瘤细胞铁死亡。

目前, PRKAA2 (AMPK) 已被证实参与了胰腺癌^[27]、结直肠癌^[28-29]、卵巢癌^[30]、肺癌^[31-32]、肝癌^[33]、乳腺癌^[34]等肿瘤的铁死亡调控, 但未见 PRKAA2 调控胃癌铁死亡的报道, 而本研究填补了这一空白。与 Song 等^[24]发现的“AMPK-BECN1-SLC7A11”通路相呼应, 笔者推测 TENT5B 可能通过稳定 PRKAA2 mRNA, 持续激活 AMPK-BECN1 轴, 进而抑制 system Xc⁻ 活性, 加速脂质过氧化, 构成胃癌铁死亡的新调控范式。不同于 Lee 等^[26]报道的能量应激条件下 PRKAA2 (AMPK) 抑制铁死亡, 本研究在胃癌中观察到 PRKAA2 促进铁死亡。机制差异可能源于: (1) 胃癌细胞高基线 ROS 负荷; (2) AMPK 下游底物选择 (BECN1 或 ACC) 受微环境调控。此外, 本研究首次将 TENT5B 介导的 mRNA 稳定性调控 (多聚腺苷酸化) 引入铁死亡领域, 为理解 AMPK 表达的转录后调控提供了新视角。

3.3 TENT5B 可作为胃癌 mRNA 治疗的潜在分子

本研究还通过动物实验初步验证了 TENT5B 的体内抑癌作用, 有望为胃癌的铁死亡靶向治疗提供潜在分子。随着 mRNA 技术的飞速发展, mRNA 疫苗和 mRNA 药物已成为抗肿瘤药物研发的新策

略^[35-38]。相比传统的药物研发策略 (如小分子化合物、单克隆抗体), mRNA 药物具有靶标范围广、免疫原性低、生产快速、存储方便、价格低廉等优势, 故已成为全球最具创新和潜力的疾病防治模式之一^[39-40]。因此, 通过 mRNA 技术 (包括基于脂质纳米颗粒的体内递送系统) 制备 TENT5B mRNA 药物, 并将其导入体内发挥抗癌作用, 有望成为胃癌 mRNA 治疗的新方法。

综上所述, 本研究首次揭示了 TENT5B 促进胃癌细胞铁死亡和抑制胃癌进展的生物学功能, 初步阐明了 TENT5B 通过增强 PRKAA2 mRNA 稳定性上调 PRKAA2 表达的分子机制, 为胃癌的精准防治提供了新策略和新方法。但本研究仍存在以下缺陷或不足: (1) TENT5B 在胃癌中下调的分子机制尚不清楚; (2) TENT5B 如何选择性识别并延长 PRKAA2 mRNA poly (A) 尾的直接证据不足。在后续研究中将对上述问题进行深入探讨, 以进一步丰富 TENT5B 调控胃癌的分子生物学理论。未来, 筛选在肿瘤中特异性低表达的抑癌基因, 阐明其促进肿瘤细胞铁死亡的分子机制, 并联合 mRNA 技术, 研制高效低毒的抗肿瘤 mRNA 药物, 将成为肿瘤基础研究和临床转化研究的新思路、新方向^[41]。基于 mRNA 技术和铁死亡靶向的 mRNA 疗法, 也将开启肿瘤预防和治疗的新时代。

作者贡献声明: 林芝负责实验操作、数据整理和分析、文稿初稿撰写; 龙飞负责课题设计、指导课题实施、提供基金资助、文稿审校; 李亮协助细胞实验和分子实验; 朱开宇负责生信分析和协助数据统计分析。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3):229-263. doi:10.3322/caac.21834.
- [2] Han B, Zheng R, Zeng H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1):47-53. doi:10.1016/j.jncc.2024.01.006.
- [3] Sundar R, Nakayama I, Markar SR, et al. Gastric cancer[J]. Lancet, 2025, 405(10494): 2087-2102. doi: 10.1016/s0140-6736(25)00052-2.

- [4] Lei G, Zhuang L, Gan B. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(7): 381–396. doi: [10.1038/s41568-022-00459-0](https://doi.org/10.1038/s41568-022-00459-0).
- [5] Stockwell BR. Ferroptosis turns 10: Emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications[J]. *Cell*, 2022, 185(14):2401–2421. doi: [10.1016/j.cell.2022.06.003](https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.003).
- [6] Zhou Q, Meng Y, Li D, et al. Ferroptosis in cancer: From molecular mechanisms to therapeutic strategies[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1):55. doi: [10.1038/s41392-024-01769-5](https://doi.org/10.1038/s41392-024-01769-5).
- [7] 刘斌, 钱道海. 铁死亡在胰腺癌中的作用研究及进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(3): 434–440. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.013](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.013).
- Liu B, Qian DH. Research and progress on the role of ferroptosis in pancreatic cancer[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(3): 434–440. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.013](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.013).
- [8] Hu JL, Liang H, Zhang H, et al. FAM46B is a prokaryotic-like cytoplasmic poly(A) polymerase essential in human embryonic stem cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(5): 2733–2748. doi: [10.1093/nar/gkaa049](https://doi.org/10.1093/nar/gkaa049).
- [9] Kuchta K, Muszewska A, Knizewski L, et al. FAM46 proteins are novel eukaryotic non-canonical poly(A) polymerases[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(8):3534–3548. doi: [10.1093/nar/gkw222](https://doi.org/10.1093/nar/gkw222).
- [10] Liang T, Ye X, Liu Y, et al. FAM46B inhibits cell proliferation and cell cycle progression in prostate cancer through ubiquitination of β -catenin[J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(12): 1–12. doi: [10.1038/s12276-018-0184-0](https://doi.org/10.1038/s12276-018-0184-0).
- [11] Liang T, Ye X, Yan D, et al. FAM46B promotes apoptosis and inhibits glycolysis of prostate cancer through inhibition of the MYC-LDHA axis[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13:8771–8782. doi: [10.2147/OTT.S258724](https://doi.org/10.2147/OTT.S258724).
- [12] Sang H, Wu S, Chen X, et al. FAM46B suppresses proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer via β -catenin/MMP7 signaling[J]. *Transl Cancer Res*, 2019, 8(4):1497–1505. doi: [10.21037/tcr.2019.07.27](https://doi.org/10.21037/tcr.2019.07.27).
- [13] Zhang B, Li J, Yu W. Integration of CRISPR/dCas9-Based methylation editing with guide positioning sequencing identifies dynamic changes of mrDEGs in breast cancer progression[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2025, 82(1):46. doi: [10.1007/s00018-024-05562-z](https://doi.org/10.1007/s00018-024-05562-z).
- [14] Lin Z, Zhong C, Shi M, et al. Circular RNA TERC/SCD1 mRNA interaction regulates ferroptosis and metastasis in gastric cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1): 436. doi: [10.1038/s41419-025-07759-x](https://doi.org/10.1038/s41419-025-07759-x).
- [15] Guo H, Deng C, Liang T, et al. Tripartite motif-containing protein 11 reverses paclitaxel resistance in prostate cancer drug-resistant cells by mediating family with sequence similarity 46B expression[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2022, 32(7): 67–76. doi: [10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2022043323](https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2022043323).
- [16] Yang Z, Zou S, Zhang Y, et al. ACTL6A protects gastric cancer cells against ferroptosis through induction of glutathione synthesis[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1):4193. doi: [10.1038/s41467-023-39901-8](https://doi.org/10.1038/s41467-023-39901-8).
- [17] Yang H, Li Q, Chen X, et al. Targeting SOX13 inhibits assembly of respiratory chain super complexes to overcome ferroptosis resistance in gastric cancer[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1):4296. doi: [10.1038/s41467-024-48307-z](https://doi.org/10.1038/s41467-024-48307-z).
- [18] Tu RH, Wu SZ, Huang ZN, et al. Neurotransmitter receptor HTR2B regulates lipid metabolism to inhibit ferroptosis in gastric cancer[J]. *Cancer Res*, 2023, 83(23):3868–3885. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-23-1012](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-23-1012).
- [19] Steinberg GR, Hardie DG. New insights into activation and function of the AMPK[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(4):255–272. doi: [10.1038/s41580-022-00547-x](https://doi.org/10.1038/s41580-022-00547-x).
- [20] Vila IK, Yao Y, Kim G, et al. A UBE2O-AMPK α 2 axis that promotes tumor initiation and progression offers opportunities for therapy[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(2): 208–224. doi: [10.1016/j.ccell.2017.01.003](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.01.003).
- [21] Mo JS, Meng Z, Kim YC, et al. Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(4):500–510. doi: [10.1038/ncb3111](https://doi.org/10.1038/ncb3111).
- [22] Zhuang J, Shen L, Li M, et al. Cancer-associated fibroblast-derived miR-146a-5p generates a niche that promotes bladder cancer stemness and chemoresistance[J]. *Cancer Res*, 2023, 83(10):1611–1627. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-22-2213](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-2213).
- [23] Yue C, Chen J, Li Z, et al. microRNA-96 promotes occurrence and progression of colorectal cancer via regulation of the AMPK α 2-FTO-m6A/MYC axis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1):240. doi: [10.1186/s13046-020-01731-7](https://doi.org/10.1186/s13046-020-01731-7).
- [24] Song X, Zhu S, Chen P, et al. AMPK-mediated BECN1 phosphorylation promotes ferroptosis by directly blocking system xc-activity[J]. *Curr Biol*, 2018, 28(15): 2388–2399. doi: [10.1016/j.cub.2018.05.094](https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.094).
- [25] Peng S, Chen G, Yu KN, et al. Synergism of non-thermal plasma and low concentration RSL3 triggers ferroptosis via promoting xCT lysosomal degradation through ROS/AMPK/mTOR axis in lung cancer cells[J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1):112. doi: [10.1186/s12964-023-01382-z](https://doi.org/10.1186/s12964-023-01382-z).
- [26] Lee H, Zandkarimi F, Zhang Y, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(2): 225–234. doi: [10.1038/s41556-020-0461-8](https://doi.org/10.1038/s41556-020-0461-8).
- [27] Schneider C, Hilbert J, Genevaux F, et al. A novel AMPK inhibitor sensitizes pancreatic cancer cells to ferroptosis induction[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(31):e2307695. doi: [10.1002/advs.202307695](https://doi.org/10.1002/advs.202307695).

- [28] Liu MY, Li HM, Wang XY, et al. TIGAR drives colorectal cancer ferroptosis resistance through ROS/AMPK/SCD1 pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 182: 219–231. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2022.03.002](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.03.002).
- [29] Xu J, Cai Z, Pang Z, et al. Smilax glabra flavonoids inhibit AMPK activation and induce ferroptosis in obesity-associated colorectal cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(6): 2476. doi: [10.3390/ijms26062476](https://doi.org/10.3390/ijms26062476).
- [30] Deng M, Tang F, Chang X, et al. A targetable OSGIN1 – AMPK – SLC2A3 axis controls the vulnerability of ovarian cancer to ferroptosis[J]. *NPJ Precis Oncol*, 2025, 9:15. doi: [10.1038/s41698-024-00791-8](https://doi.org/10.1038/s41698-024-00791-8).
- [31] Wei Z, Zhou Z, Zhang Y, et al. PRKAA2 promotes tumor growth and inhibits ferroptosis through SLC7A11/GSH/GPX4 pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2025, 72(4):954–962. doi: [10.1002/bab.2710](https://doi.org/10.1002/bab.2710).
- [32] Pan XP, Deng H. Deubiquitinase USP18 mediates cell migration, apoptosis and ferroptosis in lung adenocarcinoma by depending on POU4F1/PRKAA2 axis[J]. *BMC Cancer*, 2025, 25(1): 528. doi: [10.1186/s12885-025-13869-8](https://doi.org/10.1186/s12885-025-13869-8).
- [33] Li YZ, Deng J, Zhang XD, et al. Naringenin enhances the efficacy of ferroptosis inducers by attenuating aerobic glycolysis by activating the AMPK-PGC1 α signalling axis in liver cancer[J]. *Heliyon*, 2024, 10(11):e32288. doi: [10.1016/j.heliyon.2024.e32288](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32288).
- [34] Fang Q, Fang Q, Cheng R, et al. CAPE activates AMPK and Foxo3 signaling to induce growth inhibition and ferroptosis in triple-negative breast cancer[J]. *PLoS One*, 2024, 19(12):e0315037. doi: [10.1371/journal.pone.0315037](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0315037).
- [35] Callaway E, Naddaf M. Pioneers of mRNA COVID vaccines win medicine Nobel[J]. *Nature*, 2023, 622(7982):228–229. doi: [10.1038/d41586-023-03046-x](https://doi.org/10.1038/d41586-023-03046-x).
- [36] Dolgin E, Ledford H. mRNA COVID vaccines saved lives and won a Nobel-what's next for the technology? [J]. *Nature*, 2023. doi: [10.1038/d41586-023-03119-x](https://doi.org/10.1038/d41586-023-03119-x).
- [37] Lorentzen CL, Haanen JB, Met Ö, et al. Clinical advances and ongoing trials on mRNA vaccines for cancer treatment[J]. *Lancet Oncol*, 2022, 23(10): e450–e458. doi: [10.1016/S1470-2045\(22\)00372-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(22)00372-2).
- [38] Sayour EJ, Boczkowski D, Mitchell DA, et al. Cancer mRNA vaccines: clinical advances and future opportunities[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2024, 21(7): 489–500. doi: [10.1038/s41571-024-00902-1](https://doi.org/10.1038/s41571-024-00902-1).
- [39] Liu C, Shi Q, Huang X, et al. mRNA-based cancer therapeutics[J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(8):526–543. doi: [10.1038/s41568-023-00586-2](https://doi.org/10.1038/s41568-023-00586-2).
- [40] Liu M, Wang Y, Zhang Y, et al. Landscape of small nucleic acid therapeutics: moving from the bench to the clinic as next-generation medicines[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 73. doi: [10.1038/s41392-024-02112-8](https://doi.org/10.1038/s41392-024-02112-8).
- [41] Kon E, Ad-El N, Hazan-Halevy I, et al. Targeting cancer with mRNA-lipid nanoparticles: key considerations and future prospects[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(11): 739–754. doi: [10.1038/s41571-023-00811-9](https://doi.org/10.1038/s41571-023-00811-9).

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 林芝, 李亮, 朱开宇, 等. TENT5B上调PRKAA2表达促进胃癌铁死亡的作用与机制研究[J]. 中国普通外科杂志, 2025, 34(9):1975–1986. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.250323](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.250323)

Cite this article as: Lin Z, Li L, Zhu KY, et al. The role and mechanism of TENT5B in upregulating PRKAA2 expression to promote ferroptosis in gastric cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2025, 34(9): 1975–1986. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.250323](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.250323)