

SCF ^{β -TrCP} 泛素化降解 TFAP4 抑制结直肠癌上皮间质转化的分子机制研究

厉金雷 吴祥斌 蔡剑辉

摘要 **目的** 探究 SCF ^{β -TrCP} 泛素化降解转录因子激活增强子结合蛋白 4 (transcription factor - activated enhancer - binding protein 4, TFAP4) 对结直肠癌上皮间质转化的影响。**方法** 体外培养人结肠腺癌细胞 SW480, 分别用不同浓度的 MLN4924 处理 24h, 然后采用 Western blot 法检测内源性 TFAP4 蛋白水平变化。在 MLN4924 处理的基础上, 加入 CHX 分别干预不同时间, 检测 TFAP4 的蛋白半衰期和泛素化水平差异。在 CHX 干预的 SW480 细胞中过表达带 FLAG 标签的 TrCP - 1, 探究 β - TrCP 对 TFAP4 表达的影响, 通过免疫共沉淀 (co - immunoprecipitation, Co - IP) 实验检测过表达或敲低 β - TrCP 不是因为影响了其他信号通路而改变 TFAP4 的水平。将 TFAP4 上 135 位的 E 突变为 A, 139 位的 S 突变为 A, 然后在 CHX 干预的 SW480 细胞中转染结构域突变的 TFAP4, 测定 TFAP4 半衰期和泛素化水平变化。CK1/CK2/GSK3 磷酸化关键酶抑制剂对 SW480 细胞进行干预, Western blot 法检测 TFAP4 水平, 随后检测 CK2 抑制剂对 TFAP4 泛素化水平的影响, 通过划痕实验分析细胞迁移能力, 通过 Transwell 实验分析细胞侵袭能力。**结果** TFAP4 随着 MLN4924 处理浓度变化呈剂量依赖式增加, MLN4924 处理能够显著延长内源 TFAP4 蛋白的半衰期, TFAP4 和 CK2 存在相互作用, CK2 抑制剂能降低 TFAP4 泛素化水平, 蛋白的半衰期得到明显延长, 敲低 β - TrCP 引起 TFAP4 的降解受到明显抑制, β - TrCP 与 TFAP4 直接相互作用, 并促进其被泛素化, TFAP4 中 E135A 和 S139A 位点突变延长其半衰期, 沉默 β - TrCP 能促进细胞增殖和迁移。**结论** SCF ^{β -TrCP} 可能通过泛素化修饰降解 TFAP4, 从而抑制结直肠上皮间质转化的发生, 进而抑制肿瘤的浸润、转移, 可为结直肠癌治疗提供新的思路。

关键词 SCF ^{β -TrCP} 泛素化 TFAP4 结直肠癌 上皮间质转化

中图分类号 R735.3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2024.04.030

Molecular Mechanism of SCF ^{β -TrCP} Ubiquitination and Degradation of TFAP4 to Inhibit Epithelial - mesenchymal Transition in Colorectal Cancer. LI Jinlei, WU Xiangbin, CAI Jianhui. Department of Colorectal and Anal Surgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To explore the effect of SCF ^{β -TrCP} ubiquitination and degradation of transcription factor - activated enhancer - binding protein 4 (TFAP4) on epithelial - mesenchymal transformation in colorectal cancer. **Methods** Human colorectal adenocarcinoma cells SW480 were cultured in vitro and treated with different concentrations of MLN4924 for 24h, and then Western blot assay was used to detect the changes of endogenous TFAP4 protein levels. On the basis of MLN4924 treatment, CHX was added to intervene at different times to detect the difference of TFAP4 protein half - life time and ubiquitination level. Flag - labeled TrCP - 1 was overexpressed in CHX - interfered SW480 cells to explore the influence of β - TrCP on TFAP4 expression. The overexpression or knockdown of β - TrCP in co - immunoprecipitation (Co - IP) experiments did not change the level of TFAP4 because it affected other signaling pathways. The E (135) on TFAP4 was mutated to A, and the S (139) was mutated to A, and then transfected TFAP4 with mutated domain in SW480 cells treated with CHX to detect the changes in TFAP4 half - life time and ubiquitination level. CK1/CK2/GSK3 phosphorylated key enzyme inhibitors were used to intervene SW480 cells, Western blot assay was used to detect TFAP4 levels, and then the influence of CK2 inhibitors on TFAP4 ubiquitination level was detected. Cell migration performance was analyzed by scratch assay, and cell invasion ability was analyzed by Transwell assay. **Results** TFAP4 increased in a dose - dependent manner with the concentration change of MLN4924 treatment. MLN4924 treatment could significantly prolong the half - life time of endogenous TFAP4 protein. There was an interaction between TFAP4 and CK2, CK2 inhibitor could reduce the ubiquitination level of TFAP4 and significantly prolong the half - life time of the protein. The knockdown of β - TrCP significantly inhibited the degradation of TFAP4. β - TrCP directly interacted with TFAP4 and promoted its ubiquitination. The mutation of E135A and S139A in TFAP4 prolonged its half - life time, and the silencing of β - TrCP promoted cell proliferation.

基金项目:浙江省温州市科技局项目(Y20210932)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院结直肠肛门外科

通信作者:蔡剑辉,电子邮箱:460172294@qq.com

eration and migration. **Conclusion** SCF^{β-TrCP} may degrade TFAP4 through ubiquitination modification, thereby inhibiting the occurrence of colorectal epithelial – mesenchymal transformation, and then inhibiting tumor invasion and metastasis, which may provide a new idea for the treatment of colorectal cancer.

Key words SCF^{β-TrCP}; Ubiquitination; TFAP4; Colorectal cancer; Epithelial – mesenchymal transition

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是胃肠道系统中最常见的恶性肿瘤,占有恶性肿瘤的13%,已成为世界范围内人类的第二大死亡诱因^[1-3]。数据统计显示,2018年有180万例的新CRC病例,到2035年每年的新病例数可能增加至250万^[4]。近年来,由于筛查和治疗方法的改进,CRC的病死率已经明显降低^[5]。目前,手术和化疗依旧是CRC的主要治疗手段,但患者的预后并不理想,特别是转移性CRC患者。因此,需要进一步探究CRC浸润、转移的机制,并寻求更有效的治疗方法^[6,7]。

在临床中5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)是CRC最常用的化疗药物,但由于对正常组织的毒性不良作用和癌细胞的耐药表型,其疗效存在明显局限性^[8]。已有研究表明,CRC对5-氟尿嘧啶产生耐药的主要原因是TFAP4/Wnt/β-catenin信号通路的过度激活,并且TFAP4可激活上皮间充质转化(epithelial – mesenchymal transition, EMT)增强肿瘤细胞的迁移和转移^[9,10]。据此猜想通过降解TFAP4抑制EMT的发生,从而抑制肿瘤的浸润、转移,但是具体的分子机制需要进一步研究。因此,本研究主要探讨SCF^{β-TrCP}泛素化降解TFAP4抑制CRC上皮间质转化的分子机制。

材料与方法

1. 实验材料与试剂:人结肠腺癌细胞SW480购自武汉普诺赛生命科技有限公司,MLN4924(HY-70062)、MG-132(HY-13259)、CHX(HY-B0713)、5-fluorouracil(HY-90006)、CK1抑制剂(HY-111820)、CK2抑制剂(HY-145260)、GSK3抑制剂(HY-Q48328)购自美国MedChemExpress公司,ATPlite试剂盒(ml077069)购自上海酶联生物,TFAP-4(PA5-40719)抗体购自美国Thermo Fisher Scientific公司,cullin1(4995S)、β-TrCP(4394S)、ubiquitin(20326T)、CK2(2656S)抗体购自美国Cell Signaling Technology公司。

2. 细胞培养:SW480细胞使用DMEM完全培养基(含10% FBS + 1% P/S),HEK293细胞使用MEM完全培养基(含10% FBS + 1% P/S),于37℃ 5% CO₂恒温培养箱中培养。显微镜下观察细胞生长情况,待细胞长到合适密度用于后续实验。将细胞进行分组

培养:0 μmol/L MLN4924(酶抑制剂)组、0.25 μmol/L MLN4924组、0.5 μmol/L MLN4924组、DMSO + CHX组、MLN4924 + CHX组、CHX组、oe-TrCP-1 + CHX组、kd-TrCP-1 + CHX组、CK2抑制剂 + CHX组、si-Control组、siControl + 5'-F组、siTRCP + 5'-F组、siTFAP + 5'-F组。

3. Western blot法检测:使用RIPA蛋白裂解液提取细胞蛋白,12000r/min离心半径为9.8cm离心7min后取上清,BCA法测定蛋白总量,加入蛋白上样缓冲液后煮10min,用12.5% SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,将电泳后的蛋白转移到PVDF膜上,室温下5%脱脂奶粉封闭2h,加入一抗4℃摇床孵育过夜,将一抗洗干净后荧光二抗室温避光孵育2h,TBST将二抗洗干净后进行曝光。

4. 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, co-IP):转染48h后,吸除细胞培养基,PBS洗两遍,加入适量细胞裂解缓冲液,冰上裂解30min,离心后取上清,取少量裂解液以备Western blot法分析,剩余裂解液加1 μg相应的抗体,4℃孵育过夜。取10 μl protein A琼脂糖珠,用裂解缓冲液洗3次,3000r/min离心半径9.8cm离心3min;将预处理过的protein A琼脂糖珠加入到和抗体孵育过夜的细胞裂解液中,4℃孵育4h,使抗体与protein A琼脂糖珠偶联。3000r/min离心半径9.8cm速度离心3min,将琼脂糖珠离心至管底;将上清小心吸去,琼脂糖珠用1ml裂解缓冲液洗3次;最后加入15 μl的2 × SDS上样缓冲液,沸水煮7min, -20℃保存,经Western blot法分析确定免疫共沉淀结合蛋白。

5. CRISPR-cas9:从数据库挑选3条脱靶效应最低的靶向敲除β-TrCP的序列插入pspcas9(BB)-2APuro敲除质粒中;利用转染试剂盒将构建好的敲除质粒转染进细胞中,随后用Puromycin进行筛选,去掉转染效率低的细胞;3天后收集细胞,免疫印迹分析MDM2表达水平,挑选敲除效果最好的质粒用于构建相应的细胞系;用构建好的质粒转染相应的细胞,用Puromycin筛选3天后,流式细胞仪筛选含有绿色荧光的单细胞,并将该细胞扩大培养,最终形成成功敲除的单克隆细胞。

6. 体外泛素化修饰:在细胞中外转带有HA标签

的β-TrCP质粒,并用偶联有HA抗体的磁珠纯化β-TrCP蛋白,同样的方法用偶联FLAG抗体的磁珠纯化FLAG-TFAP4蛋白。在含有相应E1和E2等成分的反应缓冲液中加入纯化的HA-β-TrCP和FLAG-TFAP4,37℃条件下进行反应,结束后用蛋白凝胶电泳分离蛋白,并用相应的抗体进行免疫印迹分析。

7. 流式细胞术检测细胞凋亡:用冷PBS洗涤细胞两次,然后以1×10⁶/ml的浓度将细胞重悬于1×结合缓冲液中,将100μl细胞转移到5ml培养管中,加入5μl FITC Annexin V和5μl PI,轻轻涡旋并在室温下避光孵育15min,每管加入400μl 1×binding Buffer,1h内通过流式细胞仪进行检测。

8. 划痕实验:6孔板背面提前用马克笔划线,在6孔板中接种适宜浓度的细胞,培养至细胞融合,用无菌枪头进行划痕。划痕完成后,使用无菌PBS溶液洗细胞3次,洗去不贴壁的细胞,即划线时划线的细胞,使划线后留下的间隙清晰可见,然后更换新鲜无血清培养基。培养箱培养24h后取出细胞,显微镜线观察并拍照。

9. Transwell实验:用无血清培养基重悬细胞,调整细胞浓度至2×10⁵/ml,取200μl细胞悬液加入至

Transwell小室,24孔板下室加入500μl的含血清培养基,37℃5%CO₂培养箱中培养24h后,吸出小室培养基,用PBS溶液清洗细胞2次,加入4%多聚甲醛固定30min,然后结晶紫染色20min,冲洗晾干后显微镜下计数。

10. 统计学方法:应用SPSS 26.0统计学软件对数据进行统计分析,使用Prism 8.0软件进行作图,所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,*t*检验进行组间比较,以*P*<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. TFAP4是潜在的CRL E3泛素连接酶的底物:在MLN4924(酶抑制剂)处理SW480后,TFAP4发生累积且随着MLN4924浓度变化呈剂量依赖式增加(图1A)。为了进一步证实TFAP4是CRL E3泛素连接酶的底物,在MLN4924处理的基础上,加入CHX分别干预不同时间,DMSO作为阳性对照,检测TFAP4的蛋白半衰期。发现在结直肠癌细胞系SW480细胞中,MLN4924处理能够显著的延长内源TFAP4蛋白的半衰期(图1B),TFAP4泛素化模式如图1C所示,以上结果提示TFAP4是潜在的CRL E3泛素连接酶的底物。

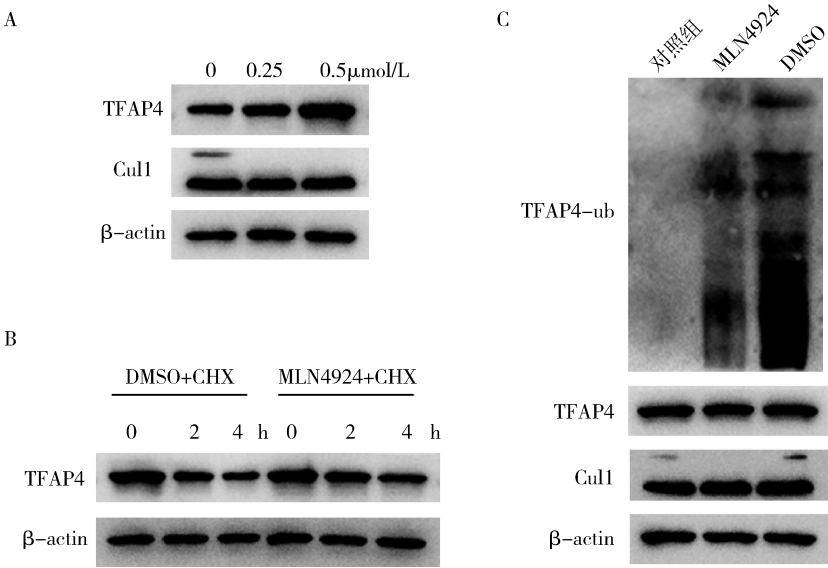


图1 TFAP4与CRL E3泛素连接酶的关系

A. TFAP4水平随着MLN4924浓度呈剂量依赖式升高;B.加入CHX干预不同时间,检测TFAP4的蛋白水平;C. TFAP4泛素化模式图

2. FLAG-β-TrCP1与TFAP4直接相互作用:通过查找TFAP4的氨基酸序列上可能存在的F-box结合和绑定的特定结构域,发现了在各物种间进化上十分保守的β-TrCP(DSGXXS)的降解结构域(图2A);为了探究β-TrCP对TFAP4在蛋白水平表达

变化的影响,在CHX处理SW480细胞中转染TrCP-1,对照组只做CHX处理。过表达β-TrCP会加快TFAP4的降解,用siRNA直接敲低β-TrCP,发现TFAP4的降解受到明显抑制,半衰期延长(图2中B、C)。为了确保过表达或敲低β-TrCP不是因为影响

了其他信号通路而改变 TFAP4 (信号转导及转录激活蛋白) 的水平,在 SW480 细胞中过表达带有 FLAG 标签的 β -TrCP1,并进行免疫沉淀(图 2D),TFAP4

泛素化模式如图 2E 所示,结果表明 FLAG - β - TrCP1 与 TFAP4 直接相互作用。

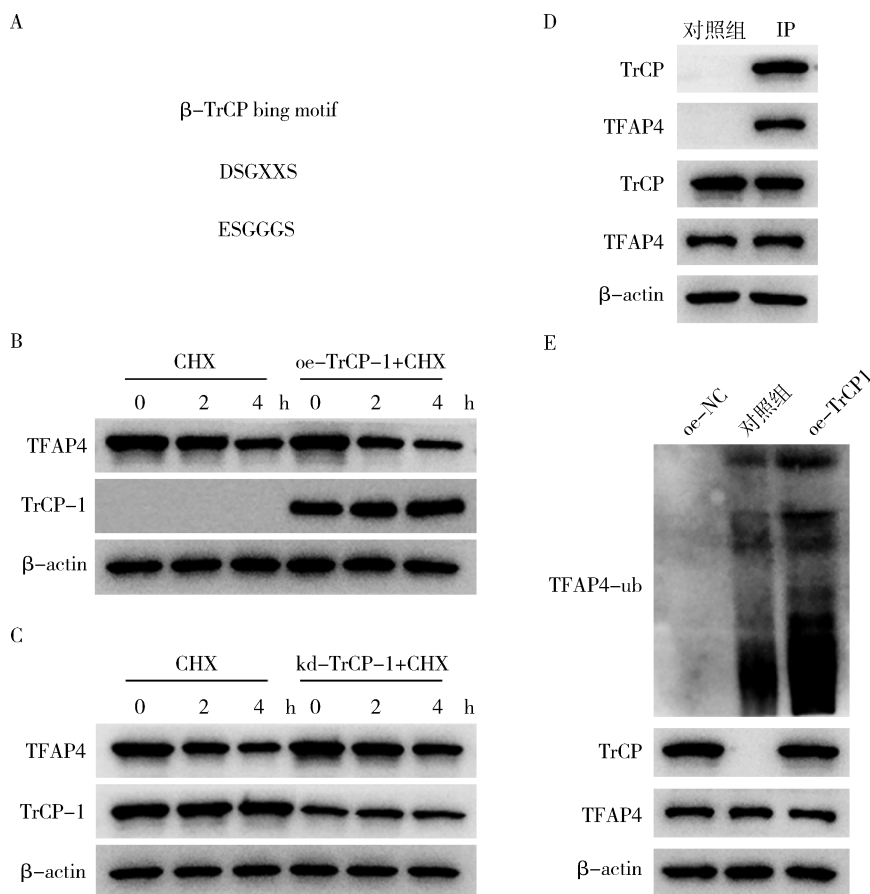


图 2 FLAG - β - TrCP - 1 与 TFAP4 直接相互作用

A. β - TrCP (DSGXXS) 的降解结构域; B. 过表达 TrCP - 1 后 TFAP4 蛋白水平变化;
C. β - TrCP 敲低后 TFAP4 蛋白水平变化; D. 免疫共沉淀; E. 泛素化模式图

3. TFAP4 结构域突变后泛素化修饰水平降低: β - TrCP1 绑定和泛素化底物依赖于其特定的降解基序,而且底物上降解基序中两个丝氨酸需要被磷酸化才能被 β - TrCP 识别。为了确定 β - TrCP1 和 TFAP4 的相互作用是否也依赖于 TFAP4 氨基酸序列上的结构域,将 TFAP4 上 135 位的 E 突变为 A,139 位的 S 突变为 A (图 3A),在 CHX 处理的 SW480 细胞中转染结构域突变的 TFAP4,空白对照只用 CHX 处理(图 3B),然后测定其半衰期,发现这位点突变后 TFAP4 的半衰期都得到了延长,与空白对照和阳性对照组比较,结构域突变的 TFAP4 结合力减弱(图 3C),TFAP4 泛素化模式如图 3D 所示,与对照组比较,结构域突变后泛素化修饰水平降低。

4. TFAP4 是 CK2 的底物:为探究磷酸化关键酶对 TFAP4 表达的影响,分别对 SW480 细胞进行干预,

结果显示,CK2 抑制剂能显著增加 TFAP4 表达(图 4A);加入 CHX 后干预不同时间(0、2、4h),发现 CK2 抑制剂能显著抑制 TFAP4 降解(图 4B)。TFAP4 泛素化模式如图 4C 所示,与对照组比较,CK2 抑制剂能降低 TFAP4 泛素化水平,免疫共沉淀结果显示,CK2 和 TFAP4 存在相互作用(图 4D)。

5. β - TrCP 泛素化降解 TFAP4 抑制结肠癌上皮间质转化:为探究 TrCP 对 TFAP4 表达的影响,在 SW480 细胞中分别进行 TRCP、TFAP4 敲低加 5 - 氟尿嘧啶干预,结果显示,与对照组比较,siTrCP + 5' - F 组 TFAP4、cleaved caspase - 3 水平都较高(图 5A)。与对照组比较,siControl + 5' - F 组细胞凋亡和坏死显著增加,而与 siControl + 5' - F 组比较,siTrCP + 5' - F 组这一趋势有缓解,siTFAP4 + 5' - F 组趋势缓解更明显(图 5B),划痕实验结果显示,siTrCP 组细胞

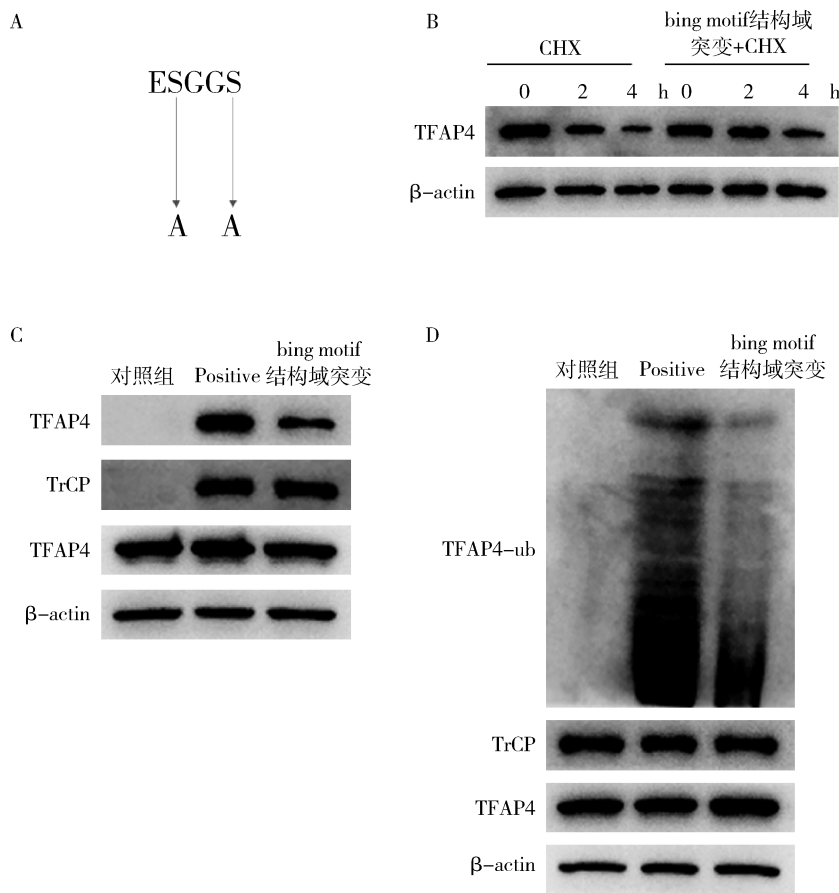


图3 TFAP4 结构域突变后泛素化修饰水平降低

A. TFAP4 氨基酸序列上的结构域突变位点;B. 结构域突变后 TFAP4 蛋白水平变化;
C. Western blot 法检测结构域突变结合能力;D. 泛素化模式图

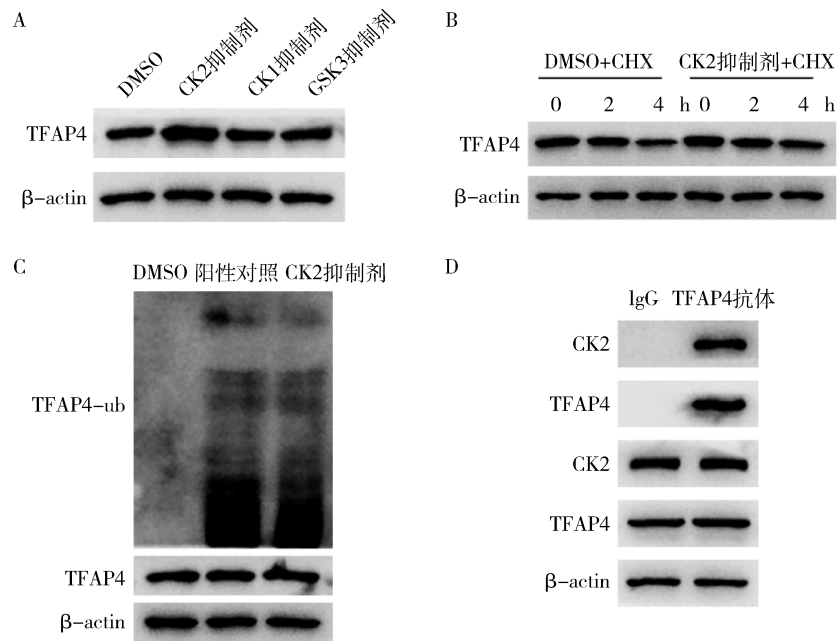


图4 TFAP4 与 CK2 的关系

A. CK1/CK2/GSK3 抑制剂对 TFAP4 表达影响;B. CK2 抑制剂联合 CHX 处理对 TFAP4 表达影响;C. 泛素化模式图;D. 免疫共沉淀

迁移能力增强, siTFAP4 组细胞迁移能力减弱, siTrCP + siTFAP4 组能恢复单纯 siTFAP4 敲降的细胞迁移能力减弱(图 5C), 同样的趋势在 Transwell 实验结果中

也能得到验证(图 5D), 表明敲低 TrCP 后结直肠细胞的迁移速度变快, 侵袭能力增强。

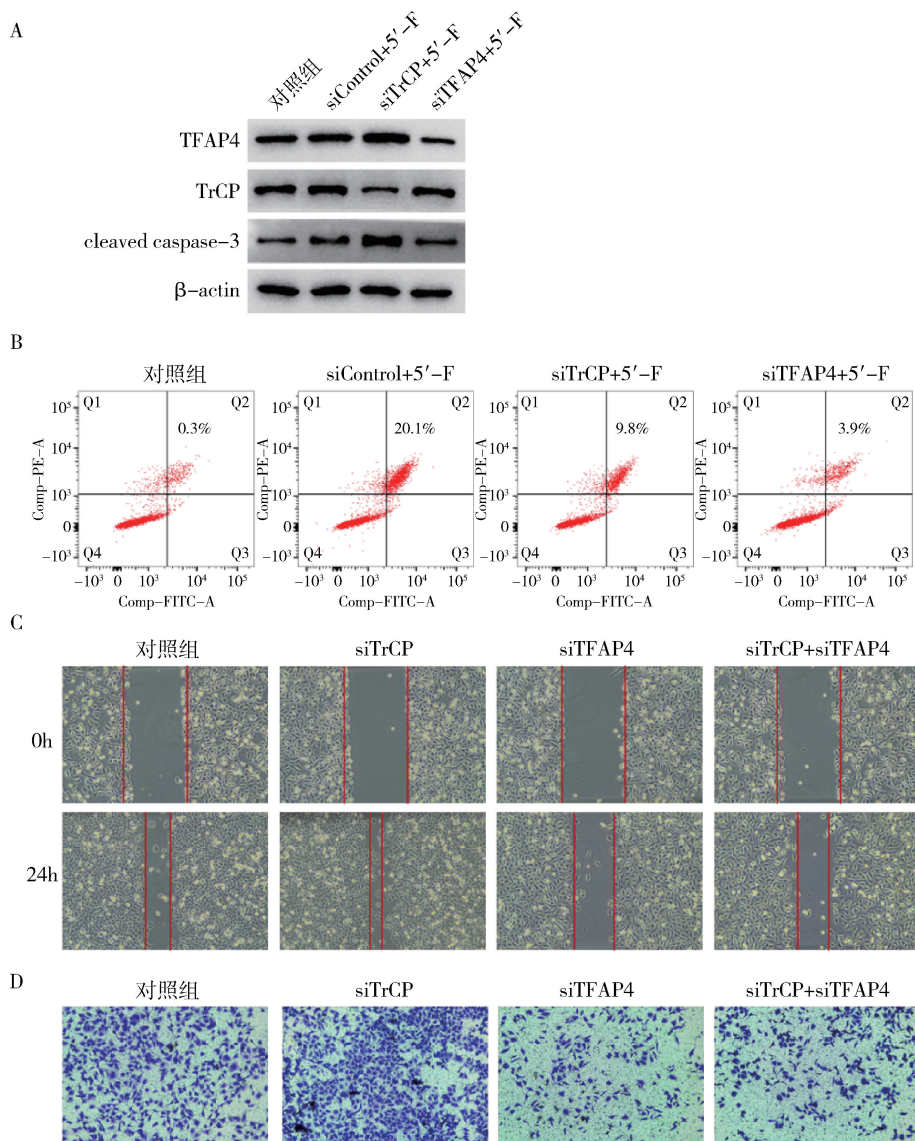


图 5 β -TrCP 泛素化降解 TFAP4 抑制结直肠癌上皮间质转化

A. siTrCP + 5'-F、siTFAP4 + 5'-F 对 TFAP4、cleaved caspase-3 表达水平的影响;
B. 敲降后细胞流式图; C. 划痕实验检测细胞迁移能力; D. Transwell 检测细胞侵袭能力

讨 论

细胞内蛋白质代谢的平衡对于维持正常细胞的生理功能起着至关重要的作用^[11]。泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)是哺乳动物细胞内最主要的蛋白质降解途径,也是维持蛋白质稳态的主要保护机制,对生命体内一系列生命活动的正常维持起着重大作用^[12]。蛋白质被泛素分子修饰的过程是一个级联的酶促反应,其中 SCF β -TrCP E3

泛素连接酶通过降解一系列重要的底物蛋白,在多种生物学进程中起着关键的调控作用^[13,14]。

转录因子激活增强子结合蛋白(TFAP4)是亮氨酸拉链亚群家族的成员之一,广泛参与恶性肿瘤的增殖、分化、转移、血管生成等生物调控功能,且与各种恶性肿瘤的预后不良密切相关^[15-19]。研究显示,TFAP4 在人类结直肠癌、肝细胞癌和胃癌中均呈高表达,可促进 CRC 细胞侵袭并通过激活 PI₃K/Akt 信号

通路促进肿瘤的转移^[20]。通常情况下,EMT 会导致细胞迁移和侵袭能力增强,而 TFAP4 通过激活 EMT 增强肿瘤细胞的迁移和转移,在 CRC 中通过激活 Wnt/ β -catenin 通路而增强成瘤能力^[21-23]。

底物蛋白结合结构域中两个丝氨酸(S)需要被磷酸化才能被 TrCP 识别,而 TrCP 的底物主要被酪蛋白激酶 1(CK1)、酪蛋白激酶 2(CK2)及糖原合成激酶 3(GSK3)3 种激酶磷酸化,因此用这 3 种抑制剂进行排查^[24]。结果显示 CK2 的抑制剂可以抑制 TFAP4 的降解,并延长半衰期,降低其泛素化水平,而且 CK2 可以与 TFAP4 直接结合,证明 TFAP4 是 CK2 的底物。本研究结果显示 siRNA 敲低 β -TrCP 后,TFAP4 的蛋白水平得到积累,Transwell 实验表明敲低 β -TrCP 后,结直肠癌细胞系的侵袭能力增强,而同时敲低 TFAP4 则能明显逆转这一现象;划痕实验表明,敲低 β -TrCP 后结直肠细胞的迁移速度变快。

综上所述,本研究利用免疫印迹,免疫共沉淀,基因沉默等生物化学手段,在生理条件下发现:在结直肠癌细胞中抑制 SCF $^{\beta$ -TrCP E3 泛素连接酶中 cullin1 骨架蛋白被 NEDD8 修饰而使其失活的小分子抑制剂 MLN4924 能明显延长 TFAP4 的半衰期,并降低其泛素化水平,而且在生理条件下 MLN4924 也能以剂量依赖性的方式使 TFAP4 得到积累;利用干扰 RNA 直接敲低或者基因敲除 cullin1 或 β -TrCP 可以明显稳定 TFAP4 延长其半衰期。在 TFAP4 氨基酸序列中存在保守的 β -TrCP 识别和结合的降解结构域,将该结构域中的关键氨基酸突变,可以抑制 TFAP4 与 β -TrCP 的结合,降低 TFAP4 的泛素化水平,并使其半衰期得到延长。以上结果表明在结直肠癌细胞中 SCF $^{\beta$ -TrCP 很有可能通过泛素化修饰降解 TFAP4,从而抑制上皮-间质转化的发生,从而抑制肿瘤的迁移和侵袭,这提示或许可以通过检测 SCF $^{\beta$ -TrCP 以及 TFAP4 的水平来判断结直肠癌患者发生转移的可能性,以及利用 SCF $^{\beta$ -TrCP 激动剂促进 TFAP4 的降解从而为结直肠癌的治疗提供新的方案。

利益冲突声明:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- 1 Favoriti P, Carbone G, Greco M, *et al.* Worldwide burden of colorectal cancer: a review [J]. *Updates Surg*, 2016, 68(1): 7-11
- 2 Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, *et al.* Colorectal cancer [J]. *Lancet*, 2019, 394(10207): 1467-1480
- 3 焉秀章, 夏文龙, 夏俊伟, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路在结直肠癌中的研究进展 [J]. *中国实验诊断学*, 2021, 25(12):

- 1856-1861
- 4 Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 22
- 5 Yang J, Ma JP, Xiao S, *et al.* Evaluating the prognostic value and functional roles of transcription factor ap4 in colorectal cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7545-7554
- 6 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30
- 7 Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, *et al.* 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: past, present and future [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 206: 107447
- 8 Marmol I, Sanchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, *et al.* Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1): 197
- 9 Yang P, Liu W, Fu R, *et al.* Cucurbitacin e chemosensitizes colorectal cancer cells via mitigating TFAP4/wnt/beta-catenin signaling [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(48): 14148-14160
- 10 Ma W, Liu B, Li J, *et al.* MicroRNA-302c represses epithelial-mesenchymal transition and metastasis by targeting transcription factor ap-4 in colorectal cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 670-676
- 11 Hanna J, Guerra-Moreno A, Ang J, *et al.* Protein degradation and the pathologic basis of disease [J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(1): 94-103
- 12 Pohl C, Dikic I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy [J]. *Science*, 2019, 366(6467): 818-822
- 13 Toma-Fukai S, Shimizu T. Structural diversity of ubiquitin e3 ligase [J]. *Molecules*, 2021, 26(21): 6682
- 14 Ci Y, Li X, Chen M, *et al.* Scf(beta-trcp) e3 ubiquitin ligase targets the tumor suppressor znr3 for ubiquitination and degradation [J]. *Protein Cell*, 2018, 9(10): 879-889
- 15 Wong MM, Joyson SM, Hermeking H, *et al.* Transcription factor ap4 mediates cell fate decisions: to divide, age, or die [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(4): 676
- 16 Wu H, Liu X, Gong P, *et al.* Elevated TFAP4 regulates lncrna trenal to promote cell migration and invasion in gastric cancer [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(2): 923-931
- 17 Jaekel S, Kaller M, Jackstadt R, *et al.* Ap4 is rate limiting for intestinal tumor formation by controlling the homeostasis of intestinal stem cells [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3573
- 18 Wang Y, Yang C, Liu X, *et al.* Transcription factor ap-4 (tfap4)-upstream orf coding 66 aa inhibits the malignant behaviors of glioma cells by suppressing the tfap4/long noncoding RNA 00520/microRNA-520f-3p feedback loop [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(3): 891-906
- 19 Liu JN, Kong XS, Sun P, *et al.* An integrated pan-cancer analysis of tfap4 aberrations and the potential clinical implications for cancer immunity [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(4): 2082-2097

(转第 106 页)

综上所述,PKP 治疗不同 BMD - T 的 OSF 患者可达到理想的临床效果。BMD - T 越低,术后椎体高度和脊柱后凸矫正就越明显,同时也更容易发生骨水泥渗漏。所以在制定外科手术计划时,有必要仔细考虑。此外,年龄、骨水泥渗漏、BMD - T、术前楔形角是影响 OSF 患者术后再骨折发生的相关因素,因此在随访临床治疗中应充分重视上述指标,并提供更可靠的治疗措施,以改善患者的预后。

利益冲突声明:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- 1 Aspray TJ, Hill TR. Osteoporosis and the ageing skeleton[J]. Sub-cell Biochem, 2019, 91: 453 - 476
- 2 Johnston CB, Dagar M. Osteoporosis in older adults[J]. Med Clin North Am, 2020, 104(5): 873 - 884
- 3 Arceo - Mendoza RM, Camacho PM. Postmenopausal osteoporosis: latest guidelines[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2021, 50(2): 167 - 178
- 4 Hollensteiner M, Sandriesser S, Bliven E, *et al.* Biomechanics of osteoporotic fracture fixation[J]. Curr Osteoporos Rep, 2019, 17(6): 363 - 374
- 5 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2022)[J]. 中国全科医学, 2023, 26(14): 1671 - 1691
- 6 Topaloglu U, Erol K. Bone mineral density and fracture risk in prediabetes: a controlled cross - sectional study[J]. Acta Reumatol Port, 2021, 46(1): 32 - 39
- 7 McCarthy C, Kelly M, Kenny P, *et al.* Assessment of previous fracture and anti - osteoporotic medication prescription in hip fracture patients[J]. Ir J Med Sci, 2022, 191(1): 247 - 252
- 8 Xin J, Liu X, Jing X, *et al.* Multifactor analysis of costal pain in osteoporotic fracture of thoracic vertebra[J]. Pain Physician, 2021, 24(6): E795 - E802
- 9 赵宗权, 吴盼红, 汤振源, 等. 老年骨质疏松症流行病学调查及预防措施研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(7): 994 - 997
- 10 鲍剑峰, 曹太见, 马建文, 等. 青海地区汉族、回族、藏族骨质疏松流行病学调查分析[J]. 颈腰痛杂志, 2020, 41(4): 442 - 444
- 11 郝定均, 贺宝荣, 郭华, 等. 胸腰段骨质疏松性骨折严重程度评分评估及临床应用[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2013, 23(8):

730 - 731

- 12 Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, *et al.* European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women[J]. Osteoporos Int, 2019, 30(1): 3 - 44
- 13 陈仲强, 袁文. AO 脊柱手册原理与技巧[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2018: 305 - 306
- 14 Alarkawi D, Bliuc D, Tran T, *et al.* Impact of osteoporotic fracture type and subsequent fracture on mortality: the Tromso Study[J]. Osteoporos Int, 2020, 31(1): 119 - 130
- 15 Yalae B, Tyurin A, Prokopenko I, *et al.* Using a polygenic score to predict the risk of developing primary osteoporosis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 10021
- 16 夏坤阳, 慈元, 李志君, 等. 经皮椎体支架内固定治疗骨质疏松性椎体压缩骨折的临床研究[J]. 中医正骨, 2022, 34(8): 1 - 7
- 17 王养华. 椎体成形术对骨质疏松脊柱骨折的临床疗效及疼痛程度的影响[J]. 中外医疗, 2021, 40(31): 68 - 71
- 18 Wang L, Liu J, Song X, *et al.* Hidden blood loss in adolescent idiopathic scoliosis patients undergoing posterior spinal fusion surgery: a retrospective study of 765 cases at a single centre[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2021, 22(1): 794
- 19 Kendler DL, Chines A, Brandi ML, *et al.* The risk of subsequent osteoporotic fractures is decreased in subjects experiencing fracture while on denosumab: results from the freedom and freedom extension studies[J]. Osteoporos Int, 2019, 30(1): 71 - 78
- 20 Blanchette PS, Lam M, Le B, *et al.* The association between endocrine therapy use and osteoporotic fracture among post - menopausal women treated for early - stage breast cancer in Ontario, Canada[J]. Breast, 2021, 60: 295 - 301
- 21 Chen Z, Song C, Chen M, *et al.* What are risk factors for subsequent fracture after vertebral augmentation in patients with thoracolumbar osteoporotic vertebral fractures[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2021, 22(1): 1040
- 22 Ji C, Rong Y, Wang J, *et al.* Risk factors for refracture following primary osteoporotic vertebral compression fractures[J]. Pain Physician, 2021, 24(3): E335 - E340
- 23 Erhan B, Ataker Y. Rehabilitation of patients with osteoporotic fractures[J]. J Clin Densitom, 2020, 23(4): 534 - 538
- 24 杜亚雷, 何保玉, 滕涛, 等. 骨质疏松性椎体压缩骨折 PVP 或 PKP 术后邻近椎体再骨折的危险因素研究进展[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(9): 1379 - 1381

(收稿日期: 2023 - 02 - 15)

(修回日期: 2023 - 05 - 15)

(接第 165 页)

- 20 Huang T, Chen QF, Chang BY, *et al.* Tfp4 promotes hepatocellular carcinoma invasion and metastasis via activating the PI₃K/Akt signaling pathway[J]. Dis Markers, 2019, 2019: 7129214
- 21 Ashrafzadeh M, Ang HL, Moghadam ER, *et al.* Micrnas and their influence on the zeb family: mechanistic aspects and therapeutic applications in cancer therapy[J]. Biomolecules, 2020, 10(7): 1040
- 22 Wang YF, Ao X, Liu Y, *et al.* Microrna - 608 promotes apoptosis in non - small cell lung cancer cells treated with doxorubicin through the inhibition of tfap4[J]. Front Genet, 2019, 10: 809

- 23 Song J, Xie C, Jiang L, *et al.* Transcription factor ap - 4 promotes tumorigenic capability and activates the wnt/beta - catenin pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Theranostics, 2018, 8(13): 3571 - 3583
- 24 Zhang Q, Yang X, Wu J, *et al.* Reprogramming of palmitic acid induced by dephosphorylation of acox1 promotes beta - catenin palmitoylation to drive colorectal cancer progression[J]. Cell Discov, 2023, 9(1): 26

(收稿日期: 2023 - 02 - 19)

(修回日期: 2023 - 03 - 13)