文章编号：0465−7942(2026)04−0001−07

RNF5-SPTLC1轴对多发性骨髓瘤硼替佐米耐药的作用及其机制

苏丹晨， 刘志强
(天津医科大学 基础医学院 生理与病理生理学系，天津 300070)

摘要：本研究旨在探讨E3泛素连接酶环指蛋白5(RNF5)在多发性骨髓瘤硼替佐米(BTZ)耐药中的作用及机制.为此,构建BTZ耐药MM细胞及相关基因稳定表达细胞系,通过免疫共沉淀、质谱及泛素化实验筛选并验证RNF5相互作用蛋白SPTLC1,采用分子生物学及功能实验评估RNF5和SPTLC1对BTZ敏感性的影响;建立Vk*MYC骨髓瘤小鼠模型评价RNF5抑制剂inh−02对BTZ增敏的体内效果.结果显示,与对照细胞相比,RNF5在BTZ耐药MM细胞中表达显著增高.RNF5敲低增强MM细胞对BTZ的敏感性并促进凋亡,过表达RNF5则促进MM细胞对BTZ耐药.RNF5与SPTLC1存在相互作用,且RNF5可对SPTLC1进行K48连接型泛素化修饰并促进降解,从而导致BTZ耐药相关.inh−02联合BTZ可显著抑制MM进展并减轻骨破坏.综上,RNF5调控SPTLC1蛋白降解与MM对BTZ药物敏感性相关,靶向RNF5可能成为克服BTZ耐药的潜在治疗策略.

关键词：多发性骨髓瘤；硼替佐米耐药；RNF5；SPTLC1；蛋白质泛素化修饰
中图分类号：R363.2 **文献标识码**：A DOI：10.27051/j.0465−7942.2026040001

0 引 言

多发性骨髓瘤(multiple myeloma，MM)是以骨髓中恶性浆细胞克隆性增殖为特征的血液系统第二大恶性肿瘤,目前仍难以治愈[1].以硼替佐米(bortezomib，BTZ)为代表的蛋白酶体抑制剂(proteasome inhibitors，PIs)已成为MM治疗的基石,显著改善了患者预后[2].蛋白酶体抑制剂的研发经历了明显的更新迭代:BTZ作为首个(第一代)蛋白酶体抑制剂,以可逆方式抑制蛋白酶体的糜蛋白酶样活性;随后以卡非佐米(carfilzomib，CFZ)为代表的第二代抑制剂通过不可逆结合实现更持久的蛋白酶体抑制,并在一定程度上克服BTZ耐药,口服制剂伊沙佐米(ixazomib)等进一步改善了给药便利性与安全性.然而,几乎所有患者最终都会出现原发或继发性BTZ耐药,导致疾病复发、生存期缩短[3].

蛋白酶体抑制剂耐药机制复杂,涉及蛋白酶体亚基突变与功能上调、自噬增强及骨髓微环境等多个层面[4],但其关键调控分子尚未完全阐明.泛素−蛋白酶体系统在MM发病与耐药中居于核心地位,其中E3泛素连接酶通过决定底物特异性,广泛参与MM细胞增殖、凋亡及硼替佐米耐药等过程的调控[5].环指蛋白5(ring finger protein 5,RNF5)是一种锚定于内质网的E3泛素连接酶,在多种肿瘤的发生发展及药物反应中具有重要作用,但其在MMBTZ耐药中的作用及机制尚未见报道.

丝氨酸棕榈酰转移酶长链碱基亚基1(serine palmitoyltransferase long chain base subunit 1，SPTLC1)催化从头鞘脂合成的起始步骤,与肿瘤细胞存活及凋亡密切相关.基于此,本研究构建BTZ耐MM模型,探讨RNF5及其潜在底物SPTLC1在BTZ耐药中的作用与分子机制,以期为逆转MM提供靶点.

1 材料与方法

1.1 细胞系与细胞培养

人MM细胞系LP1、MM.1S及人胚肾细胞系HEK293T购自普诺赛公司.LP1、MM.1S用含10%胎牛血

收稿日期：2026−02−24
基金项目：国家自然科学基金(82370209)
作者简介：苏丹晨(2001−),女,河北秦皇岛人,硕士研究生.
通讯作者：刘志强(1979−),男,山东潍坊人,教授，研究方向:多发性骨髓瘤的治疗耐受机制和靶向策略. E−mail: zhiqiangliu@tmu.edu.cn

清的RPMI-1640培养基培养,HEK293T用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养,均置于37 ℃、5% CO_2饱和湿度培养箱中.所有细胞经短串联重复(short tandem repeat, STR)鉴定并定期检测支原体.

1.2 硼替佐米耐药细胞系的构建

采用BTZ高浓度短时冲击联合低浓度持续诱导法构建耐药亚系,方法参考文献[6-7]并略作改良:先以高浓度BTZ对处于对数生长期的亲本细胞冲击处理24 h,随后弃去含药培养基,使存活细胞在无药条件下恢复增殖;待细胞状态稳定后,改以低于IC_{50}的低浓度BTZ持续培养诱导.高浓度冲击与低浓度持续诱导交替进行,并依据细胞耐受情况逐步上调冲击浓度,历时6个月获得稳定耐药亚系LP1/BTZ与MM.1S/BTZ,耐药细胞培养基中持续添加5 nmol/L BTZ以维持耐药表型.

1.3 主要试剂与抗体

硼替佐米、inh-02和嘌呤霉素,购自美国MedChemExpress公司;RPMI1640培养液和DMEM培养基,购自美国Corning公司;RNF5抗体、SPTLC1抗体和GAPDH抗体,购自武汉三鹰生物技术有限公司;ubiquitin抗体和K48连接特异性泛素抗体,购自美国Cell Signaling Technology公司;FLAG®M2-Peroxidase抗体,购自美国Sigma-Aldrich公司;Cell Counting Kit-8购自,美国MedChemExpress公司;凋亡检测试剂盒购自,上海碧云天生物技术有限公司.

1.4 细胞活力与半数抑制浓度(IC_{50})测定

采用细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)法.取对数生长期细胞,接种于96孔板,加入梯度浓度BTZ处理72 h,加入CCK-8试剂孵育后测定450 nm吸光度,通过非线性回归拟合剂量-反应曲线计算IC_{50}.每组设3复孔,独立重复3次.

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞经相应浓度BTZ处理后收集,按Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒说明书染色,经流式细胞仪检测凋亡细胞百分比.

1.6 实时荧光定量PCR

TRIzol法提取总RNA,反转录合成cDNA,SYBR Green法行qPCR,以*GAPDH*为内参,$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量.引物序列为:*RNF5*,上游引物为5'-AGAACGGCAAGAGTGTCCAG-3',下游引物为5'-AAATGG-GCTGGAATCCCCCTC-3';*GAPDH*,上游引物为5'-TCCTCCGGGTGATGCTTTTC-3',下游引物为5'-GCAGGAGGCATTGCTGATGA-3'.

1.7 蛋白质免疫印迹

采用RIPA裂解液提取总蛋白,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量法定量,等量蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离后转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,封闭后依次孵育一抗、二抗,增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显影,Image J灰度分析.

1.8 慢病毒介导的稳定敲低与过表达细胞系构建

分别构建靶向RNF5和SPTLC1的短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)干扰质粒及相应过表达质粒(空载体为对照),与包装质粒共转染HEK293T,收集并浓缩病毒上清感染MM细胞.因MM细胞仅能感染而难以转染,感染后以嘌呤霉素持续筛选获得稳定表达细胞系,效率经实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)与Western blot验证.shRNA干扰序列:shRNF5,CGGCAAGAGTGTCCAGTATGT;shSPTLC1,GCAGCAGCTTTAGCATCTCTA.

1.9 免疫共沉淀、银染与质谱分析

在HEK293T细胞中过表达带FLAG标签的RNF5,裂解细胞后采用抗FLAG抗体进行免疫共沉淀(Co-IP).沉淀产物经SDS-PAGE分离后银染,切取差异条带行液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)鉴定互作蛋白;RNF5与SPTLC1的相互作用进一步通过外源及内源Co-IP验证.

1.10 泛素化检测

免疫沉淀SPTLC1后以抗泛素抗体免疫印迹检测其泛素化水平.具体步骤:将过表达HA标签泛素(HA–Ub)及相应质粒的细胞于收获前用蛋白酶体抑制剂MG132(10 μmol/L)处理4–6 h以阻断蛋白酶体降解;随后于变性条件下裂解细胞,经免疫沉淀富集泛素化蛋白,SDS–PAGE分离后以抗泛素抗体免疫印迹检测目的蛋白的泛素化水平.为明确SPTLC1泛素链的连接类型,采用K48连接特异性泛素抗体(K48–linkage–specific polyubiquitin antibody)检测SPTLC1的K48连接型泛素化修饰;进一步转染K48位点突变泛素表达质粒(K48R),检测SPTLC1的泛素化水平,以判断SPTLC1所连接的多泛素链是否为K48连接型.

1.11 动物实验

(1)皮下移植瘤模型:将LP1–RNF5 KD及对照细胞接种于免疫缺陷小鼠皮下,成瘤后予BTZ处理(BTZ经腹腔注射,剂量0.5 mg/kg,每周2次,给药方案及体表面积/体重剂量换算参考文献[8]),定期测量肿瘤体积,记录生存期.具体参数如下:选用6–8周龄雌性NSG小鼠,每只于右侧背部皮下接种2×10^6个肿瘤细胞(接种体积100 μL);接种后每2–3 d用游标卡尺测量肿瘤长径与短径,肿瘤体积按$V=0.5\times$长径$\times$短径^{2}计算,持续监测至实验终点或肿瘤体积接近伦理批准的人道终点(2 000 mm^3)时终止实验,随后处死小鼠并收集肿瘤组织用于后续分析.

(2)系统性MM模型及联合给药:建立小鼠Vk*MYC模型,随机分为对照组、inh–02单药组、BTZ+DMSO组及BTZ+inh–02联合组.处死后取脾测量体积/质量;研磨脾脏并冲洗骨髓制备单细胞悬液,流式染色以CD138等浆细胞标志物界定骨髓瘤细胞计算其百分比;股骨固定后行显微CT(micro–CT)扫描,分析骨小梁骨体积分数(BV/TV)与骨小梁数量(Tb.N)等参数,方法参考文献[9].所有动物实验经实验动物伦理委员会批准.

1.12 统计学分析

采用GraphPadPrism11进行分析.计量资料以均数±标准差表示,两组间比较用t检验,多组间用单因素方差分析;生存分析用Kaplan–Meier法及log–rank检验.$P<0.05$为差异有统计学意义.

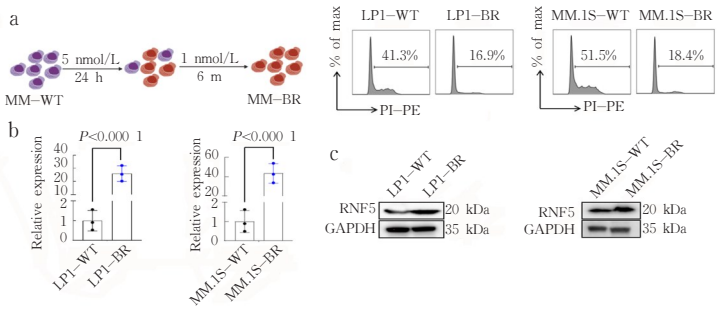
2 结　　果

2.1 RNF5在BTZ耐药的MM细胞中高表达

采用BTZ高浓度短时冲击联合低浓度持续诱导法建立LP1与MM.1S的BTZ耐药细胞系(LP1 BTZ–resistant(LP1–BR)、MM.1S BTZ–resistant(MM.1S–BR)).流式细胞术显示,相同浓度BTZ处理下耐药细胞系凋亡率明显低于野生型细胞,提示耐药模型构建成功(图1a).RNF5在两株耐药细胞中的mRNA与蛋白水平较野生型细胞明显升高(图1b–c).提示RNF5上调与MM的BTZ耐药性产生相关.

2.2 敲低RNF5增强MM细胞对BTZ的敏感性

在LP1与MM.1S中构建RNF5稳定敲低(RNF5–KD)与过表达(RNF5–OE)细胞系并验证效率.敲低RNF5后细胞对BTZ的IC_{50}降低、过表达后升高(图2a–b);BTZ处理下敲低组凋亡率升高、过表达组降低(图2c).皮下移植瘤实验中,RNF5敲低组肿瘤生长更慢、瘤体更小,荷瘤小鼠生存期延长(图2d–e).表明RNF5促进MM细胞对BTZ耐药.



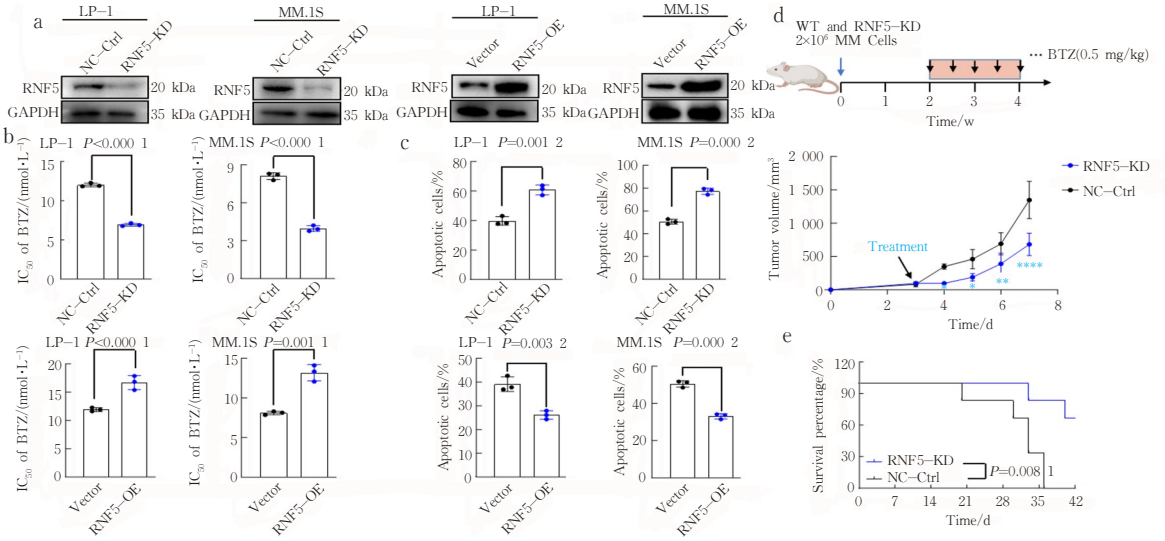
a:流式检测野生型与耐药细胞的凋亡率;b:qRT–PCR检测RNF5 mRNA表达水平;c:Western blot检测RNF5蛋白表达水平

图1 RNF5在BTZ耐药MM细胞中高表达

Fig.1 Elevated expression of RNF5 in BTZ-resistant MM cells

2.3 RNF5与SPTLC1存在相互作用并伴随SPTLC1泛素化修饰

在HEK293T中过表达RNF5后行Co–

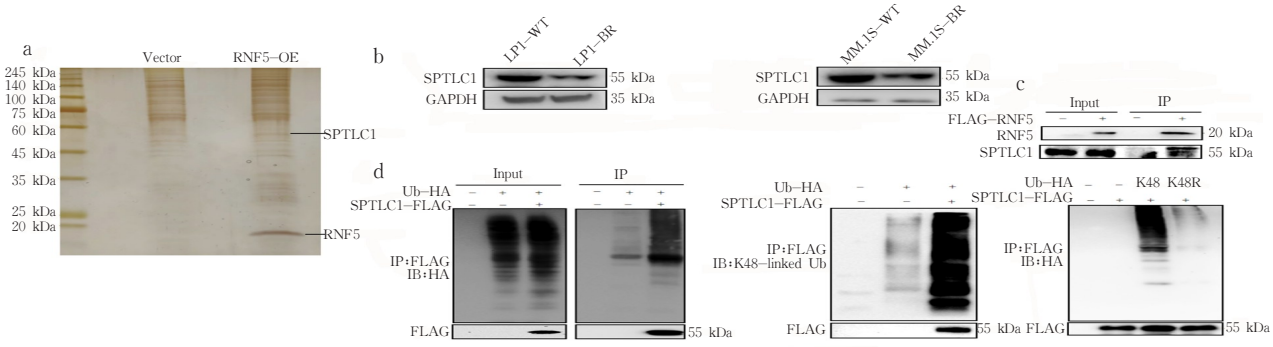


a:Western blot验证RNF5敲低过表达效果;b:CCK-8检测敲低/过表达RNF5后MM细胞对BTZ药物的IC_{50};c:流式检测RNF5敲低或过表达之后的MM细胞凋亡率;d:野生型和RNF5-KD之后MM细胞构建移植瘤模型的流程和BTZ处理之后的移植瘤体积;e:荷瘤小鼠生存曲线,*P<0.05,**P<0.01,****P<0.000 1

图2 RNF5调控MM对BTZ的敏感性

Fig.2 RNF5 regulates BTZ sensitivity in MM cells

IP、银染及质谱,鉴定出互作蛋白SPTLC1(图3a);SPTLC1为丝氨酸棕榈酰转移酶的限速亚基,参与从头鞘脂合成.SPTLC1在耐药细胞中表达降低(图3b),并且RNF5与SPTLC1相互作用(图3c).对SPTLC1的泛素化修饰进行验证,结果显示SPTLC1具有明显的泛素化修饰.采用K48连接特异性泛素抗体检测发现,SPTLC1主要发生K48连接型泛素化修饰.随后分别转染仅保留K48位点的泛素表达质粒(K48)和K48位点突变泛素表达质粒(K48R)进行验证,结果显示K48组可见明显泛素化信号,而K48R组泛素化信号基本消失,证实SPTLC1所连接的多泛素链主要为K48连接型(图3d).提示RNF5作为E3泛素连接酶参与介导SPTLC1的K48连接型泛素化修饰.



a:Co-IP-银染-质谱鉴定SPTLC1为RNF5相互作用的主要蛋白之一;b:Western blot检测耐药细胞中SPTLC1蛋白表达水平;c:Co-IP验证RNF5和SPTLC1之间存在相互作用;d:SPTLC1发生K48连接型泛素化修饰

图3 RNF5与SPTLC1相互作用且SPTLC1具有泛素化修饰

Fig.3 RNF5 interacts with SPTLC1,and SPTLC1 is ubiquitinated

2.4 SPTLC1过表达增强MM细胞对BTZ的敏感性

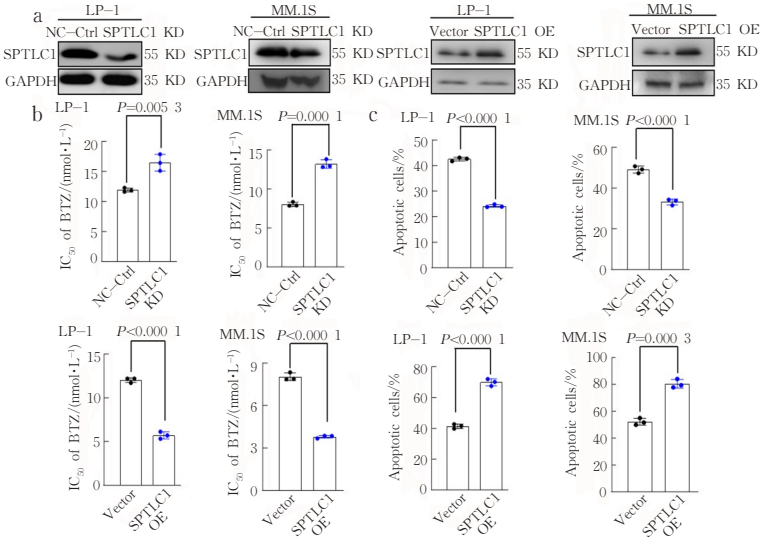
在LP1与MM.1S中构建SPTLC1敲低与过表达细胞系.敲低SPTLC1后BTZ的IC_{50}升高,过表达后降低(图4a-b).敲低组凋亡率降低,过表达组升高(图4c).表明SPTLC1为BTZ敏感相关因子,作用方向与RNF5相反,支持RNF5-SPTLC1轴调控BTZ耐药.

2.5 RNF5抑制剂inh-02联合BTZ增强体内抗MM效果

在LP1和MM.1S细胞中开展体外药效学研究.分别设置BTZ单药组和BTZ联合inh-02组,结果显示,

与BTZ单药处理相比，BTZ联合inh–02显著降低了LP1和MM.1S细胞的IC_{50}值，同时明显提高了细胞凋亡率，提示RNF5抑制可增强骨髓瘤细胞对BTZ的敏感性并促进肿瘤细胞死亡(图5a–b)．基于上述体外结果，进一步在小鼠体内模型中验证两者联合应用的抗骨髓瘤效果．

建立小鼠Vk*MYC模型，分为对照组、inh–02单药组、BTZ+DMSO组及BTZ+inh–02联合组给药．联合组脾脏体积最小，骨髓与脾脏中骨髓瘤细胞比例最低(图5c–e)；股骨micro–CT显示联合组骨破坏最轻，BV/TV与Tb.N增高(图5f)．表明inh–02联合BTZ可增强抗骨髓瘤疗效、减轻骨破坏．



a:Western blot验证SPTL1质粒敲低过表达效果验证；b:CCK–8检测敲低/过表达SPTLC1后MM细胞对BTZ药物的IC_{50}；c:流式检测SPTLC1敲低或过表达之后MM细胞对BTZ处理的凋亡率

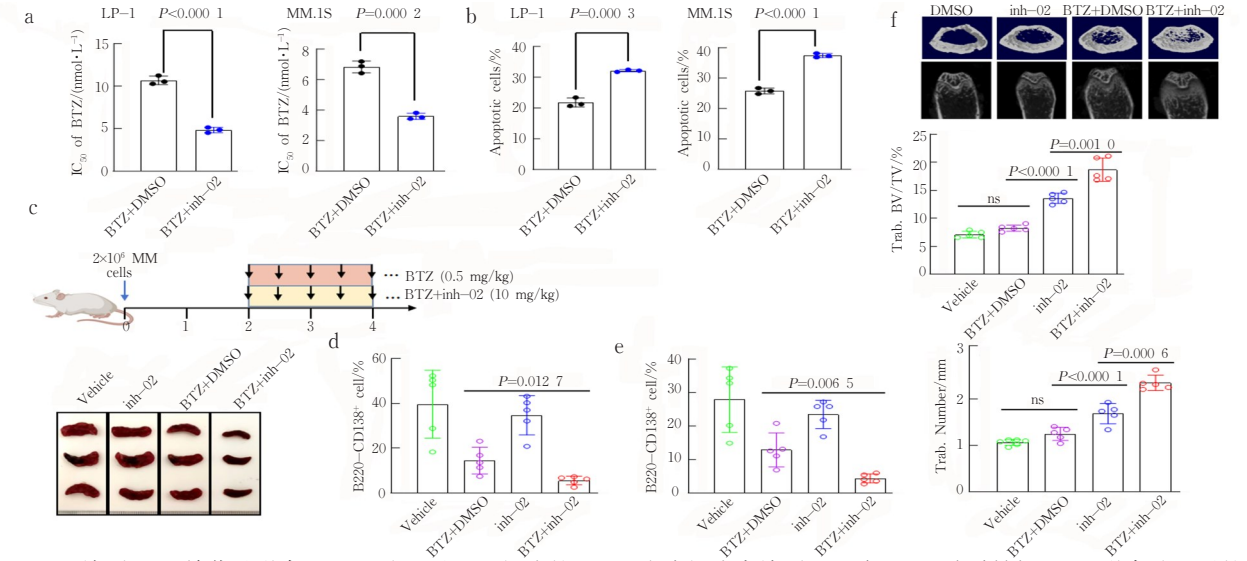
图4 SPTLC1影响MM对BTZ的敏感性

Fig.4 SPTLC1 regulates BTZ sensitivity in MM cells

3　讨　　论

本研究发现，RNF5在BTZ耐药MM细胞中显著高表达且与患者不良预后相关；敲低RNF5可增强MM细胞对BTZ的敏感性、抑制体内肿瘤生长并延长生存，过表达则相反．进一步证实RNF5与SPTLC1具备相互作用且SPTLC1具备K48连接型泛素化修饰，而SPTLC1为BTZ敏感相关因子，提示RNF5–SPTLC1轴是调控MMBTZ耐药的重要机制．

作为内质网锚定的E3泛素连接酶，RNF5在不同肿瘤中表现出促癌或抑癌的双重性．在神经母细胞瘤、黑色素瘤中，激活RNF5可抑制肿瘤生长[10]；而在病理性心肌肥厚中，RNF5通过降解STING发挥保护作用[11]．



a:CCK–8检测BTZ单药及联合inh–02处理后MM细胞的IC_{50}；b:流式细胞术检测BTZ与RNF5抑制剂inh–02联合处理后的检测凋亡率；c:各组模型小鼠在BTZ单独或者与RNF5抑制剂联合处理之后的脾脏形态及体积；d–e:骨髓与脾脏中骨髓瘤细胞比例；f:股骨micro–CT及BV/TV、Tb.N统计

图5 Inh-02联合BTZ增强体内抗骨髓瘤作用

Fig.5 Inh-02 combined with BTZ enhances anti-myeloma efficacy and alleviates bone destruction

本研究中RNF5在MM中呈促耐药、促肿瘤作用,与其在急性髓系白血病中的表现一致,提示RNF5功能具有高度的组织与底物依赖性,这种背景依赖性可能源于其在不同细胞中识别的底物不同,本研究鉴定的MM特异性底物SPTLC1即为一例.在机制层面,本研究提示RNF5作为E3泛素连接酶可介导SPTLC1的K48连接型泛素化修饰,SPTLC1表达下调则可能削弱BTZ诱导的凋亡,与上述鞘脂–耐药理论相互印证,并将泛素化修饰与鞘脂代谢重编程联系起来,拓展了对BTZ耐药的认识.

MM的BTZ耐药是多因素共同作用的结果.既往研究表明,m6A修饰的circ-0000337可通过调控DNA修复维持耐药[12];缺氧骨髓基质细胞分泌的miRNA通过靶向SPRED1赋予耐药[13];促炎巨噬细胞亦可促进MM肿瘤起始细胞富集而介导耐药[14].本研究从肿瘤细胞内在的E3连接酶–代谢酶轴提供了新的耐药机制,与微环境介导的耐药机制形成互补.在治疗层面,克服BTZ耐药的策略日益多样.临床上硼替佐米联合来那度胺、地塞米松仍是常用方案[15–18];骨髓靶向脂质体[19]及双靶向仿生纳米粒[20]可提高药物在病灶的富集并逆转耐药.本研究发现RNF5抑制剂inh–02联合BTZ可显著减轻脾脏与骨髓浸润及骨破坏,提示靶向RNF5–SPTLC1轴有望成为新的联合治疗策略.

参 考 文 献

[1] van de Donk N W C J, Pawlyn C, Yong K L. Multiple myeloma[J]. Lancet, 2021, 397(10 272): 410–427.

[2] Cowan A J, Green D J, Kwok M, et al. Diagnosis and management of multiple myeloma: a review[J]. JAMA, 2022, 327(5): 464–477.

[3] 王晨韵, 蔡 真. 双特异性抗体在复发/难治性多发性骨髓瘤中的临床应用:现状与挑战[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2025, 41(8): 1 096–1 105.

[4] Li T T, Xiao P P, Qiu D B, et al. NCX1/Ca^{2+} promotes autophagy and decreases bortezomib activity in multiple myeloma through non–canonical NF–κB signaling pathway[J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1): 258.

[5] Chen X, Zhou J, Dong X, et al. Regulatory role of E3 ubiquitin ligases in multiple myeloma: From molecular mechanisms to therapeutic strategies[J]. Front Cell Dev Biol, 2025, 13: 1620097.

[6] Downey–Kopyscinski S L, Srinivasa S, Kisselev A F. A clinically relevant pulse treatment generates a bortezomib–resistant myeloma cell line that lacks proteasome mutations and is sensitive to Bcl–2 inhibitor venetoclax[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 12788.

[7] Kubicki T, Bednarek K, Kostrzewska–Poczekaj M, et al. Bortezomib– and carfilzomib–resistant myeloma cells show increased activity of all three arms of the unfolded protein response[J]. Am J Cancer Res, 2022, 12(7): 3 280–3 293.

[8] Yue Y, Cao Y, Mao X, et al. Novel myeloma patient–derived xenograft models unveil the potency of anlotinib to overcome bortezomib resistance[J]. Front Oncol, 2022, 12: 894279.

[9] Tao J, Srinivasan V, Yi X, et al. Bone–targeted bortezomib inhibits bortezomib–resistant multiple myeloma in mice by providing higher levels of bortezomib in bone[J]. J Bone Miner Res, 2022, 37(4): 629–642.

[10] Principi E, Sondo E, Bianchi G, et al. Targeting of ubiquitin E3 ligase RNF5 as a novel therapeutic strategy in neuroectodermal tumors[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(7): 1 802–1 823.

[11] Yang L L, Xiao W C, Li H, et al. E3 ubiquitin ligase RNF5 attenuates pathological cardiac hypertrophy through STING[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(10): 889–909.

[12] Jiang S, Gao L, Li J, et al. N6–methyladenosine–modified circ–0000337 sustains bortezomib resistance in multiple myeloma by regulating DNA repair[J]. Front Cell Dev Biol, 2024, 12: 1383232.

[13] Zhang H, Du Z, Tu C, et al. Hypoxic bone marrow stromal cells secrete miR–140–5p and miR–28–3p that target SPRED1 to confer drug resistance in multiple myeloma[J]. Cancer Res, 2024, 84(1): 39–55.

[14] Colombo F, Guzzeloni V, Kizilirmak C, et al. *In vitro* models of the crosstalk between multiple myeloma and stromal cells recapitulate the mild NF–κB activation observed *in vivo*[J]. Cell Death Dis, 2024, 15(10): 731–753.

[15] 李建梅, 晋艳玲. 硼替佐米、来那度胺结合地塞米松治疗多发性骨髓瘤的有效率及安全性[J]. 昆明医科大学学报, 2023, 44(6): 120–125.

[16] 解琳娜, 王 鑫, 贺 强, 等. 国产硼替佐米联合来那度胺、地塞米松治疗初治多发性骨髓瘤的多中心、前瞻性、Ⅱ期、

单臂研究[J]. 中华血液学杂志，2024，45(6)：571–576.
[17] 王 莹，郭明珠，杨 阳. 硼替佐米联合来那度胺治疗多发性骨髓瘤的临床效果[J]. 中国血液流变学杂志，2023，33(1)：47–49.
[18] 刘玉香，宗晓燚，于冠华. 来那度胺联合硼替佐米与地塞米松治疗多发性骨髓瘤的临床效果[J]. 临床合理用药，2025，18(1)：99–102.
[19] Menachem R，Nudelman I，Vorontsova A，et al. Bone marrow–targeted liposomes loaded with bortezomib overcome multiple myeloma resistance[J]. ACS Nano，2025，19(12)：11 684–11 701.
[20] Qi R，Wang S，Yu J. Enhanced precision therapy of multiple myeloma through engineered biomimetic nanoparticles with dual targeting[J]. Engineering，2024，36(5)：178–192.

Role and Mechanism of the RNF5–SPTLC1 Axis in Bortezomib Resistance in Multiple Myeloma

Su Danchen，Liu Zhiqiang

(*Department of Physiology and Pathophysiology，School of Basic Medical Sciences，Tianjin Medical University，Tianjin* 300070，*China*)

Abstract: The role and underlying mechanisms of the E3 ubiquitin ligase ring finger protein 5 (RNF5) in bortezomib (BTZ) resistance in multiple myeloma (MM) were investigated. To this end，BTZ–resistant MM cell lines and MM cells with stable expression of target genes were established. Co–immunoprecipitation，mass spectrometry，and ubiquitination assays were performed to identify and validate SPTLC1 as an interacting protein of RNF5. Molecular and functional assays were conducted to evaluate the effects of RNF5 and SPTLC1 on BTZ sensitivity. In addition，a Vk*MYC myeloma mouse model was established to assess the in vivo efficacy of the RNF5 inhibitor inh–02 in enhancing BTZ sensitivity. The results showed that RNF5 expression was significantly upregulated in BTZ–resistant MM cells compared with control cells. RNF5 knockdown increased BTZ sensitivity and promoted apoptosis of MM cells，whereas RNF5 overexpression conferred BTZ resistance. RNF5 interacted with SPTLC1 and promoted K48–linked ubiquitination of SPTLC1，thereby contributing to BTZ resistance in MM. Combination treatment with inh–02 and BTZ significantly suppressed MM progression and alleviated bone destruction in vivo. Collectively，RNF5 regulates SPTLC1 ubiquitination and degradation，thereby contributing to BTZ sensitivity in MM. Targeting RNF5 may represent a potential therapeutic strategy for overcoming BTZ resistance in MM.

Keywords: multiple myeloma; bortezomib resistance; RNF5; SPTLC1; protein ubiquitination

[责任编辑：孙丹]