

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2021.01.0014

· 论 著 ·

## 泛素结合酶 E2C 通过特异性结合 $\beta$ -微管蛋白参与调控肝细胞癌进展

刘 梦<sup>△</sup>, 朱怡卿<sup>△</sup>, 黄金凤, 肖 邦, 陈美婷, 王 芳\*

海军军医大学(第二军医大学)基础医学院医学遗传学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 筛选泛素结合酶 E2C (UBE2C) 的底物蛋白, 并探讨其在肝细胞癌进展中的作用。**方法** 构建带有 Halotag 标签的 UBE2C 过表达质粒, 将 UBE2C 与 Halotag 在人高转移肝癌细胞系 HCCLM3 中融合表达, 通过 Halolink 树脂沉淀 UBE2C 结合的底物蛋白, 并联合 SDS-PAGE 和质谱对底物蛋白进行鉴定。在人肝癌细胞系 Huh-7 中过表达 UBE2C, 通过 qRT-PCR、蛋白质印迹分析和细胞免疫荧光实验检测 UBE2C 过表达对其底物蛋白表达的影响, 利用细胞核质分离结合蛋白质印迹分析及 TOP flash/FOP flash 荧光素酶报告基因实验检测 UBE2C 过表达对 Wnt 信号通路的影响, 并进一步通过 qRT-PCR 和蛋白质印迹分析验证 UBE2C 过表达对 Wnt 信号通路下游基因表达的影响。**结果** Halotag 共沉淀产物经 SDS-PAGE 和银染后所获得差异条带的质谱鉴定结果显示,  $\beta$ -微管蛋白是 UBE2C 结合的底物蛋白。与对照组相比, 过表达 UBE2C 降低了 Huh-7 细胞中  $\beta$ -微管蛋白在蛋白水平的表达 ( $P < 0.01$ ), 但对其在 mRNA 水平的表达没有影响 ( $P > 0.05$ )。同时, 过表达 UBE2C 促进了  $\beta$ -联蛋白入核 ( $P < 0.05$ ), 提高了 TOP flash/FOP flash 荧光素酶活性 ( $P < 0.01$ ), 增强了 Wnt 信号通路下游基因 JNK、细胞周期蛋白 D1 和基质金属蛋白酶 7 的表达 ( $P$  均  $< 0.05$ )。**结论** UBE2C 通过特异性结合  $\beta$ -微管蛋白降低肝癌细胞中  $\beta$ -微管蛋白水平, 从而提高 Wnt 信号通路活性, 促进其下游基因表达, 进而参与调控肝细胞癌的进展。

**[关键词]** 肝细胞癌; 泛素结合酶 E2C;  $\beta$ -微管蛋白; Wnt 信号通路**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2021)01-0014-07

### Ubiquitin-conjugating enzyme E2C regulates the progression of hepatocellular carcinoma by specifically binding to $\beta$ -tubulin

LIU Meng<sup>△</sup>, ZHU Yi-qing<sup>△</sup>, HUANG Jin-feng, XIAO Bang, CHEN Mei-ting, WANG Fang\*

Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To screen the substrate protein of ubiquitin-conjugating enzyme E2C (UBE2C) and to explore its role in the progression of hepatocellular carcinoma. **Methods** An overexpression plasmid of UBE2C was constructed with Halotag and was used to infect the highly metastatic human liver cancer cell line HCCLM3. The UBE2C binding substrate protein was precipitated by Halolink resin and identified by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and mass spectrometry. UBE2C was overexpressed in human liver cancer cell line Huh-7; the effect on the expression of its substrate protein was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), Western blotting and immunofluorescence staining, the effect on Wnt signal pathway was detected by cell nucleoplasmic separation combined with Western blotting and TOP flash/FOP flash luciferase reporter assay, and the effect on the expression of Wnt signal pathway downstream genes was further verified by qRT-PCR and Western blotting. **Results** The mass spectrometry analysis of the differential band of the Halotag coprecipitate obtained by SDS-PAGE and silver staining showed that the substrate protein of UBE2C was  $\beta$ -tubulin. Compared with the control group, overexpression of UBE2C had no effect on the expression of  $\beta$ -tubulin in mRNA level in Huh-7 cells ( $P > 0.05$ ), while it significantly decreased the expression of  $\beta$ -tubulin in protein level ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, overexpression of UBE2C promoted the entry of  $\beta$ -catenin into nucleus ( $P < 0.05$ ), increased the luciferase activity of TOP flash/FOP flash ( $P < 0.01$ ), and enhanced the expression of the Wnt signaling pathway downstream genes (c-Jun

**[收稿日期]** 2020-09-22 **[接受日期]** 2020-11-13**[基金项目]** 国家自然科学基金(81672775). Supported by National Natural Science Foundation of China (81672775).**[作者简介]** 刘 梦, 硕士生. E-mail: Mengliu721006@163.com; 朱怡卿, 博士, 讲师. E-mail: 971899787@qq.com<sup>△</sup>共同第一作者( Co-first authors ).

\*通信作者( Corresponding author ). Tel: 021-81871057, E-mail: wfsjz@163.com

N-terminal kinase [*JNK*], cyclin D1 and matrix metalloproteinase 7) (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** UBE2C contributes to the progression of hepatocellular carcinoma through decreasing the expression of  $\beta$ -tubulin in hepatocellular carcinoma cells by specifically binding to  $\beta$ -tubulin, activating Wnt signaling pathway and promoting expression of downstream genes.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; ubiquitin-conjugating enzyme E2C;  $\beta$ -tubulin; Wnt signaling pathway

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2021, 42(1): 14-20]

肝细胞癌是世界范围内发病率最高的恶性肿瘤之一,具有高复发、高转移的特点<sup>[1]</sup>。流行病学调查显示,肝细胞癌在男性癌症相关死亡原因中高居第2位,在女性中位居第6位<sup>[2]</sup>。近年来,外科手术、化疗和放疗技术的发展极大改善了肝细胞癌患者的预后,但是对晚期肝细胞癌患者有效的治疗手段仍十分有限。肝细胞癌的发生、发展是一个复杂的多因素过程,挖掘肝细胞癌发生过程中的关键分子、明确其调控机制对肝细胞癌的早期诊断和治疗具有重要意义。

泛素结合酶E2C (ubiquitin-conjugating enzyme E2C, UBE2C) 是泛素结合酶E2家族成员,可通过与细胞周期后期促进复合物特异性结合参与蛋白的泛素化降解途径,进而在生命活动调控中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。基于肿瘤基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库和基因型-组织表达 (Genotype-Tissue Expression, GTEx) 数据库的生物信息学研究显示,UBE2C在乳腺癌、结直肠癌、肺癌及肝细胞癌等27种肿瘤中的表达均升高,且与患者的不良预后密切相关<sup>[4-5]</sup>。UBE2C异常表达能增加染色体不稳定性,促进包括胃癌、非小细胞肺癌和黑素瘤在内多种肿瘤的发生、发展<sup>[6-8]</sup>。Wei等<sup>[9]</sup>研究发现,相比癌旁组织和正常肝细胞系,UBE2C在肝癌组织和肝癌细胞系中表达上调且提示不良预后。以上研究结果提示,UBE2C是一个重要的癌基因,参与肝癌等多种肿瘤的发生、发展。但目前人们对UBE2C促癌作用的研究仍不够深入,对具体分子机制及其参与调控的信号通路的认识仍十分有限。本研究拟通过Halotag共沉淀实验鉴定肝癌细胞中UBE2C特异性结合的底物蛋白,并考察UBE2C与其底物蛋白的相互作用对肝癌细胞的影响,为UBE2C作为生物标志物应用于肝癌的诊断和治疗提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞与试剂 人肝癌细胞系 Huh-7、人高转移

肝癌细胞系 HCCLM3、人胚胎肾细胞系 HEK293T 均购自中国科学院上海细胞库,由本实验室保存。DMEM 高糖培养液和 FBS 均购自美国 Gibco 公司,青霉素、链霉素、蛋白质印迹分析所需试剂均购自上海博光生物科技有限公司,脂质体 3000 试剂和反转录试剂均购自美国 Invitrogen 公司, RNA 抽提试剂 TRIzol RNAiso 购自日本 TaKaRa 公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司,亚细胞蛋白质组抽提试剂盒购自美国 Merck Millipore 公司, $\beta$ -微管蛋白、组蛋白 H3、细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1, CCND1)、JNK 抗体均购自美国 CST 公司, $\beta$ -联蛋白抗体购自上海泊湾生物科技有限公司,GAPDH 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

### 1.2 细胞培养及过表达 UBE2C 的稳转细胞系的构建

细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养液,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。向接种到 6 孔板同等数量并且长到 60%~80% 融合度的 Huh-7 细胞中加入嘌呤霉素 (美国 ThermoFisher Scientific 公司),浓度分别为 0、1.5、2、2.5、3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,3 d 后观察到致 Huh-7 细胞全部死亡的最低浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。UBE2C 过表达慢病毒及对照慢病毒均购于上海吉玛制药技术有限公司,分别命名为 LV-UBE2C 和 LV-Control。感染病毒前 1 d,将  $3 \times 10^5$  个细胞接种到 6 孔板,保证感染时细胞融合度为 50%~70% 并处于对数生长期。转染时换新鲜培养液,向每孔细胞中加入 30  $\mu\text{L}$  病毒和 1  $\mu\text{L}$  病毒增强剂,24 h 后换液,感染细胞 3 d 后加入嘌呤霉素,及时更换培养液,去除死细胞并传代,1 周后利用 qRT-PCR 和蛋白质印迹实验验证转录水平及蛋白水平的过表达效率。验证好的细胞一部分置于液氮中冻存,一部分用于后续实验。

### 1.3 Halotag 下拉实验与质谱分析

分别用编码 UBE2C-Halotag 融合蛋白和 Halotag 标签的质粒转染 HCCLM3。转染 72 h 后用预冷的 PBS 重悬细胞,在 4 °C 下  $2\ 000 \times g$  离心 5 min,弃掉 PBS;在

-80 °C 存放 30 min 后,将细胞沉淀用哺乳动物裂解液(美国 Promega 公司)裂解。Halolink 树脂用 TBS 洗涤 3 次后,将裂解物与树脂在 4 °C 孵育过夜,然后将结合蛋白复合物用 TBST 洗涤 3 次,进行 SDS-PAGE 和银染;切取特异性条带,并用质谱仪(美国 ProTech 公司)进行分析。

1.4 qRT-PCR 检测相关基因的表达 使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。按照反转录试剂盒操作说明合成 cDNA,以 cDNA 为模板,使用 SYBR Real-time PCR 试剂盒在 StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 系统(美国 Applied Biosystems 公司)中进行扩增。引物序列如下:微管蛋白正向引物 5'-AAGATCCGAGAAGAATACCCTGA-3',反向引物 5'-CTACCAACTGATGGACGGAGA-3'; *UBE2C* 正向引物 5'-TCAGACAACCTTTTCAAAT GGGT-3',反向引物 5'-AGCGAGAGCTTATACCTCAGG-3'; *JNK* 正向引物 5'-TCCAAGTGCCGAAAAAGGAAG-3',反向引物 5'-CGAGTTCTGAGCTT TCAAGGT-3'; *CCND1* 正向引物 5'-CAATGACCCCGCACGATTT C-3',反向引物 5'-CATGGAGGGCGGATTGGAA-3'; 基质金属蛋白酶 7(matrix metalloproteinase 7, *MMP7*) 正向引物 5'-GAGTGAGCTACAGTGGGA ACA-3',反向引物 5'-CTATGACGCGGGAGTTTA ACAT-3';  $\beta$ -肌动蛋白正向引物 5'-CTGGTGCC TGGGGCG-3',反向引物 5'-AGCCTCGCCTTGGC GA-3'。每个样本重复 3 次。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法对目标基因表达水平进行相对定量分析。

1.5 蛋白质印迹法检测相关蛋白表达 收集细胞,置于冰上,加入 200  $\mu$ L RIPA 蛋白裂解液和 2  $\mu$ L 蛋白酶抑制剂 PMSF,4 °C 摇床放置 5 min 后刮下细胞,收集细胞悬液,4 °C 17 000 $\times g$  离心 8 min,取上清用 BCA 法检测蛋白浓度。取等量蛋白上样,行 SDS-PAGE,200 mA 恒流转膜,用 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h 后分别加入  $\beta$ -微管蛋白、组蛋白 H3、*CCND1*、*JNK*、 $\beta$ -联蛋白、*GAPDH* 抗体于 4 °C 下孵育过夜。用 TBST 洗涤后加入相应二抗,室温避光孵育 1 h 后用 TBST 洗 3 次。利用 Odyssey 红外荧光扫描成像系统检测蛋白荧光强度,并对目的蛋白的表达水平进行半定量分析。

1.6 细胞免疫荧光化学染色 将 *UBE2C* 过表达的 Huh-7 细胞和阴性对照 Huh-7 细胞铺在基质胶预处理的盖玻片上,细胞生长 12 h 后去除上清,用 PBS

清洗,然后在室温下用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 30 min,弃去甲醛,PBS 清洗 3 遍。加入 400  $\mu$ L 打孔液室温孵育 10 min 后,弃去打孔液,加入 400  $\mu$ L 封闭液室温封闭 2 h。加入抗  $\beta$ -微管蛋白单克隆抗体(1 : 50 稀释)4 °C 孵育过夜。弃去液体,PBS 洗涤 3 次后,用 Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(美国 Invitrogen 公司,1 : 2 000 稀释)孵育细胞 2 h。弃去液体,用 0.1% Triton-PBS 清洗 1 次,加入 DAPI 室温孵育 10 min。去除 DAPI,用 0.1% Triton-PBS 清洗 3 次,每次 10 min。使用 Carl Zeiss 显微镜观察结果并拍照。

1.7 双荧光素酶报告基因实验 带有 TOP Flash 和 FOP Flash 质粒的 TCF 报告基因质粒试剂盒购自美国 Upstate Cell Signaling Solutions 公司。将细胞接种到 96 孔板,转染时细胞融合度为 70% 并处于对数生长期。为了测定  $\beta$ -联蛋白的转录活性,用脂质体 3000 将含有诱导型(TOP Flash)或突变型(FOP Flash)TCF 反应性萤火虫荧光素酶的报告载体和 pReceiver-M02-UBE2C 质粒(美国 GeneCopoeia 公司)的混合物瞬时转染 HEK293T 细胞。为了监测转染效率,将每个样品与表达海肾荧光素酶的 phRL-TK 对照质粒(美国 Promega 公司)共转染细胞。转染 6 h 后,换新鲜完全培养液。质粒共转染 48 h 后,弃去培养液,用 100  $\mu$ L PBS 洗 1 次,倾斜 96 孔板,吸干剩余的 PBS。用双荧光素酶报告基因检测系统测定裂解物中萤火虫和海肾荧光素酶的活性,相对荧光素酶活性利用海肾荧光素酶活性进行标准化。所有实验重复 3 次。

1.8 亚细胞蛋白质组提取 用亚细胞蛋白质组抽提试剂盒分别提取 Huh-7 LV-UBE2C 克隆和 Huh-7 LV-Control 的细胞质蛋白和细胞核蛋白质组。

1.9 统计学处理 应用 GraphPad Prism 6 软件进行数据分析和绘图。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 肝癌细胞中  $\beta$ -微管蛋白是 UBE2C 特异性结合的底物蛋白 通过双酶切,获得 UBE2C 与 Halotag 标签融合表达质粒(图 1A)。银染结果(图 1B)显示,UBE2C 融合表达组与空质粒组共沉淀产物的电泳结果存在差异条带。差异条带质谱分析结果(表 1)显示, $\beta$ -微管蛋白与 UBE2C 存在特异性

结合。进一步的生物信息学分析结果(表2)显示, β-微管蛋白存在多个泛素化修饰位点。以上结果提示, β-微管蛋白是UBE2C特异性结合的底物蛋白。

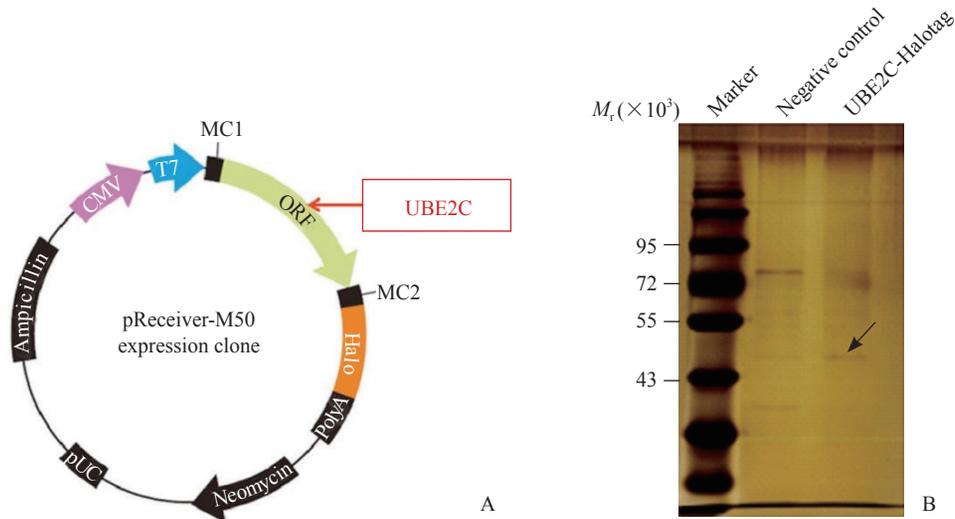


图1 UBE2C与Halotag标签融合表达质粒示意图和蛋白电泳结果

Fig 1 Schematic diagram of UBE2C expression plasmid fused with Halotag and results of protein electrophoresis

A: Schematic diagram of the Halotag-labelled UBE2C plasmid structure; B: Silver-stained SDS-PAGE gel of proteins immunoprecipitated from HCCLM3 cells extracted by Halotag-labelled UBE2C and negative control protein. The arrow indicates the region of the gel excised for mass spectrometry determination by the liquid chromatography dual mass spectrometry method. Marker: A mixture of prestained protein ladder; Negative control: Empty plasmid group. UBE2C: Ubiquitin-conjugating enzyme E2C; CMV: Cytomegalovirus; ORF: Open reading frame; MC: Monoclonal site; pUC: pBR322 plasmid vector derivatives first constructed in University of California; SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis.

2.2 UBE2C与β-微管蛋白相互作用对β-微管蛋白表达的影响 qRT-PCR检测结果显示,在过表达UBE2C的Huh-7细胞中β-微管蛋白在mRNA水平的表达与对照组比较差异无统计学意义(1.03±0.09 vs 1.00±0.10, P=0.81);蛋白质印迹分析检测结果(图2A)显示,相较于对照组,过表达UBE2C降低了Huh-7细胞中β-微管蛋白的表达,与对照组比较差异有统计学意义(0.49±0.09 vs 1.00±0.06, P<0.01);细胞免疫荧光结果(图2B)显示,相较于对照组,过表达UBE2C减少了β-微管蛋白在Huh-7细胞胞质中的分布。以上结果提示,肝癌细胞中UBE2C可以降解其底物蛋白β-微管蛋白,影响β-微管蛋白在细胞中的分布。

表1 质谱鉴定结果

Tab 1 Mass spectrometry results

Hits	Protein mass	No. of peptide	Sequence header	Link	Relative abundance/%
1	50 787.88	6	>sp Q71U36 TBA1A_HUMAN Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1	Q71U36	39.60
2	50 095.16	4	>sp P07437 TBB5_HUMAN Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2	P07437	29.00
3	50 451.24	3	>sp P68104 EF1A1_HUMAN Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	P68104	19.80
4	71 317.36	2	>sp P02768 ALBU_HUMAN Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	P02768	7.70
5	56 524.69	1	>sp P06576 ATPB_HUMAN ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3	P06576	1.20
6	58 518.73	1	>sp Q6UW63 KDEL1_HUMAN KDEL motif-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=KDEL1 PE=1 SV=1	Q6UW63	2.70

表 2 生物信息学分析显示  $\beta$ -微管蛋白的泛素化修饰位点

Tab 2 Ubiquitination modification sites of  $\beta$ -tubulin showed by bioinformatics analysis

Position	Peptide	Reference (PMID)
122	SVLDVVR <u>K</u> AESCDC	22505724
154	MGTLISK <u>R</u> EEYPD	22505724; 23266961; 25093938; 26051181
297	TQQVFD <u>A</u> KMMAACD	20639865; 20972266; 21890473; 21906983; 21963094; 21987572
324	FRGRMSM <u>K</u> VDEQML	25093938; 25825284
336	QMLNVQN <u>K</u> SSYFVE	21890473; 21906983; 21963094; 21987572; 22505724; 23266961
362	DIPPRGL <u>K</u> AVTFIG	21906983; 22505724; 23503661; 26051181
58	YNEATGG <u>K</u> VPRAIL	18781797; 20639865; 20972266; 21890473; 21906983; 21963094

Ubiquitination modification sites of  $\beta$ -tubulin were underlined. PMID: PubMed unique identifier.

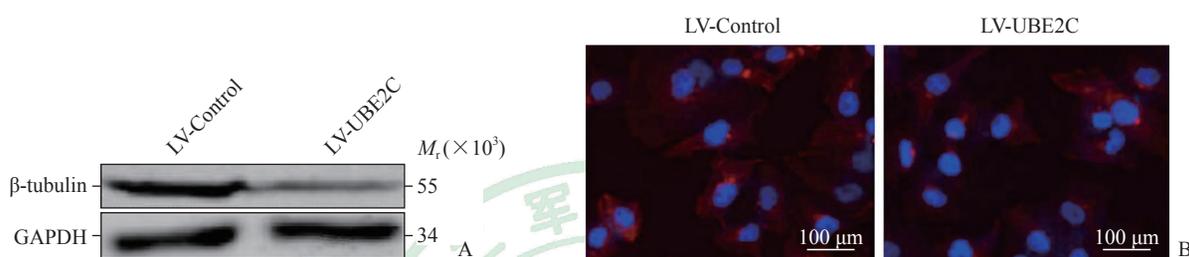


图 2 过表达 *UBE2C* 对  $\beta$ -微管蛋白表达及其在细胞中分布的影响

Fig 2 Effect of overexpression of *UBE2C* on  $\beta$ -tubulin expression and cell distribution

A: Expression of  $\beta$ -tubulin in Huh-7 cells after overexpression of *UBE2C* detected by Western blotting; B: Immunofluorescence staining showing distribution of  $\beta$ -tubulin in Huh-7 cells ( $\beta$ -tubulin was stained with red fluorescence). LV: Lentivirus; *UBE2C*: Ubiquitin-conjugating enzyme E2C; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

2.3 *UBE2C* 对  $\beta$ -微管蛋白相关的 Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号通路的影响 蛋白质印迹分析结果(图 3)显示,过表达 *UBE2C* 的 Huh-7 细胞胞质中  $\beta$ -联蛋白表达水平与对照组比较差异无统计学意义 ( $0.86 \pm 0.04$  vs  $1.00 \pm 0.12$ ,  $P=0.31$ ), 而细胞核中  $\beta$ -联蛋白的表达水平升高,与对照组比较差异有统计学意义 ( $3.27 \pm 0.18$  vs  $1.00 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ), 表明过表达 *UBE2C* 可以促进  $\beta$ -联蛋白入核。TOP flash/FOP flash 荧光素酶报告基因实验结果显示,过表达 *UBE2C* 的 Huh-7 细胞荧光素酶活性较对照组增强,差异有统计学意义 ( $2.03 \pm 0.09$  vs  $1.00 \pm 0.12$ ,  $P < 0.01$ ), 证明 *UBE2C* 对 Wnt 信号通路有激活作用。

2.4 *UBE2C* 对 Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号通路下游基因表达的影响 qRT-PCR 实验结果(图 4A)显示,过表达 *UBE2C* 后 Huh-7 细胞中 *JNK*、*CCND1* 和 *MMP7* 在 mRNA 水平的表达均较对照组上调,差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ )。蛋白质印迹分

析结果(图 4B)显示,过表达 *UBE2C* 的 Huh-7 细胞中 *JNK*、*CCND1* 和 *MMP7* 在蛋白质水平的表达均较对照组上调,差异均有统计学意义 ( $1.57 \pm 0.11$  vs  $1.00 \pm 0.06$ ,  $1.90 \pm 0.07$  vs  $1.00 \pm 0.05$ ,  $2.53 \pm 0.08$  vs  $1.00 \pm 0.02$ ,  $P$  均  $< 0.05$ )。以上结果表明 *UBE2C* 可以促进 Huh-7 细胞中 Wnt 信号通路下游基因的表达。

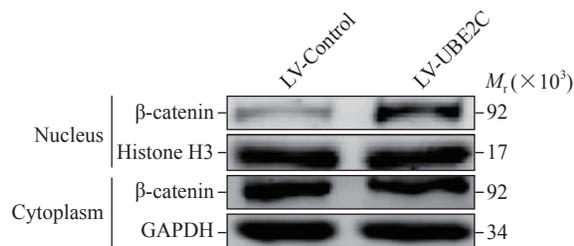


图 3 过表达 *UBE2C* 可促进 Huh-7 细胞中  $\beta$ -联蛋白入核

Fig 3 Overexpression of *UBE2C* can promote  $\beta$ -catenin to enter the nucleus of Huh-7 cells

LV: Lentivirus. *UBE2C*: Ubiquitin-conjugating enzyme E2C; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

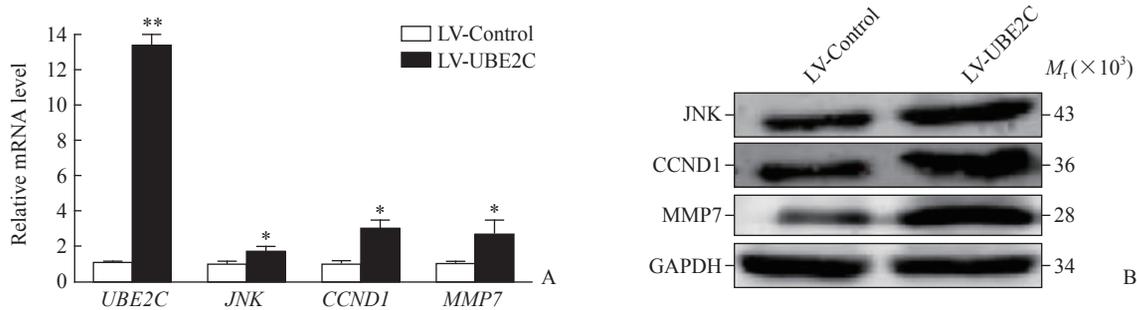


图4 过表达 *UBE2C* 促进 Huh-7 细胞中 JNK、CCND1 和 MMP7 基因转录和翻译

Fig 4 Expression of JNK, CCND1 and MMP7 increased with the overexpression of *UBE2C* in Huh-7 cells

A: mRNA expression detected by quantitative real-time polymerase reaction; B: Protein expression detected by Western blotting. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs LV-Control group.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . LV: Lentivirus; UBE2C: Ubiquitin-conjugating enzyme E2C; JNK: c-Jun N-terminal kinase; CCND1: Cyclin D1; MMP7: Matrix metalloproteinase 7; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

### 3 讨论

泛素化作为一种重要的蛋白翻译后修饰,参与细胞周期调控、细胞凋亡、DNA 修复、转录调控、自噬作用等多个重要的胞内反应,对于细胞更新胞内蛋白、清除衰老蛋白及维持内环境稳定具有重要意义。近年来,大量研究表明泛素化过程紊乱与多种疾病特别是肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[10-13]</sup>。泛素化过程依赖 E1 泛素激活酶、E2 泛素结合酶和 E3 泛素连接酶的协同作用,明确参与肿瘤发生的关键泛素化酶并阐明其作用的具体分子机制已成为肿瘤研究的热点。Jia 等<sup>[14]</sup>的研究显示, E3 泛素连接酶家族成员肽基脯氨酰异构酶(亲环蛋白)样 2 [peptidyl-prolyl isomerase (cyclophilin)-like 2, PPIL2] 可以通过特异性结合上皮间质转化的关键分子锌指转录因子 SNAIL1, 促进 SNAIL1 泛素化途径依赖的降解,进而抑制乳腺癌的转移。相似的, E3 泛素连接酶 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMG-CoA) 在肺癌组织中的表达高于正常组织, *HMG-CoA* 过表达将提高抑癌基因 NAD 依赖性组蛋白去乙酰化酶 2 (NAD-dependent histone deacetylase sirtuin 2, *SIRT2*) 的泛素化水平,从而促进肺癌的发生、发展<sup>[15]</sup>。

本实验关注了 E2 泛素结合酶家族中重要的癌胚分子 UBE2C。考虑到 UBE2C 分子结构的复杂性,在筛选肝癌细胞中 UBE2C 相互作用分子时采用了 Halotag 共沉淀技术。将共沉淀产物进行 SDS-PAGE 后,银染结果显示, UBE2C 融合表达组的沉淀中存在特异性条带,质谱分析结果表明  $\beta$ -微管

蛋白是差异条带的主要组成成分。生物信息学分析结果显示  $\beta$ -微管蛋白中存在多个潜在的泛素化位点,由此推测  $\beta$ -微管蛋白可能是 UBE2C 在肝癌细胞中特异性结合的底物分子。为了验证 UBE2C 对  $\beta$ -微管蛋白表达是否存在调控作用,我们在肝癌细胞 Huh-7 中过表达 *UBE2C*。蛋白质印迹分析结果表明,过表达 *UBE2C* 降低了肝癌细胞中  $\beta$ -微管蛋白在蛋白水平的表达; qRT-PCR 检测结果显示,  $\beta$ -微管蛋白在 mRNA 水平的表达没有显著改变。以上研究结果提示,肝癌细胞中 UBE2C 可以通过与  $\beta$ -微管蛋白的特异性结合促进  $\beta$ -微管蛋白的降解。

$\beta$ -微管蛋白是微管蛋白家族的重要成员之一,它与  $\alpha$ -微管蛋白紧密结合形成微管蛋白异二聚体,参与细胞骨架构成、形态维持、细胞收缩、有丝分裂及信号转导等重要生命活动过程。肿瘤细胞处于一种异常增殖的状态,较之于正常细胞,肿瘤细胞的细胞周期调控出现异常且有丝分裂更加频繁,微管蛋白的解聚和组合加快。有研究显示,促进肝癌细胞中  $\beta$ -微管蛋白的释放将抑制 Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号通路,从而延缓肝癌的发生、发展<sup>[16]</sup>。因此,我们推测 UBE2C 通过降解  $\beta$ -微管蛋白激活 Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号通路,从而参与肝癌的进展。荧光素酶报告基因测定实验和亚细胞蛋白质抽提实验结果显示,在肝癌细胞中过表达 *UBE2C* 可促进  $\beta$ -联蛋白入核,提高  $\beta$ -联蛋白在细胞核中的表达,激活 Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号通路。同时, qRT-PCR 和蛋白质印迹分析结果显示,过表达 *UBE2C* 提高了 Wnt 信号通路下游基因 JNK、CCND1 和 MMP7 的转录和翻译。

综上所述,在肝癌细胞中  $\beta$ -微管蛋白是 UBE2C 的底物蛋白,且 UBE2C 通过介导  $\beta$ -微管蛋白的降

解促进 $\beta$ -联蛋白入核,激活Wnt信号通路及其下游基因表达。本实验筛选到肝癌中UBE2C结合的底物蛋白,加深了对泛素化酶在肝癌进展中作用的认识,为UBE2C在肝癌诊断和治疗中的应用提供了新的依据。

#### [参考文献]

- [1] ARZUMANYAN A, REIS H M, FEITELSON M A. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13: 123-135.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, SIEGEL R L, TORRE L A, JEMAL A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 394-424.
- [3] CHANG L, ZHANG Z, YANG J, MCLAUGHLIN S H, BARFORD D. Atomic structure of the APC/C and its mechanism of protein ubiquitination[J]. *Nature*, 2015, 522: 450-454.
- [4] VAN REE J H, JEGANATHAN K B, MALUREANU L, VAN DEURSEN J M. Overexpression of the E2 ubiquitin-conjugating enzyme UbcH10 causes chromosome missegregation and tumor formation[J]. *J Cell Biol*, 2010, 188: 83-100.
- [5] OKAMOTO Y, OZAKI T, MIYAZAKI K, AOYAMA M, MIYAZAKI M, NAKAGAWARA A. UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 4167-4173.
- [6] ZHANG J, LIU X, YU G, LIU L, WANG J, CHEN X, et al. UBE2C is a potential biomarker of intestinal-type gastric cancer with chromosomal instability[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 847. DOI: 10.3389/fphar.2018.00847.
- [7] GUO J, WU Y, DU J, YANG L, CHEN W, GONG K, et al. Deregulation of UBE2C-mediated autophagy repression aggravates NSCLC progression[J/OL]. *Oncogenesis*, 2018, 7: 49. DOI: 10.1038/s41389-018-0054-6.
- [8] LIU G, ZHAO J, PAN B, MA G, LIU L. UBE2C overexpression in melanoma and its essential role in G<sub>2</sub>/M transition[J]. *J Cancer*, 2019, 10: 2176-2184.
- [9] WEI Z, LIU Y, QIAO S, LI X, LI Q, ZHAO J, et al. Identification of the potential therapeutic target gene *UBE2C* in human hepatocellular carcinoma: an investigation based on GEO and TCGA databases[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17: 5409-5418.
- [10] MANSOUR M A. Ubiquitination: friend and foe in cancer[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 101: 80-93.
- [11] POPOVIC D, VUCIC D, DIKIC I. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment[J]. *Nat Med*, 2014, 20: 1242-1253.
- [12] VADASZ I, WEISS C H, SZNAJDER J I. Ubiquitination and proteolysis in acute lung injury[J]. *Chest*, 2012, 141: 763-771.
- [13] BRAZEE P, DADA L A, SZNAJDER J I. Role of linear ubiquitination in health and disease[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 54: 761-768.
- [14] JIA Z, WANG M, LI S, LI X, BAI X Y, XU Z, et al. U-box ubiquitin ligase PPIL2 suppresses breast cancer invasion and metastasis by altering cell morphology and promoting SNAI1 ubiquitination and degradation[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 63. DOI: 10.1038/s41419-017-0094-4.
- [15] LIU L, YU L, ZENG C, LONG H, DUAN G, YIN G, et al. E3 ubiquitin ligase HRD1 promotes lung tumorigenesis by promoting sirtuin 2 ubiquitination and degradation[J/OL]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40: e00257-19. DOI: 10.1128/MCB.00257-19.
- [16] MAO J, WANG D, WANG Z, TIAN W, LI X, DUAN J, et al. Combretastatin A-1 phosphate, a microtubule inhibitor, acts on both hepatocellular carcinoma cells and tumor-associated macrophages by inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *Cancer Lett*, 2016, 380: 134-143.

[本文编辑] 尹 茶