DOI:10.16016/j.1000-5404.201910077

环指蛋白14通过抑制HNF1α促进肝癌细胞增殖与侵袭转移

朱光曦,王文生,张 亮,文良志,陈东风 400042 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)大坪医院消化内科

[摘要] **目的** 研究环指蛋白14(ring finger protein 14,RNF14)对肝癌细胞增殖与侵袭转移能力的影响,并探讨RNF14在肝癌发生、发展中的作用机制。**方法** 利用基因表达谱交互式分析网站(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA; http://gepia.cancer-pku.cn)与Western blot实验分析正常人肝细胞与肝癌细胞间RNF14的表达差异;应用Transwell小室迁移与侵袭实验研究过表达和敲低RNF14对肝癌细胞(Hu7、7404)运动迁移能力的影响;通过CCK-8增殖实验、克隆形成实验及裸鼠皮下成瘤实验体外、体内共同验证RNF14对肝癌细胞7404增殖能力的影响;通过免疫共沉淀实验检测RNF14与肝细胞核因子1α(hepatocyte nuclear factor-1alpha,HNF1α)之间的相互作用。**结果** GEPIA与Western blot实验结果显示:RNF14在肝癌组织和肝癌细胞中的表达分别显著高于癌旁组织和正常肝细胞($P<0.05$)。Transwell侵袭迁移实验结果显示:过表达RNF14后,肝癌细胞Hu7的迁移与侵袭能力显著高于阴性对照组($P<0.05$),同样地,敲低RNF14后,肝癌细胞7404的迁移与侵袭能力显著低于阴性对照组($P<0.05$)。CCK-8增殖实验、克隆形成与皮下移植瘤实验结果证明:敲低RNF14能够显著抑制肝癌细胞的增殖($P<0.05$)。免疫共沉淀实验结果显示:RNF14与HNF1α之间存在相互结合,且RNF14能够下调HNF1α的表达。**结论** RNF14能够通过抑制抑癌因子HNF1α的表达,增强肝癌细胞的增殖与侵袭转移能力,从而在肝癌的发生、发展中起到重要作用。

[关键词] 环指蛋白14;肝细胞核因子1α;肝细胞癌;细胞增殖;肿瘤侵袭;肿瘤转移
[中图法分类号] R341;R730.23;R735.7 [文献标志码] A

Ring finger protein 14 promotes proliferation, migration and invasion of hepatoma cells by inhibiting hepatocyte nuclear factor-1α

ZHU Guangxi, WANG Wensheng, ZHANG Liang, WEN Liangzhi, CHEN Dongfeng Department of Gastroenterology, Daping Hospital, Army Medical University (Third Military Medical Universsity), Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of ring finger protein 14 (RNF14) overexpression and knockdown on the proliferation and invasion of hepatoma cells and explore the mechanism by which RNF14 promote the occurrence and progression of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** We investigated the expression of RNF14 in HCC and adjacent tissues using Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA), and examined its expression in normal human hepatocytes and hepatoma cells using Western blotting. The effects of overexpression and knockdown of RNF14 on the migration and invasion abilities of 2 hepatoma cell lines (Hu7 and 7404) were observed using Transwell chamber migration and invasion assay. The effect of RNF14 knockdown on the proliferation of hepatoma cells 7404 was verified by CCK8 proliferation assay, colony formation assay and subcutaneous xenograft tumor formation in nude mice. The interaction between RNF14 and hepatocyte nuclear factor-1α (HNF1α) was tested with co-immunoprecipitation assay. **Results** The results of GEPIA and Western blotting showed that the

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81802459)
[通信作者] 陈东风,E-mail: chendf1981@126.com

expression of RNF14 was significantly higher in hepatoma tissues and cells than in normal hepatic tissues and hepatocytes ($P<0.05$). Transwell chamber invasion and migration assays showed that the migration and invasion abilities of Hu7 cells were increased significantly after overexpression of RNF14 ($P<0.05$), and RNF14 knockdown significantly attenuated the migration and invasion ability of hepatoma cells 7404 ($P<0.05$). The results of CCK8 proliferation assay, colony formation and subcutaneous xenograft tumor formation in nude mice all demonstrated that RNF14 knockdown significantly inhibited the proliferation of hepatoma cells ($P<0.05$). Co-immunoprecipitation confirmed that RNF14 could bind to HNF1α and down-regulate the expression of the latter. **Conclusion** RNF14 promotes the proliferation, migration and invasion of hepatoma cells through degrading HNF1α, and may thus play an important role in the occurrence and progression of HCC.

[**Key words**] ring finger protein 14; hepatocyte nuclear factor-1alpha; hepatocellular carcinoma; cell proliferation; neoplasm migration; neoplasm invasion

Supported by the National Nature Science Foundation for Young Scholar of China (81802459). Corresponding author: CHEN Dongfeng, E-mail: chendf1981@126.com

原发性肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,且近些年来发病率持续上升[1-2]。肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的原发性肝癌类型,占原发性肝癌的80%~85%。HCC的发病率在全球范围内差异很大,我国的HCC新发病例占全球总数的一半以上[3]。近年来,外科手术治疗已成为早期肝癌患者最主要且最有效的治疗方式,但术后复发率及生存期仍不理想[4]。目前肝癌的发生被认为与慢性HBV/HCV感染、黄曲霉毒素暴露、酒精及非酒精性脂肪肝或脂肪性肝炎有关[5],但具体的发生机制并不清楚,亟需进一步深入研究。

环指蛋白14(ring finger protein 14, RNF14)分子质量为54×10^3,由474个氨基酸组成,因含有雄激素受体结合结构域,又被称为雄激素受体辅助因子54(androgen receptor-associated 54, ARA54),起初由KANG等[6]通过突变的雄激素受体ARt877s(第877位密码子的苏氨酸突变为丝氨酸)筛选酵母双杂交系统从人前列腺cDNA文库中分离出来。RNF14的蛋白结构高度保守,先前的研究表明RNF14能影响线粒体的转录功能并在全身各组织中广泛表达[7],TiGER数据库(Tissue-specific Gene Expression and Regulation, TiGER)也显示其在人体肝脏等组织中广泛表达[8]。目前关于RNF14的研究比较少,但已有研究表明其可能为人类多种消化道肿瘤,如食管癌[9]、结直肠癌[10]的促癌因子。肝细胞核因子1α(hepatocyte nuclear factor-1alpha, HNF1α)属于肝细胞核因子家族(hepatocyte nuclear factors, HNFs),该家族成员能够调节许多肝脏特异性基因的表达,在肝脏的发育和再生中起着至关重要的作用[11]。HNF1α是HNF家族的关键转录因子之一,在肝细胞分化中发挥重要的作用[12]。有研究报道HNF1α在肝癌细胞及肝癌组织中低表达,且过表达HNF1α能显著抑制肝癌细胞的增殖,表明HNF1α是肝细胞癌的抑癌因子[13]。本课题组通过蛋白相互作用数据库发现RNF14与HNF1α存在相互作用,但是RNF14如何调控HNF1α的具体机制尚不清楚。因此,本研究旨在探讨RNF14对肝细胞癌增殖与转移的影响及可能的机制,从而为阐明肝癌细胞发生、发展机制提供新的理论基础和治疗策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂及仪器 包括:RNF14质粒、HNF1α质粒(Origene公司,美国),RNF14小干扰RNA(上海生工生物工程有限公司),RNF14敲低慢病毒(上海吉凯基因科技有限公司),RNF14抗体、GFP标签抗体(武汉三鹰),DDK标签抗体、GAPDH抗体(Origene公司,美国),山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗(武汉三鹰),Transwell小室(康宁公司,美国),CCK-8试剂盒(上海圣尔生物科技有限公司),DMEM培养基、opti-MEM培养基(Gibcol公司,美国),Lipofectamine 3000(济南博涵生物科技有限公司),protein A/G-beads(Thermo公司,美国),胎牛血清FBS、0.25%胰酶(Gibcol公司,美国),4%组织固定液(上海碧云天公司),Western blot电泳及转膜仪、凝胶电泳成像仪(Bio-Rad公司,美国),倒置荧光显微镜(奥林巴斯,日本),5%CO_2细胞培养箱、酶标仪、超低速离心机、高速离心机(Thermo公司,美国)等。

1.1.2 动物 健康雄性NOD/SCID小鼠(由大坪医院

实验动物中心提供)10 只,年龄 4~6 周,体质量 20~30 g。

1.2 *方法*

1.2.1 细胞培养 Hu7、7404、L02 及其他肝癌细胞株均用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养。放置于 37 ℃、5%CO_2 恒温培养箱中孵育,每日观察细胞生长情况,隔日换液。待细胞长到 85%~95%时,0.25%胰酶消化传代。

1.2.2 小干扰 RNA 及过表达质粒转染 将 Hu7 与 7404 肝癌细胞株消化传代至 6 孔板内,待细胞生长至 70%左右即可转染。过表达质粒转染步骤:对照组,取灭菌 1.5 mL EP 管,加入 200 μL opti-MEM 培养基,加入 2 μg cmv-2 对照质粒,6 μL PEI(1 μg/μL),轻轻混匀,静置 15 min 后加入相应细胞培养孔中;实验组,加入 2 μg RNF14 质粒,其余同对照组。8~10 h 后,观察两组细胞状态,更换培养基,36 h 后即可消化细胞进行后续实验。小干扰 RNA 转染步骤:对照组,取 2 个灭菌 1.5 mL EP 管,A、B 管各加入 125 μL opti-MEM 培养基,A 管加入 6.0~7.5 μL Lipofectamine 3000,B 管加入阴性对照 si-scramble 6 μL,各自轻轻混匀后,将 A、B 管混合,静置 5 min 后加入相应细胞培养孔中;实验组,加入 siRNA RNF14 6 μL,其余同对照组。注意观察细胞生长状态,48 h 后消化细胞进行后续实验。

1.2.3 慢病毒构建稳定敲低细胞株 将 7404 肝癌细胞传代至 6 孔板中,待细胞生长到 50%~60%左右即可感染病毒。将构建好的慢病毒 shRNF14 与阴性对照病毒从-80 ℃冰箱取出,置于冰上缓慢融化。准备 A、B 2 个灭菌 1.5 mL EP 管,各加入 1 mL 高糖 DMEM 培养基备用。将融化后的病毒在 4 ℃离心机中瞬离 10 s,根据病毒的滴度和细胞的 MOI 值计算好需加入的病毒量,将 shRNF14 与对照病毒按相应剂量各自加入 A、B 2 个 EP 管中,轻轻混匀后加入 6 孔板中。12 h 后补加 1 mL 高糖 DMEM 培养基,观察细胞生长状态,待细胞生长至 90%左右即可消化传代至 10 cm 培养皿中继续培养。待细胞生长至 70%~80%即可开始用嘌呤霉素开始筛选细胞。获得感染病毒的细胞株后冻存留种以备后用。

1.2.4 Western blot 实验 提取正常人肝细胞株与肝癌细胞株的总蛋白质,检测目的蛋白的表达水平。电泳:80 V/30 min,120 V/1 h 30 min;转膜:250 mA/1 h 30 min;封闭:5%奶粉/1 h;RNF14 一抗孵育(4 ℃摇床过夜);山羊抗兔二抗孵育(室温摇床 1 h);曝光显影。

1.2.5 Transwell 小室迁移与侵袭实验 通过 Transwell 小室进行肝癌细胞株(Hu7、7404)的迁移与侵袭实验。共转染 4 组肝癌细胞株,过表达对照组:转染对照空载体质粒的肝癌细胞 Hu7-cmv-2;过表达组:转染过表达质粒的肝癌细胞 Hu7-RNF14;敲低对照组:转染对照空白质粒的肝癌细胞 7404-NC(negative control);敲低组:转染小干扰 RNA 的肝癌细胞 7404-siRNF14。上述 4 组肝癌细胞计数后,加入 Transwell 小室上室(50 000 个/200 μL),下室加入高糖 DMEM 培养基(20%FBS,850 μL),放入 37 ℃、5%CO_2 细胞培养箱孵育 24~48 h 后,固定,结晶紫染色,显微镜下观察拍照。侵袭实验方法基本同迁移实验,不同点为 Transwell 小室的聚碳酸酯基底膜上附有一层基质胶,使用前需水化 2 h。

1.2.6 CCK-8 细胞增殖实验 采用 CCK-8 试剂盒检测肝癌细胞株(Hu7、7404)的增殖能力。将转染了 RNF14 质粒及小干扰 RNA(siRNA)的肝癌细胞计数后加入 96 孔板中(3 000 个/孔,100 μL),连续 4~5 d,每天同一时间点加入 CCK-8 试剂(10 μL),细胞培养箱孵育 2 h,酶标仪检测光密度值 D(450),记录、整理数据并制作增殖曲线。

1.2.7 克隆形成实验 通过平板克隆形成实验检测肝癌细胞株 7404 的克隆形成能力变化。将转染了小干扰 RNA(siRNA)的肝癌细胞 7404 计数后加入 6 孔板中(500 个/孔),细胞培养箱孵育 12 d,固定,结晶紫染色后观察并拍照。

1.2.8 皮下成瘤实验 将感染慢病毒 shRNF14 与阴性对照病毒的肝癌细胞(7404)按 10^6/只分别接种于 NOD/SCID 小鼠两侧胁背部皮下,每 3~4 天观察 1 次肿瘤生长情况,种瘤后 25 d 左右处死小鼠,剥出肿瘤,测量瘤体大小与重量,制成蜡块保留肿瘤组织,免疫组化检测 RNF14 表达水平。肿瘤大小记录公式:体积=0.5×长径×短径^2。

1.2.9 免疫共沉淀实验(Co-Immunoprecipitation,Co-IP) 在 293T 工具细胞中过表达 GFP-RNF14 和 DDK-HNF1α 质粒;收获细胞后,加入 IP 裂解缓冲液,冰上裂解 20~30 min,12 000×g 4 ℃离心 30 min 后取上清;取少量裂解液以备 Western blot 实验,在剩余裂解液中加入对应抗体(GFP 抗体、DDK 抗体、IgG 抗体,3 μL)和 20 μL protein A/G-beads,4 ℃匀速缓慢摇晃孵育过夜;翌日,4 ℃ 3 000×g 离心 10 min,吸掉上清,用裂解缓冲液将沉淀下来的 protein A/G-beads 洗 3 次;加入上样缓冲液,100 ℃水浴锅煮 7 min。Western blot 检测 GFP-RNF14 或 Flag-HNF1α 的表达。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件,数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。Transwell 小室迁移与侵袭实验、克隆形成实验以及小鼠皮下成瘤实验中,过表达组、敲低组与各自对照组之间的差异均采用独立样本 t 检验。CCK-8 增殖实验中,过表达组、敲低组与各自对照组之间的差异采用两因素方差分析。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RNF14 在肝癌细胞中高表达

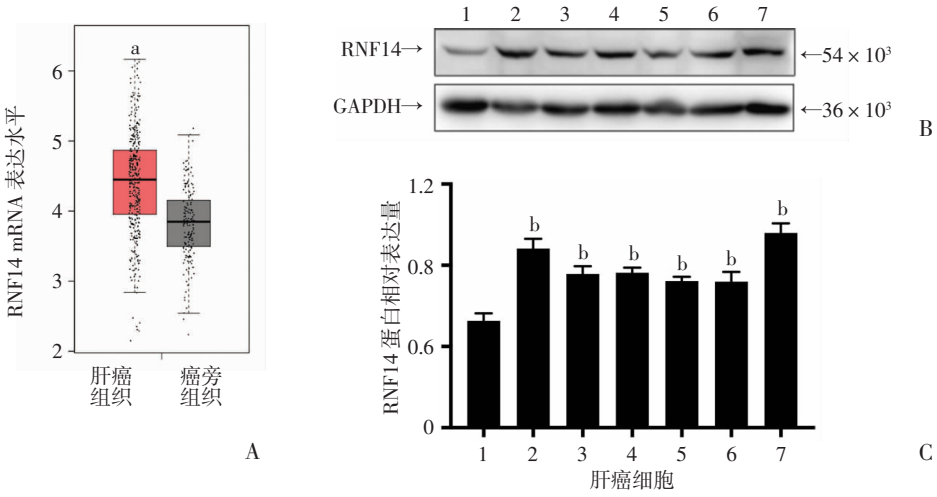
通过基因表达谱交互式分析网站(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA; http://gepia.cancer-pku.cn)分析 RNF14 在肝癌组织(369 例)与癌旁组织(160 例)间的表达差异,结果提示:RNF14 mRNA 在肝癌组织中的表达明显高于癌旁组织($P<0.05$,图 1A)。通过 Western blot 检测人正常肝细胞株 L02 与肝癌细胞株(Hep3B、HepG2、7721、7404、Hu7、PLC)间 RNF14 的蛋白表达,发现 RNF14 在 L02 中的表达也明显低于各肝癌细胞株($P<0.05$,图 1B、C)。以上结果提示:相比于正常人肝细胞,RNF14 在肝癌细胞中的表达明显增加。

2.2 RNF14 能够促进肝癌细胞的迁移与侵袭

选取肝癌细胞 Hu7 和 7404 进行后续实验。构建 4 组肝癌细胞株,过表达对照组:Hu7-cmv-2;过表达组:Hu7-RNF14;敲低对照组:7404-NC;敲低组:7404-siRNF14。应用 Transwell 小室观察 RNF14 的过表达与敲低对肝癌细胞株 Hu7 与 7404 迁移及侵袭能力的影响。结果显示:Hu7-RNF14 肝癌细胞的迁移数与侵袭数均显著多于对照组,提示其迁移能力与侵袭能力均明显增强(图 2A~D,$P<0.05$)。而相比于敲低对照组,7404-siRNF14 肝癌细胞的迁移数与侵袭数均显著减少,提示其迁移能力与侵袭能力均明显降低(图 2E~H,$P<0.05$)。以上研究结果表明:RNF14 能够增强肝癌细胞的迁移与侵袭能力。

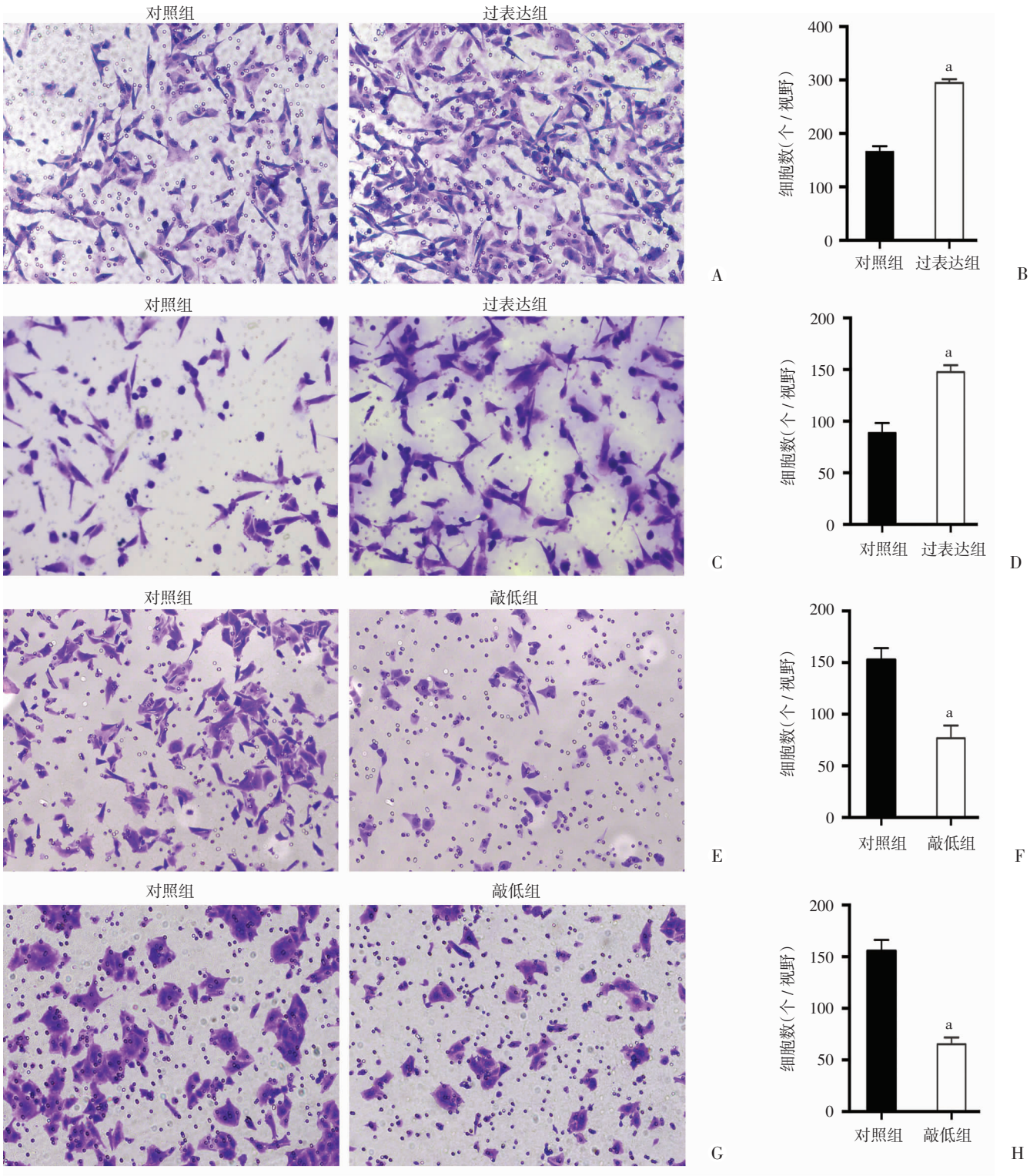
2.3 RNF14 能够促进肝癌细胞的增殖

为研究 RNF14 对肝癌细胞增殖能力的影响,除了上述转染质粒的细胞株,再利用慢病毒构建两组肝癌细胞株,敲低对照组:感染了阴性对照病毒的肝癌细胞 7404-NC;敲低组:感染了 shRNF14 慢病毒的肝癌细胞 7404-shRNF14。应用 CCK-8 增殖实验检测 Hu7-cmv-2 与 Hu7-RNF14、7404-NC 与 7404-shRNF14 各组细胞间增殖能力的差异(图 3A、B)。结果显示:相比于过表达对照组,Hu7-RNF14 增殖能力更强($P<0.05$);而相比于敲低对照组,7404-shRNF14 的增殖能力降低($P<0.05$)。此外,通过克隆形成实验比较 7404-NC 与 7404-shRNF14 两组细胞间的增殖能力,12 d 后观察并计数两组肝癌细胞形成的克隆数量。结果如图 3C、D 所示:敲低 RNF14 后,7404 肝癌细胞形成的细胞克隆数明显少于对照组,增殖能力明显降低($P<0.05$)。以上结果提示 RNF14 能够增强肝癌细胞的增殖能力。



A:RNF14 在肝癌组织($n=369$)与癌旁组织($n=160$)mRNA 表达的差异 a:$P<0.05$,与癌旁组织比较;B、C:Western blot 检测 RNF14 在 L02 与各肝癌细胞株间的蛋白表达及半定量分析 1:L02;2:Hep3B;3:HepG2;4:7404;5:7721;6:Hu7;7:PLC;b:$P<0.05$,与 LO2 比较

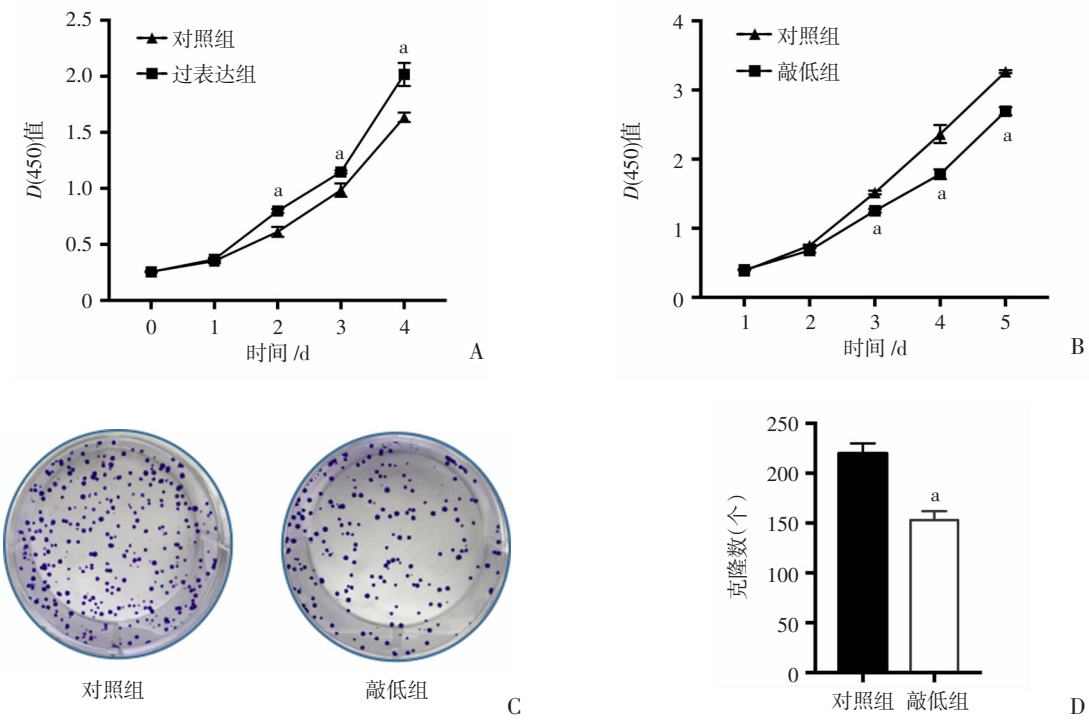
图 1 RNF14 在肝癌中高表达



a:$P<0.05$,与对照组比较

A、B:迁移实验检测 Hu7-cmv-2(对照组)与 Hu7-RNF14(过表达组)迁移能力及半定量分析;C、D:侵袭实验检测 Hu7-cmv-2(对照组)与 Hu7-RNF14(过表达组)侵袭能力及半定量分析;E、F:迁移实验检测 7404-NC(对照组)与 7404-shRNF14(敲低组)迁移能力及半定量分析;G、H:侵袭实验检测 7404-NC(对照组)与 7404-shRNF14(敲低组)侵袭能力及半定量分析

图 2 RNF14 促进肝癌细胞的迁移与侵袭 (×200)



a:$P<0.05$,与对照组比较

A:CCK-8 实验检测 Hu7-cmv-2(对照组)与 Hu7-RNF14(过表达组)的增殖能力;B:CCK-8 实验检测 7404-NC(对照组)与 7404-shRNF14(敲低组)的增殖能力;C、D:克隆形成实验检测 7404-NC(对照组)与 7404-shRNF14(敲低组)的增殖能力及半定量分析

图 3 RNF14 促进肝癌细胞的增殖

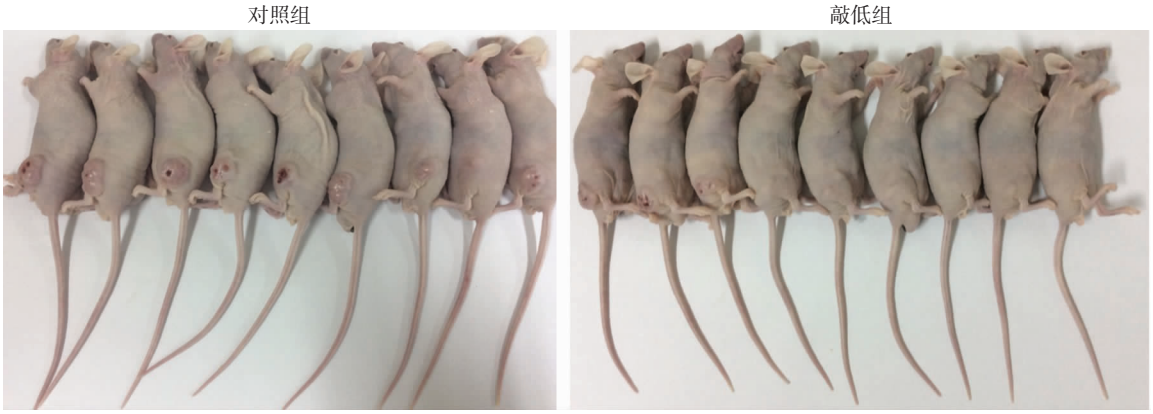
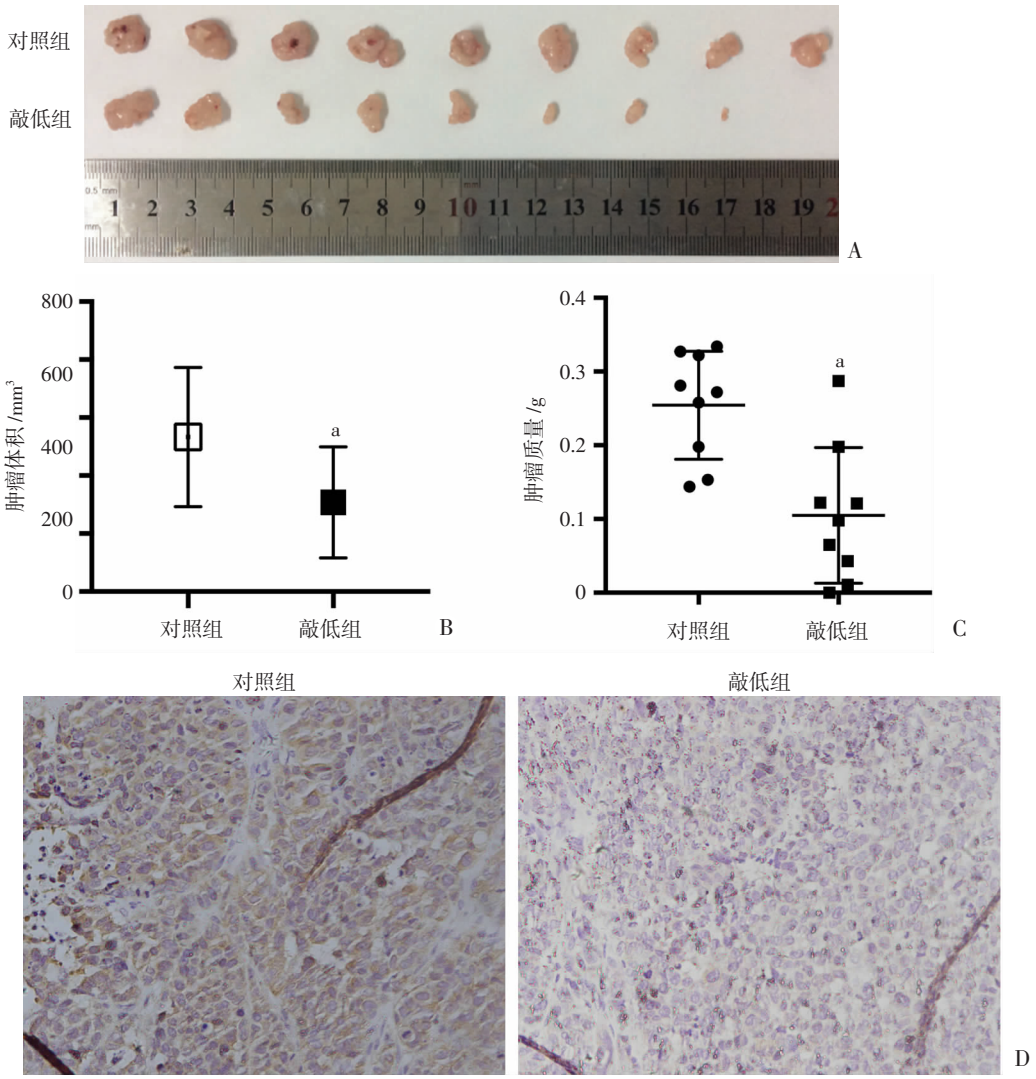


图 4 7404-NC(对照组)与 7404-shRNF14(敲低组)皮下成瘤大体观察

2.4 敲低 RNF14 能够抑制肝癌细胞的皮下成瘤能力

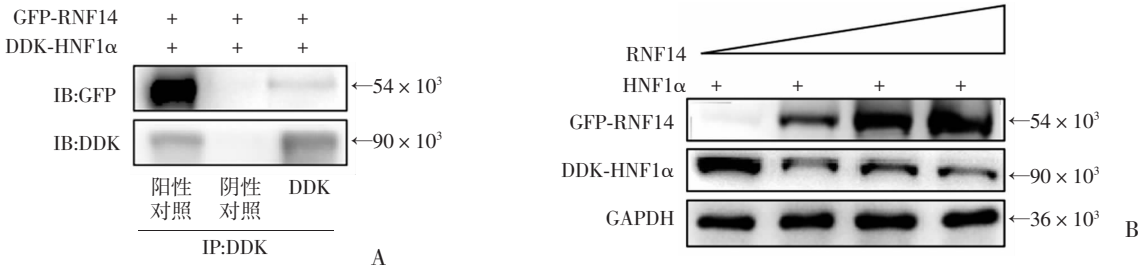
将上述构建的两组稳定的肝癌细胞株(7404-NC,7404-shRNF14)分别接种于 NOD/SCID 小鼠的左侧和右侧胁背部皮下(10^6/侧),每 3~4 天观察 1 次肿瘤生长情况,25 d 后处死小鼠,剥出肿瘤,实验结果如图 4 所示:肉眼观察实验组小鼠长出的肿瘤明显小于对照组(图 4,图 5A),两组的肿瘤体积与肿瘤质量差异均具有统计学意义($P=0.042\ 4$、$0.001\ 5$,图 5B、C)。免疫组化结果证实实验组 RNF14 的表达低于对照组(图 5D)。研究结果表明敲低 RNF14 能够显著抑制肝癌细胞的皮下成瘤能力。



a:$P<0.05$,与对照组比较

A:瘤体肉眼观察;B:肿瘤体积;C:肿瘤质量;D:肿瘤组织免疫组化染色(S-P ×200)

图 5 敲低 RNF14 对肝癌细胞皮下成瘤能力的影响



A:外源性免疫共沉淀实验;B:RNF14 与 HNF1α 蛋白间相互作用

图 6 RNF14 与 HNF1 α存在相互作用

2.5 RNF14 通过下调 HNF1α 发挥促癌作用

在 293T 工具细胞中转染 GFP-RNF14 质粒与 DDK-HNF1α 质粒进行外源性免疫共沉淀实验(Co-IP),证明 RNF14 与 HNF1α 之间确实存在相互结合(图 6A)。为进一步研究 RNF14 对 HNF1α 的调控机制,在 293T 工具细胞中转染 DDK-HNF1α 质粒(100 ng)以及梯度转染 GFP-RNF14 质粒(0、400、900、1 900 ng),以观察 RNF14 是否能够下调 HNF1α。结果如图 6B 所示:随着 RNF14 转染量的增多,HNF1α 的蛋白表达显著降低。表明 RNF14 能够结合并且下调 HNF1α。

3 讨论

随着肝细胞癌在全球发病率的不断上升,其诊断和治疗的方法也越来越丰富,除了公认的最适宜早期肝癌患者选择的外科手术治疗之外,肝癌的化疗策略也日益增多,如多激酶抑制剂和免疫检查点抑制剂[14]。但是,不管是手术治疗还是化疗,对提高肝癌患者生存率的效果都不甚理想。因此,亟需寻找肝癌发生的潜在分子机制,为肝癌的防治提供新思路。

RNF14 最早被发现时是作为一种雄激素结合蛋白,在人体多种组织中广泛表达[15]。随后被发现其存在于 unikonts 和 bikonts 这两种非常古老的真核生物中,早在动物出现之前就已经存在,意味着其起源古老,结构高度保守,在生物进化中承担着重要的作用[16]。已有研究显示 RNF14 在食管癌[9]、结直肠癌[10]、前列腺癌[17-18]、乳腺癌[19]的发生中起到重要作用。另有研究报道 RNF14 能够表观调控多种人类肿瘤细胞中细胞周期蛋白 cyclin D1 的转录,促进细胞周期从 G_1 期进展至 S 期,促进 DNA 的合成,从而影响肿瘤细胞的增殖[20]。Wnt 信号通路在肝癌的发生、发展中起到十分重要的作用,Wnt 通路中 β-catenin 的异常激活可促进肝癌的发生,并且在整个肝癌发生过程中持续存在[21]。有研究表明 RNF14 能够与 TCF 共结合靶启动子并稳定 β-catenin 的募集而正向调节肿瘤细胞中 Wnt 信号通路的传导,激活下游靶基因,提示 RNF14 在肿瘤细胞的存活中具有十分重要的作用[10]。以上研究表明 RNF14 是多种人类肿瘤的促癌因子,可能参与到肝癌的发生、发展中。

本研究通过 CCK-8 增殖实验、克隆形成实验、裸鼠皮下成瘤实验证明 RNF14 能够促进肝癌细胞的增殖,通过 Transwell 迁移与侵袭实验证明 RNF14 能够促进肝癌细胞的侵袭转移,提示 RNF14 可能是肝细胞癌的促癌因子。但其发挥促癌作用的具体机制还不清楚。已有研究报道 RNF14 属于 RBR 类 E3 泛素连接酶,存在 RING 指结构域和自身泛素化活性,能够引起底物的泛素化降解,其中 RING 指结构域对其发挥 E3 泛素连接酶功能至关重要[22]。泛素化属于翻译后修饰,在多种细胞生物学过程中发挥重要作用,包括对蛋白稳定性、细胞周期进展、细胞增殖、DNA 合成与凋亡、受体转运以及免疫反应的调节[23]。E3 泛素连接酶在泛素化过程中发挥十分重要的作用,且对底物具有特异性,越来越多的证据表明 E3 连接酶的调节异常与癌症的发展密切相关[24]。RNF14 作为一种高度保守的 E3 泛素连接酶,已有研究报道其能够调节神经病靶标酯酶(neuropathy target esterase,NTE)的泛素-蛋白酶体降解,NTE 是一种内质网膜相关的磷脂酶 B,在胚胎和神经系统的发育中发挥着重要作用,提示 RNF14 在发育与神经系统中也可能存在着重要调控作用[25]。以上研究表明 RNF14 在多种人类肿瘤中发挥着重要的调控作用,提示其在肿瘤研究中的价值和前景。同时也指出寻找 RNF14 作为 E3 泛素连接酶的底物的重要性,使其可能成为研究肝细胞癌发生分子机制的新的突破口。HNF1α 是肝脏富含的转录因子,不仅对维持正常的肝细胞功能至关重要,而且在脂肪肝和肝癌的发生中也起着十分重要的作用,是公认的肝癌的抑癌因子[13,26]。本研究通过 uniprot 蛋白数据库(http://www.uniprot.org/)分析可与 RNF14 结合的潜在底物,发现 HNF1α 与 RNF14 之间存在相互结合[27]。本研究通过免疫共沉淀实验证明 HNF1α 与 RNF14 之间存在相互结合,进一步通过在 293T 工具细胞中共转染 RNF14 质粒和 HNF1α 质粒证明 RNF14 能够下调 HNF1α 的表达,提示 HNF1α 可能是 RNF14 作为 E3 泛素连接酶的底物,RNF14 可能通过泛素化降解 HNF1α 而促进肝癌细胞的增殖与转移。

本研究探讨了 RNF14 对肝癌细胞增殖及侵袭转移能力的影响,结果表明 RNF14 能够促进肝癌细胞的增殖与转移,提示 RNF14 可能在肝癌的发生、发展中起到重要的促癌作用。本研究还发现 RNF14 可能是通过泛素化降解 HNF1α 而促进肝癌细胞的增殖与转移,接下来亟需深入研究 RNF14 对 HNF1α 具体的泛素化调控机制,为探索肝癌发生的分子机制提供新的方向和研究思路。

参考文献:

[1] LAFARO K J, DEMIRJIAN A N, PAWLIK T M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2015, 24(1): 1-17. DOI: 10.1016/j.soc.2014.09.001.

[2] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2017 年版)[J]. 中华消化外科杂志, 2017, 16(7): 635-647. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2017.07.001.
Bureau of Medical Administration. National Health and Family Planning Commission of the PRC. Standardization of diagnosis and treatment for hepatocellular carcinoma (2017 edition)[J]. Chin J Diges Surg, 2017. 16(7): 635-647. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2017.07.001.

[3] MCGLYNN K A, PETRICK J L, LONDON W T. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regionalvariability[J]. Clin Liver Dis, 2015, 19(2): 223-238. DOI: 10.1016/j.cld.2015.01.001.

[4] MALUCCIO M, COVEY A. Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellularcarcinoma[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(6): 394-399. DOI: 10.3322/caac.21161.

[5] FOMER A, LLOVET J M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2012, 379(9822): 1245-1255. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61347-0.

[6] KANG H Y, YEH S, FUJIMOTO N, *et al*. Cloning and characterization of human prostate coactivator ARA54, a novel protein that associates with the androgen receptor[J]. J Biol Chem, 1999, 274(13): 8570-8576. DOI: 10.1074/jbc.274.13.8570.

[7] INGHAM A B, OSBORNE S A, MENZIES M, *et al*. RNF14 is a regulator of mitochondrial and immune function in muscle[J]. BMC Syst Biol, 2014, 8: 10. DOI: 10.1186/1752-0509-8-10.

[8] LIU X, YU X P, ZACK D J, *et al*. TiGER: a database for tissue-specific gene expression and regulation[J]. BMC Bioinformatics, 2008, 9: 271. DOI: 10.1186/1471-2105-9-271.

[9] WANG X W, WEI W, WANG W Q, *et al*. RING finger proteins are involved in the progression of barrett esophagus to esophageal adenocarcinoma: a preliminary study[J]. Gut Liver, 2014, 8(5): 487-494. DOI: 10.5009/gnl13133.

[10] WU B B, PILOTO S, ZENG W H, *et al*. Ring Finger Protein 14 is a new regulator of TCF/β-catenin-mediated transcription and colon cancer cell survival[J]. EMBO Rep, 2013, 14(4): 347-355. DOI: 10.1038/embor.2013.19.

[11] ODOM D T, ZIZLSPERGER N, GORDON D B, *et al*. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors[J]. Science, 2004, 303(5662): 1378-1381. DOI: 10.1126/science.1089769.

[12] COSTA R H, KALINICHENKO VV, HOLTERMAN A X, *et al*. Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration[J]. Hepatology, 2003, 38(6): 1331-1347. DOI: 10.1016/j.hep.2003.09.034.

[13] ZENG X, LIN Y, YIN C, *et al*. Recombinant adenovirus carrying the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene inhibits hepatocellular carcinoma xenograft growth in mice[J]. Hepatology, 2011, 54(6): 2036-2047. DOI: 10.1002/hep.24647.

[14] ZHU S J, HOSHIDA Y. Molecular heterogeneity in hepatocellular carcinoma[J]. Hepat Oncol, 2018, 5(1): HEP10. DOI: 10.2217/hep-2018-0005.

[15] UEKI N, SEKI N, YANO K, *et al*. Isolation and characterization of a novel human gene (HFB30) which encodes a protein with a RING finger motif[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1445(2): 232-236. DOI: 10.1016/s0167-4781(99)00045-7.

[16] LUCAS J I, ARNAU V, MARÍN I. Comparative genomics and protein domain graph analyses link ubiquitination and RNA metabolism[J]. J Mol Biol, 2006, 357(1): 9-17. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.12.068.

[17] YANG Z M, CHANG Y J, MIYAMOTO H, *et al*. Transgelin functions as a suppressor *via* inhibition of ARA54-enhanced androgen receptor transactivation and prostate cancer cell growth[J]. Mol Endocrinol, 2007, 21(2): 343-358. DOI: 10.1210/me.2006-0104.

[18] MIYAMOTO H, RAHMAN M, TAKATERA H, *et al*. A dominant-negative mutant of androgen receptor coregulator ARA54 inhibits androgen receptor-mediated prostate cancer growth[J]. J Biol Chem, 2002, 277(7): 4609-4617. DOI: 10.1074/jbc.M108312200.

[19] WINTER S L, BOSNOYAN-COLLINS L, PINNADUWAGE D, *et al*. The interaction of PP1 with BRCA1 and analysis of their expression in breast tumors[J]. BMC Cancer, 2007, 7: 85. DOI: 10.1186/1471-2407-7-85.

[20] KIKUCHI H, UCHIDA C, HATTORI T, *et al*. ARA54 is involved in transcriptional regulation of the cyclin D1 gene in human cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(8): 1752-1758. DOI: 10.1093/carcin/bgm120.

[21] KALASEKAR S M, KOTIYAL S, CONLEY C, *et al*. Heterogeneous beta-catenin activation is sufficient to cause hepatocellular carcinoma in zebrafish[J]. Biol Open, 2019, 8(10): bio047829. DOI: 10.1242/bio.047829.

[22] ITO K, ADACHI S, IWAKAMI R, *et al*. N-Terminally extended human ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) mediate the ubiquitination of RING-finger proteins, ARA54 and RNF8[J]. Eur J Biochem, 2001, 268(9): 2725-2732. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2001.02169.x.

[23] DING F B, XIAO H B, WANG M S, *et al*. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in cancer development and treatment[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2014, 19: 886-895. DOI: 10.2741/4254.

[24] SUN Y. E3 ubiquitin ligases as cancer targets and biomarkers[J]. Neoplasia, 2006, 8(8): 645-654. DOI: 10.1593/neo.06376.

[25] LONG D X, WANG P, SUN Y J, *et al*. Neuropathy target esterase is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway with ARA54 as the ubiquitin ligase[J]. Biochemistry, 2015, 54(50): 7385-7392. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00879.

[26] NI Q, DING K, WANG K Q, *et al*. Deletion of HNF1α in hepatocytes results in fatty liver-related hepatocellular carcinoma in mice[J]. FEBS Lett, 2017, 591(13): 1947-1957. DOI: 10.1002/1873-3468.12689.

[27] The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D158-D169. DOI: 10.1093/nar/gkw1099.

(收稿:2019-10-14;修回:2019-11-02)

(编辑 邓强庭)