DOI:10.16016/j.1000-5404.202002072

UHRF2 通过 PI3K/Akt 信号通路促进肝细胞癌细胞的增殖和转移

程凤娟[1],孙菁婕[1],方娴韵[1],陈思圆[1],刘尚静[1],吴可佳[1],李招娣[1],蒋世铭[2],陈 勇[2],段昌柱[1] 400016 重庆,重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室,分子医学与肿瘤研究中心[1],400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肝胆外科[2]

[摘要] **目的** 探讨泛素样含 PHD 和环指域蛋白 2(ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 2,UHRF2)在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)增殖和转移中的作用及其机制。**方法** 检索 TCGA 数据库中 HCC 的基因表达谱数据和患者的临床数据,分析 UHRF2 的表达差异与 HCC 患者的预后情况,采用 Cox 比例风险模型探索 UHRF2 对 HCC 患者预后的独立作用;收集 2018 年 7 月至 2019 年 12 月在重庆医科大学附属第一医院确诊的 20 例肝癌患者的肿瘤组织和癌旁组织,采用免疫组化检测 UHRF2 蛋白的表达,分析蛋白的表达与患者临床病理参数的关系;构建 UHRF2 表达质粒,通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测转染效率,在 HCC 细胞系中过表达 UHRF2 进行划痕及平板克隆实验检测肝细胞癌细胞的迁移和增殖情况;基因富集分析探讨 UHRF2 与 PI3K/Akt 通路活化的关系,Western blot 检测 Akt、PI3K、p-Akt、p-PI3K 的表达。**结果** TCGA 数据库分析显示 UHRF2 mRNA 在 HCC 组织中表达明显升高并提示预后不良;Cox 多因素回归分析发现 UHRF2 的表达是影响患者预后的独立危险因素。免疫组化检测结果显示 UHRF2 蛋白在 HCC 中的表达明显高于癌旁组织。UHRF2 的高表达与肿瘤大小($P=0.002$)、肿瘤转移($P=0.002$)密切相关。在迁移实验和平板克隆实验中,UHRF2 过表达组的划痕愈合能力及增殖能力较对照组显著增强($P<0.01$);PI3K/Akt 通路在 UHRF2 高表达 HCC 患者中显著富集;Western blot 检测结果显示,UHRF2 过表达组的 p-Akt、p-PI3K 的表达水平明显上调($P<0.05$)。**结论** UHRF2 的表达水平与 HCC 的预后密切相关,是影响患者预后的独立危险因素;过表达 UHRF2 通过 PI3K/Akt 信号通路促进 HCC 细胞的增殖和转移。

[关键词] 肝细胞癌;UHRF2;细胞迁移;细胞增殖;PI3K/Akt 信号通路
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

UHRF2 promotes migration and proliferation of human hepatocellular carcinoma cells by PI3K/Akt signaling pathway

CHENG Fengjuan[1], SUN Jingjie[1], FANG Xianyun[1], CHEN Siyuan[1], LIU Shangjing[1], WU Kejia[1], LI Zhaodi[1], JIANG Shiming[2], CHEN Yong[2], DUAN Changzhu[1] [1]Department of Cell Biology and Genetics, Molecular Medicine and Cancer Research Center, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Hepatobillary Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role of Ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 2 (UHRF2) on the migration and proliferation of human hepatocellular carcinoma (HCC) cells and investigate its underlying mechanism. **Methods** The HCC gene expression data and patient clinical data were searched in the TCGA database, the differences of UHRF2 expression were analyzed between normal liver tissue and HCC tissue, and the correlation of its level with prognosis was also analyzed. Liver tumor tissues and adjacent normal tissues were harvested from 20 HCC patients diagnosed in the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University between July, 2008 and December, 2013 to detect UHRF2 expression by immunohistochemistry. The relationship between UHRF2 expression and clinical pathological parameters of these patients was analyzed. After UHRF2 expression plasmid was constructed and transfected into HepG2 and HepG2.2.15 cells, the transfection efficiency was measured by RT-qPCR and Western blotting. Then cell

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81772178)
[通信作者] 段昌柱,E-mail: duanchzhu@cqmu.edu.cn

scratch test and plate cloning was employed to detect the effect of UHRF2 overexpression on the migration and proliferation of the cells. Gene set enrichment analysis was applied to further explore the relationship between UHRF2 and activation of PI3K/Akt signaling pathway. The expression of Akt, PI3K, p-Akt and p-PI3K was detected with Western blotting. **Results** TCGA database analysis revealed that the expression of UHRF2 in HCC tissues was higher than that in normal liver tissues, and indicated a poor prognosis. Cox multivariate regression analysis found that UHRF2 expression was an independent risk factor for the prognosis. Immunohistochemistry showed that the expression level of UHRF2 was significantly higher in the HCC tissues than that in the adjacent normal tissues. The high expression of UHRF2 was closely related to tumor size (P=0.002) and tumor metastasis (P=0.002). In wound healing test and plate cloning test, the HCC cells with UHRF2 overexpression showed significantly stronger migration and proliferation abilities as compared with the control cells. PI3K/Akt pathway was significantly enriched in the HCC patients with higher expression of UHRF2. Western blotting results showed that UHRF2 overexpression significantly activated the phosphorylation of PI3K and Akt proteins in the HCC cells. **Conclusion** The expression of UHRF2 is closely related to the prognosis of HCC patients, and is an independent risk factor for HCC patients. Overexpression of UHRF2 promotes the proliferation and metastasis of HCC cells through the PI3K/Akt signaling pathway.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; UHRF2; cell migration; cell proliferation; PI3K/Akt signaling pathway

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81772178). Corresponding author: DUAN Changzhu, E-mail: duanchzhu@cqmu.edu.cn

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)因高发病率和高死亡率而成为全世界十大癌症之一[1]。多年来,随着化疗手段和手术技巧的不断提高,肝癌患者的生命周期得到了大大延长[2-4]。尽管如此,仍然有许多问题亟待解决,例如肝癌转移和复发的高发生率。虽然已研究了几种 HCC 生物标志物,但是这些标记物的预测能力并不是最佳的。因此,鉴定新肿瘤生物标志物,揭示肝癌转移的机制,制定更有效的预防肝癌转移的策略显得更加重要。

泛素样含 PHD 和环指域蛋白 2(ubiquitin-like with PHD and ring finger domain 2,UHRF2)是新发现的 E3 泛素蛋白连接酶,是 UHRF 家族的重要成员,由 UBL(ubiquitin-like domain)、TTD(tandem tudor domain)、PHD(plant homeodomain finger domain)、SRA(set-and ring-associated domain)和 RING 指结构域(RING finger domain)组成[5-7]。越来越多的证据表明,UHRF2 与多种癌症的发生、发展有关。有研究发现,UHRF2 通过修饰 DNA 甲基化来影响组蛋白进而促进乳腺癌的发生[8];UHRF2 与转录因子 E2F1 相互作用可以诱导肺癌细胞的凋亡[9];UHRF2 通过稳定乙酰转移酶 TIP60 调节组蛋白 H3 第 9 位和 14 位赖氨酸乙酰化来促进肝癌细胞的发展[10]。

目前,虽然 UHRF2 对 HCC 的影响已有报道,但其在 HCC 中的作用及机制尚不清楚。因此,本研究通过分析 UHRF2 在 HCC 中的表达,从磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路方面探讨 UHRF2 促进 HCC 增殖和转移的机制,旨在为研究 HCC 的发病机制、治疗和预测等提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 UHRF2 相关数据 UHRF2 的 mRNA 及相关临床数据来自 the Cancer Genome Atlas(TCGA)(http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/)数据库。

1.1.2 HCC 组织及癌旁组织 来自重庆医科大学附属第一医院 2018 年 7 月至 2019 年 12 月接受 HCC 切除手术的 20 例患者病理组织样本。获得的临床组织标本经病理学确诊,在患者手术过程中切除的每例组织标本立即冷冻并保存在液氮罐中以备后用。本研究符合医学伦理规定,经重庆医科大学伦理委员会批准(2018027),所有患者签署知情同意书。

1.1.3 细胞及质粒 HCC 细胞系 HepG2 和 HepG2.2.15 均为重庆医科大学感染病生物医学教育部重点实验室保存。pCDNA3.1-3×Flag-UHRF2 和空载 vector-pCDNA3.1-3×Flag 质粒购自武汉金开瑞生物技术有限公司。

1.1.4 主要试剂 转染试剂 Lipofectamine™ 2000 和质粒小提试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,DMEM(高糖)培养基和胎牛血清购自美国 HyClone 公司,结晶紫染料购自美国 Thermo Pierce 公司,PMSF、RIPA 强裂解液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、免疫组化 S-P 试剂盒均购自碧云天生物公司,多聚甲醛购自上海生

工生物公司,TRIzol、逆转录试剂盒和 SYBR Green 试剂购自 TaKaRa 公司。抗体:UHRF2 抗体、Akt 抗体、p-Akt 抗体、PI3K 抗体、p-PI3K 抗体均购自美国 Abcam 公司,β-actin 抗体购自碧云天生物公司,山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗均购自北京中杉金桥生物科技公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 TCGA (the Cancer Genome Atlas) 数据库下载 424 例(正常标本 50 例,癌标本 374 例)组织标本的基因表达谱和临床病理资料。利用 limma 软件包对下载的 mRNA level 3 的 FPKM 数据进行整合和标准化,分析差异表达基因及其表达水平,差异基因筛选条件为|LogFC|>1 或 $P<0.05$。使用"survival"和"survminer"软件包对单基因进行生存分析,根据基因表达水平的中位值分组,绘制生存曲线。最佳生存截点分析通过遍历所有分组情况,计算 P 值和风险比。以 UHRF2 表达水平的中位数为临界值,将数据集中包含的 HCC 患者,分为 URHF2 高表达组与低表达组,进行 GSEA 富集分析,观察各通路的富集情况。

1.2.2 免疫组化检测 采用免疫组织化学分析 20 例 HCC 病理组织中 UHRF2 的表达。根据标准程序,将组织样品固定在 4%的多聚甲醛中,组织切片在 65 ℃烤箱中熔蜡 2 h,二甲苯脱蜡 2 次,在 100%、95%、80%、70%的酒精中水化,100 ℃,121 kPa 的条件下用柠檬酸钠缓冲液进行抗原修复 20 min,H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性,用组化笔在组织周围画圈,组织上滴加山羊血清封闭 2 h,UHRF2 抗体(1∶200)孵育过夜,次日用山羊抗兔二抗孵育,快速滴入 DAB 进行显色,观察并随时终止显色,复染,脱水,透明后封片。

1.2.3 RT-qPCR 检测 用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,按照 Primer-Script™ 说明书逆转录成 cDNA。根据 Taq PCR Master Mix 试剂盒说明书,以 cDNA 作为模版,在 iQ™ SYBR Green Supermix PCR 体系中进行 RT-qPCR 反应,体系为 10 μL。PCR 反应程序为:95 ℃预变性 3 min,95 ℃变性 10 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 60 s,共 39 个循环,选用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 UHRF2 的相对定量数据。引物序列,UHRF2 上游:5′-CAAGATGTGGATACAGGTTCGC-3′,下游:5′-TATCCATTTTCCAACTGCTTGCC-3′;GADPH 上游:5′-GCTGTCCCTGTACGCCTCTG-3′,下游:5′-TGCCGATGGTGATGACCTGG-3′。每个检测指标设置 3 个复孔。

1.2.4 Western blot 检测 收获各组细胞,加入适量的 RIPA 强裂解液,低温超声,4 ℃离心提取总蛋白,用 BCA 试剂盒检测浓度。将蛋白与 5×loading buffer 以 4∶1的比例混匀,100 ℃变性 5 min,瞬时离心后,取适量样品进行 10% SDS-PAGE 电泳,电泳结束后电转至 PVDF 膜上,用 TBST 稀释的 5%脱脂牛奶封闭膜 2 h,一抗与条带在 4 ℃冰箱摇床孵育过夜,TBST 洗 3 次,二抗孵育 2 h,TBST 漂洗 3 次。在条带上滴加适量配制好的发光液,LAS-4000 成像系统进行显影,分析结果。

1.2.5 细胞划痕实验 接种细胞前,在 6 孔板底部均匀地画 3 条横线。细胞接种至 6 孔板中,待细胞达到合适的汇合度时用 200 μL 的枪头垂直划线,使所画的线与 6 孔板上记号笔画的线相互垂直。PBS 洗 2 次,每孔添加 2 mL 无血清培养基;于 0、12、24、48 h 观察拍照。

1.2.6 平板克隆实验 0.25%的胰酶消化对数生长期细胞,进行细胞计数,在 6 孔板每孔中接种 1 000 个细胞。每隔 1 周换 1 次新鲜培养基。培养 3 周后,小心地将 6 孔板中的培养基吸弃。PBS 洗涤 3 次,1 mL 甲醇固定细胞 15 min,结晶紫染色,PBS 洗涤,拍照计数。

1.3 统计学分析

TCGA 数据采用 R 语言(version 3.6)进行分析,其他数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,GraphPad Prism 5.0 软件作图。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验、χ^2 检验,Cox 风险回归模型进行生存相关的多因素分析,并筛选独立预后因素。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义,每项实验均独立重复至少 3 次。

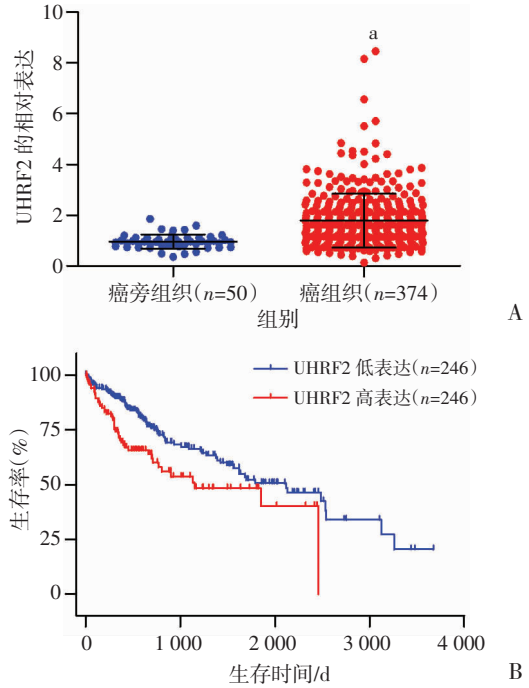
2 结果

2.1 TCGA 数据库中 UHRF2 在 HCC 组织的表达水平及预后情况

通过从 TCGA 数据库中下载 HCC 的基因表达谱数据和患者的临床数据,分析 UHRF2 的表达差异与 HCC 患者的预后情况。结果发现,比对 50 例癌旁组织和 374 例 HCC 组织,UHRF2 mRNA 表达水平在 HCC 中显著上调($P<0.0001$,图 1A);生存分析结果显示,在 UHRF2 高表达组中,HCC 患者的预后更差($P=0.002$,图 1B)。整理患者的临床数据,多因素 Cox 回归分析结果显示,UHRF2 表达(风险比=1.24,$P=0.035$)是影响患者预后的独立危险因素(表 1),提示 UHRF2 可能作为一个促进 HCC 发生发展的相关因素。

表 1 肝癌患者预后的多因素 Cox 回归分析($n=235$)

变量	危险比	95%置信区间	P 值
年龄	1.01	0.99-1.0	0.268
性别	1.09	0.65-1.8	0.734
病理分级	1.11	0.79-1.5	0.556
临床分期	1.20	0.44-3.3	0.724
肿瘤大小	1.50	0.59-3.8	0.391
肿瘤转移	1.52	0.40-5.8	0.540
淋巴结转移	0.99	0.15-6.4	0.998
UHRF2 表达	1.24	1.02-1.5	0.035



A:UHRF2 在癌旁组织和 HCC 组织中的表达;B:UHRF2 与 HCC 患者总体生存期相关性;a:$P<0.0001$,与癌旁组织比较;b:$P=0.002$,与 UHRF2 低表达患者比较

图 1　TCGA 数据库中 UHRF2 的表达情况

2.2　UHRF2 在 20 例临床组织样本及 HCC 细胞系中的表达

免疫组化检测 20 例被确诊为 HCC 患者的临床组织样本中 URHF2 蛋白的表达,结果显示,HCC 组织中 URHF2 的表达明显高于癌旁组织(图 2)。随后,分析 UHRF2 蛋白表达水平与患者临床参数之间的关系。统计结果显示,UHRF2 的表达与 HCC 患者的转移($P=0.002$)与肿瘤大小($P=0.002$)有关,而 UHRF2 表达与 HCC 患者年龄、性别、AFP、HBsAg、肝硬化、临床分期、血管侵犯无关($P>0.05$,表 2)。相比肿瘤体积较小(≤5 cm)或不转移的 HCC 患者,UHRF2 蛋白在肿瘤体积较大(>5 cm)或转移患者中的表达明显升高($P=0.002$)。

表 2　UHRF2 的表达与患者临床参数之间的关系($n=20$)

临床参数	总例数	UHRF2 表达/例		χ^2 值	P 值
		低($n=8$)	高($n=12$)		
年龄/岁				0.159	0.690
<51	6	2	4		
≥51	14	6	8		
性别				0.065	0.798
女性	3	1	2		
男性	17	7	10		
肿瘤大小/cm				9.731	0.002
≤5	9	7	2		
>5	11	1	10		
AFP/ng·mL^{-1}				0.135	0.714
≤20	9	4	5		
>20	11	4	7		
HBsAg				0.065	0.798
阴性	3	1	2		
阳性	17	7	10		
肝硬化				0.556	0.456
有	12	4	8		
无	8	4	4		
临床分期				0.000	1
Ⅰ/Ⅱ	10	4	6		
Ⅲ/Ⅳ	10	4	6		
肿瘤转移				9.731	0.002
有转移	11	1	2		
无转移	9	7	10		
血管侵犯				0.093	0.761
有	2	1	1		
无	18	7	11		

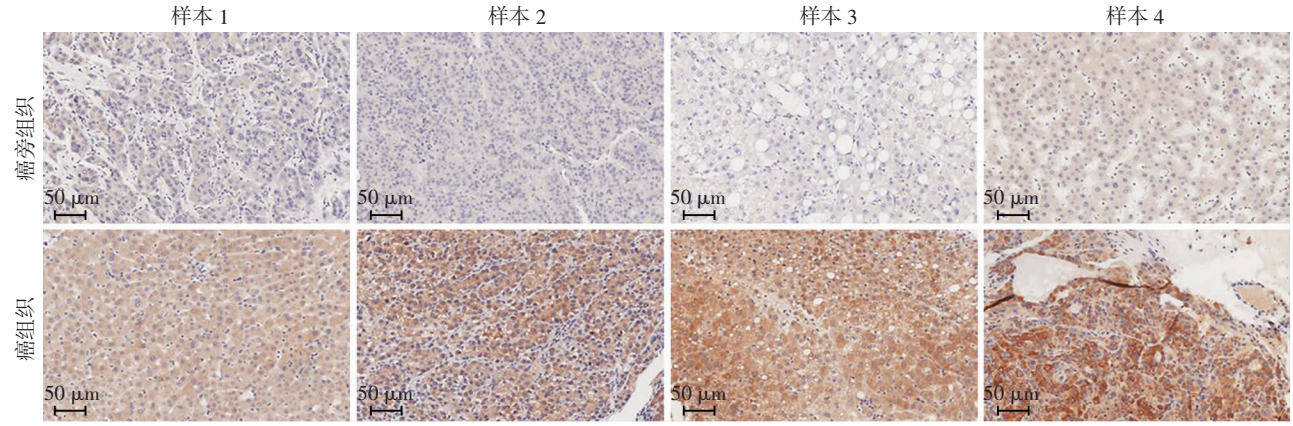
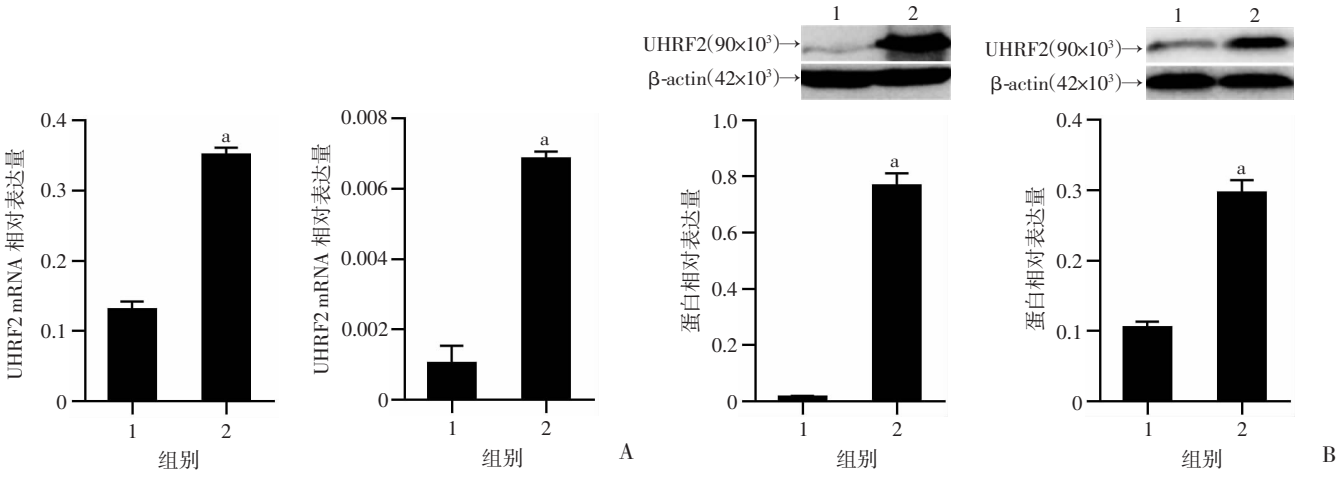


图 2　免疫组化分析 UHRF2 在癌旁组织和 HCC 组织中的表达

2.3　UHRF2 对 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞迁移和增殖的影响

构建 UHRF2 的表达质粒,将表达质粒转染到 HCC 细胞系 HepG2 和 HepG2.2.15 中,通过 RT-qPCR 和 Western blot 分别检测两种细胞系中 UHRF2 的过表达效率。结果显示,与空载体组比较,HepG2 和 HepG2.2.15 中 UHRF2 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$,图 3)。

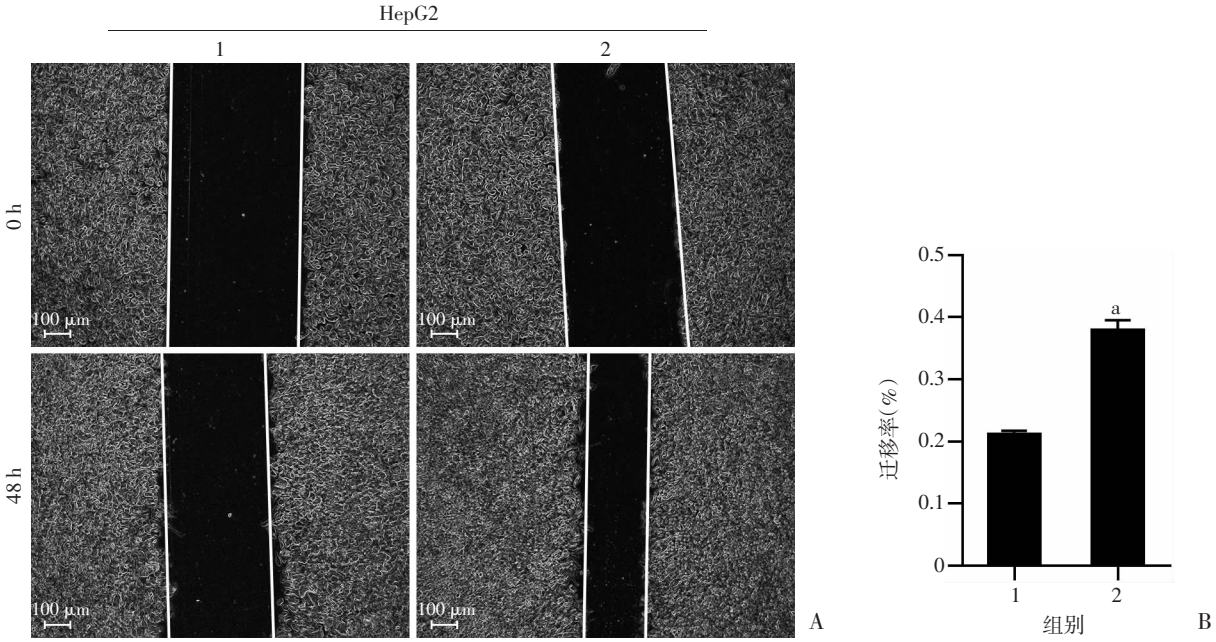
为了验证 UHRF2 是否参与了 HCC 的增殖和转移,将空载体与 UHRF2 的表达质粒分别转染到两种 HCC 细胞系中进行细胞划痕实验和平板克隆实验,结果显示,过表达 UHRF2 可显著促进 HCC 细胞 HepG2 和 HepG2.2.15 的迁移($P<0.01$,图 4、5)和增殖($P<0.01$,图 6)。



1:pCDNA3.1-3×Flag 空载体组;2:pCDNA3.1-3×Flag-UHRF2 载体组;a:$P<0.01$,与空载体组比较

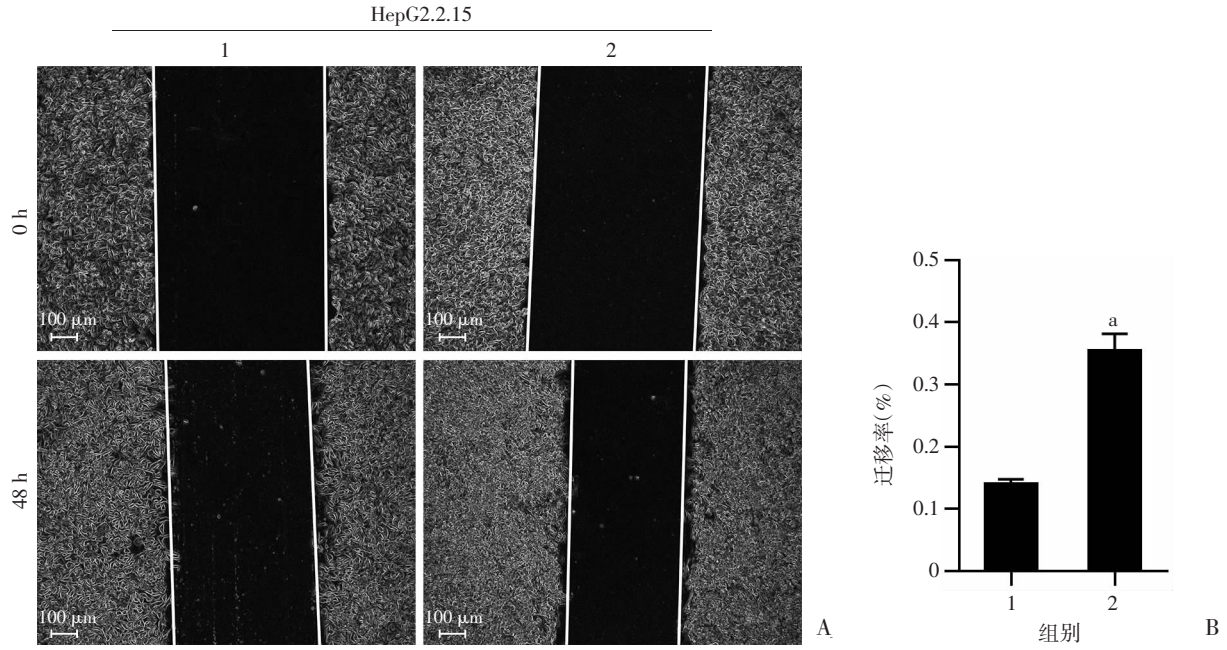
A:HepG2(左)和 HepG2.2.15(右)细胞中 UHRF2 mRNA 表达;B:HepG2(左)和 HepG2.2.15(右)细胞中 UHRF2 蛋白表达

图 3　RT-qPCR 和 Western blot 检测 UHRF2 在 HCC 细胞系的过表达情况



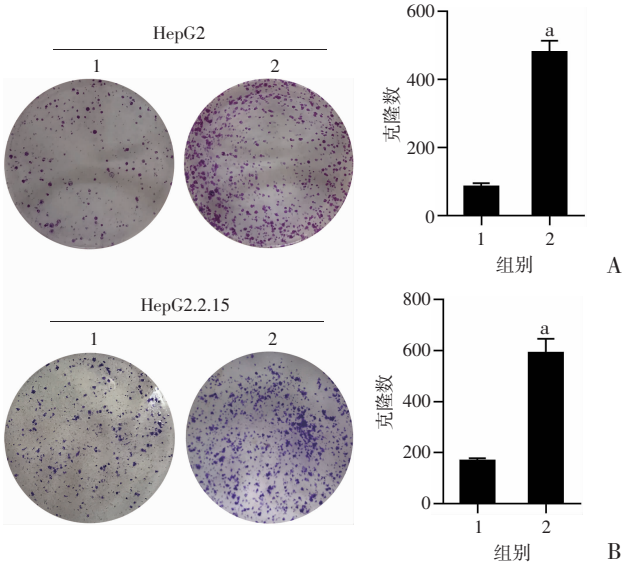
1:pCDNA3.1-3×Flag 空载体组;2:pCDNA3.1-3×Flag-UHRF2 载体组;a:$P<0.01$,与空载体组比较

图 4　划痕实验(A)观察 HepG2 细胞的迁移及其定量分析(B)



1:pCDNA3.1-3×Flag 空载体组;2:pCDNA3.1-3×Flag-UHRF2 载体组;a:$P<0.01$,与空载体组比较

图 5 划痕实验(A)观察 HepG2.2.15 细胞的迁移及其定量分析(B)



1:pCDNA3.1-3×Flag 空载体组;2:pCDNA3.1-3×Flag-UHRF2 载体组;a:$P<0.01$,与空载体组比较

图 6 平板克隆增殖实验观察 HepG2 细胞(A)和 HepG2.2.15 细胞(B)的增殖

2.4 UHRF2 过表达对 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的影响

为了进一步研究 UHRF2 是通过何种机制来影响 HCC 的增殖和转移,通过 GSEA 基因富集分析,结果显示:高表达 UHRF2 的 HCC 患者中,基因集 HALLMARK_PI3K_AKT_MTOR_SIGNALING 显著富集。其中 ENS=2.0267,NOM $P=0$,FOR q=0.0006(图 7)。

Western blot 检测 PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt 的表达水平。与对照组比较,过表达组的 p-PI3K、p-Akt 水平显著上调($P<0.05$,图 8),提示 UHRF2 可以激活 PI3K 和 Akt 蛋白,说明 UHRF2 可能通过 PI3K/Akt 信号途径来调节 HCC 细胞的迁移和增殖。

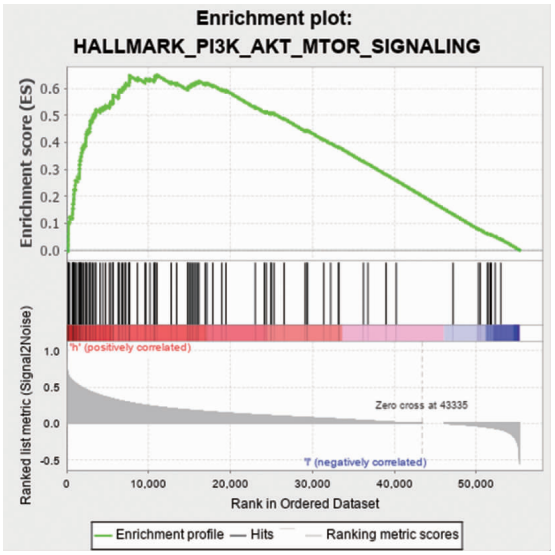
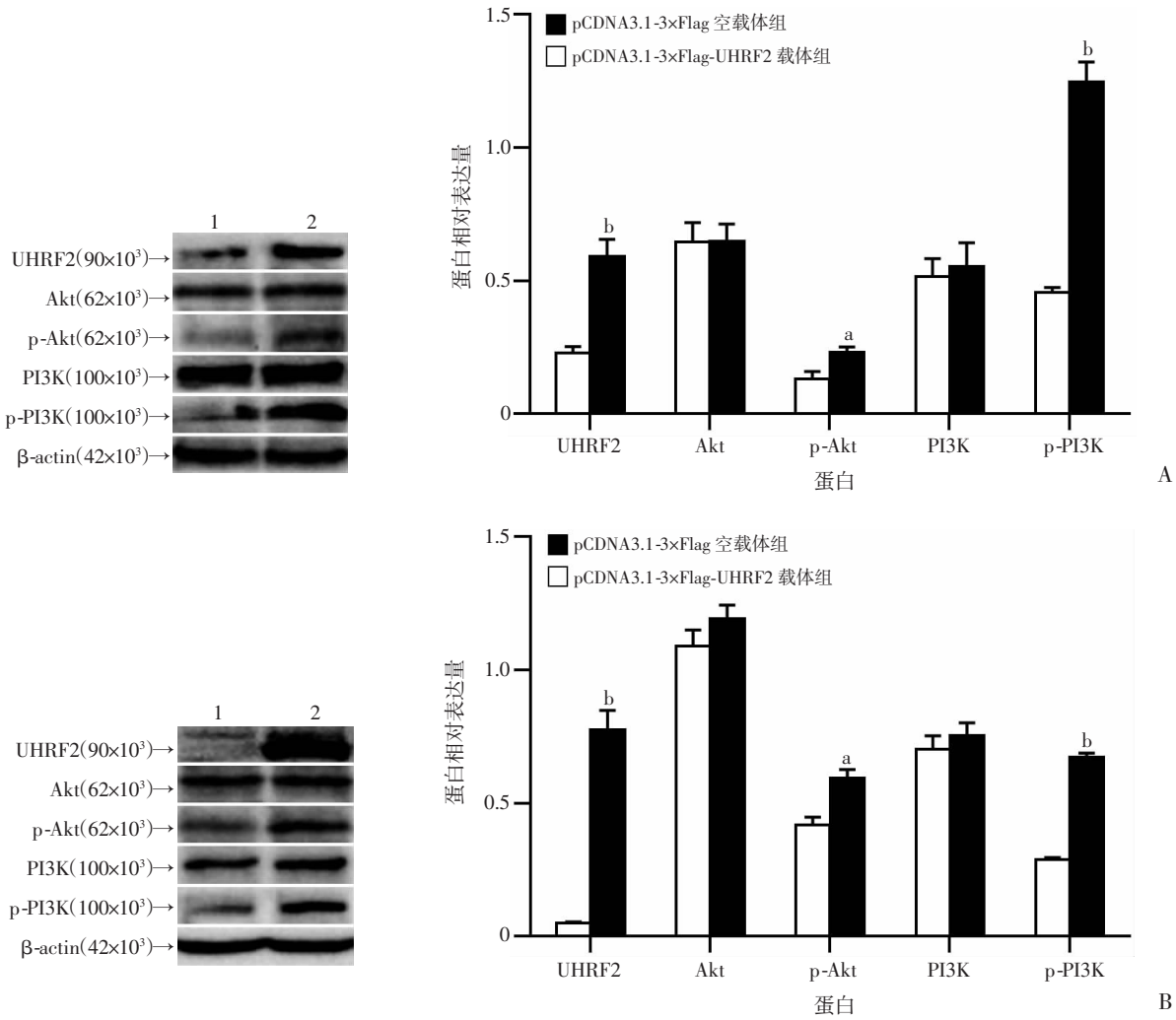


图 7 基于 UHRF2 表达差异的 GSEA 分析



1:pCDNA3.1-3×Flag 空载体组;2:pCDNA3.1-3×Flag-UHRF2 载体组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空载体组比较

图 8 Western blot 检测在 HepG2 细胞(A)和 HepG2.2.15 细胞(B)中 UHRF2 过表达对 PI3K、Akt 及其磷酸化蛋白的影响

3 讨论

作为 E3 泛素连接酶,UHRF2 的功能解释经历了一个复杂而漫长的过程。UHRF2 参与调控细胞周期、表观遗传系统,影响基因在分化和发育中的表达[11]。UHRF2 能与 DNA 甲基转移酶和组蛋白甲基转移酶结合,调控 DNA 和组蛋白的甲基化状态[8]。它能调节组蛋白翻译后修饰,包括 H3K9ac 和 H3K14ac,诱导肿瘤的发生[10]。同时,发现 UHRF2 与乙型肝炎病毒核心蛋白相互作用后可以下调乙型肝炎病毒 cccDNA 的甲基化[12]。UHRF2 通过其 RING 指结构域泛素化 P21 进而促进 DNA 的损伤[13]。多项研究表明,UHRF2 在不同癌症中的表达有所不同,甚至出现完全相反的结果。例如,UHRF2 在非小细胞肺癌、食管鳞癌、脑和中枢神经系统癌中下调,在结直肠癌、乳腺癌和肝内胆管癌中上调[6,14-16]。虽然很多研究报道了 UHRF2 与癌症之间的关系,但是 UHRF2 在癌症发展中的具体机制作用尚不清楚,尤其是 UHRF2 在 HCC 的机制还未有报道。本研究结果显示,与癌旁组织相比,UHRF2 基因在 HCC 组织中显著升高,提示 UHRF2 可能参与了 HCC 的发生和发展。

本研究通过 TCGA 公共数据库挖掘得知 UHRF2 在 HCC 组织中高表达,重要的是,UHRF2 的高表达提示 HCC 患者的预后较差,Cox 多因素回归分析显示,UHRF2 的表达是影响 HCC 患者预后的独立危险因素。同时,对 20 例 HCC 患者的临床组织样本进行免疫组化,结合患者相关临床参数分析,发现 UHRF2 的表达水平与 HCC 患者的肿瘤大小与肿瘤转移密切相关。这表明 UHRF2 在肝癌的发生、发展中是一个促癌基因,同时其极有可能参与 HCC 的增殖和转移。为了证实我们的猜想,表型研究在 HCC 细胞系中过表达 UHRF2,进行细胞的划痕和平板克隆实验,结果显示,

UHRF2 的确可以明显促进 HCC 细胞的增殖和迁移。

在癌症发生、发展的各个阶段,癌细胞的迁移和增殖都被认为是肿瘤发生的重要原因,而对细胞迁移和增殖的分子机制进行深入研究可以为癌症的临床治疗奠定基础。PI3K/Akt、Akt/mTOR、Wnt /β-catenin 和 ERK / JNK 信号通路对细胞增殖、分化、侵袭、迁移和凋亡有着非常重要的作用,同时也有证据表明这些通路与 HCC 的发展存在潜在的关系[17-21]。例如,Akt/mTOR 信号通路对细胞增殖、凋亡和肝脏再生中有非常重要的作用,EGF 可通过 Akt 磷酸化促进肝细胞的增殖[22]。也有研究发现,Akt 是肝癌发生、发展的重要分子,Akt 的激活能促进肝癌细胞的增殖,抑制 Akt 信号通路的激活,就可抑制肿瘤的增殖和生长[18]。PI3K 是一种细胞内磷脂酰肌醇激酶。研究表明,PI3K 在细胞增殖、分化及迁移的过程中发挥关键作用,其活性的提高与恶性肿瘤的发生密切相关[22]。这意味着可以通过降低 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平来抑制癌细胞的增殖,抑制 Akt 相关信号通路被认为可以有效地进行癌症的治疗。本研究显示,UHRF2 与 HCC 的迁移和增殖表型有关,深入探讨其机制,发现过表达 UHRF2 能够上调下游蛋白 PI3K 和 Akt 蛋白的磷酸化水平。也就是说 UHRF2 可以促进 PI3K/Akt 信号通路的激活,是 UHRF2 对 HCC 细胞 HepG2 和 HepG2.2.15 迁移和增殖发挥促进作用的途径。但是,UHRF2 是通过何种蛋白对 PI3K/Akt 信号通路进行调节,UHRF2 是否还可以影响 HCC 的其他恶性表型指标等问题还需要进一步研究。

综上所述,本研究探讨 UHRF2 在 HCC 中的表达及临床意义,证实了 UHRF2 在 HCC 中的高表达,并且与 HCC 患者的不良预后紧密相关,其可能是激活 PI3K/Akt 信号途径影响 HCC 细胞系的迁移和增殖能力。这对 HCC 患者的预后具有指导意义,同时也为其作为 HCC 新的诊断标志物和治疗靶点提供了新的思路。

参考文献:

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.

[2] HAN L L. Implications of biomarkers in human hepatocellular carcinoma pathogenesis and therapy[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(30): 10249-10261. DOI:10.3748/wjg.v20.i30.10249.

[3] KAMP W M, SELLERS C M, STEIN S, *et al*. Impact of direct acting antivirals on survival in patients with chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1-8. DOI:10.1038/s41598-019-53051-2.

[4] OSAKI Y, NISHIKAWA H. Treatment for hepatocellular carcinoma in Japan over the last three decades: Our experience and published work review[J]. Hepatol Res, 2015, 45(1): 59-74. DOI:10.1111/hepr.12378.

[5] SANCHEZ-FERNANDEZ C, LORDA-DIEZ C I, GARCÍA-PORRERO J A, *et al*. UHRF genes regulate programmed interdigital tissue regression and chondrogenesis in the embryonic limb[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(5): 347. DOI:10.1038/s41419-019-1575-4.

[6] WANG F, ZHANG P, MA Y L, *et al*. NIRF is frequently upregulated in colorectal cancer and its oncogenicity can be suppressed by let-7a microRNA[J]. Cancer Lett, 2012, 314(2): 223-231. DOI:10.1016/j.canlet.2011.09.033.

[7] CHEN X R, SUN S C, TENG S W, *et al*. Uhrf2 deletion impairs the formation of hippocampus-dependent memory by changing the structure of the dentate gyrus[J]. Brain Struct Funct, 2018, 223(2): 609-618. DOI:10.1007/s00429-017-1512-1.

[8] LUO T, CUI S J, BIAN C J, *et al*. Uhrf2 is important for DNA damage response in vascular smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 441(1): 65-70. DOI:10.1016/j.bbrc.2013.10.018.

[9] LU H R, HALLSTROM T C. The nuclear protein UHRF2 is a direct target of the transcription factor E2F1 in the induction of apoptosis[J]. J Biol Chem, 2013, 288(33): 23833-23843. DOI:10.1074/jbc.m112.447276.

[10] ZENG S Y, WANG Y Y, ZHANG T, *et al*. E3 ligase UHRF2 stabilizes the acetyltransferase TIP60 and regulates H3K9ac and H3K14ac via RING finger domain[J]. Protein Cell, 2017, 8(3): 202-218. DOI:10.1007/s13238-016-0324-z.

[11] CHEN W B, WU M H, HANG T R, *et al*. Structure insights into the molecular mechanism of the interaction between UHRF2 and PCNA[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 494(3/4): 575-580. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.09.102.

[12] 金芳敏, 钱冠华, 杨艳, 等. 人 NIRF 蛋白与 HBV 核心蛋白相互作用的初步研究[J]. 生命科学研究, 2011, 15(1): 1-5. DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2011.01.001.
JIN F M, QIAN G H, YANG Y, *et al*. Preliminary study on the interaction between human NIRF protein and HBV core protein[J]. Life Sci Res, 2011, 15(1): 1-5. DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2011.01.001.

[13] WANG Y Y, YAN X K, ZENG S Y, *et al*. UHRF2 promotes DNA damage response by decreasing p21 via RING finger domain[J]. Biotechnol Lett, 2018, 40(8): 1181-1188. DOI:10.1007/s10529-018-2577-5.

(下转 1344 页)

发性细菌性腹膜炎快速诊断中的应用[J]. 中国医学科学院学报, 2010(05):85-88. DOI:10.3881/j.issn.1000-503X.2010.05.017.
PAN H Y, SUN H Y, CHEN C R, *et al*. Determination of ascitic bacterial 16S rRNA gene in the rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis[J]. Acta Acad Med Sin, 2010, 32(5): 557-560. DOI:10.3881/j.issn.1000-503X.2010.05.017.

[23] MENDLER M H, AGARWAL A, TRIMZI M, *et al*. A new highly sensitive point of care screen for spontaneous bacterial peritonitis using the leukocyte esterase method[J]. J Hepatol, 2010, 53(3): 477-483. DOI:10.1016/j.jhep.2010.04.011.

[24] BOARETTI M, CASTELLANI F, MERLI M, *et al*. Presence of multiple bacterial markers in clinical samples might be useful for presumptive diagnosis of infection in cirrhotic patients with culture-negative reports[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(3): 433-441. DOI:10.1007/s10096-015-2556-x.

[25] RUNYON B A. Strips and tubes: improving the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis[J]. Hepatology, 2003, 37(4): 745-747. DOI:10.1053/jhep.2003.50178.

[26] RUNYON B A. The evolution of ascitic fluid analysis in the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis[J]. Am J Gastroenterol, 2003, 98(8): 1675-1677. DOI:10.1111/j.1572-0241.2003.07600.x.

[27] Chinese Society of Hepatology of Chinese Medical Association, XU X Y, DUAN Z P, *et al*. Chinese guidelines on the management of ascites and its related complications in cirrhosis[J]. Hepatol Int, 2019, 13(1): 1-21. DOI:10.1007/s12072-018-09923-2.

[28] GAUDET A, CHENEVIER-GOBEAUX C, PARMENTIER E, *et al*. Endocan is a stable circulating molecule in ICU patients[J]. Clin Biochem, 2017, 50(15): 870-877. DOI:10.1016/j.clinbiochem.2017.04.011.

[29] AFSAR B, TAKIR M, KOSTEK O, *et al*. Endocan: a new molecule playing a role in the development of hypertension and chronic kidney disease? [J]. J Clin Hypertens (Greenwich), 2014, 16(12): 914-916. DOI:10.1111/jch.12440.

(收稿:2020-02-15;修回:2020-04-17)
(编辑 邓强庭)

(上接1330页)

[14] PENG R, HUANG X Y, ZHANG C, *et al*. Overexpression of UHRF2 in intrahepatic cholangiocarcinoma and its clinical significance[J]. Oncotargets Ther, 2017, 10: 5863-5872. DOI:10.2147/ott.s149361.

[15] JIN C, XIONG D, LI H R, *et al*. Loss of UHRF2 is associated with non-small cell lung carcinoma progression[J]. J Cancer, 2018, 9(17): 2994-3005. DOI:10.7150/jca.25876.

[16] IGUCHI T, UEDA M, MASUDA T, *et al*. Identification of UHRF2 as a negative regulator of epithelial-mesenchymal transition and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncology, 2018, 95(3): 179-187. DOI:10.1159/000488860.

[17] YANG S X, POLLEY E, LIPKOWITZ S. New insights on PI3K/AKT pathway alterations and clinical outcomes in breast cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2016, 45: 87-96. DOI:10.1016/j.ctrv.2016.03.004.

[18] AKKOÇ Y, BERRAK Ö, ARıSAN E D, *et al*. Inhibition of PI3K signaling triggered apoptotic potential of curcumin which is hindered by Bcl-2 through activation of autophagy in MCF-7 cells[J]. Biomedecine Pharmacother, 2015, 71: 161-171. DOI:10.1016/j.biopha.2015.02.029.

[19] REDDY D, KUMAVATH R, TAN T Z, *et al*. Peruvoside targets apoptosis and autophagy through MAPK Wnt/β-catenin and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways in human cancers[J]. Life Sci, 2020, 241: 117147. DOI:10.1016/j.lfs.2019.117147.

[20] FU X, WEN H Q, JING L, *et al*. MicroRNA-155-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by suppressing PTEN through the PI3K/Akt pathway[J]. Cancer Sci, 2017, 108(4): 620-631. DOI:10.1111/cas.13177.

[21] MOHAMED E A, AHMED H I, ZAKY H S. Protective effect of irbesartan against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats: implication of AMPK, PI3K/Akt, and mTOR signaling pathways[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2018, 96(12): 1209-1217. DOI:10.1139/cjpp-2018-0259.

[22] HOROWITZ J C, OSTERHOLZER J J, MARAZIOTI A, *et al*. "Scar-cinoma": viewing the fibrotic lung mesenchymal cell in the context of cancer biology[J]. Eur Respir J, 2016, 47(6): 1842-1854. DOI:10.1183/13993003.01201-2015.

(收稿:2020-02-13;修回:2020-02-18)
(编辑 汪勤俭)