

肖潇,冯浩,唐桦,等. TNFAIP1 对 RhoA 的泛素化调节在黑色素瘤进展中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 59-68.

Xiao X, Feng H, Tang H, et al. Regulation of RhoA ubiquitination by TNFAIP1 in melanoma progression [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 59-68.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.008

TNFAIP1 对 RhoA 的泛素化调节在黑色素瘤进展中的作用

肖 潇,冯 浩*,唐 桦,李 可,李 蓝

(湖南省人民医院(湖南师范大学附属第一医院)皮肤科,长沙 410000)

【摘要】 目的 探讨肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 1(TNFAIP1)介导的 RhoA 泛素化在黑色素瘤增殖和侵袭中的作用。**方法** 进行生物信息学分析以检测黑色素瘤中 TNFAIP1 和 RhoA 的表达,然后测定黑色素瘤患者的临床组织的表达。分别通过 RT-qPCR 和蛋白质印迹测定评估基因或蛋白质的表达。体外构建 TNFAIP1 和或 RhoA 过表达的人皮肤黑色素瘤细胞系 WM2664 和 A2058 模型。细胞增殖和侵袭分别通过集落形成、CCK-8 和 Transwell 测定进行研究。将表达 TNFAIP1 和 Ub-K48 的质粒共转染到处理过的黑色素瘤细胞中,同时进行免疫沉淀测定以确定 TNFAIP1 和 RhoA 之间的相互作用。建立体内模型以确认 TNFAIP1 和 RhoA 对肿瘤生长和转移的影响。**结果** 与癌旁正常组织相比,肿瘤组织中 TNFAIP1 表达显著降低($P<0.01$)和 RhoA 表达显著升高($P<0.01$)。TNFAIP1 高表达的黑色素瘤患者预后良好,而具有 RhoA 高表达的黑色素瘤患者预后不良。在体外,TNFAIP1 的过表达显著抑制黑色素瘤细胞的增殖和侵袭。TNFAIP1 介导 K48 连接的 RhoA 泛素化以促进其降解。进一步的救援实验发现,RhoA 过表达在体内和体外显著抑制了 TNFAIP1 过度表达在黑色素瘤增殖和侵袭中的调节作用。**结论** TNFAIP1 在黑色素瘤中发挥肿瘤抑制作用,其通过诱导 RhoA 泛素化抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭。

【关键词】 肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 1;RhoA;黑色素瘤;侵袭;增殖

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0059-10

Regulation of RhoA ubiquitination by TNFAIP1 in melanoma progression

XIAO Xiao, FENG Hao*, TANG Hua, LI Ke, LI Lan

(Department of Dermatology, Hunan Provincial People's Hospital, the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the role of tumor necrosis factor α -induced protein 1 (TNFAIP1)-mediated RhoA ubiquitination in melanoma cell proliferation and invasion. **Methods** Bioinformatics analysis was performed to assess TNFAIP1 and RhoA expression in melanoma cell, followed by analyzing its expression in clinical tissues from melanoma patients. Gene and protein expression was assessed by RT-qPCR and Western blot assays, respectively. Human skin melanoma cell lines WM2664 and A2058 overexpressing TNFAIP1 and/or RhoA were established *in vitro*. Cell proliferation and invasion were investigated by colony formation, CCK-8 and Transwell assays. Plasmids expressing TNFAIP1 and RhoA were cotransfected into treated melanoma cells and immunoprecipitation assays were performed to determine the interaction between TNFAIP1 and RhoA. An *in vivo* model was established to confirm the effects of TNFAIP1

[基金项目] 湖南省中医药科研计划项目(201977)。

[作者简介] 肖潇(1986—),女,博士,主治医师,研究方向:皮肤光老化,表观遗传学。E-mail:xiaoxiao2022@163.com

[通信作者] 冯浩(1975—),女,博士,主任医师,研究方向:皮肤黑色素瘤和泛素化调控。E-mail:keyok098@163.com

and RhoA on tumor growth and metastasis. **Results** Compared with adjacent normal tissues, TNFAIP1 expression was significantly decreased ($P < 0.01$) and RhoA expression was significantly increased ($P < 0.01$) in tumor tissues. Melanoma patients with high TNFAIP1 expression had a good prognosis, whereas melanoma patients with high RhoA expression had a poor prognosis. *In vitro*, TNFAIP1 overexpression significantly inhibited melanoma cell proliferation and invasion. TNFAIP1 mediated K48-linked ubiquitination of RhoA to promote its degradation. Rescue experiments showed that RhoA overexpression significantly inhibited the regulatory role of TNFAIP1 overexpression in melanin cell proliferation and invasion *in vivo* and *in vitro*. **Conclusions** TNFAIP1 has a tumor suppressor role in melanoma, which inhibits tumor cell proliferation and invasion by inducing RhoA ubiquitination.

【Keywords】 tumor necrosis factor α -induced protein 1; RhoA; melanoma; invasion; proliferation

恶性黑色素瘤起源于黑色素细胞,主要发生在皮肤中,具有高度转移性肿瘤的特征,约 5% 的患者在初始诊断时出现远处转移^[1]。尽管免疫治疗或靶向治疗药物产生显著的临床益处,将五年总生存率提高到 35%~50%,但很大一部分转移性黑色素瘤患者对治疗仍无反应^[2]。因此,寻找黑色素瘤进展的原因对于进一步改进治疗策略仍然至关重要。肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 1 (tumor necrosis factor α -induced protein 1, TNFAIP1) 是一种众所周知的 BTB (bric-a-brac, tramtrack and broad complex) 结构域结构域蛋白,它在 DNA 合成、细胞凋亡、细胞迁移和免疫反应中起关键作用^[3-4]。新出现的证据表明 TNFAIP1 降低与非小细胞肺癌、子宫癌、胃癌等癌症转移和进展密切相关^[5-6]。然而, TNFAIP1 在黑色素瘤中的潜在机制鲜有报道。TNFAIP1 的一个主要抑癌机制涉及底物降解和蛋白质稳定性^[5]。最近研究发现, TNFAIP1 通过介导 RhoA 的泛素化来控制肺癌细胞迁移^[5]。RhoA 是小 GTP 酶 Rho 亚家族的成员,已证实靶向 RhoA 调节耐药黑色素瘤基因转录^[7]。然而, TNFAIP1 是否通过介导 RhoA 的泛素化参与黑色素瘤进展仍不清楚。因此,我们通过生物信息学分析检测了黑色素瘤组织中 TNFAIP1 和 RhoA 的表达。此外,我们还在黑色素瘤细胞中研究了 TNFAIP1 和 RhoA 之间的相互作用和功能。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

18 只 SPF 级 BALB/c 裸鼠(雌性, 6~8 周, 体重 18~22 g) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2018-0001]。小鼠喂养于湖南省实验动物中心[SYXK(湘)2018-0003], 在标准动物房饲养, 湿度为 40%~70%, 温度为 20℃~22℃, 12 h

的光/暗循环。动物实验经湖南省人民医院(湖南师范大学附属第一医院)动物实验伦理委员会审核批准(HNRMly-2020-014), 并严格遵循实验动物使用的 3R 原则。

1.1.2 细胞

人皮肤黑色素瘤细胞系 WM2664 和 A2058 均购自美国典型培养物保藏中心。细胞接种在含有 10% 胎牛血清(FBS, 美国 Gibco 公司)、10 μ g/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 Roswell Park Memorial Institute 1640 培养基(美国 Gibco 公司)中培养。

1.1.3 临床样本

于 2015 年 3 月至 2020 年 10 月期间, 从本院收集了 82 名黑色素瘤患者的黑色素瘤组织和邻近组织(距肿瘤至少 5 cm)。在所有黑色素瘤患者中, 男性患者 54 例, 女性患者 28 例, 平均年龄(53.11 ± 9.16) 岁(范围 36~74 岁)。病程(4.25 ± 2.24) 个月; 瘤体位置: 手背部 23 例, 手指甲下 15 例, 外阴 4 例, 头面部 16 例, 下肢 24 例。其中伴淋巴结转移 37 例, 不伴淋巴结转移 45 例; 根据皮肤癌的 Clark 分级定义: I 级 19 例, II 级 14 例, III 级 11 例, IV 级 22 例, V 级 16 例。所有患者均无其他临床病理特征, 未接受术前治疗, 如放疗或化疗。根据世界卫生组织标准进行黑色素瘤的组织学诊断。所有收集的组织的组织在 -80℃ 下储存直至使用。研究经本院伦理委员会批准同意(20140843-1)。

1.2 主要试剂与仪器

Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; TNFAIP1、RhoA 的过表达质粒和 Ub 及其突变体的质粒以及带有各种标签(Flag/HA/Myc) TNFAIP1 购自上海 Genepharma 公司; TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; PrimeScript^{RT} 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; Fast SYBR Green PCR 试剂购自美国 Applied Biosystems 公司; CCK-8、山羊抗兔 IgG 多克隆二抗购自上海 Beyotime 公司; Matrigel、抗 HA、

Myc、Flag 抗体购自美国 Sigma 公司;增强型放射免疫沉淀测定裂解物、二辛可宁酸蛋白质定量试剂盒购自武汉 Boster 公司;抗 TNFAIP1、RhoA、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、GAPDH、Ki-67 抗体购自美国 Abcam 公司。ABI PRISM 7300 RT-PCR 系统购自美国 Applied Biosystems 公司。光学显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 生物信息学分析

下载了来自 UCSC Xena (<https://xenabrowser.net/>) 的 TCGA 数据库中的黑色素瘤相关数据,并且仅对具有来自 RNA-seq 的生存数据和基因表达数据的患者进行了总体生存分析。对于每个基因,使用 TCGA 样本 id、时间(day_to_death 或 day_to_last_follow-up 时间)、状态(活着或死亡)和表达水平(高表达或低/中表达)的列构建了一个制表符分隔的输入文件。样品分为以下两组:高表达组(TPM 值高于上四分位数)和低/中表达组(TPM 值低于上四分位数)。Kaplan-Meier 生存曲线图是为每种 TCGA 癌症类型中的每个基因创建的,带有“survival”包和“survminer”包。通过对数秩检验比较高表达和低/中表达样本的存活曲线。Kaplan-meier 生存分析的详细步骤在相应的网站(<https://ucsc-xena.gitbook.io/project/overview-of-features/kaplan-meier-plots>)中描述。

1.3.2 细胞转染

取对数生长细胞用胰蛋白酶消化,以每孔 1×10^5 接种到 6 孔板中,并根据 Lipofectamine 2000 的说明转染,24 h 后达到约 75% 融合。用 TNFAIP1 和 RhoA 的过表达质粒以及泛素(Ub)-wt、Ub-K48、Ub-K63 单独或组合转染细胞。

1.3.3 定量逆转录 PCR(RT-qPCR)

使用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA。按照 PrimeScript RT 试剂盒的说明,将 RNA 反向转录成 cDNA。然后,通过 Fast SYBR Green PCR 试剂和 ABI PRISM 7300 RT-PCR 系统对 cDNA 进行 RT-qPCR。以 GAPDH 为内参照基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算每个基因的相对表达水平。引物序列如下: GAPDH: Forward: 5'-CGAGCCACATCGCTCAGACA-3', Reverse: 5'-GTGCTGAAGACGCCAGTGA-3'; TNFAIP1: Forward: 5'-ACACCAGACCGCAGCTCC A-3', Reverse: 5'-TCGTGGAAGATTTCCGGTGTC-3'; RhoA: Forward: 5'-TCCATTGCTGCTGTC

TGATTTGTAG-3', Reverse: 5'-AGCAAGGCATGAGTTGCACA-3'。

1.3.4 细胞增殖试验

通过 CCK-8 和克隆形成测定法评估细胞的增殖。将细胞(5×10^3 个/孔)接种到 96 孔板中并培养过夜。随后,每孔加入 CCK-8(10 μ L),再孵育 2 h。然后,通过酶标仪测量吸光度(450 nm)。对于细胞集落形成测定,将癌细胞(100 个/孔)接种在 12 孔板中,并在 37℃ 培养箱中生长 14 d。将菌落(>50 个细胞)固定 10 min。随后,应用结晶紫(1%)对菌落染色 5 min。在显微镜下测量菌落数($\times 200$ 放大倍数)。

1.3.5 Transwell 检测

为了检查癌细胞的侵袭能力,将 1.0×10^6 个癌细胞和 200 μ L 不含血清的培养基添加到用 Matrigel (8 μ m) 预处理的上室中。同时,将含有 10% FBS 的 600 μ L 培养基加入下室。培养 48 h 后,用 0.1% 结晶紫对下室细胞进行染色,光镜下观察计数。

1.3.6 蛋白质印迹

用含有蛋白酶抑制剂的增强型放射免疫沉淀测定裂解物裂解细胞,然后使用二辛可宁酸蛋白质定量试剂盒测定蛋白质浓度。蛋白质通过 10% SDS-PAGE 分离,并电泳转移到 PVDF 膜上。将膜在室温下用 5% 牛血清白蛋白封闭 2 h,与抗 TNFAIP1(1:1000)、RhoA(1:1000)、E-cadherin(1:1000)、N-cadherin(1:1000)、Vimentin(1:1000)、Flag(1:2000)、HA(1:2000)、Myc(1:1000)和 GAPDH(1:1000)在 4℃ 下过夜。随后,应用山羊抗兔 IgG 多克隆二抗(1:5000)孵育膜 1 h。应用 ECL 化学发光显示印迹。通过 Image J 软件对条带进行量化,并标准化为 GAPDH。

1.3.7 泛素化测定

将指定的质粒转染到黑色素瘤细胞中。转染 48 h 后,将细胞与 MG132(50 μ g/mL)一起培养 8 h,收获并在 IP 裂解缓冲液中裂解。使用 2 mg 抗 HA 标签抗体或 IgG 对细胞裂解物进行免疫沉淀,然后进行蛋白质印迹和 IP 测定。

1.3.8 异种移植小鼠模型

将小鼠随机分为载体组、TNFAIP1 组和 TNFAIP1 + RhoA 组,每组 6 只。将稳定转染的 TNFAIP1 过表达或 RhoA 处理过表达 TNFAIP1 的 WM2664 细胞(1×10^6 个)或载体转染细胞皮下注

射到裸鼠的右背侧。在指定的时间点监测肿瘤体积。注射后两周,处死小鼠,切除肿瘤,称重,拍照,免疫组化染色。

1.3.9 免疫组化染色

将肿瘤组织在 4% 多聚甲醛中固定过夜,石蜡包埋,并切成 5 μm 厚的切片。将石蜡切片脱蜡并再水合,并在室温下在 3% H_2O_2 中孵育 25 min,在 山羊血清中封闭 30 min。然后,样品用 TNFAIP1 (1:2000)、RhoA (1:200)、Ki-67 (1:200) 等一抗在 4℃ 孵育过夜。之后,将样品与二抗 (HRP 标记) 在 37℃ 下孵育 30 min。最后,加入新鲜制备的二氨基联苯胺进行显色。在光学显微镜下观察组织。

1.4 统计学方法

所有数据均使用 SPSS 21.0 进行处理。测量数据表示为平均数 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x}\pm s\bar{x}$)。通过配对样本 t 检验检查黑色素瘤组织和相邻组织之间的数据。使用单因素方差分析 (ANOVA) 进行多组之间的比较。使用重复测量方差分析和 Tukey's post-test 进行不同时间点的组间比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TNFAIP1 和 RhoA 在黑色素瘤中的表达及临床功能鉴定

在黑色素瘤患者收集的 82 个临床样本观察到,与癌旁正常组织相比,肿瘤组织中 TNFAIP1 表达显著降低 ($P<0.01$) 和 RhoA 表达显著升高 ($P<0.01$) (图 1)。此外,通过 TCGA 数据库采用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验绘制生存曲线。分析发现, TNFAIP1 高表达的黑色素瘤患者预后良好。具有 RhoA 高表达的黑色素瘤患者预后不良。此外, RhoA 表达与肿瘤转移密切相关 (图 2)。

2.2 TNFAIP1 的过表达在体外抑制黑色素瘤细胞增殖、侵袭

为了研究 TNFAIP1 的功能,通过转染 TNFAIP1 构建过表达 TNFAIP1 的黑色素瘤细胞,并通过 RT-qPCR 进行验证 (图 3)。与载体组相比, TNFAIP1 组显著抑制了黑色素瘤细胞的活力、克隆数和侵袭数 ($P<0.01$) (图 4)。TNFAIP1 组黑色素瘤细胞中 N-cadherin 和 Vimentin 的表达较载体组显著降低 ($P<0.01$),而 E-cadherin 的表达增加 ($P<0.01$) (图

5)。总之, TNFAIP1 过表达抑制了黑色素瘤细胞的增殖、侵袭。

2.3 TNFAIP1 调节 RhoA 泛素化

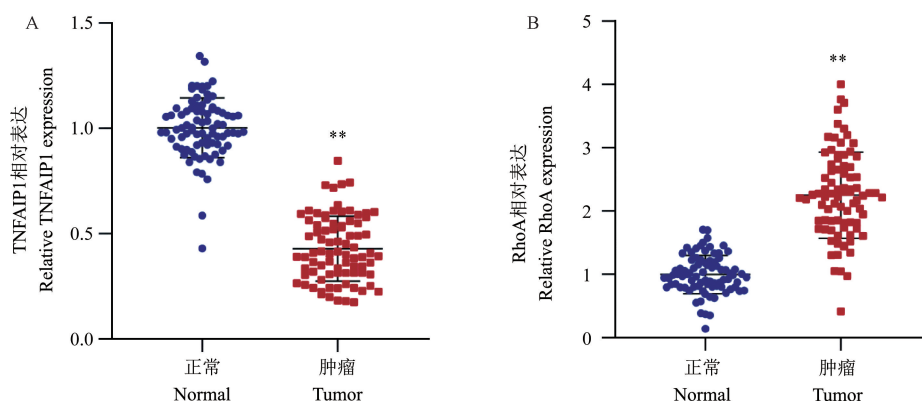
现已知在肝癌中 TNFAIP1 可以通过泛素化修饰降解 RhoA^[8]。本研究中,共免疫沉淀 (Co-IP) 的结果证实了 TNFAIP1 和 RhoA 在过表达 RhoA 的 WM2664 细胞中的直接相互作用 (图 6)。此外,标记的 TNFAIP1 在 WM2664 细胞中转染,然后进行内源性 IP 测定。结果表明 TNFAIP1 和 RhoA 之间存在直接相互作用 (图 6)。接下来,分析了 TNFAIP1 介导的 RhoA 泛素化。TNFAIP1 和 Ub 共转染到过表达 RhoA 的 WM2664 细胞中,结果显示 TNFAIP1 显著促进了 RhoA 的泛素化。过表达的 TNFAIP1 主要促进 RhoA 的 K48 泛素化并部分抑制其 K63 泛素化 (图 7)。K48 连接的泛素化主要通过蛋白酶体途径介导降解,这与 RhoA 的蛋白酶体降解一致。为了更好地证明 TNFAIP1 促进了 K48 连接的 RhoA 泛素化,我们用 TNFAIP1 和 Ub-K48 共转染过表达 RhoA 的 WM2664 细胞,然后用蛋白酶体抑制剂 MG132 处理 WM2664 细胞。根据蛋白质印迹,在 TNFAIP1 过表达后, RhoA 被 Ub 修饰 (图 8),表明 TNFAIP1 确实显著促进了 RhoA 的 K48 连接的泛素化修饰。

2.4 RhoA 上调显著逆转了 TNFAIP1 过表达体外对黑色素瘤细胞的影响

为了进一步证实 RhoA 和 TNFAIP1 之间的分子关联,数据显示, TNFAIP1 过表达对黑色素瘤细胞中 RhoA 水平的影响被 RhoA 显著逆转 (图 9)。RhoA 的过表达显著恢复了 TNFAIP1 过表达诱导的细胞增殖和侵袭抑制作用 (图 10)。同样,在 TNFAIP1 过表达的黑色素瘤细胞中, RhoA 的过表达提高了 N-钙粘蛋白和波形蛋白水平,但降低了 E-钙粘蛋白水平 (图 11)。综上, RhoA 的过表达在体外对 TNFAIP1 的生物功能产生了负面影响。

2.5 RhoA 上调显著逆转了 TNFAIP1 过表达体内对黑色素瘤细胞的影响

为了评估 TNFAIP1 在黑色素瘤细胞肿瘤发生中的作用,用裸鼠进行了皮下异种移植实验。结果表明,过表达 TNFAIP1 的 WM2664 细胞形成的肿瘤在大小和重量上均明显小于载体组细胞形成的肿瘤,同时 RhoA+TNFAIP1 组肿瘤在大小和重量均明显高于 TNFAIP1 组 ($P<0.001$) (图 12)。免疫组织

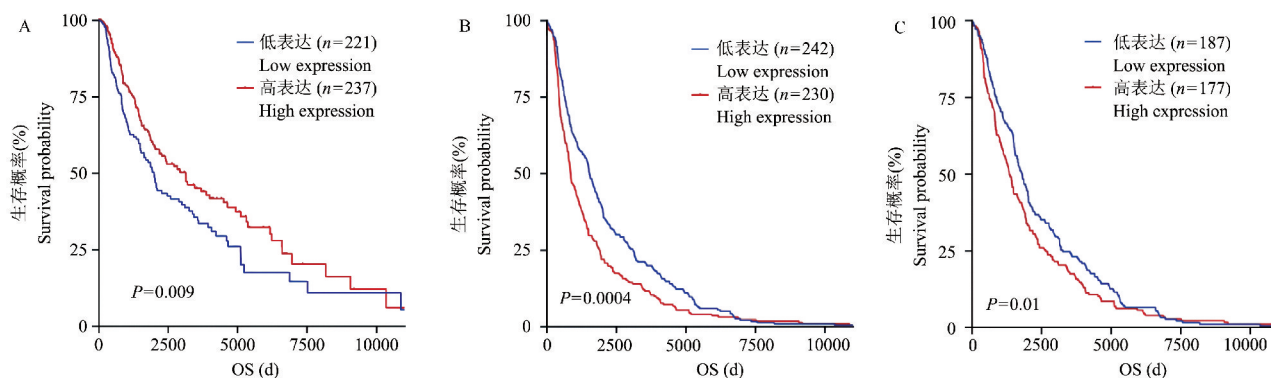


注:A;黑色素瘤组织样品中 TNFAIP1 的表达;B;黑色素瘤组织样品中 RhoA 的表达。与正常组相比, ** $P < 0.01$ 。

图1 TNFAIP1 和 RhoA 在黑色素瘤中的表达

Note. A, TNFAIP1 expression in melanoma tissue samples. B, RhoA expression in melanoma tissue samples. Compared with normal group, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Expression of TNFAIP1 and RhoA in melanoma

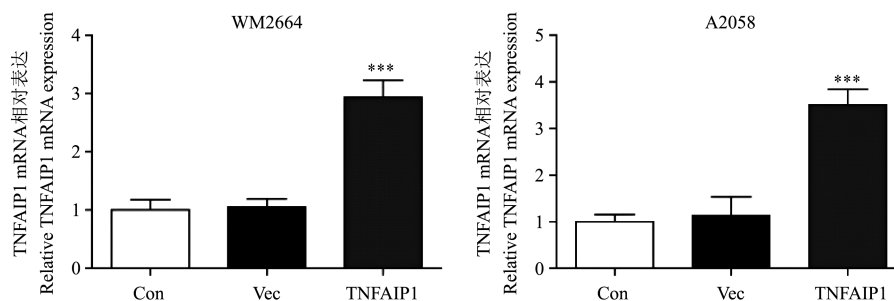


注:A;Kaplan-Meier 生存曲线反映了 TNFAIP1 高表达或低表达的黑色素瘤患者的生存差异;B;Kaplan-Meier 生存曲线反映了 RhoA 高表达或低表达的黑色素瘤患者的生存差异;C;Kaplan-Meier 生存曲线反映了 RhoA 高表达或低表达的转移性黑色素瘤患者的生存差异。

图2 TNFAIP1 和 RhoA 在黑色素瘤中的临床功能鉴定

Note. A, Kaplan-Meier survival curve reflects the survival difference of melanoma patients with high or low expression of TNFAIP1. B, Kaplan-Meier survival curve reflects the survival difference of melanoma patients with high or low expression of RhoA. C, Kaplan-Meier survival curves reflect differences in survival between patients with metastatic melanoma with high or low expression of RhoA.

Figure 2 Clinical function identification of TNFAIP1 and RhoA in melanoma

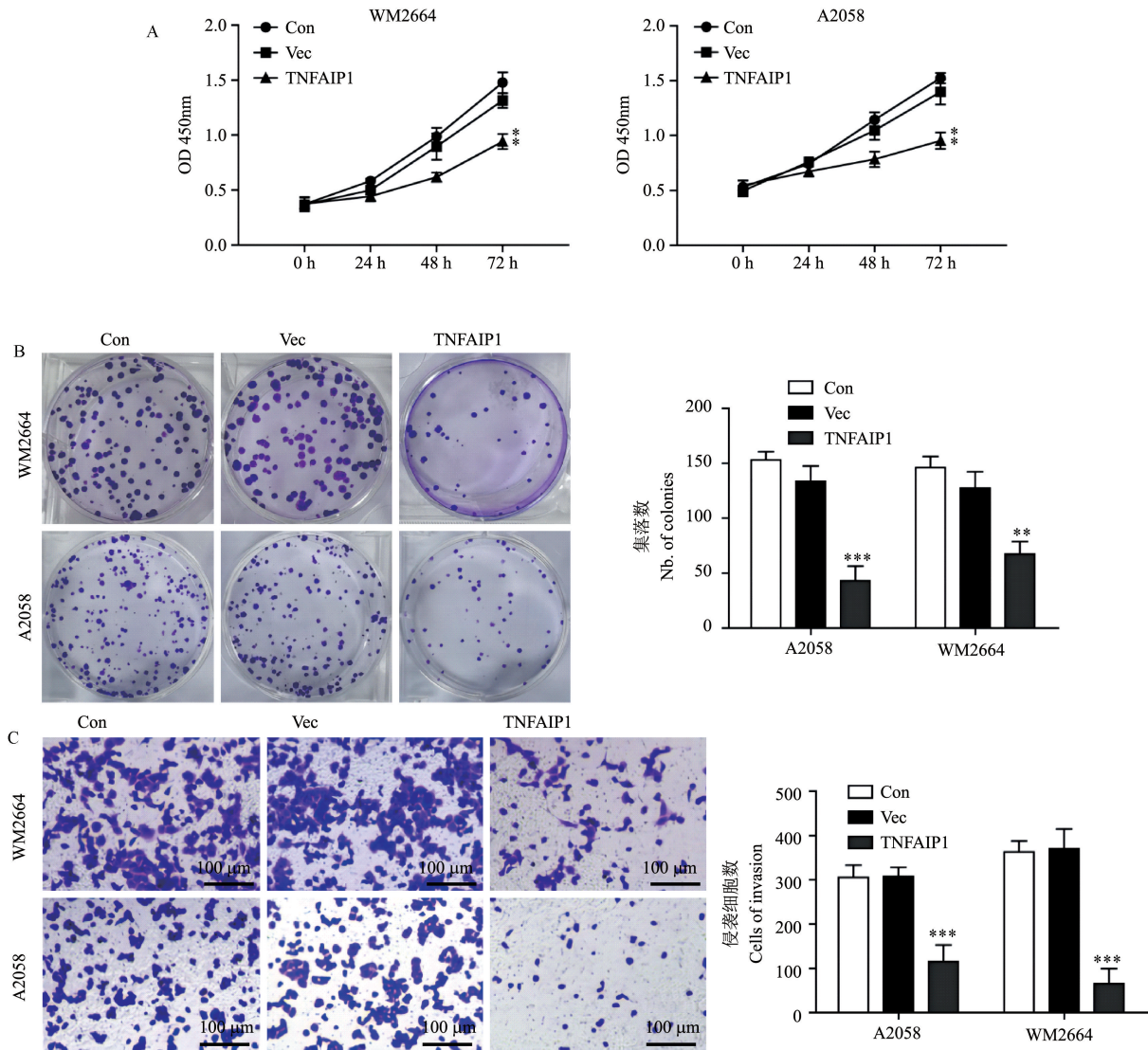


注:与 Vec 组相比, *** $P < 0.001$ 。

图3 通过 RT-qPCR 鉴定黑色素瘤细胞中转染物

Note. Compared with the Vec group, *** $P < 0.01$.

Figure 3 Identification of transfection in melanoma cells by RT-qPCR



注:A:通过 CCK-8 法检测黑色素瘤细胞的活力;B:通过集落形成测定法评估黑色素瘤细胞的增殖;C:通过 Transwell 测定评估黑色素瘤细胞的侵袭。与 Vec 组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 4 TNFAIP1 过表达在体外抑制黑色素瘤细胞的增殖、侵袭

Note. A, Melanoma cell viability was detected by CCK-8 assay. B, Melanoma cell proliferation was assessed by colony formation assay. C, Melanoma cell invasion was assessed by Transwell assay. Compared with the Vec group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

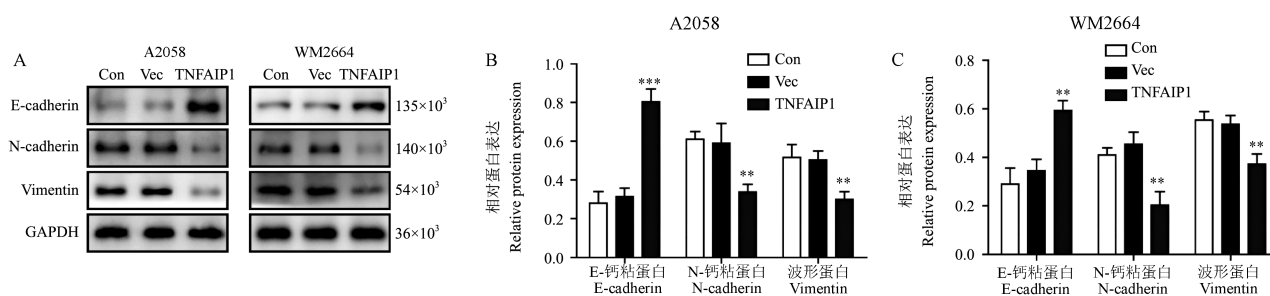
Figure 4 TNFAIP1 overexpression inhibits the proliferation and invasion of melanoma cells *in vitro*

化学染色显示,与载体组相比,TNFAIP1 组肿瘤样本中 TNFAIP1 阳性细胞的百分比显著增加 ($P<0.01$),和 RhoA/Ki-67 阳性细胞的百分比显著降低 ($P<0.01$)。RhoA+TNFAIP1 组则逆转了 TNFAIP1 组的这些变化 ($P<0.05$) (图 13)。总之,这些结果表明 TNFAIP1 通过 RhoA 介导黑色素瘤细胞的生长、侵袭和肿瘤发生。

3 讨论

全世界黑色素瘤的发病率持续上升,导致严重

的社会经济问题^[9]。在本研究中,我们发现 TNFAIP1 在人黑色素瘤组织样本中表达下调, TNFAIP1 低表达是黑色素瘤患者的不良预后因素,表明 TNFAIP1 可能是一种生物标志物黑色素瘤。在进一步研究中,我们评估了 TNFAIP1 在黑色素瘤增殖和侵袭中的意义。结果表明,黑色素瘤细胞中 TNFAIP1 过表达抑制细胞增殖、侵袭。从机制上讲,我们通过 Co-IP 验证 TNFAIP1 直接与 RhoA 结合,并诱导 RhoA 泛素化。这些发现揭示了 TNFAIP1/RhoA 可能是黑色素瘤的治疗靶点。

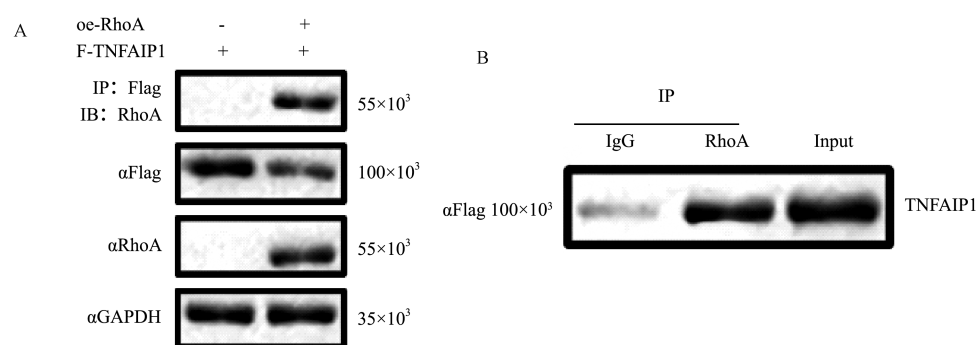


注:与 Vec 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 通过蛋白质印迹定量黑色素瘤细胞中的 E-钙粘蛋白、波形蛋白和 N-钙粘蛋白水平

Note. Compared with the Vec group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Quantification of E-cadherin, vimentin and N-cadherin levels in melanoma cells by Western blot

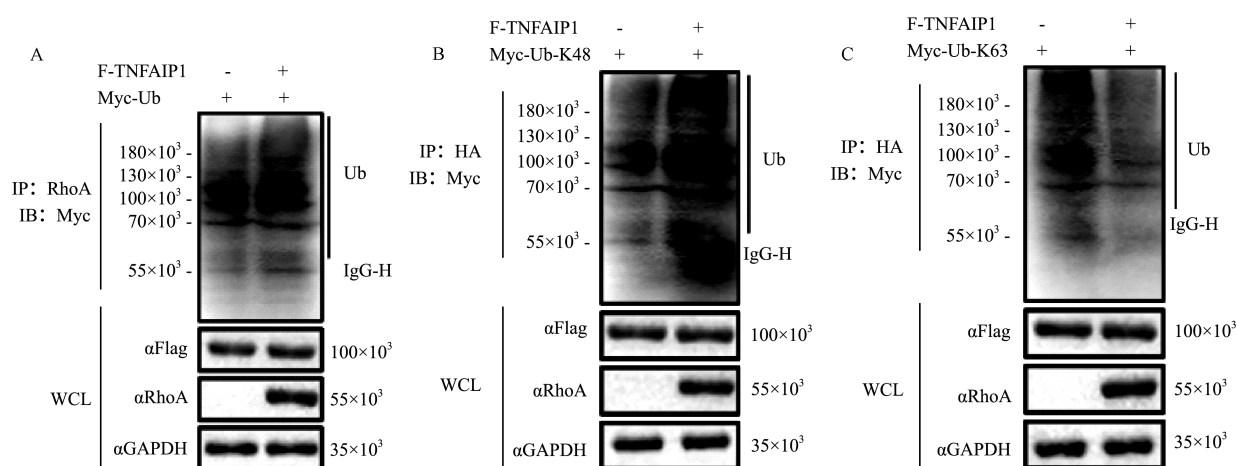


注:A;通过 Co-IP 验证 WM2664 细胞中 RhoA 和 TNFAIP1 之间的相互作用;B;通过 IP 验证 WM2664 细胞中 TNFAIP1 与内源性 RhoA 之间的相互作用。

图 6 TNFAIP1 与 RhoA 之间的相互作用

Note. A, Validation of the interaction between RhoA and TNFAIP1 in WM2664 cells by Co-IP. B, Validation of the interaction between TNFAIP1 and endogenous RhoA in WM2664 cells by IP.

Figure 6 Interaction between TNFAIP1 and RhoA



注:A;RhoA 连接的 RhoA 泛素化,B;K48 连接的 RhoA 泛素化,C;K63 连接的 RhoA 泛素化。

图 7 TNFAIP1 对过表达 RhoA 的 WM2664 细胞中 RhoA、K48、K63 连接的 ARhoA 泛素化的影响

Note. A, RhoA-linked RhoA ubiquitination. B, K48-linked RhoA ubiquitination. C, K63-linked RhoA ubiquitination.

Figure 7 Effect of TNFAIP1 on the ubiquitination of RhoA, K48, K63-linked ARhoA in WM2664 cells overexpressing RhoA

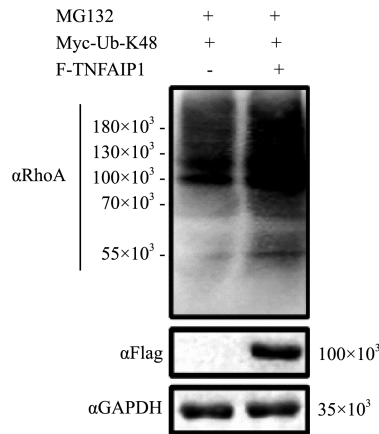


图 8 TNFAIP1 对 MG132 处理的过表达 RhoA 的 WM2664 细胞中 K48 连接的 RhoA 泛素化的影响

Figure 8 Effect of TNFAIP1 on ubiquitination of K48-linked RhoA in MG132-treated WM2664 cells overexpressing RhoA

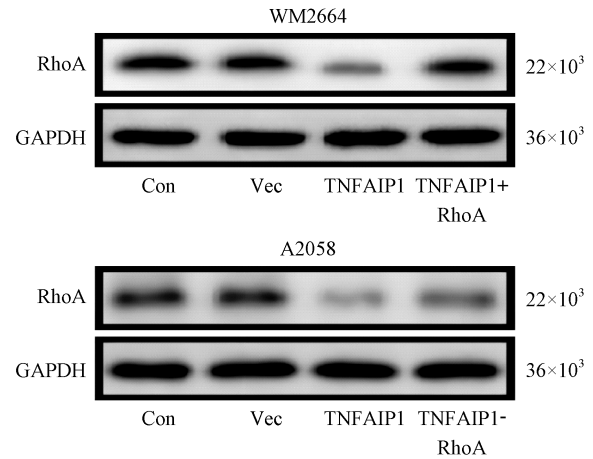
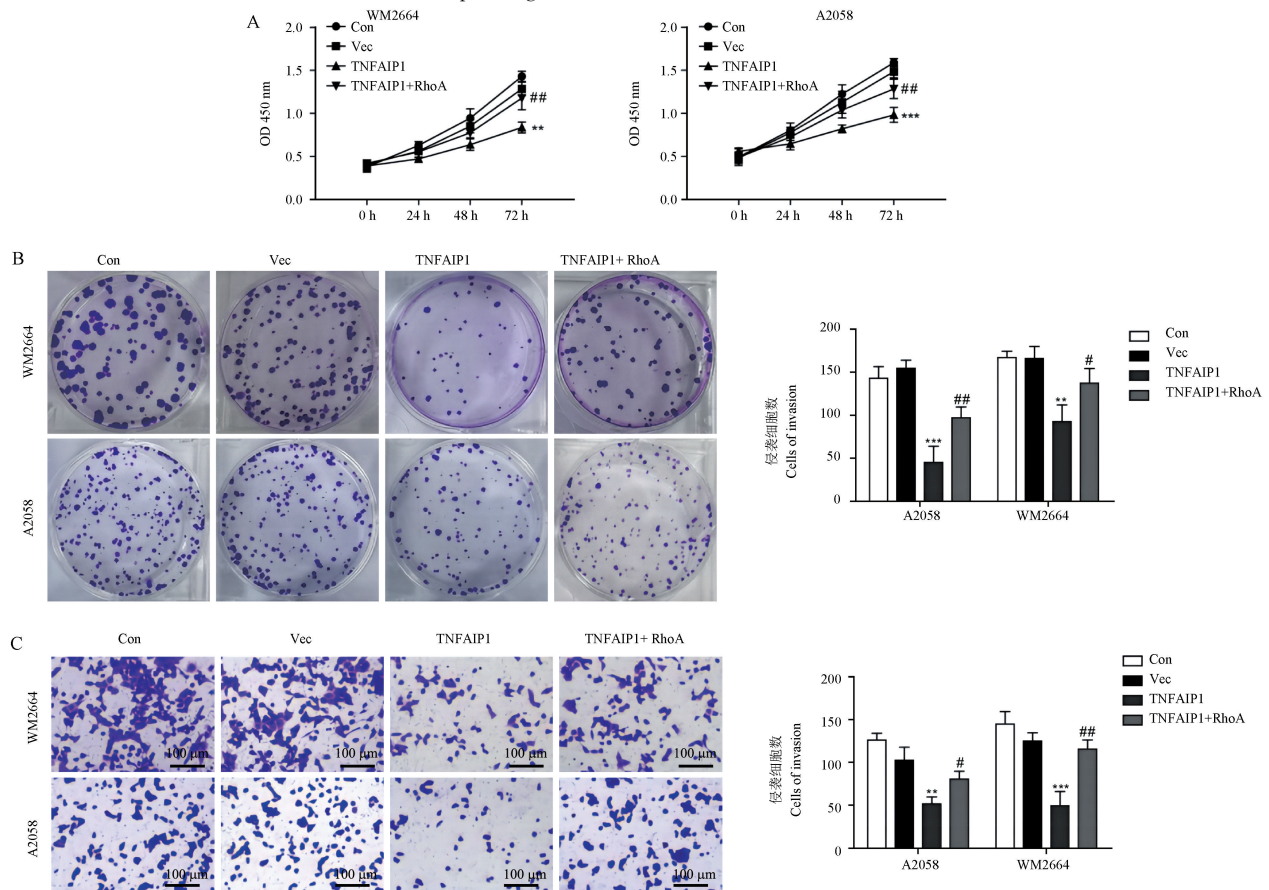


图 9 RhoA 对过表达 TNFAIP1 的肿瘤细胞中 RhoA 的蛋白水平影响

Figure 9 Effect of RhoA on the protein level of RhoA in tumor cells overexpressing TNFAIP1

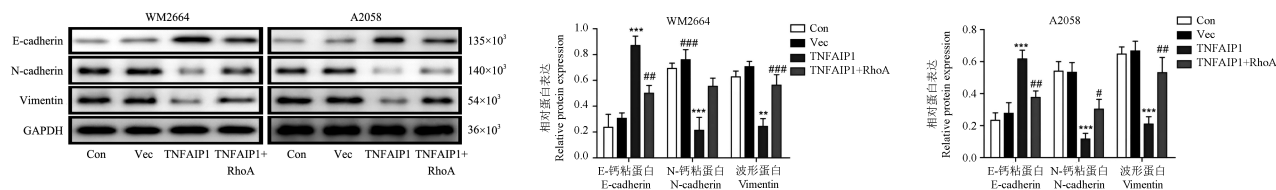


注:A:通过 CCK-8 法检测黑色素瘤细胞的活力;B:通过集落形成测定法评估黑色素瘤细胞的增殖;C:通过 Transwell 测定评估黑色素瘤细胞的侵袭。与 Vec 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 TNFAIP1 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 10 RhoA 上调对 TNFAIP1 过表达对黑色素瘤进展的影响

Note. A, Melanoma cell viability was detected by CCK-8 assay. B, Melanoma cell proliferation was assessed by colony formation assay, C, Melanoma cell invasion was assessed by Transwell assay. Compared with the Vec group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the TNFAIP1 group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 10 Effect of RhoA upregulation on the overexpression of TNFAIP1 and the progression of melanoma

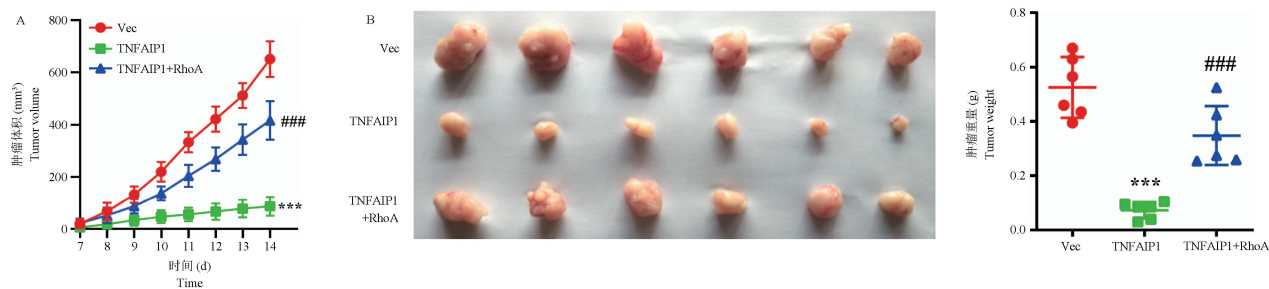


注:与 Vec 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 TNFAIP1 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

图 11 通过蛋白质印迹定量黑色素瘤细胞中的 E-钙粘蛋白、波形蛋白和 N-钙粘蛋白水平

Note. Compared with the Vec group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the TNFAIP1 group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 11 Quantification of E-cadherin, vimentin and N-cadherin levels in melanoma cells by Western blot

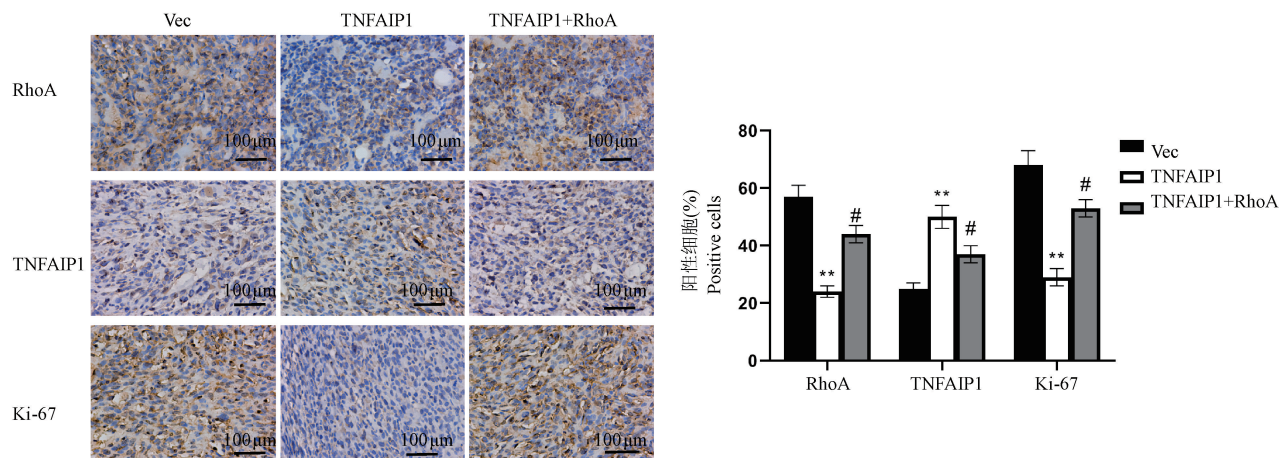


注:A:肿瘤体积,B:肿瘤代表图和重量。与 Vec 组相比, *** $P < 0.001$; 与 TNFAIP1 组相比, ### $P < 0.001$ 。

图 12 RhoA 上调体内对 TNFAIP1 过表达黑色素瘤细胞的增殖影响

Note. A, Tumor volume. B, Tumor representative graph and weight. Compared with the Vec group, *** $P < 0.001$. Compared with the TNFAIP1 group, ### $P < 0.001$.

Figure 12 Effect of RhoA upregulation on proliferation of melanoma cells overexpressing TNFAIP1 *in vivo*



注:与 Vec 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 TNFAIP1 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 13 免疫组化分析检测 TNFAIP1、RhoA 和 Ki-67 的表达

Note. Compared with the Vec group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the TNFAIP1 group, # $P < 0.05$.

Figure 13 Immunohistochemical analysis to detect the expression of TNFAIP1, RhoA and Ki-67

TNFAIP1 调节多种细胞生物学过程,包括蛋白质转运和降解、信号传导和转录^[10]。越来越多的报告表明,TNFAIP1 在多种人类恶性肿瘤中下调,在细胞增殖、凋亡和侵袭中起关键作用^[11-12]。例如,Li 等^[5]报道 CRL3BD9 E3 泛素连接酶复合物通过靶向 TNFAIP1 降解以抑制癌细胞迁移。还有研究表明

TNFAIP1 下调导致结肠、乳腺癌和甲状腺癌细胞的细胞增殖减少、周期停滞和细胞凋亡增加^[4-5]。一致地,本研究发现 TNFAIP1 在黑色素瘤组织中下调。此外,TNFAIP1 过表达显著降低了黑色素瘤细胞体外增殖、侵袭和 EMT 表型,并在体内抑制了肿瘤生长,表明 TNFAIP1 可能是黑色素瘤的肿瘤抑制因子。

RhoA 已被充分证明是一种促进肿瘤存活、进展和迁移的转录因子^[13-14]。相关研究发现, RhoA 介导的肌动蛋白丝和粘着斑的形成加速黑色素瘤增殖和迁移^[15]。此外, RhoA 上调通过激活波形蛋白驱动黑色素瘤细胞上皮间质转化^[16-17]。先前的数据表明, TNFAIP1 作为底物特异性接合器, 通过介导 RhoA 的多泛素化和降解参与细胞骨架结构的调节^[18]。本研究发现 RhoA 在黑色素瘤组织中上调, 具有高表达 RhoA 的黑色素瘤患者预后不良。此外, RhoA 表达与肿瘤转移密切相关。这些发现强调了 RhoA 作为黑色素瘤转移靶点的重要性。据报道, RhoA 是一种半衰期短的不稳定蛋白质, 可被 TNFAIP1 泛素酶降解^[19]。泛素酶被认为在调节肿瘤发生和发展中发挥作用, 并已成为一类新的抗癌靶点^[20-21]。目前, 关于 TNFAIP1 对 RhoA 泛素化的具体位点没有详细描述。本研究发现 TNFAIP1 介导了 RhoA 的 K48 连锁泛素化。此外, TNFAIP1 通过调节泛素介导的 RhoA 降解抑制了黑色素瘤细胞增殖、侵袭和 EMT 表型, 而 RhoA 基因过表达挽救了 TNFAIP1 过表达引起的所有效应。因此, RhoA 可能是黑色素瘤细胞中 TNFAIP1 的下游因子。

总之, 我们的数据表明 TNFAIP1 在黑色素瘤中发挥肿瘤抑制作用, 其通过诱导 RhoA 泛素化抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭。因此, TNFAIP1-RhoA 轴可能是黑色素瘤潜在的抗癌靶点。

参考文献:

- [1] Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, et al. Five-year outcomes with dabrafenib plus trametinib in metastatic melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(7): 626-636.
- [2] Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(16): 1535-1546.
- [3] Xiao Y, Huang S, Qiu F, et al. Tumor necrosis factor α -induced protein 1 as a novel tumor suppressor through selective downregulation of CSNK2B blocks nuclear factor- κ B activation in hepatocellular carcinoma [J]. *EBioMedicine*, 2020, 51: 102603.
- [4] Tang X, Tangkham T, Aljahdali B, et al. The role of TNF- α induced protein 1 in the activation of pro-apoptotic proteins [J]. *Hum Cell*, 2021, 34(4): 1123-1129.
- [5] Li L, Zhang W, Liu Y, et al. The CRL3 BTBD9 E3 ubiquitin ligase complex targets TNFAIP1 for degradation to suppress cancer cell migration [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 42.
- [6] Mao Y, He JX, Zhu M, et al. Circ0001320 inhibits lung cancer cell growth and invasion by regulating TNFAIP1 and TPM1 expression through sponging miR-558 [J]. *Hum Cell*, 2021, 34(2): 468-477.
- [7] Maiques O, Fanshawe B, Crosas-Molist E, et al. A preclinical pipeline to evaluate migrastatics as therapeutic agents in metastatic melanoma [J]. *Br J Cancer*, 2021, 125(5): 699-713.
- [8] Liu Y, Zhang W, Wang S, et al. Cullin3-TNFAIP1 E3 ligase controls inflammatory response in hepatocellular carcinoma cells via ubiquitination of RhoB [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 617134.
- [9] Henley SJ, Ward EM, Scott S, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics [J]. *Cancer*, 2020, 126(10): 2225-2249.
- [10] Xiao Y, Li Y, Zhang H, et al. TNFAIP1 is upregulated in app/ps1 mice and promotes apoptosis in sh-sy5y cells by binding to RhoB [J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71(6): 1221-1233.
- [11] Guo F, Yuan Y. Tumor necrosis factor alpha-induced proteins in malignant tumors: progress and prospects [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 3303.
- [12] 许斐钰, 陈果, 龙胜文, 等. 过表达 TNFAIP1 促进替莫唑胺对人脑胶质瘤细胞 U251 迁移和侵袭的抑制作用 [J]. *激光生物学报*, 2021, 30(2): 178-184.
- [13] Kalpana G, Figy C, Yeung M, et al. Reduced RhoA expression enhances breast cancer metastasis with a concomitant increase in CCR5 and CXCR4 chemokines signaling [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 16351.
- [14] Nam S, Kim JH, Lee DH. RHOA in gastric cancer: functional roles and therapeutic potential [J]. *Front Genet*, 2019, 10: 438.
- [15] Liu H, Seynhaeve ALB, Brouwer RWW, et al. CREPT promotes melanoma progression through accelerated proliferation and enhanced migration by RhoA-mediated actin filaments and focal adhesion formation [J]. *Cancers*, 2020, 12(1): 33.
- [16] Sajib MS, Zahra FT, Park JH, et al. Role of endothelial RhoA in melanoma and lung cancer trans-endothelial migration and metastasis [J]. *FASEB J*, 2019, 33(1): 368.
- [17] Zheng Q, Peng X, Zhang Y. Cytotoxicity of amide-linked local anesthetics on melanoma cells via inhibition of Ras and RhoA signaling independent of sodium channel blockade [J]. *BMC Anesthesiol*, 2020, 20(1): 43.
- [18] Podieh F, Hordijk PL. Regulation of Rho GTPases in the vasculature by Cullin3-based E3 ligase complexes [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 680901.
- [19] Dubiel W, Dubiel D, Wolf DA, et al. Cullin 3-based ubiquitin ligases as master regulators of mammalian cell differentiation [J]. *Trends Biochem Sci*, 2018, 43(2): 95-107.
- [20] 申香玉, 史磊, 申远. 泛素特异性蛋白酶在肿瘤发生发展中的作用 [J]. *生命的化学*, 2021, 41(4): 693-706.
- [21] 俞卿, 熊秀芳, 孙毅. 靶向 Cullin-RING E3 泛素连接酶的抗肿瘤策略及相关药物研发进展 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2020, 49(1): 1-19.

[收稿日期] 2022-02-16