



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.005
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.005
Chinese Journal of General Surgery, 2022, 31(3):319-328.

· 专题研究 ·

泛素/ISG15结合酶E2L6在胰腺癌中的作用及其临床价值分析

刘涛^{1,2}, 周磊^{1,2}, 肖晶晶^{1,2}, 江建新^{1,3}

(1. 贵州医科大学临床医学院, 贵州 贵阳 550000; 2. 贵州医科大学附属医院肝胆外科, 贵州 贵阳 550000; 3. 武汉大学人民医院肝胆外科, 湖北 武汉 430060)

摘要

背景与目的: 胰腺癌具有高度迁移性和侵袭性的特点, 预后不良, 但癌基因的突变及分子调控关系等的改变会影响胰腺癌的恶性生物学行为。泛素/ISG15结合酶E2L6 (UBE2L6) 在泛癌中的表达及胰腺癌中的生物学功能依然不清楚。本研究拟通过生物信息学分析及实验验证, 探讨UBE2L6对胰腺癌增殖、迁移侵袭能力的影响及可能的分子机制。

方法: 从UCSC Xena下载TCGA和GTEx的RNA-seq数据, 用R (4.0.2)软件的“limma”包分析UBE2L6在泛癌中的差异表达。利用从GEO数据集下载数据及qRT-PCR分别验证UBE2L6在胰腺癌组织及细胞中的差异表达。胰腺癌细胞转染靶向UBE2L6的siRNA后用CCK-8细胞增殖、克隆形成、Transwell迁移和侵袭实验分析UBE2L6对胰腺癌细胞生物学功能的影响。利用UBE2L6的分子相关性、蛋白相互作用及基因富集分析(GSEA)探讨其可能的作用机制。进一步利用TCGA数据库的胰腺癌临床数据, 分析UBE2L6的表达与其临床病理特征的关系及临床应用价值。

结果: 表达差异分析提示UBE2L6在泛癌中表达增高, 在胰腺癌组织及BxPC-3 ($t=33.82$, $P<0.0001$)、PANC-1 ($t=7.36$, $P=0.0018$)、AsPC-1 ($t=9.61$, $P=0.0007$)、SW1990 ($t=10.26$, $P=0.0005$)及MIA PaCa-2 ($t=12.65$, $P=0.0002$)等胰腺癌细胞系中亦高表达。细胞功能实验显示, UBE2L6可促进胰腺癌PANC-1和AsPC-1细胞的增殖、迁移及侵袭。Spearman相关性分析提示BCL2A1蛋白与UBE2L6的相关性最大($r=0.442$)。蛋白相互作用分析显示, 其可能与HERC6、RPS27A、HERC5、UBA52、ISG15、UBA7、DDX58、UBC、UBB、ARIH1等蛋白有相互作用。同时, GSEA富集分析提示UBE2L6与肿瘤免疫微环境等密切相关。而临床病理相关性分析显示, UBE2L6高表达与胰腺癌组织病理学分级密切相关($\chi^2=6.966$, $P=0.031$)。单因素及多因素Cox回归分析表明, 年龄及淋巴结转移是胰腺癌患者的独立危险因素($P<0.05$), UBE2L6的表达水平与胰腺癌患者的预后明显相关($P<0.05$), 但不是其独立预后因素($P>0.05$)。ROC曲线及Kaplan-Meier生存分析提示, UBE2L6对胰腺癌具有较高的临床诊断价值($AUC=0.970$, $95\%CI=0.950\sim0.989$)且与胰腺癌患者的预后相关($P<0.05$)。

结论: UBE2L6在胰腺癌中表达增高并促进胰腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭, 其分子机制可能与细胞凋亡、泛素化修饰、MAPK信号通路及肿瘤免疫微环境等有关, 且UBE2L6表达水平与胰腺癌的诊断及预后密切相关。

关键词

胰腺肿瘤; 泛素缀合酶类; 预后; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.9

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81871965)。

收稿日期: 2021-09-10; **修订日期:** 2022-02-22。

作者简介: 刘涛, 贵州医科大学临床医学院博士研究生/贵州医科大学附属医院主治医师, 主要从事肝胆胰疾病基础与临床方面的研究。

通信作者: 江建新, Email: rm002979@whu.edu.cn

Analysis of the function of ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2L6 in pancreatic cancer and its clinical value

LIU Tao^{1,2}, ZHOU Lei^{1,2}, XIAO Jingjing^{1,2}, JIANG Jianxin^{1,3}

(1. School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract

Background and Aims: Pancreatic cancer is characterized by high metastatic potential and invasiveness, and dismal prognosis. However, Mutations in oncogenes and changes in molecular regulatory relationships can affect the malignant biological behaviors of pancreatic cancer. The expression of ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2L6 (UBE2L6) in pan-cancer and its biological function in pancreatic cancer remain unclear. Therefore, this study was performed to explore the effect of UBE2L6 on the proliferation, migration, and invasion abilities of pancreatic cancer and its underlying molecular mechanism through bioinformatic analysis and experimental verification.

Methods: The RNA-seq data of TCGA and GTEx were downloaded from UCSC Xena, and the differential expressions of UBE2L6 in pan-cancer were analyzed using the “limma” package of R (4.0.2). The differential expression of UBE2L6 in pancreatic cancer tissue and cell lines was verified by the Gene Expression Omnibus (GEO) datasets and qRT-PCR, respectively. In pancreatic cancer cells after transfection with siRNA targeting UBE2L6, the influences of UBE2L6 on the biological functions of pancreatic cells were analyzed by CCK-8 proliferation, colony formation, Transwell migration and invasion assays. The potential action mechanism of UBE2L6 were explored by the molecular correlation, protein interaction, and gene set enrichment analysis (GSEA). Then, the clinical data of pancreatic cancer were downloaded from the TCGA database to analyze the association of UBE2L6 expression with the clinicopathologic features and its clinical application value.

Results: Differential expression analysis suggested that UBE2L6 expression was up-regulated in pan-cancer as well as in pancreatic cancer tissue and a variety of pancreatic cancer cell lines such as BxPC-3 ($t=33.82$, $P<0.0001$), PANC-1 ($t=7.36$, $P=0.0018$), AsPC-1 ($t=9.61$, $P=0.0007$), SW1990 ($t=10.26$, $P=0.0005$), and MIA PaCa-2 ($t=12.65$, $P=0.0002$). Cell function assays showed that UBE2L6 promoted the proliferation, migration, and invasion of PANC-1 and AsPC-1 cells. Spearman correlation analysis indicated that BCL2A1 protein had the highest correlation with UBE2L6 ($r=0.442$). The protein interaction analysis showed that it potentially interacted with HERC6, RPS27A, HERC5, UBA52, ISG15, UBA7, DDX58, UBC, UBB, and ARIH1. Meanwhile, GSEA enrichment analysis suggested that UBE2L6 was closely related to the tumor immune microenvironment. While clinicopathologic correlation analysis showed that the high expression of UBE2L6 was closely correlated with the histopathological grade of pancreatic cancer ($\chi^2=6.966$, $P=0.031$). Next, univariate and multivariate Cox regression analysis showed that age and lymph node metastasis were independent risk factors for pancreatic cancer patients (both $P<0.05$), and the expression of UBE2L6 was significantly correlated with the prognosis of pancreatic cancer patients ($P<0.05$), but it was not an independent prognostic factor ($P>0.05$). Furthermore, ROC curve and Kaplan-Meier survival analysis suggested that UBE2L6 had a high clinical diagnostic value for pancreatic cancer (AUC=0.970, 95% CI=0.950–0.989) and was correlated with the prognosis of pancreatic cancer patients ($P<0.05$).

Conclusion: UBE2L6 is highly expressed in pancreatic cancer, and it promotes the proliferation, migration, and invasion of pancreatic cancer cells. Its molecular mechanism may be related to cell apoptosis, ubiquitination, the MAPK signaling pathway, and tumor immune microenvironment. In

addition, UBE2L6 is closely associated with the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer.

Key words

Pancreatic Neoplasms; Ubiquitin-Conjugating Enzymes; Prognosis; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.9

胰腺癌是全球癌症相关性死亡的主要原因之一,排在美国患者癌症相关性死亡的第3位^[1],中国男性患者癌症相关性死亡的第6位及女性患者的第7位^[2],且总体病死率仍呈上升趋势,5年总体生存率亦只有10%^[3]。其病情隐匿,早期不容易发现,约80%以上的患者诊断时可能已达癌症进展期或并发远处转移^[4]。胰腺癌具有高度迁移性和侵袭性的特征^[5],肿瘤异质性明显,目前群体研究证据提供的治疗方案对改善其预后的效果有限^[6],是造成胰腺癌容易发生远处转移及预后很差的主要因素^[4,7]。研究^[8-9]表明,癌基因的突变及分子调控关系等的改变会影响胰腺癌的恶性生物学特征,而抑制突变癌基因靶点的分子靶向治疗策略可能使患者获益。例如,近期的一项前瞻性III期临床试验^[10]显示,聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(poly-ADP-ribose polymerase, PARP)抑制剂奥拉帕利可以使乳腺癌易感基因(BRCA)突变的转移性胰腺癌患者的无进展生存期得到改善(7.4个月 vs. 3.8个月)。这一令人鼓舞的结果同时也凸显了阐明胰腺癌的分子调控机制和寻找新的更有效的疾病治疗靶点的重要性。

泛素/ISG15结合酶UBE2L6(ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2 L6, UBE2L6)是编码E2泛素结合酶家族的成员,也是翻译后蛋白修饰的关键酶,有证据显示其可以促进干扰素刺激基因15(ISG15)与底物蛋白的共价连接,在白血病细胞分化过程中发挥重要作用^[11]。研究^[12]显示,UBE2L6可能通过泛素化途径介导了三氧化二砷/全反式视黄酸对C-myc的抑制作用,进而抑制了FLT3-ITD突变引起的急性髓系白血病的进展。另有研究^[13]表明,UBE2L6可通过调控ATP结合盒亚家族B成员6(ABCB6)参与肿瘤细胞的顺铂耐药。然而,其在包括胰腺癌在内的大多数癌症中的表达及生物学功能依然不清楚。笔者拟通过研究癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas Program, TCGA)和基因型-组织表达研究项目(The Genotype-Tissue Expression, GTEx)的相关数据及临床资料,分析UBE2L6在泛癌及胰腺癌中的表

达情况,探究其与胰腺癌的临床病理相关性及其诊断预后价值,研究其对胰腺癌细胞增殖、迁移侵袭能力的影响,并讨论其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 生物信息学工具分析UBE2L6在泛癌及胰腺癌中的表达

从UCSC Xena (<https://xenabrowser.net/datapages>)下载泛癌数据,将经过Toil流程统一处理的TCGA和GTEx的TPM格式的RNA-seq数据进行Log2转换,用R(4.0.2)软件的“limma”包分析UBE2L6在泛癌中的差异表达,“ggplot2”包可视化其差异表达。进一步在GEO数据集(Gene Expression Omnibus DataSets, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)下载GPL570文件,及GSE15471(包含39例胰腺癌组织及相应的癌旁组织)和GSE16515(包含36例胰腺癌组织和16例癌旁组织)数据集,利用perl软件将探针名转换为基因名后,选取UBE2L6的表达数据用GraphPad Prism 8绘制散点图。

1.2 细胞培养及siRNA转染

所有胰腺癌细胞株BxPC-3、PANC-1、AsPC-1、SW1990、MIA PaCa-2及正常胰腺导管上皮细胞HPDE均购自美国ATCC细胞库。PANC-1、MIA PaCa-2、SW1990和HPDE、BxPC-3、AsPC-1细胞分别用含10%胎牛血清(Gbico,美国)的DMEM(Gbico,美国)和RPMI 1640(Gbico,美国)培养基置于37℃的5%CO₂培养箱培养。采用Lipofectamine 2000(Invitrogen,美国)将UBE2L6的siRNA(Ribobio,中国)及阴性对照(negative control, NC)转染入PANC-1和AsPC-1细胞内,48h后进行实时荧光定量PCR检测或细胞功能实验。

1.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

用RNA-easy Isolation Reagent试剂盒(Vazyme,中国)提取总RNA,并用分光光度计测定产物纯度及浓度。然后用HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)逆转录试剂盒(Vazyme,中国)和ChamQ™ Universal SYBR® qPCR

Master Mix 试剂盒 (Vazyme, 中国) 进行 qPCR 检测, 具体操作详见说明书。本研究设计引物序列如下: UBE2L6 F: 5'-TGG ACG AGA ACG GAC AGA TTT-3', R: 5'-GGC TCC CTG ATA TTC GGT CTA TT-3'; 内参基因 GAPDH F: 5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3', R: 5'-GGG GTC GTT GAT GGC AAC A-3'。所有引物由上海生工生物股份有限公司合成。

1.4 CCK-8 细胞增殖实验

用 CCK-8 试剂盒 (Bosterbio, 中国) 检测胰腺癌细胞的增殖能力。PANC-1 和 AsPC-1 细胞转染入 siRNA 48 h 后以 2×10^3 孔接种于 96 孔板中, 在 37 °C 的 5% CO₂ 培养箱中培养 6、24、48、72、96 h 后弃除原培养基, 每孔加入 CCK-8 稀释液 (CCK-8: 培养基=1:10) 110 μ L, 置于培养箱孵育 2 h 后测定 450 nm 波长下的吸光度。

1.5 克隆形成实验

将 siRNA 转染入 PANC-1 及 AsPC-1 细胞 48 h 后, 消化重悬细胞并按 800/孔接种于 6 孔板中, 加入含 10% 胎牛血清的培养基 2 mL, 置于培养箱中培养 12~14 d, 磷酸盐缓冲液漂洗后以 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min, 然后以 0.1% 结晶紫染色 30 min 后在显微镜下拍照。

1.6 Transwell 迁移及侵袭实验

PANC-1 及 AsPC-1 细胞转染入 siRNA 48 h 后, 细胞消化重悬并以无血清培养基 200 μ L 稀释后按 5×10^4 孔接种于 Transwell 上室中 (侵袭实验预先在上室加入 Matrigel 胶 60 μ L, Matrigel: 无血清培养基=1:8), 下室加入 600 μ L 含 20% 胎牛血清的培养基, 置于培养箱中培养 16~24 h, 磷酸盐缓冲液漂洗后以 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min, 然后以 0.1% 结晶紫染色 30 min 后在显微镜下拍照。

1.7 分子相关性分析、蛋白相互作用及基因富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)

分子相关性分析: 将 TCGA 数据库中 UBE2L6 的表达按中位数分为高表达组和低表达组, Spearman 相关性分析寻找高风险组中相关性最大的基因, 并用 R (4.0.2) 软件的 “ggplot2” 包进行可视化。蛋白互作分析: 利用 string 数据库 (<https://www.string-db.org/>) 构建 UBE2L6 的蛋白相互作用网络图。GSEA 富集分析: 根据 TCGA 数据库中 UBE2L6 的 mRNA 表达中位数, 将其分为高表达组和低表达组, 使用 GSEA 3.0 软件中的 KEGG 基因集 GeneSetsDebates: C2. CP. KEGG. V6.2. Symbols. gmt

(Curated) 进行 GSEA 富集分析, 设定循环次数为 1 000 次。以错误发现率 (false discovery rate, FDR) <0.25, $P < 0.05$ 为显著富集的基因集合, 进一步筛选与 UBE2L6 密切相关的基因集用 “ggplot2” 进行多基因富集分析及可视化。

1.8 UBE2L6 表达水平与胰腺癌患者的临床病理相关性分析

从 TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov>) 下载胰腺癌的转录组、基因表达量、HTSeq-FPKM 及临床数据, 数据集截止到 2021 年 4 月 20 日。胰腺癌临床数据纳入标准: (1) 病理确诊为胰腺腺癌 (pancreatic adenocarcinoma, PAAD); (2) 临床相关资料完整。除去部分信息缺失的个体, 将 168 例胰腺癌纳入本研究。根据 UBE2L6 的表达平均值分为高表达组和低表达组, 用 SPSS 26.0 软件分析其与临床病理的相关性。用 R (4.0.2) 软件的 “Survival” 包对患者的年龄、性别、分级、肿瘤分期、淋巴结转移、UBE2L6 表达水平等指标进行单因素和多因素 Cox 回归分析, 探讨其对胰腺癌预后的影响。同时, 提取 TCGA (胰腺癌) 和 GTEx (正常组织) 的 RNA-seq 数据 (需要 Log₂ 转换), 用 R (4.0.2) 软件的 “pROC” 包绘制受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC), 分析 UBE2L6 对胰腺癌的潜在诊断价值。利用基因表达谱交互式分析数据库 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA) (<http://gepia.cancer-pku.cn>) 的 Kaplan-Meier 生存分析评估 UBE2L6 对胰腺癌的预后价值。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析, 用 GraphPad Prism 8 绘制统计图。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验; 不符合正态分布的计量资料以中位数 (四分位间距) [M (IQR)] 表示, 组间比较采用 Mann-Whitney U 秩和检验; 计数资料的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法; 采用重复测量方差分析比较组内及组间不同时间细胞增殖能力的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UBE2L6 在泛癌中的表达

分析来自 TCGA 及 GTEx 数据库的数据, 发现

UBE2L6在胰腺癌、膀胱尿路上皮癌、乳腺浸润癌、宫颈鳞癌和腺癌、胆管癌、结肠癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤、食管癌、多形成性胶质细胞瘤、头颈鳞状细胞癌、肾嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头

状细胞癌、急性髓细胞样白血病、脑低级别胶质瘤、肝细胞肝癌、卵巢浆液性囊腺癌、前列腺癌、直肠腺癌、皮肤黑色素瘤、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、胸腺癌等24种癌症中表达增高(图1)。

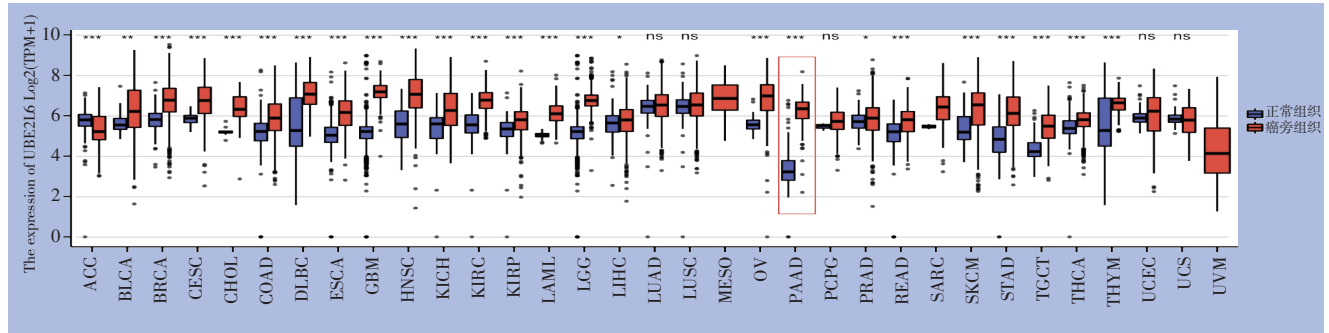


图1 UBE2L6在泛癌中的表达
Figure 1 Expressions of UBE2L6 in pan-cancer

2.2 UBE2L6在胰腺癌组织及细胞系中的表达

为了探讨UBE2L6在胰腺癌组织中的表达情况,分析其在GEO数据集中的表达,发现UBE2L6在胰腺癌组织中的表达水平相较于癌旁组织显著增高(GSE15471: $t=6.549, P<0.001$, GSE16515: $t=4.502, P<0.001$) (图2A-B)。同时,qRT-PCR检测

显示,相比于正常胰腺上皮细胞HPDE,UBE2L6在胰腺癌细胞系BxPC-3 ($t=33.82, P<0.0001$)、PANC-1 ($t=7.36, P=0.0018$)、AsPC-1 ($t=9.61, P=0.0007$)、SW1990 ($t=10.26, P=0.0005$)及MIA PaCa-2 ($t=12.65, P=0.0002$)中表达均升高(图2C)。

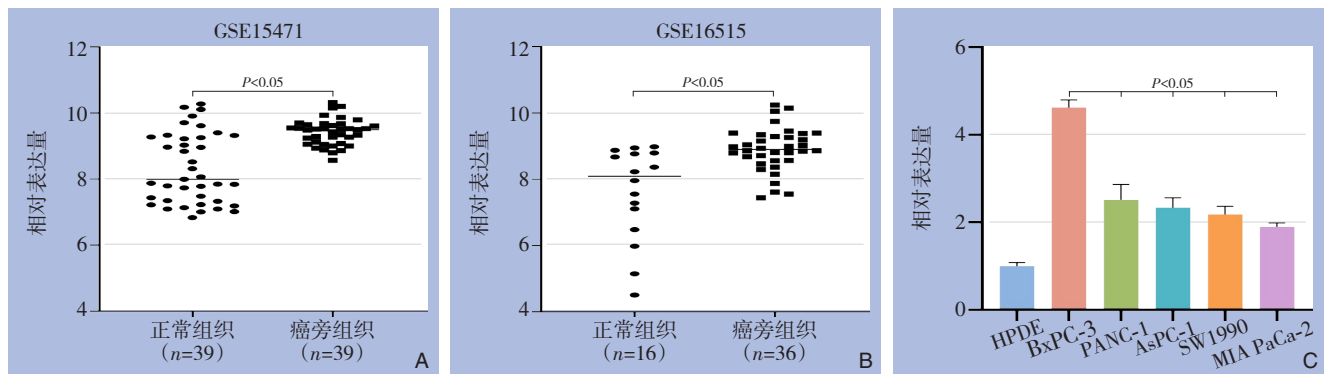


图2 UBE2L6在胰腺癌组织及细胞系中的表达 A: UBE2L6在GSE15471中的表达水平; B: UBE2L6在GSE16515中的表达水平; C: 胰腺癌细胞中UBE2L6的相对mRNA表达

Figure 2 Expressions of UBE2L6 in pancreatic cancer tissues and cell lines A: Expression of UBE2L6 in GSE15471; B: Expression of UBE2L6 in GSE16515; C: Relative mRNA expression of UBE2L6 in pancreatic cancer cell lines

2.3 UBE2L6促进胰腺癌的增殖、迁移及侵袭

为探讨UBE2L6对胰腺癌增殖、迁移及侵袭等生物学功能的影响,设计了针对UBE2L6靶序列的siRNA(GCTGGTGAA TAG ACC GAA T)。qRT-PCR检测提示,在PANC-1及AsPC-1细胞中转染UBE2L6的siRNA能明显下调其表达水平($t=39.18, P<0.0001$; $t=47.87, P<0.0001$) (图3A)。随后,将siRNA转染入PANC-1及AsPC-1细胞行CCK-8、

克隆平板及Transwell实验。结果显示,同NC组比较,si-UBE2L6组的细胞增殖能力(均 $P<0.05$)及克隆形成能力均明显下降($t=9.169, P=0.000786$; $t=7.547, P=0.001652$) (图3B-C),细胞迁移能力($t=6.510, P=0.002874$; $t=7.562, P=0.001639$)及侵袭能力($t=9.999, P=0.000562$; $t=9.651, P=0.000645$)亦明显下降(图3D-E)。

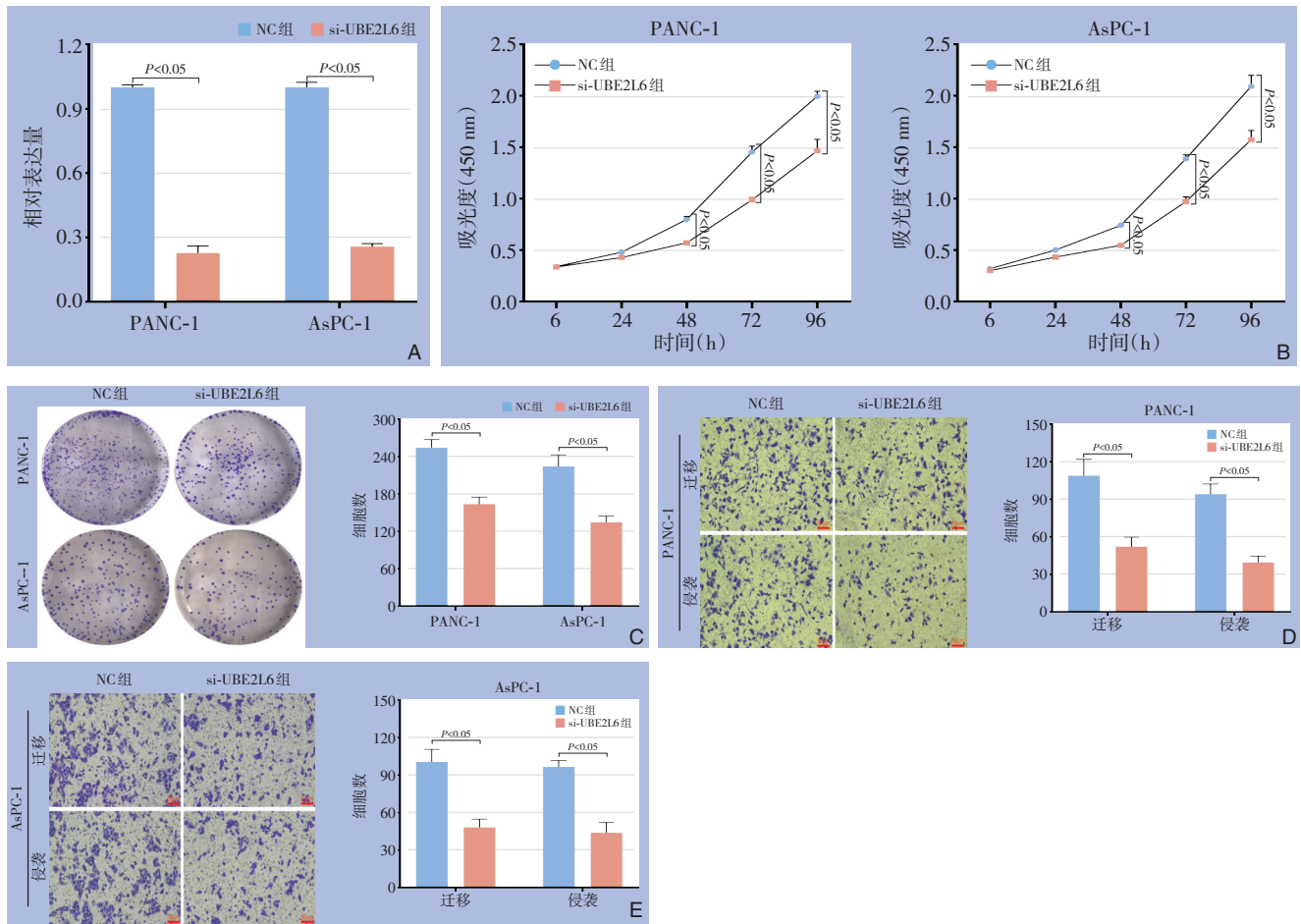


图3 UBE2L6对胰腺癌细胞PANC-1和AsPC-1的增殖、迁移及侵袭的影响 A: 在UBE2L6敲低的PANC-1和AsPC-1细胞中UBE2L6的相对mRNA表达水平; B: CCK-8检测PANC-1和AsPC-1细胞的增殖; C: 克隆平板实验检测PANC-1和AsPC-1细胞的克隆形成; D: Transwell迁移实验检测PANC-1和AsPC-1细胞的迁移; E: Transwell侵袭实验检测PANC-1和AsPC-1细胞的侵袭

Figure 3 Influences of UBE2L6 on proliferation, migration, and invasion of pancreatic cancer PANC-1 and AsPC-1 cells

A: Relative mRNA expression of UBE2L6 in UBE2L6-knockdown PANC-1 and AsPC-1 cells; B: The proliferation of PANC-1 and AsPC-1 cells detected by CCK-8 assay; C: The colony-forming capacity of PANC-1 and AsPC-1 cells detected by colony formation assay; D: The migration of PANC-1 and AsPC-1 cells detected by Transwell migration assay; E: The invasion of PANC-1 and AsPC-1 cells detected by Transwell invasion assay

2.4 UBE2L6的分子相关性、蛋白相互作用及GSEA富集分析

为进一步探讨UBE2L6的分子机制, Spearman相关性分析提示, B细胞淋巴瘤2相关蛋白A1(BCL2A1)与UBE2L6的相关性最大($r=0.442$) (图4A)。蛋白相互作用分析显示, 排名前10位的关键蛋白分别为HERC6、RPS27A、HERC5、UBA52、ISG15、UBA7、DDX58、UBC、UBB、ARIH1 (图4B)。同时, GSEA富集分析提示, UBE2L6与肿瘤及免疫微环境等通路密切相关, ggplot2可视化展现10个[antigen processing and

presentation, 标准化富集分数(normalized enrichment score, NES) =2.201; apoptosis, NES=2.153; B cell receptor signaling pathway, NES=2.049; Chemokine signaling pathway, NES=2.216; cytokine-cytokine receptor interaction, NES=2.223; MAPK signaling pathway, NES=2.108; natural killer cell mediated cytotoxicity, NES=2.207; pancreatic cancer, NES=2.056; pathways in cancer, NES=2.059; T cell receptor signaling pathway, NES=2.072]与癌症及肿瘤免疫微环境相关且NES \geq 2.0、FDR<0.001的数据集 (图4C)。

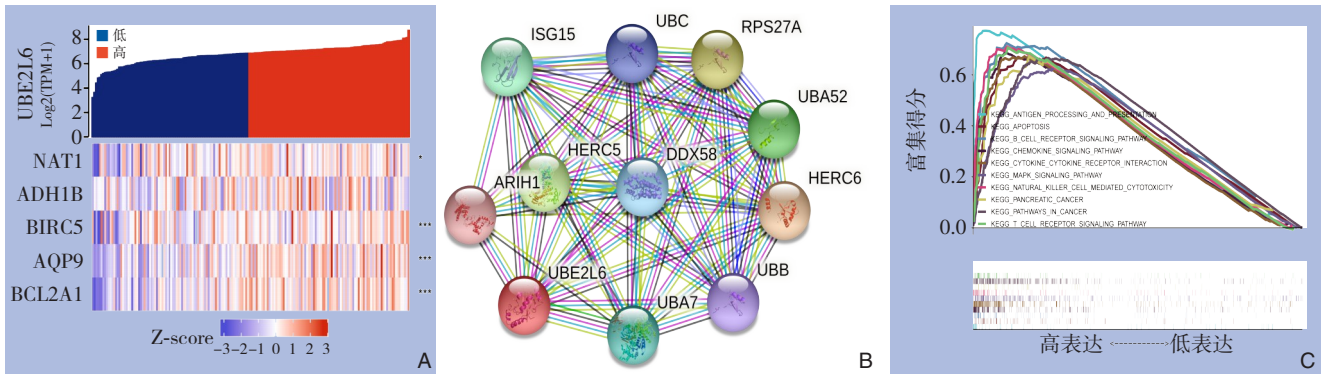


图4 UBE2L6的分子相关性、蛋白相互作用及多基因GSEA富集分析 A: UBE2L6分子相关性热图; B: UBE2L6的蛋白相互作用网络图; C: UBE2L6的多基因GSEA富集分析

Figure 4 Molecular correlation heatmap, protein interaction, and multi-gene sets enrichment analysis of UBE2L6 A: Molecular correlation heatmap of UBE2L6; B: Protein interaction network of UBE2L6; C: Multi-gene sets enrichment analysis of UBE2L6

2.5 UBE2L6表达水平与胰腺癌患者的临床病理相关性及其预后分析

临床病理相关性分析结果显示, UBE2L6的高表达与胰腺癌组织病理学分级相关 ($\chi^2=6.966, P=0.031$) (表1)。单因素Cox回归分析表明, 患者年龄、有无淋巴结转移及UBE2L6的表达水平与胰腺癌患者的预后相关 ($P<0.05$); 但是, 多因素Cox回归分析提示年龄及有无淋巴结转移是胰腺癌患者的独立危险因素 ($P<0.05$), UBE2L6不是其独立预

后因素 ($P>0.05$) (表2)。进一步利用TCGA数据库的胰腺癌数据进行GSEA富集分析, 显示UBE2L6与胰腺癌的发生发展密切相关 ($NES=2.056, FDR=0.000$) (图5A)。同时, ROC曲线分析提示UBE2L6对胰腺癌具有较高的临床诊断价值 ($AUC=0.970, 95\% CI=0.950\sim 0.989$) (图5B), 来自GEPIA数据库的生存曲线分析亦提示UBE2L6的表达水平与胰腺癌患者的预后相关 ($P<0.05$) (图5C)。

表1 UBE2L6表达水平与胰腺癌临床病理特征的关系[n (%)]

Table 1 Relationship between the expression of UBE2L6 and the clinicopathologic characteristics of pancreatic cancer [n (%)]

临床病理特征	n	低表达(n=97)	高表达(n=71)	χ^2	P
年龄(岁)					
<60	49	30(30.93)	19(26.76)	0.345	0.557
≥60	119	67(69.07)	52(73.24)		
性别				0.076	0.782
男	92	54(55.67)	38(53.52)		
女	76	43(44.33)	33(46.48)		
T分期				0.59	0.442
T1~T2	28	18(18.56)	10(14.08)		
T3~T4	140	79(81.44)	61(85.92)		
淋巴结转移				0.42	0.517
无	47	29(29.90)	18(25.35)		
有	121	68(70.10)	53(74.65)		
组织病理学分级				6.966	0.031
1级	28	22(22.68)	6(8.45)		
2级	90	51(52.58)	39(54.93)		
3~4级	50	24(24.74)	26(36.62)		
肿瘤分期				4.39	0.111
1期	18	13(13.40)	5(7.04)		
2期	143	78(80.41)	65(91.55)		
3~4期	7	6(6.19)	1(1.41)		

表 2 单因素及多因素 Cox 回归分析

Table 2 Univariate and multivariate Cox regression analysis

变量	单因素		多因素	
	HR(95% CI)	P	HR(95% CI)	P
年龄	1.028(1.005~1.051)	0.016	1.024(1.002~1.046)	0.035
性别	1.280(0.834~1.965)	0.259	1.218(0.786~1.890)	0.378
分级	1.331(0.981~1.806)	0.066	1.114(0.800~1.551)	0.522
肿瘤分期	1.294(0.862~1.942)	0.214	0.971(0.492~1.918)	0.933
T分期	1.624(0.977~2.701)	0.062	1.369(0.704~2.660)	0.354
淋巴结转移	2.258(1.308~3.898)	0.003	1.794(1.016~3.169)	0.044
UBE2L6	1.610(1.117~2.319)	0.011	1.350(0.923~1.973)	0.121

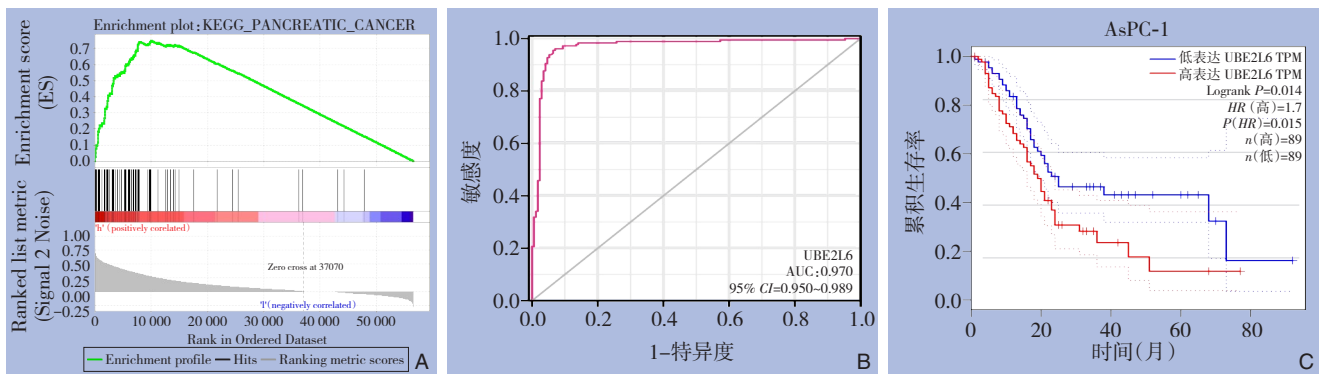


图 5 UBE2L6与胰腺癌的关系 A: UBE2L6富集于胰腺癌通路; B: UBE2L6的ROC曲线; C: UBE2L6的生存曲线

Figure 5 Relationship between UBE2L6 and pancreatic cancer A: Enrichment of UBE2L6 in pancreatic cancer signaling pathway; B: ROC curve of UBE2L6; C: Kaplan-Meier survival curve of UBE2L6

3 讨论

根据国际癌症研究中心的数据^[14], 2020年全球发生了1 930万新癌症病例和近1 000万的癌症死亡病例。预计2040年全球癌症负担将达到2 840万例, 比2020年增加47%。癌症的异质性是其诊疗困难的难点所在, 泛癌的研究可以探讨不同肿瘤间的差异及相似性, 对肿瘤的分子机制、预后评价及个体化临床诊疗有指导意义^[15-16]。为探索UBE2L6在泛癌中的表达情况, 本研究分析了TCGA及GTEx数据库中33种肿瘤组织及正常组织的RNA-seq数据, 首次发现UBE2L6在胰腺癌等24种癌症中表达增高, 提示其可能是一个重要的癌症基因, 为后续揭示其在肿瘤中的作用提供了研究基础。

UBE2L6作为一种翻译后修饰的关键酶参与了蛋白质的泛素化修饰^[17], 在肿瘤细胞凋亡等病理生理过程中发挥作用^[18]。Murakami等^[13]的研究提示, UBE2L6在顺铂耐药的肿瘤细胞系中表达上调, 本研究结果也显示, UBE2L6在结直肠癌、乳腺癌、肾细胞癌、脑胶质瘤等组织或细胞系中表

达上调, 表明UBE2L6可能在这些肿瘤中扮演着促癌基因的角色。然而, Liang等^[12]的研究却发现UBE2L6在FLT3-ITD突变的急性髓系白血病中可能起抑癌作用, 这提示UBE2L6具有组织特异度表达的特征, 在不同类型的肿瘤中可能发挥不同的生物学功能。GEO数据库存储了大量高通量测序数据, 可信度高, 挖掘及分析整理这些数据可以为各种疾病的研究提供重要线索^[19-20]。并且, 多维度数据挖掘及分析验证也有利于排除样本选择偏倚, 增加数据可信度^[21], 而恰当的实验验证又可以更确切地佐证研究结果^[22-23]。本研究利用多个在线数据集分析发现UBE2L6在胰腺癌组织中高表达, 并通过qRT-PCR实验验证其在胰腺癌细胞系中亦呈现高表达。为进一步了解UBE2L6在胰腺癌中的生物学功能, 笔者构建靶向UBE2L6的siRNA进行细胞功能学实验, 结果显示, UBE2L6在体外促进了胰腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力, 首次揭示了UBE2L6在胰腺癌中的促癌作用, 并具有成为胰腺癌治疗靶点的潜力, 为后续分子生物学实验研究奠定了基础。

目前,生物信息学技术已广泛应用于生物医学领域,为分子生物学机制研究提供了新的见解^[24-25]。本研究利用R语言等生物信息学技术探讨了UBE2L6可能潜在的分子调控机制,发现其与BCL2A1的相关性最大,而BCL2A1是重要的细胞死亡调节剂和核因子 κ B(NF- κ B)的靶基因,在多种血液系统恶性肿瘤和实体癌症中过度表达对抗凋亡^[26-27],并有助于部分肿瘤的化疗耐药而促进肿瘤进展^[28]。研究^[12,17]表明,UBE2L6可以通过泛素化途径降解并抑制C-myc的表达,也可以与塞内卡病毒A的3D聚合酶相互作用并泛素化RNA依赖性RNA聚合酶。本研究中UBE2L6相互作用蛋白分析亦提示,UBE2L6可能与HERC6等与泛素相关的蛋白存在相互作用^[29],进而通过蛋白质降解、细胞周期调节等途径对肿瘤的发展产生影响^[30]。进一步的GSEA富集分析显示UBE2L6主要富集在MAPK通路、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、细胞因子受体、抗原加工与呈递、B细胞及T细胞受体等信号通路,揭示其还可能通过调节免疫微环境参与对肿瘤的调控^[31-32]。

为了探索,笔者通过GSEA富集分析发现,UBE2L6在胰腺癌中显著富集(FDR<0.05),说明UBE2L6参与胰腺癌的病理生理过程,有一定的临床研究价值。另外,ROC曲线分析显示UBE2L6的AUC>0.9,提示其在胰腺癌中具有较高的诊断效能,而Kaplan-Meier生存分析也发现其表达水平与胰腺癌的不良预后紧密相关($P<0.05$),预示着UBE2L6表达量高的患者的中位生存时间可能更短。UBE2L6与胰腺癌的临床病理相关性分析进一步提示,虽然UBE2L6的表达水平与患者的年龄、性别、淋巴结转移和TNM临床分期等无关($P>0.05$),但却与胰腺癌的组织病理学分级显著相关($P<0.05$),意味着有血管浸润等组织病理学分级晚的胰腺癌患者其UBE2L6的表达水平也更高。并且,后续的单因素Cox回归分析亦发现UBE2L6的低表达可以改善胰腺癌患者的预后,这些结果都表明UBE2L6在胰腺癌的进展中可能扮演着癌基因的角色,开发靶向抑制UBE2L6表达的药物可能具有治疗胰腺癌的潜力。遗憾的是,受到TCGA数据库样本量的限制,本研究的多因素Cox回归分析显示UBE2L6不是胰腺癌的独立预后因素,这可能与本次纳入的样本量较少有关,有待进一步的大数据库整合研究证实。

综上,本研究确定了UBE2L6在泛癌中普遍高表达,其高表达与胰腺癌的发生发展关系密切,

并与其诊断及预后显著相关。同时,UBE2L6可促进胰腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭,其分子机制可能与细胞凋亡、泛素化修饰、MAPK信号通路以及对肿瘤免疫微环境的调节等有关。未来,需要收集更多的临床数据并增加生物学实验进一步探索UBE2L6在胰腺癌中的功能及分子机制。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Feng RM, Zong YN, Cao SM, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics?[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2019, 39(1): 22. doi: 10.1186/s40880-019-0368-6.
- [2] Cao M, Li H, Sun D, et al. Cancer burden of major cancers in China: A need for sustainable actions[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2020, 40(5):205-210. doi: 10.1002/cac2.12025.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer Statistics, 2021[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1):7-33. doi: 10.3322/caac.21654.
- [4] Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors[J]. *World J Oncol*, 2019, 10(1):10-27. doi: 10.14740/wjon1166.
- [5] 陈伟业,邢宏松,江帆,等.长链非编码RNA HOST2对胰腺癌细胞增殖迁移和侵袭的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2019, 28(3): 285-291. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.03.006.
Chen WY, Xing HS, Jiang F, et al. Effects of long non-coding RNA HOST2 on proliferation, migration and invasion in pancreatic cancer cells[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2019, 28(3): 285-291. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.03.006.
- [6] 王欢,金钢.胰腺癌精准治疗的现状和展望[J]. *中国普通外科杂志*, 2021, 30(9): 997-1005. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2021.09.001.
Wang H, Jin G. Current status and future perspective of precision medicine in pancreatic cancer treatment[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2021, 30(9):997-1005. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2021.09.001.
- [7] Huang J, Lok V, Ngai CH, et al. Worldwide Burden of, Risk Factors for, and Trends in Pancreatic Cancer[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(3):744-754. doi: 10.1053/j.gastro.2020.10.007.
- [8] Qian Y, Gong Y, Fan Z, et al. Molecular alterations and targeted therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1):130. doi: 10.1186/s13045-020-00958-3.
- [9] 张波,徐涛,徐浩,等.基于生物信息学胰腺癌关键基因的筛选及支持向量机诊断模型的构建[J]. *中国普通外科杂志*, 2021, 30(3):276-285. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2021.03.005.
Zhang B, Xu T, Xu H, et al. Identification of hub genes in pancreatic adenocarcinoma and construction of a support vector machine diagnostic classifier based on bioinformatics approaches[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2021, 30(3): 276-285. doi:

- 10.7659/j.issn.1005-6947.2021.03.005.
- [10] Golan T, Hammel P, Reni M, et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(4):317-327. doi: 10.1056/NEJMoa1903387.
- [11] Orfali N, Shan-Krauer D, O'Donovan T R, et al. Inhibition of UBE2L6 attenuates ISGylation and impedes ATRA-induced differentiation of leukemic cells[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(6):1297-1309. doi: 10.1002/1878-0261.12614.
- [12] Liang C, Peng CJ, Wang LN, et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid suppress the expression of FLT3-ITD[J]. *Leuk Lymphoma*, 2020, 61(11): 2692-2699. doi: 10.1080/10428194.2020.1775212.
- [13] Murakami M, Izumi H, Kurita T, et al. UBE2L6 is Involved in Cisplatin Resistance by Regulating the Transcription of ABCB6[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2020, 20(12): 1487-1496. doi: 10.2174/1871520620666200424130934.
- [14] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
- [15] Shen YT, Huang X, Zhang G, et al. Pan-Cancer Prognostic Role and Targeting Potential of the Estrogen-Progesterone Axis[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:636365. doi: 10.3389/fonc.2021.636365.
- [16] Larsen BM, Kannan M, Langer LF, et al. A pan-cancer organoid platform for precision medicine[J]. *Cell Rep*, 2021, 36(4):109429. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109429.
- [17] Li L, Bai J, Fan H, et al. E2 ubiquitin-conjugating enzyme UBE2L6 promotes Senecavirus A proliferation by stabilizing the viral RNA polymerase[J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(10):e1008970. doi: 10.1371/journal.ppat.1008970.
- [18] Zhang Q, Qiao L, Wang X, et al. UHRF1 epigenetically down-regulates UbcH8 to inhibit apoptosis in cervical cancer cells[J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(3): 300-308. doi: 10.1080/15384101.2017.1403686.
- [19] He S, Shi J, Mao J, et al. The expression of miR-375 in prostate cancer: A study based on GEO, TCGA data and bioinformatics analysis[J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(6):152375. doi: 10.1016/j.prp.2019.03.004.
- [20] Zhao J, Guo C, Ma Z, et al. Identification of a novel gene expression signature associated with overall survival in patients with lung adenocarcinoma: A comprehensive analysis based on TCGA and GEO databases[J]. *Lung Cancer*, 2020, 149:90-96. doi: 10.1016/j.lungcan.2020.09.014.
- [21] Zhang B, Tang B, Gao J, et al. A hypoxia-related signature for clinically predicting diagnosis, prognosis and immune microenvironment of hepatocellular carcinoma patients[J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1):342. doi: 10.1186/s12967-020-02492-9.
- [22] Zhang L, Huang Y, Ling J, et al. Is Integrin Subunit Alpha 2 Expression a Prognostic Factor for Liver Carcinoma? A Validation Experiment Based on Bioinformatics Analysis[J]. *Pathol Oncol Res*, 2019, 25(4):1545-1552. doi: 10.1007/s12253-018-0551-0.
- [23] Fan D, He X, Bian Y, et al. Triptolide Modulates TREM-1 Signal Pathway to Inhibit the Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 498. doi: 10.3390/ijms17040498.
- [24] Jiang X, Xu Z, Du Y, et al. Bioinformatics analysis reveals novel hub gene pathways associated with IgA nephropathy[J]. *Eur J Med Res*, 2020, 25(1):40. doi: 10.1186/s40001-020-00441-2.
- [25] Demircioglu D, Cukuroglu E, Kindermans M, et al. A Pan-cancer Transcriptome Analysis Reveals Pervasive Regulation through Alternative Promoters[J]. *Cell*, 2019, 178(6): 1465-1477. doi: 10.1016/j.cell.2019.08.018.
- [26] Vogler M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(1):67-74. doi: 10.1038/cdd.2011.158.
- [27] Hollevoet K, Antignani A, Fitzgerald D J, et al. Combining the antimesothelin immunotoxin SS1P with the BH3-mimetic ABT-737 induces cell death in SS1P-resistant pancreatic cancer cells[J]. *J Immunother*, 2014, 37(1): 8-15. doi: 10.1097/CJI.000000000000010.
- [28] Lionnard L, Duc P, Brennan M S, et al. TRIM17 and TRIM28 antagonistically regulate the ubiquitination and anti-apoptotic activity of BCL2A1[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(5): 902-917. doi: 10.1038/s41418-018-0169-5.
- [29] Wang F, Chen X, Yu X, et al. Degradation of CCNB1 mediated by APC11 through UBA52 ubiquitination promotes cell cycle progression and proliferation of non-small cell lung cancer cells[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(11):7166-7185.
- [30] Kim J, Kim Y, Choi H, et al. Ubiquitin C decrement plays a pivotal role in replicative senescence of bone marrow mesenchymal stromal cells[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 139. doi: 10.1038/s41419-017-0032-5.
- [31] Elyada E, Bolisetty M, Laise P, et al. Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(8): 1102-1123. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0094.
- [32] Yamamoto K, Venida A, Yano J, et al. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I[J]. *Nature*, 2020, 581(7806): 100-105. doi: 10.1038/s41586-020-2229-5.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式:刘涛,周磊,肖晶晶,等.泛素/ISG15结合酶E2L6在胰腺癌中的作用及其临床价值分析[J].中国普通外科杂志,2022,31(3):319-328. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.005

Cite this article as: Liu T, Zhou L, Xiao JJ, et al. Analysis of the function of ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2L6 in pancreatic cancer and its clinical value[J]. *Chin J Gen Surg*, 2022, 31(3):319-328. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.005