

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.08.004

TRIM59 通过结合 BCLAF1 调控人皮肤黑色素瘤 SK-MEL-2 细胞的恶性生物学行为

刘建敏, 周亚净, 何润之, 段春胜(邢台市人民医院 手足外科, 河北 邢台 054001)

[摘要] **目的:** 探究三结构域蛋白 59 (TRIM59) 调控人皮肤黑色素瘤细胞 SK-MEL-2 增殖、细胞周期、凋亡及迁移侵袭的作用机制, 及其与 Bcl2 相关转录因子 1 (BCLAF1) 之间的关系。 **方法:** qPCR 和 WB 法检测人表皮黑色素细胞 HEMn-LP、人皮肤黑色素瘤细胞 SK-MEL-2、UACC903、A375 及 36 例邢台市人民医院 2019 年 2 月至 2021 年 7 月收集的皮肤黑色素瘤组织中 TRIM59 的 mRNA 和蛋白表达, 使用脂质体将 si-con、si-TRIM59 转染至 SK-MEL-2 细胞中, WB 法检测干扰 TRIM59 表达对细胞中周期蛋白 D1 (CCND1)、细胞周期素依赖性激酶 2 (CDK2)、肿瘤抑制蛋白基因 (TP53) 和 BCLAF1 蛋白表达的影响, CCK-8 法、流式细胞术、划痕愈合实验、Transwell 实验检测对细胞的活性、凋亡、迁移和侵袭的影响, 免疫共沉淀 (Co-IP) 实验检测对细胞中 TRIM59 蛋白与 BCLAF1 结合能力的影响。 **结果:** 与 HEMn-LP 细胞相比, SK-MEL-2、UACC903、A375 细胞中 TRIM59 mRNA 和 TRIM59、BCLAF1 蛋白均呈高表达 (均 $P < 0.05$), SK-MEL-2 细胞中 TRIM59 表达水平最高。相较于 si-con 组和 Normal 组, 沉默 TRIM59 后, SK-MEL-2 细胞的活性显著降低, 细胞周期阻滞于 G2 期, CCND1、CDK2 的蛋白表达显著降低, TP53 蛋白和细胞凋亡率均显著升高, 划痕抑制率明显升高, 迁移侵袭细胞数明显降低 (均 $P < 0.05$)。免疫共沉淀实验结果显示, TRIM59 与 BCLAF1 之间存在蛋白结合关系。TRIM59 与 BCLAF1 在肿瘤组织中的表达呈显著的正相关 ($r = 0.878, P < 0.001$)。 **结论:** 干扰 TRIM59 表达能够抑制人皮肤黑色素瘤 SK-MEL-2 细胞的增殖、迁移和侵袭而促进凋亡, 抑制 SK-MEL-2 细胞的恶性生物学行为, 其机制可能与 TRIM59 结合 BCLAF1 有关。

[关键词] 皮肤黑色素瘤; SK-MEL-2 细胞; TRIM59; BCLAF1; 蛋白结合; 恶性生物学行为

[中图分类号] R739.5; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)08-0724-08

TRIM59 regulates malignant biological behaviors of skin cutaneous melanoma cells SK-MEL-2 through combination with BCLAF1

LIU Jianmin, ZHOU Yajing, HE Runzhi, DUAN Chunsheng (Department of Hand and Foot Surgery, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054001, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of tripartite motif-containing 59 (TRIM59) regulating the proliferation, cell cycle, apoptosis, migration and invasion of human skin melanoma cells SK-MEL-2, and its relationship with Bcl2-associated transcription factor (BCLAF1). **Methods:** qPCR and WB assay were used to measure the mRNA and protein expression of TRIM59 in human epidermal melanocytes HEMN-LP, human skin melanoma cells SK-MEL-2, UACC903, A375, and 36 cases of human skin melanoma tissues collected from February 2019 to July 2021 in Xingtai people's Hospital. Si-con and si-TRIM59 were transfected into SK-MEL-2 cells using liposomes. WB assay was used to detect the effects of interference with the expression of TRIM59 on cyclin D1 (CCND1), cyclin-dependent kinase 2 (CDK2), tumor suppressor protein gene (TP53) and BCLAF1 protein expression. CCK-8 assay, flow cytometry, scratch test and Transwell test were used to detect cell activity, apoptosis, migration and invasion. The binding ability of TRIM59 protein and BCLAF1 was detected by Co-IP assay. **Results:** Compared with the HEMN-LP group, the mRNA and protein expression of TRIM59 BCLAF1 protein in SK-MEL-2, UACC903 and A375 cells were significantly increased ($P < 0.05$). The expression level of TRIM59 in SK-MEL-2 cells were the highest. Compared with the si-con group and the Normal group, after silencing TRIM59, the activity of SK-MEL-2 cells was significantly decreased; the G2 phase of the cell cycle was blocked; the protein expressions of CCND1 and CDK2 were decreased significantly; the TP53 protein and apoptosis rate were significantly increased; the scratch inhibition rate was significantly increased, and the numbers of migration and invasion cells were significantly decreased. (all $P < 0.05$).

[基金项目] 邢台市重点研发计划资助项目 (No. 2020ZC233)

[作者简介] 刘建敏 (1981—), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事肢端疾病的研究, E-mail: thoosmo171@21cn.com

[通信作者] 刘建敏, E-mail: thoosmo171@21cn.com

The results of co-immunoprecipitation experiments showed that there was a protein-binding relationship between TRIM59 and BCLAF1. There was a significant positive correlation between TRIM59 and BCLAF1 expression in tumor tissues ($r=0.878$, $P<0.001$).

Conclusion: Silencing TRIM59 expression could inhibit the proliferation, migration and invasion of skin cutaneous melanoma cells, promote apoptosis and inhibit the malignant biological behaviors of SK-MEL-2 cells. The mechanism may be related to the binding of TRIM59 with BCLAF1.

[Key words] skin melanoma; SK-MEL-2 cell; tripartite motif-containing 59 (TRIM59); Bcl2-associated transcription factor 1 (BCLAF1); protein binding; malignant biological behavior

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(8): 724-731. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.08.004]

黑色素瘤是由产生色素的黑色素细胞恶性转化、增殖而来。当黑色素瘤位于皮肤表皮的基底层,则被称为皮肤黑色素瘤,这是最常见的黑色素瘤^[1-2]。皮肤黑色素瘤的发病率在世界范围内呈逐年上升的趋势^[3]。因此,关于皮肤黑色素瘤发病的分子机制研究对其高效诊断、治疗甚至预防十分有必要。近年来发现,三结构域(tripartite motif, TRIM)家族蛋白通过调控肿瘤细胞的生物学行为来参与肿瘤的发生发展。三结构域蛋白59(tripartite motif-containing 59, TRIM59)是TRIM家族成员之一,其能够识别、结合特定的靶蛋白,调节蛋白的泛素化修饰,诱导靶蛋白进入蛋白酶体依赖的泛素降解过程,从而进一步调节靶蛋白参与的许多生物过程^[4]。研究^[4]发现,TRIM21可通过调控Wnt/ β -catenin信号通路增强卵巢癌细胞的增殖能力。TRIM59在肿瘤的发展过程中既具有促癌作用也有抑癌作用^[6],而其在皮肤黑色素瘤中的作用尚未可知。Bcl2相关转录因子1(Bcl2-associated transcription factor 1, BCLAF1)在多种细胞中发挥抗凋亡作用,但其在癌症中具有双重作用,其在皮肤黑色素瘤中的功能也尚不清楚。据以往研究^[7]推测BCLAF1在皮肤黑色素瘤中发挥致癌作用。通过Starbase网站分析发现,在黑色素瘤中TRIM59与BCLAF1的表达存在负相关性,采用RBPsuite预测到BCLAF1为TRIM59的蛋白结合基因之一。本研究旨在探究TRIM59调控黑色素瘤细胞增殖、凋亡、迁移侵袭的潜在机制,及其与BCLAF1之间的关系。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

36例人皮肤黑色素瘤组织来自2019年2月至2021年7月间于邢台市人民医院接受手术的皮肤黑色素瘤患者。本研究经医院伦理委员会审批通过[院科伦审:(2019)伦审第(04)号],所有患者均签署知情同意书。人表皮黑色素细胞HEMn-LP、人皮肤黑色素瘤细胞SK-MEL-2、UACC903和A375均购自美国菌种保藏中心,DMEM培养基购自北京索莱宝生物科技公司,总核糖核酸提取试剂(TRIZol)、

Lipofectamine™3000脂质体均购自美国Invitrogen公司,qPCR检测试剂盒购自南宁建成生物科技有限公司,兔抗TRIM59、周期蛋白D1(cyclin D1, CCND1)、细胞周期素依赖性激酶2(cyclin dependent kinase 2, CDK2)、人肿瘤抑制蛋白(human tumor protein P53, TP53)、Bcl2相关转录因子1(Bcl2-associated transcription factor 1, BCLAF1)多抗、HRP标记的二抗均购自上海艾博抗贸易有限公司,Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,细胞计数试剂盒(CCK-8)购自日本同仁化学研究所,迁移、侵袭Transwell小室购自美国Corning公司。

1.2 细胞培养与分组转染

HEMn-LP、SK-MEL-2、UACC903、A375细胞均使用含10%胎牛血清和1%的青链霉素双抗的DMEM培养基于37℃、5%CO₂的饱和湿度恒温细胞培养箱中常规培养,每2d更换一次培养液。

通过qPCR实验检测SK-MEL-2、UACC903和A375细胞中TRIM59 mRNA的表达水平,选择与HEMn-LP细胞相比TRIM59水平变化幅度最大的细胞(SK-MEL-2细胞)进行后续研究,进行分组、转染。采用siDirect version 2.0软件(<http://sidirect2.mai.jp/design.cgi>)设计si-TRIM59序列(5'-CCCUGAACAUUA CAGGCAATT-3')及其对照片段si-con,委托上海吉玛公司合成。将SK-MEL-2细胞分为3组,使用Lipofectamine™3000脂质体分别将si-TRIM59、si-con转染入细胞作为si-TRIM59组、si-con组,另一组不进行任何转染为Normal组,转染12h后更换新培养基再继续培养36h,共培养48h,qPCR法检测干扰是否成功。

1.3 qPCR法检测TRIM59、BCLAF1 mRNA在黑色素瘤组织与细胞中的表达

TRIZol液提取对数生长期细胞RNA或充分研磨的肿瘤组织中的总RNA,并将其反转录为cDNA,作为模板,-20℃保存备用。使用qPCR试剂盒检测模板中TRIM59的表达情况。GAPDH为内参,2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算TRIM59的相对表达量。GAPDH的正向引物为5'-CACCCACTCCTCCACCTTTG-3',反向引物为5'-

CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'; TRIM59 的正向引物为 5'-CACCCACTCCTCCACCTTTG-3', 反向引物为 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'; BCLAF1 的正向引物为 5'-TCTGGAATAGAAGGCACTCTAGG-3', 反向引物为 5'-ACCCTCGTCTTTTAGAACAGGA-3'。反应程序: 95 °C 预变性 50 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火并延伸 50 s, 共进行 40 次循环。

1.4 WB 法检测沉默 TRIM59 对 SK-MEL-2 细胞 TRIM59、CCND1、CDK2、TP53、BCLAF1 蛋白表达的影响

使用 RIPA 裂解液充分裂解各组细胞, 并提取总蛋白。使用 BCA 定量试剂盒对蛋白定量, 100 °C 沸水浴中使蛋白变性, 结束后, 用上清液做蛋白电泳上样模板行 SDS-PAGE, 再用转膜仪在 0 °C 下将胶上的蛋白转移至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭液于 37 °C 封闭膜 2 h, PBS 洗膜 3 次, 浸入 10 mL 稀释的一抗溶液中, 37 °C 反应 3 h, 洗膜后再浸入稀释的二抗溶液, 37 °C 反应 1.5 h, 洗膜, 用 ECL 试剂盒显影、曝光。Image J 软件分析蛋白条带的灰度值, 用目的蛋白灰度与内参蛋白灰度之比表示蛋白的相对表达量。

1.5 CCK-8 法检测沉默 TRIM59 对 SK-MEL-2 细胞增殖的影响

调整对数期的各组细胞至 0.5×10^5 个/mL, 接种至 96 孔板, 每孔 200 μ L。细胞培养箱中分别培养 24、48、72、96 h。取出细胞加入 10 μ L/孔的 CCK-8 溶液, 震荡混匀, 避光反应 25 min。用酶标仪检测 490 nm 处细胞悬液的光密度 (D) 值, 以 D 值代表细胞增殖水平。

1.6 流式细胞术检测沉默 TRIM59 对 SK-MEL-2 细胞周期与凋亡的影响

细胞周期: 收集对数期各组细胞, 用 PBS 洗涤 3 次。用预冷的 70% 乙醇固定, 4 °C 固定 30 min。洗涤, 用 RNase A 除去 RNA, 加入 PI 染色 (50 μ g/mL), 4 °C 避光培养 30 min。上流式细胞仪分析细胞周期的分布情况。

细胞凋亡: 用预冷的 PBS 溶液洗涤对数期的各组细胞 5 次, 再用结合缓冲液 (500 μ L) 悬浮。先加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC 室温避光反应 20 min, 再加入 5 μ L 的 PI 继续培养 15 min, 终止反应。300 目筛过滤, 上细胞流式仪检测分析细胞凋亡。细胞总凋亡率 = 早期凋亡率 + 晚期凋亡率。

1.7 划痕愈合实验检测沉默 TRIM59 对 SK-MEL-2 细胞迁移能力的影响

取对数期的细胞, 更换细胞培养液为含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液。培养约 12 h, 细胞铺满单层, 汇合度达 90% 以上, 用灭菌牙签垂直板底划线。洗

去划痕脱落的细胞, 用低血清培养基继续培养 24 h, 显微镜下观察划痕愈合的抑制情况。划痕抑制率 = $(\text{si-TRIM59 组宽度}_{0\text{h}} - \text{si-TRIM59 组宽度}_{24\text{h}}) / (\text{si-con 组宽度}_{0\text{h}} - \text{si-con 组宽度}_{24\text{h}}) \times 100\%$ 。

1.8 Transwell 实验检测沉默 TRIM59 对 SK-MEL-2 细胞迁移、侵袭能力的影响

将对数期的各组细胞, 用含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液饥饿处理 12 h, 调整细胞密度至 0.5×10^4 个/mL, 待用。用含人工基膜的 Transwell 小室检测细胞侵袭能力, 不含人工基膜的小室检测细胞迁移能力。按照 Transwell 小室说明书要求操作, 上室铺细胞, 下室加含 5% 胎牛血清的培养基, 培养 12 h。结束后, 4% 多聚甲醛固定, 0.5% 结晶紫溶液染色, 显微镜下观察细胞穿膜情况, 采用五点法计数穿膜细胞, 取平均值代表细胞的迁移或侵袭能力。

1.9 Co-IP 实验检测 TRIM59 与 BCLAF1 的蛋白结合能力

将对数期的各组细胞, 经 RIPA 处理后充分裂解, 8 500 \times g 离心 10 min, 取上清。将上清分别设为 input 组、IP: TRIM59 组、IP: BCLAF1 组。其中 input 组不添加任何抗体, IP: TRIM59 组加入 TRIM59 抗体, IP: BCLAF1 组加入 BCLAF1 抗体, 混匀, 4 °C 反应过夜。取出, 加入蛋白 A/G, 继续反应 5 h, 离心, 收集沉淀。PBS 充分清洗沉淀, 用上样缓冲液悬浮细胞, 煮沸变性, 取上清液, 用 WB 法检测 TRIM59、BCLAF1 的表达情况。

1.10 统计学处理

实验中的数据均用 SPSS23.0 处理。计量资料用均数 \pm 标准差 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据比较用单因素方差分析, 组内两两比较用 LSD- t 检验。两组数据比较用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

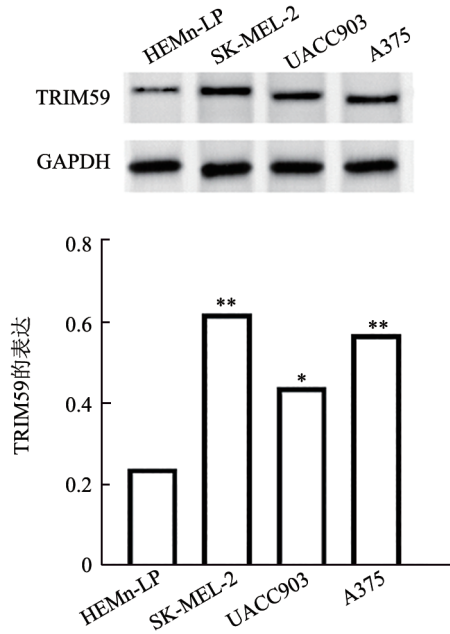
2.1 TRIM59 在人皮肤黑色素瘤细胞和黑色素细胞中的表达及其与患者存活率的关系

WB 法 (图 1) 和 qPCR (表 1) 检测结果显示, 与 HEMn-LP 组相比, SK-MEL-2、UACC903、A375 组细胞 TRIM59 的 mRNA 和蛋白表达均显著升高 (均 $P < 0.01$)。gepia.cancer 网站分析结果 (图 2) 显示, TRIM59 高表达患者的存活率降低。

2.2 沉默 TRIM59 抑制 SK-MEL-2 细胞的增殖

WB 法 (图 3)、qPCR (表 2) 检测结果显示, 与 si-con 组相比, si-TRIM59 组细胞 TRIM59 的 mRNA 和蛋白表达均显著降低 (均 $P < 0.01$); CCK-8 法检测结果 (图 4) 显示, 在 48、72、96 h 时 si-TRIM 组细胞增殖

水平显著降低(均 $P < 0.05$)。



与HEMn-LP细胞比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
图1 人皮肤黑色素瘤细胞和黑色素细胞中TRIM59蛋白表达及其对患者存活的影响

表1 TRIM59 mRNA在人皮肤黑色素瘤细胞和黑色素细胞中的表达($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	TRIM59 mRNA
HEMn-LP	0.98±0.12
SK-MEL-2	4.02±0.15**
UACC903	2.94±0.20**
A375	3.01±0.33**
<i>F</i>	313.1673
<i>P</i>	0.000

与HEMn-LP组比较, ** $P < 0.01$

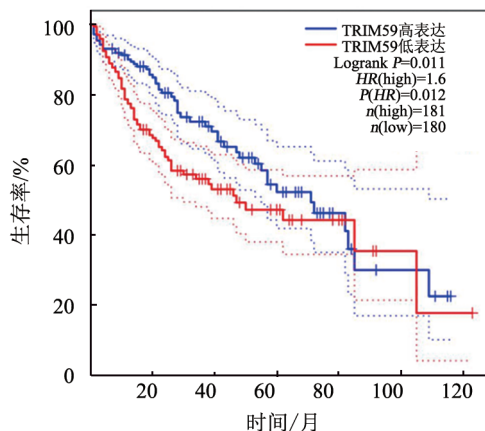
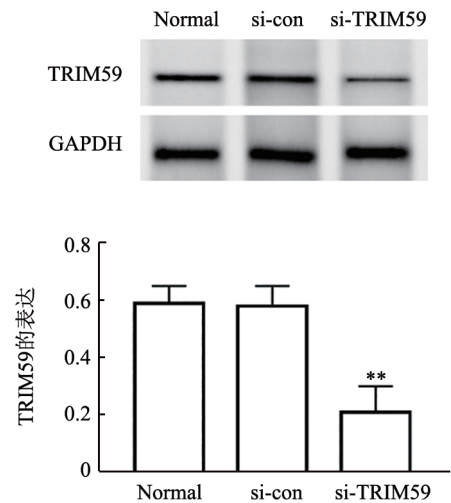


图2 TRIM59蛋白表达水平对黑色素瘤患者生存率的影响

2.3 沉默TRIM59诱导SK-MEL-2细胞周期阻滞

WB法检测结果(图5A、B)显示,与si-con组和

Normal组相比, si-TRIM59组SK-MEL-2细胞CCND1、CDK2蛋白表达显著降低(均 $P < 0.01$);流式细胞术检测结果(图5C)显示, si-TRIM59组SK-MEL-2细胞周期阻滞于G2期($P < 0.05$)。

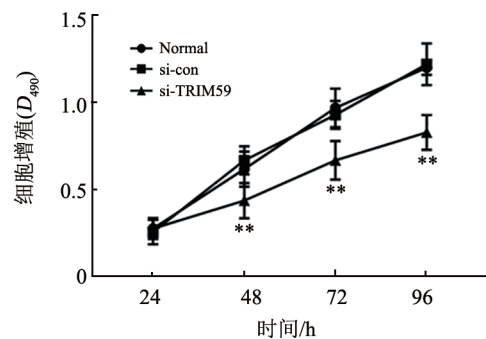


与si-con组和Normal组比较, ** $P < 0.01$
图3 转染si-TRIM59抑制SK-MEL-2细胞中TRIM59蛋白的表达

表2 转染si-TRIM59后SK-MEL-2细胞中TRIM59 mRNA的表达显著降低($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	TRIM59 mRNA
Normal	0.97±0.03
si-con	0.97±0.07
si-TRIM59	0.60±0.07**
<i>F</i>	115.150
<i>P</i>	0.000

与si-con组和Normal组比较, ** $P < 0.01$



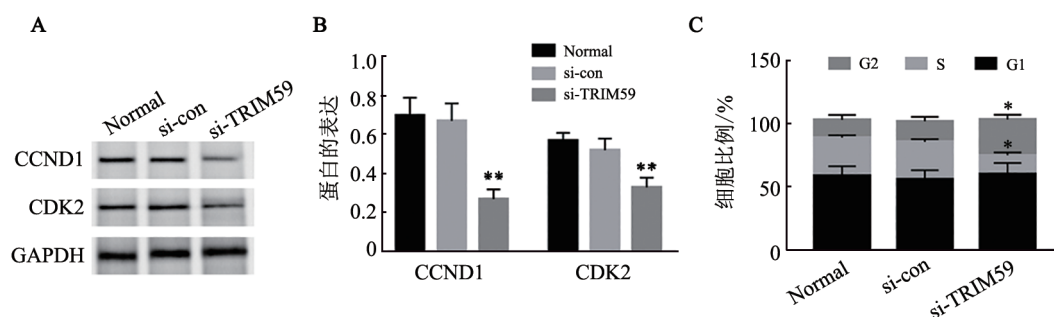
与si-con组和Normal组比较, ** $P < 0.01$
图4 沉默TRIM59抑制SK-MEL-2细胞的增殖

2.4 沉默TRIM59促进SK-MEL-2细胞的凋亡

WB法检测结果(图6A、B)显示,与si-con组和Normal组相比, si-TRIM59组SK-MEL-2细胞TP53

蛋白表达显著升高(均 $P < 0.01$);流式细胞术检测结果(图 6C)显示, si-TRIM59 组 SK-MEL-2 细胞凋亡率

较 si-con 组和 Normal 组显著升高[(13.35±1.87)% vs (5.10±0.78)%、(4.51±1.13)%、 $P=0.000$ 、 $F=122.534$]。

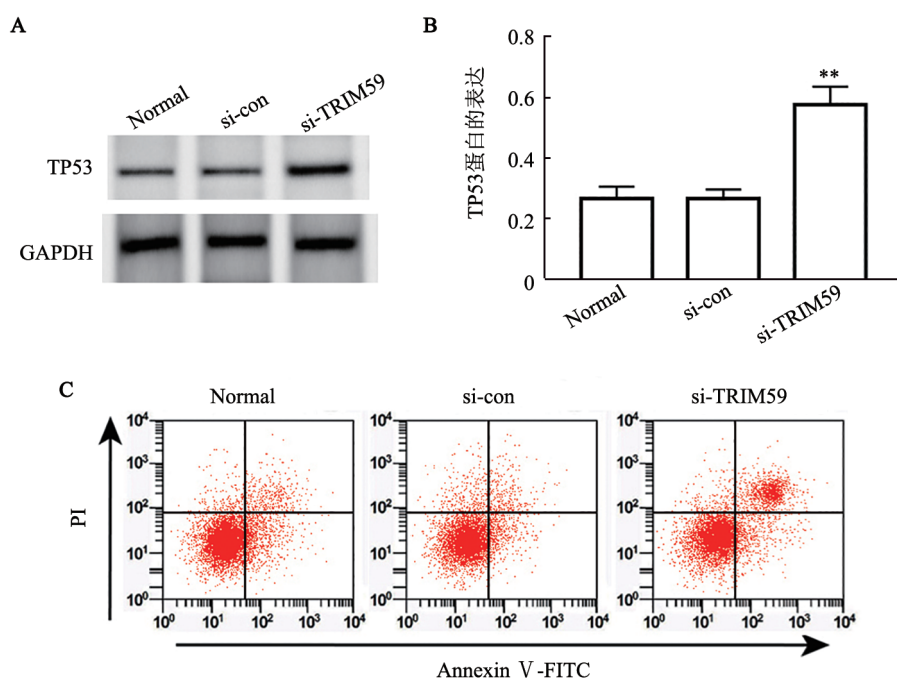


与 si-con 组和 Normal 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A、B: WB 法检测转染 si-TRIM59 对 SK-MEL-2 细胞 CCND1 和 CDK2 蛋白表达的影响;

C: 流式细胞术检测转染 si-TRIM59 对 SK-MEL-2 细胞周期分布的影响

图 5 沉默 TRIM59 诱导 SK-MEL-2 细胞周期阻滞并抑制 CCND1 和 CDK2 表达



与 si-con 组和 Normal 组比较, ** $P < 0.01$

A、B: 沉默 TRIM59 促进 SK-MEL-2 细胞中 TP53 的表达(WB 法); C: 沉默 TRIM59 促进 SK-MEL-2 细胞的凋亡(流式细胞术)

图 6 沉默 TRIM59 促进 SK-MEL-2 细胞的凋亡与 TP53 的表达

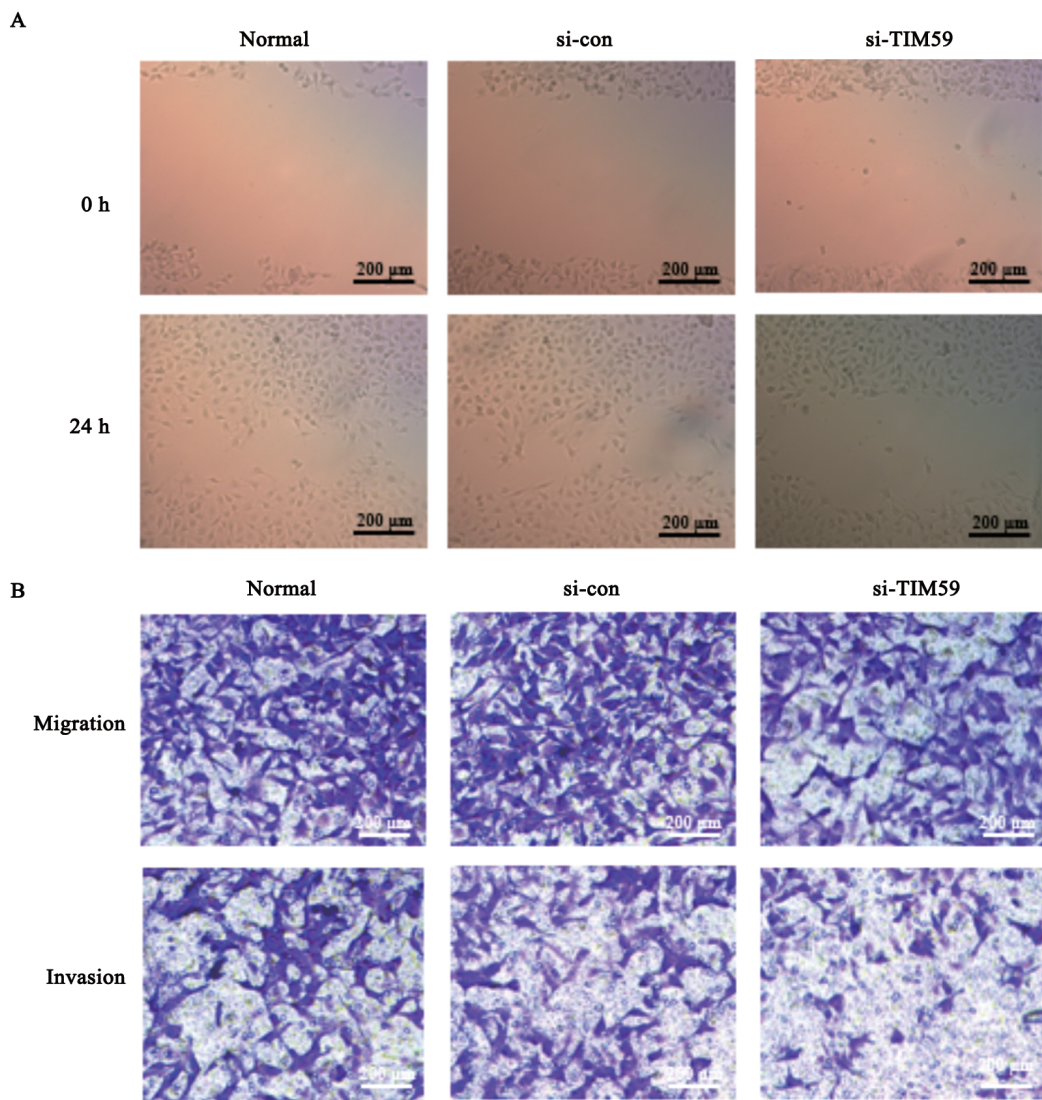
2.5 沉默 TRIM59 抑制 SK-MEL-2 细胞的迁移和侵袭

划痕愈合实验(图 7A)、Transwell 实验(图 7B)检测结果显示,与 si-con 组和 Normal 组相比, si-TRIM59 组细胞划痕抑制率显著升高($P < 0.01$ 、 $F=602.589$),迁移($P < 0.01$ 、 $F=32.866$)和侵袭($P < 0.01$ 、 $F=40.398$)细胞数均显著降低。

2.6 TRIM59 与 BCLAF1 间存在相互作用及其在黑色素瘤患者体内表达的相关性

RBPsuite 预测发现 BCLAF1 能够与 TRIM59 结合(图 8A)。免疫共沉淀实验结果(图 8B)显示,

TRIM59 与 BCLAF1 之间存在相互作用。WB 法(图 8C)、qPCR 法(表 3)检测结果显示,与 HEMn-LP 细胞相比, SK-MEL-2、UACC903、A375 细胞中 BCLAF1 的 mRNA 和蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.01$)。36 例癌组织中 TRIM59 与 BCLAF1 的表达之间呈明显的正相关($r=0.878$, $P < 0.001$, 图 8D)。利用 Starbase 网站(https://starbase.sysu.edu.cn/pan_GeneCoExp.php#)分析黑色素瘤患者体内 TRIM59 和 BCLAF1 表达相关性,结果(图 8E)显示,两者呈明显的正相关($r=0.561$, $P < 0.001$)。



A: 划痕愈合实验检测沉默TRIM59对SK-MEL-2细胞迁移的影响;
B: Transwell实验检测沉默TRIM59对SK-MEL-2细胞迁移和侵袭的影响

图7 沉默TRIM59抑制SK-MEL-2细胞的迁移和侵袭

表3 人皮肤黑色素瘤细胞和黑色素细胞中BCLAF1 mRNA的表达($\bar{x}\pm s, n=9$)

分组	BCLAF1 mRNA
HEMn-LP	1.02±0.11
SK-MEL-2	5.15±0.21
UACC903	2.46±0.25
A375	3.45±0.33**
F	476.383
P	0.000

与HEMn-LP细胞比较, * $P<0.05$, ** $P<0.05$

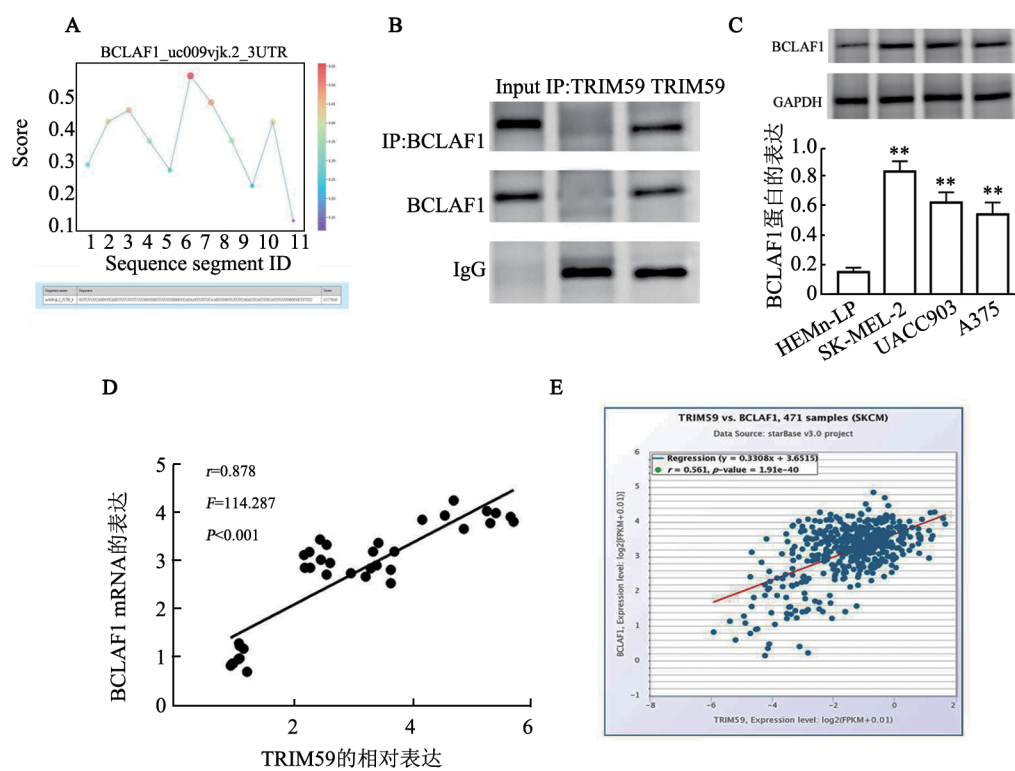
3 讨论

TRIM59可能通过介导蛋白质之间的相互作用调节泛素调节蛋白的稳定性,越来越多的研究结果支持TRIM59具有癌蛋白的功能^[8]。TRIM59参与部

分肿瘤的发展,其表达水平在这些癌症中随着病情的恶化而上调^[9]。JIN等^[10]对纳入的46项研究(包括11 558名患者)进行分析发现,与相邻组织相比,TRIM59的表达水平在15种类型的人类实体瘤中的显著上调,TRIM59高表达组患者的总生存率明显低于低表达组患者,并且TRIM59高表达预示着多发性实体瘤预后不良,表明TRIM59有可能被用作人类实体瘤的诊断和预后的标志物。KHATAMIANFAR等^[11]发现,TRIM59在肺癌、肾癌等多种肿瘤组织中均表达上调,并与肿瘤发生、发展具有明显的相关性;此外,该研究还通过小鼠全胚胎监测上皮细胞中TRIM59上调的起源,揭示TRIM59可作为一种新的多肿瘤标志物用于早期肿瘤的免疫组织化学检测。也有研究^[12]发现,TRIM59在部分肿瘤中的表达异常降低,而进行过表达则有助于肿瘤的控制。因此,为了探究TRIM59在皮肤黑色素瘤中的表达及其功能,

本研究检测发现皮肤黑色素瘤细胞中 TRIM59 呈高表达, 而沉默 TRIM59 后, SK-MEL-2 细胞发生增殖活性降低、G2 期阻滞, 同时 CCND1、CDK2 表达受到抑制, 迁移侵袭能力也降低, 凋亡率及 TP53 表达明显升高。这说明 TRIM59 能够促进 SK-MEL-2 细胞的恶性细胞表型发展。这与 TIAN 等^[13]的 TRIM59 增强巨

噬细胞的吞噬作用以抑制黑色素瘤生长的实验结果相悖, 与 TRIM59 在实体瘤中的致癌功能相一致。本研究中, 免疫共沉淀实验发现, TRIM59 与 BCLAF1 之间存在互作关系, 提示 BCLAF1 可能与 TRIM59 在皮肤黑色素瘤细胞中的功能有关。



与 HEMn-LP 细胞比较, ** $P < 0.05$

A: RBP Suite 预测 BCLAF1 与 TRIM59 的结合; B: 免疫共沉淀法检测 TRIM59 与 BCLAF1 之间的相互作用关系;

C: WB 法检测多种细胞中 BCLAF1 的表达水平; D: 36 例癌组织中 BCLAF1 和 TRIM59 表达相关性分析;

E: 黑色素瘤患者体内 BCLAF1 和 TRIM59 之间的关系

图8 TRIM59 与 BCLAF1 存在互作关系

近年来,越来越多的实验证据表明 BCLAF1 在肿瘤发展过程中发挥肿瘤促进因子或肿瘤抑制因子的作用, 其功能取决于肿瘤微环境及癌症类型^[14-15]。BCLAF1 在肝癌、白血病、膀胱癌、结肠癌中促进癌细胞恶性表型变化, 而在肺癌、骨肉瘤中抑制癌细胞的进一步恶化^[16-17]。在肝癌的研究中发现, BCLAF1 的表达水平以 HIF-1 α 依赖性方式升高, 有助于肝癌细胞的增殖, 肿瘤的生长及血管的形成^[18-20]。本研究发现, BCLAF1 在皮肤黑色素瘤细胞中的表达明显升高, 提示 BCLAF1 可能在黑色素瘤中发挥促癌基因的作用。进一步通过 qPCR 检测发现, 在皮肤黑色素瘤组织中 BCLAF1 和 TRIM59 表达水平之间呈明显的正相关, 并且在 Starbase 中分析发现, 在皮肤黑色素瘤中 BCLAF1 的表达水平随 TRIM59 的升高而升高, 也呈明显的正相关。本研究未进行 BCLAF1 在皮肤

黑色素瘤细胞及动物模型中的功能探讨, 课题组将继续开展相关研究, 为 BCLAF1 用于皮肤黑色素瘤患者的康复提供更充分的实验支持。

综上所述, TRIM59 在皮肤黑色素瘤细胞中呈高表达, 沉默 TRIM59 抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭而促进凋亡, 其发挥抗癌作用的潜在机制与 TRIM59 蛋白结合 BCLAF1 有关。

[参考文献]

- [1] LOPES F C P S, SLEIMAN M G, SEBASTIAN K, *et al*. UV exposure and the risk of cutaneous melanoma in skin of color: a systematic review[J]. *JAMA Dermatol*, 2021, 157(2): 213-219. DOI:10.1001/jamadermatol.2020.4616.
- [2] STRASHILOV S, YORDANOV A. Aetiology and pathogenesis of cutaneous melanoma: current concepts and advances[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6395 [2022-04-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39111111/>.

- nih.gov/34203771/. DOI:10.3390/ijms22126395.
- [3] LEONARDI G C, FALZONE L, SALEMI R, *et al.* Cutaneous melanoma: from pathogenesis to therapy (review)[J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(4): 1071-1080. DOI:10.3892/ijo.2018.4287.
- [4] 常旺燕, 李爱明, 窦丽, 等. TRIM21通过Wnt/ β -catenin信号通路调控卵巢癌细胞增殖及耐药[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(7): 749-756. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.07.005.
- [5] SANG Y Z, LI Y X, ZHANG Y W, *et al.* CDK5-dependent phosphorylation and nuclear translocation of TRIM59 promotes macroH2A1 ubiquitination and tumorigenicity[J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4013 [2022-04-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31488827/>. DOI:10.1038/s41467-019-12001-2.
- [6] HAN T Y, GUO M, GAN M X, *et al.* TRIM59 regulates autophagy through modulating both the transcription and the ubiquitination of BECN1[J]. *Autophagy*, 2018, 14(12): 2035-2048. DOI: 10.1080/15548627.2018.1491493.
- [7] YU Z D, ZHU J, WANG H B, *et al.* Function of BCLAF1 in human disease[J/OL]. *Oncol Lett*, 2022, 23(2): 58 [2022-04-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34992690/>. DOI:10.3892/ol.2021.13176.
- [8] TIAN Y, JIN Z, ZHU P, *et al.* TRIM59: a membrane protein expressed on *Bacillus Calmette-Guérin*-activated macrophages that induces apoptosis of fibrosarcoma cells by direct contact[J/OL]. *Exp Cell Res*, 2019, 384(1): 111590 [2022-04-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31479687/>. DOI:10.1016/j.yexcr.2019.111590.
- [9] JIN Z, ZHU Z H, ZHANG W X, *et al.* Effects of TRIM59 on RAW264.7 macrophage gene expression and function[J/OL]. *Immunobiology*, 2021, 226(4): 152109[2022-04-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34252840/>. DOI: 10.1016/j.imbio.2021.152109.
- [10] JIN Z, LIU L P, YU Y R, *et al.* TRIM59: a potential diagnostic and prognostic biomarker in human tumors[J/OL]. *PLoS One*, 2021, 16(9): e0257445 [2022-04-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34534244/>. DOI:10.1371/journal.pone.0257445.
- [11] KHATAMIANFAR V, VALIYEVA F, RENNIE P S, *et al.* TRIM59, a novel multiple cancer biomarker for immunohistochemical detection of tumorigenesis[J/OL]. *BMJ Open*, 2012, 2(5): e001410 [2022-04-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23048060/>. DOI: 10.1136/bmjopen-2012-001410.
- [12] JIANG T, LIU B J, WU D P, *et al.* BCLAF1 induces cisplatin resistance in lung cancer cells[J/OL]. *Oncol Lett*, 2020, 20(5): 227 [2022-04-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32968449/>. DOI: 10.3892/ol.2020.12090.
- [13] TIAN Y, GUO Y T, ZHU P, *et al.* TRIM59 loss in M2 macrophages promotes melanoma migration and invasion by upregulating MMP-9 and Madcam1[J]. *Aging*, 2019, 11(19): 8623-8641. DOI: 10.18632/aging.102351.
- [14] CHEN M W, ZHANG R Y, LU L, *et al.* LncRNA PVT1 accelerates malignant phenotypes of bladder cancer cells by modulating miR-194-5p/BCLAF1 axis as a ceRNA[J]. *Aging*, 2020, 12(21): 22291-22312. DOI:10.18632/aging.202203.
- [15] 李细媛, 朱智鑫, 赵海龙. BRAF突变型黑色素瘤的耐药性机制及治疗最新研究进展[J]. *天津医药*, 2022, 50(2): 214-219. DOI: 10.11958/20212135.
- [16] 秦文欣, 王永晨. 细胞自噬与PI3K/Akt/mTOR信号通路在黑色素瘤耐药性中的研究进展[J]. *医学综述*, 2022, 28(7): 1327-1331. DOI:10.3969/j.issn.1006-2084.2022.07.014.
- [17] 郑方园, 潘桂珍, 钟婷, 等. CDC25C表达下调对黑色素瘤细胞B16自噬和迁移能力的影响[J]. *广西医科大学学报*, 2022, 39(2): 221-226. DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2022.02.007.
- [18] WEN Y, ZHOU X Q, LU M T, *et al.* Bclaf1 promotes angiogenesis by regulating HIF-1 α transcription in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2019, 38(11): 1845-1859. DOI: 10.1038/s41388-018-0552-1.
- [19] 刘德权, 孙纲, 李校冲, 等. TRIM59调控波形蛋白促进人肝细胞肝癌细胞的增殖与迁移[J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(19): 3341-3346. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2021.19.004.
- [20] 巩伟亮, 徐媛媛, 董文丽, 等. 长链非编码RNA FOXD3-AS1对黑色素瘤细胞增殖与侵袭的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(16): 2167-2169, 2183. DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2021.16.016.

[收稿日期] 2022-04-15

[修回日期] 2022-07-25

[本文编辑] 黄静怡