

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.01.004

DNMT1通过抑制 TRAF6介导的 EZH2泛素化促进结直肠癌 HCT8 细胞增殖与迁移

彭小梅¹, 罗舜元², 师鑫鹏³, 左浩健³, 曹璐阳¹, 陈函³, 周海涛⁴, 罗晓勇^{1,3} (1. 郑州大学附属洛阳中心医院 洛阳市肿瘤疾病临床诊疗研究中心, 河南 洛阳 471000; 2. 郑州大学附属洛阳中心医院 体检中心, 河南 洛阳 471000; 3. 郑州大学附属洛阳中心医院 放疗科, 河南 洛阳 471000; 4. 郑州大学附属洛阳中心医院 中心实验室, 河南 洛阳 471000)

[摘要] **目的:** 探讨 DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 通过稳定 zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2) 促进结直肠癌 (CRC) HCT8 细胞增殖与迁移的机制。 **方法:** 利用生物信息学方法分析 DNMT1 在 CRC 组织中的表达水平。 WB 法检测 DNMT1 在 CRC 细胞 HCT8、SW620 和正常结肠上皮细胞 NCM460 中的表达。通过 siRNA 或慢病毒载体转染 HCT8 细胞, 分为 siNC 组、siDNMT1 组、Vector 组、DNMT1-OE 组、siTRAF6 组、siEZH2 组、siEZH2 + DNMT1-OE 组。采用克隆形成实验、CCK-8 法、Transwell 实验和划痕愈合实验检测敲低或过表达 DNMT1 对 HCT8 细胞增殖与迁移的影响, WB 和 qPCR 法检测 EZH2 蛋白和 mRNA 水平, 免疫沉淀 (IP) 法检测 EZH2 泛素化水平, 免疫荧光双染检测肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6) 与 EZH2 的细胞内共定位情况, 克隆形成和划痕愈合实验验证 EZH2 对 DNMT1 功能的逆转作用。收集 2022—2025 年间郑州大学附属洛阳中心医院手术切除的 12 例 CRC 患者的癌及癌旁组织标本, 采用免疫组化法检测 CRC 组织中 DNMT1、TRAF6 和 EZH2 的表达水平。 **结果:** DNMT1 在 CRC 组织中表达显著高于癌旁组织 ($P < 0.01$), 且在 CRC 细胞中表达上调 ($P < 0.05$); DNMT1 敲低显著抑制 HCT8 细胞增殖及迁移 (均 $P < 0.01$), 过表达则相反 (均 $P < 0.01$)。DNMT1 正向调控 EZH2 的蛋白水平 ($P < 0.01$), 而 mRNA 水平不变 ($P > 0.05$)。MG132 可恢复 siDNMT1 组的 EZH2 蛋白表达 ($P < 0.01$), 且 siDNMT1 组 EZH2 泛素化水平升高。DNMT1 负向调控 TRAF6 的表达 ($P < 0.01$), 且 TRAF6 与 EZH2 在细胞质中共定位, IP 证实两者直接结合。敲低 TRAF6 可减弱 EZH2 的泛素化水平, 敲低 EZH2 可逆转 DNMT1 对 HCT8 细胞增殖、迁移的促进作用 (均 $P < 0.01$)。DNMT1 和 EZH2 在 CRC 组织中呈高表达 ($P < 0.01$), TRAF6 在 CRC 组织中表达显著低于癌旁组织 ($P < 0.05$)。 **结论:** DNMT1 通过抑制 TRAF6 稳定 EZH2 促进 CRC 细胞的增殖和迁移, DNMT1、TRAF6 和 EZH2 可能是 CRC 治疗的潜在靶点。

[关键词] DNA 甲基转移酶 1; 结直肠癌; HCT8 细胞; 增殖; 迁移; 肿瘤坏死因子受体相关因子 6; zeste 基因增强子同源物 2

[中图分类号] R735.3; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026) 01-0028-09

DNMT1 promotes the proliferation and migration of colorectal cancer HCT8 cells by suppressing TRAF6-mediated ubiquitination of EZH2

PENG Xiaomei¹, LUO Shunyan², SHI Xinpeng³, ZUO Haojian³, CAO Luyang¹, CHEN Han³, ZHOU Haitao⁴, LUO Xiaoyong^{1,3} (1. Luoyang Cancer Disease Clinical Diagnosis and Treatment Research Center, Luoyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang 471000, Henan, China; 2. Health Check-up Center, Luoyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang 471000, Henan, China; 3. Department of Radiotherapy, Luoyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang 471000, Henan, China; 4. Central Laboratory, Luoyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang 471000, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanisms by which DNA methyltransferase 1 (DNMT1) promotes the proliferation and migration of colorectal cancer (CRC) HCT8 cells through the stabilization of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2). **Methods:** Bioinformatic analysis was performed to evaluate the expression level of DNMT1 in CRC tissues. Western blotting (WB) analysis was used to determine DNMT1 expression levels in CRC cell lines HCT8 and SW620, as well as in normal colon epithelial cells NCM460. HCT8 cells, after transfection with siRNA or lentivirus, were assigned to the following groups: the siNC group, the siDNMT1 group, the Vector group, the DNMT1-OE group, the siTRAF6 group, the siEZH2 group, the siEZH2 + DNMT1-OE group. The effects of DNMT1 knockdown or overexpression on the proliferation and migration of HCT8 cells were assessed by colony formation assay,

[基金项目] 2025 年河南省医学科技攻关联合共建项目 (LHGJ20250785); 2023 年河南省医学科技攻关计划项目 (LHGJ20230815)

[作者简介] 彭小梅, 硕士, 研究实习员

[通信作者] 罗晓勇 (扫码获取作者通信方式)



CCK-8 assay, Transwell assay, and scratch assay. The protein and mRNA levels of EZH2 were measured by WB and quantitative real-time PCR (qPCR), respectively. EZH2 ubiquitination levels were examined using immunoprecipitation (IP). Intracellular co-localization of TRAF6 and EZH2 was evaluated by immunofluorescence double staining. The reversing effects of EZH2 on DNMT1 was confirmed by colony formation and wound healing (scratch) assays. Cancerous tissue and adjacent tissue specimens of 12 CRC patients surgically removed at Luoyang Central Hospital affiliated to Zhengzhou University between 2022 and 2025 were collected and immunohistochemical staining was performed to detect the expression levels of DNMT1, TRAF6, and EZH2 in CRC tissue samples. **Results:** DNMT1 expression was significantly higher in CRC tissues than in adjacent non-tumor tissues ($P < 0.01$), and its expression was also upregulated in CRC cells ($P < 0.05$). Knockdown of DNMT1 markedly inhibited the proliferation ($P < 0.01$) and migration ($P < 0.01$) of HCT8 cells, whereas overexpression of DNMT1 produced the opposite effects (both $P < 0.01$). DNMT1 positively regulated EZH2 at the protein level ($P < 0.01$) but did not affect its mRNA expression ($P > 0.05$). MG132 restored the protein expression of EZH2 ($P < 0.01$) and increased EZH2 ubiquitination levels in the siDNMT1 group, DNMT1 negatively regulated TRAF6 expression ($P < 0.01$). TRAF6 and EZH2 co-localized in cytoplasm, and IP confirmed that they bound directly. Knockdown of TRAF6 reduced EZH2 ubiquitination levels. EZH2 knockdown reversed the promotive effects of DNMT1 on HCT8 cell proliferation ($P < 0.01$) and migration ($P < 0.01$). DNMT1 and EZH2 were highly expressed in CRC tissues ($P < 0.01$), whereas TRAF6 expression was significantly lower in CRC tissues than in adjacent non-tumor tissues ($P < 0.05$). **Conclusion:** DNMT1 promotes the proliferation and migration of CRC cells through suppressing the stabilization of EZH2 by TRAF6. DNMT1, TRAF6, and EZH2 are expected to become diagnostic markers and therapeutic targets for CRC.

[Key words] DNA methyltransferase 1 (DNMT1); colorectal cancer (CRC); HCT8 cell; proliferation; migration; tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6); enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(1): 28-36. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.01.004]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球第三大高发恶性肿瘤,也是癌症相关死亡的第二大原因^[1]。早期患者经手术联合辅助放疗化疗预后较好,但转移性CRC治疗效果欠佳,即使采用靶向治疗联合免疫检查点抑制剂的多模式疗法,仍面临高耐药高复发的风险^[2-4],亟须从肿瘤发生机制层面挖掘新的干预靶点。近年研究^[5]表明,表观遗传调控在CRC进展中起关键作用:DNA甲基转移酶1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)通过维持异常DNA甲基化,使抑癌基因沉默,其表达与CRC患者TNM分期正相关,且促进癌细胞增殖与迁移^[6-7];多梳抑制复合物关键组分zeste基因增强子同源物2(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)通过催化组蛋白H3赖氨酸27三甲基化(trimethylation of histone H3 at lysine 27, H3K27me3)修饰重塑染色质结构,其过表达已被证实与CRC肝转移密切相关^[8]。同时,E3泛素连接酶肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)通过非经典自噬途径降解 β -catenin进而抑制肿瘤转移^[9],提示表观遗传调控与蛋白翻译后修饰可能存在潜在关联,但三者CRC中的相互作用及调控机制尚未明确。本研究旨在揭示CRC中DNMT1-TRAF6-EZH2的调控关系及分子机制,阐明表观遗传酶与泛素化系统的功能偶联,为开发三靶点抑制剂、逆转CRC耐药提供理论依据和治疗策略。

1 材料与方法

1.1 细胞、组织标本及主要试剂

CRC细胞HCT8、SW620和正常结肠上皮细胞NCM460均购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。本实验所用12对CRC组织及其配对癌旁组织标本,均取自2022—2025年间于郑州大学附属洛阳中心医院接受手术的患者,标本采集经医院伦理委员会批准(伦理审批号LWLL-2025-06-16-01),所有患者均签署知情同意书。

DMEM、RPMI 1640、L15培养基购自Cytiva公司, FBS购自BI公司, siRNA购自上海吉玛生物技术有限公司, DNMT1过表达慢病毒购自上海吉凯生物技术有限公司, Lipofectamine™ RNAiMAX转染试剂、OPTI-MEM减血清培养基购自上海英潍捷基生物技术有限公司, 总蛋白提取试剂盒、CCK-8试剂盒、BCA蛋白浓度定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, DNMT1、TRAF6(兔抗)、EZH2、泛素(ubiquitin, Ub)抗体均购自CST公司, HRP标记山羊抗兔IgG(H+L)购自Proteintech公司, TRAF6(鼠抗)购自圣克鲁斯生物技术(上海)有限公司, 内参GAPDH抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, 逆转录试剂盒和荧光定量PCR(qPCR)试剂盒购自TaKaRa Bio Inc公司, DNMT1、EZH2、GAPDH引物购自上海生工生物工程有限公司, 蛋白酶体抑制剂MG132购自Selleck Chemicals公司, 免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)试剂盒购自Thermo fisher公司。

1.2 基因表达数据来源及处理

通过UCSC Xena浏览器平台(<https://xenabrowser>。

net/)获取基因表达数据。本研究选取TCGA Colon and Rectal Cancer(COADREAD)数据集,通过临床注释信息筛选CRC组织样本($n = 380$)及癌旁组织样本($n = 51$)。使用Xena数据过滤工具提取DNMT1的RNA-seq表达值 $[\log_2(\text{FPKM} + 1)]$ 标准化数据。

1.3 细胞培养、转染及分组

将CRC细胞HCT8、SW620和正常结肠上皮细胞NCM460从液氮罐中取出并复苏,分别用含10% FBS的RPMI 1640培养基、L15培养基和DMEM培养基培养,置于5% CO₂、37 °C恒温培养箱中培养。

依据慢病毒转染试剂说明书,将DNMT1过表达(DNMT1-OE)慢病毒与空载体对照(Vector)慢病毒转染至HCT8细胞。随后,以10 μg/mL的嘌呤霉素进行筛选,获取稳定转染DNMT1-OE及Vector的HCT8细胞,分为DNMT1-OE组与Vector组。

当HCT8细胞汇合度达到80%~90%时,按照每孔 1×10^6 个细胞铺板,24 h后按照转染试剂操作说明,转染阴性对照干扰片段(siNC)和DNMT1干扰片段(siDNMT1)。RNA干扰片段序列:siDNMT1-130正义链为5'-GCGGCUCAAAGAUUUGGAATT-3',反义链为5'-UUCCAAUUCUUUGAGCCGCTT-3'; siDNMT1-2961正义链为5'-CAGAGCACUACCGGAAAUATT-3',反义链为5'-UAUUUCCGGUAGUGCUCUGTT-3'; siDNMT1-1231正义链为5'-UCUGGCUUUGAGAGUUAUTT-3',反义链为5'-AUAACUCUCAAGCCAGACTT-3'; siDNMT1-810正义链为5'-CACCCAAACAGAAACUGAATT-3',反义链为5'-UUCAGUUUCUGUUUGGGUGTT-3'; siEZH2正义链为5'-UAGGUUAAUUGGGACCAAATT-3',反义链为5'-UUUGGUCCCAAUUAACCUAGC-3'; siTRAF6正义链为5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUUU-3',反义链为5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAUU-3'; NC正义链为5'-UUCUCCGAACGUGUCA CGUTT-3',反义链为5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。

1.4 WB法检测CRC组织和细胞中DNMT1、EZH2蛋白的表达

在CRC组织及细胞中加入含10% PMSF的RIPA裂解液,充分混匀后收集至1.5 mL EP管中,4 °C、13 500 × g离心30 min,吸取上清于新的EP管中。蛋白样品经电泳(80 V)、转膜(300 mA, 2 h)、5%脱脂牛奶封闭2.5 h后,加入均以1:1 000稀释的DNMT1、EZH2和TRAF6、GAPDH一抗,4 °C冰箱中过夜。TBST洗3次,加入HRP标记山羊抗兔IgG(H + L)(1:5 000),室温中作用1 h, TBST洗3次, ECL化学发光法显影,用ImageJ软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.5 CCK-8法检测HCT8细胞的增殖能力

选取各组HCT8细胞,用胰酶消化后,以 $1\ 000 \times g$ 离心5 min后收集细胞,计数后接种至96孔板中(3×10^3 个/孔),每孔含培养基100 μL。每天同一时间利用CCK-8试剂盒测定细胞的光密度(D)值。用GraphPad Prism 9软件统计分析细胞的增殖能力。

1.6 克隆形成实验检测HCT8细胞的克隆形成能力

将各组对数生长期HCT8细胞接种至6孔板(2×10^3 个/孔),摇匀。培养2周后,将自然形成的细胞群用PBS清洗3次后,用4%多聚甲醛溶液固定30 min,0.1%结晶紫染色30 min, PBS清洗细胞,晾干后拍照并计数克隆形成数量。

1.7 Transwell实验检测HCT8细胞的迁移能力

将密度为 1×10^5 个/150 μL的HCT8细胞接种至Transwell小室上室,下室中添加500 μL完全培养基。培养2 d后,取出小室用PBS清洗后,4%多聚甲醛固定30 min。用PBS清洗,0.1%结晶紫染色30 min, PBS清洗后,在光学显微镜下随机选取5个视野,拍照并统计迁移细胞数目。

1.8 划痕愈合实验检测HCT8细胞的划痕愈合能力

用记号笔在6孔板背面划线,标记要进行划痕的位置,将状态良好的HCT8细胞接种于6孔板(4×10^5 个/孔),待细胞汇合度达到100%时,用200 μL移液器吸头垂直细胞平面进行划痕,用PBS清洗漂浮的细胞,培养基换成含3%血清的培养基,分别于0、24 h进行观察拍照,用ImageJ软件进行统计分析,计算细胞的划痕愈合率。

1.9 qPCR法检测HCT8细胞中DNMT1、EZH2 mRNA的表达水平

采用TRIzol法提取各组细胞总RNA,测定浓度与纯度,取1 μg RNA逆转录成cDNA。取2 μL逆转录产物作为模板进行qPCR反应。引物序列:DNMT1正向引物为5'-CCGAGCGAGCCAGAGATA GAG-3',反向引物为5'-GAGATGCCTGCTTGGTGAATC-3'; EZH2正向引物为5'-TTGTTGGCGGAA GCGTGTAATAATC-3',反向引物为5'-TCCCTAGTCCGCGCAATGAGC-3'; GAPDH正向引物为5'-AGA AGGCTGGGGCTCATTTG-3',反向引物为5'-AGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。反应条件:95 °C预变性30 s;95 °C变性5 s;60 °C退火30 s;72 °C延伸30 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因mRNA的相对表达量。

1.10 IP与Co-IP分析HCT8细胞中EZH2泛素化水平及EZH2与TRAF6相互作用

采用RIPA裂解液提取各组细胞总蛋白,根据IP试剂盒的说明用EZH2抗体进行免疫共沉淀,然后将

沉淀的样品进行SDS-PAGE电泳,转膜及封闭后,用Ub或TRAF6抗体作为一抗4℃过夜处理后,采用化学发光液曝光显影,通过IP检测EZH2的泛素化水平,并以Co-IP验证EZH2与TRAF6的相互作用。

1.11 免疫荧光染色法检测HCT8细胞中TRAF6、EZH2蛋白的表达

将处于对数生长期的HCT8细胞接种于24孔板。24 h后,用PBS轻轻漂洗24孔板,4%多聚甲醛固定30 min,0.5% Triton X-100通透10 min,以含5% BSA、0.1% Triton X-100的PBS封闭1 h。加一抗TRAF6(稀释比例1:50)、EZH2(稀释比例1:200)混合液,4℃下处理过夜。次日,PBS洗3次(5 min/次),加入稀释比例1:400的Alexa Fluor® 594和Alexa Fluor® 488室温作用45 min,PBS洗3次(5 min/次)。在即用型DAPI中处理5 min,PBS洗4次(5 min/次)。最后,在荧光显微镜下观察、拍照,分析TRAF6与EZH2的共定位情况。

1.12 免疫组化法检测CRC组织中DNMT1、TRAF6和EZH2蛋白的表达水平

取4 μm厚的CRC组织石蜡切片,用免疫组化法检测DNMT1、TRAF6和EZH2的表达。切片经二甲苯脱蜡和梯度乙醇水化后,进行抗原修复(柠檬酸缓冲液,pH 6.0),以暴露目标蛋白。用3% H₂O₂室温封闭10 min,以抑制内源性过氧化物酶活性。随后,切片用5% BSA封闭30 min,加入稀释比例均为1:100的DNMT1、TRAF6、EZH2一抗,4℃处理过夜。次日,滴加HRP标记山羊抗兔IgG二抗(1:5 000),室温下处理1 h。使用DAB显色试剂进行显色,苏木精复染,脱水、透明后用中性树胶封片。DNMT1、TRAF6和EZH2蛋白表达按以下方法进行评分:(1)阳性细胞百分比评分:<5% 0分,≥5%~<25% 1分,≥25%~<50% 2分,≥50% 3分;(2)染色强度评分:无染色0分,浅黄色1分,棕黄色2分,深棕色3分。两者评分乘积为最终评分。

1.13 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。本实验所有实验结果均为计量资料,采用GraphPad Prism 9软件进行统计分析。两组间比较采用*t*检验,多组间比较采用单因素方差分析。以*P*<0.05或*P*<0.01表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DNMT1在CRC组织和细胞中均呈高表达

TCGA数据集分析结果(图1A)显示,DNMT1 mRNA在CRC组织中表达水平显著高于癌旁组织(*P*<0.000 1)。WB法检测结果(图1B)显示,DNMT1

蛋白在CRC细胞HCT8和SW620中表达水平显著高于正常结肠上皮细胞NCM460,以在HCT8细胞中表达水平最高,因此后续实验选用HCT8细胞。

2.2 成功建立DNMT1敲低和过表达的HCT8细胞株

qPCR法检测结果显示,4条siRNA均能显著降低DNMT1 mRNA的水平(均*P*<0.01),其中以siDNMT1-130干扰效率最高(*P*<0.01,图2A),故选用该序列进行后续实验;DNMT1-OE组DNMT1 mRNA表达显著高于Vector组(*P*<0.01,图2B)。结果表明,成功获得DNMT1敲低或过表达的HCT8细胞模型,可用于后续功能实验。

2.3 敲低或过表达DNMT1对HCT8细胞增殖的调控作用

CCK-8法和克隆形成实验检测结果显示,与siNC组比较,siDNMT1组HCT8细胞的增殖能力显著降低、克隆形成数目显著减少(均*P*<0.01,图2C、E);与Vector组比较,DNMT1-OE组细胞的增殖能力显著增强、克隆形成数目显著增加(均*P*<0.01,图2D、F)。结果表明,敲低DNMT1降低HCT8细胞的增殖能力,过表达DNMT1则提高细胞的增殖能力。

2.4 敲低或过表达DNMT1对HCT8细胞迁移的调控作用

划痕愈合实验(图2G、I)和Transwell实验(图2H、J)检测结果显示,与siNC组比较,siDNMT1组HCT8细胞的划痕愈合率、迁移细胞数均显著降低(均*P*<0.01);与Vector组比较,DNMT1-OE组HCT8细胞的划痕愈合率、迁移细胞数均显著增加(均*P*<0.01)。结果表明,敲低DNMT1降低HCT8细胞的迁移能力,过表达DNMT1则提高细胞的迁移能力。

2.5 DNMT1通过翻译后修饰稳定EZH2的蛋白水平

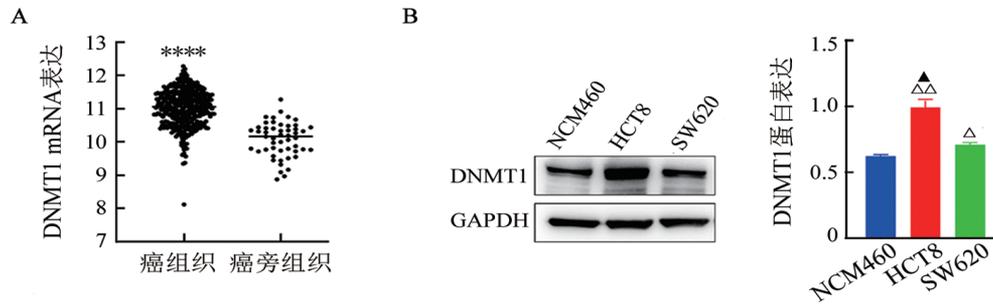
WB法检测结果显示,与siNC组比较,siDNMT1组HCT8细胞中EZH2蛋白表达显著降低(*P*<0.01,图3A);与Vector组比较,DNMT1-OE组细胞中EZH2蛋白表达显著增加(*P*<0.01,图3B)。qPCR法检测结果显示,敲低或过表达DNMT1后,HCT8细胞中EZH2 mRNA表达均无显著差异(*P*>0.05,图3C、D)。实验结果提示,DNMT1可能通过翻译后修饰稳定EZH2的蛋白表达。

2.6 DNMT1通过TRAF6稳定EZH2的蛋白水平

利用蛋白酶体抑制剂MG132处理siDNMT1组HCT8细胞,结果显示,MG132可完全逆转敲低DNMT1导致的EZH2蛋白下调(*P*<0.01,图4A),提示DNMT1对EZH2的调控依赖泛素-蛋白酶体途径。进一步通过IP实验验证发现,敲低DNMT1后,EZH2的泛素化修饰水平显著提高(图4B),直接证实DNMT1通过抑制EZH2的泛素化降解维持其蛋白稳定性。为明确介导EZH2泛素化的E3连接酶,检测TRAF6的表达变化发现,敲

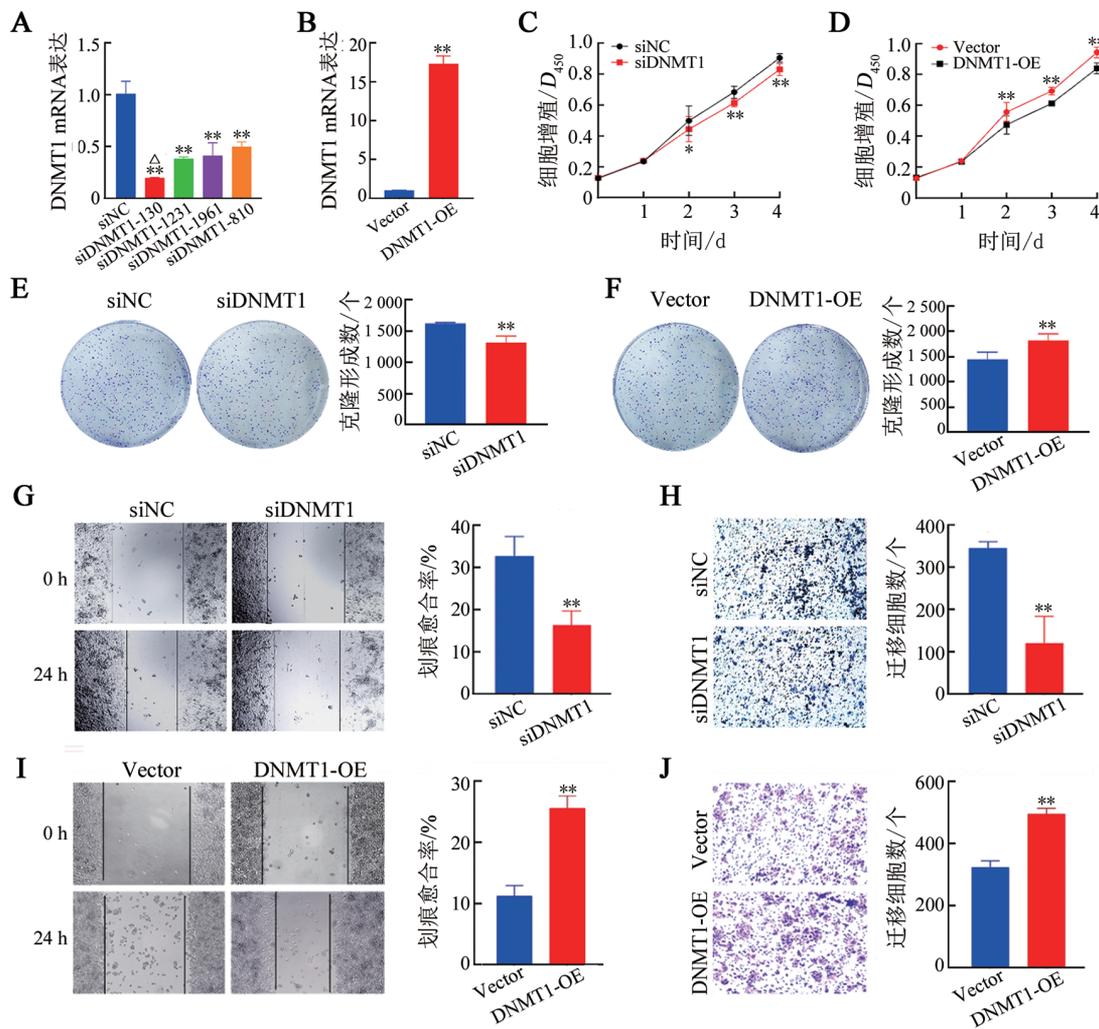
低 DNMT1 后, HCT8 细胞中 TRAF6 蛋白表达水平显著升高, 过表达 DNMT1 后, TRAF6 蛋白表达水平显著降低 (均 $P < 0.01$, 图 4C)。提示 DNMT1 与 TRAF6 的表达呈反向关联。后续实验进一步证实, TRAF6 的功能依赖于 EZH2, 且 EZH2 与 TRAF6 在 HCT8 细胞核内共定位 (图 4D); 敲低 TRAF6 可显著降低 EZH2 的泛素化水

平, 且 Co-IP 实验直接验证 EZH2 与 TRAF6 存在蛋白-蛋白相互作用 (图 4E), 说明 TRAF6 是介导 EZH2 泛素化降解的 E3 泛素连接酶。综合上述结果, DNMT1 通过抑制 E3 泛素连接酶 TRAF6 的表达, 减少其与 EZH2 的结合及后续泛素化修饰, 最终抑制 EZH2 经泛素-蛋白酶体途径降解, 从而维持 EZH2 的蛋白稳定性。



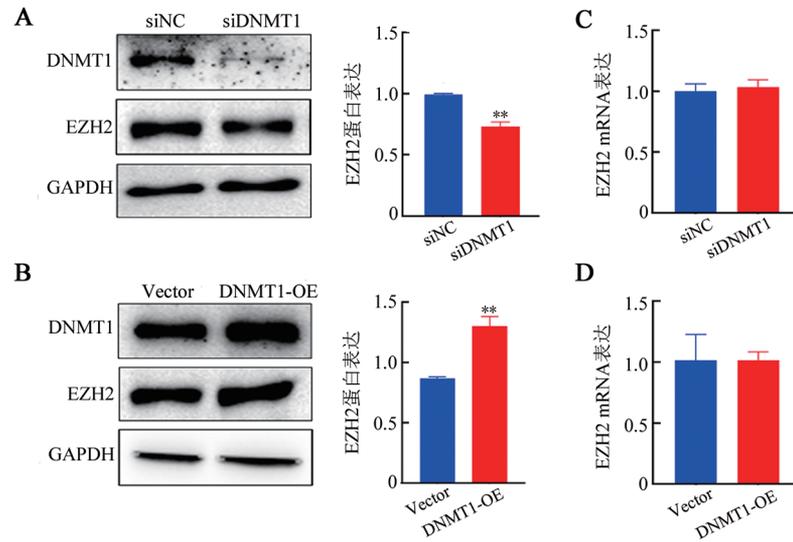
A: TCGA 数据库分析 DNMT1 在 CRC 组织与癌旁组织中的表达差异; B: WB 法检测 CRC 细胞和正常结肠上皮细胞中 DNMT1 蛋白表达。与癌旁组织相比, **** $P < 0.0001$; 与 NCM460 细胞相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 SW620 细胞相比, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图1 DNMT1 在 CRC 组织和细胞中呈高表达



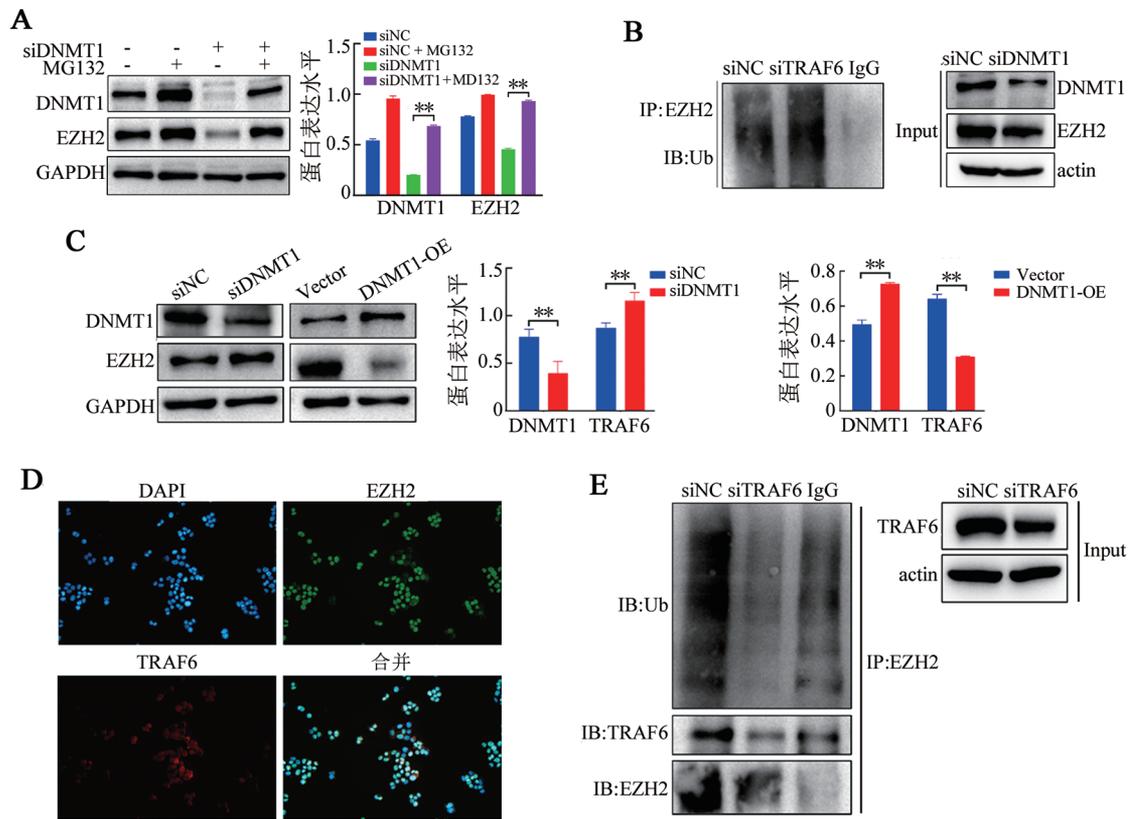
A、B: qPCR 法检测敲低 (A) 或过表达 (B) DNMT1 的效率; C、D: CCK-8 法检测细胞的增殖能力; E、F: 克隆形成实验检测细胞的增殖能力; G~J: 划痕愈合实验 (G、I)、Transwell 实验 (H、J) 检测细胞的迁移能力 (结晶紫染色, $\times 100$)。与 siNC 或 Vector 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与其他 siRNA 相比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图2 敲低或过表达 DNMT1 对 HCT8 细胞 DNMT1 表达、增殖及迁移的影响



A、B:WB法检测敲低(A)或过表达(B)DNMT1后EZH2蛋白表达水平;C:qPCR法检测敲低(C)或过表达(D)DNMT1后EZH2 mRNA表达水平。与siNC或Vector组比较,** $P < 0.01$ 。

图3 敲低或过表达DNMT1对HCT8细胞EZH2表达的影响



A:MG132逆转siDNMT1诱导的EZH2蛋白下调;B:敲低DNMT1增强EZH2的泛素化修饰水平;C:DNMT1表达变化对TRAF6蛋白水平的调控作用;D:EZH2与TRAF6在HCT8细胞核内共定位($\times 200$);E:TRAF6与EZH2的相互作用及对EZH2泛素化的影响。

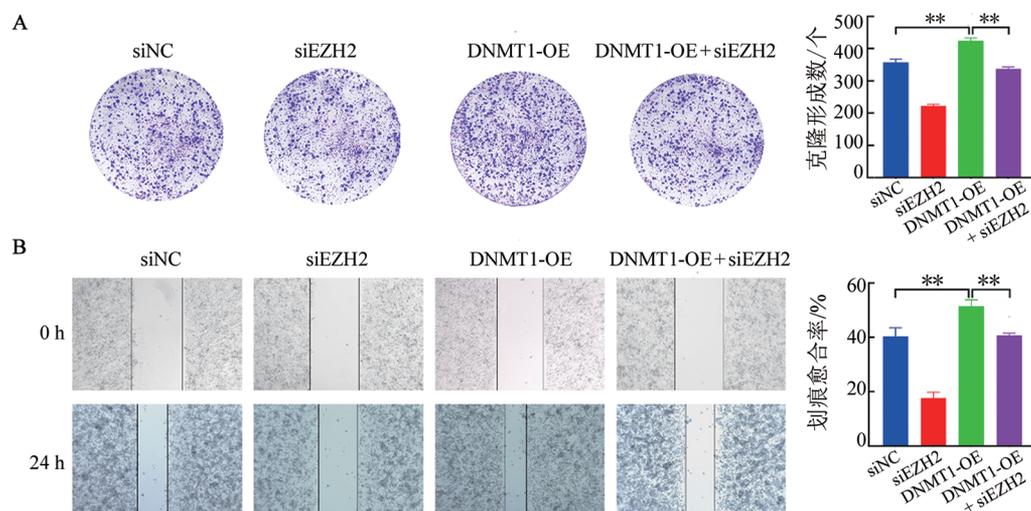
** $P < 0.01$ 。

图4 DNMT1通过抑制TRAF6介导的EZH2泛素化降解维持其蛋白稳定性

2.7 敲低EZH2能够逆转DNMT1对CRC细胞增殖和迁移的作用

为验证EZH2在DNMT1促进CRC细胞增殖和迁移中的关键作用,本实验进行了功能恢复实验,向

DNMT1-OE组HCT8细胞中转染EZH2的siRNA (siEZH2)后,克隆形成实验和划痕愈合实验检测结果(图5)显示,敲低EZH2能够逆转DNMT1过表达对HCT8细胞增殖和迁移的促进作用(均 $P < 0.01$)。



A: 克隆形成实验检测细胞增殖能力; B: 划痕愈合实验检测细胞的迁移能力。 ** $P < 0.01$ 。

图5 敲低 EZH2 对 DNMT1 过表达 HCT8 细胞增殖和迁移能力的影响

2.8 DNMT1、EZH2 在 CRC 组织中呈高表达而 TRAF6 呈低表达

免疫组化染色结果(图6)显示,与癌旁组织比较, CRC 组织中 DNMT1、EZH2 蛋白表达显著增加 (4.75 ± 1.83 vs 2.67 ± 1.55 、 5.25 ± 1.64 vs 3.42 ± 1.12 , 均 $P < 0.01$), 而 TRAF6 蛋白表达显著减少 (3.42 ± 1.19 vs 5.42 ± 2.22 , $P < 0.05$)。结果表明, DNMT1 和 EZH2 的上调与 TRAF6 的下调可能共同参与了 CRC 的分子发病机制, DNMT1-EZH2-TRAF6 轴可作为潜在的诊断标志物或治疗靶点。

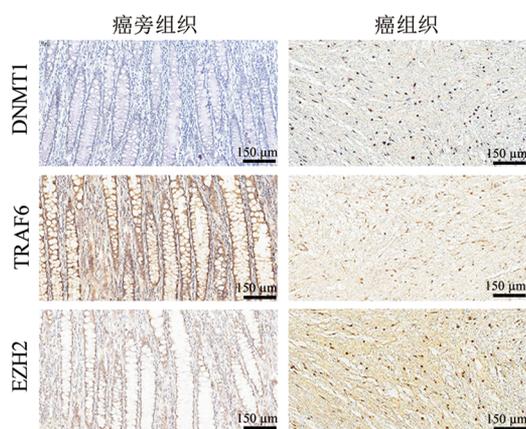


图6 免疫组化染色检测 CRC 组织与癌旁组织中 DNMT1、TRAF6 和 EZH2 蛋白的表达

3 讨论

CRC 是消化道常见恶性肿瘤, 中国发病率已接近发达国家水平, 饮食习惯改变、遗传等因素推动其发病增加, 预防与治疗均面临严峻挑战。目前, CRC 的治疗已涵盖手术、放疗、化疗、靶向治疗及免疫治

疗, 但针对发病机制的精准治疗策略仍有待进一步深入探索^[10]。CRC 的发生发展涉及表观遗传与翻译后修饰的复杂作用^[6, 11]。翻译后修饰通过改变蛋白质的稳定性、活性和定位, 在肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移过程中发挥着核心作用^[12]。本研究聚焦 DNA 甲基转移酶 DNMT1, 突破其传统“甲基化依赖”的致癌范式, 揭示了 DNMT1 通过非酶功能调控 E3 泛素连接酶 TRAF6, 进而抑制 EZH2 泛素化降解、稳定 EZH2 蛋白表达, 最终驱动 CRC 细胞增殖与迁移的全新机制; 同时, 明确了 DNMT1-TRAF6-EZH2 调控轴在 CRC 中的核心作用, 这一发现不仅拓展了 DNMT1 的生物学功能边界, 更为 CRC 靶向治疗耐药提供了新的解决方案。

DNMT1 在多种实体瘤中存在异常表达, 并伴随着异常的 DNA 甲基化^[13]。传统观点认为, DNMT1 通过催化 DNA 甲基化沉默抑癌基因, 从而驱动肿瘤发生^[14-17]。然而, 本研究发现, DNMT1 在 CRC 中可通过非甲基化依赖性途径发挥致癌作用。敲低或过表达 DNMT1 显著改变 EZH2 蛋白水平, 但对其 mRNA 表达无影响, 提示调控发生在翻译后层面; 蛋白酶体抑制剂 MG132 可完全逆转敲低 DNMT1 导致的 EZH2 蛋白降解, 且 DNMT1 敲低显著增强 EZH2 泛素化水平, 表明 DNMT1 通过抑制泛素-蛋白酶体途径维持 EZH2 稳定性。这一发现与近年提出的“DNMT1 非酶功能”假说相契合^[18-20]。在急性髓系白血病中的研究^[21]也证实, DNMT1 可通过与去泛素化酶 USP48 相互作用调控染色质稳定性, 进一步验证了 DNMT1 可通过泛素化相关通路发挥非甲基化依赖的致癌作用。既往研究^[22]发现, DNMT1 在滋养层细胞迁移和

侵袭中的积极作用, 据此推测其在 CRC 细胞恶性表型中也发挥重要作用。本研究通过克隆形成实验、CCK-8 法、划痕愈合实验和 Transwell 实验证实, DNMT1 显著促进 CRC 细胞的增殖与迁移能力, 表明 DNMT1 在 CRC 中可能扮演促癌因子的关键角色。

EZH2 作为 PRC2 复合物的核心催化亚基, 通过催化 H3K27me3 介导靶基因转录沉默, 同时可通过非经典途径(如 STAT3 甲基化)激活促癌信号, 其双重致癌机制在多种肿瘤中已被证实^[23-24]。本研究的核心发现之一是明确了 EZH2 为 DNMT1 调控 CRC 细胞恶性表型的关键下游执行者: DNMT1 过表达对 CRC 细胞增殖与迁移的促进作用, 可被 EZH2 敲低完全逆转。这一结果不仅建立了 DNMT1 与 EZH2 的直接功能关联, 更提示 DNMT1 对 EZH2 的稳定作用可同时强化其表观遗传沉默功能与非经典促癌通路, 进而放大促癌效应。值得注意的是, 胶质母细胞瘤中已证实 EZH2 的稳定性受 TRAF6 介导的泛素化降解调控^[25], 而本研究将这一调控模式整合入 DNMT1 的调控网络, 构建了“DNMT1-TRAF6-EZH2”的级联调控轴, 为理解表观遗传分子与泛素化系统的交互作用提供了新的范式, 即表观酶可通过调控泛素连接酶活性以间接控制下游表观关键分子的稳定性, 而非仅依赖自身酶活性发挥作用。

泛素-蛋白酶体系统是细胞内蛋白降解的主要途径, EZH2 的蛋白水平受多种 E3 泛素连接酶的动态调控, 而 TRAF6 作为其中关键分子, 其在 CRC 中的作用尚未与 DNMT1 关联。本研究的另一核心突破是阐明 TRAF6 在 DNMT1-EZH2 调控轴中的桥梁作用: DNMT1 通过负向调控 TRAF6 蛋白表达, 削弱其对 EZH2 的泛素化修饰能力, 从而延长 EZH2 蛋白半衰期。免疫荧光染色证实的 TRAF6 与 EZH2 细胞核共定位, 进一步提示二者可形成功能复合物直接调控 EZH2 泛素化; 而敲低 TRAF6 对 EZH2 泛素化的抑制作用, 直接验证了 TRAF6 作为 EZH2 泛素化的直接执行者。这一调控模式的发现, 为靶向泛素化通路干预表观异常提供了新思路。

本研究系统揭示了 DNMT1 通过抑制 TRAF6 介导的 EZH2 泛素化降解, 以非甲基化依赖方式驱动 CRC 细胞增殖与迁移的核心机制, 明确了 DNMT1-TRAF6-EZH2 调控轴在 CRC 中的功能与临床相关性。这一发现不仅拓展了对 DNMT1 经典功能的认知, 丰富了表观遗传与泛素化交互调控的理论体系, 更为 CRC 的精准治疗提供了全新的靶点方向与策略思路。但本研究仍存在一定局限性: 其一, 目前仅完成细胞层面的机制验证, 缺乏体内动物模型(如 CRC 异种移植瘤模型)对 DNMT1-TRAF6-EZH2 轴调控肿

瘤生长与转移的功能验证; 其二, 临床样本仅分析了 DNMT1 与 EZH2 的表达相关性, 尚未深入探究该轴关键分子表达与患者临床病理特征(如肿瘤分期、分化程度、预后)的关联, 其临床价值需进一步明确; 其三, DNMT1 负向调控 TRAF6 的具体分子机制(如是否通过直接结合抑制其活性, 或通过转录调控影响其表达)尚未解析。针对上述不足, 后续研究将重点开展以下工作: (1) 构建 CRC 异种移植瘤模型与原位瘤模型, 验证 DNMT1-TRAF6-EZH2 轴在体内的促癌功能及靶向干预的治疗效果; (2) 扩大临床样本队列, 结合随访数据分析该轴关键分子表达与患者预后的相关性, 明确其作为生物标志物的临床价值; (3) 通过 Co-IP、ChIP-seq 及萤光素酶报告基因实验, 解析 DNMT1 调控 TRAF6 的具体分子机制, 完善该调控轴的通路网络。未来研究将围绕这些方向深入探索, 为将 DNMT1-TRAF6-EZH2 轴转化为 CRC 临床治疗靶点奠定坚实基础。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] HOSSAIN M S, KARUNIAWATI H, JAIROUN A A, et al. Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(7): 1732. DOI: 10.3390/cancers14071732.
- [3] KAVIYARASAN V, DAS A, DEKA D, et al. Advancements in immunotherapy for colorectal cancer treatment: a comprehensive review of strategies, challenges, and future prospective[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2024, 40(1): 1. DOI: 10.1007/s00384-024-04790-w.
- [4] LI Q, GENG S, LUO H, et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer: pathogenesis and targeted therapy[J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2024, 9: 266. DOI: 10.1038/s41392-024-01953-7.
- [5] LIU H M, YANG J Y, ZHAO C M, et al. Identification of methylation-related genes and the potential regulatory mechanism of SLAMF6 in CMS4 colorectal cancer[J]. *Clin Epigenetics*, 2025, 17(1): 166. DOI: 10.1186/s13148-025-01953-6.
- [6] JUNG G, HERNÁNDEZ-ILLÁN E, MOREIRA L, et al. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(2): 111-130. DOI: 10.1038/s41575-019-0230-y.
- [7] WANG C C, MA X J, ZHANG J Y, et al. DNMT1 maintains the methylation of miR-152-3p to regulate TMSB10 expression, thereby affecting the biological characteristics of colorectal cancer cells[J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(11): 2432-2443. DOI: 10.1002/iub.2366.
- [8] LI C, SONG J G, GUO Z Y, et al. EZH2 inhibitors suppress colorectal cancer by regulating macrophage polarization in the tumor microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 857808. DOI: 10.3389/fimmu.2022.857808.

- [9] WU H, LU X X, WANG J R, et al. TRAF6 inhibits colorectal cancer metastasis through regulating selective autophagic CTNNB1/ β -catenin degradation and is targeted for GSK3B/GSK3 β -mediated phosphorylation and degradation[J]. *Autophagy*, 2019, 15(9): 1506-1522. DOI: 10.1080/15548627.2019.1586250.
- [10] ZHU G J, JIN L F, SUN W C, et al. Proteomics of post-translational modifications in colorectal cancer: discovery of new biomarkers[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2022, 1877(4): 188735. DOI: 10.1016/j.bbcan.2022.188735.
- [11] ZHANG W, XU J. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis[J]. *Biomark Res*, 2017, 5(1): 1. DOI: 10.1186/s40364-017-0081-z.
- [12] PENG N, LIU J W, HAI S S, et al. Role of post-translational modifications in colorectal cancer metastasis[J]. *Cancers (Basel)*, 2024, 16(3): 652. DOI: 10.3390/cancers16030652.
- [13] BIHL M P, FOERSTER A, LUGLI A, et al. Characterization of CDKN2A(p16) methylation and impact in colorectal cancer: systematic analysis using pyrosequencing[J]. *J Transl Med*, 2012, 10(1): 173. DOI: 10.1186/1479-5876-10-173.
- [14] CUNNINGHAM J M, CHRISTENSEN E R, TESTER D J, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(15): 3455-3460.
- [15] LIANG T J, WANG H X, ZHENG Y Y, et al. APC hypermethylation for early diagnosis of colorectal cancer: a meta-analysis and literature review[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(28): 46468-46479. DOI: 10.18632/oncotarget.17576.
- [16] WANG Q, LIANG N, YANG T, et al. DNMT1-mediated methylation of BEX1 regulates stemness and tumorigenicity in liver cancer[J]. *J Hepatol*, 2021, 75(5): 1142-1153. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.06.025.
- [17] MOHAN K N. DNMT1: catalytic and non-catalytic roles in different biological processes[J]. *Epigenomics*, 2022, 14(10): 629-643. DOI: 10.2217/epi-2022-0035.
- [18] ESPADA J. Non-catalytic functions of DNMT1[J]. *Epigenetics*, 2012, 7(2): 115-118. DOI: 10.4161/epi.7.2.18756.
- [19] QUARTO G, GRECI A L, BIZET M, et al. Fine-tuning of gene expression through the Mettl3-Mettl14-Dnmt1 axis controls ESC differentiation[J]. *Cell*, 2025, 188(4): 998-1018.e26. DOI: 10.1016/j.cell.2024.12.009.
- [20] ZHOU Y, ZHANG X Y, LIU Z, et al. DNMT1 mediates proliferation, migration and invasion of extravillous trophoblasts by regulating the methylation level of APLNR[J]. *Placenta*, 2023, 138: 33-43. DOI: 10.1016/j.placenta.2023.05.001.
- [21] SCHNEIDER C, ALEXE G, MERICKEL L A, et al. Chromatin perturbation promotes susceptibility to hypomethylating agents[J]. *bioRxiv*, 2025: 2025.07.28.666975. DOI: 10.1101/2025.07.28.666975.
- [22] LI S, ZHAI J Y, LIU J S, et al. BMAL1 facilitates trophoblast migration and invasion *via* SP1-DNMT1/DAB2IP pathway in recurrent spontaneous abortion[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(52): 89451-89464. DOI: 10.18632/oncotarget.20702.
- [23] VERMA A, SINGH A, SINGH M P, et al. EZH2-H3K27me3 mediated KRT14 upregulation promotes TNBC peritoneal metastasis[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7344. DOI: 10.1038/s41467-022-35059-x.
- [24] ZHOU W L, HUANG W L, YOU H J, et al. EZH2 knockout in mice activates STAT3 signalling *via* STAT3 methylation and modulates ferroptosis in pulpitis-affected dental pulp vascular endothelial cells: a laboratory investigation[J]. *Int Endod J*, 2025, 58(7): 1025-1041. DOI: 10.1111/iej.14232.
- [25] WANG J, SHEN S Q, YOU J, et al. PRMT6 facilitates EZH2 protein stability by inhibiting TRAF6-mediated ubiquitination degradation to promote glioblastoma cell invasion and migration[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(7): 524. DOI: 10.1038/s41419-024-06920-2.

[收稿日期] 2025-07-04

[修回日期] 2025-12-16

[本文编辑] 党瑞山