

·基础研究·

MMS21 通过维持 MCM2-7 复合物稳定性 促进肝细胞癌增殖活性

李文佳, 朱元昕, 胡开顺

(中山大学孙逸仙纪念医院基础与转化医学研究中心//广东省恶性肿瘤表观遗传与基因调控重点实验室,
广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨 SUMO E3 泛素连接酶 MMS21 在肝细胞癌的表达及发挥作用机制。【方法】利用 GEPIA2 和 CPATC 数据库分析 MMS21 在肝细胞癌中的 mRNA 和蛋白表达变化及与患者预后的关系;设计两条 siRNA 分别敲低肝癌细胞内源性 MMS21 的表达,并采用流式细胞技术检测细胞周期分布比例;进行 BrdU 染色和 DNA fiber 实验检测细胞增殖能力与 DNA 合成速度;构建带有 MYC 标签的 MMS21 蛋白过表达载体,并在细胞系 SK-hep1 中建立其稳定表达的细胞株;利用 Co-IP 联合质谱分析的方法鉴定 MMS21 的互作蛋白组并进行信号通路富集分析;采用 Western Blot,检测 MMS21 对细胞周期相关蛋白的影响。【结果】在肝细胞癌中,与癌旁组织(160例)相比,MMS21 在癌组织(369例)中显著高表达($P < 0.05$),其高表达与患者不良预后相关($P < 0.01$)。在肝癌细胞系中,使用两条 siRNA 分别敲低内源 MMS21 的表达后,SK-hep1 细胞中 G1 期的细胞比例显著上升($P < 0.001$; $P < 0.01$),S 期比例显著下降($P < 0.01$; $P < 0.05$),G2/M 期比例下降($P < 0.05$; $P < 0.05$);HepG2 细胞中 G1 期的细胞比例显著上升($P < 0.001$; $P < 0.001$),S 期比例显著下降($P < 0.01$; $P < 0.01$),G2/M 期比例下降($P < 0.05$; $P < 0.05$);SK-hep1 细胞的 DNA 合成速度明显减慢($P < 0.0001$; $P < 0.0001$);SK-hep1 和 HepG2 细胞增殖能力显著下降($P < 0.01$; $P < 0.001$; $P < 0.001$; $P < 0.001$)。质谱鉴定 MMS21 的互作蛋白组,共鉴定到 641 个高可信度蛋白;通路富集分析表明,这些结合蛋白显著富集于细胞周期相关的生理过程;进一步的 Western Blot 结果表明,MMS21 的缺失能抑制 S 期和 G2/M 期的周期蛋白表达量,降低微小染色体维持蛋白家族(MCMs)的蛋白水平。【结论】SUMO E3 连接酶 MMS21 在肝细胞癌中高表达,并与患者不良预后相关;MMS21 与肝癌细胞的增殖密切相关,能够维持细胞周期蛋白和复制复合物 MCM 蛋白稳定性,促进肝癌细胞的增殖能力。

关键词:肝癌;MMS21;增殖;CoIP-MS;微小染色体维持蛋白家族

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2022)02-0203-09

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0205

MMS21 Maintains the Stability of Complex MCM2-7 to Promote Hepatocellular Carcinoma Proliferation

LI Wen-jia, ZHU Yuan-xin, HU Kai-shun

(Medical Research Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital//Guangdong Provincial Key Laboratory of Malignant Tumor Epigenetics and Gene Regulation, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: HU Kai-shun; E-mail: huksh3@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression level of MMS21 and its functions in hepatocellular carcinoma. 【Methods】 The GEPIA2 and CPATC databases were used to analyze the mRNA and protein levels of MMS21 in adjacent

收稿日期:2021-12-21

基金项目:国家自然科学基金(82172636);广东省恶性肿瘤表观遗传与基因调控重点实验室项目(2020B1212060018)

作者简介:李文佳,硕士生,研究方向:恶性肿瘤表观遗传与基因调控研究,E-mail:liwj229@mail.sysu.edu.cn;胡开顺,通信作者,副研究员,研究方向:恶性肿瘤表观遗传与基因调控研究;E-mail:huksh3@mail.sysu.edu.cn

and carcinoma tissues; the endogenous expression levels of MMS21 were reduced individually by two siRNAs. Meanwhile, flow cytometry was used to detect the distribution ratio of cell cycle of hepatocellular carcinoma cells. BrdU staining and DNA fiber assay were employed to determine cells proliferation rate, and colony assay was used to evaluate the ability of cell proliferation; the MYC tagged MMS21 was cloned and transfected into SK-hep1 to generate MMS21 stably overexpressed cells. Co-IP combined with mass spectrometry were used to identify MMS21-interacting proteome and map interactive pathway; Western Blot (WB) was performed to determine the effect of MMS21 towards cell cycle-related proteins. [Results] Compared with adjacent tissues ($n = 160$), MMS21 was significantly higher expressed in cancerous tissues ($n = 369; P < 0.05$) and its high expression was associated with poor prognosis ($P < 0.01$) in hepatocellular carcinoma; Knockdown of endogenous MMS21 by two siRNAs led to the increase of the proportion of cells in G0/G1 phase ($P < 0.001; P < 0.01$), and the decrease of the ratio of cells in S ($P < 0.01; P < 0.05$), G2/M ($P < 0.05; P < 0.05$) phase. Moreover, depletion of endogenous MMS21 greatly attenuated the speed of DNA replication ($P < 0.0001; P < 0.0001$) and the rate of cell proliferation ($P < 0.01; P < 0.001$). Mass spectrometry analysis identified the total of 641 high-confidence proteins for MMS21, and interactive pathway analysis showed that these binding proteins were highly correlated with cell cycle-related genes. The results of Western Blot further confirmed this conclusion, and depletion of endogenous MMS21 markedly reduced the protein levels of Microchromosome maintenance protein family (MCMs). [Conclusions] MMS21 is highly expressed in hepatocellular carcinoma and positively correlated with the poor prognosis. MMS21 is closely related to the proliferation of Hepatocellular Carcinoma and regulated the stability of cell cycle related proteins and MCM family.

Key words: hepatocellular carcinoma; MMS21; proliferation; CoIP-MS; MCMs

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2022, 43(2): 203-211]

肝癌是世界第六大常见的恶性肿瘤。在中国,肝癌更是位列肿瘤相关死亡原因第二位;其中,85%~90%属于肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)。早期诊断率低、有效治疗药物的缺乏、术后易复发等,是导致肝癌患者预后差的主要原因^[1]。因此,深入研究肝癌形成及进展的分子机制,寻找新的诊断及治疗靶点,仍然是目前肝癌研究的重要内容。SUMO E3连接酶MMS21(NSMCE2),结构上包含两种染色体结构维持蛋白(Smc5/6)和一个Siz/PIAS(激活信号转导蛋白抑制剂和转录激活因子)RING结构域,具有E3连接酶活性并参与Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)进程。当E3连接酶MMS21的SUMO活性被破坏时,会导致不同的表型,如DNA损伤、核仁完整性和端粒聚集缺陷等^[2]。MMS21作为SMC5/6复合体的亚基,同时也是停滞叉蛋白质组的关键组成部分,能拮抗基因组不稳定^[3]。Zhao^[2]和Branzei等^[4]发现在芽殖酵母中,MMS21的缺失是致命的,虽然缺失其部分SUMO活性不完全致死,但造成复制相关DNA修复缺陷。Richard等^[5]证明MMS21通过维持DNA修复、平衡转录和基因组稳定性等在植物发育过程起到至关重要的作用。Kelvin等^[6]发现MMS21是复制应激修复反应的基因产物,是细胞有效拯救折叠的

复制叉以完成DNA合成所必需的。然而MMS21在肝癌中的功能与作用机制尚未报道,我们将对此问题进行全面探讨,以期对肝癌的诊断和治疗提供新的靶点和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

表达载体 pLVX-DsRed-Monomer-N1 (Clontech, 632152), 胎牛血清 (LONSERA, S712-012), 总RNA提取试剂盒 (ESscience, RN001), 逆转录试剂盒 (TaKaRa, RR047A-1), SYBR Green qPCRMix (TaKaRa, RR820), ECL化学发光底物 (Vazyme, E412-01-AA), 高保真酶 (TaKaRa, R040), 限制性内切酶 BamH1 (Thermo Scientific, ER0051), Xho1 (Thermo Scientific, ER0691), GeneJET PCR纯化试剂盒 (Thermo Scientific, K0702), T4连接酶 (Thermo Scientific, EL0014), 粘附载玻片 (CITOTEST, 80312-3161), 显微镜盖玻片 (CITOTEST, 80340-3610), 快速银染试剂盒 (Beyotime, P0017S), RNase (AG, A3A0336), PI (Beyotime, ST511), Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Scientific, 13778150), anti-Br-

dU (ABclonal, A1482), DAPI (Beyotime, C1002), Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific, A11001), anti-IdU (Origene, TA190129), anti-BrdU (Abcam, ab6326), Goat anti-Rat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 (Thermo Scientific, A-21434), anti-MYC (Servicebio, GB12076), anti-Tubulin (TransGen Biotech, HC101-01), anti-Cyclin A2 (CST, 4656T), anti-Cyclin B1 (CST, 4138T), anti-Cyclin D1 (PTG, 60186-1-Ig), anti-Cyclin D3 (CST, 2936T), anti-Cyclin E1 (PTG, 11554-1-AP), anti-MCM2 (BD, 610700), anti-MCM3 (PTG, 15597-1-AP), anti-MCM4 (PTG, 13043-1-AP), anti-MCM5 (PTG, 11703-1-AP), anti-MCM6 (BD, 611622), anti-MCM7 (PTG, 11225-1-AP), anti-NSE2/MMS21 (Santa, sc-51747)。

1.2 细胞培养

SK-hep1、Huh7、HepG2、SNU-182和LO2细胞均来自中科院上海细胞库,细胞在37℃和5% CO₂的培养箱中使用含有10%的FBS高糖DMEM培养基培养。

1.3 PCR扩增MMS21

以SK-hep1全基因组cDNA为模板,高保真酶扩增目的基因。反应条件为:98℃ 5 min;98℃ 10 s;55℃ 5 s;72℃ 1 min,进行35个循环。将PCR产物进行电泳检测,取正确大小的胶带进行回收纯化。纯化后的产物用BamH1和XhoI内切酶37℃反应1 h后,纯化片段,并用T4连接酶将其连接到同样酶切过后的Plvx表达载体中,通过大肠杆菌转化涂板,挑选出单克隆菌落,测序鉴定。MMS21 PCR扩增引物:F(含MYC标签):CCCTCGAGATG-GAGCAGAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGAT -GCCAGGACGTTCCAGTTC; R:CGGGATCCTCCTA CTCGGAATGACGATGTC。

1.4 免疫沉淀与质谱

采用10 cm大皿扩增Plvx-MYC-MMS21和Plvx-MYC-Vector细胞,待细胞长到85%,去除上清,用1 mL含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的NETN buffer(20 mmol/L Tris - HCl [pH 8.0], 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA and 0.5% Nonidet P-40)裂解液将细胞在冰上裂解30 min并收集^[7]。再用4℃ 15 000×g高速离心机去除细胞碎片沉淀,收

集上清。在上清中加入用NETN buffer清洗过三次的MYC标签的琼脂糖珠,置于4℃冰箱摇床孵育过夜。将琼脂糖珠-抗体-蛋白的混合物清洗三次,取90%样品进行银染及质谱分析,10%样品在98℃高温变性10 min,置于8% SDS-PAEG电泳胶。

1.5 DNA Fiber

在细胞密度70%~85%时,CIdU(50 μmol/L)处理20 min后,用PBS洗两次,用IdU(500 μmol/L)处理20 min,用胰酶消化细胞并收集于1.5 mL EP管中离心,用预冷的PBS重悬细胞沉淀,置于冰上30 min,将1 μL细胞滴在载玻片静置片刻,待液滴边缘干燥时,加入裂解液7 μL并静置2 min,再将载玻片倾斜(20°~40°角)使液滴缓慢流下,待玻片风干后,固定并变性90 min,用PBS洗3 min,用免疫荧光封闭液封闭30 min,加入一抗BrdU(Rat)/IdU(M)于4℃孵育过夜。第二天用PBST清洗3次,每次3 min,荧光二抗Goat anti-Rat IgG(H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555和Goat anti-Mouse IgG(H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488混合液常温孵育1 h,用PBST洗3次后,载玻片依次用75%、95%和无水乙醇脱水。载玻片用盖玻片封片后,在具有63倍物镜的激光共聚焦显微镜下成像。

1.6 流式细胞术

细胞用siRNA处理48 h后,用胰酶将细胞消化收集在1.5 mL EP管中,常温120×g低速离心机离心,细胞沉淀用预冷的PBS清洗1次后,用1 mL预冷的PBS和75%酒精混合物(1:9)重悬细胞沉淀。单细胞悬浮液在4℃固定过夜后,离心去上清,避光加入1 mL RNase和PI混合液(RNase工作浓度2 μg/mL,PI工作浓度50 μg/mL)并避光孵育30 min。处理后的单细胞悬浮液置流式管中,使用流式细胞仪测定,数据采用ModFit LT 5.0软件进行分析。

1.7 定量PCR

总RNA提取、反转录、qPCR:均使用购自Takara的提取、反转录、qPCR试剂盒,参照说明书操作。β-actin的qPCR引物F:5'-TCATGAAGTGTGAC-GTGGACAT-3', R:5'-CTCAGGAGGAGCAAT-GATCTTG-3'; MMS21的qPCR引物F:5'-ATGC-CAGGACGTTCCAGTTC-3', R:5'-CCATACCAGAGTTGATACA GGCT-3'。

1.8 细胞siRNA转染

在细胞密度40%~50%时,进行细胞siRNA

(small interference RNA)干扰。具体实验步骤如下:分别将5 μ L Lipofectamine® RNAiMAX 试剂用150 μ L Opti-MEM 培养基稀释成混合液(1),30 pmol siRNA用150 μ L Opti-MEM 培养基稀释成混合液(2)。再将混合液(2)加入混合液(1)中,室温孵育5 min后,加入细胞培养皿中。细胞在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂的培养箱中继续培养48 h。MMS21 siRNA序列如下:siMMS21#1:5'-UUCAACCAUUGCCUUGUCCTT-3', siMMS21#2:5'-GACUGAAGUGAGUAGUGAAAdTdT-3'。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行数据统计分析, GraphPad Prism 8.0 软件作图。组间数据平均值比较采用 Student's *t*-test 检验。

2 结果

2.1 MMS21 在肝细胞癌中高表达且与预后不良相关

为了阐述 MMS21 在肝癌发生发展中的作用,我们首先分析了 MMS21 在 HCC 中的 mRNA 表达水平。Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) (<http://gepia.cancer-pku.cn/>)的数据显示,与160例癌旁组织(N)相比,369例肝细胞癌组织(T)中的 MMS21 表达显著上调(图1A)。同时在数据库 clinical proteomic tumor analysis consortium (CPTAC) (<https://proteomics.cancer.gov/programs/>

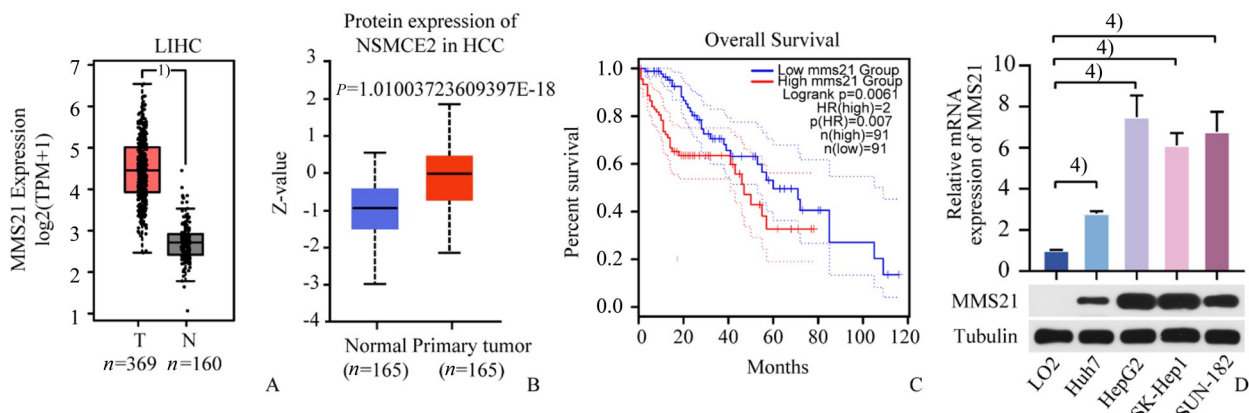
cptac)中,对比 HCC 的癌旁组织, MMS21 (NSMCE2) 在肝癌组织中的蛋白水平也呈现高表达(图1B)。值得注意的是, MMS21 的高表达与肝癌患者的不良预后相关(图1C)。接下来,我们收集了正常肝细胞系 LO2 和4个肝癌细胞系(Huh7、SK-hep1、HepG2 和 SUN-182)以做进一步的证明。通过 qPCR 和 Western blot 分别检测 mRNA 和蛋白表达水平,结果显示肝癌细胞系中 MMS21 的 mRNA 和蛋白表达明显高于正常肝细胞系(图1D)。综上所述, MMS21 与肝癌的恶性进展密切相关。

2.2 沉默 MMS21 阻碍肝癌细胞 G1-S 期的转换

接下来,为证明 MMS21 在肝癌增殖中的重要作用,我们分别敲低肝癌细胞 SK-hep1 和 HepG2 中的内源性 MMS21 蛋白表达来进行功能缺失实验(图2A)。细胞周期分析显示,在 MMS21 敲低的 SK-hep1 细胞中 G1 期比例增加, S 期比例减少, G2/M 期的比例减少;同样在 HepG2 细胞中,敲低内源性 MMS21 后, G1 期细胞比例增加, S 期细胞比例减少, G2/M 期细胞的比例减少(图2B、2C)。

2.3 沉默 MMS21 抑制肝癌细胞的增殖

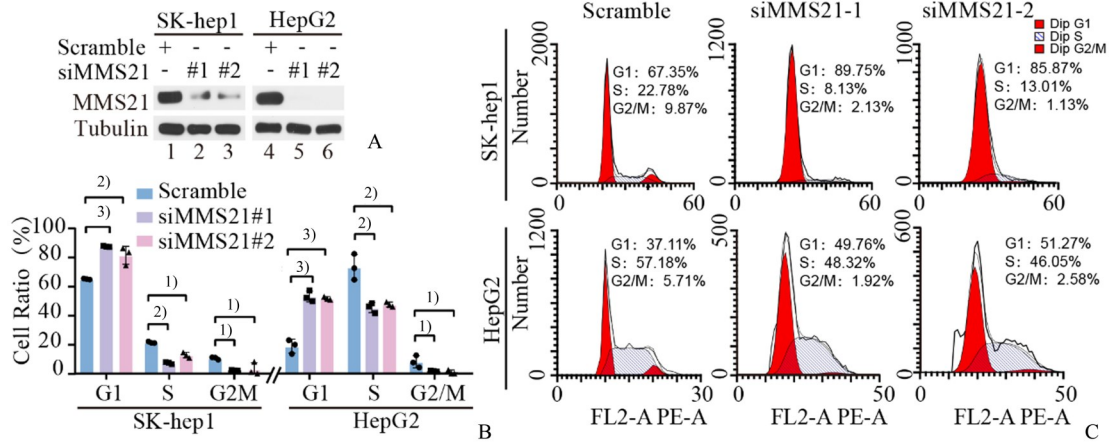
为进一步探讨肝细胞癌中 MMS21 的促增殖作用,我们利用 BrdU 和克隆形成试验来评估 MMS21 对肝癌细胞 SK-hep1 和 HepG2 细胞增殖能力的影响。如图3A、3所示,在 MMS21 敲低的 SK-hep1 和 HepG2 细胞中, SK-hep1 细胞增殖能力和克隆形成能力显著降低。在 HepG2 细胞中也得到了一致结论,敲低内源性 MMS21 后细胞的增殖能力显著下降。



A: MMS21 mRNA expression in HCC specimens ($n = 369$) and HCC non-tumour tissues ($n = 160$) was analyzed by the GEPIA web tool. 1) $P < 0.05$. B: MMS21 protein expression in HCC specimens ($n = 165$) and HCC non-tumour tissues ($n = 165$) was analyzed by the CPTAC web tool. $P = 1.01003723609397E-18$. C: The overall survival time of the low vs. high MMS21 expression in HCC patients. D: The expression of MMS21 in LO2, Huh7, HepG2, SK-Hep1 and SUN-182 cells was analyzed by RT-qPCR and Western blotting. $n = 3$; 4) $P < 0.0001$.

图1 MMS21在肝细胞癌中高表达且与患者预后不良相关

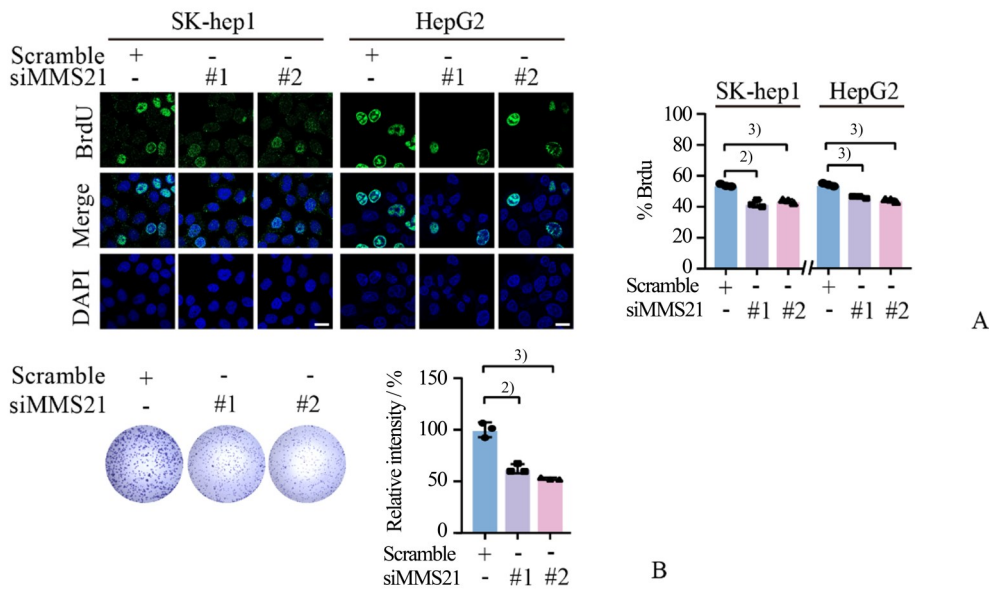
Fig. 1 MMS21 was upregulated in HCC tissues and associated with poor prognosis



A: Efficiency of MMS21 silencing in SK-Hep1 and HepG2 cells. B, C: Cell cycle distributions of SK-Hep1 and HepG2 with siMMS21-1, siMMS21-2 or Scramble. Data are presented as the mean ± SEM, n = 3; 1) P < 0.05; 2) P < 0.01, 3) P < 0.001, Student's t-test.

图2 沉默MMS21阻碍肝癌细胞G1-S期的转换

Fig. 2 MMS21 silencing blocks the G1-S phase transition in HCC cells



A, B: The proliferative ability of HCC cells transfected with either scrambled or siMMS21 were tested by BrdU assay (n = 3); 2) P < 0.01, 3) P < 0.001, 3) P < 0.001 and colony formation assay (n = 3); 2) P < 0.01, 3) P < 0.001; scale bar indicates 20 μm. >500 cells were analyzed in each group.

图3 沉默MMS21抑制肝癌细胞的增殖

Fig. 3 Depletion of MMS21 inhibits HCC cells proliferation

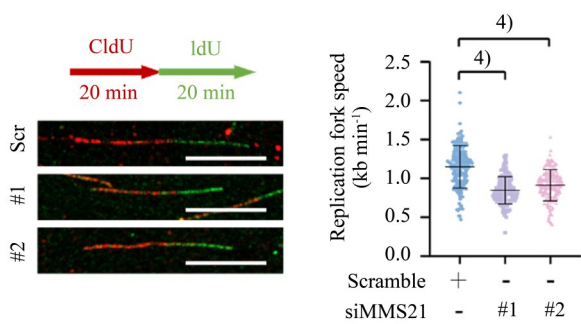
2.4 沉默MMS21减慢DNA复制叉的速度

我们进行了DNA Fiber实验以研究敲低MMS21后对细胞复制叉动力学的影响,以进一步明确MMS21调控肝细胞癌增殖的分子机制。与对照细胞(~1.154 kb/min)相比,敲低MMS21的细胞中表现出平均复制速度(~0.844 kb/min和~0.9125 kb/min)显著降低。这些结果表明MMS21在肝癌细

胞的DNA复制过程中发挥十分重要作用(图4)。

2.5 MMS21互作蛋白组聚类分析

我们以上数据表明,MMS21在肝癌细胞的增殖中发挥着重要作用。为了更深入地了解MMS21在HCC形成中的潜在机制,我们采用质谱蛋白质组学来鉴定MMS21的下游靶蛋白。在稳定过表达MMS21的SK-hep1细胞中,Co-IP后的银染结果提



DNA fibers were stained with antibodies recognizing CldU (red) and IdU (green). Representative images of DNA fibers in Scramble (Scr) and MMS21 knockdown (#1, #2). The lengths of the CldU and IdU tracts were measured and converted to kilobases using a common conversion factor, the DNA fibers were 2.59 kb/ μm using the spreading methods. Approximately 200 fibers were counted per sample ($n = 3$); 4) $P < 0.0001$.

图4 沉默MMS21减慢DNA复制叉的速度
Fig. 4 MMS21 knockdown reduces the DNA replication-fork speed

示,与对照组相比,有较多差异蛋白存在(图5A、5B)。进一步,我们通过质谱鉴定了MMS21的互作蛋白质组。对比对照组和实验组质谱数据,鉴定出与MMS21特异结合的641个蛋白(图5C)。通过对641个互作蛋白进行GO(Gene Ontology)分析,显示MMS21及其互作蛋白参与蛋白翻译、定位、折叠,线粒体翻译以及免疫反应等细胞过程,同时利用3.6.3 Cytoscape分析软件,进一步对与MMS21相互作用的蛋白构建蛋白相互作用关系网。值得注意的是,MMS21的互作蛋白与细胞周期调控密切相关,如Cyclin A2, MCM3/5/6等(图5D-5F)。

2.6 MMS21参与调控肝癌细胞的周期蛋白

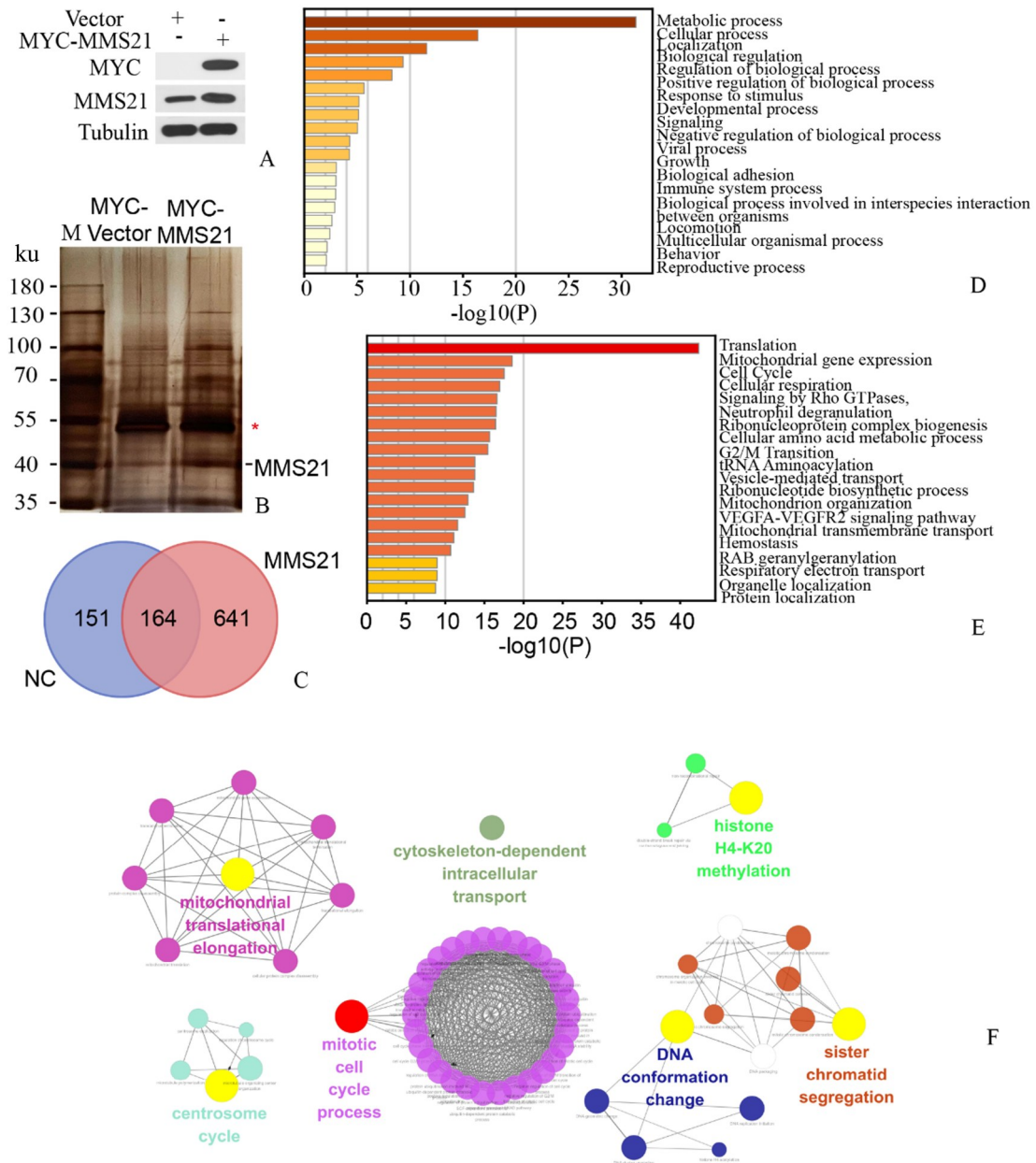
细胞周期受到细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶等的共同调节。如图6A所示,在经典细胞周期模型中,G1期细胞受生长因子刺激会导致D型细胞周期蛋白(Cyclin D1、D2和D3)上调,进而激活细胞周期蛋白依赖性激酶CDK4/6,形成的Cyclin D-CDK4/6复合物与E型细胞周期蛋白(Cyclin E1和E2)及其相关激酶(主要是CDK2,但也有CDK1/3)磷酸化并使视网膜母细胞瘤蛋白Rb失活。在协同作用驱动下细胞进入S期,此时细胞周期蛋白A2(Cyclin A2)上调并与CDK1/2结合促进S期进展。在第二个间隙阶段(G2)之后,细胞周期蛋白B(Cyclin B)易位到细胞核,激活CDK1,并推动遗传物质分离到子细胞。通过质谱结果,提示我

们MMS21可能参与调控细胞周期蛋白。为了验证这一假说,我们进行了蛋白质印迹分析,结果显示MMS21敲低后,可以显著降低S期和G2/M期的周期蛋白表达量,而对G1期的前期周期蛋白没有显著变化,G1期的后期周期蛋白E1水平增加(图6B)。微小染色体维持蛋白家族(minichromosome maintenance proteins, MCMs)是DNA复制所必需的蛋白,MCM2-7形成的六聚体具有DNA解旋酶活性是DNA复制解旋酶的催化核心,在单个细胞的S期中确保基因组DNA完全准确的复制。为了进一步证实MMS21参与细胞周期的调控,我们敲低MMS21蛋白后检测MCM2-7复合物的蛋白水平,发现整个复合物蛋白水平都降低,其中MCM3/6降低尤其明显。综上所述,MMS21能够影响细胞周期蛋白表达水平进而调控肝癌细胞的增殖(图6C)。

3 讨论

近年来,随着手术方案的改进以及新的化疗方案等的出现,虽然肝癌患者的生存率较前有所提高,但是肝癌患者的预后仍然较差^[8]。因此,深入阐明肝癌发生发展的分子机制,对于寻找新的诊断及治疗靶点、改善肝癌患者的预后具有十分重要的作用。

在本课题研究中,我们通过GEPIA和CPTAC数据库分析发现,在肝癌组织中MMS21的mRNA和蛋白水平均呈高表达,并且其高表达与肝癌患者不良预后相关。进一步,通过qPCR和Western blot检测LO2(人正常肝细胞)、Huh7、HepG2、SK-Hep1和SUN-182等细胞系,发现在肝癌细胞系中MMS21的mRNA和蛋白水平均显著上调。提示,MMS21在肝癌中可能发挥促癌的功能。同时在GEPIA数据库中,我们也发现MMS21在胆管癌(CHOL)、弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBC)、胶质母细胞瘤(GBM)、胰腺癌(PAAD)和胸腺癌(THYM)中均呈高表达,提示MMS21在多种肿瘤中扮演促癌基因的角色。对于MMS21在多种肿瘤中高表达的原因,我们推测可能有以下三个方面的因素:1、在DNA水平,通过UALCAN(<http://ualcan.path.uab.edu/>)中的TCGA数据库发现,相比于癌旁组织,在肝癌组织中MMS21的启动子甲基化水平更低,提示MMS21启动子的去甲基化与肝癌的发生发展密



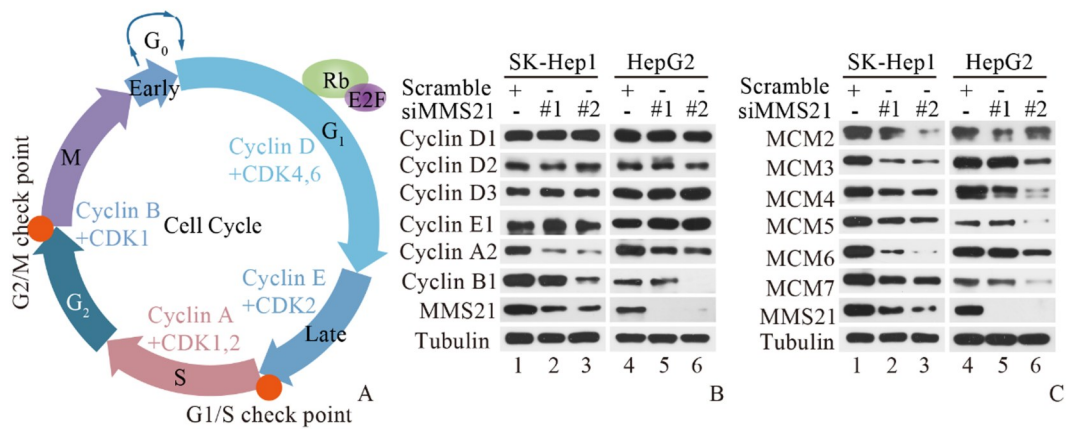
A: Expression of Plvx-MYC-MMS21 in stably transfected SK-hep1 cell line was verified by Western blot. B, C: Silver staining of MMS21 interacting proteins and mass spectrometry identification. D-F: Genetic ontology annotation, pathway enrichment and protein-protein interaction network.

图5 MMS21 互作蛋白组聚类分析

Fig. 5 Bioinformatic clustering analyses of MMS21 interactome

切相关;2、在转录水平,利用 miRDB 数据库(<http://www.mirdb.org/>)预测 MMS21 可能相互作用的 mi-croRNA,发现其可作为 miR-3143, miR-498-5p, miR-302c-5p, miR-6798-3p, and miR-31-3p 等 microRNA 的靶基因。Jing 等^[9]发现在宫颈癌细胞中 miR-31-3p 显著下调,体外过表达 miR-31-3p 能够抑制宫颈癌细胞的恶性行为和 EMT,提示我们

microRNA 可能参与调控 MMS21 的 mRNA 表达水平;不过我们也不排除还有其他潜在的转录因子,在转录水平介导 MMS21 的表达,我们后续将进一步实验研究证明;3、在蛋白水平,通过分析 Co-IP 联合质谱鉴定 MMS21 的互作蛋白,我们发现 MMS21 与去泛素化酶(DUB)家族中的 USP5/33/37/53 有相互作用,这提示我们去泛素化酶也参与



A: Phases of the cell cycle and cycle regulators. B, C: SK-hep1 and HepG2 cells transfected with either scrambled or MMS21 siRNAs for 48 h were subjected to Western blot with indicated antibodies.

图6 MMS21参与调控肝癌细胞的周期相关蛋白稳定性

Fig. 6 MMS21 maintained the protein stability of several cell cycle regulators in HCC

MMS21 的蛋白稳定性调节,对此我们将在接下来研究中深入探讨。Jacome 等^[10]在转基因鼠的研究发现, MMS21 的单拷贝缺失可以增加淋巴瘤等肿瘤的发生率,而且这种作用并不依赖于其SUMO化酶活性。Potts 等^[11]报道,在骨肉瘤细胞中, MMS21 参与形成的 SMC5/6 复合物能够调节端粒结合蛋白的 SUMO 化修饰,介导端粒的同源修复和延长抑制肿瘤细胞的衰老。然而, Ni 等^[12]发现,在乳腺癌 MCF-7 细胞中, MMS21 参与细胞 DNA 损伤修复和细胞有丝分裂进程导致细胞增殖受阻。因此, MMS21 在不同的研究模型或肿瘤中,可能通过不同的机制发挥着截然不同的作用。然而 MMS21 在肝癌中的功能及作用机制目前尚未见报道。在本研究中,我们通过流式细胞术、BrdU、DNA Fiber 等多种方法检测了 MMS21 对肝癌细胞增殖等影响。结果表明,当 MMS21 缺陷时能够明显抑制肝癌的细胞周期进程,阻碍细胞由 G1 向 S 期的转换,从而使其阻滞在 G1 期。MMS21 已被证明有助于 DSB 修复、暂停复制叉重启和 HR 的端粒伸长^[13]。当复制叉遇到阻力会导致复制叉停顿, DNA Fiber 技术已成为直接监测 DNA 复制叉动力学的金标准^[14]。DNA Fiber 分析结果表明,敲低 MMS21 能阻碍复制叉的前进,抑制 DNA 合成速度,这提示 MMS21 与肝癌细胞复制叉进程有关。MMS21 作为 SMC5/6 复合物的一员,在调节 DNA 损伤修复过程中具有重要作用,而 DNA 损伤与细胞周期的有序进行密切相关^[15]。为了更直接的阐明 MMS21 调节细胞周期的

作用,我们通过 Co-IP 联合质谱鉴定的方法检测了 MMS21 的互作蛋白组。结果发现, MMS21 的互作蛋白主要与细胞周期相关通路有关。这提示我们,除了通过调节 DNA 损伤修复间接促进细胞周期的正常进行, MMS21 还可以通过结合细胞周期相关蛋白直接调节细胞周期。为了证实这一猜想,我们检测了 MMS21 对细胞周期相关蛋白的调节作用,发现 MMS21 能够调控细胞周期相关蛋白的表达,敲低 MMS21 能下调 S 和 G2 期周期蛋白 Cyclin A2 和 Cyclin B1 的蛋白水平同时上调 G1 后期蛋白 Cyclin E1 水平,提示 MMS21 的缺陷导致细胞阻滞在 G1 期,抑制 G1/S 的转变。MCMs 蛋白家族在所有真核生物中具有高度保守性^[16]。既往研究将 MCM 确定为 DNA 复制起始的核心参与者^[17]。最近的研究表明, MCM 蛋白也在复制延长中起作用,可能作为 DNA 解旋酶^[16]。MCMs 在整个细胞周期中组成性地定位于细胞核中,它们与染色质结合,受细胞周期蛋白调控^[18-19],同时 MCM 与扩展复制叉相关联,其动力学与 DNA 合成因子相似,随着复制叉的扩展而移开^[20-21]。我们在质谱蛋白互作数据中发现, MMS21 与 MCM2/3/5/6 相互作用,同时敲低 MMS21 能下调 MCM2-7 复合物内的几乎所有蛋白的稳定性。然而, MMS21 对其结合的细胞周期相关蛋白的调节是否依赖于其 SUMO 化酶活性以及具体的调节靶蛋白是什么,以及 MMS21 对于 MCM2-7 复合物的稳定性调节具体机制,目前尚不清楚。我们将通过后续研究对此问题进行深入阐明。

综上所述,本研究证实 MMS21 在肝癌中高表达,并促进肝癌细胞的生长,其机制为调控细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶表达,同时影响

MCM2-7 复合物的蛋白水平。这些数据表明 MMS21 可能是肝癌诊治的潜在新靶标,为肝癌的诊断和治疗提供新思路。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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.
- [2] Zhao X, Blobel G. A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(13): 4777-4782.
- [3] Dungrawala H, Rose KL, Bhat KP, et al. The replication checkpoint prevents two types of fork collapse without regulating replisome stability[J]. *Mol Cell*, 2015, 59(6): 998-1010.
- [4] Branzei D, Sollier J, Liberi G, et al. Ubc9- and mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks[J]. *Cell*, 2006, 127(3): 509-522.
- [5] Zhang J, Augustine RC, Suzuki M, et al. The SUMO ligase MMS21 profoundly influences maize development through its impact on genome activity and stability[J]. *PLoS Genet*, 2021, 17(10): e1009830.
- [6] Pond KW, de Renty C, Yagle MK, et al. Rescue of collapsed replication forks is dependent on NSMCE2 to prevent mitotic DNA damage[J]. *PLoS Genet*, 2019, 15(2): e1007942.
- [7] Hu K, Wu W, Li Y, et al. Poly(ADP-ribosyl)ation of BRD7 by PARP1 confers resistance to DNA-damaging chemotherapeutic agents[J]. *EMBO Rep*, 2019, 20(5): e46166.
- [8] Torimura T, Iwamoto H. Treatment and the prognosis of hepatocellular carcinoma in Asia[J]. *Liver Int*, 2021, doi: 10.1111/liv.15130.
- [9] Jing L, Bo W, Yourong F, et al. Sema4C mediates EMT inducing chemotherapeutic resistance of miR-31-3p in cervical cancer cells[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 17727.
- [10] Jacome A, Gutierrez-Martinez P, Schiavoni F, et al. NSMCE2 suppresses cancer and aging in mice independently of its SUMO ligase activity[J]. *EMBO J*, 2015, 34(21): 2604-2619.
- [11] Potts PR, Yu H. The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(7): 581-590.
- [12] Ni HJ, Chang YN, Kao PH, et al. Depletion of SUMO ligase hMMS21 impairs G1 to S transition in MCF-7 breast cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(12): 1893-1900.
- [13] Potts PR. The Yin and Yang of the MMS21-SMC5/6 SUMO ligase complex in homologous recombination[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2009, 8(4): 499-506.
- [14] Halliwell JA, Gravells P, Bryant HE. DNA Fiber Assay for the analysis of DNA replication progression in human pluripotent stem cells[J]. *Protoc Stem Cell Biol*, 2020, 54(1): e115.
- [15] Duan X, Sarangi P, Liu X, et al. Structural and functional insights into the roles of the Mms21 subunit of the Smc5/6 complex[J]. *Mol Cell*, 2009, 35(5): 657-668.
- [16] Forsburg SL. Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation[J]. *Microbiology and molecular biology reviews: Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(1): 109-131.
- [17] Hayashi-Takanaka Y, Hayashi Y, Hirano Y, et al. Chromatin loading of MCM hexamers is associated with di-/tri-methylation of histone H4K20 toward S phase entry[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(21): 12152-12166.
- [18] Pasion SG, Forsburg SL. Nuclear localization of *Schizosaccharomyces pombe* Mcm2/Cdc19p requires MCM complex assembly[J]. *Mol Biol Cell*, 1999, 10(12): 4043-4057.
- [19] Lee PH, Osley MA. Who gets a license: DNA synthesis in quiescent cells re-entering the cell cycle[J]. *Curr Genet*, 2021, 67(4): 539-543.
- [20] Jenkyn-Bedford M, Jones ML, Baris Y, et al. A conserved mechanism for regulating replisome disassembly in eukaryotes[J]. *Nature*, 2021, 600(7890): 743-747.
- [21] Wang Y, Chen H, Zhang J, et al. MCM family in gastrointestinal cancer and other malignancies: From functional characterization to clinical implication[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1874(2): 188415.