

UBE2L6 在胃癌中的表达及其生物学功能

张佳慧,孔洁羽,李胜棉*

(河北医科大学第四医院消化内科,河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的** 探究泛素结合酶 E2L6 (ubiquitin-conjugating enzyme E2L6, UBE2L6) 在胃癌中的表达、预后价值及其对细胞恶性行为的影响。**方法** 利用癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas Program, TCGA)等公共数据库分析 UBE2L6 表达、预后及与免疫微环境关联。通过免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)、定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)验证其在胃癌组织和细胞中的表达,并结合临床资料分析其与病理特征及预后的关系。在胃癌细胞中进行过表达和敲低 UBE2L6,利用细胞增殖实验、克隆形成、细胞迁移/侵袭实验评估其对增殖、迁移、侵袭的影响。**结果** UBE2L6 在多种肿瘤中表达增高,在胃癌组织及多种胃癌细胞系中表达显著增高($P < 0.001$),细胞功能实验证实过表达 UBE2L6 促进胃癌细胞增殖、迁移和侵袭;敲低则显著抑制这些能力($P < 0.001$)。IHC 结果显示胃癌组织中 UBE2L6 高表达组阳性率显著高于癌旁组织($\chi^2 = 57.760, P < 0.001$),且其表达水平与患者年龄、肿瘤大小相关。生存分析显示 UBE2L6 高表达组总生存期显著延长($P < 0.05$),尽管中位无进展生存期(progression-free-survival, PFS)有延长趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。生物信息学分析进一步揭示,UBE2L6 的高表达与肿瘤微环境中免疫细胞浸润水平呈显著正相关,提示其可能通过调控免疫微环境参与胃癌进展。**结论** UBE2L6 在胃癌中表达显著增加,这表明 UBE2L6 在细胞水平上参与了胃癌的发生发展。结合高表达 UBE2L6 的患者预后优于低表达患者的趋势,进一步指向 UBE2L6 在胃癌中的作用具有复杂性,可能与免疫微环境中的抗肿瘤免疫反应有关,然而其具体机制仍需深入研究。

[关键词] 胃肿瘤;泛素结合酶 E2L6;功能调控 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2025.11.003

[中图分类号] R735.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2025)11-1259-11

Expression of UBE2L6 in gastric cancer and its biological function

ZHANG Jia-hui, KONG Jie-yu, LI Sheng-mian*

(Department of Gastroenterology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University,
Shijiazhuang 050011, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of ubiquitin-conjugating enzyme E2L6 (UBE2L6) in gastric cancer, its prognostic value and its impact on malignant cellular behaviors. **Methods** Public databases, including The Cancer Genome Atlas (TCGA), were used to analyze UBE2L6 expression, prognosis, and its association with the immune microenvironment. Immunohistochemistry (IHC) and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) were performed to validate its expression in GC tissues and cells. Clinical data were analyzed to assess correlations of UBE2L6 with pathological features and prognosis. UBE2L6 was overexpressed or knocked down in GC cells, and its effects on proliferation, migration, and invasion were evaluated using cell proliferation assays, colony formation, and transwell migration/invasion assays. **Results** UBE2L6 expression was upregulated in multiple cancers,

[收稿日期]2025-06-13

[基金项目]河北省自然科学基金会项目(H2022206538)

[作者简介]张佳慧(1994-),女,河北邢台人,河北医科大学第

四医院医学博士研究生,从事消化道肿瘤诊治研究。

* 通信作者。E-mail:shengmianli@163.com

which was significantly higher in gastric cancer tissues and various cell lines ($P < 0.001$). Functional assay demonstrated that UBE2L6 overexpression promoted GC cell proliferation, migration, and invasion, whereas UBE2L6 knockdown significantly suppressed these malignant capacities ($P < 0.001$). IHC analysis revealed that the positive rate of UBE2L6 of gastric cancer tissues in the high-expression group was significantly higher than that in the adjacent non-cancerous tissues ($\chi^2 = 57.760$, $P < 0.001$), and its expression level was correlated with patient age and tumor size. Survival analysis indicated that high UBE2L6 expression was associated with significantly prolonged overall survival (OS) ($P < 0.05$), while median progression-free survival (PFS) showed a trend of prolongation without statistical significance. Bioinformatics analysis further demonstrated that high UBE2L6 expression was positively correlated with immune cell infiltration levels in the tumor microenvironment, suggesting that it might be involved in the progression of gastric cancer by regulating the immune microenvironment. **Conclusion** UBE2L6 expression is significantly increased in gastric cancer, suggesting that UBE2L6 is involved in the development of gastric cancer at the cellular level. Considering the trend that the prognosis of patients with high expression of UBE2L6 is better than that of patients with low expression, it further points to the complexity of the role of UBE2L6 in gastric cancer, which may be related to the anti-tumor immune response in the immune microenvironment. However, the specific mechanism still needs to be studied in depth.

[Key words] stomach neoplasms; UBE2L6; functional regulation

胃癌是一种全球范围内高发且致死率极高的恶性肿瘤,根据2022年国际癌症研究机构数据统计,全球新增胃癌病例约35.87万例,在各类癌症发病率中位列第五^[1],在所有癌症死亡人数中位列第三^[2]。其发病机制涉及遗传、环境和生活方式等多种因素^[3],近年来,虽然靶向治疗与免疫疗法的确获得一定成效,但由于肿瘤异质性及耐药性问题,胃癌患者的5年生存率仍不理想^[4]。在泛素-蛋白酶体系统中,泛素结合酶E2L6(ubiquitin-conjugating enzyme E2L6, UBE2L6)作为蛋白泛素化或泛素样修饰过程中的关键酶,通过泛素化修饰影响肿瘤发生发展^[5-7],对于底物蛋白以及泛素化系统活性的调控具有重要意义^[8]。研究^[9-10]表明,UBE2L6具有组织特异性:在胰腺癌和卵巢癌中促进肿瘤进展,但在食管癌中与干扰素刺激基因15(interferon-stimulated gene 15, ISG15)协同抑制癌细胞增殖^[11],而目前UBE2L6在胃癌中的功能尚未明确。本研究拟通过研究癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas Program, TCGA)和RNA测序数据集成平台(Gene Expression Profiling Interactive Analysis2, GEPIA2)的生物信息学数据分析UBE2L6在胃癌中的表达情况,并结合临床资料深入探究其在胃癌中的临床病理特征及预后价值。同时借助一系列体外实验,分析UBE2L6在胃癌中的功能角色,为寻找新的治疗靶点提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集了在2021年3月—2022年10月通过手术切除的50份胃癌患者的癌及癌旁组织标本,通过免疫组织化学法检测UBE2L6蛋白的表达情况,所采集的所有样本均通过组织病理学确诊,并确保所有患者均为初次接受根治性手术治疗,且在手术前未曾经历放疗、化疗、免疫疗法或生物治疗。对患者进行临床病理数据采集,包括年龄、性别、肿瘤大小、临床分期、Lauren分型、神经受侵、MSS/MSI状态、Ki67、P53、Her-2。

本研究所有标本均来源于已通过伦理审查的项目,并且该研究方案已获得河北医科大学第四医院伦理委员会的批准(编号为2022KT373)。

1.2 生物信息学分析 UBE2L6在泛癌及胃癌中的表达 通过访问Timer数据库(<http://timer.cistrome.org/>),并利用Gene_DE模块进行操作,输入基因名称UBE2L6,生成的图表展示了该基因在不同组织类型,特别是肿瘤组织与正常组织之间的差异表达情况^[12]。进一步访问GEPIA2(网址为<http://gepia2.cancer-pku.cn/>)数据库,在“ExpressionDIY”模块中选择癌症类型为“胃癌(STAD)”,并在搜索框内输入目标基因UBE2L6,保持其余选项为默认设置,分析UBE2L6在胃癌和正常胃粘膜组织中UBE2L6的表达水平^[13]。

1.3 Kaplan-Meier Plotter 进行生存分析 采用 Kaplan-Meier Plotter(<http://kmplot.com>)在线工具进行生存分析。该平台可评估 54 000 个基因在多种癌症中的预后价值,其核心方法是构建随时间变化的生存曲线,以直观呈现临床结局^[14]。本研究利用此工具分析 UBE2L6 表达水平对胃癌患者生存期的影响。

1.4 免疫组织化学法检测 UBE2L6 蛋白的表达 操作流程:石蜡包埋→组织切片→脱蜡→梯度乙醇水化→抗原修复→阻断内源性过氧化物酶活性→一抗特异性结合→二抗信号放大→显色→复染→封片。组织切片后用二甲苯脱蜡每个缸 10 min,梯度酒精(100%、95%、80%)各浸泡 5 min;柠檬酸钠热修复 3 min,冷却至室温;内源性过氧化物酶阻断液 37 °C 孵育 10 min,PBS 清洗 2 次,每次 5 min;根据组织大小滴加兔抗人 UBE2L6 单克隆抗体(1:250),4 °C 过夜,PBS 荡洗 2 次,每次 5 min;滴加 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗,37 °C 恒温箱内孵育 30 min 后,再次 PBS 清洗;DAB 显色;苏木素复染 3 min,过水;盐酸酒精分化 10 s,过水;自来水返蓝 10~15 min 后,流水冲洗 30 s。梯度酒精脱水,晾干后中性树胶封片,在光镜下对细胞进行分析。

1.5 细胞培养及转染 人胃正常细胞 GES-1 及胃癌细胞系 SNU216、NCI-N87、MKN74、AGS、HGC-27,这些细胞样本均源自中国典型培养物保藏中心,并储存于河北医科大学第四医院肿瘤研究所的病理研究室中,通过定期传代以维持其生长状态。所有肿瘤细胞系均在 37 °C、5% CO₂ 环境下,并使用含 10% 胎牛血清(Gbico,美国)的 RPMI-1640 培养基(Gbico,美国)进行培养。采用 Lipofectamine3000 (Invitrogen,美国)将 UBE2L6 特异性小干扰 RNA (siRNA)、过表达质粒载体 pcDNA3.4-UBE2L6 及对应的阴性对照组转染入 AGS 和 HGC-27 细胞内,48 h 后进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测或细胞功能实验。

1.6 qRT-PCR 用 TriQuickReagen 提取总 RNA,并用分光光度计测定产物纯度及浓度。使用反转录试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司,中国)配制逆转录反应液并使用实时荧光定量 PCR 试剂盒(2X qPCR Mix Green)进行 qRT-PCR 检测,具体操作详见说明书。本研究 UBE2L6 引物序列为 Forward5' CCTCAATGTGCTGGTGAATAGA3'; Reverse5' GGTGAAGCTCTTCGGCATTCT3'。GAPDH 引物序列 Forward5' TCCAAAATCAAGTGGGGCG-A3'; Reverse5' AAATGAGCCCCAGCCTTCTC3',

引物源自江苏赛索飞生物有限公司。

1.7 CCK-8 细胞增殖实验 将 siRNA 及质粒 pcDNA3.4-UBE2L6 转染入 AGS、HGC-27 细胞,48 h 后以 1 000/孔接种于 96 孔板中,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 0 h、24 h、48 h 及 72 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 μL,置于培养箱避光孵育 2 h,在 450 nm 波长处记录每孔对应的吸光度。

1.8 细胞克隆形成实验 转染处理 24 h 后,采用胰蛋白酶对细胞进行解离并计数,以每孔 800 个活细胞的接种密度转移至六孔板。加入完全培养基 2 mL 后轻柔涡旋混匀,于 37 °C 恒温、5% CO₂ 的培养箱中孵育 7 d。待形成肉眼可辨的细胞集落后,弃去上清,用 PBS 缓冲液轻柔漂洗 3 次,室温下用 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min。后用 0.1% 结晶紫溶液进行 30 min 染色,自然风干后拍照。

1.9 Transwell 细胞迁移及侵袭实验 转染完成后的细胞消化重悬于无血清培养基中,调整细胞密度至 1×10^5 /mL。移液枪取 200 μL 细胞悬液均匀铺在 Transwell 上室,同时下室加入 600 μL 含 20% 胎牛血清的完全培养基,静置培养 20~24 h 后取出。先用 PBS 溶液反复冲洗迁移至下室的细胞,将小室浸入 4% 多聚甲醛中进行结构固定,采用 0.1% 结晶紫染色 20 min,最后于显微镜下拍照。侵袭实验预先取 20 μL 基质胶稀释液(Matrigel:无血清培养基=1:10)涂布于 Transwell 上室内壁,置于 37 °C 培养箱中 12 h 以完成凝胶化,后续步骤同上。

2.10 统计学方法 应用 SPSS 27.0 统计软件处理数据并构建 Kaplan-Meier 生存曲线。图像使用 Image J 软件对细胞克隆数量统计及迁移侵袭数量比较,所有数据分析均通过 GraphPad Prism9.0 平台处理,符合正态分布的计量资料以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)形式呈现,组间比较采用配对 *t* 检验或单因素方差分析和 SNK-*q* 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 UBE2L6 在胃癌中表达特征 通过在线分析 Timer 数据库发现 UBE2L6 基因在不同类型癌症中表现出显著的表达差异,见图 1。通过 GEPIA2 数据库分析显示来自 TCGA 胃癌组织中 UBE2L6 基因 mRNA 表达量相较于正常组织升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。采用免疫组织化学方法检测我院 50 份胃癌和癌旁组织标本中的 UBE2L6 蛋白的表达,结果显示 UBE2L6 主要定位

在细胞质中,呈棕黄色颗粒(图 3),其中 50 例胃癌组织 UBE2L6 蛋白染色显示强阳性为 15 例(30.00%),阳性 29 例(58.00%),弱阳性 6 例(12.00%),且未发现阴性表达;相比之下,在 50 例癌旁组织中,未检出强阳性表达,阳性表达 6 例(12.00%),弱阳性 39 例(78.00%),阴性 5 例(10.00%),依据评分标准^[15],设定评估结果的表达为: ≤ 6 分为低表达, ≥ 6 分为高表达,通过比较发现胃癌组织中 UBE2L6 蛋白的表达水平高于相对应

的癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.001$),见表 1。同时,qRT-PCR 检测显示,相比于正常胃黏膜上皮细胞 GES-1(1.00 ± 0.09),UBE2L6 在胃癌细胞系 AGS($3.84 \pm 0.00, t = 53.570$)、HGC-27($2.45 \pm 0.07, t = 21.230$)、SNU216($10.26 \pm 0.00, t = 174.900$)、MKN74($3.33 \pm 0.33, t = 11.900$)、NCI-N87($16.90 \pm 0.32, t = 83.620$)中亦高表达,差异均有统计学意义($P < 0.001$)。

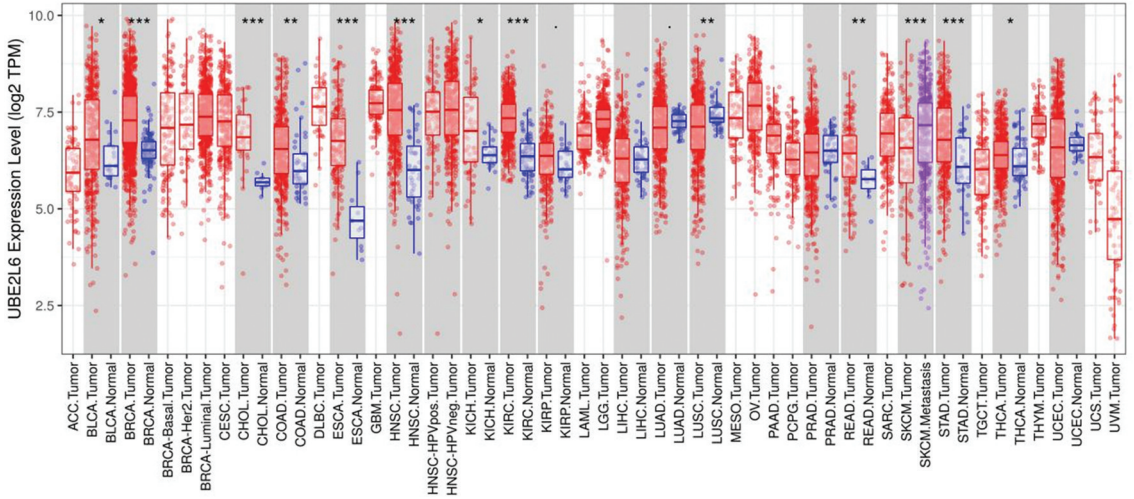


图 1 UBE2L6 在肿瘤组织与正常组织的表达差异分析

红色为胃癌组织,蓝色为胃正常组织 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

Figure 1 Analysis of UBE2L6 differential expression in tumor and versus normal tissues

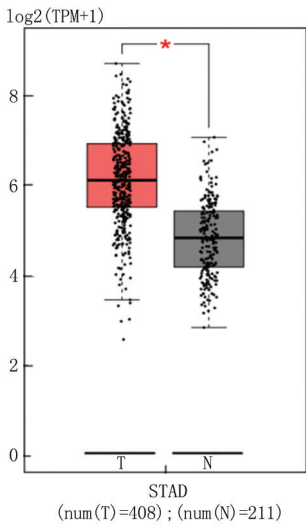


图 2 UBE2L6 在胃癌组织中的差异表达

T,肿瘤组织;N,正常组织 * $P < 0.05$

Figure 2 Differential expression of UBE2L6 in gastric cancer tissues

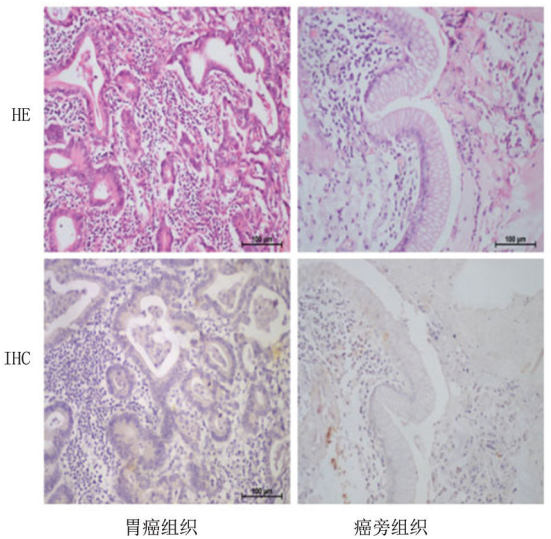


图 3 HE 及免疫组织化学技术检测 UBE2L6 在胃癌及周围正常组织中的表达($\times 200$)

Figure 3 Expression of UBE2L6 in gastric cancer and adjacent tissues detected by immunohistochemistry and HE ($\times 200$)

表1 免疫组织化学检测结果

Table 1 Immunohistochemistry results
(n=50, 例数, %)

| 组别 | UBE2L6 高表达 | UBE2L6 低表达 |
|------------|------------|------------|
| 胃癌组 | 44(88.00) | 6(12.00) |
| 癌旁组 | 6(12.00) | 44(88.00) |
| χ^2 值 | 57.760 | |
| P 值 | <0.001 | |

2.2 UBE2L6 对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭及克隆形成能力的影响 为了探讨 UBE2L6 对胃癌细胞生物学功能的影响,设计了针对 UBE2L6 靶序列的特异性 siRNA(siUBE2L6.3)及过表达质(pcDNA3.4-UBE2L6),并分别在 AGS 及 HGC-27 细胞中检测转染后 UBE2L6 基因敲低及过表达效率,qRT-PCR 结果提示转染 siUBE2L6.3 细胞中 UBE2L6 基因表达明显下调($P<0.001$),转染 pcDNA3.4-UBE2L6 后 UBE2L6 基因显著升高($P<0.001$),见表 2。

细胞增殖和克隆形成实验结果显示,UBE2L6 敲低组的细胞增殖、克隆形成细胞减少($P<0.05$);反之,过表达 UBE2L6 则使增殖和克隆形成细胞数

量增加($P<0.001$),见表 3、图 4、图 5。

表2 UBE2L6 在胃癌细胞中的转染效率检测
Table 2 Detection of transfection efficiency of UBE2L6 in gastric cancer cells

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | AGS | HGC-27 |
|------|-------------|---------------|
| 对照组 | 1.03±0.24 | 1.00±0.09 |
| 敲低组 | 0.08±0.02* | 0.16±0.03* |
| 过表达组 | 10.44±0.39* | 224.24±34.16* |
| F 值 | 1 409.000 | 128.600 |
| P 值 | <0.001 | <0.001 |

* P 值<0.05 与对照组比较(SNK-q 检验)

表3 UBE2L6 影响细胞克隆形成能力

Table 3 UBE2L6 affecting the self-renewal ability of cells
(n=3, $\bar{x} \pm s, \uparrow$)

| 组别 | AGS 细胞克隆平均值 | HGC-27 细胞克隆平均值 |
|------|---------------|----------------|
| 对照组 | 342.00±49.15 | 245.33±6.66 |
| 敲低组 | 192.00±6.24* | 133.67±13.01* |
| 过表达组 | 612.67±23.03* | 617.33±23.18* |
| F 值 | 137.000 | 768.500 |
| P 值 | <0.001 | <0.001 |

* P 值<0.05 与对照组比较(SNK-q 检验)

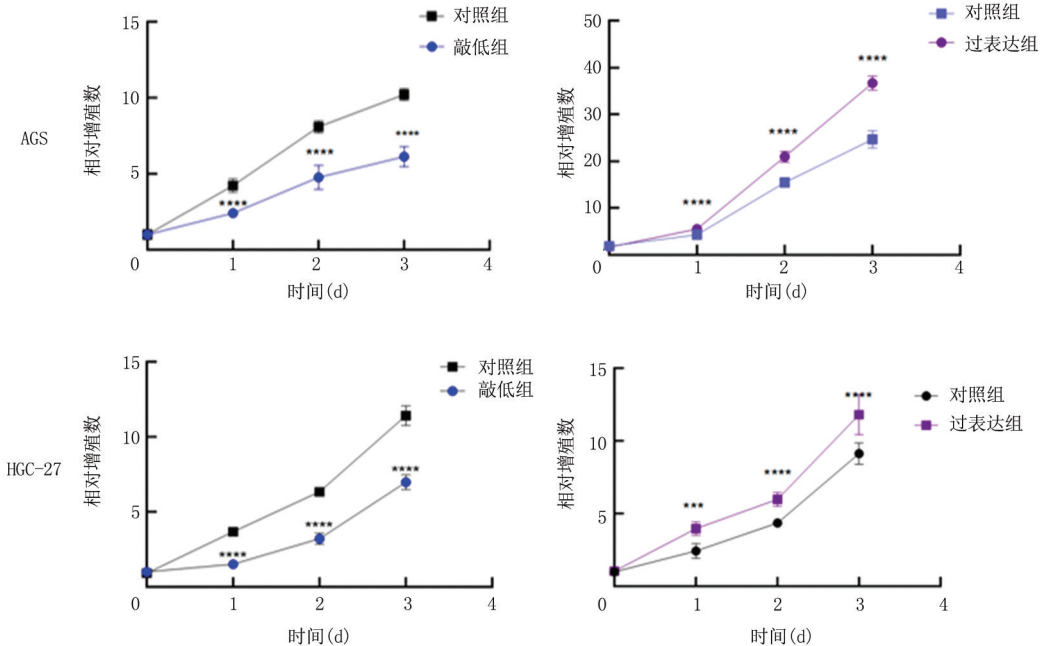


图4 CCK-8 法检测敲低与过表达 UBE2L6 基因后 AGS 和 HGC-27 细胞的增殖能力

*** P<0.01 **** P<0.0001

Figure 4 Cell proliferation curves of AGS and HGC-27 cells before and after UBE2L6 knockdown and overexpression detected by CCK-8 assay

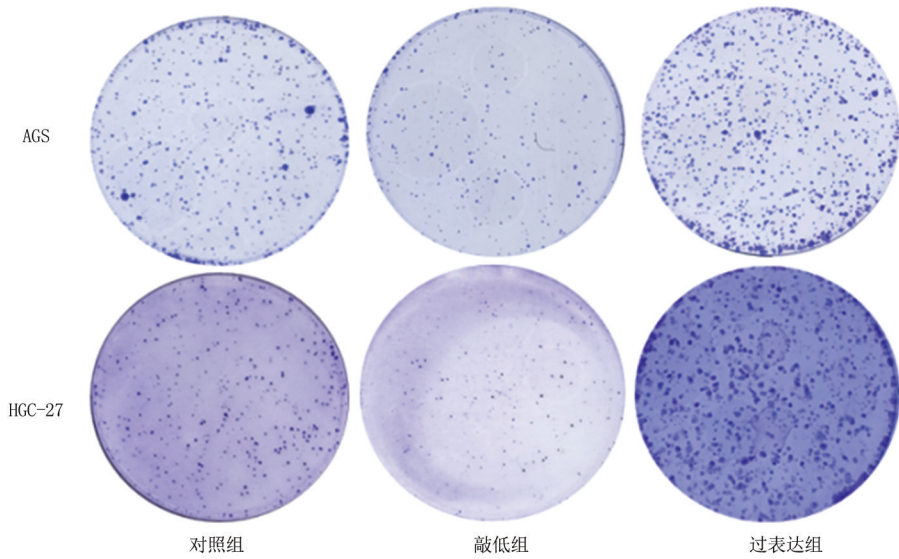


图5 平板克隆实验检测敲低与过表达 UBE2L6 基因后 AGS 和 HGC-27 细胞的克隆形成情况

Figure 5 Clonogenic ability of AGS and HGC-27 cells before and after UBE2L6 knockdown and overexpression detected by colony formation assay

通过迁移实验和侵袭实验检测 UBE2L6 对 AGS 细胞及 HGC-27 细胞的迁移及侵袭的影响。结果显示,敲低 UBE2L6 使得能够迁移的细胞数减少至对照组的 60%左右,侵袭能力分别被抑制至 46.45% ($P < 0.001$) 和 39.67% ($P < 0.001$),而过表达 UBE2L6 不仅使细胞迁移数量增加,还增强了细胞的侵袭能力,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 6、图 7、表 4,说明 UBE2L6 在胃癌细胞的运动方面表现出调控作用。

2.3 UBE2L6 的表达与胃癌临床病理资料分析

对 50 例胃癌患者进行了 UBE2L6 表达与临床病理特征之间的相关性分析,结果显示,UBE2L6 的表达水平与性别、临床分期、Lauren 分型、神经受侵、MSS/MSI 状态、Ki67、P53、Her-2 指标之间无关联 ($P > 0.05$),而与患者的年龄 ($P = 0.005$)、肿瘤大小 ($P = 0.014$) 显著相关,其中年龄 < 60 岁的胃癌患者及肿瘤直径较小的患者 UBE2L6 的表达水平显著升高,见表 5,说明 UBE2L6 可能在肿瘤早期阶段参与胃癌发生并可能成为年轻胃癌患者的预后生物标志物。

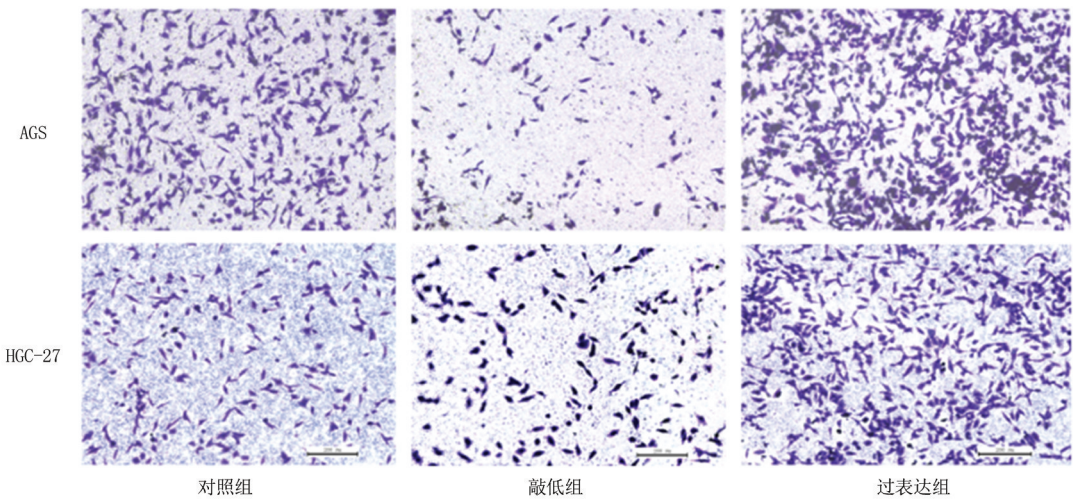


图6 敲低及过表达 UBE2L6 后 AGS 及 HGC-27 细胞的迁移实验(结晶紫染色 ×400)

Figure 6 Transwell migration assay on AGS and HGC-27 cells after UBE2L6 knockdown and overexpression(Crystal violet staining ×400)

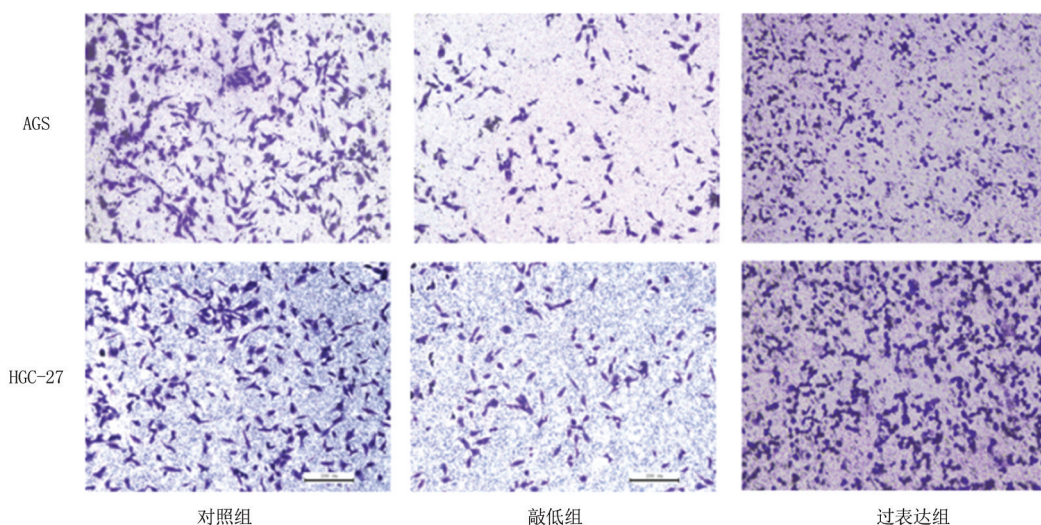


图7 敲低及过表达 UBE2L6 后 AGS 与 HGC-27 细胞的侵袭实验(结晶紫染色 $\times 400$)

Figure 7 Transwell invasion assay on AGS and HGC-27 cells after UBE2L6 knockdown and overexpression (Crystal violet staining $\times 400$)

表4 UBE2L6 调控胃癌细胞运动能力

Table 4 Regulation of AGS cell motility by UBE2L6

($n=3, \bar{x} \pm s, \text{个}$)

| 组别 | 迁移实验 | | 侵袭实验 | |
|------|-------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| | AGS | HGC-27 | AGS | HGC-27 |
| 对照组 | 738.33 \pm 39.88 | 617.33 \pm 19.76 | 322.00 \pm 13.53 | 367.67 \pm 11.72 |
| 敲低组 | 460.00 \pm 37.47 * | 291.33 \pm 11.93 * | 184.67 \pm 8.50 * | 167.00 \pm 29.31 * |
| 过表达组 | 1 392.33 \pm 165.50 * | 1 572.33 \pm 109.95 * | 867.00 \pm 72.03 * | 702.33 \pm 16.62 * |
| F 值 | 67.850 | 316.000 | 215.300 | 517.200 |
| P 值 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

* P 值<0.05 与对照组比较(SNK- q 检验)

表5 临床病理特征分析

Table 5 Analysis of clinicopathological features

(例数)

| 临床特征 | 例数 | UBE2L6 高表达组 | UBE2L6 低表达组 | χ^2 值 | P 值 |
|-------------|----|-------------|-------------|------------|-------|
| 性别 | | | | | |
| 男性 | 35 | 19 | 16 | 0.139 | 0.708 |
| 女性 | 15 | 9 | 6 | | |
| 年龄 | | | | | |
| ≥ 60 岁 | 30 | 12 | 18 | 7.792 | 0.005 |
| <60 岁 | 20 | 16 | 4 | | |
| 肿瘤大小 | | | | | |
| ≥ 5 cm | 29 | 12 | 17 | 5.991 | 0.014 |
| <5 cm | 21 | 16 | 5 | | |
| 临床分期 | | | | | |
| I ~ II 期 | 26 | 16 | 10 | 0.288 | 0.537 |
| III ~ IV 期 | 24 | 12 | 12 | | |
| Lauren 分型 | | | | | |
| 肠型 | 10 | 5 | 5 | 2.625 | 0.475 |
| 弥漫型 | 15 | 11 | 4 | | |
| 混合型 | 25 | 12 | 13 | | |
| 神经受侵 | | | | | |
| 有 | 18 | 10 | 8 | 0.002 | 0.914 |
| 无 | 32 | 18 | 14 | | |

表 5 (续)

| MSS/MSI | | | | | |
|---------|----|----|----|-------|-------|
| 微卫星稳定性 | 36 | 22 | 14 | | |
| 微卫星不稳定性 | 14 | 6 | 8 | 0.723 | 0.397 |
| Ki67 | | | | | |
| 高表达 | 31 | 15 | 16 | | |
| 低表达 | 19 | 13 | 6 | 1.192 | 0.262 |
| P53 | | | | | |
| 阳性 | 25 | 12 | 13 | | |
| 阴性 | 25 | 16 | 9 | 0.732 | 0.424 |
| Her-2 | | | | | |
| 阳性 | 19 | 10 | 9 | | |
| 阴性 | 31 | 18 | 13 | 0.006 | 0.777 |

2.4 UBE2L6 在胃癌中的预后价值 在 TCGA 数据库中 UBE2L6 高表达组患者的总生存期显著优于低表达组(HR=0.800, P=0.023), 见图 8, 说明 UBE2L6 高表达胃癌患者可能具有较好的预后。为了进一步验证 UBE2L6 对患者的无进展生存期(progression-free survival, PFS)的影响, 对纳入本研究的 50 例患者进行随访(其中失访 3 例, 随访率达 94%, 最后一次随访日期截至 2025 年 3 月 1 日), 并绘制 Kaplan-Meier 生存曲线, 结果显示, 47 例患者均未达到中位 PFS, UBE2L6 高表达的患者的 PFS 时间相对较长, 与 TCGA 数据库中的相关数据相似, 但差异无统计学意义(P=0.180), 见图 9。这可能是由于样本量较小且随访时间相对较短所致。由 KM 生存曲线结合临床资料发现本组数据中未达到中位 PFS, 为此定义 PFS(≥24 个月=0, <24 个月=1)为因变量, UBE2L6(高表达=0, 低表达=1)为自变量, 进行了单因素分析, 结果表明: UBE2L6 高表达患者其 PFS 延长 2 年的风险是 UBE2L6 低表达患者的 1.012 倍(HR=1.012, 95% CI:0.360~2.847, P=0.981), 但差异无统计学意义(P>0.05)。

2.5 UBE2L6 高表达对胃癌影响的机制探究 为进一步分析 UBE2L6 的高表达对胃癌发生、发展的作用机制, 利用 cBioPortal 数据库分析与 UBE2L6 具有高度共表达性的基因, 结果显示, 与 UBE2L6 结合的相关性由大到小为 PSMB9、TAP1、IRF1、ETV7, 以及 STAT1 等, 见图 10。对数据进行相关性分析后发现蛋白酶体相关基因 PSMB9 与

UBE2L6 之间存在显著的正向相关性, Spearman 系数为 0.78, 见图 11。说明 UBE2L6 可能通过调控蛋白酶体活性改变肿瘤微环境。为深入解析其免疫调节机制, 利用 TIMER 在线数据库对胃癌样本进行免疫细胞浸润相关性研究, 结果表明, UBE2L6 在胃癌组织中的表达水平与 CD8⁺ T 细胞的浸润程度存在显著的正相关性(P<0.0001), 见图 12。

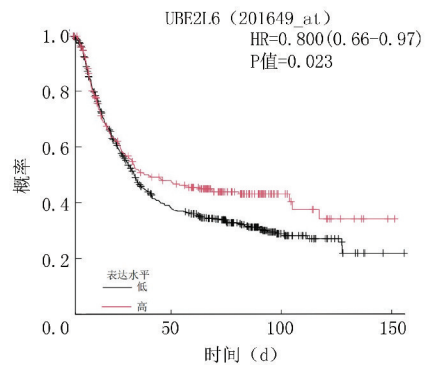


图 8 UBE2L6 表达的 Kaplan Meier 生存曲线

Figure 8 Kaplan Meier survival curves of UBE2L6 expression

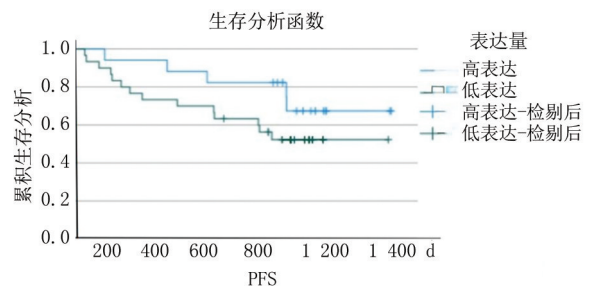


图 9 UBE2L6 对胃癌患者中位 PFS 的 Kaplan-Meier 生存曲线分析

Figure 9 Kaplan-Meier survival curve analysis of median PFS in gastric cancer patients based on UBE2L6 expression

| Correlated Gene | Cytoband | Spearman's Correlation | p-Value | q-Value |
|-----------------|----------|------------------------|----------|----------|
| PSMB9 | 6p21.32 | 0.784 | 7.81e-86 | 1.48e-81 |
| IFI35 | 17q21.31 | 0.758 | 3.23e-77 | 3.06e-73 |
| TAP1 | 6p21.32 | 0.749 | 2.58e-74 | 1.62e-70 |
| IRF1 | 5q31.1 | 0.746 | 1.26e-73 | 5.94e-70 |
| ETV7 | 6p21.31 | 0.743 | 1.36e-72 | 5.15e-69 |
| STAT1 | 2q32.2 | 0.736 | 9.40e-71 | 2.96e-67 |
| CXCL10 | 4q21.1 | 0.729 | 1.36e-68 | 3.69e-65 |
| GBP1 | 1p22.2 | 0.723 | 5.05e-67 | 1.19e-63 |
| LAG3 | 12p13.31 | 0.721 | 1.51e-66 | 3.18e-63 |
| IDO1 | 8p11.21 | 0.721 | 2.23e-66 | 4.22e-63 |
| GBP4 | 1p22.2 | 0.718 | 9.57e-66 | 1.64e-62 |
| PLAAT4 | 11q12.3 | 0.710 | 1.41e-63 | 2.22e-60 |
| BST2 | 19p13.11 | 0.704 | 3.32e-62 | 4.60e-59 |
| BATF2 | 11q13.1 | 0.704 | 3.40e-62 | 4.60e-59 |
| GZMB | 14q12 | 0.701 | 1.66e-61 | 2.10e-58 |
| IFIT3 | 10q23.31 | 0.697 | 1.48e-60 | 1.75e-57 |
| CXCL11 | 4q21.1 | 0.696 | 3.72e-60 | 4.14e-57 |
| PSMB8 | 6p21.32 | 0.684 | 2.29e-57 | 2.40e-54 |

图10 UBE2L6在胃癌中的共表达基因

Figure 10 Co-expressed genes of UBE2L6 in gastric cancer

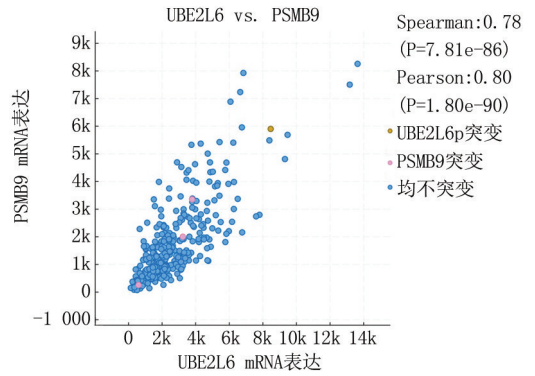
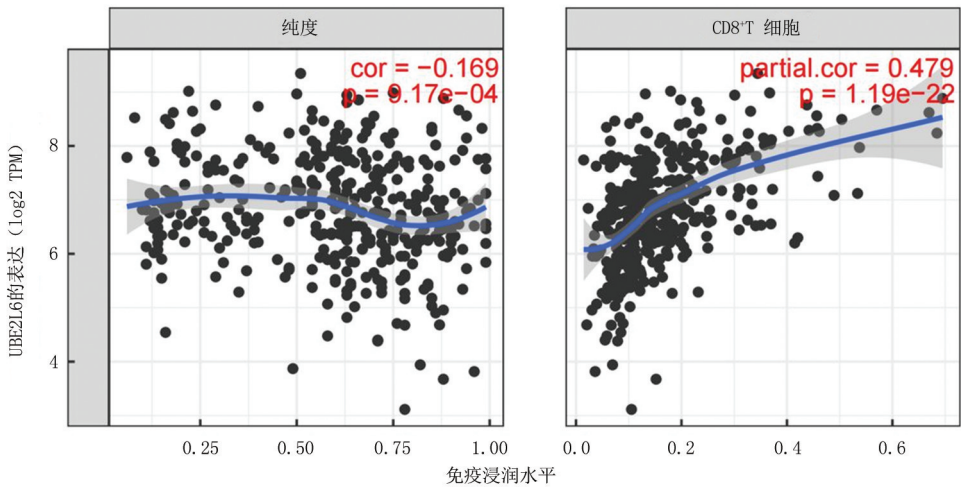


图11 UBE2L6与PSMB9基因的相关性分析

Figure 11 Correlation analysis of UBE2L6 with PSMB9 gene

图12 UBE2L6的表达与CD8⁺T细胞的浸润程度相关Figure 12 Correlation between UBE2L6 expression and the infiltration level of CD8⁺T cells

3 讨论

肿瘤的发生发展是一个多因素、多步骤的复杂过程,涉及基因突变、表观遗传改变及信号通路失调等多个层面的异常^[6]。在这一过程中,泛素与类泛素系统作为关键的蛋白质翻译后修饰系统,通过调控细胞周期、DNA修复和凋亡等生物学过程,在肿瘤发生发展中发挥重要作用^[5]。泛素化过程由E1-E2-E3酶级联反应介导,其中泛素结合酶E2作为核心“桥梁”,不仅决定泛素链的拓扑结构,还参与底物蛋白的特异性识别^[6-7]。作为泛素结合酶E2家族成员,UBE2L6通过在细胞内与泛素的结合来调节蛋白质的降解和功能,其主要作用是通过泛素化途

径参与细胞周期、DNA修复及信号转导等生物过程,从而在细胞内维持蛋白质的稳态和功能平衡^[17]。在肿瘤细胞中,UBE2L6的表达失调往往伴随着细胞分裂加速,凋亡受阻以及转移侵袭力升级,例如UBE2L6已被发现可以调节p53和NF- κ B等关键肿瘤抑制因子和促癌因子的功能,从而影响细胞增殖周期及细胞侵袭能力^[18]。

研究^[19]表明,UBE2L6的异常表达模式与胰腺癌、结直肠癌、乳腺癌、肾细胞癌等多种肿瘤细胞的恶性表型存在显著关联,特别是在卵巢癌中,UBE2L6的高表达与患者预后不良相关,也是铂类耐药卵巢癌的潜在生物标志物^[20]。然而目前对UBE2L6是如何影响胃癌的发生发展及预后的研究

较少,就此本文展开研究。本研究通过多组学分析发现,UBE2L6在胃癌组织中表达显著上调,这一结果在蛋白质水平得到免疫组织化学验证。值得注意的是,UBE2L6在癌旁组织中的弱阳性表达提示其在生理状态下可能参与维持细胞稳态,但在肿瘤微环境中可能发挥更为复杂的作用。

通过体外实验还探讨了UBE2L6对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。UBE2L6在胃癌细胞中的mRNA和蛋白表达水平显著高于正常胃黏膜上皮细胞,这一结果在细胞层面上也证实了UBE2L6的异常高表达,与前期生信分析及临床胃癌组织中UBE2L6高表达特征一致,提示UBE2L6高表达可能会促进胃癌的发生。然而,UBE2L6高表达与胃癌患者较好的总生存期和无进展生存期相关,但其表达水平与临床分期无显著相关性。这一结果提示UBE2L6的生物学功能并非单纯的促癌或抑癌作用。由临床病理特征相关性分析可知,UBE2L6的表达强度与肿瘤大小呈负相关,提示UBE2L6可能在肿瘤发生早期通过促进细胞增殖驱动生长,而在晚期可能因免疫压力导致表达下调,其生物学效应可能依赖肿瘤微环境的调控。年轻患者(<60岁)中UBE2L6高表达比例更高,可能与年轻患者肿瘤微环境代谢活跃或基因组不稳定性增加有关。年轻的胃癌患者通常具有更高的EBV病毒感染率^[21],已有研究^[22]表明,EBV阳性胃癌中具有更高水平的浸润淋巴细胞,导致干扰素信号通路异常激活。而UBE2L6作为干扰素刺激基因,可能在此类肿瘤中表达量升高,然而,本研究样本量较小(50例),且未纳入转移性胃癌样本和不同分子分型的亚组分析,未来需扩大样本并分层探讨其临床意义及具体调控机制。

通过生物信息学分析,本研究结果显示UBE2L6表达与CD8⁺T细胞浸润及PSMB9表达呈显著正相关。已有研究表明,PSMB9是免疫蛋白酶体的一个关键亚基,在干扰素 γ 诱导下,PSMB9会替代标准蛋白酶体中的 $\beta 1$ 亚基从而形成免疫蛋白酶体,在泛素-蛋白酶体系统中发挥作用^[23]。结合UBE2L6在泛素-蛋白酶体链条中的作用,推测其可能通过以下途径参与肿瘤免疫编辑:在肿瘤发生早期,UBE2L6可能通过增强免疫蛋白酶体介导的蛋白降解,促进促增殖因子的积累,从而启动肿瘤发生;随着肿瘤进展,免疫系统开始发挥作用,免疫抗原性细胞的死亡释放出肿瘤抗原并募集CD8⁺T细胞,由CD8⁺T细胞介导免疫清除,导致体积较大的肿瘤被清除,最终,临床检测到的肿瘤直径较小且

预后较好。而在免疫系统逐渐识别和清除高表达UBE2L6的细胞后,选择性地保留低表达UBE2L6的细胞,使其在肿瘤晚期阶段中逐渐占据优势^[24],最终结局导致肿瘤的TNM分期与UBE2L6的表达水平无关,这也与临床病例分析结果一致。这些结果共同表明了UBE2L6在胃癌的表达与功能呈现复杂性。

机制上,有研究学者指出UBE2L6的表达与M1巨噬细胞和活化记忆CD4⁺T细胞的比例均呈现出显著的正相关关系,类似现象在结肠癌中也有报道,低表达的UBE2L6与结肠癌患者较差的预后相关^[25]。同时通过构建免疫表型评分,有研究者发现在胃癌中UBE2L6的表达水平与免疫激活状态密切相关,UBE2L6高表达的患者通常表现出更强的免疫激活特征和更好的临床结局^[26]。这些证据说明了UBE2L6在肿瘤免疫微环境中也发挥作用。因此UBE2L6的功能可能具有促癌和免疫调节的双重特性,和PD-L1类似^[27],后者既可作为免疫检查点分子促进免疫逃逸,又在某些情况下参与抗肿瘤免疫应答。这似乎也能解释UBE2L6对CD8⁺T细胞浸润的正相关性与潜在促癌作用的矛盾性。综上所述,UBE2L6在胃癌中可能具有促肿瘤和免疫调节的双重功能,其最终生物学效应取决于肿瘤微环境的动态平衡。本研究仍存在一定局限性:①样本量较小;②未通过动物模型证实UBE2L6对胃癌生长转移的体内影响及免疫调控;③未明确UBE2L6的具体泛素化底物及下游信号通路导致机制深度不足。未来研究应进一步扩大临床队列,深入分析UBE2L6表达与免疫治疗效果及患者生存率之间的相关性。这将有助于明确UBE2L6在胃癌免疫治疗中的潜在价值,并为个体化治疗策略的制定提供依据。

[参考文献]

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] Han B, Zheng R, Zeng H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47-53.
- [3] Sato Y, Okamoto K, Kida Y, et al. Overview of chemotherapy for gastric cancer[J]. J Clin Med, 2023, 12(4): 1336.
- [4] Kim SG, Lee SE, Eom BW, et al. Gastric cancer surgery in South Korea: Past, present, and future[J]. Chin J Cancer Res, 2023, 35(6): 627-635.
- [5] Knipscheer P, Sixma TK. Protein-protein interactions

- regulate Ubl conjugation[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17(6):665-673.
- [6] Ye Y, Rape M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, 10(11):755-764.
- [7] Michelle C, Vourc'h P, Mignon L, et al. What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? [J]. *J Mol Evol*, 2009, 68(6): 616-628.
- [8] Middleton AJ, Wright JD. Regulation of E2s: A role for additional ubiquitin binding sites [J]. *J Mol Biol*, 2017, 429(22):3430-3440.
- [9] Alcalá S, Sancho P, Martinelli P, et al. ISG15 and ISGylation is required for pancreatic cancer stem cell mitophagy and metabolic plasticity [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):2682.
- [10] Shibahara M, Kurita T, Murakami M, et al. Association of UBE2L6 and ABCB6 expression with platinum resistance in serous ovarian carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2023, 43(8): 3787-3792.
- [11] Falvey CM, O'Donovan TR, El-Mashed S, et al. UBE2L6/UBCH8 and ISG15 attenuate autophagy in esophageal cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14):23479-23491.
- [12] Li T, Fan J, Wang B, et al. TIMER: A web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(21):e108-e110.
- [13] Li C, Tang Z, Zhang W, et al. GEPIA2021: Integrating multiple deconvolution-based analysis into GEPIA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(w1):w242-w246.
- [14] D'Arrigo G, Leonardi D, Abd Elhafeez S, et al. Methods to analyse time-to-event data: The kaplan-meier survival curve [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021(2):1-7.
- [15] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. *中国癌症杂志*, 1996, 6(4):229-231.
- [16] Patnaik MM, Tefferi A. Cytogenetic and molecular abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia [J]. *Blood Cancer J*, 2016, 6(2):e393.
- [17] Ministerial meeting on population of the non-aligned movement (1993; Bali). Denpasar declaration on population and development [J]. *Integration*, 1994, 40:27-29.
- [18] Batista MV, Ulrich J, Costa L, et al. Multiple primary malignancies in head and neck cancer: A university hospital experience over a five-year period [J]. *Cureus*, 2021, 13(8): e17349.
- [19] 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.
- [20] Shibahara M, Kurita T, Murakami M, et al. Association of UBE2L6 and ABCB6 expression with platinum resistance in serous ovarian carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2023, 43(8): 3787-3792.
- [21] Fukayama M, Ushiku T. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma [J]. *Pathol Res Pract*, 2011, 207(9):529-537.
- [22] Zheng ZQ, Zhong CR, Wei CZ, et al. Hyperactivation of mTOR/eIF4E signaling pathway promotes the production of tryptophan-to-phenylalanine substituents in EBV-positive gastric cancer [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(35):e2402284.
- [23] 王佳豪, 冯利杰, 张瑶, 等. 稳定表达 PSMB9-eGFP-His 蛋白的 THP-1 细胞系建立及免疫蛋白酶体活性检测 [J]. *生物工程学报*, 2024, 40(7):2282-2293.
- [24] Wei W, Li Y, Li D. Adipose-specific knockout of ubiquitin-conjugating enzyme E2L6 (Ube2l6) reduces diet-induced obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2021, 145(4):327-334.
- [25] Wu Y, Zhang S, Yan J. IRF1 association with tumor immune microenvironment and use as a diagnostic biomarker for colorectal cancer recurrence [J]. *Oncology Letters*, 2020, 19(3):1759-1770.
- [26] Wang JB, Qiu QZ, Zheng QL, et al. Tumor immunophenotyping-derived signature identifies prognosis and neoadjuvant immunotherapeutic responsiveness in gastric cancer [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(15):e202207417.
- [27] 曹馨, 张进萍. PD-1/PD-L1 轴的作用及其在胃肠道肿瘤免疫治疗中的意义 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2024, 51(8): 1834-1847.

(本文编辑:王聪)