

高表达 UBE2S 通过增加癌细胞干性促进肝癌的进程机制

陈浩^{1,2,3}, 李振汉⁴, 王明婷⁵, 卢林明³, 唐乾利², 罗良平¹

¹暨南大学临床医学博士后流动站, 广东 广州 510632; ²右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000; 皖南医学院³病理解剖学教研室, ⁴临床医学院, 安徽 芜湖 241002; ⁵南京市第一医院产科, 江苏 南京 210006

摘要:目的 探究UBE2S在肝癌微环境不同细胞类型的特异性表达及对肝癌细胞干性的影响。方法 使用TCGA数据库分析肝癌中UBE2S转录水平及其启动子甲基化水平差异,使用CPTAC数据库分析UBE2S蛋白水平差异。使用TISCH单细胞测序数据挖掘UBE2S在不同细胞类型中的表达,并分析细胞通讯的强度以及细胞群各自的关键转录因子。免疫组化验证UBE2S在肝癌组织中的表达;多色免疫荧光检测UBE2S在肝癌细胞以及T细胞的表达情况。利用shRNA敲低肝癌细胞HCC-LM3中的UBE2S,分为shCtrl(对照组)、shUBE2S-1(敲低组1)、shUBE2S-2(敲低组2)3个组,利用克隆形成实验、悬浮成球实验检测UBE2S敲低对HCC-LM3干性影响。结果 UBE2S在TCGA数据库中非配对肿瘤组织中高表达($P<0.001$),配对肿瘤组织中也高表达($P<0.001$),随着肿瘤分级增高,转录水平逐渐增高($P<0.001$);在CPTAC数据库中肝癌组织UBE2S蛋白水平表达也增高($P<0.001$);肝癌中UBE2S启动子甲基化水平降低($P<0.001$);TP53突变组UBE2S转录水平更高($P<0.001$)。单细胞测序结果显示,UBE2S在T细胞等细胞群高表达;内皮与上皮及成纤维细胞之间的细胞交互强度较高,SMAD1等转录因子可能是Tprolif细胞关键转录因子。与正常组织相比,UBE2S在肝癌组织高表达;且在肝癌细胞和T细胞中均有较高表达。克隆形成实验显示:与shCtrl组相比,敲低UBE2S能减少肝癌细胞克隆形成数目(shUBE2S-1, $P<0.05$ 、 $P<0.01$; shUBE2S-2, $P<0.01$ 、 $P<0.05$);悬浮成球实验显示:与shCtrl组相比,敲低UBE2S能减少肝癌细胞肿瘤球形成数目(shUBE2S-1, $P<0.05$ 、 $P<0.01$; shUBE2S-2, $P<0.01$ 、 $P<0.01$)。结论 UBE2S在肝癌组织T细胞中高表达,与预后不良相关,且其能促进肝癌细胞干性特性。

关键词:单细胞测序;UBE2S;肝癌;T细胞

High expression of UBE2S promotes progression of hepatocellular carcinoma by increasing cancer cell stemness

CHEN Hao^{1,2,3}, LI Zhenhan⁴, WANG Mingting⁵, LU Linming³, TANG Qianli², LUO Liangping¹

¹Postdoctoral Research Station of Clinical Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China; ³Department of Pathology, ⁴School of Clinical Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; ⁵Department of Obstetrics, Nanjing First Hospital, Nanjing 210006, China

Abstract: Objective To investigate the expression of the ubiquitination enzyme UBE2S in different cell types in hepatocellular carcinoma (HCC) microenvironment and its impact on proliferation and stemness of HCC cells. **Methods** TCGA and CPTAC database were used to analyze the transcriptional and promoter methylation levels and protein expressions of UBE2S in HCC. Specific expression patterns of UBE2S, intercellular communication and key transcription factors in different cell types were analyzed based on single-cell sequencing data from TISCH website. We further examined UBE2S expressions in clinical samples of HCC tissues, HCC cells and T cells using immunohistochemistry and immunofluorescence staining. We also tested the effects of UBE2S knockdown on stemness of HCC-LM3 and HepG2 cells using clone formation experiments and sphere formation assay. **Results** Analysis based on TCGA database suggested significant overexpression of UBE2S in both paired and non-paired tumor tissues ($P<0.001$), and its transcriptional level increased with tumor grades. The methylation level of UBE2S promoter was significantly decreased in HCC ($P<0.001$), and its transcription level increased obviously in HCC with TP53 mutation ($P<0.001$). Analysis of CPTAC database also demonstrated overexpression of UBE2S protein in HCC tissues ($P<0.001$). Three prognostic models suggested that HCC patients with high UBE2S expression had poorer prognosis ($P<0.001$). Single-cell sequencing data analysis revealed high expressions of UBE2S in T cells and high intensities of interaction between endothelial cells, epithelial cells and fibroblasts in HCC microenvironment. Immunohistochemistry and immunofluorescence staining demonstrated high UBE2S expressions in clinical samples of HCC tissues, HCC cells and T cells. In HCC-LM3 and HepG2 cells, UBE2S knockdown significantly inhibited cell clone formation and tumor sphere formation ($P<0.05$). **Conclusion** UBE2S is highly expressed in T cells in HCC microenvironment in close correlation with a poor prognosis. High UBE2S expression promotes the stemness of HCC cells.

Keywords: single-cell sequencing; UBE2S; hepatocellular carcinoma; T cells

收稿日期:2023-09-25

基金项目:国家自然科学基金(81774327);广西自然科学基金(2021GXNSFBA196039);安徽省自然科学基金(2308085QH245);安徽省高校科学研究重大项目(2023AH040261)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81774327).

作者简介:陈浩,博士后,副教授,E-mail: ha0chen@wnmc.edu.cn

通信作者:唐乾利,教授,主任医师,博士后合作导师,E-mail: htmgx@163.com;罗良平,教授,主任医师,博士后合作导师,E-mail: tluolp@jnu.edu.cn

原发性肝癌在各类恶性肿瘤中发病率排第六位,已经上升为全球肿瘤第二大死因^[1];亦是我国最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率逐年增加,肝细胞性肝癌(HCC)是主要病理类型^[2,3]。由于HCC早期症状不明显,发现时绝大部分都会出现远处转移,经治疗整体预后仍然较差^[4]。因此,探究HCC的发病机制,寻找有效

的治疗靶点是亟待解决的问题^[5]。泛素结合酶 E2S (UBE2S) 是 E2 泛素结合酶的一种, 参与各种病理生理过程^[6-8], 与多种癌症联系紧密^[9-12]。免疫逃逸是癌症发展的重要标志, 肝癌具有多种免疫逃逸机制, 因此深入研究肝癌微环境中不同免疫细胞状态以提出针对性的治疗策略对肝癌的防治具有重要意义^[13-16]。UBE2S 能否通过维持肝癌细胞的干细胞特性从而促进肝癌的进程尚未见报道。因此, 本研究拟通过生信分析, 挖掘单细胞测序结果, 探究 UBE2S 在肝癌中的表达与预后的关系, 并进一步分析其在各种细胞亚群的表达情况, 及肝癌微环境中细胞通讯以及细胞群内部的关键转录因子等情况; 利用临床样本对生物信息学分析结果进行验证, 并通过细胞实验探究 UBE2S 对肝癌细胞干性的调控作用, 该研究有望为肝癌的精准治疗提供新的候选靶点。

1 材料和方法

1.1 HCC 标本

本研究使用的人类肝癌组织样本于 2022 年 3 月 1 日~2023 年 9 月 31 日从弋矶山医院(中国芜湖)获得, 并经弋矶山医院医学伦理委员会批准(2022 伦审研 7 号), 共 10 例配对的肝癌组织与正常肝脏样本。

1.2 数据库分析

从 UCSC XENA (<https://xenabrowser.net/datapages/>) 下载经 Toil 流程统一处理的 TCGA 和 GTEx 的 TPM 格式的 RNAseq 数据。提取 TCGA 的 LIHC(肝细胞性肝癌) 和 GTEx 中对应的正常组织数据, 该数据用于进行非配对样本之间转录水平差异分析。将 TPM 格式的 RNAseq 数据进行 log₂ 转化后在进行样本间的表达比较。通过 R (3.6.3 版本) 和 ggplot2 [3.3.3 版本] 进行 Mann-Whitney *U* 检验。从 TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 下载 LIHC 肝细胞肝癌项目中 level 3 HTSeq-FPKM 格式的 RNAseq 数据, 将 FPKM 格式的 RNAseq 数据转换为 TPM 格式并进行 log₂ 转化的同时保留配对样本。UNLCA (http://ualcan.path.uab.edu/index.html) 是一个可视化包含 TCGA 数据库中 32 个肿瘤和 CPTAC 数据的在线网站, 本研究从 UALCAN 数据库中获取不同分组条件下的转录水平、甲基化差异情况, 并基于蛋白组水平分析肝癌组织与正常对照组织的差异。

通过下载肿瘤免疫单细胞中心(TISCH)网站中的单细胞数据 GSE166635, 该数据集使用原发肝癌患者的临床样本进行了单细胞 RNA 测序(scRNA-seq) 分析。首先利用 10x 基因组学从患者中生成了新鲜分离的 PLC 的 scRNA-seq 图谱。在初始质量控制后, 共从两例患者的肿瘤中获得 25 189 个单细胞转录组。使用标准化分析管道 MAESTRO 进行质量控制、聚类和细

胞类型注释。基于标准过滤细胞每个细胞的 UMI 计数 (>1000) 和每个细胞的基因数 (>500)。为探索组织内不同细胞之间的交流强度, 集成 CellChat 来推断集群之间的细胞-细胞通信。在“CCI”选项卡中, 使用预先计算的交互计数热图来提供这些集群之间通信模式的概述。此外, 本研究使用 LISA 来预测影响不同单细胞 RNA-seq 簇中基因表达模式的转录调控因子。热图显示各簇中最高转录因子(TF)的富集情况, 并标记了前 10 个 TF。

1.3 细胞和试剂

肝癌细胞株 HCC-LM3、HepG2[赛百慷(上海)生物技术股份有限公司]。转染试剂 Lipofectamine™3000 (Invitrogen), pGCSIL-GFP 载体(上海吉凯公司), 敲低 UBE2S 的目的序列为 shCtrl, 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'; shUBE2S-1, 5'-CATATGCTGGAGGTCTGTT-3'; shUBE2S-2, 5'-GGGCTCTCTTCCTCCTTCCAC-3', BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司), UBE2S 抗体和 Tubulin 抗体(Abcam), CD3 抗体和 AFP 抗体(Servicebio)。

1.4 实验方法

1.4.1 免疫组化 HCC 组织蜡块连续切片, 然后将切片进行脱蜡复水, 并在微波炉用柠檬酸盐缓冲液煮沸抗原修复。再通过 3% H₂O₂ 溶液孵育。然后将切片与 UBE2S 一抗 4 °C 孵育过夜, 随后将切片与山羊兔二抗孵育。最后切片用苏木精复染, 脱水, 封片。

1.4.2 多色免疫荧光 石蜡切片脱蜡至水, 抗原修复, H₂O₂ 封闭, 血清封闭, 加 AFP 一抗, 再加对应 HRP 标记的二抗, 加对应的 TSA; 微波处理, 加 UBE2S 一抗, 加对应 HRP 标记的二抗, 加对应的 TSA, 微波处理, 加 CD3 一抗, 加对应的荧光二抗, DAPI 复染胞核, 淬灭组织自发荧光, 封片, 采集图像。

1.4.3 肝癌细胞培养与转染 肝癌细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 温育箱中培养, 取对数生长期的细胞用于后续实验与转染^[17]。

1.4.4 免疫印迹法 提取总蛋白并通过 BCA 法对其含量进行测定。利用聚丙烯酰胺变性凝胶电泳对蛋白进行分离处理, 再进行转膜, 5% 的 BSA 室温封闭 2 h。孵育 UBE2S 及 Tubulin 一抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 加入二抗, 室温孵育 2 h。TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, ECL 化学发光显影并拍照。以 Tubulin 为内参, 使用 Image J 软件分析各条带平均灰度值。

1.4.5 克隆形成实验 将细胞分散接种于 6 孔板中 (1 × 10³/孔), 培养 1~2 周。PBS 洗涤后, 4% 多聚甲醛固定, 结晶紫染色, PBS 洗涤。直接观察, 计算克隆数。

1.4.6 成球实验 将细胞分散接种于超低吸附六孔板 (2 × 10³/孔), 使用无血清 DMEM/F12 培养基, 3 d/次添加

一次新鲜微球体培养基。培养1~2周后,显微镜下观察并计算肿瘤球数目。

1.5 统计学方法

运用SPSS22.0统计软件分析数据。细胞实验均都分别进行3次独立重复实验,计量资料采用均数±标准差表示,两组比较用两样本*t*检验,多组比较采用单因素方差分析。使用Kaplan-Meier生存曲线评估UBE2S高、低表达组的预后差异,统计分析基于log-rank检验。以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鉴定肝癌中UBE2S的表达特征

RNA-seq数据库分析显示,UBE2S的转录水平在肿瘤中升高(图1A,B,*P*<0.001)。UALCAN数据库分析明确了UBE2S蛋白在肿瘤组织中的高表达(图1C)。UBE2S的表达随着肿瘤分级的增加而逐渐升高(图1D)。UBE2S启动子区的甲基化水平低于正常组织(图1E);UBE2S在TP53突变时的表达水平比正常组高(*P*<0.001,图1F)。

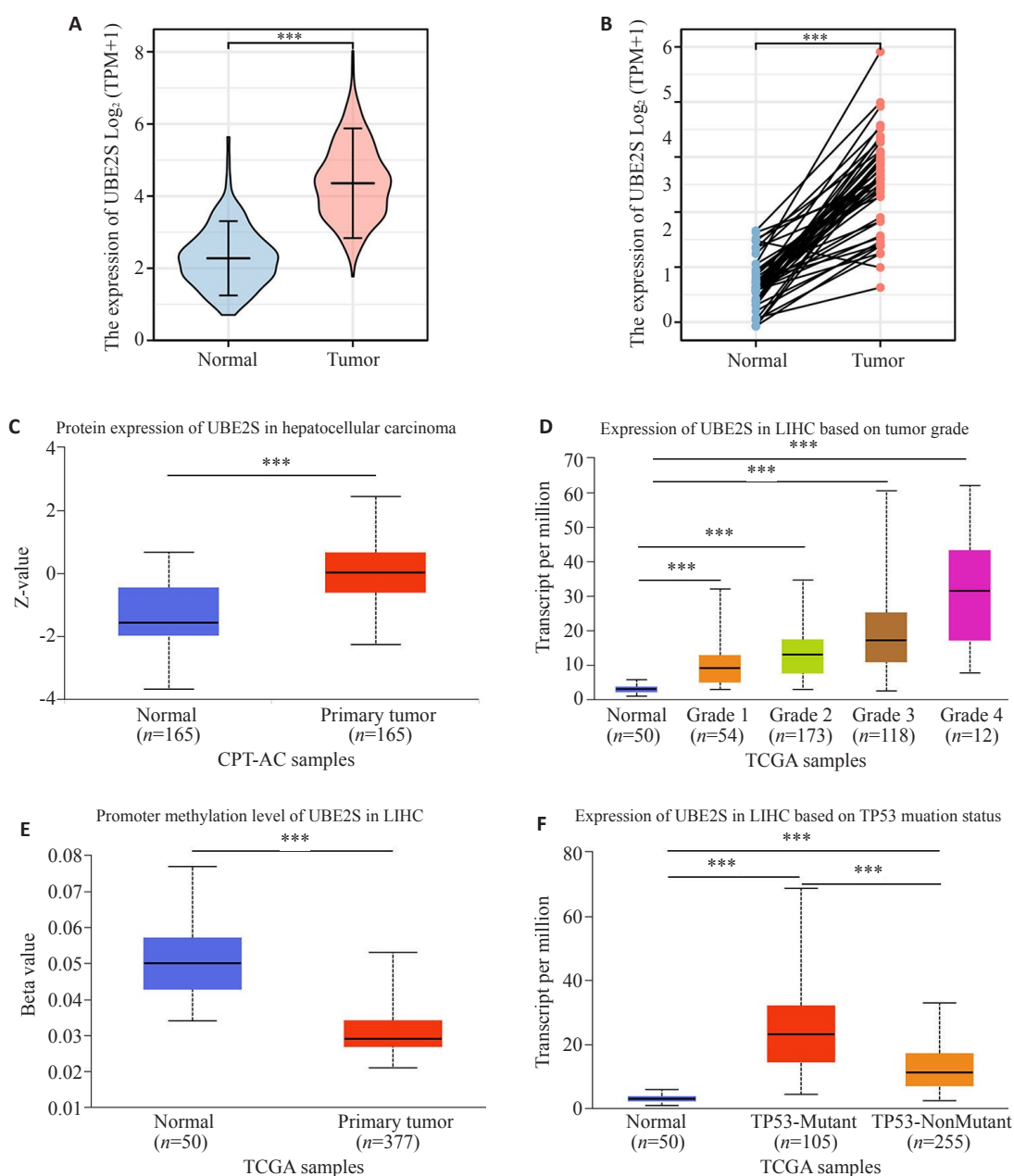


图1 分析UBE2S在肝癌中的表达差异

Fig.1 Analysis of UBE2S expression in LIHC. **A, B**: mRNA expression of UBE2S in unpaired and paired samples. **C**: Protein expression of UBE2S in tumor and normal tissues in CPATC with UALCAN. **D**: Correlation of UBE2S expression level with tumor grade in TCGA with UALCAN. **E**: Promoter methylation levels of UBE2S in tumor and normal tissues in TCGA with UALCAN. **F**: Correlation of UBE2S expression levels and TP53 mutation in HCC in TCGA with UALCAN. ****P*<0.001.

2.2 鉴定肝癌中UBE2S的预后特征

生存分析显示UBE2S高表达组的患者预后更差

(图2A~C)。ROC曲线分析UBE2S的临床诊断价值,结果显示曲线下面积高达0.946(图2D)。

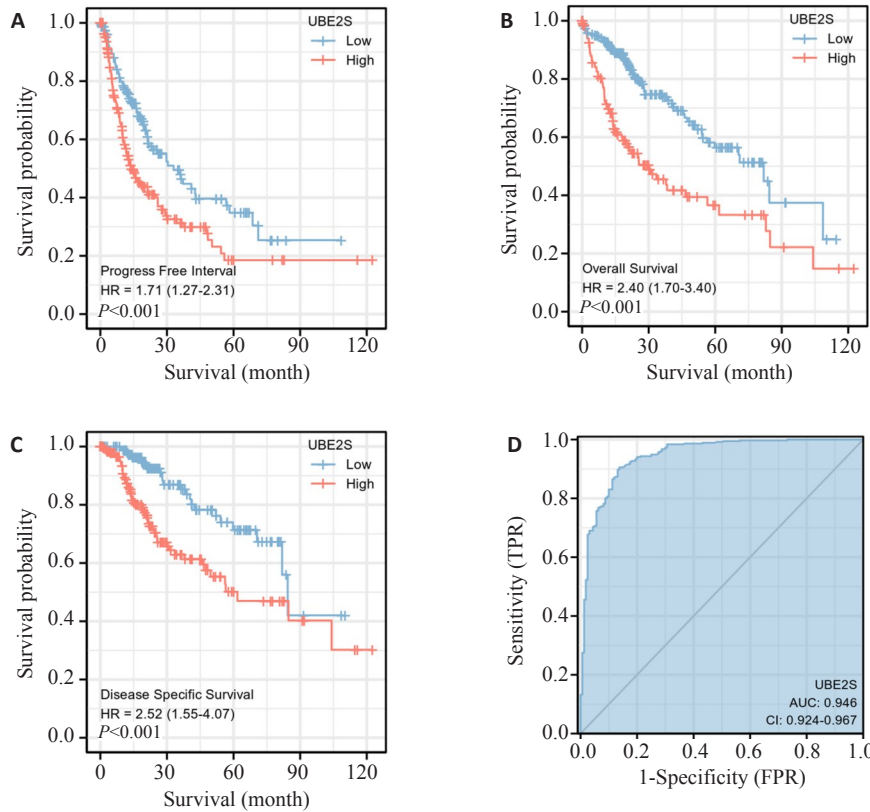


图2 探究UBE2S在肝癌中的预后意义

Fig.2 Prognostic value of UBE2S for LHC. A: Progression-free survival curves of the patients. B: Overall survival curves of the patients. C: Disease-specific survival curves of the patients. D: ROC curve.

2.3 单细胞测序显示UBE2S在增殖性T细胞中特异性高表达

分析单细胞数据GSE166635中UBE2S在肝癌组织微环境的各细胞类群中表达水平。结果显示,经过对数据的降维聚类处理之后,共得到21个不同的细胞clusters(图3A)。用于注释细胞类型的细胞markers如图3B。在11个不同的细胞类型,上皮细胞比例最高(图3C、D)。UBE2S在Tprolif细胞中表达丰度相对较高(图4)。

2.4 单细胞测序揭示细胞间通讯

在肝癌中Epithelial之间、和Fibroblasts以及和Endothelial的交互强度强于其他种类的细胞(图5A)。Tprolif细胞与其他细胞之间的交互强度相对不活跃(图5B、C)。

2.5 单细胞测序揭示调控各种细胞的转录因子

CEBPB、SMAD1、SPI1、IRF1、JMJD1C、CEBPA和STAT1可以调控Tprolif细胞的状态(图6A);在

Tprolif_C12中,最显著的转录因子是SPI1;在Tprolif_C18中,最显著的转录因子是FOXM1(图6B、C)。

2.6 UBE2S肝癌组织高表达

免疫组化结果显示,UBE2S确实高表达于肝癌组织(图7A);多色免疫荧光结果显示,UBE2S在肝癌组织中的肝癌细胞和T细胞中均有较高的表达(图7B)。

2.7 敲低UBE2S可降低肝癌细胞的干性

免疫印迹分析结果显示,在转染shUBE2S的HCC中UBE2S蛋白表达水平降低(shUBE2S-1, $P < 0.01$, $P < 0.05$; shUBE2S-2, $P < 0.01$, $P < 0.01$, 图8A)。克隆形成实验结果显示,UBE2S敲低组HCC细胞克隆形成数与对照组相比减少(shUBE2S-1, $P < 0.05$, $P < 0.01$; shUBE2S-2, $P < 0.01$, $P < 0.05$, 图8B)。悬浮成球实验结果显示,UBE2S敲低组HCC细胞形成肿瘤球的数目与对照组相比减少(shUBE2S-1, $P < 0.05$, $P < 0.01$; shUBE2S-2, $P < 0.01$, $P < 0.01$, 图8C)。

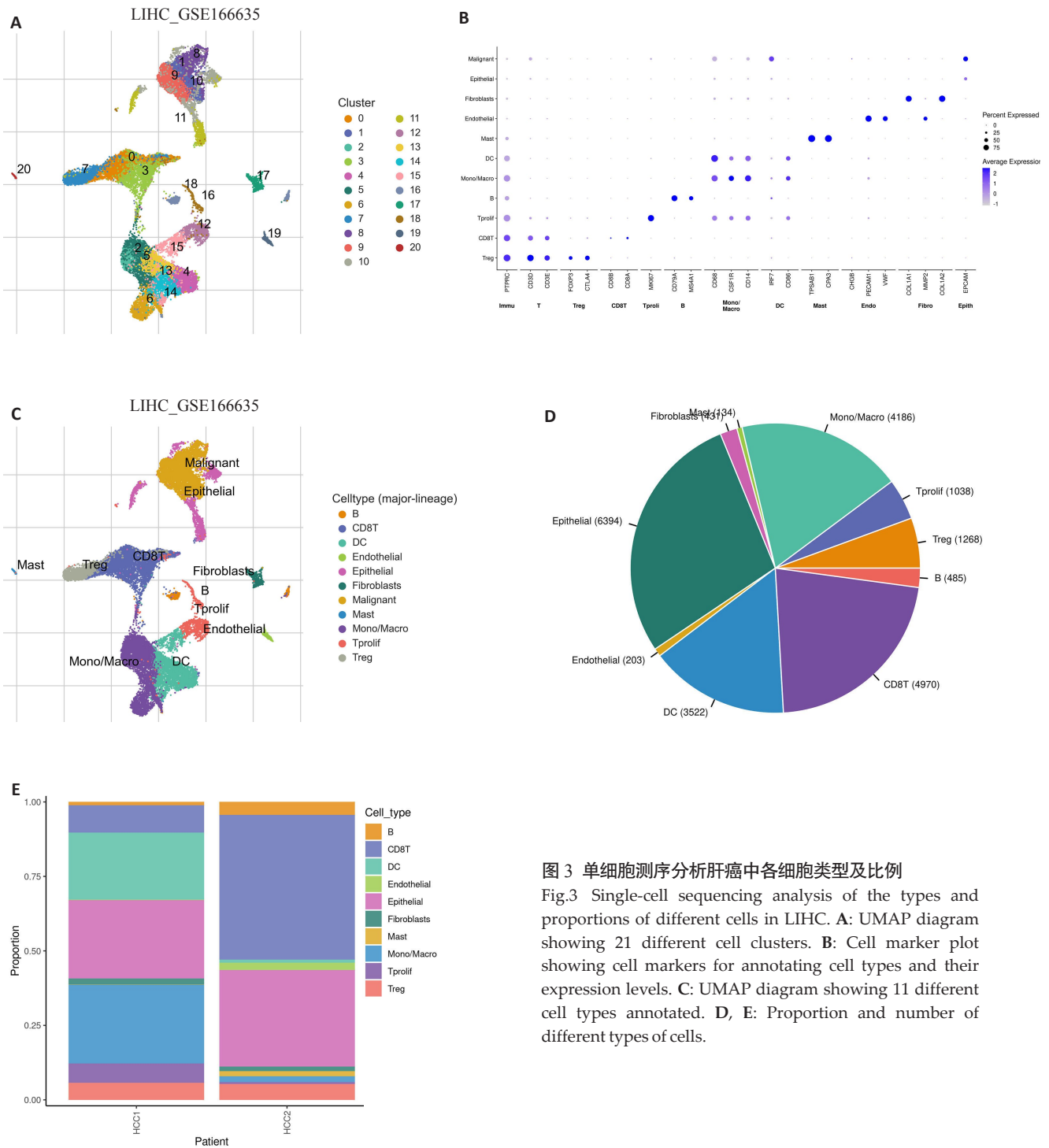


图3 单细胞测序分析肝癌中各细胞类型及比例
 Fig.3 Single-cell sequencing analysis of the types and proportions of different cells in LIHC. **A:** UMAP diagram showing 21 different cell clusters. **B:** Cell marker plot showing cell markers for annotating cell types and their expression levels. **C:** UMAP diagram showing 11 different cell types annotated. **D, E:** Proportion and number of different types of cells.

3 讨论

UBE2S是泛素化过程所需的泛素结合酶E2家族的成员之一,可以促进蛋白结合泛素分子,参与细胞信号转导和调节细胞分裂周期等病理生理过程^[18-20]。关于UBE2S在肝癌中的作用有部分文献报道,其高表达于肿瘤微环境的各种免疫细胞,但局限于生物信息学分析,未进行实验确认;生物信息学分析依赖于高通量数据,数据质量多种因素的影响,可能会有偏差,需要进一步实验验证以明确生物学意义^[21,22]。

UBE2S可以用作各种肿瘤的标志物;如UBE2S在乳腺癌和宫颈癌的表达水平更高,并与预后不良有关^[23,24]。通过数据库挖掘分析和多重验证,本研究发现UBE2S表达水平与HCC的进展密切相关。从表观遗传学的角度分析,启动子区甲基化水平与该基因的转录水平呈现负相关。我们发现UBE2S的DNA启动子甲基化在肿瘤组织中显著的下调,这与肿瘤组织中转录水平增加是统一的。UBE2S在HCC中高度表达,并与HCC患者相关癌症预后不良是相关的,这为进一步研

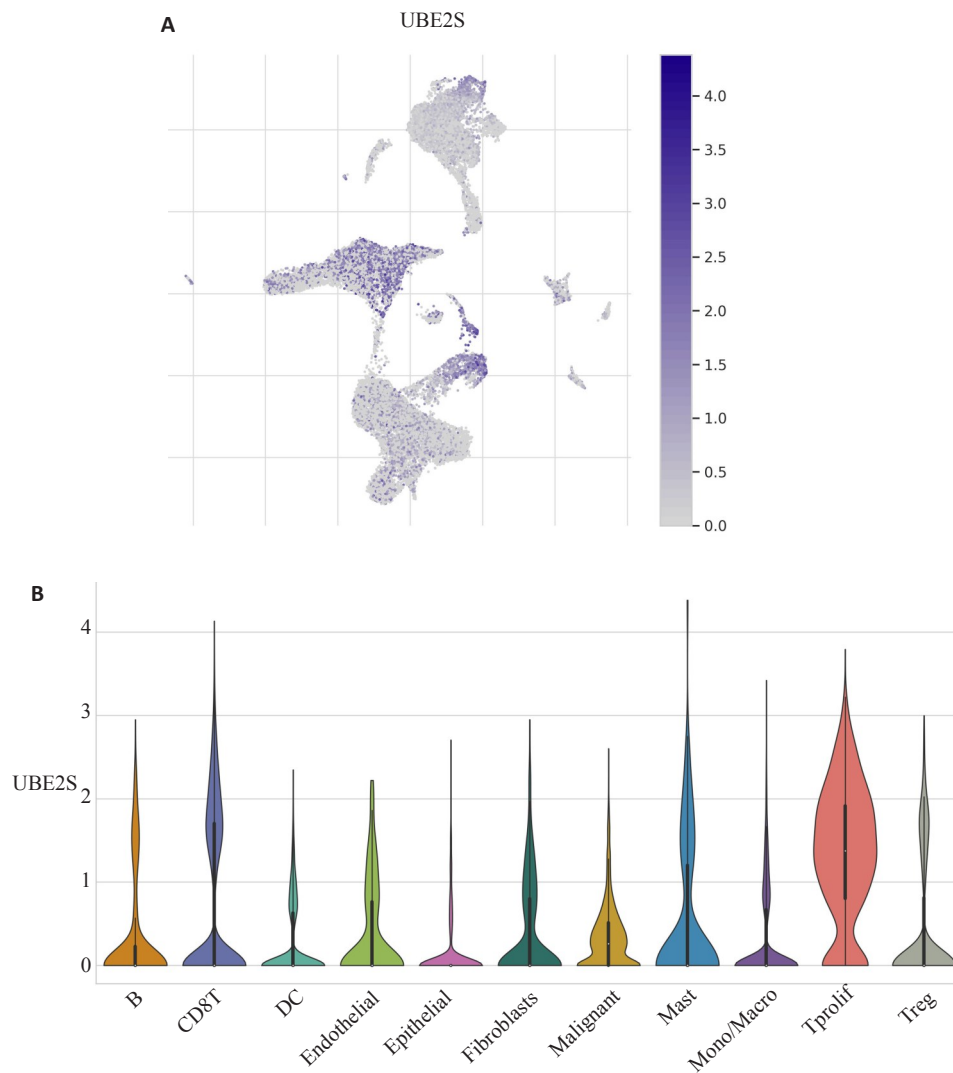


图4 单细胞测序分析肝癌中UBE2S在各细胞类型中的表达情况

Fig.4 Single-cell sequencing analysis of UBE2S expression in different cell types in LIHC. A: UMAP map showing UBE2S expression levels in different types of cells. B: Violin diagram showing that the expression of UBE2S is the highest in Tprolif cells.

究癌症生物标志物和靶向治疗提供了新的途径。细胞验证实验结果提示,敲低UBE2S能明显抑制肝癌细胞的干细胞特性。

免疫微环境异质性是肿瘤耐药、复发和预后不良的重要原因之一^[25-27]。近年来,免疫疗法和联合治疗给晚期癌症患者带来了希望^[28]。系统探索肿瘤免疫微环境的异质性,对治疗选择、疗效预测、方案优化和新免疫治疗靶点的开发具有重要指导作用^[29]。先前的研究主要依赖于病理分析或大量转录组测序,其局限性是只能代表组织的平均基因水平,无法准确分析其细胞组成,并且容易忽视含量较低的关键细胞亚群。而单细胞测序则可以挖掘组织异质性,促进了肿瘤免疫领域的探索,以系统地揭示癌症免疫微环境的异质性。TISCH收集了来自GEO和ArrayExpress的高质量肿瘤单细胞转录

组数据以及相应的患者信息,数据涵盖了多种癌症类型^[30]。本研究从TISCH进一步探索了UBE2S在不同细胞簇中的表达水平,并进行GSEA,细胞通讯和关键转录因子分析。

基于T细胞的免疫疗法的出现显著改变了癌症患者的治疗模式^[31];对T细胞活化和抑制的分子机制有更深入的了解,以便调整免疫疗法的靶点。有文献表明,泛素依赖性通路的调节可以显著改变T细胞的功能,UBE2S增加T细胞耗竭标志物的产生促进肿瘤的免疫逃逸^[32,33]。本研究首次通过免疫荧光实验明确,UBE2S显著高表达于肝癌组织中的T细胞。T细胞作为免疫治疗的主要执行者,对疗效有重要的影响^[34];Tprolif细胞是指具有高增殖能力的细胞,可以进行快速的细胞分裂和增殖。Tprolif细胞增强或抑制其他免疫细胞的功能,

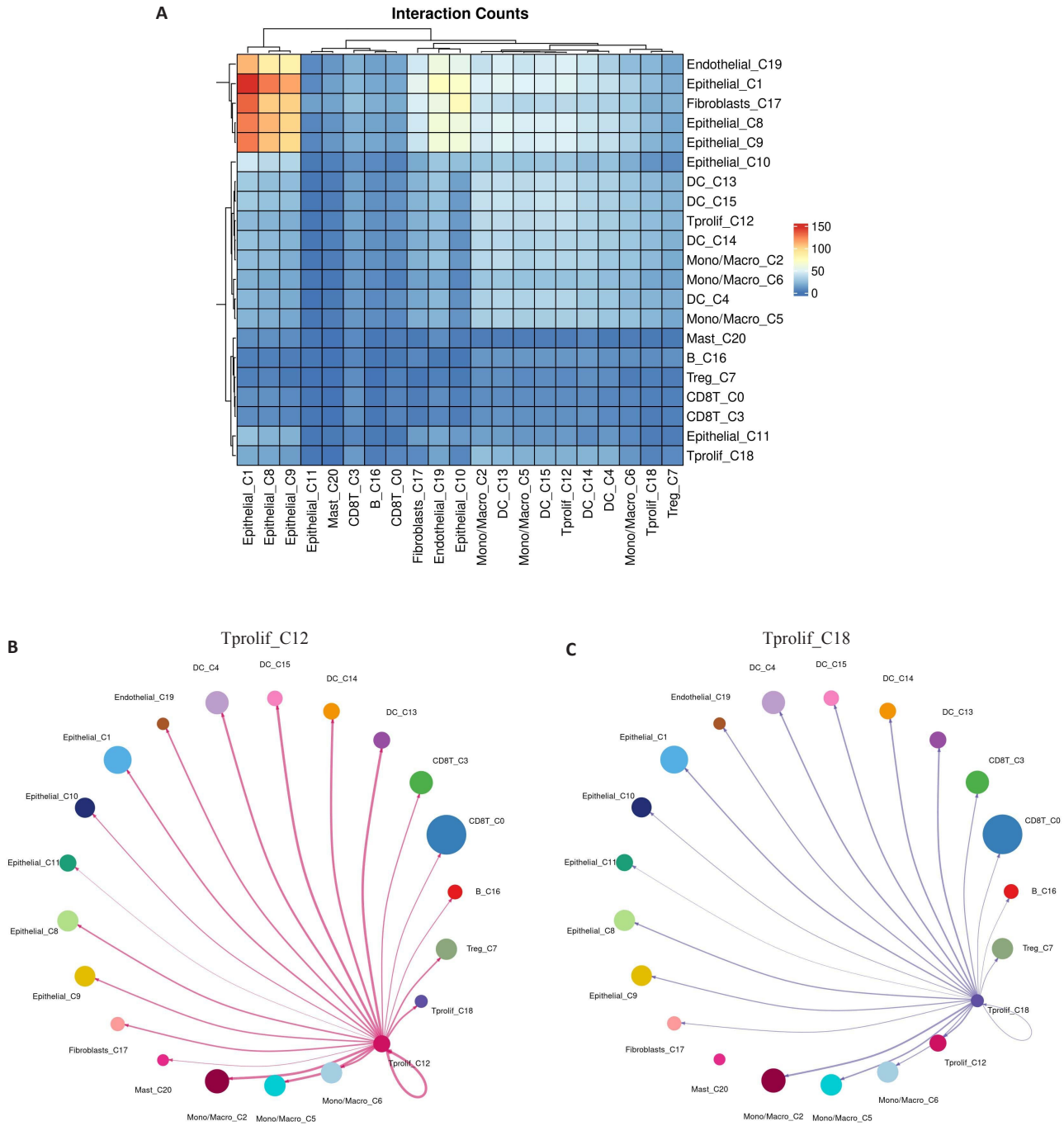


图 5 在不同细胞类型中进行细胞交互分析

Fig.5 Cell interaction analysis among different cell types. A: Heat map of the intensity of interactions between different cell types. B, C: Circle diagram showing the intensity of interaction between other types of cells and Tprolif cells.

从而调节免疫反应的程度和方向。Tprolif细胞的异常增殖和功能障碍与肿瘤发生和发展有关。UBE2S在Tprolif细胞高表达这一发现为肝癌的联合免疫治疗提供了基础^[35]。但UBE2S在Tprolif细胞中具体发挥何种作用有待后续进一步研究。同时基于单细胞测序数据,我们探索了细胞通讯和关键转录调控因子在肝癌中的特征。细胞通讯会影响周围的免疫微环境从而影响肿

瘤的发生发展^[36],本研究发现肝癌肿瘤微环境中内皮与上皮及成纤维细胞之间的细胞交互强度较高。对此的进一步研究将有利于完善肝癌的诊断、治疗与预后评价系统,制定更优化的治疗方案。

综上所述,本研究通过生物信息学挖掘结合细胞实验多重验证,揭示了UBE2S在HCC中的作用。UBE2S是促进肝癌进展的重要调控因子,在增值T细胞呈高表

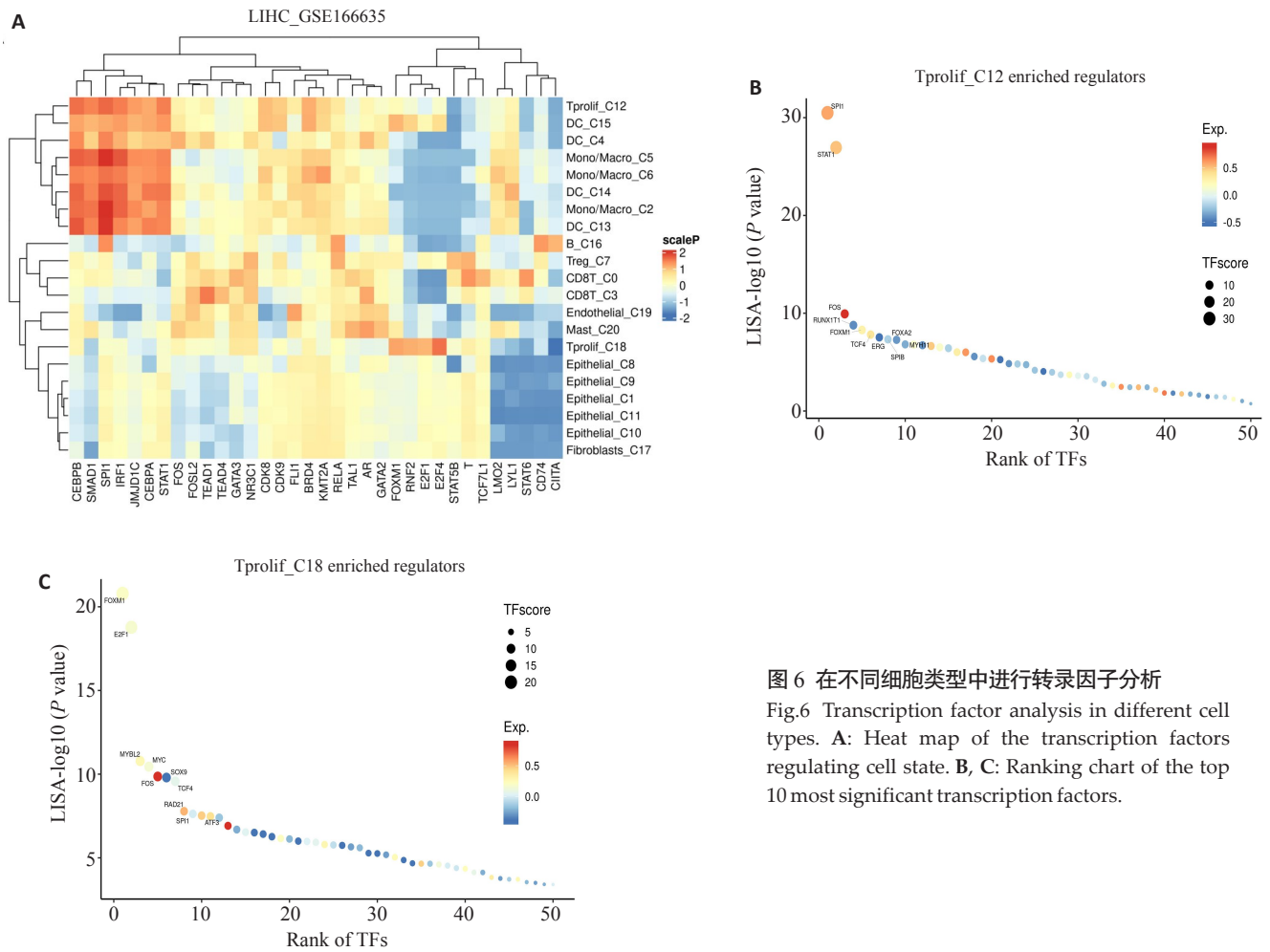


图6 在不同细胞类型中进行转录因子分析
 Fig.6 Transcription factor analysis in different cell types. **A**: Heat map of the transcription factors regulating cell state. **B**, **C**: Ranking chart of the top 10 most significant transcription factors.

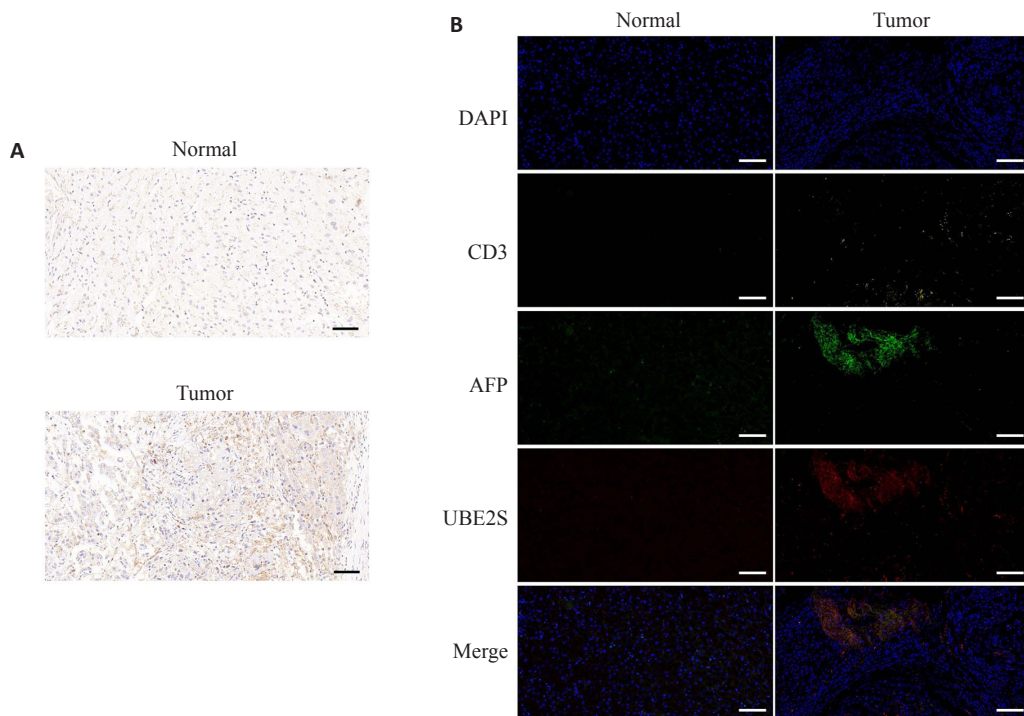


图7 UBE2S在肝癌组织中表达增加
 Fig.7 High expressions of UBE2S in HCC tissues detected by immunohistochemistry (**A**; scale bar=50 μ m) and multicolor immunofluorescence staining (**B**; scale bar=50 μ m).

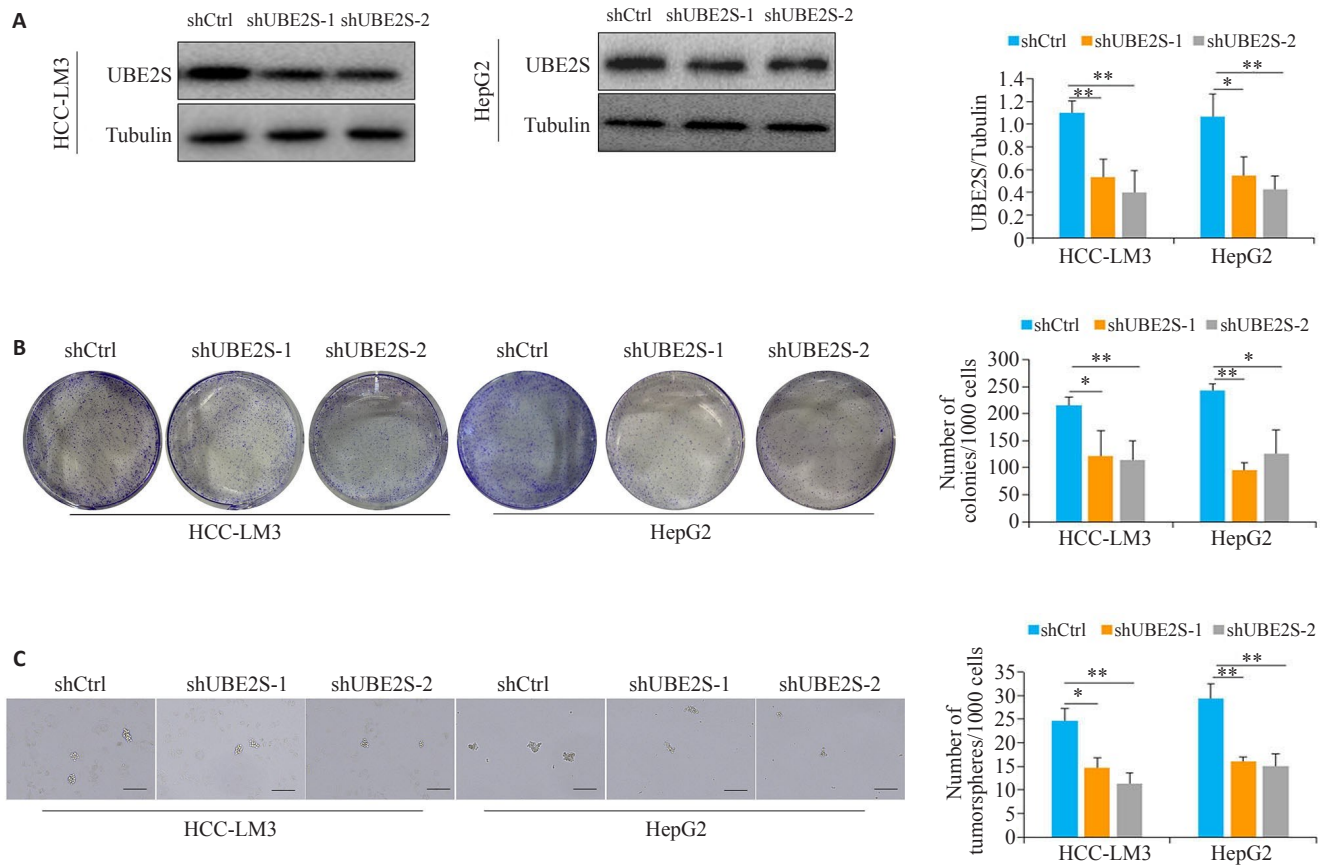


图 8 敲低ShUBE2S能减少肝癌细胞的干细胞特性

Fig.8 Knockdown of UBE2S inhibits cancer stem cell-like characteristics of HCC cells. A: Western blotting for the expressions of UBE2S proteins in cells with shRNA transfection. B: Colony-forming assay of HCC cells with UBE2S knockdown. C: Tumor sphere formation assay of HCC cells with UBE2S knockdown (scale bar=150 μm). **P*<0.05, ***P*<0.01.

达,能够促进肝癌细胞的干性。UBE2S可能为HCC诊断和治疗方法的发展提供新的思路,并可能成为HCC治疗的新靶点。

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): 209-49.
- [2] 王瑞华, 胡明, 杨之雨, 等. 2000—2020年全球肝癌发病和死亡状况和未来流行趋势: GLOBOCAN 数据分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2023, 9(3): 271-80.
- [3] Li QR, Cao MM, Lei L, et al. Burden of liver cancer: from epidemiology to prevention[J]. Chin J Cancer Res, 2022, 34(6): 554-66.
- [4] Raoul JL, Edeline J. Systemic treatment of hepatocellular carcinoma: standard of care in China and elsewhere[J]. Lancet Oncol, 2020, 21(4): 479-81.
- [5] 管宇帆, 甘雨, 安家泽. 青年肝癌的发病特征及危险因素的思考[J]. 空军军医大学学报, 2024, 45(1): 1-12.
- [6] Bodrug T, Welsh KA, Bolhuis DL, et al. Time-resolved cryo-EM (TR-EM) analysis of substrate polyubiquitination by the RING E3 anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) [J]. Nat Struct Mol Biol, 2023, 30(11): 1663-74.
- [7] Wang MZ, Zhao K, Liu M, et al. BMP4 preserves the developmental potential of mESCs through Ube2s- and Chmp4b-mediated chromosomal stability safeguarding [J]. Protein Cell, 2022, 13(8): 580-601.
- [8] Zheng PF, Chen LZ, Liu P, et al. Identification of immune-related key genes in the peripheral blood of ischaemic stroke patients using a weighted gene coexpression network analysis and machine learning[J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 361-8.
- [9] Xiao KH, Peng SM, Lu JL, et al. UBE2S interacting with TRIM21 mediates the K11-linked ubiquitination of LPP to promote the lymphatic metastasis of bladder cancer[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(7): 408-15.
- [10] Ho JY, Lu HY, Cheng HH, et al. UBE2S activates NF-κB signaling by binding with IκBα and promotes metastasis of lung adenocarcinoma cells[J]. Cell Oncol, 2021, 44(6): 1325-38.
- [11] Wang P, Li Y, Ma YY, et al. Comprehensive investigation into the role of ubiquitin-conjugating enzyme E2S in melanoma development [J]. J Invest Dermatol, 2021, 141(2): 374-84.
- [12] Khan OM, Almagro J, Nelson JK, et al. Proteasomal degradation of the tumour suppressor FBW7 requires branched ubiquitylation by TRIP12[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2043-9.
- [13] Lei X, Lei Y, Li JK, et al. Immune cells within the tumor

- microenvironment: biological functions and roles in cancer immunotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2020, 470: 126-33.
- [14] Onkar SS, Carleton NM, Lucas PC, et al. The great immune escape: understanding the divergent immune response in breast cancer subtypes[J]. *Cancer Discov*, 2023, 13(1): 23-40.
- [15] Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion[J]. *Science*, 2011, 331(6024): 1565-70.
- [16] Ruiz de Galarreta M, Bresnahan E, Molina-Sánchez P, et al. β -catenin activation promotes immune escape and resistance to anti-PD-1 therapy in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(8): 1124-41.
- [17] Liu Z, Xu LJ. UBE2S promotes the proliferation and survival of human lung adenocarcinoma cells [J]. *BMB Rep*, 2018, 51(12): 642-7.
- [18] Zhang MJ, Liu Y, Yin Y, et al. UBE2S promotes the development of ovarian cancer by promoting PI3K/AKT/mTOR signaling pathway to regulate cell cycle and apoptosis[J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 62-71.
- [19] Zhang RY, Liu ZK, Wei D, et al. UBE2S interacting with TRIM28 in the nucleus accelerates cell cycle by ubiquitination of p27 to promote hepatocellular carcinoma development [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 64-78.
- [20] Garnett MJ, Mansfeld J, Godwin C, et al. UBE2S elongates ubiquitin chains on APC/C substrates to promote mitotic exit[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(11): 1363-9.
- [21] Ma YL, Li KZ, Li SJ, et al. Prognostic value of ubiquitin-conjugating enzyme E2 S overexpression in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 119: 225-31.
- [22] Lai EJ, Tai Y, Jiang JS, et al. Prognostic evaluation and immune infiltration analysis of five bioinformatic selected genes in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(24): 11128-41.
- [23] Guo YJ, Chen XY, Zhang XW, et al. UBE2S and UBE2C confer a poor prognosis to breast cancer *via* downregulation of Numb [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 992233-42.
- [24] Lin TH, Hsu WH, Tsai PH, et al. Dietary flavonoids, luteolin and quercetin, inhibit invasion of cervical cancer by reduction of UBE2S through epithelial-mesenchymal transition signaling[J]. *Food Funct*, 2017, 8(4): 1558-68.
- [25] Khalaf K, Hana D, Chou JTT, et al. Aspects of the tumor micro-environment involved in immune resistance and drug resistance[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 656364-73.
- [26] Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer [J]. *Nature*, 2019, 575(7782): 299-309.
- [27] 赵爱月, 苏云霞, 傅德强. MiR-4772通过调控卵巢癌免疫相关基因改变肿瘤免疫微环境[J]. *南方医科大学学报*, 2022, 8(11): 1638-45.
- [28] Feng CH, Mell LK, Sharabi AB, et al. Immunotherapy with radiotherapy and chemoradiotherapy for cervical cancer[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2020, 30(4): 273-80.
- [29] Zhang YY, Zhang ZM. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(8): 807-21.
- [30] Liu JH, Zhu XN, Gao L, et al. Expression and prognostic role of Glia maturation factor- γ in gliomas [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 906762-9.
- [31] 许雨柔, 邹宜丰, 蔡宁, 等. 晚期食管癌PD-1/PD-L1免疫检查点抑制剂疗法的Cochrane Meta分析[J]. *复旦学报: 医学版*, 2023, 50(5): 660-9, 682.
- [32] Chen ZJ, Luo XR, Lu Y, et al. Ubiquitination signals critical to regulatory T cell development and function [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 16(3): 348-52.
- [33] Bao HL, Luo Y, Ding GS, et al. A pan-cancer analysis of UBE2S in tumorigenesis, prognosis, pathway, immune infiltration and evasion, and therapy response from an immune-oncology perspective [J]. *J Oncol*, 2022, 2022: 3982539-45.
- [34] Oliveira G, Wu CJ. Dynamics and specificities of T cells in cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(5): 295-316.
- [35] Ruf B, Heinrich B, Gretten TF. Immunobiology and immunotherapy of HCC: spotlight on innate and innate-like immune cells[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(1): 112-27.
- [36] Chen LX, Zeng SJ, Liu XD, et al. Cell-cell communications shape tumor microenvironment and predict clinical outcomes in clear cell renal carcinoma[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 113-23.

(编辑:林萍)