



拟素化酶和去拟素化酶在肺癌发生发展中的作用*

郑雅文^{1,2)} 熊秀芳^{1,2)} 孙毅^{1,2,3,4)**}

¹⁾ 浙江大学医学院附属第二医院肿瘤研究所, 杭州 310029; ²⁾ 浙江大学转化医学研究院, 杭州 310029;

³⁾ 浙江大学滨江研究院, 杭州 310058; ⁴⁾ 浙江大学肿瘤中心, 杭州 310029)

摘要 蛋白质拟素化是一种类似于泛素化的翻译后修饰, 由 NEDD8 活化酶 E1 (NAE)、NEDD8 耦联酶 E2 (UBE2M 或 UBE2F) 和 NEDD8 连接酶 E3 三种酶催化组成的级联反应。Cullin 家族蛋白是拟素化修饰的生理性底物, Cullin 的拟素化修饰激活 Cullin-RING 连接酶 (CRLs), CRLs 是最大一类 E3 泛素连接酶家族, 介导了其中约 20% 蛋白质的泛素化降解来调节许多生物过程, 包括细胞周期调控、DNA 损伤修复、细胞生长、代谢、存活、自噬、迁移和免疫逃逸等。去拟素化过程则是通过特异性的去拟素化酶将拟素分子 NEDD8 从底物蛋白上水解并移除, 释放至细胞中以维持拟素化的动态平衡。NEDD8 和拟素化修饰的催化酶在多种癌症中高表达或活性上调, 导致 CRLs 的过度激活, 催化许多抑癌蛋白质的降解, 从而促进肺癌细胞的增殖与存活以及肺肿瘤的发生发展。蛋白质拟素化修饰已被证实是有希望的癌症靶点。同样地, 多种去拟素化酶在肺癌中高表达, 其改变也与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关, 亦是潜在的肿瘤治疗重要靶点。本综述主要聚焦于拟素化及去拟素化通路在肺癌细胞中表达水平的改变, 如何调节肺癌细胞的生长、存活和肺癌微环境和炎症免疫反应以及在肺癌发生发展中的作用。了解驱动癌症发生、发展和转移的关键分子机制, 提出通过靶向拟素化和去拟素化修饰各重要组件来作为肺癌治疗手段, 为临床肺癌的治疗提供新的思路。

关键词 拟素化修饰, 去拟素化修饰, 催化酶, 肿瘤, 肺癌, 靶向治疗

中图分类号 Q7, R734.2

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0117

肺癌是最常见的人类恶性肿瘤之一, 也是全球范围内癌症致死的第一大杀手^[1-3]。从 2008 年起, 肺癌已取代肝癌成为中国癌症死亡的首要原因, 在过去 30 年内肺癌死亡率已增加了近 470%^[4]。2015 年, 中国肺癌的发生率和死亡率居所有癌症类型之首^[5]。最新统计数据预测表明, 肺癌最常见的类型是非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC), 占整个肺癌的近 80%, 包括肺腺癌、肺鳞癌等^[6]。由于肺癌临床表现的隐匿性, 早期症状缺乏特异性, 多数肺癌患者确诊已经为晚期, 丧失最佳治疗时机^[7]。肺癌的治疗效果很大程度上取决于确诊时的疾病阶段, 目前临床上对肺癌的主要治疗方法是靶向治疗、手术治疗、化疗治疗和放射治疗等。用于治疗肺癌的化疗药物有紫杉醇、顺铂、吉西他滨和多柔比星等^[8-9]。虽然治疗肺癌的药物较多, 但是患者的生存率并没有提高且副作用

较大, 且化疗属于姑息性治疗^[10-11]。尽管现在有了新的诊断技术, 外科技术和生物治疗手段 (如靶向治疗和免疫治疗) 也取得了许多进展, 但是肺癌的 5 年生存率仍然很低^[2, 6, 12]。

拟素化 (neddylation)^[13] 是一种类似于泛素化的可逆性蛋白质修饰, 也是一个由 E1、E2 和 E3 三类关键酶催化的三步级联反应^[14]。类泛素蛋白 NEDD8 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 8) 与泛素分子 (ubiquitin, Ub) 具有高达 60% 的序列相似

* 国家重点研发计划 (2022YFC3401500, 2021YFA1101000), 浙江省自然科学基金 (LD22H300003) 和国家自然科学基金 (92253203, U22A20317, 81974429, 82172898) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 15257195968, E-mail: yisun@zju.edu.cn

收稿日期: 2023-04-02, 接受日期: 2023-04-12

性^[15], 它以前体分子的形式合成, 再经C端水解酶(如UCH-L3^[16]、NEDP1/SEN8^[17]等)的催化切割掉末端的5个氨基酸残基, 暴露出第76位甘氨酸^[18]。成熟 NEDD8 分子在 NEDD8 活化酶 E1 (NEDD8-activating enzyme E1, NAE) 作用下以 ATP 依赖的方式活化, 形成 NEDD8-NAE 复合物。然后, NEDD8 耦联酶 E2 (NEDD8-conjugating enzyme E2) 与 NEDD8-NAE 复合物结合, 并催化转硫酯反应, 将 NEDD8 分子转移到 E2 上。最后, NEDD8 连接酶 E3 催化 NEDD8 分子的 Gly76 与靶蛋白的赖氨酸残基形成异肽键, 将 NEDD8 分子共价结合到底物上, 从而调控该蛋白质的活性和功能等^[18-19] (图1)。

目前已知的在哺乳动物细胞中负责催化拟素化修饰的 E1 活化酶仅有 1 个 NAE, NAE 是异二聚体蛋白, 由调节亚基 NAE1/APPBP1 和催化亚基 UBA3/NAE β 组成。参与拟素化修饰的耦联酶 E2 仅有 2 种: UBE2M (也叫 UBC12) 和 UBE2F。介导拟素化修饰的 E3 连接酶有十几种^[20], 其中研究得最多的是 RING-Box 1 (RBX1, 也叫 ROC1) 和

RING-Box 2 (RBX2, 也叫 ROC2、SAG)。RBX1 与 UBE2M 共同催化底物 CUL1、CUL2、CUL3、CUL4A 和 CUL4B 的拟素化修饰, 而 RBX2/SAG 则与 UBE2F 共同催化 CUL5 的拟素化修饰作用^[21]。其余研究较多的 E3 连接酶还包括 MDM2^[22]、SCF^{FBXO11}^[23]、c-CBL^[24]、TRIM40^[25]、凋亡抑制剂 (IAPs)^[26]、RNF111^[27]、TFB3^[28]、DCN1-LIKE 蛋白 (DCNL1-5)^[29-30] 和 Parkin^[31] 等。目前已知的拟素化 E3 连接酶, 都同时具有泛素化修饰 E3 连接酶的功能^[32]。拟素化修饰的生理性底物是 Cullin 家族蛋白, 主要成员有 Cullin1 (CUL1)、Cullin2 (CUL2)、Cullin3 (CUL3)、Cullin4A (CUL4A)、Cullin4B (CUL4B) 和 Cullin5 (CUL5)。Cullin 蛋白经过拟素化修饰, 即 NEDD8 蛋白标记到 Cullin 蛋白的赖氨酸残基上, 其构象会发生改变, 从而激活对应的 CRL E3 泛素连接酶 (Cullin-RING ligases, CRLs)。研究表明, CRLs 在包括肺癌的多种肿瘤中高度激活, 促进了肿瘤的发生发展^[18, 33]。

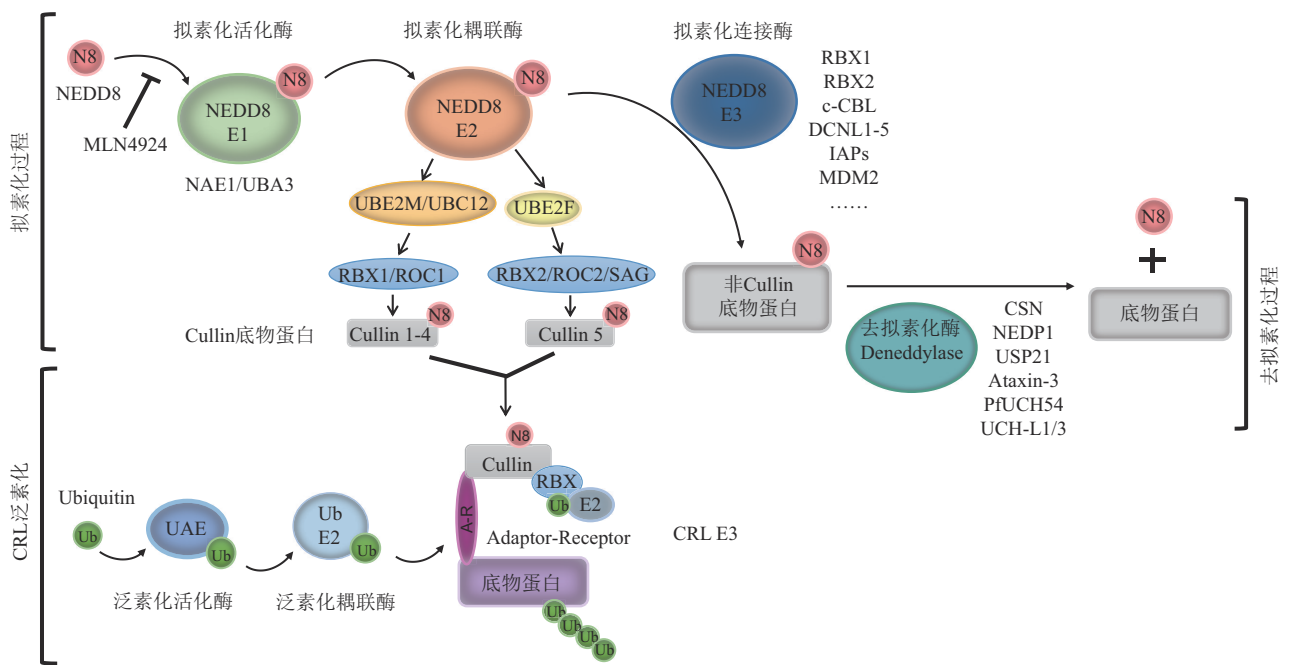


Fig. 1 The process of neddylation and deneddylation
图1 拟素化修饰和去拟素化修饰过程概况

蛋白质拟素化修饰过程是通过给底物加上NEDD8分子, 从而实现对底物蛋白的稳定性或者功能的调控, 主要是由拟素活化酶E1、拟素耦联酶E2和拟素连接酶E3催化的级联反应。Cullin家族蛋白是已知最主要的拟素化修饰底物。CRL泛素化与拟素化过程类似, 也是一个由E1、E2和Cullin-RING E3泛素连接酶三种酶催化的级联反应, 实现对底物蛋白的泛素化修饰和降解。去拟素化修饰主要通过去拟素化酶催化, 是将NEDD8分子从底物蛋白上去除并释放到细胞中的过程。Adaptor: 衔接蛋白; Receptor: 底物受体蛋白。

在去拟素化过程中, COP9 信号体复合物 (CSN) 或其他去拟素化酶与经拟素化后的 Cullins 结合, 并从 Cullins 中去除 NEDD8 分子^[34]。去拟素化的 Cullin 与 CAND1 结合, 使 CRLs 保持非活性构象。因此, 拟素化促进了活性 CRL E3 复合物的组装, 并刺激了底物的泛素化, 而去拟素化促进了 CRL E3 复合物的解离, 并增强了 Cullin 与抑制性 CAND1 的结合。拟素化和去拟素化的动态平衡促进了 NEDD8 等组件的循环利用, 使其可用于 CRLs 以外其他蛋白质的修饰, 因此, 许多不同底物可以同时被拟素化, 并正常行使其功能^[35]。越来越多的数据表明, 这些过程的组件酶等的改变会影响细胞生物学功能, 如 CSN 的缺失会导致细胞周期和信号转导等生命活动发生异常^[36-38]。

去泛素化酶 (DUBs) 包括 7 个亚家族, 最大的亚家族是泛素特异性蛋白酶 (USPs), 还包括泛素羧基端水解酶、卵巢肿瘤蛋白酶、含有 Machado-Josephin 结构域的蛋白酶、与新型含泛素的 DUB 家族相互作用的基序 (MINDYs)、ZUP1 和 JAB1/MPN/MOV34 金属酶^[39]。很多去泛素化酶也能够从蛋白质底物中去除拟素分子 (NEDD8), 参与催化蛋白质去拟素化, 即对 Ub 和 NEDD8 具有双重特异性。目前研究较多的 NEDD8 特异性的异肽酶是 CSN, 它是一种由 8 个亚基组成的锌金属蛋白酶复合体。其中 CSN5 是 CSN 的催化亚基, 可以催化 Cullins 的去拟素化^[40-41]。另一个经典的 NEDD8 特异性异肽酶是半胱氨酸蛋白酶 NEDP1, 它也作用于 NEDD8 前体^[42-44]。其他对 NEDD8 和 Ub 具有双重特异性的异肽酶还有 USP21^[45]、Ataxin-3^[46]、PfUCH54^[47]、UCH-L1 和 UCH-L3^[42]。

近几年的研究发现, 在肺癌^[48]、肝癌^[49]和结直肠癌^[50]等多种癌症中, 蛋白质拟素化修饰通路和去拟素化通路过度激活^[18, 51]。MLN4924 作为拟素化的小分子抑制剂, 能与 NEDD8 形成稳定的加合物, 使 NEDD8 分子无法与耦联酶 E2 结合形成复合物, 从而特异性地抑制拟素化级联反应的进行^[52-53], 目前正在进行 I~III 期临床试验^[53-54]。由于 MLN4924 诱导 DNA 再复制, 抑制细胞从 S 期到 G2 期的转变, 从而诱导 DNA 损伤和随后的细胞死亡^[55-57], 因此, MLN4924 在多种类型的癌症中都表现出较强的抗肿瘤活性^[58]。拟素化过程和去拟素化过程与几乎所有细胞生理活动相关, 这两个过程的异常调控会导致肺癌等肿瘤的发生。因此, 阐

明拟素化通路和去拟素化通路在肺癌发生发展中的作用与机制, 有助于研发新型肺癌治疗策略。本文总结了拟素化和去拟素化过程中主要酶在肺癌的发生、发展和转移中的作用和功能, 并以此为依据致力对研发相应的肺癌诊断及治疗手段等的应用做一综述。

1 拟素化修饰酶在肺癌细胞生长存活及肺癌发生发展中的作用

越来越多的研究表明, 在包括肺癌在内的多种癌症的发生、发展和转移与拟素化修饰通路的多个关键组分密切相关 (图 2, 表 1), 如 NEDD8 和拟素化修饰催化酶 (包括 NAE1、UBA3、UBE2M、UBE2F、RBX1、SAG、DCN1 等) 的水平在多种癌症中的表达水平要显著高于癌旁正常组织, 且这些酶的高表达与患者的不良预后密切相关。本课题组的研究表明, NEDD8 和 NAE1 的高表达与胰腺癌患者的不良预后呈正相关^[59], UBE2F^[60] 和 SAG^[61] 在肺癌中的高表达与患者的不良预后呈正相关。同时本课题组未发表的工作也发现, RBX1 和 UBE2M 在肺癌发生中起到至关重要的作用。拟素化激活酶 NAE 和耦联酶 UBE2M、UBE2F 等酶在 NSCLC 中表达量升高, NEDD8 连接酶 E3 (如 RBX1/ROC1) 在肺肿瘤中的表达也比在正常肺组织中的表达更高。EGFR 等其他拟素化底物在 6% 的 NSCLC 病例中存在基因扩增或者过表达^[62]。

1.1 拟素化分子 NEDD8 和拟素化活化酶 E1

NEDD8 在肺癌中过表达, 且与患者的不良预后正相关。同时 NEDD8 的缺失可以通过诱导 CRL 底物肿瘤抑制蛋白 (如 p21、p27 和 Wee1) 的积累, 引发 G2 期细胞周期阻滞并导致细胞衰老, 从而显著抑制肺癌细胞 A549 在体外的生长和增殖^[63]。为了进一步研究体内 NEDD8 缺失对肺癌的作用, Jiang 等^[63] 采用裸鼠异种移植瘤模型发现, p27 在 NEDD8 敲除的肿瘤组织中累积, 同时肿瘤体积和重量明显偏小, 表明 NEDD8 敲除显著抑制肿瘤生长。有趣的是, 他们发现敲除 NEDD8 会诱发 A549 细胞衰老, 而不会诱发细胞凋亡, 推测细胞衰老可能与 CRL 底物 p21 和 p27 的累积相关。然而, 这些底物蛋白是否参与了敲除 NEDD8 引起的细胞衰老仍有待进一步研究。

Li 等^[64] 发现 NEDD8 活化酶 E1、耦联酶 E2 UBE2M 以及整个拟素化通路在肺腺癌和鳞状细胞癌中都过度活化。MLN4924 可以在体外抑制肺癌

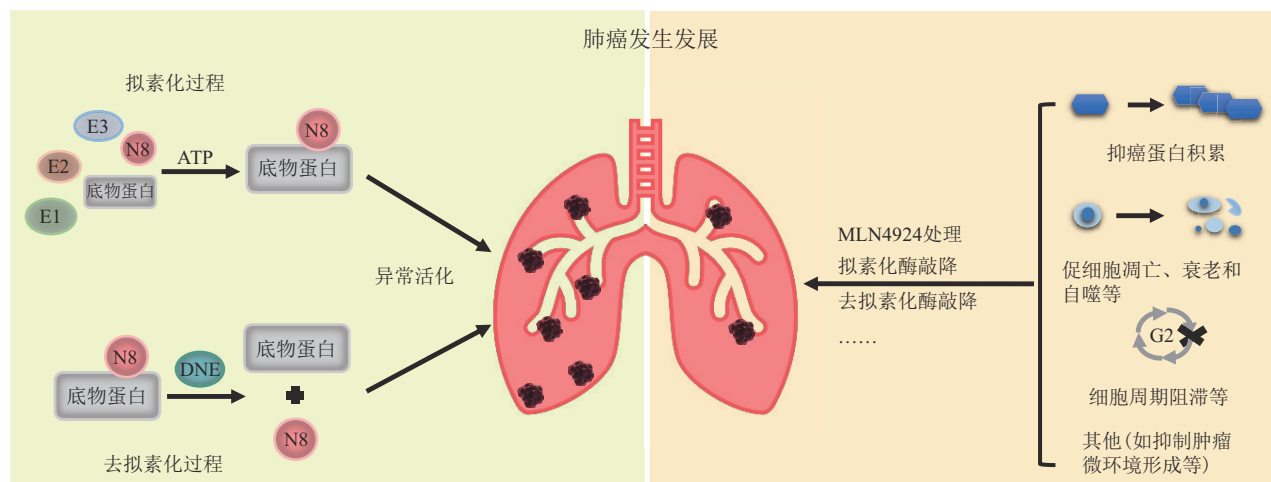


Fig. 2 The mechanism of neddylation and deneddylation in lung cancer

图2 拟素化与去拟素化通路在肺癌中的作用机制

在正常肺组织中, 拟素化与去拟素化过程协同精确地调节着各项生物学功能; 在肺癌组织中, 拟素化和去拟素化通路均异常活化, 通过 MLN4924 处理以及关键性酶组分的敲低来抑制通路的激活, 促进抑癌蛋白质的累积、引起细胞周期阻滞, 诱导细胞凋亡、衰老和自噬, 抑制肿瘤微环境形成, 等等, 从而抑制肺癌的发生发展。DNE: 去拟素化酶 (deneddylation enzymes)。

A549、H460 和 H1299 细胞的增殖、存活、迁移和运动, 在分子水平上, MLN4924 抑制拟素化, 灭活 CRL, 诱导 A549 和 H1299 细胞中的 CRL 底物 p21 和 p27 积累、H460 细胞中的促凋亡蛋白 NOXA 的累积, 从而引发 A549 和 H1299 细胞衰老、H460 细胞凋亡^[64]。为了证明 NOXA 在 MLN4924 诱导的细胞凋亡中发挥关键作用, 作者进一步敲降了 NOXA, 发现 MLN4924 诱导的细胞凋亡水平显著降低。同时, 他们通过尾静脉注射 A549 细胞建立了小鼠肿瘤转移模型, 发现 MLN4924 可以诱导 CRL 底物 p21 和 p27 在肿瘤组织中的累积, 并抑制体内肿瘤形成和转移^[64]。Luo 等^[49]也发现, MLN4924 可以通过抑制 Cullin 的拟素化修饰失活 CRL 泛素连接酶, 诱导产生细胞自噬, 在体外肝癌细胞、肺癌细胞等多种癌症细胞中发挥促生存和抗凋亡作用。通过 RNA 干扰技术阻断细胞自噬通路增强了 MLN4924 诱导的细胞凋亡, 从而抑制细胞的生长。机制研究表明, MLN4924 诱导的自噬部分归因于 mTOR 抑制蛋白 DEPTOR 积累引发的对 mTOR 通路的抑制^[49, 65]。

肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 指肿瘤生长所处的体内环境, 肿瘤细胞依赖于这些复杂的环境来持续生长、侵袭和转移^[66-67]。肿瘤转移是肿瘤高致死率的主要原因, 超过 90% 的肿瘤患者死于肿瘤转移^[68]。越来越多的研究发现拟素

化修饰可通过调节肿瘤衍生因子、纤维母细胞、组织内皮细胞、免疫细胞、巨噬细胞、T 细胞和树突细胞等在肿瘤微环境中发挥重要作用^[18, 69]。研究表明, MLN4924 可以显著抑制引起急性炎症反应的细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的产生^[70-71], 同时可通过抑制 IL-12 的分泌和共刺激因子的表达, 阻断树突细胞 DCs 分化成 Th1, 限制 T 细胞活化和免疫应答的能力^[72]。由肿瘤相关巨噬细胞 (tumor associated macrophages, TAMs) 通过产生细胞因子、趋化因子、生长因子和触发 T 细胞中抑制性免疫检查点蛋白的释放而形成的肿瘤免疫抑制微环境, 对肿瘤的生长和转移都起到重要的影响^[73-76]。Zhou 等^[77]发现, 在 H1299 和 A549 肺癌细胞中通过 MLN4924 抑制剂作用或者 siRNA 敲降拟素化通路中的 NEDD8、UBA3 或 NAE1 可以抑制 TNF- α 诱导的趋化因子 CCL2 在 mRNA 和蛋白质水平上表达, 从而抑制肿瘤相关巨噬细胞的浸润, 最终抑制肿瘤的转移。他们从分子机制上阐明了, 抑制拟素化失活 CRLs 可诱导 CRL 底物 I κ B α 的积累, 以抑制 NF- κ B (通过 TNF- α 激活) 的转录活性, 进而抑制 CCL2 的转录活化^[77]。作者还通过静脉注射小鼠 Lewis 肺癌 (LLC) 细胞建立了小鼠肿瘤转移模型发现, MLN4924 处理或者 NEDD8 的敲降可以通过抑制 CCL2 的转录活化而显著抑制 TAMs 的浸润, 从而抑制体内肺癌的转移^[77]。此外, NEDD8 在肺

腺癌组织中的表达水平与CCL2的高表达呈正相关,高表达患者总体生存期较差^[77]。上述结果表明,拟素化通路在肺癌中促进CCL2的转录活化和TAMs的浸润,并提供促进肿瘤生长发展的微环境。

1.2 拟素化耦联酶E2s

UBE2M作为负责活化下游CRL1~4的E2,与肺癌的发生发展也密切相关。Li等^[78]发现,拟素化耦联酶E2 UBE2M/UBC12的敲降显著抑制肺癌细胞中其底物Cullin 1、2、3、4A和4B的拟素化修饰,但对非UBE2M底物Cullin 5的拟素化修饰无抑制作用,导致CRL底物肿瘤抑制蛋白p21、p27和Wee1积累,诱导细胞周期G2期阻滞,从而抑制肺癌细胞的生长。他们同时验证了UBE2M/UBC12的敲降通过相似的分子机制抑制了具有MLN4924抗药性的H1299肺癌细胞的生长。为了研究在体内靶向UBE2M的抗癌作用,作者建立了肺癌细胞异体移植小鼠肿瘤模型,发现UBE2M敲降显著抑制了肿瘤的形成、生长和转移^[78]。在这项研究中,作者并没有发现活化酶E1的两个组件NAE1和UBA3与全蛋白质拟素化修饰的水平和肺癌患者的存活率存在明显关联。

UBE2M不仅与肺癌的发生发展密切相关,同时还能参与调控肿瘤微环境。Jin等^[79]发现,在体外初始CD4⁺ T细胞培养条件下敲除UBE2M会导致细胞周期的G0/G1期阻断,不能有效地通过S期从而抑制细胞生长。同时他们用携带有GFP的Ube2m shRNA或对照shRNA逆转录病毒感染从SJL B6小鼠(CD45.1⁺)分离的骨髓细胞,然后移植到C57BL/6小鼠(CD45.2⁺)身上。8周后,从该小鼠的脾脏和骨髓淋巴结中分离出的GFP⁺CD4⁺ T细胞发现,敲降Ube2m体内影响CD4⁺ T细胞的各个功能,包括增殖、细胞因子产生和Th细胞分化。同时MLN4924会抑制Shc蛋白拟素化,阻止ZAP70-Shc-Grb2复合物的形成,导致Ras/Erk通路活化减弱,从而抑制细胞炎症的发生。

UBE2F作为另一个拟素化耦联酶E2,在非小细胞肺癌组织中高表达,并与患者的不良预后正相关。本课题组前期的工作表明,拟素化E2 UBE2F与E3 SAG/RBX2共同催化Cullin 5的拟素化,激活下游CRL5并促进其底物NOXA的泛素化和降解,从而诱导了肺癌细胞凋亡^[60]。NOXA的敲降可以一定程度上逆转UBE2F敲降引发的表型,证明由UBE2F敲降引发的NOXA累积是导致肺癌细胞凋

亡的原因。UBE2F在肺癌细胞中高表达,特异性激活Cullin 5的拟素化修饰,对Cullin 1~4的拟素化修饰并没有显著影响。通过皮下注射稳定表达野生型UBE2F和不具有催化活性的突变型UBE2F的肺癌细胞建立小鼠肿瘤模型,发现野生型UBE2F促进了体内肿瘤的生长,而突变型UBE2F则抑制了体内肿瘤的生长^[60]。同样,MLN4924也能显著抑制异种移植肺癌细胞的小鼠体内肿瘤的生长^[60]。

1.3 CRL连接酶E3s

前期的工作发现,ROC1/RBX1在非小细胞肺癌组织和多种肺癌细胞中高表达,通过RNA干扰技术在肺癌细胞中敲降ROC1/RBX1可以诱导DNA损伤,从而引发细胞周期G2期阻滞、细胞凋亡和细胞衰老^[80]。ROC1/RBX1的敲降诱导肺癌细胞的衰老似乎与p16/pRB和p53/p21蛋白无关^[80]。但MLN4924诱导的肺癌细胞衰老与p21蛋白的累积和DNA损伤相关^[81]。MLN4924处理的肺癌细胞内出现p21蛋白和与DNA复制密切相关的CDT1和ORC1蛋白的显著累积,诱导产生了DNA损伤信号,引发细胞衰老,抑制了肺癌细胞的生长。值得一提的是,p21蛋白和DNA损伤反应蛋白在去除MLN4924后仍在肺癌细胞中继续累积,持续诱导细胞衰老,从而证明MLN4924诱导的细胞衰老是一个不可逆的过程^[81]。至于为何p21蛋白在上述两项研究中发挥的作用不同,推测可能与使用的调控抑制拟素化通路的方法不同有关。

Yang等^[82]进一步阐明了ROC1/RBX1敲降是否同样会在肝癌细胞、肺癌细胞等细胞中引发细胞自噬反应。他们发现,ROC1的敲降可以引发细胞自噬,阻断细胞自噬通路可以增强敲降ROC1/RBX1诱导的细胞凋亡,显著抑制细胞的体外生长。他们还发现,敲降ROC1诱导的细胞自噬是由于抑制Cullin的拟素化修饰失活CRL,导致DEPTOR的积累,从而抑制mTOR通路活性。ROC1的敲降同时引起G2期阻滞并诱导p21依赖的细胞衰老,细胞自噬通路的抑制对细胞衰老诱导没有明显影响^[82]。以上结果表明,在抑制蛋白质拟素化修饰通路的同时抑制细胞自噬,可以显著增强细胞凋亡,为有效治疗肺癌等癌症提供了新思路。

RBX2/SAG作为拟素化另一个主要的连接酶E3在肺癌等多种肿瘤中高表达,前期的研究中发现Kras^{G12D}驱动的小鼠肺肿瘤模型中RBX2/SAG过表达^[61]。SAG敲降可导致NF- κ B和mTOR信号通路失活以及p21、p27等肿瘤抑制底物蛋白的积

累, 从而显著抑制 Kras^{G12D} 诱导的小鼠肺癌的发生发展, 延长小鼠的生存期。机制研究发现, 在 A549、A427 和 H358 肺癌细胞中敲降 SAG 可导致 NF-κB 和 mTOR 通路失活, 抑制肺癌细胞的生长和存活。而 SAG 的过表达选择性地降低了 A427 细胞内肿瘤抑癌蛋白的累积并促进了 A427 细胞的生长和存活, 对 A549 和 H358 细胞的生长没有明显的影响, 这表明 SAG 过表达促进抑癌蛋白质的降解和

细胞生长与细胞系相关。同时, MLN4924 通过抑制与 SAG 相关的 CRL 拟素化修饰, 导致 NF-κB 和 mTOR 信号通路失活以及 p21、p27 等肿瘤抑制底物的积累, 进而抑制体外肺癌细胞生长和体内肺肿瘤形成^[61]。本课题组未发表的实验结果发现, 小鼠肺组织中 Rbx1 敲除导致的表型与 Sag 敲除的一致, 可以抑制 Kras^{G12D} 诱导的小鼠肺癌的发生发展。

Table 1 The regulation of neddylation enzymes in lung cancer
表1 拟素化酶在肺癌调控中的作用

拟素化酶	底物蛋白	调控方式	作用机理	参考文献
NAE1/UBA3	CUL1	MLN4924	通过累积NOXA、p21和p27诱导细胞凋亡或衰老	[64]
	CUL1	NAE1/UBA3敲降	通过累积IκBα来阻断NF-κB的转录活性, 进而抑制趋化因子CCL2的表达, 导致肺肿瘤部位MDSCs和免疫细胞的浸润	[69, 77]
		MLN4924		
	CUL1	MLN4924	通过累积DNA-licensing蛋白CDT1和ORC1和衰老介体p21来诱导细胞衰老	[81]
	CUL1	MLN4924	通过累积CDT1来诱导DNA损伤反应和细胞凋亡	[83]
	CUL1, 2	MLN4924	通过累积DEPTOR和HIF-1α来激活HIF1-REDD1-TSC1-mTORC1-DEPTOR轴, 从而抑制mTOR和诱导细胞自噬	[65]
	CUL1, 4	MLN4924	通过累积CDT1来诱导DNA再复制, 最终诱导细胞凋亡	[58]
UBE2M	CUL1	MLN4924	通过累积NOXA, p21和p27诱导细胞凋亡或衰老	[64]
	CUL1, 2, 3, 4A, 4B	UBE2M敲降	通过累积肿瘤抑制因子p21、p27和Wee1来诱导G2期细胞周期阻滞	[78]
UBE2F	CUL5	UBE2M敲降 MLN4924	通过累积促凋亡蛋白NOXA来诱导细胞凋亡	[60]
RBX1	CUL1	RBX1敲降 MLN4924	通过累积mTORCs抑制剂DEPTOR来抑制mTOR通路, 首先诱导产生细胞自噬, 起到促生存和抗凋亡的作用, 然后诱导产生p21相关的细胞衰老	[49, 82]
SAG	CUL1	SAG敲降 MLN4924	通过累积肿瘤抑制底物IκBα、DEPTOR、p21、p27、NOXA和BIM来抑制NF-κB和mTOR通路	[61]
	CUL1	SAG敲降 MLN4924	通过累积p27来抑制内皮细胞的迁移、增殖和血管的形成, 最终抑制肿瘤血管生成	[84]

1.4 其他连接酶E3s

越来越多的研究证明, 绝大多数非 RBX 家族拟素化连接酶 E3s 都与肺癌等多种肿瘤发生密切相关^[85-89], 然而其通过拟素化修饰在肺癌中的作用研究却甚少。Lee 等^[89]发现, E3 连接酶 c-CBL 可以通过拟素化修饰调控原癌基因 c-Src 来抑制癌细胞迁移。首先作者通过 siRNA 敲除 NEDD8 和小分子抑制剂 MLN4924 处理 H1299 和 U251MG 细胞, 阻断了整个拟素化修饰的通路后发现细胞的迁移能力

增强, 该结果在肺癌 HCC-44、NCI-H1650 和 NCI-H292 细胞中也得到了验证。机制研究表明, 原癌蛋白 c-Src 作为 c-CBL 的拟素化底物能够诱导细胞迁移, 而抑制拟素化修饰可以活化并增加原癌蛋白 c-Src 的稳定性, 从而激活 PI3K/AKT 通路而促进细胞迁移。进一步实验发现, c-CBL 本身可以抑制肺癌细胞的迁移, 敲除 c-CBL 上调 c-Src 的量, 并抑制 c-Src 的拟素化修饰。最后通过对临床患者肺癌组织的分析发现, 肿瘤转移的组织中少有

c-CBL, 其表达与 p-Src 和 p-AKT 的表达呈负相关。p-Src 和 p-AKT 两者的表达正相关, 高表达的患者生存率较低, 而 c-CBL 高表达的患者整体生存率高, 提示 c-CBL-Src-Akt 轴可以调控肺癌细胞的转移。与之前多种拟素化修饰酶在肺癌等肿瘤中高表达且过度活化不同的是, c-CBL 作为拟素化修饰连接酶 E3 是低表达的, 其高表达可以通过促进下游底物 c-Src 拟素化修饰来抑制肿瘤细胞的发生转移^[89]。该项研究与大多数 MLN4924 抑制肿瘤细胞迁移的报道正相反, 该结果有待其他实验室的验证。

DCNL (defective in cullin neddylation -like) 作为协同 E3 连接酶 (Co-E3), 既可以与拟素化耦联酶 E2 UBE2M 结合, 也可以连接 RBX1-Cullins, 从而稳定 Cullin-E2-E3 复合物, 促进 Cullin 的拟素化修饰^[29, 90]。DCN1 在非小细胞肺癌等多种恶性肿瘤中高度表达, 且与患者的不良预后相关^[91-93]。目前对 DCN1 在肺癌的研究主要集中在 DCN1 可以作为一个潜在的抗肿瘤治疗靶点, 通过其结合 UBE2M 乙酰化 N 端的疏水口袋, 并有效抑制 UBE2M 催化的拟素化修饰, 来研发 DCN1-UBE2M 抑制剂^[91, 94]。近年来, 许多科研工作者通过分子对接、结构模拟和化学合成优化等手段研发出各种靶向 DCN1-UBE2M 的小分子抑制剂, 并通过生物学手段在肺癌细胞中加以验证^[95-97]。2017 年, Scott 等^[95] 经高通量筛选、梯度复筛, 结合小分子的溶解度和化学结构分析, 再经过 SAR 结构优化, 最终得到了 NAcM-OPT 和 NAcM-COV, 两者的半数抑制浓度 IC_{50} 分别为 80 nmol/L 和 28 nmol/L。作用于 DCN1 高表达的人肺鳞状细胞癌 HC995 细胞发现 NAcM-OPT 及 NAcM-COV 能有效抑制 CUL1 和 CUL3 的拟素化修饰, 从而有效抑制 CRL1 和 CRL3 活性, 导致底物蛋白 p27 和 NRF2 的积累, 但抑制肿瘤细胞增殖的作用有限^[95]。随后, 该团队基于以上化合物再次优化得到小分子化合物 Compound 27 和 Compound 40^[98-99]。Compound 27 与 DCN1 的结合更为紧密, 有比 NAcM-OPT 更强的 DCN1 抑制活性, 能够更强地抑制肝癌 HCC95 细胞的增殖^[98]。Compound 40 相较于 Compound 27 代谢稳定性强, 水溶性更高, 小鼠体内代谢更稳定, 口服生物利用度达到 92%^[99]。Zhou 等^[96] 利用荧光偏振技术高通量筛选, 经结构优化得到了 DCN1 抑制剂 DC-2, 其半数抑制率 IC_{50} 为 15 nmol/L。体外细胞实验证明, DC-2 可以靶向 DCN1, 特异

性地抑制 Cullin 3 的拟素化修饰, 导致 CRL3 底物蛋白 NRF2 及其下游蛋白 HO-1 和 NQO1 积累, 对 PC9、H1795 等肺癌细胞的增殖和克隆形成能力有一定的抑制作用^[96]。2021 年, 该团队在其苗头化合物的结构基础上, 通过结构优化得到了 DCN1 的高效抑制剂 SK-464 (IC_{50} =26 nmol/L)^[97]。SK-464 通过抑制 DCN1 与 UBE2M 的结合来抑制 Cullin 3 的拟素化和 CRL3 的活性, 同时上调底物 NRF2 及 HO-1 的蛋白质水平, 并下调 N-Cadherin, 从而抑制肺癌细胞的增殖、侵袭和迁移^[97]。

本课题组前期与其他课题组合作, 基于分子结构设计和药物化学优化等手段研发出靶向 DCN1-UBE2M 的小分子抑制剂 (DI-591、404、1548、1859)^[100-102]。在肺鳞状细胞癌 H2170 和 SK-MES-1 细胞中, 小分子抑制剂 DI-404 降低了 DCN1 蛋白与 UBE2M 蛋白的结合, 有效地抑制了 CUL3 的拟素化修饰, 从而有效抑制 CRL1 活性, 导致底物蛋白 NRF2 的积累, 但 DI-404 对 CUL1 和其他 Cullin 家族蛋白的拟素化抑制作用不明显^[102]。上述靶向拟素化连接酶 E3 DCN1 的小分子抑制剂不可避免会产生一些毒副作用, 目前该类药物尚未应用于临床, 仍需要更深入的分子机制研究等。

其他与肺癌相关的非 RBX 家族拟素化连接酶 E3s 包括 MDM2^[22, 103]、IAPs^[26] 等。MDM2 即是拟素化通路的催化酶, 又是底物蛋白。它即可以通过促进自身拟素化来增加其蛋白质稳定性, 同时作为非 RBX 家族拟素化连接酶 E3, MDM2 能促进 p53 的拟素化修饰以抑制 p53 的转录活性^[22, 104]。p53 突变或过表达对肺癌患者的预后产生不利影响^[105], 因此靶向 p53-MDM2 通路及其拟素化修饰可能是一种有吸引力的抗肺癌治疗方法。目前更多的研究集中在 MDM2 作为泛素化连接酶在肺癌中的影响^[106], 迄今为止 MDM2 作为拟素化连接酶与肺癌的联系的研究还很少。同样, 关于 IAPs 在肺癌细胞中的作用, 研究主要集中于药物抑制其作用而导致促凋亡蛋白表达, 致使细胞凋亡^[107], 少有研究证明该调控是否与拟素化修饰相关。今后的研究将有望填补 MDM2 和 IAPs 作为拟素化连接酶在肺癌中的作用的研究空白。

2 去拟素化酶对肺癌细胞生长存活及肺癌发生发展中的作用

去拟素化是拟素化修饰的反向过程, 即 NEDD8 分子被去拟素化酶从底物中去除进入再循

环。去拟素化酶也能够从蛋白质底物中去除 Ub, 参与催化蛋白质去泛素化, 即对 Ub 和 NEDD8 具有双重特异性。研究表明, 去拟素化酶可以调控转录活性、细胞生长和分化以及肿瘤发生等众多生物学过程^[108-114]。在肺癌中, UCH-L3^[110]、CSN5^[112]、USP21^[113] 和 Ataxin-3^[111] 等去拟素化酶通常过表达, 并通过去拟素化、稳定致癌基因和抑制肿瘤抑制因子来促进肺癌细胞生长和肿瘤发生 (表 2), 然而相关研究主要集中在理解其作为去泛素化酶在肺癌发生发展中的作用。

目前研究最多的去拟素化酶是 COP9 信号体 (CSN), 它由 8 个亚基 (CSN1 到 CSN8) 组成, 对 Ub 和 NEDD8 具有双重特异性。越来越多的研究证明拟素化 CRLs 与 CSN 的结合被 CSN4 识别, 并在 CSN6 的协助下传递给 CSN5, 从而激活 CSN5 去拟素化酶活性^[108, 112]。CSN 与泛素化连接酶 SCF 结合, 催化 CUL1 的去拟素化修饰^[40-41], 从而影响 CRL1 催化底物蛋白的泛素化修饰和降解。Xiao 等^[112] 研究表明, 在肺腺癌组织和肿瘤邻近的巨噬细胞和淋巴细胞中 CSN5 的表达量上调, 并与患者的不良预后相关。作者发现, 敲降 CSN5 能够有效抑制肺癌细胞的增殖和生长, 而过表达 CSN5 则能促进肺癌细胞的生长。作者推测由于免疫抑制因子 PD-L1 在肿瘤细胞中的表达水平与肿瘤转移和复发率正相关^[115]。机制研究表明, CSN5 可通过调节 PD-L1 的去泛素化过程来影响肺癌的发生发展; 同时作为 NF- κ B 信号通路的下游效应因子, CSN5 会被炎症细胞因子诱导, 而肿瘤组织中的免疫细胞处在炎症环境中, 这也解释了为什么 CSN5 会在一定比例肿瘤附近的巨噬细胞中表达^[112]。不同的是, 他们发现 CSN6 (与 CSN5 形成异二聚体发挥去拟素化酶活性) 在肺腺癌组织和在正常组织中的表达无异, 这可能与研究中使用的样本数量过少有关, 需要在更大的样本中做进一步验证。

与肺癌相关的其他去拟素化酶还包括 UCH-L3、USP21 和 Ataxin-3。其中 UCH-L3 是泛素 C 端水解酶 (UCHs) 的亚基, 可以识别并水解 Ub 或 NEDD8 的 C 端甘氨酸上的异肽键^[109]。Li 等^[110] 发现, UCH-L3 在非小细胞肺癌 (尤其是肺腺癌) 组织中高表达, 并与患者生存预后不良呈正相关。同样, 敲降 UCH-L3 显著抑制肺癌细胞的体外增殖, 而过表达则能促进细胞增殖。机制研究表明, 敲降 UCH-L3 导致抑癌蛋白 p21 和促凋亡蛋白 Caspase-3、

Caspase-9 和 Bax 的上调以及 CyclinD1 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的下调, 诱导 G1 期阻滞并促进细胞凋亡, 从而显著抑制肺癌细胞的体外增殖。相反, UCH-L3 高表达则会加速肺癌细胞周期的运行并抑制细胞凋亡, 从而促进细胞增殖^[110]。USP21^[113] 和 Ataxin-3^[111] 也是具有去泛素化和去拟素化双重功能的去拟素化酶。Yang 等^[113] 发现, USP21 和 PD-L1 的表达在包括 H1975 非小细胞肺癌细胞在内的多种细胞系中成正相关。过表达 USP21 可显著增加 PD-L1 蛋白的含量和稳定性, 而 USP21 的敲降可诱导 PD-L1 的泛素化修饰和降解。他们还发现在肺癌 (尤其是肺鳞状细胞癌) 组织中, USP21 高表达, 且其上调同时伴随着 PD-L1 的上调。因此, 靶向 USP21 去拟素化酶可能是治疗肺癌的一种新策略。Sacco 等^[111] 研究了 Josephin 家族去拟素化酶 Ataxin-3 的敲降对肺癌细胞中肿瘤抑制因子 PTEN 和 PI3K 致癌通路表达的影响。在 A549 细胞中敲降 Ataxin-3 可以诱导 PTEN 转录, 抑制 AKT 磷酸化, 从而下调 PI3K 致癌通路并降低肺癌细胞的活力。他们还发现, 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (HDACi) (非小细胞肺癌中 PTEN 转录再激活的潜在介质) 与 ATXN3 的敲降可以协同诱导 PTEN 的转录, 二者结合对于 PTEN 抑制的癌症 (包括肺腺癌) 的治疗提供了一种新思路。然而, 去拟素化酶 UCH-L3、USP21、Ataxin-3 等与底物的相互作用的研究并不多, 大多研究局限于它们与 NEDD8 的结合^[45-46, 116]。将来的研究可以着手于探索去拟素化酶和 NEDD8 之间相互作用的性质和特异性的决定因素, 作用于哪些底物, 对底物的影响和生物学功能影响等。

上述研究表明, 去拟素化酶与拟素化酶一样, 似乎也是肺癌生长的关键调节因子 (图 3), 是肺癌患者的独立预后因素和有希望的治疗靶点。然而, 一个关键的科学问题是, 为什么两个作用完全相反的酶, 在肿瘤组织中都有高表达, 且都与患者的不良预后正相关? 哪一类型的肿瘤需要去靶向拟素化酶, 而哪一类型的肿瘤需要去靶向去拟素化酶? 只有在机制上满意地回答了这些问题, 才有可能实施肿瘤的精准个体化治疗。另外, 迄今为止去拟素化作用在肺癌中的研究还在初级阶段, 而且对于靶向去拟素化酶方面的药物研究几乎是空白, 虽然靶向去泛素化酶的药物研发有不少进展^[117-119]。这些方面是这个领域今后的研究方向。

Table 2 The regulation of deneddylation enzymes in lung cancer
表2 去拟素化酶在肺癌调控中的作用

去拟素化酶	底物蛋白	作用机理	参考文献
CSN5	PD-L1	在CSN4和CSN6辅助下，CSN5调节CRL的去拟素化；CSN5调节免疫抑制因子PD-L1的去泛素化和稳定性，CSN5敲降抑制肺癌细胞的生长	[108, 112]
UCH-L3	p21、CyclinD1	UCH-L3敲降导致抑癌蛋白p21和促凋亡蛋白表达上调，以及CyclinD1和抗凋亡蛋白Bcl-2表达下调，进而阻断细胞周期，促进细胞凋亡	[110]
USP21	PD-L1	USP21敲降诱导免疫抑制因子PD-L1的降解，进而抑制肿瘤的转移与复发	[113]
Ataxin-3	PTEN	Ataxin-3抑制PTEN的转录，从而上调PI3K致癌信号，增加肺癌细胞活性	[111]

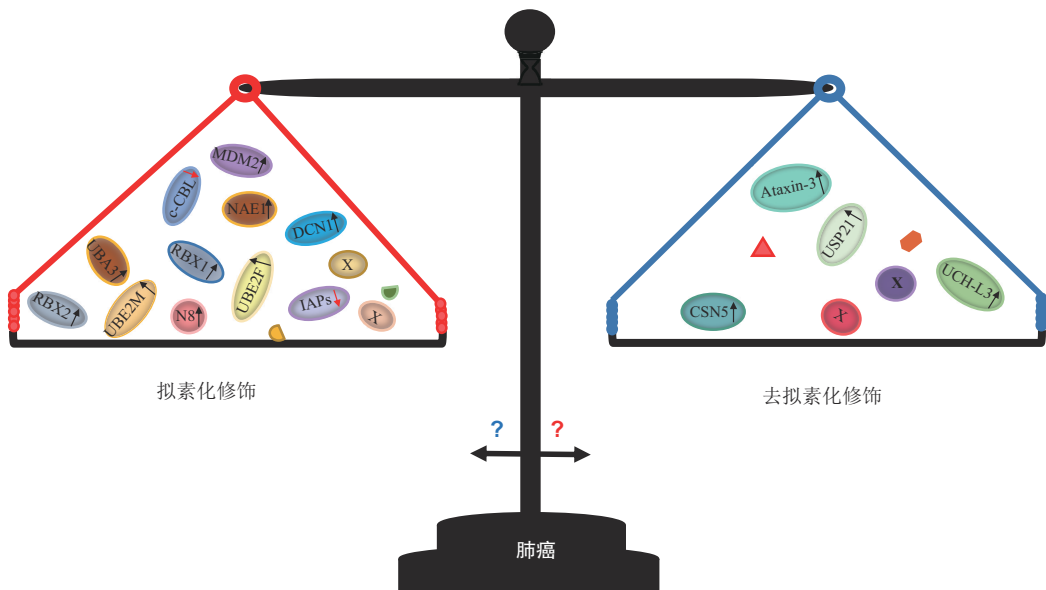


Fig. 3 Neddylation and deneddylation pathways synergistically regulate lung cancer
图3 拟素化和去拟素化通路共同作用于肺癌
拟素化修饰和去拟素化修饰关键酶在肺癌中的表达相关性，X代表尚未发现或未研究的酶。

3 总结与展望

本文主要对拟素化与去拟素化这两大类蛋白质修饰过程的主要酶及组分在体外肺癌细胞生长存活，以及在体内肺癌发生发展中的调控作用做了系统的概述和总结。蛋白质拟素化和去拟素化修饰是一个受到精密调控的过程，各种相关蛋白酶的激活与失活、表达与降解、重组与定位等的改变都会改变整个修饰过程，如果发生异常，就有可能导致肿瘤的发生发展^[18, 51, 109]。拟素化和去拟素化通路在人类肺癌中的过度活化可能导致肿瘤包括肺癌的发生发展，因此为靶向该过程作为一种有效的新型抗

癌治疗策略提供了合理的依据。尽管目前在这方面有大量的基础研究和一些靶向药物的研究，但由于肿瘤的复杂性、多变性，所以仍然需要更多这方面的研究和临床工作，来进一步了解拟素化和去拟素化在肺癌以及其他癌症领域的作用，从而为临床治疗提供真正的帮助。

今后这个领域的研究方法应该包括以下几个方面（图4）。

3.1 基础研究方面

需要探讨拟素化和去拟素化修饰在人类肿瘤中是如何被异常激活的？其上游关键性激活分子是如何发挥作用？激活其高表达的分子机制分别都是

什么? 同时去拟素化作用作为拟素化修饰的反向过程, 当拟素化修饰的异常激活会导致包括肺癌在内的各种肿瘤的发生发展, 那为何其反向过程去拟素化也同时被异常活化, 表达升高, 而不是被抑制? 二者之间是否存在一个反馈机制? 另外, 去拟素化修饰是如何调控肿瘤微环境的形成从而影响肺癌的发生发展的?

3.2 转化应用药物研发方面

近几十年来, 越来越多的靶向拟素化激活酶 E1 的抑制剂被相继研究和报道^[19, 120-122], 其中 MLN4924/Pevonedistat 作为第一个靶向拟素化通路 E1 激活酶的小分子抑制剂, 对多种恶性肿瘤具有有效的抗肿瘤活性^[58]。尽管已经进入到 41 个 I~III 期临床试验中^[123], 但由于其阻断拟素化修饰全过程所带来的毒副作用, 肿瘤靶点突变带来的耐药性^[124-125], 以及它的“脱靶”效应^[126-127], 包括诱导炎症反应^[128]、免疫反应^[129-130]和糖酵解代谢^[131]等, 至今尚未在临床上用于肿瘤治疗。因此, 靶向下游的 E2 和 E3 拟素化酶减少毒副作用应该是更好的选择。

另外, 随着对拟素化耦联酶 E2 研究的深入, 科学家们发现 UBE2M/UBC12 和 UBE2F 在肿瘤中过度表达且与患者不良预后密切相关, 亦是潜在的

抗肿瘤治疗靶点。目前对于靶向拟素化耦联酶 E2 的小分子抑制剂的研发主要是靶向 DCN1-UBE2M 相互作用的小分子抑制剂的研发, 通过靶向 DCN1 上结合 UBE2M 乙酰化 N 端的疏水口袋来有效地抑制 UBE2M 催化的拟素化修饰^[91, 94]。由于 UBE2M 靶向多数的下游 CRL 连接酶 E3 (CRL1~4), 因而其特异性并不高, 也有一定的毒副作用。同时因为靶向少数 CRL 连接酶 E3 (CRL5) 的 UBE2F 结构表面缺乏明显的成药口袋, 迄今为止在靶向 UBE2F 的药物研发远远没有 UBE2M 成熟。已知目前仅有本课题组研发的 UBE2F 抑制剂 HA-9104, 通过降低 UBE2F 蛋白水平来降低 CRL5 连接酶的活性, 从而促使其泛素化底物蛋白 NOXA 大量积累并诱发肺癌细胞发生严重的凋亡^[132]。HA-9104 本身的水溶性和稳定性, 以及其“脱靶”效应仍需进一步改善。同理, 靶向更下游拟素化连接酶 E3, 如 ROC1/RBX1 和 ROC2/RBX2/SAG 等的小分子抑制剂也应该继续探索研发。

毫无疑问, 拟素化和去拟素化修饰在人类疾病尤其是肿瘤发生发展中的重要性已经不言而喻, 今后这个领域的研究探索最终目的将是造福肿瘤患者。

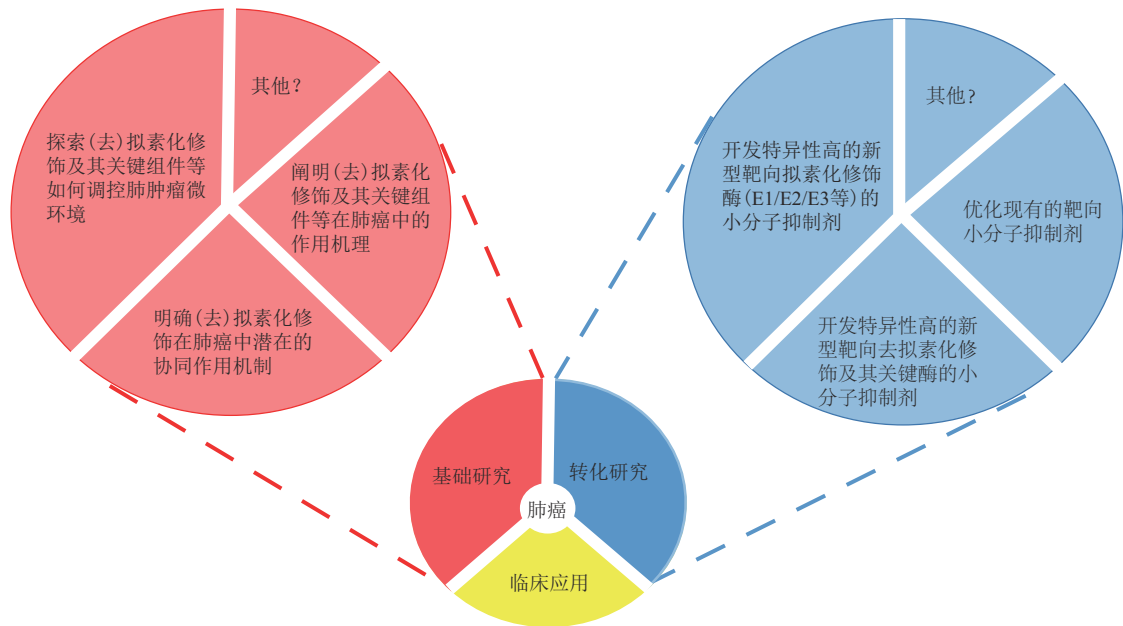


Fig. 4 The prospects of neddylation/denedylation in lung cancer research and treatment

图4 (去)拟素化修饰在肺癌研究治疗中的应用前景

基础研究方面, 明确拟素化和去拟素化修饰在肺癌中的调控机理以及两者潜在的协同作用机制, 探索两者与肿瘤微环境之间的关系; 临床研究方面, 开发并优化靶向拟素化和去拟素化修饰及其关键酶的小分子抑制剂用于肺癌治疗。

参 考 文 献

- [1] Mathur P, Sathishkumar K, Chaturvedi M, *et al.* Cancer statistics, 2020: report from National Cancer Registry Programme, India. *JCO Glob Oncol*, 2020, **6**: 1063-1075
- [2] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, *et al.* Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*, 2022, **72**(1): 7-33
- [3] 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. *CA Cancer J Clin*, 2021, **71**(3): 209-249
- [4] She J, Yang P, Hong Q, *et al.* Lung cancer in China: challenges and interventions. *Chest*, 2013, **143**(4): 1117-1126
- [5] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, 2017, **67**(1): 7-30
- [6] Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, *et al.* Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet*, 2018, **391**(10125): 1023-1075
- [7] Herbst R S, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 2018, **553**(7689): 446-454
- [8] Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther*, 2014, **10**(4): 853-858
- [9] 方向, 胡世莲, 沈干, 等. 吉西他滨联合顺铂方案与多西紫杉醇联合顺铂方案治疗晚期非小细胞肺癌的系统评价. 第三军医大学学报, 2010, **21**: 2347-2351
Fang X, Hu S L, Shen G, *et al.* *J Third Mil Med Univ*, 2010, **21**: 2347-2351
- [10] Bagcchi S. Lung cancer survival only increases by a small amount despite recent treatment advances. *Lancet Respir Med*, 2017, **5**(3): 169
- [11] Bradley C J, Yabroff K R, Mariotto A B, *et al.* Antineoplastic treatment of advanced-stage non-small-cell lung cancer: treatment, survival, and spending (2000 to 2011). *J Clin Oncol*, 2017, **35**(5): 529-535
- [12] World Health Organization. Cancer fact sheet [M/OL]. Geneva: World Health Organization, 2022[2022-02-03]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [13] 魏文毅, 孙毅, 曹诚, 等. 类泛素蛋白及其中文命名. 科学通报, 2018, **63**(25): 2564-2569
Wei W Y, Sun Y, Cao C, *et al.* *Chi Sci Bull*, 2018, **63**(25): 2564-2569
- [14] Zhao Y, Morgan M A, Sun Y. Targeting neddylation pathways to inactivate Cullin-RING ligases for anticancer therapy. *Antioxid Redox Signal*, 2014, **21**(17): 2383-2400
- [15] Kamitani T, Kito K, Nguyen H P, *et al.* Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein. *J Biol Chem*, 1997, **272**(45): 28557-28562
- [16] Hafez N, Modather El-Awadly Z, Arafa R K. UCH-L3 structure and function: insights about a promising drug target. *Eur J Med Chem*, 2022, **227**: 113970
- [17] Mendoza H M, Shen L N, Botting C, *et al.* NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins. *J Biol Chem*, 2003, **278**(28): 25637-25643
- [18] Zhou L, Zhang W, Sun Y, *et al.* Protein neddylation and its alterations in human cancers for targeted therapy. *Cell Signal*, 2018, **44**: 92-102
- [19] Yu Q, Jiang Y, Sun Y. Anticancer drug discovery by targeting cullin neddylation. *Acta Pharm Sin B*, 2020, **10**(5): 746-765
- [20] Zhou L, Jia L. Targeting protein neddylation for cancer therapy. *Adv Exp Med Biol*, 2020, **1217**: 297-315
- [21] Huang D T, Ayrault O, Hunt H W, *et al.* E2-RING expansion of the NEDD8 cascade confers specificity to cullin modification. *Mol Cell*, 2009, **33**(4): 483-495
- [22] Xirodimas D P, Saville M K, Bourdon J C, *et al.* Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell*, 2004, **118**(1): 83-97
- [23] Abida W M, Nikolaev A, Zhao W, *et al.* FBXO11 promotes the neddylation of p53 and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem*, 2007, **282**(3): 1797-1804
- [24] Zuo W, Huang F, Chiang Y J, *et al.* c-Cbl-mediated neddylation antagonizes ubiquitination and degradation of the TGF- β type II receptor. *Mol Cell*, 2013, **49**(3): 499-510
- [25] Noguchi K, Okumura F, Takahashi N, *et al.* TRIM40 promotes neddylation of IKK γ and is downregulated in gastrointestinal cancers. *Carcinogenesis*, 2011, **32**(7): 995-1004
- [26] Broemer M, Tenev T, Rigbolt K T, *et al.* Systematic *in vivo* RNAi analysis identifies IAPs as NEDD8-E3 ligases. *Mol Cell*, 2010, **40**(5): 810-822
- [27] Ma T, Chen Y, Zhang F, *et al.* RNF111-dependent neddylation activates DNA damage-induced ubiquitination. *Mol Cell*, 2013, **49**(5): 897-907
- [28] Rabut G, Le Dez G, Verma R, *et al.* The TFIIF subunit Tfb3 regulates cullin neddylation. *Mol Cell*, 2011, **43**(3): 488-495
- [29] Kurz T, Chou Y C, Willems A R, *et al.* Dcn1 functions as a scaffold-type E3 ligase for cullin neddylation. *Mol Cell*, 2008, **29**(1): 23-35
- [30] Kurz T, Ozl   N, Rudolf F, *et al.* The conserved protein DCN-1/Dcn1p is required for cullin neddylation in *C. elegans* and *S. cerevisiae*. *Nature*, 2005, **435**(7046): 1257-1261
- [31] Xiong H, Wang D, Chen L, *et al.* Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest*, 2009, **119**(3): 650-660
- [32] Zheng N, Shabek N. Ubiquitin ligases: structure, function, and regulation. *Annu Rev Biochem*, 2017, **86**: 129-157
- [33] Vogl A M, Phu L, Becerra R, *et al.* Global site-specific neddylation profiling reveals that NEDDylated cofilin regulates actin dynamics. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, **27**(2): 210-220
- [34] Lyapina S, Cope G, Shevchenko A, *et al.* Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science*, 2001, **292**(5520): 1382-1385
- [35] Lo S C, Hannink M. CAND1-mediated substrate adaptor recycling is required for efficient repression of Nrf2 by Keap1. *Mol Cell*

- Biol, 2006, **26**(4): 1235-1244
- [36] Bech-Otschir D, Seeger M, Dubiel W. The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Cell Sci*, 2002, **115**(Pt 3): 467-473
- [37] Björklund M, Taipale M, Varjosalo M, *et al.* Identification of pathways regulating cell size and cell-cycle progression by RNAi. *Nature*, 2006, **439**(7079): 1009-1013
- [38] Wei N, Serino G, Deng X W. The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem Sci*, 2008, **33**(12): 592-600
- [39] Davis M I, Pragani R, Fox J T, *et al.* Small molecule inhibition of the ubiquitin-specific protease USP2 accelerates cyclin D1 degradation and leads to cell cycle arrest in colorectal cancer and mantle cell lymphoma models. *J Biol Chem*, 2016, **291**(47): 24628-24640
- [40] Cope G A, Deshaies R J. COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell*, 2003, **114**(6): 663-671
- [41] Wei N, Deng X W. The COP9 signalosome. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, **19**: 261-286
- [42] Hemelaar J, Borodovsky A, Kessler B M, *et al.* Specific and covalent targeting of conjugating and deconjugating enzymes of ubiquitin-like proteins. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(1): 84-95
- [43] Reverter D, Wu K, Erdene T G, *et al.* Structure of a complex between Nedd8 and the Ulp/Senp protease family member Den1. *J Mol Biol*, 2005, **345**(1): 141-151
- [44] Shen L N, Liu H, Dong C, *et al.* Structural basis of NEDD8 ubiquitin discrimination by the deNEDDylating enzyme NEDP1. *EMBO J*, 2005, **24**(7): 1341-1351
- [45] Gong L, Kamitani T, Millas S, *et al.* Identification of a novel isopeptidase with dual specificity for ubiquitin- and NEDD8-conjugated proteins. *J Biol Chem*, 2000, **275**(19): 14212-14216
- [46] Ferro A, Carvalho A L, Teixeira-Castro A, *et al.* NEDD8: a new ataxin-3 interactor. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1773**(11): 1619-1627
- [47] Artavanis-Tsakonas K, Misaghi S, Comeaux C A, *et al.* Identification by functional proteomics of a deubiquitinating/deNEDDylating enzyme in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*, 2006, **61**(5): 1187-1195
- [48] Heijnen H F, Van Wijk R, Pereboom T C, *et al.* Ribosomal protein mutations induce autophagy through S6 kinase inhibition of the insulin pathway. *PLoS Genet*, 2014, **10**(5): e1004371
- [49] Luo Z, Yu G, Lee H W, *et al.* The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 induces autophagy and apoptosis to suppress liver cancer cell growth. *Cancer Res*, 2012, **72**(13): 3360-3371
- [50] Xie P, Zhang M, He S, *et al.* The covalent modifier Nedd8 is critical for the activation of Smurf1 ubiquitin ligase in tumorigenesis. *Nat Commun*, 2014, **5**: 3733
- [51] Tanguturi P, Kim K S, Ramakrishna S. The role of deubiquitinating enzymes in cancer drug resistance. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2020, **85**(4): 627-639
- [52] Brownell J E, Sintchak M D, Gavin J M, *et al.* Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic *in situ*. *Mol Cell*, 2010, **37**(1): 102-111
- [53] Nawrocki S T, Griffin P, Kelly K R, *et al.* MLN4924: a novel first-in-class inhibitor of NEDD8-activating enzyme for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012, **21**(10): 1563-1573
- [54] Sarantopoulos J, Shapiro G I, Cohen R B, *et al.* Phase I study of the investigational NEDD8-activating enzyme inhibitor pevonedistat (TAK-924/MLN4924) in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, 2016, **22**(4): 847-857
- [55] Blank J L, Liu X J, Cosmopoulos K, *et al.* Novel DNA damage checkpoints mediating cell death induced by the NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924. *Cancer Res*, 2013, **73**(1): 225-234
- [56] Lin J J, Milhollen M A, Smith P G, *et al.* NEDD8-targeting drug MLN4924 elicits DNA rereplication by stabilizing Cdt1 in S phase, triggering checkpoint activation, apoptosis, and senescence in cancer cells. *Cancer Res*, 2010, **70**(24): 10310-10320
- [57] Mackintosh C, García-Domínguez D J, Ordóñez J L, *et al.* WEE1 accumulation and deregulation of S-phase proteins mediate MLN4924 potent inhibitory effect on Ewing sarcoma cells. *Oncogene*, 2013, **32**(11): 1441-1451
- [58] Soucy T A, Smith P G, Milhollen M A, *et al.* An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature*, 2009, **458**(7239): 732-736
- [59] Li H, Zhou W, Li L, *et al.* Inhibition of neddylation modification sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Neoplasia*, 2017, **19**(6): 509-518
- [60] Zhou W, Xu J, Li H, *et al.* Neddylation E2 UBE2F promotes the survival of lung cancer cells by activating CRL5 to degrade NOXA via the K11 linkage. *Clin Cancer Res*, 2017, **23**(4): 1104-1116
- [61] Li H, Tan M, Jia L, *et al.* Inactivation of SAG/RBX2 E3 ubiquitin ligase suppresses KrasG12D-driven lung tumorigenesis. *J Clin Invest*, 2014, **124**(2): 835-846
- [62] Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer*, 2008, **123**(1): 1-7
- [63] Jiang Y, Cheng W, Li L, *et al.* Effective targeting of the ubiquitin-like modifier NEDD8 for lung adenocarcinoma treatment. *Cell Biol Toxicol*, 2020, **36**(4): 349-364
- [64] Li L, Wang M, Yu G, *et al.* Overactivated neddylation pathway as a therapeutic target in lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2014, **106**(6): dju083
- [65] Zhao Y, Xiong X, Jia L, *et al.* Targeting Cullin-RING ligases by MLN4924 induces autophagy via modulating the HIF1-REDD1-TSC1-mTORC1-DEPTOR axis. *Cell Death Dis*, 2012, **3**(9): e386
- [66] Lin Y, Xu J, Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J Hematol Oncol*, 2019, **12**(1): 76
- [67] Quail D F, Joyce J A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, 2013, **19**(11): 1423-1437
- [68] Robinson D R, Wu Y M, Lonigro R J, *et al.* Integrative clinical genomics of metastatic cancer. *Nature*, 2017, **548**(7667): 297-303
- [69] Zhou L, Jiang Y, Luo Q, *et al.* Neddylation: a novel modulator of

- the tumor microenvironment. *Mol Cancer*, 2019, **18**(1): 77
- [70] Cheng M, Hu S, Wang Z, *et al.* Inhibition of neddylation regulates dendritic cell functions via Deptor accumulation driven mTOR inactivation. *Oncotarget*, 2016, **7**(24): 35643-35654
- [71] Mathewson N, Toubai T, Kapeles S, *et al.* Neddylation plays an important role in the regulation of murine and human dendritic cell function. *Blood*, 2013, **122**(12): 2062-2073
- [72] Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, *et al.* Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(16): 4677-4685
- [73] Altorki N K, Markowitz G J, Gao D, *et al.* The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2019, **19**(1): 9-31
- [74] Arneth B. Tumor microenvironment. *Medicina (Kaunas)*, 2019, **56**(1): 15
- [75] Noy R, Pollard J W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*, 2014, **41**(1): 49-61
- [76] Singh S, Mehta N, Lilan J, *et al.* Initiative action of tumor-associated macrophage during tumor metastasis. *Biochim Open*, 2017, **4**: 8-18
- [77] Zhou L, Jiang Y, Liu X, *et al.* Promotion of tumor-associated macrophages infiltration by elevated neddylation pathway via NF- κ B-CCL2 signaling in lung cancer. *Oncogene*, 2019, **38**(29): 5792-5804
- [78] Li L, Kang J, Zhang W, *et al.* Validation of NEDD8-conjugating enzyme UBC12 as a new therapeutic target in lung cancer. *EBioMedicine*, 2019, **45**: 81-91
- [79] Jin H S, Liao L, Park Y, *et al.* Neddylation pathway regulates T-cell function by targeting an adaptor protein Shc and a protein kinase Erk signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(2): 624-629
- [80] Jia L, Soengas M S, Sun Y. ROC1/RBX1 E3 ubiquitin ligase silencing suppresses tumor cell growth *via* sequential induction of G2-M arrest, apoptosis, and senescence. *Cancer Res*, 2009, **69**(12): 4974-4982
- [81] Jia L, Li H, Sun Y. Induction of p21-dependent senescence by an NAE inhibitor, MLN4924, as a mechanism of growth suppression. *Neoplasia*, 2011, **13**(6): 561-569
- [82] Yang D, Li L, Liu H, *et al.* Induction of autophagy and senescence by knockdown of ROC1 E3 ubiquitin ligase to suppress the growth of liver cancer cells. *Cell Death Differ*, 2013, **20**(2): 235-247
- [83] Xu Q, Lin G, Xu H, *et al.* MLN4924 neddylation inhibitor promotes cell death in paclitaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells. *Oncol Lett*, 2018, **15**(1): 515-521
- [84] Tan M, Li H, Sun Y. Endothelial deletion of Sag/Rbx2/Roc2 E3 ubiquitin ligase causes embryonic lethality and blocks tumor angiogenesis. *Oncogene*, 2014, **33**(44): 5211-5220
- [85] Fung S, Knoefel W T, Krieg A. Clinicopathological and prognostic significance of inhibitor of apoptosis protein (IAP) family members in lung cancer: a meta-analysis. *Cancers (Basel)*, 2021, **13**(16): 4098
- [86] Chen H, Yang T, Lei Z, *et al.* RNF111/Arkadia is regulated by DNA methylation and affects TGF- β /Smad signaling associated invasion in NSCLC cells. *Lung Cancer*, 2015, **90**(1): 32-40
- [87] Lo F Y, Tan Y H, Cheng H C, *et al.* An E3 ubiquitin ligase: c-Cbl: a new therapeutic target of lung cancer. *Cancer*, 2011, **117**(23): 5344-5350
- [88] Chibaya L, Karim B, Zhang H, *et al.* Mdm2 phosphorylation by Akt regulates the p53 response to oxidative stress to promote cell proliferation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(4): e2003193118
- [89] Lee G W, Park J B, Park S Y, *et al.* The E3 ligase C-CBL inhibits cancer cell migration by neddylation of the proto-oncogene c-Src. *Oncogene*, 2018, **37**(41): 5552-5568
- [90] Scott D C, Monda J K, Bennett E J, *et al.* N-terminal acetylation acts as an avidity enhancer within an interconnected multiprotein complex. *Science*, 2011, **334**(6056): 674-678
- [91] Fang Y, Yu B, Liao G, *et al.* Targeting the DCN1-UBC12 protein-protein interaction: novel approaches and future directions. *Future Med Chem*, 2019, **11**(22): 2869-2871
- [92] Jiang Z, Song Q, Zeng R, *et al.* MicroRNA-218 inhibits EMT, migration and invasion by targeting SFMBT1 and DCUN1D1 in cervical cancer. *Oncotarget*, 2016, **7**(29): 45622-45636
- [93] Yoo J, Lee S H, Lym K I, *et al.* Immunohistochemical expression of DCUN1D1 in non-small cell lung carcinoma: its relation to brain metastasis. *Cancer Res Treat*, 2012, **44**(1): 57-62
- [94] Zhou H, Lu J, Yang C Y, *et al.* Targeting DCN1-UBC12 protein-protein interaction for regulation of neddylation pathway. *Adv Exp Med Biol*, 2020, **1217**: 349-362
- [95] Scott D C, Hammill J T, Min J, *et al.* Blocking an N-terminal acetylation-dependent protein interaction inhibits an E3 ligase. *Nat Chem Biol*, 2017, **13**(8): 850-857
- [96] Zhou W, Ma L, Ding L, *et al.* Potent 5-cyano-6-phenyl-pyrimidin-based derivatives targeting DCN1-UBE2M interaction. *J Med Chem*, 2019, **62**(11): 5382-5403
- [97] Zhou W, Xu C, Dong G, *et al.* Development of phenyltriazole thiol-based derivatives as highly potent inhibitors of DCN1-UBC12 interaction. *Eur J Med Chem*, 2021, **217**: 113326
- [98] Kim H S, Hammill J T, Scott D C, *et al.* Discovery of novel pyrazolo-pyridone DCN1 inhibitors controlling cullin neddylation. *J Med Chem*, 2019, **62**(18): 8429-8442
- [99] Kim H S, Hammill J T, Scott D C, *et al.* Improvement of oral bioavailability of pyrazolo-pyridone inhibitors of the interaction of DCN1/2 and UBE2M. *J Med Chem*, 2021, **64**(9): 5850-5862
- [100] Zhou H, Lu J, Chinnaswamy K, *et al.* Selective inhibition of cullin 3 neddylation through covalent targeting DCN1 protects mice from acetaminophen-induced liver toxicity. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 2621
- [101] Zhou H, Lu J, Liu L, *et al.* A potent small-molecule inhibitor of the DCN1-UBC12 interaction that selectively blocks cullin 3 neddylation. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 1150
- [102] Zhou H, Zhou W, Zhou B, *et al.* High-affinity peptidomimetic inhibitors of the DCN1-UBC12 protein-protein interaction. *J Med Chem*, 2018, **61**(5): 1934-1950
- [103] Watson I R, Blanch A, Lin D C, *et al.* Mdm2-mediated NEDD8

- modification of TAp73 regulates its transactivation function. *J Biol Chem*, 2006, **281**(45): 34096-34103
- [104] Watson I R, Li B K, Roche O, *et al.* Chemotherapy induces NEDP1-mediated destabilization of MDM2. *Oncogene*, 2010, **29**(2): 297-304
- [105] D'amico T A, Massey M, Herndon J E 2nd, *et al.* A biologic risk model for stage I lung cancer: immunohistochemical analysis of 408 patients with the use of ten molecular markers. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1999, **117**(4): 736-743
- [106] Li H, Zhang H, Huang G, *et al.* Loss of RPS27a expression regulates the cell cycle, apoptosis, and proliferation via the RPL11-MDM2-p53 pathway in lung adenocarcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, **41**(1): 33
- [107] Xu X M, Zhang M L, Zhang Y, *et al.* Osthole induces lung cancer cell apoptosis through inhibition of inhibitor of apoptosis family proteins. *Oncol Lett*, 2016, **12**(5): 3779-3784
- [108] Du W, Zhang R, Muhammad B, *et al.* Targeting the COP9 signalosome for cancer therapy. *Cancer Biol Med*, 2022, **19**(5): 573-590
- [109] Fang Y, Fu D, Shen X Z. The potential role of ubiquitin c-terminal hydrolases in oncogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1806**(1): 1-6
- [110] Li G, Jin X, Zheng J, *et al.* UCH-L3 promotes non-small cell lung cancer proliferation via accelerating cell cycle and inhibiting cell apoptosis. *Biotechnol Appl Biochem*, 2021, **68**(1): 165-172
- [111] Sacco J J, Yau T Y, Darling S, *et al.* The deubiquitylase Ataxin-3 restricts PTEN transcription in lung cancer cells. *Oncogene*, 2014, **33**(33): 4265-4272
- [112] Xiao D, Yang S, Huang L, *et al.* COP9 signalosome subunit CSN5, but not CSN6, is upregulated in lung adenocarcinoma and predicts poor prognosis. *J Thorac Dis*, 2018, **10**(3): 1596-1606
- [113] Yang S, Yan H, Wu Y, *et al.* Deubiquitination and stabilization of PD-L1 by USP21. *Am J Transl Res*, 2021, **13**(11): 12763-12774
- [114] Yu J, Yu S, Jia M, *et al.* Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 expression in non-small-cell lung cancer and its association with clinicopathological features and prognosis. *Virchows Arch*, 2022, **480**(3): 577-585
- [115] Petrelli F, Maltese M, Tomasello G, *et al.* Clinical and molecular predictors of PD-L1 expression in non-small-cell lung cancer: systematic review and meta-analysis. *Clin Lung Cancer*, 2018, **19**(4): 315-322
- [116] Wada H, Kito K, Caskey L S, *et al.* Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **251**(3): 688-692
- [117] Harrigan J A, Jacq X, Martin N M, *et al.* Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, **17**(1): 57-78
- [118] Lange S M, Armstrong L A, Kulathu Y. Deubiquitinases: from mechanisms to their inhibition by small molecules. *Mol Cell*, 2022, **82**(1): 15-29
- [119] Schauer N J, Magin R S, Liu X, *et al.* Advances in discovering deubiquitinating enzyme (DUB) inhibitors. *J Med Chem*, 2020, **63**(6): 2731-2750
- [120] Li Y, Wang C, Xu T, *et al.* Discovery of a small molecule inhibitor of cullin neddylation that triggers ER stress to induce autophagy. *Acta Pharm Sin B*, 2021, **11**(11): 3567-3584
- [121] Yin L, Xue Y, Shang Q, *et al.* Pharmaceutical inhibition of neddylation as promising treatments for various cancers. *Curr Top Med Chem*, 2019, **19**(12): 1059-1069
- [122] Yu Q, Sun Y. Targeting protein neddylation to inactivate Cullin-RING ligases by gossypol: a lucky hit or a new start?. *Drug Des Devel Ther*, 2021, **15**: 1-8
- [123] ClinicalTrials. gov. U. S. National Library of Medicine[M/OL]. 2023. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?%20cond=&term=MLN4924>
- [124] Milhollen M A, Thomas M P, Narayanan U, *et al.* Treatment-emergent mutations in NAE β confer resistance to the NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924. *Cancer Cell*, 2012, **21**(3): 388-401
- [125] Toth J I, Yang L, Dahl R, *et al.* A gatekeeper residue for NEDD8-activating enzyme inhibition by MLN4924. *Cell Rep*, 2012, **1**(4): 309-316
- [126] Mao H, Sun Y. Neddylation-independent activities of MLN4924. *Adv Exp Med Biol*, 2020, **1217**: 363-372
- [127] Zhou Q, Sun Y. MLN4924: additional activities beyond neddylation inhibition. *Mol Cell Oncol*, 2019, **6**(5): e1618174
- [128] Hao R, Song Y, Li R, *et al.* MLN4924 protects against interleukin-17A-induced pulmonary inflammation by disrupting ACT1-mediated signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, **316**(6): L1070-L1080
- [129] Li C, Zhang L, Qian D, *et al.* RNF111-facilitated neddylation potentiates cGAS-mediated antiviral innate immune response. *PLoS Pathog*, 2021, **17**(3): e1009401
- [130] Song H, Huai W, Yu Z, *et al.* MLN4924, a first-in-class NEDD8-activating enzyme inhibitor, attenuates IFN- β production. *J Immunol*, 2016, **196**(7): 3117-3123
- [131] Zhou Q, Li H, Li Y, *et al.* Inhibiting neddylation modification alters mitochondrial morphology and reprograms energy metabolism in cancer cells. *JCI Insight*, 2019, **4**(4): e121582
- [132] Xu T, Ma Q, Li Y, *et al.* A small molecule inhibitor of the UBE2F-CRL5 axis induces apoptosis and radiosensitization in lung cancer. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, **7**(1): 354

Neddylation and Deneddylation Enzymes in Regulation of Lung Tumorigenesis*

ZHENG Ya-Wen^{1,2)}, XIONG Xiu-Fang^{1,2)}, SUN Yi^{1,2,3,4)**}

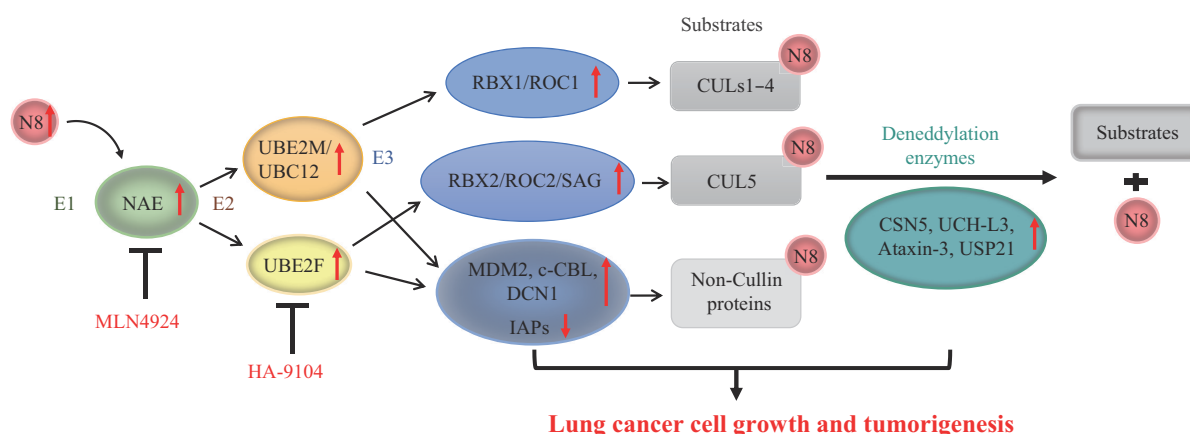
⁽¹⁾Cancer Institute, the Second Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310029, China;

⁽²⁾Department of Translational Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

⁽³⁾Binjiang Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

⁽⁴⁾Zhejiang University Cancer Center, Hangzhou 310029, China)

Graphical Abstract



Abstract Protein neddylation is a ubiquitylation-like post-translational modification, catalyzed by a cascade consisting of three enzymes: NEDD8-activating enzyme E1 (NAE), an NEDD8-conjugating enzyme E2 (UBE2M or UBE2F), and NEDD8 E3 ligases. Cullin family proteins are the physiological substrates of neddylation, and Cullin neddylation activates Cullin-RING ligases (CRLs). CRLs are the largest ubiquitin E3 ligase family and mediate the ubiquitylation of ~20% cellular proteins to regulate many biological processes, including cell cycle, DNA damage response, cell growth, metabolism, survival, autophagy, migration, and immune escape. In the process of deneddylation, NEDD8 is hydrolyzed and removed from the substrate protein by specific deneddylation enzymes, and is released into cells to maintain the dynamic balance of the neddylation/deneddylation. NEDD8 and NEDD8 enzymes are overexpressed or upregulated in a variety of cancers, leading to excessive activation of CRLs and subsequent degradation of many tumor suppressor proteins, thereby promoting the growth and survival of lung cancer cells, and lung tumorigenesis. Protein neddylation has been validated to be a promising target for anti-cancer therapy. Similarly, some deneddylation enzymes are highly expressed in lung cancer and their changes are also closely related to the growth and tumorigenesis of various malignant tumors, thus is a potential target for anti-cancer therapy. In this review, we mainly focus on the role of protein neddylation/

* This work was supported by grants from National Key R&D Program of China (2022YFC3401500, 2021YFA1101000), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LD22H300003), and The National Natural Science Foundation of China (92253203, U22A20317, 81974429, 82172898).

** Corresponding author.

Tel: 86-15257195968, E-mail: yisun@zju.edu.cn

Received: April 2, 2023 Accepted: April 12, 2023

deneddylation in lung cancer, how the expression of neddylation and deneddylation pathways is changed in lung cancer cells, and how they regulate the growth and survival of lung cancer cells, as well as the lung tumor microenvironment and the related inflammatory/immune response. A better understanding of the role of key components of neddylation/deneddylation pathways in the promotion of lung cancer cell growth and tumorigenesis and establishment of lung tumor microenvironment will provide a sound rationale for targeting this pathway for effective lung cancer therapy.

Key words neddylation, deneddylation, enzymes, tumor, lung cancer, targeted therapy

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0117