

USP13 上调 STAT1 抑制前列腺癌细胞 增殖、克隆和迁移

张 驰^{1,2}, 卢 山^{1,2}

(1.南京师范大学生命科学学院,江苏 南京 210023)

(2.南京师范大学江苏省分子医学生物技术重点实验室,江苏 南京 210023)

[摘要] 为了探究去泛素化酶 USP13 在前列腺癌中发挥的功能及其相关分子机制,采用 PCR、酶切、酶连和转化大肠杆菌等方法,成功构建 USP13 基因真核表达重组质粒。同时,在前列腺癌细胞 PC-3 和 DU145 中转入 USP13 质粒,进行 CCK-8 实验、克隆形成、划痕以及 Transwell 迁移实验;利用逆转录 PCR、蛋白质免疫印迹法和泛素化 Co-IP 等实验,分析 USP13 过表达对信号转导与转录激活因子 1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)的影响。实验结果发现,USP13 可以抑制前列腺癌细胞的增殖、克隆和迁移能力;过表达 USP13 不影响 STAT1 mRNA 水平,但上调 STAT1 蛋白水平,而敲低 USP13 则下调 STAT1 蛋白水平;同时,过表达 USP13 降低了 STAT1 泛素化水平,敲低 USP13 则提高 STAT1 泛素化水平。

[关键词] 前列腺癌, USP13, 去泛素化, 迁移, STAT1

[中图分类号] R737.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-1292(2021)04-0072-08

USP13 Inhibits Proliferation, Cloning, and Migration of Prostate Cancer Cells by Upregulating STAT1

Zhang Chi^{1,2}, Lu Shan^{1,2}

(1.School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2.Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: In order to explore the role of deubiquitination enzyme USP13 in prostate cancer cells and its regulatory pathway, the eukaryotic expression plasmid of USP13 is successfully constructed via PCR, enzyme digestion, enzyme ligation and transformation into Escherichia coli. Meanwhile, CCK-8 assay, colony formation assay, wound healing assay and Transwell migration assay are performed by transfecting USP13 plasmid into PC-3 and DU145 cells. Then the effects of USP13 overexpression on mRNA expression, protein expression and ubiquitination level of signal transducer and activator of transcription 1(STAT1) are detected by reverse transcription PCR, western blotting and ubiquitination Co-IP assay, respectively. USP13 is found to inhibit the growth, cloning and migration of prostate cancer cells, which has an effect on STAT1 protein level but not on transcription level of STAT1. Overexpression of USP13 upregulates STAT1 protein level, while knockdown of USP13 decreases STAT1 protein level. Furthermore, overexpression of USP13 decreases the level of STAT1 ubiquitination, while knockdown of USP13 increases the level of STAT1 ubiquitination.

Key words: prostate cancer, USP13, deubiquitination, migration, STAT1

2020 年,美国男性新增癌症病例中,前列腺癌(prostate cancer, PCa)以 21% 的发病率跃居发病率首位,死亡率高达 10%,仅次于肺癌和支气管癌^[1]。虽然前列腺癌高发病率主要集中在中南美洲、西欧和北欧以及撒哈拉以南非洲地区^[2],但近年来我国前列腺癌发病率也呈明显上升趋势,这和国内高蛋白、高脂肪饮食结构倾向、家族病史影响以及平均寿命延长等密切相关^[3]。寻找和解析影响前列腺癌发生发展的新分子靶标和分子机制迫在眉睫。

收稿日期:2021-06-09.

基金项目:国家自然科学基金项目(81272850、81472415)。

通讯作者:卢山,博士,教授,研究方向:前列腺肿瘤侵袭转移的分子机制及调控。E-mail:lu_shan@hotmail.com

USP13 是泛素特异性蛋白酶(ubiquitin specific protease, USP)超家族中的一员,其依赖 Cys345 的催化活性逆转泛素化过程,水解多聚泛素链羧基端的肽键或酯键将泛素链从底物上分离^[4]. USP13 从 N 端到 C 端依次为 ND(N-terminal domain)、ZnF(zinc finger domain)、C box(catalytic domain)、UBA1/2(ubiquitin associated domain)和 H box(catalytic domain)结构域^[5-6]. ZnF 结构域能与游离泛素链的 C 末端结合,激活酶本身的去泛素化活性^[7]. 两个串联的 UBA1/2 结构域是泛素特异性受体. 据文献报道,USP13 在不同肿瘤中发挥抑癌或促癌的不同作用^[8-11]. USP13 在前列腺癌中的作用及调控机理尚未见文献报道. 本研究首先在前列腺癌细胞 PC-3 和 DU145 中转染 pcDNA3.0-USP13-HA 质粒,利用 CCK-8 法、克隆形成、划痕及 Transwell 迁移实验分别检测 USP13 对细胞增殖、克隆和迁移能力的影响;然后,在上述两种细胞中过表达或敲低 USP13,采用逆转录 PCR(RT-PCR)和蛋白质免疫印迹(western blotting)技术分别检测 USP13 对 STAT1 转录水平和蛋白水平的调控;同时,在 DU145 细胞中,过表达或敲低 USP13 进行 Co-IP 实验,检测 STAT1 泛素化水平的变化. 实验结果发现 USP13 能够通过影响 STAT1 泛素化水平调节稳定 STAT1,可为深入研究 USP13 在前列腺癌发生、发展中的分子机制奠定基础,还可以为开发前列腺癌治疗药物提供新思路.

1 材料方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞

CaCl₂ 法制备的大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞和真核表达载体 pcDNA3.0-HA 由本实验室保藏;人前列腺癌细胞 PC-3 和 DU145 购自上海复祥生物科技有限公司.

1.1.2 主要试剂

Hind III-HF(星选酶)、*Xho* I(星选酶)购自 NEB(北京)公司;DNA Marker 购自上海捷瑞生物工程有限公司;PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase、T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司;2 \times Taq Master Mix、FastPure[®] Gel DNA Extraction Mini Kit、HiScript[®] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司;去内毒素质粒中提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;RPMI 1640 粉末、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;0.25%胰蛋白酶购自德国 Capricorn Scientific 公司;Lipofectamine[®] 2000、Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;USP13 兔一抗、STAT1 兔一抗购自 Proteintech 公司; β -Actin 兔一抗购自 ABClonal 公司;SMURF2 鼠一抗、ProteinA/G 琼脂糖珠购自 Santa Cruz 公司;Ubiquitin 鼠一抗购自 CST 公司;pEGFP-N1-USP13 真核表达质粒、HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)购自南京巴傲德生物科技有限公司;siRNA 购自上海吉玛制药技术有限公司;青霉素-链霉素溶液(100 \times)、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)、兔 IgG、小鼠 IgG、MG132、RIPA 裂解液(强)、Western 及 IP 细胞裂解液、cocktail(磷酸酶抑制剂混合物)、蛋白标准(5 mg/mL BSA)均购自碧云天生物技术有限公司;福林酚购自北京索莱宝科技有限公司.

1.2 实验方法

1.2.1 真核表达重组质粒的构建

参考 GeneBank 数据库中人 USP13 基因 mRNA 序列(NM_003940.3),应用 SnapGene v5.2.3 软件设计 PCR 引物,上游引物为 5'-CC AAGCTT ATGCAGCGCCGGGGC-3';下游引物为 5'-CC CTCCAG GCTTGG-TATCCTGCGGTAAAAGTAC-3'. 按 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase 说明书,以 pEGFP-N1-USP13 质粒为模板进行 PCR 扩增,反应体系为 50 μ L,反应条件为:98 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 5 s,72 $^{\circ}$ C 160 s,共 35 个循环. PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离后,用 FastPure[®] Gel DNA Extraction Mini Kit 回收,然后用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 分别对 USP13 基因和 pcDNA3.0-HA 质粒进行双酶切,将双酶切后的 USP13 基因和 pcDNA3.0-HA 质粒按 10:1 混合,加入 T4 DNA 连接酶,16 $^{\circ}$ C 酶连过夜. 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,37 $^{\circ}$ C,200 r/min 摇菌 1 h,将转化后菌液涂布于含氨苄抗性的固体 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜. 第二天挑取 4 个单克隆菌落扩大培养,第三天提取质粒并用 *Hind* III 和 *Xho* I 对质粒进行单、双酶切,酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离,利用凝胶成像系统拍照,根据 DNA 条带大小判断目的基因是否成功构建到载体上. 最后将重组质粒送通用生物系统(安徽)有限公司测序,将测序结果与 NM_003940.3 进行序列比对.

1.2.2 质粒或 siRNA 转染细胞

取约 3.5×10^5 个细胞接种于六孔板中,待细胞密度达 80% 时进行转染。(1) 质粒转染时,将 A 液(100 μL RPMI-1640+2 μg pcDNA3.0-USP13-HA)与 B 液(100 μL RPMI-1640+3 μL Lipofectamine[®] 2000)分别于 1.5 mL EP 管中室温静置 5 min,将 A 液加入到 B 液中混匀,室温静置 10 min;(2) siRNA 转染时,将 C 液(100 μL RPMI-1640+100 pmol siUSP13)与 D 液(100 μL RPMI-1640+5 μL Lipofectamine[®] 2000)分别于 1.5 mL EP 管中室温静置 5 min,将 C 液加入到 D 液中混匀,室温静置 10 min. 将上述混悬液分别加入待转染细胞中,每孔添加无血清、无双抗 1640 培养基至 2 mL,在转染 4~6 h 后弃去旧培养基,更换为含 5% FBS 的 1640 培养基继续培养至 48 h 待用。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖

待细胞转染 48 h 后,取约 2×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后加入 10 μL /孔 CCK-8 溶液;以第一次加入 CCK-8 溶液的时间点计作 0 h,后续按不同时间点(24 h、48 h、72 h)再加入 CCK-8 溶液,同时用酶标仪测定和记录 A549nm 吸光值。

1.2.4 克隆形成实验

待细胞转染 48 h 后,取约 2×10^3 个细胞接种于六孔板中,每 2~3 d 更换一次培养基;待细胞种板 7~10 d 后进行结晶紫染色;4%多聚甲醛室温固定细胞 30 min,1 \times PBS 漂洗 3 次,每孔加入 1 mL 0.1%结晶紫染液室温静置 20 min,1 \times PBS 漂洗 3 次;染色结束后用高清摄像机拍照。

1.2.5 划痕实验

待细胞转染 48 h 后,取约 2×10^5 个细胞接种于 12 孔板中,待细胞贴壁后使用同一支灭菌的 200 μL 黄枪头进行划痕,划痕结束后用无菌 1 \times PBS 洗去漂浮细胞,置于显微镜下拍照(50 \times),此时记做 0 h;拍照后弃去 PBS,加入 1 mL 含 1%血清、不含抗生素的 1640 培养基继续培养;待第一次划痕 24 h、48 h 后分别置于显微镜下拍照(50 \times)。

1.2.6 Transwell 迁移实验

待细胞转染 48 h 后,取约 4×10^4 个细胞接种于 Transwell 小室中,上室中加入 200 μL 细胞悬液,下室中加入 500 μL 含 20% FBS 的 1640 培养基,培养 48 h 后进行结晶紫染色,染色结束后将小室置于载玻片上,置于显微镜下拍照(50 \times)。

1.2.7 DC 法蛋白定量

将蛋白标准(5 mg/mL BSA)用 ddH₂O 稀释至以下浓度:5 mg/mL,2.5 mg/mL,1.25 mg/mL,0.625 mg/mL,0.313 mg/mL,0.156 mg/mL,0.078 mg/mL,0 mg/mL;向 96 孔板中分别加入 5 μL 不同浓度的蛋白标准以及待测蛋白样品,设 3 个重复;按照样品孔数现配现用试剂 C(试剂 C=试剂 A+试剂 S,其中 $V_{\text{试剂A}}:V_{\text{试剂S}}=50:1$),每孔加入 25 μL 试剂 C,然后加入 200 μL 1 \times 福林酚溶液混匀,室温避光静置 20 min;酶标仪 755 nm 测定吸光值,绘制标准曲线计算出待测蛋白样品浓度。其中,试剂 A 为:Na₂CO₃ 20%+NaOH 5%;试剂 S 为:CuSO₄ 0.25%+酒石酸钠 0.5%+SDS 2.5%。

1.2.8 Trizol 法提取细胞总 RNA

待细胞转染 48 h 后,每孔加入 500 μL Trizol 试剂,室温静置 5 min,将混悬液转移至 1.5 mL EP 管中,按 Trizol:氯仿=5:1 的体积比加入氯仿,涡旋 15 s 后室温静置 5 min;4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min 离心 15 min,将上层水相转移至新的 1.5 mL EP 管中,按 Trizol:异丙醇=2:1 的体积比加入异丙醇混匀,室温静置 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 1 mL 75% RNAse Free 乙醇清洗 RNA;4 $^{\circ}\text{C}$,7 500 r/min 离心 5 min,弃上清,室温静置控干 EP 管,加入 20 μL 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理水溶解 RNA。

1.2.9 逆转录 PCR(RT-PCR)法检测 mRNA 表达

待细胞转染 48 h 后,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,利用 HiScript[®] II 1st Strand cDNA Synthesis Ki 将 RNA 逆转录为 cDNA,具体步骤详见试剂盒内说明书;参考 GeneBank 中人 USP13(NM_003940.3)和人 STAT1(NM_007315.4)基因序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物;按 2 \times Taq Master Mix 说明书,以 cDNA 为模板进行 PCR,反应体系为 20 μL ,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,共 30 个循环;用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物条带。

1.2.10 蛋白质免疫印迹(western blotting)

待细胞转染 48 h 后,1×PBS 漂洗细胞 3 次,每孔加入 120 μ L 蛋白裂解液(RIPA 裂解液:苯甲基磺酰氟:cocktail=9:1:0.1),冰上裂解 30 min,提取细胞总蛋白;用 DC 法对蛋白样品进行定量,加入 5×蛋白上样缓冲液(5×loading buffer)将蛋白样品配成 20 μ g/20 μ L,95 $^{\circ}$ C 煮样 5 min;取 20 μ L 样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),260 mA 恒流湿转 100 min,取出聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)于 5%脱脂奶粉中室温封闭 1 h,1×PBST(磷酸盐缓冲液+吐温)洗膜 3 次,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;1×PBST 洗膜 3 次,二抗室温孵育 1 h,1×PBST 洗膜后用 ECL 化学发光液进行显影,用天能全自动化学发光图像分析系统拍照。

1.2.11 蛋白质免疫共沉淀(Co-IP)

待细胞转染 48 h 后,1×PBS 漂洗细胞 3 次,按 Western 及 IP 细胞裂解液:苯甲基磺酰氟:cocktail=9:1:0.1 配置 IP 裂解液;每孔加入 100 μ L IP 裂解液,将裂解液转移至 1.5 mL EP 管中,插于冰上,置于摇床上 40~50 r/min 裂解细胞 30 min;4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 20 min,取上清进行 DC 法蛋白定量,然后分为 3 组:Input 组、IgG 组和抗体组;向 Input 组加入 5×loading buffer 煮样配置成 20 μ g/20 μ L;分别向 IgG 组和抗体组加入 1 μ g IgG 抗体和 1 μ g 目的抗体,4 $^{\circ}$ C 旋转摇床孵育过夜;分别向 IgG 组和抗体组加入 25 μ L Protein A/G 琼脂糖珠,4 $^{\circ}$ C 旋转摇床孵育 4 h;4 $^{\circ}$ C,3 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1×PBS,4 $^{\circ}$ C 旋转摇床漂洗 5 次,最后一次离心弃干净上清;最后加入 25 μ L 2×loading buffer,100 $^{\circ}$ C 煮样 5 min,取上清液进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.12 统计分析

使用 Image Pro Plus 6.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析和作图,所有实验数据的结果统计均以 Mean \pm 标准误差(SEM)表示,使用 t 检验(t test)分析数据以确定不同组之间的显著差异;*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 构建 pcDNA3.0-USP13-HA 真核表达质粒

空载体质粒和重组质粒的凝胶电泳鉴定和酶切结果如图 1(a)所示,泳道 1 和 2 分别为空载体质粒 pcDNA3.0-HA 和重组质粒 pcDNA3.0-USP13-HA 的 *Hind* III 单酶切产物,两条带长度分别为 5 448 bp 和 7 985 bp;泳道 3 为重组质粒 pcDNA3.0-USP13-HA 的 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切产物,产物中 USP13 条带大小为 2 595 bp,由此可见目的基因已构建到载体上。如图 1(b)所示,经测序分析,证实重组质粒 pcDNA3.0-USP13-HA 构建成功。

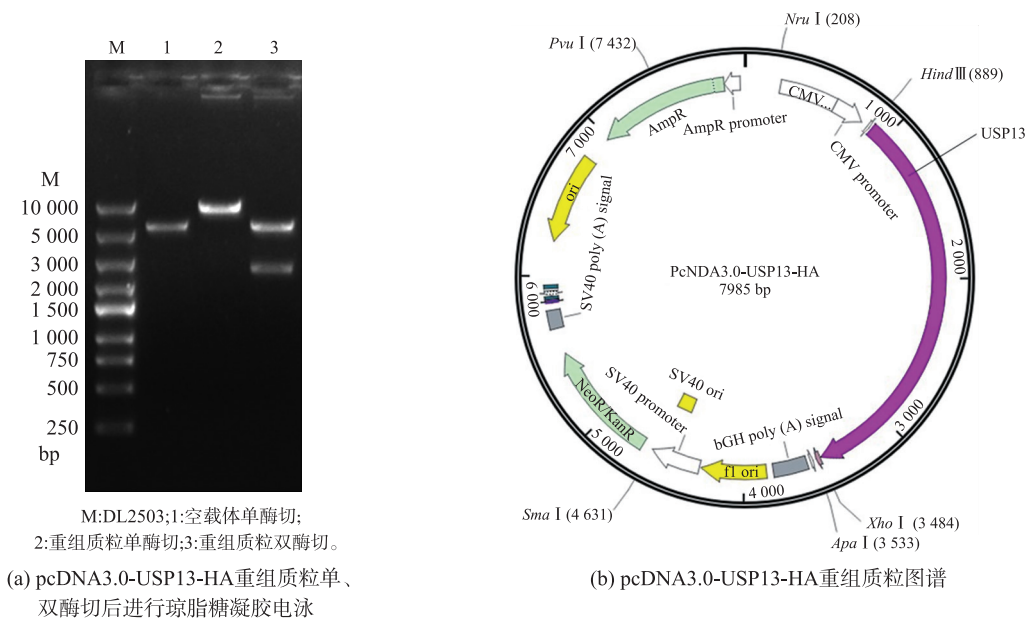


图 1 pcDNA3.0-USP13-HA 真核表达质粒构建

Fig. 1 Construction of eukaryotic expression plasmid pcDNA3.0-USP13-HA

2.2 USP13 抑制前列腺癌细胞增殖

为了检测 USP13 对前列腺癌细胞增殖的影响,本研究通过 CCK-8 法检测过表达 USP13 的前列腺癌细胞 PC-3 和 DU145 在 0~72 h 期间的细胞增殖变化. 实验结果如图 2 所示,过表达 USP13 组细胞生长曲线与对照组有明显差异,说明过表达 USP13 能够显著抑制前列腺癌细胞增殖能力.

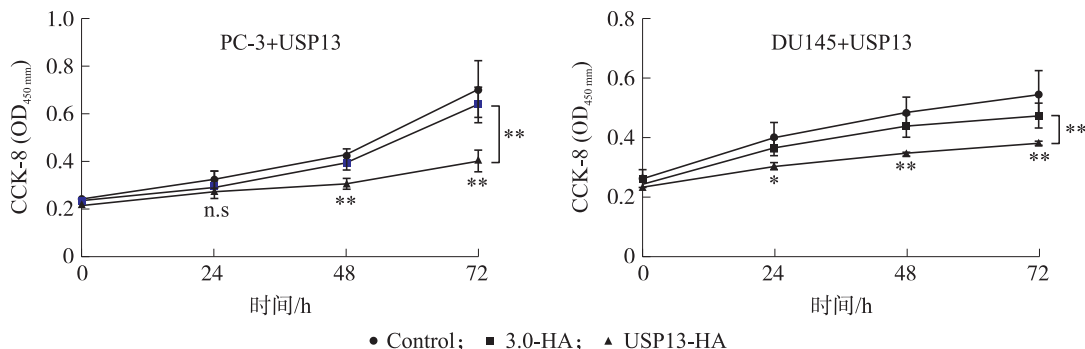


图 2 CCK-8 法检测细胞增殖

Fig. 2 Cell proliferation by CCK-8 assay

2.3 USP13 抑制前列腺癌细胞克隆形成能力

为了探究 USP13 对前列腺癌细胞克隆形成能力的影响,本研究在 PC-3 细胞中过表达 USP13,进行克隆形成的观察. 实验结果如图 3 所示,与对照组相比,过表达 USP13 组的克隆数显著降低,且形成的克隆较小,说明过表达 USP13 会抑制前列腺癌细胞的克隆形成能力.

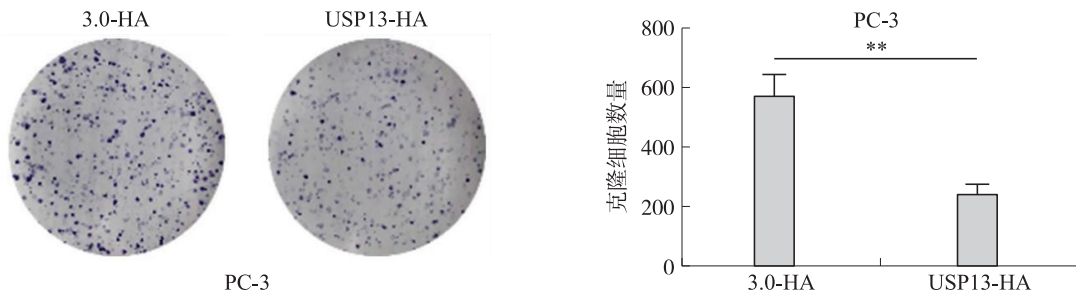


图 3 克隆形成实验

Fig. 3 Colony formation assay

2.4 USP13 抑制前列腺癌细胞迁移

为了探究 USP13 对前列腺癌细胞迁移能力的影响,本研究进行了划痕实验. 结果如图 4(a)所示,与对照组相比,无论在 PC-3 细胞还是在 DU145 细胞中,过表达 USP13 均显著降低细胞迁移能力. 对这两种细胞进行 Transwell 迁移实验,结果如图 4(b)所示,再次证实过表达 USP13 抑制前列腺癌细胞的迁移能力.

2.5 USP13 正调控 STAT1 蛋白水平

为了探究前列腺癌细胞中 USP13 的下游信号途径,本研究利用 RT-PCR 检测了 USP13 过表达对 STAT1 转录水平的影响,相关引物设计如表 1 所示. 当 PC-3 和 DU145 细胞中分别转染 pcDNA3.0-USP13-HA 质粒时,实验结果如图 5(a)所示,STAT1 mRNA 水平未发生变化,说明过表达 USP13 不影响 STAT1 转录水平. 利用 western blotting 检测过表达或敲减 USP13 条件下 STAT1 蛋白表达水平,实验结果如图 5(b)所示. 当 PC-3 和 DU145 细胞中分别转染两种 USP13 重组质粒 (pcDNA3.0-USP13-HA 和 pEGFP-N1-USP13) 时,STAT1 蛋白水平均显著上升;反之,当转染 siUSP13 时,STAT1 蛋白水平则明显下降;说明在前列腺癌细胞中 USP13 正调控 STAT1 蛋白水平,由此推测 USP13 可能通过去泛素化作用影响 STAT1 泛素化水平,进而使胞内稳态 STAT1 蛋白水平增加.

2.6 USP13 降低 STAT1 泛素化水平

为了确认 USP13 对 STAT1 蛋白进行泛素化蛋白酶体降解的影响,本文在 DU145 细胞中加入蛋白酶体抑制剂 MG132 条件下,转染 USP13 重组质粒或 siUSP13,进行 Co-IP 实验. 实验结果如图 6(a)所示,与 MG132 单独处理组相比,USP13 过表达显著下调 STAT1 泛素化水平;与此相反,如图 6(b)所示,敲低

USP13 时,STAT1 泛素化水平上升;说明前列腺癌细胞中 USP13 通过发挥去泛素化酶作用,降低 STAT1 泛素化水平,从而使胞内稳态 STAT1 蛋白水平增加。

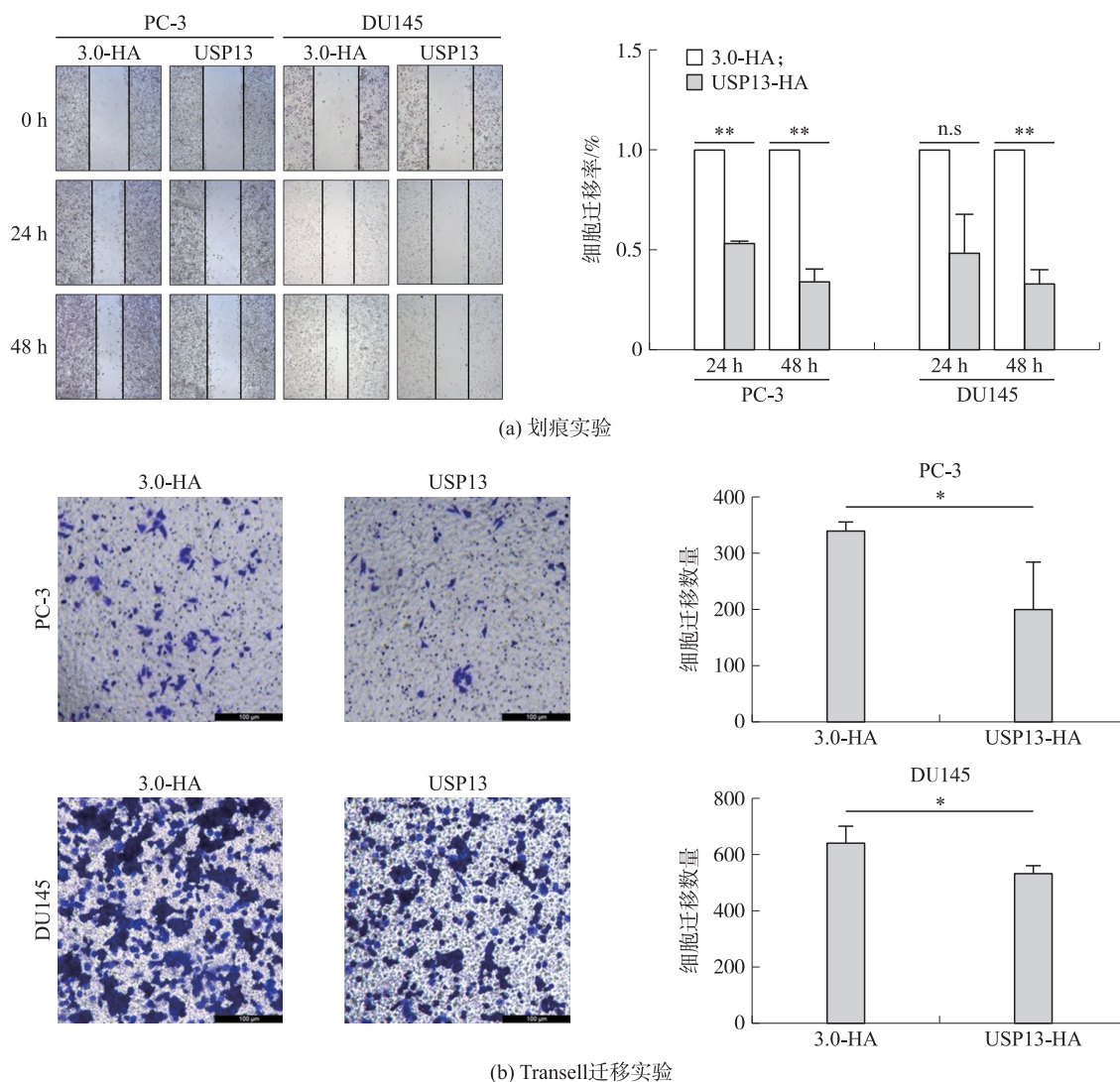


图 4 细胞迁移实验

Fig. 4 Cell migration assay

表 1 RT-PCR 引物设计

Table 1 Design of RT-PCR primers

Primer	Sequences(5'-3')
hSTAT1(294 bp)-F	5' AAGTCAGAAATGTGAAGGACAAGG 3'
hSTAT1(294 bp)-R	5' GTCTCCGCTTCCACTCCACTA 3'
hUSP13(285 bp)-F	5'CCTGATGAACCAATTGATAGACC 3'
hUSP13(285 bp)-R	5' GTGATGATAGCTACGATTTCTCTC 3'
hβ-Actin(416 bp)-F	5' GAGCTACGAGCTGCCTGACG 3'
hβ-Actin(416 bp)-R	5' CCTAGAAGCATTTGCGGTGG 3'

3 结论

本文构建了 USP13 基因真核表达重组质粒,在前列腺癌细胞 PC-3 和 DU145 中转染 USP13 重组质粒,观察到过表达 USP13 显著抑制前列腺癌细胞的增殖、克隆和迁移能力. USP13 尽管在黑色素瘤、成胶质细胞瘤、肺癌和卵巢癌中起到促癌作用,但在乳腺、膀胱等肿瘤中和本文研究结果相一致,发挥抑癌作用^[12].

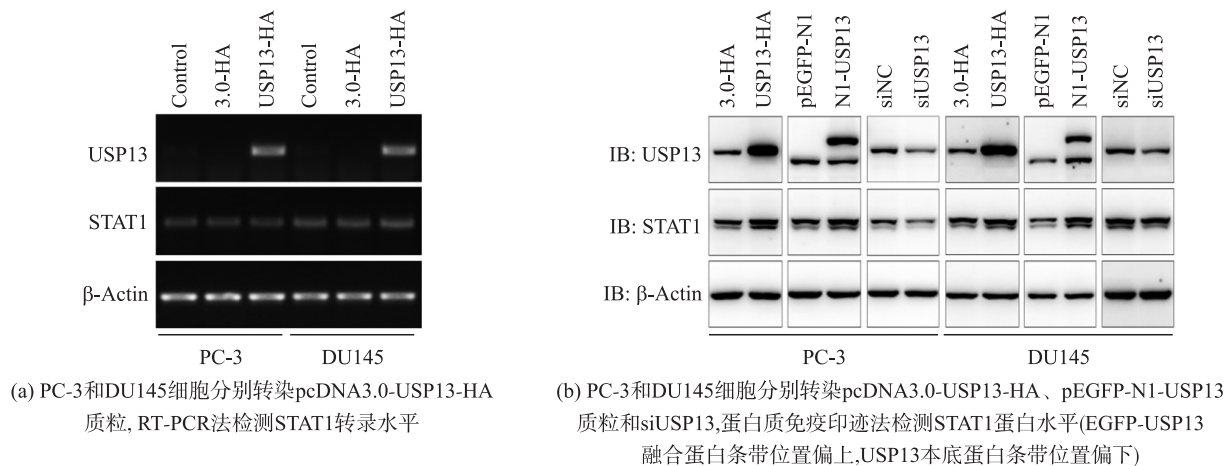


图 5 USP13 正调控 STAT1 蛋白水平
Fig. 5 USP13 regulated STAT1 protein positively

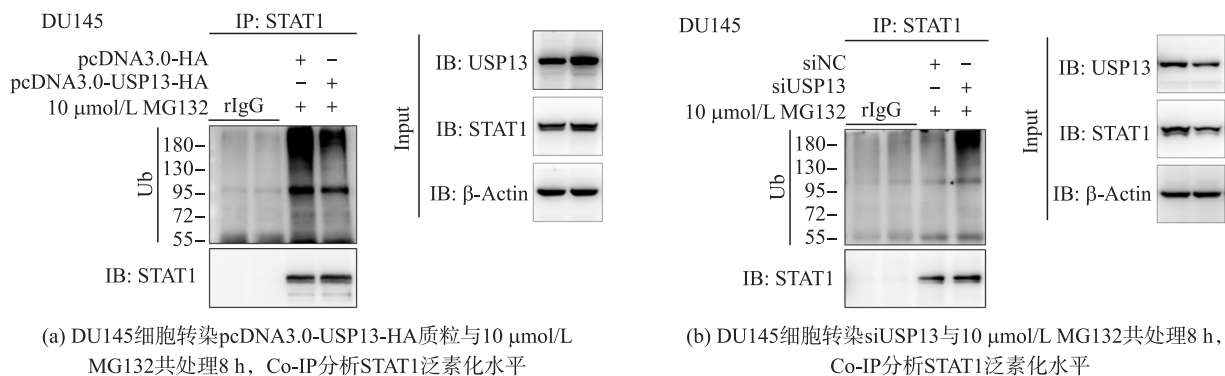


图 6 USP13 降低 STAT1 泛素化水平
Fig. 6 USP13 reduced STAT1 ubiquitination

有文献报道,USP13 能够去泛素化调控 STING 蛋白(与宿主防御病毒有关),水解 K27 连接的多聚泛素链,阻碍 STING 招募 TBK1 到信号复合物上,削弱细胞对病毒的免疫反应^[13]. 在肺成纤维细胞中,USP13 能够通过去泛素化 Smad 4 延长其蛋白稳定性,经 TGF- β 1 刺激后,胞浆中的 USP13 和 Smad 4 共同转位进入细胞核,上调 ECM(extracellular matrix)相关基因的表达以维持细胞外基质分泌^[14]. 但在乳腺癌细胞中,过表达 USP13 显著增加内源性 PTEN 蛋白表达,且 USP13 通过去泛素化作用稳定 PTEN,从而抑制 AKT 磷酸化诱导的细胞增殖、糖酵解和肿瘤生长^[8]. 在口腔鳞状细胞癌(OSCC)中,USP13 也是通过调控 PTEN/AKT 信号通路发挥肿瘤抑制因子的功能,主要体现在过表达 USP13 后诱导 PTEN 上调,并抑制 p-AKT 激活,在体外抑制 OSCC 细胞增殖^[9]. 而且,在肺癌细胞中 USP13 通过去泛素化作用稳定 STAT1 蛋白水平,正调控 I 型和 II 型 IFN 信号途径,提高细胞的抗病毒活性^[15]. STAT1 属于信号转导和转录激活因子家族成员,目前已发现的 STAT 家族还包含 2、3、4、5a、5b 和 6 等. 激活的 STAT1 和 STAT2 可诱导产生多种抗病毒蛋白(如 Mx1、OAS、IRF-7)抑制丙型肝炎病毒复制,激活的 STAT3 促进包含肝癌在内的多种肿瘤发生^[16]. 但大多数研究表明,激活的 STAT1 是作为肿瘤抑制因子发挥作用的^[17-19]. 有文献报道,BRCC36 利用 USP13 形成一种复合物来拮抗 SMURF1 介导的 STAT1 泛素化降解,从而维持纤维肉瘤细胞中稳态 STAT1 蛋白水平^[20]. 本文实验结果发现,过表达或敲低 USP13 对 STAT1 转录水平无影响,但对 STAT1 蛋白水平呈现显著的正调控作用,提示 USP13 在前列腺癌细胞中可通过上调 STAT1 进而发挥抑制前列腺癌细胞增殖、克隆和迁移的作用.

通过泛素化 Co-IP 实验,本文证实 USP13 在前列腺癌细胞 DU145 中显著影响 STAT1 蛋白泛素化水平,说明 USP13 是通过对 STAT1 去泛素化,抑制 STAT1 蛋白泛素-蛋白酶体降解而上调 STAT1 蛋白. 还有文献报道,USP13 中充当泛素特异性受体并发挥催化作用的是 UBA1/2 域而不是 ZnF 域,具有较弱的去泛素化功能,仅能水解 K63 连接的多聚泛素链^[21]. 因此,USP13 在前列腺癌中是否存在其他作用也值得深

入探讨. 另一个重要的去泛素化酶 USP5 与 USP13 拥有相似的去泛素化结构域,前列腺癌中 USP13 是否发挥特异性的 STAT1 去泛素化作用也值得进一步研究. 此外,由于锌指蛋白 Slug 可通过抑制 E-cadherin 表达促进 EMT 发生^[22],在肺癌细胞中,STAT1 入核并结合到 EMT 标志性转录因子 Slug 的启动子上抑制 Slug 转录,从而抑制肺癌细胞发生 EMT^[23]. 据此可以推测,在前列腺癌中,USP13 在细胞质中发挥去泛素化酶活性,降低 STAT1 泛素化水平使胞内稳态 STAT1 蛋白水平增加,STAT1 蛋白能够形成二聚体入核,并结合到 EMT 标志性转录因子 Slug 的启动子上抑制 Slug 表达,从而抑制癌细胞发生 EMT,最终表现为 USP13 抑制前列腺癌细胞的增殖、克隆和迁移,此推测尚有待下一步研究证实.

综上所述,本研究发现 USP13 能够抑制前列腺癌细胞增殖、克隆和迁移;过表达 USP13 不影响 STAT1 mRNA 水平而上调 STAT1 蛋白水平,反之敲低 USP13 则下调 STAT1 蛋白水平;同时,过表达 USP13 降低 STAT1 泛素化水平,敲低 USP13 却提高 STAT1 泛素化水平. 本研究提示 USP13 在前列腺癌中可以通过调节 STAT1 蛋白水平影响前列腺癌生长,可为进一步探索 USP13 在前列腺癌发生、发展中的作用以及开发前列腺癌治疗药物提供新的思路.

[参考文献] (References)

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA: A Cancer Journal Clinicians, 2020, 70: 7-30.
- [2] CULP M B, SOERJOMATARAM I, EFSTATHIOU J A, et al. Recent global patterns in prostate cancer incidence and mortality rates[J]. European Urology, 2020, 77(1): 38-52.
- [3] GU X Y, ZHENG R S, XIA C F, et al. Interactions between life expectancy and the incidence and mortality rates of cancer in China: a population-based cluster analysis[J]. Cancer Communications, 2018, 38(1): 44.
- [4] LIU X G, MOUSSA C. Regulatory role of ubiquitin specific protease-13 (USP13) in misfolded protein clearance in neurodegenerative diseases[J]. Neuroscience, 2021, 460: 161-166.
- [5] DIKIC I, WAKATSUKI S, WALTERS K J. Ubiquitin-binding domains-from structures to functions[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, 10(10): 659-671.
- [6] SCORTEGAGNA M, SUBTIL T, QI J F, et al. USP13 enzyme regulates Siah2 ligase stability and activity via noncatalytic ubiquitin-binding domains[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(31): 27333-27341.
- [7] BONNET J, ROMIER C, TORA L, et al. Zinc-finger UBPs: regulators of deubiquitylation[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2008, 33(8): 369-375.
- [8] ZHANG J S, ZHANG P J, WEI Y K, et al. Deubiquitylation and stabilization of PTEN by USP13[J]. Nature Cell Biology, 2013, 15(12): 1486-1494.
- [9] QU Z, ZHANG R, SU M, et al. USP13 serves as a tumor suppressor via the PTEN/AKT pathway in oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Management and Research, 2019, 11: 9175-9183.
- [10] WU Y, ZHANG Y Q, LIU C C, et al. Amplification of USP13 drives non-small cell lung cancer progression mediated by AKT/MAPK signaling[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 114: 108831.
- [11] MORGAN E L, PATTERSON M R, BARBA-MORENO D, et al. The deubiquitinase (DUB) USP13 promotes Mcl-1 stabilisation in cervical cancer[J]. Oncogene, 2021, 40: 2112-2129.
- [12] 陶守松, 刘凯, 李亚婷, 等. 去泛素化酶 USP13 在癌症中的研究进展[J]. 军事医学, 2021, 45(1): 76-80.
- [13] SUN H, ZHANG Q, JING Y Y, et al. USP13 negatively regulates antiviral responses by deubiquitinating STING[J]. Nature Communications, 2017, 8: 15534.
- [14] LIAO X X, LI Y H, LIU J, et al. Deubiquitinase USP13 promotes extracellular matrix expression by stabilizing Smad4 in lung fibroblast cells[J]. Translational Research, 2020, 223: 15-24.
- [15] YEH H M, YU C Y, YANG H C, et al. Ubiquitin-specific protease 13 regulates IFN signaling by stabilizing STAT1[J]. Journal of Immunology, 2013, 191(6): 3328-3336.
- [16] GAO B, WANG H, LAFDIL F, et al. STAT proteins-key regulators of anti-viral responses, inflammation, and tumorigenesis in the liver[J]. Journal Hepatology, 2012, 57(2): 430-441.
- [17] HUANG S, BUCANA C D, VAN ARSDALL M, et al. Stat1 negatively regulates angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of tumor cells[J]. Oncogene, 2002, 21(16): 2504-2512.

(下转第 92 页)

- Ontology consortium[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2011, 12(5): 449–462.
- [6] CAPPELLO F, GAMMAZZA A M, PICCTONELLO A P, et al. Hsp60 chaperonopathies and chaperonotherapy: targets and agents[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2014, 18(2): 185–208.
- [7] HOTER A, RIZK S, NAIM H Y. The Multiple Roles and Therapeutic Potential of Molecular Chaperones in Prostate Cancer[J]. *Cancers*, 2019, 11(8): 1194.
- [8] van EDEN W, JANSEN M A A, LUDWIG I S, et al. Heat shock proteins can be surrogate autoantigens for induction of antigen specific therapeutic tolerance in rheumatoid arthritis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 279.
- [9] BROSS P, MAGNONI R, BIE A S. Molecular chaperone disorders: defective Hsp60 in neurodegeneration[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2012, 12(22): 2491–2503.
- [10] MENG Q L, LI B B X, XIAO X S. Toward developing chemical modulators of Hsp60 as potential therapeutics[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2018, 5: 35.
- [11] HOTER A, RIZK S, NAIM H Y. The multiple roles and therapeutic potential of molecular chaperones in prostate cancer[J]. *Cancers*, 2019, 11(8): 1194.
- [12] STEVENS M, ABDEEN S, SALIM N, et al. HSP60/10 chaperonin systems are inhibited by a variety of approved drugs, natural products, and known bioactive molecules[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2019, 29(9): 1106–1112.
- [13] GALLO G J, SCHUETZ T J, KINGSTON R E. Regulation of heat shock factor in *Schizosaccharomyces pombe* more closely resembles regulation in mammals than in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(1): 281–288.
- [14] HALLBERG E M, SHU Y, HALLBERG R L. Loss of mitochondrial hsp60 function: nonequivalent effects on matrix-targeted and intermembrane-targeted proteins[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13(5): 3050–3057.
- [15] SINGH B, PATEL H V, RIDLEY R G, et al. Mitochondrial import of the human chaperonin (HSP60) protein[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1990, 169(2): 391–396.
- [16] CHANDRA D, CHOY G, TANG D G. Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(43): 31289–31301.
- [17] READING D S, HALLBERG R L, MYERS A M. Characterization of the yeast HSP60 gene coding for a mitochondrial assembly factor[J]. *Nature*, 1989, 337(6208): 655–659.
- [18] YOSHIDA H, YANAGI H, YURA T. Cloning and characterization of the mitochondrial HSP60-encoding gene of *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Gene*, 1995, 167(1–2): 163–166.

[责任编辑: 严海琳]

(上接第 79 页)

- [18] RYAN N, ANDERSON K, VOLPEDO G, et al. STAT1 inhibits T-cell exhaustion and myeloid derived suppressor cell accumulation to promote antitumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *International Journal of Cancer*, 2020, 146(6): 1717–1729.
- [19] SASIDHARAN N V, TOOR S M, ALI B R, et al. Dual inhibition of STAT1 and STAT3 activation downregulates expression of PD-L1 in human breast cancer cells[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2018, 22(6): 547–557.
- [20] CHENG Q, FENG Q, XU Y, et al. BRCC36 functions noncatalytically to promote antiviral response by maintaining STAT1 protein stability[J]. *SSRN Electronic Journal*, 2021, 51(2): 296–310.
- [21] ZHANG Y H, ZHOU C J, ZHOU Z R, et al. Domain analysis reveals that a deubiquitinating enzyme USP13 performs non-activating catalysis for Lys63-linked polyubiquitin[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29362.
- [22] CAPPELLESSO R, MARIONI G, CRESCENZI M, et al. The prognostic role of the epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin and Slug in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Histopathology*, 2015, 67(4): 491–500.
- [23] PAN C M, WANG M L, CHIOU S H, et al. Oncostatin M suppresses metastasis of lung adenocarcinoma by inhibiting SLUG expression through coordination of STATs and PIASs signalings[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(37): 60395–60406.

[责任编辑: 严海琳]