

## 论著·基础研究

## USP47通过促进抗凋亡蛋白表达介导头颈鳞癌细胞顺铂耐药

童 桐, 秦 星, 谢 非, 蒋英英, 石剑波, 张建军

上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院口腔颌面头颈-肿瘤科, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011

**[摘要]** **目的**·探讨去泛素化酶47 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47, USP47) 对头颈鳞癌细胞顺铂耐药的影响及潜在机制。**方法**·通过梯度增加顺铂浓度, 构建头颈鳞癌顺铂耐药细胞株; 通过实时定量PCR和蛋白免疫印迹实验检测耐药株中USP47的表达情况; 利用慢病毒载体构建USP47基因过表达或敲除的稳转细胞株, MTT法检测USP47表达升高或降低对头颈鳞癌细胞顺铂耐药性的影响; 并检测USP47对癌细胞增殖、克隆形成和凋亡等生物学行为的影响; 通过免疫印迹实验检测USP47对抗凋亡蛋白X-连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)和重组人B细胞淋巴瘤因子2 xL (recombinant human B-cell leukemia/lymphoma 2 xL, Bcl-xL)的表达及泛素化水平的影响。**结果**·USP47在头颈鳞癌顺铂耐药细胞株中显著高表达; 过表达USP47后, 顺铂对头颈鳞癌细胞的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ )明显升高, 而敲除USP47可以降低头颈鳞癌顺铂耐药细胞株的 $IC_{50}$ ; 过表达USP47的头颈鳞癌细胞, 其增殖和克隆形成能力均被抑制, 而抗凋亡能力明显增强。USP47基因过表达显著提高了抗凋亡蛋白XIAP和Bcl-xL的表达量。泛素化测定证实了USP47通过降低XIAP和Bcl-xL蛋白的泛素化水平从而导致其表达量升高, 而敲低XIAP和Bcl-xL基因表达水平可以阻断USP47基因过表达诱导的顺铂耐药性。**结论**·USP47通过降低XIAP和Bcl-xL蛋白的泛素化修饰水平, 提高两者的蛋白表达水平, 从而介导头颈鳞癌细胞顺铂耐药; 抑制USP47的表达对降低头颈鳞癌细胞顺铂耐药具有潜在应用价值。

**[关键词]** 去泛素化酶47; 顺铂耐药; 头颈鳞癌; X-连锁凋亡抑制蛋白; 重组人B细胞淋巴瘤因子2 xL

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.04.004 **[中图分类号]** R739.8 **[文献标志码]** A

### USP47 induces cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma by up-regulation of anti-apoptotic proteins

TONG Tong, QIN Xing, XIE Fei, JIANG Ying-ying, SHI Jian-bo, ZHANG Jian-jun

Department of Oral and Maxillofacial-Head &amp; Neck Oncology, Shanghai Ninth People's Hospital, College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology &amp; Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China

**[Abstract]** **Objective**·To investigate the effects and underlying mechanism of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47 (USP47) on cisplatin resistance in head and neck squamous cells carcinoma (HNSCC). **Methods**·The cisplatin-resistant cell lines of HNSCC were constructed by gradient increase of cisplatin concentration. The expression of USP47 in cisplatin-resistant cell was analyzed by real-time PCR and Western blotting. Stable USP47 over-expressed and silenced USP47 HNSCCs cell lines were generated by lentivirus vector. The influence of the increased or silenced USP47 expression on cisplatin resistance were tested by MTT. The influence of USP47 on cell proliferation, colony formation, and apoptosis were examined. Western blotting was performed to detect the expression and ubiquitination levels of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and recombinant human B-cell lymphoma factor 2 xL (Bcl-xL). **Results**·USP47 expression was significantly increased in cisplatin-resistant cancer cells. Over-expression of USP47 significantly increased the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ), while knockout of USP47 gene increased the sensitivity to cisplatin. In addition, the data showed that USP47 expression was negatively related to the proliferation and colony formation abilities of HNSCC cell lines, but it remarkably enhanced the anti-apoptotic effect of HNSCC cells. The protein levels of XIAP and Bcl-xL were significantly elevated in stable USP47 over-expressed cell lines and ubiquitination assay proved that USP47 reduced the ubiquitination levels of XIAP and Bcl-xL proteins. Knockdown of the XIAP and Bcl-xL gene expression blocked cisplatin resistance induced by USP47 gene overexpression. **Conclusion**·USP47 can increase the protein expressions of XIAP and Bcl-xL by inhibiting the ubiquitination modification of them, thereby mediate the cisplatin resistance of HNSCC cells. Inhibition of USP47 expression provides potential application value to reduce cisplatin-resistance during the treatment on HNSCC.

**[Key words]** ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47 (USP47); cisplatin resistance; head and neck squamous cells carcinoma (HNSCC); X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP); recombinant human B-cell lymphoma factor 2 xL (Bcl-xL)

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81972573, 81772933); 上海市科学技术委员会科研计划项目 (18JC1413700); 上海交通大学医学院高水平地方高校创新团队 (SSMU-ZLCX20180502)。

**[作者简介]** 童 桐 (1996—), 女, 硕士生; 电子信箱: 1605049815@qq.com。

**[通信作者]** 张建军, 电子信箱: zjjshuobo@163.com。

**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81972573; 81772933); Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (18JC1413700); Innovative Research Team of High-Level Local Universities in Shanghai (SSMU-ZLCX20180502)。

**[Corresponding Author]** ZHANG Jian-jun, E-mail: zjjshuobo@163.com。



头颈部恶性肿瘤患者的病死率较高,其中90%属于鳞状细胞癌<sup>[1]</sup>,简称头颈鳞癌(head and neck squamous cells carcinoma, HNSCC)。尽管有许多针对HNSCC的新疗法,但“手术+化学治疗(化疗)+放射治疗(化疗)”的三联疗法仍是治疗HNSCC的主要方法<sup>[2-3]</sup>。顺铂(cisplatin, DDP)是治疗HNSCC常用的化疗药物之一<sup>[4]</sup>。许多患者在DDP治疗的早期阶段获得了良好的效果,但会随着时间的推移而发生耐药<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>结果表明,超过70%的HNSCC患者因为对DDP产生耐药而导致疾病复发。因此,了解DDP耐药的潜在机制并制定有效的抵抗DDP的耐药策略是临床上需要解决的问题。

泛素化是主要的蛋白翻译后修饰方式之一,在调节细胞的生长、分化和凋亡等过程中起着至关重要的作用<sup>[6]</sup>。泛素化是可逆的,主要通过去泛素化酶(deubiquitylating enzymes, DUB)从底物蛋白上裂解泛素,编辑泛素链并加工泛素前体<sup>[6-7]</sup>。DUB作为E3泛素连接酶的拮抗剂,是泛素-蛋白酶体系统的组成部分<sup>[8]</sup>。根据序列和结构域保守性,DUB分为6个家族:泛素特异性蛋白酶家族(ubiquitin-specific proteases, USPs)、泛素羧基末端水解酶家族(ubiquitin carboxy-terminal hydrolases, UCHs)、Joesphin结构域蛋白家族(Machado-Joesphin domain-containing proteases, MJDs)、卵巢肿瘤蛋白酶家族(ovarian tumour proteases, OTUs)、与含泛素的新型DUB家族相互作用的基序(motif-interacting with ubiquitin-containing novel DUB family, MINDYs)和JAMM家族(JAB1、MPN、MOV34 family)<sup>[7,9]</sup>。其中,USPs是数量最多的一类DUB<sup>[10]</sup>,并在各种生物学过程中起着重要作用。

去泛素化酶47(ubiquitin specific peptidase 47, USP47)是USPs的成员之一<sup>[7-8]</sup>,在调节细胞活力和维持基因组完整性方面发挥关键作用<sup>[10-11]</sup>。USP47可以促进肺癌和前列腺癌细胞Wnt信号通路的活化<sup>[11]</sup>,也可以调控结直肠癌细胞的上皮-间充质转化<sup>[12]</sup>。在胃癌中,USP47还被证实可以增强癌细胞的化疗耐药性和生存能力,并且被认为是一种新的治疗靶标<sup>[8]</sup>。但是,关于USP47在HNSCC发病进展和治疗过程中发挥的作用,尚无文献报道。因此,本研究通过构建人HNSCC的DDP耐药细胞株,探索USP47与HNSCC的DDP耐药之间的关系及潜在的机制,为逆转DDP耐药的临床研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

高糖DMEM培养基(源培,中国),10%胎牛血清

(CellMax, 中国), DDP注射液(豪森药业, 中国), PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa, 日本), SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒(TaKaRa, 日本), Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, 美国), 4%~20% SurePAGE蛋白预制胶(GenScript, 中国), 鼠单克隆GAPDH抗体(Proteintech, 美国; 1:10 000), 鼠单克隆USP47抗体(Santa Cruz Biotechnology, 美国; 1:500), 兔多克隆重组人B细胞淋巴瘤因子2 xL (recombinant human B-cell leukemia/lymphoma 2 xL, Bcl-xL)抗体(ABclonal, 中国; 1:2 000), 兔多克隆X-连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)抗体(Proteintech, 美国; 1:2 000), 鼠单克隆Ubiquitin抗体(CST, 美国; 1:2 000), 荧光二抗(LI-COR Biosciences, 美国; 1:10 000), MTT (Sigma, 美国), Annexin V FITC Apop Dtec Kit I 100Tst (BD Pharmingen, 美国), Protein A/G免疫沉淀磁珠(Bimake, 美国), MG132 (Selleck, 美国)。

### 1.2 细胞培养

人HNSCC细胞系WSU-HN4 (HN4)、WSU-HN30 (HN30)由美国马里兰大学牙医学院赠送。HN4、HN30细胞均用高糖DMEM培养基(含10%胎牛血清、青霉素100 U/mL、链霉素100 μg/mL)培养,放置于37℃、5% CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱中培养。

### 1.3 DDP耐药株构建

采用浓度逐步递增法构建人HNSCC细胞的DDP耐药株, DDP浓度依次为5、7.5、10、15、20 μmol/L。具体操作方法是在细胞传代时向培养基中加入终浓度为5 μmol/L的DDP,连续传代培养至细胞可以在此DDP浓度的培养基中稳定生长。再按前文所述的浓度梯度增加DDP剂量。将耐受DDP的HN4和HN30细胞株分别命名为HN4/DDP和HN30/DDP。

### 1.4 USP47基因过表达细胞株的构建

采用慢病毒感染法构建USP47基因过表达细胞株(USP47基因过表达及对照慢病毒均购于上海汉尹公司)。细胞用胰酶消化、计数后,重悬成单细胞悬液并接种至6孔板,以24 h后贴壁细胞密度为20%~30%为宜;待细胞密度为40%左右,根据感染复数(multiplicity of infection, MOI)值计算加入病毒悬液的体积,同时加入聚凝胺(终浓度为10 μg/mL)摇匀;72 h后用含10 μg/mL的嘌呤霉素进行筛选,连续培养1个月后进行相应实验。USP47基因过表达和对照组细胞分别命名为USP47和Vector。

1.5 USP47基因敲除细胞株构建

采用慢病毒感染法构建 USP47 基因敲除细胞株（敲除对照慢病毒及敲除慢病毒购于上海汉尹公司），USP47 基因敲除组和对照组细胞分别命名为 KO USP47 和 KO NC。具体步骤见“1.4”。

1.6 小干扰RNA转染

使用 XIAP 和 Bcl-xL 基因各自特异的小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）序列（Genomeditech，中国）分别敲减 USP47 基因过表达细胞中 XIAP mRNA 和 Bcl-xL mRNA 的表达。使用 Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent 进行 siRNA 的转染。细胞接种至 6 孔板中，以贴壁后细胞密度为 30%~40% 为宜；转染前，换双无培养基；按照每孔 siRNA 终浓度为 50 pmol/L 的量进行转染。XIAP 和 Bcl-xL 基因特异的 siRNA 序列见表 1。

表 1 XIAP 和 Bcl-xL 基因特异的 siRNA 序列

Tab 1 siRNA sequences specific for XIAP and Bcl-xL genes

Gene name	siRNA sequence (5'→3')
XIAP	Forward:GGGCCGGAATCTTAATATTdT
	Reverse:AATATTAAGATTCGCGCCdT
Bcl-xL	Forward:AGUGCAGUUCAGUAAUAAACUdT
	Reverse:AGTTTATTACTGAACTGCACTdT
NC	Forward:UUCUCCGAACGUGUCACGUDt
	Reverse:ACGTGACACGTTTCGAGAAAdt

1.7 MTT法检测细胞DDP半数抑制浓度

细胞的 DDP 半数抑制浓度（half maximal inhibitory concentration，IC<sub>50</sub>）主要通过 MTT 法进行检测。将处于指数生长期的细胞用胰酶消化、计数后，重悬成单细胞悬液，并接种至 96 孔板中，每孔 100 μL，细胞数为 3 000 个；以相同体积培养基孔为空白对照；设置 10 个 DDP 浓度梯度，每个浓度设置 3 个复孔；放入培养箱中常规培养 24 h 后，将正常培养基换成含有 DDP 的培养基；72 h 后，向每孔中加入 10 μL MTT 溶液，37 °C 孵育 4 h，小心弃去上清，每孔加入 150 μL DMSO，避光摇匀；用酶标仪检测 490 nm 波长下各孔的吸光度 [D（490 nm）]。利用 Graphpad prism 7 软件计算 IC<sub>50</sub>。

1.8 免疫印迹实验

用全细胞裂解液提取细胞总蛋白并测定蛋白浓度；取蛋白裂解产物（40 μg/孔）置于 4%~20% SurePAGE 蛋白预制胶中进行电泳；电泳结束后，再用 90 V 恒压电转；5%脱脂牛奶室温封闭 1 h，分别加入 USP47（1：500）、GAPDH（1：10 000）、XIAP（1：2 000）、Bcl-xL（1：2 000）抗体，4 °C 孵育过夜；PBST 洗涤 3 次，10 min/次；加入与一抗相

同种属的二抗，室温孵育 1 h，PBST 洗涤 3 次后，显影观察。

1.9 实时定量PCR

提取细胞总 RNA，使用 PrimerScript RT 试剂盒将提取的总 RNA 反转录成 cDNA，使用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒进行所有实时定量 PCR（real-time PCR，RT-PCR）反应。每组设置 3 个复孔，使用 β-actin 作为内参基因。运用 ΔΔC<sub>T</sub> 法分析实验数据，从而得到目的基因在样本中的相对表达量。用 Primer Premier 5 软件设计引物序列，由上海生工生物股份有限公司合成，具体序列见表 2。

表 2 RT-PCR 引物序列

Tab 2 RT-PCR primer sequences

Gene name	Primer sequence (5'→3')
Human USP47	Forward:CTCGACGCTAATTTGAGCCA
	Reverse:CTCTTGAAGCGGACCTATAAAC
Human β-actin	Forward:CACCCACACTGTGCCATCTACGA
	Reverse:CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG

1.10 细胞增殖实验

将细胞以每孔 100 μL、1 000 个细胞的密度接种到 96 孔板上，每组设 3 复孔。细胞增殖测定采用 MTT 法。每天向每组的 3 个复孔中加入 10 μL MTT，培养箱中静置 4 h，弃上清液，每孔加入 150 μL DMSO，避光摇匀，用酶标仪检测 D（490 nm）。

1.11 细胞平板克隆形成实验

将细胞接种到 6 孔板中（每孔约 500 个细胞），置于培养箱中培养 8~15 d，直至形成可见的克隆。PBS 洗涤 2~3 次，用 4% 多聚甲醛固定 30 min，并用 0.1% 结晶紫色 30 min。染色后，洗涤、风干、拍照。

1.12 细胞凋亡检测

采用流式细胞术检测细胞的凋亡比例。用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞，用 PBS 洗涤细胞 2 次（5 000×g，4 °C 离心 5 min），加入 1×结合缓冲液重悬，300×g，4 °C 离心 10 min，弃上清，加入 Annexin V 和 PI（1×结合缓冲液=1：50），混匀、冰上避光反应 15 min；加入 400 μL 1×结合缓冲液重悬，转移至流式管中，立即进行检测。

1.13 泛素化测定

提取细胞总蛋白并稀释至蛋白质量浓度为 2 μg/μL，取 30 μL 样品留作对照 Input。将上述稀释好的蛋白样品等分成 2 份（每份蛋白总量至少 1 mg），用 RIPA 裂解液稀释 5 倍；向稀释好的 2 份样品中各加入 70 μL 蛋白 A/G 免疫磁珠，4 °C



旋转30 min后, 1 000×g离心1 min取上清; 将上清等分为2份, 一份加入目的抗体, 一份加入等体积的同种属的IgG抗体, 4℃旋转过夜; 第2日, 向两份样品中各加入60 μL蛋白A/G免疫磁珠, 室温旋转4 h, 1 000×g离心1 min, 弃液取沉淀; 沉淀用洗液反复漂洗5次后加入60 μL 1×上样缓冲液, 105℃金属浴煮10 min。实验所得样品进行后续的免疫印迹实验。

### 1.14 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析。2组之间比较采用独立样本 $t$ 检验, 3组及3组以上的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

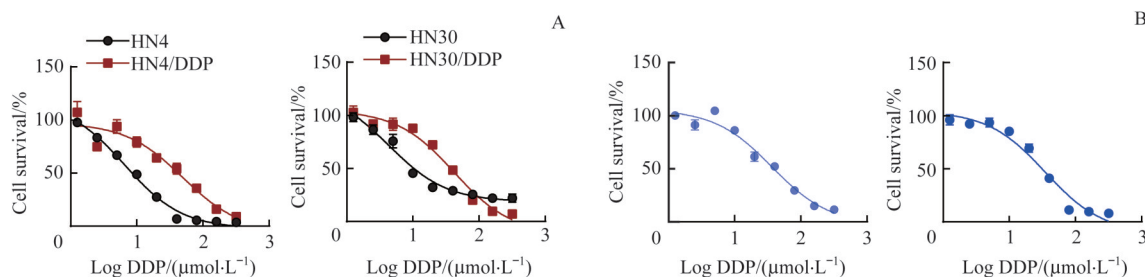
### 2.1 HNSCC细胞DDP耐药株的构建

以HN4和HN30为亲本细胞, 采用梯度增加DDP浓

度的方法构建DDP耐药株HN4/DDP和HN30/DDP。6个月后, DDP处理浓度达到20 μmol/L。利用MTT法分别检测DDP对亲本细胞和耐药细胞的 $IC_{50}$ 。亲本细胞HN4的 $IC_{50}$ 为6.62 μmol/L, 而耐药细胞HN4/DDP的 $IC_{50}$ 为49.56 μmol/L (为HN4的7.49倍); 亲本细胞HN30的 $IC_{50}$ 为4.37 μmol/L, 而耐药细胞HN30/DDP的 $IC_{50}$ 为42.14 μmol/L (为HN30的9.64倍)(图1A)。为了进一步验证耐药性的持续能力, 将HN4/DDP和HN30/DDP在正常培养基中培养48 h后, 检测各自的 $IC_{50}$ 。结果显示: HN4/DDP的 $IC_{50}$ 仍高达36.74 μmol/L, 而HN30/DDP的 $IC_{50}$ 也达到34.98 μmol/L (图1B)。

### 2.2 DDP耐药株中USP47蛋白表达的变化

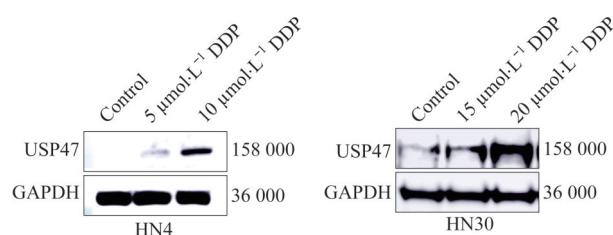
通过免疫印迹实验检测HN4、HN30、HN4/DDP和HN30/DDP中USP47蛋白的表达水平。结果显示, 与亲本细胞相比, HN4/DDP和HN30/DDP中USP47蛋白表达水平显著上调(图2), 且表达量与DDP耐受浓度呈正相关。



Note: A. The  $IC_{50}$  of DDP on HN4 and HN30. B. The  $IC_{50}$  of HN4/DDP (left) and HN30/DDP (right) after removing DDP stimulation.

图1 DDP耐药HNSCC细胞株的构建

Fig 1 Construction of DDP-resistant strains of HNSCC



Note: Western blotting analysis of USP47 protein levels in HNSCC cells with different DDP tolerance.

图2 DDP耐药细胞株HN4/DDP和HN30/DDP中USP47蛋白的表达

Fig 2 USP47 protein expressions in DDP-resistant HN4/DDP and HN30/DDP cell lines

### 2.3 USP47基因过表达对HNSCC细胞DDP耐药性的影响

免疫印迹实验及RT-PCR结果显示, USP47基因过表达稳转细胞株构建成功(图3A、3B)。运用MTT法检测DDP对USP47基因过表达稳转细胞株的 $IC_{50}$ (图3C), 结果发现过表达USP47基因后, DDP对HN4细胞的 $IC_{50}$ 由2.98 μmol/L升至12.34 μmol/L, 而DDP对HN30细胞的 $IC_{50}$ 由3.76 μmol/L升至7.41 μmol/L。

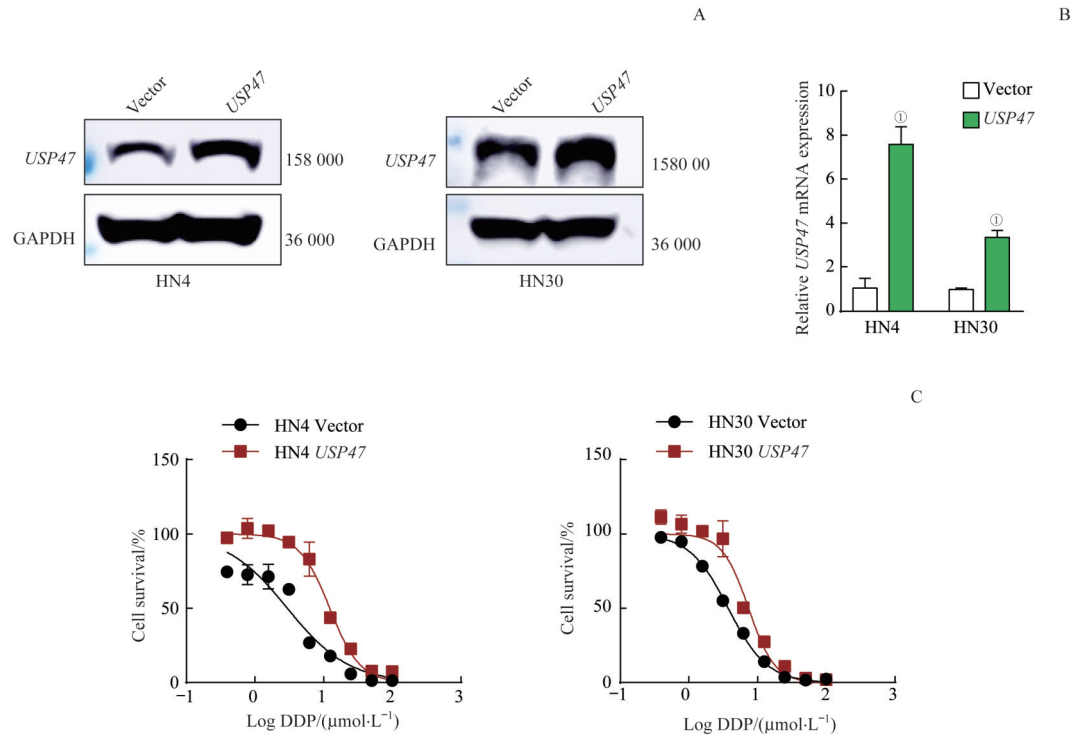
### 2.4 敲除USP47基因提高HNSCC细胞对DDP的敏感性

RT-PCR和免疫印迹实验检测USP47的敲除效率, 结果表明HN4/DDP和HN30/DDP中USP47的蛋白及mRNA表达水平显著下降, 差异具有统计学意义(图4A、4B)。通过MTT法检测DDP对处理组和对照组细胞的 $IC_{50}$ , 发现敲除USP47基因后, 耐药株HN4/DDP和HN30/DDP的 $IC_{50}$ 均下降; HN4/DDP细胞的 $IC_{50}$ 由39 μmol/L降至26.02 μmol/L, 而HN30/DDP细胞的 $IC_{50}$ 由33.45 μmol/L降至20.26 μmol/L(图4C)。

### 2.5 过表达USP47对HNSCC细胞增殖、克隆形成及凋亡的影响

细胞增殖实验和平板克隆形成实验结果显示, 过表达USP47后, HNSCC细胞的增殖能力显著减弱(图5A), 克隆形成能力也下降(图5B)。通过流式细胞技术检测过表

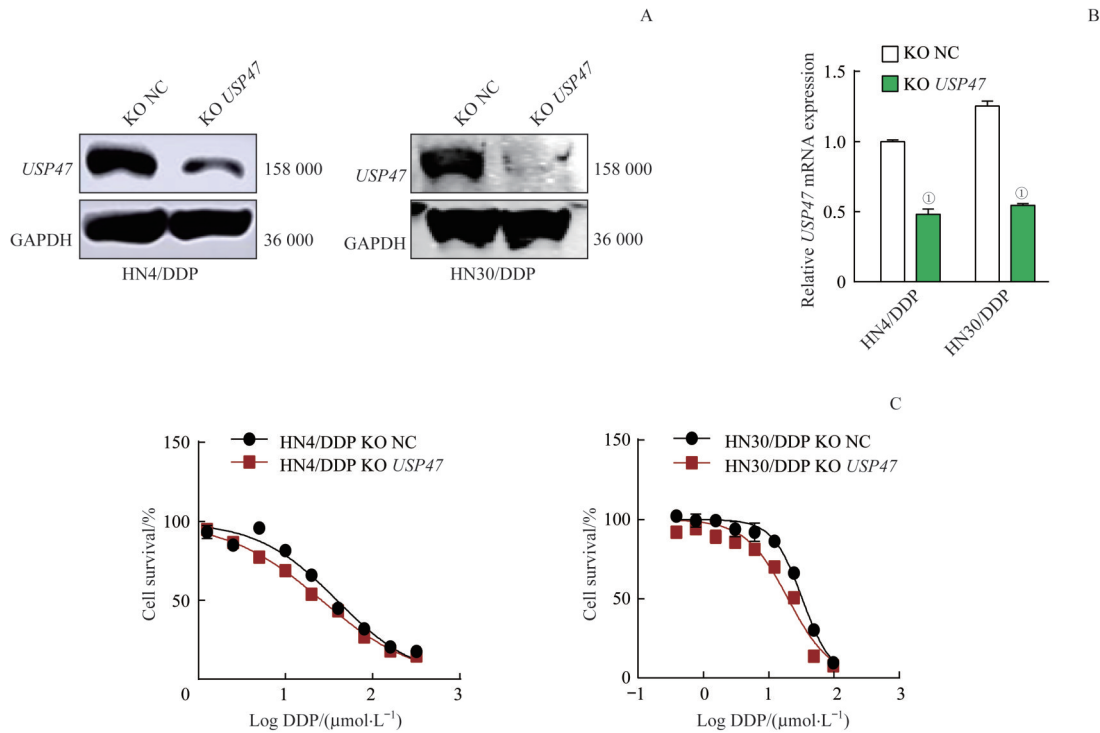
达 *USP47* 后 HNSCC 细胞的凋亡变化, 结果发现, 过表达 *USP47* 后, HN4 和 HN30 的基础凋亡率与对照组相比无明显改变 (图 5C); 而在 DDP 的作用下, 过表达 *USP47* 的 HN4 和 HN30 细胞, 其凋亡率出现明显下降 (图 5D)。



**Note:** A. Western blotting analysis of USP47 protein levels in overexpressing stable cell lines. B. *USP47* mRNA expression in overexpressing stable cell lines detected by RT-PCR. C. The  $IC_{50}$  of DDP on *USP47* overexpression stable cell lines checked by MTT. <sup>①</sup>  $P=0.000$ , compared with the Vector group.

图3 *USP47* 基因过表达增强 HNSCC 细胞对 DDP 的抵抗能力

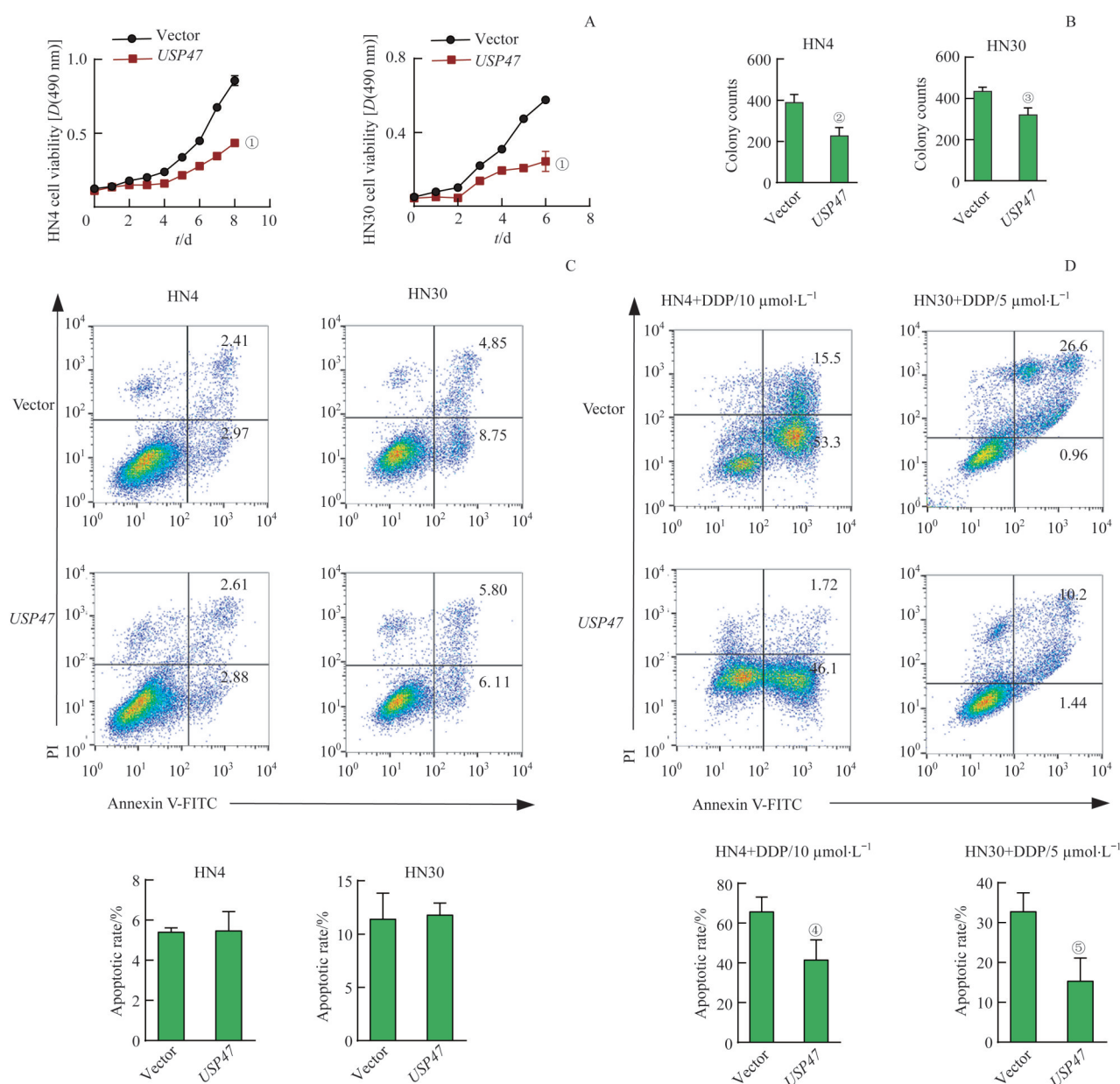
Fig 3 Overexpression *USP47* gene increases cell's resistance to DDP



**Note:** A. Western blotting analysis of USP47 protein levels in *USP47* knocking out cell lines. B. *USP47* mRNA expression in *USP47* knocking out cell lines detected by RT-PCR. C.  $IC_{50}$  of DDP on *USP47* knocking out cell lines checked by MTT. <sup>①</sup>  $P=0.000$ , compared with the KO NC group.

图4 敲除 *USP47* 基因逆转 HNSCC 细胞对 DDP 的耐药

Fig 4 Knocking out *USP47* gene reverses cell's resistance to DDP



**Note:** A. Overexpression of *USP47* in HN4 and HN30 cells inhibited the proliferation of tumor cells. B. Overexpression of *USP47* significantly inhibited the colony formation of tumor cells. C. Flow cytometry analysis of the effect of *USP47* overexpression on apoptosis of HN4 and HN30 cells. D. Flow cytometry analysis of the resistance of HN4 and HN30 to DDP-induced apoptosis after overexpression of *USP47*. ① $P=0.000$ , ② $P=0.005$ , ③ $P=0.006$ , ④ $P=0.003$ , ⑤ $P=0.015$ , compared with the Vector group.

**图5** 过表达 *USP47* 对 HNSCC 细胞的增殖、克隆形成和凋亡的影响

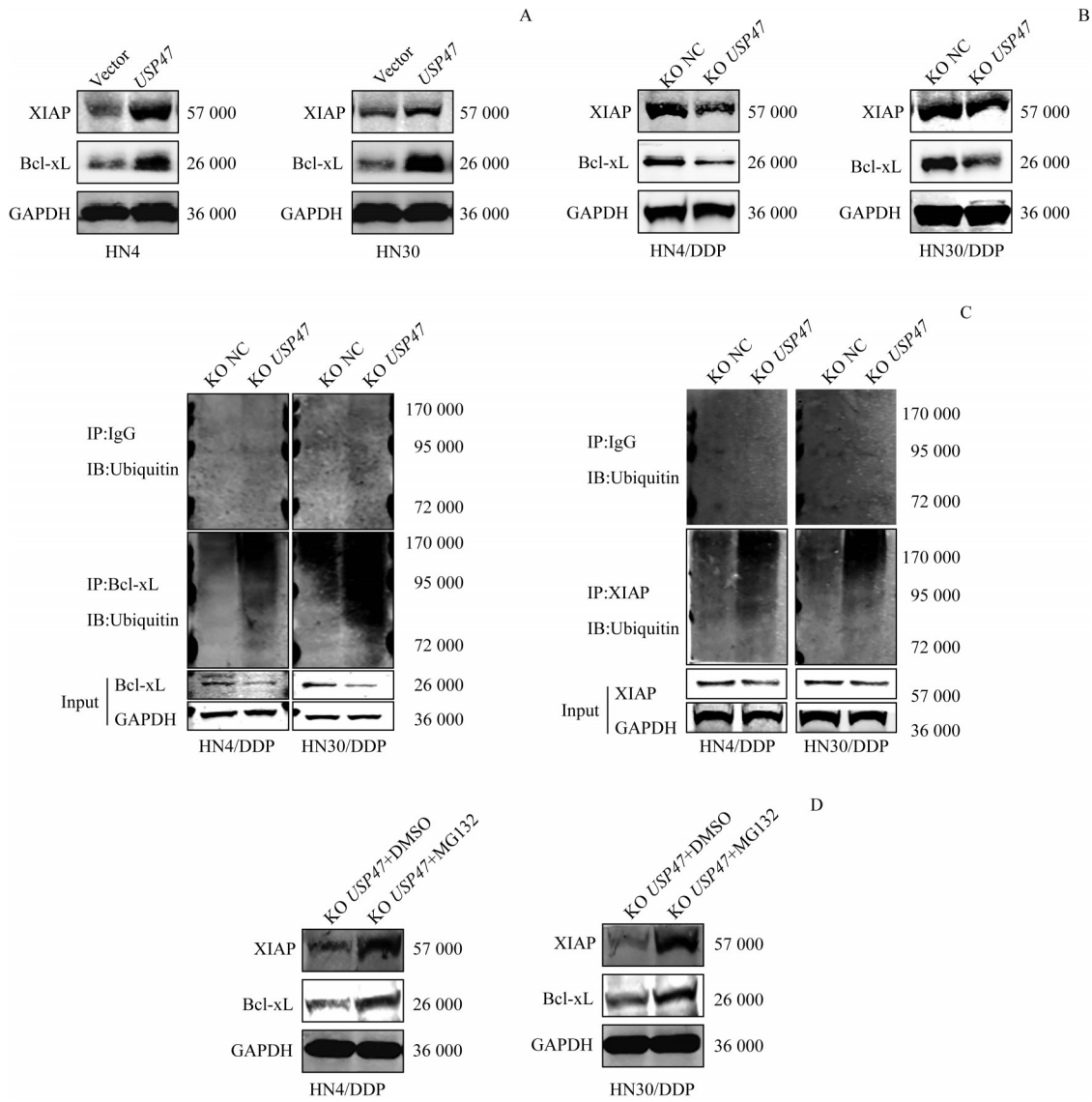
**Fig 5** Effect of *USP47* gene overexpression on cell proliferation, colony formation and apoptosis

## 2.6 过表达 *USP47* 促进抗凋亡蛋白的表达

免疫印迹实验结果显示, 在 HN4 和 HN30 细胞中过表达 *USP47* 后, 抗凋亡蛋白 XIAP 和 Bcl-xL 表达水平均显著升高 (图 6A); 相应地, 敲除 HN4/DDP 和 HN30/DDP 细胞中 *USP47* 基因后, XIAP 和 Bcl-xL 的表达水平则明显下降 (图 6B)。进一步的泛素化实验结果显示, 敲除 *USP47* 后, XIAP 和 Bcl-xL 蛋白的泛素化水平升高, 蛋白自身表达水平下降 (图 6C); 而在抑制泛素化蛋白的降解“场所”——蛋白酶体的活性后, XIAP 和 Bcl-xL 的表达水平相比对照组明显升高 (图 6D)。

## 2.7 抗凋亡蛋白表达下调阻断 *USP47* 基因过表达诱导的 DDP 耐药性

在 *USP47* 基因过表达稳转细胞中, 利用 siRNA 技术降低抗凋亡蛋白 XIAP 和 Bcl-xL 的表达量, 观察 DDP 对其  $IC_{50}$  的影响, 结果显示 (图 7): HN4 *USP47* 对照组细胞 (HN4 *USP47*+si NC) 的 DDP  $IC_{50}$  为 12.09  $\mu\text{mol/L}$ , 而实验组细胞 (HN4 *USP47*+si XIAP 和 HN4 *USP47*+si Bcl-xL) 的 DDP  $IC_{50}$  分别为 2.80 和 3.71  $\mu\text{mol/L}$ ; HN30 *USP47* 对照组细胞 (HN30 *USP47*+si NC) 的 DDP  $IC_{50}$  为 7.41  $\mu\text{mol/L}$ , 而实验组细胞 (HN30 *USP47*+si XIAP 和

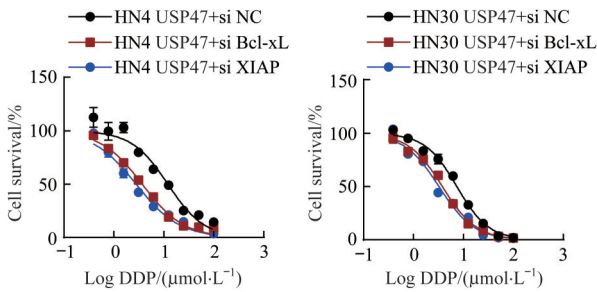


**Note:** A. XIAP and Bcl-xL protein levels in *USP47* overexpression stable cell lines. B. XIAP and Bcl-xL protein levels in knocking out *USP47* cell lines. C. Ubiquitination level of XIAP and Bcl-xL protein levels in knocking out *USP47* cell lines. D. XIAP and Bcl-xL protein levels in knocking out *USP47* cell lines after inhibiting proteasome.

**图6** 免疫印迹实验检测 *USP47* 过表达对抗凋亡蛋白表达的影响

**Fig 6** Effect of *USP47* overexpression on expression of anti-apoptotic proteins by Western blotting

HN30 USP47+si Bcl-xL) 的 DDP  $IC_{50}$  分别为 3.25 和 3.80  $\mu\text{mol/L}$ 。抗凋亡蛋白 XIAP 和 Bcl-xL 表达降低阻断了 *USP47* 基因过表达诱导的 DDP 耐药性。



**图7** 抗凋亡蛋白表达下调阻断 *USP47* 基因过表达诱导的 DDP 耐药性

**Fig 7** Down-regulation of anti-apoptotic protein blocks DDP resistance induced by overexpression of *USP47* gene

### 3 讨论

大多数耐药株的诱导方式是反复间歇性给予高浓度药物。在本研究中, 若一开始即使用高浓度的 DDP 刺激细胞, 会导致细胞大量死亡, 很难诱导成耐药株。因此, 本研究采用渐进式升高 DDP 浓度的方法, 并且每一个浓度都至少传代 3 次, 以保证提高浓度时大部分细胞可以很好地生存。整个诱导周期在 6 个月左右。采用 MTT 法检测 DDP 对 HNSCC 细胞的  $IC_{50}$ , 判断 DDP 耐药株的诱导情况。诱导成功的 2 个细胞株均在正常培养基中培养, 经检测, 2 个细胞株对 DDP 的耐药性是稳定的。

DDP 作为治疗肿瘤的一线药物, 由于内源或获得性



的耐药性而严重限制了其在临床中的使用,也因此导致了HNSCC患者总体预后较差。针对DDP耐药性分子机制的研究较多,例如药物积累的减少、DNA损伤修复的增加、凋亡信号通路的抑制等。研究<sup>[8,13]</sup>表明,去泛素化酶在参与转移及凋亡途径中发挥调节作用,因而被认为是癌症治疗中有希望的新型药物靶标。

在本研究中,我们发现HNSCC耐药细胞中去泛素化酶USP47表达量升高,且与DDP耐受浓度呈正相关。本研究证实了USP47可以提高DDP对HNSCC细胞的 $IC_{50}$ ,而抑制USP47的表达可以降低 $IC_{50}$ 。同时,本研究还发现USP47过表达会抑制细胞的凋亡,同时抑制细胞的增殖和克隆形成能力。机制研究显示,USP47基因过表达可以显著提高抗凋亡蛋白XIAP和Bcl-xL的蛋白表达量;泛素化测定实验证实了USP47基因通过降低抗凋亡蛋白XIAP和Bcl-xL的泛素化水平导致其表达量升高;敲低抗凋亡蛋白XIAP和Bcl-xL的表达明显阻断了USP47基因过表达诱导的DDP耐药性。

XIAP是已知的功能强大的调控凋亡的蛋白<sup>[14]</sup>,可以直接抑制半胱天冬氨酸蛋白酶(caspases)家族的活性<sup>[15-16]</sup>。XIAP在大多数肿瘤细胞中过表达,其表达水平与肿瘤的恶性进展、复发、预后以及肿瘤化疗耐药密切相关<sup>[17]</sup>。Bcl-xL蛋白属于Bcl-2家族,位于线粒体外膜上,通常与Bcl-2形成同源二聚体抑制细胞凋亡<sup>[18]</sup>。有研究<sup>[19-20]</sup>表明,在DDP耐药的肿瘤细胞中检测到Bcl-xL的表达显著升高。本研究结果证实了XIAP和Bcl-xL是去泛素化酶USP47的潜在底物;USP47通过降低XIAP和Bcl-xL蛋白的泛素化修饰水平,提高二者的蛋白表达水平,从而发挥促进HNSCC细胞化疗耐药的生物学效应。

综上所述,USP47过表达可以抑制HNSCC细胞的增殖和克隆形成,通过降低抗凋亡蛋白XIAP和Bcl-xL的泛素化水平导致其表达量升高进而抑制细胞凋亡,提高HNSCC细胞的DDP耐药性。该研究结果提示USP47可能有望成为治疗HNSCC的潜在靶基因,探讨其作用机制可为DDP耐药的临床研究提供新思路。

## 参 · 考 · 文 · 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] Chinn SB, Myers JN. Oral cavity carcinoma: current management, controversies, and future directions[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(29): 3269-3276.
- [3] Hedberg ML, Goh G, Chiosea SI, et al. Genetic landscape of metastatic and recurrent head and neck squamous cell carcinoma[J]. J Clin Invest, 2016, 126(4): 1606.
- [4] Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine[J]. Pharmacol Res, 2016, 106: 27-36.
- [5] Gibson MK, Li Y, Murphy B, et al. Randomized phase III evaluation of cisplatin plus fluorouracil versus cisplatin plus paclitaxel in advanced head and neck cancer (E1395): an intergroup trial of the Eastern Cooperative Oncology Group[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(15): 3562-3567.
- [6] Clague MJ, Barsukov I, Coulson JM, et al. Deubiquitylases from genes to organism[J]. Physiol Rev, 2013, 93(3): 1289-1315.
- [7] Harrigan JA, Jacq X, Martin NM, et al. Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities[J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17(1): 57-78.
- [8] Naghavi L, Schwalbe M, Ghanem A, et al. Deubiquitinylase USP47 promotes RelA phosphorylation and survival in gastric cancer cells[J]. Biomedicines, 2018, 6(2): E62.
- [9] Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1695(1-3): 189-207.
- [10] Pfoh R, Lacedao IK, Saridakis V. Deubiquitinases and the new therapeutic opportunities offered to cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2015, 22(1): T35-T54.
- [11] Shi JD, Liu YJ, Xu XH, et al. Deubiquitinase USP47/UBP64E regulates  $\beta$ -catenin ubiquitination and degradation and plays a positive role in wnt signaling[J]. Mol Cell Biol, 2015, 35(19): 3301-3311.
- [12] Choi BJ, Park SA, Lee SY, et al. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells through ubiquitin-specific protease 47-mediated stabilization of Snail: a potential role of Sox9[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15918.
- [13] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: asystematic analysis for the global burden of disease study[J]. JAMA Oncol, 2017, 3(4): 524-548.
- [14] Mansouri A, Zhang QX, Ridgway LD, et al. Cisplatin resistance in an ovarian carcinoma is associated with a defect in programmed cell death control through XIAP regulation[J]. Oncol Res, 2003, 13(6): 399-404.
- [15] Qian H, Huang T, Chen Y, et al. X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibitor Embelin induces apoptosis via PI3K/Akt pathway and inhibits invasion in osteosarcoma cells[J]. J Cancer Res Ther, 2018, 14(Supplement): S648-S655.
- [16] DPDC Tirapelli, Lustosa IL, Menezes SB, et al. High expression of XIAP and Bcl-2 may inhibit programmed cell death in glioblastomas[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2017, 75(12): 875-880.
- [17] Yang TW, Gao YX, Liu DJ, et al. ASP2 enhances chemotherapeutic sensitivity through the down-regulation of XIAP expression in a p53 independent manner in hepatocellular carcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 508(3): 769-774.
- [18] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [19] Yang XK, Zheng F, Xing H, et al. Resistance to chemotherapy-induced apoptosis via decreased caspase-3 activity and overexpression of antiapoptotic proteins in ovarian cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130(7): 423-428.
- [20] Williams J, Lucas PC, Griffith KA, et al. Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease[J]. Gynecol Oncol, 2005, 96(2): 287-295.

[收稿日期] 2020-05-12

[本文编辑] 吴洋

