

论著·基础研究

去泛素化酶 USP38 通过稳定 RBM14 促进胃癌进展的机制研究

陈赟琪, 那迪娜·帕尔哈提, 张鹏善[#], 黄 陈[#]

上海交通大学医学院附属第一人民医院胃肠外科, 上海 200080

[摘要] **目的**·探讨去泛素化酶泛素特异性肽酶 38 (ubiquitin-specific peptidase 38, USP38) 在胃癌中的表达特征、临床预后价值及其促癌分子机制, 并鉴定下游关键靶点核糖核酸结合基序蛋白 14 (RNA-binding motif protein 14, RBM14)。**方法**·收集 50 例在上海交通大学医学院附属第一人民医院胃肠外科接受手术治疗的胃癌患者的肿瘤及癌旁组织标本, 利用实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法验证 USP38 在胃癌中的表达, 并使用癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 和基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 分析胃癌患者临床特征与 USP38 表达水平的相关性; 通过基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)、基因本体论 (Gene Ontology, GO) 及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 预测 USP38 相关信号通路。结合文献报道与 Pearson 相关性分析结果筛选 USP38 的潜在底物。采用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 试剂盒、克隆形成及划痕实验评估 USP38 对 AGS、HGC-27 胃癌细胞增殖和迁移的影响; 利用慢病毒载体包装靶向 USP38 的短发夹核糖核酸 (short hairpin RNA, shRNA) 构建稳定敲低细胞株, 并通过功能回补 (rescue) 实验验证 USP38-RBM14 调控轴的生物学功能。**结果**·TCGA 数据库分析显示, USP38 在胃癌组织中显著高表达 ($P<0.001$), 其表达水平与患者较短的总生存期 (Log-rank $P<0.001$, $HR=1.36$) 及病理分期 ($P=0.017$) 呈正相关, GSEA 分析发现 USP38 高表达组显著富集于 G2/M 期检查点、早期 2 因子 (early 2 factor, E2F) 靶点、核斑点及 DNA 损伤修复等通路 (调整后 P 值均 <0.001), 且敲低 USP38 能够下调增殖及间质标志物的表达。功能实验证实敲低 USP38 可显著抑制胃癌细胞增殖与迁移 (均 $P<0.05$)。Pearson 相关性分析显示, USP38 与其潜在结合蛋白 RBM14 的表达呈显著正相关 ($R=0.22$, $P<0.001$)。进一步研究发现, 敲低 USP38 可降低 RBM14 蛋白水平, 而蛋白酶体抑制剂及放线菌酮 (cycloheximide, CHX) 实验表明 USP38 在蛋白质翻译后水平稳定 RBM14。功能回补实验显示, 过表达 RBM14 可部分恢复 USP38 敲低对胃癌细胞的抑制效应, 证实 USP38 通过稳定 RBM14 蛋白发挥促癌作用。**结论**·USP38 在胃癌中高表达且与患者不良预后相关; 敲低 USP38 能够抑制胃癌细胞增殖和迁移。USP38 可通过稳定 RBM14 蛋白促进胃癌进展。

[关键词] 胃癌; 泛素特异性肽酶 38; 核糖核酸结合基序蛋白 14; 去泛素化酶**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2026.08.005 **[中图分类号]** R735.2 **[文献标志码]** A

Deubiquitinase USP38 promotes gastric cancer progression by stabilizing RBM14

Chen Yunqi, Nadina Paerhati, Zhang Pengshan[#], Huang Chen[#]

Department of Gastrointestinal Surgery, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the expression characteristics and clinical prognostic value of the deubiquitinating enzyme ubiquitin-specific peptidase 38 (USP38) in gastric cancer, as well as its pro-oncogenic molecular mechanism, and to identify the downstream key target RNA-binding motif protein 14 (RBM14). **Methods**·Tumor and adjacent non-tumor tissue specimens were collected from 50 patients with gastric cancer who underwent surgical treatment at the Department of Gastrointestinal Surgery, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. Quantitative real-time PCR and Western blotting

[基金项目] 国家自然科学基金 (82203751, 82472921); 上海交通大学“交大之星”计划医工交叉研究基金 (24X010301419)。**[通信作者]** 黄 陈, 主任医师, 博士; 电子信箱: richard-hc@hotmail.com。张鹏善, 助理研究员, 博士; 电子信箱: zhangpengshanxc@163.com。[#]为共同通信作者。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (82203751, 82472921); Shanghai Jiao Tong University "JiaoDa Star" Medical-Engineering Interdisciplinary Research Fund (24X010301419)。**[Corresponding Author]** Huang Chen, E-mail: richard-hc@hotmail.com. Zhang Pengshan, E-mail: zhangpengshanxc@163.com. [#]Co-corresponding authors.**[网络首发]** <https://link.cnki.net/urlid/31.2045.R.20260813.1330.006> (2026-08-13 15:40:37)。

were used to verify the expression of USP38 in gastric cancer, and data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Gene Expression Omnibus (GEO) were used to analyze the correlation between the clinical characteristics of patients with gastric cancer and *USP38* expression levels. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), Gene Ontology (GO), and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses were performed to predict USP38-related signaling pathways. Potential substrates of USP38 were screened by combining published literature with the results of Pearson correlation analysis. The effects of USP38 on the proliferation and migration of AGS and HGC-27 gastric cancer cells were assessed using the cell counting kit-8 (CCK-8), 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assay, colony formation assay, and wound healing assay. A stable knockdown cell line was constructed using lentiviral vectors carrying short hairpin RNA (shRNA) targeting *USP38*, and functional rescue experiments were performed to validate the biological function of the USP38-RBM14 regulatory axis. **Results**·TCGA data analysis showed that *USP38* was significantly highly expressed in gastric cancer tissues ($P<0.001$), and its expression level was positively correlated with shorter overall survival (log-rank $P<0.001$, $HR=1.36$) and pathological stage ($P=0.017$). GSEA analysis revealed that the high-*USP38*-expression group was significantly enriched in the G2/M checkpoint, early 2 factor (E2F) targets, nuclear speckles, and DNA damage repair pathways (all adjusted P value <0.001), and knockdown of *USP38* downregulated the expression of proliferation- and mesenchymal-related markers. Functional experiments confirmed that *USP38* knockdown significantly inhibited the proliferation and migration of gastric cancer cells ($P<0.05$). Pearson correlation analysis revealed that the expression levels of USP38 and its potential binding protein RBM14 were significantly positively correlated ($R=0.22$, $P<0.001$). Further studies revealed that *USP38* knockdown decreased RBM14 protein levels, and experiments with a proteasome inhibitor and cycloheximide (CHX) indicated that USP38 stabilized RBM14 at the post-translational level. Functional rescue experiments showed that *RBM14* overexpression partially reversed the inhibitory effect of *USP38* knockdown on gastric cancer cells, confirming that USP38 promoted gastric cancer progression by stabilizing RBM14 protein. **Conclusion**·USP38 is highly expressed in gastric cancer and is associated with poor patient prognosis; knocking down *USP38* can inhibit the proliferation and migration of gastric cancer cells. USP38 exerts an oncogenic effect by stabilizing the RBM14 protein.

[Key words] gastric cancer; ubiquitin-specific peptidase 38 (USP38); RNA-binding motif protein 14 (RBM14); deubiquitinase

胃癌是全球常见的消化道恶性肿瘤之一，其发病率和死亡率均高居第5位^[1]。中国是胃癌高发的国家^[2]，尽管手术与综合治疗手段不断进步，但由于缺乏特异性早期诊断标志物及有效治疗靶点，晚期患者预后依然不佳。因此，深入探究胃癌背后的分子调控机制具有重要临床意义。在分子层面，蛋白质稳态失衡是驱动胃癌恶性进展的重要机制，而泛素-蛋白酶体系统在其中发挥核心调控作用。去泛素化酶作为该系统的重要调节因子，通过水解泛素链调控底物蛋白的稳定性与功能^[3]。研究^[4]表明，去泛素化酶的异常表达与肿瘤细胞周期紊乱、凋亡逃逸及转移密切相关。靶向去泛素化酶已成为抗肿瘤药物研发的新兴方向。

泛素特异性肽酶 38 (ubiquitin-specific peptidase 38, USP38) 是 USP 家族去泛素化酶的重要成员，含有保守的半胱氨酸盒 (cysteine box, Cys-box) 和组氨酸盒 (histidine box, His-box) 催化结构域，能够通过调控底物蛋白稳定性，广泛参与 DNA 损伤修复、缺氧应答、免疫炎症等关键生物学过程^[5-6]。近年研究^[7-10]发现，USP38 的表达及其酶活性在恶性肿瘤、心血管疾病、免疫炎症、脂质代谢及病毒感染中表现出复杂调节作用。在分子水平上，USP38 不仅直接去

泛素化稳定多种转录因子和信号分子，还可通过对组蛋白 H2B 的去泛素化修饰影响下游基因转录活性^[11]。此外，USP38 的表达亦受到复杂的上游调控：如腺苷脱氨酶 RNA 特异性酶 (adenosine deaminase acting on RNA, ADAR) 通过非 RNA 编辑依赖方式促进其自动去泛素化以维持蛋白稳定^[12]，而甲基转移酶样 14 (methyltransferase-like 14, METTL14) 介导的 N⁶-甲基腺苷 (N⁶-methyladenosine, m⁶A) 修饰则在转录水平影响其信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) 的稳定性^[13]。USP38 在不同肿瘤中呈现功能异质性：在肾癌、结直肠癌中发挥抑癌作用，而在膀胱癌、肺癌中则促进肿瘤进展^[13-16]。新近研究^[17]揭示了 USP38 在胃癌中的促癌作用，证实其通过稳定鼠双微体 2 (murine double minute 2, MDM2) 下调肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, p53) 信号通路，进而抑制铁死亡并促进肿瘤增殖。然而，胃癌的恶性演进是一个多因素、多通路协同驱动的复杂过程。尽管 USP38 与 p53 轴的关联已被初步阐明，但该基因是否通过调控其他网络来发挥促癌功能，目前尚缺乏系统研究。

已有文献^[12]报道，USP38 可能与 RNA 结合基序蛋白 14 (RNA-binding motif protein 14, RBM14) 相

互结合。RBM14 不仅是核斑点的核心组成成分,还在转录辅助激活、RNA 剪接及 DNA 损伤应答中发挥重要作用^[18]。鉴于 USP38 的去泛素化特性与 RBM14 在亚细胞定位及功能上的高度契合,探讨 USP38 是否通过稳定 RBM14 来介导胃癌的恶性进展具有重要科学意义。据此,本研究拟验证 USP38 对胃癌细胞增殖和迁移的影响,探讨 USP38 参与的相关分子通路,并解析其对潜在下游底物 RBM14 的调控作用,旨在为确立新的胃癌标志物、开发新的靶向治疗方式提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床样本与细胞株培养

收集上海交通大学医学院附属第一人民医院胃肠外科接受外科手术治疗的 50 例胃癌患者的肿瘤及癌旁组织标本,经液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱,用于后续 RNA 提取。

实验所用人胚胎肾细胞 (HEK-293T)、人永生化胃黏膜上皮细胞 (GES-1) 以及人胃癌细胞系 (AGS、HGC-27、MKN-45、SNU-1、MKN-28、KATO-3、MGC-803) 均为实验室保存。HEK-293T 细胞用 DMEM 高糖培养基 (含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素双抗) 培养。GES-1 及胃癌细胞用 RPMI-1640 培养基 (含 10% 胎牛血清及 1% 双抗) 培养。所有细胞均置于 37 °C、含 5% 二氧化碳的细胞培养箱中。

1.2 主要试剂与仪器

USP38 兔多克隆抗体 (17767-1-AP)、增殖标志物 Ki-67 兔多克隆抗体 (27309-1-AP)、p53 兔多克隆抗体 (10442-1-AP)、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 兔多克隆抗体 (10205-2-AP)、N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 兔多克隆抗体 (22018-1-AP)、波形蛋白 (vimentin) 兔多克隆抗体 (10366-1-AP) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司, RBM14 兔多克隆抗体 (A13159) 及 β -肌动蛋白 (β -actin) 兔单克隆抗体 (AC026) 均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (G-21234) 购自美国 Invitrogen。RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清、Trizol 试剂、细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)

及增强化学发光液均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。放线菌酮 (cycloheximide, CHX)、蛋白酶体抑制剂 MG132、Dpn I 限制性内切酶购自上海皓元生物医药科技有限公司, KOD PLUS 聚合酶购自日本 TOYOBO, 质粒小量制备试剂盒购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司, 凝胶回收试剂盒及 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 试剂盒均购自上海碧云天生物技术股份有限公司。聚乙烯亚胺转染试剂购自武汉三鹰生物技术有限公司。聚合酶链式反应 (PCR) 引物和 pCDH-RBM14 质粒由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

Mateo FL 型倒置荧光显微镜 (Leica, 德国), PCR 扩增仪、NanoDrop 分光光度计、QuantStudio 6 型实时荧光定量 PCR 仪 (Thermo Fisher Scientific, 美国), 全自动化学发光成像仪 (上海天能科技有限公司), 多功能酶标仪 (Molecular Devices, 美国)。

1.3 蛋白质印迹法

收集细胞, 加入含蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀裂解液 (radioimmunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA 裂解液), 冰上裂解 30 min, 12 000×g 离心 10 min 取上清液。二辛可宁酸法 (bicinchoninic acid assay, BCA 法) 测定蛋白浓度后, 加入 5×上样缓冲液煮沸 10 min 变性。取 30 μ g 蛋白经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离 (浓缩胶 80 V, 分离胶 120 V), 湿转法 (300 mA 恒流, 90 min) 转至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride membrane, PVDF 膜)。用含吐温-20 的 Tris 缓冲盐水 (Tris-buffered saline with Tween-20, TBST) 配制 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入一抗 4 °C 孵育过夜 (USP38、Ki-67、p53、PCNA、N-cadherin、vimentin 兔多克隆抗体的稀释比例 1:3 000, RBM14 兔多克隆抗体、 β -actin 兔单克隆抗体稀释比例 1:3 000), TBST 洗膜 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (稀释比例 1:5 000), 室温孵育 1 h。TBST 洗膜后以增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 检测蛋白条带。

1.4 RNA 提取及实时荧光定量 PCR

采用 Trizol 法提取组织或细胞总 RNA。加入三氯

甲烷萃取后离心(12 000×g, 15 min),取水相加入异丙醇沉淀,用体积分数75%的乙醇洗涤2次,干燥后溶于焦碳酸二乙酯水(diethyl pyrocarbonate water, DEPC水)。使用分光光度计检测RNA纯度,要求A260/A280比值在1.8~2.0之间。取1 μg总RNA,使用反转录试剂盒在42 °C反应60 min,70 °C灭活5 min,合成互补脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid, cDNA)。

实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)反应体系(20 μL):SYBR Green预混液(SYBR Green Master Mix)10 μL、上下游引物各0.5 μL(终浓度250 nmol/L)、cDNA模板2 μL(约100 ng)、无核糖核酸酶水补至20 μL。以β-actin为内参,采用SYBR Green法在qPCR仪上进行检测。反应条件:95 °C预变性3 min;40个循环(95 °C变性10 s,60 °C退火/延伸30 s)。每个样品设置3个复孔,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物序列为:USP38上游引物,5'-TGTGAGACCTGGTGCTCTTGCA-3';USP38下游引物,5'-GGCTGTACTTGAAGGCAGACCA-3';β-actin上游引物,5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTTC-3';β-actin下游引物,5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'。

1.5 稳定转染及瞬时转染

取对数生长期的HEK-293T细胞接种于10 cm培养皿,待细胞汇合度达60%~70%时进行转染。转染采用聚乙烯亚胺试剂,按PEI与质粒质量比3:1将慢病毒包装质粒混合物加入无血清DMEM培养基中,室温孵育15 min后均匀滴加至细胞培养皿中。慢病毒包装质粒混合物包括:穿梭质粒10 μg、辅助包装质粒psPAX2 7.5 μg和pMD2.G 2.5 μg。穿梭质粒为靶向USP38的shRNA质粒pLKO1-shUSP38,或阴性对照(shNC)质粒pLKO.1-shNC,或RBM14过表达质粒pLV3-RBM14。shNC序列为5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3',shUSP38序列为5'-ACAAGATTCTTGTTAATAA-3'。转染6 h后更换为含10%胎牛血清的DMEM完全培养基,48 h和72 h后收集病毒上清液,0.45 μm滤膜过滤。病毒液与细胞培养基按1:1体积感染对数生长期胃癌细胞AGS和HGC-27,24 h后换液,48 h后加入嘌呤霉素筛选1~2周。通过蛋白质印迹法(Western blotting)及qPCR验证感染效率,建

立稳定敲低USP38或过表达RBM14的胃癌细胞株。

在稳定敲低USP38的AGS或HGC-27细胞中瞬时转染RBM14过表达质粒。细胞接种于6孔板,待汇合度达70%时,使用PEI将RBM14过表达质粒(pLV3-RBM14,2 μg/孔)转染细胞,同时转染空载体作为对照。6 h后更换为完全培养基,继续培养48 h。收集细胞用于后续功能实验。

1.6 细胞功能实验及回补实验

细胞功能实验中使用稳定敲低USP38的AGS及HGC-27细胞株(shUSP38组)和阴性对照细胞(shNC组)。功能回补(rescue)实验中,将RBM14过表达质粒pCDH-RBM14转染至shUSP38组细胞中。实验分为3组:shUSP38组、shNC+OE-RBM14组和shUSP38+OE-RBM14组。所有细胞均经嘌呤霉素筛选,并通过qPCR和蛋白质印迹法验证表达效率。

CCK-8增殖实验将上述细胞以 2×10^3 个/孔的密度接种于96孔板,分别于0、24、48、72 h加入CCK-8试剂,37 °C孵育2 h后于450 nm测定吸光度值。克隆形成实验以 1×10^3 个/孔的密度接种于6孔板,连续培养12 d,每5 d换液1次;终止后用4%多聚甲醛固定、0.1%结晶紫染色,计数含50个细胞以上的克隆数。EdU增殖实验采用10 μmol/L EdU标记细胞2 h,用Apollo 567染色,Hoechst 33342复染细胞核,在荧光显微镜下拍摄随机5个视野,ImageJ软件计算EdU阳性细胞比例。划痕实验待细胞汇合度达95%以上时,用200 μL无菌枪头划痕,经磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤后加入无血清培养基,于0 h和24 h在倒置显微镜下拍照,用ImageJ软件测量划痕宽度并计算迁移率。所有实验独立重复3次。

1.7 蛋白稳定性检测实验

为检测USP38对下游靶蛋白RBM14稳定性的调控作用,分别采用CHX追踪实验和蛋白酶体抑制剂MG132处理实验。将对照组(shNC组)和USP38敲低组(shUSP38组)的AGS及HGC-27胃癌细胞接种于6孔板,待细胞汇合度达80%时进行以下处理。CHX实验中,加入50 μg/mL CHX以抑制新蛋白合成,分别于0、2、4、6 h收集细胞,用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液提取总蛋白,通过蛋白质印

迹法检测 RBM14 蛋白水平,以 β -actin 为内参,计算各时间点蛋白残留百分比,比较 2 组间 RBM14 降解速率及半衰期。MG132 实验中,加入 10 μ mol/L MG132 处理 6 h 以抑制蛋白酶体活性,同时设置二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 处理组作为阴性对照;处理结束后收集细胞,提取总蛋白,蛋白质印迹法检测 RBM14 蛋白水平,并评估泛素化修饰变化。

1.8 数据库生物信息学分析

使用癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库胃腺癌 (stomach adenocarcinoma, STAD) 数据集分析 USP38 的表达特征及其对预后的评估价值,并依托 R 语言 (v4.5.2) 对原始数据进行校正、标准化处理及差异表达分析,共筛选出 407 例含有病理组织信息的患者。基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)、基因本体论 (Gene Ontology, GO) 及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 均通过 clusterProfiler 和 enrichplot R 软件包完成;人类基因注释使用 R 包 org.Hs.eg.db;基因集通过 msigdb 获取;差异表达分析使用 limma 包完成;可视化图形使用 tidyverse、ggpubr 和 patchwork 包绘制;相关性热图使用 corrplot 包绘制。使用 Kaplan-Meier Plotter 在线生存分析工具对基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 中的胃癌患者进行 Kaplan-Meier 生存分析^[19];以 USP38 表达量的中位数为临界值将患者划分为高、低表达 2 组,绘制 856 例患者总生存期的生存曲线,借助 Log-rank 检验评价组间总生存期差异的统计学意义。利用 Pearson 相关性分析考察 USP38 与增殖标志物、免疫检查点等关键分子的表达相关性。最后,以 $|R|>0.3$ 且 $P<0.05$ 为标准筛选与 USP38 表达相关的基因,分别进行 GSEA、GO 和 KEGG 分析,探索 USP38 相关基因参与胃癌调控的潜在分子通路。

1.9 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9.0、R 4.5.2 软件处理数据。定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。生存分析采用 log-rank 检验,结果以风险比 (HR) 展示。相关性分析采用 Pearson 相关分析,结果以相关系数

(R) 及其 P 值表示。对于 TCGA 数据库中 458 例含完整临床数据的胃癌患者,分析 USP38 表达水平与患者临床病理特征的关联性,定量资料组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验,定性资料组间比较采用 χ^2 检验。GSEA、GO 及 KEGG 富集分析采用调整后 P 值 (adjusted P value, P_{adj}) 进行多重假设检验校正,以控制假阳性率。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

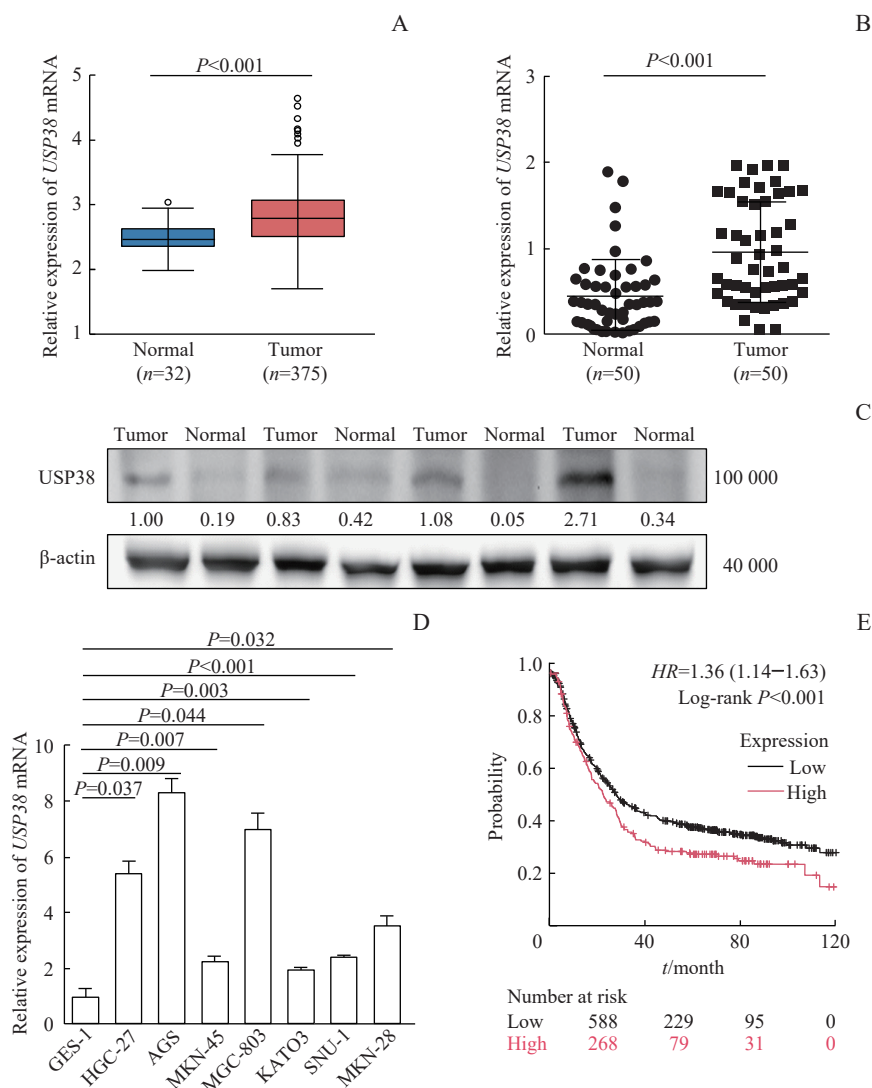
2.1 USP38 在胃癌中高表达且与晚期病理分期相关

通过 TCGA 数据库分析发现,胃癌组织中的 USP38 mRNA 水平显著高于正常组织 ($P<0.001$, 图 1A)。进一步在 50 对胃癌临床样本中验证, qPCR 和蛋白质印迹法结果显示 USP38 在癌组织中的表达量显著高于配对癌旁组织 ($P<0.001$, 图 1B、C)。细胞层面,与人正常胃黏膜上皮细胞系 GES-1 相比, USP38 在多种胃癌细胞系中均呈高表达,其中以 AGS 细胞的上调最为显著 ($P=0.009$, 图 1D)。此外,采用 Kaplan-Meier 法对 GEO 数据库的 856 例胃癌患者进行生存分析,结果显示 USP38 高表达组患者的总生存期显著短于低表达组 (Log-rank $P<0.001$, $HR=1.36$, 图 1E),提示 USP38 高表达与胃癌患者不良预后密切相关。上述结果表明, USP38 在胃癌组织中表达上调,可能作为促癌因子参与疾病进展。

随后纳入 TCGA 数据库中含完整临床信息的 458 例胃癌患者,以 USP38 表达水平中位数为界分为高、低表达组,分析 USP38 表达水平高低与临床病理参数的相关性。结果 (表 1) 表明, USP38 的表达与患者性别 ($P=0.005$) 及病理分期 ($P=0.017$) 显著相关。具体而言,高表达组中女性患者比例显著高于低表达组,而年龄分布差异则未见统计学意义。在临床特征方面,高表达组中 III 期 (45.1% vs 33.8%) 和 IV 期 (11.8% vs 9.7%) 患者的比例均高于低表达组,而低表达组中 II 期患者占比高于高表达组 (40.7% vs 26.5%)。综上所述, USP38 高表达与胃癌晚期分期密切相关,提示其可能参与肿瘤进展。

2.2 USP38 促进胃癌细胞增殖与迁移

为探究 USP38 对胃癌细胞生物学行为的影响,在 AGS 及 HGC-27 细胞中转染 shUSP38 构建 USP38 稳



Note: A. Expression of *USP38* mRNA in gastric cancer ($n=375$) and normal ($n=32$) tissues from the TCGA-stomach adenocarcinoma (STAD) database. B. *USP38* mRNA expression in 50 paired gastric cancer and adjacent normal tissues determined by qPCR. C. Detection of *USP38* expression in gastric cancer ($n=4$) and adjacent normal ($n=4$) tissues detected by Western blotting. The numbers indicate relative protein expression levels. D. qPCR analysis of *USP38* mRNA expression in different gastric cancer cell lines, compared with human normal gastric mucosal cells. E. Kaplan-Meier survival curves of gastric cancer patients ($n=856$) from GEO database according to *USP38* expression.

图1 *USP38*在胃癌组织及细胞中的表达模式及其对预后的影响

Fig 1 Expression of *USP38* in gastric cancer tissues and cells and its impact on prognosis

定敲低模型,同时转染 shNC 作为阴性对照。qPCR 结果显示,相较于 shNC 组,sh*USP38* 组 *USP38* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.001$,图 2A)。CCK-8 实验显示,敲低 *USP38* 后胃癌细胞的增殖速率显著下降 ($P<0.05$,图 2B)。平板克隆形成实验表明,sh*USP38* 组细胞形成的克隆数目减少、体积缩小 ($P<0.05$,图 2C),提示 *USP38* 参与维持胃癌细胞的群体增殖能力。与 shNC 组相比,sh*USP38* 组细胞中 EdU 阳性细胞比例显著降低 ($P<0.05$,图 2D),同样验证了敲低 *USP38* 可抑制胃癌细胞增殖。划痕愈合实验中,sh*USP38* 组细胞的愈合率在 24 h 后显著低于对照组

($P<0.05$,图 2E),表明敲低 *USP38* 可抑制胃癌细胞的迁移。因此,*USP38* 表达的下调可有效抑制胃癌细胞的增殖与迁移能力,提示其在胃癌恶性进展中发挥促进作用。

2.3 *USP38* 通过调控细胞周期、炎症信号及代谢重编程驱动胃癌恶性进展

为进一步探究 *USP38* 调控胃癌进展的分子机制,通过转录组相关性分析筛选与 *USP38* 表达高度相关的基因集。结果(图 3)显示,*USP38* 表达水平与 SWI/SNF 相关基质肌动蛋白依赖性染色体重塑因子 5

表1 USP38表达水平与胃癌临床病理特征相关性分析

Tab 1 Association between USP38 expression and clinicopathological characteristics of gastric cancer

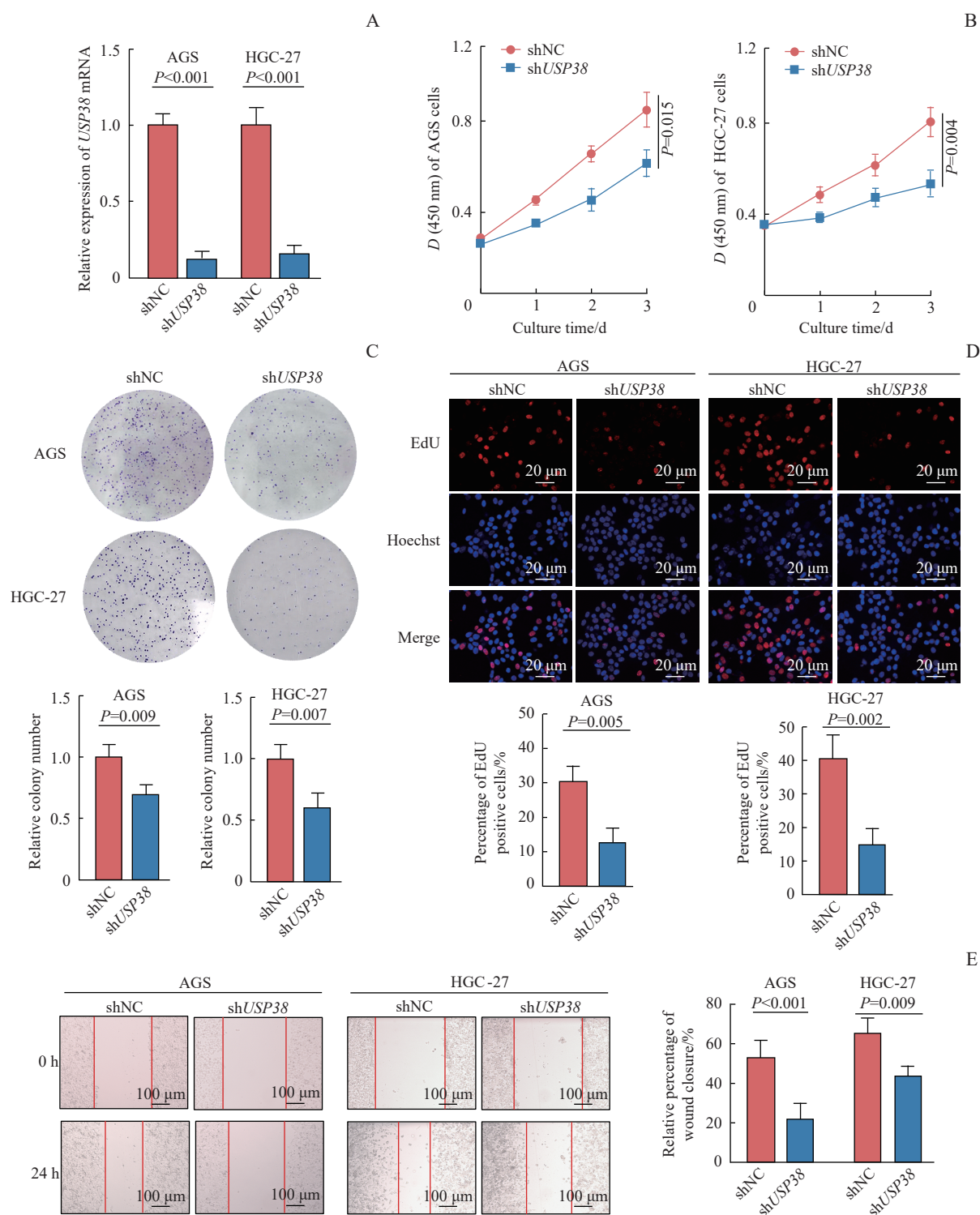
Variable	Overall (n =458)	Low (n =229)	High (n =229)	P value
Age/year	67.5 (58.0, 74.0)	67.0 (58.0, 72.0)	68.0 (60.0, 75.0)	0.051
Gender/n(%)				0.005
Female	167 (36.5)	69 (30.1)	98 (42.8)	
Male	291 (63.5)	160 (69.9)	131 (57.2)	
Histologic grade/n(%)				0.600
G1	13 (2.9)	6 (2.7)	7 (3.1)	
G2	168 (37.8)	88 (40.0)	80 (35.6)	
G3	264 (59.3)	126 (57.3)	138 (61.3)	
Pathologic stage/n(%)				0.017
Stage I	68 (16.2)	34 (15.7)	34 (16.7)	
Stage II	142 (33.8)	88 (40.7)	54 (26.5)	
Stage III	165 (39.3)	73 (33.8)	92 (45.1)	
Stage IV	45 (10.7)	21 (9.7)	24 (11.8)	
T stage/n(%)				0.066
T1	25 (5.7)	12 (5.2)	13 (6.1)	
T2	104 (23.5)	49 (21.4)	55 (25.8)	
T3	201 (45.5)	118 (51.5)	83 (39.0)	
T4	112 (25.3)	50 (21.8)	62 (29.1)	
N stage/n(%)				0.200
N0	141 (32.9)	81 (37.0)	60 (28.6)	
N1	120 (28.0)	61 (27.9)	59 (28.1)	
N2	88 (20.5)	38 (17.4)	50 (23.8)	
N3	80 (18.6)	39 (17.8)	41 (19.5)	
M stage/n(%)				0.800
M0	402 (93.3)	200 (93.0)	202 (93.5)	
M1	29 (6.7)	15 (7.0)	14 (6.5)	

Note: Subgroup totals may not sum to the overall total due to missing clinical information for some cases in TCGA database. Analyses were based on cases with available data. Data are presented as median (first quartile, third quartile) for continuous variables and as number (percentage) for categorical variables. Comparisons between USP38 high- and low-expression groups were performed using the Wilcoxon rank sum test for continuous variables and Pearson's χ^2 test for categorical variables.

(SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5, SMARCA5) ($R=0.76$, $P<0.001$)、跨膜蛋白 184C (transmembrane protein 184C, TMEM184C) ($R=0.74$, $P<0.001$) 及 OTU 结构域去泛素化酶 4 (OTU domain containing 4, OTUD4) ($R=0.69$, $P<0.001$) 等基因的表达水平呈强正相关。SMARCA5 作为染色质重塑复合物的关键亚基, 可参与染色体分离与基因组稳定性, 与 GO 富集分析中染色体分离及纺锤体通路的上调相吻合 (图 4A、B), 提示 USP38 可能通过协同此类因子确保胃癌细胞的高速有丝分裂进程。此外, USP38 表达水平与线粒体编码基因表达水平呈现

普遍负相关, 其中与氧化磷酸化核心亚基线粒体编码细胞色素 c 氧化酶 III (mitochondrially encoded cytochrome c oxidase III, MT-CO3)、线粒体编码 ATP 合酶 6 (mitochondrially encoded ATP synthase 6, MT-ATP6) 及线粒体编码 NADH 脱氢酶 3 (mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 3, MT-ND3) 的表达水平相关性尤为显著 (R 值 -0.43 – -0.39 , $P<0.001$)。这一负向关联提示 USP38 高表达可能伴随细胞能量代谢从氧化磷酸化向糖酵解模式转变。

随后, 对 TCGA 数据库中 USP38 高、低表达组的转录组数据进行 GSEA 分析。结果 (图 4A) 显示,



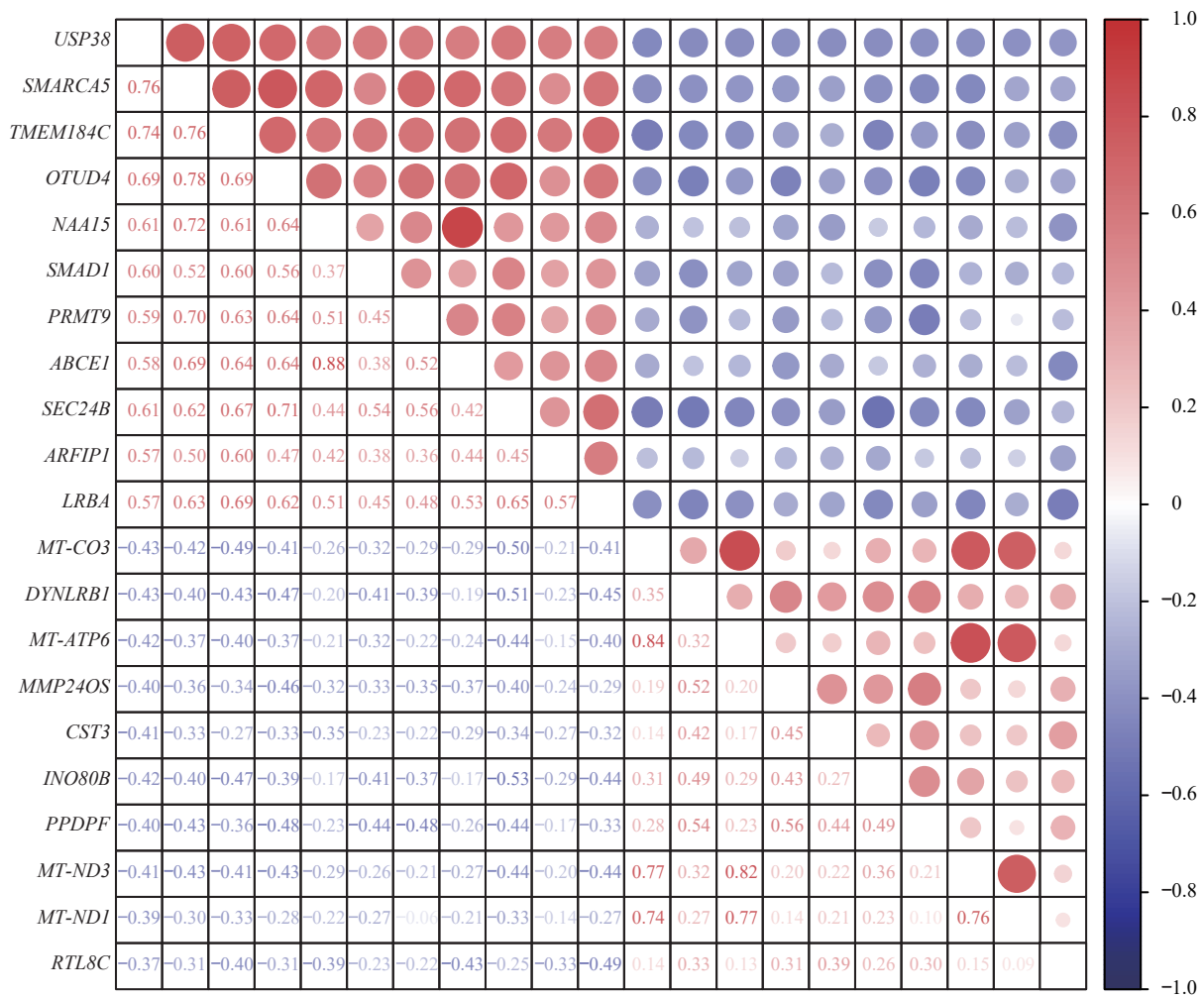
Note: A. Validation of *USP38* knockdown efficiency in AGS and HGC-27 gastric cancer cells by qPCR. B–D. CCK-8 assay (B), colony formation assay (C), and EdU assay (D) assessing the effect of *USP38* knockdown on the proliferation of AGS and HGC-27 gastric cancer cells. E. Wound healing assay examining the effect of *USP38* knockdown on the migration of AGS and HGC-27 gastric cancer cells. Data are presented as mean $\pm$ SD (unpaired *t*-test, sh*USP38* vs shNC).

图2 *USP38*促进胃癌细胞增殖和迁移的作用

Fig 2 Promotive effects of *USP38* on proliferation and migration of gastric cancer cells

*USP38*高表达组显著富集于细胞周期调控与免疫应答相关通路。其中, G2/M检查点通路富集 ($P_{\text{adj}} < 0.001$), 同时早期2因子 (early 2 factor, E2F) 靶基

因信号也显著上调 ($P_{\text{adj}} < 0.001$)。尽管 G2/M 检查点的激活理论上会阻碍细胞周期进程, 但 E2F 的上调可能促进 S 期向 G2/M 期的转换, 两者的综合作用在胃



Note: Color represents the Pearson correlation coefficient, with red indicating positive correlation and blue indicating negative correlation. *SMARCA5*—SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 5; *TMEM184C*—transmembrane protein 184C; *OTUD4*—OTU domain containing 4; *NAA15*—N- α -acetyltransferase 15 NatA auxiliary subunit; *SMAD1*—SMAD family member 1; *PRMT9*—protein arginine methyltransferase 9; *ABCE1*—ATP-binding cassette subfamily E member 1; *SEC24B*—SEC24 homolog B COP II coat complex component; *DYNLRB1*—dynein light chain roadblock-type 1; *MMP24OS*—MMP24 opposite strand; *CST3*—cystatin C; *INO80B*—INO80 complex subunit B; *PPDPF*—pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor; *RTL8C*—retrotransposon Gag-like 8C; *ARFIP1*—ADP-ribosylation factor interacting protein 1; *LRBA*—lipopolysaccharide responsive beige-like anchor protein.

图3 与 USP38 表达水平相关的基因热图

Fig 3 Heatmap of genes correlated with USP38 expression

癌中尚不清楚。然而，USP38 高表达整体上表现为促增殖特征，提示 USP38 可能通过多种机制促进肿瘤进展。干扰素 γ 响应及核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 介导的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 信号通路的显著激活 ($P_{\text{adj}} < 0.001$), 表明 USP38 在胃癌免疫微环境重塑及炎症信号转导中也具有潜在作用。

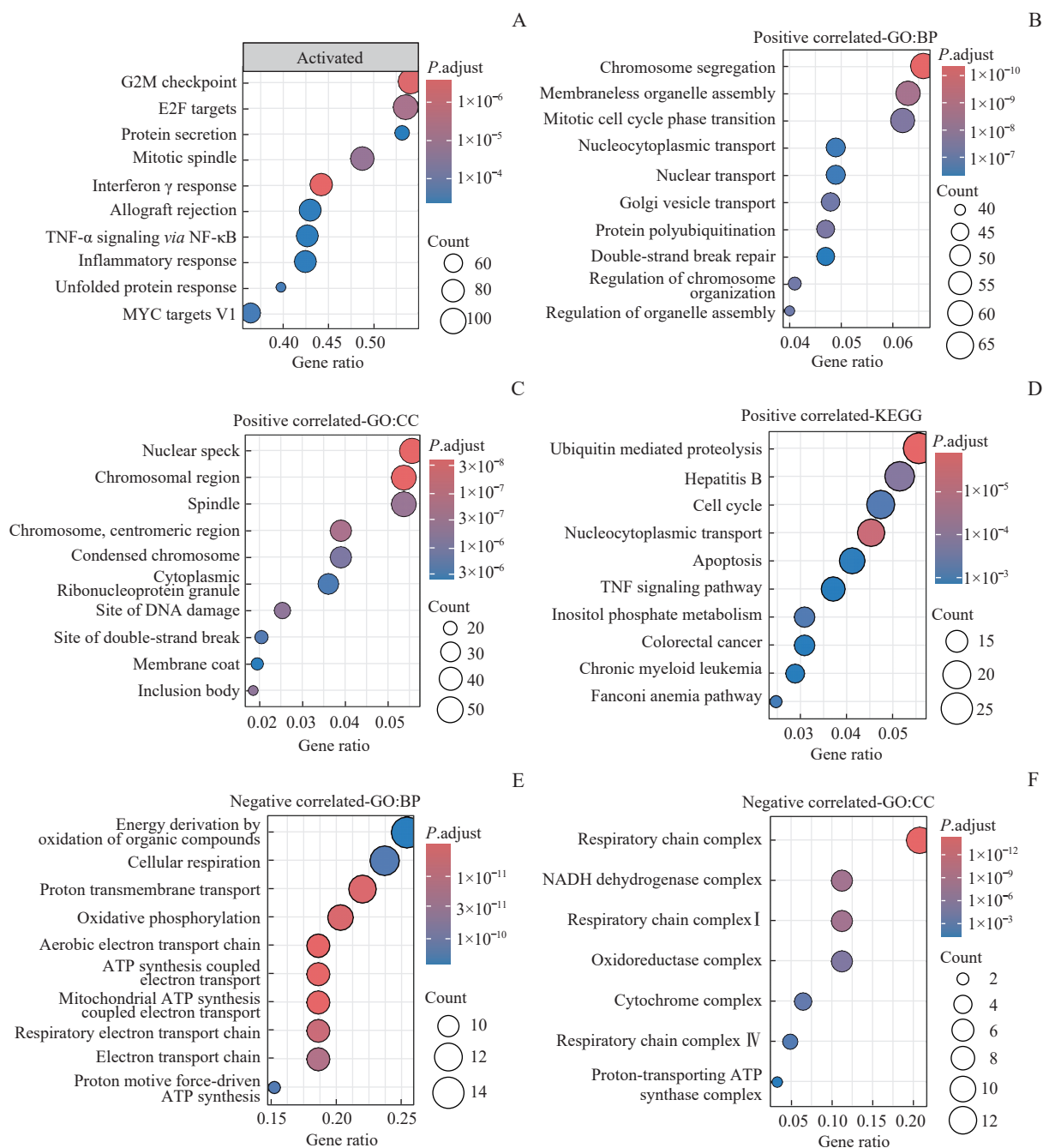
在基因功能注释层面，这一预测得到进一步印证。对 USP38 表达显著相关 ($|R| > 0.3$, $P < 0.05$) 的基因开展 GO 富集分析，结果显示正相关基因主要参与染色体分离、无膜细胞器组装及有丝分裂细胞周期转

变等过程 (均 $P_{\text{adj}} < 0.001$, 图 4B)。细胞组分分析也证实这些基因表达的产物主要定位于核斑点、染色体区域及纺锤体 (均 $P_{\text{adj}} < 0.001$, 图 4C)。核斑点是 RNA 剪接的核心场所，提示 USP38 的下游底物可能与定位于核斑点的 RNA 结合蛋白有关。同时，着丝粒区域与 DNA 损伤位点的富集进一步提示 USP38 可能参与维持基因组稳定性及调控有丝分裂。KEGG 通路分析表明，这些基因在泛素介导的蛋白质水解通路中高度富集，印证了 USP38 的去泛素化酶功能 (均 $P_{\text{adj}} < 0.001$, 图 4D)。此外，这些基因还显著富集于细胞周期、核质转运、凋亡、TNF 信号转导等通路，同时

与乙型肝炎、结直肠癌、慢性髓细胞性白血病等多种疾病相关。

另一方面, 与 *USP38* 表达显著负相关的基因则高

度富集于能量代谢相关通路 (均 $P_{\text{adj}} < 0.001$, 图 4E、F), 涉及有机化合物氧化、氧化磷酸化及线粒体 ATP 合成等核心过程。



Note: A. GSEA bubble plot (TCGA-STAD) showing the top 10 hallmark pathways activated in the *USP38*-high expression group. B–D. Enrichment analyses of genes positively correlated with *USP38*: GO biological process (B), GO cellular component (C), and KEGG pathway (D). E/F. Enrichment analyses of genes negatively correlated with *USP38*: GO biological process (E), and GO cellular component (F).

图4 *USP38*相关基因在胃癌中的通路富集分析

Fig 4 Pathway enrichment analysis of *USP38*-related genes in gastric cancer

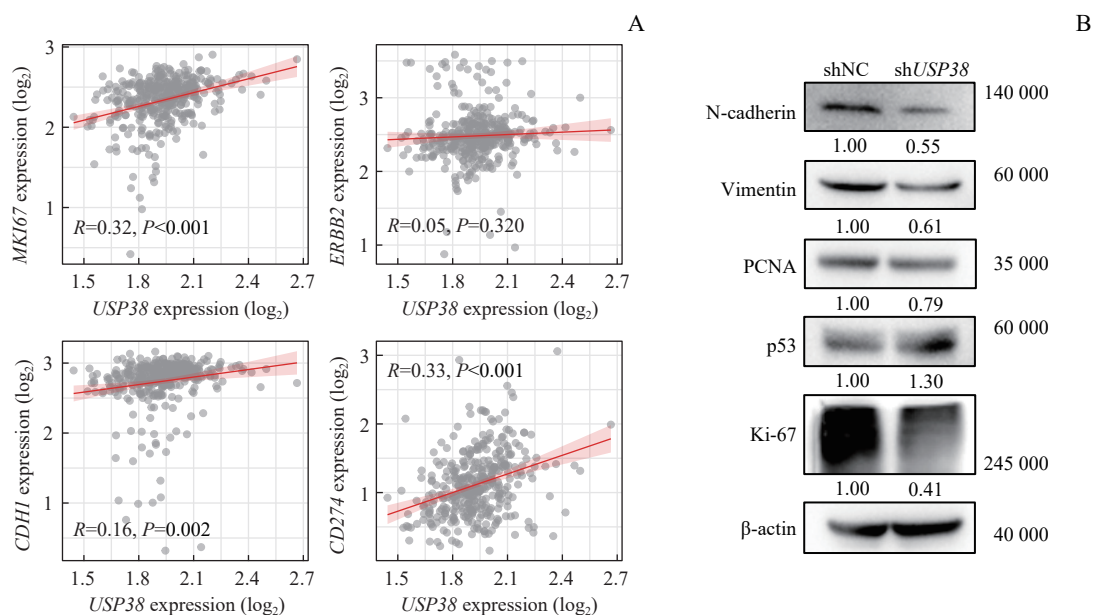
为验证上述发现与肿瘤恶性行为的相关性, 通过 Pearson 相关性分析探讨 *USP38* 表达水平与肿瘤相关标志物的表达的关系。结果 (图 5A) 显示, *USP38*

表达水平与增殖标志物 *MKI67* ($R=0.32$, $P<0.001$)、免疫检查点标志物 *CD274* (即程序性死亡配体 1, programmed death-ligand 1, *PD-L1*) ($R=0.33$, $P<$

0.001) 呈显著正相关, 与上皮标志物钙黏蛋白 1 (cadherin 1, *CDH1*, 即 E-钙黏蛋白, E-cadherin) 亦呈显著正相关 ($R=0.16$, $P=0.002$), 但与 Erb-B2 受体酪氨酸激酶 2 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2, *ERBB2*, 即人表皮生长因子受体 2, human epidermal growth factor receptor 2, *HER2*) 无显著相关性 ($R=0.05$, $P=0.320$)。上述结果表明 USP38 可能参与调控胃癌细胞增殖与肿瘤免疫逃逸, 且该调控作用独立于 HER2 信号通路。

进一步利用蛋白质印迹法检测敲低 USP38 对胃癌细胞关键信号蛋白表达的影响。结果 (图 5B) 显

示, 敲低 USP38 能够上调抑癌蛋白 p53 的表达, 下调增殖标志物 PCNA 与 Ki-67 的表达, 同时降低上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 间质标志物 N-cadherin 与 vimentin 的表达。这些结果侧面验证了生物信息学预测的 E2F/G2/M 驱动增殖效应, 推测 USP38 可能通过维持特定底物的稳定性, 抑制了 p53 信号通路并促进了细胞周期进展与 EMT。综上, USP38 不仅是判断胃癌预后的潜在分子指标, 还可能通过协同调控多条肿瘤相关通路参与胃癌进展, 有望成为胃癌临床干预的关键靶点。



Note: A. Correlation of USP38 with gastric cancer biomarkers *MKI67*, *ERBB2*, *CDH1*, and *CD274* (95% confidence intervals shaded). B. Western blotting analysis of USP38 knockdown effects on AGS cell proliferation and tumor-associated protein expression. The numbers indicate relative protein expression levels.

图 5 USP38 相关标志物在胃癌中的表达分析

Fig 5 Expression analysis of USP38-associated biomarkers in gastric cancer

2.4 USP38 通过稳定 RBM14 蛋白促进胃癌进展

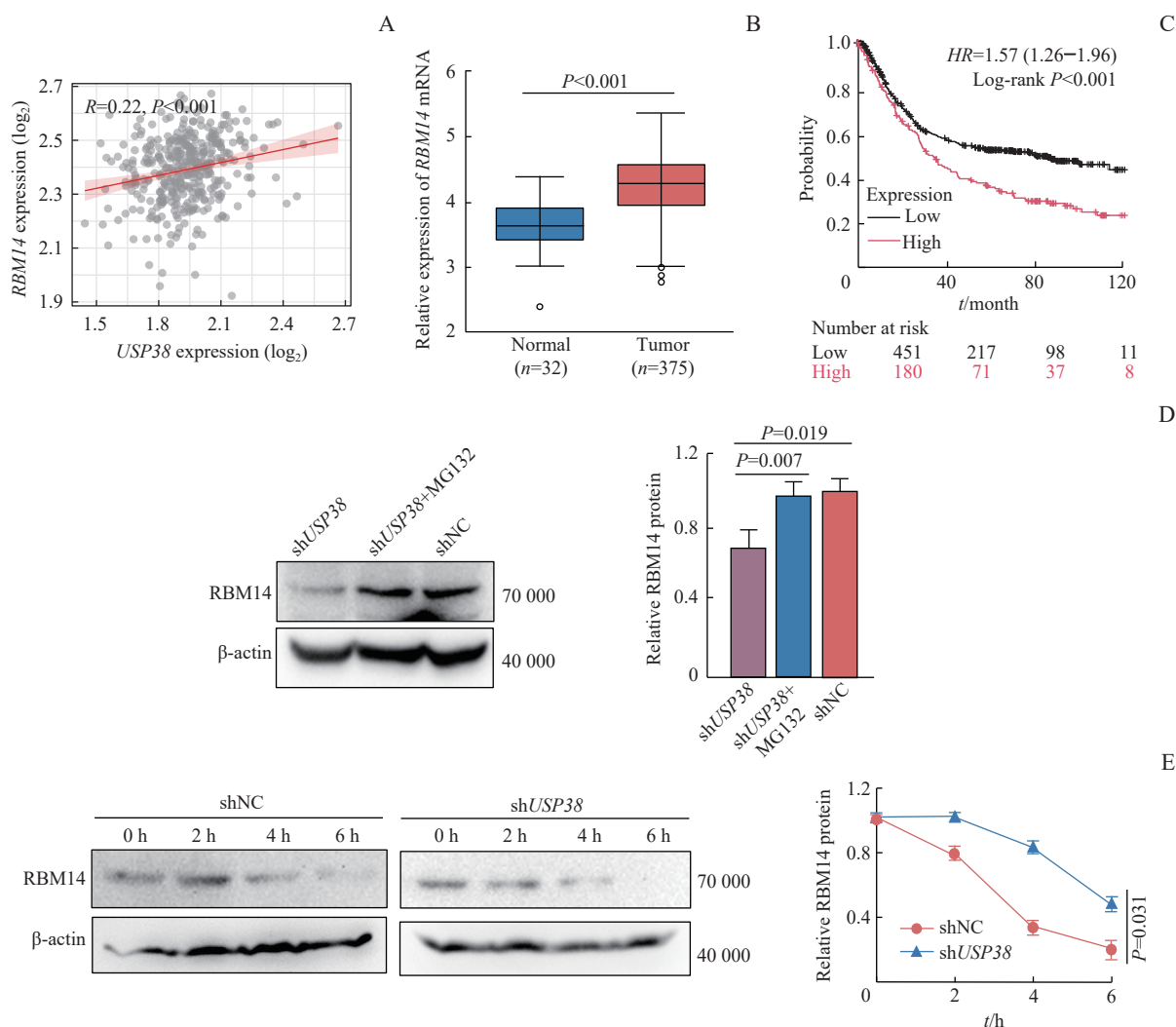
为探索 USP38 调控胃癌进展的下游靶点, 首先对 TCGA-STAD 数据库进行表达相关性分析, 筛选与 USP38 表达正相关的基因。其中, *RBM14* 不仅与 USP38 的表达呈正相关 ($R=0.22$, $P<0.001$, 图 6A), 而且在胃癌组织中较正常组织显著高表达 ($P<0.001$, 图 6B), 同时高表达 *RBM14* 的患者总生存期显著缩短 ($HR=1.57$, Log-rank $P<0.001$, 图 6C)。RBM14 是一种广泛参与转录辅助激活及 RNA 剪接调控的核蛋白, 在核斑点组成及 DNA 损伤修复等过程中发挥重要作用, 已被报道在多种肿瘤中具

有促癌功能^[20]。GO/KEGG 富集分析显示, USP38 相关基因显著富集于 RNA 剪接、mRNA 加工等生物学过程, 这与 RBM14 作为 RNA 结合蛋白的功能相吻合。二者在核斑点及 DNA 损伤位点等细胞组分的富集高度一致, 提示两者可能在核内功能复合体中协同发挥作用。已有质谱研究^[12]提示 RBM14 是 USP38 的潜在结合蛋白, 据此推测其可能是 USP38 的关键下游靶点。基于上述证据, 选择 RBM14 作为 USP38 调控胃癌恶性表型的候选分子进行后续功能验证。

鉴于 USP38 作为去泛素化酶主要发挥调控蛋白

稳定性的功能, 本研究首先考察其对 RBM14 蛋白水平的影响。蛋白酶体抑制剂 MG132 处理可逆转敲低 USP38 后 RBM14 蛋白表达下降的趋势 ($P=0.007$, 图 6D), 提示 USP38 通过蛋白酶体途径调控 RBM14 稳

定性。CHX 追踪实验显示, 敲低 USP38 后 RBM14 蛋白的降解速率加快, 半衰期缩短, 表明 USP38 可通过抑制 RBM14 的泛素-蛋白酶体途径降解来维持其蛋白稳定性 ($P=0.031$, 图 6E)。



Note: A. Correlation analysis showing a positive association between *USP38* and *RBM14* mRNA expression in the TCGA-STAD database. B. *RBM14* expression in gastric cancer tissues ($n=375$) and normal tissues ($n=32$) in TCGA database. C. Kaplan-Meier survival curves associating high *RBM14* expression with poor prognosis in gastric cancer patients ($n=631$) in GEO database. D. Western blotting analysis of RBM14 protein levels following *USP38* knockdown with or without MG132 treatment. Comparison of RBM14 protein levels: shUSP38 vs shNC and shUSP38 vs shUSP38+MG132. E. CHX chase assay showing accelerated RBM14 protein degradation upon *USP38* knockdown (shUSP38 vs shNC). Data are presented as mean $\pm$ SD.

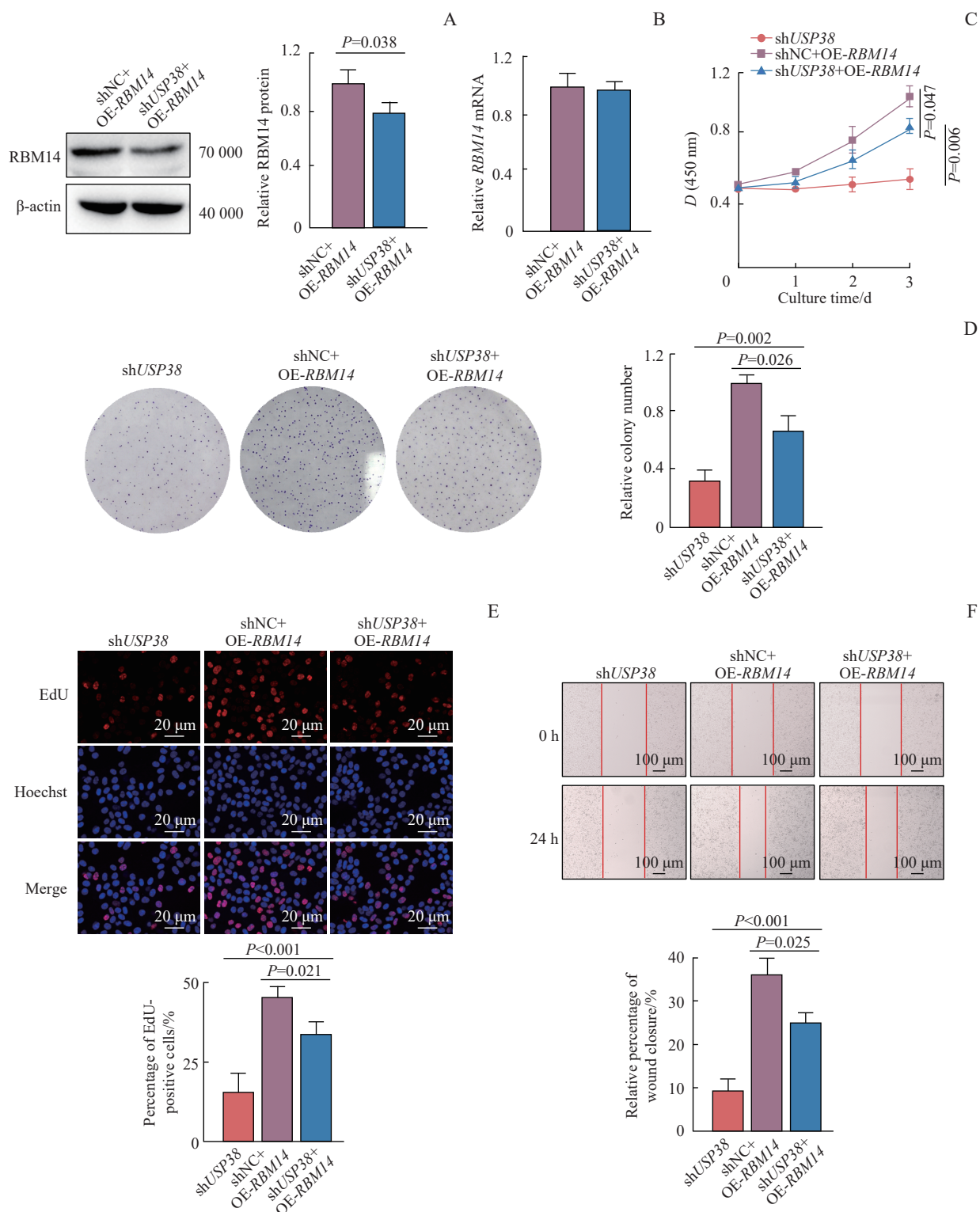
图6 USP38对RBM14蛋白的稳定作用

Fig 6 Stabilizing effect of USP38 on RBM14 protein

在 shUSP38 组细胞中过表达 *RBM14*, USP38 蛋白水平仍低于 shNC 组 ($P=0.038$, 图 7A), 但 USP38 mRNA 水平未见明显改变 (图 7B), 进一步证实 USP38 在蛋白质翻译后水平调控 RBM14。

前述实验已证实敲低 USP38 可显著抑制胃癌细胞恶性表型。在 shUSP38 组细胞中过表达 *RBM14*, 可部分逆转由 USP38 敲低所致的增殖抑制 ($P<0.05$,

图 7C~E) 及迁移能力下降 ($P<0.001$, 图 7F)。值得注意的是, 过表达 *RBM14* 在 shUSP38 背景下的促癌效应显著弱于 shNC+OE-*RBM14* 对照组 ($P<0.05$), 推测 RBM14 的促癌功能部分依赖于 USP38 的存在。可见, RBM14 是 USP38 在胃癌中发挥促癌效应的关键下游效应分子, USP38 通过稳定 RBM14 蛋白促进胃癌恶性进展。



Note: A. Validation of *RBM14* overexpression efficiency in shUSP38 cells by Western blotting. B. qPCR analysis of the effect of *USP38* knockdown on *RBM14* mRNA expression in gastric cancer cells. C. CCK-8 assay showing the rescue effect of *RBM14* overexpression on the inhibition of cell proliferation induced by *USP38* knockdown. D. Colony formation assay assessing the rescue effect of *RBM14* overexpression on the clonogenic capacity of shUSP38 cells. E. EdU assay showing that *RBM14* overexpression rescues the proliferation defect caused by *USP38* knockdown. F. Wound healing assay assessing the rescue effect of *RBM14* overexpression on cell migration. Data are presented as mean $\pm$ SD. Comparisons were performed between the shUSP38+OE-RBM14 group and the shNC+OE-RBM14 group or the shUSP38 group.

图7 USP38通过稳定 RBM14蛋白对胃癌细胞增殖迁移的促进作用

Fig 7 Promotive effect of USP38 on the proliferation and migration of gastric cancer cells via stabilizing RBM14 protein

3 讨论

USP38 作为泛素特异性蛋白酶 USP 家族的成员, 在不同肿瘤中的功能具有异质性。本研究证实了 USP38 在胃癌中发挥促癌作用, 与在膀胱癌^[13]和肺腺癌^[16]等的报道一致, 但其背后的底物特异性值得深究。在膀胱癌中, USP38 通过稳定 RNA 甲基化酶 METTL14 促进肿瘤进展; 而本研究发现的新底物 RBM14 同样是一类关键的 RNA 结合蛋白, 提示 USP38 能通过稳定不同的 RNA 结合蛋白来重塑肿瘤的转录后调控图谱。相比 METTL14 侧重于 m⁶A 修饰, RBM14 更多参与 RNA 剪接与核斑点组装, 这解释了为何本研究生物信息学分析中 RNA 剪接通路呈高富集。在结直肠癌和肾癌中, USP38 通过稳定组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 家族发挥抑癌作用^[14-15]。然而在胃癌中, 生物信息学分析显示 USP38 与 HDAC 的相关性弱于 SMARCA5 等染色质重塑因子。这种底物选择性的差异可能源于胃癌中特定的辅因子环境, 使得 USP38 优先选择驱动细胞周期的因子作为底物, 而非抑癌性的表观调控因子。既往研究^[17]报道 USP38 在胃癌中通过稳定 MDM2 间接抑制 p53。本研究蛋白质印迹法结果显示敲低 USP38 后 p53 显著上调, 这在验证先前研究的同时也提出了新的问题: RBM14 作为转录共激活因子, 是否也参与对 p53 靶基因的转录调控? 我们推测, USP38 一方面可能通过 MDM2 直接降解 p53 蛋白, 另一方面通过 RBM14 介导的转录调控或 RNA 剪接削弱 p53 的抑癌效应。

本研究系统阐明了 USP38 促进胃癌进展的分子机制。临床样本分析显示, USP38 在胃癌组织中显著高表达, 且与患者不良预后密切相关。本研究发现 USP38 高表达与胃癌患者的晚期病理分期 (Ⅲ、Ⅳ期) 相关, 而未检测到与淋巴结转移 (N) 或远处转移 (M) 的显著关联。这一看似不一致的结果实际上反映了病理分期的综合性质。淋巴结转移和远处转移是复杂的多步骤过程, 受肿瘤微环境、免疫监视、淋巴管生成等多种因素调控。USP38 可能参与了侵袭的早期步骤, 但在 TCGA 的横断面数据中 (表 1), 由于大部分纳入患者 (93.3%) 并无远处转移, 不一定完全反映 USP38 与转移的相关性。功能实验在同质

遗传背景和微环境下进行, 排除了人体内及治疗过程等复杂因素的干扰, 因而能够在理想状态下探究生物学功能, 证实敲低 USP38 显著抑制胃癌细胞的增殖与迁移。细胞层面的促迁移功能与临床数据间的差异, 恰恰揭示了 USP38 在胃癌进展不同阶段的功能权重可能存在偏向性。未来可通过分析转移灶中 USP38 的表达水平或使用原位种植转移模型进一步验证。

GSEA 结果揭示 USP38 高表达组 E2F 靶点与 G2/M 检查点信号同步激活, 从转录组水平明确了 USP38 驱动胃癌细胞增殖的特征。尽管通常认为 G2/M 检查点的激活与周期阻滞相关, 但该通路的富集也代表了 G2/M 期转换因子如周期蛋白 B1 (cyclin B1, CCNB1)、周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1, CDK1) 及 DNA 拓扑异构酶 II α (DNA topoisomerase II α , TOP2A) 等的丰度上调^[21]。在本研究中, 虽然涉及检查点激活及 E2F 信号上调等多种因素, 但其综合作用在胃癌复杂网络中的具体影响尚不完全清楚。然而, 功能实验证实 USP38 显著促进胃癌进展, 提示 USP38 可能通过维持相关底物蛋白的稳定性, 参与复杂的信号调控, 介导细胞周期从 S 期向 G2/M 期推进, 从而表现出促细胞增殖作用。高度活跃的细胞周期必然产生大量能量需求, 本研究观察到氧化磷酸化通路的显著下调, 提示 USP38 参与诱导细胞从氧化磷酸化向无氧糖酵解的代谢模式转变。肿瘤细胞通过牺牲单位 ATP 的产生效率, 换取糖酵解途径中丰富的碳源前体, 进而为 RBM14 和 E2F 介导的增殖提供物质支撑。这意味着 USP38 高表达可能伴随肿瘤细胞代谢重塑的瓦尔堡效应^[22], 以满足细胞快速分裂所需的物质基础。

在临床转化方面, USP38 展现出作为胃癌生物标志物及治疗靶点的潜力。本研究发现 USP38 表达水平与临床病理分期呈显著正相关, 且与增殖标志物 MKI67 及免疫检查点 PD-L1 的表达高度同步, 提示检测 USP38 不仅有助于胃癌患者的精准预后分层, 亦可能为免疫检查点抑制剂疗效评估提供参考。目前, 靶向去泛素化酶的小分子抑制剂研发已成为抗肿瘤药物领域的热点^[23]。借鉴 USP7 抑制剂 P5096^[24]、USP13 抑制剂 Spautin-1^[25] 等临床前研究经验, 开发靶向 USP38 催化结构域的特异性抑制剂, 有望为克服胃癌耐药及增强免疫治疗效果提供

新策略。另外,基于 USP38 与 PD-L1 表达水平的显著正相关性,靶向 USP38 的抑制剂联合 PD-1/PD-L1 免疫疗法有望成为晚期胃癌患者的潜在治疗策略。RBM14 是一种定位于核斑点的核蛋白,广泛参与转录调控、RNA 剪接与 DNA 损伤修复等过程^[21]。USP38-RBM14 轴的激活可能赋予胃癌细胞更强的化学治疗和放射治疗耐受能力。因此,在开发 USP38 特异性抑制剂时,也可以重点考察其与顺铂或放射疗法的联用效果,以期通过阻断 RBM14 介导的 DNA 修复和周期演进,打破胃癌的耐药性。然而,考虑到 USP38 在不同组织中的功能异质性,未来药物研发需兼顾组织特异性,以最大限度降低脱靶毒性,实现精准干预。

本研究仍存在一定局限性。首先,质谱数据^[12]显示 USP38 具有众多潜在底物,除 RBM14 外,腺苷脱氨酶 RNA 特异性酶 (adenosine deaminase acting on RNA, ADAR)、甲状腺激素受体相关蛋白 3 (thyroid hormone receptor-associated protein 3, THRAP3) 等蛋白亦表现出较强结合潜能,后续研究需在胃癌中进一步解析这些候选底物的功能效应。其次,本研究主要在细胞水平验证 USP38 的促癌功能,其体内的生物学效应仍需动物实验确证。后续拟通过裸鼠皮下成瘤及肺转移模型,系统评估 USP38 对胃癌生长及转移的调控作用。此外,GSEA 分析提示 USP38 可能参与干扰素响应通路重塑,且其表达与 PD-L1 呈显著正相关,提示其或可通过调控肿瘤免疫微环境介导免疫逃逸,有待在免疫健全荷瘤小鼠模型中验证。最后,USP38 在胃癌中异常高表达的上游调控机制尚不明确。未来研究可聚焦于转录因子调控及表观遗传学修饰如 DNA 甲基化对其表达的影响,以完善分子调控网络。鉴于 RBM14 在 RNA 剪接中的作用,USP38-RBM14 轴是否可能通过影响 PD-L1 mRNA 稳定性参与免疫抑制,亦值得深入

探究。

综上所述,本研究证实 USP38 通过稳定 RBM14 蛋白在胃癌中发挥促癌作用,并可能参与细胞周期进程、代谢重编程及免疫逃逸等通路驱动胃癌恶性进展。USP38 可作为胃癌诊疗的潜在靶点,其调控网络解析及靶向药物研发值得在未来研究中进一步深化。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors declare no relevant conflict of interests.

伦理批准和知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究所使用组织标本已通过上海交通大学医学院附属第一人民医院医学伦理委员会批准(编号:2022AW030)。所有标本采集前均已取得患者书面知情同意。

This study was approved by the Medical Ethics Committee of Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval No.2022AW030), and written informed consent was obtained from all patients prior to tissue collection.

作者贡献/Authors' Contributions

陈赞琪负责实验设计、实验操作、数据整理、初稿撰写和作图,那迪娜·帕尔哈提负责实验操作、数据整理、作图和文章修改,张鹏善负责实验方法建立、稿件审阅与修改,黄陈负责对稿件进行最终的审阅和修改。所有作者均阅读并同意最终稿件的提交。

Chen Yunqi was responsible for the experimental design, conducting the experiments, data organization, drafting the initial manuscript, and figure preparation. Nadina Paerhati was responsible for conducting the experiments, data organization, figure preparation, and manuscript revision. Zhang Pengshan was responsible for establishing the experimental methods, manuscript review, and revision. Huang Chen was responsible for the final review and revision of the manuscript. All authors have read the final version of the manuscript and consented to its submission.

• Received: 2026-03-02

• Accepted: 2026-05-18

• Published online: 2026-08-13

参·考·文·献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] 孙可欣,李荔,王少明,等. 2024 年中国分地区恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2026, 48(3): 400-412.
Sun K X, Li L, Wang S M, et al. Cancer incidence and mortality across diverse geographical regions in China, 2024[J]. Chinese Journal of Oncology, 2026, 48(3): 400-412.
- [3] Dewson G, Eichhorn P J A, Komander D. Deubiquitinases in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2023, 23(12): 842-862.
- [4] Han S Z, Wang R K, Zhang Y N, et al. The role of ubiquitination and deubiquitination in tumor invasion and metastasis[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(6): 2292-2303.
- [5] Li J Y, Zhong J H, Ye J M, et al. USP38: an important regulatory factor in tumor malignant progression[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1612723.



- [6] Wang R, Cai X L, Li X, et al. USP38 promotes deubiquitination of K11-linked polyubiquitination of HIF1 α at Lys769 to enhance hypoxia signaling[J]. *J Biol Chem*, 2024, 300(1): 105532.
- [7] Xiao Z, Dai C, Yu T T, et al. Ubiquitin specific protease 38 aggravates pathological cardiac remodeling by stabilizing phospho-TBK1[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(5): 1815-1832.
- [8] Yi X M, Li M, Chen Y D, et al. Reciprocal regulation of IL-33 receptor-mediated inflammatory response and pulmonary fibrosis by TRAF6 and USP38[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(10): e2116279119.
- [9] Wang Y C, Li Q, Hu D W, et al. USP38 inhibits zika virus infection by removing envelope protein ubiquitination[J]. *Viruses*, 2021, 13(10): 2029.
- [10] Zheng Z, Shang Y X, Xu R, et al. Ubiquitin specific peptidase 38 promotes the progression of gastric cancer through upregulation of fatty acid synthase[J]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(6): 2686-2696.
- [11] Yue Q Y, Li Z J, Du Y X, et al. Dehydrocostus lactone attenuates ulcerative colitis *via* USP38-mediated histone H2B deubiquitination to suppress NF- κ B-driven inflammation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 164: 115346.
- [12] Hu Q Y, Chen Y H, Zhou Q R, et al. ADAR promotes USP38 auto-deubiquitylation and stabilization in an RNA editing-independent manner in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Biol Chem*, 2024, 300(10): 107789.
- [13] Huang J, Zhou W M, Hao C, et al. The feedback loop of METTL14 and USP38 regulates cell migration, invasion and EMT as well as metastasis in bladder cancer[J]. *PLoS Genet*, 2022, 18(10): e1010366.
- [14] Yang Y F, Yang C Z, Li T T, et al. The deubiquitinase USP38 promotes NHEJ repair through regulation of HDAC1 activity and regulates cancer cell response to genotoxic insults[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(4): 719-731.
- [15] Zhan W, Liao X, Liu J, et al. USP38 regulates the stemness and chemoresistance of human colorectal cancer *via* regulation of HDAC3[J]. *Oncogenesis*, 2020, 9(5): 48.
- [16] Zhang T, Su F, Wang B F, et al. Ubiquitin specific peptidase 38 epigenetically regulates KLF transcription factor 5 to augment malignant progression of lung adenocarcinoma[J]. *Oncogene*, 2024, 43(16): 1190-1202.
- [17] Zhao S Y, Liu X L, Luo R K, et al. USP38 functions as an oncoprotein by downregulating the p53 pathway through deubiquitination and stabilization of MDM2[J]. *Cell Death Differ*, 2025, 32(6): 1128-1141.
- [18] Li Z, Liao Y T, Tang C, et al. RBM14 promotes DNA end resection during homologous recombination repair[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2023, 55(12): 1864-1873.
- [19] Posta M, Györfy B. Pathway-level mutational signatures predict breast cancer outcomes and reveal therapeutic targets[J]. *Br J Pharmacol*, 2025, 182(23): 5734-5747.
- [20] Jang Y, Elsayed Z, Eki R, et al. Intrinsically disordered protein RBM14 plays a role in generation of RNA: DNA hybrids at double-strand break sites[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(10): 5329-5338.
- [21] Qian Z X, Bai W, Li J X, et al. Gut microbiome-mediated epigenetic modifications in gastric cancer: a comprehensive multiomics analysis[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2025, 15: 1585881.
- [22] Wang Y H, Patti G J. The Warburg effect: a signature of mitochondrial overload[J]. *Trends Cell Biol*, 2023, 33(12): 1014-1020.
- [23] Gao H L, Xi Z, Dai J W, et al. Drug resistance mechanisms and treatment strategies mediated by ubiquitin-specific proteases (USPs) in cancers: new directions and therapeutic options[J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 88.
- [24] Silvestrini V C, Thomé C H, Albuquerque D, et al. Proteomics analysis reveals the role of ubiquitin specific protease (USP47) in epithelial to mesenchymal transition (EMT) induced by TGF β 2 in breast cells[J]. *J Proteomics*, 2020, 219: 103734.
- [25] Gao Z S, Li C, Sun H Y, et al. N⁶-methyladenosine-modified USP13 induces pro-survival autophagy and imatinib resistance *via* regulating the stabilization of autophagy-related protein 5 in gastrointestinal stromal tumors[J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(2): 544-559.

[本文编辑] 崔黎明