

# USP1通过调控E2F1对膀胱癌细胞增殖和周期的作用研究

彭鹏 张安琪 周曼莉 刘霏柳 张慧慧 张霞\*

(湖南师范大学医学院, 长沙 410013)

**摘要** 该文探讨了泛素特异蛋白酶1(USP1)对膀胱癌细胞增殖和周期等生物学行为的作用, 并进一步探索其作用机制。通过分子克隆技术构建膀胱癌T24细胞USP1过表达细胞株; CRISPR-Cas9技术构建膀胱癌UMUC3细胞USP1敲除细胞株; CCK8和克隆形成实验检测细胞增殖和克隆形成能力; 划痕实验检测细胞迁移; PI染色流式细胞术检测细胞周期; 转录组测序检测USP1敲除后基因表达差异及其相关的功能与信号通路; 双荧光素酶报告基因检测USP1对信号通路的影响, 并通过免疫印迹技术进行验证。结果显示, USP1过表达可以促进膀胱癌细胞增殖, 敲除后显著抑制了膀胱癌细胞的增殖和克隆形成及迁移能力, 促进S期细胞阻滞。转录组测序结果显示, USP1敲除后差异表达基因共4 522个, 其中上调基因2 078个, 下调基因2 444个。KEGG分析结果显示, 这些基因涉及多个方面, 包括细胞周期调控、细胞信号转导、转录翻译、蛋白折叠降解、自噬凋亡等。Hallmark数据库分析结果显示, 差异表达基因与E2F信号通路密切相关。双荧光素酶报告基因显示, USP1过表达后, E2F1信号通路明显上调并且呈剂量依赖性, 免疫印迹结果也显示USP1敲除后E2F1蛋白水平下调明显。该研究得出, USP1通过E2F1调控膀胱癌细胞增殖和周期, 从而促进膀胱癌进展。

**关键词** 去泛素特异性蛋白酶1; 膀胱癌; 细胞增殖; 细胞周期

## Effect of USP1 on Proliferation and Cell Cycle of Bladder Cancer Cells by Regulating E2F1

PENG Peng, ZHANG Anqi, ZHOU Manli, LIU Feiliu, ZHANG Huihui, ZHANG Xia\*

(School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410013, China)

**Abstract** This study aimed to investigate the effect of USP1 (ubiquitin-specific Protease 1) on the biological behavior of bladder cancer cells such as proliferation and cell cycle, and further explore its mechanism. The over-expression of USP1 in bladder cancer T24 cell line was established by molecular cloning technique, the USP1 knockout cell line of bladder cancer UMUC3 cell line was established by CRISPR-Cas9 technique, the cell proliferation and clonogenic ability were detected by CCK8 and clonogenic test, cell migration was detected by scratch test, cell cycle was detected by flow cytometry with PI staining. The difference of gene expression was detected by transcriptome sequencing, and the effect of USP1 on signal transduction were measured by dual luciferase reporter

收稿日期: 2022-09-19 接受日期: 2022-11-21

湖南省自然科学基金(批准号: 2018JJ3365)、湖南省教育厅重点项目(批准号: 20A308)、湖南省卫生健康委一般资助课题(批准号: 202102071747)和湖南省大学生创新训练项目(批准号: S202210542142)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0731-88912416, E-mail: zx717@hunnu.edu.cn

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (Grant No.2018JJ3365), the Key Project of Education Department of Hunan Province (Grant No.20A308), General Supported Project of Health Commission of Hunan Province (Grant No.202102071747) and the Innovation Training Program for College Students of Hunan Province (Grant No.S202210542142)

\*Corresponding author. Tel: +86-731-88912416, E-mail: zx717@hunnu.edu.cn

gene and then verified by immunoblotting. The results showed that overexpression of USP1 could promote the proliferation of bladder cancer cells, and knockout of *USP1* significantly inhibited the proliferation, colony formation and migration of bladder cancer cells, and promoted s-phase cell arrest. The results from RNA sequence showed that there were 4 522 differentially expressed genes between *USP1* knockout cells and wide type cells. Among them, 2 078 genes expression were up-regulated and 2 444 genes expression were down-regulated, which mainly involved in cell cycle regulation, signal transduction, transcription and translation, protein folding and degradation, autophagy and apoptosis, etc. The results of Hallmark database analysis showed that differentially expressed genes were closely related to E2F signaling pathway. Moreover, dual luciferase reporter genes also showed that the E2F1 signaling pathway was up-regulated in a dose-dependent manner after *USP1* overexpression. Immunoblotting results also showed that E2F1 protein level was down-regulated after *USP1* knockout. This study revealed that *USP1* promotes bladder cancer progression by regulating the proliferation and cycle of bladder cancer cells through E2F1.

**Keywords** ubiquitin-specific protease 1; bladder cancer; cell proliferation; cell cycle

膀胱癌是泌尿系统常见的肿瘤,近年来其发病率、死亡率逐渐增高<sup>[1]</sup>。膀胱癌具有高度的侵袭性,可分为两种类型:非肌层浸润性膀胱癌和肌层浸润性膀胱癌<sup>[2]</sup>,后者具有高区域和远处转移风险,尽管接受有效的治疗,患者5年生存率依然很低<sup>[2]</sup>,因此仍然需要确定和开发新的靶点和有效的治疗方法。

泛素化是真核细胞蛋白质降解的主要途径之一,是调节蛋白质降解和周转的关键翻译后修饰。泛素修饰系统参与许多不同的细胞过程:蛋白质降解内吞作用、DNA修复、炎症、自噬、免疫和细胞凋亡<sup>[3]</sup>。泛素化降解的蛋白可以通过去泛素化酶(deubiquitinating enzyme, DUB)避免触发泛素蛋白酶体系统<sup>[4-5]</sup>。DUB的活性不仅限于去除泛素偶联物,还参与很多生物学过程例如DNA修复、染色质重塑、细胞周期进展<sup>[6]</sup>。

泛素特异性蛋白酶1(ubiquitin-specific protease 1, USP1)是去泛素化酶家族中的一员,可以去泛素化和稳定DNA结合抑制剂,抑制细胞分化,促进肿瘤发生<sup>[7]</sup>。有研究显示,USP1在多种癌症如前列腺癌、胃癌、肝癌、骨肉瘤和胶质母细胞瘤等中高表达<sup>[8-13]</sup>,其异常表达与癌症的发生和进展密切相关。但USP1在膀胱癌中的作用尚不清楚。因此,本研究将着重于USP1对膀胱癌细胞的生物学功能的影响及其相关机制的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒与菌种来源 293T细胞系、膀胱癌 UMUC3、T24细胞系和 Lenti-CRISPR V2质粒

以及大肠埃希菌感受态细胞DH5 $\alpha$ 由武汉大学生命科学院张晓东实验室惠赠。

1.1.2 主要试剂 McCoy's 5A及高糖DMEM培养基购自美森生物科技有限公司;兔抗人USP1抗体购自ABclonal公司;FLAG抗体及鼠抗人GAPDH抗体购自MBL公司;山羊抗兔抗二抗及山羊抗鼠二抗购自天地人和生物科技有限公司;蛋白Marker购自ThermoFisher公司;ECL化学发光试剂盒购自碧云天生物科技有限公司;周期检测试剂盒购自Biosharp公司;双荧光素酶系统报告基因试剂盒购自Promega公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 293T和UMUC3使用高糖DMEM培养基,T24使用McCoy's 5A培养基,所有培养体系均添加10% FBS、100 U/mL的青霉素和0.1 mg/mL的链霉素。所有细胞均置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中进行培养,2~3天传代一次。

1.2.2 CRISPR-Cas9技术构建稳定敲除*USP1*的细胞株 打靶载体构建:使用常规分子克隆技术构建带有靶向*USP1*的CRISPR-Cas9质粒转化后得到的菌落做菌落PCR鉴定后,挑选菌落测序。慢病毒包装:将包装质粒sPAX2、包膜质粒pMD2.G、载体质粒LentiV2-2 sgRNA以1:1:2的比例转染至293T细胞中,48~72 h后回收培养基并用0.45  $\mu$ m滤器过滤,并存放于-80 °C。慢病毒感染:将收取的病毒和新鲜培养基按1:1比例同时加入待感染的UMUC3细胞,同时加入终浓度5  $\mu$ g/mL的聚凝胺,感染时间约为36~48 h,GFP孔荧光50%及以上时,进行puromycin抗性筛选(1.0  $\mu$ g/mL),扩大培养后通过Western blot鉴定是否

有敲低效果,并冻存保种。

取消化好的验证有敲低效果的UMUC3细胞400个,按每孔约1个细胞的数量加入到3个96孔板中,培养10~14天后,将单个细胞株长大的克隆扩大培养后进行Western blot鉴定。将具有敲除效果的细胞系扩大培养并冻存保种。

**1.2.3 构建稳定过表达USP1细胞系** 过表达载体构建:使用常规分子克隆技术构建插入USP1片段的phage质粒,转化后得到的菌落做菌落PCR鉴定后,挑选菌落测序。慢病毒包装:将包装质粒sPAX2、包膜质粒pMD2.G、载体质粒phage-USP1或phage-MOCK以1:1:2的比例转染至293T细胞中,48~72 h后回收培养基并用0.45  $\mu\text{m}$ 滤器过滤,并存放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。慢病毒感染:将收取的病毒和新鲜培养基按1:1比例同时加入待感染的T24细胞,同时加入终浓度5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的聚凝胺,感染时间约为36~48 h, GFP孔荧光50%及以上时,进行puromycin抗性筛选(0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),扩大培养后通过Western blot鉴定是否有过表达效果,并冻存保种。

**1.2.4 Western blot** 收取细胞加入适量含有PMSF的RIPA裂解液,冰上裂解10 min后将样品置于 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 金属浴变性10 min后,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离,采用湿转的方式将SDS凝胶上的蛋白转移到PVDF膜上。转膜完成后,将PVDF膜放入含5%的脱脂牛奶的PBST溶液中室温封闭1~2 h。再将膜分别浸入一抗中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,用TBST洗膜3次,每次10 min;最后在二抗中室温孵育1 h;TBST洗3次,每次10 min;滴加ECL化学发光液显影。

**1.2.5 CCK8** 将细胞按照每孔1 000个细胞的密度接种于96孔板,每组5个复孔。次日,待细胞完全贴壁后,每孔加入100  $\mu\text{L}$  CCK8混合液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续培养1 h,使用酶标仪在450 nm处检测每孔吸光度(D)值,之后在后续的3天内同一时间点连续重复操作并测量,最后将得到的吸光度数据处理,绘制生长曲线。

**1.2.6 克隆形成实验** 取400个细胞加入到6孔板中,每组3个复孔。将细胞置于培养箱中培养约10~14天。待克隆大小合适后取出6孔板,弃掉细胞培养基,用PBS洗1次后每孔加入1 mL 4%多聚甲醛固定60 min。PBS洗1次后每孔加入0.25%结晶紫溶液1 mL,室温染色15~30 min,弃去结晶紫染液,用清水漂洗6孔板直至克隆清晰可见,烤箱内烘干后用扫

描仪扫描,统计克隆个数。

**1.2.7 双荧光素报告基因检测** 将293T细胞接种到24孔板中,每孔转染包含报告质粒(200 ng/孔)、pRL-CMV(2 ng/孔)和USP1过表达质粒。每组设置3个重复孔,转染28~36 h后,弃掉细胞培养基,使用PBS洗涤细胞,加入荧光素检测细胞裂解液裂解30 min,随后进行荧光素酶报告基因活性检测,将得到的荧光值进行数据处理,分析通路的激活和抑制情况。

**1.2.8 细胞周期检测** 将细胞提前一天接种到6孔板中,次日用PBS洗涤1次,弃掉上清后,加入1 mL预冷的70%乙醇混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定3 h, PBS洗涤1次,加入0.5 mL碘化丙啶染色液,放入培养箱避光孵育30 min后,流式细胞仪上机前用200目筛网过滤1次后,记录波长488 nm红色荧光,应用FlowJo软件分析数据。

**1.2.9 划痕实验** 提前一天将膀胱癌UMUC3细胞的野生株及其两株敲除细胞分析接种到6孔板中,第二天密度为90%为宜,然后用10  $\mu\text{L}$ 移液器吸头划三条平行的直线。用PBS冲洗后,将完全培养基替换成无血清培养基,用显微镜拍摄划痕0 h、24 h和48 h的细胞划痕图。用ImageJ软件定量各组细胞划痕间伤口距离。愈合率=[划痕间伤口距离(0 h)-划痕间伤口距离(24 h/48 h)]/划痕间伤口距离(0 h) $\times 100\%$

**1.2.10 统计学分析** 本实验数据均采用GraphPad Version 8.3软件进行了统计学分析,两组间比较采用配对或非配对t检验,多组间比较采用方差分析。根据P值大小设置统计显著性,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ,所有样本均独立进行3次重复实验。

## 2 结果

### 2.1 USP1可以促进膀胱癌细胞增殖

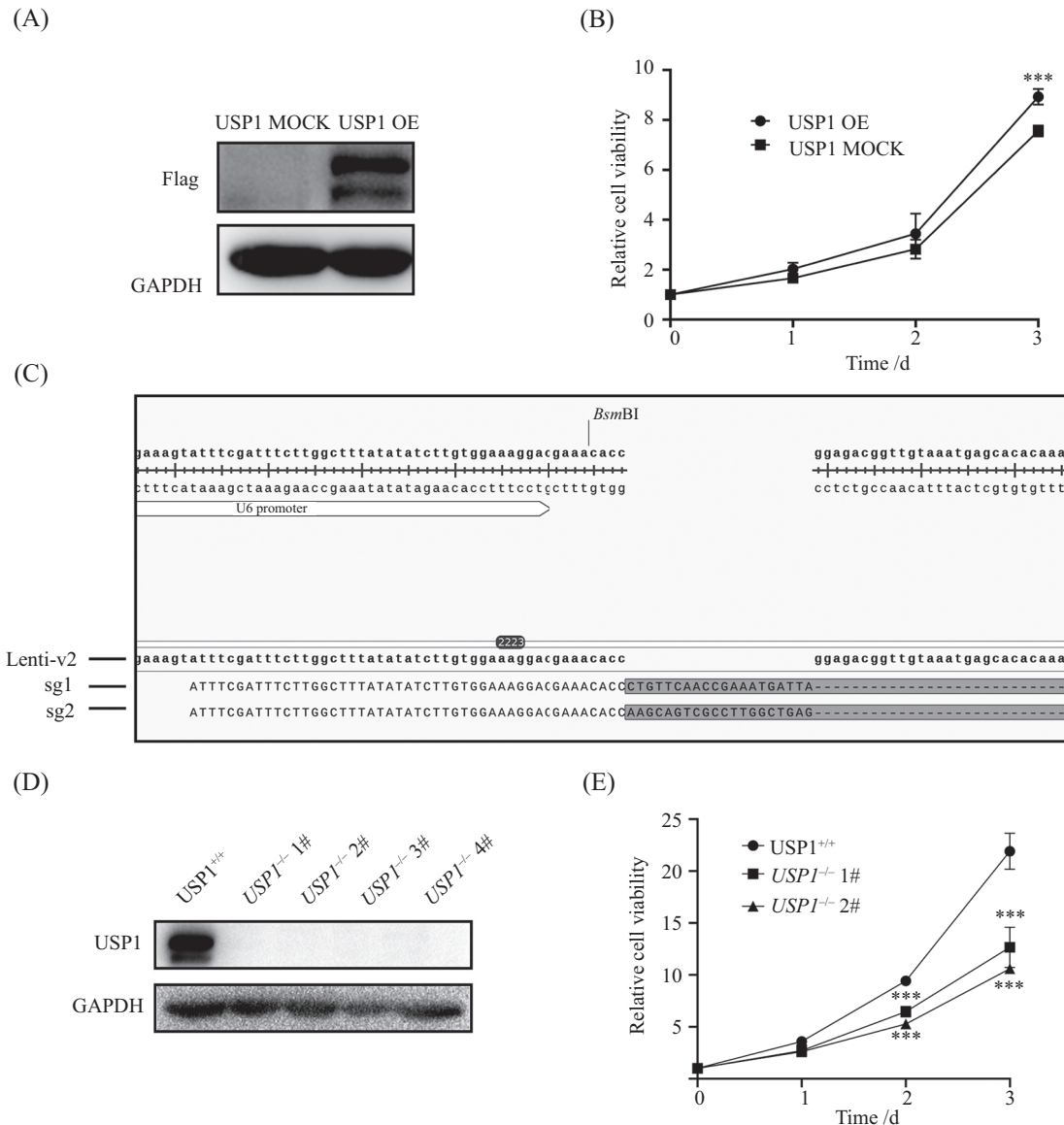
为了研究USP1在膀胱癌中的作用,我们在膀胱癌T24细胞中过表达USP1,Western blot结果显示,对照组(MOCK)不表达USP1,而过表达组(USP1 OE)可以明显检测到USP1蛋白的表达(图1A)。CCK8结果显示,与MOCK组相比,USP1 OE组增殖加快,提示USP1可能促进T24细胞增殖(图1B)。为了进一步验证我们的结果,我们采用CRISPR-Cas9技术构建了膀胱癌UMUC3细胞的USP1敲除细胞株。首先,我们利用分子克隆技术成功构建了两个靶向USP1的lenti-v2质粒,我们进行了菌落PCR鉴定,并将质粒进行测序,显示质粒构建成功(图1C)。然后将我们将上

述构建好的质粒包装成慢病毒, 经过感染、嘌呤霉素筛选、单克隆细胞分选, 经Western blot验证, 野生型对照组( $USP1^{+/+}$ )可以明显检测到USP1蛋白的表达, 而 $USP1$ 敲除的几个克隆( $USP1^{-/-}$  1#、 $USP1^{-/-}$  2#、 $USP1^{-/-}$  3#、 $USP1^{-/-}$  4#), 其USP1蛋白条带消失, 证明成功获取了UMUC3细胞的 $USP1$ 敲除细胞株(图1D)。CCK8结果显示, 与 $USP1^{+/+}$ 组相比,  $USP1^{-/-}$

1#和 $USP1^{-/-}$  2#两组的细胞增殖明显减慢, 差距有明显统计学意义(图1E)。因此, 从正反两方面我们证实了USP1具有促进膀胱癌细胞增殖的能力。

## 2.2 敲除 $USP1$ 抑制膀胱癌细胞的克隆形成和迁移能力

为了进一步探讨USP1对膀胱癌细胞的作用, 我们采用克隆形成实验检测细胞的增殖活力, 结果



A: Western blot检测T24细胞中USP1蛋白的表达(MOCK: 空载体; USP1 OE: USP1过表达); B: CCK8检测USP1过表达后T24细胞生长曲线图。n=3。\*\*\* $P < 0.001$ , 与MOCK组比较; C: 靶向 $USP1$ 的lenti-v2质粒的测序图; D: Western blot检测UMUC3细胞中USP1蛋白的表达( $USP1^{+/+}$ : 野生型;  $USP1^{-/-}$  1#-4#:  $USP1$ 敲除的单克隆); E: CCK8检测 $USP1$ 敲除后UMUC3细胞生长曲线图。n=3。\*\*\* $P < 0.001$ , 与 $USP1^{+/+}$ 组比较。

A: USP1 protein expression detected by Western blot in T24 cells (MOCK: vector; USP1 OE: USP1 overexpression); B: the growth curves of the T24 cells after over-expression of USP1 by CCK8 assay. n=3. \*\*\* $P < 0.001$  vs MOCK group; C: the figure for sequencing the lenti-v2 plasmid which targeted  $USP1$ ; D: USP1 protein expression detected by Western blot in UMUC3 cells ( $USP1^{+/+}$ : wide type;  $USP1^{-/-}$  1#-4#: monoclone for  $USP1$  knockout); E: the growth curves of the UMUC3 cells after  $USP1$  knockout by CCK8 assay. n=3. \*\*\* $P < 0.001$  vs  $USP1^{+/+}$  group.

图1 USP1过表达和敲除对膀胱癌细胞增殖的影响

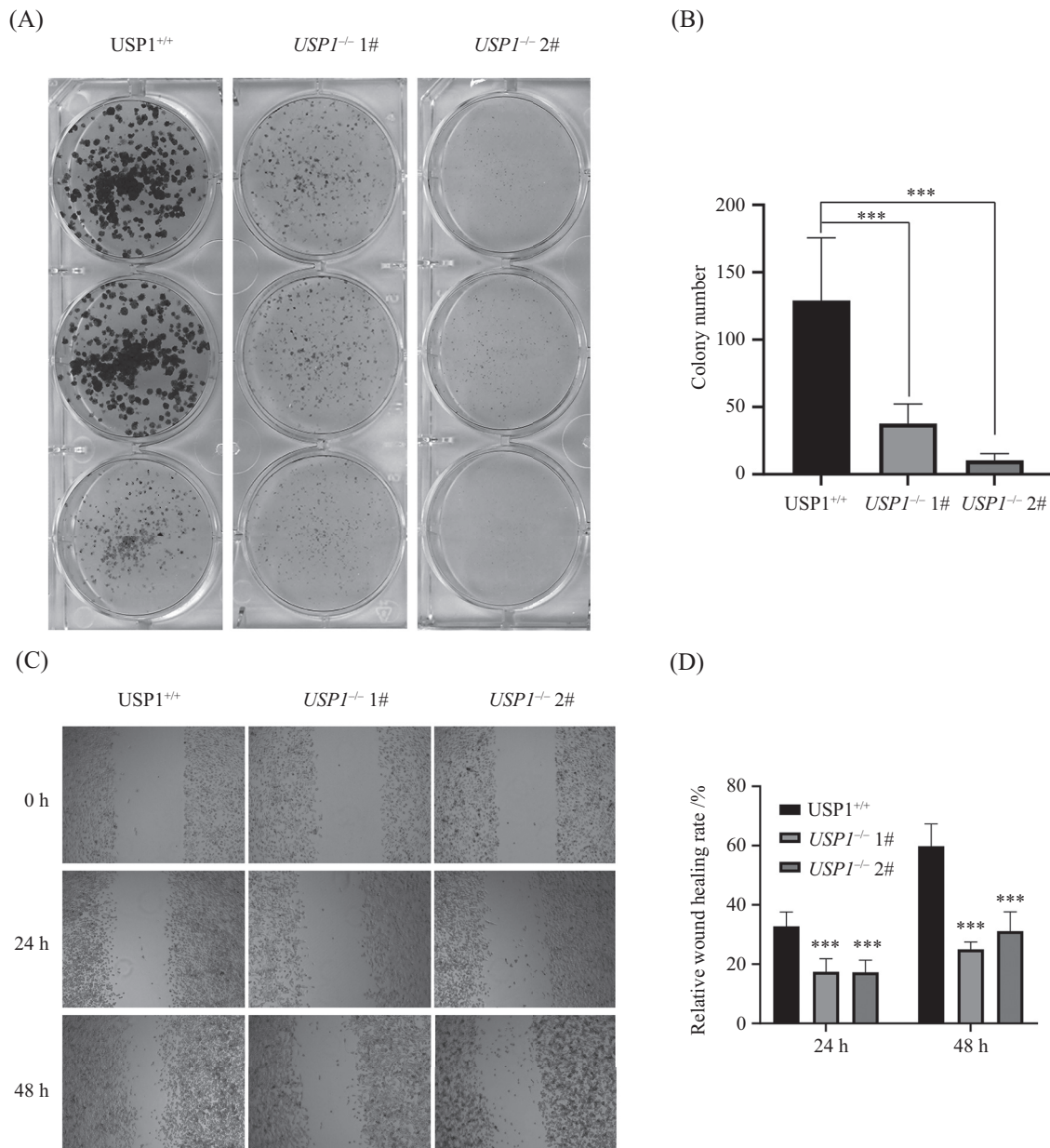
Fig.1 The effect of USP1 overexpression and knockout on the proliferation of bladder cancer cell

显示培养14天以后,与*USP1*<sup>+/+</sup>组相比,*USP1*<sup>-/-</sup> 1#和*USP1*<sup>-/-</sup> 2#两组的细胞形成克隆数明显减少(图2A),计数分组的细胞克隆数统计分析发现,差异有明显统计学意义(图2B)。接下来我们进行划痕实验,结果如图2C显示,*USP1*<sup>-/-</sup> 1#和*USP1*<sup>-/-</sup> 2#两组向划痕处迁移的细胞减少,通过计算愈合率,发现*USP1*<sup>-/-</sup> 1#和*USP1*<sup>-/-</sup> 2#两组的愈合率明显降低,与*USP1*<sup>+/+</sup>组

相比差异有明显统计学意义(图2D)。因此,*USP1*敲除后不仅克隆形成能力得到了显著抑制,同时其迁移能力也下降明显。

### 2.3 *USP1*敲除导致膀胱癌细胞周期阻滞

为了进一步探究*USP1*对膀胱癌细胞周期的影响,我们用PI染色,流式细胞仪检测细胞周期变化。结果发现,*USP1*<sup>-/-</sup> 1#和*USP1*<sup>-/-</sup> 2#两组细胞的S期分



A: *USP1*敲除对UMUC3细胞克隆形成能力的影响; B: 细胞克隆数的统计学分析; C: 划痕实验检测*USP1*敲除对UMUC3细胞迁移能力的影响; D: 愈合率的统计学分析。n=3。\*\*\*P<0.001, 与*USP1*<sup>+/+</sup>组比较。

A: the effect of *USP1* knockout of UMUC3 cells on their clonal formation ability; B: statistical analysis of cell clone number; C: the effect of *USP1* knockout on the migration ability of UMUC3 cells detected by scratch assay; D: statistical analysis of wound healing rate. n=3. \*\*\*P<0.001 vs *USP1*<sup>+/+</sup> group.

图2 *USP1*敲除对膀胱癌细胞克隆形成和迁移的影响

Fig.2 The effect of *USP1* knockout on the clonal formation and migration capacity of bladder cancer cells

别为 $26.60\% \pm 0.95\%$ 和 $26.53\% \pm 1.27\%$ , 均明显高于USP1<sup>+/+</sup>组的S期 $18.00\% \pm 1.39\%$ (图3A~图3C), 分析显示差异具有统计学意义(图3D)。这说明, USP1的缺失可促进UMUC3细胞S期阻滞。

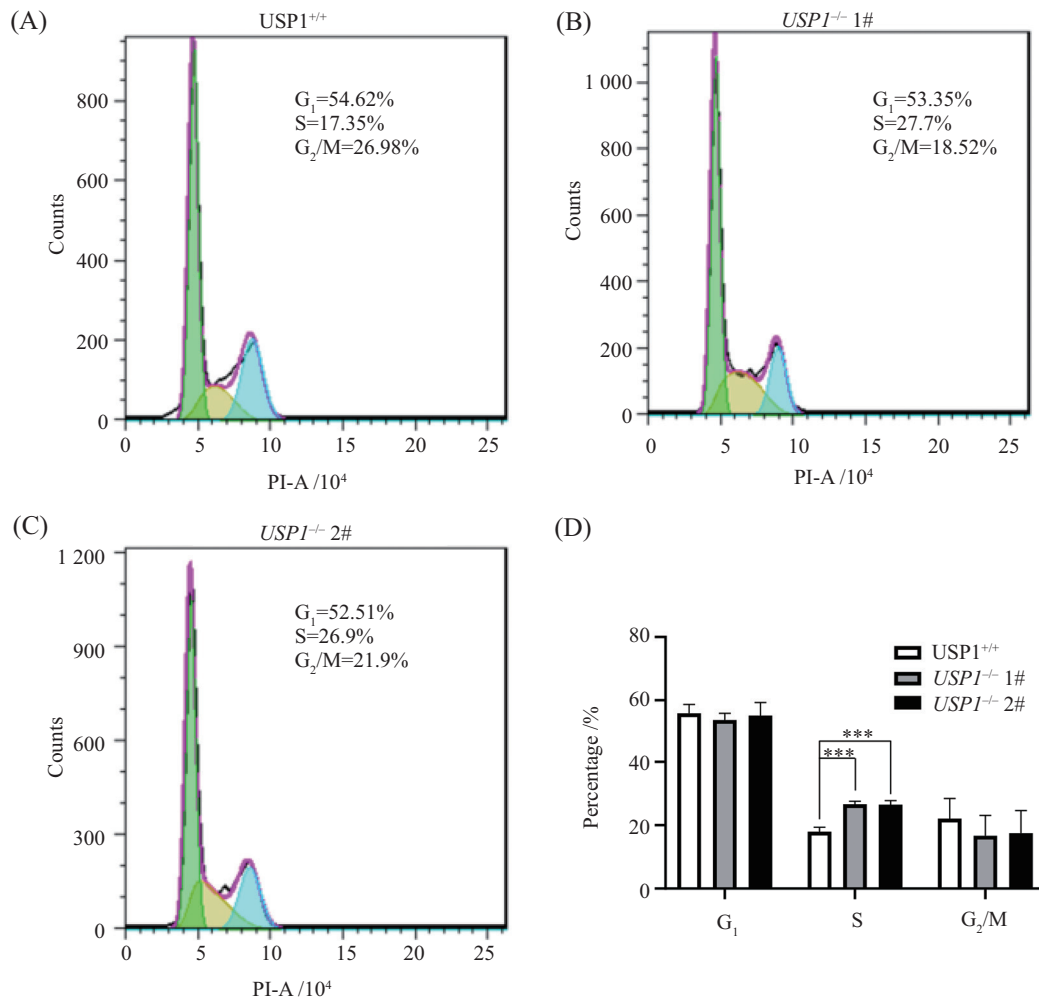
## 2.4 USP1敲除后下调细胞周期相关的E2F信号通路

为了研究USP1对膀胱癌的作用机制, 我们通过转录组测序分析USP1<sup>+/+</sup>组和USP1<sup>-/-</sup>组的差异表达基因, 并对其进行KEGG富集分析, 并通过Western blot进行验证。结果显示, USP1敲除后的差异表达基因有4 522个, 其中上调基因2 078个, 下调基因2 444个(图4A)。KEGG分析发现这些基因的功能涉及多个方面, 包括细胞周期调控、细胞信号转导、转录翻译、蛋白折叠降解、自噬凋亡等(图4B)。Hallmark数据

库分析结果显示, 差异表达基因与E2F信号通路密切相关(图4C)。为了更全面地探究E2F信号通路整体的变化情况我们用所有变化的基因做了表达聚类热图, E2F周期相关信号通路90个基因有74个基因下调(图4D)。同时我们利用双荧光报告基因筛选了十几个通路, 也发现E2F信号通路被激活(图4E)。这些结果提示我们USP1可能对E2F通路有作用。

## 2.5 USP1激活E2F信号通路

为了进一步研究USP1和E2F之间的关系, 我们首先通过GEPID数据库分析, 结果发现, USP1与E2F1有很强的相关性(图5A)。双荧光素酶报告的结果表明, E2F信号通路激活呈USP1剂量依赖性(图5B)。为了验证USP1是否在蛋白水平对E2F进行调

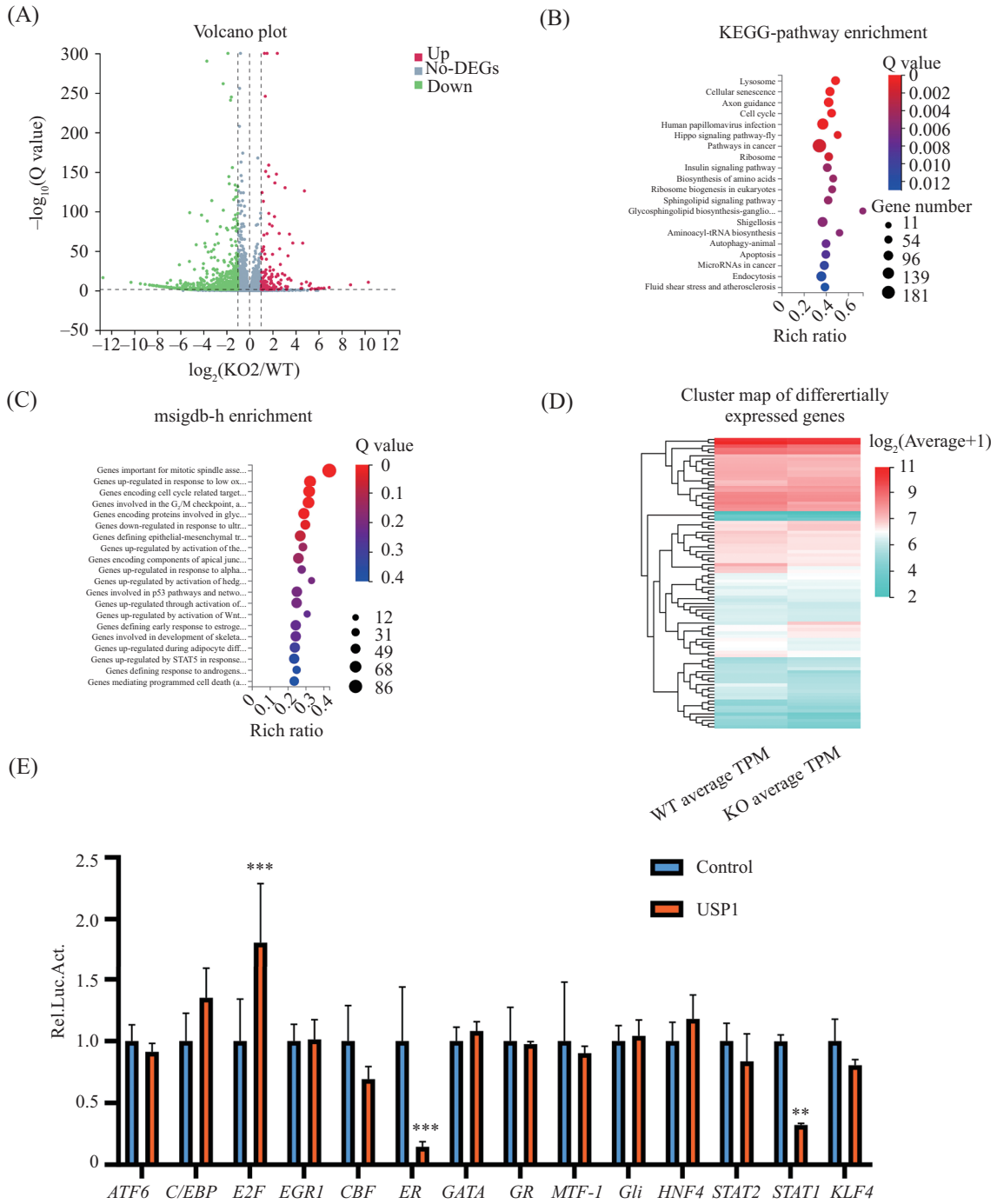


A: USP1<sup>+/+</sup>组的细胞周期图; B: USP1<sup>-/-</sup> 1#的细胞周期图; C: USP1<sup>-/-</sup> 2#的细胞周期图; D: 细胞周期分布的统计学分析。n=3。\*\*\*P<0.001, 与USP1<sup>+/+</sup>组比较。

A: the figure for the cell cycle of USP1<sup>+/+</sup> group; B: the figure for the cell cycle of USP1<sup>-/-</sup> 1# group; C: the figure for the cell cycle of USP1<sup>-/-</sup> 2# group; D: statistical analysis of the cell cycle distribution. n=3. \*\*\*P<0.001 vs USP1<sup>+/+</sup> group.

图3 USP1敲除对膀胱癌细胞周期的影响

Fig.3 The effect of USP1 knockout on the cell cycle of bladder cancer cells



A: *USP1* 敲除后差异基因的火山图; B: KEGG数据库富集的信号通路; C: hallmark数据库富集的信号通路; D: *USP1* 敲除后E2F信号通路的基因表达水平; E: 双荧光素报告基因检测*USP1*过表达后激活信号通路的情况。n=3。\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, 与control组比较。

A: volcanic map of differentially expressed genes after *USP1* knockout; B: the signal pathway enriched by the KEGG database; C: the signal pathway enriched by the hallmark database; D: gene expression levels of the E2F signaling pathway after *USP1* knockout; E: bifluorescein reports activation of the signaling pathway after the gene detection of *USP1* overexpression. n=3. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs control group.

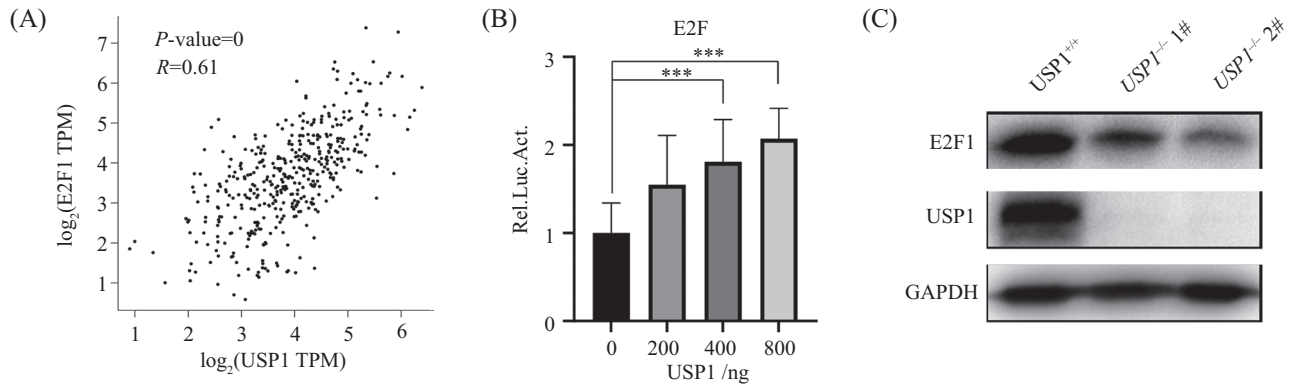
图4 USP1的表达水平引起的通路变化情况

Fig.4 Changes in pathways caused by expression levels of USP1

控, 蛋白质免疫印迹法检测结果显示, *USP1* 敲除显著降低了UMUC3细胞的E2F1的蛋白水平(图5C)。以上结果表明, *USP1* 可以通过调控E2F1对膀胱癌细胞的增殖和周期发挥作用。

### 3 讨论

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤, 其发病率居泌尿系统恶性肿瘤的首位。膀胱癌具有高侵袭性、高复发性和高转移性的特征, 患者的预后很差,



A: USP1与E2F的相关性分析。B: USP1激活E2F, 并与USP1的剂量有关。 $n=3$ 。\*\*\* $P<0.001$ 。C: *USP1*敲除后E2F1的蛋白表达。

A: the analysis of relationship between USP1 and E2F. B: USP1 activates E2F which is associated with the dose of USP1.  $n=3$ . \*\*\* $P<0.001$ . C: the protein levels of E2F1 after *USP1* knockout.

图5 USP1对E2F信号通路的影响

Fig.5 The effect of USP1 on the signal pathway of E2F

5年生存率低<sup>[1]</sup>。筛选新的治疗靶点,将对临床治疗和药物开发提供新的思路。去泛素化是一个高度调控的过程,对维持细胞内稳态至关重要,参与调节许多细胞功能,包括蛋白质水平、细胞凋亡、DNA修复等。USP1作为去泛素化酶家族中的一员,可以通过调控多种细胞功能参与肿瘤的发生发展。本研究首次证实了USP1与膀胱癌的进展有关,通过体外实验过表达和敲除*USP1*证实USP1可以促进膀胱癌细胞增殖,并且USP1缺失可以抑制其克隆形成和迁移能力,促进S期阻滞。进一步通过转录组测序分析差异基因,结合双荧光素酶报告基因提示USP1可以调控E2F1信号通路,并初步进行了验证。

USP1促进肿瘤细胞迁移已经在其他肿瘤中得到了证实:在乳腺癌中,USP1可以通过稳定KPNA2表达促进乳腺癌转移<sup>[13]</sup>;在胃癌中,USP1通过稳定ID2表达促进胃癌转移<sup>[9]</sup>;在骨肉瘤中,USP1可以促进骨肉瘤细胞转移<sup>[11,14]</sup>;我们在膀胱癌细胞中也发现敲除USP1可以抑制细胞迁移。而在肝癌中发现USP1的表达上调和肿瘤转移密切相关,但是USP1促进肿瘤转移主要是通过促进癌细胞在血液中的存活而不是促进癌细胞的迁移<sup>[10]</sup>。USP1对肿瘤细胞增殖的作用在不同的肿瘤中作用不尽相同:在肝癌、胃癌和乳腺癌中,USP1不影响肿瘤细胞的增殖<sup>[9-10,13]</sup>,在骨肉瘤和前列腺癌中,抑制USP1可以抑制细胞增殖<sup>[8,11,14]</sup>,然而关于USP1对肿瘤细胞增殖的调控机制研究较少。

我们在膀胱癌细胞中证实敲除*USP1*可以抑制细胞增殖和克隆形成能力,并且证明*USP1*敲除可以

促进S期阻滞,这可能是其抑制增殖的机制。研究表明,细胞周期相关蛋白的泛素化降解在细胞周期的有序运行中起着极其重要的作用。S期是DNA合成期,从S期进入G<sub>2</sub>期需要检查DNA复制是否完全,被称为S期检查点。很多去泛素化酶如USP29和USP20能够去泛素化稳定S期检查点关键的蛋白质Claspin来促进DNA损伤和修复<sup>[15-16]</sup>。还有研究表明,USP1可以通过FA途径和TLS途径参与DNA损伤修复<sup>[17]</sup>。那么,在膀胱癌细胞中USP1通过什么机制来调控细胞周期是我们想要进一步探讨的问题。因此我们采用了RNA测序的方法来进行差异基因分析,并结合双荧光素酶报告基因的结果,通过初步鉴定发现*USP1*敲除可使E2F1表达明显下调。E2F1是细胞周期相关转录因子E2F重要的家族成员之一,决定了进入细胞周期的S期并进展到细胞周期S期所需的许多基因的及时表达,从而参与了包括细胞周期进展、分化、增殖、凋亡以及DNA修复和复制等多种细胞过程<sup>[18-19]</sup>。研究表明E2F1在多种肿瘤(胃癌、骨肉瘤、前列腺癌、肝癌等)中高表达,E2F1表达上调与肿瘤的发生、发展、转移及预后密切相关<sup>[20-23]</sup>。因此,我们提出敲除*USP1*导致的膀胱癌细胞中E2F周期相关信号通路转导抑制,可能是抑制其增殖、克隆形成与迁移的重要原因。但USP1是否与E2F有直接相互作用,或者USP1是否通过其去泛素化酶功能影响E2F的转录后修饰,从而阻滞膀胱癌的进展需进一步的工作来阐明。另外,USP1是否也能通过其他信号通路影响膀胱癌细胞增殖、克隆形成和迁移能力也有待进一步的探究。



此外, USP1作为去泛素化家族中治疗癌症的非常具有潜力的靶点, 还有很多其他机制有待于深入的研究。USP1在一些癌症中高表达并与化疗耐药性有关<sup>[24-25]</sup>, USP1抑制剂可克服肿瘤对靶向DNA药物的耐药性。最近发现, USP1有助于阻断骨肉瘤的分化, 通过抑制USP1来诱导骨肉瘤分化的治疗策略是可能的<sup>[26]</sup>。USP1在DNA修复过程中与其辅因子UAF1一起作用, 特异性去除泛素信号<sup>[27]</sup>。因此, 除了抑制其酶活性外, 另一种靶向USP1的方法可能是干扰USP1/UAF1复合物的形成<sup>[28]</sup>。

目前, 泛素-蛋白酶体系统已成为研究热点, USP1的深入研究对研发USP1抑制剂从而应用于肿瘤治疗非常重要。本研究为USP1作为膀胱癌治疗的有效靶标提供了依据, 但其作用机制以及如何更好地进行临床应用仍需进一步研究。

### 参考文献 (References)

- [1] JEONG S H, KU J H. Urinary markers for bladder cancer diagnosis and monitoring [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 892067.
- [2] ZHANG H H, LI C, REN J W, et al. OTUB1 facilitates bladder cancer progression by stabilizing ATF6 in response to endoplasmic reticulum stress [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(6): 2199-209.
- [3] CAI D, LIU L, TIAN B, et al. Dual-role ubiquitination regulation shuttling the entire life cycle of the flaviviridae [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 835344.
- [4] ZHANG X, MENG T, CUI S, et al. Roles of ubiquitination in the crosstalk between tumors and the tumor microenvironment (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2022, 61(1): 84.
- [5] NEWTON K, GITLIN A D. Deubiquitinases in cell death and inflammation [J]. *Biochem J*, 2022, 479(10): 1103-19.
- [6] TYAGI A, HAQ S, RAMAKRISHNA S. Redox regulation of DUBs and its therapeutic implications in cancer [J]. *Redox Biol*, 2021, 48: 102194.
- [7] GONCALVES J M, CORDEIRO M M R, RIVERO E R C. The role of the complex USP1/WDR48 in differentiation and proliferation processes in cancer stem cells [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2017, 12(5): 416-22.
- [8] CUI S Z, LEI Z Y, GUAN T P, et al. Targeting USP1-dependent KDM4A protein stability as a potential prostate cancer therapy [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(5): 1567-81.
- [9] LI N, WU L, ZUO X, et al. USP1 Promotes GC metastasis via stabilizing ID2 [J]. *Dis Markers*, 2021, 2021: 3771990.
- [10] LI Y, XU Y, GAO C, et al. USP1 maintains the survival of liver circulating tumor cells by deubiquitinating and stabilizing TBLR1 [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 554809.
- [11] LIU J, ZHU H, ZHONG N, et al. Gene silencing of USP1 by lentivirus effectively inhibits proliferation and invasion of human osteosarcoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(6): 2549-57.
- [12] LEE J K, CHANG N, YOON Y, et al. USP1 targeting impedes GBM growth by inhibiting stem cell maintenance and radioresistance [J]. *Neuro Oncol*, 2016, 18(1): 37-47.
- [13] MA A, TANG M, ZHANG L, et al. Correction to: USP1 inhibition destabilizes KPNA2 and suppresses breast cancer metastasis [J]. *Oncogene*, 2022, 41(11): 1673.
- [14] YUAN P, FENG Z, HUANG H, et al. USP1 inhibition suppresses the progression of osteosarcoma via destabilizing TAZ [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(8): 3122-36.
- [15] MARTIN Y, CABRERA E, AMOEDO H, et al. USP29 controls the stability of checkpoint adaptor Claspin by deubiquitination [J]. *Oncogene*, 2015, 34(8): 1058-63.
- [16] WANG C, YANG C, JI J, et al. Deubiquitinating enzyme USP20 is a positive regulator of Claspin and suppresses the malignant characteristics of gastric cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(4): 1136-46.
- [17] NIJMAN S M, HUANG T T, DIRAC A M, et al. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the fanconi anemia pathway [J]. *Mol Cell*, 2005, 17(3): 331-9.
- [18] SUN H, LIU B, WANG W, et al. Adenovirus-mediated expression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase gene induces S-phase arrest in human colorectal cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(5): 1229-35.
- [19] SHEN C, LI J, CHANG S, et al. Advancement of E2F1 in Common Tumors [J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2020, 23(10): 921-6.
- [20] FU Y, HU C, DU P, et al. E2F1 Maintains gastric cancer stemness properties by regulating stemness-associated genes [J]. *J Oncol*, 2021, 2021: 6611327.
- [21] WANG Z, SUN X, BAO Y, et al. E2F1 silencing inhibits migration and invasion of osteosarcoma cells via regulating DDR1 expression [J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(6): 1639-50.
- [22] LIANG Y X, LU J M, MO R J, et al. E2F1 promotes tumor cell invasion and migration through regulating CD147 in prostate cancer [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(4): 1650-8.
- [23] YE W Y, LU H P, LI J D, et al. Clinical implication of E2F transcription factor 1 in hepatocellular carcinoma tissues [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2021, doi: 10.1089/cbr.2020.4342.
- [24] SONEGO M, PELLARIN I, COSTA A, et al. USP1 links platinum resistance to cancer cell dissemination by regulating Snail stability [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(5): eaav3235.
- [25] GARCIA-SANTISTEBAN I, PETERS G J, GIOVANNETTI E, et al. USP1 deubiquitinase: cellular functions, regulatory mechanisms and emerging potential as target in cancer therapy [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 91.
- [26] WILLIAMS S A, MAECKER H L, FRENCH D M, et al. USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma [J]. *Cell*, 2011, 146(6): 918-30.
- [27] RENNIE M L, ARKINSON C, CHAUGULE V K, et al. Structural basis of FANCD2 deubiquitination by USP1-UAF1 [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2021, 28(4): 356-64.
- [28] CHEN J, DEXHEIMER T S, AI Y, et al. Selective and cell-active inhibitors of the USP1/UAF1 deubiquitinase complex reverse cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells [J]. *Chem Biol*, 2011, 18(11): 1390-400.