

USP35促进膀胱癌细胞的恶性亚型转变

周子敬^{1*} 郭亚东² 单泽志³ 毛士玉² 郑泽柠² 葛欣²

¹安徽理工大学医学院, 淮南 232001; ²同济大学医学院/同济大学附属上海市第十人民医院, 上海 200092;

³复旦大学上海肿瘤医院内科, 上海 200030)

摘要 膀胱癌(bladder cancer, BCa)细胞的恶性亚型转变是由非肌层浸润性膀胱癌向肌层浸润性膀胱癌的转变, 其对膀胱癌患者是有害的。据报道, 上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)与这种转变呈正相关。然而, 尽管EMT相关基因标记已被证明可作为癌症的预后指标和潜在治疗靶点, 但其潜在机制仍然不清楚。该研究发现, 去泛素化酶USP35改变了EMT相关因子的蛋白质稳定性。USP35在E-cadherin和P53的下调以及N-cadherin的上调中起到了关键的作用。同时, 通过TargetScan分析发现, 几乎一半的USP35相关的miRNA也参与了MDM2介导的转录后调控。因此USP35可能通过miRNA竞争触发MDM2上调, 从而导致P53下调, MDM2与P53形成了一个完整的负反馈回路。此外, 敲低USP35抑制EMT诱导的膀胱癌细胞的增殖和迁移, 提示USP35的上调可能是膀胱癌向恶性亚型转变的基础信号。

关键词 USP35; EMT; 膀胱癌; P53; 亚型转变; 肿瘤迁移

USP35 Promotes Malignant Subtype Transition of Bladder Cancer Cells

ZHOU Zijing^{1*}, GUO Yadong², SHAN Zezhi³, MAO Shiyu², ZHENG Zening², GE Xin²

¹School of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China; ²School of Medicine, Tongji University/Shanghai Tenth People's Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200092, China;

³Department of Internal Medicine, Fudan University Shanghai Cancer Hospital, Shanghai 200030, China)

Abstract The malignant subtype transition of BCa (bladder cancer) cells is the transition from non-muscle invasive bladder cancer to muscle invasive bladder cancer, which is detrimental to bladder cancer patients. EMT (epithelial-mesenchymal transition) is reported to possess the most positive correlation with this transition. However, the underlying mechanism is still elusive although EMT-related gene signature have been shown to be prognostic indicators and potential therapeutic targets for cancer. This study found that the deubiquitinase USP35 altered the protein stability of multiple EMT-related factors. USP35 played a clear evident role in downregulation of E-cadherin and P53, together with upregulation of N-cadherin. Simultaneously, TargetScan analysis found that almost half of USP35-related miRNAs were also involved in MDM2 mediated post-transcriptional regulation. So USP35 may trigger MDM2 upregulation through miRNA competition, resulting in P53 downregulation, and MDM2 forms a complete negative feedback loop with P53. Furthermore, knockdown USP35 inhibits EMT-induced proliferation and migration capability of BCa cells, suggesting that the up-regulation of USP35 may serve as a foundational signal for BCa transition to malignant phenotype.

Keywords USP35; EMT; BCa; P53; subtype transition; tumor migration

收稿日期: 2023-03-09

接受日期: 2023-05-04

国家自然科学基金(批准号: 82073086、81874198)资助的课题

*通讯作者。Tel: 19155440625, E-mail: zzz20210818@163.com

Received: March 9, 2023

Accepted: May 4, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82073086, 81874198)

*Corresponding author. Tel: +86-19155440625, E-mail: zzz20210818@163.com

膀胱癌(bladder cancer, BCa)通常发生在膀胱上皮细胞中,是世界上第五大最常见的癌症类型。据估计,2019年有524 305例膀胱癌新发病例,有超过228 735例死亡病例^[1]。最常见的膀胱癌类型是尿路上皮癌,占总病例数的90%。30%~50%的早期膀胱癌患者在术后2年内会出现复发的情况,术后5年内复发率也很高^[2]。膀胱癌的存活率与肿瘤分期、病理类型和诊断时间密切相关,其中IV期膀胱癌的5年生存率仅为15%^[3]。

荷兰拉德堡德(Radboud)大学医学中心的研究表明,P53基因突变与膀胱癌的复发和进展有关^[4]。此外,他们还发现P53会影响86%膀胱癌患者基因组的结构^[5]。这一新的认识强调了P53信号在发现膀胱癌治疗的潜在药物方面的重要性。同时,对577例患者和412名健康对照进行了膀胱癌生物标志物的Meta分析,将膀胱癌分为多种亚型,包括肌层浸润性膀胱癌(muscle-invasive bladder cancer)、非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle-invasive bladder cancer)和尿路上皮癌等^[6]。一般来说,与非肌层浸润性膀胱癌相比,肌层浸润性膀胱癌更容易发生远处转移。转移性膀胱癌患者的预后往往不良,总生存率仅为15%左右^[3]。因此,有必要对膀胱癌转移扩散进行深入研究。

上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)通过增强肿瘤细胞的干性,减少肿瘤细胞凋亡,已被证明是赋予肿瘤细胞转移和侵袭能力的重要过程,其与膀胱癌细胞的恶性转化密切相关^[7-9]。尽管EMT已被确定为膀胱癌转移的预测指标且与膀胱癌的耐药性有关^[9],但其潜在机制仍未被完全了解^[10]。因此,人们对膀胱癌的EMT过程中涉及的关键信号分子进行了大量的研究。

本研究报道泛素特异性蛋白酶35(ubiquitin specific peptidase 35, USP35)与膀胱癌细胞的病理特征呈正相关,可以预测膀胱癌患者的不良预后。本研究的数据首次表明,USP35可以诱导膀胱癌上皮细胞的EMT过程,从而促进膀胱癌细胞的增殖和迁移。此外,USP35在膀胱癌细胞中的表达量增加伴随着miRNA竞争,USP35的上调以双微体同源基因2(mouse double minute 2, MDM2)依赖性方式下调P53,这表明USP35可以通过P53介导EMT过程,且可作为膀胱癌的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人HEK293T细胞系、2株膀胱癌细胞

系(T24和RT-4)及人永生化膀胱上皮细胞SV-HUC-1均购于中国科学院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养基、RPMI-1640培养基、10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、1%青霉素-链霉素双抗和0.25%胰酶购于美国Gibco公司; PBS、甘油、TEMED、Tween-20、40%丙烯酰胺、硝酸纤维素膜、4%多聚甲醛等购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 转染试剂lipo2000和RNA提取试剂盒购于美国Invitrogen公司; Trizol、PrimeScript RT反转录试剂盒、Real-time PCR试剂盒、10× DNA上样缓冲液、DNA marker等均购于日本TaKaRa公司; USP35抗体(货号: LS-C178984)购于美国LifeSpan BioSciences公司; N-cadherin(#4061)和E-cadherin(#14472)抗体购于美国Cell Signaling Technology公司; P53(货号: DO-1)、MDM2(货号: SMP14)抗体购于美国Santa Cruz Biotechnology公司; P21(货号: WL0362)和Cyclin D1(货号: WL01435a)抗体购于沈阳万类生物科技有限公司; 4xFlag(货号: 20543-1-AP)和GAPDH(货号: 10494-1-AP)抗体购于美国Proteintech公司; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG抗体购于北京博奥龙免疫技术有限公司。

1.1.3 质粒与菌种 pcDNA3.1-4xFlag-USP35质粒由王平教授(同济大学附属第十人民医院癌症中心)提供。感受态大肠杆菌DH5 α 购于日本TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与克隆筛选 HEK293T培养在含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中,而T24培养在含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的RPMI-1640培养基中,以上细胞均放入37℃、5% CO₂培养箱中培养。HEK293T细胞使用磷酸钙法进行转染,T24细胞使用lipo2000进行转染。将T24细胞接种于6孔板中,当细胞密度为80%时,参照lipo2000说明书将重组质粒及对照载体转染至细胞内。细胞贴壁后,换液,加入2 μ g/mL的嘌呤霉素进行筛选,2天后更换全新培养基。挑选形成的单细胞克隆至6孔板中进行扩大培养,直至获得稳定的具有抗性的细胞克隆。文章中使用的USP35和MDM2的shRNA靶序列(所有序列均为人源)见表1。

1.2.2 总RNA的提取及qRT-PCR检测 Trizol法提取T24细胞中的总RNA,将RNA用一步法逆转录成cDNA,然后用qRT-PCR检测USP35和MDM2的

表1 短发夹RNA序列
Table 1 Sequences of shRNA

短发夹RNA shRNA	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
NC shRNA	TTC TCC GAA CGT GTC ACG T
USP35 shRNA1	AGC ATC CTT CAG GCC TTA TTC
USP35 shRNA2	CGC AGA TGC TGA CTG CCA TTA
USP35 shRNA3	CCG ACT GCT GTA CGG TAT AAA
MDM2 shRNA1	GAT TCC AGA GAG TCA TGT GTT
MDM2 shRNA2	AAT ACC AAC ATG TCT GTA CCT

表2 qRT-PCR引物序列
Table 2 Primer sequences for qRT-PCR

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
<i>USP35</i>	F: ATC TGT CAG CAA CGT CAC C R: CCT TCA TCC TCA TCC TTG TCT TC
<i>MDM2</i>	F: GGC AGG GGA GAG TGA TAC AGA R: GAA GCC AAT TCT CAC GAA GGG

mRNA水平,以 *GAPDH* 作为内参。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达水平,每个基因设置3个复孔。qRT-PCR引物序列(所有序列均为人源)见表2。

1.2.3 WB(Western bolt)检测蛋白表达水平 收集的细胞在蛋白质裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-Cl、0.5% NP-40、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、10%甘油磷酸盐和蛋白酶抑制剂, pH7.4)中裂解。30 min后, 4 °C、12 000 r/min离心15 min以分离细胞裂解物的可溶性部分。将蛋白样品煮沸,然后加入到凝胶样品孔中,通过SDS-PAGE凝胶电泳进行分离,最后进行WB分析。使用电化学发光(electrogenated chemiluminescence, ECL)图像分析系统(上海天能科技有限公司)对ECL发光等直接成像,获得实验结果。

1.2.4 CCK8实验 将处于对数生长期的T24细胞及筛选的细胞,按 5×10^3 个/孔的密度接种于96孔板(培养基体积: 100 μ L)中。每组细胞设置5个复孔,分别于Day0、Day1、Day2、Day3、Day4弃去上清,加入100 μ L含有10% CCK8的无血清DMEM培养基,于37 °C、5% CO₂培养箱中孵育2 h后,吸取90 μ L上清,用酶标仪测定波长为450 nm处的吸光度(optical density, *D*)值,计算细胞增长率。

1.2.5 平板克隆实验 将转染的细胞接种于6孔板中,初始细胞密度为每孔500个细胞,培养7~10天。细胞集落用4%多聚甲醛室温固定15 min,并在室温下用结晶紫染色15 min。将培养板在水流下洗涤后拍照。

1.2.6 细胞划痕实验 将细胞接种于6孔板中,待其融合率达到90%以上时,弃去培养基,用PBS清洗3次,用200 μ L枪头在每孔细胞中均匀划十字横线,用PBS清洗漂浮的细胞,加入培养基,置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。在0、24、48 h分别进行显微镜观察和拍照,计算愈合率。划痕愈合率= $[(S_{0h}-S_{24h})/S_{0h}] \times 100\%$, *S*表示未愈合的面积。

1.2.7 肿瘤干细胞成球实验 肿瘤球富集自T24细胞。将T24细胞的单细胞悬液(每孔200个细胞,每组有5个复孔)接种在96孔超低附着板(Corning公司,货号: 3474)上,并在DMEM/F12培养基(Gibco, 1:1)中培养,补充5 mg/mL胰岛素(Sigma)、20 ng/mL EGF(Sigma)、1:50 B27(Gibco)、10 ng/mL碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和0.4% BSA。培养大约10天后,离心收集培养基中悬浮的较大、形状较规则的肿瘤细胞球体,胰酶消化,用配制好的培养基重悬肿瘤细胞,按照1:2的比例传代,继续培养。在相差显微镜下可视化肿瘤球体,拍照和计数并以图形表示。显微镜下计数其中直径大于100 μ m的悬浮细胞球体数目,随机选取5个连续视野,计算悬浮细胞球的比率。用0.05% EDTA消化球体,并通过40 μ m过滤器过滤。

1.2.8 生物信息学分析 采用基因富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA),获得了300个与USP35呈正相关的基因,检测了USP35在膀胱癌中

的生物学功能。GSEA分析使用R包聚类分析器进行。

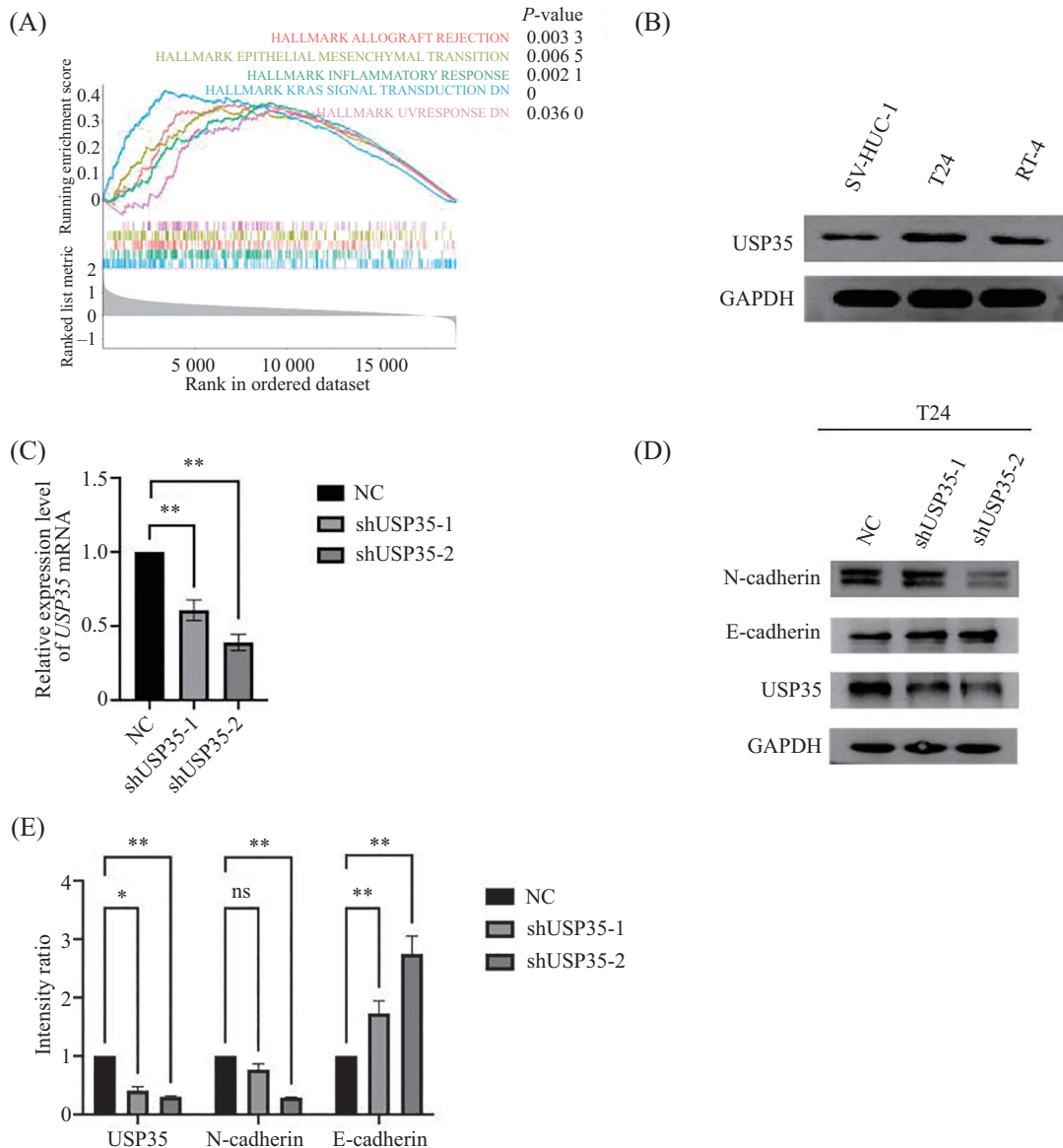
1.3 统计学分析

GraPhPad Prism软件(V9.1.1, GraPhPad Software, Inc., USA)用于数据分析。使用双尾未配对 Student's *t* 检验进行统计分析。这些数据以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)的方式表示。所有实验独立重复至少3次。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 USP35参与膀胱癌EMT的过程

通过GSEA发现USP35高表达与移植排斥、EMT、炎症应答、KRAS信号转导和UV应答密切相关(图1A)。EMT已被证明在膀胱癌细胞的亚型转化中起着关键作用,并在膀胱癌转移和预后中起决定性作用。为了能够更好地验证USP35在膀胱癌中的生物学作用,我们通过WB检测了3株常见的具有不同特



A: GSEA分析显示USP35与移植排斥反应、上皮-间充质转化、炎症反应、KRAS信号转导和UV应答密切相关; B: USP35在膀胱癌不同细胞系中的表达水平; C: qRT-PCR检测细胞中USP35的表达水平; D、E: WB检测T24细胞中USP35、E-cadherin和N-cadherin的蛋白水平, 敲低USP35降低了N-cadherin和USP35蛋白的表达水平, 增加了E-cadherin蛋白的表达水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, ns: 无统计学意义。

A: GSEA analysis shows that USP35 is closely related to allograft rejection, epithelial-mesenchymal transition, inflammatory response, KRAS signal transduction and UV response; B: the expression level of USP35 in different cell lines of bladder cancer; C: the RNA level of USP35 was detected by qRT-PCR; D,E: the expression of N-cadherin, E-cadherin and USP35 protein was measured by WB, knocking down USP35 reduced N-cadherin and USP35 protein expression, and increased E-cadherin protein expression. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, ns: no significance.

图1 USP35参与介导膀胱癌的EMT过程

Fig.1 USP35 is involved in the EMT process of bladder cancer

征的膀胱癌细胞株(T24、SV-HUC-1和RT-4)中 USP35 的表达情况,发现 USP35 在 T24 中表达量较高(图 1B),因此随后构建了 USP35 敲低的 T24 细胞系。通过 qRT-PCR 和 WB 验证 shRNA 在 T24 中的敲减效率,结果显示两条 shRNA 都可以显著降低 USP35 mRNA 的转录水平和 USP35 蛋白的表达水平(图 1C~图 1E)($P < 0.05$)。通过 WB 检测发现,在 T24 细胞中,敲低 USP35 可以显著上调 E-cadherin 的表达和抑制 N-cadherin 的表达(图 1D 和图 1E)。结果提示 USP35 参与了膀胱癌 EMT 的调控。

2.2 USP35 通过影响 MDM2/P53 信号通路来调控 EMT

接下来,我们进一步解析了 USP35 促进膀胱癌发生 EMT 的分子机制。USP35 作为一种去泛素化酶,通过 UbiBrowser 2.0(<http://ubibrowser.ncpsb.org/>)来预测 USP35 的下游底物,预测到的下游底物包括已知的 AURKB、ESR1、TNIP2、VDAC1,还有 KDM1A、TP53、MDM2 等。MDM2/P53 可能是 USP35 潜在的下游底物(图 2A)。USP35 和 MDM2 之间的蛋白质相互作用结构模式图如图 2B 所示,应用 HDOCK(<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>)和 LigPlot+ 2.2.4(<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>)软件找出氢键、盐桥与疏水键相互作用形成的功能残基,利用 PyMol 2.2.0(<https://pymol.org/2/>)观察蛋白质-蛋白质对接构象。MDM2 显示为绿色,USP35 显示为蓝色,它们的结合位点由小棒显示(见图 2B 中的放大图像)。利用 Prodigy(<https://bianca.science.uu.nl/prodigy/>)计算组合蛋白的结合能和解离常数(dissociation constant, K_d),结果表明组合蛋白的结合能为 -11.1 kcal/mol, K_d 得分为 7.3×10^9 。其中 P53 已被多篇文献报道参与了 EMT 的调控^[11-12]。而在 P53 诸多负反馈调节机制中,最核心的机制是由 MDM2 及其同源异聚复合蛋白 MDMX(murine double minute X)实现的。MDM2 可以降低 P53 的转录活性和稳定性^[13],因此 MDM2 被认为是与 P53 关联最为紧密的功能靶标。WB 结果显示在 T24 细胞中,敲低 USP35,可显著下调 MDM2 的表达水平,上调 P53 的表达(图 2C 和图 2D)($P < 0.05$)。分子对接分析和 WB 结果表明,USP35 可能通过与 MDM2 的直接相互作用介导 MDM2/P53 信号转导(图 2B),从而增加 MDM2 的稳定性。另外,我们还构建了 USP35 和 MDM2 同时敲低的 T24 细胞系,通过 WB 验证 shRNA 在 T24 中的敲减效率,结果显示 shUSP35

和 shMDM2 分别显著降低了 USP35 和 MDM2 蛋白的表达量(图 2E 和图 2F)。通过 WB 检测发现,在 T24 细胞中,同时敲低 USP35 和 MDM2 后,USP35 调控 EMT 的能力降低(图 2E 和图 2G)。

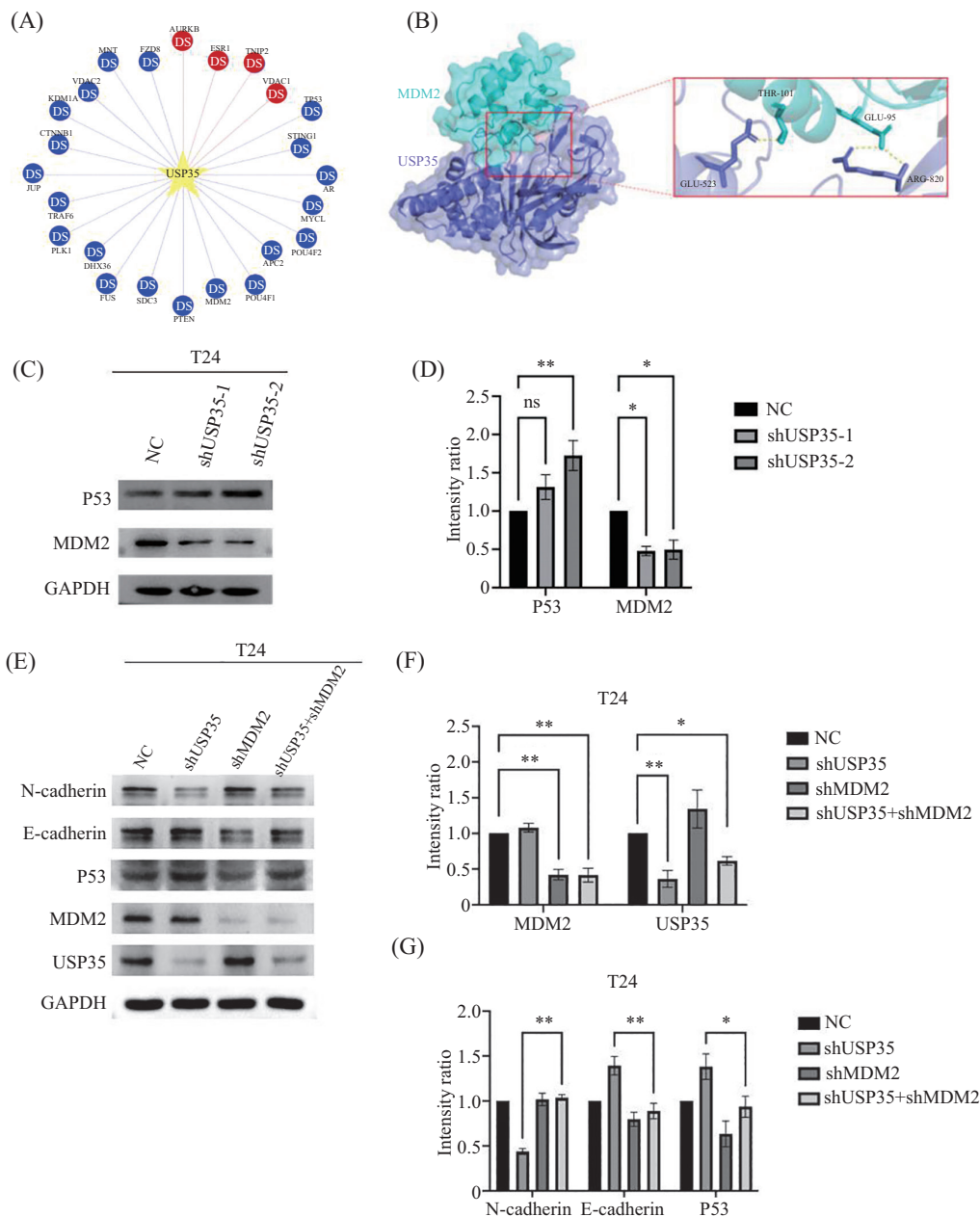
2.3 参与 USP35 和 MDM2 调控的 miRNA

为进一步探索 USP35 上调 MDM2 表达的原因,通过 TargetScan 分析寻找可能参与 USP35 和 MDM2 调控的 miRNA,因为研究发现,miRNA 通过靶向 MDM2/P53 信号通路的调控因子(例如 Zeb1/2、Snail、Slug 和 Twist1)促进 EMT,从而导致 MDM2/P53 通路的激活^[14]。

有趣的是,我们发现几乎一半已被鉴定的调节 USP35 的 miRNA 参与 MDM2 表达调控(图 3A 和表 3),这表明在膀胱癌细胞中过表达 USP35 可以上调 MDM2(图 3B),根据 miRNA 竞争理论^[14-16],共享 miRNA 结合位点的转录本会竞争结合相同的 miRNA,由此调控彼此的表达水平。这种 USP35 过表达将有效地阻止 miRNA 诱导的 MDM2 下调,从而导致 P53 水平的显著降低($P < 0.05$)。为了证实我们的假设,我们进行了实验,发现 USP35 以剂量依赖性的方式降低了 P53 水平(图 3C)。此外,敲低 USP35 抑制了癌细胞生长(图 3D),这也可能与激活 P53 信号有关,因为 P53 也以其诱导细胞周期停滞的能力而闻名^[17-18]。由于 MDM2/P53 可能是 USP35 潜在的下游底物,USP35 促进 BCa 进展的过程与 P53 通路密切相关。因此,我们用 WB 检测 P53 通路相关蛋白(P53、P21 和 Cyclin D1)的表达水平以阐明 USP35 促进 BCa 进展的分子机制,结果发现敲除 USP35 后,P53 和 P21 表达量明显增高;相反 Cyclin D1 的表达量明显降低。P53/P21/Cyclin D1 被广泛认为是调控细胞周期的经典途径。敲低 USP35 显著改变了细胞周期相关蛋白的表达水平(图 3E 和图 3F)。

2.4 在体外,敲低 USP35 抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移和干性的获得

由于 P53 在调节癌细胞特性(如肿瘤细胞的生长和转移)方面具有广泛的功能,因此研究 USP35 是否能够促进肿瘤细胞的增殖和转移侵袭引起了我们的兴趣。我们通过平板克隆(图 4A 和图 4B)、肿瘤成球(图 4C 和图 4D)和细胞迁移(图 4E 和图 4F)实验进行验证。平板克隆结果表明,USP35 促进膀胱癌细胞的增殖。肿瘤成球实验结果显示,NC 组膀胱癌肿瘤干细胞的数量分别从 57 和 58 减少到 40 和 45,而敲低



A: UbiBrowser 2.0分析预测USP35的下游底物; B: USP35和MDM2蛋白质相互作用结构模式图。USP35表现为蓝色, MDM2表现为绿色, 两者结合位点为黄色小棒; C、D: WB检测T24细胞中P53和MDM2的蛋白水平, 敲低USP35降低了MDM2蛋白的表达量, 增加了P53蛋白的表达量; E~G: 同时敲低USP35和MDM2后, 通过WB检测T24细胞中USP35、MDM2、E-cadherin和N-cadherin的蛋白水平。同时敲低USP35和MDM2后, USP35调控EMT的能力降低。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns: 无统计学意义。

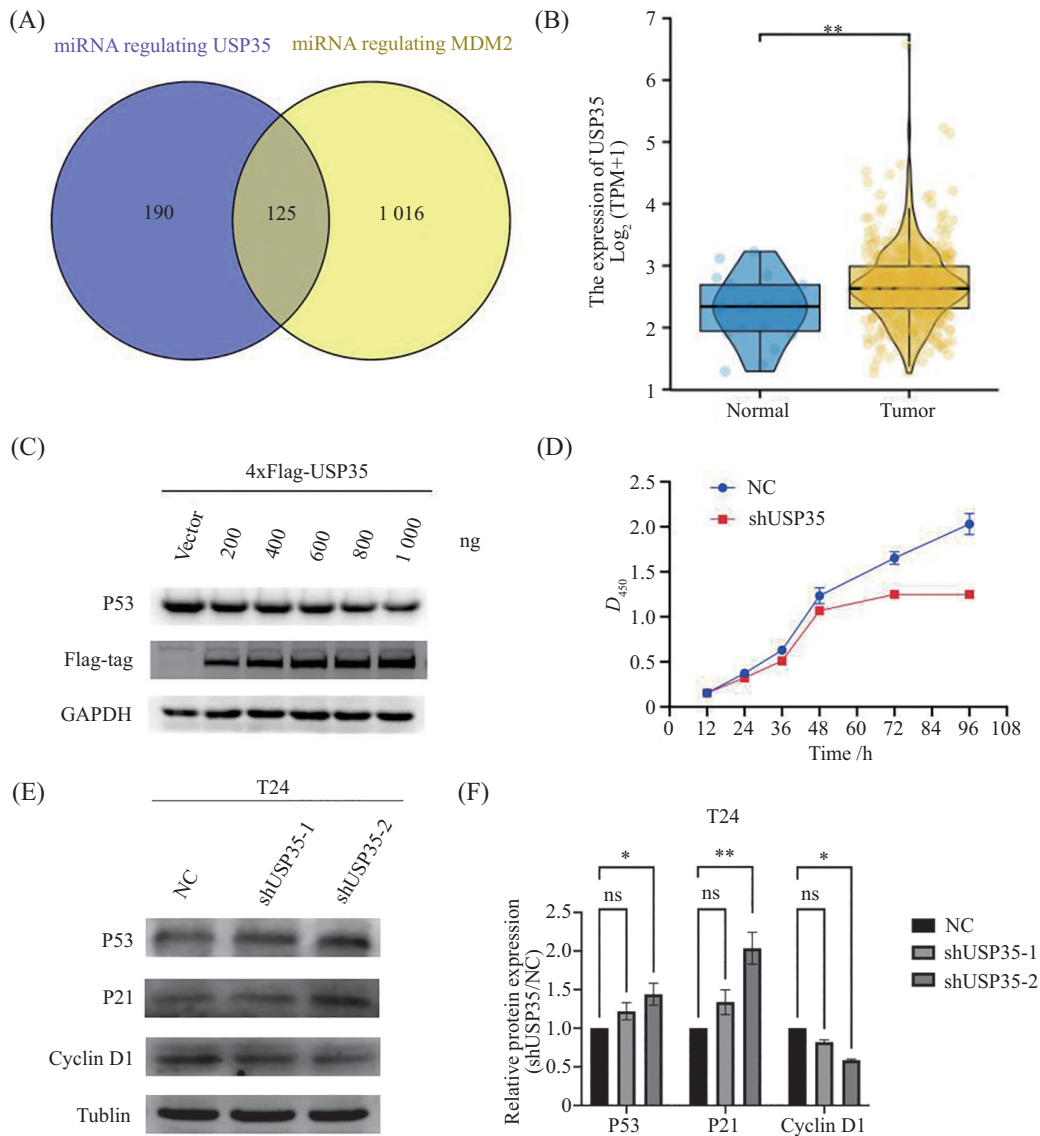
A: UbiBrowser 2.0 analysis predicts downstream substrates for USP35; B: USP35 and MDM2 protein interaction structure pattern diagram. USP35 is represented as slate cartoon, while MDM2 is shown as cyan cartoon, and their binding sites are displayed yellow sticks; C,D: the expression of P53 and MDM2 protein were measured by WB, knocking down USP35 reduced MDM2 protein expression, and increased P53 protein expression; E-G: after knocking down USP35 and MDM2 at the same time, WB is used to detect the proteins levels of USP35, MDM2, E-cadherin and N-cadherin in T24 cells. After knocking down USP35 and MDM2 at the same time, USP35's ability to regulate EMT is reduced. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns: no significance.

图2 USP35通过影响MDM2/P53信号通路来调控EMT

Fig.2 USP35 regulates EMT by affecting the MDM2/P53 signaling pathway

USP35后, 膀胱癌肿瘤干细胞的数量分别从65和69减少到34和35, 因此USP35可促进膀胱癌细胞干性的获得。细胞划痕实验结果表明, USP35促进膀胱

癌细胞的转移。综上所述, USP35积极促进膀胱癌细胞的增殖、迁移和干性的获得, 为膀胱癌治疗提供了有前途的治疗策略。



A: TargetScan预测可能参与USP35和MDM2调控的miRNA, 取调控USP35的miRNA和调控MDM2的miRNA的交集并作图; B: 正常组织和BCa组织中的USP35表达水平; C: WB检测T24细胞中USP35转染不同剂量时P53的蛋白水平; D: CCK8实验检测转染USP35基因对膀胱癌细胞增殖能力的影响; E、F: WB检测T24细胞中P53通路相关蛋白的表达水平; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns: 无统计学意义。

A: TargetScan predicts the miRNA that may be involved in the regulation of USP35 and MDM2. The intersection of USP35-regulated miRNA and MDM2-regulated miRNA is taken and plotted; B: USP35 expression levels in normal tissues and BCa tissues; C: WB detects protein levels of P53 when USP35 is transfected at different doses in T24 cells; D: CCK8 experiments detects the effect of transfection of USP35 gene on the proliferation capacity of bladder cancer cells; E,F: WB detects the expression levels of P53 pathway-related proteins in T24 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns: no significance.

图3 参与USP35和MDM2调控的miRNA

Fig.3 miRNA involved in the regulation of USP35 and MDM2

3 讨论

膀胱癌是一种异质性疾病。虽然膀胱癌的治疗已经取得了长足的进展, 但是目前膀胱癌向侵袭性疾病发展的相关研究甚少^[19]。因此, 全面了解膀胱癌细胞亚型转变的分子机制将会为未来膀胱癌的复发预测和个性化治疗提供必要的帮助^[20]。

泛素化是最常见的蛋白质翻译后修饰之一,

在介导细胞功能方面具有多种作用^[21-22]。泛素与底物蛋白的结合是通过酶级联介导的多步骤过程来实现的^[14,23], 而泛素部分的去除是由去泛素化酶(deubiquitinating enzyme, DUB)催化的^[24]。到目前为止, 只有少数DUB被报道参与膀胱癌的进展, 例如, MINDY1作为YAP的去泛素化酶, 为膀胱癌的治疗提供了一个可能的靶点^[25]。METTL14和USP38的反

表3 MDM2相关miRNA对不同肿瘤EMT的影响

Table 3 Effects of MDM2-related miRNA on EMT in different tumors

小干扰RNA microRNA	分子机制 Molecular mechanism
miRNA-370-3p	The combination of miR-370 and PTEN inactivates AKT, MDM2 and mTOR while stimulates caspase-3, P53 and GSK3 β expression, promoting apoptosis and suppressing proliferation of gastric cancer cells ^[32]
miRNA-1827	circ_0080229 is an oncogenic factor that mechanistically promotes proliferation and metastasis in glioma by increasing MDM2 through sponging miR-1827 ^[33] miR-1827 is a novel miRNA that targets MDM2 through binding to the 3'-UTR of <i>MDM2</i> mRNA. miR-1827 negatively regulates MDM2, which in turn increases P53 protein levels to increase transcriptional activity of P53 and enhance P53-mediated stress responses, including apoptosis and senescence. Overexpression of miR-1827 suppresses the growth of xenograft colorectal tumors, whereas the miR-1827 inhibitor promotes tumor growth in mice in a largely P53-dependent manner ^[34]
miRNA-647	Upregulation of circular RNA circFAM53B predicts adverse prognosis and accelerates the progression of ovarian cancer via the miR-646/VAMP2 and miR-647/MDM2 signaling pathways ^[35]
miRNA-1252-5p	Circular RNA hsa_circ_0000073 enhances osteosarcoma cells malignant behavior by sponging miR-1252-5p and modulating CCNE2 and MDM2 ^[36]
miRNA-2113	MNX1-AS1 is over-expressed in prostate cancer patients, posing promotive effects on proliferation, migration and invasion via miR-2113/MDM2 axis ^[37]
miRNA-205-5p	BMSCs (bone marrow mesenchymal stem cells)-derived exosomal miR-205-5p inhibits inflammation in RA (rheumatoid arthritis) through MDM2 ^[38]
miRNA-152-3p	Nuclear HOTAIRM1 promotes EGR1 ubiquitination by enhancing the MDM2-EGR1 interaction, while cytoplasmic HOTAIRM1 increases ULK3 expression by competitively sponging miR-152-3p, therefore contributing to leukemia cell autophagy and proliferation ^[39]
miRNA-5003-3p	LINC00342 promotes cell proliferation, migration and invasion and inhibites cell apoptosis <i>in vitro</i> by miR-545-5p/MDM2 axis. LINC00342 knockdown suppresses COAD tumor growth and proliferation <i>in vivo</i> by regulating miR-545-5p/MDM2 ^[40]
miRNA-545-5p	miR-140-3p can promote the migration and differentiation of D-NPMSCs (degenerative intervertebral disc nucleus pulposus stem/progenitor cells) and down-regulate KLF5 to promote N-cadherin expression and transcriptionally inhibit MDM2 to up-regulate Slug expression ^[41]
miRNA-140-3p	miR-503-3p promotes epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by directly targeting SMAD2 and E-cadherin ^[42]

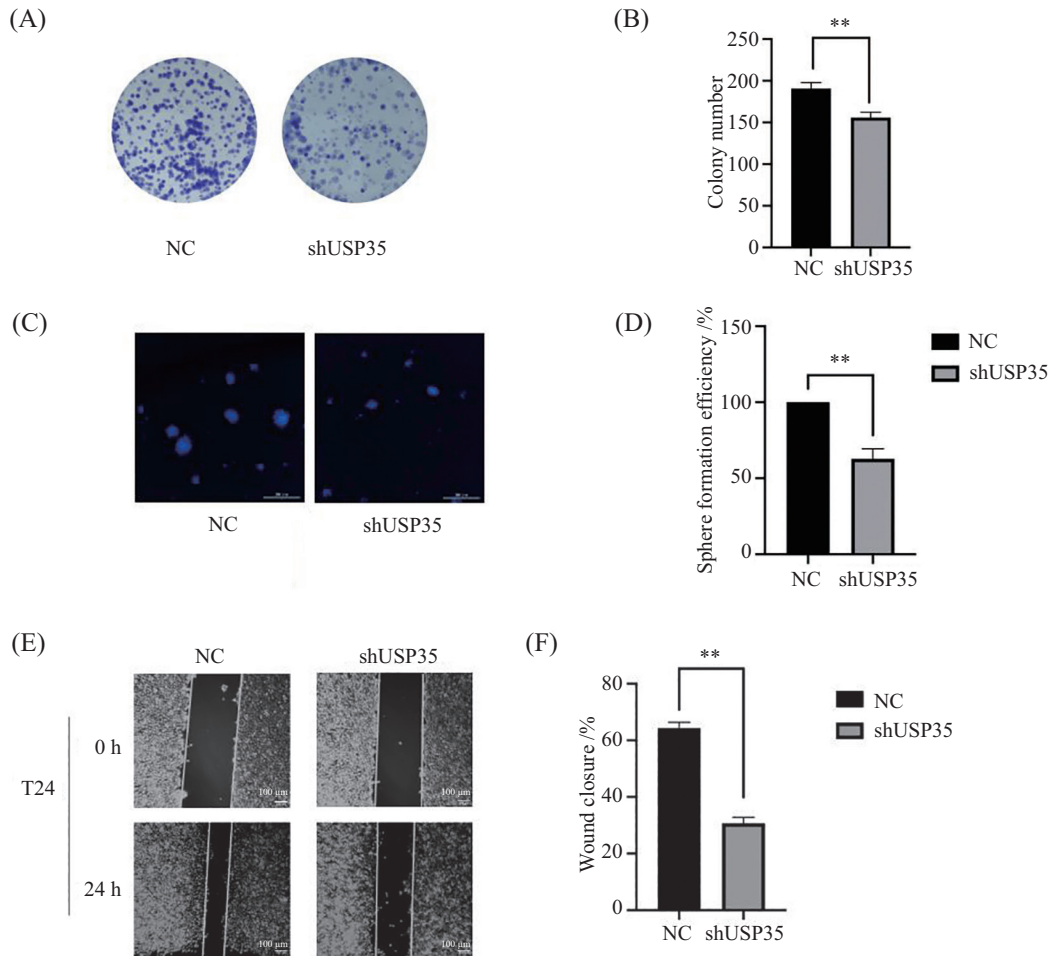
馈回路调控膀胱癌细胞的迁移、侵袭和EMT^[26]。因此,对于DUB在膀胱癌细胞恶性亚型转变期间的调节机制知之甚少。

USP35作为一种去泛素酶已被报道通过与肿瘤相关蛋白的相互作用参与多个肿瘤的发生发展。例如,USP35通过抑制卵巢癌中STING介导的干扰素信号转导^[27],从而诱导肿瘤免疫逃逸。USP35过表达抑制了Erastin/RSL3诱导的铁死亡,从而促进肺癌的发生发展。USP35由雌激素和AKT调节,通过稳定和增强雌激素受体 α 的转录活性来促进乳腺肿瘤发生^[28]。在非小细胞肺癌中,USP35通过抑制RRBP1蛋白的降解,从而缓解内质网应激诱导的细胞凋亡^[29]。另外USP35可通过稳定BIRC3的表达抑制顺铂诱导的肿瘤细胞凋亡^[30]。

在本研究中,我们发现USP35可通过稳定MDM2蛋白的表达,从而抑制P53的表达,促进膀胱癌的EMT,最终增强膀胱癌的侵袭转移能力。几乎所有人类肿瘤中均存在P53信号通路的异常,近50%的恶性肿瘤中

存在P53的突变。在结构上,MDM2的N端P53结合结构域可以结合到P53的转录激活结构域,阻碍P53与其共转录激活因子的结合,抑制P53靶基因的激活;此外,MDM2的C端RING(really interesting new gene)结构域具有E3泛素连接酶活性,可以泛素化降解P53和MDMX。随后我们通过分子对接分析发现,USP35可能通过与MDM2的直接相互作用介导MDM2/P53信号转导。P53抑制EMT最显著的特征是它对肿瘤获得干性的能力的影响,因为EMT是肿瘤复发、转移和侵袭所依赖的主导因素^[31]。我们进一步通过肿瘤成球实验发现敲低USP35可显著抑制肿瘤球的形成。因此,我们的数据提供了一个USP35-MDM2/P53-EMT的完整信号轴,此信号轴可作为膀胱癌亚型转变的新型转导途径,相关功能实验的研究也证实了USP35可促进膀胱癌细胞的增殖、迁移和膀胱癌细胞干性的获得(图4)。

本研究揭示了DUB USP35作为膀胱癌亚型转变的治疗靶点,可能为专注于抑制EMT信号轴的癌症治疗开辟一条新的途径。但本研究缺少动物实验以



A, B: 敲低USP35后, 平板克隆实验检测T24细胞的增殖情况; C, D: 敲低USP35后, 肿瘤干细胞成球实验检测膀胱肿瘤球体的大小、直径及数目; E, F: 敲低USP35后, 划痕实验检测T24细胞的迁移情况。 ** $P < 0.01$ 。

A,B: colony formation assay was taken to evaluate the proliferation of T24 cells after knocking down USP35; C,D: after knocking down USP35, the cancer stem cell sphere formation assay was taken to evaluate the size, diameter and number of bladder tumor spheroids; E,F: wound-healing assay was taken to evaluate the migration of T24 cells after knocking down USP35. ** $P < 0.01$.

图4 USP35促进膀胱癌细胞的增殖、迁移及膀胱癌细胞干性的获得

Fig.4 USP35 promotes the proliferation and migration of bladder cancer cells and the acquisition of dryness of bladder cancer cells

进一步在体内验证 USP35 是否可通过诱导 EMT 促进膀胱癌远处转移, 并且需要进一步通过临床样本验证 USP35 与膀胱癌患者远处转移的临床相关性。

参考文献 (References)

- [1] KARIMI A, SHOBEIRI P, AZADNAJAFABAD S, et al. A global, regional, and national survey on burden and Quality of Care Index (QCI) of bladder cancer: the global burden of disease study 1990-2019 [J]. PLoS One, 2022, 17(10): e0275574.
- [2] TANG X, CAO Y, LIU J, et al. Diagnostic and predictive values of inflammatory factors in pathology and survival of patients undergoing total cystectomy [J]. Mediators Inflamm, 2020, 2020: 9234067.
- [3] ROTH B, FURRER M A, GIANNAKIS I, et al. Positive precystectomy biopsies of the prostatic urethra or bladder neck do not necessarily preclude orthotopic bladder substitution [J]. J Urol, 2019, 201(5): 909-15.
- [4] GALESLOOT T E, GROTENHUIS A J, KOLEV D, et al. Genome-wide meta-analysis identifies novel genes associated with recurrence and progression in non-muscle-invasive bladder cancer [J]. Eur Urol Oncol, 2022, 5(1): 70-83.
- [5] LORENZO ROMERO J G, SALINAS SANCHEZ A S, GIMENEZ BACHS J M, et al. p53 gene mutations in superficial bladder cancer [J]. Urol Int, 2004, 73(3): 212-8.
- [6] ZHENG L F, SUN W Y. Meta-analysis of microRNAs as biomarkers for muscle-invasive bladder cancer [J]. Biomed Rep, 2016, 5(2): 159-64.
- [7] TANG C, MA J, LIU X, et al. Development and validation of a novel stem cell subtype for bladder cancer based on stem genomic profiling [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 457.
- [8] XIAO Z, CAI Z, DENG D, et al. An EMT-based risk score thoroughly predicts the clinical prognosis, tumor immune microenvironment and molecular subtypes of bladder cancer [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1000321.
- [9] CAO R, YUAN L, MA B, et al. An EMT-related gene signature for

- the prognosis of human bladder cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(1): 605-17.
- [10] HUANG J, LO U G, WU S, et al. The roles and mechanism of IFIT5 in bladder cancer epithelial-mesenchymal transition and progression [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 437.
- [11] SCHUBERT J, BRABLETZ T. P53 spreads out further: suppression of EMT and stemness by activating miR-200c expression [J]. *Cell Res*, 2011, 21(5): 705-7.
- [12] JACKSON-WEAVER O, UNGVIJANPUNYA N, YUAN Y, et al. PRMT1-p53 pathway controls epicardial EMT and invasion [J]. *Cell Rep*, 2020, 31(10): 107739.
- [13] WANG X, JIANG X. Mdm2 and MdmX partner to regulate p53 [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(10): 1390-6.
- [14] PARFENYEV S, SINGH A, FEDOROVA O, et al. Interplay between p53 and non-coding RNAs in the regulation of EMT in breast cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 17.
- [15] NGUYEN A V, TOEPEL J, BURGESS S, et al. Time-course global expression profiles of *Chlamydomonas reinhardtii* during photobiological H₂ production [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29364.
- [16] WANG X, YIN H, ZHANG L, et al. The construction and analysis of the aberrant lncRNA-miRNA-mRNA network in non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(5): 1772-8.
- [17] LIVINGSTONE L R, WHITE A, SPROUSE J, et al. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53 [J]. *Cell*, 1992, 70(6): 923-35.
- [18] LI T, KON N, JIANG L, et al. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1269-83.
- [19] CHOI W, CZERNIAK B, OCHOA A, et al. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer [J]. *Nat Rev Urol*, 2014, 11(7): 400-10.
- [20] KNOWLES M A. Bladder cancer subtypes defined by genomic alterations [J]. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 2008, 42: 116-30.
- [21] YAO T, COHEN R E. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome [J]. *Nature*, 2002, 419(6905): 403-7.
- [22] MAXWELL B A, GWON Y, MISHRA A, et al. Ubiquitination is essential for recovery of cellular activities after heat shock [J]. *Science*, 2021, 372(6549): eabc3593.
- [23] SAIFEE N H, ZHENG N. A ubiquitin-like protein unleashes ubiquitin ligases [J]. *Cell*, 2008, 135(2): 209-11.
- [24] D'ARCY P, LINDER S. Molecular pathways: translational potential of deubiquitinases as drug targets [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(15): 3908-14.
- [25] LUO Y, ZHOU J, TANG J, et al. MINDY1 promotes bladder cancer progression by stabilizing YAP [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 395.
- [26] HUANG J, ZHOU W, HAO C, et al. The feedback loop of MET-TL14 and USP38 regulates cell migration, invasion and EMT as well as metastasis in bladder cancer [J]. *PLoS Genet*, 2022, 18(10): e1010366.
- [27] ZHANG J, CHEN Y, CHEN X, et al. Deubiquitinase USP35 restrains STING-mediated interferon signaling in ovarian cancer [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(1): 139-55.
- [28] CAO J, WU D, WU G, et al. USP35, regulated by estrogen and AKT, promotes breast tumorigenesis by stabilizing and enhancing transcriptional activity of estrogen receptor alpha [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6): 619.
- [29] WANG W, WANG M, XIAO Y, et al. USP35 mitigates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by stabilizing RRBP1 in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Oncol*, 2022, 16(7): 1572-90.
- [30] LIU C, CHEN Z, DING X, et al. Ubiquitin-specific protease 35 (USP35) mediates cisplatin-induced apoptosis by stabilizing BIRC3 in non-small cell lung cancer [J]. *Lab Invest*, 2022, 102(5): 524-33.
- [31] BECK B, LAPOUGE G, RORIVE S, et al. Different levels of Twist1 regulate skin tumor initiation, stemness, and progression [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 67-79.
- [32] ZENG Y, FU M, WU G W, et al. Upregulation of microRNA-370 promotes cell apoptosis and inhibits proliferation by targeting PTEN in human gastric cancer [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(4): 1589-99.
- [33] ZHOU Z, ZHENG X, MEI X, et al. Hsa_circ_0080229 upregulates the expression of murine double minute-2 (MDM2) and promotes glioma tumorigenesis and invasion via the miR-1827 sponging mechanism [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(9): 762.
- [34] ZHANG C, LIU J, TAN C, et al. microRNA-1827 represses MDM2 to positively regulate tumor suppressor p53 and suppress tumorigenesis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 8783-96.
- [35] SUN D, LIU J, ZHOU L. Upregulation of circular RNA circ FAM53B predicts adverse prognosis and accelerates the progression of ovarian cancer via the miR 646/VAMP2 and miR 647/MDM2 signaling pathways [J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(6): 2728-37.
- [36] REN Z, YANG Q, GUO J, et al. Circular RNA hsa_circ_0000073 enhances osteosarcoma cells malignant behavior by sponging miR-1252-5p and modulating CCNE2 and MDM2 [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 714601.
- [37] LIANG D, TIAN C, ZHANG X. lncRNA MNX1-AS1 promotes prostate cancer progression through regulating miR-2113/MDM2 axis [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 26(1): 231.
- [38] SUN Q, ZHANG X, TAN Z, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells-secreted exosomal microRNA-205-5p exerts inhibitory effect on the progression of liver cancer through regulating CDKL3 [J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 225: 153549.
- [39] JING Y, JIANG X, LEI L, et al. Mutant NPM1-regulated lncRNA HOTAIRM1 promotes leukemia cell autophagy and proliferation by targeting EGR1 and ULK3 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 312.
- [40] MIAO Z, LIU S, XIAO X, et al. LINC00342 regulates cell proliferation, apoptosis, migration and invasion in colon adenocarcinoma via miR-545-5p/MDM2 axis [J]. *Gene*, 2020, 743: 144604.
- [41] WANG Z, ZHANG S, ZHAO Y, et al. MicroRNA-140-3p alleviates intervertebral disc degeneration via KLF5/N-cadherin/MDM2/Slug axis [J]. *RNA Biol*, 2021, 18(12): 2247-60.
- [42] ZHAO Z, FAN X, JIANG L, et al. MiR-503-3p promotes epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by directly targeting SMAD2 and E-cadherin [J]. *J Genet Genomics*, 2017, 44(2): 75-84.