

泛素特异性蛋白酶36调控Caspase-8抑制 肝癌细胞凋亡

韩军军 於伟明 赵文妍 金肇清 杨自强 陈炜青 陈飞华 龚谋春*

(杭州市临安区第一人民医院/杭州医学院附属临安人民医院, 杭州 311300)

摘要 泛素特异性蛋白酶36(ubiquitin specific peptidase 36, USP36)是由USP36基因编码的去泛素化过程中的关键酶。它通过去除靶蛋白上的泛素修饰调节蛋白质的稳定性和功能,在细胞内信号转导、蛋白质降解及细胞周期调控中发挥重要作用,而其在肝癌中的功能和作用尚不清楚。本研究通过生物信息学分析USP36在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达水平及其与临床预后的关系。构建USP36基因过表达和敲低的HepG2与Huh7肝癌细胞株,分别在EGF因子和TNF- α 因子刺激条件下进行细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡相关实验[四甲基偶氮唑盐法(MTT法)、小室迁移(Transwell迁移)、划痕实验、流式细胞术及原位末端标记法(TUNEL)]。通过蛋白质免疫印迹法(Western blot)分析半胱天冬酶-8蛋白(Caspase-8蛋白)、活化型半胱天冬酶-8蛋白(Cleaved-Caspase-8蛋白)表达水平。结果显示: USP36在HCC组织中显著高表达,且其高表达与患者的总体生存率(OS)、无进展生存期(PFS)、无病生存期(DFS)和无复发生存期(RFS)均呈负相关。实验表明, USP36基因过表达组在EGF因子与TNF- α 因子刺激下, Caspase-8总蛋白水平显著上升,但活化形式Cleaved-Caspase-8蛋白下降,同时细胞增殖、迁移与侵袭能力变强,而凋亡水平大幅下降。相反, USP36敲低组表现出Caspase-8总量降低、Cleaved-Caspase-8表达量上升,且细胞增殖、迁移和侵袭能力减弱,凋亡水平提升。总之, USP36通过稳定Caspase-8,抑制外源性凋亡并促进肿瘤细胞的增殖、迁移与侵袭,从而在HCC的发生与发展中发挥促癌作用。USP36有望成为肝癌治疗的潜在分子靶点。

关键词 USP36; 肝细胞癌; Caspase-8; EGF/EGFR; TNF- α ; 细胞凋亡

Ubiquitin-Specific Peptidase 36 Suppresses Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma by Stabilizing Caspase-8

HAN Junjun, YU Weiming, ZHAO Wenyan, JIN Zhaoqing, YANG Ziqiang, CHEN Weiqing,

CHEN Feihua, GONG Mouchun*

(The First People's Hospital of Lin'an District, Hangzhou/Lin'an People's Hospital Affiliated to Hangzhou Medical College, Hangzhou 311300, China)

Abstract USP36 (ubiquitin-specific peptidase 36), a key deubiquitinating enzyme encoded by the USP36 gene, modulates protein stability and function by removing ubiquitin modifications. It plays crucial roles in intracellular signal transduction, protein degradation, and cell cycle regulation. However, its functions and mechanisms in

收稿日期: 2025-01-23

接受日期: 2025-06-17

杭州市临安区第一人民医院管课题(批准号: LY202103)、杭州市医药卫生科技项目(批准号: B20210227)和杭州市医学重点学科建设项目资助的课题

*通信作者。Tel: 0571-61117305; E-mail: gongmouchun@163.com

Received: January 23, 2025

Accepted: June 17, 2025

This work was supported by the Foundation of the First People's Hospital of Lin'an District, Hangzhou (Grant No. LY202103), the Foundation of Hangzhou Municipal Health Commission (Grant No. B20210227), and the Construction Fund of Key Medical Disciplines of Hangzhou

*Corresponding author. Tel: +86-571-61117305, E-mail: gongmouchun@163.com

HCC (hepatocellular carcinoma) remain largely elusive. This study first investigated the expression levels of *USP36* in HCC and their correlation with clinical prognosis using bioinformatic analysis. Subsequently, this article established *USP36*-overexpressing and knockdown HepG2 and Huh7 HCC cell lines. A series of *in vitro* assays, including MTT, Transwell, wound healing, flow cytometry, and TUNEL, were performed to evaluate cell proliferation, migration, invasion, and apoptosis under stimulation with EGF and TNF- α . The protein expression levels of total Caspase-8 and its activated form, Cleaved-Caspase-8, were analyzed by Western blot. These results revealed that *USP36* was significantly upregulated in HCC tissues. Furthermore, high *USP36* expression was negatively correlated with OS (overall survival), PFS (progression-free survival), DFS (disease-free survival), and RFS (recurrence-free survival) in patients with HCC. *In vitro*, upon stimulation with EGF and TNF- α , overexpression of *USP36* led to a significant increase in total Caspase-8 protein levels but a decrease in its active form, Cleaved-Caspase-8. Concurrently, *USP36* overexpression enhanced cell proliferation, migration, and invasion, while substantially inhibiting apoptosis. Conversely, knockdown of *USP36* resulted in decreased total Caspase-8, increased Cleaved-Caspase-8 expression, attenuated cell proliferation, migration, and invasion, and promoted apoptosis. In conclusion, these findings suggest that *USP36* exerts a pro-tumorigenic role in the development and progression of HCC. Mechanistically, *USP36* stabilizes Caspase-8, thereby inhibiting extrinsic apoptosis and promoting the proliferation, migration, and invasion of tumor cells. These findings highlight *USP36* as a promising potential therapeutic target for HCC treatment.

Keywords *USP36*; hepatocellular carcinoma; Caspase-8; EGF/EGFR; TNF- α ; apoptosis

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)属于全球最为常见的恶性肿瘤,在所有恶性肿瘤里,其发病率位居第六,死亡率则排在第三^[1],肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)这一病理亚型最为常见,在原发性肝癌病例里占80%以上^[2]。当前HCC的临床治疗方案主要是外科切除,尽管靶向治疗、免疫治疗、化疗和放疗等治疗方案在不断进展,但晚期诊断、复发和耐药性等仍是严峻挑战^[3]。HCC的发生和发展受到外源性生长信号与炎症微环境的显著影响^[4-5]。表皮生长因子/表皮生长因子受体轴(epidermal growth factor/epidermal growth factor receptor axis, EGF/EGFR axis)是典型的促生长信号通路,通过激活Ras/Raf/MEK/ERK和PI3K/Akt信号级联,显著促进肿瘤细胞的增殖、存活和迁移,且在HCC中常呈高表达或异常活化^[6]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是一种重要的促炎因子,它既能通过TRADD-FADD-Caspase-8诱导外源性凋亡信号,还能经由NF- κ B和MAPK通路调控促炎基因表达以及抗凋亡反应,其作用呈现“双刃剑”特性^[7]。EGF/EGFR通路和TNF- α 信号分别代表了促增殖和炎症/凋亡两大关键调控维度,深入解析肿瘤细胞在不同刺激条件下的分子病理机制,对于揭示肿瘤发生发展的本质及开发新型治疗靶点具有

重要意义。

在外源性凋亡信号传递方面,半胱天冬酶-8蛋白(Caspase-8)作为起始性半胱天冬酶发挥核心作用,尤其在死亡受体激活的早期阶段^[8]。有研究发现,Caspase-8的表达水平或活性降低与HCC的进展密切相关^[9]。然而,目前大多数研究主要集中于通过基因表达或常规药物层面干预来影响Caspase-8的表达或活性,对翻译后修饰如何影响这一关键蛋白的稳定性与活化尚缺乏深入研究。

USP36(ubiquitin-specific protease 36)基因编码泛素特异性蛋白酶36(*USP36*),主要定位于细胞核仁,参与调控核糖体RNA(rRNA)的转录和稳定性,从而在核糖体生成和细胞增殖中发挥重要作用,基因位于人类17号染色体17q25.3区域。2005年,研究人员首次从人类卵巢癌细胞中成功分离并表征了*USP36*蛋白,确认其具有去泛素化酶活性,能够切割泛素结构^[10]。*USP36*在细胞核仁中与c-Myc相互作用,去泛素化并稳定c-Myc,抑制其降解,从而促进癌细胞增殖^[11]。在胶质母细胞瘤中,*USP36*稳定ALKBH5,从而促进肿瘤生长并增强其对药物的耐受能力^[12]。同样,在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中,*USP36*有助于维持癌症干细胞特性,导致肿瘤复发并加剧化疗耐药^[13]。此外,在乳腺癌中,*USP36*能

调控 Warburg 效应, 对肿瘤细胞的代谢与增殖产生重要影响^[14]。在 HCC 中, USP36 与免疫细胞浸润及免疫检查点分子关系密切, 这表明其或许在肿瘤免疫方面发挥作用^[15]。然而, USP36 对 Caspase-8 的作用尚不明确。基于此, 本研究聚焦于 USP36, 通过构建稳定敲低和过表达 USP36 的肝癌细胞株, 探讨其在 EGF/EGFR 促增殖环境及 TNF- α 促凋亡/促炎环境下对肝癌细胞凋亡和存活的影响, 并进行初步的机制探究。

1 材料和方法

1.1 UALCAN 数据库、GEPIA2 及 kmplot 在线分析

利用 UALCAN 在线数据库 (<http://ualcan.path.uab.edu>) 分析比较正常组和肿瘤样本之间的基因表达水平, 以及肿瘤患者的临床分期、病理学分级等临床特征与基因表达水平的相关性。利用 GEPIA2 及 kmplot 在线分析工具, 采用 Kaplan-Meier 生存曲线与 Log-rank 检验, 对不同表达水平组间的生存差异予以评估。

1.2 细胞系与培养条件

本研究选用肝癌细胞系 HepG2 和 Huh7, 购自中国科学院细胞与生物工程研究所。细胞在含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, Gibco, 美国)、1% 青霉素-链霉素 (penicillin-streptomycin, Gibco, 美国) 的 DMEM 培养基 (Gibco, 美国) 中培养, 然后置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中继续培养。重组人 EGF 及 TNF- α 均购自 MCE 公司 (MedChemExpress, 美国)。

1.3 USP36 过表达与敲低构建

本研究使用的肝癌细胞株 HepG2 和 Huh7 分别进行了 USP36 的过表达和敲低构建, 具体方法参照我们之前的研究^[16]。

1.4 Western blot 分析

HepG2 和 Huh7 两种细胞, 分为 3 组: 对照组、USP36 敲减组、USP36 过表达组。上述分组基础上分别经 EGF (100 ng/mL)、TNF- α (5 ng/mL) 2 种因子进行干预 96 h。细胞裂解后, 用 BCA 法测定蛋白浓度。等量蛋白 (30 μ g) 通过 10% SDS-PAGE 电泳分离后, 把它转印到 PVDF 膜上。用 5% 的脱脂奶粉在室温下将膜封闭 1 h, 然后将特异性一抗 [(GAPDH、Caspase-8、Cleaved-Caspase-8 蛋白), 稀释比例为 1:1 000] 置于 4 °C 下孵育过夜。第二天, 将二抗 (稀释比例为 1:5 000) 用辣根过氧化物酶 (horseradish

peroxidase, HRP) 标记后, 于室温下孵育 1 h。以化学发光法 (electrochemiluminescence, ECL) 来检测蛋白表达情况, 蛋白表达情况的图像则由 ChemiDoc 系统予以记录。

1.5 细胞增殖实验——MTT 比色法检测 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide assay)

HepG2 和 Huh7 两种细胞, 分为 3 组: 对照组、USP36 敲减组、USP36 过表达组。上述分组基础上分别经 EGF (100 ng/mL)、TNF- α (5 ng/mL) 2 种因子进行干预 96 h。将 HepG2 和 Huh7 细胞分别接种于 96 孔板中, 密度为 5×10^3 /孔。每组细胞设 6 个复孔, 分别干预后开展如下实验: 每孔加入 20 μ L 配好的 MTT 溶液 (5 mg/mL), 置于 37 °C 培养箱孵育 4 h。将培养基移除, 于每孔中添加 100 μ L 的 DMSO, 轻轻摇晃 10~20 min。在紫蓝色结晶完全溶解之后, 使用酶标仪并选定 490 nm 的波长, 对各孔的吸光度值进行测定。细胞活力的百分比等于 (实验组的吸光度值减去空白组的吸光度值) 除以 (对照组的吸光度值减去空白组的吸光度值), 再乘以 100%。

1.6 划痕实验 (wound healing assay)

HepG2 和 Huh7 两种细胞, 分为 3 组: 对照组、USP36 敲减组、USP36 过表达组。上述分组基础上分别经 EGF (100 ng/mL)、TNF- α (5 ng/mL) 2 种因子进行干预 96 h。取 6 孔细胞培养板, 用记号笔在板后均匀地画出 5 条横线, 每条横线间距 0.5 cm。将各组细胞以每孔 5×10^5 个的密度进行接种, 待细胞长满板孔后, 用移液枪枪头顺着直尺垂直于板孔底部划均匀的直线。用 PBS 缓冲液对细胞清洗 3 次, 将划痕下的细胞洗去。加入无血清培养基后进行培养, 于 24 h 后查看划痕愈合情况并拍照。

1.7 Transwell 实验

HepG2 和 Huh7 两种细胞, 分为 3 组: 对照组、USP36 敲减组、USP36 过表达组。上述分组基础上分别经 EGF (100 ng/mL)、TNF- α (5 ng/mL) 2 种因子进行干预 96 h。将 Transwell 小室置于 24 孔培养板内, 在上室加入细胞, 每孔加入量为 5×10^4 个, 随后置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h。接着, 用棉签把上室底层细胞擦去, 再用 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 室温固定 10 min, 之后拍照并统计迁移到下室的细胞数量。实验进行 3 次。

1.8 流式细胞术检测凋亡

HepG2 和 HUH7 两种细胞, 分为 3 组: 对照组、

USP36敲减组、USP36过表达组。上述分组基础上分别经EGF(100 ng/mL)、TNF- α (5 ng/mL) 2种因子进行干预96 h。把处于对数生长期的细胞种到6孔板里,每孔的工作体积是2 mL,接种密度为每孔 1.2×10^6 个细胞。按照前面的分组处理完相应时间后收集细胞,用预冷的PBS洗涤2次,将细胞浓度调整为 1×10^6 /mL。按照Annexin V-FITC说明书操作,于1 h内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验进行3次。

1.9 荧光染色检测凋亡

HepG2和Huh7两种细胞,分为3组:对照组、USP36敲减组、USP36过表达组。上述分组基础上分别经EGF(100 ng/mL)、TNF- α (5 ng/mL) 2种因子进行干预96 h。先将无菌且高洁净度的盖玻片放入,然后以60%~70%的细胞密度进行种板,在细胞贴壁之后分别加药作用96 h。药物作用停止后将培养液弃掉,随后在每个孔中加入1~2 mL预先冷却的4% PFA,室温固定30 min后吸除,再用PBS漂洗1次,每次5 min。室温下细胞以4%的多聚甲醛来固定,透化之后,用DAPI对核酸进行染色。借助荧光显微镜对凋亡细胞的形态变化予以观察拍照。

1.10 统计分析

所有实验至少重复3次,数据用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示。组间比较的时候,用独立样本 t 检验或者单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 视为有统计学意义。用GraphPad Prism 5.0软件进行统计分析。

2 结果

2.1 USP36在肝癌中过表达,且与预后指标呈负相关

我们运用生物信息学的方法来探究USP36在肝癌里的临床意义与预后价值。我们通过UALCAN数据集(<http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>)分析USP36在正常肝组织与原发性肝癌中的表达情况。如图所示,与正常肝组织相比,肝癌组织中USP36表达显著上调(图1A和图1B)。同时,USP36的表达水平显示出与肿瘤患者的临床T分期(图1C)及HCC肿瘤病理学分级(图1D)的进展相一致的显著增加。为了评估肝癌USP36表达的预后意义,我们采用Kaplan-Meier绘制生存曲线。利用GEPIA2(<http://gepia2.cancer-pku.cn>)对TCGA和GTEx数据库的数据进行生存分析,发现USP36高表达组肝癌患者的总生存

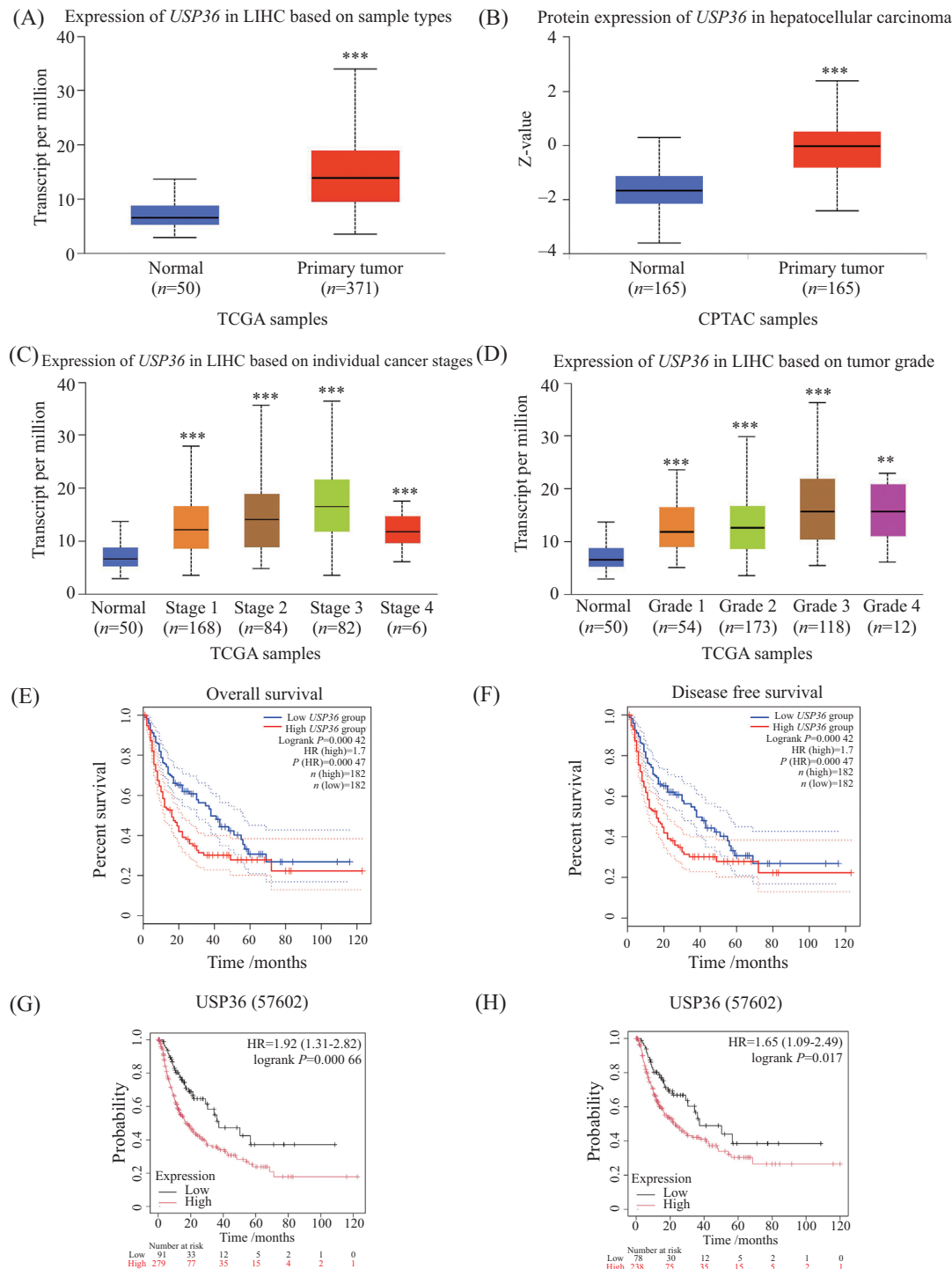
率(overall survival, OS)显著低于低表达组($HR=1.7$, $P < 0.005$)(图1E),同时无病生存率(disease-free survival, DFS)显著低于低表达组($HR=1.7$, $P < 0.005$)(图1F)。使用Kaplan-Meier Plotter(<https://kmplot.com/analysis/>)在线工具分析,发现USP36高表达组患者的无进展生存率(progression-free survival, PFS)显著低于低表达组($HR=1.92$, $P < 0.005$)(图1G),无复发生存率(recurrence free survival, RFS)显著低于低表达组($HR=1.65$, $P < 0.05$)(图1H)。这些结果显示USP36是一个不良预后因素,提示USP36在肝癌组织中呈高表达,且与预后不良有关。

2.2 USP36调控HepG2和Huh7细胞的增殖、迁移和侵袭

为了探讨USP36在肝癌细胞增殖、迁移和侵袭中的作用,我们利用之前构建的稳定过表达和敲低USP36的HepG2和Huh7细胞株(该结果已发表)^[6],并在不同刺激条件下进行了细胞学实验。我们通过分别添加EGF和TNF- α 这两个因子进行刺激,旨在模拟肿瘤微环境中的不同生物学状态,其中EGF/EGFR通路与细胞增殖、迁移和侵袭密切相关,而TNF- α 则参与调节炎症反应和细胞凋亡。通过这种模拟,我们能够更好地探索USP36在不同微环境刺激下对肝癌细胞发生发展的调控作用。首先,MTT实验结果(图2A和图2B)显示,与对照组相比较,USP36过表达组的HepG2和Huh7细胞在EGF和TNF- α 刺激下,细胞活力显著增加,而USP36敲低组细胞活力明显降低,表明USP36的过表达促进了肝癌细胞的增殖,敲低则抑制了增殖。在评估迁移和侵袭时,Transwell小室(图2C和图2E)结果显示,USP36过表达组细胞在EGF和TNF- α 的刺激下,迁移能力显著增强,而敲低组则表现为较弱的迁移能力。同样地,划痕实验(图2G和图2I)也证实了相同的趋势,USP36过表达组的细胞在24 h后显著加速了划痕的闭合,而敲低组的细胞迁移则受到明显抑制。这些数据表明,USP36通过调控肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭,在肝癌的发生与发展进程中起到关键作用,这显示出其作为潜在治疗靶点具有临床应用的前景。

2.3 USP36调控HepG2和Huh7细胞的凋亡

EGF/EGFR信号轴通过激活Ras/Raf/MEK/ERK和PI3K/Akt等信号通路,促进肿瘤细胞的增殖和存活^[6],而TNF- α 则通过TRADD-FADD-Caspase-8途径



A: UALCAN数据集分析, USP36在正常肝组织与原发性肝癌中的表达情况; B: CPTAC数据集分析正常肝组织与肝癌组织中USP36的蛋白表达差异(<http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>); C、D: USP36的表达与肿瘤T分期的相关性(C)及USP36的表达与肿瘤病理学分级的相关性(D); E~H: Kaplan-Meier生存曲线分析表明, USP36的表达与总体生存期OS(E)、无病生存期DFS(F)、无进展生存期PFS(G)及无复发生存期RFS(H)等均呈负相关。*** $P<0.01$, *** $P<0.001$,与正常组比较。n=3。

A: analysis of the UALCAN, database showing *USP36* expression in primary HCC (hepatocellular carcinoma) tissues and normal liver tissues; B: differential protein expression of *USP36* in HCC and normal liver tissues based on the CPTAC database; C,D: correlation analysis between *USP36* expression and clinical-pathological features, including tumor T stage (C) and pathological grade (D), using the UALCAN dataset. E-H: Kaplan-Meier survival analysis demonstrating the negative correlation between *USP36* expression and patient prognosis; *USP36* expression was negatively correlated with OS (overall survival) (E), DFS (disease-free survival) (F), PFS (progression-free survival) (G), and RFS (recurrence-free survival) (H). ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with the normal group. n=3.

图1 USP36在肝癌中的表达与预后分析

Fig.1 Expression and prognostic analysis of *USP36* in hepatocellular carcinoma

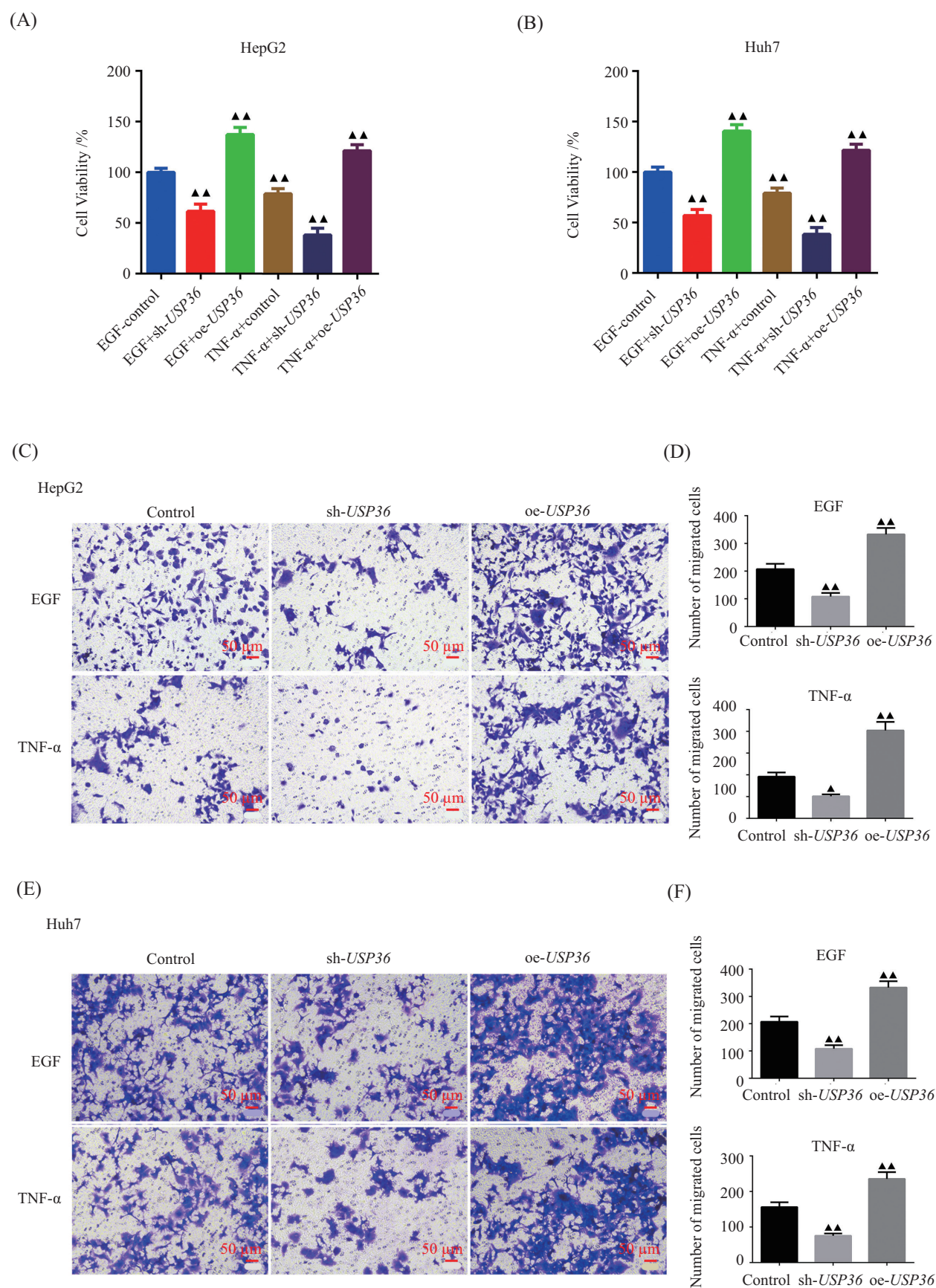
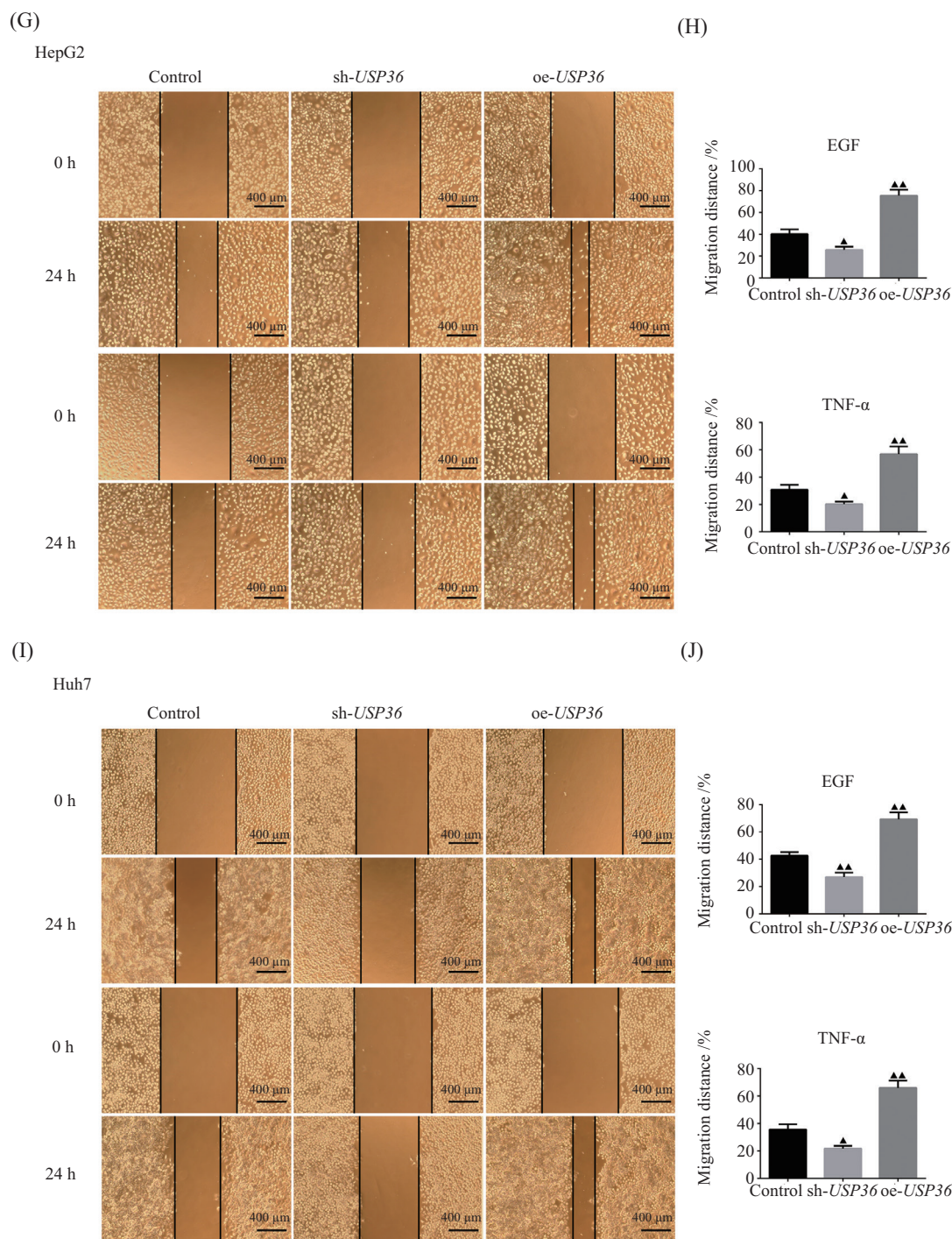


图2 USP36促进肝细胞癌细胞的增殖和迁移

Fig.2 USP36 promotes the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells

续图2



A、B: 在EGF和TNF- α 刺激下, MTT实验检测HepG2细胞(图A)及Huh7细胞(图B)在对照组、USP36敲低组及USP36过表达组的细胞活力; C~F: 在EGF和TNF- α 刺激下, Transwell实验检测HepG2细胞(图C)及Huh7细胞(图E)在对照组、USP36敲低组及USP36过表达组的迁移能力, 图D和图F分别对应图C和图E的定量结果; G~J: 在EGF和TNF- α 刺激下, 划痕实验检测HepG2细胞(图G)及Huh7细胞(图I)在对照组、USP36敲低组及USP36过表达组的侵袭能力, 图H和图J分别对应图G和I的定量结果。▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$, 与对照组比较。n=3。

A,B: the viability of HepG2 (A) and Huh7 (B) cells, following transfection with USP36-knockdown (sh-USP36) or overexpression (oe-USP36) vectors, was assessed by MTT assay after stimulation with EGF and TNF- α ; C-F: the migratory capacity of HepG2 and Huh7 cells was evaluated using a Transwell migration assay under EGF and TNF- α stimulation; representative images of migrated HepG2 (C) and Huh7 (E) cells are shown; the corresponding quantitative results are presented in (D) and (F); G-J: the effect of USP36 on cell migration was further examined by a wound healing assay; representative images show wound closure in HepG2 (G) and Huh7 (I) cell monolayers; the quantitative analysis of the wound closure rate is shown in (H) and (J). ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$ compared with the control group. n=3.

图2 USP36促进肝细胞癌细胞的增殖和迁移

Fig.2 USP36 promotes the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells

诱导外源性凋亡,同时可通过NF- κ B等通路增强细胞的抗凋亡能力^[7]。因此,我们通过检测肝癌细胞在EGF和TNF- α 刺激条件下的凋亡情况,以评估USP36对细胞生存和凋亡的调控作用。我们运用流式细胞术与TUNEL染色法对细胞凋亡水平做了检测。在流式细胞术(图3A和图3C)中,我们检测了在不同外源性刺激(EGF、TNF- α)下,USP36过表达与敲低对肝癌细胞凋亡的影响。结果显示,与对照组相比,USP36过表达组在EGF和TNF- α 刺激下,凋亡率明显降低。相反,USP36敲低组则表现出较高的凋亡率,凋亡细胞比例显著增加。进一步使用TUNEL染色法(图3B和图3D)观察肝癌细胞的凋亡情况。与对照组相比,USP36过表达组在EGF和TNF- α 的刺激下均显示出明显的凋亡细胞数量减少的现象。相反,USP36敲低组在所有刺激条件下均表现出更高的凋亡比例,凋亡细胞的数量显著增加。这些结果表明,USP36可能通过抑制肝癌细胞的凋亡,在肝癌细胞的生存和增殖中起到促进作用。

2.4 USP36通过Caspase-8促进肝癌细胞进展

为了进一步揭示USP36在不同外源性刺激(EGF和TNF- α)下的作用机制,我们关注了Caspase-8蛋白及其活化形式Cleaved-Caspase-8蛋白。Caspase-8是外源性凋亡途径的关键启动蛋白,参与调节肿瘤细胞对凋亡信号的反应,特别地,Cleaved-Caspase-8是Caspase-8的活化形式,其表达水平的升高通常代表着凋亡反应的激活^[8]。EGF/EGFR信号促进肿瘤细胞增殖与存活,可通过影响Caspase-8的活性来抑制凋亡反应^[17]。此外,作为一种关键的促炎细胞因子,TNF- α 已被证明能通过激活Caspase-8在肿瘤微环境中促进细胞凋亡^[7]。因此,我们采用Western blot检测Caspase-8与Cleaved-Caspase-8蛋白的表达情况(图4A和图4C)。结果表明,2种因子刺激下均表现出相同的趋势,在USP36过表达组中,Caspase-8的总蛋白表达量显著上升,而Cleaved-Caspase-8的表达量显著降低,这提示USP36可能通过维持Caspase-8的稳定性抑制其激活,进而抑制凋亡信号的传递。相比之下,在USP36敲低组中,Caspase-8总蛋白量明显减少,Cleaved-Caspase-8的活化形式显著增加,表明USP36的缺失促进了Caspase-8的激活,进而促进了凋亡。定量分析结果如图4B和图4D所示。综上所述,这些结果进一步证实了USP36在肝癌细胞中的关键作用,表明它可能通过

调控Caspase-8信号通路,参与肝癌细胞生物学行为的调节。

3 讨论

当前肝癌研究的热点凸显了翻译后修饰在肿瘤进展中的关键作用,尤其是去泛素化酶(deubiquitinating enzymes, DUBs)在肿瘤生长、转移和治疗中的重要地位^[18-19]。我们的研究表明,USP36可能通过Caspase-8介导的方式调控肝癌细胞增殖,尤其是细胞凋亡,在肝癌的发生发展中起重要作用。与正常组织相比,USP36在肝癌组织中显著过表达。USP36表达相对较高的肝癌患者临床结局更差。此外,USP36的抑制增加肝癌细胞的凋亡,导致EGF与TNF- α 刺激下的增殖水平降低。Caspase-8可能参与USP36的促肿瘤作用。本研究证实了USP36可促进肝癌细胞进展,并初步探讨了USP36如何调控细胞凋亡的可能分子机制。

据报道,USP36可通过去泛素化作用稳定核仁蛋白(如B23、纤维蛋白),调节核仁结构与功能^[20]。作为一种H2B去泛素化酶,USP36也能显著降低细胞中H2Bub1水平,从而影响p21等基因的表达及细胞的增殖^[21]。另有研究显示,USP36通过稳定ALKBH5,促进胶质母细胞瘤的发生^[12]。我们发现,USP36在肝癌组织中的表达量高于正常肝组织。更重要的是,肝癌患者的总生存率与USP36表达水平呈负相关。这些结果提示USP36可能作为肿瘤治疗的分子靶点。

USP36可通过去泛素化作用稳定关键蛋白,如c-Myc和SOD2,从而调节细胞凋亡和其他生物过程^[22]。厄洛替尼等EGFR酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)能够诱导HCC细胞的凋亡和细胞周期停滞,并增强化疗药物的抗增殖效果^[23]。我们的研究表明,肝癌细胞在接受EGF和TNF- α 刺激下,USP36过表达组均显著抑制了细胞凋亡。

进一步分析显示,USP36的上调引起Caspase-8总蛋白水平显著上升、活化形式Cleaved-Caspase-8蛋白表达水平下降。Caspase-8是外源性凋亡的关键启动酶,与FADD等蛋白组装成死亡诱导信号复合物(death-inducing signaling complex, DISC),然后才被切割成活化片段^[24]。Caspase-8在细胞凋亡过程中的核转位现象已有报道^[25];此外,在癌细胞中,DNA

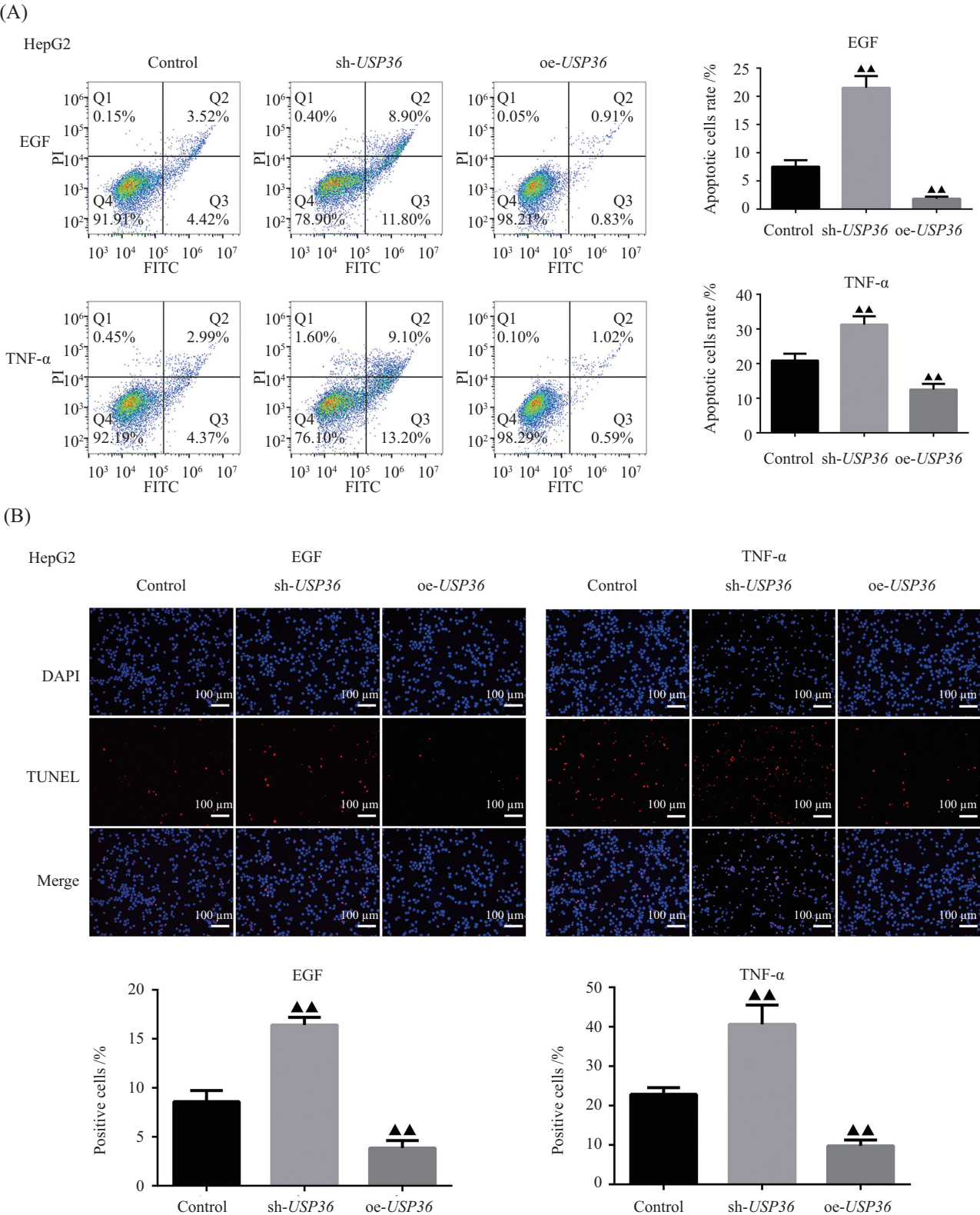
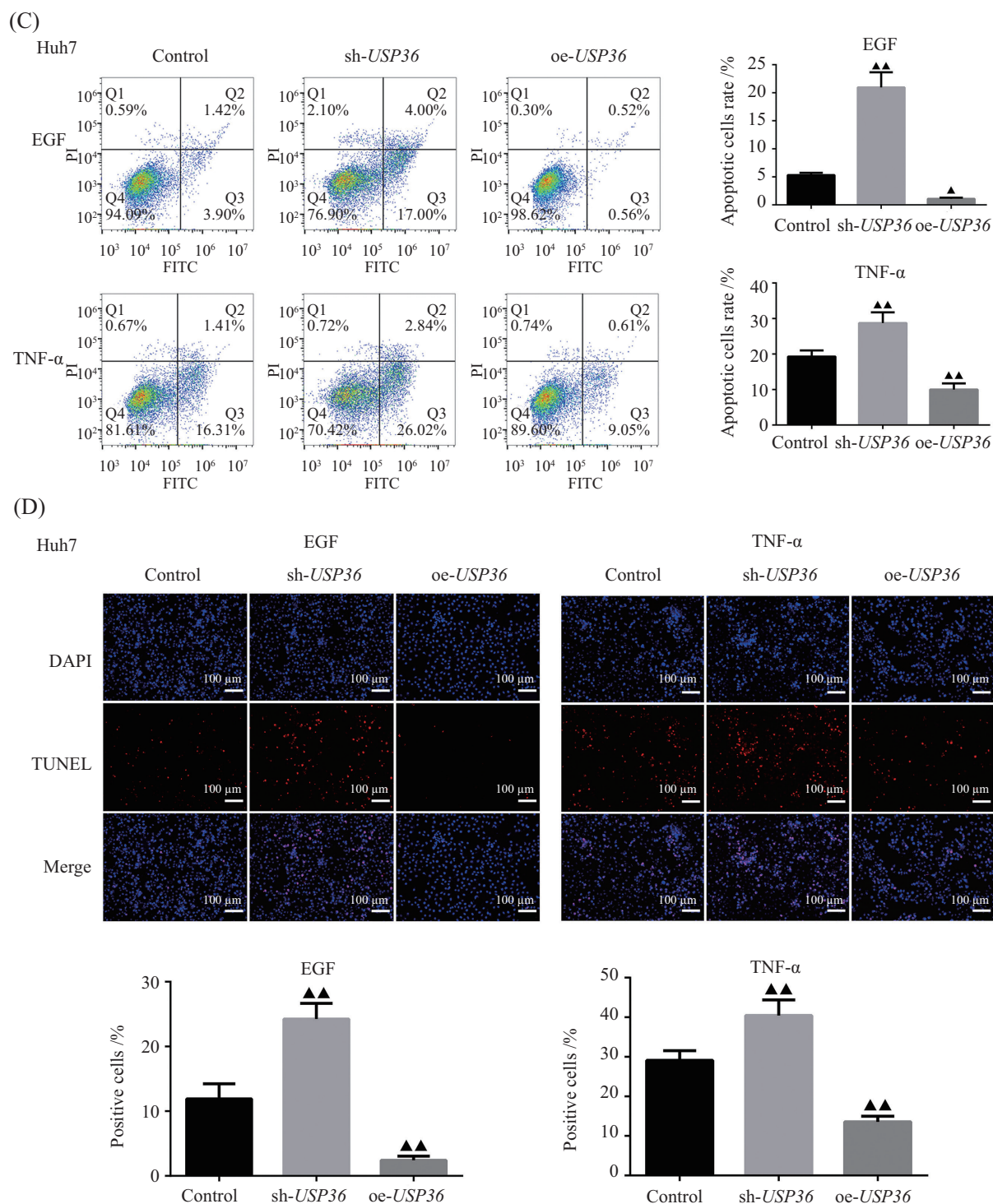


图3 USP36抑制HepG2和Huh7细胞的凋亡
Fig.3 USP36 inhibits apoptosis in HepG2 and Huh7 cells

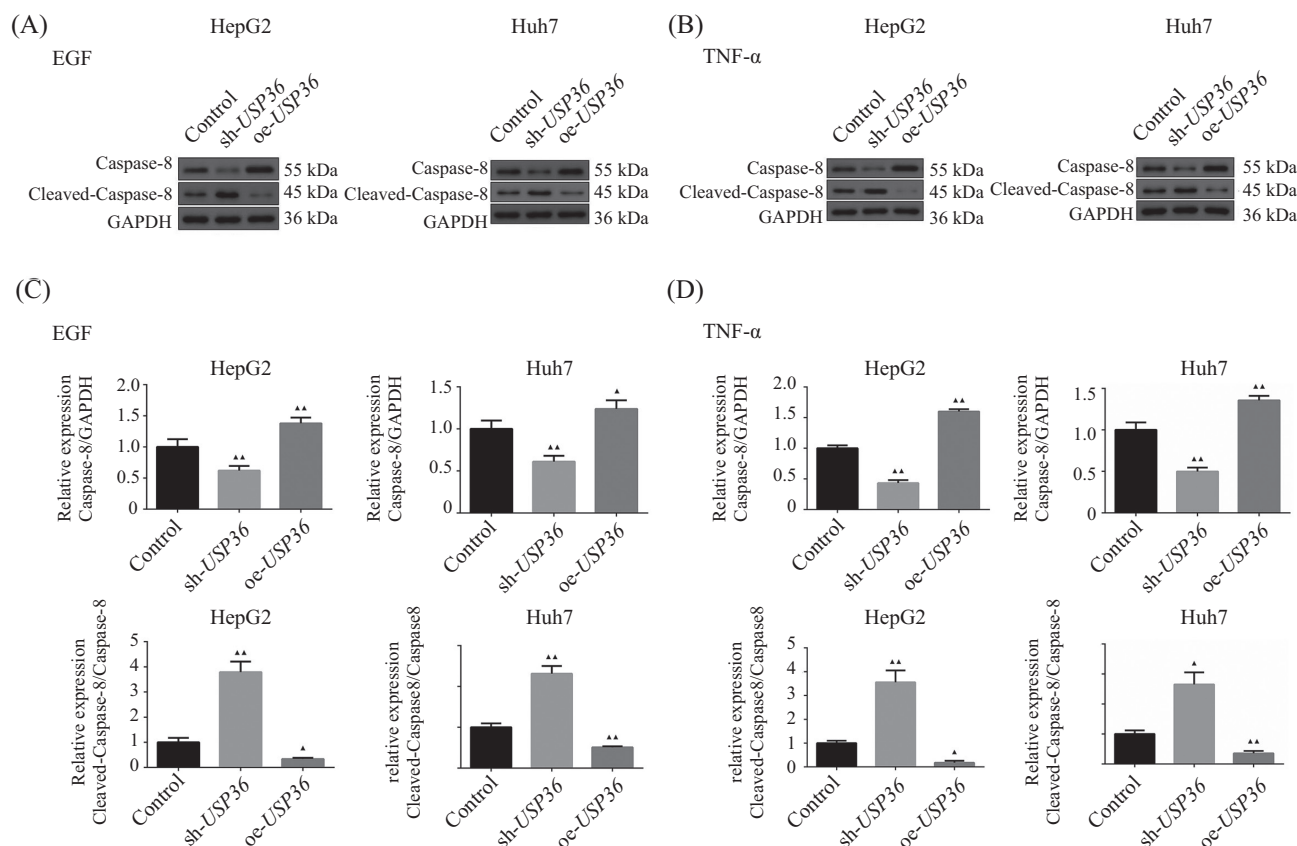
续图3



A, C: 在EGF和TNF- α 刺激下, 流式细胞术检测HepG2细胞(图A)及Huh7细胞(图C)在对照组、USP36敲低(sh-USP36)或过表达(oe-USP36)组的凋亡比率; B, D: 在EGF和TNF- α 刺激下, TUNEL染色法检测HepG2细胞(图B)及Huh7细胞(图D)在对照组、USP36敲低(sh-USP36)或过表达(oe-USP36)组的凋亡比率。▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$, 与对照组比较。n=3。

A, C: after stimulation with EGF and TNF- α , apoptosis was assessed by two independent methods; the percentage of apoptotic cells was determined by Annexin V/PI staining and flow cytometry in HepG2 (A) and Huh7 (C) cells; B, D: apoptosis was further confirmed by a TUNEL assay in HepG2 (B) and Huh7 (D) cells. Representative images and quantification of TUNEL-positive cells are shown. ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$ compared with the control group. n=3.

图3 USP36抑制HepG2和Huh7细胞的凋亡
Fig.3 USP36 inhibits apoptosis in HepG2 and Huh7 cells



将HepG2和Huh7细胞分别转染USP36敲低(sh-USP36)或过表达(oe-USP36)载体,通过Western blot法检测各组细胞中Caspase-8通路相关蛋白的表达。A、C:细胞经EGF刺激后,检测总Caspase-8(Caspase-8)和活化Caspase-8(Cleaved-Caspase-8)的蛋白水平,代表性蛋白印迹图见(A),对应的定量分析见(C);B、D:细胞经TNF-α刺激后,检测总Caspase-8和活化Caspase-8(Cleaved-Caspase-8)的蛋白水平,代表性蛋白印迹图见(B),对应的定量分析见(D)。▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$,与对照组比较。 $n = 3$ 。

Western blot analysis was performed to investigate the effect of USP36 on the Caspase-8 pathway in HepG2 and Huh7 cells. Cells were transfected with USP36-knockdown (sh-USP36) or overexpression (oe-USP36) vectors. A,C: after stimulation with EGF, the protein levels of total Caspase-8 and Cleaved-Caspase-8 were detected; representative blots are shown in (A), with corresponding quantitative analysis in (C); B,D: after stimulation with TNF-α, the protein levels of total Caspase-8 and Cleaved-Caspase-8 were examined; representative blots are shown in (B), with corresponding quantification in (D). ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ compared with the control group. $n = 3$.

图4 USP36调控Caspase-8信号通路

Fig.4 USP36 regulates the Caspase-8 signaling pathway

损伤可以诱导Caspase-8转运到细胞核内^[26]。本研究显示, USP36过表达会提高Caspase-8总蛋白水平,却减弱其切割成为Cleaved-Casase-8的效率。因此可以推测其机制可能在于, USP36通过去泛素化调控Caspase-8的稳定性,阻碍其形成活化片段。

对于EGF/EGFR路径而言, USP36可能与其下游ERK、Akt信号形成“协作”,共同强化细胞对外源性生长因子的响应;对于TNF-α而言, USP36干扰了TNF-α诱导的外源性凋亡启动(Caspase-8切割受阻)。反观敲低 USP36,则使两种外源刺激均易触发更高水平的Cleaved-Caspase-8,明显提升了细胞凋亡率,进一步佐证了USP36可能是外部信号与细胞命运之间的重要“闸门”,提示其有能力在多种环境下帮助

肝癌细胞规避凋亡。

总之,我们的研究表明 USP36在肝癌中起致癌作用。我们还初步揭示了USP36促进肝癌进展的新机制。同时,敲低USP36可增加肝癌细胞在EGF和TNF-α因子刺激下的细胞凋亡率,最终抑制肝癌细胞的增殖、迁移与侵袭。从临床角度来看, HCC患者常伴有高水平的生长因子及炎症因子,相关通路的失衡会加剧肿瘤进展和耐药性。我们关于USP36的发现,提示其在同时调控增殖信号与凋亡/炎症通路中可能扮演重要角色。值得注意的是,目前已有一些针对去泛素化酶的小分子抑制剂正在开发中,例如USP1抑制剂SIM0501,我们的发现为靶向去泛素化酶的药物开发提供了理论依据。

参考文献 (References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] YANG J D, HAINAUT P, GORES G J, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10): 589-604.
- [3] ANWANWAN D, SINGH S K, SINGH S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(1): 188314.
- [4] BREUHAHN K, LONGERICH T, SCHIRMACHER P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2006, 25(27): 3787-800.
- [5] SUN B, KARIN M. Inflammation and liver tumorigenesis [J]. *Front Med*, 2013, 7(2): 242-54.
- [6] HUANG P, XU X, WANG L, et al. The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(2): 218-30.
- [7] JANG M K, KIM H S, CHUNG Y H. Clinical aspects of tumor necrosis factor-signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(17): 2799-808.
- [8] SHI Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2002, 9(3): 459-70.
- [9] BOEGE Y, MALEHMIR M, HEALY M E, et al. A dual role of caspase-8 in triggering and sensing proliferation-associated dna damage, a key determinant of liver cancer development [J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(3): 342-59, e10.
- [10] KIM M S, KIM Y K, KIM Y S, et al. Deubiquitinating enzyme USP36 contains the PEST motif and is polyubiquitinated [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(3): 797-804.
- [11] SUN X X, HE X, YIN L, et al. The nucleolar ubiquitin-specific protease USP36 deubiquitinates and stabilizes c-Myc [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(12): 3734-9.
- [12] CHANG G, XIE G S, MA L, et al. USP36 promotes tumorigenesis and drug sensitivity of glioblastoma by deubiquitinating and stabilizing ALKBH5 [J]. *Neuro Oncol*, 2023, 25(5): 841-53.
- [13] LUO L, LI Y, HUANG R, et al. USP36 plays an oncogenic role in colorectal cancer cells [J]. *Neoplasma*, 2024, 71(1): 13-21.
- [14] WU H, JIAO Y, ZHOU C, et al. miR-140-3p/usp36 axis mediates ubiquitination to regulate PKM2 and suppressed the malignant biological behavior of breast cancer through Warburg effect [J]. *Cell Cycle*, 2023, 22(6): 680-92.
- [15] SUN W, SHEN J, LIU J, et al. Gene signature and prognostic value of ubiquitin-specific proteases members in hepatocellular carcinoma and explored the immunological role of USP36 [J]. *Front Biosci Landmark*, 2022, 27(6): 190.
- [16] JIN Z, YANG Z, SHENG Z, et al. USP36 facilitates the progression of hepatocellular carcinoma by upregulating Myc [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2022, 18(9): 2145-53.
- [17] FINLAY D, HOWES A, VUORI K. Critical role for caspase-8 in epidermal growth factor signaling [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(12): 5023-9.
- [18] JING T, WANG B, YANG Z, et al. Deubiquitination of the repressor E2F6 by USP22 facilitates AKT activation and tumor growth in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2021, 518: 266-77.
- [19] SUN X, CAI M, WU L, et al. Ubiquitin-specific protease 28 deubiquitinates TCF7L2 to govern the action of the Wnt signaling pathway in hepatic carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2022, 113(10): 3463-75.
- [20] ENDO A, MATSUMOTO M, INADA T, et al. Nucleolar structure and function are regulated by the deubiquitylating enzyme USP36 [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(5): 678-86.
- [21] DEVINE T, SEARS R C, DAI M S. The ubiquitin-specific protease USP36 is a conserved histone H2B deubiquitinase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(3): 2363-8.
- [22] LIU Q, SHENG W, MA Y, et al. USP36 protects proximal tubule cells from ischemic injury by stabilizing c-Myc and SOD2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 513(2): 502-8.
- [23] HUETHER A, HÖPFNER M, SUTTER A P, et al. Erlotinib induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular cancer cells and enhances chemosensitivity towards cytostatics [J]. *J Hepatol*, 2005, 43(4): 661-9.
- [24] HORN S, HUGHES M A, SCHILLING R, et al. Caspase-10 negatively regulates caspase-8-mediated cell death, switching the response to CD95l in favor of nf-kb activation and cell survival [J]. *Cell Rep*, 2017, 19(4): 785-97.
- [25] BENCHOUA A, COURIAUD C, GUEÁGAN C, et al. Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly(ADP-ribose) polymerase-2 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(37): 34217-22.
- [26] MÜLLER I, STROZYK E, SCHINDLER S, et al. Cancer cells employ nuclear caspase-8 to overcome the p53-dependent G₂/M checkpoint through cleavage of USP28 [J]. *Mol Cell*, 2020, 77(5): 970-84, e7.