

网络出版时间:2024-03-21 18:08:40 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.015

去泛素化酶 OTUB2 通过诱导 DDX54 活性增加中性粒细胞外诱捕网的形成以及促进结直肠癌细胞活力和侵袭能力

蒋良君¹, 李卫²

摘要 目的 探讨含 OTU 结构域的泛素醛结合蛋白 2 (OTUB2) 影响 RNA 解螺旋酶 54 (DDX54) 的活性及其对中性粒细胞外诱捕网 (NETs) 的形成和结直肠癌 (CRC) 细胞活力、侵袭的影响。方法 分离 CRC 患者和健康对照组的外周血中性粒细胞, 并使用佛波酯 (PMA) 或脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 刺激中性粒细胞 4 h; Western blot 检测 NETs 标记物髓过氧化物酶 (MPO) 和瓜氨酸组蛋白 H3 (Cit-H3) 的表达; 干预 SW480 细胞中 OTUB2 或 DDX54 的表达并将其和中性粒细胞共培养, 细胞分为如下组: 对照组 (不做任何处理), NETs 组、vector 组、OTUB2 组、NETs + si-OTUB2 组 (SW480 细胞、转染了 vector、OTUB2 过表达质粒和 si-OTUB2 的 SW480 细胞分别与 PMA 处理的中性粒细胞共培养), OTUB2 + DNase I 组 (转染了 OTUB2 过表达质粒的 SW480 细胞与 DNase I 处理的中性粒细胞共培养), si-OTUB2 组、OTUB2 + si-NC 组和 OTUB2 + si-DDX54 组 (转染了 si-OTUB2、OTUB2 过表达质粒和 si-NC、OTUB2 过表达质粒和 si-DDX54 的 SW480 细胞分别与中性粒细胞共培养)。ELISA 检测 SW480 细胞上清液中 MPO-DNA 复合物相对

表达量和 Cit-H3 的浓度; MTT 和 Transwell 检测 SW480 细胞活力和侵袭能力; RNA 测序筛选 OTUB2 调控的下游基因并使用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR)、免疫共沉淀 (co-IP) 和谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 亲和纯化 (GST-pull-down)、His-tag pull-down 实验验证 DDX54 和 OTUB2 的相互作用。结果 与健康对照相比, CRC 患者外周血中 NETs 的形成增加。与对照组相比, NETs 组 CRC 细胞活力和侵袭增加 ($P < 0.05$)。与 vector 组比较, OTUB2 组 MPO-DNA 复合物相对表达量和 Cit-H3 的浓度增加, 细胞活力和侵袭增加 ($P < 0.05$); 而与 OTUB2 组比较, OTUB2 + DNase I 组 MPO-DNA 复合物相对表达量和 Cit-H3 的浓度减少, 细胞活力和侵袭减少 ($P < 0.05$)。Co-IP 实验、GST pull down 实验和 His-tag pull down 实验表明 OTUB2 和 DDX54 之间存在相互作用。与 OTUB2 + si-NC 组比较, OTUB2 + si-DDX54 组 MPO-DNA 复合物相对表达量和 Cit-H3 的浓度减少, 细胞活力和侵袭减少 ($P < 0.05$)。结论 去泛素化酶 OTUB2 可以通过上调 DDX54 的增加 NETs 的形成并促进 CRC 细胞活力和侵袭。

关键词 去泛素化; OTUB2; DDX54; 中性粒细胞外诱捕网; 结直肠癌; 中性粒细胞

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0463-10
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.015

2024-02-18 接收

基金项目: 湖南省卫生健康委卫生科研项目 (编号: D202303038378)

作者单位: 南华大学衡阳医学院附属南华医院¹ 消化内科、² 肝胆外科, 衡阳 421002

作者简介: 蒋良君, 女, 副主任医师;

李卫, 男, 副主任医师, 责任作者, E-mail: 13875732434@163.com

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 又称大肠癌, 是一种起源于大肠上皮组织的恶性肿瘤, 其发病率

associated X protein (Bax), and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) were determined by Western blot. **Results** Compared to the Normal group, the expression of MALAT1 was upregulated and the expression of miR-181a was down-regulated in the AMI group ($P < 0.05$), and there was a negative correlation between MALAT1 and miR-181a expression. The lncBase online prediction database and dual-luciferase reporter assay results had proven that MALAT1 could target and regulate the expression of miR-181a. Compared to the H₂O₂ group, the H₂O₂ + si-MALAT1 group showed increased cell viability ($P < 0.05$), decreased TUNEL-positive rate ($P < 0.05$), decreased expression levels of cleaved caspase-3 and Bax ($P < 0.05$), and increased expression level of Bcl-2 ($P < 0.05$), while the H₂O₂ + si-NC group showed no significant changes ($P > 0.05$). **Conclusion** LncRNA MALAT1 expression is elevated in AMI patients, which could promote oxidative stress-induced myocardial cell damage through targeted inhibition of miR-181a.

Key words MALAT1; microRNA-181a; acute myocardial infarction; cell apoptosis; cell proliferation; cardiomyocyte injury

逐年上升,明确结肠癌的发病机制对于该疾病的诊断和治疗具有重要意义^[1]。中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)是一种由脱聚染色质和颗粒蛋白组成的细胞外网状结构,由活化的中性粒细胞在特定的刺激下产生并释放,NETs在先天性免疫和癌症转移中起着重要作用^[2]。含 OTU 结构域的泛素醛结合蛋白 2 (OTU deubiquitinase, ubiquitin aldehyde binding 2, OTUB2)是一种去泛素化酶,也被证明是一种致癌因子,研究^[3]显示 OTUB2 在胃癌组织和细胞中高表达,过表达 OTUB2 促进胃癌细胞增殖、迁移和侵袭。OTUB2 可通过抑制丙酮酸激酶 M2 型同工酶的泛素化诱导癌细胞糖酵解进而促进 CRC 进展^[4]。此外,研究^[5]表明 RNA 解螺旋酶 54 (DEAD-box helicase 54, DDX54)在 CRC 组织中高表达,与肿瘤的生长和不良预后有关。然而关于 OTUB2 调控 DDX54 在 CRC 中的作用和相关的分子机制仍不明确。该研究旨在探讨去泛素化酶 OTUB2 调控 DDX54 对 NETs 的形成和 CRC 细胞活力、侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器 人 CRC 细胞系 (HCT116、SW480、DLD-1) 和人正常结肠上皮细胞 (NCM460) (武汉尚恩生物技术有限公司,货号:SNL-077、SNL-074、SNL-076、SNL-519); OTUB2 野生型 SW480 细胞 (OTUB2-WT) 以及 OTUB2 敲除 SW480 细胞 (OTUB2-KO) 购自南京金斯瑞生物技术有限公司; DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司,货号:12634010); 佛波酯 (phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA) (美国 MedChem Express 公司,货号:HY-18739); 脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)、谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione s-transferase, GST) 抗体和组氨酸 (histidine, His) 抗体 (美国 Sigma 公司,货号:D21962、G6511、GT359); vector、OTUB2 过表达质粒、si-OTUB2、si-DDX45 及相应的阴性对照 (广州锐博生物科技有限公司); 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (北京索莱宝科技有限公司,货号:D8372); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、Lipofectamine 3000 试剂、TRIzol 试剂、蛋白质 A/G 琼脂糖珠 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司,货号:A5669701、L3000075、15596018、78609); 人外周血中性粒细胞分离试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司,货号:P9040); ELISA 试剂盒:白细胞介素-8 (Interleukin-8, IL-8) (货号:ab214030)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor-

alpha, TNF- α) (货号:ab181421)、一抗:MPO (货号:ab208670)、Cit-H3 (货号:ab219407)、OTUB2 (货号:ab74371)、抗泛素抗体 (ab7780)、DDX54 (货号:ab76947)、二抗:HRP 标记的山羊抗兔 IgG (货号:ab6721) 均购自英国 Abcam 公司; 髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)-DNA 复合物 ELISA 试剂盒 (上海仁捷生物科技有限公司,货号:RJ23716); 瓜氨酸组蛋白 H3 (citrullinated histone H3, Cit-H3) ELISA 试剂盒 (武汉纽莱生物科技有限公司,货号:NLH7890); Transwell 小室 (美国康宁公司,货号:3412); MTT 溶液、结晶紫染色液、RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司,货号:C0009S、C0121、P0013B、P0009); 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (美国 Millipore 公司,货号:HVLP02500); ECL 试剂盒 (美国 Bio-Rad 公司,货号:1705061); HiScript II Q RT SuperMix、SYBR Green qPCR Master 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号:R232-01、Q111-02); 大肠埃希菌 BL21 (上海泽叶生物科技有限公司,货号:ZY-12-174Y); His-Trap HP 层析柱 (上海桂宁实验器材有限公司,货号:17-5247-01)、谷胱甘肽-琼脂糖 4B 层析柱 (上海信裕生物科技有限公司,货号:XY90421); Illumina 测序仪 (美国 Illumina 公司,型号:MiSeq); 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司,型号:LightCycler 96); 酶标仪 (德国 BioTek 公司,型号:Cytation 5); 荧光显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司,型号:Axio Imager 2); 红外成像系统 (美国 LI-COR 公司,型号:Odyssey); 紫外可见分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司,型号:Nanodrop 2000)。

1.2 方法

1.2.1 临床样本收集 收集 2021 年 4 月—2022 年 1 月期间在南华大学衡阳医学院附属南华医院接受手术治疗的 CRC 患者的癌组织与癌旁组织 (距离癌组织 3 cm), 共 61 例。纳入标准如下:① 病理活检诊断为 CRC 的患者;② 初次被诊断为 CRC 且之前未患过其他癌症;③ 术前未接受过手术切除、化疗等任何形式的治疗。排除标准:① 合并有肝、肾、心脏等严重器质性疾病的患者;② 临床资料不完整的患者。所有患者均签署书面知情同意书且本研究经过南华大学衡阳医学院附属南华医院医学伦理委员会备案 (批号:NHY2021a025)。标本放置在 -80°C 条件下保存。

1.2.2 中性粒细胞分离和 NETs 诱导 收集 CRC 患者的外周血样本,使用外周血中性粒细胞提取试

剂盒分离外周血中性粒细胞,分离的原代中性粒细胞在含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中培养。将中性粒细胞分为对照组(中性粒细胞不做任何处理)、PMA 组(中性粒细胞加入 10 mmol/L NETs 释放激活剂 PMA)、PMA + DNase I 组(中性粒细胞被 PMA 处理后加入 100 U/ml NETs 抑制剂)。首先将外周血中分离的中性粒细胞(密度 1×10^6)接种于 24 孔板中黏附 1 h。PMA 组加入 100 nmol/L 的 PMA 刺激 4 h, PMA + DNase I 组在加入 PMA 的同时加入 100 U/ml 的 DNase I。各组细胞上清液用于 ELISA 检测。收集 PMA 组中含有 NETs 的上清液,在 4 °C 下以 10 000 r/min 的转速离心 10 min,再以 40 000 r/min 的转速离心 20 min 以得到纯化的 NETs,储存在 -80 °C 下以备后续实验。

1.2.3 CRC 细胞培养 人 CRC 细胞系(HCT116、SW480、DLD-1)和人正常结肠上皮细胞(NCM460)在 DMEM 培养基(添加有 10% FBS 和 1% 青-链霉素)中培养,并置于 37 °C、5% CO₂ 加湿的培养箱中培养 48 h。

1.2.4 CRC 细胞转染和分组 将 SW480 细胞接种于 24 孔板中,在 37 °C 下培养过夜。使用 Lipofectamine 3000 试剂将 OTUB2 过表达质粒及其阴性对照 vector 和 siRNA (si-OTUB2、si-DDX54) 及对应的阴性对照 (si-NC) 转染至 SW480 细胞。转染 48 h 后,使用 qRT-PCR 法检测转染效率并用于后续研究。使用 Transwell 共培养系统将中性粒细胞和 CRC 细胞共培养,中性粒细胞接种于 Transwell 下腔,SW480 细胞接种于 Transwell 上腔,具体细胞分组如下:对照组、NETs 组、vector 组、OTUB2 组、OTUB2 + DNase I 组、si-OTUB2 组、NETs + si-OTUB2 组、OTUB2 + si-NC 组和 OTUB2 + si-DDX54 组。对照组 SW480 细胞不做任何处理,NETs 组、NETs + si-OTUB2 组(分别使用 SW480 细胞、转染了 si-OTUB2 的 SW480 细胞与 PMA 处理的中性粒细胞共培养),vector 组、OTUB2 组、si-OTUB2 组、OTUB2 + si-NC 组、OTUB2 + si-DDX54 组(分别与转染了 vector、OTUB2 过表达质粒、si-OTUB2、OTUB2 过表达质粒和 si-NC、OTUB2 过表达质粒和 si-DDX54 的 SW480 细胞与中性粒细胞共培养),OTUB2 + DNase I 组(转染了 OTUB2 过表达质粒的 SW480 细胞与 DNase I 处理的中性粒细胞共培养)。

1.2.5 ELISA 检测 IL-8、TNF- α 、MPO-DNA 复合物水平和 Cit-H3 浓度 收集健康对照组和 CRC 患者血清样本,根据 ELISA 试剂盒说明中的要求检测 IL-

8 和 TNF- α 的浓度;收集与 NETs 共培养后的 SW480 细胞,1 000 r/min 离心 5 min 后取上清液。使用 ELISA 试剂盒检测上清液中 MPO-DNA 复合物相对表达量和 Cit-H3 浓度。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达 RIPA 裂解液提取各组 SW480 细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,行 SDS-PAGE 凝胶电泳并转膜后,使用 5% BSA 将转移后的膜封闭 2 h,并与一抗:抗 MPO (1 : 1 000)、抗 Cit-H3 (1 : 1 000)、抗 OTUB2 (1 : 1 000)和抗 DDX54 (1 : 2 000)在 4 °C 下孵育过夜,然后与 HRP 标记的二抗(1 : 2 000)在室温下孵育 1 h。TBST 溶液洗膜 3 次,ECL 显色,ImageJ 软件对蛋白条带进行定量。

1.2.7 MTT 检测细胞活力 将各组对数生长期的 SW480 细胞接种于 96 孔板(2×10^3)中孵育过夜,之后按照 MTT 试剂盒说明书要求对每组细胞活力进行检测。细胞活力(%) = (待测样品吸光度值 - 背景吸光度值) / (对照样品吸光度值 - 背景吸光度值) $\times 100\%$ 。

1.2.8 Transwell 检测细胞侵袭 已转染的 SW480 细胞胰酶消化后,重悬于无血清的培养基中,调整细胞密度为 1×10^5 个/ml。Transwell 小室(孔径 8 μ m)的上室预埋有基质胶,然后向上室中加入各组细胞,下室中加入 600 μ l 含 10% FBS 的培养基。孵育 24 h 后,取出 Transwell 膜,用棉签擦去未侵入的细胞,4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色后显微镜下观察染色结果。

1.2.9 qRT-PCR 检测 mRNA 表达 使用 TRIzol 试剂分别提取各组 SW480 细胞和 CRC 患者癌组织和癌旁组织中的 RNA,Nanodrop 2000 分光光度计测量总 RNA 的浓度和纯度。跟据 HiScript II Q RT Super Mix 的说明将总 RNA 逆转录为 cDNA,然后通过 SYBR Green qPCR Master 试剂盒在 Light Cycler 96 实时荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增。*GAPDH* 作为内参,具体引物序列见表 1。

表 1 引物序列表

| 基因 | 上游(5'-3') | 下游(5'-3') |
|--------------|----------------------|----------------------|
| <i>OTUB2</i> | GTCTCTTTACCAGGGCAGT | ACCCTAGCCCTCACATTCAA |
| <i>DDX54</i> | CGCTGATCTTGGATGGCAAG | CAGGATCAGGGCAGCTTGA |
| <i>GAPDH</i> | TGGTTGAGCACAGGTACTT | CCAAGCAGTAAGACCCCTGG |

1.2.10 生物信息学分析 UALCAN 数据库(<http://ualcan.path.uab.edu>)用于分析 OTUB2 和 DDX54 在 CRC 中的表达。StarBase 数据库(<http://www.cnki.net>)

tps://starbase.sysu.edu.cn)用于预测 OTUB2 的结合蛋白。采用韦恩图在线工具(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)取 RNA 测序得到的敲减 OTUB2 后 SW480 细胞中的差异表达基因以及 OTUB2 的结合蛋白的交集。Timer 数据库(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)预测 OTUB2 表达和中性粒细胞的相关性。

1.2.11 RNA 测序 在人 CRC 细胞 SW480 细胞中转染 si-OTUB2,从细胞中分离 RNA, DNase I 处理总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 的质量;将纯化后的 RNA 进行 rRNA 去除、片段化并且合成 cDNA、修复 cDNA 末端、连接接头后构建测序样本文库;通过 RNA 测序测定敲减 OTUB2 后 SW480 细胞中的所有差异表达基因。依据 cBot 用户指南指示的流程,在 Illumina 测序仪的 cBot 上生成 Cluster 和测序引物杂交,准备测序试剂并将含 cluster 的 flow cell 上机并对数据进行实时分析。差异因子筛选条件为 $P < 0.05$ 且差异倍数 ≥ 1 。

1.2.12 免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 反应和 Western blot 实验 Co-IP 实验用于验证 OTUB2 和 DDX54 的相互作用。收集 SW480 细胞,将细胞使用裂解缓冲液裂解、胰蛋白酶消化后加入 OTUB2 (1 : 1 000)、DDX54 抗体 (1 : 2 000) 和山羊抗兔 IgG (1 : 2 000) 抗体在 4 °C 下孵育 4 h,之后加入蛋白质 A/G 琼脂糖珠捕捉抗原抗体复合物,收集沉淀后的蛋白行 Western blot 检测。Co-IP 检测 OTUB2 对 DDX54 的泛素化修饰时,首先对 OTUB2-WT 和 OTUB2-KO 细胞进行裂解,之后向上清中加入抗泛素抗体 (HA-Ubi) (1 : 1 000)、HA-Ub-DDX54,将抗体与蛋白质 A/G 琼脂糖珠结合,使用缓冲液洗涤后行 Western blot 检测。

1.2.13 蛋白质纯化与谷胱甘肽 S-转移酶亲和纯化 (glutathione s-transferase pull down, GST pull down) 采用 GST pull down 实验验证 OTUB2 和 DDX54 的相互作用。重组 His 标记的 OTUB2 和 DDX54 在大肠埃希菌 BL21 中表达,并使用 HisTrap HP 层析柱进行纯化。GST 标记的 OTUB2 和 DDX54 也在大肠埃希菌 BL21 中表达,并使用谷胱甘肽-琼脂糖 4B 层析柱进行纯化。对于体外 GST pull-down 测定,GST 标记蛋白与带有 His 标签的蛋白在 PBS 中 4 °C 下孵育 2 h。接下来,将谷胱甘肽-琼脂糖树脂添加到缓冲液中,并将混合物在 4 °C 下孵育 3 h。将珠子用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,并用 30 μ l 2 × SDS 上样缓冲液煮沸,然后进行 SDS-

PAGE 分析。

1.2.14 His-tag pull-down His-tag pull-down 实验验证 OTUB2 对 DDX54 的泛素化修饰情况。转染 OTUB2 过表达质粒的 SW480 细胞室温下在 8 ml His-tag pull down 裂解缓冲液中裂解 2 h。将细胞裂解物与 50 μ l Ni NTA 珠在室温下孵育 6 h。用 His-tag pull-down 洗涤缓冲液 I、II、III 和 IV 依次洗涤珠子。珠子在 30 μ l His-tag pull-down 洗脱缓冲液中洗脱,并用 30 μ l 2 × SDS 上样缓冲液煮沸。对样品进行蛋白质印迹分析。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。实验结果统计以平均值 \pm 标准差表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组之间比较采用单因素方差分析,多组间数据的两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRC 患者外周血中 NETs 的形成增加并促进 CRC 细胞活力和侵袭 当中性粒细胞释放 NETs 时,它们会释放一系列的细胞因子,包括 TNF- α 和 IL-8。与健康对照组相比,CRC 组患者外周血中 NETs 相关因子 TNF- α 和 IL-8 的水平上调 ($t = 9.79, 10.15$, 均 $P < 0.001$) (图 1A)。与对照组相比,PMA 组中性粒细胞 MPO 和 Cit-H3 蛋白表达上调 ($q = 19.09, 22.49$, 均 $P < 0.001$);与 PMA 组相比,使用 PMA + DNase I 处理后,MPO 和 Cit-H3 蛋白表达降低 ($q = 11.34, 16.25$, 均 $P < 0.001$),表明 PMA 成功诱导 NETs 形成,而 DNase I 抑制了 NETs 水平 (图 3B)。将分离的 NETs 用于处理 SW480 细胞并检测细胞活力与侵袭,与对照组相比,NETs 处理组细胞活力和侵袭增加 ($t = 7.69, 6.72$, 均 $P < 0.01$) (图 3C、D)。

2.2 OTUB2 在 CRC 组织和细胞中高表达并与中性粒细胞呈正相关 UALCAN 数据库分析显示 OTUB2 在 CRC 组织中的表达高于癌旁组织 (图 2A);与癌旁组织相比,CRC 患者癌组织中 OTUB2 的 mRNA 表达上调 ($t = 8.51$, $P = 0.001$) (图 2B),并且 OTUB2 mRNA 和蛋白在 CRC 细胞中的表达均高于 NCM460 细胞 ($q = 8.11, 12.89, 10.70, 7.59, 16.48, 9.99$, 均 $P < 0.01$) (图 2C、D)。TIMER 数据库预测结果显示,在 CRC 中 OTUB2 的表达与中性粒细胞的相对浸润水平呈正相关 ($r = 0.16$, $P = 0.001$) (图 2E)。

2.3 过表达 OTUB2 增加 NETs 的形成并促进 CRC 细胞活力和侵袭 qRT-PCR 检测结果显示,过

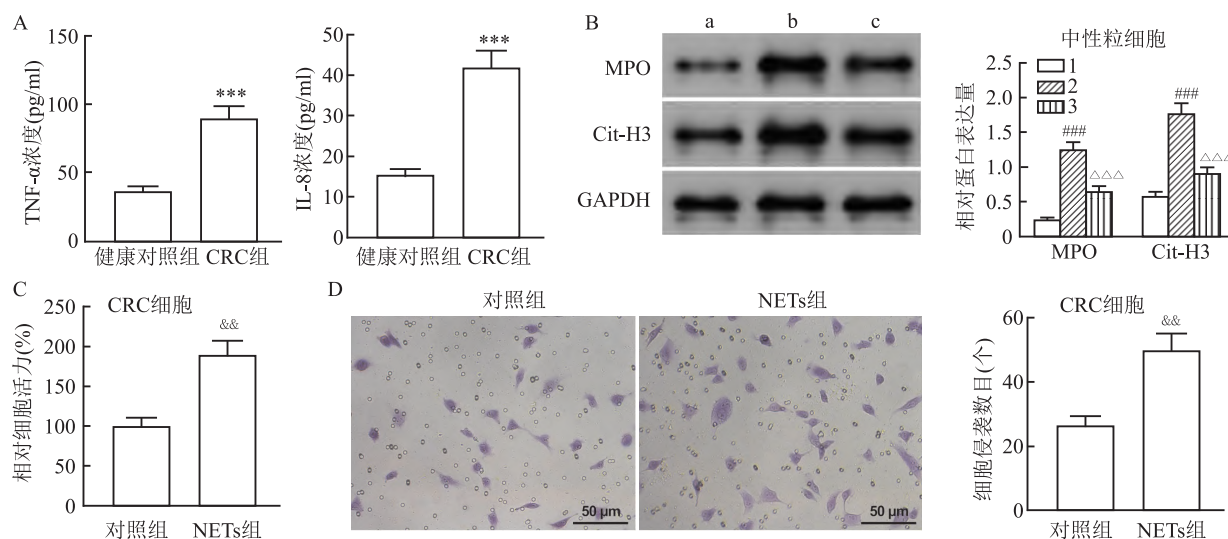


图1 NETs分离及其对CRC细胞活力和侵袭的影响

A: CRC患者和健康对照组外周血中TNF- α 和IL-8水平的检测结果; B: MPO和Cit-H3的蛋白表达检测结果; C: 各组细胞活力检测结果; D: 各组细胞侵袭检测结果 $\times 400$; a: 对照组; b: PMA组; c: PMA + DNase I组; 与健康对照组比较: $*** P < 0.001$; 与中性粒细胞对照组比较: $### P < 0.001$; 与PMA组比较: $\triangle\triangle\triangle P < 0.001$; 与CRC细胞对照组比较: $\&\& P < 0.01$

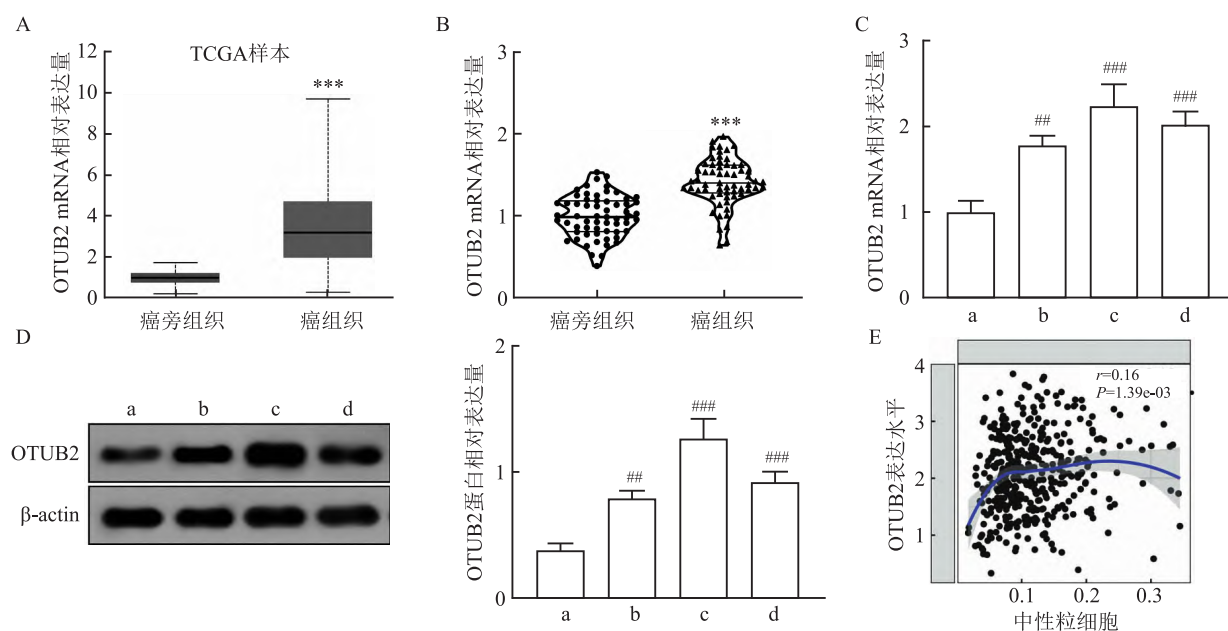


图2 OTUB2在CRC组织和细胞中的mRNA和蛋白表达以及OTUB2与中性粒细胞的相关性分析

A: UALCAN数据库中OTUB2表达的预测结果; B: OTUB2在癌旁组织与癌组织中的表达; C、D: NCM460细胞和CRC细胞系(HCT116、SW480、DLD-1)中OTUB2的mRNA和蛋白表达; E: TIMER数据库中OTUB2与中性粒细胞相对浸润水平在CRC中的相关性预测结果; a: NCM460细胞; b: HCT116细胞; c: SW480细胞; d: DLD-1细胞; 与癌旁组织比较: $*** P < 0.001$; 与NCM460细胞比较: $## P < 0.01$, $### P < 0.001$

表达OTUB2后OTUB2的mRNA水平高于vector组($t = 9.47$, $P < 0.001$) (图3A)。ELISA检测结果显示,与vector组相比,OTUB2组MPO-DNA复合物相对表达量和Cit-H3的浓度上调($q = 19.29$ 、 12.92 , 均 $P < 0.001$)、细胞活力和侵袭能力提高($q = 11.11$ 、 18.32 , 均 $P < 0.001$);与OTUB2组相比,OTUB2 + DNase I组MPO-DNA复合物相对表达量和Cit-H3的浓度降低($q = 13.33$ 、 8.88 , 均 $P <$

0.001)、细胞活力和侵袭能力被抑制($q = 7.90$ 、 11.20 , 均 $P < 0.01$) (图3B - D)。提示过表达OTUB2能够促进NETs的形成并促进CRC细胞的活力和侵袭。

2.4 敲低OTUB2逆转NETs诱导的CRC细胞活力和侵袭 qRT-PCR检测结果显示相对于对照组,si-OTUB2组细胞的OTUB2 mRNA表达降低、细胞活力和侵袭能力也降低($t = 4.04$, $q = 7.28$ 、 8.56 ,

均 $P < 0.01$) (图 4A), NETs 组细胞活力和侵袭增加 ($q = 14.51, 11.61$, 均 $P < 0.001$)。而与 NETs 组相比, 敲低 OTUB2 后 NETs + si-OTUB2 组细胞活力和侵袭被抑制 ($q = 11.25, 12.38$, 均 $P < 0.01$) (图 4B、C)。提示敲减 OTUB2 能够抑制 NETs 诱导的 CRC 细胞的活力和侵袭能力。

2.5 OTUB2 直接调控 DDX54 的表达 为了研究 OTUB2 在 CRC 中作用的机制, 本研究在 CRC 细胞

中敲低 OTUB2 并做 RNA 测序 (图 5A)。将测序差异显著的前 100 个基因和 StarBase 中预测的 OTUB2 的结合蛋白取交集, 发现共 3 个交集分子: DDX54 (差异倍数 = -1.37013298)、IGF2BP1 (差异倍数 = 1.7614246)、ABHD2 (差异倍数 = 0.9325771) (图 5B)。UALCAN 数据库预测显示 DDX54 在 CRC 癌组织中高表达 ($P = 1.624^{-12}$) (图 5C), qRT-PCR 检测结果显示 DDX54 在本研究纳入的 CRC 患者癌组

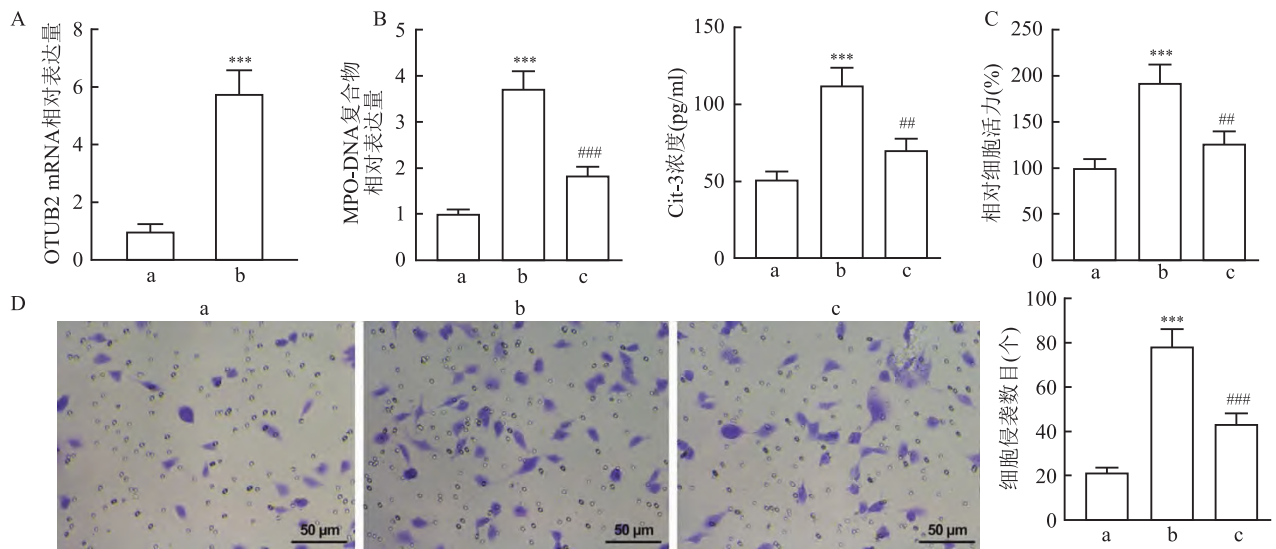


图 3 共培养系统中 NETs 形成以及各组 CRC 细胞活力和侵袭的检测结果

A: OTUB2 过表达转染效率验证结果; B: 各组细胞上清中 MPO-DNA 复合物相对表达量和 Cit-H3 浓度的检测结果; C: 各组细胞活力检测结果; D: 各组细胞侵袭检测结果 $\times 400$; a: vector 组; b: OTUB2 组; c: OTUB2 + DNase I 组; 与 vector 组比较: *** $P < 0.001$; 与 OTUB2 组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

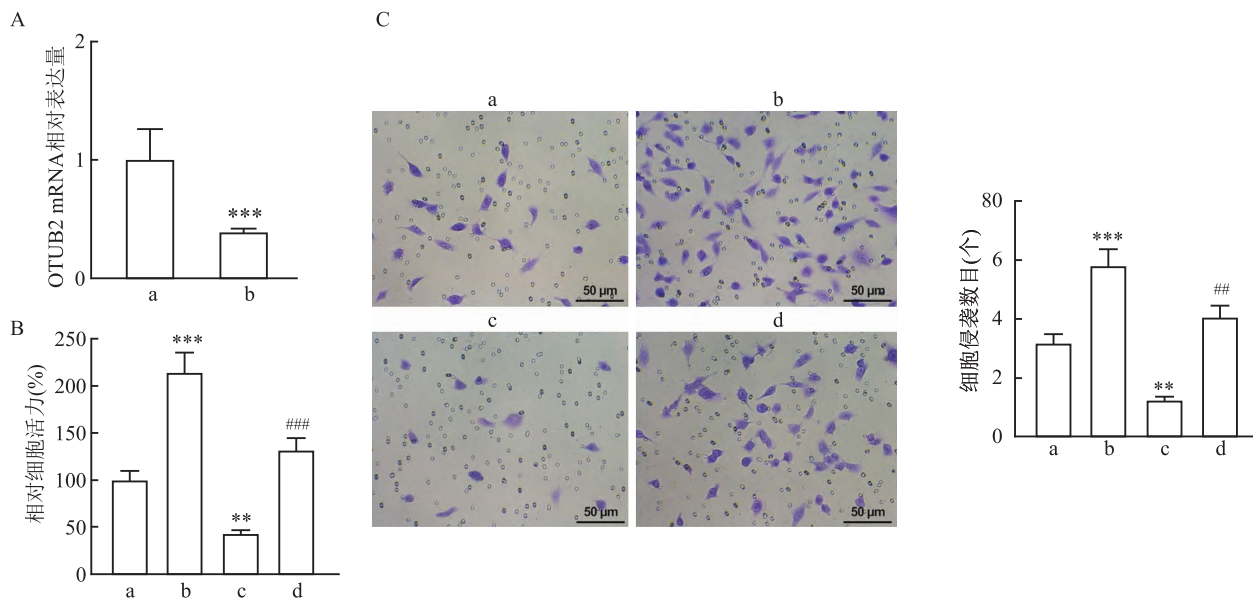


图 4 各组细胞活力和侵袭检测结果

A: qRT-PCR 检测 OTUB2 的 mRNA 的检测结果; B: 各组细胞活力检测结果; C: 各组细胞侵袭检测结果 $\times 400$; a: 对照组; b: NETs 组; c: si-OTUB2 组; d: NETs + si-OTUB2 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 NETs 组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

织中表达上调($t = 7.72$, $P < 0.001$)(图 5D)。与 NCM460 细胞相比,DDX54 mRNA 和蛋白在 CRC 细胞系中均高表达($q = 7.13$ 、13.27、10.70、7.48、16.79、13.59, 均 $P < 0.01$)(图 5E、F)。co-IP 实验结果显示,在 DDX54 抗体免疫沉淀的蛋白质中可检测到 OTUB2 蛋白,在 OTUB2 抗体免疫沉淀的蛋白质中可检测到 DDX54 蛋白,表明二者发生了共沉淀(图 5G)。GST-pull-down 实验进一步表明,在 GST-DDX54 融合蛋白中可检测到 OTUB2 蛋白,在 GST-OTUB2 融合蛋白中可检测到 DDX54 蛋白。(图 5H)。提示 OTUB2 能够与 DDX54 结合,OTUB2 可

能是 DDX54 的去泛素化酶。

2.6 OTUB2 抑制 DDX54 的泛素化 对 OTUB2 和 DDX54 的泛素化修饰情况进行 His pull-down 实验检测,结果显示,相对于加入了 DDX54 和 His-Ubi 抗体的 SW480 细胞,加入了 DDX54、His-Ubi 以及 OTUB2 抗体后 SW480 细胞中 DDX54 的泛素化水平被抑制(图 6A)。Co-IP 实验检测结果显示,在 SW480 细胞中敲除 OTUB2 后,DDX54 的泛素化增加,而进一步加入 OTUB2 抗体后,DDX54 的泛素化被抑制(图 6B)。这些结果表明 OTUB2 抑制 DDX54 的泛素化。

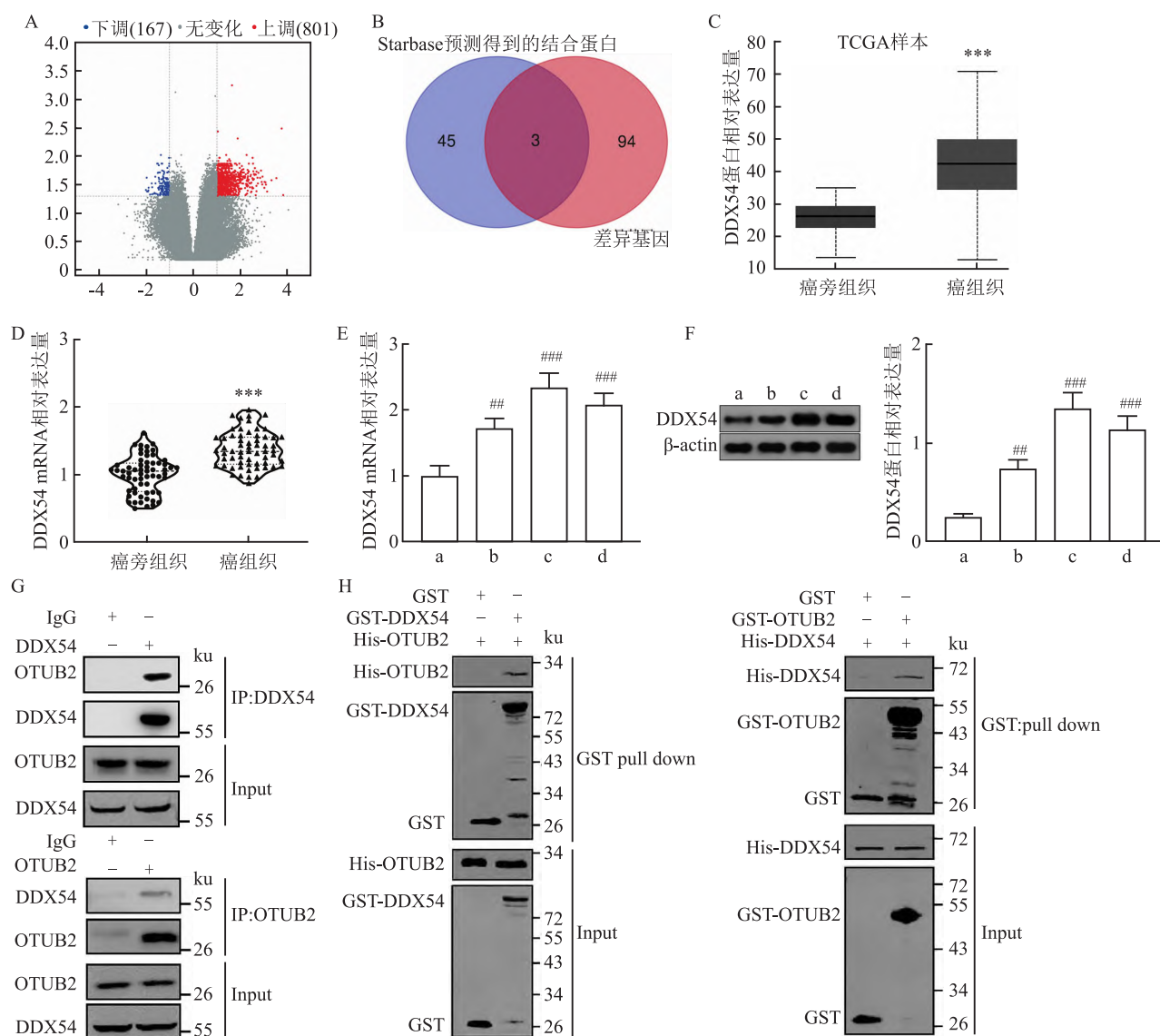


图 5 OTUB2 和 DDX54 的结合验证

A: CRC 细胞敲减 OTUB2 后的高通量测序结果;B:高通量测序的差异表达基因和 Starbase 数据库预测得到的 OTUB2 结合蛋白的交集;C: UALCAN 数据库中 DDX54 在 CRC 中的表达;D:癌旁组织与癌组织中 DDX54 的 mRNA 表达;E、F:NCM460 与 CRC 细胞系中 DDX54 的 mRNA 和蛋白表达;G:co-IP 实验检测结果;H:GST-pull-down 实验检测结果;a:NCM460 细胞;b:HCT116 细胞;c:SW480 细胞;d:DLD-1 细胞;与癌旁组织组比较:*** $P < 0.001$;与 NCM460 细胞比较:## $P < 0.01$,### $P < 0.001$

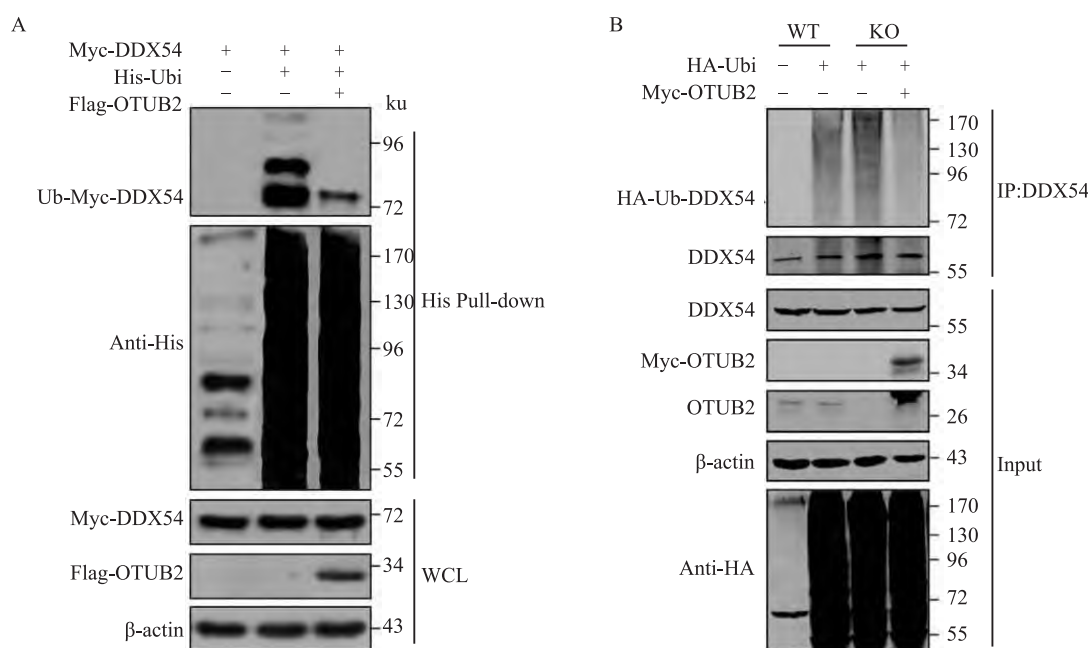


图6 OTUB2影响DDX54的泛素化的检测结果

A: His-tag pull down 检测 OTUB2 影响 DDX54 泛素化的结果; B: Co-IP 实验检测 OTUB2 影响 DDX54 泛素化的结果

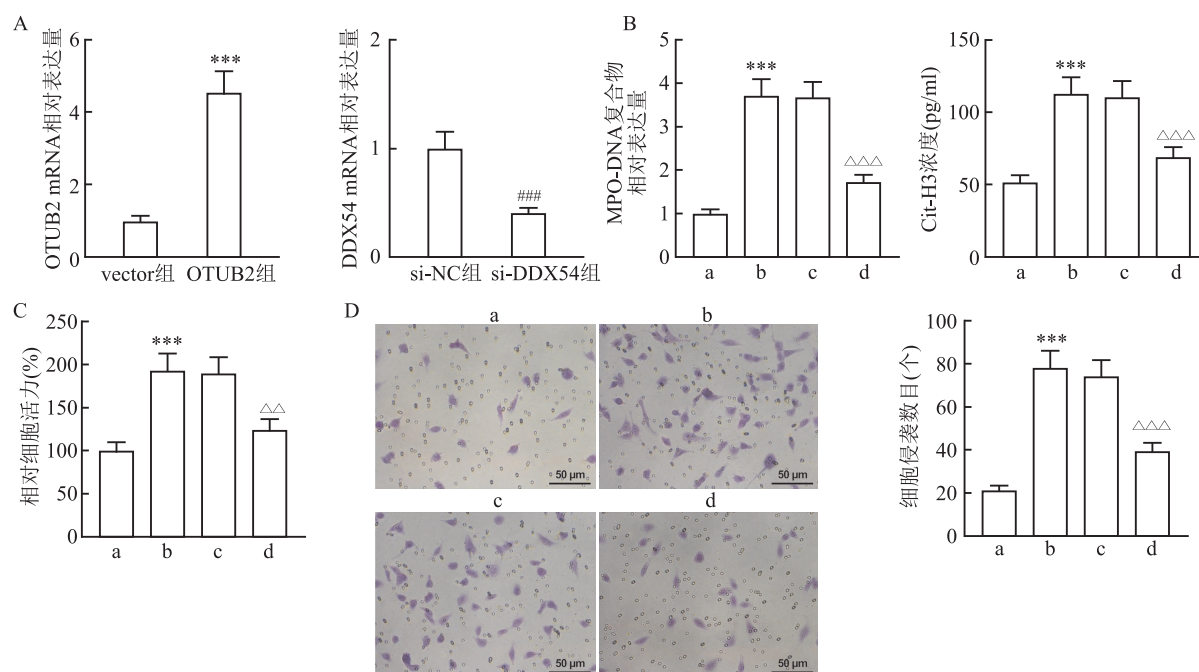


图7 敲低 DDX54 减弱过表达 OTUB2 诱导的 NETs 的形成和 CRC 细胞增殖和侵袭

A: qRT-PCR 检测 OTUB2 mRNA 的检测结果; B: 各组细胞上清液中 MPO-DNA 复合物相对表达量和 Cit-H3 浓度的检测结果; C: 各组 SW480 细胞活力检测结果; D: 各组 SW480 细胞侵袭检测结果图以及比较 ×400; a: vector 组; b: OTUB2 组; c: OTUB2 + si-NC 组; d: OTUB2 + si-DDX54 组; 与 vector 组比较: *** $P < 0.001$; 与 si-NC 组比较: ### $P < 0.001$; 与 OTUB2 + si-NC 组比较: △△ $P < 0.01$, △△△ $P < 0.001$

2.7 敲低 DDX54 减弱过表达 OTUB2 诱导的 NETs 的形成、CRC 细胞活力和侵袭 图 7A 检测结果显示, 相对于 vector 组, OTUB2 组的 OTUB2 mRNA 表达增强 ($t = 10.46$, $P < 0.001$)。ELISA 检测结果显示, 与 OTUB2 + si-NC 组相比, 敲低 DDX54

后共培养系统中 MPO-DNA 复合物相对表达量和 Cit-H3 的浓度降低 ($q = 12.23, 8.00$, 均 $P < 0.001$) (图 7B), 细胞活力和侵袭被抑制 ($q = 7.22, 10.29$, 均 $P < 0.01$) (图 7C、D)。提示敲低 DDX54 能够抑制 OTUB2 诱导的 NETs 形成和降低 CRC 细胞的

活力和侵袭能力。

3 讨论

本研究结果显示,去泛素化酶 OTUB2 在 CRC 中表达增强,OTUB2 能够增加 NETs 的形成并促进 CRC 细胞的恶性生物学行为,该作用的实现可能与增强 DDX54 的活性有关。这些发现为进一步研究 OTUB2 和 DDX54 之间的相互作用以及它们在 CRC 治疗中的潜在价值提供了重要依据。

中性粒细胞是数量最多的免疫细胞,与肿瘤细胞协同促进肿瘤的恶性进展^[6]。研究^[7]表明,高水平的肿瘤浸润性中性粒细胞与 CRC 的较差预后有关。NETs 是中性粒细胞独特的产物,可以保护肿瘤细胞免受宿主免疫系统的攻击从而促进肿瘤的侵袭和转移^[8]。此外,还有研究^[9]表明靶向抑制肿瘤中 NETs 的形成或活性是癌症治疗的潜力策略。本研究通过生物信息学在线预测网站显示,OTUB2 在 CRC 中与中性粒细胞呈正相关,体外实验显示,过表达 OTUB2 促进 NETs 的形成以及 CRC 细胞的增殖和侵袭,而敲低 OTUB2 减弱 NETs 介导的 CRC 细胞增殖和侵袭。

泛素-蛋白酶体系是蛋白质翻译后修饰的主要机制,泛素酶 E1、E2、E3 通过催化靶蛋白的泛素化使其降解,而泛素特异性蛋白酶 (deubiquitinating enzyme, DUB) 通过去除靶蛋白中的泛素链抑制其泛素化从而增强靶基因的稳定性^[10]。OTUB2 是卵巢肿瘤结构域 (ovarian tumor domain, OTU) 家族成员之一。研究^[11]表明,OTUB2 一方面通过促进 DNA 损伤修复诱导肿瘤免疫逃逸促进肿瘤进展;另一方面通过调控多种信号通路促进肿瘤转移,如 OTUB2 可以介导 Hippo 通路的下游分子 YAP/TAZ 去泛素化。OTUB2 去泛素化酶活性在肿瘤中的致癌作用已被广泛报道,且研究^[4]显示,敲低 OTUB2 可以抑制 CRC 细胞增殖、迁移并促进细胞凋亡,抑制小鼠肿瘤生长。本研究通过生物信息学分析和高通量测序发现 DDX54 是 OTUB2 的潜在靶点,qRT-PCR 结果表明 DDX54 在 CRC 组织和细胞中高表达,co-IP 和 GST-pull-down 实验显示 OTUB2 可以直接与 DDX54 结合,His-tag pull down 和免疫沉淀分析表明 OTUB2 通过去泛素化增强 DDX54 的活性。据报道^[12],无论 DNA 是否存在损伤 DDX54 均可促进细胞存活,且 DDX54 在 9 种实体瘤中表达上调,可以作为一种新的肿瘤标记物。此外,研究^[5, 13]表明 DDX54 在包括 CRC 在内的多种癌症中表达上

调,促进肿瘤的增殖、迁移和侵袭。在本研究中,敲低 DDX54 能够抑制过表达 OTUB2 介导的促癌作用。

综上所述,本研究通过实验证明 NETs 在 CRC 患者中高表达,并促进促进 CRC 细胞活力和侵袭;OTUB2 通过抑制 DDX54 的泛素化从而调节 NETs 的生成和 CRC 细胞的活力和侵袭。上述研究结果揭示了 OTUB2 在 CRC 发生和发展中的关键作用,使其成为 CRC 的潜在的诊断和治疗靶点。

参考文献

- [1] 陈培风,韩文秀,陈章明,等. T1 和 T2 期直肠癌患者预后的影响因素分析及列线图模型的建立[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(12):2002-6.
- [2] Wang Y, Liu F, Chen L, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) promote non-small cell lung cancer metastasis by suppressing lncRNA MIR503HG to activate the NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:867516.
- [3] Liu G, Guo W, Qin J, et al. OTUB2 facilitates tumorigenesis of gastric cancer through promoting KDM1A-mediated stem cell-like properties[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:71735.
- [4] Yu S, Zang W, Qiu Y, et al. Deubiquitinase OTUB2 exacerbates the progression of colorectal cancer by promoting PKM2 activity and glycolysis[J]. *Oncogene*, 2022, 41(1):46-56.
- [5] Yu Y, Wang J L, Meng L L, et al. DDX54 plays a cancerous role through activating P65 and AKT signaling pathway in colorectal cancer[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:650360.
- [6] 商占仙,路丽明. 中性粒细胞在肿瘤发生、发展中的研究进展[J]. *现代免疫学*, 2018, 38(6):488-92, 518.
- [7] Su H, Cai T, Zhang S, et al. Identification of hub genes associated with neutrophils infiltration in colorectal cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(7):3371-80.
- [8] Zhang Y, Guo L, Dai Q, et al. A signature for pan-cancer prognosis based on neutrophil extracellular traps[J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(6):e004210.
- [9] Masucci M T, Minopoli M, Del Vecchio S, et al. The emerging role of neutrophil extracellular traps (NETs) in tumor progression and metastasis[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:1749.
- [10] Park J, Cho J, Song E J. Ubiquitin-proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment[J]. *Arch Pharm Res*, 2020, 43(11):1144-61.
- [11] Li J, Zhang N, Li M, et al. The emerging role of OTUB2 in diseases: from cell signaling pathway to physiological function[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10:820781.
- [12] Milek M, Imami K, Mukherjee N, et al. DDX54 regulates transcriptome dynamics during DNA damage response[J]. *Genome Res*, 2017, 27(8):1344-59.
- [13] Liu B, Yao P, Xiao F, et al. MYBL2-induced PTPN-AS1 up-regulates SIK2 to exert oncogenic function in triple-negative breast cancer through miR-520d-5p and DDX54[J]. *J Transl Med*,

2021,19(1):333.

Deubiquitinating enzyme OTUB2 increases the formation of neutrophil extracellular trapping nets and promotes the viability and invasion of colorectal cancer cells by inducing DDX54 activity

Jiang Liangjun¹, Li Wei²

(¹Gastroenterology, ²Hepatobiliary surgery, The Affiliated Nanhua Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421002)

Abstract *Objective* The purpose of this study was to investigate the effects of OTU deubiquitinase, ubiquitin aldehyde binding 2 (OTUB2) on the activity of DEAD-box helicase 54 (DDX54) and its influence on the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) and the vitality and invasion of colorectal cancer (CRC) cells. *Methods* Peripheral blood neutrophils were isolated from CRC patients and healthy controls, then stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) or DNase I for 4 hours. Western blot analysis was performed to detect the expression of NETs markers, myeloperoxidase (MPO), and citrullinated histone H3 (Cit-H3). The expression of OTUB2 or DDX54 was manipulated in SW480 cells, and they were co-cultured with neutrophils. The cells were divided into the following groups: Control group (without any treatment), NETs group, vector group, OTUB2 group, NETs + si-OTUB2 group (SW480 cells, SW480 cells transfected with vector, OTUB2 overexpression plasmid and si-OTUB2 were co-cultured with PMA-treated neutrophils, respectively), OTUB2 + DNase I group (SW480 cells transfected with OTUB2 overexpression plasmid co-cultured with neutrophils treated with DNase I), si-OTUB2 group, OTUB2 + si-NC group, OTUB2 + si-DDX54 group (SW480 cells transfected with si-OTUB2, OTUB2 overexpressing plasmid and si-NC, OTUB2 overexpressing plasmid and si-DDX54 were co-cultured with neutrophils, respectively). ELISA was used to measure the relative expression of MPO-DNA complexes and the concentration of Cit-H3 in the supernatant of SW480 cells. MTT and Transwell assays were performed to evaluate cell viability and invasive ability. RNA sequencing was conducted to screen downstream genes regulated by OTUB2. The interaction between DDX54 and OTUB2 was validated using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), co-immunoprecipitation (Co-IP), Glutathione S-Transferase (GST) pull-down, and His-tag pull-down experiments. *Results* Compared to healthy individuals, there was an increased formation of NETs in the peripheral blood of CRC patients. The CRC cells in the NETs group exhibited increased cell viability and invasion compared to the control group ($P < 0.05$). In comparison to the vector group, the OTUB2 group showed increased relative expression of MPO-DNA complexes and Cit-H3, as well as increased cell viability and invasion ($P < 0.05$). However, when compared to the OTUB2 group, the OTUB2 + DNase I group exhibited decreased relative expression of MPO-DNA complexes and Cit-H3, as well as decreased cell viability and invasion ($P < 0.05$). Co-IP, GST pull-down, and His-tag pull-down experiments demonstrated the interaction between OTUB2 and DDX54. In comparison to the OTUB2 + si-NC group, the OTUB2 + si-DDX54 group showed decreased relative expression of MPO-DNA complexes and Cit-H3, as well as decreased cell viability and invasion ($P < 0.05$). *Conclusion* deubiquitinating enzyme OTUB2 can increase the formation of NETs and promote CRC cell viability and invasion by up-regulating DDX54.

Key words deubiquitination; OTUB2; DDX54; neutrophil extracellular traps; colorectal cancer; neutrophil