

网络出版时间: 2024-07-04 12:08:10 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20240702.1449.011>

USP10 对 KLF4 蛋白的调控及对肝细胞癌侵袭的影响

陆路 黎东明 王学国 冉博 王太成 赵红岩 李鹏

摘要 目的 探究泛素特异蛋白酶 10 (USP10) 对肝细胞癌 (HCC) 中 Krüppel 样因子 4 (KLF4) 蛋白的调控及对 HCC 细胞增殖与侵袭的影响。方法 采用 Western blot 实验检测 USP10 和 KLF4 在人正常肝细胞系 L02 和 HCC 细胞系 HepG2、HUH7、HCCLM3 等中的表达差异。选取 HCCLM3 和 HUH7 细胞, 将过表达或沉默 USP10 的慢病毒颗粒 (oe-USP10 或 sh-USP10) 转染入细胞中, 并将其记为 oe-USP10 组和 oe-NC 组。免疫共沉淀 (Co-IP) 实验检测 HCCLM3 或 HUH7 细胞中 USP10 是否可与 KLF4 直接结合。加入蛋白酶体抑制剂 MG132, 再次使用 Co-IP 检测转染 oe-USP10 或 sh-USP10 的 HCCLM3 和 HUH7 细胞中 KLF4 蛋白的泛素化水平。将过表达 KLF4 的 pcDNA3.1 载体质粒及其阴性对照质粒 (pc-KLF4 或 pc-NC) 共转染入 HCCLM3 和 HUH7 的 sh-USP10 组或 sh-NC 组细胞中, 并将细胞记为 sh-NC + pc-NC 组、sh-USP10 + pc-NC 组、sh-NC + pc-KLF4 组和 sh-USP10 + pc-KLF4 组。采用 CCK-8 法检测 HCCLM3 和 HUH7 中各组细胞的增殖活力, Transwell 实验检测各组细胞的侵袭能力。结果 与 L02 细胞比较, USP10 和 KLF4 在 HepG2、HUH7、HCCLM3 等细胞中蛋白表达均降低 ($P < 0.05$)。在 HCCLM3 和 HUH7 细胞中, USP10 蛋白可直接与 KLF4 相互结合。同时, MG132 处理后, HCCLM3 和 HUH7 细胞中 KLF4 蛋白表达量呈时间依赖性增加。沉默 USP10 可增加 HCCLM3 与 HUH7 细胞中 KLF4 的泛素化, 过表达 USP10 可降低上述细胞中 KLF4 的泛素化水平。与 sh-NC + pc-NC 组比较, sh-USP10 + pc-NC 组中 HCCLM3 和 HUH7 的增殖和侵袭能力均升高 ($P < 0.01$), 而 sh-NC + pc-KLF4 组和 sh-USP10 + pc-KLF4 组的 HCCLM3 或 HUH7 细胞增殖和侵袭能力均降低 ($P < 0.05$); 与 sh-USP10 + pc-NC 组比较, sh-USP10 + pc-KLF4 组细胞的增殖和侵袭能力均降低 ($P < 0.05$)。结论 在 HCC 细胞中 USP10 通过去泛素化促进 KLF4 蛋白稳定性, 进而抑制肿瘤细胞的增殖与侵袭。

关键词 肝细胞癌; 泛素特异蛋白酶 10; 去泛素化; Krüppel 样因子 4

中图分类号 R 392.12; R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1181-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.011

2024-03-09 接收

基金项目: 海南省基础与应用基础研究计划项目 (编号: 821MS0833)

作者单位: 海南医学院第二附属医院肝胆胰脾外科, 海口 570100

作者简介: 陆路, 男, 副主任医师;

李鹏, 男, 博士, 主任医师, 责任作者, E-mail: lipeng512e

@163.com

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的原发性肝癌, 占肝脏肿瘤的 80% 以上^[1-2]。Krüppel 样因子 4 (Krüppel-like factor 4, KLF4) 是锌指蛋白 KLF 样因子亚家族的成员, 其在多种生理病理 (如 DNA 损伤反应、炎症、细胞凋亡和干细胞重编程等) 过程中发挥重要作用^[3-4]。研究^[5-6]显示, KLF4 在 HCC 的发病和进展过程中发挥着重要的抑制作用, 且 KLF4 表达的降低可能与肿瘤的进展和转移有关。因此, 探究影响 KLF4 表达的调控机制可能是抑制 HCC 转移潜能的有效策略。研究^[7]显示, 肿瘤中的 KLF4 表达受泛素化调节。泛素特异蛋白酶 10 (ubiquitin-specific protease 10, USP10) 是去泛素化酶家族的主要成员之一, 其主要定位于细胞质, 可通过水解、剪切目标蛋白的泛素化修饰发挥稳定后者表达和功能的作用^[8]。同时, 在 HCC 中, USP10 的表达显著降低。机制研究^[9]发现, USP10 可通过去泛素化来稳定 AMP 激活蛋白激酶 α 亚单位 (AMP-activated protein kinase α subunit, AMPK α) 和磷酸酶及张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 表达, 从而参与影响 HCC 的进展。然而, 能否同样通过 USP10 的去泛素化作用来维持 KLF4 蛋白表达, 从而下调 HCC 细胞的增殖与侵袭能力尚不明确。因此, 该研究通过体外实验进行揭示 USP10 在 KLF4 表达调控中的功能, 并探究 USP10 和 KLF4 在抑制 HCC 细胞增殖与侵袭中作用关系。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂 人正常干细胞系 L02, HCC 细胞系 HepG2、HUH7、HCCLM3, 低转移性人 HCC 细胞系 MHCC-97L 均购自中国科学院上海细胞库。DMEM 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 转染试剂 Lipofectamine 3000、TRIzol 试剂 (美国 Thermo 公司); 逆转录试剂盒 PrimeScrip RT Reagent Kit、RT-PCR 试剂盒 SYBR Green Mix (日本 Takara 公司); 蛋白酶体抑制剂 MG132 (美国 Selleck 公司); 过表达 USP10 (oe-USP10) 与其阴性对照慢病毒 (oe-NC) 和沉默 USP10 (sh-USP10) 与其阴性对照慢病毒 (sh-

NC) 及过表达 KLF4 的 pcDNA3.1 载体质粒 (pc-KLF4) 及其阴性对照质粒 (pc-NC) 均购自上海吉玛生物制药有限公司。兔抗人 KLF4、USP10 和 GAPDH 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); 过氧化物酶偶联的山羊抗兔二抗 (武汉博士德生物工程有限公司); Transwell 小室 (美国 Corning 公司); Matrigel 基质胶 (美国 BD 公司)。

1.2 细胞培养与转染 人正常肝细胞系 L02 和 HCC 细胞系 HepG2、HUH7、HCCLM3 与 MHCC-97L 的培养条件均为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。取生长状态良好的 HCCLM3 和 HUH7, 调整细胞密度按 1 × 10⁵ 个/孔接种至 6 孔板中, 按转染指数 20 将过表达 USP10 (oe-USP10) 与其阴性对照慢病毒 (oe-NC)、沉默 USP10 (sh-USP10) 与其阴性对照慢病毒 (sh-NC) 分别转染入 HCCLM3 和 HUH7 细胞中, 并记为 oe-USP10 组、oe-NC 组、sh-USP10 组和 sh-NC 组。转染 12 h 后更换为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。3 d 后将上述转染的细胞进行常规传代, 并使用 2 μg/ml 嘌呤霉素进行筛选, 以获得稳定转染的上述各组 HCCLM3 和 HUH7 细胞。随后, 采用转染试剂 Lipofectamine 3000 将过表达 KLF4 的 pcDNA3.1 载体质粒 (pc-KLF4) 及其阴性对照质粒 pc-NC 转染按照试剂盒说明书方法转染入上述稳定表达的 sh-USP10 或 sh-NC 细胞中, 并将其记为 sh-NC + pc-NC 组、sh-USP10 + pc-NC 组、sh-NC + pc-KLF4 组和 sh-USP10 + pc-KLF4 组。

1.3 RT-PCR 实验 采用 TRIzol 法提取待测各组 HCCLM3 和 HUH7 细胞中的总 RNA, 并使用 Prime-Script RT Reagent Kit 试剂盒进行反转录。参考 SYBR Green Mix 试剂盒说明书方法进行 RT-PCR, 反应条件为: 95 °C 预热 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 34 s, 共 40 个循环。RT-PCR 引物序列见表 1。以 GAPDH 为内参, 采用 2^{-ΔΔC_T} 方法分析 USP10 和 KLF4 的 mRNA 相对表达量。

表 1 qPCR 引物序列

引物	序列 (5'-3')
KLF4	F: CAAGTCCCGCCGCTCCATTA
	R: CCATCCACACGCCGTCCAGT
USP10	F: TTTTAAATGCCACCGAACCTATC
	R: CCAGCCATTCAGACCGATCT
GAPDH	F: AATCCCATCACCATCTTCC
	R: CATCACGCCACAGTTCC

1.4 Western blot 实验 将待测细胞在含有蛋白

酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中裂解, 并提取细胞中总蛋白。BCA 法进行蛋白定量, 并加热变性后, 将蛋白样品用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中电泳法分离, 并采用湿转法将分离后的蛋白条带印迹到 PVDF 膜上。分别用稀释后的一抗: KLF4 (1:800)、USP10 (1:800) 和 GAPDH (1:2000) 在 4 °C 下孵育过夜, 随后再加入过氧化物酶偶联的山羊抗兔二抗 (1:2000), 室温下孵育 2 h。最后滴加增强型化学发光检测试剂在凝胶成像系统进行显色、成像。Image-Pro Plus 6.0 软件用于蛋白条带的灰度分析, 并以 GAPDH 为内参, 按目标蛋白表达量 = 目标蛋白灰度值/GAPDH 灰度值, 计算 USP10 和 KLF4 的蛋白表达量。

1.5 CCK-8 增殖实验 将待测各组 HCCLM3 和 HUH7 细胞, 按 5 × 10³ 个/孔接种至 96 孔板中, 分别于 24、48 h 后, 向每孔加入 10 μl CCK-8 试剂, 观察各孔在 450 nm 处的吸光度值, 以吸光度值表示各组细胞增殖能力。每组每个时间点设置 5 个复孔。

1.6 Transwell 侵袭实验 将 Matrigel 基质胶预先包被在 8.0 μm 孔的 Transwell 小室中, 再将待测 HCCLM3 和 HUH7 细胞按 1 × 10⁵ 个/孔接种至小室内, 并加入 200 μl 含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基。下室为 800 μl 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 培养箱中孵育 48 h 后, 取出小室, 轻轻擦拭小室内未穿出的细胞, 并在 4 °C 预冷 5% 戊二醛溶液中固定后, 使用 0.1% 结晶紫染色, 显微镜下随机选取 5 个高倍视野进行观察、计数各组穿出的细胞数, 并以穿出的细胞数作为细胞的侵袭能力。

1.7 蛋白酶体抑制和免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 实验 取生长状态良好的 HCCLM3 或 HUH7 细胞, 参考文献方法^[10] 加入 15 μmol/L 的蛋白酶体抑制剂 MG132 处理细胞 3、6、9、12 h 或采用 15 μmol/L 的 MG132 处理转染 oe-USP10 组或 sh-USP10 组的 HCCLM3 或 HUH7 细胞 12 h 后, 按“1.4”项下方法裂解、提取细胞中的总蛋白后进行 Western blot 实验以检测细胞中 KLF4 的蛋白表达水平。对于 Co-IP 实验, 首先收集不同处理组中的 HCCLM3 或 HUH7 细胞, 加入 500 μl 的免疫共沉淀缓冲液 (IP buffer) 在冰上进行裂解细胞, 4 °C 下离心取上清液后, 取部分蛋白裂解液作为 Input 对照, 向剩余蛋白裂解液中加入各 2 μl 的 KLF4 和 USP10 抗体, 4 °C 下孵育过夜, 次日经 IP buffer 充分洗涤后, 加入蛋白 A/G 琼脂糖磁珠, 再次置于 4 °C 下孵育过夜, 最后样品经离心洗涤后, 向沉淀组织中

加入蛋白上样缓冲液,加热煮沸使蛋白变性,再按“1.4”项下方法进行 Western blot 实验。

1.8 统计学处理 本研究所有实验均单独重复 3 次。采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析和图表绘制。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较采用独立样本 t 检验。三组及三组以上的均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 USP10 和 KLF4 在 HCC 细胞系中的表达情况 Western blot 实验检测结果显示,与正常的肝细胞系 L02 比较,USP10 和 KLF4 在 HCC 细胞系 HepG2、HUH7、HCCLM3 和 MHCC-97L 中的蛋白表达均降低 ($F = 110.37, 172.80$, 均 $P < 0.05$),且 USP10 在 HCCLM3 中的降低趋势最为显著 ($P < 0.01$),而 KLF4 在 HUH7 中降低水平较其他 HCC

细胞系更为明显 ($P < 0.01$),见图 1。因此选择 HCCLM3 和 HUH7 进行后续相关实验。

2.2 USP10 对 KLF4 蛋白表达的影响 RT-PCR 和 Western blot 实验结果显示,与转染 oe-NC 组的 HCCLM3、HUH7 细胞比较,过表达 USP10 的 oe-USP10 组细胞中 USP10 mRNA ($t = 17.12, 24.26$) 与蛋白 ($t = 13.05, 16.35$) 表达均升高 ($P < 0.01$),而 KLF4 mRNA ($t = 3.13, 1.89$) 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但 KLF4 蛋白 ($t = 21.10, 18.34$) 表达增加 ($P < 0.05$),见图 2A ~ C; 此外,与转染 sh-NC 组的 HCCLM3、HUH7 细胞比较,沉默 USP10 的 sh-USP10 组细胞中 USP10 mRNA ($t = 12.51, 19.37$) 与蛋白 ($t = 11.10, 15.48$) 表达均降低 ($P < 0.01$),但 KLF4 mRNA ($t = 1.02, 4.71$) 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而 KLF4 蛋白 ($t = 14.05, 12.67$) 表达减少 ($P < 0.05$),见图 2D ~ F。提示,USP10 可能通过蛋白水平影响 KLF4 表达。

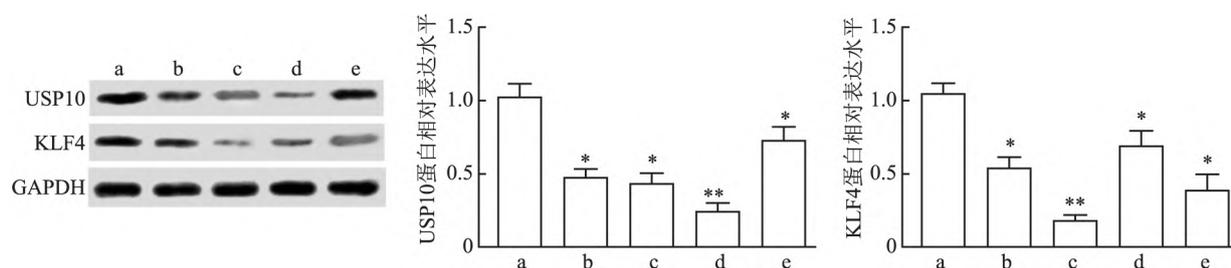


图1 Western blot 检测 USP10 和 KLF4 在 HCC 细胞系中的表达

a: L02; b: HepG2; c: HUH7; d: HCCLM3; e: MHCC-97L; 与 L02 细胞比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

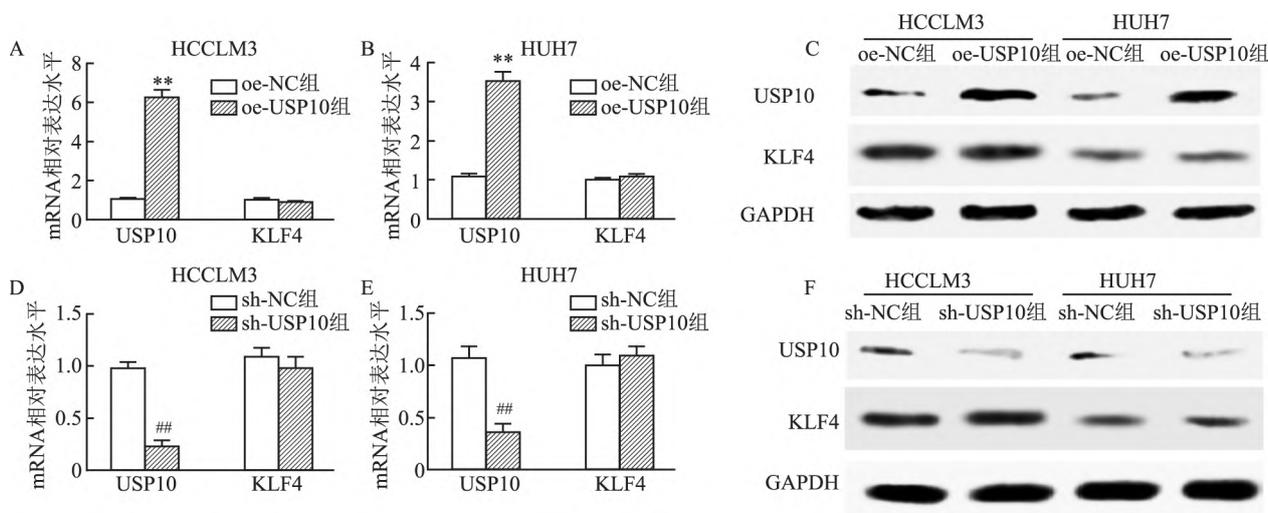


图2 RT-PCR 与 Western blot 实验检测干扰 USP10 表达后对 HCCLM3 和 HUH7 细胞中 USP10、KLF4 mRNA 与蛋白表达的影响

A: oe-USP10 组、oe-NC 组 HCCLM3 细胞中 USP10 与 KLF4 的 mRNA 表达水平; B: oe-USP10 组、oe-NC 组 HUH7 细胞中 USP10 与 KLF4 的 mRNA 表达水平; C: oe-USP10 组、oe-NC 组 HCCLM3 和 HUH7 细胞中 USP10 与 KLF4 的蛋白表达水平; D: sh-USP10 组、sh-NC 组 HCCLM3 细胞中 USP10 与 KLF4 的 mRNA 表达水平; E: sh-USP10 组、sh-NC 组 HUH7 细胞中 USP10 与 KLF4 的 mRNA 表达水平; F: sh-USP10 组、sh-NC 组 HCCLM3 和 HUH7 细胞中 USP10 与 KLF4 的蛋白表达水平; 与 oe-NC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 sh-NC 组比较: ## $P < 0.01$

2.3 USP10 通过去泛素化对 KLF4 蛋白表达的影响 Co-IP 实验结果表明 ,在 HCCLM3 和 HUH7 细胞中 ,USP10 蛋白可直接与 KLF4 相互结合(图 3A);同时 ,蛋白酶体抑制剂实验结果显示 ,加入 MG132 处理后 ,HCCLM3 和 HUH7 细胞中 KLF4 蛋白表达量随处理时间的延长而不断累积(图 3B)。此外 ,Western blot 实验结果显示 ,采用 MG132 处理转染 oe-USP10 或 sh-USP10 的 HCCLM3 和 HUH7 后 细胞中 KLF4 蛋白表达水平不会随 USP10 的沉默或过表达而发生改变(图 3C) 这提示 KLF4 蛋白在 HCC 细胞中表达是通过泛素 - 蛋白酶体系统进行降解。最后 ,Co-IP 实验结果表明 ,使用 MG132 处理转染 sh-USP10 或 oe-USP10 的 HCCLM3 和 HUH7 后 ,沉默 USP10 可增加细胞中 KLF4 的泛素化 ,而过表达 USP10 可降低 KLF4 的泛素化(图 3D)。

2.4 USP10 调控 KLF4 表达对 HCC 增殖和侵袭能力的影响 CCK-8 检测结果显示 ,与 sh-NC + pc-NC 组比较 ,sh-USP10 + pc-NC 组中 HCCLM3 和 HUH7 的增殖活力升高($F = 35.69, P < 0.01$) ,而 sh-NC + pc-KLF4 组和 sh-USP10 + pc-KLF4 组降低($P < 0.05$) ;与 sh-USP10 + pc-NC 组比较 ,sh-USP10 + pc-KLF4 组细胞的增殖活力降低($F = 67.14, P < 0.05$) ,见图 4。Transwell 实验各组 HCCLM3 和 HUH7 细胞侵袭能力的结果显示 ,与 sh-NC + pc-NC 组比较 ,sh-USP10 + pc-NC 组中的侵袭能力升高($F = 113.60, P < 0.05$) ,而 sh-NC + pc-KLF4 组和 sh-USP10 + pc-KLF4 组降低($P < 0.05$) ;与 sh-USP10 + pc-NC 组比较 ,sh-USP10 + pc-KLF4 组细胞的侵袭能力明显降低($F = 76.24, P < 0.05$) ,见图 5。

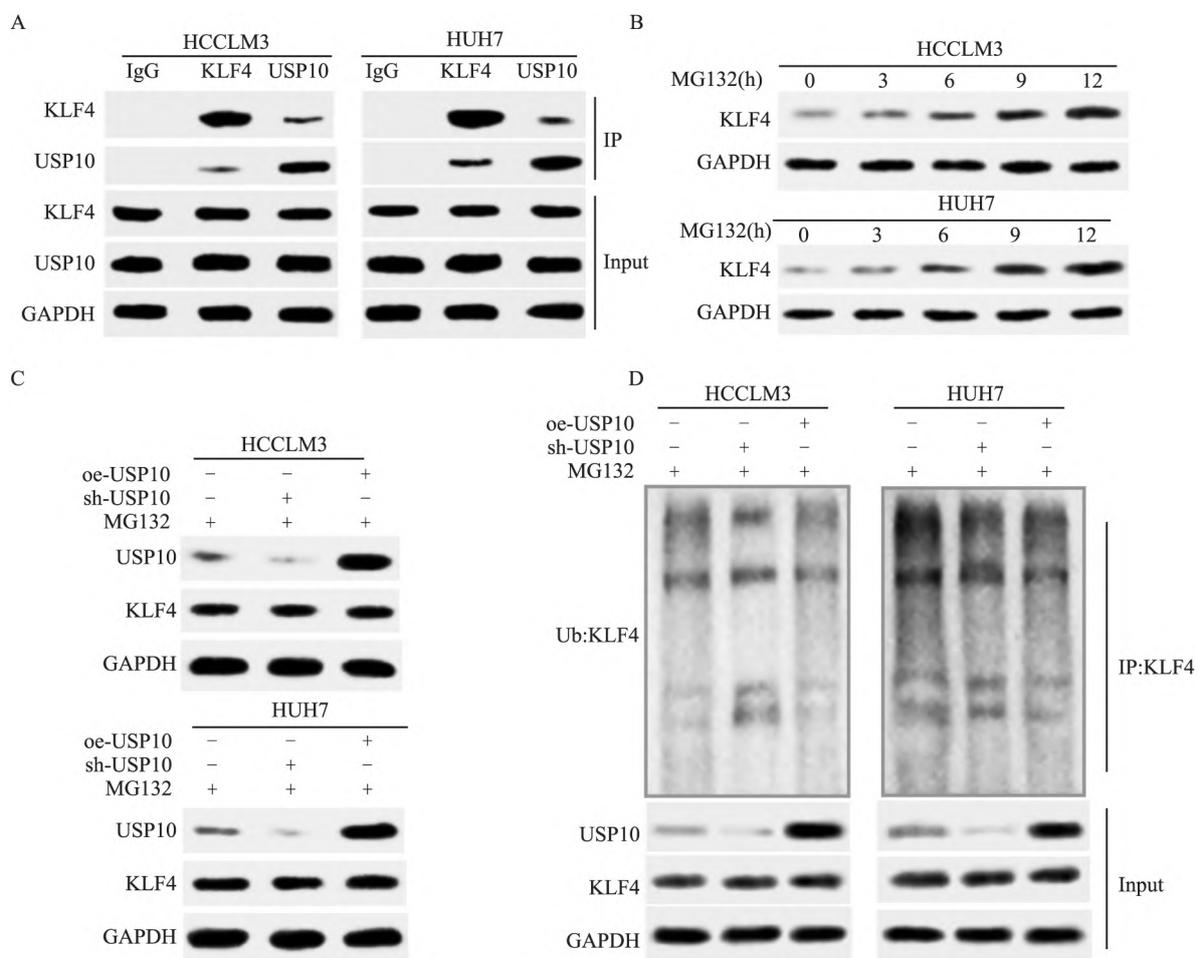


图 3 USP10 通过去泛素化对 KLF4 蛋白表达的影响

A: Co-IP 实验检测在 HCCLM3 和 HUH7 细胞中 USP10 可直接与 KLF4 的相互作用; B: Western blot 实验检测 MG132 处理后对 HCCLM3 和 HUH7 细胞中 KLF4 表达的影响; C: Western blot 实验检测 MG132 处理干扰 USP10 表达的 HCCLM3 和 HUH7 细胞中 USP10 与 KLF4 蛋白变化; D: Co-IP 实验检测在 HCCLM3 和 HUH7 中干扰 USP10 的表达对细胞中 KLF4 泛素化的影响

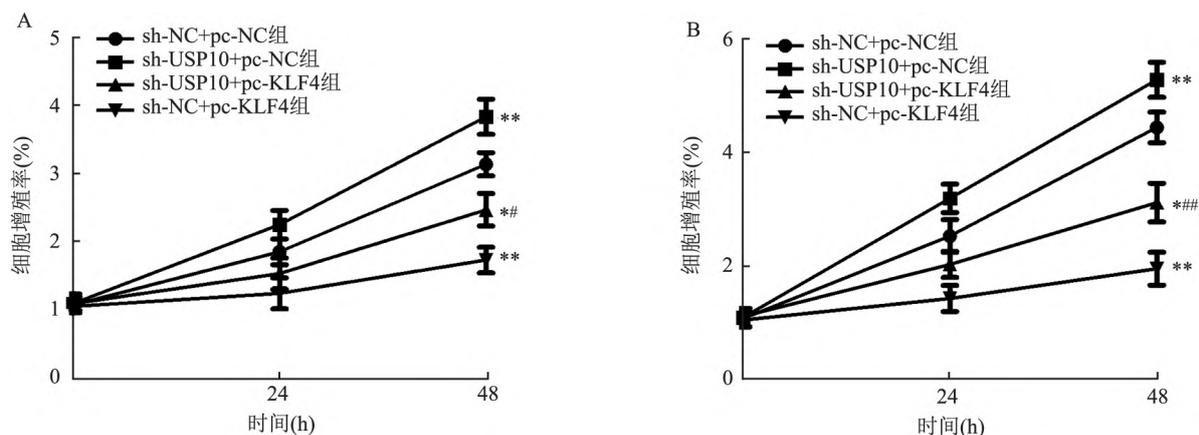
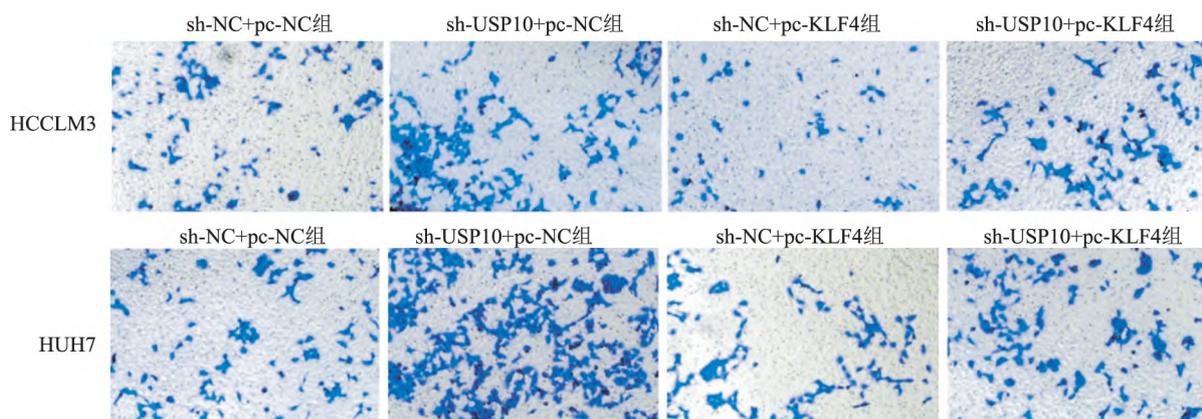


图4 CCK-8 实验检测各组 HCCLM3 和 HUH7 细胞的增殖

A: HCCLM3 细胞; B: HUH7 细胞; 与 sh-NC + pc-NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 sh-USP10 + pc-NC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图5 Transwell 实验检测各组 HCCLM3 和 HUH7 细胞的侵袭 $\times 200$

3 讨论

研究^[3-5]显示,在多种消化系统肿瘤中可检测到 KLF4 的异常表达,如在胰腺癌中,KLF4 表达显著降低,并与肿瘤的浸润深度和疾病分期相关。在胰腺癌中,沉默 KLF4 可在体内外通过上调肿瘤的上皮-间充质转化,来促进肿瘤的生长和转移^[11]。KLF4 在结直肠癌中的表达也明显降低,并与患者的生存率相关。同时,过表达 KLF4 不仅能抑制结肠癌细胞的增殖,还可通过调控下游靶基因 RAB26 来抑制细胞的自噬,从而增强细胞对 5-氟尿嘧啶的敏感性^[12]。而在胃癌中,KLF4 的低表达可作为独立的负性预后因子,这与其能维持胃黏膜的稳态,并抑制胃癌的发生和进展的作用相关^[13]。上述研究证实,KLF4 在抑制肿瘤发生发展中具有重要作用。然而,KLF4 是一种不稳定的蛋白,其在多种组织中具有较高的周转率。在 HCC 中,表达缺失的 KLF4 与患者的病理分期和低生存率相关,但调节 KLF4 蛋

白稳定性的相关机制却鲜有文献报道。本研究发现,泛素特异性蛋白酶家族的成员 USP10 可通过去泛素化来稳定 HCC 细胞中的 KLF4 表达,进而抑制肿瘤细胞的增殖与侵袭。

迄今为止,人们发现多种蛋白可作为 USP10 去泛素化酶活性的潜在底物。如在结直肠癌中,Ouyang et al^[14]研究表明,USP10 能通过去泛素化调节致癌因子 Musashi-2 的稳定性,促进结肠癌的肿瘤增殖能力。在非小细胞肺癌中,USP10 可通过阻止 TRIM25 介导的 k63 连锁多泛素化来恢复 PTEN 蛋白的活性,并通过 PI3K/AKT/mTOR 通路抑制非小细胞肺癌的增殖,同时,该研究还表明 USP10 在非小细胞肺癌中具有肿瘤抑制的作用^[15]。尽管越来越多的研究证实 USP10 具有抗肿瘤活性,但其在 HCC 中的表达及作用尚未得到充分探究。Lu et al^[9]研究显示,与正常肝组织或细胞比较,USP10 在 HCC 组织和细胞系中的表达降低,而低表达水平的 USP10 与患者的 BCLC 分期和预后相关。同时,在

HCC 细胞系中,过表达 USP10 可抑制细胞的增殖,进一步分析发现,这可能与 USP10 通过抑制 PTEN 和 AMPK α 的多泛素化来稳定后者的表达,进而下调 AKT/AMPK/mTOR 通路的活化水平相关。本研究结果同样表明,USP10 在 HCC 细胞系中的表达较正常人正常干细胞系 L02 降低,且干扰 USP10 表达可在蛋白水平上调 KLF4 表达,而不影响其转录水平。结合两者的功能和分子特征,提示 KLF4 可能是 USP10 泛素化调控底物蛋白之一。

去泛素化酶是一类具有去除蛋白质上泛素修饰的酶活性的蛋白质,能够识别和结合泛素修饰的蛋白质底物,并催化泛素蛋白与底物蛋白之间的连接断裂,从而将泛素从底物蛋白上去除,以发挥稳定底物蛋白的作用^[16-17]。本研究结果表明,KLF4 可通过 USP10 去泛素化在 HCC 细胞中发挥抑制增殖和侵袭的作用。首先,课题组发现 USP10 可直接与 KLF4 相互作用。此外,利用蛋白酶体抑制剂 MG132 处理 HCC 细胞后,细胞中 KLF4 蛋白表达量呈时间依赖性增加。且在 MG132 的处理情况下,无论上调还是沉默 USP10 表达,均对 HCC 细胞中 KLF4 的蛋白表达无明显影响,这说明 USP10 影响的是 KLF4 的泛素化过程。课题组进一步通过 Co-IP 实验证实,在施加 MG132 进行阻断蛋白酶体途径的情况下,沉默 USP10 表达可显著增加 HCC 中 KLF4 蛋白中的泛素化水平,而上调 USP10 表达则能降低 KLF4 的泛素化。这与 Wang et al^[18] 在肺癌中的报道一致,均表明 USP10 可通过去泛素化来稳定 KLF4 蛋白的表达。最后,课题组通过细胞功能实验探究 USP10 与 KLF4 在 HCC 细胞增殖与侵袭方面的影响,结果表明,沉默 USP10 能显著促进 HCC 细胞的增殖与侵袭能力,但上述促进现象可被上调 KLF4 逆转。

综上所述,本研究结果表明在 HCC 细胞系中 USP10 可通过去泛素化来稳定 KLF4 表达,进而抑制肿瘤细胞的增殖与侵袭。本研究为 KLF4 在 HCC 中的调控机制提供了新的见解,后期课题组将在动物实验中靶向 USP10/KLF4 轴及对去泛素化在 HCC 治疗中作用进行深入探究,以期改善 HCC 预后提供理论基础和实验依据。

参考文献

- [1] Ganesan P, Kulik L M. Hepatocellular carcinoma: New developments[J]. *Clin Liver Dis* 2023 27(1): 85-102.
- [2] 胡磊, 陈红霞, 周钢桥. METTL16 对肝癌细胞增殖、迁移和侵

- 袭能力的影响及其作用机制[J]. *安徽医科大学学报* 2022 57(12): 1849-57.
- [3] Ghaleb A M, Yang V W. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know[J]. *Gene* 2017 611: 27-37.
- [4] Luo X, Zhang Y, Meng Y, et al. Prognostic significance of KLF4 in solid tumours: An updated meta-analysis[J]. *BMC Cancer* 2022, 22(1): 181-94.
- [5] Xue M, Zhou C, Zheng Y, et al. The association between KLF4 as a tumor suppressor and the prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. *Aging (Albany NY)* 2020, 12(15): 15566-80.
- [6] Tian C, Yao S, Liu L, et al. Klf4 inhibits tumor growth and metastasis by targeting microRNA-31 in human hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Mol Med* 2017 9(1): 47-56.
- [7] Hao Z, Sheng Y, Duncan G S, et al. K48-linked KLF4 ubiquitination by E3 ligase mule controls T-cell proliferation and cell cycle progression[J]. *Nat Commun* 2017 8(22): e14003.
- [8] Tao L, Liu X, Jiang X, et al. USP10 as a potential therapeutic target in human cancers[J]. *Genes (Basel)* 2022, 13(5): 831-42.
- [9] Lu C, Ning Z, Wang A, et al. USP10 suppresses tumor progression by inhibiting mTOR activation in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett* 2018 67(436): 139-48.
- [10] Wang X, Xia S, Li H, et al. The deubiquitinase USP10 regulates KLF4 stability and suppresses lung tumorigenesis[J]. *Cell Death Differ* 2020 27(6): 1747-64.
- [11] Zhu Z, Yu Z, Wang J, et al. Krüppel-like factor 4 inhibits pancreatic cancer epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis by down-regulating caveolin-1 expression[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018 46(1): 238-52.
- [12] Zheng Y, Wu J, Chen H, et al. KLF4 targets RAB26 and decreases 5-FU resistance through inhibiting autophagy in colon cancer[J]. *Cancer Biol Ther* 2023 24(1): 2226353.
- [13] Hashimoto I, Nagata T, Sekine S, et al. Prognostic significance of KLF4 expression in gastric cancer[J]. *Oncol Lett* 2017, 13(2): 819-26.
- [14] Ouyang S W, Liu T T, Liu X S, et al. USP10 regulates musashi-2 stability via deubiquitination and promotes tumor proliferation in colon cancer[J]. *FEBS Lett* 2019 593(4): 406-13.
- [15] He Y, Jiang S, Mao C, et al. The deubiquitinase USP10 restores PTEN activity and inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation[J]. *J Biol Chem* 2021 297(3): e101088.
- [16] Snyder N A, Silva G M. Deubiquitinating enzymes (DUBs): Regulation, homeostasis, and oxidative stress response[J]. *J Biol Chem*, 2021 297(3): 101077.
- [17] Zhu H, Yan F, Yuan T, et al. USP10 promotes proliferation of hepatocellular carcinoma by deubiquitinating and stabilizing YAP/TAZ[J]. *Cancer Res* 2020 80(11): 2204-16.
- [18] Wang X, Xia S, Li H, et al. The deubiquitinase USP10 regulates KLF4 stability and suppresses lung tumorigenesis[J]. *Cell Death Differ* 2020 27(6): 1747-64.

Regulation of KLF4 protein by USP10 and its effect on hepatocellular carcinoma invasion

Lu Lu, Li Dongming, Wang Xueguo, Ran Bo, Wang Taicheng, Zhao Hongyan, Li Peng
(Dept of Hepatobiliary Pancreatic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570100)

Abstract *Objective* To investigate the regulatory role of ubiquitin-specific protease 10 (USP10) on the protein expression of Krüppel-like factor 4 (KLF4) and its impact on the proliferation and invasion ability of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. *Methods* The protein expression differences of USP10 and KLF4 in normal liver cell line L02 and HCC cell lines, including HepG2, HUH7, HCCLM3 were detected by immunoblotting (Western blot) methods. HCCLM3 and HUH7 cells were selected, and lentiviral particles overexpressing or silencing USP10 (oe-USP10 or sh-USP10) was transfected into the cells, and they were designated as the oe-USP10 group and oe-NC group, respectively. Immunoprecipitation (Co-IP) experiments were conducted to examine whether USP10 could directly interact with KLF4 in HCCLM3 or HUH7 cells. The Co-IP assay was repeated in HCC cells transfected with oe-USP10 or sh-USP10, with the addition of the proteasome inhibitor MG132, which used to detect the ubiquitination level of KLF4 protein in the transfected HCC cells. The pcDNA3.1 vector containing overexpressed KLF4 or its negative control plasmid (pc-KLF4 or pc-NC) was co-transfected into cells of the sh-USP10 group or sh-NC group. These cells were designated as the sh-NC + pc-NC group, sh-USP10 + pc-NC group, sh-NC + pc-KLF4 group, and sh-USP10 + pc-KLF4 group. The cell proliferation activity of each group was measured using the CCK-8 assay, and the cell invasion ability was assessed using the Transwell assay. *Results* Compared to L02 cells, the protein expression of USP10 and KLF4 significantly decreased in HepG2, HUH7, HCCLM3, and other cells ($P < 0.05$). In HCCLM3 and HUH7 cells, USP10 protein directly interacted with KLF4. Furthermore, treatment with MG132 resulted in a time-dependent increase in KLF4 protein expression in HCCLM3 and HUH7 cells. Silencing USP10 increased the ubiquitination of KLF4 in HCCLM3 or HUH7 cells, while overexpressing USP10 decreased the ubiquitination level of KLF4 in cells. Compared to the sh-NC + pc-NC group, both the proliferation activity and invasion ability of HCCLM3 and HUH7 cells significantly increased in the sh-USP10 + pc-NC group ($P < 0.01$), while they significantly decreased in the sh-NC + pc-KLF4 group and sh-USP10 + pc-KLF4 group ($P < 0.05$). Compared to the sh-USP10 + pc-NC group, the proliferation activity and invasion ability of cells significantly decreased in the sh-USP10 + pc-KLF4 group ($P < 0.05$). *Conclusion* USP10 can promote the stability of KLF4 protein through deubiquitination in HCC cell lines, thereby inhibiting the proliferation and invasion of tumor cells.

Key words hepatocellular carcinoma; ubiquitin-specific protease 10; deubiquitination; Krüppel-like factor 4