

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.12.006

· 基础研究 ·

USP20通过稳定 TWIST 促进胰腺癌细胞增殖与迁移

汤佩佩^{1,2}, 刘凌^{1,2}, 李春梅^{1,2}, 季润元¹, 傅玉峰¹, 陈松^{1,2} (1. 江苏省消化及生殖系统肿瘤精准防治工程研究中心, 江苏 淮安 223300; 2. 江苏护理职业学院 医药生物技术研究, 江苏 淮安 223300)

[摘要] **目的:**探究泛素特异性蛋白酶20(USP20)在胰腺癌组织中的表达及其对胰腺癌细胞增殖和迁移的作用及分子机制。**方法:**用癌症基因组图谱(TCGA)数据库数据分析 USP20 和扭曲家族碱性螺旋-环-螺旋转录因子(TWIST)在胰腺癌组织中的表达,通过 Kaplan-Meier 曲线评估其与患者预后的相关性。常规培养正常胰腺细胞 HPNE 和胰腺癌细胞 MIAPaca2、BxPC3、PANC1、SW1990 和 Aspc1,用 WB 法检测 USP20 蛋白在其中的表达。将 PANC1 和 SW1990 细胞分为 shNC 组、shUSP20-1 组和 shUSP20-2 组,用转染试剂将相应的慢病毒感染各组细胞,用 qPCR 法和 WB 法验证敲减效率,用 CCK-8 法、克隆形成实验、划痕愈合实验、Transwell 实验和流式细胞术分别检测各组细胞的增殖、迁移能力和细胞周期, WB 法检测各组细胞中的上皮-间质转化转录因子相关蛋白的表达。免疫共沉淀和泛素化实验检测 USP20 是否与 TWIST 相互作用,阐明 USP20 是否通过泛素化途径调控 TWIST 表达。**结果:**USP20、TWIST mRNA 在胰腺癌组织中均呈高表达(均 $P < 0.05$),其表达水平与患者预后呈负相关(均 $P < 0.05$)。USP20 蛋白在 PANC1、SW1990、MIAPaca2 和 BxPC3 细胞中均呈高表达(均 $P < 0.001$)。敲减 USP20 均可明显抑制 PANC1 和 SW1990 细胞的增殖、迁移能力(均 $P < 0.001$)。USP20 与 TWIST 相互结合($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),USP20 通过降低 TWIST 泛素化水平稳定其表达($P < 0.01$)。**结论:**USP20 在胰腺癌组织中呈高表达,通过去泛素化 TWIST 稳定其表达,从而促进胰腺癌细胞的增殖和迁移,提示 USP20 可能成为胰腺癌诊断和治疗的潜在靶点。

[关键词] 泛素特异性蛋白酶20;扭曲家族碱性螺旋-环-螺旋转录因子;胰腺癌;增殖;迁移;去泛素化

[中图分类号] R735.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)12-1253-09

USP20 promotes pancreatic cancer cell proliferation and migration by stabilizing TWIST

TANG Peipei^{1,2}, LIU Ling^{1,2}, LI Chunmei^{1,2}, JI Runyuan¹, FU Yufeng¹, CHEN Song^{1,2} (1. The Digestive and Reproductive System Cancers Precise Prevention and Treatment Engineering Research Center of Jiangsu Province, Huai'an 223300, Jiangsu, China; 2. Institute of Medicinal Biotechnology, Jiangsu College of Nursing, Huai'an 223300, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of ubiquitin-specific protease 20 (USP20) in pancreatic cancer tissues and its role and molecular mechanism in the proliferation and migration of pancreatic cancer cells. **Methods:** The Cancer Genome Atlas (TCGA) database was used to analyze USP20 and TWIST family bHLH transcription factor (TWIST) expression in pancreatic cancer tissues. Kaplan-Meier curve analysis was used evaluate their correlation with patient prognosis. Normal pancreatic cells (HPNE) and pancreatic cancer cells (MIAPaca2, BxPC3, PANC1, SW1990, Aspc1) were routinely cultured, and USP20 protein expression was detected by Western blot (WB). PANC1 and SW1990 cells were divided into shNC, shUSP20-1, and shUSP20-2 groups, and transfected with corresponding lentiviruses. Knockdown efficiency was verified by qPCR and WB. Cell proliferation, migration, and cell cycle distribution were assessed using CCK-8, colony formation, wound healing, Transwell assays, and flow cytometry, respectively. WB was used to detect the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related transcription factors. Co-immunoprecipitation (Co-IP) and ubiquitination assays were conducted to determine whether USP20 interacts with TWIST and regulates its expression via the ubiquitination pathway. **Results:** USP20 and TWIST mRNA levels were significantly upregulated in pancreatic cancer tissues (both $P < 0.05$), and their levels were negatively correlated with patient prognosis (both $P < 0.05$). USP20 protein was highly expressed in PANC1, SW1990, MIAPaca2, and BxPC3 cells (all $P < 0.001$). Knockdown of USP20 significantly inhibited the proliferation and migration of PANC1 and SW1990 cells (all $P < 0.001$). USP20 interacted with TWIST ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and stabilized TWIST expression by reducing its ubiquitination level ($P < 0.01$). **Conclusion:** USP20 is highly expressed in pancreatic cancer tissues and

[基金项目] 国家自然科学基金(No. U2004138);江苏省高等学校自然科学研究项目(No. 21KJD310002);江苏省青蓝工程优秀教学团队(No. 2022-25)

[作者简介] 汤佩佩(1990—),硕士,助理研究员,主要从事肿瘤生物学的研究

[通信作者] 陈松(扫码获取作者通信方式)



promotes pancreatic cancer cell proliferation and migration by stabilizing TWIST through deubiquitination. These findings suggest that USP20 may serve as a potential diagnostic and therapeutic target in the treatment of pancreatic cancer.

[Key words] ubiquitin-specific protease 20 (USP20); Twist family BHLH transcription factor (TWIST); pancreatic cancer; proliferation; migration; deubiquitination

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(12): 1253-1261. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.12.006]

据北美和欧洲的资料预测,至2030年,胰腺癌将成为全球第二大癌症致死原因^[1]。尽管其诊疗方面取得了较大的进展^[2-3],但5年生存率仍低于3%。由于胰腺癌具有高度侵袭性、无特定症状和早期标志物,绝大多数患者被诊断时已为晚期^[4]。研究^[5-6]表明,胰腺癌在分子和细胞水平上具有高度异质性,可能是其高耐药性的原因之一。因此,分子生物标志物越来越多地被视为预测胰腺癌患者预后的工具。泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)在真核细胞转录后修饰中非常重要,参与基因表达、细胞周期调控、DNA损伤修复、细胞生长和凋亡等关键过程^[7]。UPS调控过程对于维持细胞稳态至关重要,其异常调节会导致肿瘤发生发展^[8]。去泛素酶(deubiquitinating enzyme, DUB)能从蛋白质底物中去除泛素或泛素样蛋白质^[9]。泛素特异性蛋白酶是人DUB七个家族成员之一,也是参与多种肿瘤进展的最大DUB亚家族^[7]。USP20是肽酶C19家族的成员^[10]。研究表明,USP20参与调节自噬^[11]、炎症反应^[12]、病毒免疫反应^[13]和胆固醇生物合成^[14]。一项研究^[15]发现,USP20可促进乳腺癌的转移;另一项研究^[16]则表明,USP20能抑制胃癌细胞的恶性进展。这些结果表明,USP20在癌症中发挥了重要作用。然而,USP20在胰腺癌中的潜在作用尚未得到研究。上皮-间质转化(EMT)是胚胎发育过程中形态发生的关键生物学过程,其异常激活可促进肿瘤转移^[17]。EMT进程主要由一组EMT-激活转录因子(EMT-activated transcription factor, EMT-TF)诱导激活,其成员包括包括蜗牛家族转录抑制因子1(snail family transcriptional repressor 1, SNAIL1)和SNAIL2、扭曲家族碱性螺旋-环-螺旋转录因子(twist family BHLH transcription factor, TWIST)(也称TWIST1)和TWIST2,以及锌指E盒结合同源盒蛋白1(zinc finger E-box binding homeobox 1, ZEB1)和ZEB2^[18]。TWIST作为EMT进程中关键调节因子,与肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭密切相关,TWIST在多种癌细胞中表达上调,且与多种肿瘤的不良预后相关^[19]。本研究旨在探讨USP20在胰腺癌中的表达及其对肿瘤细胞增殖和迁移的调控作用,并分析USP20与TWIST之间的互作关系,为胰腺癌的诊断和治疗提供新的理论依据与潜在分子靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

人胰腺癌细胞 MIAPaca2、BxPC3、PANC1、SW1990、AspC1均购自海星生物公司,293FT细胞由本实验室冻存复苏。shUSP20-1/2慢病毒敲低质粒、Lenti-EFs-3×Flag-USP20慢病毒过表达质粒及pcDNA3.1-HA-Twist质粒均来自本实验室。USP20、TWIST、ZEB2、Flag、HA抗体均购自Preoteintech公司,SLUG、SNAIL抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或抗鼠二抗均购自CST公司,GAPDH抗体购自HUABIO公司。转染试剂聚乙烯亚胺(PEI 40K)购自赛维尔生物公司,抗HA-磁珠、抗Flag-磁珠与抗HisPur Ni-NTA磁珠均购自赛默飞公司。

1.2 细胞培养、分组与转染

293FT、PANC1与SW1990细胞在含10%胎牛血清、1%青-链霉素的高糖DMEM培养基中,置于37℃、5%CO₂的培养箱中进行培养。取对数生长期的293FT细胞,以 5×10^5 /孔接种于6孔板,当汇合度达95%时,按照聚乙烯亚胺使用说明将Gag/Pol包装质粒、VSVG包膜质粒、USP20敲减质粒(shUSP20-1和shUSP20-2),以及对照质粒(shNC)分别共转染至293FT细胞中以制备慢病毒颗粒,36h后收集慢病毒。实验分为shNC组、shUSP20-1组和shUSP20-2组,分别用shNC、shUSP20-1和shUSP20-2慢病毒颗粒感染PANC1和SW1990细胞,24h后更换含有2μg/mL嘌呤霉素的新鲜培养基筛选3d,以此获得稳定敲减USP20的细胞。

1.3 CCK-8法和克隆形成实验检测各组细胞的增殖能力

取对数生长期的PANC1和SW1990细胞,以每孔 2×10^4 个/0.1 mL接种于96孔板中,每组设置5个复孔。在第0、1、2、3、4、5天加入0.11 mL CCK-8溶液+培养基混合溶液(CCK-8溶液:培养基=1:10)于对应孔中,37℃处理2h,用酶标仪检测对应孔在450 nm处的光密度(D)值,以D值代表细胞的增殖活力。

取对数生长期的PANC1和SW1990细胞,以 10^3 个/孔接种于6孔板中,置于37℃培养箱中培养,每3d更换1次培养基,培养10~12d。用4%多聚甲醛固定、0.1%结晶紫染色、蒸馏水洗涤、晾干后在显微镜下拍照、计数。细胞数>60个的克隆即认为1个克隆。

1.4 流式细胞术检测各组细胞的细胞周期

各组细胞经胰蛋白酶处理后,以 $1\,000 \times g$ 离心5 min收集细胞,用1 mL预冷的70%乙醇固定4 h,向固

定细胞中加入0.1 mL RNase A (1 mg/mL) 避光处理30 min, 用50 μ g/mL 碘化丙啶处理10 min后用NovoCyte流式细胞仪分析各组细胞的细胞周期分别情况。

1.5 划痕愈合实验和Transwell实验检测各组细胞的迁移能力

取对数生长期的各组PANC1和SW1990细胞, 以 5×10^5 /孔接种于6孔板中, 当汇合度达95%时, 用黄色吸头均匀划痕, 弃原培养基, 用预热的PBS清洗细胞, 显微镜下观察无明显漂浮细胞后加入无血清培养基, 分别于0、24 h在显微镜下拍照记录。用ImageJ软件定量分析划痕面积, 以“细胞迁移率 = (0 h划痕宽度 - 24 h划痕宽度) / 0 h划痕宽度 $\times$ 100%”计算各组细胞的迁移率。

取对数生长期的各组PANC1和SW1990细胞, 用无血清培养基将细胞稀释成 4×10^5 个/mL, 取0.1 mL细胞悬液接种至小室的上室, 下室加入0.6 mL含血清培养基, 培养16 h后取出小室, PBS清洗上下室, 用4%多聚甲醛固定、0.5%结晶紫染色和PBS洗涤, 用干净棉签去除小室膜上侧的细胞, 显微镜下随机取5个视野计算细胞数。

1.6 qPCR法检测各组细胞中USP20和TWIST mRNA的表达

用TRIzol试剂提取各组细胞的总RNA, 用逆转录试剂盒将其逆转录为cDNA, 用qPCR法进行扩增。引物序列: USP20上游为5'-CTTTGACGGCTCCATTCTCAGC-3', 下游为5'-CTCCTTCCAGGAATGGGCAGT-3'; TWIST上游为5'-GCCAGGTACATCGACTTCCTCT-3', 下游为5'-TCCATCCTCCAGACCGAGAAGG-3'; GAPDH上游为5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3', 下游为5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'。以GAPDH为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算USP20和TWIST mRNA的相对表达水平。

1.7 免疫共沉淀实验验证USP20与TWIST的互作关系

取对数生长期的293FT细胞, 以 2×10^5 /孔接种于12孔板中, 用转染试剂将Flag-USP20、Flag-vector、HA-TWIST和HA-vector分别转染至293FT细胞中, 培养24 h后收集细胞, 用含20 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl、137 mmol/L NaCl、10% (v/v) 甘油、1% (v/v) NP40、PMSF和磷酸酶抑制剂的IP缓冲液, 在4 $^{\circ}$ C下裂解细胞20 min, $12\ 000 \times g$ 离心15 min, 将上清液转移至新离心管中。取适量上清液作为对照, 剩余上清液中加入含Anti-HA Magnetic Beads或Anti-DYKDDDDK (Flag) Magnetic Agarose的IP缓冲液中, 4 $^{\circ}$ C下处理4 h。收集并清洗Beads 5次以去除非特异性结合。吸干IP缓冲液, 加入适量蛋白裂解液, 95 $^{\circ}$ C变性10 min, 用于WB法检测, 具体方法见文献[20]。

1.8 WB法检测各组PANC1和SW1990细胞中MET相关蛋白和293FT细胞中标签蛋白的表达

用蛋白裂解液裂解各组PANC1和SW1990细胞, 提取其总蛋白, 用Bradford蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度, 95 $^{\circ}$ C变性10 min, 用SDS-PAGE分离、转膜, 用5%脱脂奶室温下封闭1 h, 抗USP20 (1:1 000稀释)、TWIST (1:2 000稀释)、ZEB2 (1:1 000稀释)、SLUG (1:1 000稀释)、SNAIL (1:1 000稀释)、Flag (1:20 000稀释)、HA (1:20 000稀释) 和GAPDH (1:10 000) 抗体, 4 $^{\circ}$ C下处理过夜, TBST洗膜5次, 与相应辣根过氧化物酶标记二抗室温下处理1 h, TBST洗膜5次, ECL显影, 具体方法见文献[20]。

1.9 泛素化试验

将His-Ub、Flag-vector、Flag-USP20与HA-TWIST质粒分组共转染293FT细胞46 h, 用MG132 (10 μ M/L) 处理转染后的细胞2 h, 用8 mol/L尿素缓冲液室温下裂解细胞, 对裂解物进行超声处理后, $12\ 000 \times g$ 离心10 min, 取适量上清液作为对照 (Input), 剩余上清液转移至含适量HisPur Ni-NTA磁珠的离心管中进行下拉分析。洗脱的蛋白样本, 加入适量 $2 \times$ SDS裂解液, 95 $^{\circ}$ C变性10 min, 用于WB法检测, 具体方法见文献[21]。

1.10 统计学处理

用GraphPad Prism 8.0软件对实验数据进行统计分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 独立两组间均值差异比较用 t 检验, 多组间均值差异比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

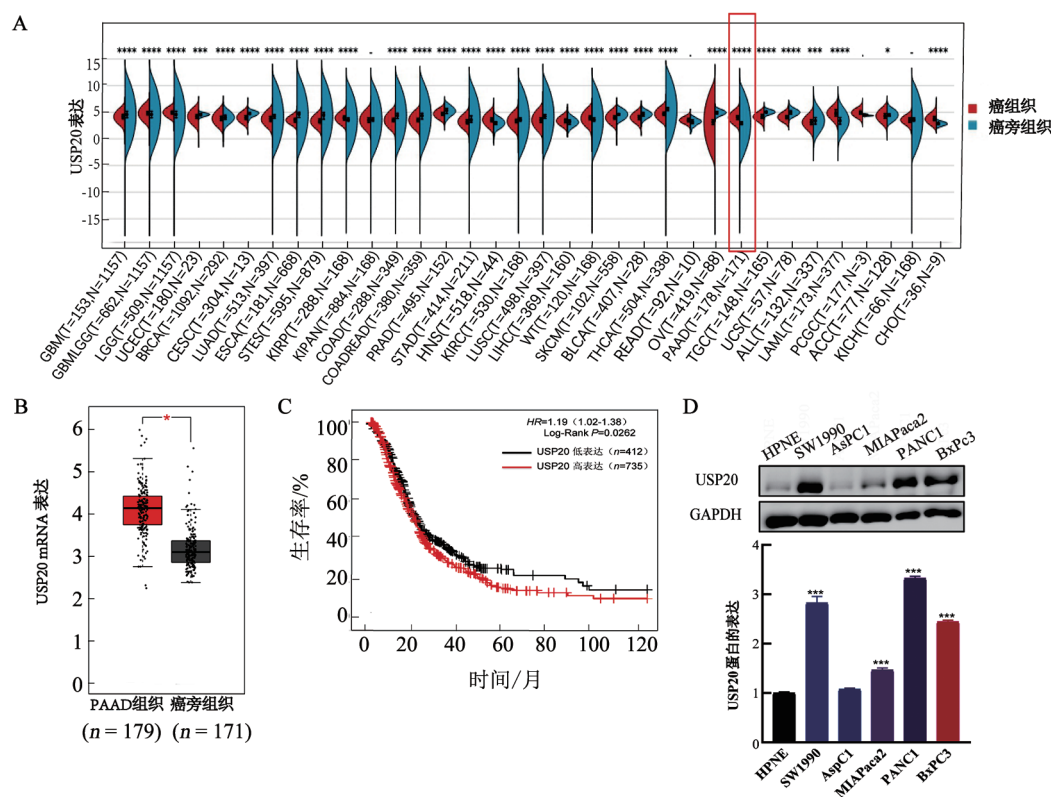
2 结果

2.1 USP20在胰腺癌组织与细胞中呈现高表达且与患者愈合不良有关联

用TCGA数据库, 比较了包括胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM)、子宫内膜癌 (uterine corpus endometrial carcinoma, UCEC)、乳腺癌 (breast carcinoma, BRCA)、宫颈上皮细胞癌 (cervical epithelial cellular carcinoma, CESC)、肺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD)、食管癌 (esophageal carcinoma, ESCA)、肾透明细胞癌 (kidney renal clear cell carcinoma, KIRC)、结肠癌 (colon adenocarcinoma, COAD)、胃腺癌 (stomach adenocarcinoma, STAD)、胰腺腺癌 (pancreatic adenocarcinoma, PAAD) 等33种不同类型肿瘤组织和GTEx数据库中相应正常组织的USP20表达情况, 结果 (图1A) 显示, USP20在包括胰腺癌等多种肿瘤组织中呈显著高表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$ 或 $P < 0.000\ 1$)。GEPIA在线数据库数据分析结果 (图1B)

显示, USP20 在胰腺癌组织中的表达显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。用 Kaplan-Meier 数据库数据进行生存分析结果(图 1C)显示, USP20 高表达患者总生存期明显较短 ($P = 0.0262$)。WB 法检测结果(图 1D)显示, 与正常胰腺导管细胞 HPNE 比较, SW1990、MIAPaCa2、

PANC1、BxPC3 细胞中 USP20 蛋白均呈高表达(均 $P < 0.001$), USP20 蛋白在 PANC1 和 SW1990 细胞中表达较高, 故选择其进行后续实验。这些结果提示, USP20 在胰腺癌中呈高表达, 且与患者预后不良有关联, 表明 USP20 可能是治疗胰腺癌的潜在靶点。



A: 用 Sanger Box 数据库数据分析 USP20 mRNA 在不同类型癌症中的表达情况; B: GEPIA 数据库数据分析 USP20 mRNA 在胰腺癌组织及癌旁组织中的表达; C: Kaplan-Meier 生存分析; D: WB 法检测胰腺癌细胞和正常胰腺 HPNE 细胞中 USP20 蛋白表达。

与癌旁组或 HPNE 细胞比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 1 USP20 在胰腺癌组织或细胞中高表达及与胰腺癌患者预后的关系

2.2 敲减 USP20 可明显抑制 PANC1 和 SW1990 细胞的增殖能力, 使细胞停滞于 G1 期

qPCR 和 WB 法检测结果(图 2A、B)显示, 与 shNC 组比较, shUSP20-1 和 shUSP20-2 组 PANC1 和 SW1990 细胞中 USP20 mRNA 和蛋白表达均显著降低 ($P < 0.001$)。实验结果说明, 在 PANC1 和 SW1990 细胞中成功地敲减了 USP20 的表达。CCK-8 法和克隆形成实验检测结果(图 2C、D)显示, 与 shNC 组比较, 敲减组 PANC1 和 SW1990 细胞增殖活力均明显下降(均 $P < 0.001$)。流式细胞术检测结果(图 2E)显示, 敲减 USP20 导致 PANC1 和 SW1990 细胞停滞于 G1 期。实验结果说明, 敲减 USP20 可显著抑制 PANC1 和 SW1990 细胞的增殖能力, 使细胞停滞于 G1 期。

2.3 敲减 USP20 明显抑制 PANC1 和 SW1990 细胞的迁移能力

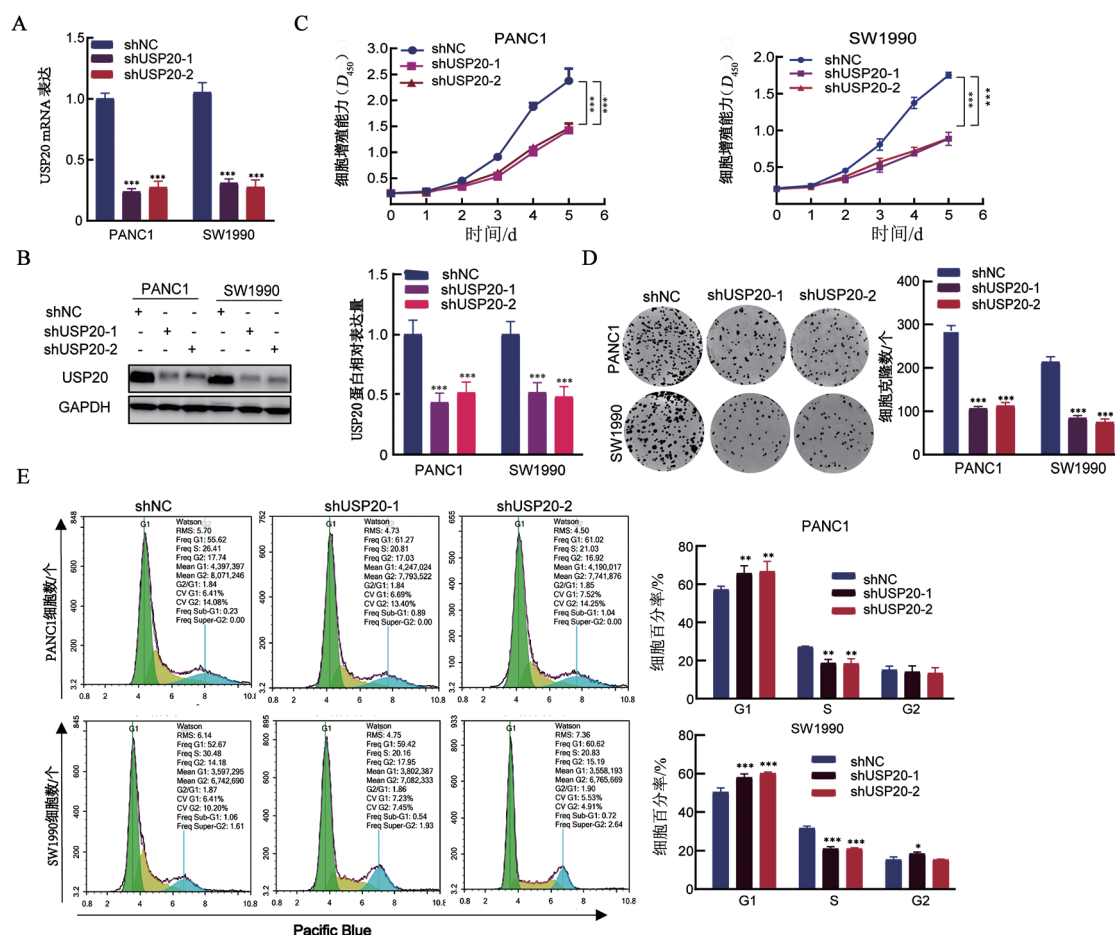
划痕愈合实验和 Transwell 实验检测结果(图 3)显示, 与 shNC 组比较, 敲减组 PANC1 和 SW1990 细

胞的划痕愈合率均明显下降 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 迁移细胞数均明显减少 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。实验结果表明, 敲减 USP20 可显著抑制 PANC1 和 SW1990 细胞的迁移能力。

2.4 USP20 调控 TWIST 的表达

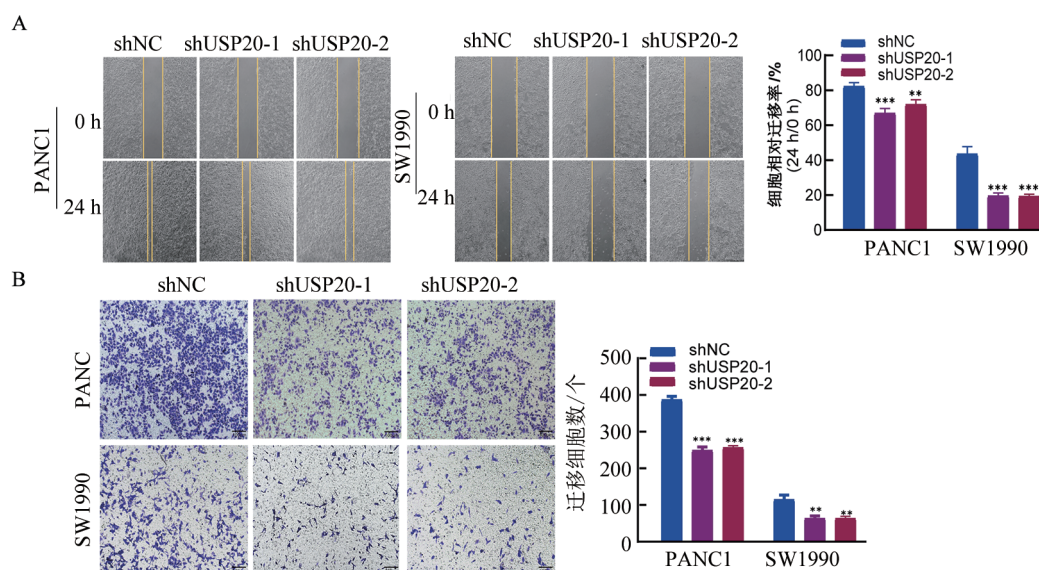
WB 法检测结果(图 4A)显示, 与 shNC 组比较, 敲减组 PANC1 和 SW1990 细胞中 USP20 和 TWIST 蛋白均显著下降(均 $P < 0.001$), 其他 MET-RF 相关蛋白均无明显变化。TCGA 数据库数据分析结果(图 4B、C)显示, TWIST mRNA 在胰腺癌组织中的表达显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$), 且高表达 TWIST 与患者的不良预后有关联 ($P = 0.0395$)。用 TCGA 数据库数据分析结果(图 4D)显示, USP20 与 TWIST mRNA 表达水平无明显的相关性。qPCR 法结果(图 4E)显示, 敲减 USP20 对 PANC1 和 SW1990 细胞中 TWIST mRNA 的表达无明显影响。WB 法检测结果(图 4F)显示, 与 Flag-vector 组比较, 过表达 USP20 的 293FT

细胞中TWIST的蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。实验结果说明, USP20可能调控TWIST的表达。



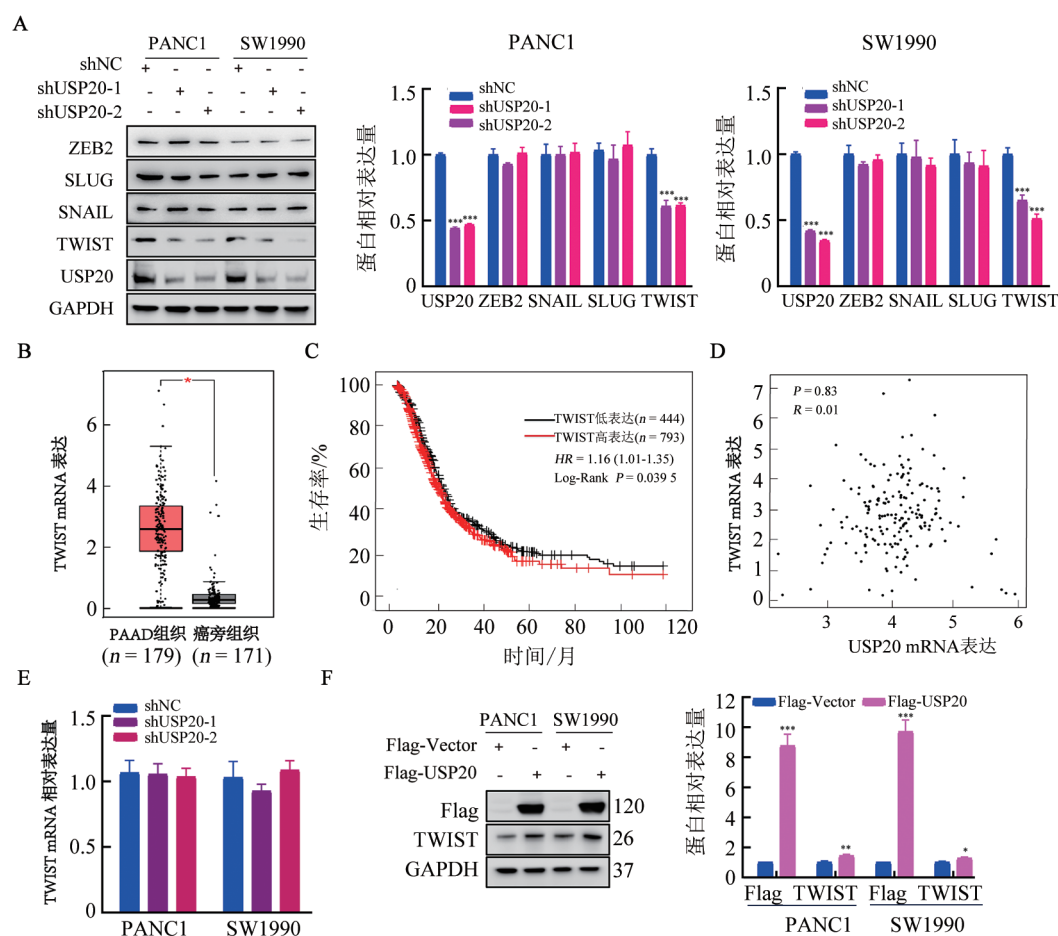
A: qPCR法检测敲减效率; B: WB法检测敲减效率; C: CCK-8法检测各组细胞的增殖活力; D: 克隆形成实验检测各组细胞的增殖活力; E: 流式细胞术检测各组细胞的细胞周期。与shNC组比较, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

图2 敲减USP20抑制胰腺癌PANC1和SW1990细胞的增殖能力



A: 划痕愈合实验检测各组PANC1和SW1990细胞细胞迁移能力($\times 40$); B: Transwell实验检测PANC1和SW1990细胞的迁移能力($\times 200$)。与shNC组比较, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

图3 敲减USP20抑制胰腺癌PANC1和SW1990细胞的迁移能力

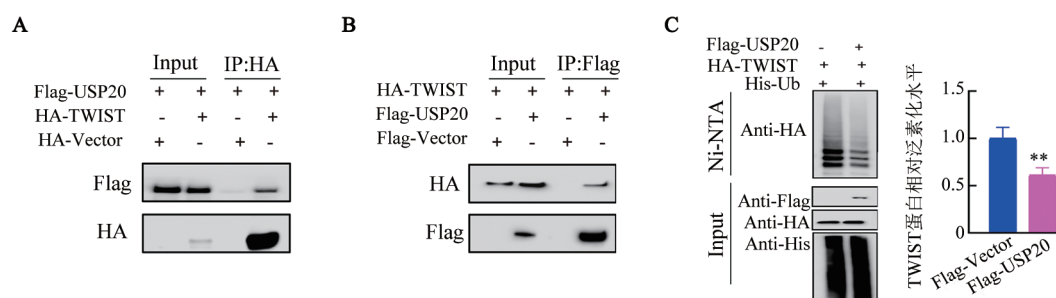


A: WB 法检测敲减 USP20 对 PANC1 和 SW1990 细胞中 EMT 相关蛋白的表达影响; B: GEPIA 在线数据库分析 TWIST mRNA 在胰腺癌组织中的表达情况; C: Kaplan-Meier 生存分析; D: 在线数据库数据分析 USP20 和 TWIST mRNA 表达水平间的相关性; E: qPCR 法检测敲减 USP20 对 PANC1 和 SW1990 细胞中 TWIST mRNA 水平的影响; F: WB 法检测过表达 USP20 对 PANC1 和 SW1990 细胞中 TWIST 蛋白表达的影响。与 shNC 组或癌旁组织或 Flag-vector 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图4 USP20调控TWIST的表达

2.5 USP20 与 TWIST 相互作用并抑制其泛素化降解
为研究 USP20 与 TWIST 之间的相互关系, 在 293FT 细胞中以不同组合共转染 Flag-USP20 和 HA-TWIST 质粒, 分别用 HA-beads (图 5A) 和 Flag-beads (图 5B) 进行免疫共沉淀实验, 检测结果显示, USP20 与 TWIST 可以相互结合。鉴于 USP20 不是通过转录水平调节 TWIST 的表达, 且 USP20 作为泛素特异性

蛋白酶, 提出假设 USP20 是否通过去除 TWIST 的泛素化修饰来调控其蛋白水平, 为验证这一猜想, 进行了泛素化实验, 检测结果 (图 5) 显示, USP20 显著抑制 TWIST 的泛素化 ($P < 0.01$)。实验结果说明, USP20 与 TWIST 相互结合并通过抑制其泛素化降解, 稳定 TWIST 的表达水平。



A: 用 HA-beads 进行免疫共沉淀实验; B: 用 Flag-beads 进行免疫共沉淀实验; C: 泛素化实验检测 USP20 对 TWIST 泛素化的影响。与 Flag-vector 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图5 USP20与TWIST相互作用并稳定其蛋白水平

3 讨 论

100种不同的DUB中有超过40种与癌症相关^[22],其中几种与胰腺癌的发生发展密切关联。例如,USP22在晚期胰腺癌组织中显著高表达,其异常表达与胰腺癌及其他多种癌症的表观遗传变化有关^[23]。USP11在胰腺癌组织中高表达,用针对USP11的小分子抑制剂米托蒽醌,能显著降低胰腺癌细胞的存活率^[24]。USP5在胰腺癌组织和胰腺癌细胞中过表达,USP5通过稳定转录因子FOXMI的表达促进胰腺癌的发生发展^[25]。本研究结果显示,USP20在胰腺癌组织与细胞中也显著高表达。但USP20在不同肿瘤中表达存在较大的差异。WANG等^[16]证实,USP20和Claspin蛋白在人胃癌组织以及多种胃癌细胞系中均呈低表达,且低表达与患者预后不良相关。然而,WU等^[26]发现,USP20在临床结肠癌组织中呈现特异性高表达,且与样本中 β -catenin表达水平呈正相关。类似地,在乳腺癌中,USP20表达水平升高与患者不良预后显著相关^[27]。这些研究提示,USP20高表达可能与胰腺癌的恶性进展密切相关,但其具体生物学功能尚不明确。

有研究^[26]表明,USP20通过稳定 β -catenin促进结肠癌细胞的增殖和迁移。EMT-TF(SNAIL、SLUG、TWIST和ZEB1/2)在促进肿瘤进展中起着关键作用。据报道,这些因子的表达受到DUB的严格控制。SNAIL蛋白可以被USP26、OTUB1或USP11去泛素化和稳定化^[28-30],SLUG可以被USP10和DUB3稳定化^[31-32],ZEB1被USP51去泛素化^[33];另一方面,TWIST蛋白可被DUB3和USP51进行稳定^[34-36]。USP20作为USP家族的重要成员,也参与调节EMT-TF,进而影响肿瘤的发生发展。研究^[37]显示,USP20可以稳定SLUG的蛋白水平进而促进乳腺癌的发生发展。然而,在本研究中发现USP20敲低不影响PANC1和SW1990细胞中ZEB2、SNAIL和SLUG的蛋白水平,却显著抑制TWIST的蛋白表达。通过在线数据库数据分析发现,TWIST在胰腺癌中呈现显著上调,其高表达与胰腺癌预后不良具有显著相关性,这也支持了TWIST对细胞恶性生物学行为的正向调控作用。同时,本研究发现USP20可与TWIST相互结合并可去泛素化修饰TWIST1进而调节其表达水平。总体而言,这些结果表明USP20-TWIST轴在胰腺癌中发挥促癌作用。抑制USP20能够下调TWIST的蛋白水平,从而抑制胰腺癌细胞的增殖与迁移能力。然而,USP20调控TWIST的具体分子机制,以及该通路在胰腺癌中的临床应用潜力仍需进一步研究。本研究为胰腺癌的诊断和治疗提供了潜在靶点和实验依

据,希望未来能够为胰腺癌的精准治疗做出贡献。

[参 考 文 献]

- [1] RAHIB L, SMITH B D, AIZENBERG R, *et al.* Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(11): 2913-2921. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0155.
- [2] CONROY T, CASTAN F, LOPEZ A, *et al.* Five-year outcomes of FOLFIRINOX *vs* gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Oncol*, 2022, 8(11): 1571-1578. DOI: 10.1001/jamaoncol.2022.3829.
- [3] LABORI K J, BRATLIE S O, ANDERSSON B, *et al.* Neoadjuvant FOLFIRINOX versus upfront surgery for resectable pancreatic head cancer (NORPACT-1): a multicentre, randomised, phase 2 trial[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2024, 9(3): 205-217. DOI:10.1016/S2468-1253(23)00405-3.
- [4] KLEIN A P. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(7): 493-502. DOI:10.1038/s41575-021-00457-x.
- [5] ZHAO Z Y, LIU W. Pancreatic cancer: a review of risk factors, diagnosis, and treatment[J/OL]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19: 1533033820962117[2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33357065/>. DOI: 10.1177/1533033820962117.
- [6] STOFFEL E M, BRAND R E, GOGGINS M. Pancreatic cancer: changing epidemiology and new approaches to risk assessment, early detection, and prevention[J]. *Gastroenterology*, 2023, 164(5): 752-765. DOI: 10.1053/j.gastro.2023.02.012.
- [7] HARRIGAN J A, JACQ X, MARTIN N M, *et al.* Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(1): 57-78. DOI:10.1038/nrd.2017.152.
- [8] GAO H L, XI Z, DAI J W, *et al.* Drug resistance mechanisms and treatment strategies mediated by Ubiquitin-Specific Proteases (USPs) in cancers: new directions and therapeutic options[J/OL]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 88[2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38702734/>. DOI:10.1186/s12943-024-02005-y.
- [9] KOMANDER D, CLAGUE M J, URBÉ S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(8): 550-563. DOI: 10.1038/nrm2731.
- [10] QIN B Y, ZHOU L H, WANG F, *et al.* Ubiquitin-specific protease 20 in human disease: Emerging role and therapeutic implications[J/OL]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 206: 115352

- [2025-09-11]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115352>. DOI:10.1016/j.bcp.2022.115352.
- [11] KIM J H, SEO D, KIM S J, *et al.* The deubiquitinating enzyme USP20 stabilizes ULK1 and promotes autophagy initiation[J/OL]. *EMBO Rep*, 2018, 19(4): e44378[2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29487085/>. DOI: 10.15252/embr.201744378.
- [12] HA J, KIM M, SEO D, *et al.* The deubiquitinating enzyme USP20 regulates the TNF α -induced NF- κ B signaling pathway through stabilization of p62[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3116[2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32354117/>. DOI:10.3390/ijms21093116.
- [13] ZHANG M, ZHANG M X, ZHANG Q, *et al.* USP18 recruits USP20 to promote innate antiviral response through deubiquitinating STING/MITA[J]. *Cell Res*, 2016, 26(12): 1302-1319. DOI:10.1038/cr.2016.125.
- [14] XIAO X, TONTONNOZ P. USP20 links feeding-induced cholesterol synthesis and energy expenditure[J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(2): 337-338. DOI:10.1007/s11427-020-1867-8.
- [15] WANG Q, LI G Z, MA X, *et al.* LncRNA TINCR impairs the efficacy of immunotherapy against breast cancer by recruiting DNMT1 and downregulating miR-199a-5p *via* the STAT1-TINCR-USP20-PD-L1 axis[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(2): 76[2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36725842/>. DOI:10.1038/s41419-023-05609-2.
- [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): 1136-1146. DOI:10.3892/ijo.2017.3904.
- [17] JONCKHEERE S, ADAMS J, DE GROOTE D, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition (EMT) as a therapeutic target[J]. *Cells Tissues Organs*, 2022, 211(2): 157-182. DOI: 10.1159/000512218.
- [18] SAITOH M. Transcriptional regulation of EMT transcription factors in cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2023, 97: 21-29. DOI: 10.1016/j.semcancer.2023.10.001.
- [19] YANG J, MANI S A, DONAHER J L, *et al.* Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis[J]. *Cell*, 2004, 117(7): 927-939. DOI:10.1016/j.cell.2004.06.006.
- [20] ZHU Y F, YU R H, ZHOU S, *et al.* TAX1BP1 and FIP200 orchestrate non-canonical autophagy of p62 aggregates for mouse neural stem cell maintenance[J]. *Zool Res*, 2024, 45(4): 937-950. DOI:10.24272/j.issn.2095-8137.2024.021.
- [21] YANG Y, ZHU Y F, ZHOU S, *et al.* TRIM27 cooperates with STK38L to inhibit ULK1-mediated autophagy and promote tumorigenesis[J/OL]. *EMBO J*, 2022, 41(14): e109777[2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35670107/>. DOI:10.15252/embj.2021109777.
- [22] SELVARAJU K, MAZURKIEWICZ M, WANG X, *et al.* Inhibition of proteasome deubiquitinase activity: a strategy to overcome resistance to conventional proteasome inhibitors?[J]. *Drug Resist Updat*, 2015, 21/22: 20-29. DOI: 10.1016/j.drug.2015.06.001.
- [23] LIANG J X, NING Z, GAO W, *et al.* Ubiquitin-specific protease 22-induced autophagy is correlated with poor prognosis of pancreatic cancer[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(6): 2726-2734. DOI:10.3892/or.2014.3508.
- [24] BURKHART R A, PENG Y, NORRIS Z A, *et al.* Mitoxantrone targets human ubiquitin-specific peptidase 11 (USP11) and is a potent inhibitor of pancreatic cancer cell survival[J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11(8): 901-911. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0699.
- [25] LI X Y, WU H Y, MAO X F, *et al.* USP5 promotes tumorigenesis and progression of pancreatic cancer by stabilizing FoxM1 protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 492(1): 48-54. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.08.040.
- [26] WU C M, LUO K T, ZHAO F, *et al.* USP20 positively regulates tumorigenesis and chemoresistance through β -catenin stabilization[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(10): 1855-1869. DOI:10.1038/s41418-018-0138-z.
- [27] MATHIEN S, DÉLÉRIS P, SOULEZ M, *et al.* Deubiquitinating enzyme USP20 regulates extracellular signal-regulated kinase 3 stability and biological activity[J/OL]. *Mol Cell Biol*, 2017, 37(9): e00432-16[2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28167606/>. DOI:10.1128/MCB.00432-16.
- [28] WANG W W, WANG J, YAN H, *et al.* Upregulation of USP11 promotes epithelial-to-mesenchymal transition by deubiquitinating Snail in ovarian cancer[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(3): 1739-1748. DOI:10.3892/or.2018.6924.
- [29] LI L, ZHOU H H, ZHU R, *et al.* USP26 promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis through stabilizing Snail[J]. *Cancer Lett*, 2019, 448: 52-60. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.02.007.
- [30] ZHOU H H, LIU Y S, ZHU R, *et al.* OTUB1 promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis through modulating Snail stability[J]. *Oncogene*, 2018, 37(25): 3356-3368. DOI:10.1038/s41388-018-0224-1.
- [31] LIN Y W, WANG Y, SHI Q, *et al.* Stabilization of the transcription factors slug and twist by the deubiquitinase dub3 is a key requirement for tumor metastasis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 75127-75140. DOI: 10.18632/oncotarget.20561.
- [32] OUCHIDA A T, KACAL M, ZHENG A D, *et al.* USP10 regulates the stability of the EMT-transcription factor Slug/SNAI2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 502(4): 429-434. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.05.156.
- [33] ZHANG Z, LI J J, OU Y, *et al.* CDK4/6 inhibition blocks cancer metastasis through a USP51-ZEB1-dependent deubiquitination mechanism[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5: 25[2025-09-11]. <https://doi.org/10.1038/>

s41392-020-0118-x. DOI:10.1038/s41392-020-0118-x.

[34] YANG-HARTWICH Y, TEDJA R, ROBERTS C M, *et al.* p53-Pirh2 complex promotes Twist1 degradation and inhibits EMT[J]. Mol Cancer Res, 2019, 17(1): 153-164. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-18-0238.

[35] LANDER R, NORDIN K, LABONNE C. The F-box protein Ppa is a common regulator of core EMT factors Twist, Snail, Slug, and Sip1[J]. J Cell Biol, 2011, 194(1): 17-25. DOI:10.1083/jcb.201012085.

[36] CHEN J, WU Z Q, DENG W Y, *et al.* USP51 promotes non-small cell lung carcinoma cell stemness by deubiquitinating TWIST1[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 453. DOI:10.1186/s12967-023-04304-2.

[37] LI W Y, SHEN M H, JIANG Y Z, *et al.* Deubiquitinase USP20 promotes breast cancer metastasis by stabilizing SNAI2[J]. Genes Dev, 2020, 34(19/20): 1310-1315. DOI: 10.1101/gad.339804.120.

[收稿日期] 2025-09-27 [修回日期] 2025-11-11

[本文编辑] 向正华