

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.12.010

siRNA 干扰 USP7 表达对喉癌细胞生物学特性的影响

周 芑¹, 邓世山², 严达忠¹, 刘 海^{1△}

(1. 川北医学院附属医院耳鼻喉科, 四川南充 637007; 2. 川北医学院基础医学院, 四川南充 637007)

[摘要] **目的** 通过小干扰 RNAs(siRNA)干扰泛素特异性蛋白酶 7(USP7)在喉癌细胞中的表达,来探讨 USP7 对喉癌细胞生物学特性的影响。**方法** 自行设计并使用高效 siRNA 在喉癌 HEP2 细胞株特异性干扰 USP7 表达,然后利用 CCK-8 法、Transwell 小室迁移实验和流式细胞术观察 USP7 干扰后对喉癌细胞增殖、迁移能力和凋亡的影响。**结果** 自行设计的 siRNA 可高效抑制喉癌 HEP2 细胞 USP7 mRNA 及蛋白表达,显著抑制喉癌细胞的增殖、迁移能力,促进喉癌细胞的凋亡。**结论** siRNA-USP7 可以显著抑制喉癌细胞增殖和迁移能力,并促进凋亡,提示 USP7 可能是晚期喉癌治疗的一个重要靶标。

[关键词] 喉肿瘤;泛素特异性蛋白酶 7;HEP2 细胞;RNA,小分子干扰;细胞凋亡**[中图分类号]** R739.6**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)12-1616-04**Influence of siRNA interfering USP7 expression on cytobiological characteristics of laryngeal cancer cells**Zhou Ji¹, Deng Shishan², Yan Dazhong¹, Liu Hai^{1△}

(1. Department of Otolaryngology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637007, China; 2. School of Basic Medicine, North Sichuan Medical College of Nanchong, Sichuan 637007, China)

[Abstract] **Objective** This study is to investigate the influences of USP7 on the cytobiological characteristics of laryngeal cancer cells by small interfering RNA (siRNA) interfering the USP7 expression in the laryngeal cancer cells. **Methods** The self-designed highly efficient siRNA was used to conduct the specific interference on USP7 expression in laryngeal cancer HEP2 cells. Then the influence on the capacity of cell proliferation and migration, as well as apoptosis after USP7 interference were observed by using the CCK-8 method, Transwell chamber migration test and flow cytometry. **Results** The self-designed siRNA could efficiently inhibit the expression of USP7 mRNA in laryngeal cancer cells, furthermore markedly suppressed the proliferation and migration of laryngeal cancer cells, enhanced the cell apoptosis in laryngeal cancer HEP2 cells in vitro. **Conclusion** The siRNA interfering USP7 can inhibit the proliferation and migration capacity of laryngeal cancer cells, and promoted their apoptosis.

[Key words] laryngeal neoplasms; ubiquitin-specific protease 7; HEP2 cell line; RNA, small interfering; apoptosis

喉癌(laryngeal carcinoma)在头颈部肿瘤中比较常见,手术是其主要治疗手段^[1]。对于晚期患者,手术范围广,术后容易并发声音嘶哑甚至失声,给患者本身带来极大社会心理压力^[2]。因此,探索新的治疗方法及如何改善晚期喉癌患者的预后并提高其生活质量具有重要的临床价值。泛素蛋白酶系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)在肿瘤的发生发展中扮有重要作用,通过抑制其活性显示出好的抑瘤效应^[3]。作者前期研究发现,泛素特异性蛋白酶 7(USP7)蛋白在喉癌组织中高表达,癌旁组织中低表达;并发现 USP7 阳性表达与肿瘤分化程度呈负相关,分化越低,USP7 蛋白阳性表达率越高^[4]。因此深入研究 USP7 在喉癌中的作用是非常必要的。

双链小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)由 21~25 个核苷酸组成,能引起 RNA 沉寂和抑制靶蛋白的表达^[5-6]。为了进一步明确 USP7 在喉癌中的作用,本研究拟使用 siRNA 干扰 USP7 的表达,观察其对喉癌细胞株 HEP2 细胞增殖、迁移和凋亡的影响,从而进一步探讨 USP7 在喉癌发生发展中的作用。

1 材料与方 法

1.1 细胞株 人喉癌 HEP2 细胞株购自中国科学院上海生物化学研究所细胞资源中心,在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基,5% CO₂、37 °C 恒温孵箱内培养。

1.2 USP7 siRNA 设计 使用 siDirect Version 2.0 软件设计

出针对 USP7 基因的特异性 siRNA 片段 3 对及无关序列的 siRNA 片段(negative control siRNA, NC siRNA)1 对,见表 1,由广州锐博生物科技有限公司合成。

表 1 USP7 siRNA 设计序列

siRNA 编号	序列
siRNA1	正向:5'-CGAAUUUAAACAGAGAGAAU dTdT-3'
	反向:5'-dTdT GCUUAAAUUGUCUCUCUUA-3'
siRNA2	正向:5'-GGUUCUAGUGGAGAUAAU dTdT-3'
	反向:5'-dTdT CCAAGUAUCACCUCUAUUA-3'
siRNA3	正向:5'-GUGUAAAAGAAGUAGACUAU dTdT-3'
	反向:5'-dTdT CACAUUUCUUAUCUGAUA-3'
NC siRNA	正向:5'-AGGUGACUAGCACUGUUAGTT-3'
	反向:5'-GUAACAGUGCUAGUCACCUTT-3'

1.3 细胞转染 将喉癌 HEP2 细胞以 3×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板后 24 h,细胞覆盖达 50%~60%后进行转染。根据脂质体 Lipofectamine 2000 说明书进行操作。实验分实验组(转染有 siRNA)、阴性对照组(转染 NC siRNA)、空白组(不转染),实验组中又包括 siRNA 1 组、siRNA 2 组、siRNA 3 组。

1.4 半定量逆转录 PCR(RT-PCR) 在 GeneBank 中检索出

人 USP7 和 β -actin 全长序列,用 Oligo6 软件分别设计引物(表 2)。以逆转录所得 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增反应。反应条件:94 °C,5 min;94 °C 30 s,54 °C 30 s,72 °C 45 s,共 30 个循环。用 2% 琼脂糖凝胶,电压 100 V、时间 40 min 进行电泳,结果在凝胶成像系统观察扩增的条带,采集图片,用 Image Lab 3.0 软件分析,测量灰度值,计算 mRNA 的相对表达值。

1.5 Western blot 提取总蛋白等量蛋白加入到 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行电泳,并转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜。10% 的牛奶封闭 60 min,然后敷一抗,4 °C 过夜。抗体及工作浓度如下:兔抗人 USP 多克隆抗体(1:200,北京博奥森生物技术有限公司),鼠抗人 β -actin 抗体(1:5 000,Santa Cruz 公司)。复温 60 min。敷二抗 60 min。最后胶片显影。

表 2 RT-PCR 引物序列及产物大小

基因	引物序列	产物大小(bp)
USP7	正向:5'-GCTTGTACAGTGGCGCATT-3'	108
	反向:5'-GGATTGCTTCATCACTTCTCG-3'	
β -actin	正向:5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGT-3'	117
	反向:5'-TGAGGTCAATGAAAGGGTC-3'	

1.6 CCK-8 检测细胞活力 CCK-8 实验操作步骤按照说明书进行:将细胞以 5×10^3 密度接种于 96 孔板,每组设 8 个复孔,常规转染;分别在转染后 24、48、72 h,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂;放入 CO₂ 培养箱继续孵育 1 h;用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度(A)值,并根据 A 值分析细胞活力情况。

1.7 Transwell 小室迁移模型检测细胞迁移能力 Transwell 小室迁移模型实验根据文献[6]所述方法进行。简述如下,常规接种 6 孔板,分空白组、阴性对照组和 siRNA 实验组,转染 72 h 后。消化细胞,离心弃培养液,用无血清 RPMI 1640 培养基重悬。调整细胞密度至 5×10^4 。Transwell 小室放入 24 孔培养板中,在小室外加入 600 μ L 含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基,将各组细胞分别按 1×10^4 个/孔加入到小室上室,使每孔内外室液面高度基本保持一致。培养 18 h 后,取出 Transwell 小室,用棉签小心拭去上室膜上细胞;4% 多聚甲醛固定 30 min,结晶紫染色 20 min。倒置显微镜 200 倍光镜下取上、下、左、右和中心 5 个视野照相,并计数迁移到膜背面的细胞数,计算其平均值。

1.8 细胞凋亡检测 将细胞以 1×10^5 密度接种于 6 孔板,转染 72 h 后收集细胞大约 1×10^5 个;加入 150 μ L 1 \times Binding Buffer(含有 1:1 比例的 Annexin V-FITC 和 PI 双染混合液)悬浮细胞;室温,避光,孵育 15 min;加入 100 μ L 的 1 \times Binding Buffer,1 h 内用流式细胞仪检测。数据的统计与分析软件为 WinMDI 2.9。

1.9 统计学处理 采用 GraphPad Prism 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组喉癌 HEP2 细胞中 USP7 mRNA 的表达比较 RT-PCR 结果表明,转染 72 h 后,实验组 siRNA1、siRNA2、siRNA3 3 亚组细胞中 USP7 mRNA 表达水平分别为 $0.150 5 \pm 0.001 2$ 、 $0.102 6 \pm 0.001 9$ 、 $0.147 3 \pm 0.000 8$;而阴性对照组

USP7 mRNA 表达水平为 $0.456 7 \pm 0.000 9$,空白组 USP7 mRNA 表达水平为 $0.312 9 \pm 0.001 0$ 。统计分析发现,USP7 mRNA 表达水平在阴性对照组和空白组两组间差异无统计学意义($P=0.155 6$)。实验组各亚组较阴性对照组及空白组的 USP7 mRNA 水平均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。siRNA2 组中 USP7 mRNA 下降最为显著。

2.2 siRNA 转染喉癌 HEP2 细胞后对 USP7 蛋白表达情况 转染 72 h 后,细胞中 USP7 蛋白表达水平与阴性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);而阴性对照组及空白组 USP7 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。表明 siRNA 显著抑制了 USP7 蛋白在 HEP7 细胞内的表达。

2.3 SiRNA 干扰 USP7 蛋白后对喉癌 HEP2 细胞活力的影响 在转染后不同时间点,阴性对照组和空白组两组之间细胞活力差异无统计学意义($P > 0.05$)。但在实验组中,分别在转染 24、48、72 h 后,细胞活力呈时间依赖方式较阴性对照组有显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

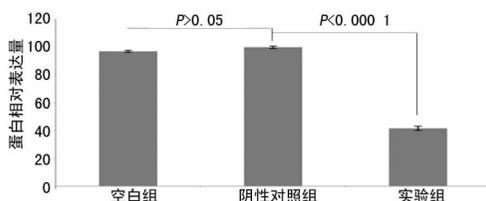
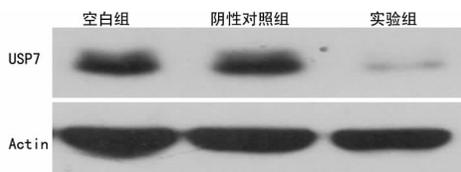


图 1 Western blot 检测 USP7 在各组 HEP2 细胞中的表达情况

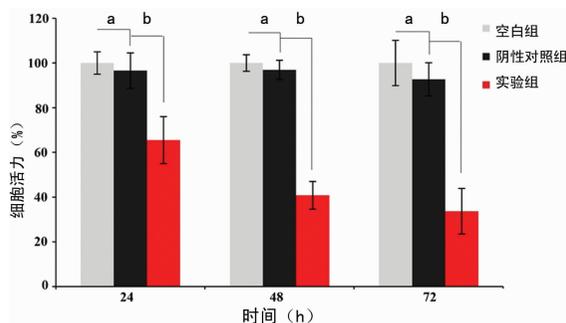


图 2 CCK-8 检测各组 HEP2 细胞活力变化情况

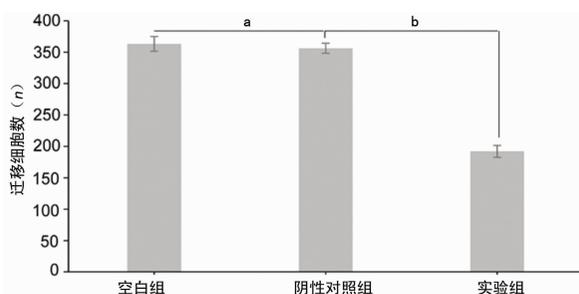
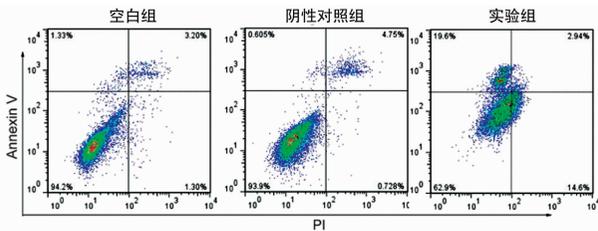


图 3 Transwell 小室迁移实验检测各组细胞的迁移能力

2.4 siRNA 干扰 USP7 蛋白后对喉癌 HEP2 细胞迁移能力的影响 倒置显微镜下计数穿移到微孔膜下层的细胞。实验组较阴性对照组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。阴性对照组和空白组细胞数量差异无统计学意义($P = 0.1968$),见图 3。

2.5 siRNA 干扰 USP7 蛋白后对喉癌 HEP2 细胞凋亡能力的影响 转染 72 h 后,实验组细胞的凋亡率为(33.67±4.00)%,空白组和阴性对照组细胞凋亡率分别为(5.21±0.56)%和(6.08±0.43)%,实验组细胞凋亡率较阴性对照组显著增加,差异有统计学意义($P = 0.0003$)。而空白组和阴性对照组间细胞凋亡率差异无统计学意义($P = 0.0995$)。见图 4。



^a: $P = 0.0995$; ^b: $P = 0.0003$ 。

图 4 流式细胞术检测细胞的凋亡情况

3 讨论

喉癌是头颈部最常见的恶性肿瘤之一,占到了头颈部肿瘤的 20% 左右^[7]。治疗方法包括全喉切除、单独或者加颈部淋巴结清扫、放射治疗、全喉切除加放射治疗、以及放射治疗联合化学治疗等^[8]。病期较晚的患者,除了临床疗效差之外,患者治疗后的生活质量受到不同程度的影响,其中尤以手术导致的声音嘶哑甚至失声和吞咽困难影响最大,给患者及社会造成极大的负担^[9-10]。因此,深入探讨如何提高喉癌疗效的同时并改善患者的生活质量具有重要临床价值。

本研究在喉癌样本组织中发现,USP7 蛋白在喉癌组织高表达,在癌旁组织低表达。USP7 蛋白阳性表达与肿瘤分化程度显著相关,分化程度愈低,阳性表达率则越高^[4]。靶向治疗已经运用于临床,并显示出卓越的治疗前景^[11]。这为喉癌研究提供了一个着眼点。抑制 USP7 蛋白功能是否影响喉癌细胞的生物学特性成为本次研究目的。

siRNA 由 21~25 个核苷酸组成,能引起 RNA 沉默和抑制靶蛋白的表达。因此,siRNA 对诸多疾病(包括基因疾病、病毒性感染和癌)极具治疗前景^[5]。本研究结果显示,自行设计的 siRNA 在 mRNA 水平显著抑制了 USP7 的表达,具有高效性和专一性。进而,利用效率最高的 siRNA 作为研究,进行细胞转染,观察对细胞迁移、增殖和凋亡的影响。结果表明 siRNA 显著干扰 USP7 蛋白表达,抑制喉癌 HEP2 细胞株的增殖和迁移能力,促进肿瘤细胞凋亡。提示 USP7 在喉癌中可能作为一个癌基因^[12],在癌组织中高表达,具有促进肿瘤细胞增殖和迁移的能力,并有抗癌细胞凋亡的作用。这为喉癌的临床治疗提供了新思路,即通过靶向治疗来抑制 USP7 蛋白高表达类晚期肿瘤的生长,从而达到控制肿瘤的作用。目前,关于泛素类蛋白酶抑制剂的研究已经成为肿瘤治疗领域的热点。Chauhan 等^[13]研究发现 USP7 在多发性骨髓瘤患者的骨髓和肿瘤细胞中高表达。回顾性分析发现 USP7 蛋白表达与总生存时间呈负相关,且 USP7 蛋白表达水平越低患者复发的时间

间隔越长。进而使用 USP7 的选择性抑制剂 P5091 作用于多发性骨髓瘤的耐药细胞株,发现可以逆转耐药促进凋亡;在体内实验研究中,P5091 能显著抑制肿瘤生长并延长生存时间,且耐受性好。其机制为 P5091 通过抑制 USP7 蛋白表达,导致 HDM2 多聚泛素化,加速 HDM2 的降解,结果增加了 p53 和 p21 蛋白的稳定性。Altun 等^[14]研究发现 P22077 作为 P5091 的类似物,除了具有降低 HDM2 水平,稳定 p53、p21 蛋白状态的作用外,还有降低 DNA 损伤蛋白 DDB1、RBX1、DCAF7 和 DCAF11 的作用,提示 P22077 可能参与了 USP7 蛋白和 DNA 修复酶之间某种未知的功能联系。Fan 等^[15]在儿童神经母细胞瘤的研究中,发现 USP7 高表达可以用于预测患者的不良预后,亦发现其小分子抑制剂 P22077 在 p53 野生状态下通过 USP7-HDM2-p53 轴高效促进神经母细胞瘤细胞的凋亡,并能逆转神经母细胞瘤耐药细胞株 LA-N-6 耐药,体内实验证明 P22077 能显著抑制移植瘤生长。而新鉴别出的 USP7 选择性抑制剂 HBX19818^[16],其 IC₅₀ 为 28.1 μmol/L,HBX19818 通过催化位点的亲核攻击不可逆地绑定到 USP7 蛋白,引起羧基释放,从而与位于 USP7 活性位点的 Cys223 形成共价结合。

去泛素化酶(deubiquitinating enzymes,DUBs)家族负责负性调控泛素信号系统,对癌基因和抑癌基因都有影响,涉及细胞周期、DNA 损伤反应、凋亡、信号通路及抑癌基因相关通路。USP7 蛋白作为 DUBs 家族的一员,主要表达于细胞核,少量表达于细胞质^[4,12]。除了一个 DUB 结构域外,USP7 还有一个 C-末端结构域(至少包含 5 个泛素样结构域)和一个 N-末端 TRAF 样 MATH 结构域。通过其去泛素化作用,USP7 调控多个多聚泛素化亚类蛋白的稳定状态,如通过改变 Mdm2 和 Bmi1/Mel18 的稳定性来分别调控 p53 和 p16INK4a 的水平^[17-18]。TSPYL5 通过和 p53 竞争绑定到 USP7 相同区域来调控 USP7 与 p53 的绑定结合^[19]。USP7 还可以通过去泛素化作用调控几个单聚泛素化的亚类物在细胞内的分布。在氧化应激状态下,USP7 通过和 FOXO 蛋白相互作用和去泛素化作用,抑制 FOXO4 的核定位和转录活性^[20]。同样,USP7 去泛素化作用于 PTEN 抑癌基因,从而调控它的核排斥^[21]。综上所述,USP7 运用 p53 依赖的和 not 依赖的方式作用于细胞生理生化功能。本研究的缺陷在于未对 USP7 通过何种机制来调控喉癌细胞的增殖、迁移和凋亡等生物学行为进行深入探讨。通过文献阅读,作者猜测 USP7 通过 p53 依赖的方式对细胞凋亡、细胞周期产生作用,并拟通过移植瘤模型验证的体外实验结果,为 siRNA-USP7 的临床转化研究打下基础。这是作者下一步研究的目标和方向。

总之,本研究设计出了高效专一的能够抑制 USP7 蛋白功能的 siRNA,并利用其中效率最高的 siRNA2 作用于喉癌细胞,在抑制 USP7 蛋白表达的同时,抑制肿瘤细胞的增殖、迁移能力,促进肿瘤细胞凋亡。这为 USP7 作为喉癌治疗靶点提供了理论基础。

参考文献

- [1] 符晓,李赞,王大海,等. 综合治疗 9 例喉癌术后咽痿的疗效分析[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2012, 18(4): 305-306.
- [2] Li L, Zhang Z, Wang C, et al. Quantitative proteomics approach to screening of potential diagnostic and therapeutic

targets for laryngeal carcinoma[J]. PLoS One, 2014, 9 (2):e90181.

[3] Kar G, Keskin O, Fraternali F, et al. Emerging role of the ubiquitin-proteasome system as drug targets [J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(18):3175-3189.

[4] 周茂, 邓世山, 刘海. USP7 在喉癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2015, 21(1): 27-30.

[5] Higuchi Y, Kawakami S, Hashida M. Strategies for in vivo delivery of siRNAs: recent progress [J]. Bio Drugs, 2010, 24(3):195-205.

[6] Ren T, Qing Y, Dai N, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 induced upregulation of fibroblast growth factor 2 and its receptor 3 induces angiogenesis in human osteosarcoma cells[J]. Cancer Sci, 2014, 105(2):186-194.

[7] Karatzanis AD, Psychogios G, Waldfahrer F, et al. Management of locally advanced laryngeal cancer[J]. J Otolaryngol Head Neck Surg, 2014, 43(1):4.

[8] Spector GJ, Sessions DG, Lenox J, et al. Management of stage IV glottic carcinoma: therapeutic outcomes[J]. Laryngoscope, 2004, 114(8):1438-1446.

[9] Keszte J, Danker H, Dietz A, et al. Mental disorders and psychosocial support during the first year after total laryngectomy[J]. Clin Otolaryngol, 2013, 38(6):494-501.

[10] Starmer HM, Tippett DC, Webster KT. Effects of laryngeal cancer on voice and swallowing[J]. Otolaryngol Clin North Am, 2008, 41(4):793-818, vii.

[11] Shen M, Schmitt S, Buac D, et al. Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2013, 17(9):1091-1108.

[12] Cheng C, Niu C, Yang Y, et al. Expression of HAUSP in gliomas correlates with disease progression and survival of patients[J]. Oncol Rep, 2013, 29(5):1730-1736.

[13] Chauhan D, Tian Z, Nicholson B, et al. A small molecule inhibitor of ubiquitin-specific protease-7 induces apoptosis in multiple myeloma cells and overcomes bortezomib resistance[J]. Cancer Cell, 2012, 22(3):345-358.

[14] Altun M, Kramer HB, Willems LI, et al. Activity-based chemical proteomics accelerates inhibitor development for deubiquitylating enzymes[J]. Chem Biol, 2011, 18(11): 1401-1412.

[15] Fan YH, Cheng J, Vasudevan S, et al. USP7 inhibitor P22077 inhibits neuroblastoma growth via inducing p53-mediated apoptosis[J]. Cell Death Dis, 2013, 4:e867.

[16] Reverdy C, Conrath S, Lopez R, et al. Discovery of specific inhibitors of human USP7/HAUSP deubiquitylating enzyme[J]. Chem Biol, 2012, 19(4):467-477.

[17] Cummins JM, Rago C, Kohli M, et al. Tumour suppression; disruption of HAUSP gene stabilizes p53[J]. Nature, 2004, 428(6982):1 p following 486.

[18] Maertens GN, El Messaoudi-Aubert S, Elderkin S, et al. Ubiquitin-specific proteases 7 and 11 modulate Polycomb regulation of the INK4a tumour suppressor[J]. EMBO J, 2010, 29(15):2553-2565.

[19] Epping MT, Meijer LA, Krijgsman O, et al. TSPYL5 suppresses p53 levels and function by physical interaction with USP7[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(1):102-108.

[20] Van Der Horst A, De Vries-Smits AM, Brenkman AB, et al. FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(10):1064-1073.

[21] Song MS, Salmena L, Carracedo A, et al. The deubiquitylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network [J]. Nature, 2008, 455(7214): 813-817.

(收稿日期:2015-10-18 修回日期:2015-12-20)

《中文核心期刊要目总览(2014 年版)》综合性医药卫生类核心期刊

序号	刊名	序号	刊名	序号	刊名
1	中华医学杂志	15	复旦学报·医学版	28	郑州大学学报·医学版
2	第三军医大学学报	16	重庆医科大学学报	29	中国比较医学杂志
3	南方医科大学学报	17	上海交通大学学报·医学版	30	安徽医科大学学报
4	中国医学科学院学报	18	中国全科医学	31	山东大学学报·医学版
5	北京大学学报·医学版	19	吉林大学学报·医学版	32	上海医学
6	中山大学学报·医学科学版	20	华中科技大学学报·医学版	33	军事医学
7	第二军医大学学报	21	首都医科大学学报	34	东南大学学报·医学版
8	解放军医学杂志	22	中国医科大学学报	35	福建医科大学学报
9	四川大学学报·医学版	23	重庆医学	36	山东医药
10	中南大学学报·医学版	24	医学研究生学报	37	医学与哲学·人文社会医学版(与: 医学与哲学·临床决策论坛版 合并改名为:医学与哲学)
11	西安交通大学学报·医学版	25	实用医学杂志		
12	浙江大学学报·医学版	26	广东医学		
13	中国现代医学杂志	27	南京医科大学学报·自然科学版		
14	医学争鸣				