

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.11.1410

MicroRNA-30e-5p 通过下调泛素特异性蛋白酶 22 抑制非小细胞肺癌的发生和发展

徐高俊, 蔡捷, 黄健兵, 梅举, 丁芳宝*

上海交通大学医学院附属新华医院心胸外科, 上海 200092

[摘要] **目的** 探讨 microRNA-30e-5p(miR-30e-5p)是否可通过下调泛素特异性蛋白酶 22(USP22)抑制非小细胞肺癌(NSCLC)的发生和发展。**方法** 采用 qPCR、蛋白质印迹法和免疫组织化学染色法检测 miR-30e-5p、USP22 在 NSCLC 组织和癌旁组织中的表达。NSCLC 细胞株 H460 转染 miR-30e-5p 模拟物或 miR-30e-5p 抑制物后,利用 qPCR 和蛋白质印迹法检测细胞中 miR-30e-5p、USP22 的表达。构建 USP22 突变载体,采用荧光素酶报告基因检测 miR-30e-5p 在 USP22 基因中的结合位点。采用 MTT 法检测转染后 H460 细胞的增殖情况,并采用异种移植法检测裸鼠体内肿瘤生长情况。流式细胞术检测转染后 H460 细胞的周期阻滞和凋亡情况。**结果** MiR-30e-5p、USP22 在肿瘤组织中的表达均高于癌旁组织(P 均 <0.01)。在 H460 细胞中过表达 miR-30e-5p 后 USP22 mRNA 和蛋白的表达均下调(P 均 <0.01),而抑制 miR-30e-5p 表达后 USP22 mRNA 和蛋白的表达均上调(P 均 <0.01)。NSCLC 组织中 miR-30e-5p 与 USP22 的表达呈负相关($P<0.01$)。miR-30e-5p 可通过结合在 3'UTR 的特异序列负调控 USP22 的表达。过表达 miR-30e-5p 可抑制 H460 细胞的增殖、诱导细胞周期阻滞和凋亡,并抑制裸鼠体内肿瘤的生长($P<0.05, P<0.01$); 而抑制 miR-30e-5p 的表达可促进 H460 细胞的增殖、抑制细胞周期阻滞和凋亡($P<0.05, P<0.01$)。**结论** MiR-30e-5p 可以下调 USP22 的表达,从而抑制 NSCLC 的发生和发展,提示其可作为 NSCLC 患者的潜在治疗靶点。

[关键词] 肺肿瘤;非小细胞肺癌;miR-30e-5p;泛素特异性蛋白酶 22;癌基因;肿瘤抑制基因

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)11-1410-08

MicroRNA-30e-5p inhibits development and progression of non-small cell lung cancer by down-regulating ubiquitin-specific protease 22 expression

XU Gao-jun, CAI Jie, HUANG Jian-bing, MEI Ju, DING Fang-bao*

Department of Cardiothoracic Surgery, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

[Abstract] **Objective** To investigate whether microRNA-30e-5p (miR-30e-5p) can inhibit tumor growth by down-regulating the expression of ubiquitin-specific protease 22 (USP22) in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** We detected the expressions of miR-30e-5p and USP22 in NSCLC tissues and adjacent non-tumor tissues by qPCR, Western blotting, and immunohistochemistry. After transfecting with miR-30e-5p mimic or miR-30e-5p inhibitor, the expressions of miR-30e-5p and USP22 in H460 cells was detected by qPCR and Western blotting. USP22 mutant vector was constructed and used to identify miR-30e-5p binding sites in the USP22 gene by luciferase reporter assay. The proliferation of H460 cells was measured *in vitro* by MTT assay and the tumor growth in nude mice was measured *in vivo* by xenograft assay. The cell cycle arrest and apoptosis of H460 cells were detected by flow cytometry. **Results** The expressions of MiR-30e-5p and USP22 in NSCLC tissues were significantly higher than those in adjacent non-tumor tissues (both $P<0.01$). Overexpression of miR-30e-5p significantly down-regulated the expressions of USP22 mRNA and protein in NSCLC tissues (both $P<0.01$), while inhibition of miR-30e-5p expression significantly up-regulated the expressions of USP22 mRNA and protein (both $P<0.01$). MiR-30e-5p was negatively related to USP22 in NSCLC tissues ($P<0.01$). MiR-30e-5p could negatively regulate the expression of USP22 by binding to the specific sequence of 3'UTR. Overexpression of miR-30e-5p significantly inhibited proliferation of H460 cells, induced cell cycle arrest and

[收稿日期] 2017-06-23 **[接受日期]** 2017-08-27

[基金项目] 国家自然科学基金(81572248)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81572248)。

[作者简介] 徐高俊, 硕士, 住院医师。E-mail: xugaojunzzu@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-25079032, E-mail: dingfangbao@xinhumed.com.cn

apoptosis, and inhibited tumor growth in nude mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$); while inhibition of miR-30e-5p significantly promoted the cell proliferation and inhibited cell cycle arrest and apoptosis ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** MiR-30e-5p can down-regulate the expression of USP22, thereby inhibiting the development and progression of NSCLC, suggesting that it can be used as a potential therapeutic target for NSCLC.

[Key words] lung neoplasms; non-small cell lung carcinoma; microRNA-30e-5p; ubiquitin-specific protease 22; oncogenes; tumor suppressor genes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(11): 1410-1417]

肺癌是全球范围内发病率及死亡率最高的恶性肿瘤之一,其中 80%~85% 为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)^[1-2]。近年来,虽然肺癌的诊断和治疗方法不断改进,但肺癌患者的长期存活率并无明显提高。目前已公认肺癌的发生、发展与多种因素相关,但其具体机制还未完全阐明。因此,寻找新的与肺癌密切相关的基因,对于肺癌的诊断与治疗具有重要的意义。

微 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度为 18~25 nt 的非编码小单链 RNA,参与调控转录后基因表达^[3]。MiRNA 与多种肿瘤相关^[4],并且在肿瘤的发生、诊断、治疗和预后中起着重要作用。MiR-30e-5p 为肿瘤抑制基因,其靶基因主要是致癌基因^[5-8],且其在 NSCLC 中的表达下调^[9-11],表明其可能在 NSCLC 中发挥着重要作用。泛素特异性蛋白酶 22 (ubiquitin-specific protease 22, USP22) 是近年来发现的泛素水解酶家族的一个新成员,参与肿瘤细胞周期相关基因的调控,并与肿瘤细胞增殖密切相关^[12-13]。USP22 可促进肿瘤的形成并在不同的肿瘤中表达上调^[14-19]。我们前期工作已经证实 USP22 在 NSCLC 的发展中具有关键作用^[20]。通过在线 TargetScan (www.targetscan.org) 预测发现,USP22 是 miR-30e-5p 的靶基因之一。基于此,本研究通过使用 miR-30e-5p 模拟物或 miR-30e-5p 抑制物转染 H460 细胞来过表达或抑制 miR-30e-5p,验证 miR-30e-5p 与 USP22 的关系及其在 NSCLC 发生、发展中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂与仪器 收集 2014 年 1 月至 2016 年 7 月在上海交通大学医学院附属新华医院就诊的 23 例 NSCLC 患者的肿瘤组织和癌旁组织(距离肿瘤边缘 > 2 cm)。所有患者均获知情同意,研究经上海交通大学医学院附属新华医院医学伦理委员会批准。将组织样本一部分置于 -80 °C 冰箱中保存,用于 mRNA 和蛋白测定;另一部分用 4% 多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋,制作切片,用于 H-E 染色和免疫

组化分析。TRIzol 试剂、Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司)、反转录试剂盒、双荧光素酶系统、荧光素酶报告基因 pmirGlo 载体、甘氨酸 (美国 Promega 公司)、焦碳酸乙二酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC)、HEPES 缓冲液、RNaseA (美国 Sigma 公司)、RIPA 细胞裂解液 (美国 Millipore 公司)、BCA 蛋白质定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)。抗 USP22 抗体 (美国 Novus Biologicals 公司);抗 PCNA 一抗、抗 SIRT1 一抗、HRP 山羊抗兔 IgG 二抗 (英国 Abcam 公司);KOD-plus 定点突变试剂盒 (日本 Toyobo 公司);异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)-Annexin V 试剂盒 (美国 Roche 公司)。H460 细胞株、HEK293T 细胞株购自中国科学院上海细胞库。胎牛血清、0.25% 胰酶、RPMI 1640 培养液均购自美国 Gibco 公司,pWPXL 慢病毒载体及其包装系统购自美国 Addgene 公司。680T 型酶联免疫检测仪 (美国 Bio-Rad 公司);3111 型 CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo Forma 公司);FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司);GHP-9050 型细胞培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 免疫组织化学染色检测组织中 USP22 蛋白的表达 取 NSCLC 组织与癌旁组织切片,按照即用型 SP 免疫组织化学超敏试剂盒说明书,将切片依次经组织脱蜡、水化、PBS 浸泡 5 min,滴加阻断剂、抗原修复、非免疫血清封闭、标记一抗和二抗、DAB 显色、蒸馏水浸泡等处理。苏木精复染 2 min,1% 盐酸乙醇分化、脱水、透明,后使用 ECL 试剂盒封片和成像。

1.3 细胞培养与转染 NSCLC 细胞株 H460 接种于含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素 (美国 Hyclone 公司) 的 RPMI 1640 培养液中,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度环境下培养。当细胞达到约 80% 融合时使用 0.25% 胰蛋白酶溶液 (美国 Hyclone 公司) 消化、传代。取对数期生长细胞,用胰酶消化细胞并计数,以 2 × 10³/孔的密度铺于 96 孔板,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。用 100 μL 不含血清的培养液漂洗 2 次,再加入新的不含血清和抗生

素的培养液。使用 25 μL 无血清培养液稀释 miR-30e-5p 模拟物、miR-30e-5p 抑制物(广州锐博生物科技公司)或 siRNA/pCMV-USP22 存储液,制成 A 液;另使用 25 μL 无血清培养液稀释 0.5 μL Lipofectamine 2000 试剂,制成 B 液,轻轻混合 A、B 液(体积比 1:1),后转染细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h 后,收集细胞。

1.4 qPCR 检测 miR-30e-5p、USP22 mRNA 的表达 根据美国 Promega 公司的 M-MLV 操作说明书合成引物。引物序列:miR-30e-5p 正向 5'-GGC GTG TAA ACA TCC TTG ACT G-3',反向 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3';U6 正向 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',反向 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3';USP22 正向 5'-GGA CAA CTG GAA GCA GAA CC-3',反向 5'-TGA AAC AGC CGA AGA AGA CA-3'; β actin 正向 5'-GAG CAC AGA GCC TCG CCT TT-3',反向 5'-AGA GGC GTA CAG GGA TAG CA-3'。利用 TRIzol 试剂提取各组织和细胞的总 RNA,反转录为 cDNA 后行 qPCR。qPCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,循环 40 次。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。

1.5 蛋白质印迹法检测 USP22 蛋白的表达 使用 RIPA 裂解缓冲液提取 H460 细胞总蛋白。按 BCA 试剂盒说明书测定蛋白浓度。取总蛋白行 SDS-PAGE 分离并转移到 PVDF 膜上,室温下浸入 5% 非脂肪乳封闭 1 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别使用抗 USP22 一抗(1:200)、抗 SIRT1 一抗(1:500)、抗 p53 一抗(1:1000)、抗磷酸化 STAT 3 一抗(1:1000)孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1000)室温孵育 2 h,运用 ECL 法观察蛋白条带。

1.6 MTT 法检测细胞增殖能力 取对数生长期细胞,以 2×10^3 /孔的密度接种到 96 孔板。于培养后 24、48、72、96、120 h 时加入 0.5 mg/mL MTT 溶液 20 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h。加 150 μL DMSO 终止反应,在酶联免疫检测仪上检测 570 nm 处各孔的光密度(D)值。重复实验 3 次。

1.7 流式细胞术检测细胞周期与凋亡 细胞凋亡分析:转染细胞 48 h 后,用胰蛋白酶处理细胞,并使用结合缓冲液再悬浮细胞使细胞密度为 1×10^6 /mL。用 100 μL 的标记溶液[含 FITC-Annexin V 和碘化乙啶(propidium iodide, PI)的孵育缓冲液,终浓度均为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$]重悬细胞,室温下避光孵育 10~15 min,上流式细胞仪检测凋亡细胞比例。所有实验均重复 3 次。细胞周期分析:转染细胞 48 h 后常规胰酶消化,固定在 70%乙醇中,PBS 洗 1 次,然后

加入 150 μL RNaseA(250~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PBS 稀释)重悬细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min。加入 150 μL PI 工作液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min。上流式细胞仪测定 PI 染色情况,用 Cell Quest 软件计算细胞周期各时相细胞的百分比。

1.8 荧光素酶报告分析验证 miR-30e-5p 在 USP22 的结合位点 提取细胞总 RNA,按反转录试剂盒操作说明反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板行 PCR 扩增,具体条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,共 25 个循环。将纯化后的 PCR 产物行 *Sac* I 与 *Xho* I 双酶切后接入 pmirGlo 载体并转化大肠杆菌 DH5 α ,挑取单克隆并用 *Sac* I 与 *Xho* I 行双酶切鉴定。获取酶切鉴定正确的克隆序列,得重组质粒 USP22-WT。取上述序列与 miR-30e-5p 中的结合位点按 KOD-plus 定点突变试剂盒说明书进行点突变并人工合成之后接入 pmirGlo 载体,得重组载体 USP22-MUT。将构建好的靶分子真核表达载体 USP22-WT、USP22-MUT 与 miR-30e-5p 模拟物或 miR-30e-5p 抑制物共转染 H460 细胞,每孔分别转染重组质粒 100 ng、miRNA 1 μL 和脂质体 1 μL ,分别以转染相应的对照序列为对照(NC)。转染 48 h 后吸出培养液并用 PBS 洗涤 2 次,37 $^{\circ}\text{C}$ 用 50 μL 细胞裂解缓冲液裂解细胞 20 min;收集裂解后的细胞样品,10 000 $\times g$ 离心 10 min。使用 TD 20/20 荧光光度计检测不同报告基因间的相对活性。

1.9 裸鼠移植瘤实验 将 miR-30e-5p 模拟物及其对照序列亚克隆到慢病毒表达载体,与 psPAX2、PMD2G 共转染 HEK293T 细胞,包装生产慢病毒,然后再以后者感染 H460 细胞。取雄性 BALB/c 裸鼠 12 只,4~6 周龄,购自中国科学院上海药物研究所[生产许可证号 SCXK(沪)2013-0016,使用许可证号 SYXK(沪)2015-0027]。将裸鼠随机分为两组($n=6$),消毒皮肤,无菌条件下在双侧下肢髌关节上方皮下分别注射 miR-30e-5p 过表达或对照空白载体转染的 H460 细胞悬液($2.5 \times 10^6/0.2 \text{ mL}$)。恒温、通风、无菌条件下饲养,观察皮下肿瘤生长情况,3 周后颈椎脱臼处死裸鼠取瘤测量体积。所有动物维护和实验程序均按照上海交通大学实验动物伦理委员会批准的实验动物健康指南实施。

1.10 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。相关性分析采用 Spearman 相关分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 NSCLC 组织中 miR-30e-5p 和 USP22 的

表达 qPCR检测结果(图 1A、1B)显示, miR-30e-5p 在肿瘤组织中的表达低于癌旁组织($P < 0.01$), 而 USP22 在肿瘤组织中的表达高于癌旁组织($P < 0.01$)。蛋白质印迹结果(图 1C)显示, USP22 在肿

瘤组织中高表达。进一步免疫组化法结果(图 1D)显示增殖细胞核抗原、USP22 和 SIRT1 在 NSCLC 组织中均呈现高表达。

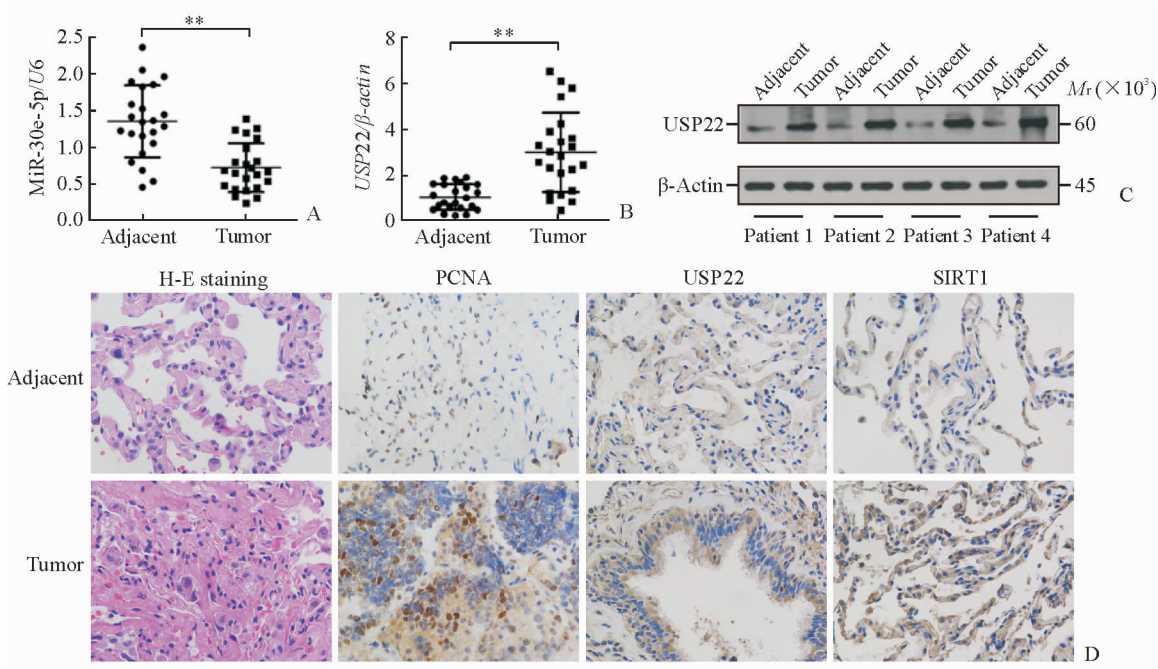


图 1 NSCLC 组织中 miR-30e-5p 和 USP22 的表达

Fig 1 Expressions of miR-30e-5p and USP22 in NSCLC tissues

A, B; Relative expressions of miR-30e-5p (A) and USP22 mRNA (B) in 23 pairs of NSCLC and adjacent non-tumor tissues by qPCR; C; Expression of USP22 protein in 4 pairs of NSCLC and adjacent non-tumor tissues by Western blotting; D: NSCLC and adjacent non-tumor tissues by hematoxylin-eosin (H-E) staining, and PCNA, USP22, and SIRT1 expressions by immunohistochemistry staining. miR: MicroRNA; NSCLC: Non-small cell lung cancer; USP22; Ubiquitin-specific protease 22; PCNA: Proliferating cell nuclear antigen; SIRT1: Silent information regulator 1. Original magnification: $\times 400$ (D), $** P < 0.01$

2.2 H460 细胞中 miR-30e-5p mRNA 的表达 与 NC 相比, 转染 miR-30e-5p 模拟物后 H460 细胞中 miR-30e-5p 的表达上调($P < 0.01$), 而转染 miR-30e-5p 抑制物后细胞中 miR-30e-5p 的表达下调($P < 0.01$, 图 2)。

2.3 MiR-30e-5p 与 USP22 的相关性及靶标关系 与 NC 相比, 转染 miR-30e-5p 模拟物后 USP22 mRNA($P < 0.01$)和蛋白(0.52 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.10 , $P < 0.01$)的表达均下调, 而转染 miR-30e-5p 抑制物后 USP22 mRNA($P < 0.01$)和蛋白(2.55 ± 0.19 vs 0.98 ± 0.08 , $P < 0.01$)的表达均上调(图 3A、3B)。相关性分析显示 USP22 与 miR-30e-5p 呈负相关($P < 0.01$, 图 3C)。且在线 TargetScan 显示 UGUUUAC 为 miR-30e-5p 的结合序列(图 3D)。荧光素酶基因报告分析结果(图 3E、3F)显示, 在转染 USP22-MUT 荧光素酶的 H460 细胞中, 共转染 miR-30e-5p 模拟物或 miR-30e-5p 抑制物的细胞荧光素酶活性与相应 NC 相比差异均无统计学意义; 而在转染 USP22-WT 荧光素酶的 H460 细胞中, 共转染 miR-30e-5p 模拟物的细胞荧光素酶活性相比 NC 下降($P < 0.01$), 而共转染 miR-30e-5p 抑制物的细胞荧光素酶活性较 NC 升高($P < 0.01$)。

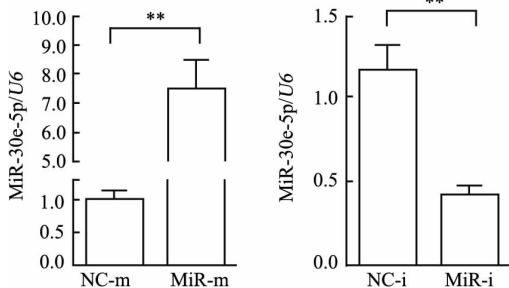


图 2 转染 miR-30e-5p 模拟物和抑制物对 H460 细胞中 miR-30e-5p 表达的影响

Fig 2 MiR-30e-5p expression in H460 cells transfected with miR-30e-5p mimic (miR-m) or miR-30e-5p inhibitor (miR-i)

NC-m: Negative control mimic; NC-i: Negative control inhibitor. miR: MicroRNA. $** P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

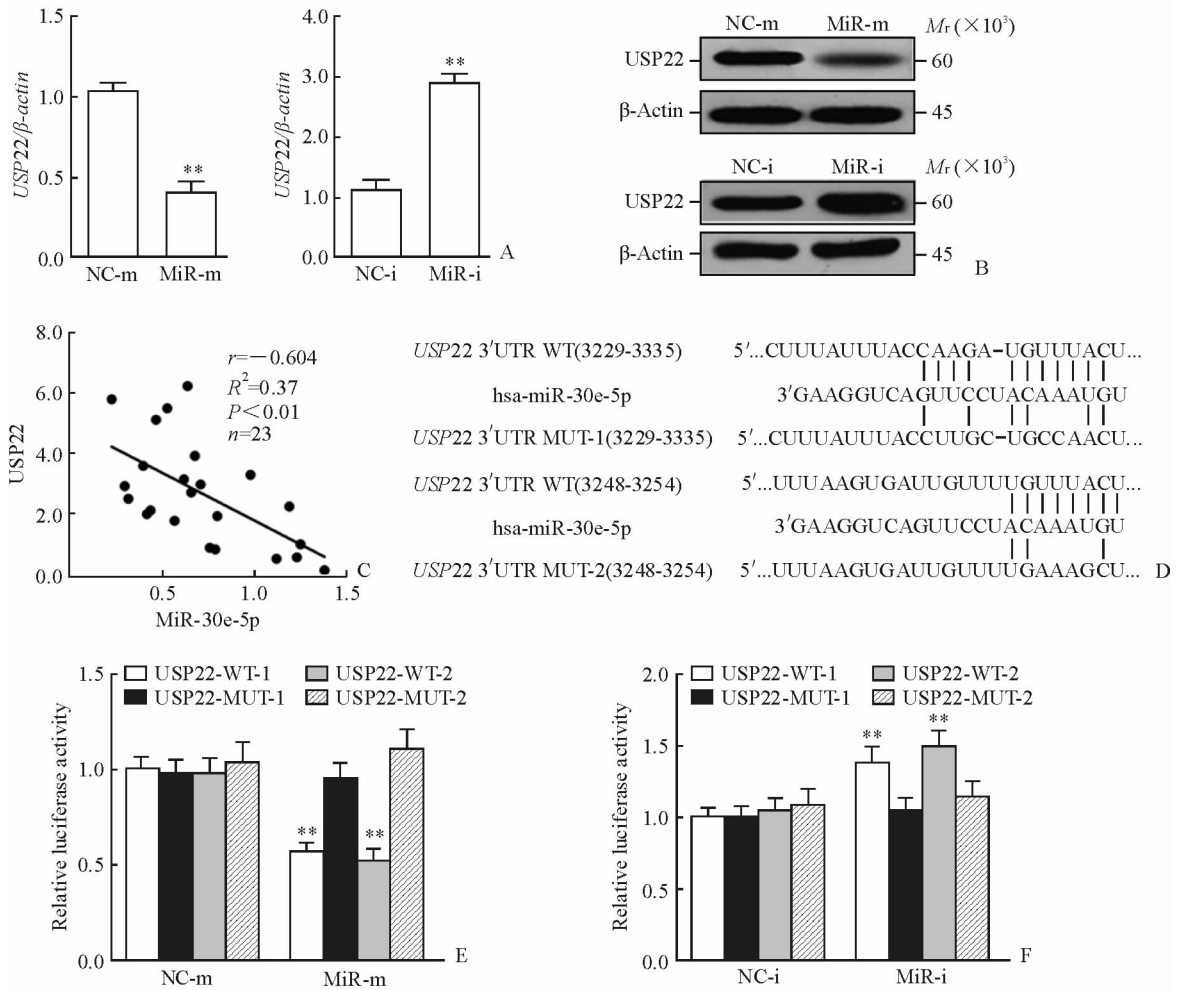


图3 MiR-30e-5p与USP22的相关性及靶标关系

Fig 3 Correlation and target relationship between miR-30e-5p and USP22

A, B; Expressions of USP22 mRNA (A) and protein (B) in H460 cells; C; MiR-30e-5p expression was negatively related to USP22 expression in NSCLC tissues; D; Putative miR-30e-5p binding sites in 3'UTR of USP22; E, F; Relative luciferase activity in H460 cells transfected with wild type (WT) or mutant (MUT) USP22 3'UTR reporter constructs together with miR-30e-5p mimic (miR-m), miR-30e-5p inhibitor (miR-i), and the corresponding negative controls (NCs). miR: MicroRNA. ** $P < 0.01$ vs NC group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.4 MiR-30e-5p抑制H460细胞增殖和裸鼠体内肿瘤的生长 转染72h后,miR-30e-5p模拟物组H460细胞的增殖能力较对照组下降,而miR-30e-5p抑制物组H460细胞的增殖能力增加($P < 0.01$,图4A、4B)。裸鼠成瘤实验结果(图4C、4D)显示,接种miR-30e-5p过表达H460细胞的小鼠肿瘤体积和肿瘤质量均减少($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。

2.5 MiR-30e-5p诱导H460细胞周期阻滞、促进细胞凋亡 对NC相比,转染miR-30e-5p模拟物后G₀/G₁期H460细胞数目增加,S期细胞数目减少($P < 0.05$);而转染miR-30e-5p抑制物后G₀/G₁期H460细胞数目减少,S期细胞数目升高($P < 0.05$,

图5A)。此外,转染miR-30e-5p模拟物增加H460细胞的凋亡率,而转染miR-30e-5p抑制物可减少细胞凋亡($P < 0.05$,图5B)。

3 讨论

MiR-30e-5p是一种肿瘤抑制基因,在NSCLC组织中表达下调,研究发现在多发性骨髓瘤中miR-30e-5p靶向作用Wnt/ β -catenin/BCL9通路发挥肿瘤抑制功能^[5]。然而,它是通过何种机制抑制NSCLC的发生和发展仍未明确。本研究发现,在NSCLC组织中miR-30e-5p表达下调,由此推测miR-30e-5p与NSCLC的发生、发展具有相关性。

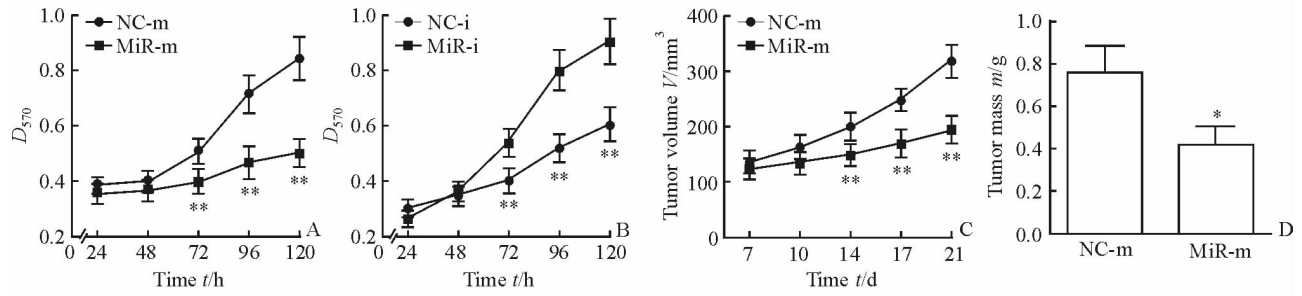


图 4 MicroRNA-30e-5p 对 H460 细胞增殖能力和裸鼠肿瘤生长情况的影响

Fig 4 Effect of microRNA-30e-5p on H460 cell proliferation *in vitro* and tumor growth in nude mice *in vivo*

A, B: Effect of microRNA-30e-5p mimic (miR-m, A) or microRNA-30e-5p inhibitor (miR-i, B) on cell proliferation of H460 cells *in vitro* by MTT assay ($n=3$); C, D: Tumor volume (C) and mass (D) in nude mice by xenograft assay ($n=6$). NC: Negative control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group. $\bar{x} \pm s$

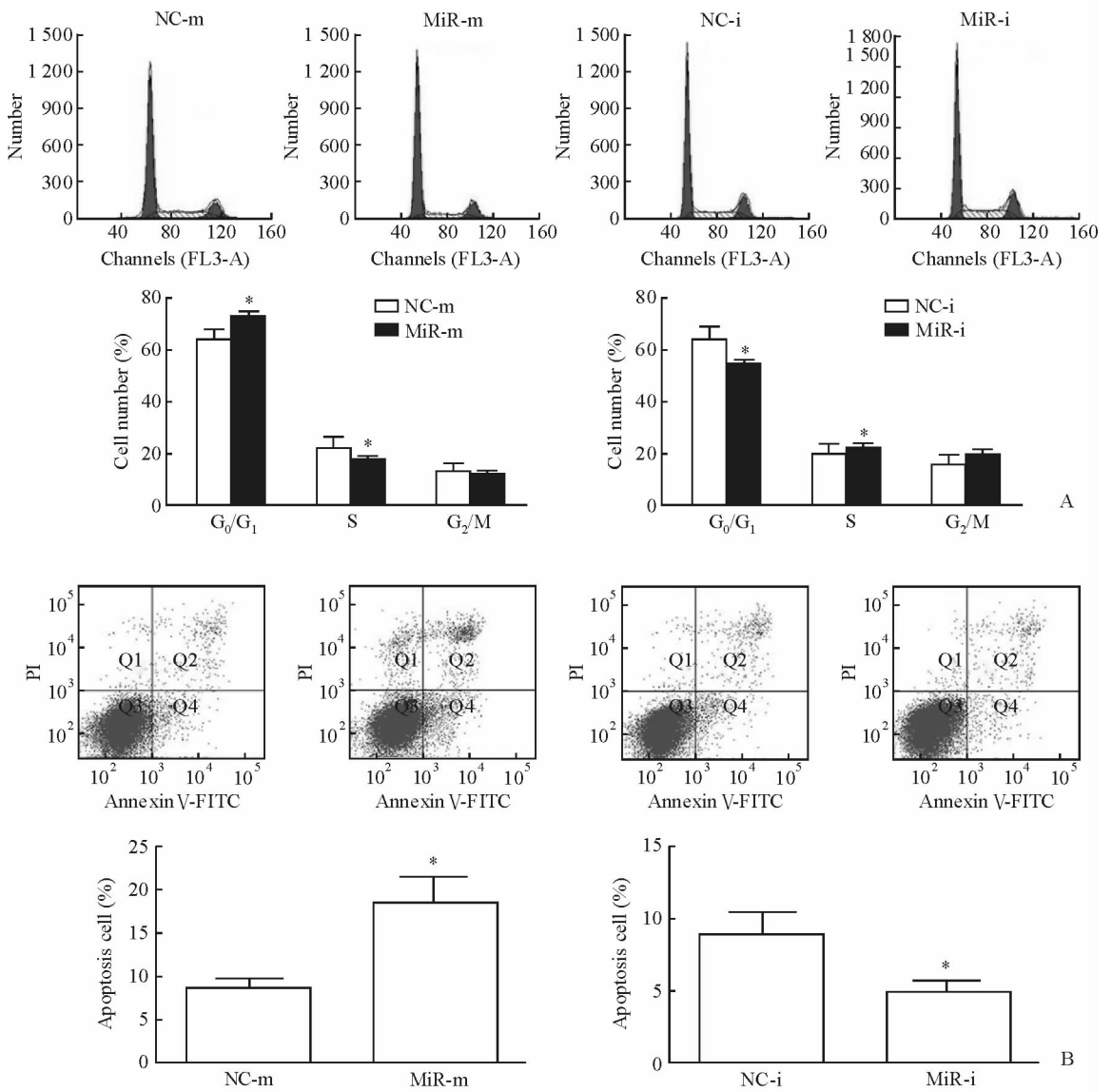


图 5 MiR-30e-5p 对 H460 细胞周期及凋亡的影响

Fig 5 Effect of miR-30e-5p on H460 cells cycle and apoptosis by flow cytometry

A: Effect of miR-30e-5p mimic (miR-m) and miR-30e-5p inhibitor (miR-i) on cell cycle arrest in H460 cells; B: Effect of miR-m and miR-i on cell apoptosis. miR: MicroRNA; NC: Negative control. * $P < 0.05$ vs NC group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

USP22 是近年来发现的泛素水解酶家族的一个新成员,定位于人 17 号染色体上,由 14 个外显子组成,其 cDNA 包含一个长为 1 578 bp 的开放阅读框,可编码 525 个氨基酸,包括半胱氨酸、天冬氨酸、组氨酸和天冬氨酸/天冬酰胺以及泛素水解酶家族去泛素化酶的高度保守区域等。研究表明,USP22 参与肿瘤细胞周期相关基因的调控,并与肿瘤细胞增殖密切相关;此外,USP22 在肿瘤组织中高表达是预后不良的指标^[5]。USP22 可促进肿瘤的形成并在不同肿瘤中表达上调,有研究结果显示在大肠癌组织中 USP22 可通过 Bmi-1 和 p-Akt 通路诱导细胞周期的进展^[21],其也被证明可通过调控上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标志物的表达促进 EMT^[16-18]。然而,USP22 基因在 NSCLC 发展中是否具有关键作用及其具体分子机制如何,目前尚不清楚,而 miR-30e-5p 是否通过调控 USP22 激活下游通路的机制,继而影响 NSCLC 的发生、发展,目前也未见研究报道,因此揭示 miR-30e-5p 与 USP22 的关系以及其在 NSCLC 发生、发展中的具体机制,对于 NSCLC 的治疗有着重要意义。

本研究结果证明在 NSCLC 组织中 USP22 mRNA 及蛋白均呈高表达,而 miR-30e-5p 则呈相反表达,且两者呈负相关,表明 miR-30e-5p 可能通过下调 USP22 影响 NSCLC 发生、发展。在线 TargetScan 生物信息学算法结果显示,UGUUUAC 是 miR-30e-5p 在 USP22 上的特定结合序列,同时荧光素酶报告分析方法结果也证实了 NSCLC 中 miR-30e-5p 通过与 USP22 3'UTR 特异序列结合下调其表达。

细胞的异常增殖和凋亡以及细胞失控在肿瘤的发生、发展中起着重要作用。本研究发现过表达 miR-30e-5p 可抑制 NSCLC 细胞株 H460 的增殖能力;流式细胞术检测结果也发现,过表达 miR-30e-5p 使 G₀/G₁ 期 H460 细胞数目增加,S 期细胞数目减少,且细胞凋亡率增加,表明 miR-30e-5p 可诱导 NSCLC 细胞的细胞周期阻滞、促进细胞凋亡。以上发现从分子水平证明 miR-30e-5p 可通过下调 USP22 抑制 NSCLC 细胞的生长、阻碍细胞周期的进程、促进细胞凋亡,从而抑制 NSCLC 的发生和发展。

此外,本研究通过裸鼠成瘤实验证明在裸鼠体内过表达 miR-30e-5p 可以抑制肿瘤生长,进一步验证了 miR-30e-5p 的抗肿瘤作用,但其在体内是否是通过下调 USP22 来发挥作用,尚需进一步实验证实。

综上所述,miR-30e-5p 可抑制 USP22 蛋白的表达,从而抑制 NSCLC 的发生和发展,上调 miR-30e-5p 可能是 NSCLC 治疗的新方法。下一步研究中我们将探究 miR-30e-5p 调控 USP22 影响 NSCLC 发生和发展的可能通路。

[参考文献]

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, FERLAY J, LORTET-TIEULENT J, JEMAL A. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65: 87-108.
- [2] GOLDSTRAW P, BALL D, JETT J R, LE CHEVALIER T, LIM E, NICHOLSON A G, et al. Non-small-cell lung cancer [J]. Lancet, 2011, 378: 1727-1740.
- [3] HE L, HANNON G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. Nat Rev Genet, 2004, 5: 522-531.
- [4] SOTIROPOULOU G, PAMPALAKIS G, LIANIDOU E, MOURELATOS Z. Emerging roles of microRNAs as molecular switches in the integrated circuit of the cancer cell[J]. RNA, 2009, 15: 1443-1461.
- [5] ZHAO J J, LIN J, ZHU D, WANG X, BROOKS D, CHEN M, et al. miR-30-5p functions as a tumor suppressor and novel therapeutic tool by targeting the oncogenic Wnt/ β -catenin/BCL9 pathway [J]. Cancer Res, 2014, 74: 1801-1813.
- [6] NING J, ZHANG J, LIU W, LANG Y, XUE Y, XU S. Overexpression of ubiquitin-specific protease 22 predicts poor survival in patients with early-stage non-small cell lung cancer[J/OL]. Eur J Histochem, 2012, 56: e46. doi: 10.4081/ejh.2012.e46.
- [7] LI Y, YANG Y, LI J, LIU H, CHEN F, LI B, et al. USP22 drives colorectal cancer invasion and metastasis via epithelial-mesenchymal transition by activating AP4 [J]. Oncotarget, 2017, 8: 32683-32695.
- [8] TANG B, TANG F, LI B, YUAN S, XU Q, TOMLINSON S, et al. High USP22 expression indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma

- [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 12654-12667.
- [9] MARKOU A, SOURVINOU I, VORKAS P A, YOUSEF G M, LIANIDOU E. Clinical evaluation of microRNA expression profiling in non small cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2013, 81: 388-396.
- [10] ZHU J, ZENG Y, XU C, QIN H, LEI Z, SHEN D, et al. Expression profile analysis of microRNAs and downregulated miR-486-5p and miR-30a-5p in non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34: 1779-1786.
- [11] WANG Y, CHEN J, LIN Z, CAO J, HUANG J, JIANG Y, et al. Role of deregulated microRNAs in non-small cell lung cancer progression using fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded samples [J]. *Oncology letters*, 2016, 11: 801-808.
- [12] ZHANG X Y, PFEIFFER H K, THOME A W, McMAHON S B. USP22, an hSAGA subunit and potential cancer stem cell marker, reverses the polycomb-catalyzed ubiquitylation of histone H2A[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7: 1522-1524.
- [13] NING Z, WANG A, LIANG J, XIE Y, LIU J, FENG L, et al. USP22 promotes the G₁/S phase transition by upregulating FoxM1 expression via β -catenin nuclear localization and is associated with poor prognosis in stage II pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45: 1594-1608.
- [14] HE Y, JIN Y J, ZHANG Y H, MENG H X, ZHAO B S, JIANG Y, et al. Ubiquitin-specific peptidase 22 overexpression may promote cancer progression and poor prognosis in human gastric carcinoma[J]. *Trans Res*, 2015, 165: 407-416.
- [15] HU J, LIU Y L, PIAO S L, YANG D D, YANG Y M, CAI L. Expression patterns of USP22 and potential targets BMI-1, PTEN, p-AKT in non-small-cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2012, 77: 593-599.
- [16] HU J, YANG D, ZHANG H, LIU W, ZHAO Y, LU H, et al. USP22 promotes tumor progression and induces epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma[J]. *Lung Cancer*, 2015, 88: 239-245.
- [17] TAN T Z, MIOW Q H, MIKI Y, NODA T, MORI S, HUANG R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients[J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6: 1279-1293.
- [18] LIANG L, SUN H, ZHANG W, ZHANG M, YANG X, KUANG R, et al. Meta-analysis of EMT datasets reveals different types of EMT[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11: e0156839. doi: 10.1371/journal.pone.0156839.
- [19] TANG B, LIANG X, TANG F, ZHANG J, ZENG S, JIN S, et al. Expression of USP22 and survivin is an indicator of malignant behavior in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47: 2208-2216.
- [20] DING F, BAO C, TIAN Y, XIAO H, WANG M, XIE X, et al. USP22 promotes NSCLC tumorigenesis via MDMX up-regulation and subsequent p53 inhibition [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 16: 307-320.
- [21] LIN Z, YANG H, KONG Q, LI J, LEE S M, GAO B, et al. USP22 antagonizes p53 transcriptional activation by deubiquitinating Sirt1 to suppress cell apoptosis and is required for mouse embryonic development[J]. *Mol Cell*, 2012, 46: 484-494.

[本文编辑] 曾奇峰