

USP7促进结肠癌细胞干性特征及奥沙利铂耐药

刘小涵, 邹宇*

(中国医科大学基础医学院, 辽宁 沈阳 110122)

摘要: **目的** 研究泛素特异性蛋白酶7(USP7)对人结肠癌HCT116细胞干性特征及奥沙利铂(OXA)耐药的影响。**方法** 构建HCT116 OXA耐药细胞株,检测USP7的表达水平;分别转染siCON、USP7-si1和USP7-si2,采用免疫印记法验证敲减效率;通过克隆形成实验检测细胞增殖能力;qPCR实验检测结肠癌细胞干性相关基因的mRNA水平;CCK-8实验检测细胞对OXA的敏感性。**结果** USP7在OXA耐药HCT116细胞中表达水平上调,敲减USP7能够显著抑制HCT116细胞的增殖能力($P<0.01$),抑制结肠癌干性相关基因的表达和OXA耐药性($P<0.01$)。**结论** USP7能够促进结肠癌HCT116细胞的干性特征并介导OXA耐药。

关键词: 泛素特异性蛋白酶7;结肠癌细胞;奥沙利铂耐药;肿瘤细胞干性

中图分类号: R735.34

文献标志码: A

文章编号: 1004-6879(2026)03-0181-05

USP7 promotes the stemness characteristics of colon cancer cell and induces oxaliplatin resistance

LIU Xiaohan, ZOU Yu*

(College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110122, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of USP7 on the stemness characteristics and oxaliplatin resistance of human colon cancer HCT116 cells. **Methods** Oxaliplatin-resistant HCT116 cell line was established, and the expression level of USP7 was detected. Si-CON, USP7-si1, and USP7-si2 were transfected respectively, and the knockdown efficiency was verified by immunoblotting. Colony formation assays were used to assess cell proliferation ability. qPCR was performed to detect the expression levels of cancer stemness-related genes. CCK-8 assays were employed to evaluate the sensitivity of cells to oxaliplatin. **Results** USP7 expression was upregulated in oxaliplatin-resistant HCT116 cells. Knockdown of USP7 significantly inhibited the proliferation ability of HCT116 cells ($P<0.01$) and suppressed the expression of cancer stemness-related genes and oxaliplatin resistance ($P<0.01$). **Conclusion** USP7 can promote the stemness characteristics of colon cancer HCT116 cells and mediate oxaliplatin resistance.

Key words: USP7; colon cancer cell; oxaliplatin resistance; cancer stemness

USP7又称疱疹病毒相关泛素特异性蛋白酶,是一种去泛素化酶,其通过去除靶蛋白上的泛素分子,调控蛋白质的稳定、定位及功能,从而参与细胞周期调控、肿瘤发生、DNA损伤修复等多种生物学过程^[1-2]。结肠癌是男性人群中仅次于前列腺癌、肺癌,女性人群中仅次于乳腺

癌、肺癌的第三大常见非皮肤恶性肿瘤,全球年死亡人数超90万^[3-4]。肿瘤干细胞是指具有自我更新和分化为肿瘤组织的能力、具有肿瘤异质性的细胞,近年来有研究发现^[5-6],肿瘤干细胞与结肠癌细胞耐药性相关。因此,本研究拟探究USP7对结肠癌细胞干性特征及耐药的影响。

资助项目:国家自然科学基金资助项目(82102740)

作者简介:刘小涵(1996—),女,博士,讲师,研究方向:肿瘤干细胞。

*通信作者:邹宇(1995—),女,博士,讲师,研究方向:蛋白质翻译后修饰;E-mail:yzou@cmu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

USP7多克隆兔抗(1:1 000)和 β -Actin多克隆兔抗(1:5 000)购自武汉爱博泰克公司;USP7小干扰RNA(si-CON、USP7-si1、USP7-si2)购自广州锐博生物技术有限公司;脂质体jetPRIME购自Polyplus。

1.2 细胞培养、传代、构建耐药株

人结肠癌细胞HCT116购自中国科学院细胞库,使用McCoy's 5A培养基 + 10%胎牛血清 + 1%双抗进行培养,每天换液。传代间隔时间为2 d,待细胞生长至对数生长期,采用OXA浓度递增1 μ M,翻倍递增至8 μ M诱导HCT116细胞耐药。当诱导细胞在含2 μ M OXA的培养液中可以稳定生长传代时,即为OXA耐药HCT116细胞(以下简称HCT116 OXA-R)。

1.3 细胞转染

将HCT116 OXA-R细胞按 5×10^5 /孔接种于6孔板,12 h后达到50%的汇合度开始转染。转染前无血清培养基培养细胞4 h,按照jetPRIME说明书转染si-CON、USP7-si1和USP7-si2。转染48 h后,进行后续实验。

1.4 qPCR

收集细胞,Trizol法抽提细胞总RNA,使用PrimeScript RT reagent试剂盒将mRNA逆转录为cDNA,实时荧光定量PCR扩增目的基因。反应条件如下:93 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,总共40个循环,最后70 $^{\circ}$ C反应5 min。实验设置3个复孔,每个实验重复3次。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算以下基因的相对表达量。

USP7引物序列:前引物5'-GGAAGCGGGAGATACAGATGA-3',后引物5'-AAGGACCGACTCACTCAGTCT-3';CD44引物序列:前引物5'-CTGCCGCTTTGCAGGTGTA-3',后引物5'-CATTGTGGGCAAGGTGCTATT-3';CD133引物序列:前引物5'-CCACAGATGCTCCTAAGGCT-3',后引物5'-AGCGAGTACTCAGGTTGCAC-3';OCT4引物序列:前引物5'-GCTGGATGTCAGGGCTCTTT-3',后引物5'-AACCACACTCGGACCACATC-3';Nanog引物序列:前引物5'-TTTGTGGGCCTGAAGAAACT-3',后引物5'-AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG-3';SOX2引物序列:前引物5'-CTCGTGACGTTCTACTCGTCG-3',后引物5'-AGCTCTCGGTCAGGTCCTTT-3';GAPDH

前引物5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',后引物5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。

1.5 CCK-8实验

将转染后的细胞用胰酶消化,重悬并计数,取约5 000个细胞/孔种植于96孔板,加入含2 μ M OXA的培养基,48 h后弃去孔内液体,加入CCK-8工作液100 μ L,培养1 h,测定450 nm波长的吸光度(OD值),以空白孔(仅含CCK8工作液)调零。细胞存活率(%)=(实验组OD值-空白OD值)/(对照组OD值-空白OD值) $\times$ 100%。

1.6 免疫印迹法

向细胞中加入含蛋白酶抑制剂的Lysis buffer进行蛋白提取,采用BCA法定量蛋白,8% SDS-PAGE凝胶电泳,湿转法转膜,5% BSA室温封闭2 h,使用TBST稀释USP7和 β -Actin,一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,第二天TBST洗膜10 min $\times$ 3次,使用TBST稀释的二抗室温孵育2 h,TBST 10 min $\times$ 3次,凝胶成像仪成像,使用Image J分析电泳条带灰度值并计算相对表达量。

1.7 克隆形成实验

将转染后的细胞用胰酶消化并接种于6孔细胞培养板培养。约2周后,当培养板中出现肉眼可见克隆时终止培养,去除培养基,PBS洗涤2次,晾干后结晶紫染色,计算克隆形成率。

1.8 成球实验

消化细胞,将细胞重悬在成球实验培养基(干细胞培养基)中,并通过400目滤网过滤,得到单细胞悬液。准确计数1 000个细胞,将其重悬在2 mL干性培养基中,并转移到低黏附六孔板中,继续培养。两周后,将低黏附六孔板置于显微镜下,统计直径大于100 μ m的球体并计算比例。

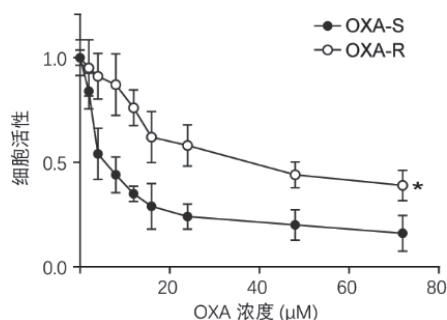
1.9 统计学分析

使用Graphad 9.0软件分析,其中2组样本间的数据比较采取独立样本 *t* 检验;多组样本数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

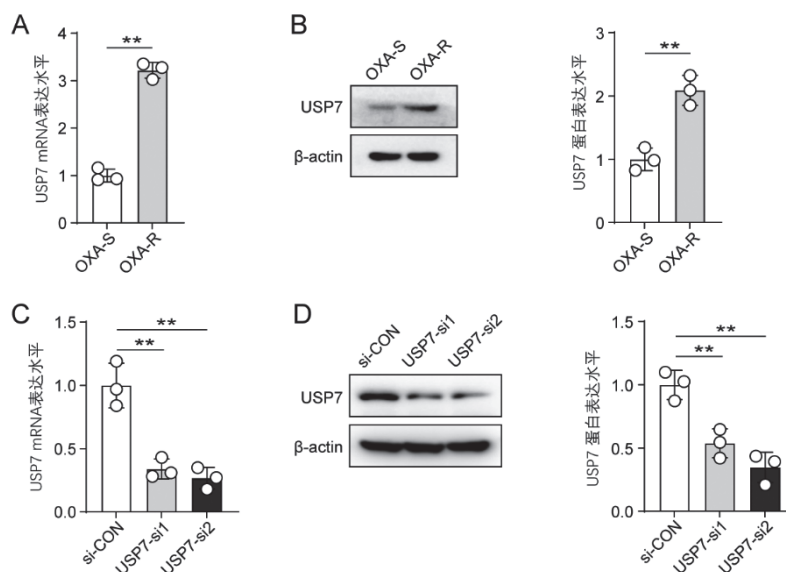
2.1 OXA耐药HCT116细胞的构建

如图1所示,与HCT116细胞(即OXA敏感细胞,以下简称OXA-S)相比,OXA对耐药HCT116细胞(以下简称OXA-R)的抑制率明显降低($P < 0.05$),OXA在OXA-R细胞组的IC50远大于OXA-S细胞组。



注: $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图1 OXA耐药细胞的细胞活性检测

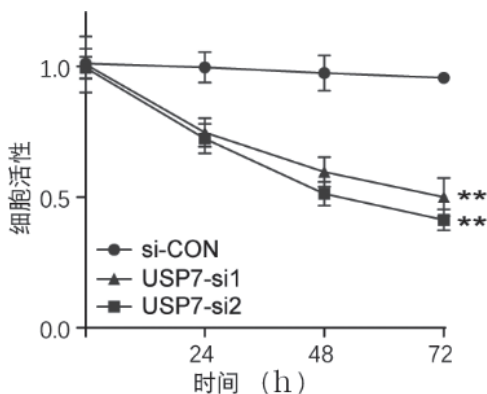


注: A. qPCR检测OXA敏感细胞和耐药细胞中USP7的mRNA水平; B. WB检测OXA敏感细胞和耐药细胞中USP7的蛋白质水平和统计定量分析; C. qPCR检测转染si-USP7细胞中的USP7 mRNA水平; D. WB检测转染si-USP7细胞中USP7的蛋白质水平和统计定量分析; $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图2 OXA耐药HCT116细胞中USP7的表达水平检测

2.3 敲减USP7抑制HCT116 OXA-R细胞OXA耐药

如图3所示,较Control组相比,转染si-USP7后,OXA对HCT116 OXA-R细胞的抑制率显著升高 ($P < 0.01$)。



注: $P < 0.01$, $n = 3$ 。

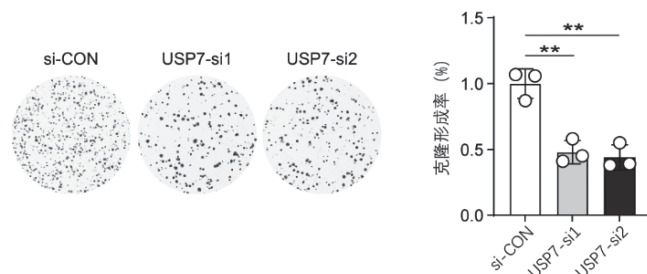
图3 转染si-USP7的OXA耐药细胞的细胞活性检测

2.2 HCT116 OXA-R细胞中USP7的表达水平上调

如图2所示,与HCT116 OXA-S细胞相比,OXA-R细胞中USP7的mRNA水平(图2A)及蛋白水平(图2B)显著升高 ($P < 0.01$),在HCT116 OXA-R细胞中敲减USP7,发现较Control组相比,转染si-USP7后,HCT116 OXA-R细胞中USP7的mRNA水平(图2C)及蛋白水平(图2D)均明显降低 ($P < 0.01$)。

2.4 敲减USP7抑制HCT116 OXA-R细胞克隆形成

如图4所示,较Control组相比,转染si-USP7后,HCT116 OXA-R细胞的克隆形成率明显降低 ($P < 0.01$)。



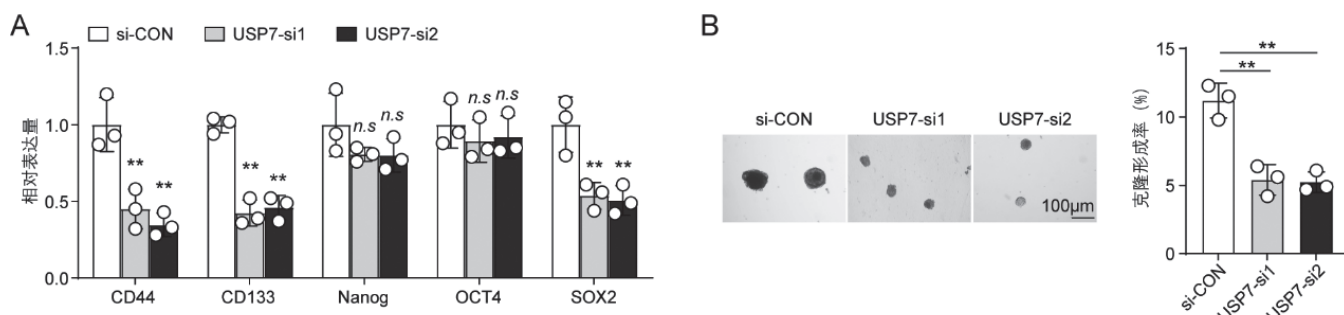
注: $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图4 转染si-USP7的OXA耐药细胞的克隆形成率检测

2.5 敲减USP7抑制HCT116 OXA-R细胞的干性特征

有研究表明结肠癌细胞的耐药性与其干性特征密切相关^[5]。因此,本研究检测了USP7敲减细胞干性相关基因CD44、CD133、Nanog、OCT4及SOX2的表达水平,如图5A所示,与Control组相比,转染si-USP7后,HCT116

OXA-R细胞中CD44、CD133及SOX2的mRNA水平明显降低。本研究进一步进行了成球实验,如图5B所示,与Control组相比,转染si-USP7后,HCT116 OXA-R细胞的成球能力显著降低($P<0.01$)。



注:A. qPCR检测转染si-USP7的OXA耐药细胞 CD44、CD133、Nanog、OCT4和SOX2的mRNA水平;B. 成球实验检测转染si-USP7的OXA耐药细胞的成球率;** $P<0.01$, $n=3$ 。

图5 转染si-USP7的OXA耐药细胞的干性特征检测

3 讨论

结肠癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,其发病率呈逐年上升趋势,也是全球癌症相关死亡的第二大原因^[7]。尽管随着治疗手段的发展,结肠癌患者的临床结局有所改善,但其总体生存率仍不尽如人意^[8]。OXA是一种第三代铂类化合物,可抑制基因转录和DNA合成,常用于结肠癌患者术后化疗方案中^[9]。然而,癌细胞最终会产生耐药性,这一现象通过多种机制阻碍了OXA的疗效^[10]。因此,明确结肠癌细胞对OXA产生耐药性的精确分子机制至关重要。

USP7是泛素蛋白酶体系统的成员,已被报道在乳腺癌、前列腺癌等多种癌症中表达上调,且其表达水平与肿瘤侵袭性、患者不良预后相关^[1]。研究发现^[11-12],USP7可以通过去泛素化修饰Chk1和Claspin,促进细胞周期进展,甚至在DNA损伤时仍允许细胞增殖。c-Myc和N-Myc是维持肿瘤干细胞干性的致癌转录因子,研究表明USP7能够调控c-Myc和N-Myc从而促进肝癌等肿瘤增殖^[13-14]。在免疫方面,USP7去泛素化p65(NF- κ B亚基)激活NF- κ B通路,进而促进了IL-6、TNF- α 等促炎因子表达,并招募肿瘤相关巨噬细胞,促进肿瘤增长^[15]。在胃癌细胞中,USP7可直接与PD-L1相互作用,通过去泛素化修饰稳定PD-L1蛋白。这种稳定作用使得PD-L1能够持续表达并与T细胞

表面PD-1结合,从而抑制T细胞的细胞毒性作用,促进肿瘤细胞逃避免疫杀伤^[16-17]。然而,USP7在结直肠癌中的作用仍不明确。

本研究发现,USP7在结肠癌OXA耐药细胞中表达上调,敲减USP7能显著降低HCT116 OXA-R细胞的耐药性。随后,进一步检测了干性相关基因的表达,并进行了成球实验,结果表明敲减USP7可导致HCT116 OXA-R细胞中CD44、CD133及SOX2的表达水平以及成球能力降低。因此初步得出结论:USP7能够促进结肠癌细胞干性特征并介导OXA耐药。

综上所述,USP7在OXA耐药结肠癌细胞中表达上调,敲减USP7能够显著降低结肠癌细胞的干性特征并从一定程度上逆转OXA耐药,其分子机制仍有待后续深入研究。

参考文献

- [1] Saha G, Roy S, Basu M, et al. USP7 - a crucial regulator of cancer hallmarks[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2023, 1878(3): 188903.
- [2] Liu X, Lu R, Yang Q, et al. USP7 reduces the level of nuclear DICER, impairing DNA damage response and promoting cancer progression[J]. Mol Oncol, 2024, 18(1): 170-189.

- [3] 国星奇,宿濛. 西红花酸通过PI3K/Akt通路抑制结肠癌细胞恶性发展[J]. 解剖科学进展, 2024, 30(3): 237-239.
- [4] Kotula AE, Korde YV, Oyler HJ, et al. Colorectal polyps: pathophysiology, malignant potential, and advancements in therapeutic strategies[J]. Med Oncol, 2025, 42(8): 287.
- [5] Telang N. Drug-resistant stem cells: novel approach for colon cancer therapy[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(5): 2519.
- [6] 陈雪霁,丁玉霞,朱波. CST1靶向OTUB1对胃癌干细胞特性的影响[J]. 解剖科学进展, 2024, 30(6): 641-644.
- [7] Abedizadeh R, Majidi F, Khorasani HR, et al. Colorectal cancer: a comprehensive review of carcinogenesis, diagnosis, and novel strategies for classified treatments[J]. Cancer Metastasis Rev, 2024, 43(2): 729-753.
- [8] Qiu L, Luo W, Chen Y, et al. The incidence, mortality, and survival rate of colorectal cancer in Xiamen, China, from 2011 to 2020[J]. BMC Public Health, 2025, 25(1): 176.
- [9] Zeng K, Li W, Wang Y, et al. Inhibition of CDK1 overcomes oxaliplatin resistance by regulating ACSL4-mediated ferroptosis in colorectal cancer[J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10(25): e2301088.
- [10] 国星奇,宿濛. 熊果酸抑制自噬增强结肠癌对奥沙利铂的敏感性[J]. 解剖科学进展, 2024, 30(2): 139-141, 145.
- [11] Alonso-de Vega I, Martin Y, Smits VA. USP7 controls Chk1 protein stability by direct deubiquitination[J]. Cell Cycle, 2014, 13(24): 3921-3926.
- [12] Faustrup H, Bekker-Jensen S, Bartek J, et al. USP7 counteracts SCFbetaTrCP- but not APCCdh1-mediated proteolysis of Claspin[J]. J Cell Biol, 2009, 184(1): 13-19.
- [13] Hou R, Li Y, Luo X, et al. ENKUR expression induced by chemically synthesized cinobufotalin suppresses malignant activities of hepatocellular carcinoma by modulating beta-catenin/c-Jun/MYH9/USP7/c-Myc axis[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(6): 2553-2567.
- [14] Tavana O, Li D, Dai C, et al. HAUSP deubiquitinates and stabilizes N-Myc in neuroblastoma[J]. Nat Med, 2016, 22(10): 1180-1186.
- [15] Mitxitorena I, Somma D, Mitchell JP, et al. The deubiquitinase USP7 uses a distinct ubiquitin-like domain to deubiquitinate NF-kB subunits[J]. J Biol Chem, 2020, 295(33): 11754-11763.
- [16] Wang Z, Kang W, Li O, et al. Abrogation of USP7 is an alternative strategy to downregulate PD-L1 and sensitize gastric cancer cells to T cells killing[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(3): 694-707.
- [17] 温清国,蔡为为,赵睿喧,等. 吉非替尼耐药肺癌HCC827/GR细胞对与其共培养的巨噬细胞M2极化的影响[J]. 解剖科学进展, 2024, 30(6): 645-649.

(收稿日期:2025-08-05)

桑白皮总黄酮对大鼠急性肝损伤的保护作用

李 博,张凤怡,尹浩羽,白梦璇,赵 娟*,王 途*

(承德医学院基础医学院,河北 承德 067000)

摘要: **目的** 探讨桑白皮总黄酮(TFMB)通过拮抗U II/UT系统、调控JAK2/STAT3信号通路防治急性肝损伤(ALI)的作用。**方法** 将大鼠随机分为对照组、ALI模型组、MgIG组、Urantide组、TFMB组。MgIG组和Urantide组分别静脉注射MgIG和Urantide,剂量为10 mg·kg⁻¹,TFMB组分别灌胃1.8、3.6、7.2 g·kg⁻¹;对照组和ALI模型组给予等量生理盐水,各组治疗周期均为连续14 d。**结果** ALI模型组大鼠的病理表现为肝脏明显水肿、严重脂肪变性、肝窦扩张,EIF4EBP1、p-p70s6蛋白表达增高,同时U II/UT系统及JAK2/STAT3通路被激活,p-JAK2、p-STAT3主要

资助项目:河北省自然科学基金中医药联合基金重点项目(H2023406017);河北省自然科学基金(H2020406011);河北省教育厅高校重点学科建设项目(冀教高[2013]4号);河北省高等学校科学研究青年基金(QN2024116);承德医学院基本科研业务费(KY202227);承德医学院学科建设经费

作者简介:李博(2003—),女,本科在读,研究方向:急性肝损伤的预防。

*通信作者:王途(1993—)男,硕士,讲师,研究方向:肝损伤机制研究;E-mail:wangtu522@cdmc.edu.cn;

赵娟(1981—)女,博士,教授,研究方向:肝损伤机制研究;E-mail:zhaojuan@cdmc.edu.cn。