

去泛素化酶JOSD2通过调控DNA损伤修复影响非小细胞肺癌细胞对抗肿瘤药物的敏感性

葛孚晶,刘湘宁,张鸿宇,袁涛,朱虹,杨波,何俏军

浙江大学药学院,浙江杭州310058

[摘要] 目的:研究去泛素化酶含约瑟芬结构域2蛋白(JOSD2)对非小细胞肺癌(NSCLC)恶性进展的调控作用及其分子机制。方法:从基因表达数据库下载NSCLC转录组表达数据及临床资料,利用主成分分析、limma差异分析和基因表达量分析考察NSCLC中表达水平显著上调的去泛素化酶相关基因;利用Kaplan-Meier生存分析算法考察不同去泛素化酶对NSCLC患者总生存期的影响;利用基因本体论富集分析和基因集富集分析考察高表达JOSD2的患者中信号通路的变化情况;利用基因集变异分析和皮尔逊相关性分析考察JOSD2表达水平与DNA损伤反应(DDR)通路的相关性;利用蛋白质印迹法考察JOSD2和DNA损伤修复通路相关蛋白的表达水平;利用免疫荧光法考察JOSD2在细胞内亚定位的变化;利用磺酰罗丹明染色法考察敲低JOSD2对DNA损伤类药物的敏感性。结果:与癌旁组织比较,NSCLC组织中JOSD2的表达量显著上调($P<0.05$),且与NSCLC患者的不良预后显著相关($P<0.05$);与低表达JOSD2的组织比较,高表达JOSD2的NSCLC组织中DDR相关途径显著激活(均 $P<0.05$),且JOSD2的表达水平与DDR相关途径激活程度呈显著正相关(均 $P<0.01$);与对照组比较,过表达JOSD2显著促进NSCLC细胞系的DDR过程,此外,DNA损伤剂处理可显著提高JOSD2的细胞核定位,而敲低JOSD2显著增强NSCLC细胞对DNA损伤剂的敏感性(均 $P<0.05$)。结论:JOSD2通过促进DNA损伤修复途径调控NSCLC的恶性进展,而敲低JOSD2可显著增强NSCLC细胞对DNA损伤剂的敏感性。



[关键词] 非小细胞肺癌;去泛素化酶;DNA损伤修复;药物敏感性

[中图分类号] R734.2 [文献标志码] A

Deubiquitinating enzyme JOSD2 affects susceptibility of non-small cell lung carcinoma cells to anti-cancer drugs

收稿日期(Received):2023-05-30 接受日期(Accepted):2023-09-12 网络预发表日期(Online):2023-10-03

基金项目(Funding):浙江省重点研发计划(2022C03077)

第一作者(First author):葛孚晶,博士研究生,主要从事肿瘤和内分泌药理相关研究;E-mail:3160105302@zju.edu.cn;
https://orcid.org/0000-0003-2742-0200

通信作者(Corresponding author):何俏军,教授,博士生导师,主要从事药理毒理学研究及新药研发;E-mail:qiaojunhe@zju.edu.cn;https://orcid.org/0000-0002-0104-6989

through DNA damage repair

GE Fujing, LIU Xiangning, ZHANG Hongyu, YUAN Tao, ZHU Hong, YANG Bo, HE Qiaojun (College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Corresponding author: HE Qiaojun, E-mail: qiaojunhe@zju.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-0104-6989>

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the effects and mechanisms of deubiquitinating enzyme Josephin domain containing 2 (JOSD2) on susceptibility of non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cells to anti-cancer drugs. **Methods:** The transcriptome expression and clinical data of NSCLC were downloaded from the Gene Expression Omnibus. Principal component analysis and limma analysis were used to investigate the deubiquitinating enzymes up-regulated in NSCLC tissues. Kaplan-Meier analysis was used to investigate the relationship between the expression of deubiquitinating enzymes and overall survival of NSCLC patients. Gene ontology enrichment and gene set enrichment analysis (GSEA) were used to analyze the activation of signaling pathways in NSCLC patients with high expression of *JOSD2*. Gene set variation analysis and Pearson correlation were used to investigate the correlation between *JOSD2* expression levels and DNA damage response (DDR) pathway. Western blotting was performed to examine the expression levels of *JOSD2* and proteins associated with the DDR pathway. Immunofluorescence was used to detect the localization of *JOSD2*. Sulforhodamine B staining was used to examine the sensitivity of *JOSD2*-knock-down NSCLC cells to DNA damaging drugs. **Results:** Compared with adjacent tissues, the expression level of *JOSD2* was significantly up-regulated in NSCLC tissues ($P<0.05$), and was significantly correlated with the prognosis in NSCLC patients ($P<0.05$). Compared with the tissues with low expression of *JOSD2*, the DDR-related pathways were significantly upregulated in NSCLC tissues with high expression of *JOSD2* (all $P<0.05$). In addition, the expression of *JOSD2* was positively correlated with the activation of DDR-related pathways (all $P<0.01$). Compared with the control group, overexpression of *JOSD2* significantly promoted the DDR in NSCLC cells. In addition, DNA damaging agents significantly increase the nuclear localization of *JOSD2*, whereas depletion of *JOSD2* significantly enhanced the sensitivity of NSCLC cells to DNA damaging agents (all $P<0.05$). **Conclusion:** Deubiquitinating enzyme *JOSD2* may regulate the malignant progression of NSCLC by promoting DNA damage repair pathway, and depletion of *JOSD2* significantly enhances the sensitivity of NSCLC cells to DNA damaging agents.

[**Key words**] Non-small cell lung carcinoma; Deubiquitinating enzyme; DNA damage repair; Drug sensitivity

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2023, 52(5): 533-543.]

[**缩略语**] 非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC);去泛素化酶(deubiquitinating enzymes, DUB);磺酰罗丹明B(sulforhodamine B, SRB);含约瑟芬结构域2蛋白(Josephin domain containing 2, JOSD2);甘油醛-3-磷酸脱氢酶

(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH); 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenyl indole, DAPI); 基因本体论(Gene Ontology, GO); 基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA); 基因集变异分析(Gene Set Variation Analysis, GSVA); 磷酸化组蛋白 H2AX (γ -H2A histone family member X, γ -H2AX); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS); 含0.05%吐温-20的PBS (PBS with 0.05% Tween-20, PBST); 蛋白酶体 26S 亚基非 ATP 酶(proteasome 26S subunit, non-ATPase, PSMD); 泛素特异性加工酶家族蛋白(ubiquitin-specific proteases, USP); DNA损伤反应(DNA damage response, DDR); 半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50}); Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(Kirsten rats arcomaviral oncogene homolog, KRAS); 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR); 间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK); 吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO); Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP); 具有 PDZ 结合基序的转录共激活因子(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ); 连环素 β 1 (catenin beta1, CTNNB1); 组蛋白脱乙酰酶(histone deacetylase, HDAC); 非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ); 乳腺癌相关基因(breast cancer-related gene, BRCA)

据统计,近年来亚洲新发肺癌患者逐年增加,我国肺癌发病率和病死率也呈逐年上升趋势^[1]。肺癌中 80%~85% 为 NSCLC, 其具有发病隐匿、早期症状不明显的特点,确诊时往往为中晚期,病死率居高不下,患者 5 年存活率不到 20%^[2-4]。近年来,虽然针对 NSCLC 的分子靶向药物治疗获得一定进展,但仍有 70%~80% 的 NSCLC 患者无法从中获益。因此,迫切需要探究 NSCLC 进展的分子机制,寻找治疗 NSCLC 新的靶点,从而开发行之有效的靶向治疗策略。

泛素化修饰是一种动态可逆的翻译后修饰,在细胞的蛋白降解途径中发挥重要调控作用^[5]。DUB 能够特异性地移除底物蛋白上的泛素链,从而调控多种底物蛋白的降解过程。近年大量文献报道,DUB 通过调控细胞内多种信号通路,从而影响细胞周期和凋亡,并最终促进宫颈癌、黑色素瘤和前列腺癌等肿瘤的恶性进展^[6-11]。因此,针对 DUB 展开研究有望发现治疗 NSCLC 新的靶点,为 NSCLC 治疗提供新的思路。本研究基于公共数据库中数据的生物信息学分析,全面考察了 NSCLC 中发挥关键调控作用的 DUB,并分析其中分子机制,旨在为 NSCLC 的治疗提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

人 NSCLC 细胞株 PC-9 和 NCI-H1299 购自中

国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;依托泊苷、多柔比星和奥拉帕尼为美国 MedChemExpress 公司产品;RPMI-1640 培养基、胎牛血清、Opti-MEM[®]、非必需氨基酸和 L-谷氨酰胺为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;SRB、丙酮酸钠、聚凝胺和 JOSD2 抗体为美国 Sigma-Aldrich 公司产品;GADPH 抗体为戴格生物技术有限公司产品; γ -H2AX 抗体为美国 Cell Signaling Technology 公司产品;辣根过氧化物酶标记二抗(兔抗与鼠抗)为杭州联科生物技术股份有限公司产品;DAPI 为美国 Dojindo Molecular Technologies 公司产品;pCDH-JOSD2-HA 质粒为山东维真生物科技有限公司产品;jetPRIME[®]为法国 Polyplus 公司产品;si-JOSD2 为上海吉玛制药技术有限公司产品。

细胞培养箱和生物安全柜为美国 Thermo Electron 公司产品;普通倒置显微镜和荧光显微镜为德国 Leica 公司产品;电泳及转膜装置为美国 Bio-Rad 公司产品;AI 600 成像仪为美国 GE 公司产品;多功能酶标仪为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品。

1.2 NSCLC 基因表达数据及临床资料的收集

从基因表达数据库(Gene Expression Omnibus)下载 NSCLC 转录组表达数据及临床资料,筛选条件:①物种为人类;②疾病类型为 NSCLC;③肿瘤原发位点为肺部;④数据形式为高通量测序或芯

片数据;⑤数据类型为基因表达定量;⑥数据集样本数100例及以上;⑦其余筛选条件为默认或不选。下载各数据集的基因表达矩阵和分组信息,在R 4.2.1软件中利用相应的R软件包进一步处理。

1.3 筛选与NSCLC患者预后相关的DUB相关差异表达基因

首先,将不同数据集转录组测序数据进行数据清洗,并根据样本来源分为正常组织和NSCLC组织。然后使用R软件包factoMineR 2.8和factoextra 1.0.7进行主成分分析及可视化。接着,使用R软件包limma 3.42.2进行数据比较并计算差异表达基因,筛选上调差异表达基因的标准为 $P < 0.05$ 且差异倍数大于1,筛选下调差异表达基因的标准为 $P < 0.05$ 且差异倍数为 $>0 \sim <1$ 。再将多个数据集中的差异表达基因与DUB列表取交集筛选出DUB相关差异表达基因,并使用R软件包ggplot2 3.4.2对各数据集中的DUB相关差异表达基因的表达水平进行可视化。最后,使用Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com/analysis/>)数据库分析NSCLC样本中差异表达的DUB表达量对患者总生存期的影响,筛选出与NSCLC患者预后相关的DUB相关差异表达基因。

1.4 基因富集分析考察JOSD2高表达患者信号通路的变化情况

将数据集NSCLC样本按照JOSD2表达量中位数分为JOSD2高表达组和低表达组,利用limma分析筛选组间差异表达基因,并采用R软件包clusterProfiler 4.0进行GO与GSEA富集分析。GO富集分析包括生物过程、分子功能和细胞组分三个层次。R软件包org.Hs.eg.db 3.10.0用于ID转换。GSEA分析参考基因集数据库MSigDB (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/>)进行注释。使用R软件包GSVA 1.48.0进行GSVA分析,并通过皮尔逊相关系数评估JOSD2表达水平与DNA修复相关生物学功能的相关性。

1.5 细胞培养

PC-9和NCI-H1299细胞在添加10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的RPMI-1640培养基中,置于培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳)中培养。待细胞生长至合适密度时进行传代培养,经0.05%胰蛋白酶消化传代,所有实验细胞均传代十代以内。

1.6 转染JOSD2过表达质粒

待PC-9细胞长至适宜密度时开始转染,按照jetPRIME[®]转染试剂说明将Jet-Buffer、pCDH-JOSD2-HA质粒和Jet-PRIME共转染至PC-9细胞,转染4~6 h后更换成新鲜培养基,并按照实验目的进行后续实验操作。

1.7 构建DNA损伤细胞模型

待PC-9细胞长至适宜密度时,利用DNA损伤诱导剂多柔比星和依托泊苷构建DNA损伤模型。利用梯度浓度的多柔比星(1、2 $\mu\text{mol}/\text{L}$)和梯度浓度的依托泊苷(100、200 $\mu\text{mol}/\text{L}$)处理细胞8 h,构建长时间内DNA损伤修复模型。依据造模效果,选定200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 浓度的依托泊苷分别处理细胞0、1、2、4、6、8 h,构建时间梯度的DNA损伤修复模型。

1.8 蛋白质印迹法考察JOSD2和DNA损伤修复通路相关蛋白的表达水平

收集处理后的PC-9或NCI-H1299细胞,加入2.5 \times 上样缓冲液裂解细胞,后置于95 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴加热变性30 min制成样本。样本进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜至聚偏二氟乙烯膜后用5%脱脂牛奶封闭1 h,加入 γ -H2AX一抗(1:1000)、JOSD2一抗(1:1000)和内参GAPDH抗体稀释液(1:3000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。1 \times PBST漂洗三次后,加入对应属性的二抗稀释液(1:5000)室温孵育1 h,1 \times PBST漂洗三次将ECL显影液按照1:1的比例配置,混合后均匀覆盖于聚偏二氟乙烯膜表面,采用AI-600曝光仪进行曝光采集图像。

1.9 免疫荧光法考察JOSD2细胞内定位

生长至合适密度的细胞弃去培养液,加入适量的4%多聚甲醛固定以及含有0.1% Triton X-100的1 \times PBS透化细胞后,使用含有4%牛血清白蛋白的1 \times PBS封闭细胞,随后使用JOSD2荧光一抗(按1:100用4%牛血清白蛋白的1 \times PBS进行稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第二天弃去荧光一抗,用1 \times PBS洗涤,并加入荧光二抗孵育液(按1:100稀释),室温孵育1 h。弃去荧光二抗,用1 \times PBS洗涤后加入抗褪色的DAPI染色液(按1:1000稀释),1 \times PBS洗涤。加入适量体积的抗淬灭剂封片,置于风机下吹干后,用荧光显微镜拍照。

1.10 SRB染色考察细胞存活率

利用细胞转染技术进行RNA干扰实验,构造阴性对照siRNA和si-JOSD2的NCI-H1299细胞

系。待NCI-H1299细胞生长至合适密度时,分别以 3.0×10^4 个/孔的细胞密度接种于96孔板中(100 μ L/孔),于细胞培养箱中培养24 h后,给予梯度浓度的多柔比星(200.00、100.00、50.00、25.00、12.50和6.25 nmol/L)和奥拉帕尼(50.00、25.00、12.50、6.25、3.13和1.56 μ mol/L)孵育72 h。孵育结束弃上清液,每孔加入100 μ L 10%三氯乙酸溶液固定,弃培养液,用双蒸水洗涤后烘干。每孔加入100 μ L SRB染色液(用1%冰醋酸配置,每500 mL加入1.5~2.0 g SRB粉末),室温放置20 min,用1%冰醋酸洗涤干净后烘干。每孔加入100 μ L Tris-base碱溶液溶解结合到细胞内的SRB染色液,置于室温摇床20 min后,在波长为515 nm下检测吸光度,计算细胞存活率。实验独立重复三次,每次设置三个复孔。

1.11 统计学方法

采用RStudio、Excel软件和Graphpad Prism 7软件进行实验数据的分析和绘图。计量数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用双侧student's *t*检验分析两组数据间的差异,采用one-way ANOVA分析多组数据间的差异, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 JOSD2在NSCLC组织中高表达且与患者预后不良相关

经初步筛选,五个独立数据集GSE19188、GSE33532、GSE43458、GSE44077、GSE75037纳入考察。主成分分析结果显示,不同队列中NSCLC组织与癌旁正常组织的转录组主成分均存在显著差异(图1)。其中,DUB家族中的JOSD2、USP5和PSMD14的表达量均显著上调($P < 0.05$,图2、附图1)。Kaplan-Meier Plotter分析结果显示,JOSD2表达水平与患者的总生存期和进展后生存期均显著相关($P < 0.05$),见图3、附图2。提示JOSD2表达水平高的NSCLC患者预后不良。

2.2 JOSD2高表达NSCLC组织中DDR相关通路显著激活

GO富集分析结果显示,JOSD2高表达组样本中蛋白泛素化调控、葡萄糖代谢过程等通路发生显著富集(均 $P < 0.05$),DNA生物合成过程的正向调控、参与DNA修复的DNA合成等途径也发生显著富集(均 $P < 0.05$),见图4。GSEA结果显示,JOSD2表达量高的样本中DNA修复、DNA损伤检

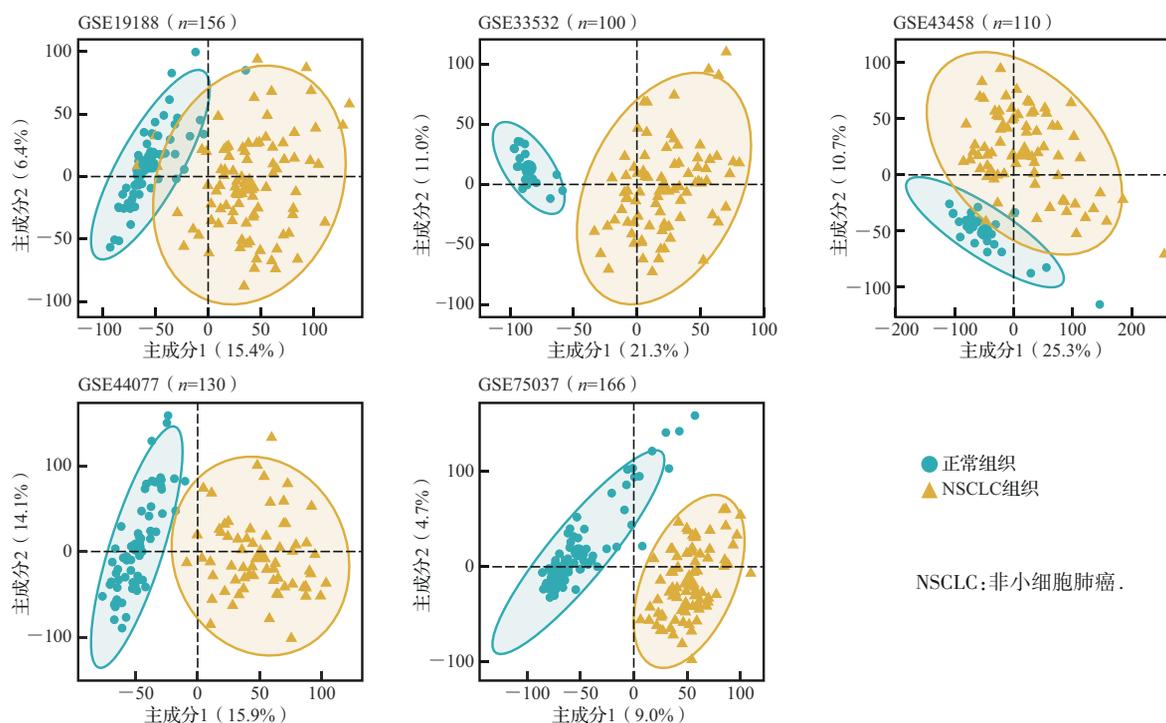
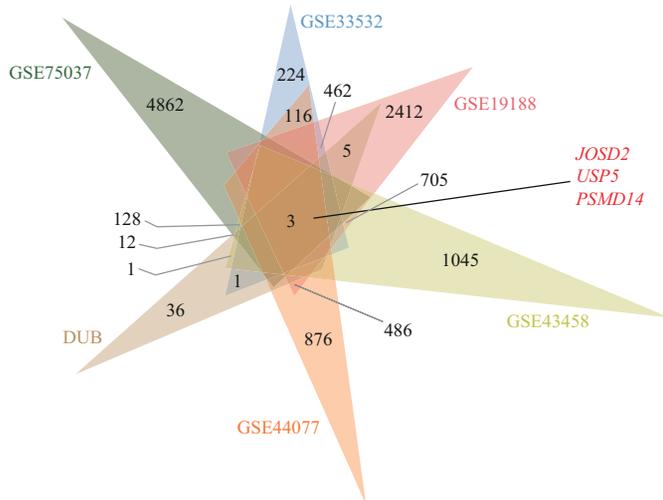


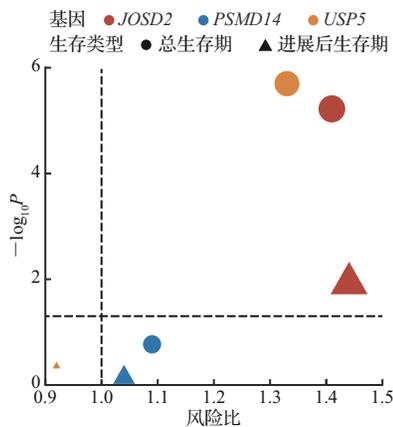
图1 基因表达数据库各数据集中NSCLC组织和正常组织转录组测序数据主成分分析结果

Figure 1 Principal component analysis results of transcriptome sequencing data of NSCLC tissue and normal tissue in Gene Expression Omnibus



DUB:去泛素化酶;J OSD2:含约瑟芬结构域2蛋白;USP:泛素特异性加工酶家族蛋白;PSMD:蛋白酶体26S亚基非ATP酶.

图2 各数据集集中非小细胞肺癌组织共同高表达的DUB相关基因
Figure 2 Cross analysis illustrating the overlap of DUB related genes with elevated expression in NSCLC patients within five independent cohorts



J OSD2:含约瑟芬结构域2蛋白;PSMD:蛋白酶体26S亚基非ATP酶;USP:泛素特异性加工酶家族蛋白.

图3 J OSD2、PSMD14和USP5对非小细胞肺癌患者预后影响的生存分析结果
Figure 3 Effect of J OSD2, PSMD14 and USP5 on the prognosis of non-small cell lung carcinoma patients

查点信号传递、DNA构象改变和DNA双链断裂修复途径发生显著激活(均 $P < 0.05$),见图5。进一步行GSVA和相关性分析结果显示,J OSD2表达水平与DNA双链断裂修复、经同源重组的双链断裂修复和经非同源末端连接的双链断裂修复等途径的激活呈显著正相关(均 $P < 0.01$,图6)。上述结果提示,J OSD2高表达患者DDR相关通路均激活,J OSD2可能通过调控DDR途径发挥促NSCLC作用。

2.3 J OSD2是DNA双链断裂修复的潜在调节因子

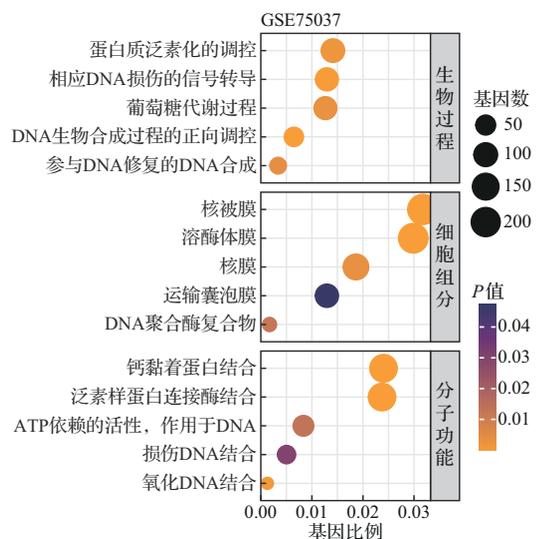
蛋白质印迹法检测结果显示,在多柔比星和依托泊苷处理的情况下,相比对照组,过表达J OSD2的PC-9细胞中 γ -H2AX的表达水平降低(图7),提示J OSD2与DNA损伤修复过程相关。

2.4 DNA损伤后J OSD2入核并加快DDR过程

蛋白质印迹法检测结果显示,与对照组比较,过表达J OSD2显著加快了 γ -H2AX的下调(图8)。免疫荧光检测结果显示,与对照组比较,200 μ mol/L的依托泊苷处理2 h后,J OSD2在细胞核区域发生显著富集(图9)。提示J OSD2在细胞DNA损伤后入核并加快DDR过程。

2.5 si-J OSD2显著提高NSCLC细胞对多柔比星和奥拉帕尼的敏感性

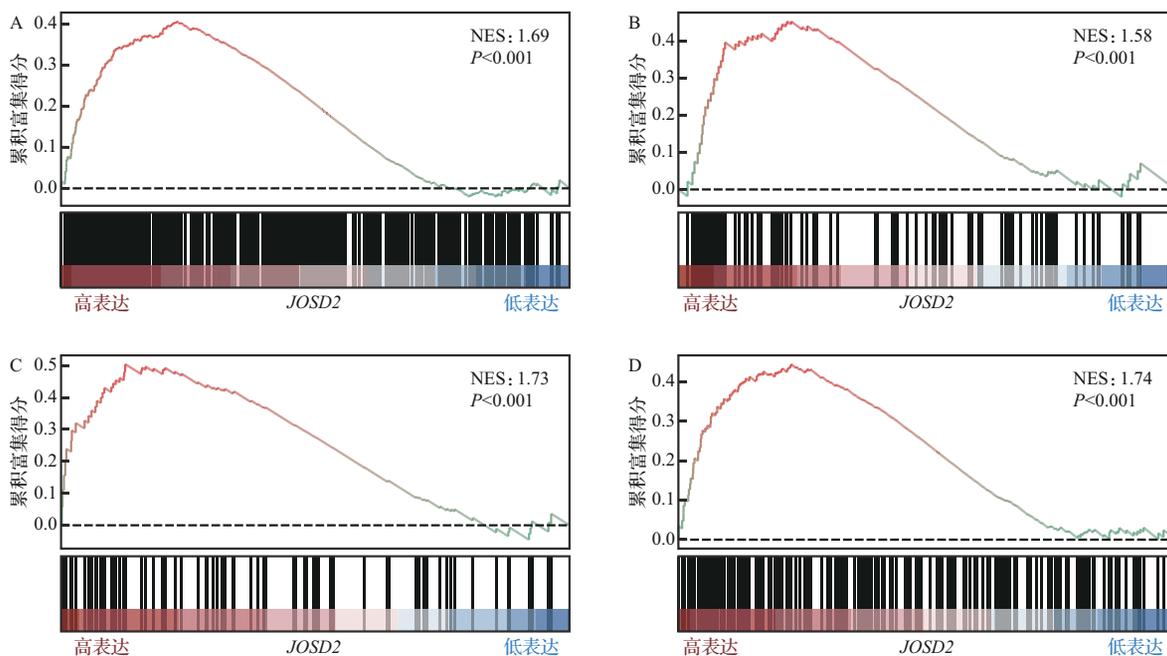
蛋白质印迹法结果显示,si-J OSD2组细胞中J OSD2的表达量显著降低(图10)。SRB结果显示,50 nmol/L多柔比星处理72 h的条件下,si-J OSD2组的存活率显著低于对照组($P < 0.05$),对



J OSD2:含约瑟芬结构域2蛋白;ATP:腺苷三磷酸.

图4 J OSD2高表达组差异基因的基因本体论富集分析结果

Figure 4 Gene ontology enrichment analysis of differentially expressed genes in the J OSD2 high-expression group



A: DNA 修复;B:DNA 损伤检查点信号传递;C:DNA 构象改变;D:DNA 双链断裂修复. JOSD2: 含约瑟芬结构域 2 蛋白;NES: 标准化富集分数.

图5 JOSD2 高表达组差异基因基因集富集分析结果

Figure 5 Gene set enrichment analysis of differentially expressed genes in the JOSD2 high-expression group

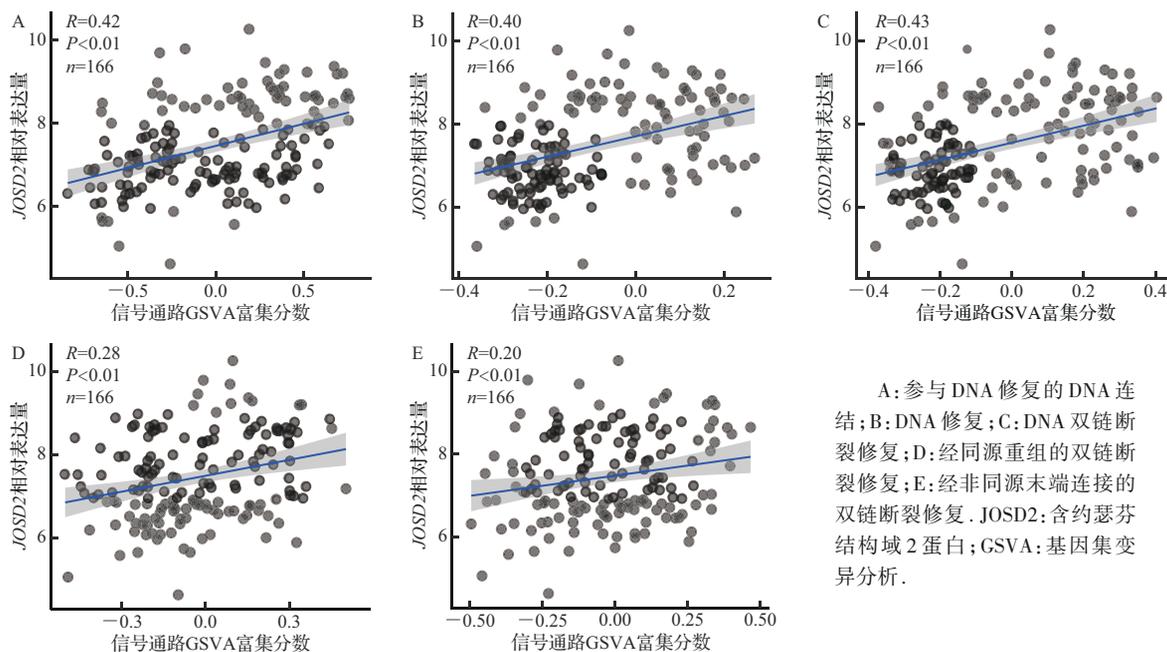
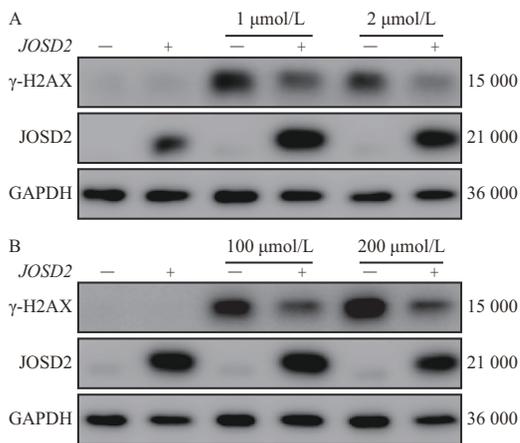


图6 JOSD2 表达水平与DNA 损伤反应相关通路激活程度的相关性分析结果

Figure 6 Correlation analysis of JOSD2 expression levels and the activation status of DNA damage response related pathways

照组和 si-JOSD2 组多柔比星的 IC_{50} 分别为 (90.38 ± 8.98) 和 (46.32 ± 16.11) nmol/L ($P < 0.05$); $12.5 \mu\text{mol/L}$ 奥拉帕尼处理 72 h 的条件下, si-JOSD2 组的存活率显著低于对照组 ($P < 0.05$), 对照组和 si-JOSD2

组奥拉帕尼的 IC_{50} 分别为 (22.58 ± 1.75) 和 (13.26 ± 4.14) nmol/L ($P < 0.05$), 见图 11。提示 si-JOSD2 可提高 NSCLC 细胞对多柔比星和奥拉帕尼的敏感性。



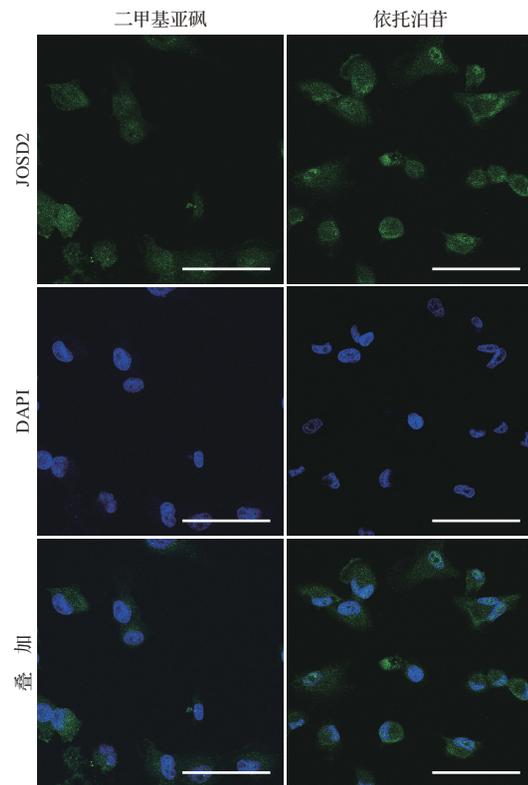
A:多柔比星处理;B:依托泊苷处理. JOSD2:含约瑟芬结构域2蛋白; γ -H2AX:磷酸化组蛋白H2AX;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶.

图7 过表达 *JOSD2* 对不同药物诱导 γ -H2AX 表达水平的蛋白电泳图

Figure 7 Western blotting analysis of γ -H2AX expression levels induced by different drugs in cells overexpressing *JOSD2*

3 讨论

NSCLC是世界上最为常见的癌症相关死亡原因之一,每年死亡人数超过6万人^[12]。研究显示,50%以上的NSCLC患者存在致癌驱动突变,其中KRAS突变患者占比约25%,EGFR突变患者占比约15%,ALK突变患者占比约7%^[13]。靶向NSCLC的驱动突变可以显著改善相关患者的生存期,为NSCLC的临床治疗提供了新的范式^[14]。尽管随着肿瘤标志物的不断发现和靶向药物的开发,NSCLC患者的存活期显著延长^[15],但对于缺乏明确致癌驱动的晚期NSCLC患者,联合化疗仍然是主要的治疗手段^[16]。研究报道,尽管化疗药物改善了晚期NSCLC患者的生活质量,但中位



与二甲基亚砜处理后的细胞比较,200 μ mol/L的依托泊苷处理2 h后,JOSD2在细胞核区域发生显著富集.标尺=100 μ m. JOSD2:含约瑟芬结构域2蛋白;DAPI:4',6-二脒基-2-苯基喹啶.

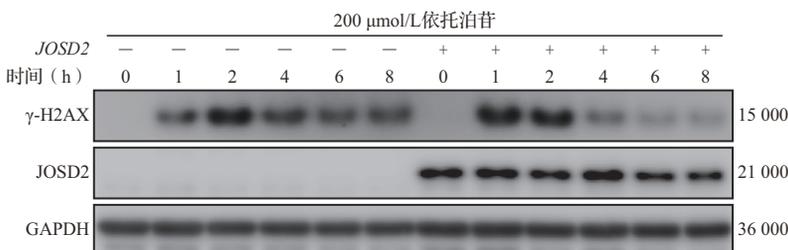
图9 DNA损伤后 *JOSD2* 细胞内定位免疫荧光图

Figure 9 Immunofluorescence analysis of the effect of DNA-damaging agents on the cellular localization of *JOSD2*

生存期仍不足3年。因此,亟须探究NSCLC的全新靶点,以提高晚期NSCLC患者化疗敏感性,延长晚期NSCLC患者的总生存期。

泛素化修饰是一种物种间高度保守的翻译后修饰类型,其主要依赖于泛素激活酶、泛素偶联酶和泛素连接酶将泛素分子连接到底物蛋白

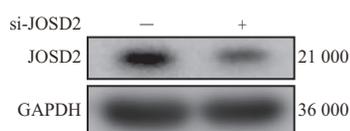
的赖氨酸残基上^[17]。据研究报道,多聚泛素化修饰与底物蛋白的降解途径高度相关,经多聚泛素化修饰的蛋白主要通过泛素-蛋白酶体途径和自噬-溶酶体途径降解^[18]。DUB能够特异性地将底物蛋白上的泛素分子移除,从而逆转细胞内泛素化修饰的过程,维持细胞内泛素化-去泛素化的平



JOSD2:含约瑟芬结构域2蛋白; γ -H2AX:磷酸化组蛋白H2AX;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶.

图8 过表达 *JOSD2* 加速 γ -H2AX 下调的蛋白电泳图

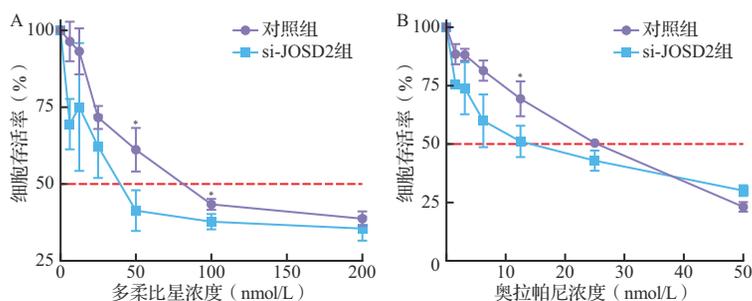
Figure 8 Western blotting analysis of γ -H2AX down-regulation rate in cells overexpressing *JOSD2*



JOSD2: 含约瑟芬结构域2蛋白;GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图10 RNA干扰后JOSD2表达量的蛋白电泳图

Figure 10 Immunofluorescence analysis of JOSD2 expression after RNA interference



A: 多柔比星处理72 h; B: 奥拉帕尼处理72 h. JOSD2: 含约瑟芬结构域2蛋白。

图11 敲低JOSD2后在不同浓度多柔比星和奥拉帕尼作用下细胞存活曲线

Figure 11 Cell survival curves under different concentrations of doxorubicin and olaparib after depletion of JOSD2

衡^[19]。近年来,DUB被广泛报道参与多种恶性肿瘤的发生和进展^[20-21]。例如,USP14通过结合并移除IDO1上的多聚泛素链,从而抑制IDO1的降解并促进色氨酸代谢,最终抑制T淋巴细胞的活性并促进结肠癌的进展^[20]。研究显示,USP2可调控E2F4的稳定性,促进肿瘤细胞的自噬和锌稳态,最终调控肿瘤的恶性进展^[21]。因此,靶向DUB是开发抗肿瘤药物的潜在策略。基于此,本研究考察了多个独立NSCLC队列中均发生显著失调的DUB。结果显示,JOSD2、USP5和PSMD14的表达水平均显著上调。基于数据库进一步考察了JOSD2、USP5和PSMD14对NSCLC患者预后的影响,结果显示JOSD2的表达水平与NSCLC患者预后不良显著相关,提示JOSD2参与NSCLC的恶性进展。

尽管USP5和PSMD14在预后分析中显示与患者预后无显著相关性,本研究未纳入考察,但两者在NSCLC和其他肿瘤中的作用有广泛报道^[22-24]。例如,USP5被证实直接结合并介导细胞核Beclin 1的去泛素化,从而稳定Beclin 1并促进p53的特异性降解,在KRAS突变驱动的肺癌中发挥关键作用^[22]。此外,也有研究证实USP5直接结合并移除程序性死亡蛋白-1上的多聚泛素

链,从而促进程序性死亡蛋白-1稳定和免疫疗法的耐受性^[23]。除此之外,PSMD14也被证实通过调控E2F1的去泛素化激活AKT信号通路,并最终介导头颈部鳞状细胞癌的耐药^[24]。以上报道提示,尽管本研究中所使用的筛选方法具有较高的普适性,仍须对排除在外的潜在靶点进一步研究。

JOSD2是马查多-约瑟夫结构域亚家族的成员之一,近年来不少研究报道其参与多种肿瘤的恶性进展^[25-27]。例如,JOSD2被鉴定为YAP/TAZ和CTNNB1的去泛素化酶,能够直接结合并移除YAP/TAZ和CTNNB1上的多聚泛素链,从而提高YAP/TAZ和CTNNB1的稳定性,促进肝细胞肝癌的恶性进展^[25, 27]。此外,JOSD2还被证实直接结合多种代谢酶,通过发挥去泛素化作用介

导代谢酶的稳定和累积,并最终促进NSCLC细胞的糖酵解和恶性演进^[26]。然而,JOSD2在NSCLC中发挥促肿瘤作用的分子机制仍未完全阐明。为此,本研究依据JOSD2相对表达量将队列中的样本分组,并基于GO分析和GSEA分析探究发生显著改变的信号通路。结果显示,DDR相关通路被富集且在JOSD2较高表达水平的组中显著激活。

DDR是细胞内一种维持基因组稳定性的复杂生物过程,其主要通过激活细胞周期检查点和协调细胞代谢反应以修复受损的DNA。有研究报道,癌症中多种参与编码DDR的基因发生突变,从而引起肿瘤细胞基因组不稳定性,并最终介导肿瘤的发生和发展^[28]。因此,靶向DDR途径,从而增加肿瘤细胞额外的复制应激和复制压力,是抗肿瘤药物开发过程中的重要思路^[29]。近年来,多项研究报道,DUB广泛参与细胞中的DDR过程^[30-31]。例如,USP38通过结合并移除HDAC1上的K63型多聚泛素链,从而促进了HDAC1去乙酰化活性,并最终导致肿瘤细胞中NHEJ过程的激活和DNA损伤剂的不敏感性^[30]。USP17通过移除Ku70上的泛素链从而促进NHEJ,是PTEN缺失肿瘤细胞中发挥DDR的主要原因^[31]。本研究基于GSVA分析,计算了JOSD2

表达水平与DDR途径的相关性。结果显示, *JOSD2*的表达水平与DDR途径的激活程度呈显著正相关。体外实验进一步证实,细胞在发生DNA损伤后*JOSD2*的核定位显著增加,且过表达*JOSD2*能促进DNA修复过程。以上结果提示,*JOSD2*可通过调控DDR途径发挥促NSCLC进展的作用。

近年来,多种DNA损伤类药物体现了靶向DDR途径在肿瘤治疗中的巨大价值^[32]。奥拉帕尼是多腺苷二磷酸核糖聚合酶特异性抑制剂,其通过靶向DDR过程抑制BRCA突变肿瘤的恶性进展,被广泛应用于BRCA突变型乳腺癌、卵巢癌和急性白血病的临床治疗。多柔比星是一种强效的化疗药物,其主要通过诱导肿瘤细胞的DNA损伤发挥抗肿瘤功能,被广泛用于多种肿瘤的新辅助化疗^[33]。然而,多柔比星通过诱导氧化应激、细胞自噬和细胞凋亡产生严重的心脏毒副作用,极大限制了其在肿瘤治疗中的临床应用^[34-35]。通过药物联用策略增强肿瘤细胞对DNA损伤类药物的敏感性是提高其抗肿瘤作用并降低其毒副作用的重要思路。本研究通过转染技术和SRB技术考察了敲低*JOSD2*对多柔比星和奥拉帕尼的敏感性。结果显示,敲除*JOSD2*能显著降低多柔比星和奥拉帕尼在NSCLC细胞系上的IC₅₀,提示靶向*JOSD2*是增强NSCLC细胞系对DNA损伤类药物敏感性的重要思路。

综上所述,本研究通过生物信息学分析和体外实验证实,*JOSD2*通过调控DDR发挥促NSCLC作用,靶向*JOSD2*是提高NSCLC化疗敏感性的重要举措,为NSCLC的临床治疗提供了新的思路。但是,尽管本研究证实*JOSD2*显著降低了DNA损伤剂引起的 γ -H2AX上调,观察到*JOSD2*在DNA损伤剂的诱导下入核,但具体的分子机制仍未完全阐明。近年研究报道,DUB通过介导组蛋白和DNA修复相关蛋白的去泛素化调控DNA损伤修复途径^[30-31]。因此,课题组后续将从*JOSD2*直接结合的蛋白出发,通过体内外实验进一步考察*JOSD2*经由酶活发挥促DNA损伤修复作用,探索*JOSD2*发挥作用的具体分子机制。

本文附图见电子版。



志谢 研究得到浙江省重点研发计划(2022C03077)支持

Acknowledgements The work was supported by the Key R&D Program of Zhejiang Province (2022C03077)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2023. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献(References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] SAW S, ONG B H, CHUA K, et al. Revisiting neoadjuvant therapy in non-small-cell lung cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(11): e501-e516.
- [3] CHEN P, LIU Y, WEN Y, et al. Non-small cell lung cancer in China[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2022, 42(10): 937-970.
- [4] PADELLA A, GHELLI LUSERNA DI RORÀ A, MARCONI G, et al. Targeting PARP proteins in acute leukemia: DNA damage response inhibition and therapeutic strategies[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 10.
- [5] DENG L, MENG T, CHEN L, et al. The role of ubiquitination in tumorigenesis and targeted drug discovery[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 11.
- [6] KIM J J, LEE S Y, HWANG Y, et al. USP39 promotes non-homologous end-joining repair by poly (ADP-ribose)-induced liquid demixing[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(19): 11083-11102.
- [7] DAS S, CHANDRASEKARAN A P, SURESH B, et al. Genome-scale screening of deubiquitinase subfamily identifies USP3 as a stabilizer of Cdc25A regulating cell cycle in cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(11): 3004-3020.
- [8] GRANIERI L, MAROCCHI F, MELIXETIAN M, et al. Targeting the USP7/RRM2 axis drives senescence and sensitizes melanoma cells to HDAC/LSD1 inhibitors [J]. *Cell Rep*, 2022, 40(12): 111396.
- [9] KOSCHEL J, NISHANTH G, JUST S, et al. OTUB1 prevents lethal hepatocyte necroptosis through stabilization of c-IAP1 during murine liver inflammation [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(7): 2257-2275.
- [10] LI C, XIA J, FRANQUI-MACHIN R, et al. TRIP13 modulates protein deubiquitination and accelerates tumor development and progression of B cell malignancy

- nancies[J/OL]. *J Clin Invest*, 2021, 131(14): e146893.
- [11] HAQ S, SARODAYA N, KARAPURKAR J K, et al. CYLD destabilizes NoxO1 protein by promoting ubiquitination and regulates prostate cancer progression[J]. *Cancer Lett*, 2022, 525: 146-157.
- [12] HERBST R S, MORGENZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-454.
- [13] WANG M, HERBST R S, BOSHOFF C. Toward personalized treatment approaches for non-small-cell lung cancer[J]. *Nat Med*, 2021, 27(8): 1345-1356.
- [14] BOUMAHDI S, DE SAUVAGE F J. The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(1): 39-56.
- [15] RAMALINGAM S S, VANSTEENKISTE J, PLANCHARD D, et al. Overall survival with osimertinib in untreated, EGFR-mutated advanced NSCLC[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(1): 41-50.
- [16] SCAGLIOTTI G V, PARIKH P, VON PAWEL J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(21): 3543-3551.
- [17] HERSHKO A, CIECHANOVER A. The ubiquitin system[J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 425-479.
- [18] SUN T, LIU Z, YANG Q. The role of ubiquitination and deubiquitination in cancer metabolism[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 146.
- [19] ANTAO A M, TYAGI A, KIM K S, et al. Advances in deubiquitinating enzyme inhibition and applications in cancer therapeutics[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(6): 1579.
- [20] SHI D, WU X, JIAN Y, et al. USP14 promotes tryptophan metabolism and immune suppression by stabilizing IDO1 in colorectal cancer[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5644.
- [21] XIAO W, WANG J, WANG X, et al. Therapeutic targeting of the USP2-E2F4 axis inhibits autophagic machinery essential for zinc homeostasis in cancer progression[J]. *Autophagy*, 2022, 18(11): 2615-2635.
- [22] LI J, WANG Y, LUO Y, et al. USP5-beclin 1 axis overrides p53-dependent senescence and drives Kras-induced tumorigenicity[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7799.
- [23] XIAO X, SHI J, HE C, et al. ERK and USP5 govern PD-1 homeostasis via deubiquitination to modulate tumor immunotherapy[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2859.
- [24] JING C, DUAN Y, ZHOU M, et al. Blockade of deubiquitinating enzyme PSMD14 overcomes chemoresistance in head and neck squamous cell carcinoma by antagonizing E2F1/Akt/SOX2-mediated stemness [J]. *Theranostics*, 2021, 11(6): 2655-2669.
- [25] QIAN M, YAN F, WANG W, et al. Deubiquitinase JOSD2 stabilizes YAP/TAZ to promote cholangiocarcinoma progression[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(12): 4008-4019.
- [26] KRASSIKOVA L, ZHANG B, NAGARAJAN D, et al. The deubiquitinase JOSD2 is a positive regulator of glucose metabolism[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(3): 1091-1109.
- [27] HUANG Y, ZENG J, LIU T, et al. Deubiquitinating enzyme JOSD2 promotes hepatocellular carcinoma progression through interacting with and inhibiting CTNBN1 degradation[J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46(7): 1089-1097.
- [28] TAYLOR A, ROTHBLUM-OVIATT C, ELLIS N A, et al. Chromosome instability syndromes[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 64.
- [29] LORD C J, ASHWORTH A. PARP inhibitors: synthetic lethality in the clinic[J]. *Science*, 2017, 355(6330): 1152-1158.
- [30] YANG Y, YANG C, LI T, et al. The deubiquitinase USP38 promotes NHEJ repair through regulation of HDAC1 activity and regulates cancer cell response to genotoxic insults[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(4): 719-731.
- [31] SHARMA A, ALSWILLAH T, KAPOOR I, et al. USP14 is a deubiquitinase for Ku70 and critical determinant of non-homologous end joining repair in autophagy and PTEN-deficient cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(2): 736-747.
- [32] GROELLY F J, FAWKES M, DAGG R A, et al. Targeting DNA damage response pathways in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(2): 78-94.
- [33] WHELAN J S, DAVIS L E. Osteosarcoma, chondrosarcoma, and chordoma[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(2): 188-193.
- [34] KONG C Y, GUO Z, SONG P, et al. Underlying the mechanisms of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity: oxidative stress and cell death[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(2): 760-770.
- [35] CUI N, WU F, LU W J, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity is maturation dependent due to the shift from topoisomerase II α to II β in human stem cell derived cardiomyocytes [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(7): 4627-4639.

[本文编辑 沈敏余方]