

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.015

· 临床研究 ·

## 泛素特异性蛋白酶 53 在结直肠癌中的表达及其对 HCT116 细胞的抑制作用

沈文彬, 智佳俊<sup>△</sup>, 姜宏华, 崔龙(上海交通大学医学院附属新华医院 结直肠肛门外科, 上海 200092)

**[摘要]** **目的:** 探讨泛素特异性蛋白酶 53(ubiquitin specific peptidase 53, USP53)在结直肠癌组织中的表达水平及其过表达对人结直肠癌 HCT116 细胞功能的影响。**方法:** 运用 Real-time PCR 及 IHC 方法检测结直肠癌及癌旁组织中 USP53 的表达情况;利用 UCSC CANCER BROWSER 提供的 TCGA 数据库,检测 USP53 mRNA 表达水平与临床特征及预后的关系;HCT116 细胞中瞬时过表达 USP53,利用 CCK-8 及克隆形成实验检测 HCT116 细胞增殖变化。**结果:** 免疫组化结果显示,USP53 在癌旁组织中的表达显著高于肿瘤组织[91.67%(44/48) vs 18.75%(9/48),  $P < 0.01$ ]。癌旁组织中 USP53 mRNA 水平也高于肿瘤组织[ $0.85 \pm 0.32$ ] vs [ $0.46 \pm 0.27$ ],  $P < 0.05$ ]。组织中 USP53 mRNA 表达水平与预后有关,表达越低预后越差( $P < 0.05$ )。过表达 USP53 后,细胞克隆形成数目显著下降[ $123 \pm 27.22$ ] vs [ $338 \pm 55.24$ ]个,  $P < 0.01$ ]; CCK-8 实验结果显示,肿瘤细胞增殖受到显著抑制[ $0.14 \pm 0.01$ ] vs [ $0.18 \pm 0.04$ ],  $P < 0.05$ ; [ $0.23 \pm 0.01$ ] vs [ $0.32 \pm 0.01$ ],  $P < 0.01$ ; [ $0.45 \pm 0.03$ ] vs [ $0.80 \pm 0.05$ ],  $P < 0.01$ ; [ $0.83 \pm 0.03$ ] vs [ $1.18 \pm 0.10$ ],  $P < 0.01$ ]。**结论:** USP53 在结直肠癌中表达下调与不良预后相关,USP53 可抑制肿瘤细胞增殖,提示 USP53 可作为诊断及治疗结直肠癌的新靶标。

**[关键词]** 泛素特异性蛋白酶 53;结直肠癌;HCT116 细胞

**[中图分类号]** R735.3;R730.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2017)04-0423-06

## Expression of ubiquitin specific peptidase 53 in colorectal cancer tissues and its inhibitory effect on HCT116 cells

SHEN Wenbin, ZHI Jiajun<sup>△</sup>, JIANG Honghua, CUI Long (Department of Colorectal and Anal Surgery, Shanghai Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 20009, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of ubiquitin specific peptidase 53(USP53) in colorectal cancer tissues and its over-expression on human colorectal cancer(CRC) HCT116 cells. **Methods:** Real-time PCR and IHC were used to examine the expression level of USP53 in colorectal cancerous tissues and the para-cancerous tissues; TCGA database, provided by UCSC CANCER BROWSER, was used to validate the relationship between USP53 mRNA expression and clinical characteristics as well as prognosis; After over-expressing USP53 in HCT116, the changes in cell proliferation were measured by CCK-8 assay and colony formation assay. **Results:** IHC showed that the expression level of USP53 was higher in the normal para-cancerous tissues than that in cancerous tissues (91.67% [44/48] vs 18.75% [9/48],  $P < 0.01$ ); the same was also found in the mRNA level ([ $0.46 \pm 0.27$ ] vs [ $0.85 \pm 0.32$ ],  $F = 0.925$ ,  $P < 0.05$ ). The mRNA level of USP53 in CRC was negatively correlated with the prognosis ( $P < 0.05$ ); Over-expression of USP53 in HCT116 cell significantly decreased the colony formation ([ $123 \pm 27.22$ ] vs [ $338 \pm 55.24$ ],  $P < 0.01$ ); CCK-8 assay also showed that over-expression of USP53 also significantly inhibited the proliferation of HCT116 cells ([ $0.14 \pm 0.01$ ] vs [ $0.18 \pm 0.04$ ],  $P < 0.05$ , [ $0.23 \pm 0.01$ ] vs [ $0.32 \pm 0.01$ ],  $P < 0.01$ , [ $0.45 \pm 0.03$ ] vs [ $0.80 \pm 0.05$ ],  $P < 0.01$ ,

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81372636; No. 81302089);国家高技术研究发展计划(863计划)(No. SQ2014SFOZD00314);上海杰出青年教师计划(No. ZJjdyx13074)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81372636 and No. 81302089), the National High Technology Research and Development Program of China(863 Program)(No. SQ2014SFOZD00314), and the Shanghai Excellent Young Teachers Program(No. ZJjdyx13074)

**[作者简介]** 沈文彬(1991-),男,博士生,主要从事结直肠癌基础方面的研究,E-mail:swb1991@126.com;智佳俊(1987-),男,硕士生,主要从事结直肠癌基础方面研究,E-mail:234074044@qq.com。△共同第一作者

**[通信作者]** 姜宏华(JIANG Honghua, corresponding author),博士,副主任医师,主要从事结直肠癌基础与临床方面的研究,E-mail:honghuajiangdr@126.com;崔龙(CUI Long, co-corresponding author),博士,主任医师,主要从事结直肠癌基础与临床方面的研,E-mail:Longcuidr@126.com

[ 0.83 ± 0.03 ] vs [ 1.18 ± 0.10 ],  $P < 0.01$  ). **Conclusion:** USP53 was downregulated in CRC, which is correlated with the poor prognosis; and up-regulation of USP53 could inhibit the proliferation of HCT116 cells *in vitro*, indicating USP53 could be used as a diagnostic and therapeutic target for colorectal cancer.

[ **Key words** ] ubiquitin specific peptidase 53( USP53 ); colorectal cancer; HCT116 cell

[ Chin J Cancer Biother, 2017, 24(4): 423-428. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.008 ]

结直肠癌是全球范围发病率最高的恶性肿瘤之一,在美国每年大约有 132 700 的人口被新诊断患有结直肠癌<sup>[1]</sup>。值得注意的是,最近几十年中,发展中国家特别是中国结直肠癌的发病率显著上升<sup>[2]</sup>。虽然目前有外科切除、化疗、放疗及生物靶向治疗的综合应用,但结直肠癌患者的生存情况依然不容乐观,特别是进展期结直肠癌患者<sup>[3]</sup>。去泛素化酶家族成员可以通过水解底物蛋白上泛素链之间的连接,从而达到调控泛素-蛋白酶体这一细胞内重要蛋白降解途径的作用,因此去泛素化酶在细胞生理功能中发挥重要的作用。去泛素化酶的异常表达,可以引起诸如 Wnt 信号通路及 P53 等细胞内重要信号通路及分子的异常,从而导致诸多疾病的发生、发展,包括恶性肿瘤<sup>[4-7]</sup>。泛素特异性蛋白酶 53 (ubiquitin specific peptidase 53, USP53) 是去泛素化酶家族中的一员。USP53 可能与 Cantu 综合征及小鼠听力进行性下降有关<sup>[8-9]</sup>,但与恶性肿瘤的关系并无研究报道。本研究采用 IHC、实时荧光定量 PCR、TCGA 数据库及体外细胞实验等手段,初步研究 USP53 在结直肠癌患者中的表达情况及其细胞生物学功能,为将来进一步阐明 USP53 的生理功能提供基础。

## 1 资料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

人结直肠癌细胞株 HCT116 购自中国科学院上海细胞库,采用 DMEM + 10% 胎牛血清培养。胎牛血清(FBS)及 Opti-MEM 培养基均购自美国 Gibco 公司;DMEM 高糖培养基购自美国 Hyclone 公司。转染试剂 PEI 购自美国 Polysciences 公司。USP53 抗体(HPA035845)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。免疫组化所用的修复液、二抗及显色液购自中国基因公司。RNA 抽提及 qPCR 试剂均购自日本 TaKaRa 公司。CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所。Western blotting 检验所用二抗购自中国碧云天公司,Actin 抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司,显色液购自美国 Milipore 公司。

### 1.2 结直肠癌标本采集

收集上海交通大学医学院附属新华医院结直肠

肛门外科 2009 年 1 月至 2011 年 12 月期间的正常/肿瘤配对的结直肠癌患者组织标本总计 48 例。所有标本的采集均通过伦理委员会审查,患者均签署知情同意书。48 例正常/肿瘤配对的结直肠癌标本被制作成组织芯片用于免疫组化染色。取 15 例冰冻标本用来进行 Real-time PCR 实验。

### 1.3 实时荧光定量 PCR 检测 USP53 在组织及细胞中表达水平

组织总 RNA 采用 RNAiso Plus 提取,采用 PrimeScript<sup>®</sup> RT-PCR Kit 进行反转录。实时荧光定量 PCR 检查使用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>®</sup> 试剂盒及 ABI 7500 cycler 进行检测。条件设置: 95 °C、5 min,之后 95 °C、5 s,60 °C、10 s 共 50 个循环,采用 GAPDH 作为内参,使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 分析基因表达量。实时定量 PCR 所用引物如下: GAPDH, Forward(5'-GTCATC-CAACGGGAATGCA-3'), Reverse(5'-TGATCGGT-TACCGTGATCAAAA-3'); USP53, Forward(5'-CCA-GATTACGACAAGCAACC-3'), Reverse(5'-CCTGCT-TCCAAATTCCTGAG-3')。

### 1.4 免疫组织化学染色检测 USP53 在肿瘤组织和正常组织中的表达

组织芯片常规脱蜡、水化、抗原修复、去除内源性过氧化物酶后加入一抗,4 °C 冰箱过夜,次日加入辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 30 min, DAB 显色后,苏木精复染,后脱水、透明、封片。采用 12 分法进行评估:无染色为 0 分,轻度染色为 1 分,中度染色为 2 分,重度染色为 3 分;0~25% 范围为 1 分,26%~50% 范围为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分,采取范围 × 强度进行评分。

### 1.5 Western blotting 检测 HCT116 细胞中 USP53 表达

HCT116 细胞的蛋白样品在十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至硝酸纤维素膜,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后一抗(1:1 000)4 °C 过夜,次日加入辣根过氧化物酶偶联二抗(1:1 000)后室温孵育 1 h,同时以 β-Actin 为内参, ECL 显影。

### 1.6 USP53 过表达质粒转染 HCT116 细胞

将 USP53 全长 cDNA 插入 pCDNA3.1 中,测序确定无突变后进行转染。第 1 天将 HCT116 细胞以

70% 密度铺入 6 孔板中, 次日转染时融合度约为 80% 左右, 将 pCDNA3.1 及 pCDNA3.1-USP53 质粒按每孔 5  $\mu\text{g}$  用量加至 6 孔板, 按 PEI 转染法进行转染, 转染后 6 h 再次铺板。

### 1.7 克隆形成检测 USP53 过表达对 HCT116 细胞克隆形成能力的影响

转染细胞消化计数之后, 以 500 个/孔接种于 6 孔板中, 培养至肉眼可见细胞克隆后(约 7~8 d)弃去培养基, PBS 洗涤后加入 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下预冷的甲醇, 固定 30 min, 结晶紫染色 10 min, PBS 洗涤后晾干, 并计算克隆形成数。

### 1.8 CCK-8 法检测 USP53 过表达后 HCT116 细胞增殖情况

转染细胞消化计数之后, 以 1 000 个/孔接种于 96 孔板中, 设置空白对照组以及 24、48、72、96、120 h 组, 分别加入 20  $\mu\text{l}$  CCK-8 试剂, 孵育 1.5 h 后测定其在 450 nm 处的光密度( $D$ )值。将实验组各孔  $D$  值减去空白对照孔  $D$  值可得最终结果, 代表细胞增殖水平。实验重复 3 次。

### 1.9 统计学分析

应用 SPSS19.0 版本软件进行分析, 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用  $t$  检验; Kaplan-Meier 法作生存曲线图, 以 Log-rank 检验; Pearson  $\chi^2$  法作四格表检验。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 USP53 在结直肠癌组织中表达低

48 例正常/肿瘤配对组织芯片免疫组化结果显示, 肿瘤组织中 USP53 表达量显著低于正常组织 [18.75% (9/48) vs 91.67% (44/48),  $P < 0.01$ ]; 同时, 实时荧光定量 PCR 检测(图 1)发现, USP53 mRNA 水平同样存在着正常组织高、肿瘤组织低的趋势 [(0.85  $\pm$  0.32) vs (0.46  $\pm$  0.27),  $F = 0.925$ ,  $P < 0.05$ ]。

### 2.2 TCGA 数据库中 USP53 mRNA 表达水平与预后相关

采用 UCSC CANCER BROWSER 工具下载 TCGA 数据库中的可视化数据, 得到 406 例带有完整预后及 USP53 mRNA 表达信息的资料。分析结果显示, 除了与年龄有关之外(表 1,  $P < 0.05$ ), 与肿瘤的 T、N、M 分期无明显相关。通过对 5 年生存率的分析可见, USP53 mRNA 表达水平越低, 其预后越差(图 2,  $P < 0.05$ )。

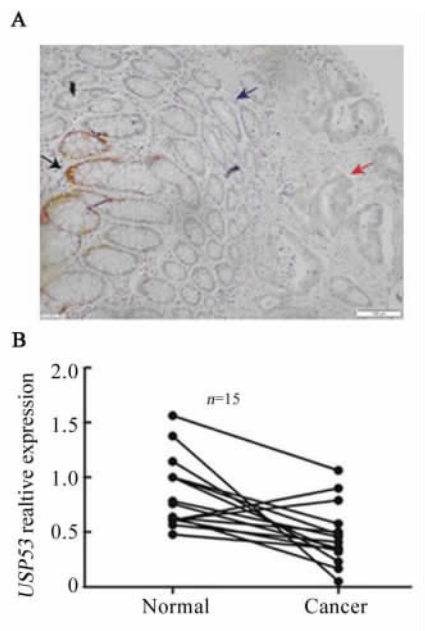
表 1 USP53 mRNA 表达与结直肠癌患者临床病理特征关系( $n = 409$ )

Tab. 1 Relationship between the expression level of USP53 mRNA and clinicopathological features of patients with colorectal cancer ( $n = 409$ )

Clinical feature	USP53 mRNA		$P$
	High	Low	
Age( t/a )			0.038
<50	39	23	
$\geq 50$	167	180	
Gender			0.524
Male	111	109	
Female	95	94	
T			0.2
T1	7	6	
T2	35	30	
T3	145	134	
T4	19	33	
N			0.263
N0	124	107	
N1	51	53	
N2	29	42	
NX	2	1	
M			0.496
M0	136	144	
M1	34	26	
MX	36	33	
Site			0.392
Colon	158	159	
Rectum	48	44	

### 2.3 HCT116 细胞中过表达 USP53 能显著抑制 HCT116 细胞增殖

实时荧光定量 PCR 及 Western blotting 检测结果显示, USP53 在 HCT116 细胞中过表达(图 3A、B)。克隆形成实验结果显示过表达 USP53 组克隆形成数明显少于对照组 [(123  $\pm$  27.22) vs (338  $\pm$  55.24) 个,  $F = 2.168$ ,  $P < 0.01$ ; 图 3C], 提示过表达 USP53 能够显著减少 HCT116 细胞的克隆形成能力。同时 CCK-8 结果(图 3D)显示过表达 USP53 组细胞增殖能力在第 2、3、4、5 天均显著低于对照组 [Day 2: (0.14  $\pm$  0.01) vs (0.18  $\pm$  0.04),  $F = 7.429$ ,  $P < 0.05$ ; Day 3: (0.23  $\pm$  0.01) vs (0.32  $\pm$  0.01),  $F = 1.189$ ,  $P < 0.01$ ; Day 4: (0.45  $\pm$  0.03) vs (0.80  $\pm$  0.05),  $F = 1.803$ ,  $P < 0.01$ ; Day 5: (0.83  $\pm$  0.03) vs (1.18  $\pm$  0.10),  $F = 2.054$ ,  $P < 0.01$ ]。



A: Schematic of expression of USP53 in normal mucosa, black arrow showed the luminal side, blue arrow showed the basal side and red arrow showed the cancer;

B: Real-time PCR was carried out in 15 paired tissues ( normal mucosa vs cancer )

图 1 USP53 在结直肠癌组织中表达下调

Fig.1 Expression of USP53 was down-regulated in colorectal cancer tissues

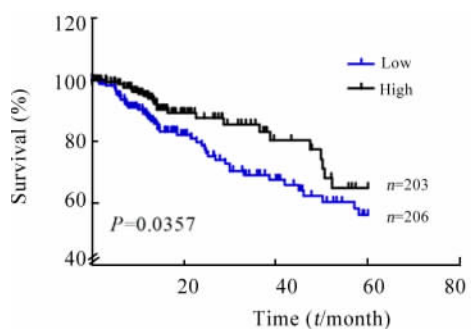
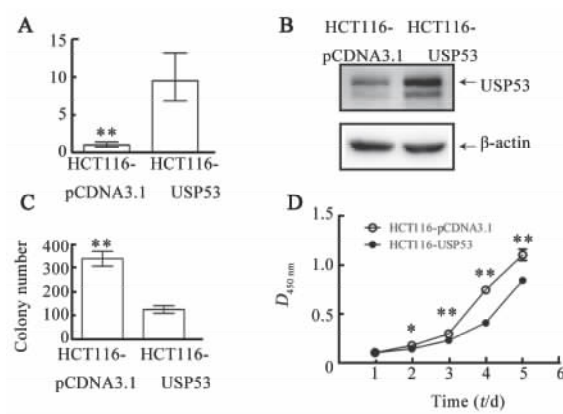


图 2 USP53 的低表达与肠癌患者不良预后相关  
Fig.2 Low-expression of USP53 was correlated with prognosis of colorectal cancer patients

### 2.4 TCGA 数据库中 USP53 mRNA 表达水平与肿瘤大小及后续化疗反应性相关

采用 UCSC CANCER BROWSER 工具下载 TCGA 数据库中可视化数据, 得到 51 例带有完整资料的病例, 分析显示, USP53 表达越低, 肿瘤直径越大[ ( 1.15 ± 0.10 ) vs ( 1.51 ± 0.15 ) cm, P < 0.05; 图 4 ], 对化疗反应性也越差[ 73.10% ( 19/26 ) vs

96.00% ( 24/25 ), P < 0.05 ]。



\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs HCT116-USP53 group

A: Real-time PCR analysis of USP53 expression in HCT116 cells;

B: Immunoblot analysis of USP53 protein level in HCT116 cells;

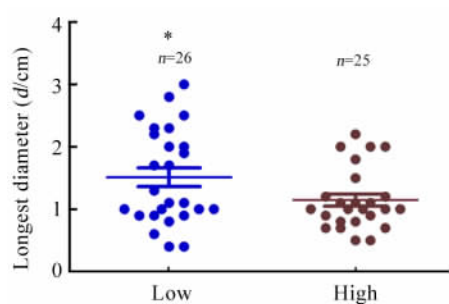
C: Colony formation assay was applied to investigate the ability;

of colony formation of HCT116-pCDNA3.1 and HCT116-USP53 cells;

D: CCK-8 assay was carried out to study the effect on proliferation when overexpressed USP53

图 3 过表达 USP53 抑制肿瘤细胞 HCT116 的增殖

Fig.3 Over-expression of USP53 inhibited HCT116 cells proliferation



\* P < 0.05 vs high expression group

Data were obtained by using the TCGA database and tested by independent samples t test

图 4 USP53 表达与结直肠肿瘤最大直径负相关

Fig.4 USP53 expression was negatively correlated with the maximum tumor diameter

### 3 讨论

去泛素化酶家族大约有 90 个成员, 大致可以分为七大家族, 包括 USP、泛素羧基末端水解酶(ubiquitin carboxy-terminal hydrolases, UCH), 卵巢肿瘤域蛋白酶( Otubainproteases, OTU), 含 Machado-Joseph 结构域的蛋白酶( machado-Joseph disease protein domain proteases, MJD), JAMM 金属蛋白酶( JAMM/

MPN domain-associated metalloproteinase, JAMM), 单核细胞趋化蛋白诱导蛋白 (monocyte chemo-tactic protein-induced protein, MCPPI) 以及模体蛋白酶 (motif interacting with Ub-containing novel DUB family, MINDY), 除 JAMM 为锌金属蛋白酶外其余均为丝氨酸蛋白酶<sup>[10-13]</sup>。在细胞中, 去泛素化酶家族已被发现在包括细胞增殖、转录后调控等多方面起到重要作用<sup>[14-17]</sup>, 同时对于肿瘤发生发展的关键信号通路比如 Hippo 及 Wnt 通路起到调控作用<sup>[18-21]</sup>, 因此去泛素化酶家族在肿瘤的发生发展中起到关键作用<sup>[22-24]</sup>, 其中最有名的是能够调控 P53 蛋白的诸多去泛素化酶<sup>[25-27]</sup>。尽管去泛素化酶家族在肿瘤的发生、发展中的作用已经越来越为人所知, 但是少见关于 USP53 的研究, 本课题组前期研究表明 USP53 可能是一个缺乏酶活性的蛋白, 最近文献显示在 USP53 突变的小鼠中, 可以观察到耳蜗毛细胞的变性及 Cortis 器的破坏, 从而使得小鼠听力进行性下降, 而在恶性肿瘤中却没有相关报道<sup>[8-9]</sup>。

本研究在收集的结直肠癌患者组织样品中, 通过 Real-time PCR 及 IHC 等实验手段, 初步确定了 USP53 在正常组织中高表达而肿瘤组织中低表达。通过国外癌症研究数据 TCGA 数据库中的表达谱芯片及临床随访的数据, 证实了结直肠癌组织中 USP53 mRNA 的表达水平与预后成正比, 表达越高, 预后越好。此外, 为了研究体外 USP53 对结直肠癌细胞的影响, 本研究在人结直肠癌细胞株 HCT116 中瞬时过表达 USP53, 通过 CKK-8 及克隆形成实验证明 USP53 可以在体外抑制肿瘤细胞的增殖。

结合临床及基础实验得到的数据, USP53 能够影响细胞增殖, 虽与传统分期相关的 T、N、M 无显著相关性, 但是通过分析可以发现 USP53 表达水平与肿瘤大小、化疗抵抗存在相关性, 因此 USP53 可能通过肿瘤大小影响肿瘤缺氧区大小, 调控相应基因如 HIF1A 表达从而导致诸如化疗抵抗等相关肿瘤特性从而影响肿瘤预后<sup>[28-29]</sup>。

另外, 本研究发现正常组织中 USP53 呈现管腔面高而基底面低的趋势, 在冠状面尤为明显, 故对于横切的组织, 阳性率与切割平面相关。通过找寻特殊位点, 可以发现肿瘤中 USP53 的表达模式为管腔面高于基底面。USP53 在结直结直肠癌中低表达与较差预后、化疗抵抗及肿瘤大小相关, 过表达 USP53 可以抑制肿瘤细胞的体外增殖, 推测 USP53 在结直肠癌中可能作为一个抑癌基因发挥作用, 而其深入机制和功能仍然有待发掘, 其在正常肠黏膜组织中的差异表达仍然值得研究。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015 [ J ]. CA Cancer J Clin, 2015, 65( 1 ): 5-29. DOI:10.3322/caac.21254.
- [ 2 ] POURHOSEINGHOLI M A. Increased burden of colorectal cancer in Asia[ J ]. World J Gastrointest Oncol, 2012, 4( 4 ): 68-70. DOI:10.4251/wjgo.v4.i4.68.
- [ 3 ] PERDAWID S K, HEMMINGSEN L, BOESBY S, et al. Survival after elective surgery for colonic cancer in Denmark[ J ]. Colorectal Dis, 2012, 14( 7 ): 832-837. DOI:10.1111/j.1463-1318.2011.02821.x.
- [ 4 ] GLICKMAN M H, CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction[ J ]. Physiol Rev, 2002, 82( 2 ): 373-428. DOI:10.1152/physrev.00027.2001.
- [ 5 ] CHEN Z J, SUN L J. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling[ J ]. Mol Cell, 2009, 33( 3 ): 275-286. DOI:10.1016/j.molcel.2009.01.014.
- [ 6 ] YUAN J, LUO K, ZHANG L, et al. USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53[ J ]. Cell, 2010, 140( 3 ): 384-396. DOI:10.1016/j.cell.2009.12.032.
- [ 7 ] MADAN B, WALKER M P, YOUNG R, et al. USP6 oncogene promotes Wnt signaling by deubiquitylating Frizzleds[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113( 21 ): E2945-E2954[ 2011-11-26 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4889410/>. DOI: 10.1073/pnas.1605691113.
- [ 8 ] KURBAN M, KIM C A, KIURU M, et al. Copy number variations on chromosome 4q26-27 are associated with Cantu syndrome [ J ]. Dermatology, 2011, 223( 4 ): 316-320. DOI: 10.1159/000333800.
- [ 9 ] KAZMIERCZAK M, HARRIS S L, KAZMIERCZAK P, et al. Progressive hearing loss in mice carrying a mutation in Usp53[ J ]. J Neurosci, 2015, 35( 47 ): 15582-15598. DOI:10.1523/JNEUROSCI.1965-15.2015.
- [ 10 ] KOMANDER D, CLAGUE M J, URBE 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.
- [ 11 ] FRAILE J M, QUESADA V, RODRIGUEZ D, et al. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options[ J ]. Oncogene, 2012, 31( 19 ): 2373-2388. DOI: 10.1038/onc.2011.443.
- [ 12 ] KOLATTUKUDY P E, NIU J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway[ J ]. Circ Res, 2012, 110( 1 ): 174-189. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243212.
- [ 13 ] ABDUL REHMAN S A, KRISTARIYANTO Y A, CHOI S Y, et al. MINDY-1 is a member of an evolutionarily conserved and structurally distinct new family of deubiquitinating enzymes[ J ]. Mol Cell, 2016, 63( 1 ): 146-155. DOI:10.1016/j.molcel.2016.05.009.
- [ 14 ] BELLE J I, NIJNIK A. H2A-DUBbing the mammalian epigenome: expanding frontiers for histone H2A deubiquitinating enzymes in

cell biology and physiology[ J ]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 50 ( 1 ): 161-174. DOI:10.1016/j.biocel.2014.03.004.

[ 15 ] BAIETTI M F, SIMICEK M, ABBASI ASBAGH L, et al. OTUB1 triggers lung cancer development by inhibiting RAS monoubiquitination[ J ]. EMBO Mol Med, 2016, 8( 3 ): 288-303. DOI:10.15252/emmm.201505972.

[ 16 ] LIM K H, SONG M H, BAEK K H. Decision for cell fate: deubiquitinating enzymes in cell cycle checkpoint[ J ]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73( 7 ): 1439-1455. DOI:10.1007/s00018-015-2129-2.

[ 17 ] KIM J, KIM W J, LIU Z, et al. The ubiquitin-specific protease USP2a enhances tumor progression by targeting cyclin A1 in bladder cancer[ J ]. Cell Cycle, 2012, 11( 6 ): 1123-1130. DOI:10.4161/cc.11.6.19550.

[ 18 ] CHEN Y, LI Y, XUE J et al. Wnt-induced deubiquitination FoxM1 ensures nucleus beta-catenin transactivation[ J ]. EMBO J, 2016, 35( 6 ): 668-684. DOI:10.15252/emboj.201592810.

[ 19 ] YANG B, ZHANG S, WANG Z, et al. Deubiquitinase USP9X deubiquitinates beta-catenin and promotes high grade glioma cell growth[ J ]. Oncotarget, 2016, 7( 48 ):79515-79525. DOI:10.18632/oncotarget.12819.

[ 20 ] KIM M, KIM M, PARK S J, et al. Role of Angiomotin-like 2 mono-ubiquitination on YAP inhibition[ J ]. EMBO Rep, 2016, 17 ( 1 ): 64-78. DOI:10.15252/embr.201540809.

[ 21 ] THANH NGUYEN H, ANDREJEVA D, GUPTA R, et al. Deubiquitylating enzyme USP9x regulates hippo pathway activity by controlling angiomotin protein turnover[ J/OL ]. Cell Discov, 2016, 2: 16001 [ 2016-11-26 ]. <http://www.nature.com/articles/celldisc20161>. DOI:10.1038/celldisc.2016.1.

[ 22 ] ZHAO Y, THORNTON A M, KINNEY M C, et al. The deubiquitinase CYLD targets Smad7 protein to regulate transforming growth factor beta ( TGF-beta ) signaling and the development of regulatory T cells[ J ]. J Biol Chem, 2011, 286( 47 ): 40520-40530. DOI: 10.1074/jbc.M111.292961.

[ 23 ] YUASA-KAWADA J, KINOSHITA-KAWADA M, RAO Y, et al. Deubiquitinating enzyme USP33/VDU1 is required for Slit signaling in inhibiting breast cancer cell migration[ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106( 34 ): 14530-14535. DOI:10.1073/pnas.0801262106.

[ 24 ] 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. DOI:10.1016/j.ccr.2012.08.007.

[ 25 ] SUN X X, DAI M S. Deubiquitinating enzyme regulation of the p53 pathway: a lesson from Otub1[ J ]. World J Biol Chem, 2014, 5 ( 2 ): 75-84. DOI:10.4331/wjbc.v5.i2.75.

[ 26 ] ZOU Q, JIN J, HU H, et al. USP15 stabilizes MDM2 to mediate cancer-cell survival and inhibit antitumor T cell responses[ J ]. Nat Immunol, 2014, 15( 6 ): 562-570. DOI:10.1038/ni.2885.

[ 27 ] ATANASSOV B S, DENT S Y. USP22 regulates cell proliferation by deubiquitinating the transcriptional regulator FBPI[ J ]. EMBO Rep, 2011, 12( 9 ): 924-930. DOI:10.1038/embor.2011.140.

[ 28 ] QIU Y Y, HU S J, BAO Y J, et al. Anti-angiogenic and anti-proliferative effects of inhibition of HIF-1alpha by p-HIF-1alpha RNAi in colorectal cancer[ J ]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8( 7 ): 7913-7920.

[ 29 ] ZHANG J, ZHU L, FANG J, et al. LRG1 modulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in colorectal cancer via HIF-1alpha activation[ J/OL ]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35: 29 [ 2016-11-26 ]. <https://jccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-016-0306-2>. DOI:10.1186/s13046-016-0306-2.

[ 收稿日期 ] 2017-01-03 [ 修回日期 ] 2017-03-08  
[ 本文编辑 ] 韩丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

### 参考文献题名后应标注文献类型和文献载体标识代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2015《信息与文献 参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求,每条文献的题名后都应标上[ 文献类型标识代码 ]或[ 文献类型标识代码/文献载体标识代码 ]。对纸质文献,如为期刊中析出文献,题名后应标上[ J ];如为专著中析出文献,题名后应标上[ M ]。对电子资源类文献,如为网络期刊析出文献,题名后须标上[ J/OL ];如为网络专著中析出文献,题名后须标上[ M/OL ]。现将常用文献类型标识和电子文献载体标识代码列于表 1 作一介绍。

表 1 文献类型和文献载体标识代码

文献类型	标识代码	文献类型	标识代码	载体类型	标识代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会 议 录	C	数 据 库	DB	联机网络	OL
学 位 论 文	D	计 算 机 程 序	CP		
报 告	R	电 子 公 告	EB		