

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.10.007

泛素特异性蛋白酶21对胆管癌细胞增殖及迁移的影响及机制

陶璐¹, 张耀东², 邵沈焯², 宗前兴³, 陈妍安澜² (1. 东南大学附属中大医院 急诊科, 江苏 南京 210009; 2. 南京医科大学第一附属医院 肝胆外科, 江苏 南京 210029; 3. 江苏大学京江学院 生命科学技术学院, 江苏 镇江 212100)

[摘要] **目的:** 探究泛素特异性蛋白酶21(USP21)在胆管癌(CCA)中的表达及其对CCA细胞增殖与迁移的作用及其机制。**方法:** 通过生物信息学方法和免疫组化及WB法检测CCA组织及细胞中USP21的表达情况。利用体外克隆形成、EdU及Transwell实验检测敲低USP21对CCA细胞QBC939和RBE增殖及迁移的影响。通过RNA测序、质谱、免疫共沉淀(Co-IP)及WB法探究USP21的促癌机制。**结果:** TCGA等数据库分析结果显示, USP21 mRNA在CCA组织中呈高表达(均 $P < 0.05$)。USP21蛋白在CCA组织和细胞中呈高表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$)。敲低USP21后, QBC939和RBE细胞的增殖和迁移能力均显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。RNA测序结果表明, 敲低USP21可以通过抑制PI3K/AKT信号通路抑制CCA细胞的增殖和迁移能力($P < 0.05$)。质谱鉴定发现, USP21与胰岛素样生长因子2 mRNA结合蛋白1(IGF2BP1)相结合。Co-IP和WB实验结果表明, USP21与IGF2BP1结合并通过泛素化途径调控IGF2BP1的蛋白表达($P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$)。**结论:** USP21在CCA组织和细胞中均呈高表达, 其通过IGF2BP1/PI3K/AKT信号通路增强CCA细胞的增殖及迁移能力。

[关键词] 泛素特异性蛋白酶21; 胰岛素样生长因子2 mRNA结合蛋白1; 胆管癌; 增殖; 迁移; PI3K/AKT信号通路

[中图分类号] R735.8; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)10-0984-07

Effect and mechanism of ubiquitin-specific protease 21 on proliferation and migration of cholangiocarcinoma cells

TAO Lu¹, ZHANG Yaodong², SHAO Shenye², ZONG Qianxing³, CHEN Yananlan² (1. Department of Emergency, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 3. School of Life Sciences and Biotechnology, Jiangsu University Jingjiang College, Zhenjiang 212100, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objectives:** To investigate the expression of ubiquitin-specific protease 21 (USP21) in cholangiocarcinoma (CCA) and its effect on the proliferation and migration of CCA cells, as well as the underlying mechanisms. **Methods:** The expression of USP21 in CCA tissues and cells was detected using bioinformatics approaches, immunohistochemistry, and Western blotting (WB). The effects of USP21 knockdown on the proliferation and migration of CCA cell lines (QBC939 and RBE) were assessed by *in vitro* colony formation, EdU, and Transwell assays. The oncogenic mechanism of USP21 was explored using RNA sequencing, mass spectrometry, co-immunoprecipitation (CO-IP), and WB. **Results:** Analysis of databases such as TCGA revealed that USP21 mRNA expression was significantly elevated in CCA tissues ($P < 0.05$) and USP21 protein expression was highly expressed in both CCA tissues and cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$, or $P < 0.001$). Knockdown of USP21 led to a significant decrease in the proliferative and migratory abilities of QBC939 and RBE cells ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). RNA sequencing results indicated that USP21 knockdown inhibited the proliferative and migratory abilities of CCA cells by suppressing the PI3K/AKT signaling pathway ($P < 0.05$). Mass spectrometry identified a binding between USP21 and insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1). Co-IP and WB results demonstrated that USP21 interacts with IGF2BP1 and regulates its protein expression through the ubiquitination pathway ($P < 0.001$ or $P < 0.0001$). **Conclusion:** USP21 is highly expressed in both CCA tissues and cells and enhances the proliferative and migratory abilities of CCA through the IGF2BP1/PI3K/AKT signaling pathway.

[Key words] ubiquitin-specific protease 21 (USP21); insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1); cholangiocarcinoma (CCA); proliferation; migration; PI3K/AKT signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(10): 984-990. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.10.007]

[基金项目] 江苏省基础研究计划自然科学基金-青年基金项目(No. BK20220723)

[作者简介] 陶璐(1997—), 硕士, 主要从事肝胆肿瘤发生发展的机制及治疗研究, E-mail: 1879120635@qq.com

[通信作者] 陈妍安澜, E-mail: 631990332@qq.com

胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)起源于胆管上皮,是一种病死率极高的恶性肿瘤。根据肿瘤在胆道树中的位置,可分为肝内、肝门部和远端CCA^[1]。近年来,CCA的发病率逐渐上升,已成为第二大常见的原发性肝恶性肿瘤^[2]。研究结果^[3-4]表明,手术切除是治疗CCA最有效的方法。然而由于早期无特异性症状,CCA患者确诊时往往处于疾病晚期,预后较差。因此,寻找CCA的潜在治疗靶点和预后预测因子尤为重要。人类基因组编码了约100种去泛素化酶(deubiquitylating enzyme, DUB),其中五种亚型为半胱氨酸蛋白酶^[5]。越来越多的证据^[6]表明,DUB的失调与人类肿瘤的进展有关。泛素特异性蛋白酶21(ubiquitin specific protease 21, USP21)是DUB中的一员,与肿瘤的发生和发展密切相关。在胰腺癌中,USP21通过激活Wnt信号通路促进肿瘤发生^[7]。此外,USP21通过去泛素化FOXO1促进间质胶质母细胞瘤干细胞的致瘤^[8]。在CCA中,USP21上调可促进肿瘤细胞增殖及迁移并与患者预后不良相关,但其具体作用机制有待进一步深入研究^[9-10]。胰岛素样生长因子2 mRNA结合蛋白1(insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1, IGF2BP1)可通过m⁶A依赖的方式调控靶mRNA的稳定性,从而调控基因翻译^[11]。IGF2BP1在多种肿瘤中表达升高,发挥致癌作用^[12]。在CCA中,IGF2BP1激活ZIC2/AKT轴调控CCA生长和转移^[13]。然而USP21与IGF2BP1的作用关系尚不清楚。本研究利用生物信息学方法和免疫组化及WB法检测CCA组织与细胞中USP21的表达水平,探讨敲低USP21基因对CCA细胞增殖、迁移能力的影响及其分子机制,为CCA诊断和治疗提供新的标志物和治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 USP21表达数据的来源及分析方法

利用GEO数据库的GEO2R程序获取GSE26566、GSE107943及GSE45001数据集每个样本中USP21 mRNA表达数据并进行统计分析。通过GEPIA2(<http://GEPIA2.cancer-pku.cn/>)从TCGA数据库中检测USP21表达水平。

1.2 细胞、组织标本及主要试剂

人CCA细胞QBC939、HuCCT1、RBE、HCC9810和人胆管上皮细胞HIBEC购自中科院上海细胞库。在含10%胎牛血清和1%抗生素的DMEM培养基中,于37℃、5%CO₂、20%O₂的培养箱中培养。

从2008年6月至2017年3月间在南京医科大学第一附属医院肝胆外科接受外科手术的CCA患者中挑选2例纳入本研究。病例纳入标准:2例均经病理学确诊为CCA;患者在手术前均未接受过放疗、化疗或其他相关治疗。病例排除标准:CCA患者术前接受相关治

疗;患有其他恶性疾病的CCA患者。此研究符合赫尔基辛宣言,经南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准(伦理批准号:2019-SR-133)。

DMEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和0.25%胰蛋白酶等细胞培养试剂购自美国Gibco公司,靶向USP21小干扰RNA(siRNA)购自上海吉玛公司,Transwell小室购自美国Corning公司,BCA蛋白测定试剂盒购自美国Thermo公司,USP21一抗购自美国Santa Cruz公司, β -actin抗体购自美国Abcam公司,AKT、p-AKT、PI3K和p-PI3K抗体购自中国Proteintech公司。qPCR引物由锐尔真生物技术有限公司合成,逆转录试剂盒和qPCR试剂盒均购自诺唯赞生物试剂股份有限公司。

1.3 免疫组化染色法检测CCA组织中USP21蛋白的表达

采用半定量评分法测定USP21的表达水平。评分标准:依据染色强度和阳性细胞百分率进行评分。染色强度评分:阴性为0分,弱阳性为1分,中等阳性为2分,强阳性3分;阳性细胞百分率评分:<5%为0分,>5%~35%为1分,>35%~70%为2分,>70%为3分。将染色强度评分与阳性细胞百分率评分相乘计算总分。由两名病理医师独立计算每张切片的染色分数,两者平均分作为最终分数。

1.4 细胞转染及分组

选用对数生长期的QBC939和RBE细胞,使用Lipofectamine 3000进行siRNA转染。将USP21-1(引物序列为5'-TCACTAAGGAAGAAGAGCT-3')和USP21-2(引物序列为5'-AACCTAATGTGGAAACGTT-3')及其阴性对照(si-NC)质粒转染QBC939和RBE细胞。实验分为si-NC、USP21-1和USP21-2组。

1.5 克隆形成实验检测敲低USP21对CCA细胞克隆形成的影响

取各组QBC939和RBE细胞,以每孔 1×10^3 个细胞的数量均匀接种于六孔板中,连续培养10 d,弃上清,PBS清洗3遍,在4%甲醛溶液中固定30 min,在0.5%结晶紫染色液中染色20 min,晾干后计数克隆形成数(50个细胞/克隆)。

1.6 EdU实验检测敲低USP21对CCA细胞增殖的影响

使用EdU细胞增殖试剂进行实验。取各组CCA细胞,当细胞汇合度达80%时接种到4孔板(1×10^6 个细胞/孔),培养24 h后,在10 μ mol/L EdU培养基中处理2 h。4%多聚甲醛溶液中固定15 min,0.3%Triton渗透15 min后,用EdU工作液避光染色30 min,DAPI避光染色10 min。荧光显微镜下观察细胞并拍照。

1.7 Transwell小室法检测敲低USP21对CCA细胞迁移的影响

消化离心各组细胞,重悬细胞并计数。将 2×10^4 个细胞置于300 μ L无血清培养基中,加于Transwell小

室的上室中,下室中加入 600 μL 含 20% 血清的 DMEM 培养基中。将细胞置于 5% CO_2 、20% O_2 、37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养 72 h,随后将 Transwell 小室放入 4% 甲醛溶液中固定 30 min,结晶紫染色 20 min,晾干后在光学显微镜下观察计数穿膜细胞数。

1.8 免疫共沉淀(Co-IP)实验检测 USP21 与 IGF2BP1 的结合能力及对 IGF2BP1 泛素化水平的影响

PBS 清洗各组 CCA 细胞,使用 NP40 及蛋白酶抑制剂裂解细胞并提取总蛋白,用抗 USP21 抗体与蛋白液混合后于 4 $^\circ\text{C}$ 培养过夜。加入预处理的磁珠,于常温下反应结合 90 min 后,使用磁力架收集磁珠,清洗磁珠 3 遍,加蛋白上样缓冲液,95 $^\circ\text{C}$ 煮 10 min。收集蛋白液检测 IGF2BP1 表达。采用抗 IGF2BP1 抗体,重复上述步骤,收集蛋白液,检测泛素化水平。

1.9 银染及质谱鉴定可能与 USP21 互作的结合蛋白

银离子染色实验在进行 WB 电泳后依照碧云天银染试剂盒方法进行实验。质谱分析由广东深圳华大基因公司完成。

1.10 RNA 测序

使用 TRIzol 试剂从 si-NC 组和 si-USP21 组的 QBC939 细胞中提取总 RNA。总 RNA 的纯度和浓度由 NanoDrop 2000 核酸蛋白分析仪测定。RNA 测序分析由派森诺公司完成。

1.10 免疫荧光染色法检测 CCA 细胞中 USP21 及 IGF2BP1 共定位情况

贴在载玻片上的细胞用 4% 多聚甲醛固定,用免疫染色渗透缓冲液渗透。洗净后,用 5% BSA 在 PBS 中阻断

1 h,室温下用合适的一抗在 4 $^\circ\text{C}$ 下反应过夜。细胞清洗 3 次,与相应的二抗室温反应 1 h。细胞核用 DAPI 染色。

1.11 WB 法检测 CCA 细胞 USP21 蛋白的表达及 USP21 对 IGF2BP1 和 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达的影响

裂解细胞后提取总蛋白。进行 10% SDS-PAGE,将蛋白质条带转移到 PVDF 膜上。PVDF 膜在阻断缓冲液中阻断 20 min,与一抗在稀释缓冲液中 4 $^\circ\text{C}$ 反应过夜。随后,将 PVDF 膜用相应的二抗处理 2 h。最后,使用 ECL 试剂盒和化学发光凝胶成像系统对蛋白质条带进行可视化处理。

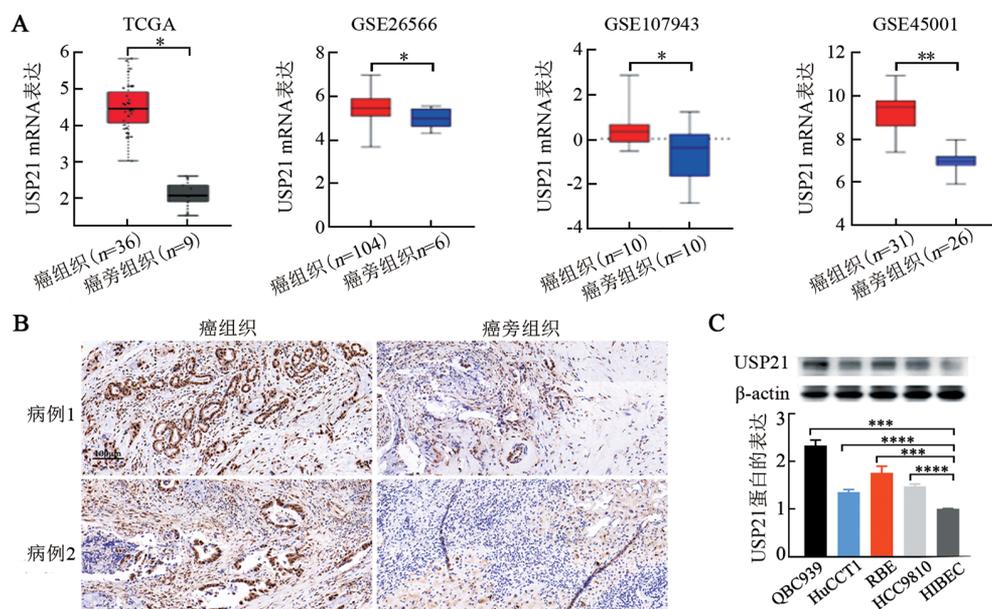
1.12 统计学处理

以上主要实验均独立重复 3 次。采用 GraphPad Prism 9 对实验数据进行统计分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异比较采用 *t* 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 USP21 在 CCA 组织和细胞中均呈高表达

通过 TCGA、GSE26566、GSE107943 和 GSE45001 数据库分析结果(图 1A)发现,CCA 组织中 USP21 mRNA 表达水平显著高于癌旁组织($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。免疫组化染色检测结果(图 1B,)显示,CCA 组织中 USP21 蛋白表达水平高于癌旁组织(患者 1: 9 分 vs 4 分;患者 2: 6 分 vs 1 分)。WB 法检测结果(图 1C)显示,CCA 细胞中 USP21 蛋白表达水平显著高于 HIBEC 细胞($P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$)。结果表明,USP21 在 CCA 组织和细胞中均呈高表达。



A: 利用 TCGA 及相关数据库数据分析 USP21 mRNA 在 CCA 组织及癌旁组织中的表达差异; B: 免疫组化法检测 CCA 组织和癌旁组织中 USP21 蛋白的表达 ($\times 200$); C: WB 法检测 CCA 细胞和 HIBEC 细胞中 USP21 蛋白的表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

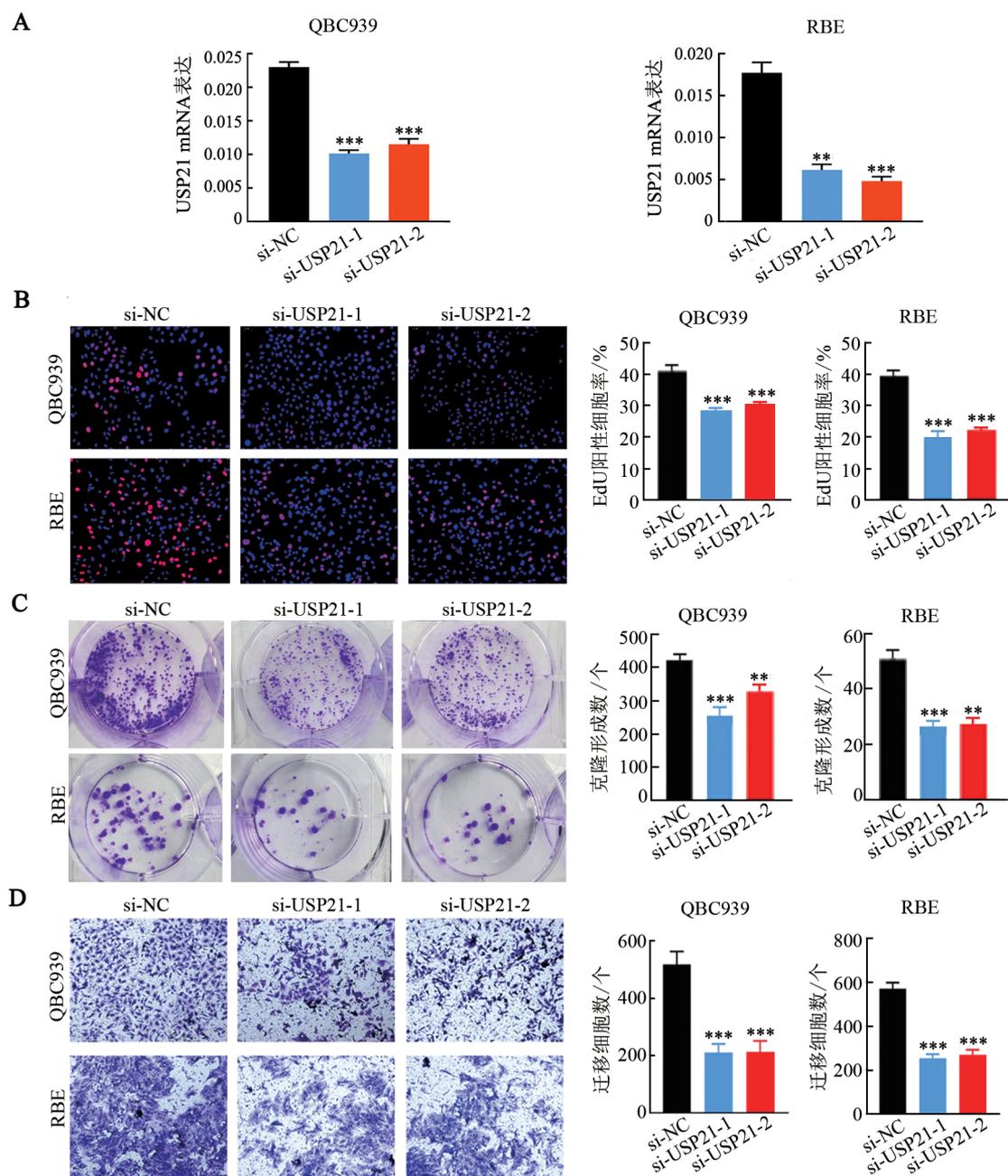
图 1 CCA 组织和细胞中 USP21 呈高表达

2.2 敲低 USP21 可显著降低 CCA 细胞的增殖和迁移能力

qPCR 法检测结果(图 2A)显示,在 QBC939 及 RBE 细胞中敲低 USP21 后,两种细胞 USP21 mRNA 表达水平均显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),表明成功建立敲低 USP21 基因的细胞系,可以进行后续功能实验。

EdU 实验结果(图 2B)显示,与 si-NC 组相比,si-USP21-1 组及 si-USP21-2 组 QBC939、RBE 细胞的 EdU 阳性细胞率均显著降低($t = 10.73、8.611$,

$t = 13.70、13.47$; 均 $P < 0.001$)。克隆形成实验结果(图 2C)显示,与 si-NC 组相比,si-USP21-1 组及 si-USP21-2 组 QBC939、RBE 细胞的克隆形成数量均显著减少($t = 9.311、5.722, t = 9.621、8.367$; $P < 0.001$ 或 $P < 0.01$)。Transwell 小室法检测结果(图 2D)显示,与 si-NC 组相比,si-USP21-1 组及 si-USP21-2 组 QBC939、RBE 细胞的迁移数目均显著减少($t = 16.44、14.54, t = 9.716、8.885$; 均 $P < 0.001$)。实验结果表明,敲低 USP21 可显著降低 CCA 细胞的增殖和迁移能力。



A: qPCR 法验证敲低 USP21 的效率; B: EdU 实验检测 CCA 细胞的增殖能力($\times 200$); C: 克隆形成实验检测 CCA 细胞的克隆形成能力; D: Transwell 实验检测 CCA 细胞的迁移能力($\times 200$)。与 si-NC 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 敲低 USP21 对 CCA 细胞 USP21 mRNA 表达、增殖、克隆形成及迁移能力的影响

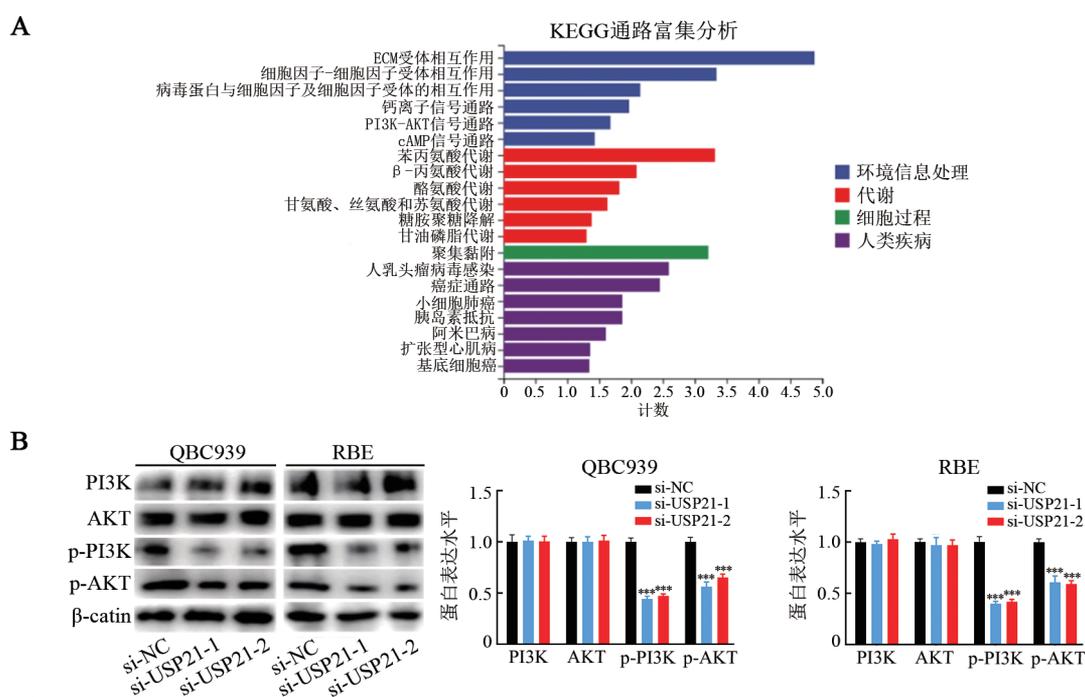
2.3 USP21 通过调控PI3K/AKT 通路促进 CCA 进展

为探寻 USP21 调控 CCA 进展的具体作用机制, 对 si-NC 组及 si-USP21 敲低组 QBC939 细胞进行转录组测序, 结果发现 PI3K/AKT 是主要的活化通路 (图 4A, $P < 0.05$)。WB 法进一步验证敲低 USP21 可显著降低 AKT 及 PI3K 磷酸化水平 (图 4B, 均 $P < 0.001$)。结果表明, USP21 可通过 PI3K/AKT 信号通路促进 CCA 进展。

2.4 USP21 可使 IGF2BP1 去泛素化

为进一步探究 USP21 调控 PI3K-AKT 通路的分子机制, 通过银离子染色及质谱鉴定, 确定了 USP21 的结合蛋白是 IGF2BP1 (图 4A、B)。IGF2BP1 可通过 PI3K/AKT 信号通路促进 CCA 的进展^[14]。进一步行

免疫荧光染色, 确定了 USP21 与 IGF2BP1 存在空间上的共定位 (图 4C)。Co-IP 实验, 验证 USP21 和 IGF2BP1 的结合 (图 4D)。结果发现, 敲低 USP21 后, IGF2BP1 的表达受到显著抑制, 蛋白酶体抑制剂 MG132 可逆转这一结果 (图 4E, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$; 图 4F, $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$)。WB 法进一步检测发现, 敲低 USP21 可显著提高 IGF2BP1 的泛素化水平 (图 4G, $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$)。TCGA 数据库中相关性分析结果 (图 4H) 表明, CCA 组织中 USP21 与 IGF2BP1 mRNA 表达相关性无统计学意义 ($P > 0.05$)。上述研究结果表明, USP21 可通过调控 IGF2BP1 泛素化调控其表达。



A: RNA 测序提示敲低 USP21 可通过 PI3K/AKT 通路调控 CCA 进展; B: WB 法检测敲低 USP21 对 AKT 及 PI3K 蛋白表达的影响。与 si-NC 组比较, $^{**}P < 0.001$ 。

图3 敲低 USP21 通过下调 PI3K/AKT 通路抑制 CCA 进展

3 讨论

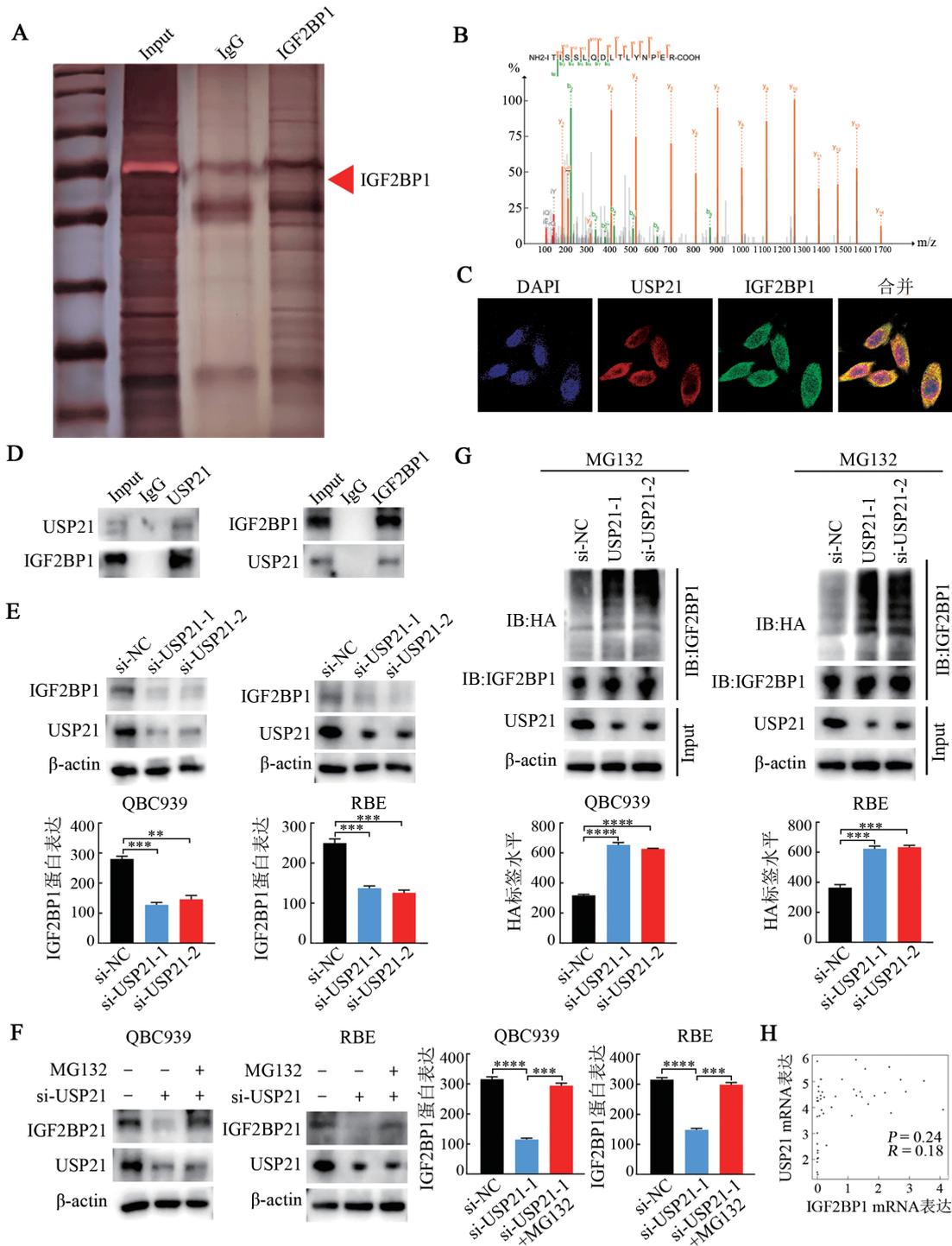
CCA 是仅次于肝细胞癌的第二大常见原发性肝恶性肿瘤, 其发病隐匿、预后不良。目前, 外科根治性 R0 切除仍是 CCA 治疗的最有效方法^[15], 术后辅助性化疗可有效延长患者生存期^[16]。然而, 许多患者存在耐药的情况, 因此亟须寻找新的治疗靶点。越来越多的证据^[17]表明, DUB 家族成员在肿瘤进展中发挥着关键作用。LIAO 等^[18]研究发现, USP1 通过稳定 RPS16 蛋白调控人肝细胞癌细胞的增殖和转移。在骨肉瘤及 CCA 中也证实了 USP1 的促癌作用^[19-20]。靶

向 USP44 可显著抑制前列腺癌细胞的致瘤性及干性^[21]。此外, USP21 可以通过稳定 MEK2 蛋白促进肝细胞癌的生长^[22]。但是 USP21 在 CCA 中 DUB 的分子机制仍需进一步研究。

本研究利用多个数据库及本中心组织标本验证了 USP21 在 CCA 组织中的高表达, 随后利用 siRNA 在 CCA 细胞中敲低 USP21, 功能验证发现敲低 USP21 可显著抑制 CCA 细胞的增殖及迁移能力。为进一步探究 USP21 调控 CCA 进展的作用机制, 行 RNA 测序结果发现, USP21 敲低后差异基因显著富集于 PI3K/AKT 信号通路。WB 实验进一步验证了这

一结果。既往研究^[23-25]表明,PI3K/AKT信号通路在包含CCA在内的多种肿瘤中发挥促癌效应。进一步深入研究后发现,USP21能够与IGF2BP1结合,并通过泛素蛋白酶体途径调控其降解,然而USP21与IGF2BP1的具体结合位点及USP21调控IGF2BP1去

泛素化的具体泛素链形式有待未来进一步研究。既往研究^[14]证实,在CCA中,IGF2BP1可通过激活PI3K/AKT信号通路调控肿瘤进展。因此,笔者认为USP21可通过泛素蛋白酶体途径调控IGF2BP1蛋白的表达进而调控PI3K/AKT信号通路。



A: 银染显示IgG及USP21结合差异蛋白;B:IP/MS证实IGF2BP1与USP21结合;C:免疫荧光染色显示USP21与IGF2BP1共定位($\times 400$);D:Co-IP实验证实USP21与IGF2BP1结合;E:敲低USP21可抑制IGF2BP1蛋白表达;F:MG132可逆转USP21对IGF2BP1的抑制作用;G:USP21通过调控IGF2BP1去泛素化发挥作用;H:TCGA数据库相关性分析CCA组织中USP21与IGF2BP1 mRNA相关性。Input:蛋白裂解液组; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图4 USP21通过翻译后修饰调控IGF2BP1表达

综上所述, USP21 在 CCA 组织和细胞中呈高表达, 其可通过 IGF2BP1/PI3K/AKT 信号通路促进 CCA 细胞的增殖及迁移。本研究从转录后调控及翻译后修饰双层面探究了 USP21 调控 CCA 的分子机制, 为协助临床医生诊断 CCA 及判断疾病进展提供参考, 同时为 CCA 患者的靶向治疗提供了新的研究方向。

[参考文献]

- [1] BANALES J, MARIN J, LAMARCA A, *et al.* Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17: 557-588. DOI: 10.1038/s41575-020-0310-z.
- [2] FLORIO A A, FERLAY J, ZNAOR A, *et al.* Global trends in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma incidence from 1993 to 2012[J]. *Cancer*, 2020, 126(11): 2666-2678. DOI: 10.1002/cncr.32803.
- [3] ALABRABA E, JOSHI H, BIRD N, *et al.* Increased multimodality treatment options has improved survival for hepatocellular carcinoma but poor survival for biliary tract cancers remains unchanged[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2019, 45(9): 1660-1667. DOI: 10.1016/j.ejso.2019.04.002.
- [4] TAURA K. Comment on "meta-analysis and meta-regression of survival after liver transplantation for unresectable perihilar cholangiocarcinoma"[J]. *Ann Surg*, 2021, 274(6): e920-e921. DOI: 10.1097/SLA.0000000000005016.
- [5] D'ARCY P, WANG X, LINDER S. Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 147: 32-54. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.002.
- [6] LANGE S M, ARMSTRONG L A, KULATHU Y. Deubiquitinases: from mechanisms to their inhibition by small molecules[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(1): 15-29. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.10.027.
- [7] HOU P P, MA X D, ZHANG Q, *et al.* USP21 deubiquitinase promotes pancreas cancer cell stemness *via* Wnt pathway activation[J]. *Genes Dev*, 2019, 33(19/20): 1361-1366. DOI: 10.1101/gad.326314.119.
- [8] ZHANG Q X, CHEN Z X, TANG Q K, *et al.* USP21 promotes self-renewal and tumorigenicity of mesenchymal glioblastoma stem cells by deubiquitinating and stabilizing FOXD1[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(8): 712[2024-02-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9381540/>. DOI: 10.1038/s41419-022-05163-3.
- [9] ZHOU P, SONG T, SUN C J, *et al.* USP21 upregulation in cholangiocarcinoma promotes cell proliferation and migration in a deubiquitinase-dependent manner[J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2021, 17(6): 471-477. DOI: 10.1111/ajco.13480.
- [10] XU X, CHEN Y, SHAO S Y, *et al.* USP21 deubiquitinates and stabilizes HSP90 and ENO1 to promote aerobic glycolysis and proliferation in cholangiocarcinoma[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(4): 1492-1508. DOI: 10.7150/ijbs.90774.
- [11] JIANG X L, LIU B Y, NIE Z, *et al.* The role of m⁶A modification in the biological functions and diseases[J/OL]. *Sig Transduct Target Ther*, 2021, 6: 74[2024-02-18]. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00450-x>. DOI: 10.1038/s41392-020-00450-x.
- [12] HUANG X W, ZHANG H, GUO X R, *et al.* Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) in cancer[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 88[2024-02-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29954406/>. DOI: 10.1186/s13045-018-0628-y.
- [13] XIAO P, MENG Q H, LIU Q, *et al.* IGF2BP1-mediated N⁶-methyladenosine modification promotes intrahepatic cholangiocarcinoma progression[J/OL]. *Cancer Lett*, 2023, 557: 216075 [2024-02-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36736530/>. DOI: 10.1016/j.canlet.2023.216075.
- [14] SUN L X, SUN W, SONG H B, *et al.* MiR-885-5p inhibits proliferation and metastasis by targeting IGF2BP1 and GALNT3 in human intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59(12): 1371-1381. DOI: 10.1002/mc.23262.
- [15] CILLO U, FONDEVILA C, DONADON M, *et al.* Surgery for cholangiocarcinoma[J]. *Liver Int*, 2019, 39(Suppl 1): 143-155. DOI: 10.1111/liv.14089.
- [16] OHAEGBULAM K C, KOETHE Y, FUNG A, *et al.* The multidisciplinary management of cholangiocarcinoma[J]. *Cancer*, 2023, 129(2): 184-214. DOI: 10.1002/cncr.34541.
- [17] CHEN S Y, LIU Y Q, ZHOU H C. Advances in the development ubiquitin-specific peptidase (USP) inhibitors[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4546[2024-02-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33925279/>. DOI: 10.3390/ijms22094546.
- [18] LIAO Y N, SHAO Z L, LIU Y, *et al.* USP1-dependent RPS16 protein stability drives growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 201[2024-02-18]. <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-021-02008-3>. DOI: 10.1186/s13046-021-02008-3.
- [19] ZHANG D Y, ZHU Y, WU Q, *et al.* USP1 promotes cholangiocarcinoma progression by deubiquitinating PARP1 to prevent its proteasomal degradation[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(10): 669[2024-02-18]. <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-021-02008-3>. DOI: 10.1038/s41419-023-06172-6.
- [20] YUAN P T, FENG Z H, HUANG H, *et al.* USP1 inhibition suppresses the progression of osteosarcoma *via* destabilizing TAZ[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(8): 3122-3136. DOI: 10.7150/ijbs.65428.
- [21] PARK J M, LEE J E, PARK C M, *et al.* USP44 promotes the tumorigenesis of prostate cancer cells through EZH2 protein stabilization[J]. *Mol Cells*, 2019, 42(1): 17-27. DOI: 10.14348/molcells.2018.0329.
- [22] LI W J, CUI K S, PROCHOWNIK E V, *et al.* The deubiquitinase USP21 stabilizes MEK2 to promote tumor growth[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 48[2024-02-18]2. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0523-z>. DOI: 10.1038/s41419-018-0523-z.
- [23] 姚佳丽, 石秀枝, 程圣旗, 等. NCOR2 基因通过调控 PI3K/AKT 通路促进食管鳞状细胞癌 KYSE450 细胞迁移和侵袭[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(4): 342-350. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.04.004.
- [24] 王湘宁, 张金华, 江娜, 等. 异莲心碱通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路影响结肠癌 SW480 细胞增殖、凋亡和自噬[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(7): 694-699. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.07.008.
- [25] JIANG W J, YANG X, SHI K H, *et al.* MAD2 activates IGF1R/PI3K/AKT pathway and promotes cholangiocarcinoma progression by interfering USP44/LIMA1 complex[J]. *Oncogene*, 2023, 42(45): 3344-3357. DOI: 10.1038/s41388-023-02849-6.

[收稿日期] 2024-02-19

[修回日期] 2024-09-08

[本文编辑] 党瑞山