



· 论 著 ·

PSMD7基因在人食管鳞癌组织中的表达及影响癌细胞增殖、凋亡的机制研究

张进忠¹, 石科^{1,2}, 郭丹¹, 杨亮¹, 闫秀明¹

1. 河南医学高等专科学校生物化学教研室, 河南 郑州 451191;
2. 郑州大学细胞生物研究室, 河南 郑州 450008

[摘要] 背景与目的: 26S蛋白酶体非ATP酶调节亚基7 (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7, PSMD7) 作为组成19S蛋白酶体盖子结构的核心成员是否参与肿瘤的发生、发展, 以及具体的分子机制尚不清楚。本实验将研究PSMD7基因在人食管鳞癌组织中的表达, 以及对癌细胞增殖及凋亡的影响。**方法:** 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测食管鳞癌及其癌旁正常组织标本中PSMD7的mRNA及蛋白表达情况。在人食管鳞癌细胞系TE-1中, 用慢病毒介导的RNA干扰技术下调PSMD7的表达, 观察细胞增殖及凋亡的变化, 检测线粒体膜电位的变化、细胞质中Cyt C的表达以及凋亡相关因子的表达。**结果:** PSMD7基因的mRNA和蛋白在食管鳞癌组织中的表达显著高于癌旁正常组织 ($P<0.05$), PSMD7蛋白的高表达与淋巴结转移阳性呈正相关 ($P<0.05$)。抑制PSMD7蛋白的表达可使细胞的增殖能力降低 ($P<0.05$), 并促进细胞的凋亡 ($P<0.05$), 同时线粒体膜电位降低, 促进Cyt C释放进入细胞质, 激活caspase级联反应, 说明抑制PSMD7的表达诱导细胞凋亡是通过线粒体信号通路进行的。**结论:** PSMD7在食管鳞癌中呈高表达, 并通过线粒体依赖的方式促进TE-1细胞凋亡。

[关键词] PSMD7; 食管鳞癌; 增殖; 凋亡; 线粒体

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2018.10.004

中图分类号: R735.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2018)10-0740-09

Expression of PSMD7 in human esophageal squamous cell carcinoma specimens and its effects on cell proliferation and apoptosis ZHANG Jinzhong¹, SHI Ke^{1,2}, GUO Dan¹, YANG Liang¹, YAN Xiuming¹ (1. Biochemistry Teaching and Research Office of Henan Medical College, Zhengzhou 451191, Henan Province, China; 2. Laboratory for Cell Biology of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, Henan Province, China)

Correspondence to: ZHANG Jinzhong E-mail: jinzhongzhang1@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** As a core member of 19S proteasome lid structure, whether 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 (PSMD7) is involved in the tumorigenesis and its molecular mechanism are unclear. The expression of PSMD7 in human esophageal squamous cell carcinoma specimens was investigated, and its effects on cell proliferation and apoptosis were examined. **Methods:** The mRNA expression and protein level of PSMD7 were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) and Western blot. PSMD7 was downregulated by lentivirus transfection in TE-1 cells. Cell proliferation and apoptosis were examined after PSMD7 inhibition. The mitochondrial membrane potential, expression of Cyt C and apoptosis-related proteins were investigated. **Results:** PSMD7 was highly expressed in human esophageal squamous cell carcinoma specimens at both mRNA and protein levels ($P<0.05$). The overexpression of PSMD7 was positively correlated with lymph node metastasis ($P<0.05$). The proliferation of TE-1 cells was decreased and the apoptosis was induced upon PSMD7 downregulation ($P<0.05$). The mitochondrial membrane potential was reduced whereas expression of cytosolic Cyt C was increased, followed by activation of caspase cascade reaction, suggesting PSMD7 downregulation induced apoptosis through the mitochondrial pathway.

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (16A310008, 18A310015); 河南省科技攻关计划项目 (152102310161, 162102310047); 河南省医学科技攻关计划项目 (201601027)。

通信作者: 张进忠 E-mail: jinzhongzhang1@163.com

Conclusion: PSMD7 is highly expressed in human esophageal squamous cell carcinoma. Cell apoptosis induced by PSMD7 downregulation may be processed via mitochondria-dependent pathway.

[Key words] PSMD7; Esophageal squamous cell carcinoma; Proliferation; Apoptosis; Mitochondria

泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 是一个高度复杂的维持蛋白质平衡和细胞活性的体系, 通过选择性周转目标底物来调节细胞内许多蛋白的稳定, 因此UPS参与细胞的多种功能^[1], 如细胞的增殖、凋亡、血管生成和运动, 以及肿瘤的发生、发展^[2]。

19S蛋白酶体中有4个去泛素化酶亚基, 其中26S蛋白酶体非ATP酶调节亚基7 (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7, PSMD7) 和26S蛋白酶体非ATP酶调节亚基14 (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14, PSMD14) 是JAMM家族的去泛素化酶, 位于19S蛋白酶体中^[3]。对完整的19S蛋白酶体组织结构学分析表明, 在组成盖子亚复合体的9个亚基中, PSMD7位于中央核心部位, 同时和其他4个亚基相结合^[4], 说明PSMD7在形成19S蛋白酶体结构中起重要作用。PSMD7作为组成19S蛋白酶体结构中的核心成员是否参与肿瘤的发生、发展, 以及其具体的分子机制尚不清楚。前期工作中, 我们已经证实了PSMD7在食管鳞癌细胞EC9706和Eca109中呈高表达^[5]。因此, 本研究通过实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测食管鳞癌及其癌旁正常组织标本中PSMD7的mRNA及蛋白表达情况。在食管鳞癌细胞TE-1中, 用慢病毒介导的RNA干扰技术下调PSMD7的表达, 观察细胞增殖及凋亡的变化, 建立PSMD7表达量与肿瘤恶性程度之间的关系, 为进一步确定PSMD7作为肿瘤治疗的靶点提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

TRIzol购自美国Invitrogen公司, RNA逆转录试剂盒和SYBR Green购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 蛋白提取试剂盒购自美国Solarbio公司,

鼠抗人PSMD7单克隆抗体、鼠抗人GAPDH单克隆抗体和免疫组织化学SP试剂盒购自美国Santa Cruz Biotechnology公司, Western blot相关试剂和JC-1线粒体膜电位检测试剂盒购自美国Solarbio公司, CCK-8试剂盒购自美国Beyotime Inst Biotech公司, Annexin V-APC/7-AAD凋亡检测试剂盒购自美国KeyGEN Biotech公司, 细胞质和线粒体蛋白提取试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.1.2 标本来源

本研究所采用的30例标本均采自河南医学高等专科学校附属医院2016—2017年间未经放疗和化疗的食管鳞癌手术患者, 其中男性17例, 女性13例, 年龄35~72岁 (平均52.4岁)。手术后立即将新鲜标本进行液氮冻存, 每例标本均取癌组织及其癌旁组织 (距原发灶边缘5 cm以上)。所有标本均经病理学检查确诊为食管鳞状细胞癌。

1.2 方法

1.2.1 RTFQ-PCR检测PSMD7的基因表达

采用TRIzol提取组织标本的总RNA, mRNA逆转录试剂盒合成cDNA, 分别用PSMD7和GAPDH进行RTFQ-PCR检测。PSMD7引物: 上游5'-CTGTCGTGAGCTGAGATC-3'; 下游5'-TCTCAGATTCAAGTGATC-3'。GAPDH引物: 上游5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCA-3'; 下游5'-AGGGGTCATTGATGGCAACA-3'。反应体系20 μL, 在实时荧光定量PCR仪器ABI Q7上设置如下反应条件: 94 °C预变性10 min, 94 °C变性15 s, 60 °C退火延伸32 s, 共30个循环, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

1.2.2 Western blot检测PSMD7蛋白水平

提取临床食管鳞癌和癌旁正常食管组织标本的蛋白质, 或离心收集细胞并提取总蛋白。检测细胞质中Cyt C的表达时, 首先用细胞质蛋白提取试剂盒提取细胞质总蛋白, 二辛可酸法 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度,

每个标本取20 μ g蛋白进行SDS-PAGE, 电泳结束后进行湿转至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 用5%脱脂奶粉对膜进行4 $^{\circ}$ C过夜封闭, 然后将膜与一抗 (PSMD7单克隆抗体, 1:1 000; GAPDH单克隆抗体, 1:2 000; Cyt C单克隆抗体, 1:2 000; cleaved caspase 3单克隆抗体, 1:2 000; cleaved caspase 9单克隆抗体, 1:2 000; PARP单克隆抗体, 1:2 000; Bax单克隆抗体, 1:2 000; Bcl-2单克隆抗体, 1:2 000) 4 $^{\circ}$ C温育过夜, 用TBST洗膜3次, 每次5 min。再与辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:3 000) 室温下温育1 h, TBST洗膜3次, 每次5 min, 用ECL发光液进行显影, 计算相对灰度值表示蛋白的相对水平。

1.2.3 慢病毒介导的shRNA干扰PSMD7的表达与细胞增殖能力和凋亡的检测

本研究设计4条动力学参数较优的RNA干扰靶点, 采用Scramble序列 (5'-TTCTCCGAA

CGTGTCACGT-3') 作为阴性对照 (negative control, NC)。采用HEK-293T细胞进行慢病毒包装, 收集病毒后用polybrene感染人食管鳞癌细胞系TE-1, 转染72 h后用RTFQ-PCR和Western blot检测PSMD7的表达量。选择效率最高的RNA干扰靶点进行后续实验 (表1)。

将干扰PSMD7表达慢病毒 (PSMD7-LV-shRNA) 和阴性对照慢病毒 (NC-LV-shRNA) 感染食管鳞癌细胞TE-1, 然后用嘌呤霉素 (puromycin) 筛选阳性感染细胞, 将细胞接种在96孔板上, 培养至融合度达80%~90%, 每孔加入10 μ L CCK-8溶液, 放入培养箱中继续培养, 4 h后用酶标仪检测450 nm处的吸光度 (D) 值, 计算抑制PSMD7表达后TE-1增殖能力的变化。

将慢病毒干扰的阳性细胞接种在6孔板上, 培养至融合度达80%~90%, 胰酶消化后加入Annexin V-PE和7-AAD对细胞进行双染, 采用流式细胞术测定细胞的凋亡情况。

表1 PSMD7 shRNA靶点序列

Tab. 1 Targeting sequence of PSMD7 shRNA

No.	Target sequence(5'-3')	Coding DNA sequence/bp	GC/%
LV-PSMD7-shRNA(8777-1)	TGCACAACCTCATCAACAA	133-1 107	42.11
LV-PSMD7-shRNA(8778-1)	TGAGGAAGTTGGAGTTGAA	133-1 107	42.11
LV-PSMD7-shRNA(8779-1)	CATCAACGAACTCATGAAA	133-1 107	36.84
LV-PSMD7-shRNA(8780-1)	TGACAAAGACGATTCTGTA	133-1 107	36.84

1.2.4 细胞线粒体膜电位的测定

采用JC-1线粒体膜电位检测试剂盒检测未感染组、对照组和干扰组的线粒体膜电位。具体方法参照说明书, 收集细胞, 加入JC-1溶液混匀后置37 $^{\circ}$ C、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养15 min之后离心, 离心速率为10 000 \times g, 离心5 min收集细胞, 加入2 mL膜电位检测缓冲溶液, 混匀后离心弃上清液, 再加入1 mL膜电位检测缓冲溶液混匀, 采用流式细胞术进行分析。红色荧光标记正常细胞线粒体, 表示膜电位正常, 绿色荧光标记凋亡细胞线粒体, 表示膜电位降低。

1.2.5 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析, 其中两组之间的比较, 每个样本数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t

检验分析, PSMD7蛋白表达和临床病理因素的相关性采用Spearman分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PSMD7在食管鳞癌组织中的表达

30例临床食管鳞癌和癌旁正常食管组织标本中PSMD7的mRNA表达量见图1A, 73.3% (22/30) 的标本中PSMD7的mRNA呈现高表达, 且PSMD7 mRNA在食管鳞癌和癌旁正常食管组织标本中的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明大多数食管鳞癌组织中PSMD7的mRNA表达增高。

采用Western blot对食管鳞癌标本中PSMD7蛋白的表达进行检测,结果显示,70% (21/30)的食管鳞癌标本中PSMD7蛋白呈高表达,与癌旁正常组织相比,PSMD7在食管鳞癌组织中的表达显

著升高 ($P < 0.05$, 图1B)。PSMD7蛋白的高表达与淋巴结转移呈正相关 ($P < 0.05$),而与肿瘤分化程度和TNM分期无关 ($P > 0.05$, 表2)。

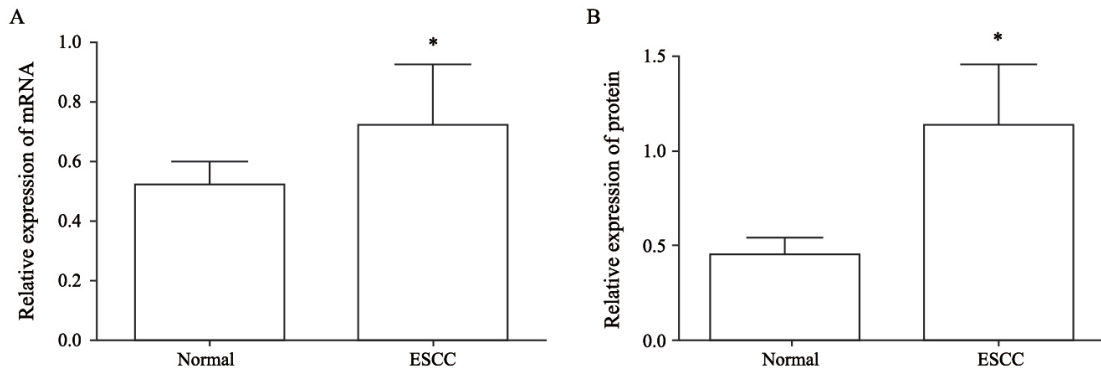


图 1 食管鳞癌组织中PSMD7的表达

Fig. 1 Expression of PSMD7 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and paracancerous tissues

A: Expression of PSMD7 mRNA in ESCC and paracancerous tissues; B: Expression of PSMD7 protein in ESCC and paracancerous tissues

表 2 PSMD7蛋白表达与食管鳞癌组织临床病理特征的相关性

Tab. 2 The correlation of PSMD7 expression and ESCC clinical pathological characteristics

Group	n	Protein expression of PSMD7	
		n(%)	P value
Age/year			0.295
<60	16	12 (75.0)	
≥60	14	9 (64.3)	
Gender			0.107
Male	21	15 (71.4)	
Female	9	6 (66.7)	
Lymph node status			0.000
Positive	20	17 (85.0)	
Negative	10	4 (40.0)	
Differentiation			0.695
Well/moderate	12	7 (58.3)	
Poor	18	14 (77.8)	
TNM stage			0.384
I + II	23	15 (65.2)	
III + IV	7	6 (85.7)	

2.2 PSMD7表达水平对人食管鳞癌细胞系TE-1增殖能力和凋亡的影响

将PSMD7-LV-shRNA和NC-LV-shRNA感染人食管鳞癌细胞系TE-1后,用puromycin筛选阳性感染细胞(图2A~D)。设计的4种RNA慢病毒

干扰序列都能显著降低PSMD7在TE-1中的表达,其中LV-3的敲减效率最高(图2E),因此选取LV-3进行后续实验。Western blot检测结果显示,筛选的PSMD7-LV-shRNA可以显著降低TE-1细胞中PSMD7蛋白的表达(图2F、G)。

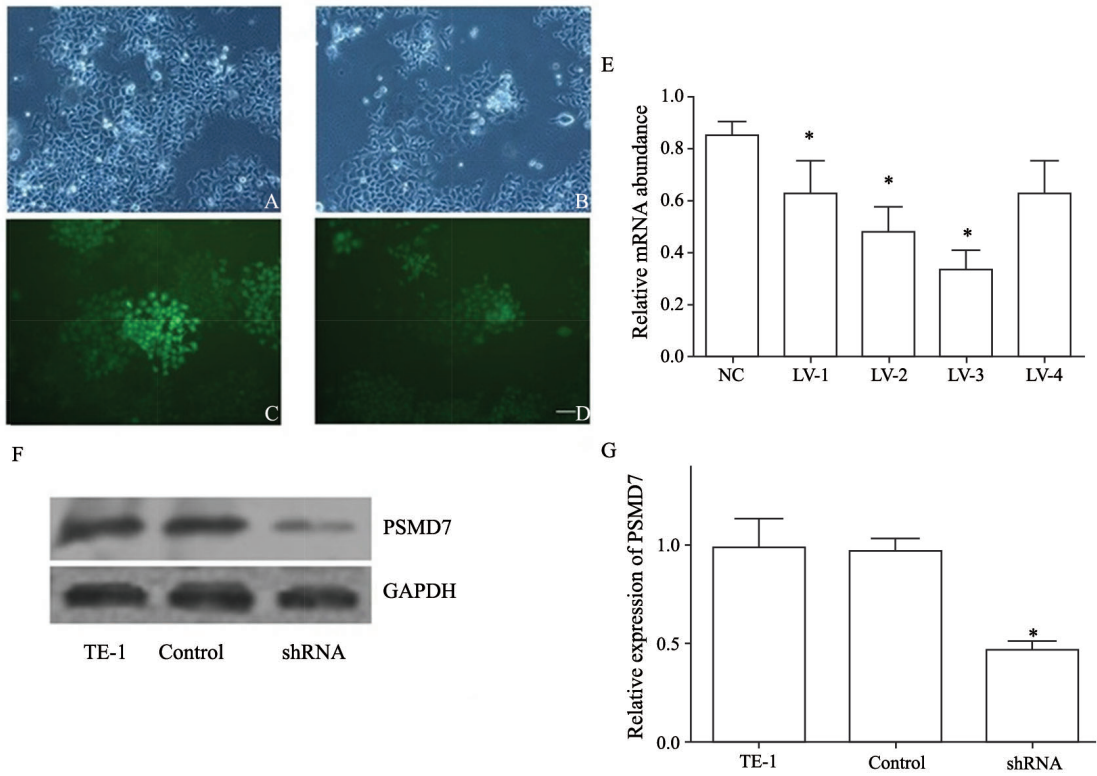


图2 慢病毒干扰TE-1细胞中PSMD7的表达

Fig. 2 Lentiviral-mediated RNAi suppressed mRNA expression of PSMD7 in TE-1 cells

A and C: TE-1 cells were transduced with negative control lentivirus; B and D: TE-1 cells was transduced with sh-PSMD7 lentivirus; E: Relative expression of PSMD7 mRNA after lentiviral-mediated RNAi; F: Western blot result of PSMD7 after lentiviral-mediated RNAi; G: Relative abundance of PSMD7 from A; $P < 0.05$, compared with NC group

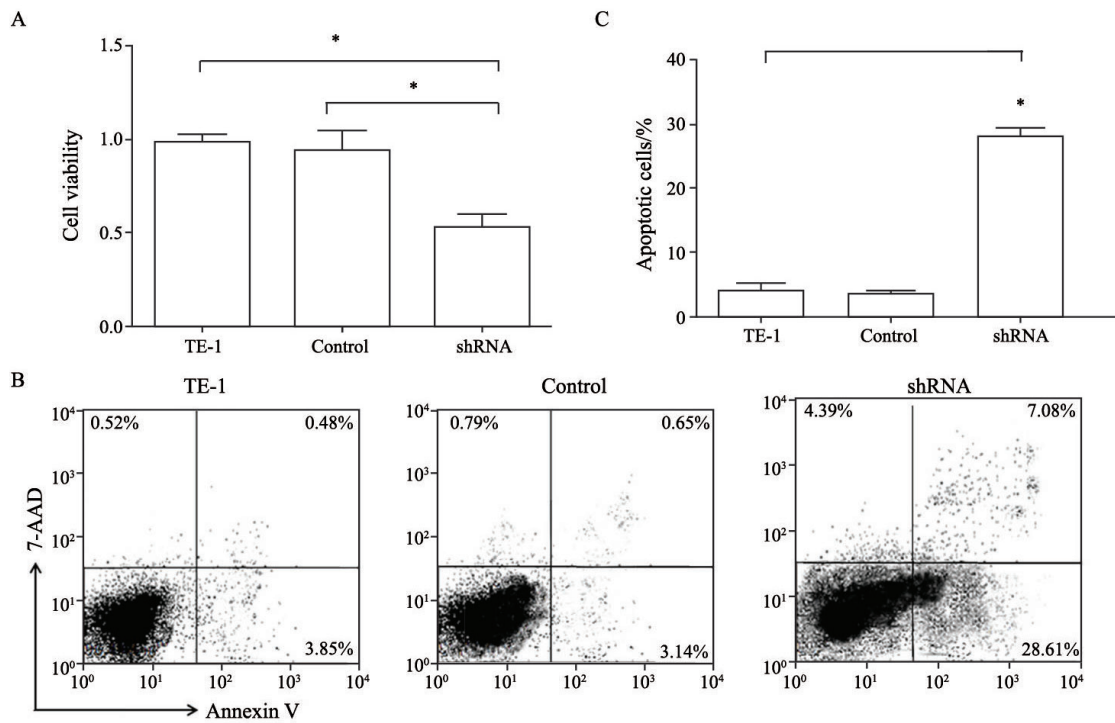


图3 干扰TE-1细胞中PSMD7的表达抑制细胞增殖并促进细胞凋亡

Fig. 3 Cell proliferation was decreased and apoptosis was induced when PSMD7 expression was inhibited in TE-1 cells

A: CCK-8 results of TE-1 cells after lentiviral-mediated RNAi; B: Apoptosis results from flow cytometry using Annexin V-FITC and 7-AAD staining; C: Apoptotic cell numbers from B; $*$: $P < 0.05$, as compared with each other

通过CCK-8方法检测干扰PSMD7的表达后TE-1细胞增殖能力的变化,结果显示,PSMD7干扰组的细胞增殖能力显著低于对照组(图3A),说明抑制PSMD7的表达可以降低TE-1细胞的增殖能力。流式细胞术检测细胞凋亡结果发现,PSMD7干扰组的细胞凋亡率为28.1%(3次取平均值),显著高于对照组和未转染组(图3B和3C),说明抑制PSMD7的表达可以诱导TE-1细胞的凋亡。

2.3 干扰PSMD7的表达对TE-1细胞线粒体膜电位和Cyt C的影响

细胞线粒体膜电位测定结果显示(图4A),

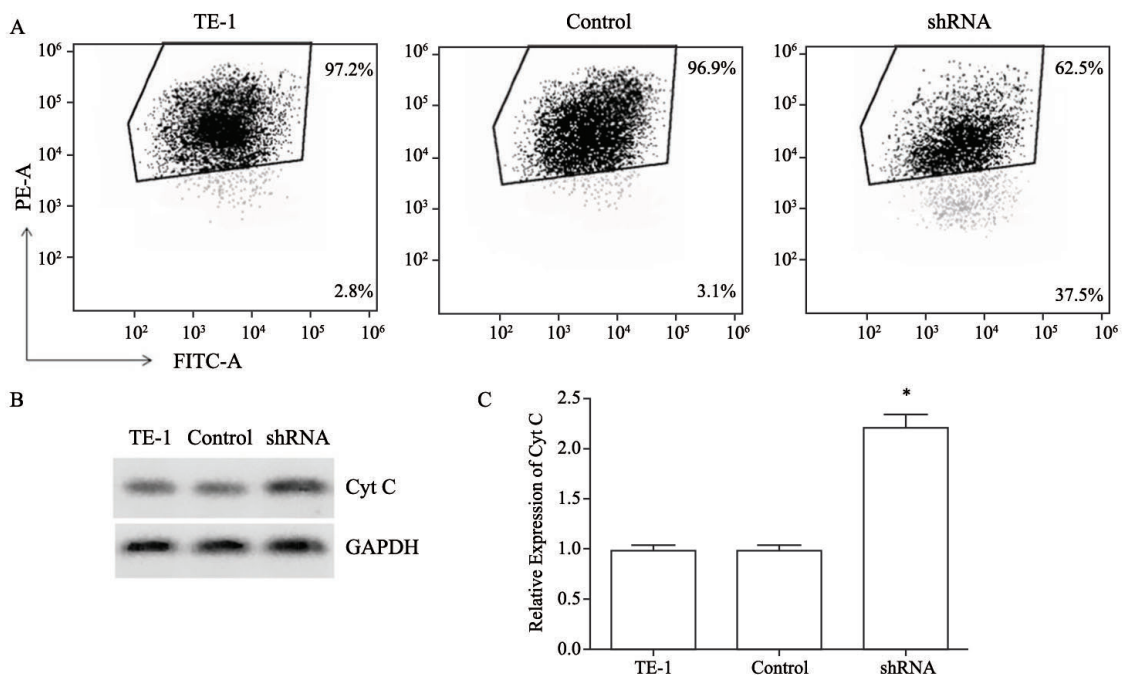


图4 干扰PSMD7的表达对TE-1细胞线粒体膜电位和Cyt C的影响

Fig. 4 Effects of PSMD7 inhibition on mitochondrial membrane potential and Cyt C expression in TE-1 cells

A: Results of mitochondrial membrane potential by flow cytometry; B: Expression of Cyt C in cytoplasm; C: Cyt C expression from B

2.4 干扰PSMD7的表达对凋亡相关蛋白表达的影响

抑制PSMD7的表达后,我们检测了促细胞凋亡蛋白caspase-3、caspase-9和PARP的活性降解产物的表达,结果显示,与对照组相比,干扰组中cleaved caspase-3和cleaved caspase-9的表达显著增高,其中cleaved caspase-3增加2.3倍,cleaved caspase-9增加2.0倍(图5A和5B)。此外,我们检测了凋亡标志物PARP的表达和裂解情况,PSMD7干扰组的PARP发生裂解,而未转染组和对照组未见PARP的裂解(图5C)。

未处理组TE-1细胞和对照组细胞的绿色荧光的比例为2.8%和3.1%,而PSMD7干扰组为37.5%,说明在TE-1细胞中抑制PSMD7的表达后线粒体的膜电位显著降低。我们用Western blot进一步检测了细胞质中Cyt C的表达,结果显示,与未处理组TE-1细胞和对照组相比,shRNA组细胞质中Cyt C的表达量显著升高(图4B和4C),说明抑制PSMD7的表达增加了线粒体膜的通透性,促进Cyt C从线粒体进入细胞质,表明PSMD7可能通过线粒体途径诱导TE-1细胞凋亡。

促凋亡因子Bax和抗凋亡因子Bcl-2在细胞内的表达水平与线粒体膜的敏感性密切相关^[6]。我们的研究表明,在TE-1细胞中抑制PSMD7的表达使线粒体膜电位增高,膜通透性增强,Cyt C从线粒体释放进入细胞质,我们进一步检测了这些变化是否影响Bax和Bcl-2在细胞内的表达。结果显示(图6),干扰PSMD7的表达后Bax的表达增高,Bcl-2的表达下降,与对照组相比,Bax/Bcl-2的比值增加了1倍左右,说明抑制PSMD7通过线粒体依赖的方式诱导细胞凋亡。

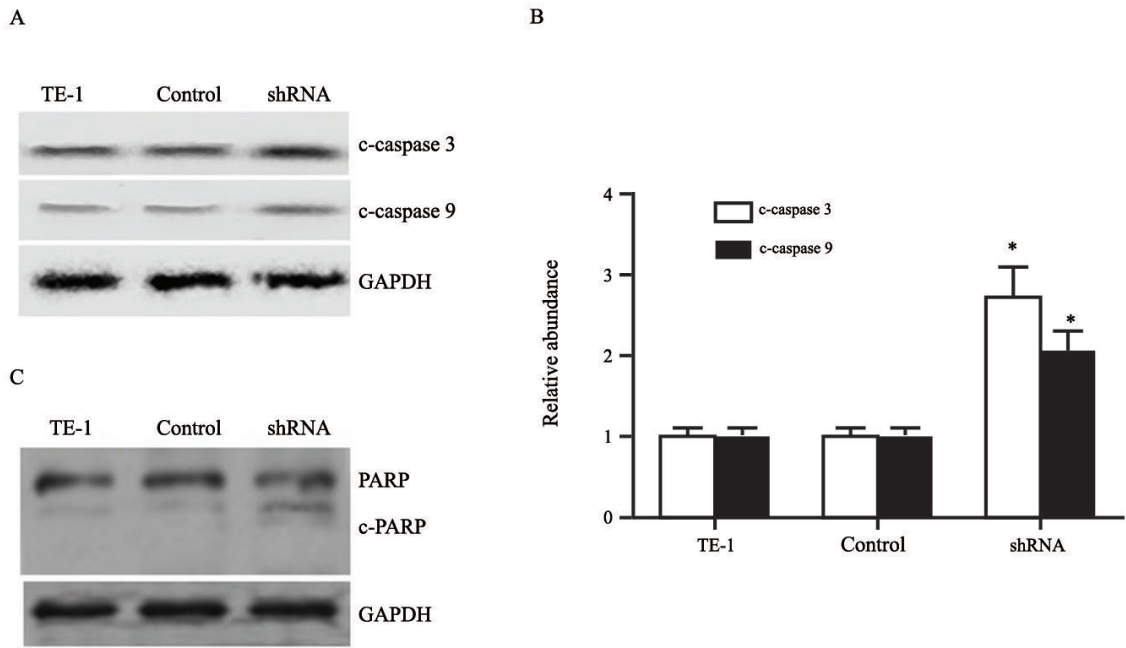


图 5 干扰PSMD7的表达对凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of PSMD7 inhibition on the expression of apoptosis-related protein in TE-1

A: Western blot results of cleaved caspase 3(c-caspase 3) and cleaved caspase 9(c-cleaved caspase 9); B: Expressions of c-caspase 3 and c-cleaved caspase 9 from A; C: Western blot results of PARP and cleaved PARP (c-PARP); *: $P < 0.05$, compared with other groups

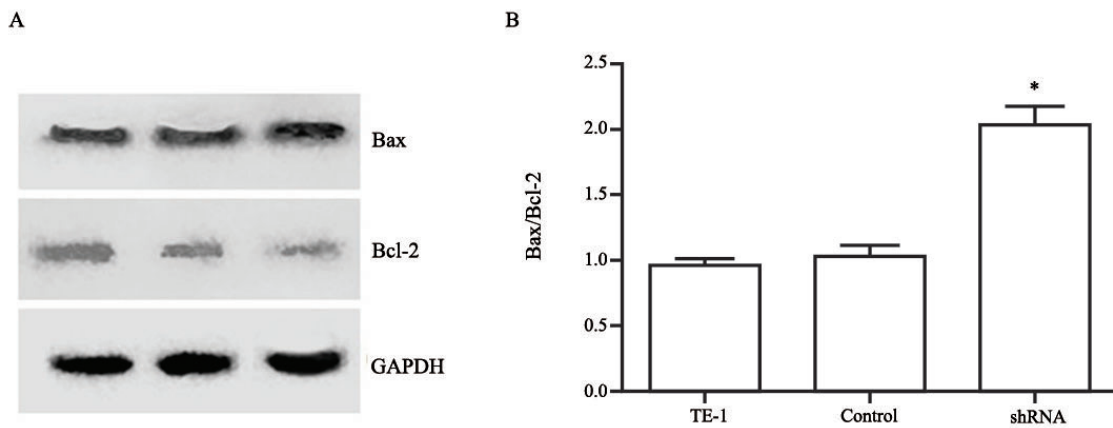


图 6 干扰PSMD7的表达对Bax和Bcl-2表达的影响

Fig. 6 Effects of PSMD7 inhibition on the expressions of Bax and Bcl-2 in TE-1

A: Western blot results of Bax and Bcl-2; B: Ratio of Bax and Bcl-2 from A; *: $P < 0.05$, compared with other groups

2.5 Caspase抑制剂对PSMD7诱导TE-1细胞凋亡的影响

本研究采用Caspase抑制剂z-VAD-fmk处理TE-1细胞抑制Caspase的活性, 结果显示(图7), z-VAD-fmk使干扰组的细胞活力从

53%增加至84%, 而抑制PSMD7引起的凋亡细胞从25.5%降为15.2%, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 进一步说明抑制PSMD7的表达诱导的细胞凋亡是通过线粒体依赖的方式进行的。

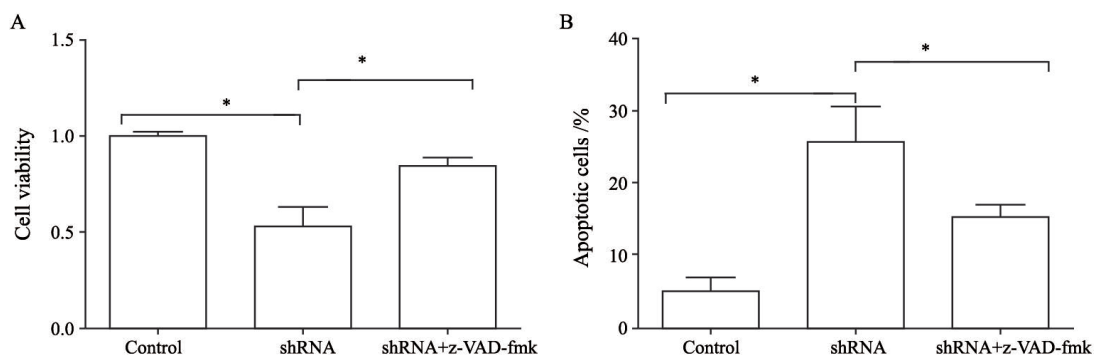


图7 Caspase抑制剂对PSMD7诱导TE-1细胞增殖和凋亡的影响

Fig. 7 Effect of caspase inhibitor on cell proliferation and induction of apoptosis after PSMD7 inhibition in TE-1 cells

A: Cell viability of TE-1 from CCK-8; B: Apoptosis results from flow cytometry using Annexin V-FITC and 7-AAD staining; *: $P < 0.05$, compared with each other

3 讨 论

20S蛋白酶体的抑制剂硼替佐米被用来治疗多发性骨髓瘤和淋巴瘤,但易产生耐药,且对实体瘤的治疗效果差^[7]。研究显示,19S蛋白酶体中的去泛素化酶参与肿瘤的发生、发展并可以作为肿瘤治疗的靶点,如一些去泛素化酶对肿瘤细胞活力是必需的,通过改变凋亡因子的表达来促进细胞的生存,它们的表达和肿瘤的恶性程度相关^[8]。在本研究的前期工作中,我们已经证实PSMD7在食管鳞癌细胞EC9706和Eca109中高表达,且定位发生改变。慢病毒介导的shRNA干扰PSMD7的表达可以降低食管鳞癌细胞的蛋白酶体活性,使泛素化蛋白在细胞内发生聚集^[5]。本研究以临床采集的肿瘤标本为研究对象,发现73.3%的标本中PSMD7的mRNA呈高表达,70%的标本中PSMD7蛋白呈高表达,并且其高表达与淋巴结转移呈正相关,而与肿瘤的分化程度和TNM分期无关。这些结果表明PSMD7的过表达在食管癌发生、发展中可能起着重要的作用,因此我们对PSMD7在食管癌发生、发展中的作用机制进行了深入的研究。

研究显示,shRNA干扰PSMD7的表达增加了依赖泛素的GFP报告基因的荧光强度,并导致细胞死亡,和蛋白酶体抑制剂MG132处理细胞得到的结果类似^[9]。本研究用慢病毒介导的RNA干扰来抑制TE-1细胞中PSMD7的表达,发现使细胞的增殖能力下降并且诱导了细胞的凋亡,这

些现象和蛋白酶体抑制剂的作用类似。对PSMD7的结构分析显示,JAMM结构域是一个非金属的无等位酶活性的结构^[10],说明PSMD7可能不直接水解多泛素化蛋白链。然而PSMD7却同时和其他4个亚基相结合,并位于中央核心部位^[4],说明PSMD7在形成19S蛋白酶体lid结构中起重要作用。因此抑制PSMD7的表达有可能影响19S蛋白酶体的组装,并影响其识别和水解多泛素化链的功能。我们的前期研究已表明,抑制食管鳞癌细胞中PSMD7的表达使细胞内泛素化蛋白增加,泛素的荧光增强,并且蛋白酶体的活性降低^[5],说明PSMD7参与维持蛋白酶体的正常功能,因此在TE-1细胞中抑制PSMD7的表达得到了类似抑制蛋白酶体活性的结果。

线粒体是细胞的能量工厂,是参与细胞凋亡的重要细胞器,在凋亡早期即出现结构和功能的改变。在外界因子的刺激下,细胞内首先会发生线粒体膜通透性增加,体现在膜电位下降,使Cyt C释放进入细胞质,激活一系列caspase级联反应,从而引起细胞核发生凋亡。促凋亡因子Bax可以插入线粒体外膜上诱发线粒体导致的细胞凋亡,抗凋亡因子Bcl-2通过稳定线粒体膜电位的方式使细胞避免进入凋亡通路^[11]。本研究抑制PSMD7的表达后观察到细胞增殖能力下降并诱导细胞凋亡,接着我们研究了这种凋亡是否通过线粒体依赖的方式进行。结果发现,抑制PSMD7的表达后TE-1细胞的线粒体膜电位显著降低,细胞质中Cyt C的表达量显著升高,说明抑制PSMD7的

表达增加了线粒体膜的通透性, 并促进Cyt C从线粒体进入细胞质。此外, PSMD7干扰组中cleaved caspase-3和cleaved caspase-9的表达显著增高, 凋亡标志物PARP发生裂解, 而未转染组和对照组未见PARP的裂解。干扰PSMD7的表达后, Bax的表达增高, Bcl-2的表达下降, 与对照组相比, Bax/Bcl-2的比值增加了1倍, 说明PSMD7通过线粒体途径诱导TE-1细胞凋亡。Caspase抑制剂z-VAD-fmk使干扰组的细胞活力恢复, 而抑制细胞的凋亡, 进一步说明抑制PSMD7的表达诱导的细胞凋亡是通过线粒体依赖的方式进行的。

本实验结果表明, PSMD7在食管鳞癌标本中呈高表达, 参与了食管癌的发生、发展。进一步的机制研究表明, 抑制PSMD7使TE-1细胞的增殖能力下降, 并诱导细胞凋亡, 其机制是以线粒体依赖的方式进行的。本研究为进一步确定PSMD7作为食管鳞癌治疗的靶点提供了依据。

[参 考 文 献]

- [1] LIU J, SHAIK S, DAI X, et al. Targeting the ubiquitin pathway for cancer treatment [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1855(1): 50-60.
- [2] BASSERMANN F, EICHNER R, PAGANO M. The ubiquitin proteasome system - implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(1):150-162.
- [3] SOWA M E, BENNETT E J, GYGI S P, et al. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape [J]. *Cell*, 2009, 138 (2): 389-403.
- [4] SHARON M, TAVERNER T, AMBROGGIO X I, et al. Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4 (8): e267.
- [5] SHI K, ZHANG J Z, ZHAO R L, et al. PSMD7 downregulation induces apoptosis and suppresses tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via the mTOR/p70S6K pathway [J]. *FEBS Open Biol*, 2018, 8(4): 533-543.
- [6] LIU H, LI Q, WANG Y, et al. Elevated nitric oxide levels associated with hepatic cell apoptosis during liver injury [J]. *Hepatol Res*, 2017, 47(2):178-185.
- [7] LAUBACH J P, MITSIADES C S, ROCCARO A M, et al. Clinical challenges associated with bortezomib therapy in multiple myeloma and Waldenströms macroglobulinemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2009, 50(5): 694-702.
- [8] D'ARCY P, WANG X, LINDER S. Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 147: 32-54.
- [9] SOWA M E, BENNETT E J, GYGI S P, et al. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape [J]. *Cell*, 2009, 138(2):389-403.
- [10] SANCHES M, ALVES B S, ZANCHIN N I, et al. The crystal structure of the human Mov34 MPN domain reveals a metal-free dimer [J]. *J Mol Biol*, 2007, 370(5), 846-855.
- [11] MARTIN J L, GRUSZCZYK A V, BEACH T E, et al. Mitochondrial mechanisms and therapeutics in ischaemia reperfusion injury [J]. *Pediatr Nephrol*, 2018, doi: 10.1007/s00467-018-3984-5.

(收稿日期: 2018-04-15 修回日期: 2018-08-25)