



· 论 著 ·

# 孟鲁司特钠靶向USP2诱导骨髓瘤细胞凋亡的实验研究

杜承蓉<sup>1</sup>, 王莹莹<sup>2</sup>, 唐 勇<sup>3</sup>, 姚一芸<sup>3</sup>, 吴英理<sup>2</sup>, 朱 琦<sup>1</sup>

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面-头颈肿瘤科, 上海交通大学口腔医学院, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011;

2. 上海交通大学医学院病理生理学系, 细胞分化与凋亡教育部重点实验室, 上海 200025;

3. 上海市第二人民医院血液肿瘤内科, 上海 200011

**[摘要]** 背景与目的: 多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 细胞内泛素特异性肽酶2 (ubiquitin-specific peptidase 2, USP2) 通过去泛素化作用调控细胞内蛋白降解及稳态平衡, 参与MM细胞增殖和存活, 靶向抑制MM细胞内USP2活性可以调控其生物学行为。本研究旨在探究白三烯受体拮抗剂孟鲁司特钠对MM细胞内USP2的调控作用及其机制。方法: 应用纯化USP2蛋白及其底物蛋白谷胱甘肽S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 标签的泛素核糖体融合蛋白52 (ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product, UbA52) 即GST-UbA52蛋白构建体外去泛素化反应体系, 观察孟鲁司特钠对USP2去泛素化酶活性的影响。以MM细胞系MM1.S和H929细胞为模型, 采用细胞热迁移分析检测孟鲁司特钠与细胞内USP2的相互结合效力。以不同浓度的孟鲁司特钠处理MM1.S和H929细胞, 应用蛋白质印迹法 (Western blot) 检测细胞内USP2蛋白及其靶向调控分子 [包括细胞周期调控分子细胞周期蛋白D1 (cyclin D1, CCND1) 和细胞周期蛋白A1 (cyclin A1, CCNA1), 经典信号转导通路分子KRAS和葡萄糖调节蛋白78 (glucose regulated protein 78kD, GRP78), 以及凋亡通路相关分子C/EBP同源蛋白 (C/EBP-homologous protein, CHOP)] 水平的改变。利用慢病毒载体构建过表达USP2的H929-OE和MM1.S-OE细胞以及低表达USP2的H929-LE和MM1.S-LE细胞, 采用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 和流式细胞术检测孟鲁司特钠处理后H929、H929-OE、H929-LE、MM1.S、MM1.S-OE和MM1.S-LE细胞增殖抑制率和凋亡率。结果: 孟鲁司特钠可以抑制USP2介导的GST-UbA52蛋白降解, 并呈浓度依赖性 [半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) 为3.814 μmol/L]。同时孟鲁司特钠能够增加USP2蛋白加热环境 (49.1、53.2和56.4 °C) 的稳定性。经孟鲁司特钠处理后, MM1.S和H929细胞内CCND1、CCNA1和KRAS蛋白表达明显降低, 而GRP78和CHOP蛋白表达显著升高。进一步研究发现40 μmol/L孟鲁司特钠处理24 h后, H929-OE细胞增殖抑制率和凋亡率分别为 (37.68±1.10)%和 (18.99±0.26)%, MM1.S-OE细胞增殖抑制率和凋亡率分别为 (24.48±0.49)%和 (33.29±0.75)%, 显著低于H929和MM1.S细胞 [H929: (57.19±1.93)%和 (45.65±0.24)%; MM1.S: (50.04±0.53)%和 (40.25±0.91)%; P均<0.05, n=3]; 而低表达USP2的H929-LE和MM1.S-LE细胞增殖抑制率和凋亡率明显升高 [H929-LE-1#: (80.70±1.60)%和 (89.08±0.49)%; H929-LE-2#: (75.30±3.80)%和 (82.41±1.07)%; MM1.S-LE-1#: (70.64±0.84)%和 (67.63±0.21)%; MM1.S-LE-2#: (68.47±1.32)%和 (85.90±0.18)%; P均<0.05, n=3]。结论: 孟鲁司特钠能够与MM细胞内泛素-蛋白酶体调控分子USP2结合并抑制其去泛素化酶活性, 进而调控USP2靶蛋白表达并激活内质网应激, 诱导MM细胞增殖阻滞和凋亡。

基金项目: 无。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

伦理批件: 不需要。

知情同意: 不需要。

引用本文: 杜承蓉, 王莹莹, 唐 勇, 等. 孟鲁司特钠靶向USP2诱导骨髓瘤细胞凋亡的实验研究 [J]. 中国癌症杂志, 2025, 35(9): 850-858.

Funding: no.

Conflicts of interest: authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval: not required.

Informed consent: not required.

Cite this article: DU C R, WANG Y Y, TANG Y, et al. Experimental study on montelukast sodium inducing apoptosis in multiple myeloma cells via targeting intracellular USP2 protein [J]. China Oncol, 2025, 35(9): 850-858.

[关键词] 多发性骨髓瘤; 孟鲁司特钠; 泛素特异性肽酶2; 去泛素化; 细胞凋亡

中图分类号: R738.1 文献标志码: A

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2025.09.005

**Experimental study on montelukast sodium inducing apoptosis in multiple myeloma cells via targeting intracellular USP2 protein** DU Chengrong<sup>1</sup>, WANG Yingying<sup>2</sup>, TANG Yong<sup>3</sup>, YAO Yiyun<sup>3</sup>, WU Yingli<sup>2</sup>, ZHU Qi<sup>1</sup> (1. Department of Oral and Maxillofacial-Head and Neck Oncology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology; Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China; 2. Department of Pathophysiology, Key Laboratory of Cell Differentiation and Apoptosis of the Chinese Ministry of Education, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 3. Department of Hematology/Oncology, Shanghai Second People's Hospital, Shanghai 200011, China)

Correspondence to: ZHU Qi E-mail: zhuqi70@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** Intracellular deubiquitylating enzymes, such as ubiquitin-specific peptidase 2 (USP2), play a pivotal role in regulating protein degradation and cellular homeostasis by modulating protein ubiquitin deconjugation, which have been implicated in the proliferation and survival of multiple myeloma (MM) cells. Targeting the inhibition of USP2 activity in MM cells might modulate their biological behavior. This study aimed to investigate regulatory effects of the leukotriene receptor antagonist montelukast sodium on USP2 in MM cells and its subsequent biological effects. **Methods:** An *in vitro* deubiquitination reaction system was established using purified USP2 protein and its substrate, the glutathione S-transferase (GST) tagged ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product (UbA52), known as GST-UbA52 protein. This system was used to characterize inhibitory effects of montelukast sodium on USP2 deubiquitinase activity. The MM cell lines MM1.S and H929 were used as *in vitro* models. Cellular thermal shift assay (CETSA) was subsequently employed to test interaction mode between montelukast sodium and USP2 in MM cells. Western blot assay was applied to detect expression levels of USP2 and its targeting regulators, including cell cycle supervisors cyclin D1 (CCND1) and cyclin A1 (CCNA1), classical signaling transducer KRAS and glucose regulated protein 78kD (GRP78), as well as apoptotic molecule C/EBP-homologous protein (CHOP) in MM1.S and H929 cells before and after the treatment with different concentrations of montelukast sodium. MM cells with either overexpression (H929-OE, MM1.S-OE) or knockdown (H929-LE, MM1.S-LE) of USP2 were generated using a lentiviral vector. Cell counting kit-8 (CCK-8) and flow cytometry were utilized to detect the proliferation and apoptotic rates of H929-OE, MM1.S-OE, H929-LE and MM1.S-LE cells treated with montelukast sodium. **Results:** Montelukast sodium was found to inhibit USP2 mediated degradation of GST-UbA52 protein in a concentration-dependent manner, with a half inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of 3.814 μmol/L. Additionally, montelukast sodium significantly enhanced the thermal stability of USP2 at temperatures of 49.1, 53.2 and 56.4 °C. It was also shown that montelukast sodium could down-regulate expressions of CCND1, CCNA1 and KRAS, while increase levels of GRP78 and CHOP in MM1.S and H929 cells. Furthermore, after treating with 40 μmol/L montelukast sodium for 24 h, the proliferation inhibition and apoptotic rate of H929-OE cells reached to (37.68±1.10)% and (18.99±0.26)%, while the proliferation inhibition and apoptotic rate of MM1.S-OE cells reached to (24.48±0.49)% and (33.29±0.75)%, which were significantly lower than those in H929 and MM1.S cells [H929: (57.19±1.93)% and (45.65±0.24)%; MM1.S: (50.04±0.53)% and (40.25±0.91)%; *P*<0.05, *n*=3]. Conversely, the proliferation inhibition and apoptotic rates of H929-LE and MM1.S-LE cells were significantly higher [H929-LE-1#: (80.70±1.60)% and (89.08±0.49)%; H929-LE-2#: (75.30±3.80)% and (82.41±1.07)%; MM1.S-LE-1#: (70.64±0.84)% and (67.63±0.21)%; MM1.S-LE-2#: (68.47±1.32)% and (85.90±0.18)%; *P*<0.05, *n*=3]. **Conclusion:** Montelukast sodium can target ubiquitin proteasome regulator USP2 and inhibit its deubiquitylating activity, which may modulate USP2 directing protein and trigger endoplasmic reticulum stress to induce cell cycle arrest and apoptosis in MM cells.

[Key words] Multiple myeloma; Montelukast sodium; Ubiquitin-specific peptidase 2; Deubiquitylation; Cell apoptosis

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是临床和生物学特征高度异质的克隆性浆细胞肿瘤, MM细胞内泛素-蛋白酶体通路是目前治疗的主要靶标。蛋白酶体抑制剂 (包括硼替佐米、伊沙佐米和卡非佐米等) 目前已成功地应用于MM的临床治疗, 能显著提高患者临床治疗反应率和缓解程度, 但仍有部分患者出现蛋白酶体抑制

剂耐药或不良反应<sup>[1-2]</sup>。因此, 积极探索新型高效、精准和低毒的靶向泛素-蛋白酶体通路治疗药物有其必要性和临床意义。有研究<sup>[3-5]</sup>显示, 泛素特异性肽酶2 (ubiquitin-specific peptidase 2, USP2) 通过调控细胞内蛋白酶体上游信号通路分子泛素化参与多种恶性肿瘤 (包括膀胱癌、直肠癌和前列腺癌等) 的发生、发展过程。近期

研究<sup>[6]</sup>还发现, MM细胞内USP2高表达与患者的不良预后密切相关, 抑制MM细胞内USP2活性可以抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡, 提示USP2可能成为泛素-蛋白酶体通路潜在的“非蛋白酶体”治疗靶标。前期研究<sup>[7]</sup>显示, 白三烯受体拮抗剂孟鲁司特钠对MM细胞内多个靶蛋白具有调控效应。因此, 本研究以MM细胞系H929和MM1.S细胞为体外模型, 观察孟鲁司特钠对MM细胞内的USP2蛋白及其调控分子的影响并探究其可能的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

孟鲁司特钠 (No.151767-02-1) 购自上海毕得医药科技有限公司, USP2抑制剂ML364 (No.1991986-30-1) 购自美国MedChem Express公司, 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、RPMI-1640培养基和DMEM培养基均购自美国Sigma公司, 10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和限制性核酸内切酶*Bam*HI/*Xho*I均购自美国Thermo Fisher Scientific公司, Ni-NTA柱和AKTA蛋白纯化液相色谱仪均购自美国GE Healthcare公司, 尺寸排阻色谱柱购自美国Cytiva公司, Amicon离心超滤管购自法国Millipore公司, 大肠杆菌BL21感受态细胞购自北京擎科生物科技股份有限公司, P<sub>gex</sub>-6p1载体购自上海泽叶生物科技有限公司, 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) 购自上海源培生物科技股份有限公司, 谷胱甘肽高速层析介质4FF预装柱、细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 和Annexin-V/异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 凋亡检测试剂盒均购自上海翌圣生物科技股份有限公司, USP2、细胞周期蛋白D1 (cyclin D1, CCND1)、细胞周期蛋白A1 (cyclin A1, CCNA1)、KRAS、GRP78、CHOP和tubulin一抗均购自上海艾比玛特医药科技有限公司, 考马斯亮蓝快速染色液购自上海碧云天生物技术有限公司, PAGE凝胶快速制备试剂盒和电化学发光 (electrochemical luminescence, ECL) 试剂盒均购自上海雅酶生物医药科技有限公司, 阳离子聚合物感染增强液购自上海吉凯生物科技有限公司, 细胞培养皿、孔板和离心管等耗材均购自美国Corning公司。

### 1.2 细胞培养

人MM细胞系H929、MM1.S和人胚肾细胞

系HEK-293T细胞由上海交通大学医学院病理生理学系提供。H929和MM1.S细胞均接种于含10%FBS、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的RPMI-1640培养基中。HEK-293T细胞接种于含10%FBS、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM培养液中, 每隔2 d换液保持细胞维持在最佳生长状态。上述细胞均在加湿培养箱 (37 °C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%、95%湿度) 中培养。传代时, 胰酶消化2 min后将培养液重悬, 保证细胞维持在最佳生长密度。

### 1.3 USP2和泛素核糖体融合蛋白52 (ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product, Uba52) 纯化

将USP2催化核心部分 (从天冬酰胺259到甲硫氨酸605) 插入到原核表达质粒 (pET-28a质粒) 载体中, 随后将质粒转化入大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞中, 在37 °C下过夜培养以表达USP2蛋白。当细菌倍增到600 nm波长处的吸光度 ( $D_{600\text{ nm}}$ ) 值为0.6~0.8时, 用0.5 mmol/L异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导USP2过表达。收集细胞, 用缓冲液A (10 mmol/L Tris-HCL, 100 mmol/L NaCl, pH=8.0) 重悬。在4 °C下以18 000×g离心1 h, 将上清液与细胞碎片分离, 并加载到用缓冲液A平衡过的Ni-NTA柱上。使用AKTA蛋白纯化液相色谱仪, 用补充了20~250 mmol/L咪唑的缓冲液A对USP2进行梯度洗脱。随后将洗脱蛋白质加载到已用45 mmol/L磷酸钾 (pH=6.0) 和300 mmol/L NaCl平衡的尺寸排阻色谱柱 (Superdex 75, HiLoad 26/60, Amersham) 上。将含有USP2的组分以1:3的比例加入超纯水稀释, 并使用Amicon离心超滤管 (10 kDa截留相对分子质量) 浓缩至10 mg/mL, 置于-80 °C分装保存。

从cDNA文库中通过正向引物5'-TCGCGGATCCATGCAGATCTTTGTGAAGACCCTC-3'和反向引物5'-TCCGCTCGAGTTATTTGACCTTCTTGGGACG-3'扩增出人UBA52基因, 并使用限制性核酸内切酶*Bam*HI/*Xho*I克隆到P<sub>gex</sub>-6p1中。随后将pGEX-6P1-UBA52质粒转染到大肠杆菌BL21 (DE3) 中, 在16 °C下培养过夜表达谷胱甘肽S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 标签的Uba52即GST-Uba52蛋白。当 $D_{600\text{ nm}}$ 值达到0.6~0.8时, 用0.5 mmol/L异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导过表达。收集细胞并用裂解缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCL, 140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L二氢磷酸钠,

1.8 mmol/L磷酸二氢钾, 0.1%NP-40, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L Cocktail, pH=8.0) 重悬。在4 °C下以18 000×g离心1 h, 将上清液与细胞碎片分离。用谷胱甘肽高速层析介质4FF预装柱纯化蛋白, 用洗脱缓冲液(250 mmol/L Tris-HCL, 50 mmol/L还原型谷胱甘肽, 100 mmol/L NaCl和0.1%NP-40, pH=8.0)洗脱, 随后按照与USP2相同的条件进行纯化、浓缩、分装和速冻。

#### 1.4 以GST-UbA52为底物筛选USP2小分子化合物抑制剂

选择GST-UbA52为反应底物, 建立USP2体外酶活性检测体系, 检测孟鲁司特钠对USP2酶活性的影响。配制相应GST-UbA52反应体系为: 1 mmol/L EDTA-Na、0.5 mmol/L DTT、50 mmol/L Tris-HCL (pH=7.4) 及400 nmol/L GST-UbA52。用不同浓度的孟鲁司特钠、ML364和DMSO与纯化USP2蛋白(包含催化功能区域: 氨基酸序列259~605位)在37 °C恒温箱中预温育15 min后, 加入底物蛋白GST-UbA52继续温育15 min, 随后将得到的反应液上样电泳, 最后用考马斯亮蓝快速染色液给凝胶染色, 用成像仪进行蛋白印迹条带扫描。

#### 1.5 蛋白质印迹法(Western blot)检测细胞内的蛋白水平

向PBS洗涤后的各组细胞中加入细胞裂解液提取总蛋白, 采用考马斯亮蓝定量后, 取各组等量总蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 250 mA恒流转膜90 min; 室温下用5%脱脂牛奶封闭1 h, 加入按照说明书比例配制的一抗, 置于4 °C冷库摇床上过夜; 第2天用含有0.1%吐温-20的PBS洗涤3次, 每次5 min, 弃去洗涤液, 加入1:5 000稀释的相应二抗, 摇床上室温温育1 h。温育完成后用含有0.1%吐温-20的PBS充分洗涤(洗涤3次, 每次5 min), 用ECL试剂盒显影液均匀覆盖在NC膜上, 使用化学发光成像仪进行蛋白印迹条带扫描。

#### 1.6 细胞热迁移分析(cellular thermal shift assay, CETSA)

收集大约 $1 \times 10^7$ 个细胞, 使用含有1%磷酸酶抑制剂和1%蛋白酶抑制剂混合物的PBS重悬MM1.S细胞, 将重悬液置于液氮2 min后, 用镊子取出, 置于室温下融化, 反复3次, 将样品以20 000×g离心, 4 °C 20 min。取上清液, 将细胞裂解物与DMSO(对照)或200 μmol/L孟鲁司特钠在37 °C下温育30 min, 然后分成6等份并使

其经受不同温度(43.6、46.0、49.1、53.2、56.4和58.6 °C)3 min后将样品冷却至室温30 s, 随后将样品进一步以20 000×g离心, 4 °C 30 min, 取上清液置于1.5 mL Eppendorf试管中, 加入5×SDS, 在100 °C加热机器上加热5 min并使用Western blot分析USP2蛋白水平。

#### 1.7 病毒感染构建稳定过表达或敲除USP2的MM细胞株

根据GenBank数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)和张锋实验室提供的sgRNA文库<sup>[8]</sup>(<https://www.zlab.bio/resources>)中的基因信息, 设计合成USP2蛋白质编码区全长序列引物和USP2 sgRNA引物, 并采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术扩增目的基因片段, 运用基因重组技术将其克隆至慢病毒表达载体中, 经酶切、测序对重组质粒进行验证。将重组质粒和慢病毒包装质粒共转染HEK-293T细胞。收集转染后48 h的HEK-293T细胞上清液, 以4 000×g离心, 4 °C 10 min。采用0.45 μm滤器过滤上清液后置于超速离心管中, 采用Beckman超速离心机以50 000×g离心, 4 °C 2 h。弃去上清液, 用RPMI-1640培养基重悬病毒沉淀。采用荧光法测定上清液中病毒滴度达 $1 \times 10^9$  TU/mL, 置于-80 °C分装保存。将H929和MM1.S细胞分别稀释为 $6 \times 10^5$ 和 $1 \times 10^6$ 个/mL的浓度, 接种于6孔板中, 每孔加入1 mL细胞悬液。每孔加入适量病毒悬液和40 μL阳离子聚合物感染增强液, 使用37 °C恒温离心机以1 800×g离心2 h, 促进病毒感染。离心结束后放入加湿培养箱中继续培养4 h后更换新鲜RPMI-1640培养基, 48 h后再次离心换液, 加入嘌呤霉素, 使其终浓度为1 μg/mL。筛选转染成功的细胞并扩大培养, 同时收集一部分细胞采用Western blot验证空载组、过表达组和敲除组细胞内USP2蛋白的表达情况。

#### 1.8 CCK-8法检测细胞活性

收集对数生长期细胞, 密度调整为 $6 \times 10^5$ 个/mL, 在96孔板中每孔接种50 μL细胞悬液(DMSO对照组和药物处理组均为3个复孔), 即每孔中 $3 \times 10^4$ 个细胞; 向96板中加入50 μL含不同浓度孟鲁司特钠的培养液; 设置空白对照孔, 即不含细胞培养液。最后向加样孔周围一圈加入适量培养液, 防止时间过长引起加样孔周围液体蒸发, 导致D值不准; 放入37 °C恒温培养箱中培养24 h后向每孔加入10 μL CCK-8试剂, 将96孔板十字混匀后, 放入培养箱中继续温育1~4 h; 将酶

标仪程序设置为先振动后读数, 检测450 nm波长处的 $D$ 值。

### 1.9 Annexin-V/FITC/碘化丙啶(propidium iodide, PI) 双染法检测细胞凋亡

根据Annexin-V/FITC凋亡检测试剂盒说明, 将不同处理组细胞收集于Eppendorf试管中, 以 $1\ 000\times g$ 离心3 min, 弃去配液, 加入1 mL PBS洗涤, 再次离心弃去洗涤液, 并加入500  $\mu$ L结合缓冲液, 轻柔吹打重悬细胞。在每组细胞悬液中加入5  $\mu$ L Annexin-V/FITC, 混匀后避光温育15 min, 再加入5  $\mu$ L PI, 避光温育3 min, 30 min内进行流式细胞术检测。

### 1.10 统计学处理

使用Graph Pad. Prism9.0版软件对数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 对细胞增殖抑制率及凋亡率各组均数间进行正态性检验和方差齐性检验后, 采用单因素方差分析并计算 $F$ 值, 进一步与对照组两两比较采用Dunnnett检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 孟鲁司特钠与MM细胞内的USP2直接结合并抑制其活性

将不同摩尔浓度(1.6~50.0  $\mu$ mol/L)的孟鲁司特钠、USP2抑制剂ML364和DMSO分别加入USP2纯化蛋白预温育15 min, 然后加入底物蛋白GST-UbA52进行反应, 结果显示, DMSO预处理组出现USP2介导降解片段GST-Ub, 而ML364预处理组未出现降解片段, 1.6~5.0  $\mu$ mol/L孟鲁司特钠预处理组出现不同灰度GST-Ub, 6.2  $\mu$ mol/L以上孟鲁司特钠预处理组未出现降解片段(图

1A)。使用Image J软件进行灰度扫描并计算孟鲁司特钠对USP2活性的抑制浓度, 结果发现, 孟鲁司特钠对USP2活性的半数抑制浓度(half inhibitory concentration,  $IC_{50}$ )为3.814  $\mu$ mol/L(图1B)。进一步应用200  $\mu$ mol/L孟鲁司特钠和DMSO分别与MM1.S细胞裂解液预温育30 min, 然后进行CETSA, 结果显示, 孟鲁司特钠预处理组USP2蛋白在49.1、53.2和56.4  $^{\circ}C$ 的热稳定性明显高于DMSO预处理组(图1C)。

### 2.2 孟鲁司特钠调控MM细胞内USP2调控分子表达, 抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡

MM1.S和H929细胞经过40.0  $\mu$ mol/L孟鲁司特钠分别处理6、8、12和24 h后, Western blot检测结果显示, 与对照组相比, MM1.S和H929细胞内USP2调控分子CCND1、CCNA1和KRAS蛋白表达水平呈时间依赖性下调, 同时内质网应激标志蛋白和凋亡相关分子GRP78和CHOP蛋白表达水平呈时间依赖性上调(图2A)。不同摩尔浓度(30、40、50和60  $\mu$ mol/L)的孟鲁司特钠处理MM1.S和H929细胞24 h后, 细胞内CCND1、CCNA1和KRAS分子蛋白表达水平呈浓度依赖性降低, 而GRP78和CHOP蛋白表达水平呈浓度依赖性升高(图2B)。进一步应用CCK-8法检测两株细胞在不同浓度的孟鲁司特钠分别处理24 h后的生长抑制率, 结果显示, 孟鲁司特对MM1.S和H929细胞的 $IC_{50}$ 分别为35.87和34.89  $\mu$ mol/L(图2C)。与此同时, Annexin-V/PI双染法流式细胞术检测细胞凋亡率的结果显示, MM1.S和H929细胞经过不同浓度的孟鲁司特钠分别处理24 h后, Annexin-V/PI双染细胞(即凋亡细胞)相比对照组均明显增多, 且呈明显浓度依赖性(图2D)。

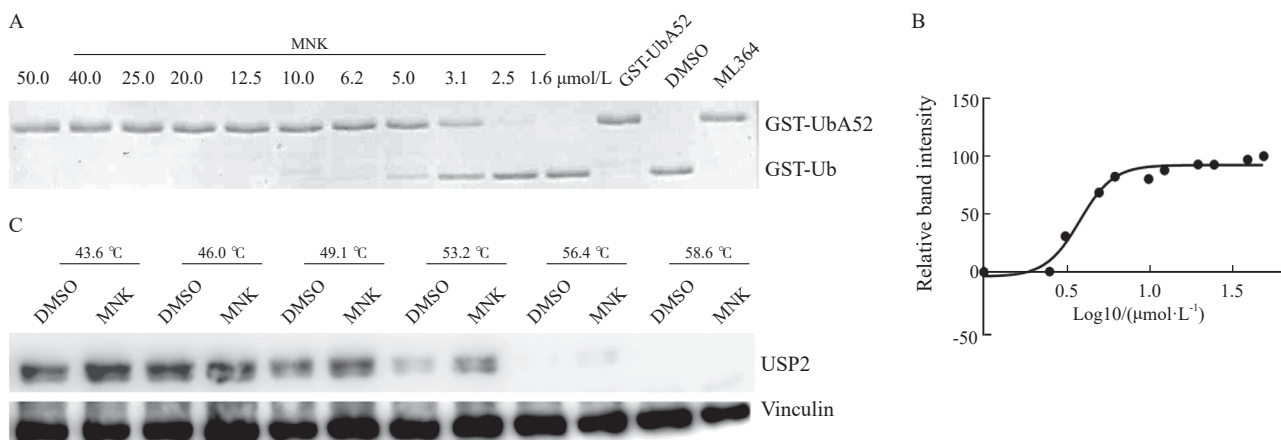


图1 孟鲁司特钠对USP2活性的影响

Fig. 1 Effects of montelukast sodium on activities of USP2

A: Effects of montelukast sodium (MNK) on purified USP2 *in vitro* deubiquitination reaction. B:  $IC_{50}$  of MNK was calculated through gray scanning of GST-UbA52 band. C: Effects of MNK (200  $\mu$ mol/L) on the thermal stability of USP2 was detected by co-incubation with MM1.S cell lysate.

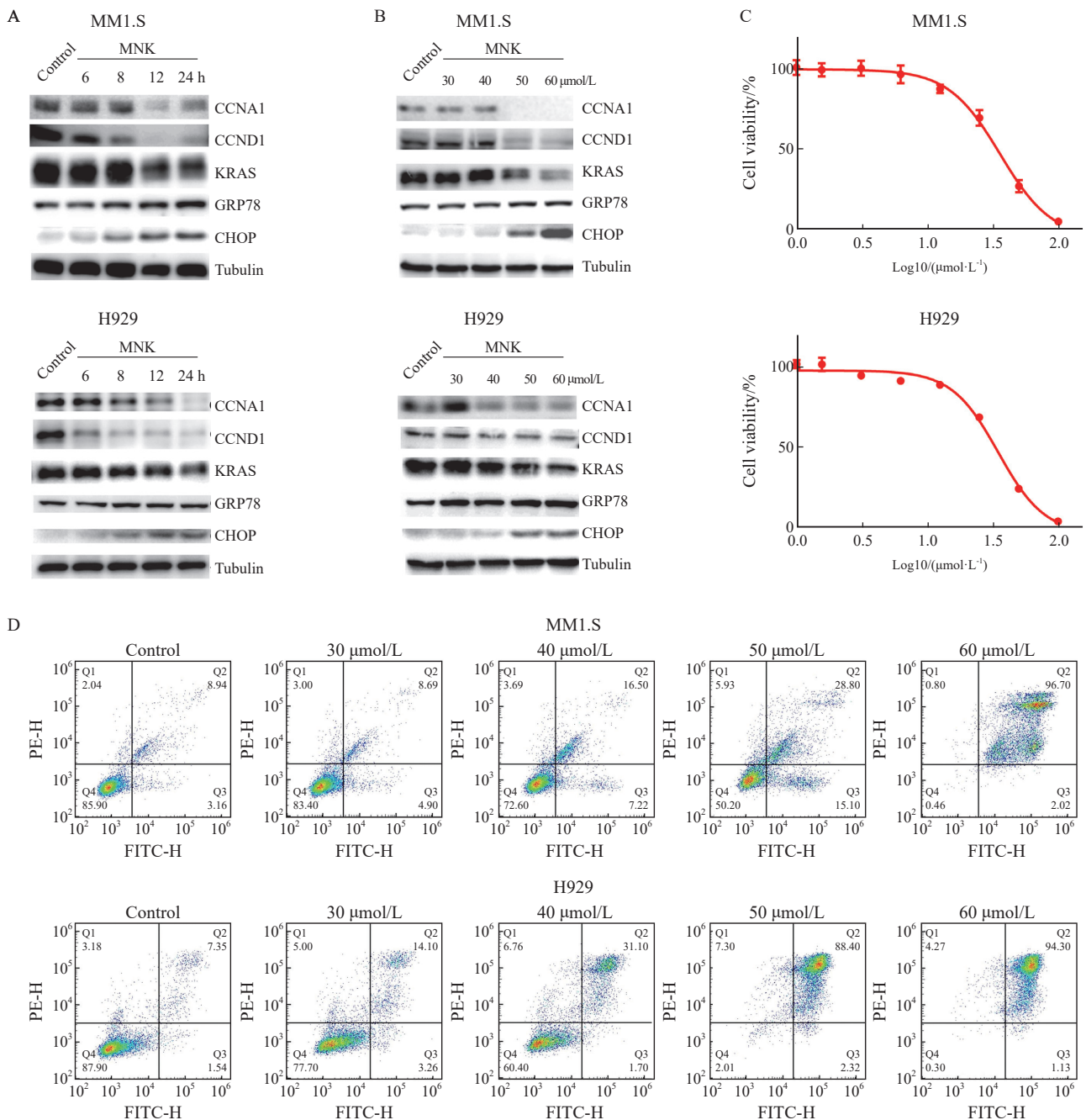


图2 孟鲁司特钠对MM细胞内USP2调控分子和内质网应激关键分子的影响

Fig. 2 Effects of montelukast sodium on USP2 targeted proteins and regulators of endoplasmic reticulum stress in MM cells

A: Western blot analysis of cell cycle regulators, signal transduction protein and endoplasmic reticulum stress molecules in MM1.S and H929 treated with 40 μmol/L montelukast sodium (MNK) at indicated times. B: Western blot analysis of cell cycle regulators, signal transduction protein and endoplasmic reticulum stress molecules in MM1.S and H929 treated with MNK at indicated concentrations for 24 h. C: CCK-8 tests of MM1.S and H929 cells treated with MNK in at indicated concentrations for 24 h. D: Flow cytometry analysis of apoptosis rate of MM1.S and H929 cells treated with different concentrations of MNK.

### 2.3 调控MM细胞内的USP2水平对孟鲁司特钠生物学效应的影响

采用Western blot检测过表达和敲除USP2的H929和MM1.S细胞内的USP2蛋白水平，结果显示，相比空载组，过表达USP2的H929-OE和MM1.S-OE细胞内的USP2蛋白水平显著升高，而敲除USP2的H929-LE（包括H929-LE-1#和H929-LE-2#）和MM1.S-LE（包括MM1.S-LE-

1#和MM1.S-LE-2#）细胞内的USP2蛋白水平显著降低（图3A、3B）。使用40 μmol/L孟鲁司特钠处理H929-OE、MM1.S-OE、H929-LE和MM1.S-LE细胞以及对对照组H929和MM1.S细胞24 h后，采用CCK-8法和流式细胞术检测细胞生长抑制率和凋亡率，结果显示，过表达USP2的H929-OE细胞增殖抑制率和凋亡率分别为（37.68±1.10）%和（18.99±0.26）%，

MM1.S-OE细胞增殖抑制率和凋亡率分别为(24.48±0.49)%和(33.29±0.75)%,显著低于H929和MM1.S细胞[H929:(57.19±1.93)%和(45.65±0.24)%;MM1.S:(50.04±0.53)%和(40.25±0.91)%],差异均有统计学意义( $P$ 均<0.05, $n=3$ ,各样本为独立样本);而低表达USP2的H929-LE和MM1.S-LE细胞增殖抑制率和凋

亡率明显升高[H929-LE-1#:(80.70±1.60)%和(89.08±0.49)%;H929-LE-2#:(75.30±3.80)%和(82.41±1.07)%;MM1.S-LE-1#:(70.64±0.84)%和(67.63±0.21)%;MM1.S-LE-2#:(68.47±1.32)%和(85.90±0.18)%],差异均有统计学意义( $P$ 均<0.05, $n=3$ ,各样本为独立样本,表1)。

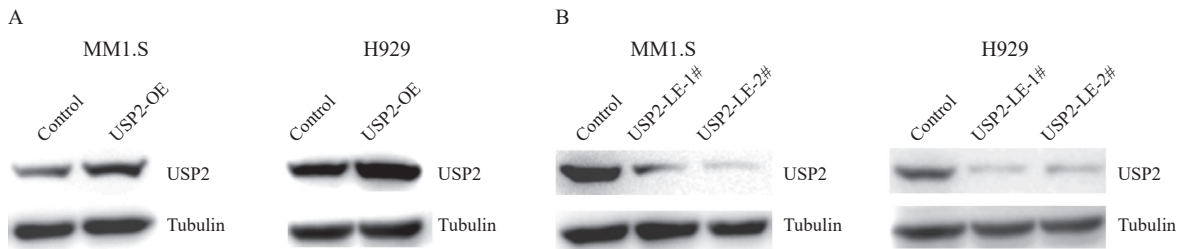


图3 MM细胞内USP2蛋白表达情况

Fig. 3 USP2 protein expression in MM cells

A: Western blot analysis of transfection efficiency of USP2 overexpression plasmid in MM1.S-OE and H929-OE cells. B: Western blot analysis of transfection efficiency of USP2 knock-out plasmid in MM1.S-LE-1#, MM1.S-LE-2#, H929-LE-1# and H929-LE-2# cells.

表1 孟鲁司特钠对MM细胞增殖抑制和凋亡的影响

Tab. 1 Effects of montelukast sodium on proliferation inhibition and apoptosis rate of MM cells

Group	Samples $n$	H929		MM1.S	
		Proliferation inhibition rate/%	Apoptosis rate/%	Proliferation inhibition rate/%	Apoptosis rate/%
Control	3	57.19±1.93	45.65±0.24	50.04±0.53	40.25±0.91
USP2-OE	3	37.68±1.10*	18.99±0.26**	24.48±0.49**	33.29±0.75**
USP2-LE-1#	3	80.70±1.60**	89.08±0.49**	70.64±0.84**	67.63±0.21**
USP2-LE-2#	3	75.30±3.80*	82.41±1.07**	68.47±1.32**	85.90±0.18**
$F$ value		143.7	5 664	1 233	3 290

The treatment concentration of montelukast sodium was 40  $\mu\text{mol/L}$ . \*:  $P<0.001$ , compared with control group; \*\*:  $P<0.000 1$ , compared with control group.

### 3 讨 论

MM细胞通常特征性合成并分泌异常单克隆免疫球蛋白或其组分,进而细胞内累积大量未折叠或错误折叠蛋白,导致其依赖细胞内泛素-蛋白酶体和自噬等蛋白降解系统维持细胞内蛋白质稳态<sup>[1, 9]</sup>。也正因为如此,泛素-蛋白酶体系统成为MM治疗靶标之一,蛋白酶体抑制剂(如硼替佐米)已成为MM一线治疗药物,但长期应用易引发耐药及剂量限制性毒性<sup>[10]</sup>,亟待探索更具选择性的干预策略。近年来研究<sup>[11-12]</sup>表明,UPS关键调控元件—去泛素化酶家族在MM中发挥重要作用,其中USP通过动态调节底物蛋白稳定性参与肿瘤细胞增殖、凋亡及应激应答等过

程。本课题组前期研究<sup>[6]</sup>显示,USP2在MM中具有独特的病理学意义:临床样本分析表明,MM患者骨髓中USP2 mRNA表达及蛋白水平较健康对照人群显著升高,并与疾病进展及患者预后密切相关;功能实验证实,在MM细胞系内敲低USP2可显著抑制MM细胞增殖,促进细胞凋亡,并在小鼠异种移植模型中显著降低成瘤能力。由此可见,靶向USP2成为MM的潜在治疗途径。

USP2作为去泛素化酶家族的关键成员,通过动态调控靶蛋白的泛素化修饰稳态,在肿瘤恶性进展中发挥多维度促癌作用<sup>[13]</sup>。近年来,USP2成为抗肿瘤药物研发的热点靶点。目前针对USP2的抑制剂研究已取得阶段性进展,多种小分子化合物(如ML364、STD1T)和天然产物

衍生物（如LCAHA）在多种临床前模型中展现出潜在疗效。然而，现有抑制剂普遍存在药代动力学缺陷，包括水溶性低、血浆半衰期短及血脑屏障穿透效率不足等关键问题，这些转化瓶颈导致多数候选药物仍局限于临床前研究阶段<sup>[14-15]</sup>。因此，在临床常用药物中筛选具有USP2抑制作用的制剂可能是寻找MM“新型”治疗药物的有效途径。本研究通过构建体外去泛素化反应体系，筛选发现支气管哮喘常用治疗药物孟鲁司特钠可以抑制USP2活性，并呈时间和浓度依赖性，IC<sub>50</sub>约为3.814 μmmol/L，进一步CETSA结果显示，孟鲁司特钠在体外能够提高MM1.S细胞内USP2蛋白的热稳定性，提示孟鲁司特钠可以与MM细胞内的USP2蛋白直接结合而干扰其活性。

鉴于药物与细胞内蛋白接触和抑制效率会因培养液、细胞膜屏障及代谢等干扰因素而削弱，本研究应用较高浓度的孟鲁司特钠（40~60 μmol/L）处理MM细胞系H929和MM1.S细胞，结果显示，其可浓度依赖性地抑制细胞生长并诱导凋亡。已有研究显示，USP2在肿瘤中的作用具有组织特异性。在乳腺癌细胞中，USP2通过拮抗人表皮生长因子受体2（human epidermal growth factor receptor 2, HER2）的泛素化介导的内吞降解来维持其表面水平<sup>[16]</sup>；在肝癌细胞中，USP2可以稳定肿瘤细胞内抗凋亡蛋白（caspase-like FLICE-inhibitory protein, cFLIP）降低其化疗药物敏感性<sup>[17]</sup>。而在MM中，我们发现其核心靶标为细胞周期调控蛋白（CCND1和CCNA1）和细胞增殖信号通路关键蛋白（KRAS），这与MM高度依赖细胞周期驱动蛋白的特征一致。此外，孟鲁司特钠可以显著上调H929和MM1.S细胞中内质网应激标志物GRP78和凋亡效应蛋白CHOP的水平，这些生物学效应可能与孟鲁司特钠抑制MM细胞内USP2活性进而导致泛素化未折叠蛋白堆积，促使蛋白酶体超负荷进而触发未折叠蛋白反应和内质网应激有关。进一步采用孟鲁司特钠处理过表达USP2的MM细胞，结果发现其生长抑制率和凋亡率明显下降，而低表达USP2的MM细胞对孟鲁司特钠的敏感性显著增强。上述结果提示，孟鲁司特钠

调控MM细胞的生物学行为与其对USP2的抑制作用密切相关，为孟鲁司特钠应用于MM患者治疗提供了实验及理论基础。

孟鲁司特钠的临床转化潜力源于其独特的安全性优势。临床药物毒理学研究<sup>[18-19]</sup>显示，孟鲁司特钠的人体最大耐受剂量为1 000 mg，与此同时，既往大剂量应用研究提示其治疗窗口可拓展。相较于尚处于临床前阶段的USP2特异性抑制剂，孟鲁司特钠的已获批身份可加速其临床应用进程，尤其适合与现有蛋白酶体抑制剂联用以实现协同增效，如前期研究<sup>[7]</sup>提示其可增强卡非佐米效应。此外，通过结构修饰或前药设计研发新型“孟鲁司特钠类似物”提高药物靶向性和抑制效应，有望实现其药效和药代动力学的进一步优化。

然而，本研究仍存在一定局限性。体外模型对骨髓微环境动态特征的模拟存在显著不足，特别是基质细胞介导的耐药机制及体内药物代谢特征的缺失，可能使细胞系实验结果产生偏差。原代MM细胞可保留患者特异性遗传背景及肿瘤-基质交互，而动物模型可系统评估药物分布及多器官毒性，这些关键环节的缺失可能导致孟鲁司特钠的体外药效被高估。此外，USP2在MM中的异常转录调控机制尚未完全阐明，其上游信号转导通路（如表观遗传修饰或转录因子调控）可能影响靶向治疗的长期效果。值得注意的是，近期研究<sup>[20]</sup>显示，USP2抑制剂ML364可交叉抑制USP8，而孟鲁司特钠对USP家族同源蛋白或非靶蛋白的潜在脱靶效应也需予以排除，这对其临床转化的安全性评估具有关键意义。

综上所述，MM细胞内USP2通过调节关键肿瘤相关蛋白的稳定性参与疾病的发生、进展和侵袭，孟鲁司特钠能够直接与MM细胞内的USP2结合并抑制其活性进而促使细胞增殖调控信号蛋白降解，同时诱导泛素化未折叠蛋白增多和内质网应激，导致MM细胞增殖阻滞和凋亡，从而为MM的治疗提供新思路。

第一作者：

杜承蓉（ORCID: 0009-0008-6631-9897），硕士。

通信作者：

朱琦（ORCID: 0000-0002-7128-806X），博士，主

任医师, E-mail: zhuqi70@hotmail.com。

#### 作者贡献声明:

杜承蓉: 进行实验, 数据收集、整理和统计分析, 撰写论文; 王莹莹: 实验操作指导; 唐勇: 数据统计分析指导; 姚一芸: 修改论文; 吴英理: 实验方案设计, 实验指导; 朱琦: 提出研究方案和设计思路, 设计论文框架, 撰写和修改论文。

#### [参 考 文 献]

- [ 1 ] COWAN A J, GREEN D J, KWOK M, et al. Diagnosis and management of multiple myeloma: a review [ J ] . JAMA, 2022, 327(5): 464–477.
- [ 2 ] VINCENT RAJKUMAR S. Multiple myeloma: 2024 update on diagnosis, risk-stratification, and management [ J ] . Am J Hematol, 2024, 99(9): 1802–1824.
- [ 3 ] BONACCI T, EMANUELE M J. Dissenting degradation: deubiquitinases in cell cycle and cancer [ J ] . Semin Cancer Biol, 2020, 67(Pt 2): 145–158.
- [ 4 ] XU F H, XU X D, DENG H H, et al. The role of deubiquitinase USP2 in driving bladder cancer progression by stabilizing EZH2 to epigenetically silence SOX1 expression [ J ] . Transl Oncol, 2024, 49: 102104.
- [ 5 ] KUANG Z A, LIU X J, ZHANG N, et al. USP2 promotes tumor immune evasion *via* deubiquitination and stabilization of PD-L1 [ J ] . Cell Death Differ, 2023, 30(10): 2249–2264.
- [ 6 ] WANG Y Y, ZHANG Y P, LUO H, et al. Identification of USP2 as a novel target to induce degradation of KRAS in myeloma cells [ J ] . Acta Pharm Sin B, 2024, 14(12): 5235–5248.
- [ 7 ] TONG J, YU Q, XU W B, et al. Montelukast enhances cytotoxic effects of carfilzomib in multiple myeloma by inhibiting mTOR pathway [ J ] . Cancer Biol Ther, 2019, 20(3): 381–390.
- [ 8 ] Integrated DNA Technologies [ EB/OL ] . [ 2023–02–11 ] . [https://sg.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR\\_CUSTOM](https://sg.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM).
- [ 9 ] LI Y N, LI S J, WU H J. Ubiquitination–proteasome system (UPS) and autophagy two main protein degradation machineries in response to cell stress [ J ] . Cells, 2022, 11(5): 851.
- [ 10 ] SOGBEIN O, PAUL P, UMAR M, et al. Bortezomib in cancer therapy: mechanisms, side effects, and future proteasome inhibitors [ J ] . Life Sci, 2024, 358: 123125.
- [ 11 ] PARK J, CHO J, SONG E J. Ubiquitin–proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment [ J ] . Arch Pharm Res, 2020, 43(11): 1144–1161.
- [ 12 ] ZANGOOIE A, TAVOOSI S, ARABHOSSEINI M, et al. Ubiquitin–specific proteases (USPs) in leukemia: a systematic review [ J ] . BMC Cancer, 2024, 24(1): 894.
- [ 13 ] KITAMURA H, HASHIMOTO M. USP2–related cellular signaling and consequent pathophysiological outcomes [ J ] . Int J Mol Sci, 2021, 22(3): 1209.
- [ 14 ] ZHANG S L, GUO Y, ZHANG S J, et al. Targeting the deubiquitinase USP2 for malignant tumor therapy (review) [ J ] . Oncol Rep, 2023, 50(4): 176.
- [ 15 ] CHEN S Y, LIU Y Q, ZHOU H C. Advances in the development ubiquitin–specific peptidase (USP) inhibitors [ J ] . Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4546.
- [ 16 ] ZHANG J R, LIU S Y, LI Q, et al. The deubiquitylase USP2 maintains ErbB2 abundance *via* counteracting endocytic degradation and represents a therapeutic target in ErbB2–positive breast cancer [ J ] . Cell Death Differ, 2020, 27(9): 2710–2725.
- [ 17 ] LIU D, FAN Y F, LI J, et al. Inhibition of cFLIP overcomes acquired resistance to sorafenib *via* reducing ER stress–related autophagy in hepatocellular carcinoma [ J ] . Oncol Rep, 2018, 40(4): 2206–2214.
- [ 18 ] WERMUTH H R, BADRI T, TAKOV V. Montelukast. In StatPearls. StatPearls Publishing [ EB/OL ] . (2023–03–22) [ 2025–03–07 ] . <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459301>.
- [ 19 ] TSAI M J, CHANG W A, CHUANG C H, et al. Cysteinyl leukotriene pathway and cancer [ J ] . Int J Mol Sci, 2022, 23(1): 120.
- [ 20 ] TIAN Y C, LIU K, WU D D, et al. The discovery of potent USP2/USP8 dual–target inhibitors for the treatment of breast cancer *via* structure guided optimization of ML364 [ J ] . Eur J Med Chem, 2024, 268: 116275.

(收稿日期: 2025-01-22 修回日期: 2025-05-16)

(责任编辑: 李广涛)