

论著 DOI: 10.16369/j.oh.er.issn.1007-1326.2025.240568

· 实验研究 ·

MitoCur-1 通过靶向抑制泛素特异性蛋白酶 14 对肝细胞癌的影响

李怡¹, 李国艳¹, 程丽¹, 李格格¹, 李艾铭¹, 杨子琰², 崔红梅¹

1. 兰州大学公共卫生学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州大学护理学院, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 探究 MitoCur-1 通过抑制泛素特异性蛋白酶 14 (USP14) 对肝细胞癌增殖、迁移的影响, 为 MitoCur-1 的抗肿瘤作用提供理论依据。 **方法** 首先, 体外培养 HepG2 细胞, 应用 CCK-8 实验和克隆形成实验检测 MitoCur-1 对细胞增殖能力的影响; 应用划痕实验检测 MitoCur-1 对细胞迁移能力的影响; 应用实时荧光定量 PCR、蛋白质印迹法检测 MitoCur-1 作用于 HepG2 后细胞内 USP14 的 mRNA 和蛋白表达水平的变化; 放线菌酮 (CHX) 实验检测 MitoCur-1 对蛋白半衰期的影响; 其次, 构建动物模型, 应用苏木精-伊红染色 (HE) 和免疫组织化学 (IHC) 法, 检测 MitoCur-1 在体内的抗肿瘤效应。 **结果** HepG2 的细胞活力随 MitoCur-1 浓度的升高而降低, 细胞的 IC₅₀ 为 3.62 μmol/L。与对照组相比, 0.2、0.4、0.8 μmol/L MitoCur-1 处理后, HepG2 细胞的克隆形成能力均有下降 (均 $P < 0.05$)。1、2、4 μmol/L 的 MitoCur-1 处理 48 h, HepG2 细胞迁移能力均下降 (均 $P < 0.05$)。与对照组相比, 1、2、4 μmol/L MitoCur-1 处理 HepG2 细胞 24 h, USP14 的 mRNA 和蛋白表达水平均下降 (均 $P < 0.05$)。CHX 实验结果提示, MitoCur-1 缩短了 USP14 的蛋白半衰期 ($P < 0.05$)。体内实验显示, 15 mg/kg (以体重计) MitoCur-1 给药组小鼠肿瘤体积增长速度减缓, 肿瘤体积明显低于对照组 ($P < 0.05$), 但小鼠体重总体上增长, 与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 **结论** MitoCur-1 能抑制 USP14 的表达, 降低 HepG2 细胞的增殖、迁移能力, 诱导肿瘤细胞发生凋亡, 促进自噬, 抑制肝细胞癌的发展。

关键词: 泛素特异性蛋白酶 14; 肝细胞癌; MitoCur-1; 靶向; 抗肿瘤; HepG2 细胞

中图分类号: R114; R735 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-1326(2025)02-0239-08

引用: 李怡, 李国艳, 程丽, 等. MitoCur-1 通过靶向抑制泛素特异性蛋白酶 14 对肝细胞癌的影响[J]. 职业卫生与应急救援, 2025, 43(2): 239-245; 258.

Effect of MitoCur-1 on development of hepatocellular carcinoma by targeting inhibition of ubiquitin-specific protease 14 LI Yi¹, LI Guoyan¹, CHENG Li¹, LI Gege¹, LI Aiming¹, YANG Ziyang², CUI Hongmei¹ (1. School of Public Health, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China; 2. School of Nursing, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of MitoCur-1 on the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma through the inhibition of ubiquitin-specific protease 14 (USP14), providing a theoretical basis for the antitumor activity of MitoCur-1. **Methods** HepG2 cells were cultured in vitro, and CCK-8 assays and colony formation assays were used to assess the effects of MitoCur-1 on cell proliferation. The scratch assay was employed to evaluate the impact of MitoCur-1 on cell migration. real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot were performed to detect changes in both USP14 mRNA and protein expression levels in HepG2 cells after treatment with MitoCur-1. The CHX assay was conducted to examine the effect of MitoCur-1 on protein half-life. An animal model was established, and hematoxylin and eosin (HE) staining along with immunohistochemistry (IHC) were used to analyze the in vivo antitumor effects of MitoCur-1. **Results** The cell viability of HepG2 cells decreased with increasing concentrations of MitoCur-1, with an IC₅₀ of 3.62 μmol/L. Compared to the control group, MitoCur-1 at concentrations of 0.2, 0.4, and 0.8 μmol/L significantly reduced the colony formation ability of HepG2 cells (all $P < 0.05$). After 48 hours of treatment with 1, 2, and 4 μmol/L MitoCur-1, the migratory ability of HepG2 cells was diminished (all $P < 0.05$). Additionally, treatment with 1, 2, and 4 μmol/L MitoCur-1 for 24 hours led to decreased mRNA and protein expression levels of USP14 in HepG2 cells compared to the control group (all $P < 0.05$). CHX assay results indicated that MitoCur-1 reduced the protein half-life of USP14 ($P < 0.05$). The experiments in

基金项目: 国家级大学生创新创业项目 (202310730215)

作者简介: 李怡 (1992—), 女, 硕士在读

通信作者: 崔红梅, E-mail: cuihm@lzu.edu.cn

vivo showed that the growth rate of tumor volume was slowed in the 15 mg/kg (in body weight) MitoCur-1 group of mice, resulting in a significantly lower tumor volume than that of the control group ($P < 0.05$). However, there was no statistically significant difference in the overall weight gain of mice between the treated and control groups ($P > 0.05$). **Conclusions** MitoCur-1 treatments inhibited the expression of USP14, reduced the proliferation and migratory capabilities of HepG2 cells, induced apoptosis, promoted autophagy, and suppressed the development of hepatocellular carcinoma.

Keywords: ubiquitin-specific protease 14 (USP14); hepatocellular carcinoma; MitoCur-1; targeting; antitumor; HepG2 cells

据 2020 年全球癌症统计数据,原发性肝癌是全球第六大常见癌症以及癌症死亡的第三大原因,其最常见的组织学类型(约占 75% ~ 85%)是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),具有侵袭性强、转移性强、易产生耐药性、预后差的特点,严重威胁人类健康,是迫切需要解决的公共卫生问题^[1-2]。HCC 的危险因素除乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、黄曲霉毒素、饮酒、吸烟^[3]外,还包括职业危险因素。工人在职业活动中可能接触到各种肝毒性化学制剂,如无机污染物砷、镉以及有机溶剂等^[4]。大多数化学物质在肝脏中代谢,而代谢过程中产生的有毒代谢物可通过细胞增殖和凋亡改变、过氧化物酶体增殖和表观遗传改变等机制诱发肝细胞癌。

HCC 常用的生物标志物有甲胎蛋白、甲胎蛋白异质体、异常凝血酶原,其他标志物还包括磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3、骨桥蛋白、高尔基体蛋白 73 等^[5-6]。生物标志物众多,但在可靠性、准确性方面仍然不能满足诊断需求。泛素特异性蛋白酶 14(ubiquitin-specific protease 14, USP14)属于泛素特异性蛋白酶家族(ubiquitin-specific proteases, USPs),其失调会导致疾病的发生,如癌症、神经退行性疾病、免疫反应和病毒感染等^[7]。USP14 在 HCC 患者肿瘤组织中的表达明显高于癌旁组织及正常肝组织,且患者预后与 USP14 表达水平呈负相关^[8],是 HCC 干预治疗的生物标志物。目前,针对 USP14 的特异性抑制剂主要包括 b-AP15、IU1 及其类似物以及金属化合物。大多 USP14 相关抑制剂在多种抗性肿瘤研究中展现出效果,但具备高活性、高选择性和临床有效性的抑制剂仍有待进一步发掘^[9]。

姜黄素是一种从姜科植物中提取的酚类化合物,是具有抗炎和抗肿瘤作用的天然化合物^[10],但因其水溶性低,口服生物利用度低、吸收差、代谢迅速等特点,临床推广应用困难。兰州大学化学化工学院郑亚龙博士设计合成了 MitoCur-1,其是在姜黄素的芳香环上嫁接了线粒体靶向基团三苯基膦正离子,并在姜黄素亚甲基活性位点引入偕二甲基以改善母体分子的稳定性,其分子式为 $C_{65}H_{64}Cl_2O_6P_2$,可被肿瘤线粒体特异性摄取。研究^[11]

表明,MitoCur-1 可以抑制硫氧还蛋白还原酶而选择性产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)杀死肿瘤,而本课题组在前期研究中发现,MitoCur-1 是新型 USP14 抑制剂,可以通过抑制 USP14 的表达而促进细胞凋亡、周期停滞以及诱导细胞铁死亡,从而逆转黑色素瘤细胞的维莫非尼耐药性^[12]。

本研究拟以 HepG2 细胞作为体外 HCC 研究的细胞模型并构建 HepG2 荷瘤小鼠模型,以 MitoCur-1 作为 USP14 的靶向抑制剂,探究 USP14 对肿瘤细胞生长和迁移的影响,为进一步深入探讨 USP14 在 HCC 中的调控作用提供重要研究依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及细胞

HepG2 细胞为兰州大学公共卫生学院提供;5 ~ 6 周龄 BALB/c 雄性裸鼠,购于湖南 SJA 实验动物有限公司。动物实验经兰州大学伦理委员会批准。国家动物实验许可证号:SYXK (Gan)2018—0002。

1.1.2 实验试剂

胎牛血清、青-链霉素、胰酶消化液(以色列 Biological Industries 公司);MitoCur-1(由兰州大学化学系提供);cell counting kit-8 (CCK-8)试剂(美国 APE-BIO 公司);逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒(日本 Takara 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);结晶紫染色液以及甘氨酸、Tris-HCl 缓冲液、质量分数为 30%的丙烯酰胺等蛋白质印迹法(Western blot)试剂(北京索莱宝科技有限公司);Matrigel 基质胶(美国 Corning 公司);USP14 抗体(美国 Sigma 公司);放线菌酮(cycloheximide, CHX)、原位末端转移酶标记法(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);TRIzol(美国 Invitrogen 公司)裂解液;二甲苯、无水乙醇(天津市大茂化学试剂工厂);苏木精返蓝液、苏木精分化液、伊红染色液(武汉塞维尔生物科技有限公司)。

1.1.3 实验仪器

电泳和转膜装置 Mini-PROTEAN Tetra System

(美国 Bio-Rad 公司)、凝胶成像系统 Universal Hood II (美国 Bio-Rad 公司)、多功能多波段酶标仪 Infinite M Nano(瑞士 TECAN 公司)、LC96 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士罗氏 Roche 公司)。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 实验

将生长状态良好的 HepG2 细胞接种于 96 孔板中,约 5 000 个细胞/孔,设置 4 个复孔,于第 2 天弃去孔内培养基,将含有 0、0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$ MitoCur-1 的培养基依次加入 96 孔板中。72 h 后,每孔中加入 CCK-8 试剂 10 μL 并置于培养箱中继续培养 4 h,后测定 450 nm 处的吸光度。使用 GraphPad Prism 软件计算半抑制浓度 IC_{50} 。

1.2.2 克隆实验

将对数生长期的 HepG2 细胞接种于 12 孔板中,约 2 500 个细胞/孔,设置 3 个复孔。于第 2 天弃去孔内培养基,将含有 0、0.2、0.4、0.8 $\mu\text{mol/L}$ MitoCur-1 的培养基依次加入孔中。置于培养箱中培养 1 周后,除去培养基,磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤 2 次,用甲醇固定 10 min,再用结晶紫染色 15 min,去除结晶紫后用 PBS 清洗 2 次,自然晾干并采集图像。加入裂解液 150 μL ,裂解完全后,吸取 10 μL 到 96 孔板中,再在 96 孔板中加入 190 μL 新的裂解液,590 nm 测吸光度并进行定量分析。

1.2.3 划痕实验

将细胞接种于 12 孔板中,细胞数以 24 h 后细胞能铺满底部为宜,3 个复孔。次日,用 200 μL 枪头画 1 条竖线,拍照后将含有 0、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ MitoCur-1 的培养基加入孔内,继续培养 48 h 后,再次拍照。测定 48 h 细胞迁移率。迁移率 = (0 h 划痕宽度 - 培养后划痕宽度)/0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.2.4 蛋白质印迹法

收集用 0、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ MitoCur-1 处理 24 h 后的 HepG2 细胞,用 PBS 润洗 2 次,再加入含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞,离心后取含有蛋白质的上清液,并用 BCA 试剂进行蛋白定量。蛋白质变性后,通过电泳分离蛋白样本,转膜至硝酸纤维素膜上,脱脂牛奶室温封闭,再加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜。次日,回收一抗,再加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗,室温温育,化学发光试剂曝光显影后采集图像,使用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.2.5 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR)

用 TRIzol 试剂裂解 HepG2 细胞,加入适量的氯仿。静置 3 min 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,取上清液至新的 EP 管中,再加等体积的异丙醇。离心弃上清,加入 75% (体积分数)的乙醇,弃上清,静置晾干后加入焦碳酸二乙酯(DEPC)得到总 RNA。取 1 μg 总 RNA 并用反转录试剂盒转录成 cDNA,再用 SYBR Green 试剂进行 RT-qPCR。USP14 的引物序列为 5'-TGT GCCTGAAC TCAAAGATGC-3' 和 5'-ATATACTGCGC TGAAGCCATTT-3'。用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对阈值循环数进行计算。

1.2.6 蛋白质稳定性实验

将细胞接种在培养皿中,次日实验组加入 4 $\mu\text{mol/L}$ 的 MitoCur-1 处理 4 h 后,在对照组和实验组的细胞培养基中都加入 CHX,使其终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。分别在 0、4、8、24 h 的时间点收取加了 MitoCur-1 的细胞样品和不含 MitoCur-1 的对照样品。提取蛋白质,并使用 Western blot 检测蛋白质的表达水平从而计算降解速度。通过比较不同时间点的蛋白质水平,以及与对照组的差异来分析蛋白质的稳定性。

1.2.7 体内异种移植模型

将 HepG2 细胞悬浮于 PBS 中,与 matrigel 基质胶按 2:1 的比例混合。取含 2×10^6 个细胞的混悬液注射于每只小鼠右侧背侧皮下。当肿瘤体积达到 100 mm^3 时,将 HepG2 荷瘤小鼠随机分为 3 组(每组 3 只):对照组和 2 个治疗组(5 mg/kg MitoCur-1 和 15 mg/kg MitoCur-1)。治疗组和对照组分别腹腔注射相应药物和培养液[体积分数:5%二甲基亚砷(DMSO)、5%聚乙二醇(PEG)、90%PBS],每隔 1 d 注射 1 次,连续 4 周。实验结束时,将小鼠安乐死,并收集肿瘤组织。

1.2.8 苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)

将小鼠肿瘤组织用质量分数 4%的多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋,然后制作 4 μm 厚的切片。用苏木精染液进行染色,随后乙醇分化,流水冲洗;伊红液进行染色,染色后使用梯度乙醇完成脱水,二甲苯透明,滴加中性树脂后封固,晾干后用显微镜进行观察拍照。

1.2.9 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)法

石蜡切片脱蜡后,用柠檬酸进行抗原高温修复。血清封闭后,再用一抗(稀释比例 1:100)4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜,次日用辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下温育,并用二氨基联苯胺染色。最后,将切片用苏木精复染、乙醇脱水、树脂封固,并用显微镜观察蛋

白阳性表达情况,利用 Image J 8.0 软件分析。

1.2.10 显色法 TUNEL 细胞凋亡检测

将切片放入二甲苯中脱蜡 10 min,再放入无水乙醇 5 min,质量分数 90%的乙醇 2 min,70%的乙醇 2 min,蒸馏水 2 min。滴加 20 $\mu\text{g/mL}$ 不含脱氧核糖核酸酶(DNase)的蛋白酶 K,20 ~ 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 15 ~ 30 min,PBS 洗涤 3 次。用质量分数 3%的过氧化氢溶液室温温育 20 min,以灭活切片内源的过氧化物酶。用 PBS 洗涤后,在切片上加 50 μL 生物素标记液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 60 min,用 PBS 洗涤 1 次,滴加 0.1 mL 标记反应终止液,再室温温育 10 min。在切片上加 50 μL Streptavidin-HRP 工作液,室温温育 30 min 后,用 PBS 洗涤。滴加 0.2 mL 二氨基联苯胺显色液,室温温育 20 min 后,用 PBS 洗涤。随后用苏木精染色液进行细胞核染色,再用乙醇脱水,二甲苯透明处理,随后封固观察。最后,在显微镜下观察并拍照。

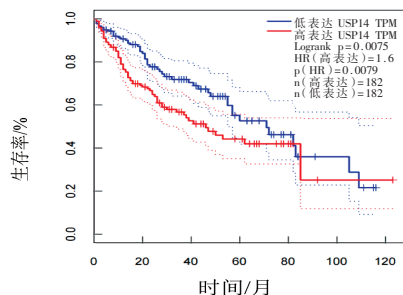
1.2.11 统计学分析

使用 Image J 8.0 软件进行图片处理,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据分析采用 GraphPad Prism 软件,多组间均数比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Dunnett- t 法进行比较。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 USP14 在黑色素瘤中表达谱的生物信息学分析

为了解 USP14 在肝细胞癌治疗中的重要性,本研究通过基因表达谱交互分析(GEPIA)数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn>)分析了 USP14 的表达与肝癌患者生存期的关系。如图 1 所示,蓝色曲线代表高表达 USP14 的患者,红色曲线代表低表达 USP14 的患者。结果显示,相对于低表达组,高表达 USP14 的肝细胞癌患者总生存期缩短 ($P < 0.05$),提示 USP14 可能与 HCC 的预后相关,寻找靶向 USP14 的化合物具有重要意义。

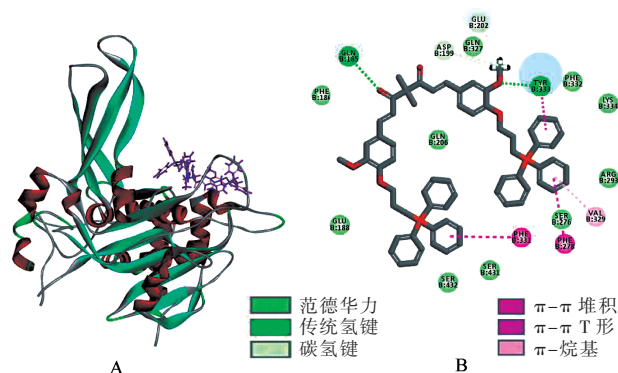


注:TPM 代表每百万转录本中的转录本数(transcripts per million)。

图 1 基于 TCGA 数据库的 USP14 表达与患者预后之间的关系

2.2 MitoCur-1 的分子对接模拟

本研究在蛋白质结构数据库(ProteinData Bank, PDB)(<https://www.rcsb.org/>)中获得了蛋白质 USP14 的结构(PDB:6IIK),并使用 Discovery Studio 和 PyMOL 软件模拟 USP14 和 MitoCur-1 的对接构象,如图 2A 所示。MitoCur-1 可进入 USP14 的活性空腔内,与 USP14 上 Gln-185、Tyr333 残基形成氢键,与 Phe331、Phe278、Ser276、Val329、Tyr333 残基形成 $\pi-\pi$ 键,这些键使 MitoCur-1 与 USP14 结合,发挥抑制作用(图 2B)。



注:(A)MitoCur-1(紫色)结合在 USP14(PDB:6IIK)的活性空腔内;(B)MitoCur-1 与 USP14 的分子对接结合模式预测。

图 2 MitoCur-1 的分子对接模拟

2.3 MitoCur-1 对 HepG2 细胞活性的影响

利用 CCK-8 实验检测细胞在药物处理 72 h 后 450 nm 处的光密度值(optical density, OD),并绘制了生长曲线。如图 3 所示,HepG2 细胞的活力随 MitoCur-1 浓度的升高而降低,呈剂量依赖性,细胞的 IC_{50} 为 3.62 $\mu\text{mol/L}$,提示 MitoCur-1 能抑制 HepG2 细胞的活性。

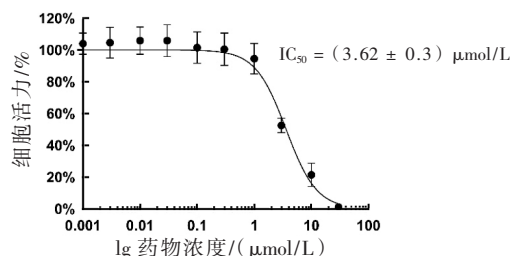
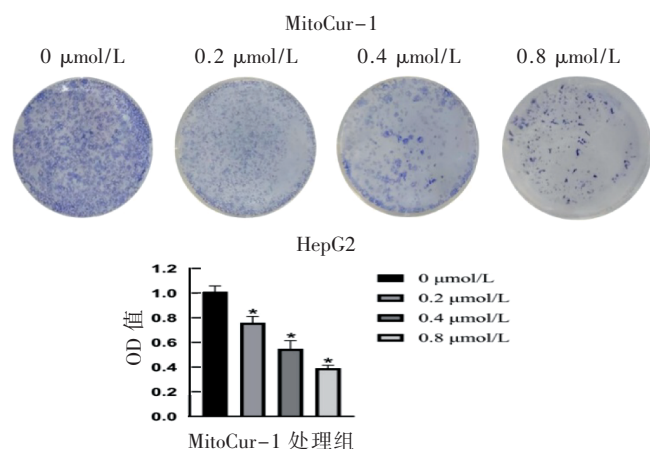


图 3 CCK-8 实验检测 MitoCur-1 对 HepG2 细胞活力的影响

2.4 MitoCur-1 对 HepG2 细胞增殖能力的影响

克隆实验结果显示,不同浓度给药组的克隆形成能力差异有统计学意义 ($F = 29.97, P < 0.05$)。与对照组相比,0.2、0.4 和 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 组克隆形成能力均有下调 ($P < 0.05$),表明 MitoCur-1 对 HepG2 细胞的增殖能力有明显的抑制作用。见图 4。

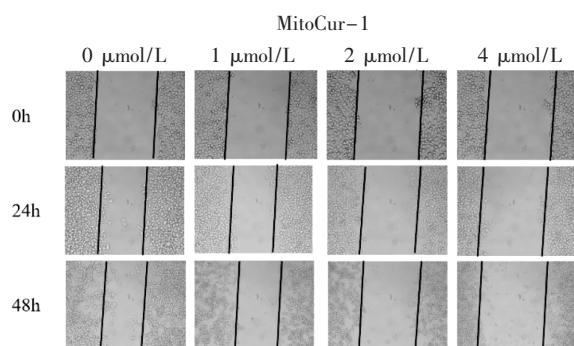


注:与对照组相比,* $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图 4 MitoCur-1 对 HepG2 细胞克隆形成能力的影响

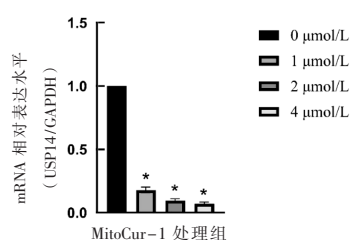
2.5 MitoCur-1 对 HepG2 细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验结果显示,在 24 h 和 48 h 时,各组细胞迁移能力之间差异有统计学意义 ($F =$



注:与对照组相比,* $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图 5 细胞划痕实验检测 MitoCur-1 对 HepG2 细胞迁移能力的影响



注:与对照组相比,* $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图 6 MitoCur-1 对 HepG2 细胞中 USP14 mRNA 表达水平的影响

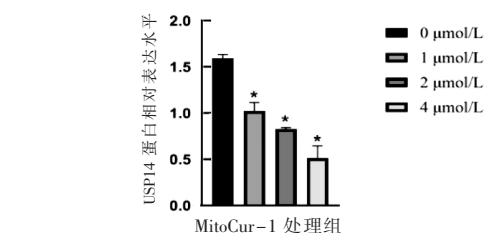
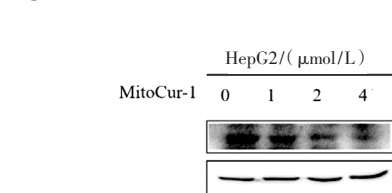
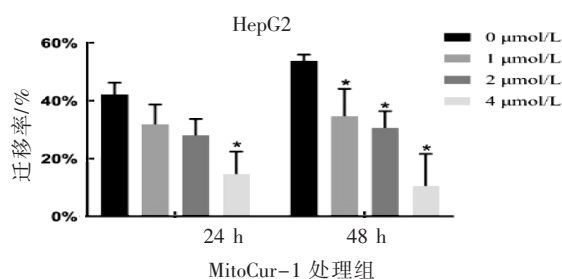
2.7 MitoCur-1 对 USP14 蛋白表达的影响

采用蛋白质印迹法检测了不同浓度(0、1、2、4 μmol/L)MitoCur-1 处理 HepG2 细胞 24 h,USP14 蛋白的表达变化情况。结果如图 7,随着 MitoCur-1 浓度升高,USP14 蛋白表达水平下降,不同剂量组 USP14 的蛋白相对表达量不同,差异有统计学意义 ($F = 90.1$, $P < 0.05$)。与对照组相比,1、2、4 μmol/L 组 USP14 蛋白的相对表达量下调 (均 $P < 0.05$),且 4 μmol/L 组下降 60%左右。

9.842、15.063,均 $P < 0.01$)。与对照组相比,处理 24 h 时 4 μmol/L MitoCur-1 组细胞迁移能力下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而处理 48 h 时,1、2、4 μmol/L 组的细胞迁移能力均下降 (均 $P < 0.05$),说明 MitoCur-1 有良好的抑制细胞迁移的能力。见图 5。

2.6 MitoCur-1 对 USP14 mRNA 表达水平的影响

本研究采用 RT-qPCR 技术检测 MitoCur-1 处理 HepG2 细胞 24 h,USP14 mRNA 的表达变化情况。结果显示,各组之间 USP14 mRNA 表达水平不同,差异有统计学意义 ($F = 3155$, $P < 0.05$);与对照组相比,1、2 和 4 μmol/L 的 MitoCur-1 处理后 HepG2 细胞中 USP14 mRNA 表达水平均有下调,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),且在低剂量 1 μmol/L 时 mRNA 的表达水平已下降了 80%左右。见图 6。



注:与对照组相比,* $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图 7 MitoCur-1 对 HepG2 细胞中 USP14 蛋白表达的影响

2.8 MitoCur-1 对 USP14 蛋白降解半衰期的影响

为了进一步阐明 MitoCur-1 下调 HepG2 细胞中 USP14 的作用机制,本研究应用 CHX 处理不同时间点的 HepG2 细胞。结果如图 8 所示,MitoCur-1 干预后,HepG2 中的 USP14 蛋白降解半衰期缩短,与对

照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示 MitoCur-1 通过减少蛋白质降解半衰期而降低 USP14 的蛋白水平。

2.9 MitoCur-1 的体内抗肿瘤疗效

实验期间,各组小鼠的皮毛光滑,大小便无异常,眼、鼻和口腔均无分泌物,呼吸、饮食和饮水均正常。结果如表 1 所示,各组小鼠体重总体上增长,给药后组间差异均无统计学意义($P > 0.05$),提示 MitoCur-1 对小鼠无明显的毒作用。MitoCur-1 给药组肿瘤体积增长速度减缓,特别是 15 mg/kg (以小

鼠体重计)MitoCur-1 给药组呈现良好的抗肿瘤作用,在第 1 周、第 3 周、第 4 周时肿瘤体积明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

将肿瘤组织包埋切片,进行 HE 染色、IHC 染色和 TUNEL 染色。结果如图 9 所示,HE 染色病理切片显示,MitoCur-1 给药组出现明显的肿瘤细胞坏死现象,且呈现剂量依赖性。IHC 切片显示,USP14 蛋白表达水平在实验组中明显下降。MitoCur-1 以剂量依赖的方式,抑制肿瘤增殖相关蛋白 Ki67 的表达。凋亡蛋白 Cleaved Caspase-3 和显色法 TUNEL

表 1 动物实验各组小鼠体重 ($n = 3, g$)

组别	初始体重	给药后体重			
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
对照组	20.92 ± 0.47	20.72 ± 0.54	23.43 ± 0.15	23.04 ± 0.39	24.68 ± 0.79
MitoCur-1 (给药剂量 5 mg/kg)	20.71 ± 0.59	20.52 ± 0.41	23.90 ± 1.73	23.67 ± 0.61	24.26 ± 1.13
MitoCur-1 (给药剂量 15 mg/kg)	20.96 ± 0.29	19.01 ± 2.10	22.22 ± 0.10	23.83 ± 1.26	23.72 ± 0.17
F 值	0.254	1.617	2.210	0.144	1.076
P 值	0.784	0.274	0.191	0.869	0.399

表 2 动物实验各组肿瘤体积 ($n = 3, mm^3$)

组别	初始肿瘤体积	给药后肿瘤体积			
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
对照组	112.20 ± 14.29	172.94 ± 16.31	201.07 ± 87.03	685.93 ± 177.91	1 034.55 ± 248.88
MitoCur-1 (给药剂量 5 mg/kg)	115.45 ± 16.17	145.60 ± 14.01	135.92 ± 37.19	308.55 ± 155.36	525.33 ± 221.37
MitoCur-1 (给药剂量 15 mg/kg)	109.01 ± 7.99	113.00 ± 10.28 ^①	109.65 ± 3.25	172.19 ± 92.76 ^①	240.45 ± 235.69 ^①
F 值	0.177	14.27	2.223	9.899	8.748
P 值	0.842	0.005	0.189	0.013	0.017

注:①与对照组比较, $P < 0.05$ 。

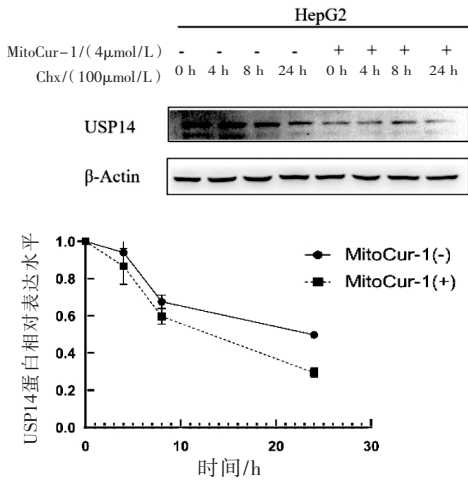


图 8 MitoCur-1 干预后的 HepG2 细胞中 USP14 蛋白水平变化

细胞凋亡检测病理切片显示,MitoCur-1 能够明显地诱导肿瘤细胞发生凋亡。随 MitoCur-1 的剂量升高,自噬分子标志蛋白 LC3 A/B 的表达增高,自噬反应增强。以上结果表明,MitoCur-1 具有良好的抗肿瘤活性。

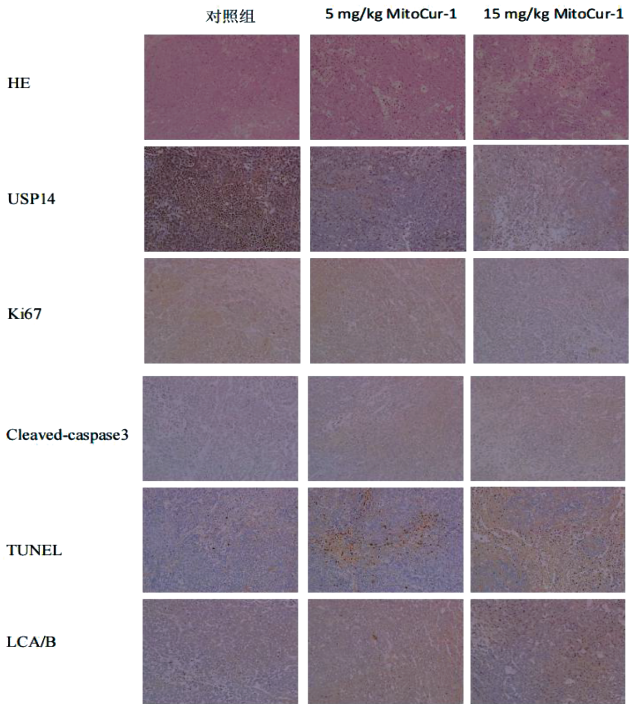


图 9 不同实验组肿瘤组织的染色结果(20 ×)

3 讨论

目前国内外针对肝癌的临床治疗手段主要包括手术切除、肝脏移植、局部治疗、免疫治疗等,传统的治疗手段往往疗效较差且容易复发^[13]。因此,寻找新的 HCC 治疗药物具有重要的意义。

USP14 是潜在的反映 HCC 预后的生物标志物。研究发现,抑制 USP14 能诱导肝癌、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌等细胞发生自噬^[14]、凋亡^[15]、铁死亡^[12]等,进而达到抗肿瘤效果。本研究通过 GEPIA 数据库,发现 HCC 中 USP14 的上调是 HCC 患者生存的不良预测因子,因此可以通过 USP14 抑制剂来实现抗肿瘤效应。

MitoCur-1 是姜黄素的类似物,是在姜黄素的芳香环上引入烷基化的三苯基磷并在亚甲基活性位点引入偕二甲基而设计合成的,稳定性优于姜黄素。研究^[16]显示,MitoCur-1 对人正常肝细胞 L02 的细胞毒性低于常见的化疗药物吉西他滨、阿霉素,而对人肝癌细胞 HepG2 的细胞毒性则高于吉西他滨和 5-氟尿嘧啶。它能高效且选择性地促进癌细胞中 ROS 生成,以 ROS 依赖的模式抑制氧化磷酸化和糖酵解,进而选择性抑制癌细胞三磷酸腺苷的合成,诱导癌细胞能量危机和死亡;此外,MitoCur-1 能够通过下调细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK2、CDK4 以及细胞周期蛋白 Cyclin E1、Cyclin D1、Cyclin A2,在 G0/G1 期选择性诱导 HepG2 细胞周期阻滞,并能通过线粒体膜电位的丧失、抗凋亡蛋白 Bcl-2 的下调、凋亡蛋白 Caspase-9 和 Caspase-3 的激活,介导 HepG2 细胞线粒体凋亡。

研究发现,沉默 USP14^[17]或使用 USP14 特异性抑制剂 b-AP15^[18]或 IU1^[19]都会降低 HCC 的细胞增殖、迁移能力,在本研究中使用 USP14 的新型抑制剂 MitoCur-1 作用于 HepG2 细胞后有着同样的效果。敲低 USP14,流式细胞术检测细胞凋亡明显增加^[17],凋亡蛋白 Caspase-3 增加和抗凋亡蛋白 Bcl-2 降低^[20];使用 b-AP15 处理 HepG2 细胞后,也会促使凋亡蛋白如 Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP、Bax 和 Bak 的表达明显升高,而抗凋亡蛋白 Bcl-xL 的表达明显降低^[18]。在本研究中肿瘤组织病理切片显示凋亡蛋白 Cleaved Caspase-3 增加、TUNEL 显色加深,说明 MitoCur-1 能够诱导肿瘤细胞发生凋亡。研究^[21]显示,敲低 USP14 可以使自噬蛋白 LC3-II 表达上升和 p62 下降,从而导致自噬增加。在本研究的病理切片中自噬标志物 LC3 A/B 的表达增加,提示 MitoCur-1 能诱导肿瘤细胞自噬死亡。此外,体内实验 USP14 稳定敲除构建的动物模型中小鼠肿瘤

组织的重量和体积明显降低^[19],在本研究中也可见 MitoCur-1 给药组的肿瘤体积小于对照组。综上所述,MitoCur-1 可以通过抑制 USP14 控制肝细胞癌的增殖、迁移、凋亡和自噬,为治疗肝细胞癌提供新的可能性。

在后续研究中,本课题组将继续探讨 MitoCur-1 在多种肝细胞癌细胞中对 USP14 表达的调节作用以及 USP14 在 HCC 中的调控机制,为 MitoCur-1 的应用以及 USP14 在 HCC 的诊断、治疗及预后过程中的作用提供科学依据。

致谢 本研究得到了兰州大学公共卫生学院古雪岩老师和化学系周波教授的大力支持

作者声明 本文无实际或潜在的利益冲突

参考文献

- [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] LEE T K, GUAN X Y, MA S. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma - from origin to clinical implications [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022, 19(1): 26-44.
- [3] EL-SERAG H B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2012, 142(6): 1264-1273.e1.
- [4] LEDDA C, LORETO C, ZAMMIT C, et al. Non-infective occupational risk factors for hepatocellular carcinoma: a review [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(2): 511-533.
- [5] 陈茜, 王岩, 杜鲁涛, 等. 肝细胞癌生物标志物检测及应用专家共识[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(24): 2945-2948.
- [6] 徐新飞, 吴寒, 邢昊, 等. 肝细胞癌血清标志物的现状及进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2021, 26(2): 171-175.
- [7] 周昌龙, 李格格, 王璐, 等. 泛素特异性蛋白酶 14 作为肿瘤分子生物标志物的研究进展[J]. 环境与职业医学, 2023, 40(6): 722-727.
- [8] HUANG G, LI L, ZHOU W. USP14 activation promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2015, 34(6): 2917-2924.
- [9] 李佳旺, 王丰. 蛋白酶体相关去泛素化酶 USP14 的研究进展[J]. 生命科学仪器, 2019, 17(增刊 1): 22-33.
- [10] WAN MOHD TAJUDDIN W N B, LAJIS N H, ABAS F, et al. Mechanistic understanding of curcumin's therapeutic effects in lung cancer[J]. Nutrients, 2019, 11(12): 2989.
- [11] LIU X, CUI H, LI M, et al. Tumor killing by a dietary curcumin mono-carbonyl analog that works as a selective ROS generator via TrxR inhibition[J]. Eur J Med Chem, 2023, 250: 115191.
- [12] LI G, ZHOU C, WANG L, et al. MitoCur-1 induces ferroptosis to reverse vemurafenib resistance in melanoma through inhibition of USP14 [J]. Pigment Cell & Melanoma Res, 2024, 37(2): 316-328.

(下转第 258 页)

- following respiratory viral infection[J]. J Virol, 2019, 93(9): e00030–19.
- [11] BADDING M A, STEFANIAK A B, FIX N R, et al. Cytotoxicity and characterization of particles collected from an indium–tin oxide production facility [J]. J Toxicol Environ Health A, 2014, 77(20): 1193–1209.
- [12] LIU N, GUAN Y, ZHOU C, et al. Pulmonary and systemic toxicity in a rat model of pulmonary alveolar proteinosis induced by indium–tin oxide nanoparticles[J]. Int J Nanomedicine, 2022, 17: 713–731.
- [13] YIN Y, TAN Z, HU L, et al. Isotope tracers to study the environmental fate and bioaccumulation of metal-containing engineered nanoparticles: techniques and applications[J]. Chem Rev, 2017, 117(5): 4462–4487.
- [14] LIU N, LI G, GUAN Y, et al. N-acetylcysteine alleviates pulmonary alveolar proteinosis induced by indium–tin oxide nanoparticles in male rats: involvement of the NF- κ B signaling pathway[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 241: 113812.
- [15] ZOOK J M, MACCUSPIE R I, LOCASCIO L E, et al. Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect of their size on hemolytic cytotoxicity [J]. Nanotoxicology, 2011, 5(4): 517–530.
- [16] CHEN Z, LI J, CHEN L, et al. The pneumotoxic effect and indium ion release induced by indium tin oxide nanoparticles [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2019, 19(8): 4357–4365.
- [17] 彭秋雨, 高举, 陈敏. N-乙酰半胱氨酸在血液系统疾病治疗中的研究进展[J]. 中国药房, 2021, 32(1): 115–120.
- [18] 王舒婷, 夏宁, 袁记方, 等. NAC 通过不同机制抑制激动剂依赖和非依赖的过表达 mGlu1a 介导的细胞凋亡[J]. 疾病监测, 2013, 28(3): 172–177.
- [19] 耿维佳, 李阳, 于永波, 等. N-乙酰半胱氨酸对纳米二氧化硅所致细胞毒性的抑制作用 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2015, 41(3): 486–490.
- [20] 李伟康, 张意, 曲晓雨, 等. N-乙酰半胱氨酸通过调节 NF- κ B 信号通路减轻纳米氧化铜锡诱导的大鼠肺毒性效应 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2024, 42(10): 721–729.
- [21] LIU J, LIU Q, HAN J, et al. N-acetylcysteine inhibits patulin-induced apoptosis by affecting ROS-mediated oxidative damage pathway[J]. Toxins (Basel), 2021, 13(9): 595.

收稿日期: 2025–01–17

(上接第 245 页)

- [13] YANG J D, HEIMBACH J K. New advances in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma [J]. BMJ, 2020, 371: m3544.
- [14] HAN K H, KWAK M, LEE T H, et al. USP14 inhibition regulates tumorigenesis by inducing autophagy in lung cancer in vitro[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5300.
- [15] LIAO Y, XIA X, LIU N, et al. Growth arrest and apoptosis induction in androgen receptor-positive human breast cancer cells by inhibition of USP14-mediated androgen receptor deubiquitination[J]. Oncogene, 2018, 37(14): 1896–1910.
- [16] ZHENG Y L, TU Z S, CUI H M, et al. Redox-based strategy for selectively inducing energy crisis inside cancer cells: an example of modifying dietary curcumin to target mitochondria[J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(9): 2898–2910.
- [17] ZHANG N, ZHANG H, YANG X, et al. USP14 exhibits high expression levels in hepatocellular carcinoma and plays a crucial role in promoting the growth of liver cancer cells through the HK2/AKT/P62 axis[J]. BMC cancer, 2024, 24(1): 237.
- [18] DING Y, CHEN X, WANG B, et al. Deubiquitinase inhibitor b-AP15 activates endoplasmic reticulum (ER) stress and inhibits Wnt/Notch1 signaling pathway leading to the reduction of cell survival in hepatocellular carcinoma cells [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 825: 10–18.
- [19] LV C, WANG S, LIN L, et al. USP14 maintains HIF1- α stabilization via its deubiquitination activity in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(9): 803.
- [20] ZHANG Y, JIA J, JIN W, et al. Lidocaine inhibits the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma by downregulating USP14 induced PI3K/Akt pathway [J]. Pathol Res Pract, 2020, 216(8): 152963.
- [21] XU D, SHAN B, SUN H, et al. USP14 regulates autophagy by suppressing K63 ubiquitination of Beclin 1 [J]. Genes dev, 2016, 30(15): 1718–1730.

收稿日期: 2024–12–02