



去泛素化酶 USP10 通过稳定 Smurf1 抑制 TGF- β /BMP 信号通路*

张新¹⁾ 李洪昌²⁾ 汪思应^{1)**} 张令强^{1,2)**}⁽¹⁾ 安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032; ⁽²⁾ 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 国家蛋白质科学中心(北京), 北京 102200

摘要 目的 探究生理条件下去泛素化酶 USP10 调控的关键信号通路及分子机制。方法 利用 GEO2R 和 Metascape 对 *Usp10*^{+/+} 和 *Usp10*^{-/-} 新生小鼠肾组织基因芯片 (GSE198574) 差异表达基因和通路富集分析, 使用免疫印迹实验和免疫组化技术检验核心转录因子的表达情况; 进一步利用免疫印迹检测该信号通路, 并通过基因芯片和免疫组化分析候选分子的表达情况; 使用免疫共沉淀 (Co-IP) 和 GST-pull down 实验验证 USP10 与候选分子的相互作用, 通过泛素化实验明确 USP10 对底物分子的调控机制; 利用免疫印迹检测细胞增殖、凋亡相关蛋白 p21、Cleaved-caspase 3 的表达情况, 使用 CCK-8 和克隆形成实验分析 USP10 对细胞增殖的影响。结果 *Usp10*^{-/-} 新生小鼠肾组织中 TGF- β /BMP 通路激活, USP10 在小鼠体内缺失后导致 Smad 泛素相关因子 1 (Smurf1) 蛋白质水平降低, Smad1/5 蛋白质水平上调, 却不影响它们的转录水平; 机制上, USP10 与 Smurf1 存在相互作用, 并依赖其去泛素化酶活性去除 Smurf1 多聚泛素化。*Usp10* 敲除后促进细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白 p21 表达上调, 并抑制细胞的增殖能力。结论 USP10 通过去泛素化并稳定 Smurf1, 抑制 TGF- β /BMP 信号通路, 从而维持小鼠组织器官和细胞增殖稳态。

关键词 USP10, Smurf1, Smad1/5, 去泛素化, 细胞增殖
中图分类号 Q2, Q28

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0566

泛素化修饰是由泛素激活酶、泛素耦合酶和泛素连接酶将 76 个氨基酸的泛素多肽共价连接到底物蛋白的过程, 通过调节蛋白质稳定性、蛋白质-蛋白质相互作用、定位和酶活性, 从而影响多种细胞功能^[1], 如基因转录^[2]、DNA 损伤修复^[3]、细胞凋亡^[4]、免疫应答等^[5]。泛素化修饰是一种高度动态可逆的过程, 去泛素化酶可以将底物蛋白上共轭的泛素剪切成游离的泛素, 从而逆转泛素化修饰对底物蛋白的调控作用^[6]。去泛素化酶基于蛋白质序列和结构域特征分为 7 个亚家族, 分别是泛素特异性蛋白酶 (ubiquitin-specific proteases, USPs)、泛素羧基末端水解酶 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolases, UCHs)、Machado-Josephin 综合征相关蛋白酶 (Machado-Josephin domain-containing proteases, MJDs)、卵巢肿瘤相关泛素蛋白酶 (ovarian tumour proteases, OTUs)、基序与含泛素的新型 DUB 家族相互作用蛋白酶

(motif-interacting with ubiquitin-containing novel DUB family, MINDYs)、锌指与 UFM1 特异性肽酶结构域蛋白酶 (zinc finger with UFM1-specific peptidase domain protein/C6orf113/ZUP1, ZUFSP) 和 Jab1/MPN 域相关金属异肽酶 (JAB1, MPN, MOV34 family, JAMMs)^[7]。去泛素化修饰与泛素化修饰对底物蛋白的调控同样重要, 但是去泛素化酶的底物鉴定及其调节机制仍需要进一步探究。

去泛素化酶 USP10 属于成员最多的 USP 亚家族, 全长 798 氨基酸, 由 C 端核心的 USP 结构域和 N 端的无序氨基酸序列组成。USP10 是一种半胱氨

* 国家重点研发计划 (2021YFA1300200, 2022YFC3401500) 和国家自然科学基金 (82002969, 81972769) 资助项目。

** 通讯联系人。

汪思应 Tel: 13505698633, E-mail: sywang@ahmu.edu.cn

张令强 Tel: 010-66931216, E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2022-12-16, 接受日期: 2023-02-17

酸水解酶, 通过水解泛素羧基端的甘氨酸和底物的赖氨酸之间形成的酯键, 移除靶蛋白上的泛素, 从而在细胞水平上发挥多种功能^[8]。目前研究发现, USP10 通过调控靶蛋白 TP53^[9]、CFTR^[10]、AMPK α ^[11]、SIRT6^[12] 和 NEMO^[13] 参与细胞代谢和肿瘤, 通过去泛素化 TP53、BECN1 调控细胞自噬^[14]。此外, USP10 通过与 G3BP1 和 G3BP2 结合调控细胞内应激颗粒形成^[15]。少数研究报道, USP10 与 TANK 和 MCPIP1 结合后, 去泛素化 TRAF6 从而抑制基因毒性反应或 IL-1 β 介导的 NF- κ B 信号通路激活^[13]。但是去泛素化酶 USP10 的生理功能目前还不清楚。

本实验室最近的研究发现, *Usp10* 基因敲除小鼠由于细胞自噬缺陷在出生后 36 h 内死亡。机制上, 新生小鼠出生后, USP10 与 MDM2 的相互作用增强, USP10 去除 MDM2 K27 链型的多聚泛素化修饰, 从而激活其泛素连接酶活性, 促进 p53 降解。*Usp10* 基因在小鼠体内缺失后, 细胞质中的 p53 降解受阻并积累。积累的 p53 通过结合 ATG12 抑制 ATG12-ATG5 共轭复合体的形成, 从而抑制细胞自噬的激活, 最终导致小鼠因细胞自噬不足而死亡^[16]。研究发现, 与野生型小鼠相比, *Usp10* 基因敲除小鼠的体重和体型显著偏小, 尤其是肾组织, 提示 USP10 还参与调节小鼠的发育过程, 但是其原因以及调控机制尚不清楚。

本文通过分析 *Usp10*^{+/+} 和 *Usp10*^{-/-} 新生小鼠肾组织基因芯片 (GSE198574) 发现, *Usp10*^{-/-} 新生小鼠肾组织中 TGF- β /BMP 信号通路激活。通过小鼠肾组织检测发现, *Usp10* 基因缺失后, Smad1/5 蛋白水平上调。利用免疫共沉淀和 GST-pull down 实验验证 Smurf1 是 USP10 的互作蛋白, 泛素化实验证实 USP10 去除 Smurf1 的多聚泛素化。此外, 在细胞和小鼠组织检测发现 *Usp10* 基因缺失后, 细胞增殖能力受到抑制。总之, USP10 通过去泛素化并稳定 Smurf1, 抑制 TGF- β /BMP 信号通路, 从而维持细胞增殖稳态。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗体与试剂

anti-DDDDK (MBL International, Cat# M185-3)、anti-Myc (MBL International, Cat# M047-3)、anti-HA (MBL International, Cat# M180-3)、anti-GST (AE001, ABclonal)、anti-GAPDH (AC033,

ABclonal)、anti-USP10 (Cell Signaling Technology, Cat# 8501)、anti-Smurf1 (Abcam, ab57573)、anti-Smurf2 (Cell Signaling Technology, Cat #12024)、anti-Smad1/5 (Abcam, ab75273)、anti-Smad1 (Santa, sc-7965)、anti-Smad5 (Santa, sc-101151)、anti-p21 (BD Pharmingen, #556430)、anti-Cleaved-caspase 3 (Cell Signaling Technology, Cat# 9661)、MG132 (Calbiochem); TRIzol、ECL 发光液试剂盒、蛋白 Marker (Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific); 蛋白酶抑制剂 Cocktail (Roche 公司); Lipofectamine 2000 转染试剂 (汉恒生物科技); 5 $\times$ RT Master Mix、无核酶水 (ToYoBo)。

1.1.2 小鼠模型

Usp10 基因敲除小鼠购买自南京大学模式动物研究所。实验中用到的所有小鼠均在军事医学研究院动物房饲养与繁殖, 严格遵守军事医学研究院实验动物伦理相关要求 (本课题动物实验伦理审查号: IACUC-DWZX-2018-505)。

1.1.3 细胞

人胚肾细胞系 HEK293T 购买自美国菌种保藏中心 (ATCC), *USP10* 敲除的 HEK293T 细胞株构建方法详见参考文献 [16]。

1.1.4 质粒

Flag-Smurf1、Myc-USP10、Myc-USP10 C488A、GST-Vector、GST-USP10、HA-Ub 由本实验构建。

1.1.5 菌株

E. coli 感受态 DH5 α 、*E. coli* 感受态 BL21 (DE3) 购于北京擎科生物公司。

1.2 细胞复苏与培养

实验室前期已经利用 CRISPR 技术成功构建 *USP10* 基因敲除的 HEK293T 细胞株并冻存, 将冻存的 HEK293T 细胞置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中快速融解; 800 r/min 离心 3 min, 弃去细胞冻存液; 加入 1 ml 新的 DMEM 细胞培养液到冻存管中, 吹打混匀细胞后移至新的 T25 细胞培养瓶中; 加入 4 ml 培养液吹打混匀, 细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。

1.3 小鼠解剖和提取组织蛋白

通过基因型鉴定确定新生小鼠的基因型, 选取同窝出生的 *Usp10*^{+/+} 和 *Usp10*^{-/-} 小鼠进行安乐处死; 75% 酒精棉球擦拭小鼠腹部消毒后, 使用高压灭菌烘干后的手术器械剪开小鼠腹部, 取出小鼠的

肾组织于灭菌消毒后的2 ml EP管中,并置于冰上;向EP管中加入一颗钢珠和适量RIPA裂解液(10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、150 mmol/L NaCl、1% 脱氧胆酸钠、0.1% SDS、20 μ mol/L MG132、蛋白酶抑制剂),组织震荡仪中高速震荡2 min;取出含有小鼠组织样品的EP管快速置于冰上1 min;4℃混悬仪上充分混旋裂解30 min;转移组织裂解液至1.5 ml离心管中,4℃、12 000 r/min离心10 min;吸取上清液体于新的离心管中,加入等体积的2×SDS-PAGE上样缓冲液,沸水浴15 min制取样品,储存于-20℃冰箱。

1.4 免疫印迹(Western blot)法

待检测蛋白样品5 000 r/min离心5 min,取适量样品上样至SDS-PAGE凝胶;90 V恒压电泳使蛋白质进入分离胶1 cm后,加大电压至120 V,预计目的蛋白分离后停止电泳;将SDS-PAGE凝胶上蛋白质样品电转到硝酸纤维素膜(180 mA, 2 h);5%脱脂牛奶室温封闭1 h;一抗4℃过夜孵育或常温孵育4 h;TBST洗涤10 min,重复3次;二抗孵育50 min, TBST洗涤10 min,重复3次;滴加混好的ECL发光液,室温孵育3 min后弃去,使用保鲜膜将条带封存在暗夹后于暗室显影。

1.5 GST pull-down实验

将GST-Vector和GST-USP10质粒转化到大肠杆菌BL21中,挑取单克隆摇菌,异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导表达后利用镍珠纯化表达的GST和GST-USP10蛋白;收取过表达Flag-Smurfl的HEK293T细胞裂解液,将等量的细胞裂解液分别与GST和GST-USP10蛋白混匀,4℃孵育过夜;镍珠分别结合GST和GST-USP10蛋白,最后用GST结合缓冲液洗涤3次,制取蛋白质样品用于免疫印迹检测。

1.6 免疫共沉淀(Co-IP)实验

HEK293T细胞中分别过表达Myc-vector/Flag-Smurfl和Myc-USP10/Flag-Smurfl,36 h后收集细胞,使用HEPES裂解液(20 mmol/L HEPES (pH 7.2)、50 mmol/L NaCl、0.5% Triton X-100、1 mmol/L DTT、蛋白酶抑制剂)裂解;细胞超声破碎仪30 W功率超声3 min后,4℃离心机12 000 r/min转速离心10 min,吸取上清液,留50 μ l用作裂解物(Lysate);剩余上清液加入2 μ l Myc抗体,4℃环境下混旋仪慢速孵育过夜;随后

加入40 μ l Protein A/G琼脂糖,4℃环境下混旋仪慢速孵育6 h;用HEPES裂解液洗涤珠子3次,每次10 min,获取含有目的蛋白混合液后制备蛋白质样品,用免疫印迹检测结果。

1.7 泛素化实验

在HEK293T细胞中转染HA-Ub、Myc-USP10、Myc-USP10 C488A和Flag-Smurfl质粒;24 h后加入20 μ mol/L蛋白酶体抑制剂MG132,继续培养8 h后收集细胞;使用RIPA裂解液(10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、150 mmol/L NaCl、1% 脱氧胆酸钠、0.1% SDS、20 μ mol/L MG132、蛋白酶抑制剂)裂解细胞,细胞超声破碎仪60 W超声3 min裂解细胞;4℃离心机12 000 r/min转速离心10 min,吸取上清液并留50 μ l用作Lysate;剩余上清液加入2 μ l Flag抗体,4℃环境下共孵育过夜;之后加入40 μ l Protein A/G琼脂糖,4℃环境下共孵育6 h;使用RIPA裂解液洗涤珠子10 min,重复3次;制样完成后使用免疫印迹实验进行检测。

1.8 免疫组化

将石蜡切片置于60℃烘箱过夜,趁热取出放入二甲苯中10 min后,取出再放入另一个二甲苯溶液中10 min,使切片上的石蜡完全脱去;依次放入100%乙醇10 min(两次),95%乙醇6 min,90%乙醇5 min,80%乙醇和70%乙醇各3 min逐步水化;将切片放入已通过微波炉加热至煮沸的柠檬酸盐溶液中,低火煮5 min,取出后冷却至室温;使用PBS缓冲液润洗组织切片3次,每次5 min;向切片组织上加入适量的内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育15 min;PBS缓冲液洗涤3次,每次5 min;加入适量羊血清室温封闭2 h;一抗4℃过夜,PBS缓冲液洗涤3次,每次5 min;滴加适量反应增强液,37℃孵育20 min后,PBS缓冲液洗涤3次,每次3 min;滴加增强酶标山羊抗小鼠IgG聚合物,37℃孵育20 min后,PBS缓冲液洗涤3次,每次3 min;加入适量的DAB显色液(A液:B液=1:20,现配现用,避光保存),室温孵育,边孵育边在显微镜下观看,直到显色完成;使用苏木素复染1 min后,使用自来水冲洗,直到玻片上无苏木素颜色;酒精-盐酸分化1 s后,置于氨水2 min返蓝;70%、80%、90%乙醇依次浸润3 min、95%乙醇酒精浸润5 min、100%乙醇10 min(重复两次)、二甲苯10 min;脱水完成后,使用中性树脂

封片固定。

1.9 CCK-8法检测细胞增殖

将HEK293T细胞中旧培养液弃去, 加入1~2 ml PBS缓冲液洗涤细胞1~2次; 使用1~2 ml胰蛋白酶消化细胞1 min, 直到细胞脱落; 加入等体积的培养液终止细胞消化; 将细胞移到15 ml离心管后, 800 r/min离心3 min, 沉淀细胞后, 弃去旧培养液, 加入新的培养液; 取适量的细胞混悬液滴加在细胞计数器上, 使用相匹配的软件计算细胞密度; 根据细胞密度, 取2 000个细胞铺在96孔板中, 每组细胞设置5个复孔, 共计6个96孔板; 待所培养的细胞贴壁生长后, 加入100 μ l CCK-8培养基混合溶液, 孵育1 h后, 使用酶标仪在450 nm波长下, 测量细胞的吸光度值, 此为基准值, 此后每隔1 d测1次至第6天。

1.10 细胞克隆形成

将消化的HEK293T细胞铺在6孔板中, 每孔1 000个细胞; 培养12 d, 每2 d换一次新的培养液; 弃去旧培养液, 使用PBS缓冲液洗涤轻轻洗涤细胞两次后, 加入2 ml 4%多聚甲醛室温孵育20 min; PBS缓冲液轻轻洗涤两次后, 每孔加入1 ml结晶紫染料染色30 min; 回收结晶紫染料, 使用蒸馏水轻轻洗涤细胞2次, 晾干拍照, 观察细胞形成克隆的数量, 进行数据分析。

2 结 果

2.1 Smad1和Smad5在*Usp10*^{-/-}新生小鼠肾组织中表达上调

在研究去泛素化酶USP10调控新生小鼠细胞自噬过程中发现, *Usp10*^{-/-}小鼠的体重和体型显著偏小, 尤其是肾组织^[16]。通过分析*Usp10*^{+/-}和*Usp10*^{-/-}新生小鼠肾组织基因芯片数据(GSE198574), 对差异基因进行通路富集后发现:*Usp10*^{-/-}新生小鼠肾组织中差异表达基因主要富集在Hippo信号通路、TGF- β 信号通路以及p53信号通路(图1a)。TGF- β /BMP信号在调控组织发育、骨形成、稳态和疾病中发挥重要作用^[17]。为了探究*Usp10*^{-/-}新生小鼠肾组织中TGF- β /BMP信号通路激活的原因, 利用GEO2R (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r>) 对该数据(GSE198574)进行基因表达差异显著性分析, 再使用Metascape数据库(<http://metascape.org>)对显著差异前200个基因(*P*值最小的前200个基因)的转录因子进行富集分

析后显示: 前200个差异基因中大部分受*Smad1*和*Smad5*调控(图1b), 而基因芯片数据中*Smad1*和*Smad5*在转录水平上却没有显著差异(图1c)。因此推测, *Usp10*^{-/-}新生小鼠肾组织中*Smad1*和*Smad5*蛋白水平上调导致了TGF- β /BMP信号通路的激活。随后提取新生的小鼠肾组织蛋白进行免疫印迹验证, 发现*Usp10*^{-/-}小鼠肾组织中*Smad1*和*Smad5*蛋白水平表达显著上调(图1d)。此外, 通过免疫组化检测小鼠肾组织中的*Smad1*和*Smad5*的蛋白质表达, 结果显示, 相比野生型小鼠肾组织, *Usp10*基因敲除小鼠肾组织中的*Smad1*和*Smad5*蛋白表达显著上调, 这一结果与免疫印迹结果一致(图1e)。这些实验结果提示*Usp10*^{-/-}新生小鼠组织中TGF- β /BMP信号通路激活。

2.2 USP10稳定Smurf1蛋白水平

以上数据表明, 去泛素化酶USP10在小鼠体内敲除后引起*Smad1*和*Smad5*蛋白水平上调, 因此去泛素化酶USP10直接或间接调控了*Smad1*和*Smad5*的蛋白质水平。因此推测USP10可能稳定*Smad1*和*Smad5*的负调控分子, 而*Smurf1*或*Smurf2*是*Smad1*和*Smad5*蛋白水平的最主要的负调控分子^[18-19]。接下来利用免疫印迹检测*Usp10*^{-/-}新生小鼠肾组织中*Smurf1*和*Smurf2*的蛋白水平, 结果显示, *Smurf1*在*Usp10*^{-/-}新生小鼠肾组织中表达下调, *Smurf2*蛋白水平不变(图2a)。基因芯片(GSE198574)数据显示*Usp10*^{-/-}新生小鼠肾组织中*Smurf1*的转录水平与野生型小鼠相比无显著差异(图2b), 因此, USP10可能是稳定*Smurf1*的去泛素化酶。为了证实这一猜想, 利用CRISPR构建*USP10*^{+/-}与*USP10*^{-/-} HEK293T细胞株, 并在*USP10*^{-/-} HEK293T细胞中过表达*Smurf1*。Western blot检测结果显示, 与*USP10*正常表达的HEK293T细胞相比较, *USP10* knockout的HEK293T细胞中*Smad1*和*Smad5*表达上调。然而, 在*USP10*缺失的HEK293T细胞中过表达*Smurf1*后, *Smad1*和*Smad5*表达下调(图2c)。除此之外, 还利用免疫组化检测小鼠肾组织中的*Smurf1*的蛋白质表达水平, 相比野生型小鼠肾组织, *Usp10*基因敲除小鼠肾组织中的*Smurf1*蛋白表达同样显著降低, 这一结果与免疫印迹结果一致(图2d)。以上结果提示, *Smurf1*可能是USP10的去泛素化底物。

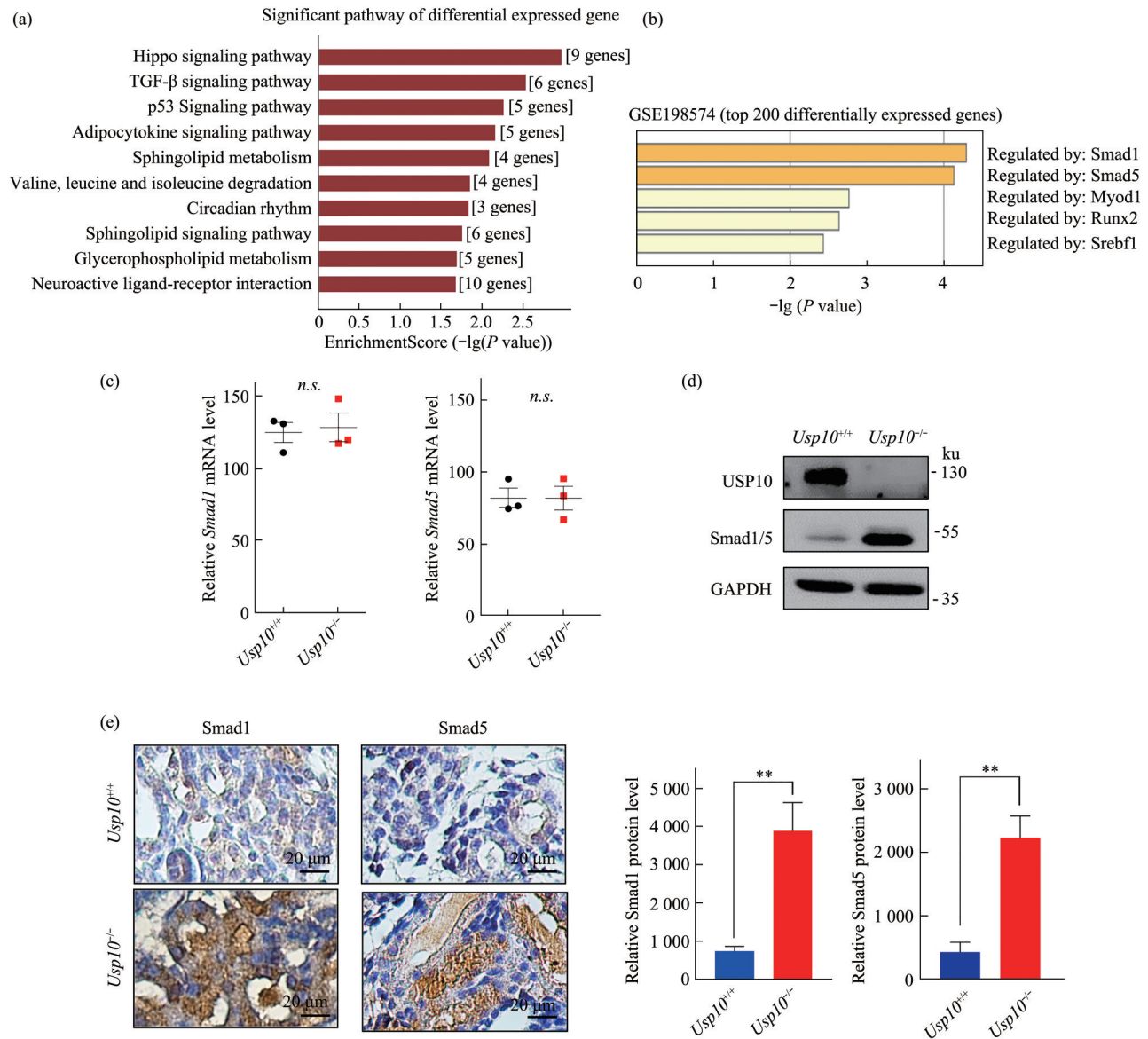


Fig. 1 Smad1/5 are upregulated in *Usp10*^{-/-} neonatal kidney tissues

(a) Enriching analyzed the differentially expressed genes in microarray (GSE198574) of kidney tissues from *Usp10*^{+/+} and *Usp10*^{-/-} neonates. (b) Metascape analyzed the top 200 differentially expressed genes. (c) The mRNA expression of *Smad1* and *Smad5* in microarray (GSE198574). The data were represented as the means $\pm$ S.E.M. and analyzed by Student's *t*-test. n.s., not significant. (d) Protein extracts from kidney tissues of *Usp10*^{+/+} and *Usp10*^{-/-} neonates were analyzed by immunoblotting. (e) Representative sections of immunohistochemical staining of Smad1 and Smad5 in *Usp10*^{+/+} and *Usp10*^{-/-} mice kidney tissues. The column chart showed the quantification of Smad1 and Smad5 levels. The data were represented as the means $\pm$ S.E.M. Student's *t*-test, ***P*<0.01.

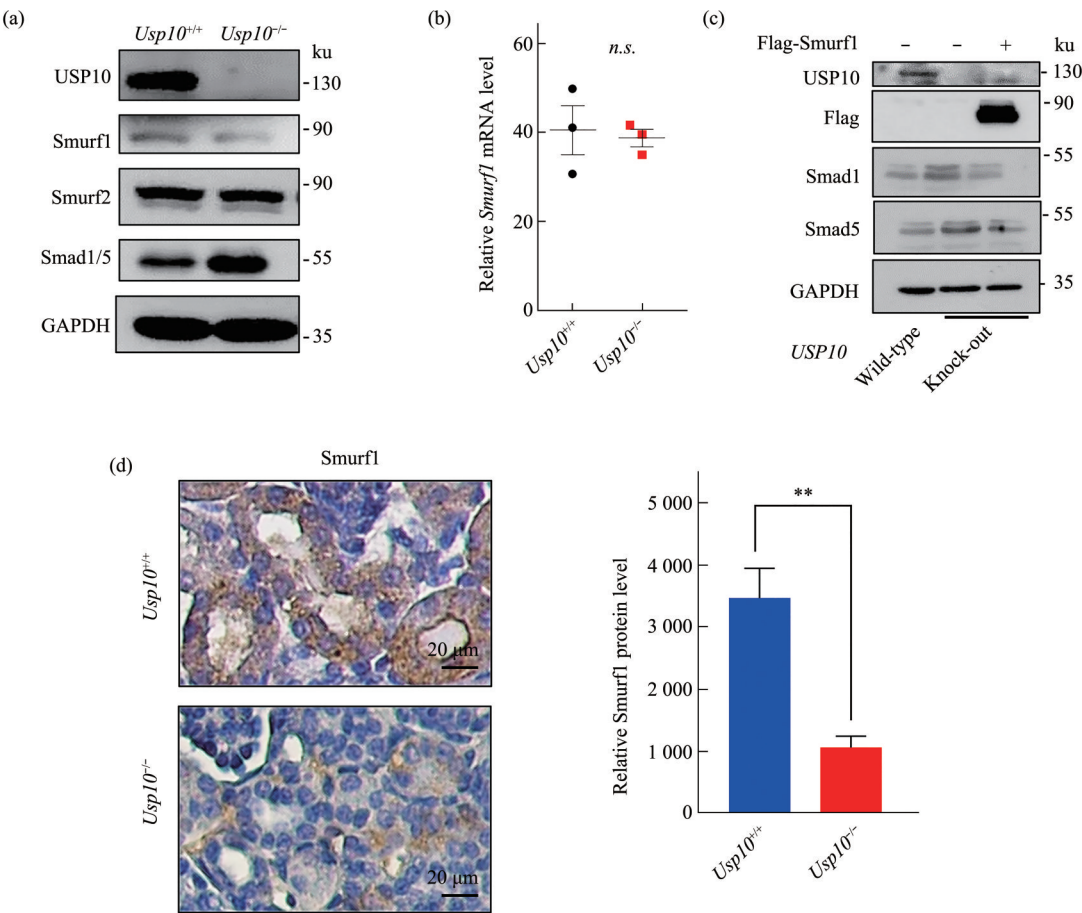


Fig. 2 USP10 suppresses TGF-β/BMP signaling pathway by stabilizing Smurf1

(a) Immunoblotting analyzed of the protein levels of Smurf1, Smurf2 and Smad1/5 in extracts from kidney of *Usp10*^{+/+} and *Usp10*^{-/-} neonates. (b) The mRNA expression of *Smurf1* in microarray (GSE198574). The data were represented as the means±S.E.M. and analyzed by Student's *t*-test. *n.s.*, not significant. (c) Flag-Smurf1 was overexpressed in *USP10* KO HEK293T cells; Western blot analyzed the protein levels of Smad1/5 in HEK293T cells in a different condition. (d) Immunohistochemical staining of Smurf1 in *Usp10*^{+/+} and *Usp10*^{-/-} neonatal kidney tissues. The column chart showed the quantification of Smurf1 level. The data were represented as the means±S.E.M. Student's *t*-test, ** *P*<0.01.

2.3 USP10结合并去泛素化Smurf1

为了检测 Smurf1 与 USP10 是否存在相互作用，在 HEK293T 细胞中同时转染 Flag-Smurf1 和 Myc-USP10 质粒并收集细胞制备细胞裂解液。通过免疫共沉淀和免疫印迹检测，结果显示 USP10 与 Smurf1 存在相互作用（图 3a）。GST pull-down 实验结果也表明二者在体外存在直接的相互作用（图 3b）。为了探究去泛素化酶 USP10 是否去除 Smurf1 的泛素化水平，在 HEK293T 细胞中分别转染

Flag-Smurf1/HA-Ub/Myc-USP10 和 Flag-Smurf1/HA-Ub/Myc-USP10 C488A，检测 Smurf1 的泛素化水平。结果显示，野生型 USP10 能有效减少 Smurf1 的多聚泛素化水平，而 USP10 酶活突变体（USP10 C488A）过表达后 Smurf1 的多聚泛素化水平显著高于野生型 USP10 过表达，但低于 Smurf1 基础泛素化水平，提示 USP10 去除 Smurf1 的多聚泛素化修饰部分依赖其去泛素化酶活性（图 3c）。以上结果证实 USP10 结合并去泛素化 Smurf1。

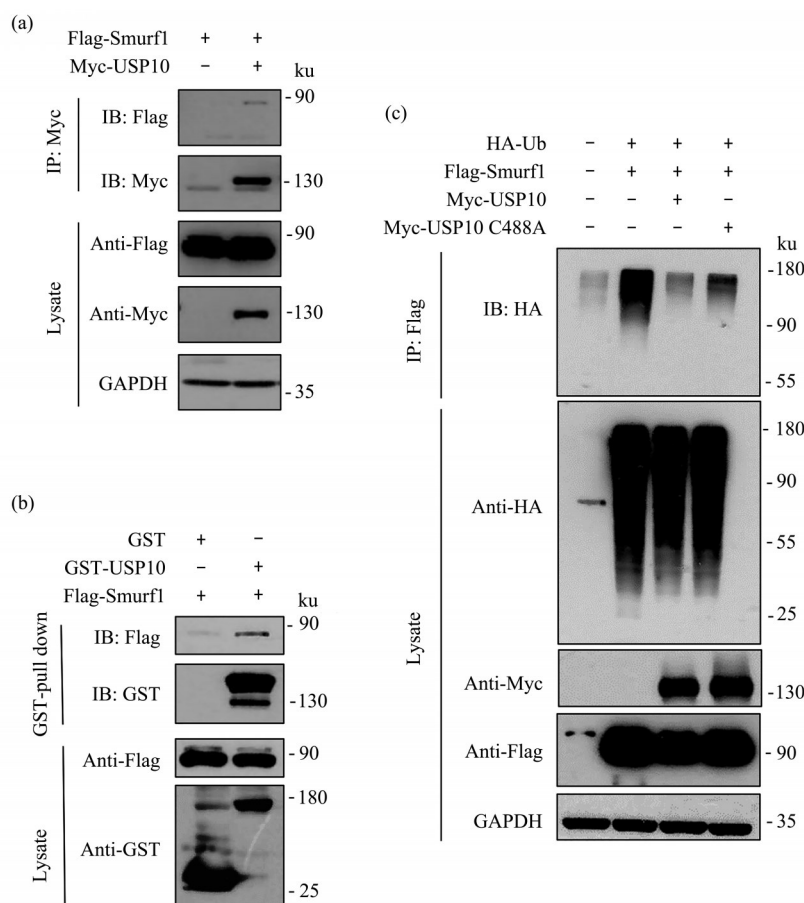


Fig. 3 USP10 interacts and depolyubiquitylates Smurf1

(a) HEK293T cells transfected with the indicated Myc-USP10 and Flag-Smurf1 plasmids were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-Myc antibody. The lysates and immunoprecipitates were analyzed. (b) GST-vector or GST-USP10 was retained on glutathione-Sepharose beads, incubated with extracts from Flag-Smurf1 transfected HEK293T cells, and then immunoblotted with antibody against Flag and GST. (c) HEK293T cells transfected with the indicated plasmids were treated with MG132 for 8 h before collection. Smurf1 was immunoprecipitated with anti-Flag and analyzed through immunoblotting.

2.4 USP10通过抑制TGF- β /BMP信号通路维持细胞增殖

p21 又称 Cdkn1a, 是 Smad1/5 转录调控的下游靶基因之一^[20-21], 是重要的细胞周期抑制因子。通过免疫印迹检测 *Usp10*^{+/+} 和 *Usp10*^{-/-} 新生小鼠肾组织中细胞周期阻遏蛋白 p21 以及细胞凋亡标志物 Cleaved-caspase 3 的表达情况, 结果显示 *Usp10*^{-/-} 新生小鼠中 p21 表达显著上调而 Cleaved-caspase 3 表达不变 (图 4a)。接下来利用基因芯片 (GSE198574) 分析发现, *p21* 基因的转录水平确实显著上调 (图 4b), 提示 USP10 敲除后通过激活 TGF- β /BMP 通路促进了 p21 的表达。前期的研究中发现 *Usp10* 基因敲除小鼠组织中细胞增殖受到抑制^[16], 这里检测到 *Usp10* 基因缺失导致 p21 表达上

调, 因此推测 *Usp10* 基因敲除后导致 TGF- β /BMP 信号通路激活从而抑制细胞增殖。为了证实这一猜想, 使用 *USP10*^{+/+} 与 *USP10*^{-/-} HEK293T 细胞株, 以相同的数量 (2 000 个细胞) 铺在 96 孔板中, 利用 CCK-8 实验分析不同培养天数细胞的吸光度值, 结果显示 *USP10*^{-/-} HEK293T 细胞增殖速度显著低于正常细胞, 而在 *USP10*^{-/-} HEK293T 细胞中过表达 Smurf1, 细胞的增殖速度部分恢复 (图 4c)。此外, 细胞克隆形成实验也发现, *USP10*^{-/-} HEK293T 细胞形成克隆的能力也显著低于正常细胞, 但在 *USP10*^{-/-} HEK293T 过表达 Smurf1 后, 细胞形成的克隆数量也得到了部分恢复 (图 4d)。以上结果证实, 去泛素化酶 USP10 通过稳定 Smurf1 抑制 TGF- β /BMP 通路激活, 维持细胞增殖稳态。

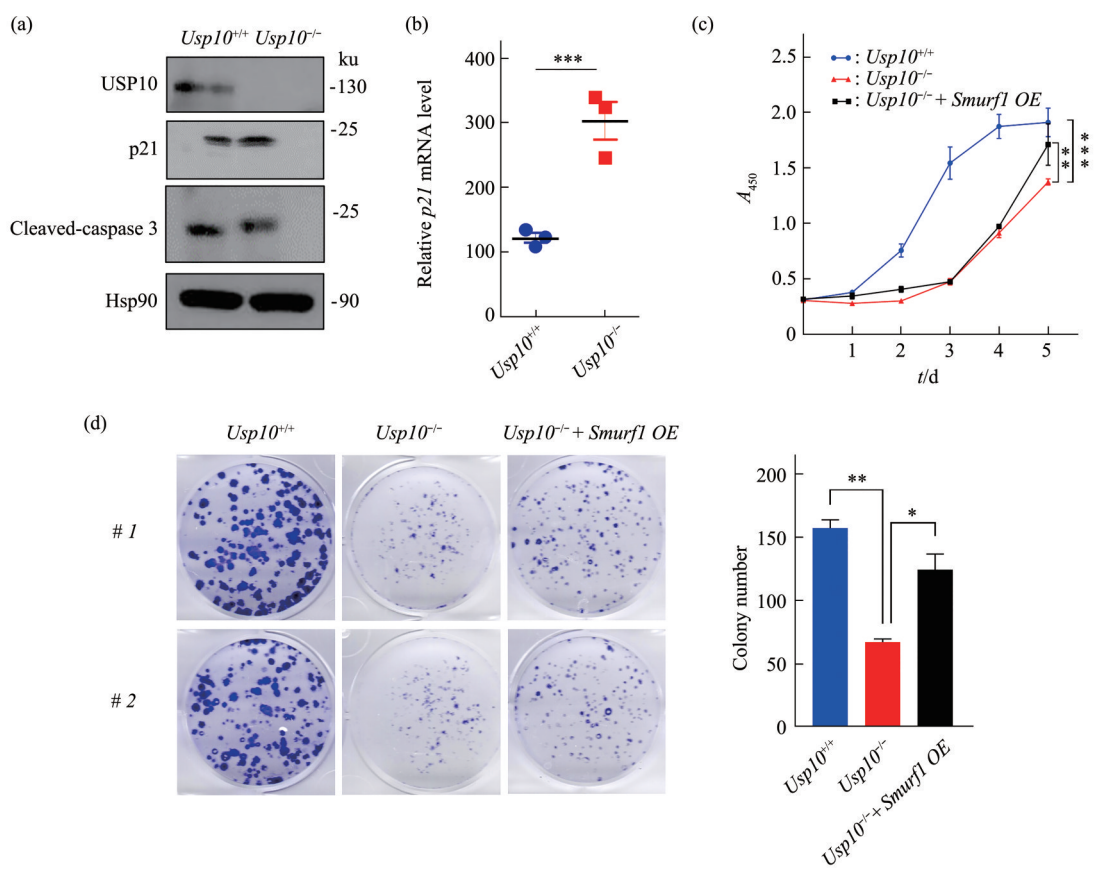


Fig. 4 USP10 inhibits cell proliferation

(a) Western blot analyzed p21 and Cleaved-caspase 3 protein levels in kidney tissues from *Usp10^{+/+}* and *Usp10^{-/-}* neonates. (b) The mRNA expression of *p21* in microarray (GSE198574). The data were represented as the means±S.E.M. and analyzed by Student's *t*-test. *** *P*<0.001. (c) Knockout of *USP10* significantly inhibited cell growth in HEK293T cells; Overexpress Flag-Smurf1 significantly rescued cell growth in HEK293T cells. The data were represented as the means±S.E.M. and calculated by two-way ANOVA test. ** *P*<0.01, *** *P*<0.001. (d) Flag-Smurf1 was transfected in *USP10* KO HEK293T cells; Representative images and statistical analysis of colony formation assay in a different condition. The cells were cultured at the indicated concentration and time intervals. The data were represented as the means±S.E.M., Student's *t*-test. * *P*<0.05, ** *P*<0.01.

3 讨 论

去泛素化酶 USP10 依赖于其去泛素化酶活性通过与不同的底物蛋白结合发挥不同的生物学作用^[22]。USP10 最知名的底物分子是抑癌因子 p53，在 DNA 损伤条件下，ATM 磷酸化 USP10 使其进入细胞核稳定 p53^[9]。然而，在新生小鼠体内，USP10 通过去除 MDM2 的 K27 链型泛素化，激活其泛素化活性降解 p53，从而维持新生小鼠组织细胞中的自噬水平^[17]。通过对比分析新出生的 *Usp10^{+/+}* 与 *Usp10^{-/-}* 小鼠肾组织中的差异基因发现，*Usp10* 基因缺失后 TGF-β/BMP 信号通路激活（图 1a），细胞周期抑制因子 p21 转录升高（图 4a），因此，推测 USP10 通过 TGF-β/BMP 信号通路调控小鼠组织细胞增殖。

TGF-β/BMP 信号通路是维持细胞稳态和骨发育的重要通路，该通路的激活涉及一系列关键蛋白的调控^[17, 23]。TGF-β 信号通路包括不同的 R-Smads (Smad1、Smad2、Smad3 和 Smad5) 和 co-Smad (Smad4) 转录因子^[24]。TGF-β/BMP 信号通路信号紊乱常导致发育异常和癌症。在正常的细胞和早期癌症中，TGF-β 信号抑制细胞增殖；然而在肿瘤晚期，TGF-β 信号通路的功能被逆转^[25]。Smurf1 是 TGF-β/BMP 信号通路最重要的负调控因子，依赖其泛素连接酶活性降解 Smad1/5^[18, 26]。为了探究 *Usp10* 基因缺陷后 TGF-β/BMP 信号通路激活的机制，检测了 *Usp10^{+/+}* 与 *Usp10^{-/-}* 小鼠肾组织中 Smurf1、Smurf2 以及 Smad1/5 的表达水平。结果显示，*Usp10^{-/-}* 新生小鼠肾组织中 Smurf1、Smad1/5 转录水平不变，Smurf1 蛋白水平下降，Smad1/5 蛋

白水平升高 (图 1c~e 和图 2a~d)。为了鉴定 Smurf1 是否是去泛素化酶 USP10 的新底物, 免疫共沉淀和 GST-pull down 实验证实了 USP10 与 Smurf1 存在相互作用 (图 3a, b), 且 USP10 依赖去泛素化酶活性稳定 Smurf1 (图 3c)。

USP10 作为去泛素化酶最早报道于 2001 年^[8], 经过 20 年的研究发现 USP10 的底物多样, 涉及多种重要的细胞功能。然而, 利用基因敲除小鼠研究 USP10 整体的生理功能直至 2022 年才首次报道^[16]。Usp10^{-/-}小鼠虽然能顺利出生, 然而组织器官却小于野生型小鼠。已报道的研究结果虽然揭示了 USP10 在新生小鼠细胞自噬激活以及维持中的重要作用, 但却并未解释 Usp10^{-/-}小鼠组织器官变小的原因。本文的研究发现 Usp10 基因缺陷后 TGF- β /BMP 信号通路激活、p21 蛋白表达上调、细胞增殖能力受到抑制, 这可能是 Usp10^{-/-}小鼠组织形态上小于野生型小鼠的原因之一。综上, 本文在以往研究基础上进一步揭示了 USP10 通过稳定 Smurf1 抑制 TGF- β /BMP 信号通路维持细胞增殖稳态的新机制。

4 结 论

本文揭示了 USP10 抑制细胞增殖新的调控机制。Smurf1 是 USP10 新的去泛素化底物, USP10 通过去除 Smurf1 的多聚泛素化维持其蛋白质稳定性, 从而间接抑制 Smad1/5 的蛋白质水平, 维持 TGF- β /BMP 信号通路和细胞增殖稳态。

参 考 文 献

- [1] Clague M J, Heride C, Urbé S. The demographics of the ubiquitin system. Trends Cell Biol, 2015, **25**(7): 417-426
- [2] Muratani M, Tansey W P. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, **4**(3): 192-201
- [3] Jackson S P, Durocher D. Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. Mol Cell, 2013, **49**(5): 795-807
- [4] Jesenberger V, Jentsch S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, **3**(2): 112-121
- [5] Zhou X, Sun S C. Targeting ubiquitin signaling for cancer immunotherapy. Signal Transduct Target Ther, 2021, **6**(1): 16
- [6] Haq S, Suresh B, Ramakrishna S. Deubiquitylating enzymes as cancer stem cell therapeutics. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2018, **1869**(1): 1-10
- [7] Harrigan J A, Jacq X, Martin N M, et al. Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities. Nat Rev Drug Discov, 2018, **17**(1): 57-78
- [8] Soncini C, Berdo I, Draetta G. Ras-GAP SH3 domain binding protein (G3BP) is a modulator of USP10, a novel human ubiquitin specific protease. Oncogene, 2001, **20**(29): 3869-3879
- [9] Yuan J, Luo K, Zhang L, et al. USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53. Cell, 2010, **140**(3): 384-396
- [10] Bomberger J M, Barnaby R L, Stanton B A. The deubiquitinating enzyme USP10 regulates the post-endocytic sorting of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway epithelial cells. J Biol Chem, 2009, **284**(28): 18778-18789
- [11] Deng M, Yang X, Qin B, et al. Deubiquitination and activation of AMPK by USP10. Mol Cell, 2016, **61**(4): 614-624
- [12] Luo P, Qin C, Zhu L, et al. Ubiquitin-specific peptidase 10 (USP10) inhibits hepatic steatosis, insulin resistance, and inflammation through Sirt6. Hepatology, 2018, **68**(5): 1786-1803
- [13] Niu J, Shi Y, Xue J, et al. USP10 inhibits genotoxic NF- κ B activation by MCP1-facilitated deubiquitination of NEMO: MCP1 promotes deubiquitination of NEMO by USP10. EMBO J, 2013, **32**(24): 3206-3219
- [14] Liu J, Xia H, Kim M, et al. Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. Cell, 2011, **147**(1): 223-234
- [15] Meyer C, Garzia A, Morozov P, et al. The G3BP1-Family-USP10 deubiquitinase complex rescues ubiquitinated 40S subunits of ribosomes stalled in translation from lysosomal degradation. Mol Cell, 2020, **77**(6): 1193-1205.e5
- [16] Li H, Li C, Zhai W, et al. Destabilization of TP53 by USP10 is essential for neonatal autophagy and survival. Cell Rep, 2022, **41**(1): 111435
- [17] Wu M, Chen G, Li Y P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. Bone Res, 2016, **4**: 16009
- [18] Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, et al. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. Nature, 1999, **400**(6745): 687-693
- [19] Kushioka J, Kaito T, Okada R, et al. A novel negative regulatory mechanism of Smurf2 in BMP/Smad signaling in bone. Bone Res, 2020, **8**(1): 41
- [20] Zhou J, Lee P L, Tsai C S, et al. Force-specific activation of Smad1/5 regulates vascular endothelial cell cycle progression in response to disturbed flow. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, **109**(20): 7770-7775
- [21] Pardali K, Kowanz M, Heldin C H, et al. Smad pathway-specific transcriptional regulation of the cell cycle inhibitor p21WAF1/Cip1. J Cell Physiol, 2005, **204**(1): 260-272
- [22] Bhattacharya U, Neizer-Ashun F, Mukherjee P, et al. When the chains do not break: the role of USP10 in physiology and pathology. Cell Death Dis, 2020, **11**(12): 1033
- [23] Chen G, Deng C, Li Y P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. Int J Biol Sci, 2012, **8**(2): 272-288
- [24] Massagué J, Blain S W, Lo R S. TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. Cell, 2000, **103**(2): 295-309
- [25] Peng D, Fu M, Wang M, et al. Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy. Mol Cancer, 2022, **21**(1): 104
- [26] Fu L, Cui C P, Zhang X, et al. The functions and regulation of Smurfs in cancers. Semin Cancer Biol, 2020, **67**(Pt 2): 102-116

Deubiquitinase USP10 Stabilizes Smurf1 and Inhibits TGF- β /BMP Signaling*

ZHANG Xin¹⁾, LI Hong-Chang²⁾, WANG Si-Ying^{1)**}, ZHANG Ling-Qiang^{1,2)**}

(¹⁾School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

(²⁾National Center for Protein Sciences (Beijing), Beijing Institute of Lifeomics, Academy of Military Medicine, Academy of Military Sciences, Beijing 102200, China)

Abstract Objective To explore the regulated function and mechanisms of deubiquitinating enzyme USP10 regulation under physiological conditions. **Methods** GEO2R and Metascape analyze the differential gene expression and pathway enrichment in microarray (GSE198574) of *Usp10*^{+/+} and *Usp10*^{-/-} neonatal kidney tissues. Western blot and immunohistochemistry are used to measure the expression levels of candidate transcription factors. Co-immunoprecipitation (Co-IP) and GST-pull down assays analyze the interaction between USP10 and the candidate molecules, and deubiquitination experiments verify the regulatory mechanisms of USP10 on target molecules. The expression of cell proliferation marker p21 and apoptosis marker Cleaved-caspase 3 are detected by Western blot. Meanwhile, CCK-8 and plate clonality assays analyze the regulatory functions of USP10 on cell proliferation. **Results** The TGF- β /BMP signaling pathway is activated in kidney tissues of *Usp10*^{-/-} neonatal mice. Physiological deficiency of *Usp10* in mice leads to downregulation of Smad ubiquitin-related factor-1 (Smurf1) protein and upregulation of Smad1/5 without affecting their transcription levels. Mechanistically, USP10 interacts with Smurf1 and removes poly-ubiquitylation of Smurf1 which rely on its deubiquitination activity. *USP10*-deficient promotes the expression of cell cycle inhibitors p21, which is one of the transcriptional target gene of Smad1/5 and inhibits cell proliferation. **Conclusion** USP10 inhibits TGF- β /BMP signaling pathway by deubiquitinating and stabilizing Smurf1, thus maintains cell proliferation homeostasis.

Key words USP10, Smurf1, Smad1/5, deubiquitination, cell proliferation

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0566

* This work was supported by grants from National Key R&D Program of China (2021YFA1300200, 2022YFC3401500) and The National Natural Science Foundation of China (82002969, 81972769).

** Corresponding author.

WANG Si-Ying. Tel: 86-13505698633, E-mail: sywang@ahmu.edu.cn

ZHANG Ling-Qiang. Tel: 86-10-66931216, E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn

Received: December 16, 2022 Accepted: February 17, 2023