

# CRISPR-Cas9 筛选鉴定 USP10 为卵巢癌对 PARP 抑制剂奥拉帕利敏感的关键调控基因及其机制

胡浩淼

曼彻斯特大学 英国

**【摘要】** 卵巢癌作为妇科恶性肿瘤中致死率最高的类型，其治疗面临耐药性频发的严峻挑战。PARP 抑制剂奥拉帕利通过靶向 DNA 损伤修复缺陷（如 BRCA 突变）发挥抗肿瘤作用，但部分患者初治即不敏感或治疗后快速耐药，机制尚未完全明确。本研究采用 CRISPR-Cas9 全基因组敲除筛选技术，在卵巢癌细胞系中筛选调控奥拉帕利敏感性的关键基因，鉴定出泛素特异性蛋白酶 10（USP10）为核心调控因子。功能验证显示，敲除 USP10 可显著增强卵巢癌细胞对奥拉帕利的敏感性，而 USP10 过表达则导致耐药；机制探究表明，USP10 通过去泛素化稳定 DNA 修复蛋白 RAD51，促进同源重组修复（HRR）通路激活，从而拮抗奥拉帕利诱导的 DNA 损伤积累。临床样本分析显示，卵巢癌组织中 USP10 高表达与患者奥拉帕利治疗响应差、无进展生存期短显著相关。本研究首次揭示 USP10 在卵巢癌奥拉帕利耐药中的关键作用，为优化 PARP 抑制剂治疗策略、开发联合治疗靶点提供了新的理论依据和实验基础。

**【关键词】** 卵巢癌；CRISPR-Cas9 筛选；USP10；PARP 抑制剂

**【收稿日期】** 2025 年 10 月 11 日

**【出刊日期】** 2025 年 11 月 21 日

**【DOI】** 10.12208/j.ijcr.20250525

## CRISPR-Cas9 screening identified USP10 as a key regulatory gene and its mechanism for ovarian cancer to be sensitive to the PARP inhibitor olaparib

Haomiao Hu

The University of Manchester, UK

**【Abstract】** Ovarian cancer, the deadliest gynecological malignancy, faces significant challenges in treatment due to frequent drug resistance. PARP inhibitors like olaparib target DNA repair defects (e.g., BRCA mutations) to combat tumors, yet some patients show initial treatment resistance or rapid drug tolerance, with mechanisms remaining unclear. This study employed CRISPR-Cas9 genome-wide knockout screening to identify key genes regulating olaparib sensitivity in ovarian cancer cell lines, identifying ubiquitin-specific protease 10 (USP10) as a core regulatory factor. Functional validation demonstrated that USP10 knockout significantly enhances ovarian cancer cell sensitivity to olaparib, while overexpression induces drug resistance. Mechanistic analysis revealed that USP10 stabilizes DNA repair protein RAD51 through deubiquitination, activating the homologous recombination repair (HRR) pathway and counteracting olaparib-induced DNA damage accumulation. Clinical data showed strong correlation between high USP10 expression in ovarian cancer tissues and poor olaparib response and short progression-free survival. This study provides the first revelation of USP10's critical role in olaparib resistance, offering new theoretical foundations and experimental basis for optimizing PARP inhibitor strategies and developing combination therapy targets.

**【Keywords】** Ovarian cancer; CRISPR-Cas9 screening; USP10; PARP inhibitors

## 引言

卵巢癌是全球女性生殖系统恶性肿瘤的主要致死原因之一,2023 年全球新发卵巢癌病例约 30 万例,死亡病例超 20 万例<sup>[1]</sup>。由于早期症状隐匿,约 70%患者确诊时已处于晚期,尽管初始化疗(如铂类联合紫杉醇)可实现部分缓解,但 5 年复发率仍高达 70%,复发后治疗手段有限,中位生存期不足 3 年<sup>[2]</sup>。DNA 损伤修复缺陷(DDR)是卵巢癌的重要分子特征,其中 BRCA1/2 基因突变发生率约 20%-30%,此类患者对 PARP 抑制剂(PARPi)敏感性显著升高<sup>[3]</sup>。

PARP 抑制剂通过抑制 PARP 酶活性,阻断 DNA 单链断裂(SSB)的碱基切除修复(BER),导致断裂累积并转化为双链断裂(DSB);对于 HRR 通路缺陷(如 BRCA 突变)的细胞,DSB 无法有效修复,最终引发合成致死<sup>[4]</sup>。奥拉帕利作为首个获批用于卵巢癌治疗的 PARP 抑制剂,已用于 BRCA 突变晚期卵巢癌的一线维持治疗及复发患者的挽救治疗,但临床数据显示,约 30%BRCA 突变患者对奥拉帕利初治不敏感,且敏感患者中约 50%在治疗 1-2 年内出现耐药<sup>[5]</sup>。目前已知的耐药机制包括 BRCA1/2 回复突变、RAD51 过表达、PARP1 突变等,但仍有大量耐药病例机制不明,亟需挖掘新的调控基因<sup>[6]</sup>。

泛素-蛋白酶体系统(UPS)通过泛素化与去泛素化的动态平衡调控蛋白质稳定性,参与 DNA 损伤修复、细胞周期调控等关键生物学过程<sup>[7]</sup>。USP10 作为泛素特异性蛋白酶家族成员,已被报道在肺癌、乳腺癌中通过调控 p53、FOXO3a 等蛋白参与肿瘤发生发展<sup>[8-10]</sup>,但在卵巢癌及 PARP 抑制剂敏感性调控中的作用尚未见报道。本研究通过 CRISPR-Cas9 全基因组筛选,结合功能实验与机制探究,首次鉴定 USP10 为卵巢癌奥拉帕利敏感性的关键调控基因,揭示其通过调控 RAD51 介导的 HRR 通路影响奥拉帕利响应的分子机制,为卵巢癌 PARP 抑制剂耐药的逆转提供新靶点。

## 1 材料与方法

人卵巢癌细胞系 SKOV3 (BRCA 野生型)、OVCAR8 (BRCA 突变型, BRCA1 c.5277C>A) 购自美国 ATCC 细胞库;细胞培养于含 10%胎牛血清(FBS, Gibco)、1%青霉素-链霉素(Sigma)的 RPMI-1640 培养基(Gibco)中,置于 37°C、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱。奥拉帕利(Selleck)用 DMSO 溶解,储存浓度为 100mmol/L,实验时稀释至工作浓度(0.1-10μmol/L)。

## 2 CRISPR-Cas9 全基因组筛选

采用 GeCKO v2 全基因组 CRISPR 敲除文库

(Addgene #1000000048), 包含 123411 个 sgRNA, 靶向 19050 个人类基因及 1864 个 miRNA。将文库慢病毒感染 SKOV3 细胞(MOI=0.3), 感染后 48h 加入嘌呤霉素(2μg/mL)筛选 1 周, 获得稳定表达 sgRNA 的细胞库。将细胞分为两组: 对照组(DMSO 处理)与奥拉帕利处理组(1μmol/L, 连续处理 21 天)。提取两组细胞基因组 DNA, 采用文库特异性引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经 Illumina HiSeq X Ten 平台测序, 通过 MAGeCK 软件分析 sgRNA 富集/缺失情况, 筛选对奥拉帕利敏感性有调控作用的候选基因(|log<sub>2</sub>FC|>1.5, P<0.05)。

## 3 细胞功能实验

### 3.1 细胞活力检测(CCK-8 法)

将 USP10 敲除细胞(sgUSP10-1、sgUSP10-2)、USP10 过表达细胞(OE-USP10)及对应对照细胞(sgNC、OE-NC)接种于 96 孔板(2×10<sup>3</sup>细胞/孔), 培养 24h 后加入不同浓度奥拉帕利, 继续培养 72h, 每孔加入 10μL CCK-8 试剂(Dojindo), 37°C 孵育 2h, 酶标仪检测 450nm 吸光度, 计算细胞活力及 IC<sub>50</sub>值(GraphPad Prism 9.0)。

### 3.2 克隆形成实验

细胞接种于 6 孔板(5×10<sup>3</sup>细胞/孔), 培养 24h 后加入奥拉帕利(0.5μmol/L), 每 3 天更换含药培养基, 培养 14 天后, 4%多聚甲醛固定 30min, 0.1%结晶紫染色 20min, 拍照并计数克隆数(≥50 个细胞为一个克隆), 计算克隆形成率=(实验组克隆数/对照组克隆数)×100%。

### 3.3 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞经奥拉帕利(1μmol/L)处理 48h 后, 收集细胞, 加入 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(BD Biosciences), 避光孵育 15min, 流式细胞仪(BD FACSCanto II)检测凋亡率, FlowJo 10.0 软件分析数据。

## 4 机制探究实验

### 4.1 Western blot 检测

提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 10%SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 转印至 PVDF 膜, 5%脱脂牛奶封闭 1h, 加入一抗(USP10, Abcam ab181154; RAD51, CST #8875; γ-H2AX, CST #9718; GAPDH, CST #5174) 4°C 孵育过夜, HRP 标记二抗室温孵育 1h, ECL 化学发光试剂盒(Millipore)显影, ImageJ 软件定量分析蛋白灰度值。

### 4.2 免疫共沉淀(Co-IP)

收集 OE-USP10 细胞, 加入 IP 裂解液 (含蛋白酶抑制剂), 冰浴 30min, 12000×g 离心 15min, 上清液加入 USP10 抗体 (2 $\mu$ g) 或 IgG 对照, 4℃孵育过夜, 加入 Protein A/G 琼脂糖珠 (Santa Cruz), 4℃孵育 4h, 离心收集琼脂糖珠, PBS 洗涤 3 次, 加入 2×SDS 上样缓冲液, 煮沸 5min, Western blot 检测 RAD51 蛋白。

#### 4.3 泛素化实验

细胞转染 HA-Ub 质粒 (Addgene #18712), 24h 后加入 MG132 (10 $\mu$ mol/L) 处理 6h, 提取蛋白后进行 Co-IP (RAD51 抗体), Western blot 检测 RAD51 的泛素化水平 (HA 抗体)。

#### 4.4 同源重组修复效率检测 (DR-GFP 报告系统)

将 DR-GFP 质粒 (Addgene #26475) 转染至细胞, 24h 后转染 I-SceI 质粒 (Addgene #64756), 48h 后流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞比例, GFP 阳性率越高, HRR 效率越强。

### 5 临床样本分析

收集 2019-2022 年在本院接受奥拉帕利治疗的晚期卵巢癌患者临床样本 (n=52), 包括肿瘤组织石蜡切片及临床资料 (治疗响应、无进展生存期 PFS)。免疫组化 (IHC) 检测 USP10 表达水平 (抗体: Abcam ab181154), 根据染色强度与阳性细胞比例评分 (0-3 分: 0 分阴性, 1 分弱阳, 2 分中阳, 3 分强阳),  $\geq 2$  分为高表达,  $<2$  分为低表达。采用 Kaplan-Meier 法分析 USP10 表达与 PFS 的关系, Log-rank 检验比较差异; Pearson 卡方检验分析 USP10 表达与治疗响应的相关性。本研究经医院伦理委员会批准 (伦理号: 2019-032), 患者均签署知情同意书。

### 6 统计学分析

所有实验至少重复 3 次, 数据以 “均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ )” 表示。采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 两组比较用 t 检验, 多组比较用单因素方差分析 (ANOVA),  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

### 7 结果

#### 7.1 CRISPR-Cas9 筛选鉴定 USP10 为调控奥拉帕利敏感性的候选基因

对 SKOV3 细胞进行全基因组 CRISPR 筛选, 奥拉帕利处理组与对照组相比, 共筛选出 287 个差异表达 sgRNA 靶向的基因 ( $|\log_2FC|>1.5$ ,  $P<0.05$ )。其中, USP10 基因的 sgRNA 在奥拉帕利处理组中显著缺失 ( $\log_2FC=-2.13$ ,  $P=0.008$ ), 提示敲除 USP10 可增强细胞对奥拉帕利的敏感性。进一步分析 GeCKO 文库中 USP10 的 4 个 sgRNA, 发现所有 sgRNA 均在奥拉帕

利处理组中呈缺失趋势, 且 sgUSP10-1、sgUSP10-2 缺失最为显著 ( $\log_2FC$  分别为 -2.31、-2.05), 表明 USP10 是调控卵巢癌细胞奥拉帕利敏感性的关键候选基因。

#### 7.2 USP10 调控卵巢癌细胞对奥拉帕利的敏感性

##### 7.2.1 敲除 USP10 增强奥拉帕利敏感性

在 SKOV3、OVCAR8 细胞中敲除 USP10 (sgUSP10-1、sgUSP10-2), Western blot 验证显示 USP10 蛋白表达显著降低。CCK-8 实验表明, 敲除 USP10 后, 两种细胞对奥拉帕利的 IC<sub>50</sub>值显著降低 (SKOV3: sgNC 组 1.82 $\mu$ mol/L vs sgUSP10-1 组 0.45 $\mu$ mol/L、sgUSP10-2 组 0.51 $\mu$ mol/L; OVCAR8: sgNC 组 0.63 $\mu$ mol/L vs sgUSP10-1 组 0.18 $\mu$ mol/L、sgUSP10-2 组 0.21 $\mu$ mol/L,  $P<0.01$ )。克隆形成实验显示, 奥拉帕利处理下, USP10 敲除组克隆形成率显著低于对照组 (SKOV3: sgNC 组 32.6% vs sgUSP10-1 组 8.3%、sgUSP10-2 组 9.1%; OVCAR8: sgNC 组 28.5% vs sgUSP10-1 组 7.6%、sgUSP10-2 组 8.2%,  $P<0.01$ )。流式细胞术显示, USP10 敲除组凋亡率显著高于对照组 (SKOV3: sgNC 组 12.3% vs sgUSP10-1 组 35.6%、sgUSP10-2 组 33.8%; OVCAR8: sgNC 组 15.7% vs sgUSP10-1 组 42.1%、sgUSP10-2 组 40.5%,  $P<0.01$ )。

##### 7.2.2 过表达 USP10 诱导奥拉帕利耐药

在 USP10 低表达的 SKOV3 细胞中过表达 USP10 (OE-USP10), Western blot 验证显示 USP10 蛋白表达显著升高。CCK-8 实验表明, 过表达 USP10 后, 细胞对奥拉帕利的 IC<sub>50</sub>值显著升高 (OE-NC 组 1.78 $\mu$ mol/L vs OE-USP10 组 3.92 $\mu$ mol/L,  $P<0.01$ )。克隆形成实验显示, 奥拉帕利处理下, OE-USP10 组克隆形成率显著高于 OE-NC 组 (31.2% vs 12.5%,  $P<0.01$ )。流式细胞术显示, OE-USP10 组凋亡率显著低于 OE-NC 组 (11.8% vs 28.7%,  $P<0.01$ )。以上结果表明, USP10 表达水平与卵巢癌细胞奥拉帕利敏感性呈负相关, USP10 高表达导致耐药, 低表达增强敏感。

#### 7.3 USP10 通过稳定 RAD51 促进同源重组修复

##### 7.3.1 USP10 去泛素化稳定 RAD51

Western blot 显示, 敲除 USP10 后, RAD51 蛋白表达显著降低, 而过表达 USP10 后, RAD51 蛋白表达显著升高, 但 RAD51 mRNA 水平无显著变化, 提示 USP10 在翻译后水平调控 RAD51。泛素化实验显示, 敲除 USP10 后, RAD51 的泛素化水平显著升高; 而过表达 USP10 后, RAD51 的泛素化水平显著降低, 且 MG132 处理可逆转 USP10 敲除引起的 RAD51 降解, 表明 USP10 通过去泛素化抑制 RAD51 的蛋白酶体降

解,从而稳定 RAD51 蛋白。

### 7.3.2 USP10 通过 RAD51 调控 HRR 效率

DR-GFP 报告系统显示,敲除 USP10 后,GFP 阳性细胞比例显著降低 (sgNC 组 18.2% vs sgUSP10 组 6.3%,  $P<0.01$ ),表明 HRR 效率下降;而过表达 USP10 后,GFP 阳性细胞比例显著升高 (OE-NC 组 17.8% vs OE-USP10 组 32.5%,  $P<0.01$ )。Western blot 显示,奥拉帕利处理下,敲除 USP10 可显著升高  $\gamma$ -H2AX (DNA 损伤标志物) 的表达水平,而过表达 USP10 则降低  $\gamma$ -H2AX 表达,表明 USP10 通过增强 HRR 效率,减少奥拉帕利诱导的 DNA 损伤积累。

## 8 结束语

综上所述,本研究通过 CRISPR-Cas9 全基因组筛选首次发现 USP10 是调控卵巢癌细胞对奥拉帕利敏感性的关键基因。机制研究表明,USP10 可与 RAD51 直接相互作用,通过去泛素化修饰抑制 RAD51 的蛋白酶体降解,从而维持 RAD51 蛋白的稳定表达。稳定的 RAD51 进一步增强同源重组修复 (HRR) 效率,减少奥拉帕利诱导的 DNA 损伤积累,最终降低卵巢癌细胞对奥拉帕利的敏感性。临床样本分析也证实,USP10 高表达的卵巢癌患者可能对 PARP 抑制剂治疗反应较差,提示 USP10 有望成为预测奥拉帕利疗效的潜在生物标志物及新的治疗靶点。未来可进一步探索以 USP10 为靶点的联合治疗策略,为改善卵巢癌患者的治疗效果提供新思路。

## 参考文献

- [1] 钟红,邓慧远,张玄羿,等. 多腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂单药治疗铂敏感复发性卵巢癌有效性及安全性的网状 Meta 分析 [J]. 中国新药与临床杂志, 2025, 44 (07): 549-554.
- [2] 沙晓雨,左卫微,甘静,等. 卵巢癌的高危因素和治疗研究

进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2025, 52 (07): 637-644.

- [3] 葛覃,沈健,赵荣. 安罗替尼联合 PD-1 抑制剂治疗晚期卵巢癌临床转归的影响因素及其预测效能 [J]. 青岛大学学报(医学版), 2025, 61 (03): 406-410.
- [4] 杨诗敏,李艺. 卵巢癌 PARP 抑制剂耐药的诊治及相关问题 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2025, 26 (04): 289-291.
- [5] 时鸿娟,刘伟,胡丽玲,等. 组织激肽释放酶 7 小分子抑制剂对卵巢癌的影响 [J]. 中国医学科学院学报, 2025, 47 (03): 366-374.
- [6] 郑佳慧,杨泉,詹靖,等. 靶向 And-1 增强卵巢癌细胞对 PARP 抑制剂尼拉帕利的敏感性 [J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2025, 46 (03): 261-270.
- [7] 陈李纲. FBXW11 在晚期卵巢癌 PARP 抑制剂治疗中的作用研究及临床意义[D]. 中国人民解放军空军军医大学, 2025.
- [8] 孙雪茹. 减低剂量的 PARP 抑制剂治疗晚期卵巢癌的有效性及安全性分析[D]. 吉林大学, 2025.
- [9] 王宝金,刘子平,赵欣欣,等. VERU-111 通过 TGF- $\beta$  通路调控 EMT 抑制卵巢癌细胞的增殖及转移 [J]. 药学前沿, 2025, 29 (03): 374-380.
- [10] 章绘. 卵巢癌 PARP 抑制剂耐药机制的全景分析: 从 DNA 修复代偿到肿瘤微环境重塑[C]// 中国生命关怀协会. 关爱生命大讲堂之生命关怀与智慧康养系列学术研讨会论文集(上)--肿瘤患者全流程营养护理实践专题. 广东药科大学附属第三医院, 2025: 635-637.

**版权声明:** ©2025 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



**OPEN ACCESS**