

USP7 在喉癌组织中的表达及其临床意义

周 芑¹, 邓世山², 刘 海¹

(1. 川北医学院附属医院 耳鼻咽喉科, 四川 南充 637000; 2. 川北医学院基础医学院, 四川 南充 637007)

摘 要: **目的** 探讨泛素特异性蛋白酶 7(ubiquitin specific peptidase 7, USP7)在喉癌组织中的表达与其临床病理特征间的联系。**方法** 收集经病理科确诊的喉癌组织标本 73 例,同时选取癌旁组织 52 例作为对照。采用免疫组织化学法检测 USP7 在喉癌和癌旁组织中的表达情况。**结果** 73 例喉癌组织中,61 例(83. 5%) USP7 呈阳性表达,较癌旁组织阳性表达(19/52, 36. 5%)显著升高($\chi^2 = 29. 1446, P < 0. 05$)。病理分型中,肿瘤分化程度越低,USP7 阳性表达率越高。**结论** 喉癌组织中 USP7 的高阳性表达与肿瘤分化程度相关,对晚期 USP7 阳性表达喉癌患者治疗提供新思路。

关 键 词: 喉癌;泛素特异性蛋白酶 7;免疫组织化学
中图分类号:Q786;R739. 65 文献标识码:A 文章编号:1007-1520(2015)01-0027-04

Expression of USP7 in human laryngeal carcinoma and its significance

ZHOU Ji, DENG Shi-shan, LIU Hai

(Department of Otorhinolaryngology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of ubiquitin-specific processing protease-7 (USP7) in human laryngeal carcinoma and to explore its correlation with clinicopathological characteristics of the tumor. **Methods** 73 specimens from laryngeal carcinoma patients were selected, and 52 specimens from para-carcinoma tissue were chosen as control. Expression of USP7 was detected with immunohistochemical staining. **Results** The positive expression rate of USP7 in carcinoma specimens was 83. 5%, which was higher than that in the para-carcinoma tissue (36. 5%). The difference was significant ($P < 0.05$). Moreover, the worse histologic class, the higher rate was the positive expression of USP7 ($P < 0.05$). **Conclusion** The high expression rate of USP7 in laryngeal carcinoma is associated with differentiation of the tumor, which may provide new idea for the treatment of advanced laryngeal carcinoma in patients with positive expression of USP7.

Key words: Laryngeal neoplasm; Ubiquitin specific peptidase 7; Immunohistochemistry

喉癌(laryngeal carcinoma)是头颈部较为常见的恶性肿瘤之一,在耳鼻喉头颈外科中仅次于鼻咽癌,居第二位。手术治疗为喉癌的主要治疗手段^[1]。但是,多数患者就诊时病期较晚,导致手术范围大,术后声音嘶哑甚至失声给患者带来巨大的社会心理压力,而且疗效较差^[2]。为了提高喉癌的治疗效果和手术保留喉功能,探索肿瘤标志物和喉癌临床病理特征的联系对理解喉癌临床病理特点和治疗具有重要作用。其中,泛素特异性蛋白酶 7(ubiquitin specific peptidase 7, USP7)是一种去泛素化酶,具有调控许多关键蛋白如抑癌基因、DNA 修复蛋白、免疫应答子、病毒蛋白和表观遗传调控子等生物活性的作用,USP7 的异常可引起肿瘤和病毒性疾病的发生,因此,它成为了潜在的治疗靶点^[3]。目前,关于 USP7 在喉癌的研究,国内尚少。本实验旨在研究 USP7 在喉癌组织和癌旁组织的表达情况,探讨其表达与喉癌临床病理特征的关系,以明确 USP7 在喉癌发展中的意义,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 标本来源

收集 2010 年 1 月~2012 年 12 月在我院经病理科确诊的喉癌标本 73 例。所有患者临床资料齐全,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81172496);四川省科技厅项目(2010SZ0295)。
作者简介:周 芑,女,硕士研究生,主治医师。
通信作者:刘 海,Email:112090009@qq. com

术前均未接受任何治疗。73 例患者中男 66 例,女 7 例;年龄 33 ~ 82 岁,中位年龄 63 岁,其中 ≤ 60 岁 21 例, > 60 岁 52 例。所有患者均为喉鳞状细胞癌,其中,高分化 42 例,中分化 24 例,低分化 7 例。声门型 57 例,声门下型 11 例,声门上型 5 例。T1 19 例,T2 28 例,T3 23 例,T4 3 例。其中有淋巴结转移 17 例。临床分期中,I 期 18 例,II 期 26 例,III 期 29 例。同时在 73 例喉癌病例中,选取经病理确诊癌旁组织 52 例。

1.2 免疫组化试剂及操作

I 抗为兔抗人 USP7 多克隆抗体(Beijing Biosynthesis Biotechnology Co, Ltd. 北京,中国)。免疫组织化学染色操作按 EliVision plus 试剂盒(福州迈新生物,福州,中国)说明书进行。简述如下:石蜡切片脱蜡和水化,修复,3% 的过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性,加 I 抗 USP7 抗体(1: 200),4℃ 过夜。PBS 洗涤后,加聚合物增强剂,室温孵育 20 min 孵 II 抗(酶标抗鼠/兔聚合物)30 min。加新配制的 DAB 溶液 5 min,水洗,苏木素复染,脱水干燥,中性树胶封片。最后镜下观察并照像。

1.3 免疫组织化学结果判断标准^[4]

结果判定采用二级计分法。染色强度分级计分标准为:无显色为 0 分;淡黄色为 1 分;黄或深黄色为 2 分;褐或棕褐色为 3 分。阳性细胞计分标准为:≤ 5% 为 0 分; > 5% ~ 25% 为 1 分; > 25% ~ 50% 为 2 分; > 50% ~ 75% 为 3 分; > 75% 为 4 分。两者计分的乘积作为判断标准:0 分为阴性(-);1 ~ 4 分为弱阳性(+);5 ~ 8 分为阳性(++);9 ~ 12 分为强阳性(+++)。为了便于统计,将阴性和弱阳性定义为阴性(-),阳性和强阳性定义为阳性(+)。

1.4 统计学处理

使用 SAS 9.0 统计软件进行检验。计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 癌组织和癌旁组织中 USP7 阳性表达差异比较

73 例喉癌组织中,61 例(83.5%)组织的 USP7 呈阳性表达。USP7 主要定位于细胞浆,呈片状、弥漫状分布,着色深浅不一,细胞核中有少量表达(图 1、2)。与 73 例喉癌组织比较,52 例癌旁组织中 USP7 表达阳性率(19/52,36.5%)显著低于癌组织(61/73,83.6%),两者比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 29.1446, P < 0.05$)。

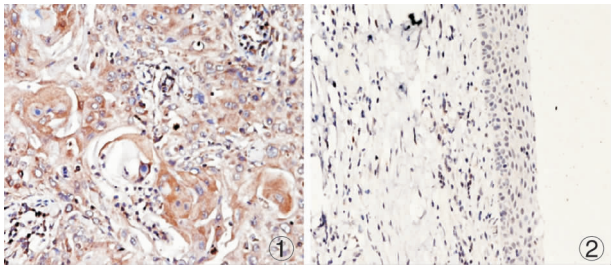


图 1 喉癌组织阳性表达(免疫组化 × 200) 图 2 癌旁组织阴性表达(免疫组化 × 200)

2.2 喉癌组织中 USP7 的阳性表达与临床病理特征间的关系

为了探讨喉癌组织中 USP7 的表达与临床病理特征之间的关系,我们将性别、年龄、肿瘤发生部位、分化类型、T 分级、临床分期和有无淋巴结转移等因素纳入进行分析。结果显示,USP7 在喉癌组织中的阳性表达与性别、年龄、肿瘤发生部位、T 分级、临床分期和有无淋巴结转移无关。与肿瘤的分化程度有关,肿瘤分化程度越低,USP7 阳性表达率越高。其中,高分化与中分化 + 低分化比较,差异具有统计学意义($P = 0.0479$)。T 分级中,总体趋势显示出分期越晚,USP7 阳性表达率越高,但差异无统计学意义($P = 0.1337$),可能与临床病例系回顾性分析和病例数较少有关。具体结果见表 1。

表 1 USP7 蛋白阳性表达与喉癌临床病理特征间的关系(例)

临床特征	例数	USP7 表达		χ^2	P
		-	+		
性别					
男	66	10	56	0.8298	0.3623
女	7	2	5		
年龄(岁)					
≤ 60	21	5	16	1.1661	0.2802
> 60	52	7	45		
分型					
高	57	8	49	1.1093	0.5743
中	5	1	4		
低	11	3	8		
病理分型					
高	42	10	32	3.9122	0.0479 *
中	24	2	22		
低	7	0	7		
T 分级					
T1	19	5	14	2.2488	0.1337 **
T2	28	5	23		
T3	23	2	21		
T4	3	0	3		
临床分期					
I	18	3	15	0.8566	0.6516
II	26	3	23		
III	29	6	23		
淋巴结转移					
-	56	9	47	0.0236	0.8780
+	17	3	14		

注: * $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义; ** T₁、T₂ 与 T₃、T₄ 比较

3 讨论

泛素化蛋白通过级联 2~4 个酶的特异性修饰,从而保证靶蛋白的稳定性、细胞内定位和生物活性^[5]。去泛素化酶通过裂解单聚或者多聚泛素,达到降解底物蛋白的泛素化作用,最终实现翻译后的调控^[5]。异常的去泛素化活性存在于许多疾病中,尤以肿瘤更加明显^[6]。HSP7 是一种去泛素化酶,最初在研究单纯疱疹病毒蛋白 ICP0 时被发现,故又称为 HAUSP(herpes virus-associated ubiquitin-specific protease)^[7]。

USP7 在肿瘤发生发展中的作用存在争议。Li 等^[8]研究认为,USP7 能特异性结合 p53 泛素化链,通过直接的去泛素化作用,p53 稳定性增强,从而促进 p53 依赖的凋亡和抑制肿瘤生长,提示 USP7 可能是一个抑癌基因。与其相反的是,Meulmeester 等^[9]研究发现降低 USP7 的表达,能增加 p53 的稳定,提示 USP7 可能发挥癌基因的作用。目前,更多研究结果倾向于 USP7 在肿瘤的致癌作用,并有发现在肺癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌和肝癌中过表达^[3]。研究结果显示,USP7 在癌组织中阳性表达率高,癌旁组织中阳性表达率低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。进而分析发现,USP7 阳性表达与肿瘤分化程度相关,分化程度越低,阳性表达率越高;而 T 分级虽没有统计学差异,但有 T 分期越晚,USP7 阳性表达率越高的趋势。综合表明,USP7 阳性表达与喉癌的恶性进展有关。这与程传东等^[10]报道的 HAUSP 与 NANOG 两者在胶质瘤发病中起重要作用,且与肿瘤恶性度相关;HAUSP(USP7)的去泛素化作用可能对于 NANOG 维持胶质瘤细胞的未分化状态有重要作用的结果一致。研究发现 HAUSP 表达随胶质瘤级别增加而增加,与该病进展相关,并显著影响预后^[11]。在结肠癌的研究中,发现 STAT3 通过下调 USP7 表达,从而降低内源性 p53 水平,表明 STAT3-USP7-p53 信号通路在结肠癌的发展中扮有重要作用^[12]。Masuya 等^[13]报道在非小细胞肺癌,HAUSP 基因表达与 T 分级、N 分级和病理分级等方面没有差异,但在鳞癌和腺癌病理亚型中 HAUSP 蛋白和 mRNA 表达有差异,鳞癌显著高于腺癌。综合提示,USP7 在肿瘤的发生与发展中均伴有重要作用。本研究结果表明,USP7 蛋白在喉癌组织中较癌旁组织阳性表达率高,这为临床治疗提供了新思路。针对 USP7 阳性表达的晚期喉癌患者,设想术前使用特异性抑制剂来降低肿瘤恶性进程和控

制肿瘤生长,使缩小手术范围保留喉的发声功能成为可能。

目前,关于 USP7 的小分子抑制剂研究^[14-15]与在抗肿瘤研究方面,许多公司已经启动了 USP7 药物研发计划。近年,通过专有的筛选平台,鉴别出 USP7 新的选择性的 P005091 系列小分子抑制剂,具有稳定 p53 表达、抑制癌细胞增殖和疾病细胞模型内有活性等特点^[3]。相信,随着 USP7 基础研究的深入和转化应用,更多高效有选择性的抑制剂被发现和应用于肿瘤临床。

参考文献:

- [1] 符晓,李赞,王大海,等. 综合治疗 9 例喉癌术后咽瘘的疗效分析[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2012,18(4):305-306.
- [2] Li L, Zhang Z, Wang C, et al. Quantitative proteomics approach to screening of potential diagnostic and therapeutic targets for laryngeal carcinoma[J]. PLoS one, 2014,9(2):e90181.
- [3] Nicholson B, Suresh Kumar KG. The multifaceted roles of USP7: new therapeutic opportunities[J]. Cell biochemistry and biophysics, 2011,60(1-2):61-68.
- [4] 任媛媛,何妙霞,应明真,等. 疱疹病毒相关性泛素特异性蛋白酶在乳腺癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国癌症杂志,2009,19(7):491-496.
- [5] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system[J]. Annu Rev Biochem, 1998,67:425-479.
- [6] Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes[J]. Annu Rev Biochem, 2009,78:363-397.
- [7] Everett RD, Meredith M, Orr A, et al. A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein[J]. The EMBO Journal, 1997,16(7):1519-1530.
- [8] Li M, Chen D, Shiloh A, et al. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization[J]. Nature, 2002,416(6881):648-653.
- [9] Meulmeester E, Maurice MM, Boutell C, et al. Loss of HAUSP-mediated deubiquitination contributes to DNA damage-induced destabilization of Hdmx and Hdm2[J]. Molecular cell, 2005,18(5):565-576.
- [10] 程传东,牛朝诗,杨洋,等. HAUSP 与 NANOG 在胶质瘤中的表达及意义[J]. 中华神经医学杂志,2013,12(1):4-8.
- [11] Cheng C, Niu C, Yang Y, et al. Expression of HAUSP in gliomas correlates with disease progression and survival of patients[J]. Oncology reports, 2013,29(5):1730-1736.
- [12] Yang Z, Huo S, Shan Y, et al. STAT3 repressed USP7 expression is crucial for colon cancer development[J]. FEBS letters, 2012,586(19):3013-3017.
- [13] Masuya D, Huang C, Liu D, et al. The HAUSP gene plays an important role in non-small cell lung carcinogenesis through p53-depend-

ent pathways[J]. The Journal of pathology, 2006,208(5):724 – 732.

[14] Colland F,Formstecher E,Jacq X,et al. Small-molecule inhibitor of USP7/HAUSP ubiquitin protease stabilizes and activates p53 in cells[J]. Molecular cancer therapeutics, 2009,8(8):2286 – 2295.

[15] Fan YH,Cheng J,Vasudevan SA,et al. USP7 inhibitor P22077 inhibits neuroblastoma growth via inducing p53-mediated apoptosis [J]. Cell death & disease, 2013,4:e867.

(修回日期:2014 – 06 – 05)

(上接第 26 页)

和淋巴系统丰富,易发生早期转移远处播散有一定的相关性。像手术那样,放疗只能对局部病灶发挥作用,对已远处扩散的瘤细胞无能为力,而 MM 的主要临床特征就是早期易发生转移,探讨如何使放,化疗,免疫等综合措施在 MM 治疗中起到更有效的作用,还需要更多的实践与经验的积累。

参考文献:

[1] 周际昌. 实用肿瘤内科学[M]. 北京:人民出版社,2010:738 – 740.

[2] Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. AJCC cancer staging manual[M]. 7th ed. New York: Springer, 2010: 67.

[3] 林宜玲,聂国辉,苏永进,等. 鼻腔鼻窦恶性黑色素瘤临床研究进

展[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2013, 19(5):471 – 474.

[4] 张运东,乐建新,何纯会,等. 鼻腔鼻窦恶性黑色素瘤 17 例临床分析 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2013, 19(2):102 – 104.

[5] Thomas JM, Newton-Bishop J,A’Hem R, et al. Excision margins in high-risk malignant melanoma [J]. New Engl J Med, 2004, 350(8):757 – 766.

[6] McCarthy WH,Shaw HM. The surgical treatment of primary melanoma[J]. Hematol Oncol Clin North Am,1998,12(4):797 – 805.

[7] Jansen L,Nieweg OE,Peterse L,et al. Reliabilitiy of sentinel lymph node biopsy for staging melanoma[J]. Br J Surg,2000,87(4):484 – 489.

[8] Lawton GP,Ariyan S. Regional lymph node dissections in malignant melanoma[J]. Clin Plast Surg,2000,27(3):431 – 440.

(修回日期:2014 – 11 – 18)

· 消息 ·

《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》实行优质论文网上优先数字出版

为进一步提高期刊学术质量,缩短出刊周期,及时有效地传播优秀学术成果,提高作者学术成果的认可、传播和利用价值,作者可尽快发表成果,争取成果首发权,也为广大学者提供良好的文献查阅条件,我刊已加入“中国知网”学术期刊优先数字出版平台。并将于 2014 年 5 月开始对优质稿件实行优先数字出版。

优先出版是数字化出版的一种创新与革命,凡已达到本刊正式出版水平的论文,在正式按期次成册印刷出版前,均可在“中国知网”学术期刊以单篇论文为单位、以 PDF 文档的形式在线优先发表。优先出版通常比印刷出版提前几周或几个月。作者所投本刊论文在通过外审,定稿及编辑加工后,能够第一时间在“中国知网”上发表。

如果作者同意所投本刊的论文于期刊印刷出版前在中国学术期刊(光盘版)电子杂志社主办的“中国知网”上进行优先数字出版,并许可“中国知网”在全球范围内使用该文的信息网络传播权,作者可在本刊远程投稿系统“作者投稿查稿”中下载“中国知网”优先出版授权书,签字后寄回。优先数字出版期刊的名称与印刷版期刊相同,其编辑单位是期刊编辑部。论文的网上优先数字出版由编辑部完成。