

## USP22 在神经母细胞瘤中的表达及意义的初步研究

曲志博<sup>1</sup> 刘家旭<sup>1</sup> 鞠春成<sup>1</sup> 王欢<sup>1</sup> 张浩然<sup>1</sup> 孙清政<sup>1</sup> 张世伟<sup>1</sup> 刘彦龙<sup>2</sup> 李昭铸<sup>3</sup>

**【摘要】 目的** 观察肿瘤干细胞标记物泛素特异性肽酶 22 (USP22) 蛋白在神经母细胞瘤中的表达,探讨其在神经母细胞瘤发生发展过程中的作用。**方法** 用免疫组化法检测 USP22 蛋白在 68 例神经母细胞瘤组织和瘤旁组织细胞中的表达,结合临床资料分析其与临床病理学特征的关系。**结果** 免疫组织化学染色结果显示 USP22 主要在肿瘤细胞核中呈阳性表达,而瘤旁组织中呈阴性表达。进一步统计分析,USP22 在Ⅲ~Ⅳ期肿瘤中的表达水平高于Ⅰ~Ⅱ肿瘤( $P < 0.05$ );USP22 在有淋巴结转移组的表达水平明显高于无淋巴结转移组( $P < 0.05$ );而 USP22 在神经母细胞瘤中的表达水平与性别、年龄、大小、肿瘤部位、病理分型等参数无相关性( $P > 0.05$ )。**结论** USP22 在神经母细胞瘤细胞中有表达,其表达水平与肿瘤的临床分期及是否淋巴结转移有相关性,与性别、年龄等参数无明显相关性。

**【关键词】** 肿瘤干细胞; 泛素特异性肽酶 22 (USP22); 神经母细胞瘤; 基因表达

**A preliminary study for USP22 expression and significance in neuroblastoma.** QU Zhi-bo, LIU Jia-xu, JU Chun-cheng, et al. 1, Haerbin Children's Hospital, Haerbin, 150010, China; 2, The Tumor Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Haerbin, 150081, China; 3, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Haerbin, 150086, China.

**【Abstract】 Objective** Aim By observing the expression of the tumor stem cell marker ubiquitin specific processing peptidase 22 (USP22) in neuroblastoma, discusses its significance of development in neuroblastoma. **Methods** There were 68 cases of neuroblastoma in this study. The expressions of USP22 protein were detected by immunohistochemical method in 68 tumor and peritumoral tissue. The USP22 results were analyzed combing with clinical data and pathological features of the tumor. **Results** Immunohistochemical staining showed USP22 mainly expressed in tumor cell nucleus, the peritumoral tissues are negative. After statistical analysis found that the USP22 of expression level is higher in Ⅲ-Ⅳ stage tumor than Ⅰ-Ⅱ stage tumor ( $P < 0.05$ ); And USP22 expression level was higher in the group with lymph node metastasis than the group without lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ); There is no correlation with gender, age, tumor location, size, pathological classification parameters ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** USP22 expression in neuroblastoma is positive. The expression level of USP22 has certain correlation of the clinical stages and lymph node metastasis, and no significant correlation with the parameters such as gender, age, tumor location, size, pathological classification.

**【Key words】** Tumor Stem Cells; Ubiquitin specific peptidase 22 (USP22); Neuroblastoma; Gene Expression

神经母细胞瘤 (Neuroblastoma, NB) 是儿童和婴儿常见实体肿瘤之一,发病率约 1/10 万,1~5 岁儿童多见<sup>[1]</sup>。其起源于神经嵴,可发生于交感神经系统的任何部位,早期即可发生转移,恶性程度极高<sup>[2]</sup>。尽管手术及联合辅助化疗不断改进,但神经

母细胞瘤患者预后仍不理想。癌细胞增殖过快是导致患者生存率低的重要原因。抑制肿瘤细胞增殖可作为抑制肿瘤进展、改善其预后的重要手段。目前,针对肿瘤细胞生长、凋亡、细胞周期的分子靶向治疗在肿瘤诊治中逐渐受到重视,寻找到合适的治疗靶点成为影响治疗效果的关键因素<sup>[3-5]</sup>。科学家发现某些肿瘤细胞与干细胞具有相似的生长调控机制,肿瘤细胞也存在等级现象,由此提出了肿瘤干细胞 (Tumor Stem Cell, TSC) 概念,也称之为癌症干细胞 (Cancer Stem Cell, CSC)<sup>[6]</sup>。2005 年, G. V. Glinsky 等<sup>[7]</sup>利用 mRNA 微集阵列 (microarray) 技术,对不同组织来源的肿瘤细胞进行分析,归纳出 11 个在多数细胞中普遍高表达的标记基因,包括 BMI-1、cyc-

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2015.06.011

基金项目: 哈尔滨市科技局科技创新人才研究专项基金后备人才项目资助,项目号:2014RFQJ124。

作者单位: 1, 哈尔滨市儿童医院普外二科 (黑龙江省哈尔滨市, 150010), 2, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院结直肠外科 (黑龙江省哈尔滨市, 150081), 3, 哈尔滨医科大学附属第二医院小儿外科 (黑龙江省哈尔滨市, 150086)。曲志博、刘家旭为本文并列第一作者,通讯作者: 李昭铸, 曲志博。E-mail: zhaozhu247@163.com, zhiboqu@126.com。

lin B1、FGFR-2、USP22、BUB1、HEC1、GBX2、Ankyrin3、RNF2、Mad2、Ki67 等。以上基因在肿瘤的发生进展中扮演着重要角色,不仅编码促使肿瘤生长的蛋白质,且表达程度与肿瘤转移的潜能、化疗耐药性及患者预后密切相关,被认为是肿瘤细胞的标记基因。USP22 是肿瘤干细胞成员之一,是一种新型去泛素化水解酶,是新近发现的胞内蛋白分子,通过去泛素化修饰组蛋白(H2A 及 H2B),间接影响染色质结构,从而调控众多基因的转录激活而发挥广泛的生物学功能,包括调控细胞周期、调节细胞生长发育以及调节端粒酶的活性等功能<sup>[8]</sup>。USP22 作为肿瘤干细胞信号成员,其所活化的基因可使肿瘤细胞更具侵袭性和转移性。其在直肠癌等消化道肿瘤细胞中呈高表达,且其表达程度与肿瘤转移潜能和患者预后密切相关<sup>[9,10]</sup>。但其在神经母细胞瘤中表达及其相关作用机制国内外鲜有报道。本研究通过观察 USP22 蛋白在神经母细胞瘤中的表达,探讨其在神经母细胞瘤发生发展过程中的作用。

## 材料与方法

### 一、标本来源

收集本院 2005 年 3 月至 2013 年 8 月经病理检查诊断为神经母细胞瘤的手术标本 68 例,其中男性 29 例,女性 39 例,年龄 36 天至 11 岁 8 个月,平均 $(4.2 \pm 2.17)$ 岁。按国际神经母细胞瘤分期系统(INSS)进行临床分期:I~II 期 27 例,平均年龄 $(2.46 \pm 1.98)$ 岁,术前均未接受化疗;III~IV 期 41 例,其中 18 例术前未接受化疗而直接手术,平均年龄 $(4.52 \pm 2.96)$ 岁;23 术前接受化疗,平均年龄 $(3.67 \pm 2.05)$ 岁,均为 III~IV 期肿瘤。按病理 Shima 分型,组织结构良好型(FH)36 例,组织结构不良型(UFH)32 例。术中切取直径约 1 cm 的肿瘤组织,同时取其瘤旁组织作为对照。本研究经本院伦理委员会批准,受试者家长均知情同意。

### 二、随访情况

以患儿死亡、2014 年 8 月 1 日或失访作为随访结果点。68 例中,失访 5 例,失访率 7.35%。

### 三、主要试剂及步骤

1. 兔抗人 USP22 多克隆抗体(美国 Abgent 公司),PV-6000 通用型二步法免疫组化检测试剂盒及 DAB 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司提供)。
2. 采用免疫组织化学方法进行神经母细胞瘤及瘤旁组织抗原检测。所有肿瘤组织及瘤旁组织标本均经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,连续 3~4 mm 切片。操作按 PV-6000 试剂盒完成,DAB 染色看试验结果。USP22 抗体的工作浓度为 1:250。

### 四、染色阳性标准

于光学显微镜下,任意挑选 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,由 2 名病理学专家双盲独立评分。Mucl 采用半定量积分法:癌细胞细胞核中无着色为 0 分,浅棕黄色为 1 分,中度棕黄色为 2 分,深棕黄色为 3 分;任意视野中阳性细胞数 0% 记为 0 分,<15% 记为 1 分,15%~50% 记为 2 分,>50% 则记为 3 分;二者之积为最后得分,0~2 分为低表达,2~4 分为中度表达,4~6 分为高表达。且设定 <1 分为阴性表达,>1 分为阳性表达。

### 五、统计学方法

应用 SPSS13.0 进行统计学分析,目的基因阳性率及相关性分析采用  $\chi^2$  检验分析,组间均数的比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为检验水准。

## 结果

### 一、USP22 在神经母细胞瘤中的表达

免疫组化结果显示 USP22 在小儿神经母细胞瘤中呈明显表达;USP22 蛋白表达主要定位于胞核,以胞核着色判断为阳性,细胞核呈棕色细颗粒状;而 USP22 在瘤旁组织中未见明显表达,瘤旁组织细胞核呈蓝染,见图 1。

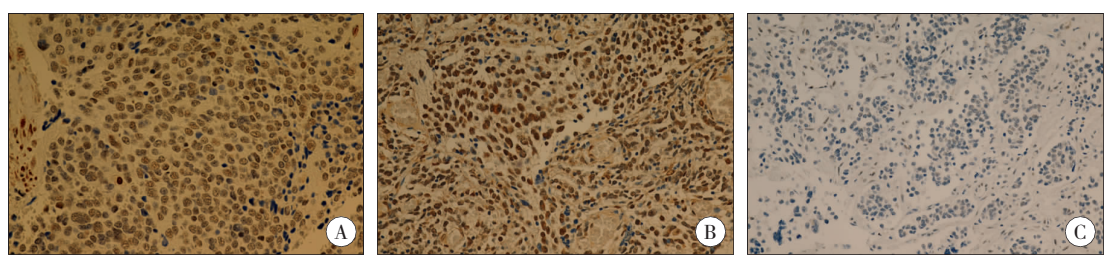


图 1 免疫组化 USP22 蛋白表达情况。A:USP22 在 I 期患儿中呈中高表达,神经母细胞瘤细胞核多呈浅棕黄色,SP  $\times 400$ ;B:USP22 在 IV 期患儿中呈高表达,神经母细胞瘤细胞核多呈深棕黄色,SP  $\times 400$ ;C:USP22 在神经母细胞瘤旁组织中无明显表达,瘤旁组织细胞核呈蓝染,SP  $\times 400$ 。

二、USP22 表达与神经母细胞瘤临床病理关系

USP22 在神经母细胞瘤中的表达水平与性别、年龄、大小、肿瘤部位、病理分型等参数无相关性 ( $P > 0.05$ ), 与肿瘤的临床分期相关, 高分期肿瘤 (Ⅲ ~ Ⅳ期) 中 USP22 的表达水平高于低分期肿瘤 (Ⅰ ~ Ⅱ期), 有淋巴结转移组的表达水平明显高于无淋巴结转移组 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 USP22 蛋白的表达与神经母细胞瘤各临床病理参数的关系

组别	例数	USP22 蛋白		阳性率	$\chi^2$	$P$ 值
		( + )	( - )			
性别						
男	29	17	12	60	0.38	>0.05
女	39	25	14	64		
年龄(岁)						
≥3	28	16	12	58	0.29	>0.05
<3	40	24	16	61		
肿瘤大小直径						
≥5 cm	37	21	16	57	0.11	>0.05
<5 cm	31	18	13	59		
肿瘤部位						
肾上腺	35	17	18	48	0.57	>0.05
腹膜后	28	15	13	55		
颈部	3	2	1	67		
胸腔及纵膈	2	1	1	50		
病理组织分型						
分化良好	38	18	20	46	0.218	>0.05
分化不良	30	16	14	51		
临床分期						
高分期组 (Ⅲ ~ Ⅳ期)	41	32	9	81	12.73	<0.05
低分期组 (Ⅰ ~ Ⅱ期)	27	9	18	34		
淋巴结转移						
无	20	7	13	38	8.27	<0.05
有	48	35	13	72		

讨 论

神经母细胞瘤为起源于原始神经嵴的胚胎性恶性肿瘤, 是儿童时期常见颅外实体瘤之一<sup>[1,11]</sup>。它具有起病隐匿、恶性程度高、进展迅速、易发生远处转移、治疗抵抗、复发率高等临床特点<sup>[2,12]</sup>。患者临床表现差异很大, 有的肿瘤成熟后可自然消退, 有的则呈恶性进展, 导致患儿治疗效果及预后不佳。目前, 其诱发因素及发病机制尚不十分明确, 是临床和实验室研究的热点和难点。

泛素蛋白酶体系统 (Ubiquitin proteasome system, UPS) 和去泛素化酶 (deubiquitinating enzymes, DUBS) 广泛存在于人体组织细胞中, 它们能识别并特异调节靶向底物蛋白的降解, 共同调节人体而参与基因转录、细胞增殖和凋亡、细胞周期进程、肿瘤生长等多项重要生理和病理过程<sup>[13]</sup>。USP22 是泛素特异性加工酶家族主要成员之一, 它是近年发现的 BMI-1 通路上的标记基因, 能够在体内或体外与泛素分子结合, 发挥其去泛素化的功能。在人类多种正常组织如心肌、肺脏和神经系统及生殖系统等中都有表达, 参与多项重要生理病理过程<sup>[14]</sup>。近年来在多种肿瘤组织细胞中检测出 USP22 高表达, 因而被称为新的肿瘤干细胞标志基因<sup>[15,16]</sup>。有研究表明 USP22 参与肿瘤细胞的增殖和凋亡、细胞周期、浸润和转移、复发等肿瘤发生发展过程, 是多种肿瘤发生发展的一个分子机制。其不仅高表达于肿瘤组织, 且与淋巴结转移、复发和远期的总生存率密切相关<sup>[17]</sup>。

本研究首先采用免疫组化方法检测神经母细胞瘤及瘤旁组织中的表达情况, 结果显示 USP22 在神经母细胞瘤组织中呈高表达, 而在瘤旁组织部表达; 结合临床资料分析发现 USP22 阳性表达率与临床指标有相关性, 其表达水平与患儿性别、年龄、肿瘤部位、大小、病理分型等参数无相关性。但在高分期的Ⅲ ~ Ⅳ期肿瘤, 其表达水平要比低分期的Ⅰ ~ Ⅱ期高, 且其在有淋巴结转移组的表达水平比无淋巴结转移组高。提示 USP22 的表达可能与神经母细胞瘤的发生发展相关, 这与其在大多数恶性肿瘤中的研究结果一致。其可能是一个新的潜在的基因治疗靶点。当然, 其具体机制有待我们在后续实验中进一步探讨, 从而为神经母细胞瘤的防治提供新的思路。

参 考 文 献

1 Castel V, Grau E, Noguera R, et al. Molecular biology of neuroblastoma[J]. Clin Transl Oncol, 2007, 9(8):478-483.

2 陈烁, 周春菊, 马晓莉, 等. 儿童神经母细胞瘤 ALK 基因及其表达的异常[J]. 中华病理学杂志, 2014, 43(8):541-545.

3 Kiyonari S, Kadomatsu K. Neuroblastoma models for insights into tumorigenesis and new therapies[J]. Expert Opin Drug Discov, 2014, 25:1-10.

4 邢莉莉, 吴晔明. MYCN 与神经母细胞瘤相关性研究进展[J]. 临床小儿外科杂志, 2014, 13(04):338-340.

- 5 张蛟,刘秋亮,高敬尧. DKK1 在儿童神经母细胞瘤组织中的表达及临床意义[J]. 临床小儿外科杂志,2015,14(5):388-390.
- 6 Liu N, Lu M, Tian X, et al. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells[J]. Journal of cellular physiology, 2007, 211(2): 279-286.
- 7 Xiong J, Che X, Li X, et al. Cloning and characterization of the human USP22 gene promoter[J]. PLoS One, 2012, 7(12):e52716.
- 8 Kapoor S. Usp22 and its evolving role in systemic carcinogenesis[J]. Lung Cancer, 2013, 79(2):191.
- 9 Liu YL, Yang YM, Xu H, et al. Aberrant expression of USP22 is associated with liver metastasis and poor prognosis of colorectal cancer[J]. J Surg Oncol, 2011, 103(3):283-289.
- 10 Liu YL, Yang YM, Xu H, et al. Increased expression of ubiquitin-specific protease 22 can promote cancer progression and predict therapy failure in human colorectal cancer[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2010, 25(11):1800-1805.
- 11 Sano H, Bonadio J, Gerbing RB, et al. International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(8):1113-1119.
- 12 Yang S, Zheng J, Xiao X, et al. SOX2 promotes tumorigenicity and inhibits the differentiation of I-type neuroblastoma cells[J]. Int J Oncol, 2014, 46(1):17.
- 13 Schrecengost RS, Dean JL, Goodwin JF, et al. USP22 regulates oncogenic signaling pathways to drive lethal cancer progression[J]. Cancer Res, 2014, 74(1):272-286.
- 14 Gao Y, Lin F, Xu P, et al. USP22 is a positive regulator of NFATc2 on promoting IL2 expression[J]. FEBS Lett, 2014, 588(6):878-83.
- 15 Li ZH, Yu Y, DU C, et al. RNA interference-mediated USP22 gene silencing promotes human brain glioma apoptosis and induces cell cycle arrest[J]. Oncol Lett, 2013, 5(4):1290-1294.
- 16 Wang H, Li YP, Chen JH, et al. Prognostic significance of USP22 as an oncogene in papillary thyroid carcinoma[J]. Tumour Biol, 2013, 34(3):1635-1639.
- 17 Piao S, Liu Y, Hu J, et al. USP22 is useful as a novel molecular marker for predicting disease progression and patient prognosis of oral squamous cell carcinoma[J]. PLoS One, 2012, 7(8):e42540.

(收稿日期:2015-03-10)

(上接第 491 页)

- 250-258.
- 10 Esmaili J, Izadyar S, Karegar I, et al. Biliary atresia in infants with prolonged cholestatic jaundice; diagnostic accuracy of hepatobiliary scintigraphy[J]. J Abdom Imaging, 2007, 32(2):243-247.
- 11 郑珊. 胆道闭锁的规范化诊断和治疗进展[J]. 临床小儿外科杂志, 2012, 11(04):241-243.
- 12 Okazaki T, Miyano G, Yamataka A, et al. Diagnostic laparoscopy assisted cholangiography in infants with prolonged jaundice[J]. Pediatr Surg Int, 2006, 22(2):140-143.
- 13 Tang ST, Li SW, Ying Y, et al. The evaluation of laparoscopy assisted cholangiography in the diagnosis of prolonged jaundice in infants[J]. J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 2009, 19(6):827-830.
- 14 Harada K, Isse K, Kamihira T, et al. Th1 cytokine-induced downregulation of PPARgamma in human biliary cells relates to cholangitis in primary biliary cirrhosis[J]. Hepatology, 2005, 41(6):1329-1338.
- 15 Escobar J, Pereda J, Arduini A, et al. Oxidative and nitrosative stress in acute pancreatitis modulation by pentoxifylline and oxypurinol[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(1):122-130.
- 16 Muratore CS, Harty MW, Papa EF, et al. Dexamethasone alters the hepatic inflammatory cellular profile without changes in matrix degradation during liver repair following biliary decompression[J]. J Surg Res, 2009, 156(2):231-239.
- 17 Shneider BL, Brown MB, Haber B, et al. A multicenter study of the outcome of biliary atresia in the United States, 1997 to 2000[J]. J Pediatr, 2006, 148(4):467-474.
- 18 Suzuki T, Hashimoto T. Evaluating patients' outcome post-Kasai operation; a 19-year experience with modification of the hepatic portoenterostomy and applying a novel steroid therapy regimen[J]. Pediatr Surg Int, 2010, 26(8):825-830.
- 19 Meyers RL, Book LS, O Gorman MA, et al. High-dose steroids, ursodeoxycholic acid, and chronic intravenous antibiotics improve bile flow after Kasai procedure in infants with biliary atresia[J]. J Pediatr Surg, 2003, 38(3):406-411.
- 20 Dillon PW, Owings E, Cilley R, et al. Immunosuppression as adjuvant therapy for biliary atresia[J]. J Pediatr Surg, 2001, 36(1):80-85.
- 21 Bartalena L, Marcocci C, Tanda ML, et al. An update on medical management of Graves' ophthalmopathy[J]. J Endocrinol Invest, 2005, 28(5):469-478.

(收稿日期:2015-12-11)