

子宫颈鳞状细胞癌组织中泛素特异性蛋白酶 4 和基质金属蛋白酶 2 的表达及意义

周林艳¹, 罗居东², 严菊芳², 万美珍²

(1. 常州市金坛区人民医院病理科, 江苏 常州 213200; 2. 常州市第四人民医院, 江苏 常州 213001)

摘要:目的 观察宫颈鳞状细胞癌及癌旁正常宫颈组织中泛素特异性蛋白酶 4(USP4)和基质金属蛋白酶 2(MMP2)的表达,探讨两者在宫颈鳞状细胞癌发生、发展中的作用及相关性,并分析两者与各临床病理因素的关系。方法 收集常州市金坛区人民医院病理科 2010 年 1 月至 2013 年 12 月 70 例宫颈鳞状细胞癌组织及癌旁组织,采用免疫组化检测 USP4 和 MMP2 的表达。结果 USP4 和 MMP2 在宫颈鳞状细胞癌中的表达率分别为 61.4%,44.3%,而在癌旁组织中的表达分别为 8.0%,4.3%。它们在有淋巴结转移的宫颈癌组织中表达率分别为 80.0%,90.7%,在无淋巴结转移的宫颈癌组织的表达分别为 47.5%,56.1%。在浸润深度 $\geq 1/2$ 间质的宫颈癌组织中的表达分别为 62.2%,83.8%,在 $< 1/2$ 间质的宫颈癌组织中的表达为 29.2%,37.5%,与淋巴结转移及浸润深度呈正相关($P < 0.05$),但与患者年龄、肿瘤大小、组织学分级无关($P > 0.05$)。且 USP4 和 MMP2 在宫颈鳞状细胞癌组织中的表达呈正相关($P < 0.05$)。结论 USP4 和 MMP2 表达可能与宫颈鳞状细胞癌的发生发展有关,可作为预后判断和治疗指导的参考指标之一。

关键词: 子宫颈肿瘤;鳞状细胞癌;泛素特异性蛋白酶 4;基质金属蛋白酶 2;免疫组织化学

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.11.031

Expression and clinical significance of USP4 and MMP2 in cervical squamous cell carcinoma tissues

ZHOU Linyan¹, LUO Judong², YAN Jufang², WAN Meizhen²

(1. Department of Pathology, Jintan People's Hospital, Changzhou, Jiangsu 213200, China;

2. The Fourth People's Hospital of Changzhou, Changzhou, Jiangsu 213001, China)

Abstract: Objective To evaluate the expressions of ubiquitin-specific protease 4 (USP4) and matrix metalloproteinases 2 (MMP2) in cervical squamous cell carcinoma tissues and normal cervical tissues, to discuss their relevance and roles in carcinogenesis and development of cervical squamous cell carcinoma, and to investigate their correlation with the clinicopathological features. Methods Immunohistochemical technique was used to detect the expression of USP4 and MMP2 in 70 cases of cervical squamous cell carcinoma tissues and normal cervical tissues collected from Jintan People's Hospital between January 2010 and December 2013. Results The expression rates of USP4 and MMP2 in the cervical squamous cell carcinoma tissues were 61.4%, 44.3%, and the expression rates were 8.0%, 4.3% in the normal cervical tissues. The expression rates of USP4 and MMP2 in the cervical squamous cell carcinoma tissues with lymph node metastasis were 80.0%, 90.7%, while the expression rates were 47.5%, 56.1% in those without lymph node metastasis. The expression rates were 62.2%, 83.8% in those cervical carcinoma tissues deeper than or equal to 1/2 interstitium, and the expression rates were 29.2%, 37.5% in those less than 1/2 interstitium. They were related to lymph node metastasis and the depth of invasion ($P < 0.05$), but not related to age, tumor size, and differentiation ($P > 0.05$). There was a positive correlation between USP4 and MMP2 in the cervical squamous cell carcinoma ($P < 0.05$). Conclusion The expressions of USP4 and MMP2 may contribute to the carcinogenesis and development of cervical squamous cell carcinoma, which could be a marker to evaluate prognosis and guide treatment.

Key words: Cervical neoplasm; Squamous cell carcinoma; Ubiquitin-specific protease 4; Matrix metalloproteinases 2; Immunohistochemistry

宫颈鳞状细胞癌是女性常见的恶性肿瘤之一,其浸润转移的恶性能力是全世界面临的共同问题之一。泛素特异性蛋白酶 4(USP4)是去泛素酶家族中泛素特异性修饰酶中的一个亚型,它在肿瘤中的机制尚不清楚。它是通过作用于目标蛋白参与肿瘤的发生发展。研究发现基质金属蛋白酶 2(MMP2)在诱导炎症细胞和刺激肿瘤细胞迁移方面

具有重要作用,是许多肿瘤浸润转移的重要机制^[1]。USP4 可以调节 MMP2 的表达从而参与宫颈鳞状细胞癌的浸润转移过程。本文旨在应用免疫组化 SP 法检测 USP4 和 MMP2 在宫颈鳞状细胞癌的表达,探讨其表达与宫颈鳞状细胞癌细胞浸润转移能力的关系,以及两者的相关性,为进一步探讨 USP4 参与宫颈鳞状细胞癌细胞浸润转移的机制提

供初步依据,并为肿瘤治疗提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集常州市金坛区人民医院病理科2010年1月至2013年12月的宫颈鳞状细胞癌标本70例,所有病例手术前均未行放化疗。患者年龄(59 ± 6)岁,年龄范围为32~81岁,病理分型均为鳞状细胞癌,其中低分化(组织学分级Ⅲ级)15例,高中分化(组织学分级Ⅰ+Ⅱ级)55例。浸润深度 $\geq 1/2$ 间质27例, $< 1/2$ 间质43例。淋巴结转移22例,未发现淋巴结转移48例。癌灶 ≥ 4 cm者19例, < 4 cm者51例。同时取相应的癌旁基本正常的子宫颈鳞状上皮作为对照。本研究经常州市金坛区人民医学伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。

1.2 方法 所有标本均经10%甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μ m连续切片后,在美国罗氏公司 BenchMarkXT全自动免疫组织化学染色机上进行染色。主要试剂鼠抗人 USP4 单克隆抗体、鼠抗人 MMP2 单克隆抗体均购自 Invitrogen 公司。稀释比例分别为1:500,1:200。以磷酸缓冲盐溶液(PBS)代替一抗作为阴性对照组,已知阳性片作为阳性对照。操作步骤均严格按照罗氏诊断优化程序进行。基本过程为:4 μ m切片脱蜡,3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活动,抗原修复,滴加10%正常山羊血清2滴封闭非特异染色后,顺序加一抗、二抗室温静置1 h后,二氨基联苯胺(DAB)染色,苏木精对比染色,常规脱水、透明、封片,光镜下观察结果。

1.3 结果判断

1.3.1 USP4 蛋白 在光学显微镜下观察每张切片选取5个高倍视野(10×40)计数细胞。阳性表达主要定位于肿瘤细胞的胞核内,少量定位于细胞质内。阳性结果采用双积分进行半定量判定,表达面积的百分比与染色强度的乘积为总分。以阳性细胞数占所计数的肿瘤细胞总数的百分比进行评分,其中 $< 5\%$ 为0分, $5\% \sim < 25\%$ 为1分, $25\% \sim < 50\%$ 为2分, $\geq 50\%$ 为3分。染色强度:无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。两者相乘时:0~2分为阴性,3~5分为+,6~9分为++,判定 < 3 分为阴性, ≥ 3 分为阳性^[2]。所有阅片均由两位经验丰富的病理医生独立完成,取平均值。

1.3.2 MMP2 蛋白 在光学显微镜下观察每张切片选取5个高倍视野(10×40)计数细胞。以细胞质内出现棕黄色颗粒沉着为阳性染色。阳性结果采用双积分进行半定量判定,表达面积的百分比与

染色强度的乘积为总分。染色强度:无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。染色面积:阳性细胞占计数的全部癌细胞百分率 $\leq 5\%$ 为0分, $> 5\% \sim 25\%$ 为1分, $> 25\% \sim 50\%$ 为2分, $> 50\% \sim 75\%$ 为3分, $> 75\%$ 为4分。将两者相乘: ≤ 4 分为阴性, > 4 分为阳性。

1.4 统计学方法 使用统计学软件 SPSS 12.0,计数资料组间比较及两者的相关性分析采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 USP4 蛋白、MMP2 蛋白在宫颈鳞状细胞癌中的表达 USP4 蛋白阳性表达主要定位于肿瘤细胞的胞核内,强阳性表达时在胞质内也有着色。在70例子宫颈鳞状细胞癌标本中43例呈阳性(61.4%),其中强阳性36例(图1A),弱阳性7例。在相应的70例癌旁正常鳞状上皮中阳性表达率为8.0%(6/70),多定位于细胞核上(图1B),均呈现弱阳性表达。两者表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。MMP2 蛋白阳性表达定位于肿瘤细胞的胞质内,同时在间质细胞中也有表达,包括成纤维细胞和血管内皮细胞等(图1C)。在宫颈鳞状细胞癌中阳性表达率为44.3%,在正常鳞状上皮中阳性表达率为4.3%,定位于胞质内(见图1D),均呈弱阳性表达。两者表达差异有统计学意义($P < 0.05$),具体数据见表1。

表1 宫颈鳞癌及正常组织中 USP4、MMP2 的表达/例(%)

组织类别	例数	USP4		MMP2	
		+	-	+	-
正常组织	70	6(8.6)	64(91.4)	3(4.3)	67(95.7)
宫颈鳞癌组织	70	43(61.4)	27(38.6)	31(44.3)	39(55.7)
χ^2 值		21.5		15.2	
P值		< 0.05		< 0.05	

2.2 子宫颈鳞状细胞癌中 USP4 与 MMP2 表达的相关性 70例宫颈鳞状细胞癌标本中,43例 USP4 表达阳性,其中25例 MMP2 同时表达阳性。39例 MMP2 表达阴性中,21例 USP4 同时表达阴性。两者表达呈正相关性,差异有统计学意义($\chi^2 = 8.67$, $P < 0.05$)。

2.3 子宫颈鳞状细胞癌中 USP4、MMP2 蛋白表达与临床病理因素的关系 USP4 表达与淋巴结转移、间质浸润深度呈正相关($P < 0.05$);MMP2 表达与淋巴结转移、间质浸润深度呈正相关($P < 0.05$),但均与患者年龄、肿瘤大小、组织学分级无关($P > 0.05$),具体数据见表2。

表2 USP4、MMP2与宫颈鳞癌临床病理参数的关系/例(%)

临床病理因素	例数	USP4 阳性表达	χ^2 值	P值	MMP2 阳性表达	χ^2 值	P值
年龄			0.0	>0.05		0.1	>0.05
<40岁	24	15(62.5)			10(70.5)		
≥40岁	46	28(60.9)			21(77.5)		
组织学分级			0.5	>0.05		0.6	>0.05
I+II	55	35(63.6)			23(76.0)		
III	15	8(53.3)			8(72.9)		
淋巴结转移			7.6	<0.05		9.3	<0.05
有	30	24(80.0)			7(90.7)		
无	40	19(47.5)			24(56.1)		
浸润深度			11.8	<0.05		16.1	<0.05
<1/2间质	39	16(29.2)			9(37.5)		
≥1/2间质	31	27(62.2)			22(83.8)		
肿瘤大小			0.0	>0.05		0.7	>0.05
≤4cm	51	31(64.7)			21(52.9)		
>4cm	19	12(58.0)			10(88.0)		

3 讨论

去泛素化酶是一大类数量众多的蛋白酶家族,不仅在正常细胞活动中发挥作用,也被证实与肿瘤的发生发展有关。目前,去泛素化酶通过作用下游蛋白影响肿瘤的发生发展,包括酶、转录因子、信号传导分子等,有的是癌基因或抑癌基因的产物^[3]。泛素特异性蛋白酶是去泛素化酶家族中种类最多且结构最具多样性的一个亚类,包括 USP1、USP2、USP3、USP4……USP54 和 CYLD 等^[4]。它们分别在多种肿瘤中表达和作用各异。USP4 作为癌基因在多种肿瘤中表达不同,有的肿瘤中呈高表达,如肝癌^[5]、黑色素瘤等,但在肺癌^[6]、头颈部鳞癌^[7]中呈低表达。与肿瘤相关的可能机制是影响一些关键癌基因的稳定性或调节与泛素化相关的信号通路^[8]。本研究检测了癌旁正常宫颈组织、宫颈鳞状细胞癌组织中 USP4 的表达。结果显示,USP4 在宫颈鳞状细胞癌组织中阳性表达率比癌旁组织显著增高,差异有统计学意义,提示 USP4 的高表达与宫颈鳞状细胞癌的发生密切相关。同时,实验检测到在伴有和不伴有淋巴结转移的宫颈鳞状细胞癌中 USP4 阳性率有明显差异,提示宫颈鳞状细胞癌中淋巴结转移与 USP4 高表达有相关性。本实验还检测发现浸润深度 ≥ 1/2 间质的宫颈鳞状细胞癌中 USP4 阳性率明显高于浸润深度 < 1/2 间质的宫颈鳞状细胞癌,表明检测 USP4 在宫颈鳞状细胞癌中的表达可以预测其淋巴结转移情况及其恶性程度,这为临床评估预后和制订治疗方案提供了新思路,有望提高患者生存率。实验初步认为 USP4 在宫颈鳞状细胞癌中的表达与患者年龄、肿瘤大小及组织学分级无关,进一步明确需要更多的实验完善。

对于 MMP2 在宫颈鳞状细胞癌中的表达及意

义已有一些研究,提示 MMP2 在宫颈鳞状细胞癌侵袭转移中起着重要作用,其高表达加强降解肿瘤细胞外基质成分,是宫颈鳞状细胞癌发生浸润转移的重要机制。本研究发现 MMP2 在癌旁正常宫颈鳞状上皮组织中显示阴性表达或微弱表达,而在宫颈鳞状细胞癌组织中表达明显上升,差异有统计学意义。且发现在宫颈鳞状细胞癌中,有淋巴结转移的比无淋巴结转移的 MMP2 阳性表达率明显增高。浸润深度 ≥ 1/2 间质的宫颈鳞状细胞癌中 MMP2 阳性表达率明显高于浸润深度 < 1/2 间质的宫颈鳞状细胞癌,提示正常细胞间连接存在稳定状态,而肿瘤细胞因为 MMP2 表达增强而加速细胞外基质的降解,从而促进肿瘤细胞之间的连接和间质的束缚,浸润转移能力增强。

本组宫颈鳞状细胞癌中,USP4 与 MMP2 蛋白表达呈正相关。提示 USP4 的高表达可能促进了 MMP2 的表达,因而增强了宫颈癌细胞浸润转移的能力。USP4 在肿瘤中的作用机制尚不清楚,有研究发现它可以激活肿瘤细胞的 Wnt/β-catenin 信号通路^[9]。Wnt/β-catenin 信号通路在不同类型的癌症中起着重要作用,它可调节 T 淋巴细胞、间充质干细胞和多种肿瘤细胞的 MMP 表达,包括 MMP2、MMP7,从而影响肿瘤细胞的迁徙和侵袭^[10]。我们的实验也初步显示 USP4 与 MMP2 表达的正相关性,由此可以初步推断,在子宫颈鳞状细胞癌中,USP4 蛋白可能通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路而加强 MMP2 蛋白的表达,从而增强癌细胞浸润转移的能力。近来也有研究^[11]发现 AKT 信号通路的磷酸化调节 USP4 的表达,而直接引起转化生长因子-β受体的去泛素化,促进乳腺癌细胞的迁移,我们将在进一步实验中研究在宫颈癌中 USP4 与 MMP2 之间的作用通路。

综上所述,联合检测 USP4 与 MMP2 的表达水平,探讨宫颈鳞状细胞癌发生发展中的关键分子的相互作用,有助于患者预后判断及治疗指导,为进一步研究宫颈鳞状细胞癌发生发展机制提供思路。

(本文图1见插图11-3)

参考文献

- [1] MOROZ A, DELELLA FK, LACORTE LM, et al. Fibronectin induces MMP2 expression in human prostate cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(4): 1319-1321.
- [2] PENG J, HU Q, LIU W, et al. USP9X expression correlates with tumor progression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Diagn Pathol, 2013, 8: 177.