

OTUD3 与 p53 在乳腺癌中表达及对 DNA 损伤应答的研究

蒲倩¹ 吕艳蓉² 高海东¹

¹ 山东大学齐鲁医院(青岛) 普通外科 (山东 青岛 266000)

² 山东大学齐鲁医院 乳腺外科 (山东 济南 250012)

【摘要】目的:研究去泛素化酶 OTUD3 与肿瘤抑制因子 p53 蛋白在乳腺癌组织中表达相关性以及对 DNA 损伤应答的意义。方法:免疫组化检测 80 对乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织中去泛素化酶 OTUD3 蛋白表达情况;Western Blot 检测其中 10 对新鲜组织标本中 OTUD3 与 p53 及其下游 p21 蛋白的表达;紫外线照射损伤乳腺癌 MCF7 细胞 DNA,并用 CHX 处理细胞,Western Blot 检测 OTUD3 与 p53 蛋白水平变化,在 ATM 野生型(ATM+/+)与 ATM 敲除(ATM-/-)细胞中重复 DNA 损伤实验,Western Blot 检测 OTUD3 与 p53 蛋白水平变化。结果:乳腺癌组织中 OTUD3 的阳性表达率(42.5%)显著低于癌旁正常组织阳性表达率(83.8%, $P<0.05$)。OTUD3 与 p53 在乳腺癌组织中表达低于癌旁组织,且两者表达一致。OTUD3 和 p53 能够响应 DNA 损伤并且 OTUD3 对损伤的应答可能与其泛素化酶活性有关。结论:OTUD3 是一个潜在的抑癌分子,其表达下降参与乳腺癌的发生,并且在 DNA 损伤情况下,OTUD3 可能通过去泛素化作用对 p53 蛋白产生影响。

【关键词】 乳腺癌;OTUD3;p53

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A doi:10.3969/j.issn.1009-9905.2019.04.006

【文章编号】 1009-9905(2019)04-0275-04

Expression of OTUD3 and p53 in breast cancer and its response to DNA damage

PU Qian¹, LV Yan-rong², GAO Hai-dong¹

¹Department of General Surgery, Qilu Hospital of Shandong University (Qingdao 266000, China)

²Department of Breast Surgery, Qilu Hospital of Shandong University (Jinan 250012, China)

【ABSTRACT】 Objective: To investigate the correlation between expression of deubiquitinase OTUD3 and tumor suppressor p53 protein in breast cancer (BC) tissues and its response to DNA dam-

【基金项目】国家自然科学基金资助项目(81572587);山东省重点研发计划(公益类专项)项目(2017GSF18114)

【作者简介】 蒲倩(1986-05~),女,山东淄博人,博士研究生,研究方向:乳腺肿瘤。E-mail:angeljogging@163.com

【通讯作者】 高海东(1973-06~),男,山东济南人,博士,主任医师。研究方向:乳腺肿瘤。E-mail:15806661668@163.com

age. **Methods:** Immunohistochemistry was used to detect the expression of OTUD3 in 80 pairs of BC tissues and the adjacent normal tissues. Western Blot was used to detect the expressions of OTUD3, p53 and its downstream p21 protein in 10 pairs of fresh tissue samples. Breast cancer MCF7 cells were damaged by Ultraviolet irradiation, and were treated with CHX. The changes of OTUD3 and p53 protein levels were detected by Western Blot. Repeated DNA damage experiments were performed in ATM wild-type (ATM+/+) and ATM-/- (ATM-/-) cells, and changes in OTUD3 and p53 protein levels were detected by Western Blot. **Results:** The positive expression rate of OTUD3 in BC tissues (42.5%) was significantly lower than the adjacent normal tissues (83.8%, $P<0.05$). OTUD3 and p53 expressed less in BC tissues than in adjacent tissues, and they were positively correlated. OTUD3 and p53 can respond to DNA damage and the response of OTUD3 to damage may be related to its ubiquitin enzyme activity. **Conclusion:** OTUD3 is a potential tumor suppressor molecule, and its decreased expression is involved in the occurrence of breast cancer. In the case of DNA damage, OTUD3 may affect p53 protein through deubiquitination.

[KEY WORDS] Breast cancer · OTUD3 · p53

乳腺癌是全球女性癌症患者死亡的主要原因^[1]。核受体/转录因子信号通路异常,如雌激素受体 α (ER α /ESR1),肿瘤抑制蛋白 p53 (p53/TP53) 和核转录因子 κ B (NF κ B),在乳腺癌的发病机制中起着重要的作用,而大约 70% 的乳腺癌存在野生型 p53^[2]。目前研究也认为, p53 调控环路及其自身稳定性的调控是肿瘤形成机制中的重要事件^[3]。当应对 DNA 损伤、致癌基因激活和缺氧反应时, p53 便会经历一系列的翻译后修饰,如磷酸化、乙酰化、泛素化等^[4]。尽管研究热点多集中在泛素连接酶对 p53 的泛素化调节作用^[5],但是有学者逐渐对 p53 相关去泛素化调控展开研究。本实验首次发现去泛素酶 OTUD3 在乳腺癌组织中的表达下降,不仅与 p53 表达有正相关性,而且能够共同应对 DNA 损伤应答。提示 OTUD3 可能作为一个抑癌因子在乳腺癌发生中发挥作用,并且可能是 p53 调控环路中的一个重要因子。

1 资料和方法

1.1 一般资料 收集 2017 年 1 月—2018 年 12 月山东大学齐鲁医院(青岛)普外科行乳腺癌改良根治术的 80 对标本(包括癌组织和距离癌灶 5 cm 以上的癌旁组织),所有患者术前均未接受任何形式的放化疗。肿瘤组织均经病理诊断为乳腺浸润性导管癌,所取癌旁乳腺组织经病理诊断证实均未检测到癌细胞。

1.2 细胞 人乳腺癌 MCF-7 细胞株在含 10% 体积胎牛血清、100 μ g/mL 双抗(青霉素、链霉素)的 DMEM 中培养。

1.3 试剂 OTUD3 免疫组化抗体、Flag 单克隆抗体购自 Sigma 公司; Western Blot 用野生型 p53 抗体、抗 21 抗体、抗 BAX 抗体和 OTUD3 抗体购自

Abcam 公司。

1.4 免疫组织化学法检测去泛素化酶 OTUD3 蛋白表达 采用双盲法请病理科医生进行评分(无染色=0 分,轻微染色=1 分,中度染色=2 分,重度染色=3 分),0 分及 1 分被判读为阴性,2 分及 3 分被判读为阳性。

1.5 Western blot 检测新鲜组织中 OTUD3 和 p53 蛋白表达水平 分别取 10 对乳腺癌组织及癌旁组织新鲜标本,加入 RIPA (Sigma, USA) 裂解并检测蛋白浓度,将蛋白样品(总量 20 μ g/mL)加入到凝胶中进行电泳和转膜,分别加入一抗 OTUD3、p53 和 p21、二抗进行孵育,曝光显影。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件。计量资料以率表示,采用卡方检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

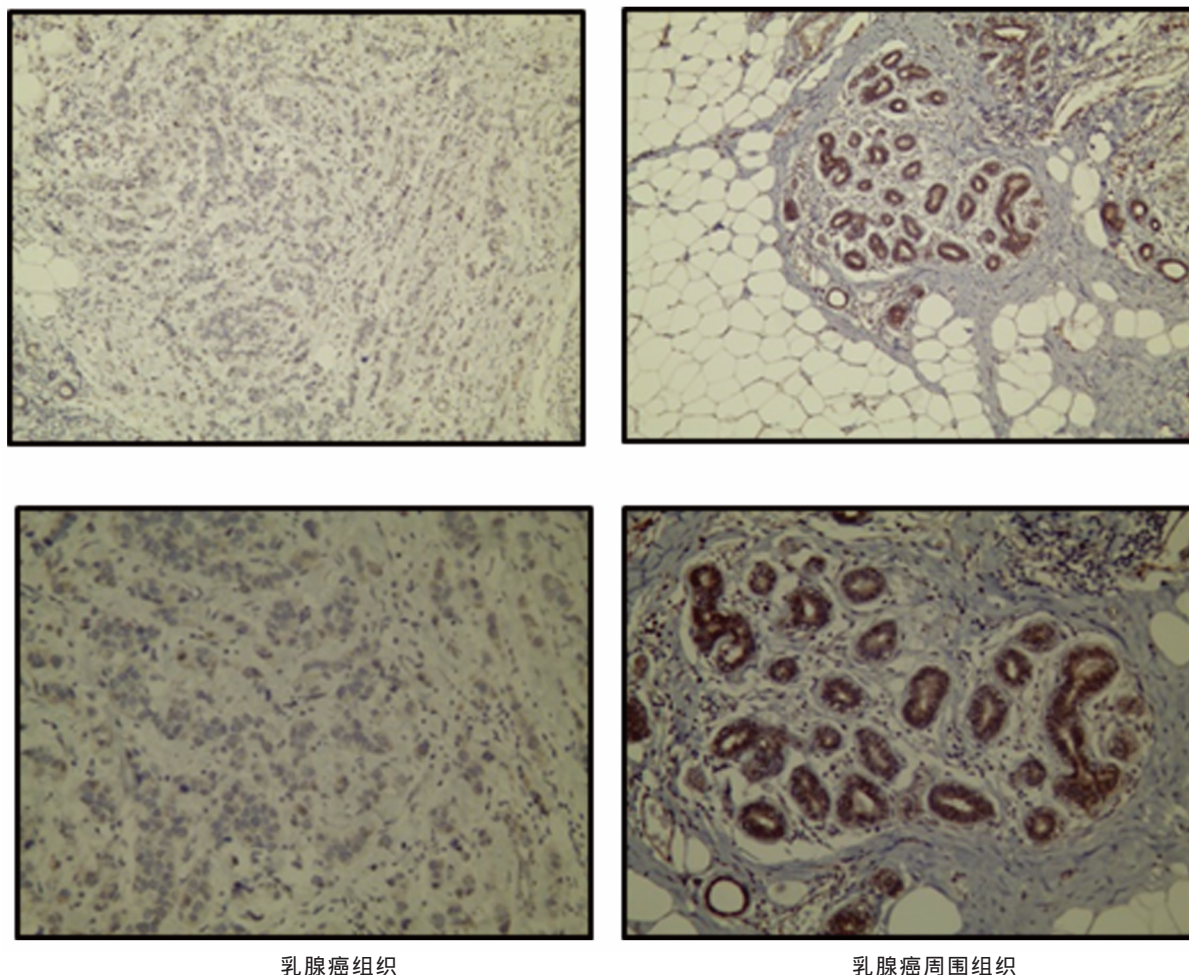
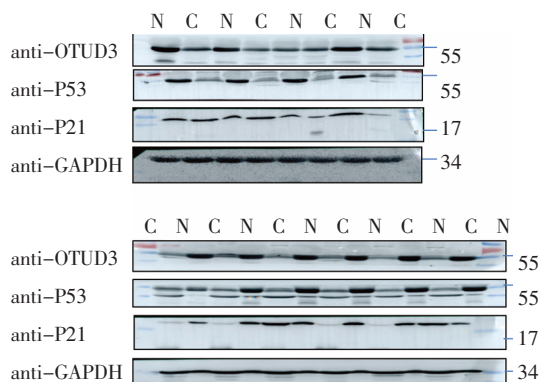
2 结果

2.1 乳腺癌组织中 OTUD3 蛋白表达低 通过免疫组织化学检测可知 OTUD3 在乳腺癌组织及对应乳腺癌周围组织中的阳性表达率分别为 42.5% 和 83.8%,提示与乳腺癌周围组织相比,癌组织中 OTUD3 蛋白表达显著降低($\chi^2_{\text{otud3}}=29.24$, $P<0.05$,表 1,图 1)。

表 1 OTUD3 蛋白在乳腺癌标本中的表达

观察对象	例数	OTUD3 阳性表达	
		例	率(%)
乳腺癌组织	80	34	42.5
乳腺癌周围组织	80	67	83.8

2.2 OTUD3 与 p53 在新鲜乳腺癌组织标本及癌旁正常组织标本中均有表达 但是在癌组织中的表达低于癌旁正常乳腺组织;p53 下游 p21 蛋白也有同样趋势,三者的表达一致。见图 2。

图1 OTUD3 在乳腺癌组织及癌旁组织中免疫组化染色(上: $\times 100$,下: $\times 200$)图2 OTUD3 与 P53 在乳腺癌及癌旁正常组织中的表达
新鲜组织标本裂解后提取组织蛋白,行 Western Blot 检测,提示 OTUD3 与 P53 及 P21 在癌旁组织中表达均低于癌旁组织,表达一致

2.3 (A)紫外线照射损伤 MCF7 细胞 DNA,OTUD3 和 p53 的蛋白水平均出现升高;(B)紫外线照射 MCF7 细胞 1h 后加入蛋白合成抑制剂己酰亚胺(cycloheximide,CHX)处理细胞,相比停止紫外线照射组,紫外线继续照射组细胞内 OTUD3 半衰期显著延长,提示 OTUD3 能够响应紫外线照射引起的 DNA 损伤;(C)在 MCF 细胞中分别过表达 OTUD3 或酶活突变体 OTUD3C76A,紫外线照射细胞,过表

达 OTUD3 的 MCF 细胞中 OTUD3、p53、p21 及 BAX 水平逐渐升高,但过表达 OTUD3C76A 的细胞中,OTUD3C76A 蛋白水平却显著下降,p53、p21 及 BAX 水平也明显下调,提示 OTUD3 对 DNA 损伤的应答与其去泛素化酶活性密切相关。见图 3。

3 讨论

蛋白质的泛素化过程可以通过去泛素化逆转,人类基因组编码大约 100 个去泛素酶(deubiquitinating enzymes,DUBs)且被分成六大家族^[6],包括:ubiquitin-specific proteases (USPs),ubiquitin carboxy-terminal hydrolases (UCHs),ovarian tumor proteases (OTUs),Machado-Joseph disease protein domain proteases (MJDs),JAMM/MPN domain-associated metalloproteases (JAMMs),和 monocyte chemo-tactic protein-induced protein (MCPIP) 家族;p53 相关去泛素化酶的研究始于 USP 家族,USP7 (HAUSP)^[7]是第一个发现通过去泛素化稳定 p53 的 USPs,不过 USP7 也可以稳定 p53 的泛素连接酶 Mdm2^[8]。USP10 在结肠癌细胞中可以去泛素化 p53 并增强其稳定性,但是在乳腺癌组织中表达不明确^[9],

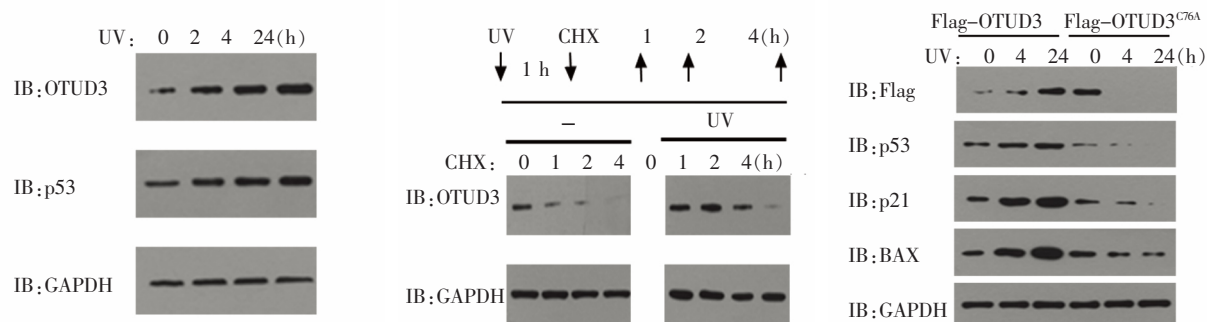


图3 OTUD3 与 P53 响应 DNA 损伤应答

紫外线照射 MCF7 细胞后,OTUD3 及 P53 蛋白水平均升高;OTUD3 能够响应紫外线照射引起的 DNA 损伤,OTUD3 及 P53 对 DNA 损伤应答与其去泛素化酶活性密切相关

OTUD1 是第一个被研究的 OTU 家族成员^[10],并被证实可以抑制人肺癌细胞增殖。笔者前期实验证明 OTUD3 能够去除 PTEN 泛素化并稳定 PTEN^[11]。该实验利用乳腺癌临床样本分析了 OTUD3 在肿瘤组织及癌旁组织中表达有差异,提示 OTUD3 水平下降与乳腺癌发生相关。

野生型 p53 蛋白半衰期非常短,各相关实验免疫组化检测的 p53 蛋白是突变型 p53 蛋白^[12]。因此,本实验选择用 Western Blot 来检测新鲜组织标本中 p53 的表达,同时 OTUD3 及 p21 的表达一并检测。实验结果首次证明 OTUD3 与 p53 在乳腺癌及癌旁正常组织中均有表达,并且两者乳腺癌组织中的表达低于癌旁组织,两者表达一致,提示 OTUD3 与 p53 两者之间存在重要关联。

p53 蛋白在正常条件下,其稳定性受到严格调控;当细胞遭遇不利信号刺激如 DNA 损伤时,p53 会被激活。笔者发现,乳腺癌 MCF7 细胞受到紫外线伤害导致 DNA 损伤后,p53 蛋白质含量增加;同时,OTUD3 蛋白水平也出现了类似的升高(图 3A)。由于大多数 DNA 损伤信号被认为是发生在细胞核中,这些结果表明,DNA 损伤引起的 p53 上调不仅在转录水平上受到调控,而且可能在翻译后水平上受到调控,推测 p53 仍有积极核输出并在细胞质中被降解,OTUD3 作为主要胞质蛋白,可能通过稳定 p53 来参与对 DNA 损伤应答的反应。并且,OTUD3 在辐照细胞中的积累是由于稳定性的不断增强(图 3B)。笔者进一步建立过表达 OTUD3 或其酶活性突变体 OTUD3C76A 稳定细胞。如图 3C 所示,功能失活的 OTUD3C76A 突变体重建的细胞在 DNA 损伤后 p53 稳定不佳,对 p53 靶蛋白 BAX 和 p21 的诱导能力较差;而功能过表达 OTUD3 的 MCF7 细胞在 DNA 损伤后表现出 p53 稳定性增强,并能强烈诱导 p21 和 BAX 的表达。该结果表明,OTUD3 对 DNA 损

伤的反应与其去泛素化活性密切相关。

综上所述,本实验的结果提示 OTUD3 可能是一个抑癌因子,与乳腺癌发生密切相关,OTUD3 与 p53 在乳腺癌中表达有一定相关性;细胞实验表明 OTUD3 可能通过稳定 p53 来响应紫外线照射引起的 DNA 损伤,在此过程中,其去泛素化酶活性发挥着重要作用。本研究结果可以为 OTUD3 与 p53 在乳腺癌发生发展中的作用和相互关系提供实验依据,具有重要的参考价值。

参 考 文 献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Zhu J, Zhao C, Zhuang T, et al. RING finger protein 31 promotes p53 degradation in breast cancer cells [J]. Oncogene, 2016, 35(1): 1955-1964.
- [3] Niazi S, Purohit M, Niazi JH, et al. Role of p53 circuitry in tumorigenesis: A brief review[J]. Eur J Med Chem, 2018, 158(10): 7-24.
- [4] Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination[J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(5): 937-953.
- [5] Lee JT, Gu W. The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(1): 86-92.
- [6] Xiao Z, Zhang P, Ma L. The role of deubiquitinases in breast cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2016, 35(4): 589-600.
- [7] 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.
- [8] Li M, Brooks CL, Kon N, et al. A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway[J]. Mol Cell, 2004, 13(6): 879-886.
- [9] Yuan J, Luo K, Zhang L, et al. USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53[J]. Cell, 2010, 140(3): 384-396.
- [10] Sun XX, Challagundla KB, Dai MS. Positive regulation of p53 stability and activity by the deubiquitinating enzyme Otubain 1 [J]. EMBO J, 2012, 31(3): 576-592.
- [11] Yuan L, Lv YR, Li HC, et al. Deubiquitylase OTUD3 regulates PTEN stability and suppresses tumorigenesis [J]. Nat Cell Biol,

2015, 17(9): 1169-1181.

[12] Joypaul BV, Newman EL, Hopwood D, et al. Expression of p53 protein in normal, dysplastic, and malignant gastric mucosa: an

immunohistochemical study[J]. J Pathol, 1993, 170(3): 279-283.

(收稿日期:2019-02-22)

(本文编辑:刘毅;技术编辑:张珂)

【文章编号】1009-9905(2019)04-0279-01

doi:10.3969/j.issn.1009-9905.2019.04.007

腹腔镜脾切除加贲门周围血管离断术治疗门静脉高压症 9 例

王连武¹ 刘海燕² 赵艳丽² 刘修元² 田洪斌¹ 杨玉素¹¹贵州省交通医院 普通外科 (贵州 贵阳 550001)²徐州市矿山医院 普通外科 (江苏 徐州 221151)

我院2015年1月—2018年4月为9例有上消化道出血史、脾功能亢进的肝硬化门静脉高压症患者施行腹腔镜脾切除加贲门周围血管离断术,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 男8例,女1例,年龄39~74岁;1例为酒精性肝硬化,其余均为乙型肝炎后肝硬化,且有消化道出血病史。术前影像学检查脾脏平均18 cm×8.5 cm。肝功能评估为Child A级3例,B级6例。术前予保肝、纠正贫血、纠正低蛋白血症、消除腹水、补充维生素K等治疗。

1.2 手术方法 患者取人字位。Trocarr分别置于脐部上缘、左右锁骨中线肋缘下、左右锁骨中线与脐平线上5 cm交界处。脐部Trocarr建立气腹,压力13 mmHg。根据脾脏大小及手术需要调整Trocarr位置及变换主操作孔。手术方法及切除顺序:(1)脾切除术。超声刀自幽门下方向胃近端游离切断胃结肠韧带、脾胃韧带和胃短血管,在胰腺体尾上缘显露脾动脉主干,用7号丝线结扎或Hemolock夹闭合脾动脉,可不必切断。从脾脏下极用超声刀游离脾周粘连,离断脾结肠韧带、脾胃韧带、脾肾韧带,显露脾蒂,将脾脏托起,在脾门处自下而上逐支分离脾蒂血管分支,用Hemolock夹闭合后离断,最后处理脾胃韧带上部及脾膈韧带,或完全游离脾周韧带后用腹腔镜直线切割闭合器离断脾蒂。将游离的脾脏置入标本袋暂时放置于盆腔,待手术结束时经左上腹主操作孔碎脾后取出。(2)贲门周围血管离断术。超声刀游离显露出胃左动脉,用Hemolock夹闭胃左动脉后离断,紧贴胃壁向近端逐步离断胃底、胃后血管和食管支,打开贲门前方浆膜,沿食管向上游离6~8 cm,离断高位食管支以及食管周围可见的曲张静脉。

2 结果

9例手术均获得成功,手术时间120~240 min,平均(143.2±20.8)min,术中出血量100~1000 mL,平均(212.5±130.2)mL。手术前后肝功能差异无统计学意义;血小板术前(79.0±15.25)×10⁹/L,术后(228.0±80.5)×10⁹/L;住院时间15~33 d,平均(22.11±8.16) d。术后随访2~72月,无一例发生再出血,无其他并发症发生。

3 讨论

肝硬化门静脉高压患者腹腔镜手术难度较大。防止静脉曲张出血是手术成功的关键。脾组织较脆易碎,巨脾操作空间有限也是造成操作中易出血的原因^[1],因此要求术者腔镜操作娴熟,耐心细致。对于肝功能障碍、凝血机制异常者,术前应尽可能纠正,血小板低于30×10⁹/L的患者手术当天补充血小板^[2]。如果脾脏巨大,脾门亦较宽,可采用次级脾蒂离断法,分别结扎切断。处理脾蒂时,应紧贴脾脏包膜,尽量锐性分离。离断脾蒂时要根据脾蒂厚度及宽度选择合适的钉仓,一般选用白钉或蓝钉,也可选用多排不同钉脚长度的棕钉或紫钉^[3]。预防术后上消化道再出血的关键是彻底离断贲门周围血管,特别是高位食管支和左膈下静脉。在解剖离断高位食管分支时,沿贲门右侧食管下段后方上行,分离至贲门上6~8 cm,避免遗漏少数深在且位置隐蔽的异位食管支。

腹腔大量积液、不明原因发热、肺部感染、门静脉血栓形成、左膈下感染、切口感染、肝衰竭等术后并发症的发生主要与低蛋白血症、凝血功能障碍、机体免疫力低下、术后血小板升高及门静脉系统血流动力学异常等有关^[4]。本组病例术前给予护肝治疗、纠正低蛋白血症、输血,术后给予预防血栓形成治疗,9例患者均未发生以上相关并发症。

参 考 文 献

- [1] 白剑峰,孙跃明,陆文熊,等.完全腹腔镜脾切除加门奇静脉断流术治疗门静脉高压症[J].腹腔镜外科杂志,2008,13(4):274-276.
- [2] 温治强,宋越,张耀明,等.腹腔镜脾切除联合贲门周围血管离断术治疗肝硬化门静脉高压症[J].腹腔镜外科杂志,2016,21(5):369-372.
- [3] 王跃东.腹腔镜脾切除术的临床应用[J].腹腔镜外科杂志,2010,15(9):641-643.
- [4] 张爱军,王忆勤,姚俊,等.腹腔镜脾切除术治疗门静脉高压术后并发症及相关因素分析[J].腹部外科杂志,2016,29(6):448-451.

(收稿日期:2018-07-05)

(本文编辑:毕轶;技术编辑:张珂)