

论著·临床研究

ISG15 蛋白在原发性肝细胞癌中表达及其对预后的影响^{*}黄丽芳, 宋建华, 韦翠容, 林子芹, 杨达平, 粟连秀[△]

(贵港市人民医院病理科, 广西 贵港 537100)

[摘要] **目的** 探讨干扰素刺激基因 15(ISG15)蛋白在原发性肝细胞癌(HCC)中的表达水平及其临床预后价值。**方法** 选取 2018 年 1 月至 2020 年 10 月该院经术后病理确诊的 HCC 患者 100 例,根据 ISG15 蛋白表达水平将其分为低表达组和高表达组。比较不同临床特征患者 ISG15 蛋白表达水平,分析不同 ISG15 蛋白表达水平患者生存情况。**结果** 癌组织及癌旁组织中 ISG15 蛋白表达水平分别为 (5.00 ± 1.69) 、 (3.78 ± 1.22) ,二者比较,差异有统计学意义($t=5.766, P<0.001$)。不同肿瘤大小、HBV-DNA 拷贝数及分化程度患者 ISG15 蛋白表达水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。低表达组中位生存期为 40.5 个月,生存率为 70.83%,高表达组中位生存期为 33.0 个月,生存率为 24.39%,二者比较,差异有统计学意义($\chi^2=9.980, P=0.0016$)。**结论** ISG15 蛋白在 HCC 癌组织中高表达,其在抑制肿瘤细胞生长、抵抗 HBV 病毒复制、抑制癌细胞分化过程中具有相关作用。ISG15 蛋白表达与临床预后相关,低表达者生存期更长。

[关键词] 原发性肝细胞癌; 干扰素刺激基因 15; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.02.007

中图法分类号:R365;R736.7

文章编号:1009-5519(2024)02-0209-04

文献标识码:A

Expression of ISG15 protein in primary hepatocellular carcinoma and its prognostic impact^{*}HUANG Lifang, SONG Jianhua, WEI Cuirong, LIN Ziqin, YANG Daping, SU Lianxiu[△]

(Department of Pathology, Guigang City People's Hospital, Guigang, Guangxi 537100, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression level and clinical prognostic value of interferon stimulated gene 15(ISG15) protein in primary hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** A total of 100 HCC patients confirmed by postoperative pathology in the hospital from January 2018 to October 2020 were selected, and divided into the low expression group and the high expression group based on the ISG15 protein expression level. The expression levels of ISG15 protein in patients with different clinical characteristics were compared, and the survival status of patients with different levels of ISG15 protein expression were analyzed. **Results** The expression levels of ISG15 protein in cancer tissue and adjacent tissues were (5.00 ± 1.69) and (3.78 ± 1.22) , respectively, and the difference between the two tissue was statistically significant($t=5.766, P<0.001$). There was statistically significant difference in the expression level of ISG15 protein among patients with different tumor sizes, HBV-DNA copy numbers, and differentiation levels($P<0.05$). The median survival time of the low expression group was 40.5 months, with a survival rate of 70.83%, while the median survival time of the high expression group was 33.0 months, with a survival rate of 24.39%. The difference between the two groups was statistically significant($\chi^2=9.980, P=0.0016$). **Conclusion** ISG15 protein is highly expressed in HCC cancer tissue and plays a related role in inhibiting tumor cell growth, resisting HBV virus replication, and inhibiting cancer cell differentiation. The expression of ISG15 protein is related to clinical prognosis, and those with low expression have a longer survival period.

[Key words] Primary hepatocellular carcinoma; Interferon stimulated gene 15; Prognosis

原发性肝癌是临床常见的恶性肿瘤之一,其中又以原发性肝细胞癌(HCC)的发生率最高,其发病机制较为复杂、预后效果差、易反复发作及转移。干扰素刺激基因 15(ISG15)蛋白是最早被鉴定出来的泛素

样蛋白(UBL)^[1],其是 ISG15 编码的小分子蛋白质,经 I 型干扰素诱导后强表达。ISG15 蛋白与细胞底物结合形成的蛋白复合物显示出抗病毒和抗菌活性,能够在免疫功能中发挥出重要的作用^[2-3]。研究发

* 基金项目:广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z20210848)。

作者简介:黄丽芳(1990—),硕士研究生,主管技师,主要从事肝细胞癌相关机制研究。△ 通信作者, E-mail:1281428389@qq.com。

现,ISG15 蛋白在多种肿瘤组织中均存在高表达^[4-5],且 ISG15 蛋白高表达与肿瘤预后不良相关,但其与 HCC 的相关性研究较少见。本研究探讨了 ISG15 蛋白在 HCC 中的表达情况及其与临床预后的相关性,旨在给 HCC 治疗新靶点及预后判断带来新选择。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 1 月至 2020 年 10 月本院经术后病理确诊的 HCC 患者 100 例,其中男女比例为 9 : 1,年龄 29~75 岁,平均(50.7±11.9)岁。纳入标准:术前均未接受靶向治疗和免疫治疗等相关的抗肿瘤治疗。排除标准:HCC 合并其他肿瘤。本研究经院医学伦理委员会批准(GYYXLL-20210618-08)。

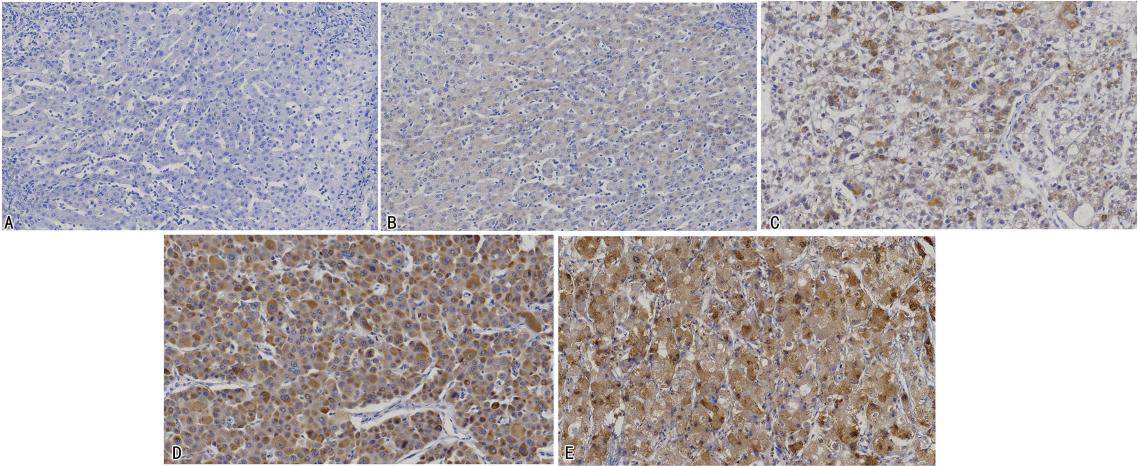
1.2 方法 病理诊断由 2 位病理医生分开阅片,收集患者基本信息及相关临床资料,如肿物(含癌组织和癌旁组织)大小、甲胎蛋白(AFP)水平、乙型肝炎病毒(HBV)-DNA 拷贝数、分化程度等。采用免疫组织化学法检测 ISG15 蛋白在癌组织和癌旁组织中表达水平,阳性对照采用说明书推荐的结直肠癌石蜡组织标本,阴性对照采用磷酸盐缓冲液代替一抗。参考

Axiotis 评分标准,整体细胞阳性程度:淡染或无染色记 0 分,一般黄染记 1 分,中等强度黄染记 2 分,棕黄色或棕褐色记 3 分。阳性细胞数占比依次为小于或等于 10%、>10%~25%、>25%~50%、>50%~75%、>75%,分别记为 0、1、2、3、4 分。将 2 项分数相加作为最终得分,其中 5~7、3~4、1~2、0 分依次定义为强阳性(3+)、阳性(2+)、弱阳性(+)、阴性(-)。门诊或电话进行随访,对术后 3 年患者进行生存分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 或中位数表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以率或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。采用 GraphPad Prism8.0 软件绘制生存曲线图。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 癌组织和癌旁组织中 ISG15 蛋白表达水平比较 癌组织及癌旁组织中 ISG15 蛋白表达水平分别为(5.00±1.69)、(3.78±1.22),二者比较,差异有统计学意义(*t* = 5.766, *P* < 0.001)。病理图见图 1。



注:ISG15 蛋白表达定位在肝细胞的胞浆和胞核,在癌旁组织中呈阴性表达(A),在癌旁组织中呈弱阳性表达(B),在癌组织中呈阳性表达(C),在癌组织中呈强阳性表达(D、E)。

图 1 病理图(400×)

2.2 不同临床特征患者 ISG15 蛋白表达水平比较 不同肿物大小、HBV-DNA 拷贝数及分化程度患者 ISG15 蛋白表达水平比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 1。

2.3 不同 ISG15 蛋白表达水平患者生存期分析 术后 3 年随访 70 例患者,其中存活 27 例、死亡 38 例、失联 5 例。总生存期为 6.0~61.0 个月,中位生存期为 38.0 个月。癌组织中,ISG15 蛋白表达中位数值为 5.5(<5.5 为低表达组,>5.5 为高表达组)。低表达组(24 例)中位生存期为 40.5 个月,生存率为 70.83%,高表达组(41 例)中位生存期为 33.0 个月,生存率为 24.39%。2 组生存率比较,差异有统计学

意义(χ^2 = 9.980, *P* = 0.001 6)。见图 2。

表 1 不同临床特征患者 ISG15 蛋白表达水平比较 (n, n = 100)

项目	n	ISG15 蛋白		χ^2	P
		-/+	≥2+		
性别				0.006	0.939
男	90	24	66		
女	10	2	8		
年龄(岁)				0.024	0.878
≤60	78	20	58		
>60	22	6	16		

续表 1 不同临床特征患者 ISG15 蛋白表达水平比较
(n,n=100)

项目	n	ISG15 蛋白		χ^2	P
		-/+	≥2+		
肿物大小(cm)				4.261	0.039
<3	27	3	24		
≥3	73	23	50		
AFP(ng/mL)				1.907	0.167
<400	72	16	56		
≥400	28	10	18		
HBV-DNA 拷贝数(IU/mL)				6.221	0.013
<100	31	3	28		
≥100	69	23	46		
分化程度				4.005	0.045
低分化	31	4	27		
中、高分化	69	22	47		
脉管内癌栓				0.592	0.442
有	59	17	42		
无	41	9	32		
微血管浸润分级				1.613	0.204
M0 级	53	11	42		
M1~M2 级	47	15	32		
微卫星瘤灶				0.000	1.000
有	12	3	9		
无	88	23	65		

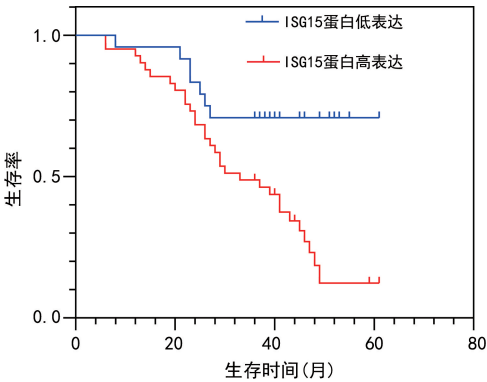


图 2 总生存期分析

3 讨 论

HCC 是常见癌症之一,其中超过 90% 的患者感染了 HBV^[6]。目前,HCC 仍以手术治疗为主,但术后复发率高、预后较差,放疗、化疗效果有限且有不良反应。因此,研究新型有效药物对 HCC 的治疗具有重要意义。ISG15 是干扰素刺激基因家族成员之一,其编码的小分子蛋白是免疫系统的关键效应分子。在生理条件下,成纤维细胞、单核细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和浆细胞均可分泌少量 ISG15 蛋白。ISG15 蛋白由 2 个泛素样小亚基通过特殊折叠链接形成,其

发挥生物学功能需要从无活性的蛋白前体变成有活性的成熟蛋白体。ISG15 蛋白由 I 型干扰素和脂多糖诱导,对多种病毒具有直接或间接抗病毒活性,主要通过抑制病毒核酸复制、影响病毒蛋白修饰和加工及释放而发挥抗病毒作用。在免疫调节活动中也发挥多种作用,包括诱导自然杀伤细胞增殖和树突状细胞成熟,触发 T 细胞反应,增强淋巴因子激活的杀伤细胞活性,趋化中性粒细胞^[7]。另外,ISG15 蛋白可通过刺激 γ -干扰素发挥抗肿瘤作用及对某些蛋白共价修饰表现出促癌作用^[8]。ISG15 蛋白以游离形式和(或)与其他蛋白质结合的形式存在,ISG15 蛋白修饰(ISGylation)通过酶级联发生,ISG15 蛋白可通过修饰作用进而调节致病蛋白和宿主蛋白的功能,并影响下游信号通路。

本研究结果显示,HCC 癌组织中 ISG15 蛋白表达水平显著高于癌旁组织,与 LI 等^[5]研究结果一致。提示 ISG15 蛋白与 HCC 的发生和发展具有相关性。本研究结果显示,ISG15 蛋白在低分化、肿物小于 3 cm、HBV-DNA 拷贝数小于 100 IU/mL 的肝癌组织中高表达。提示 ISG15 蛋白在抵抗肿瘤细胞分化、增殖、抑制 HBV 病毒复制过程中存在一定作用。CHEN 等^[9]研究表明,HCC 组织中 ISG15 mRNA 和蛋白表达水平明显增加,且 ISG15 表达与肿物大小、分化程度呈正相关,ISG15 在高分化、大肿物中高表达。提示 ISG15 的过表达具有促癌作用,与本研究结果恰好相反,其原因可能是样本量不同,本研究纳入了 100 例患者,而 CHEN 等^[9]研究仅纳入 37 例患者。另一个原因可能是病例间的个体差异,本研究中的病例主要以大肿物(≥3 cm)(73/100)、中高分化(69/100)为主,与 CHEN 等^[9]研究有较大差异。

本研究结果显示,低表达组生存率(70.83%)显著高于高表达组(24.39%),与 QIU 等^[10]研究结果一致。提示 ISG15 蛋白高表达可能是预后不良的风险因素,并可预测预后。QIU 等^[10]研究结果显示,高水平的 ISG15 蛋白表达与肝癌患者手术切除后的不良预后显著相关,当 ISG15 蛋白表达较高时,患者生存时间较短。ZHOU 等^[11]研究发现,ISG15 蛋白在结肠癌组织中高表达,其与患者预后不良密切相关,增强 ISG15 蛋白表达可促进体外结肠癌细胞株的迁移和增殖,而 ISG15 蛋白低表达则可减少细胞增殖和转移。YAN 等^[12]通过比较大样本膀胱癌组织和正常组织中候选基因的表达情况,并利用多个数据库进行生物信息分析筛选出膀胱癌组织中高表达基因,其中就包括 ISG15,结果显示,ISG15 与膀胱癌的进展和不良预后相关。CHEN 等^[13]研究显示,ISG15 蛋白在鼻咽癌中表达上调,并与肿瘤复发和不良预后存在相关性,ISG15 蛋白高表达的肿瘤细胞能增强癌症干细胞

(CSC)特征和放化疗耐药性。CSC 被认为能决定肿瘤的发生和发展,在肿瘤形成过程中起重要作用。TONG 等^[7]研究发现,ISG15 修饰酶基因 EFP、HERC5、UBA1 和 USP18 在 HCC 癌组织中的表达显著增高,其与 HCC 的发病机制有关。HERC5 是 ISGylation 的主要 E3 连接酶,其在 HCC 组织中高表达,有助于 HCC 的免疫逃逸,可能是肝移植后 HCC 复发的预后标志物^[14]。USP18 是针对 HBV 复制的免疫应答中的一个重要因素,其通过与 S 期激酶相关蛋白 2 相互作用影响细胞周期进程及激活信号通路,在抑制 HBV 复制中发挥重要作用^[15]。

综上所述,ISG15 蛋白在 HCC 癌组织中高表达,其在抑制肿瘤细胞生长、抵抗 HBV 病毒复制、抑制癌细胞分化过程中具有相关作用。ISG15 蛋白表达与临床预后相关,低表达者生存期更长。因此,研究抑制 ISG15 蛋白表达的药物,有望给 HCC 治疗带来新方向。

参考文献

[1] ZHANG X,BOGUNOVIC D,PAYELLE-BROGARD B,et al. Human intracellular ISG15 prevents interferon- α/β over-amplification and auto-inflammation[J]. *Nature*, 2015, 517 (7532): 89-93.

[2] MUSTACHIO L M,LU Y,KAWAKAMI M, et al. Evidence for the ISG15-specific deubiquitinase USP18 as an antineoplastic target. [J]. *Cancer Res*,2018,78(3):587-592.

[3] MYOUNG K L, YE J K, YOUNG E K, et al. Transmembrane protein pUL50 of human cytomegalovirus inhibits ISGylation by downregulating UBE1L [J]. *J Virol*, 2018, 92 (15): e00462.

[4] JUN T,PING H,JING W,et al. Prognostic value of ISG15 mRNA level in drinkers with esophageal squamous cell cancers[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8(9):10975-10984.

[5] LI C, WANG J, ZHANG H, et al. Interferon-stimulated gene 15(ISG15) is a trigger for tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2014, 5 (18): 8429-8441.

[6] FERLAY J, SHIN H R, BRAY F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127

(12):2893-2917.

[7] TONG H V, HOAN N X, BINH M T, et al. Upregulation of Enzymes involved in ISGylation and Ubiquitination in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Med Sci*,2020,17 (3):347-353.

[8] LO P K, YAO Y, LEE J S, et al. LIPG signaling promotes tumor initiation and metastasis of human basal-like triple-negative breast cancer[J]. *Elife*,2018,7:e31334.

[9] CHEN B, JIN S, BAI B, et al. Knockdown of interferon-stimulated gene 15 affects the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to norcantharidin[J]. *Exp Ther Med*,2019,18(5):3751-3758.

[10] QIU X, HONG Y, YANG D, et al. ISG15 as a novel prognostic biomarker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Med*,2015,8(10):17140-17150.

[11] ZHOU S, REN M, XU H, et al. Inhibition of ISG15 enhances the anti-cancer effect of trametinib in colon cancer cells[J]. *Onco Targets Ther*,2019,12:10239-10250.

[12] YAN X, LIU X P, GUO Z X, et al. Identification of hub genes associated with progression and prognosis in patients with bladder cancer [J]. *Front Genet*,2019,10:408.

[13] CHEN R H, DU Y, HAN P, et al. ISG15 predicts poor prognosis and promotes cancer stem cell phenotype in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncotarget*,2016,7(13):16910-16922.

[14] MORROW M P, YAN J, SARDESAI N Y. Human papillomavirus therapeutic vaccines:targeting viral antigens as immunotherapy for precancerous disease and cancer [J]. *Expert Rev Vaccines*,2013,12(3):271-283.

[15] INDROVÁ M, JANA B, BUBENÍK J, et al. IL-12 immunotherapy of minimal residual disease in murine models of HPV16-associated tumours:Induction of immune responses, cytokine production and kinetics of immune cell subsets[J]. *Int J Oncol*,2008,32(2):499-507.

(收稿日期:2023-05-20 修回日期:2023-06-19)