

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.06.013

· 临床研究 ·

去泛素化酶 UCHL5 在甲状腺癌组织中表达的临床意义及其与肿瘤细胞恶性行为的关系

任力¹, 马珊², 冯超¹, 顾毅¹, 刘彤¹, 张博维¹, 陈超¹, 宋哲¹ (1. 四川省医学科学院 四川省人民医院 血管·甲状腺外科, 四川 成都 610072; 2. 成都市第五人民医院 乳腺甲状腺外科, 四川 成都 611130)

[摘要] **目的:** 探究泛素羧基端水解酶 5 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5, UCHL5) 在甲状腺癌 (thyroid carcinoma, TC) 组织中表达的临床意义及其体外生物学效应。**方法:** TCGA 数据库分析 UCHL5 在 TC 组织中的表达及其与患者预后的关系, 临床收集四川省人民医院血管·甲状腺外科 2018 年 5 月至 2019 年 7 月期间手术切除的 TC 及癌旁组织各 82 例, 体外培养 TC 细胞 KTC-1 及 WRO 并慢病毒转染 UCHL5 过表达及相应对照载体, qPCR 及 Western blotting 检测组织及细胞中 UCHL5 及 B-Raf 原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase, BRAF) 的 mRNA 和蛋白表达水平, CCK-8 检测细胞增殖能力, 划痕修复实验及 Transwell 检测细胞侵袭及迁移能力。**结果:** UCHL5 在 TC 组织中呈低表达 ($P < 0.01$), 在 TNM 分期高的患者肿瘤组织中表达重新上调 ($P < 0.01$), UCHL5 的表达与 BRAF 表达及患者 TNM 分期显著相关 ($P < 0.01$), 而与患者年龄、性别、病理类型及 BRAF 突变无显著联系 ($P > 0.05$)。体外 KTC-1 及 WRO 细胞中过表达 UCHL5 可显著促进细胞 BRAF 的表达及细胞的增殖、转移能力 (均 $P < 0.01$)。**结论:** UCHL5 在 TC 组织中低表达, 但在肿瘤进展时 UCHL5 表达上调, TC 患者 UCHL5 高表达提示预后较差; 同时 UCHL5 在体外可促进 TC 细胞的恶性行为。

[关键词] 甲状腺癌; 泛素羧基端水解酶 5; KTC-1 细胞; WRO 细胞; 恶性增殖; 肿瘤转移

[中图分类号] R736.1; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)06-0671-07

Clinical significance of deubiquitinase UCHL5 expression in thyroid carcinoma and its relationship with malignant behaviors of carcinoma cells

REN Li¹, MA Shan², FENG Chao¹, GU Yi¹, LIU Tong¹, ZHANG Bowei¹, CHEN Chao¹, SONG Zhe¹ (1. Department of Vascular and Thyroid Surgery, Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan Academy of Medical Sciences, Chengdu 610072, Sichuan, China; 2. Department of Breast Thyroid Surgery, the Fifth People's Hospital of Chengdu, Chengdu 611130, Sichuan, China)

[Abstract] Objective: To explore the clinical significance and in vitro biological effect of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5 (UCHL5) expression in thyroid carcinoma (TC) tissues. **Methods:** TCGA data were used to analyze the expression of UCHL5 in thyroid carcinoma tissues and its relationship with the prognosis of patients. 82 pairs of TC tissues and corresponding adjacent tissues were collected in the Department of Vascular and Thyroid Surgery, Sichuan Provincial People's Hospital from May 2018 to July 2019; TC cell lines (KTC-1 and WRO) were cultured in vitro, and transfected with UCHL5 overexpression vectors or their control vectors via lentivirus. The mRNA and protein expressions of UCHL5 and B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase (BRAF) in tissues and cells were detected by qPCR and Western blotting, respectively. Cell proliferation was detected by CCK-8, and cell invasion and migration were detected by Transwell and Wound-healing experiments. **Results:** The expression of UCHL5 was low in TC tissues ($P < 0.01$), and its expression was upregulated in tumor tissues with high TNM stage ($P < 0.01$). The expression of UCHL5 was significantly correlated with BRAF expression and TNM stage of patients (all $P < 0.01$), but not significantly related with patient's age, gender, pathological type and BRAF mutation (all $P > 0.05$). *In vitro* overexpression of UCHL5 in KTC-1 and WRO cells could significantly promote BRAF expression, cell proliferation and metastasis (all $P < 0.01$). **Conclusion:** The expression of UCHL5 is low in TC tissue, but upregulated with tumor progression. The high expression of UCHL5 in TC patients suggests poor prognosis. Meanwhile, UCHL5 can promote the malignant behaviors of TC cells *in vitro*.

[Key words] thyroid carcinoma; ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5 (UCHL5); KTC-1 cells; WRO cells; de ubiquitination; malignant proliferation; tumor metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(6): 671-677. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.06.013]

[作者简介] 任力(1989-),男,硕士,医师,主要从事甲状腺与甲状旁腺恶性肿瘤基础与临床研究,E-mail:lirenren8989@163.com

[通信作者] 宋哲(SONG Zhe, corresponding author),本科,主治医师,主要从事甲状腺与甲状旁腺恶性肿瘤基础与临床研究,E-mail:alexandaniel@163.com

甲状腺癌(thyroid carcinoma, TC)是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,2018年全球TC新发56.7万例,引起相关死亡4.1万例^[1]。TC根据不同病理类型可分为甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)、滤泡状癌(follicular thyroid carcinoma, FTC)、未分化癌及髓样癌(medullary thyroid carcinoma, MTC)四种。绝大多数TC患者病情进展较慢,预后较好,但部分发生淋巴结转移或远处转移的患者较易复发,严重影响患者预后^[2]。因此,明确影响TC细胞恶性行为的关键因素对于临床早期诊断及治疗具有重要意义。泛素化是泛素分子对靶蛋白进行特异性修饰的过程,在蛋白质的定位、代谢、功能、调节和降解中都起着十分重要的作用,同时与恶性肿瘤的发生发展密切相关^[3-4],去泛素化酶是泛素化调控的核心因素,泛素羧基末端水解酶5(ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5, UCHL5)作为泛素羧基末端水解酶的异构体之一参与蛋白质的泛素化调控,并在多种恶性肿瘤中发挥重要作用^[5-6],但其与TC的关系尚不明确。本研究分析UCHL5在TC组织中表达的临床意义及其体外生物学效应。

1 资料与方法

1.1 临床样本收集

收集2018年5月至2019年7月四川省人民医院血管·甲状腺外科手术切除的TC组织及相应的癌旁组织(距离癌灶边缘5 cm)各82例,患者年龄22~71岁,中位年龄44岁;其中男性29例、女性53例;根据2004年WHO病理组织分类标准,包括55例PTC、16例FTC、11例MTC;临床分期根据2017年美国癌症联合委员会AJCC TC分期,I+II期45例,III+IV期患者37例;有淋巴结转移患者34例,无淋巴结转移患者48例;其中61例患者进行基因检测(百迈客生物科技),包括23例野生型BRAF及38例突变型BRAF患者。所有患者均确诊为原发性甲状腺癌,且术前尚未经过系统性的抗肿瘤治疗,纳入患者或其家属均签署本研究知情同意书。

1.2 细胞株与主要试剂

人TC细胞系KTC-1及WRO及人胚肾细胞293T购自中科院上海细胞库,KTC-1及WRO均采用RPMI 1640+10%FBS培养,293T细胞采用DMEM+10%FBS培养,均在37℃、5%CO₂条件下培养。RPMI 1640、高糖DMEM培养基及胎牛血清(FBS)购自美国Hyclone公司,转染脂质体Lipofectamine 2000购自美国Thermo公司,病毒包装质粒pLP1-gag/pol、pLP2-Rev和pLP-VSVG购自美国Addgene),RNAiso Plus RNA提取试剂盒及RNA逆转录试剂盒购自日本TaKaRa),SYBR Green核

酸荧光染料购自美国Roche公司,Western blotting(WB)实验所用的UCHL5及B-Raf原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(B-Raf Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase, BRAF)抗体(ab133508、ab85972,稀释度1:1 000)、羊抗兔二抗(ab6721,稀释度1:2 000)均购自美国Abcam公司,CCK-8试剂购自日本Dojindo公司,小室配套24孔板及Matrigel胶购自美国Corning公司。7500荧光定量PCR仪购自美国Applied Biosystems公司,GelDoc XR凝胶成像仪购自美国Bio-Rad公司,Nanodrop2000超微量分光光度计购自美国Thermo公司,多孔酶标仪购自美国Bio-Tek公司。引物由上海生工公司合成。

1.3 生物信息学数据库分析UCHL5与TC的潜在联系

利用TCGA子数据库UALCAN及HPRD(Human Protein Reference Database),分析UCHL5在TC中的表达情况及与患者预后的关系,并预测其可能与TC有关的相互作用蛋白。

1.4 qPCR检测组织及细胞中UCHL5及BRAF mRNA表达水平

RNAiso Plus提取组织或细胞总RNA,分光光度法检测RNA浓度,取1 μg RNA用无核酸酶水稀释至1 ml,作为逆转录模板。引物序列:UCHL5 Forward为5'-TTCGATGTCTCTAGGGTGGC-3', Reverse为5'-GATCCACCTCTCGCTCTCAG-3';BRAF Forward为5'-TGACTTTCTAGTAACTCAGC-3', Reverse为5'-ATAGAAATTAGATCTCTTACC-3';β-Actin Forward为5'-TGGCACCCAGCACAAATGAA-3', Reverse为5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAA-3',稀释引物至2 μmol/L。10 μl SYBR Green 核酸荧光染料体系进行qPCR反应,设置3个平行复孔,95℃预变性10min后,95℃变性15 s、60℃退火30 s、72℃延伸45 s,进行40个循环;熔解阶段:95℃、15 s、60℃、1 min、95℃、15 s。以β-Actin为内参基因,采用2^{-ΔΔCT}法计算组织及细胞中UCHL5及BRAF mRNA表达水平。

1.5 细胞培养及慢病毒转染

在293T细胞中进行慢病毒包装,培养对数生长期的293T细胞并接种于6孔板中,转染脂质体介导慢病毒载体及目的载体(包括plvx-Puro-UCHL5及plvx-Puro空白载体)分别进入2组293T细胞中,48 h后收集2组病毒悬液并过滤,分别感染对数生长期的KTC-1及WRO细胞。每种细胞均分为2组,分别感染对照病毒及UCHL5过表达重组病毒,并使用Polybrene提升感染效率,连续感染3 d,加入1 μg/ml嘌呤霉素筛选至细胞生长状态良好。采用qPCR及WB实验分别检测UCHL5 mRNA和蛋白的表达水平。

1.6 WB检测TC组织及细胞中UCHL5及BRAF蛋

白表达水平

提取 TC 组织及细胞的总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度, 取 40 μg 蛋白行 10% SDS-PAGE, 120 V 恒压 2 h, 260 mA 恒流湿转至 PVDF 膜, 加 10% 脱脂牛奶室温下封闭 2 h, 加入 UCHL5 及 BRAF 抗体 (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜, 加入羊抗兔二抗 (1:2 000) 室温下孵育 1 h, 加入 ECL 化学发光试剂孵育, ChemiDoc XRS+ 成像系统 (美国 Bio-Rad) 进行胶片曝光处理, 采用 Image Plus 软件计算条带灰度值及蛋白相对表达量。

1.7 CCK-8 实验检测 UCHL5 过表达对 TC 细胞增殖能力的影响

待测细胞以 1×10^3 个细胞/孔接种至 96 孔板中, 设置 5 个平行复孔。5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱培养 24 h, 分别设置 5 个不同的观察时间点: 0、24、48、72 和 96 h, 以细胞贴壁做为 0 h 的时间点。检测时 CCK-8 试剂与培养基 1:9 混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 后, 使用酶标仪检测 450 nm 处光密度 (D) 值, 计算细胞的相对增殖率 = $[(24 \text{ h } D_{\text{实验组}} - 24 \text{ h } D_{\text{对照组}}) / (0 \text{ h } D_{\text{实验组}} - 0 \text{ h } D_{\text{对照组}})] \times 100\%$ 。

1.8 Transwell 实验检测 UCHL5 过表达对 TC 细胞侵袭及迁移能力的影响

侵袭实验: 使用 RPMI 1640+10%FBS 稀释 Matrigel 胶至 10 mg/ml, 混匀后取 100 μl 加入 Transwell 小室底的上室面, 37 $^{\circ}\text{C}$ 风干 4 h。待测细胞以 RPMI 1640+1% FBS 重悬, 并以 2×10^5 个/孔接种至铺胶的 Transwell 小室, 下室加入 600 μl RPMI 1640+10% FBS, 培养 48 h 后, 棉签拭去上室面细胞, 无水乙醇固定 20 min, 0.1% 结晶紫染色 10 min, 200 \times 光镜计数并拍照, 随机计数中间和四周 5 个视野的总数。

迁移实验: 待测细胞以 RPMI 1640+1%FBS 重

悬, 细胞计数并以 1×10^5 个细胞/孔接种至未铺胶的 Transwell 小室, 下室加入 600 μl RPMI 1640+10%FBS, 后续步骤同侵袭实验。

1.9 划痕修复实验检测 UCHL5 过表达对 TC 细胞迁移能力的影响

采用标记笔于六孔板底部均匀划横线, 每隔 0.5 cm 划一条线, 每个孔至少 5 条线。于孔内接种 6×10^5 个细胞, 待细胞贴壁后, 用移液枪的枪头沿标记线条在细胞层上划痕。用 PBS 洗 1 次, 加入无血清培养基, 0 及 24 小时拍照, 测量划痕宽度, 计算划痕修复率。划痕修复率 = $[(0 \text{ h 时划痕宽度} - 24 \text{ h 时划痕宽度}) / 0 \text{ h 时划痕宽度}] \times 100\%$ 。

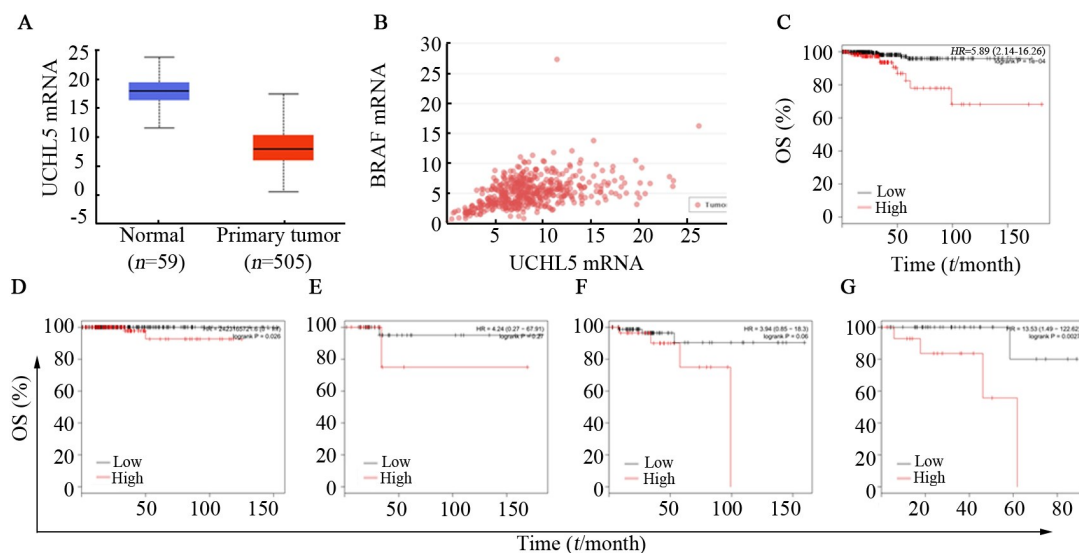
1.10 统计学处理

采用 SPSS23.0 统计软件分析, 呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以百分率 (%) 表示, 计量资料组间比较采用 t 检验, 计数资料组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TCGA 数据库分析 UCHL5 在 TC 组织中的表达特征及与预后的关系

分析 TCGA 数据库中资料, 结果 (图 1A) 显示, 与癌旁组织相比, UCHL5 在 TC 组织中呈低表达 [(7.89 ± 1.87) vs (17.97 ± 1.66) tpm, $P < 0.01$], 并且在 TC 组织中 UCHL5 表达与 BRAF 表达呈正相关 ($r = 0.43$, $P < 0.01$) (图 1B); Kaplan-Meier 生存分析结果显示, UCHL5 在 TC 组织中的高表达与患者预后不良呈正相关 ($P < 0.01$) (图 1C), 同时, UCHL5 在不同 TNM 分期 (I ~IV 期) TC 组织中的高表达均提示患者预后不良 (图 1D-G)。



A: Comparison of UCHL5 in TC and normal adjacent tissues; B: Correlation between UCHL5 expression and BRAF in TC tissues; C: Relationship between UCHL5 expression and survival time of TC patients; D-G: Relationship between UCHL5 expression and survival time of TC patients with TNM I (D), II (E), III (F), IV (G)

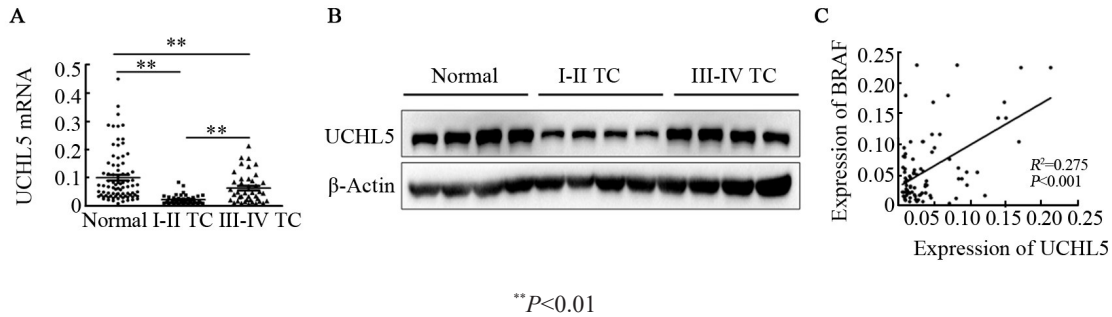
图 1 UCHL5 在 TC 组织中的表达情况及临床意义的生物信息学分析

Fig.1 Bioinformatics analysis of UCHL5 expression in TC tissues and its clinic value

2.2 UCHL5在TC标本组织中的表达及其与BRAF表达的关系

qPCR及WB检测显示,与癌旁组织相比(0.102±0.009),UCHL5在TC组织中呈低表达($P<0.01$),且

其在III、IV期TC组织中(0.063±0.008)表达水平显著高于I、II期(0.022±0.002, $P<0.01$;图2A及2B)。同时,TC组织中UCHL5表达与BRAF表达呈正相关($R^2=0.275, P<0.01$;图2C)。



A: The mRNA expression of UCHL5 in TC tissues; B: The protein expression of UCHL5 in TC tissues; C: The correlation between UCHL5 expression and BRAF

图2 UCHL5在TC标本组织中的表达情况及其与BRAF表达的关系

Fig.2 Expression of UCHL5 in TC tissues and its relationship with BRAF expression

2.3 UCHL5在TC组织中的表达的临床意义

以TC组织中UCHL5表达水平的中位数0.024为界限,将患者分为高表达及低表达组, χ^2 检验结果(表1)显示,UCHL5高表达与患者临床分期有关($P<0.01$),而与性别、年龄、TC病理类型及BRAF V600E突变无显著关系($P>0.05$)。

2.4 过表达UCHL5促进KTC-1和WRO细胞的增殖

CCK-8实验结果(图3)显示,感染UCHL5过表达重组病毒后,与对照组相比,KTC-1细胞增殖水平在48、72及96h均显著升高($P<0.01$),WRO细胞增殖能力在72及96h均显著升高($P<0.01$)。

2.5 过表达UCHL5促进KTC-1和WRO细胞的迁移和侵袭

Transwell迁移实验结果(图4A)显示,与对照组相比,过表达UCHL5组KTC-1细胞迁移[(72.0±6.9) vs (24.7±3.1)个, $P<0.01$]、侵袭[(55.7±6.1) vs (19.3±5.0)个, $P<0.01$]细胞数均显著增加,WRO细胞迁移[(140.6±8.2) vs (52.9±4.4)个, $P<0.01$]、侵袭[(161.3±9.7) vs (46.3±5.0)个, $P<0.01$]细胞数均显著增加。

划痕修复实验结果(图4B)显示,过表达UCHL5组KTC-1细胞[(54.6±7.0)% vs (19.5±2.1)%, $P<0.01$]及WRO细胞[(71.5±9.4)% vs (34.4±3.8)%, $P<0.01$]划痕修复率较对照组均显著升高。

2.6 过表达UCHL5对KTC-1及WRO细胞BRAF mRNA及蛋白表达的影响

过表达UCHL5后,KTC-1及WRO细胞BRAF mRNA及蛋白表达均显著增高,差异具有统计学意义($P<0.01$),见图5。

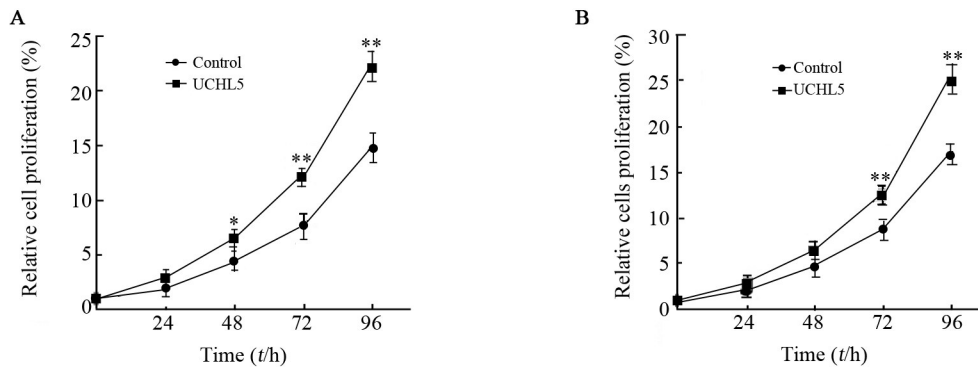
表1 UCHL5表达与TC患者临床病理特征的关系

Tab.1 Relationship between UCHL5 expression and clinical pathological characteristics of TC patients

Factor	N	UCHL5 (n)		χ^2	P
		High	Low		
Gender				1.297	0.255
Male	31	13	18		
Female	51	28	23		
Age (t/a)				0.781	0.377
>45	40	18	22		
≤45	42	23	19		
Clinical stage				8.323	0.004
I/II	37	12	25		
III/IV	45	29	16		
Histotype				2.706	0.258
PTC	55	24	31		
FTC	16	10	6		
MTC	11	7	4		
BRAF V600E				0.796	0.372
Wild type	23	10	13		
Mutant	38	21	17		

3 讨论

丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine-protein kinase, RAF)基因家族被发现参与TC进展及复发,而BRAF作为RAF中的重要成员,可促进下游MAPK/ERK通路的激活,介导细胞的恶性转化^[6-7]。BRAF基因外显子V600E的突变可导致BRAF活性增强,8%的人类肿瘤存在该基因的突变,在TC中突变率则为77.8%^[8-9],是最关键的原癌基因之一。因此,明确BRAF的调控因素对于恶性肿瘤,尤其是TC的治疗指导及新药开发具有重要意义。



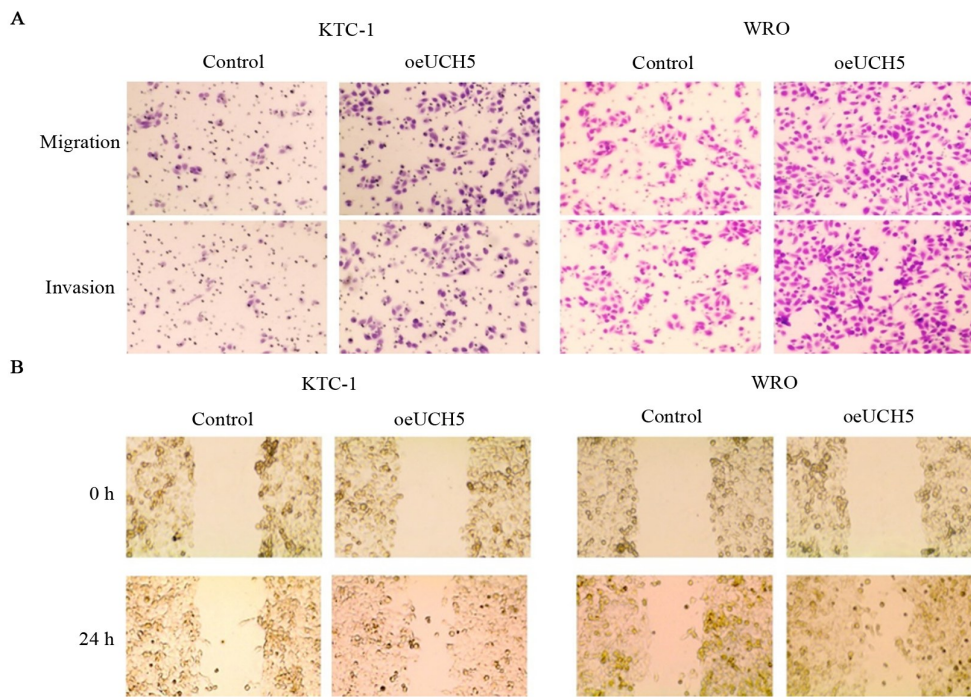
**P<0.01 vs Control group

A: Effect of UCHL5 overexpression on the proliferation of KTC-1 cells;

B: Effect of UCHL5 overexpression on the proliferation of WRO cells

图3 过表达 UCHL5 促进 KTC-1 和 WRO 细胞的增殖

Fig.3 Overexpression of UCHL5 promoted the proliferation of KTC-1 and WRO cells

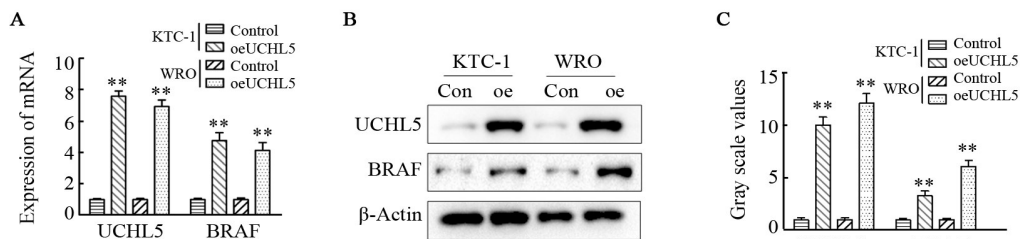


A: Migration and invasion of KTC-1 and WRO cells detected by Transwell assay;

B: Migration of KTC-1 and WRO cells detected by scratch repair experiment

图4 过表达 UCHL5 促进 KTC-1 及 WRO 细胞的迁移和侵袭

Fig.4 Overexpression of UCHL5 promoted the migration and invasion of KTC-1 and WRO cells



**P<0.01 vs Control group

A: mRNA expressions of UCHL5 and BRAF in KTC-1 and WRO cells; B and C: Protein expressions of UCHL5 and BRAF in KTC-1 and WRO cells detected by WB

图5 感染 UCHL5 过表达慢病毒促进 KTC-1 及 WRO 细胞中 BRAF mRNA 及蛋白的表达

Fig.5 Infection with UCHL5 overexpressing lentivirus promoted the mRNA and protein expressions of BRAF in KTC-1 and WRO cells

泛素化参与调控细胞增殖、分化及转移等极其广泛的生命活动。去泛素化酶可作用于泛素链,使泛素链发生水解,防止蛋白质通过泛素化途径降解,是泛素化调控的核心因素之一^[10-11]。去泛素化酶主要分为半胱氨酸蛋白酶及金属蛋白酶两大类,泛素C末端水解酶(ubiquitin C terminal hydrolase, UCH)属于半胱氨酸蛋白酶的亚类,可使多聚泛素链水解成游离的泛素单体,一方面具有逆转泛素化的作用,另一方面可加速泛素链的解聚和泛素循环^[12-13]。UCHL5作为UCHs的异构体之一,参与多种蛋白质的泛素化调控,并影响多种恶性肿瘤的发生发展。丁芳等^[14]在体外敲降乳腺癌细胞中UCHL5,发现可抑制细胞增殖、凋亡和成瘤,同时通过TCGA数据库挖掘发现,UCHL5的高表达与乳腺癌增殖基因相关,并提示患者总生存时间和无复发生存时间的显著缩短;TIAN等^[15]研究显示,多发性骨髓瘤细胞中UCHL5高表达,UCHL5小分子抑制剂可显著抑制细胞周期蛋白CDC25c、CDC2和cyclin b1的表达,并诱导细胞发生caspase3依赖性凋亡,进而降低多发性骨髓瘤细胞的活性并克服硼替佐米耐药;LU等^[16]使用双苄啶哌啶酮RA190抑制UCHL5的活性后发现,血液肿瘤细胞体内成瘤能力显著降低;CHITTA等^[17]发现,UCHL5小分子抑制剂可介导红细胞失色性淋巴瘤细胞的凋亡,并抵抗细胞硼替佐米抵抗;而ARPALAHTI等^[18-20]发现UCHL5高表达是结直肠癌及胰腺导管腺癌患者预后的保护因素,也与胃癌肿瘤较小的原发灶、较低的TNM分期及年龄密切相关。上述研究均揭示了UCHL5在多种恶性肿瘤中发挥着不同的生物学效应,但其在TC中的表达情况及作用仍不明确,故本研究通过生物信息工具和利用组织标本开展了相关研究工作。

本研究在公共数据库及临床样本中均发现UCHL5在TC组织中低表达,但其低表达却提示患者预后时间延长,分析UCHL5可能在正常甲状腺细胞转化为TC细胞的过程中起到抑制作用,但在TC细胞中则可增强细胞的恶性表型,导致患者预后不良,其机制可能与UCHL5在不同来源细胞中的靶蛋白不同所致。同时,分析数据库中检索结果发现UCHL5与BRAF表达显著正相关,同时在临床组织中也验证了两者相关性,提示UCHL5可能与BRAF共同参与TC的进展。为了进一步明确UCHL5在TC中的表达特征及意义,本研究收集了TC患者临床资料,通过比对分析发现UCHL5在晚期患者中高表达,与患者病情进展显著正相关,同时,体外研究显示过表达UCHL5可显著促进TC细胞BRFA表达及增殖转移能力,可以认为UCHL5在TC中发挥着重要的促

癌作用。

综上,本研究揭示了UCHL5在TC组织和细胞中的表达特征及临床意义,并对其体外效应及潜在机制进行了初步探究,在接下来的研究中将进一步明确其体内效应,探究其对BRAF表达的调控机制,为UCHL5作为TC的治疗靶点及诊断依据提供新的线索。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] ITO Y, MIYAUCHI A, ODA H. Low-risk papillary microcarcinoma of the thyroid: a review of active surveillance trials[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2018, 44(3): 307-315. DOI:10.1016/j.ejso.2017.03.004.
- [3] SANE S, REZVANI K. Essential roles of E3 ubiquitin ligases in p53 regulation[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): E442[2019-09-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5343976/>. DOI: 10.3390/ijms18020442.
- [4] FRAILE J M, QUESADA V, RODRÍGUEZ D, et al. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options[J]. *Oncogene*, 2012, 31(19): 2373-2388. DOI:10.1038/ncr.2011.443.
- [5] FANG Y, SHEN X Z. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases: involvement in cancer progression and clinical implications[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(4): 669-682. DOI: 10.1007/s10555-017-9702-0.
- [6] NIETO P, AMBROGIO C, ESTEBAN-BURGOS L, et al. A BRAF kinase-inactive mutant induces lung adenocarcinoma[J]. *Nature*, 2017, 548(7666): 239-243. DOI:10.1038/nature23297.
- [7] HALING J R, SUDHAMSU J, YEN I, et al. Structure of the BRAF-MEK complex reveals a kinase activity independent role for BRAF in MAPK signaling[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(3): 402-413. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.07.007.
- [8] CHEN D, QI W J, ZHANG P X, et al. Investigation of BRAF V600E detection approaches in papillary thyroid carcinoma[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(2): 303-307. DOI: 10.1016/j.prp.2017.09.001.
- [9] PRAHALLAD A, SUN C, HUANG S D, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR[J]. *Nature*, 2012, 483(7387): 100-103. DOI:10.1038/nature10868.
- [10] MEVISSSEN T E T, KOMANDER D. Mechanisms of deubiquitinase specificity and regulation[J]. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 159-192. DOI:10.1146/annurev-biochem-061516-044916.
- [11] CAI J T, CULLEY M K, ZHAO Y T, et al. The role of ubiquitination and deubiquitination in the regulation of cell junctions[J]. *Protein Cell*, 2018, 9(9): 754-769. DOI:10.1007/s13238-017-0486-3.
- [12] FANG Y, SHEN X Z. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases: involvement in cancer progression and clinical implications[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(4): 669-682. DOI: 10.1007/s10555-017-9702-0.
- [13] SEO E Y, JIN S P, SOHN K C, et al. UCHL1 regulates melanogene-

- sis through controlling MITF stability in human melanocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137(8): 1757-1765. DOI: 10.1016/j.jid.2017.03.024.
- [14] 丁芳, 马建林, 吴晓巍, 等. 泛素羧基末端水解酶 L5 对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中华肿瘤杂志*, 2018, 40(12): 900-904. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2018.12.005.
- [15] TIAN Z, D'ARCY P, WANG X, et al. A novel small molecule inhibitor of deubiquitylating enzyme USP14 and UCHL5 induces apoptosis in multiple myeloma and overcomes bortezomib resistance[J]. *Blood*, 2014, 123(5): 706-716. DOI:10.1182/blood-2013-05-500033.
- [16] LU X X, NOWICKA U, SRIDHARAN V, et al. Structure of the Rpn13-Rpn2 complex provides insights for Rpn13 and UCH37 as anticancer targets[J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15540[2019-09-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5494190/>. DOI:10.1038/ncomms15540.
- [17] CHITTA K, PAULUS A, AKHTAR S, et al. Targeted inhibition of the deubiquitinating enzymes, USP14 and UCHL5, induces proteotoxic stress and apoptosis in Waldenström macroglobulinaemia tumour cells[J]. *Br J Haematol*, 2015, 169(3): 377-390. DOI:10.1111/bjh.13304.
- [18] ARPALAHTI L, HAGSTRÖM J, MUSTONEN H, et al. UCHL5 expression associates with improved survival in lymph-node-positive rectal cancer[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(7): 1010428317716078. DOI:10.1177/1010428317716078.
- [19] ARPALAHTI L, SAUKKONEN K, HAGSTRÖM J, et al. Nuclear ubiquitin C-terminal hydrolase L5 expression associates with increased patient survival in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6): 1010428317710411. DOI: 10.1177/1010428317710411.
- [20] ARPALAHTI L, LAITINEN A, HAGSTRÖM J, et al. Positive cytoplasmic UCHL5 tumor expression in gastric cancer is linked to improved prognosis[J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0193125[2019-10-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5825037/>. DOI:10.1371/journal.pone.0193125.

[收稿日期] 2020-01-05

[修回日期] 2020-04-30

[本文编辑] 黄静怡