

JMJD3 和 EZH2 在 45 例喉鳞状细胞癌中的表达及其临床意义分析

Expression of JMJD3 and EZH2 in Forty-five Cases with Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and Its Clinical Significance//TANG Yan-zhen, ZANG Chuan-shan, QIN Zuo-rong, JIANG Li-wei, QIU Jie

唐艳珍,臧传善,秦作荣,姜立伟,邱杰
(青岛大学附属医院,山东 青岛 266000)

摘要: [目的] 研究 JMJD3 及 EZH2 在喉鳞状细胞癌中的表达及其临床意义。[方法] 收集 45 例喉鳞状细胞癌患者的喉癌、癌旁组织切片及相关临床特征数据,采用免疫组化染色法检测标本。采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法分析 JMJD3 与 EZH2 在喉鳞状细胞癌中的表达及其与临床特征的相关性。Kaplan-Meier 分析 JMJD3 及 EZH2 与喉鳞状细胞癌 3 年总生存率的关联。[结果] JMJD3 及 EZH2 在喉癌组织中表达阳性率明显高于癌旁组织 ($\chi^2=9.800, 10.766, P$ 均 <0.01)。在喉癌组织中, JMJD3 及 EZH2 的表达与患者肿瘤分化程度、肿瘤部位、淋巴结转移、临床分期相关。JMJD3 阳性表达及阴性表达患者的 3 年生存率分别为 68.2%、87.0% ($\chi^2=2.631, P=0.105$); EZH2 阳性表达及阴性表达患者的 3 年生存率分别为 70.8%、85.7% ($\chi^2=1.688, P=0.194$)。JMJD3 和 EZH2 在喉癌中的表达呈正相关 ($P=0.02$)。[结论] 在喉鳞状细胞癌中 JMJD3 和 EZH2 均起了促癌基因的作用。JMJD3 及 EZH2 的高表达与喉鳞状细胞癌的发生、转移、恶性程度存在显著关联,两者的失衡共同促进了喉癌的发生发展。

关键词: JMJD3 蛋白; EZH2 蛋白; 喉鳞状细胞癌

中图分类号: R739.65 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2021)06-0505-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.06.B016

喉癌是头颈部肿瘤中第二常见的恶性肿瘤,因喉部器官的特殊性,喉癌在治疗上注重生存率与生活质量并重的治疗方式^[1]。尽管手术、放化疗等多种治疗方式在不断发展,但晚期喉癌患者的 5 年生存率仍偏低。近 10 年来,喉癌患者的生存率没有进一步升高,反而出现了下降。晚期患者生存率低与肿瘤转移和复发有很大关联,因此,寻找新的治疗方法和手段极为关键。多数肿瘤发生、发展的原因尚不明确,但离不开基因和环境因素共同的影响。随着对肿瘤发生发展基因层面研究的逐渐深入,研究者们发现除了基因序列改变能影响基因表达外,表观遗传修饰也参与了基因的表达调控,且能被相关抑制剂逆转其错误的表达^[2]。DNA 甲基化就是表观遗传调控中的一种,不仅参与基因正常表达调控,还与多种恶性肿瘤的发生、发展有关,其中 JMJD3 及 EZH2 作为组蛋白 H3K27 的去甲基化酶及甲基化酶,广泛存在于不同类型的肿瘤和干细胞中,其异常表达通

过一定的分子机制参与异常的细胞增殖、迁移等多种生物学过程,如肝癌、卵巢癌、胃癌、淋巴瘤等^[3]。EZH2 在许多恶性肿瘤中高度表达,通过促进癌细胞的增殖、侵袭而起着促癌的作用,且有研究显示其在头颈部鳞状细胞癌中高表达^[4]。JMJD3 在不同类型的肿瘤中起着促癌或抑癌的作用,但其在喉癌中的作用尚未被研究。JMJD3 与 EZH2 在组蛋白 H3K27 的调控上存在着相反的作用。本文探讨 JMJD3 及 EZH2 在喉鳞状细胞癌中的表达及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究对象为 2016 年 1 月至 2017 年 2 月期间在青岛大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科就诊的 45 例喉鳞状细胞癌患者,对所有患者进行随访并征得患者同意,通过查阅患者住院记录、门诊记录及电话随访等方式,对所有患者进行治疗后生存情况的随访。每位患者随访 40 个月,随访终点事件为患者死亡,截止时间为 2020 年 6 月 30 日。

通信作者: 邱杰,科主任,教授,主任医师,博士;青岛大学附属医院头颈外科,山东省青岛市市南区江苏路 16 号(266000);
E-mail: wfpeter2000@163.com
收稿日期: 2021-02-16;修回日期: 2021-04-28

患者纳入标准:初始治疗方式为手术治疗;具有完整的病历资料。排除标准:患者既往有其他部位癌症病史;手术治疗前做过化疗、放疗等其他治疗。收集 45 例符合标准患者的组织切片,分为 2 组,喉鳞状细胞癌(以下简称喉癌)组及癌旁组,癌旁组取距肿瘤边缘 0.5~1.0cm 的正常组织,组织均经病理学确诊。其中年龄<60 岁 12 例,年龄≥60 岁 33 例;男性 41 例,女性 4 例;声门型喉癌患者 29 例,非声门型喉癌患者 16 例;高分化 28 例,中低分化 17 例;N₀(无淋巴结转移)26 例,N_x(有淋巴结转移)19 例;早期(I~II 期)22 例,晚期(III~IV 期)23 例。本研究经医院伦理委员会批准(伦理批件号为 QYFYWZLL26157)。

1.2 实验试剂

研究所用试剂 EZH2 一抗及 JMJD3 一抗均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。由武汉赛维尔生物科技有限公司提供其他实验试剂及仪器设备。

1.3 实验方法

采用免疫组化染色法,即链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(streptavidin peroxidase, SP)染色法检测研究标本。以 4μm 的厚度对石蜡标本进行连续切片,经过烤片、脱蜡、脱水、抗原修复、封闭、加一抗、孵育过夜、加二抗、显色、复染细胞核、脱水封片,最后镜检并采集图像。

1.4 染色结果判读

JMJD3 及 EZH2 免疫组化阳性产物表达于细胞核和细胞浆。由 2 名有经验的病理科医师进行双盲阅片,首先在低倍镜下(×100)观察染色结果,选取喉癌或者癌旁细胞区域,然后在高倍镜下(×400)随机选取 5 个视野,结果判读为染色强度和阳性细胞百分比组成。细胞染色强度计分标准:基本不着色,0 分;淡黄色,1 分;深黄色,2 分;棕黄色,3 分。阳性细胞百分比计分标准:<5%,0 分;5%~<25%,1 分;25%~<50%,2 分;

50%~<75%,3 分;75%~100%,4 分。上述两项的乘积≥1 为阳性。

1.5 统计学处理

选择 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析,采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法分析 JMJD3 与 EZH2 在喉鳞状细胞癌中的表达及其与临床特征的关系。采用 Kaplan-Meier 分析 JMJD3 及 EZH2 与喉鳞状细胞癌 3 年总生存率的关联。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 JMJD3 及 EZH2 在喉癌及癌旁组织中的表达

JMJD3 蛋白及 EZH2 蛋白阳性表达表现为细胞核和细胞浆着色,在喉鳞状细胞癌细胞中呈棕黄色细网状或粗大颗粒状(Figure 1A, Figure 2A),而在癌旁正常组织中基本不着色(Figure 1B, Figure 2B)。JMJD3 及 EZH2 在喉癌组织中均表达高于癌旁组织,差异均有统计学意义($P<0.01$)(Table 1)。

Table 1 The different expression of JMJD3 and EZH2 in laryngocarcinoma group and paracancerous group

Groups	N	JMJD3 expression		EZH2 expression	
		Positive	Negative	Positive	Negative
Laryngocarcinoma group	45	22	23	24	21
Paracancerous group	45	8	37	9	36
χ^2	—	9.800		10.766	
P	—	<0.01		<0.01	

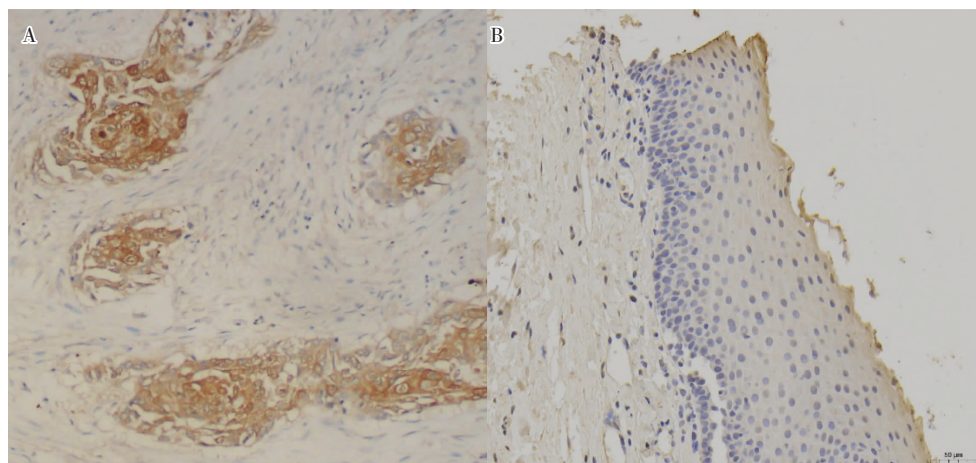


Figure 1 Expression of JMJD3 in laryngeal squamous cell carcinoma(A) and paracancerous tissue(B) (SP×400)

2.2 JMJD3及EZH2与喉癌患者临床特征的关系

在喉癌组织中, JMJD3及EZH2的表达与患者肿瘤分化、肿瘤部位、淋巴结转移、临床分期存在关联($P<0.05$), 与患者年龄、性别无关($P>0.05$)。JMJD3及EZH2阳性表达率越高则肿瘤分化程度越低、存在淋巴结转移风险越大、肿瘤分期越晚。非声门型喉癌中JMJD3及EZH2阳性率较声门型高(Table 2)。

2.3 JMJD3及EZH2与喉癌生存率的关系

在45例喉鳞状细胞癌患者3年随访中,生存35例,死亡10例,3年总生存率为77.8%。在喉鳞状细胞癌中,JMJD3及EZH2阳性表达患者的3年生存率较阴性表达患者低,JMJD3阳性表达及阴性表达患者的3年生存率分别为68.2%、87.0% ($\chi^2=2.631, P=0.105$), 差异无统计学意义(Figure 3); EZH2阳性表达及阴性表达患者的3年生存率分别为70.8%、85.7% ($\chi^2=1.688, P=0.194$), 差异无统计学意义(Figure 4)。

2.4 JMJD3与EZH2在喉癌中表达相关性

在45例喉鳞状细胞癌中, 分析JMJD3蛋白表达和EZH2蛋白表达的相关性, 采用卡方检验得出 $\chi^2=9.911, P=0.02$, 两者呈显著的正相关。

3 讨论

组蛋白是染色体的基本组成成分, 它通过组蛋白修饰参与基因的表达调控。组蛋白修饰是表观遗传调控中的重要内容, 包括组蛋白的甲基化、乙酰化、磷酸化等, 通过抑制或促进基因的表达, 参与了机

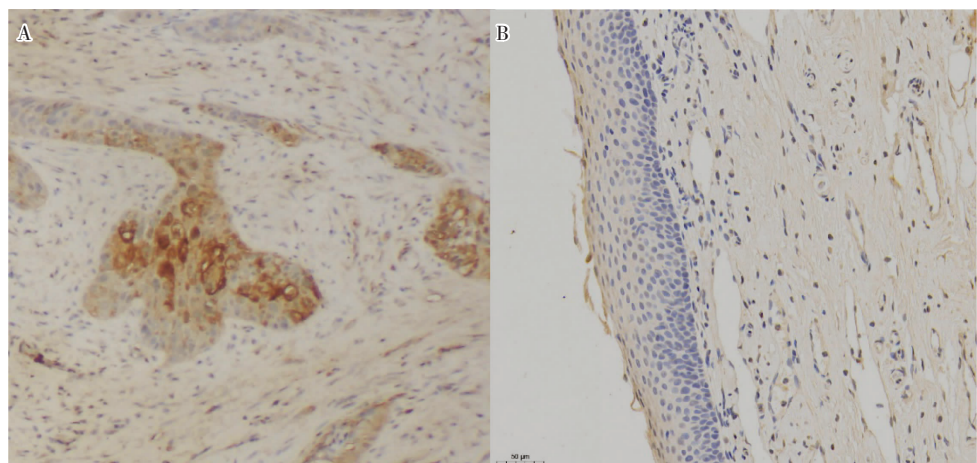


Figure 2 Expression of EZH2 in laryngeal squamous cell carcinoma(A) and paracancerous tissue(B) (SPx400)

Table 2 Correlation between JMJD3, EZH2 and clinical features of laryngeal carcinoma

Clinical features	N	JMJD3 expression			EZH2 expression		
		Positive	Negative	P	Positive	Negative	P
Age(years)							
≥60	33	15	18	0.445	19	14	0.334
<60	12	7	5		5	7	
Gender							
Male	41	19	22	0.346	21	20	0.611
Female	4	3	1		3	1	
Differentiation							
High	28	10	18	0.023	10	18	0.002
Medium,low	17	12	5		14	3	
Tumor location							
Glottic	29	11	18	0.048	12	17	0.030
Non glottic	16	11	5		12	4	
Lymph node metastasis							
Yes	19	13	6	0.025	14	5	0.019
No	26	9	17		10	16	
Clinical stages							
Early	22	7	15	0.025	7	15	0.005
Late	23	15	8		17	6	

体正常的生长发育、免疫代谢等多种遗传调控^[3,5]。JMJD3是组蛋白H3第27位赖氨酸(H3K27)特异性去甲基化酶, 通过诱导靶基因启动子区H3K27me2/3的去甲基化而激活基因的表达。EZH2是PRC2的催化亚基, 能介导H3K27甲基化从而抑制相关基因的表达, 与JMJD3在组蛋白甲基化上起着相反的作用。H3K27的甲基化调节酶贯穿整个胚胎发育过程, 在不同分化阶段通过对不同基因的激活或抑制从而调控细胞正常分化^[6]。除了调控机体

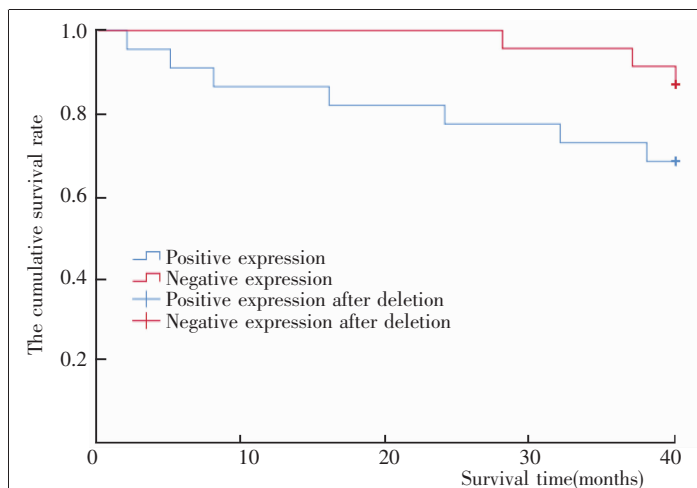


Figure 3 Survival curve of positive and negative expression of JMJD3 in laryngeal cancer patients

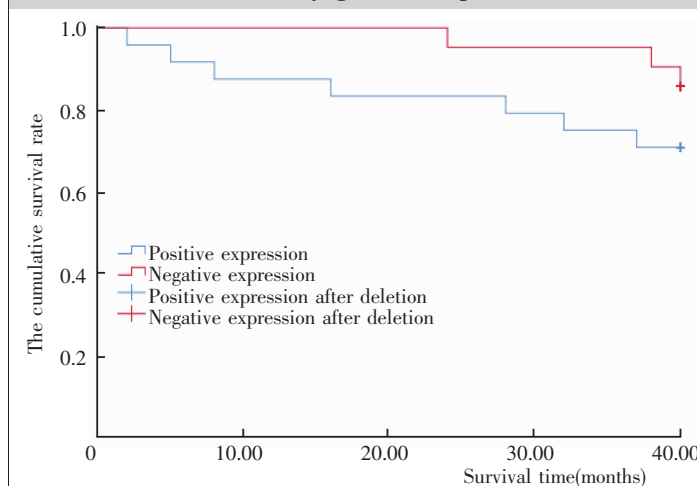


Figure 4 Survival curve of positive and negative expression of EZH2 in laryngeal carcinoma patients

正常的生长发育, JMJD3 及 EZH2 还广泛存在于不同类型的肿瘤中, 通过不同的分子机制参与肿瘤的发生、发展^[3]。

JMJD3 及 EZH2 与肿瘤的发生发展密切相关, 研究显示肿瘤抑制蛋白 p16INK4a 和 p14ARF 是衰老的关键调节因子, 癌基因通过激活去甲基化酶 JMJD3 和下调甲基转移酶 EZH2 来促进 p16INK4a 和 p14ARF 的表达, 从而诱导细胞的衰老^[7-8]。通过上述机制, 可以推测 JMJD3 有着潜在的抑癌作用, 而 EZH2 有着致癌作用。在乳腺癌中 JMJD3 起抑癌基因的作用, 且 JMJD3 低表达与患者预后差有关^[9]。在结肠癌中, JMJD3 作为 1, 25(OH)₂D₃ 靶基因, 又与该激素的基因调控作用相结合, 起到了肿瘤抑制因子的作用^[10]。但除了参与抑制肿瘤的发展, 研究显示

JMJD3 也发挥了促进肿瘤发展的作用。JMJD3 在食管癌中过度表达, 且与肿瘤生物侵袭性密切相关, 能用于预测食管癌的生存率^[11]。JMJD3 在胃癌中也起致癌作用, JMJD3 高表达与胃癌患者的生存率相关, 重要的是, 组蛋白去甲基化酶抑制剂 GSK-J4 可以逆转 JMJD3 过表达的致癌效应^[12]。JMJD3 在喉鳞状细胞癌中的作用尚未被研究。本研究显示 JMJD3 在喉癌组织中高表达, 且明显高于癌旁组织, 提示喉癌的发生与 JMJD3 存在关联, JMJD3 在喉癌的发生中扮演了促癌基因的作用。且 JMJD3 高表达与喉癌的分化程度、肿瘤部位、淋巴结转移及临床分期存在关联, 提示 JMJD3 与喉癌的侵袭性及恶性程度相关。生存分析显示, JMJD3 阳性表达患者较阴性表达患者 3 年总生存率低, 但差异无统计学意义, 考虑可能与本研究样本量不足、死亡例数少等有关, 需进一步研究证实。

EZH2 参与调控机体正常的发育, 在细胞周期、细胞凋亡以及 DNA 损伤修复中参与正常调控^[13]。但 EZH2 在多种肿瘤中也存在异常表达, EZH2 的过度表达与卵巢癌^[14]、肝癌^[15]、软骨肉瘤^[16]、结直肠癌^[17]等多种恶性肿瘤的增殖、转移相关。此外, 高度激活的 EZH2 突变经常在癌症的早期阶段被发现, 这表明 EZH2 的失调起着癌症驱动因素的作用^[13]。本研究显示 EZH2 在喉鳞状细胞癌组织中的表达显著高于癌旁正常组织, 说明在喉癌的发生过程中 EZH2 也起着促癌基因的作用。且 EZH2 高表达与喉癌有无淋巴结转移、分化程度及肿瘤部位显著相关 ($P < 0.05$), 提示 EZH2 在促进喉癌增殖转移方面发挥了作用, 且 EZH2 高表达预示着更高的恶性程度。与 JMJD3 相似, EZH2 阳性表达患者较阴性表达患者 3 年总生存率低, 但差异无统计学意义, 考虑可能与本研究样本量不足、死亡例数少等有关, 需进一步研究证实。

值得关注的是, JMJD3 与 EZH2 在组蛋白甲基化调节过程中承担着相反的功能, 但在喉癌组织中均出现高表达, 它们的表达呈正相关且存在显著相关性。在前列腺癌中也有相似的结论, Idrissou 等^[18]研究显示 JMJD3 和 EZH2 在前列腺癌的不同临床阶段存在联合作用。Xiang 等^[19]推测, JMJD3 和 EZH2 同时表达上调存在以下几种原因: (1) JMJD3 和

EZH2 均是导致癌症发生的原因,但不共同出现在一次疾病进展中;(2) 如果 JMJD3 及 EZH2 在同一次疾病进展中出现,则存在拮抗作用的一个分子,一个原发性升高,另一个作为代偿因素升高;(3)EZH2 及 JMJD3 还存在组蛋白修饰调节的其他功能,通过其他调节通路而共同促进肿瘤发生、发展。目前许多研究都致力于寻找 JMJD3 及 EZH2 在肿瘤中存在的调节信号通路^[20-21],随着 JMJD3 及 EZH2 在肿瘤的发生、发展关系中越来越明确,许多靶向抑制剂也逐渐被发现并进行实验研究。JMJD3 组蛋白去甲基化酶活性抑制剂,如 JIB-04 和 GSK-J1/J4,在多种恶性肿瘤被报道有抑制肿瘤发展的作用^[12]。在头颈部鳞状细胞癌中也有研究显示 GSK-J1 可导致肿瘤缩小并且抑制肿瘤的发生、发展^[22]。针对 EZH2 的抑制剂是近年来研究的一个活跃领域,相关药物的几项临床试验目前正在不同类型的癌症中进行,如淋巴瘤、多发性骨髓瘤、前列腺癌等^[15]。JMJD3 及 EZH2 在喉癌中的作用机制需要进一步研究,对于新药物的开发、提高肿瘤患者的生存率均有重要意义。

参考文献:

- [1] Tamaki A, Miles BA, Lango M, et al. AHNS Series: do you know your guidelines? Review of current knowledge on laryngeal cancer[J]. *Head Neck*, 2018, 40(1): 170-181.
- [2] 朱静. EZH2 组蛋白甲基转移酶在肿瘤发生发展中的作用[J]. *国际妇产科学杂志*, 2011, 38(5): 415-418.
Zhu J. Roles of EZH2 histone methyltransferase in tumorigenesis [J]. *Journal of International Obstetrics and Gynecology*, 2011, 38(5): 415-418.
- [3] Yin X, Yang S, Zhang M, et al. The role and prospect of JMJD3 in stem cells and cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 1-8.
- [4] Huang J, Zhou L, Chen H, et al. EZH2 is overexpressed in laryngeal squamous cell carcinoma and enhances the stem-like properties of AMC-HN-8 cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(2): 837-846.
- [5] 郭晓强, 陆菁潇. 组蛋白 H3K27 去甲基化酶与肿瘤发生[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2011, 27(8): 706-711.
Guo XQ, Lu JX. Histone H3K27 demethylases and tumorigenesis[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 27(8): 706-711.
- [6] 胡珊, 韩聪, 胡建宏, 等. 组蛋白去甲基化酶 JMJD3 研究进展[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(9): 64-72.
Hu S, Han C, Hu JH, et al. Research progress on histone demethylase JMJD3 [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(9): 64-72.
- [7] Agger K, Cloos PA, Rudkjaer L, et al. The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A-ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(10): 1171-1176.
- [8] Barradas M, Anderton E, Acosta JC, et al. Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(10): 1177-1182.
- [9] 徐小艳, 王建君, 闫琛, 等. 乳腺浸润性导管癌中 JMJD3、MMP-2 和 VEGF 的表达及其与临床病理特征的关系[J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(11): 1593-1600.
Xu XY, Wang JJ, Yan C, et al. Association of JMJD3, MMP-2 and VEGF expressions with clinicopathological features of invasive ductal breast carcinoma [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2020, 40(11): 1593-1600.
- [10] Pereira F, Barbachano A, Silva J, et al. KDM6B/JMJD3 histone demethylase is induced by vitamin D and modulates its effects in colon cancer cells [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(23): 4655-4665.
- [11] Li SH, Lu HI, Chen YH, et al. JMJD3 expression is an independent prognosticator in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Surgery*, 2019, 165(5): 946-952.
- [12] Xu Z, Xia Y, Xiao Z, et al. Comprehensive profiling of JMJD3 in gastric cancer and its influence on patient survival[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 868-878.
- [13] Hanaki S, Shimada M. Targeting EZH2 as cancer therapy[J]. *J Biochem*, 2021, Jan 21. [Ahead of print]
- [14] Dai ZY, Jin SM, Luo HQ, et al. LncRNA HOTAIR regulates anoikis-resistance capacity and spheroid formation of ovarian cancer cells by recruiting EZH2 and influencing H3K27 methylation[J]. *Neoplasma*, 2021, Jan 28. [Ahead of print]
- [15] Zhang H, Liang H, Wu S, et al. MicroRNA-638 induces apoptosis and autophagy in human liver cancer cells by targeting enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2021, 82: 103559.
- [16] Pu FF, Shi DY, Chen T, et al. SP1-induced long non-coding RNA SNHG6 facilitates the carcinogenesis of chondrosarcoma through inhibiting KLF6 by recruiting EZH2 [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 1-17.
- [17] Liang W, Wu J, Qiu X. LINC01116 facilitates colorectal cancer cell proliferation and angiogenesis through targeting EZH2-regulated TPM1[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 45-58.
- [18] Idrissou M, Daures M, Jemia AB, et al. EZH2 histone methyltransferase and JMJD3 histone demethylase Implications in prostate cancer[J]. *OMICS*, 2017, 21(12): 751-753.
- [19] Xiang Y, Zhu Z, Han G, et al. JMJD3 is a histone H3K27 demethylase[J]. *Cell Res*, 2007, 17(10): 850-857.
- [20] Bracken AP, Pasini D, Capra M, et al. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer[J]. *EMBO J*, 2003, 22(20): 5323-5335.
- [21] Tai Y, Ji Y, Liu F, et al. Long noncoding RNA SOX2-OT facilitates laryngeal squamous cell carcinoma development by epigenetically inhibiting PTEN via methyltransferase EZH2[J]. *IUBMB Life*, 2019, 71(9): 1230-1239.
- [22] Zhang W, Cheng J, Diao P, et al. Therapeutically targeting head and neck squamous cell carcinoma through synergistic inhibition of LSD1 and JMJD3 by TCP and GSK-J1[J]. *Br J Cancer*, 2020, 122(4): 528-538.