

Bioinformatics analysis of ISG15 expression in hypopharyngeal cancer

Yingjie Wang¹ Lianhe Li^{2*} Liangyu Zou²

1. Chengde Medical College, Chengde, Hebei, 067000, China

2. Chaoyang Central Hospital of China Medical University, Chaoyang, Liaoning, 122000, China

Abstract

Through the bioinformatics analysis of ISG15, firstly, the expression of ISG15 in cancer tissues was analysed by pan-cancer analysis in TCGA database, and it was found that its expression was up-regulated in many cancer types, among which it was significantly up-regulated in head and neck cancers, which confirmed that it was a cancer-related gene. The expression of ISG15 in hypopharyngeal carcinoma was found to be significantly elevated compared with normal tissues, and its possible role in hypopharyngeal carcinoma was analysed by enrichment analysis, and it was further concluded that ISG15 plays a certain role in hypopharyngeal carcinogenesis. Finally, the qPCR results confirmed that the expression of ISG15 was up-regulated in hypopharyngeal carcinoma and had the potential to become a molecular marker for hypopharyngeal carcinoma.

Keywords

ISG15 Bioinformatics; Hypopharyngeal cancer; GSEA enrichment analysis; qPCR

ISG15 在下咽癌中表达的生物信息学分析

王颖杰¹ 李连贺^{2*} 邹良玉²

1. 承德医学院, 中国·河北承德 067000

2. 中国医科大学朝阳市中心医院, 中国·辽宁朝阳 122000

摘要

通过对ISG15进行相关生物信息学分析, 首先通过TCGA数据库泛癌分析其在癌症组织中表达情况, 发现其在多种癌种中表达上调, 其中在头颈癌中显著上调, 确认其为癌症相关基因, 经TCGA数据库差异分析下咽癌以及正常组织中表达, 发现相比正常组织, ISG15在下咽癌中表达显著升高, 通过富集分析其在下咽癌中可能发挥的作用, 进一步认为 ISG15在下咽癌发生中发挥一定作用。最后经qPCR实验结果证实: ISG15在下咽癌中表达上调, 有成为下咽癌分子标志物的潜力。

关键词

ISG15生物信息学; 下咽癌; GSEA富集分析; qPCR

1 引言

下咽癌是一类发病率较低的癌症, 其发病率仅占头颈癌的3%~5%, 其中鳞状细胞癌最常见, 而下咽癌中70%为低分化癌, 在解剖学上, 下咽位于喉部和食道之间, 包括咽侧壁、咽后壁、梨状窝和通向食管入口的环状后区域^[1], 因其解剖位置隐蔽, 且起病隐匿、易发生淋巴结转移, 使得此类癌症的早期诊断极为困难, 常常在发现时已发展至中晚

期, 导致预后不良^[2], 且近50%的患者在治疗后第一年复发^[3], 5年总生存率约为30%~35%^[4]。由于大部分患者在临床初诊时可能就已处于中晚期, 已丧失手术条件, 且具备手术条件的大部分下咽癌的患者需进行喉全切除的手术, 可能面临终生佩戴呼吸套管、说话方式改变等情况, 所以早期诊断对下咽癌的治疗至关重要。

ISG15为干扰素刺激基因15, 干扰素诱导超过500的基因表达, 所有这些基因统称为ISG, 其中ISG15为诱导最早的ISG之一^[5]”, 由于具有与泛素类似的结构, 所以可以具有类似泛素化的酶促级联反应, 称为ISGylation。ISG15蛋白是一种由干扰素刺激基因15编码产生的类泛素化蛋白, 其初级结构和高级结构均与泛素相似, 它的氨基端和羧基端各有1个与泛素类似的高度同源功能域, 是第一个被证明可以共价修饰蛋白质的泛素样蛋白^[6], ISG15蛋白在生理条件下表达最少, 然而, 其IFN依赖性表达在各种人类疾病中

【作者简介】王颖杰(1998-), 女, 中国辽宁凌源人, 在读硕士, 从事头颈癌研究。

【通讯作者】李连贺(1974-), 男, 中国辽宁朝阳人, 博士, 从事耳鼻咽喉头颈外科相关领域常见病、多发病以及疑难病的诊断与治疗、头颈癌相关临床以及生物信息学研究。

异常升高或受损，除了抗病毒功能外^[7]，还包括多种类型的癌症、神经退行性疾病、炎症性疾病等等。本文旨在通过生物信息学分析 ISG15 在下咽癌中的相关表达，来探讨 ISG15 在下咽癌中可能发挥的作用。

材料与方法

2 一般资料

2.1 样本来源

2.1.1 TCGA 数据库

TCGA 数据库中下载下咽癌患者及正常患者的测序数据，其中包括 9 例下咽癌患者及 44 例正常患者。并下载泛癌信息。

2.1.2 qPCR 患者信息

收集 2019 年 6 月至 2023 年 6 月就诊于朝阳市中心医院 6 例下咽癌临床初治患者，术后病理证实为下咽部鳞状细胞癌，治疗前已完善电子喉镜检查，6 例患下咽其余疾病临床初治患者，正常对照粘膜组织取自 6 例鼻咽、成人慢性扁桃体炎或扁桃体良性肿物等行扁桃体切除术临床初治患者，部位为扁桃体下极粘膜组织，下咽癌患者均取其下咽癌组织标本，下咽癌组织及正常组织均在离体 15 分钟内放入液氮罐中保存，然后在半小时内移至 -80℃ 冰箱中保存至核酸提取。纳入及排除标准：纳入标准：患者年龄在 18~80 岁，临床资料完善，依从性好，术前均已签署相关知情同意书。排除标准：排除既往有除下咽以外的原发肿瘤病史；既往曾接受过下咽部手术、放疗或化疗；对利多卡因等麻药过敏，患有重症难以控制的呼吸困难、不稳定型心绞痛、难以控制的出血性疾病，患者基础状态难以耐受手术以及无法理解和签署知情同意书的患者

2.2 泛癌分析

全面的分子分析正在从根本上改变癌症研究。癌症基因组图谱（TCGA）和国际癌症基因组联盟（ICGC）生成的数万种肿瘤的基因组目录为我们对驱动肿瘤发生的突变的理解增添了极大的深度^[8]。CPTAC 数据集目前包括 10 个前瞻性收集的肿瘤癌症队列，这些肿瘤通过基因组学、转录组学、蛋白质组学和磷酸化蛋白质组学进行了分析。

2.3 差异分析

我们对 TCGA 数据库中的 ISG15 在下咽癌中的表达进行了差异分析，确定 ISG15 是否在下咽癌中显著表达。

2.4 富集分析

GSEA(Gene Set Enrichment Analysis, 基因集富集分析) 是一种用于分析基因表达数据的计算方法，旨在检测预先定义的基因集（如通路、功能类别或生物学过程）在表达谱中是否显著富集。其中 KEGG 及 GO 富集分析数据在 MSigdb 获得，利用 R 软件“clusterprofiler”包用于低免疫浸润簇和高免疫浸润簇之间的基因集富集分析（GSEA），而 R 软件“enrichplot”包用于可视化。

2.5 qPCR

2.5.1 引物序列（见表 1）

表 1 ISG15 表达 qPCR 验证引物序列

引物名称	引物序列	引物长度	产物长度
人 ISG15-F2	GGGCAACGAATTCAGGTGT	20	81
人 ISG15-R2	ACGCCGATCTTCTGGGTGAT	20	

2.5.2 实验过程

RNA 提取步骤：

①取约 100mg 冻存肿瘤样本，经灭菌剪刀剪碎后转移至 2mL RNase-Free 离心管，加入 2 枚匀质钢珠和 1000 μL Trizol 裂解液，通过高通量匀浆仪（40Hz，180s）充分裂解。将匀浆液转移至预冷 1.5mL EP 管，4℃ 12000rpm 离心 2 分钟收集上清。

②按 1:5 体积比加入氯仿，涡旋振荡 15 秒后室温孵育 2 分钟。4℃ 12000 × g 离心 10 分钟，定量转移上层水相至新管。加入等体积 70% 乙醇（DEPC 水配制）轻柔混匀，分次过柱后 12000rpm 离心 20 秒弃液。

③依次用 350 μL Buffer RW1 和 500 μL Buffer RW2 漂洗吸附柱，每次离心 20 秒。配置 DNaseI 消化体系（80 μL 含 20U 酶），加至吸附柱 25℃ 避光孵育 15 分钟，再次用 Buffer RW1/RW2 清洗。

④空离去残液后室温干燥 5 分钟，用 ≥30 μL DEPC 水浸提 1 分钟，离心收集洗脱液。重复洗脱可提高产率，终产物分装保存于 -80℃。

关键质控：全程使用 DEPC 水处理耗材，所有离心步骤均在 4℃ 预冷转子中以 12000rpm（13400g）进行。可通过减少洗脱体积或重复洗脱提升 RNA 终浓度。

反转录体系及步骤：

反转录：使用全式金 Transgen 反转录试剂盒操作，将各组分混匀后置于 42℃ 水浴锅中孵育 1h，得到第一链 cDNA，将逆转录后的 cDNA 用 H₂O 5 倍稀释后，进行后续 qPCR 反应。

Real-Time PCR 反应体系及步骤：

本实验采用 SYBR Green I 法实时荧光定量 PCR（相对定量）进行 mRNA 表达量分析

2.6 数据统计

本研究采用 2^{^(-ΔΔCt)} 算法进行目的基因表达量相对定量分析，具体实施流程如下：通过实时荧光定量 PCR 获取目的基因与内源性参照基因（Housekeeping gene）的 Ct 值，计算 ΔCt=Ct_{target}-Ct_{reference}；选取对照组样本 ΔCt 值的算术平均数作为基准值（ΔCt_{control_mean}）；各实验组 ΔCt 值经基准校正获得 ΔΔCt=ΔCt_{sample}-ΔCt_{control_mean}；通过指数转换公式计算基因表达量相对倍数变化：Relative Expression=2^{^(-ΔΔCt)}。

采用 SPSS26.0 统计软件对数据进行处理，符合正态分

布的计量资料用均数和标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异采用 t 检验, 非正态分布的计量资料用中位数和四分位间距表示 (M, Q), 组间差异采用非参数秩和检验 U 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

①对 ISG15 进行泛癌分析, 发现 ISG15 在多种癌症中表达升高, 其中头颈癌中 ISG15 表达明显升高, 且 $p < 0.05$ (见

图 1)。

②下咽癌中差异分析结果认为 ISG15 在下咽癌中表达明显升高, $p < 0.05$ (见图 2)。

③ GSEA 富集分析结果认为 ISG15 主要富集在嗅觉传导、核糖体及剪接体通路。

④ ISG15 的 qPCR 验证结果认为 ISG15 在下咽癌组织中明显升高, 且 $p < 0.05$ (见图 4)。

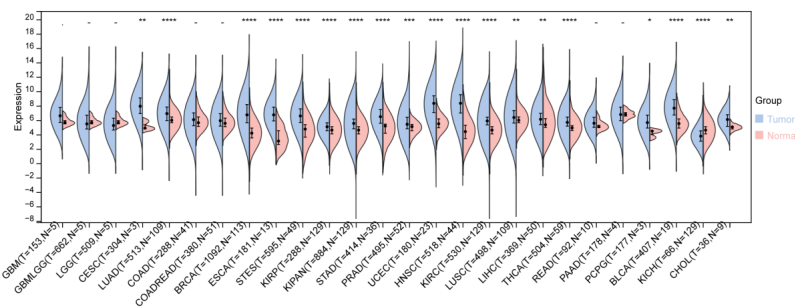


图 1 泛癌分析结果 \

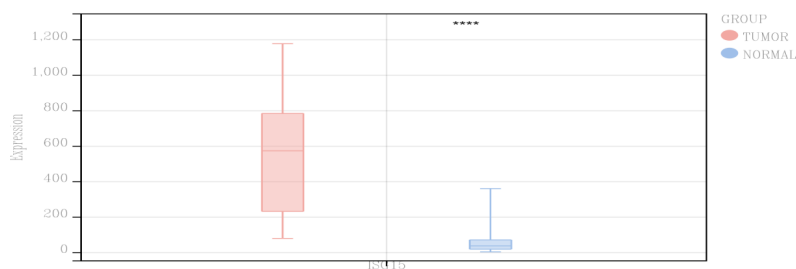


图 2 ISG15 在下咽癌中表达情况

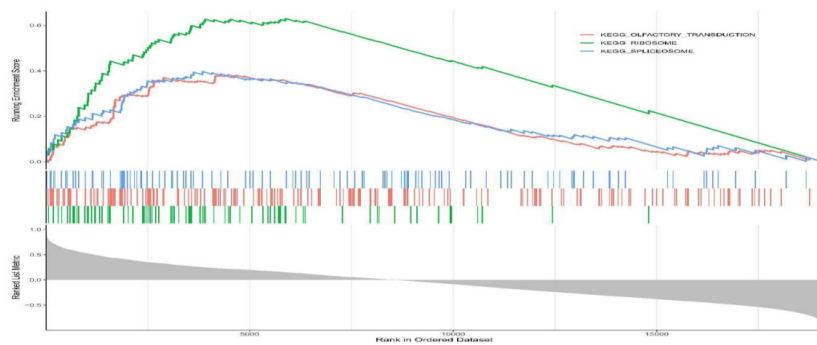


图 3 ISG15 的 GSEA 分析

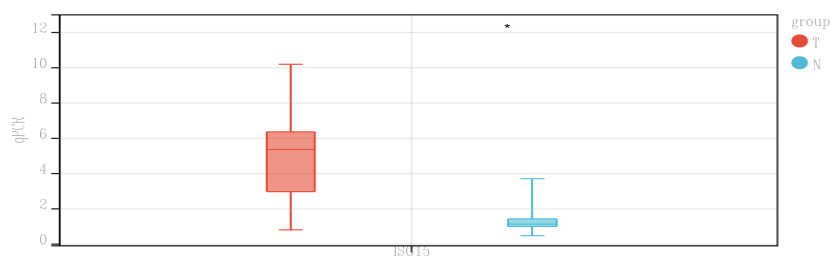


图 4 ISG15 的 qPCR 验证

4 讨论

下咽癌是头颈部肿瘤中预后非常差的高恶性肿瘤，其基本原因主要是该病起病隐匿，早期症状不典型，且极易发生颈部淋巴结转移^[9]，所以下咽癌早期诊断尤为重要。目前已知的下咽癌诊断方法包括：①内镜检查，通过内镜检查可以发现异常的癌症病灶，以及评估浅表肿瘤扩展以及癌症浸润情况^[10]；②影像学检查，目前下咽癌的诊断主要还是依靠CT及MRI，可以用于评估肿瘤的大小、位置及是否发生转移，从而判断患者的临床分期以及制定合理的手术及治疗方案，目前还有PET-CT及PET-MRI在临床诊断中发挥作用^[11]；③病理检查，为癌症诊断的金标准，通过内镜或手术获取癌症病灶的病理组织，从而进行活检；④分子标志物检测：目前已知的分子标志物包括p53、ki67等。发现新的分子诊断标志物会对下咽癌的诊治有重要意义。

我们通过泛癌分析发现ISG15在多种癌症中均升高，且ISG15目前在多种癌症中均有研究，有研究表明ISG15通过调节IL6/JAK2/STAT3信号传导以促进肿瘤的增殖、迁移和侵袭^[12]，且ISG15的低表达降低了肿瘤生长速率并促进了细胞凋亡，且几项独立研究表明，ISG15在肿瘤干细胞样特征中具有新的作用^[13]。例如，ISG15介导的肿瘤干细胞被证明是卵巢癌顺铂耐药的重要原因^[14]。ISG15对肿瘤干细胞的自我更新、侵袭和致瘤潜力对胰腺癌的发展至关重要。也有研究认为胰腺癌干细胞增加了干扰素刺激基因15（ISG15）和蛋白质ISGylation的表达，这对于维持其代谢可塑性至关重要，若降低ISGylation表达会损害了胰腺癌的自我更新及其体内致瘤能力。

我们通过差异分析发现ISG15在下咽癌中显著升高，目前ISG15在头颈癌中的表达也有相关研究，有研究认为鼻咽癌中高ISG15水平与更频繁的局部复发和较短的总生存期有关，且ISG15的过表达增加了鼻咽癌细胞对放疗和顺铂（DDP）治疗的耐药性^[15]，而在口腔癌中，有研究认为，牙周病原菌感染后，可能通过上调ISG15的方式来促进口腔癌的发生^[16]。

5 结论

相比于正常组织来说，ISG15在多种癌症中表达显著升高，其中在头颈癌中升高显著，进一步分析下咽癌中ISG15表达，发现ISG15在下咽癌中表达显著升高（ $p<0.05$ ），且可能参与嗅觉传导、核糖体及剪接体通路，经qPCR验证后结果成立，结果认为ISG15可能在下咽癌发生中具有一定作用。

参考文献

- [1] Hinerman R W, Amdur R J, Mendenhall W M, et al. Hypopharyngeal carcinoma[J]. Current Treatment Options in Oncology, 2002, 3(1): 41-49.
- [2] Zhang Y, Liu G, Tao M, et al. Integrated transcriptome study of the tumor microenvironment for treatment response prediction

- in male predominant hypopharyngeal carcinoma[J]. Nature Communications, 2023, 14: 1466.
- [3] Garneau J C, Bakst R L, Miles B A. Hypopharyngeal cancer: A state of the art review[J]. Oral Oncology, 2018, 86: 244-250.
- [4] Newman J R, Connolly T M, Illing E A, et al. Survival trends in hypopharyngeal cancer: a population-based review[J]. The Laryngoscope, 2015, 125(3): 624-629.
- [5] Perng Y C, Lenschow D J. ISG15 in antiviral immunity and beyond[J]. Nature Reviews. Microbiology, 2018, 16(7): 423-439.
- [6] Mirzalieva O, Juncker M, Schwartzburg J, et al. ISG15 and ISGylation in Human Diseases[J]. Cells, 2022, 11(3): 538.
- [7] Dzimianski J V, Scholte F E M, Bergeron É, 等. ISG15: It's complicated[J]. Journal of Molecular Biology, 2019, 431(21): 4203-4216.
- [8] Li Y, Dou Y, Da Veiga Leprevost F, et al. Proteogenomic data and resources for pan-cancer analysis[J]. Cancer Cell, 2023, 41(8): 1397-1406.
- [9] Li Y, Pan M, Lu T, et al. RAF1 promotes lymphatic metastasis of hypopharyngeal carcinoma via regulating LAGE1: an experimental research[J]. Journal of Translational Medicine, 2022, 20: 255.
- [10] C P, A P, M R, et al. Clinical and Radiological Evaluation of Hypopharyngeal Carcinoma[J]. Advances in oto-rhino-laryngology, 2019, 83.
- [11] Kave M, Sadegi K, Parooie F, et al. Diagnostic Accuracy of Combined PET/CT with MRI, 18F-FDG PET/MRI, and 18F-FDG PET/CT in Patients with Oropharyngeal and Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Contrast Media & Molecular Imaging, 2021, 2021: 6653117.
- [12] Xie W, Zhang Y, Zhang Z, et al. ISG15 promotes tumor progression via IL6/JAK2/STAT3 signaling pathway in ccRCC[J]. Clinical and Experimental Medicine, 2024, 24(1): 140.
- [13] T X, C Z, J C, et al. ISG15 and ISGylation modulates cancer stem cell-like characteristics in promoting tumor growth of anaplastic thyroid carcinoma[J]. Journal of experimental & clinical cancer research : CR, 2023, 42(1).
- [14] Zhang Q, Wang J, Qiao H, et al. ISG15 is downregulated by KLF12 and implicated in maintenance of cancer stem cell-like features in cisplatin-resistant ovarian cancer[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2021, 25(9): 4395-4407.
- [15] Rh C, Y D, P H, et al. ISG15 predicts poor prognosis and promotes cancer stem cell phenotype in nasopharyngeal carcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(13).
- [16] Y Q, Z L, T L, et al. Prevotella intermedia boosts OSCC progression through ISG15 upregulation: a new target for intervention[J]. Journal of cancer research and clinical oncology, 2024, 150(4).