

去泛素化酶PSMD7对喉鳞状细胞癌恶性进展调控的作用研究

徐海铭^{1,2}, 刘清华^{1,2}, 高歌^{1,2}, 李北成³, 车琴³, 张泽生^{1,2}, 赵凯³, 刘明波^{2,3}

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第六医学中心耳鼻咽喉头颈外科医学部, 北京 100853;

³解放军总医院海南医院耳鼻咽喉头颈外科, 海南三亚 572013

摘要: **背景** PSMD7作为去泛素化酶家族中的重要一员, 在癌症的发生、发展中起着至关重要的作用, 但其在喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)中的作用研究较少。**目的** 探讨去泛素化酶PSMD7在LSCC中的临床意义, 明晰其与患者预后的关联, 剖析其免疫浸润特性及药物敏感性, 同时借助体外细胞实验, 对PSMD7影响LSCC细胞生物学功能的作用进行验证。**方法** 运用TCGA数据库结合R语言工具进行生物信息学分析, 包括表达差异分析、生存分析、富集分析、免疫浸润分析和药物敏感性分析。采用喉鳞癌细胞系开展体外实验, 通过质粒转染和siRNA技术构建PSMD7过表达组(OE-PSMD7)、敲减组(si-PSMD7)和对照组(Control/si-NC)。利用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)和Western blot实验检测PSMD7在喉癌细胞中的表达水平; 通过CCK-8实验和克隆形成实验评估细胞增殖, Transwell、划痕实验检测细胞迁移与侵袭; Western blot分析细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。**结果** 差异分析发现PSMD7在喉癌组织中表达上调($P < 0.001$)。预后分析显示, 高表达组喉癌患者总生存期低于低表达组($P < 0.001$), 且PSMD7表达与LSCC患者的临床分期及T分期相关。富集分析表明, PSMD7通过ATM等信号通路影响LSCC恶性进展。免疫浸润分析发现PSMD7与Th2细胞等存在正相关关系, 与B细胞等存在负相关关系。PSMD7与达拉非尼、雷帕霉素等药物的敏感性相关。PSMD7能够促进LSCC细胞增殖($P < 0.05$)、迁移($P < 0.05$)与侵袭($P < 0.05$), 且PSMD7能够调控EMT相关蛋白, 促进喉鳞状细胞癌细胞发生EMT。**结论** 去泛素化酶PSMD7表达水平与患者的预后状况、肿瘤免疫浸润特征、化疗药物的选择及疗效紧密相关, 可对喉鳞状细胞癌的增殖、迁移、侵袭及EMT作用产生影响。

关键词: 去泛素化酶; 喉鳞状细胞癌; PSMD7; 生物信息学; 分子功能

中图分类号: R739.65

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2025)06-0605-11

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.25010203

引用本文: 徐海铭, 刘清华, 高歌, 等. 去泛素化酶PSMD7对喉鳞状细胞癌恶性进展调控的作用研究 [J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (6): 605-615.

Effect of deubiquitinating enzyme PSMD7 on regulation of laryngeal cancer malignant progression

XU Haiming^{1,2}, LIU Qinghua^{1,2}, GAO Ge^{1,2}, LI Beicheng³, CHE Qin³, ZHANG Zesheng^{1,2}, ZHAO Kai³, LIU Mingbo^{2,3}

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ³Department of Head and Neck Surgery, Hainan Hospital of PLA General Hospital, Sanya 572013, Hainan Province, China

Corresponding author: LIU Mingbo. Email: mingbo666@vip.163.com

Abstract: Background PSMD7, a key member of the deubiquitinating enzyme family, plays a critical role in cancer development and progression. However, its role in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) remains poorly understood. **Objective** To explore the clinical significance of deubiquitinating enzyme PSMD7 in LSCC, clarify its association with patient prognosis, analyze its immune infiltration characteristics and drug sensitivity, and verify the effect of PSMD7 on the biological functions of LSCC cells through in vitro cell experiments. **Methods** Data from the TCGA database were analyzed using R language for bioinformatics analyses, including differential expression analysis, survival analysis, enrichment analysis, immune infiltration analysis, and drug sensitivity analysis, to explore the impacts of PSMD7 on clinical prognosis, immune infiltration, and drug sensitivity in laryngeal cancer patients. In vitro experiments were performed using LSCC cell lines (AMC-HN-8 and FD-LSC-1). PSMD7 overexpression (OE-PSMD7), knockdown (si-PSMD7), and control (Control/si-NC) groups were established via plasmid transfection and siRNA technology. Quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blot were used to detect PSMD7 expression in LSCC cells. CCK-8 and colony formation assays were used to evaluate cell proliferation; Cell migration and invasion was assessed by Transwell and wound-healing assays; Western blot was applied to analyze the expression of epithelial-mesenchymal transition

收稿日期: 2025-01-02

基金项目: 海南省重大科技计划项目(ZDKJ202005); 海南省科技计划项目(LCYX202105, LCYX202202)

第一作者: 徐海铭, 在读硕士, 医师. Email: 709801509@qq.com

通信作者: 刘明波, 博士, 主任医师, 博士生导师. Email: mingbo666@vip.163.com

(EMT)-related proteins (E-cadherin, N-cadherin, and vimentin). **Results** Differential expression analysis revealed that PSMD7 was significantly upregulated in laryngeal cancer tissues ($P<0.001$). Survival analysis showed that patients with high PSMD7 expression had a significantly shorter overall survival (OS) than those with low expression ($P<0.001$), and PSMD7 expression was correlated with clinical stage and T stage in LSCC patients. Enrichment analysis indicated that PSMD7 influenced the malignant progression of LSCC through signaling pathways including ATM. Immune infiltration analysis demonstrated positive correlations between PSMD7 expression and Th2 cells, eosinophils, and macrophages, while negative correlations were observed with B cells and CD8⁺ T cells. Drug sensitivity analysis further showed associations between PSMD7 expression and sensitivity to chemotherapeutic agents such as dabrafenib and rapamycin. In vitro functional experiments revealed that PSMD7 promoted LSCC cell proliferation ($P<0.05$), migration ($P<0.05$), and invasion ($P<0.05$). Western blot analysis showed that PSMD7 regulated the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins (E-cadherin, N-cadherin, vimentin), thereby facilitating EMT in laryngeal squamous cell carcinoma cells. **Conclusion** The expression level of the deubiquitinating enzyme PSMD7 is closely related to the prognosis of patients, the characteristics of tumor immune infiltration, the selection of chemotherapeutic drugs, and their efficacy. It can affect the proliferation, migration, invasion, and EMT of laryngeal squamous cell carcinoma.

Keywords: deubiquitinating enzyme; laryngeal squamous cell carcinoma; PSMD7; bioinformatics; molecular function

Cited as: Xu HM, Liu QH, Gao G, et al. Effect of deubiquitinating enzyme PSMD7 on regulation of laryngeal cancer malignant progression[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(6): 605-615.

喉癌是头颈部最为常见的恶性肿瘤，其病理类型中有超过 95% 为喉鳞状细胞癌 (laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)，在头颈部肿瘤中属于高发的类型^[1-2]。手术治疗及同步放化疗等手段虽在一定程度上改善了 LSCC 患者的生存质量，但其极易复发且常伴有淋巴结转移的特性，使 LSCC 患者 5 年生存率难以通过现有的治疗得到显著提升^[3-4]。LSCC 发生发展常伴随着基因突变的累积，这些基因突变会导致关键信号通路的异常激活，从而促进喉癌细胞的增殖与转移。

去泛素化酶 (deubiquitination enzyme, DUBs) 是一类通过调节泛素化与去泛素化之间的平衡来维持细胞稳态的重要蛋白酶。它能够从特定蛋白质上去除泛素，从而抵消连接酶的功能，逆转或抑制泛素化的效应^[5-6]，以此来维持泛素系统的稳态。在 DUBs 的 7 个亚家族分类中，JAMM 家族主要包括 PSMD7、PSMD14、MYSM1、PRPF8 等蛋白酶，它与肿瘤发生、免疫和炎症性疾病在多个水平上特异性相关^[7-8]。目前喉癌的治疗迫切需要新的生物标志物和治疗靶点，而 PSMD7 在多种肿瘤中已显示出重要作用，但关于 LSCC 的研究较少。我们从 TCGA 数据库获取喉癌相关转录组数据和临床资料，进行生物信息学分析并开展细胞实验，旨在初步探究 PSMD7 与 LSCC 的关联，研究 PSMD7 对 LSCC 细胞生物学功能的影响，揭示其在肿瘤发生发展中的作用机制，从而为临床诊断和治疗提供潜在的靶点和思路。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析

1.1.1 喉癌相关数据的获取 从 TCGA 数据库中

下载 529 例头颈肿瘤患者的转录组数据 (TCGA-STAD)，依据 TCGA 数据库中明确标注的肿瘤类型及组织来源信息进行筛选，获得 LSCC 患者资料 104 例和癌旁对照组织 12 例。

1.1.2 PSMD7 在 LSCC 中的表达差异分析与生存分析 采用 R 语言中的 “ggplot2” 包进行喉癌相关数据的可视化分析，并根据肿瘤组织中 PSMD7 的表达量，以中位值为界，将样本划分为高表达组与低表达组，利用 “survival” 包对喉癌患者样本的临床资料进行生存分析，旨在探究关键基因 PSMD7 的表达水平与喉癌患者预后之间的潜在关联，并采用 “survminer” 包绘制 Kaplan-Meier 生存曲线，以评估 PSMD7 表达对喉癌预后的影响。

1.1.3 PSMD7 在 LSCC 中的富集分析 借助 “DESeq” 包针对 PSMD7 进行单基因差异分析。最后使用 “ggplot2” 包对目标基因 PSMD7 进行 Gene Ontology (GO)/Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 富集分析。运用 “clusterProfiler” 包进行基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)，并对分析结果进行可视化处理，旨在评估 PSMD7 在喉癌发生发展中的潜在生物学功能及其可能参与的信号传导通路。

1.1.4 免疫浸润分析 采用 CIBERSORT 算法，基于 LSCC 组织转录组数据计算 22 类免疫细胞浸润分数，结合免疫细胞特征基因集进行反卷积分析。通过 Pearson/Spearman 相关分析探讨 PSMD7 表达与免疫细胞浸润的关联，筛选显著相关的免疫细胞类型 ($P<0.05$)，以棒棒糖图可视化相关性强度及统计学显著性，进一步揭示 PSMD7 在肿瘤免疫微环境中的潜在调控作用。

1.2 药物敏感性分析

为评估 PSMD7 高表达组与低表达组之间的药物敏感性差异, 利用 R 语言中的“pRRophetic”包, 结合癌症药物敏感性基因组学(Genomics of Drug Sensitivity in Cancer, GDSC)数据库, 对 LSCC 样本 RNA 测序数据进行分析。以半数抑制浓度 (the half maximal inhibitory concentration, IC50) 反映 LSCC 患者对药物的敏感性。

1.3 细胞实验

1.3.1 主要试剂与仪器 支气管上皮细胞系 HaCat 与 LSCC 细胞系(AMC-HN-8 和 FD-LSC-1)均购于武汉尚恩生物技术有限公司; RNA 快速提取试剂盒购于上海飞捷公司、cDNA 合成试剂盒购于大连 TaKaRa 公司、qPCR 试剂盒购于北京诺贝莱生物公司; DMEM 购于 MACGENE 公司, 青霉素-链霉素双抗购于 Gibco 公司, Trans-MEM、FBS 购于武汉普诺赛公司; 0.25% 胰酶购于广州济恒医药科技有限公司、LIPO fectamine™ RNAiMAX Reagent 及 Lipo3000 转染试剂(赛默飞)用于细胞处理; CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所)用于细胞活性检测; qPCR 仪(赛默飞 ABI7500)配合 qPCR 试剂盒(北京诺贝莱生物)进行基因表达分析。质粒提取试剂盒购于 OMEGA 公司; 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)、抗体稀释液、封闭液购于 Boster Bio 公司, 一抗 Vimentin (ab92547)、N-Cadherin (ab245117)、E-Cadherin (ab40772)、 β -actin(ab179467) 和二抗 Goat pAb to Rb IgG (ab6721)、Rb pAb to Ms IgG (ab6728) 购于 Abcam 公司, 基底膜基质胶及实验所用的细胞孔板均购于康宁公司。

1.3.2 细胞培养与传代 本研究主要使用支气管上皮细胞系 HaCat、LSCC 细胞系 AMC-HN-8 及 FD-LSC-1。细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中常规培养, 设置培养箱为恒温 37°C, 5% CO₂。当细胞增殖至密度为 80% 时进行细胞传代, 并选用处于对数生长期的细胞开展后续实验。

1.3.3 细菌的培养与质粒的提取 将大肠埃希菌接种于 LB 液体培养基中, 置于 37°C 恒温摇床中进行过夜培养以扩增菌体。随后, 采用质粒提取试剂盒进行质粒抽提, 并通过测定确定质粒浓度。最终, 将提取的质粒保存于 -20°C 条件下以备长期储存使用。

1.4 喉癌细胞 PSMD7 高表达与敲减模型的构建

本研究选用 AMC-HN-8 和 FD-LSC-1 喉癌细胞

系, 构建了 PSMD7 的高表达与低表达模型。利用 Lipo3000 及 LipoIMax Reagent 分别将过表达质粒和 siRNA 转染至 LSCC 细胞中, 并进行培养。

1.5 CCK-8 及克隆形成实验检测细胞的增殖能力

采用 CCK-8 及克隆形成实验检测 PSMD7 对 LSCC 细胞的增殖影响。在 CCK-8 实验中, 向 96 孔板中加入 100 μ L/孔转染细胞悬液, 细胞浓度为 5×10^3 /mL, 设置 3 个复孔。再加入 10 μ L/孔 CCK-8 试剂, 置于 37°C 温箱中孵育 1 h 后测定 450 nm 处的吸光度。在克隆形成实验中, 将细胞以 800/孔的密度接种于 6 孔板中, 设置 3 个复孔, 并培养 14 d。随后, 对细胞进行固定、染色、拍照, 并计算克隆形成率, 即克隆数与接种细胞数的比值 $\times 100\%$ 。每个实验重复 3 次。

1.6 划痕实验及 Transwell 实验检测细胞的迁移、侵袭能力

细胞划痕实验用于检测细胞的迁移情况, 每孔接种 4×10^5 个转染细胞。48 h 后, 使用无菌 1 000 μ L 移液枪头对贴壁细胞进行直线划痕, 使用 PBS 冲洗 2 遍后分别在 0 h 和 24 h 时拍摄划痕照片。在 Transwell 迁移实验中, 将转染后的细胞重悬于 200 μ L 无血清培养基中, 随后移至 Transwell 孔板(康宁公司)上室, 同时在下室加入 500 μ L 含 10% FBS 的 DMEM。将孔板在 37°C 下孵育 24 ~ 48 h 后, 对细胞进行固定和染色处理。进行 Transwell 侵袭实验前, 需先将细胞外基质胶铺于上室, 待其凝固 30 min 后用 DMEM 培养基进行冲洗, 后续步骤按前述方法进行, 每组实验均设置 3 个复孔, 每个实验重复 3 次。最后统一使用 Image J 软件进行定量分析。

1.7 qPCR 实验检测 PSMD7 RNA 的表达

使用 RNA 快速提取试剂盒提取细胞中的总 RNA, 使用 Rescript II RT SuperMix 进行逆转录过程以促进 cDNA 合成。采用 SYBR Premix UrTaq II 试剂盒(诺贝莱生物技术有限公司, 中国北京)进行 qPCR 检测。选择 GAPDH 作为内参基因使检测标准化, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算相对表达水平并可视化。该实验每个样本设置 3 个复孔, 每个实验重复 3 次。相关引物序列见表 1。

1.8 Western blot 检测 PSMD7 蛋白、E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白及波形蛋白的表达

通过 BCA 蛋白定量法测量提取的蛋白浓度, 并根据其定量结果加入相应体积的总蛋白样品, 与 5 \times 蛋白质凝胶电泳上样缓冲液混合。配制 4% ~

表 1 siRNA 及 qPCR 引物序列
Tab. 1 siRNA and primers sequences

基因	序列(5'-3')
siPSMD7-1	5'-GCCCUAAACUACACAAGAAUU-3'
siPSMD7-2	5'-UUCUUGUGUAGUUUAGGGCUU-3'
siPSMD7-3	5'-UGACAUUGCCAUCAACGAAUU-3'
siNC	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
PSMD7	
Forward	5'-TTGGAGCAGAGGAAGCTGAG-3'
Reverse	5'-CTGACATCTGGCAGCAGGTT-3'
GAPDH	
Forward	5'-GTCTCTCTGACTTCAACAGCG-3'
Reverse	5'-ACCACCTGTTGCTGTAGCAA-3'

12%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶, 分组加样后进行电泳。当条带至分离胶适当位置时结束电泳, 在恒压状态下进行转膜(20 V, 10~20 min)。将转好的膜进行封闭1 h, 洗膜后加入稀释的一抗4°C孵育过夜, 3次洗膜后再加入二抗孵育1 h, 再次洗膜并进行显影、成像。该实验每个样本设置3个复孔, 每个实验重复3次。

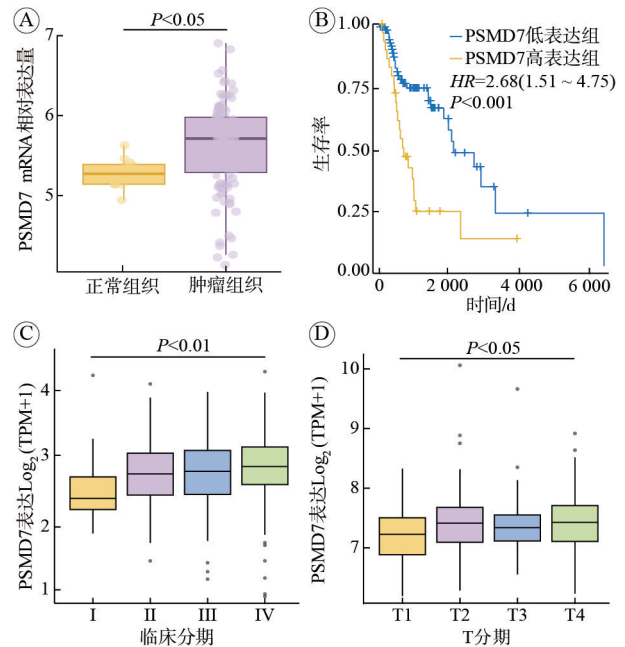
1.9 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8、Image J 及 SPSS 25.0 进行统计分析。所有实验数据均为正态分布计量资料, 两组比较采用两独立样本 *t* 检验; 多组比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Tukey 检验; Spearman 检验用于相关性分析; 使用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 组间比较采用 Log-rank 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PSMD7 在 LSCC 中的表达及临床意义

通过目的基因表达差异分析, 我们发现相比正常组织, LSCC 组织中 PSMD7 的表达水平上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 1A)。根据 PSMD7 表达量将患者分为高表达组与低表达组进行生存分析。结果显示, 高表达组患者的总体生存期显著低于低表达组, 该差异有统计学意义($P < 0.001$, 图 1B)。同时, I 期与 IV 期喉癌患者的 PSMD7 表达水平有统计学差异($P < 0.05$, 图 1C)。在对肿瘤的 T 分期进行分析时, 我们发现 T4 期与 T1 期患者癌组织中 PSMD7 的表达有统计学差异($P < 0.05$, 图 1D)。这些数据表明, PSMD7 的表达水平与喉癌的临床分期及 T 分期紧密相关, 进而提示该基因可能在喉癌的发生与发展过程中扮演着至关重要的角色。



A: 正常组织和 LSCC 组织中 PSMD7 表达水平(TCGA 数据库); B: Kaplan-Meier 曲线显示 PSMD7 在 LSCC 中表达水平与总生存期的关系(TCGA 数据库); C: PSMD7 表达与 LSCC 患者临床分期; D: PSMD7 表达与 LSCC 患者 T 分期的相关性。

图 1 PSMD7 的表达与 LSCC 患者的预后特征及临床关系

Fig. 1 The expression of PSMD7 and its clinical correlation with prognostic features in patients with LSCC

2.2 PSMD7 在 LSCC 恶性进展中潜在的分子作用机制及生物学功能

GO/KEGG 富集分析结果提示, PSMD7 与 B 细胞增殖和活化、细胞裂解、药物代谢以及细胞因子间的相互作用等多种细胞功能紧密相关(图 2A, 图 2B)。此外, GSEA 富集分析进一步指出, PSMD7 显著富集于 ATM 信号通路($P < 0.001$, 图 2C), 并与三羧酸循环及电子传递链功能存在相关性($P = 0.041$, 图 2D)。

2.3 PSMD7 与喉癌免疫细胞浸润相关性分析

免疫浸润相关性分析显示, PSMD7 与 Th2 细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞等存在正相关关系, 而与 B 细胞、CD8⁺ T 细胞、细胞毒性细胞等存在负相关关系(图 3)。这表明 PSMD7 在喉癌免疫微环境中与免疫细胞的浸润和功能调控紧密相关。

2.4 PSMD7 表达与药物敏感性的关系

药物敏感性分析提示, PSMD7 高表达组对达拉非尼、雷帕霉素、Syk 抑制剂、BIBR-1532 的敏感性升高(图 4A~图 4D)。这些发现对于指导临床用药实践具有重要意义, 有助于优化治疗方案、提高治疗效果并减少不必要的药物反应。

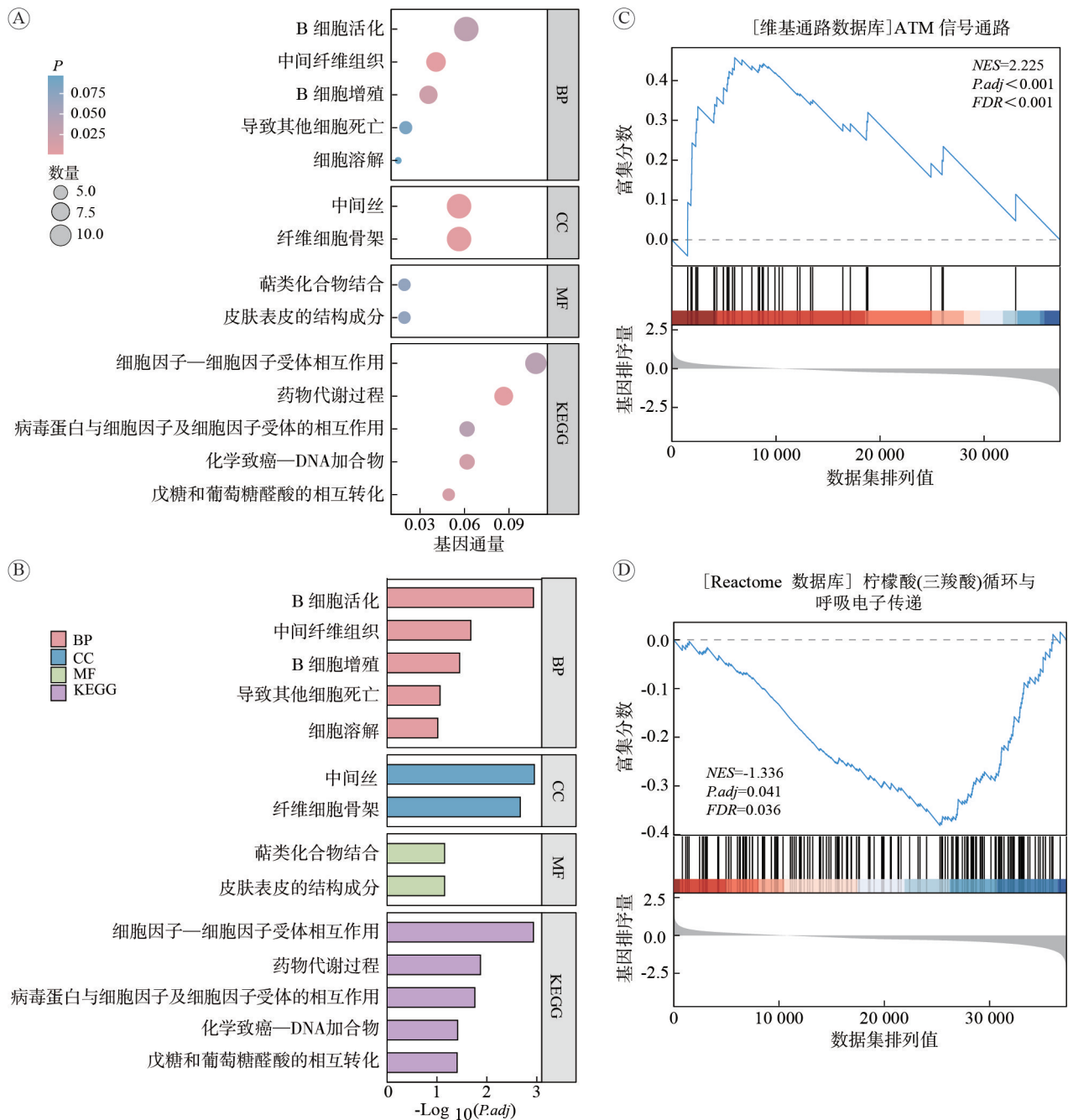


图 2 PSMD7 在 LSCC 中的潜在生物学功能及分子机制

Fig. 2 The potential biological functions and molecular mechanisms of PSMD7 in LSCC

2.5 PSMD7 在喉癌细胞系中表达水平的验证

通过 qPCR 和 Western blot 实验检测 PSMD7 在 HACAT、AMC-HN-8 和 FD-LSC-1 三种细胞系中的表达情况。结果显示，相比 HACAT 细胞，AMC-HN-8 和 FD-LSC-1 细胞中 PSMD7 的 mRNA 和蛋白质表达水平更高 ($P < 0.05$, 图 5A ~ 图 5C)。

2.6 喉癌细胞 PSMD7 过表达及敲减模型的构建

采用 qPCR 与 Western blot 验证喉癌细胞转染后

PSMD7 的过表达与敲减效率，同时以常规培养的喉癌细胞及转染空质粒载体的喉癌细胞作为参照。结果显示，成功构建喉癌细胞中 PSMD7 的过表达与敲减模型。见图 6。

2.7 PSMD7 促进 LSCC 细胞的增殖

通过 CCK-8 实验探究 PSMD7 对 LSCC 细胞生长速率的影响。结果显示，培养初期 (24 h) 各组增殖能力无统计学差异 ($P > 0.05$)，随着时间延长至

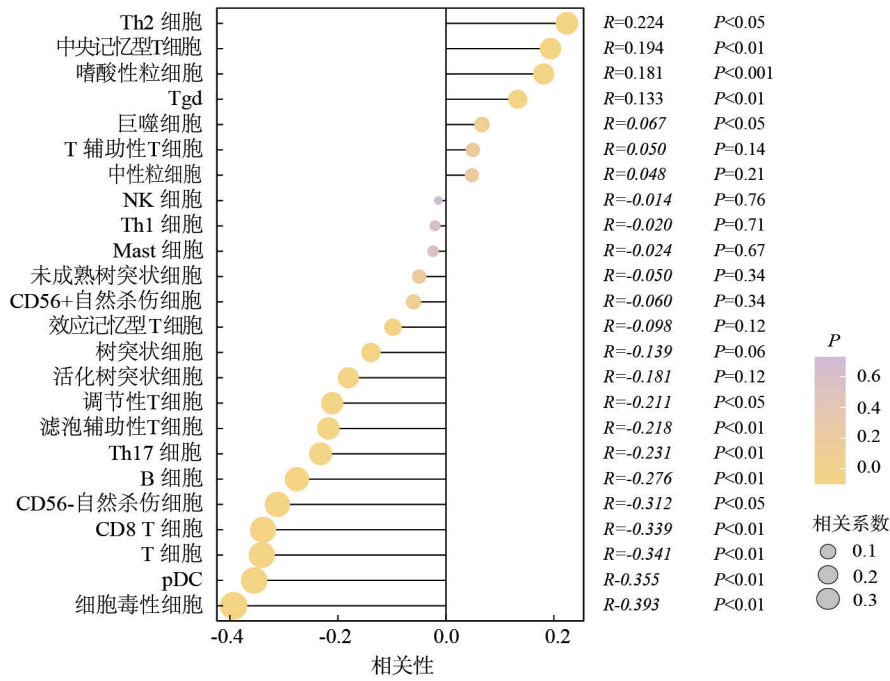
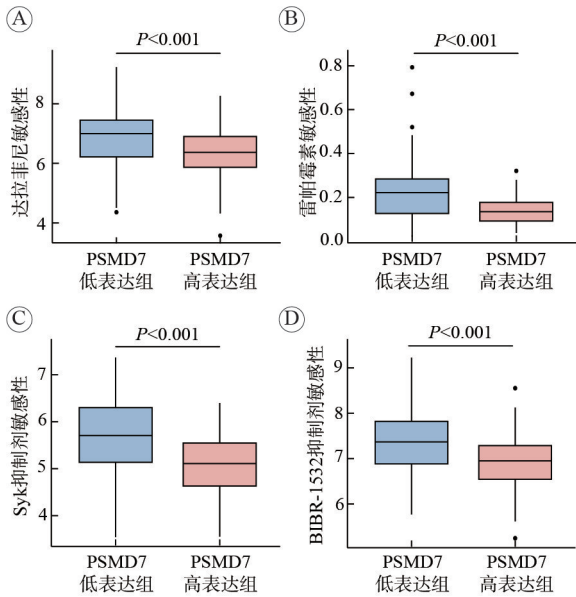


图3 PSMD7在LSCC中的免疫浸润分析

Fig. 3 Analysis of immune infiltration of PSMD7 in LSCC

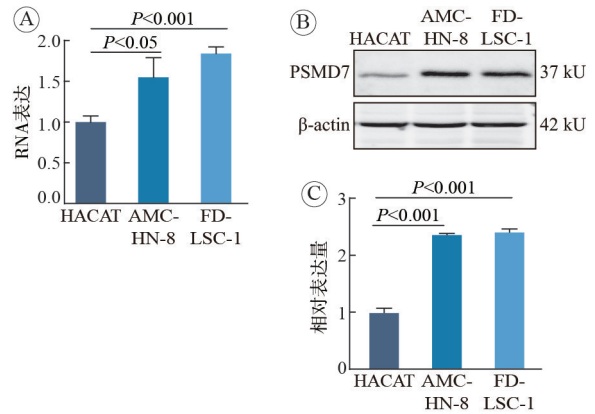


PSMD7 表达水平与达拉非尼敏感性(A)、雷帕霉素敏感性(B)、Syk 抑制剂敏感性(C)、BIBR-1532 敏感性(D)的关系。

图4 PSMD7与常见化疗药物敏感性的关系

Fig. 4 Relationship between PSMD7 and sensitivity to common chemotherapeutic drugs

48 h 和 72 h, 与对照组相比, 敲减 PSMD7 的 AMC-HN-8 和 FD-LSC-1 细胞增殖能力提高 ($P < 0.05$), 过表达 PSMD7 的细胞均增殖能力下降 ($P < 0.05$)。进一步通过克隆形成实验验证, 敲减 PSMD7 促进了 LSCC 细胞的克隆形成 ($P < 0.05$), 过表达 PSMD7 则抑制了这一水平 ($P < 0.05$)。综上所述, 这些结果提示 PSMD7 在 LSCC 细胞中扮演



A: PSMD7 mRNA 的表达在不同细胞系之间的差异; B: Western blot 实验检测 PSMD7 蛋白质的表达; C: Western blot 实验定量分析。

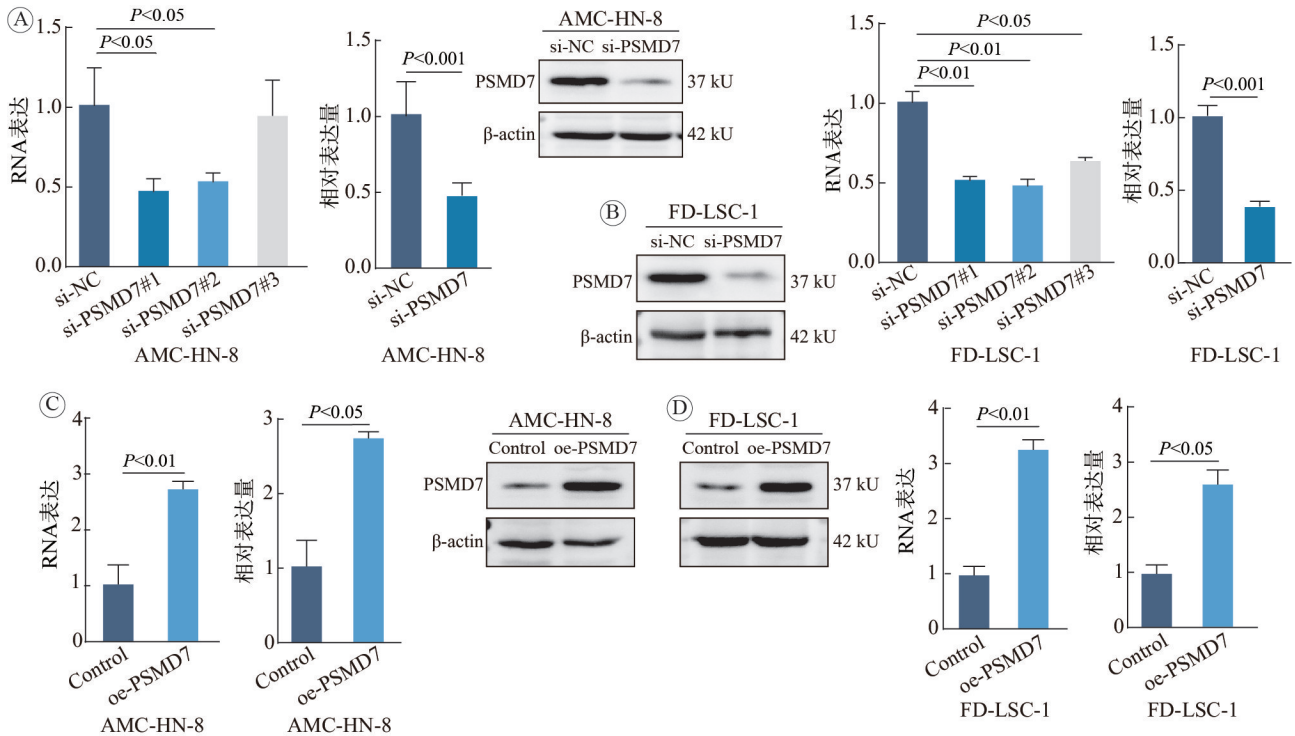
图5 PSMD7在LSCC不同细胞系中的表达差异

Fig. 5 Differential expression of PSMD7 in various LSCC cell lines

着抑制增殖的角色。见图7。

2.8 PSMD7 促进 LSCC 细胞的迁移、侵袭能力及 EMT 进展

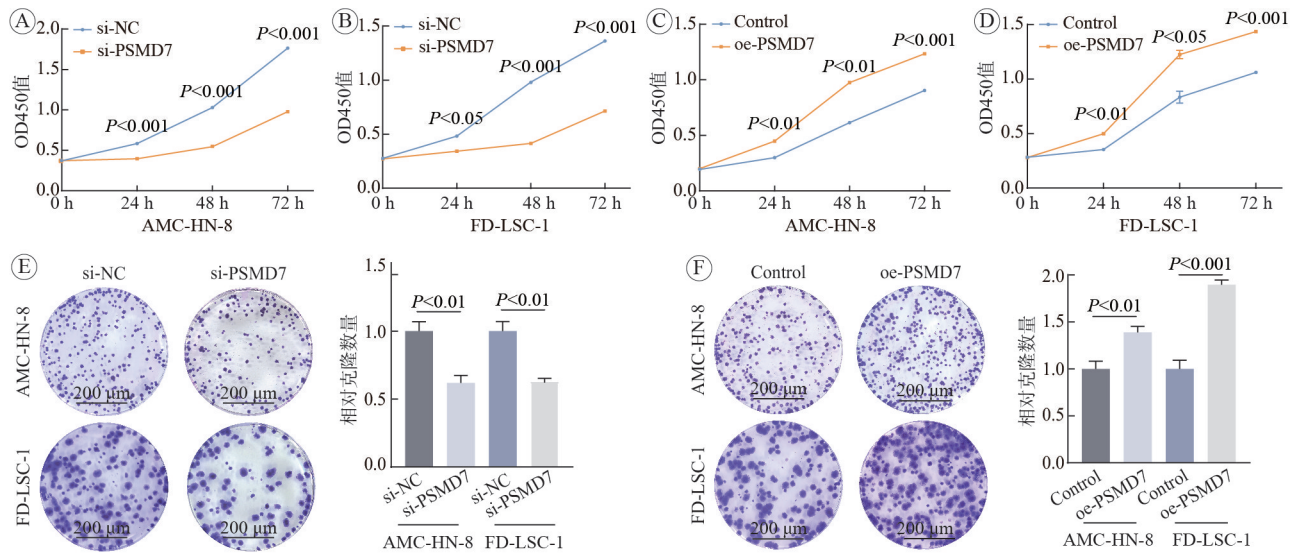
为深入探究 PSMD7 表达水平对细胞迁移与侵袭特性的影响, 我们采用划痕实验与 Transwell 实验进行验证。结果显示, 相比对照组, AMC-HN-8 及 FD-LSC-1 细胞在 PSMD7 敲减后, 迁移与侵袭能力下降 ($P < 0.05$, $P < 0.005$); PSMD7 过表达时, 这两种细胞的迁移与侵袭能力提高。Transwell 实验的结果与划痕实验的发现高度一致, 均证实了 PSMD7 表达水平对细胞迁移、侵袭能力的影响



qPCR及Western blot实验验证AMC-HN-8 (A)、FD-LSC-1 (B)细胞PSMD7的敲减以及AMC-HN-8 (C)、FD-LSC-1 (D)细胞PSMD7的过表达。

图6 qPCR、Western blot实验验证过表达及敲低PSMD7细胞体系

Fig. 6 qPCR and Western blot validation of PSMD7 overexpression and knockdown in cell systems



CCK-8实验验证敲减PSMD7后AMC-HN-8 (A)、FD-LSC-1 (B)细胞的增殖能力；CCK-8实验验证过表达PSMD7后AMC-HN-8 (C)、FD-LSC-1 (D)细胞的增殖能力；E：克隆形成实验验证敲减PSMD7后AMC-HN-8及FD-LSC-1细胞的增殖能力(50×)；F：克隆形成实验验证过表达PSMD7后AMC-HN-8及FD-LSC-1细胞的增殖能力(50×)。

图7 PSMD7促进AMC-HN-8和FD-LSC-1喉癌细胞的增殖能力

Fig. 7 PSMD7 promotes the proliferative capacity of AMC-HN-8 and FD-LSC-1 laryngeal cancer cells

($P < 0.05$)。进一步通过Western blot实验，我们发现PSMD7的敲减导致AMC-HN-8及FD-LSC-1细胞中波形蛋白(Vimentin)、N-钙黏蛋白(N-Cadherin)表达下调，而E-钙黏蛋白(E-Cadherin)表达则呈现

升高趋势；PSMD7的过表达则与上述结果相反。这一系列结果提示，PSMD7的表达水平变化能够影响喉癌细胞的迁移、侵袭能力及EMT过程。见图8。

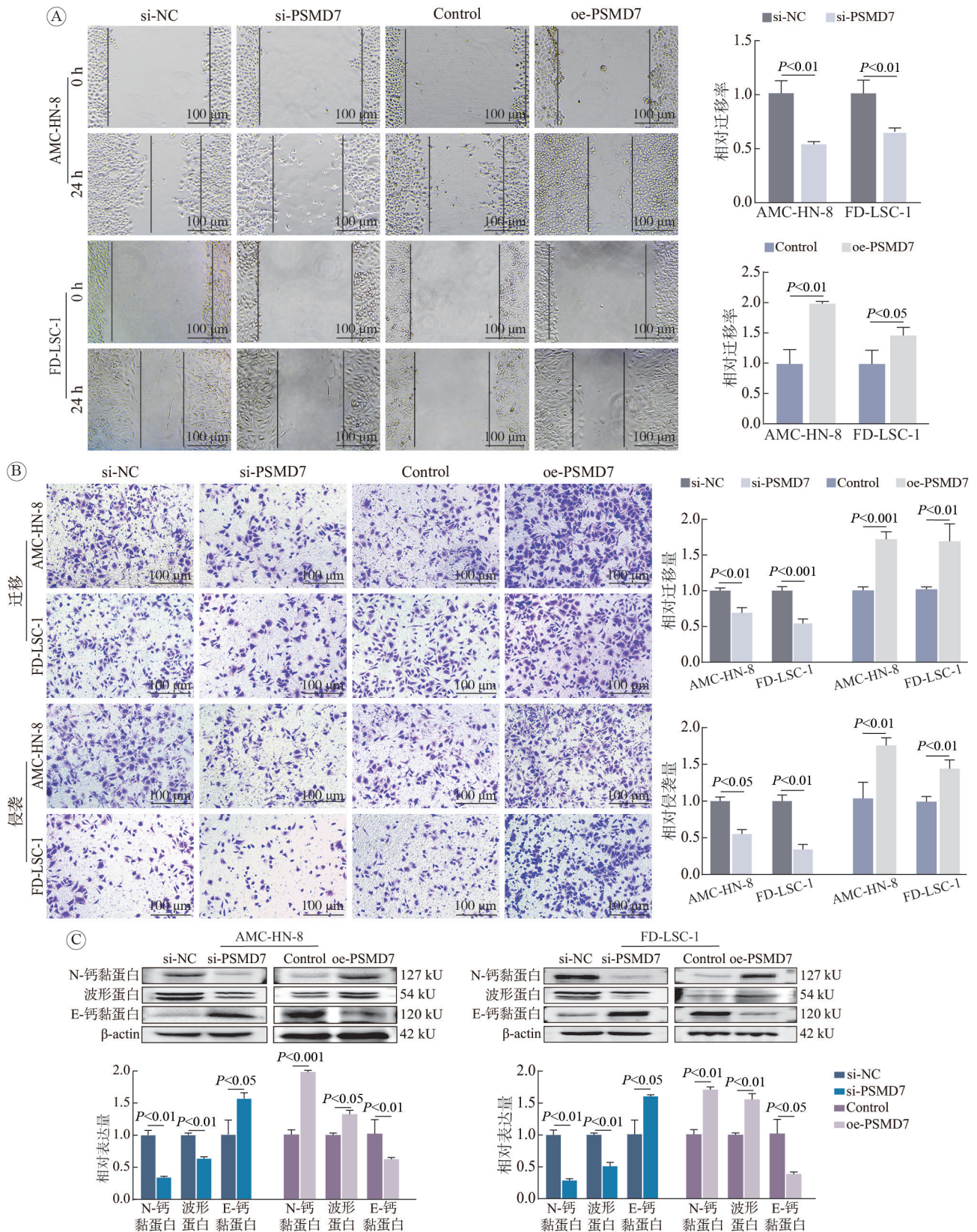


图 8 PSMD7 可促进 LSCC 细胞的迁移、侵袭和 EMT 进程

Fig. 8 PSMD7 promotes migration, invasion, and EMT processes in LSCC cells

3 讨论

LSCC作为头颈部最常见的恶性肿瘤之一,其侵袭性强、易复发转移的特性导致临床治疗效果欠佳^[9]。尽管烟酒暴露、HPV感染等风险因素明确,且发病率存在显著的地域及性别差异^[10-11],但缺乏精准治疗靶点是改善患者预后的瓶颈。本研究通过整合生物信息学分析与体外功能实验,首次系统揭示去泛素化酶PSMD7在LSCC中的关键作用:PSMD7在肿瘤组织中显著高表达,其水平与患者临床分期、T分期及不良预后密切相关,且通过调控上皮-间质转化相关蛋白,显著促进肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭能力。

泛素化作为一种关键的蛋白质翻译后修饰,对细胞的分化、增殖及凋亡调控发挥着至关重要的作用^[12]。既往研究已证实,泛素连接酶FBXW7在调控细胞EMT及肿瘤转移过程中扮演着重要角色^[13]。此外,去泛素化过程,特别是通过稳定鞭毛蛋白并促进泛素水解的途径,也日益成为研究热点^[14]。近期的研究结果证明,蛋白酶体抑制剂在抗癌治疗中展现出显著的疗效^[15-17]。

蛋白酶体26S亚基非ATP酶7(PSMD7),亦称Mov34,定位于蛋白酶体的19S调节颗粒,并属于DUBs中的JAMM结构域金属蛋白酶家族^[18-19]。PSMD7与26S蛋白酶体的核心结构紧密相连,并通过相互作用激活蛋白酶体的活性,进而调控泛素化底物的降解过程^[20]。现有研究普遍认为,PSMD14在多种癌症中作为抗蛋白酶体治疗的潜在靶点具有广阔前景^[14,21]。为深入探究PSMD7与喉癌的关联,本研究对TCGA数据库中喉癌的数据进行详细分析,结果显示喉癌组织中PSMD7的mRNA表达水平相比正常组织呈现显著上升。此外我们还利用qPCR、Western blot实验进一步验证PSMD7在HaCat、AMC-HN-8、FD-LSC-1细胞中mRNA及蛋白表达水平的差异,结果与TCGA数据库分析一致。进一步生物信息学分析揭示,PSMD7的表达水平与患者的临床预后不良具有显著相关性,并且这种表达差异与患者的临床分期及T分期紧密相关:具体而言,临床分期为I期患者的PSMD7表达水平低于IV期患者;而在T分期中,T1期患者的PSMD7表达亦低于T4期患者。Xu等^[22]、Wang等^[14]的研究发现,PSMD7在乳腺癌和肺癌组织中的高表达水平与患者预后不良紧密相关,这与本研究在LSCC中观察到的结果类

似。GO/KEGG富集分析和GSEA分析揭示,PSMD7与B细胞增殖及活化、细胞裂解、药物代谢等多种关键细胞生物学功能存在密切联系,且PSMD7在ATM信号通路中显著富集。ATM信号通路在维持基因组稳定性和细胞应激反应中扮演着关键角色。已有研究表明,ATM信号通路可通过调节细胞周期检查点,如在DNA损伤时激活相关蛋白,使细胞周期停滞,为DNA修复争取时间;同时,它还参与DNA损伤修复过程,保障基因组的完整性^[23]。而肿瘤细胞往往会利用这些细胞内的关键通路来促进自身的增殖、迁移和侵袭,喉癌细胞也不例外。

去泛素化酶通过其去泛素化作用可能影响ATM信号通路中关键蛋白的稳定性和活性^[24]。如ATM信号通路中的一些蛋白在泛素化修饰后会被蛋白酶体降解,去泛素化酶可能通过去除这些蛋白的泛素标签,使其稳定存在,从而干扰ATM信号通路的正常功能^[25]。当ATM信号通路功能异常时,细胞周期检查点的调控和DNA损伤修复机制被破坏,喉癌细胞不受控制地增殖、迁移和侵袭,进而促进喉癌的恶性进展。这一机制与喉癌的特性紧密相关,揭示了去泛素化酶在喉癌发展过程中的重要作用机制,也为ATM信号通路和去泛素化酶的联合治疗策略提供了理论依据。

在肿瘤微环境中,免疫细胞为免疫治疗这一前沿治疗策略提供了广阔的应用前景^[26-28]。本研究运用CIBERSORT算法对样本中的免疫细胞比例进行了量化评估,分析结果显示,PSMD7的表达水平与Th2细胞、嗜酸性粒细胞及巨噬细胞的浸润呈正相关趋势,而与B细胞、CD8⁺T细胞等呈负相关趋势。相关研究已证实巨噬细胞和嗜酸性粒细胞的浸润对喉癌的恶性进展密切相关^[29]。进一步药物敏感性分析揭示,PSMD7的表达水平与多种化疗药物,包括达拉非尼、雷帕霉素、Syk抑制剂、BIBR-1532的敏感性显著相关。已有研究表明,PSMD7在乳腺癌和肺癌中也与肿瘤的增殖、转移等过程相关,但在不同癌种中,PSMD7发挥作用的具体机制和程度存在差异。在乳腺癌中,PSMD7可能通过稳定某些致癌蛋白,促进癌细胞的增殖和侵袭^[30-31]。而在肺癌中,PSMD7可能主要参与调节肿瘤细胞的代谢重编程,这一作用机制在LSCC中尚未得到明确证实^[22]。这说明PSMD7可能作为LSCC预后评估的指标,并可能作为预后预测因子,为其治疗靶点的选择提供较

为科学的参考。

为探究 PSMD7 表达水平变化对细胞表型的具体影响,我们敲减及过表达 PSMD7 在 AMC-HN-8 及 FD-LSC-1 细胞中的含量,并评估了这些细胞增殖能力的变化。结果显示,PSMD7 的下调抑制了细胞的增殖,其上调则促进了细胞的增殖,这与 Luo 等^[32]报道的前列腺癌中 PSMD7 表达与癌细胞增殖活性存在显著正相关关系的结果一致。为验证 PSMD7 对 LSCC 细胞转移能力的影响,本研究采用了划痕实验与 Transwell 实验进行双重验证。结果显示,无论是在 AMC-HN-8 还是 FD-LSC-1 细胞中,敲减或过表达 PSMD7 均显著影响细胞的迁移与侵袭特性,证实 PSMD7 在 LSCC 中具有促进细胞迁移与侵袭的功能。转移是恶性肿瘤的关键特征,而 EMT 是肿瘤转移过程中的核心步骤,表现为细胞极性的丧失与细胞间连接的松弛^[33]。作为 EMT 的重要标志物,波形蛋白和 N-钙黏蛋白在多种肿瘤的 EMT 进程中表达上调, E-钙黏蛋白则表达下调,其水平可反映细胞 EMT 的活跃程度^[34]。本研究发现,改变 PSMD7 的表达水平后,AMC-HN-8 及 FD-LSC-1 细胞中的波形蛋白、N-钙黏蛋白及 E-钙黏蛋白表达水平亦发生相应变化,表明 PSMD7 的表达调控与细胞 EMT 过程紧密相关。综上所述,PSMD7 通过调控细胞的增殖、迁移、侵袭以及促进 EMT 进程,从而在 LSCC 的恶性发展中扮演关键角色。

综上所述,本研究通过生物信息学分析与细胞实验结果相互印证,共同揭示了 PSMD7 在 LSCC 中的重要作用。从临床数据来看,PSMD7 的表达与患者预后、临床分期及 T 分期相关;在细胞实验中,PSMD7 影响细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT 过程。这表明 PSMD7 可能成为 LSCC 预后评估的生物标志物,以及潜在的治疗靶点。例如,通过检测患者体内 PSMD7 的表达水平,医师可以更准确地判断患者的预后情况,为制定个性化治疗方案提供参考。未来可以基于 PSMD7 开发靶向治疗药物,抑制其促进肿瘤进展的功能,有望提高 LSCC 的治疗效果。同时,本研究也为探索肿瘤微环境与肿瘤细胞之间的相互作用提供了新的视角,有助于进一步理解 LSCC 的发病机制,为开发新的治疗策略奠定基础。

本研究揭示了 PSMD7 在促进 LSCC 细胞增殖、迁移、侵袭以及 EMT 进程中扮演重要角色,从而加速疾病恶性进展,但仍存在一定的局限性。关

于 PSMD7 影响 LSCC 发展的详尽分子机制,尤其是其与 ATM 通路相互作用的细节,尚缺乏直接实验证据的支持。因此,未来的研究方向可聚焦于深入探索 PSMD7 在喉癌中的具体作用靶点,并通过构建更为完善的动物模型实验,进一步验证和拓展当前的研究发现,以期更全面地理解 PSMD7 在 LSCC 发病机制中的作用。

作者贡献 徐海铭: 研究设计, 论文撰写; 刘清华、高歌: 实验实施; 李北成、车琴: 数据分析; 张泽生: 图片编辑; 赵凯: 修订及指导; 刘明波: 审读, 修订, 指导。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取, Email: 709801509@qq.com。

参考文献

- 1 Chen ZG, Yang S, Zhao ZY, et al. Smart tumor cell-derived DNA nano-tree assembly for on-demand macrophages reprogramming [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11 (10): e2307188.
- 2 Shaath H, Vishnubalaji R, Elango R, et al. Long non-coding RNA and RNA-binding protein interactions in cancer: Experimental and machine learning approaches [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86 (Pt 3): 325-345.
- 3 Guttman M, Donaghey J, Carey BW, et al. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation [J]. *Nature*, 2011, 477 (7364): 295-300.
- 4 Gao K, Zhu YN, Wang H, et al. Network pharmacology reveals the potential mechanism of Baiying Qinghou decoction in treating laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13 (24): 26003-26021.
- 5 Kirtane K, St John M, Fuentes-Bayne H, et al. Genomic immune evasion: diagnostic and therapeutic opportunities in head and neck squamous cell carcinomas [J]. *J Clin Med*, 2022, 11 (24): 7259.
- 6 Uz U, Eskiiizmir G. Association between interleukin-6 and head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review [J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2021, 14 (1): 50-60.
- 7 Żylicz JJ, Bousard A, Žumer K, et al. The implication of early chromatin changes in X chromosome inactivation [J]. *Cell*, 2019, 176 (1/2): 182-197.
- 8 Zientara-Rytter K, Subramani S. The roles of ubiquitin-binding protein shuttles in the degradative fate of ubiquitinated proteins in the ubiquitin-proteasome system and autophagy [J]. *Cells*, 2019, 8 (1): 40.
- 9 Johnson DE, Burtneis B, Leemans CR, et al. Head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6 (1): 92.
- 10 McCullagh KL, Shah RN, Huang BY. Anatomy of the larynx and cervical Trachea [J]. *Neuroimaging Clin N Am*, 2022, 32 (4): 809-829.
- 11 Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, et al. An update on larynx cancer [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67 (1): 31-50.
- 12 Sun TS, Liu ZN, Yang Q. The role of ubiquitination and deubiquitination in cancer metabolism [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19 (1): 146.

- 13 Cui DR, Xiong XF, Shu JF, et al. FBXW7 confers radiation survival by targeting p53 for degradation [J]. *Cell Rep*, 2020, 30 (2): 497-509.
- 14 Wang J, Wang T, Feng YK, et al. Deubiquitinating enzyme PSMD7 promotes bladder cancer development: Involvement of RAB1A stabilization [J]. *Cell Signal*, 2024, 114: 110996.
- 15 Manasanch EE, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors in cancer therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14 (7): 417-433.
- 16 Gandolfi S, Laubach JP, Hideshima T, et al. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36 (4): 561-584.
- 17 Sogbein O, Paul P, Umar M, et al. Bortezomib in cancer therapy: Mechanisms, side effects, and future proteasome inhibitors [J]. *Life Sci*, 2024, 358: 123125.
- 18 Harrigan JA, Jacq X, Martin NM, et al. Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17 (1): 57-78.
- 19 Dubiel W, Ferrell K, Dumdey R, et al. Molecular cloning and expression of subunit 12: a non-MCP and non-ATPase subunit of the 26 S protease [J]. *FEBS Lett*, 1995, 363 (1/2): 97-100.
- 20 Wang JJ, Liu RK, Mo HY, et al. Deubiquitinase PSMD7 promotes the proliferation, invasion, and cisplatin resistance of gastric cancer cells by stabilizing RAD23B [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17 (13): 3331-3342.
- 21 Sun TS, Liu ZN, Bi FF, et al. Deubiquitinase PSMD14 promotes ovarian cancer progression by decreasing enzymatic activity of PKM2 [J]. *Mol Oncol*, 2021, 15 (12): 3639-3658.
- 22 Xu XC, Xuan XF, Zhang JR, et al. PSMD7 downregulation suppresses lung cancer progression by regulating the p53 pathway [J]. *J Cancer*, 2021, 12 (16): 4945-4957.
- 23 Zolotovskaia MA, Modestov AA, Suntsova MV, et al. Pan-cancer antagonistic inhibition pattern of ATM-driven G2/M checkpoint pathway vs other DNA repair pathways [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2023, 123: 103448.
- 24 Yang QY, Lin WR, Liu ZW, et al. RAP80 is an independent prognosis biomarker for the outcome of patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (2): 146.
- 25 Ramachandran S, Haddad D, Li CL, et al. The SAGA deubiquitination module promotes DNA repair and class switch recombination through ATM and DNAPK-mediated γ H2AX formation [J]. *Cell Rep*, 2016, 15 (7): 1554-1565.
- 26 Li XC, Sun Z, Peng GX, et al. Single-cell RNA sequencing reveals a pro-invasive cancer-associated fibroblast subgroup associated with poor clinical outcomes in patients with gastric cancer [J]. *Theranostics*, 2022, 12 (2): 620-638.
- 27 Donisi C, Pretta A, Pusceddu V, et al. Immunotherapy and cancer: the multi-omics perspective [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25 (6): 3563.
- 28 Bergman PJ. Cancer immunotherapy [J]. *Vet Clin N Am Small Anim Pract*, 2024, 54 (3): 441-468.
- 29 Sun YY, Chen S, Lu YP, et al. Single-cell transcriptomic analyses of tumor microenvironment and molecular reprogramming landscape of metastatic laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Commun Biol*, 2024, 7 (1): 63.
- 30 Xuan DTM, Wu CC, Kao TJ, et al. Prognostic and immune infiltration signatures of proteasome 26S subunit, non-ATPase (PSMD) family genes in breast cancer patients [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13 (22): 24882-24913.
- 31 Zhao YJ, Yang XM, Xu XC, et al. Deubiquitinase PSMD7 regulates cell fate and is associated with disease progression in breast cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12 (9): 5433-5448.
- 32 Luo C, Yu Y, Zhu JF, et al. Deubiquitinase PSMD7 facilitates pancreatic cancer progression through activating Noct1 pathway via modifying SOX2 degradation [J]. *Cell Biosci*, 2024, 14 (1): 35.
- 33 Fontana R, Mestre-Farrera A, Yang J. Update on epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression [J]. *Annu Rev Pathol*, 2024, 19: 133-156.
- 34 Xue WH, Yang L, Chen CX, et al. Wnt/ β -catenin-driven EMT regulation in human cancers [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81 (1): 79.

(责任编辑: 孟晓彤)