

泛素化特异性蛋白酶 39 在结肠癌组织中的表达及临床意义

张连花 唐国英

摘要 目的 检测泛素化特异性蛋白酶 39(ubiquitin-specific protease, USP39)在结肠癌组织中的表达情况,并分析 USP39 的表达水平与 77 例结肠癌患者的临床病理特征、生存及预后之间的相关性。**方法** 利用免疫组织化学技术检测结肠癌石蜡组织标本中 USP39 蛋白的表达情况,利用卡方分析结肠癌组织及癌旁组织中 USP39 的表达差异,利用 *Spearman* 秩相关分析 USP39 与结肠癌患者临床病理特征的相关性,利用 *K-M* 生存曲线分析 USP39 与结肠癌患者 5 年总体生存率的相关性,利用 *Cox* 风险比例模型分析 USP39 与结肠癌患者预后的相关性。**结果** 免疫组织化学结果显示 USP39 在结肠癌组织中的阳性率显著高于癌旁组织;*Spearman* 秩相关分析显示 USP39 的表达水平与结肠癌患者 TNM 分期及淋巴转移情况呈正相关,而与其他临床病理特征无显著相关性;*K-M* 生存曲线结果显示 USP39 阳性表达的结肠癌患者术后 5 年总体生存率低于 USP39 阴性表达的结肠癌患者($P=0.009$)。*Cox* 风险比例模型结果显示 USP39 可作为独立判断结肠癌患者预后的分子指标。**结论** USP39 在结肠癌组织中表达升高,可作为预测结肠癌患者生存周期及预后的潜在分子标志物。

关键词 USP39 结肠癌 生存 预后

中图分类号 R574

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.039

Expression and Clinical Significance of USP39 in Colon Cancer. Zhang Lianhua, Tang Guoying. Department of Oncology, Kaizhou District People's Hospital, Chongqing 405400, China

Abstract Objective To explore the expression of USP39 in tissues of colon cancer (CRC), investigate the association of the expression levels of USP39 and clinicopathological features of CRC patients, and analyze the relevance of USP39 and survival and prognosis of CRC patients. **Methods** Expressions of USP39 were analyzed by immunohistochemistry in 77 CRC patients. *Spearman's* rank test, *K-M* survival curves, and *Cox* proportional hazards risk were conducted to analyze the clinical relevance of USP39 in CRC. **Results** Immunohistochemistry revealed that the positive rate of USP39 was upregulated in CRC tissues compare with adjacent tissues *Spearman* rank correlation showed that positive USP39 expression was significantly associated with TNM stage, lymph node status and venous invasion of CRC patients. *Kaplan-Meier* curves showed that positive USP39 expression was inversely correlated with 5 years overall and progression-free survival time of CRC patients. *Cox* proportional hazards risk analysis revealed that USP39 was an independent prognostic factor for CRC. **Conclusion** USP39 expression is upregulated in tissues of CRC, and USP39 is a potential survival and prognosis biomarker in CRC.

Key words USP39; Colon cancer; Survival; Prognosis

结肠癌是全球范围内发生率及致死率最高的恶性肿瘤之一^[1-3]。淋巴转移不仅是结肠癌发生远处转移的主要方式之一,也是结肠癌最主要的判断预后的因素之一^[4,5]。因此,更深入的寻找与肿瘤淋巴转移相关的分子及潜在机制显得有尤为迫切。

USP39 是高度保守性蛋白,是没有泛素华蛋白酶活性的去泛素化酶家族成员之一^[6-8]。近期研究表明,USP39 在多种肿瘤细胞中过表达,并促进肿瘤的

增殖与生长^[9,10]。在结肠癌细胞中,USP39 可通过活化 Wnt/ β -catenin 信号通路而促进肿瘤增殖及转移^[11]。然而,USP39 在结肠癌组织标本中的表达及临床相关性,尚无研究报道。本研究通过免疫组织化学技术检测结肠癌及癌旁组织石蜡标本中 USP39 在的表达情况,并分析其临床相关性。

资料与方法

1. 研究对象:收集在 2010 年 6 月~2012 年 12 月期间于重庆市开州区人民医院肿瘤科接受结肠癌根治术,术后病理显示所切除的肿瘤组织为结肠癌患者的肿瘤组织及癌旁组织石蜡标本 77 例,入组患者在

作者单位:405400 重庆市开州区人民医院肿瘤科(张连花),儿科(唐国英)

通讯作者:唐国英,电子信箱:327654901@qq.com

术后 3 个月后开始随访记录,随访截止时间点为患者死亡或至 2015 年 12 月本研究截止日。入组患者详细临床病理资料见表 1。所有入选本次研究的结肠癌患者术前未进行包括放疗、化疗及靶向治疗,术中所取肿瘤组织及相应的癌旁组织,经石蜡包埋长期储存。本研究经重庆市开州区人民医院伦理委员会审核并批准,所有入组患者均亲自签署知情同意书,授权课题组使用其组织标本进行本项科学研究。

表 1 结肠癌患者不同临床病理特征癌组织 USP39 阳性表达率的比较

临床病理特征	n	阳性(n)	阳性率(%)	P
年龄(岁)				0.813
≤50	32	19	59.375	
>50	45	25	55.556	
性别				0.518
男性	41	23	56.098	
女性	36	21	58.333	
肿瘤直径				0.219
>3	39	26	66.667	
≤3	38	18	47.368	
肿瘤位置				0.346
左侧	39	22	56.410	
右侧	33	19	57.576	
乙状结肠	5	3	60.000	
血管侵袭				0.174
有	25	11	44.000	
无	52	33	63.462	
肿瘤分化程度				0.184
好	29	13	44.828	
中/差	48	31	64.583	
淋巴结转移				0.027
有	17	14	82.353	
无	60	30	50.000	
远处转移				0.069
有	12	8	66.667	
无	65	36	55.385	
TNM 分期				0.014
I, II	46	19	41.304	
III, IV	31	25	80.645	

2. 免疫组织化学:二甲苯脱蜡 2 次,100%~70% 梯度乙醇脱水。柠檬酸盐缓冲液高压修复 90s。30ml/L 过氧化氢孵育 20min,PBS 5min×5 次。兔抗人 USP39 单克隆抗体(ab131244)(1:100)4℃ 孵育过夜,磷酸盐缓冲液 5min×5 次。加入聚合物增强剂,37℃ 孵育 20min,磷酸盐缓冲液 5min×5 次。加入酶标抗兔聚合物放大剂,37℃ 孵育 15min,磷酸盐缓冲液 5min×5 次。DAB 显色,苏木素复染,1ml/L 盐酸

乙醇分化,PBS 返蓝、脱水、透明、封片。染色结果判定每个片子随机选取 10 个视野,每个视野计数 100 个细胞,统计阳性细胞百分率及着色程度。免疫组化染色结果由两位病理科医师以双盲的方式完成,两者不一致的结果请上级病理医师与两人经多镜头显微镜下讨论得出一致结果。百分率<25%、不着色或较淡着色者为阴性,百分率>35%、适中着色或深着色者为阳性。

3. 统计学方法:本研究均采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析,计量资料数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,利用卡方检验分析 77 例结肠癌患者癌组织及癌旁组织中 USP39 的阳性表达差异,利用 Spearman 秩相关分析 USP39 与结肠癌患者临床病理特征的相关性,利用 K-M 生存曲线分析 USP39 与结肠癌患者 5 年总体生存率的相关性,利用 Cox 风险比例模型分析 USP39 与结肠癌患者预后的相关性,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. USP39 蛋白在结肠癌及癌旁组织中的表达差异:免疫组织化学结果显示,结肠癌组织中 USP39 阳性率显著高于癌旁组织,结肠癌及癌旁组织中 USP39 阳性及阴性表达示例见图 1,癌旁组织中 USP39 阳性及阴性表达示例见图 2。利用 χ^2 检验分析 77 例结肠癌患者癌组织及癌旁组织 USP39 表达情况,发现两者之间 USP39 阳性率差异有统计学意义(表 2, $P<0.01$),USP39 在结肠癌组织中的阳性率高于癌旁组织。

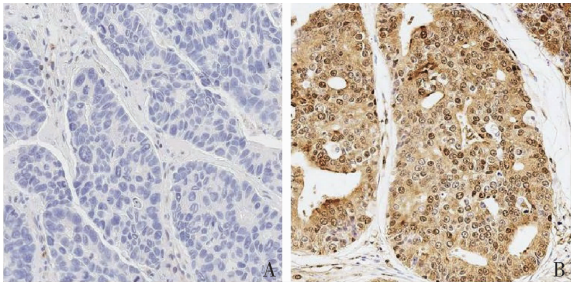


图 1 USP39 蛋白在结肠癌组织中的表达 (免疫组化,×200)

A. 结肠癌组织 USP39 阴性;B. 结肠癌组织 USP39 阳性

2. USP39 的表达与结肠癌患者临床病理特征的关系:根据结肠癌组织中 USP39 的染色结果,将结肠癌患者分为 USP39 阳性组及 USP39 阴性组,利用 Spearman 秩相关分析 USP39 表达水平与结肠癌患者临床病理特征的相关性。USP39 的表达水平与结肠

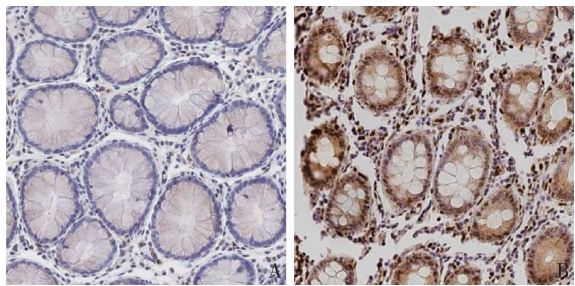


图2 USP39 蛋白在结肠癌癌旁组织中的表达
(免疫组化, ×200)

A. 结肠癌癌旁组织 USP39 阴性; B. 结肠癌癌旁组织 USP39 阳性

表2 结肠癌组织与癌旁组织中 USP39 的阳性表达率的比较

组别	n	阳性例数	阳性率(%)	χ^2	P
癌组织	77	44	57.14	48.48	<0.01
癌旁组织	77	4	5.19		

癌患者 TNM 分期 ($P = 0.014$) 和淋巴结转移情况 ($P = 0.027$) 呈正相关, 而与其他病理特征无相关性 (表1)。

3. USP39 的表达与结肠癌患者术后 5 年总体生存率的关系: 根据 USP39 免疫组化染色结果, 将结肠癌患者分为 USP39 阳性组和 USP39 阴性组。Kaplan - Meier 生存曲线显示, USP39 阳性组的结肠癌患者术后 5 年总体生存率低于 USP39 阴性组 ($\chi^2 = 6.901$, $P = 0.009$, 图3)。

4. USP39 的表达水平与结肠癌患者预后的关系: 利用 Cox 风险比例模型评估 USP39 表达水平及结肠

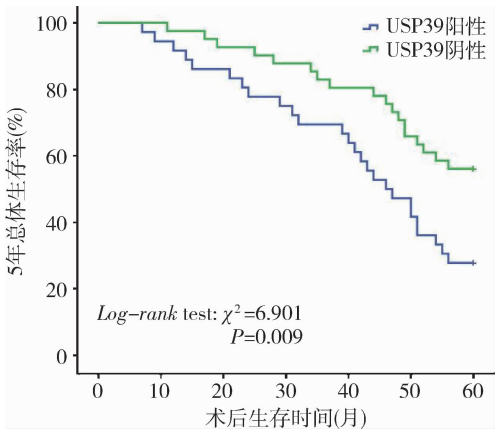


图3 USP39 的表达与结肠癌患者术后 5 年总体生存率的关系

癌其他临床病理特征与结肠癌患者预后的关系。单因素分析结果显示, TNM 分期 ($HR = 3.875$, $P = 0.018$)、淋巴结转移情况 ($HR = 3.981$, $P = 0.021$)、远处转移情况 ($HR = 4.195$, $P = 0.009$)、血管侵袭 ($HR = 2.715$, $P = 0.043$) 及 USP39 的表达水平 ($HR = 4.194$, $P = 0.024$) 与总体生存预期相关。而后, 利用多因素分析评估在单因素分析中与结肠癌预后相关的临床指标的可行性。TNM 分期 ($HR = 3.119$, $P = 0.023$)、淋巴结转移情况 ($HR = 4.146$, $P = 0.017$)、远处转移情况 ($HR = 2.918$, $P = 0.014$)、血管侵袭 ($HR = 2.891$, $P = 0.046$) 及 USP39 表达水平 ($HR = 3.851$, $P = 0.035$) 均为判断结肠癌患者预后独立的分子指标, 详见表3。

表3 结肠癌患者总体生存预期的单因素分析及多因素分析

临床病理特征	单因素分析			多因素分析		
	风险比 (HR)	95% 可信区间	P	风险比 (HR)	95% 可信区间	P
USP39 阳性	4.194	1.941 ~ 5.129	0.024	3.851	2.194 ~ 7.183	0.035
TNM 分期	3.875	1.214 ~ 4.195	0.018	3.119	1.452 ~ 3.992	0.023
淋巴结转移情况	3.981	1.829 ~ 5.159	0.021	4.146	2.192 ~ 6.153	0.017
远处转移情况	4.195	1.492 ~ 8.142	0.009	2.918	1.824 ~ 6.259	0.014
血管侵袭	2.715	1.402 ~ 3.912	0.043	2.891	1.239 ~ 4.119	0.046

讨 论

本研究通过免疫组织化学技术检测结肠癌及癌旁组织石蜡标本中 USP39 的表达情况, 并利用卡方分析结肠癌组织及癌旁组织中 USP39 的表达差异, 利用 Spearman 秩相关分析 USP39 与结肠癌患者临床病理特征的相关性, 利用 K - M 生存曲线分析 USP39 与结肠癌患者 5 年总体生存率的相关性, 利用 Cox 风险比例模型分析 USP39 与结肠癌患者预后的

相关性。结果显示, USP39 在结肠癌组织中表达升高, 其表达水平与结肠癌患者 TNM 分期及淋巴结转移情况密切相关, 并可作为判断结肠癌患者生存周期及预后的分子标志物。

泛素蛋白酶途径是真核生物细胞新合成蛋白常见的调节机制^[12~14]。人类基因组编码近 100 个去泛素华蛋白酶。特异性去泛素华蛋白酶参与调节包括细胞周期、器官进展、肿瘤增殖、细胞凋亡^[15~19]等多

种细胞功能。USP39 是不具备特异性去泛素华蛋白活性家族成员之一,是参与调控细胞主轴检查点和胞质分裂的主要调节因子。更为重要的是,众多研究表明 USP39 在乳腺癌、甲状腺癌、肝细胞癌、乳腺癌、肺癌和前列腺癌等多种肿瘤中发挥癌基因的作用^[20,21]。

研究发现,在前列腺癌中 USP39 表达显著高于癌旁组织,并与肿瘤的 Gleason 评分密切相关,USP39 高表达的前列腺癌患者生存周期显著低于 USP39 低表达者。在结肠癌中,近期研究发现结肠癌组织中 USP39 的表达高于癌旁组织。与该研究结果相符,本研究发现 USP39 在结肠癌组织中的表达显著高于癌旁组织。进一步利用 Spearman 秩相关分析 USP39 与结肠癌患者临床病理特征的相关性,结果发现 USP39 与结肠癌淋巴结转移及 TNM 分期密切相关。生存分析结果显示 USP39 高表达的结肠癌患者术后 5 年总体生存率显著低表达患者。Cox 风险比例模型结果进一步显示 USP39 为独立判断结肠癌预后的分子指标。提示 USP39 在结肠癌中可能作为癌基因发挥作用,促进肿瘤的转移与增殖。其可能的机制为,USP39 通过调控 Wnt/ β - catenin 信号通路的关键分子 TCF4、MMP2/MMP9 和 β - catenin 的表达而促进结肠癌细胞的增殖与转移。

综上所述,本研究通过免疫组织化学技术检测了结肠癌与癌旁组织中 USP39 的表达,结果发现 USP39 在结肠癌组织中的表达显著高于癌旁组织,进一步的分析显示,USP39 与结肠癌患者术后 5 年总体生存率密切相关,是判断结肠癌患者预后的独立分子指标。本研究结果提示 USP39 为结肠癌生物治疗的潜在分子靶点。

参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (1): 5 - 29
- 2 梁良, 罗树春, 赵煜, 等. 结肠癌术后肝转移危险因素回顾性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(10): 792 - 795
- 3 彭吉绕. 腹腔镜结肠癌根治术与传统术式可行性及安全性对比[J]. 中国现代普通外科进展, 2015, 18(2): 145 - 146
- 4 De Rosa M, Pace U, Rega D, et al. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review) [J]. Oncol Rep, 2015, 34 (3): 1087 - 1096
- 5 Nicastrì DG, Doucette JT, Godfrey TE, et al. Is occult lymph node disease in colorectal cancer patients clinically significant A review of the relevant literature [J]. J Mol Diagn, 2007, 9 (5): 563 - 571

- 6 Lin Z, Xiong L, Lin Q. Ubiquitin - specific protease 39 is overexpressed in human lung cancer and promotes tumor cell proliferation in vitro [J]. Mol Cell Biochem, 2016, 422 (1 - 2): 97 - 107
- 7 Yuan X, Sun X, Shi X, et al. USP39 promotes the growth of human hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo [J]. Oncol Rep, 2015, 34(2): 823
- 8 Ríos Y, Melmed S, Lin S, et al. Zebrafish usp39 mutation leads to rbl mRNA splicing defect and pituitary lineage expansion [J]. Plos Genetics, 2011, 7(1): e1001271
- 9 Wang X, Yu Q, Huang L, et al. Lentivirus - mediated inhibition of USP39 suppresses the growth of gastric cancer cells via PARP activation [J]. Mol Med Rep, 2016, 14 (1): 301 - 306
- 10 Yuan X, Sun X, Shi X, et al. USP39 promotes the growth of human hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo [J]. Oncol Rep, 2015, 34 (2): 823 - 832
- 11 Yuan X, Sun X, Shi X, et al. USP39 promotes colorectal cancer growth and metastasis through the Wnt/ β - catenin pathway [J]. Oncol Rep, 2017, 37 (4): 2398 - 2404
- 12 Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes [J]. Annu Rev Biochem, 1996, 65: 801 - 847
- 13 Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system [J]. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 425 - 479
- 14 Sakurai M, Ayukawa K, Setsue R, et al. Ubiquitin C - terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation [J]. J Cell Sci, 2006, 119 (Pt 1): 162 - 171
- 15 Stevenson LF, Sparks A, Allende - Vega N, et al. The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2 [J]. EMBO J, 2007, 26 (4): 976 - 986
- 16 徐志阳, 田文亮, 付雪, 等. 特异性泛素蛋白酶 22 在急性白血病细胞中的表达及其临床意义 [J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41 (4): 366 - 369
- 17 Wang H, Ji X, Liu X, et al. Lentivirus - mediated inhibition of USP39 suppresses the growth of breast cancer cells in vitro [J]. Oncol Rep, 2013, 30 (6): 2871 - 2877
- 18 程海东, 莎仁高娃, 陈凛. 以铂类为基础的新辅助化疗疗效与胃癌临床病理特征及泛素特异性蛋白酶 39 的相关性研究 [J]. 中国全科医学, 2016, 19(3): 277 - 281
- 19 孙明, 刘相萍, 王海波, 等. 泛素特异蛋白酶 39 基因在乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(8): 1970 - 1972
- 20 Chen FZ, Zhao XK. Ubiquitin - proteasome pathway and prostate cancer [J]. Onkologie, 2013, 36 (10): 592 - 596
- 21 何帅, 尹力, 钟伟, 等. 慢病毒介导 siRNA 靶向下调 USP39 表达小鼠血管平滑肌细胞增殖及迁移的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(6): 38 - 40

(收稿日期: 2017 - 06 - 20)

(修回日期: 2017 - 06 - 30)