

USP14 在结直肠癌中的表达及临床意义

韩秋月 章 霞 章文龙 张坚刚 周文君 林爱芬

摘 要 目的 探讨 USP14 在结直肠癌中的表达及其临床意义。**方法** 选取 225 例结直肠癌患者肿瘤组织及对应的远端正常组织,采用免疫组化法检测 USP14 表达情况,并分析其与临床病理参数间的关系。**结果** 结直肠癌组织中 USP14 表达显著高于正常组织($\chi^2 = 11.62, P < 0.05$),USP14 表达情况与患者性别($\chi^2 = 0.205, P = 0.651$)、年龄($\chi^2 = 1.274, P = 0.259$)、远处转移($\chi^2 = 0.739, P = 0.390$)、TNM 分期($\chi^2 = 3.082, P = 0.079$)无显著相关。生存分析发现,USP14 阳性表达患者的平均生存时间(63.78 个月,95% CI:57.37 ~ 70.19)明显短于 USP14 阴性表达患者(83.09 个月,95% CI:75.40 ~ 90.78, $P = 0.003$)。COX 比例风险回归分析表明,USP14 表达($HR = 2.213, P = 0.002$)和 TNM 分期($HR = 3.237, P = 0.000$)可作为结直肠癌患者的独立预后因素。**结论** USP14 在结直肠癌发展中发挥重要作用,USP14 表达是结直肠癌患者的独立预后因素。

关键词 USP14 结直肠癌 免疫组化

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.09.013

Expression and Clinical Significance of USP14 in Colorectal Cancer. Han Qiuyue, Zhang Xia, Zhang Wenlong, et al. Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To investigate the expression of USP14 in colorectal cancer and its clinical significance. **Methods** The tumor tissues of 225 patients with colorectal cancer and the corresponding distal normal tissues were selected. The expression of USP14 was detected by immunohistochemistry and the relationship between the expression of USP14 and clinical pathological parameters was analyzed. **Results** USP14 expression was significantly upregulated in colorectal cancer tissues than the corresponding distal normal tissues ($\chi^2 = 11.62, P < 0.05$). The result revealed that there was no significant difference between USP14 expression and clinicopathological characteristics, including patient gender ($\chi^2 = 0.205, P = 0.651$), patient age ($\chi^2 = 1.274, P = 0.259$), distant metastasis ($\chi^2 = 0.739, P = 0.390$) and TNM stage ($\chi^2 = 3.082, P = 0.079$). The mean survival time of patients with positive expression of USP14 (63.78 months, 95% CI: 57.37 ~ 70.19) was significantly shorter than that of patients with negative expression of USP14 (83.09 months, 95% CI: 75.40 ~ 90.78, $P = 0.003$). Cox proportional hazard regression analysis showed that USP14 expression ($HR = 2.213, P = 0.002$) and TNM staging ($HR = 3.237, P = 0.000$) were independent prognostic factors for colorectal cancer patients. **Conclusion** USP14 expression plays an important role in colorectal cancer and it is an independent risk factor for the prognosis of colorectal cancer patients.

Key words USP14; Colorectal cancer; Immunohistochemistry

结直肠癌是常见恶性肿瘤之一,男性发生率居第三位,女性发生率居第二位^[1]。近年来,结直肠癌治疗已经取得重大进展,但治愈率和长期生存率几乎没有变化,仍存在诸多问题,如早期诊断缺乏特异性标志物、转移风险高、缺乏有效治疗的特异性靶点等^[2]。泛素特异性蛋白酶 14 (ubiquitin-specific protease 14, USP14) 由 494 个氨基酸组成,相对分子质量约为 56 kDa,主要分布于细胞质和细胞膜^[3]。USP14

含有一个 N 端 UBL 结构域,与 USP14 和蛋白酶体之间的结合有关^[4]。本研究利用免疫组化法检测结直肠癌组织中 USP14 表达情况及分析其与临床病理参数的相关性,进一步分析 USP14 与结直肠癌患者预后关系,探讨 USP14 在结直肠癌中的作用。

材料与方法

1. 标本收集:选取 2005 年 9 月 ~ 2011 年 8 月浙江省台州医院确诊并行结直肠癌根治术患者肿瘤组织样本 225 例及对应的正常组织 225 例,经石蜡包埋后储存于浙江省台州医院生物资源中心。其中,男性 122 例,女性 103 例,患者年龄 28 ~ 90 岁,平均年龄 63 岁。病理分期按 AJCC 第 7 版制定的 TNM 分期:Ⅰ ~ Ⅱ期 126 例,Ⅲ ~ Ⅳ期 99 例。所有患者术前均未进行放化疗、药物等治疗。所有标本均已取得患

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81372247);国家人类遗传资源共享服务平台项目(2005DKA21300);浙江省医药卫生科技计划项目(2015KYB434)

作者单位:317000 浙江省台州医院生物资源中心(韩秋月、章霞、张坚刚、周文君、林爱芬),肝胆外科(章文龙)

通讯作者:林爱芬,研究员,电子信箱:linaf@enzemed.com

者知情同意,并通过浙江省台州医院伦理学委员会审核。

2. 主要试剂和方法:兔抗人多克隆抗体 USP14 购于美国 Sigma 公司,采用免疫组化法检测结直肠癌组织及对应远端正常组织中 USP14 表达情况。切片后,60℃烘烤过夜,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化。3% 过氧化氢孵育 15min,0.01mol/L 枸橼酸盐 (pH 值 6.0) 高压热修复。1% BSA 封闭非特异性抗原,USP14 抗体 4℃ 孵育过夜,过氧化物酶标记的抗兔第二抗体 37℃ 孵育 30min。DAB 显色,苏木精复染。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,阅片。其中,肺癌组织作为阳性对照,TBS 溶液替代 USP14 抗体作为实验阴性对照。

3. 判断标准:免疫组化结果分别由两名病理科医生进行阅片。以淡黄色至棕黄色染色为阳性,结果按照阳性细胞百分比进行评分。随机选择 10 个高倍镜视野,计算阳性细胞百分数。阳性细胞数 < 5% 为阴性,阳性细胞数 ≥ 5% 为阳性。

4. 统计学方法:采用 SPSS 23.0 统计学软件对数据进行统计分析。采用 χ^2 检验分析 USP14 表达和临床病理参数相关性,Kaplan - Meier 法用于生存分析,COX 回归模型用于多因素分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 结直肠癌组织中 USP14 的表达情况:USP14 表达于细胞质内(图 1)。结直肠癌组织中 USP14 表达率为 67.6% (152/225),正常组织中表达率为 42.2% (95/225)。结直肠癌组织中 USP14 表达显著高于正常组织($\chi^2 = 11.62, P < 0.05$)。

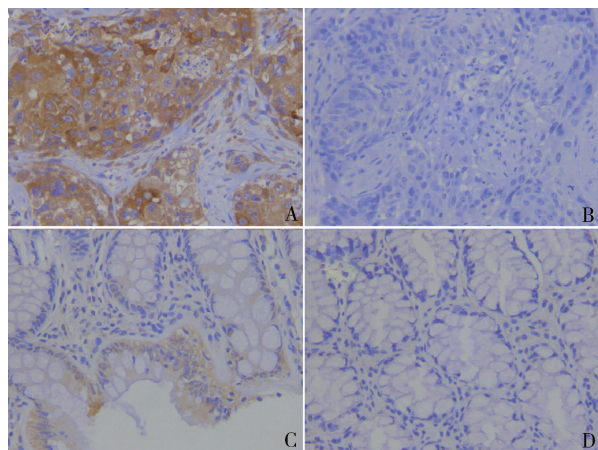


图 1 结直肠癌组织 USP14 表达结果(免疫组化,×400)

A. 结直肠癌组织阳性表达;B. 结直肠癌组织阴性表达;

C. 正常组织阳性表达;D. 正常组织阴性表达

2. USP14 表达和临床病理参数相关性:USP14 表达与临床病理参数分析表明,其与性别($\chi^2 = 0.205, P = 0.651$)、年龄($\chi^2 = 1.274, P = 0.259$)、远处转移($\chi^2 = 0.739, P = 0.390$)、TNM 分期($\chi^2 = 3.082, P = 0.079$)均无显著相关性(表 1)。

表 1 USP14 表达与临床病理参数相关性

项目	n	USP14 表达			
		阳性例数	阴性例数	χ^2	P
性别					
男性	122	38	84	0.205	0.651
女性	103	35	68		
年龄(岁)					
< 65	108	39	69	1.274	0.259
≥ 65	117	34	83		
远处转移					
无	215	71	144	0.739	0.390
是	10	2	8		
TNM					
I ~ II 期	126	47	79	3.082	0.079
III ~ IV 期	99	26	73		

3. USP14 表达与结直肠癌患者预后的关系:225 例结直肠癌患者进行生存分析表明,USP14 表达阳性患者的平均生存时间 63.78 个月(95% CI:57.37 ~ 70.19 个月),USP14 表达阴性的患者平均生存时间 83.09 个月(95% CI:75.40 ~ 90.78 个月)。USP14 阳性患者生存时间明显短于阴性患者,差异有统计学意义($\chi^2 = 8.664, P = 0.003$,图 2)。

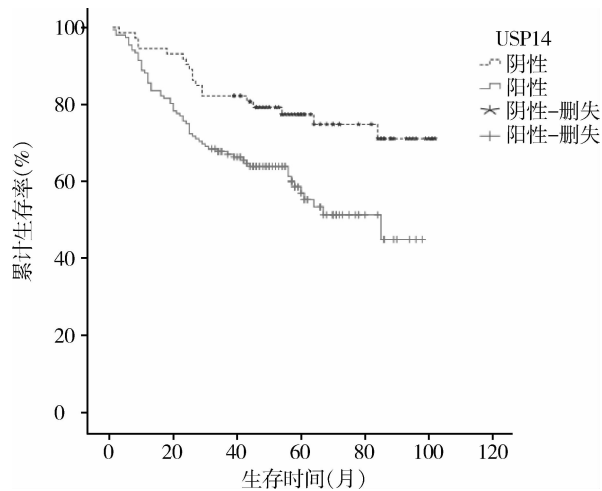


图 2 结直肠癌患者 USP14 表达 Kaplan - Meier 生存分析

为进一步分析 USP14 表达与患者预后关系,采用 COX 比例风险模型分析。单变量分析结果表明 USP14 表达(阳性 vs 阴性,HR = 2.310, $P = 0.001$)和

TNM 分期(Ⅲ~Ⅳ期 vs Ⅰ~Ⅱ期,HR = 3.377,*P* = 0.000)与患者不良预后显著相关。多变量分析结果显示 USP14 表达(HR = 2.213,*P* = 0.002)和 TNM 分

期(HR = 3.237,*P* = 0.000)可作为结直肠癌患者的独立预后因子(表 2)。

表 2 COX 比例风险回归分析结直肠癌患者预后影响因素

项目		单变量分析		多变量分析	
		HR(95% CI)	<i>P</i>	HR(95% CI)	<i>P</i>
性别	男性(vs 女性)	0.939(0.607~1.454)	0.778		
年龄(岁)	>65(vs ≤65)	0.940(0.608~1.453)	0.780		
TNM	Ⅰ~Ⅱ期(vs Ⅲ~Ⅳ期)	3.377(2.216~5.363)	0.000	3.237(2.018~5.193)	0.000
远处转移	是(vs 否)	1.557(0.629~3.831)	0.338		
USP14 表达	阳性(vs 阴性)	2.310(1.411~3.781)	0.001	2.213(1.353~3.622)	0.002

讨 论

蛋白质稳态是调控多种细胞功能的关键。细胞中有两大系统负责调控蛋白质降解,即泛素蛋白酶体系统(UPS)和溶酶体系统。泛素蛋白酶体系统包含泛素活化酶(ubiquitin-activating enzyme,E1)、泛素结合酶(ubiquitin-conjugating enzyme,E2)、泛素连接酶(ubiquitin-protein ligating enzyme,E3)及 26S 蛋白酶体。泛素连接酶将泛素单体与其靶蛋白的赖氨酸残基通过共价键连接,也可通过将泛素单体逐一连接到前一个泛素分子的 7 个内部赖氨酸残基(K6/K11/K27/K29/K33/K48/K63)上,将单泛素链转化为多聚泛素链。而去泛素化酶可以从目标蛋白上分解这些单肽和多肽链^[5]。研究表明,去泛素化酶通过稳定关键蛋白,在恶性细胞的增殖、运动和耐药中发挥重要作用^[6]。哺乳动物蛋白酶体与 3 个重要的去泛素化酶相关:RPN11、UCH37、USP14^[7]。RPN11 是 19S 调控元件亚基,UCH37 和 USP14 可与 19S 蛋白酶体可逆结合^[8]。

USP14 属于泛素特异性蛋白酶家族,其编码基因位于第 18 号染色体短臂 18p11.32 区,是靠近端粒处的功能基因,对机体生命过程具有重要作用。在真核细胞中,26S 蛋白酶体是蛋白质降解的主要位点。哺乳动物细胞 26S 蛋白酶体中,USP14 约占 10%~20%。虽然只有一小部分的 19S 颗粒含有 USP14,但细胞中绝大多数 USP14 都与蛋白酶体结合^[9]。USP14 参与体内蛋白质降解的调控,参与恶性肿瘤进展,但其具体作用机制还未完全阐明。

USP14 是哺乳动物中高度保守的去泛素化酶,因其在多种肿瘤中的高表达和重要作用而受到越来越多的关注。Tian 等^[8]研究发现 USP14 在多发性骨髓瘤细胞中高表达,b-API5 处理多发性骨髓瘤细胞可

有效抑制 USP14,阻断细胞周期进程,诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡。USP14 在上皮性卵巢癌组织中 USP14 表达水平明显升高,与肿瘤分级、肿瘤阶段、淋巴结转移相关,与 Ki-67 表达呈正相关,USP14 沉默可抑制上皮性卵巢癌细胞增殖并诱导细胞凋亡^[10]。研究发现 USP14 在乳腺癌组织中高表达,其主要分布于乳腺癌细胞的细胞质中,与组织学分级、淋巴结转移相关^[11]。USP14 在非小细胞肺癌细胞中表达上调,尤其是在腺癌细胞中^[12]。与邻近非肿瘤组织比较,食管鳞癌组织在 RNA 水平和蛋白水平上均出现 USP14 过表达,USP14 表达与远处转移相关^[13]。肝癌组织中 USP14 表达水平显著高于正常肝组织中 USP14 表达水平,其过表达可促进肝癌细胞增殖,抑制细胞凋亡,进而促进肝癌进展^[14]。Ishiwata 等^[15]在结肠癌组织中发现 USP14 表达水平高于正常组织。

本研究采用免疫组化分析 USP14 在结直肠癌中的表达情况,研究显示结直肠癌肿瘤组织中 USP14 表达显著高于正常组织,USP14 表达与性别、年龄、远处转移、TNM 分期无显著相关,生存分析发现 USP14 表达阳性患者预后较差,可作为结直肠癌预后的独立危险因素。而 Shinji 等^[16]研究表明结直肠癌患者 USP14 表达水平并不高,18.2%(18/99)患者为高表达,81.8%(81/99)为低表达,USP14 表达与淋巴结转移情况、肝转移情况、TNM 分期相关。这可能是由于本研究将结直肠癌组织 USP14 表达情况分为阴性和阳性两组。判断标准为阳性细胞数<5%为“-”,阳性细胞数≥5%为阳性。而 Shinji 等^[16]研究中“-”为未检测到 USP14 表达;“±”为弱于或与正常组织上皮细胞显色强度相当;“+”为显色强度强于正常组织上皮细胞。统计分析时将“-”组和“±”组归为

低表达组,“+”归为高表达组。这可能是导致本研究与该文章统计结果差异的原因。

以往研究表明,USP14 表达与患者生存率密切相关,USP14 表达阳性患者预后较差^[10-14]。Wang 等^[10]研究发现上皮性卵巢癌患者中 USP14 高表达与生存时间短显著相关,提示 USP14 可作为卵巢癌患者预后指标。Zhu 等^[11]研究表明,USP14 高表达的乳腺癌患者生存期明显缩短,USP14 表达沉默可以抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移,诱导细胞凋亡,淋巴结转移、USP14 表达、Ki-67 表达是患者整体生存的独立预后指标。Wu 等^[12]研究发现 USP14 沉默可抑制细胞生长和细胞周期,并伴随着 β -catenin 蛋白质水平大幅下降,肺腺癌患者 USP14 表达与生存期相关。Zhang 等^[13]研究发现 USP14 过表达与食管鳞癌患者整体生存率降低有关,表明 USP14 是总体生存的独立危险因素。Ying 等^[17]研究发现 USP14 高表达与胃癌患者不良预后相关,USP14 表达水平是胃癌患者独立预后因子。此外,USP14 沉默促进 p-ERK 和 p-Akt 蛋白酶体降解,从而阻断 Akt 和 ERK 信号通路,增加胃癌细胞对顺铂敏感度。与上述研究一致,本研究生存分析结果表明,相比于 USP14 阴性患者,USP14 阳性患者的总体生存时间明显缩短。进一步 COX 比例风险回归分析发现,USP14 表达和 TNM 分期可作为结直肠癌患者的独立预后因素。

综上所述,本研究 USP14 在结直肠癌中的表达和临床意义,研究表明 USP14 表达在结直肠癌发展中发挥重要作用,且 USP14 表达与预后相关,是结直肠癌患者独立预后指标,对结直肠癌预后判断具有重要价值。

参考文献

- 1 Fitzmaurice C, Akinyemiju TF, Al Lami FH, *et al.* Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2016: a systematic analysis for the global burden of disease study [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 11(4): 1553-1568
- 2 Ciombar KK, Bekaii-Saab T. Emerging treatments in recurrent and metastatic colorectal cancer [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2013, 11(Suppl 4): S18-27
- 3 Hu M, Li P, Song L, *et al.* Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14 [J]. *EMBO J*, 2005, 24(21): 3747-3756
- 4 Wang YW, Jiang YX, Ding S, *et al.* Small molecule inhibitors reveal allosteric regulation of USP14 via steric blockade [J]. *Cell Res*, 2018, 28(12): 1186-1194
- 5 Amelie SS, Edurne B. DUBs, new members in the hypoxia signaling club [J]. *Front Oncol*, 2016, 6: 53
- 6 McClurg UL, Robson CN. Deubiquitinating enzymes as oncotargets [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(12): 9657-9668
- 7 Lundgren S, Odrzywol E. USP14 inhibitors as potential anticancer agents [J]. *Future Med Chem*, 2018, 10(15): 1741-1743
- 8 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
- 9 Kuo CL, Goldberg AL. Ubiquitinated proteins promote the association of proteasomes with the deubiquitinating enzyme USP14 and the ubiquitin ligase Ube3c [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(17): E3404-E3413
- 10 Wang Y, Wang J, Zhong J, *et al.* Ubiquitin-specific protease 14 (USP14) regulates cellular proliferation and apoptosis in epithelial ovarian cancer [J]. *Med Oncol*, 2015, 32(1): 379
- 11 Zhu L, Yang S, He S, *et al.* Downregulation of ubiquitin-specific protease 14 (USP14) inhibits breast cancer cell proliferation and metastasis, but promotes apoptosis [J]. *J Mol Histol*, 2016, 47(1): 69-80
- 12 Wu N, Liu C, Bai C, *et al.* Over-expression of deubiquitinating enzyme USP14 in lung adenocarcinoma promotes proliferation through the accumulation of β -catenin [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(6): 10749-10760
- 13 Zhang BZ, Li MQ, Huang PZ, *et al.* Overexpression of ubiquitin-specific peptidase 14 predicts unfavorable prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Thorac Cancer*, 2017, 8(4): 344-349
- 14 Huang G, Li L, Zhou W. USP14 activation promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(6): 2917-2924
- 15 Ishiwata S, Ozawa Y, Katayama J, *et al.* Elevated expression level of 60-kDa subunit of tRNA-guanine transglycosylase in colon cancer [J]. *Cancer Lett*, 2004, 212(1): 113-119
- 16 Shinji S, Naito Z, Ishiwata S, *et al.* Ubiquitin-specific protease 14 expression in colorectal cancer is associated with liver and lymph node metastases [J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(3): 539-543
- 17 Ying Fu, Gang Ma, Guolong Liu, *et al.* USP14 as a novel prognostic marker promotes cisplatin resistance via Akt/ERK signaling pathways in gastric cancer [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(11): 5577-5588

(收稿日期:2018-12-18)

(修回日期:2018-12-25)