

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.30.007

文章编号: 1005-8982 (2018) 30-0032-05

泛素化羧基末端水解酶 37 在结直肠癌组织中的表达水平及意义

邓显伦¹, 冯立波¹, 徐建伟², 向继勇², 夏冬¹

(1. 西南医科大学附属医院 普外科, 四川 泸州 646000;
2. 四川省中江县人民医院 普外科, 四川 中江 618100)

摘要: 目的 检测泛素化羧基末端水解酶 37 (UCH37) 在结直肠癌组织中的表达情况, 并分析其与结直肠癌患者的临床病理特征、术后生存周期及预后之间的相关性。**方法** 利用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 和免疫组织化学技术检测结直肠癌石蜡组织标本中 UCH37 mRNA 及蛋白的表达水平, 分析结直肠癌组织及癌旁组织中 UCH37 的表达差异, 利用 Spearman 秩相关分析 UCH37 与结直肠癌患者临床病理特征的相关性, 利用 Kaplan-Meier 生存曲线分析 UCH37 与结直肠癌患者五年总体生存率的相关性, 利用 Cox 风险比例模型分析 UCH37 与结直肠癌患者预后的相关性。**结果** UCH37 在结直肠癌组织中的表达水平高于癌旁组织, TNM III 级和 IV 级的结直肠癌患者 UCH37 的阳性率高于 TNM I 级和 II 级患者 ($P < 0.05$); Spearman 秩相关分析显示 UCH37 的表达水平与结直肠癌患者淋巴转移情况及血管侵袭情况呈正相关 ($P < 0.05$); UCH37 阳性表达的结直肠癌患者术后 5 年总体生存率低于 UCH37 阴性表达的结直肠癌患者 ($P < 0.05$); UCH37 可作为判断结直肠癌患者预后的分子指标 [$\hat{HR} = 4.998$ (95%CI: 1.897, 8.438), $P = 0.017$]。**结论** UCH37 在结直肠癌组织中表达升高, 可作为预测结直肠癌患者生存周期及预后的潜在分子标志物。

关键词: UCH37; 结直肠癌; 生存; 预后

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

Prognostic significance of UCH 37 in colorectal cancer

Xian-lun Deng¹, Li-bo Feng¹, Jian-wei Xu², Ji-yong Xiang², Dong Xia¹

(1. Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan China, 646000; 2. Department of General Surgery, Zhongjiang People's Hospital, Zhongjiang, Sichuan 618100, China)

Abstract: Objective To explore the expression and prognostic significance of UCH37 in colorectal cancer (CRC). **Methods** Expressions of UCH37 at both mRNA and protein levels were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Immunohistochemistry in 77 CRC patients. Spearman's rank test, K-M survival curves and Cox proportional hazards risk were conducted to determine the clinical relevance of UCH37 in CRC. **Results** QRT-PCR and Immunohistochemistry results revealed that expression of UCH37 was upregulated in CRC tissues compared with adjacent normal tissues, and positive rates of UCH37 in CRC patients at TNM III and TNM IV were increased when compared with that in CRC patients at TNM I and TNM II ($P < 0.05$). Spearman rank correlation showed that expression of UCH37 was closely associated with lymph node metastasis and venous invasion ($P < 0.05$). Kaplan-Meier curves suggested that expression of UCH37 was negatively correlated with 5-year overall and progression-free survival time ($P < 0.05$). Cox proportional hazards risk analysis revealed that UCH37 was an independent prognostic factor for CRC [$\hat{HR} = 4.998$, (95%CI: 1.897, 8.438), $P = 0.017$]. **Conclusions** UCH37 is

收稿日期: 2018-04-21

[通信作者] 夏冬, E-mail: juliahhy@aliyun.com.cn

potentially a prognostic biomarker in CRC.

Keywords: UCH37; colorectal cancer; survival; prognosis

2012 年的数据显示全球新发结直肠癌病例数约为 140 万^[1], 为导致肿瘤相关性死亡最主要的原因之一^[2]。因此, 更深入的寻找与结直肠癌进展相关的分子及潜在机制显得有尤为迫切。泛素化羧基末端水解酶 37 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 37, UCH37) 是去泛素化酶家族成员, 其可通过从蛋白泛素连接链的远端亚基水解聚泛素而抑制蛋白降解^[3]。研究显示 UCH37 在多种肿瘤组织中表达上调, 并促进肿瘤的进展^[4-5]。本研究拟检测结直肠癌标本中 UCH37 的表达情况, 并分析其临床相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2010 年 6 月-2012 年 12 月于西南医科大学附属医院普外科接受结直肠癌根治术, 术后病理显示所切除的肿瘤组织为结肠癌或直肠癌患者的肿瘤组织及癌旁组织标本 77 例。组织标本收取后分为两部分, 一部分冻于液氮中供后续提取 RNA 用, 一部分进行石蜡包埋供免疫组织化学检测用。入组患者在术后 3 个月后开始随访记录, 随访截止时间点为患者死亡或至 2016 年 7 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直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, 经液氮冻存或石蜡包埋长期储存。本研究已经西南医科大学附属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。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 (简称免疫组化) 二甲苯脱蜡 2 次, 100% ~ 70% 梯度酒精脱水。柠檬酸盐缓冲液高压修复 90 s。30 ml/L 过氧化氢孵育 20 min, 磷酸盐缓冲液清洗 5 min × 5 次。兔抗人 UCH37 单克隆抗体 (ab131244) (1 : 100) 4℃ 孵育过夜, 磷酸盐缓冲液清洗 5 min × 5 次。加入聚合物增强剂, 37℃ 孵育 20 min, 磷酸盐缓冲液清洗 5 min × 5 次。加入酶标抗兔聚合物放大剂, 37℃ 孵育 15 min, 磷酸盐缓冲液清洗 5 min × 5 次。DAB 显色, 苏木素复染, 1 ml/L 盐酸酒精分化, 磷酸盐缓冲液返蓝, 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。阳性细胞百分率 < 25% 或不着色及较淡着色者为阴性, 阳性细胞百分率 > 25% 或适中着色及深着色者为阳性。

1.2.2 RNA 提取及逆转录 RNA 提取采用 Trizol 法, Trizol 购自于美国 Sigma 公司, 将液氮冷冻过的组织研磨成粉末状, 加入 1 ml Trizol 继续研磨至裂解呈透明状。12 000 r/min 4℃ 离心 5 min, 上清转移至一新离心管中。加入裂解液 1/5 体积的氯仿, 用力振荡至充分乳化。12 000 r/min 4℃ 离心 15 min。吸取上清液至一新的离心管中, 加入等体积异丙醇, 上下颠倒 15 次, 静置 10 min。12 000 r/min 4℃ 离心 15 min。弃去上清, 加入 75% 的乙醇 1 ml, 12 000 r/min 4℃ 离心 5 min。所得沉淀加入 20 μl 去离子水, 即为所需 RNA。逆转录采用 10 μl 体系, RNA 定量后, 取 1 μl RNA, 加入 5 × Prime Script RT master (日本 TaKaRa 公司) 2 μl, 7 μl 去离子水。轻柔混匀后, 进行逆转录反应。反应条件为: 37℃ 15 min RNA 二级结构打开, 逆转录酶工作; 85℃ 5 s 形成 cDNA, 置入 4℃ 冰箱储存。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (Quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 采用 TaKaRa 公司 SYBR premix Ex Taq II 试剂盒进行 qRT-PCR, 配置 PCR 反应液, PCR 反应采用 25 μl 体系, 组分如下: SYBR premix Ex Taq II 12.5 μl, UCH37 或 β-actin 正向链引物 1 μl, UCH37 或 β-actin 反向链引物 1 μl, 实时定量产物 2 μl, 去离子水 8.5 μl。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 扩增 15 s, 60℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环。反应结束后样品置入 4℃ 冰箱保存。UCH37 引物序列: 正向 5'-TGTC TCATGGAAAGCGACCC-3', 反向 5'-GCCACTTGAAAA GAAAAATTAACCC-3'; β-actin 引物序列: 正向 5'-CG TCTTCCCCTCCATCGT-3', 反向 5'-GAAGGTGTGGTGC CAGATTT-3'。计算公式为: UCH37 相对表达量: $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{UCH37} - Ct_{\beta-actin})_{待测样本} - (Ct_{UCH37} - Ct_{\beta-actin})_{校准样本}}$ 。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用 *t* 检验; 计数

资料以率 (%) 表示, 比较采用 χ^2 检验; 相关分析用 Spearman 法, 绘制 K-M 生存曲线, 比较用 Log-rank χ^2 检验; 影响因素的分析采用 Cox 风险比例模型, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UCH37 mRNA 在结直肠癌及癌旁组织中的表达水平

qRT-PCR 结果显示, 结直肠癌组织中 UCH37 mRNA 表达水平为 (5.138 ± 1.266) , 癌旁组织 UCH37 mRNA 的表达水平为 (1.325 ± 0.519) 。两者 UCH37 mRNA 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($t = 2.746$,

$P = 0.043$), UCH37 mRNA 在结直肠癌组织中的表达水平高于癌旁组织。

2.2 UCH37 蛋白在结直肠癌中的表达水平

UCH37 的阳性表达率在 TNM I 和 II 期患者为 40.625% (13/32), TNM III 和 IV 期为 68.889% (31/45)。两者间 UCH37 阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.104$, $P = 0.019$), UCH37 蛋白在 TNM III 和 IV 期结直肠癌患者组织中的阳性率高于 TNM I 和 II 期结直肠癌患者。见图 1。

2.3 UCH37 的表达与结直肠癌患者临床病理特征的关系

UCH37 的表达水平与结直肠癌患者血管侵袭情

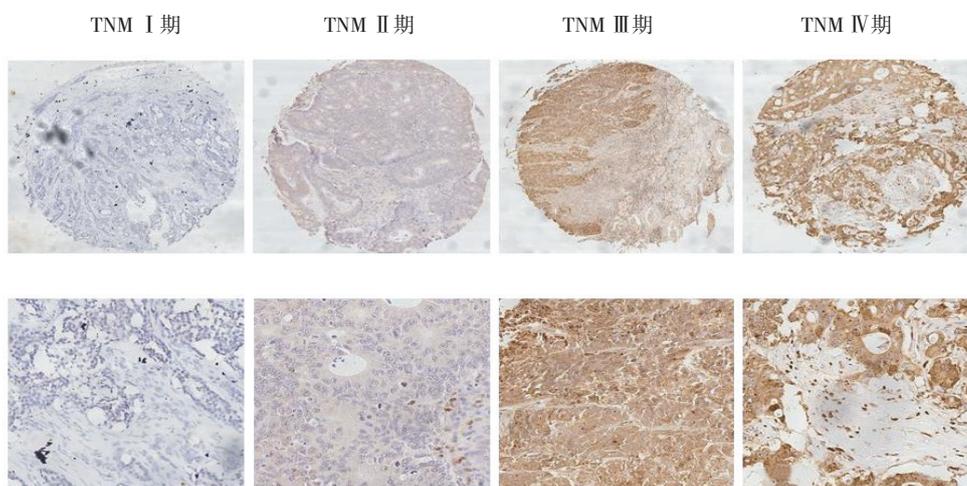


图 1 UCH37 蛋白在结直肠癌组织中的表达 ($\times 40$, $\times 200$)

表 1 UCH37 与结肠癌患者临床病理特征的相关性

临床病理特征	例数	阳性例数	r_s 值	P 值	临床病理特征	例数	阳性例数	r_s 值	P 值
年龄					血管侵袭				
≤ 50 岁	36	17	2.717	0.112	有	28	21	5.729	0.019
>50 岁	41	27			无	49	23		
性别					肿瘤分化程度				
男	43	25	0.040	0.749	好	33	15	3.222	0.133
女	34	19			中/差	44	29		
肿瘤直径					淋巴结转移				
>3 cm	37	23	0.733	0.491	有	21	17	4.364	0.047
≤ 3 cm	40	21			无	56	27		
肿瘤位置					远处转移				
左侧	33	18	1.055	0.590	有	15	9	0.062	0.681
右侧	37	23			无	62	35		
乙状结肠	7	3							

况 ($r_s=5.729$, $P=0.019$) 和淋巴结转移情况呈正相关 ($r_s=4.364$, $P=0.04$), 而与其他病理特征无相关性。见表 1。

2.4 UCH37 的表达与结直肠癌患者术后 5 年总体生存率的关系

根据 UCH37 免疫组化结果, 将结直肠癌患者分为 UCH37 阳性组和 UCH37 阴性组。Kaplan-Meier 生存曲线显示, UCH37 阳性组与阴性组结肠癌患者术后 5 年总体生存率差异有统计学意义 ($\chi^2=3.979$, $P=0.049$), UCH37 阳性组的结直肠癌患者术后 5 年总体生存率低于 UCH37 阴性组, 见图 2。

2.5 UCH37 的表达水平与结直肠癌患者预后的关系

单因素分析结果显示, TNM 分期、淋巴结转移情况、远处转移情况、血管侵袭及 UCH37 的表达水

平与总体生存预期相关。多因素分析结果显示, TNM 分期、淋巴结转移情况、远处转移情况、血管侵袭及 UCH37 表达水平均为判断结直肠癌患者预后的分子指标。见表 2。

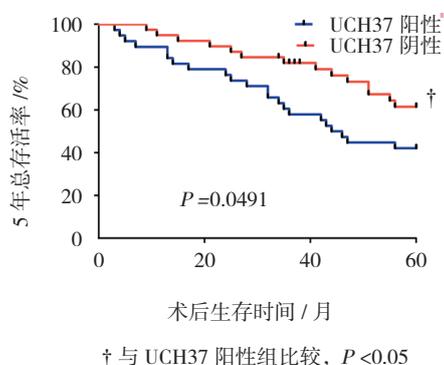


图 2 UCH37 的表达与结直肠癌患者术后 5 年总体生存率的关系

表 2 结直肠癌患者生存时间影响因素的单因素及多因素分析 Cox 风险比例模型相关参数

临床病理特征	单因素分析				多因素分析			
	$\hat{H}R$	95%CI		P 值	$\hat{H}R$	95%CI		P 值
		下限	上限			下限	上限	
UCH37 阳性	5.947	1.719	9.429	0.016	4.998	1.897	8.438	0.017
TNM 分期	4.419	1.517	5.218	0.013	5.147	2.219	7.158	0.009
淋巴结转移情况	3.517	1.178	4.268	0.034	4.441	1.798	5.189	0.023
远处转移情况	4.817	1.196	7.827	0.007	4.982	2.147	7.115	0.009
血管侵袭	3.556	1.551	5.216	0.036	4.129	1.729	6.209	0.021

3 讨论

蛋白底物可与泛素共价性结合, 而后被蛋白酶体识别并降解为小分子肽。泛素-蛋白酶体系是真核生物细胞内蛋白降解的非溶酶体途径。去泛素化酶可水解底物蛋白上的泛素链之间的链接, 从而抑制蛋白降解^[6-8]。该蛋白降解调控机制参与多种的细胞生理过程, 如转录调控、增殖、分化以及肿瘤发生^[9-11]。UCH37 是去泛素化酶家族成员, 可去泛素化 I 型活化型转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 受体, 而使其免于被蛋白酶体降解, 从而上调 TGF- β 依赖的基因表达^[12-13]。此外, UCH37 也可去泛素化 Smad2 和 Smad3, 增强其蛋白稳定性, 从而间接活化 TGF- β 信号通路^[14]。更为重要的是, 沉默 UCH37 的表达可活化 Caspase-9 和 Caspase-3 而有效地诱导非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡^[15]。既往研究发

现, UCH37 在卵巢癌中异常高表达, 并可作为卵巢癌独立判断预后的分子指标^[16]。此外, UCH37 在肝细胞癌中表达上调, 并可与葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 结合而调控细胞存活^[15]。另有研究发现, UCH37 可通过调控 Tcf7DNA 的结合而活化 Wnt 信号通路, 从而促进肿瘤进展^[17]。值得注意的是, 研究发现 UCH37 的选择性去泛素化酶抑制剂 WP1130 可介导在肿瘤中激活的 UCH37 等去泛素化酶, 从而导致抗凋亡蛋白的表达下调, 促凋亡蛋白的表达上调^[18]。本研究均提示 UCH37 可能通过促进某些原癌基因的表达而在肿瘤发生进展中发挥着重要的作用。本研究的结果进一步支持 UCH37 在肿瘤进展中的促癌作用, 本研究发现 UCH37 在结直肠癌组织中的表达高于癌旁组织, 与结直肠癌淋巴结转移及 TNM 分期密切相关。生存分析结果也显示 UCH37 高

表达的结直肠癌患者术后五年总体生存率低于低表达患者。Cox 风险比例模型结果进一步显示 UCH37 为判断结直肠癌预后的分子指标。提示 UCH37 在结直肠癌中可能作为癌基因发挥作用, 促进肿瘤的转移与增值。

参 考 文 献:

- [1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-386.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] CHEN Y J, MA Y S, FANG Y, et al. Power and promise of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 37 as a target of cancer therapy[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(4): 2173-2179.
- [4] CHEN Y, FU D, XI J, et al. Expression and clinical significance of UCH37 in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(9): 2310-2317.
- [5] FANG Y, MU J, MA Y, et al. The interaction between ubiquitin C-terminal hydrolase 37 and glucose-regulated protein 78 in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 359(1-2): 59-66.
- [6] MA J, GUO W, LI C. Ubiquitination in melanoma pathogenesis and treatment[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(6): 1362-1377.
- [7] WITTING K F, MULDER MPC, OVAA H. Advancing our understanding of ubiquitination using the ub-toolkit[J]. *J Mol Biol*, 2017. 429(22): 3388-3394.
- [8] GALLO L H, KO J, DONOGHUE D J. The importance of regulatory ubiquitination in cancer and metastasis[J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(7): 634-648.
- [9] JIN W L, MAO X Y, QIU G Z. Targeting deubiquitinating enzymes in glioblastoma multiforme: Expectations and challenges[J]. *Med Res Rev*, 2017, 37(3): 627-661.
- [10] SELVARAJU K, MAZURKIEWICZ M, WANG X, et al. Inhibition of proteasome deubiquitinase activity: a strategy to overcome resistance to conventional proteasome inhibitors[J]. *Drug Resist Updat*, 2015(21-22): 20-29.
- [11] MCCLURG U L, ROBSON C N. Deubiquitinating enzymes as oncotargets[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(12): 9657-9668.
- [12] CUTTS A J, SOOND S M, POWELL S, et al. Early phase TGFbeta receptor signalling dynamics stabilised by the deubiquitinase UCH37 promotes cell migratory responses[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(4): 604-612.
- [13] TIAN Y, LIAO F, WU G, et al. Ubiquitination and regulation of Smad7 in the TGF-beta1/Smad signaling of aristolochic acid nephropathy[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2015, 25(8): 645-652.
- [14] NAN L, JACKO A M, TAN J, et al. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-L5 promotes TGFbeta-1 signaling by de-ubiquitinating and stabilizing Smad2/Smad3 in pulmonary fibrosis[J]. *Sci Rep*, 2016(6): 33116.
- [15] CHEN Z, NIU X, LI Z, et al. Effect of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 37 on apoptotic in A549 cells[J]. *Cell Biochem Funct*, 2011, 29(2): 142-148.
- [16] WANG L, CHEN Y J, XU K, et al. High expression of UCH37 is significantly associated with poor prognosis in human epithelial ovarian cancer[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(11): 11427-11433.
- [17] HAN W, LEE H, HAN J K. Ubiquitin C-terminal hydrolase37 regulates Tcf7 DNA binding for the activation of Wnt signalling[J]. *Sci Rep*, 2017(7): 42590.
- [18] KAPURIA V, PETERSON L F, FANG D, et al. Deubiquitinase inhibition by small-molecule WP1130 triggers aggresome formation and tumor cell apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22): 9265-9276.

(王荣兵 编辑)