

USP9X 在非小细胞肺癌中的表达及与临床病理特征的关系*

彭 静^{1,2}, 胡 倩^{1,2}, 刘卫平³, 刘珊玲^{1, 2△}, 王 和^{1,2}

1. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041); 2. 四川大学华西第二医院 妇科疾病与出生缺陷教育部重点实验室(成都 610041);
3. 四川大学华西医院 病理科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨泛素特异性蛋白酶 9X(USP9X)蛋白在非小细胞肺癌(NSCLC)及肺良性病变组织中的表达特点及其临床意义。**方法** 采用免疫组织化学染色方法检测 71 例 NSCLC 及 20 例肺良性病变组织中 USP9X 蛋白的表达,并分析其中 51 例 NSCLC 患者肺癌组织标本中 USP9X 的表达与患者临床病理特征及预后的关系。**结果** NSCLC 患者 USP9X 的阳性表达率为 69.0%(49/71),较肺良性病变患者阳性表达率 20.0%(4/20)高,差异有统计学意义($P<0.001$)。NSCLC 组织中 USP9X 的表达在不同肿瘤分化程度及有无淋巴结转移间的差异有统计学意义(P 均 <0.05)。生存分析中,USP9X 阳性表达组患者的生存率低于阴性表达组($P<0.05$)。Cox 多因素回归分析显示肿瘤的病理类型、TNM 分期及 USP9X 表达是影响 NSCLC 患者预后的独立危险因素(P 均 <0.05)。**结论** USP9X 的过表达在 NSCLC 的侵袭转移及发生发展中起重要作用,并对肿瘤患者的预后判断有一定参考价值。

【关键词】 肺肿瘤 USP9X 生存 免疫组化

Expression of USP9X in Non-small Cell Lung Cancer and Its Clinical Significance PENG Jing^{1, 2}, HU Qian^{1, 2}, LIU Wei-ping³, LIU Shan-ling^{1, 2△}, WANG He^{1, 2}. 1. Department of Obstetric and Gynecologic, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Obstetric & Gynecologic and Pediatric Diseases and Birth Defects of Ministry of Education, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Pathology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: sunny630@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression and clinical significance of ubiquitin-specific protease 9X (USP9X) protein in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** USP9X proteins were detected in 71 cases of NSCLC and 20 cases of benign pulmonary tissues by immunohistochemical staining. The correlation between USP9X expression and 51 NSCLC clinicopathological parameters as well as survival rates were indicated. **Results** Higher rate [69.0% (49/71)] of the expression of USP9X was observed in NSCLC samples, compared with 20.0% (4/20) in benign pulmonary tissues ($P<0.001$). Furthermore, the expression of USP9X proteins was positively associated with both histological types and lymph node metastasis ($P<0.05$). The survival analysis showed that the survival rate was lower in patients with positive expressions of USP9X than in patients with negative expressions ($P<0.05$). USP9X expression, together with histological types and TNM stage was an independent predictor for overall survival in the multivariate Cox regression model ($P<0.05$). **Conclusion** Up-regulation of USP9X plays an important role in the invasion and progression of NSCLC and could be considered as a prognostic predictor for NSCLC.

【Key words】 Lung neoplasms USP9X Survival Immunohistochemistry

泛素特异性蛋白酶 9X(USP9X)是去泛素化酶(DUBs)家族成员,参与多种细胞调控活动及信号转导过程^[1],USP9X 在某些人体恶性肿瘤中[包括非小细胞肺癌(NSCLC)]存在过表达,但关于

USP9X 表达对 NSCLC 患者预后判断的研究尚未见报道。本研究通过对 71 例 NSCLC 患者肺癌组织中 USP9X 的表达检测,分析其中 51 例 NSCLC 患者肺癌组织的 USP9X 表达与患者临床病理特征及生存率的关系,探讨 USP9X 在肺癌发展过程中及预后方面可能起到的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源及临床资料

* 国家自然科学基金(No. 81270660)、四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2012SZ0136)和四川省科技厅“神经疾病四川省青年科技创新研究团队”(No. 2011JTD0005)资助

△ 通讯作者, E-mail: sunny630@126.com

收集四川大学华西医院病理科 2001~2003 年肺癌患者术后组织病理标本,患者术前均未接受放化疗。共 71 例 NSCLC 组织标本,其中 51 例患者临床病理信息资料完整,并进行了随访。包括男性 44 例、女性 7 例;发病年龄 28~74 岁,中位年龄 61 岁。鳞癌 19 例、腺癌 26 例、腺鳞癌 6 例;高分化 6 例、中分化 19 例、低分化 26 例;有淋巴结转移 31 例、无淋巴结转移 20 例;TNM 分期 I~II 期 16 例、III~IV 期 35 例。另收集 20 例肺良性病变组织,包括肺大泡 6 例、支气管扩张 8 例、慢性支气管炎 6 例作为非肺癌组织对照。生存时间定义为从手术日期开始到随访截止日期或由于复发、转移而死亡的时间。

1.2 主要试剂

鼠抗 USP9X 单克隆抗体(NBP2-03824)购于 NOVUS 公司;免疫组化试剂盒(SP-9002)、DAB 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色 石蜡标本常规切片后置于 60℃ 烤箱中烘烤过夜后常温保存备用。石蜡切片二甲苯脱蜡后,梯度乙醇脱水,PBS 冲洗后 3% 过氧化氢室温孵育 30 min,PBS 冲洗后在柠檬酸盐中进行热修复,待切片恢复室温即以山羊血清封闭,室温放置 30 min。用干纱布沿切片组织边缘吸尽山羊血清,加入 PBS 稀释的一抗(1:150),4℃ 过夜。次日晨 PBS 冲洗后滴加二抗,并室温下孵育 60 min,随后加入链霉亲和素-过氧化物酶结合物作用 60 min,PBS 清洗后 DAB 显色 8 min,蒸馏水终

止并充分冲洗。苏木素复染,中性树脂封固。空白对照中以 PBS 代替一抗。

1.3.2 免疫组化染色结果判定 以细胞呈棕黄色染色为阳性表达。每张切片在高倍镜下随机选取 20 个视野,结合染色强度和阳性细胞数量进行半定量分析。①按切片中细胞着色深浅评分:0 分为细胞无显色;1 分为淡黄色;2 分为棕黄色;3 分为棕褐色。②按阳性细胞占同类细胞百分比评分:0 分为无;1 分为阳性细胞<10%;2 分为阳性细胞 10%~50%;3 分为阳性细胞>50%~80%;4 分为阳性细胞>80%^[2]。染色结果由两名工作人员采取双盲法判定。取①、②两项评分的和作为总积分:0~3 分为阴性表达(-);>3 分为阳性表达(+)。

1.3.3 统计学方法 分类资料采用 Pearson χ^2 检验或者 Fisher 确切概率法检验;单因素生存分析采用 Kaplan-Meier 法,组间生存率比较采用对数秩检验(log-rank test);多因素生存分析采用 Cox 比例风险回归模型。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 USP9X 在良性病变肺组织及 NSCLC 组织中的表达

USP9X 阳性表达分布于细胞浆。在大部分良性病变肺组织中,USP9X 呈阴性表达。而在 NSCLC 肿瘤细胞中 USP9X 多呈阳性表达。71 例 NSCLC 患者 USP9X 的阳性表达率为 69.0%(49/71),高于良性病变肺组织 20.0%(4/20),差异有统计学意义($P<0.001$)。见图 1。

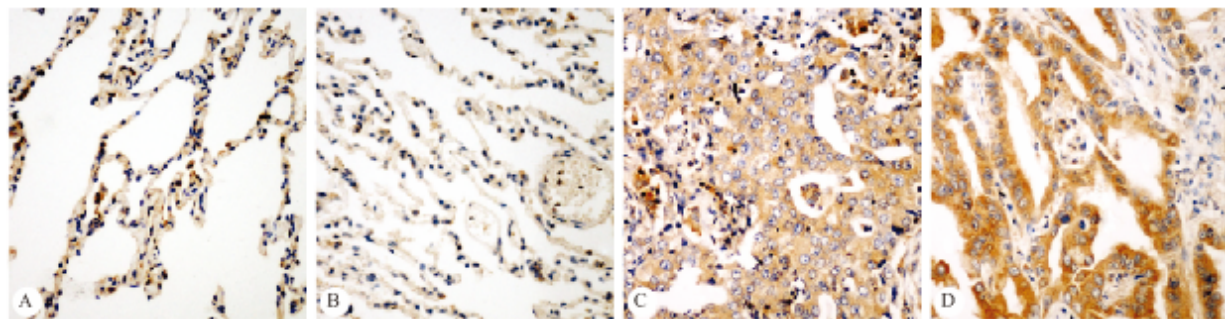


图 1 USP9X 在良性病变肺组织和 NSCLC 组织中的表达。SP ×200

Fig 1 USP9X expression in benign pulmonary tissues and NSCLC tissues. SP ×200

A: Chronic bronchitis tissues; B: Bronchiectasia tissues; C, D: NSCLC tissues

2.2 USP9X 在 NSCLC 组织中的表达与临床病理特征之间的关系

见表 1。NSCLC 组织中,USP9X 的阳性表达率随着肿瘤分化程度增高而逐渐减少($\chi^2=8.365$, $P<0.05$)。此外,相比于无淋巴结转移患者,

USP9X 的阳性表达率在有淋巴结转移的患者中升高($\chi^2=4.961$, $P<0.05$)。USP9X 表达在腺癌、鳞癌及腺鳞癌之间差异无统计学意义($\chi^2=3.377$, $P>0.05$);USP9X 阳性表达率在 I~II 期肿瘤患者与 III~IV 期患者间,虽然差异并无统计学意义,但

表现出分期越高 USP9X 表达越强的趋势($\chi^2 = 2.529, P=0.112$);USP9X 表达在患者不同年龄及性别间的差异无统计学意义。

表 1 USP9X 的表达与 NSCLC 临床病理特征的关系
Table 1 USP9X expression and NSCLC patient characteristics

	<i>n</i>	Positive expression of USP9X [case (%)]	<i>P</i>
Gender			0.114
Male	44	32 (72.7)	
Female	7	7 (100.0)	
Age			0.56
≥60 yr.	25	20 (80.0)	
<60 yr.	26	19 (73.1)	
Histological grade			0.015
Well-differentiated	6	2 (33.3)	
Moderately-differentiated	19	14 (73.7)	
Poorly-differentiated	26	23 (88.5)	
Pathologic type			0.185
Adenocarcinoma	26	22 (84.6)	
Squamous carcinoma	19	14 (73.7)	
Adenosquamous carcinoma	6	3 (50.0)	
Lymph node metastasis			0.026
Positive	31	27 (87.1)	
Negative	20	12 (60.0)	
TNM stage			0.112
I-II	16	10 (62.5)	
III-IV	35	29 (82.9)	

2.3 USP9X 表达与预后的关系

2.3.1 Kaplan-Meier 单因素生存分析 患者生存时间 0.2~11.0 年,USP9X 阴性者中位生存时间 9.5 年,USP9X 阳性者中位生存时间 4 年。USP9X

阳性表达组 NSCLC 患者 5 年生存率(33.0%)低于阴性表达组(75.0%),10 年生存率(20.5%)亦低于阴性表达组(64.3%),差异均有统计学意义($P<0.05$)。NSCLC 患者的生存曲线如图 2 所示。

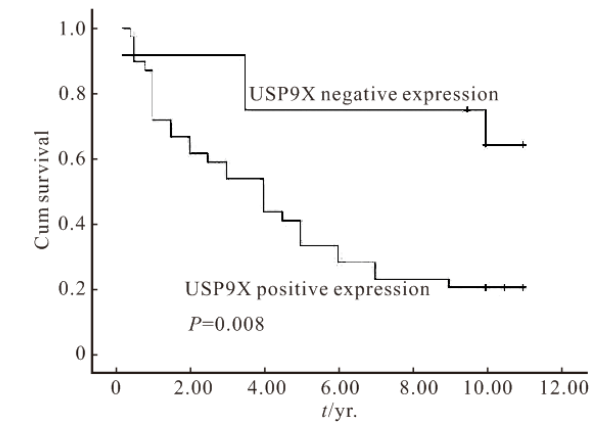


图 2 USP9X 的表达与 NSCLC 患者生存率的关系
Fig 2 Relationship between USP9X expression and cumulative survival in NSCLC

2.3.2 Cox 比例风险回归模型分析 分析 NSCLC 患者的年龄、性别、组织学类型、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移、USP9X 的表达与预后的关系,采用前向逐步法,在 $\alpha=0.05$ 水平上进行分析,结果显示病理类型、TNM 分期以及 USP9X 表达这 3 个因素成为影响 NSCLC 患者预后的独立危险因素(表 2)。

表 2 USP9X 与临床指标的 Cox 回归分析

Table 2 The Cox regression analysis of USP9X and characteristics of NSCLC patient

	β	SE	Wald	<i>P</i>	Exp (β)	95%CI
Pathologic type	1.015	0.435	5.432	0.020	2.759	1.175-6.479
TNM stage	-0.711	0.296	5.776	0.016	0.491	0.275-0.877
USP9X	1.139	0.542	4.421	0.035	3.123	1.080-9.025

3 讨论

肺癌是恶性程度及病死率最高的实体肿瘤之一。其中,NSCLC 占有肺癌病例的 60%~80%。探讨肺癌的疾病发展进程,对于临床寻找新的治疗靶点具有重要意义。去泛素化过程在多种生物学活动中起到重要调控作用,去泛素化酶(DUBs)通过对底物蛋白进行可逆的翻译后修饰作用,控制几乎所有的蛋白质功能^[3,4]。近年来,由于 DUBs 在多种细胞调节活动发挥关键作用,包括细胞周期调节、染色体修复、信号转导及肿瘤生长调节等方面,从而受到越来越多的关注和研究^[1,5,6]。泛素特异性蛋白酶(USPs)是 DUBs 家族中成员最多的一类,能够特异性识别已泛素化的底物并使其去泛素化^[7]。

USP9X 过表达最早报道于宫颈癌^[8],随后是乳

腺浸润性导管癌^[9]。接着,在滤泡型淋巴瘤、弥漫大 B 细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤中^[10]也发现 USP9X 过表达,并且在多发性骨髓瘤患者中,USP9X 表达增加预示着患者不良的生存结局,因为 USP9X 可以通过去泛素化作用稳定 Bcl-2 抗凋亡蛋白家族成员 Mcl-1,抑制恶变细胞凋亡,促进肿瘤生长。同样有文献报道 USP9X 稳定 Mcl-1 可能与肿瘤细胞耐放疗有关^[11]。Sun 等^[12]发现 DUBs 抑制剂 WP1130 可直接抑制 USP9X 的活性,下调 Mcl-1 的蛋白表达水平,促进慢性髓细胞白血病细胞发生凋亡。Peddaboina 等^[13]在结肠腺癌及非小细胞肺癌细胞中发现了 USP9X 蛋白的过表达,同时证实了通过抑制 USP9X 达到下调 Mcl-1 蛋白的作用,增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。我们前期研究^[14]发现,USP9X 在食管癌癌前病变→低度上皮

内瘤变→高度上皮内瘤变→食管癌这个过程中, USP9X 的表达呈现出增强的趋势, 差异有统计学意义, 并且 USP9X 高表达的食管癌患者生存时间缩短, 预后变差。

虽然前述有报道证实 NSCLC 中 USP9X 存在过表达, 并且肿瘤临床分期越高 USP9X 的表达越强, 但其并未研究 USP9X 与肿瘤患者其他临床指标的关系及对患者预后的影响^[12]。本实验结果不仅证实 USP9X 在 NSCLC 中的表达高于良性病变肺组织, 差异有统计学意义, 并且还着重探讨了 USP9X 与 NSCLC 患者各临床病理特征的关系以及对预后的影响。通常肿瘤细胞的分化程度越低, 它的恶性程度就越高, 肿瘤实体生长较迅速, 而且容易发生转移。分化较好的肿瘤一般生长较慢, 而且在治疗后不易复发。我们的结果显示, NSCLC 组织中 USP9X 的阳性表达与肿瘤分化程度有关, 低分化肿瘤中 USP9X 表达率高, 说明 USP9X 过表达可能与肿瘤自身的恶性程度有关, 可以预测肿瘤的进展情况。此外, 有淋巴结转移患者中 USP9X 阳性表达率高于无淋巴结转移患者, 说明 USP9X 过表达可能与肿瘤的浸润转移有关。由于淋巴结转移是影响肿瘤分期的重要因素之一, 所以尽管 USP9X 阳性表达率在 I~II 期及 III~IV 期肿瘤患者中差异无统计学意义, 却仍然表现出分期越高 USP9X 表达越强的趋势 (62.51% vs. 82.9%, $\chi^2 = 2.529$, $P = 0.112$)。由此, 我们推测 USP9X 的过表达对于肿瘤的迁移与侵袭起到重要作用, 从而影响肿瘤的临床发生发展。临床上, 除了对肿瘤患者疾病本身的关注, 还希望了解患者的预后情况, 从而综合制定最适合患者的治疗方案。在本实验中, 通过对 NSCLC 患者进行随访及生存分析, 我们得出 USP9X 阳性表达组肿瘤患者生存率低于阴性表达组, 这一结论尚未见报道。在更进一步的多因素 Cox 回归分析中, USP9X 表达、肿瘤病理类型、TNM 分期三者成为影响 NSCLC 患者预后的独立危险因素。这为临床提供了新的理论基础, 即除了分析患者的临床病理特征, 通过检测患者肿瘤组织中 USP9X 的表达程度, 亦可初步判定其预后。综上, 可认为 USP9X 在 NSCLC 的侵袭转移及发生发展中起到一定作用, 且有助于评价 NSCLC 患者的预后情况。

参 考 文 献

- deubiquitinating enzymes as oncogenes, non-oncogenes and tumor suppressors. *Cell Cycle*, 2009; 8(11): 1688-1697.
- Xue LY, Hu N, Song YM, *et al.* Tissue microarray analysis reveals a tight correlation between protein expression pattern and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 2006; 6: 296.
- Kapur V, Peterson LF, Fang D, *et al.* Deubiquitinase inhibition by small-molecule WP1130 triggers aggresome formation and tumor cell apoptosis. *Cancer Res*, 2010; 70(22): 9265-9276.
- Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006; 22: 159-180.
- Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem*, 2009; 78: 363-397. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526.
- Komander D, Clague MJ, Urbe S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009; 10(8): 550-563.
- Quesada V, Díaz-Perales A, Gutiérrez-Fernández A, *et al.* Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004; 314(1): 54-62.
- Rolén U, Kobzeva V, Gasparjan N, *et al.* Activity profiling of deubiquitinating enzymes in cervical carcinoma biopsies and cell lines. *Mol Carcinog*, 2006; 45(4): 260-269.
- Deng S, Zhou H, Xiong R, *et al.* Over-expression of genes and proteins of ubiquitin specific peptidases (USPs) and proteasome subunits (PSs) in breast cancer tissue observed by the methods of RFDD-PCR and proteomics. *Breast Cancer Res Treat*, 2007; 104(1): 21-30.
- Schwickart M, Huang X, Lill JR, *et al.* Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature*, 2010; 463(7277): 103-107.
- Trivigno D, Essmann F, Huber SM, *et al.* Deubiquitinase USP9x confers radio resistance through stabilization of Mcl-1. *Neoplasia*, 2010; 14(10): 893-904.
- Sun H, Kapuria V, Peterson LF, *et al.* Bcr-Abl ubiquitination and Usp9x inhibition block kinase signaling and promote CML cell apoptosis. *Blood*, 2011; 117(11): 3151-3162.
- Peddaboina C, Jupiter D, Fletcher S, *et al.* The downregulation of Mcl-1 via USP9X inhibition sensitizes solid tumors to Bcl-xl inhibition. *BMC Cancer*, 2012; 12: 541. doi: 10.1186/1471-2407-12-541.
- Peng J, Hu Q, Liu WP, *et al.* USP9X expression correlates with tumor progression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Diagn Pathol*, 2013; 8: 177. doi: 10.1186/1746-1596-8-177.

(2014-10-09 收稿, 2015-01-04 修回)

编辑 沈 进