

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.33.008

大肠癌组织中联合检测 USP22 和 BMI-1 表达的临床意义*

孙梓程 崔滨滨[△] 刘彦龙 张 干 李景文 韩 鹏

(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院结直肠外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨大肠癌组织中联合检测 USP22 和 BMI-1 表达的临床意义。**方法:**应用定量 RT-PCR 检测 82 例大肠癌手术切除标本及相应的癌旁组织中 USP22 及 BMI-1 mRNA 的表达水平,并分析其表达的差异,研究其表达水平与大肠癌患者临床病理特征及预后的关系。**结果:**USP22、BMI-1 mRNA 在大肠癌及癌旁组织中均可被检出,大肠癌组织中 USP22、BMI-1 mRNA 的相对表达水平均显著高于癌旁组织($P<0.01$),且二者之间呈显著正相关($r=0.708, P<0.01$)。USP22、BMI-1 mRNA 的高表达均与大肠癌的美国癌症分期联合委员会(AJCC)分期密切相关($P<0.01$)。COX 回归分析显示 USP22 及 BMI-1 的共表达可作为大肠癌患者预后的独立预测因素($P<0.01$)。**结论:** USP22 和 BMI-1 的共同激活可促进大肠癌的进展,并预示预后不良。

关键词: USP22; BMI-1; 大肠癌; 临床病理特征; 预后

中图分类号: R735.34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)33-6432-05

Clinical Significance of the Expression of USP22 and BMI-1 in Colorectal Cancer*

SUN Zi-cheng, CUI Bin-bin[△], LIU Yan-long, ZHANG Gan, LI Jing-wen, HAN Peng

(Department of Colorectal Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the clinical significances of expression of USP22 and BMI-1 in colorectal cancer(CRC). **Methods:** The mRNA level of USP22, BMI-1 in 82 matched samples comprising primary CRC and paired non-cancerous mucosa were detected and compared by quantitative RT-PCR. Then the correlation of mRNA level of USP22, BMI-1 with the clinicopathological characteristics and prognosis of patients with CRC were analyzed. **Results:** The mRNA expression of USP22 and BMI-1 were significantly up-regulated from non-cancerous mucosa to primary carcinoma ($P<0.0001$). Both genes existed positive and significant relationship ($r=0.708, P<0.0001$). Increased mRNA expression of USP22 and BMI-1 were associated with certain clinical-pathologic variables such as advancing AJCC stage ($P<0.0001$). Overexpression of USP22 and BMI-1 remained a statistically-significant prognostic marker in the Cox regression analysis. **Conclusion:** The co-activation of USP22 and BMI-1 may associate with the progression and prognosis of CRC.

Key words: USP22; BMI-1; Colorectal cancer; Clinicopathological characteristics; Prognosis

Chinese Library Classification: R735.34 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)33-6432-05

前言

大肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,其发病率呈逐年上升趋势^[1]。在过去的 10 年中,大肠癌的治疗已取得巨大的进展,如外科技术的进步(直肠全系膜切除术的推广)、靶向分子药物的研发应用以及辅助治疗手段(放疗及化疗)的更新,但患者的预后仍不容乐观,主要是因为大肠癌易发生转移和复发^[2]。因此,深入探讨大肠癌的恶性转化及演进机制,寻找更为有效的诊治靶点具有十分重要的临床意义。

Glinsky 及其同事利用基因组学技术鉴定出能够预测癌肿是否具有侵袭性和耐药性的信号途径,被称之为“Polycomb/肿瘤干细胞信号”^[3-5]。研究证实,肿瘤细胞如表达这种信号则预示

患者的预后较差,使癌症病人的诊断和病情级别的划分成为可能。USP22 和 BMI-1,作为 Polycomb/肿瘤干细胞信号成员,均已被证实普遍活化于各种癌症组织中。到目前为止,很多实验结果都显示 USP22 和 BMI-1 在功能上存在交叉。因此,有学者提出 USP22 可能与 BMI-1 相互作用调节肿瘤的进展。本研究旨在利用定量 RT-PCR 等方法检测并分析大肠癌组织中 USP22 和 BMI-1 共表达的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取哈尔滨医科大学附属肿瘤医院 2006-2007 年间部分大肠癌患者 82 例。收集其新鲜组织包括癌旁粘膜及其相配对

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81272704);黑龙江省自然科学基金面上项目(D201149)

作者简介:孙梓程(1980-),男,硕士研究生,从事结直肠癌新辅助治疗的研究

[△] 通讯作者:崔滨滨,电话:13351112888, E-mail: cbb222@hotmail.com

(收稿日期:2014-03-08 接受日期:2014-03-30)

的腺癌置于液氮保存 24 小时后置于 -80°C 冰箱保存,同时汇总研究病例的临床病理资料,包括患者的年龄、性别、分化程度、肿瘤大小、浸润深度及有无淋巴结和远处转移等。所有患者均未行术前放化疗,随访至 2009 年 11 月,中位随访时间为 36.13 个月(6.20 ~ 43.03 个月)。

1.2 试剂

1.2.1 抗体 USP22(Ab4812)、BMI-1(Ab14389)购自于美国 Abcam 公司; β -actin(sc-47778) 购自于 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.2.2 探针 USP22 (Hs00392758_m1)、BMI-1(Hs00180411_m1)、GAPDH(Hs02758991_g1)购自于美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 方法

1.3.1 定量 RT-PCR 检测 应用 Trizol 试剂(Invitrogen)等从冷冻组织样本中提取总 RNA。利用 High-capacity cDNA reverse transcription kits(Applied Biosystems)合成 cDNA。应用 TaqMan universal PCR master mix(Applied Biosystems) 和 TaqMan gene expression assays probe and primer mix(Applied Biosystems)在 ABI prism 7000 sequence detection system 完成 USP22、BMI-1 及 GAPDH 的检测。每个反应最终体积为 $20\ \mu\text{L}$,包含 $2\ \mu\text{L}$ 产物样本的 cDNA、 $1\ \mu\text{L}$ 引物、 $10\ \mu\text{L}$ TaqMan Universal PCR 反应体系以及 $7\ \mu\text{L}$ 无 RNA 酶水。热循环条件如下:先 95°C 预变性 10 min;接着进行 40 个循环,包括 95°C 15 s 和 60°C 1 min。所有样本一式三份。扩增数据用 ABI prism sequence detection software 2.1 (Applied Biosystems)分析,具体操作过程参考^[6]。

1.3.2 免疫组织化学检测 选取定量 RT-PCR 结果差异明显的配对组织进行蛋白表达验证,对手术标本经石蜡切片采用免疫化学组织法染色,具体方法参考^[7]。其中,USP22 以 1:320、BMI-1 以 1:150 稀释浓度进行染色。镜下观察标本着色度的程度。两蛋白阳性表达为细胞的核内呈棕黄色、棕褐色的颗粒,少数胞浆内呈棕黄色。

1.4 统计学分析

应用 SPSS13.0 统计学软件进行数据处理,用配对 t 检验分析 mRNA 表达差异;用 Pearson coefficient 分析基因间的关联性;生存期计算用 Kapla-Meier 检验,组间生存差异用 log-rank 检验,利用 Cox 逐步回归的方法筛选出预后因素,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大肠癌及癌旁组织中 USP22 及 BMI-1 mRNA 的表达

大肠癌中 USP22 mRNA 和 BMI-1 mRNA 的表达水平均显著高于配对的正常粘膜组($P < 0.01$)(图 1A-B),并且两者呈显著相关性($r = 0.708$, $P < 0.01$)(图 1C)。我们设定肿瘤组织中的表达高于癌旁组织 2 倍以上为高表达^[6],低于癌旁组织 2 倍为低表达,2 倍之间为中表达。在 82 个成对的 RNA 样本中,USP22 高表达率为 47.6%,BMI-1 高表达 57.3%,USP22/BMI-1 同时高表达为 41.5%(表 1)。通过连续切片进行免疫组化染色,在 USP22^[20] 高表达的组织中常伴有 BMI-1 的高表达(图 1E-F)。

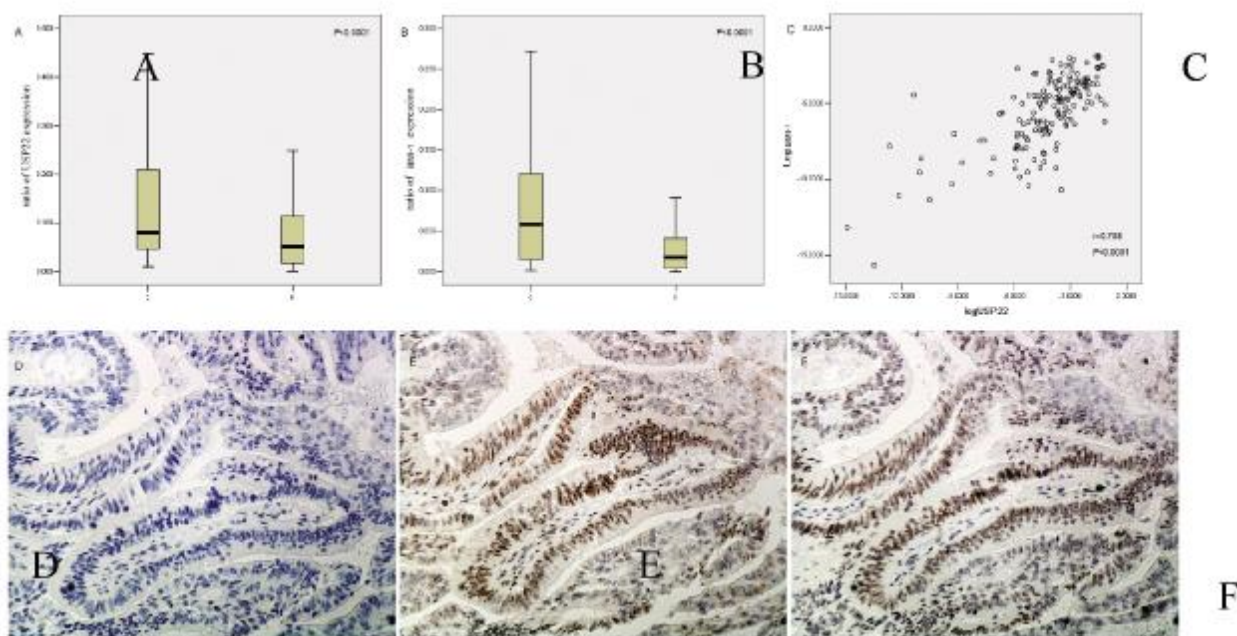


图 1 USP22 和 BMI-1 在大肠癌中的表达

Fig. 1 Expression of USP22 and BMI-1 in CRC

*注:A.代表 USP22 mRNA 在腺癌中表达显著高于正常粘膜组;B.代表 BMI-1 mRNA 在腺癌中表达显著高于正常粘膜组;C.代表 USP22 mRNA 与 BMI-1 mRNA 在腺癌组织中的表达显著相关;D.代表对照组(免疫组化);E.代表 USP22 在腺癌组织中高表达;F.代表 BMI-1 在腺癌组织中高表达。

*Note: A.USP22 mRNA expression in adenocarcinoma was significantly higher than that in normal mucosa; B.BMI-1 mRNA expression in adenocarcinoma was significantly higher than that in normal mucosa; C.USP22 mRNA was significantly associated with BMI-1 mRNA expression in adenocarcinoma; D.a control group (immunohistochemistry); E.USP22 is highly expressed in cancer tissues; F.BMI-1 is highly expressed in cancer tissue.

表 1 USP22 和 BMI-1 mRNA 在 82 对大肠癌组织中的表达

Table 1 Expression of USP22 and BMI-1 mRNA (2-fold expression analysis) in the 82 primary CRCs

基因 Gene	低表达 Decreased expression		中表达 Intermedial expression		高表达 Overexpression	
	例数 Frequency	百分比 Percentage	例数 Frequency	百分比 Percentage	例数 Frequency	百分比 Percentage
USP22	12	14.6%	31	37.8%	39	47.6%
BMI-1	12	14.6%	23	28.1%	47	57.3%
USP22+BMI-1	9	10.9%	39	47.6%	34	41.5%

表 2 USP22 mRNA 和 BMI-1 mRNA 的表达与大肠癌患者临床病理特征的相关性

Table 2 Correlations of mRNA expression level of USP22 and BMI-1 with the clinical-pathologic characteristics of patients with CRC

变量 Variables	n	USP22		BMI-1	
		GA	P	GA	P
性别 Gender			0.199		0.474
男性 Male	38	1.612		2.737	
女性 Female	44	3.455		4.045	
原发肿瘤部位 Site of primary tumor			0.526		0.808
结肠癌 Colon	27	1.855		3.071	
直肠癌 Rectum	55	2.769		3.535	
肿瘤大小 (cm) Tumor size (cm)			0.393		0.676
<5	51	2.957		3.689	
≥ 5	31	1.753		2.916	
组织学分级 Histological grade			0.891		0.882
高分化	36	2.661		3.049	
中分化 Moderately differentiated	31	2.025		3.321	
低分化 Poorly/undifferentiated	15	2.828		4.452	
pT			0.775		0.646
T1,T2,T3	29	5.756		4.711	
T4	53	1.513		2.812	
pN			0.824		0.962
N0	49	2.562		3.412	
N1	33	2.239		3.321	
pM			0.336		0.042
M0	69	2.157		2.690	
M1	13	4.832		12.685	
AJCC			0.033		0.046
I	18	9.537		7.837	
II	28	1.184		1.939	
III	23	1.390		1.811	
IV	13	4.587		10.439	

2.2 USP22 及 BMI-1 mRNA 表达水平与大肠癌临床病理特征的关系

USP22 和 BMI-1 mRNA 表达与大肠癌的临床病理学相关性见表 2。USP22 mRNA 水平^[21]与 AJCC(P=0.033)分期密切相关;而 BMI-1 mRNA 水平与 pM(P=0.042)、AJCC(P=0.046)显著相关。

2.3 USP22/BMI-1 mRNA 的表达与患者预后的相关性

Kaplan-Meier 分析表明,分别与 USP22 和 / 或 BMI-1 中表达组或低表达组相比,USP22 和 / 或 BMI-1 mRNA 高表达组患者的 3 年 DFS 较差,差异有统计学意义(表 3,图 2)。Cox 回归分析显示 USP22 和 BMI-1 的共同高表达为患者预后的独立危险因素(表 4)。

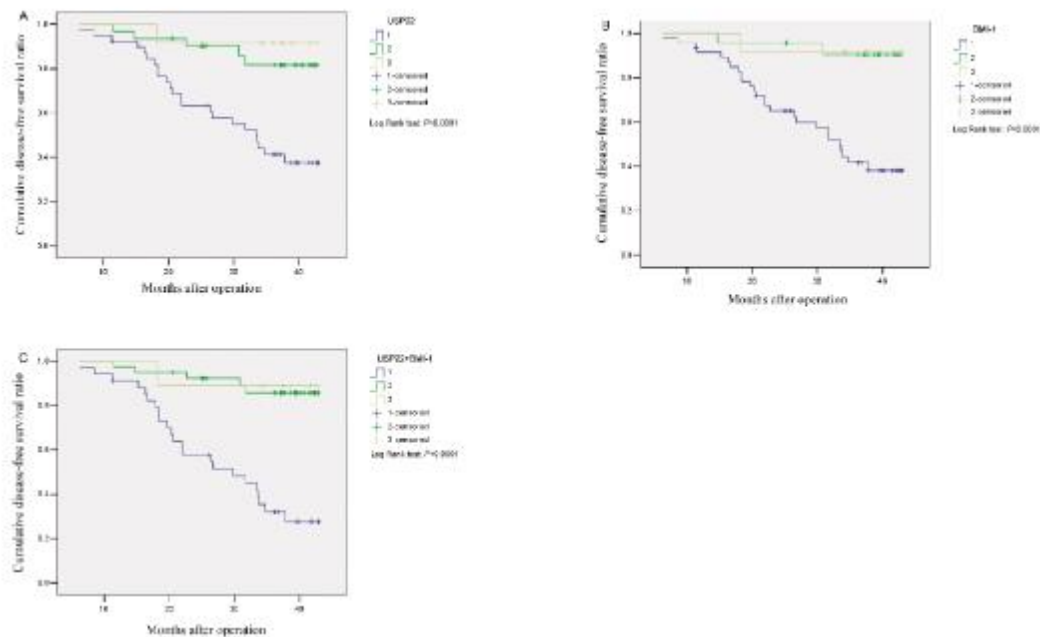


图 2 大肠癌组织中不同 USP22 和 BMI-1 mRNA 表达水平间的生存差异
Fig. 2 Survival differences of CRC patients with different mRNA expression level of USP22 and BMI-1

*注: 1.代表高表达组; 2.代表中表达组; 3.代表低表达组。
*Note: 1.Decreased expression group; 2.Intermedial expression group; 3.Ovexpressed expression group.

表 3 Kaplan-Meier 生存分析
Table 3 The survival statistics by Kaplan-Meier analysis

	N	3 年 DFS(%)	平均生存期(月)	P
总数 Total	82	64.6%	35.358± 1.242	
USP22				< .0001
低表达 Decreased	12	91.7%	40.719± 1.960	
中表达 Intermedial	31	83.9%	39.191± 1.535	
高表达 Ovexpressed	39	41.0%	30.579± 1.930	
BMI-1				< .0001
低表达 Decreased	12	91.7%	40.811± 1.968	
中表达 Intermedial	23	91.3%	40.911± 1.319	
高表达 Ovexpressed	47	44.7%	30.940± 1.758	
USP22+BMI-1				< .0001
低表达 Decreased	9	88.9%	40.037± 2.574	
中表达 Intermedial	39	87.2%	40.042± 1.240	
高表达 Ovexpressed	34	32.4%	28.647± 2.023	

表 4 Cox 回归分析预测 DFS 预后模型
Table 4 DFS predictor model in patients with CRC by Cox regression analysis for DFS

	Regression coefficient	standard error	P value	95% CI
AJCC	3.504	0.229	<0.0001	2.238-5.488
USP22+BMI-1	0.061	0.535	<0.0001	0.021-0.174

3 讨论

Glinsky 等^[3-5]建立了敲除啮齿 Polycomb 基因 BMI-1 的小鼠前列腺癌转移至肺的原发和转移模型, 选出了 BMI-1 信号转导通路上的 11 个基因, 包括 GBX2、Ki67、CCNB1、BUB1、KNTC2、USP22、HCFC1、RNF2、ANK3、FGFR2、CES1 等, 称之为“Polycomb/ 肿瘤干细胞信号通路”。多种临床标本检测结果显示这 11 个基因的表达模式可预测多种不同类型肿瘤的转移、

复发及死亡等预后情况。Lahad 等^[8]高度评价了 Glinsky 等的工作, 认为上述“魔术样的标志”如能进一步得到证实, 将对肿瘤治疗和预后具有极大价值。
USP22, 为酵母菌 Ubp8 的同系物, 是种新型的去泛素化水解酶。到目前为止, USP22 的功能虽然尚未完全明确, 但是已发现其在 DNA 转录、Myc 介导的细胞恶变以及细胞周期进程中发挥重要作用^[9]。此外, USP22 可选择性地表达于某些肿瘤中如胃癌^[10]、结直肠癌^[6,7]、肺癌^[11]等, 这些数据均证实 USP22 作为原

癌基因,在癌细胞侵袭和转移过程中发挥非常重要的作用^[18]。在前期工作中,我们发现 USP22 参与大肠癌的发生发展^[19],并且 USP22 的活化程度可预测患者的预后。但是,USP22 如何实现这些调控机制则未明确。

大量文献报道,BMI-1 在多种恶性肿瘤中高表达,并且与这些肿瘤的侵袭、转移、预后等一系列病理过程有关,表明了保守的 BMI-1 癌基因驱使通路能够激活正常干细胞,也能激活以及人类肿瘤中的临床致死亚群(肿瘤干细胞),进而表现为强烈的转移倾向和治疗耐受^[12]。目前,很多实验结果都显示 USP22 和 BMI-1 在功能上存在很多交叉重叠:1)敲除基因表达均导致细胞周期 G1 期的停滞;2) 均可调节相同的下游靶点如 INK4a/ARF 位点;3) 两者的功能与组蛋白的泛素化修饰相关。因此,有学者提出 USP22 和 BMI-1 可能构建一个共同体来调节肿瘤的进展^[13]。

本实验中,我们选取了 82 个患者的癌组织及癌旁组织进行配对检测,结果显示 USP22 和 BMI-1 mRNA 的表达水平从癌旁组织至原发癌同步上调,并且其表达与 AJCC 的分期密切相关,由此推测 USP22 和 BMI-1 的共同激活可导致大肠癌的进展^[16]。为进一步验证 USP22 和 BMI-1 潜在的临床作用,我们评估了二者与大肠癌患者预后的关系。Kaplan-Meier 分析表明,与 USP22 和 / 或 BMI-1 mRNA 的中低表达组相比较,USP22 和 / 或 BMI-1 mRNA 的高表达组其预后较差^[17]。此外,Cox 回归分析显示 USP22/BMI-1 的共同高表达可作为患者预后的独立危险因素。因此,联合检测 USP22 和 BMI-1 可将患者的预后进行分层,有利于个体化治疗;同时也表明 USP22 和 BMI-1 的共同活化可促进大肠癌的发生发展。

已有文献报道,USP22 为 c-Myc 功能所需,敲除 USP22 后 c-Myc 靶点的活性程度显著减弱^[18,19];而 BMI-1 是 c-Myc 的真正靶点^[14]。而我们的前期工作中也发现 USP22 可以调节 pRB (BMI-1/p16INK4a/cyclin D2) 和 p53(BMI-1/p14ARF)两条通路^[15]。因此,USP22 可能通过激活 BMI-1 致癌通路促进癌症的发生发展,而调节组蛋白的修饰可能是 USP22 活化 BMI-1 致癌通路的主要机制^[20]。但这些假设仍需要我们在未来的实验中逐一进行验证。

参考文献(References)

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62 (1): 10-29
- [2] 刘彦龙,王锡山. 胃肠道干细胞与肿瘤发生的探讨 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2007, 21(2): 164-168
Liu Yan-long, Wang Xi-shan. Stem cells and investigate gastrointestinal tumorigenesis[J]. Journal of Practical Oncol, 2007, 21 (2): 164-168
- [3] Glinisky GV. Death-from-cancer signatures and contribution of stem cells to metastatic cancer[J]. Cell cycle, 2005, 4(9): 1171-1175
- [4] Glinisky GV, Berezovska O, Gliniskii AB. Microarray analysis identifies a death from cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer [J]. J Clinical Invest, 2005, 115 (6): 1503-1521
- [5] Glinisky GV. Integration of HapMap-based SNP pattern analysis and gene expression profiling reveals common SNP profiles for cancer therapy outcome predictor genes[J]. Cell cycle, 2006, 5(22): 2613-2625
- [6] Liu YL, Yang YM, Xu H, et al. Increased expression of ubiquitin-specific protease 22 can promote cancer progression and predict therapy failure in human colorectal cancer [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2010, 25(11): 1800-1805
- [7] Liu YL, Yang YM, Xu H, et al. Aberrant expression of USP22 is associated with liver metastasis and poor prognosis of colorectal cancer[J]. J Surg Oncol, 2011, 103(3): 283-289
- [8] Lahad JP, Mills GB, Coombes KR. Stem cell-ness: a "magic marker" for cancer[J]. J Clin Invest, 2005, 115(6): 1463-1467
- [9] Zhang XY, Varthi M, Sykes SM, et al. The putative cancer stem cell marker USP22 is a subunit of the human SAGA complex required for activated transcription and cell-cycle progression [J]. Mol Cell, 2008, 29(1): 102-111
- [10] Yang DD, Cui BB, Sun LY, et al. The Co-expression of USP22 and BMI-1 may promote cancer progression and predict therapy failure in gastric carcinoma[J]. Cell Biochem Biophys, 2011, 61(3): 703-710
- [11] Hu J, Liu YL, Piao SL, et al. Expression patterns of USP22 and potential targets BMI-1, PTEN, p-AKT in non-small-cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2012, 77(3): 593-599
- [12] Glinisky GV. Stem cell origin of death-from-cancer phenotypes of human prostate and breast cancers[J]. Stem Cell Rev, 2007, 3(1): 79-93
- [13] Samara NL, Datta AB, Berndsen CE, et al. Structural insights into the assembly and function of the SAGA deubiquitinating module [J]. Science, 2010, 328(5981): 1025-1029
- [14] Guo WJ, Datta S, Band V, et al. Mel-18, a polycomb group protein, regulates cell proliferation and senescence via transcriptional repression of Bmi-1 and c-Myc oncoproteins [J]. Mol Biol Cell, 2007, 18(2): 536-546
- [15] Liu YL, Jiang SX, Yang YM, et al. USP22 acts as an oncogene by the activation of BMI-1-mediated INK4a/ARF pathway and Akt pathway [J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 62(1): 229-235
- [16] Yang DD. The co-expression of USP22 and BMI-1 may promote cancer progression and predict therapy failure in gastric carcinoma[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2011, 61(3): 703-710
- [17] Zhang Y, Yao L, Zhang X, et al. Elevated expression of USP22 in correlation with poor prognosis in patients with invasive breast cancer [J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2011, 137(8): 1245-1253
- [18] Y Liu, Y Yang, H Xu. Implication of USP22 in the regulation of BMI-1, c-Myc, p16INK4a, p14ARF, and cyclin D2 expression in primary colorectal carcinomas [J]. Diagnostic Molecular Pathology, 2010, 19(4): 194-200
- [19] Zhao Y, Lang G, Ito S, et al. A TFC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptor and counteracts heterochromatin silencing [J]. Molecular Cell, 2008, 29(1): 92-101
- [20] Zhang X Y, Varthi M, Sykes S M, et al. The putative cancer stem cell marker USP22 is a subunit of the human SAGA complex required for activated transcription and cell-cycle progression [J]. Molecular Cell, 2008, 29(1): 102-111