

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.20.006
文章编号: 1005-8982 (2019) 20-0034-05

USP33 在结直肠癌组织中的表达及与 Wnt/ β -catenin 通路的关系

宋正明, 杨庆华

(义乌市中心医院 肛肠外科, 浙江 义乌 322000)

摘要: 目的 探讨泛素特异性蛋白酶 33 (USP33) 在结直肠癌组织中的表达及其与 Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 通路的关系。**方法** 选取 2015 年 1 月—2017 年 12 月义乌市中心医院肛肠外科结直肠癌组织标本及对应的癌旁组织标本 90 例。采用免疫组织化学染色测定结直肠癌组织和癌旁组织中 USP33 表达; Western blotting 测定结直肠癌组织和癌旁组织中 USP33、 β -catenin 及 C-myc 蛋白水平。**结果** 结直肠癌组织中 USP33 阳性表达率低于癌旁组织 ($P < 0.05$), 而 β -catenin、C-myc 阳性率高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。Dukes 分期 C、D 期, 有淋巴结转移及有肝转移结直肠癌组织中 USP33 阳性率低于 A、B 期, 无淋巴结转移及无肝转移者 ($P < 0.05$)。不同年龄、性别、肿瘤直径、分化程度及浸润深度结直肠癌组织中 USP33 阳性率比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结直肠癌组织中 USP33 蛋白水平低于癌旁组织, 而 β -catenin、C-myc 蛋白水平高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。结直肠癌组织中 USP33 蛋白与 β -catenin、C-myc 蛋白呈负相关 ($P < 0.05$)。**结论** 结直肠癌组织中 USP33 低表达, USP33 可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路参与结直肠癌的发生、发展。

关键词: 结直肠肿瘤; 泛素化蛋白; 免疫组织化学; 基因表达调控, 肿瘤

中图分类号: R735.37; 735.35

文献标识码: A

Expression of USP33 in colorectal cancer tissues and its relationship with Wnt/ β -catenin pathway

Zheng-ming Song, Qing-hua Yang

(Department of Anorectal Surgery, Yiwu Central Hospital, Yiwu, Zhejiang 322000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of ubiquitin-specific protease 33 (USP33) in colorectal cancer tissues and its relationship with Wnt/ β -catenin pathway. **Methods** A total of 90 cases of colorectal cancer tissue specimens and corresponding adjacent tissue specimens in the Department of Anorectal Surgery of Yiwu Central Hospital from January 2015 to December 2017 were selected. Immunohistochemical staining was used to determine the USP33 expression in colorectal cancer tissues and adjacent tissues. The levels of USP33, β -catenin and c-myc protein in colorectal cancer tissues and adjacent tissues were determined by western blot. **Results** The positive expression rate of USP33 in colorectal cancer tissues was lower than that in adjacent tissues ($P < 0.05$); the positive rate of β -catenin and C-myc were higher than those of adjacent tissues ($P < 0.05$); the positive rate of USP33 in patients with Dukes stage C-D, lymph node metastasis and liver metastasis colorectal cancer tissues was lower than that in patients with Dukes A-B, no lymph node metastasis and no liver metastasis ($P < 0.05$). There were

no significant differences in the positive rate of USP33 in colorectal cancer tissues with different age, gender, tumor diameter, degree of differentiation and depth of invasion ($P > 0.05$). The level of USP33 protein in colorectal cancer tissues was lower than that in adjacent tissues ($P < 0.05$), and the levels of β -catenin and C-myc protein were higher than those in adjacent tissues ($P < 0.05$). There was negative correlation between USP33 protein and β -catenin and C-myc protein in colorectal cancer tissues ($P < 0.05$). **Conclusion** USP33 is down-regulated in colorectal cancer tissues, and USP33 may participate in the development of colorectal cancer through Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Keywords: colorectal neoplasms; ubiquitinated protein; immunohistochemistry; gene expression regulation, neoplastic

结直肠癌的预后与分期关系密切, 出现转移的结直肠癌患者 5 年生存率较低, 严重影响患者健康^[1-2]。泛素特异性蛋白酶 33 (USP33) 为泛素特异性蛋白酶家族成员之一, 在多种恶性肿瘤中表达异常。其在恶性肿瘤的侵袭、迁移中发挥重要作用^[3], 可通过多种信号通路参与恶性肿瘤的侵袭、迁移过程^[4]。Wnt/ β -catenin 信号通路在结直肠癌的发生、发展中具有重要作用, 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路对结直肠癌具有抗癌作用^[5-6]。本文对结直肠癌组织中 USP33 的表达及与 Wnt/ β -catenin 通路的关系进行研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 1 月—2017 年 12 月义乌市中心医院肛肠外科结直肠癌组织标本及对应的癌旁组织标本各 90 例。其中, 男性 55 例, 女性 35 例; 平均年龄 (61.25 ± 4.56) 岁; 肿瘤直径 (2.37 ± 1.34) cm; 分化程度: 低分化 36 例, 中分化 25 例, 高分化 29 例; Dukes 分期: A 期 24 例, B 期 23 例, C 期 27 例, D1 期 16 例; 浸润深度: $\geq T_2$ 43 例, $< T_2$ 47 例; 有淋巴结转移 40 例, 无淋巴结转移 50 例; 肝转移 42 例, 无肝转移 48 例。纳入标准: 所有患者行首次手术治疗; 经病理证实为结直肠癌。排除标准: 术前行放疗等其他治疗。本研究通过本院伦理委员会批准, 患者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 试剂 兔抗人 USP33 多克隆抗体、鼠抗人 USP33 多克隆抗体、鼠抗人 β -catenin 多克隆抗体及鼠抗人 C-myc 多克隆抗体等购自美国 Abcam 公司, ECL 购自美国 Sigma 公司。

1.2.2 免疫组织化学染色 将结直肠癌组织和癌旁组织石蜡切片脱蜡至水, 置微波炉加热 5 min 修复抗原, 用 10% 山羊血清封闭 15 min, 加入 USP33、

β -catenin 及 C-myc 一抗 (1 : 400) 过夜孵育。加入生物素标记二抗孵育 1 h; 加入辣根酶标记链霉卵白素孵育 15 min, DAB 显色, 苏木精-伊红染色, 盐酸酒精返蓝, 梯度酒精脱水; 经透明、封片后拍照观察。结果判断: 根据切片阳性细胞着色强度和阳性细胞比例判断, 细胞质出现棕褐色颗粒为阳性, 选择 5 个 400 高倍视野观察, 细胞着色强度评分。无着色: 0 分; 浅黄色: 1 分; 棕黄色: 2 分; 棕褐色: 3 分。阳性细胞比例评分, 阳性细胞比例 0% : 0 分; 阳性细胞比例 $\leq 10\%$: 1 分; 阳性细胞比例 $> 10\% \sim 50\%$: 2 分; 阳性细胞比例 $> 50\% \sim 70\%$: 3 分; 阳性细胞比例 $> 70\%$: 4 分。细胞着色强度和阳性细胞比例评分乘积 ≥ 5 分为阳性, < 5 分为阴性。

1.2.3 Western blotting 取结直肠癌组织和癌旁组织标本匀浆, 用蛋白裂解液提取总蛋白, 经电泳、转膜, 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入一抗 USP33 (1 : 1 000)、 β -catenin (1 : 250) 及 C-myc (1 : 250) 过夜孵育。以 β -actin 为内参照, 加入二抗 (1 : 1 000) 孵育 45 min, ECL 显色, Image J 图像分析软件对蛋白条带灰度值进行分析。USP33、 β -catenin 及 C-myc 蛋白相对表达量以 USP33、 β -catenin 及 C-myc 蛋白条带灰度值/ β -actin 条带灰度值表示。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验; 计数资料以率 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验; 相关性分析用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌组织与癌旁组织中 USP33、 β -catenin 及 C-myc 的表达

USP33 主要在细胞质中表达; β -catenin 主要在细胞质和细胞核中表达; C-myc 主要在细胞核中表

达。结直肠癌组织中 USP33 阳性 16 例, β -catenin 阳性 61 例, C-myc 阳性 57 例。癌旁组织中 USP33 阳性 58 例, β -catenin 阳性 14 例, C-myc 阳性 15 例。结直肠癌组织与癌旁组织中 USP33 (17.78% VS 64.44%)、 β -catenin (67.78% VS 15.56%) 及 C-myc 阳性率 (63.33% VS 16.67%) 比较, 经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2=40.479$ 、50.491 和 40.833, 均 $P=0.000$); 结直肠癌组织中 USP33 阳性率低于癌旁组织, 而 β -catenin、C-myc 阳性率高于癌旁组织 ($P<0.05$)。见图 1。

2.2 结直肠癌组织中 USP33 表达与临床病理特征的关系

Dukes 分期中 A、B 期与 C、D 期, 有淋巴结转移与无淋巴结转移, 以及有肝转移和无肝转移患者 USP33 阳性率比较, 经 χ^2 检验, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); Dukes 分期 C、D 期, 有淋巴结转移及有肝转移结直肠癌组织中 USP33 阳性率低于 A、B 期, 无淋巴结转移及无肝转移者。不同年龄、性别、肿瘤直径、分化程度及浸润深度结直肠癌组织中 USP33 阳性率比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

2.3 结直肠癌组织与癌旁组织中 USP33、 β -catenin 及 C-myc 蛋白相对表达量比较

结直肠癌组织和癌旁组织中 USP33、 β -catenin 及 C-myc 蛋白相对表达量比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 结直肠癌组织中 USP33 蛋白相

对表达量低于癌旁组织, 而 β -catenin、C-myc 蛋白相对表达量高于癌旁组织 ($P<0.05$)。见表 2 和图 2。

2.4 结直肠癌组织中 USP33 与 β -catenin、C-myc 蛋白的相关性

结直肠癌组织中 USP33 与 β -catenin、C-myc 蛋白呈负相关 ($r=-0.612$ 和 -0.564 , 均 $P=0.000$)。

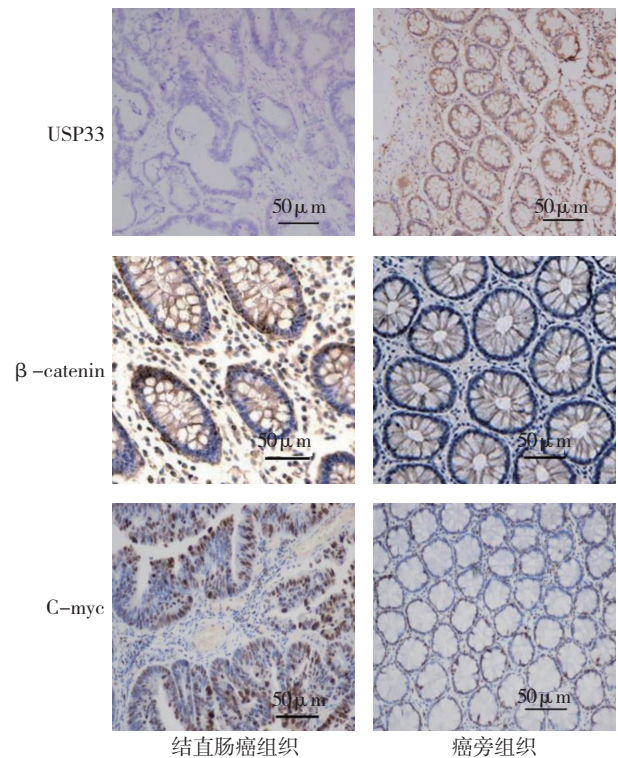


图 1 结直肠癌组织和癌旁组织中 USP33、 β -catenin 及 C-myc 蛋白的表达 (免疫组织化学染色 $\times 400$)

表 1 不同因素结直肠癌组织中 USP33 表达阳性率比较 [n=90, 例 (%)]

临床病理特征	n	USP33 阳性	χ^2 值	P 值	临床病理特点	n	USP33 阳性	χ^2 值	P 值
年龄					Dukes 分期				
≥ 60 岁	51	9 (17.65)	0.118	0.731	A、B 期	47	14 (29.79)	7.626	0.006
<60 岁	39	8 (20.51)			C、D 期	43	3 (6.98)		
性别					浸润深度				
男	55	10 (18.18)	0.046	0.830	≥ T ₂	43	6 (13.95)	1.309	0.253
女	35	7 (20.00)			<T ₂	47	11 (23.40)		
肿瘤直径					淋巴结转移				
≥ 2 cm	42	9 (21.43)	0.332	0.565	有	40	3 (7.50)	6.095	0.014
<2 cm	48	8 (16.67)			无	50	14 (28.00)		
分化程度					肝转移				
中-高分化	54	11 (20.37)	0.193	0.660	有	42	4 (9.52)	4.508	0.034
低分化	36	6 (16.67)			无	48	13 (27.08)		

表 2 结直肠癌组织和癌旁组织中 USP33、 β -catenin 及 C-myc 蛋白相对表达量比较 ($n=90, \bar{x} \pm s$)

组别	USP33	β -catenin	C-myc
结直肠癌组织	0.12 \pm 0.04	0.29 \pm 0.07	0.64 \pm 0.15
癌旁组织	0.37 \pm 0.06	0.11 \pm 0.03	0.14 \pm 0.05
<i>t</i> 值	32.890	22.422	30.000
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

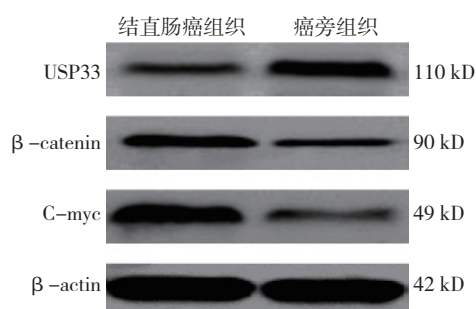


图 2 结直肠癌组织和癌旁组织中 USP33、 β -catenin 及 C-myc 蛋白的表达

3 讨论

结直肠癌患者的治疗方法是手术为主、辅以放化疗的综合治疗。治疗后可在一定程度上提高患者生存时间,但结直肠癌总体预后仍较差。因此,延长患者生存时间、提高疗效仍是目前迫切需要解决的问题^[7]。结直肠癌的发生、发展是一个多基因变异、多因素及多阶段的过程,和多个癌基因及抑癌基因引起的基因突变关系密切。研究证实,结直肠癌的发生、发展和细胞代谢、周期及信号转导通路等生命活动的紊乱和失调关系密切,原癌基因激活和抑癌基因失活是恶性肿瘤发生的最重要的遗传基础^[8-9]。探索恶性肿瘤基因变异和表达具有重要意义。

USPs 家族属于半胱氨酸蛋白酶家族成员,USPs 家族成员繁多,多种 USPs 家族成员和恶性肿瘤的发生、发展关系密切。USP33 是 USPs 家族成员,USP33 可以与 VHL 抑癌蛋白相互作用,因此又成为 VHL 相关性去泛素化酶 1^[10]。USP33 在恶性肿瘤的发生、发展中发挥关键性作用。JIA 等^[11]发现,USP33 在甲状腺癌组织中表达下调,与甲状腺癌的淋巴结转移关系密切,是甲状腺癌预后的独立生物标志物。低表达 USP33 甲状腺癌患者的复发风险升高,USP33 可减弱甲状腺癌细胞的增殖、侵袭及迁移能力。USP33 可能为甲状腺癌潜在的治疗靶点和新的生物标志物。LIU

等^[12]研究发现,USP33 在结直肠癌组织中低表达,低表达患者的复发风险高、总体预后差,为晚期结直肠癌的新型预后标志物。过表达 USP33 可抑制结直肠癌细胞的增殖、侵袭及迁移。本研究对义乌市中心医院结直肠癌组织中 USP33 的表达进行研究发现,结直肠癌组织中 USP33 表达下调,与结直肠癌的 Dukes 分期、淋巴结转移及肝转移有关。Dukes 分期、淋巴结转移及肝转移可反映结直肠癌的病情严重程度。本研究结果表明,USP33 可能参与结直肠癌的发生、发展过程,与患者疾病严重程度有关。

USP33 可通过多种信号通路参与恶性肿瘤的发生、发展过程,如 USP33 通过抑制 SLIT2/ROBO1 信号通路,抑制肺腺癌细胞的侵袭、转移^[13]; USP33 通过介导 Slit-Robo 信号通路,抑制结肠直肠癌细胞的迁移^[14]; Wnt/ β -catenin 信号通路在恶性肿瘤中常被激活,与恶性肿瘤侵袭、转移关系密切^[15]; SOX15 可通过下调 Wnt/ β -catenin 信号通路,影响结直肠癌细胞生长^[16]; miRNA-155 通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进结直肠癌 SW-480 细胞侵袭^[17]; Capn4 通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进结肠直肠癌细胞增殖^[18]。 β -catenin 和 C-myc 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的重要成员^[19-20]。本研究结果发现,结直肠癌组织中 USP33 蛋白水平低于癌旁组织,而 β -catenin、C-myc 蛋白水平高于癌旁组织,结直肠癌组织中 USP33 蛋白与 β -catenin、C-myc 蛋白呈负相关,表明 USP33 的结直肠癌中的作用可能与 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

综上所述,结直肠癌组织中 USP33 蛋白与 β -catenin、C-myc 蛋白呈负相关,USP33 可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路在结直肠癌中发挥作用。对 USP33 和 Wnt/ β -catenin 信号通路在结直肠癌中发生、发展中的具体作用,尚需在接下来的研究中进行细胞及动物实验进一步明确。USP33 可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路参与结直肠癌的发生、发展,USP33 有望成为结直肠癌的治疗靶点和潜在生物标志物。

参 考 文 献:

- [1] ZAMANI M, HOSSEINI S V, MOKARRAM P. Epigenetic biomarkers in colorectal cancer: premises and prospects[J]. Biomarkers, 2018, 23(2): 105-114.
- [2] HALL N C, RUUTIAINEN A T. Colorectal cancer: imaging conundrums[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2018, 27(2): 289-302.

- [3] CHENG Q, YUAN Y, LI L, et al. Deubiquitinase USP33 is negatively regulated by β -TrCP through ubiquitin-dependent proteolysis[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 356(1): 1-7.
- [4] 普帅, 孔瑞瑞, 吴瑛. 去泛素化酶 USP33 通过影响 Robo1 蛋白稳定性介导肺癌细胞中的 Slit2 信号通路[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(10): 1844-1844.
- [5] WANG W, LI Q, YANG T, et al. Anti-cancer effect of aquaporin 5 silencing in colorectal cancer cells in association with inhibition of Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Cytotechnology*, 2018, 70(2): 615-624.
- [6] WANG J, SHIBAYAMA Y, ZHANG A, et al. Prorenin receptor promotes colorectal cancer through the Wnt/ β -catenin signalling pathway despite constitutive pathway component mutations[J]. *Br J Cancer*, 2019, 120(2): 229-237.
- [7] SITLINGER A P, ZAFAR S Y. With colorectal cancer treatment, physical toxicity is not the only concern[J]. *Dis Colon Rectum*, 2018, 61(1): 4-5.
- [8] SMITH KM, DESAI J. Nivolumab for the treatment of colorectal cancer[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018, 18(7): 611-618.
- [9] HAMPEL H. Population screening for hereditary colorectal cancer[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2018, 27(2): 319-325.
- [10] HU S, LU Y, ORR B, et al. Specific cp110 phosphorylation sites mediate anaphase catastrophe after cdk2 inhibition: evidence for cooperation with usp33 knockdown[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(11): 2576-2585.
- [11] JIA M, GUO Y, LU X. Usp33 is a biomarker of disease recurrence in papillary thyroid carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(5): 2044-2053.
- [12] LIU H, ZHANG Q, LI K, et al. Prognostic significance of USP33 in advanced colorectal cancer patients: new insights into β -arrestin-dependent ERK signaling[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49): 81223-81240.
- [13] 王玉环, 张淑华, 穆淑坤, 等. 去泛素化酶 USP33 通过下调 SLIT2/ROBO1 信号通路抑制肺腺癌的侵袭和转移[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(8): 956-961.
- [14] HUANG Z, WEN P, KONG R, et al. USP33 mediates Slit-Robo signaling in inhibiting colorectal cancer cell migration[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(8): 1792-1802.
- [15] FANG G, YE B L, HU B R, et al. CircRNA_100290 promotes colorectal cancer progression through miR-516b-induced downregulation of FZD4 expression and Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(1): 184-189.
- [16] WANG S, YANG H, CHEN X, et al. Effects of SOX15 on the colorectal cancer cells via downregulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Future Oncol*, 2018, 14(19): 1921-1932.
- [17] LIU N, JIANG F, HAN X Y, et al. MiRNA-155 promotes the invasion of colorectal cancer SW-480 cells through regulating the Wnt/ β -catenin[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(1): 101-109.
- [18] CHENG F, MOHANMED M M, LI Z, et al. Capn4 promotes colorectal cancer cell proliferation by increasing MAPK7 through activation of the Wnt/ β -Catenin pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 363(2): 235-242.
- [19] WANG Q, ZHOU Y, RYCHAHOU P, et al. Deptor is a novel target of wnt/ β -catenin/c-myc and contributes to colorectal cancer cell growth[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(12): 3163-3175.
- [20] ZHAO H, WU L, WU J, et al. Aberrantly expressed sall4 promotes cell proliferation via β -catenin/c-myc pathway in human choriocarcinoma cells[J]. *Reprod Sci*, 2018, 25(3): 435-442.

(唐勇 编辑)