

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.014

· 临床研究 ·

## 非小细胞肺癌中卵巢癌结构域蛋白酶 1 的表达及其临床意义

王彦驰, 田辉, 岳韦名, 李林, 李树海, 高存, 司立博, 鲁铭 (山东大学齐鲁医院 胸外科, 山东 济南 250012)

[摘要] **目的:** 检测卵巢癌结构域蛋白酶 1 (ovarian tumor domain-containing protease 1, OTUD1) 在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 组织中的表达水平, 探讨 OTUD1 表达与 NSCLC 临床病理特征及预后的关系。**方法:** 选取 2008 年 3 月至 2009 年 2 月在山东大学齐鲁医院胸外科行手术治疗的 82 例非小细胞肺癌患者组织标本及 40 例正常肺组织标本, 免疫组化法检测 OTUD1 的表达水平; 另取 2015 年 3 月至 2015 年 4 月在山东大学齐鲁医院胸外科手术治疗的原发性 NSCLC 25 例, 应用 Real-time PCR 检测 OTUD1 在 NSCLC 组织及邻近正常肺组织内的表达。**结果:** 与正常肺组织相比, NSCLC 组织中 OTUD1 mRNA 的表达显著增高 ( $0.620 \pm 0.055$  vs  $0.387 \pm 0.037$ ,  $P < 0.01$ ); OTUD1 的表达与患者的年龄、性别、吸烟史、病理类型均无显著相关性 (均  $P > 0.05$ ); 与淋巴结转移 ( $P < 0.01$ )、分化程度 ( $P < 0.01$ ) 及 TNM 分期 ( $P < 0.05$ ) 显著相关。单因素及多因素分析结果显示, OTUD1 高表达与患者不良预后有关。**结论:** OTUD1 在 NSCLC 组织中高表达, 与 NSCLC 的恶性进展及不良预后密切相关, 可作为判断 NSCLC 生物学特征及预后的参考指标。

[关键词] 卵巢肿瘤结构域蛋白酶 1; 非小细胞肺癌; 预后

[中图分类号] R734.2; R730.2; R392.12 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2017)03-0295-05

## Expression of OTUD1 in NSCLC and its clinical significance

WANG Yanchi, TIAN Hui, YUE Weiming, LI Lin, LI Shuhai, GAO Cun, SI Libo, LU Ming (Department of Thoracic Surgery, Qilu Hospital of Shandong University, Ji'nan 250021, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To detect expression level of ovarian tumor domain-containing protease 1 (OTUD1) in the tissue of non-small cell lung cancer (NSCLC) and to explore relationship between the expression of OTUD1 and clinical pathological features and prognosis of the patients with NSCLC. **Methods:** Cancer tissues from 82 patients with NSCLC, who were hospitalized in Department of Thoracic Surgery, Qilu Hospital of Shandong University during March 2008 to February 2009 for operative treatment and 40 specimens of normal lung tissues were selected, and expression levels of OTUD1 were detected by immune histochemical method. And another 25 patients with primary NSCLC who were hospitalized in Department of Thoracic Surgery, Qilu Hospital of Shandong University during March to April 2015 for operative treatment were collected and expressions of OTUD1 in the NSCLC tissues and their adjacent normal lung tissues were examined by Real-time PCR assay. **Results:** Comparing with the normal lung tissues, expressions of OTUD1 mRNA in NSCLC tissues were distinct higher ( $0.620 \pm 0.055$  vs  $0.387 \pm 0.037$ ,  $P < 0.01$ ). Expression of OTUD1 did not significantly correlated with age, gender, smoking history and pathologic type of the patients with NSCLC (all  $P > 0.05$ ), and significantly correlated with lymph node metastasis, differentiation grads and TNM staging of the patients with NSCLC ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Results of univariate and multivariate analysis showed that high expression of OTUD1 associated with poor prognosis of the patients. **Conclusion:** High expression of OTUD1 in the NSCLC tissues could be closely related to malignant progression and poor prognosis of NSCLC. Expression of OTUD1 could be as a reference index to evaluate biological features of NSCLC and prognosis of the patients with NSCLC.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30571844); 山东省自然科学基金资助项目 (No. ZR2013HM089); 吴阶平医学基金资助项目 (No. 320.6750.12393)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30571844), the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2013HM089), and the Wu Jie Ping Medical Foundation (No. 320.6750.12393)

[作者简介] 王彦驰 (1991 - ), 男, 硕士生, 主要从事胸部肿瘤分子生物学的研究, E-mail: 393283491@qq.com

[通信作者] 田辉 (TIAN Hui, corresponding author), 博士, 博士生导师, 主任医师, 主要从事胸部肿瘤的临床诊治及分子生物学研究和肺移植的基础和临床研究, E-mail: tianhuiql@126.com

[ **Key words** ] ovarian tumor domain-containing protease1 ( OTUD1 ); non-small cell lung cancer ( NSCLC ); prognosis [ Chin J Cancer Biother, 2017, 24( 3 ): 295-299. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.014 ]

肺癌在全球肿瘤发病率中占首位,每年因肺癌死亡的人数大约为 140 万至 160 万<sup>[1-4]</sup>,而非小细胞肺癌( non-small cell lung cancer, NSCLC )病例大约占肺癌所有病例的 85%<sup>[5]</sup>,尽管在过去几十年手术方式不断改进,放疗、化疗的进展以及新颖的分子生物靶向药物的出现,但肺癌的总体 5 年生存率仍旧很低,大约为 17.1%<sup>[6]</sup>。泛素-蛋白酶体系统( ubiquitin-proteasome system, UPS )是人体主要的细胞内蛋白降解途径,对许多病理和生理过程发挥重要作用,包括细胞周期调控、细胞凋亡、炎症、信号转导和应激等<sup>[7-9]</sup>。该途径是一可逆过程,其中去泛素化酶( deubiquitinating enzymes, DUBs )是一种逆转泛素化过程的蛋白酶,研究表明 DUBs 在细胞生长和凋亡、遗传性肿瘤、神经退行性疾病等<sup>[10-11]</sup>中都扮演了重要角色,卵巢癌结构域蛋白酶( ovarian tumor domain-containing protease, OTUD )是去泛素化酶家族主要成员,其中 OTUD1 蛋白广泛表达于人类的很多组织内,如肾、肠、脑、肝、肺等<sup>[10]</sup>。然而目前有关 OTUD1 基因表达与肺癌组织病理指标及预后相关性的报道尚不多见。本研究主要分析 OTUD1 在 NSCLC 组织中的表达及其与患者临床病理特征和预后的关系。

1 资料与方法

1.1 组织标本及临床资料

选取 2008 年 3 月至 2009 年 2 月于山东大学齐鲁医院行肺叶切除术并行系统性肺门纵隔淋巴结清

扫术、有明确病理诊断的原发性肺癌患者癌组织标本 82 例,其中男性 51 例,女性 31 例,中位年龄 62 岁( 35 ~ 82 岁 )。所有患者术前均未接受放、化疗。NSCLC 的诊断标准参照 2015 年 WHO 肺癌组织学分类标准,其中鳞癌 37 例,腺癌 38 例,其它类型 NSCLC 7 例。国际抗癌联合会( UICC )TNM 分期( 2015 年标准 ) I ~ II 期 50 例, III ~ IV 期 32 例。有淋巴结转移 53 例,无淋巴结转移 29 例。吸烟史的定义是平均每天吸至少一支烟,并存在持续半年以上。另取距离癌组织 5 cm 以上的正常肺组织标本 40 例做阴性对照。所有标本均于手术中采集,10% 甲醛液固定,石蜡包埋,常规制备 5 μm 连续切片行免疫组化检测。

选取 2015 年 3 月至 2015 年 4 月在山东大学齐鲁医院胸外科手术治疗的原发性 NSCLC,术前均未行放射治疗及化学治疗,术后病理诊断均为原发性 NSCLC 患者 25 例,取新鲜癌组织及邻近正常肺组织行 RT-PCR 实验。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗 OTUD1 抗体购自 Abcam 公司,即用型 SP 试剂盒( 包括辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗 )购自北京中杉金桥试剂公司, OTUD1 及 β-action 基因 PCR 引物( 表 1 )均由上海生工生物技术有限公司合成, RT-PCR 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, PTC 2200 合成仪购自美国 MJ Research 公司, FTC 2000 实时荧光定量 PCR 扩增仪购自加拿大 Funglyn 公司。

表 1 OTUD1 及内参基因 β-actin 的引物序列  
Tab.1 Primer sequences of of OTUD1 and β-actin genes

Gene	Forward	Reverse
OTUD1	5'-GGTCTTGCGGATGTACGAGT-3'	5'-GCAGAACCCTCTGGTGTCTCAG-3'
β-actin	5'-AGGATGCAGAAGGAGATTACTGC-3'	5'-AAAACGCAGCTCAGTAACAGTGC-3'

1.3 Real-time PCR 检测 NSCLC 及癌旁正常组织中 OTUD1 mRNA 的表达

按 TRIzol 试剂盒说明书操作提取 25 对 NSCLC 及邻近正常肺组织总 RNA 并测定 RNA 的浓度,按 RT-PCR 试剂盒说明书操作行逆转录。选取 β-actin 作为内参照,检测 NSCLC 及邻近正常肺组织中 OTUD1 mRNA 的表达,反应条件如下: 95 °C 预变性

2 min, 94 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。采用 2<sup>-ΔΔCT</sup>法计算 OTUD1 的相对表达量。每个样本重复 3 次。

1.4 免疫组化染色法检测 NSCLC 和癌旁正常组织中 OTUD1 的表达

应用免疫组织化学 S-P 法对 NSCLC 及癌旁正常组织切片染色。滴加一抗兔抗人 OTUD1 多克隆

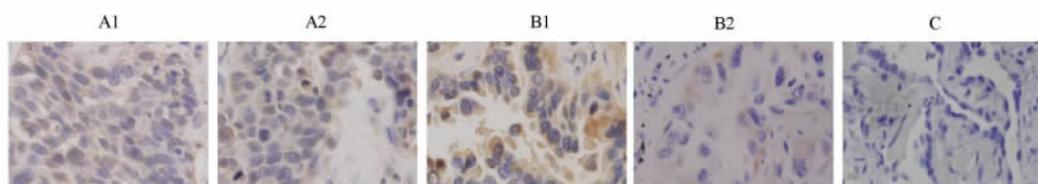
抗体(滴度 1:100)4℃ 孵育过夜,室温下置于生物素化的二抗辣根过氧化物酶(HRP)中孵育 30 min。DAB 显色,苏木紫复染,封片后置显微镜下观察并摄片。

每张切片随机选取 3 个高倍镜视野( $\times 400$ ),染色结果细胞质出现浅黄色至棕褐色颗粒,颗粒定位明确且染色明显。按染色强度分级:基本未着色,染色与背景相似者为 0 分;着色浅,略高于背景者为 1 分;中度着色,明显高于背景者为 2 分;强染,深棕色者为 3 分。按阳性细胞所占百分比分级: $< 10\%$  为 1 分; $10\% \sim 50\%$  为 2 分; $51\% \sim 80\%$  为 3 分; $> 80\%$  为 4 分。最终结果评定两项评分之和 0~2 分为阴性,3~4 分为弱阳性,5~7 分为强阳性。0~4 分为 OTUD1 低表达,5~7 分为 OTUD1 高表达。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,两组间率的比较采用  $\chi^2$  检验,OTUD1 的表达与 NSCLC 临床病理特征的关系采用  $\chi^2$  检验,采用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验分析生存期差异,Cox 回归多因素分析判定独立预后影响因素。 $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果



A1: High expression of OTUD1 in lung squamous cell carcinomas tissues;  
A2: Low expression of OTUD1 in lung squamous cell carcinomas tissues;  
B1: High expression of OTUD1 in lung adenocarcinoma tissues;  
B2: Low expression of OTUD1 in lung adenocarcinoma tissues;  
C: Negative expression of OTUD1 in normal lung tissues

图 2 免疫组织化学染色检测 OTUD1 在非小细胞肺癌及正常肺组织中的表达

Fig. 2 Expressions of OTUD1 in the NSCLC and normal lung tissues detected by immunohistochemical staining

### 2.2 OTUD1 的表达与 NSCLC 临床病理特征的关系

对 OTUD1 的表达与非小细胞肺癌患者临床病理特征做  $\chi^2$  检验分析的结果(表 2)显示,OTUD1 高表达与患者的年龄、性别、吸烟史、病理类型均无显著相关性(均  $P > 0.05$ );与淋巴结转移、分化程度及 TNM 分期显著相关( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。

### 2.3 单因素及多因素生存分析

### 2.1 OTUD1 mRNA 和蛋白在 NSCLC 组织中高表达

Real-time PCR 检测结果(图 1)显示,OTUD1 mRNA 在 NSCLC 组织中的相对表达显著高于邻近正常肺组织[ $(0.620 \pm 0.055)$  vs  $(0.387 \pm 0.037)$ ,  $P < 0.01$ ]。免疫组化染色结果(图 2)显示:肺癌组织中 OTUD1 蛋白的阳性表达率明显高于正常肺组织[ $48.7\% (40/82)$  vs  $12.5\% (5/40)$ ,  $P < 0.01$ ]。

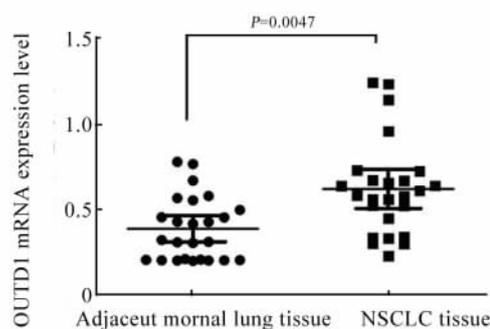


图 1 实时定量 PCR 检测 OTUD1 在非小细胞肺癌组织中及癌旁正常肺组织中的表达

Fig. 1 Expressions of OTUD1 in the NSCLC and adjacent normal lung tissues detected by Real-time PCR

82 例患者中,有 56 例(68.3%) 在术后 5 年内死亡,患者术后 5 年的总生存率为 31.7%。单因素生存分析的结果显示淋巴结转移、TNM 分期及 OTUD1 高表达与患者的不良预后显著相关,均( $P < 0.01$ ,表 3)。Cox 回归多因素生存分析的结果显示淋巴结转移、TNM 分期、OTUD1 高表达是判定 NSCLC 患者预后的独立因素,均( $P < 0.01$ ,表 3)。

表2 NSCLC 组织内 OTUD1 表达与临床病理特征的关系

Tab.2 Correlation between clinicopathologic features of the patients with NSCLC and expression of OTUD1

Feature	N	OTUD1 expression [ n( % ) ]		$\chi^2$	P
		High	Low		
Age ( t/a )				0.750	0.386
≤65	45	20( 44.4 )	25( 55.6 )		
>65	37	20( 54.1 )	17( 45.9 )		
Gender				0.732	0.392
Male	51	23( 45.1 )	28( 54.9 )		
Female	31	17( 54.8 )	14( 45.2 )		
Smoking				0.230	0.632
Yes	47	24( 51.1 )	23( 48.9 )		
No	35	16( 45.7 )	19( 54.3 )		
Histological types				0.443	0.801
Squamous	37	17( 45.9 )	20( 54.1 )		
Adeno	38	20( 54.1 )	18( 47.4 )		
Others	7	3( 42.9 )	4( 57.1 )		
Lymph metastasis				8.067	0.005
Yes	53	32( 60.4 )	21( 39.6 )		
No	29	8( 27.6 )	21( 72.4 )		
Differentiation				10.110	0.006
Well	28	7( 25.0 )	21( 75.0 )		
Moderate	25	14( 56.0 )	11( 44.0 )		
Poor	29	19( 66.5 )	10( 34.5 )		
TNM stage				5.960	0.015
I ~ II	50	19( 38.0 )	31( 62.0 )		
III ~ IV	32	21( 65.6 )	11( 34.4 )		

表3 单因素及多因素生存分析

Tab.3 Univariate and multivariate survival analysis

Group	Univariate analysis		Multivariate analysis		
	Exp( B )	P	Exp( B )	95.0% CI	P
Age( t/a )	0.807	0.409	0.587	0.332 – 1.041	0.068
Gender	1.038	0.887	1.174	0.674 – 2.046	0.570
Smoking	1.059	0.826	0.960	0.553 – 1.667	0.884
Differentiation	1.139	0.395	1.167	0.839 – 1.624	0.360
Histological types	0.918	0.666	0.656	0.426 – 1.012	0.057
Lymph node metastasis	2.266	0.005	2.157	1.164 – 3.997	0.015
TNM classification	2.236	0.002	2.092	1.165 – 3.757	0.013
OTUD1 expression	2.492	0.001	Exp( B )	1.038 – 3.480	0.037

### 3 讨论

泛素化对蛋白质功能起着广泛的作用,泛素化酶与 DUBs 通过对细胞蛋白的可逆性翻译前调节在各种生物过程及蛋白调控机制中发挥关键调节作

用<sup>[12-13]</sup>。近期,泛素化酶与 DUBs 对于细胞周期、DNA 修复以及几种常见的与肿瘤发生相关的信号通路的调控作用越来越受到关注<sup>[14-16]</sup>。OTUDs 作为去泛素化酶家族成员,OTUD 基因最初是作为果蝇卵子形成的必须基因所发现<sup>[17]</sup>,OTUD1 是最早在体外证

实具有去泛素化酶活性的 OTUD 蛋白, *OTUD1* 基因定位在 11q13.1 染色体上,其表达的蛋白质含有一个 130 个氨基酸组成的 OTUD 结构域,该结构域从酵母到哺乳动物高度保守<sup>[18]</sup>。P53 是细胞生长与分裂关键的分子,而有研究<sup>[19]</sup>发现 OTUD1 一个重要的作用就是直接抑制 MDM2 介导的 P53 泛素化来稳定和活化 P53,另有研究表明 OTUD1 通过与磷酸化 SMAD2/3 结合,抑制磷酸化 SMAD2/3 通过蛋白酶途径降解,从而增强 TGF- $\beta$  介导的基因转录和细胞迁移<sup>[20]</sup>,所以 OTUD1 可能通过 TGF-P 信号通路来促进肿瘤的发展。目前肺癌的治疗越来越倡导个体化和精准化治疗,本研究证实了 OTUD1 在 NSCLC 组织中的表达显著高于正常肺组织,且发现其高表达与淋巴结转移、分化程度和临床分期密切相关,而与其他临床及病理特征无显著相关性,提示 OTUD1 在 NSCLC 的发生发展中有重要作用,可为肺癌的个体化和精准化治疗提供新的方向。关于 OTUD1 与肺癌发生、发展的具体分子生物学机制还需进一步研究。

综上所述,OTUD1 作为去泛素化酶类家族成员参与多种机制调节肿瘤细胞的凋亡,影响肿瘤的发生、生长、侵袭及转移。本研究结果表明 OTUD1 在 NSCLC 组织中高表达,且 OTUD1 高表达与 NSCLC 患者的不良预后显著相关。OTUD1 可以作为评估 NSCLC 患者预后的独立因素,并且进一步探究肺癌发病机制及 NSCLC 的生物靶向治疗提供一个新思路。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] FERLAY J, SHIN H, BRAY F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[ J ]. *Int J Cancer*, 2010, 127( 12 ): 2893-2917. DOI: 10.1002/ijc.25516.
- [ 2 ] BRAWLEY O W. Avoidable cancer deaths globally[ J ]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61( 2 ): 67-68. DOI: 10.3322/caac.20108.
- [ 3 ] MALVEZZI M, BERTUCCIO P, LEVI F, et al. European cancer mortality predictions for the year 2012[ J ]. *Ann Oncol*, 2011, 24( 4 ): 947-956. DOI: 10.1093/annonc/mds024.
- [ 4 ] FERLAY J, STELLAROVA-FOUCHER E, LORTET-TIEULENT J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012[ J ]. *Eur J Cancer*, 2013, 49( 6 ): 1374-1403. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.
- [ 5 ] ETTINGER D S. Ten years of progress in non-small cell lung cancer[ J ]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2012, 10( 3 ): 292-295. PMID: 22393190.
- [ 6 ] SIEGEL R, DESANTIS C, VIRGO K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012[ J ]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62( 4 ): 220-241. DOI: 10.3322/caac.21149.
- [ 7 ] CAMPELLO L, ESTEVE-RUDD J, CUENCA N, et al. The ubiquitin-proteasome system in retinal health and disease[ J ]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47( 2 ): 790-810. DOI: 10.1007/s12035-012-8391-5.
- [ 8 ] D'ARCY P, LINDER S. Molecular pathways: translational potential of deubiquitinases as drug targets[ J ]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20( 15 ): 3908-3914. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0568.
- [ 9 ] SAHARA K, KOGLECK L, YASHIRODA H, et al. The mechanism for molecular assembly of the proteasome[ J ]. *Adv Biol Regul*, 2014, 54: 51-58. DOI: 10.1016/j.jbior.2013.09.010.
- [ 10 ] NIJMAN S M, LUNAVARGAS M P, VELDS A, et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes[ J ]. *Cell*, 2005, 123( 5 ): 773-786. DOI: 10.1016/j.cell.2005.11.007.
- [ 11 ] ATANASSOV B S, KOUTELOU E, DENT S Y. The role of deubiquitinating enzymes in chromatin regulation[ J ]. *FEBS Lett*, 2011, 585( 13 ): 2016-2023. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.10.042.
- [ 12 ] KERSCHER O, FELBERBAUM R, HOCHSTRASSER M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins[ J ]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22( 22 ): 159-180. DOI: 10.1146/annurev.Cellbio.22.010605.093503.
- [ 13 ] D'ARCY P, WANG X, LINDER S. Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy[ J ]. *Pharmacol Ther*, 2015, 147: 32-54. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.002.
- [ 14 ] HUSSAIN S, ZHANG Y, GALARDY P J. DUBs and cancer: the role of deubiquitinating enzymes as oncogenes, non-oncogenes and tumor suppressors[ J ]. *Cell Cycle*, 2009, 8( 11 ): 1688-1697. DOI: 10.4161/cc.8.11.8739.
- [ 15 ] DARCY P, BRNJIC S, OLOFSSON M H, et al. Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy[ J ]. *Nat Med*, 2011, 17( 12 ): 1636-1640. DOI: 10.1038/nm.2536.
- [ 16 ] KOMANDER D, CLAGUE M J, URB? S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases[ J ]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10( 8 ): 550-563. DOI: 10.1038/nrm2731.
- [ 17 ] MAKAROVA K S, ARAVIND L, KOONIN E V. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and chlamydia pneumoniae[ J ]. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25( 2 ): 50-52. DOI: 10.1016/s0968-0004(99)01530-3.
- [ 18 ] MESSICK T E, RUSSELL N S, IWATA A J, et al. Structural basis for ubiquitin recognition by the OTUD1 ovarian tumor domain protein[ J ]. *J Biol Chem*, 2008, 283( 16 ): 11038-11049. DOI: 10.1074/jbc.m704398200.
- [ 19 ] SUN X X, CHALLAGUNDLA K B, DAI M S. Positive regulation of p53 stability and activity by the deubiquitinating enzyme Otubain 1[ J ]. *EMBO J*, 2012, 31( 3 ): 576-592. DOI: 10.1038/emboj.2011.434.
- [ 20 ] HERHAUS L, AL-SALIHI M, MACARTNEY T, et al. OTUB1 enhances TGF- $\beta$  signalling by inhibiting the ubiquitylation and degradation of active SMAD2/3[ J/OL ]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2519[ 2016-12-15 ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3791481/>. DOI: 10.1038/ncomms3519.

[ 收稿日期 ] 2016 - 12 - 23

[ 修回日期 ] 2017 - 01 - 29

[ 本文编辑 ] 宋关鸿