

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.04.018

• 临床研究 •

# 特异性泛素蛋白酶22在急性白血病细胞中的表达及其临床意义

徐志阳, 田文亮, 付雪, 汤平, 陈丹丹, 王芳, 陈绍倩, 孟小莉, 刘林湘, 孙玲



## Expression of USP22 in Patients with Acute Leukemia and Its Clinical Significance

XU Zhiyang, TIAN Wenliang, FU Xue, TANG Ping, CHEN Dandan, WANG Fang, CHEN Shaoqian, MENG Xiaoli, LIU Linxiang, SUN Ling

Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding Author: SUN Ling, E-mail: sunling6686@126.com

**Abstract: Objective** To investigate the expression of ubiquitin-specific protease 22 (USP22) in bone marrow cells in patients with acute leukemia (AL) and its clinical significance. **Methods** Real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blot were used to detect mRNA and protein expression levels of USP22 in Jurkat, HL-60, K562, molt-4 and NB4 cell lines and bone marrow mononuclear cells from AL patients and negative control patients, respectively. **Results** USP22 expression was found in Jurkat, HL-60, K562, molt-4 and NB4 cell lines. mRNA and protein expressions of USP22 in initial diagnosis group ( $33.90 \pm 9.58$ ) and ( $0.58 \pm 0.15$ ) and remission group ( $1.81 \pm 0.53$ ) and ( $0.10 \pm 0.03$ ) were both increased, compared with that in negative control group ( $1.05 \pm 0.33$ ) and ( $0.05 \pm 0.02$ ) ( $P < 0.001$ ). Meanwhile, expression levels of USP22 mRNA and protein in hyperleukocytic AL patients in initial diagnosis group ( $45.23 \pm 10.92$ ) and ( $0.69 \pm 0.16$ ) were significantly higher than those in non-hyperleukocytic AL patients [ $26.73 \pm 6.12$ ] and ( $0.42 \pm 0.10$ ),  $P < 0.001$ ]. But no significant difference of USP22 and protein expressions was found between acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients in initial diagnosis group ( $P = 0.531, 0.377$ ). Moreover, AL patients with higher USP22 expression (66.67%) had lower complete remission rate than that with lower USP22 expression (88.0%) after the first induction chemotherapy. **Conclusion** USP22 is highly expressed in AL patients and decreased after complete remission, which might relate to leukocytes number. Taken together, it could be a useful parameter for prognosis of AL patients.

**Key words:** USP22; Acute leukemia; Tumor stem cell; Prognosis

**摘要: 目的** 探讨特异性泛素蛋白酶22 (USP22) 在急性白血病 (AL) 细胞中的表达及其临床意义。 **方法** 采用荧光定量PCR及Western blot检测USP22基因及蛋白在Jurkat、HL-60、K562、molt-4和NB4细胞系、急性白血病患者及阴性对照者骨髓单个核细胞中的表达量情况。 **结果** USP22在Jurkat、HL-60、K562、molt-4和NB4细胞系均有所表达。USP22 mRNA在急性白血病患者初诊组 ( $33.90 \pm 9.58$ )、缓解组 ( $1.81 \pm 0.53$ ) 中的表达量与阴性对照组 ( $1.05 \pm 0.33$ ) 相比均上调, USP22蛋白在急性白血病患者初诊组 ( $0.58 \pm 0.15$ )、缓解组 ( $0.10 \pm 0.03$ ) 中的表达量与阴性对照组 ( $0.05 \pm 0.02$ ) 相比均上调, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.001$ ); 其中USP22 mRNA在初诊组高白细胞AL患者中的表达量 ( $45.23 \pm 10.92$ ) 高于非高白细胞患者 ( $26.73 \pm 6.12$ ), USP22蛋白在初诊组高白细胞急性白血病患者中的表达量 ( $0.69 \pm 0.16$ ) 高于非高白细胞患者 ( $0.42 \pm 0.10$ ), 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。但USP22基因和蛋白在初诊组急性髓系白血病 (AML) 与急性淋巴细胞白血病 (ALL) 患者间的表达差异无统计学意义 ( $P = 0.531, 0.377$ ), 并且本研究对急性白血病患者临床转归进行了观察, 与低表达USP22的急性白血病患者初次诱导缓解率 (88.0%) 相比, 高表达的缓解率 (66.67%) 较低。 **结论** USP22在急性白血病中表达率较高, 它的表达水平可能与白细胞数目有关, USP22可作为判断急性白血病患者预后的标志基因之一。

**关键词:** 特异性泛素蛋白酶22; 急性白血病; 肿瘤干细胞; 预后

中图分类号: R733.71 文献标识码: A

## 0 引言

特异性泛素蛋白酶22 (USP22) 是泛素水解酶家族成员之一, 具有去泛素的作用<sup>[1]</sup>。USP22的N末端是锌指结构域, 能和人类染色质重塑复合体SAGA (hSAGA) 中的其他亚单位相互作用, C

收稿日期: 2013-10-16; 修回日期: 2014-01-26

作者单位: 450052郑州, 郑州大学第一附属医院血液科

通信作者: 孙玲, E-mail: sunling6686@126.com

作者简介: 徐志阳 (1986-), 男, 硕士在读, 主要从事血液病学基础和临床研究

末端是泛素水解酶活性区,能够水解组蛋白H2A和H2B上的泛素,从而使hSAGA表现出转录辅助激活因子的作用,激活靶基因转录<sup>[2]</sup>。相关研究表明:USP22在多种实体肿瘤细胞中呈现高表达,并且其表达程度与肿瘤转移潜能、化疗耐药性及患者预后密切相关<sup>[3-7]</sup>。目前关于USP22在急性白血病细胞中的表达情况报道较少,本研究意在探讨USP22在急性白血病细胞中的表达及其临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选择2012年10月—2013年6月郑州大学第一附属医院血液内科就诊的住院患者83例为研究对象,其中男47例,女36例,年龄16~72岁,中位年龄为34岁。急性白血病患者诊断及缓解标准参照张之南第三版《血液病诊断及疗效标准》<sup>[8]</sup>。另选白血病细胞系Jurkat(急性T细胞白血病细胞)、HL-60(人急性早幼粒白血病细胞)、K562(人慢性髓系白血病细胞)、molt-4(人急性淋巴瘤母细胞性白血病细胞)和NB4(急性早幼粒细胞白血病细胞),均由郑州大学干细胞中心提供。

### 1.2 研究分组

初诊组包括49例初诊为急性白血病患者,其中急性髓系白血病(acute myeloid leukemia,AML)31例,急性淋巴细胞性白血病(acute lymphoblastic leukemia,ALL)18例,缓解组包括19例治疗后达完全缓解者,另选择非恶性血液系统及其他系统恶性疾病患者15例作为阴性对照组。其中将初诊组外周血白细胞计数 $\geq 30 \times 10^9/L$ 作为高白细胞组,将白细胞计数 $< 30 \times 10^9/L$ 作为非高白细胞组,初诊组中高白细胞组32例,非高细胞组17例。

### 1.3 标本提取及制备

骨髓穿刺抽取骨髓液4 ml,用人外周血淋巴细胞分离液分离出单个核细胞,分2管,分别采用UNIQ-10柱式Trizol法提取总RNA、采用RIRA细胞裂解液提取蛋白。另所有细胞系按照常规方法培养于RPMI1640培养液,每3~4天传代一次,选取处于对数生长期的细胞作为实验对象。

### 1.4 qRT-PCR检测USP22基因mRNA

取2  $\mu\text{g}$  RNA反转录合成cDNA,进行PCR扩增,应用SYBR<sup>®</sup> Select Master Mix 1-Pack试剂盒(Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)和StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)进行此实验,根据StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR(Applied Biosystem, Foster

City, CA, USA)说明书进行。GAPDH基因作为内参基因。人USP22和GAPDH引物应用Primer Express version 2.0进行设计:USP22 mRNA引物:正义链为5'-GGGAGGAGGCTCACCTCTAA-3',反义链为5'-AAAACCATCAACTCGGGCCT-3',产物长度113 bp;GAPDH mRNA引物:正义链为5'-TGCCCTCAACGACCACCTTTG-3',反义链为5'-TCTCTCTTCTCTTGTGCTCTTGC-3',产物长度152bp,以上引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

进行实时定量PCR时,USP22基因和GAPDH在96孔板的不同孔中进行扩增,每孔的20  $\mu\text{l}$ 反应体系中由Select Master Mix 1-Pack 10 $\mu\text{l}$ , 0.2  $\mu\text{M}$ 的正义链,0.2  $\mu\text{M}$ 的反义链和25 ng的cDNA构成,无RNA酶余用水补足,每个样本设3个复孔。反应参数:95 $^{\circ}\text{C}$  10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸1 min,共40个循环。设置溶解曲线判断是否有非特异性的扩增和引物二聚体的出现。USP22基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算, $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{USP22}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}})_{\text{实验组}} - (\text{Ct}_{\text{USP22}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}})_{\text{对照组}}$ 。

### 1.5 Western blot检测USP22蛋白的表达

进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,每次两块胶。将50  $\mu\text{g}$ 溶解蛋白加入5% SDS凝胶中100 V电泳30 min进行浓缩,在10% SDS凝胶中120 V电泳70 min进行分离。将胶转移至PVDF膜(BBI, Canada),200 mA并行转膜2 h。转膜结束后,胶和膜分别用考马斯亮蓝和丽春红染色证明转膜成功。将膜浸入封闭液中封闭1 h,分别加入USP22多克隆抗体(EPITOMICS, USA)、 $\beta$ -actin多克隆抗体(上海碧云天科技有限公司)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS-T洗膜三次后,山羊抗兔二抗(BBI, Canada)25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h,接下来,PBS-T洗膜三次后,根据说明书用ECL显色法在X线片上对条带进行曝光。USP22蛋白条带大概在60 kD处显色, $\beta$ -actin蛋白大概在40 kD处显色。对X线片进行扫描后,在电脑上通过图像处理软件Image J进行图像分析。USP22蛋白的相对表达量用USP22灰度值/ $\beta$ -actin灰度值表示。

### 1.6 初诊急性白血病患者治疗情况

所有初诊急性白血病患者进行常规化疗方案化疗,AML给予DA[柔红霉素(DNR)45~90  $\text{mg}/\text{m}^2$ 第1~3天;阿糖胞苷(Ara-C)100~200  $\text{mg}/\text{m}^2$ 连用7天]或IA[去甲氧柔红霉素(IDA)8~12  $\text{mg}/\text{m}^2$ 第1~3天;阿糖胞苷(Ara-C)100~200  $\text{mg}/\text{m}^2$ 连用7天]方案;ALL患者给予VDCLP[长春新碱(VCR)1.4  $\text{mg}/\text{m}^2$ ,第1、8、15、22天;柔红霉素(DNR)40  $\text{mg}/\text{m}^2$ ,第1~3天;环磷酰胺(CTX)750  $\text{mg}/\text{m}^2$ ,

第1、15天；左旋门冬酰胺酶(L-Asp) 6000 IU，第11、14、17、20、23、26天；泼尼松 1 mg/kg连用14天，第15~28天可减量1/3]方案，老年患者根据患者情况给予剂量减量化疗，一疗程化疗后，比较USP22表达与初诊白血病患者获得缓解情况的关系。

1.7 统计学方法

应用统计学软件SPSS17.0分析。实验组和阴性对照组之间的USP22基因和蛋白表达采用独立样本t检验进行比较。显著水平用P值是否<0.05来确定。

2 结果

2.1 实时荧光定量PCR结果

熔解曲线 USP22、GAPDH的熔解曲线峰单一，未见杂峰信号；USP22熔解温度为85℃，GAPDH熔解温度为85℃。表明PCR参数选择适当，USP22、GAPDH反转录引物和扩增引物能够扩增出片段，产物特异度较好，非特异产物对结果影响较小。

2.2 急性白血病患者实时荧光定量PCR检测结果

结果显示，USP22 mRNA在Jurkat、HL-60、K562、molt-4和NB4细胞系的表达量分别为25.61、29.92、24.22、23.73、26.01。USP22 mRNA在初诊组(33.90±9.58)、缓解组(1.81±0.53)白血病患者USP22基因表达水平明显高于阴性对照组(1.05±0.33)，且差异均具有统计学意义(P<0.001)；初诊组患者的USP22基因表达水平较缓解组患者明显增高，差异具有统计学意义(P<0.001)；高白细胞组(45.23±10.92)较非高白细胞组(26.73±6.12)的急性白血病患者的USP22基因表达水平高，但是初诊AML患者和初诊ALL患者之间USP22基因的表达差异无统计学意义(P=0.531)。

2.3 Western blot检测结果

本组病例中，有些病例骨髓单个核细胞数目不足，因此未进行本实验，最终初诊组包括28例

初次诊断为急性白血病的患者(AML 17例、ALL 11例)，其中高白细胞16例，非高白细胞12例；缓解组包括15例诊断为缓解期急性白血病的患者(AML10例、ALL 5例)；阴性对照组10例进行了本实验。

结果显示，USP22蛋白在Jurkat、HL-60、K562、molt-4和NB4细胞系的表达量分别为0.69、0.78、0.64、0.44、0.49。初诊组(0.58±0.15)、缓解组(0.10±0.03)表达明显高于阴性对照组(0.05±0.02)，差异均具有统计学意义(P<0.001)；初诊组较缓解组白血病患者相比表达明显增高(P<0.001)，高白细胞组(0.69±0.16)较非高白细胞组(0.42±0.10)的急性白血病患者的USP22基因表达水平高。但是初诊AML患者和初诊ALL患者之间USP22蛋白的表达差异无统计学意义(P=0.377)。从上述结果看，实时定量PCR的结果与Western blot分析的结果基本一致，见图1。

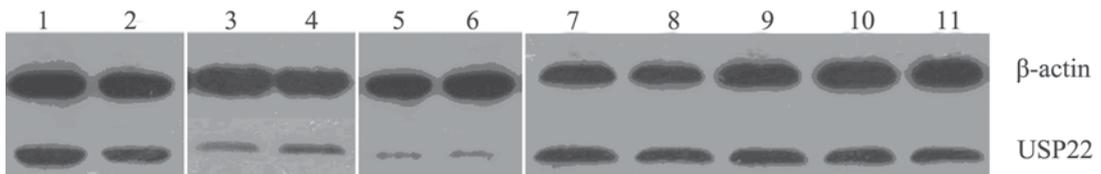
2.4 USP22的表达与初次诱导缓解率的关系

USP22 mRNA中位表达水平为32.22(12.25~61.02)，总初次诱导化疗缓解率为77.55%。按照初诊USP22 mRNA中位表达水平将初诊AL患者分为高表达组(USP22 mRNA表达>32.22)与低表达组(USP22 mRNA表达≤32.22)，高表达组与低表达组初次诱导缓解率分别为66.67%、88.0%，差异有统计学意义(χ²=8.101，P=0.004)，见表1。

USP22蛋白中位表达水平为0.57(0.23~1.05)，总初次诱导化疗缓解率为68.96%。按照初诊USP22蛋白中位表达水平将初诊AL患者分为高表达组(USP22蛋白表达>0.57)与低表达组(USP22蛋白表达≤0.57)，高表达组与低表达组初次诱导缓解率分别为50%、86.67%，差异具有统计学意义(χ²=4.392，P=0.036)，见表1。

3 讨论

USP22是泛素水解酶家族成员之一，泛素水解



1,2: USP22 and β-actin protein expressions in initial diagnosis group;3,4: USP22 and β-actin protein expressions in remission group;5,6: USP22 and β-actin protein expressions in negative control group;7,8,9,10,11: USP22 and β-actin protein expressions in Jurkat, HL-60, K562, molt-4 and NB4 cell lines

图1 Western blot检测USP22和β-actin蛋白的表达

Figure1 USP22 and β-actin protein expressions detected by Western blot

表1 USP22 的表达与初次诱导缓解率的关系 [例 (%) ]  
**Table1 Relationship between USP22 expression and remission rate of initial diagnosis before treatment[n(%)]**

	USP22 mRNA expression		USP22 Protein expression	
	High	Low	High	Low
Remission	16(32.65)	22(44.90)	7(24.14)	13(44.83)
Non-remission	8(16.33)	3 (6.12)	7(24.14)	2 (6.89)
Total	24(48.98)	25(51.02)	14(48.28)	15(51.72)

酶属半胱氨酸蛋白酶家族，其作用是将泛素与蛋白底物分离开，以此来调控泛素化过程。hSAGA复合体参与了MYC的靶基因的转录。USP22主要通过增强C-MYC介导的基因转录，从而促进肿瘤增殖和生长。通过RNA干扰下调USP22基因，能下调MYC介导的靶基因转录，包括JPO1、cyclinD2、ODC、CAD和MTA1。降低USP22表达可使高表达MYC的细胞增殖减慢，停滞于G<sub>1</sub>期，克隆形成率下降<sup>[2]</sup>，说明USP22可以通过MYC调控的靶基因促细胞增殖、介导细胞恶性行为<sup>[9]</sup>。相关研究证实USP22可能通过BMI-1调控的pRb(pRb/p16INK4a/cyclin D1)<sup>[10]</sup>、p53(p14ARF/Mdm2/P53)通路<sup>[11]</sup>和PI3k/Akt/GSK3β<sup>[12]</sup>介导细胞的恶性增殖。此外USP22在核受体介导的基因调控、端粒稳态维持、细胞周期调控等方面发挥着重要的生物学功能。USP22作为一种新颖的预测转移和预后不良的分子标记基因，已被证实在多种实体肿瘤的病理发展过程中扮演一个重要角色，包括前列腺癌<sup>[3]</sup>、乳腺癌<sup>[4]</sup>、肺癌<sup>[5]</sup>、胃癌<sup>[6]</sup>、大肠癌<sup>[7]</sup>等，并且其表达程度与肿瘤转移潜能、化疗耐药性及患者预后密切相关。

本研究发现，USP22 mRNA和蛋白在初诊急性白血病患者中有表达，且较阴性对照组表达水平高，此结果提示USP22基因可能参与了白血病的发生、发展的过程。高白细胞患者USP22表达量较非高白细胞患者表达量高，而高白细胞白血病是急性白血病的高危类型，早期死亡率高，对化疗的反应不敏感，治疗缓解率低，总体预后不良。同时我们观察了所有初诊急性白血病患者情况，一疗程的标准化疗后，分析获得完全缓解和未缓解患者的信息。与高表达USP22患者相比，低表达USP22的患者有较高的完全缓解率，此结果提示了高表达USP22可能是急性白血病的预后不良的因素之一。

总之，USP22基因作为“肿瘤细胞标志物”之一，已引起诸多肿瘤学者的重视，不仅表达与多种肿瘤疾病，并且与急性白血病治疗的预后有关。然而USP22如何介导白血病的生发、发展等相关机制并不明确，尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Lee HJ, Kim MS, Shin JM, *et al.* The expression patterns of deubiquitinating enzymes, USP22 and Usp22[J]. *Gene Expr Patterns*, 2006, 6(3): 277-84.
- [2] 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): 102-11.
- [3] Glinsky GV. Genomic models of metastatic cancer: functional analysis of death-from-cancer signature genes reveals aneuploid, anoikis-resistant, metastasis-enabling phenotype with altered cell cycle control and activated Polycomb Group (PcG) protein chromatin silencing pathway[J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(11): 1208-16.
- [4] Zhang Y, Yao L, Zhang X, *et al.* Elevated expression of USP22 in correlation with poor prognosis in patients with invasive breast cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(8):1245-53.
- [5] 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): 593-9.
- [6] 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): 703-10.
- [7] Zhou F, Cui BB, Liu YL, *et al.* Expression and clinical significance of usp22 and ki67 in colorectal carcinoma[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2012,39(1):68-70. [周飞,崔滨滨,刘彦龙,等.USP22和ki67在大肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2012,39(1):68-70.]
- [8] Zhang ZN, Shen T. *Haematology diagnostic and curative standard*[M]. Beijing: Science Press, 2009: 103-34. [张之南, 沈 悌. *血液病诊断及疗效标准*[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 103-34.]
- [9] Ao N, Liu YQ. Research advances in the function of USP22 in the occurrence and development of tumor[J]. *Ji Chu Yi Xue Yu Lin Chuang*, 2012, 32(10): 1235-8. [敖宁, 刘玉琴. USP22在肿瘤发生发展中的作用研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2012,32(10): 1235-8.]
- [10] Liu Y, Yang Y, Xu H, *et al.* Implication of USP22 in the regulation of BMI-1, c-Myc, p16INK4a, p14ARF, and cyclin D2 expression in primary colorectal carcinomas[J]. *Diagn Mol Pathol*, 2010, 19(4): 194-200.
- [11] 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): 229-35.
- [12] Song LB, Li J, Liao WT, *et al.* The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells[J]. *J Clin Invest*, 2009,119(12): 3626-36.

[编辑: 周永红; 校对: 黄园玲]