

# PSMD4 蛋白在上皮性卵巢癌中表达及意义

胡小凤<sup>1</sup>, 方醒艺<sup>2</sup>, 朱 蕾<sup>1</sup>, 杨宏英<sup>1</sup>

(1. 昆明医科大学第三附属医院, 云南省肿瘤医院, 云南 昆明 650118;

2. 昆明医科大学第四附属医院, 云南省红十字会医院, 云南 昆明 650020)

**摘要:** [目的] 探讨上皮性卵巢癌中 PSMD4 表达及意义。[方法] 回顾性分析 2013 年 1 月至 2017 年 12 月在昆明医科大学第三附属医院(云南省肿瘤医院)接受诊治的上皮性卵巢癌患者 101 例, 用免疫组化法检测上皮性卵巢癌组织中 PSMD4 表达, 并以 40 例正常卵巢上皮作为对照; 分析 PSMD4 表达与患者临床病理参数及预后的关系。[结果] 相比正常卵巢上皮, 上皮性卵巢癌组织中 PSMD4 高表达 ( $P=0.001$ )。PSMD4 表达与卵巢癌患者年龄、淋巴结转移、治疗前 CA125 及是否双侧患病无关 ( $P>0.05$ ), 但 PSMD4 低表达组肿瘤分化程度较好 ( $P=0.042$ )。至随访结束, 失访 2 例, 在访 99 例中 51 例 (51.5%) 复发, PSMD4 高表达组复发率明显高于 PSMD4 低表达组 ( $P=0.020$ ); PSMD4 低表达组的无铂间期为 (26.26±9.06) 个月, 较 PSMD4 高表达组 [(22.91±6.95) 个月] 延长约 3.5 个月 ( $P=0.042$ ); 但 PSMD4 表达程度与是否耐药复发无关 ( $P>0.05$ )。Kaplan-Meier 生存分析提示, PSMD4 高表达是未进展生存期的不良影响因素 ( $P=0.039$ )。[结论] PSMD4 蛋白在上皮性卵巢癌组织中表达上调; PSMD4 高表达与肿瘤分化不良以及肿瘤复发相关, 且是 PFS 不良影响因素。

**关键词:** 上皮性卵巢癌; PSMD4 蛋白; 免疫组织化学

**中图分类号:** R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)07-0603-04

**doi:** 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.07.B003

## Expression of PSMD4 in Epithelial Ovarian Cancer and Its Significance

HU Xiao-feng<sup>1</sup>, FANG Xing-yi<sup>2</sup>, ZHU Lei<sup>1</sup>, YANG Hong-ying<sup>1</sup>

(1. The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Provincial Tumor Hospital, Kunming 650118, China; 2. The Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, the Second People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650020, China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the expression and significance of PSMD4(26s proteasome non-AT-Pase regulated subunit 4) in epithelial ovarian cancer. [Methods] Retrospective analysis was performed on 101 cases of epithelial ovarian cancer patients who were diagnosed and treated in The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Provincial Tumor Hospital from January 2013 to December 2017. Immunohistochemistry was used to detect the expression of PSMD4 in epithelial ovarian cancer tissue, and 40 samples of normal ovarian cortex were used as the control group. The relationship between PSMD4 expression and the clinicopathological parameters and prognosis of patients were analyzed. [Results] The high-expression rate of PSMD4 in epithelial ovarian cancer tissue was higher than that in normal ovarian cortex ( $P=0.001$ ). The expression of PSMD4 was negatively correlated with tumor differentiation ( $P=0.042$ ), but was not correlated with age, lymph node metastasis, pretreatment CA125 level, unilateral or bilateral disease ( $P>0.05$ ). Ninety nine patients were followed-up, and 51 (51.5%) had recurrence. The recurrence rate of patients with PSMD4 high-expression was significantly higher than that with low PSMD4 expression ( $P=0.020$ ). The platinum free interval of patients with PSMD4 low-expression (26.26±9.06 months) was significantly longer than that of patients with PSMD4 high-expression (22.91±6.95 months) ( $P=0.042$ ). Kaplan-Meier survival analysis suggested that high-expression of PSMD4 was associated with poorer progression free survival in patients ( $P=0.039$ ). [Conclusion] PSMD4 protein is up-regulated in epithelial ovarian cancer. High expression of PSMD4 is associated with poor tumor differentiation and tumor recurrence, and is an adverse influence factor of PFS in patients with epithelial ovarian cancer.

**Subject words:** epithelial ovarian cancer; PSMD4; immunohistochemistry

上皮性卵巢癌 (epithelial ovarian cancer, EOC)

**基金项目:** 云南省卫生科技计划项目 (2017NS188)

**通信作者:** 杨宏英, 科主任, 主任医师, 硕士; 昆明医科大学第三附属医院云南省肿瘤医院妇科, 云南省昆明市西山区昆州路 519 号 (650118); E-mail: hxf960726451@163.com

**收稿日期:** 2019-03-21; **修回日期:** 2019-04-02

是卵巢癌最常见病理类型, 约占 60% 以上。由于早期诊断困难, 70% EOC 确诊时已是晚期, 主要的治疗方法仍是肿瘤细胞减灭术和铂类药物为基础的联合化疗。由于获得性耐药的产生, 约 70% 患者死于肿

瘤复发。近年卵巢癌耐药相关基因检测成为预测化疗疗效和预后的指标,但仍缺乏高敏感性的分子标志物。26S蛋白酶体 non-ATPase 调节亚基 4(proteasome 26S subunit. non. ATPase, PSMD4) 参与泛素—蛋白酶体介导的蛋白水解过程<sup>[1-2]</sup>。近年来国内外研究表明 PSMD4 参与肿瘤的发生发展。PSMD4 参与 NF- $\kappa$ B/AKT/ $\beta$ -catenin 级联,促进肿瘤细胞侵袭和增长,并且抵抗肿瘤坏死因子诱导的癌细胞凋亡<sup>[3]</sup>;在肝癌、胰腺癌、肺癌中,PSMD4 参与肿瘤细胞凋亡调控,发挥着促进肿瘤细胞生长、增加肿瘤细胞的侵袭性、抗细胞凋亡的作用<sup>[4-7]</sup>。本研究旨在检测 PSMD4 蛋白在 EOC 中的表达情况,分析其表达与患者临床病理参数及预后间关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

回顾性分析 2013 年 1 月至 2017 年 12 月在昆明医科大学第三附属医院(云南省肿瘤医院)接受诊治的 EOC 患者 101 例,收集其临床资料。纳入标准:(1)经病理确诊为 FIGO III 期 EOC;(2)新辅助疗程 $\leq$ 3 次,方案为紫杉醇联合铂类,所有患者均行满意的肿瘤细胞减灭术(单个残留病灶 $\leq$ 1cm),术后给予紫杉醇+铂类联合化疗;(3)总化疗疗程 6~8 次;(4)有完整病例资料;(5)不合并其他原发恶性肿瘤或恶性肿瘤病史,不伴其他严重疾病。排除标准:(1)非上皮性卵巢癌、转移性癌;(2)非 FIGO III 期卵巢癌;(3)合并其他原发恶性肿瘤;(4)合并其他严重疾病;(5)化疗总疗程 $<$ 6 程;(6)使用了紫杉醇+铂类以外的治疗方案;(7)单个残留病灶 $>$ 1cm。纳入病例年龄 35~71 岁,EOC 高中分化 61 例、低分化 40 例,淋巴结转移 43 例,双侧患病 84 例。本研究经医院伦理委员会批准。

### 1.2 免疫组化法检测癌组织及正常卵巢上皮 PSMD4 蛋白表达

切取蜡带厚度 3 $\mu$ m,展片以后贴于玻片上,放置于 60 $^{\circ}$ C 温箱烤片 2h;将烤好的切片经二甲苯 I、II 各 15min,经无水乙醇 I、无水乙醇 II、95%、80%、70%酒精各 2min 及蒸馏水 5min。PBS(pH7.5)液冲洗 3 次,每次 3min;除去 PBS 液,柠檬酸抗原修复液(92~95 $^{\circ}$ C)煮沸修复 90s,自然冷却至室温,PBS 洗 3

次,3min/次;除去 PBS 液,滴加 3% $H_2O_2$  封闭 10min, PBS 洗 3 次,3min/次;除去 PBS 液,滴加 PSMD4—抗(稀释比例为 1:150)4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜;PBS 洗 3 次,3min/次,除去 PBS 液,滴加二抗,室温孵育 15min, PBS 洗 3 次,3min/次;除去 PBS 液,滴加新鲜配制的 DAB 溶液,显色 3~5min,镜下观察结果,适时终止, PBS 洗 2 次,2min/次;苏木素复染 3min,自来水冲洗片刻,盐酸酒精分化 30s,温水浸泡 5min 蓝化;自然风干,中性树胶封片,镜检。

结果判断采用评分法,免疫组化切片通过图像采集系统传入计算机,在相同放大倍数( $\times$ 400)、相同光强度下随机取 5 个视野拍照,用基于 Image J 的免疫组化图像分析插件 IHC Profiler 进行自动评分。按胞质着色和胞核着色分别进行评分,5 个视野(10 个评分结果)求平均值,1~2 分为低表达,3~4 分为高表达。

### 1.3 随访

以患者开始接受治疗当日为起点,登记受检患者临床病理资料,包括确诊年龄、治疗前血清 CA125、残留病灶大小、有无淋巴结转移、病理类型、分化程度。通过病历和电话随访无进展生存期(progression free survival, PFS),PFS 定义为从开始治疗到肿瘤进展、复发或患者死亡的时间;无铂间期(platinum free interval, PFI)定义为从一线化疗结束到肿瘤进展、复发或患者死亡的时间。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计软件,计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,正态分布资料采用独立样本  $t$  检验,非正态分布资料采用秩和检验;计数资料采用卡方检验或 Fisher 精确检验进行统计学分析;采用 Kaplan-Meier 方法描述无进展生存期,用 Log-rank 检验进行差异比较。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

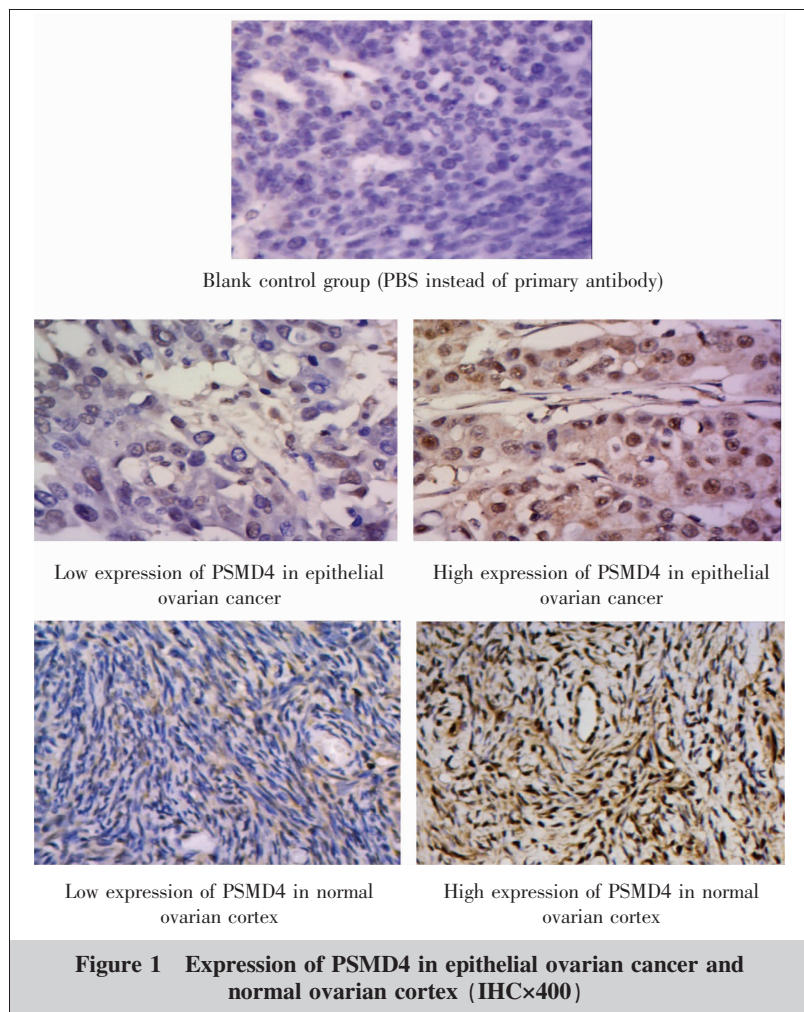
### 2.1 PSMD4 蛋白在卵巢癌组织和正常卵巢皮质中的表达

PSMD4 阳性表现为棕黄色颗粒,细胞核及周围细胞质都有表达(Figure 1)。101 例 EOC 组织中 PSMD4 高表达率为 47.5%(48/101);正常卵巢皮质 PSMD4 高表达率为 17.5%(7/40),差异有统计学意义

( $\chi^2=10.857, P=0.001$ )。

## 2.2 PSMD4 蛋白表达与卵巢癌患者临床病理特征的关系

PSMD4 表达与肿瘤分化相关。相比 PSMD4 高表达组, PSMD4 低表达组分化程度较高( $P=0.042$ )。



**Table 1 Relationship between PSMD4 and clinicopathological features**

Parameter	PSMD4		Statistic	P
	Low expression (n=53)	High expression (n=48)		
Age(years-old)	50.59±7.11	52.53±8.54	-1.245	0.216
Lymphatic metastasis			0.031	0.861
Yes	23 (43.4%)	20 (41.7%)		
No	30 (56.6%)	28 (58.3%)		
Differentiated degree			4.133	0.042
High, medium	37 (69.8%)	24 (50.0%)		
Low	16 (30.2%)	24 (50.0%)		
Bilateral			0.240	0.624
Yes	45 (84.9%)	39 (81.2%)		
No	8 (15.1%)	9 (18.8%)		
Pre-treatment CA125	1946.28±3143.02	2376.19±3760.99	-0.626	0.533

PSMD4 表达与患者年龄、淋巴结转移、治疗前 CA125 及是否双侧患病无关( $P>0.05$ )(Table 1)。

## 2.3 PSMD4 蛋白表达与预后的相关性

截至随访终止, 2 例失访, 在访 99 例中 51 例 (51.5%) 复发。复发病例中 PSMD4 低表达 21 例, PSMD4 高表达 30 例, PSMD4 高表达者复发率明显高于 PSMD4 低表达者 ( $P=0.020$ ); PSMD4 低表达组的无铂间期 ( $26.26\pm 9.06$  个月) 明显高于 PSMD4 高表达组的无铂间期 ( $22.91\pm 6.95$  个月), 差异有统计学意义 ( $P=0.027$ ); 但 PSMD4 表达程度与是否耐药复发 ( $PFI\leq 6$  个月) 无相关性 ( $P>0.05$ ) (Table 2)。

生存分析结果显示, PSMD4 低表达组相对 PSMD4 高表达组生存明显获益, 两者比较差异有统计学意义 ( $P=0.039$ )(Figure 2)。

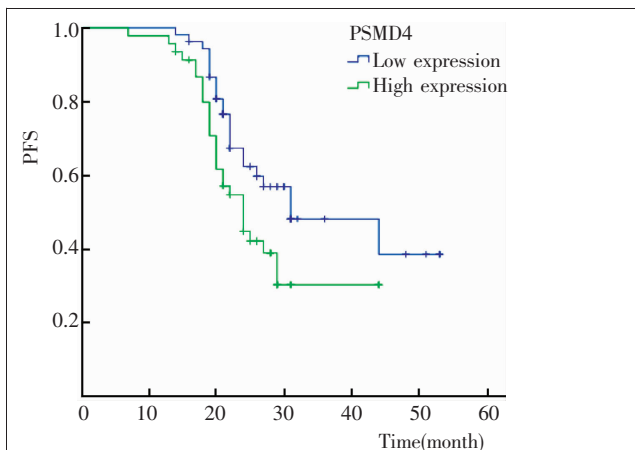
## 3 讨论

近年来以分子生物学为基础的靶向治疗在肿瘤治疗中取得了较好的效果, 在非小细胞肺癌、乳腺癌的治疗中, 靶向治疗都得到了成功应用, 为患者带来了良好的生存获益。就卵巢癌而言, 乳腺癌易感基因是上皮性卵巢癌的遗传易感基因, 与卵巢癌的铂敏感性及相关预后相关<sup>[8-10]</sup>。此外, 目前发现卵巢癌相关基因还有 TP53、PTEN、STK11、BRIP1、RAD51C 以及 MMR 错配基因 (林奇综合征), 如 MLH1、MSH2 等。目前用于卵巢癌的分子靶向药物主要有聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP 酶) 抑制剂。

泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 是一条重要的选择性蛋白质降解通路, 参与肿瘤发生和发展过程, 当 UPS 任何一个特异性功能组件出现异常时, 可以引起癌相关蛋白聚集、抑癌相关蛋白降解、突

**Table 2 PSMD4 expression and prognosis of patients**

Parameter	PSMD4		Statistic	P
	Low expression (n=52)	High expression (n=47)		
Recurrence			5.433	0.020
No	31 (59.6%)	17 (36.2%)		
Yes	21 (40.4%)	30 (63.8%)		
Drug resistance				1.000
Yes	4 (20.0%)	5 (18.2%)		
No	17 (80.0%)	25 (81.8%)		
PFI	26.26±9.06	22.91±6.95	2.057	0.042

**Figure 2 Survival curves of PFS of PSMD4 low expression and high PSMD4 expression group**

变细胞增殖加速,从而导致肿瘤的发生和发展<sup>[11-12]</sup>。26s 蛋白酶体是 UPS 的主要功能组件,PSMD4 蛋白是其主要泛素受体之一,在真核生物蛋白质水解过程中发挥着重要作用。在结直肠癌、肝癌、胰腺癌和肺癌中,PSMD4 表达与促进肿瘤细胞生长、增加肿瘤细胞的侵袭性、抗癌细胞凋亡有关。

本研究结果发现,相比正常卵巢上皮,PSMD4 蛋白在 EOC 组织中高表达,初步证实在 EOC 形成过程中,PSMD4 表达上调,PSMD4 高表达可能有促癌作用。结合临床病理参数分析,未发现 PSMD4 高表达与患者年龄、淋巴结转移、治疗前 CA125 及双侧患病有关;进一步分析发现,PSMD4 蛋白高表达者肿瘤分化程度较差,且复发率明显高于 PSMD4 低表达者,并且 PSMD4 低表达组的无铂间期较 PSMD4 蛋白高表达组延长约 3.5 个月,两者生存曲线比较差异亦有统计学意义。该研究结果提示,PSMD4 蛋白高表达者临床预后较差,提示 PSMD4 高表达与患者不良预后有关,与既往在其他恶性肿瘤中的研究结论一致<sup>[4-7]</sup>。

研究初步证实 PSMD4 具有促癌作用,有望成为肿瘤预后预测的生物指标以及生物治疗靶点。本研究只针对满意减瘤的 FIGO III 期 EOC 做了研究,PSMD4 表达与卵巢癌的病理类型、临床分期、远处转移有无相关,能否作为满意减瘤术可行性预测指标以及其促癌作用的内在分子机制尚需进一步探索。

## 参考文献:

- [1] Zhang N, Wang Q, Ehlinger A, et al. Structure of the s5a: k48-linked diubiquitin complex and its interactions with rpn13[J]. *Molecular Cell*, 2009, 35(3):280-290.
- [2] Sparks A, Dayal S, Das J, et al. The degradation of p53 and its major E3 ligase Mdm2 is differentially dependent on the proteasomal ubiquitin receptor S5a [J]. *Oncogene*, 2014, 33(38):4685-4696.
- [3] Arlt A, Bauer I, Schafmayer C, et al. Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2(Nrf2)[J]. *Oncogene*, 2009, 28(45):3983-3996.
- [4] Elangovan M, Choi ES, Jang BG, et al. The ubiquitin-interacting motif of 26S proteasome subunit S5a induces A549 lung cancer cell death [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 364(2):226-230.
- [5] Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27[J]. *Science*, 1995, 269(5224):682-685.
- [6] Xia MY. Role and mechanism of PSMD4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis of liver cancer cells [D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2016. [夏明杨. PSMD4 在内质网应激诱导的肝癌细胞凋亡中的作用及机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2016.]
- [7] Feng HB. Expression and function of PSMD4 in liver cancer cells[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2015. [冯海斌. PSMD4 在肝癌细胞中的表达及作用的研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.]
- [8] Gorodnova TV, Sokolenko AP, Ivantsov AO, et al. High response rates to neoadjuvant platinum-based therapy in ovarian cancer patients carrying germ-line BRCA mutation [J]. *Cancer Letters*, 2015, 369(2):363-367.
- [9] Fan S, Twu NF, Wang JA, et al. Down-regulation of BRCA1 and BRCA2 in human ovarian cancer cells exposed to adriamycin and ultraviolet radiation[J]. *Int J Cancer*, 1998, 77(4):600-609.
- [10] Sun C, Li N, Ding D, et al. The role of BRCA status on the prognosis of patients with epithelial ovarian cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e95285.
- [11] Carlucci A, D'Angiolella V. It is not all about BRCA: cullin-ring ubiquitin ligases in ovarian cancer[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(1):9-13.
- [12] Matsuura K, Huang NJ, Cocce K, et al. Downregulation of the proapoptotic protein MOAP-1 by the UBR5 ubiquitin ligase and its role in ovarian cancer resistance to cisplatin [J]. *Oncogene*, 2017, 36(12):1698-1706.