

# 泛素特异性蛋白酶 39 对人结直肠癌细胞增殖的调控研究



邢智远<sup>1</sup>, 张凤娟<sup>2</sup>, 王志伟<sup>1</sup>

1. 青岛大学医学院第二附属医院胃肠外科(青岛 266043)

2. 青岛大学附属医院感染科(青岛 266000)

**【摘要】** 目的 观察结直肠癌(CRC)组织中泛素特异性蛋白酶 39(USP39)蛋白的表达情况,以及 USP39 基因敲低对结直肠癌细胞系 SW1116 和 HCT116 细胞生长和细胞周期的影响。方法 ①采用免疫组织化学染色方法检测 USP39 蛋白在结直肠癌组织的表达情况。②选取结直肠癌 SW1116 和 HCT116 细胞系作为研究对象,将细胞分为 4 组(每组 5 个复孔):KD-1 组和 KD-2 组,采用慢病毒短发夹 RNA(shRNA)敲低肿瘤细胞中 USP39 基因的表达;shCon 组细胞感染阴性对照慢病毒,Con 组细胞未接受任何处理。采用四唑盐法(MTT)检测细胞的增殖能力,采用流式细胞仪检测细胞的周期分布。结果 ①免疫组织化学染色结果显示,USP39 蛋白在 CRC 组织中的高表达率高于癌旁组织( $P=0.035$ )。②不管是在 SW1116 细胞还是在 HCT116 细胞中,同时点下 KD-1 组和 KD-2 组细胞的增殖能力均明显低于 shCon 组和 Con 组( $P<0.05$ )。③不管是在 SW1116 还是在 HCT116 细胞的 KD-1 组中, $G_0/G_1$  期的细胞百分比均较 Con 和 shcon 组降低( $P<0.05$ ), $G_2/M$  期的细胞百分比和 sub- $G_1$  期细胞数均增加( $P<0.05$ )。结论 USP39 高表达于 CRC 组织中。CRC 细胞系中敲低 USP39 基因的表达可抑制肿瘤细胞的增殖形成能力,促进肿瘤细胞早期发生凋亡。

**【关键词】** 结直肠癌;泛素特异性蛋白酶 39;短发夹 RNA;细胞凋亡;靶向治疗

## Regulation study of ubiquitin-specific protease 39 for cell proliferation and apoptosis in colorectal cancer cells

XING Zhiyuan<sup>1</sup>, ZHANG Fengjuan<sup>2</sup>, WANG Zhiwei<sup>1</sup>

1. Department of Gastrointestinal Surgery, The Second Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266042, P. R. China

2. Department of Infection, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266042, P. R. China

Corresponding author: ZHANG Fengjuan, Email: zhangfj66@163.com

**【Abstract】** **Objective** This study was aimed to determine the expression of ubiquitin-specific peptidase 39 (USP39) protein in the colorectal cancer (CRC) tissue, and the effect of silencing USP39 gene on the cell growth, colony formation, and cell cycle distribution of CRC cells. **Methods** ①The expressions of USP39 protein in CRC tissues and its paracancerous tissues were determined by immunohistochemical staining method. ②By lentiviral infection, Lv-shUSP39 (KD-1 and KD-2 group) and Lv-shCon (shCon group) were transferred into SW1116 and HCT116 cells, and cells of blank control group did not received any treatment (Con group). To determine the role of USP39 gene in cell growth, MTT assay was performed to draw growth curve, and cell cycle distribution of CRC cells in 4 groups were determined by flow cytometer. **Results** ① The expression of USP39 protein was higher in CRC tissues compared to adjacent tissues ( $P=0.035$ ). ② For SW1116 and HCT116 cells, the cell proliferation ability of KD-1 and KD-2 groups were remarkably decreased than those in corresponding shCon and Con groups at the same time point ( $P<0.05$ ). ③ Flow cytometry assay showed that, the percentage of  $G_0/G_1$  phase cells were decreased obviously in  $G_0/G_1$  ( $P<0.05$ ), while increased significantly in percentage of  $G_2/M$  phase and number of sub- $G_1$  phase cells in KD-1 group compared with that in the Con group and shCon group of SW1116 and HCT116 cells ( $P<0.05$ ). **Conclusions** The expression of USP39 protein was highly expressed in CRC tissues. Knockdowning of USP39 gene can inhibit cell proliferation and promoted cell apoptosis.

**【Keywords】** colorectal cancer; ubiquitin-specific peptidase 39; shRNA; cell apoptosis; targeted therapy

近年来,我国结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的发病率呈上升趋势,已成为引起癌症死亡的最常见原因之一<sup>[1]</sup>。手术、放疗和化疗是CRC的主要治疗手段,但疗效已达到平台期<sup>[2]</sup>。许多基因在肿瘤组织中表达过度或缺失,且这些基因在肿瘤的发生和发展过程中起关键作用。采取抑制或加强这些基因的表达的生物靶向治疗策略在CRC的治疗中已取得了良好的治疗效果,成为继手术、化疗和放疗后肿瘤治疗的第4种模式<sup>[3]</sup>。目前有50多种靶向治疗药物已经被美国FDA批准,从针对肿瘤细胞分化的癌蛋白,到靶向特征性肿瘤抗原;从改变肿瘤微环境,到阻断免疫监测点;从精确阻断肿瘤异常信号通路,到抑制多靶点多通路,人类抗肿瘤药物越来越精准<sup>[4-6]</sup>。筛选更多的目的基因以提高肿瘤治疗的靶向性是当前研究的热点。泛素特异性蛋白酶39(USP39)是一类去泛素化酶,包括1个位于中心的锌指结构和2个泛素C末端的水解酶结构域,尽管其没有泛素特异性蛋白酶活性,但在mRNA前体的剪接过程中起重要作用<sup>[7]</sup>。USP39蛋白是一类分子量为 $65 \times 10^3$ 的具有U4/U6.U5三小核糖核蛋白复合物结构的剪接因子相关蛋白,与成熟剪接复合体的组装和保证有丝分裂纺锤体检查点的完整性有关<sup>[8]</sup>。最近有研究报道<sup>[9]</sup>称,在U2OS细胞中抑制USP39蛋白的表达会引起染色体分离和细胞质分裂发生错误,表明USP39蛋白在调控有丝分裂过程中起重要作用。此外,USP39分子在肿瘤细胞中的促生长作用被广泛研究。学者<sup>[10-11]</sup>的研究表明,USP39蛋白的过表达能够促进前列腺癌和乳腺癌细胞的增殖。另外,在肝癌和甲状腺髓样癌细胞中,抑制USP39蛋白的表达会引起G<sub>2</sub>/M期细胞周期停滞和细胞凋亡,这表明USP39蛋白是治疗多种肿瘤潜在的分子治疗靶点<sup>[12-13]</sup>。但是USP39分子在CRC中的生物学功能并未研究清楚。因此,本研究的目的是探索USP39分子对CRC细胞生长的潜在作用。为了探讨USP39蛋白作为靶点的可能性,本研究首先检测了USP39蛋白在CRC组织中的表达;然后采用慢病毒介导的短发夹RNA(shRNA)转染CRC细胞,再进行功能失活分析研究,最后观察USP39蛋白对CRC细胞生长形成能力的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

回顾性收集青岛大学医学院第二附属医院于2013年至2015年期间的80例CRC组织及其癌旁

组织(距癌组织以远? cm)石蜡样本。80例CRC患者中,男55例,女25例;年龄41~72岁,中位年龄为53岁;高分化10例,中分化42例,低分化28例,都是腺癌;浸润深度:T1+T2期54例,T3+T4期26例;淋巴结转移阴性51例,阳性29例;远处转移58例,未转移22例。所有患者均未接受过术前放疗及化疗。本研究经青岛大学医学院第二附属医院伦理委员会批准。

### 1.2 主要材料、试剂和设备

人CRC细胞株SW1116和HCT116,以及人胚肾细胞株293T(HEK293T)均购自中国科学院细胞库;pFH-L载体、针对USP39基因的小干扰RNA序列(shRNA1:5'-GATTTGGAAGAGGCG-AGATAACTCGAGTTATCTCGCCTCTTCCAAATCTTTT-3';shRNA2:5'-CCTTCCAGACAACATGAGATCTCGAGATCTCATAGTTGTCTGGAA GGTTTTT-3')及对照序列(5'-GCGGAGGG-TTGAAAGAATATCTCGAGATATTCTTTCAAAC CCTCCGCTTTTTT-3')由上海黄离生物科技有限公司提供设计并合成;四唑盐法(MTT)试剂盒购自碧云天公司。兔单克隆抗体USP39购自Abcam公司,工作滴度为1:200;BD FACSCalibur流式细胞仪购自美国BD公司;雷杜RT-6000酶标仪系深圳雷杜公司产品。

### 1.3 免疫组织化学染色检测 USP39 蛋白的表达

4 μm厚的石蜡切片常规脱蜡水化后,经柠檬酸钠缓冲液微波抗原修复,用3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>反应10 min,去除内源性过氧化物酶。加入一抗工作液4℃过夜孵育,然后加生物素标记的二抗工作液,37℃干燥箱孵育30 min,DAB显色,苏木精复染,透明,封片。光镜下观察染色情况,用已知肾癌阳性标本作为阳性对照,用PBS液代替一抗做阴性对照。USP39蛋白染色由2位有经验的病理科医生进行评分。每张切片随机选择5个不重叠的高倍视野(?倍),结果判读采用半定量积分分级方法<sup>[14]</sup>,积分=染色强度×染色细胞比例。染色强度阴性为0分,浅灰色为1分,淡黄色为2分,黄色为3分,棕黄色为4分;染色细胞比例,无阳性细胞为0分,1%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,76%~100%为4分;总分为两者相乘,其中0~11分为低表达组,12~16分为高表达组。

### 1.4 细胞培养

SW1116和HEK293T细胞采用含有10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基培养,HCT116细胞采用含有10%FBS的RPMI-1640培养基培养。所有

的细胞都在 37 °C 饱和湿度和 5% CO<sub>2</sub> 条件下常规培养。

### 1.5 慢病毒构建与转染

为了实现 USP39 基因的敲低表达, 本实验设计了 2 条靶向人 USP39 基因的序列和对照序列。将寡核酸片段退火后插入到 pFH-L 载体中, pFH-L 载体上带有绿色荧光蛋白标签以作为报告基因。慢病毒的构建方法参照之前的报道<sup>[15]</sup>。构建的慢病毒 Lv-shUSP39 用于特异性敲低 USP39 基因的表达, Lv-shCon 用作阴性对照。

将密度为  $5 \times 10^4$  个/mL 的 SW1116 和 HCT116 细胞悬液铺于 96 孔板中, 慢病毒依次稀释成  $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$  和  $1 \times 10^6$  TU/mL, 各取 50  $\mu$ L 感染细胞, 感染 96 h 后观察荧光并记录荧光效率, 确定慢病毒的复感染指数 (MOI) 为 30。转染细胞所需病毒的体积 = 病毒的 MOI  $\times$  种板量 / 病毒滴度 (本实验的病毒滴度为  $1 \times 10^8$  TU/mL)。将针对 USP39 基因的 2 种慢病毒载体: Lv-shUSP39 (S1) 和 Lv-shUSP39 (S2), 以及阴性对照载体转染入结肠癌细胞, 分别命名为 KD-1 组、KD-2 组和 shCon 组 (阴性对照), 未转染病毒的结肠癌细胞为空白对照组 (Con 组)。采用 MTT 法和流式细胞术分别检测敲低 USP39 表达对结肠癌细胞增殖和细胞周期分布的影响。所有实验都重复进行 3 次 (取均值), 每次实验设 5 个复孔。

### 1.6 MTT 法检测 CRC 细胞的增殖

将  $2 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板, 100  $\mu$ L/孔, 分为 4 组 (每组设 5 个复孔): KD-1 组、KD-2、shCon 组和 Con 组。放入培养箱, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 分别培养。培养 1 ~ 5 d 后, 每孔加入 20  $\mu$ L 5 mg/mL 的 MTT 母液, 轻轻震荡混匀。反应 4 h 后, 每孔加入 100  $\mu$ L 二甲基亚砜终止反应, 轻轻震荡混匀。采用酶标仪检测光密度 (OD) 值 (595 nm)。4 组肿瘤细胞分别培养 0、1、2、3、4 和 5 d 后测其 OD 值, 并根据不同时间点的 OD 值绘制生长曲线。

### 1.7 流式细胞术检测细胞周期

将慢病毒感染的细胞消化成单细胞悬液, 用预冷的 75% 乙醇固定细胞, 每管加入新鲜配制的碘化丙啶 (PI) 染色液 (50  $\mu$ g/mL), 缓慢并充分重悬细胞, 37 °C 避光温浴 1 h 后, 置于 4 °C 条件下, 24 h 内上机检测。

### 1.8 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。所有实验都进行 3 次独立重复, 计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用方差分析, 两两比较

采用 *t* 检验, 计数资料采用成组  $\chi^2$  检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 USP39 蛋白的表达结果

USP39 在正常组织和癌组织中的表达均位于细胞浆, 未见明显的细胞核染色 (图 1)。根据免疫组化染色的评分标准, 40 例正常组织标本中, 35 例呈低表达, 5 例呈高表达; 80 例 CRC 组织中, 56 例呈高表达, 24 例呈低表达。USP39 在 CRC 组织中的高表达率高于正常组织 ( $\chi^2=4.456$ ,  $P=0.035$ )。

### 2.2 USP39 蛋白表达与 CRC 患者临床病理学特征的相关性

CRC 患者中 USP39 蛋白的高表达与肿瘤分期和肿瘤分化程度呈正相关 ( $P<0.05$ ), 与患者的年龄、性别、肿瘤浸润深度和淋巴结转移的相关性无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 具体见表 1。

### 2.3 敲低 USP39 基因的表达对 CRC 细胞增殖能力的抑制效果

本实验采用 MTT 法, 检测了 USP39 基因敲低对 CRC 细胞增殖能力的影响。4 组肿瘤细胞的生长曲线见图 2。由图 2 可见, 不管是在 SW1116 细胞还是在 HCT116 细胞中, 同时点下 KD-1 组和 KD-2 组细胞的增殖能力均明显低于 shCon 组和 Con 组 ( $P<0.05$ ), 但 KD-1 和 KD-2 组比较、shCon 组和 Con 组比较, 差异均没有统计学意义 ( $P>0.05$ )。【4 组随时间的变化趋势是什么?】这表明敲低 USP39 基因的表达可抑制 CRC 细胞的生长。

### 2.4 敲低 USP39 基因的表达阻断了细胞周期进程

细胞的增殖依赖于细胞周期进程, 因此, 本实验在敲低 USP39 基因表达后对 SW1116 和 HCT116 细胞的细胞周期分布进行了分析。分析结果显示, 不管是在 SW1116 还是在 HCT116 细胞的 KD-1 组中, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的细胞百分比均较 Con 和 shcon 组降

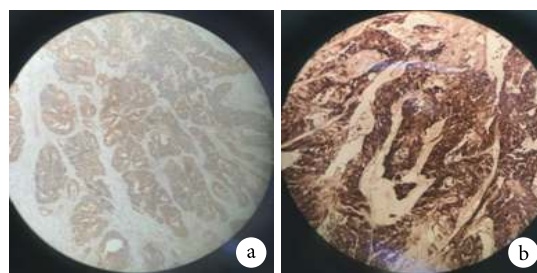


图 1 示 USP39 蛋白在正常组织 (a) 和 CRC 组织 (b) 中的表达 (SP  $\times 40$ )



表 1 USP39 蛋白表达与 CRC 患者临床病理学特征的关系 (例)

因素	总例数	USP39 蛋白表达		$\chi^2$ 值	P 值
		低表达 (n=24)	高表达 (n=56)		
年龄 (岁)					
<50	32	9	23	0.089	0.765
≥50	48	15	33		
性别					
男	55	17	38	0.069	0.792
女	25	7	18		
肿瘤分期					
I+II	24	14	10	13.107	0.001
III+IV	56	10	46		
浸润深度					
T1+T2	44	14	30	0.154	0.695
T3+T4	36	10	26		
分化程度					
高分化	13	6	7	7.356	0.025
中分化	22	10	12		
低分化	45	8	37		
淋巴结转移					
阴性	51	15	36	0.023	0.897
阳性	29	9	20		
远处转移					
阴性	58	23	35	0.01	0.919
阳性	22	9	13		

低 ( $P < 0.05$ ),  $G_2/M$  期的细胞百分比均增加 ( $P < 0.05$ ), 但同种细胞内 con 组和 shCon 组的  $G_0/G_1$ 、S 期和 M 期的细胞比例比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具体见图 3a 和 3b。该结果提示, USP39 基因调节细胞增殖是通过调控细胞周期实现的。另外, 不管是在 SW1116 还是在 HCT116 细胞中, KD-1 组的 sub- $G_1$  期细胞数均较 Con 和 shCon 组增高 ( $P < 0.05$ ), 但同种细胞内 Con 和

shCon 组的 sub- $G_1$  期细胞数比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具体见图 3g ~ 3j。该结果提示, KD-1 组细胞发生了早期凋亡。

### 3 讨论

CRC 是最常见的恶性肿瘤之一。在结直肠癌的发生和发展过程中, 由各种基因和信号转导通路组成的异常复杂的网络系统调控着 CRC 的各种生物学行为<sup>[16]</sup>。随着人们对肿瘤分子生物学了解的不断深入, 目前常以调控肿瘤细胞生物学行为的某些关键分子作为治疗靶点, 用特异性阻断剂选择性作用于该靶点, 有效地干预该关键分子的功能以达到抑制肿瘤的目的<sup>[17-20]</sup>。目前贝伐单抗、西妥昔单抗、帕尼单抗等分子靶向药物在临床应用中取得了显著疗效<sup>[18, 21-23]</sup>。因此, 探寻调控肿瘤细胞生物学活性的关键分子, 为肿瘤治疗提供有效的治疗靶点具有重要的临床应用价值。

本研究采用免疫组织化学染色的方法检测了 80 例 CRC 组织及癌旁组织中 USP39 蛋白的表达, 发现 USP39 在 CRC 组织中的高表达率较癌旁组织显著升高。同时, 笔者分析发现, USP39 蛋白的表达与肿瘤分期和分化程度相关, 这提示 USP39 蛋白的表达可能在 CRC 的发生和发展过程中发挥重要作用。

为了证实 USP39 基因在肿瘤细胞中的作用, 本实验采用慢病毒载体敲低 CRC 细胞株 SW1116 和 HCT116 细胞中 USP39 基因的表达, 发现敲低 USP39 基因的表达能够显著抑制 SW1116 和 HCT116 细胞的增殖能力。这表明 USP39 基因表达与在 CRC 细胞的生长增殖有关。最近文献<sup>[22]</sup>报道, 剪切体与肿瘤的发生和发展相关。USP39 蛋白是剪切体的重要组成部分, 调控着原癌基因极光激酶 B (Aurora B) 和肿瘤抑制基因 RB 基因 (RB1) 前体 mRNA 的剪切, 保证纺锤体检查点和胞质分裂的完

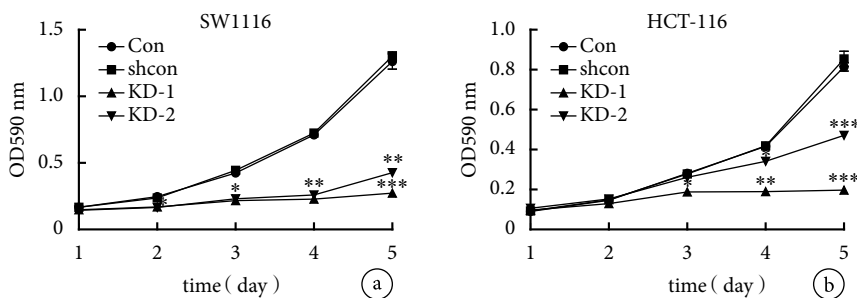


图 2 示 SW116 细胞和 HCT-116 细胞中敲低 USP39 基因的表达后细胞的生长曲线

a: SW116 细胞; b: HCT-116 细胞; 同时点下 KD-1 组和 KD-2 组的 OD 值均高于 shCon 组和 Con 组 ( $P < 0.05$ ), 但同时点下 KD-1 组和 KD-2 组比较、shCon 组和 Con 组比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )

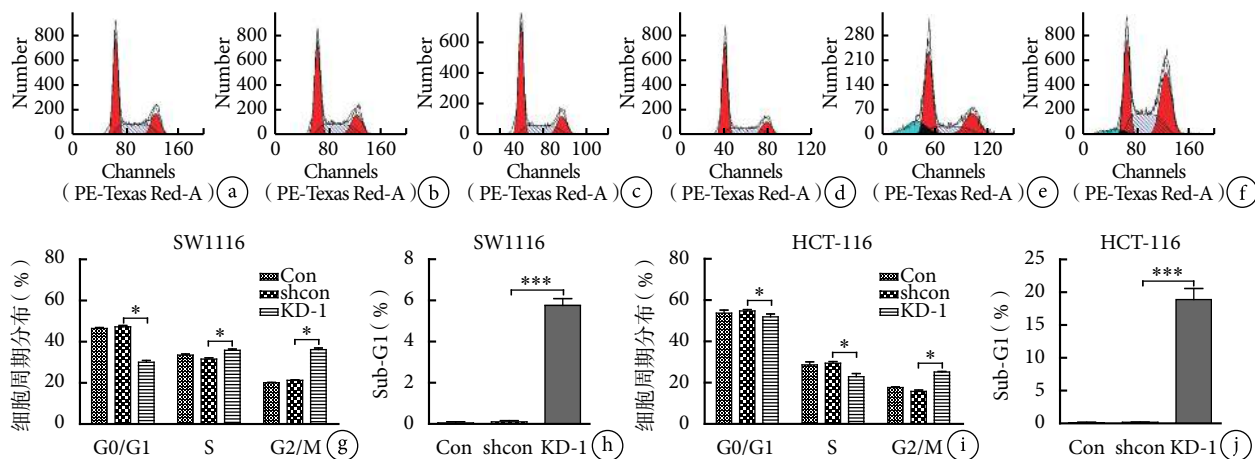


图 3 示敲低结直肠癌细胞 USP39 基因的表达影响细胞周期的分布

a ~ c: SW1116 细胞中, Con (a)、shCon (b) 和 KD-1 (c) 组的细胞周期分布; d ~ f: HCT-116 细胞中, Con (a)、shCon (b) 和 KD-1 (c) 组的细胞周期数量分布; g 和 h: SW1116 细胞中, Con、shCon 和 KD-1 组的细胞周期比例 (g) 和亚 G1 期比例 (h) 比较; i 和 j: HCT-116 细胞中, Con、shCon 和 KD-1 组的细胞周期比例 (i) 和亚 G1 期比例 (j) 比较; 与 Con 组和 shCon 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

整性<sup>[24]</sup>。Aurora B 的下调引起纺锤体检查点功能的异常和胞质分裂错误<sup>[7]</sup>。因此, USP39 蛋白可能通过调控 Aurora B mRNA 的剪切作用调节细胞的增殖。

细胞周期的异常也是恶性肿瘤的一个重要特征。笔者进一步检测了 USP39 基因表达对细胞周期的影响, 结果显示, 敲低 USP39 基因的表达显著减少了 CRC 细胞中 G0/G1 和 S 期的细胞百分比, 增加 G<sub>2</sub>/M 期百分比, 导致 G<sub>2</sub>/M 期阻滞。研究<sup>[25-27]</sup>发现, 沉默 USP39 基因的表达可抑制肿瘤细胞周期蛋白依赖性激酶 1 或细胞周期蛋白 (B1CDK1/CyclinB1) 活性, 导致细胞 G<sub>2</sub>/M 期停滞, 这与笔者的研究结果一致。

综上所述, 本研究结果显示, USP39 蛋白高表达于 CRC 组织中, 其与肿瘤的分期呈正相关, 说明 USP39 蛋白可能参与 CRC 的发生和发展。敲低 USP39 基因表达可抑制 CRC 细胞的增殖, 阻滞细胞于 G<sub>2</sub>/M 期。本研究结果提示, USP39 可能是调控 CRC 生物学活性的关键因子, 它或许是一种潜在的抗肿瘤治疗的靶点。

参考文献

- 1 Tilg H, Adolph TE, Gerner RR, et al. The intestinal microbiota in colorectal cancer. *Cancer Cell*, 2018, 33(6): 954-964.
- 2 Smith JJ, Garcia-Aguilar J. Advances and challenges in treatment of locally advanced rectal cancer. *J Clin Oncol*, 2015, 33(16): 1797-1808.
- 3 Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*, 2014, 383(9927): 1490-1502.
- 4 Kirstein MM, Lange A, Prenzler A, et al. Targeted therapies in

- metastatic colorectal cancer: a systematic review and assessment of currently available data. *Oncologist*, 2014, 19(11): 1156-1168.
- 5 Aoyagi K, Kouhiji K, Kizaki J, et al. Molecular targeting to treat gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(38): 13741-13755.
- 6 Poulin EJ, Haigis KM. No back seat for a progression event-K-RAS as a therapeutic target in CRC. *Genes Dev*, 2017, 31(4): 333-335.
- 7 van Leuken RJ, Luna-Vargas MP, Sixma TK, et al. Usp39 is essential for mitotic spindle checkpoint integrity and controls mRNA-levels of aurora B. *Cell Cycle*, 2008, 7(17): 2710-2719.
- 8 Makarova OV, Makarov EM, Lüthmann R. The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6.U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes. *EMBO J*, 2001, 20(10): 2553-2563.
- 9 Gan Z, Han K, Lin S, et al. Knockdown of ubiquitin-specific peptidase 39 inhibited the growth of osteosarcoma cells and induced apoptosis in vitro. *Biol Res*, 2017, 50(1): 15.
- 10 Huang Y, Pan XW, Li L, et al. Overexpression of USP39 predicts poor prognosis and promotes tumorigenesis of prostate cancer via promoting EGFR mRNA maturation and transcription elongation. *Oncotarget*, 2016, 7(16): 22016-22030.
- 11 Liu S, Liu X, Wang H, et al. Lentiviral vector-mediated doxycycline-inducible USP39 shRNA or cDNA expression in triple-negative breast cancer cells. *Oncol Rep*, 2015, 33(5): 2477-2483.
- 12 Yuan X, Sun X, Shi X, et al. USP39 promotes the growth of human hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Oncol Rep*, 2015, 34(2): 823-832.
- 13 An Y, Yang S, Guo K, et al. Reduced USP39 expression inhibits malignant proliferation of medullary thyroid carcinoma in vitro. *World J Surg Oncol*, 2015, 13(1): 255.
- 14 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反映结果的判断标准. *中国癌症杂志*, 1996, 6(4): 229-231.
- 15 Sun W, Yao L, Jiang B, et al. Spindle and kinetochore-associated protein 1 is overexpressed in gastric cancer and modulates cell growth. *Mol Cell Biochem*, 2014, 391(1-2): 167-174.
- 16 Mamlouk S, Childs LH, Aust D, et al. DNA copy number changes

- define spatial patterns of heterogeneity in colorectal cancer. *Nat Commun*, 2017, 8: 14093.
- 17 Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, *et al.* Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 2016, 17(6): 738-746.
- 18 Khotskaya YB, Holla VR, Farago AF, *et al.* Targeting TRK family proteins in cancer. *Pharmacol Ther*, 2017, 173: 58-66.
- 19 Wan L, Yu W, Shen E, *et al.* SRSF6-regulated alternative splicing that promotes tumour progression offers a therapy target for colorectal cancer. *Gut*, 2017, [Epub ahead of print].
- 20 Allgayer H, Fulda S. An introduction to molecular targeted therapy of cancer. *Adv Med Sci*, 2008, 53(2): 130-138.
- 21 Shih YH, Luo TY, Chiang PF, *et al.* EGFR-targeted micelles containing near-infrared dye for enhanced photothermal therapy in colorectal cancer. *J Control Release*, 2017, 258: 196-207.
- 22 Augustine TA, Baig M, Sood A, *et al.* Telomere length is a novel predictive biomarker of sensitivity to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2015, 112(2): 313-318.
- 23 Fraile JM, Quesada V, Rodríguez D, *et al.* Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene*, 2012, 31(19): 2373-2388.
- 24 Lygerou Z, Christophides G, Séraphin B. A novel genetic screen for snRNP assembly factors in yeast identifies a conserved protein, Sad1p, also required for pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(3): 2008-2020.
- 25 Dong X, Su H, Jiang F, *et al.* miR-133a, directly targeted USP39, suppresses cell proliferation and predicts prognosis of gastric cancer. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 8311-8318.
- 26 Xu Y, Zhu MR, Zhang JY, *et al.* Knockdown of ubiquitin-specific peptidase 39 inhibits the malignant progression of human renal cell carcinoma. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 4729-4735.
- 27 Yuan X, Sun X, Shi X, *et al.* USP39 regulates the growth of SMMC-7721 cells via FoxM1. *Exp Ther Med*, 2017, 13(4): 1506-1513.

收稿日期: 2018-05-24 修回日期: 2018-09-24

本文编辑: 罗云梅