

# 喉鳞癌组织中 CBLL1 蛋白表达变化及意义

侯思哲

(锦州医科大学附属第一医院耳鼻咽喉头颈外科, 辽宁 锦州 121000)

**摘要:**目的 分析喉鳞状细胞癌组织中 E3 泛素连接酶 CBLL1 的表达及其临床意义。方法 选取 2017 年 9 月~2019 年 7 月我院 60 例喉鳞状细胞癌石蜡组织切片及对应 30 例癌旁石蜡组织切片,采用免疫荧光法检测喉癌组织及癌旁组织中 CBLL1 蛋白的表达,比较喉癌组织和癌旁组织、不同性别、年龄、临床分期、淋巴结转移、组织分化程度及肿瘤分型患者中 CBLL1 蛋白的表达;另选取 10 例冰冻喉癌组织及对应癌旁组织,应用实时定量 PCR 方法检测 CBLL1 蛋白中 mRNA 的表达。结果 喉癌组织中 CBLL1 的表达高于癌旁组织,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ );不同年龄、性别、肿瘤分型及组织分化程度的患者喉癌组织中 CBLL1 蛋白表达比较,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ );不同临床分期、淋巴结转移的患者喉癌组织中 CBLL1 蛋白表达比较,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ );喉癌组织中 CBLL1 蛋白 mRNA 的相对表达量高于癌旁组织,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。结论 喉癌组织中 CBLL1 蛋白表达异常与喉鳞状细胞癌的发生、发展、浸润及转移密切相关,其可能作为喉癌未来治疗的新靶点。

**关键词:** E3 泛素连接酶 CBLL1;喉鳞状细胞癌;免疫荧光;RT-PCR

中图分类号: R739.65

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2020.05.002

文章编号: 1006-1959(2020)05-0005-04

## Changes and Significance of CBLL1 Protein Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma

HOU Si-zhe

(Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning, China)

**Abstract:** Objective To analyze the expression of E3 ubiquitin ligase CBLL1 in laryngeal squamous cell carcinoma and its clinical significance. Methods From September 2017 to July 2019, 60 paraffin sections of laryngeal squamous cell carcinoma in our hospital and 30 paraffin sections adjacent to cancer were selected to detect the expression of CBLL1 protein in laryngeal cancer tissue and adjacent tissues by immunofluorescence. Compare the expression of CBLL1 protein in laryngeal cancer tissues and adjacent tissues, different genders, ages, clinical stages, lymph node metastasis, tissue differentiation, and tumor typing; another 10 frozen throat tissues and corresponding adjacent tissues were selected and applied in real time quantitative PCR was used to detect mRNA expression in CBLL1 protein. Results The expression of CBLL1 in laryngeal cancer tissues was higher than that in adjacent tissues, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Comparison of CBLL1 protein expression in laryngeal cancer tissues of patients with different age, gender, tumor classification and degree of tissue differentiation, there was no significant difference ( $P>0.05$ ); The expression of CBLL1 protein in laryngeal cancer tissues of patients with different clinical stages and lymph node metastasis was statistically significant ( $P<0.05$ ); the relative expression of CBLL1 protein mRNA in laryngeal cancer tissues was higher than that in adjacent tissues, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Conclusion The abnormal expression of CBLL1 protein in laryngeal cancer tissues is closely related to the occurrence, development, invasion and metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma, which may be a new target for the future treatment of laryngeal cancer.

**Key words:** E3 ubiquitin ligase CBLL1; Laryngeal squamous cell carcinoma; Immunofluorescence; RT-PCR

喉癌(laryngeal cancer)是头颈部肿瘤中常见的恶性肿瘤之一,占耳鼻咽喉部位恶性肿瘤的 7.9%,头颈部恶性肿瘤的第 3 位<sup>[1]</sup>。目前,喉癌的治疗方式包括手术治疗、放射治疗、化学治疗及生物治疗。近年来多种治疗方式不断改进,使得喉癌患者的喉功能保存率及生存质量不断提高,但调查显示<sup>[2,3]</sup>,喉癌患者的生存率仍无明显改善。目前认为恶性肿瘤的发生是与内、外源因素失衡作用的结果,其中以原癌基因的激活和抑癌基因的失活最为重要,确定喉癌治疗新的基因靶点有着重要的临床意义。泛素(ubiquitin)是由 76 个氨基酸残基组成的序列高度保守的多肽,普遍存在于真核生物体内,主要参与蛋白质降解、内吞作用、转录调节、信号转导、跨膜蛋白的分选及转运等多个过程。Cbl proto-oncogene-like-1(CBLL1)是 E3 泛素连接酶的一种,在各种发

作者简介:侯思哲(1991.5-),男,辽宁葫芦岛人,硕士研究生,住院医师,主要从事喉癌相关研究

通讯作者:王雪峰(1965.11-),男,辽宁阜新人,博士,主任医师,教授,硕士生导师,主要从事耳鼻咽喉头颈外科临床与基础研究

育和疾病发挥重要的生物学功能。CBLL1 与恶性肿瘤侵袭和转移相关,本研究主要探讨喉癌中 CBLL1 的表达,同时结合临床资料分析 CBLL1 在喉癌组织中的表达情况及其与喉癌发生、发展之间的关系,现报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 选取 2017 年 9 月~2019 年 7 月就诊于锦州医科大学附属第一医院耳鼻喉科经手术病理学诊断为喉鳞状细胞癌患者的石蜡组织切片,共 60 例,对应癌旁组织 30 例,另选取 10 例冰冻喉癌及癌旁组织标本,所有患者术前均未行放疗化疗治疗。60 例石蜡切片中,男 56 例,女 4 例,年龄 45~81 岁,平均年龄( $65.03\pm 8.53$ )岁,根据国际抗癌联盟(UICC)2017 年第 8 版公布的 TNM 分期:Ⅰ期 12 例,Ⅱ期 20 例,Ⅲ期 18 例,Ⅳ期 10 例。喉癌分型:声门上型 18 例,声门型 42 例。分化程度:高分化 27 例,中分化 22 例,低分化 11 例,发生淋巴结转移者 13 例,无淋巴结转移者 47 例。10 例冰冻喉癌及癌旁正常组

组织标本中,均为男性,年龄 55~71 岁,平均年龄(62.03±3.53)岁,根据国际抗癌联盟(UICC)2017 年第 8 版公布的 TNM 分期:Ⅰ期 4 例,Ⅱ期 3 例,Ⅲ期 3 例。喉癌分型:声门上型 3 例,声门型 7 例。颈部淋巴结转移为 1 例,无淋巴结转移为 9 例。本研究经医院伦理委员会批准,患者均已签署知情同意书。

**1.2 主要实验试剂及仪器** 兔抗人多克隆抗体 anti-CBLL1 (博奥森生物技术有限公司),羊抗兔二抗 (Abcam 公司),核酸提取试剂盒 (AmoyDx 公司),PCR 引物购自上海生物工程有限公司,奥林巴斯荧光共聚焦显微照相机 (Leica TCS sp5II, 德国 Leica 公司),荧光定量 PCR 仪 (qRP-PCR) (Quant Studio3 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

**1.3 CBLL1 蛋白表达检测** 应用免疫荧光染色方法检测 CBLL1 蛋白的表达:①切片常规脱腊至水;②将切片放入柠檬酸钠抗原修复液中,微波加热,室温冷却;蒸馏水冲洗 3 次,5 min/次,PBS 中润洗 3 次,5 min/次;③滴加 5% 正常山羊血清,室温封闭 60 min,吸去多余液体;④滴加稀释的一抗工作液兔抗人 CBLL1,4℃避光湿盒过夜;⑤滴加荧光素标记二抗,37℃湿盒孵育 1 h,用 PBS 冲洗 3 次;⑥滴加抗荧光淬灭封片剂,37℃湿盒孵育 5 min,用 PBS 冲洗 3 次,封片。以 PBS 为一抗做阴性对照。

**1.4 CBLL1 中 mRNA 表达检测** 应用实时荧光定量 PCR 检测 CBLL1 中 mRNA 的表达:标本总 RNA 提取按照核酸提取试剂盒说明书进行,分光光度计检测总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处吸光值,OD260/OD280>1.8,可用于检测 CBLL1 mRNA 的表达。将提

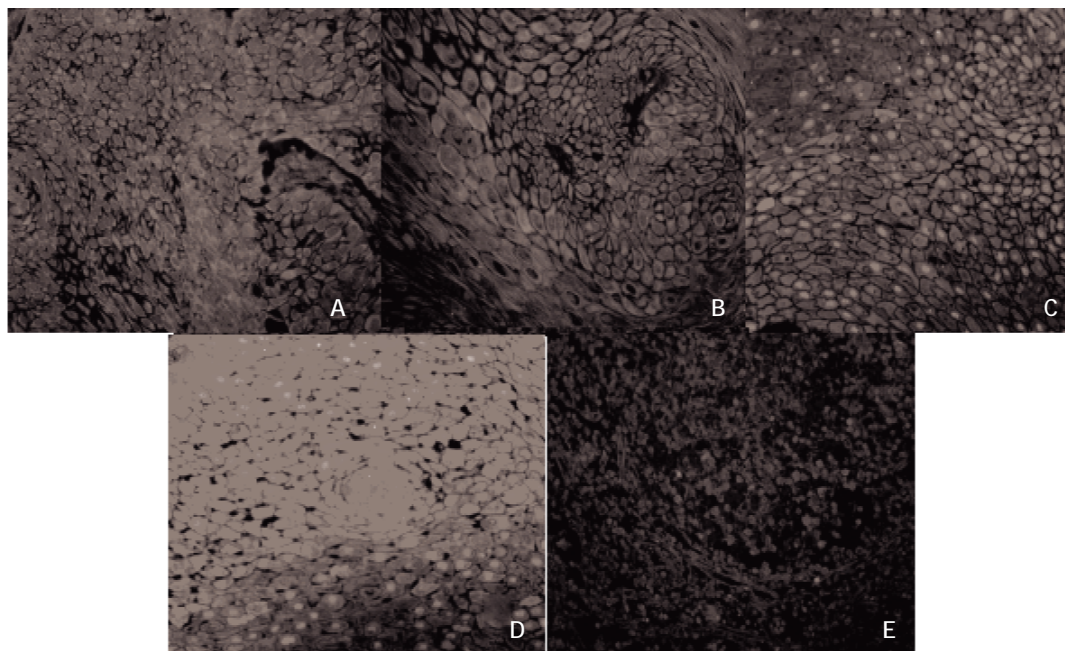
取总 RNA 逆转录转合成第一链 cDNA。以 cDNA 为模板进行扩增,引物由上海生物工程有限公司合成,序列如下:CBLL1 上游引物为 5'-GGAGTTG-GATAGTAGAGGCGAGAG-3',下游引物为 5'-AA-CATCAAGACCACCCAAGGA-3'。以  $\beta$ -actin 为内参基因,上游引物为 5'-TGGCAGCCAGCACAATGAA-3',下游引物为 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTA-GAAGCA-3'。扩增条件为:42℃ 30 min,85℃ 5 s。反应条件为 95℃ 预变性 5 min 后,95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,总计 40 个循环。

**1.5 观察指标** 比较喉癌组织及癌旁组织中 CBLL1 的表达情况和不同性别、年龄、临床分期、分化程度、淋巴结转移情况及肿瘤分型患者中 CBLL1 的表达情况;比较喉癌组织及癌旁组织中 CBLL1 mRNA 的相对表达量。CBLL1 的表达情况利用 IMAGE PRO PLUS 6.0 图像分析系统进行图像分析,根据荧光显示的亮度,测定其平均荧光密度值,CBLL1 mRNA 相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分析。

**1.6 统计学方法** 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料采用( $\bar{x}\pm s$ )表示,行  $t$  检验, $P<0.05$  差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 喉癌组织及癌旁组织中 CBLL1 表达比较** 喉癌组织及癌旁组织均有 CBLL1 的表达,见图 1。喉癌组织 CBLL1 平均光密度值为(0.1810±0.0273),高于癌旁组织中的(0.0829±0.0268),差异有统计学意义( $P<0.05$ )。



注:A:CBLL1 在Ⅰ期喉鳞状细胞癌中的表达;B:CBLL1 在Ⅱ期喉鳞状细胞癌中的表达;C:CBLL1 在Ⅲ期喉鳞状细胞癌中的表达;D:CBLL1 在Ⅳ期喉鳞状细胞癌中的表;E:CBLL1 在正常邻近组织中的表达

图 1 CBLL1 在喉癌及癌旁组织中的表达(×400)

2.2 不同临床特征患者中 CBLL1 的表达比较 不同年龄、性别、肿瘤分型及组织分化程度的患者喉癌组织中 CBLL1 蛋白表达比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );

不同临床分期、淋巴结转移的患者喉癌组织中 CBLL1 蛋白表达比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。

表 1 不同临床特征患者中 CBLL1 的表达比较( $\bar{x}\pm s$ )

项目	n	CBLL1 平均荧光密度值	t	P
性别			0.566	>0.05
男	56	0.1815±0.0276		
女	4	0.1735±0.0265		
年龄(岁)			-0.613	>0.05
<65	32	0.1771±0.0300		
≥65	28	0.1884±0.0247		
临床分期			7.954	<0.05
I~II	32	0.1627±0.0215		
III~IV	28	0.2020±0.0157		
淋巴结转移			3.610	<0.05
无	47	0.1749±0.0270		
有	13	0.2031±0.0147		
分化程度			-0.717	>0.05
高分化	27	0.1757±0.0250		
中分化	22	0.1814±0.0311		
低分化	11	0.1934±0.0227		
肿瘤分型			0.982	>0.05
声门型	42	0.1763±0.0232		
声门上型	18	0.1920±0.0334		

2.3 喉癌组织及癌旁组织中 CBLL1 mRNA 的相对表达量比较 10 例喉癌组织及对应癌旁正常组织实时荧光 PCR 分析显示,癌旁组织中 CBLL1 的 mRNA 相对表达量为(1.0000±0.0000),低于喉癌组织中的(1.7335±0.2899),差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2。

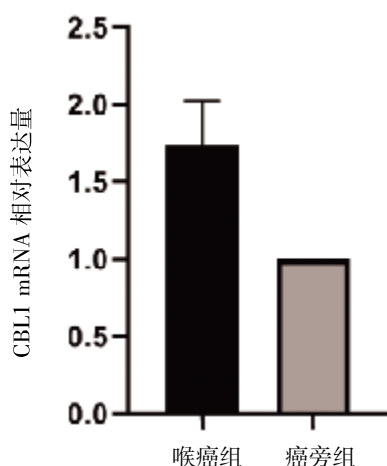


图 2 喉癌组织及癌旁组织中 CBLL1 mRNA 的相对表达量

### 3 讨论

泛素化作为一种重要的蛋白翻译后修饰,参与了包括细胞周期调控、细胞凋亡、DNA 修复、转录调控、自噬作用等多个重要胞内反应,对于细胞更新胞

内蛋白、清除衰老蛋白、维持胞内环境稳定具有重要意义<sup>[6]</sup>。泛素连接酶 E3 能够特异性识别底物,是泛素-蛋白酶体系中最重要的一部分,约 600 多个不同的泛素连接酶在人体中调节多种靶蛋白<sup>[6]</sup>。CBLL1 是 E3 泛素连接酶一种,被确定为第一个 E-钙粘蛋白稳定性的翻译后调节子<sup>[6]</sup>。既往研究表明,CBLL1 在多种肿瘤中起作用,如 CBLL1 在结肠癌组织中高表达,并参与肿瘤的发生及发展;在胃癌组织中表达上调,CBLL1 过表达促进 MDCK 细胞生长<sup>[7]</sup>;在非小细胞肺癌中 CBLL1 呈高表达,并促进细胞增殖和侵袭<sup>[8]</sup>。本研究以 CBLL1 为研究对象,观察其在喉鳞状细胞癌组织中的表达情况。

E-钙粘蛋白是经典的钙粘蛋白,主要介导同种细胞间的黏附反应,是维持上皮细胞形态和结构的完整性和极性的重要蛋白。研究表明 E-钙粘蛋白的缺失与喉癌预后不良相关<sup>[9]</sup>,E3 泛素连接酶 CBLL1 与 E-钙粘蛋白结合,再将酪氨酸激酶 v-src 酪氨酸磷酸化的 E-cadherin 进一步泛素化,将其降解,从而调节癌细胞的侵袭及转移。由于 CBLL1 介导 E-cadherin 复合体的泛素化和内吞作用,CBLL1 在上皮细胞中的表达增强 E-cadherin 的内吞作用,从而调节细胞与细胞粘附作用<sup>[10]</sup>。Figuerola A 等<sup>[7]</sup>研究表明,CBLL1 以 E-钙粘蛋白下调独立的方式调节细胞

增殖。Gong EY 等<sup>[11]</sup>研究表明,CBLL1 可以作为乳腺癌细胞中的转录调控因子,提示其在乳腺癌的发生发展中可能起重要作用。这些发现均表明 CBLL1 在 E-钙粘着蛋白依赖性和非依赖性肿瘤发生中的作用。本研究结果显示,CBLL1 在喉鳞状细胞癌中表达高于癌旁组织,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。说明 CBLL1 可能参与了喉癌的发生,另外 CBLL1 在Ⅲ~Ⅳ期喉癌组织中表达高于Ⅰ~Ⅱ期,说明随着肿瘤的发展,CBLL1 的表达逐渐增高,提示 CBLL1 可能参与了喉癌的发展。

肿瘤细胞发生侵袭和转移至少有黏附、降解、移动三个步骤,因此细胞间黏附作用的减弱是肿瘤细胞发生侵袭和转移的条件。E-钙粘蛋白的表达下降使得细胞间黏附作用下降,肿瘤细胞更容易脱离原组织而发生转移,表明喉癌的侵袭和转移与 E-钙粘蛋白相关。本研究结果显示,淋巴结转移的患者喉癌组织中 CBLL1 表达高于无淋巴结转移的患者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。表明 CBLL1 可能参与了喉癌的浸润与转移,CBLL1 在喉癌中的表达上调,可能与临床分期、淋巴结转移相关。在喉癌中也可能存在 CBLL1 通过一系列泛素化下调 E-钙粘蛋白的表达,从而促进了喉癌的侵袭和转移,但其机制需进一步研究。病理学分级是喉癌的恶性程度的指标,分化程度越低,喉癌的恶性程度越高,但本研究结果显示,CBLL1 在不同分化程度的喉癌组织中表达比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),其具体机制有待进一步研究。

目前,CBLL1 在癌症和其他疾病中的重要性正逐步被认识,CBLL1 在不同的生理或病理条件可以有不同的功能,因此不同的信号通路对 CBLL1 的影响以及研究其作为癌症治疗靶点的临床潜在有用性同样重要。目前,以泛素化为靶点的肿瘤治疗已初有成效。比起传统的抗肿瘤药物,泛素化组分抑制剂在识别底物上具有特异性,可有效减少非特异性副作用的产生,也可有效减少癌细胞对传统抗肿瘤药物的耐药性<sup>[12]</sup>。本研究证实了 CBLL1 的表达与喉

鳞状细胞癌的发生发展密切相关,期待后续相关研究能为该病的治疗提供参考依据。

综上所述,CBLL1 在喉癌的发生、发展中起重要作用,随着喉鳞状细胞癌的进展,其表达随之增高,因此 CBLL1 可能作为喉癌治疗的新靶点。

#### 参考文献:

- [1] 陈文杰,王斌全,高伟,等.喉癌流行病学特征及影响因素分析[J].中国当代医药,2015,22(12):43-46.
- [2] Macneil SD,Liu K.Secular trends in the survival of patients with laryngeal carcinoma,1995-2007[J].Curr Oncol,2015,22(2):e85-e99.
- [3] Van Dijk BA,Karim-Kos HE.Progress against laryngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2010[J].Int J Cancer,2014,134(3):674-681.
- [4] 方帅,赵博.泛素化及相关疾病研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2017,44(5):377-384.
- [5] Hammel M,Kuhlman B,Qiu Y,et al.Mechanism of ubiquitin ligation and lysine prioritization by a HECT E3 [J]. Elife,2013,2(15):e00828.
- [6] Shrestha H,Ryu T,Seo YW,et al.Hakai,an E3-ligase for E-cadherin, stabilizes  $\delta$ -catenin through Src kinase [J].Cellular Signalling,2017(31):135-145.
- [7] Figueroa A,Kotani H,Toda Y,et al.Novel Roles of Hakai in Cell Proliferation and Oncogenesis [J].Molecular Biology of the Cell,2009,20(15):3533-3542.
- [8] Hui L,Zhang S,Wudu M,et al.CBLL1 is highly expressed in non-small cell lung cancer and promotes cell proliferation and invasion[J].Thoracic Cancer,2019,10(6):1479-1488.
- [9] 张穆,刘君.E-cadherin、 $\alpha$ -catenin 与肿瘤研究进展[J].泰山医学院学报,2018,39(10):1195-1198.
- [10] Castosa R,Martinez-Iglesias O,Roca-Lema D,et al.Hakai overexpression effectively induces tumour progression and metastasis in vivo[J].Scientific Reports,2018,8(1):3466.
- [11] Gong EY,Park E,Lee K.Hakai acts as a coregulator of estrogen receptor alpha in breast cancer cells [J].Cancer Science,2010,101(9):2019-2025.
- [12] 王佳悦,赵博.泛素化在肿瘤治疗方面的应用及展望[J].生命的化学,2017,37(6):879-887.

收稿日期:2020-01-01;修回日期:2020-01-10

编辑/成森