

UbcH7 及 53BP1 基因在结直肠癌中的表达及意义

黄立勇, 窦广健, 吴佳明

【摘要】目的 探讨结直肠癌中泛素交联酶 L3(UbcH7)和 p53 结合蛋白 1(53BP1)的表达及其临床意义。**方法** 选择 2018 年 1 月至 2020 年 1 月收治的 98 例结直肠癌患者为研究对象,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测结直肠癌肿瘤组织和癌旁正常组织 UbcH7 及 53BP1 基因 mRNA 表达。采用免疫组织化学法(SP 法)检测 UbcH7 及 53BP1 基因蛋白表达。采用 Pearson 和 Spearman 法分析结直肠癌肿瘤组织 UbcH7、53BP1 基因 mRNA 及蛋白表达相关性。绘制 ROC 曲线分析结直肠癌肿瘤组织 UbcH7 和 53BP1 基因 mRNA 表达在 3 年生存期中的预测效能。Kaplan-Meier 法分析结直肠癌肿瘤组织 UbcH7 和 53BP1 基因蛋白表达与 3 年生存率的关系。**结果** 结直肠癌肿瘤组织中 UbcH7 基因 mRNA 表达及蛋白阳性率均高于癌旁正常组织,53BP1 基因 mRNA 表达及蛋白阳性率均低于癌旁正常组织(均 $P < 0.05$)。结直肠癌肿瘤组织中 UbcH7 和 53BP1 基因 mRNA 表达、蛋白表达均呈负相关($r = -0.626$ 、 -0.795 , 均 $P < 0.05$)。III+IV 期、N1+N2 淋巴结转移的结直肠癌患者 UbcH7 蛋白表达阳性率、53BP1 蛋白表达阴性率均高于 I+II 期、N0 淋巴结转移的结直肠癌患者(均 $P < 0.05$)。UbcH7 基因 mRNA 预测 3 年生存期的截断值为 1.17, 敏感度为 0.789, 特异度为 0.824, 曲线下面积(AUC)为 0.726; 53BP1 基因 mRNA 预测 3 年生存期的截断值为 0.73, 敏感度为 0.815, 特异度为 0.791, AUC 为 0.804。UbcH7 阳性表达患者 3 年生存率低于阴性表达患者($P < 0.05$), 53BP1 阳性表达患者 3 年生存率高于阴性表达患者($P < 0.05$)。**结论** 结直肠癌肿瘤组织中 UbcH7 表达水平升高, 53BP1 表达水平降低。与 TNM 分期、淋巴结转移及 3 年生存率密切相关, 可作为结直肠癌患者病情及预后评估的标志物。

【关键词】 结直肠癌; 泛素交联酶 L3; p53 结合蛋白 1; 临床价值

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.01.004

【中图分类号】 R735.3⁵ **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)01-0016-05

Expression of UbcH7 and 53BP1 gene in colorectal cancer and its clinical value

HUANG Liyong, DOU Guangjian, WU Jiaming(The First Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314000, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To investigate the expression and clinical significance of ubiquitin crosslinking enzyme L3(UbcH7) and p53-binding protein 1(53BP1) in colorectal cancer. **Methods** Ninety eight patients with colorectal cancer were selected as the study objects. Real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect UbcH7 and 53BP1 genes in colorectal cancer tumor tissues and adjacent normal tissues mRNA expression. The expression of UbcH7 and 53BP1 gene protein was detected by immunohistochemical method (SP method). The mRNA and protein expression correlation of UbcH7 and 53BP1 genes in colorectal tumor tissues were analyzed by Pearson and Spearman methods. ROC curve was drawn to analyze the predictive efficacy of UbcH7 and 53BP1 mRNA expression in colorectal tumors in 3-year survival. Kaplan-Meier method was used to analyze the relationship between the expression of UbcH7 and 53BP1 gene protein in colorectal tumor tissue and the 3-year survival rate. **Results** The mRNA expression and protein positive rate of UbcH7 gene in colorectal tumor tissue were significantly higher than those in adjacent normal tissues, and the mRNA expression and protein positive rate of 53BP1 gene were significantly lower than those in adjacent normal tissues (all $P < 0.05$). The mRNA expressions of UbcH7 and 53BP1 genes in colorectal tumor tissues were negatively correlated ($r = -0.626$, $P < 0.05$). The expression of UbcH7 and 53BP1

基金项目: 嘉兴市科技计划项目(2022AD30043)

作者单位: 314000 浙江省嘉兴, 嘉兴市第一医院

通信作者: 黄立勇, Email: huanglypw@163.com

gene protein in colorectal tumor tissue was negatively correlated ($r = -0.795, P < 0.05$). The positive rate of UbcH7 protein expression and the negative rate of 53BP1 protein expression in colorectal cancer patients with stage III+IV and N1+N2 lymph node metastasis was significantly higher than those in colorectal cancer patients with stage I+II and N0 lymph node metastasis (all $P < 0.05$). The cut-off value, sensitivity, specificity and the area under the curve (AUC) of UbcH7 gene mRNA in colorectal tumor tissue to predict 3-year survival in colorectal cancer patients were 1.17, 0.789, 0.824 and 0.726, respectively. The cut-off value, sensitivity, specificity and AUC of 53BP1 gene mRNA in colorectal tumor tissue to predict 3-year survival in colorectal cancer patients was 0.73, 0.815, 0.791 and 0.804, respectively. The 3-year survival rate of patients with positive UbcH7 expression was lower than that of patients with negative UbcH7 expression ($P < 0.05$). The 3-year survival rate of patients with positive expression of 53BP1 was higher than that of patients with negative expression ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression level of UbcH7 in colorectal tumor tissue is increased, and the expression level of 53BP1 is decreased, which is closely related to TNM stage, lymph node metastasis and 3-year survival rate, and can be used as a marker for evaluating the condition and prognosis of colorectal cancer patients.

【Key words】 Colorectal cancer; Ubiquitin cross-linking enzyme L3; P53-binding protein 1; Clinical value

[Modern Practical Medicine, 2024, 36(1): 16-20]

结直肠癌为消化道最常见的恶性肿瘤,近年来发病率呈逐年上升趋势,严重影响患者生存质量^[1]。结直肠癌早期临床表现不明显,患者就诊时往往处于进展期而失去根治手术机会,预后不佳。研究结直肠癌标志物对早期诊断、及早期治疗具有重要意义^[2]。泛素交联酶 L3 (ubiquitin conjugating enzyme L3, UbcH7) 为 E2 泛素交联酶蛋白的成员之一,可参与多种底物蛋白的泛素化并调节核因子 κ B、糖原合成酶激酶-3 β /p65 (GSK3 β /p65) 等多个信号通路,与恶性肿瘤细胞迁移、侵袭及上皮间质转化相关^[3]。p53 结合蛋白 1 (p53 binding protein, 53BP1) 功能包括调控细胞周期及 DNA 损伤修复等,与结直肠癌中 DNA 双链断裂修复过程有关^[4]。目前 UbcH7 及 53BP1 在结直肠癌发病机制中的作用尚未明确。本研究检测结直肠癌患者 UbcH7 及 53BP1 基因表达,分析其与临床病理因素和预后的关系,并探讨其在结直肠癌发病机制及预后评估中的价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 1 月至 2020 年 1 月嘉兴市第一医院收治的 98 例结直肠癌患者为研究对象。其中男 64 例,女 34 例;年龄 45 ~ 76 岁,平均 (61.1 $\pm$ 8.5) 岁。纳入标准: (1) 经肠镜、术中或术后病理组织学检查确诊,符合《中国结直肠癌诊疗规范》诊断标准; (2) 患者及家属知情并同意本研究; (3) 术中获取的组织标本保存完整,随访资料完整; (4) 首次诊治,既往未行手术、放化疗及靶向药物治疗等。

排除标准: (1) 合并身体其他部位恶性肿瘤者; (2) 合并急性感染性肠炎、肠结核、炎症性肠病等肠道疾病者; (3) 有严重心、肝、肾功能不全及全身感染性疾病、自身免疫性疾病者; (4) 临床资料不完整,合并神经精神疾病,无法配合本研究患者。本研究经嘉兴市第一医院伦理委员会批准 (审批号: LS2018-078)。

1.2 方法

1.2.1 UbcH7 和 53BP1 基因 mRNA 表达检测 收集本组结直肠癌患者癌组织及癌旁正常组织迅速置于冻存管中并投入液氮中保存待测。提取组织总 RNA 纯化并定量,采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 UbcH7 和 53BP1 基因 mRNA 表达,检测仪器为美国 ABI 公司 7500 型,引物序列见表 1。反应体系共 20 μ l: 模板 cDNA (50 ng/ μ l) 2 μ l, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ l, SYBR Green Master Mix (2 $\times$) (江西艾博因生物科技有限公司,货号: IBIO-C141) 10 μ l, ddH₂O 加至 20 μ l。选择 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 UbcH7 和 53BP1 基因 mRNA 相对表达量。

1.2.2 UbcH7 和 53BP1 基因蛋白表达检测 取癌组织和癌旁正常组织样本固定、脱水、石蜡包埋后进行连续切片。采用 SP 法检测 UbcH7 和 53BP1 基因蛋白表达。免疫组化染色结果判定采用半定量法评估 (即染色强度得分 $\times$ 阳性表达率得分), 最终评分 ≤ 3 分视为阴性表达, > 3 分视为阳性表达^[5]。

1.2.3 临床病理资料收集及预后随访 收集患者一般临床资料、肿瘤大小、组织学分级、病理类型、肿瘤

浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期等资料。患者每 3 个月电话或门诊随访 1 次,内容包括生存情况、治疗情况(包括药物治疗等)、生存质量、症状体征改变及影像学检查。随访时间至 2023 年 3 月(随访终点)。统计患者 3 年生存率、预后终点事件(死亡或存活)。

1.3 统计方法 采用 SPSS 25.0 软件对数据进行处理和分析。计数资料采用 χ^2 检验;计量资料以均数±标准差表示,采用配对 *t* 检验。结直肠肿瘤组织 UbcH7 与 53BP1 的 mRNA 及蛋白表达水平的相关性分别采用 Pearson 和 Spearman 相关性分析;ROC 曲线分析结直肠肿瘤组织 UbcH7 和 53BP1 基因 mRNA 表达预测 3 年生存期的效能;结直肠肿瘤组织 UbcH7 和 53BP1 蛋白表达与患者预后的关系采用 Kaplan-Meier 法分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UbcH7 和 53BP1 基因 mRNA 和蛋白表达比较 结直肠肿瘤组织中 UbcH7 基因 mRNA 表达及蛋白阳性率均高于癌旁正常组织,53BP1 基因 mRNA 表达及蛋白阳性率均低于癌旁正常组织(均 $P < 0.05$),见表 2、图 1。

2.2 UbcH7 和 53BP1 基因 mRNA 和蛋白表达的相关性分析 直肠肿瘤组织中 UbcH7 基因 mRNA 和 53BP1 基因 mRNA 表达水平呈负相关($r = -0.626, P < 0.05$),见图 2。结直肠肿瘤组织中 UbcH7 和 53BP1 蛋白表达呈负相关($r = -0.795, P < 0.05$),见表 3。

2.3 UbcH7 和 53BP1 蛋白表达与临床病理特征的关系 不同年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位、分化程

度的结直肠癌患者 UbcH7 和 53BP1 蛋白表达比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。TNM 分期为 III + IV 期、淋巴结转移 N1+N2 的结直肠癌患者 UbcH7 阳性表达、53BP1 阴性表达比例高于 TNM 分期为 I + II 期、淋巴结转移 N0 的结直肠癌患者,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 4。

2.4 UbcH7 和 53BP1 基因 mRNA 表达预测 3 年生存期的效能 UbcH7 基因 mRNA 预测 3 年生存期的截断值为 1.17,敏感度为 0.789,特异度为 0.824, *AUC* 为 0.726。53BP1 基因 mRNA 预测 3 年生存期的截断值为 0.73,敏感度为 0.815,特异度为 0.791, *AUC* 为 0.804,见图 3。

2.5 UbcH7 和 53BP1 蛋白表达与 3 年生存率的关系 采用 Kaplan-Meier 法分析 UbcH7 和 53BP1 蛋白表达与 3 年生存率的关系,结果显示 UbcH7 阳性表达患者 3 年生存率(38/70, 54.29%)低于阴性表达患者(25/28, 89.29%)($\chi^2 = 9.201, P < 0.05$);53BP1 阳性表达患者 3 年生存率(22/24, 91.67%)高于阴性表达患者(41/74, 55.41%)($\chi^2 = 8.859, P < 0.05$),见图 4 ~ 5。

3 讨论

结直肠癌的流行病学在世界不同地区及不同年龄、性别和种族群体间差异较大,这种差异涉及风险因素暴露、遗传易感性和遗传突变、基因表达差异等多种因素^[6]。越来越多的证据表明,UbcH7 的异常表达和许多类型的癌症发生有关^[7]。宋宁宁等^[8]研究结果显示乳腺浸润性导管癌患者 UbcH7 表达上调,且与临床分期及不良预后有关。Tao 等^[9]研究显示,肝细胞癌中 UbcH7 的过度表达通过抑制 GSK3 β /p65 通

表 1 UbcH7、53BP1、GAPDH 引物序列		
基因	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'
UbcH7	TACGATGAGATCTGACCAGT	AGTGACGATCTCTGACAGGGAC
53BP1	GCAGCGACTCTAGAGTGAG	GAGCATACACAGGTGGTAGTAG
GAPDH	CGAATGTGCGAGCTGACGGC	GTGCGCGATGCCATCCTGAGCGC

表 2 结直肠肿瘤组织和癌旁正常组织中 UbcH7、53BP1 表达水平比较					
组别	例数	UbcH7 基因 mRNA	53BP1 基因 mRNA	UbcH7 蛋白阳性率[例(%)]	53BP1 蛋白阳性率[例(%)]
正常组织	98	1.02±0.22	1.01±0.23	11(11.22)	79(80.61)
肿瘤组织	98	1.28±0.30	0.67±0.16	70(71.43)	24(24.49)
<i>t</i> (χ^2)值		6.919	12.013	(73.245)	(61.896)
<i>P</i> 值		< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

表 3 UbcH7 和 53BP1 蛋白表达的相关性		
组别	UbcH7 阴性表达 (<i>n</i> =28)	UbcH7 阳性表达 (<i>n</i> =70)
53BP1 阴性表达(<i>n</i> =74)	6	68
53BP1 阳性表达(<i>n</i> =24)	22	2

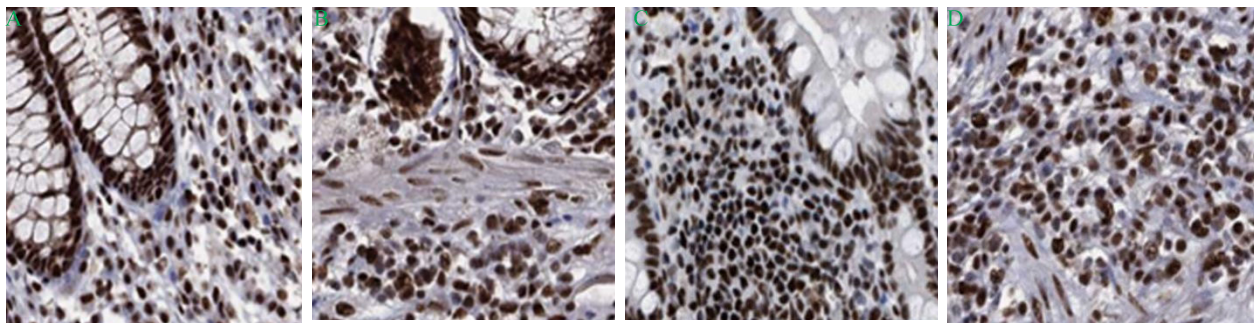
路增强细胞凋亡逃逸。本研究发现结直肠患者肿瘤组织中 UbcH7 的 mRNA 和蛋白表达水平显著高于癌旁正常组织,推测 UbcH7 在结直肠癌中可能发挥促癌基因作用。

维持基因组的完整性和稳定性是细胞内 DNA 损伤修复反应的关键责任,此种基于激酶的信号通路的任何环节被破坏均会导致各种疾病的发展,尤其是癌症。53BP1 作为细胞内 DNA 损伤修复反应的主要介质之一,在 DNA 双链断裂修复途径的选择

中发挥着关键作用^[10]。Huang 等^[11]研究结果表明,53BP1 缺失抑制了盐酸依替尼对结直肠癌细胞的放射增敏作用。本研究结果显示,结直肠肿瘤组织中 53BP1 基因 mRNA 及蛋白表达水平均显著降低,推测 53BP1 的减少或缺失使得其无法迅速高效的集中

表 4 UbcH7 和 53BP1 蛋白表达与患者临床病理特征的关系

指标	例数	UbcH7 阴性(n=28)	UbcH7 阳性(n=70)	χ^2 值	P 值	53BP1 阴性(n=74)	53BP1 阳性(n=24)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)				0.204	> 0.05			0.018	> 0.05
< 60	42	13(46.43)	29(41.43)			32(43.24)	10(41.67)		
≥60	56	15(53.57)	41(58.57)			42(56.76)	14(58.33)		
性别				0.365	> 0.05			0.682	> 0.05
男	64	17(60.71)	47(67.14)			50(67.57)	14(58.33)		
女	34	11(39.29)	23(32.86)			24(32.43)	10(41.67)		
肿瘤大小(cm)				0.340	> 0.05			0.870	> 0.05
< 5	57	15(53.57)	42(60.00)			45(60.81)	12(50.00)		
≥5	41	13(46.43)	28(40.00)			29(39.19)	12(50.00)		
TNM 分期				10.273	< 0.05			14.148	< 0.05
I+II	45	20(71.43)	25(35.71)			26(35.14)	19(79.17)		
III+IV	53	8(28.57)	45(64.29)			48(64.86)	5(20.83)		
淋巴结转移				4.969	< 0.05			5.369	< 0.05
N0	60	22(78.57)	38(54.29)			40(54.05)	20(83.33)		
N1+N2	38	6(21.43)	32(45.71)			34(45.95)	4(16.67)		
肿瘤部位				0.018	> 0.05			0.026	> 0.05
结肠	64	18(64.29)	46(65.71)			48(64.86)	16(66.67)		
直肠	34	10(35.71)	24(34.29)			26(35.14)	8(33.33)		
分化程度				0.004	> 0.05			0.070	> 0.05
中/高分化	59	17(60.71)	42(60.00)			44(59.46)	15(62.50)		
低分化	39	11(39.29)	28(40.00)			30(40.54)	9(37.50)		



注:A 为癌旁正常组织中 UbcH7 蛋白阳性表达;B 为结直肠肿瘤组织中 UbcH7 蛋白阳性表达;C 为癌旁正常组织中 53BP1 蛋白阳性表达;D 为结直肠肿瘤组织中 53BP1 蛋白阳性表达

图 1 UbcH7 和 53BP1 蛋白在结直肠肿瘤组织和癌旁正常组织中的阳性表达(SP 法,×400)

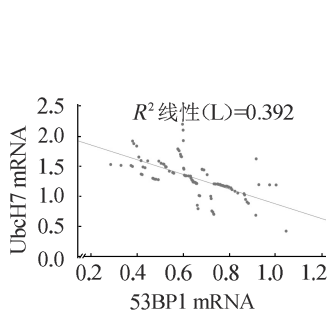


图 2 UbcH7 基因 mRNA 和 53BP1 基因 mRNA 表达水平的相关性

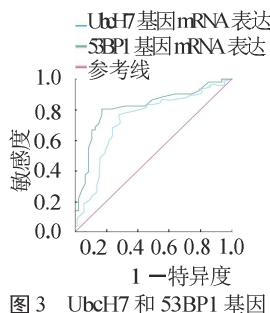


图 3 UbcH7 和 53BP1 基因

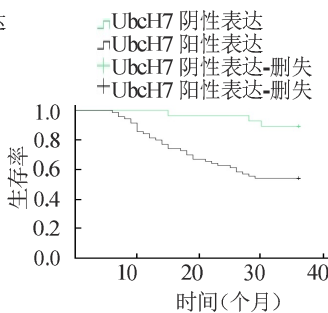


图 4 UbcH7 蛋白表达与患者 3 年生存率的关系

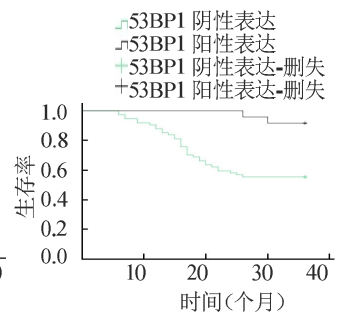


图 5 53BP1 蛋白表达与患者 3 年生存率的关系

在 DNA 双链断裂损伤部位并参与其损伤修复反应,进而导致基因组完整性和稳定性被破坏,无法有效抑制结直肠癌的病理进展。泛素-蛋白酶体系统是一种主要的蛋白质降解途径,它维持细胞中的蛋白质稳态^[12]。研究显示,UbcH7 参与了 53BP1 的蛋白酶体降解途径^[13]。本研究相关性结果显示,UbcH7 和 53BP1 的 mRNA 和蛋白表达水平均呈显著相关性,且二者表达水平与 TNM 分期和淋巴结转移有关。据此推测,UbcH7 表达上调后可能通过相关通路及泛素化修饰作用下调 53BP1 的表达水平,进而影响 DNA 损伤修复过程,正常细胞的增殖行为被抑制而结直肠癌细胞的增殖能力增强,为结直肠癌的恶性转移奠定基础,推动结直肠癌细胞的恶性生物学行为进展。此外,本研究结果中,结直肠肿瘤组织 UbcH7 阳性表达、53BP1 阴性表达患者 3 年生存率较低。Huang 等^[14]研究结果显示,与 53BP1 低表达相比,53BP1 的高表达有效地提高了直肠癌患者 3 年的生存率,本研究结果与其部分一致。推测 UbcH7 表达水平升高和 53BP1 表达水平降低不利于结直肠癌患者预后,其可能通过相互影响共同促进结直肠癌细胞的转移、侵袭等,进而推动结直肠癌的病理进展。

综上所述,结直肠肿瘤组织 UbcH7 表达水平升高,53BP1 表达水平降低,二者表达水平呈负相关且与 TNM 分期、淋巴结转移、3 年生存率有关,可能共同参与结直肠癌的病理进展。UbcH7 高表达、53BP1 低表达可能与结直肠癌患者死亡密切相关,可能是结直肠癌新的预后不良肿瘤标志物。值得注意的是,本研究为单中心研究且临床病例较少,UbcH7 和 53BP1 基因表达在结直肠癌中的临床价值有待于进一步研究证实。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 黄立勇:实验操作、论文撰写;黄立勇、窦广健:数据整理、统计学分析;吴佳明:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

[1] BAIDOUN F, ELSHIWY K, ELKERAIE Y, et al. Colorectal Can-

- cer Epidemiology: Recent Trends and Impact on Outcomes[J]. *Curr Drug Targets*, 2021,22(9):998-1009.
- [2] CHAN S, LIANG J Q. Advances in tests for colorectal cancer screening and diagnosis[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2022,22(4):449-460.
- [3] ZHANG X, HUO C, LIU Y, et al. Mechanism and Disease Association With a Ubiquitin Conjugating E2 Enzyme: UBE2L3[J]. *Front Immunol*, 2022,13:793610.
- [4] YANG C, ZHANG Y, SEGAR N, et al. Nuclear IGF1R interacts with NuMA and regulates 53BP1 dependent DNA double strand break repair in colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2021,46(2):168.
- [5] 苏博, 闫振宇, 王欣欣, 等. 结直肠癌患者癌组织中 IL-23 表达水平与预后的相关性研究[J]. *中华全科医学*, 2022,20(8):1295-1298, 1371.
- [6] SONG M. Global epidemiology and prevention of colorectal cancer[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022,7(7):588-590.
- [7] MA X, QI W, YANG F, et al. UBE2L3 promotes lung adenocarcinoma invasion and metastasis through the GSK-3 β /Snail signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2022,14(7):4549-4561.
- [8] 宋宁宁, 王丹丹. 乳腺浸润性导管癌组织中 PDGF-BB、UbcH7、TMEM16A 的表达水平及意义[J]. *中国卫生工程学*, 2021,20(6):1023-1026,1031.
- [9] TAO N N, ZHANG Z Z, REN J H, et al. Overexpression of ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3 in hepatocellular carcinoma potentiates apoptosis evasion by inhibiting the GSK3 β /p65 pathway[J]. *Cancer Lett*, 2020,481:1-14.
- [10] RASSE E, WILLAUME S, BERTRAND P. 53BP1: Keeping It under Control, Even at a Distance from DNA Damage[J]. *Genes (Basel)*, 2022,13(12):2390.
- [11] HUANG A, YAO J, LIU T, et al. 53BP1 loss suppresses the radiosensitizing effect of icotinib hydrochloride in colorectal cancer cells[J]. *Int J Radiat Biol*, 2018,94(4):327-334.
- [12] DUBEY A R, KINGER S, JAGTAP Y A, et al. Proteasome Based Molecular Strategies Against Improper Cellular Proliferation[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2021,55(S2):120-143.
- [13] MAYCA P F, TANG J, BONK K W, et al. Regulatory cross-talk determines the cellular levels of 53BP1 protein, a critical factor in DNA repair[J]. *J Biol Chem*, 2017,292(14):5992-6003.
- [14] HUANG A, XIAO Y, PENG C, et al. 53BP1 expression and immunoscore are associated with the efficacy of neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer[J]. *Strahlenther Onkol*, 2020,196(5):465-473.

收稿日期:2023-07-18

(本文编辑:吴迪汉)