

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2024.09.015

论著·临床

# 结直肠癌中 TUBB3、CCT8 表达与上皮间质转化及预后的关系

马云云,徐斌,沙巴义丁·吐尔逊,王东宏,刘洁

基金项目:新疆少数民族科技人才特殊培养计划科研项目(2021D03016)

作者单位:830000 乌鲁木齐,新疆医科大学附属中医医院肛肠科

通信作者:徐斌,E-mail:871704368@qq.com



**【摘要】**目的 探讨 3 型  $\beta$  微管蛋白(TUBB3)、含 TCP-1 的伴侣蛋白 8(CCT8)在结直肠癌(CRC)组织中的表达及与上皮间质转化(EMT)和预后的相关性。方法 回顾性选取 2018 年 1 月—2020 年 1 月新疆医科大学附属中医医院肛肠科诊治 CRC 患者 112 例。采用实时荧光定量 PCR 检测癌组织和癌旁组织 TUBB3、CCT8 mRNA 及 EMT 相关指标 N-钙黏素(N-cad)、E-钙黏素(E-cad)、转录因子 TWIST mRNA 的表达;免疫组织化学法检测 TUBB3、CCT8 蛋白水平;比较不同临床病理特征 CRC 中 TUBB3、CCT8 蛋白差异;Kaplan-Meier 曲线及 Cox 回归分析 TUBB3、CCT8 蛋白对 CRC 患者预后的影响。结果 CRC 癌组织 TUBB3、CCT8、N-cad、TWIST mRNA 表达高于癌旁组织,而 E-cad mRNA 低于癌旁组织( $t=35.030, 38.353, 32.172, 32.405, 18.928, P$  均 $<0.001$ );CRC 癌组织中 TUBB3、CCT8 蛋白阳性率为 91.07% (102/112)、94.64% (106/112),高于癌旁组织 7.14% (8/112)、6.25% (7/112)( $\chi^2=157.836, 175.032, P$  均 $<0.001$ );CRC 中 TUBB3 mRNA 与 CCT8 mRNA 表达呈正相关( $r=0.647, P<0.001$ ),CRC 中 TUBB3、CCT8 mRNA 表达与 N-cad、TWIST mRNA 表达呈正相关( $r=0.667, 0.621, 0.703, 0.686, P$  均 $<0.001$ ),与 E-cad mRNA 表达呈负相关( $r=-0.641, -0.587, P$  均 $<0.001$ );低分化、TNM 分期 III 期、淋巴结转移的 CRC 中 TUBB3、CCT8 mRNA 表达高于高中分化、I~II 期、无淋巴结转移( $t=20.327, 20.455, 21.101, 15.121, 14.985, 15.759, P$  均 $<0.001$ );CRC 患者 3 年 OS TUBB3 mRNA 高表达组为 43.33% (26/60),低于低表达组的 70.97% (44/62)(Log-rank  $\chi^2=8.792, P=0.003$ ),CCT8 mRNA 高表达组患者 3 年 OS 为 42.86% (27/63),低于低表达组的 72.88% (43/59)(Log-rank  $\chi^2=10.970, P<0.001$ );TUBB3、CCT8 mRNA 升高及 TNM 分期 III 期、有淋巴结转移、低分化是 CRC 预后的独立危险因素[ $HR(95\% CI)=1.334(1.103 \sim 1.613), 1.322(1.108 \sim 1.577), 1.435(1.161 \sim 1.773), 1.368(1.115 \sim 1.677), 1.315(1.054 \sim 1.641)$ ]。结论 CRC 中 TUBB3、CCT8 表达上调,两者可通过促进 EMT,促进 CRC 的恶性进展,是新的 CRC 预后评估标志物。

**【关键词】** 结直肠癌;3 型  $\beta$  微管蛋白;含 TCP-1 的伴侣蛋白 8;上皮间质转化;预后**【中图分类号】** R735.3<sup>+</sup>4**【文献标识码】** A

**The relationship between the expression of TUBB3, CCT8 and epithelial mesenchymal transition and prognosis in colorectal cancer** Ma Yunyun, Xu Bin, Sabayddin · Turson, Wang Donghong, Liu Jie. Department of Proctology, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang, Urumqi 830000, China  
Funding program: Xinjiang Minority Science and Technology Talent Special Training Program Research Project (2021D03016)  
Corresponding author: Xu Bin, E-mail: 871704368@qq.com

**【Abstract】 Objective** To explore type 3  $\beta$  tubulin (TUBB3) and chaperone 8 containing TCP 1 (CCT8) in colorectal cancer (CRC) and their correlation with epithelial mesenchymal transition (EMT) and prognostic significance. **Methods** From January 2018 to January 2020, 112 patients with CRC were treated in the Department of Colorectal Surgery at the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University were selected. Real time fluorescent quantitative PCR was used to detect TUBB3, CCT8 mRNA and EMT related indicators N cadherin (E cad), E cadherin (n cad), transcription factor twist mRNA expression. The expressions of TUBB3 and CCT8 proteins were detected by immunohistochemistry. The protein expressions of TUBB3 and CCT8 in CRC with different clinicopathological features were compared. Kaplan Meier curve and Cox regression analysis were used to analyze the effect of TUBB3 and CCT8 protein on the prognosis of CRC patients. **Results** The expressions of TUBB3 mRNA, CCT8 mRNA, N cad mRNA and TWIST mRNA in CRC tissues were

higher than those in adjacent tissues, while E cad mRNA was lower than that in adjacent tissues ( $t/P = 35.030, 38.353, 32.172, 32.405, 18.928$ , all  $P < 0.001$ ). The positive rates of TUBB3 and CCT8 proteins in CRC tissues were 91.07% (102/112), 94.64% (106/112), which were higher than those in adjacent tissues [7.14% (8/112), 6.25% (7/112)], and the difference was statistically significant ( $\chi^2 = 157.836, 175.032, P < 0.001$ ). There was a positive correlation between tubb3 mRNA and cct8 mRNA expression in CRC ( $r = 0.647, P < 0.001$ ). The expression of TUBB3 mRNA and CCT8 mRNA in CRC was positively correlated with the expression of N-cad mRNA and TWIST mRNA ( $r = 0.667, 0.621, 0.703, 0.686, P < 0.001$ ), and negatively correlated with the expression of E cad mRNA ( $r = -0.641, -0.587, P < 0.001$ ). The expressions of TUBB3 mRNA and CCT8 mRNA in CRC with TNM stage III, low differentiation and lymph node metastasis were significantly higher than those in CRC with stage I ~ II, high differentiation and no lymph node metastasis ( $t/P = 20.327, 20.455, 21.101, 15.121, 14.985, 15.759$ , all  $P < 0.001$ ). The 3 year OS of CRC patients was 43.33% (26/60) in the TUBB3 mRNA high expression group, which was lower than 70.97% (44/62) in the low expression group (Log rank  $\chi^2 = 8.792, P = 0.003$ ), while the 3 year OS of CCT8 mRNA high expression group was 42.86% (27/63), which was lower than 72.88% (43/59) in the low expression group (Log rank  $\chi^2 = 10.970, P < 0.001$ ). TUBB3 mRNA increased, CCT8 mRNA increased, TNM stage III, poor differentiation and lymph node metastasis were independent risk factors for prognosis of CRC [HR(95% CI) = 1.334 (1.103 - 1.613), 1.322(1.108 - 1.577), 1.435 (1.161 - 1.773), 1.368 (1.115 - 1.677), 1.315 (1.054 - 1.641)]. **Conclusion** TUBB3 and CCT8 are up-regulated in CRC, which can promote the malignant progression of CRC by promoting EMT, and are new markers for the prognosis of CRC.

**[Key words]** Colorectal cancer; Type 3  $\beta$  Tubulin; Chaperone 8 containing TCP-1; Epithelial mesenchymal transition; Prognosis

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是全球常见的恶性肿瘤, 2020 年全球新发 180 万例, 死亡 90 万例<sup>[1]</sup>。近年来新的手术方案及放疗等的发展改善 CRC 患者的临床治疗效果, 但患者术后复发和转移的风险仍然较高, 远期预后较差<sup>[2]</sup>。3 型  $\beta$  微管蛋白 (tubulin beta 3 class III, TUBB3) 属于  $\beta$ -微管蛋白家族 III 类成员, 与  $\alpha$  或  $\beta$  形成异源二聚体并组装形成微管, 参与神经发生和轴突的引导和维持<sup>[3]</sup>。研究表明, 膀胱癌<sup>[4]</sup>、前列腺癌<sup>[5]</sup>等肿瘤中 TUBB3 的表达上调能够激活丝裂原活化的蛋白激酶途径, 促进肿瘤增殖、侵袭及化疗耐药性形成。含 TCP-1 的伴侣蛋白 8 (chaperonin containing TCP1 subunit 8, CCT8) 是 CCT 伴侣蛋白的  $\theta$  亚基, 广泛表达于真核细胞中, 参与新合成蛋白质的转运和组装<sup>[6]</sup>。研究表明, 肺癌中 CCT8 的过度表达与 AKT 相互作用并激活 AKT, 促进了癌细胞迁移和肿瘤转移<sup>[7]</sup>。上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是 CRC 肿瘤细胞获得侵袭和转移潜能的重要机制<sup>[8]</sup>。但目前 CRC 中 TUBB3、CCT8 表达及两者与 EMT 的关系尚不清楚。本研究旨在分析 CRC 中 TUBB3、CCT8 表达, 探讨两者与 EMT 的关系及临床意义, 报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料 回顾性选取 2018 年 1 月—2020 年 1 月新疆医科大学附属中医医院肛肠科诊治 CRC 患者 112 例, 男 70 例, 女 42 例; 年龄 24 ~ 80 (63.28  $\pm$  8.51) 岁; 均无 CRC 家族史, 无明显诱因; 高血压史 30 例, 糖尿病史 14 例; 病理类型: 腺癌 66 例, 黏液腺癌及其他

46 例; 肿瘤位置: 结肠 50 例, 直肠 62 例; 肿瘤分化程度: 高中分化 71 例, 低分化 41 例; TNM 分期: I + II 期 74 例, III 期 38 例; 有淋巴结转移 38 例, 无淋巴结转移 74 例。本研究已获得医院伦理委员会审核批准 (2023 伦审 132 号), 患者或家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1) 纳入标准: ①均接受 CRC 根治术, 术后病理确诊为 CRC; ②首次诊治, 患者入院前未接受任何肿瘤相关治疗; ③临床病理特征资料完整。(2) 排除标准: ①合并血液系统疾病、消化系统疾病及免疫系统缺陷类疾病; ②合并其他器官原发恶性肿瘤; ③单一肿瘤、多发肿瘤或者转移类型判断暂不明确者; ④失访患者。

## 1.3 观测指标与方法

1.3.1 实时荧光定量 PCR 检测 TUBB3、CCT8 mRNA 及 EMT 相关指标 mRNA 表达: 将手术切除的癌组织及癌旁组织 (距癌灶  $\geq 5$  cm) 从液氮中取出, 称取 50 mg, 加入 RIPA 裂解液 500  $\mu$ l 中剪碎, 组织匀浆器匀浆, 4  $^{\circ}$ C 离心留取上清, 采用 Trizol 法提取组织 RNA。微量分光光度计 (美国赛默飞公司, 型号 Narodrop2000) 测定 RNA 浓度及纯度, OD260/OD280 = 1.8 ~ 2.1。提取得到的 RNA 进行逆转录获得 cDNA, 并行实时荧光定量 PCR 反应 (仪器购自美国 ABI 公司, 型号 ABI7500)。引物由 Primer 3.0 软件设计并由华大公司合成, 序列见表 1。总体系体积共 10  $\mu$ l; cDNA 1  $\mu$ l, 纯水 3.2  $\mu$ l, SYBR qPCR Master Mix 5  $\mu$ l, 上游引物 (10  $\mu$ mol/L) 0.4  $\mu$ l, 下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 0.4  $\mu$ l。上机反应按照 SYBR Premix Ex Taq TMI 试剂盒说明

(日本 TAKARA 公司,货号 RR820B)进行上机参数确定。PCR 程序为:95℃ 5 min;95℃ 30 s,60℃ 34 s,72℃ 34 s,40 个循环。以 GAPDH 为内参,2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算目的基因 TUBB3、CCT8 及 EMT 相关指标 E-钙黏素(E-cadherin, E-cad)、N-钙黏素(N-cadherin, N-cad)、转录因子 TWIST mRNA 相对表达量。

表 1 TUBB3、CCT8 及 EMT 相关指标、转录因子 TWIST 引物序列

Tab.1 TUBB3, CCT8, EMT related indicators, transcription factor TWIST primer sequences

基因	上游引物	下游引物
TUBB3 mRNA	5'-GGCCAAGGGTCACT-ACACG-3'	5'-GCAGTGGCAGTTTC-ACACTC-3'
CCT8 mRNA	5'-AGGAGGGAGCGAAA-CACITTT-3'	5'-GTTGCTGCATCGTTG-TCACA-3'
E-cad mRNA	5'-AGTTGGAGATGGCA-CAAACITTT-3'	5'-TGGAGGTACGAAGT-AGAGATGAG-3'
N-cad mRNA	5'-TTTTTCCTGATTCCG-GCCATT-3'	5'-AACCATGCCATGCA-ATACTGA-3'
TWIST mRNA	5'-CCTTCGTGTTCTGC-TGAC-3'	5'-GGCCCCAGAGATTG-GATGG-3'
GAPDH mRNA	5'-GGGCTTAGCAATATC-TGGGAAGC-3'	5'-CCAAAGGGGCAAG-CAAAGAGA-3'

1.3.2 免疫组化检测 TUBB3 蛋白、CCT8 蛋白:留取癌组织和癌旁组织(距肿瘤边缘 > 5 cm),4% 中性福尔马林固定 12 h,常规石蜡包埋,切片层厚 3 μm,按照常规免疫组织化学步骤(两步法免疫组化染色试剂盒购自北京中杉金桥生物科技公司,货号 PV9000),包括烤片、二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、高压法抗原热修复、过氧化氢去除内源性过氧化物酶,TUBB3、CCT8 一抗稀释液(1:200,TUBB3 多克隆抗体购自武汉华美生物公司,货号 CSB-PA03874D0Rb,CCT8 单克隆抗体购自美国 Biotech 公司,货号 RD83086A),4℃ 过夜,二抗 37℃ 孵育 2 h,DAB 显色,苏木素复染,脱水透明后树脂封片。采用日本奥林巴斯公司 DX31 显微镜观察染色情况,利用 Image J 软件 IHC Profiler 插件对所有样本的染色情况进行自动化评分,将阳性细胞的平均灰度值(染色强度)和阳性面积百分比(染色面积)共同作为测量指标<sup>[9]</sup>,分为强阳性(灰度值 181~236),中阳性(灰度值 121~180),弱阳性(灰度值 61~120)和阴性(灰度值 0~60)。将强阳、中阳和弱阳性者计为阳性,阴性者计为阴性。

1.3.3 随访:所有 CRC 患者出院后进行门诊随访,每 3~6 个月 1 次,随访截止日期为 2023 年 2 月。记录门诊检查资料:血清标志物、B 型超声及 CT 等检查,评

估 CRC 肿瘤复发进展和患者的生存情况。随访终点为随访时间结束或患者死亡。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 25.0 软件分析统计数据。正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验;计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;Pearson 相关分析各指标间的相关性;Kaplan-Meier 生存曲线分析 TUBB3、CCT8 mRNA 表达对 CRC 生存的影响;Cox 回归分析 CRC 预后影响因素。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 CRC 癌组织和癌旁组织中 TUBB3、CCT8 mRNA 及 EMT 相关指标表达比较 CRC 癌组织 TUBB3、CCT8、N-cad、TWIST mRNA 表达高于癌旁组织,而 E-cad mRNA 低于癌旁组织,差异均有统计学意义(*P* < 0.01),见表 2。

表 2 CRC 癌组织和癌旁组织中 TUBB3、CCT8 mRNA 及 EMT 相关指标表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Comparison of TUBB3, CCT8 mRNA and EMT related markers expression in CRC cancer tissue and adjacent tissues

项 目	癌旁组织( <i>n</i> = 112)	癌组织( <i>n</i> = 112)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
TUBB3 mRNA	1.02 ± 0.24	2.65 ± 0.43	35.030	<0.001
CCT8 mRNA	0.91 ± 0.22	2.47 ± 0.37	38.353	<0.001
E-cad mRNA	2.04 ± 0.39	1.16 ± 0.30	18.928	<0.001
N-cad mRNA	0.80 ± 0.18	2.33 ± 0.47	32.172	<0.001
TWIST mRNA	1.19 ± 0.33	3.05 ± 0.51	32.405	<0.001

2.2 CRC 组织中 TUBB3、CCT8 蛋白表达比较 TUBB3、CCT8 蛋白主要位于细胞浆和细胞膜。CRC 癌组织中 TUBB3、CCT8 蛋白阳性率为 91.07% (102/112)、94.64% (106/112),高于癌旁组织 7.14% (8/112)、6.25% (7/112),差异具有统计学意义( $\chi^2 = 157.836, 175.032, P$  均 < 0.001),见图 1。

2.3 TUBB3、CCT8 与 EMT 相关指标的相关性分析 CRC 中 TUBB3 mRNA 与 CCT8 mRNA 表达呈正相关( $r = 0.647, P < 0.001$ )。CRC 中 TUBB3、CCT8 mRNA 表达与 N-cad、TWIST mRNA 表达呈正相关( $r = 0.667, 0.621, 0.703, 0.686, P$  均 < 0.001),与 E-cad mRNA 表达呈负相关( $r = -0.641, -0.587, P$  均 < 0.001)。

2.4 TUBB3、CCT8 mRNA 表达在不同 CRC 临床病理特征中的差异比较 低分化、TNM 分期 III 期、淋巴结转移的 CRC 中 TUBB3、CCT8 mRNA 表达高于高中分化、I~II 期、无淋巴结转移者,差异均有统计学意义(*P* < 0.01),见表 3。

表 3 TUBB3、CCT8 mRNA 表达在不同 CRC 临床病理特征中的差异比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 Comparison of differences in TUBB3 and CCT8 mRNA expression in different clinical pathological characteristics of CRC

项目	例数	TUBB3 mRNA	t 值	P 值	CCT8 mRNA	t 值	P 值	
性别	男	70	2.69 ± 0.46	1.295	0.198	2.51 ± 0.35	1.387	0.168
	女	42	2.58 ± 0.39			2.41 ± 0.40		
年龄	<60 岁	44	2.60 ± 0.40	0.931	0.354	2.50 ± 0.35	1.687	0.094
	≥60 岁	68	2.68 ± 0.47			2.68 ± 0.40		
病理类型	腺癌	66	2.62 ± 0.44	1.000	0.319	2.44 ± 0.42	1.080	0.283
	黏液腺癌及其他	46	2.70 ± 0.38			2.52 ± 0.33		
肿瘤位置	结肠	50	2.67 ± 0.37	0.498	0.619	2.55 ± 0.34	1.936	0.055
	直肠	62	2.63 ± 0.46			2.41 ± 0.41		
肿瘤分化程度	高中分化	71	2.08 ± 0.33	20.327	<0.001	2.04 ± 0.30	15.121	<0.001
	低分化	41	3.64 ± 0.48			3.21 ± 0.52		
TNM 分期	I ~ II 期	74	2.10 ± 0.34	20.455	<0.001	2.08 ± 0.31	14.985	<0.001
	III 期	38	3.72 ± 0.49			3.23 ± 0.50		
淋巴结转移	有	38	3.68 ± 0.48	21.101	<0.001	3.29 ± 0.51	15.759	<0.001
	无	74	2.12 ± 0.30			2.05 ± 0.32		

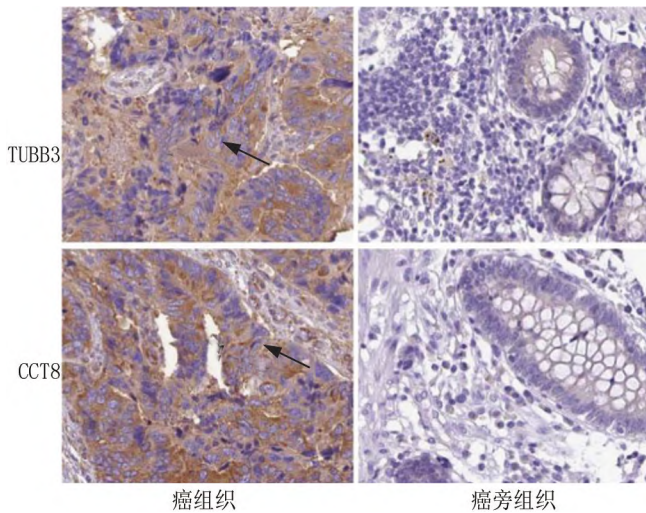


图 1 CRC 癌组织和癌旁组织中 TUBB3、CCT8 蛋白表达比较 (免疫组化, ×200)

Fig. 1 Comparison of TUBB3 and CCT8 protein expression in CRC cancer tissue and adjacent tissues (immunohistochemistry, × 200)

2.5 TUBB3、CCT8 mRNA 表达与 CRC 预后的关系  
随访中,死亡 42 例,3 年总生存率(overall survival, OS) 为 62.50% (70/112)。TUBB3 mRNA 高( $\geq 2.65$ )、低表达( $< 2.65$ )组 CRC 患者 3 年 OS 分别为 43.33% (26/60)、70.97% (44/62), 组间比较差异有统计学意义 ( $\text{Log-rank } \chi^2 = 8.792, P = 0.003$ )。CCT8 mRNA 高( $\geq 2.47$ )、低表达( $< 2.47$ )组 3 年 OS 分别为 42.86% (27/63)、72.88% (43/59), 组间比较差异具有统计学意义 ( $\text{Log-rank } \chi^2 = 10.970, P < 0.001$ ), 见图 2。

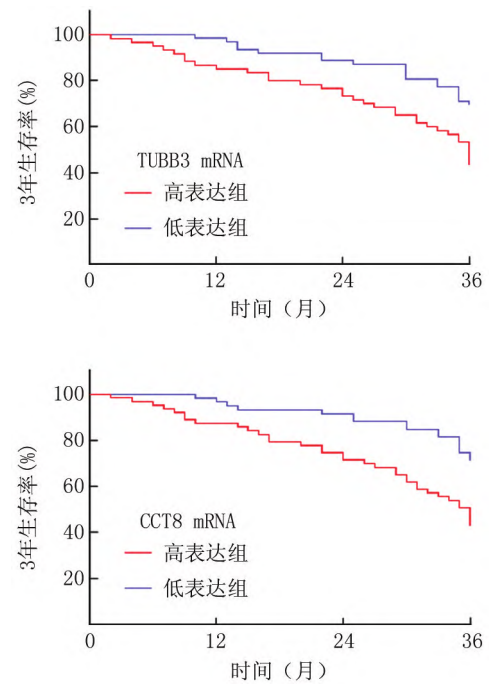


图 2 K-M 曲线分析 TUBB3、CCT8 mRNA 表达对 CRC 预后的影响

Fig. 2 K-M curve analysis of the impact of TUBB3 and CCT8 mRNA expression on CRC prognosis

2.6 CRC 预后影响的多因素 Cox 回归分析 以 CRC 预后为因变量(1 = 死亡, 0 = 生存), 以上述结果中  $P < 0.05$  项目为自变量进行多因素 Cox 回归分析, 结果显示: TUBB3、CCT8 mRNA 升高, TNM 分期 III 期、有淋巴结转移、低分化是 CRC 预后的独立危险因素 ( $P < 0.01$ ), 见表 4。

表 4 CRC 预后影响的多因素 Cox 回归分析

Tab. 4 Multivariate Cox regression analysis of the prognostic impact of CRC

因素	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
TNM III 期	0.361	0.108	11.173	<0.001	1.435	1.161 ~ 1.773
有淋巴结转移	0.313	0.104	9.058	<0.001	1.368	1.115 ~ 1.677
肿瘤分化程度低	0.274	0.113	5.879	<0.001	1.315	1.054 ~ 1.641
TUBB3 mRNA 高	0.288	0.097	8.815	<0.001	1.334	1.103 ~ 1.613
CCT8 mRNA 高	0.279	0.090	9.610	<0.001	1.322	1.108 ~ 1.577

### 3 讨论

我国 CRC 呈高发状态,每年新发病例达 37.6 万例,死亡约 19.1 万例<sup>[10]</sup>。目前 CRC 的治疗包括手术、放化疗、免疫治疗、靶向治疗等。由美国癌症联合会提出的 TNM 分期被认为是预测结直肠癌复发和预后的有效方法。但 TNM 分期只考虑了肿瘤生长部位及转移位置,并没有考虑肿瘤微环境的改变,在临床上相同 TNM 分期的患者在生存时间上存在较大差异性,因而对 CRC 患者预后的评价是有限的<sup>[11]</sup>。

TUBB3 是组成微管的蛋白之一,其作为细胞骨架和纺锤体的主要成分,能够促进细胞有丝分裂、信号传导等生物学作用。研究表明,TUBB3 能够激活 AKT/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路,促进胆囊癌细胞的抗凋亡,促进胆囊癌的发生<sup>[12]</sup>。本研究 CRC 中 TUBB3 表达升高,与既往学者在 CRC 肿瘤细胞中 TUBB3 表达升高的研究结果一致<sup>[13]</sup>,本研究进一步在组织水平证实 TUBB3 表达上调,表明 TUBB3 与 CRC 的发生关系密切。CRC 中 TUBB3 受非编码 RNA 的调控。研究发现,长链非编码 RNA RPPH1 在 CRC 组织中显著上调,其通过与 TUBB3 蛋白相互作用,抑制 TUBB3 的泛素化—蛋白酶体途径降解,导致 TUBB3 的蛋白表达升高,促进肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[13]</sup>。本研究中,TUBB3 表达与 CRC 不良临床病理特征及 EMT 指标有关,提示 CRC 中 TUBB3 可能是通过促进肿瘤细胞的 EMT 过程,促进肿瘤的进展。TUBB3 的表达上调能够增强肿瘤对微环境应激(低氧水平、营养供应不足等)的适应性反应,促进肿瘤的存活和增殖。有研究表明,外泌体中非编码 RNA 能够上调 TUBB3 的表达,诱导 CRC 癌细胞发生 EMT,促进巨噬细胞 M2 型极化,导致肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[13]</sup>。研究表明,TUBB3 能够促进结肠癌 HT-29 和 LS180 细胞系中转录因子 Snail、TWIST 等的表达,抑制上皮性标志物 E-cad 的表达,上调间质性标志物 N-cad 的表达,增强结肠癌细胞的侵袭转移能力<sup>[14]</sup>。此外,TUBB3 转录后异常磷酸化或糖基化修饰可以调节其在肿瘤细胞

中的定位,影响细胞运动和耐药性。研究表明,前列腺癌中 TUBB3 蛋白 Y340 位点能被 SRC 激酶磷酸化激活,能够增加 TUBB3 蛋白的稳定性和胞浆内亚细胞定位,促进细胞有丝分裂,维持纺锤体稳定性,促进肿瘤转移和耐药的发生<sup>[15]</sup>。本研究发现,TUBB3 能增加 CRC 患者不良预后的风险。分析其原因,TUBB3 的表达上调能够通过增加肿瘤细胞干性形成,增加细胞对化疗的抵抗性,降低 CRC 患者术后辅助治疗的有效性,增加术后肿瘤复发转移的风险,导致不良预后。研究表明,TUBB3 能够抑制 PTEN 的表达,增强肿瘤细胞对多西他赛化疗的耐药性,TUBB3 基因敲除能够重新恢复耐药癌细胞对多西他赛的敏感性<sup>[16]</sup>。

CCT8 是真核细胞的 II 型伴侣蛋白,参与构成分子伴侣蛋白 TCP1 复合物,协助端粒的维持,促进细胞骨架蛋白微管蛋白、肌动蛋白的折叠和组装,维持蛋白质稳态和完整性<sup>[17]</sup>。研究表明,肝癌中 CCT8 可上调增殖细胞核抗原、细胞周期蛋白 E 及周期蛋白依赖性激酶 2 的表达水平,加速细胞周期由 G1 期向 S 期的转变,促进癌细胞增殖<sup>[18]</sup>。本研究 CRC 中 CCT8 表达升高,提示 CCT8 参与 CRC 的肿瘤发生过程。笔者分析,CCT8 的编码基因位于染色体 21q21.3,该基因位点是一种常见于消化道肿瘤及胃腺癌的扩增子,基因的扩增能够显著上调肿瘤中 CCT8 的表达。另外,CCT8 作为一种 II 型分子伴侣,可折叠信号转导和转录激活因子 3,促进其成熟和激活,加快癌细胞的细胞周期进程和血管生成,促进肿瘤发生<sup>[19]</sup>。本研究中,CCT8 与不良临床病理特征及 EMT 指标有关,提示 CCT8 能诱导肿瘤 EMT 的发生,促进 CRC 肿瘤恶性进展。有学者报道,结肠癌肿瘤细胞中 CCT8 能与 LIM 和 Src 同源结构域 3 蛋白 1 相互作用,抑制野生型 p53 蛋白进入细胞核,拮抗野生型 p53 介导的细胞周期停滞,同时诱导 EMT 过程转录因子 TWIST 的表达,促进结肠癌细胞的增殖、转移和侵袭<sup>[20]</sup>。另外,CCT8 还能够葡萄糖调节蛋白 94 的活化下,上调肝癌细胞中 c-Jun 转录因子,激活 EMT 信号通路促进癌细胞的迁移和侵袭,导致患者不良预后<sup>[21]</sup>。本研究中,CCT8 表达与患者生存预后有关,分析其原因,CCT8 通过上调细胞支架蛋白  $\alpha$ -肌动蛋白和  $\beta$ -微管蛋白表达,促进食管鳞癌细胞的迁移和侵袭,增强顺铂治疗的抵抗性,而 CCT8 基因敲除后, $\alpha$ -肌动蛋白和  $\beta$ -微管蛋白表达下调,顺铂治疗的敏感性明显增加<sup>[22]</sup>。本研究发现,CRC 中 TUBB3 与 CCT8 呈正相关。目前两者之间的相互作用关系尚不明确,笔者分析,两者在 CRC 中可能通过激活 EMT 过程,发挥协同促癌的生物效应,

但两者之间的具体作用关系仍有待今后进行深入的基础研究进一步证实。

综上所述, CRC 中 TUBB3 与 CCT8 mRNA 和蛋白表达均明显升高, 两者与 CRC 患者 TNM 分期、分化程度、淋巴结转移的临床病理特征有关, 还与 CRC 癌组织中 EMT 指标有关, 提示 TUBB3 与 CCT8 可能是通过促进 CRC 肿瘤细胞 EMT 的发生, 促进肿瘤进展。另外, TUBB3、CCT8 mRNA 均是影响 CRC 患者不良预后的独立因素, 有利于指导临床治疗方案和随访方案。但是本研究尚存在一定的局限性: (1) 本研究未进行 CCT8 的体内体外实验, 对 CCT8 促进 CRC 癌细胞 EMT 过程的机制仍需进一步研究; (2) 本研究所收集试验样本量较小, 仍需扩大样本量加以验证。

**利益冲突:** 所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明**

马云云、沙巴义丁·吐尔逊: 设计研究方案, 实施研究过程, 论文撰写, 论文修改; 徐斌: 设计研究方案, 论文审修; 王东宏: 提出研究思路, 分析试验数据; 刘洁: 进行统计学分析

**参考文献**

[1] Song M. Global epidemiology and prevention of colorectal cancer [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(7): 588-590. DOI: 10.1016/S2468-1253(22)00089-9.

[2] 翟晓璐, 王妍, 王斐, 等. 循环肿瘤 DNA 检测对 II 期结肠癌术后患者预后的预测价值[J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(21): 3968-3972. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2023.21.012.

[3] 刘新福, 尹婵, 张辉, 等. 胃癌组织中 ERCC 1、TS 和 TUBB3 与化疗药物体外药敏相关性的实验研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(2): 166-169. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2018.02.002.

[4] Namekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, et al. ALDH1A1 in patient-derived bladder cancer spheroids activates retinoic acid signaling leading to TUBB3 overexpression and tumor progression [J]. *Int J Cancer*, 2020, 146(4): 1099-1113. DOI: 10.1002/ijc.32505.

[5] Sun X, Zhang Y, Xin S, et al. NOTCH3 promotes docetaxel resistance of prostate cancer cells through regulating TUBB3 and MAPK signaling pathway [J]. *Cancer Sci*, 2023, 12(8): 1111-1123. DOI: 10.1111/cas.16040.

[6] 盖领, 茅国新, 吴锦伟, 等. CCT8 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(7): 1064-1067. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2018.07.005.

[7] Wu Z, Deng L, Tao J, et al. CCT8 promotes cell migration and tumor metastasis in lung adenocarcinomas [J]. *J Cancer*, 2023, 14(17): 3238-3247. DOI: 10.7150/jca.87983.

[8] Gao H, Wei H, Yang Y, et al. Phase separation of DDX21 promotes colorectal cancer metastasis via MCM5-dependent EMT pathway [J]. *Oncogene*, 2023, 42(21): 1704-1715. DOI: 10.1038/s41388-023-02687-6.

[9] Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, et al. IHC Profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): 9680-9691. DOI: 10.1371/journal.

pone.0096801.

[10] 周宗磊, 周茹珍. 1994—2019 年中国结直肠癌发病趋势与年龄-时期-队列模型分析 [J]. *中国慢性病预防与控制*, 2023, 31(5): 321-326. DOI: 10.16386/j.cjpcd.issn.1004-6194.2023.05.001.

[11] 韩晶, 王贵英, 张难, 等. 肿瘤部位及临床病理特征对不同 TNM 分期行结肠癌根治性切除术患者预后的影响研究 [J]. *中国全科医学*, 2020, 23(18): 2275-2283. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2020.00.336.

[12] Liu Z, Li S, Dong J, et al. TUBB3 promotes growth and invasion of gallbladder cancer cells by Akt/mTOR signal pathway [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2021, 40(2): 23-33. DOI: 10.1615/JEnviron-PatholToxicolOncol.2021036821.

[13] Liang ZX, Liu HS, Wang FW, et al. LncRNA RPPH1 promotes colorectal cancer metastasis by interacting with TUBB3 and by promoting exosomes-mediated macrophage M2 polarization [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(11): 829-836. DOI: 10.1038/s41419-019-2077-0.

[14] Sobierajska K, Wiczorek K, Ciszewski WM, et al. beta-III tubulin modulates the behavior of Snail overexpressed during the epithelial-to-mesenchymal transition in colon cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(9): 2221-2233. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.05.008.

[15] Alfano A, Xu J, Yang X, et al. SRC kinase-mediated tyrosine phosphorylation of TUBB3 regulates its stability and mitotic spindle dynamics in prostate cancer cells [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(5): 932-945. DOI: 10.3390/pharmaceutics14050932.

[16] Sekino Y, Han X, Kawaguchi T, et al. TUBB3 reverses resistance to docetaxel and cabazitaxel in prostate cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16): 3936-3948. DOI: 10.3390/ijms20163936.

[17] Betancourt MK, Collier MP, Leitner A, et al. A hierarchical assembly pathway directs the unique subunit arrangement of TRiC/CCT [J]. *Mol Cell*, 2023, 83(17): 3123-3139. DOI: 10.1016/j.molcel.2023.07.031.

[18] Cho HJ, Baek GO, Yoon MG, et al. Overexpressed proteins in HCC Cell-Derived Exosomes, CCT8, and Cofilin-1 Are potential biomarkers for patients with HCC [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11(7): 1221-1230. DOI: 10.3390/diagnostics11071221.

[19] Vallin J, Cordoba-Beldad CM, Grantham J. Sequestration of the transcription factor STAT3 by the molecular chaperone CCT: A potential mechanism for modulation of STAT3 phosphorylation [J]. *J Mol Biol*, 2021, 433(13): 1669-1678. DOI: 10.1016/j.jmb.2021.166958.

[20] Liao Q, Ren Y, Yang Y, et al. CCT8 recovers WTP53-suppressed cell cycle evolution and EMT to promote colorectal cancer progression [J]. *Oncogenesis*, 2021, 10(12): 84-95. DOI: 10.1038/s41389-021-00374-3.

[21] Wei PL, Huang CY, Tai CJ, et al. Glucose-regulated protein 94 mediates metastasis by CCT8 and the JNK pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(6): 8219-8227. DOI: 10.1007/s13277-015-4669-3.

[22] Yang X, Ren H, Shao Y, et al. Chaperonin-containing T-complex protein 1 subunit 8 promotes cell migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma by regulating alpha-actin and beta-tubulin expression [J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(6): 2021-2030. DOI: 10.1007/s13277-015-4669-3.

(收稿日期: 2024-01-23)