

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202322086

· 头颈肿瘤专栏 ·

# SHCBP1 高表达促进鼻咽癌细胞 上皮间质转化过程的分析

鲜志芑<sup>1</sup>, 喻国冻<sup>1,2</sup>, 张田<sup>2</sup>, 吴志敏<sup>1</sup>, 周方伟<sup>1</sup>

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属医院耳鼻咽喉科, 贵州 贵阳 550004)

**摘要:** **目的** 探究 SHC SH2 结构域结合蛋白 1 (SHCBP1) 在鼻咽癌组织及鼻咽癌细胞系中的表达情况, 分析其对鼻咽癌细胞系的增殖、侵袭能力及上皮间质转化 (EMT) 过程的影响。**方法** 利用 TCGA 数据库分析 SHCBP1 在头颈鳞状细胞癌 (HNSC) 中的表达情况, 分析 SHCBP1 表达程度与肿瘤免疫细胞浸润程度的关系。同时收集 2019 年 9 月—2021 年 9 月于贵州医科大学附属医院及贵州医科大学附属肿瘤医院经病理确诊的 31 例鼻咽癌初诊患者临床组织样本, 所有患者就诊前均未接受任何放化疗, 并收集同期就诊的 31 例疑似鼻咽癌但病检示慢性鼻咽炎组织作为对照组。利用逆转录实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测临床样本及鼻咽癌细胞系 5-8F 中 SHCBP1 的表达情况。细胞实验以鼻咽癌细胞系 5-8F、正常鼻咽部永生上皮细胞系 NP69 作为研究对象。采用利用慢病毒载体 shRNA-SHCBP1 干扰技术沉默 5-8F 细胞中 SHCBP1 表达, 并分为 NC 组 (空载慢病毒 LV-Zs-Green-PURO-NC 感染 5-8F)、SHCBP1-shRNA 组 (LV-SHCBP1-shRNA-Zs-Green-PURO 沉默 5-8F 细胞 SHCBP1 表达)。CCK-8 法、克隆形成实验检测 SHCBP1 对鼻咽癌细胞增殖的影响; 划痕实验、Transwell 迁移、侵袭实验检测 SHCBP1 对鼻咽癌细胞的转移、侵袭能力的影响。Western blot 检测 NC 组、SHCBP1-shRNA 组中 E-cadherin、N-cadherin、基质金属蛋白 9 (MMP9)、Vimentin 的表达情况。**结果** 在 HNSC 中 SHCBP1 高表达, 表达量与 Th2 细胞浸润程度相关。与慢性鼻咽炎组织相比, 鼻咽癌组织中 SHCBP1 明显高表达, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与 NC 组相比, SHCBP1-shRNA 组鼻咽癌细胞增殖、迁移、侵袭能力均减弱, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。SHCBP1-shRNA 组 E-cadherin 表达较 NC 组升高, N-cadherin、MMP9、Vimentin 表达较 NC 组降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** SHCBP1 在鼻咽癌中高表达, 并可促进鼻咽癌细胞增殖、侵袭、迁移及激活 EMT 过程。

**关键词:** 鼻咽癌; 转移; 侵袭; 上皮间质转化

**中图分类号:** R739.63

## High expression of SHCBP1 promotes epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma cells

XIAN Zhipeng<sup>1</sup>, YU Guodong<sup>1,2</sup>, ZHANG Tian<sup>2</sup>, WU Zhimin<sup>1</sup>, ZHOU Fangwei<sup>1</sup>

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Department of Otorhinolaryngology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of Shc SH2-domain binding protein 1 (SHCBP1) gene in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tissues and NPC cell lines, and its effect on the proliferation, invasion ability and epithelial-mesenchymal transition (EMT) process of NPC cell lines. **Methods** The expression of SHCBP1 in head and neck squamous cell carcinoma (HNSC) was analyzed by TCGA database, and the relationship between the expression of SHCBP1 and the degree of tumor immune cell infiltration was analyzed. The clinical tissue samples of 31 patients with NPC diagnosed by pathology in the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University and the Affiliated Cancer Hospital of Guizhou Medical University from Sept 2019 to Sept 2021 were collected. At the same time, 31 cases of chronic nasopharyngitis were selected as the control group. The expression of SHCBP1 in clinical samples and NPC cell line 5-8F

基金项目: 贵州省科学技术基金(黔科合基础-ZK[2021]一般424); 贵州医科大学附属医院国家自然科学基金基金培育计划项目(gyfynsc[2020]-7); 贵州医科大学国家自然科学基金基金培育项目(20NSP023)。

第一作者简介: 鲜志芑, 男, 在读硕士研究生。

通信作者: 喻国冻, Email: ygd.1224@163.com

was detected by reverse transcriptase real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). In the cell experiment, NPC cell line 5-8F and normal nasopharyngeal immortalized epithelial cell line NP69 were used as the subjects. SHCBP1 expression in 5-8F cells was silenced by lentiviral vector shRNA-SHCBP1 interference technique and divided into normal control (NC) group (empty viral vector infected with 5-8F) and SHCBP1-shRNA group (silencing SHCBP1 expression in 5-8F cells). The effect of SHCBP1 on the proliferation of NPC cells was detected by CCK-8 assay and clone formation assay, and the effect of SHCBP1 on the metastasis and invasion of NPC cells was detected by scratch test, Transwell migration and invasion test. Western blot was used to detect the expression of E-cadherin, N-cadherin, MMP9 and Vimentin in the NC group and SHCBP1-shRNA group. **Results** SHCBP1 was highly expressed in HNSC, and the expression was related to the degree of Th2 cell infiltration. Compared with the chronic nasopharyngitis, the expression of SHCBP1 in NPC was significantly elevated ( $P < 0.05$ ). The proliferation, migration and invasion of NPC cells in the SHCBP1-shRNA group were significantly lower than those in the NC group ( $P < 0.05$ ). The expression of E-cadherin in SHCBP1-shRNA group was higher than that in the NC group, while the expressions of N-cadherin, MMP9 and Vimentin were lower than those in the NC group. **Conclusion** SHCBP1 is highly expressed in NPC and can promote the proliferation, invasion, migration and activation of EMT in NPC cells.

**Keywords:** Nasopharyngeal carcinoma; Metastasis; Invasion; Epithelial-mesenchymal transition

鼻咽癌是一种起源于鼻咽黏膜内层的上皮源性恶性肿瘤,其发病机制复杂,目前认为与EB病毒(epstein-barrvirus, EBV)感染等多因素有关<sup>[1]</sup>。鼻咽癌发病较为隐匿,患者确诊时往往已有远处转移<sup>[2]</sup>。因此,探索鼻咽癌细胞侵袭及转移分子机制对早期诊断、抑制或延缓鼻咽癌转移、改善鼻咽癌患者预后具有重大意义。

Src同源成员和胶原同源物(Src homolog and collagen homolog, SHC)SH2结构域结合蛋白1(SHC SH2-domain binding protein 1, SHCBP1)位于染色体16q11.2<sup>[3]</sup>。研究发现SHCBP1是细胞内信号转导和细胞分裂中的重要蛋白质,参与细胞生长、增殖、分化、早期胚胎发育、肿瘤发生和进展<sup>[4]</sup>。目前有研究发现SHCBP1在调控肿瘤细胞的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)过程中扮演了重要的角色,而EMT也被证实在恶性肿瘤的发生发展中极为重要,其可增强恶性肿瘤转移、侵袭、放化疗抵抗、肿瘤干性等能力<sup>[5-7]</sup>。同时也有研究指出EMT与肿瘤免疫浸润之间有着密切的联系<sup>[8]</sup>。在滑膜肉瘤中SHCBP1高表达促进了EMT过程的发生,从而使肿瘤的侵袭、迁移能力增强<sup>[9]</sup>。Liu等<sup>[10]</sup>发现在肺癌中表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)可诱导SHCBP1高表达,从而促进 $\beta$ -catenin入核,促进EMT过程发生,并可通过激活EGF- $\beta$ -catenin通路促进肺癌细胞的增殖与侵袭能力。

目前有研究表明<sup>[11-12]</sup>,在鼻咽癌的发生发展中,特别是鼻咽癌的侵袭及转移能力可能与EMT过程密切相关。前期我们利用TCGA数据库,发现SHCBP1在头颈鳞状细胞癌(head and neck squa-

mous cell carcinoma, HNSC)中高表达。因此我们假设SHCBP1在鼻咽癌中表达量也增高,而目前未见关于SHCBP1在鼻咽癌EMT过程发生的研究,故本研究通过探究SHCBP1在鼻咽癌中的表达情况,以及构建沉默SHCBP1表达的鼻咽癌细胞系稳转株,从而探究这一过程发生机制,同时分析了SHCBP1表达与HNSC患者生存率以及肿瘤免疫浸润间的关系,以期对鼻咽癌的治疗提供新的基础研究证据以及思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 生物信息学分析

从美国癌症基因图谱TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)获取502例HNSC及44例正常组织的mRNA表达水平。利用R-4.1.2软件整理、分析数据,并使用edgeR包筛选差异基因,探究SHCBP1在HNSC中的表达情况。将HNSC患者按SHCBP1表达量的四分位分组,高于表达量75%为高表达组(SHCBP1-High),低于表达量25%为低表达组(SHCBP1-Low),分析SHCBP1表达量与总体生存率之间的关系,并利用单样本基因集富集分析(single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA)探究SHCBP1表达量与常见免疫细胞浸润的相关性<sup>[13]</sup>。

### 1.2 组织样本

收集贵州医科大学附属医院及贵州医科大学附属肿瘤医院经病理确诊的初诊鼻咽癌患者,所有患者确诊前均未接受任何放化疗,其中男18例,女

13例;年龄31~60岁,平均年龄(46.19±8.46)岁。同期收集诊治的疑似鼻咽癌但病理示慢性鼻咽炎的患者,其中男12例,女19例;年龄29~67岁,平均年龄(45.64±6.79)岁。所有标本均由同一医师获取,所取组织离体后立即放入液氮中进行保存。本研究获得贵州医科大学附属医院伦理委员会伦理审查(伦理号2021伦审第81号),所取标本及标本用途均获得患者及其家属知情同意。

### 1.3 细胞及主要实验仪器、耗材

鼻咽癌细胞系5-8F、正常鼻咽部上皮NP69均购自丰晖生物,引物由上海生工设计合成,慢病毒载体(LV-SHCBP1-shRNA-ZsGreen-PURO、LV-NC-ZsGreen-PURO)购自上海汉恒生物。RPMI 160培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、Trizol均购自Thermo Fisher Scientific公司,Matrigel基质胶、Transwell小室均购自美国CORNING公司,逆转录及qPCR相关试剂购自南京诺唯赞生物科技有限公司,anti-SHCBP1(ab184467)购自美国Abcam,anti-E-cadherin(#3195)、anti-N-cadherin(#13116)、anti-Vimentin(#5741)、anti-基质金属蛋白9(matrix metalloprotein, MMP9, #13667)均购自美国CST公司。

### 1.4 临床样本检测与细胞系中SHCBP1表达情况

Trizol法分别提取临床组织及细胞系总RNA后,使用Thermo Scientific Nano Drop分光光度计测量所得RNA溶液浓度及纯度,随即按说明书使用逆转录试剂(Takara, JP)制取cDNA。将所得部分cDNA稀释3倍后用作实时荧光定量PCR(qPCR)检测,剩余cDNA置于-80℃冰箱保存。按qPCR试剂盒(诺唯赞,南京)说明书配置反应体系及设置反应条件,引物由上海生工公司合成。引物序列信息见表1,qPCR反应体系见表2,循环条件为预变性95℃,30s;变性95℃,10s,退火+延伸60℃,30s,共循环40次。每个样本设置2个复孔,分别独立重复3次实验,结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

表1 引物序列

名称	引物序列 5'-3'	产物大小(bp)
Homo SHCBP1 Forward	GCTGGCGTCTCTG-GAGAAAGGTTTGT	238
Homo SHCBP1 Reverse	AGCAAGCCTCACCACT-GCCTTCAAG	
Homo GAPDH Forward	AAGAAGGTG GTGAAG-CAGGC	203
Homo GAPDH Reverse	TCCACCACCCAGTTGCT-GTA	

注:SHCBP1(SHC SH2 结构域结合蛋白1);GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)。下同。

表2 PCR反应体系

试剂	用量(μL)
2×SYBR qPCR Master Mix	10
引物(上下游 mix)	1
模板 cDNA	1
ddH <sub>2</sub> O	8

### 1.5 细胞培养及慢病毒感染

将冷冻于液氮中的5-8F鼻咽癌细胞复苏后,接种于含有10%胎牛血清和90% RPMI 1640的完全培养基的6孔板内,接种密度为 $3 \times 10^4$ /孔,并置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱内培养。24h后待细胞密度达30%~40%时使用慢病毒进行感染(MOI=20),并分为NC组(空载慢病毒LV-ZsGreen-PURO-NC感染5-8F细胞)及SHCBP1-shRNA组(LV-SHCBP1-shRNA-ZsGreen-PURO沉默5-8F细胞SHCBP1表达)。感染24h后更换无病毒完全培养基,48~72h后于荧光显微镜下观察细胞绿色荧光表达情况,并加入嘌呤霉素(4 μg/mL)筛选稳转株用于后续实验。

### 1.6 CCK-8检测各组细胞增殖能力

取生长状态良好的NC组和SHCBP1-shRNA组细胞1500/孔接种于96孔板内,每组设置3个复孔,并重复3次。分别在0、24、48、72、96h时分别在每孔中加入10 μL CCK-8溶液,并置于培养箱内培养1h后,利用酶标仪测量450 nm处吸光度。

### 1.7 划痕实验检测各组细胞迁移能力

取生长状态良好的NC组和SHCBP1-shRNA组细胞以 $1 \times 10^5$ /孔接种于6孔板内,放入培养箱内培养,待细胞长满6孔板后,使用200 μL枪头垂直于6孔板底壁做划痕,并使用PBS漂洗划落细胞后加入无血清培养基,于0、12、24h后采用显微镜在相同位置拍照。

### 1.8 集落形成实验

取生长状态良好的NC组和SHCBP1-shRNA组细胞1000/孔接种于6孔板中,放入培养箱内,每隔2~3d换液并于倒置显微镜下观察细胞生长状况,待肉眼可见细胞集落时,去除培养基,加入多聚甲醛固定20 min,加入结晶紫溶液染色20 min,并拍照、计数、分析数据。

### 1.9 Transwell迁移、侵袭实验

取生长状态良好的NC组和SHCBP1-shRNA制成 $5 \times 10^4$ /mL无血清细胞悬液,并以200 μL/孔种入Transwell小室上室,并于下室内加入600 μL含30% FBS完全培养基。24h后取出Transwell小室,

使用棉签轻轻擦拭小室上室,将小室置于 4% 多聚甲醛内固定 20 min。固定完成后,使用 PBS 轻轻漂洗小室,并将小室置于结晶紫溶液中染色 20 min。PBS 轻轻漂洗小室后置于倒置显微镜下拍照、分析细胞迁移率。Transwell 侵袭实验先于小室上室涂抹 Matrigel 基质胶并放入细胞培养箱内 1 h 使基质胶凝固,其余步骤与迁移实验相同。

### 1.10 蛋白免疫印迹检测

取生长状态良好的 NC 组、SHCBP1-shRNA 组细胞接种于 100 mm 培养皿内。细胞汇合度达 90% 时,使用含有 PMSF 的 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白。蛋白质定量试剂盒 (BCA 法) 进行蛋白定量后,加入  $5 \times$  Loading buffer 于蛋白样品内并充分混匀,置于  $100^\circ\text{C}$  金属浴上变性 5 min,置于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱备用。按说明书配制 10% SDS-PAGE 凝胶,充分混匀变性蛋白样品后上样,上样量为  $5 \mu\text{g}/\text{孔}$ 。以恒压方式进行电泳,电泳结束后以恒流 260 mA 转膜。转膜结束后,取下 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶内室温封闭 1 h,加入一抗  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜,回收一抗, TBST 漂洗 3 次, 10 min/次,加入二抗,室温孵育 1 h,回收二抗, TBST 漂洗 3 次, 10 min/次。配置新鲜 ECL 显影液,将 PVDF 膜放入其中浸泡 10 s 左右后,放入凝胶成像仪内,采集荧光信号、拍照,并分析结果。

### 1.11 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件分析数据,计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,数据均进行正态性及方差齐性分析,对符合正态分布及方差齐性的数据,采用独立样本  $t$  检验,反之则采用 Wilcoxon 秩和检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TCGA 数据库中 SHCBP1 在 HNSC 中的表达情况

分析 TCGA 数据库中 502 例 HNSC 及 44 例正常组织的 mRNA 表达水平,得出 SHCBP1 的 mRNA 表达量在 HNSC 中明显增高 ( $P < 0.05$ ),见图 1A; Kaplan-Meier 生存分析提示,SHCBP1 高表达的患者生存率明显低于 SHCBP1 低表达患者 ( $P < 0.05$ ),见图 1B。

### 2.2 SHCBP1 表达与肿瘤免疫浸润的关系

通过 ssGSEA 算法分析肿瘤浸润免疫细胞与 HNSC 中 SHCBP1 表达量高低的关系发现,在 11 种常见免疫细胞中,共有 7 种免疫细胞在 HNSC 中

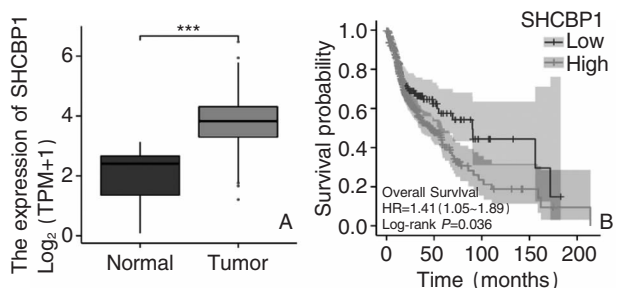


图 1 SHCBP1 在 HNSC 中的表达情况 A: 柱状图 (\*\*\*)  $P < 0.001$ ); B: HNSC 患者 Kaplan-Meier 生存曲线 ( $P = 0.036$ )

注: HNSC (头颈鳞状细胞癌)。

SHCBP1 高表达组与 SHCBP1 低表达组中浸润程度的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 2A。通过对此 7 种免疫细胞进行相关性分析发现, Th2 细胞的浸润程度与 SHCBP1 的表达量呈正相关 ( $r_s = 0.422, P < 0.05$ ), 而 B 细胞 ( $r_s = 0.101, P = 0.024$ )、T 细胞 ( $r_s = 0.148, P < 0.001$ )、CD8<sup>+</sup>T 细胞 ( $r_s = -0.151, P < 0.001$ )、Tregs 细胞 ( $r_s = 0.146, P = 0.001$ )、DC 细胞 ( $r_s = 0.169, P < 0.001$ ) 的浸润程度与 SHCBP1 的表达量呈负相关 (图 2B)。

### 2.3 RT-qPCR 分析临床样本及细胞系中 SHCBP1 表达情况

SHCBP1 在鼻咽癌中 mRNA 相对表达量  $1.58 \pm 0.37$  高于慢性鼻咽炎组织中 mRNA 相对表达量  $0.53 \pm 0.19$  ( $t = 11.729, P < 0.001$ , 图 3A); 在 5-8F 细胞中 mRNA 相对表达量  $1.75 \pm 0.27$  高于 NP69 细胞中 mRNA 的表达量,差异具有统计学意义 ( $t = 6.895, P = 0.001$ , 图 3B)。

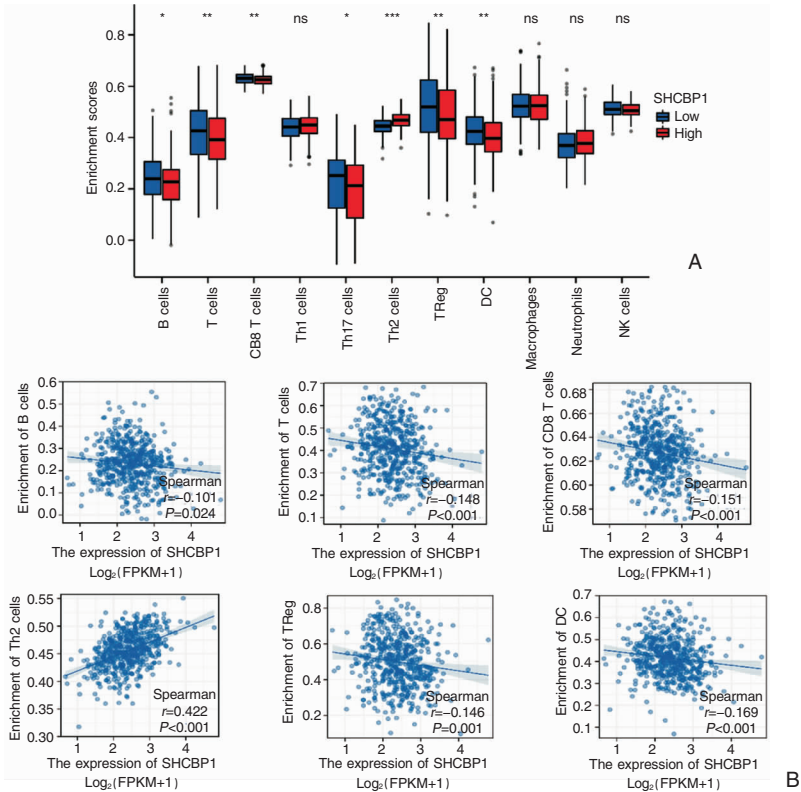
### 2.4 慢病毒感染 5-8F 细胞及感染效率

倒置荧光显微镜下观察慢病毒感染后的 5-8F 细胞中荧光蛋白的表达,在 72 h 后荧光蛋白表达率高于 80% (图 4A)。RT-qPCR 检测提示 SHCBP1-shRNA 组 SHCBP1 相对表达量  $0.25 \pm 0.03$  明显低于 NC 组 ( $t = 49.099, P < 0.001$ , 图 4B),免疫印迹实验证实 SHCBP1 在 NC 组相对表达量  $1.05 \pm 0.32$  明显高于 SHCBP1 shRNA 组  $0.34 \pm 0.40$  ( $t = 23.984, P < 0.001$ , 图 4C、D),证明 SHCBP1-shRNA 慢病毒载体能有效沉默 5-8F 中 SHCBP1 的表达。

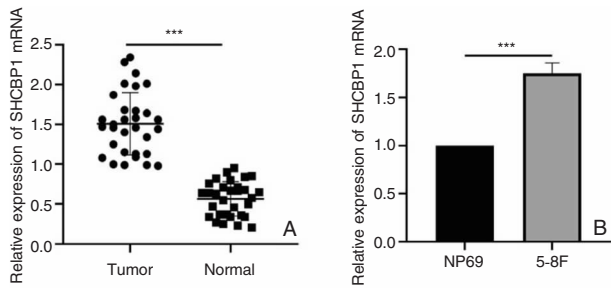
### 2.5 沉默 SHCBP1 对 5-8F 细胞增殖能力的影响

使用酶标仪测量各组各个时间点 450 nm 处的吸光度 (表 3),结果显示 NC 组在 24、48、72、96 h 的吸光度均高于 SHCBP1-shRNA 组,这说明沉默 5-8F 细胞 SHCBP1 表达后可明显抑制 5-8F 细胞增殖 (图 5A)。克隆形成实验提示,SHCBP1-shRNA 组细

胞克隆数量  $31.00 \pm 12.05$  明显低于 NC 组  $283.43 \pm 41.43$  ( $t = 15.478, P < 0.001$ , 图 5B、C)。



**图 2** 免疫细胞在 SHCBP1 高表达组与低表达组中的浸润程度差异 A:11 种免疫细胞; B:B 细胞、T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、Th2 细胞、Treg 细胞、DC 细胞浸润程度与 HNSC 中 SHCBP1 表达量的关系 (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ )

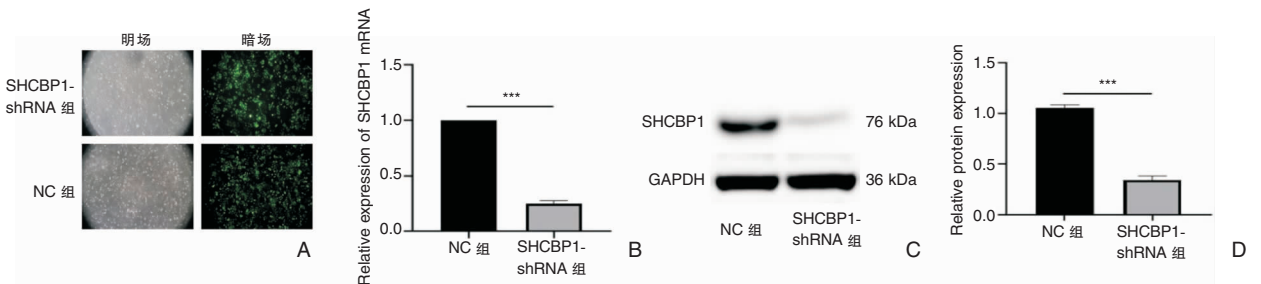


**图 3** 临床样本及细胞系中 SHCBP1 的表达情况 A:鼻咽癌组织中 mRNA 相对表达量高于慢性鼻炎组织(\*\*\*  $P < 0.001$ ); B:SHCBP1 在 NP69 及 5-8F 中表达情况(\*\*\*  $P < 0.001$ )

**表 3** 各组 450nm 处吸光度 ( $\bar{x} \pm s$ )

时间点 (h)	NC 组	SHCBP1-shRNA 组	$t$	$P$
0	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.978	0.430
24	0.30 ± 0.01	0.22 ± 0.02	4.659	0.010
48	0.68 ± 0.08	0.42 ± 0.06	4.500	0.011
72	1.35 ± 0.10	0.86 ± 0.12	5.024	0.007
96	2.44 ± 0.15	1.24 ± 0.09	11.607	<0.001

注: NC (空载慢病毒 LV-ZsGreen-PURO-NC 感染 5-8F 细胞); SHCBP1-shRNA 组 (LV-SHCBP1-shRNA-ZsGreen-PURO 沉默 5-8F 细胞 SHCBP1 表达)。

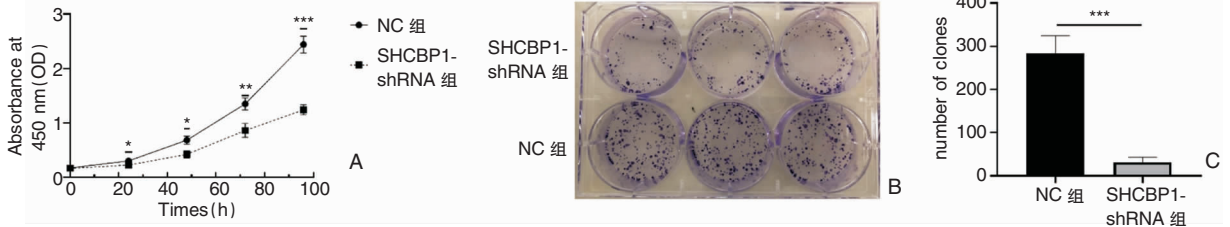


**图 4** 慢病毒感染 5-8F 细胞 A:倒置荧光显微镜下观察 ( $\times 200$ ); B:慢病毒沉默 SHCBP1 mRNA 表达效率(\*\*\*  $P < 0.001$ ); C、D:慢病毒沉默 SHCBP1 蛋白表达效率(\*\*\*  $P < 0.001$ )



**2.6 沉默 SHCBP1 表达可降低 5-8F 细胞迁移及侵袭能力**

NC 组及 SHCBP1-shRNA 组 12、24h 内迁移率见表 4, SHCBP1-shRNA 组较 NC 组迁移能力显著降低 ( $P < 0.05$ , 图 6)。Tranwell 迁移实验提示 NC 组 24h 内细胞迁移数量明显高于 SHCBP1-shRNA 组 ( $P < 0.05$ ); Transwell 侵袭实验同样显示, NC 组细胞 24h 内侵袭数量明显高于 SHCBP1-shRNA 组 ( $P < 0.05$ ) (表 5、图 7)。



**图 5** CCK-8 检测各组细胞增殖能力 A: 各组不同时间段 5-8F 细胞增殖情况 (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ); B: 集落克隆形成实验; C: 两组集落克隆数量柱状图 (\*\*  $P < 0.001$ )

**表 4** NC 组与 SHCBP1-shRNA 组不同时间迁移率比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

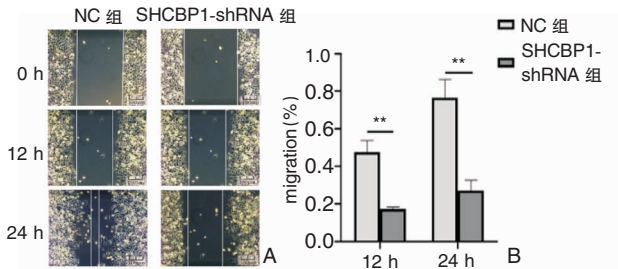
分组	NC 组	SHCBP1-shRNA 组	t	P
12 h 迁移率	0.47 ± 0.06	0.17 ± 0.01	8.597	0.001
24 h 迁移率	0.76 ± 0.09	0.27 ± 0.05	7.830	0.001

**2.7 沉默 SHCBP1 表达可抑制 5-8F 细胞 EMT 过程激活**

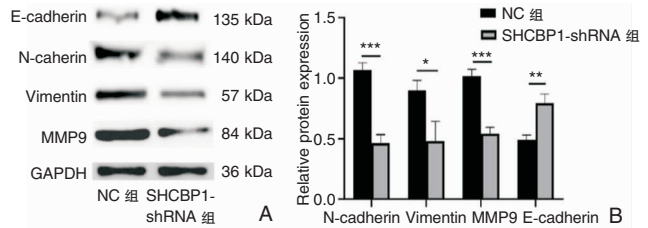
免疫印迹实验提示, SHCBP1-shRNA 组 E-cadherin 表达明显高于 NC 组 ( $t = 6.271, P = 0.003$ ), SHCBP1-shRNA 组 N-cadherin、Vimentin、MMP9 表达明显低于 NC 组 ( $t = 11.470/4.080/10.970, P < 0.05$ ), 这说明了沉默 SHCBP1 后, 可明显抑制 5-8F 细胞 EMT 过程(图 8)。

**表 5** NC 组与 SHCBP1-shRNA 组 Transwell 迁移及侵袭比较 (个,  $\bar{x} \pm s$ )

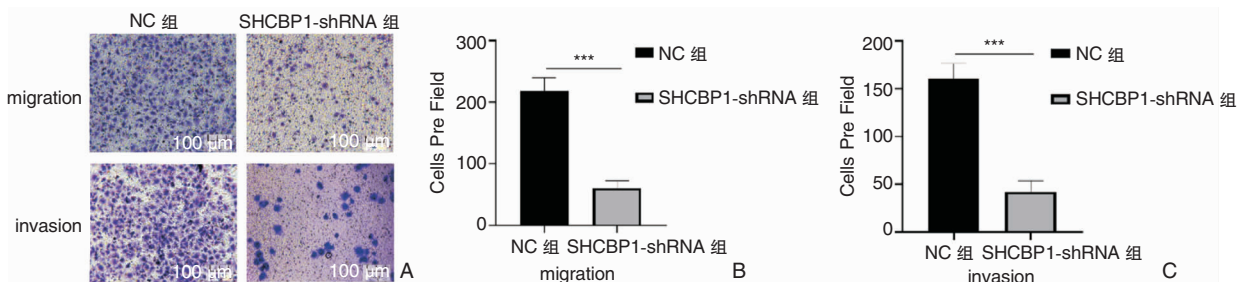
分组	NC 组	SHCBP1-shRNA 组	t	P
迁移细胞数量	218 ± 20	60 ± 11	14.854	< 0.001
侵袭细胞数量	160 ± 16	42 ± 11	13.336	< 0.001



**图 6** 划痕实验检测各组细胞迁移能力 A: 5-8F 细胞迁移能力 ( $\times 200$ ); B: 5-8F 细胞迁移率柱状图 (\*\*  $P < 0.01$ )



**图 8** 免疫印迹实验 A: 5-8F 细胞沉默 SHCBP1 后 EMT 相关蛋白变化; B: 柱状图显示 SHCBP1-shRNA 组 N-cadherin、MMP9、Vimentin 表达低于 NC 组, E-cadherin 表达高于 NC 组 (\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ ) 注: MMP9 (基质金属蛋白 9)。



**图 7** Transwell 迁移、侵袭实验 A: NC 组与 SHCBP1-shRNA 组比较 (结晶紫  $\times 200$ ); B: 检测 5-8F 细胞迁移细胞数量柱状图 (\*\*  $P < 0.001$ ); C: 检测 5-8F 细胞侵袭细胞数量柱状图 (\*\*  $P < 0.001$ )

### 3 讨论

鼻咽癌是一种常见的上皮来源的头颈部恶性肿瘤,好发于东南亚国家以及我国的福建、广东、广西等地区<sup>[14]</sup>,其发病原因主要与 EBV 感染、遗传、饮食、环境等因素相关,并且有明显的家族聚集性<sup>[14-15]</sup>。目前鼻咽癌以放疗为主要治疗方式,特别是近期调强放疗的兴起,大大提高了鼻咽癌的治疗效率<sup>[16-17]</sup>,但是因其发病部位隐蔽,早期无明显临床症状,大多数患者确诊时已经出现了局部淋巴结及远处转移,从而使得患者的远期生存率明显降低<sup>[17]</sup>。所以寻找鼻咽癌局部淋巴结及远处转移的机制以及 NPC 发病的特异性靶点就显得尤为重要。

SHCBP1 能特异性结合 SHC SH2 结构域,目前研究证实 SHCBP1 是细胞内信号转导和细胞分裂的重要蛋白,其参与了细胞生长、增殖、分化、肿瘤发生发展。一项关于胰腺癌的研究发现,SHCBP1 可抑制 E-cadherin 的表达,进而激活 EMT 过程,促进肿瘤转移<sup>[18]</sup>。在肺癌中 SHCBP1 可通过激活 Wnt 信号通路,从而促进肺癌的远处转移及侵袭<sup>[19]</sup>。另一项关于非小细胞肺癌的研究发现<sup>[10]</sup>,SHCBP1 可以促进非小细胞肺癌的增殖、侵袭、转移,并且 SHCBP1 的表达量与 NSCLC 患者的中位生存时间和无复发生存时间有密切关系。在前列腺癌<sup>[20]</sup>中 SHCBP1 高表达与前列腺癌的侵袭、转移能力相关,同时 SHCBP1 表达量与前列腺癌的临床分期呈正相关。神经胶质瘤中 SHCBP1 同样可以促进 EMT 过程,进而增强神经胶质瘤的转移、侵袭能力<sup>[21]</sup>。Feng 等<sup>[22]</sup>发现 SHCBP1 在乳腺癌中表达增高,并且 SHCBP1 的表达量与乳腺癌临床分期有明显的相关性,通过对分子机制的研究,研究人员发现 SHCBP1 可能通过激活 AKT 信号通路,从而调节乳腺癌的增殖及凋亡。在滑膜肉瘤中 SHCBP1 高表达促进了 EMT 过程的发生,从而使肿瘤的侵袭、迁移能力增强<sup>[9]</sup>。EMT 是一种细胞由上皮表型向间质表型转变的连续变化的生物学过程,从而使细胞获得更强的迁移、侵袭能力<sup>[23]</sup>。近年来多个研究已证实 EMT 在多种恶性肿瘤具有促进肿瘤转移、侵袭、耐药性的作用<sup>[24]</sup>。E-cadherin 与 N-cadherin 是 EMT 过程发生的两种重要标志性分子。近年来有许多研究表明<sup>[11-12]</sup>,在鼻咽癌发展过程中,鼻咽癌细胞 E-cadherin 的表达被抑制,这便造成了肿瘤细胞间的紧密黏附失效,从而肿瘤细胞的迁移能力增强。

因此本研究首先通过 TCGA 数据库分析发现 SHCBP1 在 HNSC 中表达明显增高,并且 SHCBP1 的表达量与 HNSC 患者的总体生存率相关。同时有文献报道 SHCBP1 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞的调节中发挥着重要的作用<sup>[25]</sup>,而 CD4<sup>+</sup>T 细胞的激活及分化在肿瘤浸润免疫中有着重要的作用。因此我们分析了 SHCBP1 的表达量与几种常见免疫细胞之间的关系。发现 SHCBP1 的表达量与 HNSC 中 Th2 细胞的浸润量呈正相关,这意味着 SHCBP1 可能也参与了 HNSC 的免疫浸润。随后我们通过对临床鼻咽癌样本的分析以及细胞实验发现 SHCBP1 在鼻咽癌组织及鼻咽癌细胞系中表达量均明显增高。紧接着在沉默鼻咽癌细胞中 SHCBP1 表达后,细胞功能实验以及检测 EMT 相关蛋白发现其表达量也出现了变化,这提示 SHCBP1 可促进鼻咽癌细胞的增殖、迁移、侵袭以及激活鼻咽癌的 EMT 过程的发生。

综上所述,SHCBP1 在鼻咽癌中作为一种促癌基因,可以促进鼻咽癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力,同时也能激活 EMT 过程。然而目前关于 SHCBP1 激活鼻咽癌的 EMT 过程所涉及的具体信号通路等仍然不明确,还有待进一步探究。与此同时,本研究也发现 SHCBP1 的表达量与 HNSC 中 Th2 细胞的浸润呈正相关,这是否意味着,SHCBP1 也参与了 HNSC 的肿瘤免疫浸润,同时也影响了鼻咽癌 EMT 过程的激活。但是由于鼻咽癌中仅有一部分属于角化型癌,仅仅通过 TCGA 数据库中对 HNSC 的分析,还不足以说明这一点。所以还有待进一步探究 SHCBP1 在鼻咽癌肿瘤免疫浸润中的作用。同时由于 SHCBP1 作为一种重要的与细胞内外信号传递有关的蛋白,这预示着 SHCBP1 有望成为一种鼻咽癌治疗的新靶点。

### 参考文献:

- [1] Chen YP, Chan ATC, Le QT, et al. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 2019, 394(10192): 64-80.
- [2] 朱振潮,邱前辉,詹建东,等.鼻咽癌组织中 BLU 与 cyclin D1 和 cyclin B1 的表达及其临床意义[J]. *中国耳鼻喉咽喉底外科杂志*, 2021, 27(4): 428-434.
- [3] Lebidzinska-Arciszewska M, Oparka M, Vega-Naredo I, et al. The interplay between p66Shc, reactive oxygen species and cancer cell metabolism[J]. *Eur J Clin Invest*, 2015, 45 Suppl 1: 25-31.
- [4] Zhang GY, Ma ZJ, Wang L, et al. The role of Shc1 in signaling and disease[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2019, 19(11): 854-862.

- [5] Georgakopoulos-Soares I, Chartoumpakis DV, Kyriazopoulou V, et al. EMT factors and metabolic pathways in cancer[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 499.
- [6] Sun Y, Pan H, He Y, et al. Functional roles of the SHCBP1 and KIF23 interaction in modulating the cell-cycle and cisplatin resistance of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Head Neck*, 2022, 44(3): 591–605.
- [7] Yin H, Zhang C, Wei Z, et al. EGF-induced nuclear translocation of SHCBP1 promotes bladder cancer progression through inhibiting RACGAP1-mediated RAC1 inactivation[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(1): 39.
- [8] Romeo E, Caserta CA, Rumio C, et al. The vicious cross-talk between tumor cells with an EMT phenotype and cells of the immune system[J]. *Cells*, 2019, 8(5):460.
- [9] Peng C, Zhao H, Song Y, et al. SHCBP1 promotes synovial sarcoma cell metastasis via targeting TGF-beta1/Smad signaling pathway and is associated with poor prognosis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 141.
- [10] Liu L, Yang Y, Liu S, et al. EGF-induced nuclear localization of SHCBP1 activates beta-catenin signaling and promotes cancer progression[J]. *Oncogene*, 2019, 38(5): 747–764.
- [11] Lu Y, Zhou X, Zhao W, et al. Epigenetic inactivation of Acetyl-CoA Acetyltransferase I promotes the proliferation and metastasis in nasopharyngeal carcinoma by blocking ketogenesis[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 667673.
- [12] Wu A, Luo N, Xu Y, et al. Exosomal LBH inhibits epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma via downregulating VEGFA signaling[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(1): 242–260.
- [13] Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer[J]. *Immunity*, 2013, 39(4): 782–795.
- [14] 邱焯,张俊杰. 鼻咽癌早期筛查的研究进展[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2020, 26(2): 201–204.
- [15] Huang T, Ploner A, Chang ET, et al. Dietary patterns and risk of nasopharyngeal carcinoma: a population-based case-control study in southern China[J]. *Am J Clin Nutr*, 2021, 114(2): 462–471.
- [16] 中国医师协会放射肿瘤治疗医师分会,中华医学会放射肿瘤治疗学分会. 中国鼻咽癌放射治疗指南(2020版)[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2021, 28(3): 167–177.
- [17] Liu Z, Chen Y, Su Y, et al. Nasopharyngeal carcinoma: Clinical achievements and considerations among treatment options [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 635737.
- [18] Yang C, Hu JF, Zhan Q, et al. SHCBP1 interacting with EOGT enhances O-GlcNAcylation of NOTCH1 and promotes the development of pancreatic cancer[J]. *Genomics*, 2021, 113(2): 827–842.
- [19] Zou A, Wu A, Luo M, et al. SHCBP1 promotes cisplatin induced apoptosis resistance, migration and invasion through activating Wnt pathway[J]. *Life Sci*, 2019, 235: 116798.
- [20] Xu N, Wu YP, Yin HB, et al. SHCBP1 promotes tumor cell proliferation, migration, and invasion, and is associated with poor prostate cancer prognosis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146(8): 1953–1969.
- [21] Zhou Y, Tan Z, Chen K, et al. Overexpression of SHCBP1 promotes migration and invasion in gliomas by activating the NF-kappaB signaling pathway[J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(9): 1181–1190.
- [22] Feng W, Li HC, Xu K, et al. SHCBP1 is over-expressed in breast cancer and is important in the proliferation and apoptosis of the human malignant breast cancer cell line[J]. *Gene*, 2016, 587(1): 91–97.
- [23] Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, et al. EMT: 2016[J]. *Cell*, 2016, 166(1): 21–45.
- [24] Zhu Y, Tao Z, Chen Y, et al. Exosomal MMP-1 transfers metastasis potential in triple-negative breast cancer through PAR1-mediated EMT[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2022, 193(1): 65–81.
- [25] Buckley MW, Arandjelovic S, Trampont PC, et al. Unexpected phenotype of mice lacking Shcbp1, a protein induced during T cell proliferation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105576.

(收稿日期:2022-03-18)

**本文引用格式:**鲜志芃,喻国冻,张田,等. SHCBP1 高表达促进鼻咽癌细胞上皮间质转化过程的分析[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2023, 29(2): 65–72. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007–1520. 202322086

**Cite this article as:**XIAN Zhipeng, YU Guodong, ZHANG Tian, et al. High expression of SHCBP1 promotes epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2023, 29(2): 65–72. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007–1520. 202322086