

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.11.014

## 胱硫醚 $\beta$ 合成酶通过 AKT/cyclin D1 通路影响肺腺癌 A549 细胞的增殖

欧阳运洁<sup>1,2</sup>, 曹培国<sup>1</sup>, 张曦<sup>1</sup> (1. 中南大学湘雅医学院附属第三医院 肿瘤科, 湖南 长沙 410078; 2. 中国人民解放军联勤保障部队第九二一医院 肿瘤科, 湖南 长沙 410000)

**[摘要]** **目的:** 探究胱硫醚 $\beta$ 合成酶(CBS)通过 AKT/cyclin D1 通路影响肺腺癌 A549 细胞的增殖及其分子机制。**方法:** 通过 cBioPortal 数据库分析肺腺癌组织中 CBS 和 AKT/cyclin D1 相关蛋白的表达, 收集的国人肺腺癌组织通过免疫荧光法验证 CBS 的表达。WB 法检测 A549 细胞及其移植瘤中半胱氨酸代谢和 AKT/cyclin D1 通路相关蛋白的表达。将 pCW57.1-myrAKT 质粒分别与 RNA 干扰对照质粒 pGIPZ-CBS-nc-shRNA、干扰质粒 pGIPZ-CBS-shNRA1 和 pGIPZ-CBS-shNRA2 共转染 A549 细胞, 共转染组又分多西环素(DOX)诱导组(DOX<sup>+</sup>)和不诱导组(DOX<sup>-</sup>), 通过细胞集落形成实验检测转染后各组 A549 细胞的集落形成能力。通过 CBS<sup>WT</sup> A549 细胞、CBS<sup>I278T</sup> A549 细胞移植瘤实验检测过表达 CBS 对移植瘤生长的影响, AzMC 荧光染色法和免疫组织化学法分别检测移植瘤组织中 H<sub>2</sub>S 水平和 Ki-67 阳性率。**结果:** 数据库分析和国人组织标本检测均显示, 与癌旁组织比较, 肺腺癌中 CBS 呈低表达(均  $P < 0.01$ ); 与 SV-40 细胞比较, A549、SKMES1 和 NCIH460 细胞中 CBS 蛋白呈低表达(均  $P < 0.01$ ), 而 p-AKT 和 cyclin D1 蛋白均呈高表达(均  $P < 0.01$ )。A549 细胞中过表达 AKT 显著促进细胞集落的形成( $P < 0.01$ ), 在此基础上敲减 CBS 可进一步促进细胞集落的形成(均  $P < 0.01$ )。移植瘤实验显示, 与 DOX<sup>-</sup> CBS<sup>WT</sup> 组比较, DOX<sup>+</sup> CBS<sup>WT</sup> 组中 CBS、RB 和 P21 蛋白表达升高、H<sub>2</sub>S 含量增加、肿瘤体积变小、Ki-67 阳性率降低(均  $P < 0.01$ ); 与 DOX<sup>-</sup> CBS<sup>I278T</sup> 组比较, DOX<sup>+</sup> CBS<sup>I278T</sup> 组中 CBS 表达升高( $P < 0.01$ ), 但 H<sub>2</sub>S 水平和移植瘤体积变化均不明显。**结论:** 肺腺癌组织和 A549 细胞中 CBS 呈低表达, 而 AKT/cyclin D1 通路呈激活状态, 过表达或敲减 CBS 可抑制或促进 A549 细胞及其移植瘤的生长, CBS 和 AKT/cyclin D1 通路相关蛋白可能是肺腺癌的潜在靶点和标志物。

**[关键词]** 肺腺癌; A549 细胞; 胱硫醚 $\beta$ 合成酶; AKT/cyclin D1 信号通路; 细胞增殖

**[中图分类号]** R734.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)11-1032-06

## Cystathionine $\beta$ -synthase affects the proliferation of lung adenocarcinoma A549 cells through the AKT/cyclin D1 pathway

OUYANG Yunjie<sup>1,2</sup>, CAO Peiguo<sup>1</sup>, ZHANG Xi<sup>1</sup> (1. Department of Oncology, the Third Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, Hunan, China; 2. Department of Oncology, 921st Hospital of the People's Liberation Army Joint Logistic Support Force, Changsha 410000, Hunan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) on the proliferation of lung adenocarcinoma A549 cells through the AKT/cyclin D1 pathway and its molecular mechanism. **Methods:** Expression of CBS and AKT/cyclinD1-related proteins in lung adenocarcinoma tissues was analyzed by cBioPortal database. The CBS expression in collected lung adenocarcinoma tissues from Chinese patients was verified by immunofluorescence method. WB assay was performed to detect the expression of cysteine metabolism and AKT/cyclin D1 pathway-related proteins in A549 cells and their transplanted tumors, and CBS DNA methylation sequencing was performed to detect the effect of its methylation on CBS mRNA expression in lung cancer cells. The pCW57.1-myrAKT plasmid was co-transfected with RNA interference control plasmid pGIPZ-CBS-nc-shRNA, interference plasmid pGIPZ-CBS-shNRA1 and pGIPZ-CBS-shNRA2, respectively, into A549 cells, which were further sub-divided into DOX<sup>+</sup> and DOX<sup>-</sup> groups. The colony formation ability of A549 cells in each group after transfection was examined by cell colony formation assay. The effect of overexpression of CBS on the growth of transplanted tumors was examined by CBS<sup>WT</sup> A549 cell- and CBS<sup>I278T</sup> A549 cell-transplanted tumor assay, and AzMC fluorescence staining and immunohistochemistry were used to detect H<sub>2</sub>S levels and Ki-67 positivity in transplanted tumor tissues, respectively. **Results:** Both database analysis and tissue specimens showed that CBS was lowly expressed in lung adenocarcinoma tissues compared with para-cancerous tissues (all  $P < 0.01$ ); CBS protein was lowly expressed in

**[基金项目]** 中南大学湘雅医学院附属第三医院科研资助项目(No. 2018C112)

**[作者简介]** 欧阳运洁(1987—), 女, 学士, 主治医师, 主要从事肺部肿瘤的研究, E-mail: seaupoez3@21cn.com

**[通信作者]** 欧阳运洁, E-mail: seaupoez3@21cn.com

A549, SKMES1 and NCIH460 cells compared with SV-40 cells (all  $P < 0.01$ ), while p-AKT and cyclin D1 protein levels were highly expressed (all  $P < 0.01$ ). Overexpression of AKT in A549 cells significantly promoted the formation of cell colonies ( $P < 0.01$ ), and knockdown of CBS on this basis further promoted the formation of cell colonies (all  $P < 0.01$ ). Transplantation tumor experiments showed that CBS, RB and P21 protein expression was elevated,  $H_2S$  level was increased, tumor volume was decreased and Ki-67 positivity was reduced in the  $DOX^+$  CBS<sup>WT</sup> group compared with those in the  $DOX^-$  CBS<sup>WT</sup> group (all  $P < 0.01$ ); CBS expression was elevated in the  $DOX^+$  CBS<sup>I278T</sup> group compared with the  $DOX^-$  CBS<sup>I278T</sup> group ( $P < 0.01$ ), but the changes in  $H_2S$  level and transplantation tumor volume were not significant. **Conclusions:** CBS is lowly expressed in lung adenocarcinoma tissues and A549 cells, while the AKT/cyclinD1 pathway is activated. Overexpression or knockdown of CBS can inhibit or promote the growth of A549 cells and their transplanted tumors, and CBS and AKT/cyclin D1 pathway-related proteins may be the potential targets and markers for lung adenocarcinoma.

**[Key words]** lung adenocarcinoma; A549 cell; cystathionine-β-synthase; AKT/cyclin D1 pathway; cell proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(11): 1032-1037. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.11.014]

肺癌作为当今病死率最高的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,按其组织病理学分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC),前者由于患病率高、预后生存率低<sup>[2]</sup>,一直是肺癌诊疗研究的热点和前沿。然而NSCLC肿瘤细胞具有增殖迅速、转移扩散快、多基因和分子共同调控的具体机制尚未完全清楚等特点,成为NSCLC诊疗发展的瓶颈。胱硫醚β合成酶(cystathionine-β-synthase, CBS)是参与转硫代谢途径的限速酶,其将同型半胱氨酸(甲基转移途径中的关键代谢物)转变为胱硫醚,后者随后被胱硫醚γ-裂解酶(cystathionine gamma-lyase, CTH)水解为半胱氨酸,其是谷胱甘肽(glutathione, GSH)产生的前体。胱氨酸/半胱氨酸转运蛋白(xCT)在癌症细胞中过度表达,为癌细胞的疯狂生长提供便利<sup>[3]</sup>。此外,CBS还催化生产硫化氢( $H_2S$ ), $H_2S$ 在调节线粒体功能和抑制活性氧(active oxygen, ROS)产生等方面发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>。因此CBS活性的异常常与包括高同型半胱氨酸血症和癌症在内的多种疾病的发生展有关<sup>[6-7]</sup>。但目前有关CBS在肺癌中的功能及分子机制研究鲜少。AKT/cyclin D1信号通路参与调节细胞生长、增殖和分化,尤其在过度活化的恶性肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭中发挥关键作用<sup>[8]</sup>。因此,本课题将探究CBS对肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭的影响及可能的分子机制,明确CBS通过调控AKT/cyclin D1信号通路参与调控肺腺癌的发生发展,为肺腺癌临床治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

收集2018年3月至2021年1月在中南大学湘雅医学院附属第三医院手术切除的33例肺腺癌组织及相应癌旁组织,经病理诊断均为肺腺癌,采集的标本保存于液氮。所有患者均签署知情同意书,本研究方案已获得本院伦理委员会批准(批注号为

No.20184013)。

SV40T转化的人支气管上皮SV-40细胞购自中科院上海细胞库,肺腺癌A549细胞、肺鳞癌SKMES1细胞、大细胞肺癌NCIH460细胞和HEK-293T细胞均购自美国ATCC公司。CBS<sup>WT</sup>和CBS<sup>I278T</sup>A549细胞委托上海吉玛基因构建,所有细胞均在实验前进行支原体检测。DMEM、RPMI 1640、HEPES、胎牛血清(FBS)和GlutaMAX™L-丙氨酸-L-谷氨酰胺二肽等均购自美国Gibco公司。多西环素(doxycycline, DOX)诱导质粒pCW57.1-myrAKT购自广州艾迪基因科技有限责任公司,DOX诱导质粒pGIPZ-CBS shRNA1、pGIPZ-CBSshRNA2和pGIPZ-CBS nc-shRNA均购自上海纽普生物科技有限公司。兔抗人CBS、CTH、xCT、p-AKT、cyclin D1、RB、p53、p-RB、p53和p21一抗、兔抗鼠CBS、RB、p53、p-RB、p53和p21一抗及兔抗鼠Ki67单抗、Cy3或HRP标记的山羊抗兔或抗小鼠二抗均购自英国Abcam公司。无特定病原体(SPF)级4周龄、雄性BALB/c裸鼠购自施莱克公司(中国上海),许可证号:[SCXK(沪)2017-0005]。

### 1.2 细胞培养和转染

人支气管上皮细胞SV-40用DMEM无血清培养基,人肺腺癌细胞A549、肺鳞癌SKMES1细胞用RPMI 1640培养基,大细胞肺癌NCIH460细胞用含10% FBS的DMEM培养基,均在37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下进行培养。

使用Lipofectamine™2000将pCW57.1-myrAKT分别与pGIPZ-CBS-nc-shRNA、pGIPZ-CBS-shRNA1和pGIPZ-CBS-shRNA2共转染处于生长对数期的A549细胞,其分为对照组(共转染pCW57.1-myrAKT+pGIPZ-CBS-nc-sh)、CBS-sh1组(pCW57.1-myrAKT+pGIPZ-CBS-shA1)和CBS-sh2组(pCW57.1-myrAKT+pGIPZ-CBS-shRNA2),共转染组又分DOX诱导组(DOX<sup>+</sup>)和不诱导组(DOX<sup>-</sup>),DOX<sup>+</sup>组培养液中加入1 000 ng/mL DOX进行诱导,DOX<sup>-</sup>组细胞正常培养液培养,继续培养48 h,然后进行后续实验。

### 1.3 过表达CBS的A549癌细胞裸鼠移植瘤的制备

BALB/c裸鼠24只,通过随机表法将它们随机分成4组,分别为DOX<sup>+</sup>CBS<sup>I278T</sup>A549细胞组、DOX<sup>+</sup>CBS<sup>I278T</sup>A549细胞组、DOX<sup>-</sup>CBS<sup>wt</sup>A549细胞组和DOX<sup>+</sup>CBS<sup>wt</sup>A549细胞组,每组6只。在DOX<sup>+</sup>组小鼠饮水中加入2mg/ml的DOX,DOX<sup>-</sup>组不加。于小鼠7~8周龄将 $1 \times 10^6$ 个各组稳定表达目标基因的A549细胞(DMEM培养基悬浮)注射于裸鼠左前肢腋下皮下。从第30天开始,每10 d使用游标卡尺测量肿瘤大小,直至第70天。测量记录瘤块宽度(mm)和长度(mm),用公式 $[(\text{瘤体长径} \times \text{瘤体短径}^2)/2]$ 计算其体积大小。第71天断颈法处死裸鼠,取出移植瘤,用4%多聚甲醛固定或-80℃保存。

### 1.4 AzMC荧光染色法检测移植瘤组织中H<sub>2</sub>S的含量

使用7-叠氮基-4-甲基香豆素(AzMC)荧光染料检测H<sub>2</sub>S含量:AzMC反应缓冲液由200 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、20 mmol/L L-半胱氨酸、1 mmol/L L-高半胱氨酸和100 μmol/L 吡哆醛5'-磷酸盐水合物组成,由此缓冲液制备20 μmol/L AzMC水合物并保存在冰上。移植瘤组织用细胞裂解缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、150 mmol/L NaCl、1% IGEPAL CA-630、1% Triton-X100]裂解,样品在冰上处理1 h后在4℃下20 000 ×g离心10 min获取总蛋白质,通过DC蛋白质测定法进行蛋白质定量。将400 μg蛋白质与100 μL 20 μmol/L AzMC水合物混合,在37℃避光处理2 h,使用Cytation™III细胞成像多模式阅读器,在340 nm激发光/445 nm发射光条件下对样本进行检测。

### 1.5 细胞集落形成实验检测转染后各组A549细胞的增殖能力

将转染后各组细胞按 $1 \times 10^3$ 个细胞/孔接种于6孔培养板中,每组设3个复孔。DOX<sup>+</sup>组培养液中加入1 000 ng/mL DOX进行诱导,DOX<sup>-</sup>组细胞正常培养液培养,培养10 d后,用甲醇固定细胞,用结晶紫染色,用H<sub>2</sub>O充分洗涤、干燥,使用ChemiDoc™成像系统获得图像。倒置显微镜(×40)观察细胞集落形成情况、计数并拍照。

### 1.6 WB法检测移植瘤组织和肺癌细胞中半胱氨酸代谢和AKT/cyclinD1通路相关蛋白的表达

用SDS-裂解缓冲液提取移植瘤组织和肺上皮SV-40细胞、肺腺癌A549细胞、肺鳞SKMES1细胞和大细胞肺癌NCIH460细胞的蛋白质,采用Bio-Rad DC蛋白质测定法测定蛋白质浓度。通过SDS-PAGE分离蛋白质,随后将蛋白转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入兔抗人CBS、CTH、xCT、p-AKT、cyclin D1、RB、p53、p-RB、p53和p21(1:1 000~

1:2 500稀释)或兔抗鼠CBS、RB、p53、p-RB、p53和p21(1:500~1:2 000稀释)一抗4℃处理过夜,加入HRP标记羊抗兔或鼠二抗(1:1 000)室温下处理1.5 h,最后利用ECL发光液进行化学发光显影,利用ChemiDoc™成像系统进行图像采集,以GAPDH为内参,用Image J软件进行定量分析。

### 1.7 免疫荧光法和免疫组织化学实验检测肺腺癌细胞和移植瘤组织中CBS或Ki67的表达

免疫荧光法检测肺腺癌组织及癌旁组织中CBS的表达,免疫组织化学法检测移植瘤组织中Ki67的表达。肺癌组织、癌旁组织和移植瘤组织经固定、脱水、石蜡包埋和切片,将切片常规脱蜡水化,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>封闭内源性过氧化物酶,加入CBS(1:200)、Ki67一抗(1:200)4℃处理过夜。次日,CBS抗体处理的标本加入Cy3标记羊抗兔二抗37℃处理30 min,DAPI复染后封片;Ki67抗体处理的标本加入HRP标记羊抗兔二抗37℃处理30 min,DAB显色,复染、脱水,封片。显微镜下观察和拍照。使用Image J分析标本的CBS阳性染色的荧光强度或Ki67阳性细胞的百分率。Ki67阳性率=阳性细胞数/总细胞数×100%。

### 1.8 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。采用SPSS19.0软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间差异使用单因素方差分析,多组间两两比较采用LSD法。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CBS在数据库肺腺癌组织和国人癌组织样本中均呈低表达

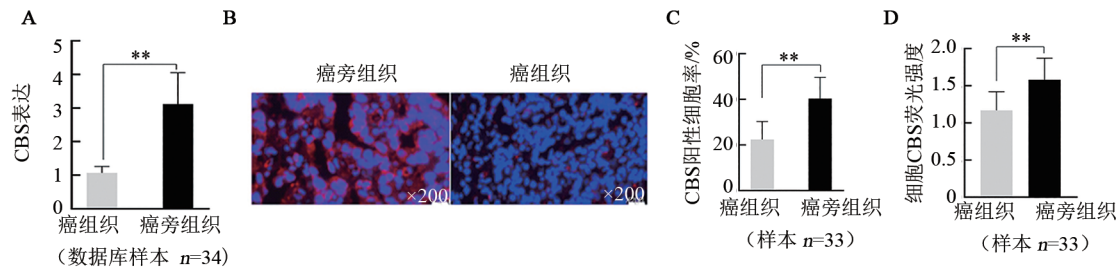
本研究对cBioPortal(<http://www.cbioportal.org>)数据库中34例肺腺癌样本进行TCGA数据分析发现,与癌旁组织比较,CBS在肺腺癌组织中呈低表达(图1A, $P < 0.01$ ),其中32.4%(11/34)肺腺癌患者中发生AKT/cyclin D1信号通路的异常改变、2.9%(1/34)的肺腺癌患者中发现CBS基因突变,提示CBS基因突变与AKT/cyclin D1信号通路的异常在肺腺癌中可能同时存在。采用33例人肺腺癌组织标本进行免疫荧光染色进行验证,检测结果(图1B~D)显示,肺腺癌组织中CBS细胞阳性率(图1C)及其胞质中CBS荧光强度均显著低于其癌旁组织(均 $P < 0.01$ )。

### 2.2 肺癌细胞中CBS蛋白呈低表达而半胱氨酸代谢途径及AKT/cyclinD1通路相关蛋白均呈高表达

WB法检测人支气管上皮SV-40细胞、肺腺癌A549细胞、肺鳞癌SKMES1细胞、大细胞肺癌NCIH460细胞中CBS,半胱氨酸代谢相关蛋白CTH和xCT,AKT/cyclin

D1通路相关蛋白p-AKT、cyclin D1和p53的表达,检测结果(图2)显示,与对照组SV-40细胞相比,CBS的表达在所有肺癌细胞中均呈低表达,xCT在A549、SKMES1、NCIH460中呈显著高表达,而p-AKT、cyclin D1蛋白在A549、SKMES1细胞中呈显著高表达(均 $P<0.01$ ),提示

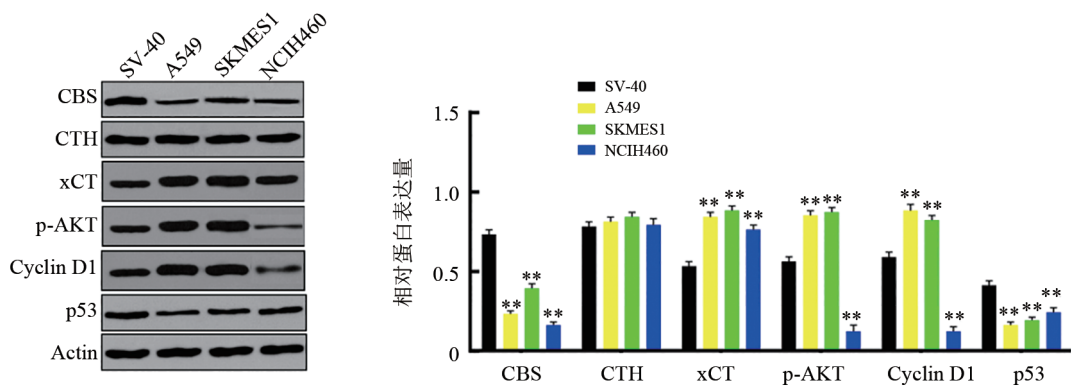
在上述肺癌细胞中AKT/cyclin D1信号通路高度活化。鉴于CBS在A549细胞呈低表达,而AKT/cyclin D1通路在肺腺癌A549细胞中又呈现出过度活化,因此在后续实验中采用A549细胞研究CBS在肺腺癌发生发展中的作用。



\*\* $P<0.01$

A: cBioPortal数据库中肺癌组织和癌旁组织中CBS的表达;B:国人肺腺癌组织免疫荧光染色;  
C:人肺腺癌组织中CBS阳性细胞百分率;D:人肺腺癌组织细胞质中CBS荧光强度

图1 CBS在数据库和国人肺腺癌组织中的表达



与SV-40细胞比较,\*\* $P<0.01$

图2 CBS和半胱氨酸代谢相关蛋白及AKT/cyclin D1通路相关蛋白在肺癌细胞中的表达

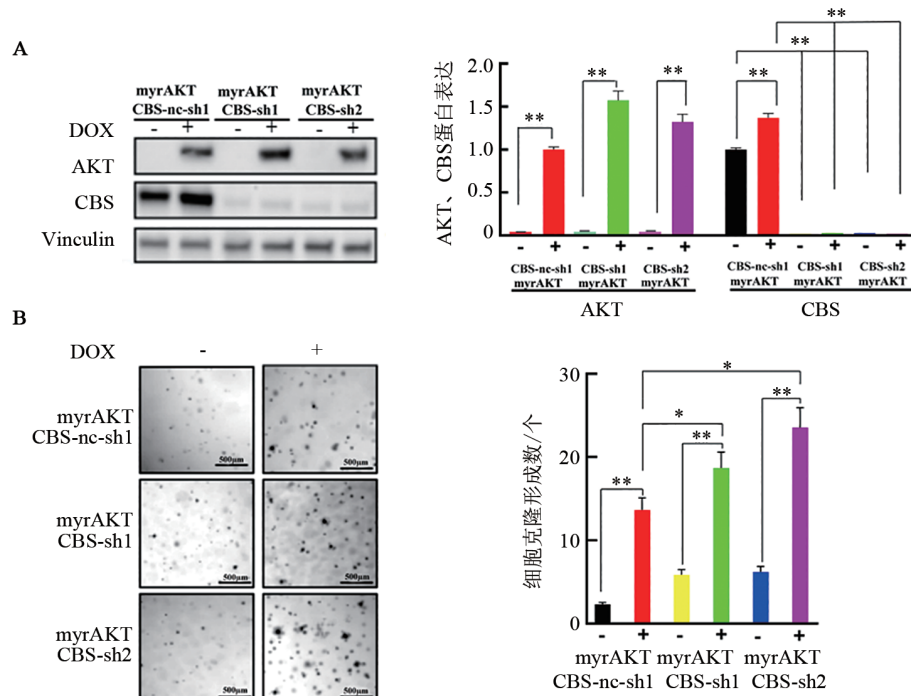
### 2.3 敲减CBS和过表达AKT促进A549细胞的增殖

转染和DOX诱导实验结果(图3)显示,与DOX<sup>-</sup>组比较,DOX<sup>+</sup>有效地诱导了转染细胞中AKT和CBS的过表达(图3A,均 $P<0.01$ );CBS敲减实验结果显示,与CBS nc-sh组比较,DOX<sup>-</sup> CBS-sh1组、DOX<sup>+</sup> CBS-sh1组、DOX<sup>-</sup> CBS-sh2组和DOX<sup>+</sup> CBS-sh2组都有效地敲减了A549细胞中CBS的表达(图3A,均 $P<0.01$ )。肺腺癌A549细胞集落形成实验结果显示,与DOX<sup>-</sup>/CBS nc-sh组比较,DOX<sup>+</sup>/CBS nc-sh组AKT高表达后,A549细胞集落形成数量明显增多(图3B, $P<0.01$ );在诱导AKT高表达后进一步敲减CBS(DOX<sup>+</sup>/CBS-sh1组和DOX<sup>+</sup>/CBS-sh2)后,A549细胞集落形成数量进一步增多(图3B, $P<0.01$ )。上述结果提示,活化AKT/cyclin D1通路和CBS敲减都能促进A549细胞的增殖能力增强。

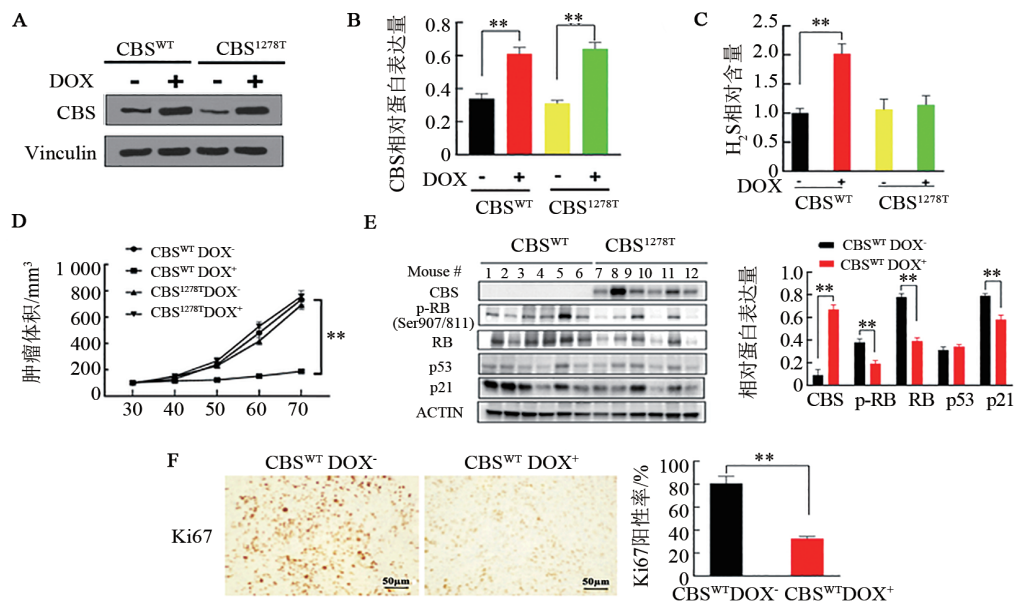
### 2.4 过表达CBS抑制裸鼠A549细胞移植瘤的生长

移植瘤实验结果显示,与DOX<sup>-</sup>CBS<sup>1278T</sup>组比较,DOX<sup>+</sup>CBS<sup>1278T</sup>组移植瘤组织中的CBS表达明显升高(图4A、B, $P<0.01$ ),但H<sub>2</sub>S含量和移植瘤体积都没有明显变化(图4C~D),说明CBS基因突变的A549细胞移植瘤生长不受突变CBS影响。与DOX<sup>-</sup>CBS<sup>WT</sup>组比较,DOX<sup>+</sup>CBS<sup>WT</sup>组移植瘤组织中的CBS表达也明显增加,且H<sub>2</sub>S产生明显增加(均 $P<0.01$ ),移植瘤体积的增长明显受到抑制( $P<0.01$ );免疫组化染色结果(图4F)显示,与DOX<sup>-</sup>CBS<sup>WT</sup>组比较,DOX<sup>+</sup>CBS<sup>WT</sup>组移植瘤组织中的Ki67阳性细胞明显减少( $P<0.01$ );这些结果表明,野生型CBS的A549细胞种植的移植瘤,其生长受过表达CBS的抑制,而且与H<sub>2</sub>S水平密切相关。WB法检测结果(图4E)显示,与DOX<sup>-</sup>CBS<sup>WT</sup>组比较,DOX<sup>+</sup>CBS<sup>WT</sup>组移植瘤组织中的p-RB和P21的表达明显减少( $P<0.01$ ),P53表达无明显变化,提示CBS的表达升高对肺腺癌的抑制可能

不依赖于p53蛋白。



+:DOX 诱导;-:DOX 未诱导;CBS nc-sh: CBS RNA 干扰对照;CBS-sh1: CBS RNA 干扰序列 1;CBS-sh12: CBS RNA 干扰序列 2;  
图3 DOX 诱导下myrAKT 和pGIPZ-nc-shCBS 或pGIPZ-shCBS 稳定共转染的A549 细胞(A)在软琼脂上形成集落数(B)的比较



\*\*P<0.01

A、B: 分别是DOX 诱导的CBS<sup>WT</sup> 和CBS<sup>1278T</sup> A549 细胞移植瘤组织中CBS 蛋白表达; C: 移植瘤组织中H<sub>2</sub>S 的水平; D: DOX 诱导CBS<sup>WT</sup> 表达可抑制裸鼠肿瘤生长; E: 移植瘤组织CBS、p-RB(Ser907/811)、RB、p53 和p21 蛋白表达; F: 免疫组化检测移植瘤组织Ki67 表达

图4 A549 细胞裸鼠移植瘤的生长与CBS、Ki67、H<sub>2</sub>S 等表达的关系

### 3 讨论

#### 3.1 CBS 在肺腺癌中的表达

CBS 在多种疾病中表达上调, 包括唐氏综合征和多种癌症<sup>[9]</sup>。据研究<sup>[10-11]</sup>报道, CBS 在甲状腺癌、胃癌、膀胱癌和肾细胞癌中的表达水平上调, 并与肿瘤

的分期、大小及转移相关, 但是其在肺腺癌中的表达尚未有人研究。本研究结果发现, CBS 在肺腺癌中的表达低于癌旁组织, 肿瘤胞质中的表达低于癌旁细胞胞质, 说明CBS 在肺腺癌中表达下调, 这与该基因在其他癌症中的高表达结果相悖。这说明了CBS 在不同癌症中的表达水平各异, 其功能也可能存在

差异, CBS在肺腺癌细胞中的功能及其潜在的临床价值仍需要继续深入探究。

### 3.2 肺腺癌中CBS通过调控半胱氨酸代谢相关蛋白xCT和AKT/cyclin D1通路相关蛋白而影响肺腺癌细胞增殖

AKT/cyclin D1信号通路的激活可以减低肺癌细胞内ROS水平, 导致肿瘤增殖。如刺激氧化磷酸化、抑制FoxO转录因子的表达, 进而加强ROS的清除; 另一方面, AKT/cyclin D1信号通路的激活抑制抗氧化反应<sup>[12]</sup>, 导致对抗肿瘤抑制因子。AKT/cyclin D1信号通路介导ROS的清除主要通过持续激活NRF2<sup>[13]</sup>。AKT/cyclin D1信号通路减低ROS水平的另一种机制是通过上调转硫途径活性和增强谷胱甘肽诱导H<sub>2</sub>S合成, 而转硫途径中的关键代谢酶CBS和CTH, 如抑制AKT/cyclin D1信号通路会降低CBS和CTH的表达<sup>[14]</sup>。上述作用可能与Keap1的巯基化、NRF2的激活有关或者抗氧化剂谷胱甘肽的产量增加有关<sup>[15]</sup>。CBS的缺失反过来上调xCT的活性并导致补偿性的胱氨酸摄取和谷胱甘肽合成的增加<sup>[16]</sup>。本研究发现在原发性肺腺癌组织和人肺腺癌细胞系中, 通过表观遗传沉默CBS蛋白表达致使肺腺癌细胞中xCT蛋白表达明显升高、肿瘤明显缩小。这与最近报道相一致, 即癌细胞维持细胞内半胱氨酸水平和通过增加xCT调控的胱氨酸摄取维持癌细胞增殖<sup>[16]</sup>。本研究还发现CBS蛋白表达减低与AKT/cyclin D1信号通路过度激活协同促进肺肿瘤细胞增殖, 提升CBS蛋白表达能有效抑制AKT/cyclin D1过度活跃所致的肺腺癌细胞增殖。以往研究<sup>[17]</sup>发现, 通过硫氢化钠(NaHS)干预, 增加H<sub>2</sub>S含量可引起肺肿瘤细胞凋亡和转移受限。但是否CBS对肺腺癌细胞的抑瘤作用是否通过H<sub>2</sub>S调控仍需进一步研究。

综上所述, 上调CBS可抑制肺腺癌A549细胞移植瘤的生长, 提示CBS作为潜在的肿瘤抑制因子, 产生这种作用的机制可能与激活AKT/cyclin D1通路有关, 因此, CBS和AKT/cyclin D1通路可能是肺腺癌临床治疗的潜在的靶点和生物标志物。

### [参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] CHO J H. Immunotherapy for non-small-cell lung cancer: current status and future obstacles[J/OL]. *Immune Netw*, 2017, 17(6): 378 [2022-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29302251/>. DOI: 10.4110/in.2017.17.6.378.
- [3] KOPPULA P, ZHUANG L, GAN B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. *Protein Cell*. 2021, 12(8):599-620. DOI: 10.1007/s13238-020-00789-5.
- [4] DEY A, PRABHUDESAI S, ZHANG Y S, *et al.* Cystathione β-synthase regulates HIF-1α stability through persulfidation of PHD2 [J/OL]. *Sci Adv*, 2020, 6(27): eaaz8534[2022-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32937467/>. DOI:10.1126/sciadv.aaz8534.
- [5] KNEJZLIK Z, DOLEZAL M, HERKOMMEROVA K, *et al.* The mycobacterial guaB1 gene encodes a guanosine 5'-monophosphate reductase with a cystathionine-β-synthase domain[J]. *FEBS J*, 2022, 289(18):5571-5598. DOI:10.1111/febs.16448.
- [6] PHILLIPS C M, ZATARAIN J R, NICHOLLS M E, *et al.* Upregulation of cystathionine-β-synthase in colonic epithelia reprograms metabolism and promotes carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(21): 5741-5754. DOI:10.1158/0008-5472.can-16-3480.
- [7] LIU M Z, WU L Y, MONTAUT S, *et al.* Hydrogen sulfide signaling axis as a target for prostate cancer therapeutics[J/OL]. *Prostate Cancer*, 2016, 2016: 8108549[2022-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27019751/>. DOI:10.1155/2016/8108549.
- [8] AKANDA M R, PARK J S, NOH M G, *et al.* TACC<sub>3</sub> promotes gastric carcinogenesis by promoting epithelial-mesenchymal transition through the ERK/Akt/cyclin D1 signaling pathway[J]. *Anticancer Res*, 2021, 41(7): 3349-3361. DOI:10.21873/anticancer.15123.
- [9] ZUHRA K, AUGSBURGER F, MAJTAN T, *et al.* Cystathionine-β-synthase: molecular regulation and pharmacological inhibition [J/OL]. *Biomolecules*, 2020, 10(5): 697[2022-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32365821/>. DOI:10.3390/biom10050697.
- [10] TURBAT-HERRERA E A, KILPATRICK M J, CHEN J, *et al.* Cystathione β-synthase is increased in thyroid malignancies[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(11): 6085-6090. DOI: 10.21873/anticancer.12958.
- [11] PADMANABHAN N, KYON H K, BOOT A, *et al.* Highly recurrent CBS epimutations in gastric cancer CpG island methylator phenotypes and inflammation[J/OL]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 167[2022-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34074348/>. DOI:10.1186/s13059-021-02375-2.
- [12] DE SEMIR D, BEZROOKOVE V, NOSRATI M, *et al.* Phip as a therapeutic target for driver-negative subtypes of melanoma, breast, and lung cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(25): E5766-E5775. DOI:10.1073/pnas.1804779115.
- [13] HOXHAJ G, MANNING B D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(2): 74-88. DOI:10.1038/s41568-019-0216-7.
- [14] LIU Y, LIAO R B, QIANG Z R, *et al.* Pro-inflammatory cytokine-driven PI3K/Akt/Sp1 signalling and H<sub>2</sub>S production facilitates the pathogenesis of severe acute pancreatitis[J/OL]. *Biosci Rep*, 2017, 37(2): BSR20160483[2022-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28396512/>. DOI:10.1042/BSR20160483.
- [15] GONG M L, LI Y, YE X P, *et al.* Loss-of-function mutations in KEAP1 drive lung cancer progression via KEAP1/NRF<sub>2</sub> pathway activation[J/OL]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 98[2022-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32576270/>. DOI: 10.1186/s12964-020-00568-z.
- [16] ZHU J J, BERISA M, SCHWÖRER S, *et al.* Transsulfuration activity can support cell growth upon extracellular cysteine limitation[J/OL]. *Cell Metab*, 2019, 30(5): 865-876.e5[2022-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31607565/>. DOI:10.1016/j.cmet.2019.09.009.
- [17] AUGSBURGER F, SZABO C. Potential role of the 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST)-hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) pathway in cancer cells[J/OL]. *Pharmacol Res*, 2020, 154: 104083[2022-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30500457/>. DOI:10.1016/j.phrs.2018.11.034.

[收稿日期] 2022-07-03

[修回日期] 2022-10-14

[本文编辑] 向正华, 沈志超