

5-磷酸核糖醇转移酶 fukutin 抑制 HeLa 细胞中 α -dystroglycan 的分泌

周 恒, 乔 兵, 李彩红, 李 强, 朱昉修, 范礼斌

摘要 目的 探究 5-磷酸核糖醇转移酶 fukutin(FKTN)对 HeLa 细胞周期、凋亡、迁移以及 α 抗肌萎缩相关糖蛋白(α -DG)分泌的影响。方法 构建质粒 pcDNA3.1- α -DAG-HA, 将 pcDNA3.1-FKTN-3xFlag 转染至 HeLa 细胞, 提取总蛋白, Western blot 法检测 FKTN 的过表达;过表达 FKTN 后利用流式细胞术检测细胞周期、凋亡情况;过表达 FKTN 后, 采用细胞划痕实验检测细胞迁移速率, 使用麦胚凝集素琼脂糖珠(WGA-agarose)富集培养液中的 α -DG, 然后进行 Western blot 检测。结果 成功构建 pcDNA3.1- α -DAG-HA 真核表达质粒;FKTN 在 HeLa 细胞中可过表达;过表达 FKTN 后与对照组相比, 实验组细胞周期 S 期百分比下降($P < 0.001$), 细胞凋亡率无变化($P > 0.05$);过表达 FKTN 后与对照组相比, 实验组细胞迁移速率无变化($P > 0.05$), α -DG 分泌量减少。结论 过表达 FKTN 阻滞 HeLa 细胞周期, 抑制 α -DG 分泌, 但对细胞凋亡、迁移无影响。

关键词 FKTN; 细胞周期; 凋亡; 迁移; 分泌

中图分类号 R 34; Q 28

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1640-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.023

抗肌萎缩相关糖蛋白(dystroglycan, DG)由 α 和 β 两个亚基构成^[1], 位于胞外的 α 亚基通过与跨膜的 β 亚基非共价连接, 而将胞外基质组分(如层粘连蛋白)与胞内组分(如 dystrophin)连接起来^[2]。研究^[2]表明 α -DG 在中枢神经系统的结构和功能、上皮的形态发生、细胞黏附、突触的发生和信号转导等方面发挥重要作用。

研究^[3]表明 α -DG 的结构和功能与该蛋白复杂的糖基化修饰密切相关。FKTN 是 5-磷酸核糖醇转

移酶家族成员之一, 可将 5-磷酸核糖醇共价连接到 α -DG O-糖基化的 M3 核心, 而 fukutin 相关蛋白(fukutin-related protein, FKR)将 5-磷酸核糖醇添加到前一个 5-磷酸核糖醇后, 后续的糖基转移酶在串联的 5-磷酸核糖醇上继续延伸糖链^[4]。 α -DG 的杂多糖链上的木糖-葡萄糖醛酸二糖重复单元是许多胞外基质蛋白结合的区域, 而 5-磷酸核糖醇是这个重复结构形成的必不可少的引物^[4]。课题组拟通过在 HeLa 细胞中过表达 FKTN 后探究其对细胞周期、凋亡、迁移和 α -DG 分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞、菌株和质粒 HeLa 细胞、TG1 菌株、pcDNA3.1 载体、质粒 pcDNA3.1- α -DAG-FLAG 为范礼斌课题组保存^[5], 质粒 pcDNA3.1-FKTN-3xFlag 购自湖南优宝生物科技有限公司(货号:F138577)。

1.2 主要仪器 BSC-II 级生物安全柜(1300)、微量核酸检测仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; 小型梯度 PCR 仪、电泳仪(美国伯乐生物科技有限公司); 全自动化学发光成像仪、小型垂直转移槽(上海天能生物科技有限公司); 倒置显微镜(日本奥林巴斯株式会社); CytoFLEX 流式细胞仪、高速冷冻离心机[贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司]; 光吸收酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]。

1.3 主要试剂 胎牛血清(美国 Clark Bioscience 公司); Opti-MEM[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; Lipo8000™ 转染试剂、苯甲基磺酰氟(PMSF)、胰酶细胞消化液(含 EDTA)、Western 细胞裂解液、一抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司); 蛋白酶抑制剂混合物(美国 MedChemExpress); 改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒、EcoR I、Xba I 限制性内切酶、T4 连接酶(上海生工生物有限公司); DNA 聚合酶[宝日医生物技术(北京)有限公司]; 胶回收、质粒提取试剂盒(广州飞扬生物工程有限公司); PI 染液(美国 BD Biosciences); Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂(上海贝博生物科技有限公司); 0.2 μ m PVDF 膜(美国伯乐生物科技有限公司);

2022-08-15 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:11040606M170); 安徽医科大学双肩挑干部学术恢复科研专项(编号:0112011109)

作者单位:安徽医科大学生命科学院生物系, 合肥 230032

作者简介:周 恒, 女, 硕士研究生;

范礼斌, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:lfan@ahmu.edu.cn;

朱昉修, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者

WGA-agarose(美国 Vector Laboratories); FLAG 抗体 [西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司]; HA 抗体 [圣克鲁斯生物技术(上海)有限公司]; GAPDH 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司); IHH6 C4 抗体(美国爱荷华大学 Campbell, K. P 教授赠送); 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgM(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 质粒构建 PCR 引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成, α -DAG-HA 正向引物序列: GGAATTCGCCACCATGAGGATGTCTGT, 反向引物序列: GCTCTAGAGCTTAAGCGTAATCTGGAACATC-GTATGGGTAGCCCCGGGTGATATTCT。以 pcDNA3.1- α -DAG-FLAG 质粒为模板, PCR 扩增出含 HA 标签的 α -DAG, 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 使用胶回收试剂盒进行回收, 得到其 PCR 纯化产物。使用 EcoR I、Xba I 限制酶分别酶切 PCR 纯化产物和 pcDNA3.1 载体, 用 T4 连接酶将两者的酶切产物进行连接。连接产物转化至 TG1 感受态细胞中, 37 °C 培养约 10 h, 分别挑取数个单克隆进行扩大培养约 12 h, 提取质粒后, 用 EcoR I 和 Xba I 进行酶切鉴定, 最后将酶切正确的重组质粒送通用生物系统(安徽)有限公司进行测序。

1.4.2 细胞培养与转染 用完全培养基(10% FBS + 90% DMEM 高糖培养基 + 100 U/ml 青霉素 + 100 μ g/ml 链霉素)于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 HeLa 细胞, 待细胞生长至 90% 汇合度时即可进行细胞传代。提前一天接种 1.5×10^6 个 HeLa 细胞至 6 cm 培养皿中, 使第 2 天细胞汇合度为 70% ~ 90%。取一个无菌的离心管, 加入 250 μ l Opti-MEM, 加入 5 μ g 质粒和 8 μ l Lipo8000™ 转染试剂, 混合后加至培养皿中, 培养至 48 h 时用于后续实验。

1.4.3 流式细胞术检测细胞周期 将 pcDNA3.1-FKTN-3xFlag 转染至 HeLa 细胞中, 培养 48 h 后收集细胞沉淀。用预冷的 PBS 清洗后, 加入 500 μ l 预冷的 70% 乙醇并 -20 °C 固定过夜。离心后用预冷的 PBS 清洗, 再加入 500 μ l PI 染液, 4 °C 避光孵育 15 min 后, 流式细胞仪检测细胞周期, FlowJo 软件用于分析细胞周期各时相百分比。

1.4.4 流式细胞术检测细胞凋亡 将 pcDNA3.1-FKTN-3xFlag 转染至 HeLa 细胞中, 培养 48 h 后收集细胞沉淀。用预冷的 PBS 清洗后, 加入 400 μ l An-

nexin V 结合液使细胞悬浮(密度大约为 10^6 /ml)。再加入 5 μ l Annexin V-FITC 染色液, 4 °C 避光孵育 15 min, 最后加入 10 μ l PI 染色液, 4 °C 避光孵育 5 min 后立即用流式细胞仪检测细胞凋亡, 用 Flow Jo 软件分析凋亡率。

1.4.5 细胞划痕实验 先用笔在 12 孔板背后均匀划 3 条横线, 每条线间隔 0.5 cm 横穿过孔, 接种 3.5×10^5 个 HeLa 细胞至 12 孔板中, 第 2 天细胞单层铺满。将 pcDNA3.1-FKTN-3xFlag 和 pcDNA3.1 分别转染至 HeLa 细胞中(设置复孔), 转染 6 ~ 8 h 后用 100 μ l 枪头垂直于背面的横线于汇合完全的单细胞层中划线。用 PBS 清洗后, 加无血清培养基。显微镜下观察并记录, 此为 0 h, 继续培养至 24 h 时观察并记录。

1.4.6 WGA 富集实验 将相关质粒分别转染至 HeLa 细胞中, 培养 48 h 后收集培养液, 立即放置冰上并加入 PMSF 和蛋白酶抑制剂混合物。离心后取少量上清液用于改良型 Bradford 试剂盒测定总蛋白浓度, 其余加入 10 μ l WGA-agarose, 4 °C 孵育过夜。上述溶液离心后, 沉淀用清洗液(PBS + 0.1% TritonX-100)清洗, 沉淀用于 Western blot 检测。

1.4.7 Western blot 法检测蛋白表达 SDS-PAGE 后的凝胶用电转仪(252 mA 恒流 1.5 h)将目的蛋白转移到 PVDF 膜上。膜置于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 1.5 h, 然后分别于相应的一抗(稀释比为 1 : 1 000)4 °C 孵育过夜, 二抗(稀释比为 1 : 2 500)室温孵育 1.5 h, 用 ECL 试剂盒进行显色, 再用化学发光仪拍摄。

1.5 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验比较两组间均数。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 真核表达质粒构建 将构建的 pcDNA3.1- α -DAG-HA 质粒进行酶切鉴定, 酶切鉴定正确的质粒送通用生物系统(安徽)有限公司测序。结果表明: 构建的质粒含有插入片段(图 1A 泳道 2、3、4), 测序结果显示载体上的插入片段是正确的(图 1B)。

2.2 HeLa 细胞过表达 FKTN HeLa 细胞转染 FKTN 后, 进行 Western blot 检测。结果显示: FKTN 可见相应的目的条带, 而对照组未见任何条带, 表明 FKTN 在 HeLa 细胞中可表达(图 2 泳道 3)。

2.3 FKTN 阻滞细胞周期 HeLa 细胞过表达 FKTN 后, 使用流式细胞仪检测细胞周期(表 1)。结果

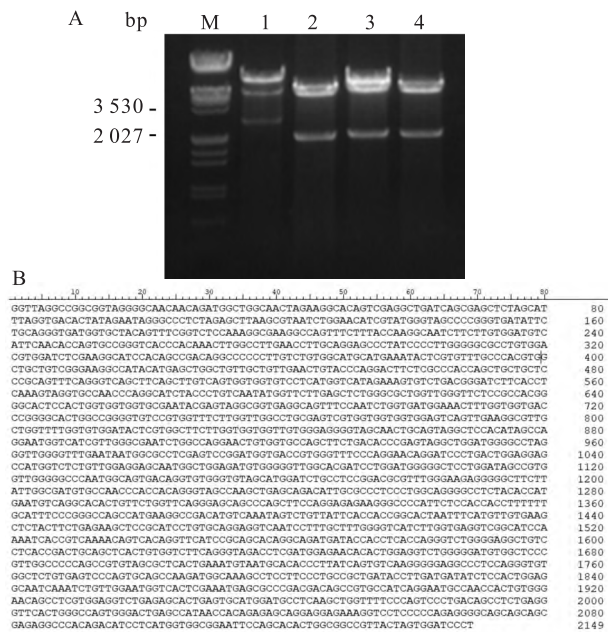


图1 pcDNA3.1-α-DAG-HA 重组质粒的酶切鉴定与测序结果

A: pcDNA3.1-α-DAG-HA 重组质粒酶切鉴定图; 1: pcDNA3.1-DAG1-HA 酶切产物; 2~4: pcDNA3.1-α-DAG-HA 酶切产物; M: Marker; B: pcDNA3.1-DAG1-HA 测序结果图

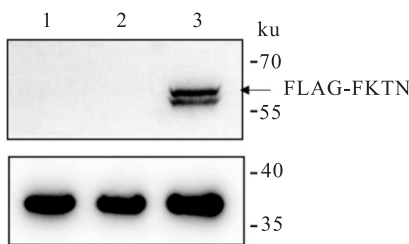


图2 FKTN 在 HeLa 细胞中的过表达

1: 未转染的 HeLa 细胞裂解液; 2: 转染 pcDNA3.1 的 HeLa 细胞裂解液; 3: 转染 pcDNA3.1-FKTN-3xFlag 的 HeLa 细胞裂解液

表1 FKTN 对细胞周期各时相平均百分比的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	G1	S	G2
对照	49.63 ± 1.021 0	36.77 ± 0.152 8	12.00 ± 0.608 3
FKTN 过表达	50.77 ± 0.602 8	34.73 ± 0.378 6	14.10 ± 0.529 2
t 值	1.655	8.677	4.512
P 值	>0.05	<0.001	<0.05

显示:与对照组相比,FKTN 过表达组 S 期百分比下降($P < 0.001$),G2 期百分比升高($P < 0.05$),G1 期百分比无变化($P > 0.05$)。表明过表达的 FKTN 使 HeLa 细胞 S 期减少、G2 期增加,因而阻滞了细胞周期(图 3)。

2.4 FKTN 对细胞凋亡的影响 HeLa 细胞过表达 FKTN 后,使用流式细胞仪检测凋亡情况(表 2)。

结果显示:与对照组相比,FKTN 过表达组细胞凋亡率无变化($P > 0.05$)。表明 FKTN 对 HeLa 细胞凋亡无影响(图 4)。

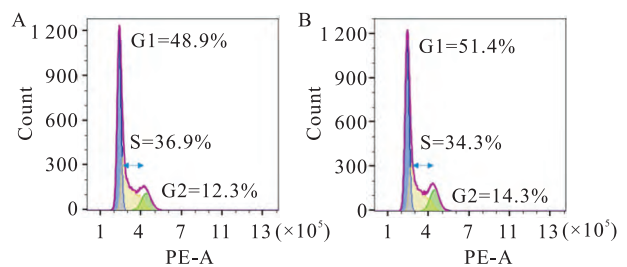


图3 FKTN 过表达后 HeLa 细胞的细胞周期图

A: 转染 pcDNA3.1 的对照组; B: 转染 pcDNA3.1-FKTN-3xFlag 的过表达组

表2 FKTN 对细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率 (%)			平均凋亡率 (%)
	1	2	3	
对照	5.31	4.23	4.18	4.573 ± 0.638 5
FKTN 过表达	4.18	4.44	4.23	4.283 ± 0.138 0
t 值				0.769
P 值				>0.05

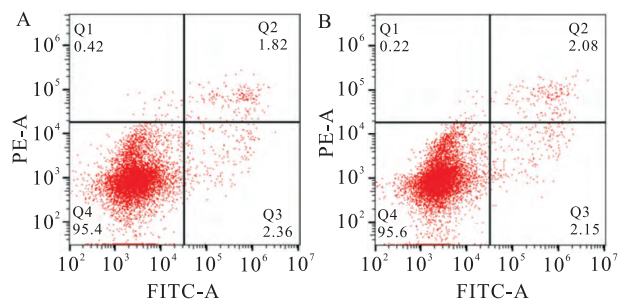


图4 FKTN 过表达后 HeLa 细胞的凋亡情况

A: 转染 pcDNA3.1 的对照组; B: 转染 pcDNA3.1-FKTN-3xFlag 的过表达组

2.5 FKTN 对细胞迁移的影响 HeLa 细胞过表达 FKTN 后,采用细胞划痕实验检测细胞迁移速率。S₀ 表示 0 h 时两条线之间的面积,S₂₄ 表示 24 h 时两条线之间的面积,迁移速率 = (S₀ - S₂₄)/S₀。结果显示:与对照组相比,FKTN 过表达组细胞迁移速率无变化($P > 0.05$),如表 3 所示。表明 FKTN 对 HeLa 细胞迁移无影响(图 5)。

2.6 FKTN 对 α-DG 分泌的影响 HeLa 细胞过表达 pcDNA3.1-FKTN-3xFlag 和 pcDNA3.1-α-DAG-HA, pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-α-DAG-HA 后,进行 WGA 富集实验和 Western blot。结果显示:细胞培养液中与对照组相比,FKTN 过表达组 α-DG 分泌量

表3 FKTN对细胞迁移的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	迁移速率(%)			平均迁移速率 (%)
	1	2	3	
对照	18.32	19.17	15.46	17.65 ± 1.944
FKTN 过表达	20.01	16.47	20.23	18.90 ± 2.110
<i>t</i> 值				0.756 7
<i>P</i> 值				>0.05

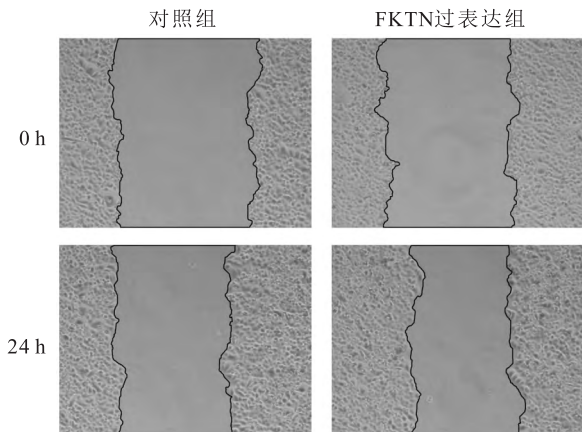


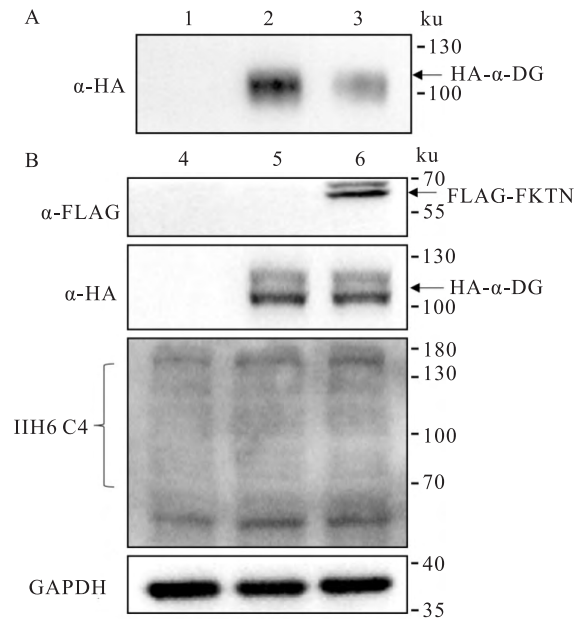
图5 FKTN过表达后HeLa细胞的迁移图 ×100

减少(图6A泳道2、3)。细胞裂解液孵育HA抗体后,对照组和FKTN过表达组均有目的条带,但HA- α -DG表达量无变化(图6B泳道5、6);孵育IIIH6 C4抗体(此抗体特异性识别 α -DG的糖链)后,FKTN过表达组 α -DG糖基化程度高于对照组(图6B泳道5、6)。表明在HeLa细胞中过表达FKTN促进 α -DG糖基化,抑制 α -DG分泌(图6)。

3 讨论

肿瘤进展的标志是侵袭和转移,肿瘤细胞为了远处转移,必须先从基膜中释放出来^[6]。细胞与细胞或基质之间的黏附对于细胞增殖、迁移、分化以及组织的稳定性具有关键性作用^[7],典型的黏附分子包括整合素(integrin)和DG。位于胞外的 α -DG是高度糖基化的受体,它与胞外基质配体和跨膜的 β 抗肌萎缩相关糖蛋白(β -dystroglycan, β -DG)结合从而紧密连接基膜与细胞膜^[7]。FKTN是福山型先天性肌营养不良病的致病基因,这种疾病属于常染色体隐性遗传病,患者表现为先天性肌无力、小脑发育不全以及严重的智力缺陷^[8]。FKTN的功能可能是通过影响 α -DG的糖基化从而对细胞的功能(如迁移)产生影响,siRNA抑制FKTN表达后,星形细胞瘤细胞系出现明显的胞质突起^[9]。

FKTN与细胞增殖的关系已经有报道。例如在胃癌细胞系中siRNA抑制FKTN表达后,细胞增殖

图6 FKTN过表达对 α -DG分泌的影响

A:过表达FKTN后分泌的 α -DG;1:转染pcDNA3.1的HeLa细胞培养液;2:转染pcDNA3.1和pcDNA3.1- α -DAG-HA的HeLa细胞培养液;3:转染pcDNA3.1-FKTN-3xFlag和pcDNA3.1- α -DAG-HA的HeLa细胞培养液;B:过表达FKTN后细胞裂解液中 α -DG及其相关蛋白;4:转染pcDNA3.1的HeLa细胞裂解液;5:转染pcDNA3.1和pcDNA3.1- α -DAG-HA的HeLa细胞裂解液;6:转染pcDNA3.1-FKTN-3xFlag和pcDNA3.1- α -DAG-HA的HeLa细胞裂解液

能力下降^[10]。在星形胶质细胞中,FKTN与激活蛋白1(activator protein-1, AP1)结合,从而促进cyclin D1表达,有利于细胞增殖^[11]。而稳定表达DG的乳腺癌细胞中,细胞周期阻滞在G0/G1期,且 α -DG表达量无明显变化, β -DG表达水平明显增加^[12]。本研究表明过表达FKTN后,HeLa细胞的细胞周期S期百分比下降,阻滞细胞周期进程。在不同的细胞中FKTN对细胞增殖的影响不同,可能与组织和细胞类型的特异性有关。在前列腺癌和乳腺癌细胞中, β 3-N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶1(β 3-N-acetylglucosaminyltransferase 1, β 3GnT1)与类乙酰氨基葡萄糖基转移酶(like acetylglucosaminyltransferase, LARGE)结合共同调节 α -DG糖基化,随后糖基化的 α -DG与laminin的相互作用可拮抗胞外基质组分诱导的ERK/AKT磷酸化,从而抑制肿瘤细胞迁移,抑制肿瘤形成^[13]。本研究虽然表明过表达FKTN后,细胞迁移速率增加,但差异无统计学意义(图5)。

目前暂无文献描述FKTN与细胞凋亡之间的关系,但5-磷酸核糖醇转移酶家族的另一成员FKRP与细胞凋亡密切相关。在FKRP基因突变患者的多

功能干细胞来源的肌管细胞中, ERK1/2 活性降低, 细胞凋亡增加^[14]。本研究表明在 HeLa 细胞中过表达 FKTN 后, 细胞凋亡率无变化(图 4)。DG 在胞内合成后, 被内质网及高尔基体中的一系列糖基转移酶修饰, 从而成为细胞膜中的 α -DG 和 β -DG 或分泌到胞外(α -DG)^[2]。WGA 富集实验常用来分离、鉴定糖基化的 α -DG^[15]。本研究用此方法富集了 HeLa 细胞和培养液, 并分析胞内和分泌的 α -DG 的含量, 结果表明过表达的 FKTN 抑制 α -DG 的分泌。

综上所述, 本研究表明在 HeLa 细胞中过表达 FKTN 阻滞细胞周期, 抑制 α -DG 分泌, 但对细胞凋亡和细胞迁移无影响。

参考文献

- [1] Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti J M, Leveille C J, et al. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix [J]. *Nature*, 1992, 355 (6362):696–702.
- [2] Barresi R, Campbell K P. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119 (Pt 2):199–207.
- [3] Matsumoto H, Noguchi S, Sugie K, et al. Subcellular localization of fukutin and fukutin-related protein in muscle cells [J]. *J Biochem*, 2004, 135(6):709–12.
- [4] Kanagawa M, Toda T. Ribitol-phosphate-a newly identified posttranslational glycosylation unit in mammals: structure, modification enzymes and relationship to human diseases [J]. *J Biochem*, 2018, 163(5):359–69.
- [5] 钱成, 王蓓华, 徐雪琴, 等. 肌营养不良蛋白及其衍生物的表达与定位的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(9):1207–10.
- [6] Condeelis J, Segall J E. Intravital imaging of cell movement in tumours [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(12):921–30.
- [7] Yoshida-Moriguchi T, Campbell K P. Matriglycan: a novel polysaccharide that links dystroglycan to the basement membrane [J]. *Glycobiology*, 2015, 25(7):702–13.
- [8] Schessl J, Zou Y, Bönnemann C G. Congenital muscular dystrophies and the extracellular matrix [J]. *Semin Pediatr Neurol*, 2006, 13(2):80–9.
- [9] Yamamoto T, Shibata N, Saito Y, et al. Functions of fukutin, a gene responsible for Fukuyama type congenital muscular dystrophy, in neuromuscular system and other somatic organs [J]. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 2010, 10(2):169–79.
- [10] Oo H Z, Sentani K, Mukai S, et al. Fukutin, identified by the *Escherichia coli* ampicillin secretion trap (CAST) method, participates in tumor progression in gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2016, 19(2):443–52.
- [11] Okamura Y, Yamamoto T, Tsukui R, et al. Fukutin protein participates in cell proliferation by enhancing cyclin D1 expression through binding to the transcription factor activator protein-1: An in vitro study [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22):12153.
- [12] Sgambato A, Camerini A, Faraglia B, et al. Increased expression of dystroglycan inhibits the growth and tumorigenicity of human mammary epithelial cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3(10):967–75.
- [13] Bao X, Kobayashi M, Hatakeyama S, et al. Tumor suppressor function of laminin-binding alpha-dystroglycan requires a distinct beta3-N-acetylglucosaminyltransferase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(29):12109–14.
- [14] Ortiz-Cordero C, Bincoletto C, Dhoke N R, et al. Defective autophagy and increased apoptosis contribute toward the pathogenesis of FKRP-associated muscular dystrophies [J]. *Stem Cell Reports*, 2021, 16(11):2752–67.
- [15] Ervasti J M, Kahl S D, Campbell K P. Purification of dystrophin from skeletal muscle [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(14):9161–5.

Ribitol-5-phosphate transferase fukutin inhibits the secretion of α -dystroglycan in HeLa cells

Zhou Heng, Qiao Bing, Li Caihong, Li Qiang, Zhu Fangxiu, Fan Libin

(Dept of Biology, School of Life Science, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effects of fukutin (FKTN) which is a member of ribitol-5-phosphate transferases on HeLa cell cycle, apoptosis, migration and the secretion of α -dystroglycan(α -DG). **Methods** The plasmid pcDNA3.1- α -DAG-HA was constructed. HeLa cells were transfected with plasmid pcDNA3.1-FKTN-3xFlag, then the total protein was extracted for Western blot to determine the expression level of FKTN. Cell cycle and apoptosis were measured by flow cytometry after the overexpression of FKTN. Following the overexpression of FKTN, wound-healing assay was performed to detect the cell migration rate, as the same time wheat germ agglutinin-agarose (WGA-agarose) was used to enrich α -DG in the cell cultures, then α -DG was detected by Western blot. **Results** The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1- α -DAG-HA was constructed successfully. FKTN could be overexpressed in HeLa cells. After the overexpression of FKTN, the percentage of S phase of cell cycle in the experimental group decreased ($P < 0.001$) and apoptosis rate unchanged ($P > 0.05$) when compared with the control group. There was no change in the cell migration rate of experimental group ($P > 0.05$), but after the

萝卜硫素下调结直肠癌中 eIF4F 翻译起始复合物的表达

邢运,周大臣,贺良,崔笑,喻宗繁

摘要 目的 研究 eIF4F 复合物的表达与人类结直肠癌(CRC)的相关性,以及萝卜硫素(SFN)影响 CRC 细胞增殖的可能机制。方法 应用免疫组织化学染色法检测 12 例 CRC 患者的肿瘤组织与癌旁组织中 eIF4F 复合物相关蛋白的表达水平;MTT 比色法检测经 SFN 处理后 CRC 细胞的活性;Western blot 法检测经 SFN 处理后 CRC 细胞中 eIF4F 复合物相关蛋白的表达;动物实验(裸鼠成瘤)比较腹腔注射 SFN 后裸鼠皮下肿瘤的生长情况,采用免疫组织化学染色法检测 PI3K/AKT/mTOR/4EBP1 信号通路相关蛋白和 eIF4F 复合物相关蛋白的表达。结果 在 CRC 患者标本中,eIF4F 复合物相关蛋白在肿瘤组织细胞中表达高于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.01$)。SFN 对 CRC 细胞的增殖起抑制作用,且浓度越高,抑制能力越强。SFN 能抑制 CRC 细胞生长发育,并下调 CRC 细胞中 eIF4F 复合物的表达。结论 eIF4F 复合物的表达与 CRC 的发展密切相关,SFN 可能通过 PI3K/AKT/mTOR/4EBP1 信号通路影响 eIF4F 复合物的上调,从而影响 CRC 细胞的发展。

关键词 结直肠癌;萝卜硫素;eIF4F 复合物;HT-29;4EBP1;免疫组化

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1645-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.024

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是指结肠和直肠黏膜上皮和腺体发生的恶性肿瘤。2018 年的全球癌症统计结果表明,CRC 总发病人数 185 万,占比 10.2%,居全球癌症发病率第 3 位。死亡人数 88.1 万(9.2%),居第 2 位^[1]。在细胞翻译过程的起始阶段,真核细胞启动因子 4F(eIF4F)翻译起始

复合物作为限速步骤发挥着重要作用^[2]。萝卜硫素(sulforaphane, SFN)是一种异硫氰酸酯,天然存在于大多数十字花科蔬菜中。1992 年首次从西兰花中提取,并定义为 II 相解毒酶诱导剂^[3]。SFN 已被证实具有多种抗癌特性,特别是对 CRC^[4]。该研究从 CRC 患者组织标本中检测 eIF4F 翻译起始复合物相关蛋白的表达,进一步探讨 SFN 影响 CRC 细胞增殖的具体分子生物学机制,为 SFN 治疗 CRC 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 收集 12 例安徽医科大学第二附属医院普外科 CRC 患者的组织标本,分别收取肿瘤组织与癌旁组织,放入装有 RNA 组织保存液的标本管中,并且所有标本在收集和运输过程中均置于冰上,并于 -80 °C 冰箱中长期保存,将收集到的 12 例组织样本制作为组织芯片。

1.1.2 细胞与动物 原代 CRC 细胞系 HT-29 购于上海生命科学院细胞典藏库。健康裸鼠,4~6 周龄,18~22 g,购自江苏南京集萃药康生物有限公司,动物生产许可证号:SCKK(苏)2018-0008。饲养于 20~25 °C、40%~60%湿度、照明与黑暗各 12 h 交替环境中,自由进水、饮食,1 周后行后续实验。

1.1.3 试剂和仪器 SFN、MTT 购自美国 Sigma 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;青霉素/链霉素、BCA 试剂盒和 4% 多聚甲醛购自上海碧云天生物技术有限公司;DMEM 购自美国 Hyclone 公司;0.25% 胰酶购自美国 Wisen 公司; β -actin 和 eIF4F 复合物相关抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;山羊抗兔或抗鼠二抗购自北京中杉金桥有限公司;二甲基亚砜(DMSO)和 0.1% 结晶紫购自北京索莱宝科技有限公司。细胞培养箱购自美国 Thermo

2022-06-06 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1808085MH270);安徽医科大学校科研基金立项资助项目(编号:2021xkj034)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院普外科,合肥 230601

作者简介:邢运,男,硕士研究生;

喻宗繁,男,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者,

E-mail: 2253865679@qq.com

overexpression of FKTN, secretion of α -DG decreased when compared with control group. **Conclusion** Overexpressing FKTN arrests cell cycle and inhibits the secretion of α -DG in HeLa cells. Apoptosis and cell migration of HeLa cells are not affected by the overexpression of FKTN.

Key words FKTN; cell cycle; apoptosis; migration; secretion