

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

Fisher 公司, 荧光倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司, 酶标仪购自上海科华生物工程股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 原代 CRC 细胞系 HT-29 细胞, DMEM 高糖培养基 + 10% 血清 + 双抗(青霉素、链霉素)中培养, 细胞培养箱培养条件为: 5% CO₂, 37 °C。每 3 d 换液 1 次, 每 5 d 传代 1 次, 传代次数不超过 10 代, 1 500 r/min 离心 5 min, 取生长状态良好的处于对数生长期的 HT-29 细胞进行实验。

1.2.2 细胞活力测定(MTT) 将细胞接种于密度为 3×10^3 个/孔的 96 孔板中。二甲基亚砜(DMSO, 对照组)和不同浓度的 SFN 处理 48 h。MTT 比色法测定细胞活力。在每个时间点加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 10 μ l, 37 °C 孵育 4 h。移除培养基并添加 200 μ l 异丙醇以溶解甲醛沉淀物。在 570 nm 处测量细胞匀浆的光密度, 620 nm 作为参比滤光片。DMSO 作为载体对照, 对细胞活力无影响。

1.2.3 Western blot 实验 处理后的 HT-29 细胞 PBS 洗 2 次, 加入蛋白裂解液(RIPA: 蛋白酶抑制剂: 磷酸酶抑制剂比例为 1:100:100), 待细胞裂解完全后吸取悬液, 4 °C、13 200 r/min 离心 30 min, 吸取蛋白上清液, 储存于 -80 °C 冰箱, 用 BCA 法测蛋白浓度并进行蛋白质定量, 加上样缓冲液煮沸 10 min 变性, 以蛋白质 30 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳。转膜后, 用含 5% BSA 的 TBST 室温慢摇封闭 1.5 h, 分别加入 β -actin 和相应一抗(1:1 000), 4 °C 孵育过夜, 加入相应的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠/兔二抗孵育 1 h, 洗膜后用显影仪检测蛋白显影。

1.2.4 动物实验(裸鼠成瘤) 12 只健康适龄裸鼠随机均分为两组, 将 0.1 ml(细胞数约 1×10^6) 处于对数生长期的 HT-29 细胞沿皮下缓慢注入裸鼠腋窝。3 d 后, 实验组每天腹腔注射溶解于 DMSO 的 SFN(0.5 mg/kg), 对照组每天腹腔注射等浓度的溶剂 DMSO(0.5 mg/kg), 共注射 14 d。14 d 后处死裸鼠, 取出肿瘤, 测量体积大小, 将肿瘤标本制成石蜡切片进行苏木精-伊红(HE)染色和免疫组织化学染色。

1.2.5 HE 染色法 石蜡切片置于 65 °C 恒温箱中烘焙 60 min, 于二甲苯中脱蜡, 依次在无水乙醇、95%、70%、50% 乙醇溶液中脱蜡处理。将切片依次放入苏木精、伊红染色槽中, 用自来水洗涤, 再置于 50%、70%、95% 乙醇溶液、无水乙醇中脱水处理, 干燥后用中性树脂密封, 镜下观察细胞结构与形态。

1.2.6 免疫组织化学染色法 石蜡切片置于 65 °C

恒温箱中烘焙 60 min, 于二甲苯中脱蜡, 依次在无水乙醇、95%、70%、50% 乙醇溶液中脱蜡处理。再放入枸橼酸钠溶液中高温下抗原修复 10 min。用纯水冲洗 2 次, 每次 5 min, 油性笔画圈, 10% 过氧化氢去离子水: 甲醇(1:9) 孵育 10 min, 以灭活内源性过氧化物酶活性, TBST 冲洗 3 次, 每次 5 min, 破膜液(含 0.25% Triton X-100 的 TBS) 10 min, TBST 冲洗, 滴加 10% 山羊血清封闭液, 室温孵育 2 h, 滴加一抗, 4 °C 过夜。回收一抗, TBST 冲洗, 滴加反应增强液, 清洗, 滴加相应辣根过氧化物酶标记的二抗, 纯水冲洗, DAB 显色后自来水冲洗终止反应, 苏木精染核 20 s, 纯水冲洗。再置于 50%、70%、95% 乙醇溶液、无水乙醇中脱水处理、固定, 中性树胶封片后镜下观察相关蛋白表达情况。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 9.0 软件对实验数据进行统计学分析。细胞相关实验均分别重复 3 次以上。用 ImageJ 软件测量蛋白灰度值以及免疫组化光密度值, 并对光密度(optical density, OD)值、裸鼠成瘤中的肿瘤体积结果进行 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRC 患者标本中 eIF4F 复合物相关蛋白在肿瘤组织中的表达高于癌旁组织 CRC 患者标本的免疫组化染色结果显示, eIF4F 复合物相关蛋白在肿瘤组织中的表达明显高于癌旁组织(图 1A)。OD 值分析显示: 肿瘤组织 4EBP1 ($t = 4.235, P < 0.001$)、P-4EBP1 ($t = 2.974, P < 0.01$)、eIF4E ($t = 3.820, P < 0.001$)、P-eIF4E ($t = 3.308, P < 0.01$)、eIF4G ($t = 4.252, P < 0.001$) 表达均高于癌旁组织, 差异有统计学意义(图 1B)。

2.2 SFN 可抑制 HT-29 细胞的增殖 用 MTT 比色法检测 SFN 作用 48 h 后 HT-29 细胞存活率的变化, 结果显示: SFN 对 HT-29 细胞活性有抑制作用, 并且呈剂量依赖性。SFN 对 HT-29 细胞的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 为 15.85 μ mol/L(图 2A)。裸鼠成瘤实验结果显示, 实验组肿瘤体积低于对照组, 差异有统计学意义($t = 3.645, P < 0.05$)(图 2B)。HE 染色结果显示, 与对照组比较, 实验组组织细胞内空泡更多(图 2C)。

2.3 SFN 通过 PI3K/AKT/mTOR/4EBP1 信号通路影响 HT-29 细胞的增殖 Western blot 实验结果显示, SFN 处理 HT-29 细胞后, eIF4F 翻译起始复合物相关蛋白的表达降低。作为其信号通路的上游,

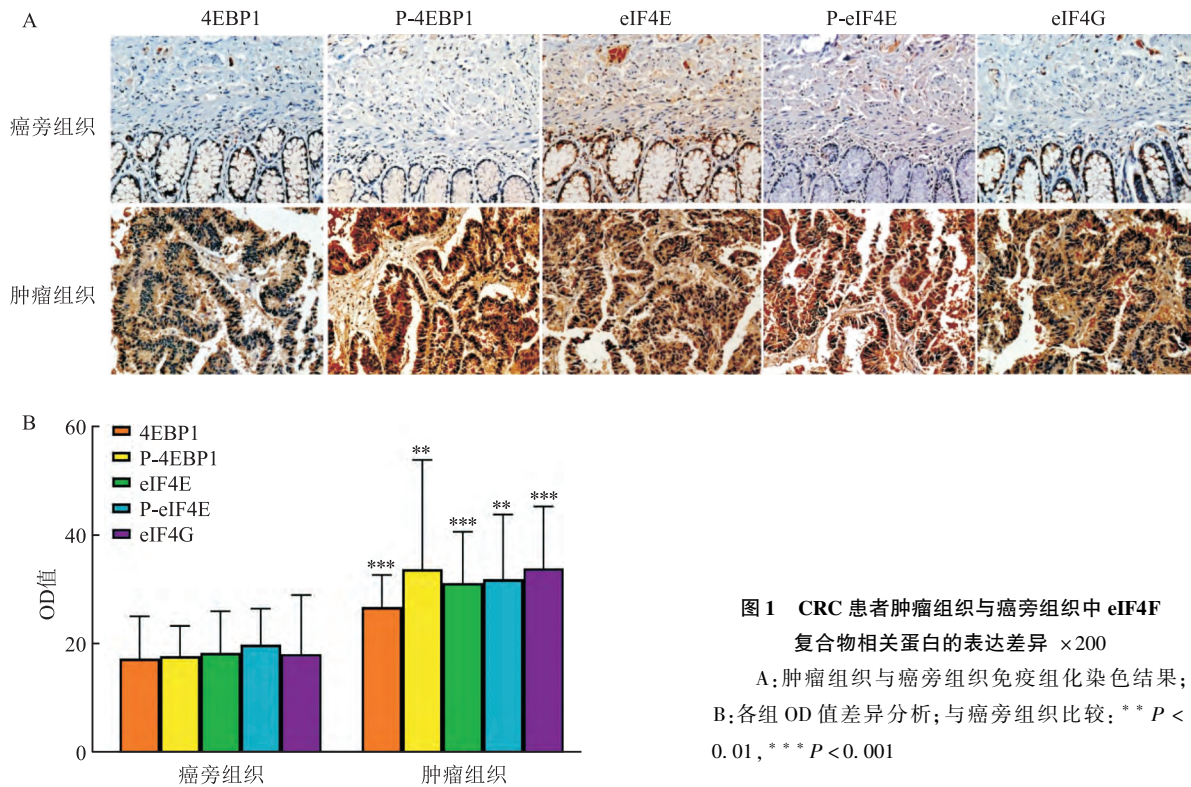


图1 CRC患者肿瘤组织与癌旁组织中 eIF4F 复合物相关蛋白的表达差异 ×200

A: 肿瘤组织与癌旁组织免疫组化染色结果; B: 各组 OD 值差异分析; 与癌旁组织比较: ** P < 0.01, *** P < 0.001

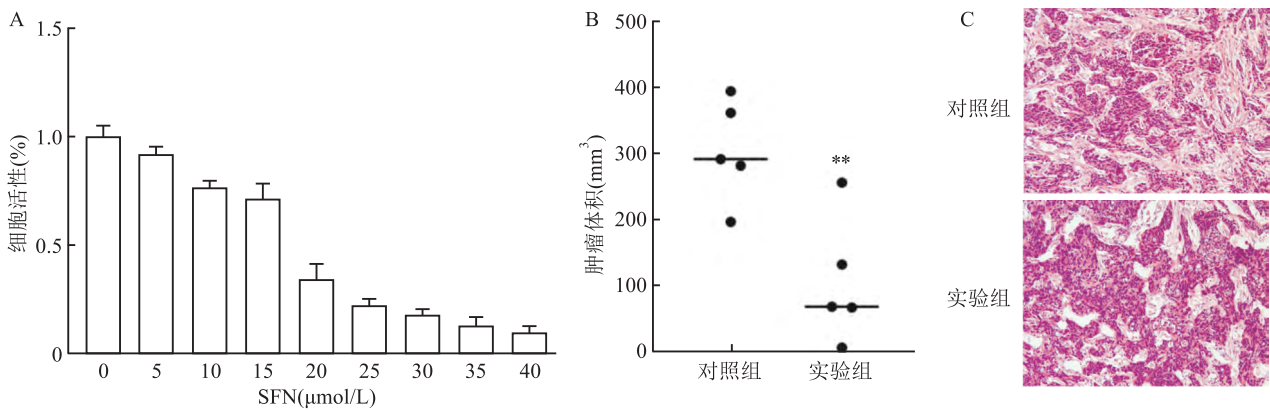


图2 SFN抑制HT-29细胞的增殖 ×200

A: 不同浓度 SFN 处理 HT-29 细胞 48 h 后的细胞活性; B: 裸鼠皮下移植瘤的体积比较; C: 裸鼠皮下移植瘤的 HE 染色; 与对照组比较: ** P < 0.01

AKT 和 mTOR 表达量也同时降低, P-AKT 和 P-mTOR 的表达有所上升, 而 PI3K 的表达量无明显差异(图 3A)。裸鼠皮下移植瘤的免疫组织化学染色显示, 与对照组相比, 实验组中 eIF4F 翻译起始复合物相关蛋白的表达量降低, AKT 的表达降低, P-AKT 与 P-mTOR 的表达增加(图 3B), 这与 Western blot 检测结果相吻合。

3 讨论

本研究显示, eIF4F 翻译起始复合物在人类 CRC 组织中上调, 这是翻译起始的关键组成部分。

同时, 从十字花科蔬菜中提取的天然异硫氰酸酯 SFN 可通过抑制 PI3K/AKT/mTOR/4EBP1 信号通路, 抑制原代 CRC 细胞中 eIF4F 复合物的上调。

mRNA 翻译(蛋白质合成)是基因表达中最耗能的步骤, 并且受到高度调控。翻译调控是细胞对环境的快速适应性反应, 对维持细胞内蛋白质的稳态至关重要。因此, 翻译过程在人体生长发育中起着重要的作用, mRNA 翻译成蛋白质更是基因表达调控中的关键^[5]。蛋白质翻译包括起始、延伸、终止和核糖体回收。起始是限速阶段, 并受到 eIF4F 翻译起始复合物合成速度的限制^[6]。eIF4F 由支架

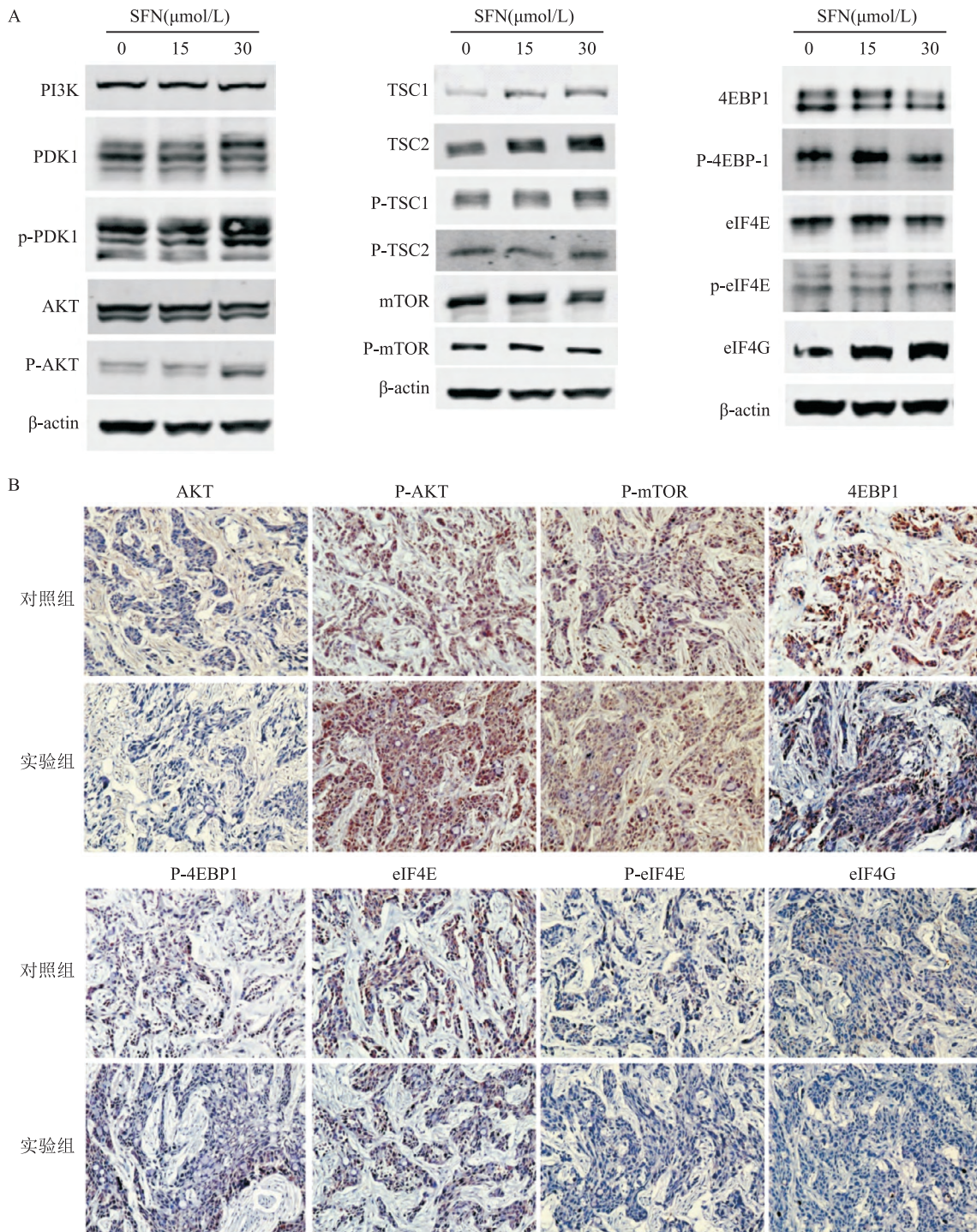


图3 SFN降低相关通路蛋白及eIF4F复合物相关蛋白的表达 ×200

A:SFN处理HT-29细胞后相关蛋白的Western blot结果;B:皮下移植瘤相关蛋白的免疫组化结果

蛋白 eIF4G、mRNA5'Cap 结合亚单位 eIF4E 和 RNA 解旋酶 eIF4A 三个部分组成。在组成蛋白质翻译起始复合物的所有起始因子中,由于 eIF4E 被认为是最不丰富的翻译起始因子,所以,eIF4E 与 eIF4G 结合形成 eIF4F 复合物的过程,也就成为了翻译开始的限速步骤和控制蛋白质翻译、表达的关键点^[7]。

eIF4E:eIF4G 的形成受到小的翻译抑制因子 4E

结合蛋白(4EBPs)的严格调控,4EBPs 与 eIF4G 竞争形成 eIF4E:4EBP1 复合物,并抑制 eIF4E:eIF4G 的形成^[7]。eIF4E 上 4EBPs 的结构结合位点与 eIF4G 重叠,从而使 eIF4E 能够同时与 eIF4G 或 4EBP1 独占结合。哺乳动物有 3 种 4EBPs:4EBP1、4EBP2 和 4EBP3,其中 4EBP1 发挥着比其他因子更重要的生物学功能^[8]。4EBP1 与帽结合 eIF4E 的结

合比与无帽 eIF4E 结合更快、更紧密。4EBP1 和 eIF4E 之间的这种相互作用受到 4EBP1 磷酸化的严格调控,这反过来又会使 4EBP1 失活,并解离 eIF4E;4EBP1 相互作用。4EBP1 的过度磷酸化在大多数人类癌症中被观察到,并且经常与肿瘤分级和不良预后相关。

文献^[9]报道,PI3K/AKT/mTOR 通路在细胞增殖、凋亡、代谢和血管生成等方面都发挥着重要作用。另外,PI3K/AKT/mTOR 信号通路与许多人类疾病密切相关,包括缺血性脑损伤、神经退行性疾病和肿瘤^[10]。PI3K/AKT/mTOR 分为两部分:磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)及其下游分子丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B(PKB,又称 AKT)。该通路被 RTK 和细胞因子受体激活。酪氨酸残基被磷酸化,为 PI3K 转位到膜上提供锚点,参与细胞外基质分子和细胞因子的转导。这一信号通路对细胞也有重要的生物学效应,如促进细胞活性和延缓衰老和死亡,与各类生理活动相联系。这一通路的功能障碍不仅与肿瘤的发生和发展有关,还与许多其他人类疾病有关,如白血病、糖尿病和精神分裂症。雷帕霉素(TOR)是真核细胞丝氨酸/苏氨酸激酶靶标,是细胞生长代谢的关键因子^[11]。哺乳动物 mTOR 能感知细胞水平的代谢物(如氨基酸、葡萄糖、氧气和生长因子),调节从蛋白质合成到自噬的一系列过程。并在不同的复合体中起作用,即 mTOR 复合体 1(mTORC1)和 mTOR 复合体 2(mTORC2)^[12]。

本研究显示,SFN 可以通过抑制 PI3K/AKT/mTOR/4EBP1 信号通路来抑制 eIF4F 翻译起始复合物的形成,其原因可能是 mTOR 磷酸化引起的信号反馈导致 AKT 过度磷酸化和 4EBP1 去磷酸化。反过来,4EBP1 被 SFN 去磷酸化并激活,其与 eIF4E 稳定结合,导致蛋白停止翻译。mTOR 通过调节 4EBP1 的磷酸化在 mRNA 的翻译过程中起着关键

作用。然而,即使 AKT 磷酸化被激活,PI3K 的表达仍无显著变化。因此,可以发现 mTOR 磷酸化可诱导反馈,激活 AKT 磷酸化,影响其下游的 4EBP1,从而影响蛋白质的翻译过程。

参考文献

- [1] 王宁,刘硕,杨雷,等. 2018 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志,2019,5(1):87-97.
- [2] Frosi Y, Usher R, Lian D T G, et al. Monitoring flux in signalling pathways through measurements of 4EBP1-mediated eIF4F complex assembly[J]. *BMC Biol*, 2019,17(1):40.
- [3] Vanduchova A, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Isothiocyanate from broccoli, sulforaphane, and its properties[J]. *J Med Food*, 2019,22(2):121-6.
- [4] Elkashty O A, Tran S D. Sulforaphane as a promising natural molecule for cancer prevention and treatment [J]. *Curr Med Sci*, 2021,41(2):250-69.
- [5] Robichaud N, Sonenberg N, Ruggiero D, et al. Translational control in cancer[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019,11(7):1-17.
- [6] Minnee E, Faller W J. Translation initiation and its relevance in colorectal cancer[J]. *FEBS J*, 2021,288(23):6635-51.
- [7] Yang X, Zhong W, Cao R. Phosphorylation of the mRNA cap-binding protein eIF4E and cancer [J]. *Cell Signal*, 2020,73:109689.
- [8] Bohm R, Imseng S, Jakob R P, et al. The dynamic mechanism of 4EBP1 recognition and phosphorylation by mTORC1 [J]. *Mol Cell*, 2021,81(11):2403-16.
- [9] 郭圣超,武雪亮,薛军,等. Glut1 基因沉默对人结肠癌 HT-29 细胞株增殖、分化及凋亡的影响及机制研究[J]. 安徽医科大学学报,2021,56(5):790-5.
- [10] Xu F, Na L X, Li Y F, et al. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours[J]. *Cell Biosci*, 2020,10(1):54.
- [11] Liu G Y, Sabatini D M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020,21(4):183-203.
- [12] Jhanwar-Uniyal M, Wainwright J V, Mohan A L, et al. Diverse signalling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship[J]. *Adv Biol Regul*, 2019,72:51-62.

Sulforaphane down-regulates the expression of eIF4F translation initiation complex in colorectal cancer

Xing Yun, Zhou Dachen, He Liang, Cui Xiao, Yu Zongfan

(Dept of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To study the relationship between the expression of eIF4F complex and human colorectal cancer (CRC), and the possible mechanism of sulforaphane on the proliferation of CRC cells. **Methods** Immunohistochemical staining was used to detect the expression of eIF4F complex related proteins in tumor and adjacent

(下转第 1655 页)

A2 (LP-PLA2), lipoprotein (a) [LP(a)] and the SYNTAX score in patients with coronary heart disease (CHD). **Methods** A total of 416 patients diagnosed with CHD by coronary angiography (CAG) were enrolled. According to the SYNTAX score, they were divided into three groups, 364 cases in the low-risk group (score of 0–22), 39 cases in the medium-risk group (score of 23–32), and 13 cases in the high-risk group (score of 33 or more). And another 30 cases which CAG showed no significant narrowing of the coronary arteries were selected as the control group (CON). We detected and compared the differences of the levels of LP-PLA2 and LP(a) in various groups. According to the levels of LP-PLA2 and LP(a), CHD patients were divided into four groups, 225 cases in the LP-PLA2 and LP(a) normal group, 35 cases in the only LP(a) elevated group (≥ 300 mg/L), 43 cases in the only LP-PLA2 elevated group (≥ 175 ng/ml) and 113 cases in the LP-PLA2 and LP(a) elevated group. The differences of the SYNTAX score, stenosis degree score and lesion feature score were compared. Pearson correlation and multiple linear regression were used to analyze the correlation between the levels of LP-PLA2, LP(a) and the SYNTAX score, stenosis degree score and lesion feature score. **Results** The levels of LP-PLA2 and LP(a) in the CHD group were significantly higher than those in the CON group ($P < 0.05$). The levels of LP-PLA2 and LP(a) in the subgroups according to the SYNTAX score were declining from the high-risk group to the low-risk group in descending order ($P < 0.05$). The SYNTAX score and stenosis degree score of the LP-PLA2 and LP(a) elevated group were significantly higher than those of the only LP-PLA2 elevated group, the only LP(a) elevated group, the LP-PLA2 and LP(a) normal group ($P < 0.05$), but there was no significant difference in lesion feature score among the groups ($P > 0.05$). Pearson correlation analysis showed that the SYNTAX score, stenosis degree score and lesion feature score were positively correlated with the levels of LP-PLA2 and LP(a) ($P < 0.05$). The multiple linear regression showed that the SYNTAX score and stenosis degree score were independently correlated with the levels of LP-PLA2 and LP(a) after adjusting for confounding effects ($P < 0.05$), while lesion feature score was only independently correlated with the levels of LP-PLA2 ($P < 0.05$). **Conclusion** The levels of LP-PLA2 and LP(a) show a positive correlation with the SYNTAX score in patients with CHD, and both can be used as indicators to determine the severity of coronary artery disease.

Key words lipoprotein-associated phospholipase A2; lipoprotein (a); SYNTAX score; coronary heart disease

(上接第 1649 页)

tissues of 12 colorectal cancer patients. MTT colorimetry was used to detect the cell activity of colorectal cancer cells treated with sulforaphane. Western blot was used to detect the expression of eIF4F complex related proteins in colorectal cancer cells treated with sulforaphane. In the animal experiment (tumor formation in nude mice), the growth of subcutaneous tumors in nude mice after intraperitoneal injection of sulforaphane was compared, and the expressions of PI3K/AKT/mTOR/4EBP1 signal pathway related proteins and eIF4F complex related proteins were detected by immunohistochemical staining. **Results** In the specimens of CRC patients, the expression of eIF4F complex related protein in tumor tissues was significantly higher than that in paracancerous tissues. SFN could inhibit the proliferation of CRC cells, and the higher the concentration, the stronger the inhibitory ability. SFN could inhibit the growth and development of CRC cells and down-regulate the expression of eIF4F complex in CRC cells. **Conclusion** The expression of eIF4F complex is closely related to the development of colorectal cancer. Sulforaphane may affect the up-regulation of eIF4F complex through PI3K/AKT/mTOR/4EBP1 signal pathway, thus affecting the development of colorectal cancer cells.

Key words colorectal cancer; sulforaphane; eIF4F complex; HT-29; 4EBP1; immunohistochemistry