

- 心在于β细胞[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2005, 21(3): 194-198.
- [13] Lingohr MK, Buettner R, Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival—a role in obesity-linked type 2 diabetes[J]. Trends in molecular medicine, 2002, 8(8): 375-384.
- [14] Zhang J, Liu F. Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging[J]. IUBMB Life, 2014, 66(7): 485-495.
- [15] Georgia S, Bhushan A. β cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal β cell mass[J]. Journal of Clinical Investigation, 2004, 114(7): 963-968.
- (收稿日期: 2023-10-06)

IFITM1和Wnt/β-catenin信号通路在结肠癌发生发展中的作用

付溶川¹, 周 涛¹, 赵学荣¹, 王建平¹, 郑 帅², 赵恩宏², 肖丽君^{1*}

(1.承德医学院基础医学院, 河北承德 067000; 2.承德医学院附属医院)

摘要: **目的** 探究干扰素诱导跨膜蛋白1(IFITM1)在结肠癌中的表达以及其在结肠癌中发挥的作用。**方法** 应用生物信息学分析IFITM1在结肠癌中的表达情况和预后情况,并分析IFITM1与β-连环蛋白的相关性。免疫组化观察IFITM1和β-catenin在结肠癌及癌旁组织中的表达情况。构建IFITM1过表达细胞模型, CCK-8实验检测细胞增殖能力的变化, 双荧光素酶报告基因检测TCF/LEF转录因子的激活情况, Western blot检测Wnt/β-catenin信号通路上关键蛋白β-catenin、C-myc、CyclinD1的表达情况。**结果** 在线数据库分析结果显示, IFITM1在结肠癌中高表达($P<0.05$), 且与患者的预后不良显著相关; IFITM1与β-catenin之间存在正相关关系。免疫组化染色结果显示, IFITM1和β-catenin在结肠癌组织中的表达显著高于癌旁组织, IFITM1的表达同肿瘤直径大小及组织浸润程度有关($P<0.05$), 与其他因素无关($P>0.05$); β-catenin的表达与仅与肿瘤直径大小有关($P<0.05$), 与其余因素无关($P>0.05$), 且二者之间存在正向相关性。在结肠癌细胞HCT-15中过表达IFITM1后, OE-IFITM1组细胞的增殖能力显著高于OE-NC组($P<0.05$), OE-NC组和MOCK组之间无差异($P>0.05$)。双荧光素酶报告基因结果显示, OE-IFITM1组的启动子活性高于OE-NC组($P<0.05$), OE-NC组与MOCK组之间无差异($P>0.05$)。Western blot结果显示, OE-IFITM1组的β-catenin、CyclinD1、C-myc的表达量高于OE-NC组($P<0.05$), OE-NC组和MOCK组之间蛋白表达无差异($P>0.05$)。**结论** IFITM1在结肠癌组织中的表达显著高于癌旁组织, 并可能通过Wnt/β-catenin信号通路促进细胞增殖。

关键词: IFITM1; 结肠癌; β-catenin; TCF/LEF转录因子

中图分类号: R735.3

文献标志码: A

文章编号: 1004-6879(2024)02-0100-06

Role of IFITM1 and Wnt/β-catenin Signaling Pathways in the Development and Progression of Colon Cancer

FU Rong-chuan¹, ZHOU Tao¹, ZHAO Xue-rong¹, WANG Jian-ping¹, ZHENG Shuai², ZHAO En-hong², XIAO Li-jun^{1*}

(1. Basic Medical Institute of Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China; 2. Affiliated Hospital of Chengde Medical University)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of IFITM1 in colon cancer and the mechanism of its promotion of colon cancer cell proliferation. **Methods** The expression and prognosis of IFITM1 in colorectal cancer were analyzed by bioinformatics, and the correlation between IFITM1 and β-catenin was researched. Immunohistochemical SP staining was examined to observe the expression of IFITM1 and β-catenin in colon cancer tissues. The overexpressed cell model

资助项目: 河北省高等学校科学技术研究项目(QN2020208)

*通讯作者

of IFITM1 was constructed, the changes of cell proliferation capacity were detected by CCK-8 assay, and the changes of TCF/LEF transcription factor activity were tested by dual luciferase reporter gene. The results of dual luciferase reporter gene showed that the promoter activity of OE-IFITM1 group was higher than that of OE-NC group ($P<0.05$), and there was no difference between OE-NC group and MOCK group ($P>0.05$). The expressions of key proteins β -catenin, C-myc and CyclinD1 in the Wnt/ β -catenin signaling pathway were detected by Western blot. **Results** The results of online database analysis showed that IFITM1 was highly expressed in colon cancer ($P<0.05$), and significantly correlated with poor prognosis. There was positive correlation between IFITM1 and β -catenin. Immunohistochemical results showed that the expression level of IFITM1 was correlated with tumor diameter and tissue invasion degree ($P<0.05$), rather than others factors ($P>0.05$). The expression of β -catenin was only correlated with tumor diameter ($P<0.05$), instead of other factors ($P>0.05$), and there was a positive correlation between IFITM1 and β -catenin. After overexpression of IFITM1 in HCT-15 colon cancer cells, the proliferation capacity of OE-IFITM1 group was significantly higher than that of OE-NC group ($P<0.05$), but there was no difference between OE-NC group and MOCK group ($P>0.05$). Western blot results showed that the expression levels of β -catenin, CyclinD1 and C-myc in OE-IFITM1 group were higher than those in OE-NC group ($P<0.05$), but there was no difference in protein expression between OE-NC group and MOCK group ($P>0.05$). **Conclusion** The expression of IFITM1 in colon cancer tissues is significantly higher than that in para-cancer tissues, and IFITM1 may promote cell proliferation through Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: IFITM1; colon cancer; β -catenin; TCF/LEF transcription factor

结肠癌是一种常见的恶性肿瘤,也是全球癌症相关死亡的原因之一^[1]。各种检查技术的革新提高了肿瘤的早期发现率,但结肠癌的发病率及死亡率仍持续升高^[2]。靶向医疗在近几年的肿瘤治疗中兴起,因此在结肠癌中寻找有效的分子靶点是当前精准医学亟待解决的问题。干扰素诱导跨膜蛋白1(interferon-induced transmembrane protein 1, IFITM1)是一类干扰素诱导跨膜蛋白成员^[3],在近些年的研究中发现其参与了非小细胞肺癌、三阴性乳腺癌的发生与发展^[4,5]。Wnt信号通路是肿瘤研究中的一个重要的通路。Wnt配体与相应的受体结合可以启动经典Wnt通路,随后使 β -catenin不能被磷酸化而激活Wnt/ β -catenin信号途径。在本研究中,我们旨在探究IFITM1在结肠癌中的表达情况,以及其对结肠癌细胞增殖的影响和可能的作用机制,以期对结肠癌的靶向治疗开辟新路。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集2020年12月~2022年12月承德医学院附属医院100例结肠癌患者术后切除的组织标本,所有患者均经临床病理诊断确诊为结肠癌,术前均未进行放疗、化疗治疗。选取同期61例结肠癌旁组织标本(距离癌组织边缘 >5 cm)作为本研究的对照。

1.2 细胞、主要试剂和仪器

细胞:HCT-15细胞为实验室留存。RPMI-1640培养基(proccll);胎牛血清(Sigama);PBS(proccll);胰酶(Gibco);青链霉素(Gibco);DMSO(Sigama);抗体(Abcam);双荧光素酶试剂盒(Progame);TOP/FOP质粒(碧云天)。仪器:酶标仪(BioTek);细胞培养箱(Thermo);显微镜(Olympus);超净工作台;多功能酶标仪(BioTek)。

1.3 生物信息学分析

单基因差异分析:从TCGA数据库(<https://cancergenome.nih.gov/>)中下载结肠癌组织及正常组织RNA测序信息,利用DESeq程序包对基因表达量进行分析。对数据进行初始筛选和标准化预处理,分析IFITM1在结肠癌组织及癌旁组织的表达量差异。KM预后分析:收集Kaplan-Meier(<http://kmplot.com/analysis/index.php?p=background>)网站评价IFITM1对结肠癌患者存活率的影响数据。在网站主页上选择“Colon cancer”,基因名称输入“IFITM1”,得到IFITM1对结肠癌患者存活率的影响数据。GEPIA数据库分析IFITM1与 β -catenin相关性:从GEPIA官方网站(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)输入基因CTNNB1和IFITM1并选择“COAD”进行分析。

1.4 免疫组化

多聚甲醛固定标本过夜后,进行石蜡包埋。将蜡块切成4 μm 厚的蜡片后,在水中展开,再将其捞至粘附载玻片上,烤片0.5 h,根据SP法试剂盒进行染色操作。IFITM1一抗浓度为1:200, β -catenin一抗浓度为1:50,阴性对照组用PBS代替一抗进行实验。采用DAB显色法进行显色,并置于显微镜下观察。

1.5 免疫组化结果判定

IFITM1以在胞膜中出现棕黄色颗粒者为阳性表达,不着色或非特异性着色为阴性表达。随机选取5个高倍镜视野,并根据染色强度和细胞阳性百分率进行评分:无染色计为0分;染色呈淡黄色计为1分;棕黄色计为2分;棕褐色计为3分,按照阳性细胞百分率评分:阳性细胞数百分率 $<5\%$ 计为0分; $5\% \sim 25\%$ 计为1分; $25\% \sim 50\%$ 计为2分; $\geq 50\%$ 计为3分。将以上两项判定的得分相乘即可得到最终结果:乘积0~3分判定为阴性(-), ≥ 3 分判定为阳性(+)^[7]。 β -catenin在正常细胞中主要定位在胞膜,在恶性肿瘤细胞中可定位于胞膜、胞质、胞核。若组织中 $>70\%$ 细胞的细胞膜染色阳性视为正常(阴性)表达,反之视为膜缺失; $>10\%$ 的细胞胞质或胞核染色阳性视作异常表达。细胞膜表达缺失和胞质或胞核异常表达均视为阳性表达。

1.6 细胞培养及慢病毒感染

细胞均用含10%胎牛血清的1640培养基进行处理。在含5% CO_2 ,37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中进行培养。将细胞种植到24孔板中,当融合度为50%~60%且生长状态良好时进行慢病毒感染。吸取旧培养基后用PBS清洗三遍,20 μL 慢病毒液和180 μL 完全培养基颠倒混匀,加入24孔板中培养,视情况正常换液。感染3 d后,用含有嘌呤霉素的完全培养基对细胞进行筛选。

1.7 CCK-8实验

取对数生长期细胞,胰酶消化并制成单细胞悬液。将细胞以5000个/孔接种到96孔板中,每组设置3个复孔。在温箱中分别培养24、48、72 h后测量每组的吸光度,实验重复3

次。

1.8 双荧光素酶报告基因实验

将 3×10^4 个细胞接种到24孔板中,状态良好时进行质粒转染。1 μL 转染试剂与49 μL 减血清培养基混匀静置5 min,后加入0.2 μL 突变型TOP质粒、0.2 μL 海肾质粒和49.6 μL 减血清培养基,室温静置20 min后加入到实验组细胞中,后补齐体系为500 μL /孔。对照组细胞中按上述步骤加入野生型FOP质粒。培养箱中培养48 h后裂解细胞并根据试剂盒说明进行荧光强度测量,实验重复3次。

1.9 蛋白免疫印迹实验

当细胞生长融合度为80%~90%时,进行蛋白提取。RIPA和PMSF按照100:1进行配置。每皿细胞加入800 μL RIPA裂解液混合物,反复冻融提取蛋白。BCA法对提取的蛋白进行定量,调整浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,加入5 $\times$ loading buffer,蛋白高温下变性10 min。配置10%的分离胶,凝固后加入5%的浓缩胶。按照15 μg /孔将蛋白样本加入到泳道中,80 V电泳浓缩胶,120 V电泳分离胶。大约2 h后停止电泳进行低温转膜,200 mA转膜90 min。5%的脱脂奶粉封闭4 h,一抗过夜,二抗孵育1 h。准备ECL显影液进行显影,实验重复3次。

1.10 统计学处理

所有数据均使用SPSS 25.0软件进行统计学分析。Graphpad 9.0进行作图。多个独立样本间比较采用单因素方差分析,计数资料的组间比较采用 χ^2 检验,相关性检验采用Spearman相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IFITM1、 β -catenin在结肠癌组织中高表达

在线数据库结果显示,IFITM1在结肠癌组织的表达显著高于癌旁组织($P < 0.05$,图1A),并且IFITM1的高表达与结肠癌患者的预后不良显著相关($P < 0.05$,图1B)。免疫组化结果显示,IFITM1在结肠癌组织中的表达明显高于癌旁正常组织($P < 0.05$,表1,图2), β -catenin在结肠癌组织中的表达也明显高于癌旁正常组织($P < 0.05$,表2,图2)。

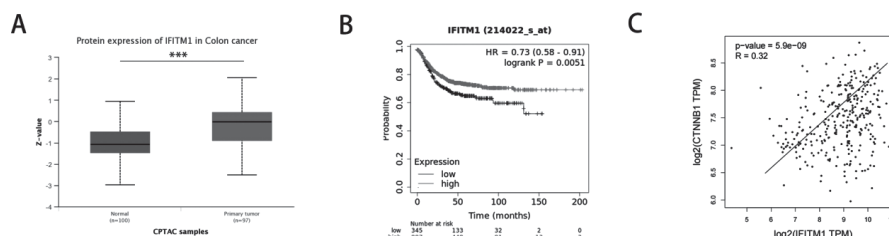


图1 生物信息学分析

A. TCGA数据库中IFITM1在结肠癌中的表达情况; B. IFITM1与患者预后生存分析; C. GEPIA数据库相关性分析

表1 IFITM1在结肠癌及癌旁组织中的表达情况

分组	<i>n</i>	IFITM1		χ^2	<i>P</i>
		-	+		
结肠癌组织	100	11	89	49.584	0.000
癌旁组织	61	39	22		

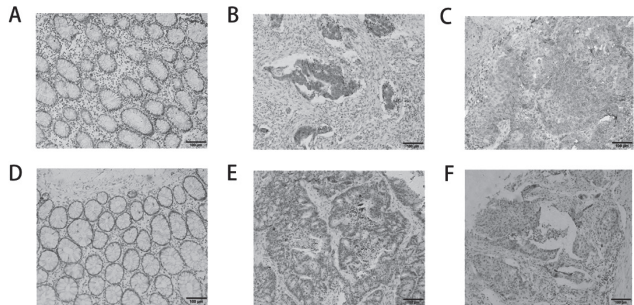


图2 石蜡组织切片中IFITM1和β-catenin的表达
(免疫组化SP法,100×)

IFITM1的表达:A.癌旁正常结肠组织;B.高-中分化结肠癌;C.低分化结肠癌。β-catenin的表达:D.癌旁正常结肠组织;E.高-中分化结肠癌;F.低分化结肠癌

表2 β-catenin在结肠癌及癌旁组织中的表达情况

分组	<i>n</i>	β-catenin		χ^2	<i>P</i>
		-	+		
结肠癌组织	100	18	82	52.141	0.000
癌旁组织	61	46	15		

2.2 IFITM1、β-catenin的表达与结肠癌临床病理特征的关系

IFITM1的阳性表达同肿瘤直径大小及组织浸润程度有关($P<0.05$,表3),同性别、年龄、分化程度、TNM分期无关($P>0.05$)。β-catenin的阳性表达同组织浸润程度有关($P<0.05$,表3),同其他因素无关。

表3 IFITM1、β-catenin在结肠癌中的表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	<i>n</i>	IFITM1		χ^2	<i>P</i>	β-catenin		χ^2	<i>P</i>
		+	-			+	-		
性别	男	66	58	0.249	0.618	53	13	0.379	0.538
	女	34	31			29	5		
年龄	≤60	44	38	0.558	0.455	38	6	1.014	0.314
	>60	56	51			44	12		
肿瘤最大直径	≤4cm	54	42	7.491	0.006	42	11	0.580	0.446
	>4cm	46	47			40	7		
分化程度	高-中	89	79	0.046	0.830	72	17	0.665	0.415
	低	11	10			10	1		
浸润深度	≤肌层	7	6	5.039	0.025	68	3	31.473	0.000
	>肌层	93	83			14	15		
TNM分期	I-II	89	79	0.046	0.083	73	16	0.000	0.987
	III-IV	11	10			9	2		

2.3 在结肠癌中IFITM1与β-catenin的关系

GEPIA数据库显示IFITM1与β-catenin之间存在正相关性($P<0.05$,图1C)。对免疫组化结果进行Spearman相关性分析,在100例结肠癌组织中,IFITM1与β-catenin的表达也呈正相关($r_s=0.334$, $P<0.05$,表4)。

表4 100例结肠癌组织中IFITM1和β-catenin的关系

IFITM1	β-catenin		<i>n</i>	r_s	<i>P</i>
	-	+			
-	6	5	11	0.334	0.001
+	12	77	89		

2.4 过表达IFITM1促进结肠癌细胞的增殖

CCK-8实验结果显示,在过表达IFITM1之后,细胞的增殖能力明显增强。在HCT-15细胞中,与空白对照MOCK组相比,空载体转染OE-NC组的增殖能力并无变化($P>0.05$,图3)。OE-IFITM1组与OE-NC相比,OE-IFITM1组的增殖能力显著高于空载体转染OE-NC组($P<0.05$,图3)。

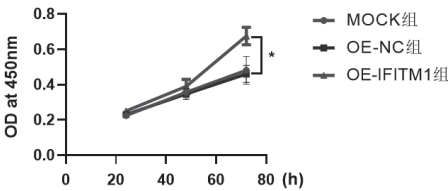


图3 HCT-15细胞各组增殖曲线图

2.5 过表达IFITM1增强TCF/LEF转录激活复合体的活性

双荧光素酶报告基因显示,与MOCK组相比,空载体转染OE-NC组的TOP/FOP荧光强度比值无差异($P>0.05$,图4)。OE-IFITM1组的荧光强度比值高于OE-NC组($P<0.05$,图4)。

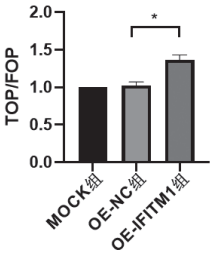


图4 双荧光素酶报告基因检测TCF/LEF转录因子活性

2.6 IFITM1激活Wnt/β-catenin信号通路

在HCT-15细胞中,与空白对照MOCK组相比,空载体转染OE-NC组的β-catenin、C-myc、CyclinD1表达量无差异($P>0.05$,图5),OE-IFITM1组各蛋白表达量显著高于OE-NC组($P<0.05$,图5)。

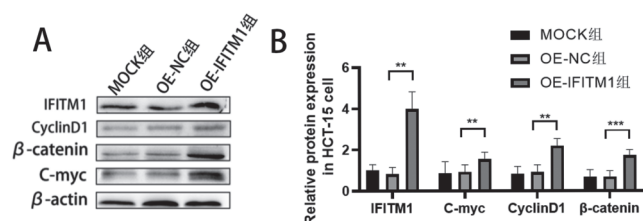


图5 IFITM1过表达后各组wnt/β-catenin信号通路上关键蛋白的表达情况

A.HCT-15细胞中各蛋白的条带图;B.各蛋白条带的统计柱状图

3 讨论

据全球癌症统计数据显示,结肠癌的发病率位居第三,目前临床上多采用手术的治疗方法,但患者术后预后不佳,生存率低。结肠癌往往是由结肠腺瘤发展而来,而从“腺瘤-癌”的过程往往需要5~10年的时间,这为疾病的早期诊断干预提供了宝贵的窗口时间^[6]。靶向治疗是在分子生物学水平上对已知的明确致癌位点进行治疗,与传统手术治疗相比,具有安全、准确的优点。若能在窗口期对致癌靶点进行治疗,可能会极大延长患者生存期,因此寻找结肠癌中有效的治疗靶点是一项重要的工作。IFITM1是干扰素跨膜家族蛋白中的一员,之前涉及与其有关的研究领域多为病原体感染与免疫,而在近些年的研究中,发现IFITM1也与肿瘤的发展有密切的关系,且其有望成为结肠癌的治疗靶点。IFITM1可参与肿瘤的增殖,侵袭和转移。在胆囊癌、食管腺癌、结肠癌中,IFITM1可作为一个独立的预后生物标志物^[7]。

Wnt信号通路的异常激活参与了肿瘤发展的多个过程^[8]。Wnt通路包括三种:Wnt/β-catenin通路、Wnt/PCP通路、Wnt/Ca²⁺通路。其中,最为经典的是Wnt/β-catenin信号通路。Wnt/β-catenin信号通路由β-catenin和TCF介导,它的激活不仅表现在细胞核内β-catenin的含量明显增加,更表现在胞核内TCF/LEF转录因子的活性显著增强。当信号通路处于关闭状态时,β-catenin在胞浆中被APC蛋白复合体磷酸化成为P-β-catenin,无法实现入核,不能激活通路。当通路处于开放状态时,蛋白复合体解离,活性下降,使得β-catenin无法被磷酸化降解,从而积聚在胞浆中后转入细胞核内,与双向调节转录因子TCF/LEF的DNA结合效应分子相作用,形成活化复合物,使下游靶基因C-myc、cyclinD1、TCF7、Sox4的表达增加^[9],Wnt/β-catenin信号通路由此被激活。有相关研究表明,在结肠癌组织中,β-catenin的表达含量远远高于癌旁组织,多种诱因均可导致Wnt/

β-catenin通路的异常激活^[10]。

在本研究中,我们首先通过生信分析发现IFITM1在结肠癌中的表达高于癌旁组织,并且与患者的预后不良显著相关,GEPIA数据库分析发现IFITM1与β-catenin有着密切关系。同时,我们检测了106例结肠癌其癌旁组织中IFITM1和β-catenin的表达情况,发现二者在结肠癌中均高表达,且IFITM1与β-catenin之间也存在着正相关关系,这些实验结果与前期的生物信息分析一致。为了更进一步探究IFITM1对细胞的调控及作用机制,我们构建了过表达IFITM1细胞模型,发现IFITM1可以促进细胞增殖,增强TCF/LEF转录因子的活性,并且在过表达IFITM1细胞中,Wnt通路下游C-myc、CyclinD1的表达也随之增加。这提示我们IFITM1很有可能通过Wnt/β-catenin信号通路促进肿瘤增殖。

综上,IFITM1促进结肠癌的发生发展,并可能通过Wnt/β-catenin信号通路发挥作用。

参考文献

- [1] Ahmed M. Colorectal Cancer: A clinician's Perspective in 2019[J]. Gastroenterology Res, 2020, 13(1):1-10.
- [2] Lee YT, Tan YJ, Oon CE. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 834: 188-196.
- [3] Yáñez DC, Ross S, Crompton T. The IFITM protein family in adaptive immunity[J]. Immunology, 2020, 159(4): 365-372.
- [4] Liu Z, Zhang W, Zhang B, et al. MiR-504-3p Has Tumor-Suppressing Activity and Decreases IFITM1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Cells[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2022, 26(7-8): 351-359.
- [5] Provance OK, Geanes ES, Lui AJ, et al. Disrupting interferon-alpha and NF-kappaB crosstalk suppresses IFITM1 expression attenuating triple-negative breast cancer progression[J]. Cancer letters, 2021, 51412-51429.
- [6] Parsons MJ, Tammela T, Dow LE. WNT as a Driver and Dependency in Cancer[J]. Cancer Discov, 2021, 11(10): 2413-2429.
- [7] Wang J, Cai H, Liu Q, et al. Cinobufacini Inhibits Colorectal Cancer Invasion and Metastasis via Suppressing Wnt/β-Catenin Signaling Pathway and EMT[J]. Am J Chin Med, 2020, 48(3): 703-718.
- [8] 陈万青,李霓,兰平,等. 中国结肠癌筛查与早诊早治指南[J]. 中国肿瘤,2021,30(1):1-28.
- [9] Renba L, Xinxiao L, Xiaodong Z. Deciphering the Roles of IFITM1 in Tumors[J]. Molecular diagnosis therapy, 2020, 24(4):

2022, 21(1): 144.

(基础医学栏目编辑:张明溪)

间苯三酚应用于无痛胃镜中对食管胃结合部观察效果的影响及安全性

(1.承德医学院基础医学院,河北承德 067000;2.承德市中心医院)

关键词: 无痛胃镜; 间苯三酚; 食管胃结合部; 观察效果

文章编号: 1004-6879(2024)02-0105-05

(1.School of Basic Medical Sciences, Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China; 2.Chengde Central Hospital)

*通讯作者