

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.20.004

多组学分析揭示 Grb2 介导 α - 硫辛酸抑制肝癌细胞增殖研究 *

杨 澜¹ 邓兴明² 李 贝² 邓雪松³ 陆菁潇¹ 吕国庆^{2Δ}

(1 深圳市第二人民医院 转化医学研究院 广东 深圳 518035;

2 北京大学深圳医院 胃肠外科 广东 深圳 518036; 3 深圳市第二人民医院 肝胆外科 广东 深圳 518035)

摘要 目的:为更深入了解 α - 硫辛酸如何影响复杂信号通路间的相互作用抑制细胞增殖。**方法:**我们凭借 RNA-Seq 与同位素相对标记与绝对定量技术,对 α -LA 处理 24 h HepG2 细胞在转录和蛋白表达水平的变化差异进行分析,并借助实时定量 PCR 免疫印迹技术对组学数据进行了鉴定。**结果:**转录组学提示共有 4,446 个基因(2,097 个基因表达下调,2,349 个基因表达上调)的表达在 α -LA 处理 24 h 后呈现显著性改变。GO 分析提示,编码肿瘤相关细胞膜蛋白的基因是受 α -LA 影响最为显著的一类 mRNA;蛋白质组学进一步提示 Grb2 可能是受 α -LA 调控的膜受体信号通路中关键的靶分子。**结论:** α -LA 抑制 HCC 细胞增殖是通过下调 Grb2 介导的相关通路而实现。

关键词: α - 硫辛酸;肝细胞癌;细胞增殖;Grb2

中图分类号: R-33; R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)20-3817-07

Multi-omics Analyses Reveal α -lipoic acid-regulated Cell Proliferation via Grb2-mediated Signaling Downregulation*

YANG Lan¹, DENG Xing-ming², LI Bei², DENG Xue-song³, LU Jing-xiao¹, LV Guo-qing^{2Δ}

(1 Institute of Translational Medicine, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, 518035, China;

2 Department of Gastrointestinal Surgery, Peking University Shenzhen Hospital, Guangdong, Shenzhen, 518036, China;

3 Department of Hepatobiliary Surgery, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, 518035, China)

ABSTRACT Objective: To more comprehensively understand how α -LA mediates the components of the complex web of interactions among the signalling pathways to repression the cell proliferation. **Methods:** In this study, we combined the use of an RNA sequencing (RNA-Seq) database and isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ)-based quantitative proteomics data to investigate the dynamic genomic/proteomic response of HepG2 cells to α -LA stress. Real-time PCR and western blotting were used to identified the expression changes of key genes which from the omics. **Results:** A total of 4,446 differentially expressed genes (2,097 downregulated and 2,349 upregulated) were identified via RNA-Seq in HepG2 cells after exposure to α -LA for 24 h. Moreover, GO analyses showed mRNA that encode cancer-relevant cell membrane proteins were significantly affected. A further proteomic analysis predicted that Grb2 may mediate the key target pathways activated by exposure to α -LA. **Conclusion:** These findings provide a novel mechanism by which α -LA regulates cell proliferation via the downregulation of growth factor-stimulated Grb2 signaling.

Key words: Alpha lipoic acid, Hepatocellular carcinoma, Cell proliferation, Growth factor receptor-bound protein 2

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)20-3817-07

前言

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)已逐渐成为全球范围内对人类健康和生命安全威胁最大的恶性肿瘤之一。尽管经导管肝动脉化疗栓塞作为常用的非手术治疗方法能有效提高治疗疗效,但对于无手术指征的患者而言,该方法并不能有效缓解肿瘤进展并改善预后^[1]。而用于 HCC 靶向治疗的索拉菲尼由于其自身价格昂贵及在亚洲人群中的治疗效率偏低,限制了其在中国患者中的使用。近年来,许多对肿瘤有效的中药

单体及小分子化合物成为肿瘤研究领域的热点。课题组前期研究发现临床上广泛应用于神经系统疾病、糖尿病及糖尿病周围神经病变、炎症等与自由基代谢紊乱相关疾病治疗中的 α - 硫辛酸(alpha lipoic acid, α -LA)具有显著抑制多种肿瘤细胞增殖的作用^[2-4]。但作为天然抗氧化剂中抗氧化性能最强的一类抗氧化剂, α -LA 对肿瘤细胞生长的调节作用至今仍不甚明了^[5]。课题组前期对 α -LA 对肿瘤细胞增殖影响的研究中发现 α -LA 可通过下调 EGFR-MAPK/ERK 和 HGF/c-met(MET)通路抑制肿瘤细胞增殖,但是 α -LA 如何调节上述通路的下调尚未可知。本

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81672813);人事部中国博士后科学基金项目(2016M602594);深圳市科技计划 2016 年基础研究项目(JCYJ20160425105945739);深圳市 "三名工程"(SZSM201612051)

作者简介:杨澜(1981-),博士,主要研究方向:非可控性炎症与肿瘤发生, E-mail: billow_yang@163.com

Δ 通讯作者:吕国庆,硕士,主任医师,主要研究方向:消化道肿瘤的化学预防, E-mail: lgq_pkzs@163.com

(收稿日期:2018-05-30 接受日期:2018-06-23)

研究中,我们将借助测序与蛋白标记技术及生物信息学分析手段,找寻在 α -LA 抑制肿瘤增殖过程中的关键调节子。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

HepG2 细胞购自 ATCC, 使用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基, 在 37℃, 5% CO₂ 恒温条件下培养。

1.2 主要试剂

胎牛血清(货号 10099141)、胰蛋白酶(25300-056)购自 Gibco 公司。 α -LA(T1395-5g)购自美国 Sigma 公司。抗体 Grb2 (ab32037)购自美国 Abcam 公司, β -actin(8457),EGFR/phospho-EGFR (Tyr1068) (11862);MET/phospho-MET (Ser1234) (3019T) 及相应二抗 (7074) 购自美国 Cell Signal 公司。PierceTM ECL 发光试剂盒(32106)购自美国 Thermo 公司。总 RNA 提取使用 Trizol (15596026) 购自美国 Invitrogen 公司。mRNA 逆转录(RR037B)与 Real-time PCR 试剂盒(RR066B)购自日本 Takara 公司。

1.3 基于 RNA-Seq 数据的分析

从样品总 RNA 中富集 mRNA, 合成 cDNA 链, 末端修复 cDNA 片段并连接测序接头, 琼脂糖凝胶电泳, 选出 200 bp 大小的片段, 进行桥式 PCR 扩增, 得到测序用 cDNA 文库。用 Illumina HiSeq2000 高通量测序仪对文库进行 pair-end 测序。计算机软件同步收集和处理荧光图像数据, 去除低质量的 reads (质量值 Q<20 的碱基数占整个 read 的 50%以上), 获得 clean reads。用 TopHat 软件将 clean reads 映射 (map) 到 UCSC Genome Browse 的 hg19 参考基因组。采用 RPKM (Reads Per Kilo bases per Milion reads, 每百万 reads 中来自某一基因每千碱基长度的 read 数)来计算基因的表达量, 将 FDR<0.05 且差异倍数 (fold change) ≥ 2.0 作为差异基因的判定标准。利用 DAVID 在线分析工具挖掘与差异表达基因相关的生物学功能。以 KEGG Pathway 为单位, 以 FDR<0.05 的 Pathway 为判定标准, 筛选差异表达基因中显著富集的 Pathway。

1.4 差异蛋白质的筛选和鉴定

提取细胞总蛋白组后, 对细胞蛋白进行酶解和脱盐; 在对照和处理组样品中分别加入带有报告基团的 iTRAQ 试剂, Sep-PakVac C18 处理标记好的混合样本, 并将溶解后的样品加载至柱中, 用 0.1%TFA 和 50%乙腈 400 μ L 0.1%TFA 洗脱样品。经胰蛋白酶消化和 iTRAQ 标记的蛋白质肽段, 用强阳离子交换液相色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 5 μ m, 200 A, Polysulfoethyl column, SCX)分离。A 相 (10 mM KH₂PO₄, 25%ACN, pH2.6), 以 200 μ L/min 流速分离, 再用不同含量的 B 相 (10 mM KH₂PO₄, 350 mM KCl, 25%CAN, pH2.6) 洗脱。将收集到的 SCX 蛋白质肽段进行真空离心浓缩处理。将不同梯度的 SCX 蛋白质肽段分别加载到反相 ZORBAX 300SB C18 柱中 (5 μ m, 300 Å, 0.1 $\times$ 150 mm)。用流动相 A(5%CAN, 0.1%甲酸) 300 nL/min 分离, 再用不同含量的流动相 B (95%CAN, 0.1%甲酸) 线性梯度洗脱 90 min。对二维液相色谱分离后的标记样本采用阳离子模式和信息独立获取模式进行质谱分析, 获得定量值。

所得的质谱数据通过 Protein Pilot 软件, 检索 Swiss-Prot 数据库牙 IPI human (version 3.87) 正反合库数据库进行检索和

定量。设阈值 ProtScore>1.3 并选择具有 2 个以上肽段为 95% 置信度的蛋白质进行后续定量分析。使用 Pro Group algorithm 定量蛋白质并分析 P 值。本研究中的差异表达蛋白定义为 $P<0.05$ 且差异倍数(fold change) ≥ 1.5 或 ≤ 0.7 倍的基因。蛋白质相互作用网络通过 STRING database (<http://string-db.org>)构建, 并将相应的数据导入 Cytoscape 进行可视化作图。

1.5 Western Blot 检测细胞中相应蛋白表达

收集处于对数生长期的细胞, 冰预冷 PBS 洗涤 2 次, 加入适量蛋白裂解液, 提取细胞总蛋白, BCA 法蛋白定量。加入相应体积的 Loading buffer 混匀, 100℃ 水浴 5 min 变性蛋白。SDS-PAGE 电泳分离蛋白后, 将蛋白电转至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉封闭 1 h。加入一抗 β -actin 按 1:2000 稀释, Grb2 按 1:5000 稀释, EGFR/phospho-EGFR (Tyr1068);MET/phospho-MET (Ser1234) 按 1:1000 稀释, 4℃ 孵育过夜; TBST 漂洗 5 min/ 次, 共 6 次, 沥干, 加入二抗, 室温反应 1 h; TBST 漂洗 5 min/ 次, 共 6 次, 沥干, ECL 显色、曝光、获取图像。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件分析并采用 GraphPad 5.0 作图。实验数据均以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。不同细胞处理组间差异比较采用 Student's t test 或 one-way ANOVA; $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 基于 α -LA 处理的 HepG2 细胞转录表达谱分析

我们比较了 1.0 mM α -LA 处理前后 HepG2 细胞转录水平差异的 mRNA。以平均上调或下调倍数大于 2 倍为限定标准, 共发现 4,446 个基因可能受 α -LA 调控, 其中 α -LA 处理后有 2,097 个基因表达下调, 2,349 个基因表达上调。我们将 α -LA 处理前后 HepG2 的共同差异表达基因从细胞组分、分子功能和生物学过程三个层面对差异表达基因参与的生物学功能进行分析。结果提示, 76.73% (2889/3765) 差异基因属于细胞器中与膜组分相关的结构; 差异基因的功能主要与抗氧化、酶活性条件相关, 其生物学功能主要集中于调控细胞生物学过程、信号转导通路、细胞代谢以及凋亡等重要的生物学过程; 但仍有部分蛋白功能未知, 有待于进一步研究。通过 KEGG 信号通路富集性分析, 我们发现差异表达基因显著富集在 6 条信号通路 ($P<0.01$): 1) 类固醇生物合成 ($P=0.0086$); 2) N-聚糖生物合成 ($P=0.0003$); 3) 蛋白输出 ($P=0.0002$); 4) 肿瘤相关通路 ($P=0$ 。

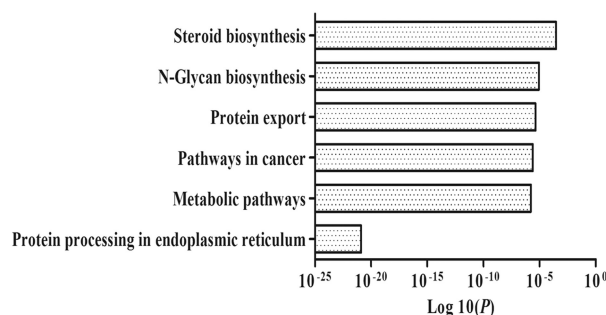


图1 α -LA 处理 HepG2 细胞差异表达基因的 KEGG 富集分析
Fig.1 KEGG enrichment analysis of the differentially expressed genes (DEGs) in the HepG2 cells after α -LA treatment.

0001);5)代谢通路 ($P=0.0001$);(6) 内质网蛋白加工 ($P=0.0000$) (图 1)。

2.2 α -LA 处理的 HepG2 蛋白质谱差异分析

提取 α -LA 处理 24 h 细胞的蛋白质酶解产物进行 iTRAQ 标记,经质谱分析鉴定及定量分析后,以未经 α -LA 处理的空白 HepG2 作为对照, α -LA 处理与对照的比值超过 1.5 或小于 0.7 倍为标准,共鉴定 182 个差异表达蛋白。通过 IPI 蛋白质序列数据库进行检索,对鉴定的差异蛋白进行 GO 分析发现, α -LA 对细胞结合蛋白 (95/182) 和细胞膜结构相关蛋白

(93/182)的影响最为显著。这提示说 α -LA 处理前后差异性蛋白质的表达多表现在细胞膜结构的不同,而这些结构及含量的改变,将有可能抑制肿瘤的发展过程。通过 KEGG 信号通路富集性分析,我们发现差异表达蛋白显著富集在 4 条通路中($P < 0.01$):1)肿瘤相关蛋白聚糖 (MAPK14, DDX5, STAT3, EGFR, PXN, GRB2, CBL);2)MAPK 通路 (MAPK14, DUSP3, EGFR, GRB2);3)FoxO 通路 (MAPK14, STAT3, EGFR, GRB2);4) PI3K-Akt 通路(CDK4, EGFR, GRB2, LAMA5)(图 2),上述信号通路不仅受到 α -LA 调节,也与肿瘤的发生发展密切相关。

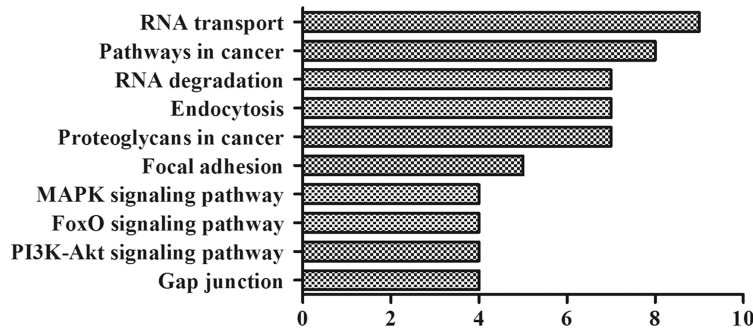


图 2 α -LA 处理 24 h HepG2 细胞差异表达蛋白的 KEGG 富集分析

Fig.2 Proteins were classified into categories for KEGG pathways analysis of the differentially expressed proteins(DEPs)enrichment in the HepG2 cells after α -LA treatment.

2.3 Grb2 作为 α -LA 调节主要基因的初步确立

欲了解 α -LA 抑制肿瘤细胞生长的机制,首先需对其调控的基因进行了预测和鉴定。我们将 HepG2 转录数据与 iTRAQ 结果进行交集,发现转录数据中有 72 个基因的表达趋势与 i-TARQ 蛋白结果吻合(表 1,图 5)。我们将这 72 个基因 / 蛋白上传至 DAVID Functional Annotation Bioinformatics 进行基因

功能聚类分析,搜索到 7 个与细胞增殖密切相关的基因 / 蛋白,其中生长因子受体结合蛋白(Grb2)的表达变化在 7 个差异基因中变化最为明显。

2.4 Grb2 介导 α -LA 诱导的细胞增殖抑制

本部分实验以 HepG2 作为研究对象,探讨 Grb2 在 α -LA 抑制细胞增殖过程中发挥的作用。首先,我们采用 CCK-8 法检

表 1 重叠的差异基因 / 蛋白列表
Table 1 List of overlapping DEGs/DEPs

Gene symbol	Description	P value of mRNA	E value of protein
MUC1	Mucin-1	5.000E-05	0.000E+00
GALNT2	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	7.500E-04	0.000E+00
IRF2BP2	Interferon regulatory factor 2-binding protein 2	5.000E-05	0.000E+00
SRRM1	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	7.000E-04	2.605E-135
DNAJC8	DnaJ homolog subfamily C member 8	5.000E-05	0.000E+00
YTHDF2	YTH domain-containing family protein 2	1.950E-03	0.000E+00
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	2.800E-03	0.000E+00
DR1	Protein Dr1	7.000E-03	6.544E-126
FNBP1L	Formin-binding protein 1-like	5.000E-05	0.000E+00
CNN3	Calponin-3	3.550E-03	0.000E+00
HAT1	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	2.000E-04	0.000E+00
HDLBP	Vigilin	5.000E-05	0.000E+00
KIAA1524	Protein CIP2A	8.050E-03	0.000E+00
TBL1XR1	F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1XR1	5.000E-05	0.000E+00
SEC24D	Protein transport protein Sec24D	5.000E-05	0.000E+00

续表 1 重叠的差异基因 / 蛋白列表

Table 1 List of overlapping DEGs/DEPs

Gene symbol	Description	P value of mRNA	E value of protein
SLC7A11	Cystine/glutamate transporter	9.600E-03	0.000E+00
NAA15	N-alpha-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit	8.650E-03	0.000E+00
PALLD	Palladin	4.400E-03	0.000E+00
SNCA	Alpha-synuclein	5.000E-05	1.808E-93
CTNNA1	Catenin alpha-1	5.000E-05	0.000E+00
PDLIM7	PDZ and LIM domain protein 7	4.000E-04	0.000E+00
DAB2	Disabled homolog 2	5.000E-05	0.000E+00
HMGCS1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	5.000E-05	0.000E+00
TRIP13	Pachytene checkpoint protein 2 homolog	5.000E-04	0.000E+00
MAP7	Ensconsin	5.000E-05	0.000E+00
DDAH2	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	5.000E-05	0.000E+00
MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	4.200E-03	0.000E+00
DSP	Desmoplakin	1.000E-04	0.000E+00
CDK5	Cyclin-dependent-like kinase 5	2.000E-04	0.000E+00
GTF2I	General transcription factor II-I	5.000E-05	0.000E+00
ASNS	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	5.000E-05	0.000E+00
GOLGA2	Golgin subfamily A member 2	2.500E-04	0.000E+00
NUP214	Nuclear pore complex protein Nup214	8.000E-04	0.000E+00
DNAJA1	DnaJ homolog subfamily A member 1	5.000E-05	0.000E+00
RFK	Riboflavin kinase	5.000E-05	2.160E-114
PDLIM1	PDZ and LIM domain protein 1	5.000E-05	0.000E+00
TRIM29	Tripartite motif-containing protein 29	5.000E-05	0.000E+00
MTA2	Metastasis-associated protein MTA2	5.000E-05	0.000E+00
PXN	Paxillin	1.155E-02	0.000E+00
CLIP1	CAP-Gly domain-containing linker protein 1	1.300E-03	0.000E+00
DIP2B	Disco-interacting protein 2 homolog B	5.000E-05	0.000E+00
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	1.160E-02	0.000E+00
AHNAK2	Protein AHNAK2	5.000E-05	0.000E+00
HEATR5A	HEAT repeat-containing protein 5A	5.000E-05	0.000E+00
C14orf28	Uncharacterized protein C14orf28	6.550E-03	0.000E+00
ERO1L	ERO1-like protein alpha	8.000E-04	0.000E+00
YLPM1	YLP motif-containing protein 1	5.500E-04	0.000E+00
OGFOD1	Prolyl 3-hydroxylase OGFOD1	6.000E-04	0.000E+00
NUP93	Nuclear pore complex protein Nup93	2.000E-04	0.000E+00
FAM192A	Protein FAM192A	5.550E-03	0.000E+00
CNOT1	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	1.000E-04	0.000E+00
EDC4	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	1.600E-03	0.000E+00
DDX19B	ATP-dependent RNA helicase DDX19B	5.000E-05	0.000E+00
PSME3	Proteasome activator complex subunit 3	3.500E-04	3.880E-178
NPEPPS	Puromycin-sensitive aminopeptidase	7.150E-03	0.000E+00

续表 1 重叠的差异基因 / 蛋白列表

Table 1 List of overlapping DEGs/DEPs

Gene symbol	Description	P value of mRNA	E value of protein
DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	1.700E-03	0.000E+00
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2	7.950E-03	6.238E-164
FXR2	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	5.000E-05	0.000E+00
DCXR	L-xylulose reductase	5.000E-05	1.735E-179
AURKB	Aurora kinase B	1.000E-03	0.000E+00
GALNT1	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1	5.000E-05	0.000E+00
GIPC1	PDZ domain-containing protein GIPC1	5.000E-05	0.000E+00
COX6B1	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	1.000E-04	7.228E-62
EIF3K	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	9.650E-03	8.420E-165
NAPA	Alpha-soluble NSF attachment protein	4.550E-03	0.000E+00
UHRF1	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1	3.900E-03	0.000E+00
NOSIP	Nitric oxide synthase-interacting protein	5.000E-05	0.000E+00
PSMF1	Proteasome inhibitor PI31 subunit	3.350E-03	0.000E+00
SNX5	Sorting nexin-5	1.450E-03	0.000E+00
EIF3D	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	5.000E-05	0.000E+00
EIF3L	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	5.000E-05	0.000E+00
ATXN10	Ataxin-10	8.500E-04	0.000E+00

测了细胞增殖速率的改变。如图 3A 所示, α -LA (1.0 mM) 处理细胞后, HepG2 细胞增殖速度明显被抑制。 α -LA 处理 HepG2 12 和 24 h 后, Grb2 表达显著抑制; 同时 EGFR 和 Met 的磷酸化水平也随之下调(图 3C)。

3 讨论

作为天然抗氧化剂中抗氧化性能最强的一类抗氧化剂, α -LA 对肿瘤细胞生长的调节作用至今仍不甚明了。 α -LA, 化学名 1,2-二硫戊环-3-戊酸, 广泛分布于动植物组织中, 但含量极低。 α -LA(氧化型)能够中和失去抗氧化功能的自由基, 从线粒体电子传递链中再次获得电子, 使自身得到还原(二氢硫辛酸, DHLA)。二者在体内协同作用, 提高清除细胞内外任何部位自由基及抑制脂质过氧化的能力, 是目前发现唯一具有水、脂双溶性的天然抗氧化剂^[6,7]。研究发现: 1) α -LA 可螯合与 DNA 结合的 Fe^{2+} , 降低羟自由基生成量, 减少 Fe^{2+} 诱导的 DNA 损伤; 2) α -LA 可直接清除 ROS, 也可作为氧化还原链中的阻断剂参与抗氧化过程。尽管针对不同的过氧化物及靶分子 α -LA 清除 ROS 的能力不是最强的, 但是 α -LA 能将胱氨酸还原成半胱氨酸, 直接再生 GSH。3) α -LA 作为酰基载体, 存在于丙酮酸脱氢酶系和 α -酮戊二酸脱氢酶系中, 参与三羧酸循环, 在 β -酮酸氧化和脱羧过程中起到偶联酰基转移和电子转移的作用, 影响糖类分解, 增加细胞的能量储备。4) α -LA 参与还原尿-甲硫氨酸亚砷还原酶的活性, 间接修复氧化导致的氨基酸残基的损伤, 这对于蛋白质等生物大分子受损后的修复, 维持机体的稳定性具有重要意义^[6-10]。

课题组前期在对 α -LA 处理前后的 HCC 细胞转录组及蛋

白组学差异表达进行分析后发现 EGFR、Grb2^[11, 12]、STAT3、MAPK14^[13]、DDX5^[14]、PXN^[15, 16]、CDK4^[17]、LAMA5^[18, 19]等多个广泛参与肿瘤形成的蛋白在 α -LA 处理前后表达发生显著性改变。进一步分析提示与差异蛋白相关的多条信号通路在 α -LA 处理后出现变化, 其中 MAPK^[20]、FoxO^[21, 22]、PI3K-AKT^[23, 24]与细胞生长或肿瘤发生密切相关的通路受 α -LA 影响最为显著。值得注意的是, 在蛋白-蛋白相互作用分析中, 我们发现 Grb2 不仅在转录及蛋白水平的下调显著, 而且与其他蛋白质的交互作用最为广泛。Grb2 是一种在诸多细胞中广泛表达的衔接蛋白, 含有一个 SH2 结构域和两个 SH3 结构域, 可分别通过 SH2 结构域与受体酪氨酸激酶(Receptor tyrosine kinase, RTK)结合, 通过 SH3 结构域与 SOS 蛋白结合, 执行一系列基本细胞活动包括细胞增生、生长、分化和生存; 维护正常胚胎发育及生命过程^[25]。现已明确 Grb2 作为主要信号传导分子在宫颈癌^[26]、胃癌^[27]、食管鳞状细胞癌^[27]等肿瘤组织中高表达, 并且 Grb2 的表达水平与肿瘤的淋巴结转移及预后密切相关^[12, 28]。Grb2 的异常表达或其所在信号通路的异常活化将减弱肿瘤细胞间或肿瘤细胞与细胞外基质间的黏附、降低保外基质结构的稳定性、增强细胞骨架的柔性和细胞的迁移能力, 促进肿瘤血管生成。我们实验室也在多种类型的细胞株中(A549, NCI-H1975, HepG2, HT29 及 HCT116)证实回补 Grb2 的表达, α -LA 对细胞克隆、增殖或迁移的抑制作用均消失, 这提示, α -LA 可通过下调 Grb2 的水平影响肿瘤细胞生物学行为的改变。

既然, Grb2 承载着某些膜受体信号传递, 那么 Grb2 是否有可能成为介导多条通路的关键整合点? 我们前期比对

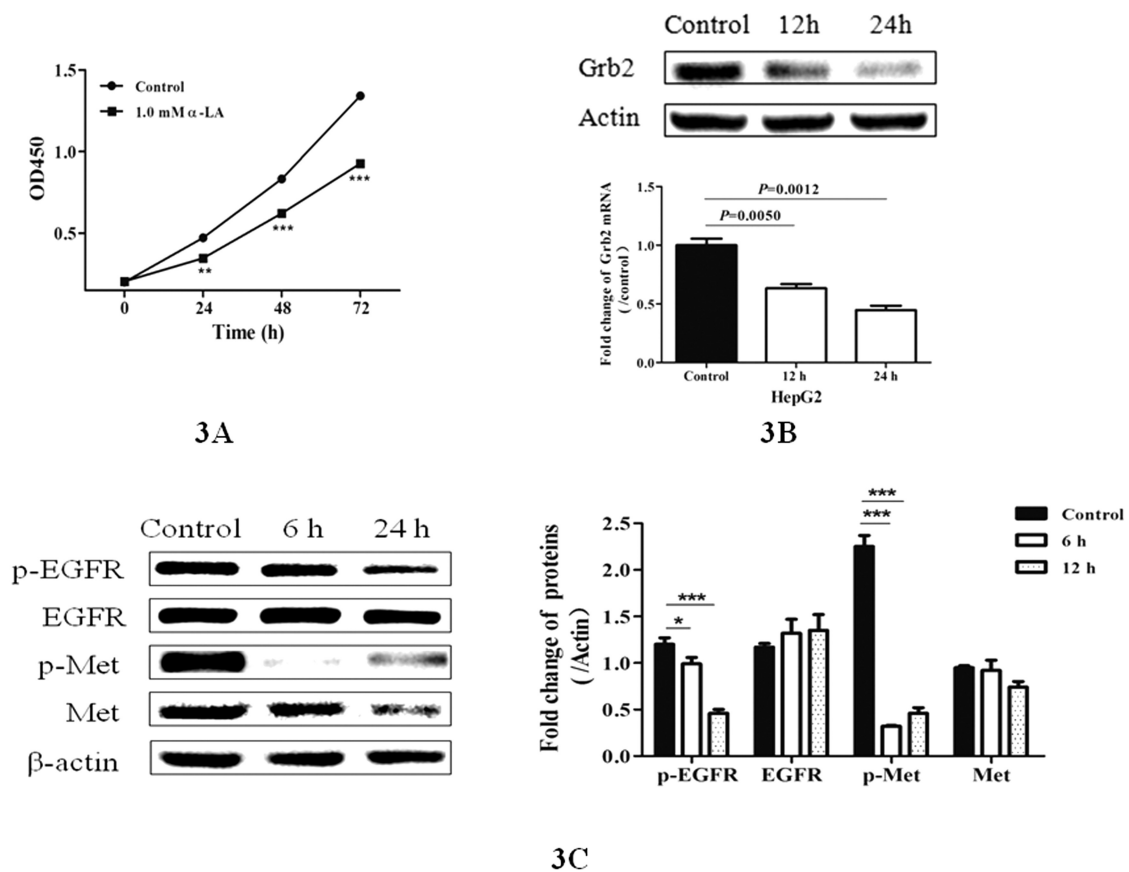


图3 Grb2 是 α -LA 抑制细胞增殖的介导因子

A. 采用 CCK-8 法在检测 HepG2 细胞增殖变化

B. 免疫印迹法与 Real-time PCR 测定 HepG2 细胞中 Grb2 在 1.0 mM α -LA 处理 12 和 24 h 时的表达变化

C. 免疫印迹法测定 HepG2 细胞中磷酸化 EGFR 与磷酸化 Met 在 α -LA 暴露 6 和 24h 的改变

Fig.3 Grb2 mediates the α -LA-induced reduction in cell proliferation.

A. HepG2 cell proliferation was measured with a CCK-8 assay at the indicated times.

B. Grb2 levels were measured via western blotting in HepG2 cells after treatment with 1.0 mM α -LA for 12 and 24 h.

E. Western blotting to assess levels of phosphorylated EGFR and Met in HepG2 cells after treatment with 1.0 mM α -LA for 6 and 24 h.

con-A549 与 sh-Grb2 A549 差异蛋白富集通路,发现 MAPK、FoxO、PI3K-AKT 三条与细胞生长或肿瘤发生密切相关的通路在 Grb2 敲降后活化程度均被抑制,这与 α -LA 处理 HepG2 细胞通路差异富集分析结果一致。与此同时,我们还发现 α -LA 对 EGFR-MAPK/ERK 和 HGF/c-met(MET)介导通路的活化程度对细胞内 Grb2 的依赖大于其自身的磷酸化水平。 α -LA 下调 Grb2 在细胞内的表达水平可反馈性抑制 phospho-EGFR 与 phospho-MET 表达,继而下调 Ras 和 PI3K 的活性,抑制下游 ERK 和 Akt 入核,最终影响肿瘤细胞生物学性状^[4,29]。

综上所述,微环境中存在的具有生物活性的物质种类繁多,作用于肿瘤细胞表面相应受体后将细胞的增殖、转移、分化产生了重要的影响。 α -LA 作为目前发现的、唯一具有水脂双溶性的天然抗氧化剂在自由基代谢紊乱相关慢性疾病的预防和治疗中发挥重要作用。通过本项研究,我们明确了 α -LA 在抑制 HCC 细胞增殖过程中发挥的重要生物学作用并初步指向 Grb2 介导 α -LA 诱导的肿瘤细胞增殖抑制与 RTKs 介导通路相关。

参考文献(References)

[1] Oliveri RS, Wetterslev J, Gluud C. Transarterial embolisation for

unresectable hepatocellular carcinoma [J]. Cochrane Db Syst Rev, 2011, 3: 1-55

[2] Yamasaki M, Iwase M, Kawano K, et al. alpha-Lipoic acid suppresses migration and invasion via downregulation of cell surface beta1-integrin expression in bladder cancer cells [J]. J Clin Biochem Nutr, 2014, 54: 18-25

[3] Michikoshi H, Nakamura T, Sakai K, et al. alpha-Lipoic acid-induced inhibition of proliferation and met phosphorylation in human non-small cell lung cancer cells[J]. Cancer Lett, 2013, 335: 472-478

[4] Yang L, Wen Y, Lyu G, et al. alpha-Lipoic acid inhibits human lung cancer cell proliferation through Grb2-mediated EGFR downregulation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 494: 325-331

[5] Durand M and Mach N. Alpha lipoic acid and its antioxidant against cancer and diseases of central sensitization [J]. Nutr Hosp, 2013, 28: 1031-1038

[6] Solmonson A, Deberardinis RJ. Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation[J]. J Biol Chem, 2018, 293: 7522-7530

[7] Koufaki M. Therapeutic applications of lipoic acid: a patent review (2011-2014)[J]. Expert Opin Ther Pat, 2014, 24: 993-1005

[8] Bingham PM, Stuart SD, Zachar Z. Lipoic acid and lipoic acid analogs

- in cancer metabolism and chemotherapy [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2014, 7: 837-846
- [9] Moura FA, de Andrade KQ, dos Santos JC, et al. Lipoic acid: its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications [J]. *Curr Top Med Chem*, 2015, 15: 458-483
- [10] Dorsam B, Fahrer J. The disulfide compound α -lipoic acid and its derivatives: a novel class of anticancer agents targeting mitochondria [J]. *Cancer Lett*, 2016, 37: 12-19
- [11] Xu Y, Zhang H, Lit LC, et al. The kinase LMTK3 promotes invasion in breast cancer through GRB2-mediated induction of integrin beta(1) [J]. *Sci Signal*, 2014, 7: ra58
- [12] Zhang Y, Xu G, Liu G, et al. miR-411-5p inhibits proliferation and metastasis of breast cancer cell via targeting GRB2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 476: 607-613
- [13] Liang N, Zhong R, Hou X, et al. Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) participates in the regulation of ionizing radiation-induced cell death via MAPK14 in lung cancer H1299 cells [J]. *Cell Prolif*, 2015, 48: 561-572
- [14] Wang Z, Luo Z, Zhou L, et al. DDX5 promotes proliferation and tumorigenesis of non-small-cell lung cancer cells by activating beta-catenin signaling pathway [J]. *Cancer Sci*, 2015, 106: 1303-1312
- [15] Li D, Li Z, Xiong J, et al. MicroRNA-212 functions as an epigenetic-silenced tumor suppressor involving in tumor metastasis and invasion of gastric cancer through down-regulating PXN expression [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5: 2980-2997
- [16] Ketscher A, Jilg CA, Willmann D, et al. LSD1 controls metastasis of androgen-independent prostate cancer cells through PXN and LPAR6 [J]. *Oncogenesis*, 2014, 3: e120
- [17] Murphy CG, Dickler MN. The Role of CDK4/6 Inhibition in Breast Cancer [J]. *Oncologist*, 2015, 20: 483-490
- [18] Gopal SK, Greening DW, Zhu HJ, et al. Transformed MDCK cells secrete elevated MMP1 that generates LAMA5 fragments promoting endothelial cell angiogenesis [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28321
- [19] Bartolini A, Cardaci S, Lamba S, et al. BCAM and LAMA5 Mediate the Recognition between Tumor Cells and the Endothelium in the Metastatic Spreading of KRAS-Mutant Colorectal Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22: 4923-4933
- [20] Nussinov R, Tsai CJ, Jang H. Oncogenic Ras isoforms signaling specificity at the membrane [J]. *Cancer Res*, 2018, 78: 593-602
- [21] Farhan M, Wang H, Gaur U, et al. FoxO signaling pathway as therapeutic targets in cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13: 815-827
- [22] Link W, Fernandez-Marcos PJ. FoxO transcription factors at the interface of metabolism and cancer [J]. *Int J Cancer*, 2017, 114: 2379-2391
- [23] Narla G, Sangodkar J, Ryder CB. The impact of phosphatases on proliferative and survival signaling in cancer [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018[Epub ahead of print]
- [24] Ouyang ZH, Wang WJ, Yan YG, et al. The PI3K/Akt pathway: critical player in intervertebral disc degeneration [J]. *Oncotarget*, 2017, 34: 57870-57881
- [25] Giubellino A, Burke TR, Bottaro DP. Grb2 signaling in cell motility and cancer [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12: 1021-1033
- [26] Timsah Z, Ahmed Z, Ivan C, et al. Grb2 depletion under non-stimulated conditions inhibits PTEN, promotes Akt-induced tumor formation and contributes to poor prognosis in ovarian cancer [J]. *Oncogene*, 2016, 35: 2186-2196
- [27] Yu GZ, Chen Y, Wang JJ. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135: 1331-1339
- [28] Li LY, Li EM, Wu ZY, et al. Overexpression of GRB2 is correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7: 3132-3140
- [29] Yang L, Wang X, Xu J, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis reveal α -lipoic acid regulated cell proliferation via Grb2-mediated signaling in hepatoma cancer cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22: 2981-2992

(上接第 3811 页)

- [26] Hudcova K, Trnkova L, Kejnovska I, et al. Novel biophysical determination of miRNAs related to prostate and head and neck cancers [J]. *Eur Biophys J*, 2015, 44(3): 131-138
- [27] Wang Y, Zhang X, Li H, et al. The role of miRNA-29 family in cancer [J]. *European Journal of Cell Biology*, 2013, 92(3): 123-138
- [28] Adams L. Non-coding RNA: Pri-miRNA processing: structure is key [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2017, 18(3): 145-152
- [29] Belter A, Gudanis D, Rolle K, et al. Mature MiRNAs Form Secondary Structure, which Suggests Their Function beyond RISC [J]. *Plos One*, 2014, 9(11): 48-57
- [30] Ouyang F, Luo Q J, Zhang Y, et al. Transposable element-associated microRNA hairpins produce 21-nt sRNAs integrated into typical microRNA pathways in rice [J]. *Integrative Genomics*, 2013, 13(2): 207-216