

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.19.018

mTOR-4EBP1/p70S6K1 信号通路在良、恶性胸腔积液中的表达研究

李燕明^{1,2}, 王翠峰^{2△}, 任美英²1. 内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古包头 014010; 2. 内蒙古科技大学包头医学院
第一附属医院检验科, 内蒙古包头 014010

摘要:目的 探讨雷帕霉素靶蛋白(mTOR)-真核启动因子 4E 结合蛋白 1(4EBP1)/核糖体蛋白 S6 激酶 1(p70S6K1)信号通路在良、恶性胸腔积液中的表达情况,为恶性胸腔积液的发生机制及诊疗靶标研究提供新思路、新方法。**方法** 选取恶性胸腔积液作为恶性测定组(44 例),良性胸腔积液作为良性对照组(44 例),实时荧光定量 PCR 法(RT-qPCR)检测 mTOR、4EBP1 及 p70S6K1 mRNA 表达情况,Western blot 检测 mTOR、磷酸化 mTOR(p-mTOR)、4EBP1、磷酸化 4EBP1(p-4EBP1)、p70S6K1 及磷酸化 p70S6K1(p-p70S6K1)蛋白表达情况。**结果** RT-qPCR 结果显示,恶性测定组中 mTOR、4EBP1 及 p70S6K1 mRNA 表达水平明显高于良性对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western-blot 结果显示,恶性测定组中 p-mTOR、p-4EBP1、p-p70S6K1 蛋白表达水平明显高于良性对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组 mTOR、4EBP1、p70S6K1 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** mTOR-4EBP1/p70S6K1 信号通路是通过激活 mTOR,调节下游 4EBP1、p70S6K1 靶蛋白的活性,从而调节胸腔积液中恶性肿瘤细胞的表达。

关键词:胸腔积液; 信号通路; 雷帕霉素靶蛋白; 真核启动因子 4E 结合蛋白 1; 核糖体蛋白 S6 激酶 1
中图分类号:R446.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2022)19-2660-04

Expression of mTOR-4EBP1/p70S6K1 signaling pathway in benign and malignant pleural effusion

LI Yanming^{1,2}, WANG Cuifeng^{2△}, REN Meiyang²

1. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014010, China

Abstract: Objective To explore the expression of mammalian rapamycin target protein (mTOR)-eukaryotic promoter 4E binding protein 1 (4EBP1)/ribosomal protein S6 kinase 1 (p70S6K1) signal pathway in benign and malignant pleural effusion, so as to provide new ideas and methods for the occurrence mechanism and diagnosis and treatment targets of malignant pleural effusion. **Methods** Malignant pleural effusion was selected as the malignant group (44 cases) and benign pleural effusion as the benign control group (44 cases). The mRNA expressions of mTOR, 4EBP1 and p70S6K1 were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR), and the protein expressions of mTOR, p-mTOR, 4EBP1, p-4EBP1, p70S6K1 and p-p70S6K1 were detected by Western blot. **Results** The results of RT-qPCR showed that the mRNA expression levels of mTOR, 4EBP1 and P70S6K1 in malignant group were significantly higher than those in benign control group ($P < 0.05$). The results of Western blot showed that protein expression levels of p-mTOR, p-4EBP1 and p-p70S6K1 in the malignant group were significantly higher than those in the benign control group ($P < 0.05$). Protein expression levels of the differences of mTOR, 4EBP1 and p70S6K1 between the two groups were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** By regulating the activity of downstream 4EBP1 and p70S6K1 target proteins by activating mTOR, mTOR-4EBP1/p70S6K1 signaling pathway could regulate the expression of malignant tumor cells in pleural effusion.

Key words: pleural effusion; signal pathway; mammalian rapamycin target protein; eukaryotic promoter 4E binding protein 1; ribosomal protein S6 kinase 1

胸腔积液是临床上常见的症状。恶性肿瘤转移、炎症刺激以及循环障碍等病理状况是引起胸腔积液的主要病因^[1]。近年来积液的诊断方法包括了影像学检查和实验室检查。胸腔积液脱落细胞学是目前

临床上最常用来诊断恶性胸腔积液(MPE)的实验室方法,其特异度可高达 89%~98%,但因受多种因素影响,灵敏度只有 40%~80%^[2],假阴性率为 31.5%^[3]。探寻弥补其不足之处的新胸腔积液诊断

靶标势在必行。有研究表明,雷帕霉素靶蛋白(mTOR)-真核启动因子 4E 结合蛋白 1(4EBP1)/核糖体蛋白 S6 激酶 1(p70S6K1)信号通路在肿瘤的发生发展中发挥重要的作用^[4]。本研究从分子水平探讨该信号通路在良恶性胸腔积液中的表达差异,期待为 MPE 的发生机制及诊疗靶标研究提供新思路、新方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院 2020 年 1 月至 2021 年 1 月符合病例纳入标准及试验要求的 131 例胸腔积液标本。通过患者的临床资料结合胸膜活检病理结果或胸腔积液脱落细胞学检查结合免疫组化结果,明确上述 131 例积液的良、恶性质后,从中选取 44 例良性胸腔积液(BPE)标本为良性对照组,44 例 MPE 标本为恶性测定组。恶性测定组中男 22 例,女 22 例;年龄 23~80 岁,中位年龄 73 岁;肺癌 32 例,乳腺癌 5 例,消化道肿瘤 4 例,淋巴瘤 2 例,膀胱癌 1 例。良性对照组中男 32 例,女 12 例;年龄 18~75 岁,中位年龄 70 岁;肺炎旁积液 22 例,结核性胸膜炎 11 例,充血性心力衰竭 11 例。恶性测定组与良性对照组年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。对标本进行 RT-PCR 检测、Western-blot 检测。

病例纳入标准:(1)确认有胸腔积液的患者;(2)所有患者均经病理及临床资料诊断明确;(3)既往未经历过放疗及化疗的患者;(4)病例资料无遗漏的患者。排除标准:(1)诊断不明的胸腔积液标本;(2)患者胸腔积液病因复杂,合并多种疾病者。

病例分组标准:(1)良性对照组入组标准。肺炎旁胸腔积液的诊断标准为肺脓肿、肺炎和感染引起的胸腔积液。结核性胸膜炎的诊断标准为胸膜涂片检出抗酸杆菌和结核分枝杆菌,胸膜活检病理检查结果显示为结核引起的胸腔积液。充血性心力衰竭所引起的胸腔积液只能依据患者的病史、体征、心电图、超声心动图等辅助检查来诊断。(2)恶性测定组入组标准:在胸腔积液脱落细胞中找到恶性肿瘤细胞,或在胸膜活检组织中看到恶性肿瘤细胞的病理变化。

1.2 主要试剂和仪器 实时荧光定量 PCR 反应试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];Western blot 相关抗体 [GAPDH、mTOR、磷酸化 mTOR (p-mTOR)、4EBP1、磷酸化 4EBP1 (p-4EBP1)、p70S6K1、磷酸化 p70S6K1 (p-p70S6K1)兔多克隆抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体,Cell Signaling 公司];BCA 蛋白浓度测定试剂盒(包含 BSA 标准品)、牛血清清蛋白(BSA,北京索莱宝科技有限公司)。液基薄层制片机(中国湖北德里森实业有限公司)、RT-PCR 分析仪(Applied Biosystems 7900 Fast)、电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 收集符合要求的胸腔积液 40 mL,分别置于 2 支试管中,每支 20 mL。以 2 000 r/min 离心 5 min,保存沉渣并标记。放置于-80 °C 冰箱中,用于 RT-qPCR 及 Western blot 检测。

1.3.2 提取总 RNA (1)向分装处理好的标本中加入 500 μ L 细胞裂解液和 10 μ L ProteinaseK,室温下静置 15 min。4 °C、12 000 r/min 离心 5 min,保留上清液并将其转入基因组去除柱中。(2)将基因组去除柱离心 2 min,留取滤液。(3)向滤液中加入 70%乙醇(加入体积与上清液相同),将其混匀,将处理好的混合液转入 RNase Free 吸附柱中,经 12 000 r/min 离心 2 min 后将废液倒掉。(4)将 500 μ L 蛋白去除液加入吸附柱中,高速离心 2 min,倒出废液。(5)将 500 μ L 冲洗液加入吸附柱中,室温条件下静置 5 min,离心 2 min,丢弃废液,再次冲洗离心一遍。(6)将吸附柱在室温下静置 2 min 晾干。(7)将吸附柱转移入 RNA 收集管中,滴加 30 μ L RNase-Free ddH₂O,静置 5 min 后在 12 000 r/min 离心 2 min,得到 RNA 溶液。(8)分光光度法检测 RNA 浓度。

1.3.3 逆转录 (1)RNA 变性:50 °C 放置 2 min,置于冰上冷却;(2)逆转录:95 °C、1 min,结束后将 cDNA 保存于-20 °C 冰箱保存。

1.3.4 实时荧光定量 PCR (1)引物: β -actin 上游,5'-TCC CTG GAG AAG AGC TAC GA-3';下游,5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'。mTOR 上游,5'-CGC TGT CAT CCC TTT ATC G-3';下游,5'-ATG CTC AAA CAC CTC CAC C-3'。4EBP1 上游,5'-CAA GGG ATC TGC CCA CCA TT-3';下游,5'-ACA CGA TGG CTG GTG CTT TA-3'。p70S6K1 上游,5'-AAG GGG GCT ATG GAA AGG CAA-3';下游,5'-TTT CCA CCA GTC TGA AAG GCA T-3'。(2)反应体系:TBGreenPremix Ex Taq II (10 μ L),上游和下游引物各 0.8 μ L,ROX Reference Dye(50 \times ,0.4 μ L),cDNA 模板(2 μ L),dH₂O(6 μ L)。(3)扩增:50 °C、2 min;95 °C、1 min;95 °C、15 s;59 °C、30 s;74 °C、30 s;72 °C、2 min,共 40 个循环。记录扩增曲线、溶解曲线、循环阈值(Ct),采用 $\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mTOR、4EBP1 和 p70S6K1 mRNA 相对表达量。

1.4 Western blot 检测蛋白表达水平 将收集好的胸腔积液标本由-80 °C 冰箱取出复溶,混匀后用新的 EP 管分装标本,每管取 100 μ L 并按顺序编号,置于冰上备用。将 400 μ L 细胞蛋白裂解液(含 PMSF)加入分装好的标本中,在冰上放置 25 min,期间需研磨。在 12 000 r/min 条件下,将标本放入 4 °C 低温超速离心机中离心 10 min,取上清液,用 BCA 法测定其蛋白浓度。将蛋白样品加上样缓冲液煮沸变性后,进行 10% SDS-PAGE 电泳、转膜,用 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h,分别加入 GAPDH(1:10 000)、

mTOR(1 : 500)、p-mTOR(1 : 500), 4EBP1(1 : 1 000)、p-4EBP1(1 : 1 000)、p70S6K1(1 : 1 000)、p-p70S6K1(1 : 1 000)抗体 4 ℃ 孵育过夜。一抗孵育结束后,室温摇床上用 TBST 洗 3 次,稀释 HRP(1 : 5 000)37 ℃ 室温孵育 2 h,用 ECL 化学发光法显影。Image J 软件进行灰度值数据测定。

1.5 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计软件进行统计分析。非正态分布的计量资料用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验。PCR 数据采用 $\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 均一化方法处理,Western blot 蛋白条带采用 Image J 进行灰度值数据测定。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 mTOR、4EBP1、p70S6K1 mRNA 表达情况 RT-qPCR 显示,恶性测定组 mTOR、4EBP1、p70S6K1 的 mRNA 表达水平均高于良性对照组,差

异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 mTOR、p-mTOR、4EBP1、p-4EBP1、p70S6K1、p-p70S6K1 蛋白表达情况 Western blot 显示,两组胸腔积液内 mTOR、4EBP1、p70S6K1 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。恶性测定组 p-mTOR、p-4EBP1、p-p70S6K1 蛋白表达水平高于良性对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2、图 1。

表 1 两组胸腔积液内 mTOR、4EBP1、p70S6K1 mRNA 表达水平比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	<i>n</i>	mTOR	4EBP1	p70S6K1
良性对照组	44	1.34(0.12,8.89)	0.03(0.02,0.05)	0.02(0.01,0.08)
恶性测定组	44	7.07(4.27,24.31)	0.80(0.32,3.12)	1.06(0.54,2.54)
<i>Z</i>		-2.078	-4.157	-4.041
<i>P</i>		0.038	<0.001	<0.001

表 2 两组胸腔积液内 mTOR、p-mTOR、4EBP1、p-4EBP1、p70S6K1、p-p70S6K1 蛋白表达水平比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	<i>n</i>	mTOR	p-mTOR	4EBP1	p-4EBP1	p70S6K1	p-p70S6K1
良性对照组	44	0.36(0.33,0.37)	0.24(0.16,0.31)	0.54(0.45,0.69)	0.20(0.16,0.37)	0.29(0.14,0.33)	0.15(0.08,0.27)
恶性测定组	44	0.36(0.34,0.38)	0.45(0.41,0.50)	0.65(0.47,0.73)	0.63(0.58,0.67)	0.44(0.35,0.46)	0.46(0.40,0.48)
<i>Z</i>		-0.289	-2.312	-0.866	-2.306	-0.908	-2.318
<i>P</i>		0.773	0.023	0.386	0.024	0.067	0.020

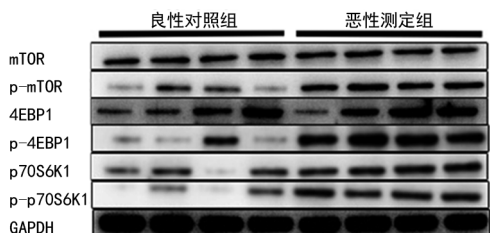


图 1 Western blot 检测两组胸腔积液内各蛋白的表达

3 讨 论

在恶性肿瘤中,最常见的引起胸膜转移癌的是肺癌,其次是乳腺癌、恶性淋巴瘤,胃癌、结直肠癌等少见^[5]。MPE 通常是胸膜转移癌患者的首发症状,也是晚期肿瘤患者的预后影响因素。MPE 的存在通常意味着患者疾病进入晚期^[6],中位生存期一般为 3~12 个月^[7],肿瘤伴 MPE 的患者病死率高于无 MPE 的患者^[8]。尽早确定胸腔积液的性质对下一步治疗有很重要的参考价值。目前临床上常用的诊断 MPE 的有效方法仍是脱落细胞形态学检查。由于胸腔积液的脱落细胞存在非典型性的形态,增生的间皮细胞与分化良好的腺癌细胞在形态上难以鉴别,从而造成结果的误判,使得液基薄层细胞检测(TCT)的特异度高,但灵敏度低。由于 TCT 诊断性能评价仍存在不足,探寻弥补其不足之处的新胸腔积液诊断靶标势在必行。

mTOR-4EBP1/p70S6K1 信号通路在细胞的生

长、增殖、分化及蛋白质的合成过程中占据重要地位。mTOR 是一种重要的进化上保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其作为多条信号通路汇聚的交点,可整合各通路传递的信息并对细胞生长、增殖、存活及自噬等过程作出相应调节。在肿瘤患者中 mTOR 信号在多种因子的刺激下过度激活为 p-mTOR;在 p-mTOR 的作用下,下游的两个重要因子 4EBP1 和 p70S6K1 磷酸化(p-4EBP1、p-p70S6K1)^[9-10],p-4EBP1 失去与真核细胞翻译启动因子 4E(eIF4E)结合的能力,eIF4E 与亚单位 eIF4G、eIF4A 和 eIF4B 结合形成 eIF4F 复合物,加速 Cap-依赖型的 mRNA 的翻译过程;p-p70S6K1 可磷酸化 S6 核糖体蛋白,从而使 5' TOP 结构的 mRNA 的翻译过程加快;两者发挥作用促进肿瘤细胞的形成与增殖。本研究通过对 mTOR-4EBP1/p70S6K1 信号通路在良恶性胸腔积液中的表达进行检测,从分子水平上探明此信号通路在 BPE 及 MPE 中均有表达,且根据其基因和蛋白水平表达的趋势变化可以初步推测是通过激活了 mTOR 进而使 4EBP1、p70S6K1 磷酸化,来调节胸腔积液中恶性细胞的生长、增殖。

本研究显示,恶性测定组的 mTOR、4EBP1 及 p70S6K1 mRNA 的表达水平高于良性对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。这与此信号通路对原发肿瘤细胞代谢的调节相一致^[11]。同时,本研究显示,恶

性测定组 p-mTOR、p-4EBP1、p-p70S6K1 蛋白表达水平明显高于良性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); mTOR、4EBP1、p70S6K1 在恶性测定组中的表达水平稍高于良性对照组, 变化趋势与磷酸化后一致, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。可能原因为 MPE 中, p-mTOR 具有活性, 从而刺激 4EBP1 上的 Thr37/46、Thr70、Ser65 位点, 使得 4EBP1 变成磷酸化形式 (p-4EBP1), p-4EBP1 失去与 eIF4E 结合的能力, eIF4E 与亚单位 eIF4G、eIF4A 和 eIF4B 结合形成 eIF4F 复合物, 加速 Cap-依赖型的 mRNA 的翻译过程^[12], 促进肿瘤细胞的形成与增殖。p-mTOR 的过度活化刺激 p70S6K1 上的 Thr389 位点, 使其成为磷酸化形式 (p-p70S6K1), 从而具备生物学活性发挥作用, p-p70S6K1 可磷酸化 S6 核糖体蛋白, 从而使 5' TOP 结构的 mRNA 的翻译过程加快^[13]。mTOR、4EBP1 及 p70S6K1 信号分子在基因层面和蛋白层面的表达变化相一致, 也与该信号通路在其他肿瘤细胞中变化相一致^[14]。

综上所述, mTOR-4EBP1/p70S6K1 信号通路在 BPE 和 MPE 中表达存在差异, 在肿瘤细胞的生长、代谢及其转移中该信号通路发挥着重要作用, 可作为新的分子靶标, 对临床鉴别诊断胸腔积液的性质具有提示性作用。对于此信号通路在胸腔积液中的具体调节机制仍需进一步研究。

参考文献

[1] 吴迪, 刘盛国, 杨凯, 等. 胸腔积液的病因分布及临床特点 [J]. 广东医学, 2020, 41(14): 1459-1463.

[2] LEPUS C M, VIVERO M. Updates in Effusion Cytology [J]. Surg Pathol Clin, 2018, 11(3): 523-544.

[3] TETIKKURT C, YILMAZ N, TETIKKURT S, et al. The value of exfoliative cell cytology in the diagnosis of exudative pleural effusions [J]. Monaldi Arch Chest Dis, 2018, 88(3): 944.

[4] ZHOU L, YUAN D, ZHANG Z G, et al. Expression of key mTOR pathway components in pancreatic ductal adenocarcinoma: a multicenter study for clinicopathologic and prognostic significance [J]. Cancer Lett, 2017, 395:

45-52.

[5] DIXIT R, AGARWAL K C, GOKHROO A, et al. Diagnosis and management options in malignant pleural effusions [J]. Lung India, 2017, 34(2): 160-166.

[6] PORCEL J M. Malignant pleural effusions because of lung cancer [J]. Curr Opin Pulm Med, 2016, 22(4): 356-361.

[7] JEBA J, CHERIAN R M, THANGAKUNAM B, et al. Prognostic Factors of Malignant Pleural Effusion among Palliative Care Outpatients: A Retrospective Study [J]. Indian J Palliat Care, 2018, 24(2): 184-188.

[8] AMIN Z, ISKANDAR S D, SIBL I. Prognostic Factors of 30-day Survival of Patients with Malignant Pleural Effusion [J]. Indian J Palliat Care, 2017, 23(3): 321-324.

[9] LEE B J, BOYER J A, BURNETT G L, et al. Selective inhibitors of mTORC1 activate 4EBP1 and suppress tumor growth [J]. Nat Chem Biol, 2021, 17(10): 1065-1074.

[10] WEISS H R, MELLENDER S J, KISS G K, et al. Improvement in Microregional Oxygen Supply/Consumption Balance and Infarct Size After Cerebral Ischemia-Reperfusion With Inhibition of p70 Ribosomal S6 Kinase (S6K1) [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28(10): 104276.

[11] WANG Z, ZHENG C, SUN H, et al. Immunohistochemical Analysis of mTOR Pathway-Related Proteins in Kaposiform Hemangioendothelioma [J]. Dermatology, 2020, 236(3): 262-270.

[12] 汪先凯, 周大臣, 喻宗繁, 等. 七叶皂苷钠通过降低 4EBP1 的磷酸化水平抑制梗阻性黄疸大鼠小胆管增生 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(10): 1521-1526.

[13] CHEN G H, XU C S, ZHANG J, et al. Inhibition of miR-128-3p by Tongxinluo Protects Human Cardiomyocytes from Ischemia/reperfusion Injury via Upregulation of p70s6k1/p-p70s6k1 [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 775.

[14] HORI Y, OZEKI M, HIROSE K, et al. Analysis of mTOR pathway expression in lymphatic malformation and related diseases [J]. Pathol Int, 2020, 70(6): 323-329.

(收稿日期: 2021-12-29 修回日期: 2022-04-11)

(上接第 2659 页)

cells through increasing the Bax/Bcl-2 ratio, caspase-3 and activating the Fas/FasL [J]. Minerva Med, 2021, 112(3): 413-414.

[15] LEE K C, LEE K F, TUNG S Y, et al. Induction Apoptosis of Erinacine A in Human Colorectal Cancer Cells Involving the Expression of TNFR, Fas, and Fas Ligand via the JNK/p300/p50 Signaling Pathway With Histone Acetylation [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1174.

[16] KILBAS P O, AKCAY I M, DOGANAY G D, et al. Bag-

1 silencing enhanced chemotherapeutic drug-induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cells affecting PI3K/Akt/mTOR and MAPK signaling pathways [J]. Mol Biol Rep, 2019, 46(1): 847-860.

[17] LIANG D, XU W, ZHANG Q, et al. Study on the effect of Integrin alphaVbeta6 on proliferation and apoptosis of cervical cancer cells [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(12): 2811-2815.

(收稿日期: 2021-12-16 修回日期: 2022-04-08)