

异硫氰酸苯乙酯经PI3K/Akt/mTOR途径抑制非小细胞肺癌细胞表达c-Myc和RPS19

胡军¹ 徐丽丽² 罗毅¹ 谢勇¹ 高文奎¹ 陈艳华² 王柏琦^{2*}

(¹南华大学附属第二医院心胸外科, 衡阳 421001; ²南华大学附属第二医院肿瘤血液内科, 衡阳 421001)

摘要 该研究旨在探讨异硫氰酸苯乙酯(PEITC)抑制人非小细胞肺癌细胞表达c-Myc和RPS19的分子机制。首先体外培养A549、H358和H1299细胞系, Western blot、qPCR检测细胞内核糖体蛋白S19(RPS19)和c-Myc的表达水平。10、30和50 $\mu\text{mol/L}$ PEITC处理细胞后, Western blot检测细胞内RPS19、c-Myc、E-cadherin、Vimentin的表达水平以及PI3K/Akt、mTOR和S6K的磷酸化情况, 并通过构建pGL4.10-RPS19荧光报告基因载体检测RPS19启动子报告基因活性。随后采用c-Myc、PI3K/Akt以及mTOR抑制剂处理细胞, 分析细胞内RPS19、c-Myc表达变化。随后细胞内转染pcDNA3-cMyc-HA质粒过表达c-Myc, 观察其对细胞内RPS19表达的影响, 并采用siRNA沉默RPS19表达, 检测细胞内EMT相关分子E-cadherin、Vimentin表达以及细胞侵袭、迁移的变化。Western blot以及qPCR结果显示, A549和H1299细胞系中RPS19和c-Myc的表达水平均显著高于MRC-5细胞。采用不同浓度PEITC处理细胞后, 细胞内RPS19、c-Myc以及Vimentin表达水平显著降低, E-cadherin表达增高, PI3K/Akt、mTOR和S6K磷酸化水平减弱。PI3K/Akt、mTOR抑制剂均可显著降低细胞内RPS19和c-Myc表达。此外, c-Myc抑制剂也能够显著降低细胞内RPS19表达以及启动子报告基因活性。转染pcDNA3-cMyc-HA质粒后, 细胞内RPS19水平显著增高, 而沉默RPS19表达则可显著增强细胞内E-cadherin表达并抑制细胞的侵袭和迁移。PEITC能够抑制人非小细胞肺癌H1299细胞表达c-Myc和RPS19, 其机制可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路有关。

关键词 异硫氰酸苯乙酯; 糖体蛋白S19; 非小细胞肺癌; c-Myc

Phenyl Isothiocyanate Inhibit the Expression of c-Myc and RPS19 in Non-Small Cell Lung Cancer Cells via the PI3K/Akt/mTOR Pathway

HU Jun¹, XU Lili², LUO Yi¹, XIE Yong¹, GAO Wenkui¹, CHEN Yanhua², WANG Baiqi^{2*}

(¹Department of thoracic surgery, the Second Hospital University of South China, Hengyang 421001, China;

²Department of hematology of tumor, the Second Hospital University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the mechanism of PEITC (phenethyl isothiocyanate) on the inhibition of c-Myc and RPS19 expression in non-small cell lung cancer cells. A549, H358 and H1299 cell lines were cultured *in vitro*. The expression levels of intracellular RPS19 (ribosomal protein S19) and c-Myc were determined by Western blot and qPCR. After treatment with 10, 30 and 50 $\mu\text{mol/L}$ PEITC, the expression levels of intracellular RPS19, c-Myc, E-cadherin, Vimentin and phosphorylation of PI3K/Akt, mTOR and S6K were detected

收稿日期: 2020-04-17

接受日期: 2020-07-22

湖南省科技创新计划(批准号: 2018SK51505)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13787342202, E-mail: wangbaiqi99@163.com

Received: April 17, 2020

Accepted: July 22, 2020

This work was supported by the Science and Technology Innovation Program of Hunan Provincial Science and Technology Department (Grant No.2018SK51505)

*Corresponding author. Tel: +86-13787342202, E-mail: wangbaiqi99@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5359>

by Western blot. The activity of *RPS19* promoter reporter gene was detected by constructing pGL4.10-RPS19 fluorescent reporter vector. The expression levels of intracellular RPS19, c-Myc were detected after treatment with c-Myc, PI3K/Akt and mTOR inhibitors. After that, the pcDNA3-c-Myc-HA plasmid was transfected into the cells to observe the effect of c-Myc on the expression of RPS19. The intracellular level of RPS19 was silenced by siRNA. The expression of E-cadherin, Vimentin, and the invasion and migration of the cells were analyzed. Western blot and qPCR results showed that RPS19 and c-Myc were highly expressed in A549 and H1299 cell lines. After treatment with different concentrations of PEITC, the expression levels of intracellular RPS19, c-Myc, Vimentin, and the phosphorylation levels of PI3K/Akt, mTOR and S6K were significantly decreased, while the E-cadherin level was significantly increased. In addition, pretreatment of the PI3K/Akt and mTOR inhibitors significantly reduced the expression of intracellular RPS19 and c-Myc. And the c-Myc inhibitors could also reduce the intracellular level of RPS19 and its transcriptional activity. Over-expression of c-Myc by transfection of the pcDNA3-cMyc-HA plasmid significantly increased the level of intracellular RPS19, while silencing the RPS19 by siRNA could increase the intracellular E-cadherin expression and inhibit the cells invasion and migration. These results demonstrate that PEITC can inhibit the expression of c-Myc and RPS19 in non-small cell lung cancer H1299 cells, which may be related to the inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

Keywords phenethyl isothiocyanate; ribosomal protein S19; non-small cell lung cancer; c-Myc

肺癌是全球癌症死亡的首要因素, 由于早期诊断率低且极易发生转移, 肺癌的5年生存率仅为17.8%^[1]。尽管随着医疗技术发展, 手术、放疗等治疗手段可在一定程度上缓解肺癌症状, 但治疗效果并不理想且无法有效提高患者生存率^[2]。异硫氰酸苯乙酯(phenethyl isothiocyanate, PEITC)是从十字花科植物中提取出来的葡萄糖苷类物质, 具有多种生物学效应, 包括激活细胞保护途径、抗肿瘤作用等^[3]。本课题组^[4-5]前期研究发现, PEITC能够通过上调抑癌基因*PETN*表达, 抑制PI3K/Akt信号通路, 进而诱导肺癌细胞凋亡。但是考虑到肺癌的发生发展存在多种诱因以及调控机制, PEITC诱导肺癌细胞凋亡具体的作用机制仍未完全明确。核糖体蛋白(ribosomal proteins, RPs)是核糖体的主要成分, 除能参与核糖体合成外, 它还与细胞增殖、迁移以及DNA复制有关^[6]。c-Myc是核糖体生成以及蛋白质合成的调节因子, 在成纤维细胞中过表达c-Myc可以激活RPs, 进而影响细胞增殖。研究表明, *RPS19*是肝细胞癌c-Myc的靶基因, 可能参与了肝细胞的转化^[7]。此外, *RPS19*异常表达还与宫颈癌的发生密切相关^[8]。然而, *RPS19*、c-Myc与人非小细胞肺癌之间的关系尚不清楚。本研究旨在探讨PEITC对人非小细胞肺癌H1299细胞分泌c-Myc、*RPS19*的影响, 以及PEITC是否通过影响PI3K/Akt信号通路发挥调控c-Myc、*RPS19*表达的作用。

1 材料方法

1.1 细胞株与实验试剂

人非小细胞肺癌细胞株A549、H1299以及正常肺成纤维细胞MRC-5购自中科院细胞库; PEITC(纯度 $\geq 95\%$)购自LKT Laboratories; pcDNA3-cMyc-HA质粒载体、siRNA-RPS19由上海生工生物工程股份有限公司构建; pGL4.10-RPS19荧光报告基因载体由上海汉恒生物科技有限公司构建; 转染试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司; E-cadherin、Vimentin、PI3K/Akt、mTOR、S6K、 β -actin抗体购自Cell Signaling公司; c-Myc、RPS19抗体购自GeneTex公司; LY294002、雷帕霉素、10058-F4购自Sigma公司; Transwell小室购自上海生博生物医药科技有限公司。

1.2 细胞培养与处理

在A549、MRC-5、H1299细胞中加入含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基, 随后将细胞置于37 °C、5% CO₂条件下培养24 h, 待细胞生长密度达到80%左右, 进行如下处理: (1) 分别用0、10、30、50 $\mu\text{mol/L}$ 的PEITC处理H1299细胞48 h, 收集细胞用于后续检测; (2) 分别用10 $\mu\text{mol/L}$ 的Akt抑制剂LY294002和200 $\mu\text{mol/L}$ 的c-Myc抑制剂10058-F4以及10 $\mu\text{mol/L}$ 的雷帕霉素预处理H1299细胞1 h, 再用50 $\mu\text{mol/L}$ 的PEITC刺激H1299细胞48 h, 收集细胞用于后续检测。

1.3 Western blot

收集上述处理后的细胞并提取细胞总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度后,获取10 μ L样品进行SDS-PAGE。随后进行转膜,并将膜于5%脱脂奶粉中37 $^{\circ}$ C封闭2 h。加入稀释好的一抗E-cadherin(1:1 000)、Vimentin(1:1 000)、PI3K/Akt(1:1 000)、mTOR(1:1 000)、S6K(1:1 000)以及c-Myc(1:2 000)、RPS19(1:2 000)于4 $^{\circ}$ C条件下孵育过夜, PBST洗膜2次后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)室温孵育2 h。最后滴加ECL发光液并于显影仪中避光显影。

1.4 报告基因活性检测与转染

按照转染试剂盒说明书要求将构建好的pGL4.10-RPS19荧光质粒转染至H1299细胞中,并以pGL4.10荧光质粒作为对照,继续培养48 h。随后在上述细胞中加入裂解液,室温孵育15 min。孵育完成后10 000 r/min离心10 min,取上清进行RPS19启动子报告基因活性测定。pcDNA3-c-Myc-HA过表达质粒也按照上述方法进行转染。

1.5 siRNA干扰

将长势良好的H1299细胞加至6孔板中培养。随后将稀释好的siRNA-RPS19以及siRNA-control分别加至6孔板中,孵育20 h后弃去上清,并加入含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基继续培养72 h,培养完成后进行传代。干扰完成后通过Western blot检测细胞内RPS19的表达水平,以评估RNA干扰效果。

1.6 qPCR

取经过方法1.2中(1)以及(2)处理后的细胞,提取细胞总RNA,并用TaqMan逆转录试剂将其逆转录为cDNA,随后进行引物扩增,扩增条件如下:95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 55 $^{\circ}$ C退火20 s, 72 $^{\circ}$ C延伸20 s, 40个循环。引物设计如下: RPS19上游引物为5'-GAT GCC TGG AGT TAC TGT AAA AGA CG-3'、下游引物为5'-CTA ATG CTT CTT GTT GGC AGC TGC C-3', c-Myc上游引物为5'-CCG AAG GGA GAA GGG TGT-3'、下游引物为5'-CTG CGA CGA GGA GGA GGA-3', E-cadherin上游引物为5'-CAG GTC TCC TCA TGG CTT TGC-3'、下游引物为5'-CTT CCG AAA AGA AGG CTG TCC-3', Vimentin上游引物为5'-ACA CCC TGC AAT CTT TCA GAC A-3'、下游引物为5'-AGA AAT CCT GCT CTC CTC GCC T-3', GAPDH上游引物为5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'、下游引物为5'-GAA GAT

GGT GAT GGG ATT TC-3'。扩增完毕后,使用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算RPS19、c-Myc、E-cadherin以及Vimentin的相对表达量。

1.7 划痕实验

将经过siRNA干扰处理的H1299细胞(4×10^5 个/孔)接种于6孔细胞培养板。当细胞生长到95%左右时,每个孔都用200 μ L无菌移液器枪头进行划伤。吸去悬浮的细胞并用PBS清洗2次,随后加入新的RPMI 1640培养基继续培养24 h。拍下图片后,利用ImageJ V2.1.4.8软件分析了每条划痕两边缘之间的距离。

1.8 Transwell实验

基质凝胶用RPMI 1640培养基稀释后,取40 μ L加入Transwell小室中,涂抹均匀后孵育24 h。将含无血清RPMI 1640培养基的H1299细胞加入上层Transwell小室,下层加入含10%胎牛血清的培养基。孵育24 h后细胞于无水乙醇中固定,并加入苏木精-伊红,染色15 min。最后在倒置显微镜下,对进入滤膜下表面的细胞进行计数,以评估细胞迁移能力。

1.9 统计学分析

所有数据均取自3次独立实验,并采用SPSS 18.0软件分析数据。实验数据分析均采用Student-*t*检验进行。所有*P*值均为双侧,*P*<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RPS19和c-Myc在A549、H358和H1299细胞系中表达

为了明确c-Myc和RPS19之间的关系,我们检测了人非小细胞肺癌A549、H1299细胞系以及正常肺成纤维细胞MRC-5中RPS19和c-Myc表达水平。Western blot结果显示,A549和H1299细胞系中RPS19和c-Myc的表达水平均显著高于MRC-5细胞(图1A)。qPCR检测结果与Western blot结果一致(图1B)。

2.2 PEITC经Akt/mTOR途径抑制RPS19表达

Western blot结果显示,30 μ mol/L和50 μ mol/L PEITC处理H1299细胞后,细胞内RPS19表达水平显著降低,且PI3K/Akt、mTOR和S6K的磷酸化水平明显受抑制(图2A)。同时,采用10 μ mol/L Akt抑制剂LY294002处理H1299细胞后,Akt磷酸化水平显著降低,但mTOR抑制剂雷帕霉素对Akt的磷酸化并

无影响。此外, LY294002和雷帕霉素均可显著抑制mTOR以及S6K的磷酸化, 并下调RPS19的表达(图2B)。

2.3 PEITC抑制c-Myc的表达

Western blot结果显示, 采用30和50 $\mu\text{mol/L}$ PEITC处理细胞后, H1299细胞内c-Myc蛋白表达水平显著降低(图3A)。而10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002以及雷帕霉素同样能够显著降低细胞内c-Myc蛋白的表达(图3B)。qPCR结果(图3C和图3D)显示, PEITC、LY294002以及雷帕霉素处理后, 细胞内c-Myc mRNA水平同样要显著低于对照组。

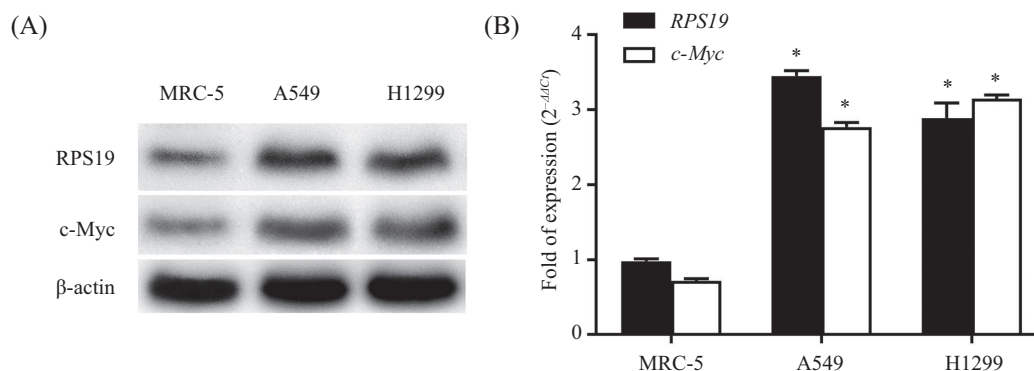
2.4 c-Myc参与调控H1299细胞表达RPS19

Western blot结果显示, 转染了pcDNA3-c-Myc-HA质粒的H1299细胞内RPS19蛋白表达水平明显增

高(图4A)。而采用不同浓度c-Myc抑制剂10058-F4处理后, RPS19蛋白水平明显降低(图4B)。报告基因结果显示, 50 $\mu\text{mol/L}$ PEITC处理细胞后, 细胞内RPS19启动子报告基因活性降低了58%(图4C和图4D)。而采用200 $\mu\text{mol/L}$ c-Myc抑制剂10058-F4处理后, 报告基因活性较抑制剂未处理组降低了45%(图4E), 此外, LY294002以及雷帕霉素处理后的细胞, RPS19转录水平均显著降低。

2.5 PEITC经RPS19抑制EMT相关分子表达

Western blot结果显示, 50 $\mu\text{mol/L}$ PEITC处理H1299细胞后, EMT相关分子E-cadherin表达增高, Vimentin表达水平有所降低(图5A)。进一步通过qPCR检测, 结果如图5B所示, EMT相关分子E-cadherin mRNA表达升高, Vimentin mRNA表达降低。

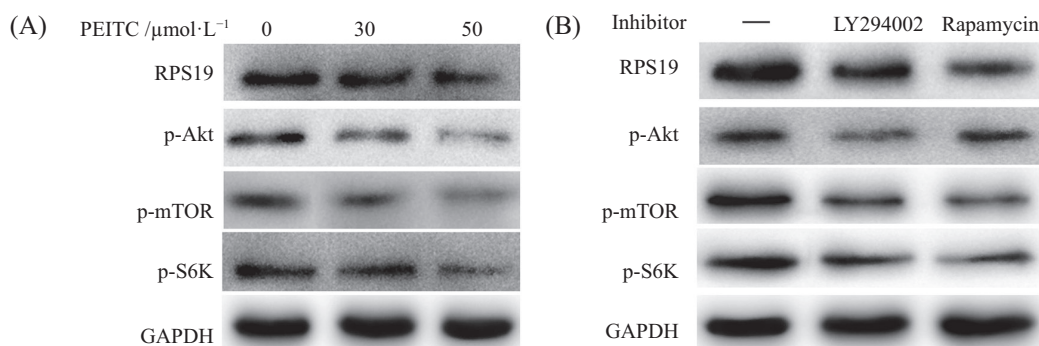


A: Western blot检测A549、H1299以及MRC-5细胞系中RPS19和c-Myc蛋白表达水平; B: qPCR检测A549、H1299以及MRC-5细胞系中RPS19和c-Myc mRNA表达水平。* $P < 0.05$, 与MRC-5组相比。

A: the expression levels of RPS19 and c-Myc protein in A549, H1299 and MRC-5 cell lines were detected by Western blot; B: the expression levels of RPS19 and c-Myc mRNA in A549, H1299 and MRC-5 cell lines were detected by qPCR. * $P < 0.05$ vs MRC-5 group.

图1 NSCLC细胞系中RPS19表达水平

Fig.1 Expression levels of RPS19 in NSCLC cell lines

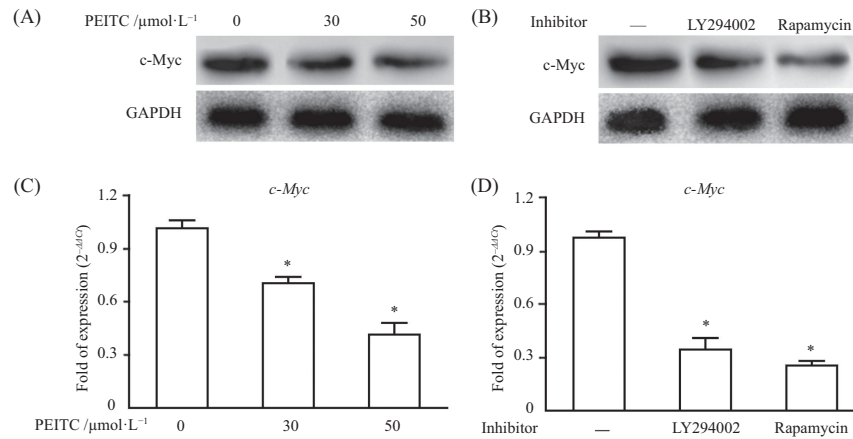


A: PEITC处理H1299细胞后, Akt/mTOR的磷酸化水平以及RPS19的表达; B: Akt抑制剂LY294002以及mTOR抑制剂雷帕霉素处理H1299细胞后, Akt/mTOR磷酸化以RPS19表达(-表示未加抑制剂)。

A: the phosphorylation of PI3K/mTOR and the expression of RPS19 detection after treatment by PEITC; B: the phosphorylation of PI3K/mTOR and the expression of RPS19 detection after treatment by PI3K/Akt inhibitor LY294002 and mTOR inhibitor rapamycin (- stands for no inhibitor).

图2 PEITC对H1299细胞Akt/mTOR磷酸化以及RPS19表达的影响

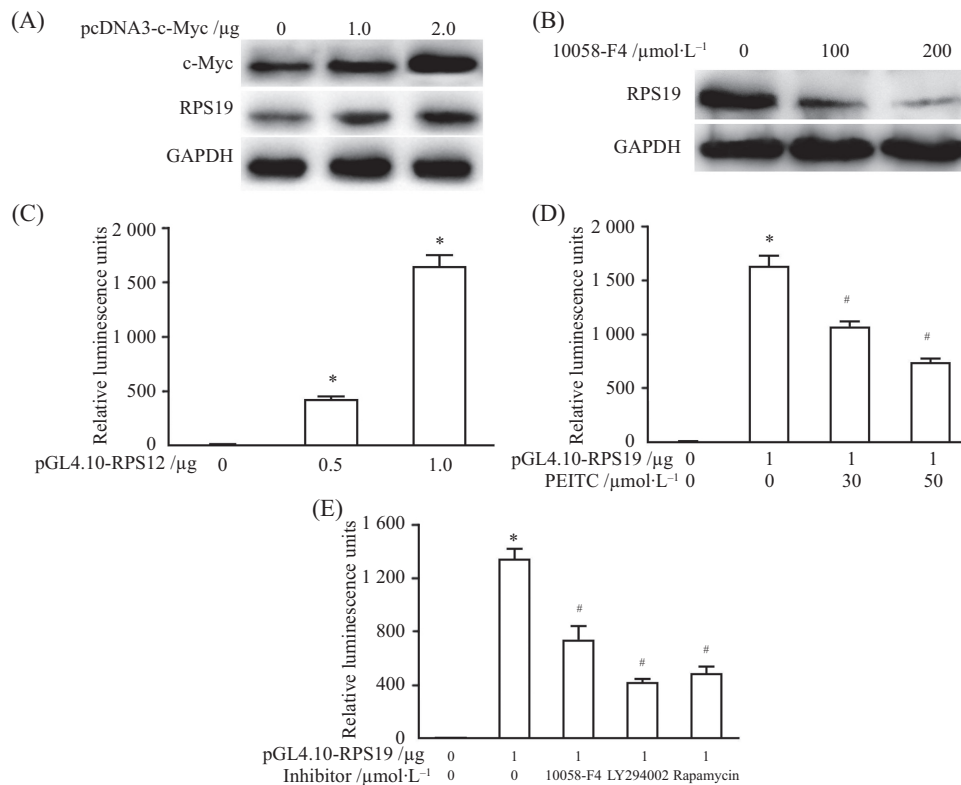
Fig.2 Effects of PEITC on the phosphorylation of Akt/mTOR and the expression of RPS19 in H1299 cells



A: PEITC处理H1299细胞后, c-Myc蛋白表达水平; B: LY294002以及雷帕霉素处理H1299细胞后, c-Myc蛋白表达水平(—表示未加抑制剂); C: PEITC处理H1299细胞后, c-Myc mRNA表达水平; D: LY294002以及雷帕霉素处理H1299细胞后, c-Myc mRNA表达水平。* $P < 0.05$, 与对照组相比。
A: the expression of c-Myc protein detection after treatment by PEITC; B: the expression of c-Myc protein detection after treatment by LY294002 and rapamycin (— stands for no inhibitor); C: the expression of c-Myc mRNA detection after treatment by PEITC; D: the expression of c-Myc mRNA detection after treatment by LY294002 and rapamycin. * $P < 0.05$ vs control group.

图3 PEITC对H1299细胞中c-Myc表达的影响

Fig.3 Effects of PEITC on the expression of c-Myc in H1299 cells

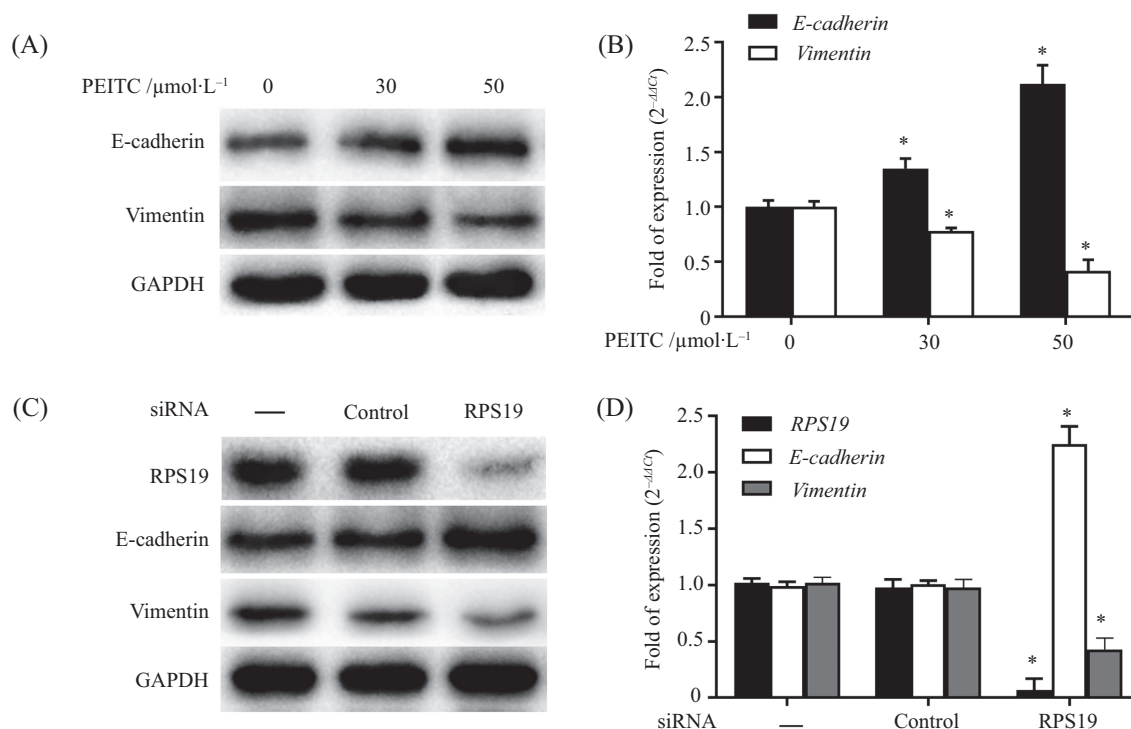


A, B: pcDNA3-c-Myc-HA质粒以及c-Myc抑制剂10058-F4处理H1299细胞后, RPS19蛋白表达水平; C, D: PEITC处理H1299细胞后, 细胞内RPS19启动子报告基因活性; E: c-Myc抑制剂10058-F4处理后, 细胞内RPS19启动子报告基因活性。* $P < 0.05$, 与对照组(0 μmol/L, 0 μg)相比; # $P < 0.05$, 与0 μmol/L, 1.0 μg组相比。

A,B: the expression of RPS19 detection after treatment by pcDNA3-c-Myc-HA plasmid and c-Myc inhibitor 10058-F4; C,D: the activity of RPS19 promoter reporter detection after treatment by PEITC; E: the activity of RPS19 promoter reporter detection after treatment by c-Myc inhibitor 10058-F4. * $P < 0.05$ vs control group (0 μmol/L, 0 μg); # $P < 0.05$ vs 0 μmol/L, 1.0 μg group.

图4 c-Myc对H1299细胞内RPS19表达的影响

Fig.4 Effects of c-Myc on the expression of RPS19 in H1299 cells



A: PEITC处理H1299细胞后, E-cadherin、vimentin蛋白表达水平; B: PEITC处理H1299细胞后, *E-cadherin*、*vimentin* mRNA表达水平; C: siRNA沉默RPS19后, E-cadherin、vimentin蛋白表达水平; D: siRNA沉默RPS19后, *E-cadherin*、*vimentin* mRNA表达水平。* $P < 0.05$, 与对照组相比。

A: the expression of E-cadherin, vimentin protein detection after treatment by PEITC; B: the expression of *E-cadherin*, *vimentin* mRNA detection after treatment by PEITC; C: the expression of *E-cadherin*, *vimentin* protein detection after silencing RPS19 by siRNA; D: the expression of *E-cadherin*, *vimentin* mRNA detection after silencing RPS19 by siRNA. * $P < 0.05$ vs control group.

图5 PEITC以及RPS19对EMT相关分子表达的影响

Fig.5 Effects of PEITC and RPS19 on the expression of EMT-related molecules

通过siRNA沉默RPS19后, 细胞内E-cadherin表达较对照组显著升高, 而Vimentin表达显著降低(图5C)。qPCR检测结果与Western blot检测结果一致, siRNA沉默RPS19后, 细胞内*E-cadherin* mRNA表达显著高于对照组, 而*Vimentin* mRNA表达则显著低于对照组(图5D)。

2.6 沉默RPS19促进H1299细胞侵袭和迁移

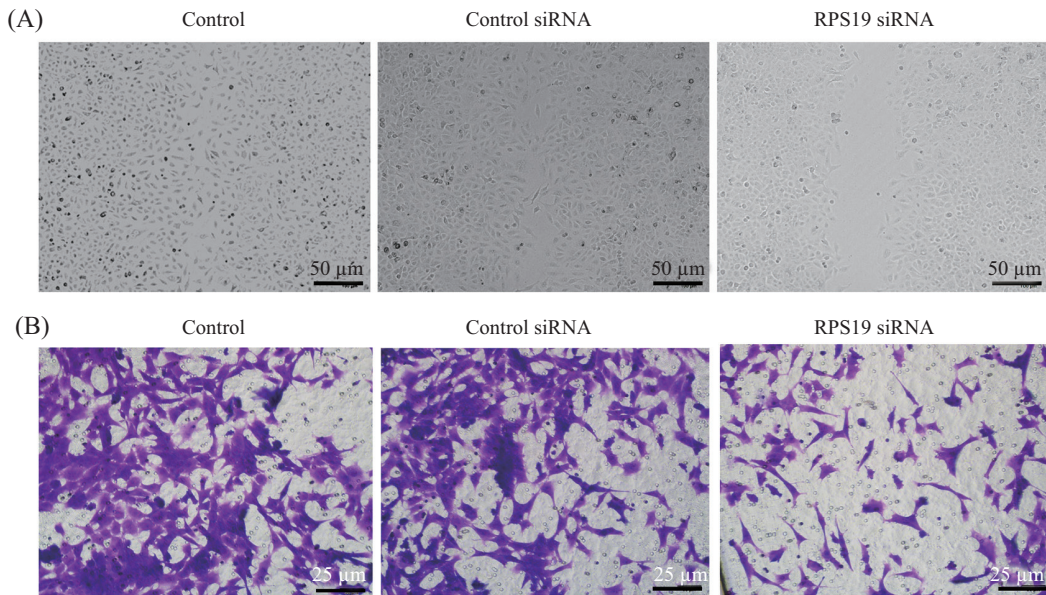
为了进一步明确RPS19在H1299细胞迁移和侵袭中的作用, 我们采用siRNA沉默细胞核RPS19表达并检测细胞的侵袭与迁移水平。结果显示, 沉默RPS19表达能够显著减弱H1299细胞的侵袭和迁移能力(图6A和图6B)。

3 讨论

PEITC作为一种重要的葡萄糖醛酸存在于多种十字花科植物中, 具有良好的抗肿瘤作用。研究表明, PEITC不仅能在启动阶段阻止癌变的发生, 还能够有效抑制肿瘤细胞的扩散^[9]。研究表明, PEITC联合常规抗癌药物能够有效提高整体治疗效果, 提

示PEITC是一种潜在的癌症治疗药物^[10]。尽管本课题组前期已经证实了PEITC对肺癌细胞凋亡的诱导作用, 但其具体的作用机制尚未明确。在本研究中, 我们发现, PEITC能够通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路来负向调控肺癌H1299细胞分泌RPS19和c-Myc。这将进一步完善PEITC诱导肺癌细胞凋亡的作用机制。

最新研究显示, RPs在多种癌症组织中均存在异常表达, 其可通过不同机制影响肿瘤细胞的增殖、凋亡以及侵袭^[11]。宫颈癌组织中的RPS19表达水平明显高于正常组织, 表明RPS19可能与宫颈癌的发生发展有关^[12]。此外, RPS19在人表皮癌细胞中也显著高于正常细胞, 其能够促进肿瘤细胞的增殖、迁移以及上皮间充质转化^[13]。本研究结果显示, 肺癌细胞系中RPS19的表达水平显著高于正常细胞, 该结果与其他肿瘤细胞一致。随后通过PEITC处理, 肺癌细胞中RPS19表达水平显著下降, 提示RPS19可能参与了PEITC对肺癌细胞增殖的调控作用。而为了进一步明确RPS19在肺癌细胞迁移、侵袭以及



A: siRNA沉默RPS19后, H1299的侵袭水平; B: siRNA沉默RPS19后, H1299的迁移水平。

A: the invasion of H1299 cells detection after silencing RPS19 by siRNA; B: the migration of H1299 cells after silencing RPS19 by siRNA.

图6 沉默RPS19对H1299细胞侵袭和迁移的影响

Fig.6 Effects of silencing RPS19 on the invasion and migration of H1299 cell

EMT中的作用, 我们又检测了沉默RPS19对细胞侵袭、迁移以及EMT的影响。结果显示, 沉默RPS19可显著抑制H1299细胞的侵袭、迁移以及EMT。这也表明, 肺癌细胞中RPS19高表达可能会促进肿瘤的发展和转移。

c-Myc是由原癌基因MYC编码的转录调节因子, 其能够通过调节核糖体合成来促进乳腺癌、结肠癌、胃癌等肿瘤的发生发展^[14]。研究表明, 在直肠癌中Wnt/ β -catenin信号通路活化能够促使c-Myc过度表达, 进而加速肿瘤的进展^[15]。此外, c-Myc还能够促进子宫内膜癌细胞发生EMT, 进而导致肿瘤细胞的迁移^[16]。本研究发现, c-Myc在肺癌细胞系的表达也显著升高, 抑制c-Myc表达可进一步下调细胞内RPS19的表达与转录水平, 进而影响肿瘤细胞的增殖。考虑到c-Myc在其他肿瘤细胞中的作用, 该结论也与之相符。

PI3K/Akt是一种重要的细胞内信号转导途径。它与多种肿瘤如胃癌、乳腺癌、肝癌、直肠癌等均存在密切联系^[17]。研究表明, 在肺癌发生过程中, PI3K/Akt信号途径往往会被异常激活, 进而影响免疫细胞及相关因子的功能^[18]。在本研究中, Akt以及mTOR抑制剂均可明显抑制mTOR以及S6K的磷酸化, 但mTOR抑制剂对Akt磷酸化无明显影响。考虑到mTOR为PI3K/Akt的下游分子, 这也可以解

释为什么mTOR抑制剂对Akt的磷酸化无影响。此外, PI3K/Akt、mTOR抑制剂还可显著降低细胞内RPS19和c-Myc表达, 进而抑制细胞侵袭、迁移以及EMT。提示RPS19和c-Myc也可能是PI3K/Akt/mTOR信号通路下游的作用分子, 参与PEITC对肺癌细胞凋亡的调控作用。

综上, 本研究初步证实PEITC可通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路下调RPS19、c-Myc表达, 进而抑制肺癌细胞侵袭、迁移以及EMT。提示RPS19以及c-Myc是肺癌基因治疗的潜在靶点, PEITC可通过抑制肺癌细胞中RPS19、c-Myc表达来发挥抗肿瘤作用。

参考文献 (References)

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] RECK M, RABE K F. Precision diagnosis and treatment for advanced non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2017, 377(9): 849-61.
- [3] GUPTA P, WRIGHT S E, KIM S H, et al. Phenethyl isothiocyanate: a comprehensive review of anti-cancer mechanisms [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1846(2): 405-24.
- [4] 胡军, 胡名松, 曾慰, 等. 异硫氰酸苯乙酯通过上调PTEN表达诱导肺癌细胞凋亡[J]. 中国生化药物杂志(HU J, HU M S, ZENG W, et al. Phenethyl isothiocyanate induces human lung cancer cells apoptosis through up-regulating PTEN expression [J]. Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceutics), 2014,

- 34(3): 37-9
- [5] 胡军, 胡名松, 曾慰, 等. 异硫氰酸苯乙酯抑制PI3K/Akt通路激活从而促进肺癌细胞凋亡[J]. 中医临床研究(HU J, HU M S, ZENG W, et al. Phenethyl isothiocyanate inhibits PI3K/Akt activation to induce human lung cancer cells apoptosis [J]. *Clinical Journal of Chinese Medicine*), 2014, 6(15): 131-3.
- [6] BROGNA S, SATO T A, ROSBASH M. Ribosome components are associated with sites of transcription [J]. *Mol Cell*, 2002, 10(4): 93-104.
- [7] HUNECKE D, SPANEL R, LÄNGER F, et al. MYC-regulated genes involved in liver cell dysplasia identified in a transgenic model of liver cancer [J]. *J Pathol*, 2012, 228(4): 520-33.
- [8] SAFAEIAN M, HILDESHEIM A, GONZALEZ P, et al. Single nucleotide polymorphisms in the PRDX3 and RPS19 and risk of HPV persistence and cervical precancer/cancer [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e33619.
- [9] TANG N Y, HUANG Y T, YU C S, et al. Phenethyl isothiocyanate (PEITC) promotes G₂/M phase arrest via p53 expression and induces apoptosis through caspase- and mitochondria-dependent signaling pathways in human prostate cancer DU 145 cells [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(5): 1691-702.
- [10] WANG L G, CHIAO J W. Prostate cancer chemopreventive activity of phenethyl isothiocyanate through epigenetic regulation [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(3): 533-9.
- [11] 袁飞, 王树斌. 核糖体蛋白与恶性肿瘤治疗研究进展[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志(YUAN F, WANG S B. Progress of ribosomal protein in malignant tumor therapy [J]. *Electron J Metab Nutr Cancer*), 2019, 6(1): 116-9.
- [12] DA ROCHA BOEIRA T, COSER J, WOLF J M, et al. Polymorphism located in the upstream region of the RPS19 gene (rs2305809) is associated with cervical cancer: a case-control study [J]. *J Cancer Prev*, 2018, 23(3): 147-52.
- [13] CHEN K C, HSU W H, HO J Y, et al. Flavonoids luteolin and quercetin inhibit RPS19 and contributes to metastasis of cancer cells through c-Myc reduction [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(3): 1180-91.
- [14] CHANG D W, CLAASSEN G F, HANN S R, et al. The c-Myc transactivation domain is a direct modulator of apoptotic versus proliferative signals [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(12): 4309-19.
- [15] WANG Q, ZHOU Y, RYCHAHOU P, et al. Deptor is a novel target of Wnt/ β -Catenin/c-Myc and contributes to colorectal cancer cell growth [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(12): 3163-75.
- [16] LIU L, ZHANG J, YANG X, et al. SALL4 as an epithelial-mesenchymal transition and drug resistance inducer through the regulation of c-Myc in endometrial cancer [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138515.
- [17] 武博荣, 金萌, 王卫真, 等. PI3K/AKT信号通路在肿瘤调控中的免疫作用及分子机制[J]. 临床合理用药杂志(WU B R, JIN M, WANG W Z, et al. Immune function and molecular mechanism of PI3K/Akt signaling pathway in tumor regulation [J]. *Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use*), 2013, 6(16): 135-7.
- [18] CONLEY-LACOMB M K, SALIGANAN A, KANDAGATLA P, et al. PTEN loss mediated Akt activation promotes prostate tumor growth and metastasis via CXCL12/CXCR4 signaling [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1): 85.