

黎凯恺,张远威,张念杰,等. 环境雌激素壬基酚通过 SRXN1 促进结直肠癌细胞增殖、侵袭和迁移的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 61-69.

Li KK, Zhang YW, Zhang NJ, et al. Effects of xenoestrogen nonylphenol on proliferation, invasion and migration of colorectal cancer cells by SRXN1 [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 61-69.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.008

环境雌激素壬基酚通过 SRXN1 促进结直肠癌细胞增殖、侵袭和迁移的作用研究

黎凯恺,张远威,张念杰,尹 硕,何 念,万 磊,陈 旭,杨雪峰*

(遵义医科大学第二附属医院,贵州 遵义 563006)

【摘要】 目的 研究环境雌激素壬基酚 (nonylphenol, NP) 对结直肠癌细胞增殖、侵袭、迁移的影响及其与 SRXN1 (sulfiredoxin-1) 表达的关系。**方法** 利用转录组测序及实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 分析 NP 对 COLO205 细胞中 SRXN1 表达的影响。通过癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 及免疫组织化学技术 (IHC) 分析 SRXN1 在结直肠癌组织中的表达。利用特异性小干扰 RNA 片段 (si-SRXN1) 抑制 SRXN1 的表达, NP (10^{-6} mol/L) 干预 24 h, 通过 CCK-8、克隆形成、Transwell 实验检测 COLO205 细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响, 蛋白印迹 (Western blot) 检测细胞中 ERK1/2、PI3K/Akt、Wnt/ β -catenin 通路激活情况。**结果** 转录组测序及 qRT-PCR 分析发现, NP 显著上调 COLO205 细胞中 SRXN1 表达 ($P < 0.05$)。TCGA 及 IHC 检测分析发现, 结直肠癌肿瘤组织中 SRXN1 的表达均显著高于癌旁组 ($P < 0.01$)。与 Control 组比较, NP (10^{-6} mol/L) 显著促进 COLO205 细胞活力、促进克隆形成、侵袭及迁移 (均 $P < 0.01$), 而 si-SRXN1 组显著抑制细胞增殖、侵袭及迁移的能力 ($P < 0.01$); 与 si-SRXN1 组比较, NP 联合 si-SRXN1 组细胞活力 ($P < 0.01$)、克隆形成 ($P < 0.05$)、侵袭 ($P < 0.01$) 及迁移 ($P < 0.01$) 显著升高。与 Control 组比较, NP 组中 ERK1/2、PI3K/Akt、Wnt/ β -catenin 通路均被激活 (均 $P < 0.01$), si-SRXN1 组均显著抑制 (均 $P < 0.01$); 与 si-SRXN1 组比较, NP+si-SRXN1 组中 ERK1/2、PI3K/Akt、Wnt/ β -catenin 通路均显著激活 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论** NP 通过促进 SRXN1 的表达, 促进结直肠癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

【关键词】 结直肠癌; 壬基酚; 细胞增殖; 侵袭及迁移; sulfiredoxin-1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0061-09

Effects of xenoestrogen nonylphenol on proliferation, invasion and migration of colorectal cancer cells by SRXN1

LI Kaikai, ZHANG Yuanwei, ZHANG Nianjie, YIN Shuo, HE Nian, WAN Lei, CHEN Xu, YANG Xuefeng*

(Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563006, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of xenoestrogen nonylphenol (NP) on the proliferation, invasion, and migration of colorectal cancer cells and its relationship with sulfiredoxin-1 (SRXN1) expression. **Methods** Transcriptomic sequencing and qRT-PCR were used to analyze the effect of NP, SRXN1 expression in colorectal cancer cells. SRXN1 expression in colorectal cancer was analyzed by TCGA and immunohistochemistry. After SRXN1 knockdown in colorectal cancer cell line COLO205 by a specific small interfering RNA (si-SRXN1), effects on the activity, proliferation, ROS release, invasion, and migration of NP (10^{-6} mol/L)-treated COLO205 cells was detected by CCK-8,

【基金项目】 遵义医科大学新苗培养及创新探索专项项目 (黔科合平台人才 [2017] 5733-081); 贵州省卫生健康委科学技术基金 (gzwjkj2020-1-099)。

【作者简介】 黎凯恺 (1993—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 消化道肿瘤发病机制。E-mail: 463912649@qq.com

【通信作者】 杨雪峰 (1973—), 男, 主任医师, 研究方向: 消化道肿瘤发病机制。E-mail: yangxuefeng1978@126.com

colony formation, transwell, and invasion assays. ERK1/2, PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin expression was assessed by Western blot. **Results** Transcriptome sequencing and qRT-PCR analysis showed that NP significantly upregulated SRXN1 expression in COLO205 cells. TCGA and IHC analysis showed that SRXN1 expression in colorectal cancer tissue samples was significantly higher than that in the paracancerous group ($P < 0.01$). Compared with control group, NP significantly promoted COLO205 cell viability, colony formation, invasion, and migration ($P < 0.01$). si-SRXN1 significantly inhibited cell proliferation, invasion, and migration ($P < 0.01$). Compared with the si-SRXN1 group, cell viability ($P < 0.01$), colony formation ($P < 0.05$), invasion ($P < 0.01$), and migration ($P < 0.01$) were significantly increased in the NP+si-SRXN1 group. Western blotting showed that, compared with the control group, ERK1/2, PI3K/Akt, and Wnt/ β -catenin were significantly increased in the NP group (all $P < 0.01$) and significantly decreased in the si-SRXN1 group (all $P < 0.01$). Compared with the si-SRXN1 group, ERK1/2, PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin were significantly increased in the NP+si-SRXN1 group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** NP promotes the proliferation, invasion, and metastasis of colorectal cancer cells by promoting SRXN1 expression.

【Keywords】 colorectal cancer; nonylphenol; cell proliferation; invasion and metastasis; sulfiredoxin-1

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,也是导致癌症死亡的重要原因,结直肠癌确诊时已经处于中晚期,转移及复发是导致其死亡的重要原因^[1-3]。深入研究结直肠癌的发生及进展的分子机制,筛选结直肠癌早期诊断的候选靶点,是结直肠癌防治的关键。课题组前期研究发现,血清壬基酚 (nonylphenol, NP) 浓度在结直肠癌组显著高于正常组^[4];体内、体外研究均发现 NP 可激活 ERK 通路,促进结直肠癌细胞增殖^[5-7]。NP 是环境内分泌干扰物 (endocrine disrupting compounds, EDCs) 典型代表,主要是由烷基酚聚氧乙醚 (alkylphenol ethoxylates, APE) 分解产生, APE 广泛应用于塑料制品、纺织品、农药以及洗涤剂、油漆等家庭用品,生活中随处可见。由于 NP 具有亲脂性,导致其极易在组织和器官中聚集,造成内分泌紊乱、免疫异常、生殖功能障碍和肿瘤的发生^[8-9]。上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肿瘤侵袭和迁移的重要原因^[10]。NP 促进 vimentin 及抑制 E-cadherin 的表达而促进卵巢癌的侵袭及迁移^[11]。NP 是否影响结直肠癌的侵袭及迁移,目前还未见报道。课题组通过转录组测序分析发现,SRXN1 (sulfiredoxin-1) 在 NP 干预后的人结直肠癌细胞 COLO205 中被显著上调。SRXN1 属于保守的内源性 sulfiredoxin 抗氧化家族的成员之一,具有调节氧化应激反应、发挥神经保护作用^[12]。最近研究发现,SRXN1 的异常表达可促进卵巢癌及肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移^[13-14]。本文通过临床及细胞水平,观察 NP 与结直肠癌增殖、侵袭及迁移的关系及与 SRXN1 相关性,初步阐

明 NP 通过 SRXN1 促进结直肠癌增殖、侵袭和迁移作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

结直肠癌 COLO205 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,由本实验室保存。

1.1.2 结直肠癌临床样本

30 对结直肠癌患者肿瘤及配对的癌旁组织均为 2020 年 1 月~2020 年 12 月在我院胃肠外科住院,经肠镜病理检查明确诊断为结直肠癌患者。患者年龄 54~77 岁,平均年龄 60.00 岁,其中男、女各 15 例。肿瘤及其配对的癌旁样本,取材后,等分成两份,一份置于 4% 多聚甲醛固定,经梯度乙醇脱水后,石蜡包埋;一份置于液氮保存。每位患者均签署知情同意书,协议由遵义医科大学第二附属医院伦理委员会审查批准 (遵医伦审 [2019] H-008 号)。

1.2 主要试剂与仪器

壬基酚购自中国 Aladdin 公司 (货号: 84852-15-3); CCK-8 (货号: CA1210) 及免疫组化 (货号: SP0041) 检测试剂盒购自于北京索莱宝科技有限公司; qRT-PCR 检测试剂盒购自于美国 Thermofisher 公司 (货号: 4472903); Anti-ERK1 + ERK2 antibody (货号: ab109282)、Anti-ERK1 + ERK2 (phospho T202 + Y204) antibody (货号: ab201015)、Anti-PI 3 Kinase p85 α antibody (货号: ab191606)、Anti-PI 3 Kinase p85 α (phospho Y607) antibody (货号: ab182651) 购自于英国 abcam 公司; Anti-Akt

antibody (货号: 60203-2-Ig)、Anti-SRXN1 antibody (货号: 14273-1-AP)、Anti-Phospho-AKT (Ser473) antibody (货号: 80455-1-RR)、Anti-Wnt3a antibody (货号: 26744-1-AP)、Anti- β -catenin antibody (货号: 51067-2-AP) 及 Anti-GAPDH antibody (货号: 60004-1-Ig) 购自于武汉三鹰生物技术有限公司。si-SRXN1 (si-SRXN1-1: 5'-GCCGGCUCCAAAUUCCC AATT-3'; si-SRXN1-2: 5'-GGACUACAUUCAGCUG CAATT-3') 及 si-NC (negative control) (5'-TAATTGAUUGGGTTAAAGGCC-3') 购自上海吉玛制药技术有限公司。qRT-PCR 引物 SRXN1 (Forward: 5'-CAGGGAGGTGACTACTTCTACTC-3'; Reverse: 5'-CAGGTACACCTTAGGTCTGA-3') 及 GAPDH 引物 (Forward: 5'-GGAGCGAGATCCC TCCAAAAT-3'; Reverse: 5'-GGCTGTTGTCATAC TTCTCATGG-3') 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

HERAcell 150i1 型 CO₂ 培养箱购自于美国 Thermo 公司; Lightcycler480 型 qRT-PCR 仪购自于美国 Roche 公司; NIKON DS-U3 正置荧光显微镜购自于日本尼康; Multiskan Sky 全波长酶标仪购自于美国 Thermo 公司; FACS Calibur 流式细胞仪购自于美国 BD 公司; PowerPace Basic 型电泳仪购自美国 Bio-rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

COLO205 细胞复苏后, 分别置于 RPMI-1640+10% 胎牛血清的培养基中, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞联合度达到 80%~90% 时, 按照 1:2~1:3 的比例传代, 备用。

1.3.2 RNA-seq 分析

将 COLO205 细胞随机分成空白对照组 (Control)、壬基酚 (10⁻⁶ mol/L) 组 (NP), 处理 24 h (NP 浓度及作用时间参考^[5-7])。收集细胞, 样品经过 RNA 抽提、纯化、建库之后, 采用第二代测序技术 (next-generation sequencing, NGS), 基于 Illumina 测序平台, 对这些文库进行双末端 (Paired-end, PE) 测序; 筛选差异表达基因 (筛选标准: $|\log_2^{\text{FoldChange}}| > 1, P < 0.05$)。测序及初步分析委托上海派森诺生物科技股份有限公司协助完成。

1.3.3 TCGA 分析肠癌中 SRXN1 表达

UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 是基于癌症基因组图谱 (the cancer genome

atlas, TCGA) 数据库构建的在线分析平台。通过 UALCAN 数据库分析 SRXN1 在肠癌中的表达情况, 其中包括肿瘤样本 241 个, 正常样本 41 个。

1.3.4 qRT-PCR 检测 SRXN1 表达

将 COLO205 细胞随机分成空白对照组 (Control)、壬基酚 (10⁻⁷ mol/L、10⁻⁶ mol/L、10⁻⁵ mol/L) 组 (NP), 干预 24 h 后, 收集细胞, 提取 RNA, 逆转录成 cDNA, qRT-PCR 检测 SRXN1 的表达。同时提取结直肠癌患者肿瘤及其配对的癌旁组织 RNA, 逆转录成 cDNA 后, qRT-PCR 检测 SRXN1 的表达变化。数据以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示; ΔCT = 目的基因 Ct 值 - 内参基因 Ct 值, $\Delta\Delta CT$ = 实验组 (Ct (目的基因) - Ct (GAPDH)) - 对照组 (Ct (目的基因) - Ct (GAPDH))。

1.3.5 免疫组化检测结直肠癌组织 SRXN1 表达

结直肠癌患者肿瘤及其配对的癌旁组织利用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋切片, 脱蜡、水化及抗原修复后, 5% BSA 抗原阻断, 滴加 SRXN1 抗体 (1:200), 4℃ 孵育过夜; PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 滴加 HRP 标记的二抗, 37℃ 孵育 30 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; DAB 显色, 苏木素复染 3 min, 1% 盐酸乙醇分化。利用徕卡显微镜 (DM1000) 采集照片。利用 Image-pro plus 6.0 分析软件计算每个样本中 SRXN1 表达的平均光密度值 (IOD)。

1.3.6 细胞分组及转染

取对数生长期的 COLO205 细胞, 1×10^4 cells/mL 的细胞量传于 6 孔板, 将 COLO205 细胞随机分成: 空白对照组 (Control)、SRXN1 干扰对照组 (si-NC)、壬基酚 (10⁻⁶ mol/L) 组 (NP)、SRXN1 干扰组 (si-SRXN1)、壬基酚 + SRXN1 干扰组 (NP + si-SRXN1)。si-NC 及 si-SRXN1 按照 Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂盒说明书转染入 COLO205 细胞 12 h 后, 再利用 NP 干预 24 h。

1.3.7 CCK-8 检测

按照 CCK-8 试剂盒操作说明, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 在细胞培养箱内继续孵育 4 h, 用酶标仪 (450 nm) 检测各组细胞的吸光值 (OD 值)。

1.3.8 克隆形成实验检测

以每皿 200 个 COLO205 细胞分别接种于 37℃ 预温 10 mL 培养液的皿中, 并轻轻转动, 使细胞分散均匀, 置 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 14 d。弃去上清液, 用 PBS 小心清洗 2 次。4% 多聚甲醛固定 15 min, 弃去固定液, 加适量吉姆萨染色液

(GIMSA)染色 30 min,然后洗去染色液。Nikon 显微镜(TS100-F)拍照后,计算克隆形成数量。

1.3.9 Transwell 检测

COLO205 细胞血清饥饿 24 h 后,将细胞按照 5×10^4 接种到 Transwell 小室上层内,下层的 24 孔板中加入含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后;每孔加入 1 mL 4%多聚甲醛溶液,室温固定 10 min;吸去固定液,用 1×PBS 清洗,加入 1 mL 0.5%结晶紫溶液染色 30 min,1×PBS 洗 3 次,每次 3~5 min;用棉签小心擦去 Transwell 小室内没有迁移的细胞,置于 200×显微镜下观察,计数每个视野中的细胞数。

1.3.10 Western blot 检测

收集细胞,利用 RIPA 裂解,冰上孵育 20 min 后, 4°C 、10 000~14 000 r/min 离心 3~5 min,取上清,BCA 定量,每孔按照 20 μg 蛋白量上样,SDS-PAGE 电泳后,转膜,分别以兔抗 SRXN1(1:800)、ERK1/2(1:800)、p-EKR1/2(1:800)、PI3K(1:1000)、p-PI3K(1:800)、Akt(1:1000)、p-Akt(1:800)、Wnt3a(1:1000)、 β -catenin(1:1000)及 GAPDH(1:10000), 4°C 、孵育过夜后,TBST 漂洗 3 次,加入 HRP 酶标抗兔二抗。加入 ECL 发光液膜置于全自动化学发光分析仪中扫描,通过 TANON GIS 软件读取相关条带灰度值。

1.4 统计学方法

所有实验均重复 3 次,数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。实验数据采用 GraphPad Prism 6.0 分析及绘图。多组间数据的比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD- t 检验,组织标本中 SRXN1 表达采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NP 对结直肠癌 COLO205 细胞中 SRXN1 表达的影响

RNA-seq 分析发现,NP 引起 COLO205 细胞中 154 个基因表达异常,上调基因 107 个,下调基因 57 个,其中 SRXN1 的 $\log_2^{\text{FoldChange}}$ 为 2.17 倍(图 1A)。与空白对照组(Control)比较,不同浓度 NP(10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L)分别作用 COLO205 细胞后,SRXN1 mRNA 及 SRXN1 蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$) (图 1B、图 1C)。与 Control 组比较,SRXN1 特异性 si-SRXN1-1、si-SRXN1-2 均显著抑制 SRXN1 表达(t

$= 7.23, 5.14$, 均 $P < 0.01$), si-SRXN1-1 的抑制效果最明显,后续实验均使用 si-SRXN1-1 特异性抑制 SRXN1(图 1D~图 1F)。与 si-SRXN1-1 组比较,不同浓度的 NP(10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L)分别作用 COLO205 细胞后,SRXN1 mRNA 及 SRXN1 蛋白表达均显著升高($P < 0.01$) (图 1G~图 1I)。以上结果说明 NP 能够促进结直肠癌 COLO205 细胞中 SRXN1 的表达。

2.2 SRXN1 在结直肠癌中的表达分析

TCGA 分析发现,在肿瘤样本中,SRXN1 的表达显著高于正常肠组织($P < 0.01$) (图 2A)。qRT-PCR 检测收集的结直肠癌肿瘤组织样本中 SRXN1 mRNA 表达量显著高于癌旁组织($t = 10.23, P < 0.01$) (图 2B);IHC 检测分析发现,结直肠癌肿瘤组织样本中 SRXN1 的表达显著高于癌旁组织($t = 6.64, P < 0.01$) (图 2C、图 2D)。以上结果说明,在结直肠癌中,SRXN1 的表达显著升高。

2.3 SRXN1 抑制后,NP 对结直肠癌细胞增殖影响

CCK-8 检测发现,与 Control 组比较,NP 组细胞活力显著高于 Control 组($t = 4.64, P < 0.01$),而 si-SRXN1 组细胞活力显著低于 Control 组;与 si-SRXN1 组比较,NP+si-SRXN1 组细胞活力显著增加($t = 5.72, P < 0.01$) (图 3A)。与 Control 组比较,NP 组克隆数显著高于 Control 组($t = 5.64, P < 0.01$),si-SRXN1 组显著低于 Control 组($t = 10.76, P < 0.01$);与 si-SRXN1 组比较,NP+si-SRXN1 克隆数显著增多($t = 4.24, P < 0.05$) (图 3B、图 3C)。

2.4 SRXN1 抑制后,NP 对结直肠癌细胞侵袭及迁移能力的影响

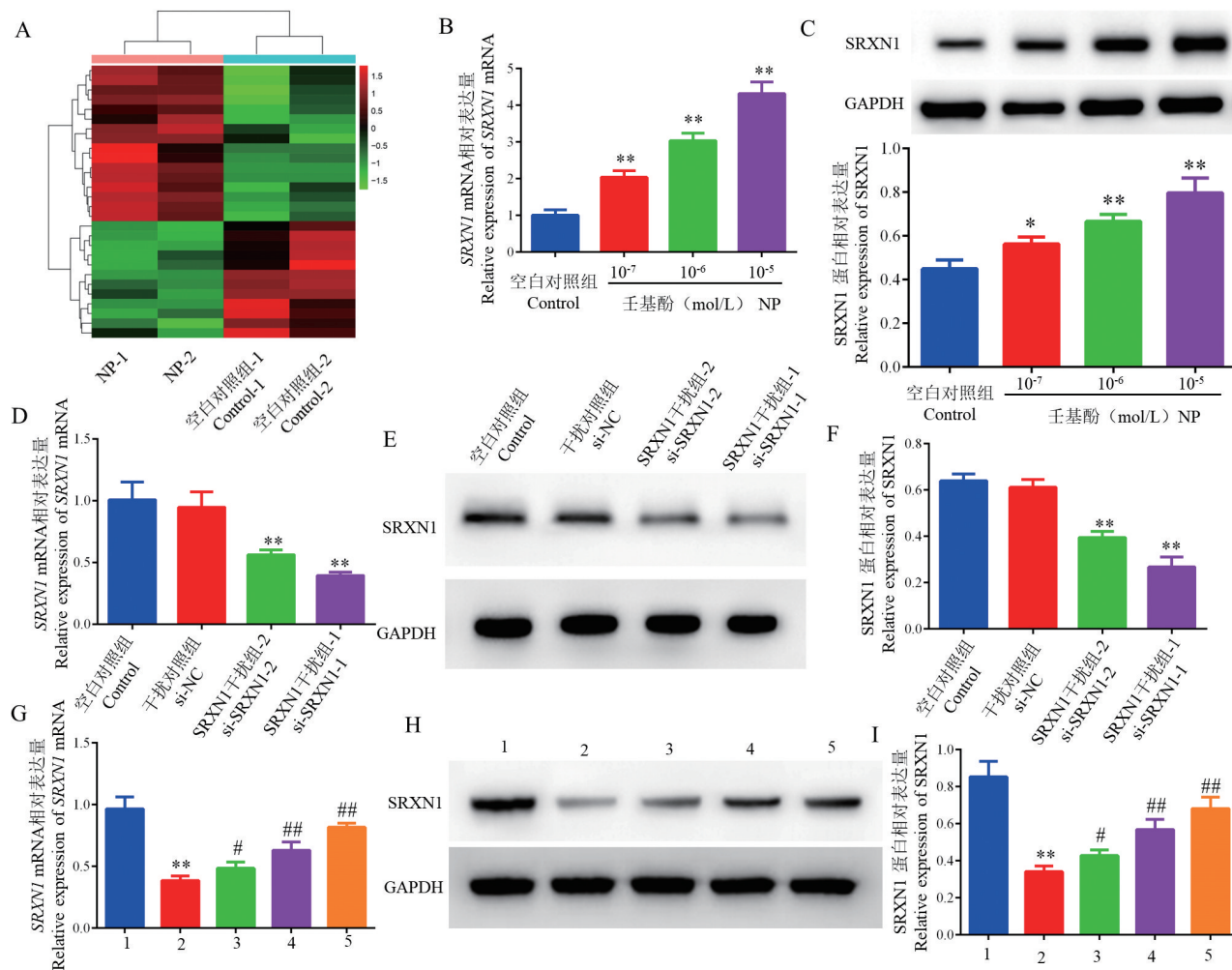
NP 组细胞侵袭数显著高于 Control 组($t = 2.31, P < 0.01$);si-SRXN1 组 COLO205 细胞侵袭数显著低于 Control 组($t = 4.99, P < 0.01$)。与 si-SRXN1 组比较,NP+si-SRXN1 能够促进细胞的侵袭($t = 2.97, P < 0.01$) (图 4A~图 4C)。NP 组 COLO205 细胞迁移数显著高于 Control 组($t = 2.45, P < 0.01$);si-SRXN1 组 COLO205 细胞迁移数显著低于 Control 组($t = 4.19, P < 0.01$)。与 si-SRXN1 组比较,NP + si-SRXN1 能够促进细胞的迁移($t = 2.07, P < 0.01$) (图 4A~图 4C)。

2.5 SRXN1 抑制后,NP 对增殖、侵袭相关通路激活的影响

课题组前期研究发现 NP 可通过激活 ERK1/2 促进结直肠癌细胞增殖^[5-7]。PI3K/Akt、Wnt/ β -

catenin 在多种肿瘤中异常激活,调节肿瘤的增殖及 EMT。Western blot 检测发现:与 Control 组比较,NP 显著促进 p-ERK1/2、p-PI3K、p-Akt、Wnt3a、 β -catenin 的表达($t=3.34, 3.04, 4.80, 6.81, 5.71$, 均 $P<0.01$),而 si-SRXN1 组抑制 p-ERK1/2、p-PI3K、p-Akt、Wnt3a、 β -catenin 的表达($t=13.34, 8.75, 11.74, 8.65, 12.47$, 均 $P<0.01$);与 si-SRXN1 组比

较,NP + si-SRXN1 组中 p-ERK1/2 ($t=4.80, P<0.01$)、p-PI3K($t=3.82, P<0.01$)、p-Akt($t=3.78, P<0.05$)、Wnt3a($t=4.48, P<0.05$)、 β -catenin($t=6.90, P<0.05$)的表达显著升高。以上结果说明 NP 能够促进 ERK1/2、PI3K/Akt、Wnt/ β -catenin 通路的激活,而 SRXN1 显著抑制上述通路的激活影响 COLO205 细胞的增殖及侵袭能力(图 5)。

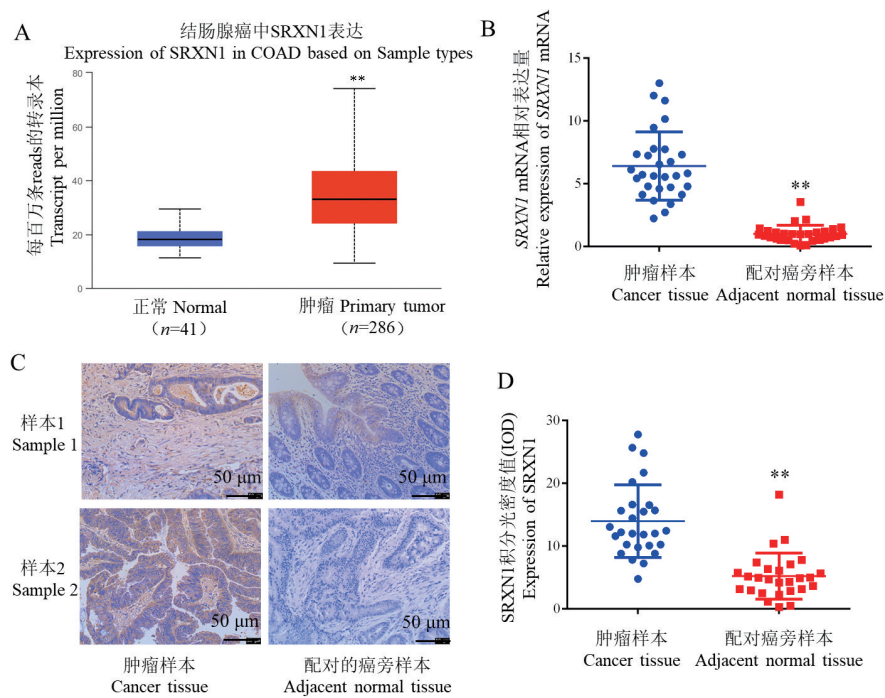


注:A:Heatmap(1,2为重复);B:qRT-PCR分析SRXN1表达;C:NP干预后,Western blot检测COLO205细胞中SRXN1表达;D:qRT-PCR分析SRXN1表达;E~F:转染si-SRXN1后,Western blot检测COLO205细胞中SRXN1表达;G:qRT-PCR分析SRXN1表达;H~I:SRXN1抑制后,Western blot检测COLO205细胞中SRXN1表达。1~5分别代表空白对照组、SRXN1干扰组、壬基酚(10^{-7} mol/L)+SRXN1干扰组、壬基酚(10^{-6} mol/L)+SRXN1干扰组、壬基酚(10^{-5} mol/L)+SRXN1干扰。与空白对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与SRXN1干扰组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图1 SRXN1在COLO205细胞中的表达

Note. A, Heatmap (1 and 2 are repetitions). B, qRT-PCR analysis of SRXN1 expression in colorectal cancer. C, After NP intervention, Western blot analysis of SRXN1 expression in COLO205 cells. D, qRT-PCR analysis of SRXN1 expression in colorectal cancer. E~F, After transfection with si-SRXN1, Western blot analysis of SRXN1 expression in COLO205 cells. G, qRT-PCR analysis of SRXN1 expression in colorectal cancer. H~I, After SRXN1 inhibition, Western blot analysis of SRXN1 expression in COLO205 cells. 1~5 represents the Control, si-SRXN1, NP (10^{-7} mol/L) + si-SRXN1, NP (10^{-6} mol/L) + si-SRXN1, NP (10^{-5} mol/L) + si-SRXN1. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with si-SRXN1 group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 1 Expression of SRXN1 in COLO205 cells

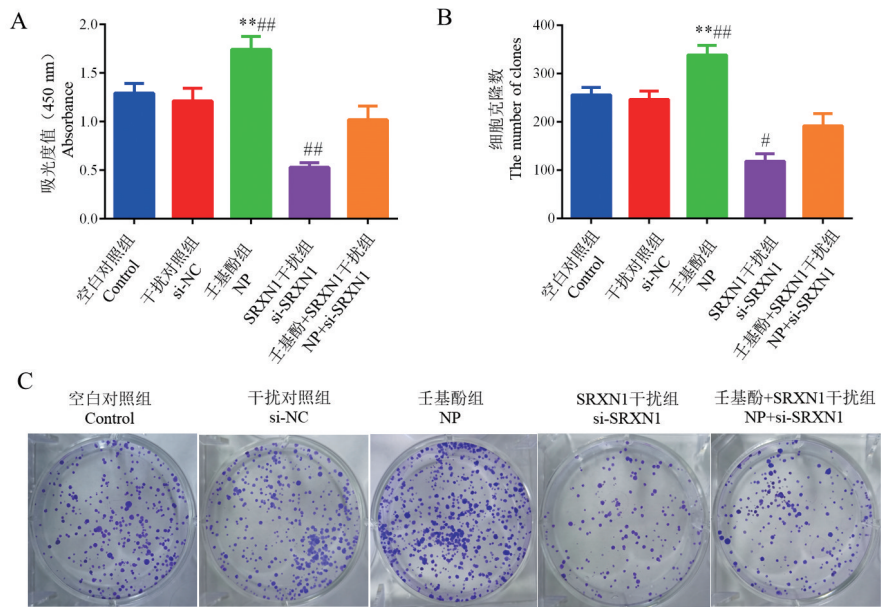


注:A;TCGA 分析 *SRXN1* 在结直肠癌中的表达;B;qRT-PCR 分析 *SRXN1* 在结直肠癌中的表达;C:IHC 分析 *SRXN1* 表达(200X);D:IOD 值统计分析结果。与肿瘤样本相比, ** $P<0.01$ 。

图 2 *SRXN1* 在结直肠癌中的表达

Note. A, TCGA analysis of *SRXN1* expression in colorectal cancer. B, qRT-PCR analysis of *SRXN1* expression in colorectal cancer. C, IHC analysis of *SRXN1* expression. D, Statistical analysis results of IOD values. Compared with cancer tissue, ** $P<0.01$.

Figure 2 Expression of *SRXN1* in colorectal cancer

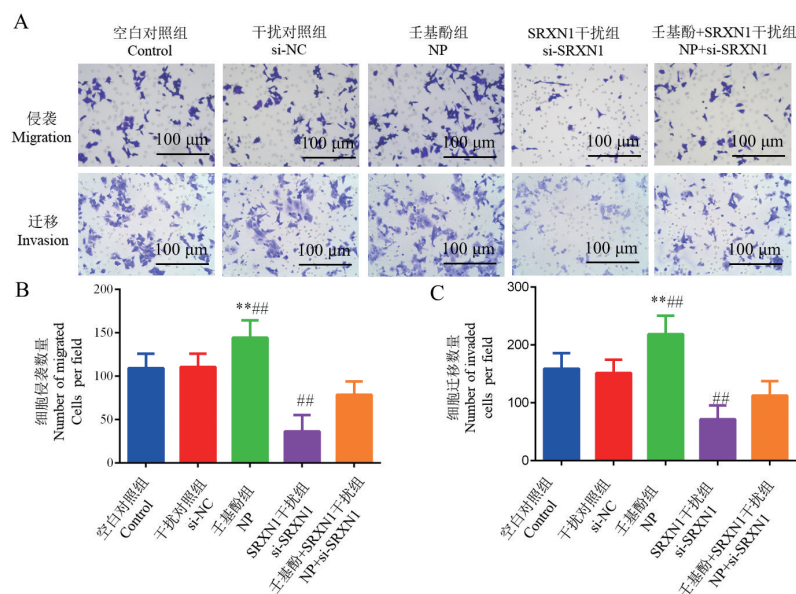


注:A;CCK-8 检测细胞活力;B、C;克隆形成实验检测。与空白对照组相比, ** $P<0.01$;与壬基酚+si-SRXN1 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 3 COLO205 细胞增殖能力检测

Note. A, Cell viability was detected by CCK-8. B/C, Experimental detection of clone formation. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with NP+si-SRXN1 group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 3 COLO205 cell proliferation capacity assay

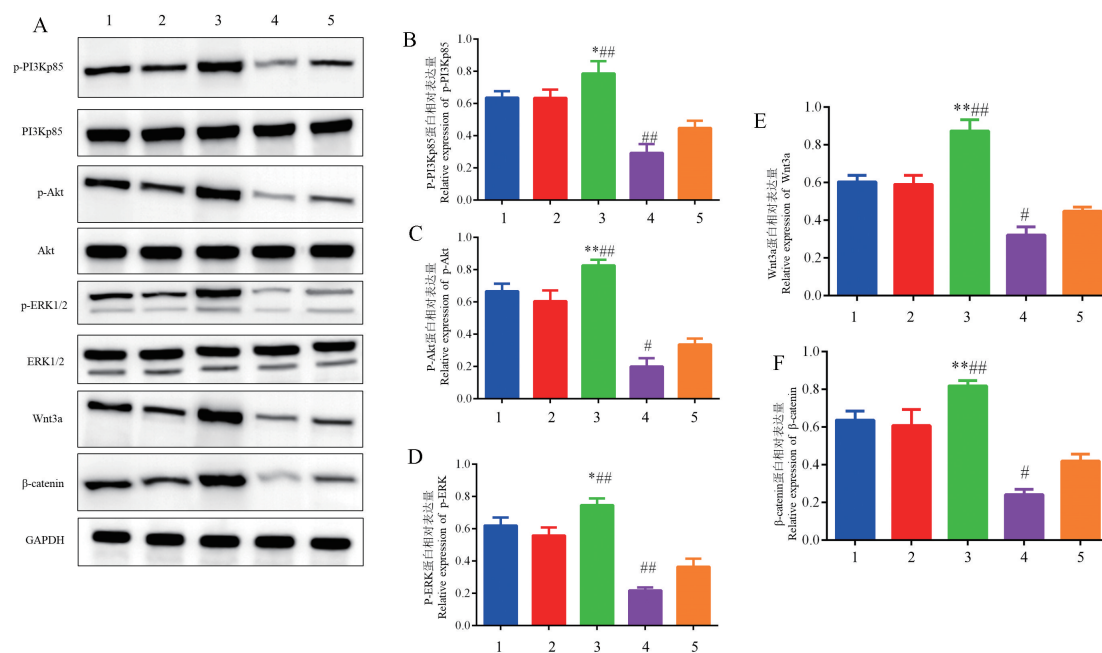


注:A:Transwell 检测;B:Migration 数据统计;C:Invasion 数据统计。与空白对照组相比, $^{**}P<0.01$;与壬基酚+SRXN1 干扰组相比, $^{##}P<0.01$ 。

图 4 COLO205 细胞侵袭及迁移能力变化

Note. A, Transwell test. B, Migration data statistics. C, Invasion statistics. Compared with Control group, $^{**}P<0.01$. Compared with NP+si-SRXN1 group, $^{##}P<0.01$.

Figure 4 Changes in invasion and migration ability of COLO205 cells



注:A:Western blot 检测;B~F:分别代表 p-PI3Kp85、p-Akt、p-ERK、Wnt3a、β-catenin 表达统计。1~5 分别代表空白对照组、干扰对照组、壬基酚组、SRXN1 干扰组、壬基酚+SRXN1 干扰组。与空白对照组相比, $^{**}P<0.01$;与壬基酚+si-SRXN1 组相比, $^{#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ 。

图 5 Western blot 检测 PI3K/Akt、ERK、Wnt3a/β-catenin 通路表达

Note. A, Western blot assay. B~F, Expression statistics of p-PI3Kp85, p-Akt, p-ERK, Wnt3a and β-catenin, respectively. 1~5 represents the Control, si-NC, NP, si-SRXN1, NP+si-SRXN1. Compared with Control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. Compared with NP+si-SRXN1 group, $^{#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$.

Figure 5 Expression of PI3K/Akt, ERK1/2 and Wnt3a/β-catenin pathways detected by Western blot

3 讨论

随着现代工业的发展,大量化学物质释放到自然环境中,造成极大的环境污染,其中一类外源性化学物质可模仿或部分模仿性激素,并通过与性激素受体结合或影响细胞信号途径等方式发挥毒性作用,这类物质被称为环境内分泌干扰物(EDCs)亦称环境雌激素^[15]。研究发现 EDCs 能够引起人类生育能力降低和诱发多种疾病,如肥胖症、糖尿病和癌症^[16]。NP 是 EDCs 的典型代表,由于 NP 具有亲脂性,导致其极易在组织和器官中聚集,与肿瘤的发生密切相关^[8-9]。深入阐明 NP 与肿瘤的发生、进展的关系,对肿瘤的防治具有重要的意义。

肿瘤的发生及进展受氧化应激水平调节,活性氧通过调节炎症、线粒体功能、激活 MAPK 及 AMPK 等通路促进肿瘤的发生及进展^[17-18]。NP 能够引起机体氧化应激水平的失衡,促进 ROS 及炎症因子的释放促进心脏毒性、胃粘膜炎症、卵巢颗粒细胞的凋亡和自噬^[19-20]。RNA-seq 及 qRT-PCR 检测发现,NP 引起 SRXN1 表达显著上调。SRXN1 属于保守的内源性 Sulfiredoxin 抗氧化家族的成员之一,可通过调节活性氧的释放,发挥神经保护作用^[12]。最近研究发现,SRXN1 在多种恶性肿瘤中具有促进增殖及转移的能力^[21-22],SRXN1 通过影响过氧化物酶活性,调节 ROS 水平,以使组织免受氧化应激损伤,进而促进肿瘤细胞增殖及 EMT 的发生^[23-24]。本文研究发现,抑制 SRXN1 的表达后,结直肠癌 COLO205 细胞的增殖、侵袭及迁移能力显著降低,而 NP 则得到相反的结果。暗示 NP 促进结直肠癌细胞增殖、侵袭及迁移可能与 SRXN1 表达相关,但 NP 如何影响 SRXN1 表达以及与氧化应激的关系,还需通过实验进一步研究。

调节细胞增殖及转移的主要通路为 ERK1/2、PI3K/Akt 及 Wnt/ β -catenin 等,ERK1/2、PI3K/Akt 在多种肿瘤中异常激活,调节肿瘤的增殖、分化及 EMT^[25]。ERK1/2 的异常激活,促进增殖相关蛋白(CyclinD1、C-myc、PCNA)的表达,促进结直肠癌细胞增殖^[7],抑制 PI3K/Akt 通路后,显著抑制卵巢癌细胞 EMT 及增殖^[26]。SRXN1 可通过激活 Wnt/ β -catenin^[27]、ERK1/2^[28] 及 PI3K/Akt^[29] 通路。通过 Western blot 检测发现,NP 显著促进 p-ERK1/2、p-Akt 及 Wnt3a、 β -catenin 的表达,暗示 NP 能够显著激活 ERK1/2、PI3K/Akt 及 Wnt/ β -catenin 通路;

SRXN1 抑制后,NP 对 ERK1/2、PI3K/Akt 及 Wnt/ β -catenin 通路的激活作用被减弱,暗示 NP 激活 ERK1/2、PI3K/Akt 及 Wnt/ β -catenin 通路与 SRXN1 表达相关。

综上所述,NP 可促进 SRXN1 的表达,调节结直肠癌细胞的增殖、侵袭及转移,其分子机制与 ERK1/2、PI3K/Akt 及 Wnt/ β -catenin 等通路激活有关;但 NP 与 SRXN1 具体调控机制,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Sauer AG, et al. Colorectal cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(3): 145-164.
- [2] Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, et al. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [3] Thanikachalam K, Khan G, et al. Colorectal cancer and nutrition [J]. Nutrients, 2019, 11(1): 164.
- [4] 黄韩冬, 宁伟伟, 张桃, 等. 结直肠癌患者血清壬基酚含量测定及临床意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(9): 1568.
- [5] Yang X, Huang H, Wang M, et al. Effect of nonylphenol on the regulation of cell growth in colorectal cancer cells [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 2211-2216.
- [6] Yang X, Huang H, Wang M, et al. Nonylphenol promotes the proliferation of colorectal cancer COLO205 cells by upregulating the expression of protein kinase C ζ [J]. Oncol Lett, 2019, 17(2): 2498-2506.
- [7] Xie M, Liang JL, Huang HD, et al. Low doses of nonylphenol promote growth of colon cancer cells through activation of ERK1/2 via G protein-coupled receptor 30 [J]. Cancer Res Treat, 2019, 51(4): 1620-1631.
- [8] Kim H, Oh S, Gye MC, et al. Comparative toxicological evaluation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates using human keratinocytes [J]. Drug Chem Toxicol, 2018, 41(4): 486-491.
- [9] Kim SH, Nam KH, Hwang KA, et al. Influence of hexabromocyclododecane and 4-nonylphenol on the regulation of cell growth, apoptosis and migration in prostatic cancer cells [J]. Toxicol In Vitro, 2016, 32(3): 240-247.
- [10] Pretzsch E, Bösch F, Neumann J, et al. Mechanisms of metastasis in colorectal cancer and metastatic organotropism: hematogenous versus peritoneal spread [J]. J Oncol, 2019, 2019: 7407190.
- [11] Kim YS, Hwang KA, Hyun SH, et al. Bisphenol A and nonylphenol have the potential to stimulate the migration of ovarian cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition via an estrogen receptor dependent pathway [J]. Chem Res Toxicol, 2015, 28(4): 662-671.
- [12] 喻姗姗, 刘远玲, 陈曦, 等. Sulfiredoxin-1 对大鼠星形胶质细

- 胞缺血损伤的保护作用 [J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(1): 11-15.
- [13] Lv XF, Yu HL, Zhang QQ, et al. SRXN1 stimulates hepatocellular carcinoma tumorigenesis and metastasis through modulating ROS/p65/BTG2 signalling [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(18): 10714-10729.
- [14] Chen X, Lan K, Liu Q, et al. Sulfiredoxin may promote metastasis and invasion of cervical squamous cell carcinoma by epithelial-mesenchymal transition [J]. Tumour Biol, 2017, 39(3): 1010428317695942.
- [15] 李金荣, 郭瑞昕, 刘艳华, 等. 五种典型环境内分泌干扰物赋存及风险评估的研究进展 [J]. 环境化学, 2020, 39(10): 2637-2653.
- [16] Yang O, Kim HL, Weon JI, et al. Endocrine-disrupting chemicals: review of toxicological mechanisms using molecular pathway analysis [J]. J Cancer Prev, 2015, 20(1): 12-24.
- [17] Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, et al. Oxidative stress in cancer [J]. Cancer Cell, 2020, 38(2): 167-197.
- [18] Zuo L, Prather ER, Stetskiv M, et al. Inflammaging and oxidative stress in human diseases: from molecular mechanisms to novel treatments [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4472.
- [19] 金海, 俞捷, 李仕旭, 等. 壬基酚暴露对大鼠胃粘膜的氧化损伤作用 [J]. 公共卫生与预防医学, 2020, 31(1): 16-20.
- [20] Liu T, Di QN, Sun JH, et al. Effects of nonylphenol induced oxidative stress on apoptosis and autophagy in rat ovarian granulosa cells [J]. Chemosphere, 2020, 261: 127693.
- [21] Wang J, Si L, Wang G, et al. Increased sulfiredoxin expression in gastric cancer cells may be a molecular target of the anticancer component diallyl trisulfide [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 4636804.
- [22] Lan K, Zhao Y, Fan Y, et al. Sulfiredoxin may promote cervical cancer metastasis via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 1-13.
- [23] Lu Q, Wang W, Zhang M, et al. ROS induces epithelial-mesenchymal transition via the TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR pathway in diabetic nephropathy [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(1): 835-846.
- [24] Li X, He P, Wang XL, et al. Sulfiredoxin-1 enhances cardiac progenitor cell survival against oxidative stress via the upregulation of the ERK/NRF2 signal pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 123: 8-19.
- [25] Liu X, Sun L, Zhang S, et al. GINS2 facilitates epithelial-to-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer through modulating PI3K/Akt and MEK/ERK signaling [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(11): 7747-7756.
- [26] Deng J, Bai X, Feng X, et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway alleviates ovarian cancer chemoresistance through reversing epithelial-mesenchymal transition and decreasing cancer stem cell marker expression [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 618.
- [27] Lan K, Zhao Y, Fan Y, et al. Sulfiredoxin may promote cervical cancer metastasis via Wnt/ β -Catenin signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 917.
- [28] Li X, He P, Wang X, et al. Sulfiredoxin-1 enhances cardiac progenitor cell survival against oxidative stress via the upregulation of the ERK/NRF2 signal pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 123: 8-19.
- [29] Zhang JK, He ZY, Guo JH, et al. Sulfiredoxin-1 protects against simulated ischaemia/reperfusion injury in cardiomyocyte by inhibiting PI3K/AKT-regulated mitochondrial apoptotic pathways [J]. Biosci Rep, 2016, 36(2): e00325.

[收稿日期] 2022-06-20