

IGF2BP3 在 MNNG 致人胃上皮细胞恶性转化中的作用及机制

任艺艺, 牡丹丹, 刘桐, 尹立红, 浦跃朴, 梁戈玉

东南大学, 公共卫生学院/环境医学工程教育部重点实验室, 江苏 南京 210009



DOI 10.11836/JEOM22044

摘要:

[背景] N6-甲基腺苷(m6A) RNA 甲基化修饰在环境致癌物诱发细胞恶性转化的过程中发挥着重要作用,但其作用及机制有待进一步探索。

[目的] 探究 m6A 结合蛋白中胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 3(IGF2BP3)在 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)致人胃黏膜上皮细胞 GES-1 恶性转化细胞中的作用及机制。

[方法] 基于 MNNG 致 GES-1 恶性转化细胞模型 MC-30,应用转染慢病毒技术构建稳定敲低 IGF2BP3 的 MC-30 细胞株(MC30-shIGF2BP3, 简写 MC30-shI3),并设置阴性对照组(MC30-NC)。实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和 Western blotting 实验分别检测 IGF2BP3 mRNA 和蛋白表达水平, RNA 结合蛋白免疫沉淀技术(RIP-qPCR)验证恶转细胞 MC-30 中 IGF2BP3 蛋白与 MYC mRNA 的结合,放线菌素 D 实验检测 MYC mRNA 的稳定性。CCK-8、Transwell 分别检测细胞增殖、迁移和侵袭能力, Western blotting 实验检测 EMT 关键蛋白(N-cadherin、Vimentin、 α -SMA、Snail)的表达。通过在 MC30-shI3 细胞中转染质粒过表达 MYC 的挽救实验,进一步观察细胞表型(增殖、迁移、侵袭)和 EMT 关键蛋白表达的变化来阐明下游靶基因 MYC 的作用。

[结果] 与对照组相比, 5、10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MNNG 染毒 GES-1 细胞后, IGF2BP3 mRNA 表达均上调($P<0.05$)。20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MNNG 染毒 GES-1 细胞后, IGF2BP3 mRNA 表达水平随染毒时间的延长呈上调趋势($P<0.05$)。5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MNNG 恶转第 10、20、30 代 IGF2BP3 mRNA 和蛋白表达水平均上调($P<0.05$)。qRT-PCR 和 Western blotting 表明,与 MC30-NC 组相比, MC30-shI3 组的细胞 IGF2BP3 mRNA 表达和蛋白表达水平明显下调($P<0.01$); CCK8、Transwell 表明,与 MC30-NC 组相比, MC30-shI3 组的细胞增殖、迁移以及侵袭能力明显降低($P<0.01$); Western blotting 实验表明,与 MC30-NC 组相比, MC30-shI3 组的 EMT 关键蛋白 N-cadherin、Vimentin、 α -SMA、Snail 蛋白表达水平均明显下调($P<0.01$); RIP-qPCR 结果显示,在 MC-30 细胞中,与 IgG 组相比, IGF2BP3 组中富集的 MYC 的 mRNA 水平更高($P<0.01$);放线菌素 D 实验表明,与 MC30-NC 组相比, MC30-shI3 组 MYC mRNA 的稳定性明显降低($P<0.01$)。挽救实验表明,与 IGF2BP3 敲低+质粒空载体组相比, IGF2BP3 敲低+过表达 MYC 组的细胞 MYC 蛋白水平明显升高($P<0.01$),细胞增殖、侵袭以及迁移能力均明显增强($P<0.01$), EMT 关键蛋白(N-cadherin、Vimentin、 α -SMA、Snail)的蛋白表达水平均明显升高($P<0.01$)。

[结论] MNNG 暴露可导致 GES-1 细胞中 IGF2BP3 表达上调; IGF2BP3 可能通过与 MYC mRNA 相结合并增强其稳定性,增加其表达水平从而促进 EMT 进程,进而增强人胃上皮细胞恶性转化细胞的增殖、迁移和侵袭能力,影响恶性转化的进程。

关键词: N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍; 胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 3; GES-1 细胞; 恶性转化; 上皮间质转化

Role and mechanism of IGF2BP3 in malignant transformation of human gastric epithelial cells induced by MNNG REN Yiyi, DU Dandan, LIU Tong, YIN Lihong, PU Yuepu, LIANG Geyu (Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering, Ministry of Education/School of Public Health, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract:

[Background] N6-methyladenosine (m6A) RNA methylation may play an important role in the process of malignant transformation of cells induced by environmental carcinogens. However, the specific roles and mechanisms need to be further explored.

[Objective] To explore the role and mechanism of m6A binding protein insulin-like growth factor 2

基金项目

国家自然科学基金面上项目(81972998)

作者简介

任艺艺(1995—),女,硕士生;

E-mail: 220193557@seu.edu.cn

通信作者

梁戈玉, E-mail: lianggeyu@163.com

伦理审批 不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2022-02-11

录用日期 2022-08-16

文章编号 2095-9982(2022)10-1146-08

中图分类号 R735.2

文献标志码 A

引用

任艺艺, 牡丹丹, 刘桐, 等. IGF2BP3 在 MNNG 致人胃上皮细胞恶性转化中的作用及机制[J]. 环境与职业医学, 2022, 39(10): 1146-1153.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM22044

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LIANG Geyu, E-mail: lianggeyu@163.com

Ethics approval Not required

Competing interests None declared

Received 2022-02-11

Accepted 2022-08-16

To cite

REN Yiyi, DU Dandan, LIU Tong, et al. Role and mechanism of IGF2BP3 in malignant transformation of human gastric epithelial cells induced by MNNG[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(10): 1146-1153.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM22044

mRNA-binding protein 3 (IGF2BP3) in the malignant transformation of human gastric mucosal epithelial cells GES-1 induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG).

[Methods] Based on the GES-1 malignant transformation cells MC-30, a stable knockdown *IGF2BP3* MC-30 cell line (MC30-shIGF2BP3, abbreviated as MC30-shI3) was constructed by lentiviral transfection technology, and a negative control group (MC30-NC) was also prepared. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting were applied to detect the mRNA expression and protein levels of IGF2BP3. RNA binding protein immunoprecipitation (RIP-qPCR) was used to examine the combination between IGF2BP3 protein and *MYC* mRNA in malignant cells MC-30. Furthermore, the stability of *MYC* mRNA was detected by actinomycin D assay. CCK-8 and Transwell respectively were employed to detect cell proliferation, migration, and invasion. Western blotting was applied to detect the expression of EMT markers (N-cadherin, Vimentin, α -SMA, and Snail). The role of the downstream target gene *MYC* was further elucidated by a rescue assay in MC30-shI3 cells transfected with a plasmid overexpressing *MYC* to observe changes in cellular phenotypes (proliferation, migration, invasion) and expression of key EMT proteins.

[Results] Compared with the control group, the expression of *IGF2BP3* mRNA was up-regulated after 5, 10, 20, and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MNNG infection of GES-1 cells ($P < 0.05$). After 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MNNG infection, the expression level of *IGF2BP3* mRNA increased with prolongation of exposure time ($P < 0.05$). Compared with the control group, the mRNA and protein expression levels of IGF2BP3 were up-regulated in the 10th, 20th, and 30th generations of 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MNNG malignant transformation ($P < 0.05$). The results of qRT-PCR and Western blotting showed that, compared with the MC30-NC group, the *IGF2BP3* and *MYC* mRNA expression and protein expression decreased in the MC30-shI3 group ($P < 0.01$). The CCK8 and transwell assay results showed that, compared with the MC30-NC group, the cell proliferation, migration, and invasion abilities significantly reduced in the MC30-shI3 group ($P < 0.01$). The results of the Western blotting showed that, compared with the MC30-NC group, the protein levels of EMT markers N-cadherin, Vimentin, α -SMA, and Snail decreased in the MC30-shI3 group ($P < 0.01$). The results of RIP-qPCR showed that, compared with the IgG group, the mRNA level was higher for the enriched *MYC* in the IGF2BP3 group ($P < 0.01$); the results of the actinomycin D assay showed that, compared with the MC30-NC group, the stability of *MYC* mRNA significantly reduced in the MC30-shI3 group ($P < 0.01$). While the rescue experiment showed that, compared with the IGF2BP3 knock-down+vector group, the *MYC* protein level significantly increased in the IGF2BP3 knock-down + *MYC* over-expression group ($P < 0.01$), the proliferation, migration, and invasion abilities significantly enhanced ($P < 0.01$), and the EMT key proteins (N-cadherin, Vimentin, α -SMA, Snail) increased in the MC30-shI3+*MYC* group ($P < 0.01$).

[Conclusion] Exposure to MNNG could result in up-regulation of IGF2BP3 expression in GES-1 cells. IGF2BP3 may enhance the proliferation, migration, and invasion of malignant transformed human gastric epithelial cells by binding to *MYC* mRNA and increasing its stability and expression level and thus promoting the EMT process, which in turn affects the progression of malignant transformation.

Keywords: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; IGF2BP3; GES-1 cell; malignant transformation; epithelial-mesenchymal transition

2020 年,胃癌发病率和死亡率分别位居第五和第四,严重威胁着人类的健康^[1]。胃癌是多病因、多阶段的复杂疾病,其发病受环境、遗传和表观遗传的共同影响,其中环境因素发挥着主要作用。流行病学研究表明,胃癌的发病率受到幽门螺杆菌感染、饮食、环境致癌物暴露等危险因素的影响^[2],而环境致癌物已被确定为胃癌发生中最重要的因素之一^[3]。其中,Ⅰ类致癌物 N-亚硝基类化合物(N-Nitroso-compounds, NOCs)是一类与胃癌发展相关的强致癌物,广泛存在于食品和饮用水当中,尤其是腌制蔬菜、水产、肉类、啤酒及霉变食品,对人类健康构成很大威胁^[4]。然而,其作用机制目前尚不十分清楚。N-甲基-N'-硝基-N'-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)是 NOCs 机制研究中公认的模式化合物,常被作为模拟胃黏膜病变的致癌化学物质^[5]。近来研究表明,表观遗传调控是 MNNG 作用的主要途径之一,但其所涉及的关键分子事件及其作用机制目前并不清楚。因此,针对 MNNG 诱发胃癌过程中的表观遗传关键分子及机制进行深入研究,对加快揭示 NOCs 环境化学致胃癌作用机制及防治具有重要的理论意义和应用价值。

N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)修饰是真核生物中最常见的 RNA 修饰之一,参与调控转录后基因表达,与环境暴露相关疾病的发生和发展密切相关,为理解环境有害物质诱发胃部疾病的研究提供了新的视角^[6]。m6A 修饰是一个动态可逆的过程,由 m6A 甲基转移酶催化并由 m6A 去甲基化酶去除^[7],m6A 修饰 RNA 的命运和生物学功能主要依赖于 m6A 结合蛋白^[8]。当暴露于环境毒物时,m6A 甲基化水平和 m6A 调控因子的表达会随着时间和剂量依赖性方式发生变化,在各种环境毒物诱发的癌症中发挥关键作用。作为关键的 m6A 结合蛋白的胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 3(insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3, IGF2BP3),在胃癌中高表达,增强了细胞增殖、侵袭和迁移的能力,显著促进了细胞恶性转化进程^[9],可作为胃癌候选生物标志物^[10]。然而,IGF2BP3 在 MNNG 引起人胃黏膜上皮细胞 GES-1 恶性转化中的作用与机制尚不清楚。

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是反映细胞恶性转化程度和侵袭转移能力的重要标志^[11]。最新研究表明,m6A 对暴露于环境化学物

质后 EMT 和转移的发生至关重要^[12]。然而,关于 IGF2BP3 能否激活 MNNG 诱导的 GES-1 细胞恶性转化的 EMT 进程,目前尚无报道。

MYC(也被称为 *c-myc*)作为经典的原癌基因,已被视为肿瘤发生远处转移的重要分子标志^[13]。此外,MYC 在致癌物诱导细胞恶变过程中也发挥重要作用^[14]。事实上,MYC 还可通过调控 EMT 进程进而促进细胞转移^[15]。相关研究表明,IGF2BP3 在肿瘤细胞中通过 m6A 依赖的方式影响 MYC mRNA 稳定性,并影响 MYC 蛋白表达^[16]。然而,关于 IGF2BP3 能否通过调控 MYC mRNA 稳定性激活 MNNG 诱导的 GES-1 细胞恶性转化的 EMT 进程,目前尚无报道。

因此,本研究基于已构建的 MNNG 致 GES-1 细胞恶性转化模型(MC 细胞),探索 IGF2BP3 在恶转细胞中的功能和分子机制,以揭示 MNNG 所致细胞恶性转化的分子机制,为进一步理解化学致癌过程的分子机制和寻找胃癌的生物学标志提供一定的实验依据,为早期识别、预防和治疗胃癌提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人正常胃黏膜上皮细胞株 GES-1 细胞、MNNG 诱导 GES-1 细胞恶性转化细胞模型(MC 细胞),由东南大学环境医学工程教育部重点实验室提供。

1.1.2 主要材料 MNNG(麦克林,中国),敲低 IGF2BP3 慢病毒及相应的空载体(汉恒生物,上海),MYC 过表达质粒及对应空载体(权阳生物,苏州),RNA 免疫沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)试剂盒(Merck Millipore,美国),放线菌素 D(Selleck,美国),CCK8 试剂盒(美仑生物,中国),3422 transwell 小室(Corning,美国),Matrigel 基质胶(BD,美国),RNA 提取及实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)相关试剂(Genestar,中国),WB 实验一级抗体(CST,美国),WB 内参抗体(鼠抗 β -actin)(CST,美国)、二级抗体(HRP)(羊抗兔、羊抗鼠)(CST,美国)、ECL 化学发光液(Merck Millipore,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、 1×10^5 U $\cdot$ L⁻¹青霉素、100 mg $\cdot$ L⁻¹链霉素的培养基在 37℃、5%CO₂ 条件下常规培养细胞,细胞贴壁生长。

1.2.2 MNNG 染毒处理 急性暴露:将人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 暴露于不同剂量 MNNG(0、5、10、20、40 μ mol $\cdot$ L⁻¹)24 h;以 20 μ mol $\cdot$ L⁻¹ MNNG 处理 GES-1 细

胞 6、12、18、24 和 30 h。慢性暴露:构建恶性转化细胞株的 MNNG 染毒浓度为 5 μ mol $\cdot$ L⁻¹,以 5 μ mol $\cdot$ L⁻¹ MNNG 处理 GES-1 细胞 10、20、30、40 代。

1.2.3 细胞转染慢病毒及质粒 将敲低 IGF2BP3 慢病毒载体及慢病毒空载体按照说明书进行慢病毒的转染;将 MYC 过表达及阴性对照质粒载体根据说明书进行质粒的转染。

1.2.4 qRT-PCR 检测细胞 mRNA 的表达 使用 Trizol 法提取总 RNA,逆转录试剂盒逆转录合成互补 DNA(complementary DNA, cDNA),采用 SYBR Green PCR Master Mix 进行 qRT-PCR 扩增,以 β -actin 作为内参,引物序列见表 1。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析目的基因表达的相对差异。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')
IGF2BP3	正向(Forward): ACGAAATATCCGCCTCATTTAC
	反向(Reverse): GCAGTTTCCGAGTCAGTGTTC
MYC	正向(Forward): CGAACACACAACGCTCTGGAGC
	反向(Reverse): CTGCTTGGACGGACAGGATG
β -actin	正向(Forward): TCTCCAAGTCCACACAGG
	反向(Reverse): GGCACGAAGGCTCATCA

1.2.5 Western blotting 实验检测细胞蛋白的表达 收集状态良好的细胞,提取总蛋白,蛋白质定量试剂盒法(bicinchoninic acid, BCA)测定总蛋白浓度。制备凝胶并上样,电泳,冰浴转膜,5%脱脂牛奶封闭,一抗 4℃ 过夜孵育,TBST 洗膜,二抗室温摇床孵育 1 h,再次洗膜,用 ECL 显色系统和天能凝胶图像分析系统显色和分析各蛋白的表达情况,Image J 软件(1.4.3.67)分析目的蛋白相对 GAPDH 的表达量。

1.2.6 CCK-8 实验检测细胞增殖 按每孔 3000 个细胞的密度将细胞接种于 96 孔板中,每组 6 复孔。分别在贴壁生长 12、24、48、72 h 后,加入细胞增殖检测试剂(cell counting kit-8, CCK-8)避光孵育 2 h。在酶标仪波长 450 nm 处检测光密度 *D* 值,分析数值并绘制生长曲线。

1.2.7 Transwell 实验 迁移实验:用不含 FBS 的培养基制备细胞悬液。将 200 μ L 含 15×10^5 个细胞的细胞悬液加入 Transwell 小室,600 μ L 含 20% FBS 的培养基加至下室。培养 12 h 后,弃培养基,取出小室,甲醛固定,结晶紫染色后,用显微镜观察,计数。侵袭实验:需预先在 Transwell 上室铺 Matrigel 基质胶,将 200 μ L 含 50×10^5 个细胞的细胞悬液加入 Transwell 小室,其他步骤同迁移实验。

1.2.8 RIP 实验 RIP 实验是根据 RIP 试剂盒说明书的标准实验步骤进行。最后,应用 qRT-PCR 检测 *MYC* mRNA 的水平,以 IgG 抗体拉取组,作为背景 RNA 含量的参照,即 RIP 实验阴性对照组。

1.2.9 放线菌素 D 实验 将细胞接种至 6 孔板,以相同的细胞培养条件进行培养,待细胞融合密度达 80% 以上时,每孔加入放线菌素 D (actinomycin D, ActD) 终质量浓度为 $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以终止 RNA 合成。在指定的时间点提取 RNA, qRT-PCR 检测细胞 mRNA 的表达。绘制 mRNA 半衰期曲线,观察 mRNA 降解速率的差异。

1.3 统计学分析

实验数据以平均数 $\pm$ 标准差表示,应用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。qRT-PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析。两组之间均数比较采用 *t* 检验,两组以上计量数据比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 IGF2BP3 在 MNNG 急性暴露和慢性暴露致 GES-1 细胞恶性转化过程中的表达特征

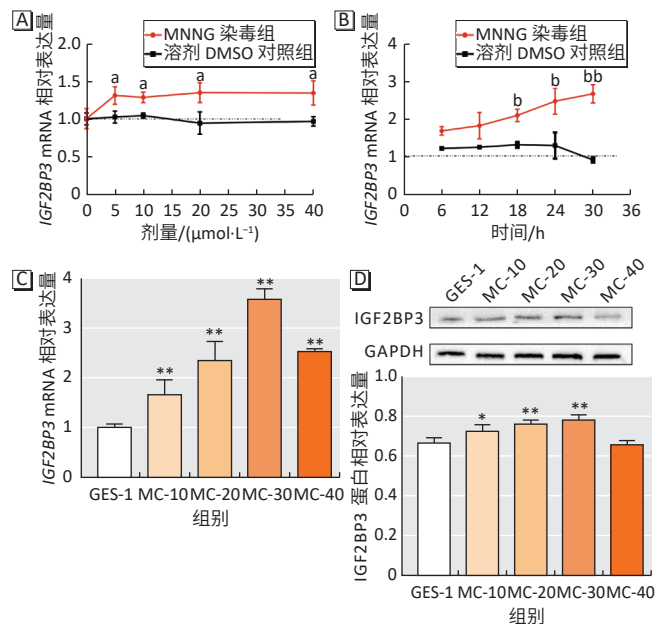
急性暴露: 与同剂量 DMSO 组相比,IGF2BP3 的表达水平无明显差异($P>0.05$),可排除 DMSO 的影响。与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照组相比,不同浓度 MNNG (5 、 10 、 20 、 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 染毒 GES-1 细胞 24 h 后,IGF2BP3 表达水平均显著上调,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 1A。这提示 MNNG 急性染毒可上调 IGF2BP3 的表达水平。为继续探索 IGF2BP3 表达水平与染毒时间的关系,使用 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MNNG 对 GES-1 细胞进行不同时间的染毒,与 6 h 相比,除了 12 h,随染毒时间的延长,IGF2BP3 表达水平呈上调趋势($P<0.05$),见图 1B。此结果表明,IGF2BP3 的表达随 MNNG 暴露时间的增加而上升。

慢性暴露: 与 GES-1 细胞相比, $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MNNG 染毒 10、20、30 代的恶转细胞 IGF2BP3 mRNA 表达均上调($P<0.01$),其中 IGF2BP3 在 30 代恶转细胞(MC-30 细胞)中表达水平最高,上调 3.57 倍,见图 1C。Western blotting 结果显示,与正常细胞相较,恶转 10、20、30 代 IGF2BP3 蛋白表达水平上调($P<0.05$),而 40 代的恶转细胞蛋白表达与正常对照无明显差异($P>0.05$),见图 1D。

2.2 成功构建稳定敲低 IGF2BP3 表达的恶转细胞株

本研究将敲低 IGF2BP3 的慢病毒以及慢病毒空载体转染至 MC-30 细胞中,并筛选敲低 IGF2BP3 稳转细胞株(MC30-shIGF2BP3,简称为 MC30-shi3)和阴性对

照稳转细胞株(MC30-NC)。荧光显微镜检测绿色荧光(ZsGreen)标记显示,MC30-shi3 组和 MC30-NC 组稳转细胞株,转染效率均在 95%,见图 2A。同时,qRT-PCR 结果显示,与空白对照组(MC30)或 MC30-NC 组相比,MC30-shi3 组 IGF2BP3 mRNA 水平均下调($P<0.01$),而 MC30 与 MC30-NC 组细胞 IGF2BP3 mRNA 表达水平无差异($P>0.05$);Western blotting 结果与 qRT-PCR 结果一致,见图 2B、2C。



[注] A: 不同浓度 MNNG 急性暴露,IGF2BP3 mRNA 表达量; B: $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MNNG 不同时间急性暴露,IGF2BP3 mRNA 表达量; C: $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MNNG 慢性暴露,IGF2BP3 mRNA 表达量; D: $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MNNG 慢性暴露,IGF2BP3 蛋白表达水平。a: 与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照组相比, $P<0.05$; 与 6 h 对照组相比, b: $P<0.05$, bb: $P<0.01$; 与 GES-1 组相比, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ 。

图 1 MNNG 急性暴露和慢性暴露对 GES-1 细胞 IGF2BP3 表达的影响

Figure 1 Effects of acute and chronic MNNG exposure on IGF2BP3 expression in GES-1 cells

2.3 IGF2BP3 促进 MC-30 细胞的增殖、侵袭、迁移能力和 EMT 的进程

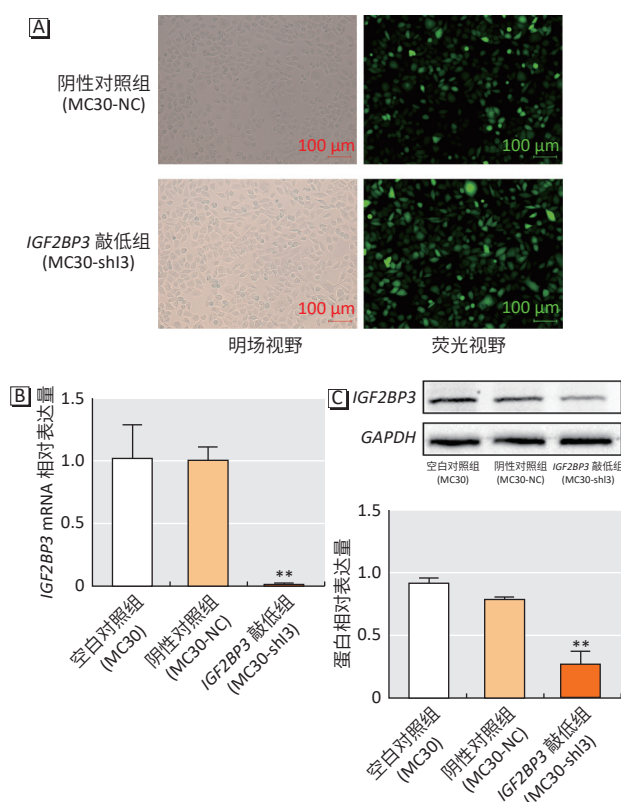
与 MC30-NC 组相较,MC30-shi3 组细胞增殖、迁移、侵袭能力均明显降低($P<0.01$),见图 3A~3C。与 MC30-NC 组相较,MC30-shi3 组 EMT 关键蛋白 N-cadherin、Vimentin、 α -SMA、Snail 蛋白表达水平下调,差异具有统计学意义($P<0.01$),见图 3D~3E。

2.4 IGF2BP3 通过提高 MYC mRNA 的稳定性进而上调 MYC 的表达并成功构建 MC30-shi3+MYC 细胞株

与 MC30 或 MC30-NC 相比,MC30-shi3 组 MYC mRNA 和蛋白水平均下调,且差异具有统计学意义($P<0.01$),见图 4A、4B,提示抑制 IGF2BP3 可降低恶

转细胞中下游 *MYC* 的表达。RIP-qPCR 实验显示, 与 IgG 组相比, IGF2BP3 组中富集的 *MYC* 的 mRNA 水平明显更高, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 4C, 提示在恶转细胞中, IGF2BP3 直接结合 *MYC*。放线菌素 D 实验结果表明, 与 MC30-NC 相比, MC30-shI3 组细胞 *MYC* mRNA 稳定性明显下降 ($P < 0.01$), 见图 4D, MC30-shI3 组细胞 *MYC* mRNA 半衰期为 72.45 min, MC30-NC 组细胞 *MYC* mRNA 半衰期为 94.29 min。

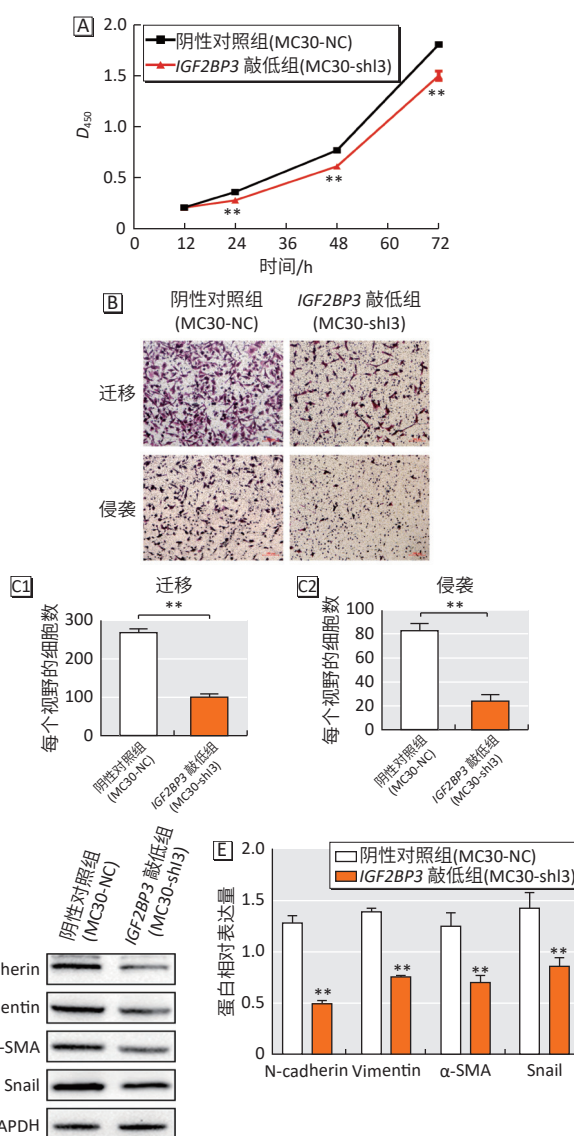
将过表达 *MYC* 质粒以及空载体转染至 MC30-shI3 以及 MC30-NC 细胞中, 分别构建在敲低 IGF2BP3 的恶转细胞中过表达 *MYC* 细胞株组 (MC30-shI3+*MYC*)、IGF2BP3 敲低阴性对照细胞株组 (即 IGF2BP3 敲低+质粒空载体组, MC30-shI3+vector) 以及空载体阴性对照细胞株组 (慢病毒空载体+质粒空载体阴性对照组, 即 MC30-NC+vector)。Western blotting 结果表明, 与 MC30-NC+vector 组相比, MC30-shI3+vector 组 *MYC* 蛋白表达水平下调 ($P < 0.01$); 与 MC30-shI3+vector 相比, MC30-shI3+*MYC* 组 *MYC* 蛋白表达得到恢复 ($P < 0.01$), 见图 4E、4F。



[注] A: 荧光显微镜检测绿色荧光 (ZsGreen) 标记; B: qRT-PCR 检测 *MYC* 的 mRNA 表达水平; C: Western blotting 检测 *MYC* 的蛋白表达水平。**: 与 MC30 组或 MC30-NC 组相比, $P < 0.01$ 。

图 2 构建稳定敲低 IGF2BP3 恶转细胞株 MC30-shI3

Figure 2 Construction of stable IGF2BP3 knockdown MC30-shI3 cell lines



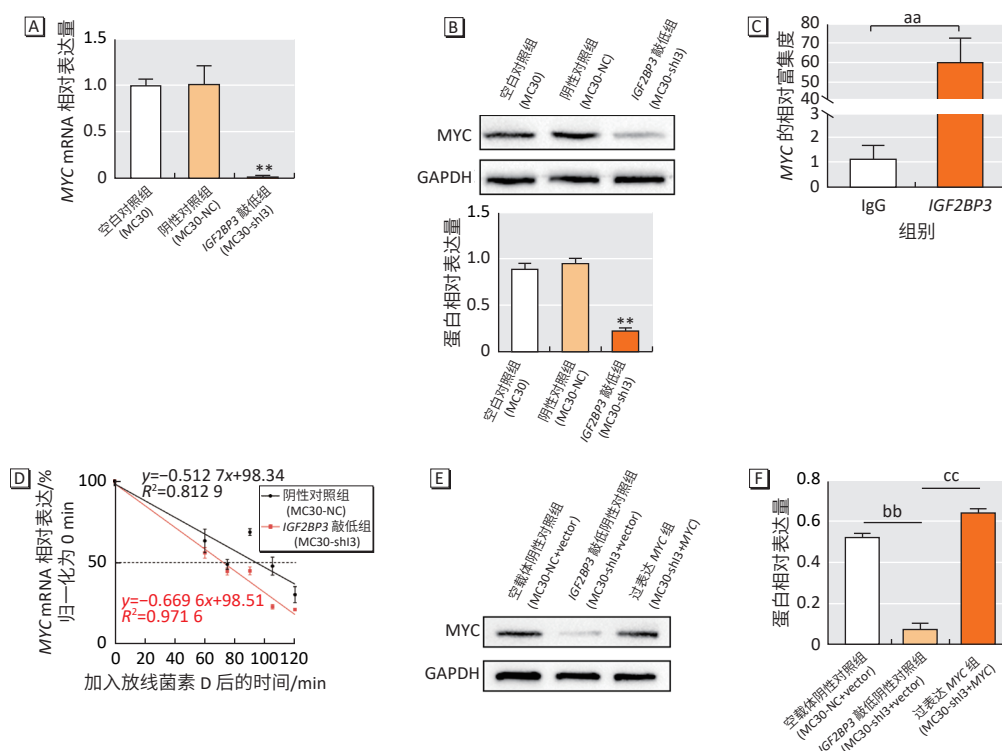
[注] A: 细胞增殖能力; B: 细胞迁移和侵袭能力; C1、C2: 每个视野的迁移、侵袭细胞数; D: EMT 关键蛋白的表达; E: EMT 关键蛋白表达的灰度值。**: 与 MC30-NC 组相比, $P < 0.01$ 。

图 3 IGF2BP3 对恶转细胞增殖、侵袭迁移能力以及 EMT 进程的影响

Figure 3 Effects of IGF2BP3 on proliferation, invasion, and migration abilities and EMT process of malignantly transformed cells MC-30

2.5 过表达 *MYC* 挽救 IGF2BP3 敲低对 MC-30 细胞增殖、迁移、侵袭能力和 EMT 过程的抑制作用

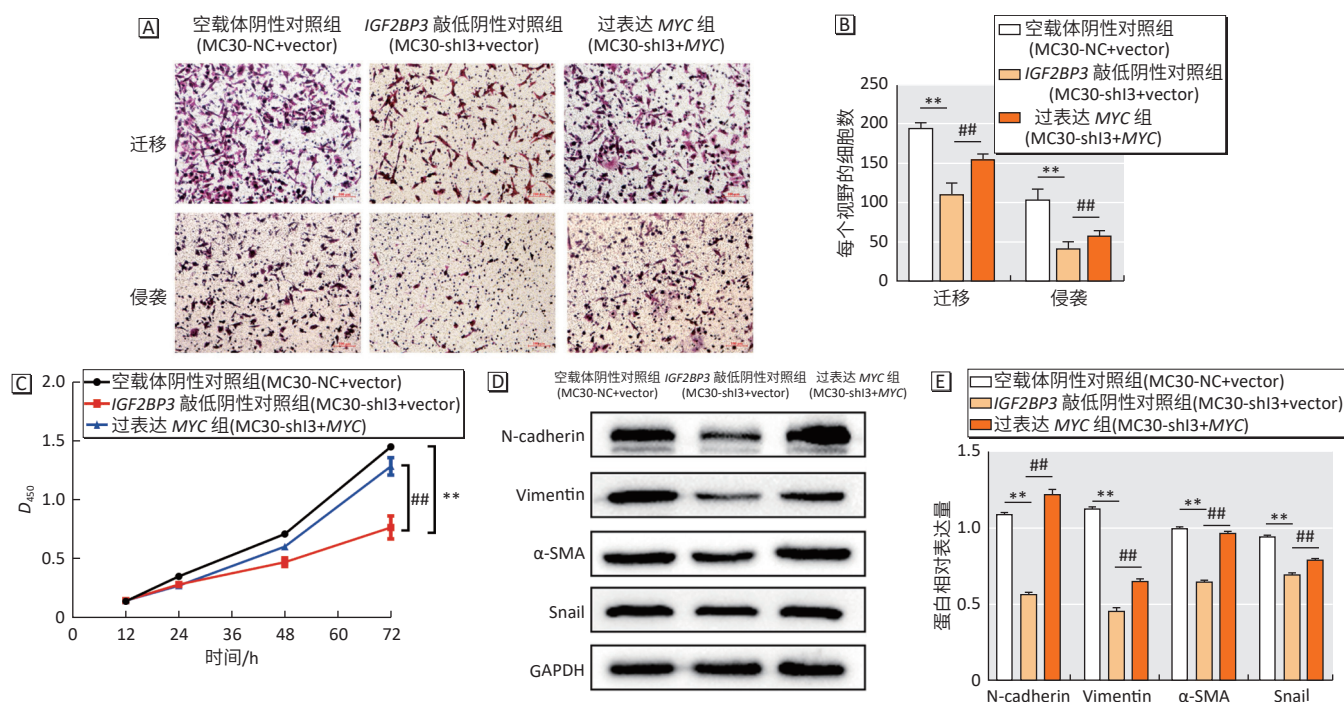
与 MC30-NC+vector 组相比, MC30-shI3+vector 组细胞增殖、侵袭和迁移能力均降低 ($P < 0.01$); 而与 MC30-shI3+vector 相比, MC30-shI3+*MYC* 组细胞增殖、侵袭和迁移能力均提高 ($P < 0.01$), 见图 5A~5C。与 MC30-NC+vector 组相比, MC30-shI3+vector 组 N-cadherin、Vimentin、 α -SMA、Snail 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$); 而与 MC30-shI3+vector 相比, MC30-shI3+*MYC* 组 EMT 关键蛋白的表达水平均有所上升 ($P < 0.01$), 见图 5D、5E。



[注] A: MYC 在稳定敲低 IGF2BP3 恶转细胞株中的 mRNA 表达水平; B: MYC 在稳定敲低 IGF2BP3 恶转细胞株中的蛋白表达水平; C: RIP-qPCR 实验结果; D: 放线菌素 D 实验结果; E、F: EMT 关键蛋白的表达水平。*: 与 MC30 组相比, $P < 0.01$; aa: 与 IgG 相比, $P < 0.01$; bb: 与 MC30-NC+vector 组相比, $P < 0.01$; cc: 与 MC30-shi3+vector 相比, $P < 0.01$ 。

图 4 IGF2BP3 和 MYC 之间的相互作用以及构建过表达 MYC 的细胞株

Figure 4 The interaction between IGF2BP3 and MYC and the construction of MYC over-expressed cells



[注] A、B: 细胞侵袭和迁移能力; C: 细胞增殖能力; D、E: EMT 关键蛋白的表达; **: 与 MC30-NC+vector 组相比, $P < 0.01$; #: 与 MC30-shi3+vector 相比, $P < 0.01$ 。

图 5 过表达 MYC 可挽救 IGF2BP3 敲低对恶转细胞 MC-30 增殖侵袭迁移、EMT 进程的抑制作用

Figure 5 MYC overexpression could reverse the inhibition effects of IGF2BP3 knockdown on proliferation, invasion, and migration abilities and EMT process of malignant transformed cells MC-30

3 讨论

胃黏膜在各种致病因素的作用下会发生一系列的恶性改变,最终导致胃癌的发生,涉及多种基因和信号通路,然而,其发病机制尚不清楚^[17]。MNNG 诱导细胞恶性转化模型为探讨 NOCs 致胃癌的作用机理提供可能^[18]。因此,本研究基于 MNNG 诱导 GES-1 细胞恶性转化模型开展研究,为尽早识别或减缓恶性转化过程提供依据。

MNNG 诱导人胃正常黏膜细胞 GES-1 恶性转化会引起表观遗传的异常改变,导致胃癌的发生^[19]。最新研究表明,暴露于环境毒物会导致 m6A 甲基化水平的异常并改变 m6A 调节因子的表达^[20]。m6A 结合蛋白 IGF2BP3 在胃癌中高表达,可能发挥致癌基因的作用^[21]。在本研究中,我们发现暴露于致癌物 MNNG 可导致 GES-1 细胞中 IGF2BP3 表达的进行性上调,这表明 IGF2BP3 表达的改变不仅在胃癌形成之后,在细胞的恶性转化肿瘤形成之前就已经发生了改变,提示 IGF2BP3 表达的升高可能是暴露于 MNNG 后的早期事件。此外,敲低 IGF2BP3 显著抑制了恶转细胞的增殖、侵袭和迁移,提示 IGF2BP3 可能参与 MNNG 致 GES-1 细胞的恶性转化早期过程,发挥着类似致癌基因的作用。

细胞暴露于环境致癌物会在恶性转化过程中诱导 EMT 过程^[22]。Cai 等^[23]研究表明,CCL2 通过诱导 EMT 进程进而促进 MNNG 预处理 GES-1 细胞和 MC 细胞的迁移。本研究发现,敲低 IGF2BP3 后恶转细胞 EMT 关键蛋白 N-cadherin、Vimentin、 α -SMA、Snail 水平均降低,提示 IGF2BP3 可能通过调控 EMT 进程在环境致癌物诱发胃癌的过程中发挥着重要的作用。

IGF2BP3 在肿瘤细胞中通过 m6A 依赖的方式影响 MYC mRNA 稳定性,并影响 MYC 蛋白表达^[24]。本研究中,RIP-qPCR 证实了恶转细胞中 IGF2BP3 蛋白与 MYC mRNA 的结合作用,同时 MYC mRNA 和蛋白的表达水平随 IGF2BP3 表达水平的降低而降低。放线菌素 D 实验结果提示抑制 IGF2BP3 会降低 MYC mRNA 的稳定性。以上研究结果共同表明,IGF2BP3 通过直接结合 MYC mRNA 影响其稳定性进而影响其 mRNA 和蛋白的表达水平。此外,本研究通过挽救实验,观察到过表达 MYC 能够恢复敲低 IGF2BP3 对 EMT 进程的抑制作用,并且提高恶转细胞的增殖、侵袭迁移的能力,进一步提示 IGF2BP3 主要通过对 MYC 的调控促进 EMT 进程的分子机制。

本研究首次探讨了 IGF2BP3 在化学致癌过程中的

功能和分子机制,揭示了 IGF2BP3 主要通过增强 MYC 稳定性促进 EMT 进程,影响细胞增殖、侵袭和迁移,从而促进 MNNG 对胃上皮细胞恶性转化过程的分子机制。然而,本研究还存在一定不足之处:研究仅通过体外细胞实验探究 IGF2BP3 在人胃上皮细胞恶性转化进程中的作用与机制,有待通过体内动物实验进一步探讨 IGF2BP3 对恶转细胞的致瘤性以及转移能力的影响。

综上所述,IGF2BP3 可识别并结合 MYC,增加 MYC mRNA 的稳定性,进而激活恶转细胞 EMT 进程,从而促进细胞的恶性转化,研究结果为探究环境致癌物 MNNG 诱导胃癌发生的调控机制、早期识别和预防提供新的思路和科学依据。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] MACHLOWSKA J, BAJ J, SITARZ M, et al. Gastric cancer: epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4012.
- [3] LIN CJ, LIAO WC, LIN HJ, et al. Statins attenuate *Helicobacter pylori* CagA translocation and reduce incidence of gastric cancer: *in vitro* and population-based case-control studies[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146432.
- [4] KOBAYASHI J. Effect of diet and gut environment on the gastrointestinal formation of N-nitroso compounds: a review[J]. *Nitric Oxide*, 2018, 73: 66-73.
- [5] WEN JX, TONG YL, MA X, et al. Therapeutic effects and potential mechanism of dehydroevodiamine on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced chronic atrophic gastritis[J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153619.
- [6] LI D, ZHU X, LI Y, et al. Novel insights into the roles of RNA N⁶-methyladenosine modification in regulating gene expression during environmental exposures[J]. *Chemosphere*, 2020, 261: 127757.
- [7] ZACCARA S, RIES RJ, JAFFREY SR. Reading, writing and erasing mRNA methylation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(10): 608-624.
- [8] SHI H, WEI J, HE C. Where, when, and how: context-dependent functions of RNA methylation writers, readers, and erasers[J]. *Mol Cell*, 2019, 74(4): 640-650.
- [9] MANCARELLA C, SCOTLANDI K. IGF2BP3 from physiology to cancer: novel discoveries, unsolved issues, and future perspectives[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 7: 363.
- [10] LEE D, YU EJ, HAM IH, et al. Clinicopathological implication of insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein 3 (IMP3) expression in gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(1): 135-142.
- [11] XU J, SHEN W, PEI B, et al. Xiao Tan He Wei Decoction reverses MNNG-induced precancerous lesions of gastric carcinoma *in vivo* and *in vitro*: regulation of apoptosis through NF- κ B pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 95-102.
- [12] CHENG C, WU Y, XIAO T, et al. METTL3-mediated m⁶A modification of ZBTB4 mRNA is involved in the smoking-induced EMT in cancer of the lung[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 23: 487-500.

- [13] GABAY M, LI Y, FELSHER DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 4(6): a014241.
- [14] CHANG YW, SINGH KP. Arsenic-induced neoplastic transformation involves epithelial-mesenchymal transition and activation of the β -Catenin/*c-Myc* pathway in human kidney epithelial cells[J]. *Chem Res Toxicol*, 2019, 32(6): 1299-1309.
- [15] MEŠKYTĖ EM, KESKAS S, CIRIBILLI Y. MYC as a multifaceted regulator of tumor microenvironment leading to metastasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7710.
- [16] HUANG H, WENG H, SUN W, et al. Recognition of RNA N^6 -methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(3): 285-295.
- [17] CAI D, YU J, QIU J, et al. Dynamic changes of Sonic Hedgehog signaling pathway in gastric mucosa of rats with MNNG-induced gastric precancerous lesions[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 10827-10834.
- [18] WANG Y, CHU F, LIN J, et al. Erianin, the main active ingredient of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl, inhibits precancerous lesions of gastric cancer (PLGC) through suppression of the HRAS-PI3K-AKT signaling pathway as revealed by network pharmacology and in vitro experimental verification[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114399.
- [19] YANG Q, XU E, DAI J, et al. miR-21 regulates *N*-methyl-*N*-nitro-*N'*-nitrosoguanidine-induced gastric tumorigenesis by targeting *FASLG* and *BTG2*[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 228(3): 147-156.
- [20] CAYIR A, BARROW TM, GUO L, et al. Exposure to environmental toxicants reduces global N^6 -methyladenosine RNA methylation and alters expression of RNA methylation modulator genes[J]. *Environ Res*, 2019, 175: 228-234.
- [21] ZHOU Y, HUANG T, SIU HL, et al. *IGF2BP3* functions as a potential oncogene and is a crucial target of miR-34a in gastric carcinogenesis[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 77.
- [22] WANG Z, ZHAO Y, SMITH E, et al. Reversal and prevention of arsenic-induced human bronchial epithelial cell malignant transformation by microRNA-200b[J]. *Toxicol Sci*, 2011, 121(1): 110-122.
- [23] CAI J, WANG M, ZHU M, et al. *N*-methyl-*N*-nitro-*N'*-nitrosoguanidine induces the expression of CCR2 in human gastric epithelial cells promoting CCL2-mediated migration[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2): 1083-1090.
- [24] PALANICHAMY JK, TRAN TM, HOWARD JM, et al. RNA-binding protein *IGF2BP3* targeting of oncogenic transcripts promotes hematopoietic progenitor proliferation[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1495-1511.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 顾心怡, 陈姣)

· 告知栏 ·

《环境与职业医学》稿件相关要求与投稿方式

长摘要

《环境与职业医学》对原创研究性论文的摘要(中英文)有特别要求: 中文摘要字数不少于 700 字。摘要分背景、目的、方法、结果、结论五部分; 背景部分写明主要研究背景信息, 应简洁而明确, 原则不超过 50 字; 重点描述方法与结果。英文摘要需提供与中文摘要对应的信息。

投稿方式

《环境与职业医学》唯一投稿方式为在线投稿。请登录杂志主页 www.jeom.org, 注册后投稿(注册账户永久有效, 不必重复注册)。一旦发现一稿两投、造假、抄袭等学术不端行为, 《环境与职业医学》将立即退稿或在杂志上刊登撤销该论文的声明, 并在一定范围内通报, 3 年内拒收该作者来稿。

投稿时需提交的材料包括投稿文书、基金证明文件及伦理审批件。各文件需在投稿后 7 日内提交, 文件齐备后方进行稿件后续处理。自投稿之日起 30 日内未提交材料之稿件, 将作退稿处理。文件提交方式: ①将所有文件制作为 1 个压缩文件。各文件按照“1.投稿文书; 2.基金证明件-基金名称; 3.伦理审批件”方式命名。②登录编辑系统, 进入稿件信息页面后, 点击“详细信息”, 于“版权协议”处上传。③如文件体积过大, 请自行压缩。

编辑部将于收稿后 1 周内发出回执。作者在收到回执后, 可按稿件编号登录投稿系统查询稿件处理进展。

《环境与职业医学》编辑部

2022 年 10 月 25 日