XXXX DOI:

TOM1L1通过上调Nrf2/TET3/SHP2/ERK1/2信号通路诱导MMPs过表达从而促进CRC侵袭转移的机制研究

胡晓峰[1],刘 斌[1],王一飞[1],王 峰[1],聂双发[1],武雪亮[2]
(1.河北北方学院附属第一医院普外二科,张家口 075000;2.河北北方学院附属第一医院普外一科,张家口 075000)

【摘 要】目的:探讨TOM1样蛋白1(target of myb 1 like protein 1,TOM1L1)通过上调核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)/十-十一易位甲基胞嘧啶双加氧酶3(ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 3,TET3)/含Src同源2结构域蛋白酪氨酸磷酸酶2(Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2,SHP2)/细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2,ERK1/2)信号通路促进基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)的表达,进而促进结直肠癌(colorectal cancer,CRC)侵袭转移的机制。**方法:**通过生物信息学分析发现TOM1L1在CRC组织中显著高表达,并构建小鼠模型进行免疫组化染色。采用蛋白质印迹法(Western blot)、免疫共沉淀(co-immunoprecipitation,Co-IP)和实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction,qPCR)检测信号通路关键蛋白及MMPs的表达水平。通过划痕实验和Transwell实验分析细胞迁移和侵袭能力,并采用抑制剂(PHPS1、SCH772984)阻断SHP2和ERK1/2活性以验证反馈调控机制。**结果:**研究显示,TOM1L1过表达显著上调MMP2/MMP9表达水平,并与磷酸化SHP2(phosphorylated SHP2,p-SHP2)、磷酸化ERK1/2(phosphorylated ERK1/2,p-ERK1/2)形成正反馈循环。此外,抑制p-SHP2和ERK1/2的活性可降低TOM1L1表达,表明三者间存在相互促进关系。实验验证了TOM1L1通过该信号通路正反馈机制加速CRC的侵袭和转移。**结论:**本研究揭示了TOM1L1通过多重信号通路的正反馈机制,显著促进了CRC的侵袭和转移,提示TOM1L1可能成为潜在的治疗靶点。这一发现为CRC的早期诊断和治疗提供了新视角和新策略。

【关键词】TOM1样蛋白1;酪氨酸蛋白激酶Fyn;核因子E2相关因子2/tet甲基胞嘧啶双加氧酶3;表皮生长因子;结直肠癌
【中图分类号】R735.34 **【文献标志码】**A

Mechanism of TOM1L1 inducing overexpression of MMPs through up-regulation of the Nrf2/TET3/SHP2/ERK1/2 signaling pathway to promote CRC invasion and metastasis

Hu Xiaofeng[1], Liu Bin[1], Wang Yifei[1], Wang Feng[1], Nie Shuangfa[1], Wu Xueliang[2]
(*1.The Second Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Hebei North University;*
2.The First Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Hebei North University)

【Abstract】*Objective*: This study aims to investigate the mechanism by which TOM1L1 promotes the expression of matrix metalloproteinases(MMPs) through the upregulation of the Nrf2/TET3/SHP2/ERK1/2 signaling pathway, thereby facilitating the invasion and metastasis of colorectal cancer (CRC). ***Methods*:** Through bioinformatics analysis, it was found that TOM1L1 was significantly highly expressed in CRC tissues, and a mouse model was constructed for immunohistochemical staining experiments. Western blot, co-immunoprecipitation(Co-IP) experiments, and q-PCR experiments were used to detect the expression levels of key proteins in the signaling pathway and MMPs. The cell migration and invasion abilities were analyzed by scratch test and Transwell assay, and inhibitors (PHPS1, SCH772984) were used to block the activities of SHP2 and ERK1/2 to verify the feedback regulation mechanism. ***Results*:** The results demonstrated that TOM1L1 overexpression significantly upregulated the expression levels of MMP2/MMP9 and formed a positive feedback loop with p-SHP2 and p-ERK1/2. Additionally, inhibition of p-SHP2 and ERK1/2 activity led to reduced TOM1L1 expression, indicating a mutually reinforcing relationship among the three. The experiments confirmed that TOM1L1 accelerates CRC invasion and metastasis through this positive feedback mechanism of the signaling pathway. ***Conclusion*:** This study reveals that TOM1L1 significantly promotes CRC invasion and metastasis through a multi-signaling pathway positive feedback mechanism, suggesting that TOM1L1 may serve as a potential therapeutic target. This discovery provides new perspectives and strategies for the early diagnosis and treatment of CRC.

【Key words】TOM1L1;FYN;Nrf2/TET3;EGF;CRC

作者介绍:胡晓峰,Email:huxiaofeng_20@yeah.net,
研究方向:结直肠癌。
通信作者:(请补充姓名和Email)

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(编号:H2022405033)

恶性肿瘤仍是全球主要死因之一[1]。监测数据显示，2022年中国新发结直肠癌51.71万例，占全部恶性肿瘤发病的10.7%。结直肠癌死亡24万例，占全部恶性肿瘤死亡的9.3%。全国结直肠癌发病率和死亡率分别为36.63/10万和17.00/10万，总体呈上升趋势[2]。近年来我国结直肠癌患者5年生存率虽有所提高，但仍处于较低水平，若早期发现、早期治疗，可显著提高5年生存率[3]。中国已成为世界上结直肠癌发病率最高的国家之一，且发病呈年轻化趋势。

细胞膜表面受体介导的信号转导是调控肿瘤发生发展的重要途径。该系统中包含多种关键受体家族，如酪氨酸激酶受体（receptor tyrosine kinases，RTKs）、G蛋白偶联受体（G protein-coupled receptors，GPCRs）及Toll样受体（Toll like receptors，TLRs）等。近年研究发现，Src激酶及其信号伴侣TOM1样蛋白1（target of myb1-like protein 1，TOM1L1）可通过调控多维度细胞信号网络参与肿瘤进程。值得注意的是，TOM1L1在肿瘤演进中表现出显著的功能异质性：其在维持正常组织稳态时具有肿瘤抑制作用，但在特定肿瘤微环境中却呈现促癌特性。在皮肤肿瘤和食管鳞状细胞癌中，TOM1L1表达显著下调。基础研究显示，在正常食管黏膜组织中，TOM1L1通过负向调控表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）信号通路发挥肿瘤抑制作用[4-5]。与此形成鲜明对比的是，乳腺癌临床样本分析显示TOM1L1基因定位于17q22（乳腺癌骨转移相关基因簇区域），且与禽成红细胞增多症病毒癌基因同源物2（erythroblastic oncogene B，homolog 2，ERBB2）基因扩增显著相关[6]。机制研究表明，TOM1L1可通过促进膜型基质金属蛋白酶（membrane-type matrix，MT1-MMP）的膜定位，协同增强ERBB2介导的乳腺癌细胞侵袭能力[7]。值得注意的是，在结直肠癌（colorectal cancer，CRC）研究领域，TOM1L1的生物学功能仍存在诸多未知。尽管有报道提示其可能通过与FYN激酶相互作用正向调控EGFR活性[8]，但关于该分子在结直肠癌恶性表型形成中的具体作用机制，特别是其在不同肿瘤微环境中的功能转换机制，仍有待系统阐明。这种功能可塑性提示，针对TOM1L1的靶向治疗策略需要充分考虑肿瘤类型特异性及微环境调控网络的复杂性。

原癌基因酪氨酸蛋白激酶（proto-oncogene tyrosine-protein kinase FYN，FYN）是酪氨酸激酶Src家族的一员，参与多种细胞表面受体介导的胞内信号级联反应。FYN包含质膜结合所需的N末端区域，2个Src同源（Src homology，SH）结构域（SH2和SH3）参与蛋白质相互作用，以及高度保守的催化结构域，包括三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）结合位点和具有负调节性酪氨酸磷酸化的C末端尾部[9]。多项研究已揭示，Src家族成员异常激活与乳腺癌、肺癌等多种癌症的发生发展相关，其中Fyn在肿瘤进展中尤为关键，但其机制尚不明确[10-11]。FYN在Tyr568位点磷酸化核因子E2相关因子2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2），导致其核输出、与Nrf2的结合以及降解。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系与实验动物 CRC细胞系SW480购自武汉普诺赛生命科技有限公司，5周龄BALB/c裸鼠购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司，适应性饲养1周后用于后续实验。

1.1.2 主要试剂与抗体 磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline，PBS），表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF），异氟醚，CO_2安乐死笼盒，4%多聚甲醛，乙醇，TOM1L1抗体，基质金属蛋白酶2抗体（matrix metalloproteinase 2 antibody，MMP2）和基质金属蛋白酶9抗体（matrix metalloproteinase 9 antibody，MMP9），EGF、磷酸化含Src同源2结构域蛋白酪氨酸磷酸酶2（phosphorylated Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2，p-SHP2）抑制剂PHPS1和ERK1/2抑制剂SCH772984（美国，Selleck公司），放射免疫沉淀测定（radioimmunoprecipitation assay，RIPA）裂解液，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE），一抗为：TOM1L1、MMP2、MMP9、Nrf2、十-十一易位甲基胞嘧啶双加氧酶3（ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 3，TET3）、缺氧诱导因子1α（hypoxia-inducible factor 1α，HIF1α）、总SHP2（total SHP2，t-SHP2）、p-SHP2、磷酸化ERK1/2（phosphorylated ERK1/2，p-ERK1/2）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）（美国，Abcam公司），Tris-吐温缓冲液（Tris-buffered saline with Tween，TBST），增强化学发光（enhanced chemiluminescence，ECL）显色液，逆转录聚合酶链式反应（reverse transcription - polymerase chain reaction，RT-PCR）试剂盒，Transwell小室，基质胶（美国，Corning Discovery公司）等。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析 整合结直肠癌数据集GSE89076（29例肿瘤组织vs. 41例正常组织）和GSE110224（17例肿瘤组织vs.17例正常组织）。数据经背景校正、归一化及批次校正后，采用limma包进行差异表达分析（筛选标准：$|\log_2 FC| > 2$且$P < 0.05$），筛选肿瘤与正常组织间的差异表达基因。通过VennDiagram筛选跨数据集共有的差异基因，为后续机制解析奠定基础。基于基因本体论（Gene Ontology，GO）（涵盖

生物过程、细胞组分、分子功能）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路富集分析，系统阐明差异基因的生物学功能及肿瘤相关机制。进一步利用TCGA-COADREAD数据，通过survival包对关键基因TOM1L1、Nrf2（NFE2L2）、TET3和含Src同源2结构域蛋白酪氨酸磷酸酶2（Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2，SHP2）（PTPN11）进行比例风险假设检验及生存回归分析。最后通过Pearson相关分析构建关键因子SHP2（PTPN11）、Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物（Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog，KRAS）、细胞外信号调节激酶1（ERK1/MAPK3）、FYN及Nrf2（NFE2L2）的相互作用网络，揭示其在肿瘤发生发展中的协同作用，为实验验证提供理论依据。

1.2.2 构建小鼠皮下移植瘤模型 为构建稳定感染的SW480细胞，将靶向TOM1L1的干扰慢病毒、空载慢病毒分别导入SW480细胞感染，获得TOM1L1敲低细胞系SW480TOM1L1-KD、TOM1L1过表达细胞系SW480TOM1L1-OE，以及对照细胞系SW480TOM1L1-NC。细胞构建完成后，收集对数生长期的细胞，将其制备成细胞悬液，调整浓度至每200 μL PBS含2×10^6个细胞。随即，将细胞悬液分别注射到裸鼠右侧腋窝中部背侧皮下，每组随机分配6只裸鼠，以保证实验的随机性和可靠性。实验小鼠共分为5组，分组及处理如下：NC组（①）：以空载慢病毒转染SW480细胞，作为基础对照组；NC+EGF组（②）：在NC组处理的基础上，添加80 ng/mL的EGF刺激12 h，观察EGF对细胞的影响；TOM1L1-KD组（③）：采用TOM1L1-KD慢病毒转染SW480细胞，用于研究TOM1L1基因敲低后的细胞变化；TOM1L1-KD+EGF组（④）：重复NC+EGF组（②）处理，保证实验数据的准确性和可重复性；TOM1L1-OE组（⑤）：利用TOM1L1-OE慢病毒转染SW480细胞，观察TOM1L1基因过表达时的实验结果。接种7 d后，所有裸鼠的接种部位均可见肿瘤形成，造模成功率达到100%。约4周后，当皮下肿瘤的长径达1~1.5 cm时，行磁共振成像（magnetic resonance imaging，MRI）扫描，获取肿瘤的影像学数据。从造模成功后的第3天起，分别在第7、14和21天，使用游标卡尺测量肿瘤长径（a）和短径（b），并依据公式“肿瘤体积=$(a\times b^2)/2$”计算肿瘤体积。实验第21天，用3%异氟醚诱导麻醉，待其完全麻醉后，调整异氟醚浓度至1.5%维持麻醉状态，随后通过高浓度CO_2实施安乐死。最后，剥离肿瘤并称重（W），为后续实验分析提供数据支持。

1.2.3 免疫组化 取剥离的肿瘤组织，置于4%多聚甲醛溶液中固定。完成固定后，依次进行乙醇脱水、石蜡包埋以及切片。切片经内源性过氧化物酶阻断剂处理以抑制其活性，随后进行抗原修复与组织封闭。接着，滴加TOM1L1抗体、MMP2抗体以及MMP9抗体，于恒温孵育箱中孵育过夜。次日，加入对应二抗继续孵育2 h。孵育结束，滴加二氨基联苯胺显色液（diaminobenzidine chromogenic solution，DAB），显色完成后再用苏木素复染。最后，在200倍显微镜下仔细观察肿瘤组织的染色情况，使用Image Pro-Plus 6.0软件分析TOM1L1、MMP2和MMP9蛋白的相对表达水平。

1.2.4 细胞感染 SW480细胞用杜尔贝科改良伊格尔（Dulbecco′s modified eagle′s medium，DMEM）培养基培养，置于含有1%O_2湿润培养箱内。转染前将5×10^4个细胞接种于24孔板，孵育24 h后，以慢病毒传导细胞。将细胞分为5组：NC组，TOM1L1-NC慢病毒传导SW480细胞；NC+EGF组，在NC组基础上加EGF（80 ng/mL）刺激12 h；TOM1L1-OE+EGF组，TOM1L1-OE慢病毒传导SW480细胞并施加EGF刺激（80 ng/mL）；TOM1L1-OE+EGF+p-SHP2抑制剂组，在TOM1L1-OE+EGF组基础上加p-SHP2抑制剂PHPS1（10 μmol/L）；TOM1L1-OE+EGF+ERK1/2抑制剂组，在TOM1L1-OE+EGF组基础上加ERK1/2抑制剂SCH772984（4 μmol/L）。为验证Nrf2/TET3/SHP2正向调控关系，将细胞分为4组：NC组，Nrf2-OE组，Nrf2-OE慢病毒传导SW480细胞；Nrf2-OE+PX-478组，Nrf2-OE慢病毒传导SW480细胞基础上加HIF1α抑制剂PX-478（10 μmol/L）；Nrf2-OE+PX-478+TET3-OE组，在Nrf2-OE+PX-478组基础上加入TET3-OE慢病毒转导。

1.2.5 Western blot检测 收集SW480细胞，采用RIPA裂解液裂解。裂解完成后，冰上孵育30 min，接着将其置于4 ℃的环境中，12 000 r/min离心10 min，收集离心后的上清液。采用二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）蛋白定量法测定蛋白浓度，依据测定结果，以每孔20 μg的蛋白量进行样品加载。完成加载后，开展SDS-PAGE电泳实验，随后转膜、封闭。封闭后，加入TOM1L1、FYN、SHP2、MMP2、MMP9、Nrf2、TET3、核HIF1α、t-SHP2、p-SHP2、p-ERK1/2、GAPDH等抗体，将其放置在4℃的环境中孵育过夜。次日，用TBST缓冲液对其洗涤3次，之后加入辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的抗兔二抗。最后，滴加ECL显色液到聚偏二氟乙烯（polyvinylidene difluoride，PVDF）膜上，用全自动化学发光分析仪扫描，借助Tanon GIS软件分析条带灰度值。

1.2.6 实时荧光定量聚合酶链反应（real-time quantitative polymerase chain reaction，qPCR） 收集SW480细胞，用Trizol法提取总核糖核酸（ribonucleic acid，RNA）。按照RT-PCR试剂盒说明书，将提取的总RNA反转录为互补脱氧核糖核酸（complementary deoxyribonucleic acid，cDNA）。以cDNA作为模板，严格依照RT-PCR试剂盒说明书中的方法进行聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）扩增。反应体系总体积设定为50 μL。95 ℃预变性3 min后进入循环，循环条件为95 ℃变性15 s、64 ℃退火15 s、72 ℃延伸1 min，重复35次。循环结束后，72 ℃再延伸5 min，产物于16 ℃长期保存。实验过程中，以β-actin作为内参，采用相对定量法来计算各待测指标的mRNA相对表达量。PCR引物序列：MMP2 Forward Primer：5′-GACCGCGACAAGAAGTATGG-3′；MMP2 Reverse Primer：5′-GTTGCCCAGGAAAGTGAAGG-3′；MMP9 Forward Primer：5′-GTTAGCCAGAAGCTGCGGT-3′；MMP9 Reverse Primer：5′-CGACTTTTGTGGTCTTCCCC-3′

1.2.7 划痕实验 为探究SW480细胞体外的迁移特性，采用细胞划痕实验。在完成对SW480细胞转染后，将1×10^5个细胞接种于6孔板。待细胞生长融合形成致密的单层细胞后，用移液器吸头垂直于细胞层均匀刮擦，从而制造出划痕

区域。随后，使用磷酸盐缓冲液轻柔地冲洗细胞，以去除刮擦产生的细胞碎片和杂质。完成冲洗后，将细胞继续置于适宜的培养环境中孵育24 h。分别于孵育0 h及24 h后，借助显微镜对划痕区域进行观察和拍照记录，用ImageJ图像分析软件对所获取的图像进行处理，计算出划痕愈合率，评估SW480细胞迁移能力。

1.2.8 Transwell 首先，在37 ℃的恒温条件下，取30 μg Matrigel均匀地涂抹于Transwell腔室膜表面，静置30 min，通过这一过程构建起重建的基底膜结构。完成基底膜的构建后，将1×10^{5}个SW480细胞接种到Transwell小室上室。之后，把整个装置放置在培养箱内孵育48 h，让细胞有足够的时间进行迁移活动。孵育期结束后，取出小室，加入4%甲醛溶液固定30 min，使细胞形态和位置得以固定。固定完成后，采用结晶紫对细胞染色15 min，以便更清晰地观察细胞。染色结束后，用湿棉签将Transwell膜上室侧，未发生侵袭的细胞去除，仅保留穿膜细胞。最后，将处理好的样本放置在200倍放大倍数的显微镜下，计数侵袭细胞，量化细胞侵袭能力。

1.2.9 免疫共沉淀 将预处理的细胞裂解提取蛋白，离心后取上清，加入40 μL的ProteinA+G琼脂糖珠，4 ℃旋转摇床上预清除2 h，相同条件下1 000 r/min离心5 min之后取上清测定蛋白浓度，每1 mg蛋白相对应加入1 μg抗体。取30 μL上清用作Input，分别吸取至少500 μg的上清加入目的蛋白抗体和相同物种来源的IgG，放置旋转摇床上4 ℃孵育过夜。第2天，向抗体上清混合液中加入40 μL的ProteinA+G琼脂糖珠，放置旋转摇床上4 ℃孵育6 h，取出EP管，4 ℃、1 000 r/min离心5 min，弃上清，用500 μL NP-40裂解液清洗3次。加入50 μL蛋白上样缓冲液混匀，金属浴95 ℃加热8 min，随后进行蛋白免疫印迹实验。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 7.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，两组间比较采用独立样本t检验，多组间比较采用单因素方差分析；不符合正态分布的计量资料以中位数（四分位间距）[Md(P_{25}, P_{75})]表示，两组间比较采用Mann-Whitney U检验，多组间比较采用Kruskal-Wallis H检验。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 生物信息学分析

本研究的生物信息学分析，系统筛选CRC中的核心致病基因与信号通路，为后续实验验证提供理论依据。关键致癌基因筛选与预后价值（图1A~C）：对GSE89076和GSE110224两个CRC数据集进行联合分析，肿瘤组织与正常组织/癌旁组织中一致性差异表达的基因（differentially expressed genes，DEGs）。其中，TOM1L1、Nrf2（NFE2L2）、TET3及SHP2（PTPN11）4个基因在CRC组织中均显著上调。癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas，TCGA）生存分析显示，这4个基因的高表达均与CRC患者总生存期缩短呈显著相关（HR均>1.46），提示它们不仅是潜在的致癌驱动因子，也是不良预后的生物标志物。功能与通路富集揭示促癌机制（图1D~F）：GO富集分析显示，DEGs显著富集于细胞膜组分、细胞因子活性及对外界刺激的反应等功能，提示这些基因参与肿瘤微环境重塑和细胞恶性行为调控。KEGG通路分析显示，DEGs共同富集于“丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）信号通路”、“细胞因子-细胞因子受体相互作用”等已知的促癌通路，提示这些基因可能通过激活MAPK等通路驱动CRC进展。核心信号轴互作网络预测（图1G~I）：相关性分析显示，SHP2（PTPN11）与Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物（Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog，KRAS）的表达呈正相关，而KRAS又与ERK1（MAPK3）呈正相关，验证了经典的“SHP2-RAS-ERK”致癌信号轴；首次解释可写为大鼠肉瘤病毒癌基因同源物（rat sarcoma viral oncogene homolog，RAS）、细胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase，ERK）”致癌信号轴在本研究队列中的存在。FYN与Nrf2（NFE2L2）的表达也呈正相关，为后续验证“TOM1L1-FYN-Nrf2”调控关系提供了依据。

结合STRING数据库的蛋白互作网络预测，本研究提出了1条新的潜在信号轴：“TOM1L1→FYN→Nrf2/TET3→SHP2”，作为后续功能实验验证的核心假说。表观遗传机制提示：基因集富集分析（gene set enrichment analysis，GSEA）发现，在TOM1L1高表达样本中，“DNA去甲基化”通路显著激活。该功能与TET3蛋白的核心作用高度吻合，提示TET3可能通过去甲基化激活下游基因（如SHP2）的转录，为阐明其表观遗传调控机制提供了重要方向。见图1。

2.2 EGFR与TOM1L1通过上调MMP2/MMP9表达促进CRC发展

与NC组相比，NC+EGF组移植瘤体积和重量明显增加（P<0.001），在NC+EGF组基础上敲低TOM1L1后，移植瘤体积和重量明显小于NC+EGF组/NC组（P<0.001）；NC+EGF组基础上使TOM1L1过表达，移植瘤体积和重量明显大于NC组（P<0.001）（图2A）。免疫组化与Western blot结果显示，TOM1L1表达与MMP2/MMP9染色强度及蛋白水平呈正相关，TOM1L1过表达的肿瘤细胞中，MMP2/MMP9表达量显著上调（P<0.001）；见图2B、C。

2.3 TOM1L1与p-SHP2、p-ERK1/2形成正反馈循环促进MMP2/MMP9表达

与NC组相比，NC+EGF组TOM1L1表达量显著升高（P<0.05），表明EGF可促进TOM1L1表达；与NC+EGF组相比，TOM1L1-OE+EGF组TOM1L1（P=0.029）、Nrf2（P=0.035）、TET3（P<0.001）、p-SHP2（P=0.002）和p-ERK1/2（P=0.005）表达显著升高（均P<0.05），TOM1L1促进Nrf2、TET3、p-SHP2和p-ERK1/2表达；为进一步探究TOM1L1调控Nrf2、TET3及p-SHP2的机制，在TOM1L1-OE+EGF组基础上加入p-SHP2抑制剂PHPS1，结果显示TOM1L1（P<0.001）、TET3（P=0.006）、p-SHP2（P<0.001）和p-ERK1/2（P=0.002）表达明显低于NC+EGF组（P<0.01）和TOM1L1-OE+EGF组（P<0.01），Nrf2表达量与NC+EGF组差异无统计学意义（P=0.999）；在TOM1L1-OE+EGF组基础上加入ERK1/2抑制剂SCH772984，结果显示TOM1L1（P=0.028）、TET3（P=0.004）、p-SHP2（P<0.001）和p-ERK1/2表达量低于NC+EGF组（均

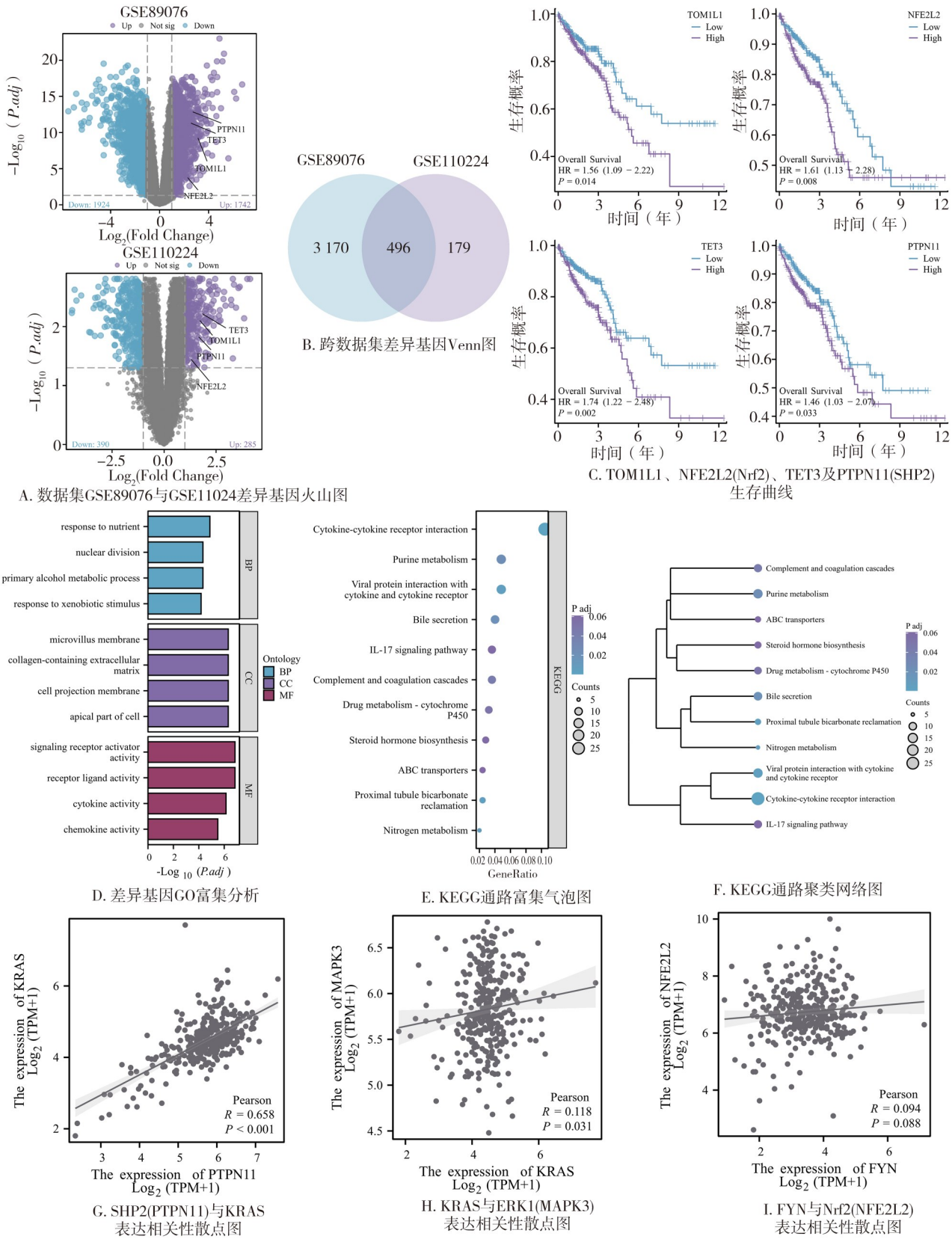
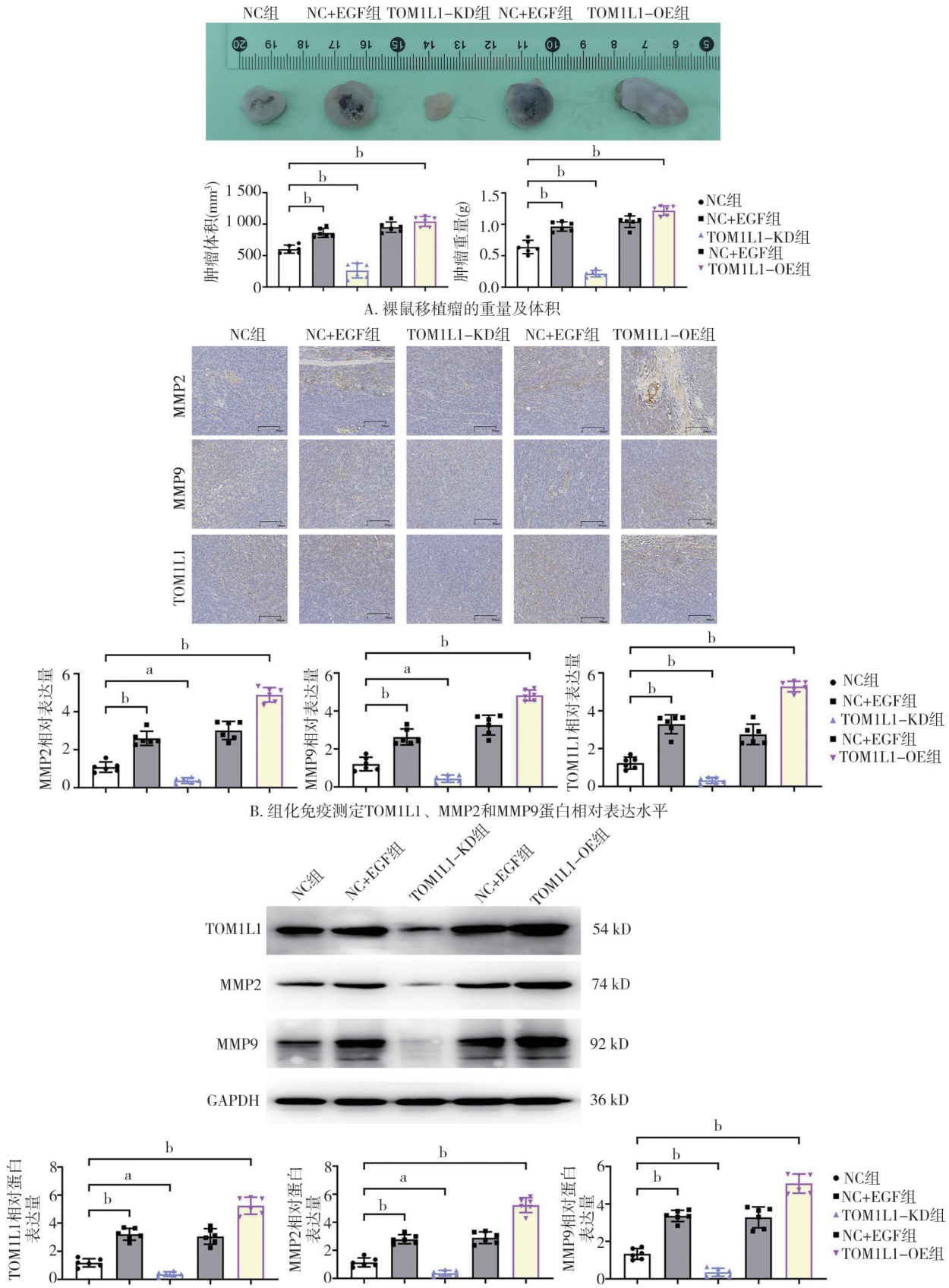


图1 生物信息学分析

P<0.05），Nrf2表达量与NC+EGF组相比差异无统计学意义（P=0.997），但明显低于TOM1L1-OE+EGF组（P=0.001）。p-SHP2与p-ERK1/2被抑制，TOM1L1表达也随之降低，结合TOM1L1对SHP2和ERK1/2的促进作用，提示TOM1L1与p-SHP2、p-ERK1/2存在正反馈调控关系；见图3A。

qPCR检测MMP2/MMP9表达水平，NC+EGF组MMP2/



A. 裸鼠移植瘤的重量及体积

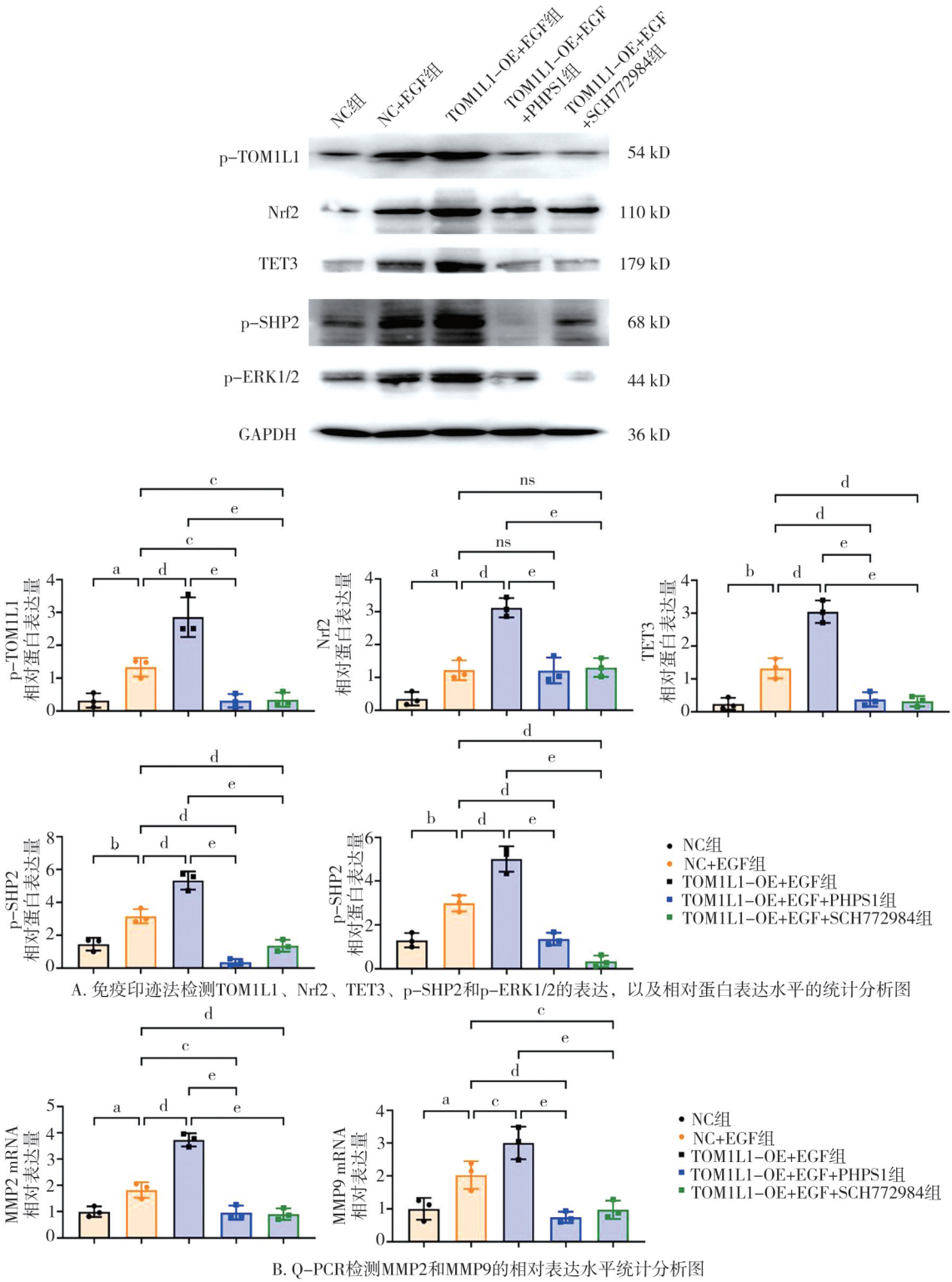
B. 组化免疫测定TOM1L1、MMP2和MMP9蛋白相对表达水平

C. Western blot实验分析TOM1L1、MMP2、MMP9、GAPDH的蛋白条带，以及相对蛋白表达水平的统计分析图

注：a，与NC组相比，$P<0.05$；b，与NC组相比，$P<0.01$

图2 EGFR与TOM1L1通过促进MMP2/MMP9的表达促进CRC的发展

MMP9表达水平明显高于NC组（P=0.015，P=0.036），TOM1L1-OE+EGF组MMP2/MMP9表达水平又明显高于NC+EGF组（P<0.01，P<0.05），EGFR与TOM1L1可促进MMP2/MMP9表达；TOM1L1-OE+EGF+p-SHP2抑制剂组和TOM1L1-OE+EGF+ERK1/2抑制剂组MMP2/MMP9表达水平与NC组相比差异无统计学意义（P>0.05），与NC+EGF组和TOM1L1-OE+EGF组相比显著降低（P<0.05），表明p-SHP2和ERK1/2对MMP2/MMP9表达起正反馈调节作用；见图3B。



A. 免疫印迹法检测TOM1L1、Nrf2、TET3、p-SHP2和p-ERK1/2的表达，以及相对蛋白表达水平的统计分析图

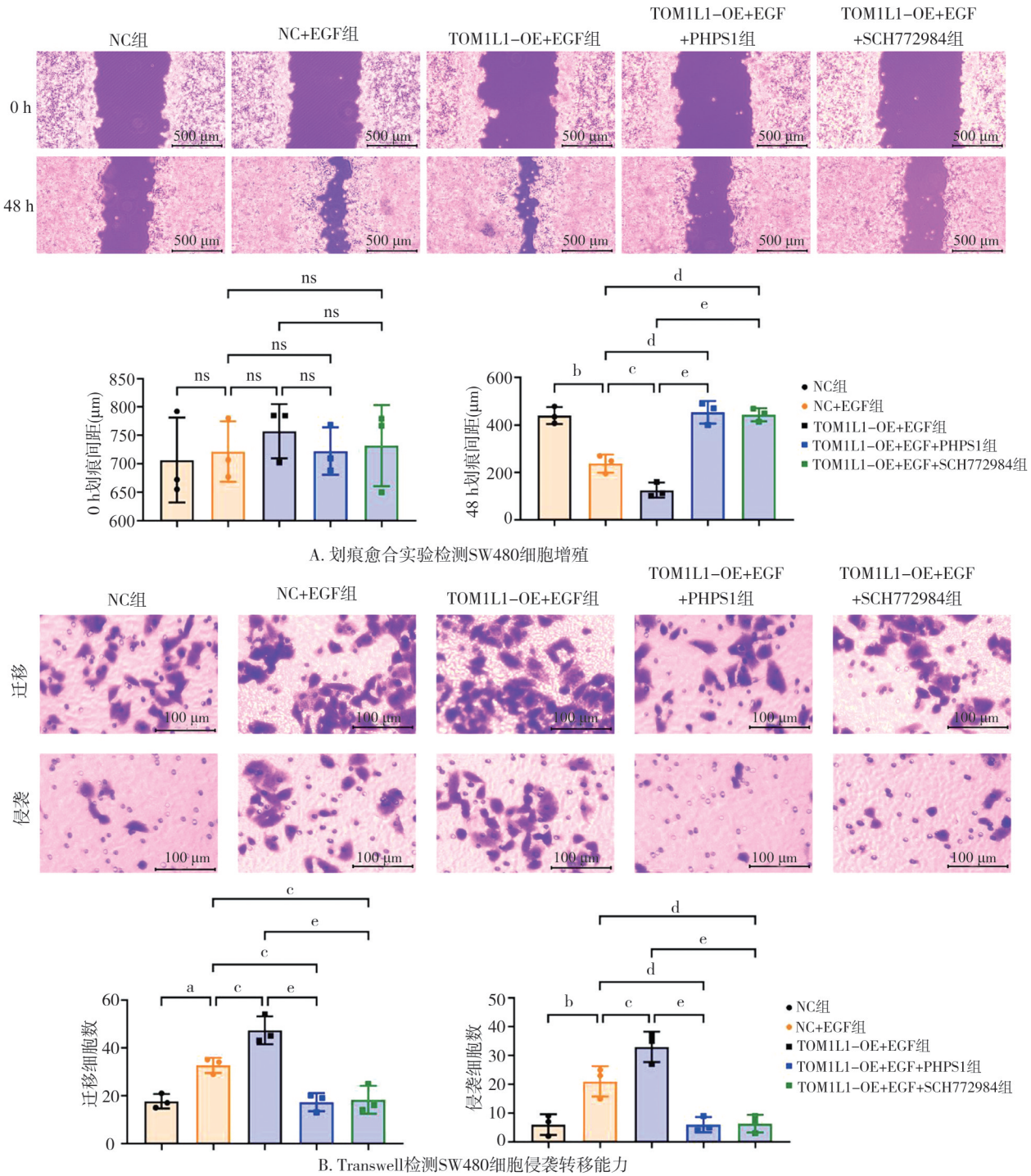
B. Q-PCR检测MMP2和MMP9的相对表达水平统计分析图

注：a，与NC组相比，P<0.05；b，与NC组相比，P<0.01；c，与NC+EGF组相比，P<0.05；d，与NC+EGF组相比，P<0.01；ns，与NC+EGF组相比，P>0.05；e，与TOM1L1-OE+EGF组相比，P<0.01

图3　TOM1L1与p-SHP2、p-ERK1/2为正循环反馈促进MMP2/MMP9表达

2.4 TOM1L1及SHP2/ERK1/2信号促进CRC细胞迁移和侵袭

与NC组相比，NC+EGF组细胞迁移能力显著增强（P=0.008），侵袭细胞数量明显增加（P=0.015）；相较于NC+EGF组，TOM1L1-OE+EGF组划痕宽度明显降低（P=0.024），迁移和侵袭细胞数明显增加（P=0.0177，P=0.033），TOM1L1与EGFR可促进肿瘤细胞增殖和侵袭转移。TOM1L1-OE+EGF+p-SHP2抑制剂组和TOM1L1-OE+EGF+ERK1/2抑制剂组划痕宽度与侵袭转移的肿瘤细胞与NC组相比差异无统计学意义（均P>0.05），划痕宽度明显高于NC+EGF组（P=0.002），侵袭转移的肿瘤细胞明显低于NC+EGF组（P=0.013，P=0.007），p-SHP2和ERK1/2也可促进肿瘤细胞增殖和侵袭转移；见图4。



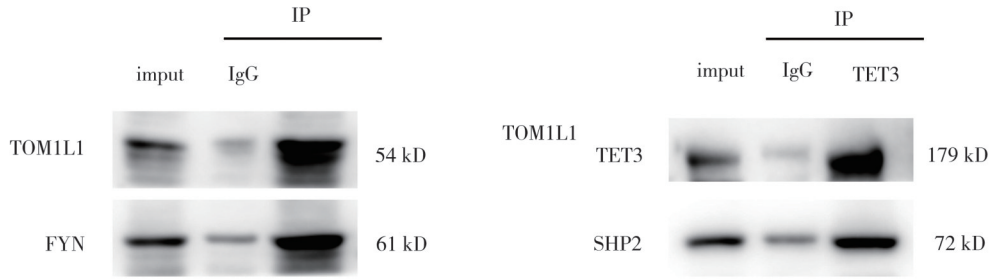
注：a，与NC组比较，P<0.05；b，与NC组比较，P<0.01；c，与NC+EGF组比较，P<0.05；d，与NC+EGF组比较，P<0.01；e，与TOM1L1-OE+EGF组比较，P<0.01；ns，与NC+EGF组比较，P>0.05

图4 TOM1L1、EGFR、p-SHP2和ERK1/2对肿瘤细胞增殖和侵袭转移有促进作用

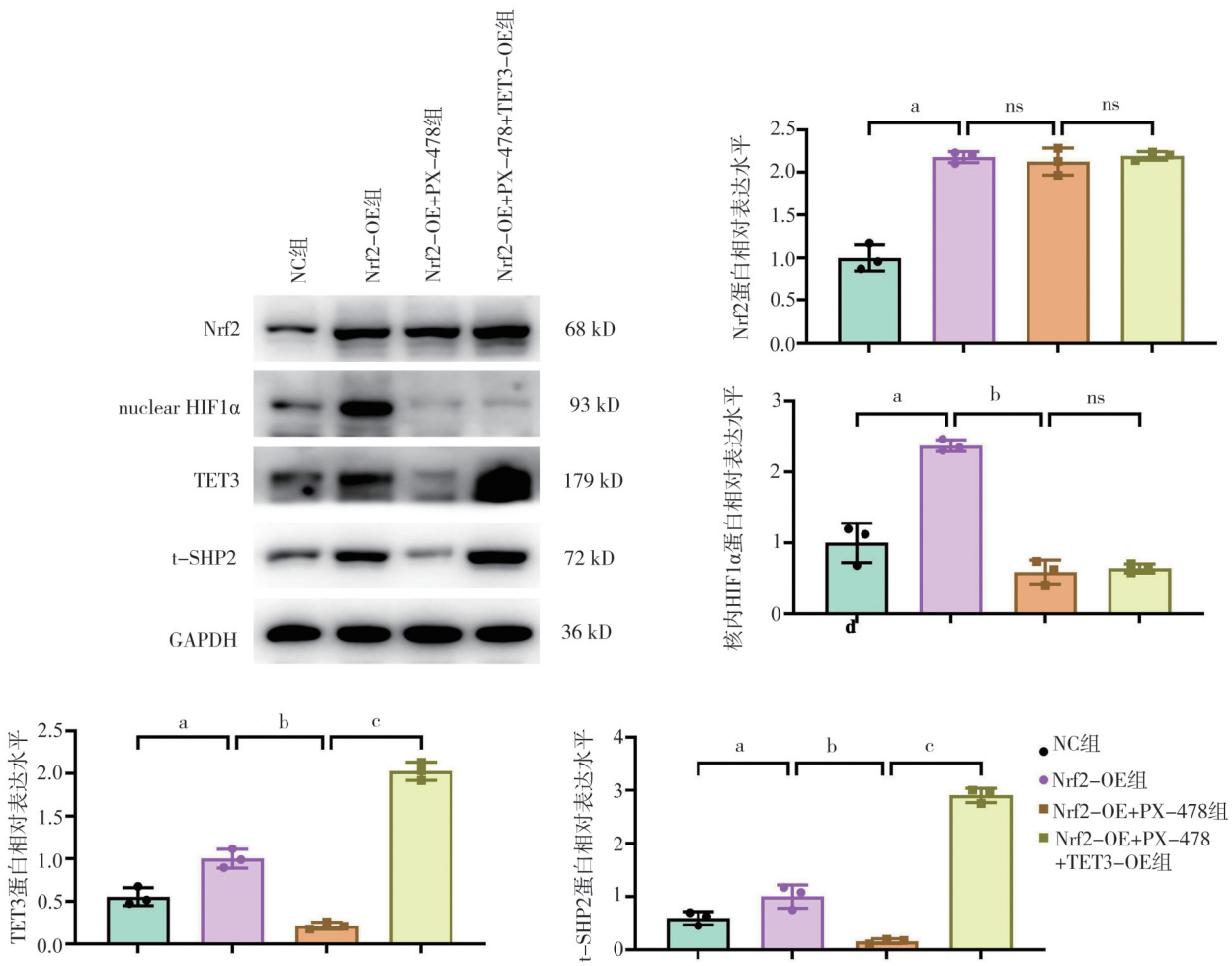
2.5　Nrf2通过上调HIF1α来增强TET3的表达

为验证Nrf2/TET3/SHP2正向调控关系，本研究采用免疫共沉淀和Western blot实验，免疫共沉淀结果显示TOM1L1与FYN蛋白、TET3与SHP2存在相互作用。Western blot实验结果显示，与NC组相比，Nrf2-OE组Nrf2（P<0.001）、核HIF1α（P<0.001）、TET3（P=0.002）、t-SHP2（P=0.036）表达量明显升高（均P<0.05），与Nrf2-OE组相比，Nrf2-OE+PX-478组Nrf2表达量差异无统计学意义（P=0.944），核HIF1α（P<0.001）、TET3（P<0.001）、t-SHP2（P=0.0005）表达量明显降低（P<0.01），与Nrf2-OE+PX-478组相比，Nrf2-OE+PX-478+TET3-OE组Nrf2（P=0.892）、核HIF1α（P=0.982）表达量差异无统计学意义（P>0.05），TET3（P<0.001）、t-SHP2（P<0.001）表达量明显升高（P<0.01）。

本研究揭示了TOM1L1通过多重信号通路的正反馈机制，显著促进了CRC的侵袭和转移，提示TOM1L1可能成为潜在的治疗靶点。这一发现为CRC的早期诊断和治疗提供了新视角和新策略（图6）。



A. 免疫共沉淀实验检测TOM1L1、FYN、TET3、SHP2



B. Western blot检测Nrf2、核HIF1α、TET3、t-SHP2表达量

注：a，与NC组相比，P<0.05；ns，P>0.05；b，与Nrf2-OE组相比，P<0.01；ns，P>0.05；c，与Nrf2-OE+PX-478组相比，P<0.01

图5　Nrf2通过上调HIF1α来增强TET3的表达

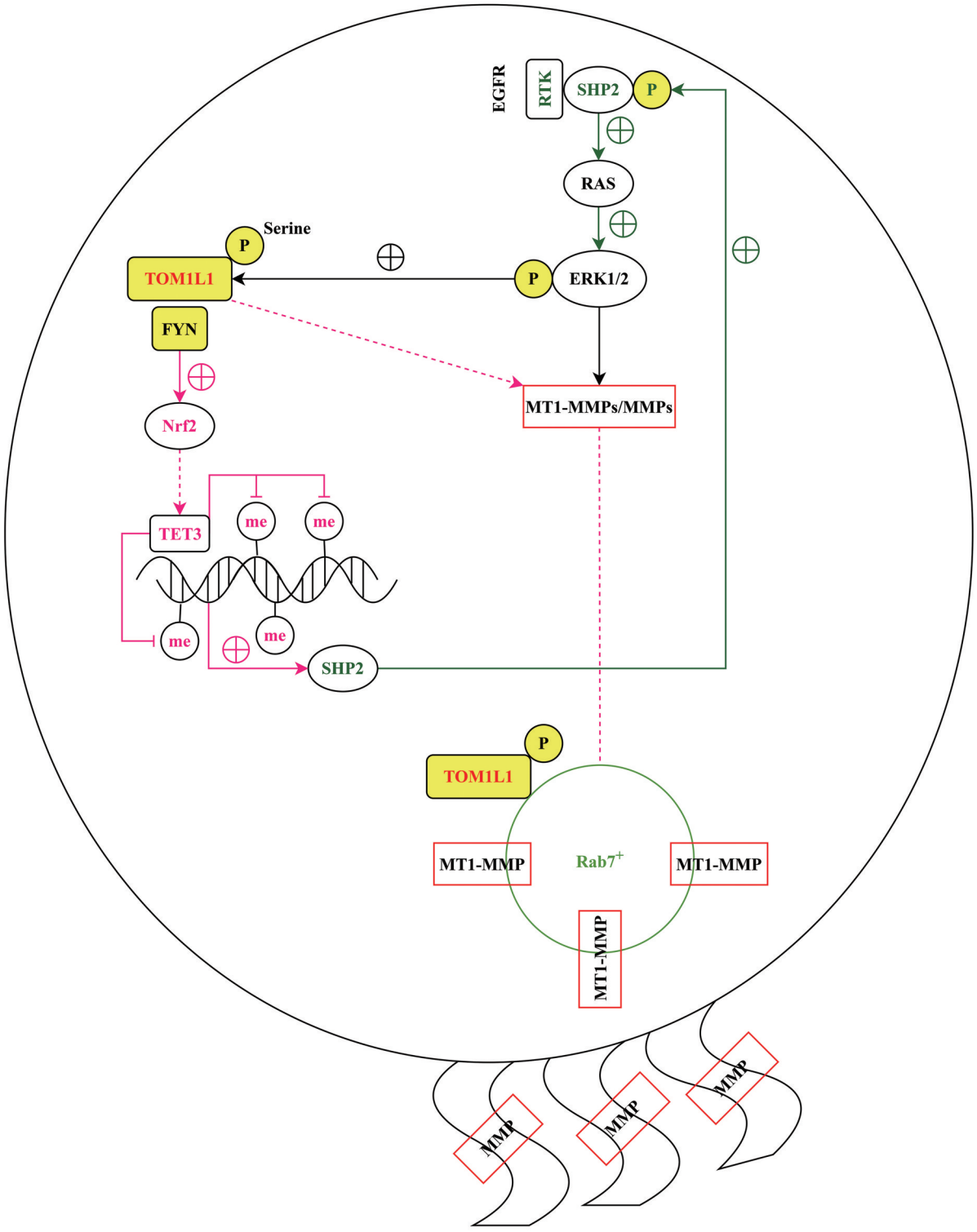


图6 TOM1L1在CRC中的高表达上调Nrf2/TET3/SHP2/ERK1/2信号通路促进MMP2/MMP9的表达来增加肿瘤侵袭和转移

3 讨 论

CRC影响约200万人，是全球第二大癌症死亡原因，占9.3%（约90万例）[12-13]。因此，寻找有效的治疗靶点或预后生物标志物具有重要意义。本文深入探讨了TOM1L1在CRC中的作用，尤其是其通过上调Nrf2/TET3/SHP2/ERK1/2信号通路诱导基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMPs）过表达，从而促进肿瘤侵袭和转移的机制。鉴于CRC的

高发病率和高致死率，这使得探索新的分子靶点和机制变得非常必要。生物信息学分析发现，TOM1L1与RAS/ERK通路存在相关性，为设计“TOM1L1-SHP2-ERK1/2-MMPs”实验链条提供了直接依据。本研究通过生物信息学分析锁定TOM1L1-Nrf2-TET3-SHP2基因簇，该基因簇富集于MAPK等促转移通路，进一步的功能实验证实TOM1L1通过表观遗传激活SHP2/ERK1/2驱动MMPs表达。

既往研究表明，TOM1L1在不同癌种中具有双重作用（如食管癌中抑癌、乳腺癌中促癌），但对其在CRC中的功能转换机制尚不明确[14]。本研究首次揭示了TOM1L1通过FYN依赖性调控改变Nrf2稳定性，实现了从“抑癌”到“促癌”的功能转换。实验证实TOM1L1过表达可逆转FYN对Nrf2的降解作用，这一发现填补了肿瘤微环境依赖性信号转导机制的理论空白。虽然Nrf2与TET3的关联已有报道，但本研究首次构建了四分子级联通路，TOM1L1/Nrf2/TET3介导DNA去甲基化/SHP2转录激活/ERK1/2磷酸化/MMPs表达，发现TET3通过表观遗传调控解除SHP2（PTPN11）的甲基化抑制，并证实p-SHP2/p-ERK1/2可反馈增强TOM1L1表达。该发现超越了SHP2单纯作为RTK下游效应分子的传统认知。相较于既往SHP2研究多聚焦于其变构抑制剂开发或RAS通路调控，本研究揭示了SHP2的表观遗传激活机制（TET3介导的去甲基化），并阐明了其与TOM1L1形成的双向调控关系，这为SHP2抑制剂（如PHPS1）与上游靶点（如TOM1L1）的联合干预提供了新思路。

FYN单独作用可诱导Nrf2降解，但本研究证实TOM1L1与FYN结合可促进Nrf2表达。已有研究表明，TOM1L1可直接结合FYN，TOM1L1作为一种衔接蛋白，可能通过其SH3结构域与FYN的SH2/SH3结构域相互作用，从而调节FYN的活性[15]。在食管鳞状细胞癌中，TOM1L1可负调控FYN的活性，但在CRC中，TOM1L1可能通过破坏FYN的自身抑制构象，增强其激酶活性[16]。在正常生理条件下，FYN可通过Tyr568位点磷酸化Nrf2，促进其核输出及泛素化降解。本研究显示，TOM1L1过表达时Nrf2表达上调，这可能源于TOM1L1竞争性结合FYN，阻断其对Nrf2的磷酸化；此外，TOM1L1改变FYN的亚细胞定位，使其从核内（降解Nrf2）转向膜区（激活SHP2/ERK1/2信号）。FYN是EGFR下游的关键效应分子，EGF刺激可激活FYN，进而通过RAS-RAF-MEK-ERK通路促进肿瘤侵袭。SHP2（PTPN11）是FYN的潜在底物，FYN可能通过磷酸化SHP2增强其磷酸酶活性，进而促进ERK1/2的激活。本研究显示抑制p-SHP2会降低TOM1L1表达，提示FYN可能作为中间桥梁，介导TOM1L1与SHP2的相互作用。

本研究首次揭示了Nrf2通过HIF1α介导的转录调控促进TET3表达的新机制。Western blot结果显示，Nrf2-OE组中核HIF1α和TET3蛋白水平显著升高，而HIF1α抑制剂PX-478可特异性阻断TET3上调，但不影响Nrf2表达。这一发现拓展了对Nrf2下游效应网络的认识：传统观点认为Nrf2主要调控抗氧化反应元件（antioxidant response element，ARE）相关基因，而本研究证实其可通过HIF1α间接调控表观遗传修饰酶TET3的表达。免疫共沉淀实验进一步验证了TET3与SHP2存在物理相互作用，为理解表观遗传调控与酪氨酸磷酸酶活性的交叉对话提供了结构基础。Nrf2是bZIP家族的转录因子，也是抗氧化应激的核心调控因子，可调节多个抗氧化基因，已有研究表明Nrf2能够促进TET3转录，本研究也证实了这一结果[17-18]。TET3属于TET家族，它通过将5-甲基胞嘧啶转化为5-羟甲基胞嘧啶来诱导表观遗传水平的DNA去甲基化和基因调控[19-21]。TET3通过介导DNA去甲基化促进SHP2的表达，SHP2是一种蛋白酪氨酸磷酸酶，在细胞信号传导中发挥重要作用[22]。它主要与RTK结合。RTK激活后，通过自磷酸化产生结合位点，招募SHP2到细胞膜。从而增强RTK下游信号通路的转导，包括RAS-RAF-ERK通路，从而促进细胞增殖和存活。SHP2通过调控RTK激活后的信号级联反应，在多种细胞功能中发挥平衡和调节作用。SHP2和RTK共同参与调控许多重要的生物学过程，如细胞生长、分化和迁移。SHP2功能或RTK信号异常可导致多种疾病，包括癌症。TOM1L1通过正反馈环路增强p-SHP2和p-ERK1/2的活性，进而上调MMP2和MMP9表达。这一机制揭示了TOM1L1在增强肿瘤侵袭能力中的关键作用。同时，对p-SHP2和ERK1/2的抑制实验显示，抑制这些分子活性可降低TOM1L1表达，进一步证实了TOM1L1与这些信号通路之间存在相互促进作用。

综上所述，TOM1L1在CRC中的作用不仅限于作为标志物，其通过调控关键的信号通路和相关分子表达，实质性地影响肿瘤侵袭和转移。这一发现为以TOM1L1为潜在靶点的CRC早期诊断和治疗提供了新视角，同时提示，进一步研究TOM1L1及其相关信号通路可能揭示更多癌症进展机制，为癌症的个性化治疗提供新的可能性。研究还强调需要开发有效的抑制剂干扰TOM1L1介导的信号通路，以阻止或延缓癌症进展，提高患者治疗效果和生存率。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突(

作者贡献声明 胡晓峰：研究方案设计、实施研究、数据分析、论文撰写；刘斌：数据收集、数据整理、统计分析；王一飞：实验操作、数据采集；王峰：文献调研、论文修改；聂双发：数据分析、图表制作；武雪亮：研究方案设计、论文修改、经费支持、最终审核

参 考 文 献

[1] Zhang XM, Yu SS, Li XB, et al. Research progress on the interaction between oxidative stress and platelets: Another avenue for cancer? [J]. Pharmacol Res, 2023, 191: 106777.

[2] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA A Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

[3] Wang J, Tang W, Yang M, et al. Inflammatory tumor microenvironment responsive neutrophil exosomes-based drug delivery system for targeted glioma therapy[J]. Biomaterials, 2021, 273: 120784.

[4] Zhao L, Li WJ, Marshall C, et al. Srcasm inhibits Fyn-induced cutaneous carcinogenesis with modulation of Notch1 and p53[J]. Cancer Res, 2009, 69(24): 9439-9447.

[5] Qi Y, Li X, Zhao L, et al. Decreased Srcasm expression in esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population[J]. Anticancer Res, 2010, 30(9): 3535-3539.

[6] Smid M, Wang YX, Klijn JGM, et al. Genes associated with breast cancer metastatic to bone[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(15): 2261-2267.

[7] Balinda HU, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Mechanisms underlying melanoma invasion as a consequence of MLK3 loss[J]. Exp Cell Res, 2022, 415(1): 113106.

[8] Cabral-Dias R, Lucarelli S, Zak K, et al. Fyn and TOM1L1 are recruited to clathrin-coated pits and regulate Akt signaling[J]. J Cell Biol, 2022, 221(4): e201808181.

[9] Davidson D, Fournel M, Veillette A. Oncogenic activation of p59fyn tyrosine protein kinase by mutation of its carboxyl-terminal site of tyrosine phosphorylation, tyrosine 528[J]. J Biol Chem, 1994, 269(14): 10956-10963.

[10] Poh AR, Ernst M. Functional roles of SRC signaling in pancreatic cancer: Recent insights provide novel therapeutic opportunities[J]. Oncogene, 2023, 42(22): 1786-1801.

[11] Peng SF, Fu Y. FYN: emerging biological roles and potential therapeutic targets in cancer[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 84.

[12] Spasic M, Ogayo ER, Parsons AM, et al, McAllister SS. Spectral Flow Cytometry Methods and Pipelines for Comprehensive Immunoprofiling of Human Peripheral Blood and Bone Marrow. Cancer Res Commun. 2024 Mar 25;4(3):895-910.

[13] 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 A Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[14] Chevalier C, Collin G, Descamps S, et al. TOM1L1 drives membrane delivery of MT1-MMP to promote ERBB2-induced breast cancer cell invasion[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10765.

[15] Li S, Liu CQ, Tang YL. Role of Fyn in hematological malignancies [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2023, 149(9): 6759-6767.

[16] Dong W, Sun SJ, Qin JJ, et al. Fyn stimulates the progression of pancreatic cancer *via* Fyn-GluN2b-AKT axis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(1): 109-121.

[17] Tebay LE, Robertson H, Durant ST, et al. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 88(Pt B): 108-146.

[18] Wu MJ, Jiang MH, Ding H, et al. Nrf2 (-/-) regulated lung DNA demethylation and CYP2E1 DNA methylation under PM(2.5) exposure [J]. Front Genet, 2023, 14: 1144903.

[19] Liu RJ, Jin Y, Tang WH, et al. Ten-eleven translocation-2 (TET2) is a master regulator of smooth muscle cell plasticity[J]. Circulation, 2013, 128(18): 2047-2057.

[20] An J, Rao A, Ko M. TET family dioxygenases and DNA demethylation in stem cells and cancers[J]. Exp Mol Med, 2017, 49(4): e323.

[21] Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, et al. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(2): 200-213.

[22] Xue F, Liu LF, Tao XQ, et al. TET3-mediated DNA demethylation modification activates SHP2 expression to promote endometrial cancer progression through the EGFR/ERK pathway[J]. J Gynecol Oncol, 2024, 35(5): e64.

(收稿：2025-03-26；修回：XXXX-XX-XX；录用：XXXX-XX-XX)

(责任编辑：周一青)

本文引用格式：

胡晓峰，刘斌，王一飞，等.TOM1L1通过上调Nrf2/TET3/SHP2/ERK1/2信号通路诱导MMPs过表达从而促进CRC侵袭转移的机制研究[J].重庆医科大学学报，XXXX，XX(XX)：1-12.