

敲除 *eIF4B* 基因对小鼠胚胎肝脏细胞凋亡的影响

王国庆^{1#}, 陈彪^{2#}, 陈玉海², 朱倩文¹, 彭敏¹, 郭桂杰¹, 陈吉龙¹

1 福建农林大学 动物科学学院 (蜂学学院) 福建省畜禽病原感染与免疫学重点实验室, 福建 福州 350002

2 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

王国庆, 陈彪, 陈玉海, 朱倩文, 彭敏, 郭桂杰, 陈吉龙. 敲除 *eIF4B* 基因对小鼠胚胎肝脏细胞凋亡的影响. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3489-3500.

WANG GQ, CHEN B, CHEN YH, ZHU QW, PENG M, GUO GJ, CHEN JL. Effect of *eIF4B* knockout on apoptosis of mouse fetal liver cells. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3489-3500.

摘要: 真核翻译起始因子 4B (eukaryotic translation initiation factor 4B, eIF4B) 在 mRNA 翻译起始、细胞存活和增殖过程中发挥着关键作用, 然而其在生物体内的生物学功能仍存在许多疑问。本研究利用 *eIF4B* 基因敲除小鼠模型, 结合苏木精和伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色、流式细胞术、Western blotting 和免疫组化等一系列实验技术手段, 探究了 eIF4B 在胚胎发育过程中的功能及作用机理。结果显示, *eIF4B* 敲除小鼠胚胎的肝脏呈现严重病理损伤, 主要表现为胚肝细胞的凋亡和坏死, 而小鼠胚胎的肺脏、脑、胃和胰腺则发育正常。进一步研究发现, 在 *eIF4B* 敲除小鼠的胚胎肝脏中活化型 caspase 3 (cleaved-caspase 3) 的表达水平显著升高。此外, *eIF4B* 敲除小鼠的胚胎成纤维细胞和胚胎肝脏中 mTOR 通路下游信号分子 p70S6K 的表达和磷酸化水平以及 4EBP1 的磷酸化水平显著升高。综上所述, *eIF4B* 敲除导致 cleaved-caspase 3 表达增加和 mTOR 信号通路过度活化, 促进胚肝细胞的凋亡, 致使小鼠胚肝发育异常, 最终引发小鼠胚胎死亡。本研究揭示了 eIF4B 在胚胎发育过程中的重要作用, 为深入了解 eIF4B 在生物体内的生物学功能提供了新的科学依据。

关键词: 真核翻译起始因子 4B; 胚胎肝脏; 活化型 caspase 3; mTOR

Received: January 13, 2022; Accepted: March 29, 2022; Published online: April 25, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (U1805231)

Corresponding author: CHEN Jilong. E-mail: chenjl@im.ac.cn

[#]These authors contributed equally to this study

基金项目: 国家自然科学基金 (U1805231)

Effect of *eIF4B* knockout on apoptosis of mouse fetal liver cells

WANG Guoqing^{1#}, CHEN Biao^{2#}, CHEN Yuhai², ZHU Qianwen¹, PENG Min¹, GUO Guijie¹, CHEN Jilong¹

1 Key Laboratory of Animal Pathogen Infection and Immunology of Fujian Province, College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

2 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Eukaryotic translation initiation factor 4B (eIF4B) plays an important role in mRNA translation initiation, cell survival and proliferation *in vitro*, but the *in vivo* function is poorly understood. In this study, via various experimental techniques such as hematoxylin-eosin (HE) staining, flow cytometry, Western blotting, and immunohistochemistry, we investigated the role of eIF4B in mouse embryo development using an *eIF4B* knockout (KO) mouse model and explored the mechanism. We found that the livers, but not lungs, brain, stomach, or pancreas, derived from eIF4B KO mouse embryos displayed severe pathological changes characterized by enhanced apoptosis and necrosis. Accordingly, high expression of cleaved-caspase 3, and excessive activation of mTOR signaling as evidenced by increased expression and phosphorylation of p70S6K and enhanced phosphorylation of 4EBP1, were observed in mouse embryonic fibroblasts and fetal livers from eIF4B KO mice. These results uncover a critical role of eIF4B in mouse embryo development and provide important insights into the biological functions of eIF4B *in vivo*.

Keywords: eIF4B; fetal liver; cleaved-caspase 3; mTOR

蛋白质合成对细胞存活、生长、增殖、迁移和分化至关重要，是真核细胞中一个复杂的生物学过程^[1-2]。真核细胞中蛋白翻译一般分为4个步骤：起始、延伸、终止和核糖体循环^[3]。真核翻译起始因子4F (eukaryotic translation initiation factor 4F, eIF4F) 复合物组装后启动信使RNA (messenger RNA, mRNA) 的翻译过程^[4-5]，它包含3个关键起始因子：识别和结合 mRNA 的5'端帽子结构的 eIF4E^[6]、发挥 ATP 依赖的 RNA 解旋酶作用的 eIF4A^[4]以及充当支架作用的 eIF4G^[7]。eIF4B 是 eIF4 家族中的一员，在真核翻译起始阶段参与核糖体的募集，并且还可以增强 eIF4A 的 RNA 解旋酶活性来解开 5'非翻译区

中 mRNA 的二级结构，保证翻译的正常进行^[8-9]。

eIF4B 在多种肿瘤细胞中高度活化，并且其磷酸化状态决定其活性^[10]。研究表明，eIF4B 的磷酸化位点可以被多种蛋白激酶激活^[9-13]。例如，在血清的刺激下，eIF4B 的 Ser422 位点可以被 p70S6 激酶 (S6K1/S6K2) 磷酸化，该位点的磷酸化对 PI3K 和 mTOR 的抑制剂敏感^[13]。此外，eIF4B 的 Ser422 位点还可以被 Akt 以独立于 S6K 或丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 活性的方式磷酸化^[10]。我们之前的研究发现，Pim 激酶 (Pim-1 和 Pim-2) 可以直接磷酸化 eIF4B 的 Ser406 和 Ser422 位点，在 Abl 转化细胞中敲低 eIF4B 会

降低 Bcr-Abl 或 v-Abl 介导的细胞转化效率^[14]。此外,非编码 RNA 也可以直接与 eIF4B 相互作用并调节其蛋白表达和磷酸化。在神经元中, eIF4B 可与调节性脑细胞质 (brain cytoplasm, BC) RNA 结合,抑制神经元中的翻译起始过程。神经元受到刺激后,蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase, PP2A) 可以去除 eIF4B Ser406 位点磷酸化,降低 BC RNA 与 eIF4B 的结合能力,从而促进翻译起始^[15]。此外,目前研究还发现 eIF4B 是一些重要的癌基因激活信号通路的共同底物,如 RAS-MAPK 和 PI3K/ mTOR 通路^[16]。磷酸化的 eIF4B 参与调节一些重要的细胞增殖 (*Cdc25c* 和 *c-Myc*) 和抗凋亡 (*Bcl-2* 和 *XIAP*) 基因 mRNA 的翻译起始,促进肿瘤细胞增殖和存活^[17]。综上所述, eIF4B 可以参与调控细胞存活、增殖和分化等多种生物学过程。

目前关于 eIF4B 的研究大多集中在体外细胞和分子水平,其在生物体内的生物学功能仍不清楚。我们前期研究发现,敲除 *eIF4B* 会导致小鼠胚胎死亡^[18],但其导致小鼠胚胎发育异常的作用机制尚不清楚。因此,本文对 *eIF4B* 基因敲除小鼠的胚胎发育和相关基因的分子调控进行了研究,为 eIF4B 在生物体内的作用和调控机制提供了新的科学参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞与质粒

细胞:293T (人胚肾细胞) 细胞株由本实验室保存; eIF4B^{+/+}、eIF4B^{+/-}和 eIF4B^{-/-}小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) 和小鼠胚胎肝脏细胞均由小鼠胚胎分离所得。

质粒: pNL-GFP、pNL-GFP-eIF4B 和慢病毒包装质粒 (VSVG, package) 均为本实验室保存。

1.1.2 实验试剂和器材

生物学试剂:胎牛血清 (Gibco), DMEM (Gibco), 细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物公司), 真核转染试剂 VigoFect (威格拉斯生物技术有限公司), ECL 化学发光显色液 (普利莱基因技术有限公司), 蛋白预染 Marker (Fermentas)。

抗体: anti-eIF4B (sc-376062) 购自 Santa Cruz Biotechnology; anti-Bcl-2 (12789-1-AP) 购自 Proteintech; anti-Bcl-x1 (2764)、anti-phospho-p70S6K (9205)、anti-p70S6K (34475)、anti-phospho-4EBP1 (2855)、anti-4EBP1 (9644)、anti-cleaved-caspase 3 (9664) 购自 Cell Signaling Technology 公司。

实验器材:硝酸纤维素 (nitrocellulose, NC) 膜 (Millipore), X 射线胶片 (Kodak), 显影粉、定影粉 (天津市世纪奥博商贸有限公司), 低温离心机 (Thermo Electron Corporation)。

1.1.3 实验动物

eIF4B^{+/+}、eIF4B^{+/-}和 eIF4B^{-/-}小鼠胚胎由雄性和雌性 eIF4B^{+/-}小鼠杂交所得。eIF4B^{+/-}小鼠由 eIF4B^{fl/fl}小鼠与胚胎发育早期特异性表达 Cre 重组酶的工具鼠 (EIIA-cre) 杂交所得。eIF4B^{fl/fl}小鼠由上海南方模式生物科技股份有限公司构建完成。本研究动物实验经中国科学院微生物研究所研究伦理委员会批准 (许可证号: SQIMCAS2021066)。所有的实验过程均遵循中华人民共和国国务院批准的《实验动物管理条例》。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠胚胎肝脏细胞的制备和细胞凋亡检测

胚胎肝脏细胞的制备:将受孕 14.5 d 的 eIF4B^{+/+}、eIF4B^{+/-}和 eIF4B^{-/-}小鼠胚胎解剖并分离胚胎肝脏,收集在含有 2%胎牛血清的 1 mL PBS 中。使用 1 mL 移液器轻轻反复吹打小鼠胚胎肝脏,并通过 40 μ m 细胞滤网过滤细胞悬液,

获得小鼠胚胎肝脏细胞悬液并进行细胞计数。

胚肝细胞凋亡检测:取 10^6 个胚肝细胞离心,用 PBS 洗涤 2-3 次,弃掉上清,加入 300 μ L 流式上样缓冲液,轻轻重悬细胞并转移进流式管,然后加入 5 μ L Annexin V-APC 和 5 μ L 碘化丙啶 (propidium iodide, PI),充分混匀后,室温避光染色 10-15 min。选用合适的激发光片和滤光片,利用流式细胞仪分析细胞凋亡情况,使用 FCS Express V3 软件进行数据分析。

1.2.2 小鼠胚胎成纤维细胞的分离培养

收取怀孕 13.5 d 母鼠的子宫,浸泡在 PBS 中。在超净台中取出胚胎, PBS 充分洗涤。接下来,剪去胎鼠的头部、四肢和内脏,用 PBS 去除血迹,将余下的胚胎剪碎放入 15 mL 离心管中,加入 5-8 mL 0.25% 胰酶,并用移液器反复吹打。将 15 mL 离心管置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅,消化 40-60 min,之后向离心管加入 2-3 mL DMEM 完全培养基终止消化。用 200 目灭菌的尼龙网将上述消化后的细胞悬液过滤到新的 15 mL 离心管中,1 500 r/min 离心 5 min。弃上清,用 2 mL DMEM 完全培养基重悬细胞,置 10 cm 细胞培养皿中,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱中培养。

1.2.3 蛋白样品的制备和免疫印迹 (Western blotting)

细胞蛋白样品的制备:收集 2×10^6 个细胞至 1.5 mL 的 EP 管中,离心,弃上清。向其中加入一定量的细胞裂解液 (Co-lysis 缓冲液),置于冰上裂解 30 min (每 10 min 漩涡 1 次,每次 15 s)。裂解结束后,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清,加入等体积 $2 \times$ 蛋白上样缓冲液后煮沸 5 min,立即使用或者 -20 $^{\circ}$ C 保存。

动物组织蛋白样品的制备:称量小鼠组织样品 30 mg,将小鼠组织放入 1.5 mL 离心管中,加入两颗预先灭菌的钢珠,然后加入 300-400 μ L

细胞裂解液,于组织研磨仪内充分研磨 2 min,冰上裂解 30 min (每 10 min 漩涡 1 次,每次 15 s),后续步骤同细胞蛋白样品制备一致。

免疫印迹 (Western blotting):蛋白样品通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,之后转移至硝酸纤维素 (NC) 膜上,恒流 250 mA,120 min,冰浴转膜。转膜完毕后,将 NC 膜转移至含 5% 脱脂牛奶的 TBS 溶液中,室温封闭 1-2 h。接下来,室温孵育一抗 3 h,一抗孵育结束后,用 TBS 缓冲液充分清洗 3 次,每次 10 min。加入辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的二抗,室温孵育 1-2 h 后,TBS 缓冲液清洗 3 次,每次 10 min。清洗完毕,等量的 ECL 发光显色液 A 液和 B 液混匀后,孵育 NC 膜 3 min,于暗室中曝光^[19]。

1.2.4 组织病理学分析

小鼠胚胎和器官用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋。然后,制备 4 mm 厚的切片并用苏木精和伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色。在 Olympus BH-2 显微镜下观察,拍照分析。

1.2.5 慢病毒包装及感染

慢病毒包装:转染前 24 h,将 293T 细胞传代分装至 10 cm 培养皿中,待细胞密度达到 85% 左右时,进行转染。转染开始时,先弃掉旧的细胞培养基,换成无双抗、无血清 DMEM 处理细胞 30 min。将慢病毒包装质粒 (VSVG, package) 和 eIF4B 表达质粒 (pNL-GFP-eIF4B) 或者空载体对照质粒 (pNL-GFP) 各 8 μ g 加至 500 μ L 无双抗、无血清 DMEM 中,轻轻混匀,室温放置 5 min。同时,将 10 μ L 真核生物转染试剂 VigoFect 加至另外一个含 500 μ L 无双抗、无血清 DMEM 的 1.5 mL 的 EP 管中,轻轻混匀,室温静置 5 min。之后,将上述质粒和转染试剂悬液混合均匀,室温静置 20 min 后逐滴加入 293T 细胞中,温和摇匀,置于细胞培养箱中培

养 4–6 h 后更换成 8 mL 的完全培养基继续培养 48 h, 收集细胞上清, 即病毒液。

慢病毒感染靶细胞: 收取的细胞上清用 0.22 μm 滤膜过滤, 加入聚凝胺 (polybrene) 至终浓度 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 分装至 6 孔板中, 同时加入适量的 *eIF4B*^{-/-} 小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF)。保鲜膜包裹 6 孔板置于恒温水平离心机中 32 $^{\circ}\text{C}$ 、2 200 r/min, 悬浮感染 120 min。离心结束后, 补加完全培养基 1.5 mL/孔, 细胞培养箱中继续培养 24 h 后, 细胞传代培养用于后续实验。

1.2.6 数据统计学分析

本研究采用 *t* 检验进行显著性差异分析, $P < 0.05$ 被认为具有显著性差异, $P < 0.01$ 被认为具有极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 敲除 *eIF4B* 促进小鼠胚胎肝脏细胞的凋亡

我们前期研究发现 *eIF4B* 敲除的纯合子 (*eIF4B*^{-/-}) 小鼠胚胎致死^[18]。为了进一步探究 *eIF4B* 敲除对小鼠胚胎发育的影响, 收取了 E14.5 和 E15.5 的 *eIF4B*^{+/+}、*eIF4B*^{-/-} 小鼠胚胎, 进行 HE 染色分析。结果显示, 与 *eIF4B*^{+/+} 小鼠相比, *eIF4B*^{-/-} 小鼠胚胎发育畸形 (图 1A)。对 E14.5 和 E15.5 的 *eIF4B*^{+/+}、*eIF4B*^{-/-} 小鼠胚胎进行病理分析发现, 与 *eIF4B*^{+/+} 小鼠胚胎相比, *eIF4B*^{-/-} 小鼠胚胎肝脏表现出更为严重的病理损伤, 主要表现为胚肝细胞凋亡和坏死, 而小鼠胚胎肺脏、脑、胃和胰腺等组织器官发育正常 (图 1B)。接下来, 我们进一步分离了 E14.5 *eIF4B*^{+/+} 和 *eIF4B*^{-/-} 小鼠胚胎肝脏细胞, 并用 Annexin V 和 PI 进行染色, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果显示, 敲除 *eIF4B* 显著增加了小鼠胚胎肝脏细胞中凋亡细胞 (Annexin V⁺ PI⁺) 和坏死细胞 (Annexin V⁻ PI⁺) 的比例 (图 1C–D)。

上述结果表明, 敲除 *eIF4B* 会促进小鼠胚胎肝脏细胞的凋亡。

2.2 敲除 *eIF4B* 促进胚肝细胞中凋亡蛋白 cleaved-caspase 3 的表达

eIF4B 在多种肿瘤细胞中可以通过调控抗凋亡蛋白 (Bcl-2、Bcl-x1 等) 的翻译来抑制细胞凋亡^[20–21]。本实验室前期研究发现, 敲低 *eIF4B* 导致 Abl 转化细胞中 Bcl-2 的表达水平明显下调, 从而促进伊马替尼诱导的 Abl 转化细胞的凋亡^[14]。为了探究 *eIF4B* 如何调控小鼠胚肝细胞的凋亡, 我们收取了 *eIF4B*^{+/+} 和 *eIF4B*^{-/-} 小鼠胚胎肝脏, 利用 Western blotting 检测抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-x1 的表达水平。结果显示, *eIF4B*^{-/-} 和 *eIF4B*^{+/+} 小鼠胚肝细胞中 Bcl-2 和 Bcl-x1 蛋白的表达水平并未发生明显变化 (图 2A)。接下来, 我们对 *eIF4B*^{-/-}、*eIF4B*^{+/-} 和 *eIF4B*^{+/+} 小鼠胚肝细胞中活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (cleaved-caspase 3) 的水平进行检测发现, 与 *eIF4B*^{+/+} 和 *eIF4B*^{+/-} 小鼠胚肝细胞相比, *eIF4B*^{-/-} 小鼠胚肝细胞中 cleaved-caspase 3 的表达水平显著增高 (图 2B)。进一步, 我们收取了 E14.5 的 *eIF4B*^{+/+} 和 *eIF4B*^{-/-} 小鼠胚胎肝脏, 进行免疫组化分析。结果表明, *eIF4B*^{-/-} 小鼠胚肝中 cleaved-caspase 3 的水平明显高于 *eIF4B*^{+/+} 小鼠 (图 2C–D)。上述结果表明, *eIF4B*^{-/-} 小鼠胚肝细胞中 cleaved-caspase 3 的高表达促进了胚肝细胞的凋亡。

2.3 *eIF4B* 敲除小鼠 MEF 细胞中 mTOR 通路下游信号分子 p70S6K 的表达和磷酸化水平以及 4EBP1 的磷酸化水平显著升高

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 是蛋白质复合物 mTORC1 和 mTORC2 的关键成分, 在基因转录、核糖体合成、蛋白质翻译等生物学过程中发挥关键作用^[22]。mTOR 信号通路不仅可以对干细胞的发育和静止进行控制, 还参

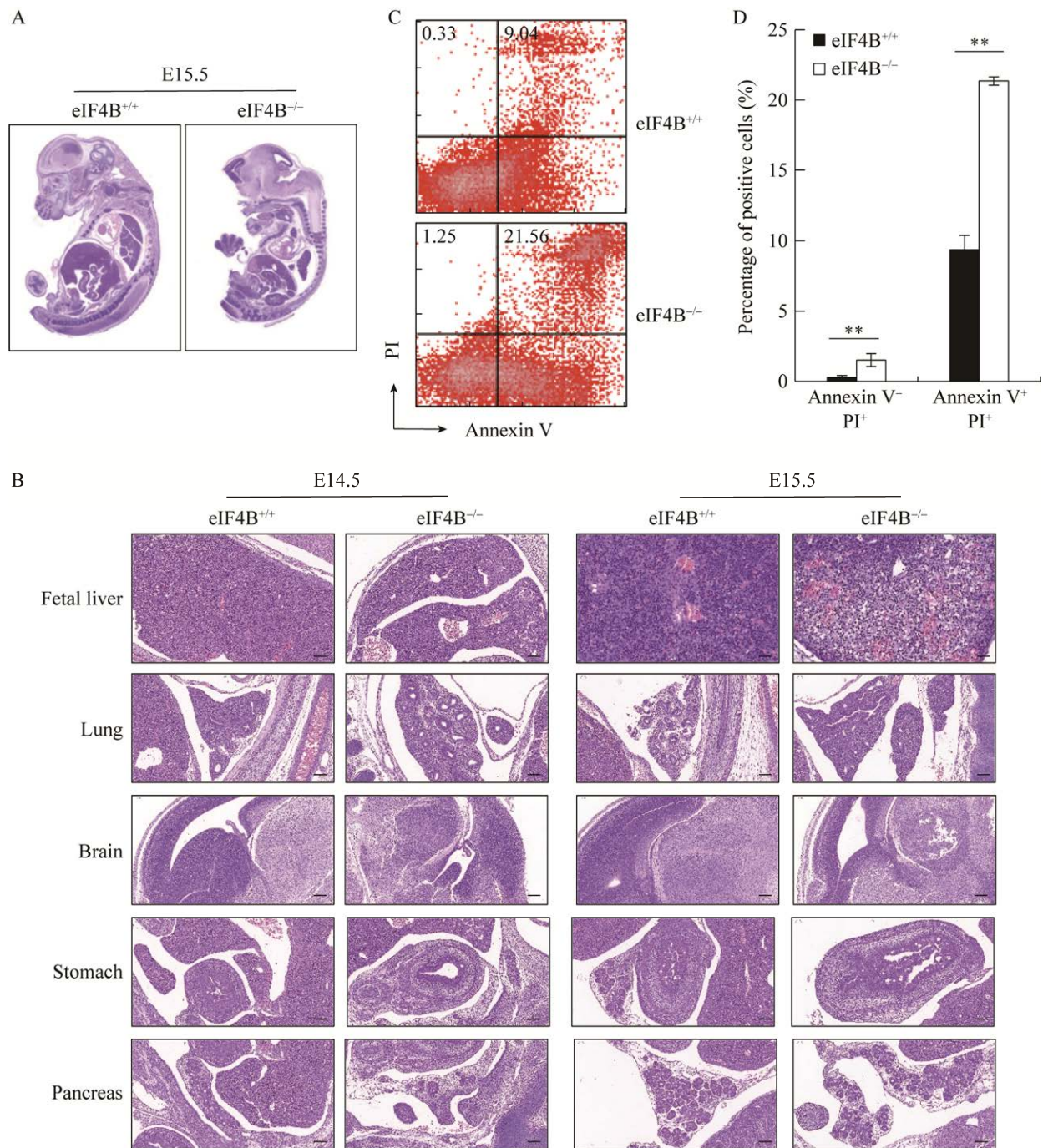


图 1 敲除 *eIF4B* 导致小鼠胚胎肝脏细胞凋亡增加

Figure 1 Knockout of *eIF4B* in mice facilitates apoptosis of fetal liver cells. (A) Representative images from HE analysis of total embryos from *eIF4B*^{-/-} and *eIF4B*^{+/+} littermates. (B) Representative images from HE analysis of fetal liver, lung, brain, stomach and pancreas from *eIF4B*^{-/-} and *eIF4B*^{+/+} embryos. Scale bars, 50 μ m. (C–D) Apoptotic cells in fetal livers from E14.5 *eIF4B*^{-/-} and *eIF4B*^{+/+} embryos, were analyzed by Annexin V and PI staining ($n=3-4$ per genotype for each group). Shown were representative images from three independent experiments (C). Data are represented as $\bar{x} \pm s$ (D). **: $P < 0.01$.

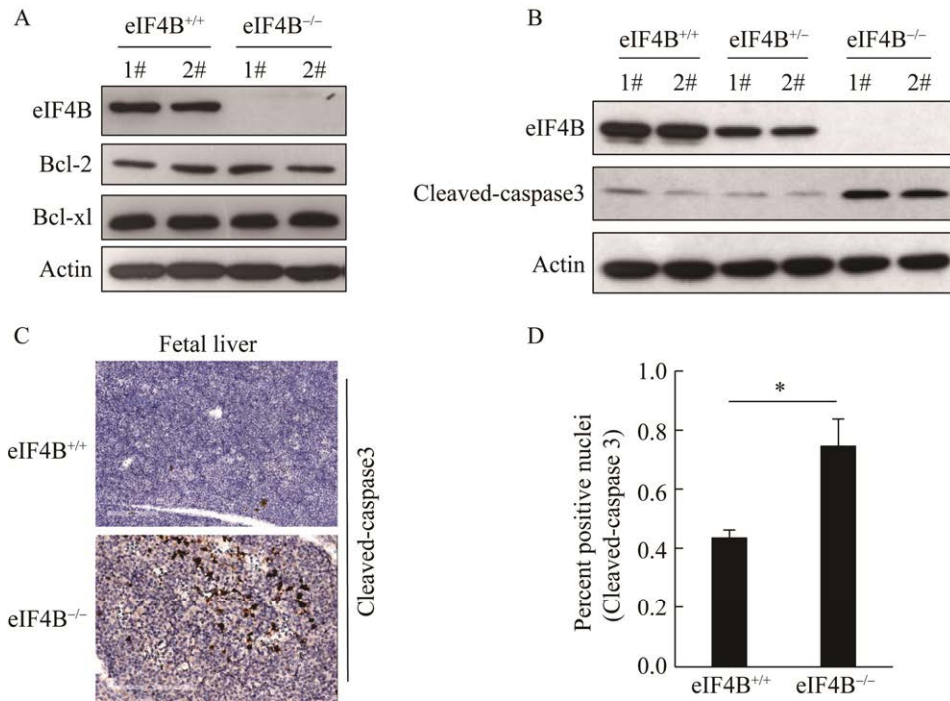


图 2 敲除 *eIF4B* 促进胚肝细胞中凋亡蛋白 **cleaved-caspase 3** 的表达

Figure 2 Knockout of *eIF4B* increases the expression of cleaved-caspase 3 in fetal livers. (A) Protein levels of Bcl-2 and Bcl-xl in fetal livers from E14.5 *eIF4B*^{-/-} and *eIF4B*^{+/+} embryos were analyzed by Western blotting. (B) The expression levels of cleaved-caspase 3 in fetal livers from E14.5 *eIF4B*^{-/-}, *eIF4B*^{+/-} and *eIF4B*^{+/+} embryos were detected by Western blotting. (C–D) The levels of cleaved-caspase 3 in fetal livers from *eIF4B*^{-/-} and *eIF4B*^{+/+} embryos were examined by immunohistochemistry analysis. Representative images are shown in (C). Cleaved-caspase 3 positive nuclei in fetal livers from *eIF4B*^{-/-} and *eIF4B*^{+/+} embryos ($n=4-10$ per genotype for each group) were quantified (D). Data are represented as $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$.

与调控自噬过程中的细胞死亡或细胞凋亡^[23]。已有的研究表明，小鼠胚胎致死与 mTOR 信号通路的过度活化密切相关^[24-25]，促使我们去分析 *eIF4B* 敲除对 mTOR 信号通路活化的影响。p70S6K 和 4EBP1 作为 mTOR 信号通路下游重要的信号分子，是参与调节细胞生长和蛋白质翻译的关键分子^[26]。因此，我们分离 *eIF4B*^{+/+} 和 *eIF4B*^{-/-} 小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF)，应用 Western blotting 检测 p70S6K 的表达和磷酸化情况。实验结果显示，*eIF4B* 敲除小鼠 (*eIF4B*^{-/-}) MEF 细胞中 p70S6K 蛋白的表达水平及其磷酸化水平

明显高于 *eIF4B*^{+/+} 小鼠 MEF 细胞 (图 3A–B)。接下来，我们利用不同浓度的血清处理 *eIF4B*^{+/+} 和 *eIF4B*^{-/-} 小鼠 MEF 细胞，应用 Western blotting 检测 p70S6K 和 4EBP1 的表达和磷酸化情况。结果显示，无论是低浓度还是高浓度血清处理，*eIF4B*^{-/-} 小鼠 MEF 细胞中 p70S6K 蛋白的表达水平和磷酸化水平以及 4EBP1 蛋白的磷酸化水平均明显高于 *eIF4B*^{+/+} 小鼠 MEF 细胞 (图 3C–D)。

为了进一步验证 *eIF4B* 对 mTOR 信号的影响，我们在 *eIF4B*^{-/-} 小鼠 MEF 细胞中高表达 *eIF4B*，检测 p70S6K 和 4EBP1 的表达和磷酸化

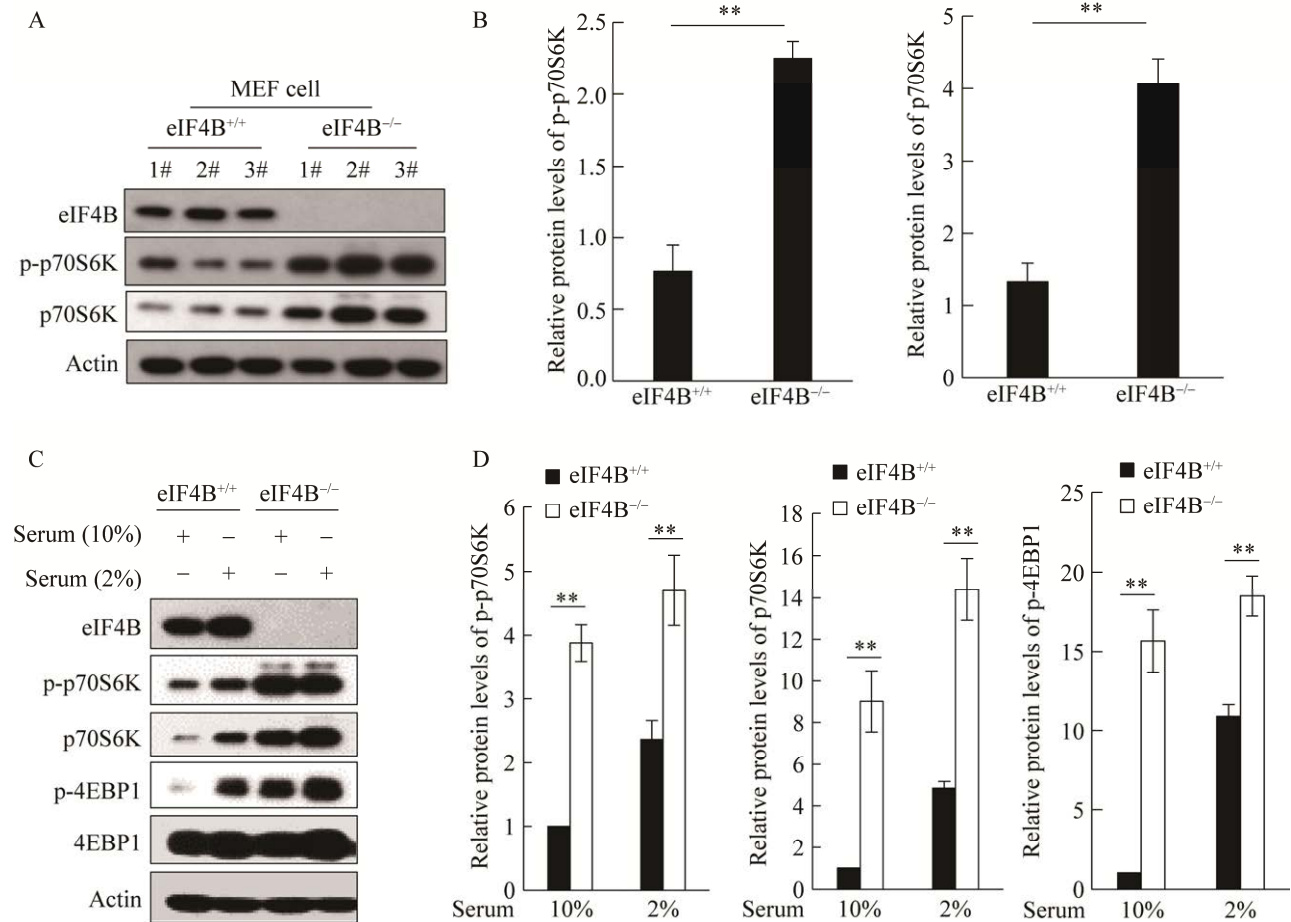


图3 *eIF4B* 敲除小鼠 MEF 细胞中 mTOR 通路下游信号分子 p70S6K 的表达和磷酸化水平以及 4EBP1 的磷酸化水平显著升高

Figure 3 Knockout of *eIF4B* results in increased expression and phosphorylation of p70S6K, and enhanced phosphorylation of 4EBP1 in MEFs. (A–B) p70S6K protein and phosphorylation levels in MEF cells from eIF4B^{-/-} and eIF4B^{+/+} mice were examined by Western blotting (A), and quantified by Image J analysis (B). $n=3$. Data are represented as $\bar{x} \pm s$. **: $P < 0.01$. (C–D) MEF cells from eIF4B^{-/-} and eIF4B^{+/+} mice were treated with 10% or 2% FBS for 12 hours. The protein and phosphorylation levels of p70S6K and p-4EBP1 were detected by Western blotting (C) and quantified by Image J analysis (D). $n=3$. Data are represented as $\bar{x} \pm s$. **: $P < 0.01$.

情况。结果显示，在低浓度血清和高浓度血清处理下，和空载体对照细胞相比，高表达 eIF4B 的 eIF4B^{-/-} 小鼠 MEF 细胞中 p70S6K 的蛋白水平和磷酸化水平以及 4EBP1 蛋白的磷酸化水平均明显降低 (图 4A–B)。上述结果表明，*eIF4B* 敲除小鼠 MEF 细胞中 mTOR 信号通路呈现过度活化状态。

2.4 *eIF4B* 敲除小鼠胚胎肝中 mTOR 通路下游信号分子 p70S6K 的表达和磷酸化水平以及 4EBP1 的磷酸化水平显著升高

进一步，我们分别收取了 eIF4B^{+/+}、eIF4B^{+/-}、eIF4B^{-/-} 小鼠胚胎肝脏，检测 p70S6K 和 4EBP1 的表达和磷酸化情况。实验结果表明，eIF4B^{+/-} 和 eIF4B^{+/+} 小鼠胚胎肝脏中 p70S6K 的蛋白

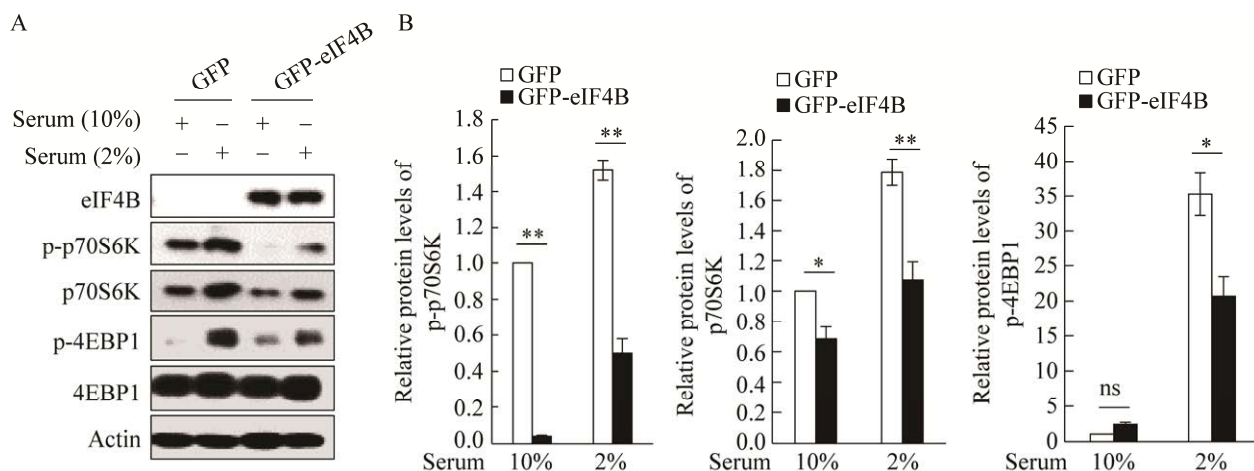


图 4 高表达 *eIF4B* 缓解 *eIF4B* 敲除小鼠 MEF 细胞中 *p70S6K* 表达和磷酸化水平以及 *4EBP1* 磷酸化水平的显著升高

Figure 4 Forced expression of *eIF4B* reverses the increased expression and phosphorylation of *p70S6K*, and enhanced phosphorylation of *4EBP1* caused by *eIF4B* depletion in MEFs. (A–B) The protein and phosphorylation levels of *p70S6K* and *p-4EBP1* in *eIF4B*^{-/-} MEF cells expressing EV (GFP) or *eIF4B* (GFP-*eIF4B*), were detected by Western blotting (A) and quantified by Image J analysis (B). $n=3$. Data are represented as $\bar{x} \pm s$. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

水平和磷酸化水平以及 *4EBP1* 蛋白的磷酸化水平无显著差异, *eIF4B*^{-/-} 小鼠胚肝中 *p70S6K* 的表达水平和磷酸化水平以及 *4EBP1* 的磷酸化水平显著增加 (图 5A–D)。另外, 小鼠胚胎肝脏的免疫组化分析结果显示, *eIF4B*^{-/-} 小鼠胚胎肝脏中 *p70S6K* 的表达水平明显高于 *eIF4B*^{+/+} 小鼠 (图 5E–F)。

3 讨论

蛋白翻译调控在生物体发育、组织稳态和肿瘤发生过程中发挥着极为关键的作用^[2,27-28]。作为蛋白质合成的限速步骤, 翻译起始受到多个信号通路的协同调控^[3]。*eIF4B* 是一种重要的真核翻译起始因子, 调控一些具有复杂二级结构 mRNA 的翻译起始, 参与肿瘤细胞存活和增殖等多种细胞生物学过程^[16]。目前关于 *eIF4B* 的研究大多集中在体外细胞和分子水平, 其在生物体内的生物学功能仍不清楚。本实验室前

期构建 *eIF4B* 基因敲除小鼠模型, 发现 *eIF4B* 敲除小鼠的胚胎会在 E14.5 和 E16.5 之间死亡^[18]。本研究中, 我们进一步探究 *eIF4B* 敲除引发小鼠胚胎致死的作用机制, 发现敲除 *eIF4B* 会导致小鼠胚胎肝脏发生严重的病理损伤。在胚胎发育过程中, 胚肝是一种重要的造血器官, 是胚胎发育过程中造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 扩增的主要部位^[29]。近期研究表明, 胚肝缺陷通常会导致 HSC 扩张受损和红细胞生成缺陷, 进而导致胚胎死亡或围产期死亡^[30-31]。因此, 胚胎肝脏发育异常可能是 *eIF4B* 敲除小鼠胚胎死亡的一个重要原因。

进一步探究 *eIF4B* 敲除导致小鼠胚肝发育异常的分子机制, 我们发现 *eIF4B* 敲除小鼠胚肝肝脏细胞凋亡显著增加。已有研究表明, *eIF4B* 参与许多具有高度结构化 5'-UTR mRNA 的翻译, 如 *Cdc25c*、*c-Myc*、*Bcl-2* 和 *XIAP*, 进而影响肿瘤细胞的增殖和凋亡^[17]。*Bcl-2*、*Bcl-xl*

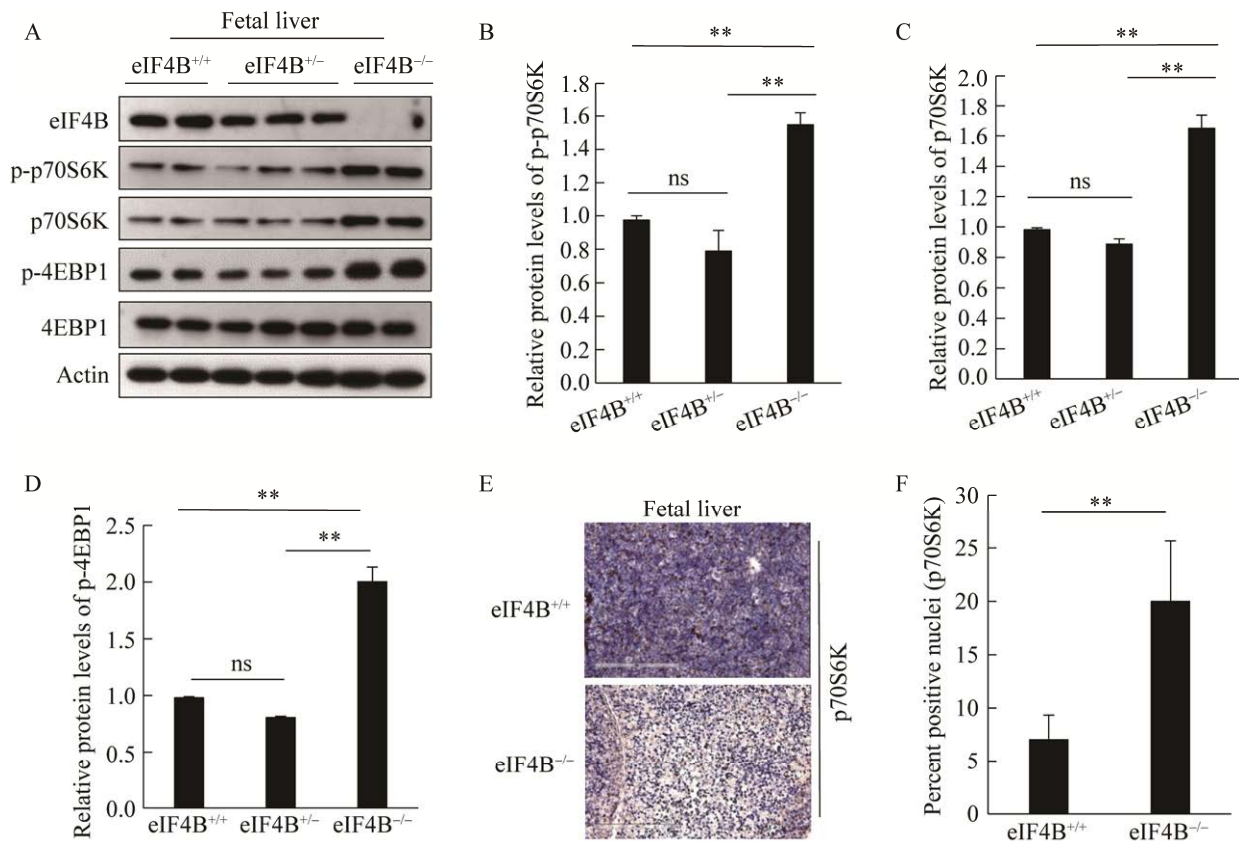


图 5 *eIF4B* 敲除小鼠胚肝中 p70S6K 的表达和磷酸化水平以及 4EBP1 的磷酸化水平显著升高

Figure 5 *eIF4B*-knockout fetal livers display increased expression and phosphorylation of p70S6K, and enhanced phosphorylation of 4EBP1. (A–D) The protein and phosphorylation levels of p70S6K and 4EBP1 in fetal livers from *eIF4B*^{-/-}, *eIF4B*^{+/-} and *eIF4B*^{+/+} embryos, were detected by Western blotting (A), and quantified by Image J analysis (B–D). $n=3$. Data are represented as $\bar{x} \pm s$. **: $P < 0.01$; ns: no significance. (E–F) The levels of p70S6K in fetal livers from *eIF4B*^{-/-} and *eIF4B*^{+/+} embryos were examined by immunohistochemistry analysis. Representative images are shown in (E). p70S6K positive nuclei in fetal livers from *eIF4B*^{-/-} and *eIF4B*^{+/+} embryos ($n=3-4$ per genotype for each group) were quantified (F). Data are represented as $\bar{x} \pm s$. **: $P < 0.01$.

等抗凋亡蛋白的上调发生在多种肿瘤中, 包括胃癌、肺癌、乳腺癌、胶质母细胞瘤等^[32-33]。有意思的是, 我们的实验结果显示, 敲除 *eIF4B* 并不影响小鼠胚胎肝脏中 Bcl-2 和 Bcl-x1 的表达水平, 而是显著增加了 cleaved-caspase 3 的水平, 表明 *eIF4B*^{-/-} 小鼠胚肝细胞中 cleaved-caspase 3 的高表达促进了小鼠胚肝细胞的凋亡。

此外, 小鼠胚胎致死与 mTOR 信号通路的过度活化密切相关^[24-25,34]。例如, *Tsc1* 等位基

因的敲除 (*Tsc1*^{-/-}) 会导致 mTOR 信号通路的高度活化, 小鼠胚胎发育到 14.5 d 时会在子宫内死亡^[24]。在营养缺乏条件下, 敲除 *SZT2* 会导致细胞中 mTORC1 通路活化增强, *SZT2* 敲除 (*SZT2*^{-/-}) 小鼠新生儿在禁食后均在子宫内死亡, 并且在多个器官中均可检测到 mTOR 通路活化增强^[35]。此外, mTOR 还可通过参与体内多种其他信号通路来调节细胞增殖、自噬和凋亡过程^[36-37]。作为细胞生长过程中消耗能量和资

源最多的生物学过程,蛋白质合成受到 mTOR 通路的严格调控^[23]。p70S6K 和 4EBP1 是 mTOR 通路下游两个重要的信号分子。mTOR 可以磷酸化 p70S6K,进而通过调节多种下游底物调控蛋白质的合成^[38]。另一方面,4EBP1 通过与翻译起始因子 eIF4E 结合来阻止翻译起始。eIF4E 是多亚基复合物,可将 40S 核糖体亚基募集到 mRNA 的 5'端帽子结构。低磷酸化的 4EBP1 与 eIF4E 相互作用,阻止其与 eIF4G 互作,从而抑制翻译过程^[39]。4EBP1 被 mTOR 磷酸化后,高磷酸化的 4EBP1 与 eIF4E 的亲和力降低,导致其从 eIF4E 解离,促进 eIF4E 和 eIF4G 复合物的形成,进而将 40S 核糖体亚基募集到 mRNA 的 5'-末端,保证翻译的正常进行^[39-40]。本研究中,我们发现 *eIF4B* 敲除小鼠的胚胎成纤维细胞和小鼠胚胎肝脏细胞中,p70S6K 蛋白的表达水平和磷酸化水平以及 4EBP1 蛋白的磷酸化水平明显升高,表明 *eIF4B* 敲除小鼠中 mTOR 信号通路的过度活化可能是胚胎致死的一个重要原因。

总之,本研究利用 *eIF4B* 基因敲除小鼠模型,揭示了 eIF4B 在胚胎发育过程中的重要作用,并对其作用机理进行了初步探究。本研究还有许多方面值得进一步深入探究,例如,eIF4B 在机体内如何调控凋亡蛋白 cleaved-caspase 3 的表达进而影响胚胎肝脏细胞的凋亡。此外,*eIF4B* 的敲除是否会影响小鼠胚胎肝脏的造血功能来调控小鼠胚胎发育也值得深入研究。

REFERENCES

- [1] Micalizzi DS, Ebright RY, Haber DA, et al. Translational regulation of cancer metastasis. *Cancer Res*, 2021, 81(3): 517-524.
- [2] Sonenberg N, Hinnebusch AG. New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Mol Cell*, 2007, 28(5): 721-729.
- [3] Pelletier J, Sonenberg N. The organizing principles of eukaryotic ribosome recruitment. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 307-335.
- [4] Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 2009, 136(4): 731-745.
- [5] Thoreen CC. Many roads from mTOR to eIF4F. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(4): 913-916.
- [6] Duncan R, Milburn SC, Hershey JW. Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J Biol Chem*, 1987, 262(1): 380-388.
- [7] Prévôt D, Darlix JL, Ohlmann T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell*, 2003, 95(3/4): 141-156.
- [8] Andreou AZ, Harms U, Klostermeier D. eIF4B stimulates eIF4A ATPase and unwinding activities by direct interaction through its 7-repeats region. *RNA Biol*, 2017, 14(1): 113-123.
- [9] Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, et al. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J*, 2006, 25(12): 2781-2791.
- [10] Van Gorp AGM, Van Der Vos KE, Brenkman AB, et al. AGC kinases regulate phosphorylation and activation of eukaryotic translation initiation factor 4B. *Oncogene*, 2009, 28(1): 95-106.
- [11] Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(2): 132-141.
- [12] Bettegazzi B, Bellani S, Roncon P, et al. eIF4B phosphorylation at Ser504 links synaptic activity with protein translation in physiology and pathology. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10563.
- [13] Raught B, Peiretti F, Gingras AC, et al. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J*, 2004, 23(8): 1761-1769.
- [14] Yang JL, Wang J, Chen K, et al. eIF4B phosphorylation by pim kinases plays a critical role in cellular transformation by Abl oncogenes. *Cancer Res*, 2013, 73(15): 4898-4908.
- [15] Eom T, Muslimov IA, Tsokas P, et al. Neuronal BC RNAs cooperate with eIF4B to mediate activity-dependent translational control. *J Cell Biol*, 2014, 207(2): 237-252.
- [16] Shahbazian D, Parsyan A, Petroulakis E, et al. eIF4B controls survival and proliferation and is regulated by

- proto-oncogenic signaling pathways. *Cell Cycle*, 2010, 9(20): 4106-4109.
- [17] Shahbazian D, Parsyan A, Petroulakis E, et al. Control of cell survival and proliferation by mammalian eukaryotic initiation factor 4B. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(6): 1478-1485.
- [18] Chen B, Chen YH, Rai KR, et al. Deficiency of eIF4B increases mouse mortality and impairs antiviral immunity. *Front Immunol*, 2021, 12: 723885.
- [19] Ma Y, Guo GJ, Li TT, et al. A novel imatinib-upregulated long noncoding RNA plays a critical role in inhibition of tumor growth induced by Abl oncogenes. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 5.
- [20] Wang YB, Begley M, Li Q, et al. Mitotic MELK-eIF4B signaling controls protein synthesis and tumor cell survival. *PNAS*, 2016, 113(35): 9810-9815.
- [21] Watanabe D, Nogami A, Okada K, et al. FLT3-ITD activates RSK₁ to enhance proliferation and survival of AML cells by activating mTORC1 and eIF4B cooperatively with PIM or PI3K and by inhibiting bad and BIM. *Cancers*, 2019, 11(12): 1827.
- [22] Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 2017, 168(6): 960-976.
- [23] Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(4): 183-203.
- [24] Ma AP, Wang LM, Gao YZ, et al. Tsc1 deficiency-mediated mTOR hyperactivation in vascular endothelial cells causes angiogenesis defects and embryonic lethality. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(3): 693-705.
- [25] Anderl S, Freeland M, Kwiatkowski DJ, et al. Therapeutic value of prenatal rapamycin treatment in a mouse brain model of tuberous sclerosis complex. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(23): 4597-4604.
- [26] Steelman LS, Martelli AM, Cocco L, et al. The therapeutic potential of mTOR inhibitors in breast cancer. *Br J Clin Pharmacol*, 2016, 82(5): 1189-1212.
- [27] Rabanal-Ruiz Y, Otten EG, Korolchuk VI. mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 565-584.
- [28] Lee LJ, Papadopoli D, Jewer M, et al. Cancer plasticity: the role of mRNA translation. *Trends Cancer*, 2021, 7(2): 134-145.
- [29] Gao SW, Liu F. Fetal liver: an ideal niche for hematopoietic stem cell expansion. *Sci China Life Sci*, 2018, 61(8): 885-892.
- [30] Liu LL, Wan XL, Zhou PP, et al. The chromatin remodeling subunit Baf200 promotes normal hematopoiesis and inhibits leukemogenesis. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 27.
- [31] Lee JA, Wang ZQ, Sambo D, et al. Global loss of leucine carboxyl methyltransferase-1 causes severe defects in fetal liver hematopoiesis. *J Biol Chem*, 2018, 293(25): 9636-9650.
- [32] Jin JF, Xiong Y, Cen B. Bcl-2 and Bcl-xL mediate resistance to receptor tyrosine kinase-targeted therapy in lung and gastric cancer. *Anticancer Drugs*, 2017, 28(10): 1141-1149.
- [33] Ryan CE, Davids MS. BCL-2 inhibitors, present and future. *Cancer J*, 2019, 25(6): 401-409.
- [34] Efeyan A, Zoncu R, Chang S, et al. Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival. *Nature*, 2013, 493(7434): 679-683.
- [35] Peng M, Yin N, Li MO. SZT2 dictates GATOR control of mTORC1 signalling. *Nature*, 2017, 543(7645): 433-437.
- [36] Zou ZL, Tao T, Li HM, et al. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell Biosci*, 2020, 10: 31.
- [37] Al-Bari MAA, Xu PY. Molecular regulation of autophagy machinery by mTOR-dependent and-independent pathways. *Ann N Y Acad Sci*, 2020, 1467(1): 3-20.
- [38] Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J*, 2012, 441(1): 1-21.
- [39] Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(5): 307-318.
- [40] Proud CG. mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(2): 429-436.

(本文责编 陈宏宇)