

GPR81 与 TOMM20 在下咽癌中的功能研究

徐 鸥,贾巧静,王建星,单春光

(河北医科大学第二医院 耳鼻咽喉一科,河北 石家庄 050000)

摘 要: **目的** 探索 G 蛋白偶联受体 81 (G - protein coupled receptor 81, GPR81) 和线粒体外膜异位酶 20 (translocase of the outer mitochondrial membrane member 20, TOMM20) 在下咽癌中的功能及临床意义。**方法** 选取 30 例经病理检查确诊为下咽鳞状细胞癌患者的下咽癌组织和癌旁组织,对患者临床资料进行统计学分析,并运用免疫组织化学方法检测 GPR81 和 TOMM20 在癌组织及癌旁组织中的表达。经特定浓度的顺铂诱导 Fadu 细胞,分别诱导 0、12、24 及 48h,经 Real-time PCR 及 Western Blot 检测 GPR81、TOMM20 在 mRNA 和蛋白质水平的变化。采用流式细胞术检测顺铂刺激 Fadu 细胞后细胞凋亡情况。**结果** GPR81 和 TOMM20 在下咽癌组织的表达水平显著高于癌旁组织,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。在下咽癌中,临床分期为 I、II 期的下咽癌中 GPR81、TOMM20 显著低于 III、IV 期 ($P < 0.05$)。有淋巴结转移的下咽癌组织中 GPR81、TOMM20 的表达显著高于无淋巴结转移的下咽癌组织 ($P < 0.05$)。GPR81 在中低分化的下咽癌中具有较高表达,在高分化下咽癌中表达较低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。不同分化程度的下咽癌中 TOMM20 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。顺铂诱导 Fadu 细胞中 GPR81 及 TOMM20 的表达随时间呈现递减趋势,其 mRNA 水平及蛋白水平 48h 表达量与对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。顺铂刺激的 Fadu 细胞中细胞凋亡数约为 $(11.35 \pm 0.87)\%$,对照组中细胞凋亡数为 $(18.68 \pm 0.33)\%$,两者经比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** GPR81、TOMM20 可能与下咽癌的发生有关,二者可能参与了下咽癌化疗抵抗。因此能量代谢相关蛋白靶向研究或许是治疗侵袭性肿瘤的一个方向。

关 键 词: 下咽癌;GPR81;TOMM20;功能

中图分类号:R739. 63

A preliminary study on the function of GPR81 and TOMM20 in hypopharyngeal carcinoma

XU Ou, JIA Qiao-jing, WANG Jian-xing, SHAN Chun-guang

(Department of Otolaryngology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: **Objective** To explore the function and significance of G-protein coupled receptor 81 (GPR81) and translocase of the outer mitochondrial membrane member 20 (TOMM20) in hypopharyngeal carcinoma. **Methods** Immunohistochemical staining was performed to evaluate the expressions of GPR81 and TOMM20 in specimens of hypopharyngeal carcinoma and corresponding adjacent hypopharyngeal mucosa from 30 patients with pathologically confirmed hypopharyngeal squamous cell carcinoma. Their clinical data were analyzed. Fadu cells were incubated with cisplatin of a certain concentration for 0h, 12h, 24h and 48h respectively. The expression profiles of mRNA and protein level about GPR81, TOMM20 were detected by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot. The apoptosis of Fadu cells incubated with cisplatin was determined by flow cytometry. **Results** The expressions of GPR81 and TOMM20 in carcinoma tissues were higher than those in adjacent hypopharyngeal tissues ($P < 0.05$). In hypopharyngeal carcinoma tissues, the expressions of GPR81 and TOMM20 in specimens of stage III-IV were higher than those of stage I-II ($P < 0.05$). The expressions of GPR81 and TOMM20 in specimens from patients with lymphatic metastasis were higher than those without lymphatic metastasis ($P < 0.05$). The expression of GPR81 in hypopharyngeal carcinoma specimens with moderate to low differentiation was higher than that with high differentiation ($P < 0.05$), while the difference of TOMM20 expression was statistically insignificant ($P > 0.05$). Expressions of both GPR81 and TOMM20 in Fadu cells

基金项目:河北省政府资助临床医学优秀人才和基础课题研究项目(361004);河北省自然科学基金(H2016206535)。

作者简介:徐 鸥,女,博士,副主任医师。

通信作者:单春光,Email:shanchunguang@hebmu.edu.cn

incubated by cisplatin showed decreasing trend with time. No significant differences were found in the expression profiles of GPR81 and TOMM20 at 48h compared with those at 0h ($P > 0.05$). The apoptosis rates in the cisplatin-induced cells and untreated cells were $(18.68 \pm 0.33)\%$ and $(11.35 \pm 0.87)\%$ respectively, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** GPR81 and TOMM20 may be associated with the genesis of hypopharyngeal carcinoma and participate in the development of chemotherapy resistance. Therefore, targeted research on proteins related with energy metabolism may be a new orientation in the treatment of invasive tumors.

Keywords: Hypopharyngeal carcinoma; GPR81; TOMM20; Function

下咽癌是一种较为罕见的头颈恶性肿瘤,其中 95% 为分化程度较低的鳞状细胞癌。下咽鳞状细胞癌每年的发生率为 10 例/百万^[1]。下咽癌患者的早期症状并不明显,一旦确诊,75% 患者已发展为晚期。其常见的治疗方式有手术和放化疗,但预后较差^[2]。在头颈肿瘤治疗过程中,研究者发现下咽癌对化疗敏感性较低,产生化疗抵抗,导致下咽癌复发及治疗效果不佳。

GPR81 (g-protein coupled receptor 81) 是一种乳酸受体,可在多种肿瘤细胞中表达,如宫颈癌、结肠癌、乳腺癌、肝癌、肺癌等,通过与乳酸结合参与细胞的能量代谢^[3]。线粒体外膜异位酶 (translocase of the outer mitochondrial membrane member20, TOMM20) 是生物氧化磷酸化过程中代表线粒体质量及生物合成的标记物,在机体氧化磷酸化过程中发挥重要功能。关于 GPR81 与 TOMM20 在头颈肿瘤中的报道较为少见,其表达特征与临床因素的关系也尚不明确。基于下咽癌的化疗抵抗的发生,顺铂诱导下咽癌 Fadu 细胞中 GPR81、TOMM20 的表达变化也尚不清楚。本研究通过研究 GPR81、TOMM20 在下咽癌组织及癌旁组织中的表达特征以及在顺铂诱导下 Fadu 细胞中表达特点,阐述上述因子的表达与临床因素之间的关系,并说明其与顺铂抵抗是否具有相关性,为解决下咽癌化疗抵抗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床材料

下咽癌组织标本均来自于 2017 年 1 月—2018 年 12 月于河北医科大学第二医院耳鼻咽喉一科经手术切除的 30 例经病理检查确定为下咽鳞状细胞癌的患者,其中男 29 例,女 1 例,年龄 53 ~ 78 岁,平均 (58.85 ± 7.39) 岁。所有患者均为首次发病,未接受放/化疗。根据国际抗癌协会 (UICC, 2002) 分期标准,Ⅰ期 4 例,Ⅱ期 10 例,Ⅲ、Ⅳ期 16 例;高分化 15 例,中分化 11 例,低分化 4 例;无淋巴结转移

者 19 例,有淋巴结转移者 11 例。以 30 例下咽鳞状细胞癌的癌旁组织 (距下咽癌组织大于 0.5 cm 处) 为对照组,进行比较研究。本研究经河北医科大学第二医院医学伦理道德委员会批准执行,并经患者本人知情同意。

1.2 细胞培养与刺激

人下咽癌 Fadu 细胞系购买于中科院上海细胞生物研究所。细胞培养于含有 10% 胎牛血清 (Gibco, 美国), 100 U/ml 青霉素, 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 DMEM 高糖细胞培养基中。培养条件为 37℃, 并含有 5% CO_2 。待细胞生长稳定后,对 Fadu 细胞进行传代培养至 6 孔板,细胞浓度为 $(1.0 \sim 2.0) \times 10^5$ 个/ml。采用无菌的生理盐水稀释顺铂 (Thermo, 美国) 至浓度为 25 mg/ml, 分装成 1ml/管。在传代的 6 孔板中,待细胞对数期,加入上述 DMEM 培养基 2ml, 25 mg/ml 的顺铂 400 μl , 最终稀释的终浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$, 分别置于培养箱中培养 0、12、24、48 h。每组设置 3 个重复。

1.3 实验试剂

使用的 GPR81 一抗购自 Santa Cruze, TOMM20 一抗购自 CST, 所有抗体均为兔抗人。兔抗人二抗购自三鹰, 兔抗人的 beta-actin 一抗购自三鹰。蛋白裂解液 RIPA 购自索莱宝, RNA 提取试剂 Trizol 购自天根, cDNA 反转录试剂盒购自天根。BCA 蛋白浓度提取试剂盒购自索莱宝。Annexin V-APC/7-AAD apoptosis kit 购自联科生物。DBA 显色试剂盒与 SP 免疫组织化学染色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 免疫组织化学及结果判读方法 30 例下咽癌组织及癌旁组织的新鲜样本使用 4% 多聚甲醛固定过夜, 石蜡包埋后, 制作石蜡切片。经脱蜡、水化后进行链菌素亲生物素-过氧化物酶免疫组织化学法检测 GPR81、TOMM20 的表达情况。详细步骤参照产品说明书进行。一抗为兔抗人 GPR81 抗体 (1:100)、兔抗人 TOMM20 (1:100), PBS 代替一抗作为标本染色的阴性对照。

GPR81 及 TOMM20 均为胞外分泌蛋白,主要分布在细胞质或细胞膜上,阳性表达为棕黄色或棕褐色颗粒。免疫组织化学计分包括染色强度、阳性细胞所占比例。按照染色强度分为 4 级:未着色计 0 分,淡黄色或浅棕色计 1 分,棕黄色计 2 分,黄褐色计 3 分。按照阳性细胞所占比例分为 4 级:阳性细胞数为 0% ~5% 计 0 分,5% ~25% 计 1 分,26% ~50% 计 2 分,>50% 计 3 分。每张切片随机选取 3~5 个 400 倍视野,计算每个视野阳性细胞所占百分比,根据平均值进行计算。每张切片得分由染色强度评分与阳性细胞所占百分比评分相乘所得。0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),4~6 分为阳性(++),大于 6 分为强阳性(+++),其中(+)(++)定义为阳性表达。

1.4.2 RNA 提取及 cDNA 第一条链反转录 将顺铂诱导的 Fadu 细胞用无菌 PBS 置于冰上清洗 3 次,每次 5 min,弃去 PBS,每孔加入 600 μ l Trizol,冰上裂解,将裂解液吸出至 1 ml 灭酶离心管中,加入 200 μ l 氯仿,震荡 30 s,充分混合,冰上静置 10 min,吸出上清,加入 500 μ l 异丙醇,上下颠倒混匀,冰上静置 15 min,4℃,12 000g 离心 15 min,吸出上清,加入 1 ml 75% 乙醇,上下颠倒混匀,4℃,12 000g 离心 5 min,吸出上清,空气中干燥 15~30 min,加入 30~100 μ l DEPC 水溶解 RNA。使用 NanoDrop 2 000C 检测 RNA 浓度。根据 FastQuant cDNA 第一条链合成试剂盒说明书,进行 cDNA 第一条链的合成。

1.4.3 Real-time PCR 以顺铂刺激的不同时间的 Fadu 细胞的 cDNA 为模板,beta-actin 为内参基因,利用 Real-time PCR 分析 GPR81、TOMM20 在顺铂刺激的 Fadu 细胞中 mRNA 水平变化。引物采用 Primer 5 设计,序列见表 1。Real-time PCR 反应体系为:超纯水 9 μ l,2 $\times$ SYBR Green I Real-time PCR Master Mix 9 μ l,上下游引物(10 μ M)各 0.5 μ l,不同刺激处理的 cDNA 模板 1 μ l。Real-time PCR 反应程序为:95℃ 预变性 2 min,95℃ 变性 15 s,58℃ 退火 20 s,68℃ 延伸 32 s,共进行 40 个循环。制作溶解曲线。

表 1 引物序列信息

名称	序列	碱基数	Tm 值(℃)
GPR81-F1	TGGCTGCGGACAGGTATT	18	58.8
GPR81-R1	CCAAACAATCTTGAAGGAGC	20	57.8
TOMM20-F1	GACCGCAAAAGACGAAGTG	19	57.3
TOMM20-R1	GGAACACTGGTGGTGAAG	19	58.2
Beta-actin-F1	TTGGCAATGACGGGTTC	18	58.3
Beta-actin-R1	GAAGGTGGACAGCGAGGC	19	57.2

1.4.4 Western Blot 将顺铂诱导的不同时间的 Fadu 细胞进行蛋白裂解。将变性的蛋白裂解液,用 12% SDS-PAGE 分离胶进行蛋白分离,再将蛋白转膜至 PVDF 膜上,用含有 3% 牛血清蛋白的 TBST 于 37℃ 封闭 1h,用 TBST 按照 1:1 000 稀释一抗,用封口膜将 PVDF 膜密封浸润在一抗中,4℃ 摇床过夜孵育。将 PVDF 膜置于摇床上用 TBST 室温清洗 3 次,每次 10 min,然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(用 TBST 按照 1:2 000 稀释),室温孵育 2 h。采用 GE 化学发光仪对蛋白进行显色。采用 Image J 进行灰度值分析。

1.4.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 Fadu 细胞传代至六孔板,待细胞生长至对数期,细胞浓度为(1 $\times$ 10⁶) 个/ml 时,用终浓度为 5 μ g/ml 的顺铂诱导 48 h,另一组为无顺铂诱导的 Fadu 细胞,每组均设置 3 个重复。用胰酶消化细胞,并用预冷的 PBS 清洗 2 次,300 g 离心 5min,弃上清。按照 Annexin V-APC/7-AAD apoptosis kit 使用说明书对细胞进行处理,以便后续仪器参数调整和检测。

1.5 数据分析

使用 SPSS 21.0 进行数据分析,不同蛋白阳性表达率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,对不同因子在 mRNA 水平及蛋白水平表达结果分析采用独立样本 *t* 检验,细胞凋亡结果比较采用方差分析,取 α = 0.05 为检验水准,*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GPR81 及 TOMM20 在下咽癌中的表达

2.1.1 GPR81 及 TOMM20 在下咽癌组织及癌旁组织中的表达特征 GPR81 在下咽癌组织中的阳性表达率为 73.33% (22/30),在癌旁组织中的表达率为 20% (6/30),二者表达差异具有统计学意义(χ^2 = 17.14, *P* = 0.00)。TOMM20 在下咽癌组织中的阳性表达率为 63.33% (19/30),在癌旁组织中的表达率为 26.67% (8/30),二者表达差异具有统计学意义(χ^2 = 8.15, *P* = 0.01),见图 1。

2.1.2 GPR81 及 TOMM20 表达与临床资料的关系

在 I、II 期的下咽癌患者中,GPR81 的阳性表达率为 28.57% (4/14),III、IV 下咽癌患者中的阳性表达率为 68.75% (11/16),二者表达差异具有统计学意义(*P* < 0.05)。GPR81 在有淋巴结转移患者中表达率为 72.73% (8/11),在无淋巴结转移患者中表达率为 26.32% (5/19),二者表达差异具有统计学

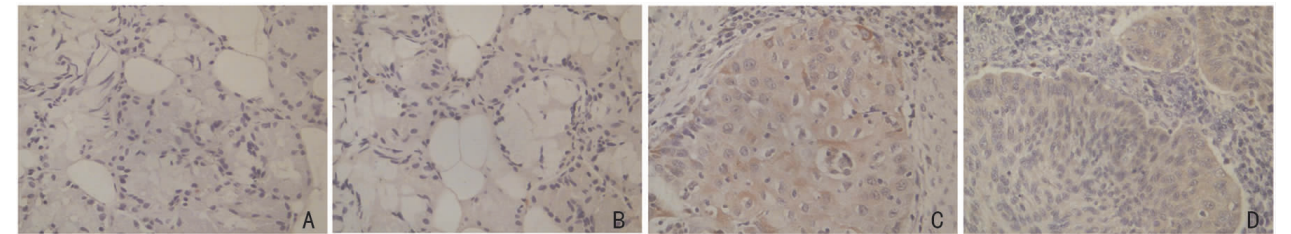


图1 GPR81 及 TOMM20 在下咽鳞状细胞癌组织及癌旁组织中的表达（免疫组化 ×400） A:GPR81 在癌旁组织中的阴性表达;B:TOMM20 在癌旁组织中的阴性表达;C: GPR81 在下咽鳞状细胞癌中的阳性表达;D: TOMM20 在下咽鳞状细胞癌中的阳性表达

意义($P < 0.05$)。在中低分化的下咽鳞状细胞癌患者中,GPR81 的表达率为 73.33% (11/15),高分化的下咽鳞状细胞癌中期表达率为 26.67% (4/15),二者表达差异具有统计学意义($P < 0.05$)。经统计学分析,GPR81 在下咽癌中的表达与有无淋巴结转移、肿瘤分期及肿瘤分化程度有关,具体数据见表 2。

在 I、II 期的下咽癌患者中,TOMM20 的阳性表达率为 35.71% (5/14),III、IV 下咽癌患者中的阳性表达率为 81.25% (13/16),二者表达差异具有统计学意义($P < 0.05$)。在有淋巴结转移患者中表达率为 63.64% (7/11),在无淋巴结转移患者中表达率为 21.05% (4/19),二者表达差异具有统计学意义($P < 0.05$)。在中低分化的下咽鳞状细胞癌患者中,TOMM20 的表达率为 66.67% (10/15),高分化的下咽鳞状细胞癌中期表达率为 53.33% (8/15),二者表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。经统计学分析,TOMM20 在下咽癌中的表达与有无淋巴结转移及肿瘤分期有关,与肿瘤分化程度无关,具体数据见表 2。

表 2 GPR81、TOMM20 与下咽鳞状细胞癌患者临床病理参数的关系 [例(%)]

临床病理参数	例数	GPR81 阳性	<i>P</i>	TOMM20 阳性	<i>P</i>
临床分期					
I、II	14	4 (28.57)	0.000	5 (35.71)	0.024
III、IV	16	11 (68.75)		13 (81.25)	
分化程度					
高分化	15	4 (26.67)	0.027	8 (53.33)	0.710
中低分化	15	11 (73.33)		10 (66.67)	
淋巴结转移					
有	11	8 (72.73)	0.023	7 (63.64)	0.047
无	19	5 (26.32)		4 (21.05)	

2.2 顺铂诱导对 Fadu 细胞中能量代谢相关因子的 mRNA 水平表达分析

经 Real-time PCR 检测顺铂刺激 Fadu 细胞中能量代谢因子在 mRNA 水平的变化,结果如图 2 所示。在顺铂刺激的 Fadu 细胞中,在不同时间,乳酸受体 GPR81 的表达情况呈现下降趋势,未刺激的

Fadu 细胞中 GPR81 表达量最高,48 h 的表达量为最低,约为 0h 的 0.68 倍,差异无统计学意义($P > 0.05$)。TOMM20 在顺铂诱导的 Fadu 细胞中,表达趋势有所下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。该结果表明顺铂诱导 Fadu 细胞,GPR81 和 TOMM20 在 mRNA 水平的表达变化与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

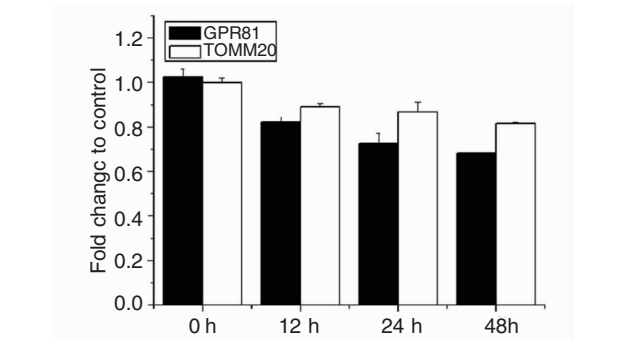


图2 顺铂诱导的 Fadu 细胞中 GPR81、TOMM20 在 mRNA 水平的表达

2.3 顺铂诱导对 Fadu 细胞中能量代谢相关因子蛋白水平表达分析

检测 GPR81、TOMM20 在蛋白质水平的表达变化采用 Western Blot 的方法,如图 3。以 beta-actin 作为内参,对顺铂诱导的 Fadu 细胞中 GPR81、TOMM20 的蛋白质水平变化进行分析。采用 Image J 进行灰度值分析,并利用 Origin70 对其统计结果进行作图,如图 3A 所示。GPR81、TOMM20 经顺铂刺激后,其表达趋势呈现下降趋势。与其在 mRNA 水平的表达结果一致。GPR81 在 48h 的表达量达到最低限,为对照组的 0.73 倍,与对照组无显著差异($P > 0.05$)。TOMM20 经顺铂刺激后表达轻微下降,但与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 顺铂诱导对细胞凋亡的影响

采用流式细胞术检测终浓度为 5 μg/ml 的顺铂诱导 48 h 后 Fadu 细胞凋亡情况。结果如图 4 所示。未经顺铂诱导的凋亡细胞数为 (11.35 ± 0.87) %,经

顺铂诱导的 Fadu 凋亡细胞数为 $(18.68 \pm 0.33)\%$,二者差异具有统计学意义($P < 0.05$) ,如图 4C。

3 讨论

肿瘤细胞能量代谢主要通过大量摄取葡萄糖进行有氧糖酵解反应,并辅助微弱的氧化磷酸化进行产能,为肿瘤细胞快速增殖分化提供能量。因此肿瘤增殖与细胞能量代谢密切相关。

在肿瘤细胞中,快速的糖酵解反应导致体内乳酸大量累积。有报道认为肿瘤细胞中乳酸的累积与肿瘤细胞的存活、转移以及侵袭密切相关。作为乳酸的关键受体,GPR81 的活性对于肿瘤细胞的生存与发展意义重大。在肺癌中,GPR81 可调控由乳酸诱导的 PD-L1 的生成,GPR81 基因沉默可导致 PD-L1 表达下调,并使 PD-L1 启动子活性丧失。GPR81 的活性还可抑制胞内 cAMP 水平降低,并抑制蛋白酶 A (PKA) 的活性^[4]。Roland 等^[3] 发现在胰腺癌组织中 GPR81 具有较高的表达水平,GPR81 基因沉默对高糖培养的胰腺癌细胞无显著影响,但可加速低糖与高乳酸环境中培养的胰腺癌细胞的死亡。在培养基中加入乳酸可导致该环境下培养的胰腺癌细胞中乳酸相关基因的高表达,如 PGC1 α 、MCT1、

MCT4 以及 CD147,然而在 GPR81 基因沉默的胰腺癌细胞中无如此结果。体内实验证明,GPR81 与胰腺癌细胞生长及代谢速率相关。胡媛等^[5] 在宫颈鳞癌中发现 GPR81 表达较高,与癌旁组织相比具有统计学意义,与肿瘤分期有显著相关性,与分化程度及淋巴结转移无显著相关性。在本研究中,GPR81 在下咽癌组织高表达,与癌旁组织相比差异具有统计学意义($P < 0.05$) ,且其表达与肿瘤分期、分化程度、淋巴结有无转移有关。但由于收集病例有限,导致部分临床因素的分组中患者数量较小,这一因素有可能对结果造成一定影响。目前,已有文献报道肿瘤的化疗抵抗可能与能量代谢密切相关^[6]。有研究报道,在经过顺铂处理后的宫颈癌 HeLa 细胞,Ca Ski 细胞及 C33A 细胞中,D - 乳酸及 L - 乳酸可以增加上述细胞的存活^[7]。我们推测这一现象可能与乳酸激活 GPR81 的活性有关。本研究中,经顺铂诱导 Fadu 细胞后,发现 GPR81 在 mRNA 水平及蛋白水平均有所下降,但与对照组相比,差异不显著,无统计学意义($P > 0.05$)。这一结果可能与下咽癌中 Fadu 细胞对顺铂的化疗抵抗有关,也有可能跟 Fadu 细胞状态、顺铂诱导方法等因素有关。

目前已有很多研究证实肿瘤细胞中能量代谢方式以氧化磷酸化与糖酵解并存^[8-10]。TOMM20 是线

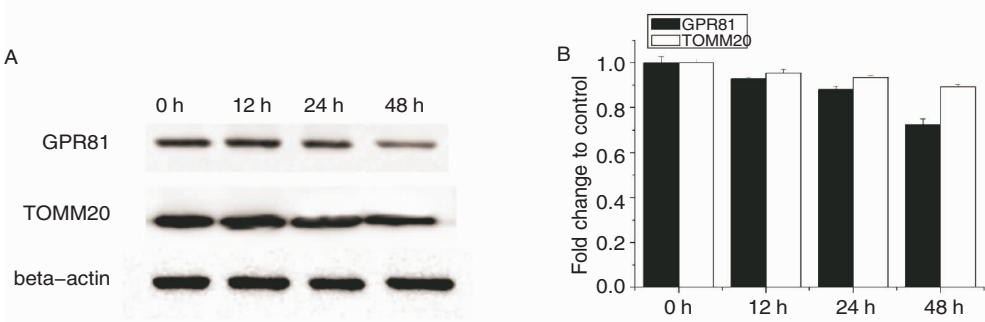


图 3 顺铂诱导的 Fadu 细胞中 GPR81、TOMM20 在蛋白质水平的表达 A:GPR81、TOMM20 及内参 Actin 蛋白的 Western Blot 结果; B:GPR81、TOMM20 与内参 Actin 的蛋白表达统计分析

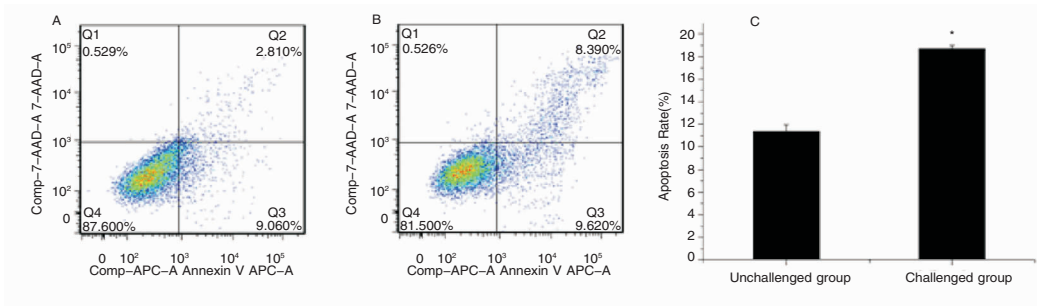


图 4 未诱导 Fadu 细胞及顺铂诱导 Fadu 细胞中的细胞凋亡分析 A:未经顺铂诱导的 Fadu 细胞凋亡情况; B:经特定浓度顺铂诱导的 Fadu 细胞凋亡情况; C:不同诱导条件下细胞凋亡统计分析

粒体外膜异位酶的一个亚基,作为前体蛋白受体在裂解 N 端靶向线粒体前序列中发挥作用,是能量代谢受体复合物的核心组成,负责细胞溶胶合成线粒体蛋白的识别与异位。TOMM20 也被认为是功能线粒体质量及氧化磷酸化活性的重要指标^[11-12]。Curry 等^[10]在头颈肿瘤中通过比较 Ki67、MCT-1、MCT-4 及 TOMM20 的表达情况,来研究在肿瘤细胞中糖酵解与氧化磷酸化是否共存,结果发现在细胞增殖较快及富含线粒体的细胞中 Ki67、MCT-1、MCT-4 及 TOMM20 均表现为阳性表达。在被检测的高分化头颈肿瘤样本中,增殖较快的肿瘤细胞的前缘 TOMM20 表达量最高,在肿瘤细胞其他部位 TOMM20 表达较低。在低分化的头颈肿瘤中,所有癌细胞中 TOMM20 的表达统一,且均表现为强阳性。Johnson 等^[13]研究发现相对于正常组织, TOMM20 在未分化的甲状腺癌和乳突型甲状腺癌中均有较高的表达。本研究中, TOMM20 在下咽癌中阳性表达率为 63.33%,显著高于在癌旁组织中的表达($P < 0.05$)。TOMM20 的表达与肿瘤分期、淋巴结转移密切相关,与肿瘤分化程度无关。这一结果与 Curry 结果不一致,其原因可能是样本来源、肿瘤发作部位不一致及样本较小所致。Podratz 等^[14]曾经在果蝇中发现顺铂诱导会抑制线粒体功能的执行,进而抑制 TOMM20 的表达。本研究中,顺铂诱导 Fadu 细胞后, TOMM20 在蛋白水平和 mRNA 水平均呈现下降趋势,但与未刺激组的 TOMM20 表达相比,差异不显著,其原因可能与化疗抵抗有关,也可能是细胞生长状态所致。

本研究通过对下咽癌组织中对 GPR81 及 TOMM20 的表达分析,及经顺铂诱导下 Fadu 细胞后二者的表达特征进行研究,发现 GPR81 及 TOMM20 的表达具有肿瘤异质性,这为头颈肿瘤靶向治疗方向提供了一个新的切入点。接下来笔者还可对 GPR81 和 TOMM20 基因在头颈肿瘤中的作用机制继续深入挖掘,进而将其更好的应用于临床治疗。

参考文献:

- [1] Davies L, Welch HG. Epidemiology of head and neck cancer in the United States[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2006, 135(3): 451–457.
- [2] Smith RB, Apostolakis LW, Karnell LH, et al. National Cancer Data Base report on osteosarcoma of the head and neck[J]. *Cancer*, 2003, 98(8): 1670–1680.
- [3] Roland CL, Arumugam T, Deng D, et al. Cell surface lactate re-

- ceptor GPR81 is crucial for cancer cell survival[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(18): 5301–5310.
- [4] Feng J, Yang H, Zhang Y, et al. Tumor cell-derived lactate induces TAZ-dependent upregulation of PD-L1 through GPR81 in human lung cancer cells[J]. *Oncogene*, 2017, 36(42): 5829–5839.
- [5] 胡媛,曾飞. G 蛋白偶联受体 81、单羧酸转运体 1 和 4 在宫颈鳞癌中的表达及临床意义[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2018, 43(9): 950–956.
- Hu Y, Zeng F. Expressions of GPR81, MCT1 and MCT4 in squamous carcinoma and their clinical significance[J]. *Journal of Central South University (Medical Science)*, 2018, 43(9): 950–956.
- [6] Farge T, Saland E, de Toni F, et al. Chemotherapy-resistant human acute myeloid leukemia cells are not enriched for leukemic stem cells but require oxidative metabolism[J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(7): 716–735.
- [7] Wagner W, Ciszewski WM, Kania KD. L- and D-lactate enhance DNA repair and modulate the resistance of cervical carcinoma cells to anticancer drugs via histone deacetylase inhibition and hydroxycarboxylic acid receptor 1 activation[J]. *Cell Commun Signal*, 2015, 13: 36.
- [8] Gootu M, Whitaker-Menezes D, Spradno J, et al. Mitochondrial and glycolytic metabolic compartmentalization in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Semin Oncol*, 2017, 44(3): 204–217.
- [9] Mikkilineni L, Whitaker-Menezes D, Domingo-Vidal M, et al. Hodgkin lymphoma: A complex metabolic ecosystem with glycolytic reprogramming of the tumor microenvironment[J]. *Semin Oncol*, 2017, 44(3): 218–225.
- [10] Curry JM, Tassone P, Cotzia P, et al. Multicompartment metabolism in papillary thyroid cancer[J]. *Laryngoscope*, 2016, 126(10): 2410–2418.
- [11] Martinez Cantarin MP, Whitaker-Menezes D, Lin Z, et al. Uremia induces adipose tissue inflammation and muscle mitochondrial dysfunction[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2017, 32(6): 943–951.
- [12] Gehrke S, Wu Z, Klinkenberg M, et al. PINK1 and Parkin control localized translation of respiratory chain component mRNAs on mitochondria outer membrane[J]. *Cell Metab*, 2015, 21(1): 95–108.
- [13] Johnson JM, Lai SY, Cotzia P, et al. Mitochondrial metabolism as a treatment target in anaplastic thyroid cancer[J]. *Semin Oncol*, 2015, 42(6): 915–922.
- [14] Podratz JL, Lee H, Knorr P, et al. Cisplatin induces mitochondrial deficits in *Drosophila* larval segmental nerve[J]. *Neurobiol Dis*, 2017, 97(Pt A): 60–69.

(收稿日期:2019-04-05)

本文引用格式:徐 鸥,贾巧静,王建星,等. GPR81 与 TOMM20 在下咽癌中的功能研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2019, 25(5): 498–503. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201905010

Cite this article as: XU Ou, JIA Qiao-jing, WANG Jian-xing, et al. A preliminary study on the function of GPR81 and TOMM20 in hypopharyngeal carcinoma [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2019, 25(5): 498–503. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.201905010