

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202120291

· 论著 ·

G 蛋白偶联受体 81 基因沉默联合顺铂诱导与喉癌能量代谢相关因子的研究

贾巧静, 贾晓芳, 张海中, 岳丽艳, 张玉波, 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** 探讨 G 蛋白偶联受体 81 (*GPR81*) 基因沉默联合顺铂诱导对喉癌细胞中能量代谢相关因子及细胞凋亡抑制蛋白表达的影响。**方法** Hep2 细胞在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂浓度下诱导 0、12、24、48 h。构建 shRNA-GPR81 干扰质粒, 转染 shRNA-scramble 质粒作对照, 转染至 Hep2 细胞后经不同浓度的顺铂诱导 Hep2 细胞 24 h, 经蛋白印迹分析 (Western Blot) 检测单羧酸转运蛋白 4 (MCT4)、细胞凋亡抑制蛋白 (survivin) 及 Na^+ -葡萄糖共转运蛋白 (SGLT-1) 在蛋白质水平的变化。**结果** *GPR81* 基因沉默的 Hep2 经不同浓度顺铂诱导后, MCT4 整体表达下调, 在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂诱导的 shRNA-GPR81 组中 MCT4 的表达显著低于 shRNA-scramble 组中 MCT4 的表达, 约为后者的 0.65 倍 ($P < 0.05$)。SGLT-1 经不同浓度顺铂诱导后先上调, 在 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 达到最大值, 约为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 3.38 倍, 其后开始下降, 其中 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂诱导 SGLT-1 在 shRNA-GPR81 组中表达显著高于 shRNA-scramble 对照组, 约为后者的 4.5 倍 ($P < 0.05$)。Survivin 经不同浓度顺铂诱导后, *GPR81* 基因沉默的 Hep2 细胞中, 表达呈现下调趋势, 其中 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度刺激使得其表达量最低, 约为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 0.36 倍, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), survivin 在 shRNA-scramble 组表达的抑制程度比 shRNA-GPR81 组弱, 在 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂诱导后, 后者约为前者的 0.62 倍和 0.64 倍。特定浓度顺铂诱导 Hep2 细胞中 MCT4、survivin、SGLT-1 的表达随时间呈现递减趋势, 其蛋白水平 48 h 表达量与 0 h 相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** *GPR81* 基因沉默联合顺铂诱导可抑制 MCT4 表达, 促进 SGLT-1 表达, 并抑制 survivin 的表达。

关键词: 喉癌; GPR81; 基因沉默; 顺铂; 能量代谢

中图分类号: R739.65

Study on G-protein-coupled receptor 81 gene silencing combined with the factors of cisplatin induction related to energy metabolism in laryngeal carcinoma cells

JIA Qiaojing, JIA Xiaofang, ZHANG Haizhong, YUE Liyan, ZHANG Yubo, SHAN Chunguang

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

Abstract: **Objective** To investigate the effects of G-protein-coupled receptor 81 (*GPR81*) gene silencing combined with cisplatin induction on expression of energy metabolism-related factors and apoptotic inhibitory proteins in laryngeal carcinoma cells. **Methods** Hep2 cells were induced at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cisplatin concentration for 0, 12, 24, 48 h. shRNA-GPR81 vector and shRNA-scramble vector were constructed, and transfected into Hep2 cells. After 48h of transfection, Hep2 cells were incubated with cisplatin of different concentrations for 24 h. The protein levels of monocarboxylate transporter 4 (MCT4), apoptotic inhibitory protein (survivin), and Na^+ /glucose co-transporter (SGLT-1) were detected by Western Blot. **Results** The expression of MCT4 was significantly down-regulated in Hep2 silencing-GPR81 combined with the treatment of cisplatin at different concentrations. The expression of MCT4 in shRNA-GPR81 group induced by 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cisplatin was significantly lower (0.65 times) than that of the shRNA-scramble group ($P < 0.05$). The expression of SGLT-1 was initially up-regulated, and then down-regulated by different concentrations of cisplatin. The expression of SGLT-1 was about 3.38 times after treatment of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ than that of 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which was the maximum value at 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

基金项目:河北省科技厅重点研发计划项目(20372401D)。

第一作者简介:贾巧静,女,硕士,研究实习员。

通信作者:单春光,Email:shanchunguang@163.com

cisplatin. The expression of SGLT-1 at 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induced cisplatin in shRNA-GPR81 group was significantly 4.5 times higher than that in shRNA-scramble control group ($P < 0.05$). The expression of survivin in Hep2 cells transfected with shRNA-GPR81 was exhibited a downtrend after stimulated with cisplatin, which was the lowest at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.36 times compared to 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and there was statistical significance between two groups ($P < 0.05$). The expression of survivin in the shRNA-scramble group was less inhibited than that in the shRNAGPR81 group. And the expression of survivin at 2 and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of cisplatin induction in shRNA-GPR81 group compared to shRNA-scramble group were about 0.62-fold and 0.64 fold ($P < 0.05$). The expressions of MCT4, survivin and SGLT-1 in Hep2 cells induced by cisplatin at a specific concentration showed a decreasing trend in time. The expression levels of MCT4, Survivin and SGLT-1 were statistically difference in Hep2 cells at 48h compared to at 0h ($P < 0.05$). **Conclusion** GPR81 silencing combined with cisplatin incubation could inhibit the expression of MCT4 and survivin, but enhance the expression of SGLT-1 in laryngeal cancer.

Keywords: Laryngocarcinoma; GPR81; Gene silencing; cisplatin; Energy metabolism

喉癌是常见的头颈部恶性肿瘤之一,以原发性较为多见,鳞状细胞癌最多,大约占耳鼻咽喉部位恶性肿瘤的 7.9% ~ 35%^[1],在头颈部恶性肿瘤中排名第 3 位。迄今为止,喉癌的治疗方式一直采用手术切除原发区癌组织及淋巴结,配合放疗化疗及细胞抑制剂。在某些情况下,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) 靶向抗体西妥昔单抗和程序性死亡受体-1 (programmed death receptor-1, PD-1) 抗体也用于喉癌的临床治疗。因其具有易复发、转移快以及预后差的特点,对患者的生理、心理及正常生活带来许多痛苦。对喉癌采取治疗及干预措施后,其晚期患者的 5 年生存率仍不尽人意^[2-3]。因此,寻找新的特异性靶点对于喉癌的治疗具有重要意义。

在肿瘤微环境中,恶性肿瘤细胞通过葡萄糖摄入进行高效的糖酵解,并将乳酸转运出细胞作为糖酵解过程的中间产物。在过去,乳酸常常被认为是代谢垃圾,然而有研究表明乳酸可作为信号传导分子,激活特定的 G 蛋白偶联受体 81 (G protein-coupled receptor, GPR81)。GPR81 的表达特征与能量代谢异常密切相关。目前有报道称其在各种原发性肿瘤细胞中均具有高表达特性^[4-6],并参与恶性肿瘤的增殖、分化、生长、生存及细胞凋亡^[7-9]。单羧酸转运蛋白(monocarboxylate transporters, MCT)在维持糖酵解进程中扮演重要角色,并具有乳酸调控及 pH 值控制的双重功能^[10-11]。Na⁺-葡萄糖共转运蛋白(sodium-glucose co-transporter 1, SGLT-1)是一种高亲和力、低容量的受体,可运输两个钠分子和一个葡萄糖分子,介导小肠细胞对葡萄糖的摄取和近端肾小管的 S3 段,主要作用是介导跨膜吸收葡萄糖和半乳糖^[12-13]。本研究主要通过构建 GPR81-shRNA,并转染至 Hep2 细胞中,联合顺铂诱导后,研究其与 MCT4、SGLT-1 表达的相关性,以及通过检测细

胞凋亡抑制蛋白(survivin)的表达,研究其对细胞凋亡的影响,进而阐述 GPR81 与顺铂诱导在喉癌发生机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

使用的一抗 GPR81 购自 Santa Cruze, SGLT-1、MCT4、survivin 一抗购自 Abcam,一抗 beta-actin 及二抗购自三鹰,抗体为兔抗人。细胞培养基 RPM1640 购买于索莱宝,胎牛血清购买于依科赛生物科技有限公司(中国),双抗、蛋白裂解液 RIPA 和 BCA 蛋白浓度提取试剂盒购自索莱宝。转染试剂 Lip3000 购自 Invitrogen。RNA 提取试剂 Trizol 及 cDNA 反转录试剂盒购自北京天根。胰酶、青霉素、链霉素购自于索莱宝。

1.2 细胞培养与刺激

喉癌 Hep2 细胞系为我院耳鼻咽喉科实验室保存。Hep2 细胞培养于 T25 细胞培养瓶,包含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 RPM1640 细胞培养基 5 mL。培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$,培养箱保持 5% CO₂、湿度 95%。待细胞贴壁生长数量达 5×10^6 ,对 Hep2 细胞传代培养至 6 孔板,待细胞浓度为 $(1.0 \sim 2.0) \times 10^5$ 个/孔时进行 shRNA 转染。带有绿色荧光蛋白(GFP)标签的 shRNA-GPR81 质粒和 shRNA-scramble(对照)质粒由广州赛业生物公司合成。采用 Lip3000 进行质粒转染,转染过程参照说明书。转染 48 h 后荧光显微镜下通过 GFP 表达情况观察细胞转染程度,对于转染达 75% 以上的细胞用不同浓度顺铂诱导处理。顺铂浓度分别为 0、0.5、1、2、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,置于培养箱中培养 24 h 后收集蛋白。每组设置 3 个重复。另外,未经质粒转染的 Hep2 细胞经 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂刺激后,分

别于培养箱中诱导 0、12、24、48 h 后收集样品用于 RNA 提取或蛋白分离,每个刺激设置 3 个重复。用于 RNA 提取的 Hep2 细胞经磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 清洗后加入 500 μL Trizol,用于后续 RNA 提取。

1.3 实验方法

1.3.1 RNA 提取及 cDNA 第一条链的合成 将转染了 shRNA-GPR81 质粒(实验组)和 shRNA-scramble 质粒(对照组)的 Hep2 细胞用预冷无菌 PBS 置于摇床清洗 3 次,每次 5 min,弃去 PBS 后,每孔加入 500 μL Trizol,冰上裂解,将裂解液吸出至 2 mL 无 RNA 酶离心管中,加入 200 μL 氯仿,剧烈震荡 30 s,冰上静置 10 min。然后轻轻吸出上清液,加入 500 μL 异丙醇,上下颠倒混匀,冰上静置 15 min,之后 4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 g 离心 15 min,吸出上清后,加入 1 mL 75% 乙醇,上下颠倒混匀,之后 4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 g 离心 5 min,将上清吸出,置于空气中干燥 30 min,最后根据 RNA 的丰度高低加入 30~100 μL DEPC 水。使用 NanoDrop 2000C 检测 RNA 浓度。cDNA 第一条链的合成参照 FastQuant cDNA 第一条链合成试剂盒说明书。

1.3.2 半定量聚合酶链式反应 (PCR) 以上述反转录的 Hep2 细胞 cDNA 为模板,beta-actin 为内参基因,利用半定量 PCR 分析 GPR81 基因在 GPR81 基因沉默的 Hep2 细胞中 mRNA 水平变化,进而检测 GPR81-shRNA 的干扰效率。引物采用 Primer 5 设计,引物序列如表 1。半定量 PCR 反应体系为:超纯水 8 μL ,PCR Master Mix 10 μL ,上下游引物 (10 μM) 各 0.5 μL ,不同刺激处理的 cDNA 模板 1 μL 。半定量 PCR 反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min。PCR 反应产物经琼脂糖凝胶电泳检测,并采用 Image J 进行灰度值分析。

表 1 引物序列信息

名称	序列	碱基数	Tm 值($^{\circ}\text{C}$)
GPR81-F1	TGCTGCGGACAGGTATT	18	58.8
GPR81-R1	CCAAACAATCTTGAAGGAGC	20	57.8
beta-actin-F1	TTGGCAATGAGCGTTCC	18	58.3
beta-actin-R1	GAAGGTGGACACCGAGCC	19	57.2

1.3.3 蛋白印迹分析 (Western Blot) 用于蛋白分离的 Hep2 细胞经无菌 PBS 清洗后,加入放射免疫沉淀实验 (RIPA) 裂解液冰上裂解 30 min,然后用细胞刮刀刮取细胞,4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 g 离心 15 min 后,吸取上清,用二辛可宁酸 (BCA) 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,加入蛋白上样缓冲液后,99 $^{\circ}\text{C}$ 加热

10 min 使得蛋白质变性,然后冰上放置 2 min,可冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 用于 Western Blot。经变性的蛋白裂解液用 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离胶进行蛋白分离,再将蛋白转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,用含有 5% 牛血清白蛋白的加入吐温 20 的 Tris-盐酸缓冲液 (TBST) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中封闭 1 h。TBST 与一抗按照 1:500 比例进行稀释,用封口膜将转有蛋白的 PVDF 膜密封浸润在一抗中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。将孵育后的 PVDF 膜置于摇床上用 TBST 室温清洗 3 次,每次 5 min,然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (TBST 与二抗按照 1:2 000 稀释),室温孵育 2 h,经 TBST 清洗 2~3 次后,加入化学发光显色剂进行显色,然后采用化学发光仪对蛋白进行发光。采用 Image J 进行灰度值分析目的蛋白的表达情况。

1.4 数据分析

利用统计软件 SPSS 20 对数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA, Duncan) 和独立样本 t 检验,取 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。数据分析完成后,导入 excel 表格中,使用 Origin 7 作图。

2 结果

2.1 GPR81 基因沉默联合顺铂诱导对 MCT4、survivin 及 SGLT-1 表达的影响

采用半定量 PCR 方法和 Western Blot 检测 GPR81 在 Hep2 细胞中的基因沉默效果,如图 1 所示。GPR81 在 GPR81 基因沉默的 Hep2 细胞中其 mRNA 水平和蛋白质水平的表达量分别为 shRNA-scramble 组的 0.28 倍 ($P < 0.01$) 和 0.31 倍 ($P < 0.05$)。

GPR81 基因沉默的喉癌 Hep2 细胞经 0、0.5、1、2、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂诱导 24 h 后 MCT4、SGLT-1 及 survivin 的表达情况如图 2~4 所示。MCT4 在转染了 shRNA-GPR81 的 Hep2 细胞和转染 shRNA-scramble 的 Hep2 细胞中其表达均呈现下调趋势。其中,在 shRNA-GPR81 组中,在顺铂浓度 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 刺激中,其表达与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的顺铂诱导下的表达比较显著有显著下调趋势,分别为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂刺激组的 0.29 倍和 0.2 倍 ($P < 0.05$)。MCT4 在对照组中的表达趋势亦呈现下调趋势,在 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂刺激下,与无顺铂诱导下的表达比较有显著差异,分别为无顺铂诱导条件下 MCT4 表达量的 0.35 倍及 0.28 倍 ($P < 0.05$),其中在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂

诱导的 shRNA-GPR81 细胞中 MCT4 的表达显著低于 shRNA-scramble 细胞中 MCT4 的表达,约为 shRNA-scramble 组的 0.65 倍,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),如图 4 所示。

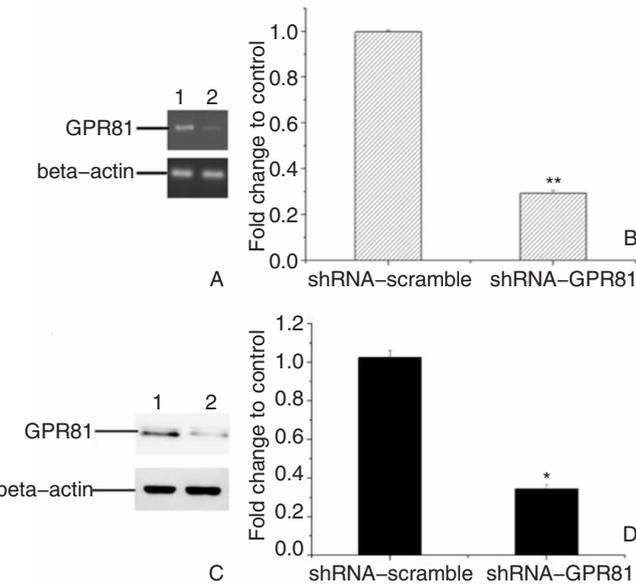


图 1 GPR81 在转染不同质粒的 Hep2 细胞中的 mRNA 及蛋白水平表达结果 A、B:GPR81 在转染不同质粒的 Hep2 细胞中的 mRNA 水平的表达及统计结果;C、D:GPR81 在转染不同质粒的 Hep2 细胞中的蛋白水平的表达及统计结果 (1:转染 shRNA-scramble 质粒;2:转染 shRNA-GPR81 质粒)

SGLT-1 在转染 shRNA-GPR81 的 Hep2 细胞中其表达趋势呈现先上调,在 $2\mu\text{g/mL}$ 顺铂诱导下,其表达达到最高峰,为无顺铂刺激组表达量的 3.38 倍 ($P < 0.01$),其后表达降低,为无顺铂刺激组表达量的 2.7 倍 ($P < 0.05$)。而在 shRNA-scramble 对照组中,SGLT-1 在不同浓度顺铂诱导下其表达呈现总体下降的趋势,其中在 $5\mu\text{g/mL}$ 顺铂诱导下,表达量最低,为无顺铂诱导条件下的 0.49 倍 ($P < 0.05$)。其中 SGLT-1 在 0.5、1、2、 $5\mu\text{g/mL}$ 的顺铂诱导的 GPR81 基因沉默的 Hep-2 细胞中的表达均显著高于阳性对照组 Hep-2 细胞。其中在 $2\mu\text{g/mL}$ 顺铂诱导时其差异最显著,约为 shRNA-scramble 组的 4.5 倍 ($P < 0.05$),如图 3 所示。

Survivin 在转染了 shRNA-GPR81 的 Hep2 细胞中其表达呈现下降趋势,其中在 0.5、1、2、 $5\mu\text{g/mL}$ 顺铂诱导条件下与无顺铂诱导相比,分别为无顺铂诱导下 survivin 表达量的 0.74、0.61、0.44、0.36 倍,在 $5\mu\text{g/mL}$ 顺铂诱导条件下达到最低,具有统计学意义 ($P < 0.05$),该结果表明 survivin 对 GPR81 沉

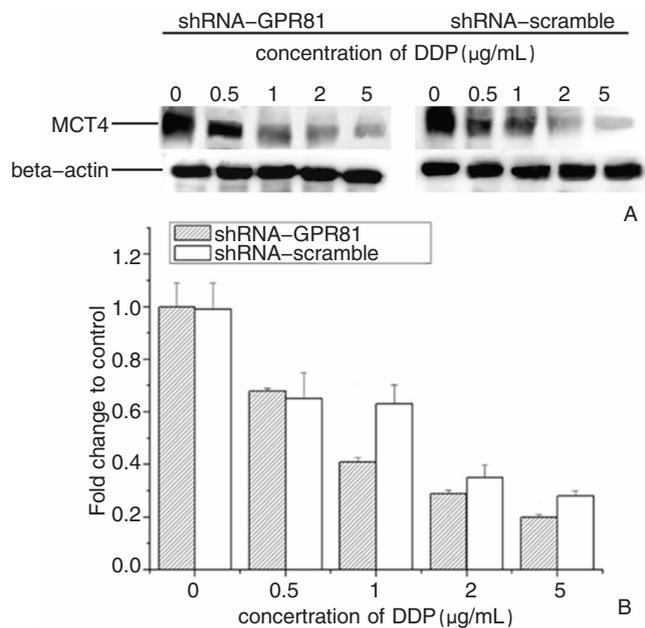


图 2 GPR81 基因沉默联合顺铂诱导条件下 Hep2 细胞中 MCT4 的表达情况 A:在转染了 shRNA-scramble 和转染了 shRNA-GPR81 质粒的 Hep2 细胞经不同浓度顺铂诱导后 MCT4 表达情况;B:MCT4 蛋白表达的统计学分析;DDP 为顺铂,下同

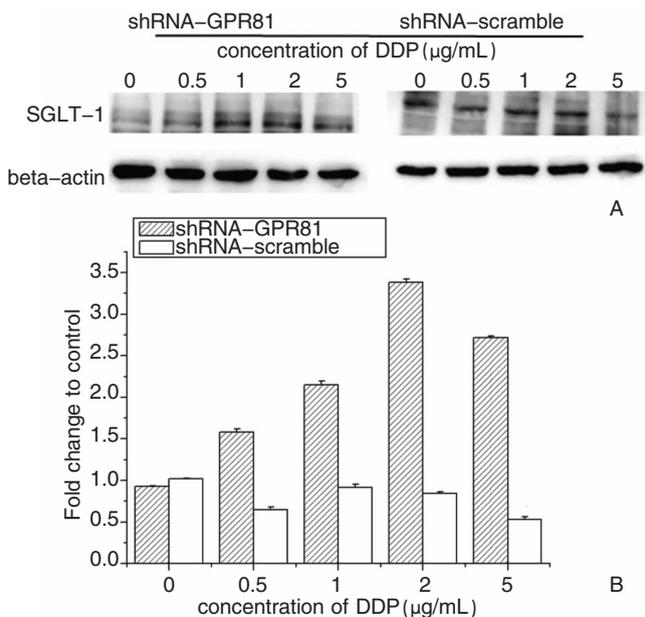


图 3 GPR81 基因沉默联合顺铂诱导条件下 Hep2 细胞中 SGLT-1 的表达情况 A:在转染了 shRNA-scramble 和转染了 shRNA-GPR81 质粒的 Hep2 细胞经不同浓度顺铂诱导后 SGLT-1 表达情况;B:SGLT-1 蛋白表达的统计学分析

默及顺铂诱导比较敏感。同时,在顺铂诱导的 shRNA-scramble 对照组 Hep2 细胞中,survivin 的表达也呈现下调趋势,其中在 0.5、1、2、 $5\mu\text{g/mL}$ 顺铂诱导条件下与无顺铂诱导相比,分别为无顺铂诱导下

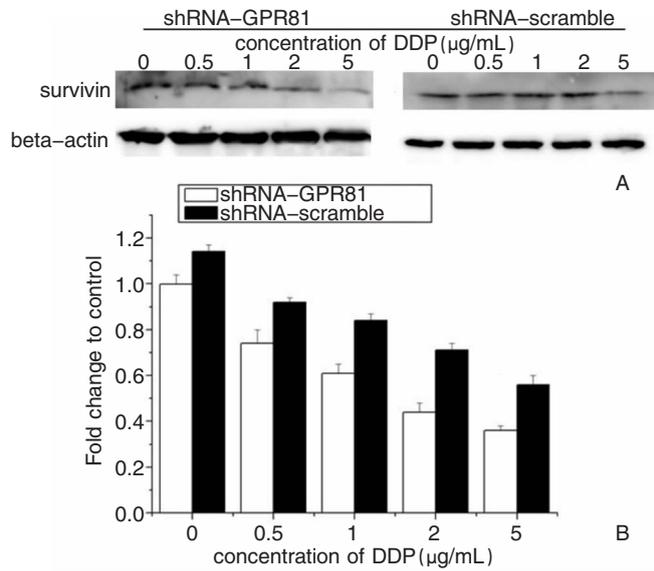
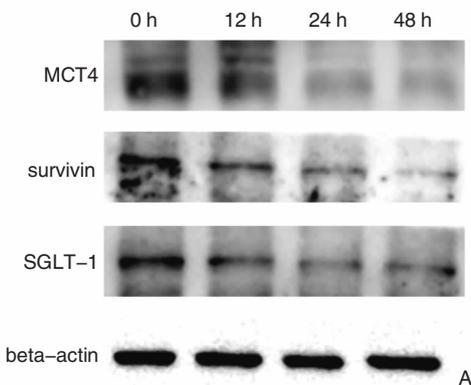


图4 *GPR81* 基因沉默联合顺铂诱导条件下 Hep2 细胞中 survivin 的表达情况 A: 在转染 shRNA-scramble 和转染了 shRNA-GPR81 质粒的 Hep2 细胞经不同浓度顺铂诱导后 survivin 表达情况; B: survivin 蛋白表达的统计学分析

survivin 表达量的 0.92、0.84、0.71、0.56 倍。在 5 μg/mL 的顺铂诱导条件下, 达到最低值, 为无顺铂诱导条件下表达量的 0.56 倍, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 但该组 survivin 表达的抑制程度比 shRNA-GPR81 组弱, 两组在 2 μg/mL 及 5 μg/mL 顺铂诱导下表达量前者约为后者的 0.62 倍和 0.64 倍, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 如图 5 所示, 这一结果说明 *GPR81* 基因沉默联合顺铂诱导可抑制 survivin 的表达, 进而促进细胞凋亡的发生。

2.2 顺铂诱导 MCT4、survivin 及 SGLT-1 在喉癌 Hep2 中的表达特征

Hep2 细胞经 5 μg/mL 顺铂诱导 0、12、24、48 h



后, MCT4、survivin 及 SGLT-1 在喉癌细胞中的表达情况如图 5 所示。MCT4 在顺铂诱导下, 随着时间的推移, 其表达呈现下调趋势, 其中 24 h 的表达量与 48 h 的表达量分别为 0 h 表达量的 0.44 倍和 0.34 倍, 与 0 h 表达量相比显著下降, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Survivin 基因在顺铂诱导下随着诱导时间的变化, 其表达趋势逐渐下降。在 48 h 下降到最低值, 约为 0 h 刺激表达量的 0.281 倍, 二者差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。SGLT-1 在顺铂诱导下的表达情况也是被抑制表达的, 随着诱导时间的延长, 其表达逐渐下调, 在 48 h 达到最低值, 约为 0 h 的 0.29 倍 ($P < 0.05$)。

3 讨论

肿瘤是一种动态的假器官, 其包含多种类型的细胞, 并通过细胞间的相互作用产生一种独特的生理微环境。在肿瘤细胞网络中, 恶性肿瘤细胞会遭遇很多挑战, 如物理压力、氧化应激、营养匮乏、细胞间竞争、乏氧及免疫监视与放疗抵抗等, 并通过改变能量代谢特性来适应各种挑战。

MCT4 在细胞中主要参与一元羧酸等胞内的释放过程, 其对丙酮酸亲和力较低, 对乳酸的亲和力较高, 并受分解代谢的核转录因子如缺氧诱导因子 HIF-1a 及核转录因子 NF-κB 调控, 在肿瘤相关的成纤维细胞中具有高表达特征^[13], 有报道称在多种恶性肿瘤中 MCT1 和 MCT4 表达上调, 可以作为肿瘤治疗的潜在靶向分子^[14]。目前尚无明确的研究报道顺铂诱导及 GPR81 对 MCT4 表达的影响。在本研究中经顺铂诱导后 MCT4 的表达随着时间推移其

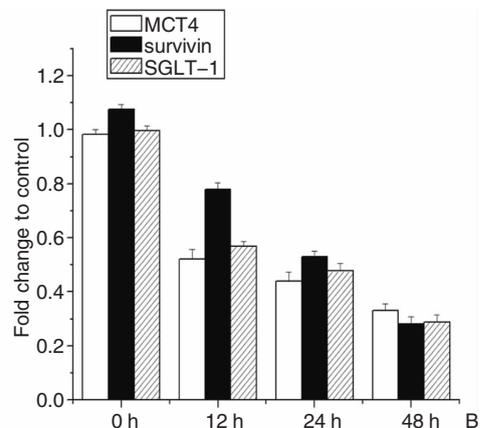


图5 顺铂诱导不同时间的 MCT4、survivin、SGLT-1 表达情况 A: Hep2 细胞经顺铂诱导 0、12、24、48h 后, MCT4、survivin 及 SGLT-1 在蛋白水平的表达情况; B: 统计分析结果

表达量逐渐降低,并在 48 h 达到最低,说明 Hep2 细胞经顺铂诱导后其乳酸含量减少。我们在先前的预实验中发现,糖酵解反应过程中的第二个限速酶磷酸果糖激酶 1 (phosphofructokinase-1, PFK-1) 经相同条件的顺铂诱导后其表达也呈现逐渐下降的趋势,因此推测顺铂对糖酵解可能存在一定的抑制作用,进而说明糖酵解过程的葡萄糖摄入及乳酸累积降低。这一结论也能从侧面解释 MCT4 经顺铂诱导后表达下调的原因。MCT1、MCT4 及 GPR81 是乳酸转运的重要参与者,三者共同调控乳酸的来源与去向,维持细胞能量代谢的正常进行。在本研究中,GPR81 基因沉默的 Hep2 细胞联合不同浓度顺铂诱导后与对照组相比,MCT4 仍表现为下调趋势,根据这一结果我们推测 GPR81 的缺失联合顺铂诱导对乳酸的转运具有抑制作用。

GPR81 作为糖酵解反应中间产物乳酸的受体,其表达量的高低与能量代谢过程密切相关。SGLT-1 在肿瘤中具有高表达特性,通过介导葡萄糖的转运为肿瘤细胞提供营养,促进肿瘤细胞的生长^[15]。葡萄糖作为细胞的主要能量来源,可通过 SGLT-1 转运葡萄糖,以满足肿瘤细胞通过高效的糖酵解反应获取细胞增殖所需的能量。目前已有许多研究表明 SGLT-1 可在多种肿瘤细胞中表达,如肺癌、头颈肿瘤、宫颈癌等^[16-18]。有研究报道,顺铂可以降低 SGLT 家族的亲和力(主要是 SGLT-2),抑制其在近曲肾小管上皮细胞中的表达^[19]。该机制可能是通过共价铂与转运蛋白的巯基(SH)集团藕联来实现的^[20]。考虑到 SGLT-1 与 SGLT-2 氨基酸序列具有 59% 的同源性^[21],我们推测 SGLT-1 在顺铂诱导下也能发挥其相应的功能。本研究中 SGLT-1 经顺铂诱导不同时间后,其表达呈现下调趋势,说明顺铂可抑制 SGLT-1 的表达,相似的研究结果在肾小管上皮细胞的相关报道中也出现过^[22]。我们知道,糖酵解反应的中间产物乳酸可以作为 GPR81 的配体激活 GPR81,进而下调 cAMP 及减弱蛋白激酶 A (PKA) 调控的信号转导通路。而有研究表明 SGLT-1 在糖酵解能量代谢过程中,为葡萄糖的摄入、能量储存及转运发挥重要作用^[23-24],进而影响乳酸的合成。因此,我们推测 GPR81 的表达量高低在一定程度上会影响 SGLT-1 的表达,进而影响生物体能量代谢的过程。本研究中在 GPR81 基因沉默的 Hep2 细胞中,经顺铂诱导后 SGLT-1 蛋白表达整体呈现先上调趋势,在 2 μg/mL 的顺铂浓度诱导后达到最大值,经 5 μg/mL 顺铂诱导后其表达又呈现下调趋

势,但整体与阳性对照组相比表达上调。这一结果提示我们,在顺铂诱导的情况下,GPR81 基因沉默会增加 SGLT-1 的表达,进而促进葡萄糖的转运,为机体活动提供能量供应。从某种角度来说,SGLT-1 表达的升高是细胞应对顺铂诱导而获得的一种自我保护功能。

众所周知,顺铂诱导可导致细胞凋亡的发生。有研究表明,在肿瘤体内实验及体外实验经顺铂诱导后,均可导致凋亡抑制蛋白表达量的下调^[25-26]。GPR81 在乳腺癌患者的肿瘤组织及乳腺癌的几种细胞系中具有高表达,GPR81 基因敲除后可导致乳腺癌细胞生长受损,并导致细胞凋亡的发生^[9]。本研究中,顺铂诱导 Hep2 细胞后 survivin 的表达随着时间呈现下调趋势,GPR81 基因敲除联合顺铂诱导后的 Hep2 细胞中,survivin 在不同浓度顺铂诱导下,也呈现下调趋势,即细胞凋亡启动。这一研究结果与当前的研究结果一致,说明 GPR81 基因沉默对于细胞凋亡具有促进作用。

综上所述,GPR81 基因沉默联合顺铂诱导对喉癌细胞能量代谢相关的 MCT4、SGLT-1 的表达具有不同程度的影响,而且对细胞凋亡的发生也具有促进作用,这一研究结果可为临床治疗化疗抗性的喉癌提供一定的理论指导,为今后研究靶向治疗喉癌奠定基础。

参考文献:

- [1] 黄兆选,汪吉宝,孔维佳,等.实用耳鼻咽喉头颈外科学[M].北京:人民卫生出版社,2008:488-493.
- [2] 孔维佳,周梁,许庚,等.耳鼻咽喉头颈外科学[M].北京:人民卫生出版社,2010:460-464.
- [3] 陈文杰,王斌全,高伟,等.喉癌流行病学特征及影响因素分析[J].中国当代医药,2015,22(12):43-46.
- [4] Stäubert C, Broom OJ, Nordström A. Hydroxycarboxylic acid receptors are essential for breast cancer cells to control their lipid/fatty acid metabolism[J]. Oncotarget, 2015, 6(23), 19706-19720.
- [5] 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.
- [6] Roland CL, Arumugam T, Deng D, et al. Cell surface lactate receptor GPR81 is crucial for cancer cell survival[J]. Cancer Res, 2014, 74(18):5301-5310.
- [7] Brown TP, Bhattacharjee P, Ramachandran S, et al. The lactate receptor GPR81 promotes breast cancer growth via a paracrine

- mechanism involving antigen-presenting cells in the tumor microenvironment[J]. *Oncogene*, 2020, 39(16):3292–3304.
- [8] 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其临床意义[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2018, 42(9): 950–956.
- [9] Lee YJ, Shin KJ, Park SA, et al. G-protein-coupled receptor 81 promotes a malignant phenotype in breast cancer through angiogenic factor secretion [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (43): 70898 – 70911.
- [10] Halestrap AP. Monocarboxylic acid transport[J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(4):1611–1643.
- [11] Marchiq I, Pouyssegur J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H symporters[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94 (2): 155–171.
- [12] Garcia-Ropero A, Santos-Gallego CG, Badimon JJ. SGLT receptors and myocardial ischaemia reperfusion injury: inhibition of SGLT-1, SGLT-2, or both [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115 (11): 1572–1573.
- [13] Wilde L, Roche M, Domingo-Vidal M, et al. Metabolic Coupling and the Reverse Warburg Effect in Cancer, implications for novel biomarker and anticancer agent development [J]. *Semin Oncol*, 2017, 44(3): 198–203.
- [14] Pinheiro C, Longatto-Filho A, Azevedo-Silva J, et al. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2012, 44(1):127–139.
- [15] Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond[J]. *Pharmacol Ther*, 2009, 121(1): 29–40.
- [16] Taira N, Atsumi E, Nakachi S, et al. Comparison of GLUT-1, SGLT-1, and SGLT-2 Expression in False-Negative and True-Positive Lymph Nodes During the 18 F-FDG PET/CT Mediastinal Nodal Staging of Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Lung Cancer*, 2018, 123:30–35.
- [17] Helmke BM, Reisser C, Idzko M, et al. Expression of SGLT-1 in Preneoplastic and Neoplastic Lesions of the Head and Neck [J]. *Oral Oncol*, 2004, 40 (1):28–35.
- [18] Perez M, Praena-Fernandez JM, Felipe-Abrio B, et al. MAP17 and SGLT-1 protein expression levels as prognostic markers for cervical tumor patient survival [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (2): e56169.
- [19] Courjault-Gautier F, Grimellec CL, Giocondi MC, et al. Modulation of sodium-coupled uptake and membrane fluidity by cisplatin in renal proximal tubular cells in primary culture and brush-border membrane vesicles [J]. *Kidney Int*, 1995, 47 (4) :1048 – 1056.
- [20] Potdevin S, Courjault-Gautier F, Du Sorbier BM, et al. Role of protein thiols in inhibition of sodium-coupled glucose uptake by cisplatin in renal brush-border membrane vesicles [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 284 (1):142–150.
- [21] Wells RG, Pajor AM, Kanai Y, et al. Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter [J]. *Am J Physiol*, 1992, 263(3 Pt 2): F459–465.
- [22] Ikari A, Nagatani Y, Tsukimoto M, et al. Sodium-dependent glucose transporter reduces peroxynitrite and cell injury caused by cisplatin in renal tubular epithelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1717 (2):109–117.
- [23] Kashiwagi Y, Nagoshi T, Yoshino T, et al. Expression of SGLT-1 in human hearts and impairment of cardiac glucose uptake by phlorizin during ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (6) :e0130605.
- [24] Gawthrop PJ, Crampin EJ. Energy-based analysis of biomolecular pathways [J]. *Proc Math Phys Eng Sci*, 2017, 473 (2202) : 20160825.
- [25] Oh SM, Park G, Lee SH, et al. Assessing the recovery from pre-renal and renal acute kidney injury after treatment with single herbal medicine via activity of the biomarkers HMGB1, NGAL and KIM-1 in kidney proximal tubular cells treated by cisplatin with different doses and exposure times [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17 (1) :544.
- [26] Chen G. The relationship between the expression of TAM, survivin and the degree of necrosis of the tumor after cisplatin treatment in osteosarcoma [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21 (3) : 490–497.

(收稿日期:2020–06–03)

本文引用格式:贾巧静,贾晓芳,张海中,等. G 蛋白偶联受体 81 基因沉默联合顺铂诱导与喉癌能量代谢相关因子的研究 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2021, 27(2) :176–182. DOI:10.11798/j.issn.1007–1520.202120291

Cite this article as: JIA Qiaojing, JIA Xiaofang, ZHANG Haizhong, et al. Study on G-protein-coupled receptor 81 gene silencing combined with the factors of cisplatin induction related to energy metabolism in laryngeal carcinoma cells [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2021, 27(2) :176–182. DOI:10.11798/j.issn.1007–1520.202120291