

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202625266

· 头颈肿瘤专栏 ·

靶向抑制 Derlin-1 促进头颈部鳞状细胞癌细胞 凋亡并增强紫杉醇敏感性的研究

邓亚萍, 黎可华, 谭凤武

(株洲市中心医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖南 株洲 412007)

摘要: **目的** 本研究探讨靶向抑制内质网相关降解蛋白-1 (Derlin-1) 表达对头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 细胞凋亡及紫杉醇敏感性的影响。**方法** 以 HNSCC 细胞系 (FADU、TU686、CAL27) 为研究对象, 构建 shRNA-Derlin-1 质粒并转染至细胞中。经紫杉醇处理细胞后, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡比例。**结果** shRNA-Derlin-1 质粒可显著抑制 HNSCC 细胞中 Derlin-1 的表达, 同时降低肿瘤细胞蛋白激酶 B (AKT) 的磷酸化水平及 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 的表达, 并且显著提高 HNSCC 细胞的凋亡率 ($P < 0.001$)。经紫杉醇处理后, HNSCC 细胞凋亡率进一步增加 ($P < 0.001$)。**结论** 靶向抑制 Derlin-1 可通过阻断 AKT 信号通路的活化, 下调 Bcl-2 表达, 从而促进肿瘤细胞凋亡, 并增强 HNSCC 细胞对紫杉醇的敏感性。

关键词: 头颈部肿瘤; 内质网相关降解蛋白-1; 紫杉醇

中图分类号: R739.91

Targeted inhibition of Derlin-1 expression promotes apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma cells and enhances sensitivity to paclitaxel

DENG Yaping, LI Kehua, TAN Fengwu

(Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Zhuzhou Central Hospital, Zhuzhou 412007, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of targeted inhibition of Derlin-1 expression on apoptosis and paclitaxel sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells. **Methods** Using HNSCC cell lines (FADU, TU686, CAL27) as the study subjects. The shRNA-Derlin-1 plasmids were constructed and transfected into the cells. After treating the cells with paclitaxel, the apoptosis rate was detected by flow cytometry. **Results** The shRNA-Derlin-1 plasmid significantly inhibited the expression of Derlin-1 in HNSCC, reduced the phosphorylation level of tumor cell protein kinase B (AKT) and the expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and significantly increased the apoptosis rate of HNSCC ($P < 0.001$). After paclitaxel treatment, the apoptosis rate of HNSCC was further increased ($P < 0.001$). **Conclusions** Targeted inhibition of Derlin-1 can promote tumor cell apoptosis by blocking the AKT pathway activation and down-regulating Bcl2 expression, thereby increasing the sensitivity of HNSCC to paclitaxel.

Keywords: Head and neck neoplasm; Derlin-1; Paclitaxel

头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)指除鼻咽癌和皮肤鳞癌之外的来源于头颈部各个部位的鳞癌,包括口腔、口咽、喉和下咽部位的鳞癌^[1]。HNSCC 位居全身恶性肿瘤第六位,5 年总生存率仅 50%,尽管治疗手段在进步,但生存率并未得到显著提高^[2]。紫杉醇及其衍生物是局

部晚期或复发 HNSCC 诱导化疗的常用药物,疗效确切且毒性较小,但耐药是其治疗失败的主要原因^[3]。

内质网相关降解蛋白-1 (Derlin-1) 是内质网相关降解途径的核心蛋白,对内质网应激诱导的细胞周期阻滞和细胞凋亡发挥抑制作用^[4]。未折叠的蛋白质反应是由内质网中未折叠或错误折叠的蛋白质积

基金项目:湖南省自然科学基金科卫联合项目(2022JJ70171)。

第一作者简介:邓亚萍,女,硕士,主治医师。

通信作者简介:黎可华,女,主任医师。

累触发的促存活机制,在许多人类癌症中被激活,在肿瘤进展和治疗抵抗中起着关键作用^[5]。前期研究结果表明,磷脂酰肌醇 3- 激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路是细胞增殖和细胞存活的关键通路,肿瘤环境下 PI3K/AKT 途径与 Derlin-1 密切相关^[6],因此, Derlin-1 与许多人类癌症的进展和预后有关。已有研究表明,降低肿瘤细胞 Derlin-1 表达,可显著减弱 PI3K/AKT 信号通路的活化,促进细胞凋亡,抑制肿瘤细胞生长^[7]。Pi 等^[8]已通过研究发现 Derlin-1 在 HNSCC 细胞系(包括 FADU、TU686、5-8F、6-10B 等)的表达量远高于非恶性细胞系,表明 Derlin-1 在 HNSCC 的发展过程中可能起到促进作用。因此,探索靶向 Derlin-1 的抑制剂是否影响 HNSCC 对紫杉醇的耐药性具有重要科学价值及临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人咽鳞癌细胞(FADU)购买于上海中桥新舟;人喉鳞癌细胞(TU686)购买于上海通派生物;人舌鳞癌细胞(CAL27)购买于吉凯基因。

1.1.2 材料 紫杉醇购买于 APEX BIO 公司;shRNA-Derlin-1 质粒(shRNA-Derlin-1 SRD)和 shRNA 空载质粒(shRNA-NC SRC)的构建由锐博生物公司完成;LY294002 购买于 APEX BIO 公司。

1.1.3 主要试剂与仪器 RPMI-1640 培养基购买于 Sigma 公司;MEM 培养基购买于 Hyclone 公司;胎牛血清(FBS)购买于 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒购买于日本同仁;LIP2000 购买于 invitrogen 公司;RIPA 裂解液购买于中国上海碧云天公司;SuperECLPlus 超敏发光液购买于美国 advansta 公司;Derlin1 抗体购买于中国博奥森公司;AKT 抗体购买于英国 abcam 公司;p-AKT 抗体购买于美国 CST 公司;Bcl-2 抗体和 β -actin 抗体购买于美国 proteintech 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 FADU、TU686 和 CAL27 3 组细胞作为实验对象,细胞经复苏、培养至对数生长期,所用培养基分别为:含 10%FBS+1%双抗的 RPMI-1640 培养基、含 15%FBS+1%双抗的 MEM 培养基和含 10%FBS+1%双抗的 RPMI-1640 培养基。

1.2.2 细胞转染 分别取对数生长期的 3 种细胞,将其分为空白对照组(Blank),SRC 转染对照组和 SRD 转染组,使用 Lipo2000 将 SRC 和 SRD 质粒分

别转染入对数生长期的肿瘤细胞,培养 48 h 后,使用 G418 筛选。

1.2.3 CCK8 检测不同浓度紫杉醇不同处理时间后的细胞活力 将处于对数生长期细胞,分别使用不同浓度的紫杉醇(0、5、10、20、40、80 和 160 $\mu\text{mol/L}$)进行处理,培养 24 h,CCK8 试剂盒检测各处理组细胞的增殖能力,确定各细胞系的 IC50 值。本实验采用 Bio-Tek 酶标仪分析 450 nm 处 OD 值。

1.2.4 Western blot 检测 Derlin-1、AKT、p-AKT 以及 Bcl-2 蛋白表达情况 蛋白提取:采用细胞刮收集细胞于 1.5 mL 离心管中,2 000 rpm 离心 5 min,收集细胞沉淀。每管中加入 200 μL RIPA 蛋白裂解液,完全震荡,静置 5 min,重复 3 次,超声破碎处理 1.5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 rpm、20 min 离心,去除沉淀,收集上清液,BCA 检测蛋白浓度,并计算上样量。

Western blot 检测:制备 10% 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE),装配电泳系统,加等量蛋白样本,电泳完成后转膜,5%脱脂奶粉封闭,孵育一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 h、孵育二抗,化学发光仪检测目的蛋白表达水平。

1.2.5 流式细胞术测细胞凋亡 取对数生长期的 HNSCC 细胞接种于 24 孔培养板,分 6 组进行实验,分别为 Blank 组、空载质粒对照组(SRC)、质粒转染组(SRD)、空白紫杉醇组(Blank+PTX)、空载质粒紫杉醇组(SRC+PTX)、质粒紫杉醇组(SRD+PTX)。紫杉醇的浓度为各细胞系的 IC50 值。细胞培养 24 h。收集细胞,将 PBS 加入到细胞中,洗涤 2 次,每次 2 000 rpm 离心 5 min 后加入 500 μL 的 Binding buffer 悬浮细胞,随后加入 5 μL Annexin V-APC 混匀后再加入 5 μL Propidium Iodide,混匀室温、避光,反应 10 min。1 h 内,在流式细胞仪检测凋亡率。

1.3 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;不符合正态分布的计量资料采用非参数检验。3 组及以上之间采用单因素方差分析,符合正态分布采用 Bonferroni 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Western-blot 检测 Derlin-1 在 FADU、TU686、CAL27 细胞株中的表达

通过显微镜观察 FADU、TU686 和 CAL27 细胞的形态结构,结果显示 3 种细胞在 $\times 100$ 、 $\times 200$ 倍数

下均具有典型的上皮样特征(图 1A)。进一步采用 Western blot 检测 Derlin-1 蛋白表达水平(图 1),结果表明,Derlin-1 在 3 种细胞系中均表达较高,FADU 与 TU686 组表达水平相近($P>0.05$),CAL27 细胞中 Derlin-1 的表达水平显著低于 FADU 组($P<0.001$)和 TU686 组($P<0.0001$)。

2.2 SRD 介导 Derlin-1 沉默在 HNSCC 细胞系中的效率验证

为验证 SRD 对 Derlin-1 的沉默效率,本研究在 CAL27、FADU 及 TU686 细胞中构建 SRD 敲低 Derlin-1 表达模型,并通过 Western blot 检测其蛋白表达水平,结果见图 2。与 Blank 组和 SRC 组相比,SRD 处理后 3 种细胞系中 Derlin-1 蛋白表达水平均明显降低($P<0.001$),表明 SRD 能够有效沉默 Derlin-1 的表达。

2.3 CCK8 检测不同浓度紫杉醇不同处理时间后的细胞活力

CCK-8 检测 FADU、TU686 和 CAL27 细胞在不同时间点以及沉默 Derlin-1 条件下对紫杉醇的敏感

性。结果显示,同一时间点,3 种细胞株的增殖能力均随着紫杉醇浓度升高而降低,且各组 24 h 比 12 h 细胞增殖能力明显降低,CAL27 细胞的 IC₅₀ 由 12 h 的 40.90 mol/L 降为 16.95 mol/L;FADU 细胞 IC₅₀ 由 29.62 mol/L 降至 13.21 mol/L;TU686 细胞由 81.73 mol/L 降至 21.92 mol/L(图 3)。

2.4 靶向抑制 Derlin-1 表达增加 HNSCC 凋亡率及对紫杉醇的敏感性

通过以上 CCK8 实验测定各细胞系对紫杉醇的敏感性,在紫杉醇处理 24 h 后的 IC₅₀ 值分别为 31.6、52.9、41.8 $\mu\text{mol/L}$ 。各细胞系分别被 IC₅₀ 浓度的紫杉醇处理 24 h,使用流式细胞仪观察检测早期凋亡和晚期凋亡细胞所占比例。与对照组比较,结果显示 SRD 的转染显著增加了 HNSCC 细胞系的凋亡率($P<0.001$),见图 4,表明靶向 Derlin-1 能诱导 HNSCC 细胞的凋亡。SRD 转染后再用紫杉醇处理的凋亡率显著高于单纯紫杉醇处理($P<0.001$),表明靶向 Derlin-1 能增加 HNSCC 细胞对紫杉醇的凋亡率及敏感性。

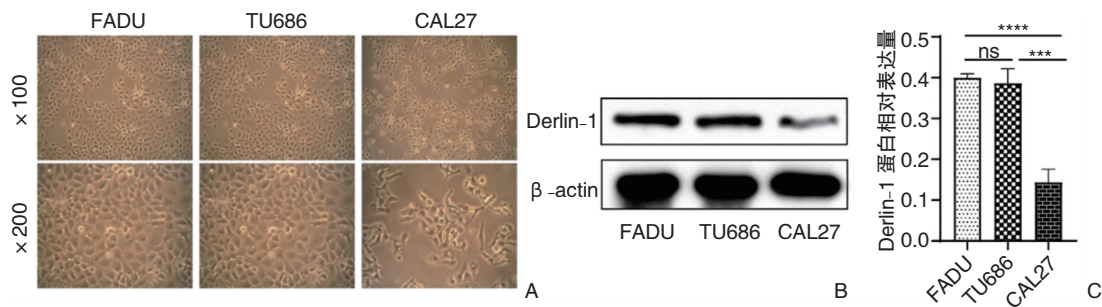


图 1 Derlin-1 蛋白在 FADU、TU686 和 CAL27 细胞株中的表达分析 A:3 种细胞形态结构;B:Western blot 蛋白电泳图;C:蛋白相对表达定量分析 注:ns $P>0.05$;*** $P<0.001$;**** $P<0.0001$ 。下同。

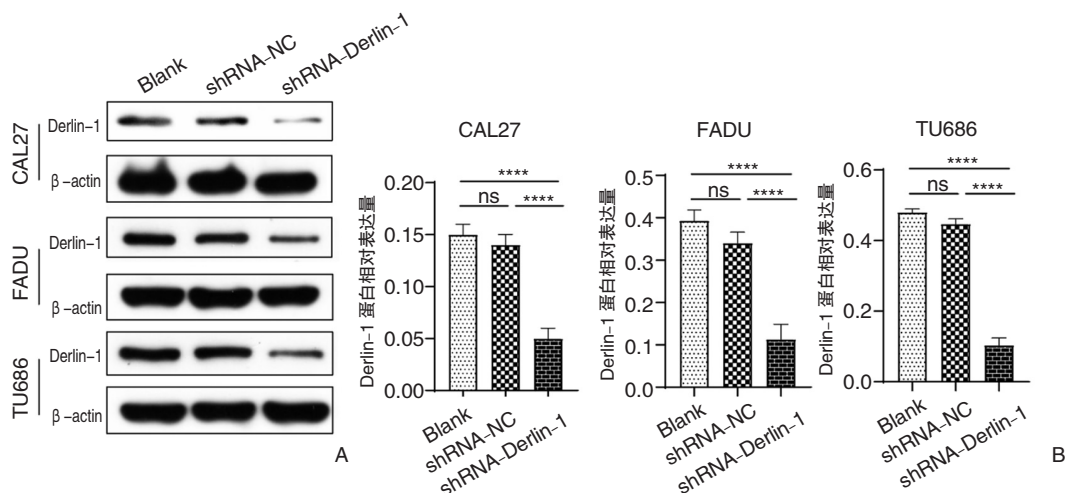


图 2 SRD 介导 Derlin-1 沉默在 CAL27、FADU 和 TU686 细胞系中的效率验证 A: Western blot 蛋白电泳图;B: 蛋白相对表达定量分析

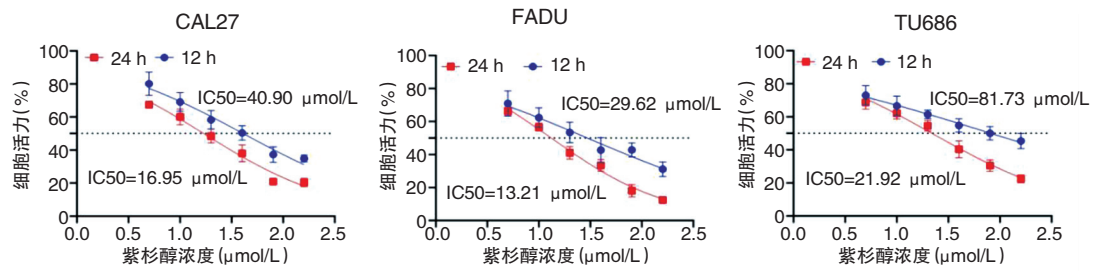


图 3 CAL27、FADU 和 TU686 细胞在 12 h 和 24 h 对紫杉醇的耐药性

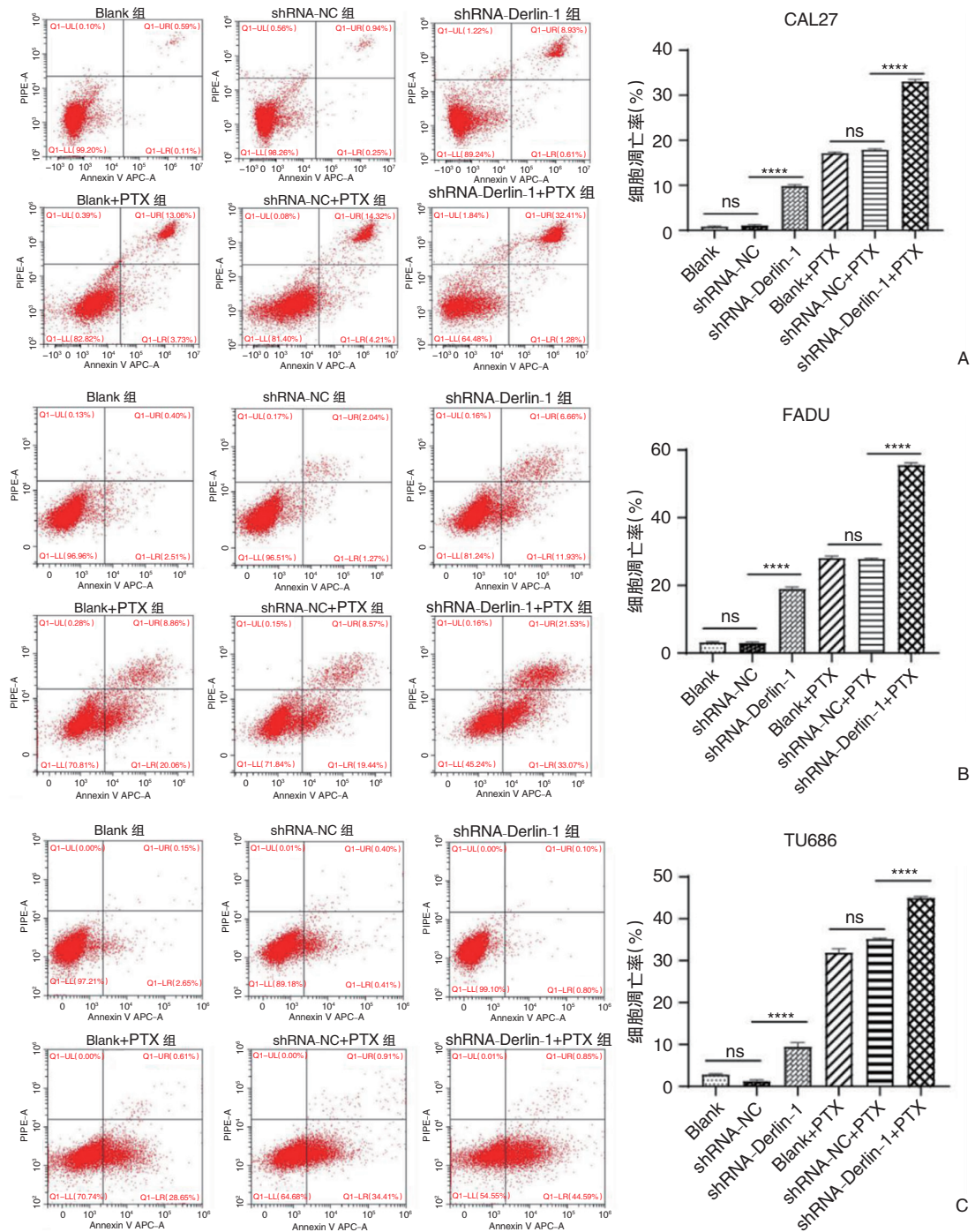


图 4 CAL27 (A)、FADU (B) 和 TU686 (C) 细胞在不同处理条件下的凋亡情况

2.5 沉默 Derlin-1 抑制 AKT 通路激活并下调 Bcl-2 表达

Western blot 检测 CAL27、FADU 和 TU686 细胞中 Derlin-1 沉默后 AKT 通路关键蛋白 (AKT、p-AKT) 及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达变化 (图 5)。在 CAL27、FADU 和 TU686 细胞中,与 Blank 组及 SRC 组相比,SRD 组中 p-AKT 水平显著降低 ($P<0.05$), Bcl-2 的表达水平同样均显著降低 ($P<0.01$),表明沉默 Derlin-1 可抑制 AKT 通路激活并降低 Bcl-2 表达。

2.6 沉默 Derlin-1 协同 PI3K 抑制剂 LY294002 通过抑制 AKT 通路下调 Bcl-2 表达并促进细胞凋亡

为进一步明确 Derlin-1 沉默是否通过 AKT 信号通路调控 Bcl-2 表达,采用 PI3K 抑制剂 LY294002 对 CAL27、FADU 及 TU686 细胞进行干预,并检测关键蛋白 (AKT、p-AKT 及 Bcl-2) 的表达

情况 (图 6)。结果显示,在 CAL27、FADU 和 TU686 细胞中,与 Blank + LY294002 组及 shRNA-NC + LY294002 组相比,shRNA-Derlin-1 + LY294002 组的 p-AKT 及 Bcl-2 表达水平均显著下降 ($P<0.05$),且与 shRNA-Derlin-1 组相比,p-AKT 及 Bcl-2 表达水平进一步显著降低 ($P<0.05$),表明沉默 Derlin-1 协同 LY294002 可能通过阻断 AKT 通路降低 Bcl-2 表达,从而增强肿瘤细胞对凋亡的敏感性,逆转 HNSCC 的耐药性。

3 讨论

Derlin-1 是一种重要的内质网膜蛋白,主要起到消除错误折叠蛋白质的作用^[9]。生存分析表明,高表达 Derlin-1 与较差的预后、较短的总生存期和无病生存期显著相关,且 Derlin-1 通过激活 AKT 信

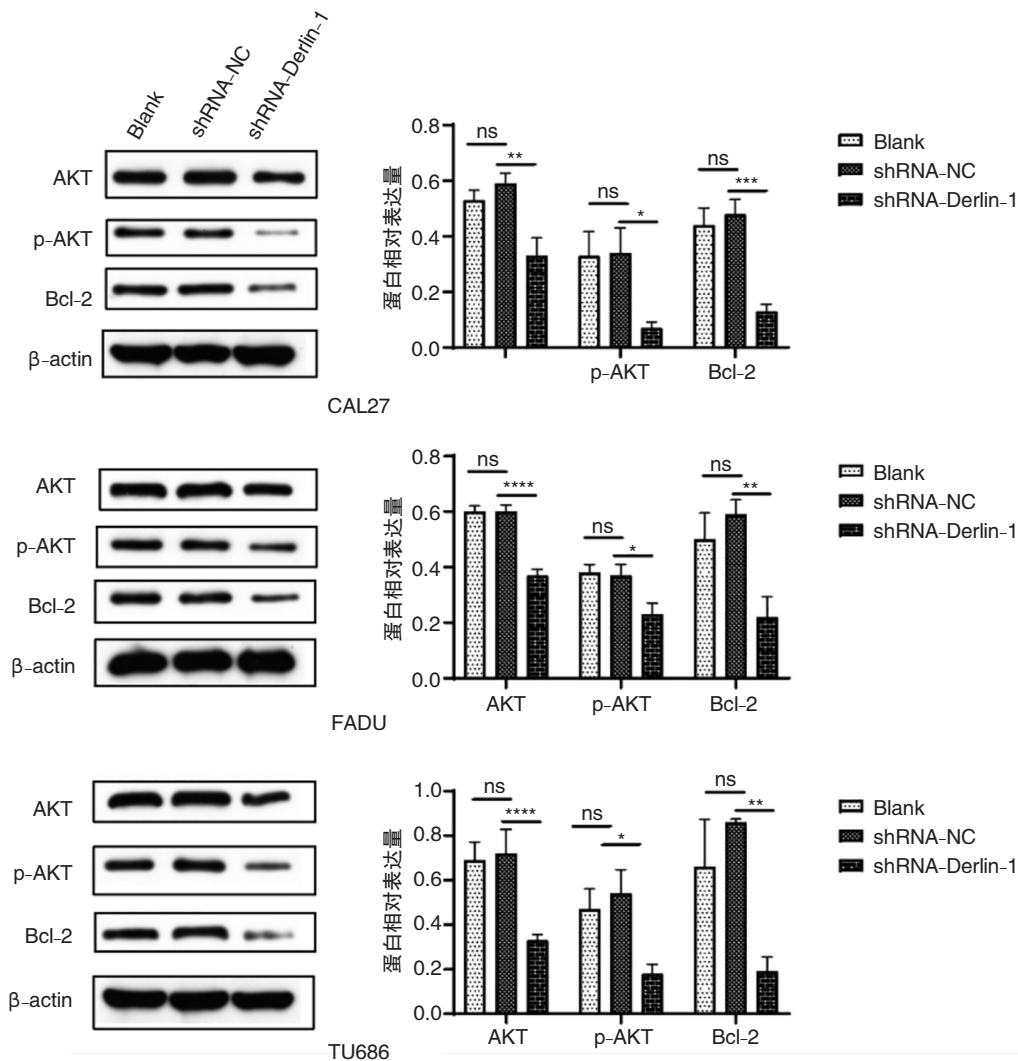


图 5 沉默 Derlin-1 抑制 AKT 通路激活并下调 Bcl-2 表达 注: * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。下同。

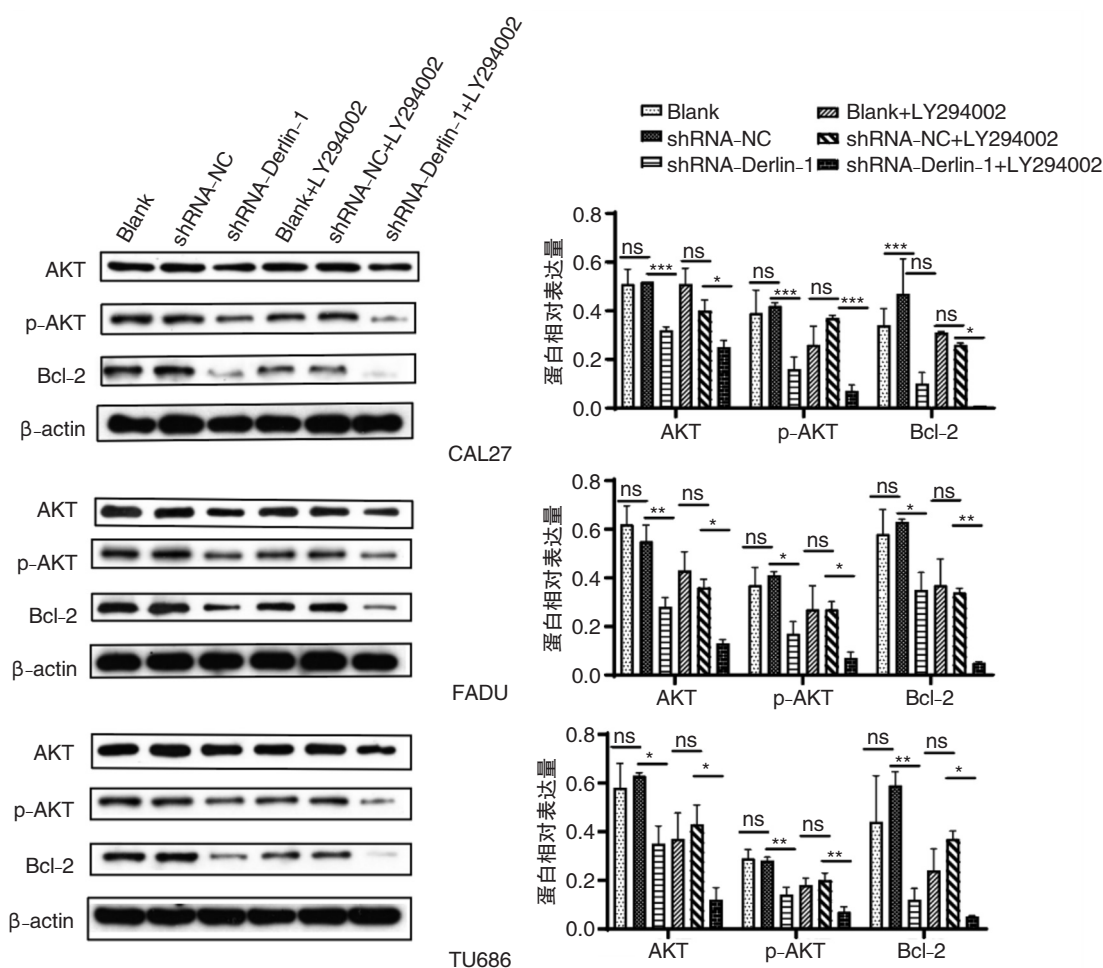


图 6 沉默 Derlin-1 协同 PI3K 抑制剂 LY294002 通过抑制 AKT 通路下调 Bcl-2 表达并促进细胞凋亡

号传导促进癌细胞的化疗耐药,随后下游 Bcl-2 升高^[6]。已有研究表明,Derlin-1 在乳腺癌、肺癌、结直肠癌、鼻咽癌中高表达,并保护肿瘤细胞免受内质网应激诱导的细胞凋亡^[7,10-11]。Fan 等^[12]研究表明 Derlin-1 沉默显著抑制了 PI3K/AKT 信号通路的激活,提高了细胞凋亡水平,进而抑制结肠癌和肝细胞癌细胞增殖。研究证实,PI3K/AKT 信号通路参与 HNSCC 发生发展的细胞途径,包括存活、增殖、侵袭以及凋亡^[13]。然而,在 HNSCC 中 Derlin-1 是否通过调控 AKT 发挥作用仍需进一步研究。Pi 等^[8]通过研究 Derlin-1 在 HNSCC 中的表达谱,发现 Derlin-1 在 HNSCC 中的表达远高于邻近黏膜,且发现 Derlin-1 在 HNSCC 细胞系中的敲低表达可抑制细胞增殖、转移并促进细胞凋亡,进一步的实验表明,PI3K/AKT、p53 和 Smad2/3 的信号可能参与这些过程。

本研究发现 Derlin-1 在多种 HNSCC 细胞系中同样高表达,表明其在 HNSCC 的恶性生物学过程

中具有普遍性。为进一步探讨 Derlin-1 影响 HNSCC 细胞凋亡和紫杉醇耐药性的分子机制,在 Pi 等^[8]已证实 Derlin-1 在 HNSCC 系中较正常细胞表达水平明显升高的基础上,使用 3 种常见的 HNSCC 细胞株 FADU、TU686、CAL27,建立各自的 Derlin-1 敲低模型,发现和空载组及空白组相比,转染组通过敲低 Derlin-1 表达进一步提高了 HNSCC 细胞凋亡水平,提示 Derlin-1 可能通过抑制凋亡途径参与耐药过程。进一步机制研究发现,Derlin-1 下调后,AKT 磷酸化水平显著降低,伴随其下游抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,Derlin-1 可能通过 AKT 信号通路发挥抗凋亡作用。该信号通路在多种肿瘤耐药机制中均被证实发挥关键作用,作为外源性生存信号与细胞内抗凋亡效应的关键枢纽,尤其是 Bcl-2 蛋白的上调,显著促进凋亡抑制及药物耐受的发生。使用 PI3K 通路抑制剂 LY294002 处理细胞后,进一步降低了 AKT、p-AKT 和 Bcl-2 表达。说明沉默 Derlin-1 可能通过抑制 PI3K/AKT 途径的激活,提高了细胞

凋亡水平,表明沉默 Derlin-1 可能促进细胞凋亡,增加了肿瘤细胞对紫杉醇的敏感性。

综上所述,本研究发现沉默 Derlin-1 通过抑制 PI3K/AKT 途径促进 HNSCC 细胞凋亡,并增强肿瘤细胞对紫杉醇的敏感性,这表明 Derlin-1 可能是 HNSCC 进展的预测因子,为开发 HNSCC 的治疗靶点提供了新的线索。

参考文献:

- [1] Solomon RJ, Young D, Rischin D, et al. Head and neck squamous cell carcinoma: genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments[J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 52(Pt 2): 228-240.
- [2] Camer JD, Burtress B, Le QT, et al. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(11): 669-683.
- [3] Hitt R, Irigoyen A, Cortes-Funes H, et al. Phase II study of the combination of cetuximab and weekly paclitaxel in the first-line treatment of patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of head and neck[J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(4): 1016-1022.
- [4] Mohamed E, Cao Y, Rodriguez PC. Endoplasmic reticulum stress regulates tumor growth and anti-tumor immunity: a promising opportunity for cancer immunotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(8): 1069-1078.
- [5] Emma M, Susan E, Sandra J, et al. The role of the unfolded protein response in cancer progression: from oncogenesis to chemoresistance[J]. *Biol Cell*, 2019, 111(1): 1-17.
- [6] Qianze D, Liu F, Yue Z, et al. Derlin-1 overexpression confers poor prognosis in muscle invasive bladder cancer and contributes to chemoresistance and invasion through PI3K/AKT and ERK/MMP signaling[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(10): 17059-17069.
- [7] Tan X, He X, Jiang Z, et al. Derlin-1 is overexpressed in human colon cancer and promotes cancer cell proliferation[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 408(1-2): 205-213.
- [8] Pi L, Zhu G, She L, et al. Elevated expression of Derlin-1 associates with unfavorable survival time of squamous cell carcinoma of the head and neck and promotes its malignance[J]. *J Cancer*, 2017, 8(12): 2336-2345.
- [9] Lilley BN, Ploegh HL. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER[J]. *Nature*, 2004, 429(6994): 834-840.
- [10] Liu Y, Wang Z, Liu H, et al. Derlin-1 functions as a growth promoter in breast cancer[J]. *Biol Chem*, 2020, 401(3): 377-387.
- [11] 沈弈廷, 谭凤武, 邓亚萍, 等. 下调内质网相关降解蛋白-1 对鼻咽癌 CNE-2Z 细胞化疗敏感性的作用及机制[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2023, 29(1): 97-103.
- [12] Fan J, Tian L, Huang S, et al. Derlin-1 promotes the progression of human hepatocellular carcinoma via the activation of AKT pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 5407-5417.
- [13] Lenze N, Chera B, Sheth S. An evaluation of buparlisib for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2021, 22(2): 135-144.

(收稿日期:2025-06-10)

本文引用格式:邓亚萍,黎可华,谭凤武. 靶向抑制 Derlin-1 促进头颈部鳞状细胞癌细胞凋亡并增强紫杉醇敏感性的研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2026, 32(1): 24-30. DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 202625266

Cite this article as:DENG Yaping, LI Kehua, TAN Fengwu. Targeted inhibition of Derlin-1 expression promotes apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma cells and enhances sensitivity to paclitaxel [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2026, 32(1): 24-30. DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 202625266