

GPRC5A 对肝癌细胞增殖、凋亡和氧化应激的影响及作用机制探讨

陈 颢¹, 王 颖^{2a}, 谢生茂¹, 李忠辉^{2b}, 武建军³

(1. 解放军联勤保障部队第九六九医院消化内分泌科, 呼和浩特 010010; 2. 内蒙古包头医院 a. 老年病科; b. 肿瘤内科, 内蒙古包头 014010; 3. 内蒙古自治区人民医院消化内科, 呼和浩特 010010)

摘要: **目的** 通过检测 G 蛋白偶联受体家族 C 群 5 成员 A (G protein coupled receptor C type group 5 member A, GPRC5A) 在肝癌组织及细胞中的表达, 探讨 GPRC5A 对肝癌细胞增殖、凋亡、氧化应激的影响及其相关作用机制。 **方法** 收集 2018 年 12 月~2019 年 11 月在解放军联勤保障部队第九六九医院行手术治疗的 38 例肝癌患者癌组织及配对癌旁正常组织样本; 另选取人正常肝上皮细胞株 HL-7702 和人肝癌细胞株 (HepG2, HCCLM3, HuH-7 和 MHCC-97H) 进行研究。采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测肝癌组织、癌旁正常组织及肝癌细胞、正常肝上皮细胞中 GPRC5A 表达量。通过转染 pcDNA3.1-GPRC5A 质粒构建过表达 GPRC5A 肝癌细胞株, 采用 MTT 实验和 V-FITC/PI 凋亡试剂盒分别检测过表达 GPRC5A 对肝癌细胞增殖、凋亡的影响。采用活性氧指示剂 DCFH-DA 检测细胞中氧化应激相关因子活性氧 (ROS), NAD^+/NADH 和三磷酸腺苷 (ATP) 水平。采用 Western blot 实验检测凋亡相关蛋白 caspase-3 及上皮生长因子 (VEGF) 蛋白表达水平。 **结果** 肝癌组织中 GPRC5A 表达较癌旁正常组织显著降低 (0.34 ± 0.09 vs 0.73 ± 0.10), 差异有统计学意义 ($t=17.869$, $P<0.01$)。肝癌细胞 HepG2 (0.35 ± 0.06), HCCLM3 (0.38 ± 0.10), HuH-7 (0.53 ± 0.07), MHCC-97H (0.67 ± 0.06) 中 GPRC5A 表达量显著低于人正常肝上皮细胞 HL-7702 中的 GPRC5A 表达量 (1.00 ± 0.08), 差异有统计学意义 ($t=5.716\sim 11.258$, 均 $P<0.05$)。pcDNA3.1-GPRC5A 组转染 36 h 细胞增殖吸光度 (A) 值 (0.94 ± 0.16) 显著低于对照组 (1.49 ± 0.05) 和 pcDNA3.1 组 (1.45 ± 0.07) ($F=25.640$, $P<0.01$)。GPRC5A 过表达组 VEGF (0.98 ± 0.04) 表达量较对照组 (2.94 ± 0.15) 和 pcDNA3.1 组 (2.89 ± 0.11) 显著降低 ($F=310.450$, $P<0.001$)。pcDNA3.1-GPRC5A 组细胞中 ROS (182.12 ± 13.42) 水平显著高于对照组 (101.23 ± 11.20) 和 pcDNA3.1 组 (98.30 ± 10.26) ($F=49.577$, $P<0.001$); NAD^+/NADH (35.24 ± 6.43) 及 ATP (55.34 ± 6.51) 水平显著低于对照组 (100.25 ± 12.41 , 100.17 ± 14.36) 和 pcDNA3.1 组 (97.86 ± 9.67 , 102.23 ± 11.02) ($F=42.338$, 17.077 , $P<0.05$)。GPRC5A 过表达组细胞凋亡率高于对照组和 pcDNA3.1 组; 细胞凋亡蛋白 caspase-3 (2.61 ± 0.16) 表达量也高于对照组 (1.00 ± 0.11) 和 pcDNA3.1 组 (1.01 ± 0.02) ($F=202.843$, $P<0.001$)。pcDNA3.1-GPRC5A 组细胞中 p-STAT3 表达量 (0.43 ± 0.06) 显著低于对照组 (1.00 ± 0.13) 和 pcDNA3.1 组 (1.03 ± 0.12) ($F=29.476$, $P<0.001$); pcDNA3.1-GPRC5A 组下游基因 Socs3 (0.47 ± 0.05), c-MYC (0.54 ± 0.06) 表达量也显著低于对照组 (1.01 ± 0.05 , 1.00 ± 0.04) 和 pcDNA3.1 组 (0.98 ± 0.09 , 1.02 ± 0.06) ($F=63.275$, 75.409 , $P<0.001$)。肝癌组织中 STAT3 与 GPRC5A 表达量呈显著负相关 ($r=-0.746$, $P<0.01$)。过转染 pcDNA3.1-STAT3 或 pcDNA3.1-NLRP3 后显著逆转了 pcDNA3.1-GPRC5A 对肝癌细胞的抑制作用 ($P<0.05$)。 **结论** GPRC5A 低表达可能通过调节 STAT3/Socs3/c-MYC 信号和炎症反应抑制了肝癌细胞的增殖, 诱导肝癌细胞的氧化应激和凋亡。

关键词: G 蛋白偶联受体家族 C 群 5 成员 A (GPRC5A); 肝癌; 增殖; 氧化应激; 凋亡; STAT3/Socs3/c-MYC 信号通路

中图分类号: R735.7; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 06-010-08

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.06.003

Effects of GPRC5A on Proliferation, Apoptosis and Oxidative Stress of Hepatocellular Carcinoma Cells and Its Mechanism

CHEN Si¹, WANG Ying^{2a}, XIE Sheng-mao¹, LI Zhong-hui^{2b}, WU Jian-jun³

(1. Department of Gastroenterology and Endocrinology, the 969 Hospital of the Toint Logistics Support Force of the People's Liberation Army, Hohhot 010010, China; 2a. Department of Geriatrics; 2b. Department of Oncology, Baogang Hospital of

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目 (2019BS08056)。

作者简介: 陈颢 (1984-), 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 消化系统疾病的诊治, E-mail: inmg1012000@yeah.net。

通讯作者: 李忠辉 (1976-), 男, 研究生, 副主任医师, 研究方向: 肿瘤介入治疗。

Inner Mongolia City, Inner Mongolia Baotou 014010, China; 3. Department of Digestive Medicine, People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010010, China)

Abstract: Objective To explore the effects of GPRC5A on the proliferation, apoptosis and oxidative stress of liver cancer cells and its related mechanism by detecting the expression of GPRC5A in liver cancer tissues and cells. **Methods** A total of 38 patients with liver cancer who underwent surgical treatment in the 969th Hospital of the Joint Logistics Support Force of the People's Liberation Army from December 2018 to November 2019 were collected for their cancer tissue samples and matched adjacent normal tissue samples. Human normal liver epithelial cell lines HL-7702 and human hepatocellular carcinoma cell lines (HepG2, HCCLM3, Huh-7 and MHCC-97H) were selected for the study. QRT-PCR was used to detect the expression of GPRC5A in liver cancer tissues, adjacent normal tissues, liver cancer cells and normal liver epithelial cells. The overexpressed GPRC5A hepatoma cell line was constructed by transfection of pcDNA3.1-GPRC5A plasmid. The effects of overexpression of GPRC5A on the proliferation and apoptosis of hepatoma cells were detected by MTT assay and V-FITC/PI apoptosis kit, respectively. The levels of reactive oxygen species (ROS), NAD^+/NADH and adenosine triphosphate (ATP) were detected by DCFH-DA, a reactive oxygen indicator. Western blot assay was used to detect the expression levels of apoptosis-related protein caspase-3 and epithelial growth factor (VEGF). **Results** The expression of GPRC5A in HCC tissues was significantly lower than that in adjacent normal tissues (0.34 ± 0.09 vs 0.73 ± 0.10), the difference was statistically significant ($t=17.869$, $P<0.01$). The expression level of GPRC5A in HepG2 cells (0.35 ± 0.06), HCCLM3 cells (0.38 ± 0.10), Huh-7 cells (0.53 ± 0.07), and MHCC-97H (0.67 ± 0.06) was significantly lower than that in HL-7702 (1.00 ± 0.08), the differences were statistically significant ($t=5.716\sim 11.258$, $P<0.05$). The A value of pcDNA3.1-GPRC5A group (0.94 ± 0.16) at 36 h after transfection was significantly lower than that of Control group (1.49 ± 0.05) and pcDNA3.1 group (1.45 ± 0.07) ($F=25.640$, $P<0.01$). The expression of VEGF in GPRC5A overexpression group was significantly decreased (0.98 ± 0.04) compared with that in control group (2.94 ± 0.15) and PCDNA3.1 group (2.89 ± 0.11) ($F=310.450$, $P<0.001$). The level of ROS (182.12 ± 13.42) in PCDNA3.1-GPRC5A group was significantly higher than that in control group (101.23 ± 11.20) and PCDNA3.1 group (98.30 ± 10.26) ($F=49.577$, $P<0.001$). NAD^+/NADH (35.24 ± 6.43) and ATP (55.34 ± 6.51) levels were significantly lower than those in control group (100.25 ± 12.41 , 100.17 ± 14.36) and PCDNA3.1 group (97.86 ± 9.67 , 102.23 ± 11.02) ($F=42.338$, 17.077 , $P<0.05$). The apoptosis rate of GPRC5A overexpression group was higher than that of control group and pcDNA3.1 group. The expression level of apoptosis protein caspase-3 (2.61 ± 0.16) was also higher than that of control group (1.00 ± 0.11) and PCDNA3.1 group (1.01 ± 0.02) ($F=202.843$, $P<0.001$). The expression level of p-STAT3 in PCDNA3.1-GPRC5A group (0.43 ± 0.06) was significantly lower than that in control group (1.00 ± 0.13) and PCDNA3.1 group (1.03 ± 0.12) ($F=29.476$, $P<0.001$). The expression levels of downstream gene SOCS3 and c-myc in pcDNA3.1-GPRC5A group were also significantly lower than those in control group (1.01 ± 0.05 , 1.00 ± 0.04) and pcDNA3.1 group (0.98 ± 0.09 , 1.02 ± 0.06) ($F=63.275$ and 75.409 , all $P<0.001$). There was a significant negative correlation between STAT3 and GPRC5A expression in liver cancer ($r=-0.746$, $P<0.01$). The overtransfection of pcDNA3.1-STAT3 or pcDNA3.1-NLRP3 significantly reversed the inhibitory effect of pcDNA3.1-GPRC5A on HCC cells ($P<0.05$). **Conclusion** GPRC5A may inhibit the proliferation of HCC cells by regulating STAT3/ SOCS3 / c-MYC signaling and inflammatory response, and induce oxidative stress and apoptosis of HCC cells. The low expression of GPRC5A may inhibit the proliferation of HCC cells by regulating STAT3/ SOCS3 / c-MYC signaling and inflammatory response, and induce oxidative stress and apoptosis of HCC cells.

Keywords: G protein coupled receptor C type group 5 member A (GPRC5A) ; liver cancer; proliferation; oxidative stress; apoptosis; STAT3/ SOCS3 / c-MYC signaling pathway

近年随着基因分子生物学的研究进展,人们发现肿瘤的发生发展机制复杂,涉及原癌基因的激活和抑癌基因的失活及众多信号分子通路,基于分子生物学的研究为肿瘤的研究及诊治提供了新的方向和思路^[1]。G蛋白偶联受体家族C群5成员A(G protein coupled receptor C type group 5 member A, GPRC5A)是3-G蛋白偶联受体家族的成员,以往研究发现GPRC5A在多种恶性肿瘤中表达失调,提示GPRC5A可能参与肿瘤的进展。GPRC5A的作用首次在肺癌中被揭示,认为是一种促进生长的

基因和一种新的p53转录靶点^[2]。且研究表明,与邻近正常组织相比,肺肿瘤组织中GPRC5A表达下调^[3],其在肺腺癌中发挥抑癌作用。而在乳腺癌中发现GPRC5A基因具有高突变率^[4]。另据报道显示,信号传导转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)在众多癌细胞中表达显著上调,能够促进癌症的发生发展。研究表明,敲除STAT3能够通过刺激肿瘤细胞产生I型干扰素,提高免疫原性化疗的疗效^[5]。STAT3在多种癌症中的表达及功能已被证实,GPRC5A和

STAT3 表达具有相关性^[6]。且证实, GPRC5A 在结肠直肠癌组织中高表达, 正向调控 STAT3 表达, 与结肠直肠癌临床病理关系密切^[6]。提示 GPRC5A 在肿瘤发生发展过程中发挥某种作用。因此, 本研究拟探究 GPRC5A 在肝癌中的表达及其对肝癌细胞增殖、凋亡及氧化应激的影响, 以为临床提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2018 年 12 月~2019 年 11 月在本院行手术治疗的 38 例肝癌患者癌组织及其对应癌旁正常组织样本, 均经临床病理确诊。人正常肝上皮细胞株 HL-7702 和人肝癌细胞株 (HepG2, HCCLM3, HuH-7 和 MHCC-97H) 均购自中国科学院细胞库。

1.2 主要试剂及仪器 胎牛血清、RPMI1640 培养液购自 Biological Industries 公司; 反转录试剂盒、Trizol 试剂盒购自大连 Takara 公司; LipofectamineTM2000 购自美国 Invitrogen 公司; 实时荧光定量 PCR 仪购自 Life technologies 公司; BCA 检测试剂盒、Transwell 小室购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 兔抗鼠 GPRC5A 单抗、兔抗鼠 VEGF 单抗、兔抗鼠 caspase-3 单抗、兔抗鼠 STAT3 单抗、兔抗鼠 c-MYC 单抗、兔抗鼠 Socs3 单抗和鼠抗 GAPDH 购自美国 Abcam 公司; 阴性对照 pcDNA3.1 质粒, pcDNA3.1-GPRC5A 质粒及 PCR 引物由武汉金开瑞生物工程有限公司设计合成; 酶标仪购自 DR-200Bs Diatek 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养: 将实验肝癌细胞置于含 10ml/dl 胎牛血清及双抗 RPMI1640 培养液常规培养, 37℃, 5ml/dl CO₂ 培养箱孵育, 待细胞融合至 85% 左右时进行传代培养, 用于后续实验。

1.3.2 细胞转染: 按照 Lipo 2000 试剂盒说明书将阴性对照 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-GPRC5 质粒分别转染至 HepG2 细胞, 37℃, 5ml/dl CO₂ 培养 48 h, 检测转染效率, 实验重复三次。分组: 根据转染情况分为空白对照组 (control 组), pcDNA3.1 (对照 pcDNA3.1 组), pcDNA3.1-GPRC5 (pcDNA3.1-GPRC5A 过表达组)。

1.3.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验: 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 通过逆转录试剂盒反转录为 cDNA, 以此为模板配置 PCR 扩增反应体系行 qRT-PCR 实验, 以 β -actin 为内参, 检测 GPRC5A 相对表达。引物序列如下, GPRC5A 正向: 5'-AGCAGGTCTCATCGCAGCTT-3', 反向: 5'-ACTTGCGAATCATACGCACG-3'; β -actin 正向: 5'-CTGACGATCGATAGTCATATGGC-3', 反向: 5'-agCatacGttGtCacGactCc-3'。2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目的基因

相对表达。

1.3.4 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 实验: 取对数生长期 HepG2 细胞接种于 25 cm² 培养皿, 待细胞融合至 80%~90% 时进行细胞转染。48 h 后收集各组细胞, 加入 RIPA 裂解液于冰上裂解, 采用 BCA 法测定蛋白浓度; 取 20 mg 蛋白样品行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转移至 PVDF 膜, 5g/dl 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗孵育过夜; 次日, TBST 洗膜 3 次, 加 HRP 标记二抗, 孵育 2 h; TBST 洗膜 3 次, ECL 显色观察。

1.3.5 MTT 细胞增殖实验: 取对数生长期 HepG2 细胞接种于 96 孔板, 浓度 6×10^5 个/孔, 培养 4h 后每孔加入 MTT 溶液 10 μ l, 继续孵育 4 h, 采用酶标仪测量 570 nm 处吸光度值。实验重复 3 次。

1.3.6 V-FITC/PI 细胞凋亡检测: 将 pcDNA3.1-GPRC5A 或空载 pcDNA3.1 质粒分别转染在 HepG2 细胞, 37℃, 5ml/dl CO₂ 培养 48 h; 收集细胞接种在 6 孔板, 浓度 1×10^6 个/孔, 根据 V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行检测, 流式细胞仪分析细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.3.7 细胞氧化应激检测: 待细胞转染后用于以下实验检测: ① ROS 含量检测: 以 1×10^6 个/孔接种在 6 孔板, 48 h 后收集细胞, 加入 10 μ mol/L DCFH-DA 重悬, 根据 ROS 检测试剂盒说明书进行检测。② NAD⁺/NADH 检测: 以同样密度接种于 96 孔板, 48 h 后收集提取细胞蛋白, 按照 NAD⁺/NADH 试剂盒说明书配制检测液, 并加入配置好的样本液, 37℃避光孵育 1 h, 检测 450 nm 处吸光度值。③ ATP 含量检测: 以同样密度接种于 96 孔板, 48 h 后收集提取细胞蛋白; 按 ATP 检测试剂盒说明书配制检测液, 加入 50 μ l 样本液, 避光孵育 30 min, 检测 450 nm 处吸光度值。实验重复 3 次。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 进行数据分析, 数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验; 多组间比较采用 one-way ANOVA 分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。肝癌组织及癌旁正常组织中表达差异采用配对 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

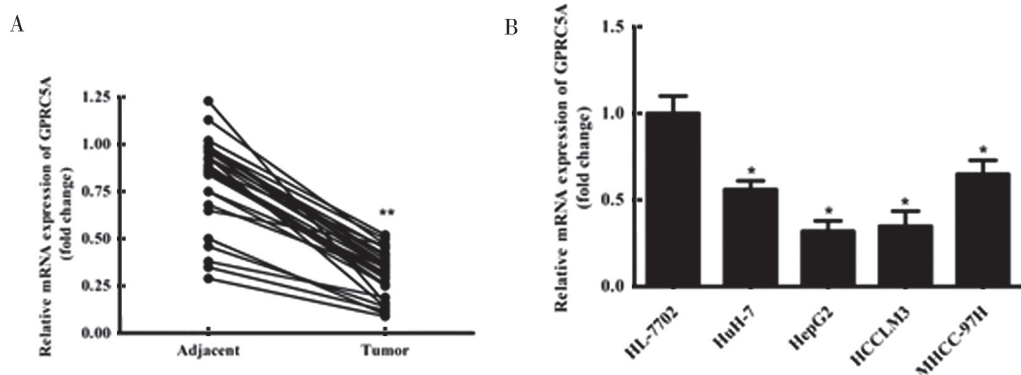
2 结果

2.1 GPRC5A 在肝癌组织及细胞中的表达 qRT-PCR 法检测肝癌组织、配对正常组织和肝癌细胞、肝正常上皮细胞中 GPRC5A 表达, 结果显示肝癌组织中 GPRC5A 表达量 (0.34 ± 0.09) 显著低于癌旁正常组织 (0.73 ± 0.10), 差异有统计学意义 ($t = 17.869$, *P* < 0.01), 见图 1A; 类似地, GPRC5A 在肝癌细胞 HepG2 (0.35 ± 0.06), HCCLM3 (0.38 ± 0.10), HuH-7 (0.53 ± 0.07) 和 MHCC-97H (0.67 ± 0.06)

中的表达量均显著低于人正常肝上皮细胞 HL-7702 中的表达量 (1.00 ± 0.08), 差异均有统计学意义 ($t=11.258, 8.386, 7.658, 5.716, P<0.05$, 见图 1B), 其中 HepG2, HCCLM3 细胞中表达最低。因此选择 HepG2 细胞进行后续实验。

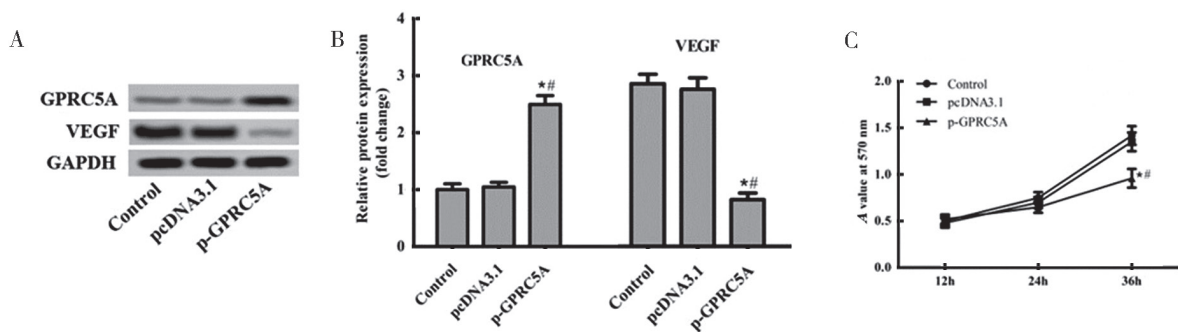
2.2 GPRC5A 过表达对肝癌细胞增殖的影响 经实验检测显示, 与对照组 (1.00 ± 0.10) 和 pcDNA3.1 组 (1.02 ± 0.08) 相比, 转染 pcDNA3.1-GPRC5A 组 (2.49 ± 0.22) 细胞中 GPRC5A 表达水平显著增

加 ($F=101.421, P<0.001$), 见图 2A 和 2B。转染 pcDNA3.1-GPRC5A 组 (0.94 ± 0.16) 36 h 的细胞增殖 A 值较对照组 (1.49 ± 0.05) 和 pcDNA3.1 组 (1.45 ± 0.07) 显著降低 ($F=25.640, P<0.01$), 见图 2C。GPRC5A 过表达组 (0.98 ± 0.04) 细胞上皮生长因子 VEGF 表达量较 Control 组 (2.94 ± 0.15) 和 pcDNA3.1 组 (2.89 ± 0.11) 也显著降低 ($F=310.450, P<0.001$), 见图 2A 和 2B。以上结果说明过表达 GPRC5A 抑制了肝癌 HepG2 细胞的增殖。



A. 肝癌组织及其配对癌旁正常组织中 GPRC5A mRNA 表达; B. 肝癌细胞及正常细胞中 GPRC5A mRNA 表达; 注: 与癌旁组织和正常细胞比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 1 GPRC5A 在肝癌组织和细胞中的表达量



A. 肝癌细胞中 GPRC5A, VEGF 蛋白表达; B. 过表达 GPRC5A 对肝癌细胞中 GPRC5A 和 VEGF 表达的影响; C. 过表达 GPRC5A 对肝癌细胞增殖的影响。注: 与 Control 组比较, * $P<0.05$, 与 pcDNA3.1 组比较, ** $P<0.05$ 。

图 2 过表达 GPRC5A 抑制肝癌细胞的增殖

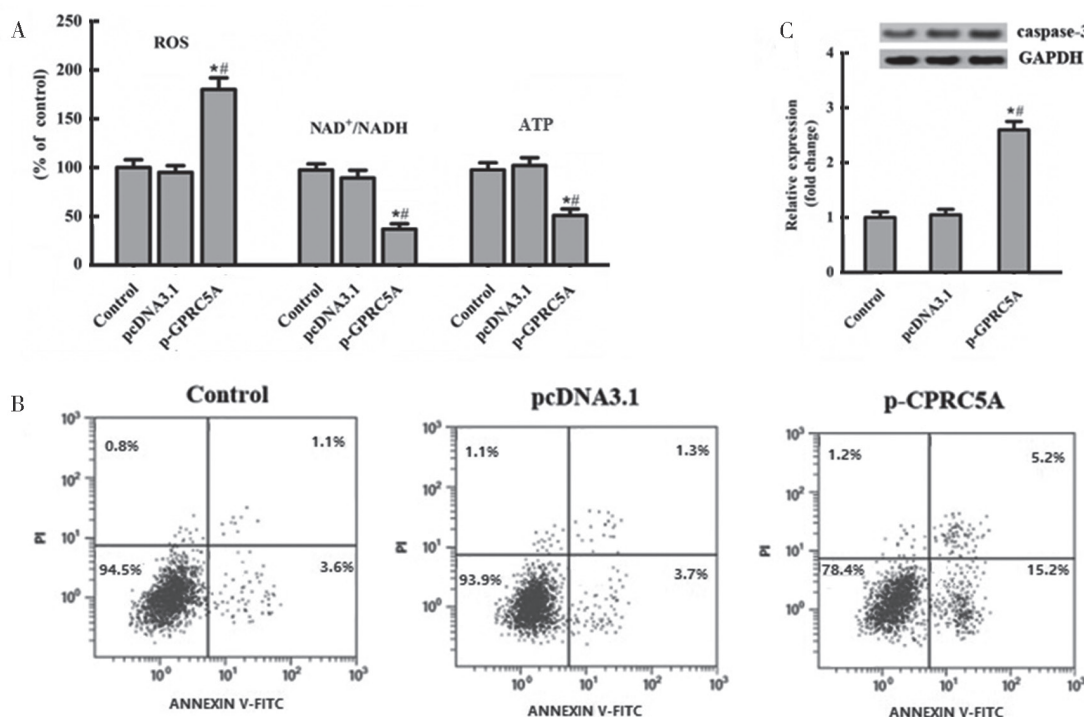
2.3 GPRC5A 过表达对肝癌细胞氧化应激和凋亡的影响 经检测显示, 转染 pcDNA3.1-GPRC5A 组 (182.12 ± 13.42) 细胞中氧化应激相关因子 ROS 水平较对照组 (101.23 ± 11.20) 和 pcDNA3.1 组 (98.30 ± 10.26) 显著增加 ($F=49.577, P<0.001$); NAD⁺/NADH (35.24 ± 6.43) 及 ATP (55.34 ± 6.51) 水平较对照组 ($100.25 \pm 12.41, 100.17 \pm 14.36$) 和 pcDNA3.1 组 ($97.86 \pm 9.67, 102.23 \pm 11.02$) 显著降低 ($F=42.338$ 和 $17.077, P<0.05$), 见图 3A。GPRC5A 过表达组 (20.70%) 细胞凋亡率较对照组 (4.70%) 和 pcDNA3.1 组 (5.00%) 显著提高, 见图 3B。细胞凋亡蛋白 caspase-3 (2.61 ± 0.16) 表达量较对照组

(1.00 ± 0.11) 和 pcDNA3.1 组 (1.01 ± 0.02) 也显著增加 ($F=202.843, P<0.001$), 见图 3C。以上结果说明过表达 GPRC5A 促进了 HepG2, HCCLM3 细胞的氧化应激, 并诱导细胞凋亡。

2.4 GPRC5A 对 STAT3/Socs3/c-MYC 信号通路相关蛋白表达的影响 研究通过转染过表达肝癌细胞中 GPRC5A 表达发现, 与对照组 (1.00 ± 0.13) 和 pcDNA3.1 组 (1.03 ± 0.12) 相比, 转染 pcDNA3.1-GPRC5A 组 (0.43 ± 0.06) 细胞中 p-STAT3 表达量显著降低 ($F=29.476, P<0.001$), 见图 4A 和 4B; pcDNA3.1-GPRC5A 组下游基因 Socs3 (0.47 ± 0.05), c-MYC (0.54 ± 0.06) 表达量显著低于对照组 ($1.01 \pm$

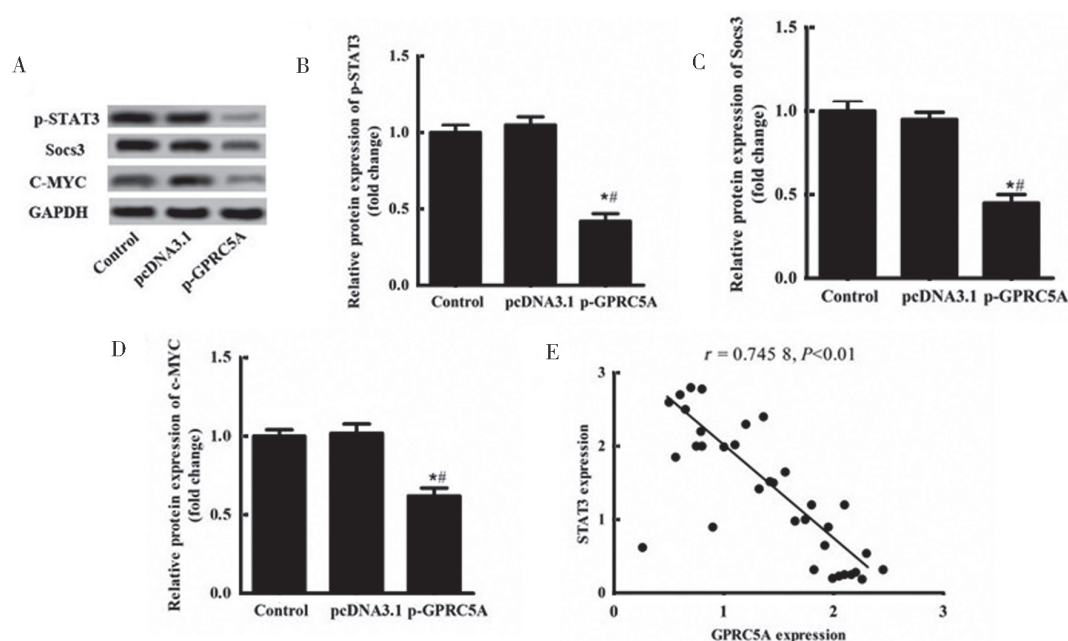
0.05, 1.00 ± 0.04) 和 pcDNA3.1 组 (0.98 ± 0.09 , 1.02 ± 0.06) ($F=63.275$, 75.409 , 均 $P<0.001$), 见图 4A, 4C 和 4D。进一步研究发现, 肝癌组织中 STAT3 与 GPRC5A 表达量呈显著负相关 ($r=-0.746$,

$P<0.01$), 见图 4E。以上结果说明过表达 GPRC5A 抑制 STAT3 的表达, 并抑制 Socs3/c-MYC 通路的激活。



A. 过表达 GPRC5A 对肝癌细胞内 ROS, NAD⁺/NADH, ATP 水平的影响; B. 过表达 GPRC5A 对肝癌细胞凋亡的影响; C. 过表达 GPRC5A 对肝癌细胞中凋亡蛋白 caspase-3 表达的影响。注: 与 Control 组比较, * $P<0.05$, 与 pcDNA3.1 组比较, ** $P<0.05$ 。

图 3 过表达 GPRC5A 诱导肝癌细胞的氧化应激和凋亡



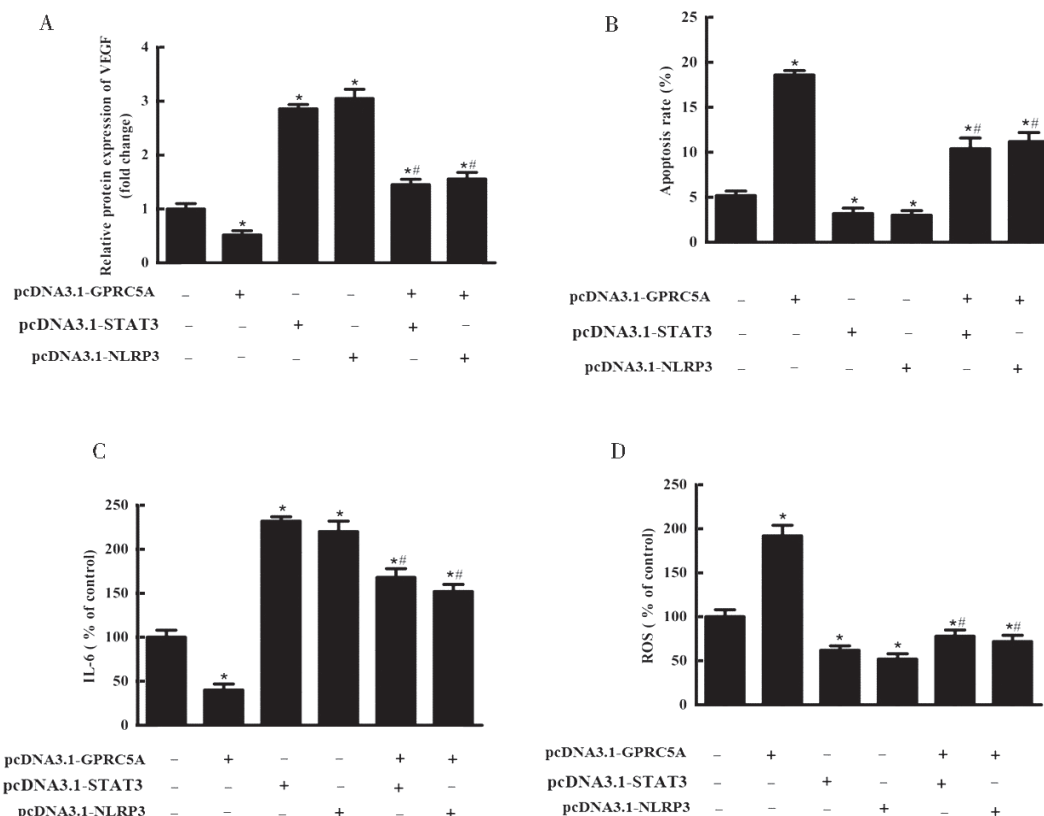
A. 肝癌细胞中 p-STAT3, Socs3 和 c-MYC 蛋白表达; B. 过表达 GPRC5A 对肝细胞中 STAT3 磷酸化表达的影响; C. 过表达 GPRC5A 对肝细胞中 Socs3 表达量的影响; D. 过表达 GPRC5A 对肝细胞中 c-MYC 表达量的影响; E. 肝癌组织中 GPRC5A 和 STAT3 表达相关性。

注: 与 Control 或癌旁组织组比较, * $P<0.05$, 与 pcDNA3.1 组比较, ** $P<0.05$ 。

图 4 过表达 GPRC5A 抑制 STAT3/Socs3/c-MYC 信号通路激活

2.5 STAT3 介导的 Socs3/c-MYC 信号通路参与 GPRC5A 对肝癌细胞的作用机制 为探究 GPRC5A 与 Socs3/c-MYC 信号通路在肝癌中作用机制, 研究在 HepG2 细胞中分别转染 pcDNA3.1-GPRC5A, pcDNA3.1-STAT3 或 pcDNA3.1-NLRP3, 经检测发现, 转染 pcDNA3.1-STAT3 或 pcDNA3.1-NLRP3 显著促进细胞内 VEGF 蛋白表达 ($P<0.05$), 见

图 5A; 抑制细胞凋亡率 ($P<0.05$), 见图 5B; 增加细胞内 IL-6 水平 ($P<0.05$), 见图 5C; 细胞内 ROS 水平明显降低 ($P<0.05$), 见图 5D, 显著逆转了 pcDNA3.1-GPRC5A 的抑制作用。以上结果表明 STAT3 介导的 Socs3/c-MYC 信号通路参与 GPRC5A 对肝癌细胞的作用机制。



A. 肝癌细胞中 VEGF 蛋白表达水平; B. pcDNA3.1-STAT3 或 pcDNA3.1-NLRP3 对肝癌细胞凋亡率的影响; C. pcDNA3.1-STAT3 或 pcDNA3.1-NLRP3 对肝癌细胞内 IL-6 水平的影响; (D) pcDNA3.1-STAT3 或 pcDNA3.1-NLRP3 对肝癌细胞内 ROS 水平的影响。

注: 与 Control 组比较, * $P<0.05$, 与 pcDNA3.1-GPRC5A 组比较, ** $P<0.05$ 。

图 5 STAT3 介导的 Socs3/c-MYC 信号通路抑制卵巢癌细胞的氧化应激和凋亡

3 讨论

肝癌是临床常见的恶性肿瘤, 高死亡率, 是全世界癌症相关死亡率的第三大常见原因。近年研究发现, 遗传、表观遗传改变、慢性乙型肝炎、丙型肝炎病毒感染、黄曲霉毒素、吸烟、肥胖和糖尿病等是肝癌的主要危险因素^[7-8]。高复发率、高转移率是肝癌患者预后差的主要原因^[9]。因此, 基于分子生物学角度找寻特异性分子靶标对肝癌临床诊治及攻克具有显著意义。

研究发现, GPRC5A 异常表达与恶性肿瘤发生发展密切相关^[10]。GPRC5A 在肺组织中异常低表达, 参与肺癌的发生发展进程^[3]。GPRC5A 通过激活表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 信号导致 MDM2 失调, 促进肺肿瘤的发

展^[11]。GPRC5A 通过调节细胞周期促进前列腺癌细胞增殖和转移^[12]。GPRC5A 通过介导细胞氧化应激反应促进了喉癌的进展^[13]。提示 GPRC5A 在人类恶性肿瘤发生发展中扮演原癌或抑癌基因作用。而本研究检测表明 GPRC5A 在肝癌组织和细胞中显著低表达, GPRC5A 过表达显著抑制了肝癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡和氧化应激。

最近研究表明, GPRC5A 功能障碍发生在多种与人类癌症相关的途径中, 包括 NF- κ B, FAK/SCR 和 STAT3 途径^[3]。STAT3 被认为是癌症治疗的重要靶点, 易在各种恶性肿瘤中被激活^[14]。研究发现, 化合物 K 通过调控 STAT3 诱导人肝癌细胞内质网应激和凋亡^[15]。MEST 通过 STAT3 激活诱导乳腺癌中 twist-1 介导的 EMT, STAT3, Twist 和

EMT标记物可作为防治乳腺癌的潜在分子靶点^[16]。此外, BRM转录调控 miR-302a-3p 靶向 SOCS5/STAT3 信号轴, 增强胰腺癌转移^[17]。GPRC5A 过表达抑制了 IL-6 诱导的 STAT3 活化, 抑制了细胞生长, 阻止了头颈部鳞状细胞癌的进一步恶化。同样, 在本研究中探究发现 GPRC5A 抑制了 STAT3 的表达, 而 STAT3 促进了肝癌细胞的增殖, 两者表达呈显著负相关, 这表明 STAT3 在促进肝癌的发展中起着重要作用。

据报道, IL-6 激活的 STAT3/Socs3 轴促进了肿瘤的发生发展^[18]。研究发现, MiR-203 通过靶向 SOCS3 调控 JAK-STAT 通路影响胰腺癌细胞增殖和凋亡^[19]。认为 STAT3 和 SOCS3 之间存在负反馈, 这可能通过抑制特异性细胞因子和凋亡信号的产生在 T 细胞淋巴瘤中发挥致癌作用。此外, STAT3 和 c-MYC 在人胃癌组织和细胞中上调, c-MYC 的敲除抑制胃癌细胞的增殖和糖酵解, 提示 STAT3/c-MYC 可能是胃癌潜在的治疗靶点^[20]。本研究发现, GPRC5A 过表达能够下调 STAT3 及下游基因 Socs3, c-MYC 表达量, 抑制 Socs3/c-MYC 通路激活, 当同时共转染 pcDNA3.1-STAT3 或 pcDNA3.1-NLRP3 时, GPRC5A 过表达对肝癌细胞的作用被完全逆转, 提示 STAT3 介导的 Socs3/c-MYC 信号通路参与 GPRC5A 对肝癌细胞的作用机制, 靶向 STAT3/Socs3/c-MYC 通路可能是肝癌潜在的肿瘤治疗方法。本研究初步探明了 GPRC5A 对肝癌细胞生物学行为及氧化应激的影响, 揭示了其在肝癌发生发展中的表达作用机制, 为临床肝癌的研究治疗提供了新的分子靶标, 具有可推广性。然而肿瘤发生的机制复杂, 其中涉及分子通过的异常激活或失活, 本研究虽证实 GPRC5A 通过调控 STAT3 介导的 Socs3/c-MYC 信号通路发挥作用, 但其更深入的调控机制还需进一步探究阐明。

综上所述, 肝癌细胞中 GPRC5A 显著低表达, GPRC5A 过表达能够抑制肝癌细胞增殖, 诱导细胞氧化应激及凋亡, 其通过调节 STAT3 介导的 Socs3/c-MYC 信号通路和 NLRP3 炎症小体参与调控肝癌的发生发展, 提示 GPRC5A 可作为新的与肝癌细胞增殖、氧化应激和凋亡相关的生物标志物。进一步探究 GPRC5A 的功能作用, 有助于为人类恶性肿瘤的治疗找寻新的治疗途径。

参考文献:

[1] 张振, 潘晴, 刘旭, 等. circRNA 与肿瘤发生的研究进展 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(2): 157-159, 164.
ZHANG Zhen, PAN Qing, LIU Xu, et al. Research progress of the relationship between circular RNA and tumorigenesis [J]. Journal of Modern Laboratory

Medicine, 2018, 33(2): 157-159, 164.

- [2] GUO Wenzheng, HU Min, WU Jingjing, et al. GPRC5A depletion enhances the risk of smoking-induced lung tumorigenesis and mortality[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 114: 108791.
- [3] JIN Er, LI Chao, LI Yiwei, et al. GPRC5A suppresses the proliferation of non-small cell lung cancer under wild type p53 background[J]. Experimental Lung Research, 2020, 46(7): 226-233.
- [4] KLASCHIK K, HAUKE J, NEIDHARDT G, et al. The GPRC5A frameshift variant c.183del is not associated with increased breast cancer risk in BRCA1 mutation carriers[J]. International Journal of Cancer, 2019, 144(7): 1761-1763.
- [5] TSAI M H, PAI L M, LEE C K. Fine-Tuning of type I interferon response by STAT3[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 1448.
- [6] 元建华, 张曙波, 李建旺, 等. GPRC5A、SOCS3 和 STAT3 在结直肠癌组织中的表达及相关性分析 [J]. 中国癌症防治杂志, 2019, 11(6): 518-522.
YUAN Jianhua, ZHANG Shubo, LI Jianwang, et al. Expression and correlation of GPRC5A, SOCS3 and STAT3 in colorectal cancer tissues [J]. Chinese Journal of Oncology Prevention and Treatment, 2019, 11(6): 518-522.
- [7] 张鑫浩, 张涛元, 李俏, 等. 基于 GEO 芯片数据的肝癌关键生物标志物的筛选与鉴定及生物信息学分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(4): 26-31.
ZHANG Xinhao, ZHANG Taoyuan, LI Qiao, et al. Screening, identification and bioinformatics analysis of Key biomarkers for hepatocellular carcinoma based on GEO chip data [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(4): 26-31.
- [8] WANG Chong, YANG Lei, LIANG Zikun, et al. Long-term survival and prognostic factors of pulmonary metastasectomy in liver cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. World Journal of Surgery, 2018, 42(7): 2153-2163.
- [9] 吴良银, 李文丽, 刘俊. 肝细胞癌患者生存预后相关长链非编码 RNA(LncRNA) 的生物信息学分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(4): 18-21.
WU Liangyin, LI Wenli, LIU Jun. Bioinformatics analysis of long-chain non-coding RNA related to survival and prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(4): 18-21.
- [10] QIAN Xuetian, JIANG Chengfei, SHEN Shanshan, et al. GPRC5A: an emerging prognostic biomarker for predicting malignancy of pancreatic cancer based on bioinformatics analysis[J]. Journal of Cancer, 2021, 12(7): 2010-2022.
- [11] SONG Hongyong, SUN Beibei, LIAO Yueling, et al. GPRC5A deficiency leads to dysregulated MDM2 via activated EGFR signaling for lung tumor development[J]. International Journal of Cancer, 2019, 144(4): 777-787.

(下转第 59 页)