

论著·基础研究

谷丙转氨酶 2 对胃癌顺铂治疗抵抗的影响及其作用机制

袁 园, 糜 军

上海交通大学基础医学院生物化学与分子细胞生物学系, 上海 200025

[摘要] **目的**·研究谷丙转氨酶 2 (glutamic-pyruvic transaminase 2, GPT2) 在胃癌顺铂治疗抵抗中的作用及其机制。**方法**·利用 Kaplan Meier-Plotter 数据库分析 GPT2 的表达与胃癌不良预后之间的关系, 采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)、蛋白质印迹 (Western blotting) 和免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 技术检测 GPT2 在胃癌细胞和临床胃癌组织样本中的表达情况。采用 CCK-8 试剂盒检测不同浓度的顺铂对人胃癌细胞和正常胃黏膜细胞的细胞毒性。分别在顺铂敏感的 MKN28 细胞和不敏感的 MKN45 细胞中构建 GPT2 过表达和低表达细胞系, 并采用 CCK-8 试剂盒、细胞克隆形成实验、Western blotting 检测顺铂对 GPT2 过表达和低表达胃癌细胞的细胞毒性、肿瘤细胞的干性及干性相关信号通路关键蛋白的变化。**结果**·GPT2 的高表达与胃癌预后呈负相关。GPT2 表达高的细胞株对顺铂治疗不敏感, GPT2 表达低的细胞株则相反。GPT2 的过表达可降低顺铂治疗的敏感性, 而低表达 GPT2 则相反。过表达 GPT2 可激活细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 信号通路、上调干性相关分子标志物 SRY 盒 2 (SRY-box 2, SOX2) 和 Nanog 同源盒 (Nanog homeobox, NANOG) 的表达, 同时可增强细胞的克隆形成能力, 而低表达 GPT2 则反之。**结论**·GPT2 的表达与顺铂治疗敏感性有关。过表达 GPT2 可通过激活 ERK 信号通路, 上调干性相关分子标志物 SOX2 和 NANOG 的表达, 实现胃癌细胞对顺铂治疗的抵抗。

[关键词] 谷丙转氨酶 2; 胃癌; 顺铂; 治疗抵抗

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.10.006 **[中图分类号]** R735.2 **[文献标志码]** A

Effects and mechanisms of glutamic-pyruvic transaminase 2 on cisplatin resistance in gastric cancer

YUAN Yuan, MEI Jun

Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Science, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the role and mechanism of glutamic-pyruvic transaminase 2 (GPT2) on cisplatin resistance in gastric cancer. **Methods**·The Kaplan Meier-Plotter database was used to analyze the relationship between GPT2 expression and poor prognosis of gastric cancer. The expressions of GPT2 in gastric cancer cells and tissues were detected by quantitative real-time PCR (qPCR), Western blotting and immunohistochemistry (IHC). The cytotoxicity of cisplatin at different concentrations to human gastric cancer cells and normal gastric epithelial cells was detected by CCK-8 assay. GPT2 overexpression and knockdown cell lines were constructed in cisplatin sensitive MKN28 cells and insensitive MKN45 cells, respectively. CCK-8 assay, colony formation assay and Western blotting were performed to evaluate the cellular cytotoxicity, stemness of cancer cells and the changes of key proteins in stemness-related signaling pathways in GPT2 overexpression and knockdown cell lines, respectively. **Results**·The high expression of GPT2 was negatively correlated with the survival of gastric cancer patients. Gastric cancer cells with high expression of GPT2 were resistant to cisplatin, while cells with low expression of GPT2 were sensitive to cisplatin. Overexpression of GPT2 could decrease the cell sensitivity to cisplatin, nevertheless knockdown of GPT2 could increase the cell sensitivity to cisplatin. Meanwhile, the further study revealed that overexpression of GPT2 could activate the extracellular regulated protein kinases (ERK) signaling pathway, up-regulate the expression of SRY-box 2 (SOX2) and Nanog homeobox (NANOG), and enhance the ability of colony formation, while knockdown of GPT2 could inhibit ERK signaling pathway, reduce the expression of SOX2 and NANOG, and suppress the ability of colony formation. **Conclusion**·GPT2 expression are related to the sensitivity of cisplatin treatment. Overexpression of GPT2 can increase the resistance of gastric cancer to cisplatin treatment by activating ERK signaling pathway and up-regulating the expression of SOX2 and NANOG.

[Key words] glutamic-pyruvic transaminase 2 (GPT2); gastric cancer; cisplatin; treatment resistance

胃癌是一种常见肿瘤。据癌症统计中心显示, 2018 年全球新增胃癌病例约 100 万例, 死亡病例约 78.3 万例, 且该疾病已上升为世界第五大常见癌症和第三大死亡癌

症^[1]。在中国、日本和韩国等亚洲国家, 胃癌的病例约占全球胃癌总病例数的 60%^[2]。研究^[3]显示, 在胃癌发生早期, 患者偶有上腹隐痛、腹胀、食欲不振等临床症状; 伴

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81372194) (General Program of National Natural Science Foundation of China, 81372194)。

[作者简介] 袁 园 (1992—), 女, 硕士生; 电子信箱: yuanyuan201609@126.com。

[通信作者] 糜 军, 电子信箱: jmei@sjtu.edu.cn。

随着胃癌恶性程度的增加, 患者的临床症状亦逐渐显现, 而当临床症状较明显时, 患者已属病变晚期。目前, 手术切除是治疗早期胃癌的最佳选择; 对于晚期患者而言, 其已无明显的手术指征, 需采用放射治疗 (放疗)、化学治疗 (化疗) 及其他辅助疗法进行救治, 但上述疗法均存在一定的局限性, 疗效并不明显。因此, 制定新的治疗方案以延长胃癌患者生存期并提高患者的生活质量已成为目前亟待解决的问题之一。

顺铂作为胃癌的一线治疗药物, 常被用于胃肠道肿瘤的治疗^[4], 且治愈率约为 20%^[5]; 然而, 由于该类患者自身或术后的耐药性, 使得胃癌较易出现复发和转移^[6]。因此, 改善顺铂治疗抵抗并探索新的治疗策略已成为研究者关注的热点。研究发现, 与顺铂治疗抵抗有关的因素较多, 包括多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance-associated protein 2, MRP2) 过表达^[7]、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 信号通路上调^[8]等。另有研究^[9]显示, 间充质干细胞也可诱导顺铂治疗抵抗的发生。此外, 顺铂还可调节丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路, 诱导 DNA 修复基因 *ERCC1* 表达的增加, 从而增强黑色素瘤化疗的耐受性^[10]。

谷丙转氨酶 2 (glutamic-pyruvic transaminase 2, GPT2) 是一种线粒体谷丙转氨酶, 能够催化丙氨酸与 α -酮戊二酸可逆性生成丙酮酸和谷氨酸, 且在骨骼肌、肾脏、肝脏等组织的糖异生和氨基酸代谢中发挥重要作用^[11-12]。有研究^[13]报道, *GPT2* 突变可引起发育性脑病。在细胞应激状态下, 转录激活因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4) 能够使 *GPT2* 表达上调, 增强胰岛 β 细胞的生存能力^[14]。此外, 结肠癌中 *PIK3CA* 基因突变会使 *GPT2* 表达上调, 导致癌细胞对谷氨酰胺的依赖增强, 从而促进肿瘤的生长^[15-16]。同时, 本课题组的前期研究^[17]亦表明, 乳腺癌细胞可以通过 *GPT2*- α -KG-PHD2 轴促进肿瘤的发展。因此, 上述研究均表明 *GPT2* 对肿瘤的发生与发展具有重要作用, 然而关于 *GPT2* 对肿瘤患者的预后和治疗反应的影响尚不清楚。基于此, 本研究针对 *GPT2* 在胃癌顺铂治疗抵抗中的作用及机制进行探讨, 为胃癌治疗提供新的研究靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂及仪器

人正常胃黏膜细胞 GES-1 和人胃癌细胞 N87、AGS、SGC-7901 均由上海消化外科研究所谢经武教授惠赠。人

胃癌细胞 MKN45、MKN28、BGC823 和人肾上皮细胞 293T 均为本实验室冻存细胞。本研究中涉及的所有细胞均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

RPMI 1640 培养基、青霉素/链霉素溶液 (100 \times) (上海源培生物科技股份有限公司), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (Hyclone, 美国), 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)、胰蛋白酶 (Gibco, 美国), BCA 蛋白定量试剂盒 (北京鼎国昌盛生物技术公司), *GPT2* 抗体、辣根过氧化物酶偶联的二抗 (Proteintech, 美国), *SRY* 盒 2 (*SRY*-box 2, *SOX2*) 抗体、*Nanog* 同源盒 (*Nanog* homeobox, *NANOG*) 抗体 (CST, 美国), β -actin (C4) 抗体 (Santa Cruz, 美国), 辣根过氧化物酶显影液 (上海天能科技有限公司), CCK-8 试剂盒 (Dojindo, 日本), 反转录试剂盒 (Takara, 日本), real-time PCR 试剂盒 (eBioscience, 美国), 顺铂 (大连美仑生物技术有限公司)。

HF160W 型 CO₂ 细胞培养箱、HFsafe-1200 细胞超净工作台 (力康生物医疗科技控股有限公司), TE2000-U 倒置显微镜 (Nikon, 日本), FRESCO17 型台式高速冷冻离心机 (Thermo Fisher, 美国), Oddsey 红外扫描仪 (LICOR, 美国), ImageQuant LAS 4000 化学发光成像分析仪 (GE, 美国)。

1.2 研究方法

1.2.1 免疫组织化学技术检测 *GPT2* 在胃癌及癌旁组织中的表达 人胃癌癌旁组织和胃癌组织石蜡切片均购自上海芯超生物技术有限公司。将石蜡切片置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烤片过夜, 结束后将其依次放入二甲苯、无水乙醇、95% 乙醇中脱蜡至水; 经微波修复、室温通透后, 去除切片本底的辣根过氧化物酶。而后, 经 10% 正常山羊血清封闭切片 30 min, 采用 *GPT2* 一抗 (工作浓度为 1:100) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 经二氨基联苯胺显色, 苏木精复染, 分化并冲洗返蓝; 脱水、透明后封片, 于倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.2 *GPT2* 过表达和低表达稳转细胞株的构建 通过引物设计、载体连接的方法构建 *GPT2* 过表达和低表达质粒, 其载体分别是 pHR-SIN 和 Mir-zip。用 293T 细胞分别包装上述质粒及空载质粒, 用过表达质粒及其空载质粒感染 MKN28 细胞, 低表达质粒及其空载质粒感染 MKN45 细胞; 感染结束后, 用 0.01% 的嘌呤霉素筛选带有荧光的细胞, 获得 *GPT2* 转染组和空载质粒组细胞, *GPT2* 转染组为转染了 *GPT2* 过表达质粒或 *GPT2* 低表达质粒的细胞 (其中, 设计了 2 对 shRNA 序列构建 *GPT2* 低表达质粒,

即为转染组 1 和转染组 2), 空载质粒组为转染了相应空载质粒的细胞。而后, 利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 和蛋白质印迹 (Western blotting) 检测 GPT2 的过表达和低表达效果。

1.2.3 qPCR 检测 GPT2 的表达 在无 RNA 酶存在的超净工作台中, 采用 TRIzol (Invitrogen, 美国) 裂解上述胃癌细胞及正常胃黏膜细胞, 分别加入氯仿、异丙醇和 75% 乙醇提取总 mRNA, 并利用 Nanodrop 检测 mRNA 浓度。取 1 μg 的 mRNA 反转录为 cDNA, 进行 qPCR 检测。上游引物: 5'-GGAGCTAGTGACGGCATTCTACGA-3'; 下游引物: 5'-CCCAGGGTTGATTATGCAGAGCA-3'。反应体系 (10 μL): SYBR Green Master 混合液 5 μL , 模板 cDNA 1 μg , 上游引物 (5 $\mu\text{mol/L}$) 0.25 μL , 下游引物 (5 $\mu\text{mol/L}$) 0.25 μL , ROX Reference Dye 0.2 μL , 双蒸水补足。反应程序设置: 50 $^{\circ}\text{C}$ 升温 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 40 个循环。以 β -actin 为内参, 通过数据分析计算 GPT2 的相对表达量。针对 GPT2 转染组和空载质粒组细胞中 GPT2 表达的检测, 步骤同上。

1.2.4 Western blotting 检测各蛋白表达 用细胞刮刀将细胞从 100 mm 的培养皿上刮下, 2 000 $\times g$ 离心 5 min, 去除上清液后加入适量 RIPA 裂解液对细胞进行裂解, BCA 法测定蛋白浓度。随后, 采用 Western blotting 进行检测: 取等量的蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。结束后, 将蛋白转移至聚偏氟乙烯膜 (Millipore, 美国) 上, 加入目的蛋白一抗 (GPT2、SOX2、NANOG、ERK1/2、p-ERK1/2、 β -catenin、GSK3 β 、p-GSK3 β 、Notch 受体相互作用抗体样品试剂盒、Hedgehog 信号通路抗体样品试剂盒的工作浓度均为 1:1 000, β -actin 抗体的工作浓度为 1:3 000) 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。经 TBST 洗膜后, 于室温下孵育二抗 (山羊抗兔 IR Dye 800 CW、驴抗鼠 IR Dye 680 CW, 过氧化物酶山羊抗兔 IgG、过氧化物酶山羊抗小鼠 IgG 的工作浓度均为 1:10 000) 1 h。再经 TBST 洗膜后, 于 Odyssey 红外扫描仪或化学发光成像分析仪扫描成像, 并对目的蛋白 GPT2 进行定量分析。

1.2.5 CCK-8 检测顺铂的细胞毒性 将人正常胃黏膜细胞 GES-1 和人胃癌细胞 MKN45、MKN28、BGC823、N87、SGC-7901、AGS 分别以一定数量接种至 96 孔板中; GES-1、MKN28、BGC823、SGC-7901、AGS 的接种浓度均为每 100 μL 中 4 000 个, MKN45 和 N87 的接种浓度均为每 100 μL 中 10 000 个。第 2 日弃去培养基, 用不

同浓度顺铂处理细胞 4 d 后终止培养。弃去培养基, 向每孔加入 90 μL 新鲜培养基和 10 μL CCK-8, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 于酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值, 计算细胞存活率并绘制存活曲线。针对 GPT2 转染组和空载质粒组细胞的细胞毒性检测, 具体步骤同上。

1.2.6 细胞克隆形成实验检测克隆形成能力 将 GPT2 过表达 MKN28 细胞和 GPT2 低表达 MKN45 细胞接种到 6 孔板中, 接种浓度分别为 1 000 个/孔和 5 000 个/孔, 每组设置 3 个复孔, 并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 10 ~ 14 d。培养 1 周后, 开始观察细胞克隆的数目及大小; 2 周后, 将细胞从培养箱取出, 弃去培养基, PBS 洗涤 2 次。向每孔加入 2 mL 固定液 (10% 甲醇 + 10% 冰醋酸 + 80% PBS), 室温固定 30 min; 弃去固定液后用 PBS 洗涤 2 次, 再向每孔加入 2 mL 1% 结晶紫溶液, 室温反应 30 min; 回收结晶紫, 用流水冲洗 6 孔板, 晾干后于扫描仪下扫描, 统计克隆形成数目 (包含 50 个细胞以上记为 1 个克隆)。

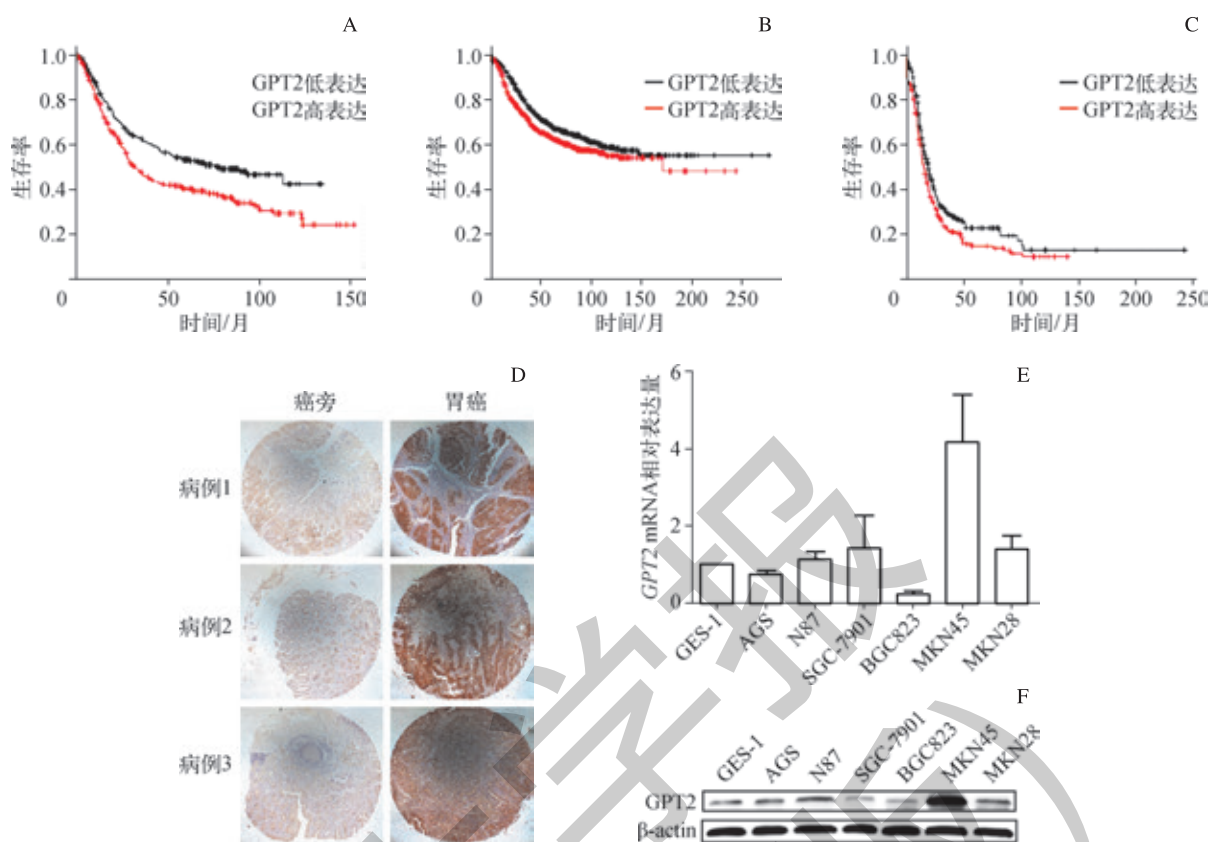
1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 软件对研究数据进行统计分析。研究中所有数据均重复 3 次以上, 组间比较采用 Student's *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GPT2 的表达水平与胃癌患者生存期之间的关系

为研究 GPT2 的表达水平与常见肿瘤的相关性, 本研究利用 Kaplan Meier-Plotter 数据库资料对 GPT2 表达水平与胃癌、乳腺癌、卵巢癌患者生存期的相关性进行分析。Kaplan Meier-Plotter 曲线分析 (图 1A) 显示, GPT2 表达高的患者存活率较低, 与胃癌患者生存期呈高度负相关 ($P = 0.000$); 且在乳腺癌 ($P = 0.009$) 和卵巢癌 ($P = 0.013$) 患者中均呈现类似的趋势 (图 1B、1C)。随后, 本研究利用免疫组织化学技术检测临床胃癌样本中 GPT2 的表达水平; 结果 (图 1D) 显示, 与胃癌癌旁组织相比, 胃癌组织中 GPT2 的表达水平显著升高。此外, 本研究又从 mRNA 水平和蛋白水平分别对 GPT2 的表达进行检测, qPCR 和 Western blotting 结果显示, GPT2 在部分胃癌细胞中高度表达 (图 1E、1F)。基于此, 我们发现 GPT2 可在部分胃癌中高度表达, 且 GPT2 的高表达与胃癌患者生存期呈负相关。



注: A、B、C. GPT2 的表达与胃癌 (A)、乳腺癌 (B)、卵巢癌 (C) 患者的生存期分析; D. 免疫组织化学技术检测临床样本中 GPT2 的表达; E. qPCR 检测 GPT2 mRNA 表达水平; F. Western blotting 检测 GPT2 的蛋白表达水平

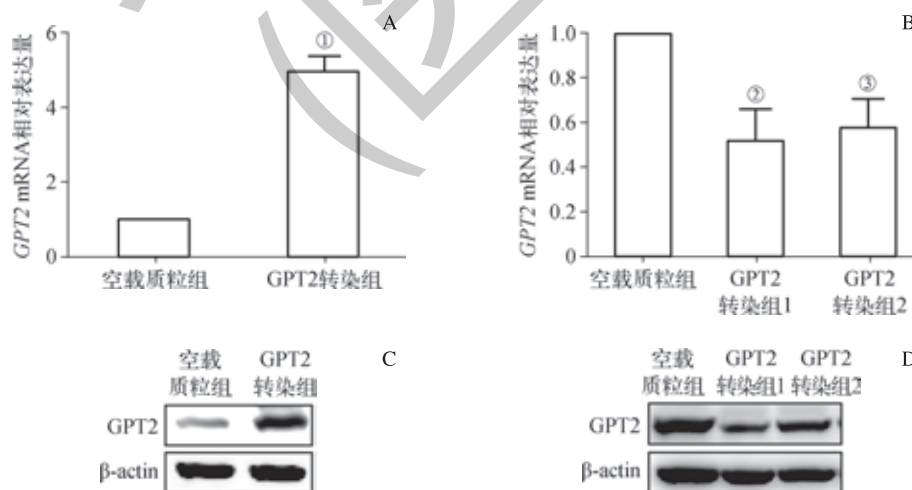
图 1 GPT2 的表达水平及其与胃癌患者生存期之间的关系

Fig 1 GPT2 expression and its relationship with survival of gastric cancer patients

2.2 构建 GPT2 过表达及低表达细胞株

为进一步研究 GPT2 与患者预后和治疗反应之间的关系, 本研究选择 GPT2 表达低的 MKN28 细胞和 GPT2 表达高的 MKN45 细胞分别构建 GPT2 过表达和低表达稳转

细胞株, 利用 qPCR 和 Western blotting 检测 GPT2 的表达, 结果 (图 2) 显示 GPT2 在 mRNA 和蛋白水平上均有明显的过表达和低表达效果; 继而表明, GPT2 过表达 MKN28 及低表达 MKN45 稳转细胞株构建成功。



注: A、B. qPCR 检测 GPT2 过表达 MKN28 细胞 (A)、GPT2 低表达 MKN45 细胞 (B) 中 GPT2 mRNA 的表达 ($^{\text{a}}$ $P=0.000$, $^{\text{b}}$ $P=0.004$, $^{\text{c}}$ $P=0.005$, 与空载质粒组比较); C、D. Western blotting 检测 GPT2 过表达 MKN28 细胞 (C)、GPT2 低表达 MKN45 细胞 (D) 中 GPT2 的蛋白表达

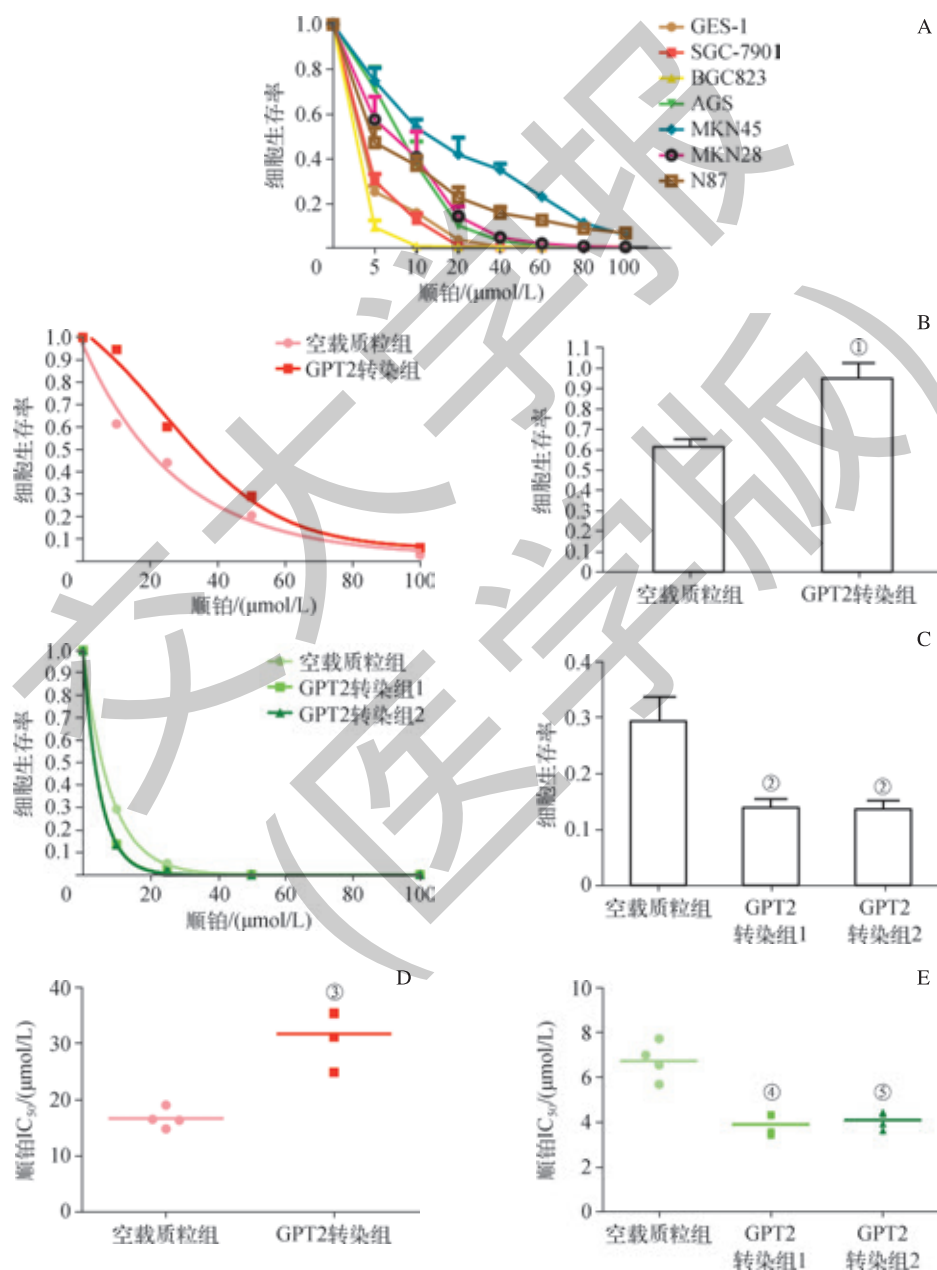
图 2 GPT2 过表达和低表达细胞株的构建

Fig 2 Construction of overexpression and knockdown cell lines of GPT2

2.3 GPT2 对顺铂治疗的影响

为分析 GPT2 的表达水平与顺铂治疗的关系, 本研究采用不同浓度的顺铂分别处理人胃癌及正常胃黏膜细胞, 通过 CCK-8 试剂盒检测细胞毒性。结果 (图 3A) 显示, GPT2 表达低的 MKN28、BGC823、SGC-7901、AGS、N87 细胞对顺铂治疗较为敏感, 而 GPT2 表达高的 MKN45 细胞则不敏感。随后, 本研究用顺铂分别处理 GPT2 转染组和空载质粒组细胞, 通过 CCK-8 试剂盒检测细胞毒性。结果显示 (图 3B、3C), GPT2 过表达的 MKN28 细

胞对顺铂的敏感性有所下降 ($P=0.040$), 而 GPT2 低表达的 MKN45 细胞对其敏感性则有所升高 (均 $P=0.009$)。另外, 本研究对 GPT2 过表达的 MKN28 细胞和 GPT2 低表达的 MKN45 细胞经顺铂治疗后的 IC_{50} 进行分析, 结果 (图 3D、3E) 显示, 对于 GPT2 过表达 MKN28 细胞而言, GPT2 转染组的 IC_{50} 值是空载质粒组的 2 倍 ($P=0.007$), 而对于 GPT2 低表达 MKN45 细胞而言, 空质粒组的 IC_{50} 值是 GPT2 转染组的 2 倍。综上所述, 本研究发现胃癌细胞中 GPT2 的高表达可增加顺铂治疗的敏感性。



注: A. GPT2 表达的细胞对不同浓度顺铂治疗的敏感性分析; B、C. 顺铂对 GPT2 过表达 MKN28 细胞 (B)、GPT2 低表达 MKN45 细胞 (C) 的细胞毒性分析 (^① $P=0.040$, ^② $P=0.009$, 与空载质粒组比较); D、E. MKN28 细胞过表达 GPT2 后 (D)、MKN45 细胞过表达 GPT2 后 (E) 的 IC_{50} 值 (^③ $P=0.007$, ^④ $P=0.004$, ^⑤ $P=0.005$, 与空载质粒组比较)

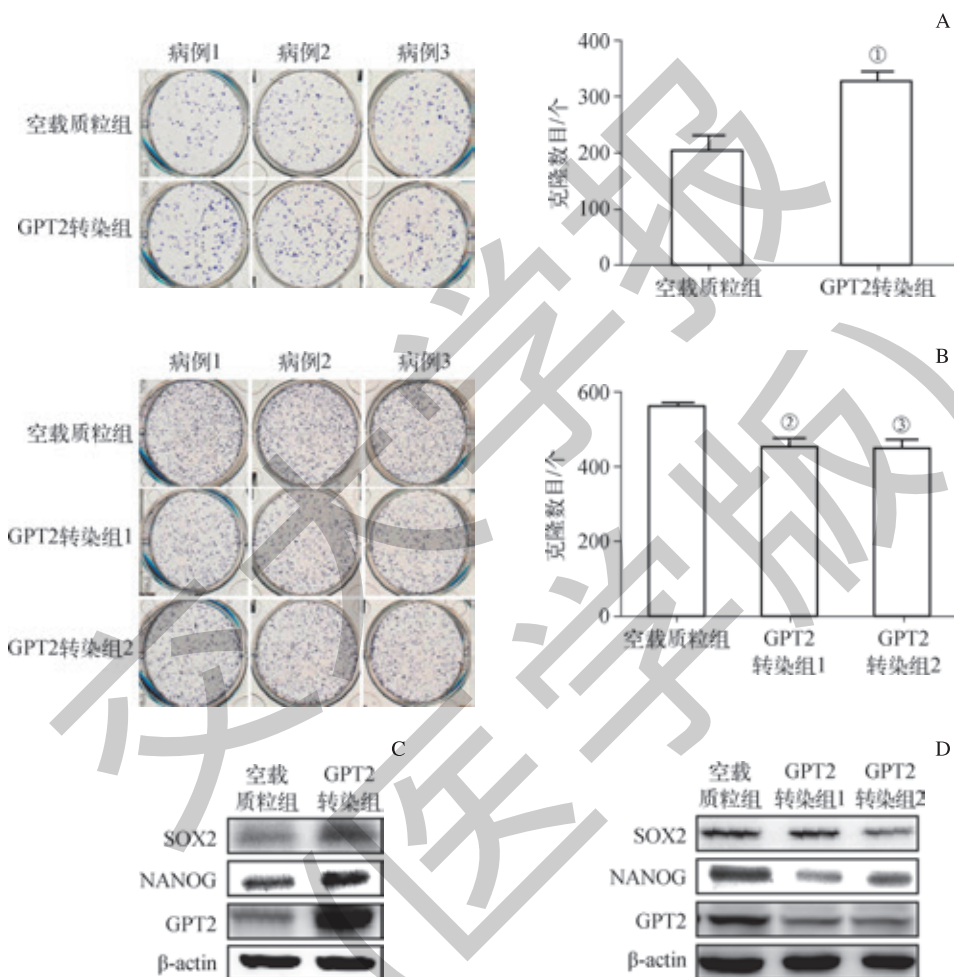
图 3 CCK-8 检测 GPT2 的表达对胃癌细胞顺铂治疗抵抗的影响

Fig 3 Effect of GPT2 expression on cisplatin resistance in gastric cancer cells by CCK-8 assay

2.4 GPT2 与胃癌细胞干性之间的关系

本课题组的前期研究^[17]表明, 乳腺癌细胞中 GPT2 的表达上调可激活肿瘤细胞的干性, 继而促进乳腺癌的进展。同时, 肿瘤细胞的干性与肿瘤治疗抵抗密切相关^[18-19]。基于此, 本研究对细胞干性和胃癌细胞治疗抵抗之间的关系进行分析。首先, 我们利用细胞克隆形成实验对 GPT2 转染组和空载质粒组细胞的细胞克隆形成能力进行检测, 结果显示 (图 4A、4B), GPT2 过表达后细胞的克隆形

成能力有所增强 ($P=0.017$), 而 GPT2 低表达后则相对减弱 (均 $P<0.05$)。随后, 我们通过 Western blotting 检测细胞干性相关分子标志物 SOX2 和 NANOG 的表达情况, 结果显示 (图 4C、4D), GPT2 过表达细胞的 SOX2 和 NANOG 表达有所增加, 而 GPT2 低表达细胞则表达减弱。继而推测, 胃癌细胞中高度表达的 GPT2 可通过上调干性相关标志物 SOX2 和 NANOG 的表达, 来增强细胞对顺铂治疗的抵抗。



注: A、B. 细胞克隆形成实验检测 GPT2 过表达 MKN28 细胞 (A)、GPT2 低表达 MKN45 细胞 (B) 的细胞克隆形成能力 (^① $P=0.017$, ^② $P=0.012$, ^③ $P=0.013$, 与空载质粒组比较); C、D. Western blotting 检测 GPT2 过表达 MKN28 细胞 (C)、GPT2 低表达 MKN45 细胞 (D) 中干性相关分子标志物 SOX2 和 NANOG 的变化

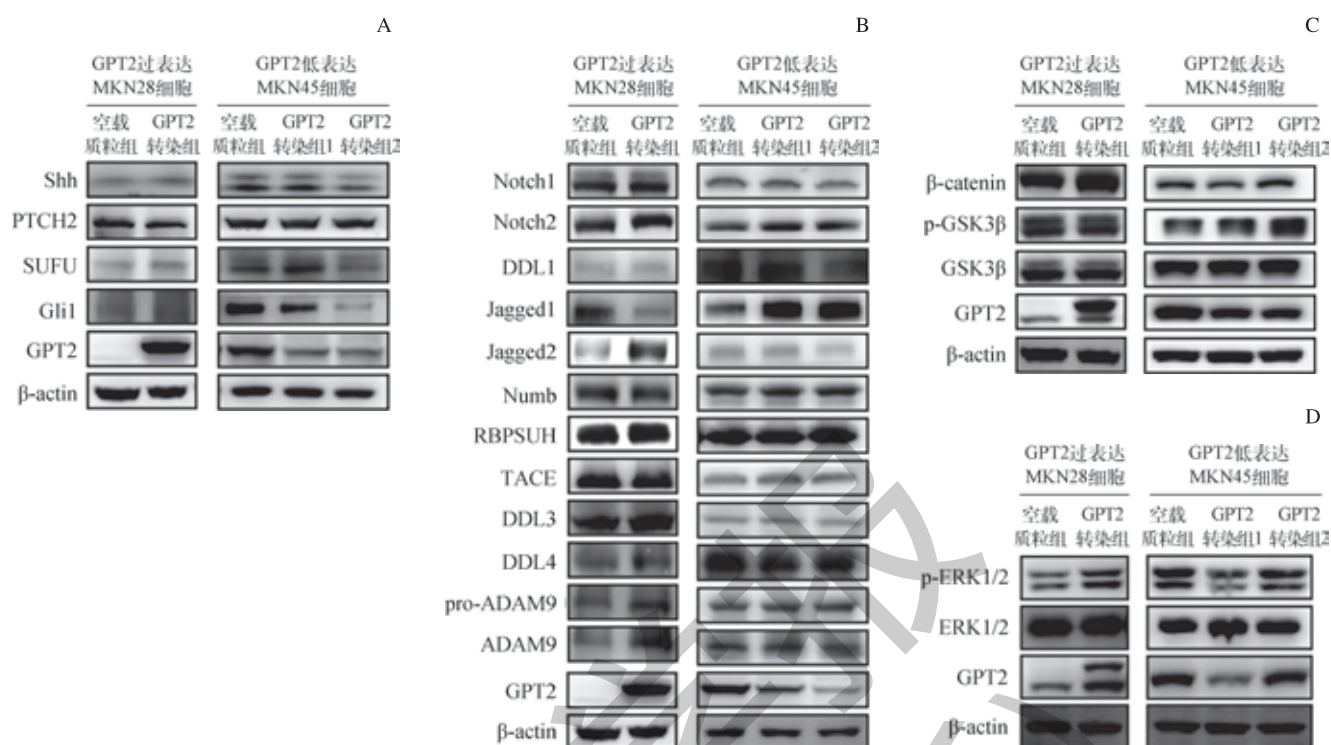
图 4 GPT2 的表达与胃癌细胞干性之间的关系

Fig 4 Relationship between GPT2 expression and stemness of gastric cancer cells

2.5 GPT2 增加胃癌细胞干性与 ERK 信号通路的相关性

为进一步探究 GPT2 增强顺铂治疗抵抗的作用机制, 本研究利用 Western blotting 检测 GPT 转染组和空载质粒组细胞中经典干性通路的变化, 结果 (图 5A ~ C) 显示, GPT2 的表达能部分上调 Hedgehog 信号通路上的关键成员 Shh、Gli1 以及 Notch 信号通路上的关键成员 DDL4, 继而部分激活了 Hedgehog 和 Notch 信号通路, 而 Wnt 信号通路则完全

不能被激活。有研究^[20-21]表明, ERK 通路可参与顺铂耐药和干性调节过程。本研究采用 Western blotting 对 ERK 信号通路上的关键蛋白 ERK 磷酸化水平进行检测, 结果 (图 5D) 显示, GPT2 过表达 MKN28 细胞中 ERK 的磷酸化水平出现上调, 而 GPT2 低表达 MKN45 细胞中则有所下调。综上可以推测, GPT2 的高表达可通过激活 ERK 信号通路来增加胃癌细胞的干性, 从而诱导胃癌顺铂治疗的抵抗。



注: A、B、C、D. 检测 GPT2 转染组和空载质粒组细胞中经典干性通路 Hedgehog 信号通路 (A)、Notch 信号通路 (B)、Wnt 信号通路 (C)、ERK 信号通路 (D) 中关键蛋白的表达水平

图 5 Western blotting 检测肿瘤细胞干性相关信号通路中蛋白的表达水平

Fig 5 Expression level of proteins in stemness-related signaling pathways of tumor cells by Western blotting

3 讨论

GPT2 在糖异生过程中扮演着重要角色。研究^[16]表明, GPT2 的无义突变可使其蛋白失去酶活, 导致神经系统中谷氨酰胺发生异常代谢; 继而提示, GPT2 在神经系统中可能发挥了重要作用。另有研究^[15-16]表明, GPT2 在多数肿瘤组织和细胞中高度表达, 使谷氨酰胺代谢发生异常, 继而导致谷氨酰胺代谢的中间代谢物 α -酮戊二酸水平升高, 而较高水平的 α -酮戊二酸可进入三羧酸循环参与肿瘤细胞的恶性生长, 从而促进肿瘤的发生与发展。然而目前, 鲜有关于在肿瘤进展中 GPT2 蛋白表达变化的相关研究。本课题组的前期研究^[17]表明, GPT2 在肿瘤代谢中起着重要的促进作用, 但关于 GPT2 与患者预后和治疗之间的关系却了解较少。本研究采用免疫组织化学技术、qPCR 和 Western blotting 对胃癌生存期进行分析发现, GPT2 在胃癌临床样本和部分胃癌细胞中高度表达, 且 GPT2 的高表达与胃癌患者预后呈负相关。

研究^[18-19]显示, 肿瘤干细胞在肿瘤的化疗抵抗中扮演着不可或缺的角色, 基于该细胞的存在, 患者在治疗过程中常出现复发和转移。在肿瘤干细胞中, Hedgehog、Wnt、Notch 和 TGF β 等信号通路存在异常调节^[22-25]。而除上述经

典的干性调节通路外, 在乳腺癌干细胞调节过程中, ERK 信号通路也发挥着重要作用^[26]。此外, Zhang 等^[27]报道显示, 在干性相关分子标志物表达上调的胃癌细胞中 p-ERK 的水平较高, 继而说明 ERK 信号通路参与了干性细胞的调节过程。而本研究发现, GPT2 过表达并不能激活或部分激活 Hedgehog、Wnt 和 Notch 等经典干性调节信号通路, 但 GPT2 过表达则可使 ERK 信号通路异常激活, 即 ERK 磷酸化水平增加、干性相关分子标志物 SOX2 和 NANOG 表达上调, 从而实现胃癌细胞对顺铂治疗的抵抗。虽然本研究证实, ERK 信号通路参与了 GPT2 表达上调引起的顺铂治疗抵抗, 但也不能排除 PI3K/AKT 等信号通路在顺铂治疗抵抗中的作用。有研究^[28]发现, Her-2/neu 受体与配体结合后, 可激活下游 PI3K/AKT 信号通路, 从而增加顺铂治疗的敏感性, 而 PI3K/AKT 信号通路可通过激活肿瘤干性以促进肿瘤的进展^[29]; 因此, 我们猜想 GPT2 有可能是通过激活 PI3K/AKT 信号通路以增强顺铂治疗抵抗, 而该猜想仍需要进一步的实验加以佐证。

此外, 谷氨酰胺的中间代谢产物谷氨酸是谷胱甘肽循环中的原料, 当肿瘤细胞中谷胱甘肽水平升高时, 细胞内的谷胱甘肽则可与靶向治疗药物相结合诱导肿瘤顺铂耐药, 继而导致患者出现顺铂治疗抵抗^[30]。但目前, GPT2

引起的顺铂治疗抵抗是否与细胞内谷胱甘肽水平的升高有关, 尚未明确。Jeong 等^[31]研究发现, 在 DNA 损伤应激条件下, 细胞和机体内代谢状态可发生改变, 尤其是谷氨酰胺代谢会被快速显著抑制。这一“代谢重编程”对于调节细胞周期、预留时间完成 DNA 损伤修复、维持基因组稳定性等方面至关重要。

综上, 本研究以顺铂治疗敏感和不敏感的胃癌细胞为研究对象, 初步在体外证实 GPT2 可增加顺铂治疗抵抗, 但仍需进一步开展 GPT2 与顺铂治疗抵抗之间关系的体内

研究; 同时, GPT2 诱导的顺铂治疗抵抗在胃癌顺铂耐药细胞株中是否有同样的效果, 也需进一步的实验验证。由于顺铂治疗抵抗主要通过减少细胞凋亡实现, GPT2 是否通过抑制细胞凋亡来增强顺铂治疗抵抗也将是课题组未来探索的问题之一。另外, 由于 GPT2 是一种催化可逆反应的谷丙转氨酶, 在谷氨酰胺代谢和三羧酸循环中亦发挥了重要作用, 因此 GPT2 是否通过发挥其酶活作用促进上、下游中间代谢产物的产生, 进而参与顺铂治疗抵抗, 还需更加深入地探讨。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Wu QN, Liao YF, Lu YX, et al. Pharmacological inhibition of DUSP6 suppresses gastric cancer growth and metastasis and overcomes cisplatin resistance[J]. Cancer Lett, 2018, 412: 243-255.
- [3] Fock KM. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2014, 40(3): 250-260.
- [4] Helleday T, Petermann E, Lundin C, et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(3): 193-204.
- [5] Hill ME, Cunningham D. Medical management of advanced gastric cancer[J]. Cancer Treat Rev, 1998, 24(2): 113-118.
- [6] Bang YJ, Kim YW, Yang HK, et al. Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial[J]. Lancet, 2012, 379(9813): 315-321.
- [7] Kool M, de Haas M, Scheffer GL, et al. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines[J]. Cancer Res, 1997, 57(16): 3537-3547.
- [8] Kong LR, Chua KN, Sim WJ, et al. MEK inhibition overcomes cisplatin resistance conferred by SOS/MAPK pathway activation in squamous cell carcinoma[J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(7): 1750-1760.
- [9] Roodhart JM, Daenen LG, Stigter EC, et al. Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids[J]. Cancer Cell, 2011, 20(3): 370-383.
- [10] Li W, Melton DW. Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene *ERCC1* and increase melanoma chemoresistance[J]. Oncogene, 2012, 31(19): 2412-2422.
- [11] Barnfield PC, Zhang X, Thanabalasingham V, et al. Negative regulation of Gli1 and Gli2 activator function by suppressor of fused through multiple mechanisms[J]. Differentiation, 2005, 73(8): 397-405.
- [12] Qian K, Zhong S, Xie K, et al. Hepatic ALT isoenzymes are elevated in gluconeogenic conditions including diabetes and suppressed by insulin at the protein level[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2015, 31(6): 562-571.
- [13] Kaymakcalan H, Yarman Y, Goc N, et al. Novel compound heterozygous mutations in GPT2 linked to microcephaly, and intellectual developmental disability with or without spastic paraplegia[J]. Am J Med Genet A, 2018, 176(2): 421-425.
- [14] Juliana CA, Yang J, Cannon CE, et al. A PDX1-ATF transcriptional complex governs β cell survival during stress[J]. Mol Metab, 2018, 17: 39-48.
- [15] Feng X, Hao Y, Wang Z. Targeting glutamine metabolism in *PIK3CA* mutant colorectal cancers[J]. Genes Dis, 2016, 3(4): 241-243.
- [16] Hao Y, Samuels Y, Li Q, et al. Oncogenic *PIK3CA* mutations reprogram glutamine metabolism in colorectal cancer[J]. Nat Commun, 2016, 7: 11971.
- [17] Cao Y, Lin SH, Wang Y, et al. Glutamic pyruvate transaminase GPT2 promotes tumorigenesis of breast cancer cells by activating sonic Hedgehog signaling[J]. Theranostics, 2017, 7(12): 3021-3033.
- [18] Chen ZG. The cancer stem cell concept in progression of head and neck cancer[J]. J Oncol, 2009, 2009: 894064.
- [19] Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, et al. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8(2): 97-106.
- [20] Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells: what challenges do they pose?[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(7): 497-512.
- [21] Wang LQ, Yu P, Li B, et al. miR-372 and miR-373 enhance the stemness of colorectal cancer cells by repressing differentiation signaling pathways[J]. Mol Oncol, 2018, 12(11): 1949-1964.
- [22] Shamai Y, Alperovich DC, Yakhini Z, et al. Reciprocal reprogramming of cancer cells and associated mesenchymal stem cells in gastric cancer[J]. Stem Cells, 2019, 37(2): 176-189.
- [23] Akrami H, Moradi B, Borzabadi Farahani D, et al. Ibuprofen reduces cell proliferation through inhibiting Wnt/ β catenin signaling pathway in gastric cancer stem cells[J]. Cell Biol Int, 2018, 42(8): 949-958.
- [24] Xu M, Gong A, Yang H, et al. Sonic hedgehog-glioma associated oncogene homolog 1 signaling enhances drug resistance in CD44⁺/Musashi-1⁺ gastric cancer stem cells[J]. Cancer Lett, 2015, 369(1): 124-133.
- [25] Li C, Song L, Zhang Z, et al. MicroRNA-21 promotes TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer through up-regulating PTEN expression[J]. Oncotarget, 2016, 7(41): 66989-67003.
- [26] Berardi DE, Raffo D, Todaro LB, et al. Laminin modulates the stem cell population in LM05-E murine breast cancer cells through the activation of the MAPK/ERK pathway[J]. Cancer Res Treat, 2017, 49(4): 869-879.
- [27] Zhang X, Hua R, Wang X et al. Identification of stem-like cells and clinical significance of candidate stem cell markers in gastric cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 9815-9831.
- [28] Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance[J]. Oncogene, 2003, 22(47): 7265-7279.
- [29] Ji N, Yu JW, Ni XC, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells increase drug resistance in CD133-expressing gastric cancer cells by regulating the PI3K/AKT pathway[J]. Tumor Biol, 2016, 37(11): 14637-14651.
- [30] Sakamoto M, Kondo A, Kawasaki K, et al. Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray[J]. Hum Cell, 2001, 14(4): 305-315.
- [31] Jeong SM, Xiao C, Finley LW, et al. SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism[J]. Cancer Cell, 2013, 23(4): 450-463.

[收稿日期] 2019-01-16

[本文编辑] 邢宇洋

