

Glut 1 基因沉默对人结肠癌 HT-29 细胞株增殖、分化及凋亡的影响及机制研究

郭圣超¹ 武雪亮² 薛军² 韩磊² 孙光源² 杨东东² 屈明²

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.05.022

摘要 目的 探究葡萄糖转运蛋白 1 (Glut 1) 基因沉默对人结肠癌 HT-29 细胞增殖、分化及凋亡的影响及机制。方法

将 Glut 1 干扰序列 (siRNA) 转染至人结肠癌 HT-29 细胞作为 shGlut 1 组, 非干扰序列转至 HT-29 细胞作为 NC 组, HT-29 细胞作为 Blank 组, 癌旁正常组织细胞作为 Control 组, 应用 qRT-PCR 法和 Western blot 法检测各组细胞中 Glut 1、TGF- β 1、PI3K、AKT、PTEN、mTOR mRNA 和相应蛋白的表达水平, 并检测 Bcl-2/Bax 比值, p-PI3K、p-S 473-AKT、p-S 389-S6K1、p-T 70-4 EBP1、Cleaved Caspase-3、Cleaved-PARP 蛋白的表达; MTT 法检测各组细胞增殖能力变化, 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡情况, 克隆形成实验检测肿瘤细胞体外增殖成瘤能力。结果 免疫荧光结果表明 shGlut 1 组转染效率较高, 符合实验标准; 与 Control 组比较, 结肠癌组织中 Glut 1、TGF- β 1、PI3K、AKT、mTOR、Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达上调, 而 PTEN、Bax 的 mRNA 和蛋白的表达下调, p-PI3K、p-S 473-AKT、p-S 389-S6K1 和 p-T 70-4 EBP1 蛋白表达上调, Cleaved Caspase-3、Cleaved-PARP 蛋白表达下调 (P 均 < 0.05); 与 Blank 组和 NC 组比较, shGlut 1 组 Glut 1、TGF- β 1、PI3K、AKT、mTORC 1、Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达下调, PTEN、Bax mRNA 和蛋白的表达上调, p-PI3K、p-S 473-AKT、p-S 389-S6K1 和 p-T 70-4 EBP1 表达下调, Cleaved Caspase-3、Cleaved-PARP 蛋白的表达上调, 增殖率下调, G_0/G_1 期较多而 S 期较少, 凋亡率上调, 克隆形成细胞生长较慢 (P 均 < 0.05)。结论 Glut 1 基因沉默能抑制结肠癌细胞的增殖与分化, 促进其凋亡, 考虑为抑制 TGF- β /PI3K-AKT-mTOR 信号通路。

关键词 Glut 1 基因沉默; 人结直肠癌 HT-29 细胞; 增殖; 分化; 凋亡; 机制

中图分类号 R 735.3+7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)05-0790-06

2020-07-14 接收

基金项目: 河北省财政厅临床医学优秀人才培养研究项目 (编号: 361009); 河北省卫计委医学科学研究重点课题计划 (编号: 20180834); 张家口市科技局指令性计划 (编号: 1621083D)

作者单位: 河北北方学院¹ 研究生学院、² 附属第一医院, 张家口 075000

作者简介: 郭圣超, 男, 硕士研究生;

薛军, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yfyxuejun@163.com

葡萄糖转运蛋白在向代谢活性细胞提供能量的过程中发挥着关键作用, 葡萄糖转运蛋白-1 (glucose transporter-1, Glut 1) 在真核生物和原核生物中均有发现, 其表达升高或激活已被证明^[1] 是诸多恶性肿瘤发生的主要原因。转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- β 是与肿瘤发生、进展和转移调控密切相关的分泌型配体。TGF- β 信号通路在控制细胞增殖和结肠直肠癌的分化中具有重要作用^[2]。现已证实^[3] 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶标 (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin, PI3K-AKT-mTOR) 信号通路参与细胞增殖、血管生成和转移密切相关, 也是导致结直肠癌变的重要机制。因此, 该研究旨在探讨 Glut 1 基因沉默介导的 TGF- β /PI3K-AKT-mTOR 信号通路对结肠直肠癌细胞的作用, 为结直肠癌的靶向诊疗提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂 人结肠癌细胞株 HT-29 细胞 (上海生物工程研究所); 10% 胎牛血清 RPMI 1640、DMEM (美国 Gibco 公司); siRNA 干扰序列 (上海生工生物工程技术有限公司), 载体 pSI-REN (北京华奥正生科技有限公司), Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司), DAPI (上海碧云天生物技术有限公司), TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), PrimeScriptTM RT reagent Kit (北京智杰方远科技有限公司), 引物 (北京擎科新业生物技术有限公司), BCA 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 酶抑制剂 (北京嘉美纽诺生物科技有限公司), MTT 溶液 (美国 Sigma-aldrich 公司), PI 染液 (上海前尘生物科技有限公司)。

1.2 细胞培养 将 H-29 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 以 1×10^5 个/孔的密度将细胞分种于 6 孔培养板, 并置于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的孵箱中培养。

1.3 构建质粒 siRNA 序列设计根据 Genbank 中的 Glut 1 的 mRNA 全序列 (005983) 从 Glut 1 编码区中寻找符合设计原则的靶序列,通过 BLAST 软件确定与其他非相关基因无同源性,按照 Pg-PU 6/Neo 载体的要求设计能编码 siRNA 的寡核苷酸链 (正: 5'-CACC GGGAGT GACAAAGACTTT GTTCAAGCA-3'; 反: 5'-GATCCAAAAAGGGAGT GACAAAGACTTCTC-3'),对所有的寡核苷酸片段进行合成。

1.4 细胞分组与转染 选对数生长期细胞,接种于 6 孔板,每孔 5×10^4 个细胞,给予新鲜完全培养基培养至细胞融合度接近 50% ~ 80% 时进行转染。依据 Lipofectamine 2000 转染,将细胞分为 3 组: Blank 组 (人结肠癌 HT 29 细胞)、NC 组 (转染非干扰序列的 HT-29 细胞) 和 shGlut 1 组 (转染 siRNA 序列的 HT-29 细胞) 组。lipo 溶液: 240 μ l 无血清培养基 + 10 μ l lipo 溶液,总体积 250 μ l,温育 5 min。质粒溶液: 20 μ l 无血清培养基 + 4 μ g 质粒,总体积 24 μ l。分别将 lipo 溶液和质粒溶液混合,室温下放置 20 min,混合液逐滴加入孔中,摇动培养板,轻轻混匀。在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 中保温 5 ~ 6 h 后,换完全培养基,继续培养 24 ~ 48 h,进行后续实验。

1.5 免疫荧光法 将细胞接种于 6 孔板中,加入 2 ml 完全培养基,置 CO_2 孵箱中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。待细胞长到 50% ~ 80% 时,在灭菌的离心管中配制如下溶液。溶液 A: 将 4 μ g 待转染的纯 DNA 稀释到 250 ml 无血清培养基中,静置 5 min; 溶液 B: 将 2 ~ 25 ml LipofectAMINE 稀释到 250 ml 无血清培养基中,静置 5 min。混合溶液 A 和 B,室温放置 15 ~ 45 min。用 2 ml 无血清培养基洗净细胞,加入 0.8 ml 无血清培养基/孔,将脂质体复合物滴加在孔中混匀,置 CO_2 孵箱中 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 ~ 24 h。DAPI 避光孵育 30 min。用完全培养基替换转染液,继续培养。24 h 后在荧光显微镜下观察蛋白表达情况,取 2 个表达区域保存,取均值,转染效率 = 转染细胞数目 / 总细胞数目。

1.6 qRT-PCR 法 取结肠直肠癌组织和癌旁正常组织各 30 mg,加入 1 ml 的 TRIzol 试剂,在冰浴中粉碎,提取组织中总 RNA,采用紫外分光光度法检测 RNA 的纯度及浓度,将纯度为 $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$ 的所有样品浓度调整为 0.1 ng/ μ l,用逆转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Ki 将 RNA 逆转录成 cDNA (50 ng/ μ l),逆转录体系 10 μ l,参照说明书进行,设定反应条件为: 37 $^{\circ}$ C、15 min \times 3 次 (逆转录反应)、85 $^{\circ}$ C、5 s (逆转录酶失活反应)、-80 $^{\circ}$ C 冻存、

备用。通过 Premier 5.0 软件自行设计引物,按两步法在 ABI 7900 HT 实时定量 PCR 仪上进行,以 GAPDH 为内参照。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s; 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s; 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 mRNA 的相对表达水平,每个样品的每个基因设 3 个复孔。实验重复 3 次。

1.7 Western blot 法 取组织样品 30 g,检测总蛋白浓度。取对数生长期细胞,以 3 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,弃上清液,估计细胞压积 (packed cell volume, PCV),按每 20 μ l 细胞压积加入裂解液 100 μ l 和酶抑制剂 1 μ l 的比例冰上裂解 30 min,低温 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液蛋白定量检测。取 50 μ g 蛋白溶于 2 \times SDS 上样缓冲液中,将样本 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min 后,将上述各样品经质量浓度 10% SDS-PAGE 凝胶转移至 PVDF 膜,用质量浓度 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,孵育兔抗人一抗 (Glut 1: 1 : 1 000、TGF- β 1: 1 : 1 000、PI3K: 1 : 2 000、AKT: 1 : 500、p-PI3K: 1 : 800、p-S 308-AKT: 1 : 1 000、p-S 473-AKT: 1 : 1 000、p-T 389-S6K1: 1 : 500、p-T 70-4 EBPI: 1 : 500、PTEN: 1 : 600、mTOR: 1 : 500、Bax: 1 : 800、Bcl-2: 1 : 1 000、Cleaved Caspase-3: 1 : 1 000、Cleaved-PARP: 1 : 1 000),用 TBST 洗 3 遍后将膜与 1 : 5 000 稀释的 HRP 标记二抗羊抗孵育 1 h。TBST 漂洗后, ECL 显色, X 片曝光、照相。使用凝胶成像分析系统对显色条带进行吸光度分析。样本蛋白的相对含量 = 样本的平均吸光度 / 内参照的平均吸光度,并做统计分析图。重复 3 次。

1.8 MTT 法 转染 24 h 后,取对数生长期的细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基制备成 2.5×10^5 个/ml 的细胞悬液,接种到 96 孔培养板,根据实验分组,每组各设 8 孔,每孔 100 μ l,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱中培养,分别于培养 24、48、72 h 时取出培养板,每孔加入 5 mg/ml MTT 溶液 10 μ l 继续培养 4 h,终止培养后,弃上清液,每孔加 150 μ l DMSO,充分溶解,自动酶标读数仪 490 nm 处测定各孔吸光度 (optical density, OD) 值。重复 3 次。

1.9 流式细胞术 细胞转染 48 h 后, 0.25% 胰蛋白酶消化,使细胞数调整为 1×10^6 /ml,取 1 ml 细胞 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,加 2 ml PBS,离心弃上清液,加入预冷的 70% 乙醇固定细胞, 4 $^{\circ}$ C 过夜。用 PBS 洗涤细胞 2 遍,取 100 μ l 细胞悬液,加入 50 μ g 含 RNAase 的 PI 染液,避光 30 min 后用 100 目的尼龙网过滤,流式细胞仪记录激发波长在 488 nm 处红色荧光检测细胞周期。Annexin V-

FITC/PI 双标染色检测细胞凋亡,将处理好的细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,收集细胞, PBS 洗涤 2 遍后离心将细胞重悬于 200 μl 结合缓冲液中,加入 10 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 混匀,避光室温反应 15 min,加入 300 μl 结合缓冲液,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,重复 3 次。

1.10 平板克隆形成实验 用胰蛋白酶消化各组细胞,血清终止后重悬并计数,按照每孔 1 000 个细胞的密度接种于 6 孔板中,37 ℃、5% CO₂ 培养于半固培养基中,2 周后用结晶紫染色,观察细胞集落数量和大小变化。重复 3 次。

1.11 统计学处理 所有数据均采用 SPSS 21.0 统计软件分析,计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示,癌组织及癌旁组织的比较采用配对 *t* 检验,多组间的比较应采用单因素方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 癌组织及癌旁正常组织中 TGF-β、PI 3 K-AKT-mTOR 信号通路及凋亡蛋白的表达 qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,和癌旁正常组织比较,结直肠癌组织中 Glut 1、TGF-β 1、AKT、mTOR、Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达上调 (*t* = 19.91、42.55、28.96、26.63、17.39, *P* 均 < 0.05); PTEN、Bax 的 mRNA 和蛋白的表达明显下调 (*t* = 54.01、28.21), p-PI3K、p-S 473-AKT、p-S 389-S6K1 和 p-T 70-4 EBPI 蛋白的表达明显上调 (*t* = 23.17、34.81、31.25、27.84), Cleaved Caspase-3、Cleaved-PARP 蛋白的表达明显下调 (*t* = 27.62、16.61, *P* 均 < 0.05), p-T 308-AKT 蛋白则差异无显著意义,见图 1。

2.2 转染效率检测 细胞转染 72 h 后,在荧光显微镜下可见明显荧光。计算视野中 NC 组的平均转染效率为 (75.2 ± 3.1) %, shGlut 1 组的平均转染效率为 (92.5 ± 4.2) %,符合实验要求,见图 2。

2.3 各组细胞中 TGF-β、PI3K-AKT-mTOR 信号通路及凋亡蛋白的表达 qRT-PCR 与 Western blot 结果显示,与 Control 组比较,其余各组细胞 Glut 1、TGF-β 1、AKT、mTOR、Bcl-2 mRNA (*F* = 26.00、26.41、20.57、31.18、27.96) 和蛋白 (*F* = 21.29、22.76、23.97、26.15、37.64) 的表达明显上调 (*P* 均 < 0.05), PTEN、Bax 的 mRNA (*F* = 84.94、96.18) 和蛋白 (*F* = 26.87、22.01) 的表达明显下调, p-PI3K、p-S 473-AKT、p-S 389-S6K1 和 p-T 70-4 EBPI 蛋白 (*F* = 62.52、87.08、37.73、34.31) 的表达明显上调,

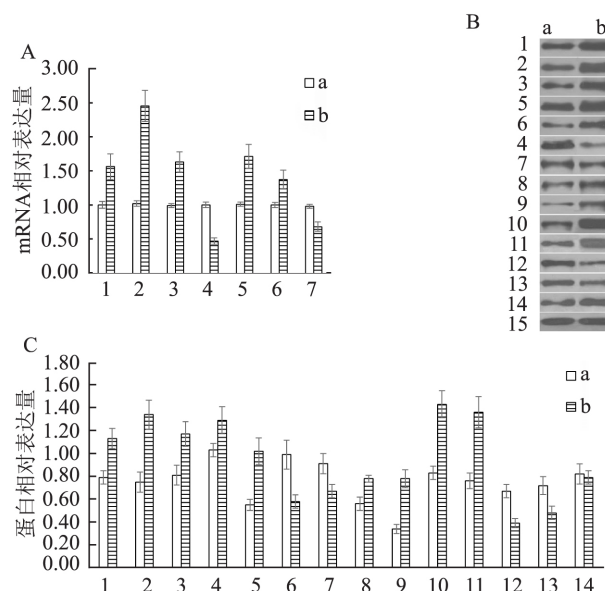


图1 癌组织和癌旁正常组织相关 mRNA 和蛋白表达水平比较

A: mRNA 表达柱状图; B: 蛋白电泳图; C: 各蛋白表达柱状图; 1: Glut-1; 2: TGF-β1; 3: AKT; 4: PTEN; 5: mTOR; 6: Bcl-2; 7: Bax; 8: p-PI3K; 9: p-S 473-AKT; 10: p-T 389-S6K1; 11: p-T 70-4 EBPI; 12: Cleaved caspase-3; 13: Cleaved-PARP; 14: p-T 308-AKT; 15: GAPDH; a: 癌旁正常组织; b: 癌组织

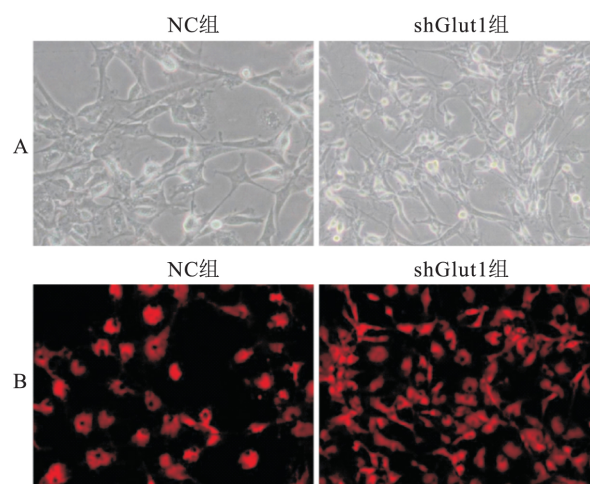


图2 荧光显微镜下观察转染效率 ×200

A: 明场; B: 暗场

Cleaved caspase-3、Cleaved-PARP 蛋白 (*F* = 74.98、104.8) 的表达明显下调 (*P* 均 < 0.05), 与 Blank 组和 NC 组比较, shGlut1-1 组 Glut 1、TGF-β 1、AKT、mTOR、Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达明显下调 (*P* 均 < 0.05), PTEN、Bax 的 mRNA 和蛋白的表达明显上调, p-PI3K、p-S 473-AKT、p-S 389-S6K1 和 p-T 70-4 EBPI 蛋白的表达明显下调, Cleaved Caspase-3、Cleaved-PARP 蛋白的表达明显上调 (*P* 均 < 0.05),

各组 p-T 308-AKT 蛋白则差异无显著意义,见图 3。

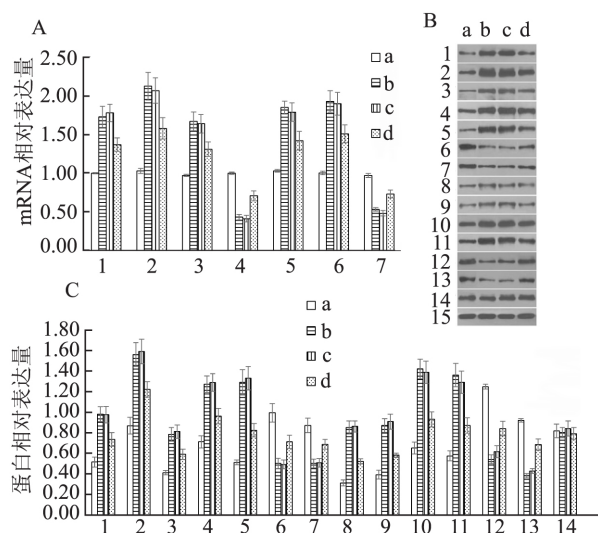


图3 转染后各组细胞中 mRNA 和蛋白表达水平比较

A: mRNA 表达柱状图; B: 蛋白表达电泳图; C: 蛋白表达柱状图; a: Control 组; b: Blank 组; c: NC 组; d: shGlut1-4 组。1: Glut-1; 2: TGF- β 1; 3: AKT; 4: PTEN; 5: mTOR; 6: Bcl-2; 7: Bax; 8: p-PI3K; 9: p-S 473-AKT; 10: p-T 389-S6K1; 11: p-T 70-4 EBPI; 12: Cleaved Caspase-3; 13: Cleaved-PARP; 14: p-T 308-AKT; 15: GAPDH

2.4 各组细胞增殖能力变化 MTT 结果表明,与 24 h ($F = 0.65$) 比较,各组细胞在 48、72 h ($F = 24.87, 36.66$) 后细胞 OD 值升高,差异有统计学意义(P 均 < 0.05),和 Control 组比较,其余各组细胞 OD 值较高(P 均 < 0.05),与 Blank 组和 NC 组比较,shGlut 1 组 OD 值较低(P 均 < 0.05),见图 4。

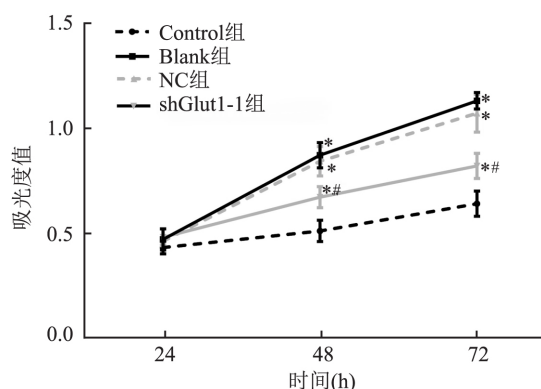


图4 各组细胞增殖能力变化

与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 Blank 组和 NC 组比较: # $P < 0.05$

2.5 各组细胞周期及凋亡情况 PI 单染法显示:和 Control 组比较,其余各组细胞 G_0/G_1 期较少而 S 期较多($F = 18.82$, P 均 < 0.05);与 Blank 组和 NC 组比较,shGlut1 组 G_0/G_1 期较多而 S 期较少,凋亡

率较高($F = 798.8$, P 均 < 0.05);各组细胞 G_2/M 期差异无显著意义,见图 5。和 Control 组比较,其余各组凋亡率较低(P 均 < 0.05),与 Blank 组和 NC 组比较,shGlut 1 组凋亡率较高($F = 49.39$, P 均 < 0.05),见图 6。

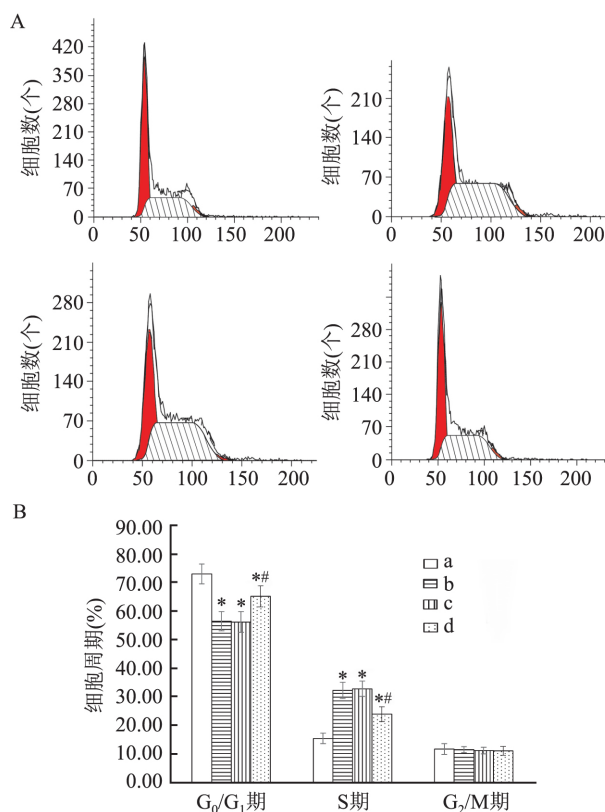


图5 各组细胞周期检测

A: 细胞周期流式图; B: 细胞周期直方图; a: Control 组; b: Blank 组; c: NC 组; d: shGlut1-4 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 Blank 组和 NC 组比较: # $P < 0.05$

2.6 平板克隆形成实验结果 和 Control 组比较,其余各组细胞克隆细胞形成数显著较多($F = 77.91$, P 均 < 0.05),Blank 组和 NC 组克隆细胞形成数差异无显著意义;与 Blank 组和 NC 组比较,shGlut 1 组克隆形成数明显小于 Blank 组和 NC 组,肿瘤增长速度最慢,差异有统计学意义(P 均 < 0.05),见图 7。

3 讨论

恶性肿瘤的高消耗、高代谢病理特征客观上要求摄取较普通细胞成倍的能量,但在正常情况下,葡萄糖无法独立通过细胞膜的双分子层结构,必须依赖跨膜分布的葡萄糖转运蛋白作为载体,因而这类载体的活性及表达量对肿瘤细胞的恶性增殖具有非常重要的意义^[4-5]。Glut1 是葡萄糖转运蛋白最重

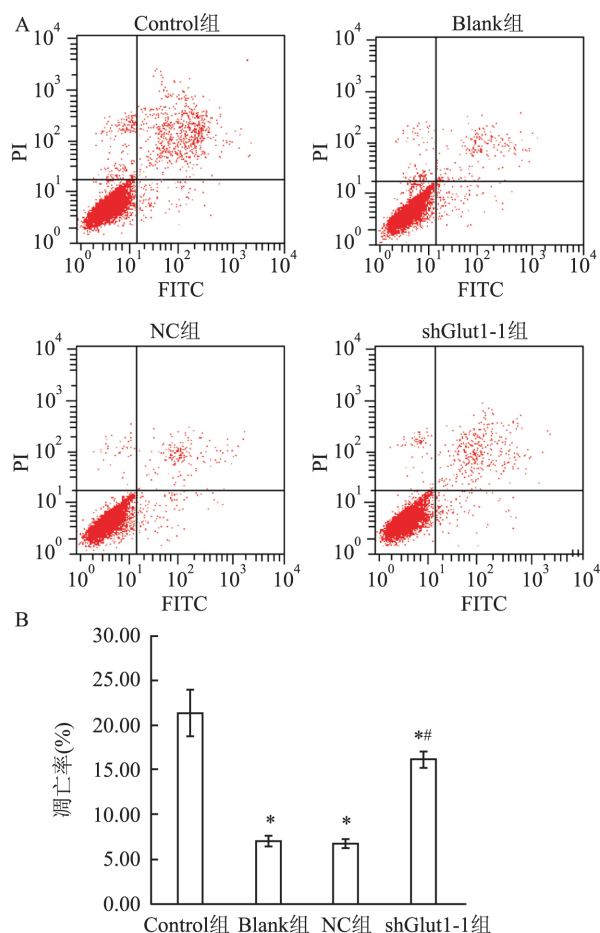


图6 各组细胞凋亡率检测

A: 细胞凋亡流式图; B 为细胞凋亡直方图; 与 Control 组比较:

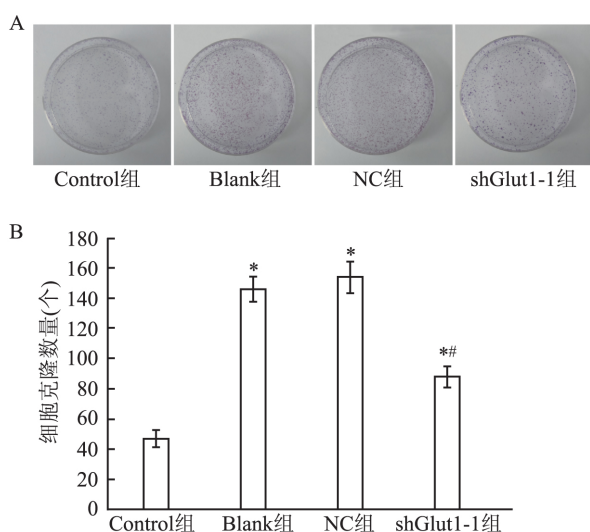
* $P < 0.05$; 与 Blank 组和 NC 组比较: # $P < 0.05$ 

图7 平板克隆形成实验

A: 各组细胞克隆形成情况; B 克隆形成细胞数柱状图; 与 Control 组比较: *

 $P < 0.05$; 与 Blank 组和 NC 组比较: # $P < 0.05$

要的成员,内含492个氨基酸,由12个疏水性的跨膜 α 螺旋结构域、2个电荷的膜内区及膜外区构成,

这即是其转运的基础框架。Zhao et al^[6]通过临床荟萃分析证实高表达 *Glut 1* 可作为诸多癌症一个独立的预后指标,可用于监测癌患者的生存预后情况; Kurahara et al^[7]证实胰腺导管癌组织中 *Glut 1* 表达明显上调,且 *Glut 1* 表达水平越高的患者预后越差; Seleit et al^[8]报道 *Glut 1* 在非黑色素瘤皮肤癌中高表达,考虑为该病变的潜在风险因子。但 *Glut 1* 在结直肠癌中的研究较少,其致癌机制尚不明确,基于此,本研究通过 TGF- β /PI3K-AKT-mTOR 信号通路探究 *Glut 1* 基因对结肠癌细胞生物学行径的影响。

本研究通过 qRT-PCR 法和 Western blot 法检测表明,与 Control 组比较,结直肠癌组织中 *Glut1*、TGF- β 1、PI3K、AKT、mTOR、Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达上调,差异显著,因而证实 *Glut 1* 表达升高满足了结肠癌细胞对能量的大幅度需求,促进癌细胞的生长。Yang et al^[9]纳入2 077例结直肠癌患者行 Meta 分析证实 *Glut 1* 的表达与结直肠癌的总生存期和无病生存期相关,同时也是结直肠癌的侵袭性临床特征的指标,本研究结果与之一致。

既往研究^[10]表明 PI3K/AKT 信号传导与结直肠癌的发生、发展相关。由于上游致癌基因(PI3K, AKT)的激活和(或)肿瘤抑制因子(PTEN, LKB1)的失活,诸多恶性肿瘤中均检测到 mTORC 1 活性升高,而作为 PI3K/AKT 信号转导的下游效应因子, mTOR 调节结肠直肠癌的肿瘤发生,因而考虑抑制 PI3K-AKT-mTOR 信号传导过程可能拮抗结直肠癌的进一步发展^[11]。TGF- β 随着多细胞生物体的进化而出现,在胚胎发生中起关键作用,对于组织稳态至关重要。据报道^[12-13],TGF- β 可通过激活 PI3K-Akt-mTOR 信号通路介导对葡萄糖的反应。本实验研究结果显示 shGlut 1 组较 NC 组和 Blank 组 *Glut 1*-AKT-mTOR 和 TGF- β 1 的 mRNA 和蛋白表达均明显下降;且 shGlut 1 组结肠直肠癌细胞增殖能力显著下降,而细胞凋亡增加,从而证实 *Glut 1* 表达降低/沉默通过抑制 TGF- β -PI3K-AKT-mTOR 信号通路来抑制细胞生长,促进细胞凋亡。

参考文献

- [1] Kapoor K, Finer-Moore J S, Pedersen B P et al. Mechanism of inhibition of human glucose transporter *glut1* is conserved between cytochalasin b and phenylalanine amides [J]. Proc Natl Acad Sci USA 2016, 113(17): 4711-6.
- [2] Ungefroren H, Witte D, Lehnert H. The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF- β -induced EMT and cell motility in cancer [J]. Dev Dyn 2018, 247(3): 451-61.
- [3] Ebrahimi S, Hosseini M, Shahidsales S et al. Targeting the Akt/

- PI3K signaling pathway as a potential therapeutic strategy for the treatment of pancreatic cancer [J]. *Curr Med Chem* ,2017 ,24 (13) : 1321 – 31.
- [4] Dong H ,Yang X ,Xie J ,et al. UP12 ,a novel ursolic acid derivative with potential for targeting multiple signaling pathways in hepatocellular carcinoma [J]. *Biochem Pharmacol* 2015 93(2) : 151 – 62.
- [5] 李玉环 ,孙国平 ,李 俊. PKM2 在肿瘤代谢及进展中的作用 [J]. *安徽医科大学学报* 2018 53(5) : 818 – 21.
- [6] Zhao Z X ,Lu L W ,Qiu J ,et al. Glucose transporter-4 as an independent prognostic marker for cancer: a meta-analysis [J]. *Oncotarget* 2018 9(2) : 2728 – 38.
- [7] Kurahara H ,Maemura K ,Mataki Y ,et al. Significance of glucose transporter type 1 (GLUT-4) expression in the therapeutic strategy for pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Ann Surg Oncol* 2018 , 25(5) : 1432 – 9.
- [8] Seleit I ,Bakry O A ,Al-Sharaky D R ,et al. Evaluation of hypoxia inducible factor-1 α and glucose transporter-4 expression in Non melanoma skin cancer: an immunohistochemical study [J]. *J Clin Diagn Res* 2017 ,11(6) : EC09 – 16.
- [9] Yang J ,Wen J ,Tian T ,et al. GLUT-4 overexpression as an unfavorable prognostic biomarker in patients with colorectal cancer [J]. *Oncotarget* 2017 8(7) : 11788 – 96.
- [10] Follo M Y ,Manzoli L ,Poli A ,et al. PLC and PI3K/Akt/mTOR signalling in disease and cancer [J]. *Adv Biol Regul* 2015 57(11) : 10 – 6.
- [11] Hua H ,Zhu Y ,Song Y H ,et al. Ruscogenin suppressed the hepatocellular carcinoma metastasis via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother* 2018 ,101: 115 – 22.
- [12] Baek SHo ,Ko J H ,Lee J H ,et al. Ginkgolic acid inhibits invasion and migration and TGF- β -induced EMT of lung cancer cells through PI3K/Akt/mTOR inactivation [J]. *J Cell Physiol* 2017 , 232(2) : 346 – 54.
- [13] 郑孝翔 ,吴文涌 ,余昌俊. 结直肠癌患者血清 TGF- β 1、Smad-3 和 Smad-7 的表达及意义 [J]. *安徽医科大学学报* ,2017 ,52 (2) : 285 – 7.

Effect of *Glut 1* gene silencing on proliferation , differentiation and apoptosis of human colon cancer cell line HT-29 and its mechanism

Guo Shengchao¹ , Wu XueLiang² , Xue Jun² , et al

(¹ Graduate School of Hebei North University Zhangjiakou 075000;

² Dept of General Surgery , First Affiliated Hospital of Hebei North University Zhangjiakou 075000)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of glucose transporter 1(*Glut 1*) gene silencing on the proliferation , differentiation and apoptosis of human colorectal cancer HT-29 cells. **Methods** *Glut 1* interference sequence (siRNA) was transfected into human colon cancer HT-29 cells as shGlut1 group , non-interfering sequence was transferred to HT-29 cells as NC group , HT-29 cells as Blank group , and normal tissue cells adjacent to cancer as Control Group. qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression levels of *Glut 1* , TGF- β 1 , PI3K , AKT , PTEN , mTOR mRNA and corresponding proteins in each group of cells , and to detect the Bcl-2/ Bax ratio , p-PI3K , p-S 473-AKT , p-S 389-S6K1 , p-T 70-4 EBP1 , CleavedCaspase-3 , Cleaved-PARP protein expression; MTT method was used to detect changes in cell proliferation in each group , flow cytometry was used to detect cell cycle and apoptosis , clone formation experiments was used to detect tumor cell proliferation and tumor formation ability *in vitro*. **Results** The immunofluorescence results showed that the transfection efficiency of shGlut1 group was higher , which met the experimental standards. Compared with the Control group , the expression of *Glut 1* , TGF- β 1 , PI3K , AKT , mTOR , Bcl-2 mRNA and protein were up-regulated in colon cancer tissues , while PTEN , Bax mRNA and protein expression were down-regulated , p-PI3K , p-S 473-AKT , p-S 389-S6K1 and p-T 70-4 EBP1 protein expression was up-regulated , Cleavedcaspase-3 , Cleaved-PARP protein expression was down-regulated , (all $P < 0.05$) ; compared with the Blank group and NC group , the expression of *Glut 1* , TGF- β 1 , PI3K , AKT , mTOR , Bcl-2 mRNA and protein was down-regulated in the shGlut 1 group , and the expression of PTEN , Bax mRNA and protein was up-regulated , p-PI3K , p-S 473-AKT , The expression of p-S 389-S6K1 and p-T 70-4 EBP1 was down-regulated , the expression of Cleavedcaspase-3 , Cleaved-PARP protein was up-regulated , the proliferation rate was down-regulated , the G₀/G₁ phase was more and the S phase was less , the apoptotic rate was up-regulated , and the clone formation was fine , the cell growth was slower (all $P < 0.05$) . **Conclusion** *Glut 1* gene silencing can inhibit the proliferation and differentiation of colorectal cancer cells and promote their apoptosis. It is considered to inhibit the TGF- β /PI3K-AKT-mTOR signaling pathway.

Key words *Glut 1* gene silencing; human colorectal cancer HT-29 cells; proliferation; differentiation; apoptosis; mechanism