网络出版时间:2018 - 8 - 2 09:39 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180731.1310.016.html

PGAM1 通过激活 Warburg 效应调控宫颈癌细胞恶性生物学行为的机制研究

傅柳陶,王青元,卫 兵,王文艳

摘要 **目的** 探讨磷酸甘油酸变位酶 1(PGAM1)在宫颈癌组织中的表达情况以及可能的生物学机制。**方法** 收集行手术切除的 67 例宫颈癌患者的新鲜宫颈癌组织及癌旁正常组织,采用免疫组化法检测 PGAM1 的表达情况并分析与患者病理特征的关系。构建 PGAM1 基因沉默稳转 Hela 宫颈癌细胞株,分析 PGAM1 基因沉默对 Hela 细胞凋亡和增殖活性的影响。采用 qRT-PCR 和 Western blot 法检测 PGAM1 对 Akt/mTOR 信号通路关键分子的影响。**结果** ① 宫颈癌组织中 PGAM1 高表达率为 58.21%,明显高于癌旁组织($P<0.05$)。② 不同临床分期、分化程度、浸润深度的患者宫颈癌组织中 PGAM1 的高表达率差异有统计学意义($P<0.05$)。③ Hela 细胞 shPGAM1 基因沉默后,细胞凋亡率较空白对照组(NC 组)明显增加,细胞增殖活性明显降低($P<0.05$)。④ Hela 细胞 shPGAM1 基因沉默后,与 NC 组比较,PTEN mRNA 和蛋白相对表达量明显上调,而 p-Akt、p-mTOR mRNA 和蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$)。**结论** 肿瘤组织 PGAM1 蛋白高表达与宫颈癌的发生、发展有关,通过激活 Akt/mTOR 信号通路诱导的 Warburg 效应,促使肿瘤细胞的增殖,抑制其凋亡。

关键词 磷酸甘油酸变位酶 1;宫颈癌;Warburg 效应;糖代谢;Akt/mTOR 信号通路

中图分类号 R737.33

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2018)09 - 1398 - 05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2018.09.016

在我国,宫颈癌是致死率较高的妇科恶性肿瘤之一[1]。由于宫颈癌起病隐匿,早期缺乏典型的临床症状,加之恶性化程度高,进展迅速,大部分患者确诊时已至中晚期,从而错过了手术的最佳时机,因此中晚期患者的复发和转移率一直居高不下[2-3]。因此实现对于宫颈癌患者的早诊断、早治疗是降低患者死亡率的关键。肿瘤细胞因线粒体功能缺陷导致糖代谢异常被公认为是肿瘤细胞的重要特征之一[4]。但是有氧糖酵解途径的发生机制和调控方式一直未有明确研究。磷酸甘油酸变位酶 1(phosphoglycerate mutase1,PGAM1)作为糖酵解途径中的关键酶,可催化 3-磷酸甘油生成 2-磷酸甘油,并且有研究[5]证实,PGAM1 是唯一受抑癌基因 P53 调控的糖酵解相关酶。该研究首先通过免疫组化法探讨 PGAM1 在宫颈癌组织中的表达情况,并通过机制研究进一步分析 PGAM1 在肿瘤细胞糖酵解及发生发展中的作用,从而为临床治疗和药物研发提供新的靶点。

2018 - 07 - 19 接收

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81100412);2016 年高校优秀青年人才支持计划重点项目的支持(编号:gxyqZD2016060);2016 年中国博士后科学基金第 59 批面上资助(编号:2016M592038)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院妇产科,合肥 230601

作者简介:傅柳陶,女,副主任医师;

王文艳,女,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:wenyanautumn@sina.com

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2016 年 7 月 ~ 2017 年 10 月在安徽医科大学第二附属医院行手术切除的 67 例宫颈癌患者的新鲜宫颈癌组织(排除肿瘤坏死区)及配对的癌旁正常组织(距离肿瘤边缘 > 3 cm),将一部分组织标本立即置于液氮中,然后转移至 -80 ℃ 保存以备 RNA 和蛋白提取用;另一部分组织标本经石蜡包埋,以进行免疫组织化学染色用。患者年龄 30 ~ 65(47.50 ± 2.46)岁。纳入标准:由两名以上经验丰富的病理科医师对组织切片进行阅片并同时确诊;所有患者术前未接受过放疗、化疗或其他辅助治疗。

1.2 受试细胞 人宫颈癌细胞株 Hela 以及 HEK293T 细胞均购自美国 Type Culture Collection 公司。

1.3 主要试剂 胎牛血清(FBS)、RPMI1640 培养基、DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶-EDTA 细胞消化液(0.25%)(美国 GIBCO 公司);MTT(美国 Sigma 公司);青霉素和链霉素(山东医药股份有限公司);二甲基亚砜(DMSO)(江西省江蓝纯生物试剂有限公司);S-P 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);PGAM1 抗体、辣根酶标记的二抗(美国 Abcam 公司);TRIzol 总 RNA 提

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

取试剂盒、细胞转染试剂 Lipofectamine™ 2000、Opti-MEM(美国 Invitrogen 公司);Taqman ® RNA reverse transcription kit、Taqman ® RNA assay kit(日本 Takara 公司);cDNA 合成试剂盒(美国 OMEGA 公司);SYBR Green PCR Mix、M-MuLV 逆转录酶(美国 ABI 公司)。PCR 引物以及 siRNA 干扰靶序列由上海生工生物工程有限公司合成并提供。

1.4 主要仪器 HERcell1501 型 CO_2 细胞培养箱和超净工作台(美国 Thermo Scientific 公司);Eppendorf 5427 R 台式高速冷冻离心机以及各种型号的移液器(德国 Eppendorf 公司);实时定量 PCR 仪、iMake 多功能酶标仪、SDS-PAGE 电泳仪和电转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);CX41 倒置光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);Amersham 电泳仪(瑞典 Bioscience 公司);LAS-4000min 凝胶成像数码分析系统(日本 FujiFilm 公司)。

1.5 方法

1.5.1 免疫组化 取石蜡包埋组织进行切片(1 ~ 2 μm)后行免疫组织化学染色,严格按照 SP 试剂盒说明书进行操作。随机选择 10 个视野,观察 PGAM1 在不同组织中的染色强度以及阳性细胞的百分比。PGAM1 呈细胞质棕黄色染色。结果判定标准为观察细胞染色强度:0 分(阴性),1 分(弱染色),2 分(中度染色),3 分(强染色),然后计算 10 个视野的平均染色分值。同时观察视野中染色细胞的百分比:0 分(阳性率为 0),1 分(阳性率 ≤ 25%),2 分(阳性率 25% ~ 50%),3 分(阳性率 50% ~ 75%),4 分(阳性率 > 75%)。染色指数(labeling index,LI) = 阳性细胞率 × 染色强度,LI ≤ 6 分为低表达或不表达,LI > 6 分为高表达。

1.5.2 细胞培养 将细胞培养在含有 10% FBS 的完全 RPMI 1640 培养基中,将细胞置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中进行培养。24 ~ 48 h 更换培养液,48 h 传代 1 次。

1.5.3 构建 PGAM1 基因沉默稳转细胞株 ① 构建慢病毒干扰载体:从 GenBank 中获得编码人 PGAM1 基因(NM-003483)的序列;选择 pGMLV-GFP RNAi 慢病毒载体,构建慢病毒重组质粒,并转染至感受态细胞 DH5α 中。采用质粒抽提试剂盒提取慢病毒重组质粒和包装质粒,并转染至 293T 细胞中,测定慢病毒滴度。② PGAM1 基因沉默稳定细胞系的建立:提前 1 d 在相应备行转染的 6 孔板上接种 5×10^5 个细胞,培养 24 h 后,待融合率达到 50% ~ 60% 时,按照脂质体转染说明书,将 PGAM1 shRNA 或 shRNA-NC 治疗转染至细胞,置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 ~ 48 h。提取细胞 RNA 及蛋白,验证目的基因表达情况及转染效率。

1.5.4 MTT 法检测细胞增殖 将各组细胞(1×10^4 个/孔)单层接种至 96 孔板中正常培养,每组设置 8 个平行孔,分别培养 24、48、72、96 h 后,加入 20 μl MTT,置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中孵育 4 h 后,弃除上清液,每孔加入 200 μl DMSO,使紫色结晶物充分溶解。将 96 孔板放置于酶标仪卡槽上,检测波长为 570 nm,参比波长为 450 nm 处的吸光度值(OD 值),计算平均值。

1.5.5 流式细胞术检测细胞凋亡 收集细胞,采用预冷的 PBS 洗涤 3 次后,离心,弃上清液;加入 500 μl Binding Buffer 重悬,细胞数量约为 1×10^4 个/100 μl;加入 Annexin V 5 μl,避光孵育 15 min;离心,弃上清液;加入 500 μl Binding Buffer 重悬;加入 PE 5 μl,避光孵育 15 min;离心,弃上清液;加入 300 μl 结合缓冲液;上机检测。所有操作严格按照试剂盒说明书操作进行。采用流式细胞仪(Ex = 488 nm,Em = 530 nm)检测细胞凋亡情况。

1.5.6 荧光定量实时 PCR(quantitative realtime PCR,qRT-PCR) ① 总 RNA 提取:采用分光光度计检测 RNA 浓度。② RNA 逆转录为 cDNA:根据试剂盒说明书操作进行。将 cDNA 保存至 -20 ℃保存备用。③ qRT-PCR:根据 NCBI 数据库资料设计引物序列,以细胞或组织 cDNA 为模板,以 β-actin 作为内参。PCR 结果判断:根据使用说明调整基线,将阈值设定在荧光值对数图的线性部分,从软件中读取 Ct 值。

1.5.7 Western blot 实验 提取蛋白样品,蛋白样品凝胶电泳,转膜,封闭,加入一抗(按照一抗说明书,将 100 μl NGS 加入 10 ml Western 一抗稀释液中混匀)孵育,室温下震荡摇床摇动 2 h;加入二抗[参考二抗说明书,将 Western 二抗稀释液(P0023D)100 μl 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗 10 ml 中混匀]孵育,室温下震荡摇床摇动 2 h,显影,采用 FluorChem FC3 凝胶成像数码分析系统进行定量分析,以积分光密度(IOD)表示灰度值。

1.5.8 细胞葡萄糖消耗和乳酸生成检测 按照韩文祺等[6]描述的实验步骤进行。每个样品重复测量 3 次,取平均值。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素分析,多组或重复测量采用方差分析,两两比较采用

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

LSD-t 检验;计数资料以% 表示,采用 χ^2 检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组织中 PGAM1 的表达情况 免疫组化结果显示,宫颈癌组织中 PGAM1 高表达率为 58.21%,明显高于癌旁组织($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同组织中 PGAM1 的表达情况 [n(%)]

项目	n	癌旁组织	宫颈癌组织
PGAM1 低表达	67	46(68.66)	28(41.79)
PGAM1 高表达	67	21(31.34)	39(58.21)
χ^2 值	-	9.778	
P 值	-	0.002	

2.2 两组患者一般临床资料比较 不同临床分期、分化程度、浸润深度的患者 PGAM1 的高表达率差异有统计学意义($P < 0.05$),其他临床资料基本一致,差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示 PGAM1 高表达可能与宫颈癌发生、侵袭、分化等密切相关。见表 2。

表 2 宫颈癌患者临床病理资料与 PGAM1 表达的关系 [n(%)]

项目	n	高表达组(n=39)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)				
<45	31	15(48.39)	2.288	0.130
≥45	36	24(66.67)		
临床分期				
Ⅰa1 - Ⅰb1	38	17(44.73)	4.439	0.035
Ⅰb2 - Ⅱa2	29	22(75.86)		
分化程度				
高 - 中分化	39	18(46.15)	5.575	0.018
中 - 低分化	28	21(75.0)		
淋巴结转移				
有	26	18(69.23)	2.122	0.145
无	41	21(51.22)		
浸润深度				
未及浆膜层	32	14(43.90)	5.265	0.022
侵入浆膜层	35	25(71.43)		

2.3 PGAM1 对 Hela 细胞增殖活性的影响 经 MTT 法检测,Hela 细胞 shPGAM1 基因沉默后,与 NC 组比较,细胞增殖活性明显受到抑制,经重复测量方差分析,差异有统计学意义($F = 98.766$,$P < 0.05$)。见图 1。

2.4 PGAM1 对 Hela 细胞凋亡活性的影响 细胞培养 48 h 后,经流式细胞术检测,Hela 细胞 shPGAM1 基因沉默后,与 NC 组比较,细胞凋亡率明显增加,差异有统计学意义($t = 9.706$,$P < 0.05$)。见图 2。

2.5 PGAM1 对 Hela 细胞葡萄糖消耗和乳酸产量的影响 细胞培养 48 h 后,取上清液,检测细胞上清液中葡萄糖含量和乳酸含量,结果显示,Hela 细胞 shPGAM1 基因沉默后,与 NC 组比较,葡萄糖消耗和乳酸产量均明显降低,差异有统计学意义($t = 16.060$、15.926,$P < 0.05$)。见图 3。

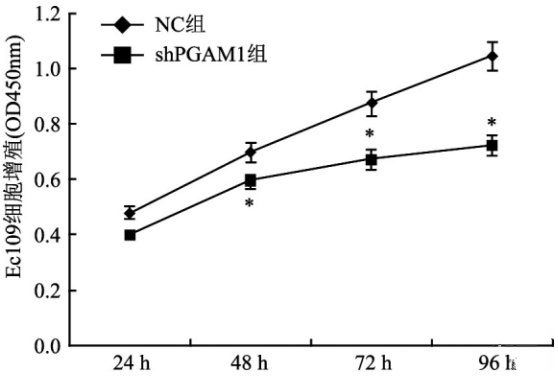

图 1 MTT 法检测 PGAM1 对 Hela 细胞增殖的影响

与 NC 组比较:* $P < 0.05$

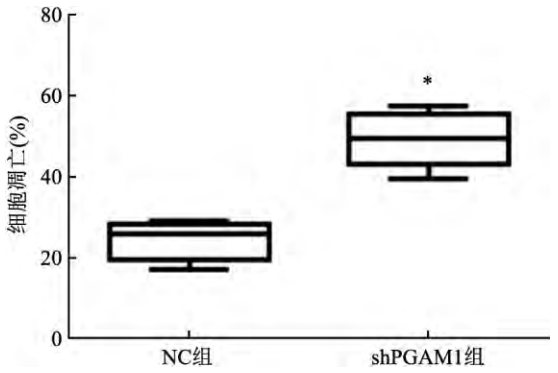

图 2 流式细胞术检测 PGAM1 对 Hela 细胞凋亡的影响

与 NC 组比较:* $P < 0.05$

2.6 PGAM1 基因沉默对 Hela 细胞糖代谢相关基因和蛋白表达的影响 磷酸酯酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog,PTEN)、磷酸化丝氨酸 - 苏氨酸蛋白激酶(phosphorylation auto-jakuljetusalan,p-Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)都属于 Akt/mTOR 信号通路中的关键分子。通过 qRT-PCR 法和 Western blot 法证实,Hela 细胞 shPGAM1 基因沉默后,与 NC 组比较,PTEN mRNA 和蛋白相对表达量明显上调,而 p-Akt、p-mTOR mRNA 和蛋白相对表达量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

在前期研究中,通过高通量基因芯片技术筛选了与正常宫颈黏膜组织存在表达差异的宫颈癌组织

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

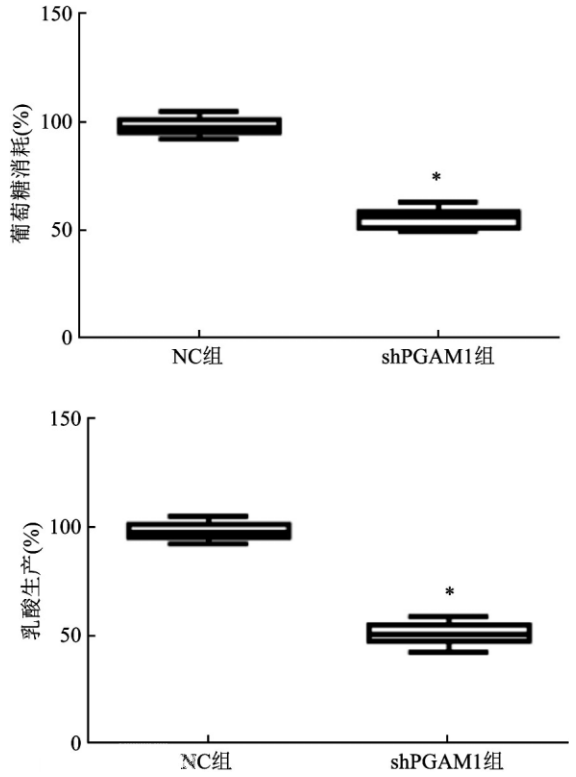

图3 PGAM1 对 Hela 细胞葡萄糖消耗和乳酸产量的影响

与 NC 组比较: $^{*}P<0.05$

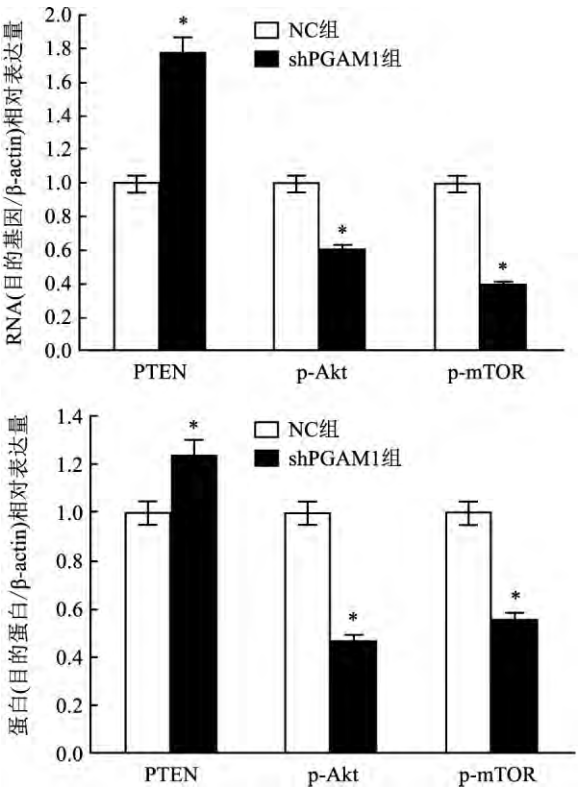

图4 qRT-PCR 法和 Western blot 法检测 PGAM1 对 Hela 细胞 PTEN、p-Akt、p-mTOR 基因和蛋白表达的影响

与 NC 组比较: $^{*}P<0.05$

基因谱,其中 PGAM1 基因的表达量明显上调,与以往关于乳腺癌、肾癌、肺癌等组织的研究[7-9]结果基本一致。说明 PGAM1 可能参与了肿瘤细胞的恶性生物学行为调控。

PGAM1 是最初在脑组织中发现的 PGAM 家族成员之一,定位于人染色体 10q25.3 区域,包括 PGAM1 和 PGAM2 两个同源二聚体,既往有研究已经证实 PGAM1 是参与细胞有氧糖酵解途径的重要酶之一,可以将 3-磷酸甘油酸 3 位上的磷酸基移位生成 2-磷酸甘油酸,从而生成磷酸烯醇式丙酮酸[10]。糖酵解方式是肿瘤细胞在有氧条件下获取能量的主要途径,因此肿瘤细胞葡萄糖消耗量、糖酵解速率以及乳酸生成量均较正常细胞明显增加,这一现象被称为"Warburg 效应"。但是在后来很长一段时间,大多数学者认为 Warburg 效应与肿瘤细胞的恶性生物学行为关系不明显[11]。近几年,随着对肿瘤发生机制的深入发展,Warburg 效应重新进入人们的视线,逐渐成为肿瘤领域的研究热点,干扰高糖代谢可能成为抗肿瘤治疗的新策略。本研究首先通过免疫组化法探讨宫颈癌组织和癌旁组织中 PGAM1 表达的差异以及与患者临床病理特征的关系,结果显示,在癌组织中,PGAM1 高表达率明显高于癌旁正常黏膜者,并且与患者的临床分期、分化程度、浸润深度相关,提示 PGAM1 可能参与肿瘤细胞的增殖、侵袭、分化、凋亡等恶性生物学过程。因此 PGAM1 有可能作为宫颈癌潜在的治疗靶标。

目前研究证实,肿瘤细胞的糖代谢需求显著高于正常细胞。这一特点使得肿瘤细胞葡萄糖消耗量和乳酸生成量大大增加,以满足细胞的增殖需求[12]。因此本文探讨 PGAM1 与宫颈癌发生发展的关系,首先从影响肿瘤细胞的增殖和凋亡着手,进一步分析 PGAM1 基因的生物学功能。结果显示,PGAM1 基因敲除后,Hela 细胞凋亡率均明显增加,增殖活性受到明显抑制,从而证实 PGAM1 参与调控肿瘤细胞的增殖和凋亡过程。另外,前期研究通过高通量基因芯片技术分析表明 Akt/mTOR 信号通路可能是 PGAM1 下游靶通路。而 Akt/mTOR 信号通路已经被公认为是控制肿瘤细胞恶性生物学行为、能量代谢等过程的重要途径,与 Warburg 效应密切相关。本研究通过 qRT-PCR 法和 Western blot 法初步证实了 PGAM1 对 Akt/mTOR 信号通路的调控影响,结果显示,Hela 细胞 shPGAM1 基因沉默后,PTEN 表达量明显上调,而 p-Akt、p-mTOR mRNA 和蛋白相对表达量明显降低。Akt 是一种高度保守的

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，通过磷酸化被激活后移位至胞质或胞核中，参与调控下游靶蛋白 mTOR 的表达。而 PTEN 是 Akt/mTOR 信号通路的负性调控蛋白，具有抑癌基因活性，可抑制肿瘤细胞增殖，并促使其凋亡。

参考文献

[1] 韩晓慧，赵卫东，方慧英. ΔNp63α 基因过表达对人宫颈癌细胞 SiHa 基因表达谱的影响[J]. 安徽医科大学学报，2017，52(2)：181－6.

[2] 刘 倩，王 玮. 浅谈宫颈癌临床治疗新进展[J]. 实用医学杂志，2018，38(1)：5－7.

[3] 崔亚云，张红雁，程 勇，等. 普通放疗和适形调强放疗治疗局部晚期宫颈癌的临床研究[J]. 安徽医科大学学报，2016，51(2)：302－4.

[4] Fu Y，Liu S，Yin S，et al. The reverse Warburg effect is likely to be an Achilles' heel of cancer that can be exploited for cancer therapy[J]. Oncotarget，2017，8(34)：57813－25.

[5] Turiján-Espinoza E，Salazar-González R A，Uresti-Rivera E E，et al. A pilot study of the modulation of sirtuins on arylamine N-acetyltransferase 1 and 2 enzymatic activity[J]. Acta Pharm Sin B，2018，8(2)：188－99.

[6] 韩文祺，毕杨辉，王芸姣，等. STAT3 通过上调 GLUT2 的表达促进转化的肝卵圆细胞 WB-F344 的 Warburg 效应[J]. 中国病理生理杂志，2018，34(2)：193－9.

[7] Zhang D，Jin N，Sun W，et al. Phosphoglycerate mutase 1 promotes cancer cell migration independent of its metabolic activity[J]. Oncogene，2017，36(20)：2900－9.

[8] 杨明山，王焕昇，庞增粉，等. 肾透明细胞癌与癌旁组织差异蛋白表达谱分析[J]. 中华肿瘤防治杂志，2012，19(5)：332－4.

[9] 潘 威，孙 倩，李舒展，等. 非小细胞肺癌组织中磷酸甘油酸变位酶 1 表达及其与患者预后的关系[J]. 山东医药，2015，55(40)：1－3.

[10] Liu S E，Hu J C，Zhang H，et al. Conformation and dynamics of the C-terminal region in human phosphoglycerate mutase 1[J]. Acta Pharmacol Sin，2017，38(12)：1673－82.

[11] Shulman R G，Rothman D L. The glycogen shunt maintains glycolytic homeostasis and the Warburg effect in cancer[J]. Trends Cancer，2017，3(11)：761－7.

[12] 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.

Effect of PGAM1 on the biological behavior of cervical cancer cell by activating Warburg effect

Fu Liutao，Wang Qingyuan，Wei Bing，et al

(*Dept of Obstetrics and Gynecology，The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University，Hefei* 230601)

Abstract ***Objective*** To investigate the expressions of phosphoglycerate mutase1 (PGAM1) in different types of human cervical cancer tissues，and to explore the related mechanisms involved. ***Methods*** 67 pairs of tumor and adjacent tissue samples from 67 patients with cervical cancer were collected. The expressions of PGAM1 in different types of human cervical tissues were detected by immunohistochemical staining. The shRNA expression vector targeting human PGAM1 gene was constructed and transfected into human cervical cancer cell line Hela. The effect of PGAM1 on proliferation and apoptosis of Hela cell was detected by MTT and FCM. And the effect of PGAM1 on expressions of Akt/mTOR signaling pathway was detected by qRT-PCR and Western blot. ***Results*** ① The high expression rate of PGAM1 in cancer tissues was 58.21%，which was higher than that of adjacent tissues ($P<0.05$). ② There was statistical significance of the high expression rate of PGAM1 in cancer tissues with different clinical stages，differentiation degrees and invasion depth ($P<0.05$). ③ The apoptosis rate of Hela cells with PGAM1-specific shRNA which had more lower proliferation rate was higher than that of negative control (NC) group ($P<0.05$). ④ The expression of PTEN mRNA and protein in Hela cells with shPGAM1 was higher than that of NC group ($P<0.05$)，whereas the expression of p-Akt and p-mTOR in shPGAM1 Hela cells was lower than that of NC group ($P<0.05$). ***Conclusion*** There are significant evidences that PGAM1 up-regulation would be related with esophageal cancer，which promote the proliferation of Hela cells by activating the Akt/mTOR signaling pathway and Warburg effect.

Key words phosphoglycerate mutase 1；cervical cancer；Warburg effect；glucose metabolism；Akt/mTOR signaling pathway

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net