

# ABCG5 在头颈鳞癌中的作用探究

吴向平<sup>1</sup>, 王 嫣<sup>2</sup>, 姚长玉<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 合肥 230022; <sup>2</sup>教育部重点实验室、  
北京大学肿瘤医院分子肿瘤学实验室, 北京 100142)

**摘要** 目的 探究 ATP 结合盒, 亚家族 G, 成员 5 (ABCG5) 在头颈鳞癌中的调控作用。方法 应用免疫组织化学染色检测 105 例下咽癌肿瘤标本中 ABCG5 的表达并分析其表达含量与患者远期生存时间的关系。依次运用免疫蛋白印迹、流式细胞术检测 ABCG5 在头颈鳞癌细胞系中的表达。运用流式分选探究 ABCG5 阳性与阴性细胞增殖、转移、成球能力和表达干细胞分子的差异。si RNA 转染进一步证明 ABCG5 是否影响癌细胞的恶性行为。结果 ABCG5 与下咽癌患者预后不良相关。ABCG5 富集于头颈鳞癌干细胞中。与阴性细胞相比, ABCG5 阳性细胞具有更强的增殖 ( $P < 0.001$ )、转移 ( $P < 0.01$ ) 和球体形成能力 ( $P < 0.001$ )。干细胞分子 SRY-box 转录因子 2 (SOX2)、NANOG、性别决定区 Y 框 9 (SOX9)、八聚体结合转录因子 4 (OCT4)、分化簇 44 受体 (CD44) 在 ABCG5 阳性细胞中的表达水平明显高于阴性细胞。上皮细胞分子上皮细胞黏附素 (E-cadherin) 在 ABCG5 阳性细胞中的表达低于阴性细胞, 而间质细胞分子神经元钙粘蛋白 (N-cadherin)、蜗牛科转录抑制因子 2 (Slug)、蜗牛同源物 1 (Snail 1) 和波形蛋白 (Vimentin) 在阳性细胞中的表达高于阴性细胞 ( $P < 0.01$ )。此外, 干扰 ABCG5 表达可抑制肿瘤细胞成球 ( $P < 0.001$ ) 以及肿瘤干细胞和上皮间质转化分子的表达 ( $P < 0.001$ )。结论 ABCG5 在维持头颈鳞癌干细胞功能中具有潜在生物学作用。

**关键词** ABCG5; 肿瘤干细胞; 头颈鳞癌; 细胞增殖; 上皮间质转化; 转移

**中图分类号** R 739.63

**文献标志码** A

癌症干细胞 (cancer stem cells, CSCs) 难以清除是癌症复发和对化疗无反应的潜在原因, 识别 CSCs 群体的生物标志物对于改善临床结局非常重要<sup>[1-2]</sup>。

肿瘤组织中的侧群 (side population, SP) 细胞通常表现为干细胞分子的上调<sup>[3]</sup>。例如, 分化簇 44 受体 (cluster of differentiation 44 receptor, CD44) 是一种常用的区分干细胞样侧群的标志物, 可诱导细胞膜构象改变, 增强肿瘤细胞的可塑性<sup>[4]</sup>。其它干性标志物有 SRY-box 转录因子 2 (SRY-box transcription factor 2, SOX2) 和八聚体结合转录因子 4 (octamer-binding transcription factor 4, OCT4), 它们是调节肿瘤干细胞自我分化潜能并参与转移关键过程上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的核转录因子<sup>[5-7]</sup>。另一个经典干细胞标志物是 ABCG 转运家族中的 ATP 结合盒, 亚家族 G, 成员 2 (ATP-binding cassette, subfamily G, mem-

ber, ABCG)<sup>[8]</sup>。而 ABCG5 是 ABCG 家族另一成员, 可与 ABCG8 形成功能性异二聚体, 负责运输胆固醇, 在心血管疾病中被广泛研究<sup>[9-11]</sup>。鉴于 ABCG5 与 ABCG2 属于同一家族, 可能类似地参与干细胞调控, 因此该研究旨在初步探究 ABCG5 与头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 干细胞之间的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞培养和溶液制备** 头颈鳞癌细胞系 SCC15 和 FaDu 购自北京协和细胞库 (北京, 中国)。培养基为 DMEM (Hyclone, USA)。培养条件为 37 °C, 95% 湿度, 5% CO<sub>2</sub>。制备 2 × 肿瘤干细胞培养基: 将 DMEM/F12 (美国 Gibco 公司, 货号: 12400024) 粉末与 2.438 g NaHCO 和 1.79 g Hepes 混合, 然后加入 500 ml 无菌水。用 NaOH 或稀 HCL 调节 pH 至 7.4。

**1.2 标本制备和免疫组织化学染色** 本研究经安徽医科大学第一附属医院伦理审查委员会批准 (伦理审查批件号: PJ2024-04-76)。105 例下咽癌患者的临床标本 (癌和癌旁组织) 采集于安徽医科大学第一附属医院, 通过电话回访患者目前生存状态。

收稿日期: 2025-02-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82173152)

作者简介: 吴向平, 女, 医师;

姚长玉, 女, 主治医师, 通信作者, E-mail: 15905600277@163.com

组织切片置于 65 °C 烤箱中 100 min, 脱蜡, PBS 洗涤。接下来, 切片浸泡在 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中约 10 min, PBS 洗涤后浸泡在沸腾的 EDTA 溶液中 (北京中衫金桥生物技术有限公司, 货号: ZLI-9071)。高压修复 15 min, 室温下冷却。将山羊血清 (货号: #SAP-9100, 北京中山金桥) 滴在样品上, 密封 30 min, 然后用 ABCG5 抗体 (杭州华安生物技术有限公司, 货号: EM1708-58, 浓度 1 : 400) 处理样品, 4 °C 孵育 9 ~ 10 h。随后, 用 PBS 洗涤组织以去除未结合的抗体。加入鼠二抗 (1 : 5 000) 孵育 40 min 后, 再次洗涤组织切片, 用 DAB 显色液 (北京中山金桥生物技术有限公司, 货号: ZLI-9019) 处理。当样品变成棕色时, 细胞核用苏木精染色 5 min, 盐酸 - 乙醇化 10 秒, 氨蓝 30 秒。最后, 在梯度乙醇 (50%、60%、70%、80% 和 90% 乙醇、无水乙醇) 中脱水。根据染色强度分为 0 ~ 3 分, 根据染色面积分为 0 ~ 4 分, 两者相乘为最终评分, 界定 6 以上为高表达, 低于 6 分为低表达。

**1.3 免疫蛋白印迹 (Western blot, WB) 实验** 收集蛋白后, 使用 BCA 试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific™ 公司, 货号: 23235) 调整蛋白浓度。蛋白质 (30 μg / 个样品) 分别在 80 V、120 V 下进行凝胶电泳, 电流设置为 300 mA, 冰上转膜。将 PVDF 膜浸泡在 5% 的牛奶中 90 min, 裁切目的条带。将膜与一抗孵育 10 h, 一抗为 SOX2 (货号: #3579S)、SOX9 (货号: #82630S)、CD44 (货号: #37259S)、OCT4 (货号: #2750S)、NANOG (货号: #4903S)、E-cadherin (货号: #3195)、N-cadherin (货号: #13116)、Vimentin (货号: #5741)、Snail 1 (货号: #3879)、Slug (货号: #9585)、GAPDH (货号: #5174) 均来自 cell signaling technology (USA), 浓度均为 1 : 1 000。培养环境为 4 °C 冰箱。第 2 天, 加入二抗 (1 : 5 000), 摇膜 1 h, 洗去非特异性抗体后, 滴加发光液成像。WB 条带差异较显著, 为了避免非必要统计图的干扰, 使排版看上去更简练, 直接呈现条带结果。

**1.4 成球实验** 制备 5 ml 2 × 培养基, 依次加入 200 μl B27 细胞因子 (美国 Gibco 公司, 货号: 17504-044)、2 μl 表皮生长因子 (美国 PEPRO TECH 公司, 货号: AF-100-15) 和 2 μl 成纤维细胞生长因子 (美国 PEPRO TECH 公司, 货号: 100-18B)。然后用无菌水将 2 × 培养基稀释成 1 × 培养基。将计数过的细胞转移到 1 × 培养基中, 倒置旋转试管进行混合。加入等体积的 1% 甲基纤维素, 吹匀, 混合均

匀。接下来, 将 500 μl 细胞悬液转移到低粘附六孔板 (美国 Corning 公司, 货号: 3471) 中。10 ~ 14 d 后细胞停止生长。

**1.5 流式分选** 收集细胞, 用 PBS 洗涤 3 次, 然后分为对照组 (1 × 10<sup>5</sup> 个细胞) 和实验组, 在 PBS 中重悬, 用 ABCG5 抗体处理 (1 : 50)。吹匀后, 细胞在冰上孵育 1 h, 以 9 500 r/min 离心 3 min, PBS 洗涤。最后, 在流式分选器中进行阴性和阳性细胞分离。

**1.6 克隆形成** 加工后, 每组接种 2 000 个细胞, 培养 10 d。加入 1 ml 甲醇固定细胞 5 ~ 10 min, 然后用 1 ml 结晶紫染色细胞。用去离子水洗涤孔板, 直到没有染料溶液残留。

**1.7 siRNA 转染** GenOFF h-ABCG5 (货号: SIGS0001401-1) 购自锐博生物 (中国广州)。将 Opti-MEM™ (50 μl) (#11058021, 美国 Gibco 公司) 与 5 μl Lipofectamine™ 2000 (美国 Gibco 公司, 货号: 11668019) 混合, 静置 5 min。将 50 μl Opti-MEM™ 与 5 μl si RNA 混合。将两根试管结合并静置 25 min, 然后将溶液转移到细胞培养皿中。

**1.8 细胞迁移实验** 细胞生长约 12 h 后, 计数 5 × 10<sup>5</sup> 个细胞, Transwell 室上层加入含有 100 μl 含细胞的无血清培养基, 下层加入 600 μl 含有 20% 血清的培养基。正常培养 12 ~ 24 h 后取出细胞, 在孔板上加入甲醇固定 10 min。染色时间为 1 h, 用棉签擦去细胞内多余的染料。使用 ImageJ 软件对 Transwell 穿室细胞进行计数。

**1.9 统计学处理** 实验结果数值以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用 Kaplan-Meier 法绘制患者总体生存曲线, 采用 Log-rank 检验进行差异分析。采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件对实验数据进行分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。双侧 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ABCG5 高表达与下咽癌患者预后不良相关** 免疫组化显示 ABCG5 在下咽癌组织中表达高于癌旁正常组织 (图 1A、1B), ABCG5 表达越高, 患者的总生存期越短 (图 1C) (*P* < 0.01)。

**2.2 ABCG5 在 HNSCC 干细胞中高度富集** 流式细胞术检测了 ABCG5 + (ABCG5 阳性) 在 SCC15、SCC25、FaDu、CAL27 和 UM1 细胞系中的比例 (图 2A)。WB 检测显示 ABCG5 在 SCC15、FaDu 和 SCC25 中的表达高于 CAL27 或 UM1 细胞系 (图 2B)。由于 SCC25 细胞系分选得到的阳性细胞数

量太少,在后续研究中被舍弃。收集 SCC15 和 FaDu 细胞系的干细胞,结果显示,干细胞中 ABCG5 表达明显高于普通贴壁细胞(图 2C)。

**2.3 ABCG5 + 细胞具有 CSCs 的特征** 通过流式分选技术,从 SCC15 和 FaDu 细胞系中分离出阳性和阴性细胞用于后续实验。SCC15 细胞中,ABCG5 + 克隆数量为(805 ± 60)个,ABCG5- (ABCG5 阴性)克隆数量为(265 ± 51)个。FaDu 细胞中,AB-

CG5 + 克隆数量为(1 082 ± 56)个,ABCG5- 克隆数量为(515 ± 53)个(图 3A)。成球能力是鉴别干细胞的金标准。SCC15 细胞中,ABCG5 + 成球数量为(29 ± 6)个,ABCG5- 成球数量为(10 ± 5)个;FaDu 细胞中,ABCG5 + 成球数量为(35 ± 7)个,ABCG5-成球数量为(13 ± 5)个(图 3B - 3C)。干细胞标志物 SOX2、NANOG、SOX9、OCT4 和 CD44 在 ABCG5 + 细胞中表达水平明显高于 ABCG5-细胞(图 3D)。

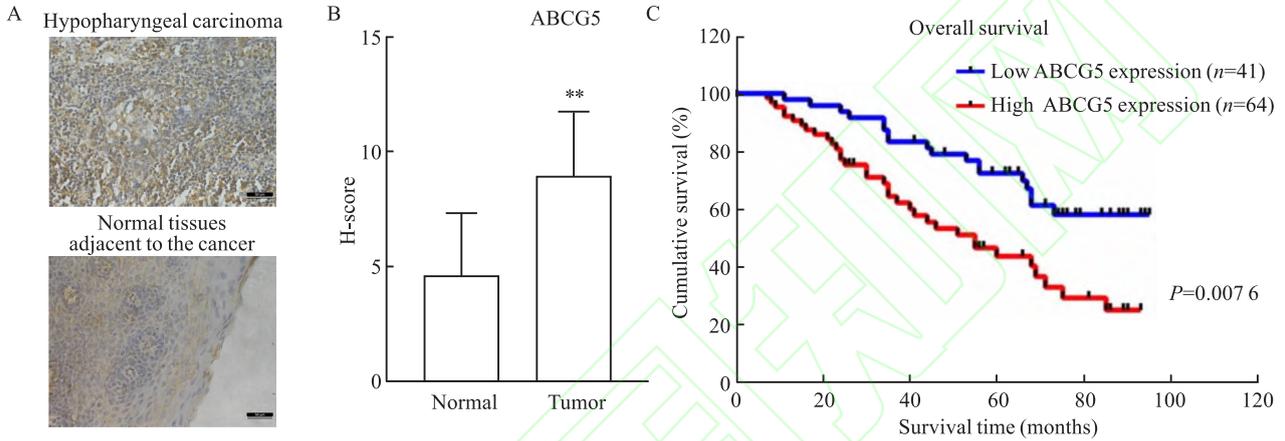


图 1 ABCG5 高表达与下咽癌患者预后之间的关系

Fig. 1 The relationship between high expression of ABCG5 and prognosis in patients with hypopharyngeal carcinoma

A: IHC detection of ABCG5 expression level x20; B: H-score of ABCG5; C: Relationship between ABCG5 expression and length of patient survival; \* \*  $P < 0.01$  vs Normal group.

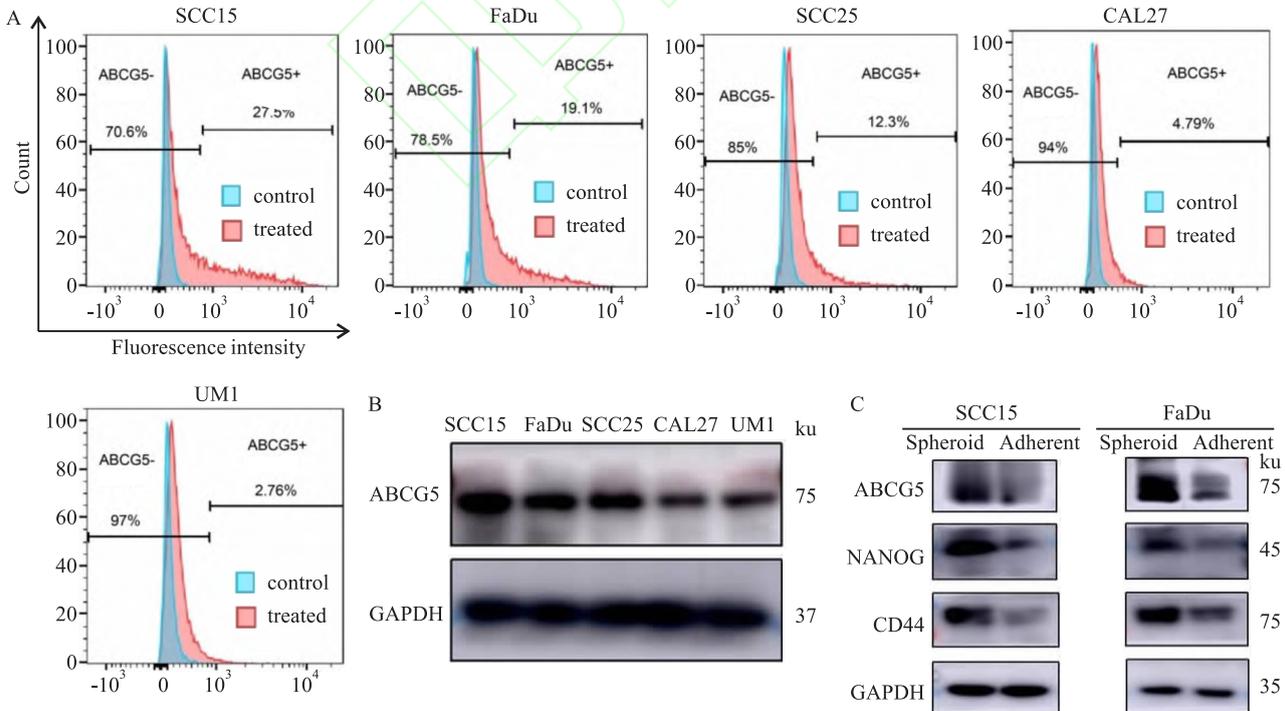


图 2 ABCG5 在 HNSCC 干细胞中的表达

Fig. 2 The expression of ABCG5 in HNSCC stem cells

A: Positive proportion of ABCG5 in the HNSCC cell lines; B: ABCG5 protein levels in the HNSCC cell lines; C: ABCG5 expression in adherent cells and CSCs.

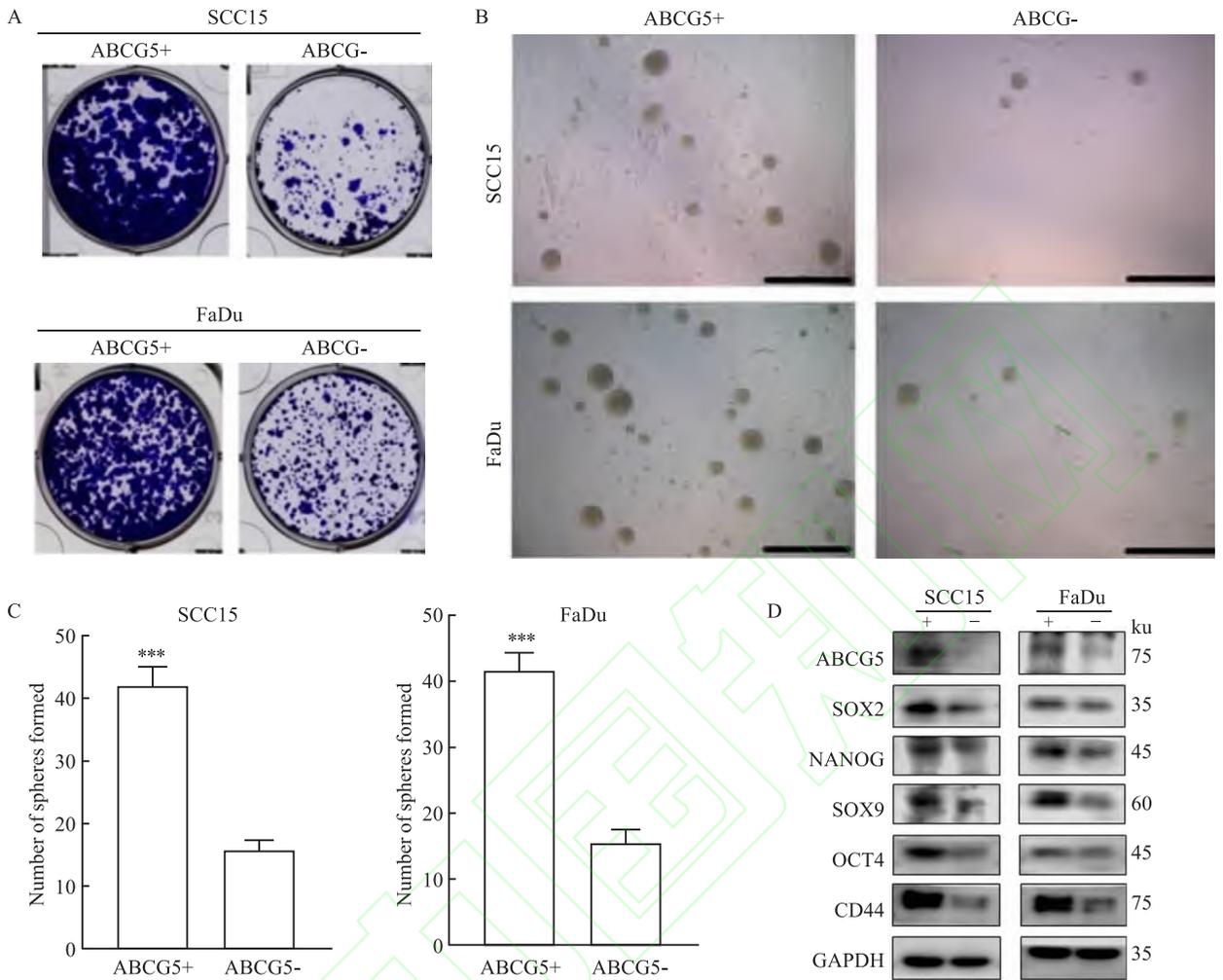


图3 ABCG5+ 细胞的干性特征

Fig. 3 Stemness characteristics of ABCG5+ cells

A: Comparison of self-renewal ability between ABCG5+ and ABCG5- cell; B: Comparison of ABCG5+ and ABCG5- spheroid formation ability  $\times 40$ ; C: Statistical analysis comparing spheroid formation ability between ABCG5+ and ABCG5- cells; D: The expression of stem genes in ABCG5+ and ABCG5- cells; \*\*\*  $P < 0.001$  vs ABCG5-cells.

#### 2.4 干扰 ABCG5 的表达会减弱 CSCs 的特性

为了进一步验证 ABCG5 是否调控干细胞特征,使用了小干扰 RNA,将 si RNA 转染到 SCC15 和 FaDu 细胞中,发现处理组细胞克隆数量 ( $t = 9.858, P < 0.001$ )、成球数量 ( $t = 9.331, P < 0.001$ ) 均少于未处理组 (图 4B-4C)。说明该实验降低了 HNSCC 细胞的克隆能力 (图 4A) 和干细胞成球能力。同时,干扰 ABCG5 均下调了干细胞标记物 SOX2、NANOG、SOX9、OCT4、CD44 的表达 (图 4D)。

**2.5 ABCG5 诱导 EMT** 接着,研究了 ABCG5 在 HNSCC 转移中的影响。数据显示,SCC15 和 FaDu 细胞中,ABCG5+ 转移数量高于 ABCG5- 转移数量 (图 5A), ( $t = 9.265, P < 0.01$ )。上皮细胞蛋白 E-cadherin 在 ABCG5+ 细胞中的表达低于 ABCG5- 细

胞,而间质细胞蛋白 N-cadherin、Slug、Snail 1 和 Vimentin 在 ABCG5+ 细胞中表达较高 (图 5B)。si RNA 诱导 ABCG5 表达阻断后,间质细胞蛋白 N-cadherin、Slug、Snail 1 均下调 (图 5C)。

### 3 讨论

一些肿瘤细胞表现出与成体干细胞相似的特性,促进恶性肿瘤的无限生长和自我修复。由于这些 CSCs 未分化,它们会影响肿瘤的异质性。在化疗和放疗损伤后,CSCs 可以抵抗细胞凋亡,修复受损的 DNA,将药物排出细胞外,并以极快的速度复制基因突变的细胞。虽然数量很少,但 CSCs 越来越被认为是癌症复发的主要原因<sup>[12,4]</sup>。为了长期控制癌症,医疗专业人员应该从单独治疗癌细胞转向靶向 CSCs。

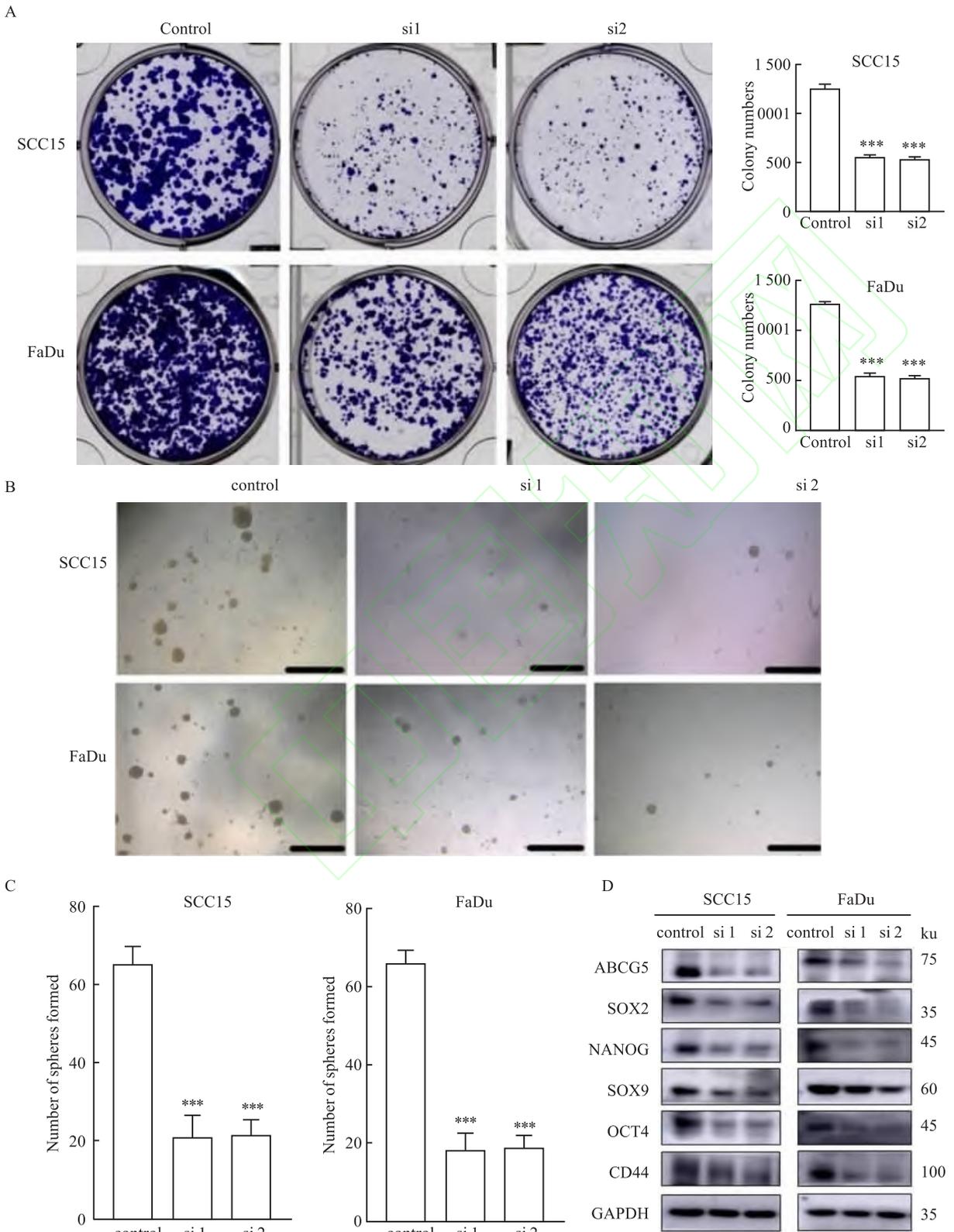


图4 干扰 ABCG5 表达对 CSCs 特性的影响

Fig. 4 The effect of ABCG5 expression on CSCs characteristics

A: siRNA was transfected to inhibit ABCG5 and the resultant effect on cellular self-renewal; B: Inhibited ABCG5 expression and associated effect on cell sphericity x40; C: Results of statistical analysis on inhibited ABCG5 expression and changes to cell sphericity; D: Inhibited ABCG5 expression and associated effects on stem gene expression; \*\*\*  $P < 0.001$  vs Control group.

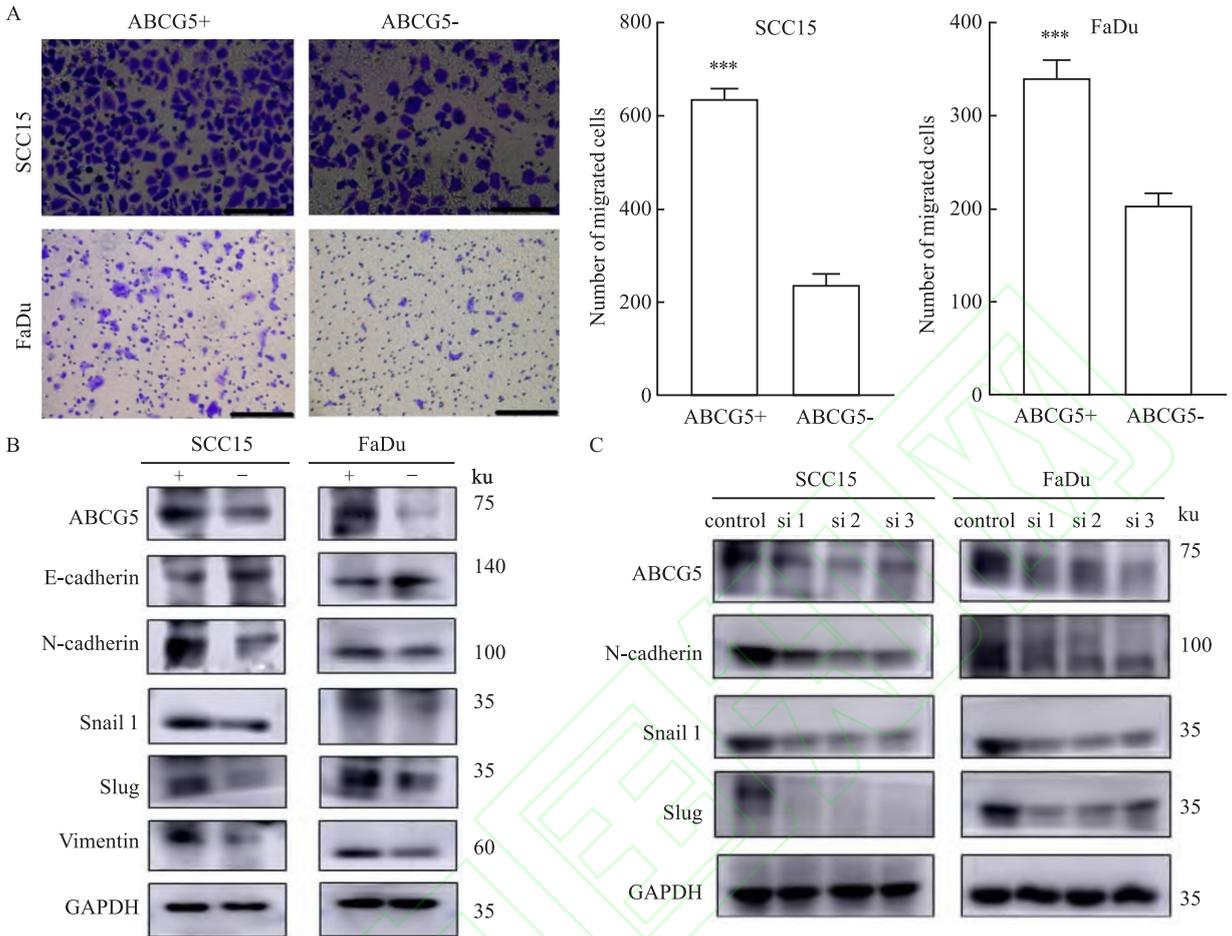


图5 ABCG5 对头颈鳞癌细胞上皮间质转化的影响

Fig. 5 The effect of ABCG5 on EMT in HNSCC

A: Comparison of cell transfer ability between ABCG5 + and ABCG5- cells x40; B: The expression of EMT proteins in ABCG5 + and ABCG5- cells; C: Interference with ABCG5 expression and changes to EMT protein expression. \*\*\*  $P < 0.001$  vs ABCG5-cells.

研究 CSCs 的一个关键问题是建立稳定的干细胞分离,这一过程需要严格匹配干细胞定义的特定义型。为此,SP 细胞是理想的选择,因为 SP 细胞富含干细胞,并且易于通过靶向其表面受体(如 CD44、CD133、ABCG2 和 CD24)进行分离<sup>[13-14]</sup>。它们表现出远高于非 SP 细胞的致癌潜力,反映了它们作为干细胞指标的有效性,靶向 SP 可能是控制癌症的强有力途径<sup>[13,15]</sup>。然而,SP 细胞并不能完全代表干细胞,部分 SP 细胞不具备干细胞特征,且并非所有的 CSCs 都分布在 SP 细胞中<sup>[4]</sup>。为了有效区分 SP 细胞和其他细胞群,本研究鉴定了另一个侧群细胞标记物: ABCG5。

首先,本研究观察到 ABCG5 在头颈鳞癌细胞系中存在侧群 SP 细胞,并在干细胞中显著富集,这证明了该蛋白在 SP 细胞分选中的有效性。迄今为止,已经确定了多种表面标记物可以分离干细胞群。然而,分离的干细胞群的纯度取决于用于筛选的标记

物,这表明癌症组织中存在多个干细胞亚群。这种现象可能与干细胞分化过程中缺乏具有高度代表性的干细胞分子和分子丢失有关<sup>[16-17]</sup>。因此,建立能够维持干细胞功能,并具有敏感性和特异性的生物标志物至关重要。本研究发现 ABCG5 + 细胞比 ABCG5-细胞表现出更强的成球能力,已知的 CSCs 生物标志物在 ABCG5 + 细胞中的表达也显著高于 ABCG5-细胞,表明 ABCG5 负责维持干细胞稳定性。相应地,si RNA 处理可以显著抑制肿瘤细胞的球体形成能力,同时也下调了干细胞调节蛋白的表达。这些结果充分体现了 ABCG5 可以分离干细胞并且可以作为治疗靶点的潜力。

总之,本研究首次揭示了 ABCG5 在肿瘤中的干细胞调控作用,这将为开发有前景的新干细胞表面标记物提供思路,更是对干细胞靶向治疗提供新见解。虽然本研究提高了 ABCG5 与 CSCs 之间关系的理解,但未来应着重阐明 ABCG5 对干细胞的调控机

制及其在其它肿瘤中的生物学影响。

### 参考文献

- [1] Day A T, Sher D J, Lee R C, et al. Head and neck oncology during the COVID-19 pandemic: reconsidering traditional treatment paradigms in light of new surgical and other multilevel risks[J]. *Oral Oncol*, 2020, 105: 104684. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104684.
- [2] Barbato L, Bocchetti M, Di Biase A, et al. Cancer stem cells and targeting strategies[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 926. doi: 10.3390/cells8080926.
- [3] Zhang M, Peng R, Wang H, et al. Nanog mediated by FAO/ACLY signaling induces cellular dormancy in colorectal cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(2): 159. doi: 10.1038/s41419-022-04606-1.
- [4] Gomez K E, Wu F, Keysar S B, et al. Cancer cell CD44 mediates macrophage/monocyte-driven regulation of head and neck cancer stem cells[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(19): 4185-98. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-1079.
- [5] Fu T Y, Hsieh I C, Cheng J T, et al. Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression[J]. *J Oral Pathol Med*, 2016, 45(2): 89-95. doi: 10.1111/jop.12335.
- [6] Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, et al. SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer[J]. *Mod Pathol*, 2011, 24(7): 944-53. doi: 10.1038/modpathol.2011.49.
- [7] Grubelnik G, Boštjančič E, Grošelj A, et al. Expression of NANOG and its regulation in oral squamous cell carcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 8573793. doi: 10.1155/2020/8573793.
- [8] Pfister O, Oikonomopoulos A, Sereti K I, et al. Role of the ATP-binding cassette transporter *Abcg2* in the phenotype and function of cardiac side population cells[J]. *Circ Res*, 2008, 103(8): 825-35. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.174615.
- [9] Yu L, Li-Hawkins J, Hammer R E, et al. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(5): 671-80. doi: 10.1172/jci0216001.
- [10] Ghosh S, Devereaux M W, Anderson A L, et al. NF- $\kappa$ B regulation of LRH-1 and ABCG5/8 potentiates phytosterol role in the pathogenesis of parenteral nutrition-associated cholestasis[J]. *Hepatology*, 2021, 74(6): 3284-300. doi: 10.1002/hep.32071.
- [11] Matsuo M, Ogata Y, Yamanashi Y, et al. ABCG5 and ABCG8 are involved in vitamin K transport[J]. *Nutrients*, 2023, 15(4): 998. doi: 10.3390/nu15040998.
- [12] Wang L, Yang G, Zhao D, et al. CD103-positive CSC exosome promotes EMT of clear cell renal cell carcinoma; role of remote miR-19b-3p[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 86. doi: 10.1186/s12943-019-0997-z.
- [13] Mallini P, Chen M, Mahkamova K, et al. Hypoxia-driven TGF $\beta$  modulation of side population cells in breast cancer; the potential role of ER $\alpha$ [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(4): 1108. doi: 10.3390/cancers15041108.
- [14] Thirusangu P, Ray U, Sarkar Bhattacharya S, et al. PFKFB3 regulates cancer stemness through the hippo pathway in small cell lung carcinoma[J]. *Oncogene*, 2022, 41(33): 4003-17. doi: 10.1038/s41388-022-02391-x.
- [15] Moserle L, Indraccolo S, Ghisi M, et al. The side population of ovarian cancer cells is a primary target of IFN- $\alpha$  antitumor effects[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(14): 5658-68. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-6341.
- [16] Ishiwata T, Matsuda Y, Yoshimura H, et al. Pancreatic cancer stem cells; features and detection methods[J]. *Pathol Oncol Res*, 2018, 24(4): 797-805. doi: 10.1007/s12253-018-0420-x.
- [17] Carrasco-Garcia E, Lopez L, Moncho-Amor V, et al. SOX9 triggers different epithelial to mesenchymal transition states to promote pancreatic cancer progression[J]. *Cancers*, 2022, 14(4): 916. doi: 10.3390/cancers14040916.

## Exploration of the role of ABCG5 in head and neck squamous cell carcinoma

Wu Xiangping<sup>1</sup>, Wang Yan<sup>2</sup>, Yao Changyu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>*Dept of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;* <sup>2</sup>*Key Laboratory of the Ministry of Education, Laboratory of Molecular Oncology, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142*)

**Abstract Objective** To investigate the regulatory role of ABCG5 in head and neck squamous cell carcinoma. **Methods** Immunohistochemical staining was used to detect the expression of ABCG5 in 105 patients with hypopharyngeal carcinoma, and the relationship between the expression and the long-term survival time of the patients was analyzed. Immunowestern blotting and flow cytometry were used to detect the expression of ABCG5 in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Flow sorting was employed to investigate the differences in proliferation and metastasis, spheroidization ability, and expression of stem cell molecules between ABCG5 positive and negative cells. si RNA interference was used to further demonstrate whether ABCG5 affects the malignant phenotype. **Results** ABCG5 was associated with poor prognosis in patients with hypopharyngeal carcinoma. ABCG5 was enriched

网络出版时间: 网络出版地址:

# LC-MS/MS 检测六种三羧酸循环代谢物 在孕期 DEHP 暴露小鼠模型中的应用

陶文康<sup>1,2,3</sup>, 张 伦<sup>2,3</sup>, 黄倩倩<sup>2,3</sup>, 余 芸<sup>2,3</sup>, 蒋 月<sup>1,2,3</sup>,

侯梦贞<sup>1,2,3</sup>, 凌旭涛<sup>1,2,3</sup>, 谢 芳<sup>1,2,3</sup>, 王建青<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup> 安徽医科大学药学科学学院, 合肥 230032; <sup>2</sup> 安徽医科大学第一附属医院

北区药学部, 合肥 230012; <sup>3</sup> 安徽省公共卫生临床中心, 合肥 230012)

**摘要** 目的 利用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)系统建立三羧酸循环主要有机酸的测定方法,探究孕期邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)暴露小鼠血清、肝脏和胎盘中富马酸、苹果酸、琥珀酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、顺乌头酸、柠檬酸6种三羧酸循环有机酸成分变化。**方法** 孕鼠血清、肝脏和胎盘样品经过前处理后,以含10 mmol/L 乙酸铵的水溶液和5  $\mu$ mol/L 亚甲基二膦酸作流动相A和含10 mmol/L 乙酸铵的90%乙腈水溶液和5  $\mu$ mol/L 亚甲基二膦酸作流动相B,流速为0.35 ml/min,采用梯度洗脱程序通过Waters ACQUITY UPLC BEH Amide Column, 130 Å, 1.7  $\mu$ m, (2.1 mm  $\times$  150 mm)色谱柱进行洗脱,质谱检测系统采用电喷雾离子源,负离子多反应监测。**结果** 三羧酸循环相关6种有机酸代谢物的标准曲线相关系数 $r$ 在定量范围内均大于0.996,所建立的方法准确度为97.14%~108.26%,低、中、高浓度日间和日内精密性相对标准偏差(RSD)为1.35%~6.73%,基质效应为93.29%~107.47%,提取回收率为94.82%~112.57%。与对照组相比,孕期DEHP暴露组小鼠不同组织样本中富马酸、苹果酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、顺乌头酸、柠檬酸均降低( $P < 0.05$ )。**结论** 本实验建立HPLC-MS/MS方法检测孕期DEHP暴露小鼠血清、肝脏和胎盘中6种三羧酸循环有机酸成分,方法稳定、灵敏度高、选择性强。孕期DEHP暴露引起小鼠肝脏、血清、胎盘中三羧酸循环有机酸代谢物水平变化,提示孕期DEHP暴露可能会影响线粒体三羧酸循环过程,在孕期DEHP暴露所致疾病的诊断和治疗中具有潜在价值。

**关键词** 三羧酸循环;三羧酸循环代谢物;高效液相色谱-质谱联用系统;孕鼠;方法学;DEHP

**中图分类号** R-331

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2025)05-

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.05.

2025-02-10 接收

**基金项目**:国家自然科学基金项目(编号:82073566);安徽省公共卫生临床中心安徽医科大学第一附属医院北区科研培育基金项目(编号:2023YKJ14、2023YKJ06、2023YKJ11);安徽医科大学青年科学基金项目(编号:2022xkj043);安徽省卫生健康科研项目(编号:AHWJ2023A20294)

**作者简介**:陶文康,男,硕士研究生;

王建青,女,教授,主任药师,博士生导师,通信作者, E-mail: jianqingwang81@126.com

三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)是线粒体能量合成代谢的核心通路,整合了细胞中的众多生物过程包括糖酵解、糖异生、蛋白质转氨作用和脱氨基作用、脂肪酸 $\beta$ -氧化和脂肪酸合成等有关氨基酸、脂肪酸和葡萄糖的多个合成代谢和分解代谢途径,是将糖、脂肪和蛋白质三大营养物质代谢联系在一起的重要枢纽和最终分解途径<sup>[1]</sup>。邻苯二甲酸酯(phthalic acid ester, PAEs)类物质作为增塑剂

in stem cells of head and neck squamous cell carcinoma. ABCG5-positive cells had stronger proliferation ( $P < 0.001$ ), metastasis ( $P < 0.01$ ), and spheroid formation abilities ( $P < 0.001$ ) than negative cells. The expression levels of some stem cell molecules (SOX2, NANOG, SOX9, OCT4, CD44) in ABCG5-positive cells were higher than those in ABCG5-negative cells. The expression of epithelial cell protein E-cadherin was lower in ABCG5-positive cells than that in ABCG5-negative cells, and the expression of interstitial cell proteins N-cadherin, Slug, Snail 1, and Vimentin were higher ( $P < 0.01$ ). Moreover, interfering with ABCG5 expression significantly inhibited tumor cell spheroid formation ( $P < 0.001$ ), as well as the expression of proteins related to cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition. **Conclusion** ABCG5 has a potential biological role in maintaining the function of head and neck squamous cell carcinoma stem cells.

**Key words** ABCG5; cancer stem cells; HNSCC; cell proliferation; EMT; transfer

**Fund program** National Natural Science Foundation of China (No. 82173152)

**Corresponding author** Yao Changyu, E-mail: 15905600277@163.com