

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.06.002

❖ 基础研究 ❖

转录因子 SREBP1 通过促进 SLC16A8 表达调控肿瘤酸性微环境参与结直肠癌发生发展

彭明沙¹, 周翼¹, 刘刚², 冯雪雅¹, 彭洪¹

(川北医学院第二临床医学院·南充市中心医院, 1. 肛肠外科; 2. 超声科, 四川南充 637000)

【摘要】目的: 探讨转录因子 SREBP1 通过促进 SLC16A8 表达调控肿瘤酸性微环境参与结直肠癌 (CRC) 发生发展的机制。**方法:** 通过生物信息学数据库分析 SLC16A8 在 CRC 中的表达情况及其与患者预后的关系。使用 RT-qPCR 法检测并比较各 CRC 细胞系中 SLC16A8 的表达水平; 过表达 SLC16A8 后使用 CCK-8 法检测细胞增殖活性; 使用 Transwell 法检测细胞侵袭能力; 使用 Metascape 数据库对 SLC16A8 的功能富集进行分析; 使用乳酸试剂盒检测细胞上清液中乳酸水平。通过生物信息学数据库分析 SLC16A8 的转录因子及潜在结合位点; 通过双荧光素酶实验检测 SREBP1 蛋白与 SLC16A8 相关性; 通过 UALCAN portal 分析 SREBP1 mRNA 表达水平; 通过 Kaplan-Meier Plotter 分析 CRC 中 SREBP1 表达水平与预后的关系; 通过 GEPIA2 分析 SREBP1 表达水平与 SLC16A8 的相关性; 使用 Western blot 分析过表达 SREBP1 对 SLC16A8 蛋白表达的影响。通过拯救实验分析 SREBP1 是否通过正调控 SLC16A8 促进乳酸转运。**结果:** SLC16A8 高表达的 CRC 患者提示预后较差 ($P < 0.05$), 且 SLC16A8 在 CRC 组织及细胞系中均为高表达水平 ($P < 0.05$)。过表达 SLC16A8 可提高 CRC 细胞增殖及侵袭能力。功能富集分析数据表明 SLC16A8 的功能聚集在乳酸转运及血管生成, 且 SLC16A8 可提高 CRC 细胞上清液中乳酸水平。双荧光素酶实验证实 SREBP1 可与 SLC16A8 直接结合。SREBP1 在 CRC 组织中高表达并与患者预后较差具有相关性 ($P < 0.05$)。SREBP1 可促进 SLC16A8 蛋白表达, 且 SREBP1 可通过正调控 SLC16A8 促进乳酸转运。**结论:** SLC16A8 可能通过调控肿瘤酸性微环境促进 CRC 细胞增殖和侵袭, 转录因子 SREBP1 通过上调 SLC16A8 表达参与 CRC 发生发展。

【关键词】 结直肠癌; SLC16A8; SREBP1; 肿瘤酸性微环境

【中图分类号】 R735.3 **【文献标志码】** A

Transcription factor SREBP1 participates in the pathogenesis of colorectal cancer by promoting the expression of SLC16A8 and regulating acidic tumor microenvironment

PENG Ming-sha¹, ZHOU Yi¹, LIU Gang², FENG Xue-ya¹, PENG Hong¹

(1. Department of Anorectal Surgery; 2. Department of Ultrasound, Nanchong Central Hospital, the Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To study the molecular mechanism that transcription factor SREBP1 involves in the process of colorectal cancer (CRC) by promoting the expression of SLC16A8 and regulating acidic tumor microenvironment. **Methods:** The expression of SLC16A8 in CRC and the association between SLC16A8 on poor prognosis were analyzed by bioinformatics database. The expression of SLC16A8 in CRC cells were detected by quantitative real-time reverse-transcription (RT-qPCR). CCK-8 was used to analyze cell proliferation, and Transwell was used to analyze cell invasive ability. A functional enrichment analysis was carried out with Metascape database. The levels of lactic acid in supernatant was monitored with lactate kit. Bioinformatics method was used to screen transcription factor which could bind to SLC16A8 and potential transcription factor binding sites, and dual luciferase reporter assay was utilized to the correlation between SREBP1 protein and SLC16A8. UALCAN portal was used to analysis SREBP1 mRNA expression, relationship between the expression of SREBP1 and prognosis was analyzed by Kaplan-Meier Plotter. GEPIA2 was used to analysis the relationship between the expression of SREBP1 and SLC16A8. The effect of overexpression of SREBP1 on the expression of SLC16A8 protein were analyzed by Western blot. Rescue experiments were used to analyse whether SREBP1 promotes lactate transport through positive regulating SLC16A8. **Results:** CRC patients with high expression of SLC16A8 indicate poor prognosis ($P < 0.05$), and SLC16A8 was highly ex-

基金项目: 四川省南充市市校合作项目 (22SXQT0069, 22SXQT0070, 22SXQT0063); 川北医学院校级项目 (CBY23-QA-Y53); 四川省青年创新科研项目 (Q22049)

作者简介: 彭明沙 (1987 -), 女, 硕士, 主治医师。E-mail: 312684052@qq.com

通讯作者: 彭洪, 博士。E-mail: 1041910523@qq.com

pressed in CRC tissues and cell lines ($P < 0.05$). Overexpression of SLC16A8 enhanced cell proliferation and invasion. GO enrichment analysis data further indicated that its functions were involved in the lactic acid transport and angiogenesis, and SLC16A8 could promote the levels of lactic acid in supernatant. The double Luciferase test confirmed that SREBP1 could bind directly to SLC16A8. SREBP1 was highly expressed in CRC tissue and was correlated with poor patient prognosis ($P < 0.05$). SREBP1 could promote the expression of SLC16A8 protein, and SREBP1 could promote lactate transport by positively regulating SLC16A8. **Conclusion:** SLC16A8 promoted CRC cell proliferation and invasion by regulating acidic tumor microenvironment, and transcription factor SREBP1 involves in the process of CRC by upregulating the expression of SLC16A8.

【Key words】 Colorectal cancer; SLC16A8; SREBP1; Acidic tumor microenvironment

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是世界范围内最常见的胃肠道恶性肿瘤。2020 年全球新增 190 万例 CRC 病例, 有 93.5 万例死亡, 占有癌症死亡的 1/10^[1]。大多数 CRC 患者在早期没有明显症状, 大约 40% ~ 50% 的患者在诊断时已经处于晚期并有远处转移^[2-3]。因此深入研究 CRC 的发病机制有利于该病的准确诊断、精准治疗和早期预防, 也是降低 CRC 死亡率的有效途径。SLC16 基因家族由 14 个成员组成, 也称为单羧酸转运蛋白 (monocarboxylate transporter, MCT) 家族^[4]。SLC16 家族成员参与多种代谢途径, 包括能量代谢、糖异生、T 淋巴细胞活化、肠道代谢、甲状腺激素代谢和脑、骨骼肌、心脏和肿瘤细胞中的药物转运^[5-6]。SLC16A8 作为该基因家族成员之一, 主要负责单羧酸代谢产物的运输, 如丙酮酸盐、L-乳酸盐和酮体^[7]。然而尚不清楚 SLC16A8 与 CRC 发生发展的关系。甾醇调节元件结合蛋白 (SREBPs) 是具有基本螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链结构域的转录因子家族, 可调节参与脂质合成和摄取途径的基因^[8]。SREBP1 由 SREBF1 基因编码, 是控制细胞脂质代谢的调节器, 可通过调控相关基因表达调节胆固醇和脂肪酸的合成及摄入^[9]。越来越多的证据表明 SREBP1 参与了不同癌症的代谢重编程, 如前列腺癌、乳腺癌和胶质母细胞瘤, 是癌症治疗的潜在靶点^[10]。既往研究^[11]发现, 肝癌微环境中乳酸浓度的增加可负反馈促进 MCT1 介导的乳酸摄取并下调 SREBP1 的表达, 然而 CRC 中 SREBP1 是否参与 SLC16A8 介导的乳酸转运尚无报道。

本研究拟探讨 SLC16A8 通过调控肿瘤酸性微环境促进 CRC 细胞增殖和侵袭, 以及转录因子 SREBP1 上调 SLC16A8 表达促进乳酸转运参与 CRC 发生发展的作用机制。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析

从 TCGA 数据库下载 619 名 CRC 患者的病例资料, 分析 SLC16A 基因家族 14 个成员与 CRC 患者预后的关系。通过 UALCAN (http://ualcan.

path.uab.edu/analysis-prot.html) 网站分析 SLC16A8 在结肠癌和直肠癌中的表达。通过 STRING (https://cn.string-db.org/cgi/input?sessionId=bg39Tea7hbww) 数据库筛选出 38 个 SLC16A8 结合蛋白, 通过 GEPIA2 数据库 (http://gepia2.cancer-pku.cn/#index) 获得与 SLC16A8 基因表达相关的前 100 个基因, 结合这两个数据集共 138 个基因。通过 Metascape 数据库 (https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1) 对 SLC16A8 的功能富集进行分析。通过 LinkedOmics 数据库 (http://www.linkedomics.org/) 查询 SLC16A8 潜在的转录因子, 再通过 JASPAR (http://jaspar.genereg.net/) 网站分析 SLC16A8 启动子序列与转录因子 SREBP1 可能的结合位点。通过 UALCAN 数据库分析 SREBP1 mRNA 的表达。使用 Kaplan-Meier Plotter 网站 (http://kmpplot.com/analysis/index.php?p=background) 分析 SREBP1 表达水平与 CRC 预后的关系, 再通过 GEPIA2 数据库分析 SREBF1 与 SLC16A8 表达的相关性。

1.2 细胞培养及转染

FHC (正常结直肠粘膜上皮细胞)、SW620、SW480、HCT116 及 HT29 细胞株均购自中国科学院细胞库。FHC 和 HT29 使用 1640 培养基 (Gibco) 培养; SW620 和 SW480 使用 L-15 培养基 (Gibco) 培养; HCT116 细胞使用 10% 胎牛血清 DMEM 培养基 (HyClone; Cytiva) 培养; 由 GenePharma 合成并构建 SREBP1 过表达载体 (OE-SREBP1)、SLC16A8 过表达载体 (OE-SLC16A8) 及 SLC16A8 siRNA。根据制造商的说明, 使用 Lipofectamine 3000 (Invitrogen) 将其转染到 HCT116 细胞中。阴性对照组转染阴性对照序列到 HCT116 细胞。SLC16A8 siRNA 序列如下: 5'-GC-CUGUUGUUGCAGAGGAA-3'。通过拯救实验检测 SREBP1 是否通过正调控 SLC16A8 表达促进乳酸转运, 分组如下: 空白对照组, 阴性对照组, SREBP1 过表达组和 SREBP1 过表达 + SLC16A8 siRNA 组。

1.3 RT-qPCR 检测细胞中 SLC16A8 的表达水平

吸掉培养基, PBS 洗 1 次, 吸掉 PBS, 加入 1 mL Trizol (Invitrogen), 将底部细胞吹打起来, 转入 1.5

mL LEP 管裂解细胞,分离各细胞总 RNA,在 37 °C 下用 RNaseR (2 U/ μ g) 处理提取的 RNA 10 min, DNA marker 以 ddH₂O 为模板作为 PCR 阴性对照。逆转录后,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算基因的相对表达量。SLC16A8 序列如下:5- AGCCGTGAGCGTCTTCTTC-3 (sense), 5- GTCAGGTAGAGCTCCAGGAG-3 (anti-sense)。

1.4 CCK-8 细胞增殖实验

设立空白对照组(不作处理),阴性对照组(添加无义序列)和 SLC16A8 过表达组并使用 CCK-8 检测细胞增殖。在 96 孔板中培养 HCT116 细胞(4 × 10⁵ 个/mL),并根据实验目的转染 48 h 后向每孔添加 10 μ L CCK-8 (Dojindo)。2 h 后,测试 450 nm 下的 OD 值。

1.5 Transwell 细胞体外侵袭实验

设立空白对照组(不作处理),阴性对照组(添加无义序列)和 SLC16A8 siRNA 组并通过 Transwell 检测细胞侵袭能力,使用涂有 Matrigel 基质的 Transwell 腔室测试细胞侵袭能力。将处理好的细胞悬浮在无血清培养基中,然后将无血清细胞悬液(500 μ L)和添加 FBS 的培养基(200 μ L)分别添加到上腔和下腔。进入下腔的细胞在 37 °C 培养 48 h 后用多聚甲醛固定,然后用 0.1% 结晶紫染色 30 min 后在显微镜下拍照及计数。

1.6 细胞上清液乳酸测定

设立空白对照组,阴性对照组和 SLC16A8 过表达组并分析 HCT116 细胞上清液中乳酸表达水平,将 1 × 10⁴ 个细胞在含有 10% 胎牛血清和 6 mmol/L 葡萄糖的无糖 DMEM 培养基中培养,然后将细胞转移至含有 5% CO₂ 温度为 37 °C 的培养箱中培养 48 h。收集上清液,按照制造商的说明使用荧光乳酸测定试剂盒检测上清液中乳酸水平。

1.7 Western blot

总蛋白通过 RIPA 裂解物(Beyotime)收获,并通

过 BCA 试剂盒(Invitrogen)检测。在 SDS-PAGE 凝胶中分离蛋白质(40 μ g)后转移至 PVDF 膜(Millipore)。封闭后,将膜在 4 °C 下暴露于一级抗体(Abcam)过夜,随后使用二级抗体(Abcam)处理 1 h,并通过滴加 ECL 显色溶液进行显影。使用 ECL 化学发光后,蛋白质在凝胶成像仪(Bio-Rad)上进行显影。

1.8 双荧光素酶报告实验

分别合成荧光素酶报告基因载体 pGL3-SLC16A8 与荧光素酶报告基因缺失突变载体 pGL3-SLC16A8-DM。将 pGL3-SLC16A8 或 pGL3-SLC16A8-DM 与 pCMV-Myc-SREBP1 过表达载体及内参质粒 pRL-TK 共转染至 HCT116 细胞 48 h 后测定荧光素酶活性。将 CRC HCT116 细胞接种至 24 孔板,将荧光素酶报告基因载体 pGL3-SLC16A8 或荧光素酶报告基因缺失突变载体 pGL3-SLC16A8-DM 与 pCMV-Myc-SREBF1 过表达载体或 pCMV-Myc 质粒及内参质粒 pRL-TK 共转染至细胞,设定荧光素酶报告基因载体、pCMV-Myc-SREBF1 过表达载体与内参质粒 pRL-TK 转染比例为 50:50:1。转染 48 h 后,按照 Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega)说明书测定荧光素酶活性。

1.9 统计学分析

使用 SPSS22.0 和 GraphPad Prism8.0 对数据进行统计分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,3 组及以上比较使用方差分析。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SLC16A 家族与 CRC 预后的关系

TCGA 数据结果表明高表达 SLC16A8 基因的 CRC 患者提示预后较差(*P* < 0.05),其余 13 个基因表达水平与 CRC 患者预后均无相关性(*P* > 0.05)。见图 1。

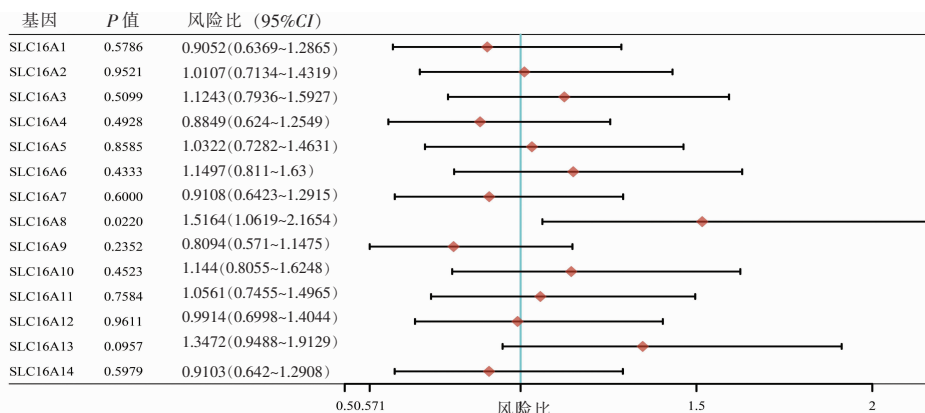


图 1 SLC16A 基因家族成员与 CRC 患者预后的关系

2.2 SLC16A8 在 CRC 组织中高表达

UALCAN 数据库结果表明 SLC16A8 在结肠癌和直肠癌中均高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 SLC16A8 在 CRC 细胞系中的表达

RT-qPCR 结果表明, SLC16A8 在 CRC 细胞株 (SW620、SW480、HCT116 和 HT29) 中的表达水平均高于 FHC 细胞 ($P < 0.05$)。既往研究^[12]证实 SLC16A8 在 HCT116 细胞中稳定表达, 因此后续实验选择 HCT116 细胞。见图 3。

2.4 SLC16A8 对 HCT116 细胞增殖的影响

结果表明 SLC16A8 过表达组中 HCT116 细胞

增殖能力提高 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 SLC16A8 对 HCT116 细胞侵袭的影响

空白对照组 (64.00 ± 1.00) 和阴性对照组 (62.67 ± 1.53) 相比, SLC16A8 siRNA 组 (34.67 ± 1.53) 中 HCT116 细胞侵袭能力降低 ($t = 27.828$, 22.450 , $P < 0.05$)。见图 5。

2.6 SLC16A8 功能富集

使用 Metascape 数据库对 SLC16A8 的功能富集进行分析, 发现其主要功能聚集在乳酸转运及血管生成。见图 6。

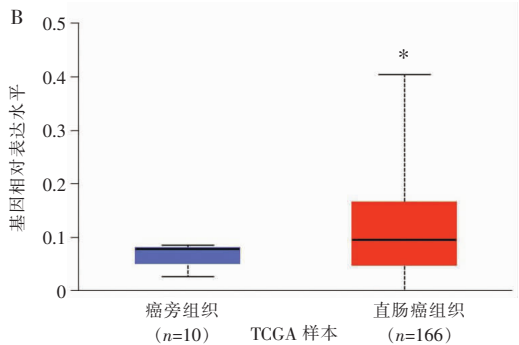
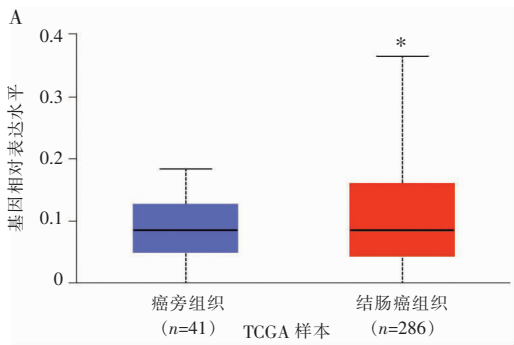


图 2 SLC16A8 在结肠癌和直肠癌中的表达

A. SLC16A8 在结肠癌组织中的表达; B. SLC16A8 在直肠癌组织中的表达。* $P < 0.05$, 与癌旁组织比较。

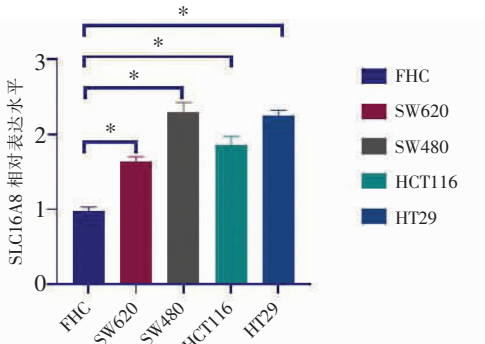


图 3 SLC16A8 在 CRC 细胞中的表达

* $P < 0.05$, 与 FHC 比较。

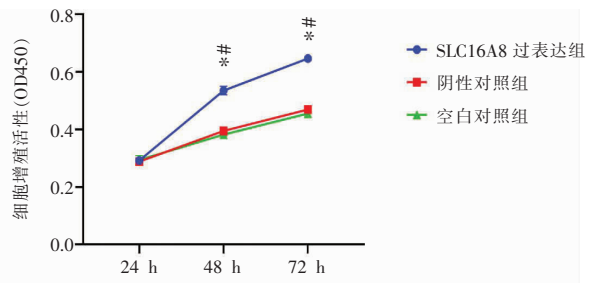


图 4 SLC16A8 对细胞增殖的影响

* $P < 0.05$, 与同时间空白对照组相比; # $P < 0.05$, 与同时间阴性对照组相比。

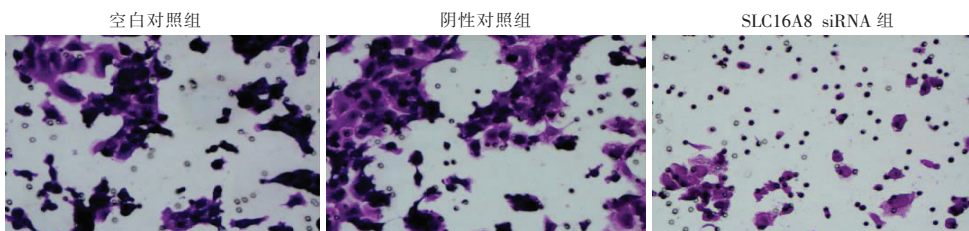
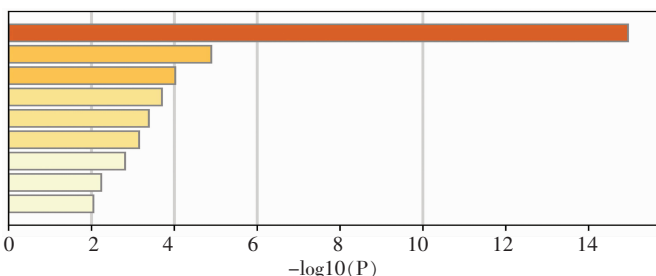


图 5 SLC16A8 对细胞侵袭的影响



GO:0015727: 乳酸运输
GO:0001525: 血管生成
GO:0030198: 细胞外基质组织
GO:0010810: 细胞-基质黏附的调节
GO:0045927: 生长正调控
GO:0008201: 肝素合成
GO:0051591: cAMP 反应
GO:0031667: 对营养水平的反应
GO:0045121: 膜筏

图 6 SLC16A8 功能富集

2.7 SLC16A8 对细胞上清液中乳酸水平的影响

结果表明 SLC16A8 过表达组细胞上清液中乳酸相对表达水平增高 ($P < 0.05$)。见图 7。

2.8 SREBP1 可能是 SLC16A8 的转录因子

通过 LinkedOmics 数据库发现 SREBP1 可能是 SLC16A8 的转录因子,且 SREBP1 蛋白与 SLC16A8 有多个结合位点。因为评分愈高两者结合的可能性愈大,所以后续实验选择评分最高的结合位点“CTCACCCCAT”进行研究。见图 8。

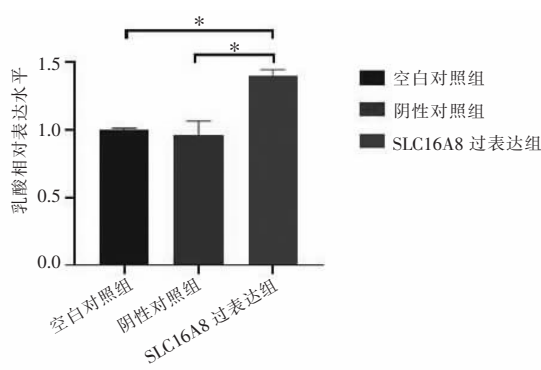


图 7 SLC16A8 对乳酸水平的影响

* $P < 0.05$,与空白对照组或阴性对照组比较。

编号	基因名	评分	相对评分	序列编号	序列开始位置	序列结束位置	正/负义链	预测序列
MA0595.1	MA0595.1.SREBF1	14.115613	0.9788405129822167	NC_000022.11:c38086184-38084085	781	790	+	CTCACCCCAT
MA0595.1	MA0595.1.SREBF1	11.90203	0.9302330645834006	NC_000022.11:c38086184-38084085	1751	1760	-	ATCACCTCAG
MA0595.1	MA0595.1.SREBF1	9.949453	0.8873569815722784	NC_000022.11:c38086184-38084085	2058	2067	+	CTCAGCCACG
MA0595.1	MA0595.1.SREBF1	9.310918	0.873335559538091	NC_000022.11:c38086184-38084085	1091	1100	-	GTCCCCCAT
MA0595.1	MA0595.1.SREBF1	9.192677	0.8707391317558113	NC_000022.11:c38086184-38084085	413	422	+	CTCTCCCCAC
MA0595.1	MA0595.1.SREBF1	9.140025	0.8695829743058627	NC_000022.11:c38086184-38084085	374	383	-	CTCTCCCAT
MA0595.1	MA0595.1.SREBF1	9.140025	0.8695829743058627	NC_000022.11:c38086184-38084085	1332	1341	-	CTCACCCCT
MA0595.1	MA0595.1.SREBF1	8.455675	0.854555524198435	NC_000022.11:c38086184-38084085	1841	1850	+	ACCACCCACG
MA0595.1	MA0595.1.SREBF1	7.715616	0.8383047782979527	NC_000022.11:c38086184-38084085	2080	2089	-	GACACCCACG
MA0595.1	MA0595.1.SREBF1	7.6634426	0.837159112522956	NC_000022.11:c38086184-38084085	1983	1992	-	CACACCTCAC

图 8 SREBP1 蛋白与 SLC16A8 可能的结合位点

2.9 SREBP1 蛋白可与 SLC16A8 靶向结合

结果显示与共转染 pCMV-Myc 空载体对照组 (1.00 ± 0.05) 相比,过表达 SREBP1 可上调 SLC16A8 荧光素酶报告基因活性 ($1.79 \pm 0.03, t = -24.099, P < 0.05$)。将 SREBP1 结合位点“CTCACCCCAT”缺失后,SLC16A8 荧光素酶报告基因活性降低 ($1.19 \pm 0.07, t = 13.704, P < 0.05$),说明 SREBP1 能够通过结合“CTCACCCCAT”促进 SLC16A8 转录。见图 9。

2.10 SREBF1 基因在 CRC 中高表达

通过 UALCAN 分析 SREBF1 在 CRC 中的表达,结果表明 SREBF1 在 CRC 中的表达水平高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。见图 10。

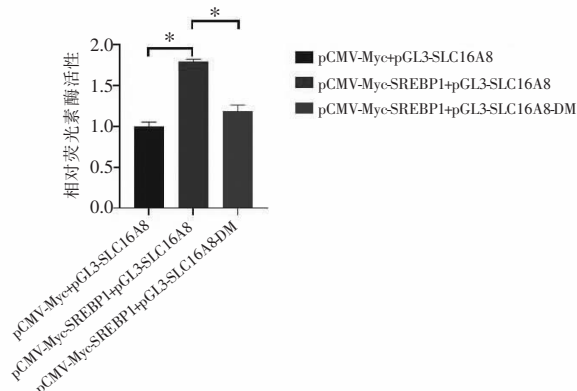


图 9 SREBP1 可与 SLC16A8 靶向结合

* $P < 0.05$,与 pCMV-Myc-SREBP1+ppGL3-SLC16A8 比较。

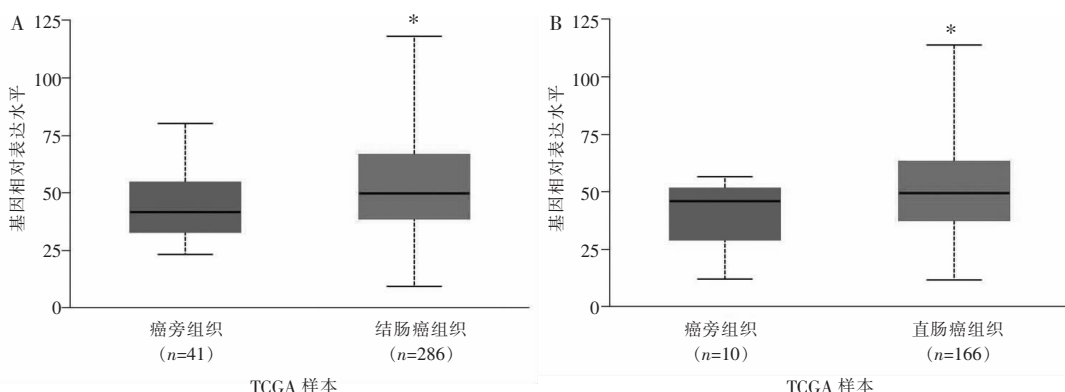


图 10 SREBF1 在 CRC 中高表达

A. SREBF1 在结肠癌组织中的表达;B. SREBF1 在直肠癌组织中的表达。* $P < 0.05$,与癌旁组织比较。

2.11 SREBF1 与患者预后相关

Kaplan-Meier Plotter 网站分析结果表明高表达 SREBF1 的 CRC 患者预后较差 ($P < 0.05$)。见图 11。

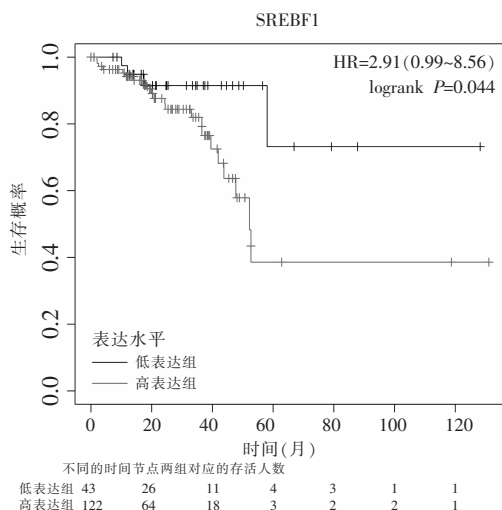


图 11 SREBF1 与患者预后的关系

2.12 SREBP1 正调控 SLC16A8 表达

GEPIA2 数据库分析结果表明 SREBP1 与 SLC16A8 正相关 ($r = 0.24, P < 0.05$)。接下来分析 SREBP1 对 SLC16A8 编码蛋白 MCT3 的影响, 结果表明与阴性对照组 (0.174 ± 0.001) 相比, SREBP1 过表达组中 MCT3 蛋白相对表达水平增高 ($0.592 \pm 0.003, t = 255.972, P < 0.05$)。见图 12。

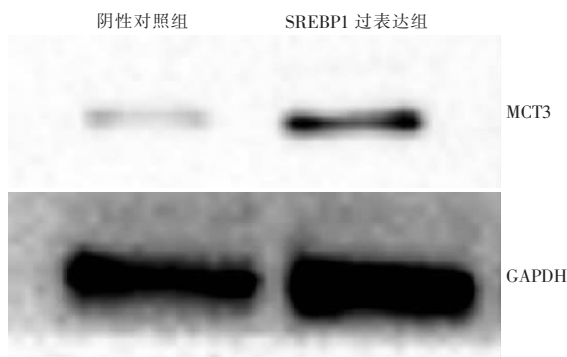


图 12 SREBP1 促进 MCT3 蛋白表达

2.13 SREBP1 通过正调控 SLC16A8 表达促进乳酸转运

拯救实验检测 SREBP1 是否通过正调控 SLC16A8 表达促进乳酸转运。结果显示与空白对照组 (1.000 ± 0.032) 和阴性对照组 (0.979 ± 0.070) 相比, SREBP1 过表达组细胞上清液中乳酸表达水平增高 ($1.707 \pm 0.144, t = 8.290, 7.875, P < 0.05$)。但相比 SREBP1 过表达组, SREBP1 过表达 + SLC16A8 siRNA 组中乳酸水平降低 ($1.313 \pm 0.057, t = 4.403, P < 0.05$), 说明抑制 SLC16A8 表达可逆转 SREBP1 对乳酸转运的促进作用, 证实 SREBP1 通过正调控 SLC16A8 促进乳酸转运。见图 13。

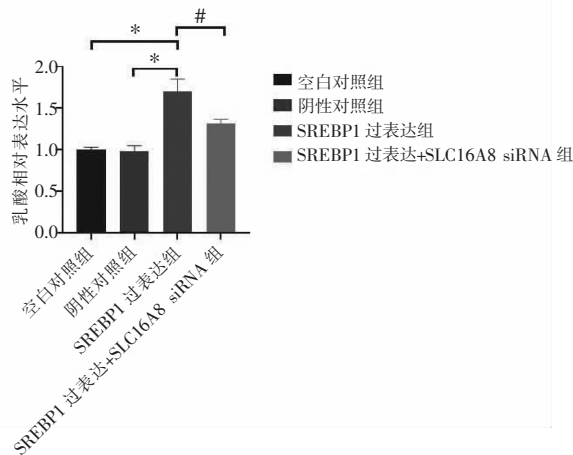


图 13 SREBP1 通过正调控 SLC16A8 促进乳酸转运

* $P < 0.05$, 与 SREBP1 过表达组相比; # $P < 0.05$, 与 SREBP1 过表达 + SLC16A8 siRNA 组相比。

3 讨论

CRC 是胃肠道常见的恶性肿瘤, 其发病率逐年上升。大多数 CRC 患者确诊时已处于晚期, 对于这些患者来说手术和辅助治疗效果有限且不良反应多, 患者预后较差。因此深入了解 CRC 发生和发展的分子机制至关重要。

SLC16A8 属于 SLC16A 基因家族, 可编码单羧酸转运蛋白 3 (MCT3)。既往研究发现, MCT1-4 蛋白主要功能为介导质子耦连的乳酸等单羧酸类物质的跨膜转运, 通过参与调控肿瘤细胞能量代谢和肿瘤微环境酸化影响肿瘤细胞的生物学行为^[5-6]。关于 SLC16A8 (MCT3) 的研究较少, 研究^[13]发现 SLC16A8 在乳腺癌中低表达, 但 SLC16A8 与 CRC 发生发展的关系尚无报道。TCGA 数据库的分析结果表明 SLC16A8 与患者预后相关, 高表达 SLC16A8 的 CRC 患者预后明显较差 ($P < 0.05$)。与癌旁组织相比, SLC16A8 在结肠癌和直肠癌组织及 CRC 细胞中的表达水平均增高, 表明 SLC16A8 可能与 CRC 的发生发展密切相关。CCK-8 及 Transwell 实验结果发现, SLC16A8 可促进 CRCHCT116 细胞的增殖和迁移, 证实 SLC16A8 在 CRC 发生发展中扮演着促癌因子的角色。为明确 SLC16A8 发挥促癌作用的具体机制, 本研究对 SLC16A8 的功能富集进行分析并发现其主要功能聚集在乳酸转运及血管生成。

在实体肿瘤中, 由于肿瘤组织迅速增长及肿瘤组织内部血管系统不完善会导致肿瘤组织内氧气供应不足。由于氧气供给不足, 肿瘤细胞只能通过无氧酵解的方式进行能量代谢, 其会造成乳酸的积累并反馈抑制糖酵解, 同时导致细胞内环境酸化使细胞生长受到抑制; 而 SLC16A8 编码的 MCT3 蛋白

可特异性的将乳酸转运到细胞外,这对于调控糖酵解具有重要生理意义^[13]。且转运至细胞外的乳酸可造成肿瘤微环境 pH 值降低,整体呈现酸性环境,而肿瘤酸性微环境可促进肿瘤细胞的增殖,重塑细胞外基质使肿瘤细胞侵入并转移到周围和远处的器官,还有助于建立利于免疫逃逸的免疫抑制微环境等^[14]。本研究发现 SLC16A8 过表达组 HCT116 细胞上清液中乳酸表达水平明显增高,证实 SLC16A8 可将乳酸转运到 CRC 细胞外形成肿瘤酸性微环境,从而促进 CRC 细胞的增殖和迁移。

转录因子是指能够与真核基因的顺式作用元件发生特异性相互作用,并对基因的转录有激活或抑制作用的 DNA 结合蛋白。使用 LinkedOmics 数据库对 SLC16A8 的转录因子进行预测,发现其可与 SREBP1 结合,通过 JASPAR 网站发现 SLC16A8 启动子区与转录因子 SREBP1 有多个结合位点,且荧光素酶实验也证实 SLC16A8 可与 SREBP1 靶向结合。SREBP1 蛋白由 SREBF1 基因编码,是控制细胞脂质代谢的调节器,但其与肿瘤酸性微环境的关系尚无报道^[15]。通过生物信息学数据库发现 SREBF1 在 CRC 中高表达,且高表达 SREBF1 的 CRC 患者预后较差,说明 SREBF1 参与 CRC 的发生发展。研究结果表明 SREBF1 基因与 SLC16A8 基因在 CRC 中的表达正相关,且高表达 SREBP1 可促进 MCT3 蛋白表达,证实转录因子 SREBP1 可通过促进 SLC16A8 基因转录上调 MCT3 蛋白表达。通过拯救实验验证 SREBP1 通过正调控 SLC16A8 表达促进肿瘤酸性微环境的形成,结果表明 SREBP1 过表达组中的乳酸表达水平较空白对照组和阴性对照组增高,但与 SREBP1 过表达组相比,SREBP1 过表达 + SLC16A8 siRNA 组中的乳酸水平有所降低,说明抑制 SLC16A8 表达可逆转 SREBP1 对乳酸转运的促进作用,证实 SREBP1 通过正调控 SLC16A8 增加乳酸转运以形成肿瘤酸性微环境,并最终促进 CRC 细胞的增殖和迁移。

综上,本研究结果表明转录因子 SREBP1 可对 SLC16A8 的转录起到正调控作用,导致 SLC16A8 编码的 MCT3 蛋白在结直肠癌中高表达并促进乳酸外排以形成肿瘤酸性微环境,最终参与 CRC 的发生发展。SLC16A8 在 CRC 中的研究尚少,本研究为完善 CRC 的发生发展机制和 CRC 的防治提供了新的依据和作用靶点,后续还需要更多的体外实验和体内实验对其进行验证。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209–249.
- [2] Engstrand J, Nilsson H, Strömberg C, *et al.* Colorectal cancer liver metastases—a population-based study on incidence, management and survival[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 78.
- [3] Johdi NA, Sukor NF. Colorectal cancer immunotherapy: options and strategies[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1624.
- [4] Li J, Xie J, Wu D, *et al.* A pan-cancer analysis revealed the role of the SLC16 family in cancer[J]. *Channels (Austin, Tex)*, 2021, 15(1): 528–540.
- [5] Bosshart PD, Charles RP, Garib Singh RAA, *et al.* SLC16 family: from atomic structure to human disease[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2021, 46(1): 28–40.
- [6] Felmler MA, Jones RS, Rodriguez-Cruz V, *et al.* Monocarboxylate transporters (SLC16): function, regulation, and role in health and disease[J]. *Pharmacological Reviews*, 2020, 72(2): 466–485.
- [7] Klipfel L, Cordonnier M, Thiébaud L, *et al.* A splice variant in SLC16A8 gene leads to lactate transport deficit in human iPSC cell-derived retinal pigment epithelial cells[J]. *Cells*, 2021, 10(1): 179.
- [8] Zhao Q, Lin X, Wang G. Targeting SREBP-1-mediated lipogenesis as potential strategies for cancer[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 952371.
- [9] Gründing AR, Schneider MA, Richtmann S, *et al.* Lung adenocarcinoma cell sensitivity to chemotherapies: a spotlight on lipid droplets and SREBF1 gene[J]. *Cancers*, 2022, 14(18): 4454.
- [10] Fukuda M, Ogasawara Y, Hayashi H, *et al.* Resveratrol inhibits proliferation and induces autophagy by blocking SREBP1 expression in oral cancer cells[J]. *Molecules*, 2022, 27(23): 8250.
- [11] Zhao Y, Li M, Yao X, *et al.* HCARI1/MCT1 regulates tumor ferroptosis through the lactate-mediated AMPK-SCD1 activity and its therapeutic implications[J]. *Cell Reports*, 2020, 33(10): 108487.
- [12] Deng H, Chen S, Yuan X, *et al.* Transcriptome sequencing analysis of the effect of β -element on colorectal cancer from the lncRNA-miRNA-mRNA perspective[J]. *Genetics Research*, 2022, 2020: 5896296.
- [13] Sohrabi E, Moslemi M, Rezaie E, *et al.* The tissue expression of MCT3, MCT8, and MCT9 genes in women with breast cancer[J]. *Genes & Genomics*, 2021, 43(9): 1065–1077.
- [14] Wang ZH, Peng WB, Zhang P, *et al.* Lactate in the tumour microenvironment: from immune modulation to therapy[J]. *EBioMedicine*, 2021, 73: 103627.
- [15] Zhang X, Bai Y, Zhu W, *et al.* ApoM regulates PFKFB3 through the transcription factor SREBF1 to inhibit the proliferation, migration and metastasis of liver cancer cells[J]. *Oncology Letters*, 2022, 24(1): 210.

(收稿日期: 2022-12-08

修回日期: 2023-01-05)