

· 论 著 ·

GPRC5A 在喉癌发生中的生物学作用及机制研究

贾巧静¹, 杨志超¹, 林迪¹, 韩永成², 单春光¹, 王建星^{1*}

(1.河北医科大学第二医院耳鼻喉一科,河北石家庄 050000;2.河北省清河县人民医院耳鼻喉科,河北邢台 054800)

[摘要] 目的 探讨 G 蛋白偶联受体 C 家族 5A(Gprotein-coupled receptor family C, member 5, group A, GPRC5A)在喉癌组织中的表达特征,分析其在喉癌发展进程中的作用及机制。方法 选取河北医科大学第二医院收治的 32 例经病理检查确定为喉鳞状细胞癌患者的喉癌组织及癌旁组织,采用免疫组织化学方法检测 GPRC5A 在喉癌组织及癌旁组织中的表达,并分析其表达特征与患者临床资料的相关性。采用定量聚合酶链式反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)方法对 GPRC5A 在喉癌组织与癌旁组织的表达进行组织水平的验证,在人支气管上皮细胞系 BEAS-2B、喉癌细胞系 TU686 及下咽癌细胞系 Fadu 中进行细胞水平的验证。构建 GPRC5A 过表达质粒 p-GPRC5A,转染至喉癌 TU686 细胞中采用 cell counting kit 8、Transwell 方法检测 GPRC5A 基因过表达对喉癌 TU686 细胞增殖、侵袭及迁移的影响。Western blot 检测 GPRC5A 基因过表达对细胞凋亡相关蛋白表达的影响。Western blot 验证 GPRC5A 基因过表达对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)/STAT3(epidermal growth factor receptor/signal transducer and activator of transcription 3)通路的影响。结果 免疫组织化学结果表明,GPRC5A 在喉癌组织中的阳性表达率显著低于癌旁组织($\chi^2 = 14.190, P < 0.001$)。GPRC5A 在不同肿瘤分期、淋巴结转移、分化程度喉癌组织中表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。GPRC5A 在喉癌组中的表达显著低于癌旁组($t = 3.175, P = 0.003$)。GPRC5A 在喉癌 TU686 和 Fadu 细胞中表达为 BEAS-2B 的(0.73±0.08)和(0.78±0.04)倍,差异有统计学意义($F = 9.060, P = 0.015$); CCK8 结果表明,48 h 后 p-GPRC5A 组的 OD 值为 0.76±0.03,显著低于 NC 组 1.20±0.01 和对照组 1.30±0.08($F = 69.970, P < 0.001$); Transwell 实验表明,p-GPRC5A 组细胞迁移的细胞数为 138.70±10.97,显著低于对照组 251.3±16.9 和 NC 组 247.7±17.5($F = 5731.100, P < 0.001$)。p-GPRC5A 组细胞侵袭的细胞数为 113.00±10.21,显著低于对照组 193.3±10.02 和 NC 组 190.00±7.90($F = 8894.100, P < 0.001$)。Western blot 结果表明,与对照组相比,Caspase3 蛋白在 p-GPRC5A 组表达显著升高($F = 78.880, P < 0.001$),Bcl-2 蛋白在 p-GPRC5A 组的表达显著降低($F = 125.820, P < 0.001$)。EGFR 和 p-STAT3 蛋白在 p-GPRC5A 组的表达显著降低($F = 27.573, P = 0.001; F = 60.614, P < 0.001$)。结论 GPRC5A 在喉癌组织及细胞系中低表达。GPRC5A 基因过表达可抑制喉癌细胞增殖,迁移和侵袭,促进细胞凋亡发生,并抑制 EGFR/STAT3 通路的激活。

[关键词] 喉肿瘤;G 蛋白偶联受体 C 家族 5A;肿瘤进展 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2024.11.014

[中图分类号] R739.65 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2024)11-1322-08

Biological role and mechanism of GPRC5A in the development of laryngeal carcinoma

JIA Qiao-jing¹, YANG Zhi-chao¹, LIN Di¹, HAN Yong-cheng²,

SHAN Chun-guang¹, WANG Jian-xing^{1*}

(1.Department of Otolaryngology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2.Department of Otolaryngology, People's Hospital of Qinghe County, Hebei Province, Xingtai 054800, China)

[收稿日期]2024-03-11

[基金项目]河北省自然科学基金(H2020206475),河北省科技厅民生科技专项(20372401D);河北省卫健委青年科技课题(20221119)

[作者简介]贾巧静(1986-),女,河北石家庄人,河北医科大学第二医院助理研究员,医学硕士,从事喉癌转移机制研究。

* 通信作者。E-mail: jianxingwang2008@163.com

[Abstract] Objective To investigate the expression characteristics of G protein-coupled receptor family C, member 5, group A (GPRC5A) in laryngeal carcinoma tissues, and to explore its role and mechanism in the development of laryngeal carcinoma. **Methods** The expression of GPRC5A in laryngeal carcinoma and para-carcinoma tissues of 32 patients with laryngeal squamous cell carcinoma confirmed in the Second Hospital of Hebei Medical University by pathological examination was detected by immunohistochemistry, and the correlation between its expression characteristics and clinical data was analyzed. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the expression of laryngeal carcinoma tissues and para-carcinoma tissues for validation at the tissue level, and to detect human bronchial epithelial cell BEAS-2B, laryngeal carcinoma cellline TU686 and hypopharyngeal cancer cell Fadu for validation at the cellular level. GPRC5A overexpression plasmid p-GPRC5A was constructed and transfected into TU686 cells. The effects of GPRC5A overexpression on the proliferation, invasion and migration of TU686 cells were detected by Cell counting kit 8 (CCK8) and Transwell methods. Western blot was applied to detect the effect of GPRC5A gene overexpression on the expression of apoptosis-related proteins in cells, and validate the effect of GPRC5A gene overexpression on epidermal growth factor receptor/signal transducer and activator of transcription 3 (EGFR/STAT3) pathway. **Results** Immunohistochemical results showed that the positive expression rate of GPRC5A in laryngeal carcinoma tissues was significantly lower than that in para-carcinoma tissues ($\chi^2 = 14.190$, $P < 0.001$). The differences in the expression of GPRC5A in laryngeal carcinoma was not significant with respect to different tumor stage, lymph node metastasis and differentiation degree ($P > 0.05$). The expression of GPRC5A mRNA in laryngeal carcinoma group was significantly lower than that in para-carcinoma group ($t = 3.175$, $P = 0.003$). The expression of GPRC5A in TU686 cells and Fadu cells was (0.73 ± 0.08) and (0.78 ± 0.04) times that of BEAS-2B respectively, with a significant difference ($F = 9.060$, $P = 0.015$). The CCK8 results indicated that after 48 h, the OD of the p-GPRC5A group was (0.76 ± 0.03), which was significantly lower than that of the NC group (1.20 ± 0.01) and the control group (1.30 ± 0.08) ($F = 69.970$, $P < 0.001$). Transwell experiment showed that the number of cells migrated in p-GPRC5A group was (138.70 ± 10.97), which was significantly lower than that in control group (251.3 ± 16.9) and NC group (247.7 ± 17.5) ($F = 5\ 731.100$, $P < 0.001$). The number of cells invaded in p-GPRC5A group was (113.00 ± 10.21), which was significantly lower than that in control group (193.30 ± 10.02) and NC group (190.00 ± 7.90) ($F = 8\ 894.100$, $P < 0.001$). Western blot results showed that the protein expression of Caspase 3 in p-GPRC5A group was significantly higher than that in control group ($F = 78.880$, $P < 0.001$), and the expression of Bcl-2 protein in p-GPRC5A group was significantly decreased ($F = 125.820$, $P < 0.001$). The expression of EGFR and p-STAT3 in p-GPRC5A group was significantly lower ($F = 25.573$, $P = 0.001$; $F = 60.614$, $P < 0.001$). **Conclusion** GPRC5A has a low expression level in laryngeal carcinoma tissues and cell lines. Overexpression of GPRC5A can inhibit the proliferation, migration and invasion of laryngeal carcinoma cells, promote cell apoptosis, and inhibit the activation of EGFR/STAT3 pathway.

[Key words] laryngeal neoplasms; G protein-coupled receptor family C, member 5, group A; tumor progression

喉癌是一种常见的头颈部恶性肿瘤,以鳞状细胞癌多见。根据 GLOBOCAN 的最新报道,2020 年全球范围内估计有 184 615 例喉癌新患者,大约有

99 840 例喉癌死亡患者^[1]。虽然化疗、放疗和手术治疗的方法已经取得了重大进展,但由于其潜在的易转移和复发率,喉癌患者 5 年生存率仍然低于

50%。因此,阐明喉癌的发生发展机制对于探讨喉癌新的治疗方法有重要意义。G蛋白偶联受体C家族第5组成员A(G-protein-coupled receptor, family C, group 5 member A, GPRC5A)是一种全反式维甲酸诱导蛋白,首次报道是在口腔鳞癌UMSCC-22B细胞系中作为全转维甲酸-(ATRA-)应答基因^[2]。研究发现,GPRC5A基因位于染色体12p13-p12.3,可编码40 000的蛋白^[3]。GPRC5A在肿瘤发生、发展过程中扮演重要角色,可参与肿瘤发生,细胞凋亡,免疫及炎症反应等过程。由于肿瘤的异质性,GPRC5A在不同类型肿瘤中的表达特征也存在差异。信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)在头颈部鳞状细胞癌中被过度激活,且与不良预后密切相关^[4]。STAT3信号可以驱动促进细胞增殖和存活的基因以及编码促进免疫抑制的生长因子和细胞因子的基因的表达^[5]。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)属于酪氨酸激酶受体ERBB家族。EGFR信号级联是细胞增殖、分化、分裂、生存和癌症发展的关键调控因子^[6]。本研究旨在阐明GPRC5A在喉癌组织中的表达特征,并从细胞水平进行验证,探究GPRC5A通过EGFR/GPRC5A在喉癌发生及细胞凋亡过程的作用及机制。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 免疫组织化学实验所用的喉癌组织与癌旁组织均选取于2018年1月—2021年6月在河北医科大学第二医院耳鼻喉一科经外科手术切除的32例病理检查确诊为喉鳞状细胞癌的患者,均为男性,年龄62~78岁,平均(65.38±2.47)岁。根据国际抗癌协会分期标准,I期14例,II期10例,III、IV期8例;高分化20例,中分化7例,低分化5例。无淋巴结转移患者24例,淋巴结转移者8例。以32例喉鳞状细胞癌的癌旁组织(距喉癌肿瘤边缘>0.5 cm处)为对照组。qPCR实验使用的喉癌组织来源于2022年9月—2023年12月进行手术治疗的喉癌患者,样本保存于-80℃冰箱中。

本研究经河北医科大学第二医院医学伦理道德委员会批准执行。

1.2 方法

1.2.1 实验试剂与细胞 MEM细胞培养基、RPM1640培养基及DMEM培养基均购自Gibco;双抗、蛋白裂解液RIPA和BCA蛋白浓度测定试剂盒、Trizol、胰蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公

司,胎牛血清购买于依科赛生物科技公司,Hieff qPCR SYBR Green Master Mix(No Rox)试剂盒、Hifair II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR试剂盒购买于翌圣生物科技(上海)股份有限公司,一抗GPRC5A,EGFR,p-STAT3(Ser727),Bcl-2,Caspase3购自Affinity公司,一抗GAPDH购自Proteintech,二抗Dylight800购自Abbkine。Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡试剂盒购自江苏凯基生物。Matrigel基质胶购自美国BD。cell counting kit 8(CCK8)检测试剂盒购自李记生物科技有限公司。Lipofectamine3000购自Thermo。人喉癌细胞TU686细胞购自赛百慷生物技术股份有限公司。人支气管上皮细胞BEAS-2B购自海星生物。Fadu细胞系为我科室液氮中保存的下咽癌细胞。

1.2.2 免疫组织化学 32例喉癌组织及相应的癌旁组织使用4%多聚甲醛室温固定过夜,经石蜡包埋后,制成蜡块。石蜡切片,切片脱蜡及水合,抗原修复,去除内源性过氧化物酶,血清封闭后,加一抗GPRC5A(1:50)置于湿盒内,4℃静置过夜,PBS洗涤3遍后滴加二抗,室温孵育1h,苏木精复染,用1%盐酸酒精分化,脱水透明,中性树胶封片,镜检。阳性评判标准为:细胞质染色呈黄色或棕褐色颗粒状。(0)表示无着色或者阳性着色细胞小于10%;(+)表示有10%轻微阳性着色的细胞,(++)表示阳性着色细胞大于10%,(+++表示有超过10%的细胞为强阳性着色。其中,(0)和(+)均表示低表达,(++)和(+++)均表示高表达。

1.2.3 细胞培养与转染 TU686细胞培养于含有10%胎牛血清,1%双抗的RPM1640细胞培养基中。Fadu细胞培养于含有10%胎牛血清,1%双抗的MEM细胞培养基中。BEAS-2B细胞培养于含有15%胎牛血清,1%双抗的DMEM细胞培养基中。培养条件均为37℃,CO₂含量为5%,湿度95%。待细胞生长至80%~90%,传代至6孔板,细胞浓度为2.0×10⁵个/mL。p-GPRC5过表达质粒购自重庆优宝生物技术股份有限公司。采用Lipofectamine 3000转染试剂进行质粒转染,转染过程参照说明书。转染48h后收取细胞,进行后续实验。

1.2.4 qPCR RNA提取采用Trizol法提取。各组转染的细胞后用PBS洗涤2次,每孔加入1 mL TRizol用于RNA提取。采用Nano Drop2000/2000c进行RNA浓度测定。喉癌组织与癌旁组织取绿豆粒大小组织块用DEPC水冲洗,然后加入

1 mL TRizol 匀浆处理 30 s, 提取方法与细胞提取方法一致。cDNA 第一条链的合成参照 Hifair II 1st Strand cDNA 合成试剂盒说明书进行 cDNA 合成。采用 Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒进行 qPCR 实验。反应体系见说明书。反应程序为: 95℃, 5 min; 95℃, 10 s; 60℃, 20 s; 72℃, 20 s, 40 个循环; 溶解曲线为 Roche LightCycler 480 系统默认程序。GAPDH 为内参基因。引物序列为: GPRC5A-F: 5'-GCTGCTCACAAAGCAACGAA-3'; GPR5A-R: 5'-ATAGAGCGTGTCCCCTGTCT-3'; GAPDH-F: 5'-AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT-3'; GAPDH-R: 5'-CCCCACTTGATTTTGGAGGGA-3'。目的基因的相对表达量根据内参基因 GAPDH 的 mRNA 表达量和 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。

1.2.5 CCK8 TU686 细胞分为未转染组(对照组, Control), 转染 p-GPRC5A 和 pcDNA3.1(作为阴性对照组, 简称 NC 组)。转染 48 h 后, 使用胰蛋白酶消化细胞, 计数制成细胞悬液, 接种至 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 接种密度为 1 000 个细胞/每孔。分别在接种后 12 h, 24 h, 48 h 加入 100 μ L 含 10% CCK-8 的 MEM 培养基, 以换液的形式加入 CCK8 试剂, 4 h 后用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(optical density, OD)值。

1.2.6 Transwell 用 4℃ 预冷的无血清培养基 RPM1640 稀释冰上过夜融化的 matrigel 至终浓度为 1 g/L。在 chamber 小室上室垂直加入 100 μ L 稀释后的 matrigel, 37℃ 孵育 4 h 使其干成胶状。转染 48 h 后的各组细胞经胰蛋白酶消化后, PBS 洗涤 2 次, 用无血清 RPM1640 悬浮细胞, 调整细胞浓度为 2×10^5 个/mL, 在下室加入 700 μ L 含 20% FBS 的 RPM1640 培养基, 上室加入 200 μ L TU686 细胞悬液, 继续培养 48 h。取出 chamber 小室, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 清洗后, 加入

800 μ L 1% 结晶紫染液中室温染色 20 min, 清水洗涤 chamber 小室数次, 吸干上室液体, 用棉签小心擦去上室膜上表面的细胞, 正置于载玻片上显微镜下进行拍照, 计数。细胞迁移实验不使用 matrigel 基质胶, 其他步骤同侵袭实验。

1.2.7 Western blot 收集各组处理细胞经 PBS 洗涤 2 次, 加入适量高效 RIPA 蛋白裂解液裂解, 经 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度, 加入适量 5 蛋白上样缓冲液, 99℃ 金属浴 10 min, 样本蛋白经 10% SDS-PAGE 分离, 120 V 转至 PVDF 膜上, 5% BSA 封闭液于室温封闭 1 h 后, TBST 洗涤 2 次, 每次 10 min, 用 TBST 稀释的一抗(1:1 000) 4℃ 孵育过夜。PVDF 膜经 TBST 洗涤 2 次后, 采用 Dylight800 二抗室温避光孵育 1 h, TBST 洗涤 2 次, 每次 10 min, 使用 Odyssey 进行 PVDF 膜扫描。Image J 软件进行灰度值分析, 以目的蛋白灰度值与内参 GAPDH 灰度值的比值表示蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 24.0 统计软件分析数据。所有数据在分析前采用 Kolmogorov-Smirnov 检验和 Bartlett 检验来确定其正态性和同质性。计数资料比较采用 χ^2 检验。计量资料比较采用 *t* 检验、单因素方差分析和 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GPRC5A 在喉癌中的表达特征及临床参数分析 GPRC5A 在癌旁组织的细胞膜和细胞核中均有表达, 见图 1。GPRC5A 在喉癌组织中的高表达率低于癌旁组织, 差异有统计学意义($\chi^2 = 14.190$, $P < 0.001$), 见表 1。GPRC5A 在不同临床分期、分化程度及有无淋巴结转移喉癌组织中的表达差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 2。

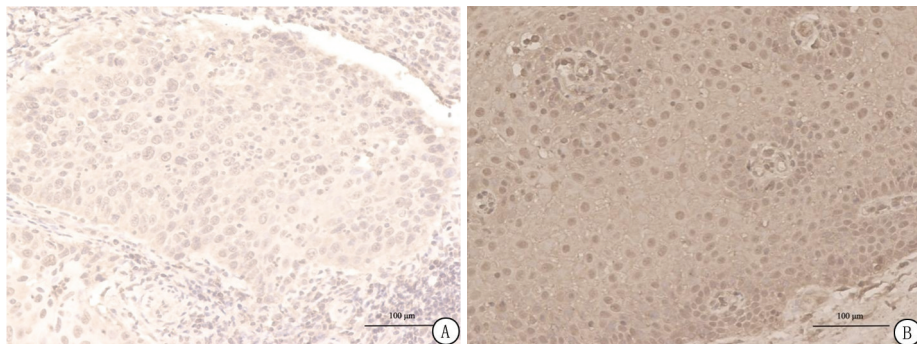


图 1 GPRC5A 在喉鳞状细胞癌组织及癌旁组织中的表达(免疫组织化学 $\times 100$)

A. 喉癌组织; B. 癌旁组织

Figure 1 The expression of GPRC5A in laryngeal squamous cell carcinoma tissue and paracarcinoma tissues (Immunohistochemistry $\times 100$)

qPCR 验证结果显示, 与癌旁组织相比, GPRC5A 在喉癌组织中整体呈现低表达($t = 3.175$,

$P = 0.003$), 见表 3。GPRC5A 在喉癌 TU686 细胞中的表达为 BEAS-2B 的 (0.73 ± 0.08) 倍, 在 Fadu

细胞中的表达为 BEAS-2B 的 (0.78 ± 0.04) 倍, GPRC5A 在 3 种细胞系中表达差异有统计学意义 $(F=9.060, P=0.015)$, 见表 4。

表 1 GPRC5A 在喉鳞状细胞癌组织中的表达情况

Table 1 Expression of GPRC5A in laryngeal squamous cell carcinoma (n=32, 例数, %)

组别	GPRC5A	
	高表达	低表达
喉癌组织	7(21.87)	25(78.13)
癌旁组织	22(68.75)	10(31.25)
χ^2 值	14.190	
P 值	<0.001	

表 2 GPRC5A 表达在不同临床参数组间的比较

Table 2 Comparison of GPRC5A expression among different clinical parameter groups (n=32, 例数, %)

临床病理参数	例数	高表达	低表达	χ^2 值	P 值
临床分期				0.063	0.805
I~II 期	24	5(20.8)	19(79.2)		
III~IV 期	8	2(25.0)	6(75.0)		
分化程度				1.690	0.439
高分化	20	6(30.0)	14(70.0)		
中分化	7	3(42.9)	4(57.1)		
低分化	5	3(60.0)	2(40.0)		
淋巴结转移				0.204	0.681
有	8	3(37.5)	5(72.2)		
无	24	11(45.8)	13(54.2)		

2.2 GPRC5A 对喉癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响 CCK8 实验结果表明, 与对照组相比, 48 h 后 p-GPRC5A 组的 OD 值显著低于对照组和 NC 组

$(F=69.970, P<0.001)$, 说明 p-GPRC5A 过表达可显著抑制 TU686 细胞增殖, 见表 5。Transwell 实验结果表明(图 2), p-GPRC5A 组细胞迁移的细胞数显著低于对照组和 NC 组 $(F=5731.100, P<0.001)$ 。p-GPRC5A 组细胞侵袭的细胞数显著低于对照组和 NC 组 $(F=8894.100, P<0.001)$, 见表 5。由此可知, GPRC5A 过表达可抑制喉癌细胞生长, 具有抑制肿瘤发展的作用。

表 3 GPRC5A 在喉癌组织与癌旁组织中相对表达量

Table 3 The relative expression of GPRC5A in laryngeal squamous cell carcinoma tissues and para-carcinoma tissues (n=21, $\bar{x} \pm s$)

组别	GPRC5A
癌旁组织	0.79±0.26
喉癌组织	0.57±0.16
t 值	3.175
P 值	0.003

表 4 GPRC5A 在不同细胞系中相对表达量

Table 4 The relative expression of GPRC5A in different types of cell lines (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	GPRC5A
BEAS-2B	1.01±0.13
TU686	0.73±0.08*
Fadu	0.78±0.04*
F 值	9.060
P 值	0.015

* P 值<0.05 与 BEAS-2B 比较(SNK-q 检验)

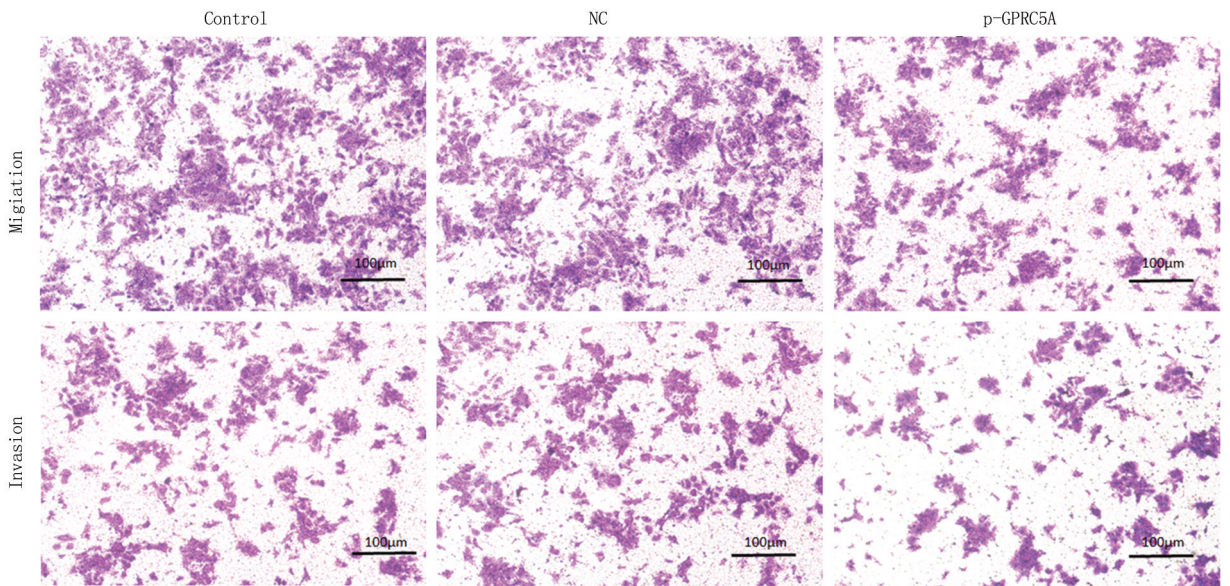


图 2 GPRC5A 过表达抑制 TU686 细胞迁移和侵袭能力(结晶紫染色×100)
Figure 2 Overexpression of GPRC5A inhibiting the migration and invasion of TU686 cells(crystal violet staining×100)

表5 GPRC5A 过表达抑制 TU686 细胞增殖、
迁移和侵袭能力

Table 5 Overexpression of GPRC5A inhibiting the
proliferation, migration and invasion of TU686 cells

(n=3, $\bar{x} \pm s$)			
组别	48 h OD 值	迁移数	侵袭数
对照组	1.30±0.08	251.30±16.90	193.30±10.02
NC 组	1.20±0.02	247.70±17.50	190.00±7.90
p-GPRC5A 组	0.82±0.03*#	138.70±10.97*#	113.00±10.21*#
F 值	69.970	5 731.100	8 894.100
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与对照组比较 # P 值<0.05 与 NC 组比较(SNK-q 检验)

2.3 GPRC5A 对喉癌细胞凋亡的影响 Western blot 检测细胞凋亡相关因子 Caspase3、Bcl-2 在不同分组中的表达,见图 3,表 6。结果发现,Caspase3 在 p-GPRC5A 组的喉癌细胞中的表达高于对照组和 NC 组 ($F = 78.880, P < 0.001$)。Bcl-2 在 p-GPRC5A 组的喉癌细胞中的表达低于对照组和 NC 组 ($F = 125.820, P < 0.001$)。

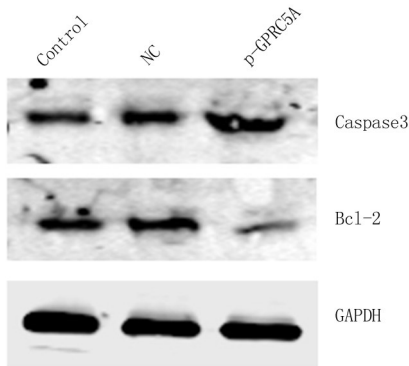


图3 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达

Figure 3 Western blot analysis of apoptosis-related proteins

表6 Caspase3 和 Bcl-2 蛋白的相对表达量

Table 6 The relative expression of Caspase3
and Bcl-2 protein

组别	相对蛋白表达量	
	Caspase3	Bcl-2
对照组	1.00±0.02	1.04±0.04
NC 组	1.06±0.07	1.05±0.07
p-GPRC5A 组	2.59±0.30*#	0.32±0.08*#
F 值	78.880	125.820
P 值	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与对照组比较 # P 值<0.05 与 NC 组比较(SNK-q 检验)

2.4 GPRC5A 对 EGFR/STAT3 信号通路的影响

EGFR 蛋白在 p-GPRC5A 组的喉癌细胞中的表达低于对照组和 NC 组 ($F = 24.573, P < 0.001$)。p-STAT3 蛋白在 p-GPRC5A 组的喉癌细胞中表达

水平低于对照组和 NC 组 ($F = 60.614, P < 0.001$), 见图 4,表 7。

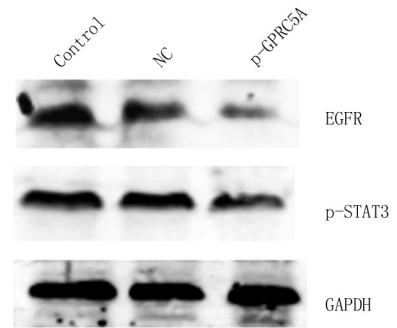


图4 Western blot 检测 EGFR 及 p-STAT3 蛋白表达

Figure 4 Western blot for detection of expression of EGFR
and p-STAT3

表7 EGFR/p-STAT3 蛋白的相对表达量

Table 7 The relative expression of EGFR/p-STAT3 protein

组别	相对蛋白表达量	
	EGFR	p-STAT3
对照组	1.07±0.20	1.08±0.09
NC 组	1.02±0.08	1.01±0.04
p-GPRC5A 组	0.42±0.03*#	0.60±0.02*#
F 值	27.573	60.614
P 值	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与对照组比较 # P 值<0.05 与 NC 组比较(SNK-q 检验)

3 讨 论

GPRC5A,也被称为维甲酸诱导蛋白 3 或视黄酸诱导基因 1^[7],属于 G 蛋白偶联受体家族,主要由 7 个跨膜糖蛋白、胞外区、胞内区构成。因其作用配体尚不明确,又被称为孤儿受体^[8]。GPRC5A 可参与多种细胞事件,如细胞骨架重组、细胞增殖、细胞周期调节、迁移和存活。它在不同的病理过程中起着核心作用,包括肿瘤发生、炎症、免疫反应和组织损伤^[9]。

GPRC5A 的表达异常与肿瘤发生密切相关。在不同部位的肿瘤中,GPRC5A 的表达具有异质性。GPRC5A 在很多肿瘤中作为致癌基因被关注。研究发现,在胰腺癌中 GPRC5A 表达上调,并且 GPRC5A 基因沉默可抑制细胞增殖与迁移^[10]。GPRC5A 在肝细胞癌组织及细胞系中表达下调,且 GPRC5A 过表达可抑制细胞增殖,阻止肝细胞癌细胞系上皮间充质转化的发生,并可促进细胞凋亡和氧化应激,进而发挥 GPRC5A 的抗肿瘤特性,GPRC5A 的低表达与肿瘤大小及肝癌是否转移有关^[11]。同时有研究表明 GPRC5A 通过向溶酶体募

集 mTORC1 激活 mTORC1/p70s6k 信号通路,从而促进多西他赛耐药和三阴性乳腺癌肝转移^[12]。有学者发现,GPRC5A 在口腔鳞癌及部分头颈部鳞状细胞癌中表达下调,GPRC5A 过表达可抑制 STAT3 的激活,进而抑制癌细胞生长。口腔鳞癌分化程度越低,GPRC5A 表达越低^[13]。谭元元等^[14]发现,在喉癌中,GPRC5A 通过调节 STAT3/SOCS3/C-MYC 信号通路,抑制喉癌细胞的增殖和 EMT,诱导细胞氧化应激和凋亡。但对于 GPRC5A 表达对 EGFR/STAT3 信号通路的影响目前还没有相关研究。本研究结果显示,GPRC5A 在喉癌患者的喉癌组织中低表达,在正常癌旁组织中高表达,但 GPRC5A 的低表达与喉癌分化程度和淋巴结转移无差异。Iglesias 等^[9]研究发现,在头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)中 GPRC5A 的低表达特征与肿瘤分期与分级、淋巴结转移等均无差异,但与肿瘤分化程度差异显著。导致这一结果出现的原因一可能是免疫组织化学过程结果的假阴性/阳性导致数据偏差,二在本研究中收集的临床样本数量较少,在统计分析中可能会造成一定的误差。后续可扩大样本量,进行进一步验证。在正常细胞中 GPRC5A 呈现高表达,在喉癌 TU686 细胞及下咽癌 Fadu 细胞中,GPRC5A 表达下降。这一结果与组织水平的验证结果基本一致。

GPRC5A 在肿瘤发生进程中的作用存在差异。GPRC5A 过表达可显著抑制喉癌 TU686 细胞的增殖,迁移及侵袭能力,说明 GPRC5A 在喉癌中是一种抑癌基因,参与喉癌的生物发生过程。在胰腺癌中,GPRC5A 的上调破坏 Hippo 通路,通过 cAMP-CREB 轴促进胰腺癌细胞的增殖和迁移^[15]。在肝癌中,GPRC5A 过表达通过 STAT3/Socs3/c-MYC 通路抑制细胞增殖^[16]。然而在结直肠癌中,GPRC5A 过表达则会刺激癌细胞氧化应激,进而促进肿瘤的发生^[17]。因此 GPRC5A 在肿瘤发生过程中扮演多重角色,调控肿瘤进展。

由于细胞凋亡是一个不可逆的过程,因此细胞凋亡的发生受到高度调控。GPRC5A 在细胞凋亡中角色取决于其与肿瘤发生的关系。本研究探究了 GPRC5A 过表达对细胞凋亡相关因子 Caspase3 和 Bcl-2 的影响,结果发现 GPRC5A 过表达可促进 Caspase3 蛋白表达,并抑制 Bcl-2 蛋白表达。在乳腺癌中,有研究发现 GPRC5A 过表达可促进细胞凋亡,上调 Caspase3 和 Caspase9 的表达,然而 GPRC5A 基因沉默则会抑制细胞凋亡的发生^[18]。

在肝细胞癌中,GPRC5A 基因过表达会抑制细胞增殖和 EMT 发生,促进氧化应激和细胞凋亡的发生^[19]。然而,在胃癌中,GPRC5A 在胃癌组织中表达上调,GPRC5A 的上游调控因子 miR-195 被抑制后,GPRC5A 的表达也会下调,进而降低 Bcl-2 表达,促进细胞凋亡的发生^[20]。在结直肠癌中,高 GPRC5A 与缺氧基因特征和不良临床结果相关,GPRC5A 通过激活 Hippo 通路效应物 YAP 及其抗凋亡靶基因 BCL2L1 来促进缺氧细胞存活^[21]。

EGFR 是一种细胞表面受体,属于酪氨酸激酶 ErbB 家族的成员,在细胞增殖、存活和分化的调控中起着至关重要的作用。信号转导子和转录激活子家族(signal transducer and activator of transcription, STAT family)在细胞信息传递过程中扮演“邮递员”的角色,可将胞外各类因子等的信号传递到细胞核,进而调节细胞的生理和病理活动。EGF 与 EGFR 结合触发该受体与其他 ERBB 成员的同二聚化或异二聚化,导致受体磷酸化和下游效应物如 ERK、PI3K-AKT 和 STAT3 的激活。同时 EGFR 会通过多种信号通路控制各种发育过程,包括 PI3K/Akt、Ras/Raf/MEK/ERK 和 STAT3 通路^[22]。目前有很多文献报道,EGFR/STAT3 可调控肿瘤进展。但在喉癌中目前还没有相关报道。有报道称在肝细胞癌中,HCC 细胞通过激活 EGFR 和刺激 EGFR-stat3-abcb1 轴对乐伐替尼产生耐药性^[23]。Yue 等^[24]发现 2'-羟黄酮具有抗肿瘤作用,通过抑制 STAT3 使人胰腺癌细胞对 EGFR 抑制剂敏感。Li 等^[25]报道抑制 DYRK1A 通过抑制 STAT3/EGFR/Met 信号通路使 EGFR 野生型 NSCLC 细胞对 AZD9291 致敏。在肺癌中,Zhong 等^[26]研究发现,在 Gprc5a(-/-)小鼠肺小细支气管和终末细支气管的正常上皮以及肿瘤中发现 EGFR 和 STAT3 异常,GPRC5A 抑制 EGFR/STAT3 信号通路的激活。在三阴性乳腺癌中,EGFR 单体可能在缺乏跨膜蛋白 TMEM25 的情况下激活信号传感器转录激活 STAT3。而 TMEM25 在人类 TNBC 中经常表达降低,缺乏 TMEM25 使 EGFR 单体能够独立于配体结合磷酸化 STAT3,从而增强 STAT3 的基础激活^[27]。本研究结果发现,GPRC5A 在喉癌细胞中过表达,可抑制 EGFR/STAT3 信号通路的激活,推断 EGFR/STAT3 在 GPRC5A 介导的喉癌发生发展过程中扮演重要角色。

综上所述,GPRC5A 在喉癌组织及喉癌细胞 TU686 和下咽癌细胞 Fadu 中均为低表达,在正常

癌旁组织和支气管上皮细胞中高表达。GPRC5A 可促进 TU686 细胞增殖, 迁移及侵袭, 并抑制细胞凋亡的发生, 其机制可能与 EGFR/STAT3 途径的激活有关。

[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 Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249.
- [2] Cheng Y, Lotan R. Molecular cloning and characterization of a novel retinoic acid-inducible gene that encodes a putative G protein-coupled receptor[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(52):35008-35015.
- [3] Ye X, Tao Q, Wang Y, et al. Mechanisms underlying the induction of the putative human tumor suppressor GPRC5A by retinoic acid[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(10):951-962.
- [4] Zou S, Tong Q, Liu B, et al. Targeting STAT3 in cancer immunotherapy[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):145.
- [5] van Ruitenbeek NJ, van der Woude LL, van Krieken JH, et al. STAT3 as a predictive biomarker in head and neck cancer: A validation study[J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(11):153172.
- [6] Sabbah DA, Hajjo R, Sweidan K. Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors[J]. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20(10):815-834.
- [7] Jiang X, Xu X, Wu M, et al. GPRC5A: an emerging biomarker in human cancer[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018:1823726.
- [8] Ngo T, Kufareva I, Coleman JL, et al. Identifying ligands at orphan GPCRs: current status using structure-based approaches[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(20):2934-2951.
- [9] Iglesias González PA, Valdivieso AG, Santa-Coloma TA. The G protein-coupled receptor GPRC5A—a phorbol ester and retinoic acid-induced orphan receptor with roles in cancer, inflammation, and immunity[J]. *Biochem Cell Biol*, 2023, 101(6):465-480.
- [10] Fang W, Yu X, Deng J, et al. Upregulated GPRC5A disrupting the Hippo pathway promotes the proliferation and migration of pancreatic cancer cells via the cAMP-CREB axis[J]. *Discov Oncol*, 2023, 14(1):17.
- [11] Zhang L, Yang W, Yang J, et al. GPRC5A regulates proliferation and oxidative stress by inhibiting the STAT3/Socs3/c-MYC pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2023, 73(1):43-51.
- [12] Ou X, Tan Y, Xie J, et al. Methylation of GPRC5A promotes liver metastasis and docetaxel resistance through activating mTOR signaling pathway in triple negative breast cancer[J]. *Drug Resist Updat*, 2024, 73:101063.
- [13] Liu S, Ye D, Wang T, et al. Repression of GPRC5A is associated with activated STAT3, which contributes to tumor progression of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17:34.
- [14] 谭元元, 卡衣赛尔·卡哈尔, 程秀琴. GPRC5A 对喉癌细胞增殖、氧化应激和细胞凋亡的影响[J]. *中国医师杂志*, 2021, 23(3):359-359.
- [15] Fang W, Yu X, Deng J, et al. Upregulated GPRC5A disrupting the Hippo pathway promotes the proliferation and migration of pancreatic cancer cells via the cAMP-CREB axis[J]. *Discov Oncol*, 2023, 14(1):17.
- [16] 陈偲, 王颖, 谢生茂, 等. GPRC5A 对肝癌细胞增殖、凋亡和氧化应激的影响及作用机制探讨[J]. *现代检验医学杂志*, 2021, 36(6):10-16.
- [17] Zhang L, Li L, Gao G, et al. Elevation of GPRC5A expression in colorectal cancer promotes tumor progression through VNN-1 induced oxidative stress[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(12):2734-2747.
- [18] Yang L, Zhao S, Zhu T, et al. GPRC5A is a negative regulator of the pro-survival PI3K/Akt signaling pathway in triple-negative breast cancer[J]. *Front Oncol*, 2021, 10:624493.
- [19] Zhang L, Yang W, Yang J, et al. GPRC5A regulates proliferation and oxidative stress by inhibiting the STAT3/Socs3/c-MYC pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2023, 73(1):43-51.
- [20] Liang M, Huang G, Liu Z, et al. Elevated levels of hsa_circ_006100 in gastric cancer promote cell growth and metastasis via miR-195/GPRC5A signaling[J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(5):e12661.
- [21] Greenhough A, Bagley C, Heesom KJ, et al. Cancer cell adaptation to hypoxia involves a HIF-GPRC5A-YAP axis[J]. *EMBO Mol Med*, 2018, 10(11):e8699.
- [22] Mitchell RA, Luwor RB, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: Structure-function informing the design of anticancer therapeutics[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 371(1):1-19.
- [23] Hu B, Zou T, Qin W, et al. Inhibition of EGFR overcomes acquired lenvatinib resistance driven by STAT3-ABCB1 signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(20):3845-3857.
- [24] Yue Y, Qian W, Li J, et al. 2'-Hydroxyflavone inhibits the progression of pancreatic cancer cells and sensitizes the chemosensitivity of EGFR inhibitors via repressing STAT3 signaling[J]. *Cancer Lett*, 2020, 471:135-146.
- [25] Li YL, Ding K, Hu X, et al. DYRK1A inhibition suppresses STAT3/EGFR/Met signalling and sensitizes EGFR wild-type NSCLC cells to AZD9291[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11):7427-7437.
- [26] Zhong S, Yin H, Liao Y, et al. Lung tumor suppressor GPRC5A binds EGFR and restrains its effector signaling[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(9):1801-1814.
- [27] Bi J, Wu Z, Zhang X, et al. TMEM25 inhibits monomeric EGFR-mediated STAT3 activation in basal state to suppress triple-negative breast cancer progression[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1):2342.