

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.003

· 基础研究 ·

G 蛋白偶联受体激酶 3 在口腔鳞状细胞癌细胞增殖、迁移和侵袭中的作用及其可能的机制

张晗, 罗清琼, 朱丽萍, 陈福祥 (上海交通大学医学院附属第九人民医院 检验科, 上海 200011)

[摘要] **目的:** 探讨沉默 G 蛋白偶联受体激酶 3 (G protein-coupled receptor kinase 3, GRK3) 对口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其可能的机制。**方法:** 利用 Oncomine 数据库分析 GRK3 在正常口腔组织及 OSCC 组织中的表达水平。用 RNA 干扰技术敲降 GRK3 在 OSCC 细胞 WSU-HN6 和 CAL27 中的表达, 用 qPCR 法验证干扰效率后, 采用 CCK-8 法和流式细胞术分别检测敲降 GRK3 对 OSCC 细胞增殖和凋亡的影响, Transwell 小室法检测对 OSCC 细胞迁移、侵袭能力的影响, qPCR 法检测对 OSCC 细胞周期、上皮间质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 相关分子 mRNA 水平表达的影响, WB 法检测 EMT 及 MMP 相关分子的蛋白表达水平变化。**结果:** OSCC 组织中 GRK3 的表达水平显著高于正常口腔组织 ($P < 0.01$)。转染 si-GRK3 后, OSCC 细胞中 GRK3 mRNA 表达水平平均下调 70% 以上。敲降 GRK3 可显著抑制 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力 (均 $P < 0.01$), 对细胞凋亡无显著影响 ($P > 0.05$)。敲降 GRK3 表达后, OSCC 细胞的 G0/G1 期比例显著增高 ($P < 0.01$), 细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、Cyclin D3、细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinases 2, CDK2) 和 CDK4 基因的 mRNA 表达降低 (均 $P < 0.05$); EMT 相关分子波形蛋白 (Vimentin)、Zeb1 和 Slug 表达降低, E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达升高 (均 $P < 0.05$); MMP3 和 MMP9 表达降低 (均 $P < 0.05$), MMP2 和 MMP7 表达无明显变化 (均 $P > 0.05$)。**结论:** GRK3 可通过调节细胞周期促进 OSCC 细胞的增殖能力, 并通过调控 EMT 和 MMP 增强细胞的迁移和侵袭能力。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; G 蛋白偶联受体激酶 3; 增殖; 迁移; 侵袭; 上皮-间质转化; 基质金属蛋白酶

[中图分类号] R739.85; R730.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)05-0435-08

Role of G protein-coupled receptor kinase 3 in the proliferation, migration and invasion of oral squamous carcinoma cells and its possible mechanism

ZHANG Han, LUO Qingqiong, ZHU Liping, CHEN Fuxiang (Department of Clinical Laboratory, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of silencing G protein-coupled receptor kinase 3 (GRK3) on the proliferation, migration and invasion of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells and the possible underlying mechanisms. **Methods:** GRK3 expression levels in normal oral tissues and OSCC tissues were analyzed using Oncomine database. RNA interference technology was used to down-regulate GRK3 expression in OSCC cell lines WSU-HN6 and CAL27. The interference efficiency was verified by qPCR. The effects of knockdown of GRK3 on proliferation and apoptosis of OSCC cells were detected by CCK-8 assay and Flow cytometry, respectively; the effects on migration and invasion abilities of OSCC cells were determined by Transwell assay; and the effects on mRNA expression levels of molecules associated with cell cycle, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and matrix metalloproteinase (MMP) were determined by qPCR. The changes in protein levels of molecules associated with EMT and MMP were detected using WB assay. **Results:** GRK3 expression level in OSCC tissues was significantly higher than that in normal oral tissues ($P < 0.01$). After being transfected with si-GRK3, the mRNA expression of GRK3 in OSCC cells was down-regulated by more than 70%. Silencing GRK3 significantly inhibited the proliferation, migration and invasion of OSCC cells (all $P < 0.01$), but had no significant effect on apoptosis ($P > 0.05$). After down-regulation of GRK3, the percentage of OSCC cells in G0/G1 phase was significantly increased ($P < 0.01$); the mRNA expression levels of Cyclin D1, Cyclin D3, CDK2 and CDK4 were decreased (all $P < 0.05$); expression levels of EMT-related proteins (Vimentin, Zeb1 and Slug) were decreased, while E-cadherin was increased (all $P < 0.05$); MMP3 and MMP9 were decreased

[基金项目] 上海市“医苑新星”青年医学人才培养计划: 青年医学人才类——临床检验项目资助 (No. 沪卫人事 [2020] 087 号); 上海交通大学医学院附属第九人民医院院级基金——基础研究助推计划资助 (No. JYZZ040)。Project supported by the Young Medical Talents-Clinical Laboratory Projects of Shanghai “Rising Stars of Medical Talent” Youth Development Program (No. Shanghai Municipal Health Personnel [2020] 087), and the Basic Research Boost Program of the Fundamental Research Program Funding of Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (No. JYZZ040)

[作者简介] 张晗 (1987-), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事肿瘤免疫相关研究, E-mail: zhanghan4015@163.com

[通信作者] 陈福祥 (CHEN Fuxiang, corresponding author), 博士, 主任技师, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤发生发展机制的研究, E-mail: chenfx@sjtu.edu.cn

(all $P < 0.05$), while MMP2 and MMP7 showed no significant changes (all $P > 0.05$). **Conclusion:** GRK3 promotes the proliferation of OSCC cells by regulating cell cycle-related molecules and enhances the migration and invasion through regulating EMT and MMPs.

[Key words] oral squamous cell carcinoma (OSCC); G protein-coupled receptor kinase 3 (GRK3); proliferation; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition (EMT); matrix metalloproteinase (MMP)

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(5): 435-442. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.003]

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 每年有超过 30 万的新发病例^[1]。虽然目前在诊断、治疗和改善患者病死率等方面取得了一定的临床进展, 但 OSCC 患者的 5 年生存率仍只有 50% 左右, 其主要原因是肿瘤复发和远处转移^[2]。因此, 阐明 OSCC 发生发展的分子机制对提高治疗效果至关重要。G 蛋白偶联受体激酶 3 (G protein-coupled receptor kinase 3, GRK3), 又称 β 肾上腺素受体激酶 2 (beta-adrenergic receptor kinase 2, BARK2), 是 G 蛋白偶联受体磷酸化和脱敏过程中发挥关键作用的 GRK 亚型之一^[3]。GRK3 在神经系统中具有较强的生物学效应, 目前已在动物模型中证实 GRK3 可参与调节味觉神经元和帕金森疾病^[4-5]。近年来, GRK3 在肿瘤发生发展中的作用日益受到关注。GRK3 在前列腺癌和结肠癌中异常高表达, 在肿瘤增殖、侵袭和转移等恶性进程中发挥重要作用, 与患者预后呈负相关^[6-7]。然而, GRK3 在乳腺癌、肝细胞癌和胰腺导管癌中表达降低, 负向调控肿瘤的转移能力^[8], 其表达水平与患者预后呈正相关^[9-10]。以上研究表明, GRK3 在不同肿瘤中的表达和作用有一定的组织特异性, 然而 GRK3 在 OSCC 中的作用及其机制尚少见文献报道。因此, 本研究首先利用 Oncomine 数据库分析 GRK3 在 OSCC 组织中的表达水平, 再进一步探索其在 OSCC 细胞增殖、迁移和侵袭中的作用及可能机制, 旨在为揭示 OSCC 的发生发展机制和开发潜在治疗靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂、仪器

人 OSCC 细胞株 WSU-HN6 和 CAL27 分别来源于美国国立卫生研究院 (NIH) 和美国 ATCC 细胞库。本研究所用的其他细胞株均由上海市口腔医学重点实验室提供。

DMEM 培养基、胎牛血清和 0.25% 胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司, siRNA 干扰序列及转染试剂盒购自广州锐博生物技术公司 (si-GRK3 序列为 5'-GAAAGCCUUCGAGGUGACATT-3', 阴性对照 si-NC 为 5'-GCGCAAUCGGACGUUAAATT-3'), CCK-8 试剂盒购自日本同仁公司, 细胞凋亡试剂盒购自江苏凯基生物技术公司, 细胞周期试剂盒购自

美国 BD 公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, PCR 引物由上海生工生物工程公司合成, TRIzol 试剂、定量 PCR 试剂盒及反转录试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司, Vimentin、E-Cadherin、MMP3 和 MMP9 抗体均购自美国 CST 公司, GAPDH 抗体及辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的 IgG 均购自上海联科生物公司。

流式细胞分析仪 (Canto II) 购自美国 BD 公司, qPCR 仪 (7500) 购自美国 ABI 公司, 多功能酶标仪 (iMark 680) 购自美国 Bio-Rad 公司, WB 曝光仪 (Tanon-5200 Multi) 购自上海天能公司。

1.2 利用 Oncomine 数据库分析 GRK3 在 OSCC 组织中的表达水平

从 Oncomine 数据库 (<http://www.oncomine>) 搜索 OSCC 中 GRK3 表达的数据, 设定搜索条件为 (1) Gene: GRK3 (ADRBK2); (2) Analysis Type: Cancer vs. Normal Analysis; (3) Cancer Type: Head and Neck Cancer; (4) Data Type: mRNA; (5) Dataset Size: 75-150 samples; (6) Sample Type: Clinical Specimen。随后选择符合条件的 Peng Head-Neck 数据集^[11], 其中包含 22 例正常口腔组织和 57 例 OSCC 组织。记录每例样本中 GRK3 基因的 mRNA 表达水平 (\log_2 median-centered intensity), 利用软件绘图并进行统计分析。

1.3 细胞培养与 siRNA 转染

WSU-HN6 和 CAL27 细胞在含 10% FBS 和 1% 青/链霉素的 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中进行常规培养。

取对数生长期的 WSU-HN6 和 CAL27 细胞, 接种于 6 孔板 (3×10^5 个/孔), 培养 24 h 后细胞汇合度达 50%~60%, 按照转染试剂说明书进行 siRNA 转染, 分别将阴性对照 siRNA (si-NC) 和敲降 GRK3 的 siRNA (si-GRK3) 转染至 OSCC 细胞。

1.4 CCK-8 法检测敲降 GRK3 对 OSCC 细胞增殖能力的影响

将转染 siRNA 24 h 后的 WSU-HN6 和 CAL27 细胞接种于 96 孔板 (6×10^3 个/孔), 每组设置 5 个复孔, 在 5% CO₂、37 °C 培养箱中分别培养 24、48、72 和 96 h。每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液, 继续孵育 2 h 后, 酶标仪上检测波长 450 nm 处的光密度 (D) 值。以 D 值表示细胞的增殖能力。

1.5 流式细胞术检测敲降 GRK3 对 OSCC 细胞凋亡和细胞周期的影响

分别消化、收集 si-NC 组和 si-GRK3 组的 OSCC 细胞,用 4 °C 预冷的 PBS 洗涤 2 次。加入 1×结合缓冲液,调整细胞密度为 1×10^6 个/ml。取 100 μ l 细胞悬液,分别加入 5 μ l PI 和 5 μ l Annexin V-APC,室温避光孵育 15 min,加入 300 μ l 1×结合缓冲液,1 h 内用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

胰酶消化、收集各组细胞, PBS 洗涤后加入 70% 预冷乙醇, 4 °C 固定过夜。染色前用 PBS 洗去固定液,细胞沉淀中加入 300 μ l 含 PI/Rase 的染色液,室温避光孵育 30 min,用流式细胞仪检测细胞周期。

1.6 Transwell 实验检测敲降 GRK3 对 OSCC 细胞迁移、侵袭能力的影响

细胞迁移和侵袭实验分别采用孔径 8 μ m 的普通 Transwell 小室和预铺基质胶 (Marigel) 的 Transwell 小室。取转染 siRNA 24 h 后的 WSU-HN6 和 CAL27 细胞,用无血清 DMEM 培养基调整细胞密度为 5×10^5 个/ml,取 200 μ l 细胞悬液加入 Transwell 上室,向 Transwell 下室中加入 600 μ l 含有 10% FBS 的 DMEM 培养基。于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 24 h,用棉签拭去上室内的细胞,4% 多聚甲醛固定 10 min,0.5% 结晶紫染色 20 min,漂洗并干燥。在倒置相差显微镜下 ($\times 100$) 观察并拍照,并随机选取 5 个视野进行计数。以 si-NC 组的细胞数量进行标化,计算迁移或侵袭细胞数量的倍数改变。

1.7 qPCR 法检测敲降 GRK3 对 OSCC 细胞 GRK3 表达及细胞周期、EMT 和 MMP 相关分子 mRNA 水平表达的影响

OSCC 细胞转染 siRNA 72 h 后,用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, Nanodrop 2000 检测浓度和纯

度。用反转录试剂盒合成 cDNA 后,按照 qPCR 试剂盒说明书在 ABI 7500 仪器上进行 qPCR 反应,每个样本设置 3 个复孔。引物序列见表 1。qPCR 反应条件: 95 °C 30 s、95 °C 5 s、60 °C 34 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达水平。

1.8 WB 法检测敲降 GRK3 对 OSCC 细胞 EMT 和 MMP 相关分子蛋白水平表达的影响

转染 72 h 后, RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。每个泳道上样等量蛋白,经 10% SDS-PAGE,转 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入均以 1 : 1 000 稀释的 Vimentin、E-cadherin、MMP3、MMP9 和 GAPDH 等的一抗,4 °C 孵育过夜。次日漂洗后,加入 HRP 标记的羊抗兔或抗鼠 IgG (1 : 5 000),室温孵育 1 h,洗膜后经 ECL 显影,用 ImageJ 软件进行蛋白条带的灰度分析。

1.9 统计学处理

1.4~1.8 实验均独立重复 3 次。采用 SPSS 19.0 软件分析,用 GraphPad Prism 6 软件绘图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

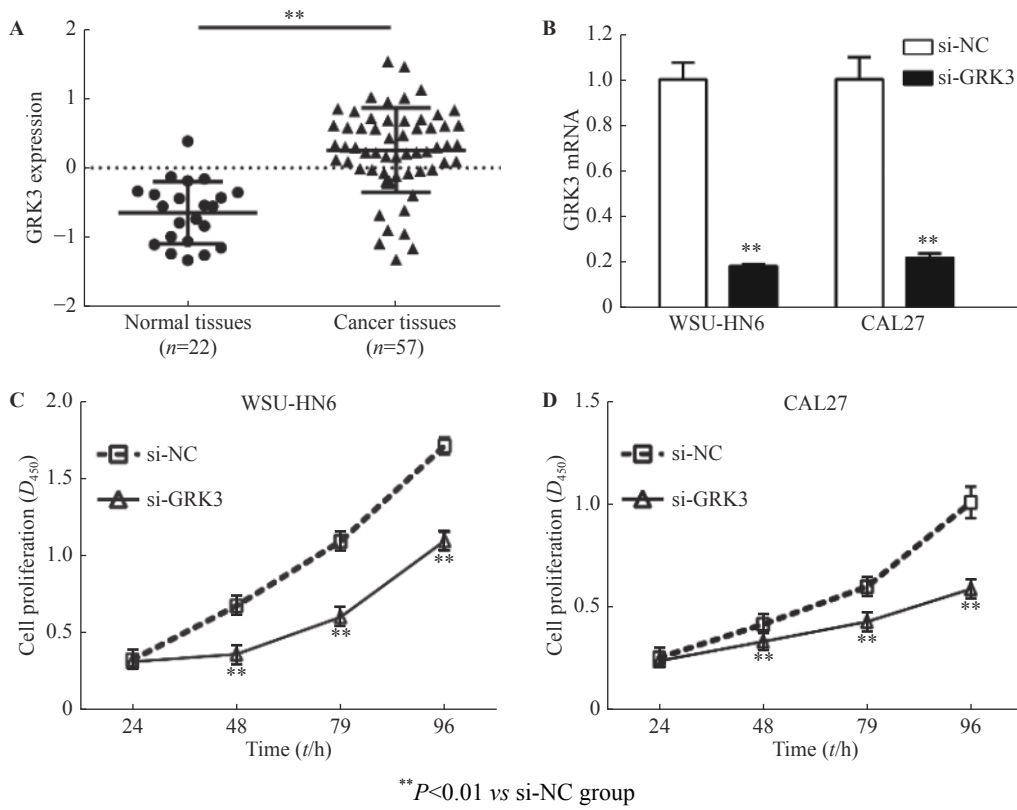
2.1 GRK3 在 OSCC 组织中呈高表达

利用 Oncomine 数据库筛选符合条件的数据集 (Peng Head-Neck),该数据集包含 22 例正常口腔组织和 57 例 OSCC 组织,对其 GRK3 基因的 mRNA 表达水平 (\log_2 median-centered intensity) 进行统计分析。结果显示,GRK3 在 OSCC 组织中的表达水平显著高于正常口腔组织 ($t=6.336$, $P < 0.01$; 图 1A)。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Cyclin D1	TCTACACCGACAACCTCCATCCG	TCTGGCATTTTGGAGAGGAAGTG
Cyclin D3	AGATCAAGCCGCACATGCGGAA	ACGCAAGACAGGTAGCGATCCA
CDK2	ATGGATGCCTCTGCTCTCACTG	CCCGATGAGAATGGCAGAAAGC
CDK4	CCATCAGCACAGTTCGTGAGGT	TCAGTTCGGGATGTGGCACAGA
Vimentin	AGGCAAAGCAGGAGTCCACTGA	ATCTGGCGTTCCAGGGACTCAT
Zeb1	GGCATAACCTACTCAACTACGG	TGGGCGGTGTAGAATCAGAGTC
E-Cadherin	GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAG	TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG
Slug	ATCTGCGGCAAGGCGTTTTCCA	GAGCCCTCAGATTTGACCTGTC
MMP2	AGCGAGTGGATGCCGCTTTAA	CATTCCAGGCATCTGCGATGAG
MMP3	CACTCACAGACCTGACTCGGTT	AAGCAGGATCACAGTTGGCTGG
MMP7	TCGGAGGAGATGCTCACTTCGA	GGATCAGAGGAATGTCCCATAACC
MMP9	GCCACTACTGTGCCTTTGAGTC	GGATCAGAGGAATGTCCCATAACC
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCTGTTGCTGTAGCCAA



A: The mRNA level of GRK3 in normal oral tissues and OSCC tissues; B: Interference efficiency of GRK3 mRNA expression in OSCC cells was determined using qPCR; C and D: CCK-8 assay was performed to detect the proliferation of OSCC cells

图 1 GRK3 在 OSCC 组织中的表达及敲降 GRK3 对 OSCC 细胞增殖的影响

Fig.1 The expression level of GRK3 in OSCC tissues and the effect of GRK3 silence on the proliferation of OSCC cells

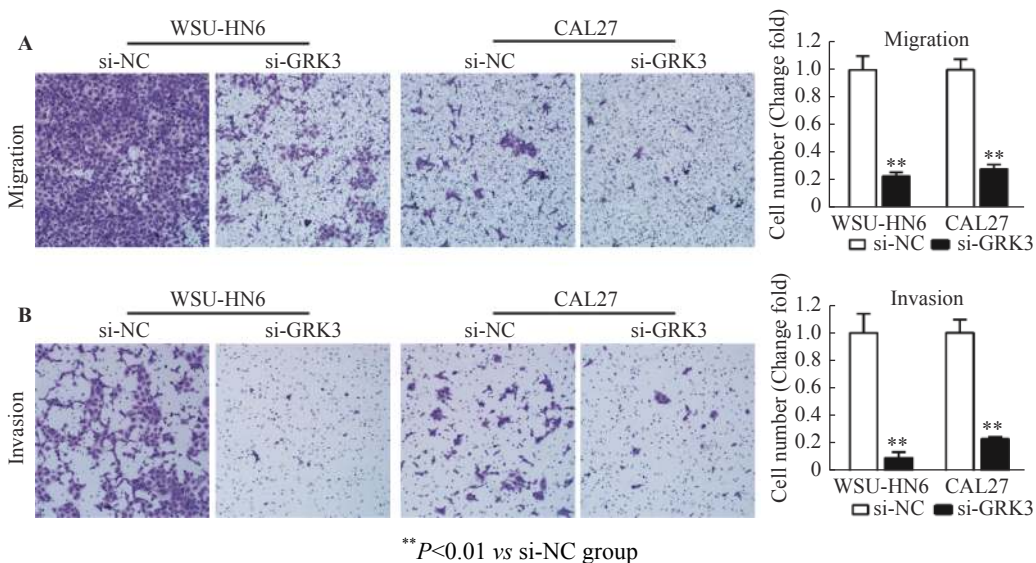
2.2 敲降 GRK3 抑制 OSCC 细胞的增殖能力

转染 siRNA 后, si-GRK3 组 WSU-HN6 和 CAL27 细胞的 GRK3 mRNA 表达水平均显著低于 si-NC 组, 下调达 70% 以上 ($t=15.44$ 、 11.14 , 均 $P<0.01$; 图 1B), 表明转染 siRNA 后已成功敲降 GRK3 表达。CCK-8 实验结果 (图 1C、D) 显示, si-GRK3 组 WSU-HN6 和 CAL27 细胞的增殖能力自第 48 h 起均

显著低于 si-NC 组 ($t_{48h}=22.64$ 、 9.159 , 均 $P<0.01$; $t_{72h}=20.70$ 、 13.70 , 均 $P<0.01$; $t_{96h}=13.01$ 、 9.004 , 均 $P<0.01$)。

2.3 敲降 GRK3 抑制 OSCC 细胞的迁移和侵袭

Transwell 实验结果 (图 2) 显示, si-GRK3 组 WSU-HN6 和 CAL27 细胞的迁移 ($t=13.01$ 、 14.86 , 均 $P<0.01$) 和侵袭 ($t=10.94$ 、 13.76 , 均 $P<0.01$) 能力均显著低于 si-NC 组。



A: Migration ability of OSCC cells ($\times 100$); B: Invasion ability of OSCC cells ($\times 100$)

图 2 敲降 GRK3 对 OSCC 细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig.2 The effects of migration knocking down GRK3 on the and invasion abilities of OSCC cells

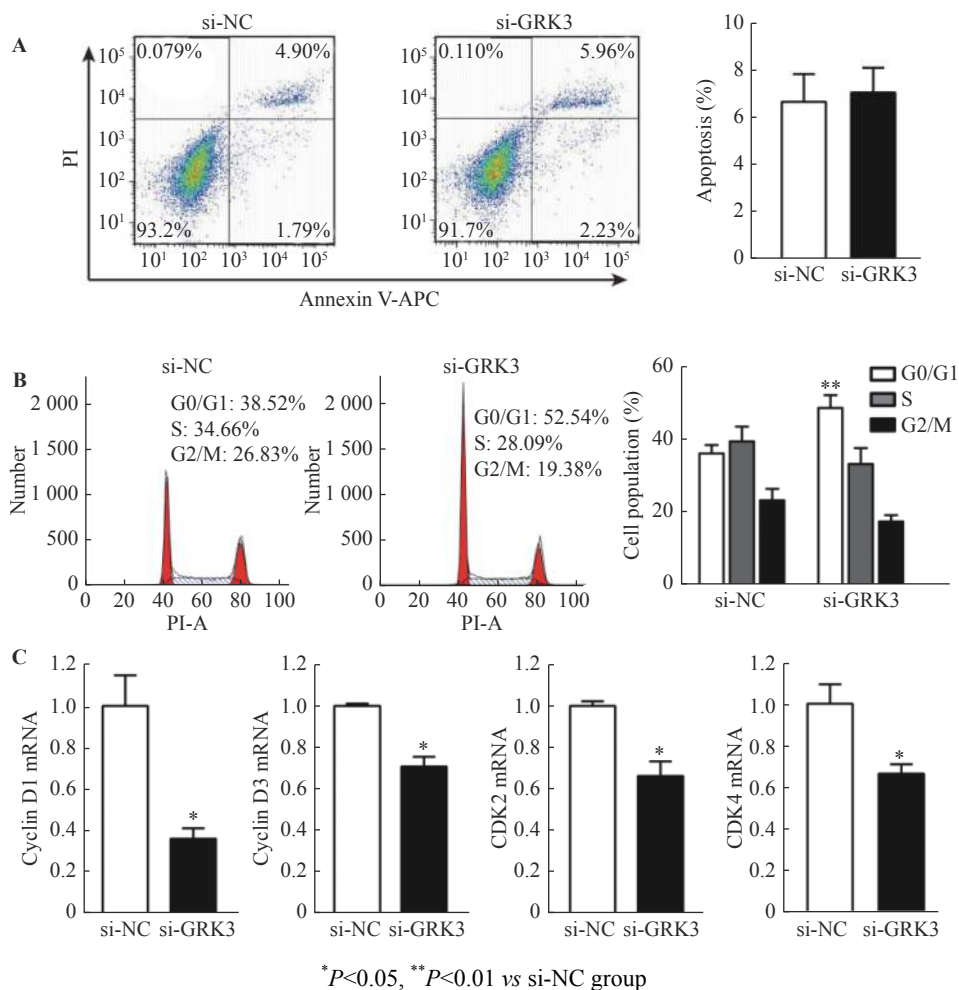
2.4 敲降 GRK3 可导致 OSCC 细胞周期阻滞但不影响细胞凋亡

流式细胞术检测凋亡实验结果 (图 3A) 显示, si-GRK3 组与 si-NC 组 WSU-HN6 细胞凋亡率之间无显著差异 ($t=0.4375$, $P>0.05$)。

流式细胞术检测细胞周期结果 (图 3B) 显示, 敲降 GRK3 后, si-GRK3 组 WSU-HN6 细胞的 G0/G1 期比例较 si-NC 组显著升高 ($t=5.799$, $P<0.01$)。

qPCR 检测结果 (图 3C) 显示, si-GRK3 组 WSU-HN6 细胞中 Cyclin D1、Cyclin D3、CDK2 和 CDK4 基因的 mRNA 表达水平均显著低于 si-NC 组 ($t=5.799$ 、 8.603 、 6.477 、 4.549 , 均 $P<0.05$)。

以上结果说明, 敲降 GRK3 可导致 OSCC 细胞周期阻滞于 G0/G1 期, 但不影响 OSCC 细胞的凋亡。



A: The apoptosis rate of WSU-HN6 cells; B: The percentage of WSU-HN6 cells at different phases of the cell cycle;

C: The mRNA levels of molecules associated with cell cycle in WSU-HN6 cells

图 3 敲降 GRK3 对 OSCC 细胞凋亡和细胞周期的影响

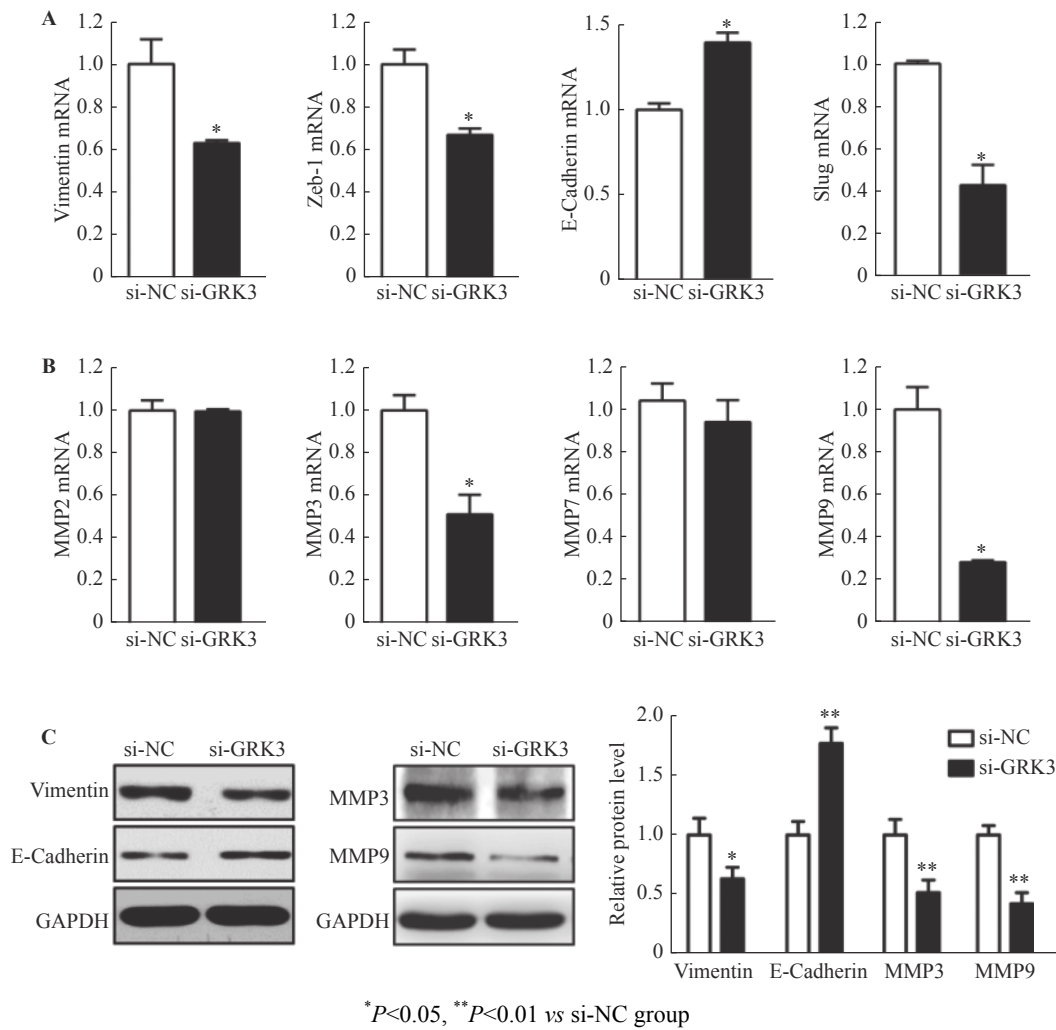
Fig.3 The effects of knocking down GRK3 on the apoptosis and cell cycle of OSCC cells

2.5 敲降 GRK3 对 OSCC 细胞 EMT 及 MMP 相关分子表达的影响

qPCR 检测结果 (图 4A、B) 显示, 与 si-NC 组相比, si-GRK3 组 WSU-HN6 细胞 Vimentin、Zeb-1 和 Slug mRNA 表达水平显著降低 ($t=4.468$ 、 6.092 、 8.215 , 均 $P<0.05$), 而 E-Cadherin mRNA 表达水平显著升高 ($t=8.265$, $P<0.05$), 同时 MMP3 和 MMP9 mRNA 表达水平显著降低 ($t=5.914$ 、 9.622 , 均

$P<0.05$), 而 MMP2 和 MMP7 mRNA 的表达水平无明显变化 ($t=0.1070$ 、 1.080 , 均 $P>0.05$)。

WB 检测结果 (图 4C) 显示, si-GRK3 组 WSU-HN6 细胞中 Vimentin 的表达水平较 si-NC 组显著降低 ($t=3.721$, $P<0.05$), E-Cadherin 表达水平显著升高 ($t=7.687$, $P<0.01$), MMP3 和 MMP9 表达水平均显著降低 ($t=4.965$ 、 8.173 , 均 $P<0.01$)。



A: The mRNA levels of EMT-associated molecules in WSU-HN6 cells; B: The mRNA levels of MMPs in WSU-HN6 cells; C: The protein levels of molecules associated with EMT and MMPs in WSU-HN6 cells

图4 敲降 GRK3 对 OSCC 细胞 EMT 及 MMP 相关分子表达的影响

Fig.4 The effects of knocking down GRK3 on the expression levels of molecules associated with EMT and MMPs in OSCC cells

3 讨论

GRK3 在不同肿瘤中的表达和功能具有组织特异性。本研究首先明确了 GRK3 在 OSCC 组织中呈高水平表达, 并进一步探索其生物学功能。通过敲降 GRK3 表达证实其在促进 OSCC 细胞增殖、迁移和侵袭过程中发挥了重要作用。本研究还发现, GRK3 可调控细胞周期相关分子、EMT 相关分子和 MMP 的表达, 初步探明了 GRK3 影响 OSCC 细胞恶性生物学行为的可能机制。

GRK3 在结肠癌中异常高表达, 可促进结肠癌细胞增殖并抑制其凋亡^[6]。本研究结果表明, GRK3 可促进 OSCC 细胞的增殖, 但对细胞凋亡无显著影响, 进一步证实 GRK3 在不同肿瘤中的功能具有组织特异性。本研究结果显示, 敲降 GRK3 表达可使 OSCC 细胞发生 G0/G1 期阻滞, 抑制细胞进入 S 期及 G2/M 期。此外, 敲降 GRK3 可显著下调细胞周期相关分子 Cyclin D1、Cyclin D3、CDK2 和 CDK4。

Cyclin D1/D3 和 CDK2/4 是调控细胞周期的关键分子, 均作用于细胞周期的 G1/S 期, 可促进细胞由 G1 期向 S 期转变^[12]。G1 期向 S 期转变是细胞周期的关键环节, 进入 S 期后细胞开始复制 DNA, 为有丝分裂做准备。Cyclin D1 与 CDK4 形成复合物, 该复合物可通过磷酸化使抑癌分子 Rb 失活, 从而促进 G1 期向 S 期转变和 DNA 合成^[13]。Cyclin D1-CDK4 复合物还可以激活 Cyclin E-CDK2 复合物, 使细胞进入 S 期^[14]。Cyclin D3 也可与 CDK4 形成复合物, 促进 G1 期向 S 期转变^[15]。因此, 本研究结果提示, GRK3 可通过调控 Cyclin D 和 CDK 分子促进 OSCC 细胞 G1 期向 S 期转变, 从而促进细胞增殖。

GRK3 在前列腺癌恶性进展中发挥重要作用。体外实验结果表明, GRK3 对前列腺癌细胞的迁移能力无影响, 但在小鼠肿瘤模型中可显著增强其远端转移能力, 其机制是 GRK3 可通过抑制血小板反应蛋白 1 (thrombospondin-1, TSP1) 促进血管新生^[7]。

与该研究不同,本研究结果显示,敲降 GRK3 可抑制 OSCC 细胞的迁移和侵袭能力。EMT 是肿瘤细胞迁移的关键步骤,本研究发现,敲降 GRK3 可抑制 OSCC 细胞 EMT 相关分子 Vimentin、Zeb1 和 Slug 的表达,促进 E-Cadherin 的表达。Vimentin 是一种细胞骨架成分,主要表达在间质细胞中。E-Cadherin 表达在上皮组织,介导细胞间连接,使上皮细胞紧密相连。肿瘤细胞发生 EMT 时,Vimentin 表达升高、E-cadherin 表达降低、细胞迁移能力增强^[16-17]。Zeb1 和 Slug 均属于锌指蛋白类转录因子,两者通过抑制 E-Cadherin 转录下调其表达水平,促进 EMT 进程^[18-19]。因此推测,GRK3 可通过调控 EMT 过程促进 OSCC 细胞迁移。肿瘤细胞向远端转移时需要破坏周围的细胞外基质,MMP 在该过程中发挥关键作用。MMP 可降解胶原、蛋白聚糖、层粘连蛋白和纤维连接蛋白等细胞外基质成分,促进肿瘤细胞侵袭和转移。本研究结果显示,敲降 GRK3 可显著抑制 OSCC 细胞中 MMP3 和 MMP9 的表达,提示 GRK3 可能通过调控 MMP 的表达促进 OSCC 细胞侵袭。

综上所述,GRK3 在 OSCC 组织中呈高表达,可通过调控 G1 期向 S 期转变促进 OSCC 细胞增殖,并可通过调控 EMT 和 MMP 促进细胞迁移和侵袭。本研究初步阐明了 GRK3 在 OSCC 恶性进展中的作用及其可能机制,但也存在不足之处,在后续研究将进一步探索 GRK3 介导增殖和转移的具体分子机制,并利用动物模型进行验证。激酶可以作为药物治疗的靶点,目前有多种激酶抑制剂已批准用于肿瘤治疗^[20-22]。本研究为激酶 GRK3 可能成为 OSCC 治疗的药物作用靶点提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- CHI A C, DAY T A, NEVILLE B W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(5): 401-421. DOI: 10.3322/caac.21293.
- THOMSON P J. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention-proliferation, position, progression and prediction[J]. *J Oral Pathol Med*, 2018, 47(9): 803-807. DOI: 10.1111/jop.12733.
- LAGANÀ M, SCHLECHT-LOUF G, BACHELERIE F. The G protein-coupled receptor kinases (GRKs) in chemokine receptor-mediated immune cell migration: from molecular cues to physiopathology[J/OL]. *Cells*, 2021, 10(1): E75[2021-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7824814/>. DOI: 10.3390/cells10010075.
- AHMED M R, BYCHKOV E, LI L Y, et al. GRK3 suppresses L-DOPA-induced dyskinesia in the rat model of Parkinson's disease via its RGS homology domain[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10920[2021-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4455246/>. DOI: 10.1038/srep10920.
- KATO A, REISERT J, IHARA S, et al. Evaluation of the role of G protein-coupled receptor kinase 3 in desensitization of mouse odorant receptors in a mammalian cell line and in olfactory sensory neurons[J/OL]. *Chem Senses*, 2014, 39(9): 771-780[2021-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4201305/>. DOI: 10.1093/chemse/bju050.
- JIANG T, YANG C, MA L Y, et al. Overexpression of GRK3, promoting tumor proliferation, is predictive of poor prognosis in colon cancer[J/OL]. *Dis Markers*, 2017, 2017: 1202710[2021-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5763208/>. DOI: 10.1155/2017/1202710.
- LI W L, AI N P, WANG S M, et al. GRK3 is essential for metastatic cells and promotes prostate tumor progression[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(4): 1521-1526[2021-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3910602/>. DOI: 10.1073/pnas.1320638111.
- BILLARD M J, FITZHUGH D J, PARKER J S, et al. G protein coupled receptor kinase 3 regulates breast cancer migration, invasion, and metastasis[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0152856[2021-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4822790/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0152856.
- LIU W J, ZHOU L, LIANG Z Y, et al. High expression of GRK3 is associated with favorable prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(2): 228-232. DOI: 10.1016/j.prp.2017.11.013.
- JIN Y, LIANG Z Y, ZHOU W X, et al. Expression and significances of G-protein-coupled receptor kinase 3 in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *J Cancer*, 2017, 8(11): 1972-1978[2021-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5559957/>. DOI: 10.7150/jca.19201.
- PENG C H, LIAO C T, PENG S C, et al. A novel molecular signature identified by systems genetics approach predicts prognosis in oral squamous cell carcinoma[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23452[2021-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3154947/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0023452.
- GAO X L, LEONE G W, WANG H Z. Cyclin D-CDK4/6 functions in cancer[J]. *Adv Cancer Res*, 2020, 148: 147-169. DOI: 10.1016/bs.acr.2020.02.002.
- QIE S, DIEHL J A. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment[J/OL]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(12): 1313-1326[2021-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5145738/>. DOI: 10.1007/s00109-016-1475-3.
- MONTALTO F I, DE AMICIS F. Cyclin D1 in cancer: a molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma[J/OL]. *Cells*, 2020, 9(12): E2648[2021-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7763888/>. DOI: 10.3390/cells9122648.
- QIE S, DIEHL J A. Cyclin D degradation by E3 ligases in cancer progression and treatment[J/OL]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67(Pt 2): 159-170[2021-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7390705/>. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.01.012.
- STROUHALOVA K, PŘECHOVÁ M, GANDALOVIČOVÁ A, et al. Vimentin intermediate filaments as potential target for cancer treatment[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(1): E184[2021-03-15].

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7017239/>. DOI: 10.3390/cancers12010184.
- [17] KASZAKI, WITKOWSKA-PIŁASZEWICZO, NIEWIADOMSKAZ, et al. Role of cadherins in cancer-A review[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): E7624[2021-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7589192/>. DOI: 10.3390/ijms21207624.
- [18] CHENG L, ZHOU M Y, GU Y J, et al. ZEB1: New advances in fibrosis and cancer[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(4): 1643-1650. DOI: 10.1007/s11010-020-04036-7.
- [19] AHMADIANKIA N, KHOSRAVI A. Significance of epithelial-to-mesenchymal transition inducing transcription factors in predicting distance metastasis and survival in patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis[J/OL]. *J Res Med Sci*, 2020, 25: 60[2021-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7554549/>. DOI: 10.4103/jrms.JRMS_174_19.
- [20] HAMED M M, DARWISH S S, HERRMANN J, et al. First bispecific inhibitors of the epidermal growth factor receptor kinase and the NF- κ B activity as novel anticancer agents[J]. *J Med Chem*, 2017, 60(7): 2853-2868. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01774.
- [21] JANG J, RATH O, SCHUELER J, et al. Development of novel patient-derived preclinical models from malignant effusions in patients with tyrosine kinase inhibitor-resistant clear cell renal cell carcinoma[J/OL]. *Transl Oncol*, 2017, 10(3): 304-310[2021-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5358930/>. DOI: 10.1016/j.tranon.2017.01.016.
- [22] SCHLÜTKE L, IMMER M, PREU L, et al. Scaffold hopping identifies 6, 8-disubstituted purines as novel anaplastic lymphoma kinase inhibitors[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018, 126: 89-94. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.03.011.

[收稿日期] 2020-12-01

[修回日期] 2021-03-16

[本文编辑] 黄静怡