

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003043

1,25-二羟基维生素 D₃ 通过下调葡萄糖转运蛋白-1 表达抑制膀胱癌细胞增殖

周 舰, 张朝阳, 程 耿, 杨 军, 张景宇, 戚晓红

(武汉大学附属同仁医院泌尿外科, 武汉 430060)

【摘要】目的:研究 1,25-二羟基维生素 D₃(1,25-(OH)₂-VitD₃)对膀胱癌细胞增殖的影响,并探讨其作用机制。**方法:**体外培养膀胱癌细胞 T24,MTT 法检测不同浓度 1,25-(OH)₂-VitD₃ 对细胞活力的影响,并筛选 1,25-(OH)₂-VitD₃ 干预细胞的最佳时间及半数抑制浓度。将细胞分为 4 组:对照组、葡萄糖转运蛋白-1(glucose transporter-1, GLUT1)抑制组、1,25-(OH)₂-VitD₃ 组、1,25-(OH)₂-VitD₃+GLUT1 抑制组。采用 Hoechst 33258 染色观察各组细胞形态变化;试剂盒检测细胞内葡萄糖摄取、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)产生及乳酸形成水平;Real-time PCR 及 Western blot 检测 GLUT1、己糖激酶 2(hexokinase 2, HK2)、6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 3(6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3,PFKFP3)、丙酮酸激酶同工酶 2(pyruvate kinase isozyme type M2,PKM2)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase A,LDHA)和低氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α ,HIF-1 α)mRNA 和蛋白表达水平。**结果:**1,25-(OH)₂-VitD₃ 可降低 T24 细胞增殖能力,且呈剂量依赖性。1,25-(OH)₂-VitD₃ 组、GLUT1 抑制组及 1,25-(OH)₂-VitD₃+GLUT1 抑制组细胞凋亡水平高于对照组,而 GLUT1、HK2、PFKFP3、PKM2、LDHA 和 HIF-1 α mRNA 及蛋白表达水平明显低于对照组。与 GLUT1 抑制组比较,1,25-(OH)₂-VitD₃+GLUT1 抑制组 GLUT1、HK2、PFKFP3、PKM2、LDHA 和 HIF-1 α mRNA(均 $P=0.000$)和蛋白(均 $P=0.000$)表达水平明显降低。**结论:**1,25-(OH)₂-VitD₃ 可抑制膀胱癌细胞增殖,诱导细胞凋亡,其作用机制可能与下调 GLUT1 表达抑制细胞糖酵解过程有关。

【关键词】1,25-二羟基维生素 D₃;膀胱癌;葡萄糖转运蛋白-1;糖酵解;增殖

【中图分类号】R737.14

【文献标志码】A

【收稿日期】2021-12-27

1,25-(OH)₂-VitD₃ inhibits the proliferation of bladder cancer cells by down-regulating the expression of glucose transporter-1

Zhou Jian, Zhang Chaoyang, Cheng Geng, Yang Jun, Zhang Jingyu, Qi Xiaohong

(Department of Urology, Tongren Hospital of Wuhan University)

【Abstract】Objective: To study the effect of 1,25-(OH)₂-VitD₃ on the proliferation of bladder cancer cells and explore its mechanism. **Methods:** Bladder cancer cells T24 were cultured *in vitro*. The effects of 1,25-(OH)₂-VitD₃ at different concentrations on cell viability were detected by MTT assay. The optimal time and half inhibitory concentration of 1,25-(OH)₂-VitD₃ on bladder cancer cells were screened. Cells were divided into four groups: control group, glucose transporter-1 (GLUT1) inhibitor group, 1,25-(OH)₂-VitD₃ group and 1,25-(OH)₂-VitD₃+GLUT1 inhibitor group. Hoechst 33258 staining was used to observe the morphological changes of cells in each group. The levels of glucose uptake, adenosine triphosphate(ATP) production and lactate formation were detected by kits. The mRNA and protein expression levels of GLUT1, hexokinase 2(HK2), 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3(PFKFP3), pyruvate kinase isozyme type M2(PKM2), lactate dehydrogenase A(LDHA) and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) were detected by real-time PCR and Western blot. **Results:** 1,25-(OH)₂-VitD₃ could reduce the proliferation of T24 cells in a dose-dependent manner. The number of apoptotic cells in 1,25-(OH)₂-VitD₃ group, GLUT1 inhibitor group and 1,25-(OH)₂-VitD₃+GLUT1 inhibitor group were higher than that in control group, while the mRNA and protein expression levels of GLUT1, HK2, PFKFP3, PKM2, LDHA and HIF-1 α were significantly lower than those in control group. Compared with GLUT1 inhibitor group, the mRNA(all $P=0.000$) and protein(all $P=0.000$) expression levels of GLUT1, HK2, PFKFP3, PKM2, LDHA and HIF-1 α were significantly lower in 1,25-(OH)₂-VitD₃ + GLUT1 inhibitor group. **Conclusion:** 1,25-(OH)₂-VitD₃ can inhibit the proliferation and induce

作者介绍:周 舰,Email:572403825@qq.com,

研究方向:泌尿系肿瘤。

通信作者:张朝阳,Email:wmzhang2021@163.com。

优先出版:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220620.1930.008.html

(2022-06-22)

apoptosis of bladder cancer cells. Its mechanism may be related to down-regulation of GLUT1 expression to inhibit cell glycolysis.

【Key words】1,25-(OH)₂-VitD₃; bladder cancer; glucose transporter-1; glycolysis; proliferation

膀胱癌是泌尿系统常见的一种恶性肿瘤,是世界上第十大常见癌症,在发达国家尤为普遍^[1-2]。其发病率在我国也不断上升,男性和老年人成为膀胱癌疾病负担的高危人群^[3]。膀胱癌具有多发灶、易复发等特性,病情复发和转移是导致治疗失败和病死的主要原因^[4]。膀胱癌在儿童中非常罕见,且被认为低级别,不太可能复发,但近期有研究发现其在儿童中同样存在多灶复发的迹象,打破了人们对这一儿童罕见疾病的既往认知^[5]。肿瘤细胞的恶性行为需要大量的能量支撑和物质供应,肿瘤细胞为了满足其物质和能量需求,改变代谢模式,进行代谢重编程^[6]。代谢重编程是恶性肿瘤的标志^[7],而糖酵解是肿瘤细胞进行代谢重编程的一种重要形式。糖酵解为肿瘤细胞的主要能量来源^[8],因此,抑制糖酵解成为一种新的癌症治疗方向。葡萄糖转运蛋白-1 (glucose transporter-1, GLUT1) 是主要的葡萄糖转运体,几乎所有细胞的葡萄糖摄取都受葡萄糖转运蛋白调节。许多研究表明, GLUT1 可促进细胞增殖和转移,抑制细胞凋亡,在肝细胞癌、乳腺癌、肾癌等多种癌症中发挥关键作用^[9]。肿瘤细胞中, GLUT1 表达的增加会导致能量消耗和癌细胞侵袭性增加。从有氧化代谢到低氧糖酵解的转变是癌细胞的一个特征,过表达 GLUT1 促进肿瘤糖酵解的适应性上调^[10]。GLUT1 是糖酵解过程中的关键因子之一^[11],探讨 GLUT1 和膀胱癌之间的关系有望为靶向分子治疗膀胱癌提供新的切入点。维生素 D 是一种脂溶性促激素,可抑制结直肠癌细胞的有氧糖酵解,在结直肠癌治疗中具有重要的治疗价值^[12]。维生素 D 在膀胱癌患者血清中的含量降低,其含量与膀胱癌发病率呈负相关^[13]。同时维生素 D 还能抑制癌细胞增殖,促进细胞分化,减少肿瘤的侵袭性和转移倾向^[14]。因此推测,维生素 D 通过影响细胞增殖代谢参与膀胱癌的发生发展过程。维生素 D₃ 是维生素 D 家族中最重要的成员之一,1,25-二羟基维生素 D₃ (1,25-(OH)₂-VitD₃) 是维生素 D₃ 的生物活性形式,可下调肿瘤细胞的糖酵解,降低葡萄糖摄取率^[15]。目前,1,25-(OH)₂-VitD₃ 在膀胱癌方面的相关报道较少,其是否可通过 GLUT1 对膀胱癌产生影响未见报道。本研究通过 1,25-(OH)₂-VitD₃ 干预膀胱癌细胞 T24,并对细胞 GLUT1 进行抑制,探讨 1,25-(OH)₂-VitD₃ 是否通过调控 GLUT1 表达参与膀胱癌的发生发展过程。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人膀胱癌细胞 T24 购自上海中国科学院细胞库;RPMI 1640 培养基购自 Hyclone;胎牛血清购自 Gibco;MTT 溶液、Hoechst 33258 染色液、兔抗 GLUT1 抗体、兔抗乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 抗体、兔抗 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3, PFKFB3) 抗体、兔抗低氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 抗体、兔抗己糖激酶 2 (hexokinase 2, HK2) 抗体、兔抗丙酮酸激酶同工酶 2 (pyruvate kinase isozyme type M2, PKM2) 抗体、兔抗 GAPDH 抗体、山羊抗兔 IgG 购自 Bioswamp (货号: PAB180013、PAB-180033、PAB30639、PAB30703、PAB32151、PAB35412、PAB-30271、PAB42174、PAB36264、SAB43711);葡萄糖、乳酸、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所 (货号: F006、A019-2、A095);TRIzol 试剂购自 Ambion;逆转录试剂盒购自 Takara;SYBR Green PCR 试剂盒购自 KAPA Biosystems;PVDF 膜、化学发光试剂购自 Millipore。酶标仪购自 Thermo 公司;荧光显微镜购自 Olympus;荧光定量 PCR 仪购自 Bio-Rad 公司;电泳仪、全自动化学发光分析仪购自上海天能科技有限公司

1.2 细胞复苏及培养

将 T24 细胞从液氮罐中取出后,置于 37℃ 水浴中融化。融化后将细胞悬液转移至离心管中,1 000 r/min 离心 3 min。弃上清,加入 1 mL 培养基重悬细胞,并转移至培养瓶中,加入 4 mL 含 10% 血清的新鲜 RPMI1640 培养基培养细胞,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中。

1.3 MTT 检测细胞活力

收集处于对数生长期的 T24 细胞,0.25%胰蛋白酶消化处理细胞,调整细胞密度,接种于 96 孔板中,每孔 180 μ L,分为 6 组,每组设置 3 复孔,5 $\times$ 10³ 个细胞/孔。按分组分别加入 0、1、10、20、50 和 100 nmol/L 的 1,25-(OH)₂-VitD₃,置于培养箱中分别培养 12、24、48 和 72 h 后,于显微镜下观察细胞生长情况。取出各组细胞培养板,每孔加入 20 μ L MTT 溶液,继续培养 4 h。吸去上清液,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷溶液,摇床低速震荡 10 min,酶标仪检测 490 nm 处的光密度 (optical density, OD) 值。

1.4 实验分组及处理

本研究分对照组、GLUT1 抑制组、1,25-(OH)₂-VitD₃ 组 (VD₃ 组) 和 1,25-(OH)₂-VitD₃+GLUT1 抑制组 (VD₃+GLUT1 抑制组)。GLUT1 抑制组采用 WZB117 (10 μ mol/L) 抑制剂处理细胞;VD₃ 组采用 MTT 结果计算出的 1,25-(OH)₂-VitD₃ 半数抑制浓度处理细胞;VD₃+GLUT1 抑制组采用 WZB117 (10 μ mol/L) 和 1,25-(OH)₂-VitD₃ 半数抑制浓度共同处理细胞。每组细胞作用 72 h 后开始各项实验检测。

1.5 Hoechst 33258 染色观察细胞变化

采用 4% 多聚甲醛固定各组细胞, 10 min 后弃固定液。PBS 清洗 2 次, 加入少量 Hoechst 33258 染色液, 覆盖细胞即可, 于室温下染色 5 min。PBS 清洗 5 次后于荧光显微镜下观察细胞形态变化。

1.6 生化实验检测细胞内葡萄糖摄取、ATP 产生及乳酸形成变化

采用比色法检测各组细胞内葡萄糖、ATP 及乳酸含量, 根据检测试剂盒说明进行, 酶标仪分别检测 505 nm、636 nm 及 530 nm 处 OD 值计算葡萄糖、ATP 及乳酸的含量。

1.7 Real-time PCR 检测 *GLUT1*、*HK2*、*PFKFB3*、*PKM2*、*LDHA* 和 *HIF-1 α* mRNA 表达水平

采用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA, 根据反转录试剂盒说明进行, 将 RNA 反转录为 cDNA, 以制备好的 cDNA 为模板进行 Real-time PCR 扩增。PCR 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。反应条件为: 95℃、3 min; 95℃、5 s; 56℃、10 s; 72℃、25 s; 共 39 个循环。以 *GAPDH* 为内参基因, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各指标 mRNA 相对表达量。

表 1 Real-time PCR 扩增反应引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>GLUT1</i> -F	TCATCGCCAGGTGTTTC
<i>GLUT1</i> -R	TCTCCTCGTTGCGGTTG
<i>HK2</i> -F	GCATCGGCATCTTCG
<i>HK2</i> -R	GCCATCGCCAGTCAT
<i>PFKFB3</i> -F	AGGGACTTGTCTCGTGAT
<i>PFKFB3</i> -R	GGTTGTGCTCGTTCTCG
<i>PKM2</i> -F	CCGAAGTGGGCTCATC
<i>PKM2</i> -R	CCACTTCCACCACCTTG
<i>LDHA</i> -F	TCAAAGTCAAAGGCTAC
<i>LDHA</i> -R	GATTCCATTCTGTCCC
<i>HIF-1α</i> -F	GGATATGTCTGGGTTG
<i>HIF-1α</i> -R	CTGTTTGTGAAGGGA
<i>GAPDH</i> -F	CCACTCCTCCACCTTTG
<i>GAPDH</i> -R	CACCACCCTGTTGCTGT

1.8 Western blot 检测 *GLUT1*、*HK2*、*PFKFB3*、*PKM2*、*LDHA* 和 *HIF-1 α* 蛋白表达水平

取出各组细胞, 吸去培养液, PBS 清洗 2 次后, 加入含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解液, 提取细胞总蛋白后采用 BCA 法进行定量。蛋白定量后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离出各目的蛋白, 每孔上样量为 20 μ g 蛋白。湿转法将蛋白转印至 PVDF 膜上, 使用 PBS 与脱脂奶粉配制的封闭液室温封闭 2 h。加入一抗稀释液 (*GLUT1*: 1:1 000; *HK2*: 1:1 000; *PFKFB3*: 1:1 000; *PKM2*: 1:1 000; *LDHA*: 1:1 000; *HIF-1 α* : 1:1 000; *GAPDH*: 1:5 000), 室温孵育 1 h。PBST 清洗 3 次后, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 稀释液 (1:10 000), 室温孵育 1 h。PBST

清洗 3 次后, 于暗室中加入化学发光试剂, 最后置于全自动化学发光分析仪中检测。

1.9 统计学处理

采用统计分析软件 SPSS 22.0 进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 1,25-(OH) $_2$ -VitD $_3$ 对 T24 细胞增殖的影响

MTT 检测各组细胞活力后, 绘制细胞生长曲线, 结果显示随 1,25-(OH) $_2$ -VitD $_3$ 浓度升高, 细胞增殖速度反而变慢, 高浓度组出现抑制现象 (图 1)。各组细胞在 72 h 的生长抑制作用更明显, 半数抑制浓度为 106.879 nmol/L, 将作为后续 1,25-(OH) $_2$ -VitD $_3$ 干预细胞的时间和浓度。

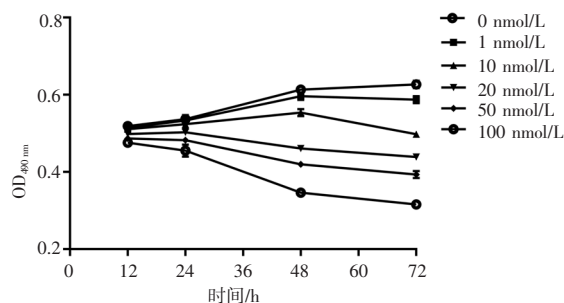


图 1 细胞生长曲线

2.2 1,25-(OH) $_2$ -VitD $_3$ 对 T24 细胞凋亡的影响

Hoechst 33258 染色结果显示, 对照组细胞形态正常, 细胞核为蓝色, 大部分细胞为淡染。经过 1,25-(OH) $_2$ -VitD $_3$ 、*GLUT1* 抑制剂分别干预后, 部分细胞核凝聚, 呈亮蓝色, 而两者联合干预的效果更明显, 大部分细胞核致密浓染 (图 2)。这一结果表明 1,25-(OH) $_2$ -VitD $_3$ 干预和抑制细胞 *GLUT1* 均可诱导 T24 细胞凋亡。

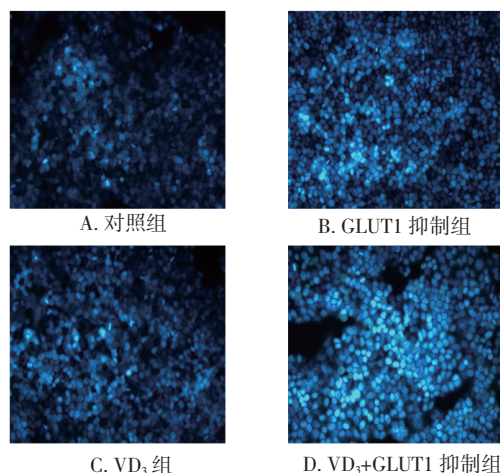


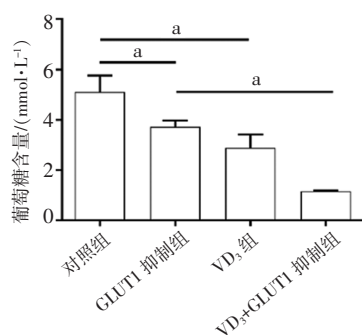
图 2 Hoechst 33258 染色观察细胞形态 (200 $\times$)

2.3 1,25-(OH)₂-VitD₃ 对 T24 细胞糖酵解过程的影响

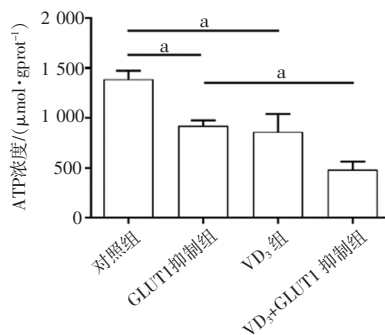
各组细胞中葡萄糖、ATP 和乳酸水平差异具有统计学意义。与对照组比较, GLUT1 抑制组和 1,25-(OH)₂-VitD₃ 组葡萄糖摄取量($P=0.004, 0.000$)、ATP 产生($P=0.001, 0.000$)以及乳酸形成水平($P=0.004, 0.000$)均明显降低。与 GLUT1 抑制组比较, 1,25-(OH)₂-VitD₃ 联合 GLUT1 抑制组细胞内葡萄糖($P=0.000$)、ATP ($P=0.001$)和乳酸($P=0.004$)水平明显降低, 差异具有统计学意义(表 2、图 3)。这些结果表明 1,25-(OH)₂-VitD₃ 干预和抑制细胞 GLUT1 可有效降低细胞糖酵解效率。

表 2 各组细胞中葡萄糖、ATP 和乳酸水平比较

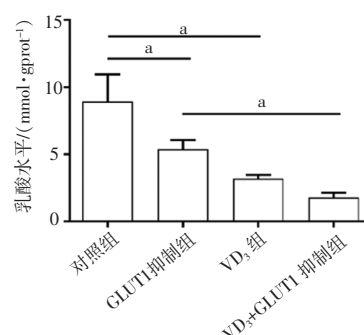
组别	葡萄糖/ (mmol·L ⁻¹)	ATP/ (μmol·gprot ⁻¹)	乳酸/ (mmol·gprot ⁻¹)
对照组	5.11 ± 0.64	1 389.78 ± 82.29	8.92 ± 2.05
GLUT1抑制组	3.72 ± 0.24	920.53 ± 53.20	5.37 ± 0.69
VD ₃ 组	2.89 ± 0.52	861.09 ± 179.99	3.18 ± 0.30
VD ₃ +GLUT1 抑制组	1.16 ± 0.04	483.32 ± 78.42	1.78 ± 0.36
<i>F</i> 值	43.825	34.451	23.742
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000



A. 生化法检测葡萄糖含量



B. 生化法检测 ATP 浓度



C. 生化法检测乳酸水平

注: a, $P < 0.05$, 差异有统计学意义

图 3 葡萄糖、ATP 及乳酸水平检测 ($\bar{x} \pm s, n=3$)表 3 各组细胞中 GLUT1、HK2、PFKFP3、PKM2、LDHA 和 HIF-1 α mRNA 水平比较

组别	GLUT1	HK2	PFKFP3	PKM2	LDHA	HIF-1 α
对照组	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.03
GLUT1抑制组	0.36 ± 0.02	0.35 ± 0.05	0.38 ± 0.08	0.34 ± 0.05	0.34 ± 0.04	0.34 ± 0.04
VD ₃ 组	0.67 ± 0.05	0.60 ± 0.10	0.73 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.50 ± 0.03	0.48 ± 0.04
VD ₃ +GLUT1 抑制组	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01
<i>F</i> 值	190.558	125.339	93.379	350.240	659.472	521.529
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

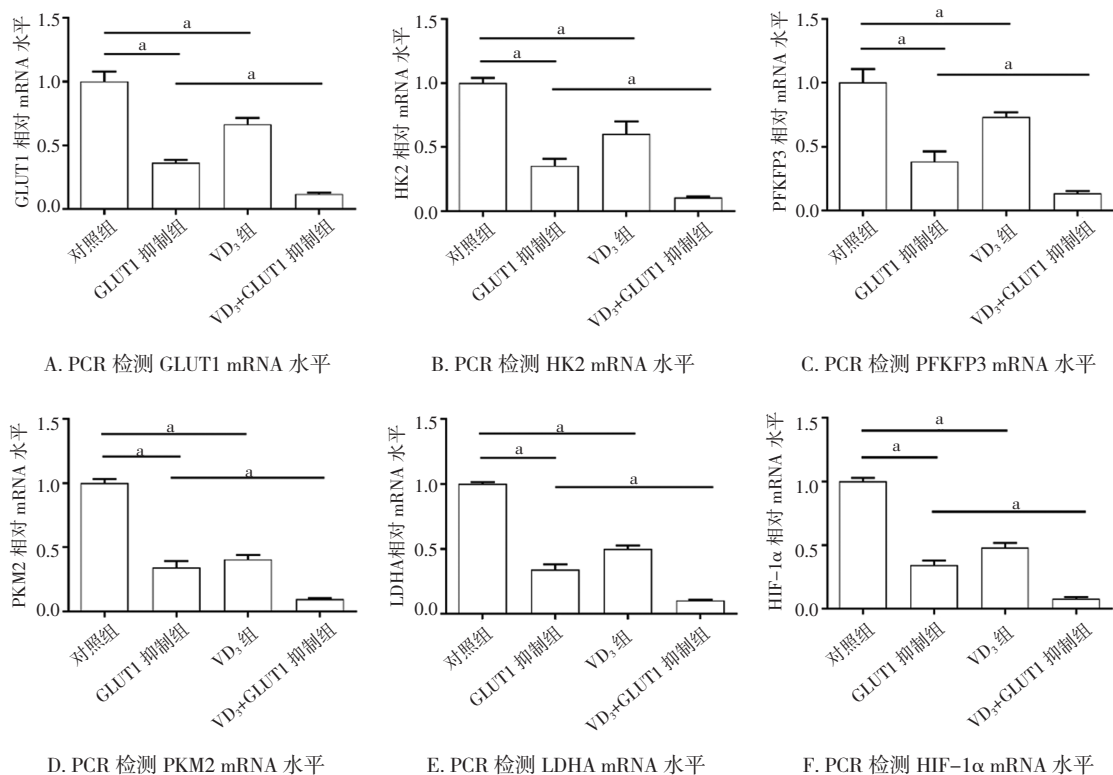
表 4 各组细胞中 GLUT1、HK2、PFKFP3、PKM2、LDHA 和 HIF-1 α 蛋白表达水平比较

组别	GLUT1	HK2	PFKFP3	PKM2	LDHA	HIF-1 α
对照组	0.98 ± 0.01	0.91 ± 0.01	0.96 ± 0.01	0.87 ± 0.02	0.89 ± 0.01	0.81 ± 0.04
GLUT1抑制组	0.81 ± 0.03	0.78 ± 0.01	0.65 ± 0.03	0.72 ± 0.03	0.80 ± 0.02	0.72 ± 0.02
VD ₃ 组	0.83 ± 0.03	0.77 ± 0.01	0.67 ± 0.02	0.71 ± 0.03	0.78 ± 0.01	0.72 ± 0.02
VD ₃ +GLUT1 抑制组	0.71 ± 0.03	0.52 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.55 ± 0.02	0.60 ± 0.03	0.56 ± 0.05
<i>F</i> 值	50.633	136.495	322.872	98.830	114.209	26.392
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.4 1,25-(OH)₂-VitD₃ 对代谢相关酶表达的影响

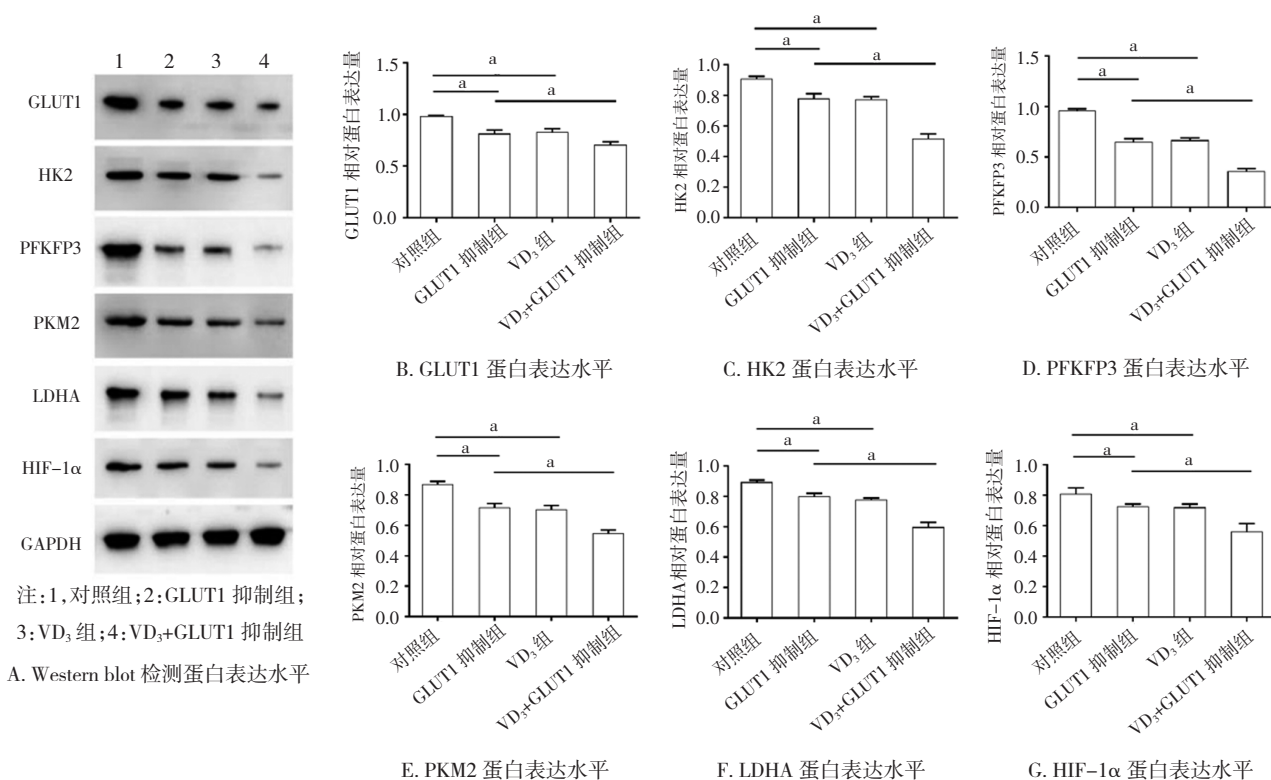
Real-time PCR 检测各组细胞 GLUT1、HK2、PFKFP3、PKM2、LDHA 和 HIF-1 α mRNA 相对表达量, 结果显示差异具有统计学意义。与对照组比较, VD₃ 组和 GLUT1 抑制组细胞 GLUT1、HK2、PFKFP3、PKM2、LDHA 和 HIF-1 α 的 mRNA 表达水平均明显降低(均 $P=0.000$); 1,25-(OH)₂-VitD₃ 联合 GLUT1 抑制剂干预细胞后, GLUT1、HK2、PFKFP3、PKM2、LDHA 和 HIF-1 α mRNA 表达水平明显低于 GLUT1 抑制剂组(均 $P=0.000$)。见表 3 和图 4。

Western blot 检测了各组细胞 GLUT1、HK2、PFKFP3、PKM2、LDHA 和 HIF-1 α 蛋白相对表达量, 结果显示差异具有统计学意义。与对照组比较, 1,25-(OH)₂-VitD₃ 组和 GLUT1 抑制组细胞 GLUT1、HK2、PFKFP3、PKM2、LDHA (均 $P=0.000$) 和 HIF-1 α ($P=0.014, 0.017$) 的蛋白表达水平均明显降低; 1,25-(OH)₂-VitD₃ 联合 GLUT1 抑制剂干预细胞后, GLUT1、HK2、PFKFP3、PKM2、LDHA 和 HIF-1 α 蛋白表达水平明显低于 GLUT1 抑制剂单独干预组(均 $P=0.000$)。见表 4 和图 5。



注:a, $P < 0.05$, 差异具有统计学意义

图4 GLUT1、HK2、PFKFB3、PKM2、LDHA 和 HIF-1 α mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)



注:a, $P < 0.05$, 表示差异具有统计学意义

图5 GLUT1、HK2、PFKFB3、PKM2、LDHA 和 HIF-1 α 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

癌细胞在有氧条件下偏好于以糖酵解途径进行葡萄糖代谢,产生一系列代谢产物的同时释放大量的 ATP,可为肿瘤细胞的生长增殖提供能量,其中间代谢产物亦能满足肿瘤增殖的物质需求^[16-17],与肿瘤的发生发展具有紧密联系。在膀胱癌肿瘤组织中的许多代谢途径均发生改变,尤其是能量代谢途径(糖酵解、氨基酸代谢等)^[18]。因此抑制细胞糖酵解途径可影响膀胱癌肿瘤细胞的生长。本研究通过 1,25-(OH)₂-VitD₃ 干预膀胱癌细胞 T24,研究 1,25-(OH)₂-VitD₃ 调控 GLUT1 表达对膀胱癌的影响,为临床应用提供理论基础。

维生素 D 是人体必需的脂溶性维生素,主要由皮肤表皮和真皮合成获得,少量维生素 D 被食物吸收。其活性形式 1,25-(OH)₂-VitD₃ 及其受体结合进入细胞核,可发挥广泛的生物学作用^[19]。1,25-(OH)₂-VitD₃ 对正常乳腺发育至关重要,可以通过其受体以多种方式诱导细胞凋亡、阻断细胞周期、抑制肿瘤细胞增殖。研究发现,1,25-(OH)₂-VitD₃ 可抑制乳腺癌细胞中 V-H⁺-ATP 酶的功能与表达,而 V-H⁺-ATP 酶在糖酵解代谢中发挥重要作用^[20]。1,25-(OH)₂-VitD₃ 能逆转 M2 巨噬细胞的极化,同时降低 M2 巨噬细胞上清诱导的卵巢癌细胞的增殖和迁移能力^[21]。1,25-(OH)₂-VitD₃ 通过刺激细胞凋亡和减少细胞增殖来增强人参皂苷 Rh2 介导的抗癌作用^[22]。此外,1,25-(OH)₂-VitD₃ 对多种恶性肿瘤细胞具有抑制增殖、促进凋亡的作用,可有效抑制肿瘤的生长,在临床试验中常作为抗癌剂^[23]。本研究发现 1,25-(OH)₂-VitD₃ 干预可有效抑制膀胱癌细胞 T24 的增殖能力,且呈现出浓度依赖性。进一步使用 1,25-(OH)₂-VitD₃、GLUT1 抑制剂以及两者联合干预 T24 细胞,发现均可明显降低细胞内葡萄糖摄取、ATP 产生及乳酸形成水平,且 1,25-(OH)₂-VitD₃ 联合 GLUT1 抑制剂干预后的效果比单独使用 GLUT1 抑制剂更好,推测 1,25-(OH)₂-VitD₃ 可能通过抑制 T24 细胞内糖酵解过程影响了细胞的增殖。

GLUT1 是一种跨膜蛋白,负责通过促进扩散将葡萄糖摄取到许多组织的细胞中。有研究表明,缺氧和低糖会通过增强 GLUT-1 的表达和激活自噬

来增加喉癌干细胞的生长和迁移能力,而高 GLUT-1 表达促进葡萄糖摄取以满足癌细胞的能量需求^[24]。此外,GLUT1 增加葡萄糖摄取、糖酵解速率和乳酸产生,从而促进胶质母细胞细胞增殖和胶质母细胞瘤发生^[25]。在糖酵解过程中,GLUT1 将葡萄糖转运至细胞内,经过己糖激酶(hexokinase, HKs)、磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFKs)、PKM2、LDHA 等糖酵解酶分解代谢,产生 ATP,最终形成乳酸^[26]。GLUT1、HK2、LDHA 为糖酵解标志物^[27]。有研究证实,HK2 在肿瘤细胞中呈现高表达,其表达水平与肿瘤细胞恶性生长相关,抑制 HK2 表达可降低肿瘤细胞增殖能力并诱导细胞凋亡^[28]。代谢关键基因 GLUT1、HK2、PFKFP3、HIF-1 α 、LDHA 和 PKM2 表达增加促使细胞代谢方式向糖酵解转变^[29]。本研究结果显示,1,25-(OH)₂-VitD₃ 可明显抑制 GLUT1 基因及蛋白的表达,1,25-(OH)₂-VitD₃、GLUT1 抑制剂均可降低 HK2、PFKFP3、PKM2、LDHA 和 HIF-1 α mRNA 及蛋白表达水平,且 1,25-(OH)₂-VitD₃ 联合 GLUT1 抑制剂干预细胞后抑制作用更明显,提示 1,25-(OH)₂-VitD₃ 可下调 GLUT1 表达,进而抑制 HK2、PFKFP3、PKM2、LDHA 和 HIF-1 α 表达,影响 T24 细胞的糖酵解过程。

综上所述,1,25-(OH)₂-VitD₃ 可抑制膀胱癌细胞 T24 的增殖能力,诱导细胞凋亡,其作用机制可能是通过下调 GLUT1 抑制细胞糖酵解途径达到抗肿瘤作用。

参 考 文 献

- [1] Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, et al. Epidemiology of bladder cancer[J]. Med Sci(Basel), 2020, 8(1): 15.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] 瞿 豪, 彭 谋, 王江宜, 等. 1990-2017 年中国膀胱癌疾病负担分析[J]. 医学新知, 2020, 30(5): 328-335.
- [4] Zi H, Peng M, Wang JY, et al. An analysis of disease burden of bladder cancer in China from 1990 to 2017[J]. New Med, 2020, 30(5): 328-335.
- [4] 吴常文, 史子敏, 林双泉, 等. 下调 SPOCK1 基因表达可抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. 肿瘤, 2017, 37(9): 936-943.
- Wu CW, Shi ZM, Lin SQ, et al. Down-regulation of SPOCK1 gene ex-

- pression inhibits the proliferation, migration and invasion of bladder cancer cells[J]. *Tumor*, 2017, 37(9): 936–943.
- [5] Peard L, Stark T, Ziada A, et al. Recurrent bladder cancer in a teenage male[J]. *Urology*, 2020, 141: 135–138.
- [6] 叶 灵, 张华凤, 李世庭. 肿瘤微环境下的代谢重编程调控[J]. *肿瘤代谢与营养电子杂志*, 2019, 6(4): 401–408.
- Ye L, Zhang HF, Li ST. Regulation of metabolic reprogramming in the tumor microenvironment[J]. *Electron J Metab Nutr Cancer*, 2019, 6(4): 401–408.
- [7] Faubert B, Solmonson A, DeBerardinis RJ. Metabolic reprogramming and cancer progression[J]. *Science*, 2020, 368(6487): eaaw5473.
- [8] Wang QQ, Li MX, Li C, et al. Natural products and derivatives targeting at cancer energy metabolism: a potential treatment strategy[J]. *Curr Med Sci*, 2020, 40(2): 205–217.
- [9] Chen J, Cao L, Li ZQ, et al. SIRT1 promotes GLUT1 expression and bladder cancer progression via regulation of glucose uptake[J]. *Hum Cell*, 2019, 32(2): 193–201.
- [10] Ancey PB, Contat C, Meylan E. Glucose transporters in cancer: from tumor cells to the tumor microenvironment[J]. *FEBS J*, 2018, 285(16): 2926–2943.
- [11] Wu JG, Chai HJ, Xu X, et al. Histone methyltransferase SETD1A interacts with HIF1 α to enhance glycolysis and promote cancer progression in gastric cancer[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(6): 1397–1409.
- [12] Zuo SY, Wu L, Wang Y, et al. Long non-coding RNA *MEG3* activated by vitamin D suppresses glycolysis in colorectal cancer *via* promoting c-Myc degradation[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 274.
- [13] Mondul AM, Weinstein SJ, Virtamo J, et al. Influence of vitamin D binding protein on the association between circulating vitamin D and risk of bladder cancer[J]. *Br J Cancer*, 2012, 107(9): 1589–1594.
- [14] Hektoen HH, Robsahm TE, Stenehjem JS, et al. Vitamin D and Vitamin D-binding protein and risk of bladder cancer: a nested case-control study in the Norwegian Janus Serum Bank Cohort[J]. *Cancer Med*, 2021, 10(12): 4107–4116.
- [15] Santos JM, Khan ZS, Munir MT, et al. Vitamin D₃ decreases glycolysis and invasiveness, and increases cellular stiffness in breast cancer cells[J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 53: 111–120.
- [16] Warburg O. On the origin of cancer cells[J]. *Science*, 1956, 123(3191): 309–314.
- [17] Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression[J]. *Int J Radiat Biol*, 2019, 95(7): 912–919.
- [18] 高振宇, 向 敏. 膀胱癌肿瘤细胞的代谢组学及其生物标记物的研究进展[J]. *抗感染药学*, 2016, 13(4): 725–728.
- Gao ZY, Xiang M. Research advances in bladder cancer cell metabolomics and biomarker[J]. *Anti Infect Pharm*, 2016, 13(4): 725–728.
- [19] Chandler PD, Chen WY, Ajala ON, et al. Effect of vitamin D₃ supplements on development of advanced cancer: a secondary analysis of the VITAL randomized clinical trial[J]. *JAMA Netw Open*, 2020, 3(11): e2025850.
- [20] Santos JM, Hussain F. VD₃ mitigates breast cancer aggressiveness by targeting V-H⁺-ATPase[J]. *J Nutr Biochem*, 2019, 70: 185–193.
- [21] Guo Y, Jiang F, Yang WQ, et al. Effect of 1 α , 25-(OH)₂D₃-treated M1 and M2 macrophages on cell proliferation and migration ability in ovarian cancer[J]. *Nutr Cancer*, 2021, 2021: 1–12.
- [22] Ben-Eltriki M, Deb S, Guns EST. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ synergistically enhances anticancer effects of ginsenoside Rh2 in human prostate cancer cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2021, 209: 105828.
- [23] Swami S, Krishnan AV, Wang JY, et al. Dietary vitamin D₃ and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol) exhibit equivalent anticancer activity in mouse xenograft models of breast and prostate cancer[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(6): 2576–2587.
- [24] Chen XH, Liu J, Zhong JT, et al. Effect of GLUT1 inhibition and autophagy modulation on the growth and migration of laryngeal carcinoma stem cells under hypoxic and low-glucose conditions[J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14: 3069–3081.
- [25] Zhang ZX, Li X, Yang F, et al. DHHC9-mediated GLUT1 S-palmitoylation promotes glioblastoma glycolysis and tumorigenesis[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5872.
- [26] Hamanaka RB, Chandel NS. Targeting glucose metabolism for cancer therapy[J]. *J Exp Med*, 2012, 209(2): 211–215.
- [27] Wang CB, Wang Y, Wang JJ, et al. LINC00662 triggers malignant progression of chordoma by the activation of RNF144B via targeting miR-16-5p[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(3): 1007–1022.
- [28] Chen J, Zhang SL, Li YC, et al. Hexokinase 2 overexpression promotes the proliferation and survival of laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(4): 3743–3753.
- [29] Hanlon MM, Rakovich T, Cunningham CC, et al. STAT3 mediates the differential effects of oncostatin M and TNF- α on RA synovial fibroblast and endothelial cell function[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2056.

(责任编辑: 冉明会)