

GLUT1对人结肠癌细胞5-氟尿嘧啶耐药性的调控作用及其机制研究

邵华明* 杨燕

(青岛市慧康医院, 检验科, 青岛 266520)

摘要 该研究探究葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)对人结肠癌细胞5-氟尿嘧啶(5-Fu)耐药性的调控作用及其机制。实验收集17例5-Fu化疗敏感结肠癌患者的结肠癌组织及癌旁组织、13例5-Fu化疗耐药结肠癌患者的结肠癌组织和癌旁组织, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法和Western blot法检测结肠癌组织和癌旁组织中GLUT1基因和蛋白的表达水平。采用5-Fu浓度递增间断刺激法诱导建立5-Fu耐药HT-29细胞(HT-29/5-Fu)。体外培养HT-29/5-Fu细胞及其亲本HT-29细胞, MTT法检测5-Fu对2种细胞增殖的抑制作用, RT-qPCR法和Western blot法检测HT-29/5-Fu细胞及其亲本HT-29细胞中GLUT1基因和蛋白的表达水平。将HT-29/5-Fu细胞分为正常对照组(NC)、无义对照质粒组(pRS-scrambled)、GLUT1干扰质粒组(pRS-GLUT1), RT-qPCR法和Western blot法检测各组GLUT1基因和蛋白的表达, MTT法检测细胞增殖能力变化, 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡情况, RT-qPCR法和Western blot法检测MRP1、ABCB1、GST- π 、Bcl-2和Bax mRNA和蛋白的表达。该实验显示: (1) 5-Fu化疗耐药结肠癌组织中GLUT1基因和蛋白表达水平较5-Fu化疗敏感结肠癌组织升高($P < 0.05$); (2) 培养24 h或48 h时5-Fu(5~100 pg/mL)对亲本HT-29细胞的抑制率较HT-29/5-Fu显著升高($P < 0.05$); (3) HT-29/5-Fu细胞中GLUT1基因和蛋白的表达水平较其亲本HT-29细胞显著升高($P < 0.05$); (4) GLUT1干扰质粒组细胞中GLUT1 mRNA和蛋白表达水平较正常对照组和无义对照质粒组显著降低($P < 0.05$); (5) GLUT1干扰质粒组48 h细胞吸光度值均较正常对照组和无义对照质粒组显著降低($P < 0.05$); (6) GLUT1干扰质粒组G₀/G₁期细胞比例较正常对照组和无义对照质粒组显著升高, 而S期细胞比例显著减少($P < 0.05$); (7) GLUT1干扰质粒组细胞凋亡率较正常对照组和无义对照质粒组显著升高($P < 0.05$); (8) GLUT1干扰质粒组细胞中MRP 1、GST- π 、ABCB 1和Bcl-2 mRNA和蛋白表达较正常对照组和无义对照质粒组显著降低($P < 0.05$), Bax mRNA和蛋白水平较正常对照组和无义对照质粒组显著升高($P < 0.05$)。该实验证明, GLUT1基因沉默可增加耐药结肠癌细胞对5-Fu的敏感性, 这可能与调节细胞周期、促进细胞凋亡、抑制结肠癌细胞中耐药相关蛋白表达以及调节Bcl2/Bax凋亡通路有关。

关键词 GLUT1; 基因沉默; 结直肠癌; HT-29细胞; 耐药性

Regulatory Effects and Mechanism of GLUT1 on 5-Fu Resistance in Human Colon Cancer Cells

SHAO Huaming*, YANG Yan

(Department of Laboratory Medicine, the Huikang Hospital of Qingdao, Qingdao 266520, China)

Abstract This study was to investigate the regulatory effect and mechanism of GLUT1 (glucose transporter 1) on 5-Fu (5-fluorouracil) resistance in human colon cancer cells. In this study, the gene and protein expression

收稿日期: 2022-06-01 接受日期: 2022-07-13

*通讯作者。Tel: 17605326322, E-mail: shaohuaming0159@126.com

Received: June 1, 2022 Accepted: July 13, 2022

*Corresponding author. Tel: +86-17605326322, E-mail: shaohuaming0159@126.com

of GLUT1 in colon cancer tissues and adjacent tissues in 17 patients with 5-Fu chemo-sensitive colon cancer and 13 patients with 5-Fu chemo-resistant colon cancer was detected by RT-qPCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction) and Western blot. 5-Fu-resistant HT-29 cells (HT-29/5-Fu) were induced by increasing 5-Fu concentration intermittently. HT-29/5-Fu cells and their parents HT-29 cells were cultured *in vitro*. The inhibitory effect of 5-Fu on the proliferation of HT-29/5-Fu cells and HT-29 cells was detected by MTT assay. The gene and protein expression of GLUT1 in HT-29/5-Fu cells and HT-29 cells was detected by RT-qPCR and Western blot. The HT-29/5-Fu cells were divided into normal control group (NC), nonsense control group (pRS-scrambled) and GLUT1 interfering group (pRS-GLUT1). The gene and protein expression of GLUT1 was detected by RT-qPCR and Western blot. The cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. The gene and protein expression of MRP1, ABCB1, GST- π , Bcl-2 and Bax in HT-29/5-Fu cells and HT-29 cells was detected by RT-qPCR and Western blot. This study showed as below: (1) The gene and protein expression of GLUT1 in 5-Fu-resistant colon cancer tissues was significantly increased than that in 5-Fu-sensitive colon cancer tissues ($P < 0.05$); (2) The inhibitory rate of 5-Fu (5-100 pg/mL) on HT-29 cells was significantly increased than that of HT-29/5-Fu ($P < 0.05$); (3) The gene and protein expression of GLUT1 in HT-29/5-Fu cells was significantly increased than that in HT-29 cells ($P < 0.05$); (4) The mRNA and protein expression of GLUT1 in pRS-GLUT1 group was significantly decreased than that in NC group and pRS-scrambled group ($P < 0.05$); (5) The absorbance in pRS-GLUT1 group was significantly decreased than that in NC group and pRS-scrambled group ($P < 0.05$); (6) The proportion of cells in G₀/G₁ phase in pRS-GLUT1 group was significantly increased, and the proportion of cells in S phase in pRS-GLUT1 group was significantly decreased than that in NC group and pRS-scrambled group ($P < 0.05$); (7) The apoptosis rate in pRS-GLUT1 group was significantly increased than that in NC group and pRS-scrambled group ($P < 0.05$); (8) The mRNA and protein expression of MRP 1, GST- π , ABCB 1 and Bcl-2 in pRS-GLUT1 group was significantly decreased than that in NC group and pRS-scrambled Group ($P < 0.05$), and the mRNA and protein level of Bax in pRS-GLUT1 group was significantly higher than that in NC group and pRS-scrambled group ($P < 0.05$). This study proved that GLUT1 gene silencing can increase the sensitivity of resistant colon cancer cells to 5-Fu, which may be related to regulating cell cycle, promoting apoptosis, inhibiting the expression of drug resistance related proteins, and regulating Bcl2/Bax apoptosis pathway in colon cancer cells.

Keywords GLUT1; gene silencing; colon cancer; HT-29 cells; resistance

结肠癌(colorectal cancer, CRC)是一种常见的消化道恶性肿瘤,是威胁我国居民健康的主要恶性肿瘤之一。近年来结直肠癌在我国的发病率也呈逐年攀升的趋势,目前稳居恶性肿瘤发病谱第3位,其死亡率也高居肿瘤死亡原因第5位,多数患者在确诊时已属于中晚期^[1]。结直肠癌的临床表现主要为排便习惯改变:便血、腹泻、腹部肿块、局部腹痛等。结直肠癌的治疗手段主要为手术治疗、放射治疗、全身化疗等^[2]。中低位进展期直肠癌推荐以5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)为基础的新辅助放化疗,可提高保肛率,延长患者无病生存期。但是,结肠癌患者经过一段时间化疗后对药物敏感性变差,结直肠癌细胞产生多药耐药性是导致化疗失败的主要原因之一^[3]。因此,如何逆转多药耐药性以改善大肠癌患者的预后仍是目前亟待

解决的问题。葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter 1, GLUT1)是一种促进葡萄糖转运到哺乳动物细胞的单转运蛋白,在向细胞提供能量的过程中GLUT1发挥着关键作用^[4]。Glut1是葡萄糖转运蛋白最重要的成员,内含492个氨基酸,由12个疏水性的跨膜 α 螺旋结构域、2个电荷的膜内区及膜外区构成。已有研究显示, GLUT1在口腔鳞状细胞癌组织中表达上调并且与癌症的发生和进展密切相关,进一步研究作用机理,发现miRNA-10a可能通过上调GLUT1促进糖代谢来促进口腔鳞状细胞增殖^[5]。另有研究显示, GLUT1基因沉默能抑制结直肠癌细胞的增殖与分化,促进其凋亡,考虑为抑制TGF- β /PI3KAKT-mTOR信号通路^[6]。此外, GLUT1在耐药人结肠腺癌细胞中表达增加,其表达水平与耐药人结肠腺癌细胞对阿霉

素的敏感性相关^[7]。但是, GLUT1在结直肠细胞中对5-Fu耐药性的作用及机制尚不明确。因此, 本研究通过构建结肠癌5-Fu耐药细胞株, 观察GLUT1表达的变化及其对结肠癌5-氟尿嘧啶耐药性的影响, 并探究其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 组织标本 收集2019年01月—2020年12月在青岛市慧康医院胃肠外科病理确诊的30例结肠癌患者的组织标本(穿刺组织标本), 包括结肠癌组织和癌旁正常组织各0.5 g, 组织样本获得后立即采用生理盐水漂洗, 然后置于-80 °C中保存。本组患者年龄范围33~68岁, 平均年龄为(49.25±9.51)岁; 男性患者17例(56.67%), 女性13例(43.33%); 所有患者均为III期。所有患者均拒绝接受结肠癌根治术, 并且无放疗及其他形式的抗肿瘤治疗史, 患者确诊后接受mFOLFOX6方案(奥沙利铂130 mg/m², 静脉输注2 h; 亚叶酸钙400 mg/m², 静脉输注2 h; 5-Fu 400 mg/m², 快滴; 5-Fu 2 400 mg/m², 持续输注46 h), 每2周重复。完成12次化疗后评估临床疗效, 化疗敏感为治疗后达到临床完全缓解并且6个月内无复发。本组患者有17例5-Fu化疗敏感结肠癌患者和13例5-Fu化疗耐药结肠癌患者, 患者的年龄、性别等临床资料差异均无统计学意义($P>0.05$)。研究设计获得医院伦理学委员会审核批准(20220531), 并获患者知情同意。

1.1.2 细胞株 人结肠癌细胞株HT-29购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.1.3 主要试剂 RPMI-1640培养基和胰蛋白酶购自美国HyClone公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司; 5-Fu和噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)试剂购自美国Sigma-aldrich公司; GLUT1干扰质粒pRS-GLUT1和无义对照质粒pRS-scrambled购自美国Origene公司; Lipofectamine 2000和TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司; AnnexinV-FITC凋亡检测试剂盒购自美国BD公司; Trizol试剂、RIPA裂解液、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)配胶试剂、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳试剂、聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜购自上海碧云天生物技术公司; BCA蛋白定量试剂盒购自南京建成生物公司; 辣根过氧化物酶标记的IgG二抗和ECL试剂盒购自美国Santa公司; RNA反转录试剂盒和实时荧光定量(polymerase chain reaction, PCR)均购自大连宝生物工程有限公司; Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自美国Everbright Inc公司; 抗多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)抗体(货号: ab260038)、ATP结合盒转运体B1(ATP binding cassette transporter B1, ABCB1)抗体(货号: ab290440)、谷胱甘肽S-转移酶- π (Glutathione-S-transferase- π , GST- π)抗体(货号: ab233112)和GAPDH抗体(货号: ab8245)购自英国Abcam公司; MRP1、ABCB1、GST- π 和GAPDH引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供, 引物序列请见表1。

表1 RT-qPCR扩增的引物序列
Table 1 Primer sequence of RT-qPCR amplification

| 基因 mRNA | 引物序列 Primer sequence |
|-----------------------------|---|
| <i>MRP1</i> | Forward: 5'-CTG CAC AAC CTG CGC TT CA-3' Reverse: 5'-GCT CCA GAG CCA TCC AGA CT TC-3' |
| <i>GST-π</i> | Forward: 5'-CCC AAG TTC CAG GAC GGA GAC-3' Reverse: 5'-TCA GCA GCA AGT CCA GAG GF-3' |
| <i>ABCB1</i> | Forward: 5'-CCT AGG AGT ACT CAC TTC AG GA-3' Reverse: 5'-CCA ATC AGC CTC ACC ACA GA-3' |
| <i>Bcl-2</i> | Forward: 5'-GGG AGA ACA GGG TAC GAT AA-3' Reverse: 5'-CCA CCG AAC TCA AAG AA GG-3' |
| <i>Bax</i> | Forward: 5'-TGG CAG CTA ACA TGT TTT CTG AC-3' Reverse: 5'-TCA CCC AAC CAC CCT GGT GTT-3' |
| <i>GAPDH</i> | Forward: 5'-CCA CTC CTC CAC CTT TG-3' Reverse: 5'-CAC CAC CCT GTT GCT GT-3' |

1.1.4 主要仪器 SW-CJ-2D垂直层流净化工作台购自苏州净化设备公司; 371型CO₂恒温培养箱、SL 8R型台式高速冷冻离心机购自美国Thermo Fisher Scientific公司; ELX 800型全自动酶标仪购自美国Bio-Tek公司; FACS Aria III型流式细胞仪购自美国BD Biosciences公司; ABI 7500快速实时荧光定量PCR仪购自美国ABI公司; VILBER INFINITY 3026凝胶成像分析系统购自法国Vilber Lourmat公司; Western-blot电泳仪、电转仪和蛋白质免疫印迹系统购自美国Bio-Rad公司。

1.2 实验方法

1.2.1 结肠癌组织和癌旁正常组织中GLUT1基因和蛋白的测定 取结肠癌和癌旁正常组织各约50 mg, PBS液冲洗后研碎成颗粒。采用Trizol试剂和RIPA裂解液提取总RNA和总蛋白, 采用qRT-PCR和Western blot法检测组织中GLUT1基因和蛋白的表达水平。

1.2.2 细胞复苏、传代和培养 将在液氮中冻存的H-29细胞取出, 37 °C水浴中快速解冻, 离心, 加入RPMI-1640培养基(含10% FBS)重悬细胞并转移至培养管。将细胞置于37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养至细胞融合度达80%左右, 采用0.25%胰酶溶液消化细胞, 用RPMI-1640培养基(含10% FBS)重悬细胞, 按1:3比例传代培养后进行后续实验。

1.2.3 耐药细胞株的建立 采用5-Fu浓度递增间断刺激法诱导建立5-Fu耐药HT-29细胞(HT-29/5-Fu)。取对数生长长期的人结肠癌细胞株HT-29培养于RPMI-1640培养基(含10% FBS), 采用10 pg/mL 5-Fu开始诱导细胞24 h。当细胞开始出现死亡时用PBS清洗3次, 继续用RPMI-1640培养基(含10% FBS, 不含5-Fu)培养。待细胞恢复正常生长后进行传代处理, 待细胞生长至对数期时再加入浓度递增的5-Fu反复诱导, 每次增加10 μg/mL, 直到HT-29细胞可在含40 μg/mL 5-Fu的RPMI-1640培养基(含10% FBS)中正常生长, 最终得到HT-29/5-Fu细胞, 继续后续实验。

1.2.4 MTT法测定5-Fu对亲本HT-29细胞和HT-29/5-Fu细胞的抑制作用 对数生长期的HT-29和HT-29/5-Fu细胞经0.25%胰酶溶液消化后采用RPMI-1640培养基(含10% FBS)重悬细胞, 按 1.0×10^3 个/孔接种密度接种于96孔培养板。各组细胞继续培养24 h后, 更换为含有不同浓度(0、5、10、20、40、100 μg/mL) 5-Fu

的新鲜培养基, 每个浓度设置6个重复。各孔细胞继续培养24 h或48 h, 加入MTT试剂继续培养3 h, 加入DMSO, 采用酶标仪检测各孔在450 nm波长处的吸光度(D)值, 计算5-Fu各浓度对HT-29和HT-29/5-Fu细胞的抑制率。

1.2.5 HT-29细胞中和HT-29/5-Fu细胞中GLUT1基因和蛋白的测定 分别采用Trizol试剂和RIPA裂解液提取HT-29细胞、HT-29/5-Fu细胞的总RNA和总蛋白, 并测定浓度和纯度, 采用qRT-PCR和Western blot法检测细胞中GLUT1基因和蛋白的表达水平。

1.2.6 细胞转染 将对数生长期HT-29/5-Fu细胞按每孔 1×10^5 个细胞接种于6孔培养板中, 将细胞分为正常对照组(NC)、无义对照质粒组(pRS-scrambled)和GLUT1干扰质粒组(pRS-GLUT1)。各组细胞培养至60%~80%融合时加入0.25%胰酶液消化细胞, 然后加入RPMI-1640新鲜培养基终止消化, 无义对照质粒组(pRS-scrambled)和GLUT1干扰质粒组(pRS-GLUT1)按照Lipofectamine 2000转染试剂说明书分别转染4 μg pRS-scrambled和pRS-GLUT1质粒, 正常对照组(NC)转染同体积的RPMI-1640培养基(不含10% FBS)。转染6 h后各组细胞均换为RPMI-1640培养基(含10% FBS)继续培养和开展后续实验。

1.2.7 沉默GLUT1基因对HT-29/5-Fu细胞中GLUT1 mRNA和蛋白的影响 正常对照组(NC)、无义对照质粒组(pRS-scrambled)和GLUT1干扰质粒组(pRS-GLUT1)转染后接种于6孔培养板中, 每孔 1×10^5 个细胞, 在RPMI-1640培养基(含10% FBS)中继续培养48 h。收获各组细胞, 分别采用Trizol试剂和RIPA裂解液提取HT-29细胞、HT-29/5-Fu细胞的总RNA和总蛋白, 采用qRT-PCR和Western blot法检测细胞中GLUT1 mRNA和蛋白的表达水平。

1.2.8 沉默GLUT1基因对HT-29/5-Fu的增殖能力的影响 正常对照组(NC)、无义对照质粒组(pRS-scrambled)和GLUT1干扰质粒组(pRS-GLUT1) HT-29/5-Fu细胞转染后接种于6孔培养板中, 每孔 1×10^5 个细胞, 在含40 μg/mL 5-Fu的RPMI-1640培养基(含10% FBS)中继续培养12、24和48 h, 加入MTT试剂继续培养3 h, 加入DMSO, 采用酶标仪检测各孔在450 nm波长处的吸光度(D)值。

1.2.9 沉默GLUT1基因对HT-29/5-Fu细胞周期的影响 正常对照组(NC)、无义对照质粒组(pRS-

scrambled)和GLUT1干扰质粒组(pRS-GLUT1)转染后接种于6孔培养板中,每孔 1×10^5 个细胞,在RPMI-1640培养基(含10% FBS)中继续培养48 h。各组细胞经0.25%胰酶溶液消化, PBS洗涤3次,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL。取1 mL细胞离心(1 500 r/min离心10 min),加入预冷的70%乙醇固定细胞,4 °C过夜。用PBS洗涤细胞2次后重悬于1 mL PBS中。取100 μ L细胞悬液,加入50 μ g PI染液(含RNAase),37 °C避光孵育30 min,流式细胞仪根据细胞DNA含量不同对细胞计数,分析细胞周期情况。

1.2.10 沉默GLUT1基因对HT-29/5-Fu细胞凋亡的影响 正常对照组(NC)、无义对照质粒组(pRS-scrambled)和GLUT1干扰质粒组(pRS-GLUT1)转染后接种于6孔培养板中,每孔 1×10^5 个细胞,在RPMI-1640培养基(含10% FBS)中继续培养48 h。各组细胞经0.25%胰酶液消化, PBS洗涤3次,离心将细胞重悬于200 μ L结合缓冲液中,加入5 μ L Annexin V-FITC和5 μ L PI染液混匀,室温避光反应15 min,加入300 μ L结合缓冲液,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.11 沉默GLUT1基因对HT-29/5-Fu细胞中MRP1、ABCB1、GST- π 、Bcl-2和Bax mRNA表达水平的影响 正常对照组(NC)、无义对照质粒组(pRS-scrambled)和GLUT1干扰质粒组(pRS-GLUT1)转染后接种于6孔培养板中,每孔 1×10^5 个细胞,在RPMI-1640培养基(含10% FBS)中继续培养48 h。各组细胞经胰酶消化,收集细胞。经PBS冲洗后加入Trizol液提取总RNA。采用全自动酶标仪检测RNA的纯度和浓度,控制260 nm和280 nm处的吸光度(D)值比值范围为1.8~2.0。参照逆转录试剂盒进行RNA逆转录得cDNA。以cDNA为模板,进行定量qRT-PCR扩增。RT-qPCR条件:95 °C预变性2 min;95 °C变性15 s,55 °C退火45 s,72 °C延展60 s,反应40个循环,72 °C延展5 min。以GAPDH作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因MRP1、ABCB1、GST- π 、Bcl-2和Bax的相对表达量。

1.2.12 沉默GLUT1基因对HT-29/5-Fu细胞中MRP1、ABCB1、GST- π 、Bcl-2和Bax蛋白表达水平的影响 正常对照组(NC)、无义对照质粒组(pRS-scrambled)和GLUT1干扰质粒组(pRS-GLUT1)转染后接种于6孔培养板中,每孔 1×10^5 个细胞,在RPMI-1640培养基(含10% FBS)中继续培养48 h。收获各组细胞,加入RIPA裂解液裂解细胞,提取总蛋白后定量,煮沸。

每孔细胞取30 μ g蛋白上样,10% SDS-PAGE凝胶电泳后湿法转至PVDF膜,封闭,洗膜,加入MRP1、ABCB1、GST- π 、Bcl-2、Bax和 β -actin一抗(1:2 000)4 °C过夜,洗膜,加入二抗(1:2 000)25 °C下孵育1 h,洗膜,显色,成像,采用Image-ProPlus图像分析系统对MRP1、ABCB1、GST- π 、Bcl-2、Bax和GAPDH蛋白条带进行灰度值测定。以GAPDH为内参,计算目标蛋白MRP1、ABCB1和GST- π 蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0进行分析。测量结果采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 5-Fu化疗耐药和敏感结肠癌组织中GLUT1 mRNA和蛋白表达水平的比较

本研究收集的17例5-Fu化疗敏感患者和13例5-Fu化疗耐药患者结肠癌组织中的GLUT1 mRNA和蛋白表达水平均较癌旁正常组织显著升高($P < 0.05$),13例5-Fu化疗耐药患者结肠癌组织中GLUT1 mRNA和蛋白表达水平均较17例5-Fu化疗敏感患者结肠癌组织显著升高($P < 0.05$),但是5-Fu化疗敏感患者和5-Fu化疗耐药患者癌旁正常组织中GLUT1 mRNA和蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)(图1)。

2.2 5-Fu对亲本HT-29细胞和HT-29/5-Fu细胞抑制作用的比较

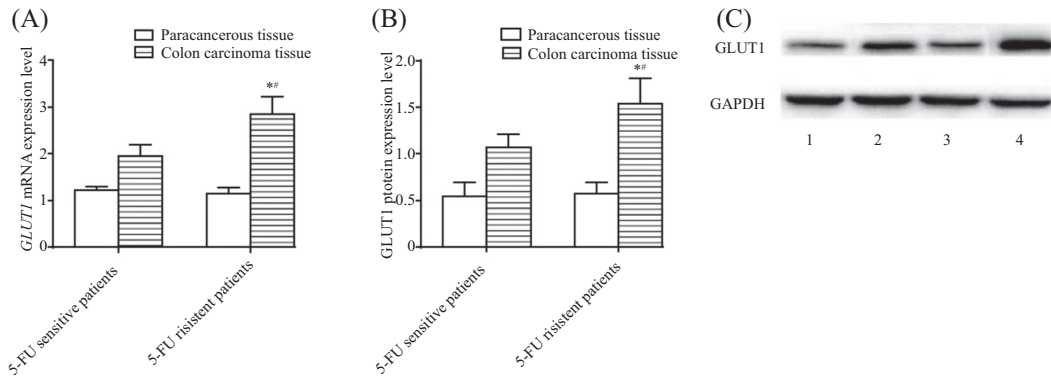
细胞培养24 h或48 h时5-Fu(5~100 μ g/mL)对亲本HT-29细胞抑制率显著高于HT-29/5-Fu($P < 0.05$),说明5-Fu对耐药细胞HT-29/5-Fu的抑制率显著降低(图2)。

2.3 亲本HT-29细胞和HT-29/5-Fu细胞GLUT1 mRNA和蛋白表达水平的比较

HT-29/5-Fu细胞中GLUT1 mRNA和蛋白表达水平较亲本HT-29细胞显著升高($P < 0.05$),说明耐药细胞HT-29/5-Fu中GLUT1 mRNA和蛋白表达水平显著升高(图3)。

2.4 沉默GLUT1基因对HT-29/5-Fu细胞中GLUT1 mRNA和蛋白表达水平的影响

正常对照组(NC)和无义对照质粒组(pRS-scrambled)细胞中GLUT1 mRNA和蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),GLUT1干扰质粒组(pRS-

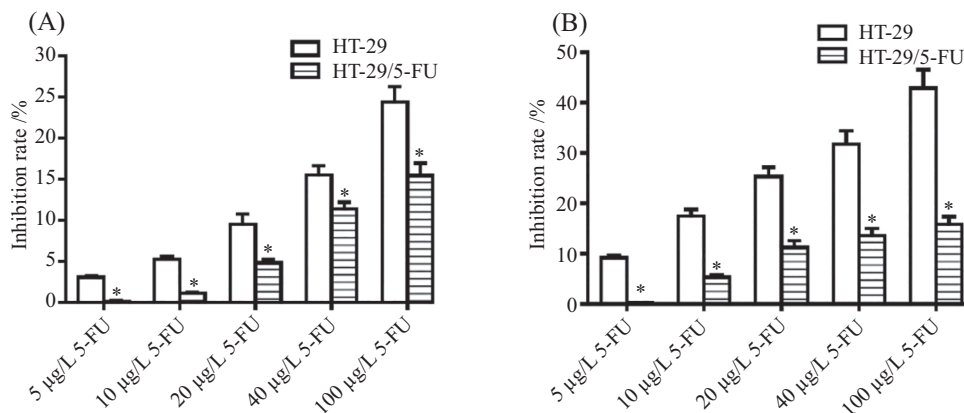


A: 基因测定结果; B: 蛋白测定结果; C: 蛋白电泳图。1: 5-Fu化疗敏感癌旁正常组织; 2: 5-Fu化疗敏感结肠癌组织; 3: 5-Fu化疗耐药癌旁正常组织; 4: 5-Fu化疗耐药结肠癌组织。* $P < 0.05$, 与癌旁正常组织比较; # $P < 0.05$, 与5-Fu化疗敏感患者比较。

A: determine results of gene; B: determine results of protein; C: protein electrophoretogram. 1: 5-Fu chemotherapy sensitive normal tissue adjacent to cancer; 2: 5-Fu chemotherapy sensitive colon cancer tissue; 3: 5-Fu chemotherapy resistant normal tissue adjacent to cancer; 4: 5-Fu chemotherapy resistant colon cancer tissue. * $P < 0.05$ compared with paracancerous tissues; # $P < 0.05$ compared with 5-Fu chemotherapy-sensitive patients.

图1 5-Fu化疗耐药和敏感结肠癌组织中GLUT1 mRNA和蛋白的表达水平

Fig.1 mRNA and protein expression level of GLUT1 in 5-Fu chemotherapy-resistant and sensitive colon cancer tissues



A: 培养24 h时5-Fu对亲本HT-29细胞抑制率; B: 培养48 h时5-Fu对亲本HT-29细胞抑制率。* $P < 0.05$, 与亲本HT-29细胞比较。n=6。

A: the inhibitory rate of 5-Fu on parental HT-29 cells after 24 h of culture; B: the effect of 5-Fu on parental HT-29 cells after 48 h of culture. * $P < 0.05$ compared with parental HT-29 cells. n=6.

图2 5-Fu对亲本HT-29细胞和HT-29/5-Fu细胞的抑制作用

Fig.2 Inhibition of 5-Fu on growth of parental HT-29 cells and HT-29/5-Fu cells

GLUT1)细胞中 GLUT1 mRNA和蛋白表达水平较正常对照组(NC)和无义对照质粒组(pRS-scrambled)显著降低($P < 0.05$), 说明耐药细胞HT-29/5-Fu沉默GLUT1基因可显著降低GLUT1 mRNA和蛋白表达水平(图4)。

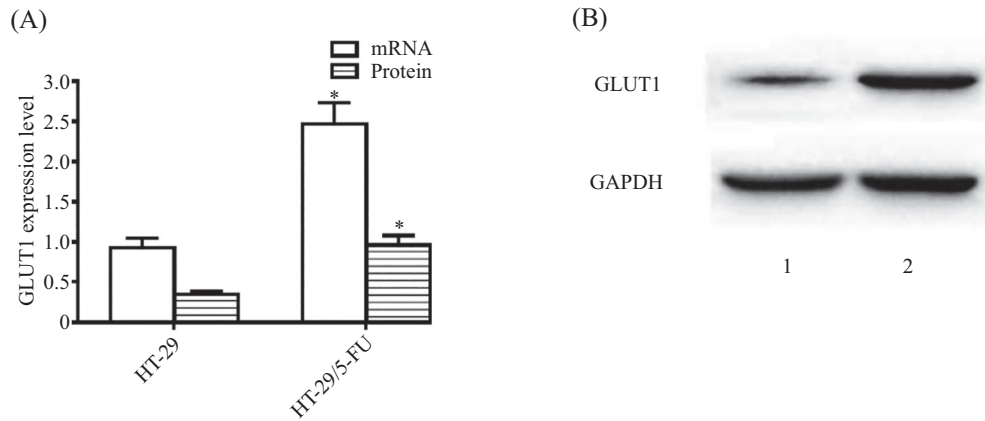
2.5 沉默GLUT1基因对HT-29/5-Fu细胞增殖能力的影响

培养12 h和24 h三组细胞吸光度值差异均无统计学意义($P > 0.05$), 培养48 h时, 正常对照组(NC)和无义对照质粒组(pRS-scrambled)细胞吸光度差异均无统计学意义($P > 0.05$), 但是GLUT1干扰质粒组(pRS-GLUT1)细胞吸光度较正常对照组(NC)和无义

对照质粒组(pRS-scrambled)显著降低($P < 0.05$), 说明耐药细胞HT-29/5-Fu沉默GLUT1基因可显著抑制细胞增殖能力(图5)。

2.6 沉默GLUT1基因对HT-29/5-Fu细胞周期的影响

正常对照组(NC)和无义对照质粒组(pRS-scrambled)细胞G₀/G₁期和S期差异无统计学意义($P > 0.05$), GLUT1干扰质粒组(pRS-GLUT1)细胞G₀/G₁期较正常对照组(NC)和无义对照质粒组(pRS-scrambled)显著升高($P < 0.05$), 而细胞S期较正常对照组(NC)和无义对照质粒组(pRS-scrambled)显著降低($P < 0.05$), 三组细胞M期差异均无统计意义

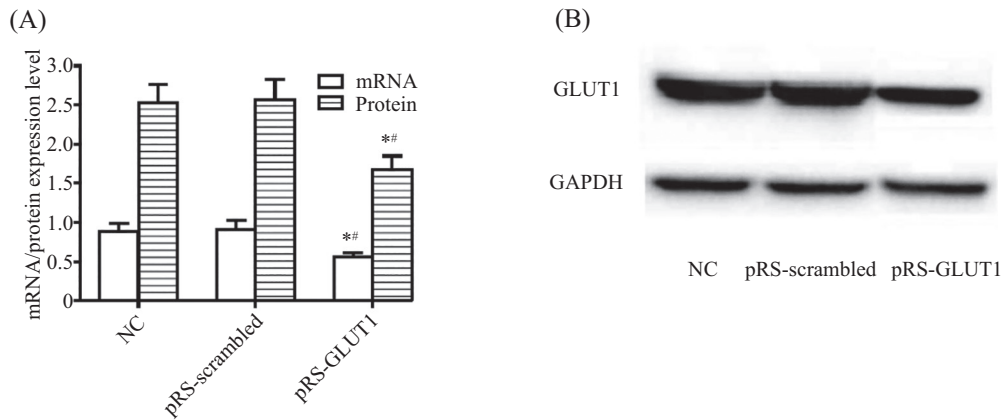


A: 基因和蛋白测定结果; B: 蛋白电泳图。* $P < 0.05$, 与亲本HT-29细胞比较。1: 亲本HT-29细胞; 2: HT-29/5-Fu细胞。

A: determine results of gene and protein; B: protein electrophoretogram. * $P < 0.05$ compared with parental HT-29 cells. 1: parental HT-29 cell; 2: HT-29/5-Fu cell.

图3 亲本HT-29细胞和HT-29/5-Fu细胞中GLUT1 mRNA和蛋白的表达水平

Fig.3 mRNA and protein expression level of GLUT1 in parental HT-29 cells and HT-29/5-Fu cells

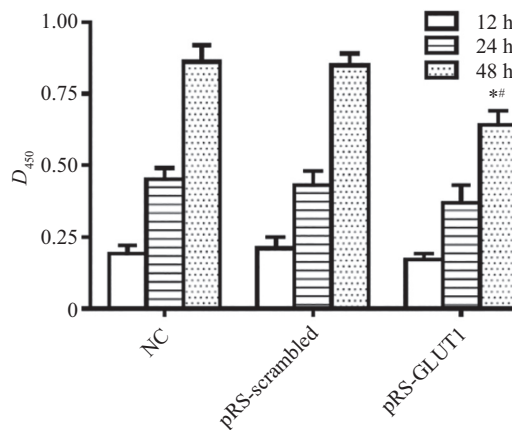


A: 基因和蛋白测定结果; B: 蛋白电泳图。* $P < 0.05$, 与NC组比较; # $P < 0.05$, 与pRS-scrambled组比较。n=6。

A: determine results of gene and protein; B: protein electrophoretogram. * $P < 0.05$ compared with NC group; # $P < 0.05$ compared with pRS-scrambled group. n=6.

图4 沉默GLUT1基因对HT-29/5-Fu细胞中GLUT1 mRNA和蛋白的影响

Fig.4 Effect of GLUT1 gene silencing on mRNA and protein expression of GLUT1 in HT-29/5-Fu cells



* $P < 0.05$, 与NC比较; # $P < 0.05$, 与pRS-scrambled比较。n=6。

* $P < 0.05$ compared with NC group; # $P < 0.05$ compared with pRS-scrambled group. n=6.

图5 GLUT1基因沉默对HT-29/5-Fu细胞增殖力的影响

Fig.5 Effect of GLUT1 gene silencing on proliferation of HT-29/5-Fu cells

($P>0.05$), 上述结果说明, 耐药细胞HT-29/5-Fu沉默 *GLUT1* 基因可显著抑制细胞周期(图6)。

2.7 沉默 *GLUT1* 基因对 HT-29/5-Fu 细胞凋亡的影响

正常对照组(NC)和无义对照质粒组(pRS-scrambled)细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$), *GLUT1* 干扰质粒组(pRS-*GLUT1*)细胞凋亡率较正常对照组(NC)和无义对照质粒组(pRS-scrambled)显著升高($P<0.05$), 说明耐药细胞HT-29/5-Fu沉默 *GLUT1* 基因可显著促进细胞凋亡(图7)。

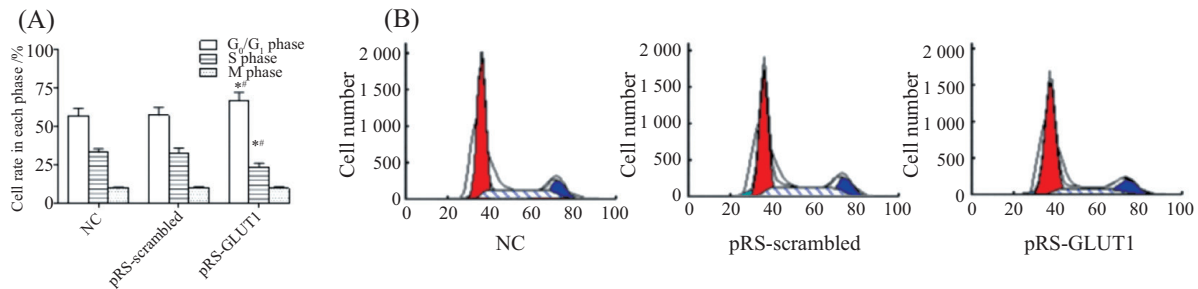
2.8 沉默 *GLUT1* 基因对 HT-29/5-Fu 细胞中 *MRP1*、*ABCB1*、*GST- π* 、*Bcl-2* 和 *Bax* mRNA 表达的影响

正常对照组(NC)和无义对照质粒组(pRS-scrambled) *MRP1*、*ABCB1*、*GST- π* 、*Bcl-2* 和 *Bax* mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$), *GLUT1* 干扰质粒组(pRS-*GLUT1*) *MRP1*、*ABCB1*、*GST- π* 和 *Bcl-2* mRNA 表达水平较正常对照组(NC)和无义对照质粒组(pRS-scrambled)显著降低($P<0.05$), *Bax* mRNA 表

达水平较正常对照组(NC)和无义对照质粒组(pRS-scrambled)显著升高($P<0.05$)。上述结果说明, 耐药细胞HT-29/5-Fu沉默 *GLUT1* 基因可显著抑制 *MRP1*、*ABCB1*、*GST- π* 和 *Bcl-2* mRNA 的表达, 而显著促进 *Bax* mRNA 的表达(图8)。

2.9 沉默 *GLUT1* 基因对 HT-29/5-Fu 细胞中 *MRP1*、*ABCB1*、*GST- π* 、*Bcl-2* 和 *Bax* 蛋白表达的影响

正常对照组(NC)和无义对照质粒组(pRS-scrambled) *MRP1*、*ABCB1*、*GST- π* 、*Bcl-2* 和 *Bax* 蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$), *GLUT1* 干扰质粒组(pRS-*GLUT1*) *MRP1*、*ABCB1*、*GST- π* 和 *Bcl-2* 蛋白表达水平较正常对照组(NC)和无义对照质粒组(pRS-scrambled)显著降低($P<0.05$), *Bax* 蛋白表达水平较正常对照组(NC)和无义对照质粒组(pRS-scrambled)显著升高($P<0.05$)。上述结果说明, 耐药细胞HT-29/5-Fu沉默 *GLUT1* 基因可显著抑制 *MRP1*、*ABCB1*、*GST- π* 和 *Bcl-2* 蛋白的表达, 而显著促进 *Bax* 蛋白的表达(图9)。

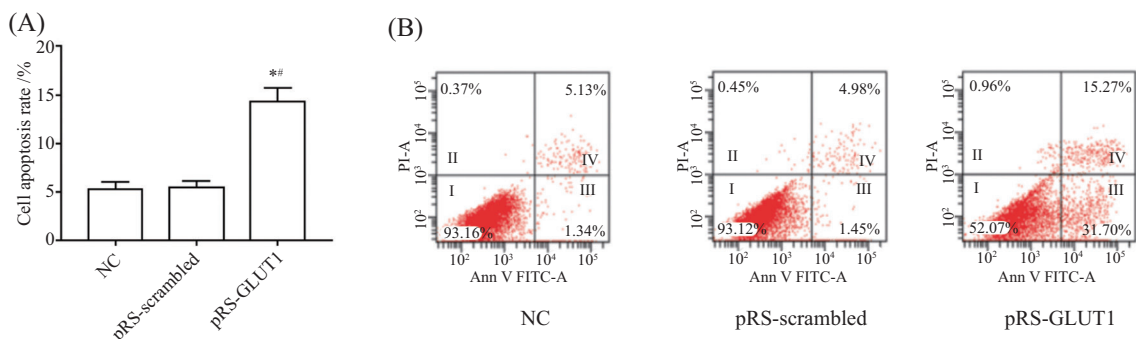


A: 细胞周期测定结果; B: 细胞凋亡流式细胞图。* $P<0.05$, 与NC组比较; # $P<0.05$, 与pRS-scrambled组比较。n=6。

A: determine results of cell cycle; B: flow cytometry of cell cycle. * $P<0.05$ compared with NC group; # $P<0.05$ compared with pRS-scrambled group. n=6.

图6 *GLUT1* 基因沉默对 HT-29/5-Fu 细胞周期的影响

Fig.6 Effect of *GLUT1* gene silencing on cell cycle of HT-29/5-Fu cells

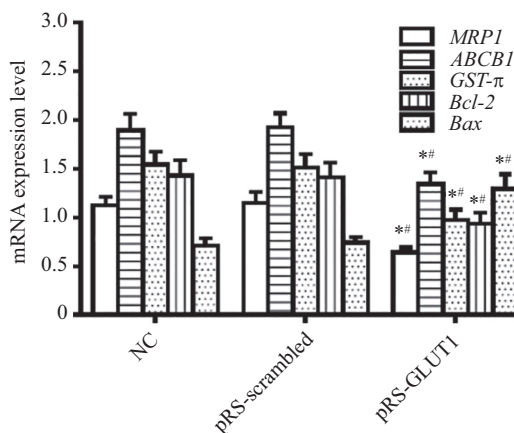


A: 细胞凋亡测定结果; B: 细胞凋亡流式细胞图。* $P<0.05$, 与NC组比较; # $P<0.05$, 与pRS-scrambled组比较。n=6。

A: determine results of cell apoptosis; B: flow cytometry of cell apoptosis. * $P<0.05$ compared with NC group; # $P<0.05$ compared with pRS-scrambled group. n=6.

图7 *GLUT1* 基因沉默对 HT-29/5-Fu 细胞凋亡的影响

Fig.7 Effect of *GLUT1* gene silencing on cell apoptosis of HT-29/5-Fu cells

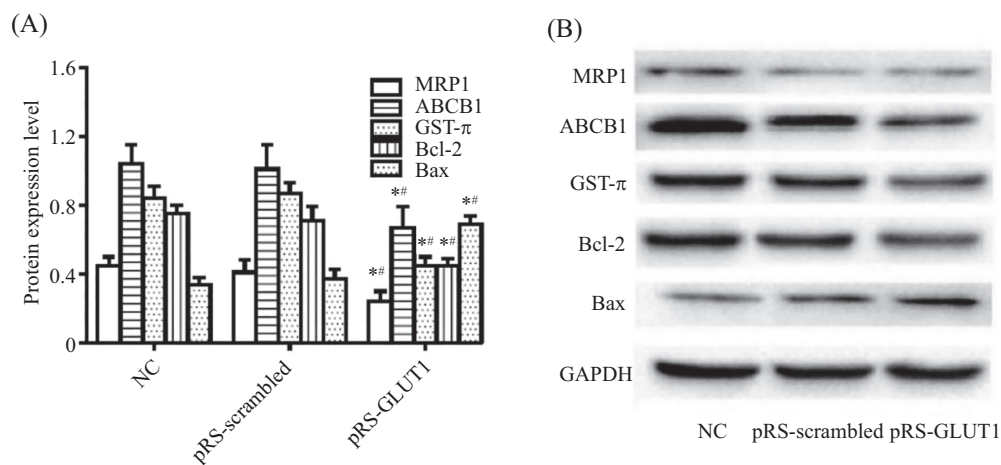


* $P < 0.05$, 与NC比较; # $P < 0.05$, 与pRS-scrambled比较。n=6。

* $P < 0.05$ compared with NC group; # $P < 0.05$ compared with pRS-scrambled group. n=6.

图8 GLUT1基因沉默对HT-29/5-Fu细胞中MRP1、ABCB1、GST-π、Bcl-2和Bax mRNA表达的影响

Fig.8 Effects of GLUT1 gene silencing on the mRNA expression of MRP1, ABCB1, GST-π, Bcl-2 and Bax in HT-29/5-Fu cells



A: 蛋白测定结果; B: 蛋白电泳图。* $P < 0.05$, 与NC比较; # $P < 0.05$, 与pRS-scrambled比较。n=6。

A: determine results of protein; B: protein electrophoretogram. * $P < 0.05$ compared with NC group; # $P < 0.05$ compared with pRS-scrambled group. n=6.

图9 GLUT1基因沉默对HT-29/5-Fu细胞中MRP1、ABCB1、GST-π、Bcl-2和Bax蛋白表达的影响

Fig.9 Effects of GLUT1 gene silencing on the protein expression of MRP1, ABCB1, GST-π, Bcl-2 and Bax in HT-29/5-Fu cells

3 讨论

结直肠癌耐药机制可能涉及药物转运蛋白的活化、升高药物新陈代谢和改变药物靶点和DNA修复能力增强等方面^[8]。恶性肿瘤的高消耗、高代谢病理特征客观上要求摄取的能量显著增加。而细胞所需能量来源葡萄糖必须依赖跨膜分布的GLUT作为载体。葡萄糖转运蛋白家族以组织特异性的方式促进葡萄糖在哺乳动物细胞质膜上的转运^[9]。GLUT1是葡萄糖转运蛋白最重要的成员,目前研究发现, GLUT1在多种恶性肿瘤中表达上调,并且与患者的临床预后相关。KURAHARA等^[10]研究表明,胰腺导管癌组织中GLUT1表达增加, GLUT1表达水平越高则患者的临床预后越差^[10]。SELEIT等^[11]研

究显示, GLUT1在非黑色素瘤皮肤癌中表达上调,是非黑色素瘤癌变的潜在风险因素^[11]。有临床荟萃分析证实,高表达GLUT1可作为多种恶性肿瘤独立的预后指标,可用于监测肿瘤患者的生存预后^[12]。在食管癌中GLUT1蛋白表达上调,并且通过上调自噬促进食管癌细胞对顺铂的耐药性^[13]。另有研究显示, GLUT1基因沉默能抑制结直肠癌细胞的增殖与分化,促进其凋亡,考虑为抑制TGF-β/PI3KAKT-mTOR信号通路^[3]。但是,关于结直肠癌的耐药性是否与GLUT1表达有关,目前尚未有报道。

本研究显示, 5-Fu化疗耐药结肠癌组织中GLUT1基因和蛋白表达水平均较5-Fu化疗敏感结肠癌组织升高,提示GLUT1可能在结肠癌5-Fu的化疗耐药中

发挥一定作用。采用5-Fu浓度递增间断刺激法诱导建立5-Fu耐药HT-29细胞(HT-29/5-Fu), 通过MTT实验显示培养24 h或48 h时5-Fu(5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对亲本HT-29细胞的抑制率较HT-29/5-Fu显著升高, 说明耐药细胞诱导成功。HT-29/5-Fu细胞中GLUT1基因和蛋白的表达水平较其亲本HT-29细胞显著升高, 体外实验进一步证明, GLUT1可能在结肠癌5-Fu的化疗耐药中发挥作用。

本研究进一步通过向HT-29/5-Fu细胞转染pRS-GLUT1沉默GLUT1探究人结直肠癌细胞对5-Fu耐药性的调控作用及其机制。研究结果显示, 经过向HT-29/5-Fu细胞转染pRS-GLUT1沉默GLUT1后GLUT1干扰质粒组细胞中GLUT1 mRNA和蛋白表达水平较正常对照组和无义对照质粒组显著降低($P<0.05$), 说明HT-29/5-Fu细胞沉默GLUT1表达成功。MTT实验显示, GLUT1干扰质粒组48 h细胞吸光度均较正常对照组和无义对照质粒组显著降低($P<0.05$), 说明沉默GLUT1可抑制HT-29/5-Fu细胞的增殖。进一步研究发现, GLUT1干扰质粒组G₀/G₁期细胞比例较正常对照组和无义对照质粒组显著升高, 而S期细胞比例显著减少, 说明沉默GLUT1可干扰HT-29/5-Fu细胞的细胞周期而发挥抑制HT-29/5-Fu细胞增殖的作用。

细胞失控性增殖和凋亡抑制可导致肿瘤发生, 因此诱导肿瘤细胞凋亡和增殖抑制是预防肿瘤发生、发展的重要策略^[14]。本研究结果显示, GLUT1干扰质粒组细胞凋亡率较正常对照组和无义对照质粒组显著升高($P<0.05$), 说明沉默GLUT1可促进HT-29/5-Fu细胞的凋亡。肿瘤细胞通常GLUT1表达上调, 维持葡萄糖代谢并对细胞凋亡产生抵抗^[15]。葡萄糖缺乏时, GLUT1表达升高可通过增强线粒体超氧化物歧化酶和还原性谷胱甘肽活性, 使肿瘤细胞对葡萄糖缺乏诱导的细胞死亡的抵抗力增加^[16]。因此, GLUT1在肿瘤细胞耐药方面具有重要作用。

获得性耐药是5-Fu化疗耐药的重要途径, 但是获得性耐药机制并不十分明确。研究发现可能的耐药机制是通过激活或过表达药物流失通路的相关蛋白包括多药耐药蛋白(MDR1、P-gp、ABCB1和MRP1等), 从而降低细胞内药物浓度, 抑制治疗效果的, 此类蛋白表达上调会抑制药物对癌细胞的毒性作用, 增强细胞对药物的存活能力^[17]。药物转运是药物在体内发挥效应的重要环节, 也是导致多药耐

药的关键因素。ABC转运蛋白是一类跨膜转运蛋白超家族, 可利用ATP水解产生的能量将与其结合的底物主动泵出细胞外^[18]。其中研究最多的ABC转运蛋白为ABCB 1, *ABCB 1*基因编码的ABCB 1蛋白/P-糖蛋白过度表达是最早发现的一种经典耐药机制。ABCB 1在多种恶性肿瘤组织中高表达, 此为导致肿瘤产生多药耐药性的重要因素^[19]。因此, 降低ABCB 1的表达有可能提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[20]。随着研究的逐渐深入, MRP亦逐渐被发现, MRP均可通过与药物结合, 促使蛋白结构发生改变, 从而减少细胞内药物的蓄积^[21]。催化谷胱甘肽与化疗药物的结合, 增加化疗药水溶性以增加其排除是形成多药耐药的重要机制。GST是同源二聚体酶超基因家族的一种, 有GST- θ 、GST- μ 、GST- α 、GST- π 等多种同工酶, 其中GST- π 是细胞内解毒系统的关键组成部分, 目前已经证实与肿瘤耐药密切相关^[22]。GST- π 除发挥直接细胞解毒作用外, 还可抑制凋亡通路MARK, 抑制肿瘤细胞凋亡而导致细胞耐药^[23]。因此, GST- π 在细胞内的含量增加越多, 表明肿瘤细胞的解毒能力就会越强。本研究结果显示, GLUT1干扰质粒组细胞中MRP 1、GST- π 和ABCB 1 mRNA和蛋白表达较正常对照组和无义对照质粒组显著升高($P<0.05$), 说明沉默GLUT1可抑制HT-29/5-Fu细胞中耐药蛋白MRP 1、GST- π 和ABCB 1的表达, 从而提高HT-29/5-Fu的化疗敏感性。

Bcl-2和Bax是调节细胞存活与凋亡的经典信号通路, 其中Bcl-2是抗凋亡因子, Bax是促凋亡因子^[24]。Bax与Bcl-2结合后可激活Caspase途径, 促进细胞凋亡^[25]。本研究结果显示, GLUT1干扰质粒组细胞中Bcl-2 mRNA和蛋白表达显著降低($P<0.05$), 而Bax mRNA和蛋白表达显著升高($P<0.05$), 说明沉默GLUT1可抑制HT-29/5-Fu细胞中Bcl-2/Bax凋亡通路从而提高HT-29/5-Fu的化疗敏感性。

总之, *GLUT1*基因沉默可增加耐药结肠癌细胞对5-Fu的敏感性, 这可能与调节细胞周期、促进细胞凋亡、抑制结肠癌细胞中耐药相关蛋白表达以及调节Bcl2/Bax凋亡通路有关。

参考文献 (References)

- [1] CHEN W, ZHENG R, ZHANG S, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2013 [J]. *Cancer Lett*, 2017, 401: 63-71.
- [2] YANG K, ZHANG F, HAN P, et al. Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for colorectal

- cancer [J]. *Metabolomics*, 2018, 14(9): 110-21.
- [3] KOTELEVETS L, CHASTRE E, DESMALE D, et al. Nanotechnologies for the treatment of colon cancer: from old drugs to new hope [J]. *Int J Pharm*, 2016, 514(1): 24-40.
- [4] KAPOOR K, FINER-MOORE J S, PEDERSEN B P, et al. Mechanism of inhibition of human glucose transporter *glut1* is conserved between cytochalasin b and phenylalanine amides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(17): 4711-6.
- [5] CHEN Y H, SONG Y, YU Y L, et al. miRNA-10a promotes cancer cell proliferation in oral squamous cell carcinoma by up-regulating GLUT1 and promoting glucose metabolism [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(2): 5441-6.
- [6] 郭圣超, 武雪亮, 薛军, 等. GLUT1基因沉默对人结肠癌HT-29细胞株增殖、分化及凋亡的影响及机制研究[J]. 安徽医科大学学报(GUO S C, WU X L, XUE J, et al. Effect of *Glut 1* gene silencing on proliferation, differentiation and apoptosis of human colon cancer cell line HT-29 and its mechanism [J]. *J Anhui Med Univ*), 2021, 56(5): 790-5.
- [7] CATANZARO D, GABBIA D, COCETTA V, et al. Silybin counteracts doxorubicin resistance by inhibiting GLUT1 expression [J]. *Fitoterapia*, 2018, 124(7): 42-8.
- [8] SALIKA T, ABEL G A, MENDONCA S C, et al. Associations between diagnostic pathways and care experience in colorectal cancer: evidence from patient-reported data [J]. *Frontline Gastroenterol*, 2018, 9(3): 241-8.
- [9] BYERS M S, HOWARD C, WANG X. Avian and mammalian facilitative glucose transporters [J]. *Microarrays*, 2017, 6(2): 7-15.
- [10] KURAHARA H, MAEMURA K, MATAKI Y, et al. Significance of glucose transporter type 1 (GLUT-1) expression in the therapeutic strategy for pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2018, 25(5): 1432-9.
- [11] SELEIT I, BAKRY O A, AL-SHARAKY D R, et al. Evaluation of hypoxia inducible factor-1 α and glucose transporter-1 expression in Nonmelanoma skin cancer: an immunohistochemical study [J]. *J Clin Diagn Res*, 2017, 11(6): EC09-16.
- [12] ZHAO Z X, LU L W, QIU J, et al. Glucose transporter-1 as an independent prognostic marker for cancer: a meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(2): 2728-38.
- [13] 张曦, 赵堃, 雷光焰, 等. GLUT1 蛋白对食管癌细胞顺铂耐药性的作用及其机制研究[J]. 广西医科大学学报(ZHANG X, ZHAO K, LEI G Y, et al. Effect and mechanism of GLUT1 protein on cisplatin resistance of esophageal cancer cells [J]. *J Guangxi Med Univ*), 2021, 38(8): 1504-10.
- [14] PFEFFER C M, SINGH A. Apoptosis: a target for anticancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 448-57.
- [15] BARRON C C, BILAN P J, TSAKIRIDIS T, et al. Facilitative glucose transporters: implications for cancer detection, prognosis and treatment [J]. *Metab Clin Exp*, 2016, 65(4): 124-39.
- [16] GONZALEZ-MENENDEZ P, HEVIA D, ALONSO-ARIAS R, et al. GLUT1 protects prostate cancer cells from glucose deprivation-induced oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2018, 17(6): 112-27.
- [17] 刘蒙, 黄晓东, 韩崢, 等. 多种人结肠癌5-氟尿嘧啶耐药细胞株的建立及耐药机制初步研究[J]. 中国普通外科杂志(LIU M, HUANG X D, HAN Z, et al. Establishment of several human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil and preliminary analysis of the mechanism for drug resistance [J]. *Chin J Gen Surg*), 2019, 28(10): 1245-52.
- [18] AMAWI H, SIM H M, TIWARI A K, et al. ABC transporter-mediated multidrug-resistant cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1141(4): 549-80.
- [19] LOMBARD A P, LIU C, ARMSTRONG C M, et al. Overexpressed ABCB1 induces Olaparib-Taxane cross-resistance in advanced prostate cancer [J]. *Transl Oncol*, 2019, 12(7): 871-8.
- [20] LAGE H. Gene therapeutic approaches to overcome ABCB1-mediated drug resistance [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2016, 209: 87-94.
- [21] CHEN M, LI D J, GONG N, et al. MiR-133b down-regulates ABCB1 and enhances the sensitivity of CRC to anti-tumor drugs [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(32): 52983-94.
- [22] 邹翩, 裴江鸿, 石卫, 等. 基于GST- π 的抗肿瘤药物研究进展 [J]. 药理学报(ZOU P, PEI J H, SHI W, et al. Anticancer drugs targeting glutathione S-transferase [J]. *Acta Pharm Sin*), 2016, 51(2): 241-7.
- [23] NAKAYAMA I, SHINOZAKI E, MATSUSHIMA T, et al. Retrospective study of RAS/PIK3CA/BRAF tumor mutations as predictors of response to first-line chemotherapy with bevacizumab in metastatic colorectal cancer patients [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 38.
- [24] ZHANG Y, YANG X, GE X H, et al. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 726-33.
- [25] LOCHMANN T L, BOUCK Y M, FABER A C. BCL-2 inhibition is a promising therapeutic strategy for small cell lung cancer [J]. *Oncoscience*, 2018, 5(7/8): 218-9.