

沉默 *GPR139* 基因对乳腺癌细胞增殖、凋亡和自噬的影响 及其机制

姚晓含¹, 姚明辰², 王志清², 李赫阳², 闫 燕¹, 雷宁静³

(1. 郑州大学第一附属医院医学研究中心, 河南 郑州 450052; 2. 郑州大学第一临床医学院, 河南 郑州 450052; 3. 郑州大学基础医学院微生物与免疫学系, 河南 郑州 450001)

[摘 要] **目的:** 探讨沉默 G 蛋白偶联受体 139 (*GPR139*) 基因对乳腺癌细胞增殖、凋亡和自噬的影响, 并阐明其可能的作用机制。**方法:** 通过癌症基因组图谱 (TCGA) 和人类蛋白质图谱 (HPA) 数据库下载 *GPR139* mRNA 和蛋白在乳腺癌组织与正常组织中的表达情况。利用慢病毒干扰技术将 *GPR139* 短发夹 RNA (shRNA) 转染至人乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞系中, 分为 sh-NC 组 (感染阴性对照慢病毒)、sh-*GPR139* (感染 *GPR139* shRNA 干扰慢病毒) 和 sh-NC+F05 组 (感染阴性对照慢病毒后, 加入 *GPR139* 拮抗剂 NCRW0005-F05)。采用噻唑蓝 (MTT) 法检测各组乳腺癌细胞增殖活性, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法和 Western blotting 法检测各组乳腺癌细胞中细胞增殖标志物 *Ki-67*、细胞周期素 (*Cyclin*) *D1*、*Cyclin E1* 和 *P21* mRNA 及蛋白表达水平, 流式细胞术检测各组乳腺癌细胞凋亡率, Western blotting 法检测各组乳腺癌细胞中腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)、磷酸化 AMPK、Unc-51 样自噬激活激酶 1 (ULK1)、磷酸化 ULK1、微管相关蛋白 1 轻链 3A/B (LC3A/B) 和 P62 蛋白表达水平, 免疫荧光法检测各组乳腺癌细胞中 LC3A/B 蛋白表达水平。**结果:** TCGA 和 HPA 数据库, 在人乳腺癌组织中的 *GPR139* mRNA 表达水平明显高于正常组织 ($P < 0.001$), *GPR139* 蛋白表达量明显高于正常组织。MTT 法, 与 sh-NC 组比较, sh-*GPR139* 组和 sh-NC+F05 组乳腺癌细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.01$)。Western blotting 法, 与 sh-NC 组比较, sh-*GPR139* 组和 sh-NC+F05 组乳腺癌细胞中 *GPR139*、*Ki67*、*Cyclin D1* 和 *Cyclin E1* 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), *P21* 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$)。RT-qPCR 法, 与 sh-NC 组比较, sh-*GPR139* 组和 sh-NC+F05 组乳腺癌细胞中 *GPR139*、*Ki67*、*Cyclin D1* 和 *Cyclin E1* mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), *P21* mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$)。流式细胞术, 与 sh-NC 组比较, sh-*GPR139* 组和 sh-NC+F05 组乳腺癌细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.01$)。免疫荧光法, 在 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞中, 与 sh-NC 组比较, sh-*GPR139* 组和 sh-NC+F05 组细胞中 LC3A/B 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。Western blotting 法, 与 sh-NC 组比较, sh-*GPR139* 组和 sh-NC+F05 组 LC3A/B、p-AMPK 和 p-ULK1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), P62 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** 沉默 *GPR139* 基因可诱导乳腺癌细胞自噬和凋亡, 抑制细胞增殖, 其机制可能与升高细胞中 AMPK 和 ULK1 磷酸化水平有关。

[关键词] 乳腺癌; G 蛋白偶联受体 139; 细胞增殖; 细胞凋亡; 自噬; 腺苷酸活化蛋白激酶

[中图分类号] R737.9 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2025-02-13 [录用日期] 2025-03-24

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82303343)

[作者简介] 姚晓含 (1990—), 女, 河南省许昌市人, 实验师, 生物学硕士, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。

[通信作者] 雷宁静, 副教授, 硕士研究生导师 (E-mail: lnj717@zzu.edu.cn)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Effect of silencing *GPR139* gene on proliferation, apoptosis and autophagy of breast cancer cells and its mechanism

YAO Xiaohan¹, YAO Mingchen², WANG Zhiqing², LI Heyang², YAN Yan¹, LEI Ningjing³

(1. Medical Research Center, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;

2. First Clinical Academy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 3. Department of Microbiology and Immunology, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of silencing G protein-coupled receptor 139 (*GPR139*) gene on the proliferation, apoptosis and autophagy of breast cancer cells, and to clarify its possible mechanism. **Methods:** The expression of *GPR139* mRNA and protein in breast cancer tissue and normal tissue was downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Human Protein Atlas (HPA) databases; the *GPR139* short hairpin RNA (shRNA) was transfected into the human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines by lentiviral interference technology, and the cells were divided into sh-NC group (infected with negative control lentivirus), sh-GPR139 group (infected with *GPR139* shRNA interference lentivirus), and sh-NC+F05 group (after infected with negative control lentivirus, *GPR139* antagonist NCRW0005-F05 was added); methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) method was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups; Western blotting and real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) methods were used to detect the expression levels of proliferation markers *Ki-67*, *Cyclin D1*, *Cyclin E1*, and *P21* mRNA and proteins in the cells in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the breast cancer cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), phosphorylated AMPK, Unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1), phosphorylated ULK1, microtubule-associated protein 1 light chain 3A/B (LC3A/B), and P62 proteins in the cells in various groups; immunofluorescence method was used to detect the expression level of LC3A/B protein in the breast cancer cells in various groups. **Results:** The TCGA and HPA database results showed that the expression level of *GPR139* mRNA in human breast cancer tissue was significantly higher than that in normal tissue ($P < 0.001$), and the expression level of *GPR139* protein was significantly higher than that in normal tissue. The MTT assay results showed that compared with sh-NC group, the proliferation activities of the breast cancer cells in sh-GPR139 group and sh-NC+F05 group were significantly decreased ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that compared with sh-NC group, the expression levels of *GPR139*, *Ki67*, *Cyclin D1* and *Cyclin E1* proteins in the breast cancer cells in sh-GPR139 group and sh-NC+F05 group were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the expression level of *P21* protein was increased ($P < 0.01$). The RT-qPCR results showed that compared with sh-NC group, the expression levels of *GPR139*, *Ki67*, *Cyclin D1* and *Cyclin E1* mRNA in the breast cancer cells in sh-GPR139 group and sh-NC+F05 group were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the expression level of *P21* mRNA was increased ($P < 0.01$). The flow cytometry results showed that compared with sh-NC group, the apoptotic rates of the breast cancer cells in sh-GPR139 group and sh-NC+F05 group were significantly increased ($P < 0.01$). The immunofluorescence results showed that in MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells, compared with sh-NC group, the expression levels of LC3A/B protein in the cells in sh-GPR139 group and sh-NC+F05 group were significantly increased ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that compared with sh-NC group, the expression levels of LC3A/B, p-AMPK and p-ULK1 proteins in sh-GPR139 group and sh-NC+F05 group were significantly increased ($P < 0.01$), and the expression level of P62 protein was significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Silencing *GPR139* gene can

induce autophagy and apoptosis of breast cancer cells and inhibit cell proliferation, and its mechanism may be related to the increased phosphorylation levels of AMPK and ULK1 in the cells.

KEYWORDS Breast cancer; G protein-coupled receptor 139; Cell proliferation; Apoptosis; Autophagy; Adenosine monophosphate-activated protein kinase

乳腺癌是女性最常见的癌症类型, 其占女性癌症死亡总数的 6.10%^[1-2]。2022 年全球乳腺癌新发病例数为 230 万例, 全球乳腺癌死亡病例数为 67 万例^[3]。乳腺癌治疗以手术切除为主, 但其复发率较高, 为 11.8%^[4-5]。因此深入探索并阐明乳腺癌发生发展机制可为乳腺癌的治疗提供新的作用靶点。G 蛋白偶联受体 139 (G protein-coupled receptor 139, GPR139) 是一种 G 蛋白偶联受体蛋白, 其基因位于 16p12.3, 相对分子质量为 45 000。GPR139 主要通过偶联 $G_{\alpha_{q/11}}$ 蛋白来激活下游钙离子和环磷酸腺苷等信号分子调节神经递质释放、能量代谢和摄食行为^[6-7]。研究^[8-9]显示: GPR139 在多种肿瘤中高表达, 通过激活细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK) 和蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 等信号通路促进肿瘤的增殖、存活和转移。目前 GPR139 在乳腺癌中的功能和作用机制还未见相关报道。本研究探讨沉默 *GPR139* 基因对乳腺癌细胞增殖、凋亡和自噬的影响并阐明其作用机制, 为乳腺癌的治疗提供新思路。

1 资料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA-MB-231 (美国 ATCC 公司)。高糖培养基 (美国 Hyclone 公司), 胎牛血清和胰酶 (美国 Gibco 公司), GPR139 拮抗剂 NCRW0005-F05 (美国 MCE 公司), 反转录试剂盒和 qPCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), *GPR139* 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 干扰慢病毒和阴性对照慢病毒 (上海吉玛基因公司), qPCR 引物 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]。噻唑蓝 (methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium promide, MTT) 和 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (上海碧云天公司), 二喹啉甲酸 (2-quinolinecarboxylic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白 Marker、凝胶预混液和超敏化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒 (上海雅酶生物公司), GPR139、Ki-67、细胞周期素 (Cyclin) D1、Cyclin E1、P21 和 β -肌动蛋白

(β -actin) 抗体 (英国 Abcam 公司), 微管相关蛋白 1 轻链 3A/B (microtubule-associated protein 1 light chain 3A/B, LC3A/B)、P62、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)、磷酸化 AMPK (phosphorylated-AMPK, p-AMPK)、Unc-51 样自噬激活激酶 1 (Unc-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1) 和磷酸化 ULK1 (phosphorylated ULK1, p-ULK1) 抗体 (美国 CST 公司), 荧光二抗 (美国 Thermo 公司)。细胞恒温培养箱 (型号: 150i, 美国 Thermo 公司), 曝光仪 (型号: ChemiDoc XRS) 和 PCR 仪 (型号: CFX96) (美国 Bio-Rad 公司), 流式细胞仪 (型号: BD FACSCanto™ II, 美国 BD 公司)。

1.2 数据库资料分析 通过癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库^[10] (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 下载乳腺癌转录组数据集 TCGA-BRCA, 其中正常组织 113 例, 乳腺癌组织 1 109 例。使用 R 软件 Limma (V3.60.3) 包对 TCGA-BRCA 数据集进行分析, 计算倍数变化 (fold change, FC), 以 $P < 0.05$ 、 $|\log_2 FC| > 3$ 为阈值筛选出差异常表达基因 *GPR139*。通过人类蛋白质图谱 (Human Protein Atlas, HPA) 数据库^[11] (<https://www.proteinatlas.org/>) 查找 GPR139 在乳腺癌组织和正常组织中的蛋白表达情况。

1.3 细胞培养、慢病毒感染和细胞分组 采用含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的高糖培养基培养 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞。将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 待细胞生长至 90% 时胰酶消化传代。收集处于对数生长期的 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔 5×10^5 个细胞。第 2 天, 采用慢病毒转染体系将 shRNA 分别转染 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞, 分为 sh-NC 组 (感染阴性对照慢病毒) 和 sh-GPR139 组 (感染 *GPR139* shRNA 干扰慢病毒), 感染 48 h。感染阴性对照慢病毒 48 h 后, 消化细胞传代铺板, 加入 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GPR139 拮抗剂 NCRW0005-F05 刺激细胞 24 h 后收样, 即为 sh-NC+F05 组 (GPR139 拮抗剂干预组)。

1.4 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法检测各组细胞中 *GPR139*、*Ki-67*、*Cyclin D1*、*Cyclin E1* 和 *P21* mRNA 表达水平 采用 TRIzol 法提取各组细胞中总 RNA, 按照 TaKaRa 反转录试剂盒合成 cDNA。反转录条件: 37 ℃、15 min, 85 ℃、5 s。以 cDNA 为模板加入引物和 TBgreen 进行 RT-qPCR 反应。扩增条件: 95 ℃、5 min, 95 ℃、30 s, 60 ℃、60 s, 共 40 个循环。以 β -actin 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因表达水平。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Gene		Primer sequence(5'-3')
<i>GPR139</i>	F	CGTGGTCTACTACAGCCTCTTG
	R	AGCAGCGAGTGCCAAGAGATAG
<i>Ki-67</i>	F	GAAAGAGTGGAACCTGCCTTC
	R	GCACCAAGTTTTACTACATCTGCC
<i>P21</i>	F	GAGCCTGGTTTTCCACTTAACGC
	R	CAGTCCAGTCTCTTGCCCTTAGC
<i>Cyclin D1</i>	F	TCTACACCGACAACCTCCATCCG
	R	TCTGGCATTGAGAGGAAGTG
<i>Cyclin E1</i>	F	TGTGTCCTGGATGTTGACTGCC
	R	CTCTATGTCGCACCACTGATACC
β -actin	F	GACCACTCCTAGCAAACCTGG
	R	GGGCGTCTGGCTGTTTTCA

1.5 MTT 法检测各组乳腺癌细胞增殖活性 将转染或 F05 刺激后的处于对数生长期的 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞胰酶消化后计数, 每孔 4 000 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 置于细胞培养箱中分别培养 24、48 和 72 h。每孔加入 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 工作液, 继续孵育培养 2 h 后加入特定溶剂溶解甲臞, 用酶标仪于波长 570 nm 处测定每孔吸光度 (A) 值, 以 A 值表示细胞增殖活性。

1.6 Western blotting 法检测各组乳腺癌细胞中 *GPR139*、*Ki-67*、*P21*、*LC3A/B*、*P62*、*p-AMPK*、*AMPK*、*p-ULK1* 和 *ULK1* 蛋白表达水平 用 RIPA 裂解液裂解不同处理的各组细胞, 冰上裂解 30 min, 4 ℃、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后取上清进行蛋白定量。取 30 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳后转印至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入 *GPR139* (1:1 000)、

Ki-67 (1:1 000)、*P21* (1:1 000)、*LC3A/B* (1:1 000)、*P62* (1:1 000)、*p-AMPK* (1:500)、*AMPK* (1:1 000)、*p-ULK1* (1:1 000)、*ULK1* (1:1 000) 和 β -actin (1:3 000) 等抗体于 4 ℃冰箱中过夜孵育。第 2 天, 用 Tris 缓冲盐溶液-吐温 20 (Tris-buffered saline with Tween-20, TBST) 溶液洗涤条带 3 次, 每次 10 min。加入 1:3 000 稀释的二抗室温低速孵育 1 h, 用 TBST 溶液洗涤条带 3 次, 每次 10 min。加入超灵敏 ECL 化学发光液, 用 Bio-Rad 成像系统进行曝光。采用 Image J 软件进行灰度分析, 并计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/ β -actin 蛋白条带灰度值, 实验重复 3 次。

1.7 流式细胞术检测各组乳腺癌细胞凋亡率 取处于对数生长期的各组乳腺癌细胞, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 收集细胞沉淀。加入磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 稀释的 1% 胎牛血清白蛋白洗涤重悬细胞, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 收集细胞沉淀。加入 Binding buffer 稀释的碘化丙啉 (propidium iodide, PI)、异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V (annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC) 流式抗体轻轻混匀, 室温避光孵育 15 min。加入适量 Binding buffer, 上机检测细胞凋亡情况。早期凋亡细胞为 FITC+ 和 PI-, 晚期凋亡细胞为 FITC+ 和 PI+。细胞凋亡率=(早期凋亡细胞数+晚期凋亡细胞数)/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.8 免疫荧光法检测各组乳腺癌细胞中 *LC3A/B* 蛋白表达水平 各组细胞计数 1×10^5 个, 接种于 12 孔细胞培养板中, 贴壁培养过夜。弃掉培养基, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min。加入 PBS 缓冲液稀释的 0.1% Triton X-100 破膜 15 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min。加入 PBS 缓冲液稀释的 1% BSA 室温封闭 30 min, 加入 *LC3A/B* 一抗 (1:200) 4 ℃冰箱低速孵育过夜。第 2 天, 回收一抗, 加入 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入 Alexa Fluor 488 标记的荧光二抗 (1:400), 室温避光孵育 1 h 后, 加入 DAPI 染液对细胞核进行复染, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min。在共聚焦显微镜 100 倍视野下拍照保存, 绿色明亮斑点为染色阳性的自噬斑点, 以荧光强度代表蛋白表达水平。

1.9 统计学分析 采用 GraphPad Prism 9 软件绘图和进行统计学分析。各组细胞中 *GPR139*、*Ki-67*、

Cyclin D1、*Cyclin E1* 和 *P21* mRNA 表达水平, 细胞增殖活性, 乳腺癌细胞中 *GPR139*、Ki-67、*P21*、LC3A/B、*P62*、p-AMPK、AMPK、p-ULK1 和 ULK1 蛋白表达水平, 细胞凋亡率, 细胞中 LC3A/B 蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

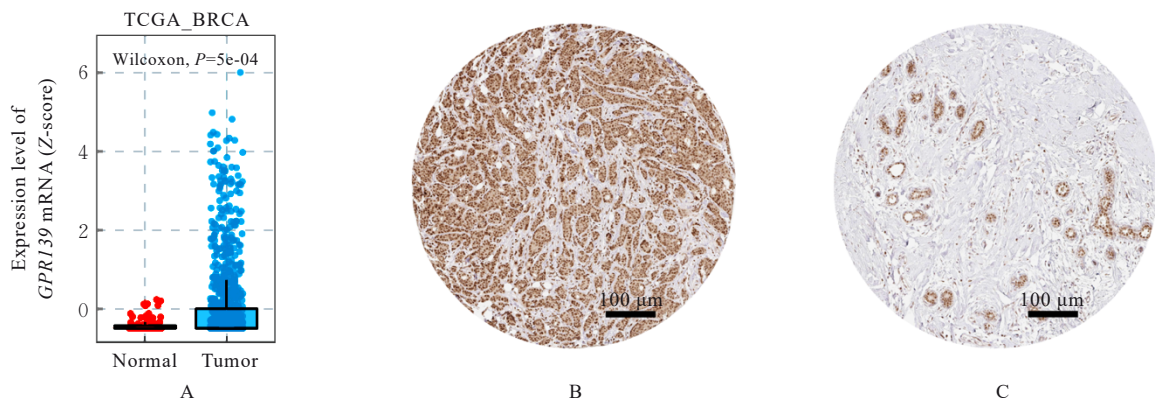
2 结果

2.1 乳腺癌组织和正常组织中 *GPR139* mRNA 表达水平 TCGA 数据库资料分析结果显示: 在乳腺癌组织中 *GPR139* mRNA 表达水平明显高于正常组织 ($P < 0.001$)。见图 1A。HPA 数据库中免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 检测结果显示: *GPR139* 蛋白在正常组织中低表达, 在乳腺癌组织中高表达。见图 1B 和 1C。

2.2 各组乳腺癌细胞增殖活性 在 MCF-7 细胞中, 与 sh-NC 组 (0.803 ± 0.033) 比较, sh-*GPR139* 组

和 sh-NC+F05 组细胞的增殖活性 (0.546 ± 0.044 和 0.601 ± 0.043) 明显降低 ($P < 0.01$)。在 MDA-MB-231 细胞中, 与 sh-NC 组 (0.662 ± 0.030) 比较, sh-*GPR139* 组和 sh-NC+F05 组细胞的增殖活性 (0.526 ± 0.012 和 0.513 ± 0.011) 明显降低 ($P < 0.01$)。

2.3 各组乳腺癌细胞中 *GPR139*、Ki-67、*Cyclin D1*、*Cyclin E1* 和 *P21* mRNA 及蛋白表达水平 RT-qPCR 法检测结果显示: 在 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中, 与 sh-NC 组比较, sh-*GPR139* 组和 sh-NC+F05 组乳腺癌细胞中 *GPR139*、Ki-67、*Cyclin D1* 和 *Cyclin E1* mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), *P21* mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$)。见图 2。Western blotting 法检测结果显示: 在 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中, 与 sh-NC 组比较, sh-*GPR139* 组和 sh-NC+F05 组细胞中 *GPR139*、Ki-67、*Cyclin D1* 和 *Cyclin E1* 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), *P21* 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$), 与 RT-qPCR 法检测结果一致。见图 3、表 2 和表 3。



A: *GPR139* mRNA expression; B: Normal tissue; C: BRCA tissue.

图1 乳腺癌组织和正常组织中 *GPR139* mRNA 和蛋白表达情况

Fig. 1 Expressions of *GPR139* mRNA and protein in BRCA tissue and normal tissue

2.4 各组乳腺癌细胞凋亡率 在 MCF-7 细胞中, 与 sh-NC 组 ($2.663\% \pm 0.492\%$) 比较, sh-*GPR139* 组 ($8.260\% \pm 0.485\%$) 和 sh-NC+F05 组 ($9.850\% \pm 0.787\%$) 细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.01$)。见图 4A。在 MDA-MB-231 细胞中, 与 sh-NC 组 ($2.750\% \pm 0.565\%$) 比较, sh-*GPR139* 组 ($8.663\% \pm 0.125\%$) 和 sh-NC+F05 组 ($7.970\% \pm 1.189\%$) 细胞凋亡率均明显升高 ($P < 0.01$)。见图 4B。

2.5 各组乳腺癌细胞中 LC3A/B 蛋白表达水平 在 MCF-7 细胞中, 与 sh-NC 组 (25.72 ± 1.84)

比较, sh-*GPR139* 组 (68.04 ± 3.48) 和 sh-NC+F05 组 (64.45 ± 2.70) 细胞中 LC3A/B 蛋白表达水平升高 ($P < 0.001$)。在 MDA-MB-231 细胞中, 与 sh-NC 组 (17.29 ± 2.34) 比较, sh-*GPR139* 组 (49.92 ± 3.26) 和 sh-NC+F05 组 (60.13 ± 2.53) 细胞中 LC3A/B 蛋白表达水平升高 ($P < 0.001$)。见图 5。

2.6 各组乳腺癌细胞中 LC3A/B、*P62*、p-AMPK、AMPK、p-ULK1 和 ULK1 蛋白表达水平 在 MCF-7 细胞中, 与 sh-NC 组比较, sh-*GPR139* 组和 sh-

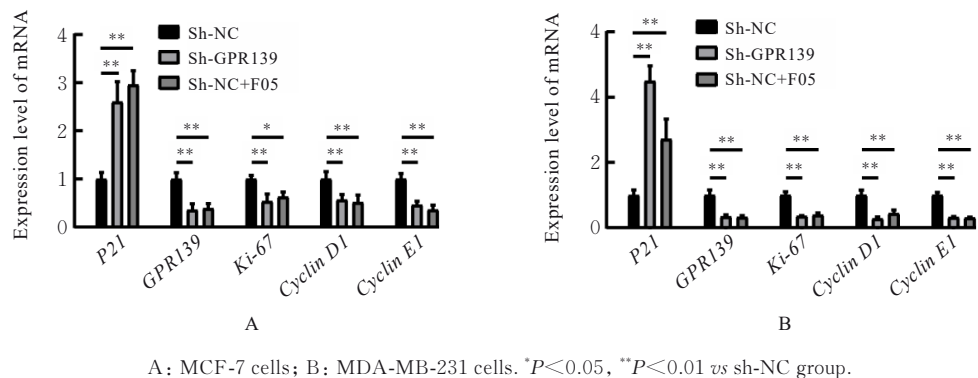
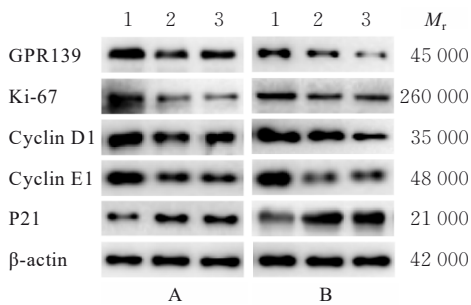


图2 各组乳腺癌细胞中 GPR139、Ki-67、Cyclin D1、Cyclin E1 和 P21 mRNA 表达水平

Fig. 2 Expression levels of GPR139, Ki-67, Cyclin D1, Cyclin E1, and P21 mRNA in breast cancer cells in various groups



A: MCF-7 cells; B: MDA-MB-231 cells. Lane 1: Sh-NC group; Lane 2: Sh-GPR139 group; Lane 3: Sh-NC+F05 group.

图3 各组乳腺癌细胞中 GPR139、Ki-67、Cyclin D1、Cyclin E1 和 P21 蛋白表达电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of expressions of GPR139, Ki-67, Cyclin D1, Cyclin E1, and P21 proteins in breast cancer cells in various groups

NC+F05 组细胞中 LC3A/B 蛋白表达水平升高以及 p-AMPK 和 p-ULK1 蛋白表达水平升高 ($P<0.01$), P62 蛋白表达水平降低 ($P<0.01$), AMPK 和 ULK1 蛋白表达水平无明显改变, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 6A 和 6B。在 MDA-MB-231 细胞中, 与 sh-NC 组比较, sh-GPR139 组和 sh-NC+F05 组中 LC3A/B 蛋白表达水平升高以及 p-AMPK 和 p-ULK1 蛋白表达水平升高 ($P<0.01$),

P62 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), AMPK 和 ULK1 蛋白表达水平无明显改变, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 6A 和 6C。

3 讨论

乳腺癌是全球女性健康的主要威胁, 其发病率高, 是女性癌症死亡的主要原因之一^[12]。近年来在乳腺癌的诊断和治疗方面取得了一定进展, 但其高复发率和高死亡率仍然是临床面临的重大挑战^[13]。GPR139 在胶质母细胞瘤、低级别胶质瘤、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤中高表达, 通过激活环磷酸酰胺 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 等反应元件促进肿瘤的增殖和转移^[7]。G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR) 家族成员 G 蛋白偶联受体 C 组 5 成员 A (G protein-coupled receptor class C group 5 member A, GPRC5A) 在乳腺癌和结直肠癌中通过抑制表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 及其下游信号通路发挥抗肿瘤作用^[14]。GPCR 是自噬的直接调节因子, GPCR 家族蛋白毒蕈碱受体、 β -肾上腺素受体和味觉受体等与自噬的关系已被广泛研究^[15-16]。

本研究结果显示: 与正常组织比较, GPR139 蛋

表2 各组 MCF-7 细胞中 GPR139、Ki-67、Cyclin D1、Cyclin E1 和 P21 蛋白表达水平

Tab. 2 Expression levels of GPR139, Ki-67, Cyclin D1, Cyclin E1, and P21 proteins in MCF-7 cells in various groups ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	GPR139	Ki-67	Cyclin D1	Cyclin E1	P21
Sh-NC	1.00±0.13	1.00±0.07	1.00±0.15	1.00±0.11	1.00±0.14
Sh-GPR139	0.36±0.13**	0.54±0.15**	0.57±0.11**	0.46±0.08**	2.60±0.42**
Sh-NC+F05	0.39±0.10**	0.63±0.10*	0.51±0.15**	0.36±0.09**	2.96±0.30**

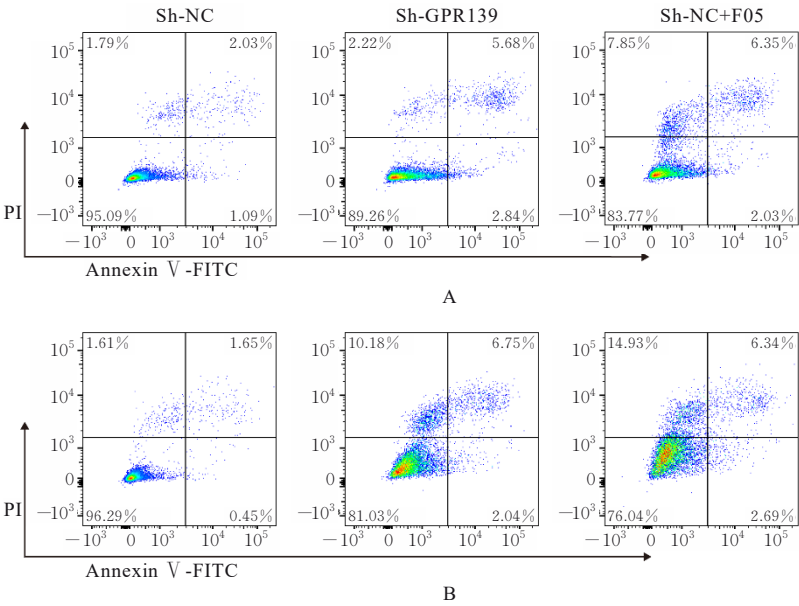
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs sh-NC group.

表3 各组MDA-MB-231细胞中GPR139、Ki-67、Cyclin D1、Cyclin E1和P21蛋白表达水平

Tab. 3 Expression levels of GPR139, Ki-67, Cyclin D1, Cyclin E1, and P21 proteins in MDA-MB-231 cells in various groups (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	GPR139	Ki-67	Cyclin D1	Cyclin E1	P21
Sh-NC	1.00±0.16	1.00±0.10	1.00±0.15	1.00±0.08	1.00±0.16
Sh-GPR139	0.34±0.05*	0.36±0.02*	0.28±0.06*	0.32±0.03*	4.50±0.46*
Sh-NC+F05	0.32±0.05*	0.39±0.06*	0.44±0.10*	0.31±0.02*	2.72±0.61*

*P<0.01 vs sh-NC group.



A: Apoptotic rates of MCF-7 cells; B: Apoptotic rates of MDA-MB-231 cells.

图4 流式细胞术检测各组乳腺癌细胞凋亡率

Fig. 4 Apoptotic rates of breast cancer cells in various groups detected by flow cytometry

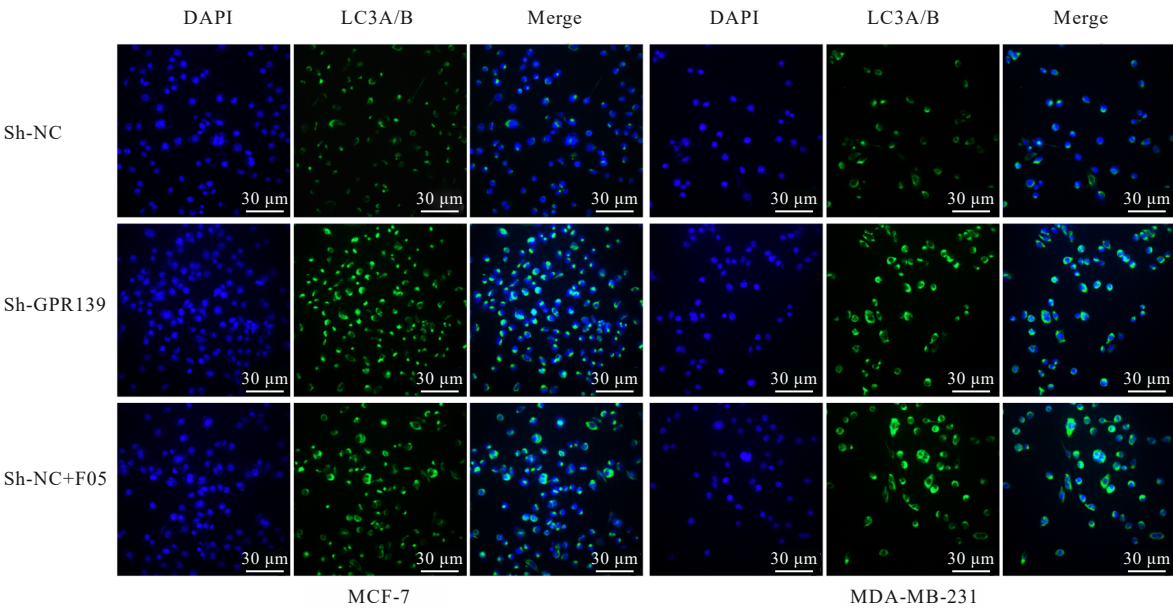
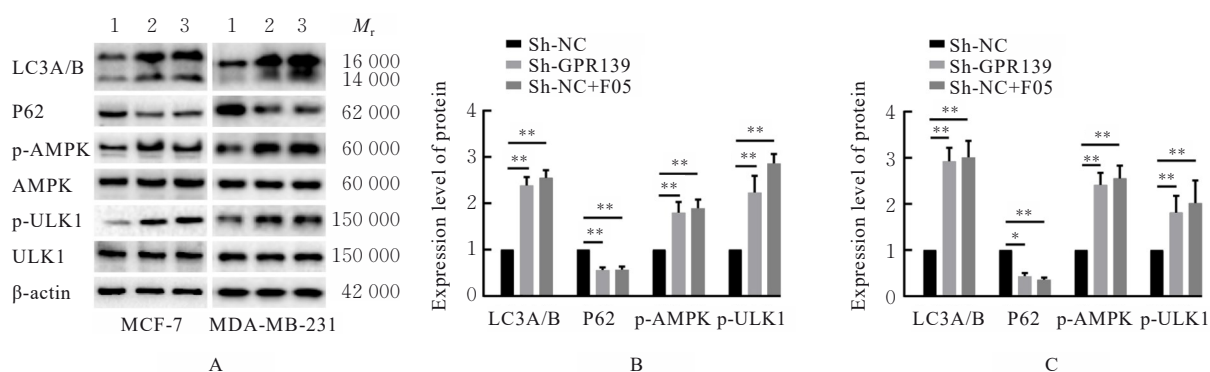


图5 免疫荧光法检测各组乳腺癌细胞中LC3A/B蛋白表达情况

Fig. 5 Expressions of LC3A/B protein in breast cancer cells in various groups detected by immunofluorescence



Lane 1: Sh-NC group; Lane 2: Sh-GPR139 group; Lane 3: Sh-NC+F05 group. B: MCF-7 cells; C: MDA-MB-231 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs sh-NC group.

图6 各组乳腺癌细胞中LC3A/B、P62、p-AMPK和p-ULK1蛋白表达电泳图(A)及直条图(B,C)

Fig. 6 Electrophoregram(A) and histograms(B, C) of expressions of LC3A/B, P62, p-AMPK, and p-ULK1 proteins in breast cancer cells in various groups

白在乳腺癌组织中高表达。sh-GPR139组即沉默*GPR139*基因可明显降低乳腺癌细胞的增殖活性,抑制增殖标志物Ki-67、Cyclin D1和Cyclin E1的表达,促进P21的表达。sh-NC+F05组即GPR139拮抗剂NCRW0005-F05处理组通过竞争性结合,可短暂抑制GPR139蛋白表达,明显降低乳腺癌细胞的增殖活性,与sh-GPR139组结果类似。研究^[13]显示:Ki-67的高表达与乳腺癌细胞的增殖活性呈正相关关系,是评估乳腺癌患者预后的重要指标。*Cyclin D1*基因扩增或蛋白过表达与乳腺癌的进展和不良预后有关,具有促进乳腺癌发展的作用^[14],与本研究结果类似。*Cyclin E1*蛋白可被长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)稳定,阻碍其泛素化降解,从而加速细胞周期的进程,使得乳腺癌细胞产生耐药性^[17]。研究^[18]显示:高表达的P21通过抑制Cyclin-周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, Cdk)复合物的活性,在G₁期诱导细胞周期阻滞,从而抑制乳腺癌细胞增殖。本研究结果提示:沉默*GPR139*基因可明显抑制乳腺癌细胞的增殖。

细胞自噬是真核生物中进化保守的对细胞内物质进行周转的重要过程,通过溶酶体降解受损、衰老或过剩的生物大分子和细胞器,释放出游离小分子供细胞回收利用^[19-20]。细胞自噬在维持细胞稳态、应对营养应激和清除有害物质等过程中发挥关键作用^[21]。微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) A/B是自噬过程中的核心蛋白,通过LC3-I向LC3-II的转化参与自噬体的形成、底物识别和降解^[22]。LC3A/B

是评估自噬活性的重要标志物,在细胞稳态、疾病发生和免疫防御中具有重要作用。本研究结果显示:沉默*GPR139*基因后,乳腺癌细胞中自噬蛋白LC3A/B蛋白表达水平升高,P62蛋白表达水平降低,AMPK和ULK1磷酸化水平升高。研究^[23-24]显示:P62的低表达可通过细胞周期阻滞和调节免疫细胞浸润进而抑制乳腺癌细胞的增殖,促进细胞凋亡。AMPK和ULK1磷酸化水平升高,启动AMPK/ULK1信号通路,激活细胞自噬,从而抑制乳腺癌细胞的增殖和转移^[25],与本研究结果一致。本研究结果提示:沉默*GPR139*基因可诱导乳腺癌细胞自噬和凋亡,其作用机制可能与AMPK和ULK1磷酸化水平升高有关。

综上所述,GPR139在乳腺癌组织中呈高表达,沉默*GPR139*基因可抑制细胞增殖,促进乳腺癌细胞自噬和凋亡,其作用机制可能与AMPK和ULK1磷酸化水平升高有关。基于此,通过设计GPR139、Ki-67和Cyclin D1等分子的特异性抑制剂,AMPK和P21等分子的特异性激活剂或靶向治疗的核酸序列,有望抑制乳腺癌细胞的生长,为乳腺癌诊疗提供新思路。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

姚晓含参与实验设计、实验操作和论文撰写,姚明辰参与实验操作和论文撰写,王志清参与实验操作、数据收集整理及分析,李赫阳和闫燕参与论文修改,雷宁静参与研究设计指导和论文审阅。

[参考文献]

- [1] HAN B F, ZHENG R S, ZENG H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 4(1): 47-53.
- [2] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2024, 74(1): 12-49.
- [3] 国家肿瘤质控中心乳腺癌专家委员会, 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会, 中国抗癌协会肿瘤药物临床研究专业委员会. 中国晚期乳腺癌规范诊疗指南(2024版)[J]. *中华肿瘤杂志*, 2024. DOI: 10.3760/cma.j.cn112152-20241009-00435
- [4] GIAQUINTO A N, SUNG H, NEWMAN L A, et al. Breast cancer statistics 2024[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2024, 74(6): 477-495.
- [5] KUMILAU R, HAYATI F, LIEW J E, et al. Short term recurrence and survival rate of breast cancer patients post surgical treatment; north Borneo experience [J]. *Ann Med Surg (Lond)*, 2022, 81: 104560.
- [6] ZHANG R M, CHEN J. Research progress on the role of orphan receptor GPR139 in neuropsychiatric behaviours[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 960: 176150.
- [7] VEDEL L, NØHR A C, GLORIAM D E, et al. Pharmacology and function of the orphan GPR139 G protein-coupled receptor [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2020, 126(Suppl 6): 35-46.
- [8] KAUSHIK A C, MEHMOOD A, DAI X F, et al. Pan-cancer analysis and drug formulation for GPR139 and GPR142[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 521245.
- [9] 王梅, 龚彪, 顾军, 等. G蛋白基因在肝外胆管癌中的表达[J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(10): 771-772.
- [10] TOMCZAK K, CZERWIŃSKA P, WIZNEROWICZ M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge[J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2015, 19(1A): A68-A77.
- [11] WU S Z, AL-ERYANI G, RODEN D L, et al. A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers[J]. *Nat Genet*, 2021, 53(9): 1334-1347.
- [12] 尚卿, 王海鹏, 王静. 1992—2021年中国女性乳腺癌发病和死亡的年龄-时期-队列模型分析及预测[J]. *解放军医学杂志*, 2025, 50(4): 436-443.
- [13] 刘丽, 白文坤. 超声造影在乳腺癌诊断与新辅助化疗疗效评估中的研究进展[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2025, 46(2): 300-304.
- [14] ROVESTI G, LEONE F, BRANDI G, et al. Prognostic role of a new index tested in European and Korean advanced biliary tract cancer patients: the PECS index[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2022, 53(2): 289-298.
- [15] CAO J, LI L L, YAO Y, et al. Dehydroepiandrosterone exacerbates nigericin-induced abnormal autophagy and pyroptosis *via* GPER activation in LPS-primed macrophages[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4): 372.
- [16] 曾小强, 周菁, 黄晏骁, 等. G蛋白偶联雌激素受体在免疫调节中作用的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2024, 33(5): 840-847.
- [17] CAI Z J, SHI Q F, LI Y D, et al. LncRNA EILA promotes CDK4/6 inhibitor resistance in breast cancer by stabilizing cyclin E1 protein [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(40): eadi3821.
- [18] MANOUSAKIS E, MIRALLES C M, ESQUERDA M G, et al. CDKN1A/p21 in breast cancer: part of the problem, or part of the solution? [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(24): 17488.
- [19] LIU X J, SUN X, MU W Q, et al. Autophagic flux-lipid droplet biogenesis cascade sustains mitochondrial fitness in colorectal cancer cells adapted to acidosis[J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 21.
- [20] YANG Y, LIU L X, TIAN Y, et al. Autophagy-driven regulation of cisplatin response in human cancers: Exploring molecular and cell death dynamics[J]. *Cancer Lett*, 2024, 587: 216659.
- [21] KHALAFIYAN A, FADAIE M, KHARA F, et al. Highlighting roles of autophagy in human diseases: a perspective from single-cell RNA sequencing analyses[J]. *Drug Discov Today*, 2024, 29(12): 104224.
- [22] SCHWALM M P, DOPFER J, KUMAR A, et al. Critical assessment of LC3/GABARAP ligands used for degrader development and ligandability of LC3/GABARAP binding pockets[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 10204.
- [23] QI J L, HE J R, LIU C B, et al. SQSTM1/p62 regulate breast cancer progression and metastasis by inducing cell cycle arrest and regulating immune cell infiltration[J]. *Genes Dis*, 2022, 9(5): 1332-1344.
- [24] JEONG S J, ZHANG X Y, RODRIGUEZ-VELEZ A, et al. p62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31(6): 458-471.
- [25] ZHAO M, XU P L, SHI W J, et al. Icarin exerts anti-tumor activity by inducing autophagy *via* AMPK/mTOR/ULK1 pathway in triple-negative breast cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 74.