

Effects and Significance of Uncoupling Protein 2 on Energy Metabolism When Everolimus Intervenes in Renal Cancer Cells

Yuling Yang

University of York, YO10 5DD, United Kingdom York

Abstract

Objective: Kidney cancer cells have a serious impact on the health of social groups, so the paper focuses on the impact and significance of uncoupling protein 2 on energy metabolism when everolimus intervened in renal cancer cells. **Methods:** Half of the inhibitory concentration was calculated by intervening in GRC-1 cells using different concentrations of everolimus. GRC-1 was divided into control, low concentration, medium concentration and high concentration groups, using everolimus intervention based on the results. **Results:** The inhibition of GRC-1 cells increased with the concentration of everolimus by $P < 0.05$. **Conclusions:** UCP2 can stimulate the activity of PKM2, tilt the mitochondrial energy metabolism of renal cancer cells to the corresponding pathway, thus induce the active proliferation of renal cancer cells, slow down apoptosis, thus leading to the decrease of everolimus in renal cancer cells, and affect the inhibition.

Keywords

everolimus; renal cancer cells; energy metabolism

依维莫司干预肾癌细胞时解偶联蛋白2对能量代谢的影响及意义

杨玉玲

University of York, YO10 5DD, United Kingdom York

摘要

目的: 肾癌细胞对社会群体的健康有着严重的影响, 因此论文着力研究依维莫司干预肾癌细胞时解偶联蛋白2对能量代谢的影响及意义。**方法:** 使用不同浓度的依维莫司干预GRC-1细胞, 计算半数抑制浓度。将GRC-1分为对照组、低浓度组、中浓度组、高浓度组, 根据结果, 使用不同浓度的依维莫司干预。**结果:** 依维莫司对GRC-1细胞抑制率随着依维莫司浓度增加而增高, 各组比较 $P < 0.05$ 。**结论:** UCP2可刺激PKM2的活性, 使肾癌细胞的线粒体能量代谢向相应途径倾斜, 从而诱导肾癌细胞的主动增殖, 减缓细胞凋亡, 从而导致肾癌细胞中依维莫司的减少, 影响抑制作用。

关键词

依维莫司; 肾癌细胞; 能量代谢

1 引言

肾细胞癌(RCC)是起源于肾小管上皮系统的恶性肿瘤。在所有泌尿道肿瘤中, 肾癌的毒性最大, 流行病学表明肾癌的死亡率超过40.0%, 全世界每年有10万人死于肾癌。肾癌的发病率和死亡率也在逐年上升, 因此对肾癌的防治非常重要。一些肿瘤的生长依赖于突变的癌基因或异常激活的信号通路, 这些失活可以减缓肿瘤细胞的生长甚至凋亡。传统化疗对肾细胞癌效果不佳, 尤其是晚期转移性肾

细胞癌, 其中常规化疗通常无效。近期, 随着对肾细胞癌研究的不断深入, 以舒尼替尼和阿西替尼为代表的酪氨酸激酶抑制剂(TKI)和以依维莫司为代表的哺乳动物雷帕抑制剂等药物相继出现, 显著改善了患者的预后。依维莫司目前广泛应用于晚期肾癌的治疗, 其主要机制是干扰细胞周期、血管生成、糖酵解等相关蛋白的翻译。UCP-2作为线粒体内膜的载体, 具有介导质子泄漏、调节细胞内氧化水平、影响线粒体膜电位等功能。UCP-2的高表达使三磷酸腺苷(ATP)从细胞线粒体氧化磷酸化转变为细胞质有氧糖酵解的主要来源^[4]。最近的研究表明, mTOR抑制剂直接与线粒体相互作用,

【作者简介】杨玉玲(1998-), 女, 中国湖北枣阳人, 硕士, 从事分子医学研究。

改变线粒体转运蛋白的基因表达,从而影响线粒体功能,而mTOR抑制剂的使用增加了UCP-2的表达,并重新设计了P13KAkt-mTOR通路。诱导肿瘤自噬并产生耐药性。研究观察了依维莫司靶向抑制肾癌细胞时UCP2表达对癌细胞增殖和凋亡的影响。代谢的调节和糖酵解中关键酶活性的影响为肾癌的靶向治疗提供了思路。

2 资料与方法

肾癌细胞(GRC-1)购自某生物技术公司,依维莫司避光保存。GRC-1细胞复苏后,放入培养基中,在含5%CO₂的培养箱中培养25小时左右,根据细胞生长情况更换培养基。当细胞达到80%~90%汇合时进行细胞传代。依维莫司制剂,将5mg依维莫司加入261LDMSO中溶解并制备成20mmol/L依维莫司储备液并保存以备将来使用。计算所需稀释液体积,加入DMSO稀释,分别调整药物浓度为0、10、20、40mol/L,进行抗抑制浓度实验。收集对数生长期细胞,重悬并计数,调整细胞至1105/mL,96孔板每孔加入100L细胞,细胞体积为5000个/孔,加入磷酸盐缓冲液至96孔板的边缘。填充溶液以防止介质挥发。细胞在培养箱中培养12h(5%CO₂,37C),加入不同浓度的依维莫司进行干预,然后返回培养箱继续培养72h。提前4小时加入10L孔的MTT溶液,并在黑暗中在孵化器中孵育。孵育完成后,取出培养基,在96孔板的每孔中加入100LFormazan溶液,摇晃10分钟,用酶标仪测量570nm处的吸光度。根据吸光度值软件计算对GRC-1肾癌细胞的依维莫司介导的抗抑制浓度(IC₅₀)后,将肾癌细胞分为对照组和低浓度组、中浓度组、高浓度组。分组完成后,按上述操作步骤调整依维莫司干预浓度和孵育时间再次孵育,完成后收集数据。

干预后72小时,去离子水稀释。胰蛋白酶消化和收集后,通过离心收集细胞。在预冷的1PBS中重悬细胞一次,离心并洗涤细胞。检测细胞PKM2和IDH1活性细胞处理和分组,干预72小时后收集细胞,离心,取上清,低温保存备用。设置标准孔和样品孔。标准ATP浓度为6200、3000、1400、600、200nmol/L,PKM2为4200、2200、1200、700、450pg/mL,IDH1分别为3000、1400、600、200、100pg/mL。在标准井中加入50L各种浓度的标准,向样品井中加入50L测试样品。氧化物酶标记检测抗体100L,用密封膜将反应孔密封好,在37C培养箱中孵育1h。孵育完成后,取出反应板,弃去溶液,吸水纸吸干,每孔加入400L1x洗涤液,静置1分钟,抖掉洗涤液。

3 结果

通过对各组细胞中PKM2、IDH1活性,发现高浓度组数据明显较大(见表1)。

表1 各组细胞中PKM2、IDH1活性比较 (ng/mL)

组别	IDH1	PKM2
对照组	1.31 ± 0.04	1.20 ± 0.03
低浓度组	1.12 ± 0.03	1.21 ± 0.02
中浓度组	0.88 ± 0.02	0.89 ± 0.06
高浓度组	1.28 ± 0.02	0.66 ± 0.02

4 讨论

依维莫司是一种口服mTOR抑制剂。依维莫司的主要不良反应包括胃粘膜炎、皮疹和疲劳。肿瘤治疗效果的降低与肿瘤细胞的适应机制有关,而这种适应机制与UCP2密切相关。UCP2在身体的许多器官和组织中表达,例如皮肤、脑、肝脏和肾脏。肿瘤细胞在不利于生存的环境中产生大量活性氧,引起氧化应激损伤,诱导细胞凋亡,并减弱其增殖作用。UCP2通过增加其表达来抑制细胞内ROS的产生,使细胞避免氧化应激造成的损伤。

UCP2的表达也可以影响肿瘤代谢和耐药性。在肾癌靶向治疗过程中,治疗效果的下降和耐药性的发展被推测与UCP2表达的上调有关。肾癌细胞中UCP2mRNA的表达随着药物浓度的增加而增加。依维莫司对肾癌细胞的生长抑制率随着浓度的增加而增加,但依维莫司对肾癌细胞的生长抑制率在中高浓度组之间没有显著差异。凋亡实验结果显示,中浓度组肾癌细胞凋亡率最高,但进一步增加依维莫司浓度后,高浓度组凋亡率下降,提示依维莫司与依维莫司同时存在。相关研究表明,耐药肿瘤细胞中存在UCP2过表达,提示UCP2可能诱发肿瘤。

为促进其发生和发展,具体机制仍在研究中。肿瘤细胞所依赖的能量供应主要由高度活跃的糖酵解支持,以及肿瘤的适应性变化以适应组织缺氧、缺血和营养缺乏等不利条件。作为ATP产生的主要场所,线粒体参与细胞发育、分化和能量代谢过程。线粒体缺陷和突变与癌症的发生和发展密切相关,UCP2表达增加是肿瘤细胞线粒体突变的常见后果。相关研究表明,UCP2过表达对线粒体具有特异性保护作用,并直接影响ATP合成。mTORC1是依维莫司的主要抑制靶点,而mTORC2由两种多蛋白复合物mTORC1和mTORC2组成,它们对依维莫司不敏感。

抑制mTORC1会阻断P13KAkt-mTOR通路的信号传导,抑制肿瘤细胞增殖和能量代谢,但也会破坏P13KAkt-

mTOR 通路的负反馈机制, 导致该通路中其他靶点的异常激活。各种细胞级联反应可能导致相关耐药性的发展, 并可能限制依维莫司的治疗效果。最近的一项研究证实, 使用 mTOR 抑制剂可以刺激 UCP-2 的表达, 而 UCP-2 表达的上调与肿瘤细胞的能量代谢密切相关。综上所述, mTOR 抑制剂治疗效果的降低和癌细胞耐药性的发展与 UCP2 表达的上调密切相关, 可能刺激肾癌细胞的效应。肿瘤细胞的能量代谢仍然需要氧化磷酸化的参与, 两种途径共同为肿瘤细胞提供 ATP。

这两种途径对 ATP 的贡献存在显著差异, 这使得肿瘤细胞不同于正常细胞增殖, 而糖酵解可能是维持这一特性的关键。此外, 糖酵解途径产生的必需代谢中间体可以满足快速增殖过程中大分子生物合成的需要。糖酵解不仅能促进肿瘤的发展, 还能为肿瘤提供复杂的缺氧环境, 增加肿瘤的抵抗力。丙酮酸激酶是糖酵解途径最后一步催化丙酮酸和 ATP 生成的关键酶, 活性的变化直接影响糖酵解途径^[2]。目前的研究主要是 PKM2 型, 它以单体、二聚体和四聚体的形式存在。磷酸烯醇式丙酮酸与二聚体聚合后, PKM2 二聚体的酶活性较低, 因为米氏常数高于 PKM2 的四聚体形式。

PKM2 的单体形式主要参与细胞周期调节和 Warburg 效应。异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 是三羧酸循环中重要的限速酶, 其活性变化会干扰三羧酸循环的正常运行。IDH1 活性与早期肿瘤形成有关, IDH1 活性增加可抑制早期恶性转化和肿瘤发生。IDH1 活性的降低与线粒体呼吸抑制有关, 线粒体呼吸抑制通过影响细胞的正常能量代谢来抑制线粒体呼吸^[3]。

因此, IDH1 可能参与了肿瘤的多种生物活性。本实验以这两种酶的活性为靶点, 观察两种途径状态的变化。实验中, 中浓度组 PKM2 的活性开始增加, 同样 UCP2 的表达也增加, 但 ATP 仍然偏低。随着依维莫司浓度的进一步增加, UCP2 的表达和 PKM2 的活性增加, ATP 水平也有所恢复。先前的研究发现, 丙酮酸激酶的活性受到细胞内氧化应激水平的负调控, 而 UCP-2 通过解偶联减少 ROS 的产生, 并作为将丙酮酸转运到线粒体中的转运蛋白。

因此, UCP-2 可以通过调节细胞内 ROS 来间接刺激丙酮酸激酶的活性。实验结果表明, 除高浓度组外, 各浓度组

的 IDH1 活性几乎没有变化, 这意味着氧化磷酸化途径贡献的 ATP 比例保持相对恒定。UCP-2 通过三羧酸循环负调节乙酰辅酶 A 产生的底物的氧化来保护肿瘤细胞, 从而降低线粒体呼吸链的氧化还原压力^[1]。细胞线粒体内膜电位也可能是促进 UCP2 表达的相关因素。

国外研究发现, 使用 mTOR 抑制剂会使线粒体膜电位超极化, 影响线粒体 ATP 的正常产生。在恶性增殖过程中, 受线粒体膜电位变化的刺激以保证能量获取, 肿瘤细胞线粒体内膜中 UCP2 的表达开始增加, 相应通路逐渐被激活, 加速线粒体 ATP 合成。

5 结语

依维莫司在特定浓度下对肿瘤细胞增殖和能量代谢有显著抑制作用, 当浓度升高时, UCP2 和 ATP 水平恢复升高, 从而激活糖酵解途径, 引起细胞凋亡。减缓死亡速度表明 UCP2 可以刺激 PKM2 的活性, 从而诱导糖酵解途径的激活, 影响依维莫司对肿瘤细胞的抑制作用。对于晚期肾癌患者, 靶向治疗是提高总体生存率和生活质量的关键, 治疗后疗效降低仍然是一个需要克服的问题。

参考文献

- [1] 罗浩鸣, 谷江, 张永春, 等. 依维莫司干预肾癌细胞时解偶联蛋白 2 对能量代谢的影响及意义[J]. 山东医药, 2021, 61(22): 42-47.
- [2] 任宗涛. HOXD10 在肾透明细胞癌侵袭转移中的作用及机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2021.
- [3] 邹雲, 王忠. MEK 抑制剂增强依维莫司对肾细胞癌的抗肿瘤活性 [C]// 首届男性大健康中西医协同创新论坛暨第三届全国中西医结合男科青年学术论坛论文集, 2019.
- [4] 罗荣团. DNMT3A 与肾透明细胞癌病理特征、预后及依维莫司耐药性的研究[D]. 福建医科大学, 2019.
- [5] 李绍江. 基于“氧化还原开关”的应激纳米载药系统在肾癌靶向治疗中的应用及机制研究[D]. 福州: 浙江中医药大学, 2018.
- [6] 王卫平. 利用 CRISPR/Cas9 技术筛选鉴定肾癌依维莫司耐药新靶点[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2018.
- [7] 曾义洲. 保护性自噬通过激活 ERK 通路减弱依维莫司在肾癌细胞中的细胞毒性[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.
- [8] 黄海鹏, 刘德云. 肾细胞癌的靶向治疗研究进展 [J]. 微创医学, 2017, 12(1): 64-67.