DOI:10.16016/j.1000-5404.202106124

饥饿微环境激活 YAP1 蛋白调控自噬促进膀胱癌细胞的增殖

李庭浩[1],童 行[1],曹洪豪[2],刘旭东[3],朱俊龙[1],秦子家[1],尹思文[1],何卫阳[1] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院泌尿外科[1];402460 重庆,重庆市荣昌中医院泌尿外科[2];402760 重庆,重庆市璧山中医院泌尿外科[3]

[摘要] **目的** 探究饥饿微环境下膀胱癌细胞恶性增殖能力的变化及其机制。**方法** 将膀胱癌 T24 细胞分为 2 组,正常组:细胞正常培养,饥饿组:细胞采用不含血清的 HBSS 处理 6 h 模拟癌细胞饥饿微环境;分别予以自噬抑制剂氯喹(CQ)或 siRNA 敲减 YAP1 基因,观察自噬水平变化以及增殖能力的改变。同时以 YAP1 及自噬相关基因 LC3B 表达量构建风险预测模型,分析二者表达量与临床预后的相关性。**结果** CCK-8 及克隆形成实验显示饥饿诱导后膀胱癌细胞增殖能力显著增加($P<0.01$),且增殖能力的改变是通过增加细胞周期由 G_1 期进入 S 期,而两组细胞凋亡差异无统计学意义。Western blot 及免疫荧光检测 P62 蛋白降解程度及 LC3-Ⅱ/Ⅰ比值,结果显示饥饿可诱导膀胱癌细胞自噬水平上调($P<0.05$),而采用 CQ 阻断自噬流后膀胱癌细胞增殖能力不再受饥饿影响。YAP1 蛋白在饥饿诱导后可出现过表达及磷酸化水平的下降($P<0.01$),而抑制自噬不影响这一结果。利用 siRNA 干扰 YAP1 的表达后膀胱癌细胞自噬水平受到明显抑制,同时增殖能力下降($P<0.05$)。生物信息学分析发现 YAP1 在恶性程度高的膀胱癌患者癌组织中表达水平更高,且 YAP1 与 LC3B 基因表达水平越高的患者预后更差。**结论** 饥饿诱导膀胱癌细胞 YAP1 的过表达,通过增强自噬水平促进膀胱癌细胞恶性增殖,且 YAP1 与自噬在膀胱癌发展过程中起到相互协同的促癌作用。

[关键词] 膀胱癌;自噬;YAP1;细胞增殖;肿瘤微环境

[中图法分类号] R341;R730.23;R737.14 [文献标志码] A

Starvation microenvironment activates Yes-associated protein 1 to regulate autophagy and promote proliferation of bladder cancer cells

LI Tinghao[1], TONG Hang[1], CAO Honghao[2], LIU Xudong[3], ZHU Junlong[1], QING Zijia[1], YIN Siwen[1], HE Weiyang[1]

[1]Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Urology, Rongchang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing, 402460; [3]Department of Urology, Bishan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing, 402760, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the changes of malignant proliferation of bladder cancer cells under starvation microenvironment and its possible mechanism. **Methods** Bladder cancer T24 cells were divided into 2 groups: the normal group was cultured normally, while the starvation group was treated with serum-free HBSS for 6 h to simulate starvation microenvironment for cancer cells. The changes of autophagy and proliferation ability of cells were observed after treating with autophagy inhibitor CQ or transfection of siRNA of Yes-associated protein 1 (YAP1) gene, respectively. Finally, a risk prediction model was established based on the expression of YAP1 and autophagy-related gene LC3B, and the correlation between their levels and clinical prognosis was subsequently analyzed. **Results** CCK-8 and clone formation assays

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81874092)

[通信作者] 何卫阳,E-mail:weiyang361@aliyun.com

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

showed that the proliferation ability of bladder cancer cells was significantly increased after starvation induction ($P<0.01$), which was caused by promoting cell cycle from G_1 phase to S phase, while there was no significant difference in apoptosis between the 2 groups. The degradation of autophagy-related marker P62 protein and LC3-Ⅱ/Ⅰ ratio were detected by Western blotting and immunofluorescence assay, and the results indicated that starvation induced up-regulation of autophagy in bladder cancer cells ($P<0.05$). However, the proliferation of cancer cells was no longer affected by starvation after the autophagy inhibitor CQ blocked the autophagy tide. Overexpression and declined phosphorylation of YAP1 protein were observed after starvation induction ($P<0.01$), and this result was not affected by inhibition of autophagy. In addition, the autophagy level and the proliferation of cells were significantly inhibited by siRNA interference in YAP1 expression ($P<0.05$). Bioinformatics analysis showed that the level of YAP1 was higher in the cancer tissues of patients with higher malignant grade of bladder cancer, and the patients with higher expression of YAP1 and LC3B genes had worse prognosis. **Conclusion** The overexpression of YAP1 protein induced by starvation promotes the malignant proliferation of bladder cancer cells by enhancing the level of autophagy, and YAP1 and autophagy play a synergistic role in the development of bladder cancer.

[**Key words**] bladder cancer; autophagy; Yes-associated protein 1; cell proliferation; tumor microenvironment

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81874092). Corresponding author: HE Weiyang, E-mail: weiyang361@aliyun.com

膀胱癌是泌尿系统常见恶性肿瘤之一[1-2]。尽管目前各类新型治疗手段不断呈现,膀胱癌预后仍无明显改善,其原因可能是膀胱癌恶性进展机制尚不清楚[3]。膀胱癌所处肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)可能对其发生、发展起至关重要的作用。TME 由癌组织、细胞间质、微血管等组成,由于肿瘤细胞特定的生长方式及新生血管的不适配,导致其往往处于饥饿、炎症及缺氧等微环境中,内环境的变化可能会诱导肿瘤细胞坏死、凋亡,但也可能促进膀胱癌恶性进程[4]。

自噬作为真核细胞一种保守的细胞代谢方式,在应对诸如缺氧、饥饿等环境时,细胞可通过这一途径维持细胞稳态以应对外界压力[5-6]。自噬可区分为巨自噬、微自噬以及分子伴侣介导的自噬。在饥饿微环境下,多种癌细胞可通过激活巨自噬(后文称自噬)调节细胞能量代谢或转录调节等途径,促进癌细胞的恶性生长,但在膀胱癌中其机制尚不清楚[7-8]。

YAP1(Yes-associated protein 1)蛋白是 Hippo 通路下游的核心效应蛋白,由于 DNA 结合区域的结构缺失,其无法作为转录因子与 DNA 相结合,但 YAP1 的异常表达以及去磷酸化可帮助 YAP1 蛋白的入核,促进相关癌基因的转录增加,激活癌细胞的恶性进程如增殖、侵袭及减少凋亡等发生[9-10]。研究表明膀胱癌中 YAP1 与膀胱癌的恶性进展密切相关,然而 YAP1 调控膀胱癌恶性进展作用的机理仍十分复杂,YAP1 与自噬的调控关系在膀胱癌中尚不清楚[11]。因此,本实验探究饥饿微环境对自噬及 YAP1 蛋白的影响,以及二者对膀胱癌细胞增殖能力的影响,利用生物信息学方法分析 YAP1 与自噬相关基因 MAP1LC3B(LC3B)表达量,并对膀胱癌患者无病生存期进行预测,希望探寻出膀胱癌进展过程中 YAP1 蛋白与自噬的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人膀胱癌 T24 细胞株购自美国模式培养物集成库(American Type Culture Collection, ATCC);RPMI1640 培养基购自美国 HyClone 公司;汉克斯平衡盐溶液(HBSS,PYG0079)购自博士德生物公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;氯喹(chloroquine, CQ)购自美国 Sigma 公司;兔抗人 LC3B(L7543)购自 Sigma 公司;兔抗人 P62(ab56416)、YAP1(ab52771)蛋白购自 Abcam 公司;引物及小干扰 RNA 均由成都擎科生物公司合成,YAP1 引物序列及 siRNA 序列见表 1;显影发光液购自美国 Millipore 公司;凝胶成像仪购自法国 Fusion FX 公司,酶标仪购自美国 Themo 公司;流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司;CCK-8 购自北京碧云天生物技术研究所。

表 1 引物及小干扰 RNA 序列

基因	序列(5′→3′)	种属
引物		
YAP1	上游:CCGTTTCCCAGACTACCTT	智人
	下游:TTGGCATCAGCTCCTCTC	
β-actin	上游:AGAAAATCTGGCACCACACCT	智人
	下游:GATAGACAGCCTGGATAGCA	
si-RNA		
YAP1-siRNA-1	上游:GCAUCUUCGACAGUCUUCUTT	智人
	下游:AGAAGACUGUCGAAGAUGCTT	
YAP1-siRNA-2	上游:UGUUGUUGUCUGAUCGUUGUGAU	智人
	下游:AUCACAACGAUCAGACAACAACA	
YAP1-siRNA-3	上游:GUCCUCCUUUGAGAUCCCUGA	智人
	下游:UCAGGGAUCUCAAAGGAGGAC	

1.2 资料收集

选用并下载癌症基因组图谱数据库(the Cancer Genome Atlas, TCGA)中 402 名膀胱癌患者的数据,均有明确临床病理特征及完整随访资料;余生物信息学资料均下载自 Oncomine (www.oncomine.org)及 GeneMANIA (http://www.genemania.org)网站。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 膀胱癌 T24 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 细胞培养基培养。分为 2 组:正常组细胞在 37 ℃及 5%CO_2 气体环境中常规传代培养。饥饿组细胞正常培养生长至 70%~80%,培养基换用不含血清的 HBSS 处理 6 h 模拟膀胱癌细胞所处饥饿微环境[12],再进行后续实验。

CQ 是一种选择性自噬晚期抑制剂,不影响自噬小体的形成,而通过干预自噬体与溶酶体的结合,破坏晚期自噬流从而干预自噬相关蛋白降解。正常组和饥饿组分别加用 CQ 处理,CQ 处理组选择三蒸水为溶剂,工作浓度为 20 μmol/L,处理时间均不小于 6 h。

1.3.2 细胞增殖能力检测 CCK-8 实验:取处于对数生长期的不同处理组细胞,包括正常组、正常+CQ 组、饥饿组、饥饿+CQ 组、正常+siYAP1 组、饥饿+siYAP1 组等,常规消化计数,以 5 000/孔接种于 96 孔板上,各孔终体积均为 100 μL。按试剂盒说明书,在不同时间点包括 0、24、48、72 h 时,向各孔加入 CCK-8 试剂 10 μL,静置 1 h 后利用酶标仪测得波长 450 nm 处各孔光密度值[D(450)],以反映各组细胞活性,各组实验重复 3 次,取均值。克隆形成实验:取处于对数生长期的不同处理组细胞常规消化计数,以 500/孔接种于 6 孔板上,常规培养约 1 周后,用多聚甲醛固定后结晶紫溶液染色,各组实验重复 3 次,取均值。

1.3.3 荧光定量 PCR 检测目的基因表达量 参照 TRIzol 试剂说明书操作提取细胞或组织总 RNA,鉴定 RNA 浓度及纯度后,逆转录成 cDNA。采用 RT-PCR 试剂盒,ABI Prism7500 型荧光定量 PCR 仪中扩增,以内参 β-actin 进行标准化,采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

1.3.4 Western blot 检测蛋白表达量 取不同处理组生长对数期细胞,提取总蛋白后利用 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gelelectrophoresis,SDS-PAGE)分离目的蛋白,电转至聚偏二氟乙烯膜后脱脂牛奶或 BSA 封闭,4 ℃下一抗孵育过夜后 TBST 洗膜,二抗室温孵育 1 h 后滴加化学发光液进行曝光显影,β-actin 作为参照,计算蛋白相对表达量。

1.3.5 免疫荧光染色检测 LC3B 蛋白表达 T24 细胞接种于共聚焦皿,待贴壁后进行相应处理。不同处理组依次加入多聚甲醛溶液固定,0.1% Tirton X-100 通透细胞膜,山羊血清封闭,加入兔抗人 LC3B 抗体(1∶100 稀释)4 ℃过夜后,羊抗兔荧光二抗 488(1∶100 稀释),避光条件下孵育 1 h,DAPI 染核 30 min,PBS 冲洗后滴加抗荧光淬灭剂,共聚焦荧光显微镜下观察并拍照。

1.3.6 细胞转染 将 T24 细胞接种于 6 孔板中,待融合生长至 70%~80%后进行转染,包括转染阴性空载对照组和 3 个不同序列 siYAP1 小干扰 RNA,siRNA 设计及合成技术均由成都擎科生物公司提供。

1.3.7 生存曲线绘制 对 TCGA 下载的 402 例膀胱癌患者 YAP1 和 LC3B 表达水平与临床资料进行多因素 Cox 分析后,建立以 YAP1 和 LC3B 高表达为危险因素的风险模型,每个个体风险值计算方式为风险值(risk score)= $\sum_{(i=1)}^{n}$(Expi×Coei),其中 n 代表基因数,Expi 代表基因表达量,Coei 代表系数值[13]。所得总和取中位值后将患者分为高风险和低风险两组。利用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,判断 YAP1 和 LC3B 蛋白表达水平所构建的风险模型与膀胱癌患者预后总生存率(overall survival, OS)和无病生存率(disease free survival,DFS)是否相关联。

1.3.8 蛋白互作网络分析(PPI) 利用 GeneMANIA(http://www.genemania.org)网站预测 YAP1 基因与 LC3B 基因可能互作或参与调控的相关蛋白,并构建蛋白互作网络,列出互作可能性最高的前 20 位基因。

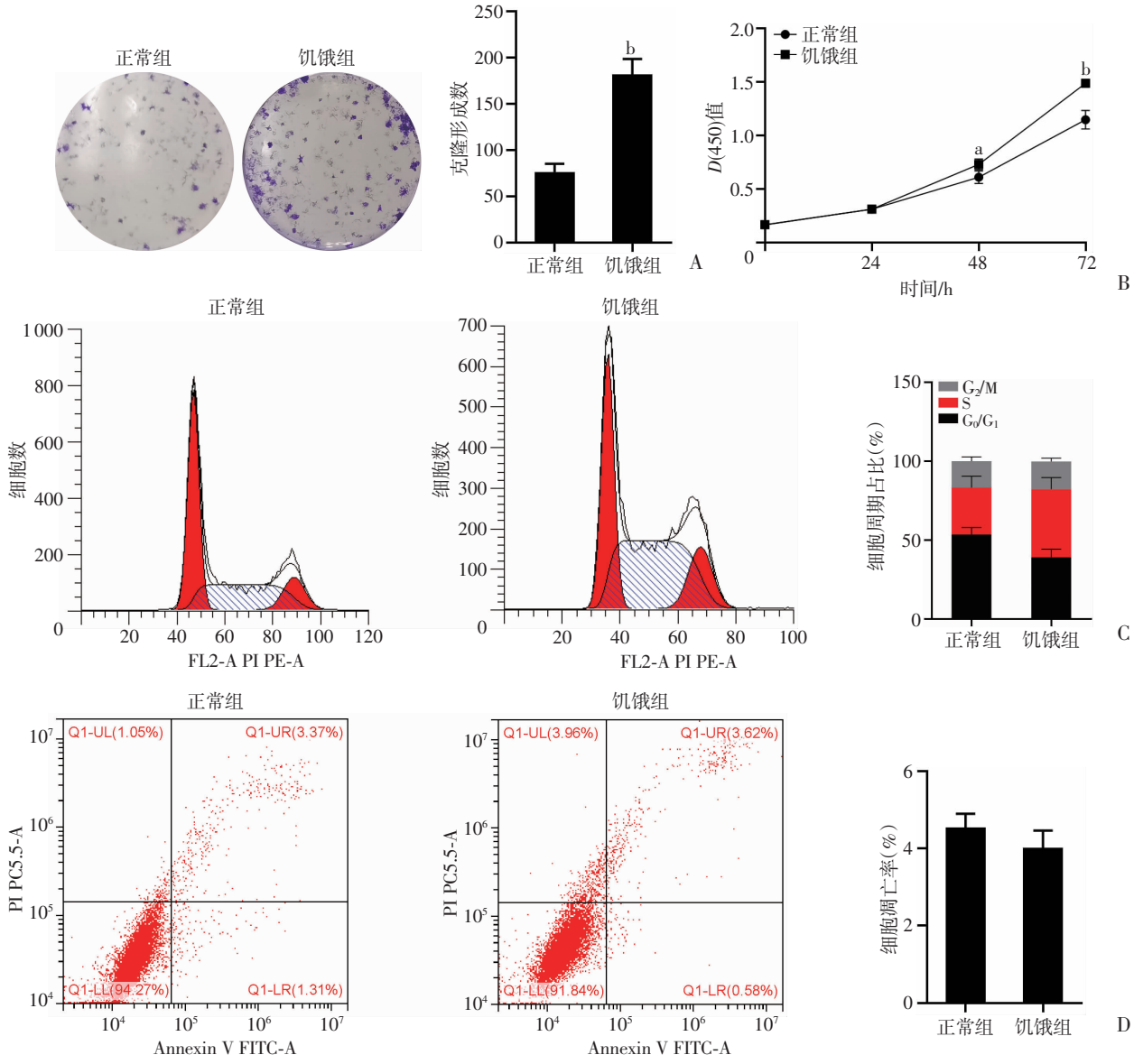
1.4　统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件包进行数据分析。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　饥饿微环境可诱导膀胱癌细胞增殖能力增强

CCK-8 及克隆形成实验结果显示,膀胱癌细胞株 T24 饥饿处理后增殖能力较正常组显著提升($P<0.05$,图 1A、B)。利用 FACS 检测 T24 细胞周期变化及凋亡情况,结果显示,经饥饿处理后进入 S 期的膀胱癌细胞较正常 T24 细胞显著增加(正常组 38.02% *vs* 饥饿组 51.73%,图 1C),而落入 G_1 期的细胞明显减少(正常组 48.39% *vs* 饥饿组 33.15%),证明饥饿微环境促进更多的癌细胞由 G_1 期进入 S 期;而两组细胞凋亡差异无统计学意义(图 1D),进一步说明饥饿处理后的膀胱癌细胞生长是通过增殖能力增加而非减少凋亡实现的。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常组比较

A:两组克隆形成情况(左)及克隆形成数分析(右);B:CCK-8 实验检测两组细胞活性;C:流式细胞术检测两组细胞周期分布(左)及占比情况(右);D:流式细胞术检测两组细胞凋亡(左)及凋亡率分析(右)

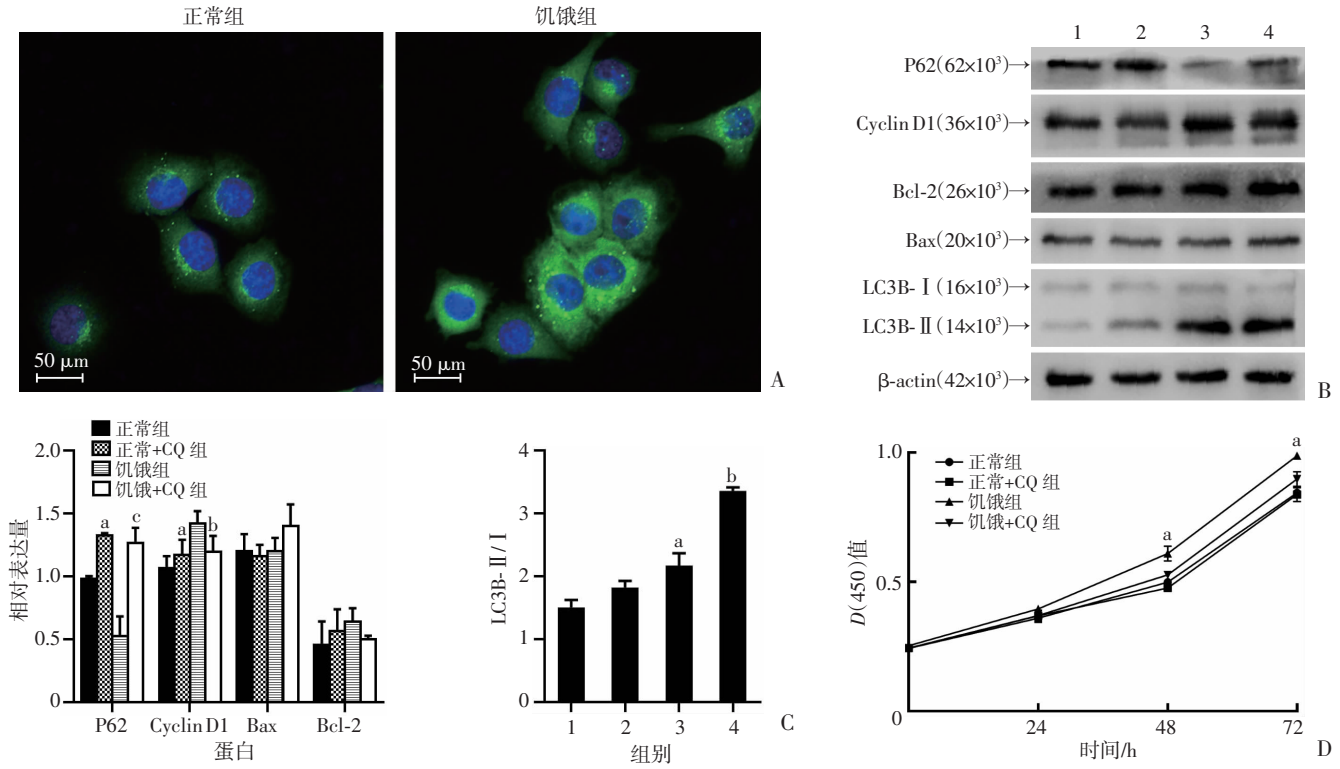
图 1　饥饿微环境可诱导膀胱癌 T24 细胞增殖能力增强

2.2 饥饿诱导自噬促进膀胱癌细胞增殖

利用免疫荧光检测 T24 细胞 LC3B 在胞质内形成自噬小体的程度。共聚焦显微镜观察结果显示,饥饿处理后的 T24 细胞胞质内 LC3B 点状浓聚显著增加(图 2A),提示自噬小体的形成增多。同时,Western blot 检测自噬相关标志物 P62 及 LC3B-Ⅱ/Ⅰ的表达变化,其结果也印证饥饿处理后自噬水平上升(图 2B)。利用 CQ 抑制饥饿诱导的自噬,Western blot 结果证实在加用 CQ 后无论正常组或饥饿组膀胱癌细胞自噬相关标志产物 P62 及 LC3B-Ⅱ/Ⅰ比值均较未用 CQ 处理组出现上升(图 2B、C),证明 CQ 可以抑制晚期自噬流。CCK-8 实验发现在抑制饥饿诱导的自噬后,膀胱癌细胞增殖能力明显下降,而在正常组中加用 CQ 并没有引起细胞增殖能力的抑制(图 2D)。以上结果证明饥饿微环境所诱导的自噬是促进膀胱癌细胞增殖能力增加的重要因素。同时,Western blot 检测增殖及凋亡相关蛋白表达,发现在饥饿处理后膀胱癌细胞凋亡相关蛋白 Bax 及 Bcl-2 未见明显变化,而增殖相关蛋白 Cyclin D1 明显上升,抑制自噬后 Cyclin D1 表达量相对减少(图 2C),由此推测饥饿处理诱导的自噬促进膀胱癌细胞增殖能力的增强而非凋亡减少。

2.3 饥饿诱导 YAP1 蛋白调控自噬

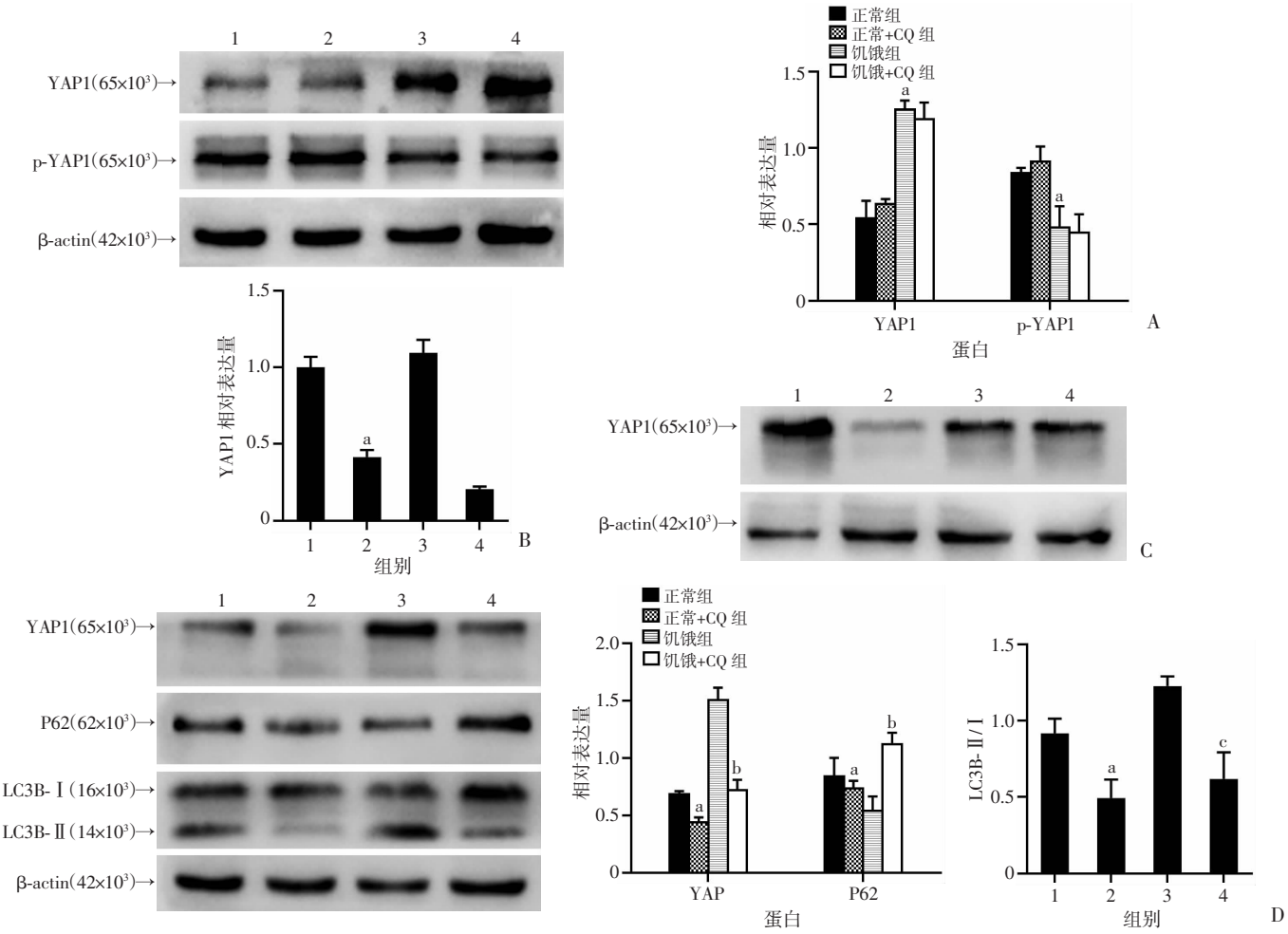
Western blot 检测结果显示,饥饿处理后 YAP1 蛋白表达显著增加,而磷酸化水平呈现明显的降低,CQ 处理后其表达量及磷酸化并未出现明显变化(图 3A)。这提示自噬水平的升高可能是膀胱癌细胞在饥饿状态下受到 YAP1 异常高表达所导致的结果。为进一步证实我们的猜想,利用 siRNA 敲低 YAP1 蛋白在 T24 细胞株中的表达,并在转录及翻译水平均证实序列 1 的沉默效能最高(图 3B、C),故选择序列 1 作为后续 siRNA。在沉默 YAP1 后,饥饿组自噬水平受到明显抑制,而正常组沉默 YAP1 也可一定程度下调自噬水平($P<0.05$,图 3D)。



1:正常组;2:正常+CQ 组;3:饥饿组;4:饥饿+CQ 组;a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与饥饿组比较

A:免疫荧光观察两组细胞内 LC3B 表达及浓聚情况;B:各组细胞不同蛋白的表达;C:各组蛋白相对表达量(左)及 LC3BⅡ/Ⅰ比值(右)分析;D:各组细胞不同时间细胞活性

图 2 饥饿诱导自噬促进膀胱癌细胞增殖



A:各组细胞总蛋白中 YAP1 及磷酸化 YAP1 蛋白相对表达量　1:正常组;2:正常+CQ 组;3:饥饿组;4:饥饿+CQ 组;a:$P<0.01$,与正常组比较;B、C:分别为 qPCR(B)和 Western blot(C)验证 siRNA 转染后 YAP1 敲低效率　1:T24-NC;2:T24-siYAP1;3:T24-siYAP2;4:T24-siYAP3;a:$P<0.01$,与 T24-NC 比较;D:各组细胞总蛋白中 YAP1、磷酸化 YAP1 及自噬相关蛋白相对表达量　1:正常组;2:正常+siYAP1 组;3:饥饿组;4:饥饿+siYAP1 组;a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与饥饿组比较

图 3　饥饿诱导 YAP1 蛋白调控自噬

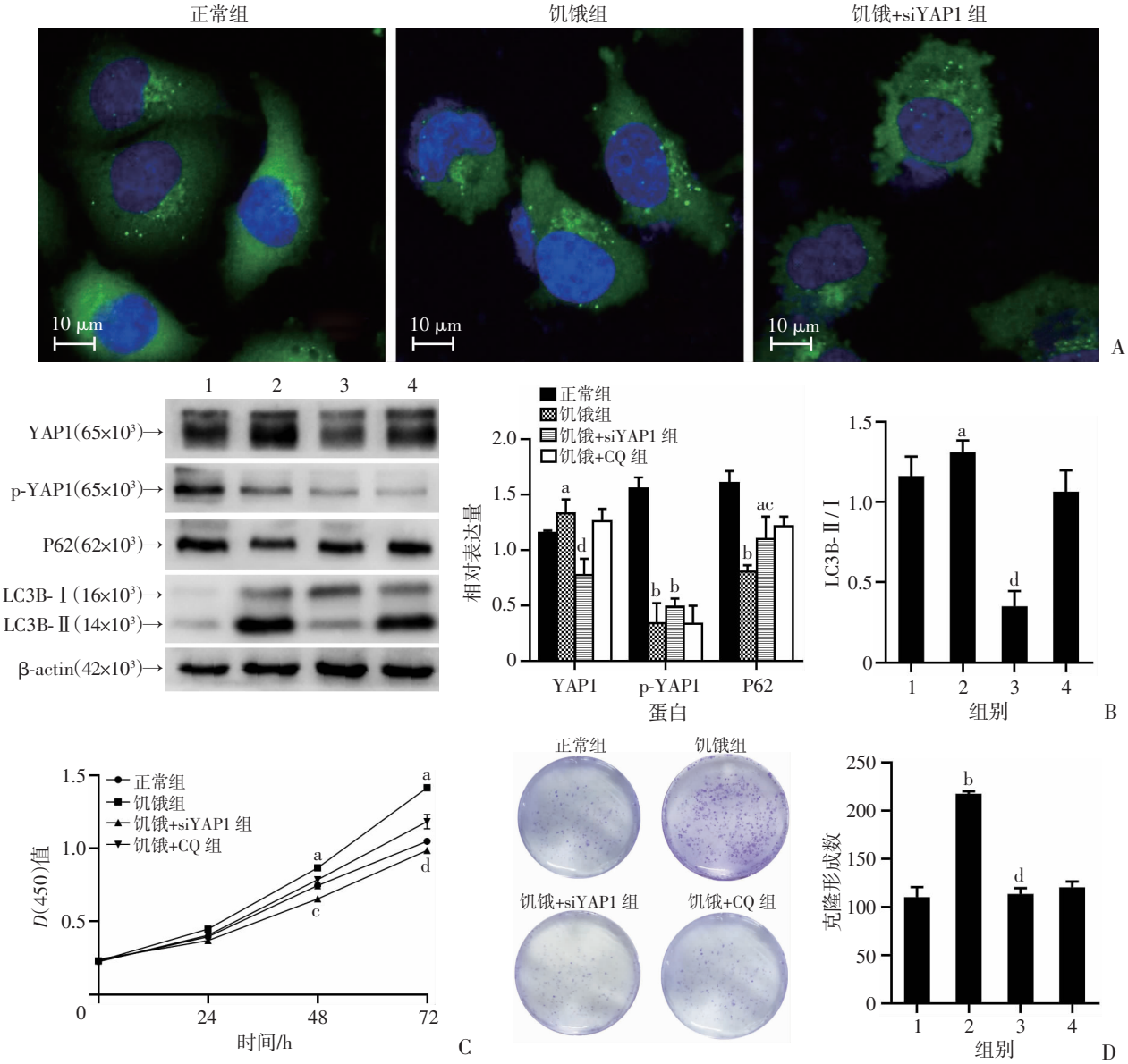
2.4　饥饿诱导 YAP1 蛋白表达增强并促进膀胱癌细胞增殖

为验证饥饿处理是否通过上调了 YAP1 蛋白表达水平及磷酸化水平从而促进自噬引起膀胱癌细胞增殖能力的增加,分别利用 siRNA 及自噬抑制剂 CQ 作为自噬启动前或启动时的阻断剂。免疫荧光可观察到饥饿处理的 T24 细胞在沉默 YAP1 后,其胞质内 LC3B 浓聚受到显著抑制(图 4A)。在蛋白水平上可以看到饥饿处理并联合 siYAP1 后的膀胱癌细胞自噬水平明显下降,且 YAP1 蛋白由于本身翻译受到抑制,其磷酸化水平也显著下降,但 CQ 并未对 YAP1 的异常表达及磷酸化的减少产生显著影响(图 4B)。而在 YAP1 及自噬被抑制后,饥饿处理不再能够促进膀胱癌细胞的增殖能力增加。这在 CCK-8 及克隆形成实验中都得到了印证(图 4C、D)。

2.5　YAP1 蛋白与临床预后

利用 Oncomine(https://www.oncomine.org/)网站数据进行 YAP1 的泛癌表达量分析,结果显示 YAP1 基因在膀胱癌中表达水平高于其他癌症(图 5A),而且相较于恶性程度更低的浅表型膀胱癌,肌层浸润性膀胱癌患者组织中 YAP1 的表达量更高(图 5B)。下载 TCGA 数据库中 402 例膀胱癌患者转录组数据及临床相关信息,通过对患者 YAP1 和 LC3B 基因的表达进行多因素 Cox 回归分析后,建立以 YAP1 和 LC3B 高表达为危险因素的风险模型,模型公式为风险值(risk score)= 0.028 824 167 978 055 5×YAP1 表达量+

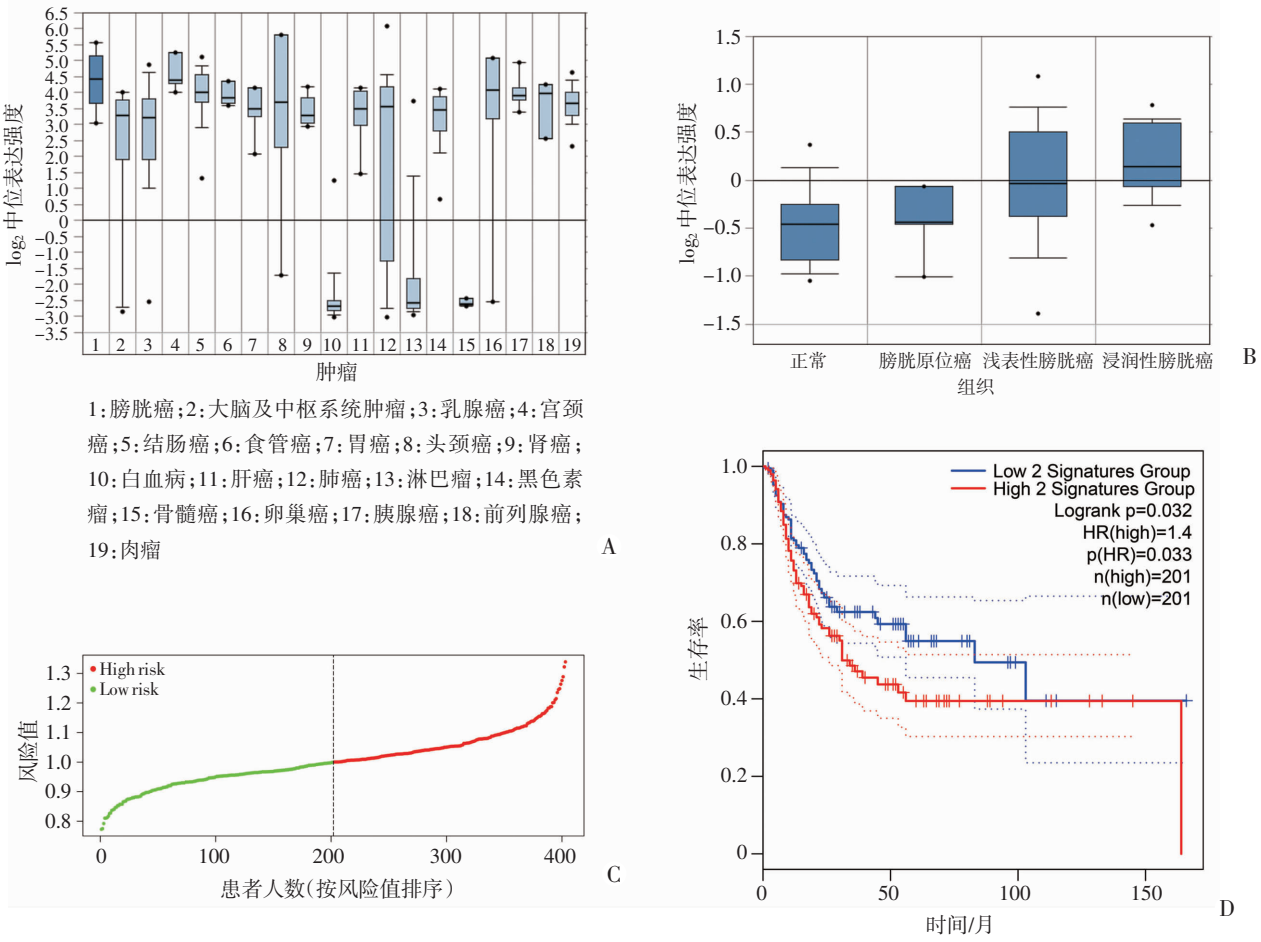
0.141 685 903 296 273×LC3B 表达量,所得总和取中位值后将患者分为高风险和低风险两组,进一步对高低风险组患者的预后进行分析发现,尽管在肿瘤预后总体生存率(OS)上两组患者并未出现明显差异(P>0.05,图 5C),但在疾病无进展生存期(PFS)上高风险组却明显短于低表达组(图 5D)。利用 GeneMANIA 预测 YAP1 基因与 LC3B 基因可能互作或参与调控的相关蛋白,并构建蛋白互作网络以及列出互作可能性最高的前 20 位基因(图 5E)。以上结果提示 YAP1 是一个与癌症发生、发展密切相关的癌基因,其在膀胱癌的进展过程晚期起到了促癌的作用,而 YAP1 和 LC3B 基因的高表达可能预示着患者无进展生存期相对较短,与前期实验发现 YAP1 促进自噬从而调控膀胱癌恶性增殖的结果是相印证的。



1:正常组;2:饥饿组;3:饥饿+siYAP1 组;4:饥饿+CQ 组;a:P<0.05,b:P<0.01,与正常组比较;c:P<0.05,d:P<0.01,与饥饿组比较

A:免疫荧光显示 T24 细胞内 LC3 表达及浓聚情况;B:Western blot 检测细胞中各蛋白表达及半定量分析;C:各组细胞在不同时间点 T24 细胞活性;D:各组细胞克隆形成实验及定量分析

图 4 饥饿诱导 YAP1 蛋白表达增强并促进膀胱癌细胞增殖



A:泛癌中 YAP1 基因表达情况　在膀胱癌中表达更高;B:Oncomine 数据库中不同浸润深度膀胱癌组织与 YAP1 表达情况　随着浸润深度的增加 YAP1 表达水平更高;C:来自 TCGA 数据库 402 例膀胱癌患者依据 YAP1 和 LC3B 的表达差异及所占权重分为高危组与低危组(划分界限为表达量中位值);D:依据 YAP1 和 LC3B 表达所构建风险模型的不同风险患者无病生存率(DFS);E:蛋白互作网络分析(PPI)预测 YAP1 与 LC3B 相互调控可能的作用蛋白

图 5　YAP1 蛋白与膀胱癌患者临床及预后的关系

3 讨论

目前膀胱癌恶性进展机制仍不清楚。本研究针对可能影响膀胱癌恶性进展的饥饿微环境进行模拟,发现膀胱癌细胞增殖能力明显增强。由此深入探究饥饿微环境对膀胱癌恶性增殖的促进作用。

膀胱癌的发生、发展与所处肿瘤微环境有着密不可分的联系,癌细胞过度生长与新生血管形成不足,可引起乏血供导致癌细胞处于缺氧、饥饿等微环境中[14]。癌细胞利用多种方式来应对这一不利于生长的环境,不仅利用代谢重编程、上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)、上调自噬水平等方式增强其生存能力,还利用微环境中不同细胞在压力下异常生成的缺氧诱导因子、乳酸以及各类外泌体所包含信号因子等促进癌细胞的增殖、侵袭转移以及免疫逃逸等[15-16]。自噬作为细胞进化出的一种分解代谢过程,在晚期进展过程中表现出促癌效应。在应对微环境所产生不利于生长的压力时,癌细胞可通过异常增强的自噬增加非必需分子、蛋白以及细胞器的降解,维持细胞内环境的稳态并促进癌细胞的存活与生长[17]。目前对饥饿微环境诱导膀胱癌细胞自噬的研究尚少,这一效应如何影响膀胱癌细胞恶性生长尚不清楚。在乳腺癌、肝癌等癌症中饥饿诱导自噬对癌细胞恶性进展的促进作用已有一定研究。乳腺癌细胞经葡萄糖饥饿诱导后可出现 mTORC1 的异常活化,引起自噬水平上调和 AKT 信号通路增强,促进乳腺癌细胞生长[18]。肝癌细胞在饥饿诱导后自噬水平上调,可通过 Wnt/β-catenin 信号通路诱导 MCT1 的高表达,从而促进肝癌细胞的转移[19]。饥饿诱导子宫内膜癌细胞中去乙酰化酶的过表达可正向调控自噬,通过 LC3 乙酰化的减少从而引起癌细胞增殖能力的增加[20]。本研究结果显示,饥饿微环境可诱导细胞自噬水平的上调,促进膀胱癌细胞增殖,利用自噬抑制剂阻断自噬流后其增殖能力得到明显的抑制,流式细胞实验及 Western blot 结果表明饥饿处理所引起增殖能力改变是通过影响膀胱癌细胞生长周期的变化而非凋亡水平改变,可能是饥饿诱导的膀胱癌细胞 G_1 期缩短,使更多的细胞从 G_1 期转变至 S 期,促进癌细胞周期变化及细胞增殖。

Hippo 信号通路是经典的细胞增殖及分化的调控通路,在癌症发生、发展中也起着重要作用[21]。YAP1 蛋白是 Hippo 通路下游的核心效应蛋白,在多种癌症中均发现其异常表达与癌症进展密切相关,例如在乳腺癌中 YAP1 可通过直接与锌指蛋白 1(ZEB1)相结合的方式诱导乳腺癌细胞 EMT,促进乳腺癌的转移发生[22];而在胰腺癌中,WDR3 的过表达可通过激活 YAP1 的异常表达促进胰腺癌的恶性进展发生[23]。在膀胱癌中,YAP1 也受到广泛关注,LI 等[24]发现 TME 中葡萄糖的含量与膀胱癌转移有明显相关性,进一步探究后发现微环境中葡萄糖含量可以调控膀胱癌细胞 EMT 发生,机制可能与 YAP1 过表达相关。尽管自噬与 YAP1 的调控关系在膀胱癌中尚不清楚,但有研究发现肝癌细胞中 lncRNA ATB 可通过上调 YAP1 过表达从而介导自噬水平增强[25]。PAVEL 等[26]研究发现相较于正常细胞,癌细胞恶性生长以及转移的发生可能与解除细胞接触抑制的作用相关,YAP1 核转位与细胞向恶性生长转变有着显著的相关性,YAP1/自噬轴的形成在其中起到至关重要作用。因此,本研究在膀胱癌中利用饥饿模型发现自噬明显增强,同时发现 YAP1 异常过表达,在利用 siRNA 成功敲低 YAP1 表达水平后,自噬水平被抑制,具体表现在自噬相关蛋白改变减少以及 LC3B 浓聚的减弱,同时膀胱癌细胞增殖能力也被抑制。通过生物信息学发掘,发现 YAP1 在膀胱癌组织中的表达水平高于其他癌组织,且随着膀胱癌的进展,YAP1 的表达逐渐上升,提示 YAP1 过表达与膀胱癌进展相关联。同时通过构建 YAP1 和 LC3B 基因表达量的风险模型,发现二者的过表达与临床预后密切相关。

综上,本研究初步证实在饥饿诱导下膀胱癌细胞可通过异常表达并活化 YAP1 蛋白,诱导细胞自噬水平的增强,从而促进癌细胞增殖能力增加。

参考文献:

[1] 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. DOI:10.3322/caac.21492.

[2] 贺海蓉, 李莉, 冯敖梓, 等. 1990-2017 年全球膀胱癌发病率和死亡率的研究[J]. 中国循证医学杂志, 2020, 20(11): 1257-1265. DOI: 10.7507/1672-2531.202007095.
HE H R, LI L, FENG A Z, *et al*. The incidence and mortality of global bladder cancer from 1990 to 2017[J]. Chin J Evid Based Med, 2020, 20(11): 1257-1265. DOI: 10.7507/1672-2531.202007095.

[3] YIN M, JOSHI M, MEIJER R P, *et al*. Neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and two-step meta-analysis[J]. Oncologist, 2016, 21(6): 708-715. DOI:10.1634/theoncologist.2015-0440.

[4] LI F P, TENG H L, LIU M D, *et al*. Prognostic value of

immune-related genes in the tumor microenvironment of bladder cancer[J]. Front Oncol, 2020, 10: 1302. DOI:10.3389/fonc.2020.01302.

[5] RYBSTEIN M D, BRAVO-SAN PEDRO J M, KROEMER G, *et al*. The autophagic network and cancer[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(3): 243-251. DOI:10.1038/s41556-018-0042-2.

[6] DE DUVE C, WATTIAUX R. Functions of lysosomes[J]. Annu Rev Physiol, 1966, 28(1): 435-492. DOI:10.1146/annurev.ph.28.030166.002251.

[7] MENG Q, XU J, LIANG C, *et al*. GPx1 is involved in the induction of protective autophagy in pancreatic cancer cells in response to glucose deprivation[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(12): 1187. DOI:10.1038/s41419-018-1244-z.

[8] SUN X, SHU Y H, XU M T, *et al*. ANXA6 suppresses the tumorigenesis of cervical cancer through autophagy induction [J]. Clin Transl Med, 2020, 10(6): e208. DOI:10.1002/ctm2.208.

[9] TAO J Y, CALVISI D F, RANGANATHAN S, *et al*. Activation of β-catenin and Yap1 in human hepatoblastoma and induction of hepatocarcinogenesis in mice [J]. Gastroenterology, 2014, 147(3): 690-701. DOI:10.1053/j.gastro.2014.05.004.

[10] FERNANDEZ-L A, SQUATRITO M, NORTHCOTT P, *et al*. Oncogenic YAP promotes radioresistance and genomic instability in medulloblastoma through IGF2-mediated Akt activation[J]. Oncogene, 2012, 31(15): 1923-1937. DOI:10.1038/onc.2011.379.

[11] XU M X, GU M, ZHOU J, *et al*. Interaction of YAP1 and mTOR promotes bladder cancer progression [J]. Int J Oncol, 2020, 56(1): 232-242. DOI:10.3892/ijo.2019.4922.

[12] TONG H, YIN H, HOSSAIN M A, *et al*. Starvation-induced autophagy promotes the invasion and migration of human bladder cancer cells *via* TGF-β1/Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition activation [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(4): 5118-5127. DOI:10.1002/jcb.27788.

[13] ZHANG J X, SONG W, CHEN Z H, *et al*. Prognostic and predictive value of a microRNA signature in stage Ⅱ colon cancer: a microRNA expression analysis[J]. Lancet Oncol, 2013,14(13):1295-1306. DOI:10.1016/S1470-2045(13)70491-1.

[14] WANG L Y, HUO M F, CHEN Y, *et al*. Tumor microenvironment-enabled nanotherapy [J]. Adv Healthc Mater, 2018, 7(8): e1701156. DOI: 10.1002/adhm.201701156.

[15] SATIJA S, KAUR H, TAMBUWALA M M, *et al*. Hypoxia-inducible factor (HIF): fuel for cancer progression [J]. Curr Mol Pharmacol, 2021, 14(3): 321-332. DOI: 10.2174/1874467214666210120154929.

[16] WU S J, KUANG H X, KE J, *et al*. Metabolic reprogramming induces immune cell dysfunction in the tumor microenvironment of multiple myeloma [J]. Front Oncol, 2020, 10: 591342. DOI:10.3389/fonc.2020.591342.

[17] D'SOUZA L, BHATTACHARYA D. Plasma cells: You are what You eat[J]. Immunol Rev, 2019, 288(1): 161-177. DOI:10.1111/imr.12732.

[18] CHEN Y Q, WEI H J, LIU F, *et al*. Hyperactivation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) promotes breast cancer progression through enhancing glucose starvation-induced autophagy and Akt signaling[J]. J Biol Chem, 2014, 289(2): 1164-1173. DOI:10.1074/jbc.M113.526335.

[19] FAN Q, YANG L, ZHANG X D, *et al*. Autophagy promotes metastasis and glycolysis by upregulating MCT1 expression and Wnt/β-catenin signaling pathway activation in hepatocellular carcinoma cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 9. DOI:10.1186/s13046-018-0673-y.

[20] HUANG S, LI Y, SHENG G H, *et al*. Sirtuin 1 promotes autophagy and proliferation of endometrial cancer cells by reducing acetylation level of LC3[J]. Cell Biol Int, 2021, 45(5): 1050-1059. DOI:10.1002/cbin.11549.

[21] PATEL S H, CAMARGO F D, YIMLAMAI D. Hippo signaling in the liver regulates organ size, cell fate, and carcinogenesis[J]. Gastroenterology, 2017, 152(3): 533-545. DOI:10.1053/j.gastro.2016.10.047.

[22] LEHMANN W, MOSSMANN D, KLEEMANN J, *et al*. ZEB1 turns into a transcriptional activator by interacting with YAP1 in aggressive cancer types[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10498. DOI:10.1038/ncomms10498.

[23] SU W J, ZHU S K, CHEN K, *et al*. Overexpressed WDR3 induces the activation of Hippo pathway by interacting with GATA4 in pancreatic cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 88. DOI:10.1186/s13046-021-01879-w.

[24] LI S, ZHU H, CHEN H D, *et al*. Glucose promotes epithelial-mesenchymal transitions in bladder cancer by regulating the functions of YAP1 and TAZ[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(18): 10391-10401. DOI:10.1111/jcmm.15653.

[25] WANG C Z, YAN G X, DONG D S, *et al*. LncRNA-ATB promotes autophagy by activating Yes-associated protein and inducing autophagy-related protein 5 expression in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(35): 5310-5322. DOI:10.3748/wjg.v25.i35.5310.

[26] PAVEL M, RENNA M, PARK S J, *et al*. Contact inhibition controls cell survival and proliferation *via* YAP/TAZ-autophagy axis[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2961. DOI:10.1038/s41467-018-05388-x.

(收稿:2021-06-16;修回:2021-07-18)

(编辑 汪勤俭)