

PKM2通过调控活性氧依赖的PI3K/Akt信号通路影响膀胱尿路上皮细胞癌细胞的侵袭能力

梁凯¹, 殷磊², 陈琦²

(1. 黑龙江省医院泌尿外科, 哈尔滨 150001; 2. 中国医科大学附属第一医院泌尿外科, 沈阳 110001)

摘要 **目的** 探讨PKM2通过调控活性氧(ROS)依赖的PI3K/Akt信号通路对膀胱尿路上皮细胞癌细胞侵袭能力的影响。**方法** 将人膀胱癌T24细胞随机分为Control组、si-NC组、si-PKM2组和si-PKM2+IGF-1组。实时PCR检测细胞中PKM2 mRNA表达; CCK-8检测细胞增殖; Transwell小室法检测细胞侵袭和转移; Hoechst 33342荧光染色和流式细胞术检测细胞凋亡; ROS荧光探针法检测细胞中ROS水平; Western blotting检测细胞中PI3K、Akt、mTOR、caspase-3、Bax、Bcl-2蛋白表达。**结果** 与人正常膀胱上皮SV-HUC-1细胞相比, 人膀胱癌T24细胞中PKM2 mRNA相对表达量明显增加($P < 0.05$)。与Control组相比, si-PKM2组T24细胞中PKM2 mRNA相对表达量、细胞增殖能力、侵袭细胞数以及细胞中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR比值和Bcl-2蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$), 细胞凋亡率、细胞中ROS相对水平以及细胞中Bax、caspase-3蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$); 与si-PKM2组相比, si-PKM2+IGF-1组T24细胞中PKM2 mRNA相对表达量、细胞增殖能力、侵袭细胞数以及细胞中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR比值和Bcl-2蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$), 细胞凋亡率、细胞中ROS相对水平以及细胞中Bax、caspase-3蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。**结论** 敲减PKM2可促进膀胱尿路上皮细胞癌细胞中ROS水平升高, 抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路激活, 进而发挥抑制细胞侵袭和促进细胞凋亡作用。

关键词 M2型丙酮酸激酶; 膀胱尿路上皮细胞癌; 活性氧; PI3K/Akt/mTOR信号通路

中图分类号 R737.14 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2024)07-0621-07

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240625.1101.024>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2024.07.008

Effect of PKM2 on the invasive ability of bladder urothelial carcinoma cells by regulating the reactive oxygen species-dependent PI3K/Akt signaling pathway

LIANG Kai¹, YIN Lei², CHEN Qi²

(1. Department of Urology, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150001, China; 2. Department of Urology, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract **Objective** To investigate the effect of PKM2 on the invasive ability of bladder urothelial carcinoma cells by regulating the reactive oxygen species (ROS)-dependent PI3K/Akt signaling pathway. **Methods** Human bladder cancer T24 cells were divided into the control, si-NC, si-PKM2, and si-PKM2+IGF-1 groups. PKM2 mRNA expression, proliferation, invasion and migration, and apoptosis of T24 cells were detected using real-time PCR, CCK-8 assay, Transwell assay, and Hoechst 33342 fluorescence staining and flow cytometry, respectively. The ROS level in the cells was measured using ROS fluorescence probe staining. Western blotting was used to detect the expression of PI3K, Akt, mTOR, caspase-3, Bax, and Bcl-2 proteins. **Results** The expression of PKM2 mRNA in human bladder cancer T24 cells was significantly higher than in normal bladder SV-HUC-1 cells ($P < 0.05$). Compared to the control group, the expression of PKM2 mRNA, cell proliferation ability, number of invading cells, p-PI3K/PI3K ratio, p-Akt/Akt ratio, p-mTOR/mTOR ratio, and Bcl-2 protein expression in T24 cells in the si-PKM2 group were significantly decreased ($P < 0.05$), whereas the apoptosis rate, relative ROS level, and expression of Bax and caspase-3 proteins were significantly increased ($P < 0.05$). Compared to the si-PKM2 group, the expression of PKM2 mRNA, cell proliferation ability, number of invading cells, p-PI3K/PI3K ratio, p-Akt/Akt ratio, p-mTOR/mTOR ratio, and Bcl-2 protein expression in T24 cells in the si-PKM2+IGF-1 group were significantly increased ($P < 0.05$), whereas the apoptosis rate, relative ROS level, and expression of Bax and caspase-3 proteins were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Knockdown of PKM2 can increase the level of ROS in bladder urothelial carcinoma cells and inhibit the activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, thus inhibiting cell invasion and promoting cell apoptosis.

基金项目: 辽宁省科技厅应用基础研究计划[辽科发(2022)43号]

作者简介: 梁凯(1976-), 男, 副主任医师, 博士.

通信作者: 陈琦, E-mail: 384655224@qq.com

收稿日期: 2024-03-27

网络出版时间: 2024-06-26 14:24:41

Keywords pyruvate kinase M2; bladder urothelial carcinoma; reactive oxygen species; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

膀胱癌是泌尿生殖系统常见的恶性肿瘤之一,发病率仅次于前列腺癌^[1]。2020年国际癌症研究机构统计显示,膀胱癌约占全球全部恶性肿瘤的3.2%,其发病率在我国泌尿系统肿瘤中居首位^[2]。目前,90%以上的膀胱癌为膀胱尿路上皮细胞癌(bladder urothelial carcinoma, BUC),临床上经尿道膀胱肿瘤电切术、膀胱根治切除术、放疗和辅助化疗等为主要治疗方法,虽然能在一定程度上控制病情,但术后复发率较高,且患者易出现尿频、尿急、尿痛、尿血等不良反应,严重影响患者的生活质量和预后^[3]。因此,寻找BUC诊疗的新靶点具有重要的临床意义。

丙酮酸激酶是细胞糖酵解反应的关键酶,也是肿瘤细胞糖代谢异常的关键酶。M2型丙酮酸激酶(pyruvate kinase M2, PKM2)是丙酮酸激酶的同工酶之一,其在肿瘤细胞能量代谢过程中发挥主导作用。已有研究^[4]证实,PKM2在多种恶性肿瘤中高表达,包括胃癌、乳腺癌、宫颈癌、膀胱癌、结肠癌等,是一种具有较好应用前景的肿瘤标志物,但PKM2在膀胱癌发生和发展中的致癌分子机制尚未明确。近年来研究^[5]发现,某些类型的肿瘤细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)过量产生在诱导凋亡中起关键作用。细胞代谢异常时,通过产生大量的ROS使细胞处于氧化应激状态,通过调控多种凋亡相关基因的表达诱导细胞凋亡^[6]。而磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)信号通路可通过参与多种生物学过程介导肿瘤细胞的凋亡,包括细胞存活、凋亡、物质代谢等^[7]。但ROS依赖的PI3K/Akt信号通路是否为PKM2影响BUC的机制尚不清楚。因此,本研究分析了PKM2对BUC细胞侵袭能力的影响,并探讨了其作用机制是否与BUC细胞中的ROS和PI3K/Akt信号通路有关。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

人膀胱癌T24细胞和人正常膀胱上皮SV-HUC-1细胞(中国科学院上海细胞库); si-PKM2质粒及其

阴性对照质粒(si-NC)(金斯瑞质粒公司);胎牛血清(美国Gibco公司);PI3K/Akt/mTOR信号通路激活剂胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)(美国Selleck公司);青霉素、链霉素(上海江莱生物科技有限公司);CCK-8试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);Annexin V-FITC/PI双染试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);ROS检测试剂盒(上海康朗生物科技有限公司);Bax抗体、Bcl-2抗体、caspase-3抗体、p-PI3K抗体、PI3K抗体、Akt抗体、p-Akt抗体、mTOR抗体、p-mTOR抗体、GAPDH抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体(美国CST公司);倒置显微镜(TS100,日本尼康公司);流式细胞仪(美国Calibur公司);垂直电泳仪(DYCZ-24DN型,北京六一生物科技有限公司);超低温冰箱(日本Sanyo公司)。

1.2 细胞培养和分组

T24细胞和SV-HUC-1细胞培养于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和链霉素的RPMI 1640培养基中,于5%CO₂、37℃的培养箱培养。4 h后显微镜下可观察到细胞开始贴壁生长,当细胞开始融合且融合率为80%以上时,在细胞中加入0.25%胰蛋白酶消化细胞,将细胞以1×10⁴/mL密度接种于6孔板中,当细胞密度大于70%~80%时,改用RPMI 1640无血清培养基培养6 h。按照Lipofectamine 3000转染试剂盒说明书转染质粒于T24细胞,转染si-PKM2质粒的细胞为si-PKM2组,转染si-NC质粒的细胞为si-NC组,转染si-PKM2质粒并培养于含20 μmol/L IGF-1培养基的细胞为si-PKM2+IGF-1组,未转染任何质粒的细胞为Control组。

1.3 实验方法

1.3.1 实时PCR检测细胞中PKM2表达:将各组T24细胞用TRIzol裂解液进行裂解,提取细胞中总RNA,并按照逆转录试剂盒说明书将总RNA逆转录为cDNA。引物序列:PKM2,正向5'-ATTATGAGGAAC TCCGCCGCT-3',反向5'-ATTCCGGGTCACAGCAATGATGG-3';GAPDH,正向5'-CGAGAGAATCCGCG GACAT-3',反向5'-TTGTGCAATACAGCGTGGAC-3'。将各引物瞬时离心,加入去离子水制成100 μmol/L

的贮存液,稀释溶液,终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 。PCR反应:94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min预变性;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s变性;60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s退火;重复40次。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算PKM2 mRNA的表达量。

1.3.2 CCK-8检测细胞增殖能力:将各组T24细胞离心,以去除培养液,并用适当的消化酶消化细胞,使其形成悬浮液,稀释细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$,以100 μL /孔接种于96孔板中,观察到细胞贴壁生长后,弃掉培养液,加入200 μL MTT溶液,继续培养细胞4 h,弃掉上清液。每孔中加入150 μL DMSO溶液,轻轻振荡10 min,待完全结晶后,在酶标仪490 nm处测定各孔的吸光度值。

1.3.3 Transwell小室法检测细胞侵袭能力:将各组T24细胞离心,以去除培养液,并用适当的消化酶消化细胞,使其形成悬浮液。清洗细胞后,在细胞中加入含0.1%胎牛血清的DMEM培养基。将Matrigel胶按1:3的比例铺于上室,将200 μL 细胞悬液加入上室;下室加入含10%胎牛血清的DMEM培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的孵箱培养小室24 h。将小室残留的细胞和Matrigel胶擦除后,固定于甲醛溶液中,10 min后在上室中加入0.1%结晶紫染料,10 min后将小室置于显微镜下观察。

1.3.4 Hoechst 33342荧光染色检测细胞凋亡:取各组T24细胞,去除上清液后用PBS洗涤1次。将细胞固定在4%多聚甲醛溶液中30 min,再用PBS洗涤3次。使用微量移液器将细胞中的液体吸干,加入Hoechst染色剂,室温下染色15 min。吸出并丢弃染液,再用PBS洗涤3次,并将液体吸干。每孔中加入适量的荧光淬灭剂,荧光显微镜下观察。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡能力:将消化的各组T24细胞接种在6孔板中,当细胞附着并生长后,更换培养基,培养48 h。使用常规方法消化细胞后,离心5 min,去除上清液。用PBS洗涤细胞后,将预冷的70%乙醇加入细胞中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定细胞12 h。细胞再次离心5 min后,PBS洗涤细胞。将含有0.01% RNase的碘化丙啶染色液加入细胞中,避光条件下染色细胞,30 min后用流式细胞仪检测。

1.3.6 DCFH-DA荧光探针法检测细胞中ROS水平:取各组T24细胞,用0.25%胰蛋白酶消化,制备单细胞悬液,细胞密度为 $5 \times 10^7/\text{mL}$ 。将悬液接种在96孔板中,每组设置3个复孔。待细胞附着并贴壁后,去除培养液并加入DCFH-DA染色液。将细胞置于37 $^{\circ}\text{C}$

恒温的培养箱中,避光条件下孵育细胞30 min。去除培养液后,荧光显微镜下观察各组细胞ROS荧光强度。

1.3.7 Western blotting检测细胞中PI3K、Akt、mTOR、caspase-3、Bax、Bcl-2蛋白表达:取各组T24细胞,加入100 μL 预先配置好的裂解液混合物,于组织匀浆器中混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 r/min离心15 min,收集上清液于EP管中,BCA法测定总蛋白浓度。热水煮沸蛋白样品(终浓度为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 10 min,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存蛋白样品。取蛋白上样50 μg ,将上样缓冲液加入到蛋白样品中煮沸变性,用SDS-PAGE凝胶分离样品,转移样品于PVDF膜后用5%脱脂牛奶封闭,1 h后用TBST溶液清洗PVDF膜,将一抗(1:500)添加到反应液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、避光条件下过夜孵育。随后将二抗(1:1 000)加入反应液中,继续孵育2 h。将ECL发光液滴加到细胞中显影曝光,用Image Lab软件分析各组蛋白条带灰度。

1.4 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件进行数据分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,2组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞中PKM2 mRNA相对表达量的比较

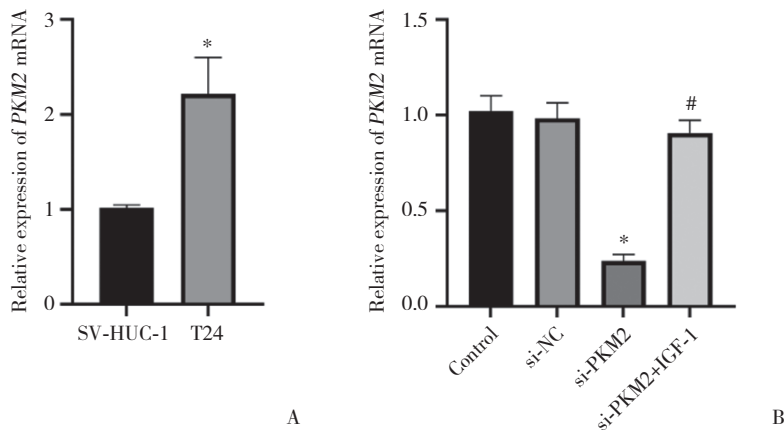
与SV-HUC-1细胞相比,T24细胞中PKM2 mRNA相对表达量明显增加($P < 0.05$)。见图1A。

Control组与si-NC组相比,T24细胞中PKM2 mRNA相对表达量无统计学差异($P > 0.05$);与Control组相比,si-PKM2组T24细胞中PKM2 mRNA相对表达量明显降低($P < 0.05$);与si-PKM2组相比,si-PKM2+IGF-1组T24细胞中PKM2 mRNA相对表达量明显增加($P < 0.05$)。见图1B。

2.2 各组细胞增殖能力的比较

Control组与si-NC组相比,在24、48、72 h时T24细胞增殖能力无统计学差异($P > 0.05$);与Control组相比,si-PKM2组在48和72 h时T24细胞增殖能力明显降低($P < 0.05$);与si-PKM2组相比,si-PKM2+IGF-1组在48和72 h时T24细胞增殖能力明显增加($P < 0.05$)。见图2。

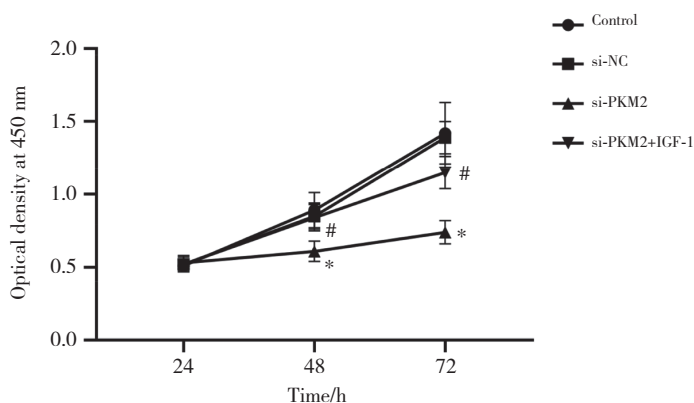
2.3 各组细胞侵袭数目的比较



A, PKM2 mRNA expression in SV-HUC-1 and T24 cells; B, PKM2 mRNA expression in the four groups. * $P < 0.05$ vs. SV-HUC-1 cells or control group; # $P < 0.05$ vs. si-PKM2 group.

图1 PKM2 mRNA相对表达量的比较

Fig.1 Comparison of relative expression of PKM2 mRNA



* $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. si-PKM2 group.

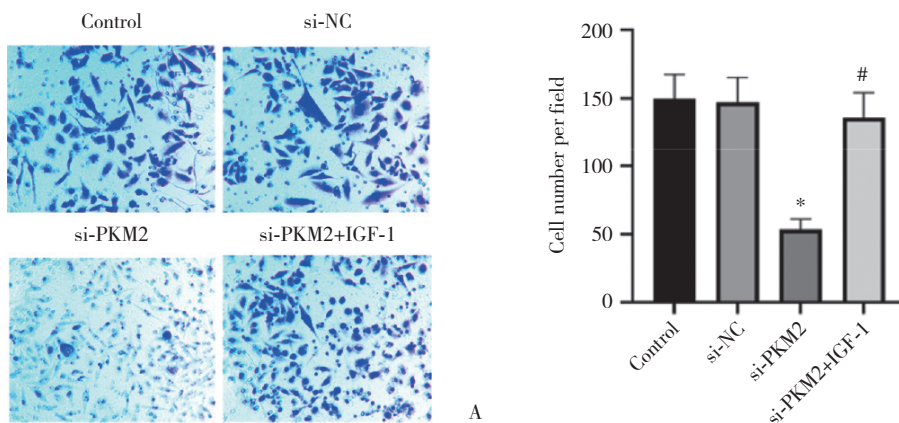
图2 CCK-8检测细胞增殖能力

Fig.2 Cell proliferation detected by CCK-8 assay

Control组与si-NC组相比, T24细胞侵袭数目无统计学差异 ($P > 0.05$); 与Control组相比, si-PKM2组 T24细胞侵袭数目明显减少 ($P < 0.05$); 与si-PKM2组

相比, si-PKM2+IGF-1组 T24细胞侵袭数目明显增加 ($P < 0.05$)。见图3。

2.4 各组细胞凋亡率的比较



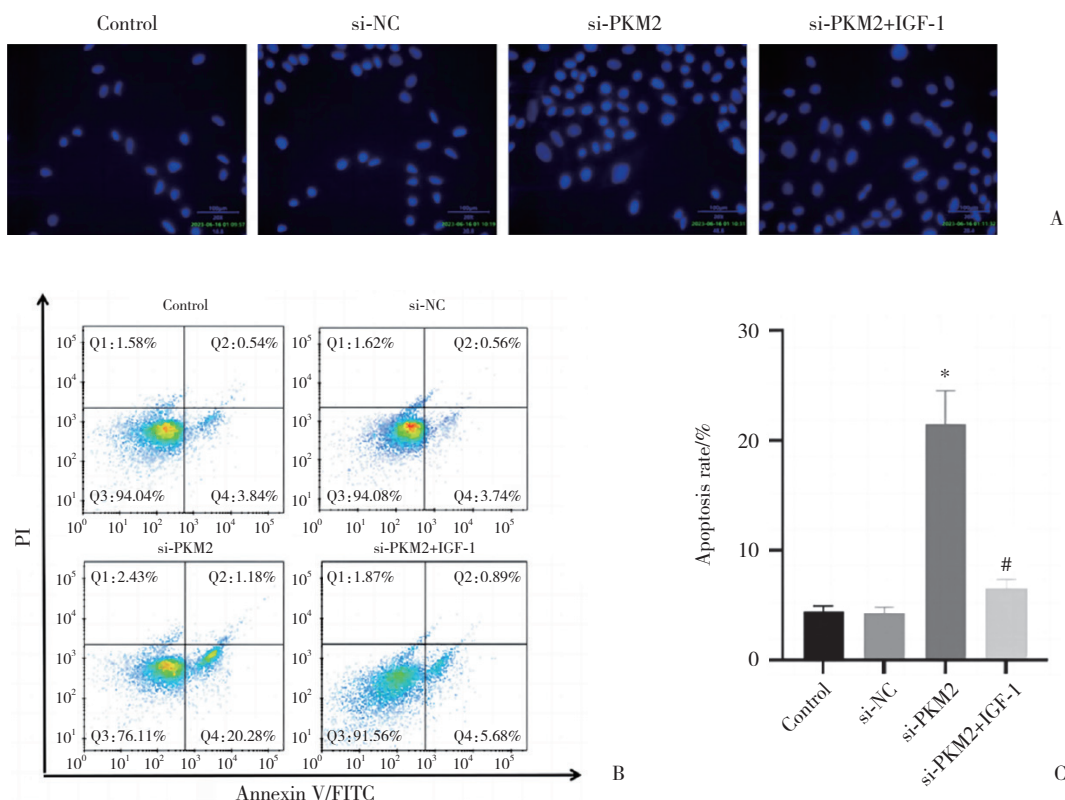
A, cell invasion detected by Transwell assay ($\times 20$); B, comparison of cell invasion. * $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. si-PKM2 group.

图3 各组细胞侵袭能力比较

Fig.3 Comparison of cell invasion ability in each group

Control组T24细胞形态正常,细胞核呈弥散均匀蓝色荧光,与si-NC组相比细胞凋亡率无统计学差异($P > 0.05$);si-PKM2组细胞出现浓染致密的颗粒块状蓝色荧光,这是细胞凋亡的明显特征,与Control

组相比,si-PKM2组细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$);si-PKM2+IGF-1组中呈亮蓝色的细胞明显减少,与si-PKM2组相比,si-PKM2+IGF-1组细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$)。见图4。



A, apoptosis detected by Hoechst 33342 fluorescent staining ($\times 20$); B, apoptosis rate detected by flow cytometry; C, comparison of apoptosis rates. * $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. si-PKM2 group.

图4 各组细胞凋亡率的比较

Fig.4 Comparison of apoptosis rate in each group

2.5 各组细胞中ROS水平的比较

Control组与si-NC组相比,T24细胞中ROS的相对水平无统计学差异($P > 0.05$);与Control组相比,si-PKM2组T24细胞中ROS相对水平明显升高($P < 0.05$);与si-PKM2组相比,si-PKM2+IGF-1组T24细胞中ROS相对水平明显降低($P < 0.05$)。见图5。

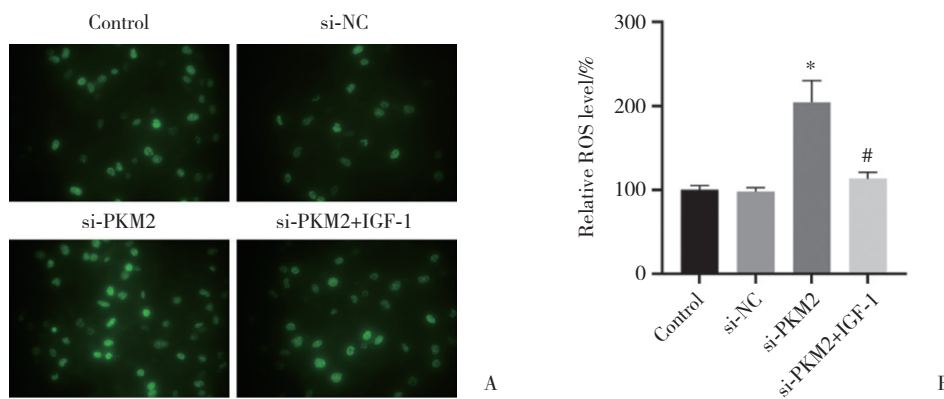
2.6 各组细胞中PI3K、Akt、mTOR、caspase-3、Bax、Bcl-2蛋白表达的比较

Control组与si-NC组相比,细胞中各蛋白表达水平无统计学差异($P > 0.05$);与Control组相比,si-PKM2组细胞中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR比值和Bcl-2表达水平均明显降低,Bax、caspase-3表达水平明显升高($P < 0.05$);与si-PKM2组相比,si-PKM2+

IGF-1组细胞中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR比值和Bcl-2表达水平明显升高,Bax、caspase-3表达水平明显降低($P < 0.05$)。见图6。

3 讨论

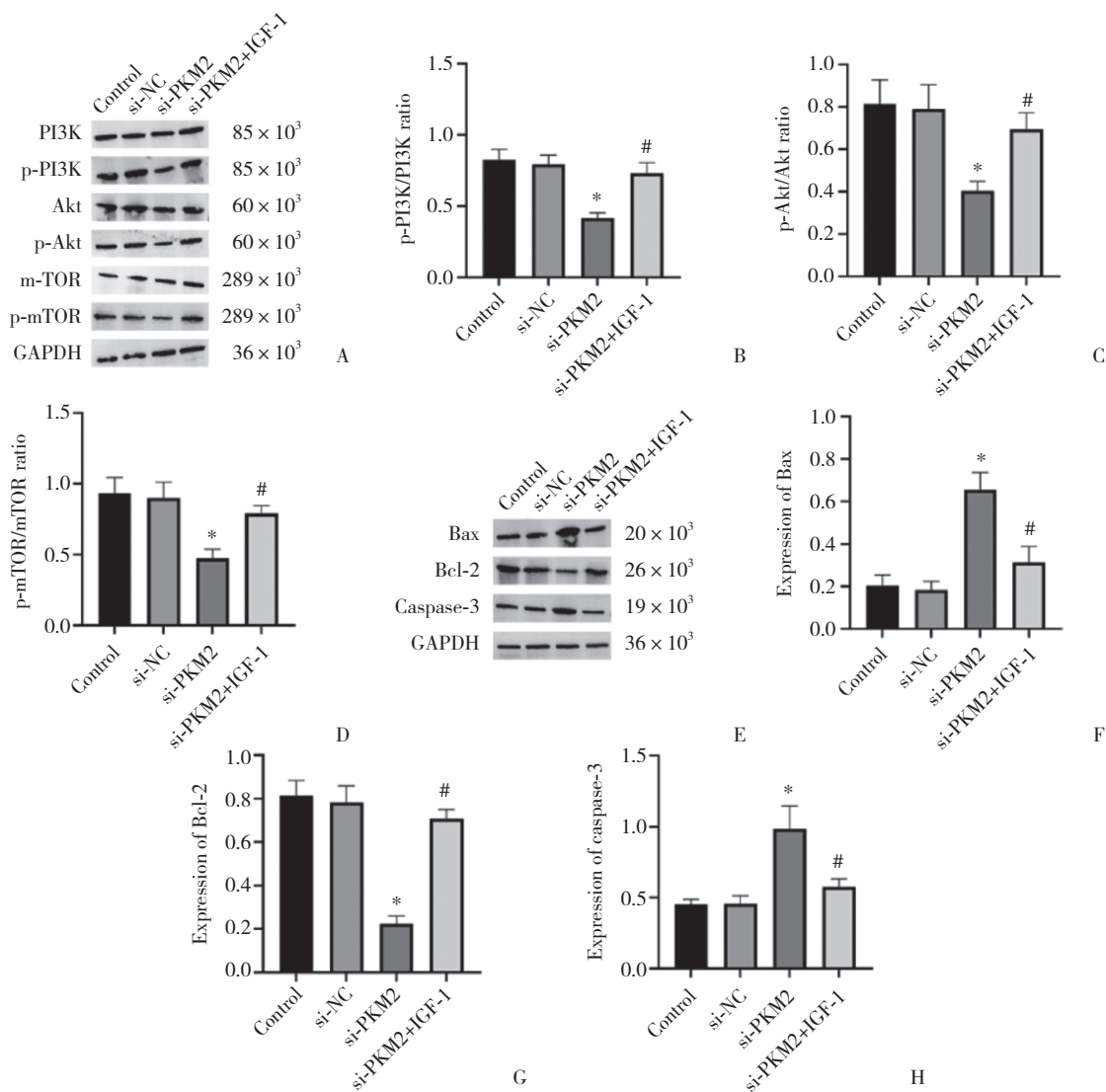
在我国,膀胱癌发病率居男性泌尿系统肿瘤首位,好发于50~70岁人群。统计显示,男性患者数量约为女性患者的3倍^[8]。BUC作为膀胱癌的常见类型,具有复发率高、侵袭性强的特点。目前,手术和放化疗是临床治疗BUC的主要方法。尽管治疗手段不断改进,其复发率仍然很高,达到30%~80%。因此,有必要寻找膀胱癌诊断和治疗的新靶点。



A, ROS levels in cells were detected using the DCFH-DA probe ($\times 20$); B, comparison of relative ROS levels. * $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. si-PKM2 group.

图5 各组细胞中ROS水平比较

Fig.5 Comparison of ROS levels in each group



A, band diagrams of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, and p-mTOR proteins; B–D, comparison of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, and p-mTOR/mTOR ratios; E, band diagram of Bax, Bcl-2, and caspase-3 proteins; F–H, comparison of Bax, Bcl-2, and caspase-3 protein expression. * $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. si-PKM2 group.

图6 各组细胞中PI3K、Akt、mTOR、caspase-3、Bax、Bcl-2蛋白表达的比较

Fig.6 Comparison of the expressions of PI3K, Akt, mTOR, caspase-3, Bax, and Bcl-2 proteins in cells in each group

丙酮酸激酶是一种代谢酶,进化上具有高度保守性,可介导细胞代谢。丙酮酸激酶可促进磷酸烯醇式丙酮酸和二磷酸腺苷之间不可逆的磷酸反应,从而产生磷酸酯和三磷酸腺苷,该反应作为无氧糖酵解过程中的关键步骤之一,可为细胞进行各种生物学活动提供能量。目前,广泛存在于哺乳动物中、具有组织特异性的丙酮酸激酶有4种,包括PKL、PKR、PKM1和PKM2,其中PKM1和PKM2是由一个PKM基因通过可变剪接产生的不同亚型。PKM2是丙酮酸激酶重要亚型之一,在具有高合成代谢需求的细胞尤其是肿瘤和胚胎组织中广泛存在。研究^[9]显示,肺癌、乳腺癌、膀胱癌等多种肿瘤组织中PKM2呈高表达,可介导癌细胞的代谢调节。研究^[10]发现,PKM2在肺癌组织中高表达,下调PKM2可抑制前列腺癌细胞的增殖和侵袭。并且高表达的PKM2可增加缺氧诱导因子1 α 募集激活核因子 κ B信号通路,促进肿瘤发展,可作为子宫内膜癌治疗的新靶点^[11]。

本研究结果显示,T24细胞中PKM2显著高表达,敲减PKM2可对T24细胞增殖和侵袭发挥抑制作用,对细胞凋亡发挥促进作用,提示敲减T24细胞中PKM2表达可发挥抑癌作用。细胞凋亡是由自身内部机制启动的一种程序性死亡方式,其不会导致周围组织炎症损伤,因此被认为是杀死肿瘤的最佳方式,其可通过多种信号转导途径促进细胞死亡^[12]。Bax是Bcl-2家族中一种经典的促凋亡因子,它能够形成线粒体外膜孔,破坏线粒体结构,并促使细胞色素c释放,最终激活caspase,并导致细胞凋亡。caspase-3是胱天蛋白酶家族中的一个重要成员,是凋亡过程中的最终效应器。本研究结果显示,敲减PKM2可抑制T24细胞中Bcl-2蛋白表达,促进Bax、caspase-3蛋白表达,进一步证实敲减PKM2可通过线粒体途径诱导T24细胞凋亡。近期有研究^[13]显示,PKM2表达可能对BUC的发生、发展和转移有促进作用,可作为膀胱癌恶性程度的肿瘤标志物。

ROS是细胞内一种氧元素单电子还原产物,可通过信号转导途径介导增殖、凋亡等多种生物学活性。当ROS在细胞内被过度激活时,会通过损伤肿瘤细胞线粒体导致细胞抗氧化能力降低,从而对肿瘤细胞发挥杀伤作用。近年来研究表明,多种抗肿瘤药物通过激活ROS发挥促凋亡作用。研究^[14]

发现,激活膀胱癌、肝癌等多种肿瘤细胞内ROS水平,可促进肿瘤细胞凋亡。本研究结果显示,敲减T24细胞中的PKM2水平,可促进ROS水平升高,提示敲减PKM2可能通过调控ROS升高促进肿瘤细胞代谢异常,进而促使T24细胞凋亡。大量研究^[15]表明,PI3K/Akt/mTOR信号通路可介导肿瘤细胞凋亡。磷酸化的PI3K可激活下游Akt并使其磷酸化,从而通过激活下游mTOR导致其活化,最终通过影响细胞凋亡促进肿瘤发展。激活ROS可抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路表达,从而对肿瘤细胞凋亡发挥促进作用。本研究结果显示,敲减PKM2可降低T24细胞中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR比值。由此推测,敲减PKM2可能通过激活ROS,抑制T24细胞中PI3K/Akt/mTOR信号通路的激活,从而发挥促凋亡作用。本研究采用si-PKM2联合PI3K/Akt/mTOR信号通路激活剂IGF-1共同干预T24细胞,结果发现,IGF-1可减弱si-PKM2对T24细胞中ROS的促进作用及对PI3K/Akt/mTOR信号通路的抑制作用。

综上所述,敲减PKM2可促进BUC细胞中ROS水平升高,抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路激活,进而发挥抑制细胞侵袭和促进凋亡作用。

参考文献:

- [1] CHEN JB, HUANG CP, QUAN C, et al. The androgen receptor in bladder cancer [J]. *Nat Rev Urol*, 2023, 20 (9) : 560-574. DOI: 10.1038/s41585-023-00761-y.
- [2] JUBBER I, ONG S, BUKAVINA L, et al. Epidemiology of bladder cancer in 2023: a systematic review of risk factors [J]. *Eur Urol*, 2023, 84 (2) : 176-190. DOI: 10.1016/j.eururo.2023.03.029.
- [3] AL HUSSEIN AL AWAMLH B, CHANG SS. Novel therapies for high-risk non-muscle invasive bladder cancer [J]. *Curr Oncol Rep*, 2023, 25 (2) : 83-91. DOI: 10.1007/s11912-022-01350-9.
- [4] WANG J, YANG P, YU T, et al. Lactylation of PKM2 suppresses inflammatory metabolic adaptation in pro-inflammatory macrophages [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18 (16) : 6210-6225. DOI: 10.7150/ijbs.75434.
- [5] CHEUNG EC, VOUSDEN KH. The role of ROS in tumour development and progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22 (5) : 280-297. DOI: 10.1038/s41568-021-00435-0.
- [6] ZHANG L, CAO Y, GUO X, et al. Hypoxia-induced ROS aggravate tumor progression through HIF-1 α -SERPINE1 signaling in glioblastoma [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2023, 24 (1) : 32-49. DOI: 10.1631/jzus.B2200269.
- [7] DONG S, LIANG S, CHENG Z, et al. ROS/PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin signalings activate HIF-1 α -induced metabolic reprogramming to impart 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41 (1) : 15. DOI: 10.1186/s13046-021-02229-6.
- [8] ZLOTTA AR, BALLAS LK, NIEMIERKO A, et al. Radical cystecto-

- 10.1177/1533033820921248.
- [12] CHEN Y,JI SB,YING JX,et al. KRT6A expedites bladder cancer progression, regulated by miR-31-5p [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21 (14) : 1479-1490. DOI: 10.1080/15384101.2022.2054095.
- [13] CHE D,WANG MS,SUN J,et al. KRT6A promotes lung cancer cell growth and invasion through MYC-regulated pentose phosphate pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:694071. DOI: 10.3389/fcell.2021.694071.
- [14] KIM DH,XING TS,YANG ZB,et al. Epithelial mesenchymal transition in embryonic development, tissue repair and cancer: a comprehensive overview [J]. *J Clin Med*, 2017, 7 (1) :1. DOI: 10.3390/jcm7010001.
- [15] MARCONI GD, FONTICOLI L, RAJAN TS, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) :the type-2 EMT in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis [J]. *Cells*, 2021, 10 (7) : 1587. DOI: 10.3390/cells10071587.
- [16] LEE SY,JEONG EK,JU MK,et al. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16 (1) : 10. DOI: 10.1186/s12943-016-0577-4.
- [17] ZHOU SN,ZHANG MX,ZHOU C,et al. The role of epithelial-mesenchymal transition in regulating radioresistance [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2020, 150: 102961. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.102961.
- [18] WEN XL,WU YL,AWADASSEID A,et al. New advances in canonical Wnt/ β -catenin signaling in cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 6987-6998. DOI: 10.2147/CMAR.S258645.
- [19] KOLEGOVA ES,SHASHOVA EE,KOSTROMITSKII DN, et al. Beta-catenin in non-small cells lung cancer and its association with proteasomes [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2020, 168 (5) :677-680. DOI: 10.1007/s10517-020-04779-9.
- [20] HUANG JQ,WEI FK,XU XL,et al. SOX9 drives the epithelial-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer through the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *J Transl Med*, 2019, 17 (1) : 143. DOI: 10.1186/s12967-019-1895-2.
- [21] ZHANG ZW,YANG Y,ZHANG XQ. MiR-770 inhibits tumorigenesis and EMT by targeting JMJD6 and regulating WNT/ β -catenin pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Life Sci*, 2017, 188: 163-171. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.09.002.

(编辑 武玉欣)

(上接第627页)

- my versus trimodality therapy for muscle-invasive bladder cancer: a multi-institutional propensity score matched and weighted analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2023, 24 (6) :669-681. DOI: 10.1016/S1470-2045 (23) 00170-5.
- [9] ZHENG Y,SHI D,CHEN L,et al. UCHL1-PKM2 axis dysregulation is associated with promoted proliferation and invasiveness of urothelial bladder cancer cells [J]. *Aging*, 2023, 15 (19) : 10593-10606. DOI: 10.18632/aging.205097.
- [10] XIA Y,WANG X,LIU Y,et al. PKM2 is essential for bladder cancer growth and maintenance [J]. *Cancer Res*, 2022, 82 (4) :571-585. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-0403.
- [11] 孙丽丽,车晓霞,冯炜炜. PKM2促进子宫内腺癌细胞增殖的作用及机制研究[J]. *现代妇产科进展*, 2022, 31 (1) : 37-40. DOI: 10.13283/j.cnki.xdfekjz.2022.01.005.
- [12] ZHANG L,LI Y,ZHOU L,et al. The m6A reader YTHDF2 promotes bladder cancer progression by suppressing RIG-I-mediated immune response [J]. *Cancer Res*, 2023, 83 (11) : 1834-1850. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-22-2485.
- [13] 李伟,刘春,黄小惠,等. 丙酮酸激酶M2在膀胱尿路上皮癌中的表达研究及临床意义[J]. *中国医学创新*, 2016, 13 (11) : 12-15. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4985.2016.11.004.
- [14] LIU CW,CHEN PH,YU TJ,et al. WWOX modulates ROS-dependent senescence in bladder cancer [J]. *Molecules*, 2022, 27 (21) : 7388. DOI: 10.3390/molecules27217388.
- [15] 刘鸿雁,孙冲,李倩,等. 氟伐他汀钠对皮肤鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡及PI3K/AKT/mTOR通路的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2020, 49 (9) : 841-845. DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2020.09.014.

(编辑 陈 姜)