

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.09.003

LINC00462 通过 MYC/ABCC3 轴影响肾透明细胞癌细胞糖酵解进而调控其对顺铂的敏感性

王晓玲^a, 胡威威^b, 孟莉丹^a(1. 衡水市人民医院 a. 肾内科; b. 老年病一科, 河北 衡水 053000)

[摘要] **目的:** 探讨 LINC00462 招募转录因子 MYC 激活 ABCC3 对肾透明细胞癌(ccRCC)顺铂敏感性的影响及其机制。**方法:** 数据库分析 ccRCC 组织中 ABCC3、MYC 和 LINC00462 的表达及其相关性, 并分析 ABCC3 基因的富集通路。常规培养人肾小管上皮细胞(HK-2)和 ccRCC 细胞(A-498、786-O 和 Caki-2), 将 si-LINC00462、oe-ABCC3、si-ABCC3、si-MYC、si-LINC00462-NC、oe-ABCC3-NC、si-ABCC3-NC 和 si-MYC-NC 核酸序列分别转染 A-498 或 786-O 细胞, 分为 si-LINC00462 组、si-LINC00462-NC 组、oe-ABCC3 组、oe-ABCC3-NC 组、si-ABCC3 组、si-ABCC3-NC 组、si-MYC 组、si-MYC-NC 组; 用 2-脱氧-D-葡萄糖(2-DG)进行回复实验, 构建 oe-NC+PBS 组、oe-ABCC3+PBS 组、oe-ABCC3+2-DG 组; 为探究 ccRCC 细胞 LINC00462/MYC/ABCC3 轴对顺铂敏感性的影响, 构建 si-NC+oe-NC 组、si-LINC00462+oe-NC 组、si-LINC00462+oe-ABCC3 组。qPCR 法检测 ABCC3、MYC 和 LINC00462 在 ccRCC 细胞中的表达, CCK-8 法检测细胞增殖活力, CCK-8 法分析梯度浓度顺铂处理 ccRCC 细胞后 IC₅₀ 值, WB 法检测糖酵解代谢途径相关蛋白的表达, Seahorse XP96 法检测各处理组细胞的胞外酸化率(ECAR)和耗氧率(OCR), 试剂盒检测细胞中丙酮酸、乳酸、ATP 水平。双荧光素酶报告基因和染色质免疫共沉淀(ChIP)实验验证 ABCC3 与 MYC 间的结合关系, RNA 结合蛋白免疫沉淀(RIP)实验验证 LINC00462 和 MYC 的结合关系。**结果:** 数据库分析和 qPCR 实验结果显示, ABCC3 在 ccRCC 组织和细胞中呈高表达, 差异基因富集在糖酵解通路上。敲减或过表达 ABCC3 能够增加 A-498 细胞或降低 786-O 细胞对顺铂的敏感性, ABCC3 可通过促进有氧糖酵解抑制 A-498 细胞对顺铂的敏感性, 2-DG 处理可以逆转过表达 ABCC3 对 ccRCC 细胞对顺铂敏感性的抑制作用。MYC 可直接和 ABCC3 结合, LINC00462 可招募转录因子 MYC; 敲低 LINC00462 可抑制 ABCC3 的表达, 敲低 LINC00462 可抑制 ccRCC 细胞的有氧糖酵解, 并提高其对顺铂敏感性; 而进一步过表达 ABCC3 可逆转敲低 LINC00462 对 ccRCC 细胞有氧糖酵解的抑制作用和顺铂敏感性的提高。**结论:** LINC00462 通过招募转录因子 MYC 激活 ABCC3 的表达促进 ccRCC 细胞的糖酵解, 进而促进 ccRCC 细胞对顺铂敏感性。

[关键词] LINC00462; MYC; ABCC3; 肾透明细胞癌; A-498 细胞; 786-O 细胞; 糖酵解; 顺铂敏感性

[中图分类号] R737.11; R730.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)09-0762-09

LINC00462 regulates clear renal cell carcinoma cells sensitivity to cisplatin by affecting their glycolysis via the MYC/ABCC3 axis

WANG Xiaoling^a, HU Weiwei^b, MENG Lidan^a (a. Department of Nephrology; b. Department of Geriatrics, Hengshui People's Hospital, Hengshui 053000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of LINC00462 binding to transcription factor MYC to activate ABCC3 on cisplatin sensitivity in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and its potential mechanisms. **Methods:** The expression of ABCC3, MYC and LINC00462 and their correlation in ccRCC were analyzed, and the enrichment pathway of ABCC3 was also analyzed. Human renal tubular epithelial cells (HK-2) and ccRCC cells (A-498, 786-O and Caki-2) were conventionally cultured. Nucleic acid sequences of si-LINC00462, si-LINC00462-NC, oe-ABCC3, oe-ABCC3-NC, si-ABCC3, si-ABCC3-NC, si-MYC and si-MYC-NC were transfected into A-498 or 786-O cells respectively, namely si-LINC00462 group, si-LINC00462-NC group, oe-ABCC3 group, oe-ABCC3-NC group, si-ABCC3 group, si-ABCC3-NC group, si-MYC group and si-MYC-NC group. 2-deoxy-D-glucose (2-DG) was used in the rescue experiment, and oe-NC+PBS group, oe-ABCC3+PBS group and oe-ABCC3+2-DG group were established. To investigate the effects of LINC00462/MYC/ABCC3 axis on the cisplatin sensitivity of ccRCC cells, si-NC+oe-NC group, si-LINC00462+oe-NC group, and si-LINC00462+oe-ABCC3 group were constructed. The expression of ABCC3, MYC and LINC00462 in ccRCC cells was detected by qPCR. CCK-8 method was used to measure cell viability and the IC₅₀ of cisplatin inhibiting the proliferation of ccRCC cells. WB was used to detect the expression of glycolytic

[基金项目] 河北省医学科学研究课题(No. 20220452)

[作者简介] 王晓玲(1983—), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事肾癌基础与临床的研究, E-mail: tethas65@21cn.com

[通信作者] 王晓玲, E-mail: tethas65@21cn.com

metabolism-related proteins. Seahorse XP96 was used to analyze the extracellular acidification rate (ECAR) and oxygen consumption rate (OCR) in the cells of different treatment groups. The levels of pyruvate, lactic acid and ATP in the cells were detected by corresponding kits. The binding relationship between ABCC3 and MYC was verified by double luciferase reporter gene assay and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay, and the binding relationship between LINC00462 and MYC was verified using RNA-binding protein immunoprecipitation (RIP) experiment. **Results:** Database analysis and qPCR experiments showed that ABCC3 was highly expressed in ccRCC tissues and cells and was enriched in the glycolytic pathway. Knockdown of ABCC3 could promoted the sensitivity of A-498 cells to cisplatin, while overexpression of ABCC3 could reduce the sensitivity of 786-O cells to cisplatin. ABCC3 could inhibit the sensitivity of A-498 cells to cisplatin through promoting glycolysis. 2-DG treatment reversed the inhibitory effect of ABCC3 overexpression on cisplatin sensitivity of ccRCC cells. MYC could directly bind to ABCC3, and LINC00462 could recruit MYC. Knockdown of LINC00462 inhibited the expression of ABCC3, suppressed aerobic glycolysis of ccRCC cells and increased their sensitivity to cisplatin; however, further over-expression of ABCC3 reversed the effects of LINC00462 knockdown on inhibiting aerobic glycolysis and promoting cisplatin sensitivity in ccRCC cells. **Conclusion:** LINC00462 promotes glycolysis of ccRCC cells and further inhibits their sensitivity to cisplatin by recruiting the transcription factor MYC to activate ABCC3 expression.

[Key words] LINC00462; MYC; ABCC3; clear cell renal cell carcinoma (ccRCC); A-498 cell; 786-O cell; glycolysis; cisplatin sensitivity [Chin J Cancer Biother, 2023, 30(9): 762-770. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.09.003]

肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) 是一种常见的肾恶性肿瘤, 在所有泌尿系统肿瘤中, ccRCC 的发病率和病死率排名第三^[1-2]。以铂类药物为基础的联合治疗是晚期 ccRCC 患者的主要治疗策略, 但许多患者会产生耐药和复发^[3]。顺铂可有效治疗包括 ccRCC 在内的多种恶性肿瘤, 然而, 耐药的快速发展从根本上削弱了其抗癌功效^[4]。因此, 探索顺铂耐药的潜在分子机制, 寻找逆转 ccRCC 耐药的分子靶点对其治疗具有积极意义。最近, 越来越多的研究报道证明有氧糖酵解影响肿瘤细胞的耐药性^[5]。然而目前关于有氧糖酵解影响 ccRCC 耐药分子机制的研究较少, 因此本研究旨在探究 ccRCC 中有氧糖酵解影响细胞耐药的具体机制, 为改善 ccRCC 的治疗寻找高效的作用靶标。ATP 结合盒 (ATP binding cassette, ABC) 转运蛋白家族是细胞外排泵的大家族, 可以清除体细胞内的外源性物质, 其中 ABCC3 是该家族的一个重要的转运因子, 能够转运多种内源性和外源性化合物^[6]。研究^[7]发现, ABCC3 在癌症中表达上调, 促进肿瘤的发生发展。ABCC3 能够参与与肿瘤细胞的糖酵解和耐药机制。如在三阴性乳腺癌中, miR-181b-2-3p 的过度表达通过抑制 ABCC3 的表达增强 MDA-MB-231/ADR 细胞对多柔比星的敏感性^[8]。在膀胱癌中, ABCC3 的表达显著上调, 敲除 ABCC3 能够显著降低膀胱癌细胞增殖、对顺铂的耐药以及有氧糖酵解的能力^[9]。然而, 目前关于 ABCC3 与 ccRCC 发生发展的关系尚未有研究报道。本研究将进一步探究 ccRCC 细胞中 LINC00462/MYC/ABCC3 轴影响糖酵解和顺铂敏感性的分子作用机制, 为 ccRCC 的诊断和治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人肾小管上皮细胞 HK-2 和 ccRCC 细胞 A-498、

786-O、Caki-2 均购自美国 ATCC 公司。si-LINC00462、oe-ABCC3、si-ABCC3、si-MYC、si-LINC00462-NC、oe-ABCC3-NC、si-ABCC3-NC 和 si-MYC-NC 核酸均购自 Ribobio 公司。DMSO、2-脱氧-D-葡萄糖 (2-deoxy-D-glucose, 2-DG) (纯度 ≥98%, 溶解于 PBS, 10 mmol/L)^[9] 均购自 Sigma-Aldrich 公司, 顺铂 (纯度 ≥95%, 溶解于 PBS) 购自上海迈瑞尔化学技术有限公司。TRIzol 试剂购自美国 Life Technologies 公司, PrimeScript^{RT} Master Mix 购自日本 TaKaRa 公司, miScript SYBR Green PCR Kit 购自德国 Qiagen 公司, Lipofectamine 2000 试剂盒购自 Thermo Fisher 公司, BCA 试剂盒购自中国 Beyotime 公司, 兔抗 β-actin、HK-2、PKM2、PFKP、MYC 抗体和兔 IgG 均购自美国 Invitrogen 公司, RIP 试剂盒购自美国 Millipore 公司, 细胞裂解液 (P0013B) 购自碧云天公司, Simple ChIP enzymatic chromatin IP Kit 购自美国 CST 公司。pmirGLO-ABCC3-promoter-WT、pmirGLO-ABCC3-promoter-MUT 荧光素酶报告载体、双荧光素酶报告基因检测系统均购自美国 Promega 公司。糖酵解应激测试试剂盒 [用于检测细胞外酸化率 (extracellular acidification rate, ECAR)]、线粒体应激测试试剂盒 [用于耗氧率 (oxygen consumption rate, OCR) 检测] 均购自美国 Seahorse 公司, 丙酮酸检测试剂盒、乳酸比色测定试剂盒和 ATP 比色/荧光检测试剂盒均购自中国索莱宝公司。

1.2 数据库分析 ccRCC 组织中 ABCC3 的差异表达、富集分析以及其相关转录因子查找分析

在 TCGA 数据库下载 TCGA-ccRCC 的 mRNA 表达量数据集 (normal: 72, tumor: 539)。以正常样本为对照组, 利用 R 包 “edgeR” 进行差异分析 ($|\log FC| > 1$, $FDR < 0.05$)。通过 lncMAP 数据库, 对 ccRCC 中目标 lncRNA 的下游转录因子和调控基因的三联体进行预

测。同时,采用RNA-Protein Interaction Prediction在线评估 lncRNA 与转录因子相互作用可能性。利用 JASPAR 数据库预测靶基因启动子区域与转录因子的结合序列(选择靶基因转录起始位置前 2 000 bp)。

1.3 细胞培养、转染与分组

将 HK-2、A-498、786-O、Caki-2 细胞在含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。按试剂盒操作步骤使用 Lipofectamine 2000 转染试剂将 si-LINC00462、oe-ABCC3、si-ABCC3、si-MYC、si-LINC00462-NC、oe-ABCC3-NC、si-ABCC3-NC 和 si-MYC-NC 核酸分别转染 A-498、786-O 细胞,并分别记作 si-LINC00462 组、si-LINC00462-NC 组、oe-ABCC3 组、oe-ABCC3-NC 组、si-ABCC3 组、si-ABCC3-NC 组、si-MYC 组和 si-MYC-NC 组。利用糖酵解抑制剂 2-DG 进行回复实验,构建细胞分组: oe-NC+PBS 组、oe-ABCC3+PBS 组、oe-ABCC3+2-DG 组。为了探究 LINC00462/MYC/ABCC3 轴对 ccRCC 细胞对顺铂敏感性的影响,用 si-NC、oe-NC、si-LINC00462、oe-ABCC3 核酸序列共转染 A-498 细胞,分别记作对照组(转染 si-NC+oe-NC)、si-LINC00462 组(转染 si-LINC00462+oe-NC)和 si-LINC00462+oe-ABCC3 组(转染 LINC00462+oe-ABCC3)。

1.4 qPCR 法检测转染各组细胞中 LINC00462、MYC 和 ABCC3 的表达

利用 TRIzol 试剂提取转染各组细胞中总 RNA,用 NanoDrop 2000 系统测定其 RNA 的纯度和浓度。利用 PrimeScript^{RT} Master Mix 试剂将总 RNA 反转录为 cDNA。利用 miScript SYBR Green PCR 试剂盒进行 qPCR,检测 LINC00462、MYC 和 ABCC3 的表达水平。qPCR 采用两步法,反应条件:95 °C 3 min,95 °C 5 s,60 °C 15 s,共 40 个循环。以 β -actin 作为内参照基因,用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

基因名称	序列(5'~3')
LINC00462	F: ACTAGTCCTTCTGGTGTTTT R: GTAAACTTGCTGCTGAT
MYC	F: AACACACAACGTCTTGAGC R: GCACAAGAGTTCCGTAGCTG
ABCC3	F: GAGGAGAAAGCAGCCATTGGCA R: TCCAATGGCAGCCGCACT TTGA
β -actin	F: TCCGGCACTACCGAGTTATC R: GATCCGGTGTAGCAGATCGC

1.5 CCK-8 法检测转染各组细胞的增殖活性

将转染的细胞接种在 96 孔板中(5×10³/孔)。培养 0、24、48、72 h 后,向每个孔中加入 10 μ L CCK-8 溶

液并继续培养 2 h;对于细胞 IC₅₀ 值的测定,用不同浓度顺铂(0、1、2、4、8、16、32 μ mol/L)处理 24 h 细胞后加入 CCK-8 溶液继续培养 2 h,通过酶标仪(Bio-Teck 公司,USA)检测在 450 nm 处的光密度(D)值来确定细胞活力,并计算 IC₅₀ 值。

1.6 WB 法检测转染各组细胞中糖酵解相关蛋白的表达

用 RIPA 裂解液提取转染各组细胞中的蛋白质,使用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。将蛋白样品通过 SDS-PAGE 分离,然后转移到 PVDF 膜上。在室温下,使用 5% 脱脂牛奶将膜封闭 2 h,一抗 HK-2 (1:1 000)、PKM2(1:1 000)、PFKP(1:1 000)、 β -actin (1:2 000)4 °C 下处理过夜,用辣根过氧化物酶标记的二抗山羊抗兔 IgG(1:5 000)室温下处理 2 h,使用增强型化学发光试剂显影,用 ImageJ 软件(NIH, USA)对蛋白条带的灰度进行定量。

1.7 RNA 结合蛋白免疫沉淀实验(RNA binding protein immunoprecipitation assay, RIP)验证 LINC00462 与 MYC 的结合

用预冷 PBS 洗涤 A-498 细胞,用等体积的裂解液冰浴 5 min 裂解细胞,4 °C 下离心 10 min 取上清液。细胞上清液一部分取出作为对照(input),一部分与抗体混合进行共沉淀,具体实验操作方法如下:每一个共沉淀反应体系取 50 μ L 磁珠清洗后重悬于 100 μ L RIP 洗涤缓冲液中,RIP 所用抗体为 MYC 抗体,兔 IgG 作为阴性对照。每体系加入 5 μ g 抗体,混匀后室温下处理 30 min,磁珠-抗体复合物经清洗后重悬于 900 μ L RIP 洗涤缓冲液,加入 100 μ L 细胞提取液,4 °C 下处理过夜,将样品置于磁座上收集磁珠-蛋白复合物。样品经蛋白酶 K 消化后提取 RNA,用于后续 qPCR 检测。

1.8 染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)实验检测 MYC 与 ABCC3 的结合关系

使用 MYC 抗体以及其对应的 Simple ChIP Enzymatic Chromatin IP Kit 中试剂进行 CHIP 实验。使用 qPCR 检测纯化的 DNA,其检测引物序列:正向引物为 5'-GCGGGATTGAGAGATGGAGG-3',反向引物序列为 5'-ATGGGCTTGTCAGTGCTCTC-3'。

1.9 双荧光素酶报告基因实验验证 ABCC3 与 MYC 的靶向关系

将 pmirGLO-ABCC3-promoter-WT、pmirGLO-ABCC3-promoter-MUT 载体、si-NC 和 si-MYC 质粒共转染到 A-498 细胞中,分别记作 ABCC3-WT+si-NC 组、ABCC3-WT+si-MYC 组、ABCC3-MUT+si-NC 组和 ABCC3-MUT+si-MYC 组。培养 48 h 后根据厂商说明书使用双荧光素酶报告系统检测各组细胞中的

荧光素酶活性。

1.10 用细胞外通量分析仪检测转染各组细胞中的 ECAR、OCR

胰蛋白酶降解后,将细胞接种在 Seahorse XF24 细胞板中(2.5×10^4 个/孔),在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱中培养 24~48 h。然后将细胞板置于 37°C 、 $0\% \text{CO}_2$ 培养箱中处理 60 min,然后使用 Seahorse XF24 细胞外通量分析仪开始检测。按照制造商的方案,使用糖酵解应激检测试剂盒和线粒体应激检测试剂盒分别检测 ECAR (mpH/min) 和 OCR (pmol/min)^[10]。

1.11 丙酮酸、乳酸和 ATP 测定

按照制造商提供的检测方案,分别使用丙酮酸检测试剂盒、乳酸比色测定试剂盒和 ATP 比色/荧光检测试剂盒检测转染各组细胞中丙酮酸、乳酸和 ATP 的含量^[10]。

1.12 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 22.0 统计学软件进行处理。所有实验均独立重复 3 次,符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间的比较应采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 数据库分析和 qPCR 检测结果显示 ABCC3 在 ccRCC 组织和细胞中呈高表达

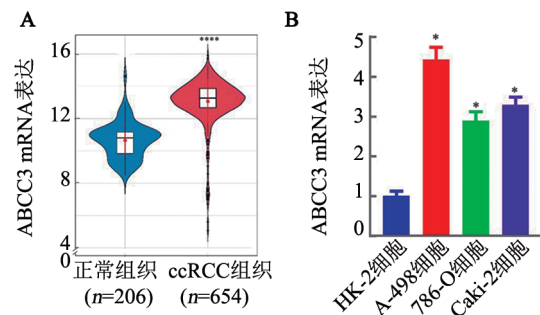
通过 TCGA-ccRCC 数据库分析结果(图 1A)显示,与正常组织比较,ABCC3 在 ccRCC 组织中呈高表达 ($P < 0.001$)。qPCR 法检测结果(图 1B)显示,与 HK-2 细胞比较,A-498、786-O、Caki-2 细胞中 ABCC3 mRNA 均呈高表达(均 $P < 0.05$),其中在 A-498 细胞中的表达相对较高、在 786-O 细胞中表达相对较低,所以后续实验中将 A-498、786-O 细胞分别用于 ABCC3 的敲减或过表达实验。实验结果表明,ABCC3 在 ccRCC 组织和细胞中呈高表达。

2.2 敲减或过表达 ABCC3 能增加 A-498 细胞或降低 786-O 细胞对顺铂敏感性

qPCR 法检测敲低或过表达 ABCC3 的 A-498 细胞或 786-O 细胞的转染效率,其结果(图 2A、B)显示,与 si-NC 组比较,si-ABCC3 组 A-498 细胞中 ABCC3 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$);与 oe-NC 组比较,oe-ABCC3 组 786-O 细胞中 ABCC3 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$)。实验结果表明,在 A-498 细胞或 786-O 细胞中成功地敲减或过表达了 ABCC3。

CCK-8 法检测结果(图 2C、D)显示,敲低 ABCC3 可以显著抑制 A-498 细胞活性 ($P < 0.05$),而过表达 ABCC3 则能显著提高 786-O 细胞活性 ($P < 0.05$)。使

用梯度浓度顺铂 (0 、 1 、 2 、 4 、 8 、 16 、 $32 \mu\text{mol/L}$) 处理 A-498 细胞或 786-O 细胞 24 h 后,CCK-8 法检测结果(图 2E、F)显示,转染 si-ABCC3 的 A-498 细胞的 IC_{50} 值显著降低 ($P < 0.05$);而转染 oe-ABCC3 的 786-O 细胞 IC_{50} 值显著升高 ($P < 0.05$)。实验结果表明,敲减或过表达 ABCC3 能够增加或降低 A-498 细胞或 786-O 细胞对顺铂的敏感性。

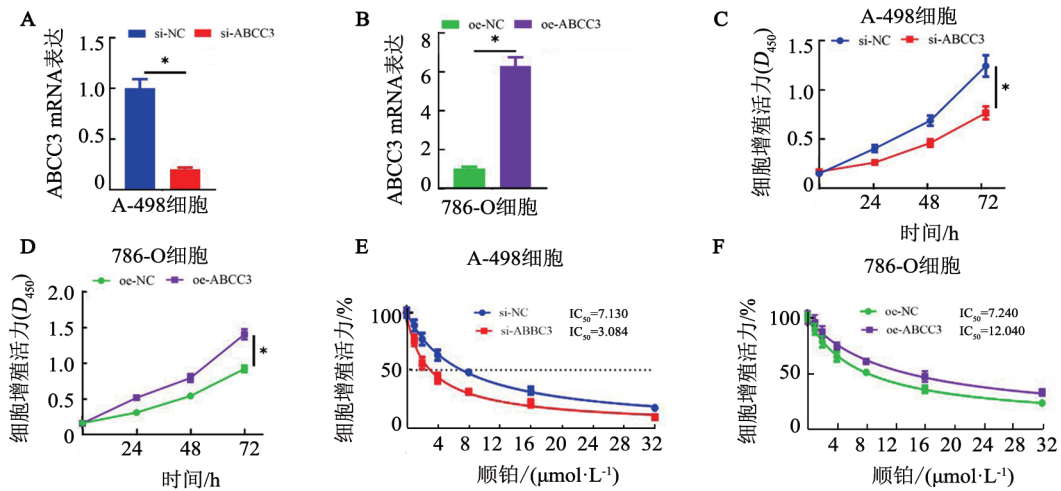


A: 数据库分析 ABCC3 在两种组织中的表达;B: qPCR 检测 ABCC3 mRNA 在 HK-2、A-498、786-O、Caki-2 细胞中的表达。与 HK-2 细胞比较,* $P < 0.05$,与正常组织比较,**** $P < 0.0001$ 。

图 1 ABCC3 mRNA 在 ccRCC 组织和细胞中的表达

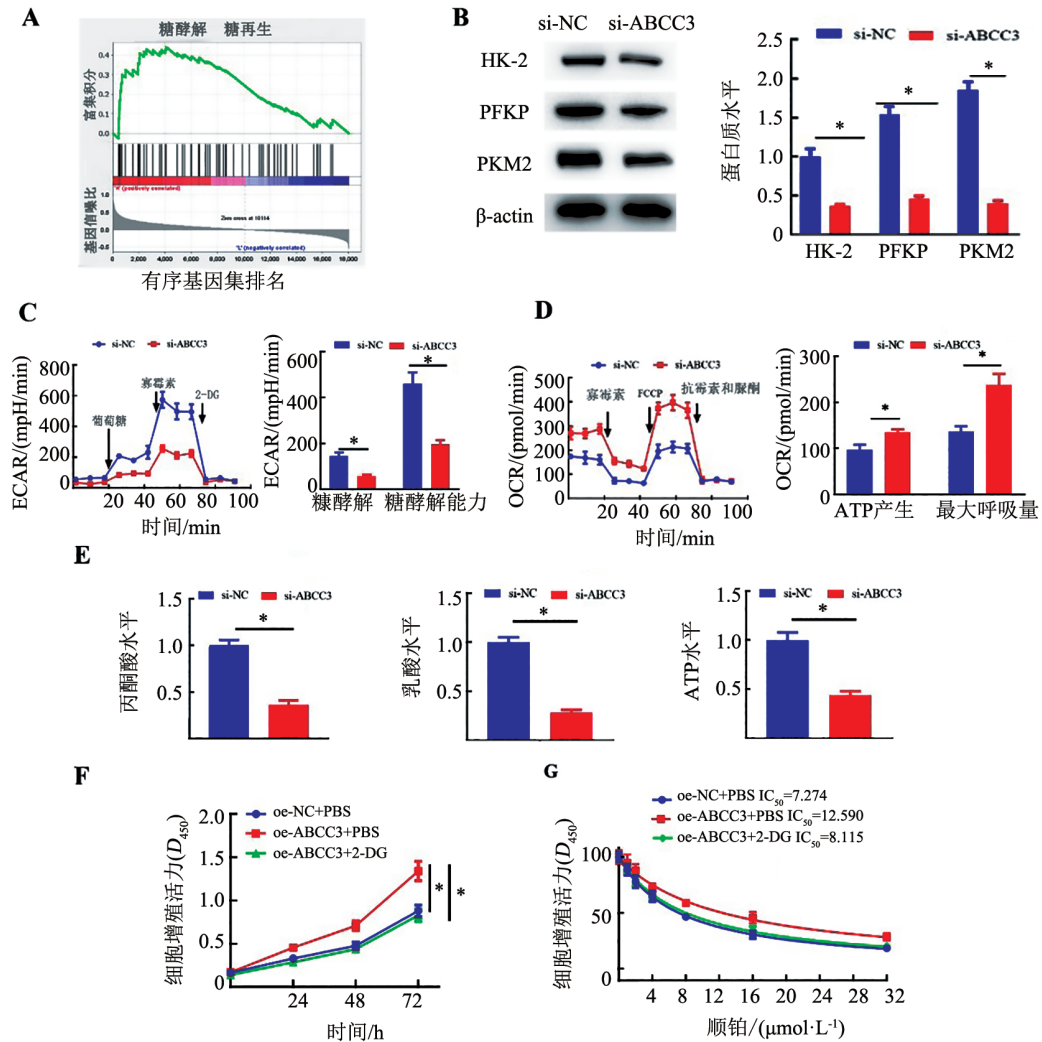
2.3 ABCC3 通过促进有氧糖酵解抑制 A-498 细胞对顺铂的敏感性

数据库分析结果(图 3A)显示,ABCC3 富集在糖酵解信号通路上。WB 法检测结果(图 3B)显示,与 si-NC 组比较,si-ABCC3 组 A-498 细胞中的糖酵解代谢途径相关蛋白 HK2、PFKP、PKM2 表达均显著下调(均 $P < 0.05$)。ECAR 和 OCR 染色结果(图 3C)显示,与 si-NC 组比较,si-ABCC3 组 A-498 细胞中 ECAR 显著降低 ($P < 0.05$),线粒体的 OCR 升高(图 3D)。此外,与 si-NC 组比较,si-ABCC3 组 A-498 细胞中的丙酮酸、乳酸和 ATP 水平均显著降低(图 3E,均 $P < 0.05$)。实验结果说明,敲减 ABCC3 可抑制 A-498 细胞的有氧糖酵解。CCK-8 法检测结果(图 3F、G)显示,与 oe-NC+PBS 组比较,oe-ABCC3+PBS 组 A-498 细胞的增殖活力明显升高 ($P < 0.05$),与 oe-ABCC3+PBS 组比较,oe-ABCC3+2-DG 组 A-498 细胞的增殖活力明显降低 ($P < 0.05$),实验结果说明,2-DG 处理能够抑制过表达 ABCC3 对细胞活力的促进作用。在检测不同浓度顺铂处理(24 h)A-498 细胞的 IC_{50} 值发现,过表达 ABCC3 可以降低 A-498 细胞对顺铂的敏感性 ($P < 0.05$),而进一步添加 2-DG 处理后 A-498 细胞对顺铂耐药性回复至对照水平 ($P < 0.05$)。实验结果说明,ABCC3 通过调节有氧糖酵解抑制 A-498 细胞对顺铂的敏感性。



A、B:qPCR法检测敲减或过表达ABCC3后A-498细胞或786-O细胞中ABCC3 mRNA的表达;C~F:CCK-8法检测敲减或过表达ABCC3后A-498细胞(C、E)或786-O细胞(D、F)的细胞活力及相应的IC₅₀值。*P<0.05。

图2 敲减或过表达ABCC3后A-498细胞或786-O细胞对顺铂敏感性的变化



A:ccRCC差异表达基因的GSEA富集分析;B:WB法检测敲减ABCC3后A-498细胞中糖酵解代谢途径相关蛋白HK2、PFKP、PKM2的表达;C、D:用细胞外通量分析仪检测检测敲减ABCC3后A-498细胞中ECAR值(C)和OCR值(D);E:敲减ABCC3后A-498细胞中丙酮酸水平、乳酸生成和ATP水平;F、G:CCK-8法检测过表达ABCC3或同时添加2-DG处理后A-498细胞的增殖活力(F)和IC₅₀值的变化(G)。FCCP:4-(三氟甲氧基)苯基脒羰基氰化物[carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone]。*P<0.05。

图3 ABCC3通过调节有氧糖酵解抑制A-498细胞对顺铂的敏感性

2.4 LINC00462通过招募MYC激活ABCC3的表达

通过数据库预测ABCC3上游潜在的转录因子(图4A),通过Pearson分析发现ABCC3的表达与转录因子MYC的表达呈正相关(图4B, $r=0.41$, $P=7.35 \times 10^{-23}$)。利用hTFtarget软件预测MYC与ABCC3上游2000 bp启动子区域存在结合位点(图4C)。TCGA数据库分析发现,与正常组织比较,MYC mRNA在ccRCC组织中呈高表达(图4D, $P<0.001$),qPCR法检测发现,与HK-2细胞比较,MYC mRNA在ccRCC细胞中的表达也均呈高表达(图4E,均 $P<0.05$)。由于MYC在A-498细胞中的表达量最高,所以使用该细胞进行后续实验。ChIP实验结果(图4F)显示,MYC和ABCC3启动子区存在结合关系($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验检测结果(图4G)显示,与si-NC+ABCC3-WT组比较,si-MYC+ABCC3-WT组细胞中荧光素酶活性显著下调($P<0.05$);与ABCC3-MUT+si-NC组比较,ABCC3-MUT+si-MYC组A594细胞中的荧光素酶活性没有明显变化。实验结果说明,ABCC3与MYC间存在靶向结合关系。利用数据库软件预测MYC上游调控分子,Pearson相关性分析结果(图4H、I)显示,MYC与LINC00462的表达呈正相关($r=0.31$, $P=1.971 \times 10^{13}$)。通过TCGA数据库和qPCR法检测结果(图4J、K)显示,LINC00462在ccRCC组织和细胞中均呈高表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。RIP实验结果(图4L)显示,与IgG对照组比较,anti-MYC组LINC00887的富集显著增加($P<0.05$)。通过Pearson相关性分析结果(图4M)显示,ABCC3与LINC00462的表达呈正相关($r=0.56$, $P=4.14 \times 10^{-45}$)。qPCR法检测结果(图4N)显示,与si-NC组相比,si-LINC00462组A-498细胞中ABCC3的表达显著降低($P<0.05$)。实验结果说明,LINC00462可以通过招募MYC激活ABCC3的表达。

2.5 LINC00462通过ABCC3促进A-498细胞糖酵解进而影响其对顺铂的敏感性

qPCR法检测结果(图5A)显示,与对照组比较,si-LINC00462组A-498细胞中ABCC3的表达显著降低($P<0.05$);与si-LINC00462组比较,si-LINC00462+oe-ABCC3组A-498细胞中的ABCC3表达明显升高($P<0.05$),并与对照组水平相似。CCK-8法检测(图5B)结果显示,敲低LINC00462后A-498细胞活力显著降低($P<0.05$),但同时过表达ABCC3能够逆转敲低LINC00462对细胞活力的抑制作用($P<0.05$)。WB法检测结果(图5C)显示,敲低LINC00462能够显著抑制糖酵解代谢途径相关蛋白HK-2、PFKP、PKM2的表达($P<0.05$),而过表达ABCC3则可逆转敲低LINC00462对HK-2、PFKP、PKM2表达的抑制作用

($P<0.05$)。ECAR和OCR检测结果(图5D、E)显示,敲低LINC00462可以提高A-498细胞中的ECAR值($P<0.05$)、降低OCR值($P<0.05$);而同时过表达ABCC3则可逆转这一结果(均 $P<0.05$)。敲低LINC00462还降低了A-498细胞的丙酮酸、乳酸以及ATP水平,而同时过表达ABCC3则可逆转这一结果(图5F,均 $P<0.05$)。CCK-8法检测不同浓度顺铂处理后的IC₅₀值,结果(图5G)显示,敲低LINC00462显著提高A-498细胞的顺铂敏感性,而同时过表达ABCC3则可逆转敲低LINC00462对A-498细胞顺铂敏感性的促进作用。实验结果说明,LINC00462通过ABCC3促进ccRCC糖酵解进而影响ccRCC细胞顺铂敏感性。

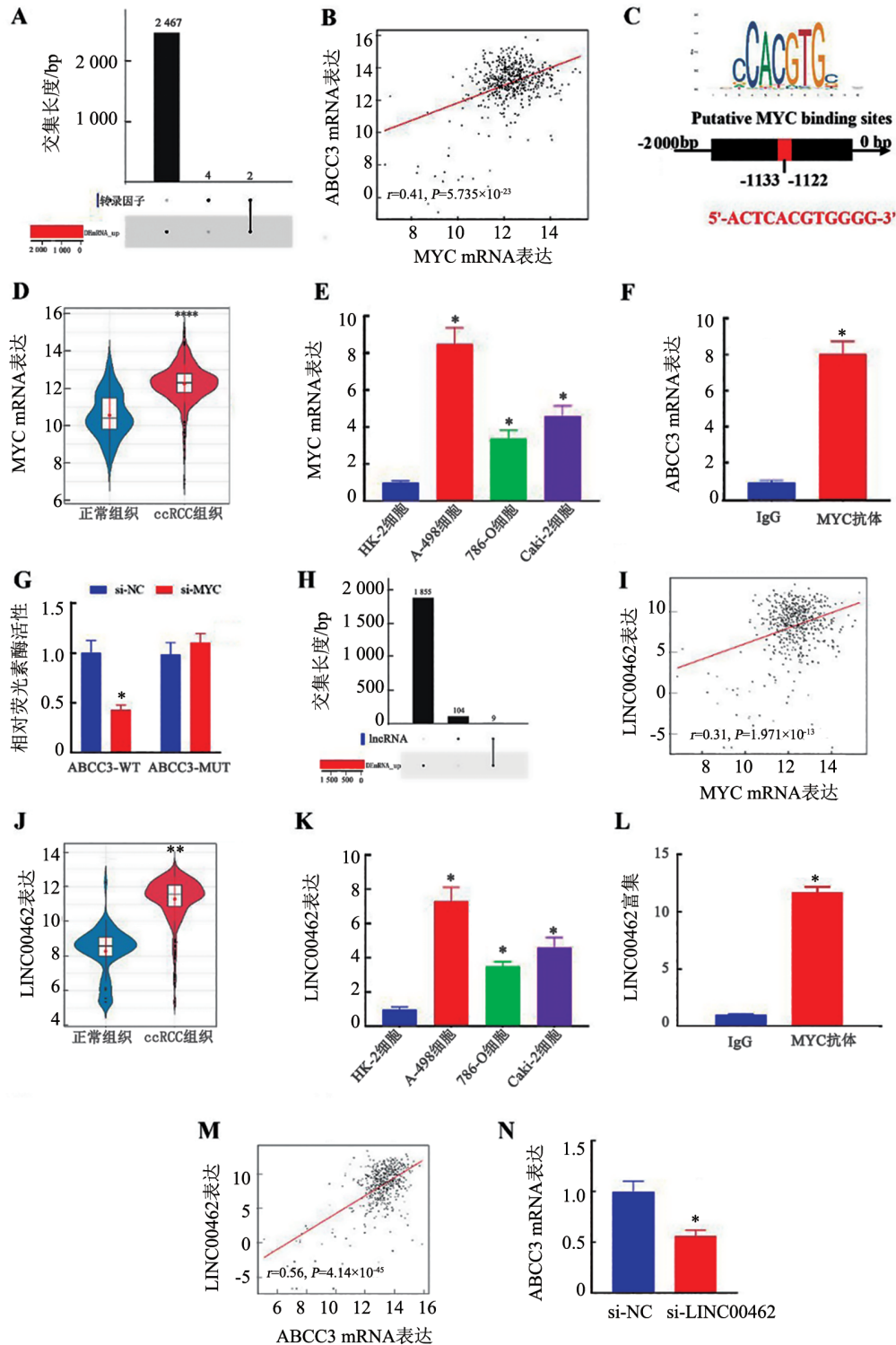
3 讨论

不同ccRCC肿瘤间和同一肿瘤内存在明显的异质性^[1]。尽管常规治疗(如手术、放疗、化疗和其他治疗手段)的ccRCC患者的生存率明显提高,但耐药仍然常见^[4]。因此,明确肿瘤细胞耐药的潜在作用机制,对提高ccRCC治疗效果和患者生存率至关重要。ABCC3是ABC转运蛋白家族的一员,它将依赖ATP供能将小分子药物泵送出细胞^[2]。ABCC3已被证明在许多恶性肿瘤(包括胰腺癌、乳腺癌等)组织中表达上调^[13-14]。本研究的结果也同样证实,ABCC3在ccRCC组织和细胞中呈高表达。最近,ABCC3被证实与肿瘤细胞耐药密切相关^[15]。例如HOXC10通过调节ABCC3促进卵巢癌的卡铂耐药^[6];姜黄素通过调节miR-181b-2-3p/ABCC3轴,提高了三阴性乳腺癌对阿霉素的敏感性^[8]。本实验结果显示,在ccRCC细胞中敲低ABCC3可以提高ccRCC细胞对顺铂的敏感性。此外,本研究还发现过表达ABCC3则可提高ccRCC细胞中丙酮酸、乳酸和ATP水平,进而促进有氧糖酵解过程。这与LIU等^[6]发现相一致,该研究表明ABCC3的过度表达可促进膀胱癌细胞增殖、顺铂耐药性和有氧糖酵解。这些结果表明,抑制ABCC3可能是逆转ccRCC顺铂耐药的有效措施。

肿瘤细胞代谢的一个显著特征是葡萄糖摄取利用率及乳酸产出率的提高,这就是Warburg(瓦博格)效应,与正常细胞相比,即使在氧气充足的条件下,肿瘤细胞也倾向于糖酵解的产能方式^[7],这是肿瘤细胞中关键的代谢途径之一。研究^[18]认为,在耐药细胞中有氧糖酵解和乳酸的生成水平上调,表明Warburg效应与肿瘤耐药有关。如GOVONI等^[19]研究发现,癌细胞中乳酸生成的增加能够上调DNA修复基因表达,从而促进细胞对顺铂耐药。PGK1可以通过激活CXCR4/ERK通路和加速糖酵解从而促进ccRCC细胞增殖以及提高对索拉非尼的耐药性^[5]。本研究结

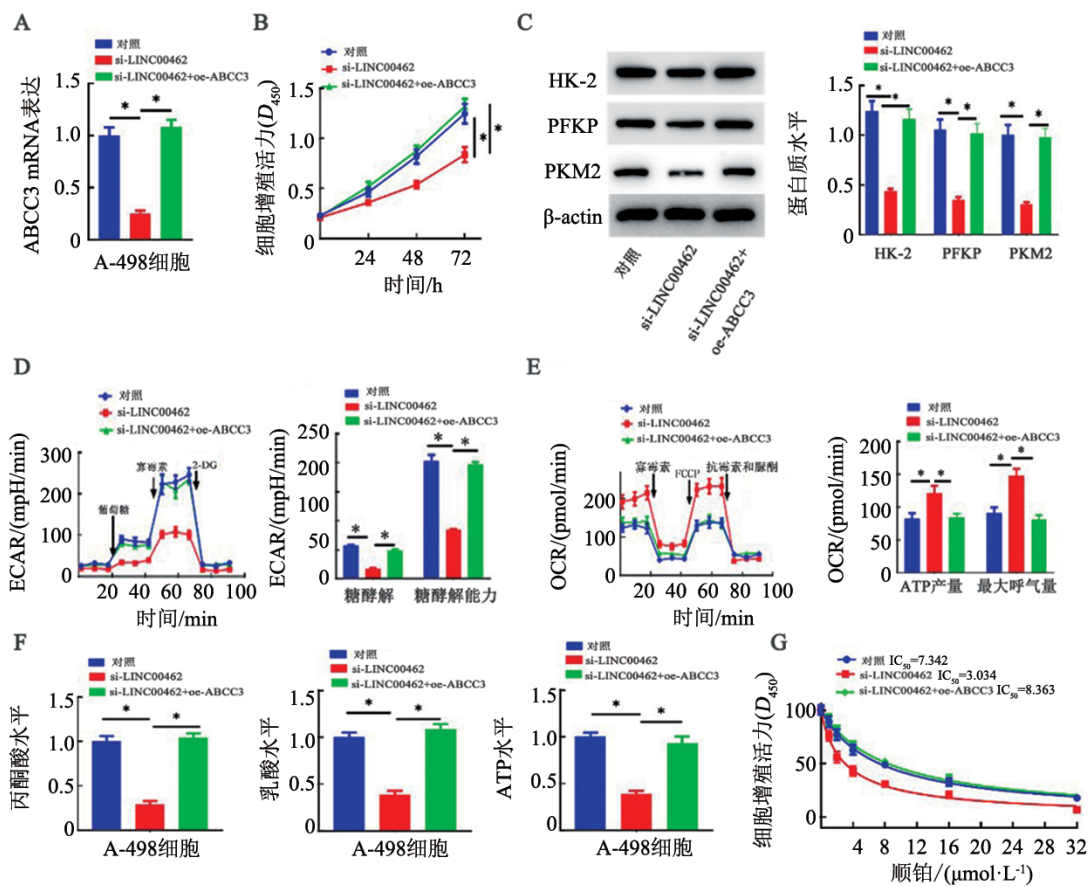
果显示, 2-DG 处理可逆转过表达 ABCC3 对 ccRCC 细胞顺铂耐药的促进作用。这些结果表明 ABCC3 通过诱导 ccRCC 细胞有氧糖酵解, 进而促进 ccRCC 细

胞顺铂耐药性。本研究结果提示, 抑制糖酵解过程可能是提高 ccRCC 顺铂敏感的有效策略。



A:数据库分析 ABCC3 上游潜在转录因子的 Upsetplot 图; B:数据库分析 ABCC3 与 MYC 表达相关性; C: MYC 与 ABCC3 结合模式; D:数据库分析 MYC 在 ccRCC 组织中表达; E: qPCR 法检测 MYC 在 ccRCC 细胞中的表达; F~G: MYC 与 ABCC3 靶向结合关系的验证; H:数据库预测 MYC 上游调控分子 lncRNA 的 Upsetplot 图; I:数据库分析 LINC00462 与 MYC 表达的相关性; J:数据库分析 LINC00462 在 ccRCC 组织中的表达; K: qPCR 法检测 LINC00462 在 ccRCC 细胞中的表达; L: RIP 实验证实 LINC00462 与 MYC 结合; M:数据库分析 ccRCC 组织中 LINC00462 与 ABCC3 表达的相关性; N: qPCR 法检测敲减 ABCC3 后 A-498 细胞中 ABCC3 mRNA 的表达。与正常组织或 HK-2 细胞或 si-NC 组或 IgG 比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 LINC00462 通过招募 MYC 激活 ABCC3 的表达



A~F: 敲减 LINC00462 或敲减 LINC00462 同时过表达 ABCC3 后 A-498 细胞中 ABCC3 mRNA 的表达(A)、细胞增殖活力的变化(B、G)、糖酵解相关蛋白表达(C)、ECAR 和 OCR 水平(D)、丙酮酸/乳酸/ATP 水平(E)以及相应的 IC_{50} 值(F)。* $P < 0.05$ 。

图5 LINC00462 通过下调 ABCC3 促进 ccRCC 糖酵解进而影响 A-498 细胞对顺铂的敏感性

为了明确 ABCC3 促进 ccRCC 细胞顺铂耐药的具体分子作用机制,本研究通过数据库分析发现, ABCC3 存在上游转录因子 MYC, 并且 MYC 在 ccRCC 组织和细胞中高表达, 还通过 ChIP 和双荧光素酶实验证实 MYC 与 ABCC3 的存在靶向结合关系。此外, 通过数据库分析发现, MYC 存在上游调控分子 LINC00462, 并且通过 RIP 实验证实 LINC00462 与 MYC 的调控关系。本研究发现了 ccRCC 中新的调控网络机制, 即 LINC00462 通过招募转录因子 MYC 以激活 ABCC3 的表达进而影响 ccRCC 细胞顺铂敏感性。

LINC00462 被证实 在肝癌^[20]、胃癌^[21] 组织中表达上调, 发挥促癌作用。有文献据^[22] 报道, 在胰腺癌中, LINC00462 通过 miR-665/TGFBR1-TGFBR2/SMAD2/3 途径促进胰腺癌细胞的侵袭。在肾细胞癌中, 敲低 LINC00462 通过靶向 miR-2355-5p 的表达抑制 786-0 细胞的增殖、迁移和侵袭^[23]。本研究结果显示, LINC00462 在 ccRCC 组织和细胞中呈高表达, Pearson 相关性分析发现 ABCC3 与 LINC00462 的表达呈正相关, 敲低 LINC00462 显著降低了 A-498 细胞中 ABCC3 的表达。细胞功能实验显示, 敲低 LINC00462 可抑制

ccRCC 细胞糖酵解和顺铂耐药性, 而同时过表达 ABCC3 则可逆转敲低 LINC00462 对 ccRCC 细胞糖酵解和顺铂耐药性的抑制作用。这些结果表明, 抑制 LINC00462 可能是提高 ccRCC 顺铂敏感性的有效途径。

综上所述, 本研究证实了 LINC00462/MYC/ABCC3 轴在 ccRCC 顺铂耐药中发挥作用。LINC00462/MYC/ABCC3 轴可能是改变在 ccRCC 顺铂耐药的潜在有效靶点。此外, 本研究还发现 LINC00462 通过招募转录因子 MYC 以激活 ABCC3 的表达, 诱导 ccRCC 细胞有氧糖酵解进而抑制肿瘤细胞顺铂敏感性, 结果表明, 抑制肿瘤细胞有氧糖酵解可能是提高肿瘤化疗敏感性的新策略。然而本研究还存在一些不足之处, 首先本研究未在动物和临床水平进一步验证研究结果的可靠性; 其次, ABCC3 下游所涉及的其他调控通路未进一步挖掘, 这些将是未来需要进一步研究的重点。总之, 本研究提出了 ABCC3 的新调控途径, 并表明 LINC00462/MYC/ABCC3 轴可能是 ccRCC 治疗的潜在靶点。

[参考文献]

[1] GILD P, EHDAIE B, KLUTH L A. Effect of obesity on bladder cancer

- and renal cell carcinoma incidence and survival[J]. *Curr Opin Urol*, 2017, 27(5): 409-414. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000425.
- [2] SAAD A M, GAD M M, AL-HUSSEINI M J, *et al.* Trends in renal-cell carcinoma incidence and mortality in the United States in the last 2 decades: a SEER-based study[J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2019, 17(1): 46-57. DOI: 10.1016/j.clgc.2018.10.002.
- [3] NI Q Q, ZHANG F W, ZHANG Y L, *et al.* *In situ* shRNA synthesis on DNA-poly lactide nanoparticles to treat multidrug resistant breast cancer [J/OL]. *Adv Mater*, 2018, 30(10): 1705737[2023-0410]. <https://doi.org/10.1002/adma.201870064>. DOI: 10.1002/adma.201705737.
- [4] WANG W G, GAN Z L, LIU Q, *et al.* Silencing of the chemokine CXCR4 receptor 4 (CXCR4) hampers cancer progression and increases cisplatin (DDP)-sensitivity in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 2957-2969. DOI: 10.1080/21655979.2021.1943112.
- [5] HE Y, WANG X X, LU W L, *et al.* PGK1 contributes to tumorigenesis and sorafenib resistance of renal clear cell carcinoma *via* activating CXCR4/ERK signaling pathway and accelerating glycolysis[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(2): 118[2023-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35121728/>. DOI: 10.1038/s41419-022-04576-4.
- [6] LIU X J, YAO D W, LIU C, *et al.* Overexpression of ABCC3 promotes cell proliferation, drug resistance, and aerobic glycolysis and is associated with poor prognosis in urinary bladder cancer patients[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(6): 8367-8374. DOI: 10.1007/s13277-015-4703-5.
- [7] ADAMSKA A, FERRO R, LATTANZIO R, *et al.* ABCC3 is a novel target for the treatment of pancreatic cancer[J/OL]. *Adv Biol Regul*, 2019, 73: 100634[2023-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31053501/>. DOI: 10.1016/j.jbior.2019.04.004.
- [8] ZENG C, FAN D, XU Y, *et al.* Curcumol enhances the sensitivity of doxorubicin in triple-negative breast cancer *via* regulating the miR-181b-2-3p-ABCC3 axis[J/OL]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 174: 113795 [2023-04-10]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113795>. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.113795.
- [9] ZHANG Y P, HUANG F Z, WANG J, *et al.* 2-DG-regulated RIP and c-FLIP effect on liver cancer cell apoptosis induced by TRAIL[J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 3442-3448. DOI: 10.12659/msm.895034.
- [10] JIANG H M, WEI H M, WANG H, *et al.* Zeb1-induced metabolic reprogramming of glycolysis is essential for macrophage polarization in breast cancer[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(3): 206[2023-04-10]. <https://www.nature.com/articles/s41419-022-04632-z>. DOI: 10.1038/s41419-022-04632-z.
- [11] LI Y Z, LIH T S M, DHANASEKARAN S M, *et al.* Histopathologic and proteogenomic heterogeneity reveals features of clear cell renal cell carcinoma aggressiveness[J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(1): 139-163. DOI: 10.1016/j.ccell.2022.12.001.
- [12] ROBEY R W, PLUCHINO K M, HALL M D, *et al.* Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(7): 452-464. DOI: 10.1038/s41568-018-0005-8.
- [13] ADAMSKA A, DOMENICHINI A, CAPONE E, *et al.* Pharmacological inhibition of ABCC3 slows tumour progression in animal models of pancreatic cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 1-14. DOI: 10.1186/s13046-019-1308-7.
- [14] PARTANEN L, STAAF J, TANNER M, *et al.* Amplification and overexpression of the ABCC3 (MRP3) gene in primary breast cancer[J]. *Genes Chromosom Cancer*, 2012, 51(9): 832-840. DOI: 10.1002/gcc.21967.
- [15] RAMÍREZ-COSMES A, REYES-JIMÉNEZ E, ZERTUCHE-MARTÍNEZ C, *et al.* The implications of ABCC3 in cancer drug resistance: can we use it as a therapeutic target?[J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(9): 4127-4140. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34659880/>.
- [16] LI Y Y, LEI H, HAI R H, *et al.* HOXC10 promotes carboplatin resistance of ovarian cancer by regulating ABCC3[J/OL]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(10): 4602-4621[2023-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36381312/>.
- [17] HSU P P, SABATINI D M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond[J]. *Cell*, 2008, 134(5): 703-707. DOI: 10.1016/j.cell.2008.08.021.
- [18] 姚利昂, 胡泽平. 肿瘤代谢重编程与药物耐药性[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2019, 11(2): 23-27[2023-04-10]. DOI: 10.12037/YXQY.2019.02-06.
- [19] GOVONI M, ROSSI V, DI STEFANO G, *et al.* Lactate upregulates the expression of DNA repair genes, causing intrinsic resistance of cancer cells to cisplatin[J/OL]. *Pathol Oncol Res*, 2021, 27: 1609951[2023-04-10]. <https://doi.org/10.3389/pore.2021.1609951>. DOI: 10.3389/pore.2021.1609951.
- [20] GONG J D, QI X F, ZHANG Y, *et al.* Long noncoding RNA linc00462 promotes hepatocellular carcinoma progression[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 40-47. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.004.
- [21] 顾秀玉, 梁炜. Linc00462在胃癌患者组织及血清中的表达及临床意义[J]. *临床检验杂志*, 2020, 38(5): 338-343. DOI: CNKI:SUN:LCJY.0.2020-05-007.
- [22] ZHOU B, GUO W D, SUN C D, *et al.* Linc00462 promotes pancreatic cancer invasiveness through the miR-665/TGFBR1-TGFBR2/SMAD2/3 pathway[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 706 [2023-04-10]. <https://www.nature.com/articles/s41419-018-0724-5>. DOI: 10.1038/s41419-018-0724-5.
- [23] 文竹, 李军, 何洁. 瑞芬太尼调控 Linc00462/miR-2355-5p 对肾癌细胞生物学行为的影响[J]. *重庆医学*. 2022, 51(7): 1903-1999. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2022.07.00.

[收稿日期] 2023-05-15

[修回日期] 2023-07-27

[本文编辑] 向正华, 沈志超