

研究论文

RAP1在肝细胞癌中的表达及其功能机制研究

杨月^{1#} 张琨^{2#} 高静³ 沈丽君¹ 方合志¹ 董杰影^{1*}¹温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 检验医学教育部重点实验室, 温州 325035;²西安大兴医院检验科, 西安 710016; ³北京市海淀区卫生学校综合办公室, 北京 100192)

摘要 RAS相关蛋白1(RAS-associated protein 1, RAP1)是属于RAS家族的一种小分子G蛋白, 被报道与多种癌症有关。然而, RAP1在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的作用及机制尚不清楚。TCGA和GTEx联合分析显示, HCC组织中RAP1A和RAP1B的mRNA水平显著高于正常肝组织。免疫组织化学技术和蛋白质免疫印迹(Western blot, WB)分析均证实, HCC患者癌组织中的RAP1蛋白水平高于其癌旁正常组织。体外研究表明, 与对照细胞相比, 下调RAP1表达可以减弱HCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力。从机制上说, 下调RAP1表达可以促进线粒体氧化磷酸化, 抑制糖酵解, 并激活p38 MAPK通路, 而抑制p38 MAPK通路可以抑制HCC线粒体功能, 提示RAP1可以通过抑制p38 MAPK通路促使细胞代谢从氧化磷酸化转为糖酵解, 从而促进HCC进程。尽管还需要进一步的研究来阐明RAP1是如何调节p38 MAPK通路及其下游能量代谢重编程的, 但该研究结果为HCC的治疗提供了新的潜在靶点。

关键词 RAS相关蛋白1; 肝细胞癌; 线粒体功能; p38 MAPK

The Expression and Function Mechanisms of RAP1 in Hepatocellular Carcinoma

YANG Yue^{1#}, ZHANG Kun^{2#}, GAO Jing³, SHEN Lijun¹, FANG Hezhi¹, DONG Jieying^{1*}¹Key Laboratory of Laboratory Medicine Designated by the Chinese Ministry of Education, College of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;²Department of Clinical Laboratory, Xi'an Daxing Hospital, Xi'an 710016, China;³General Office of Beijing Haidian Health School, Beijing 100192, China)

Abstract RAP1 (RAS-associated protein 1) is one of small GTPases belonging to RAS family, which has long been associated with the development of various cancers. However, the causal role of RAP1 in HCC (hepatocellular carcinoma) and its mechanism were not known. The conjoint analysis of TCGA and GTEx showed that the mRNA levels of RAP1A and RAP1B in HCC tissues were significantly higher than those in normal liver tissues. Both immunohistochemistry and WB (Western blot) analysis confirmed that the RAP1 level in tumor tissues was higher than that in paired adjacent normal tissues from HCC patients. *In vitro* study showed that, RAP1 depletion

收稿日期: 2021-05-15 接受日期: 2021-07-27

温州市公益性科技计划项目(批准号: Y20170029)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 13858855831, E-mail: Djy@wmu.edu.cn

Received: May 15, 2021 Accepted: July 27, 2021

This work was supported by the Wenzhou Public Welfare Science and Technology Plan Project (Grant No. Y20170029)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-13858855831, E-mail: Djy@wmu.edu.cn

in HCC cells resulted in delayed cell proliferation, decreased cell migration and invasion when compared with control cells. Mechanistically, RAP1 depletion boosts mitochondrial oxidative phosphorylation, inhibits glycolysis, and activates p38 MAPK pathway. Whereas p38 MAPK inhibition suppresses HCC mitochondrial function. These findings suggest that RAP1 can promote HCC progression by converting the cell metabolism from oxidative phosphorylation to glycolysis via inhibition of p38 MAPK pathway. Although further studies are required to clarify how RAP1 regulates p38 MAPK pathway and its downstream energy metabolic reprogramming, these findings provide a new therapeutic target for the treatment of HCC.

Keywords RAP1; HCC; mitochondrial function; p38 MAPK

原发性肝癌主要由肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组成(85%~90%)^[1], 是全球第六大常见的癌症, 也是全球癌症死亡的第三大原因^[2]。肝癌的发病率与死亡率在男女群体中均逐年上升, 并且据报道肝癌已取代甲状腺癌, 成为女性中发病率上升最快的癌症^[3-4]。此外, 肝癌是除胰腺癌外五年生存率最低的癌症^[5], 术后一年复发率和五年复发率分别可高达35%和70%^[6], 并且目前尚无辅助手段以降低其复发风险^[7]。因此, 深入研究HCC相关的分子机制, 对于寻找潜在靶标以及后续针对性治疗的展开具有重要意义。

RAS相关蛋白1(RAS-associated protein 1, RAP1)是RAS超家族成员之一。与其他RAS蛋白相似, RAP1在鸟嘌呤核苷酸交换因子和GTP酶活化蛋白的调节下可实现在GDP结合形式和GTP结合形式之间的转换^[10-12]。此外, 有证据表明, RAP1可以参与不同类型肿瘤的进程, 并且具有多样化特点^[13]。例如, RAP1可以促进黑色素瘤^[14]、乳腺癌^[15]、胰腺癌^[16]的转移, RAP1也可以作为膀胱癌^[17]、前列腺癌^[18]转移的负调节因子。RAP1对细胞生命过程的调节涉及不同的信号通路, 能通过诸如Wnt、ERK、p38 MAPK、PI3K/AKT等多条通路参与信号转导从而影响细胞增殖、侵袭、存活和血管生成^[19-22], 且对于同一条通路可以发挥不一样的作用。例如, RAP1可以通过RAS蛋白依赖的方式抑制ERK通路, 还可以独立于RAS的方式激活ERK这一通路^[23]。RAP1截然不同的作用表现可能是受细胞类型的特异性、调节因子的多效性、下游效应蛋白以及信号通路的多样性等多种复杂因素综合影响的结果^[24]。

RAP1具有两种亚型——RAP1A和RAP1B, 虽然两者在氨基酸序列上具有95%的同源性^[25], 但是在蛋白功能及作用机制上也并非完全相同。比如说, RAP1A在胶质母细胞瘤体生长中起关键作用, 而

RAP1B对瘤体生长无显著影响^[26]。*Rap1b*是PKA信号转导过程中促进滤泡性甲状腺癌发生的关键信号节点, 而*Rap1a*不是^[27]。由此可见, RAP1A和RAP1B在特定癌症中发挥的作用及其相应机制不可一概而论, 必要时需将两者分开独立研究。

最新的一项生信分析显示, RAP1信号通路在HCC组中显著富集, 提示RAP1可能参与HCC的进展^[28]。有一研究指出, CD73-A2AR轴通过激活RAP1募集P110 β 到质膜从而传递PI3K/AKT信号以促进HCC的增殖和转移, 并与HCC患者预后不良有关^[29]。研究报道, RAP1B可促进HCC细胞的体外增殖、迁移与侵袭, 以及体内肿瘤的发生与转移^[30]。过表达(overexpression, OE) RAP1A可以逆转眼缺失蛋白同源物4(eyes absent homolog 4, EYA4)在HCC细胞中的肿瘤抑制作用^[31]。然而, RAP1A与HCC细胞的直接相关研究有限, 两种亚型在HCC中的表达水平、与疾病进展的关系、具体调控机制以及确切的功能未得到进一步证实。

此外, YANG等^[32]首次提出RAP1可充当线粒体ROS产生的负调节剂从而减少心律失常的发作。研究表明, *Rap1b* OE可改善肾小管细胞中高糖诱导的线粒体功能障碍^[33]。进一步研究表明, *Rap1b*通过ERK-C/EBP- β -PGC-1 α 信号通路调节线粒体的生物发生, 从而影响线粒体功能, 改善肾脏损伤并延缓糖尿病肾病的进展^[34]。众所周知, 异常的能量代谢是肿瘤的八大特征之一, 而线粒体是细胞能量代谢的中心, 因此肿瘤发生过程中线粒体调节的机制研究有可能成为癌症治疗的突破口。目前, RAP1在HCC细胞中对于线粒体功能的影响还是一个未知的领域。因此, 本文旨在探索RAP1A/B与HCC发生发展的关系, RAP1在HCC中对于线粒体功能的影响及其具体机制, 以及能否通过该机制进而干预HCC进展, 以便为HCC的临床治疗提供潜在生物标志物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织与细胞 28位肝癌患者肝组织的石蜡切片由杭州市第一人民医院病理科提供,以肝癌组织为实验组,癌旁正常组织为对照组。20位肝癌患者术后肝癌组织和癌旁正常组织由温州医科大学附属第一医院提供。人肝癌细胞HuH7购自中国科学院上海细胞库。该研究已通过杭州市第一人民医院伦理委员会(批准号:2020-004-01)、温州医科大学伦理委员会(批准号:2019-084)审核批准,并获得患者及家属知情同意。

1.1.2 试剂与耗材 DMEM高糖培养基、胰蛋白酶、PMSF、谷氨酰胺、丙酮酸钠、葡萄糖、寡霉素(oligomycin)、羰基氰化物4-(三氟甲氧基)苯腙[carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, FCCP]、鱼藤酮(rotenone)、抗霉素A(antimycin A)购自Sigma公司;胎牛血清(FBS)购自Gibco公司;青霉素、链霉素溶液购自Beyotime公司;两性霉素B购自Sangon Biotech公司;Lipofectamine[®] RNAiMAX转染试剂、RAP1 siRNA、阴性对照(NC)、TRIzol、四甲基罗丹明(Tetramethylrhodamine, TMRM)购自Invitrogen公司;RIPA裂解液、磷酸酶抑制剂(100×)、RAP1(1:1 000,免疫印迹用)、p38 MAPK(1:1 000)、p-p38 MAPK(1:1 000)抗体、HRP标记的二抗(1:2 000)购自CST公司;BCA蛋白定量试剂盒、ATP检测试剂盒购自Thermo Fisher Scientific公司;ECL显色液、PVDF膜购自Bio-Rad公司;通用二步法检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Transwell小室、基质胶购自Corning公司;SB203580(p38抑制剂)购自Selleck公司;XF基础培养基购自Agilent公司;2-脱氧葡萄糖(2-deoxy-D-glucose, 2-DG)、GAPDH(1:1 000)、 β -Actin(1:1 000)、RAP1(1:50,免疫组化用)抗体购自Santa Cruz公司。

1.1.3 仪器 组织匀浆器购自Fluko公司;Novo-Cyte流式细胞仪、Seahorse XFe24细胞能量代谢分析仪购自Agilent公司;多功能酶标仪购自Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学分析 石蜡切片先经二甲苯和一系列浓度梯度的酒精脱蜡复水,再经过10 mmol/L柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)水浴加热以修复抗原表位,接

着使用内源性过氧化物酶阻断剂(通用二步法检测试剂盒内容物)淬灭10 min,5%山羊血清室温封闭1 h,然后4 °C过夜孵育一抗。第二天按照通用二步法检测试剂盒说明书给予反应增强剂和增强酶标羊抗小鼠/兔IgG聚合物处理。随后依次进行3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色、苏木素复染、脱水、透明以及封片。最后通过倒置显微镜观察并拍照,使用Image-Pro Plus 6.0软件分析得到平均光密度(mean optical density, MOD)值。

1.2.2 细胞培养与细胞转染 人肝癌细胞HuH7用含10% FBS、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素和0.25 μ g/mL两性霉素B的DMEM高糖培养基,于37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中培养。每48 h换1次液,待细胞密度为80%~90%时,用胰蛋白酶消化并以1:3~1:4的比例传代。取处于对数生长期的人肝癌细胞HuH7,以 2×10^5 个/孔的密度接种于6孔板,常规培养至细胞密度为60%~70%后,按照Lipofectamine[®] RNAiMAX说明书以终浓度12.5 nmol/L分别转染RAP1 siRNA#1/#2/#3和NC。6 h后更换含10% FBS的新鲜培养基,72 h后收集细胞进行后续实验。

1.2.3 蛋白样本制备与蛋白质免疫印迹(Western blot, WB) 新鲜配制含1 mmol/L PMSF的RIPA裂解液。按裂解液与磷酸酶抑制剂(100×) 100:1的比例配制专门用于提取磷酸化蛋白的裂解液。按照RIPA裂解液说明书提取蛋白。BCA法检测蛋白浓度。95 °C加热5 min进行蛋白变性。按照每孔20 μ g蛋白上样,采用12%分离胶进行SDS-PAGE电泳(程序为:80 V 45 min;120 V 50~70 min)。按照100 V 90 min的程序进行低温湿转。5%脱脂奶粉室温封闭1 h。TBST洗3次,置于相应一抗中,4 °C孵育过夜。TBST洗3次,室温孵育二抗2 h。TBST洗3次,于暗室中经ECL化学发光显影,采用Gel-Pro Analyzer 4.0软件进行蛋白定量分析。

1.2.4 细胞增殖实验 将HuH7 RAP1敲低(knock down, KD)及Ctrl细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔板,每隔24 h收集细胞并用NovoCyte流式细胞仪进行计数。

1.2.5 克隆形成实验 将细胞以 1×10^3 个/孔的密度接种于6孔板,常规培养2~3周至出现明显单克隆后终止培养。4%多聚甲醛固定20 min,再用结晶紫染色15 min。拍照记录克隆形成情况。

1.2.6 划痕实验 将细胞接种于6孔板并培养至细胞汇合,用枪头对细胞进行划线,PBS润洗后更换

含1% FBS的DMEM培养基继续培养。拍照记录0、12、24、48 h相应位置细胞的愈合情况。

1.2.7 Transwell迁移与侵袭实验 Transwell侵袭实验中小室上室需要提前包被基质胶,其他操作如下且与迁移实验相同。将Transwell小室置于24孔板,上室接种 3×10^4 个细胞并用无血清培养基培养,下室加入600 μ L含20% FBS的DMEM培养基。培养48 h后,取出小室用4%多聚甲醛固定20 min,再用结晶紫染色15 min。用棉签轻轻擦拭掉上室细胞,显微镜(100 \times)下随机选取3个视野拍照记录,并用ImageJ软件进行细胞计数。

1.2.8 ATP含量检测 待6孔板细胞生长状态良好且密度为60%~70%时,用预冷PBS洗1次,收集细胞并重悬于ATP提取液(由100 mmol/L Tris-base、4 mmol/L EDTA配制而成,冰醋酸调节pH至7.75)。煮沸90 s后,10 000 \times g离心1 min收集上清液。用ATP检测试剂盒配制ATP测定液。用多功能酶标仪检测上清液中的自发荧光,并根据蛋白浓度对荧光值进行校正。

1.2.9 线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)检测 6孔板细胞生长状态良好且密度约为60%~70%时,用预热PBS洗1次,更换含有30 nmol/L TMRM的无血清培养基并于37 $^{\circ}$ C避光孵育20 min。PBS洗3次,直接于荧光倒置显微镜下拍照,使用ImageJ软件进行荧光定量分析。

1.2.10 线粒体压力测试 将细胞以 2×10^4 个/孔的密度接种于Seahorse XFe24细胞培养板中,并常规培养至细胞密度为70%~90%。上机前细胞用分析培养基(由2 mmol/L谷氨酰胺、1 mmol/L丙酮酸钠、10 mmol/L葡萄糖、XF基础培养基配制而成,pH7.4)洗2次,并在37 $^{\circ}$ C的无CO₂恒温箱中培养1 h。XFe24探针板中装入10 μ mol/L寡霉素、10 μ mol/L FCCP、10 μ mol/L FCCP、5 μ mol/L鱼藤酮和5 μ mol/L抗霉素A。校准完毕后开始监测耗氧率(oxygen consumption rate, OCR)。

1.2.11 糖酵解压力测试 将细胞以 2×10^4 个/孔的密度接种于Seahorse XFe24细胞培养板,并常规培养至细胞密度为70%~90%。上机前细胞用分析培养基(由2 mmol/L谷氨酰胺、XF基础培养基配制而成,pH7.4)洗2次,并在37 $^{\circ}$ C的无CO₂恒温箱中培养1 h。XFe24探针板中装入100 mmol/L葡萄糖、10 μ mol/L寡霉素和500 mmol/L 2-DG。校准完毕后开始监测细胞外酸化率(extracellular acidification rate, ECAR)。

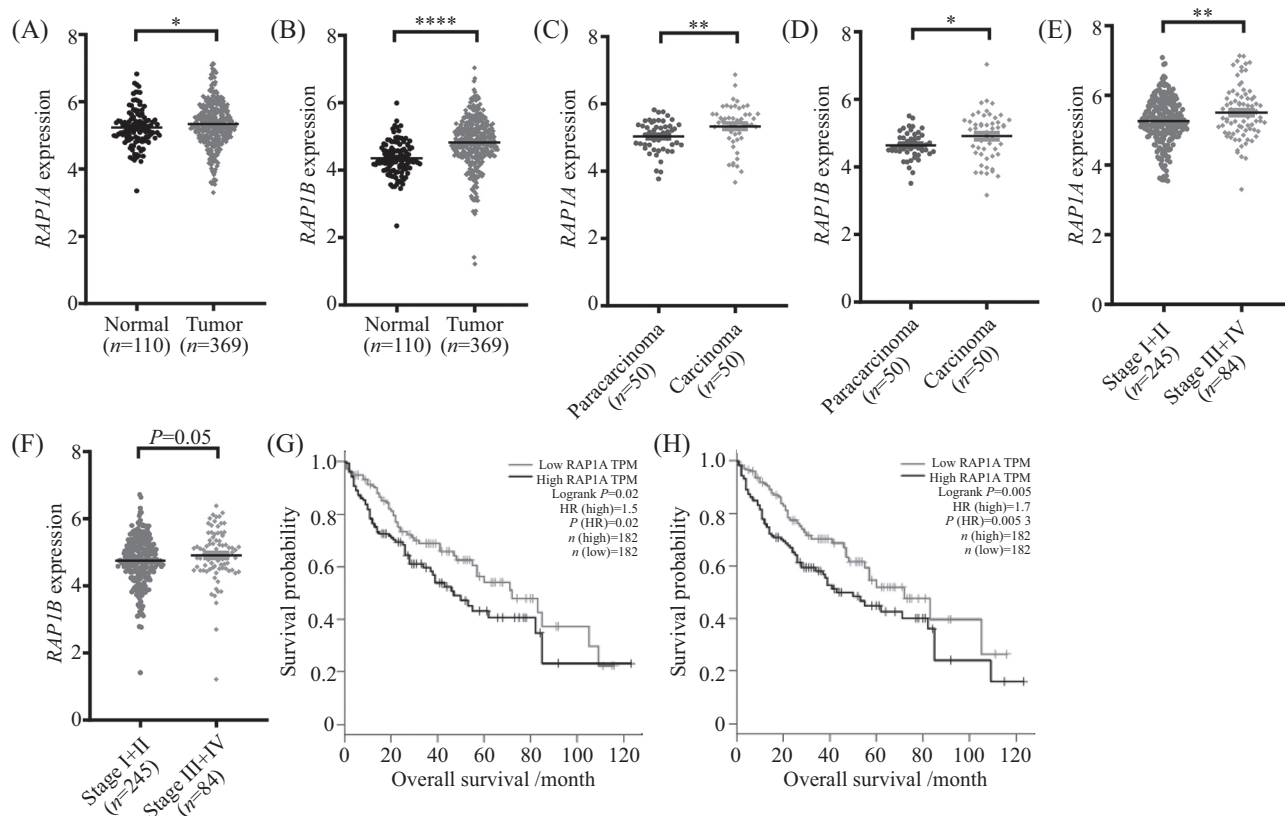
1.2.12 转录组学分析 培养皿细胞生长状态良好且密度约为80%时,用预冷PBS洗1次,然后用1 mL TRIzol分别收集Ctrl、RAP1 siRNA#2/#3细胞于冻存管中($n=3$),液氮速冻后于-80 $^{\circ}$ C保存,干冰冷冻寄送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行转录组测序与分析。以校正 P 值小于0.05为筛选条件,将Ctrl/siRNA#2的差异基因与Ctrl/siRNA#3的差异基因取交集进行GO功能富集分析。

1.2.13 统计学分析 所有数据采用SPSS 26.0软件进行统计学分析,GraphPad Prism 8.0软件作图。计量资料结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示($n \geq 3$),两组间均数比较采用 t 检验,多组间均数比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 RAP1在HCC组织中上调,与HCC的发生发展呈正相关且与患者预后不良有关

为了研究RAP1与HCC之间的关系,首先,我们使用TCGA和GTEx数据库进行生物信息学分析,结果显示,与正常肝组织相比,RAP1A和RAP1B在HCC组织中的表达均显著上调(图1A和图1B)。与癌旁正常组织相比,RAP1A和RAP1B在HCC组织中的表达同样表现为显著上调(图1C和图1D)。对肝癌病例经TNM分期后再行统计,发现III期和IV期患者的RAP1A表达水平均高于I期和II期患者(图1E),但III期和IV期患者的RAP1B表达水平与I期和II期患者相比,差异并不显著($P=0.05$,图1F)。接着,通过GEPIA分析RAP1表达水平与HCC患者生存时间的关系,生存曲线显示RAP1A和RAP1B的表达与HCC患者的总体生存率之间存在显著负相关性(图1G和图1H)。由此可见,RAP1A和RAP1B在HCC中可能发挥一致的作用。综上,生物信息学分析结果提示,RAP1与HCC的发生发展呈正相关且与患者预后不良有关。为了进一步验证结果的可靠性,我们获取了HCC和癌旁组织的石蜡切片以及新鲜组织样本进行相应实验。免疫组织化学分析结果表明,较癌旁正常组织RAP1在HCC组织中高度表达(图2A~图2C)。但是WB分析结果显示,RAP1蛋白表达水平在HCC和癌旁组织中的差异并不显著($P=0.05$,图2D和图2E),这可能是因为HCC组织中异质性细胞组分的存在掩盖了原有差异,或者是因为样本量不够大从而降低了检验效能。综上所述,升高的



A、B: 正常肝组织和HCC组织中的*RAP1A/B* mRNA表达水平; Normal表示正常肝组织, 来自GTEX数据库($n=110$); Tumor表示HCC组织, 来自TCGA数据库($n=369$)。C、D: HCC患者癌组织(carcinoma)与对应癌旁组织(paracarcinoma)中的*RAP1A/B* mRNA表达水平; 数据来自TCGA数据库($n=50$)。E、F: HCC患者癌组织中*RAP1A/B* mRNA表达水平与患者分期的关系; I期和II期(stage I+II, $n=245$); III期和IV期(stage III+IV, $n=84$)。G、H: 采用GEPIA数据库中的Log-rank检验比较*RAP1A/B*低表达(low)与高表达(high) HCC患者之间的总体生存率($n=182$, 以中位数作为临界值)。结果均以均值±标准差表示, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ 。

A,B: the mRNA level of *RAP1A/B* in normal liver tissues and HCC tissues. Normal represents normal liver tissues from the GTEX database ($n=110$). Tumor represents HCC tissues from TCGA database ($n=369$). C,D: the mRNA level of *RAP1A/B* in tumor tissues (carcinoma) and that in paired adjacent tissues (paracarcinoma) from HCC patients. Data are from the TCGA database ($n=50$). E,F: the relationship between the mRNA level of *RAP1A/B* and tumor stage in HCC patients sorted by stage I+II ($n=245$) and stage III+IV ($n=84$). G,H: the Log-rank test in GEPIA database was used to compare the overall survival rates of the patients with low *RAP1A/B* expression and high *RAP1A/B* expression, with the median as the threshold ($n=182$). Data are presented as $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

图1 *RAP1*在HCC中的mRNA表达水平与生存分析

Fig.1 The mRNA expression level and survival analysis of *RAP1* in HCC

*RAP1*表达水平可能在HCC的发生发展及患者预后中起重要作用。

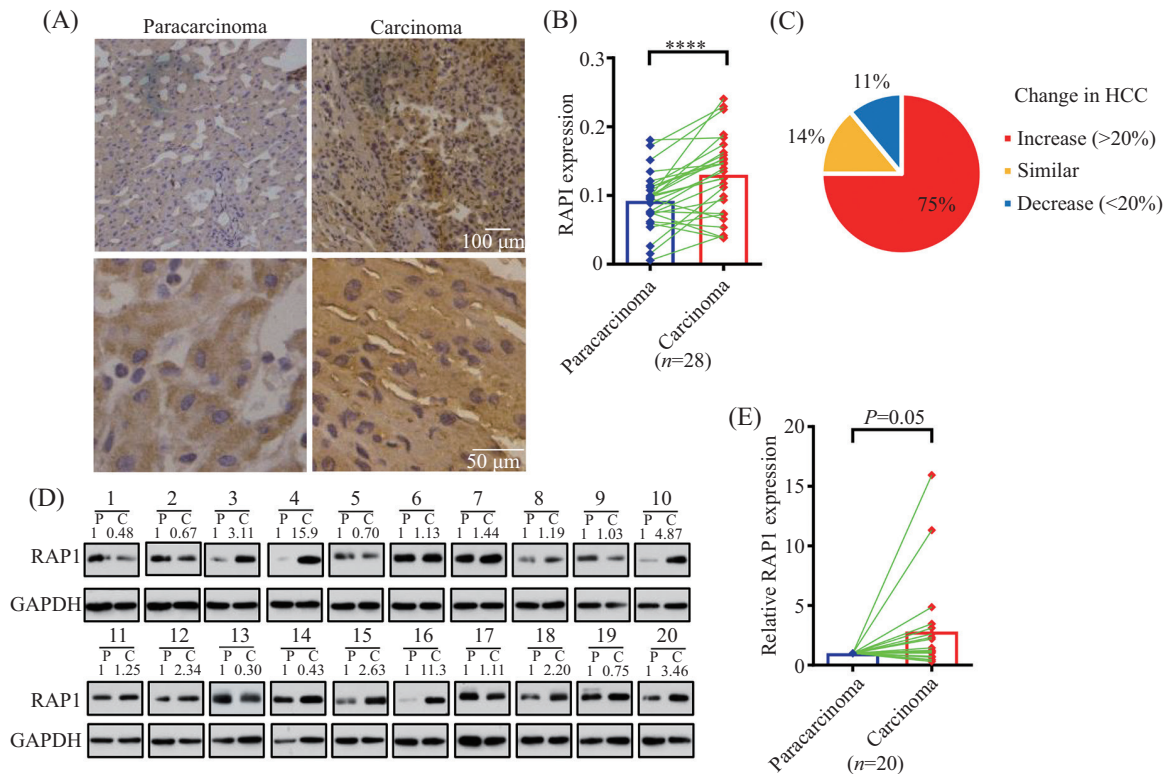
2.2 *RAP1* KD可以减弱HCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力

为了明确*RAP1*对HCC的影响, 本研究通过siRNA干扰技术成功构建了3个HuH7 *RAP1* KD细胞模型(图3A), 选取siRNA#2/#3与NC细胞一同开展后续一系列细胞表型实验。细胞增殖和克隆形成实验结果表明, 与Ctrl细胞相比, HuH7 *RAP1* KD细胞的增殖和克隆形成能力显著下降(图3B和图3C)。划痕实验、Transwell迁移与侵袭实验结果一致表明, 与Ctrl细胞相比, HuH7 *RAP1* KD细胞的迁移与侵袭能

力显著下降(图3D和图3E)。以上结果表明, *RAP1* KD可以减弱HCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力。GO分析显示, *RAP1* KD与Ctrl组差异基因与细胞周期、细胞迁移等生物过程相关(图3F), 这与上述表型实验结果相符。

2.3 *RAP1* KD可以增强HCC细胞的线粒体功能

为了研究*RAP1*对HCC细胞线粒体功能的影响, 我们通过Seahorse XFe24细胞能量代谢分析仪分别检测HuH7 *RAP1* KD及Ctrl细胞的基础OCR值, 以及给予寡霉素(复合体V抑制剂)、FCCP(解耦联剂)、鱼藤酮(复合体I抑制剂)、抗霉素A(复合体III抑制剂)等一系列药物处理之后的OCR值。结果显示, 与Ctrl



A~C: 在HCC(carcinoma)和癌旁组织(paracarcinoma)中RAPI的免疫组织化学染色($n=28$)代表性显微镜图与其定量统计结果及能反映其变化程度的饼图。D、E: 在HCC(C)和癌旁组织(P)中RAPI的WB结果图及其定量统计结果($n=20$): 其中横线上方数字1~20分别对应20位HCC患者。在校正自身GAPDH内参的基础上, 将每个RAPI蛋白灰度值以其对应的癌旁组织RAPI蛋白灰度值作归一化处理, 数据标注于条带上方。结果以均数 \pm 标准差表示, **** $P<0.0001$ 。

A~C: representative immunohistochemical staining photomicrographs, their quantitative statistics, and the pie chart of the variation of RAPI levels in HCC tissues (carcinoma) and paired adjacent tissues (paracarcinoma) ($n=28$). D,E: Western blot analysis and its quantitative statistics of RAPI level in HCC (C) and paracarcinoma tissues (P) ($n=20$). The numbers 1 to 20 above the horizontal line correspond to 20 HCC patients. On the basis of calibrating the internal reference of GAPDH, each RAPI gray value is normalized with the RAPI gray value of the corresponding adjacent tissues, and the data is marked above the band. Data are presented as $\bar{x}\pm s$. **** $P<0.0001$.

图2 RAPI在HCC中的蛋白表达水平

Fig.2 The protein expression level of RAPI in HCC

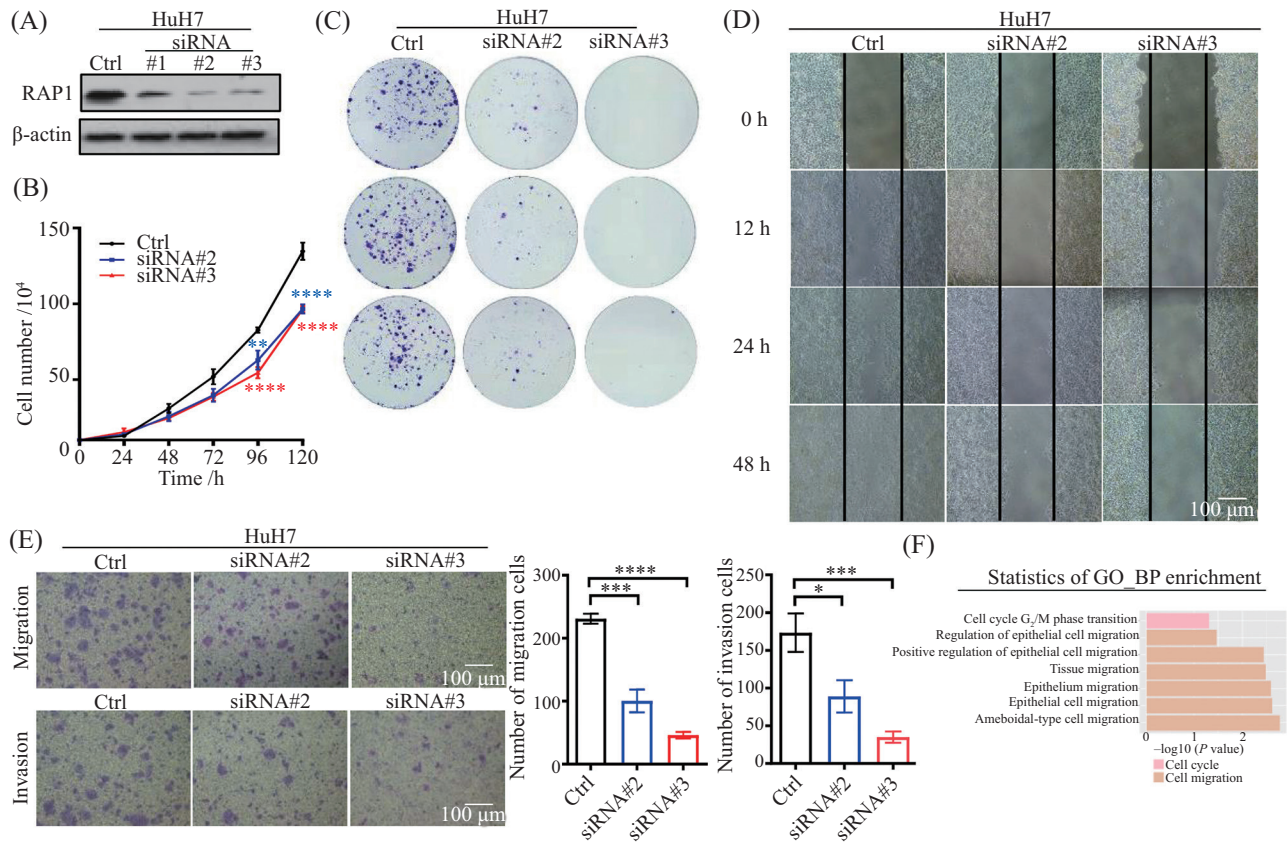
细胞相比, HuH7 RAPI KD细胞的基础氧呼吸能力(Base)、线粒体ATP生成能力(Base-Oligomycin)以及最大氧呼吸能力(FCCP)均明显升高(图4A和图4B)。全细胞ATP含量检测结果同样显示, HuH7 RAPI KD细胞的ATP含量高于Ctrl细胞, 且具有统计学意义(图4C), 与线粒体压力测试所提示的ATP生成量增加这一结果相符。MMP检测结果显示, HuH7 RAPI KD细胞内的荧光强度大于Ctrl细胞, 且具有统计学意义(图4D和图4E), 说明HuH7 RAPI KD细胞的MMP水平高于Ctrl细胞。以上结果表明, RAPI KD可以增强HCC细胞的线粒体功能。

为了研究RAPI对HCC细胞代谢途径的影响, 我们通过Seahorse XFe24细胞能量代谢分析仪先行检测HuH7 RAPI KD及Ctrl细胞的Base值, 接着相继给予葡萄糖、寡霉素、2-DG处理以获得相应处理

条件下的OCR/ECAR值, 从而观察代谢由有氧糖酵解向氧化磷酸化转变的趋势。结果(图4F和图4G)显示, 在加入葡萄糖后, 与Ctrl细胞相比, HuH7 RAPI KD细胞的OCR/ECAR值增大, 这意味着在RAPI KD的HCC细胞中能量代谢更加趋向于氧化磷酸化途径。GO分析显示, RAPI KD与Ctrl组筛选到的差异基因涉及合成与分解代谢相关的多种生物学过程(图4H), 这意味着下调RAPI对HCC细胞的代谢造成了广泛影响。

2.4 抑制p38 MAPK通路可以减弱HCC RAPI KD细胞的线粒体功能

为了研究RAPI对HCC细胞线粒体功能的可能调控机制, 我们通过WB检测HuH7 RAPI KD及Ctrl细胞中的p38蛋白磷酸化水平。结果显示, 与Ctrl细胞相比, HuH7 RAPI KD细胞中的p38蛋白磷酸化



A: RAP1 KD效果的细胞模型验证; B: 细胞增殖实验; C: 克隆形成实验; D: 划痕实验; E: Transwell迁移与侵袭实验及其定量结果; F: 细胞周期与细胞迁移相关的GO功能分析图。结果以均数±标准差表示($n \geq 3$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, 与Ctrl组相比。
 A: cell model verification of RAP1 KD effect; B: cell proliferation assay; C: colony formation assay; D: wound healing assay; E: Transwell migration and invasion assays and their quantitative statistics. F: Gene Ontology functional analysis related to cell cycle and cell migration. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n \geq 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ compared with Ctrl group.

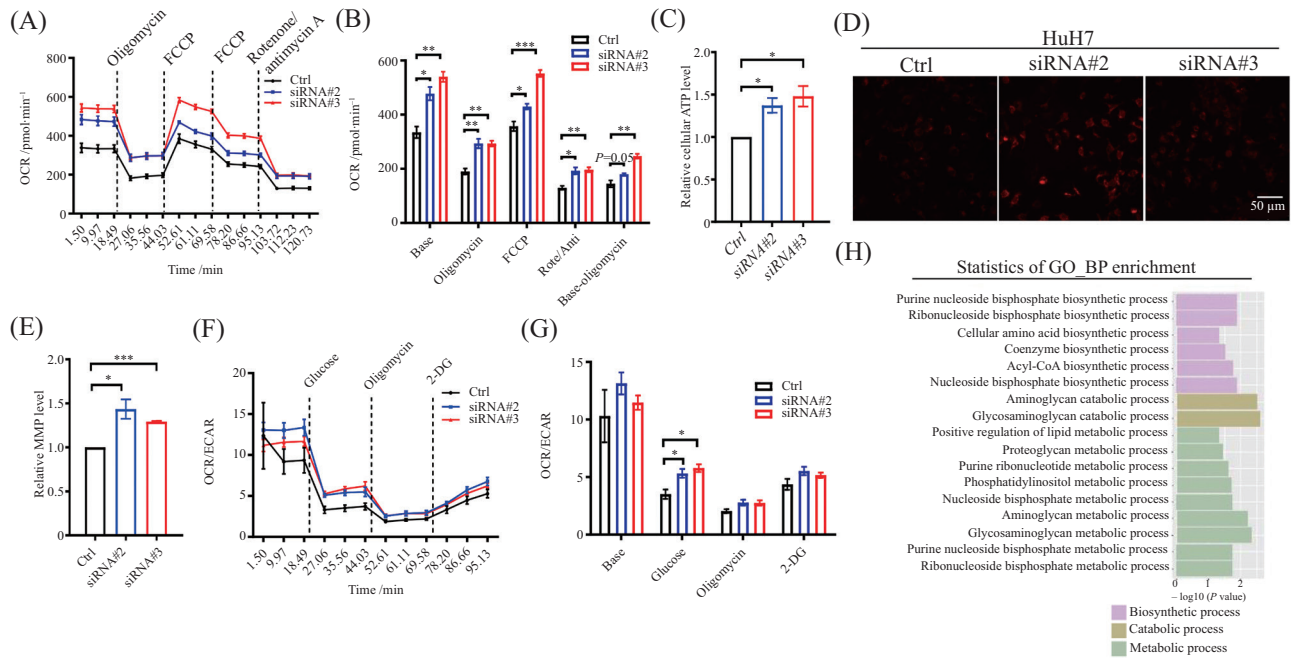
图3 HuH7 RAP1 KD细胞的增殖、迁移和侵袭能力检测
Fig.3 Detection of proliferation, migration and invasion abilities of HuH7 RAP1 KD cells

水平显著高于Ctrl细胞, p38 MAPK通路激活更为明显(图5A)。由此可见, RAP1 KD激活了HCC细胞中的p38 MAPK通路。综合上述实验结果可以推测, RAP1可能通过p38 MAPK通路调节HCC细胞线粒体功能。因此, 我们选择p38抑制剂SB203580作为干预手段以检验上述推测。利用WB检测正常培养条件下的KD与Ctrl细胞以及10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580处理30 min后(预先血清饥饿1 h)的KD细胞, 结果显示SB203580可以有效抑制p38磷酸化水平(图5B)。MMP检测结果显示, HuH7 RAP1 KD细胞经5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580处理12 h后, MMP水平显著下降, 达到与同样处理条件下的Ctrl细胞相一致的水平(图5C)。OCR检测结果显示, HuH7 RAP1 KD细胞经SB203580处理24 h后, 细胞基础氧呼吸能力、线粒体ATP生成能力以及最大氧呼吸能力均明显下降, 达到与Ctrl细胞相一致的水平

(图5D)。细胞增殖实验结果显示, HuH7 RAP1 KD细胞经5 $\mu\text{mol/L}$ SB203580连续处理72 h后, 细胞增殖能力有所提升, 但无统计学差异, 在作用时间72 h内总体仍呈现抑制状态(图5E)。以上结果表明, 抑制p38 MAPK通路可以抑制HCC RAP1 KD细胞的线粒体功能。

3 讨论

RAP1是RAS超家族成员之一, 被报道在多种癌症中表达失调并且与疾病的发生发展有关, 而RAP1与HCC的相关研究较为匮乏, 我们对于RAP1在HCC中的具体调控机制和确切功能仍然不清楚。本研究发现, *RAP1A/B* mRNA水平和RAP1蛋白水平在HCC组织中均上调, RAP1A/B表达水平高的HCC患者生存预后较差, 并且RAP1 KD可以减弱HuH7细胞的体外增殖、迁移和侵袭能力。研究显示, EYA4的表达与



A、B: Seahorse XFe24检测OCR及其统计分析结果; Base值反映细胞基础氧呼吸能力, Base与寡霉素的差值反映线粒体ATP生成能力, FCCP反映最大氧呼吸能力; C: ATP含量检测; D、E: MMP检测及其定量结果; F、G: Seahorse XFe24检测OCR/ECAR及其统计分析结果; H: 物质代谢相关的GO功能分析。结果以均数±标准差表示($n \geq 3$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A,B: detection of OCR by Seahorse XFe24 and its statistical analysis results. The Base value reflects the basic oxygen respiration capacity, the difference between Base and Oligomycin value reflects the mitochondrial ATP production capacity, and the FCCP reflects the maximum oxygen respiration capacity; C: ATP detection; D,E: MMP detection and its quantitative statistics; F,G: detection of OCR/ECAR by Seahorse XFe24 and its statistical analysis results; H: Gene Ontology functional analysis related to metabolism. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n \geq 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

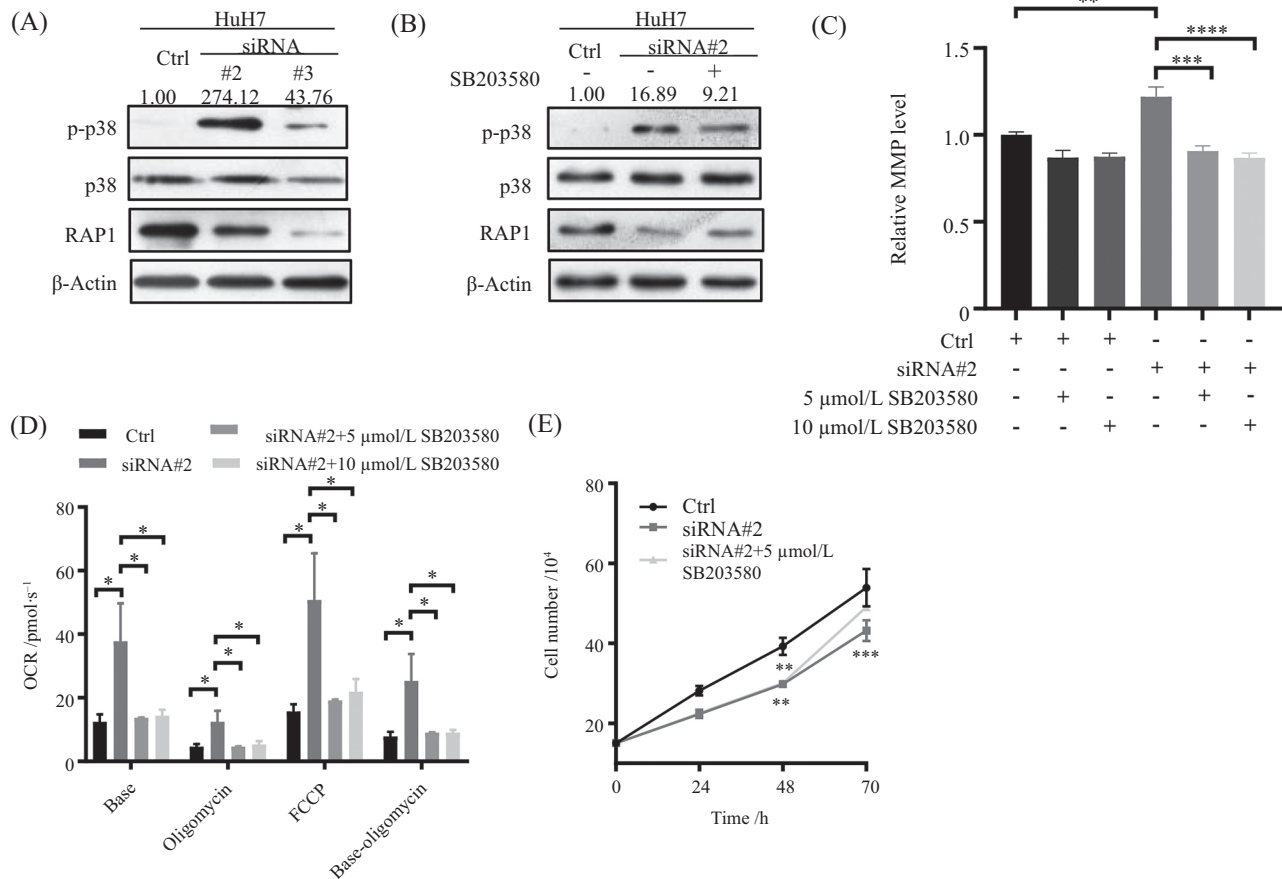
图4 HuH7 RAPI KD细胞的线粒体功能检测

Fig. 4 Detection of mitochondrial function of HuH7 RAPI KD cells

RAP1A水平呈负相关, 并且RAP1A OE可以在体外逆转EYA4在HuH7细胞中的肿瘤抑制作用^[31]。一项关于RAP1B与HCC的研究显示, RAP1B在SMMC7721、SK-Hep1和HepG2等HCC细胞系中的蛋白水平均显著升高, 并且相应的KD与OE模型一致显示RAP1B对HCC细胞增殖、迁移和侵袭有促进作用, 裸鼠皮下成瘤实验进一步表明, RAP1B促进HCC细胞在体内的迁移^[30]。目前已有研究显示, RAP1A/B在HCC中具有促增殖、侵袭和转移作用的一致表现, 并且RAP1表达失调似乎普遍存在于多种HCC细胞系, 这意味着RAP1有望成为干预HCC的靶标。多项研究也表明, RAP1信号在HCC中显著富集^[28,35]。

p38 MAPK通路参与多种肿瘤的发生, 其中与RAP1相关的研究相对较少并且现有研究均显示, RAP1正向调控p38通路从而发挥促癌作用^[38-39]。本研究发现, 与Ctrl细胞相比, HuH7 RAPI KD细胞中p38 MAPK通路被激活, 线粒体功能增强且其能量代谢更加趋向于氧化磷酸化途径。而p38 MAPK通路的抑制可以使RAP1 KD细胞的线粒体功能减弱至与Ctrl细胞

一致的水平, 提示RAP1可以通过抑制p38 MAPK通路促使细胞代谢从氧化磷酸化途径转为糖酵解途径, 从而促进HCC。对于本研究中RAP1负向调控p38通路从而发挥促癌作用这一与以往研究相悖的发现, 我们分析了其存在的可能性。首先, 有研究表明RAP1可以抑制IL-1诱导的p38通路的激活, 但该研究并未涉及这一调控对于癌症进程具有怎样正向或者负向的生理意义^[40]。其次, 在癌症中p38通路本身就具有双重作用, 既能促进也能抑制癌症, 其效应取决于环境与细胞类型特异性, 并受多种翻译后修饰调节^[41]。p38通路可以通过抑制ROS累积、DNA损伤或者促进凋亡的方式抑制HCC的发生^[42-44]。所以本研究中可能存在类似的效应使p38同样表现出肿瘤抑制活性, 而RAP1可以逆转p38的抑癌效应。再次, RAP1在HCC中的这一调控涉及细胞类型特异性因素或者是RAP1上/下游综合效应的表现, 因为有研究指出RAP1-GTP结合形式影响其质膜(plasma membrane, PM)定位, 并且在表皮生长因子刺激下PM上的RAP1-GTP水平显著增加^[45]。另一研究也表示, SHANK3的缺失显著增加了PM部分的



A、B: WB检测HuH7 RAP1 KD及Ctrl细胞的p38蛋白磷酸化水平。在校正自身 β -Actin内参的基础上,将p-p38蛋白灰度值除以其对应的p38蛋白灰度值,所得值再以Ctrl组对应数值作归一化处理,数据标注于条带上方。C: MMP检测及其定量结果;D: OCR检测及其统计分析结果;E: 细胞增殖实验。结果以均数 \pm 标准差表示($n \geq 3$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

A,B: detection of phosphorylation level of p38 protein by WB. On the basis of calibrating the internal reference of β -Actin, divide the p-p38 gray value by its corresponding p38 gray value. Mark the data above the band after normalizing the calculated value with the Ctrl group value. C: MMP detection and its quantitative statistics; D: OCR detection and its statistical analysis results; E: cell proliferation assay. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n \geq 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

图5 p38抑制剂对HuH7 RAP1 KD细胞线粒体功能以及细胞增殖的影响

Fig.5 Effects of p38 inhibitor on mitochondrial function and cell proliferation of HuH7 RAP1 KD cells

RAP1水平,而总RAP1-GTP水平并无显著改变^[46]。只有活化形式的RAP1才能与P110 β 相互作用,并将其募集于PM从而传递PI3K/AKT信号以促进HCC的增殖和转移^[29]。由此可见,RAP1的活化形式与其亚细胞定位对其细胞类型特异性功能的行使至关重要。虽然已有研究表明,在人类转移性黑色素瘤中,RAP1表达水平与其活性之间存在正相关性^[4],但是本研究中RAP1表达水平始终不能完全替代其活性,所以无法反映实际发挥功能的RAP1-GTP结合形式,加上RAP1信号特异性本身就受上游调节因子与下游效应蛋白的共同调节^[24],所以可能存在某些未知因素共同促成RAP1在HCC中的这一调控结局。最后,RAP1对于同一通路可以发挥不一样的作用,比如本文前言提及的ERK

通路,所以不能由此否定本研究中RAP1负向调控p38 MAPK通路这一发现。

除上述提及的PM外,RAP1还可存在于突触质膜、突触小泡、内质网、高尔基体和线粒体等中^[47-48]。然而RAP1与线粒体相关的研究相当匮乏,有限的研究成果已在前言末尾提及,此处不作赘述。在本研究中,线粒体相关实验和肿瘤表型实验显示,相较于Ctrl细胞,HuH7 RAP1 KD细胞的线粒体功能增强,能量代谢从有氧糖酵解转向氧化磷酸化途径,恢复到正常细胞的产能模式,一系列的肿瘤表型也随之逆转。这一结果与“Warburg效应”相符^[49],同时也与代谢组学显示的HCC糖酵解增加、线粒体氧化磷酸化减弱的特征相符^[50],提示RAP1可能通过

促进有氧糖酵解或者抑制氧化磷酸化而参与HCC代谢途径的调节,但目前并没有进一步的深入研究显示RAP1具体参与调节该过程中的哪一环节,关于这方面还有待进一步的探索。但有意思的是,已有研究发现糖酵解通过sAC-EPAC1-RAP1途径介导 β 1整合素的上调和细胞极性的丧失^[51]。尽管如此,我们有望借助RAP1对线粒体功能的调控机制抑制HCC发展。毕竟过往研究中已有类似的成功案例,比如说,乳腺癌细胞中线粒体ER β 的上调通过增加线粒体转录和增强氧化磷酸化功能从而实现恶性表型的逆转^[52]。己糖激酶II缺失或沉默可以抑制小鼠和人类HCC的发生,同样伴随着糖酵解的减少和氧化磷酸化水平的升高,而且作者进一步发现己糖激酶II沉默技术与二甲双胍的联合应用可以抑制人HCC细胞的生长^[53]。

总之,本研究发现RAP1在HCC中上调,与HCC的发生发展呈正相关且与患者预后不良有关,可以作为临床治疗的潜在靶标。进一步发现RAP1通过抑制p38 MAPK通路来抑制HCC细胞的线粒体功能从而发挥促癌作用,拓展了RAP1在线粒体功能方面的机制研究。鉴于本研究中发现的不同于一般规律的RAP1对p38的负向调控以及p38信号通路在各种类型癌症中固有的双重作用,在HCC治疗方案中,p38信号的干扰或许不能达到理想的干预效果,但是可以尝试运用干扰线粒体功能或者氧化磷酸化的手段以延缓癌症进展。

参考文献 (References)

- [1] EL-SERAG H B, RUDOLPH K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2557-76.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [3] CRONIN K A, LAKE A J, SCOTT S, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: national cancer statistics [J]. *Cancer*, 2018, 124(13): 2785-800.
- [4] HENLEY S J, WARD E M, SCOTT S, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: national cancer statistics [J]. *Cancer*, 2020, 126(10): 2225-49.
- [5] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 7-30.
- [6] TABRIZIAN P, JIBARA G, SHRAGER B, et al. Recurrence of hepatocellular cancer after resection: patterns, treatments, and prognosis [J]. *Ann Surg*, 2015, 261(5): 947-55.
- [7] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-14.
- [8] CALDERARO J, ZIOL M, PARADIS V, et al. Molecular and histological correlations in liver cancer [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(3): 616-30.
- [9] CALDERARO J, COUCHY G, IMBEAUD S, et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(4): 727-38.
- [10] WITTCHEN E S, AGHAJANIAN A, BURRIDGE K. Isoform-specific differences between Rap1A and Rap1B GTPases in the formation of endothelial cell junctions [J]. *Small GTPases*, 2011, 2(2): 65-76.
- [11] DUBE N, KOOISTRA M R, PANNEKOEK W J, et al. The Rap-GEF PDZ-GEF2 is required for maturation of cell-cell junctions [J]. *Cell Signal*, 2008, 20(9): 1608-15.
- [12] KOOISTRA M R, DUBE N, BOS J L. Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 1): 17-22.
- [13] ZHANG Y L, WANG R C, CHENG K, et al. Roles of Rap1 signaling in tumor cell migration and invasion [J]. *Cancer Biol Med*, 2017, 14(1): 90-9.
- [14] GAO L, FENG Y, BOWERS R, et al. Ras-associated protein-1 regulates extracellular signal-regulated kinase activation and migration in melanoma cells: two processes important to melanoma tumorigenesis and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(16): 7880-8.
- [15] MCSHERRY E A, BRENNAN K, HUDSON L, et al. Breast cancer cell migration is regulated through junctional adhesion molecule-A-mediated activation of Rap1 GTPase [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(2): R31.
- [16] HUANG M, ANAND S, MURPHY E A, et al. EGFR-dependent pancreatic carcinoma cell metastasis through Rap1 activation [J]. *Oncogene*, 2012, 31(22): 2783-93.
- [17] VALLES A M, BEUVIN M, BOYER B. Activation of Rac1 by paxillin-Crk-DOCK180 signaling complex is antagonized by Rap1 in migrating NBT-II cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(43): 44490-6.
- [18] SHIMIZU Y, HAMAZAKI Y, HATTORI M, et al. SPA-1 controls the invasion and metastasis of human prostate cancer [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(4): 828-36.
- [19] CHRZANOWSKA-WODNICKA M, KRAUS A E, GALE D, et al. Defective angiogenesis, endothelial migration, proliferation, and MAPK signaling in Rap1b-deficient mice [J]. *Blood*, 2008, 111(5): 2647-56.
- [20] GRADER-BECK T, VAN PUIJENBROEK A A, NADLER L M, et al. cAMP inhibits both Ras and Rap1 activation in primary human T lymphocytes, but only Ras inhibition correlates with blockade of cell cycle progression [J]. *Blood*, 2003, 101(3): 998-1006.
- [21] LISSITZKY J C, PARRIAUX D, RISTORCELLI E, et al. Cyclic AMP signaling as a mediator of vasculogenic mimicry in aggressive human melanoma cells *in vitro* [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(3): 802-9.
- [22] GOTO M, MITRA R S, LIU M, et al. Rap1 stabilizes beta-catenin and enhances beta-catenin-dependent transcription and invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(1): 65-76.

- [23] STORK P J. Does Rap1 deserve a bad Rap [J]? *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(5): 267-75.
- [24] RAAIJMAKERS J H, BOS J L. Specificity in Ras and Rap signaling [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(17): 10995-9.
- [25] ROJAS A M, FUENTES G, RAUSELL A, et al. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids [J]. *J Cell Biol*, 2012, 196(2): 189-201.
- [26] SAYYAH J, BARTAKOVA A, NOGAL N, et al. The Ras-related protein, Rap1A, mediates thrombin-stimulated, integrin-dependent glioblastoma cell proliferation and tumor growth [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(25): 17689-98.
- [27] HUK D J, ASHTEKAR A, MAGNER A, et al. Deletion of Rap1b, but not Rap1a or Epac1, reduces protein kinase A-mediated thyroid cancer [J]. *Thyroid*, 2018, 28(9): 1153-61.
- [28] WANG L, YAN K, HE X, et al. LRP1B or TP53 mutations are associated with higher tumor mutational burden and worse survival in hepatocellular carcinoma [J]. *J Cancer*, 2021, 12(1): 217-23.
- [29] MA X L, SHEN M N, HU B, et al. CD73 promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis via activating PI3K/AKT signaling by inducing Rap1-mediated membrane localization of P110beta and predicts poor prognosis [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 37.
- [30] TANG Z, PENG H, CHEN J, et al. Rap1b enhances the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells by up-regulating Twist 1 [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 367(1): 56-64.
- [31] MO S J, HOU X, HAO X Y, et al. EYA4 inhibits hepatocellular carcinoma growth and invasion by suppressing NF-kappaB-dependent RAP1 transactivation [J]. *Cancer Commun*, 2018, 38(1): 9.
- [32] YANG Z, KIRTON H M, AL-OWAIS M, et al. Epac2-Rap1 signaling regulates reactive oxygen species production and susceptibility to cardiac arrhythmias [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(3): 117-32.
- [33] SUN L, XIE P, WADA J, et al. Rap1b GTPase ameliorates glucose-induced mitochondrial dysfunction [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(12): 2293-301.
- [34] XIAO L, ZHU X, YANG S, et al. Rap1 ameliorates renal tubular injury in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2014, 63(4): 1366-80.
- [35] NATRI H M, WILSON M A, BUETOW K H. Distinct molecular etiologies of male and female hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 951.
- [36] XIE B, LIU Y, ZHAO Z, et al. MYB proto-oncogene-like 1-TWIST1 axis promotes growth and metastasis of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 18: 58-69.
- [37] ZHU G Z, LIAO X W, WANG X K, et al. Comprehensive investigation of p53, p21, nm23, and VEGF expression in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma overall survival after hepatectomy [J]. *J Cancer*, 2020, 11(4): 906-18.
- [38] LU L, WANG J, WU Y, et al. Rap1A promotes ovarian cancer metastasis via activation of ERK/p38 and notch signaling [J]. *Cancer Med*, 2016, 5(12): 3544-54.
- [39] VAN TUBERGEN E A, BANERJEE R, LIU M, et al. Inactivation or loss of TTP promotes invasion in head and neck cancer via transcript stabilization and secretion of MMP9, MMP2, and IL-6 [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(5): 1169-79.
- [40] MCDERMOTT E P, O'NEILL L A. Ras participates in the activation of p38 MAPK by interleukin-1 by associating with IRAK, IRAK2, TRAF6, and TAK-1 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(10): 7808-15.
- [41] ZOU X, BLANK M. Targeting p38 MAP kinase signaling in cancer through post-translational modifications [J]. *Cancer Lett*, 2017, 384: 19-26.
- [42] SAKURAI T, HE G, MATSUZAWA A, et al. Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(2): 156-65.
- [43] NAKAGAWA H, HIRATA Y, TAKEDA K, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 inhibits hepatocarcinogenesis by controlling the tumor-suppressing function of stress-activated mitogen-activated protein kinase [J]. *Hepatology*, 2011, 54(1): 185-95.
- [44] HUI L, BAKIRI L, MAIRHORFER A, et al. p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(6): 741-9.
- [45] BIVONA T G, WIENER H H, AHEARN I M, et al. Rap1 up-regulation and activation on plasma membrane regulates T cell adhesion [J]. *J Cell Biol*, 2004, 164(3): 461-70.
- [46] LILJA J, ZACHARCHENKO T, GEORGIADOU M, et al. SHANK proteins limit integrin activation by directly interacting with Rap1 and R-Ras [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(4): 292-305.
- [47] BÉRANGER F, GOUD B, TAVITIAN A, et al. Association of the Ras-antagonistic Rap1/Krev-1 proteins with the Golgi complex [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(5): 1606-10.
- [48] KIM S, MIZOGUCHI A, KIKUCHI A, et al. Tissue and subcellular distributions of the smg-21/rap1/Krev-1 proteins which are partly distinct from those of c-ras p21s [J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(6): 2645-52.
- [49] KOPPENOL W H, BOUNDS P L, DANG C V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(5): 325-37.
- [50] BEYOGLU D, IMBEAUD S, MAURHOFER O, et al. Tissue metabolomics of hepatocellular carcinoma: tumor energy metabolism and the role of transcriptomic classification [J]. *Hepatology*, 2013, 58(1): 229-38.
- [51] ONODERA Y, NAM J M, BISSELL M J. Increased sugar uptake promotes oncogenesis via EPAC/RAP1 and O-GlcNAc pathways [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(1): 367-84.
- [52] SONG I S, JEONG Y J, JEONG S H, et al. Modulation of mitochondrial ERbeta expression inhibits triple-negative breast cancer tumor progression by activating mitochondrial function [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 52(3): 468-85.
- [53] DEWAAL D, NOGUEIRA V, TERRY A R, et al. Hexokinase-2 depletion inhibits glycolysis and induces oxidative phosphorylation in hepatocellular carcinoma and sensitizes to metformin [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 446.