

ATP 合成酶 α -亚基在吉西他滨耐药膀胱癌细胞中的表达及其作用

米治渊 梁晔 牛海涛

(青岛大学附属医院泌尿外科, 山东 青岛 266003)

[摘要] **目的** 探究 ATP 合成酶 α -亚基(ATP5A1)在吉西他滨耐药膀胱癌细胞中的表达情况及其潜在作用。**方法** 采用人膀胱移行细胞癌细胞系 T24 和 5637,通过逐步递增吉西他滨浓度法构建 T24 耐药细胞株(T24R)和 5637 耐药细胞株(5637R)。通过蛋白免疫印迹(WB)实验和 RT-qPCR 技术检测上述细胞中 ATP5A1 蛋白与 mRNA 的表达水平;通过分别使用寡霉素(氧化磷酸化抑制剂)和 2-脱氧葡萄糖(2-DG,糖酵解抑制剂)处理,以检测上述细胞的 ATP 合成对氧化磷酸化和糖酵解依赖性。将 T24R 和 5637R 细胞分别分为 T24R-si-NC 组、T24R-si-ATP5A1 组和 5637R-si-NC 组、5637R-si-ATP5A1 组,其中 T24R-si-ATP5A1 组和 5637R-si-ATP5A1 组细胞转染敲低 ATP5A1 的小干扰 RNA(si-ATP5A1),T24R-si-NC 组和 5637R-si-NC 组转染空载体对照 si-NC。通过 ATP 检测试剂盒、葡萄糖检测试剂盒和乳酸检测试剂盒分别检测各组细胞中 ATP 含量、葡萄糖消耗量和乳酸生成量,通过 MTT 法检测各组细胞对吉西他滨的敏感性,通过平板克隆形成实验检测各组细胞在吉西他滨处理下的增殖能力。**结果** T24R 和 5637R 细胞对吉西他滨的耐药指数分别为 46.21 和 5.64。与相应亲本细胞相比,T24R 和 5637R 细胞中 ATP5A1 mRNA 和蛋白均显著高表达,对氧化磷酸化的依赖性更高,对糖酵解的依赖性更低($t=5.12\sim 18.52, P<0.01$)。T24R-si-ATP5A1 组与 T24R-si-NC 组相比、5637R-si-ATP5A1 组与 5637R-si-NC 组相比,细胞中 ATP 相对含量显著升高,葡萄糖消耗量和乳酸生成量显著减少,对吉西他滨的 IC₅₀ 显著降低,克隆数量显著减少($F=23.97\sim 45.23, q=6.58\sim 12.73, t=4.23\sim 56.55, P<0.05$)。**结论** ATP5A1 在吉西他滨耐药膀胱癌细胞中呈显著高表达,高表达的 ATP5A1 可能通过维持线粒体的氧化磷酸化功能参与膀胱癌细胞吉西他滨耐药的形成。

[关键词] 膀胱肿瘤;吉西他滨;线粒体质子转运 ATP 酶;线粒体;氧化磷酸化;能量代谢;抗药性;肿瘤

[中图分类号] R737.14 **[文献标志码]** A

Expression and role of ATP synthase α -subunit in gemcitabine-resistant bladder cancer cells MI

Zhiyuan, LIANG Ye, NIU Haitao (Department of Urology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression and potential role of ATP synthase α -subunit (ATP5A1) in gemcitabine-resistant bladder cancer cells. **Methods** Human bladder transitional cell carcinoma cell lines T24 and 5637 were used to establish gemcitabine-resistant cell lines (T24R and 5637R) through a stepwise increase in gemcitabine concentration. Western blot and RT-qPCR were used to measure the protein and mRNA expression levels of ATP5A1 in these cells, and the cells were treated with oligomycin (an inhibitor of oxidative phosphorylation) or 2-DG (an inhibitor of glycolysis) to observe the dependence of ATP synthesis on oxidative phosphorylation and glycolysis in these cells. T24R and 5637R cells were divided into T24R-si-NC group, T24R-si-ATP5A1 group, 5637R-si-NC group, and 5637R-si-ATP5A1 group; the cells in the T24R-si-ATP5A1 group and the 5637R-si-ATP5A1 group were transfected with small interfering RNA (si-ATP5A1) to knockdown ATP5A1, while those in the T24R-si-NC group and the 5637R-si-NC group were transfected with a blank vector control (si-NC). ATP, glucose, and lactate assay kits were used to measure the content of ATP, glucose consumption, and lactate production in each cell group; MTT assay was used to observe the sensitivity of cells to gemcitabine; colony formation assay was used to measure the proliferative capacity of cells under gemcitabine treatment. **Results** The resistance indices of T24R and 5637R cells to gemcitabine were 46.21 and 5.64, respectively. Compared with their respective parental cells, T24R and 5637R cells had significantly higher relative mRNA and protein expression levels of ATP5A1, as well as a significant increase in the dependence on oxidative phosphorylation and a reduction in the dependence on glycolysis ($t=5.12-18.52, P<0.01$). Compared with the corresponding T24R-si-NC group and 5637R-si-NC group, the T24R-si-ATP5A1 group and the 5637R-si-ATP5A1 group had a significant increase in relative ATP content, significant reductions in glucose consumption and lactate production, a significantly lower IC₅₀ for gemcitabine, and a significant reduction in the number of colonies ($F=23.97-45.23, q=6.58-12.73, t=4.23-56.55, P<0.05$). **Conclusion** ATP5A1 is highly ex-

pressed in gemcitabine-resistant bladder cancer cells, and highly expressed ATP5A1 may contribute to the development of gemcitabine resistance in bladder cancer cells by maintaining mito-

[收稿日期] 2026-03-10; **[修订日期]** 2026-06-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82071705)

[通信作者] 牛海涛, Email: niuht0532@126.com

chondrial oxidative phosphorylation function.

[KEY WORDS] Urinary bladder neoplasms; Gemcitabine; Mitochondrial proton-translocating ATPases; Mitochondria; Oxidative phosphorylation; Energy metabolism; Drug resistance, neoplasm

膀胱癌是泌尿系统最常见的肿瘤之一,其发病率和死亡率均位居男性泌尿系肿瘤前列^[1-2]。以吉西他滨为代表的化疗方案是肌层浸润性膀胱癌的标准辅助治疗方法^[3],但固有及获得性耐药严重限制其临床疗效,导致肿瘤复发及进展^[4]。因此,亟待阐明膀胱癌化疗抵抗的核心机制并寻找有效干预靶点。代谢重编程是肿瘤细胞的核心特征之一^[5]。在有氧条件下,肿瘤细胞不仅糖酵解增强^[6],部分还会出现线粒体氧化磷酸化的增强,以满足其生物合成和能量需求^[7-8]。

ATP 合成酶 α -亚基(ATP5A1)作为 ATP 合酶 F1 部分的亚基之一,参与构成催化 ATP 合成的核心结构,在氧化磷酸化过程中发挥关键作用^[9]。研究表明,ATP5A1 在肾透明细胞癌中表达下调,且与患者预后不良相关^[9]。多项研究表明,ATP5A1 可通过增强线粒体功能或激活相关通路,促进多种肿瘤的化疗耐药与转移^[10-12],但其在膀胱癌化疗耐药中的功能尚未阐明。本研究拟构建膀胱癌吉西他滨耐药细胞系,通过基因敲低实验探讨 ATP5A1 对膀胱癌细胞耐药性和线粒体功能的影响,旨在为膀胱癌耐药机制的阐明以及靶向药物的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与耐药细胞株构建

采用人膀胱移行细胞癌细胞系 T24 和 5637(均购自武汉普诺赛生物科技有限公司)进行吉西他滨耐药株的构建及后续功能实验。将 T24 和 5637 细胞分别接种于含 10%胎牛血清和 1%双抗(青霉素-链霉素)的 DMEM 培养基(完全培养基)中,置于细胞培养箱(37℃、体积分数 0.05 CO₂)中培养。采用逐步递增吉西他滨浓度法构建耐药细胞株。初始以 0.01 mg/L 吉西他滨处理处于对数生长期的 T24 和 5637 细胞,待细胞恢复正常生长后,逐步提高药物浓度,每次浓度递增 1.5~2 倍。持续培养 6 个月以上,获得能够在 0.5 mg/L 吉西他滨中稳定生长的耐药细胞株,分别命名为 T24R 和 5637R,于显微镜下观察两种细胞与其相应亲本细胞的形态差异,同时计算两种细胞的耐药指数。耐药指数=耐药细胞对吉西他滨的半数抑制浓度(IC₅₀)/亲本细胞对吉西他滨的 IC₅₀。

1.2 细胞分组与转染

将处于对数生长期的 T24R、5637R 细胞接种于 6 孔板中,待细胞生长密度达到 50%~60%时,分别随机地分为 T24R-si-NC 组、T24R-si-ATP5A1 组和 5637R-si-NC 组、5637R-si-ATP5A1 组。使用 Lipofectamine 3000 转染试剂(美国 Thermo Fisher 公司)进行转染。T24R-si-ATP5A1 组以及 5637R-si-ATP5A1 组细胞均转染敲低 ATP5A1 的小干扰 RNA(si-ATP5A1,正义链序列:5'-UCUGCUUACA-UUCCAACAAAU-3',反义链序列:5'-AUUUGUUGGAAUGUAAGCAGA-3'),T24R-si-NC 组和 5637R-si-NC 组转染空载体对照 si-NC,转染浓度均为 50 μ mol/L。转染 48 h 后收集细胞进行后续实验。

1.3 RT-qPCR 技术检测各组细胞当中 ATP5A1 mRNA 相对表达水平

采用 TRIzol 法提取 T24、T24R、5637 和 5637R 细胞中总 RNA,根据反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)说明书操作合成 cDNA。根据 RT-qPCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)说明书配制反应体系,使用 LightCycler96 荧光定量 PCR 仪进行检测。其中 ATP5A1 的正向引物序列为 5'-GGAGCCCAGCAAGATCACAA-3',反向引物序列为 5'-GGTGACAGTGACAGGGCTTT-3';GAPDH 的正向引物序列为 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',反向引物序列为 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'。以 GAPDH 为内参基因计算各组细胞中 ATP5A1 mRNA 相对表达水平。

1.4 蛋白免疫印迹(WB)实验检测各组细胞中 ATP5A1 蛋白相对表达水平

使用 RIPA 裂解液(含 1%蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂)提取 T24、T24R、5637 和 5637R 细胞中总蛋白。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,取蛋白样品与 5 $\times$ SDS 上样缓冲液混合,100℃煮沸 5 min 变性。进行 SDS-PAGE 电泳,将蛋白转印至 PVDF 膜。转膜后,用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗(ATP5A1 抗体稀释比例 1:1 000,GAPDH 抗体稀释比例 1:5 000),于 4℃下孵育过夜。PBST 洗膜 3 次之后,加入二抗(稀释比例 1:5 000),室温下孵育 1 h,PBST 洗膜 3 次。ECL 显影液显影,成像系统拍照,ImageJ 软件分析条带灰

度值,以 ATP5A1 蛋白与 GAPDH 条带灰度值的比值表示 ATP5A1 蛋白相对表达水平,实验独立重复 3 次,结果取均值。

1.5 T24R 和 5637R 细胞及其相应亲本细胞的 ATP 合成对氧化磷酸化和糖酵解依赖性检测

将 T24R 和 5637R 细胞及其相应亲本细胞接种于 96 孔板(每孔 5 000 个细胞)中,分别加入含下列成分的完全培养基进行处理:0.1% 的 DMSO(对照)、1 $\mu\text{mol/L}$ 寡霉素、10 mmol/L 2-脱氧葡萄糖(2-DG)、1 $\mu\text{mol/L}$ 寡霉素+10 mmol/L 2-DG。将各组细胞置于培养箱中孵育 60 min 后,迅速吸去上清液,每孔加入 50 μL ATP 裂解液,冰上裂解 5 min 后离心收集上清液。一部分上清液通过 BCA 法进行蛋白定量,其余上清液用于检测 ATP 含量。以加入 DMSO 处理的细胞中 ATP 含量为参照,计算各处理组细胞中相对 ATP 含量。

1.6 各组细胞中 ATP 相对含量检测

取 T24 细胞、T24R 细胞、T24R-si-NC 组细胞、T24R-si-ATP5A1 组细胞、5637 细胞、5637R 细胞、5637R-si-NC 组细胞和 5637R-si-ATP5A1 组细胞,使用 BCA 法测定各组细胞中总蛋白浓度,并按照 ATP 检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司)说明书中的操作要求进行检测,以总蛋白浓度为参照计算各组细胞中 ATP 相对含量。

1.7 各组细胞的葡萄糖消耗量和乳酸生成量检测

取 T24 细胞、T24R 细胞、T24R-si-NC 组细胞、T24R-si-ATP5A1 组细胞、5637 细胞、5637R 细胞、5637R-si-NC 组细胞和 5637R-si-ATP5A1 组细胞的培养基上清液。分别按照葡萄糖和乳酸检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司)说明书进行操作,使用酶标仪检测荧光强度,检测葡萄糖消耗量时于 510 nm 波长处测定吸光度值,检测乳酸生成量时于 480 nm 波长处测定吸光度值,而后计算各细胞的葡萄糖消耗量与乳酸生成量。

1.8 MTT 法检测各组细胞对吉西他滨的敏感性

将 T24 细胞、T24R 细胞、T24R-si-NC 组细胞、T24R-si-ATP5A1 组细胞、5637 细胞、5637R 细胞、5637R-si-NC 组细胞和 5637R-si-ATP5A1 组细胞接种于 96 孔板中(5×10^3 个/孔),加入不同浓度的吉西他滨(0、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 mg/L)处理 48 h。然后每孔加入 20 μL MTT 工作液,孵育 4 h 后加入 150 μL DMSO,振荡溶解 10 min 后于 490 nm 波长处测定吸光度值,并通过 GraphPad Prism 软件计算各组细胞对吉西他

滨的 IC_{50} 。

1.9 平板克隆形成实验检测各组细胞在吉西他滨处理下的增殖能力

将 T24 细胞、T24R 细胞、T24R-si-NC 组细胞、T24R-si-ATP5A1 组细胞、5637 细胞、5637R 细胞、5637R-si-NC 组细胞和 5637R-si-ATP5A1 组细胞接种于 6 孔板中(5×10^2 个/孔),细胞贴壁 24 h 后将培养基更换为含 1 mg/L 吉西他滨的完全培养基,此后每 3 d 更换含相同浓度吉西他滨的新鲜培养基,持续培养 14 d。当显微镜下观察细胞克隆 ≥ 50 个时,采用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min,0.5% 结晶紫染液(含 20% 甲醇)覆盖性染色 30 min,经 PBS 充分洗去浮色后室温干燥,采集图像并计算各组的克隆形成数量。

1.10 统计学处理

使用 GraphPad Prism 10.1.12 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据比较采用独立样本 t 检验;多组数据比较采用单因素方差分析,若总体差异有统计学意义,则进一步采用 Tukey's HSD 法进行事后多重比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 T24R 和 5637R 细胞株的建立与鉴定

经过 6 个月左右的逐步诱导,成功获得能够在 0.5 mg/L 吉西他滨当中稳定生长的耐药细胞株 T24R 和 5637R。MTT 法检测结果显示,T24 细胞对吉西他滨的 IC_{50} 为 0.11 mg/L,T24R 细胞的 IC_{50} 为 (5.14 ± 0.21) mg/L,耐药指数为 46.21;5637 细胞对吉西他滨的 IC_{50} 为 0.65 mg/L,对 5637R 细胞的 IC_{50} 为 (3.66 ± 0.33) mg/L,耐药指数为 5.64。显微镜下观察结果显示,T24R 和 5637R 细胞形态较亲本细胞更加细长,呈现间质样改变,见图 1。

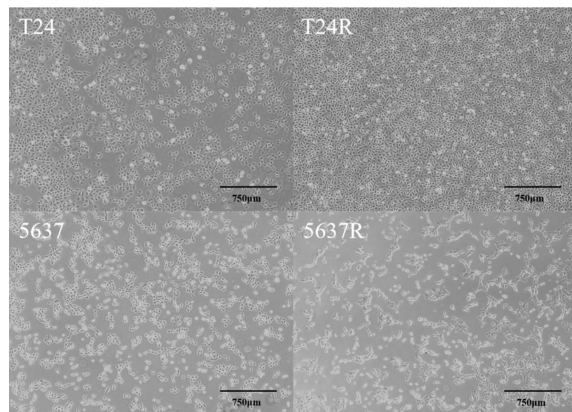


图 1 T24R 和 5637R 细胞及其相应亲本细胞的形态比较(放大 40 倍)

2.2 T24R 和 5637R 细胞及其相应的亲本细胞中 ATP5A1 mRNA 与蛋白的表达水平比较

RT-qPCR 技术和 WB 实验结果显示,T24 和 T24R 细胞中 ATP5A1 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.00 、 1.82 ± 0.21 ,ATP5A1 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.00 、 4.18 ± 0.18 ,T24R 细胞上述指标均显著高于 T24 细胞($t=18.52$ 、 10.96 , $P<0.01$)。5637 和 5637R 细胞当中 ATP5A1 mRNA 的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.00 、 1.50 ± 0.02 ,ATP5A1 蛋白的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.00 、 2.46 ± 0.55 ,5637R 细胞上述指标均显著高于 5637 细胞($t=6.14$ 、 7.37 , $P<0.01$),见图 2。

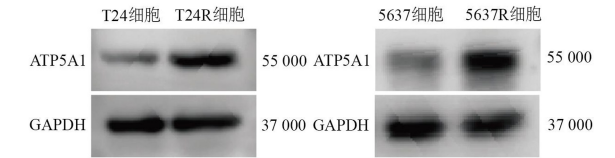


图2 T24R 和 5637R 细胞及其相应亲本细胞中 ATP5A1 蛋白表达水平的比较

2.3 T24R 和 5637R 细胞及其相应亲本细胞的 ATP 合成对氧化磷酸化和糖酵解依赖性的比较

使用寡霉素处理后,T24R 细胞中 ATP 相对含量显著低于 T24 细胞($t=6.71$, $P<0.001$),5637R 细胞当中 ATP 的相对含量显著低于 5637 细胞($t=6.89$, $P<0.001$);使用 2-DG 处理以后,T24R 细胞中 ATP 相对含量显著高于 T24 细胞($t=5.89$, $P<0.01$),5637R 细胞中 ATP 相对含量显著高于 5637 细胞($t=5.12$, $P<0.01$);寡霉素与 2-DG 联合处理后,T24R 和 5637R 细胞与其相应亲本细胞中 ATP 相对含量均无显著差异($P>0.05$)。见表 1。

表1 T24R 和 5637R 细胞及其相应亲本细胞在不同代谢抑制条件下 ATP 相对含量比较(n=3,x±s)

处理条件	T24 细胞	T24R 细胞	5637 细胞	5637R 细胞
寡霉素	0.65 ± 0.05	0.42 ± 0.04	0.68 ± 0.04	0.46 ± 0.04
2-DG	0.41 ± 0.04	0.64 ± 0.05	0.43 ± 0.04	0.60 ± 0.05
寡霉素+2-DG	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01

2.4 各组细胞线粒体功能相关指标比较

单因素方差分析结果显示,T24 细胞、T24R 细胞、T24R-si-NC 组细胞和 T24R-si-ATP5A1 组细胞中 ATP 相对含量、葡萄糖消耗量和乳酸生成量均有显著差异($F=32.15\sim45.23$, $P<0.01$),5637 细胞、5637R 细胞、5637R-si-NC 组细胞和 5637R-si-ATP5A1 组细胞中上述指标也均有显著差异($F=23.97\sim29.84$, $P<0.01$)。进一步两两比较结果显示,与 T24 细胞相比,T24R 细胞中 ATP 相对含量

显著升高,葡萄糖消耗量和乳酸生成量显著减少($q=10.24\sim12.59$, $P<0.01$);与 T24R-si-NC 组相比,T24R-si-ATP5A1 组细胞当中 ATP 相对含量显著降低,葡萄糖消耗量和乳酸生成量显著回升($q=7.77\sim12.73$, $P<0.01$);此外,与 5637 细胞相比,5637R 细胞中 ATP 相对含量显著升高,葡萄糖消耗量和乳酸生成量显著减少($q=9.82\sim10.63$, $P<0.01$);而与 5637R-si-NC 组细胞相比较,5637R-si-ATP5A1 组细胞中 ATP 相对含量显著降低,葡萄糖消耗量和乳酸生成量显著回升($q=6.58\sim8.01$, $P<0.01$)。见表 2。

表2 各组细胞的线粒体功能相关指标比较(n=3,x±s)

细胞类型/组别	ATP 相对含量	葡萄糖消耗量(X/%)	乳酸生成量(X/%)
T24 细胞	1.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
T24R 细胞	1.82 ± 0.12	62.35 ± 5.18	58.47 ± 4.93
T24R-si-NC 组	1.80 ± 0.11	63.02 ± 4.95	59.13 ± 4.70
T24R-si-ATP5A1 组	0.78 ± 0.05	87.30 ± 4.50	87.70 ± 5.10
5637 细胞	1.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
5637R 细胞	1.65 ± 0.09	68.12 ± 4.46	63.29 ± 4.11
5637R-si-NC 组	1.63 ± 0.08	68.95 ± 4.30	64.02 ± 4.00
5637R-si-ATP5A1 组	1.14 ± 0.06	92.00 ± 3.92	88.60 ± 4.35

2.5 各组细胞对吉西他滨的敏感性比较

MTT 实验结果显示,T24R-si-NC 组、T24R-si-ATP5A1 组细胞对吉西他滨的 IC₅₀ 分别为(5.21 ± 1.23)、(3.66 ± 0.62)mg/L,两组比较差异有显著性($t=7.55$, $P<0.05$);5637R-si-NC 组、5637R-si-ATP5A1 组细胞对吉西他滨的 IC₅₀ 分别为(3.78 ± 0.66)、(2.26 ± 0.85)mg/L,两组比较差异有显著性($t=4.23$, $P<0.05$)。

2.6 各组细胞在吉西他滨处理下增殖能力比较

平板克隆形成实验的结果显示,T24、T24R、T24R-si-NC 组和 T24R-si-ATP5A1 组细胞的克隆形成数量分别为(102 ± 7)、(215 ± 5)、(143 ± 8)、(32 ± 4)个。与 T24 细胞相比,T24R 细胞的克隆形成数量显著增加($t=34.28$, $P<0.01$);与 T24R-si-NC 组相比,T24R-si-ATP5A1 组细胞的克隆形成数量显著减少($t=56.55$, $P<0.01$)。5637、5637R、5637R-si-NC 组和 5637R-si-ATP5A1 组细胞的克隆形成数量分别为(166 ± 8)、(218 ± 2)、(115 ± 6)、(77 ± 3)个。与 5637 细胞相比,5637R 细胞的克隆形成数量显著增加($t=36.79$, $P<0.01$);与 5637R-si-NC 组相比较,5637R-si-ATP5A1 组细胞的克隆形成数量则显著性减少($t=47.77$, $P<0.01$)。详见图 3。

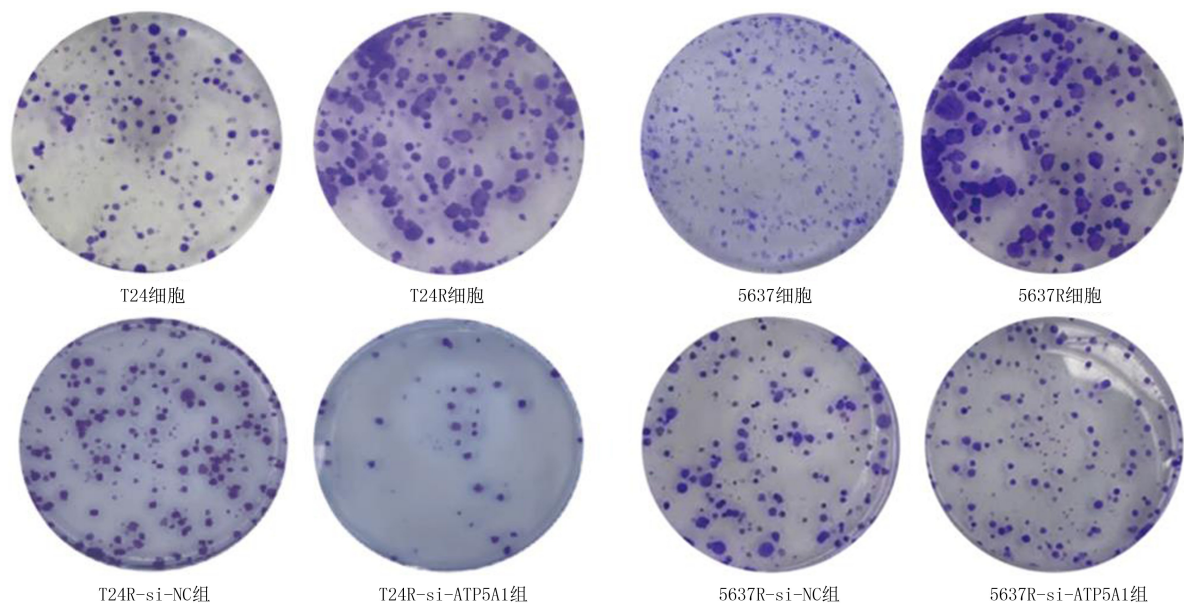


图 3 各组细胞在吉西他滨处理下的克隆形成数量比较

3 讨 论

以吉西他滨为基础的化疗是对于肌层浸润性膀胱癌的标准辅助治疗手段,但固有和获得性耐药常导致治疗失败和肿瘤进展^[13-14]。肿瘤化疗耐药机制复杂,涉及细胞药物外排、代谢解毒、DNA 损伤修复及凋亡逃逸等^[4-5]。近年来,代谢重编程在肿瘤细胞耐药中的作用备受关注^[15]。线粒体作为细胞能量代谢的中心,其功能状态直接影响肿瘤细胞的存活能力和化疗敏感性^[16]。ATP5A1 是线粒体复合物 V 的结构亚基,在细胞的 ATP 合成中发挥关键作用^[9]。相关研究发现,ATP5A1 在不同肿瘤类型当中的表达模式存在差异。在肾透明细胞癌中,包括 ATP5A1 在内的多数 ATP 合酶亚基均表达下调,可能与缺氧诱导的肿瘤细胞代谢重编程有关^[17];而在胶质母细胞瘤中,ATP5A1 和 ATP5B 则呈现高表达状态,其机制可能与肿瘤组织中微血管增殖相关^[18]。这些结果提示 ATP5A1 的作用具有组织特异性,其功能可能取决于肿瘤的代谢背景和微环境特征^[19]。目前,ATP5A1 在膀胱癌吉西他滨耐药中的表达情况和具体功能尚不明确。本文通过构建吉西他滨耐药膀胱癌细胞系,系统性检测耐药细胞中 ATP5A1 的表达情况,以及细胞线粒体功能和对吉西他滨的敏感性,探讨 ATP5A1 在膀胱癌化疗耐药中的作用。

本研究首先观察到,吉西他滨耐药膀胱癌细胞 T24R 和 5637R 中 ATP5A1 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著上调,且敲低 ATP5A1 后耐药细胞对吉

西他滨的敏感性明显恢复,提示 ATP5A1 高表达是吉西他滨膀胱癌耐药的一个显著特征,两者可能存在因果关系。ATP5A1 作为 ATP 合酶的核心亚基,其表达水平直接影响线粒体 ATP 合成效率^[20]。膀胱癌耐药细胞中 ATP5A1 的高表达,可能反映了其独特的代谢适应需求,因此本研究进一步探究了上述耐药细胞的代谢特征。结果显示,与亲本细胞相比,T24R 和 5637R 细胞中基础 ATP 含量升高,葡萄糖消耗量和乳酸生成量减少,提示氧化磷酸化增强、糖酵解减弱。分别使用寡霉素和 2-DG 进行处理后发现,耐药细胞的 ATP 合成更依赖氧化磷酸化,而亲本细胞的 ATP 合成更依赖糖酵解,证明膀胱癌细胞产生耐药性后,其能量代谢过程对氧化磷酸化依赖性增强。这种代谢转换模式并非吉西他滨耐药膀胱癌所特有。研究表明,在顺铂耐药膀胱癌中,细胞色素 c 氧化酶 I 翻译激活因子驱动的氧化磷酸化增强,参与肿瘤干细胞特性的维持^[21];乳腺癌化疗耐药细胞也同样表现出线粒体呼吸的增强^[22];此外,与急性髓系白血病亲本细胞相比,化疗后耐药的残留细胞的代谢对氧化磷酸化依赖性显著增强^[23]。这种跨瘤种的代谢趋同现象提示,氧化磷酸化增强是肿瘤细胞在化疗压力下的普遍适应性策略,其通过高效产生 ATP 满足耐药状态下的高能量需求^[24]。本研究中,吉西他滨耐药膀胱癌细胞采取了与上述研究一致的代谢转变,即由糖酵解向氧化磷酸化的代谢表型转换。

在明确吉西他滨耐药膀胱癌细胞的代谢高度依赖氧化磷酸化的基础上,本研究探讨了 ATP5A1 在

其中发挥的作用。结果显示,敲低 *ATP5A1* 会导致吉西他滨耐药膀胱癌细胞线粒体功能受损、ATP 含量下降,同时对吉西他滨的敏感性恢复,结合之前的实验结果,提示 *ATP5A1* 可能通过维持线粒体氧化磷酸化功能参与膀胱癌细胞吉西他滨耐药的形。推测其中的机制,可能是因为 *ATP5A1* 作为 ATP 合酶的重要亚基,其高表达有助于提升复合物 V 的活性,从而促进 ATP 合成^[9]。另有相关研究显示 *ATP5A1* 可以通过调控 mTOR 信号通路影响细胞代谢^[10]。此外,*ATP5A1* 还具有 RNA 结合蛋白活性,能够参与肿瘤相关基因的可变剪接以及表达调控^[25],这为 *ATP5A1* 调控肿瘤细胞耐药的机制探索提供了新视角。

本研究存在一定局限性:首先,对线粒体功能的评估缺乏线粒体膜电位及透射电镜形态学等直接证据,有关氧化磷酸化增强这一结论的证据链有待加强;其次,本研究仅限于体外细胞水平,尚未阐明 *ATP5A1* 介导膀胱癌细胞吉西他滨耐药的具体信号通路,也缺乏动物模型实验的支持以及膀胱癌患者临床组织的验证。后续研究应针对上述方面,深入探究 *ATP5A1* 调控膀胱癌细胞吉西他滨耐药的分子网络,为临床转化提供更充分的依据。

综上所述,*ATP5A1* 在吉西他滨耐药膀胱癌细胞中高表达,高表达的 *ATP5A1* 可能通过维持线粒体氧化磷酸化功能参与膀胱癌细胞吉西他滨耐药的形。本研究揭示了 *ATP5A1* 作为靶向线粒体能量代谢调控节点在膀胱癌化疗耐药中的重要作用,为克服膀胱癌化疗耐药的策略研究提供了思路,但其作为治疗靶点的价值仍需进一步研究验证。

作者声明:所有作者均参与了研究设计及论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024,74(3):229-263.

[2] FILHO A M, BRIGANTI A, JEMAL A, et al. Bladder cancer incidence and mortality: A global overview and recent trends[J]. Eur Urol, 2026,89(5):426-436.

[3] JONES G, CLEVES A, WILT T J, et al. Intravesical gemcitabine for non-muscle invasive bladder cancer[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2021;6(6):CD009294.

[4] GALLUZZI L, SENOVILLA L, VITALE I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance[J]. Oncogene, 2012, 31

(15):1869-1883.

[5] DEBERARDINIS R J, CHANDEL N S. Fundamentals of cancer metabolism[J]. Sci Adv, 2016,2(5):e1600200.

[6] PASCALE R M, CALVISI D F, SIMILE M M, et al. The Warburg effect 97 years after its discovery[J]. Cancers, 2020, 12(10):2819.

[7] PORPORATO P E, FILIGHEDDU N, PEDRO J M B, et al. Mitochondrial metabolism and cancer[J]. Cell Res, 2018,28 (3):265-280.

[8] ANTONICKA H, LIN Z Y, JANER A, et al. A high-density human mitochondrial proximity interaction network[J]. Cell Metab, 2020;32(3):479-497.e9.

[9] ZHOU W, TANG Q L, WU J, et al. *ATP5A1* as a potential prognostic biomarker in clear-cell renal cell carcinoma[J]. Transl Cancer Res, 2025,14(2):1246-1264.

[10] WANG T, SUN F Z, LI C X, et al. MTA1, a novel ATP synthase complex modulator, enhances colon cancer liver metastasis by driving mitochondrial metabolism reprogramming[J]. Adv Sci (Weinh), 2023,10(25):e2300756.

[11] FERRUCCI V, LOMADA S, WIELAND T, et al. PRUNE1 and NME/NDPK family proteins influence energy metabolism and signaling in cancer metastases[J]. Cancer Metastasis Rev, 2024,43(2):755-775.

[12] ZHANG Y M, PAN R L, LI K, et al. HSPD1 supports osteosarcoma progression through stabilizing *ATP5A1* and thus activation of AKT/mTOR signaling[J]. Int J Biol Sci, 2024,20 (13):5162-5190.

[13] KANG H, SUH J, YOU D, et al. Risk factors for failing to complete gemcitabine-cisplatin neoadjuvant chemotherapy in muscle invasive bladder cancer patients[J]. Investig Clin Urol, 2024,65(3):256-262.

[14] KAWAHARA I, YOSHINO H, FUKUMOTO W, et al. Targeting metabolic reprogramming to overcome drug resistance in advanced bladder cancer: Insights from gemcitabine- and cisplatin-resistant models[J]. Mol Oncol, 2024, 18 (9):2196-2211.

[15] ROSOLEN D, NUNES-SOUZA E, MARCHI R, et al. MiRNAs action and impact on mitochondria function, metabolic reprogramming and chemoresistance of cancer cells: A systematic review[J]. Biomedicines, 2023,11(3):693.

[16] ZHAO Z, REN Y R, YUAN M J, et al. The molecular mechanisms of mitochondrial dynamics and mitophagy and their complex association with cancer drug resistance[J]. J Transl Med, 2025,23(1):1047.

[17] BRÜGGEMANN M, GROMES A, POSS M, et al. Systematic analysis of the expression of the mitochondrial ATP synthase (complex V) subunits in clear cell renal cell carcinoma[J]. Transl Oncol, 2017,10(4):661-668.

[18] XU G Y, LI J Y. *ATP5A1* and *ATP5B* are highly expressed in glioblastoma tumor cells and endothelial cells of microvascular proliferation[J]. J Neurooncol, 2016,126(3):405-413.

ting *cyclin E* expression *via* inhibition of the MAPK signaling pathway[J]. *Chronobiol Int*, 2023,40(7):903-917.

[22] GRAMMATOPOULOS T N, JONES S M, AHMADI F A, et al. Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan, reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra[J]. *Mol Neurodegener*, 2007,2:1.

[23] ZAWADA W M, BANNINGER G P, THORNTON J, et al. Generation of reactive oxygen species in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) treated dopaminergic neurons occurs as an NADPH oxidase-dependent two-wave cascade[J]. *J Neuroinflammation*, 2011,8:129.

[24] SONSALLA P K, COLEMAN C, WONG L Y, et al. The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril protects nigrostriatal dopamine neurons in animal models of Parkinsonism[J]. *Exp Neurol*, 2013,250:376-383.

[25] QUIJANO A, RODRIGUEZ-PEREZ A I, COSTA-BESADA M A, et al. Modulation of mitochondrial dynamics by the angiotensin system in dopaminergic neurons and microglia[J]. *Aging Dis*, 2024,16(5):3180-3203.

[26] ROSSI M, ABDELMOHSEN K. The emergence of senescent surface biomarkers as senotherapeutic targets[J]. *Cells*, 2021,10(7):1740.

[27] MARZULLO M, EL MAÏ M, FERREIRA M G. Whole-mount senescence-associated beta-galactosidase (SA-β-GAL) activity detection protocol for adult zebrafish[J]. *Bio Protoc*, 2022,12(13):e4457.

[28] NILMANI, D’COSTA M, BOTHE A, et al. CDK regulators-cell cycle progression or apoptosis-Scenarios in normal cells and cancerous cells[J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2023,135:125-177.

[29] GUPTA S. The p21 resilience network: A conceptual framework linking senescence to ferroptosis and cuproptosis resistance[J]. *NPJ Syst Biol Appl*, 2026,12(1):57.

[30] TU Z W, WANG X L, CAI H, et al. The cell senescence regulator p16 is a promising cancer prognostic and immune check-point inhibitor (ICI) therapy biomarker[J]. *Aging*, 2023,15(6):2136-2157.

[31] PAWGE G, KHATIK G L. p53 regulated senescence mechanism and role of its modulators in age-related disorders[J]. *Biochem Pharmacol*, 2021,190:114651.

[32] GUAN L H, CRASTA K C, MAIER A B. Assessment of cell cycle regulators in human peripheral blood cells as markers of cellular senescence[J]. *Ageing Res Rev*, 2022,78:101634.

[33] LI X D, YAN X, CHEN Q, et al. G1/S arrest: A key mechanism of cellular aging and replicative senescence[J]. *Biogerontology*, 2026,27(1):40.

[34] ROGER L, TOMAS F, GIRE V. Mechanisms and regulation of cellular senescence[J]. *Int J Mol Sci*, 2021,22(23):13173.

[35] JANELLE V, NEAULT M, LEBEL M È, et al. p16 regulates cellular senescence in PD-1-expressing human T cells[J]. *Front Immunol*, 2021,12:698565.

[36] CHEN M S, LEE R T, GARBERN J C. Senescence mechanisms and targets in the heart[J]. *Cardiovasc Res*, 2022,118(5):1173-1187.

[37] GRISON A, ATANASOSKI S. Cyclins, cyclin-dependent kinases, and cyclin-dependent kinase inhibitors in the mouse nervous system[J]. *Mol Neurobiol*, 2020,57(7):3206-3218.

[38] WANG T W, NAKANISHI M. Immune surveillance of senescence: Potential application to age-related diseases[J]. *Trends Cell Biol*, 2025,35(3):248-257.

[39] TIZAZU A M, TESSEMA E A, CEXUS O N. Targeting immunosenescence promotes clearance of senescent cells[J]. *Immun Ageing*, 2025,22(1):35.

[40] KAMATH T, ABDULRAOUF A, BURRIS S J, et al. Single-cell genomic profiling of human dopamine neurons identifies a population that selectively degenerates in Parkinson’s disease[J]. *Nat Neurosci*, 2022,25(5):588-595.

(本文编辑 耿波)

(上接第 225 页)

[19] GALBER C, ACOSTA M J, MINERVINI G, et al. The role of mitochondrial ATP synthase in cancer[J]. *Biol Chem*, 2020,401(11):1199-1214.

[20] NI R, ZHENG D, XIONG S D, et al. Mitochondrial calpain-1 disrupts ATP synthase and induces superoxide generation in type 1 diabetic hearts: A novel mechanism contributing to diabetic cardiomyopathy[J]. *Diabetes*, 2016,65(1):255-268.

[21] DENG M H, ZHOU Z H, CHEN J W, et al. Enhanced oxidative phosphorylation driven by TACO1 mitochondrial translocation promotes stemness and cisplatin resistance in bladder cancer[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025,12(5):e2408599.

[22] SIROIS I, AGUILAR-MAHECHA A, LAFLEUR J, et al. A unique morphological phenotype in chemoresistant triple-negative breast cancer reveals metabolic reprogramming and PLIN4 expression as a molecular vulnerability[J]. *Mol Cancer Res*, 2019,17(12):2492-2507.

[23] TABE Y, KONOPLEVA M. Resistance to energy metabolism-targeted therapy of AML cells residual in the bone marrow microenvironment[J]. *Cancer Drug Resist*, 2023,6(1):138-150.

[24] USLU C, KAPAN E, LYAKHOVICH A. Cancer resistance and metastasis are maintained through oxidative phosphorylation[J]. *Cancer Lett*, 2024,587:216705.

[25] YISA S B, FEI W M, YAXUN W M, et al. ATP5A1 participates in transcriptional and posttranscriptional regulation of cancer-associated genes by modulating their expression and alternative splicing profiles in HeLa cells[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2021,20:15330338211039126.

(本文编辑 李京蔓)