

文章编号:1004-7220(2017)05-0458-06

RalA 通过小窝蛋白-1 调节肿瘤细胞活性氧 自由基和三磷酸腺苷的生成

江莹, 李顺, 杨红, 吴春惠, 刘贻尧

(电子科技大学 生命科学与技术学院, 生物物理系, 成都 610054)

摘要: **目的** 通过研究 RalA 和 Cav-1 对癌细胞线粒体功能以及活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 和三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 生成的影响, 探讨 RalA 在癌细胞能量代谢中所起的调节作用, 且此作用可能通过影响 Cav-1 及小窝的运动性得以实现。 **方法** 首先使用 siRNA 抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株的 RalA 和 Cav-1 表达水平, 然后采用蛋白免疫印迹、共聚焦显微镜、荧光定量技术比较抑制前后细胞线粒体膜电位的变化以及 ROS、ATP 和糖酵解产物乳酸盐生成的改变。 **结果** (1) RalA 和 Cav-1 表达量降低直接引起线粒体膜电位的大幅下降。(2) RalA 和 Cav-1 的表达抑制导致 ATP 生成降低而 H_2O_2 的水平升高, 结合线粒体膜电位降低的结果, 观察到线粒体功能的紊乱。(3) 伴随线粒体功能的明显抑制, RalA 和 Cav-1 表达量降低的细胞中检测到了大量的糖酵解产物乳酸盐。 **结论** RalA 和 Cav-1 通过抑制线粒体功能, 提高糖酵解水平, 共同调节细胞的能量代谢转换。 RalA 的调节作用通过 Cav-1 得以实现, 并且这种调节作用可能与小窝的内吞及运动性有关。研究结果丰富了癌症能量代谢的研究, 为靶向癌症能量代谢紊乱的治疗方法提供了新的切入点。

关键词: RalA; 蛋白小窝蛋白-1; 能量代谢; 线粒体; 活性氧自由基

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2017.05.011

RalA regulates ROS and ATP production in cancer cells by association with cavelolin-1

JIANG Ying, LI Shun, YANG Hong, WU Chun-hui, LIU Yi-yao (*Department of Biophysics, School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China*)

Abstract: Objective By analyzing mitochondrial function, reactive oxygen species (ROS) and adenosine triphosphate (ATP) production under different levels of RalA and caveolin-1 (Cav-1) expression, to investigate the regulation role of RalA played in cancer metabolism and explore the possibility of its regulation role involved in Cav-1 and caveolae motility. **Methods** Firstly, RalA and Cav-1 expression were inhibited by siRNA in breast cancer cell line MDA-MB-231, and then the changes of mitochondrial membrane potential (MMP), ROS production, ATP generation and L-lactate level before and after inhibition were assessed by Western blotting, confocal microscope and fluorescence quantification. **Results** (1) The decreased RalA and Cav-1 expression led to a significant reduction of MMP directly. (2) Low RalA and Cav-1 expression resulted in an inhibition of ATP production and an increase of H_2O_2 generation. With the reduction of MMP, mitochondrial malfunction was observed. (3) With mitochondrial function suppression, an elevated level of glycolysis metabolite L-lactate was also detected in RalA and Cav-1 deprived cells. **Conclusions** RalA and Cav-1 mediate cellular metabolic switch by inhibiting mitochondrial function and simultaneously boosting glycolysis. This regulation role of RalA depends on its associ-

收稿日期:2017-02-04; 修回日期:2017-02-24

基金项目:国家自然科学基金项目(31470906, 11502049, 11272083)。

通信作者:刘贻尧,教授,博士研究生导师, E-mail: liuyiyao@uestc.edu.cn。

ation with Cav-1, and possibly is related to the endocytosis and motility of caveolae. The research findings enrich the cancer metabolic studies, and provide a novel approach for cancer therapeutic strategy targeted to cellular metabolism.

Key words: RalA; Caveolin-1 (Cav-1); Metabolism; Mitochondria; Reactive oxygen species (ROS)

属于 Ras 小 G 蛋白家族的 Ral 具有 RalA 和 RalB 两种同源异构体^[1],是细胞物质转运、细胞增殖、细胞迁移、细胞凋亡、癌症发生等信号途径的重要调节蛋白^[2]。Ral 由失活的 GDP 结合形式转化为活化的 GTP 结合形式需要鸟嘌呤核苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) 的参与,包括了 RalGDS、RGL、RGL2/Rlf、RGL3、RalGPS1、RalGPS2 等,而水解 GTP 致其失活主要有 RalGAP1 和 RalGAP2 两种蛋白^[3-4]。虽然氨基酸序列相似度高达 80% 以上,但 RalA 和 RalB 似乎执行不同功能^[5]。研究发现,RalA 主要参与锚定依赖的细胞生长、癌症发生与增殖,而 RalB 主要参与癌细胞的存活与转移^[6-8]。高水平的活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 的表达和异常的能量代谢是癌细胞恶性表型的重要特征^[9]。ROS 可活化 HIF (hypoxia-inducible factor)、NF- κ B (nuclear factor- κ B)、Nrf2、c-jun 等信号通路^[10],而这些信号途径的活化可以增加癌细胞的增殖迁移^[11]以及血源性转移等恶性能力^[12]。异常高水平的糖酵解的能量代谢为癌细胞增殖提供充分营养物质的同时,为肿瘤提供酸性微环境,保持肿瘤干细胞状态,提高癌细胞侵袭能力^[13]。研究表明,细胞小窝结构的支架蛋白小窝蛋白-1 (caveolin-1, Cav-1) 对癌细胞能量代谢和细胞 ROS 具有关键调节作用^[14]。同时,本课题组前期的研究发现,RalA 是小窝内化及运输的上游调节蛋白^[15]。因此,本文从细胞能量代谢和 ROS 生成的角度探讨 RalA 对癌细胞的影响以及这种影响是否通过 Cav-1 得以实现。

1 材料与方法

1.1 材料

所有试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司(美国),另述除外。高糖 DMEM 培养基(Corning 公司,美国),胎牛血清 FBS (HyClone 公司,美国),RalA 兔多克隆抗体(CST 公司,美国),Cav-1 兔多克隆抗体(BD 公司,美国),GAPDH 兔多克隆抗体(SCB 公司,美

国),HRP 二抗(KPL 公司,美国),CMXROS、ATP 检测试剂盒、Amplex Red 过氧化氢试剂盒(Invitrogen 公司,美国)。L-lactate 试剂盒(Cayman 公司,美国),Dharmafect 转染试剂(Dharmacon 公司,美国),ECL 发光试剂盒(Pierce 公司,美国),Protein A Agarose 珠(Pierce 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 MDA-MB-231 细胞培养 细胞培养于含 10% 胎牛血清,10 mmol/L HEPES, 50 U/mL 盘尼西林和 50 μ g/mL 链霉素的 DMEM 完全培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱内。

1.2.2 转染 MDA-MB-231 细胞胰酶消化,重悬,细胞计数并按 1×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板。培养 24 h 后,乱序 siRNA, RalA 和 Cav-1 siRNA 与转染试剂 DharmaPECT 混合,并加入到孔板中,每孔 siRNA 终浓度为 25 nmol/L。细胞继续培养 48 ~ 72 h 后可收集,为后续实验备用。

1.2.3 免疫共沉淀和蛋白免疫印迹实验 裂解细胞,提取细胞总蛋白,BCA 法测蛋白浓度,调节样品至总蛋白浓度一致。在样品中加入 2 ~ 5 μ g 的 Cav-1 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。取出样品加入 Protein A Agarose 珠子 10 ~ 20 μ L,冰上孵育 1 ~ 2 h,3 000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,弃上清,清洗珠子 5 ~ 10 次,每次 3 000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min。沉淀物中加入上氧缓冲液煮沸 5 min,采用下述蛋白免疫印迹 (Western blotting) 方法分析样品。

Western blotting 实验,样品制备之后采用 10% SDS 凝胶电泳分离,并电转移至 NC 膜上。5% 脱脂奶粉溶液封闭 1 h 后,加入 RalA, Cav-1 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。孵育二抗后,ECL 试剂盒显色,胶片扫描后结果由 Image J 软件进行灰度定量分析。

1.2.4 激光共聚焦显微观察 siRNA 处理后的细胞消化接种于玻璃底培养皿中,加入 CMXROS 溶液使其终浓度为 20 nmol/L,孵育 15 min, PBS 洗涤 3 次后于 Zeiss LSM710 激光共聚焦显微镜 (Zeiss 公司,德国)下进行观察并拍照。

1.2.5 ATP检测 采用ATP检测试剂盒测试细胞ATP生成。收集细胞并煮沸以裂解,4℃,14 000 r/min离心5 min,取上清,样品溶液各取10 μL加入到100 μL反应溶液中,读取560 nm荧光强度,对照标准曲线,计算各样品ATP值。

1.2.6 H₂O₂检测 采用Amplex Red过氧化氢试剂盒。混合Amplex Red试剂和HRP配成终浓度分别为100 μmol/L和0.2 U/mL的工作溶液。6孔板每孔加入300 μL工作溶液,37℃孵育30 min。96孔板每孔中加入100 μL反应溶液,检测530 nm/590 nm荧光强度。

1.2.7 糖酵解检测 采用Cayman L-lactate试剂盒。收集细胞,加入0.25 mol/L偏磷酸去蛋白质,4℃,10 000 g离心5 min收集上清,并加入25 μL碳酸钾中和偏磷酸,重复4℃、10 000g离心5 min,收集上清。于96孔板中每孔加入20 μL样品,20 μL辅因子混合溶液,20 μL荧光底物,100 μL反应溶液,最后加入40 μL混合酶溶液,室温孵育20 min,检测530 nm/590 nm荧光强度。

1.3 统计学分析

所有数据均采用ANOVA进行组间差异数据分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 表示差异具有高度统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA沉默后Cav-1和Rala的表达

乳腺癌MDA-MB-231细胞具有高水平的Rala和Cav-1表达。采用siRNA的方法降低Rala和Cav-1的表达水平,并用Western blotting实验检测siRNA处理之后的细胞目标蛋白的表达水平。结果显示,Rala和Cav-1 siRNA的转染效率很高,对目标蛋白的抑制率可分别高达90%和75%,并且siRNA显示了很好的特异性,在Rala抑制组中Cav-1的表达水平并未受到影响,反之亦然[见图1(a)]。此外,进行Rala和Cav-1的双敲除,达到了预期的抑制效果。为了证明Rala和Cav-1两者之间存在直接相互作用,采用免疫共沉淀(Co-IP)的方法,检测到在231细胞中两者的直接结合[见图1(b)]。

2.2 抑制Rala、Cav-1表达时线粒体膜电位变化

考察抑制Rala和Cav-1的表达对线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)的影响。

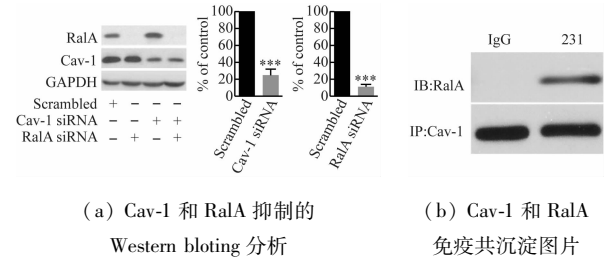


图1 Rala和Cav-1的抑制表达以及两者之间的相互作用

(*** $P < 0.001$)

Fig. 1 Down-regulation of Rala and Cav-1 and their Co-IP

(a) Cav-1 and Rala inhibition analyzed by Western blotting,

(b) Western blotting image of Co-IP between Rala and Cav-1

CMXROS与细胞孵育之后可跨膜标记线粒体,并且其累积程度与MMP成正比,检测CMXROS的荧光强度即可对比MMP的变化情况。当Rala与Cav-1表达水平受到抑制时,MMP明显降低,并且抑制Cav-1对MMP的影响强于Rala,然而同时抑制Rala和Cav-1时,MMP水平的变化与单独抑制Cav-1时没有明显差别,说明Rala对MMP的影响有可能是通过Cav-1得以实现的(见图2)。MMP的变化直接关系到线粒体ATP生成,故接下来研究Rala和Cav-1对ATP生成的影响。

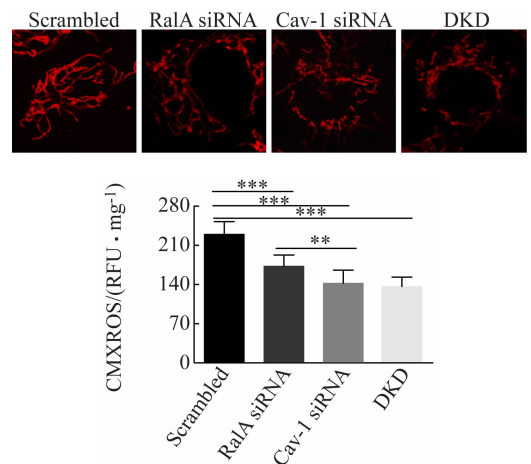


图2 Rala和Cav-1表达水平影响MMP

(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Fig. 2 MMP was influenced by Rala and Cav-1 levels

2.3 细胞ATP生成与Rala、Cav-1表达的关系

MMP水平可以显示线粒体的健康程度,与线粒体ATP生成呈正比。采用ATP检测试剂盒对细胞的ATP生成进行测试。检测结果与预期一致,即细

胞 ATP 的生成在抑制 RalA 和 Cav-1 表达的细胞中降低(见图 3)。这一结果也与 MMP 的结果相符。

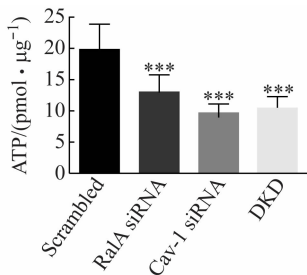


图3 抑制 RalA 和 Cav-1 表达水平降低 ATP 生成 (***) $P < 0.001$
Fig.3 ATP generation was inhibited by knockdown of RalA and Cav-1

2.4 RalA 与 Cav-1 共同调节细胞 ROS 表达

癌细胞 ROS 的水平与其恶性程度密切相关,而线粒体是细胞最主要的 ROS 来源。本课题组先前的研究表明,RalA 和 Cav-1 对 MMP 以及细胞 ATP 生成都具有调节作用。因此,考察两者是否也调节细胞 ROS 的表达。细胞 ROS 的一种主要形式是 H_2O_2 ,由于其易于被检测,在多数情况下 H_2O_2 的水平即代表了细胞 ROS 水平。采用 Amplex Red 过氧化氢试剂盒测试细胞的结果显示,RalA 和 Cav-1 对细胞 ROS 有抑制作用。当 RalA 和 Cav-1 表达水平降低的时候,细胞 H_2O_2 水平增加(见图 4)。同样地,同时抑制 RalA 和 Cav-1 时, H_2O_2 的表达与单独抑制 Cav-1 时没有明显差异,说明 RalA 对 ROS 的调节极有可能通过 Cav-1 得以实现。

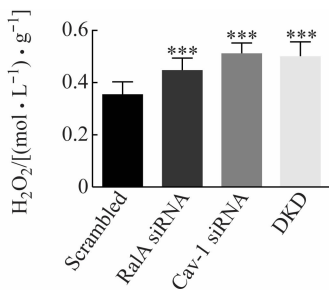


图4 RalA 和 Cav-1 siRNA 增加 H_2O_2 生成
(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Fig.4 H_2O_2 generation was increased by RalA and Cav-1 siRNA

2.5 低表达 RalA 和 Cav-1 的细胞糖酵解水平升高 癌细胞线粒体功能的抑制伴随糖酵解水平的提

高是其恶性表型的重要特征。抑制 RalA 和 Cav-1 下调了线粒体的功能,表现为 MMP 下降、ATP 生成降低以及 H_2O_2 大量产生。为进一步探讨细胞的糖酵解水平所受影响,通过检测细胞糖酵解产物乳酸盐的水平 L-Lactate 发现,RalA 和 Cav-1 抑制的细胞,其糖酵解水平大幅提高(见图 5),细胞能量代谢出现了明显的由线粒体氧化磷酸化的有氧代谢方式向无氧糖酵解方式转换的趋势。

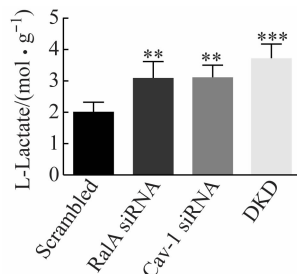


图5 抑制 RalA 和 Cav-1 增加细胞的糖酵解水平
(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Fig.5 L-Lactate production was increased by knockdown of RalA and Cav-1

3 讨论

线粒体是 ATP 合成的主要部位,是真核生物能量代谢的主要场所。电子在线粒体呼吸链多种复合物传递的同时,质子从线粒体基质泵入膜间隙,从而形成电化学梯度即 MMP,最终 ATP 合酶利用质子梯度的势能偶联合成 ATP。因而 MMP 对于线粒体功能的发挥以及 ATP 合成具有重要意义。本研究发现,RalA 和 Cav-1 调节线粒体 MMP,并且影响 ATP 生成。当采用 siRNA 的手段抑制 RalA 和 Cav-1 的表达水平时,细胞 MMP 分别下降 25% 和 39%,ATP 合成水平下降 35% 和 52% (见图 2、3),同时细胞 ROS 呈现上升的趋势(见图 4),故 Cav-1 对细胞能量代谢的改变强于 RalA。如果在抑制 Cav-1 的基础上同时对 RalA 进行双抑制,线粒体功能的改变与单独抑制 Cav-1 基本无异,因而认为,RalA 对细胞能量代谢的影响并非其独立完成,而是通过调控 Cav-1 实现。这些结果提示,RalA 和 Cav-1 可能是线粒体功能调节信号通路的上下游信号分子,而其中起关键作用并直接作用于线粒体的是 Cav-1。

Cav-1 属于小窝蛋白家族,在多种细胞中都有

大量表达,其作为支架蛋白组成的细胞膜上特化的小窝结构是细胞与胞外环境的媒介,承担大量的胞吞和胞吐的功能,并且还是细胞信号转导的平台,起到募集、活化、抑制多种信号因子的作用。虽然 Cav-1 大量表达于细胞膜,但 Cav-1 与线粒体之间的相互作用已被多篇文献报道。首先 Cav-1 被发现在线粒体具有表达^[16],其次一些特定的线粒体氧化磷酸化复合体以及 ATP 合酶也被发现存在于小窝结构^[17-18],蛋白组学研究也证实了 Cav-1 和线粒体两者之间的相互作用^[19]。关于 Cav-1 作为细胞能量代谢关键调节因子的报道也层出不穷。Cirri 等^[20]在针对肿瘤及肿瘤微环境的一系列研究中提出了“反瓦伯格效应”(Reverse Warburg Effect)的概念。他们发现,肿瘤基质成纤维细胞中 Cav-1 的表达量降低从而引起线粒体功能紊乱,由此产生的氧化胁迫状态使细胞能量代谢向糖酵解转移。糖酵解虽然是低效的 ATP 生成过程,但其代谢产生大量的乳酸盐和丙酮^[21],两者可以作为线粒体呼吸链的燃料供肿瘤细胞使用。因此,肿瘤基质细胞大量糖酵解的能量代谢方式实际上是肿瘤细胞提供了一个富集“营养”的微环境。不同于瓦伯格提出的肿瘤细胞自身出现大量糖酵解的方式,Pavlidis 等^[22]称这种肿瘤基质细胞糖酵解“哺育”肿瘤细胞的方式为“反瓦伯格效应”,而在这一过程中 Cav-1 起着决定性的作用。

基于前人对 Cav-1 与线粒体以及能量代谢之间关系的研究,本文希望探讨在乳腺癌细胞中 Cav-1 是否也有类似的调节作用。选用具有高转移侵袭能力的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株,这种细胞也有大量的 Cav-1 表达。结果显示,Cav-1 表达降低的乳腺癌细胞,线粒体功能也出现紊乱。结合糖酵解产物乳酸盐的检测结果,提示低水平的 Cav-1 促使细胞能量代谢重整,糖酵解可能占主导地位。然而对于 Cav-1 主导的能量代谢重整的具体机制,尚不明了。

本课题组前期研究发现,小 G 蛋白 RalA 直接与 Cav-1 相结合并且调节小窝的内吞与运输。抑制 RalA 的表达,Cav-1 依赖的内吞降低 80% 以上^[15]。并且 RalA 促进了 Cav-1 与细丝蛋白(filamen A, FilA)之间的相互作用,后者是小窝结构与细胞骨架结合,从而内吞、运输的关键。Fridolfsson 等^[23]在电镜下观察到小窝结构内吞并运动到线粒体与之相互

作用,如果 Cav-1 主导能量代谢重整有赖于小窝的内吞与运动,那么作为其上游调节蛋白的 RalA 也会参与到此过程中。因此,同时引入了 RalA,单独抑制 RalA 和 Cav-1 时,均观察到了线粒体功能紊乱以及糖酵解的异常。而当 Cav-1 受到抑制的情况下,再抑制 RalA,结果与仅存在 Cav-1 抑制时没有明显差别,证明 RalA 对线粒体和能量代谢的作用是通过 Cav-1 实现的。综合已发表的文献和之前的研究成果,RalA 主要作用于小窝的内吞与运动,故推测 Cav-1 不仅仅作为信号转导因子参与到线粒体功能和能量代谢调节中,其运动性也至关重要。这一结论涉及小窝结构与线粒体之间的相互作用。在心肌细胞中观察到了小窝结构与线粒体之间位置上的重合以及功能上的相互作用^[23]。而在其他类型的细胞中,两者直接的相互作用还鲜有报道。

本文的结论为 Cav-1 参与细胞能量代谢的方式开辟了一个新的篇章。后续研究将围绕 Cav-1 调节能量代谢的分子机制以及小窝结构与线粒体相互作用展开。小窝结构作为细胞与外界接触的信息交换的媒介场所参与线粒体功能调控,这也解释了细胞为何对外界环境具有极高的敏感性,并可根据环境的改变采取相应的能量代谢策略的问题。这是一个值得深入探讨的研究方向。尤其是在癌症研究方面,其能量代谢方式一直是研究热点之一,希望通过其独特的代谢方式发展靶向的高效治疗方案。而小窝结构以及 Cav-1 参与能量代谢调节的方式得以阐明,将会成为理想的治疗切入点。

参考文献:

- [1] CHARDIN P, TAVITIAN A. The ral gene: A new ras related gene isolated by the use of a synthetic probe [J]. EMBO J, 1986, 5(9): 2203-2208.
- [2] FEIG LA. Ral-GTPases: Approaching their 15 minutes of fame [J]. Trends Cell Biol, 2003, 13(8): 419-425.
- [3] NEEL NF, MARTIN TD, STRATFORD JK, *et al.* The Ral-GEF-Ral effector signaling network: the road less traveled for anti-ras drug discovery [J]. Genes Cancer, 2011, 2(3): 275-287.
- [4] SHIRAKAWA R, FUKAI S, KAWATO M, *et al.* Tuberosclerosis tumor suppressor complex-like complexes act as GTPase-activating proteins for Ral GTPases [J]. J Biol Chem, 2009, 284(32): 21580-21588.

- [5] KASHATUS DF. Ral GTPases in tumorigenesis: Emerging from the shadows [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319 (15): 2337-42.
- [6] CHIEN Y, WHITE MA. RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival [J]. *EMBO Rep*, 2003, 4(8): 800-806.
- [7] CHIEN Y, KIM S, BUMEISTER R, *et al.* RalB GTPase-mediated activation of the I κ B family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival [J]. *Cell*, 2006, 127(1): 157-170.
- [8] LIM KH, OHAYER K, ADAM SJ, *et al.* Divergent roles for RalA and RalB in malignant growth of human pancreatic carcinoma cells [J]. *Curr Biol*, 2006, 16(24): 2385-2394.
- [9] HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: The next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [10] SABHARWAL SS, SCHUMACKER PT. Mitochondrial ROS in cancer: Initiators, amplifiers or an Achilles' heel? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(11): 709-721.
- [11] 李莉, 熊妮娅, 张婧, 等. 肿瘤细胞间相互作用: Notch-1 信号转导与调控机制 [J]. *医用生物力学*, 2016, 31(2): 107-113.
- LI L, XIONG NY, ZHANG J, *et al.* Cancer cell-cell interaction: Notch-1 signaling pathway and its regulation mechanisms [J]. *J Med Biomech*, 2016, 31(2): 107-113.
- [12] 赵凤龙, 李莉, 杨红, 等. 整合素介导血源性转移中肿瘤细胞与宿主细胞相互作用规律的研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2014, 29(2): 180-187.
- ZHAO FL, LI L, YANG H, *et al.* Integrin-mediated tumor cell-host cell interaction during hematogenous metastasis and their regulatory mechanisms [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(2): 180-187.
- [13] LEE N, KIM D. Cancer Metabolism: Fueling more than just growth [J]. *Mol Cells*, 2016, 39(12): 847-854.
- [14] SOTGIA F, MARTINEZ-OUTSCHOORN UE, HOWELL A, *et al.* Caveolin-1 and cancer metabolism in the tumor microenvironment: Markers, models, and mechanisms [J]. *Annu Rev Pathol*, 2012, 7: 423-67.
- [15] JIANG Y, SVERDLOV MS, TOTH PT, *et al.* Phosphatidic acid produced by RalA-activated PLD2 stimulates caveolae-mediated endocytosis and trafficking in endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(39): 20729-20738.
- [16] LI WP, LIU P, PILCHER BK, *et al.* Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 7): 1397-1408.
- [17] CHATENAY-RIVAUDAY C, CAKAR ZP, JENO P, *et al.* Caveolae: Biochemical analysis [J]. *Mol Biol Rep*, 2004, 31(2): 67-84.
- [18] KIM BW, LEE CS, YI JS, *et al.* Lipid raft proteome reveals that oxidative phosphorylation system is associated with the plasma membrane [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2010, 7(6): 849-866.
- [19] MCMAHON KA, ZHU M, KWON SW, *et al.* Detergent-free caveolae proteome suggests an interaction with ER and mitochondria [J]. *Proteomics*, 2006, 6(1): 143-152.
- [20] CIRRI P, CHIARUGI P. Cancer associated fibroblasts: The dark side of the coin [J]. *Am J Cancer Res*, 2011, 1(4): 482-97.
- [21] BALLIET RM, CAPPARELLI C, GUIDO C, *et al.* Mitochondrial oxidative stress in cancer-associated fibroblasts drives lactate production, promoting breast cancer tumor growth: Understanding the aging and cancer connection [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(23): 4065-4073.
- [22] PAVLIDES S, TSIRIGOS A, VERA I, *et al.* Loss of stromal caveolin-1 leads to oxidative stress, mimics hypoxia and drives inflammation in the tumor microenvironment, conferring the "reverse Warburg effect": A transcriptional informatics analysis with validation [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(11): 2201-2219.
- [23] FRIDOLFSSON HN, KAWARAGUCHI Y, ALI SS, *et al.* Mitochondria-localized caveolin in adaptation to cellular stress and injury [J]. *FASEB J*, 2012, 26(11): 4637-4649.