

网络出版时间: 2021-05-14 16:34 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210513.1449.016.html>

苹果酸酶 2 乙酰化调控脑胶质瘤细胞增殖的机制

张成^{1,2}, 牛朝诗¹, 梅加明¹, 司文霞³, 魏祥品¹

摘要 目的 研究苹果酸酶 2 (ME2) 的乙酰化修饰在恶性脑胶质瘤细胞系 U87MG 增殖中的功能及其分子机制。方法

基于序列保守性并结合质谱数据库, 预测 ME2 的乙酰化修饰位点, 再构建点突变体, 转染细胞, 通过免疫沉淀 (IP) 和 Western blot 确定修饰位点; 通过 293T 细胞纯化 ME2 野生型和突变体, 检测乙酰化修饰对 ME2 酶活的影响; 通过共转染、富集纯化并结合酶活实验, 检测去乙酰化酶 Sirtuin3 (SIRT3) 对 ME2 酶活、细胞内活性氧 (ROS) 及 NADH 水平的影响; 在 U87MG 细胞中用 shRNA 敲低内源 ME2 后, 回转野生型和模拟乙酰化突变型, 检测 ME2 的乙酰化对细胞增殖的影响, 并通过裸鼠成瘤在动物水平验证; 通过 Western blot 在恶性脑胶质瘤临床样本中检测癌与癌旁组织中 ME2 的乙酰化水平差异。结果 K156 是 ME2 主要的乙酰化修饰位点, 该位点的乙酰化会抑制 ME2 活性并抑制 U87MG 细胞增殖。SIRT3 去乙酰化 ME2, 提高 ME2 活性, 促进 NADH 的生成, 降低细胞内 ROS 水平。结论 SIRT3 调控的 ME2 乙酰化修饰通过提高自身酶的活性, 上调细胞 NADH 水平, 降低 ROS 水平, 从而促进 U87MG 细胞增殖。

关键词 代谢酶; 乙酰化; 苹果酸酶; 脑胶质瘤

中图分类号 R 739.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)06-0920-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.016

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性肿瘤, 约占颅内肿瘤的半数以上, 恶性程度高, 易复发, 对放化疗不敏感, 治疗困难^[1]。近几年来, 人们对肿瘤细胞代谢的认识逐渐加深, 靶向肿瘤细胞代谢成为一种有前景的治疗策略^[2]。

苹果酸酶 2 (malic enzyme 2, ME2) 是苹果酸酶家族的一员, 定位于线粒体中。作为调控线粒体氧

化还原稳态的代谢酶, ME2 在包括脑胶质瘤在内的许多肿瘤中高表达^[3], 然而其作用机制并不清楚。研究^[4]指出乙酰化修饰在调控肿瘤细胞代谢中发挥关键作用^[4], 该研究旨在阐明 ME2 乙酰化修饰的分子机制及其在恶性脑胶质瘤增殖中的功能, 为进一步的体内研究提供支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 pCDNA3.1-HA 质粒、pCDNA3.1-Flag 质粒、shRNA 空载体质粒 pLKO.1 和慢病毒包装系统质粒 pMD2.G-pSPAX 由本实验室保存。

1.1.2 细胞 人脑星形胶质母细胞瘤细胞系 U87MG 和人肾上皮细胞系 293T 购自中国科学院上海细胞库。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清 (FBS) 及 DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司; 鼠抗人 Flag、HA、actin 抗体购自武汉 ABclonal 公司; 去乙酰化酶 Sirtuin3 (deacetylate Sirtuins 3, SIRT3) (#2627)、ME2 (#12399)、pan-AcK (#9441) 购自美国 cell signaling technology 公司; L-苹果酸、Flag 磁珠 (M2) 购自美国 sigma 公司; 转染试剂 lipo2000 购自美国 Thermo Fisher 公司; 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (#S0033)、CCK-8 试剂盒 (#C0038) 和 RIPA 细胞裂解液 (#P0013D) 购自上海碧云天公司。SIRT3 siRNA 序列: 5'-AAGUCUGGAAUGCCACUG-GTT-3', 由上海吉玛公司合成。ME2 shRNA 靶序列为 5'-GCACGGCTGAAGAAGCATATA-3', 连接于 pLKO.1-puro 载体上。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 U87MG 细胞置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养; 90% DMEM 培养基加入 10% FBS 配制完全培养基。

1.2.2 免疫沉淀 本研究主要涉及到的蛋白表达质粒包括 ME2 野生型 (WT) 和 ME2 突变体 (K156Q 和 K156R)。293T 细胞转染相应质粒 48 h 后, 加入 RIPA 细胞裂解液 (含蛋白酶抑制剂), 30 min 后, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液加入 15 μl Flag

2020-11-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (编号: 81902860); 安徽省自然科学基金 (编号: 1708085MH189)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属医院神经内科, 合肥 230001

² 阜阳市第五人民医院神经内科, 阜阳 236001

³ 湖北理工学院医学院湖北省肾脏疾病发生与干预重点实验室, 黄石 435000

作者简介: 张成, 男, 硕士研究生;

魏祥品, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

weixp_edu@126.com

beads, 于 4 °C 孵育过夜。再将 beads 用裂解液清洗 3 次(2 000 r/min 离心 2 min), 最后吸尽上清液, 加入 40 ~ 60 μ l 1 \times 上样缓冲液, 置于 95 °C 煮 10 min, 离心后, 样本可用于检测 ME2 的乙酰化修饰或蛋白相互作用, 或将样本冻存于 -80 °C。

1.2.3 Western blot 将蛋白样品上样后, 80 V 电泳 30 min, 转至 120 V 电泳至结束。湿转法将蛋白转至 PVDF 膜上, 将膜置于 5% 脱脂牛奶, 室温封闭 1 h。加入一抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次。加入二抗, 室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次。最后, 通过 ECL 化学发光显影, 并用凝胶成像系统拍照。

1.2.4 慢病毒包装和感染 在 10 cm 培养皿中铺 293T 细胞, 待密度 80% 左右时共转染 1 μ g pMD2.G、3 μ g pSPAX 和 4 μ g 目的质粒, 进行包装病毒。8 h 后换液, 36 ~ 48 h 后收含有病毒的细胞上清液, 离心后感染 U87MG 细胞。感染 48 h 后, 更换含有 2 μ g/ml 嘌呤霉素抗性的培养基, 筛选稳定过表达或者敲低的细胞系。

1.2.5 ME2 酶活检测 293T 细胞转染对应的质粒, 将 WT 或 K156R 突变体分别与 pCDNA3.1-Flag 空载体或 HA-SIRT3 质粒共转染。48 h 后, 将细胞裂解, 用 Flag 磁珠纯化 ME2 蛋白。将蛋白与 180 μ l 酶活反应液 (33 mmol/L KH_2PO_4 , 3.3 mmol/L MgCl_2 , 167 μ mol/L NAD^+ , 167 μ mol/L *L*-苹果酸) 混合。随即用酶标仪读取 340 nm 下的吸光度值, 每 30 s 测 1 次, 持续 30 min。计算每秒生成 NADH 的摩尔数 (μ mol NADH/s) 即为 ME2 相对活性。

1.2.6 ROS 水平检测 293T 细胞转染对应的质粒, control 组转染 pCDNA3.1-Flag 空载体质粒, ME2 组转染 Flag-ME2 质粒, ME2 + SIRT3 组转染 Flag-ME2 和 HA-SIRT3 质粒。48 h 后, 将细胞消化收集, 重悬于 PBS 中, 加入终浓度 20 μ mol/L 的荧光探针 DCFH-DA, 37 °C 孵育 20 min, 每隔 3 ~ 5 min 颠倒混匀。反应结束后, 用 PBS 清洗 3 次, 计数, 将酶标仪设置 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长, 读取细胞荧光值, 计算 ROS 相对水平。具体操作参考上海碧云天公司细胞 ROS 检测试剂盒说明书。

1.2.7 NADH 测定 U87MG 细胞内 NADH 含量通过 NAD (P) H-Glo Detection System (Promega G9072) 试剂盒测定。实验方法同 1.2.5 细胞裂解后离心分离上清液, 将上清液与酶活反应液混合, 随即用酶标仪读取 340 nm 下的吸光度值, 以每毫克蛋白对应测得的 NADH 量 (nmol/mg 蛋白) 反映胞内的 NADH 水平。

1.2.8 U87MG 细胞增殖 将处理后的 U87MG 细胞野生型或者 K156Q 突变型消化重悬后, 按照 2 000 个/100 μ l 加入 96 孔板, 同时设置无细胞空白对照组, 分别于第 1、2、3、4、5 天的时间点, 每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液, 于 37 °C 避光孵育 2 h 后, 用酶标仪读取 450 nm 的吸光度值 (OD_{450})。以时间为横坐标, 相对 OD 值为纵坐标, 绘制细胞增殖曲线。具体操作参考 CCK-8 检测试剂盒说明书。

1.2.9 裸鼠成瘤 购买 4 ~ 6 周龄的雌性 BALB/c-nu/nu 裸鼠, 将 U87MG 细胞野生型或者 K156Q 突变型消化处理后, 制成 1.0×10^7 个/ml 细胞悬液, 每只裸鼠注射剂量为 0.1 ml, 接种于裸鼠左侧腹部皮下建立裸鼠荷瘤模型。观察并测量记录成瘤情况, 直到第 22 天实验结束时停止。第 22 天时, 断颈处死裸鼠, 剥离肿瘤块, 拍照、称重。

1.2.10 临床样本检测 取实验室冻存的临床脑胶质瘤样本, 将癌和癌旁组织 (病变部位旁 2 cm 之外的组织区域) 分别研磨, 裂解提取蛋白, 用 ME2 的抗体进行免疫沉淀, 纯化 ME2 蛋白, 再通过 Western blot 检测 ME2 的乙酰化修饰。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计学分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本组间均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 K156 乙酰化对 ME2 催化活性的影响 通过检索质谱数据库并比较各物种 ME2 蛋白序列的保守性, 猜测 K156 位可能是 ME2 的乙酰化位点, 见图 1A。将 K156 位点突变成模拟乙酰化的 Q 和模拟去乙酰化的 R, 然后用泛乙酰化抗体检测修饰水平的变化, 结果如图 1B 所示: K156R 和 K156Q 突变体的乙酰化水平与野生型相比降低。因为乙酰化修饰往往参与调控代谢酶活性, 于是本研究检测了 WT 与 K156R 的活性, 结果显示 K156R 突变对酶的活性无显著影响, 而 K156Q 突变体活性降低, 差异有统计学意义 ($t = 17.94$, $P < 0.001$), 见图 1C。

2.2 SIRT3 去乙酰化 ME2 ME2 定位在线粒体中, 作为线粒体主要的去乙酰化酶, SIRT3 与 ME2 相互作用 (图 2A)。同时, 外源过表达 SIRT3 会降低 ME2 的乙酰化修饰水平 (图 2B), 而敲低 SIRT3 则提高 ME2 乙酰化修饰 (图 2C)。

2.3 SIRT3 对 ME2 催化活性及细胞内 ROS 水平的影响 为了研究 SIRT3 调控的 ME2 乙酰化在细胞内的生理功能, 将 SIRT3 与 ME2 共转染, 结果显

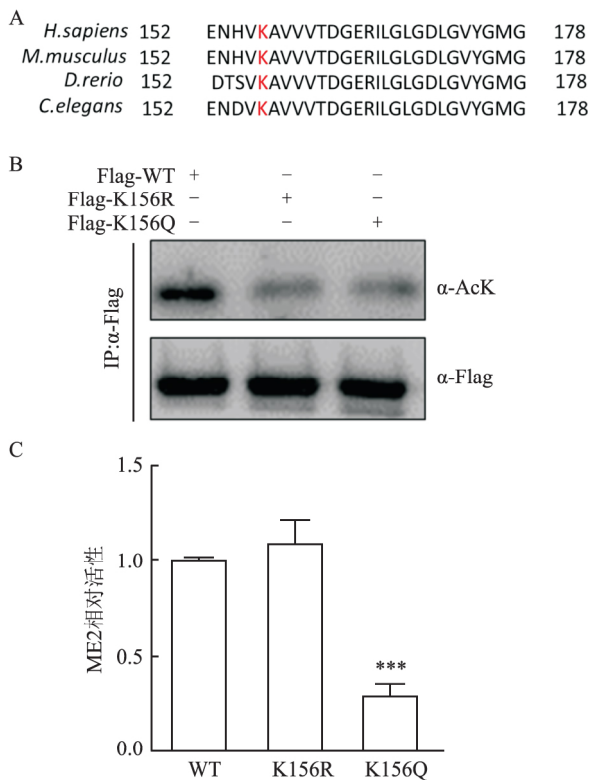


图1 ME2 乙酰化位点的鉴定及其对酶活的影响

A: 不同物种 ME2 蛋白序列比对(第 152 位至第 178 位氨基酸); *H. sapiens*: 人; *M. musculus*: 小鼠; *D. rerio*: 斑马鱼; *C. elegans*: 线虫; B: WT、K156R、K156Q 乙酰化水平检测; C: WT、K156R、K156Q 酶活水平检测; 与 WT 比较: *** $P < 0.001$

示 相较于 Control 组,过表达 SIRT3 提高了 WT 的活性($t = 11.33$, $P < 0.01$),而对 K156R 活性没有影响(图 3A),表明 K156 乙酰化负调控 ME2 活性。此外,因为 ME2 催化反应生成的 NADH 是细胞重要的还原力,相较于 WT 细胞内 ROS 和 NADH 水平,过表达 ME2 降低了细胞内的 ROS 水平($t = 9.98$, $P < 0.01$),提高了 NADH 水平($t = 4.31$, $P < 0.01$);而同时过表达 ME2 和 SIRT3 则进一步降低 ROS($t = 15.15$, $P < 0.01$),提高胞内 NADH 含量($t = 10.13$, $P < 0.01$),差异有统计学意义(图 3B、C)。

2.4 ME2 乙酰化修饰对恶性脑胶质瘤细胞增殖的影响 为了研究 SIRT3 调控的 ME2 乙酰化对 U87MG 细胞增殖的影响,在 U87MG 细胞中,通过包装病毒感染,敲低内源 ME2 之后,再外源表达 WT 和模拟乙酰化突变体 K156Q(图 4A)。回转 WT 的细胞增殖速率高于 K156Q 突变体(图 4B);通过裸鼠成瘤实验,皮下接种的 K156Q U87MG 细胞成瘤大小和质量小于野生型细胞($t = 7.238$, $P < 0.001$)(图 4C)。此外,通过对恶性脑胶质瘤的临床样本检测显示癌组织中的 ME2 乙酰化低于癌旁组织(图 4D)。

3 讨论

脑胶质瘤是最常见的原发性脑肿瘤,约 70% 的

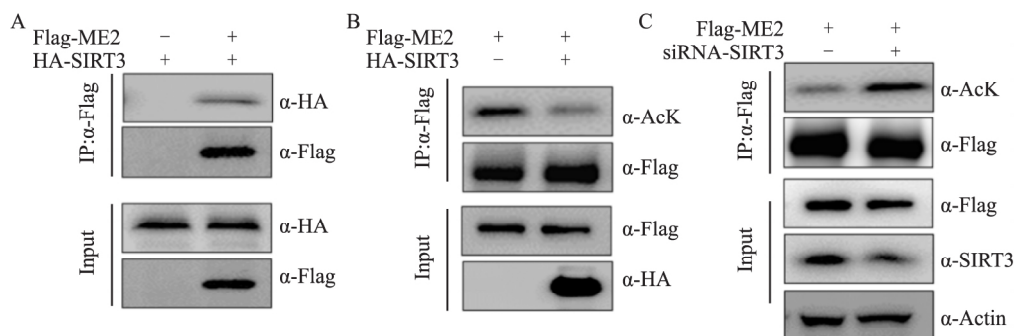


图2 SIRT3 与 ME2 的相互作用及对 ME2 乙酰化的影响

A: SIRT3 与 ME2 相互作用; B: 过表达 SIRT3 后检测 ME2 乙酰化水平; C: 敲低 SIRT3 后检测 ME2 乙酰化水平

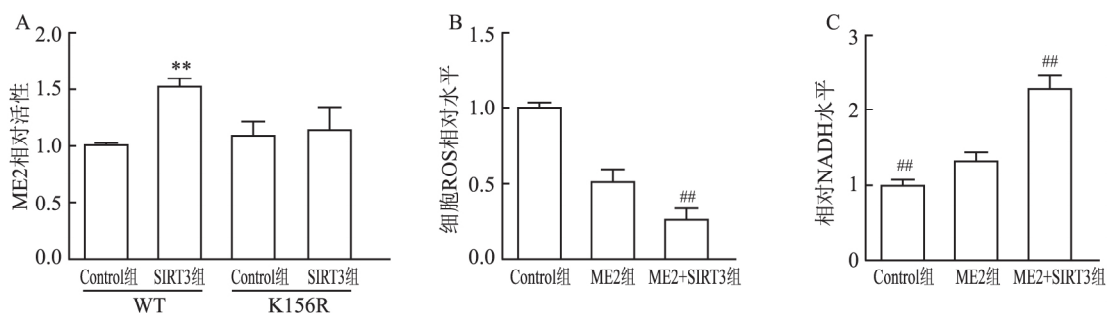


图3 SIRT3 对 ME2 活性和细胞 ROS 及 NADH 水平的影响

A: SIRT3 对 ME2 活性的影响; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; B: SIRT3 对细胞 ROS 水平的影响; C: SIRT3 对细胞 NADH 水平的影响; 与 ME2 组比较: ## $P < 0.01$

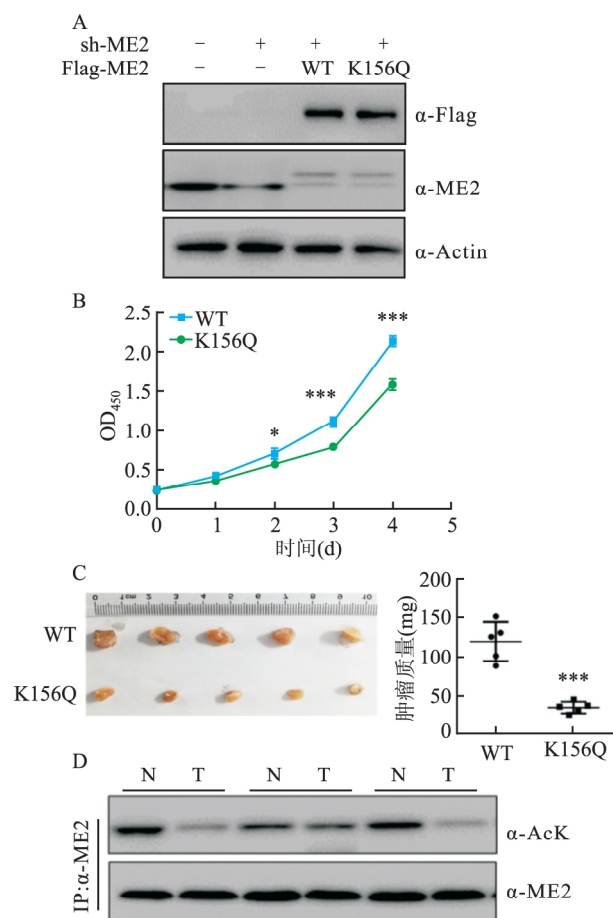


图4 ME2 乙酰化对 U87MG 细胞增殖的影响

A: U87MG 细胞敲低内源 ME2, 分别回转 WT 及 K156Q; B: WT 和 K156Q 重组后的 U87MG 细胞增殖; C: WT 和 K156Q 重组后 U87MG 细胞的裸鼠成瘤实验; D: 临床样本中检测癌与癌旁组织中 ME2 的乙酰化修饰, N: 癌旁组织; T: 癌组织; 与 WT 比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

成人脑肿瘤都是胶质瘤。在常规的外科手术以及放化疗干预下, 患者的 5 年生存率仍然很低^[5]。近十几年以来, 针对致癌信号通路中关键分子如 EGFR、VEGF、ERK 等的靶向药物在肿瘤的治疗中取得很大进展^[6-7]。然而, 在恶性脑胶质瘤尤其是多形性胶质母细胞瘤 (GBM) 患者中, 这些靶向药物有效时间短, 细胞易出现耐药性, 治疗效果有限^[8]。越来越多的证据表明肿瘤细胞通过代谢重编程以满足对高能量的需求, 协调细胞合成代谢和能量生成, 维持细胞的快速增殖。深入研究关键代谢酶在肿瘤发生发展中的作用将为开发靶向药物提供新的视角^[9]。

ME2 催化的反应将三羧酸循环中的苹果酸转化成丙酮酸, 同时产生的 NADH 是细胞内重要的还原力和能量来源。ME2 的高表达如何影响肿瘤进展的机制还不清楚。有报道^[10]指出 ME2 可以激活

AKT 通路, 促进细胞增殖。此外, 在 K562 细胞中敲低 ME2 会促进细胞凋亡, 抑制增殖和成瘤。同样, 在 U2OS 和 HCT116 细胞水平上, 沉默 ME2 可抑制细胞增殖^[11]。总的来说, 越来越多的证据支持 ME2 作为一个致癌因子, 促进肿瘤发生发展。值得注意的是, 已有报道^[12]初步筛选出针对 ME2 的小分子作为抗癌药物。

乙酰化作为一种重要的翻译后修饰, 在细胞核中通过动态调控染色体的紧密度影响多种基因的转录, 而在细胞质中大部分的代谢酶都存在乙酰化修饰, 调控其酶活及稳定性等^[13]。本研究表明 SIRT3 去乙酰化 ME2 (图 2), 提高其活性, 帮助细胞生成 NADH, 更好地清除 ROS (图 3), 维持细胞的氧化还原稳态。作为线粒体内最主要的去乙酰化酶, SIRT3 在维持线粒体稳态, 调控衰老、免疫、神经系统等方面发挥重要作用^[14]。而 SIRT3 在肿瘤中的功能一直不是很清楚, 促癌和抑癌的功能皆有报道^[15], 该研究也从 ME2 的角度暗示 SIRT3 是一个促癌因子。

综上所述, 该研究从乙酰化修饰的角度阐述了代谢酶 ME2 通过影响细胞 NADH 水平及 ROS 的清除, 从而调控 U87MG 增殖的分子机制, 有助于从代谢的视角深入认识脑胶质瘤的发生发展。该研究也从一定程度上说明通过上调 SIRT3, 降低 ME2 活性, 能达到抑制脑胶质瘤细胞增殖的目的。此外, 在动物模型和临床标本上的研究也进一步验证了 ME2 的乙酰化修饰抑制增殖的功能。后续的研究可围绕 ME2 K156 位点的乙酰化修饰制备特异性抗体, 对更多的临床样本进行检测, 研究该位点的修饰与恶性脑胶质瘤患者发展进程及预后的关系, 为恶性脑胶质瘤患者的诊断和治疗提供更多的思路。

参考文献

- [1] Louis D N, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary [J]. Acta neuropathologica, 2016, 131 (6): 803-20.
- [2] Pavlova N N, Thompson C B. The emerging hallmarks of cancer metabolism [J]. Cell Metabolism, 2016, 23 (1): 27-47.
- [3] Cheng C P, Huang L C, Chang Y L, et al. The mechanisms of malic enzyme 2 in the tumorigenesis of human gliomas [J]. Oncotarget, 2016, 7 (27): 41460.
- [4] Di Martile M, Del Bufalo D, Trisciuglio D. The multifaceted role of lysine acetylation in cancer: prognostic biomarker and therapeutic target [J]. Oncotarget, 2016, 7 (34): 55789-810.
- [5] Delgado-López P, Corrales-García E. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities [J]. Clin Transl On-

- col, 2016, 18(11): 1062–71.
- [6] Michaelsen S R, Poulsen H S, Hamerlik P. VEGF-C as a putative therapeutic target in cancer [J]. *Oncotarget*, 2019, 10(40): 3988.
- [7] Weisberg E, Meng C, Case A, et al. Evaluation of ERK as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia [J]. *Leukemia*, 2020, 34(2): 625–9.
- [8] McKinney A, Lindberg O R, Engler J R, et al. Mechanisms of resistance to EGFR inhibition reveal metabolic vulnerabilities in human GBM [J]. *Mol cancer ther*, 2019, 18(9): 1565–76.
- [9] Vander Heiden M G, DeBerardinis R J. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology [J]. *Cell*, 2017, 168(4): 657–69.
- [10] Ren J G, Seth P, Clish C B, et al. Knockdown of malic enzyme 2 suppresses lung tumor growth, induces differentiation and impacts PI3K/AKT signaling [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5414.
- [11] Sarfraz I, Rasul A, Hussain G, et al. Malic enzyme 2 as a potential therapeutic drug target for cancer [J]. *IUBMB Life*, 2018, 70(11): 1076–83.
- [12] Wen Y, Xu L, Chen F L, et al. Discovery of a novel inhibitor of NAD(P)⁺-dependent malic enzyme (ME2) by high-throughput screening [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2014, 35(5): 674–84.
- [13] Drazic A, Myklebust L M, Ree R, et al. The world of protein acetylation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1864(10): 1372–401.
- [14] Ansari A, Rahman M S, Saha S K, et al. Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease [J]. *Aging cell*, 2017, 16(1): 4–16.
- [15] Torrens-Mas M, Oliver J, Roca P, et al. SIRT3: oncogene and tumor suppressor in cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2017, 9(7): 90.

Mechanism of malic enzyme 2 acetylation regulating the proliferation of glioma cells

Zhang Cheng^{1,2}, Niu Chaoshi¹, Mei Jiaming¹, et al

(¹Dept of Neurosurgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Dept of Neurosurgery, Fuyang Fifth People's Hospital, Fuyang 236001)

Abstract **Objective** To study the function and molecular mechanism of the acetylation of malic enzyme 2 (ME2) in the proliferation of malignant glioma U87MG cells. **Methods** Based on the conserved sequence and combined with the mass spectrometry database, the acetylation modification sites of ME2 were predicted, point mutants were constructed, transfected cells were transfected, and the modification sites were determined by IP and Western blot. The wild-type and mutant of ME2 were transfected into 293T cells and purified to detect the effect of acetylation on ME2 enzyme activity. The effects of deacetylase Sirtuins 3 (SIRT3) on the activity of ME2, ROS and NADH were detected through co-transfection, purification, combined with enzyme activity experiment. After knockdown of endogenous ME2 with shRNA in U87MG cells, the effects of ME2 acetylation on cell proliferation were detected by stable ectopic expressing wild type ME2 and mutant, which was verified at the animal level by tumor formation in nude mice. Western blot was used to detect the difference of the acetylation level of ME2 in the clinical samples of malignant glioma. **Results** Results showed that K156 was the main acetylation site of ME2, which inhibited the activity of ME2 and the proliferation of U87MG cells. SIRT3 deacetylated ME2, improved its activity, thus promoting the formation of NADH and reducing the intracellular ROS level. **Conclusion** SIRT3-deacetylated ME2 can promote the proliferation of U87MG cells by increasing the activity of its own enzymes, up-regulating the level of NADH and reducing the level of ROS.

Key words metabolic enzyme; acetylation; malic enzyme; glioblastoma