

网络出版时间: 2020-12-2 9:01 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201201.1526.001.html>

◇ 基础医学研究 ◇

谷氨酰胺转运蛋白 ASCT2 介导激活突变 Ptpn11(SHP2) 促进骨髓增殖性肿瘤的发生

马牧天, 谭振亚, 周园琴, 吴梦月, 郑红

摘要 目的 探索谷氨酰胺转运蛋白 ASCT2 对 SHP2 激活突变后致骨髓增殖性肿瘤(MPN)的影响,并且使用 ASCT2 抑制剂 L-谷氨酰基-4-硝基苯胺(GPNA)观察其能否抑制 MPN 的发病进程。方法 通过构建 Ptpn11^{E76K/+} Mx1-Cre⁺ 激活突变鼠 MPN 模型,分析正常小鼠和突变鼠细胞增殖能力、氨基酸及谷氨酸含量和细胞内糖酵解情况,对比 ASCT2 蛋白表达量和能量应激;使用 GPNA 处理小鼠,比较突变鼠和药物处理组 ASCT2 蛋白、能量应激通路中 p-mTOR 等蛋白表达量和对疾病发病的抑制情况。结果 Ptpn11^{E76K/+} Mx1-Cre⁺ 激活突变鼠谷氨酸及 ASCT2 蛋白表达量高,细胞增殖能力增强;抑制 ASCT2 蛋白功能后,MPN 的发病进展受阻。结论 ASCT2 的表达量与 SHP2 激活突变后致 MPN 的发病进程相关,抑制 ASCT2 能够有效抑制 SHP2 激活突变所致骨髓增殖性肿瘤的发病进程,显示 ASCT2 可能是治疗该类型疾病的有效靶点。

关键词 ASCT2 Ptpn11; 骨髓增殖性肿瘤; 激活突变

中图分类号 R 363.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)12-1815-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.12.001

骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasia, MPN)是一类以一种或几种骨髓细胞持续异常增殖为特征性疾病,被认为是髓系肿瘤的一种^[1]。在病理后期可转化为急性白血病。蛋白质酪氨酸磷酸酶 2(domain-containing protein-tyrosine phosphatase-2, SHP2)是一种由 Ptpn11 基因编码的非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶,在造血细胞的生长发育、增殖分化过程中起着十分重要的作用。多种类型的白血病患者体内存在 SHP2 蛋白的异常活化,因此,SH2 被认

为是白血病的原癌基因^[2-4]。谷氨酰胺转运蛋白 2(alanine-serine-cysteine transporter 2, ASCT2)是由 Slc1a5 基因编码的中性氨基酸载体,在多种癌症中可通过调节肿瘤细胞对谷氨酰胺的摄入来影响肿瘤的发病,抑制 ASCT2 的表达则可有效的抑制癌细胞的恶性增殖^[5-7],但血液系统疾病与 ASCT2 相关的报道很少,与 MPN 发病机制的关系研究尚不清楚。该研究通过构建 SHP2 激活突变鼠,观察 ASCT2 对 SHP2 激活突变后致骨髓增殖性肿瘤的调控作用,为临床治疗寻找新的靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 自实验小鼠体内分离的原代细胞,包括小鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, MSC): MSC (Ptpn11^{+/+}) 和 MSC (Ptpn11^{E76K/+});造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC): HSC (Ptpn11^{+/+}) 和 HSC (Ptpn11^{E76K/+})。

1.1.2 主要试剂 Western blot 实验抗体购自美国 Cell Signaling 公司; Glutamate Assay Kit 购自美国 Cell Biolabs 公司; DMEM、胰蛋白酶(Trypsin) 购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)、青链霉素混合溶液(双抗) 购自美国 Hyclone 公司; PBS 粉末、牛血清白蛋白(BSA) 购自美国 Sigma 公司;其他试剂和耗材均购自上海生物工程(生工)股份有限公司。

1.1.3 主要仪器 细胞培养箱(型号 ELCETRON CORPORATION)、酶标仪(型号 3001)、高速低温离心机(型号 MultifugeX1R) 购自美国赛默飞世尔科技公司;恒温磁力搅拌器(型号 79HW-1)、涡旋振荡器(型号 XH-89) 购自乐清成电器厂;倒置显微镜(型号 ECLIPSE TS100) 购自日本尼康公司;凝胶成像仪(型号 FC3) 购自美国普诺森公司;超声波细胞破碎仪(型号 JY92-2D) 购自宁波新芝科技公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物的构建 Ptpn11^{E76K/+} 突变鼠来自

2020-07-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81670097、81870085); 2019 年高校拔尖人才项目(编号: gxbjZD07); 安徽省高层次人才平台奖补助; 安徽医科大学“科研提升计划”(编号: 2019xkjT004); 安徽医科大学博士基金(编号: XJ2020019)

作者单位: 安徽医科大学病理生理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 马牧天,男,硕士研究生;

郑红,女,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: hzhen30@126.com

美国埃默里大学血液/肿瘤系瞿成奎教授惠赠; Mx1-Cre⁺小鼠(C57BL/6J品系)购自上海南方模式动物中心,于安徽医科大学基础医学院动物实验中心 SPF 级环境中饲养扩繁,于鼠龄 4~5 周鉴定后,对突变鼠(Ptpn11^{E76K/+} Mx1-Cre⁺)注射 PIPC 诱导。

1.2.2 骨髓细胞的提取 全程无菌操作,脊柱脱臼处死小鼠后,用 75% 乙醇浸泡小鼠消毒 3 min,自腹部将小鼠皮肤剪开并拨下下肢皮肤,选小鼠后肢自腕关节剪下,存放于无菌 PBS 中,将小鼠后肢转移至细胞间。将小鼠后肢自膝关节分开,并将骨头上的软组织与骨头分离干净,留下干净的腿骨,置于另一无菌培养皿中,并用 PBS 浸泡清洗。用 5 ml 注射器从小鼠腿骨两端钻孔,直至有落空感且针头进入骨内,使骨髓腔两端都与外界相连。吸取 1~2 ml 无菌 PBS 反复从腿骨两端冲洗骨髓腔,直至腿骨整体呈白色为止。将含有骨髓细胞的 PBS 转移至 EP 管中,吹打均匀后,800 r/min 转速离心 3 min,吸弃上清液,沉淀即为全骨髓细胞,可用完全培养基重悬细胞至培养皿中进行接种培养。

1.2.3 细胞分选与培养 HSC 采用流式分选获得; MSC 利用磁珠分选获得; MSC 培养于含 10% FBS 的 DMEM、含 1% 双抗青链霉素混合溶液中,置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中。

1.2.4 MTT 实验法 消化培养皿中的细胞,并用完全培养基溶液(含 10% FBS)配制成单个细胞悬液,计算细胞数。以每孔体积 180 μl、细胞数量 800~1 200 个,将细胞接种至 96 孔板,置于 37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养 1~2 d。每孔加入 20 μl MTT 溶液(PBS 溶液配制,5 mg/ml, pH 7.4),继续孵育 4 h 后,离心后弃去上清液。每孔加入 150 μl DMSO,置于 37 °C 环境下,震荡 10~20 min,使结晶充分溶解。在酶联免疫检测仪上使用 490 nm 波长,测定各孔吸光度(optical density, OD),并记录结果。

1.2.5 谷氨酸检测 将超纯水和 10 × 分析缓冲液按照 9:1 的比例稀释成 1 × 分析缓冲液。按照说明书制备反应混合物溶液,用 1 × 分析缓冲液调整荧光探针最终浓度为 100 μmol/L、HRP 最终浓度为 0.2 U/ml、谷氨酸氧化酶为 0.08 U/ml、谷氨酸丙酮酸转氨酶为 0.5 U/ml、L-丙氨酸为 200 μmol/L(反应混合物溶液可在 4 °C 环境中储存 1 d)。用 PBS 将细胞浓度调整为 1 × 10⁶~2 × 10⁶ 个/ml,转移细胞悬液至 1.5 ml EP 管中,冰上放置。使用超声波细胞破碎仪破碎 EP 管中的细胞(间隔 8 s,工作 3 s,

总时长 6 min)。将 L-Glutamate 标准品溶液以 1:10 的比例,用试剂盒中的 1 × 分析缓冲液稀释配制谷氨酸盐标准品,配制成的每孔 50 μl 体积的梯度浓度标准品(谷氨酸浓度分别为 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0 μmol/L)加到 96 孔板中。每孔中加入 50 μl 反应混合物溶液,充分混合后,用锡箔纸完全包裹 96 孔板,置于 37 °C 无光照环境下孵育 30~45 min。在酶联免疫检测仪上使用 590~600 nm 的波长,测定各孔 OD 值,并记录结果。

1.3 统计学处理 用 SPSS 20.0 统计分析软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ptpn11^{E76K/+} Mx1-Cre⁺ 激活突变鼠模型的构建 构建模型的原理是利用了生物基因的同源修复机制,基因修饰使得一条链上 76 位点 E 突变为 K 后的 Ptpn11 部分外显子序列插入小鼠 DNA 中,此 DNA 序列同时包含有一个 Neo 盒并连着一个 STOP 位点,并且在 Neo 盒和 STOP 位点的两端各有一个 LoxP 位点。此时在无 Cre 酶的诱导下,由于此序列中存在 STOP 位点,此 E76K 位点无法完整转录翻译,该条基因链上的突变 SHP2 基因无法表达。通过注射 PIPC 增加干扰素(IFN)的产生诱导 Mx1 启动子启动 Cre 重组酶的表达,作用于插入 DNA 序列中 LoxP 位点,定向切除 Neo 盒和 STOP 位点,使得 E76K 突变的 Ptpn11 可以完全成功转录翻译而诱导 Ptpn11 激活突变表达,见图 1A,特异性地在转基因小鼠的造血系统及间充质干细胞中实现了 Ptpn11^{E76K} 基因的表达,此时突变小鼠体内 SHP2 蛋白得以正常表达,见图 1B,插入 DNA 序列中的 Neo 盒在骨髓细胞和间充质干细胞中约 96.1% 和 95.4% 被切除(*F* = 47.841、56.250, *P* < 0.001),见图 1C。

2.2 Ptpn11^{E76K/+} Mx1-Cre⁺ 激活突变鼠发生 MPN, HSC 体外增殖能力增强且依赖培养环境中的谷氨酰胺 突变小鼠 PIPC 注射结束约 40 d 后,可出现脾脏肿大至 0.42 g(正常 0.08 g)(*F* = 34.452, *P* < 0.01),见图 2A。骨髓及脾脏中髓系细胞增多(*F* = 62.228、43.123, *P* < 0.01),见图 2B,显示已罹患 MPN。将 Ptpn11^{E76K/+} Mx1-Cre⁺ 突变小鼠和 Ptpn11^{+/+} Mx1-Cre⁺ 正常小鼠体内的 HSC 和 MSC 自骨髓中分离纯化,并进行体外培养。利用 MTT 法检测 HSCs 在体外的增殖能力可观察到,突

变小鼠体内的 HSCs 增殖能力强于正常小鼠,见图 2C,但将培养基去除谷氨酰胺后,突变小鼠的 HSCs 增殖能力反而会弱于正常小鼠,见图 2D,提示 $Pt-pn11^{E76K/+} Mx1-Cre^{+}$ 激活突变鼠 HSC 的体外高增殖能力依赖于外界环境中谷氨酰胺的含量。

2.3 $Pt-pn11^{E76K/+} Mx1-Cre^{+}$ 激活突变鼠体内谷氨

酰胺的含量和 ASCT2 的表达量 Western blot 技术检测激活突变鼠体内 ASCT2 的变化,突变小鼠骨髓细胞中 ASCT2 的表达高于正常小鼠,并且检测 $Pt-pn11^{+/+} Mx1-Cre^{+}$ 正常小鼠和 $Pt-pn11^{E76K/+} Mx1-Cre^{+}$ 激活突变鼠血清及细胞内的谷氨酰胺含量,显示突变小鼠血浆、骨髓细胞中谷氨酰胺含量高于正

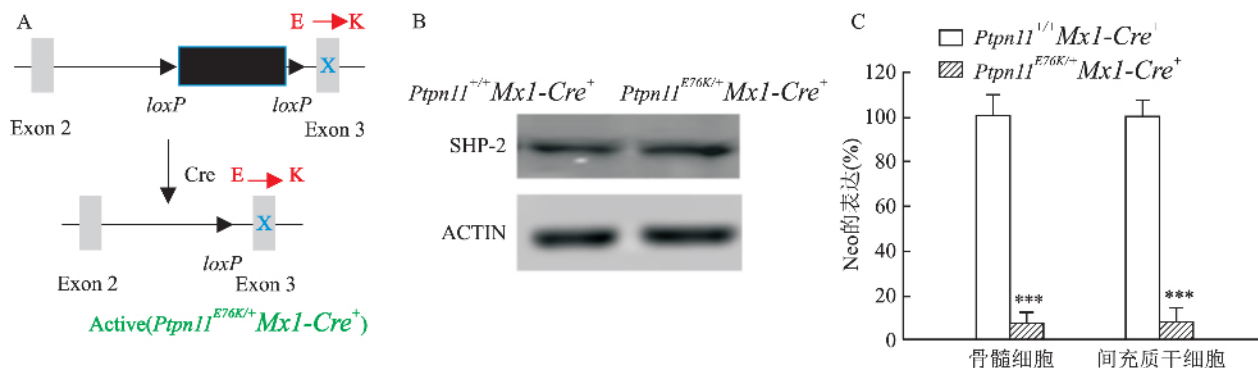


图1 成功构建 $Pt-pn11^{E76K/+} Mx1-Cre^{+}$ 激活突变鼠

A: 小鼠模型构建原理; B: PIP3 诱导后,2 组小鼠骨髓细胞 SHP2 蛋白表达情况; C: PIP3 诱导后,2 组小鼠骨髓细胞和间充质干细胞 DNA 中 Neo 的表达; 与 $Pt-pn11^{+/+} Mx1-Cre^{+}$ 比较: *** $P < 0.001$

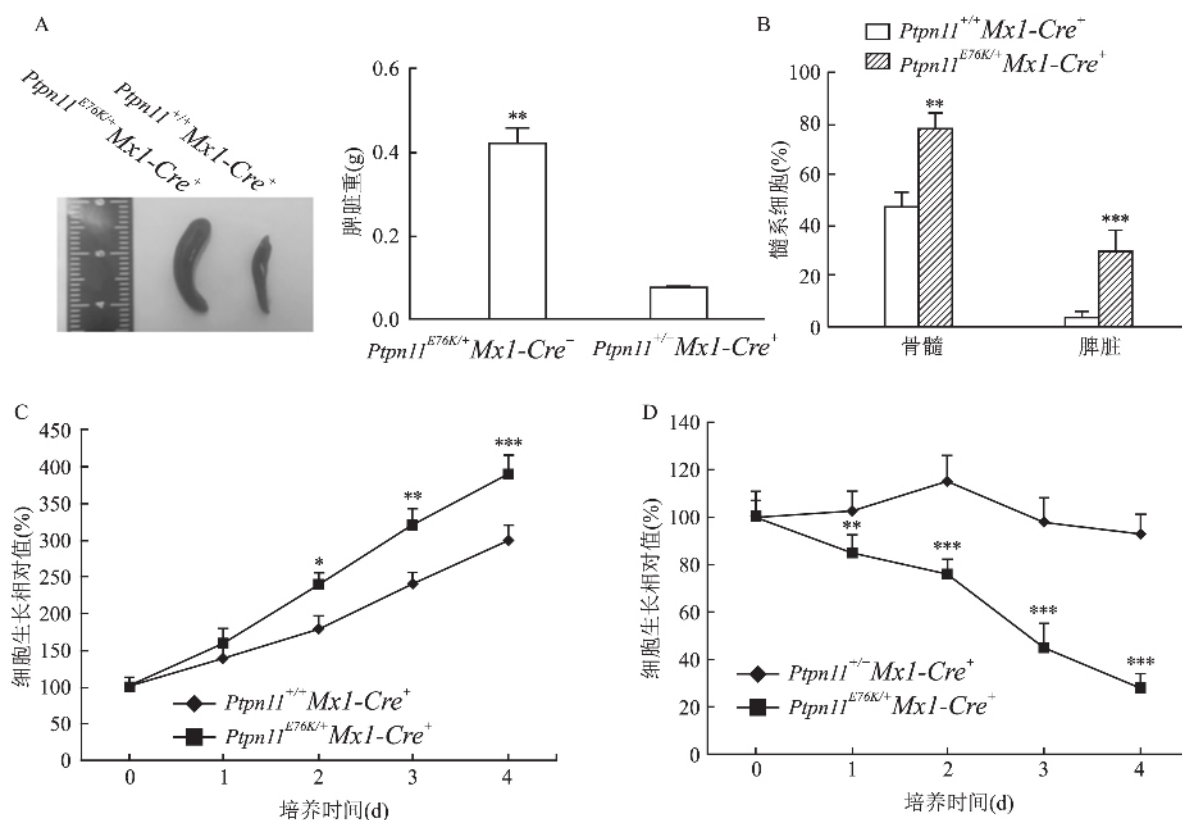


图2 $Pt-pn11^{E76K/+} Mx1-Cre^{+}$ 激活突变鼠细胞体外增殖能力高度依赖谷氨酰胺的浓度

A: 检测 2 组小鼠的脾脏大小; B: 流式细胞术检测 2 组小鼠骨髓及脾脏中成熟髓系细胞的比例; C: MTT 检测 HSC 的体外增殖能力; D: MTT 检测去除谷氨酰胺培养的 HSC 的体外增殖能力; 与 $Pt-pn11^{+/+} Mx1-Cre^{+}$ 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

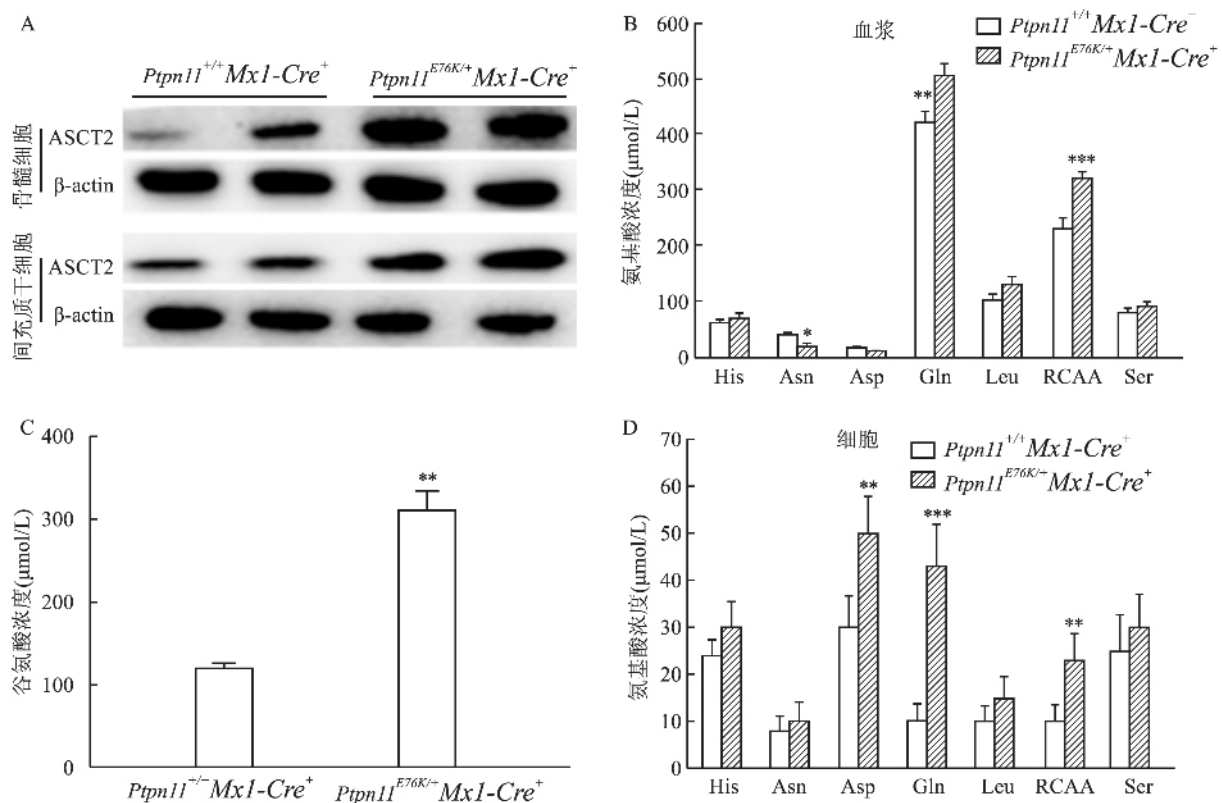


图3 *Ptpn11*^{E76K/+} *Mx1-Cre*⁺ 激活突变鼠的谷氨酰胺水平增高

A: Western blot 技术检测两组小鼠 MSC 和骨髓中 ASCT2 的表达; B: HPLC 检测两组小鼠血浆中的常见氨基酸水平; C: 检测两组小鼠 MSC 内的谷氨酸含量; D: HPLC 检测两组小鼠骨髓细胞内的氨基酸摄取水平; 与 *Ptpn11*^{+/+} *Mx1-Cre*⁺ 比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

常小鼠 ($F = 36.454, 65.243, P$ 均 < 0.01)。同时在构成骨髓微环境的 MSC 中, 激活突变鼠的谷氨酸是正常小鼠的 3 倍左右 ($F = 62.224, P < 0.01$)。由于谷氨酰胺是谷氨酸的转化前体和主要来源, 在其转化过程中谷氨酰胺被水解为谷氨酸和氨, 显示 SHP2 突变型白血病细胞为维持自我增殖的能量、氮源等需求, 对谷氨酰胺的摄取能力增强。见图 3。

2.4 *Ptpn11*^{E76K/+} *Mx1-Cre*⁺ 激活突变鼠的细胞能量代谢增强, 能量应激及增殖相关的常见信号分子表达增强 之前的实验证明, *Ptpn11*^{E76K/+} *Mx1-Cre*⁺ 激活突变鼠肿瘤模型 ASCT2 的表达增高, 而且大量摄入谷氨酰胺。检测两组小鼠 HSC 内代谢情况, 显示突变小鼠细胞上清液中乳酸水平是正常小鼠的 2 倍左右 ($F = 73.46, P < 0.001$), ATP 产生是正常小鼠 3 倍到 5 倍左右 ($F = 36.25, 54.237, P < 0.001$)。反映其糖酵解能力增强, 见图 4A、B。同时利用 Western blot 技术检测突变小鼠体内相关蛋白的表达水平, 表明突变小鼠骨髓细胞内 p-mTOR、p-AKT、p-ERK 表达

增强, p-mTOR/p-S6 信号通路也增强, 见图 4C。

2.5 抑制 ASCT2 对谷氨酰胺的摄取, 可遏制 *Ptpn11*^{E76K/+} *Mx1-Cre*⁺ 激活突变鼠 GPNA 是较为常见的 ASCT2 拮抗抑制剂, 它可以通过与 ASCT2 竞争性结合抑制细胞对谷氨酰胺的摄取。将 *Ptpn11*^{E76K/+} *Mx1-Cre*⁺ 激活突变鼠随机分成两组, 分别为实验组和抑制处理组: 在对两组小鼠注射 PIPC 诱导完成后, 抑制处理组立即注射 GPNA 溶液, 实验组不做处理, 持续 4 周, 观察两组小鼠的情况。注射 GPNA 的处理组小鼠其脾脏小于未注射的小鼠 ($F = 34.230, P < 0.01$), 而且其细胞内谷氨酸含量少于实验组 ($F = 23.440, P < 0.01$)。见图 5A、B。利用 Western blot 技术检测 2 组小鼠体内相关蛋白的表达水平, 表明抑制 ASCT2 后, 其体内 p-mTOR 表达降低, 显示 p-mTOR 信号通路活性被抑制, 见图 5C。HE 染色显示注射 GPNA 溶液的处理组小鼠骨髓、脾脏、肺部和肝中炎性细胞浸润减轻, 显示其 MPN 的发病进程被抑制。

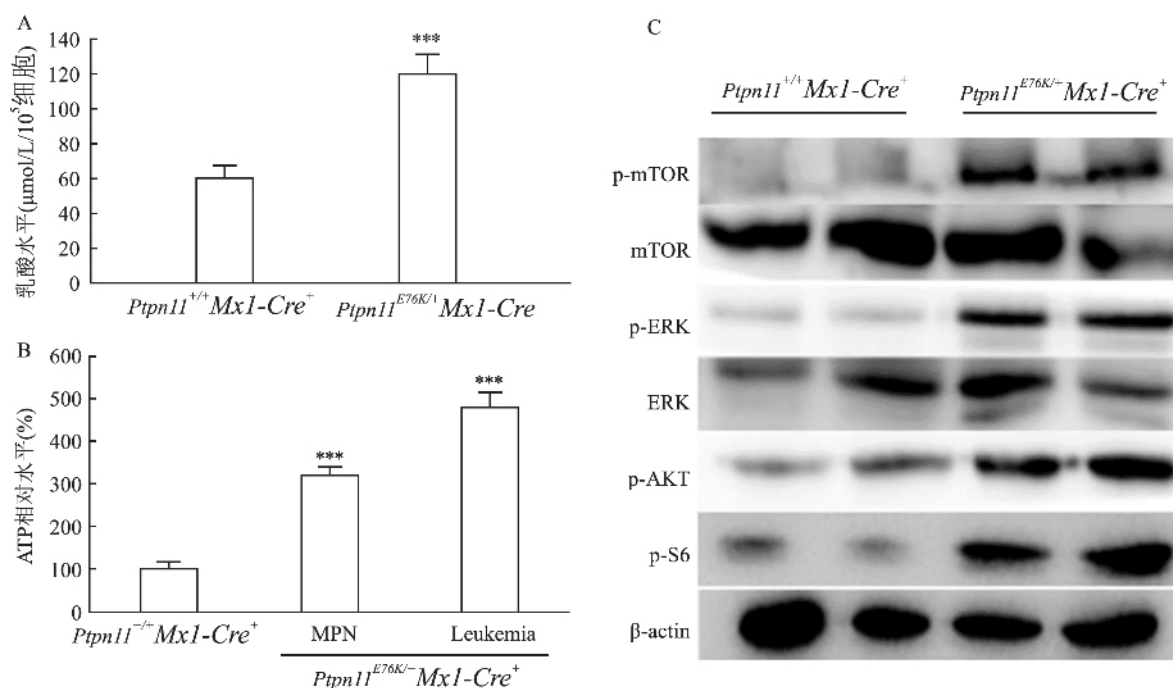


图4 *Pttn11*^{E76K/+} *Mx1-Cre*⁺ 激活突变鼠细胞的能量代谢增强, 细胞增殖相关信号表达增强

A: 检测两组小鼠的 HSC 中乳酸含量; B: 检测两组小鼠 HSC 中 ATP 产量; C: Western blot 技术检测小鼠体内信号分子的表达水平; 与 *Pttn11*^{+/+} *Mx1-Cre*⁺ 比较: *** $P < 0.001$

3 讨论

细胞代谢重构是各种肿瘤细胞普遍的特征^[8-9], 细胞分化和生长之间的平衡通常与新陈代谢有关, HSCs 的代谢调控日益受到关注。正常 HSC 必须定居在骨髓中低氧、低营养物质的环境中通过激活糖酵解来保持静息状态^[10-12]。在增殖和自我更新的过程中, 需要葡萄糖、脂肪酸以及氨基酸三大营养物质的代谢提供 ATP 供能。而肿瘤细胞主要依赖葡萄糖和谷氨酰胺。当葡萄糖的代谢途径主要依靠糖酵解产生 ATP 时, 谷氨酰胺就成为增殖期细胞(包括肿瘤细胞)的关键的能量来源, 它通过代谢可以转化为 α -酮戊二酸, 进入 Krebs 循环不仅为细胞提供 ATP, 还为大分子合成提供前体物质。但谷氨酰胺必须通过载体的转运才能进入细胞内, 其中载体 ASCT2 起重要作用。ASCT2(*Slc1a5* 基因编码) 是一个广谱的中性氨基酸载体, 主要转运谷氨酰胺、丙氨酸、丝氨酸和半胱氨酸等, 为细胞代谢提供重要的营养底物^[13-14]。虽然对谷氨酰胺载体 ASCT2 的生理学功能进行了大量的研究, 病理情况下, 尤其是在血液系统肿瘤中的调控作用相关研究并不多。关于 ASCT2 对 SHP2 激活突变后骨髓微环境及造血干细胞代谢的影响及功能调控, 目前尚

无报道。本课题探讨了 SHP2 激活突变后 ASCT2 对代谢的影响进而揭示其影响疾病发生发展的相关机制。

在低糖和谷氨酰胺缺乏的情况下, 干细胞会因为 ATP 的缺乏很快死亡^[15]。本研究显示 SHP2 激活突变后造血干细胞的体外增殖能力增强, 去除了培养基中的谷氨酰胺后, 增殖能力降低, 死亡增多, 表明突变细胞的增殖能力增强是谷氨酰胺依赖性的。同时突变鼠的骨髓细胞及间充质干细胞中检测到了高浓度的谷氨酰胺水平。进一步检测突变鼠的骨髓细胞及间充质干细胞中谷氨酰胺转运蛋白 ASCT2 的表达情况, ASCT2 的蛋白表达异常增高。

进一步检测突变鼠的代谢情况显示 ATP 产生量增加, 乳酸水平增高, 同时与细胞能量应激、增殖相关的 p-mTOR/ p-S6、p-AKT、p-ERK 信号分子表达增强。为了证实 ASCT2 对骨髓造血干细胞及其微环境代谢的影响及 SHP2 激活突变所致白血病的靶向调节作用, 课题组给突变小鼠腹腔注射 ASCT2 的抑制剂(GPNA), 显示相较于未处理的突变组, 抑制组小鼠的脾脏较小, 骨髓、脾脏、肺及肝脏等脏器中炎性细胞浸润减轻, 发生 MPN 及白血病的几率很少, 死亡率降低。同时与能量应激相关的 p-mTOR 信号分子也弱于未处理的突变组, 证实了谷氨酰胺

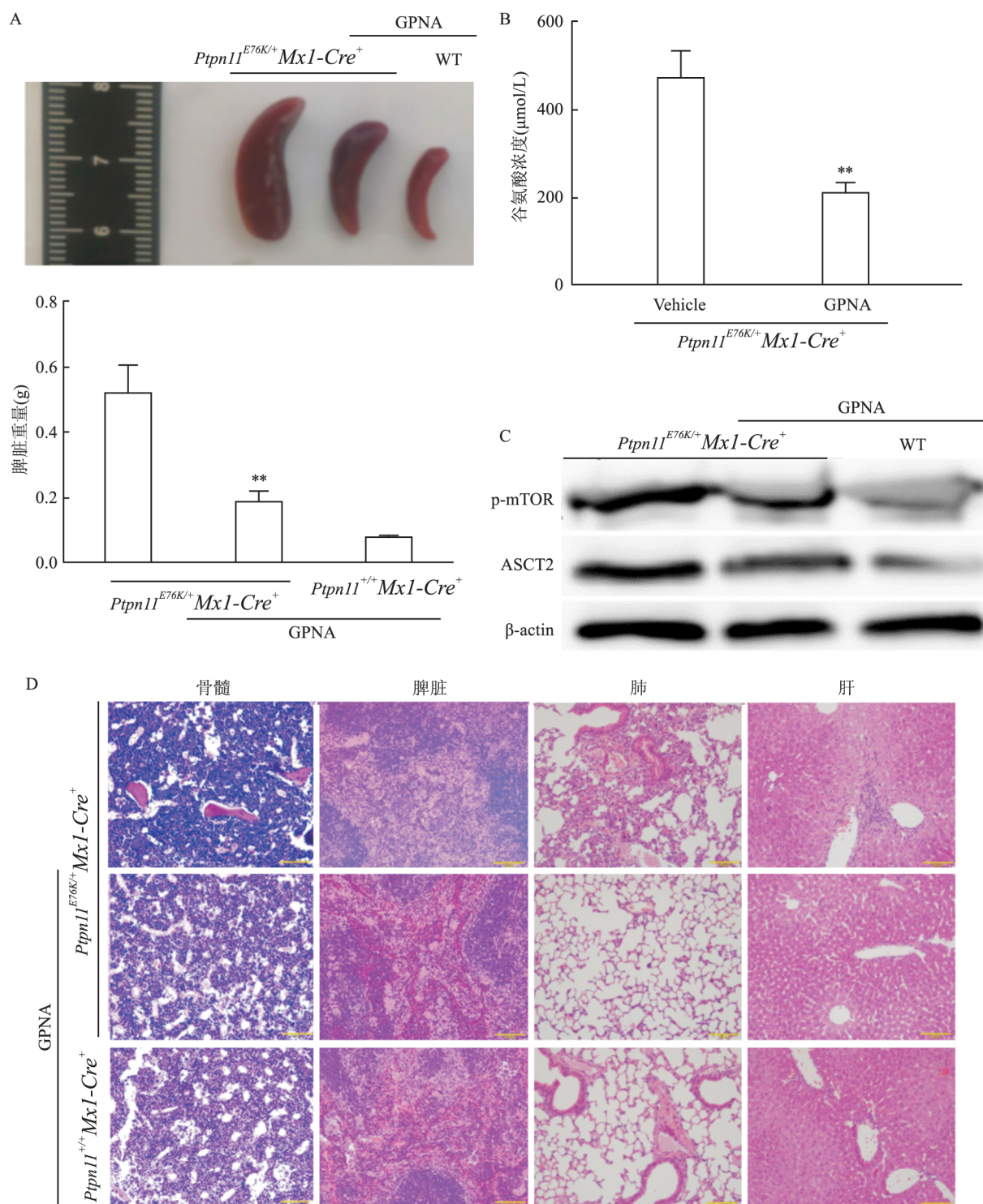


图5 抑制小鼠 ASCT2 蛋白功能,可抑制 MPN(和/或白血病)发病进程 ×20

A: 比较实验组小鼠和 ASCT2 抑制剂处理组小鼠的脾脏大小; B: 检测实验组和抑制剂处理组小鼠骨髓细胞中谷氨酸的含量; C: Western blot 技术检测实验组和抑制剂处理组小鼠体内信号分子的表达水平; D: HE 染色检测小鼠骨髓、脾脏、肝和肺部中炎性细胞的浸润情况; 与未处理组比较: ** $P < 0.01$

转运蛋白 ASCT2 在 SHP2 激活突变致骨髓增殖性肿瘤中的调控作用,提示 ASCT2 蛋白可能是一个新的治疗靶点。

参考文献

- [1] Kleppe M, Koche R, Zou L, et al. Dual targeting of oncogenic

- activation and inflammatory signaling increases therapeutic efficacy in myeloproliferative neoplasms [1]. *Cancer Cell*, 2018, 33(4): 785 – 7.
- [2] Bunda S, Burrell K, Heir P, et al. Inhibition of SHP2-mediated dephosphorylation of Ras suppresses oncogenesis [1]. *Nat Commun*, 2015, 6 : 8859.
- [3] Dong L, Yu W M, Zheng H, et al. Leukaemogenic effects of Ptpn11 activating mutations in the stem cell microenvironment [1]. *Nature*, 2016, 539(7628): 304 – 8.
- [4] Shen D, Chen W, Zhu J, et al. Therapeutic potential of targeting SHP2 in human developmental disorders and cancers [1]. *Eur J Med Chem*, 2020, 190: 112117.
- [5] van Geldermalsen M, Wang Q, Nagarajah R, et al. ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer [1]. *Oncogene*, 2016, 35(24): 3201 – 8.
- [6] Marshall A D, van Geldermalsen M, Otte N J, et al. ASCT2 regulates glutamine uptake and cell growth in endometrial carcinoma [1]. *Oncogenesis*, 2017, 6(7): e367.
- [7] Chiodi I, Picco G, Martino C, et al. Cellular response to glutamine and/or glucose deprivation in *in vitro* transformed human fibroblasts [1]. *Oncol Rep*, 2019, 41(6): 3555 – 64.
- [8] DeBerardinis R J, Thompson C B. Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us [1]. *Cell*, 2012, 148(6): 1132 – 44.
- [9] Hattori A, Tsunoda M, Konuma T, et al. Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukemia [1]. *Nature*, 2017, 545(7655): 500 – 4.
- [10] Oburoglu L, Romano M, Taylor N, et al. Metabolic regulation of hematopoietic stem cell commitment and erythroid differentiation [1]. *Curr Opin Hematol*, 2016, 23(3): 198 – 205.
- [11] Guo B, Huang X, Lee M R, et al. Antagonism of PPAR- γ signaling expands human hematopoietic stem and progenitor cells by enhancing glycolysis [1]. *Nat Med*, 2018, 24(3): 360 – 7.
- [12] Snoeck H W. Mitochondrial regulation of hematopoietic stem cells [1]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 49: 91 – 8.
- [13] Bolzoni M, Chiu M, Accardi F, et al. Dependence on glutamine uptake and glutamine addiction characterize myeloma cells: a new attractive target [1]. *Blood*, 2016, 128(5): 667 – 79.
- [14] Scalise M, Pochini L, Pingitore P, et al. Cysteine is not a substrate but a specific modulator of human ASCT2 (SLC1A5) transporter [1]. *FEBS Lett*, 2015, 589(23): 3617 – 23.
- [15] Chisom D A, Weinmann A S. Metabolites, genome organization, and cellular differentiation gene programs [1]. *Curr Opin Immunol*, 2018, 51: 62 – 7.

Glutamine transporter ASCT2 mediates activation mutation PTPN11 (SHP2) to promote the occurrence of myeloproliferative neoplasms

Ma Mutian, Tan Zhenya, Zhou Yuanqin, et al

(*Dept of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032*)

Abstract Objective To explore the effect of glutamine transporter ASCT2 on myeloproliferative neoplasms (MPN) induced by SHP2 activation mutation, and to observe whether ASCT2 inhibitor l-glutamyl-4-nitroaniline (GPNA) can inhibit the progression of myeloproliferative neoplasms. **Methods** By constructing MPN mice model induced by Ptpn11^{E76K/+} activated mutation, the cell proliferation ability, amino acid and glutamic acid content, intracellular glycolysis of normal mice and mutant mice were analyzed, and the expression of ASCT2 protein and energy stress were compared. The mice were treated with ASCT2 inhibitor (GPNA), and ASCT2 protein and energy stress were compared between mutant mice and treated groups. The expression of p-mTOR and related proteins in the energy stress pathway and the rescue effect of the disease were detected. **Results** Ptpn11^{E76K/+} Mx1-Cre⁺ activated mutant mice had high expression of glutamic acid, ASCT2 protein and strong cell proliferation ability; ASCT2 inhibitor decreased the progression of myeloproliferative neoplasms. **Conclusion** The expression level of ASCT2 is closely related to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms induced by SHP2 activated mutation. Inhibition of ASCT2 can effectively decrease the morbidity of myeloproliferative neoplasms, suggesting that ASCT2 may be an effective target for treating this type of disease.

Key words ASCT2 Ptpn11; myeloproliferative neoplasma; activating mutation