

# 低氧下氧化型ATM通过胞内柠檬酸累积促进人乳腺癌细胞的迁移和侵袭

万雪颖 彭美茜 秦旖璐 朱鹏鹏 乔伊娜 杨丽萍 曾欢 柳满然\*

(重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

**摘要** 该研究主要探讨低氧下共济失调毛细血管扩张突变(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)蛋白激酶活化通过糖代谢重塑对人乳腺癌MCF7及MDA-MB-231细胞迁移和侵袭的影响。构建靶向ATM基因的慢病毒载体(shATM)及其阴性对照病毒(shNC), 感染人乳腺癌MCF7和MDA-MB-231细胞, 建立ATM基因稳定沉默细胞系。实验设阴性对照组(shNC)、ATM基因沉默组(shATM)以及ATM特异性抑制剂KU60019处理组, 利用实时荧光定量PCR检测ATM下调效果; Western blot检测常氧及低氧下ATM、p-ATM、 $\gamma$ -H2AX、p-CHK2(T68)的蛋白表达水平, 利用伤口划痕愈合及Transwell实验分别检测细胞迁移和侵袭能力的改变, 用糖代谢相关试剂盒检测糖代谢过程中相关底物的变化。结果表明, 低氧处理12 h时(此时尚未发生DNA损伤), 人乳腺癌MCF7和MDA-MB-231细胞p-ATM(即氧化型ATM)表达量显著增加, 其迁移和侵袭能力增加。糖代谢改变表现为葡萄糖消耗量、丙酮酸产量、乙酰辅酶A产量明显高于乳酸生成量; 进而检测三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)产物, 发现与柠檬酸相比, 下游琥珀酸和延胡索酸产生了较大程度的累积。而shATM和KU60019细胞处理组能有效抑制p-ATM的表达量、细胞迁移和侵袭能力、葡萄糖消耗、丙酮酸产量、乙酰辅酶A产量, 但对于乳酸产量的抑制作用并不明显; TCA中柠檬酸的产量的降低程度明显大于其下游琥珀酸和延胡索酸的降低量。在低氧下, shATM细胞中补充外源性柠檬酸, 肿瘤细胞的迁移侵袭能力均得到一定程度回补。研究结果揭示, 低氧情况下, 氧化型ATM的表达量明显增加, 并通过胞内柠檬酸的累积促进人乳腺癌细胞的迁移和侵袭。

**关键词** 乳腺癌; 糖代谢; 氧化型ATM; 柠檬酸; 细胞迁移; 细胞侵袭

## Oxidized ATM Promotes Migration and Invasion of Hypoxic Breast Cancer Cells via Intracellular Citrate Accumulation

WAN Xueming, PENG Meixi, QIN Yilu, ZHU Pengpeng, QIAO Yina, YANG Liping, ZENG Huan, LIU Manran\*

(Key Laboratory of Medical Diagnostics of Ministry of Education, Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** This article was performed to investigate the effect of ATM (ataxia-telangiectasia mutated) protein kinase activation on the migration and invasion of human breast cancer cells (MCF7 and MDA-MB-231) via remodeling of glucose metabolism. MCF7 and MDA-MB-231 cells were infected with recombinant lentivirus vec-

收稿日期: 2019-11-20 接受日期: 2020-03-16

国家自然科学基金(批准号: 81472476)和2017年重庆市研究生科研创新项目(批准号: CYS17150)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 15111991149, E-mail: manranliu@cqmu.edu.cn

Received: November 20, 2019 Accepted: March 16, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81472476) and Chongqing Graduate Research and Innovation Project (2017) (Grant No.CYS17150)

\*Corresponding author. Tel: +86-15111991149, E-mail: manranliu@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5241>

tor (shATM) and its negative control (shNC) to establish cell lines of stable *ATM* gene silencing, and treated with KU60019 to downregulate the expression of p-ATM. All the cells were cultured in hypoxia (1% O<sub>2</sub>) or normoxia (21% O<sub>2</sub>). The expression of *ATM* mRNA was detected by quantitative Real-time PCR. The protein levels of ATM, p-ATM and DNA damage markers [ $\gamma$ -H2AX, p-CHK2(T68)] were evaluated by western blotting. The abilities of cell migration and invasion were separately analyzed by wound healing and transwell assay. The substrates related to glucose metabolism were measured according to instruction of reagent kits. Results showed that hypoxia (1% O<sub>2</sub> 12 h) induced the p-ATM expression without a notable effect of DNA damage. The DNA damage-independent ATM was called oxidized ATM. Moreover, cell migration and invasion abilities of hypoxic MCF7 and MDA-MB-231 significantly increased compared with corresponding normoxic cells. A moderate increased lactate was detected in cells after hypoxia treatment. However, remarkable enhanced glucose consumption, pyruvate production, acetyl-CoA production and lactic acid production were also observed in hypoxia. Furthermore, citrate had a greater accumulation than that of the downstream succinate and fumarate. After KU60019 treatment or *ATM* knockdown under hypoxia (1% O<sub>2</sub> 12 h), there were sharply decrease of p-ATM expression, the ability of cell migration and invasion, glucose consumption, pyruvate, acetyl-CoA production and citrate production, and a moderate reduce of lactate production, as well as no significant change of succinate and fumarate. The migration and invasion abilities of shATM cells were rescued by exogenous citrate treatment. The results showed that oxidized ATM significantly increased under the condition of hypoxia (1% O<sub>2</sub> 12 h), which promoted the migration and invasion of human breast cancer cells via intracellular citrate accumulation.

**Keywords** breast cancer; glucose metabolism; oxidized ATM; citrate; cell migration; cell invasion

乳腺癌仍是全球女性最常见的恶性肿瘤, 根据2018年统计数据, 乳腺癌发病率和死亡率均为女性癌症之首, 分别为24.2%和15.0%<sup>[1]</sup>。乳腺癌转移复发是患者死亡最主要原因。低氧是实体肿瘤重要的微环境之一, 其异质性促进肿瘤侵袭、转移、血管生成和药物抵抗等<sup>[2]</sup>。在乳腺癌中, 低氧在调控其恶性转移进展中起着重要作用<sup>[3]</sup>。

共济失调毛细血管扩张突变(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)是DNA双链损伤修复系统的核心组成部分之一<sup>[4]</sup>。ATM作为一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其活化需要自磷酸化。但进一步研究发现, ATM能直接被氧化应激激活, 而不依赖于DNA损伤活化, 这类p-ATM被称为氧化型ATM或DNA损伤非依赖型ATM<sup>[5]</sup>。越来越多的证据表明, 氧化型ATM参与许多生物学过程。ATM通过稳定细胞内氧化还原状态维持正常星形胶质细胞生长<sup>[6]</sup>。本课题组前期研究中发现氧化型ATM通过促进癌相关成纤维细胞的增殖来促进乳腺癌细胞的恶性行为<sup>[7]</sup>。肿瘤细胞低氧微环境特征之一为活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平升高<sup>[2]</sup>, 其介导的氧化应激能否导致乳腺肿瘤细胞中氧化型ATM表达增加, 以及乳腺肿瘤细胞氧化型ATM如何参与其恶性形成, 目前尚不清楚。

肿瘤进程中的代谢重塑是一个公认的过程, 对满足肿瘤细胞快速增殖相关的能量需求是必不可少的。肿瘤代谢基本学说认为, 癌细胞进行有氧糖酵解, 意味着与正常细胞相比, 肿瘤细胞会消耗更多的葡萄糖, 产生更多的乳酸, 即“Warburg效应”<sup>[8]</sup>。但近来研究发现, 肿瘤代谢具有灵活性, 表现在代谢耦合<sup>[9]</sup>以及代谢物累积所致不同的生物学功能等方面。柠檬酸作为三羧酸循环的一个代谢底物, 是否能以信号分子的形式调控细胞的生物学行为目前并不清楚。

本研究探究低氧下, 氧化型ATM(DNA损伤非依赖型ATM)通过糖代谢重塑对人乳腺癌细胞MCF7和MDA-MB-231细胞迁移和侵袭的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、试剂及仪器

人乳腺癌细胞MCF7和MDA-MB-231由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保存。RPMI 1640/DMEM培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司; Trizol购自美国Invitrogen公司; Prime Script RT Reagent Kit和SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>购自日本TaKaRa公司; RIPA蛋白裂解液、PMSF和BCA蛋白定量检测试剂盒购自上海碧云天生物技

术有限公司; 兔抗人ATM、p-ATM、 $\gamma$ -H2AX购自美国CST公司; 兔抗人p-CHK2(T68)蛋白单克隆抗体购自英国Abcam公司; 鼠抗人 $\beta$ -actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗鼠/兔IgG购自中杉金桥生物技术有限公司; PVDF膜和ECL超敏化学发光试剂购自美国Bio-Rad公司; 基质胶购自美国BD Biosciences公司; Transwell小室购自美国Millipore公司; 葡萄糖含量检测试剂盒、乳酸含量检测试剂盒、丙酮酸含量检测试剂盒、acetyl-CoA含量检测试剂盒、柠檬酸含量检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 琥珀酸含量检测试剂盒、延胡索酸检测试剂盒购自美国Sigma公司; 包含ATM基因特异性干扰序列(5'-GCT GTT ACC TGT TTG AAA A-3')和阴性对照序列(5'-TTC TCC GAA CGT GTC ACG T-3')的慢病毒载体购自吉玛制药技术有限公司; 抑制剂KU60019购自美国Selleck公司; 引物由生工生物工程上海股份有限公司设计。

实验仪器包括: CO<sub>2</sub>恒温细胞培养箱和4 °C离心机(美国Thermo)、细胞培养板/瓶/皿(美国Corning)、双垂直板电泳槽和DYY-III稳压稳流电泳仪(北京六一生物科技有限公司)、数字凝胶成像系统(美国Bio-Rad)。

## 1.2 方法

**1.2.1 贴壁培养细胞** MCF-7用含10% FBS的RPMI 1640培养基培养, MDA-MB-231用含10% FBS的DMEM培养基培养, 所有细胞均置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>、1% O<sub>2</sub>或21% O<sub>2</sub>的无菌恒温培养箱中传代培养。ATM特异性抑制剂KU60019以10  $\mu$ mol/L处理12 h。DNA损伤诱导剂顺铂(Cisplatin)以10  $\mu$ mol/L处理4 h。

**1.2.2 慢病毒细胞转染** 按每孔 $2.0 \times 10^4$ 个细胞的密度接种于24孔板内, 培养24 h后加入重组慢病毒LV3-NC-shRNA、LV3-ATM-shRNA-1#和LV3-ATM-shRNA-2#[感染复数(multiplicity of infection, MOI)为20]继续培养24 h, 更换培养液。72 h后用倒置荧光显微镜观察细胞荧光强度判断转染效率, 同时加入嘌呤霉素(终质量浓度为1  $\mu$ g/mL)筛选转入重组慢病毒的细胞, 共7天; 之后将嘌呤霉素浓度减半再筛选7天。分别构建人乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231 ATM基因靶向沉默细胞系(shATM-1#和shATM-2#)、阴性对照细胞系(shNC)。

**1.2.3 qRT-PCR法检测各组细胞ATM mRNA表达水平** 待细胞增殖至80%汇合度时, 采用Trizol试剂提取shATM、shNC组细胞的总RNA, 而后用Prime-

Script RT Reagent Kit逆转录为cDNA; 以此cDNA为模板, 用SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>试剂盒行qRT-PCR检测。ATM基因引物序列为: 上游5'-GCA AAC GCT AAG TCG CTG G-3'; 下游5'-AAC ACT GCC CCA AAA CAT TCG-3'。 $\beta$ -actin(内参照)基因引物序列为: 上游5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG-3'; 下游引物序列为5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3'。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示目的基因的相对表达量。

**1.2.4 Western blot检测各组细胞ATM、p-ATM蛋白表达水平** 待细胞增殖至80%汇合度, 分别收集MCF-7和MDA-MB-231的shNC、shATM组细胞, 利用RIPA裂解液(含1% PMSF)冰上裂解30 min, 离心收集上清液, 通过BCA蛋白定量检测试剂盒测定各组细胞蛋白浓度; 行10% SDS-PAGE凝胶电泳, 湿转后5%脱脂牛奶室温封闭2 h; 兔抗人ATM、p-ATM、 $\gamma$ -H2AX、p-CHK2(T68)及鼠抗人 $\beta$ -actin单克隆抗体(1:1 000稀释)置于4 °C孵育过夜, 洗膜后将HRP标记二抗(山羊抗兔, 山羊抗鼠)(1:3 000稀释)置于室温孵育1 h, ECL超敏化学发光试剂显色, 凝胶成像分析仪采集图像。

**1.2.5 细胞划痕愈合实验检测各组细胞的迁移能力** 消化收集各组细胞并计数, 按 $1 \times 10^6$ 个细胞/孔的密度接种细胞于6孔板, 每组3个复孔。将各组细胞置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的无菌恒温培养箱中培养, 待细胞贴壁后, 用100  $\mu$ L移液器枪头垂直划线, PBS洗净漂浮细胞, 分别于0、12 h后用光学显微镜观察并拍照。应用图像分析软件Image Pro Plus对空白区域进行面积计算, 划痕空白面积(%)=12 h划痕空白面积/0 h划痕空白面积 $\times 100\%$ , 以此表示细胞迁移能力。

**1.2.6 Transwell实验检测各组细胞侵袭能力** 在Transwell小室的滤膜上加入40  $\mu$ L稀释的基质胶(基质胶与无血清培养基体积比为1:8)。消化收集各组细胞, 用无FBS培养基重悬并计数。每个Transwell小室的下室加入500  $\mu$ L含10% FBS培养基, 上室中加入200  $\mu$ L用无FBS培养基重悬的 $3.0 \times 10^4$ 个细胞(每组3个复孔), 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养12 h后取出小室, PBS清洗、4%多聚甲醛固定15 min, 0.5%结晶紫染色5 min, 冲洗晾干; 正置相差光学显微镜下, 分别选上、下、左、右、中5个视野(100 $\times$ )拍照。

**1.2.7 糖代谢相关指标检测** 将生长状态良好的乳腺癌细胞按每孔 $1.0 \times 10^6$ 个细胞铺于6孔板中, 每组设置3个复孔, 在1% O<sub>2</sub>或21% O<sub>2</sub>条件下培养24 h。待培养结束后, 收集上清或细胞, 利用葡萄糖检测试

剂盒检测每孔中葡萄糖的消耗量; 利用乳酸、丙酮酸、乙酰辅酶A、柠檬酸、线粒体柠檬酸、琥珀酸、延胡索酸检测试剂盒检测每孔中相应物质的含量, 具体操作按照说明书进行。

**1.2.8 统计学方法** 所有实验均独立重复3次, 采用SPSS 19.0统计软件对实验数据进行统计分析, 计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间数据的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较则采用LSD-*t*检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 低氧促进MCF7和MDA-MB-231细胞中氧化型ATM(DNA损伤非依赖型ATM)表达

为验证低氧介导的氧化应激能否引起乳腺癌细胞中氧化型ATM的活化, 我们设计了低氧(1% O<sub>2</sub>)条件下一系列时间梯度, 用Western blot检测相关蛋白的表达情况。当1% O<sub>2</sub>处理12 h时, p-ATM(s1981)表达量增加明显, 而此时DNA损伤标记物 $\gamma$ -H2AX和p-CHK2(T68)表达量很弱; 加入DNA损伤诱导剂顺铂(Cisplatin)作为阳性对照(图1)。

### 2.2 低氧下氧化型ATM沉默抑制MCF7和MDA-MB-231细胞的迁移和侵袭

已有文献报道低氧促进乳腺癌细胞迁移和侵袭<sup>[3]</sup>, 同时, 低氧下ATM异常活化, 为验证氧化型ATM与乳腺癌细胞生物学功能的作用, 利用慢病毒构建靶向ATM基因稳定沉默的MCF7和MDA-MB-231细胞, 结果显示, 转染病毒的细胞其荧光比例均高达90%(图2A), 且在shATM细胞中mRNA(图2B)

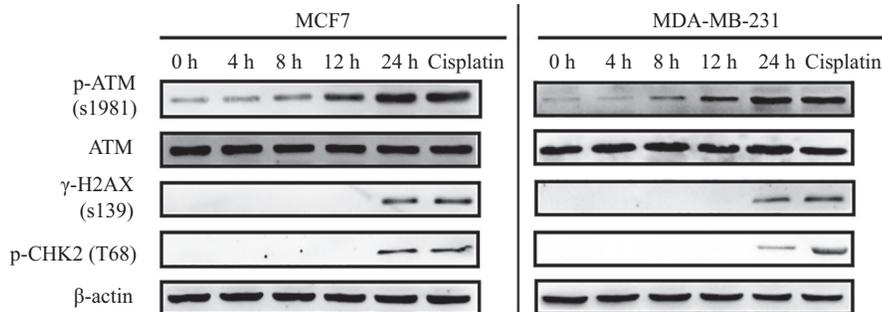
和蛋白(图2C)水平与shNC相比明显下调, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ), 表明ATM被有效稳定沉默。接下来研究结果显示: 低氧下shATM和ATM的特异性抑制剂KU60019能够有效抑制p-ATM(s1981)的表达(图2D)以及肿瘤细胞的迁移(图2E和图2G)和侵袭(图2F和图2H)能力; 但常氧下, KU60019对p-ATM(s1981)的表达量以及肿瘤细胞的迁移侵袭能力并无明显作用(图2E~图2H)。因此低氧下, 氧化型ATM沉默能够抑制乳腺肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。

### 2.3 低氧导致MCF7和MDA-MB-231细胞糖代谢改变

低氧下肿瘤细胞存在异常的能量代谢模式<sup>[10]</sup>。糖酵解过程是所有生物体进行葡萄糖分解代谢最初以及必须经过的共同阶段。我们检测了低氧下乳腺癌细胞的糖酵解过程相关物质发现: 低氧下, MCF7和MDA-MB-231细胞葡萄糖消耗量(图3A)、丙酮酸生成量(图3C)、乙酰辅酶A生成量(图3D)显著增加, 而乳酸生成量增加幅度不大(图3B)。

### 2.4 低氧下氧化型ATM介导MDA-MB-231细胞糖代谢重塑

由于低氧与氧化型ATM存在着密切关系, 那么低氧下存在的异常的能量代谢模式是否与氧化型ATM有关呢? 低氧下, 我们利用shRNA和KU60019来抑制p-ATM的表达, 葡萄糖消耗量(图4A)、丙酮酸生成量(图4C)、乙酰辅酶A生成量(图4D)被显著抑制, 而乳酸生成量轻度被抑制(图4B)。常氧下, KU60019对葡萄糖等代谢底物以及氧化磷酸化并没有显著影响(图4A~图4D)。故氧化型ATM参与了低

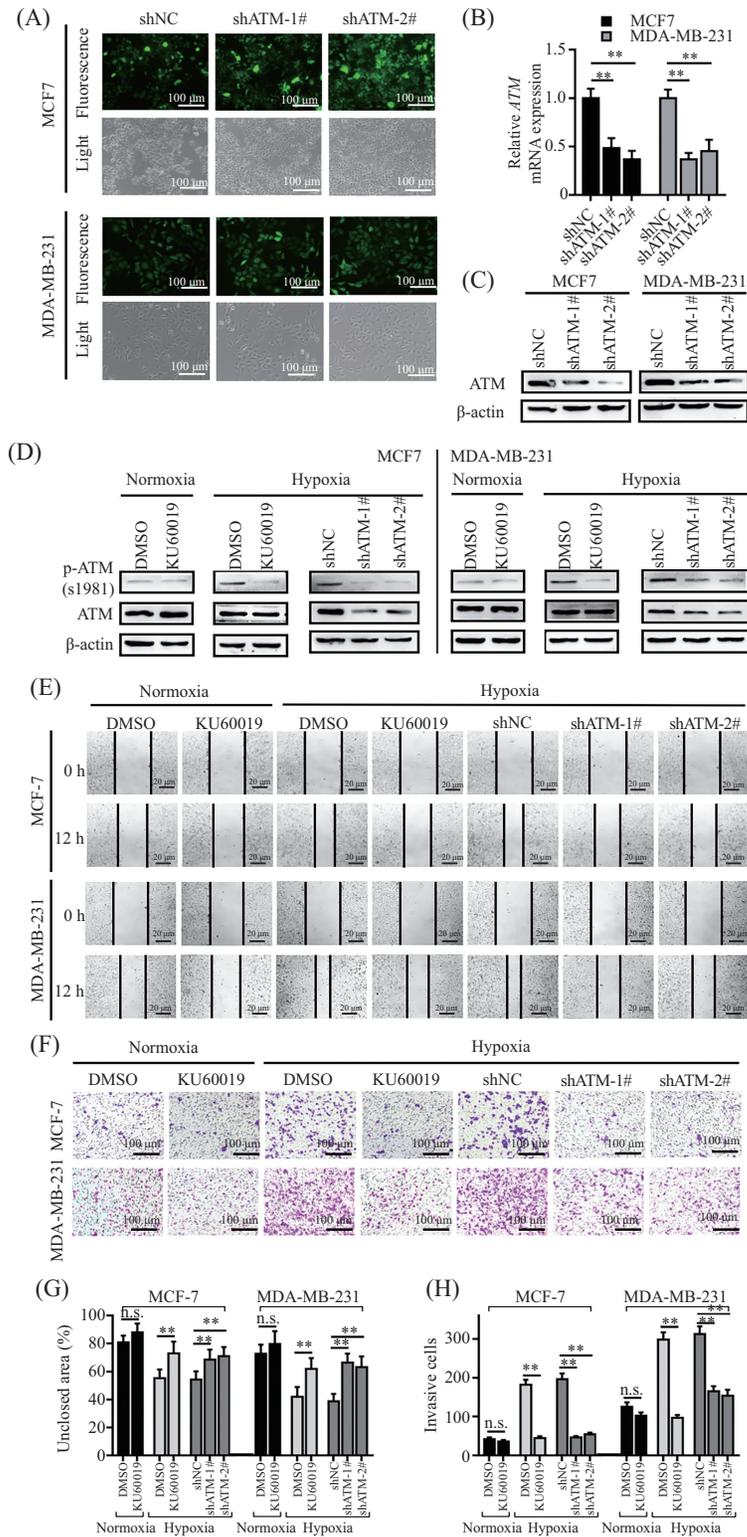


细胞p-ATM(s1981)、ATM、DNA损伤标志物( $\gamma$ -H2AX、CHK2(T68))的蛋白表达水平。顺铂(一种已知的DNA损伤诱导剂, 10  $\mu$ mol/L 4 h)组作为阳性对照。

The protein expression level of p-ATM (s1981), ATM, DNA damage markers [ $\gamma$ -H2AX, CHK2(T68)]. Cisplatin (a known drug inducing DNA damage, 10  $\mu$ mol/L 4 h) group as positive control for DNA damage.

图1 低氧下MCF7和MDA-MB-231细胞中ATM的表达

Fig.1 The expression of ATM in MCF7 and MDA-MB-231 cells under hypoxia

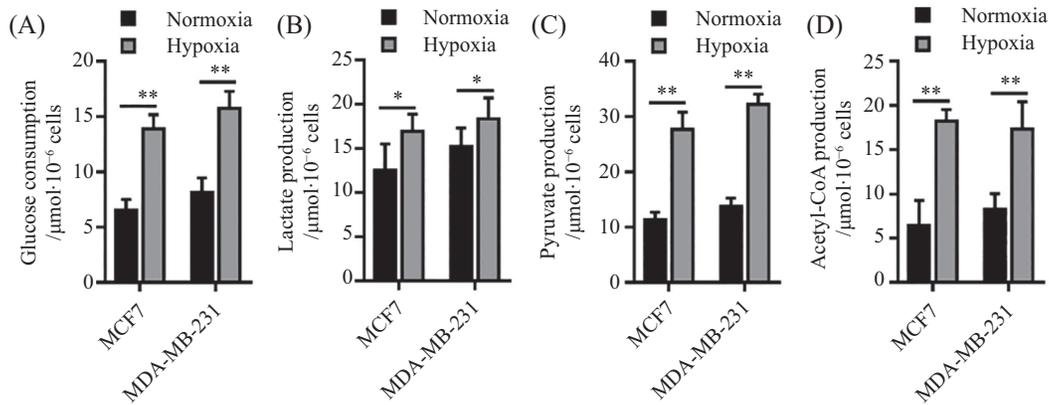


A: 荧光显微镜下观察重组慢病毒的感染效率; B: 实时荧光定量PCR检测ATM mRNA表达水平; C: 蛋白印迹法检测ATM蛋白表达水平; D: 蛋白印迹法检测细胞p-ATM表达水平; E、G: 伤口划痕愈合实验检测细胞迁移能力; F、H: Transwell实验检测细胞侵袭能力。n.s.: 无统计学差异; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ;  $n = 3$ 。

A: evaluation of the infection efficiency under a fluorescence microscope; B: the expression of ATM mRNA detected by qRT-PCR; C: the expression of ATM protein detected by Western blot; D: the expression of p-ATM protein detected by Western blot; E,G: the effects of the migration potentials of cells detected by wound healing assay; F,H: the effects of invasion potentials of cells detected by transwell assay. n.s.: no significance, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ;  $n = 3$ .

图2 稳定敲低ATM的MCF7和MDA-MB-231细胞株的构建及ATM对细胞迁移和侵袭的影响

Fig.2 Establishment of a stable shATM-expressing MCF7 and MDA-MB-231 and evaluation of migration and invasion potentials for cells with shATM and KU60019

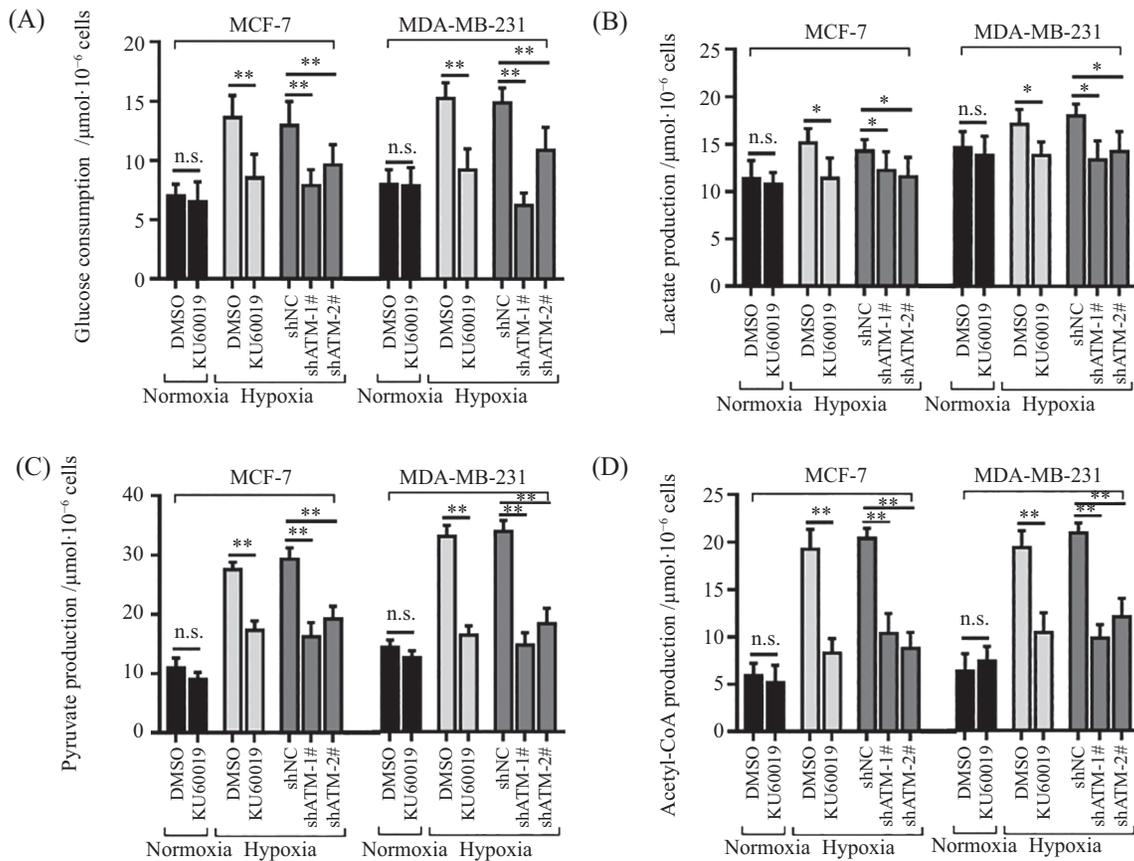


A: 葡萄糖消耗量; B: 乳酸含量; C: 丙酮酸含量; D: 乙酰辅酶A含量。\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ;  $n = 3$ 。

A: glucose consumption; B: lactate production; C: pyruvate production; D: acetyl-CoA productions. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ;  $n = 3$ 。

图3 MCF7和MDA-MB-231细胞中糖酵解过程相关代谢底物的检测

Fig.3 Detect the production of metabolic substrates related to glycolysis in MCF7 and MDA-MB-231



A: 葡萄糖消耗量; B: 乳酸含量; C: 丙酮酸含量; D: 乙酰辅酶A含量。n.s.: 无统计学差异; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ;  $n = 3$ 。

A: glucose consumption; B: lactate production; C: pyruvate production; D: acetyl-CoA production. n.s.: no significance; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ;  $n = 3$ 。

图4 shATM和KU60019处理后的MCF7和MDA-MB-231细胞中糖酵解过程相关代谢底物的检测

Fig.4 Detection of metabolic substrates in glycolysis in MCF7 and MDA-MB-231 cells with shATM and KU60019

氧下异常能量代谢模式的调控。

## 2.5 低氧下氧化型ATM通过增加柠檬酸产量促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭

糖酵解过程的重塑提示低氧下氧化型ATM可

能与TCA有关。对TCA有关代谢底物进行检测,结果显示:低氧处理细胞时,柠檬酸(图5A)、琥珀酸(图5B)和延胡索酸(图5C)的产量增加,但柠檬酸增加的量远远大于琥珀酸和延胡索酸的增加量。同样,低

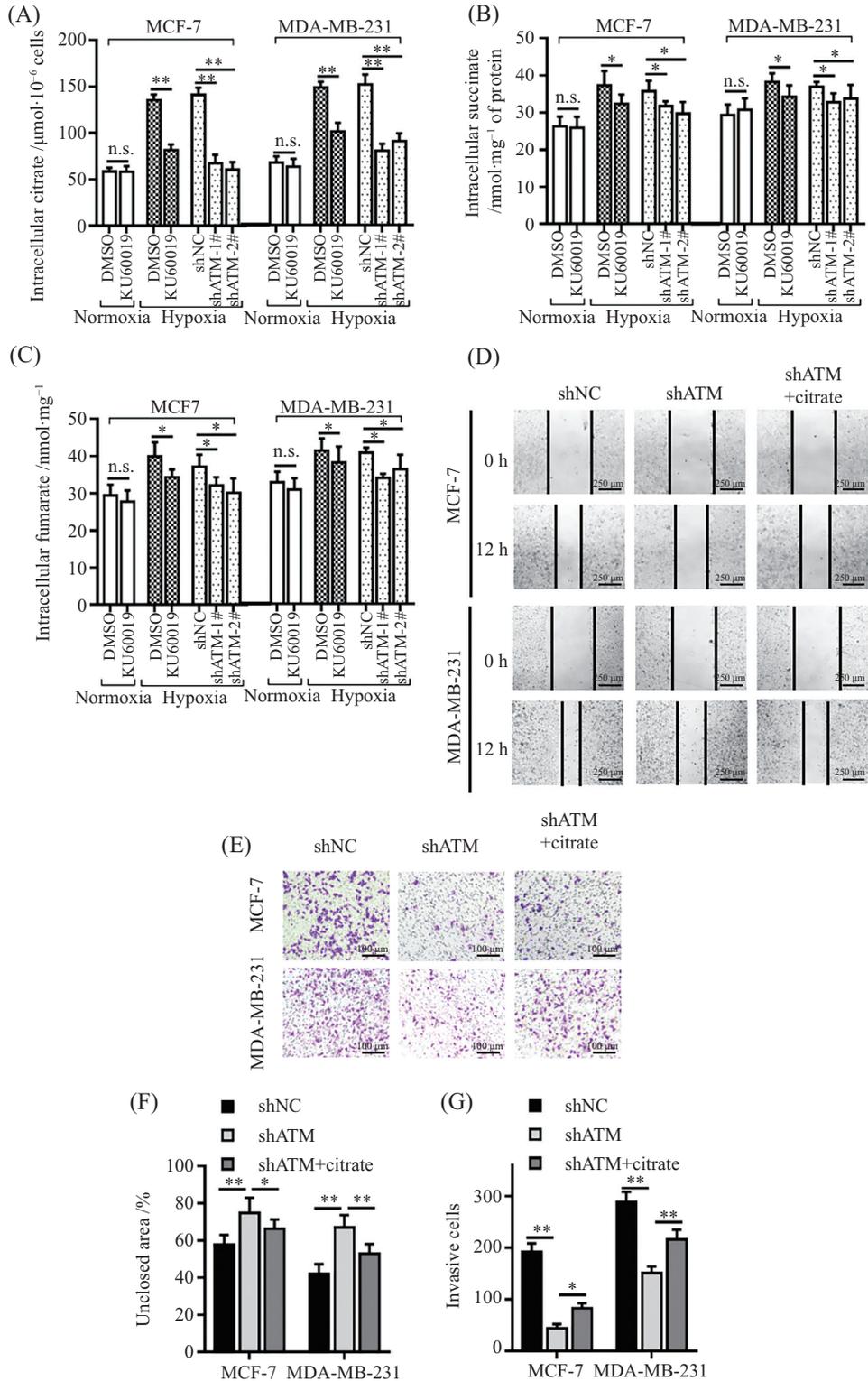


图5 shATM和KU60019处理后的MCF7和MDA-MB-231细胞中三羧酸循环中相关代谢底物的检测及外源性柠檬酸对细胞迁移和侵袭能力的影响

A: 柠檬酸含量; B: 琥珀酸含量; C: 延胡索酸含量; D, F: 伤口划痕愈合实验检测shATM处理的细胞中添加外源性柠檬酸后细胞迁移能力; E, G: Transwell实验检测shATM处理的细胞中添加外源性柠檬酸后细胞侵袭能力。n.s.: 无统计学差异; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ;  $n = 3$ 。

A: intracellular citrate; B: intracellular succinate; C: intracellular fumarate; D, F: the effects of the migration potentials for cells with shATM with or without citrate treatment by wound healing assay; E, G: the effects of the invasion potentials for cells with shATM with or without citrate treatment by Transwell assay. n.s.: no significance; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ;  $n = 3$ .

图5 shATM和KU60019处理后的MCF7和MDA-MB-231细胞中三羧酸循环中相关代谢底物的检测及外源性柠檬酸对细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig.5 Detection of metabolic substrates in TCA in MCF7 and MDA-MB-231 cells with shATM and KU60019 and evaluation of migration and invasion potentials for cells with shATM without citrate treatment

氧下,当p-ATM的活性被抑制时,柠檬酸的产量的降低程度明显大于对其下游琥珀酸和延胡索酸的降低量(图5A~图5C)。而常氧下,抑制p-ATM的表达对柠檬酸、琥珀酸和延胡索酸产量并没有明显影响(图5A~图5C)。为了验证低氧下氧化型ATM介导的柠檬酸的累积是否对乳腺癌细胞的迁移和侵袭有促进作用,我们在低氧下shATM细胞系中,分别补充外源性柠檬酸,肿瘤细胞的迁移(图5D和图5F)和侵袭(图5E和图5G)能力均得到一定程度回补。因此,氧化型ATM通过调控柠檬酸的累积从而促进肿瘤细胞的迁移和侵袭。

### 3 讨论

共济失调毛细血管扩张症(ataxia-telangiectasia, A-T)是一种常染色体隐性遗传的原发性免疫缺陷疾病,它是由共济失调毛细血管扩张突变(ATM)基因引起的<sup>[11]</sup>。ATM属于磷脂酰肌醇3激酶家族。它在癌症发展中具有多种功能,如细胞周期检查点、DNA DSB修复、染色质重塑、迁移以及代谢调节<sup>[12]</sup>。近来发现,ATM存在DNA损伤依赖型与非依赖型两种不同的活化方式。ROS可以促使ATM以DNA损伤非依赖的方式活化<sup>[5]</sup>,并且活化的氧化型ATM具有促癌作用<sup>[7,13]</sup>。同时,ATM可参与代谢重塑。研究发现,ATM磷酸化激活AKT,通过GLUT4调控胰岛素介导的葡萄糖摄取<sup>[14]</sup>。

缺氧对肿瘤生物学产生了深远的影响,调节着癌细胞的特征(如干细胞的干性、代谢重编程、抗肿瘤治疗等)。此外,缺氧与肿瘤的侵袭性和不良预后密切相关。低氧导致ROS增加,同时研究还发现,ATM可以调控低氧反应,促进缺氧诱导因子1 $\alpha$ 的稳定性<sup>[15]</sup>。但低氧与氧化型ATM的活化之间的关系目前尚不清楚。

肿瘤细胞代谢谱的改变已被认为是癌症进程中的一个常见事件。癌症代谢研究越来越多地发现意想不到的机制,比如癌细胞不单单从传统的葡萄糖得到能量补给<sup>[16]</sup>。同时,近来研究表明,代谢底物除调控细胞能量需求外,通过激活某些癌相关信号通路,维持肿瘤的恶性表型,比如:乳酸通过结合和稳定NDRG3蛋白促进血管生成和细胞生长<sup>[17]</sup>。氧化型ATM是否参与肿瘤细胞能量代谢重塑,以及代谢底物是否能发挥调控细胞能量需求以外的功能,尚有待进一步的探索。

在这里,本研究揭示了在乳腺癌细胞中,低氧使得ATM以DNA损伤非依赖的方式活化,即氧化型ATM。同时,氧化型ATM通过调节能量代谢的重塑促进胞内柠檬酸的累积从而引起肿瘤细胞的迁移侵袭。这是一种非经典的Warburg效应,使得乳腺癌细胞吸收的葡萄糖通过糖酵解过程更多地转化为柠檬酸,从而来维持乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力。这揭示了代谢底物柠檬酸,可以作为信号分子对肿瘤进程发挥重要作用。进而思考发现,肿瘤细胞的代谢重编程往往导致其产生过多的ROS并处于氧化应激状态<sup>[18]</sup>;本研究揭示低氧介导ROS反过来又影响肿瘤细胞的能量代谢重塑。这很好地验证了肿瘤代谢重塑与肿瘤的发生发展互为因果关系。这种互为因果的关系增加了肿瘤研究的复杂性,促使我们对肿瘤的研究认识应该更客观全面。

### 参考文献 (References)

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] SHARMA A, ARAMBULA J F, KOO S, et al. Hypoxia-targeted drug delivery [J]. *Chem Soc Rev*, 2019, 48(3): 771-813.
- [3] SEMENZA G L. Molecular mechanisms mediating metastasis of hypoxic breast cancer cells [J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18(9): 534-43.
- [4] JIN M H, OH D Y. ATM in DNA repair in cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 203: 107391.
- [5] GUO Z, KOZLOV S, LAVIN M F, et al. ATM activation by oxidative stress [J]. *Science*, 2010, 330(6003): 517-21.
- [6] KIM J, WONG P K. Oxidative stress is linked to ERK1/2-p16 signaling-mediated growth defect in ATM-deficient astrocytes [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(21): 14396-404.
- [7] TANG S, HOU Y, ZHANG H, et al. Oxidized ATM promotes abnormal proliferation of breast CAFs through maintaining intracellular redox homeostasis and activating the PI3K-AKT, MEK-ERK, and Wnt-beta-catenin signaling pathways [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(12): 1908-24.
- [8] LIBERTI M V, LOCASALE J W. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells [J]? *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(3): 211-8.
- [9] XU X D, SHAO S X, JIANG H P, et al. Warburg effect or reverse Warburg effect? A review of cancer metabolism [J]. *Oncol Res Treat*, 2015, 38(3): 117-22.
- [10] DEBERARDINIS R J, LUM J J, HATZIVASSILIOU G, et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation [J]. *Cell Metab*, 2008, 7(1): 11-20.
- [11] AMIRIFAR P, RANJOURI M R, Yazdani R, et al. Ataxia-telangiectasia: a review of clinical features and molecular pathology [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2019, 30(3): 277-88.
- [12] STRACKER T H, ROIG I, KNOBEL P A, et al. The ATM signal-

- ing network in development and disease [J]. *Front Genet*, 2013, 4: 37.
- [13] CHEN W T, EBELT N D, STRACKER T H, et al. ATM regulation of IL-8 links oxidative stress to cancer cell migration and invasion [J]. *Elife*, 2015, 4: e07270.
- [14] HALABY M J, HIBMA J C, He J, et al. ATM protein kinase mediates full activation of Akt and regulates glucose transporter 4 translocation by insulin in muscle cells [J]. *Cell Signal*, 2008, 20(8): 1555-63.
- [15] MONGIARDI MP, STAGNI V, NATOLI M, et al. Oxygen sensing is impaired in ATM-defective cells [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(24): 4311-20.
- [16] TERRY A R, HAY N. Fuelling cancer cells [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(2): 71-2.
- [17] LEE D C, SOHN H A, PARK Z Y, et al. A lactate-induced response to hypoxia [J]. *Cell*, 2015, 161(3): 595-609.
- [18] ZHU J, THOMPSON C B. Metabolic regulation of cell growth and proliferation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(7): 436-50.