

研究论文

苹果酸酶3(ME3)对人脑胶质瘤细胞的增殖、 迁移、侵袭及间质转换的影响

陈曦 韩秀 唐宇 程洁 刘菲 许婧 龚爱华*

(江苏大学医学院, 镇江 212013)

摘要 该研究探讨了苹果酸酶3(malic enzyme 3, ME3)对人脑胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭和间质转换能力的影响。首先,用Real-time PCR和Western blot检测胶质瘤细胞中ME3的mRNA及其蛋白质的水平。使用质粒(sh-ME3)转染高表达ME3的脑胶质瘤细胞U87MG和U251MG, CCK-8和克隆形成实验分别检测细胞增殖以及克隆形成能力。Transwell实验检测细胞迁移和侵袭能力,并且采用细胞划痕实验进一步检测细胞的迁移能力。用Western blot检测干扰ME3后细胞间质表型标志物。结果表明, ME3下调后, U87MG和U251MG细胞的增殖、迁移和侵袭能力减弱,并且胶质瘤间质表型标志物的表达明显降低,间质转换能力被抑制。以上结果说明, ME3在脑胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭中发挥了重要作用,同时, ME3因其在胶质瘤发展中发挥的重要作用可能成为肿瘤治疗的新靶点。

关键词 ME3; 胶质瘤; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞侵袭; 间质转换

Effects of ME3 on the Abilities of Proliferation, Migration, Invasion and Mesenchymal Transition in Human Glioma Cells

Chen Xi, Han Xiu, Tang Yu, Cheng Jie, Liu Fei, Xu Jing, Gong Aihua*

(School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract The purpose of this study is to investigate the effects of malic enzyme 3 (ME3) on the abilities of proliferation, migration, invasion and mesenchymal transition in human glioma cells. We first detected the relative levels of mRNA and protein of ME3 in different glioma cell lines, respectively. Then the specific plasmids (sh-ME3) were transfected into the glioma cells U87MG and U251MG. The effects of ME3 on cell proliferation and colony formation were detected by CCK-8 assay and clone formation assay, respectively. Transwell assays were used to examine the ability of ME3 on cell migration and invasion, and wound healing assay was also used to measure the cell migration. Western blot was used to examine the effect on the mesenchymal transition of glioma cells with the ME3 knockdown. The results showed that the ME3 knockdown decreased the ability of proliferation, migration and invasion in U87MG and U251MG cells, and also inhibited the expression of mesenchymal markers and mesenchymal transition of the glioma cells. Collectively, the present study demonstrates that ME3 plays a critical role in the development of glioma and may provide a potential therapeutic target for it.

Keywords ME3; glioma; proliferation; migration; invasion; mesenchymal transition

收稿日期: 2017-11-17

接受日期: 2018-03-02

*通讯作者。Tel: 13775369530, E-mail: ahg5@ujs.edu.cn

Received: November 17, 2017

Accepted: March 2, 2018

*Corresponding author. Tel: +86-13775369530, E-mail: ahg5@ujs.edu.cn

网络出版时间: 2018-05-31 16:57:11

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180531.1656.014.html>

脑胶质瘤是由神经外胚层的胶质细胞恶化而形成的,是临床上最常见的、致死率极高的原发性颅内肿瘤,发病率约占颅内肿瘤的半数以上,因其无控性增殖、侵袭性生长、容易复发和预后较差等特点,严重地影响了患者的生活质量^[1-3]。在遗传、电离辐射和化学致癌物、病毒等多种因素的共同影响下,我国脑胶质瘤的发病率已呈增长趋势^[1-3]。2016年,WHO分级标准将脑胶质瘤分为4级, I级和II级为良性肿瘤, III级和IV级为恶性肿瘤,其中, IV级恶性程度最高,且预后极差,主要为多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM), 大约占有所有脑胶质瘤的80%^[1,4]。根据GBM的分子分型,间质型(MES型)GBM恶性程度高、预后差,且其他型GBM可以转化为继发性的MES型^[5]。由于缺乏有效的治疗手段,绝大多数恶性脑胶质瘤患者于确诊后的1~2年之间死亡^[1]。因此,如果可以从肿瘤过度增殖、早期转移及间质转换的分子机制中找到有效的阻断靶点,就能够为临床提供新的诊断与治疗策略。

苹果酸酶3(malic enzyme 3, ME3)是苹果酸酶家族中的一员,苹果酸酶家族在组织的新陈代谢中发挥十分重要的作用。苹果酸酶是一种普遍存在的四聚体蛋白质,可以催化可逆的氧化脱羧反应即L-苹果酸转变为丙酮酸,这个反应同时伴随着NAD(P)⁺转变成NAD(P)H^[6]。在哺乳动物体内,苹果酸酶有三种亚型,分别根据它们的亚细胞定位及辅因子特异性来定义。细胞质和线粒体中的苹果酸酶都利用NADP⁺作为辅因子,为脂质合成提供NADPH,并促进长链脂肪酸和类固醇的合成。已有研究表明,ME1(c-NADP-ME)和ME2(m-NAD(P)-ME)都可在P53的调控下影响肿瘤细胞的增殖和新陈代谢^[7],而ME3在肿瘤的发生发展过程中的作用则尚不明确。因此,本研究旨在讨论ME3在脑胶质瘤中的生物学效应,为其进一步作体内研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒 实验用人脑胶质瘤细胞系SW1783、LN229、U87MG和U251MG购自中国科学院上海细胞库。pLKO.1-puro载体由江苏大学医学细胞生物学研究室提供。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清FBS购自Gibco公司。DMEM培养基购自Hyclone公司。Trizol试剂购自

Invitrogen公司。逆转录试剂盒购自Thermo公司。转染试剂LipofectamineTM 2000购自Invitrogen公司。Transwell小室购自Corning公司。基质胶购自BD Pharmingen公司。限制性内切核酸酶EcoR I和Age I购自NEB公司。鼠抗人 β -tubulin抗体购自Bioworld公司。兔抗人ME3抗体购自Abcam公司。EMT信号通路中信号分子相关抗体购自Cell Signaling Technology公司。羊抗兔、羊抗鼠二抗购自Santa Cruz公司。CCK-8溶液购自Promega公司。2 \times SYBR Green实时定量PCR预混合溶液购自Bioworld公司。结晶紫染色液购自碧云天生物技术有限公司。DH5 α 感受态细胞购自上海斯丹赛生物科技有限公司。dsDNA oligos由金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 荧光定量PCR(Real-time PCR) 按照Trizol试剂说明书提取4种胶质瘤细胞(SW1783、LN2229、U87MG和U251MG)的RNA,并反转录成cDNA,以cDNA为模板扩增内参基因GAPDH和目的基因ME3。Real-time PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性10 s,56 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸10 s,共38个循环;4 $^{\circ}$ C保存。ME3上游引物序列为:5'-ACC GCT CTT TGA GGA ACT CAC-3';下游引物序列为:5'-CCT AAT CCC GCG TGG TGG-3'。GAPDH上游引物序列为:5'-TGG GGA AGG TGA AGG TCG G-3';下游引物序列为:5'-CTG GAA GAT GGT GAT GGG A-3'。GAPDH作为内参基因,计算ME3的相对表达量(RQ值),计算公式为: $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$, $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$,并且将对照组的基因mRNA相对表达量作为1。

1.2.2 Western blot检测细胞中相关蛋白质水平 裂解细胞时加入2 \times 蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C加热5 min,12 000 r/min离心5 min。用10% SDS-PAGE分离样品,湿转法转至PVDF膜。5%脱脂奶粉封闭,置于室温1 h,加入一抗,4 $^{\circ}$ C孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min。室温下鼠抗(1:10 000)、兔抗(1:5 000)孵育2 h,TBST洗膜3次,每次10 min。ECL化学发光检测显影,凝胶成像系统拍照。

1.2.3 ME3干扰质粒的构建 在Sigma公司官网搜索已在293T细胞中证实的sh-ME3的序列。sh-ME3上游引物序列为:5'-CCG GCC TCC GAA TCA TGA GAT ATT ACT CGA GTA ATA TCT CAT GAT TCG GAG GTT TTT G-3',下游引物序列为:5'-AAT TCA

AAA ACC TCC GAA TCA TGA GAT ATT ACT CGA GCC TCC GAA TCA TGA GA TAT TA-3'。对照组 sh-EGFP 上游引物序列为: 5'-CCG GTA CAA CAG CCA CAA CGT CTA TCT CGA GAT AGA CGT TGT GGC TGT TGT ATT TTT G-3', 下游引物序列为: 5'-AAT TCA AAA ATA CAA CAG CCA CAA CGT CTA TCT CGA GAT AGA CGT TGT GGC TGT TGT A-3', 引物退火形成带黏性末端的双链。EcoR I 及 Age I 双酶切 pLKO.1-puro 载体, 酶切后的载体与双链 DNA 连接后转化感受态细胞, 挑取单克隆做 PCR 进行鉴定后送公司测序, 所构建质粒经测序正确后于 -20 °C 保存并用于细胞转染实验。

1.2.4 细胞转染 将胶质瘤细胞随机分为对照组和实验组, 分别转染质粒 sh-EGFP 和 sh-ME3, 转染前 1 天细胞接种至 6 孔板, 每孔 5×10^5 个细胞。在质粒转入前 1 h 将完全培养基换成无血清培养基。对照组与实验组分别将 2 μg sh-EGFP 和 sh-ME3 质粒加入 200 μL 无血清培养基, 并按培养基体积: 脂质体体积为 1:2.5 的比例将脂质体也加入 200 μL 无血清培养基中, 静置 5 min, 随后将脂质体与质粒混合。室温下静置 20~30 min, 将混合液逐滴均匀加入 6 孔板中。放入培养箱 4~6 h 后, 将无血清培养基换成完全培养基。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞的增殖能力 将转染 12 h 后的细胞用胰蛋白酶消化, 1 \times 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 清洗 1 次。以 1×10^3 /孔接种于 96 孔板, 同时设空白对照组 (不加细胞), 分别于第 1、2、3、4、5 天加入 10 μL CCK-8 溶液, 避光孵育 2 h 后, 在酶联免疫检测仪 490 nm 处读取各孔吸光度 (D) 值。重复 3 次取平均值, 以时间为横轴、相对增殖率为纵轴绘制生长曲线。

1.2.6 克隆形成实验 按上述细胞传代的方法将细胞沉淀重悬为单细胞悬液后, 将细胞以 1 000/孔接种到 6 孔板中, 轻轻摇晃, 使细胞分布均匀, 常规培养。每 3 天更换 1 次培养基, 约 10 天后, 肉眼即可看到细胞克隆时, 吸去培养基, 用 PBS 溶液轻轻地漂洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 溶液轻轻漂洗 2 次, 每孔加入 1 mL 0.5% 结晶紫染液染色 20 min。洗去多余染液, 在显微镜下观察计数大于 50 个细胞的克隆数, 每组实验独立进行 3 次, 每次 3 个复孔。

1.2.7 划痕实验 细胞转染 48 h 后, 消化细胞并接种于 24 孔板中, 过夜至细胞汇合度达 90% 时划痕, 并更换为无血清培养基, 于固定位置拍照。24 h 后再

次在固定位置拍照, 计算相对迁移率, 重复 3 次后取平均值。

1.2.8 Transwell 迁移实验 对照组和实验组细胞分别转染 sh-EGFP 和 sh-ME3 质粒, 48 h 后 0.25% 胰蛋白酶消化, PBS 洗 2 次, 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加 600 μL 无血清 DMEM 重悬细胞, 计数板计数细胞, 将 5×10^4 细胞种入 Transwell 小室上层, 小室下层加入 500 μL 完全培养基, 24 h 后用 PBS 清洗 1 次。4% 多聚甲醛溶液固定小室 30 min, 结晶紫染色 30 min, 观察细胞并拍照, 计数细胞迁移数, 结果取平均值。

1.2.9 Transwell 侵袭实验 对照组和实验组细胞分别转染 sh-EGFP 和 sh-ME3 质粒, 48 h 后用上述迁移实验方法将计数好的 5×10^4 个细胞种入 Transwell 小室上层 (冰上 100 μL 无血清 DMEM 与 4 μL 基质胶混合加入小室上层, 37 °C 放置 0.5 h, 成胶), 其余操作与迁移实验一致。

1.3 数据统计

数据统计采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。实验数据用均数 \pm 标准差表示, 两样本均数比较采用 t 检验, 多组数据采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

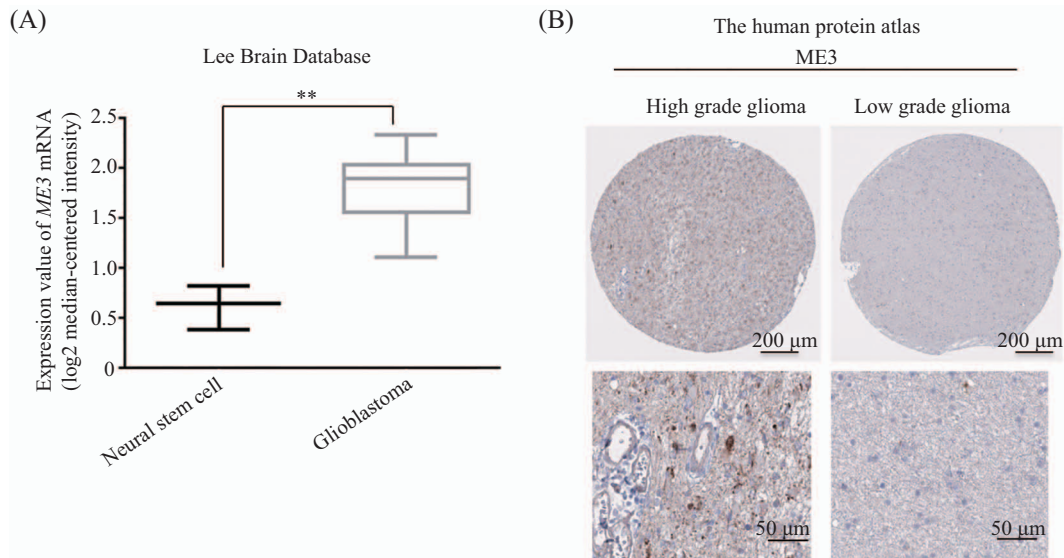
2.1 脑胶质瘤中 ME3 基因的表达水平

为了探明 ME3 在胶质瘤发生、发展中的临床意义, 我们首先在 Oncomine 数据库中分析了正常神经干细胞与 GBM 组织中 ME3 基因的表达水平情况。结果发现, 在 GBM 组织中, ME3 基因的表达水平明显升高 ($P < 0.01$, 图 1A)。同时, 我们还分析了人类蛋白质数据库 (www.proteinatlas.org) 中不同等级胶质瘤的临床样本的 ME3 蛋白质水平 (图 1B)。结果发现, 在低等级胶质瘤中, ME3 蛋白质水平远低于高等级胶质瘤。这一结果提示, 胶质瘤的等级很可能与 ME3 基因表达的水平相关。

2.2 脑胶质瘤细胞系 ME3 基因表达水平的检测及稳定干扰 ME3 细胞株的构建

荧光定量 PCR 结果表明, U87MG 和 U251MG 细胞中 ME3 mRNA 水平高于 SW1783 和 LN229 细胞, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2A)。Western blot 结果提示, U87MG、U251MG 细胞中 ME3 蛋白表达水平与 mRNA 水平相对应 (图 2B)。

本研究选取 ME3 高表达的 U87MG 和 U251MG 细

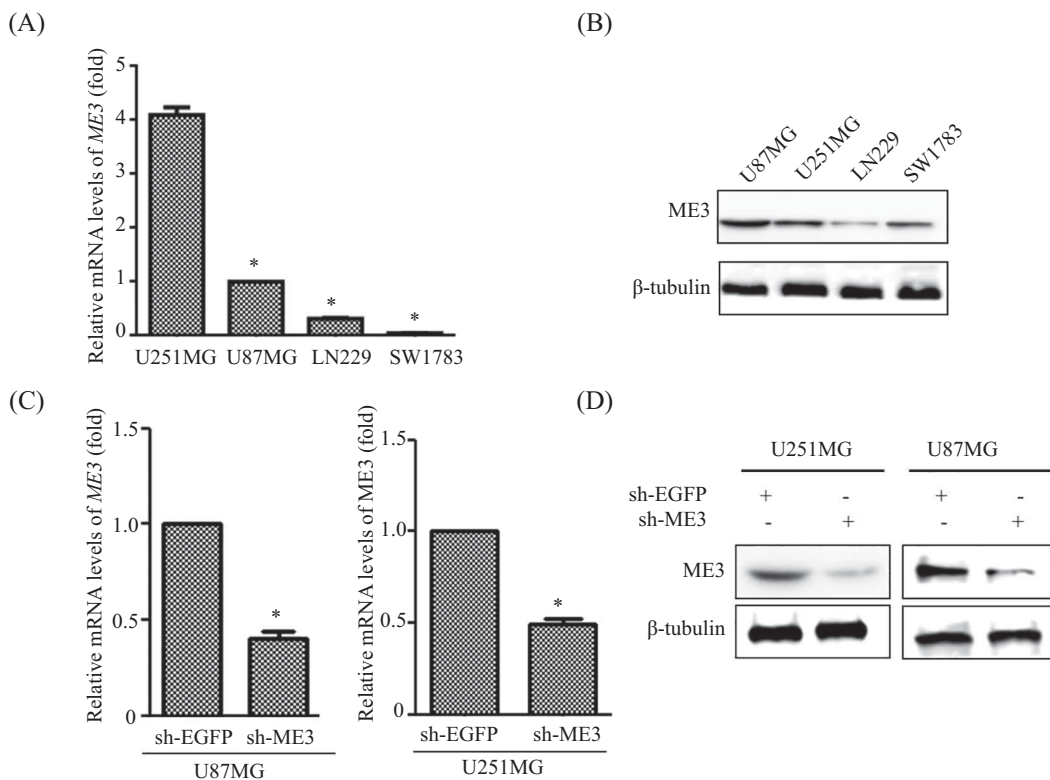


A: 正常神经干细胞与GBM组织中ME3 mRNA水平, $**P < 0.01$; B: ME3在高等级胶质瘤与低等级胶质瘤组织中的蛋白质水平(www.proteinatlas.org)。

A: the mRNA levels of ME3 in neural stem cells and glioblastoma tissues, $**P < 0.01$; B: ME3 protein levels in high grade glioma and low grade glioma tissues were analysed through the human protein atlas (www.proteinatlas.org).

图1 脑胶质瘤中ME3基因表达的水平

Fig.1 The expression of ME3 gene in human glioma

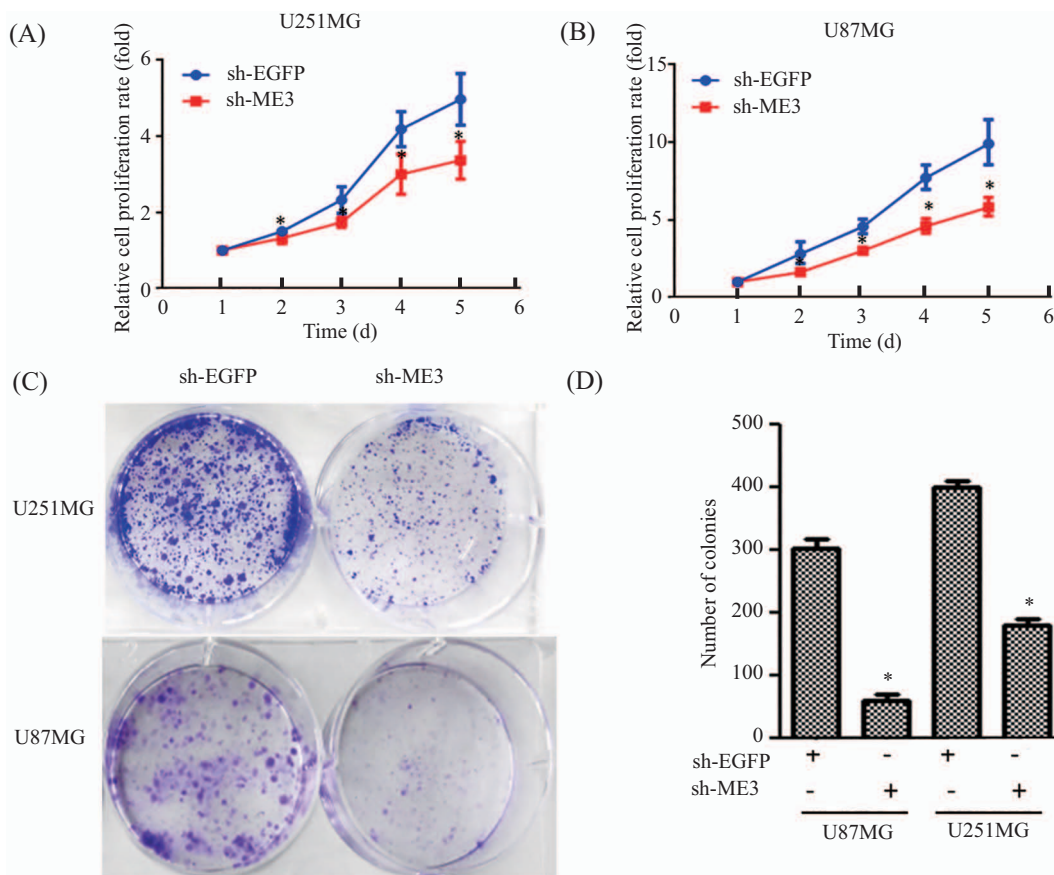


A: 4种人脑胶质瘤细胞(SW1783、LN2229、U87MG、U251MG)中ME3的mRNA水平, $*P < 0.05$, 与U251MG组比较; B: 4种人脑胶质瘤细胞(SW1783、LN229、U87MG、U251MG)中ME3的蛋白表达水平; C: sh-ME3转染U87MG和U251MG细胞后ME3 mRNA水平, $*P < 0.05$, 与sh-EGFP组比较; D: sh-ME3转染U87MG和U251MG细胞后ME3的蛋白表达水平。

A: relative mRNA levels of ME3 were detected in SW1783, LN2229, U87MG and U251MG cells, $*P < 0.05$ vs U251MG group; B: relative protein levels of ME3 were detected in SW1783, LN2229, U87MG and U251MG cells; C: mRNA expression levels of ME3 in U87MG and U251MG cells transfected by sh-ME3 plasmid, $*P < 0.05$ vs sh-EGFP group; D: protein expression levels of ME3 in U87MG and U251MG cells transfected by sh-ME3 plasmid.

图2 ME3在人脑胶质瘤细胞中的表达和sh-ME3质粒的干扰效率

Fig.2 The expression of ME3 gene in glioma cells and the efficiency of interference by sh-ME3



A: sh-ME3转染U251MG细胞后细胞的增殖速率; B: sh-ME3转染U87MG细胞后细胞的增殖速率; C: sh-ME3转染U87MG和U251MG细胞后细胞的克隆形成能力; D: 计数对照组和实验组的克隆数。* $P < 0.05$, 与sh-EGFP组比较。

A: relative proliferation rate of U251MG cells transfected with sh-ME3; B: relative proliferation rate of U87MG cells transfected with sh-ME3; C: colony formation of U251MG and U87MG cells transfected with sh-ME3; D: the graph indicated the average number of colonies. * $P < 0.05$ vs sh-EGFP group.

图3 下调ME3抑制胶质瘤细胞的增殖和克隆形成能力

Fig.3 The down-regulation of ME3 inhibited the proliferation and colony formation of glioma cells

胞进行实验。构建的sh-EGFP和sh-ME3质粒, 均经测序确认后, 进一步转染目的细胞验证干扰效率。验证后U87MG和U251MG转染干扰质粒48 h, 荧光定量PCR结果表明, 与对照组(sh-EGFP)相比, 实验组(sh-ME3)中ME3的水平明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2C)。同时, Western blot的检测结果也证实, 实验组ME3的蛋白表达水平明显降低(图2D)。此结果说明, 本研究所用的干扰质粒sh-ME3能够有效地抑制脑胶质瘤U87MG和U251MG细胞中ME3的表达。

2.2 下调ME3对U87MG、U251MG增殖和克隆形成能力的影响

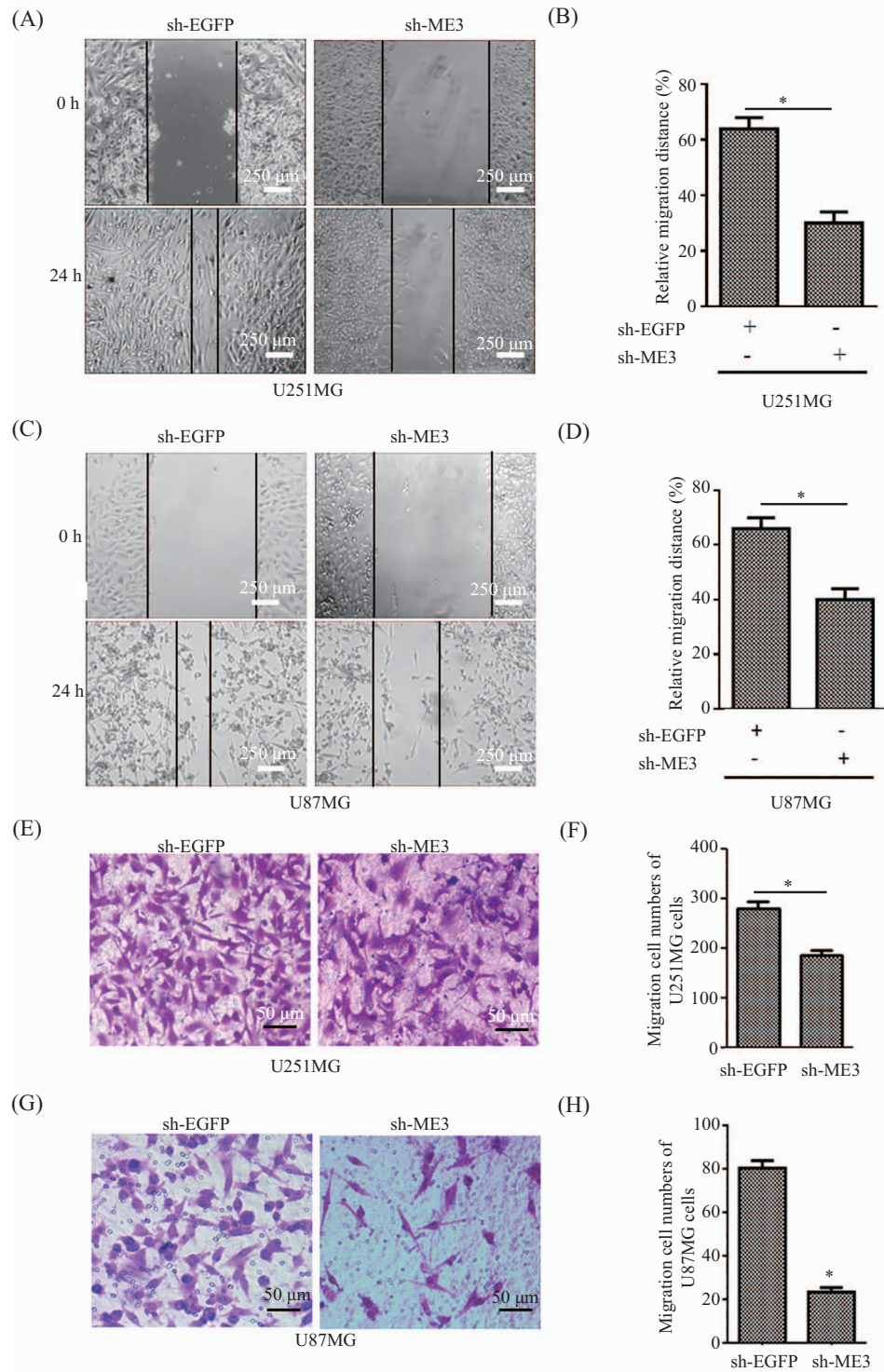
为了分析下调ME3基因表达对U87MG、U251MG细胞增殖速率的影响, 我们分别在质粒转染后的5个时间点(第1、2、3、4、5天)检测96孔板中两组细胞的增殖情况。与对照组(sh-EGFP)相比, 实验组(sh-ME3)细胞的相对增殖速率明显降低, 在48 h即出现

明显增殖抑制现象, 并随着时间延长抑制效果更加明显($P < 0.05$, 图3A和图3B)。

同时, 为了分析下调ME3基因表达对U87MG、U251MG细胞克隆形成能力影响, 在质粒转染后24 h消化细胞分别计数并取1 000个细胞于培养皿中, 10天后对大于50个细胞的克隆计数, 实验组细胞形成的克隆数明显低于对照组($P < 0.05$, 图3C和图3D)。结果说明, 下调ME3基因可以抑制U87MG、U251MG细胞的增殖速率以及细胞的克隆形成能力。

2.3 下调ME3对U87MG、U251MG细胞的迁移和侵袭能力的影响

划痕实验结果显示, 与划痕后0 h细胞相比, 对照组划痕的面积明显缩小, 而实验组划痕面细胞迁移改变较小, U251MG细胞的对照组与实验组相对迁移率分别为: 64 ± 4 和 30 ± 4 , 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图4A和图4B); U87MG细胞的对照组与实

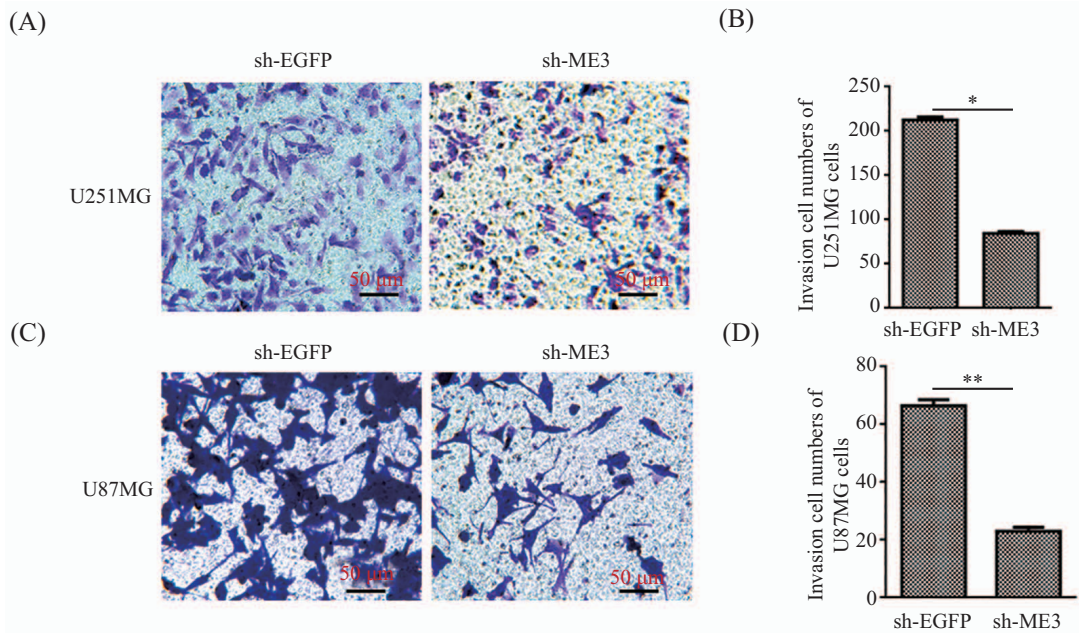


A: sh-ME3转染U251MG细胞后细胞迁移情况; B: sh-ME3转染U251MG细胞后细胞相对迁移距离(%); C: sh-ME3转染U87MG细胞后细胞迁移情况; D: sh-ME3转染U87MG细胞后细胞相对迁移距离(%); E: Transwell迁移检测sh-ME3转染U251MG细胞后的细胞穿膜数; F: 计数U251MG细胞对照组和实验组视野的平均穿膜细胞数; G: Transwell迁移检测sh-ME3转染U87MG细胞后的细胞穿膜数; H: 计数U87MG细胞对照组和实验组视野的平均穿膜细胞数。* $P < 0.05$ 。

A: migration rate of U251MG cells transfected by sh-ME3; B: relative migration distance of U251MG cells transfected by sh-ME3; C: migration rate of U87MG cells transfected by sh-ME3; D: relative migration distance of U87MG cells transfected by sh-ME3; E: the ability of migration was examined by Transwell migration assay in U251MG cells transfected by sh-ME3; F: the graph indicated the average number of migrated cells of U251MG cells per field; G: the ability of migration was examined by Transwell migration assay in U87MG cells transfected by sh-ME3; H: the graph indicated the average number of migrated cells of U87MG cells per field. * $P < 0.05$.

图4 下调ME3抑制胶质瘤细胞的迁移能力

Fig.4 The down-regulation of ME3 inhibited the migration ability of glioma cells



A: Transwell侵袭检测sh-ME3转染U251MG细胞后穿膜细胞数; B: 计数U251MG细胞对照组和实验组视野的平均穿膜细胞数; C: Transwell侵袭检测sh-ME3转染U87MG细胞后穿膜细胞数; D: 计数U87MG细胞对照组和实验组视野的平均穿膜细胞数。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: the ability of invasion was examined by Transwell invasion assay in U251MG cells transfected by sh-ME3; B: the graph indicated the average number of invaded cells of U251MG cells per field; C: the ability of invasion was examined by Transwell invasion assay in U87MG cells transfected by sh-ME3; D: the graph indicated the average number of invaded cells of U87MG cells per field. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图5 下调ME3抑制胶质瘤细胞的侵袭能力

Fig.5 The down-regulating of ME3 inhibited the invasion ability of glioma cells

实验组相对迁移率分别为: 66 ± 4 和 40 ± 4 , 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图4C和图4D)。Transwell迁移实验结果显示, 对照组与实验组细胞在转染后24 h接种于小室中, U251MG细胞对照组与干扰组迁移到下层小室中的细胞数分别为: 287 ± 5 和 188 ± 5 , 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图4E和图4F); U87MG细胞对照组与干扰组迁移到下层小室中的细胞数分别为: 80 ± 5 和 20 ± 5 , 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图4G和图4H)。这两组实验都证实了下调ME3基因能够使U87MG和U251MG细胞的迁移能力减弱。

同时, 我们还检测了下调ME3基因对人脑胶质瘤细胞的侵袭能力的影响。结果显示, U251MG细胞($P < 0.05$, 图5A和图5B)和U87MG细胞($P < 0.01$, 图5C和图5D)的实验组(sh-ME3)穿膜细胞数明显低于对照组(sh-EGFP), 证明下调ME3抑制了脑胶质瘤细胞的侵袭能力。

2.4 下调ME3逆转脑胶质瘤细胞的间质转换过程

我们进一步研究发现, 在U87MG和U251MG细胞中下调ME3后, 与对照组相比, 实验组间质表型标志物(N-钙黏蛋白、波形蛋白)以及人脑胶质瘤特异间质表型标志物YKL-40和纤连蛋白(fibronectin)

表达水平明显下降, 而上皮标志物(E-钙黏蛋白)水平上升(图6)。人脑胶质瘤细胞起源于神经胶质而非上皮细胞, 且实验组相对于对照组其间质表型发生明显降低。因此, 我们认为, 间质转换的说法更为准确。以上结果说明, 下调ME3后, 胶质瘤细胞的间质转换过程被逆转。

3 讨论

神经胶质瘤是最具侵袭性的恶性肿瘤之一, 并且是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤, 占神经系统原发性肿瘤的50%以上。目前, 胶质瘤的治疗主要依靠手术治疗、辅以术后放射治疗和化学药物治疗^[1-2]。但是神经胶质瘤生长速度较快, 极容易侵袭周围的健康组织, 且具有复发率高和转移率高的特点, 所以手术、术后放射和化学药物治疗都无法完全治愈该疾病^[8-9]。E-钙黏蛋白与上皮-间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在癌症的形成、侵袭以及其他涉及器官再生的病理过程(如器官纤维化)中起着重要作用。Wang等^[10]发现, FoxM1可以通过上调Wnt/ β -catenin通路促进GBM的EMT, 但因为脑胶质瘤细胞起源于神经胶质而非

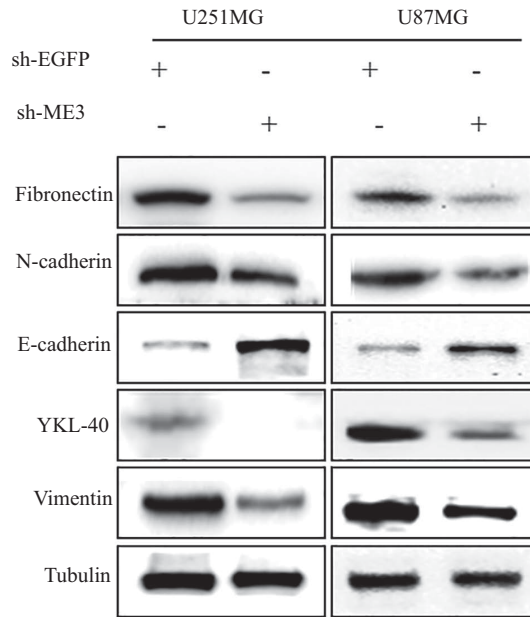


图6 下调ME3对胶质瘤细胞的间质转换的影响

Fig.6 The effect of down-regulating of ME3 on the mesenchymal transition in glioma cells

上皮细胞,因此应使用GMT(glial to mesenchymal transition)而非EMT的说法更为准确。Mu等^[11]发现,Imp2可以通过激活IGF2/PI3K/Akt信号通路调控胰岛素样生长因子2(insulin-like growth factor 2, IGF2)的活性进而促进GBM的EMT。本研究也探讨了ME3对脑胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及其间质转换的影响,结果表明,下调ME3可以抑制胶质瘤的发展,为抑制脑胶质瘤提供了新的途径。

苹果酸酶家族在肿瘤的新陈代谢中发挥了十分重要的作用,连接了糖类与脂质两大能量代谢途径。在近年来的研究中发现,ME2与ME1可在P53的调控下影响肿瘤的发生与发展,而ME2也与胰腺癌、肺癌、黑色素瘤等多种癌症的恶性转化有相当密切的联系^[12-13]。苹果酸酶家族中,ME1位于细胞质中,表达量最高,ME2与ME3的表达量仅占ME1表达量的50%和10%^[14]。因为ME3表达量相对较低,因此过去许多研究并未将ME3纳入主要范围内以考虑其对肿瘤发生发展的影响。但在本研究中发现,ME3在高度恶性组的表达高于低度恶性组,并且我们将干扰ME3的质粒转染于相对高表达ME3的人脑胶质瘤细胞后发现,干扰ME3可以抑制细胞的增殖、迁移和侵袭,并且抑制胶质瘤细胞的间质转换。

ME3和ME2是线粒体中苹果酸向丙酮酸转化过程中的关键酶,对NADPH的循环以及细胞内活性氧类(ROS)的平衡发挥相当重要的作用^[7,12,14]。已有

研究证明,在胰腺导管癌细胞中,ME3在ME2缺失的细胞中可以发挥其对ME2功能的补偿作用,ME3的下调可以促进ME2缺失细胞的死亡,并且ME3的下调抑制了ME2缺失细胞线粒体的功能^[12]。据此,我们推测,尽管在细胞中的表达量远低于ME1和ME2,ME3同样对细胞线粒体功能的维持及调控糖脂代谢发挥十分重要的作用。与此同时,在缺氧(包括葡萄糖缺乏)等肿瘤微环境或线粒体内膜上的丙酮酸载体(MPC1、MPC2)缺失或低表达的条件下,苹果酸生成的线粒体丙酮酸是柠檬酸合成的主要途径,并且上述转化过程同时生成NADPH,可以降低ROS对线粒体的损伤作用^[12],而这一关键产物则是由ME2与ME3催化产生的。Yoshii等^[15]证实,线粒体柠檬酸经由ATP-柠檬酸裂解酶(ATP-citrate lyase, ACLY)催化而生成乙酰辅酶A,是内源性脂肪酸和胆固醇生物合成的重要基础原料,这一途径也是胶质瘤细胞合成内源性脂肪酸的主要途径之一。Chinnaiyan等^[16]证实,人脑胶质瘤间质表型的变化与其代谢方式的改变密切相关。根据以上研究结果及本文中的数据我们推测,可能是由于ME3下调后,细胞内丙酮酸的生成被抑制,进而减少柠檬酸合成,最终抑制了胶质瘤细胞的脂质合成,并使胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭以及间质表型表达都受到抑制。

综上所述,ME3能够促进胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭以及间质转换,本研究能一定程度上说明

下调ME3能抑制脑胶质瘤的发生、发展及恶性转归,并希望据此可以给胶质瘤的诊断和治疗提供新的思路。然而,ME3的下调影响胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭以及间质转换的具体作用机制有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, *et al.* The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131(6): 803-20.
- 2 Rathod SS, Rani SB, Khan M, Muzumdar D, Shiras A. Tumor suppressive miRNA-34a suppresses cell proliferation and tumor growth of glioma stem cells by targeting Akt and Wnt signaling pathways. *FEBS Open Biol* 2014; 4: 485-95.
- 3 Wang Y, Zhang Y, Qian C, Cai M, Li Y, Li Z, *et al.* GSK3 β / β -catenin signaling is correlated with the differentiation of glioma cells induced by wogonin. *Toxicol Lett* 2013; 222(2): 212-23.
- 4 Iwadate Y. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett* 2016; 11(3): 1615-20.
- 5 Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006; 9(3): 157-73.
- 6 Hsieh JY, Li SY, Tsai WC, Liu JH, Lin CL, Liu GY, *et al.* A small-molecule inhibitor suppresses the tumor-associated mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme (ME2) and induces cellular senescence. *Oncotarget* 2015; 6(24): 20084-98.
- 7 Jiang P, Du W, Mancuso A, Wellen KE, Yang X. Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature* 2013; 493(7434): 689-93.
- 8 Popescu AM, Alexandru O, Brindusa C, Purcaru SO, Tache DE, Tataranu LG, *et al.* Targeting the VEGF and PDGF signaling pathway in glioblastoma treatment. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(7): 7825-37.
- 9 Grau SJ, Trillsch F, Tonn JC, Goldbrunner RH, Noessner E, Nelson PJ, *et al.* Podoplanin increases migration and angiogenesis in malignant glioma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(7): 8663-70.
- 10 Wang Z, Zhang S, Siu TL, Huang S. Glioblastoma multiforme formation and EMT: role of FoxM1 transcription factor. *Curr Pharm Des* 2015; 21(10): 1268-71.
- 11 Mu Q, Wang L, Yu F, Gao H, Lei T, Li P, *et al.* Imp2 regulates GBM progression by activating IGF2/PI3K/Akt pathway. *Cancer Biol Ther* 2015; 16(4): 623-33.
- 12 Dey P, Baddour J, Muller F, Wu CC, Wang H, Liao WT, *et al.* Genomic deletion of malic enzyme 2 confers collateral lethality in pancreatic cancer. *Nature* 2017; 542(7639): 119-23.
- 13 Ren JG, Seth P, Clish CB, Lorkiewicz PK, Higashi RM, Lane AN, *et al.* Knockdown of malic enzyme 2 suppresses lung tumor growth, induces differentiation and impacts PI3K/AKT signaling. *Sci Rep* 2014; 4: 5414.
- 14 Pongratz RL, Kibbey RG, Shulman GI, Cline GW. Cytosolic and mitochondrial malic enzyme isoforms differentially control insulin secretion. *J Biol Chem* 2007; 282(1): 200-7.
- 15 Yoshii Y, Furukawa T, Saga T, Fujibayashi Y. Acetate/acetyl-CoA metabolism associated with cancer fatty acid synthesis: overview and application. *Cancer Lett* 2015; 356(2 Pt A): 211-6.
- 16 Chinnaiyan P, Kensicki E, Bloom G, Prabhu A, Sarcar B, Kahali S, *et al.* The metabolomic signature of malignant glioma reflects accelerated anabolic metabolism. *Cancer Res* 2012; 72(22): 5878-88.