

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.01.006

ATP- 柠檬酸裂解酶在黑素瘤维罗非尼治疗抵抗中的作用机制研究*

田阳子 张倩 易秀莉 王慧娜 王思佳 郭伟楠[△]

(第四军医大学西京皮肤医院 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨 ATP- 柠檬酸裂解酶(ATP-citrate lyase, ACLY)在黑素瘤维罗非尼治疗抵抗中的作用及其可能机制。**方法:**通过 Western blot 实验检测 5 μ M 维罗非尼处理前后黑素瘤细胞中 ACLY 的表达水平,采用 shRNA 干涉黑素瘤细胞中 ACLY 的表达后再给予 5 μ M 维罗非尼处理,通过流式细胞术检测细胞凋亡水平;通过 Western blot 实验检测黑素瘤特异性转录因子 MITF 的表达水平,以及抗凋亡蛋白 BCL-2 和促凋亡蛋白 BAX 的表达水平。**结果:**1)维罗非尼处理后黑素瘤细胞 ACLY 的表达水平较处理前明显升高;2)沉默 ACLY 可以显著增加维罗非尼处理后黑素瘤细胞的凋亡水平;3)在维罗非尼处理下,沉默 ACLY 可以导致 MITF 和 BCL-2 表达水平较对照组显著降低,BAX 表达水平升高。**结论:**ACLY 表达水平升高参与了黑素瘤维罗非尼治疗抵抗,可能与其调控 MITF 表达的作用有关。

关键词:ATP- 柠檬酸裂解酶;黑素瘤;维罗非尼

中图分类号:R-33; R739.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)01-30-05

The Role of ACLY in Vemurafenib Treatment Resistance in Melanoma and the Underlying Mechanism*

TIAN Yang-zi, ZHANG Qian, YI Xiu-li, WANG Hui-na, WANG Si-jia, GUO Wei-nan[△]

(Department of Dermatology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of ATP-citrate lyase (ACLY) in Vemurafenib treatment resistance in melanoma and the possible mechanism. **Method (s):** Western blot was used to detect the protein expression of ACLY in melanoma cells before and after the treatment of 5 μ M Vemurafenib. Flow cytometry analysis was used to examine cell apoptosis of melanoma cell with or without the knockdown of ACLY after 5 μ M Vemurafenib treatment. The expression levels of melanocytic-lineage specific transcriptional factor MITF (microphthalmia-associated transcription factor), and anti-apoptotic BCL-2 and pro-apoptotic BAX were detected by Western blot. **Result (s):** 1) Vemurafenib treatment increased the expression of ACLY in melanoma cells; 2) The knockdown of ACLY could significantly increase the apoptosis of melanoma cells induced by Vemurafenib; 3) Under Vemurafenib treatment, ACLY expression deficiency resulted in the down-regulation of MITF and BCL-2, and the up-regulation of BAX. **Conclusion (s):** ACLY is involved in the Vemurafenib treatment resistance in melanoma, and this effect may be related to the regulation of MITF expression by ACLY.

Key words: ATP-citrate lyase; Melanoma; Vemurafenib

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R739.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)01-30-05

前言

黑素瘤起源于表皮黑素细胞,是最致命的皮肤恶性肿瘤,具有很强的增殖和转移能力,极易复发,治疗困难^[1,2]。2011年,维罗非尼(Vemurafenib)作为 BRAF 突变黑素瘤患者的一线治疗药物,开启了黑素瘤靶向治疗的新时代^[3,4]。然而,大多数病例在短暂的缓解期后均会出现治疗抵抗,限制了靶向治疗的效果。因此,进一步明确其发病机制及靶向治疗抵抗机理,对于改善患者的预后具有重要意义。

在黑素瘤快速增殖的过程中,肿瘤细胞的脂肪合成过程明显活跃,肿瘤细胞脂肪生成的主要来源是脂肪酸的从头合成,该过程受到一系列酶的精确调控,其中就包括 ATP- 柠檬酸裂

解酶(ATP citrate lyase, ACLY)^[5]。已有的研究显示,ACLY 在多种肿瘤中表达水平升高,且主要是通过促进脂肪合成参与肿瘤的进展^[6]。然而,ACLY 在黑素瘤中的作用以及是否参与靶向药物的治疗抵抗尚不明确,本研究旨在细胞水平探讨 ACLY 在黑素瘤维罗非尼治疗抵抗中的作用及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要细胞、试剂和仪器

1.1.1 黑素瘤细胞系 人黑素瘤细胞系 A2058 和 451Lu 购于美国 ATCC 细胞库,我室常规液氮冻存保种。

1.1.2 实验试剂 委托上海吉玛制药技术有限公司合成靶向 ACLY 分子的 Sh-RNA 干涉片段,种属均为人,序列为:Sh-ACLY#1

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81625020, 81402261)

作者简介:田阳子(1985-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:黑素瘤发病机制,E-mail: tianyangzi428@163.com

[△] 通讯作者:郭伟楠(1992-),男,博士,主治医师,主要研究方向:黑素瘤发病机制,E-mail: guown@fmmu.edu.cn, 电话:18700916853

(收稿日期:2019-10-01 接受日期:2019-10-23)

(5'-3') GCTGAATACCGAGGACATTAA;Sh-ACLY#2 (5'-3'): GCATTAAGCCTGGATGCTTTA;对照组序列为:Sh-NC sense (5'-3'):UUCUCCGAACGUGUCACGUTT。维罗非尼 (PLX4032, Vemurafenib) 购自美国 Selleck 公司;DMSO(二甲基亚砜)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;Annexin V-PE/7AAD 细胞凋亡检测试剂盒购自杭州联科生物技术有限公司;细胞转染试剂 Lipo3000 购自美国 Invitrogen 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 生命科技公司;DMEM/F12 培养基、RPMI 培养基均购自美国 Hyclone 公司。

1.1.3 实验仪器 Cytomics FC500 数字化流式细胞分析仪购自美国 Beckmen 公司;免疫印迹蛋白电泳仪、免疫印迹蛋白转膜仪(湿型)、免疫印迹凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司;荧光定量 PCR 检测系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养 451Lu 细胞系使用含 10% 胎牛血清的 RPMI 培养基;A2058 细胞系用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基按常规方法培养。

1.2.2 分组与药物处理 Vemurafenib 工作液(浓度 5 μM)使用 Vemurafenib 储存液(浓度 10 mM)5 μL 和无血清培养基 10 mL 进行混合配置。本研究中实验分组为:DMSO+Sh-NC 组(阴性对照组)、DMSO+ACLY 沉默组(Sh-ACLY 转染组)、维罗非尼处理组(Vemurafenib+Sh-NC 组)、维罗非尼处理联合 ACLY 沉默组(Vemurafenib+Sh-ACLY 组)。

1.2.3 Western blot 实验 用胰蛋白酶消化离心细胞,之后加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液于冰上裂解 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 rpm 离心 15 min 后收集上清即获得细胞内总蛋白,蛋白用 BCA 法进行浓度检测,随后加入上样缓冲液于沸水中煮 5 min,蛋白自然冷却后即可用加样器加入凝胶中进行电泳。蛋白在凝胶中充分分离后,即可将其转印至 PVDF 膜。抗体孵育前将 PVDF 膜用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,滴加稀释好的一抗于膜表面后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中反应过夜。PBST 洗膜三次,每次

10 min,滴加稀释好的二抗于膜表面并在常温下孵育 2 h,孵育结束后用 PBST 洗 3 次,每次 10 min,最后滴加 ECL 发光液对结果进行检测。

1.2.4 ShRNA 转染 首先,取状态良好的对数期细胞,以 2.5×10^5 个/孔均匀铺 6 孔板,常规培养,镜下观察发现 80% 融合时可进行转染,配置转染体系:六孔板每孔转染体系为 250 μL 无血清培养基,分为两个 EP 管配置,每管 125 μL 。向第一管中滴加 5 μL Lipo3000,小心吹匀;向第二管滴加 2.5 μg 质粒及 5 μL P3000,小心吹匀,室温静置 5 min 后,再将 2 管中液体轻柔混合,室温静置 5 min,向六孔板中小心滴加混匀的转染体系,置于 CO₂ 孵箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续常规培养,24 h 后即可进行后续细胞凋亡实验、蛋白提取等实验操作。

1.2.5 流式细胞凋亡检测 取前述 ShRNA 转染的细胞,以 2.5×10^5 个/孔均匀铺 6 孔板,每个处理 3 个重复,常规培养 48 h 后,使用 0.25% 胰蛋白酶消化,800 rpm 离心 5 min 收集细胞,使用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷无菌 PBS 洗涤细胞后进行计数,取 1×10^5 个细胞用 100 μL 结合缓冲液重悬,向每管悬液加入 5 μL Annexin V-PE 和 10 μL 7AAD,震荡后室温避光放置 10 min,向每管中继续加入 250 μL 结合缓冲液,震荡后上机分析检测。

1.3 统计方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,实验均需独立重复至少 3 次,定量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组均数比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 维罗非尼处理可促进黑色素瘤细胞 ACLY 表达水平升高

我们分别给予 2 株黑色素瘤细胞系 A2058 和 451Lu 5 μM 维罗非尼处理,通过 Western Blot 实验检测维罗非尼处理前后 ACLY 的蛋白表达水平。结果显示,维罗非尼处理后 ACLY 的蛋白表达水平明显升高(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)(见图 1)。

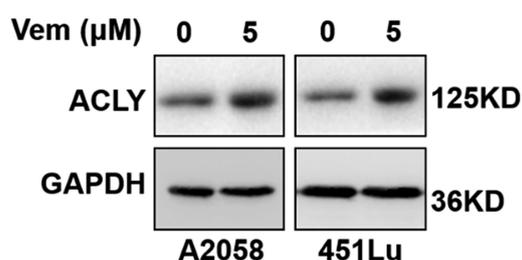


图 1 维罗非尼处理后黑色素瘤细胞 ACLY 的表达水平(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Fig. 1 The expressions of ACLY after the treatment of Vemurafenib in melanoma cell lines(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

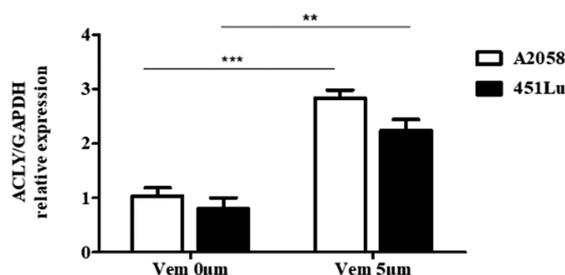
2.2 ACLY 沉默效率验证

为了探讨 ACLY 在黑色素瘤维罗非尼治疗抵抗中的作用,我们首先合成了靶向 ACLY 表达的 ShRNA 干涉片段,并对其效率进行了 Western blot 分析,结果显示 ACLY 沉默效果良好,与 Sh-NC 组(阴性对照片段转染组)相比,ACLY 沉默组(Sh-ACLY 转染组)细胞内 ACLY 蛋白含量下降明显(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)(见图 2)。

2.3 沉默 ACLY 可以显著增加维罗非尼诱导的黑色素瘤细胞凋

亡水平

在 A2058 和 451Lu 黑色素瘤细胞系中给予相应分组处理后用流式细胞术检测细胞凋亡率,结果显示:与阴性对照组(DMSO+Sh-NC 组)相比,ACLY 沉默组(DMSO+Sh-ACLY 组)细胞凋亡率无明显差异($P > 0.05$),而维罗非尼处理组(Vemurafenib+Sh-NC 组)细胞凋亡率明显增加(** $P < 0.01$),且维罗非尼处理联合 ACLY 沉默组(Vemurafenib+Sh-ACLY 组)细胞凋亡率增加更为显著(*** $P < 0.001$)。与维罗非尼处理组



(Vemurafenib+Sh-NC 组)相比,维罗非尼处理联合 ACLY 沉默组 (Vemurafenib+Sh-ACLY 组)细胞凋亡率显著增加 (** $P<0.01$).

01)。该部分结果表明,干涉 ACLY 可以加剧维罗非尼诱导的黑素瘤细胞凋亡水平(见图 3)。

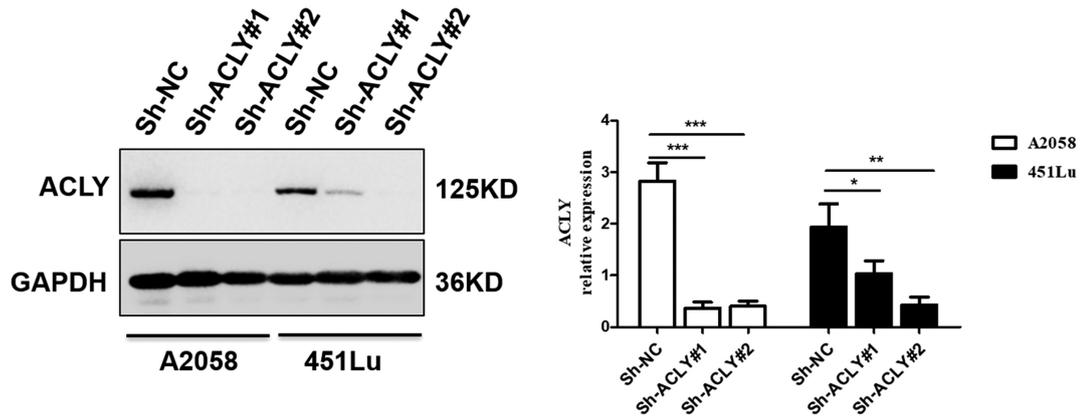


图 2 黑素瘤细胞系中 ACLY 沉默效率的检测 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

Fig. 2 The efficacy of ACLY knockdown in melanoma cells(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

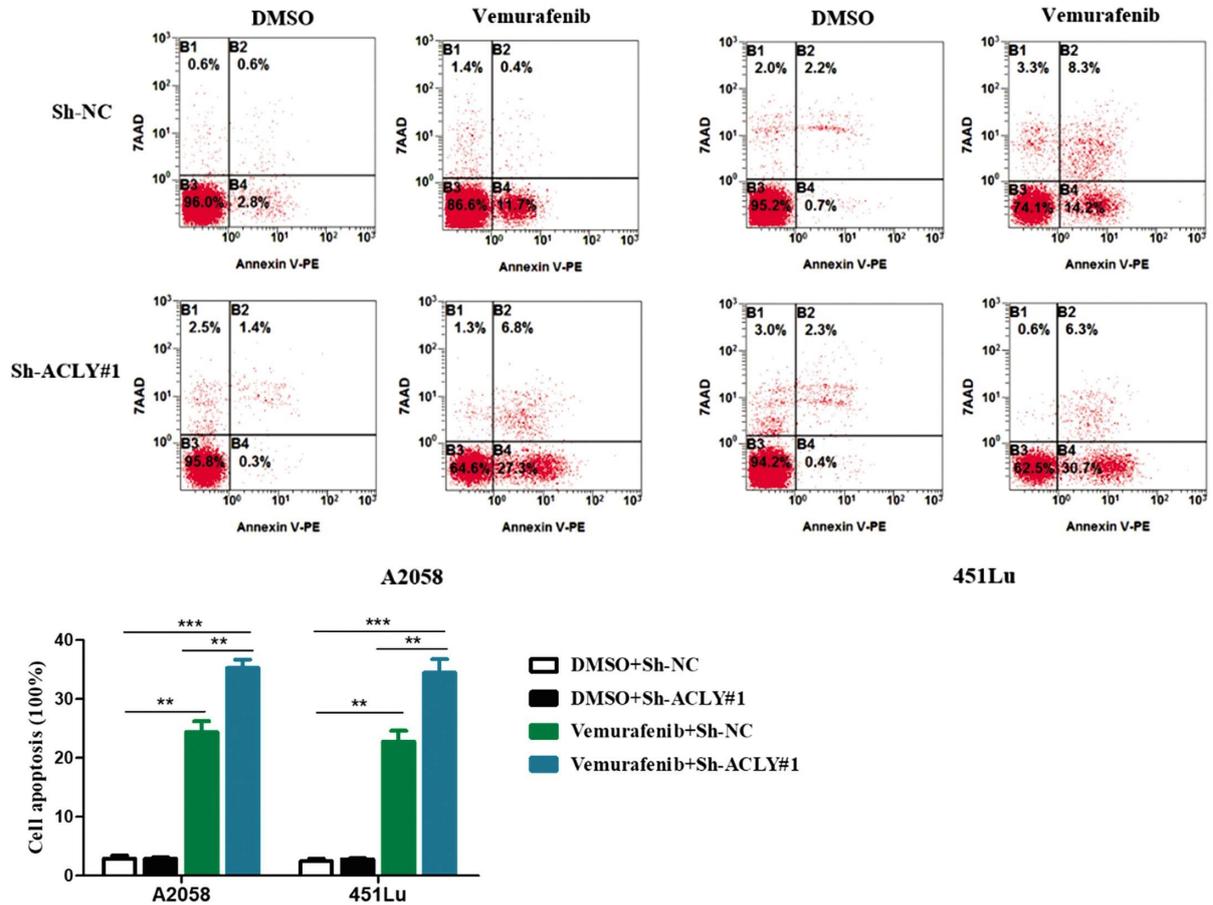


图 3 沉默 ACLY 可加剧维罗非尼诱导的细胞凋亡 (** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

Fig. 3 The knockdown of ACLY augmented Vemurafenib-induced melanoma cell apoptosis (** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

2.4 在维罗非尼处理下沉默 ACLY 导致 MITF 和 BCL-2 表达水平降低,BAX 表达水平升高

著降低 (** $P<0.01$, *** $P<0.001$),BAX 蛋白表达水平升高 (** $P<0.01$, * $P<0.05$)(见图 4)。

在 A2058 和 451Lu 两株细胞系中沉默 ACLY 后给予 5 μ M 维罗非尼处理,通过 Western Blot 实验检测 MITF、BCL-2、BAX 表达水平,结果显示,与维罗非尼处理组(Vemurafenib+Sh-NC 组)相比,维罗非尼处理联合 ACLY 沉默组 (Vemurafenib+Sh-ACLY 组)中 MITF、BCL-2 蛋白表达水平显

3 讨论

随着黑素瘤的发病率逐渐升高,对于黑素瘤的发病和药物耐药机制研究越来越要得到重视。维罗非尼是针对 BRAF 突变黑素瘤的特异性靶向药物,可以显著抑制细胞内 MAPK 信号的

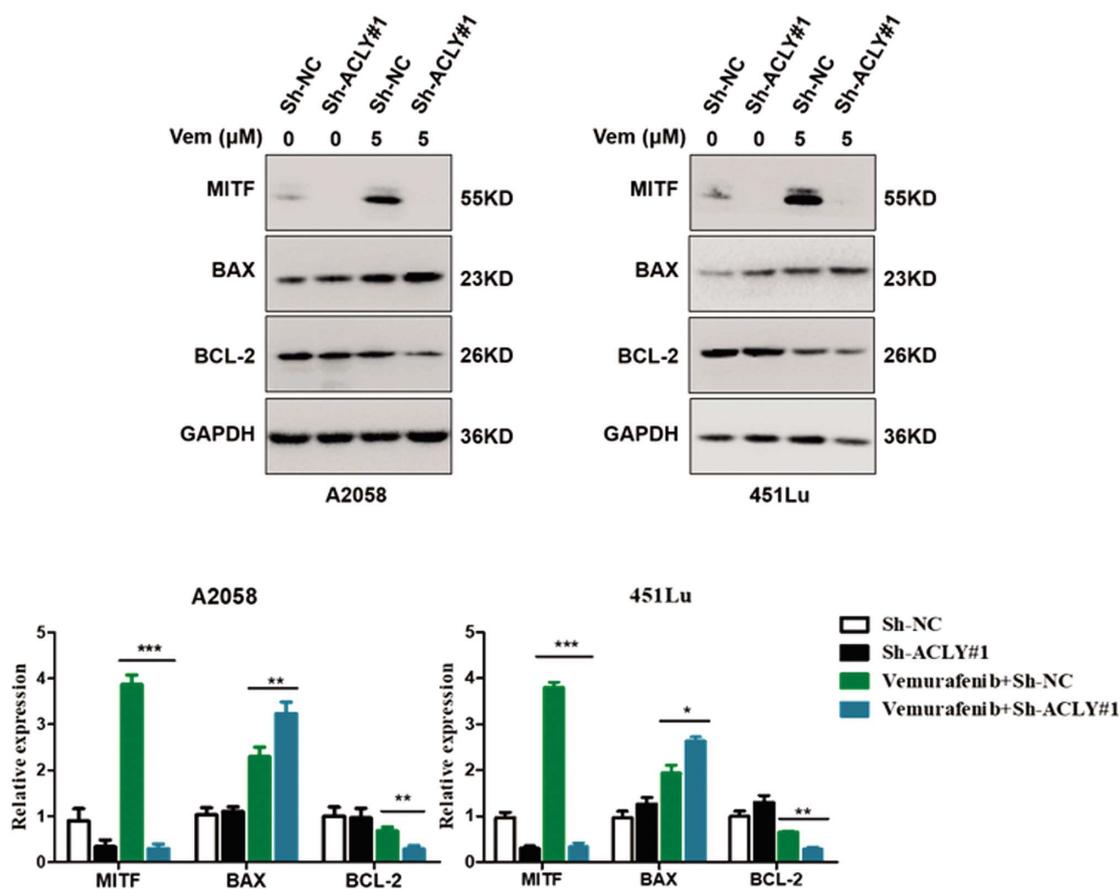


图4 沉默 ACLY 对维罗非尼处理后 A2058 和 451Lu 细胞中 MITF、BAX、BCL-2 表达水平的影响 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Fig. 4 The expressions of MITF, BAX and BCL-2 in Vemurafenib-treated melanoma cells after the knockdown of ACLY (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

过度活化并阻止黑素瘤的发展^[7]。然而,对于维罗非尼的治疗抵抗大大限制了其在临床的应用。目前认为,黑素瘤维罗非尼治疗抵抗的机制涉及 MAPK 通路、PI3K/AKT 通路的激活以及多个基因变异^[8]等等,然而,代谢相关分子在黑素瘤维罗非尼治疗抵抗中的作用知之甚少。

越来越多的研究表明,脂肪代谢及相关分子表达变化可显著影响肿瘤的发生发展。在黑素瘤快速增殖的过程中,细胞的脂肪合成过程明显活跃,为细胞膜的生物合成和细胞的能量代谢提供原料,该过程受到一系列酶的精确调控,其中就包括耦联细胞糖代谢和脂代谢的关键酶-ATP-柠檬酸裂解酶 ACLY^[9-11]。已有大量研究表明,ACLY 表达水平升高能维持多种肿瘤细胞的快速增殖和恶性进展,如在肺癌、前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、胃癌以及结肠癌等多种肿瘤中 ACLY 均呈现出不同程度的表达上调并发挥促癌作用^[12-15]。此外,还有研究显示使用基因干预方法沉默 ACLY 能抑制肿瘤细胞的增殖和存活,促进细胞凋亡和分化,并在动物模型中起到相应的抑癌效应^[16-18]。说明 ACLY 是参与肿瘤进展的关键促癌因子。

在机制研究方面,已有文献报道,在非小细胞肺癌细胞系中沉默 ACLY 后,关键促癌磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, 又称 Akt)信号受到显著抑制,提示该通路参与 ACLY 介导的促癌效应。体外实验证实 ACLY 抑制联合他汀类药物能够下调 PI3K/AKT 和 MAPK 通路,可显著降低 ERK 磷酸化水平^[19]。而

在结直肠癌的研究中发现,高表达 ACLY 可诱导 SN38 对伊立替康的治疗抵抗,而沉默 ACLY 和 Akt 可以使耐药的细胞株 SN38 对伊立替康于再次敏感^[20],提示代谢酶分子表达水平适应性变化可能是肿瘤药物治疗抵抗的重要机制。

在本研究中,我们的结果显示,维罗非尼处理后可显著诱导黑素瘤细胞 ACLY 表达水平升高;沉默 ACLY 可以增加维罗非尼诱导的黑素瘤细胞凋亡水平。进一步我们发现,在沉默 ACLY 的条件下给予维罗非尼刺激,黑素瘤细胞中的 MITF 和抗凋亡分子 BCL-2 表达显著下降,而促凋亡分子 BAX 表达显著升高,提示 ACLY 表达水平升高参与黑素瘤维罗非尼治疗抵抗的作用机制可能与其调控 MITF 表达并抑制细胞凋亡有关。而既往研究发现,大约有 20%的黑素瘤中会出现 MITF 基因的扩增,其表达水平升高能够促进黑素瘤细胞的增殖^[21],而上调 MITF 可从转录水平激活其下游的抗凋亡蛋白 BCL-2^[22],进一步维持肿瘤细胞存活,促进肿瘤进展。而 ACLY 是如何调控 MITF、其诱导耐受的具体机制还有待进一步明确,这将是我们的下一步研究的主要方向之一。

综上所述,本研究首次证实 ACLY 在维罗非尼处理后的黑素瘤细胞中表达显著升高,可能通过调控 MITF 的表达、抑制细胞凋亡诱导黑素瘤细胞对于维罗非尼的治疗抵抗。因此,ACLY 可能是黑素瘤维罗非尼联合治疗的潜在重要靶点。

参考文献(References)

[1] Schandendorf D, van Akkooi ACJ, Berking C, et al. Melanoma [J].

- Lancet, 2018, 392(10151): 971-984
- [2] Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics[J]. Science, 2014, 346(6212): 945-949
- [3] Kim A, Cohen MS. The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma [J]. Expert Opin Drug Discov, 2016, 11(9): 907-916
- [4] Kim G, McKee AE, Ning YM, et al. FDA approval summary: vemurafenib for treatment of unresectable or metastatic melanoma with the BRAFV600E mutation [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(19): 4994-5000
- [5] Khwairakpam AD, Shyamananda MS, Sailo BL, et al. ATP citrate lyase (ACLY): a promising target for cancer prevention and treatment [J]. Curr Drug Targets, 2015, 16(2): 156-163
- [6] Granchi C. ATP citrate lyase (ACLY) inhibitors: An anti-cancer strategy at the crossroads of glucose and lipid metabolism [J]. Eur J Med Chem, 2018, 157: 1276-1291
- [7] Arozarena I, Wellbrock C. Overcoming resistance to BRAF inhibitors [J]. Ann Transl Med, 2017, 5(19): 387
- [8] Manzano JL, Layos L, Bugés C, et al. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma[J]. Ann Transl Med, 2016, 4(12): 237
- [9] Zaidi N, Swinnen JV, Smans K. ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism[J]. Cancer Res, 2012, 72(15): 3709-3714
- [10] Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy [J]. Br J Cancer, 2009, 100(9): 1369-1372
- [11] Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation [J]. Cancer Res, 2010, 70(20): 8117-8126
- [12] Migita T, Narita T, Nomura K, et al. ATP citrate lyase: activation and therapeutic implications in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(20): 8547-8554
- [13] Wang D, Yin L, Wei J, et al. ATP citrate lyase is increased in human breast cancer, depletion of which promotes apoptosis [J]. Tumour Biol, 2017, 39(4): 1010428317698338
- [14] Wang Y, Wang Y, Shen L, et al. Prognostic and therapeutic implications of increased ATP citrate lyase expression in human epithelial ovarian cancer[J]. Oncol Rep, 2012, 27(4): 1156-1162
- [15] Qian X, Hu J, Zhao J, et al. ATP citrate lyase expression is associated with advanced stage and prognosis in gastric adenocarcinoma[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(5): 7855-7860
- [16] Xin M, Qiao Z, Li J, et al. miR-22 inhibits tumor growth and metastasis by targeting ATP citrate lyase: evidence in osteosarcoma, prostate cancer, cervical cancer and lung cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(28): 44252-44265
- [17] Zaidi N, Royaux I, Swinnen JV, et al. ATP citrate lyase knockdown induces growth arrest and apoptosis through different cell- and environment-dependent mechanisms [J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(9): 1925-1935
- [18] Hanai JI, Doro N, Seth P, et al. ATP citrate lyase knockdown impacts cancer stem cells in vitro[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(undefined): e696
- [19] Hanai J, Doro N, Sasaki AT, et al. Inhibition of lung cancer growth: ATP citrate lyase knockdown and statin treatment leads to dual blockade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT pathways [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(4): 1709-1720
- [20] Zhou Y, Bollu LR, Tozzi F, et al. ATP citrate lyase mediates resistance of colorectal cancer cells to SN38 [J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(12): 2782-2791
- [21] Wellbrock C, Arozarena I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2015, 28(4): 390-406
- [22] McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability[J]. Cell, 2002, 109(6): 707-718

· 重要信息 ·

《现代生物医学进展》2020 年封面设计说明

美国癌症学家威廉·凯林(William G. Kaelin Jr),英国医学家彼得·拉特克利夫(Sir Peter J. Ratcliffe)和美国医学家格雷格·塞门扎(Gregg L. Semenza)共享了2019年诺贝尔生理学或医学奖,他们发现了细胞如何感知并适应氧气变化的含量,证实存在调控基因活性的分子机器,从而响应于不同水平的氧气,这些开创性的发现揭示了生命最重要的适应过程之一。

本刊2020年度的封面设计紧贴上述诺贝尔奖项的主题,封面主体为气泡构成的氧气分子式,表现了氧分子与生命之间的密切联系。此版封面设计主题突出,色彩简约明了,一如既往的体现了《现代生物医学进展》始终与生物医学学科发展前沿衔接的办刊主旨和特色。