

YAP对细胞线粒体功能的影响及其生物学意义研究

李晋¹ 杜苗苗¹ 吕建新^{1,2} 叶子扬^{3*}

(¹温州医科大学检验医学院生命科学学院, 温州 325035; ²浙江省人民医院, 杭州医学院附属人民医院, 杭州 310014;

³温州市中心医院, 温州医科大学定理临床学院, 温州 325000)

摘要 YAP(yes-associated protein)是Hippo信号通路中发挥转录共激活作用的蛋白。已知YAP能够参与细胞的多个代谢过程, 但YAP是否参与了线粒体功能的调控尚不清楚。该研究发现, 无论是化合物抑制YAP功能还是基因敲低YAP表达水平均能够显著提升线粒体呼吸链组装水平, 并促进线粒体呼吸能力的上升和膜电位的升高。初步的机制分析表明, YAP基因功能的抑制可正向调控促进线粒体生物能学的相关转录因子Nrf1、RXR α 和POLG的表达; 负向调控抑制线粒体生物能学的转录因子HIF1- α 的表达。进一步的生物学功能分析表明, 葡萄糖应激或者葡萄糖剥夺下线粒体功能的上升部分依赖于YAP表达量的抑制。综上, 该研究发现, YAP可通过调节线粒体功能调控相关转录因子的表达来影响线粒体功能, 且葡萄糖应激条件下线粒体功能的维持可通过YAP途径实现。

关键词 YAP; 线粒体功能; 葡萄糖应激

Effects of YAP in the Regulation of Mitochondrial Function

LI Jin¹, Du Miaomiao¹, LÜ Jianxin^{1,2}, YE Ziyang^{3*}

(¹School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; ²Zhejiang Provincial People's Hospital, Affiliated People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China; ³Department of Orthopedics, Wenzhou Central Hospital, The Dingli Clinical Institute of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

Abstract YAP (yes-associated protein) is transcriptional co-activator and functions as a downstream effector of Hippo signaling pathway. YAP has been recognized as a transcriptional regulator of multiple metabolic enzymes, however its role in the regulation of mitochondrial function is not known. In this study, inhibition of YAP by either chemical or KD (gene knockdown) in HeLa cells enhanced mitochondrial function by increase the assembly of mitochondrial respiratory chain complexes. Mechanistically, KD of YAP positively regulates the expression of transcriptional factors related to mitochondrial biogenesis including Nrf1, RXR α , and POLG. Whereas HIF1- α , a transcriptional factor which negatively associated with mitochondrial function, was inhibited by the KD of YAP in HeLa cells. Moreover, decreased expression of YAP may be responsible for the enhanced mitochondrial function in glucose deprived HeLa cells. Altogether, YAP is a negative regulator of mitochondrial function and its suppression in glucose deprived cells enhances mitochondrial function.

Keywords YAP; mitochondrial function; glucose stress

HIPPO信号通路最早在果蝇的发育中被发现参与了组织器官大小的调控。该通路进化上非常保守, 通过遗传筛选系统在果蝇中发现的HIPPO通路蛋

白, 在哺乳动物中均有与之对应的成员^[1]。自从该通路相关的salvador蛋白被发现能够调控细胞周期和凋亡, 并且其哺乳动物同功能蛋白SAV1(salvador ho-

收稿日期: 2019-11-02 接受日期: 2019-12-31

国家自然科学基金(批准号: 31670784)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13757707301, E-mail: 84749693@qq.com

Received: November 2, 2019 Accepted: December 31, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31670784)

*Corresponding author. Tel: +86-13757707301, E-mail: 84749693@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5203>

molog 1)在人癌细胞系中存在突变后, 研究开始关注HIPPO信号通路在癌症发生发展中的作用^[2]。在哺乳动物中, HIPPO信号通路的激活主要是胞内的STE20样蛋白激酶(STE20-like protein kinase, MST1/2)发生磷酸化, 激活大肿瘤抑制激酶1/2(large tumor suppressor 1/2, LATS1/2)的磷酸化, 从而导致转录共激活因子yes相关蛋白(yes-associated protein, YAP)磷酸化而被滞留在细胞质基质, 最终抑制了YAP同转录因子TAZ在细胞核内形成起始基因转录的复合体^[3]。在癌症的发生发展过程中, HIPPO通路的抑制会导致未被磷酸化的YAP入核, 从而促进癌症相关基因的转录表达。由于代谢重编程是癌症发生的必要条件, 因此近年来的研究也发现, YAP能够促进多个合成代谢相关的基因转录, 如脱氧核糖核苷酸合成相关的多个关键酶被发现受YAP的转录调控^[4]; 谷氨酰胺(glutamine)合成酶被发现受YAP转录调控从而提升癌细胞中谷氨酰胺的水平来维持细胞内嘌呤和嘧啶的生成^[5]。值得注意的是, YAP还被认为直接参与了线粒体分裂融合以及线粒体呼吸的正向调控^[6-7]。提示YAP极有可能通过对线粒体功能的影响来调控癌细胞的代谢。

线粒体是细胞代谢网络的中心枢纽, 参与葡萄糖分解和脂肪酸氧化, 以及氨基酸、脂质、核苷酸等多种生物分子的合成, 在调控细胞增殖、凋亡、存活及能量代谢等众多生理病理过程中发挥着重要作用。线粒体对细胞代谢的影响极大程度上依赖于其内部氧化磷酸化系统(oxidative phosphorylation system, OXPHOS)功能的改变。OXPHOS以复合体I、II、III、IV和ATP合酶V的形式分布在线粒体内膜上, 构成电子传递链, 合成生物体内95%的ATP。电子传递链中不仅存在散在的复合体, 还存在由复合体I、III、IV等组成的超级复合体^[8], 超级复合体的含量与电子传递效率、活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平密切相关, 是评价OXPHOS功能的重要指标之一^[9]。Warburg效应认为, 癌细胞中OXPHOS功能的下降会过度激活糖酵解来促进细胞合成途径如磷酸戊糖途径和脂肪酸合成途径, 通过降低葡萄糖的氧化来促进葡萄糖向细胞合成代谢途径转变^[10]。此外, 也有研究认为, OXPHOS功能的维持可促进葡萄糖通过三羧酸循环生成更多的天冬氨酸来促进癌细胞的增殖^[11]。但值得注意的是, 由于过度的葡萄糖摄取会导致癌细胞处于糖缺乏的微环境。因此, 癌细胞除了上述两个与糖摄取有关的机制外, 还可能存

在更为精细的葡萄糖缺乏适应性机制。近年的研究表明, 葡萄糖应激下, AMPK可以通过磷酸化YAP抑制YAP介导的基因转录^[5]。但值得注意的是, AMPK的激活本身可以促进OXPHOS的功能, 而以往的报道认为, YAP的抑制可能抑制线粒体功能^[6-7]。因此, 在葡萄糖应激环境下, YAP可能存在不同于以往所报道的其对于OXPHOS的作用。

在研究中, 我们在HeLa细胞中分别使用维替泊芬(verteporfin, VP)(YAP活性抑制剂)和shRNA抑制YAP活性, 分析YAP对线粒体OXPHOS功能的影响, 以及这一影响在葡萄糖应激下的代谢意义。藉此, 我们希望能够进一步明确葡萄糖应激、线粒体功能以及HIPPO信号通路间的联系。

1 材料方法

1.1 主要材料

YAP兔抗人单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的抗兔/抗鼠二抗购自Cell Signaling Technology公司; Nrf1、 β -actin鼠抗人单克隆抗体购自Sananta Cruz Biotechnology公司; Grim19、SDHA、UQCRC2、PGC1 α 、POLG、RXR α 、MT-COI和ATP5A鼠抗人单克隆抗体均购自Abcam公司。

DMEM培养基、无糖培养基、四甲基罗丹明乙酯(tetramethylrhodamine, TMRM)、Lipofectamine 3000试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、超级ECL发光试剂盒以及多功能酶标仪均购自Thermo Fisher Scientific公司; 胎牛血清(fatal bovine serum, FBS)购自Clark Bioscience公司; 青霉素-链霉素溶液购自碧云天生物科技有限公司; 两性霉素B、新霉素(neomycin)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 细胞培养皿购自Corning公司; 小牛血清(cosmic calf serum, CS)、葡萄糖(glucose)、寡霉素(oligomycin)、L-羧基氰对三氟甲氧基苯腙(carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone, FCCP)和细胞滤器购自Sigma公司; Oxygraph-2k线粒体功能测定仪购自Oroboros公司; 蛋白提取用RIPA购自Cell Signaling Technology公司; 毛地黄皂苷(digitonin)购自Merck公司。

1.2 细胞培养

HeLa细胞和HEK 293T细胞均购自中国科学院, 分别用含有10% FBS(HeLa)或10% CS(HEK 293T)、抗生素(100 U/mL青霉素、0.1 mg/mL链霉素和2.5 ng/mL两性霉素B)的DMEM培养基于37 °C、

5% CO₂的培养箱中培养。

1.3 YAP蛋白敲低稳转细胞株的构建

设计shRNA并连接到pRNAU6.1腺病毒质粒中, shRNA序列如下: shYAP-1, 5'-GCT TCA GGT CCT CTT CCT GAT-3'(ORF区); shYAP-2, 5'-GGC AGG CAA TGC GGA ATA TCA-3'(3'-UTR区)。根据Lipofectamine 3000试剂说明书, 用含有shRNAs的载体转染6孔板中生长状态良好的HEK 293T细胞(30%密度)。转染24 h后更换培养基, 继续培养24或48 h后收集含有病毒液的培养基上清, 并用0.45 μm的细胞滤器过滤以去除细胞碎片。

用预热的PBS轻柔冲洗6孔板中生长状态良好的HeLa细胞(50%密度), 每孔加入1 mL无抗生素的培养基及1 mL过滤后的病毒液, 并加入工作浓度为8 μg/mL的聚凝胺(polybrene), 感染24 h后更换含有800 μg/mL neomycin的培养基进行筛选培养, 每2天更换培养基, 直到筛选出具有耐药性的细胞克隆。用不含shRNA的pRNAU6.1作平行对照, 构建对照细胞。将YAP敲低的稳转细胞和对照细胞扩大培养, 并用200 μg/mL neomycin维持抗性。

1.4 Western blot

收集生长状态良好的细胞($2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个/mL), 离心后用预冷的PBS清洗2次, 在细胞沉淀中加入适量含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液(RIPA), 充分重悬后于冰上裂解15 min, 然后于4 °C、14 000 r/min离心10 min, 得到的上清即总蛋白, 用BCA法测蛋白浓度。蛋白95 °C煮沸5 min后经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离并转印到PVDF膜上, 于5%脱脂牛奶中封闭2 h, 1× TBST清洗后于4 °C孵一抗过夜。1× TBST洗膜, 用对应的抗-兔二抗(1:1 000)或抗-鼠二抗(1:1 000)室温孵育2 h。1× TBST清洗后, 加入ECL发光试剂后曝光获得胶片。用Gel-pro Analyzer 4.0图像分析软件对蛋白表达量进行分析。目的蛋白与内参蛋白β-actin光密度D值的比值即为蛋白的相对表达水平。

免疫印迹所用抗-Grim19抗体、抗-UQCRC2抗体、抗-NDUFB6抗体、抗-NDUFS3抗体、抗-CYB抗体、抗-COX IV抗体、抗-PGC1α抗体、抗-POLG抗体、抗-RXRα抗体、抗-Nrf1抗体和抗-YAP抗体浓度均为1:1 000, 抗-SDHA抗体、抗-ATP5A抗体和抗-β-actin抗体浓度均为1:2 000。

1.5 BN-PAGE

收集10 cm培养皿中生长状态良好(密度

80%~90%)的细胞, 离心后用预冷的PBS清洗2次, 在细胞沉淀中加入2%毛地黄皂苷, 充分重悬后于冰上裂解15 min, 然后于4 °C、20 000 r/min离心20 min, 得到的上清即总蛋白, 用BCA法测蛋白浓度。蛋白经过3%~11%非变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(BN-PAGE)分离并转印到PVDF膜上, 于5%脱脂牛奶中封闭2 h, 1× TBST清洗后于4 °C孵一抗过夜(抗-Grim19抗体(1:1 000)、抗-UQCRC2抗体(1:1 000)、抗-MT-COI抗体(1:1 000))。用1× TBST洗膜并用对应的抗-兔二抗(1:1 000)在室温下孵育2 h。1× TBST清洗后, 加入ECL发光试剂并曝光得胶片。用Gel-pro Analyzer 4.0软件对复合体表达量进行统计分析。

1.6 细胞内源性氧呼吸的检测

用Oxygraph-2k线粒体功能测定仪检测线粒体氧呼吸能力。按照说明书清洗、平衡检测仓并校正仓内氧浓度。收集6 cm培养皿中生长状态良好的细胞(密度70%~80%)于离心管中, 离心后用37 °C预热的TDs(1× TD+10% CS)清洗2次。从检测仓内取200 μL TD重悬细胞沉淀, 充分混匀后将其中180 μL加入检测仓内, 另外20 μL用BCA法检测蛋白浓度。待基线平衡后(此时为线粒体基值), 用微量加样器加入3.5 μL oligomycin(0.1 mg/mL)以检测ATP合酶V被抑制后的非偶联性氧呼吸。待基线平衡后加入3 μL FCCP(0.1 mmol/L)以检测去偶联后的最大氧呼吸容量。最后, 用蛋白浓度校正氧呼吸结果。

1.7 线粒体膜电位检测

细胞在6孔板中贴壁生长48 h, 生长状态良好且密度为60%~80%。弃去培养基后用预热的PBS清洗2次, 用含30 nmol/L TMRM染色剂的DMEM在37 °C孵育15 min, 空白对照组细胞用不含TMRM的DMEM孵育。消化并收集细胞, 用预热的PBS清洗3次, 离心后用400 μL PBS重悬。在黑色96孔板中加入细胞悬液(100 μL/孔), 为减少实验误差, 设置3个复孔, 结果取平均值。多功能酶标仪检测荧光值, 激发波长和发射波长分别是549 nm和573 nm。BCA法检测蛋白浓度, 所有荧光值均用细胞浓度校正。

1.8 统计学分析

用SPSS 21.0软件进行统计学分析。计量数据用均数±标准误差($\bar{x} \pm s$)表示。两样本间均数的比较用Student's *t*-test。P<0.05为差异具有统计学意义。所有实验均进行了至少3次独立重复。

2 结果

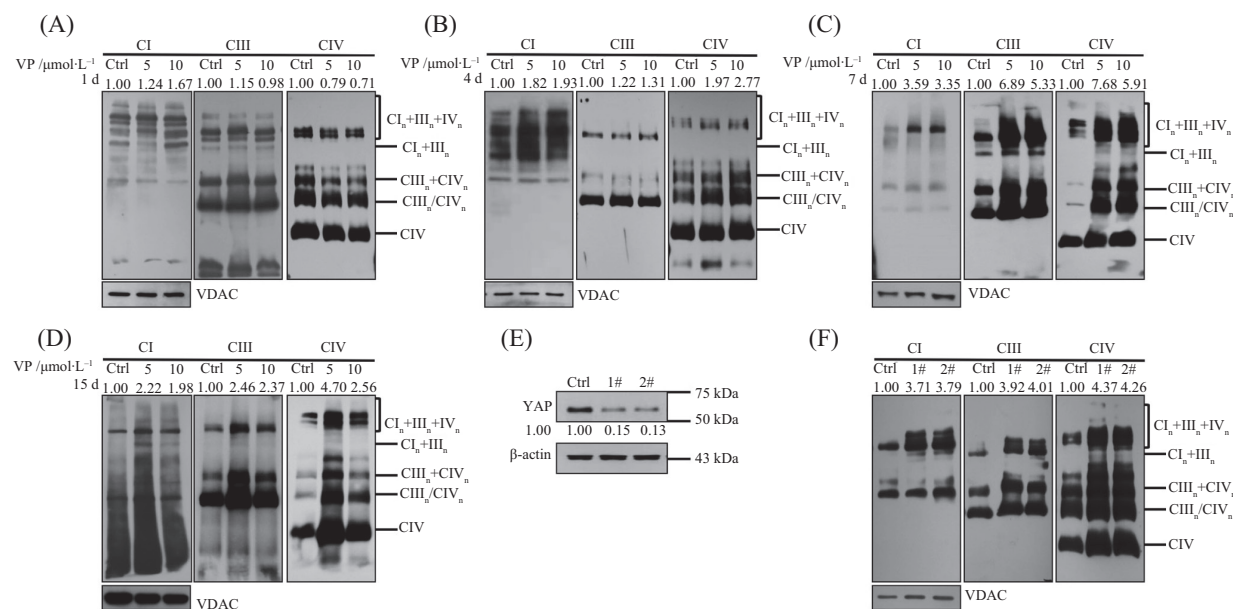
2.1 YAP对呼吸链复合体组装的影响

研究表明, YAP可以调节部分线粒体酶和转运蛋白相关基因的转录, 其中包括呼吸链复合体I相关基因^[12-13], 提示YAP可能对线粒体功能存在正调控作用。为了深入探讨YAP对线粒体功能的潜在影响, 我们分析了HeLa细胞中YAP功能改变后线粒体呼吸链超级复合体含量的变化。首先, 我们利用VP(一种YAP抑制剂, 通过解除YAP-TEAD相互作用以抑制YAP活性), 5 $\mu\text{mol/L}$ 和10 $\mu\text{mol/L}$ VP分别处理HeLa细胞1天(图1A)、4天(图1B)、7天(图1C)和15天(图1D)后分析YAP活性受抑时呼吸链超级复合体的组装情况。结果显示, 虽然VP处理1天对超级复合体没有明显影响, 但是VP处理4天后, HeLa细胞中超级复合体I+III+IV($\text{CI}_n+\text{III}_n+\text{IV}_n$)的组装水平开始显著高于未处理组。此外, VP处理7天后, 超级复合体 III_n+IV_n ($\text{CIII}_n+\text{CIV}_n$)、复合体III与复合体IV的二聚体($\text{CIII}_n/\text{CIV}_n$)和复合体IV(CIV)的组装水平显著高于未处理对照组。上述结果表明, YAP活性受抑时线粒体呼吸链超级复合体的含量普遍升高。为了进一

步说明YAP与呼吸链超级复合体之间的关系, 我们利用shRNA在HeLa细胞中构建了YAP稳定敲低的细胞株(图1E)。结果显示, YAP敲低(1#、2#)细胞中呼吸链复合体($\text{CI}+\text{III}+\text{IV}$ 、 $\text{CIII}+\text{IV}$ 、 $\text{CIII}_n/\text{CIV}_n$ 、 CIV)的含量均高于对照细胞(图1F)。上述结果表明, YAP功能的抑制可提升线粒体呼吸链的组装水平。提示, YAP的敲低极有可能促进了细胞的呼吸。

2.2 YAP影响线粒体相关生物合成

为了进一步明确YAP对呼吸链复合体组装的影响机制。我们对5个OXPHOS复合体的代表性亚基含量进行了分析。我们发现, 在YAP敲低细胞中, 复合体I、III、IV编码亚基的含量均高于对照细胞(图2A)。此外, 复合体II与V的含量并未受到影响, 表明YAP的敲低可能影响复合体I、III、IV而非复合体II与V的组装。由于YAP对呼吸链复合体含量的负调控发生在组成亚基水平, 我们推测, YAP的表达抑制可能通过其他机制影响呼吸链复合体组成亚基的转录与翻译。基于这一假设, 我们对调控线粒体生物合成的4个主要调节因子进行了分析。我们发现, 在YAP敲低细胞中, 尽管PGC1 α 的含量并未受到影响; 但是



A~D: 5 $\mu\text{mol/L}$ 和10 $\mu\text{mol/L}$ 的VP分别处理HeLa细胞1天(A)、4天(B)、7天(C)和15天(D)后, 用BN-PAGE(3%~11%)分析呼吸链超级复合体的含量; E: shRNA转染后用SDS-PAGE(10%)验证YAP的敲低水平; F: shRNA转染后用BN-PAGE(3%~11%)分析YAP敲低细胞中线粒体超级复合体的含量。免疫印迹所用抗体: 抗-Grim19抗体、抗-UQCRC2抗体、抗-MT-COI抗体、抗-VDAC抗体和抗-YAP抗体浓度为1:1 000, 抗- β -actin抗体浓度为1:2 000。CI、CIII、CIV分别代表线粒体复合体I、III、IV。

A-D: BN-PAGE analysis of respiratory chain supercomplexes after treated with VP (5 $\mu\text{mol/L}$ or 10 $\mu\text{mol/L}$) for 1 day (A), 4 days (B), 7 days (C) and 15 days (D); E: SDS-PAGE analysis of YAP after shRNA transfection; F: BN-PAGE analysis of respiratory chain supercomplexes after shRNA transfection. Blots were probed with anti-Grim19, anti-UQCRC2, anti-MT-COXI, anti-VDAC, and anti-YAP (1:1 000), and anti- β -actin (1:2 000). CI, CIII, CIV representing complex I, complex III, and complex IV, respectively.

图1 HeLa细胞呼吸链超级复合体的含量受YAP影响

Fig.1 Expression of respiratory chain supercomplexes in HeLa cells were influenced by YAP

在YAP敲低细胞中, 转录因子Nrf1、RXR α 和POLG的表达量高于对照细胞(图2B)。上述结果提示, YAP可能通过提升呼吸链复合体相关转录因子表达, 来促进呼吸链复合体组成亚基的转录, 进而促进呼吸链复合体的组装。此外, 我们还发现, YAP的敲低能够显著降低细胞内负调节线粒体OXPHOS功能的HIF1- α 基因的转录(图2C)。综上, 我们的结果提示, YAP对线粒体呼吸链功能的负调控作用可能来自于其对线粒体呼吸链功能调控因子的调控作用来达到。

2.3 YAP对线粒体功能的影响

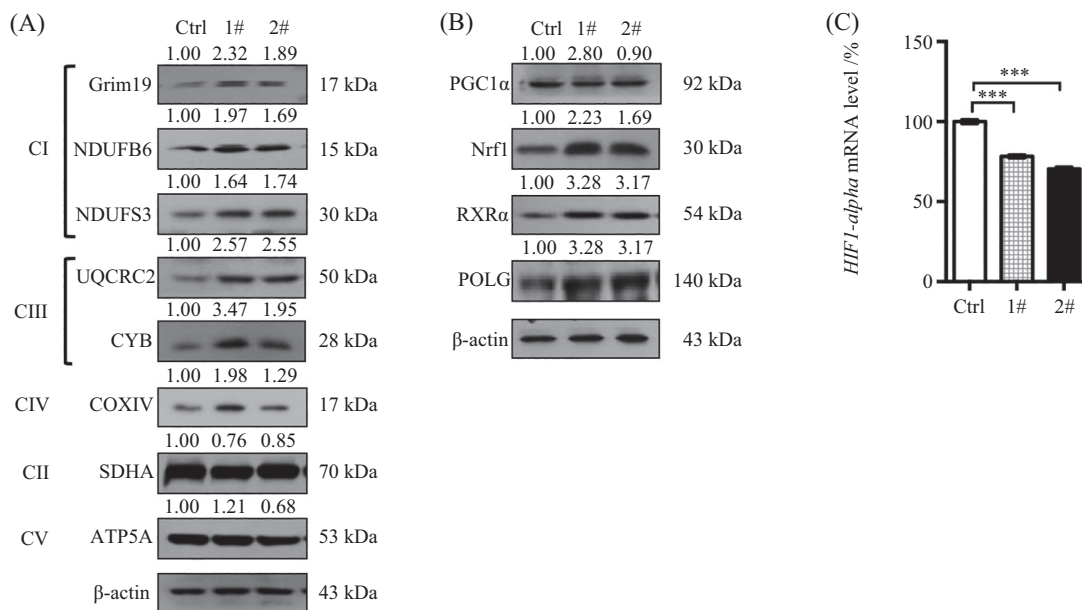
由于呼吸链复合体的组装增加可能来自于线粒体功能下降后的代偿。为了进一步探讨YAP敲低后线粒体呼吸链组装上升的生物学意义。我们首先对直接反应呼吸链功能的细胞耗氧量进行了分析, 我们发现, YAP敲低细胞的基础耗氧量显著高于对照组细胞(图3A)。在去除非偶联呼吸之后, 我们发现, YAP敲低细胞中与线粒体ATP合成相关的细胞呼吸能力也显著高于对照细胞(图3B)。此外, 细胞最大氧呼吸能力也在YAP敲低之后得到了显著的提升(图3A)。

线粒体膜电位是驱动质子回流线粒体基质的动力, 是评价线粒体氧化呼吸能力重要指标之一。

为进一步反映YAP敲低后线粒体氧化呼吸能力的变化, 我们用TMRM染料对细胞进行染色并分析其荧光强度, 结果显示, YAP敲低后线粒体膜电位水平显著高于未敲低组(图3C)。上述结果表明, YAP表达受抑时线粒体功能得到了增强。

2.4 葡萄糖应激条件下呼吸链复合体含量及MMP水平

研究表明, 葡萄糖应激条件下, 线粒体在短时间内可保持较高活性, 使细胞内维持较高ATP水平^[14]。为了探讨葡萄糖应激时线粒体在短时间内维持其OXPHOS功能的原因, 我们分析了无糖或低糖(1 mmol/L)处理48 h后线粒体呼吸链复合体的含量, 结果显示, 葡萄糖应激条件下超级复合体I+III+IV的表达量高于未处理正常细胞(图4A)。此外, 部分反映线粒体功能的膜电位也在葡萄糖应激细胞中得到了显著的提升(图4B)。上述结果表明, 在葡萄糖应激情况下, 线粒体功能缺失得到了显著的提升。而值得注意的是, 在葡萄糖应激过程中, YAP的表达量也显著下调(图4C)。鉴于YAP表达量的下调已经在本研究中被认为参与了线粒体功能的上调(图3), 上述结果综合表明, YAP表达量的下降极有可能参与了葡萄糖应激

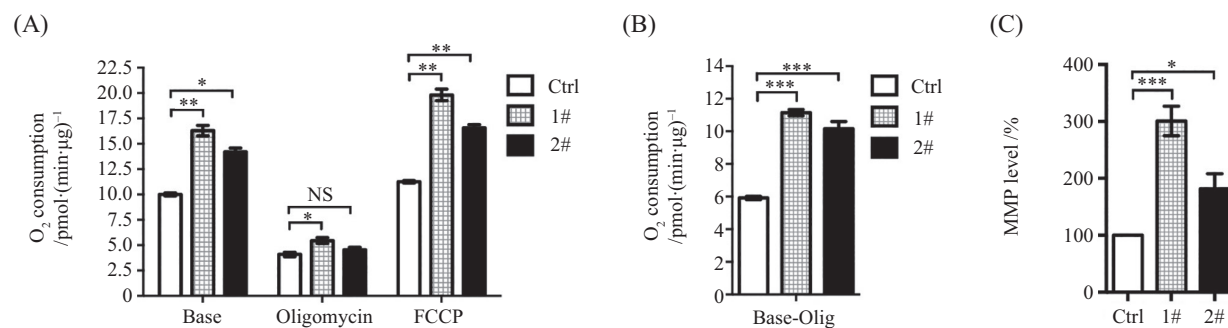


A: SDS-PAGE(10%)分析线粒体呼吸链复合体亚基的表达水平; B: SDS-PAGE(10%)分析线粒体相关转录因子的表达水平; C: HIF1- α 的mRNA水平分析。免疫印迹所用抗-Grim19抗体、抗-UQCRC2抗体、抗-NDUF6抗体、抗-NDUF3抗体、抗-CYB抗体、抗-COX IV抗体、抗-PGC1 α 抗体、抗-POLG抗体、抗-RXR α 抗体和抗-Nrf1抗体浓度均为1:1 000, 抗-SDHA抗体、抗-ATP5A抗体和抗- β -actin抗体浓度均为1:2 000。*** P <0.001。

A: SDS-PAGE analysis of mitochondrial respiratory chain complex subunits; B: SDS-PAGE analysis of mitochondrial related transcription factors; C: mRNA level of HIF1- α . Blots were probed with anti-Grim19, anti-UQCRC2, anti-NDUF6, anti-NDUF3, anti-CYB, anti-COX IV, anti-PGC1 α , anti-POLG, anti-RXR α and anti-Nrf1 (1:1 000); anti-SDHA, anti-ATP5A and anti- β -actin (1:2 000). *** P <0.001.

图2 HeLa细胞线粒体相关生物合成受YAP的影响

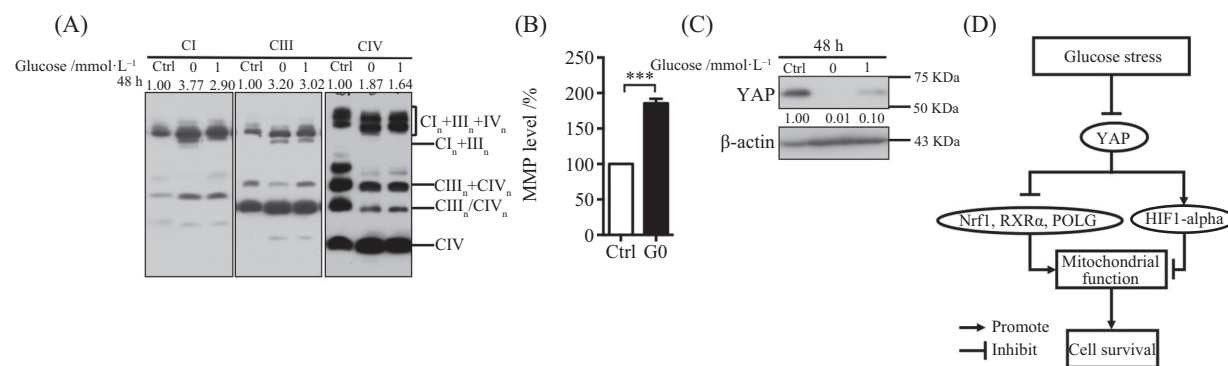
Fig.2 Mitochondrial related biosynthesis in HeLa cells were influenced by YAP



A: 分析对照细胞与YAP敲低细胞的内源性氧耗量; B: 分析对照细胞与YAP敲低细胞中线粒体ATP合成相关的细胞呼吸能力; C: 分析对照细胞与YAP敲低细胞MMP水平。细胞内源性氧耗量及MMP结果均经过蛋白浓度校正。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: analysis of the oxygen consumption rate of control cells and HeLa cells with knockdown of YAP; B: analysis of the mitochondrial ATP synthesis-related respiratory capacity; C: analysis of the MMP level. The values of oxygen consumption rate and MMP were normalized to protein concentration. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图3 HeLa细胞线粒体功能受YAP的影响
Fig.3 Mitochondrial function was influenced by YAP



A: 无糖(0 mmol/L)或低糖(1 mmol/L)处理48 h后, 用BN-PAGE(3%~11%)分析线粒体超级复合体的含量; B: 分析对照细胞与无糖处理48 h细胞(G0)的MMP水平; C: 无糖(0 mmol/L)或低糖(1 mmol/L)处理48 h后, SDS-PAGE(10%)分析YAP表达水平; D: 总结YAP的活性或表达受抑时相关信号通路蛋白的表达变化、线粒体功能的变化及细胞状态。免疫印迹所用抗体为抗-Grim19抗体(1:1 000)、抗-UQCRC2抗体(1:1 000)和抗-MT-COI(1:1 000)抗体。MMP结果经蛋白浓度校正。*** $P<0.001$ 。

A: BN-PAGE (3%~11%) analysis of respiratory chain supercomplexes after treated with low glucose (1 mmol/L) or glucose-free (0 mmol/L) medium for 48 h; B: analysis of the MMP levels of HeLa cells after treating without glucose (G0) for 48 h; C: SDS-PAGE (10%) analysis of YAP after treated with low glucose (1 mmol/L) or glucose-free medium for 48 h; D: summarize the changes in expression of related signaling pathway proteins, changes in mitochondrial function, and cell status when YAP activity or expression is suppressed. The values of MMP were normalized to protein concentration. *** $P<0.001$ 。

图4 低糖或无糖处理能抑制HeLa细胞YAP的表达并提高线粒体功能

Fig.4 Low glucose or glucose-free treatment inhibited YAP expression and increased mitochondrial function in HeLa cells

情况下细胞线粒体功能上调的过程。

3 讨论

已知在细胞代谢应激, 如葡萄糖应激情况下, YAP活性受到了严格的调节。如葡萄糖应激情况下AMPK或者有氧糖酵解情况下, YAP的活性分别受到抑制和激活^[15-16]。由于YAP的激活是一个促生物合成过程, HIPPO通路的抑制或者YAP的激活通常情况下能够促进细胞的增殖, 进而促进癌症的发生发展^[17]。因此, 在能量应激下, 细胞必然需要节省更多的葡萄糖等碳源用于维持细胞的基础代谢而非生

物合成。因此, 我们有理由相信, 葡萄糖应激情况下HIPPO通路应该被某些未知机制激活用于保护细胞免受能量应激导致的凋亡。其中一个主要机制在于AMPK可以通过磷酸化YAP间接激活HIPPO通路。而在我们的实验中, 我们发现, 葡萄糖应激情况下YAP的表达量受到了显著的抑制。尽管我们并没有检测YAP的磷酸化水平, 但我们相信, AMPK对YAP的磷酸化促进了YAP的泛素化降解^[18]。

癌细胞的一个典型特征是在葡萄糖剥夺或者葡萄糖应激情况下, 细胞仍然保持增殖能力。我们相信, YAP通过其它途径避免自身被AMPK的磷

酸化而保持其入核能力可能是其维持细胞增殖的主要机制。但是, 鉴于促癌症发生的常见机制如 *KRAS* 基因的激活或者 *P53* 基因的突变在促进细胞增殖的同时也会抑制细胞的分解代谢^[19-20]。我们推测, YAP 入核除了促进细胞增殖外可能进一步抑制了细胞的分解代谢。

在本研究中, 我们发现, YAP 的敲低能够促进线粒体呼吸链超级复合体的组装及相关生物合成, 进一步促进线粒体呼吸链的功能。这与 AMPK 激活促进线粒体功能的结局一致。我们也注意到有研究认为, YAP 入核能够促进 2 个氧化磷酸化相关基因的转录^[21], 虽然该结果看上去与我们的结果并不是非常一致。但是由于该研究并未对线粒体功能进行深入分析, 我们有理由相信, 单纯 2 个亚基的表达水平改变可能不足以支持线粒体呼吸功能的整体变化。根据我们实验结果, 我们认为在葡萄糖应激情况下, YAP 表达水平的降低可能通过提升线粒体功能来迫使细胞更多地将有限的碳源(包括谷氨酰胺和脂肪酸)用于能量生成而避免生物合成的发生, 从而达到对碳源的充分利用, 维持细胞生存的目的(图 4D)。

我们的结果提示, YAP 的高表达或者其可能的入核具有抑制线粒体功能的能力。因此, 作为转录共激活因子, YAP 更有可能促进了那些负调控线粒体功能的转录因子如 *HIF1- α* 基因的高表达(图 2C)。反之, YAP 的低表达可抑制 *HIF1- α* 的表达。当然, 更进一步的研究需要开展来阐明以下在我们研究中尚未解决的问题。(1) YAP 如何影响 *HIF1- α* 的表达? (2) YAP 如何发挥其对多个线粒体生物合成相关转录因子表达的抑制作用, 以及 *HIF1- α* 是否起到了协调作用? 这些问题的解决将有助于我们充分了解 YAP 对线粒体功能调控的本质。综上, 我们发现, YAP 能够通过调控线粒体生物合成相关的转录因子来负调控细胞线粒体的功能; 糖剥夺下 YAP 表达水平的降低极有可能通过增强线粒体功能来促使细胞将有限的碳源用于生物氧化, 来维持细胞的生存。

参考文献 (Reference)

- [1] MENG Z, MOROISHI T, GUAN K L. Mechanisms of Hippo pathway regulation [J]. *Genes Dev*, 2016, 30(1): 1-17.
- [2] TAPON N, HARVEY K F, BELL D W, et al. Salvador promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines [J]. *Cell*, 2002, 110(4): 467-78.
- [3] HARVEY K F, ZHANG X, THOMAS D M. The Hippo pathway and human cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(4): 246-57.
- [4] SANTINON G, BRIAN I, POCATERRA A, et al. dNTP metabolism links mechanical cues and YAP/TAZ to cell growth and oncogene-induced senescence [J]. *EMBO J*, 2018, 37(11): pii: e97780.
- [5] COX A G, HWANG K L, BROWN K K, et al. Yap reprograms glutamine metabolism to increase nucleotide biosynthesis and enable liver growth [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(8): 886-96.
- [6] NAGARAJ R, GURURAJA-RAO S, JONES K T, et al. Control of mitochondrial structure and function by the Yorkie/YAP oncogenic pathway [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(18): 2027-37.
- [7] QIN F, TIAN J, ZHOU D, et al. Mst1 and Mst2 kinases: regulations and diseases [J]. *Cell Biosci*, 2013, 3(1): 31.
- [8] ACÍN-PÉREZ R, FERNÁNDEZ-SILVA P, PELEATO M L, et al. Respiratory active mitochondrial supercomplexes [J]. *Mol Cell*, 2008, 32(4): 529-39.
- [9] MARANZANA E, BARBERO G, FALASCA A I, et al. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(13): 1469-80.
- [10] VANDER HEIDEN M G, CANTLEY L C, THOMPSON C B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-33.
- [11] SULLIVAN L B, GUI D Y, HOSIOS A M, et al. Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells [J]. *Cell*, 2015, 162(3): 552-63.
- [12] NAGARAJ R, GURURAJA-RAO S, JONES K T, et al. Control of mitochondrial structure and function by the Yorkie/YAP oncogenic pathway [J]. *Gene Dev*, 2012, 26(18): 2027-37.
- [13] OWUSU-ANSAH E, YAVARI A, MANDAL S, et al. Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(3): 356-61.
- [14] 王圆媛. 葡萄糖代谢驱动的质子平衡在肿瘤发生发展中的作用[D]. 天津: 天津医科大学, 2018.
- [15] ENZO E, SANTINON G, POCATERRA A, et al. Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity [J]. *EMBO J*, 2015, 34(10): 1349-70.
- [16] MO J S, MENG Z, KIM Y C, et al. Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(4): 500-10.
- [17] PAN D. The hippo signaling pathway in development and cancer [J]. *Dev Cell*, 2010, 19(4): 491-505.
- [18] ZHAO B, LI L, TUMANENG K, et al. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF (beta-TRCP) [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(1): 72-85.
- [19] HUTTON J E, WANG X, ZIMMERMAN L J, et al. Oncogenic KRAS and BRAF drive metabolic reprogramming in colorectal cancer [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15(9): 2924-38.
- [20] KIM J, YU L, CHEN W, et al. Wild-type p53 promotes cancer metabolic switch by inducing PUMA-dependent suppression of oxidative phosphorylation [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(2): 191-203 e8.
- [21] ROSMARIN A G, RESENDES K K, YANG Z, et al. GA-binding protein transcription factor: a review of GABP as an integrator of intracellular signaling and protein-protein interactions [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2004, 32(1): 143-54.