

PLC ϵ 通过GLS/p-mTOR途径促进膀胱癌细胞T24生存

袁鸿玲¹ 范佳鑫¹ 杨锦潇¹ 李婷¹ 何镇廷¹ 吴小侯² 陈琪³ 欧俐苹^{1*} 罗春丽^{1*}

(¹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;

²重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016; ³贾家中心卫生院, 成都 610000)

摘要 谷氨酰胺对于细胞的代谢和生长十分重要, 也是血液中含有最丰富的氨基酸, 且肿瘤的代谢特征之一就是谷氨酰胺成瘾。该研究探讨磷脂酰肌醇特异性磷脂酶PLC epsilon(phospholipase C epsilon, PLC ϵ)是否通过谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS), 调节膀胱癌T24细胞自噬, 促进膀胱癌细胞生存。首先通过数据库Su Multi-cancer Statistics、Sanchez-Carbado Bladder 2和细胞实验分析PLC ϵ 在膀胱癌中表达情况。结果表明, PLC ϵ 在膀胱癌中高表达。并通过LV-shPLC ϵ 转染膀胱癌T24细胞, q-PCR和Western blot检测PLC ϵ 在膀胱癌T24中的表达情况以及对凋亡和自噬的影响, 同时免疫荧光检测细胞内自噬斑点(LC3)的变化。结果显示, 敲低PLC ϵ 后, Caspase-3/Caspase-8/LC3-II表达增加, p62表达降低; 流式细胞术结果显示凋亡率增高; 免疫荧光发现自噬斑点LC3均增多; GLS和p-mTOR的表达受到抑制。在shPLC ϵ 组中添加过表达GLS质粒后, p-mTOR和p62表达增加, LC3-II表达降低并且免疫荧光自噬斑点LC3减少; 加入敲低GLS质粒后出现相反结果。该研究得出, PLC ϵ 通过GLS/p-mTOR抑制膀胱癌T24细胞自噬, 促进膀胱癌T24细胞的生存。

关键词 膀胱癌; 谷氨酰胺代谢; PLC ϵ ; GLS; 自噬

PLC ϵ Can Promote Bladder Cancer Cell T24 Survival via GLS/p-mTOR Pathway

YUAN Hongling¹, FAN Jiaxin¹, YANG Jinxiao¹, LI Ting¹, HE Zhenting¹,

WU Xiaohou², CHEN Qi³, OU Liping^{1*}, LUO Chunli^{1*}

(¹Key Laboratory of Diagnostics Medicine of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Department of Urinary Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

³Jiajia Central Health Center, Chengdu 610000, China)

Abstract Glutamine which is the most abundant amino acid in the blood, plays a particularly important role in cell growth and metabolism. One of the characteristics of tumor metabolism is glutamine addiction. This study investigated whether PLC ϵ can regulate autophagy and promote the survival of bladder cancer cells T24 targeted by GLS (glutaminase). Firstly, PLC ϵ expression in bladder cancer was analyzed using Su Multi-cancer Statistics, Sanchez-Carbado Bladder 2 database and cell culture experiment. Results showed that PLC ϵ highly expressed in bladder cancer. Then, shPLC ϵ cell lines were established by transfecting LV-shPLC ϵ into bladder cancer cell T24.

收稿日期: 2020-03-20 接受日期: 2020-07-14

国家自然科学基金(批准号: 81072086)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68584890, E-mail: luochunli79@126.com; olp1979@163.com

Received: March 20, 2020 Accepted: July 14, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81072086)

*Corresponding authors. Tel: +86-23-68584890, E-mail: luochunli79@126.com; olp1979@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5335>

The expression of PLC ϵ in bladder cancer cell T24 and its effects on apoptosis and autophagy were detected by q-PCR and Western blot. Meanwhile, the changes of autophagy spot (LC3) were detected by immunofluorescence. The results illustrated that PLC ϵ knockdown increased the expression of Caspase-3/Caspase-8/LC3-II, apoptosis cell ratio and decreased p62; meanwhile increased the number of green autophagy spots LC3 in the cytoplasm by immunofluorescence and inhibited the expression of GLS and p-mTOR. Adding GLS over-expression plasmid into shPLC ϵ group decreased the expression of LC3-II and the number of LC3 autophagy spots, and improved p-mTOR/p62 expression. However the results were reversed after adding GLS knockdown plasmids. This study showed that PLC ϵ could inhibit autophagy in bladder cancer cell T24 via GLS/p-mTOR, thus promoting the survival of tumor cells.

Keywords bladder cancer; glutamine metabolism; PLC ϵ ; GLS; autophagy

膀胱癌(bladder cancer, BCa)是全球九大常见的恶性肿瘤之一^[1], 来源于膀胱上皮组织, 表现出较高的发病率和复发率^[2]。肿瘤微环境中含量最丰富的氨基酸是谷氨酰胺^[3], 它参与供能、生物合成和细胞信号调节等诸多较为重要的生理过程^[4], 同时也对肿瘤的生存和发展起着十分重要的作用。“谷氨酰胺成瘾”是指癌细胞通过大量利用和消耗谷氨酰胺促进肿瘤细胞生存的一种现象^[5], 其中就包括通过谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS)的异常表达增强谷氨酰胺分解。PLC ϵ 属于磷脂酶C家族, 具有与H-ras癌基因的蛋白质表达产物(小G蛋白)和G蛋白进行双向调节的能力^[6]。研究表明, PLC ϵ 能促进膀胱癌细胞的增殖与侵袭^[7-8]并且与糖酵解^[9]、瓦伯格效应(Warburg effect)^[10]都密切相关。在前列腺癌中, PLC ϵ 也参与调节丝氨酸和甘氨酸的代谢^[11]。研究表明, PLC ϵ 在肿瘤细胞中发挥致癌效应并且与糖代谢、氨基酸代谢密切相关。自噬是一个复杂的生理过程, 其通过细胞胞吞和利用溶酶体消化囊泡内容物, 从而降解循环物和维持平衡稳态^[12]。同时氨基酸代谢也与自噬密切相关并且相互调节, 其中谷氨酰胺和亮氨酸通过氨基酸感受器和氨基酸转运体影响肿瘤的多种生理活动, 如: 自噬^[13]作用。然而膀胱癌中PLC ϵ 是否能通过影响谷氨酰胺酶调节自噬机理至今尚不清楚。研究发现, PLC ϵ 在膀胱癌中高表达。因此, 本研究拟通过shPLC ϵ 慢病毒建立干扰PLC ϵ 的膀胱癌细胞株, 以此为基础探讨PLC ϵ 调节谷氨酰胺酶影响膀胱癌细胞凋亡与自噬的具体机制, 为膀胱癌的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人膀胱癌细胞株T24和人膀胱上皮永生化细胞株SV-HUC-1购自中国科学院上海细胞库, 由重庆医

科大学临床检验诊断学教育部重点实验室进行保存。

1.2 病人样本

收取2018~2020年重庆医科大学附属第一医院泌尿外科手术病人的膀胱组织标本(经病理学确诊), 包括20例膀胱癌组织和12例癌旁膀胱组织, 并获取病人知情同意书以及重庆医科大学医学研究伦理委员会审查批准。

1.3 慢病毒

PLC ϵ 干扰慢病毒(LV-shPLC ϵ)以及通用阴性对照慢病毒(LV-shNC)均由上海吉玛制药技术公司负责构建, 序列信息见表1。

1.4 主要试剂

胎牛血清和细胞培养基RPMI-1640购自上海欲立生物科技有限公司。嘌呤霉素定购于北京索莱宝生物科技有限公司。q-PCR引物由Invitrogen英潍捷基(上海)贸易有限公司负责合成, 引物信息见表2。RNA提取试剂盒Trizol、RT-PCR试剂盒和q-PCR定量试剂购于TaKaRa成都微克生物技术有限公司。蛋白质提取试剂以及BCA蛋白浓度测定试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。山羊抗兔多克隆抗体、山羊抗鼠多克隆抗体购于杭州联科生物技术有限公司。兔多克隆抗体LC3B购于Abcam艾博抗(上海)贸易有限公司。兔抗人单克隆抗体LC3、p62购于上海毕傲图生物技术有限公司。山羊抗人多克隆抗体PLC ϵ 定购于圣克鲁斯生物技术有限公司。兔抗人单克隆抗体mTOR、p-mTOR购于Cell Signaling Technology赛信通(上海)生物试剂有限公司。Caspase-3、Caspase-8购于北京博奥森生物技术有限公司。GLS抗体购于Novus上海优宁维生物科技股份有限公司。质粒提取试剂盒购于天根生化科技有限公司。鼠抗人 β -actin单克隆抗体购于ImmunoWay乐

博生物有限公司。防淬灭剂和DAPI购于生物工程(上海)股份有限公司。GLS过表达质粒以及阴性对照质粒购于上海吉凯生物有限公司(将GLS的编码区克隆至GV141表达质粒载体中构建GLS过表达载体。过表达阴性对照就是空载体)。GLS干扰质粒以及阴性对照质粒购于Addgene质粒保藏中心, 序列信息见表3。

1.5 实验方法

1.5.1 细胞培养 将膀胱癌细胞株T24和膀胱上皮永生细胞株SV-HUC-1常规培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640细胞培养基中, 并将其放置于37℃、5% CO₂的饱和湿度的孵箱中观察状态, 待细胞完全贴壁且生长到90%左右时, 使用0.25%胰酶将细胞消化将其传代。

1.5.2 病毒转染 使用胰酶将T24细胞消化下来再接种于6孔板中(每孔 5×10^4 个), 待细胞生长融合度达40%~60%, 更换培养基后再向其中2个孔中加入2 μ L的聚凝胺(polybrene), 再分别加入5 μ L的LV-shNC、LV-shPLC ϵ 病毒原液, 将细胞放入37℃、5% CO₂孵箱中继续培养48 h持续观察细胞状态和转染效率。细胞株转染病毒后再传代3次, 每次添加1 μ g/mL嘌呤霉素用于细胞筛选, 最后获得T24-shNC、T24-shPLC ϵ 稳定细胞株。

1.5.3 实时定量PCR(q-PCR)检测自噬和凋亡基因 q-PCR常规处理细胞48 h待细胞贴壁生长到90%左右, PBS洗涤细胞, 利用Trizol方法提取RNA并且测定对应浓度, 再逆转录为cDNA。最后使用SYBR Green方法, 以 β -actin为内参进行定量PCR检测。检测体系如下: 95℃预变性3 min; 95℃变性10 s, 退火(温度因不同基因而异)30 s, 72℃延伸20 s; 40个循环(RT-PCR为30个循环)。

1.5.4 质粒扩增和提取 将质粒转入感受态细胞中, 再通过四区划线法将菌液划线至固体培养平板上, 后放入37℃孵箱中培养, 12 h后观察平板表面是否形成单个菌落。挑取单个菌落接种于适量含有抗生素的液体培养基中, 37℃、200 r/min恒温摇床孵育过夜(12~16 h)。使用Tiangen质粒提取试剂盒进行质粒抽提, 收集质粒后测定浓度。

1.5.5 使用过表达及干扰质粒转染T24细胞 将T24细胞胰酶消化后接种于6孔板中(每孔 5×10^4 个细胞), 细胞融合度达70%~80%, 改换无血清培养基培养, 并将细胞分为以下实验组: 空白组(仅加入转染

试剂)、阴性对照组(转染试剂+阴性对照质粒)、过表达组(转染试剂+过表达质粒)、干扰组(转染试剂+干扰质粒)。再将250 μ L无血清培养基分别与2 μ g/孔的质粒和4 μ L/孔的Lipofectamine 2000进行稀释混匀, 室温静置5 min后, 再次混匀持续静置20~30 min, 随后以每孔500 μ L混合物加入6孔板中, 轻柔摇匀后将其放入37℃、5% CO₂细胞孵箱中继续观察培养, 待4~6 h后改换有血清培养基, 放入孵箱48 h后, 再观察细胞的状态及转染效率, 为后续实验准备。

1.5.6 提取组织RNA并测定相应浓度 提前配好裂解液, 组织放入预冷研钵, 加入少量液氮, 研磨组织, 待组织变软, 再加入液氮再研磨重复3~5次, 最后按50~100 mg/mL加入总RNA提取试剂后, 装入EP管后, 利用Trizol方法提取组织RNA并且测定浓度, 再逆转录为cDNA。最后定量PCR检测组织中PLC ϵ 的mRNA表达情况。

1.5.7 Western blot检测细胞蛋白质水平 常规处理T24细胞, 待细胞贴壁到90%左右, 使用热裂解法提取不同处理组的总蛋白以及BCA测定其蛋白浓度。用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离样品蛋白, 并用湿转法将其转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上, 持续5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 稀释后再4℃一抗(稀释比例1:1 000)孵育过夜, TBST洗涤5次(5 min/次); 稀释后二抗(稀释比例1:5 000)室温孵育1.5 h, TBST洗5次(5 min/次), 最后ECL化学发光, 显影分析结果。

1.5.8 流式细胞术测定细胞凋亡 常规处理细胞培养一段时间后, PBS洗涤细胞3次, 加入0.25%无EDTA的胰酶消化细胞后将液体转移到离心管中, 500 r/min离心10 min, 弃上清PBS重复洗涤2次, 最后PBS重悬, 送于凋亡测定。

1.5.9 细胞免疫荧光 常规处理细胞后, 将细胞分别以 1×10^5 个/mL细胞密度置于12孔板盖玻片上均匀生长。用PBS洗涤细胞, 并在室温下使用4%甲醛中固定20 min。PBS洗涤细胞, 然后将细胞置于0.05% Triton X-100中透膜, 37℃孵育30 min。PBS洗5 min重复3次, 山羊血清37℃封闭30 min, 一抗(稀释比例1:200)4℃孵育过夜。PBS洗5 min重复3次, 避光加二抗(稀释比例1:200)后继续37℃孵育1 h, PBS洗5 min反复3次, 避光使用DAPI染色5 min, 然后使用防淬灭剂避光封片, 并用指甲油固定, 最后通过正置荧光显微镜观察并拍照。

1.5.10 统计学分析 各项实验均重复3次以上, 结果使用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料使用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间两两比较使用 t 检验分析, 多组间比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膀胱癌细胞株T24中PLCε呈现高表达状态

使用 Oncomine(<https://www.oncomine.org/resource/login.html>)分析 Su Multi-cancer Statistics数据库中多种肿瘤的PLCε表达情况, 结果相较于其他癌症, PLCε在膀胱癌中高表达(图1); 分析Sanchez-Carbayo Bladder 2数据库中PLCε在膀胱癌中的表达, 与膀胱正常组织相比, PLCε在浅表型膀胱癌中高表达($P < 0.001$, 图1)。并收集膀胱癌患者组织标本,

包括膀胱癌组织($n=20$)和癌旁组织($n=12$), 提取组织RNA, q-PCR结果显示, 相较于癌旁组织, PLCε在膀胱癌组织中高表达($P < 0.01$, 图1)。同时q-PCR和Western blot检测膀胱上皮永生化细胞株SV-HUC-1和膀胱癌细胞株T24中PLCε的表达。结果显示, 与SV-HUC-1相比, PLCε在T24中高表达($P < 0.01$, 图1)。综上证明, PLCε在膀胱癌中高表达。

2.2 转染shPLCε慢病毒下调T24细胞中PLCε的表达

q-PCR和Western blot的结果显示, 无论是在mRNA还是蛋白质水平, 转染shPLCε慢病毒组的PLCε表达均低于shNC组和空白对照组($P < 0.01$, 图2); 空白对照组和shNC组的PLCε表达差异无统计学意义($P > 0.05$, 图2)。结果表明, 转染shPLCε慢病毒成功敲低T24细胞内PLCε的表达, 为后续实验做准备。

表1 慢病毒序列
Table 1 Lentivirus sequence

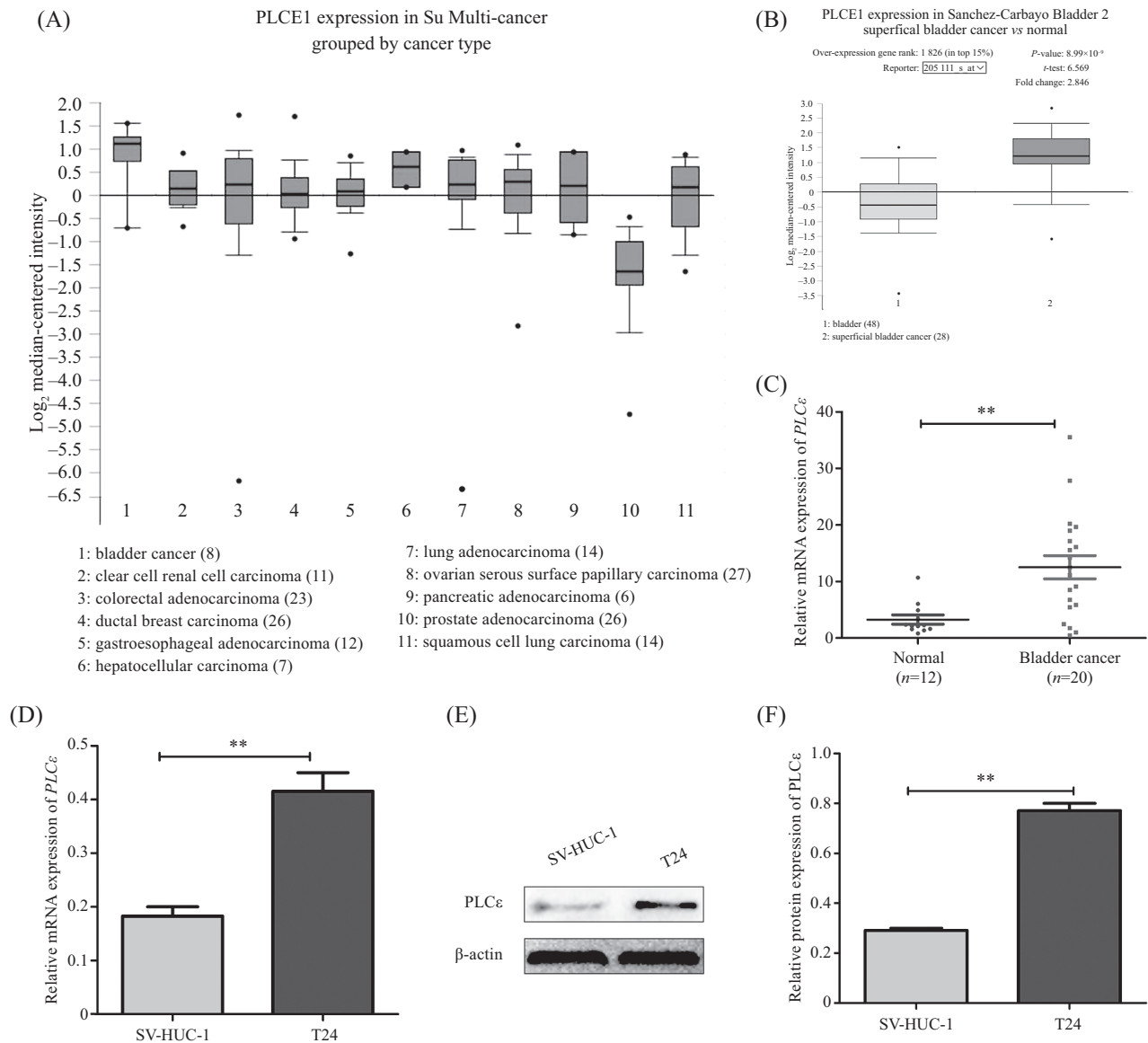
病毒名称	病毒序列(5'→3')
Lentivirus name	Lentivirus sequence (5'→3')
LV-shNC	Sense: TTC TCC GAA CGT GTC ACG T Anti-sense: AAG AGG CTT GCA CAG TGC A
LV-shPLCε	Sense: GGT TCT CTC CTA GAA GCA ACC Anti-sense: CCA AGA GAG GAT CTT CGT TGG

表2 PCR引物信息
Table 2 The sequence of primer for q-PCR

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
PLCε	GGA GAA TCC TCG GTA G	GGT TGT CAG CGT ATG TCC
GLS	TAC TGA GCC CTG AAG C	TCC AGA GGA GGA GAC C
LC3	GAC CGC TGT AAG GAG GTG C	CTT GAC CAA CTC GCT CAT GTT A
p62	GGG GAC TTG GTT GCC TTT T	CAG CCA TCG CAG ATC ACA TT
Caspase3	CAT GGA AGC GAA TCA ATG GAC T	CTG TAC CAG ACC GAG ATG TCA
Caspase8	GAA TGT TGG AGG AAA GCA ATC TC	TGA GCC CTG CCT GGT GTC T
β-actin	GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC	ACG AGA CCA CCT TCA ACT CCA C

表3 质粒序列信息
Table 3 Plasmid vector sequence

质粒名称	质粒序列(5'→3')
Plasmid vector name	Plasmid vector sequence (5'→3')
pLKO.1-blast shKGA	Sense: ACA GCG GGA CTA TGA TTC T Anti-sense: TGT CGC CCT GAT ACT AAG A
pLKO.1-blast-SCRAMBLE	Sense: CCT AAG GTT AAG TCG CCC TCG Anti-sense: GGA TTC CAA TTC AGC GGG AGC



A: 通过Oncomine(<https://www.oncomine.org/resource/login.html>)分析Su Multi-cancer statistics数据库中11类癌症样本(n =样本例数)中PLCE1的表达情况; B: 通过Oncomine分析Sanchez-Carbayo Bladder 2数据库中PLCE1在膀胱癌中的表达; C: q-PCR检测膀胱癌组织标本($n=20$)和癌旁组织标本($n=12$)的PLCE1 mRNA表达; D: q-PCR检测SV-HUC-1与T24细胞中PLCE1 mRNA表达水平; E: Western blot检测SV-HUC-1与T24细胞中PLCE1蛋白水平; F: SV-HUC-1与T24细胞蛋白表达灰度值水平。*** $P<0.01$ 。

A: analyze PLCE1 expression in 11 cancer samples (n =samples number) using Oncomine (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>) in Su Multi-cancer statistics database; B: analyze PLCE1 expression in bladder cancer samples using Oncomine in Sanchez-Carbayo Bladder 2 database; C: PLCE1 mRNA expression measured by q-PCR in bladder cancer tissues ($n=20$) and adjacent tissues ($n=12$); D: PLCE1 mRNA expression measured by q-PCR in T24 and SV-HUC-1 cells; E: PLCE1 protein expression measured by Western blot; F: relative protein levels in SV-HUC-1 and T24 cells. *** $P<0.01$.

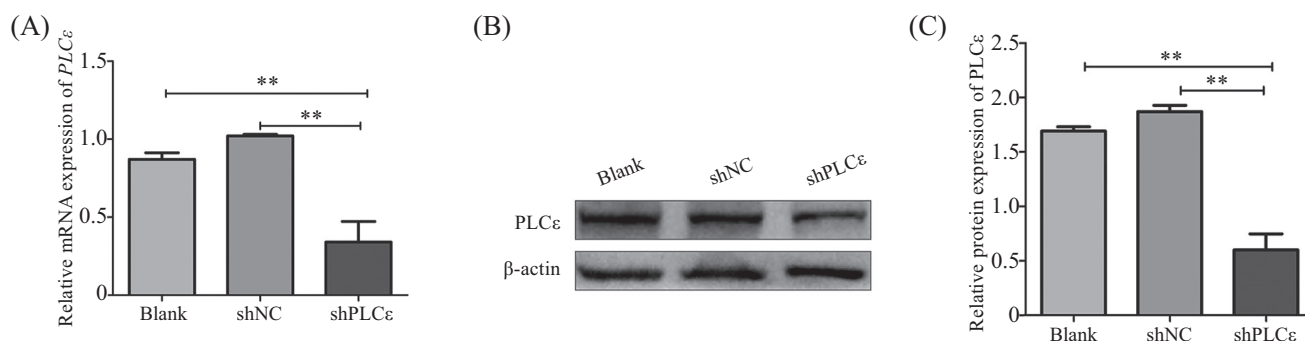
图1 PLCE1在膀胱癌中高表达

Fig.1 PLCE1 highly expresses in bladder cancer

2.3 转染shPLCE1慢病毒促进T24细胞凋亡和自噬

流式细胞术结果显示, shNC组细胞凋亡比例为3.19%, shPLCE1组凋亡细胞比例为12.89%(图3A), 重复3次实验后分析2组凋亡比例的差异水平, 结果显示, 敲低PLCE1细胞凋亡率增加($P<0.01$, 图3B)。q-PCR和Western blot结果表明, shPLCE1组相较于

shNC组, 凋亡分子Caspase3和Caspase8的mRNA和蛋白水平升高($P<0.01$, 图3)。自噬相关分子LC3表达增高以及自噬相关分子p62降低($P<0.01$, 图3)。进行免疫荧光染色, 并在荧光显微镜下观察shNC组和shPLCE1组的LC3的绿色荧光斑点结构, 结果显示, 敲低PLCE1, LC3绿色荧光斑点增多($P<0.05$, 图3C)。



A: 转染shPLC ϵ 慢病毒后, q-PCR检测T24细胞中PLC ϵ 的mRNA表达水平; B: Western blot检测转染shPLC ϵ 慢病毒后T24细胞中PLC ϵ 蛋白表达水平; C: T24细胞蛋白表达灰度值相关水平。 ** $P < 0.01$ 。

A: PLC ϵ mRNA expression measured by q-PCR after being treated with shPLC ϵ lentivirus transfection; B: PLC ϵ protein expression measured by Western blot after being treated with shPLC ϵ lentivirus transfection; C: relative protein level in T24 cells. ** $P < 0.01$.

图2 转染shPLC ϵ 慢病毒后T24细胞中PLC ϵ mRNA以及蛋白表达水平

Fig.2 PLC ϵ mRNA and protein levels in T24 cells treated with shPLC ϵ lentivirus transfection

实验结果证明, 敲低PLC ϵ 促进膀胱癌T24细胞的凋亡和自噬。

2.4 转染shPLC ϵ 慢病毒后, GLS和p-mTOR表达水平下降

研究发现, PLC ϵ 与氨基酸代谢相关, 谷氨酰胺代谢是肿瘤代谢异常特征之一, 为验证PLC ϵ 是否与谷氨酰胺代谢相关, 通过Western blot检测转染shPLC ϵ 慢病毒后GLS的表达。结果显示, 敲低PLC ϵ 抑制GLS的表达($P < 0.01$, 图4)。研究表明, mTOR与细胞代谢密切相关, 并能作为感受器感受外源生长因子、内源营养物和能量的变化^[14], 而谷氨酰胺不仅作为营养信号调节mTORC1的活性, 并且与亮氨酸结合通过促进谷氨酰胺分解和 α -酮戊二酸(α -ketoglutaric acid, α -KG)的产生激活mTORC1^[15]。因此, 通过Western blot检测转染shPLC ϵ 慢病毒后mTOR的活化情况。结果显示, 敲低PLC ϵ 抑制p-mTOR的表达, 从而抑制mTOR的活化($P < 0.05$, 图4)。提示PLC ϵ 可能通过GLS/p-mTOR信号通路抑制膀胱癌细胞T24自噬, 促进肿瘤细胞生存。

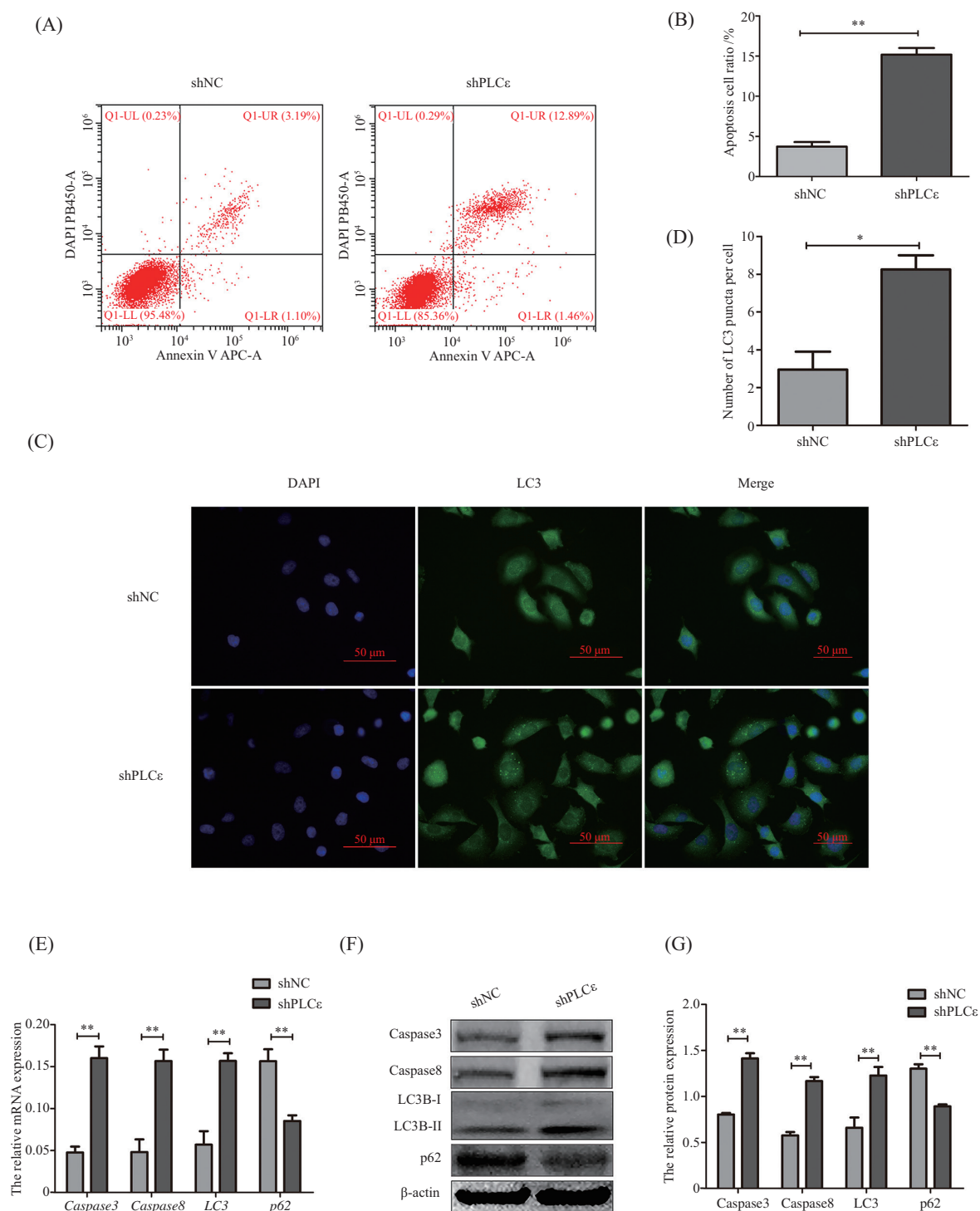
2.5 shPLC ϵ 通过抑制GLS/p-mTOR调节T24细胞自噬

为了验证我们的猜想, 构建过表达GLS(+GLS)质粒和干扰GLS(-GLS)质粒, q-PCR和Western blot结果显示, 转染过表达GLS质粒后, T24细胞中GLS的表达均高于对照组($P < 0.05$, 图5); 转染干扰GLS质粒后, T24细胞中GLS的表达均低于对照组($P < 0.05$, 图5)。以上结果表明, 过表达和敲低GLS质粒构建成功, 为后续实验奠定基础。在稳定转染

shPLC ϵ 的细胞中加入+GLS或-GLS质粒后, Western blot检测自噬蛋白水平以及免疫荧光观察自噬斑点LC3的变化。结果显示, 在T24细胞中, shPLC ϵ +GLS组的LC3表达和免疫荧光自噬斑点低于shPLC ϵ 组($P < 0.05$, 图5), p62和p-mTOR表达高于shPLC ϵ 组($P < 0.05$, $P < 0.01$, 图5)。shPLC ϵ +shGLS组LC3表达高于shPLC ϵ +GLS组($P < 0.01$, 图5), p62和p-mTOR表达低于shPLC ϵ +GLS组($P < 0.01$, $P < 0.001$, 图5)且免疫荧光自噬斑点LC3也高于shPLC ϵ +GLS组。以上结果表明, 上调GLS的表达可以一定程度上逆转shPLC ϵ 对自噬的促进作用, 而下调GLS可进一步促进自噬, 以上结果进一步说明, PLC ϵ 可能通过GLS/p-mTOR从而抑制膀胱癌细胞T24自噬, 促进肿瘤细胞生存。

3 讨论

PLC ϵ 是磷脂酶C家族的一员^[16], 定位在细胞质和细胞膜, 其特点之一是具有RA和CDC25双结构域, 从而可以与癌基因Ras双向调节^[6]。也可以被多种信号分子激活, 将细胞膜上磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2)水解, 产生细胞内重要的第二信使分子三磷酸肌醇(inositol triphosphate, IP3)和甘油二酯(diacylglycerol, DAG)^[17], 并继续激活相关下游信号通路, 促进肿瘤细胞的增殖、侵袭与转移^[18]。PLC ϵ 与肿瘤细胞关系密切并且发挥致癌效应促进肿瘤细胞的生存与发展, 如食管癌、胃癌、前列腺癌等^[19-20]。而细胞自噬也是一个相对复杂的过程, 它是分解代谢途径

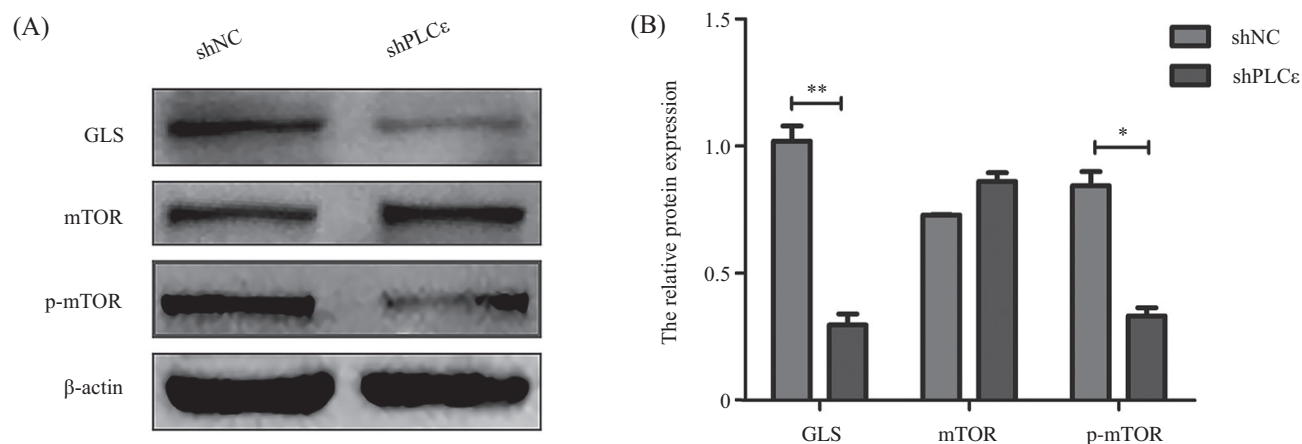


A: 转染shPLCε慢病毒后, 通过流式细胞术检测T24细胞凋亡率; B: 细胞凋亡率进行统计分析; C: 转染shPLCε慢病毒后, 荧光显微镜观察细胞自噬斑点, LC3用抗LC3 I/II(绿色)染色, 核(蓝色)通过DAPI染色; D: 统计分析细胞内LC3自噬小体斑点数量; E: q-PCR检测转染shPLCε慢病毒后, T24细胞中Caspase3、Caspase8、LC3、p62 mRNA水平; F: Western blot检测转染shPLCε慢病毒后T24细胞中Caspase3、Caspase8、LC3、p62蛋白水平; G: T24细胞蛋白表达灰度值相关水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: T24 apoptosis cells ratio was detected by flow cytometry after being treated with shPLCε lentivirus transfection; B: statistical analysis of apoptosis cell ratio; C: representative microscopy images of LC3 puncta detected by Immunofluorescence in T24 cells treated with shPLCε lentivirus transfection, LC3 was stained with anti-LC3 I/II (green), nucleus (blue) was visualized by DAPI; D: the number of LC3 autophagosome spots was analyzed statistically; E: Caspase3, Caspase8, LC3, p62 mRNA expression measured by q-PCR; F: Caspase3, Caspase8, LC3, p62 protein expression measured by Western blot; G: relative protein level in T24 cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图3 转染shPLCε慢病毒后对凋亡和自噬的影响

Fig.3 Effects of shPLCε on apoptosis and autophagy in T24 cells



A: Western blot检测转染shPLC ϵ 慢病毒后T24细胞中GLS、mTOR和p-mTOR蛋白水平变化; B: T24细胞中蛋白表达灰度值相关水平。* P <0.05, ** P <0.01。

A: GLS, mTOR, p-mTOR protein expression was detected by Western blot after being treated with shPLC ϵ lentivirus transfection; B: relative protein level in T24 cells. * P <0.05, ** P <0.01.

图4 T24细胞中GLS、p-mTOR、mTOR蛋白表达水平

Fig.4 GLS, p-mTOR, mTOR protein levels in T24 cell

之一,可用于细胞质量控制和在营养剥夺过程中发挥作用^[21],受多种因素影响。实验结果表明,PLC ϵ 在膀胱癌中高表达。敲低PLC ϵ 使Caspase3、Caspase8和LC3的表达增加以及p62的表达降低,同时通过免疫荧光检测和流式细胞术,发现T24细胞的自噬斑点LC3增多和凋亡率增加。表明PLC ϵ 在膀胱癌细胞株T24中对自噬和凋亡的调节发挥抑制作用,从而促进肿瘤细胞生存反应,发挥致癌效应。

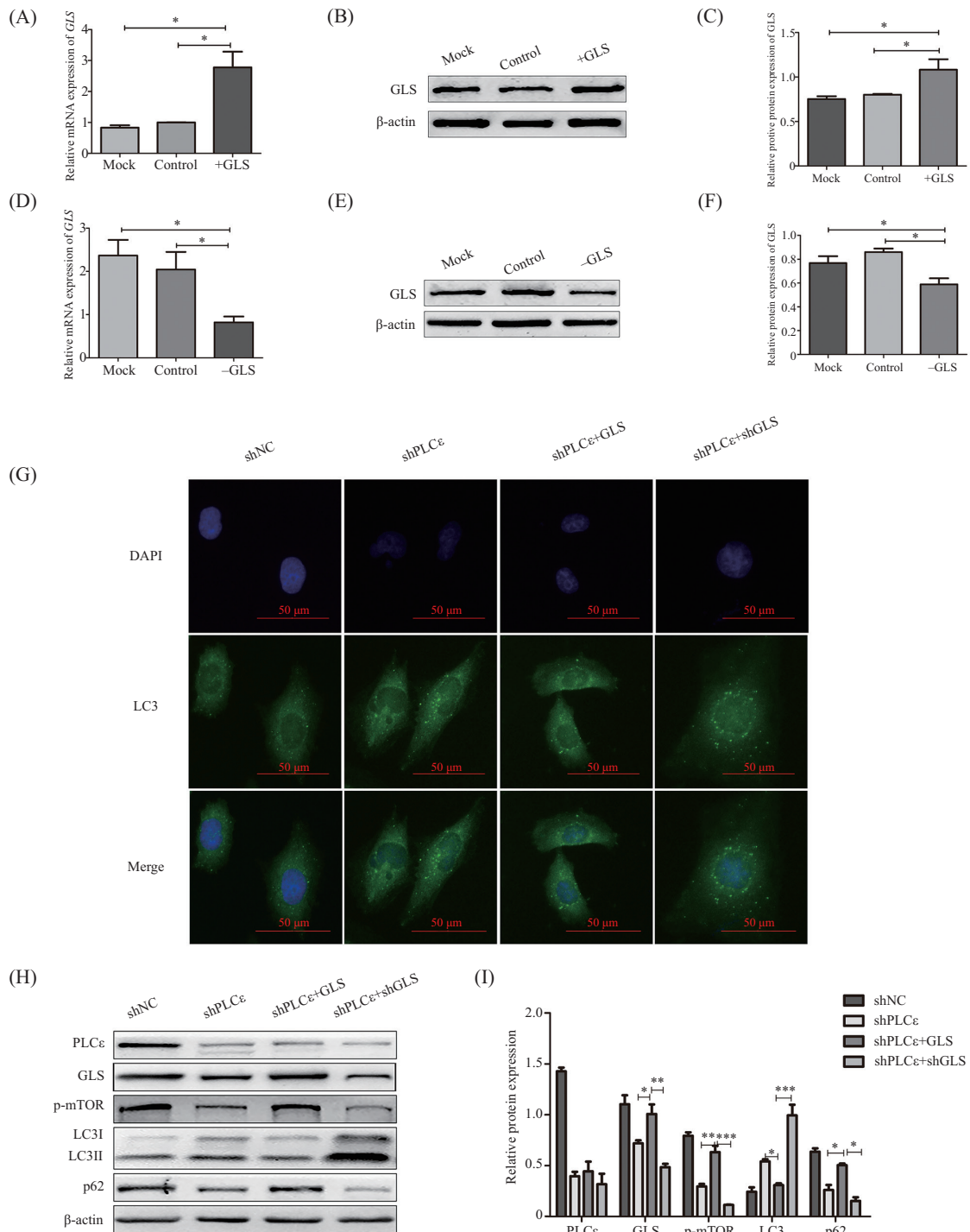
1924年,WARBURG^[29]提出有氧糖酵解的概念被称为瓦伯格效应。随后RUBIN^[22]提出谷氨酰胺在正常细胞和肿瘤细胞中的重要性,以及三羧酸循环作为谷氨酰胺为肿瘤细胞供能的基础。由于肿瘤细胞与正常细胞存在代谢异常,从而代谢重编程表现出有氧糖酵解和谷氨酰胺成瘾等多种代谢特征促进肿瘤细胞的生长^[5]。而“谷氨酰胺成瘾”是由于肿瘤细胞对于谷氨酰胺的需求远高于正常细胞,对其过度利用和消耗,表现出高摄取率和高分解率,以此来维持摄取必需氨基酸和提供氮源和碳源发挥促癌作用^[22-23]。其中谷氨酰胺代谢分为两步,第一步由GLS分解谷氨酰胺产生谷氨酸,然后谷氨酸脱氢酶将谷氨酸分解为 α -酮戊二酸。所以GLS是谷氨酰胺分解中至关重要的一个限速酶,而谷氨酰胺的高分解率也是通过高表达GLS来实现的。氨基酸与自噬关系密切,可通过多种方式相互作用,如氨基酸传感器或氨基酸转运体等。其中谷氨酰胺、精氨酸^[24]和亮氨酸^[25]可将其信号变化传递给氨基酸传感器mTOR复合物和

AMPK而作用于自噬影响肿瘤的发生发展^[26],以及谷氨酰胺也可通过产生谷胱甘肽和NAPDH抑制应激产生的ROS,从而抑制自噬^[27]。同时,自噬也属于分解代谢可为氨基酸提供合成原料调节其代谢,由此可见谷氨酰胺与自噬关系十分密切。课题组前期发现,敲低PLC ϵ 可影响膀胱癌中瓦伯格效应^[10]和糖代谢^[28]以及在前列腺癌中可影响丝氨酸/甘氨酸代谢^[11],表明PLC ϵ 与肿瘤代谢密切相关。本实验发现,敲低PLC ϵ 可以抑制GLS和p-mTOR的表达,表明PLC ϵ 与谷氨酰胺分解相关,调节GLS的表达。同时,通过添加过表达和干扰GLS质粒后发现,证明PLC ϵ 通过GLS/p-mTOR途径调节膀胱癌细胞T24的自噬,从而促进肿瘤细胞生存发展。

综上所述,该研究揭示了在膀胱癌中PLC ϵ 与谷氨酰胺酶密切相关,并通过抑制膀胱癌细胞的自噬和凋亡,使肿瘤细胞存活。将肿瘤中的致癌基因与谷氨酰胺代谢连接起来,探索谷氨酰胺代谢与肿瘤细胞的相关生命活动的机制,为降低肿瘤的“谷氨酰胺成瘾”和膀胱癌的治疗提供新的临床思路。

参考文献 (References)

- ANTONI S, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends [J]. Eur Urol, 2017, 71(1): 96-108.
- humphrey P A, MOCH H, CUBILLA A L, et al. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital



A: q-PCR检测转染过表达GLS质粒后, T24细胞中*GLS* mRNA水平; B: Western blot检测转染过表达GLS质粒后T24细胞中GLS蛋白表达水平; C: 过表达质粒转染后GLS蛋白灰度值相关水平; D: q-PCR检测转染干扰GLS质粒后, T24细胞中*GLS* mRNA水平; E: 干扰GLS质粒后T24细胞中GLS蛋白表达水平; F: 干扰质粒转染后GLS蛋白灰度值相关水平; G: 免疫荧光检测转染过表达或干扰GLS质粒后T24细胞自噬斑点LC3变化; H: Western blot检测转染质粒后PLC ϵ 、GLS、p-mTOR、p62、LC3蛋白水平的变化; I: T24细胞中蛋白表达灰度值相关水平。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001。

A: relative mRNA level of over-expression *GLS* in T24 cells; B: relative protein level of over-expression GLS in T24 cells; C: GLS protein over-expression measured by Western blot; D: *GLS* mRNA knockdown measured by q-PCR; E: GLS protein knockdown measured by Western blot; F: relative protein level of knockdown GLS in T24 cells; G: treated with over-expression or knockdown of GLS plasmid changes of LC3 puncta in T24 cells measured by Immunofluorescence; H: treated with over-expression or knockdown of GLS plasmid, PLC ϵ , GLS, p-mTOR, p62, LC3 protein levels in T24 cells detected by Western blot; I: relative protein level in T24 cells. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

图5 转染过表达或敲低GLS质粒后对T24细胞自噬的影响

Fig.5 Effects of over-expression or knockdown of *GLS* on autophagy in T24 cells

- organs-part B: prostate and bladder tumours [J]. Eur Urol, 2016, 70(1): 106-19.
- [3] MATES J M, SEGURA J A, CAMPOS-SANDOVAL J A, et al. Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(10): 2051-61.
- [4] ZHANG J, PAVLOVA N N, THOMPSON C B. Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine [J]. EMBO J, 2017, 36(10): 1302-15.
- [5] DAYE D, WELLEN K E. Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis [J]. Semin Cell Dev Biol, 2012, 23(4): 362-9.
- [6] BUNNEY T D, BAXENDALE R W, KATAN M. Regulatory links between PLC enzymes and Ras superfamily GTPases: signalling via PLCepsilon [J]. Adv Enzyme Regul, 2009, 49(1): 54-8.
- [7] CHENG H, Luo C, WU X, et al. shRNA targeting PLCepsilon inhibits bladder cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* [J]. Urology, 2011, 78(2): 474.e7-11.
- [8] WANG X, FAN Y, DU Z, et al. Knockdown of phospholipase cepsilon (PLCepsilon) inhibits cell proliferation via phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN)/AKT signaling pathway in human prostate cancer [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 254-63.
- [9] CHENG H, HAO Y, GAO Y, et al. PLCepsilon promotes urinary bladder cancer cells proliferation through STAT3/LDHA pathway-mediated glycolysis [J]. Oncol Rep, 2019, 41(5): 2844-54.
- [10] 郝燕妮, 李婷, 范佳鑫, 等. shPLCε通过下调CDC25A抑制T24细胞的瓦伯格效应[J]. 中国生物工程杂志(HAO Y N, LI T, FAN J X, et al. shPLC epsilon inhibits the warburg effect of T24 cells by down-regulating CDC25A [J]. China Biotechnology), 2018, 38(5): 33-9.
- [11] DUAN L M, LIU J Y, YU C W, et al. PLCepsilon knockdown prevents serine/glycine metabolism and proliferation of prostate cancer by suppressing YAP [J]. Am J Cancer Res, 2020, 10(1): 196-210.
- [12] LEONE R D, AMARAVADI R K. Autophagy: a targetable linchpin of cancer cell metabolism [J]. Trends Endocrinol Metab, 2013, 24(4): 209-17.
- [13] CARROLL B, KOROLCHUK V I, SARKAR S. Amino acids and autophagy: cross-talk and co-operation to control cellular homeostasis [J]. Amino Acids, 2015, 47(10): 2065-88.
- [14] BEN-SAHRA I, MANNING B D. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth [J]. Curr Opin Cell Biol, 2017, 45: 72-82.
- [15] DURAN R V, OPPLIGER W, ROBITAILLE A M, et al. Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling [J]. Mol Cell, 2012, 47(3): 349-58.
- [16] 王晓亮, 彭志海. 磷酸酯酶C家族新成员—磷酸酯酶CE1[J]. 医学分子生物学杂志(WANG X L, PENG Z H. Phospholipase CE1, a new member of the phospholipase C family [J]. J Med Mol Biol), 2008, 5(4): 332-5.
- [17] DUSABAN S S, BROWN J H. PLCepsilon mediated sustained signaling pathways [J]. Adv Biol Regul, 2015, 57: 17-23.
- [18] TYUTYUNNYKOVA A, TELEGEV G, DUBROVSKA A. The controversial role of phospholipase C epsilon (PLCepsilon) in cancer development and progression [J]. J Cancer, 2017, 8(5): 716-29.
- [19] ABNET C C, FREEDMAN N D, Hu N, et al. A shared susceptibility locus in PLCE1 at 10q23 for gastric adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma [J]. Nat Genet, 2010, 42(9): 764-7.
- [20] LI L, DU Z, GAO Y, et al. PLCepsilon knockdown overcomes drug resistance to androgen receptor antagonist in castration-resistant prostate cancer by suppressing the wnt3a/beta-catenin pathway [J]. J Cell Physiol, 2019, doi: 10.1002/jcp.28195.
- [21] KIMMELMAN A C, WHITE E. Autophagy and tumor metabolism [J]. Cell Metab, 2017, 25(5): 1037-43.
- [22] RUBIN H. Deprivation of glutamine in cell culture reveals its potential for treating cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(14): 6964-8.
- [23] YANG L, VENNETI S, NAGRATH D. Glutaminolysis: a hallmark of cancer metabolism [J]. Annu Rev Biomed Eng, 2017, 19: 163-94.
- [24] MENG D, YANG Q M, WANG H Y, et al. Glutamine and asparagine activate mTORC1 independently of Rag GTPases [J]. J Biol Chem, 2020, 295(10): 2890-9.
- [25] KIMBALL S R, GORDON B S, MOYER J E, et al. Leucine induced dephosphorylation of Sestrin2 promotes mTORC1 activation [J]. Cell Signal, 2016, 28(8): 896-906.
- [26] LAHIRI V, HAWKINS W D, KLIONSKY D J. Watch what you (self-) eat: autophagic mechanisms that modulate metabolism [J]. Cell Metab, 2019, 29(4): 803-26.
- [27] VILLAR V H, MERHI F, DJAVAHERI-MERGNY M, et al. Glutaminolysis and autophagy in cancer [J]. Autophagy, 2015, 11(8): 1198-208.
- [28] CHENG H, HAO Y, GAO Y, et al. PLCepsilon promotes urinary bladder cancer cells proliferation through STAT3/LDHA pathway mediated glycolysis [J]. Oncol Rep, 2019, 41(5): 2844-54.
- [29] WARBURG O. On the origin of cancer cells [J]. Science, 1956, 123(3191): 309-14.