

研究论文

mTORC1通过激活线粒体代谢抑制小鼠胚胎干细胞多能性基因表达

徐舒慧¹ Tanveer AHMED² 王璐璐^{3*} 秦宝明^{1,2*} 徐雪婷^{2*}

(¹中国科学技术大学生命科学与医学部, 合肥 230027; ²中国科学院广州生物医药与健康研究院, 代谢与细胞命运实验室, 广州 510530; ³广州医科大学附属第五医院, 广东高校生物靶向诊治与康复重点实验室, 广州 510799)

摘要 利用 *Tsc1* 条件敲除小鼠分离得到 *Tsc1*^{Loxp/Loxp} mESCs, 培养于 2iL 条件下, 使用腺相关病毒Cre(AAV-Cre)敲除 *Tsc1* 构建稳定培养的 *Tsc1* WT/KO mESCs 模型, 结合 Western blot 和 RT-qPCR 确定模型的可靠性。该文利用这一模型探讨了 mTORC1 过度激活对 mESCs 多能性的影响。通过细胞形态观察、AP 染色和 RT-qPCR 实验检测多能性基因表达水平的变化; 通过线粒体数量、活性氧(ROS)水平和耗氧率(OCR)水平检测线粒体活性; 使用 mTORC1 抑制剂雷帕霉素和线粒体抑制剂 DMM 进行恢复实验; 机制部分, 使用线粒体激活剂 DCA 进行模拟实验; 使用丙酮酸脱氢酶(PDH)复合物抑制剂进行恢复实验。结果显示, mTORC1 过度激活后 mESCs 细胞形态由未分化的克隆状变为扁平状、AP 染色颜色变为接近无色且多能性基因表达水平下降; 同时线粒体数量增加, ROS 水平和 OCR 水平同时增加, 说明线粒体活性增强; 此外, 通过雷帕霉素和 DMM 处理可以抑制线粒体活性并恢复细胞形态、AP 染色颜色和多能性基因表达。进一步的机制探索发现 mTORC1 过度激活后, PDHE1 α 磷酸化水平下调, PDH 复合物活性增加。通过使用线粒体激活剂 DCA 处理可以模拟 mTORC1 过度激活表型, 抑制多能性基因表达, 使用 PDH 复合物抑制剂 UK5099 进行细胞恢复实验, 结果显示抑制 PDH 复合物活性可以恢复 mTORC1 过度激活后 mESCs 中多能性基因的表达。综上, 该研究揭示了 mTORC1 通过激活 PDH 复合物上调线粒体代谢抑制 mESCs 多能性基因表达。

关键词 小鼠胚胎干细胞; 雷帕霉素机制靶蛋白复合物1; 线粒体; 多能性; 丙酮酸脱氢酶复合物

mTORC1 Suppresses the Expression of Pluripotency Genes in Mouse Embryonic Stem Cells by Activating Mitochondrial Metabolism

XU Shuhui¹, AHMED Tanveer², WANG Lulu^{3*}, QIN Baoming^{1,2*}, XU Xueting^{2*}

(¹Department of Life Science and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China; ²Laboratory of Metabolism and Cell Fate, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China; ³Key Laboratory of Biological Targeting Diagnosis, Therapy and Rehabilitation of Guangdong Higher Education Institutes, the Fifth Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510799, China)

收稿日期: 2025-01-03 接受日期: 2025-03-14

国家自然科学基金(批准号: 32370849、32300664)资助的课题

*通信作者。Tel: 13246819881, E-mail: wang_lulu@gzhmu.edu.cn; Tel: 18676634613, E-mail: qin_baoming@gibh.ac.cn; Tel: 15155110198, E-mail: xu_xueting2022@163.com

Received: January 3, 2025

Accepted: March 14, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32370849, 32300664)

*Corresponding authors. Tel: +86-13246819881, E-mail: wang_lulu@gzhmu.edu.cn; Tel: +86-18676634613, E-mail: qin_baoming@gibh.ac.cn; Tel: +86-15155110198, E-mail: xu_xueting2022@163.com

Abstract *Tsc1* conditional knockout mice were used to isolate *Tsc1*^{Loxp/Loxp} mESCs (mouse embryonic stem cells), which were cultured under 2iL condition. Stable *Tsc1* wild-type/knockout (WT/KO) mESCs models were established by knocking out *Tsc1* using AAV-Cre (adeno-associated virus Cre), with its reliability confirmed by Western blot and RT-qPCR analysis. Using this models, this study investigates the effects of hyperactivation of the mTORC1 (mechanistic target of Rapamycin complex 1) on the pluripotency of mESCs. Changes in pluripotency were assessed through morphological observations, AP (alkaline phosphatase) staining, and RT-qPCR analysis of pluripotency gene expression. Mitochondrial activity was evaluated by measuring mitochondrial number, ROS (reactive oxygen species) level, and OCR (oxygen consumption rate). Rescue experiments involved treatments with the mTORC1 inhibitor rapamycin and the mitochondrial inhibitor DMM. In the mechanistic studies, the mitochondrial activator DCA was used to simulate mTORC1 hyperactivation, while the PDH (pyruvate dehydrogenase) complex inhibitor was employed for recovery experiments. The results showed that mTORC1 hyperactivation caused a shift in mESCs morphology from undifferentiated colony-like structures to flattened cells, AP staining became nearly colorless, and decreased pluripotency gene expression. Concurrently, mitochondrial number, ROS level, and OCR were elevated, indicating enhanced mitochondrial activity. Treatment with rapamycin and DMM suppressed mitochondrial activity and restored cell morphology, AP staining, and pluripotency gene expression. Further mechanistic exploration revealed that mTORC1 hyperactivation downregulated PDHE1 α phosphorylation and increased PDH complex activity. DCA treatment mimicked the mTORC1 hyperactivation phenotype, suppressing pluripotency gene expression, while the PDH complex inhibitor UK5099 restored pluripotency gene expression in mESCs following mTORC1 hyperactivation. In conclusion, this study demonstrates that mTORC1 suppresses pluripotency gene expression in mESCs by upregulating mitochondrial metabolism through activation of the PDH complex.

Keywords mouse embryonic stem cells; mechanistic target of Rapamycin complex 1; mitochondrial; pluripotency; pyruvate dehydrogenase

作为细胞内调控代谢与生物合成的关键丝/苏氨酸激酶,雷帕霉素靶蛋白(mechanistic target of Rapamycin, mTOR)参与形成两个构成和功能均不同的复合物,即mTOR复合物1(mTORC1)和mTOR复合物2(mTORC2),其中mTORC1感受外界营养、压力和生长因子等信号,激活生物合成并抑制自噬降解^[1-2]。经过二十多年的深入研究,科学家们发现mTORC1几乎参与调控细胞内所有重要的调控网络,许多生理病理疾病甚至衰老均与其活性异常密切相关^[3-6],然而,至今仍有许多未知功能亟待进一步探究。

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具备自我更新和分化成三胚层细胞的多能性这两大特征^[7],阐明其自我更新和多能性的调控机制不仅对体外研究胚胎生长发育具有重要意义,还有助于多种疾病的研究和药物研发。其中,早在2004年就有研究发现,mTOR对于小鼠ESCs(mouse ESCs, mESCs)的胚胎发育至关重要,mTOR敲除的小鼠在

胚胎发育5.5~6.5天时死亡,甚至无法获得mTOR敲除的mESCs^[8-9]。紧接着科学家们又发现,mTOR1和mTORC2复合物的各组分缺失也会导致小鼠在胚胎发育不同时期死亡^[8-11],其中mTORC1特异组分Raptor敲除小鼠与mTOR敲除小鼠相似,也在胚胎发育5.5~6.5天死亡^[10],暗示mTORC1在小鼠胚胎发育早期发挥至关重要的功能。随后在2016年,BULUT等^[12]研究发现,使用mTOR激酶抑制剂INK128完全抑制mTORC1和mTORC2的活性后,mESCs会进入自我更新停滞但发育潜能不变的“pause”状态。本实验室进一步研究揭示,mTORC1通过翻译起始因子复合物eIF4F(eukaryotic translation initiation factor 4F)同时控制细胞质和线粒体的翻译,进而调控mESCs的自我更新。然而mTORC1活性过高也会对胚胎发育产生负面影响,上游抑制因子TSC1/2缺失后,mTORC1过度激活会导致小鼠在胚胎发育14.5天时死亡,暗示mTORC1活性过高也不利于小鼠胚胎发育^[11]。此外,在体细胞重编程过程中,过度激活的

mTORC1活性会通过促进线粒体生物合成抑制线粒体和细胞重塑从而阻碍重编程过程的发生^[13-14]。在经典的血清(serum+LIF, SL)培养条件下的mESCs分化过程中, mTORC1的活性逐渐上调, 从而提高细胞内的整体翻译水平以应对分化过程中所需的大量蛋白合成^[15]。但在基态(ground state, 无血清培养基中添加LIF以及MEK/ERK和GSK3的两种小分子抑制剂PD0325901和CHIR99021, 即2iL)培养条件下, 敲除上游抑制因子TSC1/2会过度激活mTORC1, 从而导致mESCs多能性退出受阻, 原因是mTORC1的激活会促进转录因子TFE3(transcription factor binding to IGHM enhancer 3)在细胞核内的累积, 从而阻碍相关基因的转录^[16-17]。综上可知, mTORC1如何调控稳态下mESCs多能性尚不清楚。

在本研究中, 我们从*Tsc1*^{Loxp/Loxp}小鼠体内分离得到*Tsc1*^{Loxp/Loxp} mESCs, 并通过毒性较低的腺相关病毒Cre(AAV-Cre)敲除*Tsc1*得到可以在体外稳定培养的*Tsc1*野生型(wild-type, WT)和敲除型(knockout, KO) mESCs。通过细胞形态观察、AP染色和多能性基因表达分析, 我们发现*Tsc1*被敲除后, mTORC1过度激活会导致mESCs细胞形态由中间隆起、折光性强且边缘清晰的未分化致密状态变成无隆起的扁平状态, AP染色颜色由深色变为接近无色, 同时多能性基因表达下调。为了探明其机制, 结合我们实验室早期研究发现mTORC1通过调控线粒体生物合成和翻译来分别调控体细胞诱导重编程的命运转变和mESCs自我更新^[13-14], 我们检测线粒体活性发现, mTORC1过度激活后会增强线粒体活性, 线粒体数量、活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平和OCR水平均上调, 且这可以被mTORC1抑制剂雷帕霉素(Rapamycin)恢复。为了证明线粒体激活是mESCs多能性基因表达下调的原因, 我们使用线粒体复合物II抑制剂DMM(dimethyl malonate, 丙二酸二甲酯)抑制*Tsc1* KO mESCs的线粒体活性, 发现其结果与雷帕霉素相似, 可以恢复线粒体数量、ROS水平并恢复*Tsc1* KO mESCs中的多能性基因表达。在机制方面, 我们检测到mTORC1过度激活后丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)复合物活性上调, 利用线粒体激活剂DCA(sodium dichloroacetate, 二氯乙酸钠)激活PDH复合物进而激活线粒体代谢, 发现其可以模拟mTORC1过度激活的表型, 抑制多能性基因表达, PDH复合物抑制剂UK5099可

以恢复*Tsc1* KO mESCs的线粒体活性和多能性基因表达。综上, 我们的研究发现了mTORC1通过激活PDH复合物上调线粒体代谢抑制mESCs的多能性基因表达, 为后续进一步阐明mTORC1如何调控ESCs的发育潜能和分化提供了基础。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 *Tsc1*^{Loxp/Loxp}实验小鼠购自Jackson实验室, 品系为C57BL/6J, 饲养和繁殖地点为中国科学院广州生物医药与健康研究院(GIBH)的SPF级实验动物中心。遵照实验动物伦理, 所有小鼠均经过中国科学院广州生物医药与健康研究院实验动物中心伦理委员会的审查与批准后使用, 实验许可编号为2021008。

1.1.2 细胞系 *Tsc1*^{Loxp/Loxp} mESCs由*Tsc1*^{Loxp/Loxp}小鼠雌雄交配3.5天后, 分离怀孕雌鼠胚胎并于体外培养得到, 然后使用AAV-Cre进行处理, 得到*Tsc1*野生型(WT)/敲除型(KO) mESCs, 这是本论文主要使用的细胞模型。E14 mESCs由Igor SAMOKHVALOV实验室赠送, 本论文中使用的所有未标明品系的小鼠胚胎干细胞均为E14。

1.1.3 实验试剂 2iL培养基: DMEM高糖培养基、丙酮酸钠(sodium pyruvate)购自美国Corning公司; Advanced DMEM/F-12、Neurobasal培养基、 β -me、N-2添加剂、B-27添加剂、GlutaMax和非必需氨基酸(non-essential amino acids, NEAAs)购自美国Gibco公司; 小鼠白血病抑制因子(mouse leukemia inhibitory factor, mLIF)购自德国Millipore公司; PD0325901和CHIR99021购自源生生物科技有限公司; 青霉素-链霉素双抗溶液(penicillin/streptomycin)购自美国Hyclone公司。

细胞培养相关小分子化合物: mTORC1抑制剂雷帕霉素(Rapamycin)、PDH复合物激活剂DCA和丙酮酸转运载体抑制剂UK5099购自美国Selleck公司; 线粒体呼吸链复合物II抑制剂DMM购自美国Sigma公司。

RNA提取、反转录和实时荧光定量PCR相关试剂: RNA提取所用Trizol RNA裂解液购自深圳研顺生物有限公司; 无RNA酶水(RNase-free water)购自上海碧云天生物有限公司; 异丙醇和无水乙醇购自天津大茂化学试剂厂; 反转录所用RNA酶抑制剂

(RNase inhibitor, RRI)、Oligo d(T)和dNTP购自日本TaKaRa公司; 反转录酶(RTase)和反转录缓冲液(RT buffer)购自日本TOYOBO公司; 实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)所用的Essential SYBR Green Master购自瑞士Roche公司; 引物合成于广州艾基生物技术有限公司。

蛋白免疫印迹(Western blot)相关试剂: 溴酚蓝(bromophenol blue)、SDS和胎牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自北京鼎国昌盛生物有限公司; PMSF和过硫酸铵粉末购自Sigma公司; 吐温-20(Tween-20)购自Amresco公司; 30%聚丙烯酰胺(polyacrylamide)购自申能博彩生物科技有限公司; 蛋白酶抑制剂Cocktail购自Roche公司; 无水甲醇购自天津大茂化学试剂厂; 脱脂奶粉购自内蒙古伊利实业集团股份有限公司; pH6.8 Tris-HCl、pH8.8 Tris-HCl、10% SDS、10× SDS-PAGE储液、10× 转膜液储液和10× TBS洗膜液储液粉末购自上海碧云天生物有限公司; 蛋白裂解液(5× 上样缓冲液)为实验室自配; 聚偏氟乙烯(PVDF)膜购自Millipore公司。

线粒体检测试剂盒: ROS检测试剂盒购自上海碧云天生物有限公司; 耗氧率(oxygen consumption rate, OCR)检测所需的Seahorse XFe24 FluxPak、Xfe24V7PS cell culture microplates和XF Base Medium购自美国Seahorse公司。

其他试剂: 0.1% Gelatin和Tryple酶购自美国Gibco公司; 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自Sigma公司; DPBS缓冲液购自上海源培生物科技有限公司; 腺相关病毒Cre(AAV-Cre)购自广州派真生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 *Tsc1* WT/KO mESCs与E14 mESCs使用2iL培养基常规培养。*Tsc1* WT/KO mESCs每4天传代一次, E14 mESCs每3天传代一次。传代时, 先使用DPBS清洗细胞并利用Tryple在37 °C培养箱中消化2 min, 然后加入3~4倍Tryple体积的2iL培养基终止消化, 室温300× g离心3 min后重悬计数, 以 8×10^4 /孔的密度接种在提前铺好0.1% Gelatin的培养板中放入37 °C、5% CO₂细胞培养箱中继续培养。

1.2.2 RNA提取与RT-qPCR 收集足量细胞后用Trizol裂解液裂解细胞, 通过蛋白质沉淀、异丙醇纯化和75%乙醇洗脱后得到细胞总RNA。随后取2 μg RNA进行反转录得到cDNA。接着将cDNA样本稀释40倍并将其作为模板, 使用SYBR Green荧光染料和相关引物上机进行RT-qPCR。最后以肌动蛋白(Actin)的表达值归一化数据, 并基于 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算相对表达值。所用引物及序列见表1。

1.2.3 Western blot 首先, 收集足量细胞后加入含有β-巯基乙醇的1× 上样缓冲液裂解, 金属溶

表1 RT-qPCR相关引物序列
Table 1 RT-qPCR related primer sequences

引物名称 Primer names	引物序列(5'→3') Sequences (5'→3')
<i>Actin</i> -F	CCA CGA AAC TAC CTT CAA CTC C
<i>Actin</i> -R	GTG ATC TCC TTC TGC ATC CTG T
<i>Tsc1</i> -F	ACA AGC CCG ATA CAG TCA GC
<i>Tsc1</i> -R	CTG TAA CTC CTG ACT CTG GTT GT
<i>Nanog</i> -F	CTC AAG TCC TGA GGC TGA CA
<i>Nanog</i> -R	TGA AAC CTG TCC TTG AGT GC
<i>Oct4</i> -F	GCT CGA GAA GGA TGT GGT CC
<i>Oct4</i> -R	CGT TGT GCA TAG TCG CTG CT
<i>Sox2</i> -F	AGG GCT GGG AGA AAG AAG AG
<i>Sox2</i> -R	CCG CGA TTG TTG TGA TTA GT
<i>Rex1</i> -F	TCT TCT CTC AAT AGA GTG AGT GTG C
<i>Rex1</i> -R	GCT TTC TTC TGT GTG CAG GA
<i>Esrrb</i> -F	TTC TCA TCT TGG GCA TCG TG
<i>Esrrb</i> -R	AAT CTG AGT TGG CGA GGG C
<i>Klf4</i> -F	CCA GCA AGT CAG CTT GTG AA
<i>Klf4</i> -R	GGG CAT GTT CAA GTT GGA TT
<i>Dppa5a</i> -F	CCG TGC GTG GTG GAT AAG
<i>Dppa5a</i> -R	GCG ACT GGA CCT GGA ATAC

100 °C煮5~10 min以提取蛋白质。随后利用SDS-PAGE胶垂直电泳分离后,采取“滤纸-胶-膜-滤纸”的三明治法湿转将蛋白转移至PVDF膜上,然后在1× TBST配制5%的脱脂牛奶中室温摇床封闭1 h。提前根据抗体说明书使用封闭液按照1:1 000稀释一抗,室温孵育2 h或4 °C过夜。一抗孵育结束后,使用加入了Tween-20的1× TBST清洗PVDF膜3次,每次5 min。按照1:2 000稀释二抗,室温孵育1~2 h,孵育结束后,重复上述清洗过程。所用抗体见表2。化学发光液A液和B液体以1:1混合配制足量显影液,避光反应3 min,使用化学发光仪自动曝光并保存图片。

1.2.4 AP染色 使用DPBS清洗细胞2次后加入适量4%多聚甲醛室温固定2 min,使用DPBS先清洗3次后再使用TBST清洗细胞1次。弃废液,加入适量AP染液(9 μL 100 mg/mL NBT和35 μL 20 mg/mL BCIP溶于1 mL碱性磷酸酶缓冲液),避光室温染色6~15 min。弃AP染液,并使用DPBS清洗2次,浸泡在DPBS中终止染色并保存。利用扫描仪扫描得到图片并保存结果。

1.2.5 线粒体活性检测 OCR检测及数据分析。提前配置OCR检测缓冲液并预热,同时过夜预热仪器。在Utility Plate中加入Sachorse XF校准液,将测试板放在水化板上,置于37 °C无CO₂培养箱中过夜水化探针。将要检测的细胞消化计数,用配制的OCR检测缓冲液稀释,置于水化板上,每次实验设置3~5个重复。然后将细胞放置在37 °C无CO₂培养箱中1 h。配制并稀释药物至所需浓度,将稀释好的药物分别加入测试板上的A、B、C、D四个加药孔中利用仪器开始检测OCR。最后采用wave软件进行数据分析。

ROS染色及数据分析。根据试剂使用说明书进行实验。操作步骤如下:提前使用预热的F12培养基按照1 000×的比例稀释染料。然后常规消化收集细胞,并使用DPBS清洗2次后加入染料并于37 °C培养箱孵育30 min,其间混匀2~3次。室温300 ×g离心5 min并弃染料,使用DPBS清洗2次细胞以洗掉多余的染料,接着用预冷的DPBS重悬并迅速置于冰上,于30 min内完成样品检测。BD C6 plus流式细胞仪收集荧光信号,以未加染料的细胞为空白对照,用FITC通道收集信号并用FlowJo软件进行数据分析。

1.2.6 数据统计分析 本论文通篇数据统计使用平均数±标准差,每个实验组都为独立的生物学重复,*P*值计算使用双尾未配对学生*t*检验(two-tailed unpaired student's *t* test)。**P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001; ns,无统计学差异。

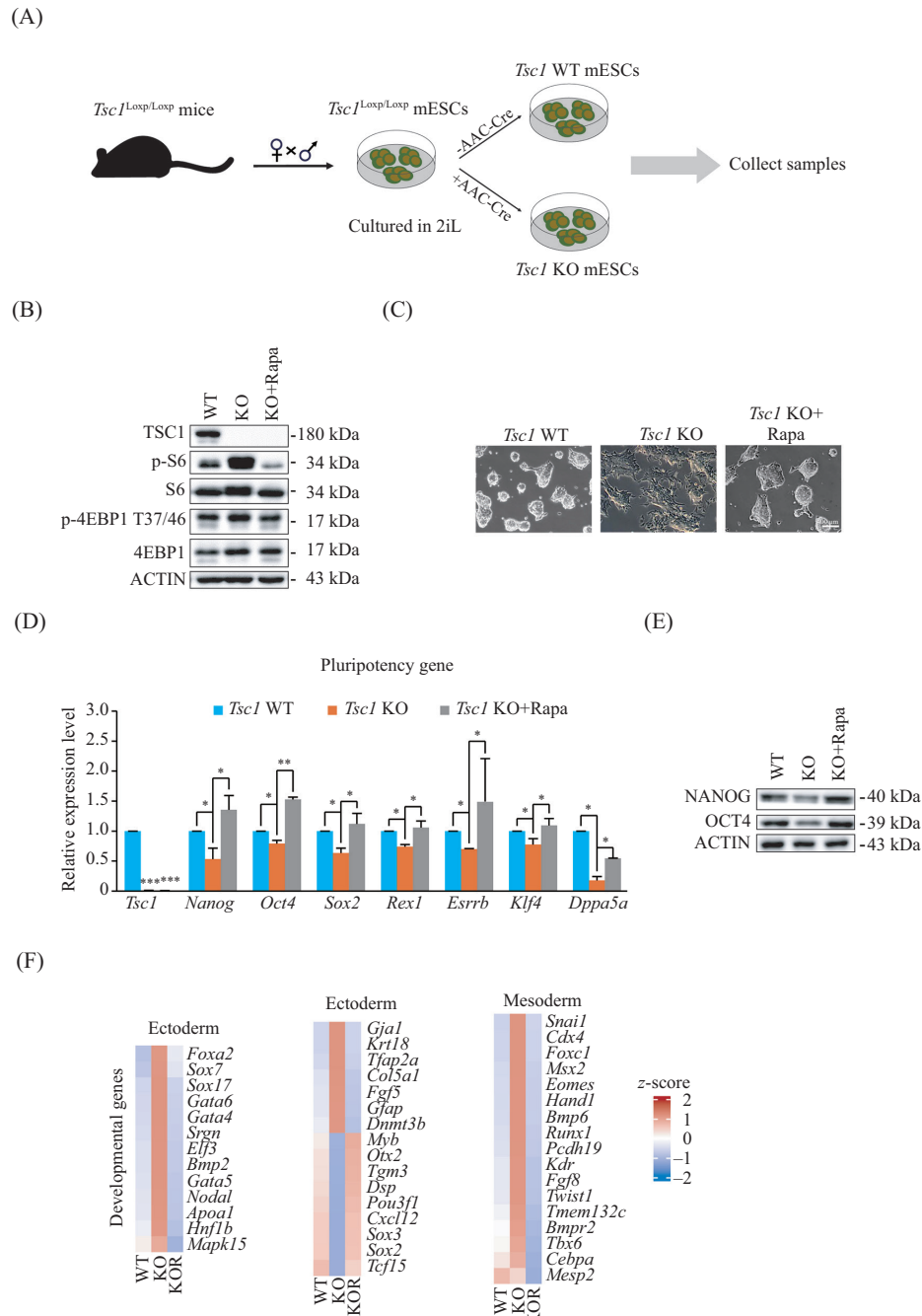
2 结果

2.1 mTORC1过度激活引起mESCs多能性基因表达下调

作为细胞内调控合成代谢的重要激酶,mTORC1活性受到上游多种信号通路调控,包括TSC1/2-Rheb和GATOR2-GATOR1两条通路^[18-19],本研究通过敲除*Tsc1*来激活mTORC1活性。为了获得*Tsc1*完全敲除且能够体外稳定培养的mESCs细胞系,我们购买*Tsc1*^{Loxp/Loxp}小鼠使其雌雄交配,分离胚胎3.5天的*Tsc1*^{Loxp/Loxp} mESCs并培养在2iL条件下,随后使用腺相关病毒(对照以及AAV-Cre)^[14]感染细胞得到可以稳定培养的*Tsc1* WT和KO mESCs(图1A)。Western blot和RT-qPCR检测证明*Tsc1*已被完全敲除(图1B和图1D),*Tsc1* KO mESCs中mTORC1过度激

表2 抗体信息
Table 2 Antibody information

抗体 Antibodies	来源 Source	货号 Identifier
ACTIN	Sigma	#A2066
TSC1	Cell Signaling	#6935
p-S6	Cell Signaling	#4858
p-4EBP1 T37/46	Cell Signaling	#2855
4EBP1	Cell Signaling	#9452
NANOG	Bethyl	#A300-397A
OCT4	Santa Cruz	#sc-8628
p-PDHE1α S232	Abcam	#ab92696
p-PDHE1α S293	Millpore	#AP1063



A: 分离 *Tsc1* WT和KO mESCs示意图; B: Western blot检测 *Tsc1* WT、KO以及雷帕霉素恢复的mESCs中mTORC1活性, p-S6和p-4EBP1 T37/46, mTORC1下游底物S6和4EBP1磷酸化水平, 代表mTORC1活性, Rapa、Rapamycin、雷帕霉素, 0.3 nmol/L, 下同; C: *Tsc1* WT、KO以及雷帕霉素恢复的mESCs克隆形态; D: RT-qPCR检测 *Tsc1* WT、KO以及雷帕霉素恢复的mESCs多能性基因表达水平, 数据统计使用平均数±标准差, *P*值计算使用双尾未配对学生*t*检验(two-tailed unpaired Student's *t* test), 下同, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *n*=3(独立生物学重复); E: Western blot检测 *Tsc1* WT、KO以及雷帕霉素恢复的mESCs中多能性蛋白表达水平; F: *Tsc1* WT、KO以及雷帕霉素恢复的mESCs中三胚层基因表达水平的热图结果。

A: schematic representation of the isolation of *Tsc1* WT and KO mESCs; B: Western blot analysis of mTORC1 activity in *Tsc1* WT, KO, and Rapamycin rescued mESCs, phosphorylation levels of p-S6 and p-4EBP1 (T37/46), downstream substrates of mTORC1 (S6 and 4EBP1), represent mTORC1 activity, Rapa, Rapamycin, 0.3 nmol/L, also hereafter in all similar experiments; C: representative colony morphology of *Tsc1* WT, KO, and Rapamycin-treated mESCs; D: RT-qPCR analysis of pluripotency gene expression in *Tsc1* WT, KO, and Rapamycin rescued mESCs, data are presented as $\bar{x} \pm s$ deviation. *P*-values were calculated using two-tailed unpaired student's *t*-test. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *n*=3 (independent biological replicates), also hereafter in all similar experiments; E: Western blot analysis of pluripotent proteins in *Tsc1* WT, KO, and Rapamycin rescued mESCs; F: heatmap results of triploblastic (endoderm, ectoderm and mesoderm) genes in *Tsc1* WT, KO, and Rapamycin rescued mESCs.

图1 过度激活mTORC1引起mESCs细胞形态扁平且多能性基因表达下调

Fig.1 mTORC1 hyperactivation induces the flattening of mESCs morphology and downregulation of pluripotency gene expression

活且可以被mTORC1抑制剂雷帕霉素(Rapamycin)恢复(图1B)。Tsc1 WT mESCs细胞形态呈现中间隆起、折光性强且边缘清晰的未分化致密状,而Tsc1 KO mESCs细胞形态呈现扁平状,更接近分化细胞,雷帕霉素可以恢复这种细胞形态异常(图1C),暗示mTORC1过度激活后mESCs多能性可能受到抑制。因此我们检测了包括Oct4、Nanog、Sox2等在内的多个多能性基因的表达,与预期一致,相比Tsc1 WT mESCs, Tsc1 KO mESCs多能性基因表达整体下调且可以被雷帕霉素恢复(图1D),同时,多能性蛋白NANOG和OCT4在Tsc1 KO mESCs中同样表达下调且可以被雷帕霉素恢复(图1E)。因此,在2iL培养条件下,敲除Tsc1过度激活mTORC1会引起多能性基因表达下调。同时我们检测三胚层分化基因表达,发现虽然外胚层基因有一半表达上调,一半表达下调,但中胚层和内胚层相关基因表达均整体上调(图1F),然而这些三胚层基因的表达值都还普遍偏低。因此,mTORC1过度激活后mESCs多能性下降,多能性基因表达下调,分化基因表达上调,但尚未出现胚层定向分化的趋势。

2.2 mTORC1过度激活引起mESCs线粒体活性上调

本实验室早期研究发现,mTORC1通过介导线粒体重塑和线粒体翻译来分别参与调控体细胞诱导重编程和mESCs自我更新^[12-14]。因此我们猜测mTORC1也通过介导线粒体调控mESCs稳态下多能性基因表达。

通过检测线粒体活性,我们发现与Tsc1 WT mESCs相比,Tsc1 KO mESCs的线粒体数量(图2A)、ROS水平(图2B)、OCR的基础水平和最高水平(图2C和图2D)均显著上调,且这可以被雷帕霉素恢复。上述结果初步证明mTORC1过度激活会引起mESCs中线粒体活性上调。

2.3 过度激活mTORC1通过激活线粒体抑制mESCs多能性基因表达

为了进一步验证过度激活mTORC1后引起的mESCs多能性基因表达下调是通过激活线粒体导致的,我们通过使用线粒体抑制剂DMM抑制线粒体活性。DMM是琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)的竞争性抑制剂,而SDH位于三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)和电子传递链(electron transfer chain, ETC)的交叉点,因此,它可

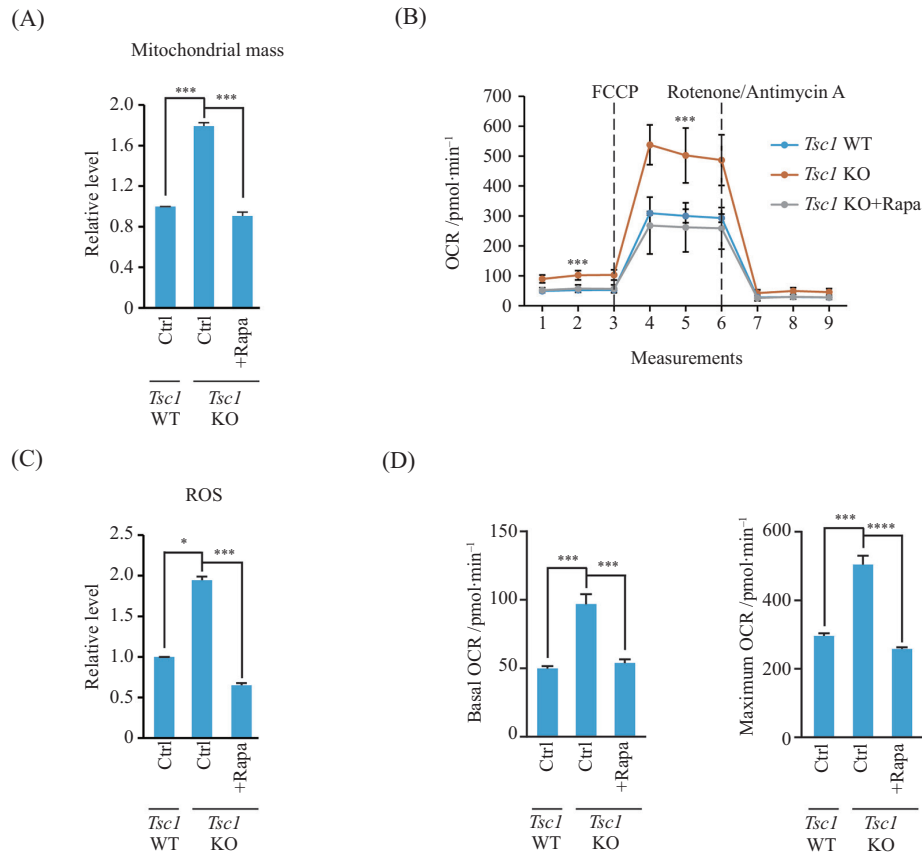
以抑制线粒体复合物II活性,从而同时阻断TCA循环和ETC(图3A)^[20]。在Tsc1 KO mESCs中加入DMM后,细胞形态恢复为中间隆起、折光性强且边缘清晰的未分化致密状,与雷帕霉素效果相似(图3B上)。通过AP(碱性磷酸酶)染色检测mESCs分化状态,我们发现,与Tsc1 WT mESCs相比,AP染色结果显示Tsc1 KO mESCs的染色变浅至接近无色,而雷帕霉素和DMM可以恢复AP染色的颜色,说明Tsc1 KO mESCs的多能性下调且可以被雷帕霉素和DMM恢复(图3B下)。为了证明DMM是通过抑制线粒体活性发挥功能的,我们检测了线粒体数量和ROS水平,发现了DMM确实可以有效抑制Tsc1 KO mESCs中的线粒体活性,结果与雷帕霉素相似,DMM同样能令线粒体活性恢复至接近Tsc1 WT mESCs的水平(图3C和图3D)。接着,我们使用RT-qPCR检测了Tsc1 WT、Tsc1 KO、雷帕霉素恢复以及DMM恢复的mESCs中的多能性基因表达情况,同样发现了DMM可以恢复Tsc1 KO mESCs的多能性基因表达,这与雷帕霉素效果一致(图3E)。

综上所述,过度激活mTORC1通过激活线粒体下调mESCs多能性基因表达。

2.4 mTORC1过度激活通过上调PDH复合物活性激活线粒体代谢从而抑制mESCs多能性基因表达

为了进一步验证过度激活mTORC1激活线粒体下调多能性基因表达的具体机制,我们发现报道称mTORC1下游S6K1会通过磷酸化PDK增强其活性,进而抑制PDH复合物^[21]。PDH复合物是一种核基因编码的线粒体多酶复合物,主要由丙酮酸脱氢酶(E1)、二氢硫辛酰胺乙酰转移酶(E2)和硫辛酰胺脱氢酶(E3)三种酶成分的多个拷贝组成。PDH复合物作为线粒体将丙酮酸钠催化生成乙酰辅酶A的关键酶,使TCA循环和糖酵解紧密关联在一起。PDH激酶(PDK1~4)介导的E1亚基 α (PDHE1 α)在丝氨酸(Ser)232、293和300位的磷酸化均会抑制PDH复合体的活性^[22-23]。

通过以往研究报道发现,线粒体激活剂DCA是PDH复合物的激活剂,并通过抑制PDK活性以提高PDH复合物活性^[24](图4A)。因此,我们首先通过Western blot检测mTORC1过度激活的Tsc1 KO mESCs中PDH复合物活性,发现PDHE1 α 磷酸化水平大幅下调,证明mTORC1过度激活后PDH复合物



A: *Tsc1* WT、KO和雷帕霉素恢复的mESCs中线粒体数量的检测, $***P<0.001$, $n=3$ (独立生物学重复); B: *Tsc1* WT、KO和雷帕霉素恢复的mESCs的线粒体OCR检测, FCCP, 氧化磷酸化解偶联剂; 鱼藤酮(Rotenone)/抗霉素A(Antimycin A), 线粒体电子传递链复合物I/III抑制剂, 下同, $***P<0.001$, $****P<0.0001$, $n=3$ (独立生物学重复); C: *Tsc1* WT、KO和雷帕霉素恢复的mESCs中线粒体ROS水平的检测, $*P<0.05$, $***P<0.001$, $n=3$ (独立生物学重复); D: *Tsc1* WT、KO以及雷帕霉素恢复的mESCs的线粒体基础水平(basal level)耗氧率和最大水平(maximum level)耗氧率, $***P<0.001$, $n=3$ (独立生物学重复)。

A: mitochondrial quantity in *Tsc1* WT, KO, and Rapamycin rescued mESCs, $***P<0.001$, $n=3$ (independent biological replicates); B: mitochondrial OCR detection in *Tsc1* WT, KO, and Rapamycin rescued mESCs, FCCP, oxidative phosphorylation uncoupler; Rotenone/Antimycin A, mitochondrial electron transport chain complex I/III inhibitors, also hereafter in all similar experiments, $***P<0.001$, $n=3$ (independent biological replicates); C: mitochondrial ROS levels in *Tsc1* WT, KO, and Rapamycin rescued mESCs, $*P<0.05$, $***P<0.001$, $n=3$ (independent biological replicates); D: mitochondrial basal (basal level) and maximal (maximum level) oxygen consumption rates in *Tsc1* WT, KO, and Rapamycin rescued mESCs, $***P<0.001$, $****P<0.0001$, $n=3$ (independent biological replicates).

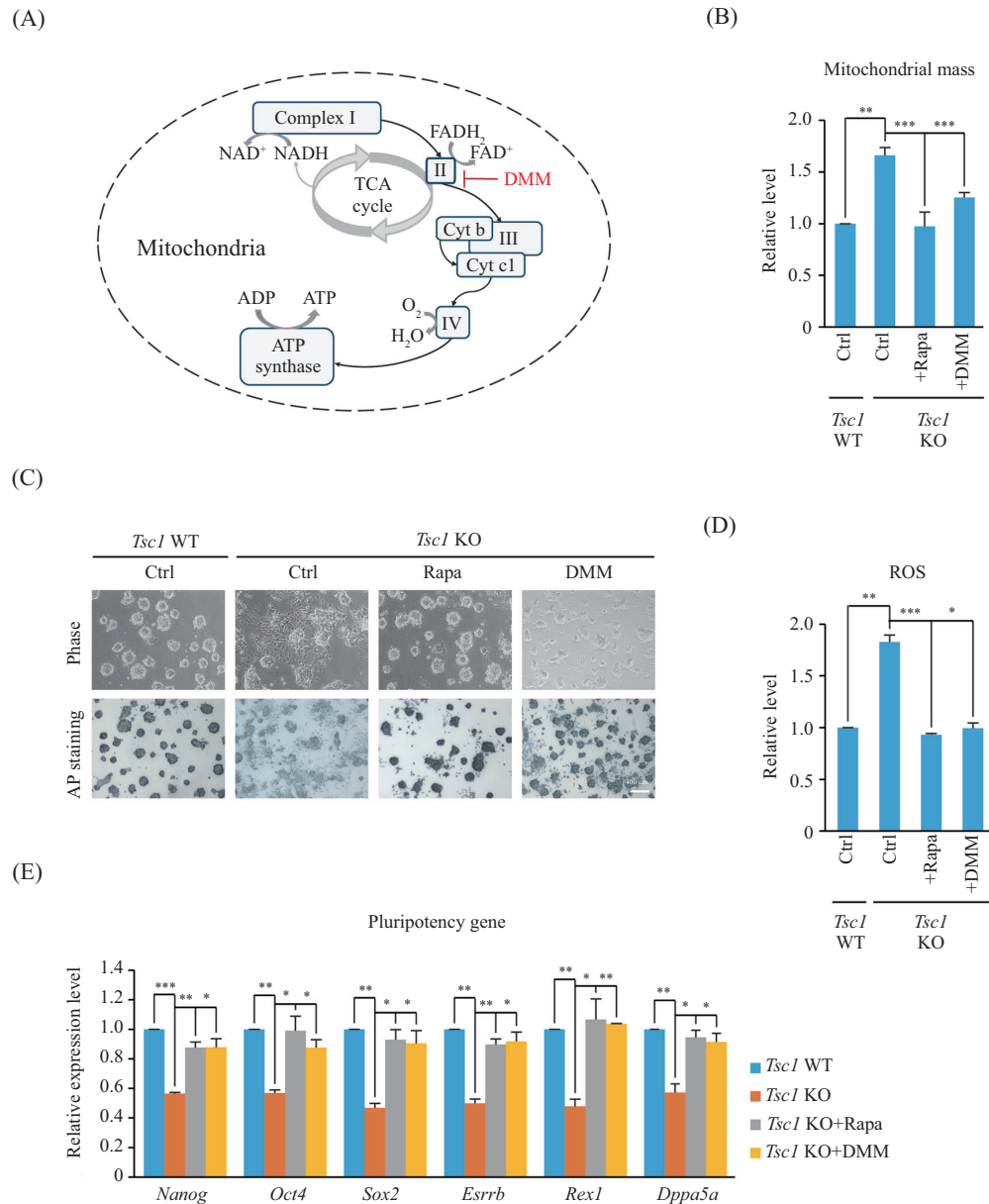
图2 mTORC1过度激活引起mESCs线粒体活性上调

Fig.2 Hyperactivation of mTORC1 increases mitochondrial activity in mESCs

活性被激活(图4B)。接着,我们使用DCA处理正常mESCs模拟线粒体激活的表型, Western blot检测结果显示使用DCA激活线粒体后, PDH复合物的磷酸化水平显著下调(图4C), 且与对照相比, DCA处理mESCs后, 线粒体数量和ROS水平上调, 且随着使用浓度增加上调水平同时增加(图4D和图4E), 证明DCA有效增强了PDH活性并激活了线粒体代谢。随后, 通过RT-qPCR检测对照和DCA不同浓度处理后的mESCs中的多能性基因表达情况, 结果发现DCA处理后mESCs多能性基因表达水平整体下调(图4F), 说明上调PDH复合物活性激活线粒体会诱导mESCs多能性基因表达下调。

为了进一步探究mTORC1过度激活后mESCs多能性基因表达下调是因为PDH复合物被激活, 我们通过线粒体丙酮酸转运蛋白MPC抑制剂UK5099抑制PDH复合物活性(图4G), 我们发现UK5099处理后, *Tsc1* KO mESCs细胞形态恢复为正常mESCs的未分化致密状克隆(图4H), 这和使用雷帕霉素处理的效果类似。OCR结果显示使用UK5099处理后, 线粒体活性被抑制, 验证了抑制剂的有效性(图4I)。RT-qPCR检测发现部分多能性基因如*Nanog*、*Sox2*和*Rex1*表达水平恢复正常(图4J)。

综上所述, 过度激活mTORC1通过上调PDH复合物活性激活线粒体代谢, 从而抑制mESCs的多能



A: 线粒体抑制剂DMM作用机制图; B: *Tsc1* WT、KO以及雷帕霉素和DMM恢复的mESCs的线粒体数量, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $n=3$ (独立生物学重复); C: *Tsc1* WT、KO以及雷帕霉素(0.3 nmol/L, 下同)和DMM(1 nmol/L, 下同)恢复的mESCs的克隆形态与AP染色; D: *Tsc1* WT、KO以及雷帕霉素和DMM恢复的mESCs的ROS水平, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $n=3$ (独立生物学重复); E: RT-qPCR检测*Tsc1* WT、KO以及雷帕霉素和DMM恢复的mESCs的多能性基因表达水平, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $n=3$ (独立生物学重复)。

A: mechanism diagram of the mitochondrial inhibitor DMM; B: mitochondrial quantity in *Tsc1* WT, KO, and Rapamycin and DMM rescued mESCs, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $n=3$ (independent biological replicates); C: colony morphology and AP staining of *Tsc1* WT, KO, and Rapamycin (0.3 nmol/L, also hereafter in all similar experiments) and DMM (1 nmol/L, also hereafter in all similar experiments) rescued mESCs; D: ROS levels in *Tsc1* WT, KO, and Rapamycin and DMM rescued mESCs, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $n=3$ (independent biological replicates); E: RT-qPCR analysis of pluripotency gene expression levels in *Tsc1* WT, KO, and Rapamycin and DMM rescued mESCs. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $n=3$ (independent biological replicates).

图3 线粒体抑制剂DMM可以恢复过度激活mTORC1导致的mESCs多能性下调

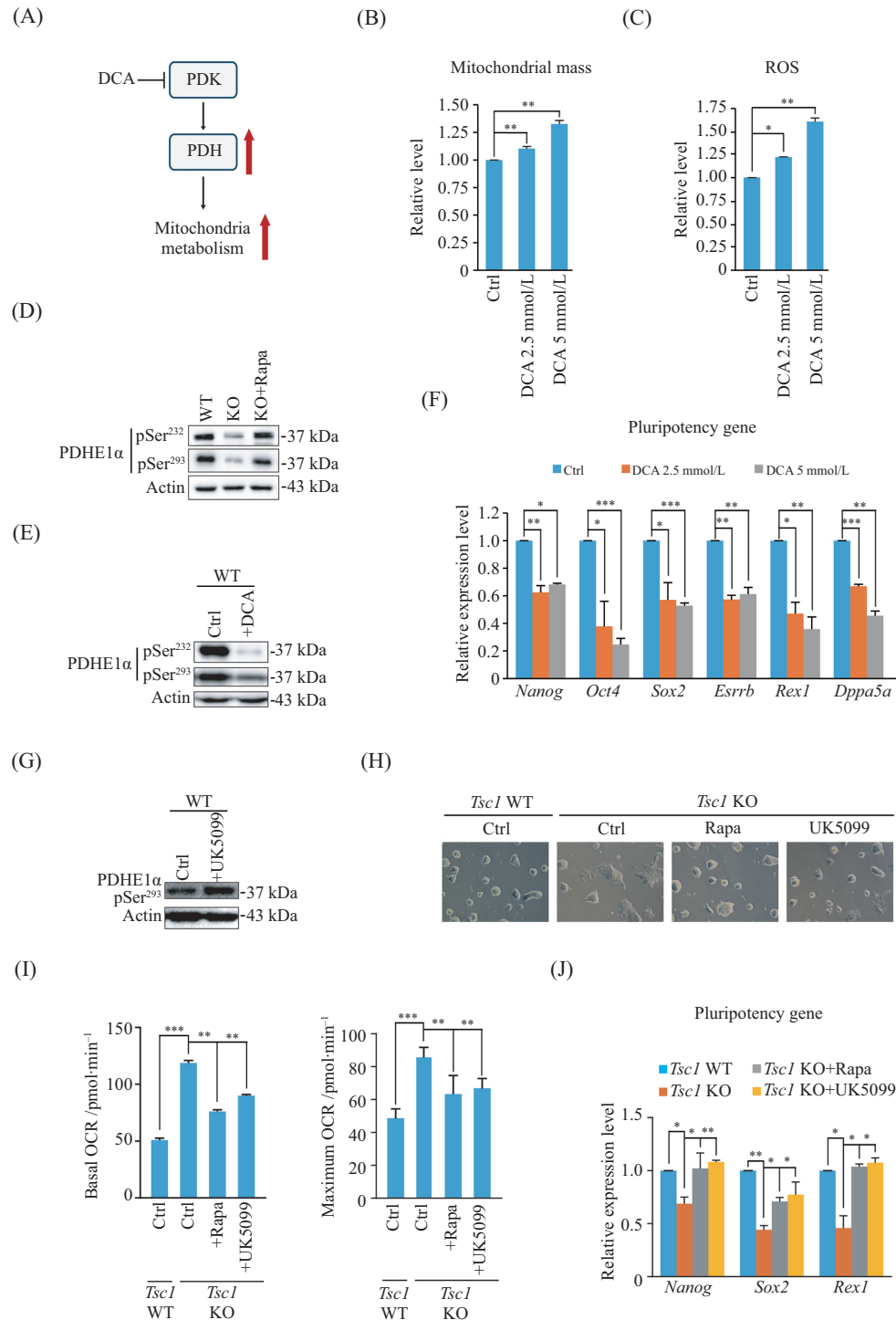
Fig.3 Mitochondrial inhibitor DMM can rescue the downregulation of mESC pluripotency due to mTORC1 hyperactivation

性基因表达。

3 讨论

胚胎干细胞是再生医学的重要研究材料, 其

自我更新与多能性会受到多种信号通路的调控, 从而能够在体外实现长期稳定培养^[25-26]。为了排除体内过度激活mTORC1对胚胎早期发育的影响以及体外使用CRISPR/Cas9技术敲除基因时可能产



A: DCA作用机制示意图; B: Ctrl、2.5 mmol/L DCA和5 mmol/L DCA处理Tsc1 WT mESCs中线粒体数量的检测, $^{**}P<0.01$, $n=3$ (独立生物学重复); C: Ctrl、2.5 mmol/L DCA和5 mmol/L DCA处理Tsc1 WT mESCs中ROS水平的检测, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $n=3$ (独立生物学重复); D: Western blot检测Tsc1 WT、KO以及雷帕霉素恢复的mESCs中PDH复合物活性; E: Western blot检测正常2iL培养条件下和使用5 mmol/L DCA处理的mESCs中的PDH复合物活性, p-PDHE1 α S293和p-PDHE1 α S232为PDHE1 α 磷酸化位点; F: RT-qPCR检测对照和分别使用两个浓度DCA处理后的Tsc1 WT mESCs的多能性基因表达水平, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $n=3$ (独立生物学重复); G: Western blot检测正常2iL培养条件下和使用20 μ mol/L UK5099处理的mESCs中PDH复合物活性; H: Tsc1 WT、KO以及使用0.3 nmol/L雷帕霉素和20 μ mol/L UK5099恢复的mESCs的克隆形态; I: Tsc1 WT、KO以及使用雷帕霉素和20 μ mol/L UK5099恢复的mESCs的线粒体基础水平(basal level)耗氧率和最大水平(maximum level)耗氧率, $^{*}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $n=3$ (独立生物学重复); J: RT-qPCR检测Tsc1 WT、KO以及使用雷帕霉素和UK5099恢复的mESCs的多能性基因表达水平, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $n=3$ (独立生物学重复)。

A: schematic diagram of the mechanism of action of DCA; B: detection of the number of mitochondria in Tsc1 WT mESCs treated with Ctrl, 2.5 mmol/L DCA and 5 mmol/L DCA, $^{**}P<0.01$, $n=3$ (independent biological replicates); C: detection of ROS levels in Tsc1 WT mESCs treated with Ctrl, 2.5 mmol/L DCA and 5 mmol/L DCA, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $n=3$ (independent biological replicates); D: PDH complex activity in Tsc1 WT, KO and Rapamycin rescued mESCs

were detected; E: Western blot analysis of PDH complex activity in mESCs treated with 5 mmol/L DCA and untreated under normal 2iL culture conditions, p-PDHE1 α S293 and p-PDHE1 α S232 were phosphorylated sites of PDHE1 α ; F: pluripotency gene expression levels of *Tsc1* WT mESCs detected by RT-qPCR control and treated with two concentrations of DCA, respectively, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, n =3 (independent biological repeats); G: Western blot analysis of PDH complex activity in mESCs treated with 20 μ mol/L UK5099 and untreated under normal 2iL culture conditions, p-PDHE1 α S293 and p-PDHE1 α S232 were phosphorylated sites of PDHE1 α ; H: *Tsc1* WT, KO, and clonal morphology of mESCs recovered with 0.3 nmol/L rapamycin and 20 μ mol/L UK5099; I: basal level and maximum level oxygen consumption rates of *Tsc1* WT, KO, and mESCs recovered with rapamycin and 20 μ mol/L UK5099, ** P <0.01, *** P <0.001, n =3 (independent biological replicates); J: RT-qPCR was used to detect the expression levels of pluripotency genes in *Tsc1* WT, KO and mESCs recovered with rapamycin and UK5099, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, n =3 (independent biological replicates).

图4 mTORC1过度激活上调PDH复合物活性激活线粒体代谢进而抑制多能性基因表达

Fig.4 Hyperactivation of mTORC1 promotes the increase of mitochondrial activity by activating PDH complex, thereby inhibiting the expression of pluripotency genes



图5 过度激活mTORC1通过调控线粒体活性抑制mESCs多能性基因表达示意图

Fig.5 Schematic diagram showing that hyperactivation of mTORC1 suppresses pluripotency gene expression in mESCs through mitochondrial activity

生的脱靶效应,我们从条件敲除型小鼠体内分离得到 *Tsc1*^{Loxp/Loxp} mESCs, 并通过 AAV-Cre 敲除处理, 得到可以在体外稳定培养的 *Tsc1* KO mESCs。由于早期研究报道 mTORC1 激活时会抑制 mTORC2 活性^[6-27], 但敲降 mTORC2 复合物特有组分 *Rictor* 并不影响 mESCs 多能性蛋白表达水平^[12], 且本实验室早期发现 mTORC1 通过线粒体调控体细胞诱导重编程和 mESCs 的自我更新^[12-14], 因此, 本研究利用稳定培养的 *Tsc1* WT/KO mESCs 细胞系, 从线粒体代谢层面探讨了过度激活 mTORC1 对 mESCs 多能性的影响及其下游机制。研究结果表明, *Tsc1* 敲除后, mTORC1 过度激活会导致线粒体活性增强, 进而造成 mESCs 细胞形态由中间隆起的未分化状态变为扁平状, AP 染色颜色接近无色, 同时多能性基因表达水平显著下调, 该表型是 mTORC1 激活 PDH 复合物使线粒体活性上调造成的, mTORC1 抑制剂雷帕霉素、线粒体复合物 II 抑制剂 DMM 和 PDH 复合物抑制剂 UK5099 均可以有效恢复这些表型(图5)。

ESCs 线粒体活性相对较低, 功能尚不成熟, 代谢方式主要依赖于糖酵解^[28], 尽管如此, 线粒体活性及其代谢产物对 ESCs 命运具有重要影响。研究表明, 大幅抑制线粒体活性会抑制 mESCs 自我更新^[12]; 适度抑制线粒体活性则有助于抑制 ESCs 分化^[29-30]; 而抑制线粒体分裂则有利于维持其多能性^[31-32]。mTORC1 可以从多个层面调控线粒体代谢: 通过 4EBP1/2 或 S6K 从翻译层面调控线粒体蛋白表达^[33-34]; 通过 Pgc1 α /YY1 或者 HIF1 α 从转录

层面调控线粒体相关基因转录^[35-37]; 通过 ULK1 抑制自噬从而抑制线粒体降解^[38]; 通过 4EBP-MTFP1 促进线粒体分裂^[39]; 通过抑制 FH 抑制延胡索酸水平^[40]等。此外, 敲除 T 细胞中的去泛素酶 CYLD (Cylindromatosis) 会通过激活 AMPK α /mTOR/ULK1 信号通路, 降低线粒体代谢活性, 减少线粒体中 ROS 的产生并促进线粒体自噬^[41]。在衰老模型中, mTORC1 持续激活则会导致线粒体自噬减少, 进而导致失常线粒体和过量 ROS 的累积最终对细胞造成损伤^[42]。此外, 有研究表明, 在发育中的小鼠心脏线粒体内, PDH 复合物会被 NOTCH1 胞内结构域 (Notch1 intracellular domain 1, NICD1) 激活从而使得线粒体代谢得到改善, 并最终驱动了内皮细胞到间充质转化 (endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT) 的过程^[43]。值得注意的是, PDH 复合物作为线粒体氧化反应和糖酵解代谢的关键限速酶, 其活性与线粒体活性息息相关。PDH 复合物通过将丙酮酸转化为乙酰辅酶 A, 促进三羧酸循环从而增强线粒体呼吸链活性。过往研究表明, mTORC1 过度激活可抑制丙酮酸脱氢酶激酶 (pyruvate dehydrogenase kinase, PDK), 从而解除 PDK 对 PDH 复合物的抑制作用。PDH 复合物活化后通过促进丙酮酸氧化脱羧生成乙酰辅酶 A, 增强线粒体氧化代谢, 最终导致活性氧 (ROS) 累积^[18]。本研究中 mTORC1 过度激活通过上调 PDH 复合物活性从而促进 mESCs 线粒体激活, 最终抑制多能性基因表达, 但 mTORC1 调控 PDH 复合物活性的机制和 TSC1

其他下游通路如TGF- β /Smad2/3通路等是否参与这一过程尚不清楚,需要后续进一步的研究。

作为代谢和生长的核心调控因子,mTORC1和线粒体功能密切相关,其过度激活通常会引发ROS的累积、基因组损伤以及细胞稳态的紊乱。早期研究发现抑制mTORC1会诱导线粒体活性降低并直接导致胚盘功能不全^[30]。此外,氧化应激是导致DNA损伤的重要因素,mTORC1可以通过RNF168加剧细胞DNA损伤,引发基因组不稳定,而这一过程可能与线粒体激活产生的ROS有关^[35]。我们发现mTORC1过度激活后,mESCs内ROS水平显著上升,接近正常水平的两倍(图2B),提示mTORC1过度激活可能是通过促进线粒体活性和细胞内ROS的累积,引发基因组不稳定,并扰动多能性基因的表达的。

综上所述,本研究发现过度激活mTORC1通过激活PDH复合物诱导线粒体活性上调,最终抑制mESCs多能性基因表达,为体外研究ESCs的发育分化提供了重要基础。通过调控mTORC1和线粒体活性,不仅有助于在体外维持ESCs更好的发育潜能,还可能实现干细胞的体外精确定向诱导分化,进而推动再生医学发展。此外,深入研究mTORC1和线粒体对多能干细胞的影响将有助于衰老机制的进一步揭示,为未来实现延缓甚至阻断体内干细胞衰老提供理论基础和技术支撑。

参考文献 (References)

- ENG C P, SEHGAL S N, VEZINA C. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors [J]. *J Antibiot*, 1984, 37(10): 1231-7.
- VÉZINA C, KUDELSKI A, SEHGAL S N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle [J]. *J Antibiot*, 1975, 28(10): 721-6.
- SHE Q B, HALILOVIC E, YE Q, et al. 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors [J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(1): 39-51.
- LLOYD B A, HAKE H S, ISHIWATA T, et al. Exercise increases mTOR signaling in brain regions involved in cognition and emotional behavior [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 323: 56-67.
- MANNICK J B, LAMMING D W. Targeting the biology of aging with mTOR inhibitors [J]. *Nat Aging*, 2023, 3(6): 642-60.
- SIMCOX J, LAMMING D W. The central mTOR of metabolism [J]. *Dev Cell*, 2022, 57(6): 691-706.
- HACKETT J A, SURANI M A. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(4): 416-30.
- GANGLOFF Y G, MUELLER M, DANN S G, et al. Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(21): 9508-16.
- MURAKAMI M, ICHISAKA T, MAEDA M, et al. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(15): 6710-8.
- GUERTIN D A, STEVENS D M, THOREEN C C, et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1 [J]. *Dev Cell*, 2006, 11(6): 859-71.
- MA A, WANG L, GAO Y, et al. Tsc1 deficiency-mediated mTOR hyperactivation in vascular endothelial cells causes angiogenesis defects and embryonic lethality [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(3): 693-705.
- XU X, AHMED T, WANG L, et al. The mTORC1-eIF4F axis controls paused pluripotency [J]. *EMBO Rep*, 2022, 23(2): e53081.
- WU Y, LI Y, ZHANG H, et al. Autophagy and mTORC1 regulate the stochastic phase of somatic cell reprogramming [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(6): 715-25.
- WANG L, XU X, JIANG C, et al. mTORC1-PGC1 axis regulates mitochondrial remodeling during reprogramming [J]. *FEBS J*, 2020, 287(1): 108-21.
- SAMPATH P, PRITCHARD D K, PABON L, et al. A hierarchical network controls protein translation during murine embryonic stem cell self-renewal and differentiation [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(5): 448-60.
- BETSCHINGER J, NICHOLS J, DIETMANN S, et al. Exit from pluripotency is gated by intracellular redistribution of the bHLH transcription factor Tfe3 [J]. *Cell*, 2013, 153(2): 335-47.
- VILLEGAS F, LEHALLE D, MAYER D, et al. Lysosomal signaling licenses embryonic stem cell differentiation via inactivation of Tfe3 [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(2): 257-70.e8.
- YANG W, PANG D, CHEN M, et al. Rheb mediates neuronal activity-induced mitochondrial energetics through mTORC1-independent PDH activation [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(6): 811-25.e6.
- LI M, YU J S L, TILGNER K, et al. Genome-wide CRISPR-KO screen uncovers mTORC1-mediated Gsk3 regulation in naive pluripotency maintenance and dissolution [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(2): 489-502.
- XU J, PAN H, XIE X, et al. Inhibiting succinate dehydrogenase by dimethyl malonate alleviates brain damage in a rat model of cardiac arrest [J]. *Neuroscience*, 2018, 393: 24-32.
- JIANG Q, ZHANG X, DAI X, et al. S6K1-mediated phosphorylation of PDK1 impairs AKT kinase activity and oncogenic functions [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1548.
- CAI Z, LI C F, HAN F, et al. Phosphorylation of PDHA by AMPK drives TCA cycle to promote cancer metastasis [J]. *Mol Cell*, 2020, 80(2): 263-78.e7.
- CAI Z, PENG D, LIN H K. AMPK maintains TCA cycle through sequential phosphorylation of PDHA to promote tumor metastasis [J]. *Cell Stress*, 2020, 4(12): 273-7.
- MATSUHASHI T, HISHIKI T, ZHOU H, et al. Activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate has the potential to

- induce epigenetic remodeling in the heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 82: 116-24.
- [25] BULUT-KARSLIOGLU A, BIECHELE S, JIN H, et al. Inhibition of mTOR induces a paused pluripotent state [J]. *Nature*, 2016, 540(7631): 119-23.
- [26] YING Q L, WRAY J, NICHOLS J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal [J]. *Nature*, 2008, 453(7194): 519-23.
- [27] BATTAGLIONI S, BENJAMIN D, WÄLCHLI M, et al. mTOR substrate phosphorylation in growth control [J]. *Cell*, 2022, 185(11): 1814-36.
- [28] WU J, OCAMPO A, BELMONTE J C I. Cellular metabolism and induced pluripotency [J]. *Cell*, 2016, 166(6): 1371-85.
- [29] VARUM S, MOMČILOVIĆ O, CASTRO C, et al. Enhancement of human embryonic stem cell pluripotency through inhibition of the mitochondrial respiratory chain [J]. *Stem Cell Res*, 2009, 3(2/3): 142-56.
- [30] MANDAL S, LINDGREN A G, SRIVASTAVA A S, et al. Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2011, 29(3): 486-95.
- [31] KOWNO M, WATANABE-SUSAKI K, ISHIMINE H, et al. Prohibitin 2 regulates the proliferation and lineage-specific differentiation of mouse embryonic stem cells in mitochondria [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e81552.
- [32] HOPPINS S. The regulation of mitochondrial dynamics [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 29: 46-52.
- [33] VON MANTEUFFEL S R, DENNIS P B, PULLEN N, et al. The insulin-induced signalling pathway leading to S6 and initiation factor 4E binding protein 1 phosphorylation bifurcates at a rapamycin-sensitive point immediately upstream of p70s6k [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(9): 5426-36.
- [34] ISOTANI S, HARA K, TOKUNAGA C, et al. Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase *in vitro* [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(48): 34493-8.
- [35] HE L, GOMES A P, WANG X, et al. mTORC1 promotes metabolic reprogramming by the suppression of GSK3-dependent Foxk1 phosphorylation [J]. *Mol Cell*, 2018, 70(5): 949-60.e4.
- [36] DÜVEL K, YECIES J L, MENON S, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1 [J]. *Mol Cell*, 2010, 39(2): 171-83.
- [37] CUNNINGHAM J T, RODGERS J T, ARLOW D H, et al. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1–PGC-1 α transcriptional complex [J]. *Nature*, 2007, 450(7170): 736-40.
- [38] KANG S A, PACOLD M E, CERVANTES C L, et al. mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin [J]. *Science*, 2013, 341(6144): 1236566.
- [39] MORITA M, PRUDENT J, BASU K, et al. mTOR controls mitochondrial dynamics and cell survival via MTFP1 [J]. *Mol Cell*, 2017, 67(6): 922-35.e5.
- [40] DRUSIAN L, NIGRO E A, MANNELLA V, et al. mTORC1 up-regulation leads to accumulation of the oncometabolite fumarate in a mouse model of renal cell carcinoma [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(5): 1093-104.e6.
- [41] YU L, GAO G, GAO J, et al. CYLD regulates T cell metabolism and mitochondrial autophagy through LKB1/AMPK α pathway [J]. *Immune Discov*, 2025, 1(1): 10002.
- [42] MIWA S, KASHYAP S, CHINI E, et al. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(13): e158447.
- [43] WANG J, ZHAO R, XU S, et al. NOTCH1 mitochondria localization during heart development promotes mitochondrial metabolism and the endothelial-to-mesenchymal transition in mice [J]. *Nature Commun*, 2024, 15(1): 9945.
- [44] XIE X, HU H, TONG X, et al. The mTOR-S6K pathway links growth signalling to DNA damage response by targeting RNF168 [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(3): 320-31.