

GDH1 抑制剂 R162 靶向 EGFR 通路抑制 NSCLC 细胞的增殖

邬爱红^{1,2,3} 韩田雨² 许飞^{2,4} (通讯作者)

1.南昌大学医学部, 江西 南昌 330000

2.南昌大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 江西 南昌 330000

3.高安市人民医院重症医学科, 江西 高安 330800

4.深圳市宝安区人民医院呼吸与危重症医学科, 广东 深圳 518100

摘要: 在我国恶性肿瘤中, 肺癌的发病率及死亡率位居首位, 其中非小细胞肺癌 (NSCLC) 占比可达 80%–85%。近年来, 肿瘤代谢重编程成为癌症研究的热点领域, 谷氨酰胺代谢增强是肿瘤代谢的主要特征之一。谷氨酰胺脱氢酶 GDH1 是谷氨酰胺代谢的关键酶, 在多种肿瘤中发挥促癌作用, 是目前抗肿瘤药物研发的潜在靶点。R162 是 GDH1 的特异性小分子抑制剂, 在 NSCLC 中的作用研究较少, 部分研究仅探讨了 R162 对 NSCLC 细胞转移的影响, 而 R162 是否影响 NSCLC 细胞的增殖尚未知晓。本研究证明了 R162 抑制 NSCLC 细胞的增殖和细胞周期运转, 阐明了 R162 抑制 NSCLC 细胞的 EGFR 信号通路来抑制细胞增殖, 还揭示了 R162 诱导 NSCLC 的线粒体自噬。综上所述, 我们的研究阐明了 R162 对 NSCLC 细胞的影响及其机制, 对以 R162 为基础开发新型肺癌治疗药物提供了理论依据。

关键词: 谷氨酰胺脱氢酶 1; R162; 表皮生长因子受体; 细胞周期; 非小细胞肺癌细胞

肺癌具有高度异质性, 是全球癌症相关死亡的主要原因^[1,2]。非小细胞肺癌(NSCLC)约占肺癌病例的 85%, 其中肺腺癌是最常见的分期^[1]。至今, 非小细胞肺癌最有效的治疗方法包括手术联合放疗和化疗, 但预后不佳。因此, 探究 NSCLC 发展的分子机制, 并寻找更有效的生物标志物和治疗靶点具有临床价值。

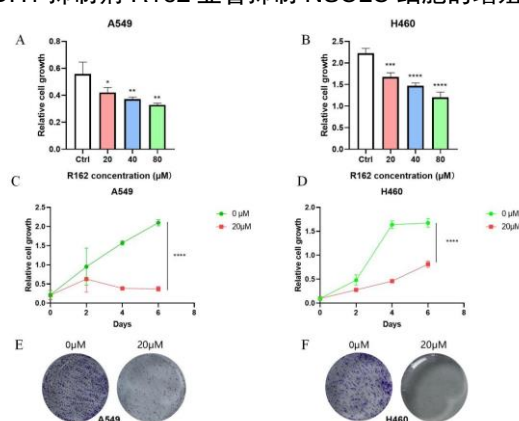
代谢重编程被认为是癌症的标志之一^[3]。谷氨酰胺经分解代谢产生谷氨酸和氨^[4]。谷氨酸转化为 TCA 循环中间体 α -KG, 以产生 ATP 和合成代谢碳, 用于合成氨基酸、核苷酸和脂质^[5]。谷氨酸转化为 α -KG 是由谷氨酰胺脱氢酶 1(GDH1)或其他转氨酶催化, 并产生相应的氨基酸^[4]。GDH1 在人类癌症中上调。研究证实, GDH1 在癌症的发生发展中起着重要作用。

抑制 GDH1 会导致 H1299 和 MDA-MB231 细胞内富马酸水平降低、GPx 活性减弱、ROS 水平升高、细胞增殖减少^[6]。研究表明, 靶向 GDH1 可以消除原始细胞并延缓 AML 进展^[7]。GDH1 也是缺氧反应所必需的, 并且与结直肠癌(CRC)预后不良有关^[8]。抑制 GDH1 的表达和/或活性是一个潜在的治疗靶点。

癌症的特征是由于各种细胞周期蛋白的异常激活而导致肿瘤细胞的异常增殖。因此, 细胞周期调节剂是癌症

治疗具有吸引力的靶点^[9,10]。在本研究中, 我们发现小分子抑制剂 R162 靶向 GDH1 可抑制体外 NSCLC 细胞的增殖并诱导细胞周期停滞。此外, R162 可通过抑制 EGFR 信号通路来抑制细胞增殖和发生线粒体自噬。我们的研究确定了 GDH1 在 NSCLC 进展中的新作用, 这可能是人类 NSCLC 的潜在生物标志物和治疗靶点。

1 GDH1 抑制剂 R162 显著抑制 NSCLC 细胞的增殖



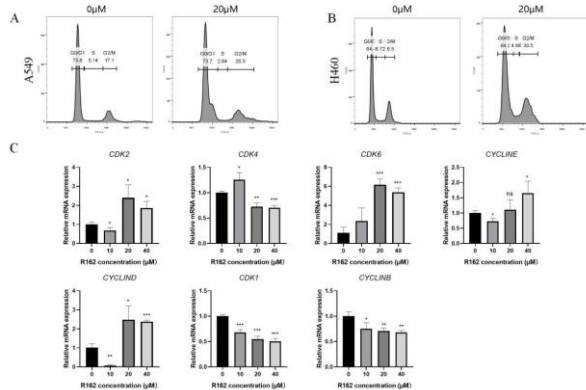
(图 A 和 B) 通过 CCK8 实验检测细胞活力。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ 。(图 C 和 D) 通过结晶紫染色检测 A549 和 H460 细胞增殖能力。****, $P < 0.0001$ 。(E 和 F) 通过克隆集落形成实验检测 A549 和 H460 细胞的克隆集落形成能力。

图 1 R162 显著抑制 NSCLC 的增殖。

为了明确 GDH1 抑制剂 R162 对 NSCLC 细胞增殖的

影响,我们通过 CCK8 实验检测不同浓度 R162 (20 μ M, 40 μ M, 80 μ M) 对 A549 和 H460 细胞活力的影响。如图 1A 和 1B 所示,随着 R162 浓度的增加, A549 和 H460 两株细胞的活力被显著抑制。我们通过结晶紫染色法检测 R162 对 A549 和 H460 细胞增殖能力的影响。发现随着 R162 (20 μ M) 处理时间的延长, A549 和 H460 细胞的增殖速度受到显著抑制 (1C 和 1D); 同时,我们通过克隆集落形成实验,发现 R162 (20 μ M) 能显著抑制 A549 和 H460 细胞的克隆集落形成能力 (1E 和 1F)。这些结果说明, GDH1 抑制剂 R162 能够显著抑制 NSCLC 细胞的增殖能力。

2 GDH1 抑制剂 R162 抑制 NSCLC 细胞的周期运转

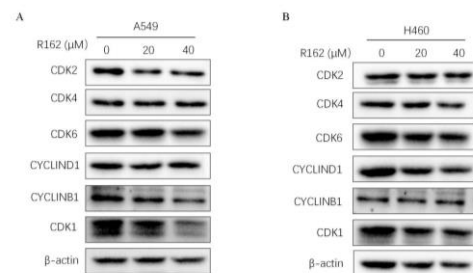


(图 A 和 B) 通过流式细胞仪明确 R162 对细胞周期的影响。(C) 通过 Q-PCR 分析细胞周期相关蛋白的表达。ns, $P>0.05$; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$ 。

图 2 R162 抑制 NSCLC 细胞的周期运转并将细胞周期阻滞在 G2/M 期。

肿瘤细胞的快速增殖与细胞周期的快速运转密切相关。鉴于 R162 对细胞增殖的显著抑制作用,我们运用流式细胞术明确 R162 处理对 A549 和 H460 细胞的细胞周期运转的影响。如图 2A 和 2B 所示, R162 的处理抑制了 NSCLC 细胞的周期运转,并将细胞周期阻滞在 G2/M 期。接着检测了 R162 处理对 NSCLC 细胞中周期蛋白 Cyclins 和周期蛋白激酶 CDKs 的 mRNA 表达水平的影响。发现随着 R162 处理浓度的增加, G2/M 期蛋白 CDK1 和 Cyclin B1 表达水平呈梯度下降,而 G1 期和 S 期蛋白 (CDK2, CDK4, CDK6, Cyclin D1, Cyclin E1) 的表达则没有随 R162 处理浓度的增加呈现一致的变化趋势,特别是在高浓度 R162 (20 μ M, 40 μ M) 处理条件下, CDK2, CDK6, Cyclin D1, Cyclin E1 的 mRNA 表达水平显著增加,这进一步说明 R162 对非小细胞肺癌周期的阻滞未发生在 G1 和 S 期 (图 2C)。

为了明确 R162 对 NSCLC 细胞周期的抑制效果,检测了这些周期相关蛋白的表达水平。如图 3A 和 3B 所示, R162 的处理显著降低了 A549 和 H460 细胞中 CDK1 的蛋白表达水平,但 R162 的处理对 H460 细胞中 Cyclin B1 的蛋白表达影响不大,而显著降低了 A549 细胞中 Cyclin B1 的蛋白表达,这表明 R162 对 G2/M 期的阻滞主要通过降低 CDK1 的表达来实现。同时, R162 对 G1 和 S 期周期相关蛋白的表达影响不明显或者在两株细胞中没有呈现一致的变化趋势。综上所述, R162 处理通过降低 CDK1 的蛋白表达将 NSCLC 细胞周期阻滞在 G2/M 期。



(图 A 和 B) 通过 western blot 实验检测周期相关蛋白的表达。

图 3 R162 抑制 NSCLC 细胞 CDK1 的蛋白表达

3 R162 通过抑制 EGFR 信号通路来抑制细胞增殖

为了探究 R162 抑制 NSCLC 进展的分子机制,我们对 R162 处理后的 A549 细胞进行转录组测序分析,发现 R162 处理组中共有 3186 个基因显著上调, 1961 个基因显著下调 (表达差异倍数 $\log_2\text{FoldChange} > 1$, 显著性 $P\text{-value}<0.05$) (图 4A)。聚类分析进一步表明, R162 处理引起 A549 细胞基因表达水平的整体改变 (图 4B)。对这些差异基因进行 KEGG 通路分析,发现 EGFR 通路 (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance、ErbB signaling pathway) 发生了明显改变 (图 4C)。接着对 R162 处理下调的基因进行 KEGG 通路分析,发现与癌症发生发展密切相关的信号通路如 ErbB signaling pathway、EGFR signaling pathway 等发生显著变化 (图 4D), 并且通过对其中变化较为明显的 LATS2 和 WWC1 两个基因进行 Q-PCR 验证明确了 R162 可下调这些基因 (图 4E 和 4F)。这表明这些信号通路在 R162 处理后显著下调。EGFR 通路与肿瘤的快速增殖和细胞周期运转密切相关。我们检测了 EGFR 及其下游信号分子的表达,如图 4G 所示, R162 处理后 EGFR 的表达水平显著降低,同时其下游关键信号分子 ERK1/2 的磷酸化显著下调,而总体 ERK1/2 水平无明显差异。这表明 R162 通过抑制 EGFR 信号通路来抑制 NSCLC 细胞的增殖。

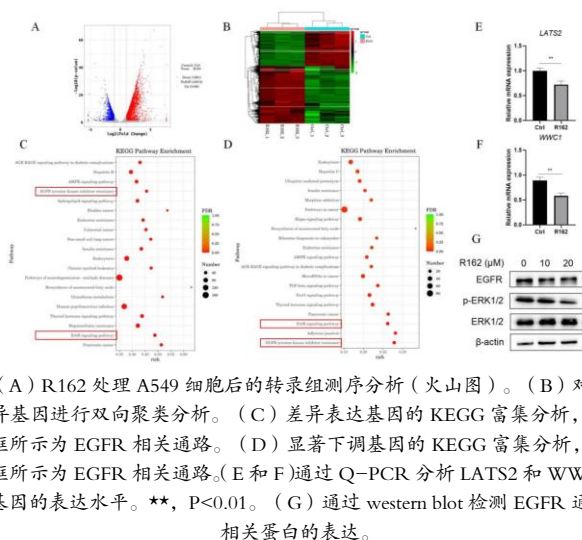


图4 R162通过抑制EGFR信号通路来抑制细胞增殖。

4 R162处理诱导NSCLC细胞发生线粒体自噬

在转录组测序数据中,对R162处理后上调的基因进行了KEGG通路分析,发现线粒体自噬通路发生了明显的改变(图5A),对其中显著变化的基因ULK1和PINK1进行Q-PCR验证,明确了R162处理后ULK1和PINK1的mRNA水平显著上调(图5B),提示线粒体自噬通路在R162处理后上调。接着检测了线粒体自噬相关蛋白的表达水平。如图5C所示,R162处理后LC3B-II水平显著增加,同时p62表达水平下调,此外线粒体蛋白TOM20水平在R162处理后降低,这些结果表明R162处理诱导非小细胞肺癌细胞发生了线粒体自噬。

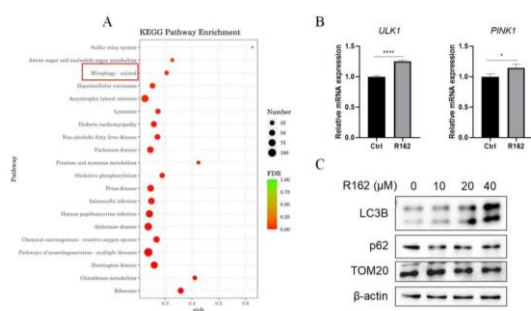


图5 R162处理诱导NSCLC细胞发生线粒体自噬。(A)根据R162处理后显著上调基因的KEGG富集分析结果,红框所示为线粒体自噬通路。(B)R通过Q-PCR分析ULK1和PINK1基因的表达水平。*, $P<0.05$;****, $P<0.0001$ 。(C)R162处理A549细胞,通过western blot检测线粒体自噬相关蛋白的表达。

图5 R162处理诱导NSCLC细胞发生线粒体自噬。

5 讨论

谷氨酰胺分解是一种代谢途径,将谷氨酰胺转化为谷氨酸,进而转化为 α -酮戊二酸(α -KG)和氨^[11]。GDH1是谷氨酰胺分解途径中的谷氨酸脱氢酶,在癌细胞中将谷氨酸转化为 α -KG发挥作用^[4]。此前,刘等人^[12]发现GDH在侵袭性CRC细胞系中表达较高,改变GDH表

达会影响细胞增殖、迁移和侵袭。此外,GDH1控制细胞内 α -KG及其下游代谢物富马酸的水平,进而激活谷胱甘肽过氧化物酶1,促进乳腺癌和肺癌的细胞增殖和肿瘤生长^[6]。我们的研究证实,应用针对GDH1的小分子抑制剂R162可抑制肺癌细胞的生长。而且,我们发现这种抑制是由细胞周期停滞导致。这些发现表明GDH1在NSCLC进展中发挥着重要作用。

癌细胞的快速增殖依赖于细胞周期的快速运转。在细胞周期的不同阶段分别由不同的周期蛋白和周期蛋白激酶调控,例如CDK4或CDK6与Cyclin D1结合后激活,对下游蛋白进行磷酸化来启动细胞周期,CDK2则主要结合Cyclin E并促进细胞从G1期进入S期。在G2期进入M过程中,CDK1和Cyclin B1发挥重要作用。我们发现R162处理将细胞周期阻滞在G2/M期,并且对周期蛋白和周期蛋白激酶相关基因检测发现,R162对G2/M期周期蛋白Cyclin B1和周期蛋白激酶CDK1的mRNA影响较明显,且随R162浓度的增加CDK1和Cyclin B1的mRNA水平呈梯度下调。通过检测蛋白表达水平,发现在A549和H460细胞中,R162均可有效抑制CDK1的蛋白表达。R162的处理对H460细胞中Cyclin B1的蛋白表达影响不大,而显著降低了A549细胞中Cyclin B1的蛋白表达。这提示,在非小细胞肺癌细胞中R162是通过影响CDK1基因的转录来调控其蛋白表达水平,且R162对G2/M期的影响主要通过影响CDK1来实现。

R162除了影响细胞代谢通路外,其对细胞整体基因表达水平有什么影响并不清楚。我们通过转录组测序分析发现,R162处理可诱导细胞整体基因表达水平的改变。并发现与癌症进展密切相关的促癌信号通路如ErbB signaling pathway、EGFR signaling pathway等显著下调,提示R162可能通过影响促癌信号通路中关键基因的表达来抑制癌细胞增殖。EGFR通路是激活细胞周期促进癌细胞增殖的关键信号通路,我们发现R162处理显著抑制EGFR的表达及其下游ERK1/2的磷酸化,因此EGFR信号通路可能是R162抑制细胞周期运转的关键信号通路。但A549和H460是EGFR野生型非小细胞肺癌细胞,R162是否影响EGFR突变肺癌细胞中的EGFR信号通路需要进一步探究。

线粒体是产生能量的动态双膜细胞器,对细胞和生物体的生存至关重要^[19]。线粒体自噬在维持细胞和组织功能稳态方面起着重要作用,它促进肿瘤发生,而这种促进是通过抑制功能失调的线粒体的积累来实现的,而线粒体会

产生 ROS 并改变代谢物^[20]。我们的研究表明,抑制 GDH1 会影响线粒体自噬途径。我们还发现 R162 治疗促进了 E2F1 的表达。

总之,我们的研究发现,R162 抑制 GDH1 可抑制肺癌细胞的生长,这是通过诱导 G2/M 期停滞实现的。我们还发现,使用 R162 时,EGFR 信号通路发生变化,线粒体自噬受到影响。我们的研究揭示了 GDH1 在 NSCLC 进展中的作用,并为 NSCLC 提供了潜在的诊断和预后生物标志物和治疗靶点。

6 展望

(1) 我们发现 R162 可抑制 NSCLC 细胞的增殖和细胞周期运转,但研究主要在体外细胞水平上开展,R162 是否在体内也具有抑制 NSCLC 细胞增殖的能力需在动物实验中进一步探究。

(2) 我们发现 R162 可影响 EGFR 的表达水平和下游的 ERK1/2 的激活,但 R162 调控 EGFR 信号通路的详细分子机制尚不明确,这也是本项目接下来要研究的重点方向。

(3) 线粒体自噬在肿瘤进展中发挥了“双刃剑”的作用,我们的研究证明了 R162 可诱导 NSCLC 细胞的线粒体自噬,但诱导线粒体自噬的该机制需要进一步探究。

参考文献:

[1]HERBST R S, MORGENSZTERN D, BOSHOF C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. Nature,2018,553(7689):446-54.

[2]SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer Statistics, 2021 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021,71(1): 7-33.

[3]HANAHAN D, WEINBERG ROBERT A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-74.

[4]金 L,阿莱西 GN,康 S.谷氨酰胺分解代谢作为癌症治疗靶点[J].癌基因,2015,35(28):3619-3625.

[5]WISE D R, THOMPSON C B. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer [J]. Trends in Biochemical Sciences,2010,35(8):427-33.

[6]JIN L, LI D, ALESI GINA N, et al. Glutamate Dehydrogenase 1 Signals through Antioxidant Glutathione Peroxidase 1 to Regulate Redox Homeostasis and Tumor Growth [J].Cancer Cell,2015,27(2):257-70.

[7]MA Z, YE W, WANG J, et al. Glutamate dehydrogenase 1: A novel metabolic target in inhibiting acute myeloid

leukaemia progression [J]. British Journal of Haematology,2023,202(3): 566-77.

[8]HU K, DING Y, ZHU H, et al. Glutamate dehydrogenase1 supports HIF - 1 α stability to promote colorectal tumorigenesis under hypoxia [J].The EMBO Journal,2023, 42(12).

[9]奥托 T,西钦斯基 P. 细胞周期蛋白作为癌症治疗的潜在靶点[J].自然综述:癌症,2017,17(2): 93-115.

[10]MATTHEWS H K, BERTOLI C, DE BRUIN R A M. Cell cycle control in cancer [J].Nature Reviews Molecular Cell Biology,2021,23(1): 74-88.

[11]VILLAR V H, MERHI F, DJAVAHERI-MERGNY M, et al. Glutaminolysis and autophagy in cancer [J].Autophagy,2015,11(8):1198-208.

[12]LIU G, ZHU J, YU M, et al. Glutamate dehydrogenase is a novel prognostic marker and predicts metastases in colorectal cancer patients [J].Journal of Translational Medicine,2015,13(1).

[13]SEDLACKOVA L, KOROLCHUK V I. Mitochondrial quality control as a key determinant of cell survival [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research,2019,1866(4): 575-87.

[14]乔拉西亚 AH,博兰 ML,麦克劳德 KF. 线粒体自噬与癌症[J].癌症与代谢,2015,3(1): 1-15.

[15]DRAKE L E, SPRINGER M Z, POOLE L P, et al. Expanding perspectives on the significance of mitophagy in cancer [J].Seminars in Cancer Biology,2017,47:110-24.

[16]CHANG J Y, YI H-S, KIM H-W, et al. Dysregulation of mitophagy in carcinogenesis and tumor progression [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2017, 1858(8): 633-40.

[17]POLAGER S, GINSBERG D. E2F - at the crossroads of life and death [J]. Trends in Cell Biology,2008,18(11):528-35.

[18]春 JN,赵 M,朴 S,等. E2F1 在前列腺癌中的矛盾作用: 细胞微环境差异还是诠释灵活性?[J].生物化学与生物物理学报(BBA)-癌症综述,2020,1873(1):188487.

[19]ENGELMANN D, PütZER B M. The Dark Side of E2F1: In Transit beyond Apoptosis [J].Cancer Research,2012,72(3): 571-5.

[20]PütZER B M, ENGELMANN D. E2F1 apoptosis counterattacked: evil strikes back [J]. Trends in Molecular

Medicine,2013,19(2):89-98.

作者简介：邬爱红（1985—），女，汉族，本科（在职研究生在读），肺肿瘤。通讯作者：许飞（1973—），

男，汉族，博士，肺部肿瘤及呼吸纤维支气管镜。通讯地址：广东省深圳市宝安区人民医院呼吸与危重症医学科。