

doi: 10.7541/2022.2021.0221

烯醇化酶1多肽共价修饰改变细胞的生长和代谢模式

宋学文^{1*} 李文玲^{1*} 朱丽雯² PRITHIVIRAJ Nagarajan² 王 军² 严继舟^{1,2}

(1. 上海海洋大学海洋生态系统和神经科学研究所, 上海 201306; 2. 上海海洋大学水产科学
国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 文章利用斑马鱼胚胎成纤维细胞(PAC2), 研究烯醇化酶1(Enolase1, ENO1)多肽生化功能及其共价修饰的影响。首先体外合成甲基修饰、乙酰修饰、磷酸修饰和未修饰的ENO1多肽, 分别处理PAC2细胞, 然后检测处理细胞CCK-8、胞内外乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)和二磷酸甘油酸(2-phosphoglycerate, 2-PG)相对含量; 以及线粒体和溶酶体完整性; 同时利用PCR ARRAY试剂盒比较葡萄糖代谢通路变化。结果表明不同修饰的多肽处理后, 细胞增殖, 溶酶体和线粒体形态, 以及糖代谢通路发生了不同程度的改变。为了进一步研究乙酰化修饰ENO1多肽促进细胞增殖的代谢机制, 又将乙酰化修饰的多肽和空白对照处理的PAC2细胞进行转录组测序。转录组分析进一步显示乙酰化修饰的ENO1多肽可以改变糖、脂、蛋白质代谢途径, 并激活与癌症和病毒感染的KEGG通路。研究结果提示烯醇化酶1的多种生化功能可能是蛋白翻译后不同化学修饰的结果。

关键词: 多肽; 翻译后修饰; 细胞生长; 代谢途径; 烯醇化酶1(ENO1)

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2022)11-1658-10



烯醇化酶1(Enolase1, ENO1)存在于许多组织中, 是糖酵解的限速酶, 除在葡萄糖代谢过程中催化2-磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇丙酮酸外, 根据其细胞定位还参与多种生理和病理过程^[1]。在糖酵解代谢, Warburg效应是肿瘤异常代谢的主要特征之一, 肿瘤细胞借助这一异常能量代谢可以逃避正常的细胞凋亡, 来进行增殖和迁移^[2]。Warburg效应中葡萄糖代谢以糖酵解方式为主, 并抑制线粒体的氧化磷酸化^[3]。比如ENO1在卵巢癌和胃癌组织中呈现高表达^[4, 5]; ENO1在肝癌组织中高表达并促进肝癌细胞的增殖、迁移与侵袭^[6, 7]。但也有研究表明ENO1在非小细胞肺癌(Non-small-cell carcinoma, NSCLC)组织中表达的上调与临床结果相关性不大^[8, 9]。Chang等^[10]的研究表明, 非小细胞肺癌中ENO1蛋白水平明显降低, ENO1过表达抑制了A549细胞系向上皮间充质的转变(Epithelial-Mesenchymal Transi-

tion, EMT)。这些结果表明ENO1是一个多功能蛋白。

蛋白质翻译后修饰(Post-translational modification, PTM)是蛋白质功能调节的一种重要方式, 对蛋白质的结构和功能起着至关重要的作用^[11]。蛋白质翻译后修饰几乎参与细胞的所有生命活动过程, 发挥着非常重要的调控作用。常见的修饰方式包括甲基化、磷酸化、泛素化、乙酰化、糖基化、SUMO化、亚硝基化和氧化等。绝大部分的蛋白质在合成过程中或合成后都要经过某些形式的翻译后修饰, 某些疾病常常与一些蛋白质异常的修饰有关。修饰基团的加入, 可能会引起蛋白质理化性质、结构和空间构象的改变, 从而引起蛋白质功能的改变, 进而引发某些疾病。特定的翻译后修饰还被作为疾病的生物标志或治疗的靶标^[12]。

生物活性肽是一类能够调节生物体生理功能的多肽, 参与神经调节、抗癌、免疫调节、激素递

收稿日期: 2021-08-30; 修订日期: 2022-06-10

基金项目: 上海市教委水产学高峰学科项目(A1-2035-17-0001B3-12); 上海市科技兴农重点攻关项目(2017-02-08-00-10-F00076); 上海海洋大学大学生创新活动计划项目(X201710264008)资助 [Supported by Fisheries Peak Discipline Project of Shanghai Municipal Education Commission (A1-2035-17-0001B3-12); Key Projects of Shanghai Science and Technology for Agriculture (2017-02-08-00-10-F00076); Shanghai Ocean University Undergraduate Innovation Activity Program (X201710264008)]

作者简介: 宋学文(1996—), 女, 硕士研究生; 研究方向为水生生物学。E-mail: 17854225015@163.com 李文玲(1990—), 女, 硕士研究生; 研究方向为水生生物学。E-mail: wenlingforver@163.com *共同第一作者

通信作者: 严继舟, 教授; 研究方向为海洋生物医学和再生生物学。E-mail: jyan2@shou.edu.cn

质调节、新陈代谢、营养保健、抗氧化和延缓衰老等^[13, 14]。从肽转运可能性到双甘肽跨膜转运现象再到寡肽吸收机制实验证实蛋白质能以肽的形式被人体利用和吸收。相比于蛋白质等大分子, 多肽更容易被机体吸收, 因此被广泛应用于生物活性多肽功能和营养学的研究。本实验室前期在研究海星活性成分过程中, 利用蛋白质质谱检测多肽种类, 通过蛋白质谱结果和文献筛选追踪到ENO1多肽。我们推测ENO1的不同功能是由ENO1活性多肽的不同化学修饰引起的。本文通过合成甲基化、乙酰化、磷酸化修饰及不经过修饰的ENO1多肽片段, 探究ENO1蛋白的生化功能和对细胞生长的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要实验材料

细胞系: PAC2斑马鱼胚胎成纤维细胞^[15, 16], 从美国国立卫生研究院(NIH)引进。甲基化、乙酰化、磷酸化修饰和未修饰的ENO1多肽(ENO1多肽序列: EG-Me: ELRDNDK(Me)TPYLGKG; EG-Ac: ELRDNDK(Ac)TPYLGKG; EG-Ps: ELRDNDK(Ps)TPYLGKG; EG: ELRDNDKTRYLGKG)由强耀生物公司合成。Leibovitz's L-15 培养基、胎牛血清、含酚红的2.5%胰酶为美国Gibco公司产品, CCK-8细胞增殖检测试剂盒(Cat.No.C0037)、乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(Cat.No.C0016)为碧云天生物科技有限公司产品, 线粒体染色试剂盒(Cat.No.E607509)、溶酶体染色试剂盒(Cat.No.E607506)为上海生工生物有限公司产品。2-Phosphoglycerate Colorimetric/Fluorometric Assay Kit(Cat.No.MAK198)为Sigma-Aldrich公司产品。RT² ProfilerTM PCR Array试剂盒(Cat. No. PAZF-006Z), RT² SYBR[®] Green qPCR Mastermix(Cat. No. 330529)和RNeasy Mini Kit(Cat.No.74104)为Qiagen Germany公司产品, PrimeScriptTM RT Reagent Kit(Perfect Real Time)(Cat. No. RR037B)为TaKaRa公司产品。

1.2 四种多肽对细胞的处理

取对数生长期的PAC2斑马鱼胚胎成纤维细胞, 用含10%胎牛血清的L15培养基调整细胞悬液密度为 1×10^5 ind./mL, 向96孔板或LAB-TEK板每个孔中加入100 μ L细胞悬液, 置于32℃培养箱中培养。Dai等^[17]的研究结果表明海星的甲醇水层提取物在100 μ g/mL的浓度下处理细胞24h作用效果较好。因此, 待细胞密度达到80%左右, 用不含血清的细胞培养液(Leibovitz's L-15 培养基)分别将4种多肽稀释至100 μ g/mL, 培养PAC2细胞24h。以不含多

肽的稀释液培养细胞为空白对照, 所有实验有3个平行。

1.3 CCK-8法检测PAC2细胞增殖能力

向上面细胞培养的96孔板每孔加入10 μ L CCK-8和90 μ L无血清的L15培养基, 32℃孵育过夜。用酶标仪(Microplate reader)在450 nm处测定各孔的吸光度(OD)值。

1.4 胞内、胞外乳酸脱氢酶(LDH)释放的检测

糖酵解过程中生成的丙酮酸在LDH的催化下还原为乳酸。LDH试剂盒检测中: LDH可使1种四唑盐INT(2-p-iodophenyl-3-nitrophenyltetrazolium chloride)转化为强生色的红色甲瓞, 生成的红色产物的量与LDH的含量成正比, 在490 nm波长下产生吸收峰, 从而可以通过比色法来定量乳酸脱氢酶的活性。实验操作按照试剂盒说明书进行。先用4种多肽处理细胞24h进行预实验, 确定后续裂解的细胞组(样品最大酶活性孔)。到预定检测时间的前1h, 在“样品最大酶活性对照孔”中加入10 μ L LDH释放试剂、混匀, 孵育。到达预定时间后, 将细胞培养板400 r/min离心5min。取上清液120 μ L, 进行胞外LDH检测。细胞沉淀加入150 μ L用PBS稀释了10倍的LDH释放工作液试剂(10体积1×PBS中加入1体积LDH释放试剂并混匀), 适当摇晃混匀, 32℃孵育1h, 到达预定时间后, 400 r/min离心5min, 取120 μ L上清用于细胞内总LDH的检测。分别向胞外和胞内LDH检测样本中, 加入60 μ L LDH检测工作液(乳酸溶液:1×INT溶液:酶溶液=1:1:1), 混匀。室温避光孵育2h, 用酶标仪(Microplate reader)在490 nm测吸光度值。细胞LDH释放率=(多肽处理后细胞上清液OD-对照组细胞上清液OD)/(最大酶活性组细胞培养液OD-对照组上清培养液OD)×100%。

1.5 线粒体和溶酶体完整性检测

将对数生长期的PAC2斑马鱼胚胎成纤维细胞用胰酶消化后取细胞悬液(1×10^5 ind./mL)接种到LAB-TEK板中, 按上述的多肽处理方法用100 μ g/mL的4种多肽分别处理PAC2细胞并培养24h。线粒体和溶酶体染色: 用1×PBS清洗细胞2—3次, 加入200 μ L溶酶体(红色)和线粒体(绿色)工作液32℃孵育1h。然后弃染色液, 用L15培养基:PBS=1:1的缓冲液洗涤2次。用TRITC和FITC滤光器的荧光显微镜(OLYMPUS TH4-200)观察细胞并拍照。

1.6 2-磷酸甘油酸(2-PG)检测

2-PG的含量是通过将2-PG转化为PEP再转化为丙酮酸来确定的。丙酮酸被氧化, 产生的荧光强度(Ex/Em=535/587 nm)与2PG含量成正比。利用2-

PG试剂盒可以检测ENO1修饰后的4条多肽对糖酵解代谢的终极产物丙酮酸生成的影响。

先建立标准曲线: 用975 μL 超纯水稀释25 nmol/L (1 mmol/ μL)的2-磷酸甘油(2-PG)至工作浓度为25 $\mu\text{mol/L}$ (25 pmol/ μL)的2-PG标准品, 添加0、2、4、6、8和10 μL 的2-PG标准品工作液, 使最终浓度为0、50、100、150、200和250 pmol/孔。然后加2-PG Buffer至每个使最终体积为50 μL 。用4种多肽处理PAC2细胞24h后, 将96孔板从培养箱中取出, 移走培养基, 用PBS清洗2次。每个孔用50 μL 胰酶消化贴壁细胞3min, 显微镜观察细胞变圆后加入含10%FBS的L15培养基终止消化, 转移至离心管, 1000 $\times$ g离心3min, 弃培养基。加入100 μL 的1 $\times$ PBS清洗细胞。离心沉淀加入200 μL 预冷的2-PG Assay Buffer, 超声破碎并匀浆, 12000 $\times$ g离心5min, 将上清液移至另一个新的96孔板中, 每孔中50 μL 的荧光反应体系混合液, 室温避光孵育40min。酶标仪在Ex/Em=535/587 nm下测荧光值。2-PG浓度 $C=\text{Sa}/\text{Sv}(\text{Sa})$ 。从标准曲线中得到未知样品中2-PG的含量; Sv. 检测的样品体积)

1.7 RNA提取及PCR Array分析葡萄糖代谢通路

总RNA提取和cDNA合成 用0.25%的胰酶消化收集4种不同修饰多肽处理24h后的细胞悬液, 利用TRIzol法提取细胞total RNA, 并去除基因组DNA; cDNA的合成: 按照TaKaRa公司的PrimeScriptTM II High Fidelity RT-PCR Kit试剂盒方法进行反转录合成cDNA。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

PCR ARRAY 利用PCR ARRAY通过Real-Time PCR分析参与葡萄糖代谢过程中84个关键基因的表达。每个编目的RT² Profiler PCR阵列中包含葡萄糖代谢的84个关键基因和5个管家基因。将上述合成的cDNA用于real-time RT² Profiler PCR Array (QIAGEN, Cat. No. PAZF-006Z)与RT² SYBR[®] Green qPCR Mastermix (Cat. No. 330529)检测。将CT值导出到Excel文件, 以创建CT值表。该表随后上传至QIAGEN官方数据分析门户网站 <http://www.qiagen.com/geneglobe>, 将样本分配给对照组和试验组。从GeneGlobe的QIAGEN门户网站导出相应数据分析报告。

1.8 转录组测序

基于以上结果, 选取空白对照处理和乙酰化修饰多肽处理24h之后的PAC2细胞进行转录组分析。利用TRIzol法提取total RNA, 由金唯智生物科技有限公司(现改名为“安升达生命科学技术公司”)进行RNA-seq测序, 采用Illumina测序平台完成转录组测序, 构建Illumina PE文库进行150 bp测序。

1.9 数据统计分析

我们利用PCR ARRAY通过Real-Time PCR分析了参与葡萄糖代谢过程中84个关键基因的表达。PCR ARRAY中包含5种管家基因, 基因组DNA污染质控。未经修饰的ENO1的多肽EG-4作为对照, 采用相对定量法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)分析了葡萄糖代谢通路中基因表达水平的变化, 通过T-Student计算P值。筛选出变化倍数在2以上, 具有统计学意义($P<0.05$)的差异表达的基因。利用DAVID对PCR ARRAY葡萄糖代谢通路中差异表达的基因进行功能富集。

转录组数据分析, 参考基因组使用的是EN-SEMBL, *Danio rerio*. GRCz11.100, 比对软件是Hisat2(v2.0.1)默认参数, 定量软件是Htseq(v0.6.1), KEGG使用的是R包里的数据库。基因差异分析使用Bioconductor软件包的DESeq2(V1.6.3)进行分析, 对检测的结果按照差异显著性标准(差异基因表达变化2倍以上且 q value (fdr, padj) ≤ 0.05)进行筛选, 统计基因显著性差异表达上下调情况。然后对数据进行相似度计算, 并根据相似度将数据进行分类, 从而将具有相同功能或密切联系的基因聚集成类, 识别未知基因的功能或已知基因的未知功能, 推断是否共同参与同一代谢过程或细胞通路。最后利用KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) R包里的数据库对差异基因进行通路(Pathway)显著性富集分析, 来确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。

2 结果

2.1 四种多肽对PAC2细胞增殖的影响

实验采用CCK-8评估PAC2细胞增殖和细胞活性。与对照组相比, 甲基化修饰的烯醇化酶肽(EG-Me)表现为抑制PAC2细胞增殖; 乙酰化修饰的烯醇化酶肽(EG-Ac)表现为极显著地促进细胞增殖; 磷酸化修饰的多肽(EG-Ps)也表现为较为明显地促进细胞增殖; 然而没有经过任何修饰的多肽(EG)对细胞的作用并不明显(图1)。

2.2 四种多肽处理对胞内和胞外LDH释放的影响

胞内总LDH的含量一方面可以反映细胞糖酵解代谢生成乳酸的能力, 另一方面能间接反映细胞数量的多少。结果显示(图2): 与对照组相比, ENO1的4种多肽处理PAC2后的导致细胞内总LDH的含量均下降, 尤其未修饰肽最显著。

胞外LDH的释放被认为是细胞膜完整性的重要指标, 通过检测质膜破裂的细胞中释放到培养液中LDH的活性, 可实现对细胞膜完整性的定量分析^[18]。结果显示4种多肽处理后细胞LDH的释放量极低,

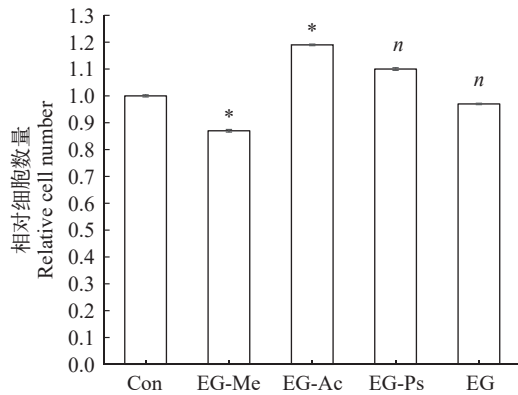


图1 烯醇化酶1多肽修饰的处理PAC2细胞的计量分析

Fig. 1 Quantitative analysis of PAC2 cells in different modified enolase peptides

$P > 0.05$ (用 n 表示); $0.01 < P < 0.05$ (用 * 表示); $P < 0.01$ (用 ** 表示); 下同

$P > 0.05$ (indicated by n); $0.01 < P < 0.05$ (indicated by *); $P < 0.01$ (indicated by **). The same applies below

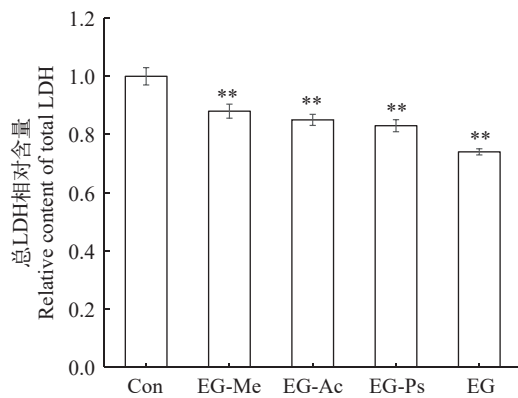


图2 24h时PAC2细胞总LDH的相对含量

Fig. 2 Relative content of total LDH in pac2 cells at 24h

其中释放最多的EG-Ac处理PAC2细胞其LDH的释放率仅为胞内LDH的3.953871%, 因此, 修饰后ENO1的4种多肽没有或很少破坏细胞膜结构的完整性。

2.3 四种多肽处理对2-磷酸甘油酸(2-PG)的影响

2-PG是糖酵解途径的重要中间代谢产物, 在烯醇化酶(ENO1)的催化下转化为磷酸烯醇丙酮酸(PEP), 后者又被丙酮酸激酶转化为丙酮酸。本实验所用2-PG试剂盒是通过2-PG酶转化成PEP, PEP进一步转化成丙酮酸, 通过检测丙酮酸含量来间接反映2-PG含量。图3显示4种多肽处理后的细胞生成丙酮酸的量都显著降低, 而修饰的EG下降更为明显。实验结果显示4种多肽处理后细胞内2-PG和丙酮酸含量下降, 4种多肽都不同程度地改变了糖酵解代谢途径或者改变内源性烯醇化酶反应活性, 特别是修饰EG比未修饰EG改变更为明显。

2.4 四种多肽对线粒体和溶酶体的影响

线粒体和溶酶体结构观察比较显示对照组的细胞线粒体和溶酶体都呈现单层完整的细胞形态结构, 经过修饰后的4种多肽处理细胞后溶酶体均呈现不同程度的细胞粘附团(图4)。经过甲基化多肽EG-Me和乙酰化修饰的多肽EG-Ac使线粒体发生聚集, 经过磷酸化修饰的EG-Ps及未修饰的多肽EG处理后PAC2细胞中明显看到绿色荧光聚集变大变亮, 可见线粒体体积变大, 推测是线粒体发生了融合的结果。这些两种细胞器的形态改变也提示氧化磷酸化发生变化。

2.5 四种多肽对葡萄糖代谢通路的影响

利用PCR ARRAY分析参与葡萄糖代谢过程中84个关键基因的表达。结果显示甲基化修饰的EG-Me引起13个基因的表达上调和3个基因的表达下调。乙酰化修饰的EG-Ac组有6个基因的表达上调和4个基因的表达下调。经过磷酸化修饰的EG-Ps组有3个基因的表达上调和41个基因的表达下调(图5和表1)。

通过DAVID对PCR ARRAY葡萄糖代谢通路中差异表达的基因富集分析(表1)发现, 甲基化修饰EG-Me和乙酰化修饰EG-Ac处理后的PAC2细胞, 表达上调的基因明显多于下调的基因。相反, 磷酸化修饰的EG-Ps处理后的PAC2细胞, 表达上调的基因明显多于下调的基因。这说明多肽共价修饰不同程度地改变细胞糖酵解、糖异生、葡萄糖代谢调控、磷酸戊糖途径、糖原合成和糖原分解、糖酵解、糖异生等代谢途径。

2.6 基因差异表达和通路分析

为了将糖代谢与细胞增殖关联, 本文将空白对照处理和乙酰化修饰的EG-Ac处理的PAC2细胞进行转录组测序。按照差异显著性标准(差异基因表达变化2倍以上且 q value (fdr, padj) ≤ 0.05)进行筛

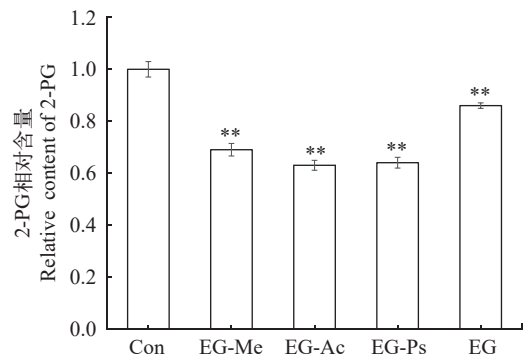


图3 多肽处理24hPAC2细胞2-PG的相对含量

Fig. 3 Relative content of 2-PG in peptide-treated PAC2 cells at 24h

选,统计基因显著性差异表达上下调情况。如图6所示,与对照组相比,有189个基因显著性上调,45个基因显著性上调。火山图表示样本采集有代表性,差异分析非常明显。

将筛选出来的显著性差异基因从细胞组分(CC, cellular component)、生物进程(BP, biological process)和分子功能(MF, molecular function)三个层面进行GO功能显著性富集分析,然后采用通过KEGG分析显著性富集能确定差异表达基因参与

的最主要生化代谢途径和信号转导途径(表2和表3)。

由图7可见,可显著富集到30条途径, MF Term包括ATP结合、钙离子结合、结构分子调节、肌动活动、微管肌动活动、三价铁运动、NAD+ADP核苷转移酶活性、双链RNA腺苷脱氨酶活性和左手Z-DNA结合; CC Term包括细胞内、微管、肌球蛋白复合物、微管相关复合物、细胞内复合物、微管骨架和脂类粒子; BP Term包括微管为基础的运动、体节特异性、抗原处理和内源性肽通过

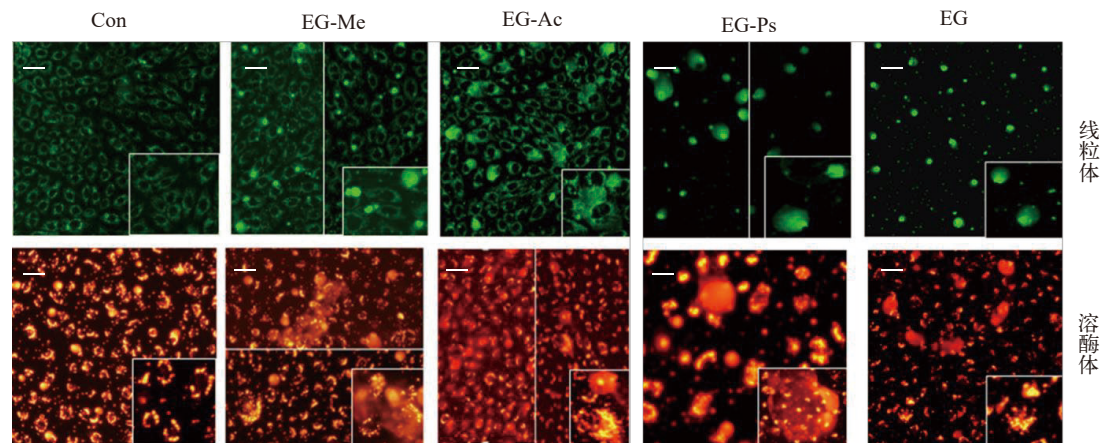


图4 四种多肽对PAC2细胞线粒体和溶酶体的影响

Fig. 4 Fluorescence image of mitochondrion and lysosome staining of PAC2 cell after 4 peptide treatments
嵌入图为细胞放大图。左上角标尺: 50 μ m

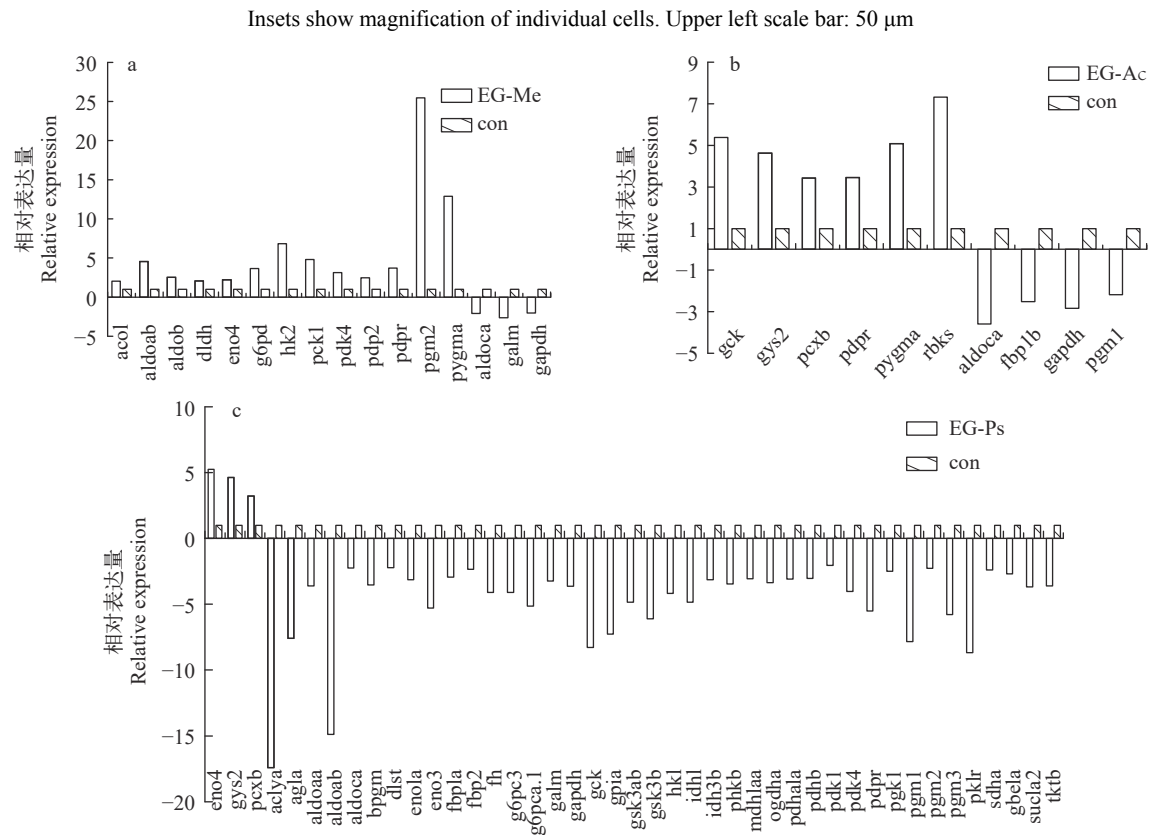


图5 四种多肽对葡萄糖代谢通路中特异性基因表达的相对表达水平

Fig. 5 Effects of four peptides on relative expression level of specific gene in glucose metabolic pathway

表 1 糖代谢途径中差异表达基因的富集

Tab. 1 Enrichment of differentially expressed genes in glucose metabolism pathway

途径Pathway	EG-Me(甲基化)		EG-Ac(乙酰化)		EG-Ps(磷酸化)	
	上调	下调	上调	下调	上调	下调
糖酵解	<i>aldoab, aldob, eno4, hk2, pgm2</i>	<i>aldoca, galm, gapdh</i>	<i>gck</i>	<i>aldoca, gapdh, pgm1</i>	<i>Eno4</i>	<i>aldoaa, aldoab, aldaoac, bpgm, eno1a, eno3, galm, gapdh, gck, gpia, hk1, pgm1, pgm2, pklr, fbp1a, fbp2, g6pc3, g6pca.1, idh1, idh3b</i>
糖异生	<i>pck1</i>		<i>pcxb</i>	<i>Fbp1b</i>	<i>pcxb</i>	<i>pdh1, pdk3a, pdk4, pdpr</i>
葡萄糖代谢调控	<i>pdk4, pdp2, pdpr</i>		<i>pdpr</i>			<i>tktb</i>
磷酸戊糖途径	<i>G6pd</i>		<i>rbks</i>			
三羧酸循环	<i>ac01, dldh, pck1</i>					<i>acly, dlst, fh, mdh1aa, ogdha, pdha1a, pdhb, sdha, sucla2, agla</i>
糖原分解	<i>pygma</i>		<i>pygma</i>			
糖原合成			<i>gys2</i>		<i>gys2</i>	
糖原代谢						<i>gsk3ab, gsk3b, phkb</i>

注: 未修饰的ENO1多肽为对照组, 粗体标记代表同一基因参与不同的代谢途径
Note: Unmodified eno1 polypeptide is the control group, and the bold mark represents that the same gene participates in different metabolic pathways

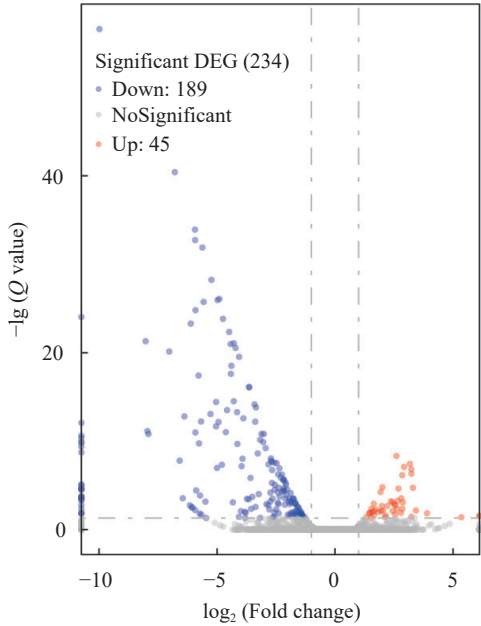


图 6 乙酰化修饰ENO1多肽处理引起PAC2差异表达基因火山图
Fig. 6 Volcano map of differentially expressed genes induced by acetylation modified eno1 polypeptide in PAC2

MHC-1类抗原呈递、细胞铁离子稳态、ATP分解代谢过程、铁离子转运、有丝分裂纺锤体定位、ATP合成过程、电子传递、胆固醇流出、有丝分裂纺锤体组装检查。GO富集结果显示, 一些ATP结合和分解过程和NAD+ADP核苷转移酶活性都受到了影响, 说明乙酰化修饰烯醇化酶1多肽EG-Ac可以改变细胞的能量代谢过程。

KEGG通路富集分析将富集到的一些DEGs关联到一些相关的信号通路。与对照组相比, 一些与癌症和病毒感染相关的信号通路比较明显。与疾病相关的信号通路有人乳头瘤病毒感染、甲型流

表 2 乙酰化修饰ENO1多肽处理引起PAC2差异表达基因KEGG富集分析(疾病相关的通路)

Tab. 2 KEGG Enrichment analysis of PAC2 differentially expressed genes between acetylation modified eno1 polypeptide treatment and non-treatment (disease related pathways)

Pathway	DEGs with pathway annotation (79)	P value	Q value
Human papillomavirus infection	13(16.46%)	0.0000113	0.000451
Influenza A	14(17.72%)	0.000107	0.00214
Herpes simplex infection	7(8.86%)	0.000433363	0.006117737
Hepatitis B	5(6.33%)	0.00539	0.043
Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection	5(6.33%)	0.0135	0.0748
Viral carcinogenesis	6(7.59%)	0.0137	0.0748
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	116(1.35%)	0.0216	0.0996
Hepatitis C	5(6.33%)	0.0281	0.113
Small cell lung cancer	2(2.53%)	0.0973	0.212
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	1(1.27%)	0.216	0.371
Transcriptional misregulation in cancer	3(3.80%)	0.242	0.383
Pancreatic cancer	1(1.27%)	0.264	0.401
MicroRNAs in cancer	2(2.53%)	0.29	0.424
Colorectal cancer	1(1.27%)	0.335	0.457
Proteoglycans in cancer	1(1.27%)	0.797	0.811

感、单纯疱疹病毒感染、乙型肝炎、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、病毒致癌、肥厚型心肌病

(HCM)、丙型肝炎、小细胞肺癌、致心律失常性右心室心肌病(ARVC)、癌症中的转录失调、胰腺癌、microRNA与癌症、结直肠癌、癌症中的蛋白多糖等信号通路。与代谢相关的信号通路有苯丙氨酸和酪氨酸等多种氨基酸代谢、胆固醇代谢、糖代谢和蛋白质代谢等信号通路。所富集的多个代谢通路与PCR array结果相符。还富集到一些其他的信号通路,有胞浆DNA感应途径、卵母细胞减数分裂、孕酮介导的卵母细胞成熟、黏着、RIG-I样受体信号通路、ECM受体相互作用、雌激素信号通路等信号通路。

3 讨论

3.1 烯醇化酶1不同修饰多肽改变PAC2细胞生长模式

本文从亚细胞水平和细胞代谢水平相互验证了4种多肽ENO1对PAC2细胞生长和代谢的影响。首先通过CCK-8细胞活性检测,可以反映4种多肽处理细胞后细胞活性和增殖能力,接着通过胞内外

LDH释放实验检测糖酵解代谢和细胞膜完整性,再用线粒体(绿色)和溶酶体(红色)专一性染料对4种多肽处理的细胞进行染色,检测细胞器形态和代谢功能,然后通过2-PG和PCR Array实验检测糖代谢相关途径,最后利用RNA测序进行转录组深层功能分析。

线粒体和溶酶体对维持细胞内稳态起到重要的作用,在很多疾病中都观察到他们的功能缺陷。线粒体是真核细胞重要的细胞器,是细胞氧化磷酸化和ATP合成的主要场所,线粒体与众多疾病的发生、发展、治疗密切相关^[19]。线粒体是一个高度动态、呈网络结构的细胞器,他们通过不断分裂和融合来调节自身动态,交换线粒体内部分子。损伤线粒体可通过与健康线粒体相互融合交换成分,在一定程度上修复缺陷,改善功能^[20]。因此线粒体的融合和分裂对线粒体形态功能都有很大的调节作用^[21]。溶酶体不仅是细胞中物质的降解中心,也是一些物质代谢过程和细胞生长的重要代谢传感器^[22]。在线粒体自噬和线粒体应激过程中,线粒体和溶酶体融合来维持线粒体和细胞的稳态;通过形成线粒

表 3 乙酰化修饰ENO1多肽处理引起PAC2差异表达基因KEGG富集分析(代谢相关的通路)

Tab. 3 KEGG Enrichment analysis of PAC2 differentially expressed genes between acetylation modified eno1 polypeptide treatment and non-treatment (metabolism related pathways)

Pathway	DEGs with pathway annotation (79)	P value	Q value
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	2(2.53%)	0.0000252	0.000757
Phenylalanine metabolism	2(2.53%)	0.000459	0.00612
Vitamin digestion and absorption	2(2.53%)	0.00206	0.0206
Fat digestion and absorption	2(2.53%)	0.00573	0.043
Cysteine and methionine metabolism	2(2.53%)	0.0112	0.0717
Mineral absorption	2(2.53%)	0.0145	0.0756
Arginine and proline metabolism	2(2.53%)	0.0224	0.0996
Folate biosynthesis	1(1.27%)	0.0385	0.131
Oxidative phosphorylation	3(3.80%)	0.0375	0.131
Nicotinate and nicotinamide metabolism	1(1.27%)	0.0427	0.131
Tyrosine metabolism	1(1.27%)	0.0449	0.131
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	1(1.27%)	0.0517	0.141
Glycine, serine and threonine metabolism	1(1.27%)	0.0662	0.166
Tryptophan metabolism	1(1.27%)	0.0792	0.19
Valine, leucine and isoleucine degradation	1(1.27%)	0.0902	0.208
Glycolysis/Gluconeogenesis	1(1.27%)	0.163	0.321
Ubiquitin mediated proteolysis	2(2.53%)	0.163	0.321
Cholesterol metabolism	2(2.53%)	0.185	0.353
Central carbon metabolism in cancer	1(1.27%)	0.203	0.364
Pyrimidine metabolism	1(1.27%)	0.26	0.4
Protein processing in endoplasmic reticulum	2(2.53%)	0.28	0.414
Carbon metabolism	1(1.27%)	0.342	0.457
Hippo signaling pathway	1(1.27%)	0.548	0.616
Metabolic pathways	11(13.92%)	0.687	0.73

体-溶酶体的膜接触点来维持两者的动态平衡^[23]。线粒体和溶酶体通过RAB7 GTP酶作用相互交流,对细胞功能的完整性有重要作用^[17]。结合CCK-8结果和线粒体形态的变化表明4种ENO1多肽影响细胞的生长和代谢状况,但只有乙酰化修饰ENO1肽EG-Ac促进细胞增殖效果最为明显。虽然磷酸化修饰多肽EG-Ps和未修饰多肽EG处理后的细胞对照组相比线粒体发生了一定程度的融合,但都没有增加细胞膜通透性,应该是改变细胞代谢的结果。

3.2 烯醇化酶1不同修饰多肽改变PAC2细胞糖代谢模式

LDH发挥作用是Warburg 效应的重要一环,与恶性肿瘤的增殖和侵袭息息相关^[3]。但LDH的具体调节通路不清楚。本实验结果显示4种多肽处理后细胞内总LDH的含量均显著降低。检测胞外LDH释放的活性实验结果表明4种多肽处理后没有或很少程度的造成细胞膜结构的破坏,总LDH含量

的检测结果表明4种多肽处理后均显著下降,表明4种多肽处理后细胞生成乳酸的能力下降。进一步的2-磷酸甘油酸检测发现4种多肽处理后2-PG含量显著降低,结合LDH检测结果,表明4种多肽可能抑制内源性烯醇化酶反应活性的能力,特别是共价修饰后抑制ENO活性。

进一步利用PCR ARRAY筛选出差表达的基因进一步分析了修饰化多肽对糖代谢通路的影响。与对照组相比,磷酸化修饰多肽EG-Ps处理后细胞相关糖代谢通路基因整体上呈现下调趋势,表明磷酸化修饰多肽EG-Ps整体上是抑制细胞的糖代谢通路。甲基化修饰多肽EG-Me和乙酰化修饰多肽EG-Ac对细胞糖酵解、糖异生、磷酸戊糖途径、三羧酸循环等糖代谢通路都表现出不同程度的调控作用,但没有磷酸化修饰作用明显。

3.3 乙酰化修饰烯醇化酶1多肽改变细胞能量和物质代谢模式

PCR ARRAY结果提示乙酰化修饰多肽EG-

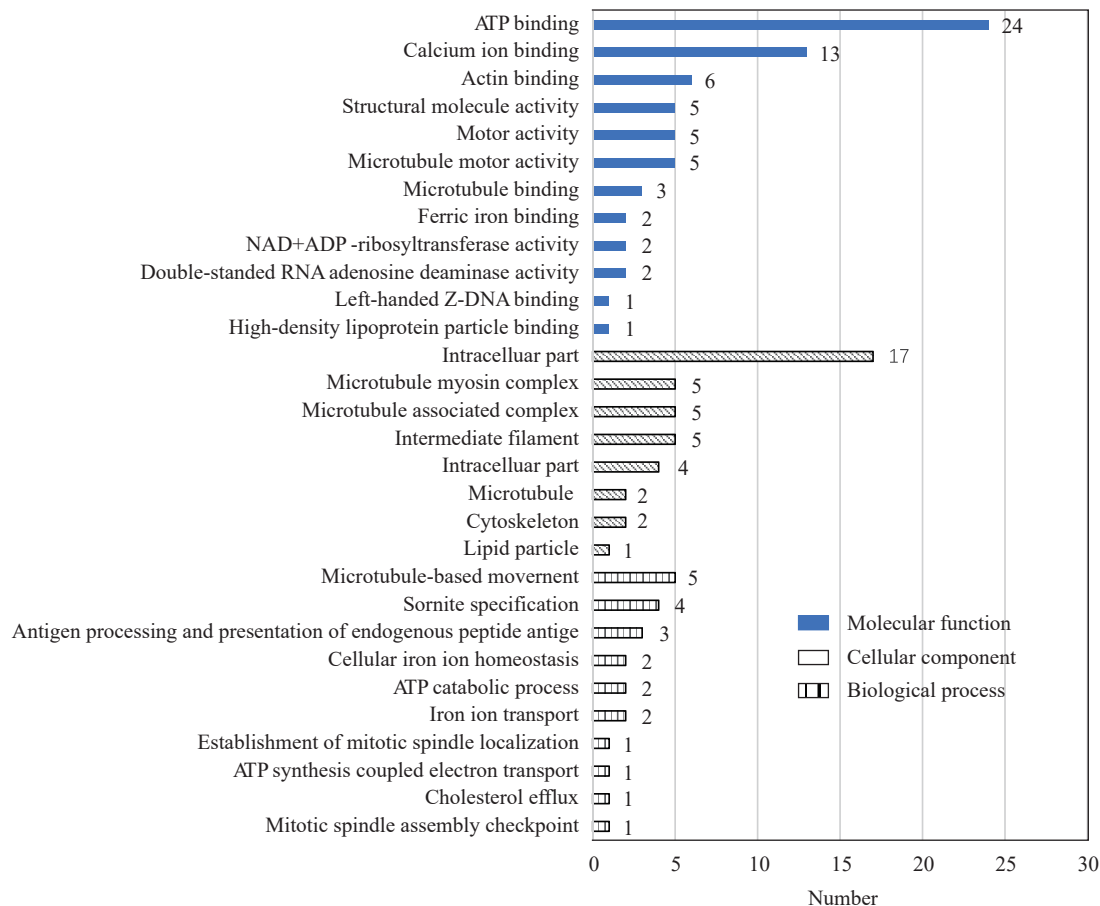


图7 乙酰化修饰ENO1多肽(EG-Ac)处理引起PAC2差异表达基因GO富集分析

Fig. 7 Enrichment analysis of pac2 differentially expressed gene go caused by acetylation modified eno1 polypeptide treatment

GO富集柱状图。纵坐标为富集的GO term,横坐标为该term中差异基因个数。不同填充用来区分生物过程、细胞组分和分子功能
Go enrichment histogram. The ordinate is the enriched GO term, and the abscissa is the number of differential genes in the term. Different filling are used to distinguish biological processes, cellular components and molecular functions

Ac可以改变细胞的糖代谢模式,但可能不是促进细胞增殖的主要原因。进一步的转录组结果显示,GO富集到些ATP结合和分解过程和NAD⁺ADP核苷转移酶活性都受到了影响,说明PAC2细胞内能量代谢发生了变化,我们推测乙酰化修饰烯醇化酶1多肽EG-Ac可以改变PAC2细胞的能量代谢过程。

转录组结合PCR Array检测结果显示,调节磷酸戊糖途径中的rbks基因表达上调,rbks基因编码的蛋白是激酶PfkB家族的一个成员。编码的蛋白质在ATP和Mg²⁺存在下磷酸化核糖形成核糖-5-磷酸,参与调控磷酸戊糖途径。rbks基因表达上调表明乙酰化修饰多肽可能激发磷酸戊糖途径来增加细胞的核酸代谢。转录组结果还显示乙酰化修饰多肽处理后参与氨基酸代谢和脂类代谢基因明显富集。我们推测这些代谢可能是乙酰化修饰多肽处理后刺激细胞增殖的代谢机制。

4 结论

烯醇化酶(ENO1)是糖酵解途径的一个重要蛋白酶,同时也是一个多功能蛋白。本文研究显示同一个烯醇化酶蛋白肽经不同修饰处理后,对细胞生长、代谢途径,对细胞线粒体和溶酶体形态结构的完整性都有特异影响。在细胞水平上,甲基化修饰多肽表现为抑制细胞增殖、乙酰化和磷酸化修饰表现为促进细胞增殖。EG-Ps总体上抑制糖代谢,而EG-Ac促进氨基酸代谢,脂类代谢和磷酸戊糖途径促进细胞生长,并调控一些疾病如一些癌症和病毒感染等的发生发展过程。不同修饰的ENO1多肽发挥作用的具体分子机制和所调节的代谢通路尚未明确,有待于进一步研究。本文采用的研究方法对以后ENO1蛋白以及多肽的多功能研究提供了一个新的思路,也有助于生物活性多肽功能和营养学的研究。

参考文献:

- [1] Merkulova T, Dehaupas M, Nevers M C, *et al.* Differential modulation of alpha, beta and gamma enolase isoforms in regenerating mouse skeletal muscle [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, **267**(12): 3735-3743.
- [2] Cutruzzola F, Giardina G, Marani M, *et al.* Glucose metabolism in the progression of prostate cancer [J]. *Frontiers in Physiology*, 2017(8): 97.
- [3] Jiang X Y, Jiang Y. Advances in lactate dehydrogenase and Warburg effect [J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2017, **48**(5): 352-356. [蒋晓月, 江瑛. 乳酸脱氢酶和Warburg效应的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2017, **48**(5): 352-356.]
- [4] Shen A H, Li Y H, Su C J, *et al.* Study on the expression and meaning of FBXW7 and ENO1 in high and low grade serous ovarian adenocarcinoma tissue [J]. *Clinical Medicine of China*, 2018, **34**(6): 496-502. [沈爱红, 李月红, 宿敬存, 等. 卵巢高低级别浆液性腺癌组织中FBXW7和ENO1的表达和意义 [J]. *中国综合临床*, 2018, **34**(6): 496-502.]
- [5] Sun L, Lu T, Tian K, *et al.* Alpha-enolase promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis via regulating AKT signaling pathway [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019(845): 8-15.
- [6] Zhu W, Li H, Yu Y, *et al.* Enolase-1 serves as a biomarker of diagnosis and prognosis in hepatocellular carcinoma patients [J]. *Cancer Management Research*, 2018(10): 5735-5745.
- [7] Yan T T, Ma L N, Luo X, *et al.* Role of enolase1 in hepatocellular carcinoma and possible mechanism [J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2017, **25**(6): 429-434. [闫婷婷, 马丽娜, 雒夏, 等. α -烯醇化酶在肝细胞肝癌中的作用及其机制 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2017, **25**(6): 429-434.]
- [8] Chang G C, Liu K J, Hsieh C L, *et al.* Identification of alpha-enolase as an autoantigen in lung cancer: its overexpression is associated with clinical outcomes [J]. *Clinical Cancer Research*, 2006, **12**(19): 5746.
- [9] He P, Naka T, Serada S, *et al.* Proteomics-based identification of alpha-enolase as a tumor antigen in non-small lung cancer [J]. *Cancer Science*, 2007, **98**(8): 1234-1240.
- [10] Chang Y S, Wu W, Walsh G, *et al.* Enolase-alpha is frequently down-regulated in non-small cell lung cancer and predicts aggressive biological behavior [J]. *Clinical Cancer Research*, 2003, **9**(10): 3641-3644.
- [11] Zhang K, Tian S, Fan E. Protein lysine acetylation analysis: current MS-based proteomic technologies [J]. *Analyt*, 2013, **138**(6): 1628-1636.
- [12] Jiang Z, Wang F, He X, *et al.* Progress on protein/peptide phosphorylation [J]. *Letters in Biotechnology*, 2009, **20**(2): 233-237. [姜铮, 王芳, 何湘, 等. 蛋白质磷酸化修饰的研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2009, **20**(2): 233-237.]
- [13] Chalamaiah M, Yu W L, Wu L P. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review [J]. *Food Chemistry*, 2018(1): 205-222.
- [14] Li X, Wu H J, Su X L, *et al.* New bioactive peptide reduces the toxicity of chemotherapy drugs and increases drug sensitivity [J]. *Oncology Reports*, 2017, **38**(1): 129-140.
- [15] Follo C, Ozzano M, Montalenti C, *et al.* Similarities and differences in the biogenesis, processing and lysosomal targeting between zebrafish and human pro-Cathepsin D: functional implications-ScienceDirect [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2013, **45**(2): 273-282.
- [16] Šrut M, Bourdineaud J P, Štambuk A, *et al.* Genomic and

- gene expression responses to genotoxic stress in PAC2 zebrafish embryonic cell line [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2015(35): 1381-1389.
- [17] Dai Y C, Prithiviraj N, Gan J H, *et al.* Tissue extract fractions from starfish undergoing regeneration promote wound healing and lower jaw blastema regeneration of zebrafish [J]. *Scientific Reports*, 2016(6): 38693.
- [18] Hong Q T, Song Y T, Tang Y P, *et al.* Determination and application of leakage rate of lactate dehydrogenase in the cultured medium of cells [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2004, **26**(1): 4. [洪庆涛, 宋岳涛, 唐一鹏, 等. 细胞培养液乳酸脱氢酶漏出率的比色测定及其应用 [J]. 细胞生物学杂志, 2004, **26**(1): 4.]
- [19] Pan L L, Pan D, Lei K L. Advances of mitochondrion and mitochondrial diseases [J]. *Biomedical Engineering and Clinical Medicine*, 2016, **20**(3): 328-333. [潘凌立, 潘达, 雷克林. 线粒体与线粒体疾病 [J]. *生物医学工程与临床*, 2016, **20**(3): 328-333.]
- [20] Tong C. Mitochondrial defects and premature ovarian failure [J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2018, **56**(4): 23-27. [佟超. 线粒体异常与卵巢早衰 [J]. 山东大学学报(医学版), 2018, **56**(4): 23-27.]
- [21] Youle R J, van der bliek A M. Mitochondrial fission, fusion, and stress [J]. *Science*, 2012, **337**(6098): 1062-1065.
- [22] Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane protein: trafficking meets function [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, **10**(9): 623-635.
- [23] Wong Y C, Kim S, Peng W, *et al.* Regulation and function of mitochondria-lysosomal membrane contact sites in cellular homeostasis [J]. *Trends in Cell Biology*, 2019, **29**(6): 500-513.

COVALENT MODIFICATIONS OF ENOLASE 1 POLYPEPTIDE CHANGE CELL GROWTH AND METABOLISM PROFILE

SONG Xue-Wen¹, LI Wen-Ling¹, ZHU Li-Wen², PRITHIVIRAJ Nagarajan², WANG Jun² and YAN Ji-Zhou^{1,2}

(1. Institute of Marine Biosystem and Neurosciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Enolase 1 (ENO1) is a rate limiting enzyme of glycolysis, and participates in a variety of physiological and pathological processes according to its cell localization. In this study, zebrafish embryonic fibroblasts (PAC2 cell line) were used to study biochemical functions of ENO1 polypeptide and its covalent modifications. At first, methylated, acetylated, phosphorylated and unmodified eno1 peptides were artificially synthesized, and separately transduced into PAC2 cells. Then the treated cells were collected and examined by using CCK-8 assay, intracellular and extracellular lactate dehydrogenase (LDH) assay, mitochondrial and lysosomal integrity detection kits, as well as quantitative PCR Array. The results showed that the four polypeptides differentially changes cell proliferation, morphology of lysosomes and mitochondria, and glucose metabolic pathways. Furthermore, RNA-sequencing were conducted for the cells treated by acetylated Eno1 polypeptide and vehicle control Transcriptomal analysis indicated that acetylation modified Eno1 polypeptide significantly changed metabolism profile of sugar, lipid and protein, and is closely associated with carcinogenesis, viral infection and cardiomyopathy. These results suggest that multifaceted functional diversity of Enolase 1 may result from its various post-translational modifications.

Key words: Polypeptide; Post-translational modification; Cell growth; Metabolism pathway; Enolase 1(ENO1)