

· 肿瘤学研究 ·

JWA 调控能量代谢重编程抑制胰腺癌细胞迁移

王晓颖¹, 丁 昆¹, 王章定¹, 李爱萍¹, 陈冬寅², 周建伟^{1,3*}¹南京医科大学公共卫生学院, ²药学院, ³胰腺研究所, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:探讨JWA通过调节细胞能量代谢,抑制胰腺癌细胞迁移的作用及其分子机制。方法:通过基因转染和JWA小分子激动剂JAC4处理人胰腺癌细胞Panc1和Bxpc3,采用划痕实验、穿孔实验、Seahorse XF能量代谢分析仪分别检测细胞迁移能力以及能量代谢水平的改变。用小鼠被动转移模型检测JAC4抑制胰腺癌转移的作用。蛋白免疫印迹法检测相关分子蛋白质表达水平。结果:JWA基因在胰腺癌肿瘤组织与胰腺癌细胞中表达水平显著低于正常;JAC4处理可显著增加JWA表达并抑制胰腺癌细胞迁移,并且抑制小鼠胰腺癌转移并降低血清中乳酸脱氢酶(LDH)水平;JAC4增强肿瘤细胞线粒体有氧呼吸,同时抑制糖酵解;JAC4通过AMPK信号通路正调控FOXO3a,激活线粒体复合物Ⅲ(UQCRC2)的表达,同时下调FAK。结论:JWA通过AMPK/FOXO3a/UQCRC2/FAK信号通路调节细胞能量重编程,进而抑制胰腺癌细胞的迁移。

[关键词] JWA;UQCRC2;能量代谢;细胞迁移;胰腺癌**[中图分类号]** R735.9**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)12-1728-09**doi:** 10.7655/NYDXBNS20191205

JWA regulates energy metabolism reprogramming and inhibits migration of pancreatic cancer cell

Wang Xiaoying¹, Ding Kun¹, Wang Zhangding¹, Li Aiping¹, Chen Dongyin², Zhou Jianwei^{1,3*}¹School of Public Health, ²School of Pharmacology, ³Institute of Pancreas, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to elucidate the role and molecular mechanism of JWA in regulating cell energy metabolism and inhibiting the migration of pancreatic cancer cells. **Methods:** Human pancreatic cancer Panc1 and Bxpc3 cells were treated with the JWA small molecule agonist JAC4. The assays of wound healing and transwell were used to determine cell migration; the mitochondrial energy metabolisms of cells were measured by Seahorse XF energy metabolism analyzer. The pancreatic cancer cells Panc1 were used to establish series vivo metastatic mice models. Western blotting was performed to determine the levels of protein expression in related molecules. **Results:** The mRNA expressions of JWA was significantly lower in pancreatic cancer tumor tissues and pancreatic cancer cells compared with that in adjacent normal tissues and normal pancreatic cells; JAC4 inhibited migrations of pancreatic cancer Panc1 and Bxpc3 cells, and inhibited pancreatic cancer metastasis in mice and reduces serum LDH levels. The mechanistic evidences indicated that JAC4 positively regulates FOXO3a through AMPK signaling pathway led to the activation of mitochondrial complex Ⅲ (UQCRC2), and enhanced the oxidative phosphorylation; at the same time, JAC4 suppressed glycolysis of pancreatic cancer cells. **Conclusion:** The inhibiting role of JAC4 on pancreatic cancer cells was realized by mitochondria metabolic reprogramming through the JWA/AMPK/FOXO3a/UQCRC2/FAK signaling.

[Key word] JAC4;UQCRC2;energy metabolism;cell migration;pancreatic cancer

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(12): 1728-1736]

[基金项目] 国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(8151001113);南京医科大学胰腺疾病创新团队项目

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jwzhou@njmu.edu.cn

根据国家癌症中心统计数据,2015年中国胰腺癌发病率位于第10位,但死亡率却高居第6位^[1]。治疗胰腺癌的手段包括手术、化疗、分子靶向治疗、内镜下姑息化疗和生物靶向治疗。化疗是治疗晚期或转移性胰腺癌的标准方案,但疗效十分有限,死亡率仍然居高不下^[2]。与其他癌症相似,胰腺癌发生发展除了与癌细胞内抑癌分子失活或促癌分子过度激活所致的信号网络紊乱有关,可能还有其特殊性。因此,寻找驱动胰腺癌细胞转移的关键分子,发展针对关键分子的靶向治疗,具有重要意义^[3]。FOXO3a是FOXO叉头转录因子亚家族的成员,介导多种细胞生物学过程,包括细胞凋亡、增殖、细胞周期、DNA损伤和肿瘤发生。FOXO3a的去磷酸化,可导致线粒体途径的细胞凋亡^[4],对能量代谢也产生重要影响。FOXO3a在抑制肿瘤进展中的积极作用,以及其对肿瘤能量代谢的重要影响,使其成为肿瘤治疗中的一个重要靶点^[5]。

本课题组以往研究显示JWA是细胞骨架结合蛋白,具有抑制肿瘤血管新生和转移的作用^[6]。近期用JWA启动子构建的报告基因系统筛选获得了小分子化合物激动剂JAC4,本研究探讨了JWA基因及其激动剂JAC4抑制胰腺癌细胞迁移的作用和分子机制,为发展基于JWA基因的治疗胰腺癌新手段提供学术证据。

1 材料和方法

1.1 材料

AMPK抑制剂Compound C(Selleck公司,美国),抗霉素抑制剂Antimycin A(BioVision公司,美国),DMEM培养基、Opti-MEM培养液、胎牛血清(Biological Industries公司,美国);ECL化学发光检测试剂盒(BIO-RAD公司,美国);环丙沙星(Sigma公司,美国);结晶紫染色液、BCA蛋白浓度测定试剂盒(杭州碧云天生物技术有限公司);转染试剂Lipofectamine 2000(上海Invitrogen公司);转染试剂DharmaFECT4(Dharmacon公司,美国);质粒DNA抽提试剂盒(Roche公司,美国);纤维粘连蛋白FN(Sigma公司,美国);乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。JAC4,分子式C₁₆H₁₃N₃O₃S,分子量327.358,纯度>99.5%,由本课题组合成。

抗-JWA单克隆抗体由本课题组自主制备;抗-β-Actin、抗-mTORC(杭州碧云天生物技术有限公司);抗-FAK、抗-p-AMPK(Cell Signaling Technology公司,

美国);抗-AMPK、抗-FOXO3a、抗-NDUFAF1、抗-SDHA、抗-UQCRC2、抗-ATP5L(Abcam公司,美国);抗-SURF1、抗-VDAC/Porin(武汉三鹰生物技术有限公司);抗-Flag(MBL公司,日本)以及HRP标记的山羊抗小鼠/兔IgG(杭州碧云天生物技术有限公司)

Flag-JWA载体构建:Hind III和Kpn I 2个限制性酶切位点,线性载体pCMV,构建成功的质粒以及相应的菌株均于-70℃保存。JWA siRNA(5'-CGAGCUAUUCCUUAUCUC-3'),FOXO3a siRNA(5'-AATGATGGGCTGACTGAAA-3')以及对照均购于广州锐博生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人胰腺癌细胞Panc1、Miapaca-2和Bxpc3细胞均购于美国模式培养物集存库(ATCC)DMEM培养基培养。细胞培养液中均加入1%的环丙沙星和10%胎牛血清(Miapaca-2添加5%胎牛血清,2.5%马血清),置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。hTERT-HPNE人胰腺正常细胞由中山大学肿瘤防治中心徐瑞华教授赠予,按ATCC培养条件进行培养传代。

1.2.2 免疫印迹实验

JAC4处理胰腺癌细胞后提取蛋白,在40 μg/20 μL蛋白样品中含1/3体积的6×SDS+β-巯基乙醇。取等量蛋白样品,经10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,并转移至PVDF膜。5%脱脂牛奶中封闭1 h,加一抗4℃摇床孵育过夜。TBST(含0.1% Tween 20)洗涤30 min后,加二抗室温孵育1 h。TBST洗涤50 min。用化学发光凝胶成像仪拍照。采用Adobe Photoshop扫描并记录相对灰度值。

1.2.3 细胞活性检测

将2 000个/孔胰腺癌细胞,均匀接种于96孔板。待细胞贴壁后分别加入0~500 μmol/L JAC4处理48 h。加入10 μL MTT试剂后孵育2 h。检测各孔在450 nm处的吸光度值,实验设6个平行样。

1.2.4 克隆形成试验

Panc1细胞以500个/孔、Bxpc3以2 000个/孔均匀接种于6孔板内。细胞贴壁后弃去培养液,加入配置好的JAC4 10 μmol/L处理48 h。每隔2~3 d更换新鲜完全培养液,待培养14 d后,用甲醇固定,结晶紫染色,拍照计算克隆团形成个数(>50个细胞)。

1.2.5 LDH测定

Panc1细胞接种于6孔板,待其贴壁后,换新鲜培养液,加入JAC4 10 μmol/L处理48 h。取上清液3 000 r/min,离心5 min,根据制造商的说明,使用

LDH测定试剂盒(Cat编号:A020-2)测定Panc1细胞上清液中LDH的水平。

1.2.6 Seahorse 细胞能量代谢检测

糖酵解应激监测细胞外酸化率(ECAR):在XF96细胞培养微孔板接种Panc1细胞 3×10^3 个/孔和hTERT-HPNE胰腺正常细胞 3.5×10^3 个/孔(设8个平行孔)。贴壁后加入不同剂量的JAC4处理48 h;在实验之前,使用补充有2 mmol/L谷氨酰胺,pH7.4的Seahorse XF基础培养基温育1 h。加入1.5 μ mol/L寡霉素(Panc1细胞)或1.8 μ mol/L寡霉素(hTERT-HPNE细胞)和50 mmol/L 2-DG,实时监测ECAR。

细胞线粒体应激监测氧气消耗速率(OCR):如上所述,处理目的细胞,在测量之前,使用补充有10 mmol/L葡萄糖、1 mmol/L丙酮酸盐、2 mmol/L谷氨酰胺的Seahorse XF基础培养基温育1 h,加入1.5 μ mol/L寡霉素(Panc1细胞)或1.8 μ mol/L寡霉素(hTERT-HPNE细胞)、1 μ mol/L FCCP和0.5 μ mol/L鱼藤酮、0.5 μ mol/L抗霉素A,通过传感器实时监测OCR值的变化。

1.2.7 划痕实验

将细胞以30%的密度均匀接种于6孔板中,培养使细胞完全贴壁。JAC4处理胰腺癌细胞48 h后,细胞密度达到100%。划痕前1 d更换成低血清(1%)的培养基,使细胞休克,停止增殖。用10 μ L小枪头划线。PBS清洗2次,洗去脱落的细胞。在不同时间点显微镜下拍照。

1.2.8 穿孔实验

实验前1 d,50 μ L FN溶液涂抹于小室底部,风干2 h。接种 3×10^4 个/100 μ L细胞,小室的下层加入600 μ L的10% FBS完全培养基。待细胞穿过后,甲醇固定30 min。结晶紫染色2 h。轻轻擦掉上室的细胞。显微镜下拍照。

1.2.9 尾静脉被动转移模型

每只小鼠通过尾静脉注射Panc1细胞 5×10^5 个/100 μ L PBS,随机分为2组:①对照组(对照饲料, $n=14$);②JAC4组(100 mg/kg,JAC4饲料, $n=15$);69 d后待小鼠行动不便,状态不好时,安乐死处理全部模型小鼠,取血分离血清,仔细检查全身脏器确定有无肿瘤转移,分离肺组织并拍照,取主要脏器检查有无转移灶,冷冻保存或福尔马林固定后做相应研究。

1.3 统计学方法

数据分析用SPSS 20.0统计分析软件。统计数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组资料分析用

ANOVA(one-way analysis of variance)Dunnett方法、两组资料之间差异检验用成组 t 检验。JWA基因表达水平与FOXO3a基因的表达水平之间的关系用Pearson相关分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。IC₅₀采用非线性回归模型进行计算。每组实验独立重复3次。

2 结果

2.1 JWA基因在胰腺癌组织及胰腺癌细胞中低表达

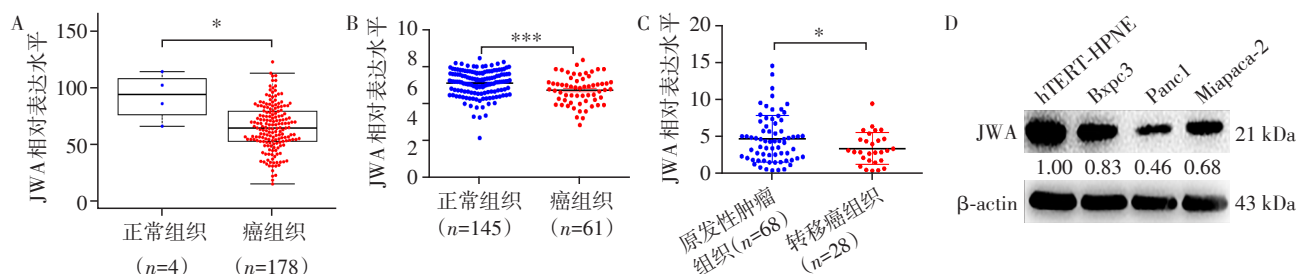
首先分析TCGA公共数据库、GEO数据库中胰腺癌组织和正常胰腺组织以及原发性肿瘤组织和转移瘤组织中JWA mRNA表达水平差异(图1),胰腺癌组织JWA mRNA表达水平显著低于正常组织(GSE11838)(图1A、B),转移瘤组织中JWA mRNA表达水平显著低于原发性肿瘤组织(GSE71729)(图1C, $P < 0.05$)。胰腺正常hTERT-HPNE细胞与胰腺癌Panc1、Bxpc3和Miapaca-2细胞中JWA表达水平显示胰腺癌细胞中JWA蛋白的表达水平均有不同程度的下降(图1C)。选择JWA表达相对较低的Panc1细胞以及JWA表达相对较高的Bxpc3细胞进行研究。

2.2 JAC4抑制胰腺癌细胞迁移

用JAC4处理2株胰腺癌细胞,观察对细胞迁移的影响。免疫印迹结果显示,用0、0.1、1.0、10.0、50.0 μ mol/L JAC4处理2种胰腺癌细胞48 h后,JWA蛋白表达水平增加,呈剂量效应关系(图2A)。进一步用MTT法检测和计算JAC4对Panc1和Bxpc3细胞的IC₅₀值分别为204 μ mol/L和655 μ mol/L(图2B)。穿孔实验与划痕实验结果均显示,与溶剂对照组相比,JAC4 10 μ mol/L处理可以明显抑制胰腺癌细胞的迁移(图2C、D)。克隆形成结果显示,JAC4对胰腺癌Panc1、Bxpc3细胞的克隆形成并无显著影响(图2E)。

2.3 JAC4抑制胰腺癌小鼠的转移并降低血清及Panc1细胞中LDH水平

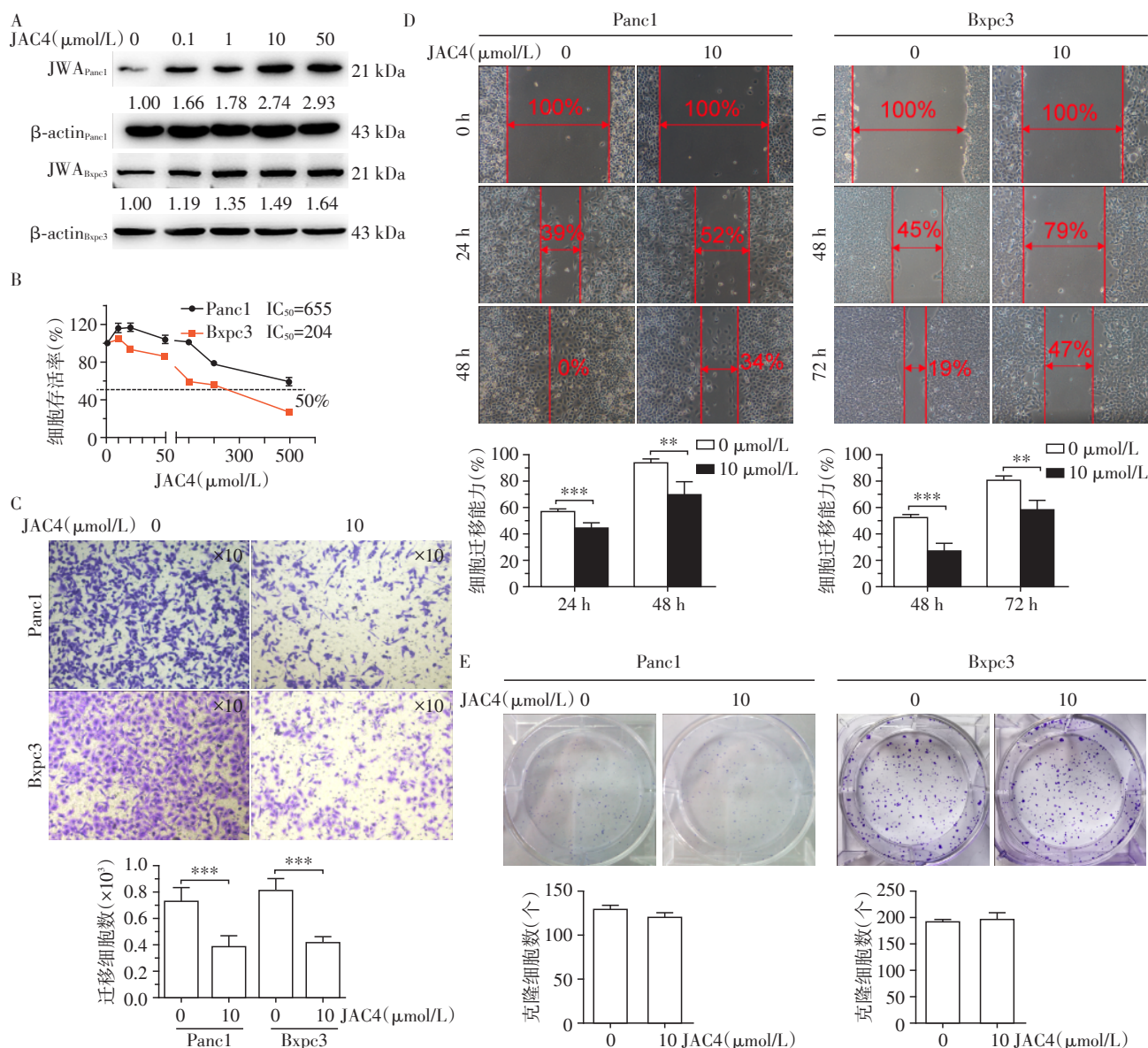
为了确定JAC4是否在体内抑制胰腺癌细胞的转移,完成了Panc1细胞尾静脉异种移植小鼠模型。实验期间2组小鼠外观无明显异常,体重曲线呈稳定增长趋势,两组间无明显差别(图3A)。然而,在模型结束时(模型的第69天),与对照小鼠相比,JAC4处理的小鼠肺转移灶面积和肺转移小鼠数量减少(图2B、C)。Western blot检测结果显示,JAC4组转移性胰腺癌组织中FAK的表达明显低于对照组(图2D)。血液生化测定表明,与对照小鼠相



A: TCGA 数据库中胰腺癌组织和对照正常组织中 JWA mRNA 水平比较。B: GEO 数据库中胰腺癌组织和对照正常组织中 JWA mRNA 水平比较(GSE11838)。C: GEO 数据库中原发性肿瘤和转移瘤中 JWA mRNA 水平比较。D: 胰腺癌细胞与胰腺正常细胞中 JWA mRNA 水平比较(GSE71729)。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图1 胰腺癌组织及胰腺癌细胞中 JWA 表达水平下降

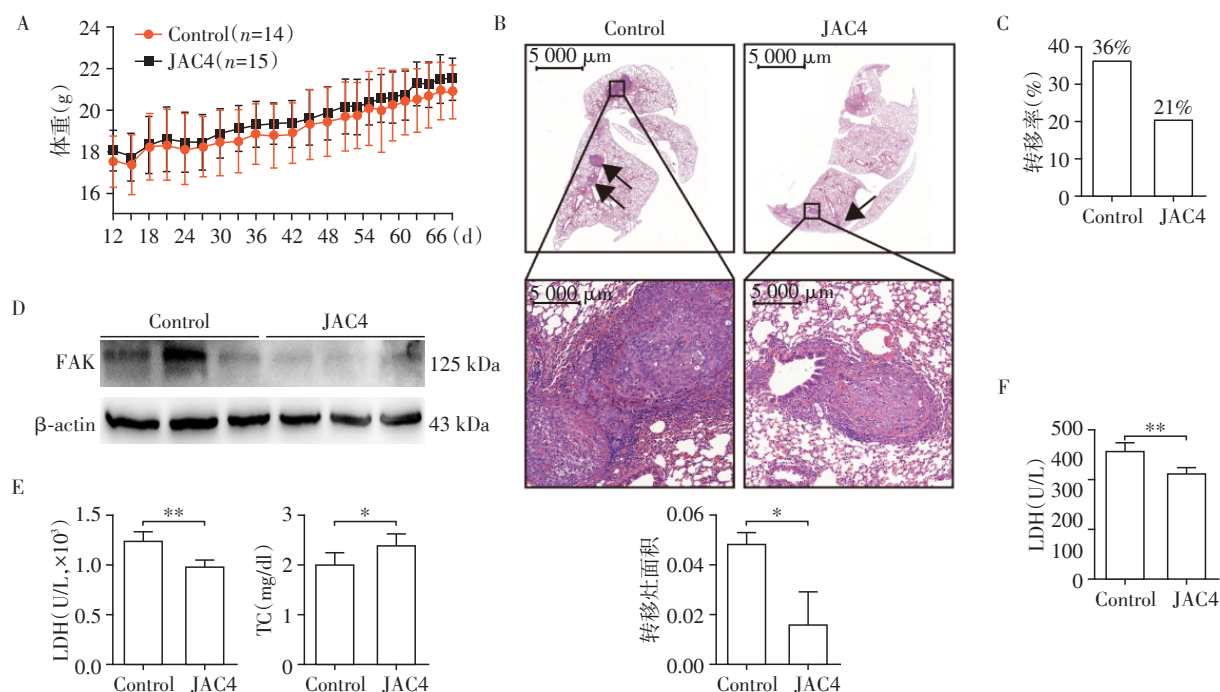
Figure 1 Decreased expression of JWA in pancreatic cancer tissues and pancreatic cancer cells



A: 免疫印迹检测 JWA 蛋白的表达水平; B: MTT 法检测 JAC4 对 2 株胰腺癌细胞的 IC_{50} 值; C: 穿孔实验检测细胞迁移能力($\times 10$), 并定量分析; D: 划痕实验检测细胞迁移能力并定量分析; E: 克隆形成实验检测 Panc1 和 Bxpc3 细胞增殖能力。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图2 JAC4 抑制胰腺癌细胞迁移

Figure 2 JAC4 inhibits pancreatic cancer cell migration



A: 小鼠体重曲线图; B: 病理切片典型图并定量分析; C: 肺部转移小鼠数; D: 免疫印迹检测转移相关蛋白 FAK 的表达水平; E: 血生化指标统计; F: JAC4 处理 Panc1 细胞 LDH 水平测定。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 JAC4抑制胰腺癌Panc1细胞小鼠被动转移

Figure 3 JAC4 inhibits passive transfer of pancreatic cancer Panc1 cells in mice

比, JAC4 处理的小鼠的 LDH 水平降低 ($P < 0.01$), 总胆固醇 (TC) 水平升高 ($P < 0.05$, 图 2E)。结合实验室前期结果, JAC4 显著降低荷瘤小鼠 LDH 水平^[7]。接下来, 用 JAC4 处理 Panc1 胰腺癌细胞, 观察对 LDH 水平的影响。结果显示, JAC4 处理后, Panc1 细胞上清中 LDH 水平明显下降 ($P < 0.01$, 图 2F)。这些结果表明 JAC4 在抑制小鼠转移和减少胰腺癌代谢负荷中起作用。

2.4 JAC4 促进胰腺癌细胞有氧呼吸, 抑制糖酵解

采用 Seahorse XF96 细胞外能量代谢分析仪, 实时监测 JAC4 对细胞能量代谢的影响, 对主要参数进行标准化分析。用不同剂量的 JAC4 处理后, 促进胰腺癌 Panc1 细胞的有氧呼吸, 抑制糖酵解代谢 (图 4 A); 低剂量 JAC4 对胰腺正常 hTERT-HPNE 细胞的基础呼吸与基础糖酵解无明显影响 (图 4 B)。

2.5 JAC4 增加胰腺癌细胞 FOXO3a 同时抑制 FAK 的表达

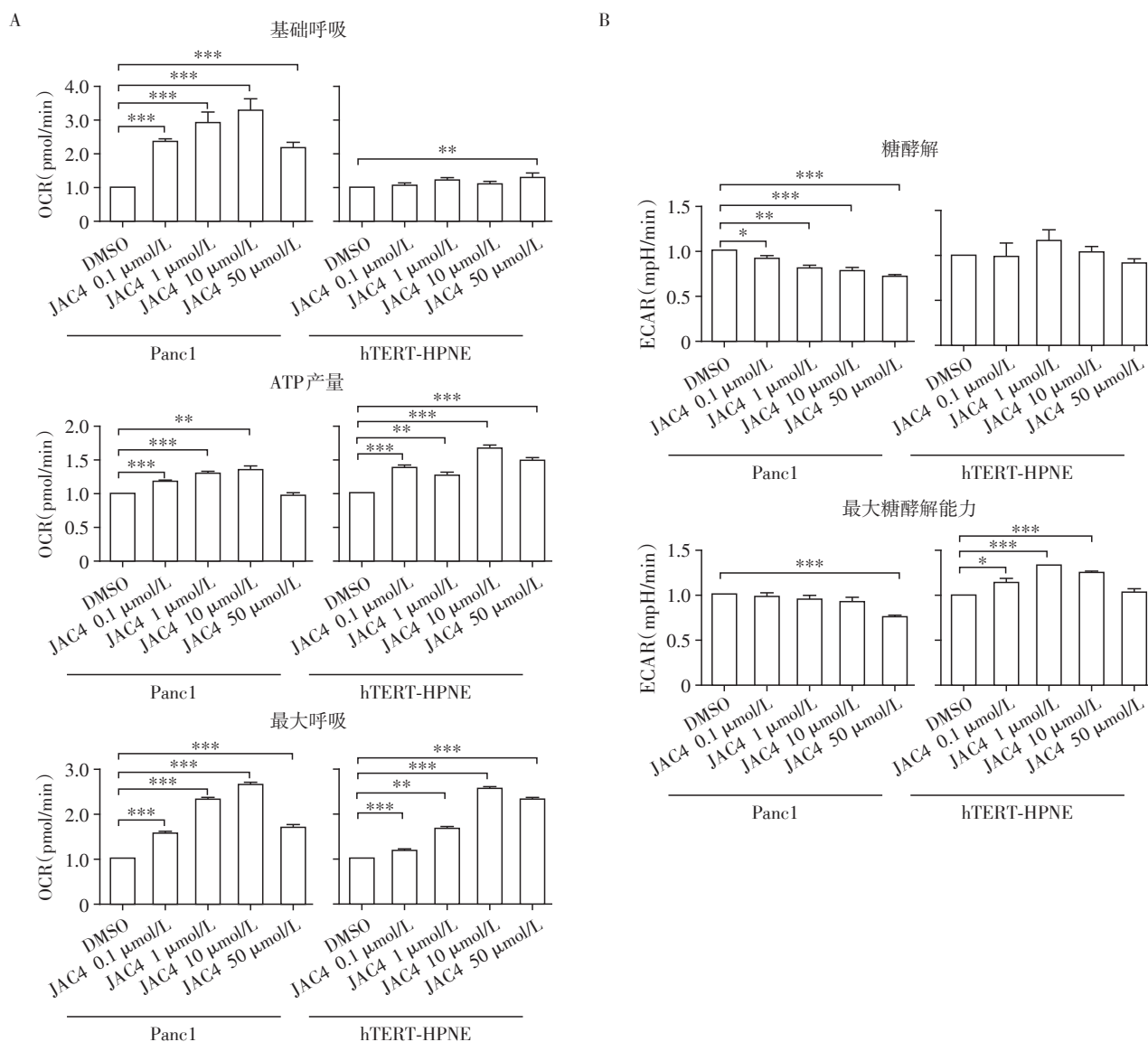
以上结果已经证明增加 JWA 表达可抑制胰腺癌细胞迁移, 并调节胰腺癌细胞能量代谢。推测 JWA 调节细胞迁移的机制可能与其对能量代谢的调节有关。已知 FOXO3a 是参与调节线粒体能量代谢的重要分子, 且网络工具 (cBioPortal for Cancer Genomics) 预测显示 JWA 基因与 FOXO3a 之间存在

正相关关系 (图 5 A)。为验证 JWA 对 FOXO3a 的调节作用, 免疫印迹结果显示, 在胰腺癌细胞中 FOXO3a 与 JWA 表达水平正相关 (图 5 B)。而改变 JWA 表达后, FOXO3a 表达水平也随之改变, 但 FAK 表达趋势与之相反 (图 5 C)。这些结果提示, 在胰腺癌细胞中 JWA 可能是通过正调控 FOXO3a 的表达水平后抑制 FAK 的。为进一步验证 JWA 是否通过该机制抑制胰腺癌细胞的迁移, Panc1 细胞转染 FOXO3a siRNA 48 h 后, 用穿孔实验检测细胞迁移能力。结果发现, 抑制胰腺癌细胞 FOXO3a 表达后迁移显著加快 (图 5 D)。

2.6 JAC4 通过 FOXO3a 增加线粒体复合物 III 表达

利用 JAC4 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理 Panc1 和 Bxpc3 细胞 48 h。免疫印迹结果显示, JAC4 处理后, JWA 表达升高, 同时线粒体复合物 III (UQCRC2) 表达水平明显增加, 但对线粒体其他复合物表达水平的影响不明显 (图 6 A)。提示, JAC4 对 Panc1 细胞有氧呼吸的激活作用, 可能是通过线粒体复合物 III。使用线粒体复合物 III 的抑制剂抗霉素 A 与 JAC4 同时处理 Panc1 和 Bxpc3 细胞, 穿孔实验结果显示: 用抗霉素 A 抑制线粒体复合物 III 后, 原本被 JAC4 抑制的穿孔细胞数增加 (图 6 B)。

用 JAC4 和 FOXO3a siRNA 处理 Panc1 细胞 48 h



A: 细胞线粒体应激检测: 基础呼吸, ATP产量和最大呼吸。B: 糖酵解应激检测: 糖酵解和最大糖酵解能力。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n=3$ 。

图4 JAC4促进胰腺癌细胞有氧呼吸, 抑制糖酵解

Figure 4 JAC4 promotes aerobic respiration and inhibits glycolysis of pancreatic cancer cells

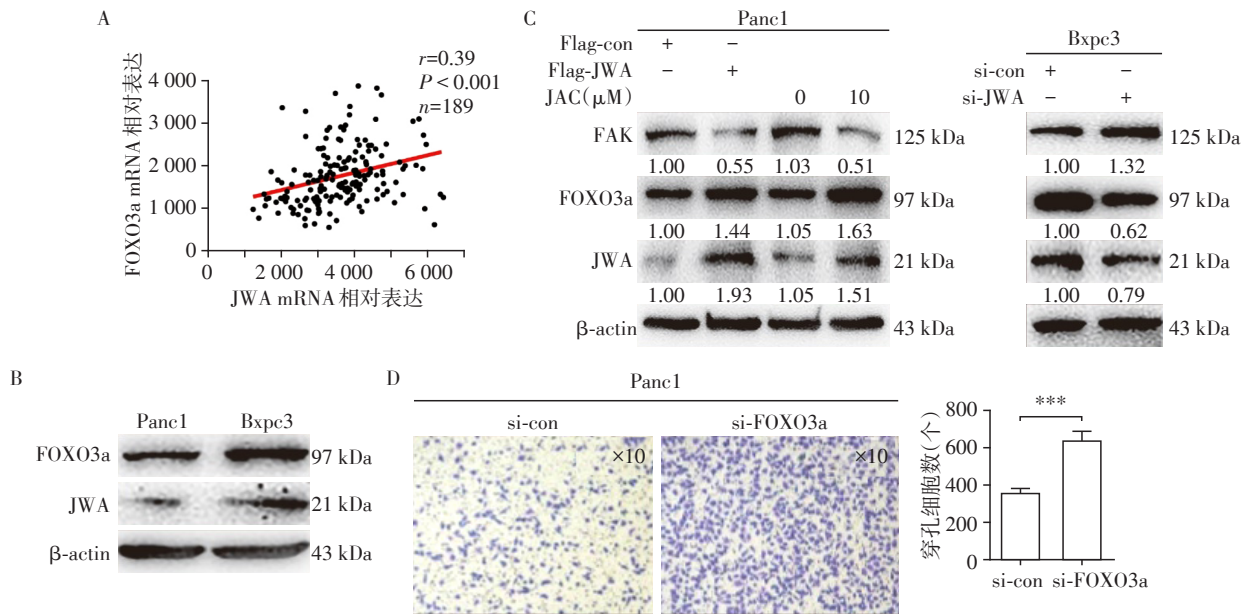
后,再用抗霉素A(500 nmol/L)处理1 h。结果发现, JAC4和FOXO3a siRNA共处理比单纯JAC4处理, FAK表达水平增加3.04倍;但在JAC4和FOXO3a siRNA共处理或单纯JAC4 10 μmol/L处理基础上若再用抗霉素A处理,则FAK表达水平仅增加1.98倍(图6 C)。提示JWA对FAK的抑制作用部分是通过FOXO3a-线粒体复合物III途径实现的。

用抗霉素A与JAC4共处理Panc1胰腺癌细胞,观察对LDH水平的影响。结果显示,用抗霉素A处理后,原本被JAC4降低的LDH增加(图6 D)。

2.7 JWA通过AMPK信号通路正调控FOXO3a表达

已知JWA的同源蛋白GTRAP3-18缺陷时显示

AMPK抑制^[7]。为探究JWA在胰腺癌细胞中是否通过AMPK信号通路发挥作用,将Panc1和Bxpc3细胞JAC4处理48 h,再使用10 μmol/L复合物C(AMPK抑制剂)处理6 h后,免疫印迹结果显示FOXO3a, AMPK、p-AMPK的表达趋势均与JWA的表达一致;而FAK、mTORC与JWA的趋势相反。使用复合物C后,AMPK、p-AMPK表达水平下降,原本升高的FOXO3a的表达被抑制,但FAK表达水平升高(图7 A)。穿孔实验结果显示,使用复合物C后,原本被抑制的迁移能力升高,细胞迁移数增加(图7 B)。说明复合物C有效抑制了AMPK及下游FOXO3a的激活,导致细胞迁移增加。



A: JWA 与 FOXO3 表达的相关性分析; B: 免疫印迹法检测 JWA 和 FOXO3a 的本底表达水平; C: 免疫印迹法检测 JWA、FOXO3a 和 FAK 的表达; D: 抑制 FOXO3a 后穿孔实验检测细胞迁移能力并定量分析。两组比较, *** $P < 0.001, n=3$ 。

图5 JAC4增加胰腺癌细胞FOXO3a并抑制FAK的表达
Figure 5 JAC4 increases FOXO3a expression and inhibits FAK expression

3 讨论

本研究着重探讨了JAC4对胰腺癌细胞迁移的抑制作用及其分子机制。首次发现,JAC4处理胰腺癌细胞可以提高JWA基因表达水平,有效抑制细胞迁移,但对细胞增殖的作用不明显。机制研究显示,JWA抑制胰腺癌细胞迁移的作用可能是其对胰腺癌细胞线粒体能量代谢的调节最终抑制FAK表达水平而实现的。

包括胰腺癌在内的多数癌细胞都高表达FAK^[8]。前期研究已经发现JWA对癌细胞迁移和转移抑制作用的途径之一是通过FAK相关的信号通路^[9],本研究则进一步揭示了增加JWA基因表达水平后显著增强胰腺癌细胞线粒体有氧呼吸,同时抑制糖酵解。首次揭示JWA通过AMPK-FOXO3直接影响线粒体能量代谢,而其确切作用是通过线粒体复合物Ⅲ的调节实现的。

FOXO3属于叉头转录因子家族的O亚类,参与代谢重编程的信号传导。FOXO3a通过诱导失巢凋亡抑制胰管腺癌(PDAC)的生长和转移^[2]。FOXO3a的失调可导致肿瘤免疫逃逸^[3]。此外,FOXO3a的去磷酸化可能导致线粒体凋亡^[10]。

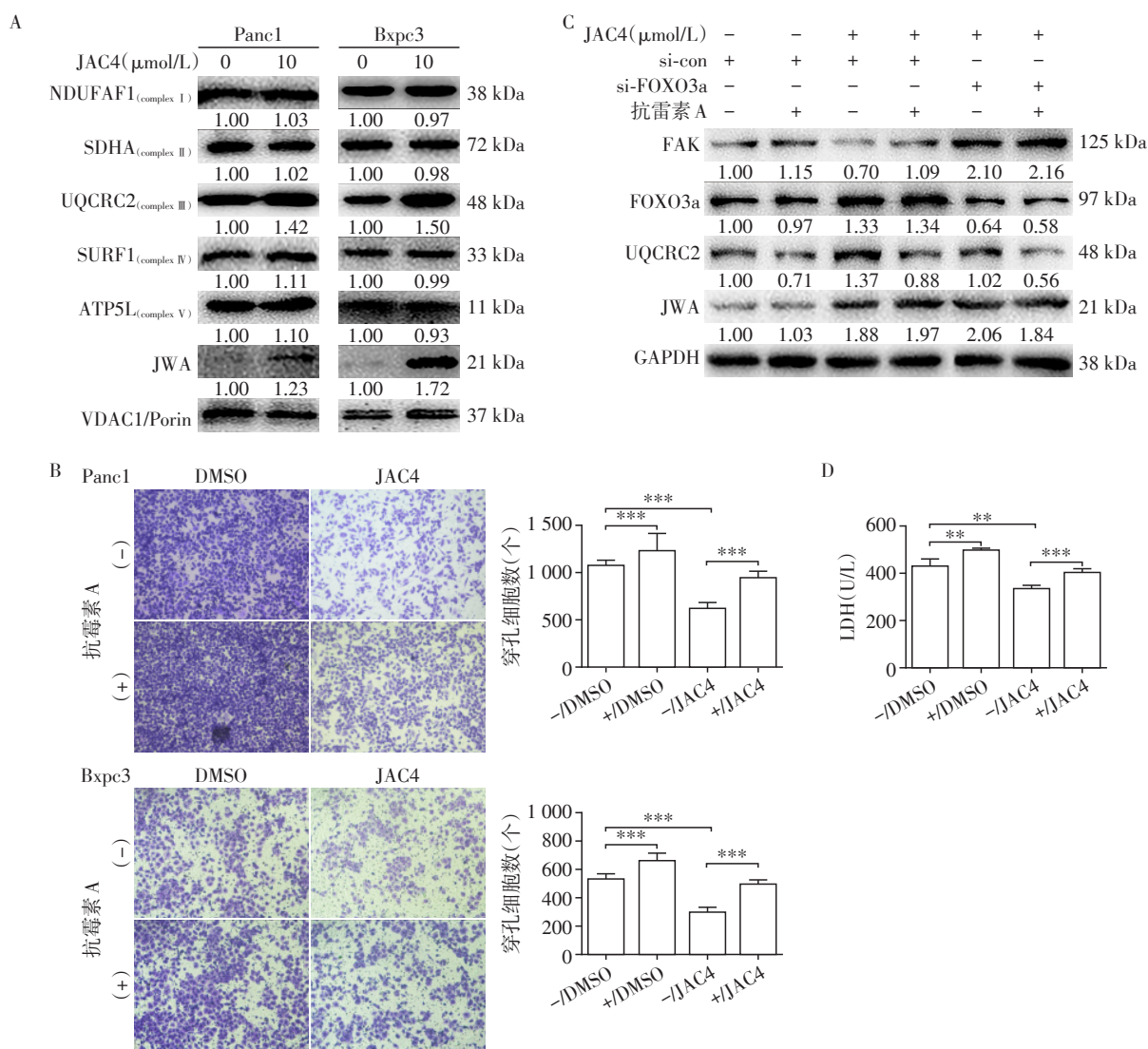
以往研究已阐明JWA通过MAPK-FAK途径抑制癌细胞迁移^[11]。JWA基因表达降低与胃癌和恶性黑色素瘤患者的细胞迁移和转移加速以及预后不

良有关^[12]。JWA表达的减少增加了Panc1细胞的恶性表型,包括迁移、侵袭和较少的细胞凋亡^[13]。

由于肿瘤生长与正常细胞增殖调控的信号通路交叉重复,因而普遍认为癌症驱动基因并不能作为调控肿瘤的靶点。相反,癌细胞异常代谢本身可以靶向控制由癌症信号触发的癌细胞增殖,因此,通过调节癌症代谢找到治愈癌症的方法可能是将来的研究重点^[14]。

本研究结果表明,JAC4的作用是通过AMPK-FOXO3a-UQCRC2-FAK信号途径实现的。JAC4在促进胰腺癌细胞有氧呼吸和抑制糖酵解的同时,对正常胰腺细胞的基础代谢并无明显干扰,表明JAC4可选择性地作用于具有异常线粒体呼吸的胰腺癌细胞。因而可以预测,JAC4具有较好的特异性调节胰腺癌细胞异常能量代谢的作用,在其他癌细胞是否具有类似功能值得进一步研究。本研究也存在不足,虽然发现JAC4对胰腺癌细胞和胰腺正常细胞线粒体能量代谢的差异调节作用,但这种差异调节的确切机制尚待进一步阐明。

综上所述,本研究初步阐明了JWA通过AMPK/FOXO3a信号通路调节细胞能量代谢,抑制胰腺癌细胞迁移。本研究提示JWA可能通过调节胰腺癌细胞异常能量代谢的关键节点复合物Ⅲ表达影响了细胞能量代谢的重编程,并在抑制细胞迁移中发挥作用。



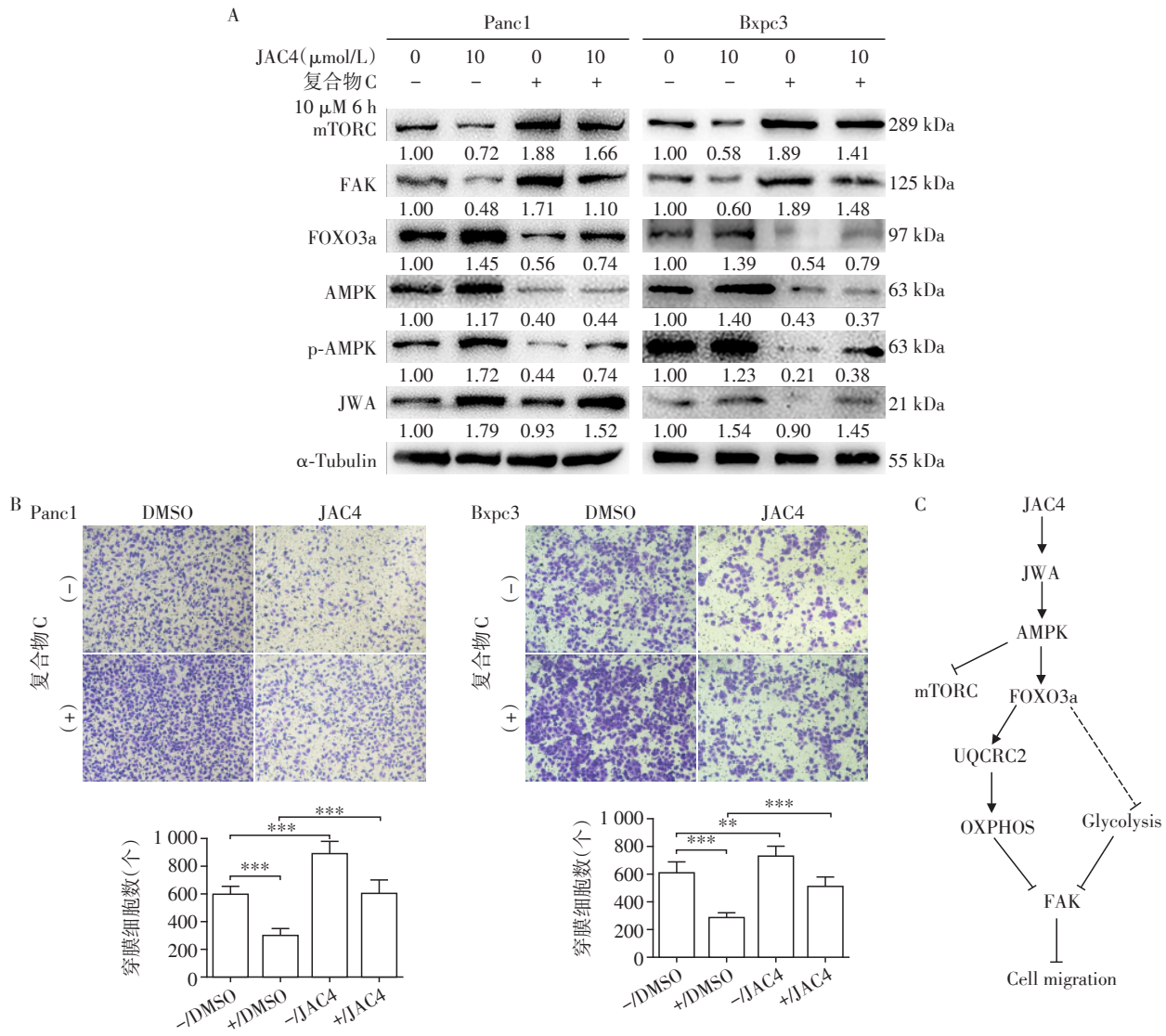
A: 免疫印迹法检测线粒体复合物的表达水平; B: 穿孔实验检测抗霉素 A 与 JAC4 共处理后细胞迁移能力并定量分析穿孔细胞数; C: 免疫印迹实验检测相关蛋白的表达; D: Panc1 细胞 LDH 水平测定。两组比较, $P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $n=3$ 。

图6 JAC4 激活 FOXO3a 增加线粒体复合物 III 表达, 抑制胰腺癌细胞迁移

Figure 6 JAC4 increases mitochondrial complex III expression via FOXO3a, and inhibits migration of pancreatic cancer cell

【参考文献】

- [1] CA: 2015 中国癌症统计数据发布[J]. 中国医学创新, 2016, 13(5): 6
- [2] Liu GF, Li GJ, Zhao H. Efficacy and toxicity of different chemotherapy regimens in the treatment of advanced or metastatic pancreatic cancer: A network meta-analysis [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 511-523
- [3] Conroy T, Gavaille C, Adenis A. Metastatic pancreatic cancer: old drugs, new paradigms [J]. Curr Opin Oncol, 2011, 23(4): 390-395
- [4] Pagano MA, Tibaldi E, Molino P, et al. Mitochondrial apoptosis is induced by Alkoxy phenyl-1-propanone derivatives through PP2A-mediated dephosphorylation of Bad and Foxo3A in CLL [J]. Leukemia, 2019, 33(5): 1148-1160
- [5] Nagarajan A, Dogra SK, Sun L, et al. Paraoxonase 2 facilitates pancreatic cancer growth and metastasis by stimulating GLUT1-mediated glucose transport [J]. Mol Cell, 2017, 67(4): 685-701 e686
- [6] Chen YS, Huang YF, Huang YL, et al. JWA suppresses tumor angiogenesis via Sp1-activated matrix metalloproteinase-2 and its prognostic significance in human gastric cancer [J]. Carcinogenesis, 2014, 35(2): 442-451
- [7] Aoyama K, Bhadhrasit W, Watabe M, et al. GTRAP3-18 regulates food intake and body weight by interacting with pro-opiomelanocortin [J]. FASEB J, 2018, 32(1): 330-341
- [8] Shen M, Jiang YZ, Wei Y, et al. Tinagl1 suppresses triple-negative breast cancer progression and metastasis by simultaneously inhibiting integrin/FAK and EGFR signaling



A: JAC4处理Panc1和Bxpc3细胞48 h后,再用复合物C处理6 h,免疫印迹法检测JWA、FOXO3a、p-AMPK、FAK的表达水平;B:穿孔实验检测细胞迁移能力,定量分析上述处理后穿膜细胞数目(10个随机视野);C:JWA激活AMPK信号通路后上调FOXO3a并抑制细胞迁移的机制图。两组比较,*** $P < 0.001, n = 3$ 。

图7 JWA通过AMPK信号通路正调控FOXO3a表达

Figure 7 JWA regulates FOXO3a expression through AMPK signaling pathway

[J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(1): 64-80 e67

[9] Qiu DP, Wang Q, Wang ZD, et al. RNF185 modulates JWA ubiquitination and promotes gastric cancer metastasis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(5 Pt A): 1552-1561

[10] Jin LM, Han XH, Jie YQ, et al. 14-3-3zeta silencing retards tongue squamous cell carcinoma progression by inhibiting cell survival and migration [J]. *Cancer Gene Ther*, 2016, 23(7): 206-213

[11] 严冬琳,王强,邱丹萍,等. SP-141抑制胃癌细胞增殖,迁移并促进凋亡[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(8): 926-931

[12] Wang SY, Wu XM, Chen YS, et al. Prognostic and predictive role of JWA and XRCC1 expressions in gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(10): 2987-2996

[13] Wu YY, Ma TL, Ge ZJ, et al. JWA gene regulates PANC-1 pancreatic cancer cell behaviors through MEK-ERK1/2 of the MAPK signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(4): 1859-1863

[14] Kim SY. Cancer metabolism: A hope for curing cancer [J]. *Biomol Ther(Seoul)*, 2018, 26(1): 1-3

[收稿日期] 2019-07-19