

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.10.006

FHL2与LDHA相互作用促进胶质瘤细胞的增殖

吴国庆, 张婷[△], 宋小锋, 朱婷, 李娜, 李明(新乡医学院三全学院 生命科学技术学院, 河南 新乡 453000)

[摘要] **目的:**探讨四个半LIM结构域2(FHL2)蛋白对胶质瘤细胞增殖的影响及其分子机制。**方法:**利用TCGA和CGGA数据库分析胶质瘤组织中FHL2 mRNA表达水平与患者预后的关系。通过WB法检测人胶质瘤组织标本及人胶质瘤细胞U87、T98G、U251、SNB19、GSC23、A172、LN229、G267和星形胶质细胞NHA中的FHL2蛋白表达水平。利用慢病毒载体构建稳定敲低FHL2的U87细胞和过表达FHL2的SNB19细胞,即U87-shGFP、U87-shFHL2-1#、U87-shFHL2-4#和SNB19-3flag、SNB19-3flag-FHL2组。通过CCK-8法、克隆形成实验检测敲低和过表达FHL2对细胞增殖的影响,免疫共沉淀(Co-IP)和液相色谱-串联质谱(LC/MS)法筛选FHL2在胶质瘤细胞中的相互作用蛋白,并用Co-IP和免疫荧光法验证它们的结合作用和共定位情况。使用酶标仪检测敲低和过表达FHL2细胞内乳酸产量和乳酸脱氢酶(LDH)活性的变化, WB法分析FHL2、LDHA及p-LDHA在正常脑组织和胶质瘤组织中的蛋白表达差异及其相互关系。在过表达FHL2的SNB19细胞中使用LDHA的小分子抑制剂AT-101,通过CCK-8实验和酶标仪比色法验证FHL2在胶质瘤乳酸代谢中的作用,验证AT-101在胶质瘤中潜在的治疗效果。**结果:**Co-IP和LC/MS检测发现,FHL2与LDHA在胶质瘤细胞中存在相互作用。FHL2过表达可提高LDHA活性和乳酸生成(均 $P < 0.001$),进而促进胶质瘤细胞增殖($P < 0.001$)。相反,敲低FHL2会降低LDHA活性和乳酸产量($P < 0.001$ 或 $P < 0.05$)并抑制细胞增殖($P < 0.001$)。AT101能抑制LDHA活性,并显著抑制FHL2促进胶质瘤细胞的增殖,同时恢复磷酸化LDHA(Y10)水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。**结论:**FHL2与LDHA蛋白相互作用,FHL2通过激活p-LDHA(Y10)的表达促进LDHA活性和乳酸产生,进而促进胶质瘤细胞的增殖,靶向这种相互作用可能成为治疗胶质瘤的潜在策略。

[关键词] 四个半LIM结构域2;乳酸脱氢酶A;胶质瘤;U87细胞;SNB19细胞;增殖

[中图分类号] R739.41; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024) 10-0976-08

FHL2 interacts with LDHA to promote glioma cell proliferation

WU Guoqing, ZHANG Ting[△], SONG Xiaofeng, ZHU Ting, LI Na, LI Ming (School of Life Science and Biotechnology, Sanquan Medical College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of four-and-a-half LIM domains 2 (FHL2) on glioma cell proliferation and its molecular mechanisms. **Methods:** The relationship between FHL2 mRNA expression levels in gliomas and patient prognosis was analyzed using TCGA and CGGA databases. The protein expression levels of FHL2 in collected human glioma tissue samples and human glioma cell lines (U87, T98G, U251, SNB19, GSC23, A172, LN229, G267), and astrocyte NHA were analyzed using Western blot (WB). Lentiviral vectors were used to construct U87 cells with stable FHL2 knockdown and SNB19 cells overexpressing FHL2, namely U87-shGFP, U87-shFHL2-1#, U87-shFHL2-4#, and SNB19-3flag, SNB19-3flag-FHL2 groups. The effects of FHL2 knockdown and overexpression on cell proliferation were assessed using CCK-8 assays and colony formation assay. Co-immunoprecipitation (Co-IP) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS) were employed to identify proteins interacting with FHL2 in glioma cells, and Co-IP and immunofluorescence were used to verify their binding and co-localization. Changes in intracellular lactate production and lactate dehydrogenase (LDH) activity following FHL2 knockdown and overexpression were measured using a microplate reader. WB was used to analyze the protein expression levels of FHL2, LDHA, and p-LDHA in normal brain tissues and glioma tissues, as well as their relationships. The small molecule inhibitor of LDHA, AT-101, was used to treat SNB19 cells overexpressing FHL2. The role of FHL2 in glioma lactate metabolism and the potential therapeutic effect of AT-101 in glioma were validated using CCK-8 assays and colorimetric assays with a microplate reader. **Results:** Co-IP and LC/MS analyses revealed an interaction between FHL2 and LDHA in glioma cells. Overexpression of FHL2 increased LDHA activity and lactate production (all $P < 0.001$), thereby promoting glioma cell proliferation ($P < 0.001$ or $P < 0.001$). Conversely, knockdown of FHL2

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 82072802)

[作者简介] 吴国庆(1994—),男,硕士,助教,主要从事肿瘤分子机制研究,E-mail: 15695693671@163.com;张婷(1986—),女,硕士,副教授,主要从事肿瘤分子机制研究,E-mail: tege377@163.com。△为共同第一作者

[通信作者] 李明,E-mail: m2lichn@163.com

reduced LDHA activity and lactate production ($P < 0.001$, $P < 0.05$) and inhibited cell growth ($P < 0.01$). AT101 inhibited LDHA activity and significantly suppressed FHL2-induced glioma cell proliferation while restoring phosphorylated LDHA (Y10) levels ($P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion:** FHL2 interacts with LDHA protein, and FHL2 promotes LDHA activity and lactic acid production by activating the expression of p-LDHA (Y10), thus facilitating the proliferation of glioma cells. Targeting this interaction may become a potential strategy for treating gliomas.

[Key words] four-and-a-half LIM domains 2 (FHL2); lactate dehydrogenase A (LDHA); glioma; U87 cell; SNB19 cell; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(10): 976-983. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.10.006]

四个半 LIM 结构域 (four-and-a-half LIM domain, FHL) 蛋白是 LIM 蛋白家族的一部分, 由 FHL1、FHL2 (也称为 DRAL 或 SLIM3)、FHL3、FHL4 和人类睾丸 CREM 激活因子组成^[1]。这些蛋白在多种组织类型中表达, 并在细胞迁移、黏附、运动和信号传导中发挥关键作用^[2-5]。其中, FHL2 广泛参与细胞骨架组织、细胞迁移、凋亡、自噬和分化等功能^[6-11]。FHL2 的活性归因于 LIM 结构域, 使其能够通过一个双保守的锌指基序发挥转录共激活因子或转录抑制剂的作用。因此, FHL2 可以与肿瘤相关基因相关的转录因子相互作用, 参与多种类型肿瘤的发生发展^[12-13]。胶质瘤是成人中最常见、致死率极高的恶性肿瘤之一^[14-15]。研究^[16-17]发现, FHL2 在胶质瘤中高表达, 其高表达与细胞增殖、迁移和侵袭的增强相关。然而, 这些效应背后的潜在分子机制尚未明了。本研究通过免疫沉淀-质谱 (immunoprecipitation-mass spectrometry, IP-MS) 实验, 鉴定 FHL2 在胶质瘤中新发现的相互作用因子, 探索其在胶质瘤中的生物学作用, 以期为未来胶质瘤的临床治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 胶质瘤中 FHL2 表达数据的获取与分析

利用癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 和中国胶质瘤基因组图谱 (Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA) 数据库进行 FHL2 表达谱分析。

1.2 组织标本、细胞及主要试剂

本课题所用的 7 例胶质瘤组织及邻近正常脑组织标本均取自 2020 年 01 月 01 日至 2022 年 06 月 01 日新乡医学院附属第一医院神经外科收治的胶质瘤患者, 收集的组织标本置于冻存管中在液氮罐内保存。所有患者均经病理学确诊为胶质瘤, 术前均未接受过放疗或化疗。术前均被告知并签订知情同意书, 研究方案征得新乡医学院三全学院伦理委员会审核批准 (伦理审批号: SQLL-20220018)。

胶质瘤 U87、T98G、U251、SNB19、GSC23、A172、LN229 和 G267 细胞购自美国模式培养物集存库 (ATCC), 星形胶质细胞 NHA 由牛津大学 Ludwig 肿瘤研究所 CAVENEE 教授赠与。

DMEM 高糖培养基、Opti-MEM 培养基购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自 BI 公司, Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂、Lipofectamine 3000 转染试剂购自 Invitrogen 公司, FHL2 抗体购自 Abcam 公司, Flag 抗体、乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 抗体、p-LDHA 抗体购自 Sigma 公司, Actin 抗体购自 Abclonal 公司, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗购自 Proteintech 公司, CCK-8 试剂购自 Bimake 公司, BCA 试剂、ECL 化学发光超敏显色试剂盒购自上海碧云天生物技术公司, 乳酸及 LDH 活性检测试剂盒购自美国 Biovision 公司, 质谱用快速银染试剂盒购自上海生工公司, Dynabeads™ Protein G 购自 Thermofisher 公司, shRNA 购自 Sigma 公司。

1.3 细胞培养、质粒转染及分组

胶质瘤 U87、SNB19 和 NHA 细胞在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。取对数生长期的 SNB19 细胞, 接种于 6 孔板 (2 × 10⁵ 个/孔) 中, 根据制造商的说明, 使用 Lipofectamine 3000 分别转染 pcDNA3.1-3xflag-FHL2 (过表达) 及 pcDNA3.1-3xflag (阴性对照) 质粒, 实验分为 SNB19-3flag-FHL2 组和 SNB19-3flag 组。继续培养 48 h 后, 进行后续实验。

1.4 慢病毒感染及分组

用于设计 pLKO.1-shGFP 和 pLKO.1-shFHL2 慢病毒载体的 shRNA 序列: sh-GFP 为 5'-CAAGCTGAC CCTGAAGTTCAT-3', sh-FHL2-1# 为 5'-GAGACT TTCTTCTAGTGCTTTC-3', sh-FHL2-4# 为 5'-CGA ATCTCTCTTTGGCAAGAAC-3'。选取对数生长期的 U87 细胞, 接种于 6 孔板 (3 × 10⁵ 个/孔) 中, 根据说明书用 Lipofectamine 3000 转染上述载体, 转染 48 h 后备用。采用 293T 细胞制备慢病毒颗粒, 用慢病毒颗粒感染 U87 细胞 48 h 后, 用 2 μg/mL 嘌呤霉素筛选 10 d, 获得稳定的聚集克隆。实验分为 U87-shGFP、U87-shFHL2-1#、U87-shFHL2-4# 组。

1.5 WB 法检测各组胶质瘤细胞中 FHL2 蛋白的表达

利用 RIPA 裂解液提取各组细胞的总蛋白, BCA 蛋白含量测定试剂盒测定每个样品的总蛋白含量。经 SDS-PAGE 分离蛋白质, 在 450 mA 恒定电流下转膜 90 min, 将 PVDF 膜在 5% 脱脂牛奶 TBST 缓冲液中室温下封闭 1 h, 加入稀释比例为 1:1 000 的 FHL2

一抗、1:10 000的Actin一抗,4 °C下处理过夜。用TBST缓冲液洗膜3次,加入稀释比例为1:5 000的HRP标记的兔抗山羊二抗,室温下处理2 h,洗膜后使用ECL显影。显影后,使用Image J软件(版本号1.52 V)分析蛋白条带的灰度值。

1.6 CCK-8法检测各组胶质瘤细胞的增殖活力

将转染后的各组细胞接种于96孔板(2×10^3 个/孔)中,并在37 °C、5%CO₂的细胞培养箱中培养。细胞生长至24、48、72 h时,向96孔板中加入10 μL CCK-8试剂,在37 °C下作用2 h。上酶标仪在450 nm波长处测定各孔光密度(D)值,以D值表示细胞的增殖能力。

1.7 克隆形成实验检测各组胶质瘤细胞的克隆形成能力

将各组细胞接种到6孔板(3×10^2 个/孔)中,每孔加入2 mL培养基。细胞培养8~14 d(期间更换培养基1~2次),当可见的细胞克隆形成时,终止培养。去除培养基,PBS轻轻洗涤克隆后用4%多聚甲醛溶液固定15 min,结晶紫染色15 min,显微镜下观察并统计克隆形成数。

1.8 Co-IP法检测各组胶质瘤细胞中FHL2的互作蛋白

从U87细胞(内源性FHL2表达较强)和分别转染了pcDNA3.1-3xflag和pcDNA3.1-3xflag-FHL2的SNB19细胞(内源性FHL2表达较弱)中提取总蛋白样本,按照蛋白A/G磁珠说明,用抗体结合法对磁珠进行预处理,将IgG、FHL2、flag一抗加入磁珠中并彻底混合,室温下反应1 h。洗涤和富集磁珠后,与提取的蛋白样品混合,4 °C下处理过夜。用结合/洗涤缓冲液洗涤4次, $7\ 161 \times g$ 离心30 s,弃上清液。TBS溶液洗涤磁珠2次(体积是磁珠体积的20倍),0.1 mol/L甘氨酸HCl(pH3.5)将上述磁珠洗1遍(两者混合不超过20 min),弃上清液,加入30 μL的5 × 上样缓冲液,金属浴中变性10 min,将Marker和制备的IP样品进行SDS-PAGE后转移凝胶到100 mm的培养皿中,按照银染色试剂盒的步骤进行银染并切割银染凝胶条带进行质谱分析。

1.9 免疫荧光法检测胶质瘤细胞FHL2和LDHA蛋白的表达

将SNB19-3flag-FHL2细胞接种到带有预先清洗玻片的24孔板,待细胞生长至为70%汇合(10^5 个/孔)时,将细胞在4%甲醛中37 °C固定20 min,用0.2% TritonX-100于4 °C渗透15 min。用含0.2% Triton X-100和1%胎牛血清的PBS阻断通透细胞。加入稀释比例为1:200的FHL2一抗和1:200的LDHA一抗,4 °C培养过夜。次日,在荧光标记的小鼠抗兔二抗(稀释比例为1:500)室温下作用30 min。最后,用

共聚焦显微镜观察图像。

1.10 酶标仪比色法检测乳酸含量和LDH活性

乳酸含量检测:按照试剂盒说明,检测过表达FHL2的SNB19细胞和敲低FHL2后U87细胞的乳酸产量及LDH活性。乳酸含量实验:收集6孔板中的培养基,乳酸与试剂盒中的酶混合物特异性反应,其产物与乳酸探针相互作用以产生紫色(D_{570}),通过酶标仪检测结果。

LDH活性检测:收集细胞沉淀,使用超声破碎仪裂解细胞,LDH将NAD还原为NADH,NADH与探针相互作用产生橙色(D_{450}),通过酶标仪检测结果。

乳酸含量和LDH活性按照试剂说明书中提供的计算公式得出结果。

1.11 统计学处理

上述所有实验均独立重复3次。采用Graph Prism 8.0软件进行统计学分析,符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异比较采用独立样本*t*检验,多组间差异比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FHL2在胶质瘤中呈高表达且与胶质瘤患者的不良预后相关并促进胶质瘤细胞增殖

通过GEPIA数据库分析结果(图1A)显示,与正常的脑组织相比,FHL2 mRNA在低级别胶质瘤(low grade glioma, LGG)和胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)组织中呈低表达(均 $P < 0.05$),而在GBM组织中FHL2 mRNA表达较LGG组织中高($P < 0.05$,图1A)。此外,在TCGA和CGGA两个胶质瘤患者队列中,FHL2高表达均与不良预后相关(均 $P < 0.01$,图1B)。

WB法检测结果(图1C)显示,与正常脑组织相比,胶质瘤组织中FHL2蛋白水平显著上调($P < 0.05$);与NHA细胞相比,胶质瘤细胞中FHL2蛋白水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。敲低FHL2后,U87细胞中FHL2蛋白表达水平显著降低($P < 0.001$,图1D);过表达FHL2后,SNB19细胞中FHL2蛋白表达水平显著升高($P < 0.001$,图1D)。

CCK-8法和克隆形成实验(图1E、F)结果显示,FHL2的敲低显著降低了U87细胞的增殖能力($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$);过表达FHL2的SNB19细胞的增殖能力显著升高($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$)。

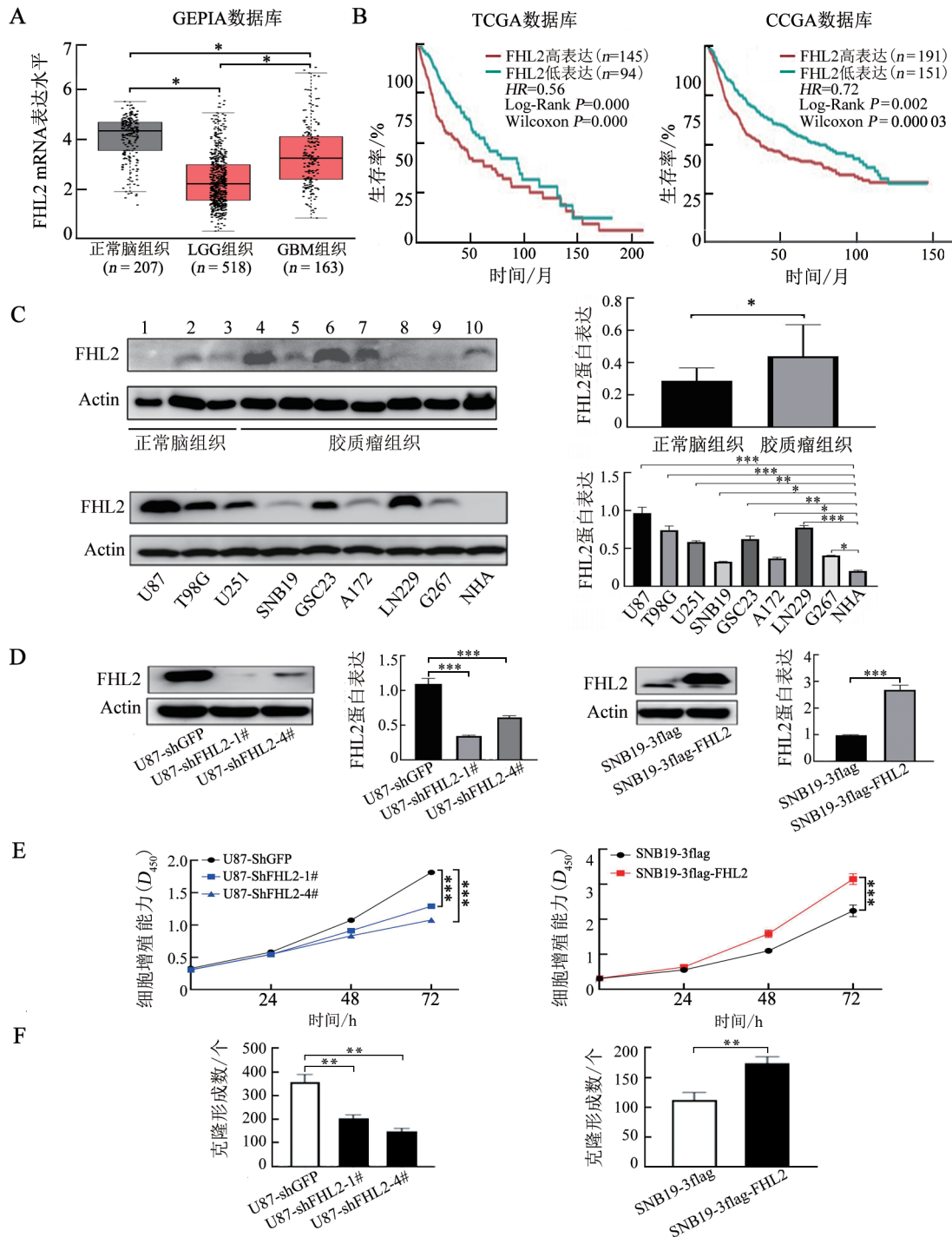
以上实验结果表明,敲低FHL2表达降低U87细胞的增殖能力,过表达FHL2则升高SNB19细胞的增殖能力。

2.2 LDHA在胶质瘤细胞中与FHL2相互作用

Co-IP实验和LC/MS实验结果(图2A)显示,

LDHA 是 FHL2 的相互作用蛋白之一(表 1)。Co-IP 实验和 WB 法检测结果(图 2B)表明,用 Flag 抗体从 SNB19-3flag-FHL2 细胞中拉下 Flag 抗体蛋白,导致

FHL2 和 LDHA 共沉淀。同样,从这些细胞中拉下含有 LDHA 抗体的蛋白会导致 FHL2 的共沉淀,证明了 FHL2 和 LDHA 之间存在相互结合。



A: 利用 GEPIA 数据库分析 LGG、GBM 组织和正常脑组织中 FHL2 mRNA 表达差异; B: FHL2 表达的 TCGA 和 CCGA 胶质瘤队列的 Kaplan-Meier 生存分析; C: WB 法检测胶质瘤组织和细胞中 FHL2 的蛋白水平; D: WB 法检测敲低或过表达 FHL2 对 U87、SNB19 细胞 FHL2 蛋白表达的影响; E: CCK-8 法检测敲低或过表达 FHL2 对 U87 细胞增殖的影响; F: 克隆形成实验检测敲低或过表达 FHL2 对 SNB19 细胞克隆形成的影响。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

图 1 FHL2 在胶质瘤中的表达及其对患者预后和胶质瘤细胞增殖的影响

为确定 FHL2 负责相互作用的特定结构域,生成了 FHL2 的 LIM 结构域,包括第 2~4 个 LIM 结构域

(称之为 77)、第 3~4 个 LIM 结构域(称之为 78)和第 4 单独结构域(称之为 79)。结果显示,第 4 个结构域本

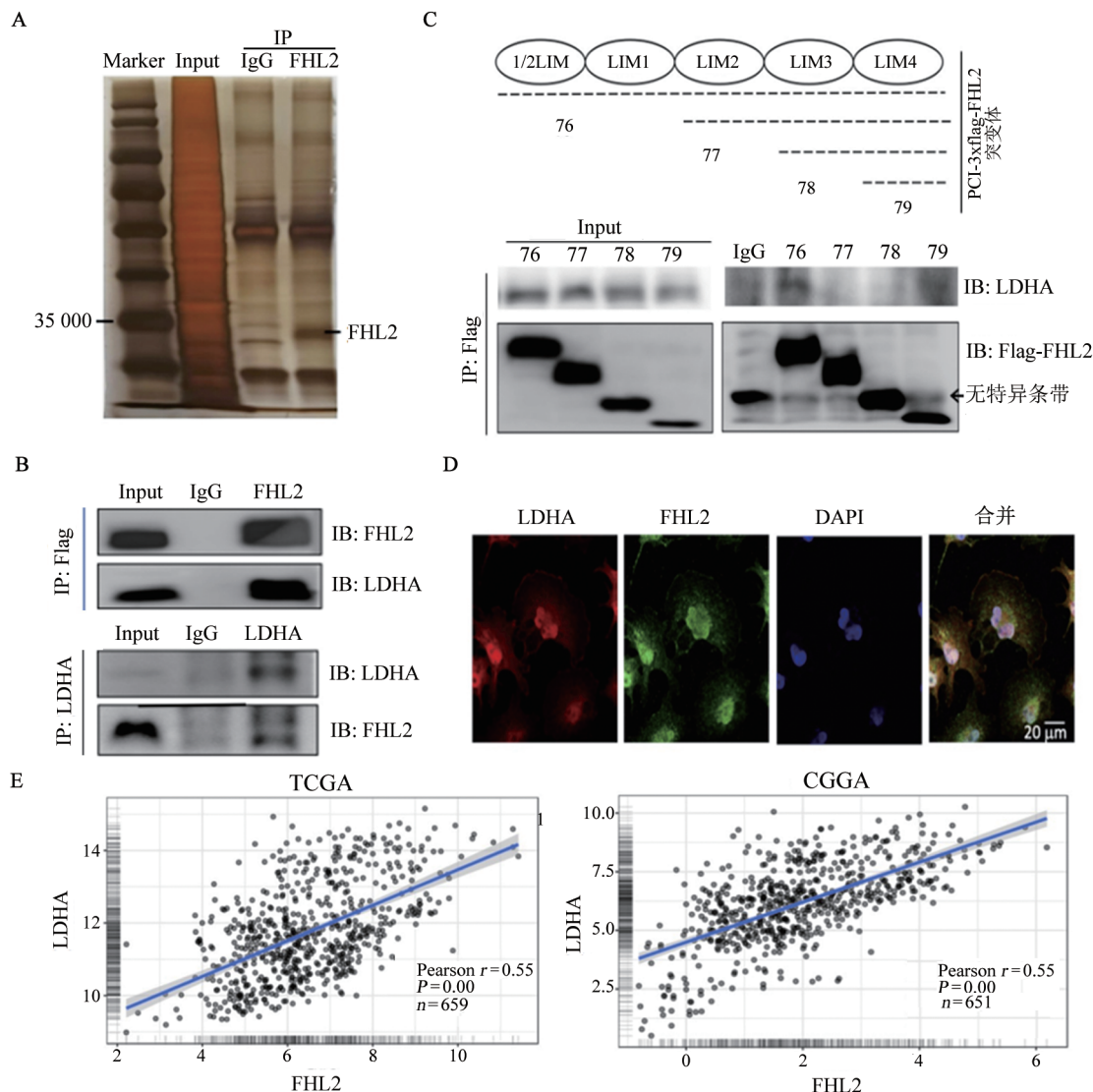
身就足以与 LDHA 相互作用(图 2C)。对表达 3 × flag-FHL2 的 SNB19 细胞进行免疫荧光分析发现, FHL2(绿色荧光)和 LDHA(红色荧光)在细胞内区域共定位,进一步证实了它们在细胞内的相互作用(图 2D)。

为探索 FHL2 和 LDHA 在 mRNA 水平上的相关性,分析 TCGA 和 CGGA 中来自于两个数据集中的患者样本的结果,发现 FHL2 mRNA 与 LDHA mRNA 的表达呈正相关($r = 0.55, 0.64$, 均 $P < 0.001$; 图 2E)。

以上实验结果表明, FHL2 与 LDHA 在胶质瘤细胞中存在相互作用,其主要在细胞内区域结合。LDHA 与 FHL2 第 4 个 LIM 结构域相互作用,这为未来的靶向药物设计提供了可能的位点。

表 1 IP-MS 鉴定出的 FHL2 的潜在相互作用蛋白

蛋白名称	蛋白 ID	分数	范围/%
半乳糖凝集素-7	P47929	37	40
延伸因子 Tu	P49411	29	12
原肌球蛋白 α -1 链	P06753	28	30
肌凝蛋白调节轻链 12A	P19105	26	23
ADP/ATP 转位酶 2	P05141	21	10
S100-A8 蛋白	P05109	15	12
丙酮酸盐	P14618	12	6
LDHA 链	P00338	12	6
催乳素诱导蛋白	P12273	8	8
鸟嘌呤核苷酸结合蛋白	P47929	6	8



A: 抗体免疫沉淀蛋白的 SDS-PAGE 和银染结果; B: 在 SNB19-3flag-FHL2 细胞中, 通过外源性 Co-IP 和 WB 法检测与抗 FHL2 抗体(上图)或抗 LDHA 抗体(下图)免疫共沉淀后, FHL2 与 LDHA 之间的相互作用; C: Co-IP 检测全长 FHL2 (PCI-3×Flag-76) 和各种结构域 (PCI-3×Flag-77、78、79) 与 LDHA 的相互作用; D: 共聚焦荧光显微镜下观察 SNB19 细胞中 FHL2(绿色)和 LDHA(红色)蛋白的亚细胞定位 (DAPI 染色显示细胞核 DNA); E: TCGA 和 CGGA 患者组织中 FHL2 和 LDHA 基因之间的相关性分析。

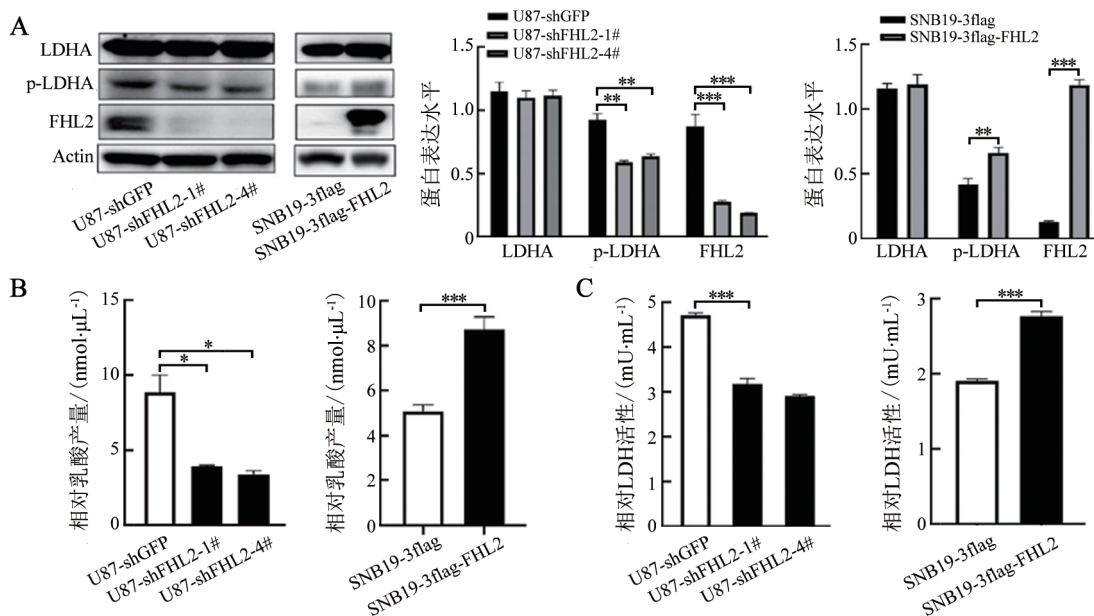
Marker: 蛋白分子量标准; Input: 全细胞裂解液组; IP: 免疫沉淀 (immunoprecipitation); IB: 免疫印迹 (immunoblotting)。

图 2 FHL2 在胶质瘤细胞中与 LDHA 相互作用

2.3 FHL2 调控胶质瘤细胞中 LDHA 的活性

WB 法检测结果(图 3A)显示,在 SNB19 细胞中过表达 FHL2 并没有改变 LDHA 的总表达量,但导致 p-LDHA(Y10)水平的上调($P < 0.01$);在 U87 细胞中,FHL2 的敲低没有影响 LDHA 的总表达,但导致了 p-LDHA(Y10)水平的下降($P < 0.01$)。结果表明,FHL2 并不调控 LDHA 的整体表达,而是特异性激活

Y10 的 LDHA。此外发现,在 U87 细胞中下调 FHL2 会导致 LDH 活性降低和乳酸产量降低($P < 0.05$, $P < 0.001$; 图 3B);在 SNB19 细胞中过表达 FHL2 会导致 LDH 活性的增加和乳酸产量的升高(均 $P < 0.001$, 图 3B)。实验结果表明,FHL2 可以调控 p-LDHA 的表达,但不影响总的 LDHA 表达水平。FHL2 可以调节乳酸的产生及 LDH 活性。



A: WB法检测下调或过表达 FHL2 对 U87 和 SNB19 细胞中 LDHA 磷酸化的影响; B: FHL2 下调对 U87 中乳酸产量和 LDH 活性水平的影响; C: FHL2 下调对 U87 细胞和 FHL2 上调对 SNB19 细胞乳酸产量和 LDH 活性水平的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 3 FHL2 表达失调对神经胶质瘤细胞中 Tyr 10 位点 LDHA 磷酸化的影响

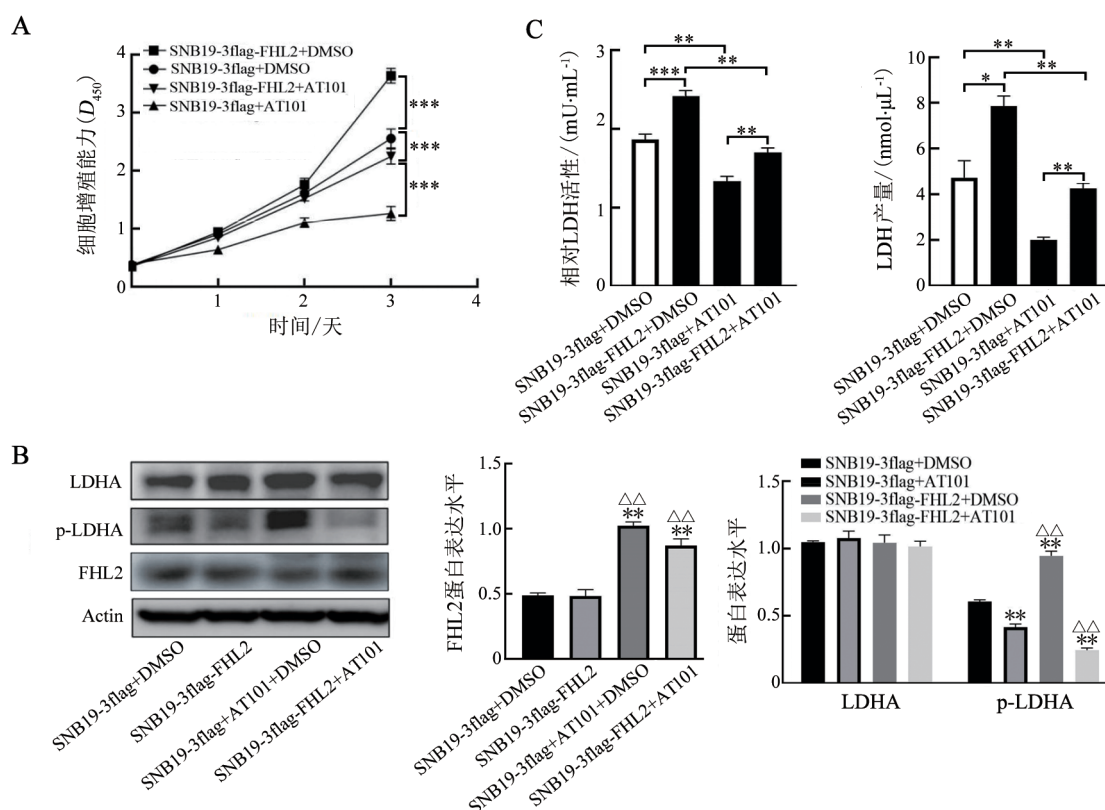
2.4 抑制 LDHA 活性可抑制 FHL2 介导的胶质瘤细胞的增殖和乳酸代谢

为确定 FHL2-LDHA 相互作用在胶质瘤细胞中的生物学意义,使用小分子抑制剂 AT101 抑制 LDHA 活性来确定其是否可以影响 FHL2 促进的胶质瘤细胞增殖。CCK-8 法(图 4A)和 WB 法(图 4B)检测结果显示,过表达 FHL2 的 SNB19 细胞增殖能力显著增强,而在 SNB19-3flag-FHL2 组中,使用 AT101 处理显著抑制了细胞增殖能力(均 $P < 0.001$);在 SNB19 细胞中过表达 FHL2 并没有改变 LDHA 的表达,但却导致了 p-LDHA(Y10)水平的升高($P < 0.01$)。然而,当 FHL2 过表达时用 AT-101 处理细胞后,FHL2 的表达保持不变,而 p-LDHA(Y10)的表达下降(图 4B)。此外,与对照组(SNB19-3flag)相比,SNB19-3xflag-FHL2 细胞表现出增强的 LDH 活性和乳酸产量($P < 0.001$, $P < 0.05$; 图 4C)。在 SNB19-3flag-FHL2+AT101 组中,LDH 活性降低,乳酸产量降低($P < 0.01$, 图 4C)。实验结果表明,FHL2 调控 LDHA 的激活有助于胶质

瘤细胞的增殖。

3 讨论

本研究发现 FHL2 在胶质瘤组织中表达上调,且与 WHO 的胶质瘤分级呈正相关,WHO 分级越高,FHL2 表达越强。FHL2 高表达与胶质瘤患者的不良预后相关,其过表达促进了体外胶质瘤细胞的增殖,提示 FHL2 的表达可能是胶质瘤的独立预后因素。为进一步研究 FHL2 的生物学功能和潜在机制,利用 IP-MS 鉴定了其结合蛋白,发现 FHL2 与 LDHA 之间的相互作用。随后的 Co-IP、WB、免疫荧光和乳酸代谢相关检测实验结果显示,FHL2 通过上调 LDH 活性促进乳酸代谢,从而增强胶质瘤中的 Warburg 效应。此外,还发现 FHL2 和 LDHA 共同定位于细胞内区域。虽然 FHL2 并不调控 LDHA 的整体表达,但它可以增强 LDHA 的活性形式 p-LDHA(Y10)的表达。FHL2 通过促进 LDH 的活性来实现这一目标,从而导致乳酸产量的增加。



A: CCK-8法检测SNB19-NC、SNB19-FHL2和SNB19-FHL2+AT101(5 μmol/L)组的细胞增殖活力; B: WB法检测上述四组中p-LDHA(Y10)和LDHA的表达水平,与SNB19-3flag+DMSO组相比,**P<0.01;与SNB19-3flag+AT-101组相比,△△P<0.01; C:酶标仪比色法测定上述4组细胞的LDH活性和乳酸产量,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。

图4 小分子抑制剂AT-101通过抑制LHDA的磷酸化,抑制FHL2促进胶质瘤细胞增殖

在正常分化的细胞中,细胞能量的产生主要依赖于线粒体氧化磷酸化,而大多数肿瘤细胞依赖于有氧糖酵解,被称为“Warburg效应”^[18]。在肿瘤细胞的代谢中很容易观察到不受控制或异常活化的糖酵解,糖酵解相关蛋白和酶活性水平明显增强^[19]。Warburg效应在胶质瘤的发生中起着至关重要的作用。有研究结果^[20]表明,Warburg效应与GBM的预后和免疫微环境有关,因此,靶向Warburg效应相关基因可能提供新的治疗选择。GBM细胞中构成性激活的AKT可以促进糖酵解速率的增加,而不改变培养基中的耗氧量^[20]。LDHA是一个参与有氧和厌氧糖酵解的细胞质酶(Warburg效应)。然而,LDHA并不仅仅是一种代谢基因,直接或间接地参与维持各种肿瘤的生长、侵袭和转移^[21]。本研究结果表明,FHL2调节LDHA的活性形式——p-LDHA控制LDH的活性。既往研究^[22]表明,小分子抑制剂AT101是棉酚的右旋对映体,可通过抑制Bcl-2蛋白、诱导线粒体功能障碍,诱导自噬、有丝分裂、凋亡等多种细胞过程,并与替莫唑胺具有协同作用。本实验结果表明,AT101抑制FHL2对细胞的增殖作用,下调FHL2诱导的p-LDHA水平升高,从而抑制胶质瘤中的乳酸代谢和Warburg效应。

由于FHL2本身缺乏蛋白激酶活性,不能直接磷酸化LDHA,因此可能在FHL2和LDHA之间存在第三种具有激酶活性的蛋白。本实验排除了FGFR1、SRC和HER2(未发表的数据),但尚未确定负责LDHA磷酸化激活的蛋白。在未来的实验中,将继续研究FHL2和LDHA之间的新的相互作用,它调节了胶质瘤中的Warburg效应。使用LDHA小分子抑制剂AT101进一步验证FHL2在促进Warburg效应中的作用具有潜在的临床意义。

[参考文献]

[1] MORGAN M J, WHAWELL S A. The structure of the human LIM protein ACT gene and its expression in tumor cell lines[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273(2): 776-783. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3006.

[2] CAO C Y, MOK S W F, CHENG V W S, *et al.* The FHL2 regulation in the transcriptional circuitry of human cancers[J]. *Gene*, 2015, 572(1): 1-7. DOI: 10.1016/j.gene.2015.07.043.

[3] SALA S, OAKES P W. LIM domain proteins[J]. *Curr Biol*, 2023, 33(9): R339-R341. DOI: 10.1016/j.cub.2023.03.030.

[4] ANDERSON C A, KOVAR D R, GARDEL M L, *et al.* LIM domain proteins in cell mechanobiology[J]. *Cytoskeleton*,

- 2021, 78(6): 303-311. DOI: 10.1002/cm.21677.
- [5] BOATENG L R, BENNIN D, DE OLIVEIRA S, *et al.* Mammalian actin-binding protein-1/hip-55 interacts with FHL2 and negatively regulates cell invasion[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(27): 13987-13998. DOI: 10.1074/jbc.M116.725739.
- [6] CANAULT M, TELLIER E, BONARDO B, *et al.* FHL2 interacts with both ADAM-17 and the cytoskeleton and regulates ADAM-17 localization and activity[J]. *J Cell Physiol*, 2006, 208(2): 363-372. DOI: 10.1002/jcp.20671.
- [7] LUAN X R, ZHAI J Y, LI S, *et al.* Downregulation of FHL2 suppressed trophoblast migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in recurrent miscarriage[J/OL]. *Reprod Biomed Online*, 2024, 48(1): 103342[2023-12-14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37945432/>. DOI: 10.1016/j.rbmo.2023.103342.
- [8] LU Y, CAI G Y, CUI S Y, *et al.* FHL2-driven molecular network mediated Septin2 knockdown inducing apoptosis in mesangial cell[J]. *Proteomics*, 2014, 14(21/22): 2485-2497. DOI: 10.1002/pmic.201400252.
- [9] LIU Z H, HAN S S, WANG Y, *et al.* The LIM-only protein FHL2 is involved in autophagy to regulate the development of skeletal muscle cell[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(4): 838-846. DOI: 10.7150/ijbs.31371.
- [10] KIM S Y, VÖLKL S, LUDWIG S, *et al.* Deficiency of Fhl2 leads to delayed neuronal cell migration and premature astrocyte differentiation[J/OL]. *J Cell Sci*, 2019, 132(6): jcs228940[2023-12-14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30745335/>. DOI: 10.1242/jcs.228940.
- [11] XIE Z Q, XU Y, WEI X J, *et al.* Four and a half LIM domains protein 2 mediates bortezomib-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in multiple myeloma through p53 signaling and β -catenin nuclear enrichment[J/OL]. *Front Oncol*, 2021, 11: 729799[2023-12-14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34589431/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.729799.
- [12] PAN B, WAN L, LI Y, *et al.* Comprehensive pan-cancer analysis identifies FHL2 associated with poor prognosis in lung adenocarcinoma[J]. *Transl Cancer Res*, 2023, 12(6): 1516-1534. DOI: 10.21037/tcr-22-2786.
- [13] LOUIS D, PERRY A, REIFENBERGER G, *et al.* The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary[J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131(6): 803-820. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- [14] YANG K Y, WU Z J, ZHANG H, *et al.* Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches[J/OL]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 39[2023-12-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8822752/>. DOI: 10.1186/s12943-022-01513-z.
- [15] SUN L L, YU S Y, XU H, *et al.* FHL2 interacts with EGFR to promote glioblastoma growth[J]. *Oncogene*, 2018, 37: 1386-1398. DOI: 10.1038/s41388-017-0068-0.
- [16] LI M, WANG J D, NG S S M, *et al.* The four-and-a-half-LIM protein 2 (FHL2) is overexpressed in gliomas and associated with oncogenic activities[J]. *Glia*, 2008, 56(12): 1328-1338. DOI: 10.1002/glia.20701.
- [17] VALVONA C J, FILLMORE H L, NUNN P B, *et al.* The regulation and function of lactate dehydrogenase A: therapeutic potential in brain tumor[J]. *Brain Pathol*, 2016, 26(1): 3-17. DOI: 10.1111/bpa.12299.
- [18] VANDER HEIDEN M G, CANTLEY L C, THOMPSON C B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation[J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-1033. DOI: 10.1126/science.1160809.
- [19] FUKUSHI A, KIM H D, CHANG Y C, *et al.* Revisited metabolic control and reprogramming cancers by means of the Warburg effect in tumor cells[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 10037[2023-12-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9456516/>. DOI: 10.3390/ijms231710037.
- [20] ZHANG R, WANG C, ZHENG X H, *et al.* Warburg effect-related risk scoring model to assess clinical significance and immunity characteristics of glioblastoma[J/OL]. *Cancer Med*, 2023, 12(21): 20639-20654[2023-12-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10660605/>. DOI: 10.1002/cam4.6627.
- [21] HOSIOS A M, MANNING B D. Cancer signaling drives cancer metabolism: AKT and the Warburg effect[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(19): 4896-4898. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-2647.
- [22] CAYLIOGLU D, MEYER R J, HELLMOLD D, *et al.* Effects of the anti-tumorigenic agent AT101 on human glioblastoma cells in the microenvironmental glioma stem cell niche[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3606[2023-12-14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33808494/>. DOI: 10.3390/ijms22073606.

[收稿日期] 2023-12-15

[修回日期] 2024-05-30

[本文编辑] 党瑞山