

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research代谢酶 PGK1 琥珀酰化修饰位点突变载体
构建及其在 HEK - 293T 细胞中表达的研究Research on the construction of metabolizing enzyme PGK1 succinylation modification
site mutation vector and its expression in HEK - 293T cells王瑶瑶^{1a}, 刘立琨^{1b}, 高秀丽^{1b},
朱文斌^{1b}, 郝经纬^{1a}, 岳丽玲^{1b}(1. 齐齐哈尔医学院, a. 医学技术学院; b. 医药
科学研究院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)WANG Yao - yao^{1a}, LIU Li - kun^{1b},
GAO Xiu - li^{1b}, ZHU Wen - bin^{1b},
HAO Jing - wei^{1a}, YUE Li - ling^{1b}(1. a. School of Medical Science and
Technology; b. Research Institute of
Medicine and Pharmacy, Qiqihar Medical
University, Qiqihar 161006, Heilongjiang
Province, China)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目
(81972491); 黑龙江省自然科学基金
资助项目 (H2022H108); 黑龙江
省博士后面上基金资助项目 (LBH -
Z22295); 齐齐哈尔医学院研究生创
新基金资助项目 (QYYCX2022 - 17)

作者简介: 王瑶瑶 (1994 -), 女, 硕士研究生,
主要从事肿瘤发病机制的相关研究

通信作者: 岳丽玲, 教授, 博士生导师

Tel: (0452) 2663715

E - mail: yuell1025@126.com

摘要:目的 通过构建磷酸甘油酸激酶 1 (PGK1) 过表达载体 (PGK1 - WT) 及 4 个赖氨酸位点琥珀酰化突变载体, 实现其在人胚肾 HEK - 293T 细胞中过表达并筛选 PGK1 琥珀酰化关键位点。方法 用 GEPIA2 数据库分析正常乳腺组织 (291 例) 和乳腺癌组织 (135 例) 中 PGK1 mRNA 的表达情况, 以及 PGK1 表达水平与乳腺癌患者总生存率的关系; 用蛋白质修饰组学检测 4 株三阴性乳腺癌 (TNBC) 细胞系 (MDA - MB - 436、MDA - MB - 468、MDA - MB - 231、BT - 549) 及正常乳腺上皮细胞 (MCF - 10A) 中蛋白质琥珀酰化水平; 用点突变试剂盒构建 K11、K131、K323、K361 琥珀酰化正、负向突变载体。实验分为 NC 组、shPGK1 - 496 组、shPGK1 - 220 组、PGK1 - WT 组及 K11、K131、K323、K361 位点正、负向突变体组。用实时荧光定量聚合酶链反应检测 NC 组、shPGK1 - 496 组和 shPGK1 - 220 组的 PGK1 mRNA 表达情况; 用蛋白质印迹法检测 NC 组、shPGK1 - 496 组和 shPGK1 - 220 组 PGK1 蛋白的表达情况及 NC 组、PGK1 - WT 组及 4 个位点正、负向突变体组的 Flag 表达情况, 并通过免疫共沉淀检测 PGK1 琥珀酰化关键位点。结果 与正常乳腺组织相比, PGK1 mRNA 水平在乳腺癌组织中高表达, 且 PGK1 高表达的乳腺癌患者生存期较短。TNBC 细胞中 PGK1 的 4 个赖氨酸位点呈高琥珀酰化。NC 组、shPGK1 - 496 组和 shPGK1 - 220 组的 PGK1 mRNA 相对表达水平分别为 1.03 ± 0.23 、 0.15 ± 0.11 和 1.42 ± 0.69 , PGK1 蛋白相对表达水平分别为 1.08 ± 0.05 、 0.49 ± 0.05 和 1.28 ± 0.01 , shPGK1 - 496 组的上述指标与 NC 组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。NC 组、PGK1 - WT 组及 K11、K131、K323 位点正、负向突变体组的 Flag 蛋白相对表达水平分别为 0 、 3.43 ± 0.09 、 3.28 ± 0.10 、 2.28 ± 0.11 、 3.03 ± 0.03 、 2.79 ± 0.11 、 3.29 ± 0.09 和 2.98 ± 0.04 , PGK1 - WT 组及 K11、K131、K323 位点正、负向突变体组与 NC 组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。NC 组、PGK1 - WT 组及 K361 正、负向突变体组的 Flag 蛋白相对表达水平分别为 0 、 2.58 ± 0.11 、 3.04 ± 0.02 和 4.04 ± 0.10 , PGK1 - WT 组及 K361 正、负向突变体组与 NC 组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。IgG 组、PGK1 - WT 组及 K11、K131、K323、K361 位点负向突变体组的赖氨酸琥珀酰化水平分别为 0 、 1.53 ± 0.12 、 1.30 ± 0.18 、 1.29 ± 0.09 、 1.23 ± 0.03 和 0.89 ± 0.16 , K361 负向突变体组与 PGK1 - WT 组比较, 在统计学上差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 TNBC 细胞中 PGK1 4 个赖氨酸位点呈高琥珀酰化, 且 K361 位点是其琥珀酰化的关键位点。

关键词: 磷酸甘油酸激酶 1; 琥珀酰化; 突变体; 翻译后修饰

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.09.006

中图分类号: R97

文献标志码: A

文章编号: 1001 - 6821 (2025) 09 - 1229 - 07

Abstract: Objective To achieve overexpression of phosphoglycerate

kinase 1 (PGK1) in HEK-293T cells and screen the key site of its succinylation through constructing PGK1 overexpression vector (PGK1-WT) and four lysine site succinylation mutation vectors. **Methods** GEPIA2 database was used to analyze the expression of PGK1 mRNA in normal breast tissue (291 cases) and breast cancer tissue (135 cases) and the relationship between PGK1 expression level and the overall survival rate of breast cancer patients. Protein modification proteomics was used to detect the levels of protein succinylation in four triple negative breast cancer (TNBC) cell lines (MDA-MB-436, MDA-MB-468, MDA-MB-231, BT-549) and normal breast epithelial cells (MCF-10A); the succinylated positive and negative mutation vectors of K11, K131, K323, K361 were constructed with point mutation kit. The experiment was divided into NC, shPGK1-496, shPGK1-220, PGK1-WT groups and positive and negative mutant groups of K11, K131, K323 and K361. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect the level of expression of PGK1 mRNA in NC, shPGK1-496 and shPGK1-220 groups. The expression levels of PGK1 proteins in NC, shPGK1-496 and shPGK1-220 groups, and the expression levels of Flag proteins in NC, PGK1-WT and four sites in positive and negative mutant groups were detected by Western blot. The key site of PGK1 succinylation was detected by co-immunoprecipitation. **Results** Compared with normal breast tissues, the level of PGK1 mRNA was highly expressed in breast cancer tissue, and the survival time of breast cancer patients with high PGK1 expression was shorter. Four lysine sites of PGK1 in TNBC cells were hypersuccinylated. The relative expression levels of PGK1 mRNA in NC, shPGK1-496 and shPGK1-220 groups were 1.03 ± 0.23 , 0.15 ± 0.11 and 1.42 ± 0.69 , respectively; the relative expression levels of PGK1 protein were 1.08 ± 0.05 , 0.49 ± 0.05 and 1.28 ± 0.01 respectively; compared with NC group, the above indexes in shPGK1-496 group were statistically different (all $P < 0.01$). The relative expression levels of Flag protein in NC group, PGK1-WT group and positive and negative mutant groups of K11, K131, K323 site were 0 , 3.43 ± 0.09 , 3.28 ± 0.10 , 2.28 ± 0.11 , 3.03 ± 0.03 , 2.79 ± 0.11 , 3.29 ± 0.09 and 2.98 ± 0.04 , respectively; compared with the NC group, PGK1-WT group and the positive and negative mutant groups of K11, K131 and K323 had statistical differences (all $P < 0.01$). The relative expression levels of Flag protein in NC group, PGK1-WT group and K361 positive and negative mutant group were 0 , 2.58 ± 0.11 , 3.04 ± 0.02 and 4.04 ± 0.10 , respectively; compared with NC group, PGK1-WT group and K361 positive and negative mutant group had statistical significance (all $P < 0.01$). The levels of lysine succinylation in IgG group, PGK1-WT group and negative mutant groups of K11, K131, K323, K361 were 0 , 1.53 ± 0.12 , 1.30 ± 0.18 , 1.29 ± 0.09 , 1.23 ± 0.03 and 0.89 ± 0.16 , respectively; compared with PGK1-WT group, the negative mutant group of K361 had statistical significance ($P < 0.01$). **Conclusion** The four lysine sites of PGK1 in TNBC cells are highly succinylated, and K361 site is critical to their succinylation.

Key words: phosphoglycerate kinase 1; succinylation; mutant; post-translational modification

美国癌症协会发布的数据显示,乳腺癌、肺癌及结肠癌占所有新生病例的51%,其中乳腺癌就占据32%^[1]。蛋白质翻译后修饰(post-translational modifier, PTM)通过共价结合将化学基团添加或去除至氨基酸侧链上^[2],从而调节肿瘤细胞多种生物学功能,参与多种实体瘤发生发展^[3]。琥珀酰化修饰是一种新型的PTM,是琥珀酰基供体通过酶促或非酶促的方式共价结合到赖氨酸残基上的过程^[4]。磷酸甘油酸激酶1(phosphoglycerate kinase 1, PGK1)是糖酵解途径中第1个产生腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)的代谢酶,主要功能是催化1,3-二磷酸甘油酸转变为3-磷酸甘油酸^[5]。本研究通过蛋白质修饰组学检测发现在三阴性乳腺癌(triple-negative breast

cancer, TNBC)中PGK1赖氨酸4个位点呈高琥珀酰化,通过构建PGK1-WT及4个位点琥珀酰化正、负向突变载体,实现其在HEK-293T细胞中表达并筛选出PGK1发生琥珀酰化的关键位点。

材料与方法

1 材料

细胞株 人乳腺癌MDA-MB-436、MDA-MB-468细胞、人胚肾HEK-293T细胞、人乳腺上皮MCF-10A细胞,均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;人乳腺癌MDA-MB-231、BT-549细胞,均购自中国科学院上海细胞库。

试剂 胎牛血清,购自美国Clark公司;DMED高

糖培养液,购自武汉普诺赛生命科技有限公司;基因定点突变试剂盒,均购自上海碧云天公司;Opti-MEM 培养液、Lip3000 转染试剂盒,均购自美国 Invitrogen 公司;PVDF 膜,购自德国 Millipore 公司;一抗、二抗,均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;超敏 ECL 化学发光试剂盒,购自中国 Biosharp 公司;引物,均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成。

仪器 ChemiDoc MP 全能型成像系统、C1000 Touch 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪,均为美国 Bio-Rad 公司产品;Biospec-nano 紫外可见分光光度计,日本岛津公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[6]

将人乳腺癌 MDA-MB-436、MDA-MB-468、MDA-MB-231 细胞置于含有 10% 胎牛血清的 L-15 培养基中,放置在无 CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养;将人乳腺上皮 MCF-10A 细胞、人胚肾 HEK-293T 细胞置于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,人乳腺癌 BT-549 细胞置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,将上述细胞置于含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养。

2.2 生物信息学分析

通过 GEPIA2 数据库分析在正常乳腺组织(291 例)和乳腺癌组织(135 例)中 *PGK1* mRNA 表达情况及 *PGK1* 表达水平与乳腺癌患者总生存率的关系。

2.3 蛋白质修饰组学检测

收集 4 株 TNBC 细胞系(MDA-MB-436、MDA-MB-468、MDA-MB-231、BT-549)及正常乳腺上皮细胞(MCF-10A)送至杭州景杰生物公司进行蛋白质修饰组学的测定。

2.4 模型构建^[7]

用 pcDNA3.0 载体构建含人 *PGK1* 基因(NM_000291.4)全长序列的过表达载体(*PGK1*-WT);用点突变试剂盒构建 K11、K131、K323、K361 位点模拟琥珀酰化正向突变体[赖氨酸(K)突变成谷氨酸(E)]和模拟去琥珀酰化负向突变体[赖氨酸(K)突变成精氨酸(R)];用慢病毒包装后转染人胚肾 HEK-293T 细胞,并用嘌呤霉素进行筛选,获得稳定低表达 *PGK1* 的 HEK-293T 细胞系。

2.5 细胞分组与处置方法

稳定敲低 *PGK1* 基因的人胚肾 HEK-293T 细胞系(sh*PGK1*-293T)由本实验室构建。实验分为 NC 组、*PGK1*-WT 组、*PGK1*-K11E 组、*PGK1*-K11R

组、*PGK1*-K131E 组、*PGK1*-K131R 组、*PGK1*-K323E 组、*PGK1*-K323R 组、*PGK1*-K361E 组及 *PGK1*-K361R 组。用 Lip3000 转染试剂盒在 sh*PGK1*-293T 细胞中瞬时转染适量 pcDNA3.0、*PGK1*-WT 及 4 个位点正、负向突变质粒。

2.6 基因测序法检测构建 *PGK1*-WT 野生型及 *PGK1* 各修饰位点突变载体的表达情况^[8]

根据前期构建 *PGK1*-WT 载体为模板,通过基因定点突变试剂盒构建 K11、K131、K323 及 K361 各修饰位点突变体。扩增条件:①95 °C 变性 5 min;②95 °C 变性 1 min,65 °C 退火 1 min,68 °C 延伸 10 min,上述步骤重复 20 个循环;③68 °C 延伸 15 min。待 PCR 反应结束后,直接在 PCR 反应体系中加入 Dpn I 1 μL,混匀后,37 °C 孵育 1 h。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳并通过凝胶成像仪进行凝胶成像。

2.7 实时荧光定量 PCR 检测 *PGK1* mRNA 的表达情况^[9]

用 TRIzol 法提取 HEK-293T 细胞总 RNA,按照逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。以 β-肌动蛋白(*β-actin*)基因作为内参对照进行 PCR 扩增。反应条件:94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 5 min,反应总体积为 80 μL。实时荧光定量 PCR 检测 NC 组、sh*PGK1*-496 组和 sh*PGK1*-220 组中 *PGK1* mRNA 的表达情况。

2.8 蛋白质印迹法检测 sh*PGK1*-293T 细胞系敲低 *PGK1* 效果及 *PGK1*-WT 和 4 个位点正、负突变体转染效率^[10]

收集转染对照载体、*PGK1*-WT 及正、负向突变型的 HEK-293T 细胞,加入适量 NP40 细胞裂解液于冰上充分裂解,在 4 °C 下,以 $1.2 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液,用 BCA 检测试剂盒检测总蛋白浓度。取蛋白 20~40 μg,在 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳中进行分离,并转移至 PVDF 膜,用含 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,清洗后,加入一抗,4 °C 孵育过夜,清洗后,加入相应二抗,室温标记 2 h,ECL 显影,用凝胶成像分析系统成像。用 Image Lab 软件分析 NC 组、sh*PGK1*-496 组、sh*PGK1*-220 组的 *PGK1* 条带灰度值,以 *PGK1*/β-actin 灰度值比值表示 *PGK1* 敲低效果;分析 NC 组、*PGK1*-WT 组及 4 个位点正、负向突变体组的 Flag 条带灰度值,以 Flag/β-actin 灰度值比值表示 *PGK1*-WT 及 4 个位点正、负向突变体的转染效率。

2.9 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)法检测 *PGK1* 发生琥珀酰化的关键位点^[10]

收集 *PGK1*-WT 及 4 个位点负向突变型的

HEK-293T细胞,按“2.8”的步骤提取蛋白,每组样品加入Flag磁珠25 μL 置于静音混匀仪上于4 $^{\circ}\text{C}$ 下摇过夜。次日,收集磁珠加入适量蛋白上样缓冲液于95 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中煮沸5 min,取蛋白30 μg 进行电泳。用Image Lab软件分析PGK1-WT组、PGK1-K11R组、PGK1-K131R组、PGK1-K323R组及PGK1-K361R组琥珀酰化条带灰度值,以Succ-K/Flag灰度值比值表示PGK1琥珀酰化水平。

3 统计学处理

用GraphPad Prism 8软件进行统计分析。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用LSD- t 法。

结 果

1 PGK1在TNBC中呈高表达及与预后不良相关

首先通过生物信息学分析发现与正常乳腺组织相比,PGK1 mRNA在乳腺癌组织中高表达,且PGK1 mRNA高表达的TNBC患者生存期较短,见图1A/B。

2 TNBC细胞中PGK1 4个赖氨酸位点呈高琥珀酰化修饰

4株TNBC细胞(MDA-MB-436、MDA-MB-468、MDA-MB-231、BT-549)及正常乳腺上皮细胞(MCF-10A)的蛋白质修饰组学检测结果发现,PGK1在TNBC中4个位点(K11、K131、K323、K361)高琥珀酰化,见表1。4株TNBC细胞中蛋白质琥珀酰化水平,见图2。

3 成功构建PGK1-WT表达载体

用PCR仪扩增PGK1全长序列,1%琼脂糖凝胶显示PGK1扩增成功,见图3A。将PGK1全长序列与pcDNA3.0载体连接,1%琼脂糖凝胶显示在6 654 bp处出现明显条带,见图3B。经双酶切初步鉴定PGK1-WT构建成功,见图3C。基因测序结果显示PGK1-WT表达载体构建成功,见图3D。

4 成功构建K11、K131、K323、K361正向和负向突变载体

将构建成功的WT、K11、K131、K323、K361突变体用琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,在6 654 bp位置出现明显条带,见图4A。经双酶切初步鉴定突变体构建成功,见图4B。基因测序结果显示4个位点正负向突变体构建成功,见图4C-J。

5 WT及突变体在HEK-293T细胞中成功表达且K361是PGK1发生高琥珀酰化的关键位点

NC组、shPGK1-496组和shPGK1-220组的PGK1 mRNA相对表达水平分别为 1.03 ± 0.23 、 0.15 ± 0.11 和 1.42 ± 0.69 ,PGK1蛋白相对表达水平分别为 1.08 ± 0.05 、 0.49 ± 0.05 和 1.28 ± 0.01 ,shPGK1-496组的上述指标与NC组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),见图5A。

NC组、PGK1-WT组及K11、K131、K323位点正、负向突变体组的Flag蛋白相对表达水平分别为

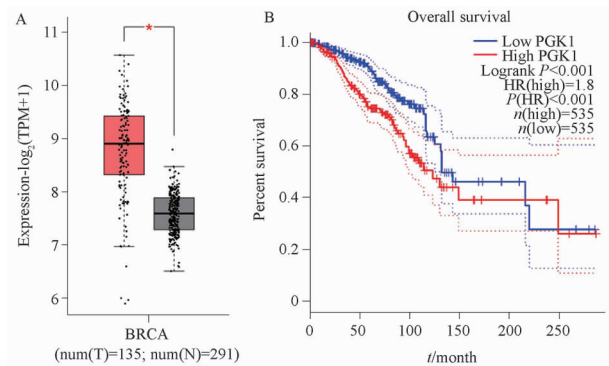


图1 磷酸甘油酸激酶1(PGK1)在三阴性乳腺癌(TNBC)中的表达及与预后的关系

Figure 1 Expression of phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) in triple-negative breast cancer (TNBC) and its relationship with prognosis

BRCA: Breast cancer susceptibility gene; A: GEPIA2 database was used to analyze the mRNA level of PGK1 in TNBC; B: GEPIA2 database was used to analyze the relationship between PGK1 and overall survival of TNBC breast cancer patients.

表1 4株三阴性乳腺癌细胞中PGK1琥珀酰化位点及修饰水平的检测($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Detection of succinylation sites and modification levels of PGK1 in four strains of triple negative breast cancer cells ($\bar{x} \pm s$)

Cell line type	n	Relative PGK1 of amino acid position succinylation levels ratio (fold change ≥ 1.5)			
		K11	K131	K323	K361
MDA-MB-231	9	1.48 ± 0.18	1.62 ± 0.15	1.69 ± 0.17	1.76 ± 0.04
MDA-MB-436	9	4.62 ± 0.59	4.23 ± 0.31	4.18 ± 0.46	5.29 ± 0.59
MDA-MB-468	9	3.03 ± 0.66	3.33 ± 0.51	2.97 ± 0.44	5.01 ± 0.17
BT-549	9	2.71 ± 0.32	2.39 ± 0.51	2.46 ± 0.50	3.66 ± 0.40

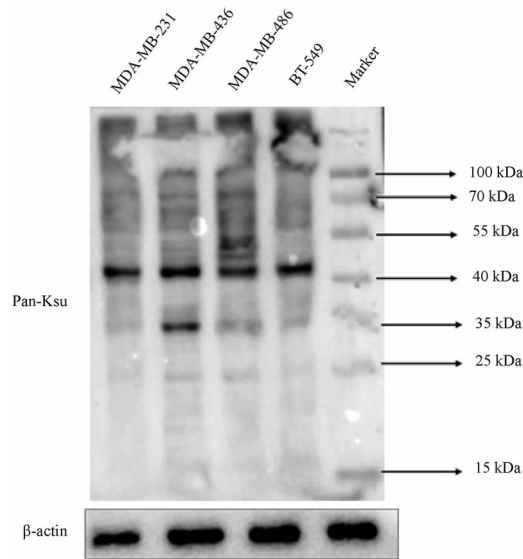


图2 4株TNBC细胞株中蛋白质琥珀酰化水平

Figure 2 Protein succinylation levels in four TNBC cell lines

0.343 ± 0.09, 3.28 ± 0.10, 2.28 ± 0.11, 3.03 ± 0.03, 2.79 ± 0.11, 3.29 ± 0.09 和 2.98 ± 0.04, PGK1 - WT 组及 K11、K131、K323 位点正、负向突变体组与 NC 组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),见图 5B。

NC 组、PGK1 - WT 组及 K361 正、负向突变体组的 Flag 蛋白相对表达水平分别为 0.258 ± 0.11、3.04 ± 0.02 和 4.04 ± 0.10, PGK1 - WT 组及 K361 正、负向突变体组与 NC 组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),见图 5C。

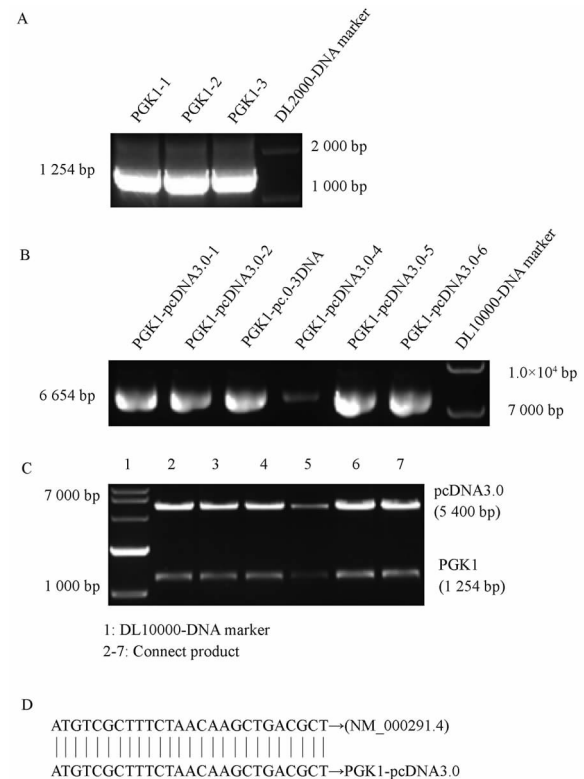


图3 PGK1 - WT 表达载体构建及鉴定

Figure 3 PGK1 - WT expression vector construction and characterization

A: Agarose gel electrophoresis was used to detect the position of PGK1 polymerase chain reaction (PCR) product; B: Agarose gel electrophoresis was used to detect the position of PGK1 - WT product; C: Agarose gel electrophoresis was used to detect the position of PGK1 - WT double enzyme cleavage product; D: Sequencing results of PGK1 - WT product.

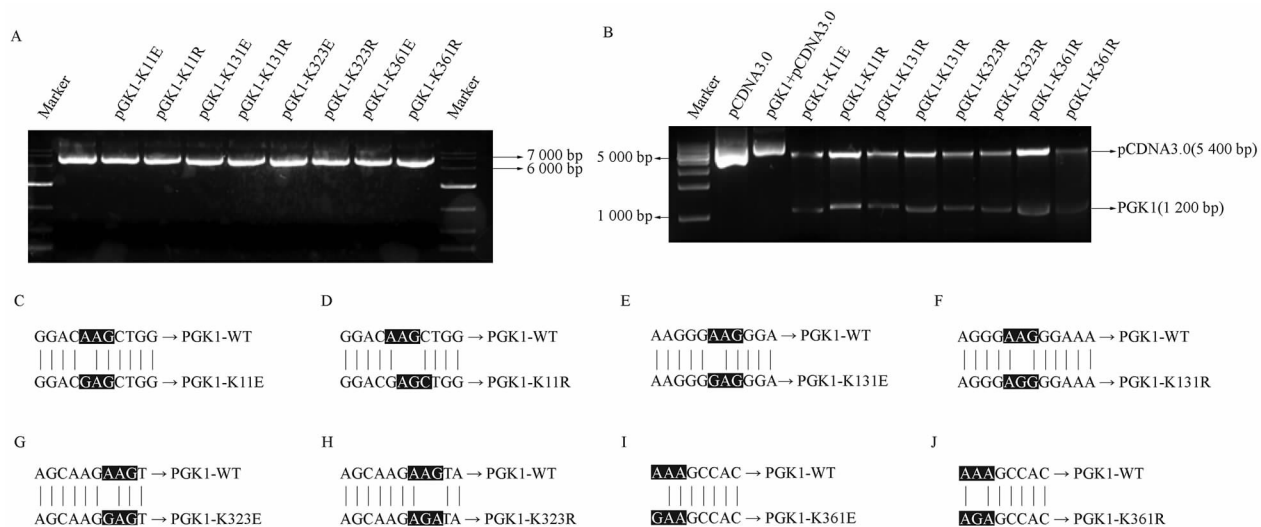


图4 K11、K131、K323、K361 位点琥珀酰化正向、负向突变质粒构建及鉴定

Figure 4 Construction and characterization of succinylated positive and negative mutant plasmids at K11, K131, K323 and K361 loci

A: Agarose gel electrophoresis was used to detect the position of WT and the four loci mutant plasmids; B: Agarose gel electrophoresis was used to detect the position of the four loci mutant plasmids after double enzyme digestion of the products; C, E, G, I: Lysine at position K11, K131, K323, K361 of PGK1 was mutated to glutamic acid to mimic succinimidyl modification, respectively; D, F, H, J: Lysine at position K11, K131, K323, K361 of PGK1 was mutated to arginine without succinimidyl modification, respectively.

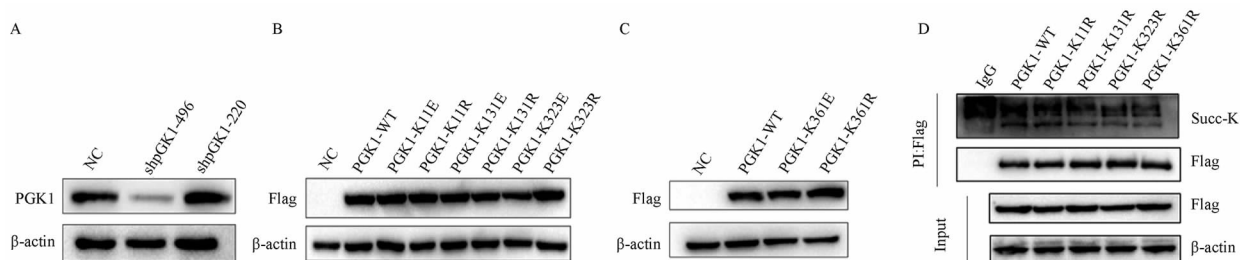


图5 用蛋白质印迹法检测 PGK1 - WT 及 4 个位点正、负向突变体瞬转至 HEK - 293T 细胞中的转染效率及免疫共沉淀检测 4 个负向突变体琥珀酰化水平

Figure 5 Transfection efficiency of positive and negative mutants of PGK1 - WT and four loci transiently transfected into HEK - 293T cells by Western blot and succinylation levels of the four negative mutants by co - immunoprecipitation

A: Detection of the effect of knockdown of PGK1 in HEK - 293T cells by Western blot; B: Detection of the transfection efficiency of PGK1 - WT, K11E, K11R, K131E, K131R, K323E, K323R transiently transfected into HEK - 293T cells by Western blot; C: Detection of transfection efficiency of PGK1 - WT, K361E and K361R transiently transfected into HEK - 293T cells by Western blot; D: Succinylation levels in four site - negative mutants by co - immunoprecipitation assay.

IgG 组、PGK1 - WT 组及 K11、K131、K323、K361 位点负向突变体组赖氨酸琥珀酰化水平的蛋白表达水平分别为 0 、 1.53 ± 0.12 、 1.30 ± 0.18 、 1.29 ± 0.09 、 1.23 ± 0.03 和 0.89 ± 0.16 ，K361 位点负向突变体组与 PGK1 - WT 组比较，在统计学上差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，见图 5D。

讨 论

2022 年中国恶性肿瘤新发病例约为 482.47 万，其中女性乳腺癌新发病例数 35.72 万，占总病例数 7.4%。乳腺癌已经严重威胁女性生命健康。TNBC 的特点是具有较强侵袭性，易出现远端转移，对标准激素疗法和靶向干预人表皮生长因子受体 - 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 都具有较强耐药性，这无非给临床治疗带来极大困难。

近年来，研究表明，肿瘤表观遗传修饰的改变成为引发癌症的主要原因之一^[6-7]。表观遗传修饰可以控制基因激活与沉默，参与疾病的发生发展^[8-10]。PTM 与表观遗传修饰不同，其可以调节蛋白质活性、亚细胞定位、自身结构与稳定性及与其他生物大分子之间的相互作用^[11-13]，其是发生在氨基酸侧链的共价修饰，参与激活免疫细胞、信号传导、免疫应答及肿瘤代谢重编程^[14]。琥珀酰化修饰是一种新型的 PTM，是琥珀酰基团供体通过酶促或非酶促方式将琥珀酰基团共价的结合到赖氨酸残基上^[15]。由于琥珀酰化赖氨酸基团被赋予 2 个负电荷，高于乙酰化和单甲基化引发的电荷改变，因此琥珀酰化修饰引起蛋白质结构和功能发生巨大改变^[16-17]。

代谢重编程是恶性肿瘤细胞生长过程中重要的

特征之一。当肿瘤细胞受到外部因素刺激后，通过改变其代谢能力（如脂质代谢、糖代谢、氨基酸代谢等）来抵御外部压力，满足其快速增长时所需大量的 ATP 及各类营养物质^[18-19]。PGK1 是糖酵解途径中第 1 个产生 ATP 的代谢酶，催化 1,3 - 二磷酸甘油酸 (1,3 - diphosphoglyceric acid, 1,3 - BPG) 生成 3 - 磷酸甘油酸 (3 - phosphoglyceric acid, 3 - PG) 和 ATP^[20]。PGK1 在多种恶性肿瘤中呈高表达，例如在结肠癌、胃癌中，PGK1 表达量增加且与肿瘤细胞转移、侵袭密切相关^[21-22]。不仅如此，PGK1 还存在多种翻译后修饰，PGK1 相关的翻译后修饰参与肿瘤的发生发展，引起肿瘤细胞代谢重编程。例如 PGK1 K220 位点发生乙酰化时，可以通过阻断 PGK1 与底物的结合抑制其自身酶活，从而影响肿瘤细胞的生长^[23]；PGK1 T255 位点发生糖基化时，可以激活自身酶活，促进乳酸生成，且诱导 PGK1 易位到线粒体^[24]；在肾癌组织中 PGK1 的赖氨酸琥珀酰化修饰水平呈明显上调趋势，且对肾癌细胞的增殖及迁移能力具有重要的调控作用^[25]。

本研究提示：PGK1 在 TNBC 中呈高表达且与预后不良相关且 PGK1 多个位点发生高琥珀酰化，为了深入探究 PGK1 琥珀酰化具体机制，本课题组构建了模拟琥珀酰化与去琥珀酰化的正负向突变体，通过将正向和负向突变载体瞬转到 HEK - 293T 细胞中且 IP 检测发现 PGK1 发生高琥珀酰化的关键位点即 PGK1 - K361 位点。这不仅为探究 PGK1 翻译后修饰调控代谢酶的功能提供前期实验依据，更为乳腺癌治疗提供潜在的治疗靶点，为临床医学诊断提供新思路。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(1):12—49.
- [2] WALSH C T, GARNEAU - TSODIKOVA S, GATTO G J. Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44(45):7342—7372.
- [3] 孟阳, 马毓阳, 陈明聪, 等. 赖氨酸琥珀酰化: 心血管疾病治疗的新视角[J]. *中国医学科学院学报*, 2024, 46(3):435—443.
- [4] LI Y, ZHANG R, HEI H. Advances in post - translational modifications of proteins and cancer immunotherapy [J/OL]. *Front Immunol*, 2023, 14:1229397. 2023 - 08 - 22 [2024 - 03 - 09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37675097/>.
- [5] DUNCAN L, SHAY C, TENG Y. PGK1: An essential player in modulating tumor metabolism [J/OL]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2343:57—70. 2021 - 09 - 03 [2024 - 03 - 09]. https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1558-4_4.
- [6] AHMED D, EIDE P W, EILERTSEN I A, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines [J/OL]. *Oncogenesis*, 2013, 2(9):e71. 2013 - 09 - 16 [2024 - 03 - 09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24042735/>.
- [7] 许雪萌, 崔适文, 张文龙, 等. 表观遗传修饰在肿瘤代谢重编程中的作用和机制[J]. *肿瘤药理学*, 2023, 13(6):686—692.
- [8] JONES P A, BAYLIN S B. The fundamental role of epigenetic events in cancer [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(6):415—428.
- [9] PATEL S G, KARLITZ J J, YEN T, et al. The rising tide of early - onset colorectal cancer: A comprehensive review of epidemiology, clinical features, biology, risk factors, prevention and early detection [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(3):262—274.
- [10] ABOLGHASEMI F A, MAHMOODZADEH A. Unraveling the progression of colon cancer pathogenesis through epigenetic alterations and genetic pathways [J/OL]. *Cureus*, 2024, 16(5):e59503. 2024 - 05 - 02 [2024 - 03 - 09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38826873/>.
- [11] ZHANG N, WU J, ZHENG Q. Chemical proteomics approaches for protein post - translational modification studies [J]. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2024, 1872(4):141017.
- [12] WANG T, YE Z, LI Z, et al. Lactate - induced protein lactylation: A bridge between epigenetics and metabolic reprogramming in cancer [J/OL]. *Cell Prolif*, 2023, 56(10):e13478. 2023 - 04 - 14 [2024 - 03 - 09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37060186/>.
- [13] RAMAZI S, ZAHIRI J. Posttranslational modifications in proteins: Resources, tools and prediction methods [J/OL]. *Database (Oxford)*, 2021:baab012. 2021 - 04 - 07 [2024 - 03 - 09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33826699/>.
- [14] ALLEYN M, BREITZIG M, LOCKEY R, et al. The dawn of succinylation: A posttranslational modification [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 314(2):C228—C232.
- [15] SHEN R, RUAN H, LIN S, et al. Lysine succinylation, the metabolic bridge between cancer and immunity [J]. *Genes Dis*, 2023, 10(6):2470—2478.
- [16] MA Q, ZENG Q, WANG K, et al. Acetyltransferase P300 regulates glucose metabolic reprogramming through catalyzing succinylation in lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2):1057.
- [17] SADHUKHAN S, LIU X, RYU D, et al. Metabolomics - assisted proteomics identifies succinylation and SIRT5 as important regulators of cardiac function [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(16):4320—4325.
- [18] CONTI D F L, CASTILHO R M, SQUARIZE C H. Histone modification on parathyroid tumors: A review of epigenetics [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10):5378.
- [19] CHEN Z, ZHANG X. The role of metabolic reprogramming in kidney cancer [J/OL]. *Front Oncol*, 2024, 14:1402351. 2024 - 05 - 31 [2024 - 03 - 09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38884097/>.
- [20] MAZZIO E A, SOLIMAN K F. Basic concepts of epigenetics: Impact of environmental signals on gene expression [J]. *Epigenetics*, 2012, 7(2):119—130.
- [21] ZIEKER D, KONIGSRAINER I, TRITSCHLER I, et al. Phosphoglycerate kinase 1 a promoting enzyme for peritoneal dissemination in gastric cancer [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(6):1513—1520.
- [22] AHMAD S S, GLATZLE J, BAJAEIFER K, et al. Phosphoglycerate kinase 1 as a promoter of metastasis in colon cancer [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(2):586—590.
- [23] WANG S, JIANG B, ZHANG T, et al. Insulin and mTOR pathway regulate HDAC3 - mediated deacetylation and activation of PGK1 [J/OL]. *PLoS Biol*, 2015, 13(9):e1002243. 2015 - 09 - 10 [2024 - 11 - 09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26356530/>.
- [24] NIE H, JU H, FAN J, et al. O - GlcNAcylation of PGK1 coordinates glycolysis and TCA cycle to promote tumor growth [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):36.
- [25] 张乃文. PGK1 及其赖氨酸琥珀酰化修饰在肾细胞癌中的作用及其相关机制研究[D]. 辽宁 沈阳:中国医科大学, 2018.

(收稿日期 2024 - 12 - 23)