

NEDD4 样 E3 泛素蛋白连接酶通过介导果糖二磷酸 A 的泛素化修饰调控胶质母细胞瘤细胞铁死亡敏感性

聂秋成^{1,2}, 李云峰², 田静³, 刘辛靖^{1,2}, 孙丽丽^{1,2}, 魏义举^{1,2}

(1. 山东第一医科大学生命科学学院, 山东 泰安 271016; 2. 山东第一医科大学医学科技创新中心, 山东 济南 250117;

3. 山东第一医科大学第二附属医院输血科, 山东 泰安 271016)

摘要:目的 探讨神经前体细胞表达发育性下调蛋白4(neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4 like, NEDD4L)介导胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)铁死亡的作用,揭示NEDD4L介导醛缩酶(aldehyde dehydrogenase A, ALDOA,又名果糖二磷酸A)的泛素化修饰在铁死亡信号通路中的调控机制。方法 对TCGA-GBM数据库中NEDD4L基因表达水平进行分析,利用shRNA/CRISPR-Cas9技术在GBM LN229细胞中敲低/除NEDD4L,通过细胞死亡和脂质过氧化实验观察敲低NEDD4L表达对GBM铁死亡敏感性的影响,并利用蛋白质免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, CO-IP)、免疫印记等实验鉴定ALDOA是NEDD4L的潜在修饰底物,通过siRNA方法敲低NEDD4L或ALDOA后检测其对GBM细胞铁死亡及铁死亡通路的影响。所有数据均使用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析。结果 敲除NEDD4L明显抑制IKE诱导的铁死亡发生,同时显著降低GBM细胞内的脂质过氧化水平($P<0.001$),鉴定NEDD4L是ALDOA新的E3泛素化连接酶,并与ALDOA相互作用介导其单泛素化修饰,调控GBM细胞铁死亡易感性。敲低NEDD4L和ALDOA的表达均增强4EBP1和ACC的磷酸化水平以及上调GPX4蛋白的表达。结论 NEDD4L介导ALDOA的单泛素化修饰并可能通过影响mTORC1-4EBP1信号通路和脂质代谢促进GBM细胞的铁死亡敏感性。

关键词:胶质母细胞瘤;神经前体细胞表达发育性下调蛋白4;果糖二磷酸A;泛素化;铁死亡

中图分类号:R574

文献标志码:A

NEDD4L regulates ferroptosis by mediating ubiquitination of ALDOA in glioblastoma cells

NIE Qiucheng^{1,2}, LI Yunfeng², TIAN Jing³, LIU Xinjing^{1,2}, SUN Lili^{1,2}, WEI Yiju^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Shandong First Medical University, Taian 271016, Shandong, China;

2. Medical Science and Technology Innovation Center, Shandong First Medical University, Jinan 250117, Shandong, China;

3. Department of Blood Transfusion, Second Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Taian 271016, Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the role of the E3 ubiquitin ligase neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4 like (NEDD4L)-mediating ferroptosis in glioblastoma, aiming to elucidate molecular mechanism of NEDD4L-mediated ubiquitination of aldolase A (ALDOA) which regulates ferroptosis pathway. **Methods** The effects of knockdown of NEDD4L on ferroptosis in glioblastoma (GBM) were assessed through cell death and lipid peroxidation assays. ALDOA was identified as a potential substrate modified by NEDD4L using protein Western blotting and co-immunoprecipitation (Co-IP) techniques. The impact of NEDD4L or ALDOA on ferroptosis and ferroptosis-related pathways in GBM cells were further investigated using siRNA/shRNA or CRISPR-Cas9 technology. **Results** Knockdown of NEDD4L significantly inhibited IKE-induced ferroptosis and reduced lipid peroxidation levels in GBM cells. This study validated NEDD4L as a novel E3 ubiquitin ligase for ALDOA, demonstrating its interaction with ALDOA to mediate monoubiquitination, thereby modulating GBM cell susceptibility to ferroptosis. Additionally,

收稿日期:2025-03-13

基金项目:国家自然科学基金(82473420);泰山学者青年专家项目(tsqn202211225);山东省医药卫生科技项目(202402050941, 202402050918);山东省自然科学基金(ZR2024QC208)

通信作者:魏义举。E-mail:weiyiju@sdfmu.edu.cn

the knockdown of both NEDD4L and ALDOA promoted phosphorylation of 4EBP1 and ACC, and increased the expression of GPX4 protein, which suggested that NEDD4L-mediated ubiquitination of ALDOA might regulate ferroptosis susceptibility in GBM cells through the mTORC1-4EBP1 signalling pathway and lipid metabolism. All data were statistically analyzed using GraphPad Prism 9.0 software. **Conclusion** NEDD4L has been shown to mediate monoubiquitination of ALDOA, with potential to promote ferroptosis sensitivity by affecting the mTORC1-4EBP1 signaling pathway and lipid metabolism in GBM cells.

Key words: Glioblastoma; Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4 like; Aldolase A; Ubiquitination; Ferroptosis

胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 是一种极其常见的,易复发易侵袭且临床预后极差的原发性颅内恶性肿瘤,患者 5 年的生存率小于 5%^[1]。铁死亡是一种依赖于铁离子氧化损伤引起脂质过氧化物的积累而最终导致细胞溶解和膜破裂的细胞死亡形式^[2-3]。研究证明铁死亡与胶质瘤化疗耐药、肿瘤恶性进展、不良预后和免疫抑制密切相关^[4-7], GBM 细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和 PUFAs 的产生促使其对铁死亡更敏感^[8]。因此,通过靶向铁死亡信号通路关键蛋白 SLC7A11、GPX4、FSP1 及 GCH1 等来逆转 GBM 治疗抵抗以达到肿瘤治疗的目的,是一种新兴的肿瘤耐药治疗策略^[9]。大量研究表明,铁死亡关键靶分子的翻译后修饰 (如泛素化修饰),在调控铁死亡信号通路中起着关键作用^[10-15]。因此,寻找和探究铁死亡关键功能靶蛋白的泛素化修饰及其调控机制是目前 GBM 治疗和诊断的重要研究策略之一。

神经前体细胞表达发育性下调蛋白 4 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4 like, NEDD4L) 是参与调控铁死亡的重要泛素化连接酶,虽然有报道 NEDD4L 在胰腺癌、食管鳞状细胞癌和炎症性肠病等疾病发生发展中调控铁死亡的作用机制^[16-18],但其下游靶分子在 GBM 铁死亡中的调控机制仍不清晰,亟待进一步的研究。因此本研究通过建立 NEDD4L 基因敲除细胞系,观察 NEDD4L 对铁死亡诱导剂咪唑酮伊拉斯汀 (imidazole ketone erastin, IKE) 介导的铁死亡的作用,并利用 NEDD4L 过表达细胞系通过免疫共沉淀等实验鉴定出其泛素化修饰底物醛缩酶 (aldolase A, ALDOA, 又名果糖二磷酸 A) 探究 NEDD4L 通过介导 ALDOA 的泛素化修饰调控 GBM 细胞铁死亡的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞

本研究所用人类 GBM 细胞系 LN229、T98G、U251n、A172、NHA 和人胚肾细胞 293T 购自普诺赛

生物公司 (武汉,中国)。所有细胞均在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养,培养基为 DMEM 培养基 (Gibco, 11965118),并补充 10% 胎牛血清 (Vazyme, F101-01)、1% 青霉素-链霉素 (Gibco, 15140-122)。所有细胞均进行支原体常规检测。

1.1.2 主要试剂

本研究所用 ALDOA、NEDD4L 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 购自广州锐博生物科技有限公司,所有引物购自通用生物 (安徽) 股份有限公司。DMEM 培养基、胰蛋白酶-EDTA (0.25%) 和青霉素-链霉素 (1 000 U/mL) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司,胎牛血清购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司 (中国),BCA 蛋白质测定试剂盒购于 Thermo Scientific 公司 (美国),硝酸纤维素印迹膜购于 Millipore 公司 (美国)。铁死亡抑制剂 (ferrostatin-1, Fer-1) 购自 Med Chem ExpressMCE 生物科技公司 (美国),IKE 购自 Selleck 生物科技公司 (美国),脂质过氧化传感器 C11-BODIPY 探针购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。jetPRIME 转染试剂购自赛多利斯莱珀思 (上海) 贸易有限公司, PolyJet 体外 DNA 转染试剂购自 Signa-Gen 公司。Anti-GAPDH (10494-1-AP)、anti-Tubulin (10068-1-AP) 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。Anti-Flag (14793T)、Anti-Myc (13987T)、Anti-NEDD4L (4013S)、Anti-Ubiquitin (8240T)、Anti-4EBP1 (9644T)、Anti-P-4EBP1 (2855T)、Anti-p-ACC (3661S) 和 anti-ACC (3676T) 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, anti-GPX4 (ab41487) 购自美国 Abcam 公司, Anti-ALDOA (SAB5700974) 抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 方法

1.2.1 NEDD4L 基因表达与铁死亡相关性分析

1.2.1.1 TCGA 数据库分析

本实验中的实验组为 TCGA-GBM 数据集中的 GBM 肿瘤组织样本 ($n=528$), 对照组则是正常脑组织样本 ($n=10$) 在 Gliosis 中选择 TCGA-GBM 数据集, 提取 NEDD4L 在 GBM 肿瘤组织与正常脑组织中的 mRNA 表达数据。所有可视化结果由 Gliosis 自动生成。

1.2.1.2 免疫印迹检测 NEDD4L 蛋白表达

本实验中的实验组为 LN229、T98G、U251、A172 四种脑胶质瘤细胞系,对照组为神经星形胶质细胞 NHA 细胞,所有细胞以常规条件培养,未进行特殊处理。使用 SDS 裂解缓冲液(10 mmol/L Tris pH 7.5、1% SDS、50 mmol/L NaF、1 mmol/L NaVO₄)裂解上述细胞;通过 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白质浓度。按每个样品 10~15 μg 定量加入 SDS 样品缓冲液中并进行 SDS-PAGE 电泳;将凝胶转移到硝酸纤维素印迹膜上;5%脱脂牛奶/TBST 室温封闭 1 h;一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜,二抗(1:2 000)室温孵育 1 h;使用化学发光成像仪检测目标蛋白表达。

1.2.2 敲低 NEDD4L 对胶质瘤细胞铁死亡敏感性的影响

在 1.2.2 节中涉及的实验分组如下:实验组为 2 个经 NEDD4L 敲低质粒转染的 LN229 细胞(shN4L-5#和 shN4L-7#),对照组为空载体转染组(sc)。

1.2.2.1 免疫荧光实验

将上述 3 组 LN229 细胞接种于细胞爬片,经终浓度为 12.5 μmol/L IKE 处理后,用 4%多聚甲醛固定 30 min,0.5% Triton X-100 通透 10 min;5%牛血清蛋白封闭 20 min,一抗(1:100 稀释)4 °C 孵育过夜;;二抗(1:100 稀释)37 °C 孵育 1 h,DAPI 染色细胞核;激光共聚焦显微镜观察。

1.2.2.2 Sytox Green 染色细胞死亡实验

上述细胞分别经 12.5 μmol/L IKE 处理细胞 16 h 后,吸除培养基,用 PBS 清洗细胞 1 次。随后加入含有 1 μmol/L Sytox Green 的 100 μL 的无血清 DMEM 培养基,避光孵育 30 min。直接在荧光显微镜(FITC 通道,Ex/Em: 504/523 nm)下观察并拍摄图像。使用 ImageJ 软件计算荧光阳性细胞数占总细胞数的比例。

1.2.2.3 CRISPR-Cas9 基因敲除细胞的建立

使用 Guide Design Tool (<https://www.zlab.bio/resources>)设计所需引物,将合成的寡核苷酸引物退火并连接到 lentiCRISPR-v2 载体构建成 NEDD4L 基因敲除质粒。Guide RNA 序列:GCAACAACCGGACCACTCAG。将基因敲除质粒同 pMD2.G 以及 psPAX2 通过 PEI 转染试剂转染至 293T 细胞以收集慢病毒。将包装好的慢病毒使用聚凝胺感染 LN229 细胞后用 2 μg/mL 嘌呤霉素进行筛选 2 d,筛选后存活的细胞即为 CRISPR-Cas9 基因敲除细胞,96 孔板有限稀释法,筛选敲除 NEDD4L 单克隆细胞。

1.2.2.4 免疫印迹检测 NEDD4L 蛋白表达

本实验中涉及的实验组为 NEDD4L 敲低(shN4L-5#和 shN4L-7#)或敲除(KO-E02 和 KO-F11)质粒转染组(具体构建过程详见 1.2.2.3),对照组为空载体转染组(sc 和 Control-sg),Western blotting 参考 1.2.1.2 进行操作,以检测敲除或敲低

NEDD4L 后,对其蛋白表达水平的影响。

1.2.3 NEDD4L 对脂质过氧化水平的影响

本实验中的实验组为 NEDD4L 敲除转染组(KO-E02 和 KO-F11),对照组为空白载体转染组(Control-sg)。三组细胞分别经 12.5 μmol/L IKE 处理细胞 16 h,PBS 清洗两次,加入 10 μmol/L C11 BODIPY 581/591 或碘化丙啶染色 30 min。随后用 500 μL PBS 重悬细胞在流式细胞仪上进行检测,并使用 FlowJo v10.8.1 分析数据。

1.2.4 NEDD4L 与 ALDOA 相互作用检测

1.2.4.1 siRNA 转染实验和 NEDD4L 蛋白表达检测

本实验涉及的实验组为 NEDD4L-siRNA 转染组(si-N4L),而对照组则为空白-siRNA 转染组(sc)。将上述细胞按照每孔接种 3×10⁵ 个接种于 6 孔板中培养,待细胞密度达到 50%~70%时,进行 siRNA 转染。选用合适的 siRNA 序列(NEDD4L-siRNAs: GCUAGACUGUGGAUUGAGU GCGUA-UCCGGUACUGCAG),使用 jetPRIME 转染试剂转染。转染前,用无菌无酶水稀释 siRNA 至最终浓度 20 nmol/L。按比例将转染试剂与 siRNA 稀释液混合,静置 5~10 min 以待复合物形成,随后加入细胞培养基中,继续培养 24~72 h 后,进行免疫印记检测实验检测 NEDD4L 和 ALDOA 蛋白水平的表达,具体方法见 1.2.1.2。

1.2.4.2 Flag 标签蛋白免疫共沉淀实验

根据以往研究 Flag-NEDD4L 的质谱结果^[19],发现醛缩酶 ALDOA 是泛素化酶 NEDD4L 的潜在修饰底物。将含有 Flag-ALDOA 的质粒转染至 LN229 细胞,RIPA 裂解液裂解细胞,与 Flag 标签亲和树脂共孵育。用 IP2 缓冲液(50 mmol/L Tris,pH 7.5、150 mmol/L NaCl、4 mmol/L EDTA、1 mmol/L EGTA、0.5% NP-40、10% 甘油、1×磷酸酶抑制剂和 1×蛋白酶抑制剂)洗涤沉淀物三次,并用溶解在 TBS(10 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl,pH 7.4)中的 3×Flag 多肽(碧云天生物)洗脱。然后制备蛋白质并在 SDS-PAGE 凝胶(Sevenbio,中国)上分离并进行 Western blotting 免疫印迹,方法见 1.2.1.2。

1.2.4.3 免疫荧光检测 NEDD4L 和 ALDOA 的相互作用

将含有 Flag-ALDOA 的质粒转染至 LN229 细胞接种于细胞爬片通透固定,方法见 1.2.2.1。激光共聚焦显微镜观察 ALDOA 和 NEDD4L 的亚细胞共定位情况。ImageJ 软件对 ALDOA 与 NEDD4L 的免疫荧光信号进行共定位分析。

1.2.5 NEDD4L 介导 ALDOA 的泛素化修饰(His 标记蛋白的免疫沉淀)

将 6×His-Ubiquitin, Flag-ALDOA 以及 EGFP-NEDD4L 质粒转染至 293T 细胞并过夜,并用 RIPA

裂解液裂解细胞,与Ni²⁺-NTA高亲和树脂孵育2h,用IP2缓冲液(50mmol/L Tris,pH 7.5、150mmol/L NaCl、0.5% NP-40、10%甘油、1×磷酸酶抑制剂和1×蛋白酶抑制剂)洗涤沉淀物三次。配制蛋白上样缓冲液(40 μL LDS+40 μL 1 mol/L 咪唑+3.5 μL β-巯基乙醇)并按照每个样品20 μL的体积加入到IP组蛋白中置于98℃加热5min,并在SDS-PAGE凝胶上分离并进行标准免疫印迹,详见1.2.1.2。

1.2.6 NEDD4L与ALDOA介导GBM细胞铁死亡的机制验证

本实验涉及的实验组为NEDD4L/ALDOA-siRNA转染组(si-N4L, siALDOA),而对照组则为空白siRNA转染组(sc)。将上述细胞按照每孔接种3×10⁵个接种于6孔板中培养,待细胞密度达到50%~70%时,进行siRNA转染,siALDOA序列(ALDOA-siRNAs: CCGAGAACACCGAGGAGAA CCAUGCU-UGCACUCAGAAGUU),NEDD4L-siRNA序列及siRNA转染步骤见1.2.4.1。经siRNA转染后的三组细胞sc、siALDOA、siN4L分别通过Sytox Green染色实验(方法见1.2.2.2)和Western blotting实验检测其对胶质瘤细胞LN229的铁死亡敏感性及其相

关铁死亡信号通路蛋白表达水平的影响。

1.3 统计学处理

使用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本t检验。多组间比较采用双因素方差分析(two-way ANOVA),若交互作用显著,组间两两比较则采用Bonferroni校正。所有实验均独立重复至少3次。通过Pearson相关分析评估NEDD4L与铁死亡关键分子SLC7A11及GPX4的表达相关性,并生成散点图。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 泛素化连接酶NEDD4L在GBM患者中低表达且与铁死亡密切相关

NEDD4L在GBM患者中呈现低表达($P < 0.001$),且与GPX4和SLC7A11负性相关。与此同时通过检测不同GBM细胞系中NEDD4L的蛋白表达水平发现,与正常小胶质细胞NHA相比,NEDD4L在GBM细胞内呈现低表达($F = 4.267, P = 0.0286$),见图1。

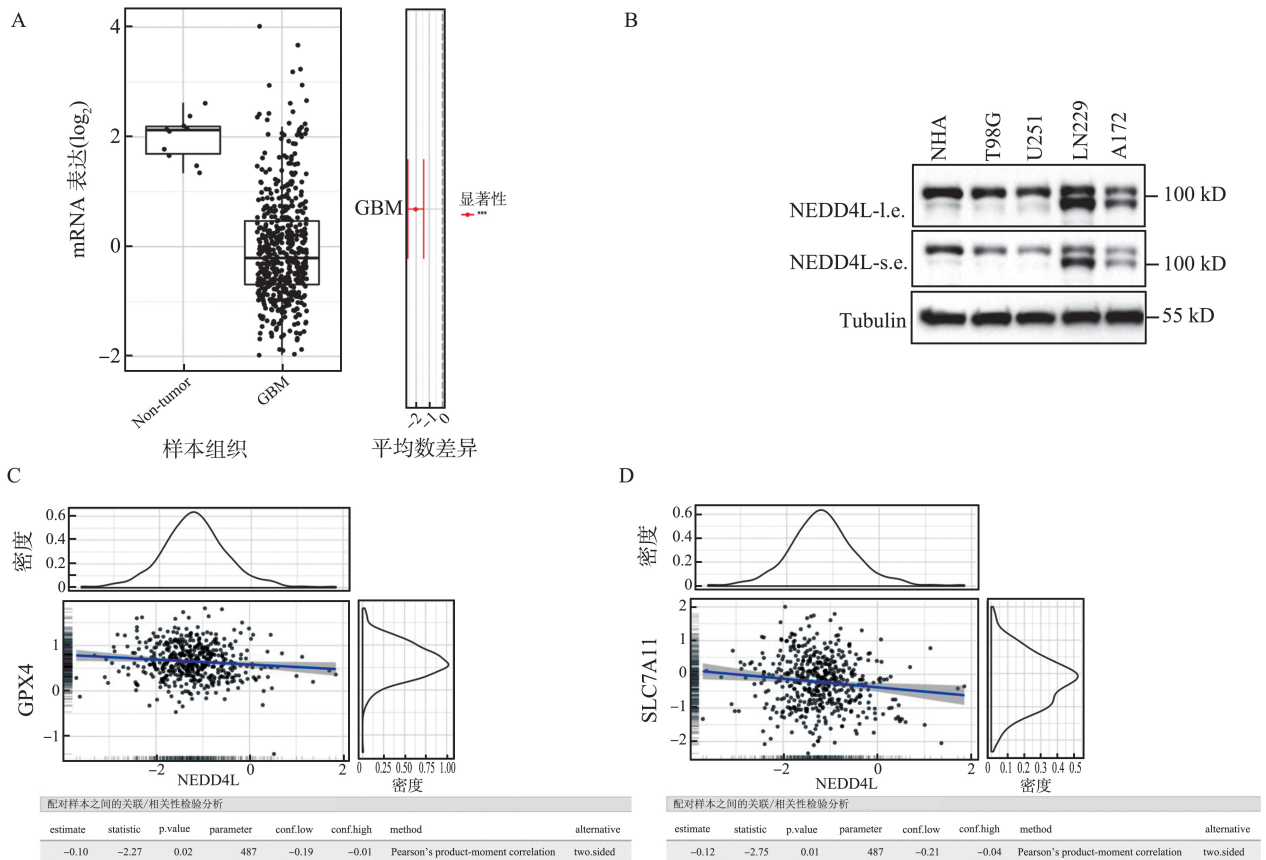


图1 泛素化连接酶NEDD4L在TCGA GBM数据库的临床分析结果 A: NEDD4L在GBM组织中的表达水平低于正常组织。*** $P < 0.001$; B: NEDD4L在不同GBM细胞中蛋白表达水平的Western blotting检测; C~D: NEDD4L与GPX4和SLC7A11的相关性分析图。

Figure 1 Clinical analysis of NEDD4L in TCGA GBM database A: NEDD4L expression level is lower in GBM than in normal tissue. *** $P < 0.001$; B: Detection of Western blotting expression of NEDD4L in different GBM cells; C-D: Correlation analysis plots of NEDD4L with GPX4 and SLC7A11.

2.2 敲除 NEDD4L 显著增强 GBM 细胞铁死亡敏感性

免疫荧光与 Sytox Green 染色实验显示,敲低/除

NEDD4L 可显著降低其蛋白表达水平,且敲低 NEDD4L 能明显抑制 IKE 诱导的 LN229 细胞铁死亡($P < 0.01$),见图 2。

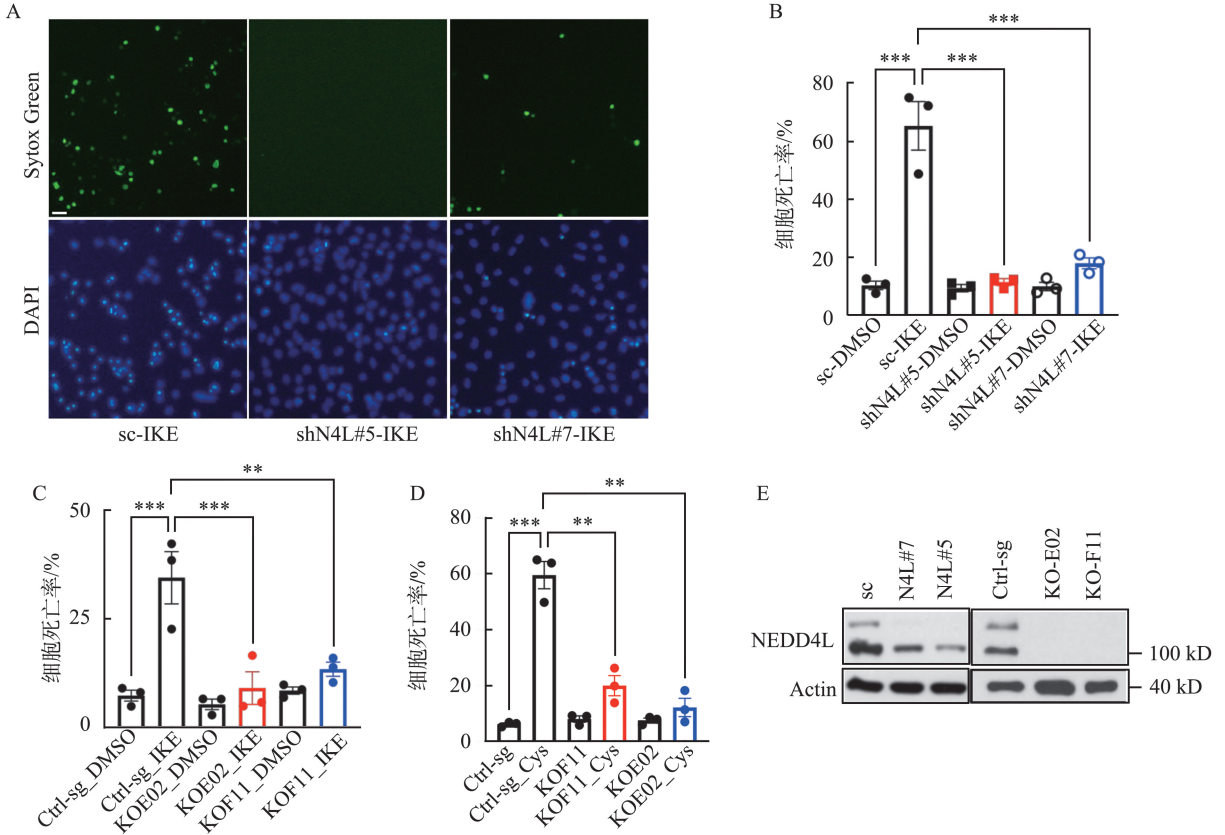


图 2 敲除 NEDD4L 增强 GBM 细胞铁死亡敏感性

A: 使用 IKE 处理不同实验组后 Sytox Green 染料和 DAPI 的荧光图, 比例尺为 $50 \mu\text{m}$; B: Sytox Green 阳性细胞死亡的统计图, $***P < 0.001$; C~D: 通过 Sytox Green 染料 $12.5 \mu\text{mol/L}$ IKE (C) 以及胱氨酸饥饿 (D) 处理 LN229 以及 NEDD4L 敲除细胞 18 h 后细胞死亡统计图, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; E: NEDD4L-shRNA 以及敲除细胞系的 Western blotting 结果图。

Figure 2 NEDD4L knockout enhanced the sensitivity of ferroptosis in GBM cells

A: Fluorescence images of Sytox Green and DAPI after IKE treatment in different experimental groups, scale bar: $50 \mu\text{m}$; B: Statistical graph of Sytox Green positive cells $***P < 0.001$; C-D: Cell death ratio statistics of LN229 and NEDD4L knockout cells after 18 h of LN229 and NEDD4L knockout cells treated with Sytox Green dye $12.5 \mu\text{mol/L}$ IKE (C) and cystine starvation (D), $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; E: Western blotting of NEDD4L-shRNA and knockout cell lines.

2.3 敲除 NEDD4L 对 IKE 诱导的 LN229 细胞脂质过氧化水平的影响

C11-BODIPY (581/591) 荧光标记方法检测结果表明,与对照组相比,NEDD4L 敲除的 LN229 细胞在 IKE 诱导后脂质过氧化水平显著降低 ($P < 0.001$),且铁死亡抑制剂 Fer-1 可逆转 IKE 诱导的脂质过氧化升高,见图 3。

2.4 NEDD4L 通过与醛缩酶 ALDOA 相互作用介导其泛素化修饰

siRNA 转染 LN229 细胞结果显示,IKE 处理下敲低 NEDD4L 可显著降低 ALDOA 的泛素化水平。

Flag 标签蛋白免疫共沉淀实验表明 ALDOA 与 NEDD4L 可以相互结合, MG132 也明显增强了 ALDOA 与 NEDD4L 的相互作用。免疫荧光染色实验也证明 Flag-ALDOA 与内源性 NEDD4L 在细胞质内呈明显表达共定位现象,并通过使用 ImageJ 软件对 ALDOA 与 NEDD4L 的免疫荧光信号进一步共定位分析显示 ALDOA 和 NEDD4L 的荧光信号在多个位置上存在相似的分布趋势,表现为两者曲线的高峰和低谷大致重合,尤其是在 $100 \sim 500 \mu\text{m}$ 之间,共同出现了多个信号峰,表明二者在这些区域可能具有很高的共定位现象,见图 4。

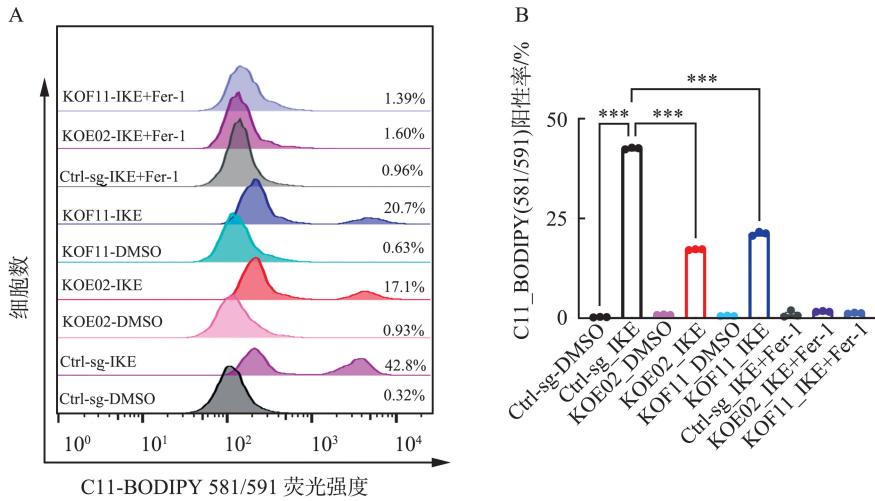


图 3 敲除 NEDD4L 促进 GBM 细胞的脂质过氧化
A: C11-BODIPY 染色法检测 LN229 细胞敲除 NEDD4L 后的脂质过氧化流式峰图; B: 脂质过氧化的柱状统计图。
*** $P < 0.001$ 。

Figure 3 Knockdown of NEDD4L promoted lipid peroxidation in GBM cells
A: Flow cytometry histograms of lipid peroxidation in LN229 cells after NEDD4L knockout, detected by C11-BODIPY staining; B: Bar graph quantifying lipid peroxidation. *** $P < 0.001$.

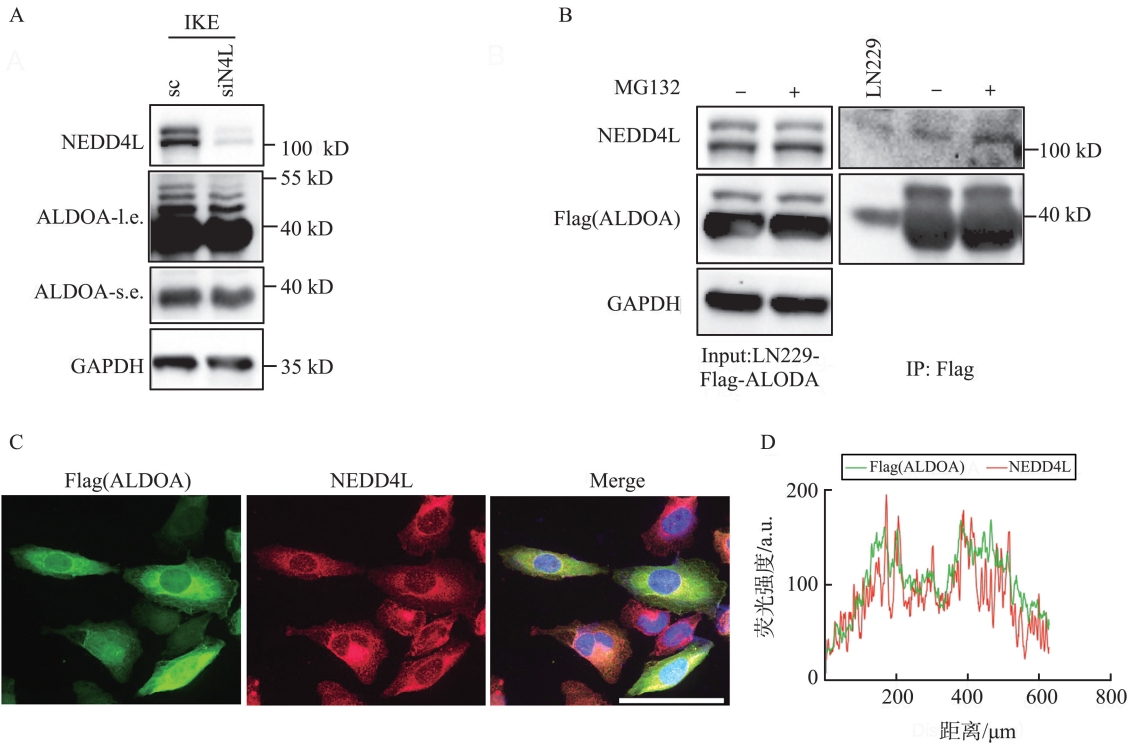


图 4 NEDD4L 与 ALDOA 的相互作用及荧光共定位检测
A: 在 IKE 处理条件下, LN229 细胞中敲低 NEDD4L 对 ALDOA 的泛素化影响; B: 10 $\mu\text{mol/L}$ 蛋白酶抑制剂 MG132 处理过表达 Flag-ALDOA 的 LN229 细胞 6 h, Flag-ALDOA 免疫共沉淀实验; C: 过表达 Flag-ALDOA 的 LN229 细胞的免疫荧光图 (比例尺 100 μm); D: 使用 ImageJ 软件对 ALDOA 与 NEDD4L 的免疫荧光信号进行共定位分析。

Figure 4 The interaction and co-localization of NEDD4L and ALDOA
A: Effect of knockdown of NEDD4L on ALDOA in LN229 cells under IKE treatment conditions; B: 10 $\mu\text{mol/L}$ protease inhibitor MG132 treated overexpression of Flag-ALDOA in LN229 cells for 6 h, Flag-ALDOA co-immunoprecipitation assay; C: Immunofluorescence staining with indicated antibodies of protein in overexpression of Flag-ALDOA of LN229 cells (scale bar: 100 μm); D: Colocalization of ALDOA and NEDD4L immunofluorescence signals analyzed by ImageJ software.

2.5 NEDD4L 是 ALDOA 新的泛素化连接酶

Ni²⁺-NTA 亲和柱层析实验表明,ALDOA 蛋白可发生单泛素化修饰,且该修饰水平在 NEDD4L 作用下显著提升。在 293T 细胞中将质粒 Flag-

ALDOA, 分别与 Myc-NEDD4L 以及 myc-NEDD4L 失活突变体(C942A)共转染,发现 ALDOA 可以直接被野生型泛素化酶 NEDD4L 单泛素化修饰(*号标记),却不被 NEDD4L 失活突变体所修饰,见图 5。

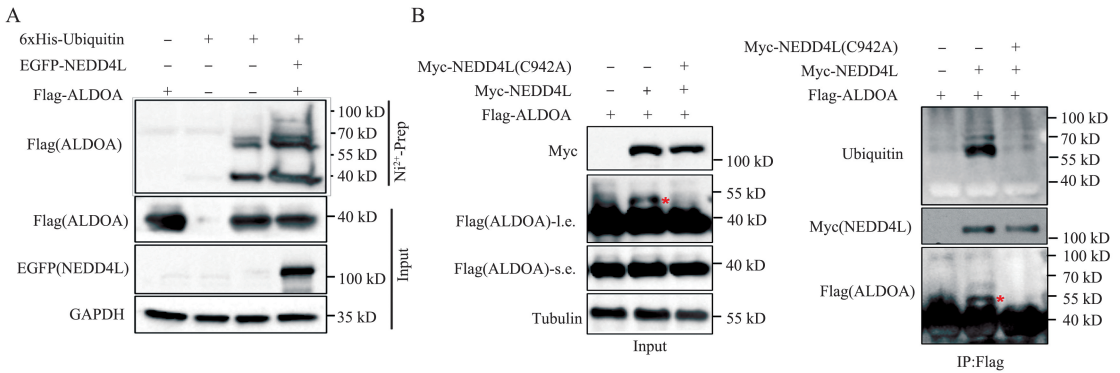


图 5 NEDD4L 介导 ALDOA 的泛素化修饰

A: 转染不同质粒后,经 Ni²⁺-NTA 亲和柱层析分析,ALDOA 被证实存在单泛素化修饰; B: 免疫共沉淀实验提示了 ALDOA 是 NEDD4L 新的泛素化修饰底物。

Figure 5 NEDD4L mediate the ubiquitination of ALDOA

A: Transfection with various plasmids followed by Ni²⁺-NTA affinity chromatography demonstrates that ALDOA can undergo monoubiquitination; B: Co-immunoprecipitation assays suggests that ALDOA is a novel ubiquitination substrate of NEDD4L.

2.6 NEDD4L 与 ALDOA 调控 GBM 细胞铁死亡敏感性的作用机制

Sytox 绿色荧光染色法检测显示,敲低 NEDD4L 或 ALDOA 表达均可显著抑制胶质母细胞瘤铁死亡的发生(P<0.001)。蛋白免疫印迹实验进一步揭示,敲低 NEDD4L 或 ALDOA 表达均能提

升 GPX4 蛋白水平,并显著增强 4EBP1 和乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)的磷酸化状态。这些结果表明,NEDD4L 可能通过介导 ALDOA 的泛素化修饰,进而激活 mTORC1-4EBP1 信号通路并调控脂质代谢,最终影响肿瘤细胞的铁死亡过程,见图 6。

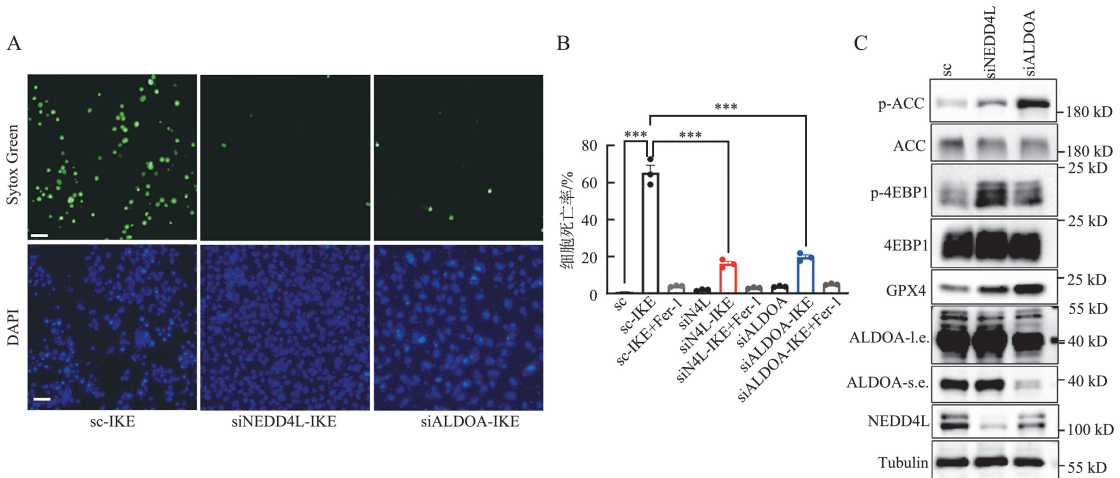


图 6 NEDD4L 与醛缩酶 ALDOA 调控铁死亡敏感性的潜在机制

A: Sytox Green 染料和 DAPI 的荧光图检测 IKE 诱导 LN229 对照,siNEDD4L 和 siALDOA 敲低组的细胞死亡情况,比例尺: 50 μm; B: Sytox Green 阳性细胞死亡的统计图,***P<0.001; C: 在 LN229 对照,siNEDD4L 和 siALDOA 敲低细胞中,通过 Western blotting 检测铁死亡调控通路的相关蛋白表达水平。

Figure 6 Potential mechanisms by which NEDD4L and ALDOA regulate ferroptosis sensitivity

A: Fluorescence of Sytox Green dye and DAPI after IKE treatment in LN229 control, siNEDD4L and siALDOA cells (scale bar: 50 μm); B: Statistical graph of Sytox Green positive cells (***P<0.001); C: The protein expression levels of key regulators in the ferroptosis signaling pathway were analyzed by Western blotting in LN229 control cells, siNEDD4L-knockdown cells, and siALDOA-knockdown cells.

3 讨论

GBM 是一种成人最常见的原发性恶性脑瘤,诊断后的中位生存率仅为 12~16 个月,患者生存质量低。主要的治疗方法是手术切除,随后进行放射治疗,同时辅助替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 化疗,但疗效有限,临床上亟需新的 GBM 治疗手段^[20-21]。在 GBM 患者中,铁死亡是其发生程序性死亡的主要类型,与肿瘤恶性进展、不良预后和免疫抑制密切相关^[22-23]。靶向铁死亡通路被认为是近年来一种新兴的有效抗肿瘤方法。目前已知替莫唑胺与铁死亡诱导剂 Erastin 联合使用,可以提高对胶质瘤细胞的治疗效果^[24],但其协同效应的分子机制仍不清晰。因此,如何将铁死亡应用到胶质母细胞瘤治疗以及揭示铁死亡在胶质母细胞瘤中的作用分子机制等,仍需进一步研究。大量研究表明泛素蛋白降解系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 在调控铁死亡通路中起着关键作用,寻找和探究泛素连接酶介导靶分子的泛素化修饰调控铁死亡分子机制也是目前癌症治疗和诊断的重要研究策略^[25-26]。基于以上背景,本研究发现 NEDD4L 是 ALDOA 新的 E3 泛素化连接酶,并与 ALDOA 相互作用介导其单泛素化修饰,影响调控 GBM 细胞铁死亡易感性。敲低 NEDD4L 和 ALDOA 的表达均促进 4EBP1 和 ACC 的磷酸化水平以及 GPX4 蛋白的表达。因此本研究旨在需要寻找针对 GBM 新的潜在干预治疗靶点,为治疗 GBM 提供了新的理论基础和研究思路。

已有研究^[16-19]发现 E3 泛素连接酶 NEDD4L 不仅在肿瘤发生发展中起着重要作用,也参与调控铁死亡的作用。在 GBM 患者中,与正常组织相比泛素化连接酶 NEDD4L 呈低表达,下调 NEDD4L 促进 GBM 的发生发展^[27]。研究报道小鼠体内敲除 NEDD4L 通过泛素降解 SLC3A2 抑制 GPX4 的表达增强小鼠肠上皮细胞铁死亡,以限制炎症性肠病和结直肠癌发生^[16]。NEDD4L 通过泛素化降解 SLC7A11 促进铁死亡,抑制食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell cancer, ESCC) 肿瘤生长^[18]。也有研究报道 Erastin/RSL3 诱导胰腺癌 PANC1 细胞铁死亡 24 h 后,分析 571 个泛素-蛋白酶体系统基因的 mRNA 表达时,泛素化连接酶 NEDD4L 的表达明显上调,且 NEDD4L 通过降解 LTF 抑制脂质氧化,抑制肿瘤细胞的铁死亡,但其分子机制研究尚不清晰^[17]。以上均提示 NEDD4L 在多种疾病中参与调控铁死亡的重要作用。本研究发

现,与正常组织相比,NEDD4L 在 GBM 患者中呈低表达,且与铁死亡关键因子 SLC7A11 和 GPX4 表达密切相关。在 GBM 细胞系 LN229 细胞中通过基因敲低或敲除的方式抑制 NEDD4L 的表达,能显著抵抗 IKE 和胱氨酸饥饿诱导铁死亡的发生,并可以被铁死亡抑制剂所逆转,进一步验证了在 GBM 细胞中低表达 NEDD4L 能够抵抗铁死亡的发生。

有研究发现靶向代谢酶也是克服抵抗铁死亡发生的重要潜在靶标^[28]。糖酵解的下游代谢产物 3-磷酸甘油酸 G3P 通过介导线粒体上的磷酸甘油酸脱氢酶 2 (GPD2) 抑制铁死亡,提示了 G3P 相关的代谢酶与调控铁死亡的潜在相关性^[29]。另有报道通过利用靶向 87 个糖代谢相关酶的 siRNA 文库筛选方法发现,丙酮酸脱氢酶激酶 4 (PDK4) 是抵抗铁死亡的关键基因,PDK4 通过阻断丙酮酸脱氢酶 (pyruvate dehydrogenase complex, PDH) 依赖性的丙酮酸氧化和脂肪酸合成来抵抗胰腺癌铁死亡的发生^[30]。而代谢酶 ALDOA 是葡萄糖的关键胞内感受器,抑制 ALDOA 可以激活 AMPK 通路,缓解脂肪肝、延长寿命等作用^[31],但在 GBM 细胞中 ALDOA 呈高表达,促进胶质瘤的侵袭与生长,但其分子机制不甚清楚^[32]。此外在肝癌和胰腺癌等肿瘤中,ALDOA 促使癌症转移和侵袭,降低 ALDOA 表达可以抑制 ATP 的合成,促进 ROS 的产生,继而抑制肿瘤细胞的生长^[33-34],揭示 ALDOA 是治疗癌症的重要潜在药物靶点。以上研究均说明,ALDOA 在肿瘤发生发展中发挥了重要作用,但是关于 ALDOA 在泛素化修饰以及铁死亡调控等方面研究较少。而本项目根据本实验室以往的 Flag-NEDD4L 蛋白质谱数据^[19]发现 ALDOA 也是泛素连接酶 NEDD4L 的潜在修饰底物,因此本研究验证 NEDD4L 是 ALDOA 新的 E3 泛素化连接酶,并与 ALDOA 相互作用介导其单泛素化修饰,影响胶质母细胞瘤铁死亡敏感性。敲低 ALDOA 和 NEDD4L 均显著抑制胶质瘤铁死亡的发生,抑制脂肪酸活化酶 ACC 活性和上调 GPX4 的表达,提示了 ALDOA 可能通过调控脂肪酸合成和脂质氧化抵抗铁死亡的发生。还发现 ALDOA 是 NEDD4L 的潜在重要修饰底物,NEDD4L 通过与 ALDOA 相互作用介导其单泛素化修饰。敲低 NEDD4L 和 ALDOA 的表达明显抵抗 GBM 细胞铁死亡,并上调 mTORC 通路下游分子 4EBP1 的磷酸化水平以及铁死亡核心调控分子 GPX4 的表达,提示 NEDD4L 介导 ALDOA 的单泛素化修饰调控铁死亡。但 ALDOA 的泛素化修饰如何通过 mTORC1-4EBP1 信号轴和 ACC 的磷

酸化影响 GPX4 蛋白表达和脂质代谢的分子机制,需要进一步的探讨和研究。

综上所述,本研究证实了泛素化连接酶 NEDD4L 对 IKE 和胱氨酸饥饿诱导 GBM 铁死亡的作用,发现 NEDD4L 是 ALDOA 新的 E3 泛素化连接酶,并与 ALDOA 相互作用介导其单泛素化修饰,可能通过影响 mTORC1-4EBP1 信号通路和脂质代谢调控铁死亡。随着对 NEDD4L 和 ALDOA 调控铁死亡的机制研究的深入,ALDOA 有望成为新的调控铁死亡重要因子,也为恶性肿瘤诊断和治疗提供新的研究策略。将有助于阐明和完善泛素化酶介导靶分子泛素化修饰调控肿瘤铁死亡的分子机制和癌症治疗的研究策略,为治疗胶质母细胞瘤提供了全新的研究思路和治疗靶点。

本研究仍存在以下不足:①主要基于体外 GBM 细胞系实验,缺乏动物模型及患者来源肿瘤类器官的验证,后续需进一步在体内证实 NEDD4L-ALDOA 信号轴对 GBM 进展和治疗反应的作用;②虽然发现 NEDD4L 介导 ALDOA 的单泛素化修饰可能通过调控 mTORC1-4EBP1 信号通路及脂质代谢影响 GPX4 的表达,但未深入解析 ALDOA 泛素化修饰具体位点及其与代谢通路互作的分子细节;③未探讨 NEDD4L 和 ALDOA 在 GBM 患者临床样本中的预后价值,缺少对其作为潜在生物标志物的临床转化意义的评估。未来研究应结合 CRISPR/Cas9 基因编辑小鼠模型、患者来源类器官及临床样本,系统验证 NEDD4L-ALDOA 信号轴在 GBM 发生发展中的作用及预后价值;同时通过质谱和突变体构建精确鉴定 ALDOA 泛素化修饰位点,明确其在脂质代谢及铁死亡调控中的关键作用;并探索靶向 NEDD4L 或 ALDOA 的药物小分子或 PROTAC 降解剂,为开发新的铁死亡敏感化治疗策略及 GBM 精准治疗提供理论基础和潜在靶点。

参考文献:

- [1] Gritsch S, Batchelor TT, Gonzalez Castro LN. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system[J]. *Cancer*, 2022, 128(1): 47-58.
- [2] Jiang XJ, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [3] Dixon SJ, Olzmann JA. The cell biology of ferroptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(6): 424-442.
- [4] Yee PP, Wei YJ, Kim SY, et al. Neutrophil-induced ferroptosis promotes tumor necrosis in glioblastoma progression[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5424. doi: 10.1038/s41467-020-19193-y
- [5] Liu TQ, Zhu C, Chen X, et al. Ferroptosis, as the most enriched programmed cell death process in glioma, induces immunosuppression and immunotherapy resistance [J]. *Neuro Oncol*, 2022, 24(7): 1113-1125.
- [6] Yan YL, Zhou SJ, Chen X, et al. Suppression of ITPKB degradation by Trim25 confers TMZ resistance in glioblastoma through ROS homeostasis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 58. doi: 10.1038/s41392-024-01763-x
- [7] 洪喆, 毛欣晨, 侯翔云, 等. 脑胶质瘤与铁死亡研究进展 [J]. *肿瘤学杂志*, 2024, 30(3): 236-244.
HONG Zhe, MAO Xinchun, HOU Xiangyun, et al. Research progress on relationship between brain glioma and ferroptosis [J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2024, 30(3): 236-244.
- [8] Minami JK, Morrow D, Bayley NA, et al. CDKN2A deletion remodels lipid metabolism to prime glioblastoma for ferroptosis[J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(6): 1048-1060.e9.
- [9] 王文佳, 夏启龙, 张迪, 等. 铁死亡通路泛素化调控的研究进展 [J]. *华中科技大学学报(医学版)* 2024, 53(4): 528-534.
WANG Wenjia, XIA Qilong, ZHANG Di, et al. Research advances in the ubiquitination regulation of ferroptosis pathways [J]. *Journal of Huazhong University of Science and Technology (Medical Sciences)*, 2024, 53(4): 528-534.
- [10] Zhou YJ, Zhao Z, Jiang C, et al. LINC01088 prevents ferroptosis in glioblastoma by enhancing SLC7A11 via HLTF/USP7 axis[J]. *Clin Transl Med*, 2025, 15(3): e70257. doi: 10.1002/ctm2.70257
- [11] Li DB, Wang YH, Dong C, et al. CST1 inhibits ferroptosis and promotes gastric cancer metastasis by regulating GPX4 protein stability via OTUB1 [J]. *Oncogene*, 2023, 42(2): 83-98.
- [12] Anandhan A, Dodson M, Shakya A, et al. NRF2 controls iron homeostasis and ferroptosis through HERC2 and VAMP8[J]. *Sci Adv*, 2023, 9(5): eade9585. doi: 10.1126/sciadv.ade9585
- [13] Bao ZY, Liu YL, Chen BL, et al. Prokineticin-2 prevents neuronal cell deaths in a model of traumatic brain injury[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4220. doi: 10.1038/s41467-021-24469-y
- [14] Zhou QY, Yu HF, Chen YX, et al. The CRL3KCTD10 ubiquitin ligase-USP18 axis coordinately regulates cystine uptake and ferroptosis by modulating SLC7A11[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121(28): e2320655121. doi: 10.1073/pnas.2320655121

- [15] Yang JJ, Zhou YL, Xie SD, et al. Metformin induces Ferroptosis by inhibiting UFMylation of SLC7A11 in breast cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 206. doi: 10.1186/s13046-021-02012-7
- [16] Liang JJ, Wang N, Yao YH, et al. NEDD4L mediates intestinal epithelial cell ferroptosis to restrict inflammatory bowel diseases and colorectal tumorigenesis[J]. *J Clin Invest*, 2024, 135(3): e173994. doi: 10.1172/JCI173994
- [17] Wang Y, Liu Y, Liu J, et al. NEDD4L-mediated LTF protein degradation limits ferroptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 531(4): 581-587.
- [18] Chen Z, Wang WL, Hou JH, et al. NEDD4L contributes to ferroptosis and cell growth inhibition in esophageal squamous cell carcinoma by facilitating xCT ubiquitination[J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10: 473. doi: 10.1038/s41420-024-02243-5
- [19] Wei YJ, Yee PP, Liu ZJ, et al. NEDD4L-mediated Merlin ubiquitination facilitates Hippo pathway activation [J]. *EMBO Rep*, 2020, 21(12): e50642. doi: 10.15252/embr.202050642
- [20] Valerius AR, Webb LM, Sener U. Novel clinical trials and approaches in the management of glioblastoma[J]. *Curr Oncol Rep*, 2024, 26(5): 439-465.
- [21] 王剑, 周文婧, 薛知, 等. 脑胶质母细胞瘤模型研究概况及类脑模型的研发应用 [J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2020, 58(8): 74-80.
WANG Jian, ZHOU Wenjing, XUE Zhi, et al. Research overview of glioblastoma models and development application of brain-like models [J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2020, 58(8): 74-80.
- [22] de Souza I, Monteiro LS, Guedes CB, et al. High levels of NRF2 sensitize temozolomide-resistant glioblastoma cells to ferroptosis via ABCC1/MRP1 upregulation[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7): 591. doi: 10.1038/s41419-022-05044-9
- [23] Wang YM, Wu XR, Ren Z, et al. Overcoming cancer chemotherapy resistance by the induction of ferroptosis [J]. *Drug Resist Updat*, 2023, 66: 100916. doi: 10.1016/j.drug.2022.100916
- [24] Sehm T, Rauh M, Wiendieck K, et al. Temozolomide toxicity operates in a xCT/SLC7a11 dependent manner and is fostered by ferroptosis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(46): 74630-74647.
- [25] Liu X, Wang W, Nie QC, et al. The role and mechanisms of ubiquitin-proteasome system-mediated ferroptosis in neurological disorders[J]. *Neurosci Bull*, 2025, 41(4): 691-706.
- [26] 陈安静, 张训. 靶向小类泛素化修饰的胶质瘤治疗新策略 [J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2020, 58(8): 88-94.
CHEN Anjing, ZHANG Xun. Novel therapeutic strategies for glioma targeting SUMOylation [J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2020, 58(8): 88-94.
- [27] He SM, Deng JP, Li G, et al. Down-regulation of Nedd4L is associated with the aggressive progression and worse prognosis of malignant glioma[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2012, 42(3): 196-201.
- [28] Liu J, Kang R, Tang DL. Metabolic checkpoint of ferroptosis resistance[J]. *Mol Cell Oncol*, 2021, 8(3): 1901558. doi: 10.1080/23723556.2021.1901558
- [29] Wu SQ, Mao C, Kondiparthi L, et al. A ferroptosis defense mechanism mediated by glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in mitochondria[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(26): e2121987119. doi: 10.1073/pnas.2121987119
- [30] Song XX, Liu J, Kuang FM, et al. PDK4 dictates metabolic resistance to ferroptosis by suppressing pyruvate oxidation and fatty acid synthesis[J]. *Cell Rep*, 2021, 34(8): 108767. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108767
- [31] Li MQ, Zhang CS, Feng JW, et al. Aldolase is a sensor for both low and high glucose, linking to AMPK and mTORC1[J]. *Cell Res*, 2021, 31(4): 478-481.
- [32] Luo K, Liu AQ, Wu H, et al. CircKIF4A promotes glioma growth and temozolomide resistance by accelerating glycolysis[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(8): 740. doi: 10.1038/s41419-022-05175-z
- [33] Ji SR, Zhang B, Liu J, et al. ALDOA functions as an oncogene in the highly metastatic pancreatic cancer[J]. *Cancer Lett*, 2016, 374(1): 127-135.
- [34] Niu Y, Lin ZY, Wan A, et al. Loss-of-function genetic screening identifies aldolase a as an essential driver for liver cancer cell growth under hypoxia[J]. *Hepatology*, 2021, 74(3): 1461-1479.

(编辑:李伟)