

分类号：
学 号：20212014085

密 级：
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



ENO1 的 SUMO1 修饰通过糖酵解对乳腺癌 发生发展的相关性研究

学 位 申 请 人	袁 瑶
指 导 教 师	曹玉文教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	临床医学
研 究 方 向	肿瘤病理及分子诊断
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子
2024 年 07 月

分类号：
学 号：20212014085

密 级：
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



ENO1 的 SUMO1 修饰通过糖酵解对乳腺癌 发生发展的相关性研究

学 位 申 请 人	袁 瑶
指 导 教 师	曹玉文教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	临床医学
研 究 方 向	肿瘤病理及分子诊断
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子
2024 年 07 月

**The SUMOylation of ENO1 was modified by glycolysis to study
the correlation between the development of breast cancer**

A Dissertation Submitted to
Shihezi University
In Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master of Medicine

By

Yuan Yao

(Oncology)

Dissertation Supervisor: Prof. Cao Yu-wen

July, 2024

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：袁瑶

时间：2024年7月9日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：袁瑶

时间：2024年7月9日

导师签名：曹文

时间：2024年7月9日

摘要

目的：分析 ENO1 的 SUMO 化通过糖酵解对乳腺癌发生发展的影响。

方法：（1）乳腺癌组织中通过 Western Blot 实验检测 ENO1 水平。（2）免疫共沉淀（Co-IP）实验检测乳腺癌和细胞中 ENO1 的 SUMO 化修饰程度。（3）Western Blot 实验检测三个糖酵解关键酶（PKM2、LDHA、PDH）蛋白表达水平；试剂盒检测三个糖酵解关键酶（PKM2、LDHA、PDH）活性。（4）试剂盒检测糖酵解代谢产物（丙酮酸、乙酰 CoA、乳酸）含量。（5）试剂盒检测葡萄糖摄取能力、ATP 含量。（6）统计学分析 ENO1 SUMO 化与乳腺癌患者临床病理特征及预后的关联性。

结果：（1）在正常乳腺组织到浸润性乳腺癌的演变过程中，ENO1 蛋白表达逐渐升高，其差异有统计学意义（ $p < 0.05$ ）。（2）乳腺癌组织和细胞内 ENO1 是 SUMO1 的目标蛋白质，在不同乳腺癌组织和细胞里，ENO1 的 SUMO 化水平存在差异（ $p < 0.0001$, $p = 0.0187$ ）。（3）在 ENO1 高 SUMO 化修饰水平下，PKM2（ $p < 0.05$ ）和 LDHA（ $p < 0.05$ ）蛋白表达和活性（ $p < 0.05$ ）均升高，而 PDH（ $p < 0.05$ ）蛋白表达和活性（ $p < 0.05$ ）均降低。（4）ENO1 高 SUMO 化修饰水平下，丙酮酸和乙酰辅酶 A 表达均降低（ $p < 0.05$ ）。（5）ENO1 高 SUMO 化修饰水平下，葡萄糖摄取能力（ $p < 0.05$ ）、ATP 及乳酸含量（ $p < 0.05$ ）均升高。（6）乳腺癌中 ENO1 的高 SUMO 化与组织学高分级（ $P = 0.001$ ），ER、PR、HER2 阳性状态（ $p < 0.001$ ），Ki-67 表达（ $p = 0.048$ ），化疗（前 vs. 后， $p < 0.001$ ）明显相关。

结论：（1）乳腺癌中 ENO1 的 SUMO 化修饰水平升高。（2）ENO1 的高 SUMO 化水平提高 ENO1 酶催化活性。（3）ENO1 的 SUMO 化修饰与乳腺癌发生、恶性进展和预后差有相关性。

关键词： ENO1；SUMO 化修饰；糖酵解；乳腺癌

论文类型：A（基础研究）

Abstract

Objective: Analysis of the effect of SUMOylation of ENO1 on breast cancer development via glycolysis.

Methods: (1) ENO1 levels were detected in breast cancer tissues by Western Blot assay. (2) Immunoprecipitation (Co-IP) assay to detect the degree of SUMOized modification of ENO1 in breast cancer and cells. (3) Western Blot assay for protein expression levels of three key enzymes of glycolysis (PKM2, LDHA, PDH); The kit detects the activity of three key enzymes of glycolysis (PKM2, LDHA, PDH). (4) The kit detects the content of glycolytic metabolites (pyruvate, acetyl CoA, lactate). (5) The kit detects glucose uptake capacity, ATP content. (6) To analyze the correlation between ENO1 SUMOylation and clinicopathological characteristics and prognosis of breast cancer patients.

Results: (1) During the evolution of normal breast tissue to invasive breast cancer, ENO1 protein expression gradually increased, and the difference was statistically significant ($p < 0.05$). (2) ENO1 is a target protein for SUMO1 in breast cancer tissues and cells, and the SUMOized level of ENO1 varies in different breast cancer tissues and cells ($p < 0.0001$, $p = 0.0187$). (3) At ENO1 high SUMOized modification level, PKM2 ($p < 0.05$) and LDHA ($p < 0.05$) protein expression and activity ($p < 0.05$) were elevated, while PDH ($p < 0.05$) protein expression and activity ($p < 0.05$) were decreased. (4) Both pyruvate and acetyl coenzyme A expression were decreased ($p < 0.05$) at ENO1 high SUMOized modification levels. (5) Glucose uptake capacity ($p < 0.05$), ATP and lactate content ($p < 0.05$) were elevated at ENO1 high SUMOized modification levels. (6) High SUMOization of ENO1 in breast cancer was significantly correlated with high histological grade ($p=0.001$), ER, PR, and HER2-positive status ($p<0.001$), Ki-67 expression ($p=0.048$), and chemotherapy (pre vs. post, $p<0.001$).

Conclusions: (1) The SUMO modification level of ENO1 is increased in breast cancer. (2) The high SUMO level of ENO1 increased the catalytic activity of ENO1. (3) SUMO modification of ENO1 is associated with breast cancer occurrence, malignant progression and poor prognosis.

Key words: ENO1; SUMOylation; glycolysis; Breast cancer

Type of thesis: A (Basic Research)

目录

摘要	I
Abstract	II
目录	III
第 1 章 前言	1
第 2 章 材料与amp;方法	4
2.1 实验材料	4
2.1.1 研究对象	4
2.1.2 实验主要试剂与耗材	7
2.1.3 实验主要仪器	9
2.2 实验方法	9
2.2.1 MDA-MB-231 细胞培养	9
2.2.2 总蛋白提取	11
2.2.3 Western Blot 实验	12
2.2.4 Co-IP 实验	13
2.2.5 糖酵解关键酶的活性检测	14
2.2.6 试剂盒检测糖酵解代谢产物含量	17
2.2.7 葡萄糖摄取能力检测	19
2.2.8 ATP 含量检测	20
2.2.9 乳酸生成检测	20
2.2.10 随访	21
2.2.11 在线数据库预测蛋白表达及预后信息的分析过程	21
2.3 统计学分析	22
第 3 章 结果	23
3.1 ENO1 在乳腺癌中的表达	23
3.2 乳腺癌中 ENO1 的 SUMO 化水平	24
3.3 ENO1 的 SUMO1 高/低水平中糖酵解关键酶表达及活性	24
3.4 ENO1 的 SUMO1 高/低水平中糖酵解代谢产物含量	26
3.5 ATP 生成	27
3.6 葡萄糖摄取能力	28
3.7 ENO1 的 SUMO 化水平与乳腺癌患者的临床相关性	28
3.7.1 ENO1 的 SUMO1 化水平与患者临床病理特征的关系	28

3.7.2 ENO1 的 SUMO 化修饰与患者预后的关系	31
第 4 章 讨论	33
第 5 章 结论	36
第 6 章 综述	37
参考文献	43
致谢	53
作者简介	54
导师评阅表	55

英文缩略词表

英文缩写	英文全名	中文译名
ANBT	Adjacent normal breast tissue	癌旁正常乳腺组织
ADH	Atypical ductal hyperplasia	乳腺非典型导管增生
BC	Breast cancer	乳腺癌
Co-IP	Co-Immunoprecipitation	免疫共沉淀
DCIS	Ductal carcinoma in situ	乳腺导管原位癌
ENO1	Enolase	烯醇化酶
ER	Estrogen receptor	雌激素受体
Her-2	Human epidermal growth factor receptor-2	人表皮生长因子受体 2
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
IDC	Invasive ductal carcinoma	乳腺浸润性导管癌
LDHA	Lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
OS	Overall Survival	总体生存
PBS	Phosphate Buffer Solution	磷酸缓冲液
PR	Progesterone receptor	孕激素受体
SPSS	Statistics Package for Social Science	统计软件
SUMO1	Small Ubiquitin-related Modifiers1	小泛素样相关修饰物 1
TNM	Tumor Node Metastasis	临床分期
UDH	Usual ductal hyperplasia	乳腺普通型型导管增生
WB	Western Blot	免疫印迹

第 1 章 前言

(Introduction)

乳腺癌被公认为全球最常见的女性恶性肿瘤之一，对女性健康造成严重威胁，同时也是全球女性癌症死亡的主要原因之一^[1]。尽管手术、术后化疗和靶向治疗等治疗方法取得了显著进展，乳腺癌的发病率和死亡率依然居高不下，且转移性乳腺癌的五年生存率仍不足 30%^[2]。虽然现在针对乳腺癌的治疗手段在逐步改善，但乳腺癌确切的发病机制还不完全清楚。所以，深入研究乳腺癌的发生和发展机制，对预防和治疗乳腺癌至关重要。

随着癌症代谢和调节机制研究的深入，肿瘤代谢过程中的 Warburg 效应日益受到关注。这种效应，也被称为有氧糖酵解，指的是癌细胞在氧气充足的条件下，依然主要依赖糖酵解途径进行能量生成。虽然该过程中会消耗大量的葡萄糖，但它快速生成 ATP，同时会产生酸性的微环境，从而促进血管生成，这些条件共同作用，支持了癌细胞的不断增殖和侵袭能力^[3, 4]。

糖类的代谢过程能够分为两大类，即分解代谢和合成代谢。虽然生物体内糖代谢的基本过程大致相同，但是我们主要关注的还是糖的分解代谢。这个过程指的是糖类物质被分解成为小分子物质。糖的分解代谢可分为无氧代谢和有氧代谢。在无氧条件下，糖分的降解通常未能彻底完成，此刻放出的能量相对较少，同时触发各类代谢产物的生成；在充足氧气环境中，糖分能够被充分氧化，最后产生二氧化碳和水，同时释放大量能量。葡萄糖经过一系列反应生成 2-磷酸甘油酸，它在 ENO1 的催化作用下生成磷酸烯醇式丙酮酸，磷酸烯醇式丙酮酸在丙酮酸激酶（PK）的作用下生成丙酮酸，而丙酮酸在无氧条件下，由乳酸脱氢酶（LDH）催化生成乳酸；在有氧条件下，由丙酮酸脱氢酶（PDH）催化生成乙酰 CoA，从而进入三羧酸循环途径。

ENO1（Enolase，烯醇化酶），是糖酵解途径中的一个关键酶，具备催化 1,3-二磷酸甘油向 3-磷酸甘油转化的功能。ENO1 在几乎所有类型肿瘤中均表达上调^[5]，前期课题组研究发现在乳腺癌组织及细胞中 ENO1 表达水平较高，提示 ENO1 是原癌基因，可能通过参与有氧糖酵解过程，通过增强肿瘤的糖酵解途径从而促进乳腺癌生长、侵袭和迁移^[6-10]。

ENO1 蛋白的表达受到多种因素的调控，既包括基因突变等遗传因素，也包括后翻

译修饰等表观遗传因素。其中，蛋白质的后翻译修饰方式是调控基因表达最直接、最快速且精确的方法之一。目前，关于 ENO1 蛋白质表达调控的一些研究指出，在肌肉组织中，观察到了 ENO1 的磷酸化变化^[11]，该变化与胰腺癌有一定关联^[12]；在鼠脑中，ENO1 表现出了乙酰化的特征^[13]；在糖尿病大鼠的心脏中，ENO1 被发现有硝基化修饰，这一修饰显著加速了肿瘤细胞的恶性行为^[14]；在氧化应激状态下的人类成肌细胞中，研究检测到了 ENO1 的甲基化现象^[15]。

SUMO 化修饰 (SUMOylation) 是目前研究较多的一种蛋白翻译后修饰类型，在真核细胞当中，一种普遍存在的翻译后修饰方式是 SUMO 化。其主要作用机制包括几个步骤：首要，SUMO 需要被激活并成熟，通过 SENP 酶切割 SUMO 的 C 端氨基酸，这样子露出的二甘氨酸就构成了成熟的 SUMO；随后，在 ATP 水解释放能量下，SUMO 经由腺苷化作用与 E1 酶上的半胱氨酸残基结合，生成能量较高的硫脂键；其次，被激活的 SUMO 转移到 E2 酶上；其余流程中，E2 将识别基质的特定序列并推动 SUMO 与基质的选择性联结；最后，SUMO 化是一个可逆的过程，SENP 可以把基质上的赖氨酸残基同 SUMO 分开，这样释放出的 SUMO 再度参与新一轮的 SUMO 化活动。SUMO 化修饰对于维持细胞对各种细胞应激信号的稳态至关重要^[16]。靶蛋白的 SUMO 修饰通常会导致其生化活性、稳定性、细胞定位或与其他细胞成分相互作用能力的改变，进而调控细胞周期、细胞转移、糖酵解、DNA 修复、转录、翻译等多种细胞过程^[17,18]。自 20 世纪 90 年代中期识别出小泛素样修饰物即 SUMO 之后，已有研究确认 SUMO 对蛋白修饰起着调控作用，影响众多细胞功能，涵盖了染色质结构调整、DNA 的修复作用、核小体生成、细胞核与胞浆间的物质转移、蛋白质循环静滞、RNA 的生物生成以及新陈代谢等方面。近年来，SUMO 化修饰被发现在癌症、心血管疾病、神经变性和感染等人类疾病的发展中起到了关键的作用^[19]。

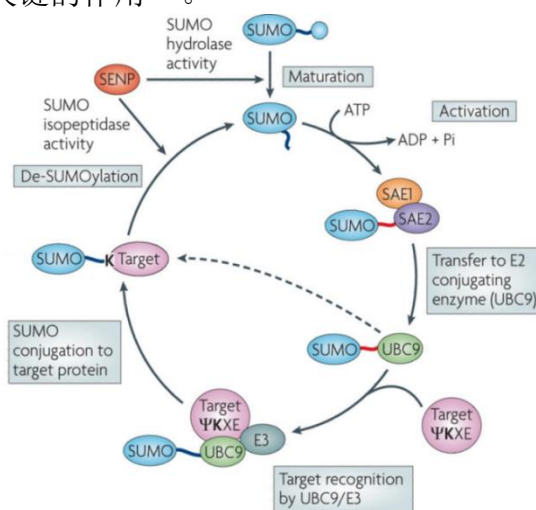


图 1-1 SUMO 化循环示意图

目前 SUMO 化修饰的 ENO1 只有三篇研究提到过。在一个研究中，人类精子细胞

以及神经母细胞瘤通过质谱分析表明, ENO1 可能是 SUMO1 的修饰靶蛋白^[20,21]。另外一篇研究在小鼠乳腺癌细胞中, 通过质谱技术确认了 ENO1 受到 SUMO 修饰, 并且这种修饰在转移性癌症中的程度显著增加^[22]。本研究团队在前期实验中检测了乳腺癌组织和细胞中 SUMO1 分子的表达情况, 结果显示乳腺癌中 SUMO1 分子以结合态存在且其表达明显上升。然而, 目前文献中尚未有关于 ENO1 的 SUMO 化修饰以及其在葡萄糖代谢途径中对乳腺癌发生发展的影响的报道。

总结以上内容, 本项研究的目的是在课题组先前研究的基础上, 深入研究 ENO1 的 SUMO 化修饰对乳腺癌产生和发展的作用。我们拟在乳腺癌组织和细胞中检测糖酵解相关酶 ENO1 分子的内源性表达, 采用 Co-IP 方法检测乳腺癌中 ENO1 的 SUMO 化修饰水平, 分为 ENO1 的高、低 SUMO 化水平两组, 利用 Western Blot 糖酵解关键酶的表达和应用相关试剂盒检测关键酶的活性, 利用代谢产物试剂盒分析其含量, 同时收集患者临床病理参数及预后随访, 分析 ENO1 的 SUMO 化高、低状态下的糖代谢变化以及与患者临床特征的相关性, 可能为乳腺癌进展和预后评估提供新的分子标志物及促进新型治疗策略的开发。

第2章 材料与方法

(Materials & Methods)

2.1 实验材料

2.1.1 研究对象

2.1.1.1 新鲜组织

在借鉴先前课题组的免疫组化研究成果的基础上，我们选择了石河子大学医学院第一附属医院自2021年9月至2023年6月期间进行手术切除的乳腺组织样本。这些样本中，我们挑选了30例乳腺癌组织及30例相应的正常乳腺癌旁组织，以上全部患者经过临床诊断被确诊为乳腺癌，他们手术切除前未进行过放疗、化疗、靶向治疗和内分泌治疗，因此确定，此次样本取得的临床和病理诊断资料足够精确。以上样本全部经过10%的中性福尔马林充分固定。若样本中存在以下任一情况，则排除在研究之外：（1）肿瘤的组织学起源不明确；（2）患者有其他恶性肿瘤病史；（3）临床资料不完整。

2.1.1.2 乳腺癌患者临床资料

审查乳癌病人的院内治疗档案，搜集每位病人的基本信息，涵盖病人的姓名、年纪、病灶初始位置和组织学等级、肿块尺寸、淋巴结状况、器官扩散、TNM阶段划分、雌性激素接收体ER、孕酮激素受体PR、人类表皮生长因子受体-2HER-2的活性、分子构型、Ki-67的活性以及治疗前后的情况（表1）。石河子大学第一附属医院的伦理委员会已经批准了本项研究，并且所有参与者均已经签订了知情同意声明。

表1 乳腺癌患者临床病理学特征

基线特征	总病例数 (N=150)		
	例数	百分比 (%)	
年龄	≤55 岁	87	58.0
	>55 岁	63	42.0
原发部位	左	84	56.0

续表1 乳腺癌患者临床病理学特征