



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.11.010
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2024.11.010
China Journal of General Surgery, 2024, 33(11):1835-1845.

· 甲状腺外科专题研究 ·

PIM1 过表达对甲状腺乳头状癌细胞代谢组学的影响及意义

王佳琦¹, 许茜茜¹, 唐茜², 朱欣^{1,2}

[1. 温州医科大学研究生培养基地(浙江省肿瘤医院), 浙江 杭州 310022; 2. 浙江省头颈肿瘤转化医学研究重点实验室, 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022]

摘要

背景与目的: 编码组成型活性丝苏氨酸激酶的致癌基因 PIM1 表达上调与各种肿瘤的发生和发展有关, 笔者前期研究中证实 PIM1 对甲状腺癌的致癌作用, 能够影响甲状腺癌的发生发展及预后。因此, 本研究通过代谢组学分析过表达 PIM1 的甲状腺乳头状癌 (PTC) 细胞的代谢特性, 为进一步研究 PIM1 如何调节 PTC 的代谢过程提供依据。

方法: 构建 PIM1 过表达载体, 建立稳定转染的 PTC 细胞株 (BCPAP); 通过 qRT-PCR 和 Western blot 验证 PIM1 过表达的效果; 基于液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 技术, 对 PIM1 过表达的 BCPAP 细胞株 (PIM1-OE) 及转染空白质粒的对照细胞株 (NC) 进行代谢组学分析, 结合多元统计分析以及 KEGG 数据库, 鉴定并筛选出差异常代谢物及代谢通路; 基于生物信息学验证 PIM1 及相关代谢通路与甲状腺癌患者的预后关系。

结果: PIM1 过表达的 BCPAP 细胞株中 PIM1 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显上调 (均 $P < 0.05$); 代谢组学结果显示, PIM1 过表达后, 细胞内 41 种代谢物发生变化, 其中 15 种代谢物 (L-天冬氨酸、琥珀酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、甜菜碱、2-脱氢泛酸、3-吡啶乙腈、D-章鱼碱、吡啶、N-乙酰谷氨酸、肌酸、泛酸、尿毒酸、N-乙酰-L-天冬氨酸、磷酸羟基丙酮酸) 差异较为明显 (均 $P < 0.05$); 结合 KEGG 数据库分析差异代谢产物后发现 31 条代谢通路存在差异, 其中 4 条代谢通路 (丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 色氨酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢) 差异较为明显, 且代谢途径的活性均下调 (均 $P < 0.05$); 生物信息学分析结果显示, PIM1 的高表达以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路活性下调的甲状腺癌患者的总生存率均明显降低 (均 $P < 0.05$)。

结论: PIM1 可能通过调节天冬氨酸、琥珀酸和色氨酸在内的多种氨基酸代谢水平, 影响多种代谢途径, 改变 PTC 的代谢状态, 进而促进 PTC 的发生发展过程, 其中甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径的变化可能与患者预后密切相关。

关键词

甲状腺肿瘤; 甲状腺癌, 乳头状; 代谢组学; PIM1
中图分类号: R736.1

Impact of PIM1 overexpression on the metabolomics of papillary thyroid carcinoma cells and its significance

WANG Jiaqi¹, XU Qianqian¹, TANG Xi², ZHU Xin^{1,2}

[1. Postgraduate Training Base Alliance of Wenzhou Medical University (Zhejiang Cancer Hospital), Hangzhou 310022, China; 2. Key

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82072950)。

收稿日期: 2023-12-13; **修订日期:** 2024-04-10。

作者简介: 王佳琦, 温州医科大学硕士研究生, 主要从事甲状腺癌方面的研究。

通信作者: 朱欣, Email: zhuxin@zjcc.org.cn

Laboratory of Head & Neck Cancer Translational Research of Zhejiang Province, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China]

Abstract

Background and Aims: The oncogene PIM1, encoding a constitutively active serine/threonine kinase, is upregulated in various tumors and closely associated with tumorigenesis and progression. Our previous studies have confirmed the oncogenic role of PIM1 in thyroid cancer, demonstrating its impact on tumor development, progression, and prognosis. This study was conducted to investigate the metabolic characteristics of papillary thyroid carcinoma (PTC) cells overexpressing PIM1 using metabolomics analysis, providing a basis for further exploring how PIM1 regulates metabolic processes in PTC.

Methods: A PIM1 overexpression plasmid was constructed, and a stably transfected PTC cell line (BCPAP) was established. The overexpression of PIM1 was verified by qRT-PCR and Western blot. Metabolomics analysis of PIM1-overexpressing BCPAP cells (PIM1-OE) and control cells transfected with an empty vector (NC) was performed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Differential metabolites and metabolic pathways were identified and screened through multivariate statistical analysis and the KEGG database. Bioinformatics analysis was conducted to explore the relationship between PIM1, associated metabolic pathways, and the prognosis of thyroid cancer patients.

Results: The mRNA and protein levels of PIM1 were significantly upregulated in the PIM1-OE BCPAP cells (both $P < 0.05$). Metabolomics analysis identified changes in 41 intracellular metabolites in PIM1-OE cells, with 15 metabolites showing significant differences, including L-aspartic acid, succinic acid, L-threonine, L-tryptophan, betaine, 2-dehydropantothenate, 3-indoleacetonitrile, D-octopine, indole, N-acetylglutamic acid, creatine, pantothenic acid, uremic acid, N-acetyl-L-aspartic acid, and hydroxyphosphono-pyruvic acid (all $P < 0.05$). KEGG database analysis revealed significant alterations in 31 metabolic pathways, with 4 pathways—alanine, aspartate and glutamate metabolism; tryptophan metabolism; glycine, serine, and threonine metabolism; and arginine and proline metabolism—being notably affected, showing decreased activity (all $P < 0.05$). Bioinformatics analysis indicated that high PIM1 expression and reduced activity in the glycine, serine, and threonine metabolic pathways were associated with significantly decreased overall survival in thyroid cancer patients (both $P < 0.05$).

Conclusion: PIM1 may influence multiple metabolic pathways by regulating the levels of various amino acids, including aspartic acid, succinic acid, and tryptophan, thereby altering the metabolic state of PTC and promoting its development and progression. Among these, changes in the glycine, serine, and threonine metabolic pathways may be closely associated with patient prognosis.

Key words

Thyroid Neoplasms; Thyroid Cancer, Papillary; Metabolomics; PIM1

CLC number: R736.1

甲状腺癌是内分泌系统最常见的恶性肿瘤，也是目前发病率增长最快的恶性肿瘤之一，其中以甲状腺乳头状癌（PTC）最为常见，约占甲状腺癌总数的85%以上^[1-3]。PIM1作为原癌基因，其表达产物PIM1蛋白具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性^[4]，能够磷酸化众多特异性底物（抗凋亡蛋白、细胞周期蛋白等）来调节细胞周期进程、增殖和细胞凋亡等^[5]，并且PIM1在许多类型的癌细胞中过表达，包括肝癌、前列腺癌、肺癌、乳腺癌和结直肠癌等^[6-9]，其表达在肿瘤的发生、进展和维

持中发挥重要作用。前期研究中，笔者团队也首次证实PIM1在PTC中的重要致癌作用^[10]。

在肿瘤发展过程中，代谢物作为基因和蛋白表达的下游产物，会随着酶活性、细胞调控、信号通路激活和遗传变异而改变^[11]。多数研究^[12-15]表明，代谢重编程是决定甲状腺癌临床表型的关键因素，与健康的邻近甲状腺组织相比，甲状腺癌中葡萄糖、氨基酸和脂质代谢的水平更高，包含多种过度活跃的代谢途径，且甲状腺癌的发生发展与高糖酵解速率和生物合成途径的激活密切相

关。代谢组学是研究代谢物的种类、数量及其变化,全面表征细胞、器官或其他生物系统中代谢物的方法,能够提供有关潜在代谢途径的信息,在代谢物特性的研究中具有较高的价值,还可以完善肿瘤的发生机制^[16-17]。

因此,本研究通过代谢组学的方法研究 PIM1 过表达后 PTC 细胞株 (BCPAP) 中的代谢变化,筛选出差异代谢物及代谢通路,探索 PIM1 如何影响 PTC 的代谢过程,为揭示 PTC 的发病机制提供了重要的科学依据。

1 材料与方法

1.1 构建 PIM1 过表达的 BCPAP 细胞株

通过生物信息分析 PIM1 基因序列和药物筛选等过程,构建出 PIM1 过表达慢病毒载体 GV141 (图 1); 以 GV141 感染 BCPAP 细胞株, MOI 值设计为 10, 构建 PIM1 过表达的 BCPAP 细胞株。BCPAP 细胞系购自中国科学院上海生物科学研究所细胞资源中心。

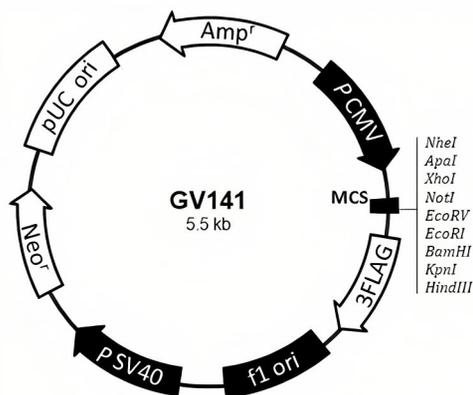


图 1 慢病毒载体 GV141

Figure 1 The lentiviral vector GV 141

1.2 细胞培养

成功构建的 PIM1 过表达 BCPAP 细胞株 (PIM1-OE) 与转染空白质粒的 BCPAP 细胞株 (NC) 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific Inc.) 培养基中,置于 5% CO₂, 37 °C 培养箱中培养。

1.3 转染效果验证

1.3.1 qRT-PCR 使用 TRIzol 法从细胞中提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。根据逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA,以 cDNA

为模板,构建 PCR 反应体系,设置反应条件为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 进行 35 个循环,通过 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因 mRNA 水平,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列
PIM1	
正向引物	5'-CGA CAT CAA GGA CGA AAA C-3'
反向引物	5'-CCA CAC ACC ATA TCA TAC AGC-3'
GAPDH	
正向引物	5'-CTG GGC TAC ACT GAG CAC C-3'
反向引物	5'-AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG-3'

1.3.2 Western blot 收集细胞后,使用含有磷酸酶和蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液 (Beyotime, 中国) 裂解细胞,裂解物在 4 °C 下,按照说明书要求, 12 000 r/min, 10 min, 去除碎片。所有样品的蛋白浓度均采用 BCA 蛋白测定试剂盒 (Beyotime, 中国) 测定。所有样品在使用前均保存在 -20 °C 冰箱中。等量的蛋白样品采用 SDS-PAGE 凝胶进行电泳,然后将凝胶上的所有蛋白样品转移至 PVDF 膜上 (100 V, 90 min)。加入含 5% 脱脂牛奶的 TBST 缓冲液,在室温下封闭 2 h,以防止非特异性结合。然后使用 TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min。加入一抗封闭液: 抗 PIM1 抗体 (1:2 000 稀释; Huabio, ET1609-57, 中国), 抗内参 β-actin 抗体 (1:5 000 稀释; Abconal, AC004, 中国), 放置 4 °C 下摇床孵育过夜。再加入二抗封闭液: 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/鼠 IgG (1:10 000 稀释, Beyotime, 中国), 室温孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。在膜上滴加 ECL 试剂后,至 BioRAD 凝胶图像成像仪中进行扫描拍照,条带通过 Image J 软件进行灰度分析。

1.4 代谢组学的相关样品制备

分别移取全部细胞样本 (3 组 PIM1-OE 细胞株、3 组 NC 细胞株) 到 2 mL EP 管中,准确加入 1 mL 乙腈:甲醇:H₂O 混合溶液 (2:2:1, v/v/v), 涡旋振荡 30 s; 将离心管浸入液氮快速冷冻 5 min, 取出离心管室温冻融,再次把离心管置于 2 mL 适配器内,安装至研磨仪中,55 Hz 振荡 2 min,重复上述步骤 2 次; 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 取上清液 850 μL 至 2 mL 离心管中,真空浓缩仪浓缩至尽干; 准确加入 300 μL 乙腈:0.1%FA (1:9, v/v) 配制的

2-氯苯丙氨酸溶液 (4 ppm) (-20 °C) 复溶样品, 经过 0.22 μm 膜过滤, 过滤液加入检测瓶中待测。

1.5 LC-MS 分析条件

色谱条件: 仪器采用 Thermo Vanquish, 使用 ACQUITY UPLC[®] HSS T3 1.8 μm (2.1 mm × 150 mm) 色谱柱, 自动进样器温度设为 8 °C, 以 0.25 mL/min 的流速, 40 °C 的柱温, 进样 2 μL 进行梯度洗脱, 流动相为正离子 0.1% 甲酸水 (A2) -0.1% 甲酸乙腈 (B2); 负离子 5 mmol/L 甲酸铵水 (A3) -乙腈 (B3)。梯度洗脱程序为 0~1 min, 2% B2/B3; 1~9 min, 2%~50% B2/B3; 9~12 min, 50%~98% B2/B3; 12~13.5 min, 98% B2/B3; 13.5~14 min, 98%~2% B2/B3; 14~20 min, 2% B2- 正模式 (14~17 min, 2% B3- 负模式)。

质谱条件: 仪器使用 Thermo Q Exactive, 电喷雾离子源 (ESI), 正负离子电离模式, 正离子喷雾电压为 3.50 kV, 负离子喷雾电压为 2.50 kV, 鞘气 30 arb, 辅助气 10 arb。毛细管温度 325 °C, 以分辨率 70 000 进行全扫描, 扫描范围 81~1 000, 并采用 HCD 进行二级裂解, 碰撞电压为 30 eV, 同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息。

1.6 样本数据处理和分析

原始数据转换成 mzXML 格式后, 通过 R (v3.3.2) 的 XCMS 程序包进行峰识别、峰过滤、峰对齐等峰信号检测, 依据 80% 规则去除缺失值, 得到质核比 (mass to charge ratio, m/z) 和保留时间 (retention time) 及峰面积 (intensity), 然后对所得数据进行峰面积的总峰归一化处理 (sum peak normalization)。通过主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)

和正交-偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLSS-DA) 对数据进行多元统计分析, 根据变量权重重要性 (variable importance in projection, VIP) ≥1 和 $P \leq 0.05$ 筛选出最终差异代谢物。通过 R (v3.3.2) 计算各个代谢物间的相关性, 并通过 heatmap 程序包对数据集进行缩放, 得到代谢物热图, 最后运用 Metaboanalyst (www.metaboanalyst.ca) 数据库分析差异代谢通路。

1.7 生物信息学分析

本研究通过 GEPIA 数据库^[18]分析 500 余例甲状腺癌患者中 PIM1 对甲状腺癌的预后价值, 进一步从 TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov>) 下载甲状腺癌的相关数据, 使用 R 语言中 GSVA 包进行 ssGSEA 分析, 得到每个通路的打分, 使用 survminer 包 surv_cutpoint 命令获取最优的 cut-off 分为高低打分两组。采用 Kaplan-Meier 法计算其与生存的相关性, 然后通过 R 语言的 survival 包绘制生存曲线。

1.8 统计学处理

所有实验数据均采用 GraphPad Prism 8.0 进行分析。通过单因素方差分析和 *t* 检验比较各组间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PIM1 过表达的 BCPAP 细胞株中 PIM1 的 mRNA 和蛋白表达水平

与对照细胞 (NC) 比较, 在 PIM1 过表达的 BCPAP 细胞株 (PIM1-OE) 中, PIM1 的 mRNA 和蛋白表达水平明显上调 (图 2)。

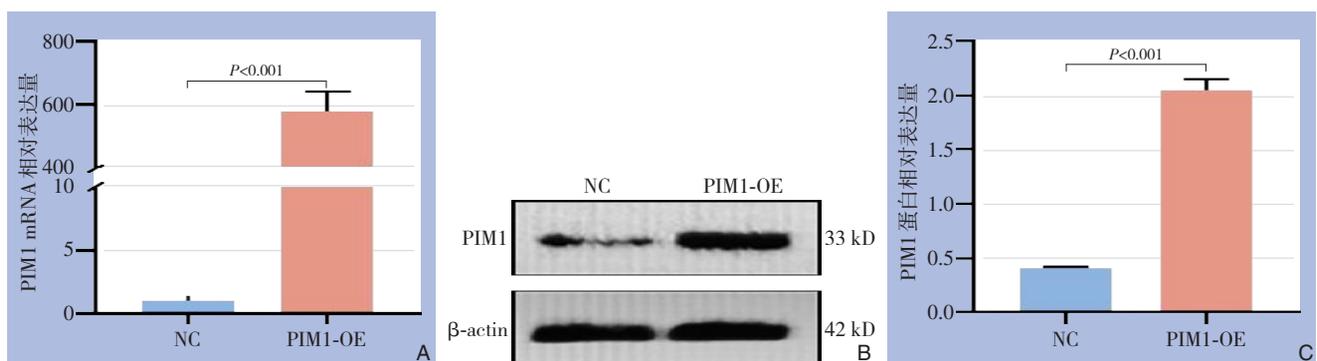


图2 PIM1-OE和NC细胞中PIM1的mRNA和蛋白表达水平 A: qPCR检测PIM1的mRNA水平; B-C: Western blot检测PIM1的蛋白表达水平

Figure 2 The mRNA and protein expression levels of PIM1 in PIM1-OE and NC cells A: qPCR analysis of PIM1 mRNA levels; B-C: Western blot analysis of PIM1 protein expression levels

2.2 多元统计分析

首先采用 PCA 识别方法对两组的代谢轮廓进行整体分析, 结果发现, 两组细胞之间有明显分离趋势 (图 3A); 我们进一步使用 PLS-DA 对两组数据进行分析, 并使用置换检验评估当前 PLS-DA 模

型是否过拟合, 结果显示模型有着良好的拟合优度与预测能力 (图 3B-C); 此外, OPLS-DA 对数据进行分析, 结果也显示在正、负离子模式下能够很好地区分 NC 组和 PIM1-OE 组 (图 3D)。

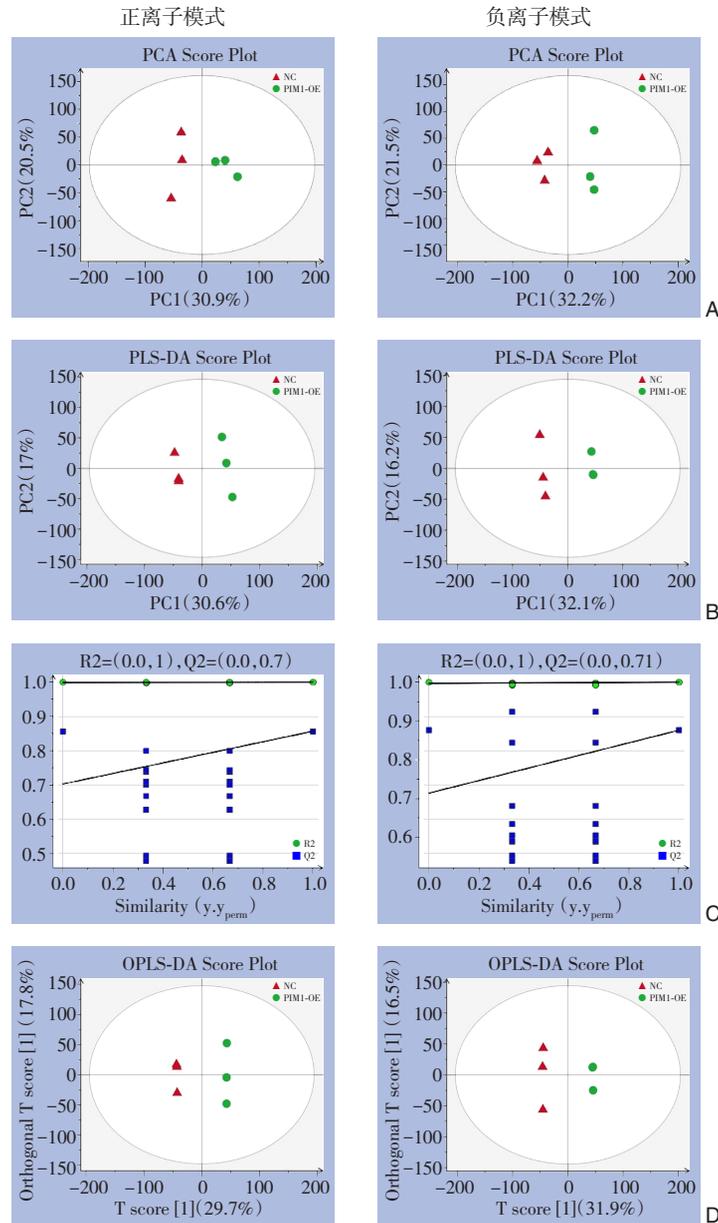


图 3 多元统计分析 A: PCA 得分图; B: PLS-DA 得分图; C: 置换检验图; D: OPLS-DA 得分图

Figure 3 Multivariate analysis scores plot

A: PCA scores plot; B: PLS-DA scores plot; C: Corresponding validation plot; D: OPLS-DA scores plot

2.3 差异代谢物分析

VIP 值反映各变量在模型建立中的重要性, 本研究以 $VIP \geq 1$ 和单因素方差分析 ($P \leq 0.05$) 作为截断标准, 共筛选鉴定出 41 个差异代谢物 (表 2)。其中有 15 种代谢物差异较为显著: L-天冬氨酸、

琥珀酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、甜菜碱、2-脱氢泛酸、3-吡啶乙腈、D-章鱼碱、吡啶、N-乙酰谷氨酸、肌酸、泛酸、尿毒酸、N-乙酰-L-天冬氨酸、磷酸羟基丙酮酸 (图 4)。

表2 41种差异代谢产物信息
Table 2 Information of the 41 differential metabolites

编号	代谢物名称	化学式	核质比	RT(min)	VIP	P
1	胞嘧啶	C4H5N3O	112.050 5	118.039 5	3.774	0.048
2	鸟苷	C10H13N5O5	284.098 7	282.510 0	2.035	0.014
3	苯酚	C6H6O	94.045 7	403.614 0	1.768	0.023
4	甜菜碱	C5H11NO2	118.086 1	90.111 3	3.423	0.002
5	L-苏氨酸	C4H9NO3	120.065 5	86.191 8	1.808	0.045
6	吡哌酸	C6H11NO2	130.049 4	86.811 7	3.399	0.023
7	肌酸	C4H9N3O2	132.076 9	94.429 1	11.210	0.000
8	3-吡啶乙腈	C10H8N2	156.120 8	774.290 0	1.547	0.008
9	N- α -乙酰赖氨酸	C8H16N2O3	188.070 6	394.129 0	7.048	0.015
10	L-色氨酸	C11H12N2O2	205.097 8	394.129 0	4.131	0.017
11	吡啶	C8H7N	118.065 6	394.535 5	1.214	0.047
12	1-甲基烟酰胺	C7H9N2O	137.071 1	136.106 0	3.288	0.021
13	4-甲氧基苯甲醛	C8H8O2	136.049 2	826.318 0	1.413	0.014
14	鸟嘌呤	C5H5N5O	152.057 1	121.941 0	1.251	0.023
15	去甲肾上腺素	C9H13NO3	184.096 7	148.479 0	1.318	0.002
16	N1-乙酰亚精胺	C9H21N3O	188.175 3	74.316 4	2.883	0.000
17	N-乙酰谷氨酸	C7H11NO5	190.071 3	172.397 0	1.050	0.000
18	哌啶	C5H11N	86.096 9	192.875 0	5.643	0.008
19	N-乙酰L-天冬氨酸	C6H9NO5	158.045 3	134.479 5	1.028	0.004
20	1,5-萘二胺	C10H10N2	159.092 1	394.129 0	1.274	0.021
21	2-萘胺	C10H9N	144.080 8	394.129 0	1.310	0.022
22	5-(2-羟乙基)-4-甲基噻唑	C6H9NOS	143.040 4	519.394 5	1.737	0.016
23	2-脱氢泛酸	C6H10O4	146.061 0	394.129 0	1.825	0.030
24	磷酸羟基丙酮酸	C3H5O7P	184.985 9	740.283 0	1.104	0.002
25	D-章鱼碱	C9H18N4O4	247.141 7	127.451 5	1.570	0.034
26	N-乙酰- α -D-氨基葡萄糖 1-磷酸	C8H16NO9P	284.053 3	92.609 3	1.151	0.003
27	甘露醇	C6H14O6	181.071 2	91.147 8	6.315	0.041
28	尿核苷	C9H12N2O6	243.060 3	169.429 5	5.117	0.041
29	甘氨酸亮氨酸	C8H16N2O3	187.107 3	173.889 0	1.097	0.043
30	脱氧肌苷	C10H12N4O4	251.076 4	295.515 5	1.140	0.010
31	乙基甲基乙酸	C5H10O2	101.022 5	352.397 0	2.365	0.010
32	L-天冬氨酸	C4H7NO4	133.031 7	81.210 8	2.898	0.001
33	琥珀酸	C4H6O4	117.017 3	98.626 1	5.883	0.007
34	尿毒酸	C6H6N2O2	137.033 7	97.928 1	1.511	0.005
35	6-甲基硫代嘌呤	C6H6N4S	166.015 8	102.716 5	1.967	0.010
36	泛酸	C9H17NO5	218.101 8	187.322 0	4.196	0.010
37	羟基苯基乳酸	C9H10O4	181.048 5	179.186 5	1.496	0.001
38	L-天精氨酸	C7H16N4O2	187.117 9	102.829 5	1.151	0.009
39	肌苷	C10H12N4O5	267.072 5	250.433 0	3.440	0.013
40	黄嘌呤	C10H12N4O6	283.066 5	274.900 0	2.435	0.006
41	非对称性二甲基精氨酸	C8H18N4O2	201.134 1	115.771 5	5.121	0.018

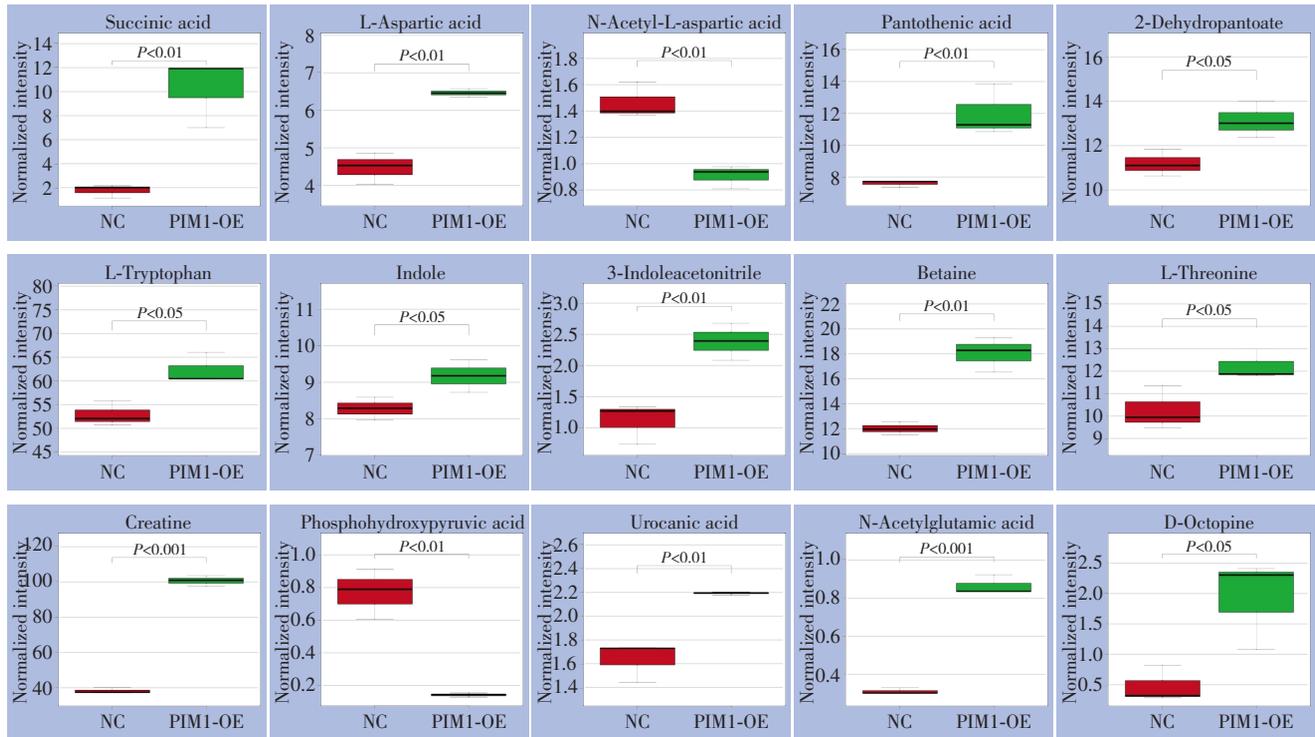


图 4 差异较为明显的 15 种差异代谢物的箱式图

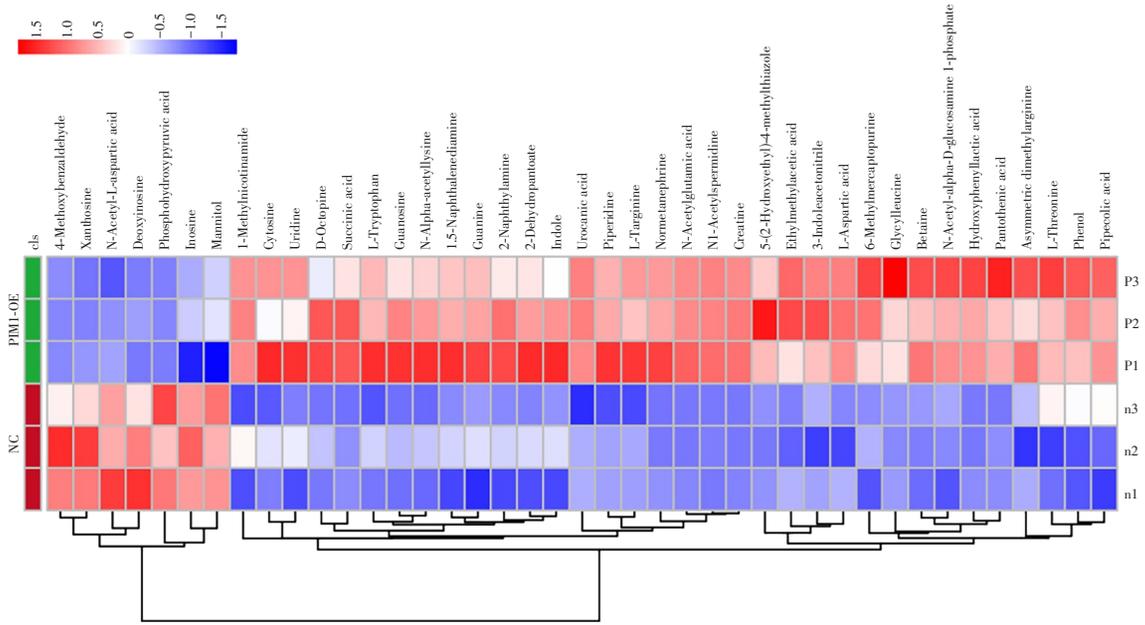
Figure 4 Box plots of 15 differential metabolites with significant differences

2.4 差异代谢通路分析

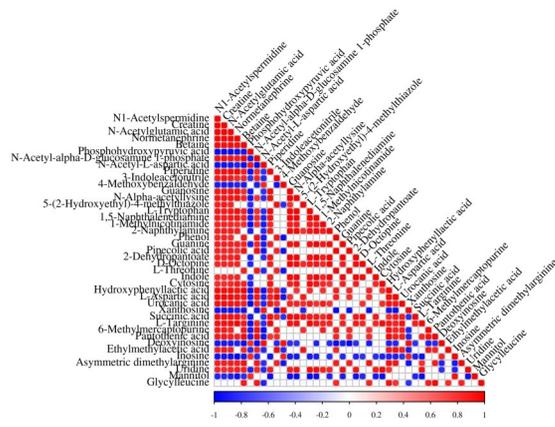
通过 R (v3.3.2) 中 pheatmap 程序包对数据集进行缩放, 得到代谢物热图 (图 5A)。将筛选出的差异代谢物进行关联热图分析 (图 5B); 基于 KEGG 代谢通路, 利用 Metaboanalyst (<http://www.Metaboanalyst.ca>) 数据库, 进行代谢通路分析 (图 5C)。结果发现其中有明显差异的通路有丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (alanine, aspartate and glutamate metabolism), 色氨酸代谢 (tryptophan metabolism), 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 (glycine, serine and threonine metabolism), 泛酸和 CoA 合成代谢 (pantothenate and CoA biosynthesis) 等四条代谢通路。

2.5 PIM1 和相关代谢通路与甲状腺癌患者预后的相关性分析

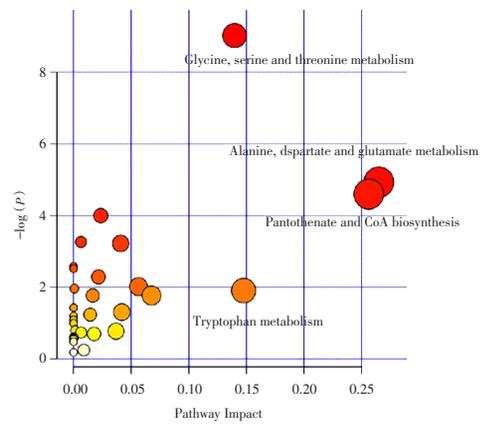
通过对代谢组学中差异代谢物进行 KEGG Compound 分析富集通路, 得到代谢网络图 (图 6A)。进一步通过 GEPIA 数据库分析 TCGA 数据库中甲状腺癌患者, Kaplan-Meier 生存曲线显示, PIM1 的高表达明显影响甲状腺癌患者的总生存率 ($P < 0.05$), 随后比较 4 条明显差异代谢途径对甲状腺癌预后的影响, 结果显示, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径活性上调的甲状腺癌患者的预后明显优于该代谢途径活性下调的患者 (均 $P < 0.05$), 而丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 色氨酸代谢, 泛酸和 CoA 合成代谢通路无显著影响 (均 $P > 0.05$) (图 6B)。



A



B



C

图5 代谢组学分析结果 A: 差异代谢物热图; B: 差异代谢物关联热图; C: 差异代谢通路分析

Figure 5 Results of metabolomics analysis A: Heatmap of differential metabolites; B: Correlation heatmap of differential metabolites; C: Analysis of differential metabolic pathways

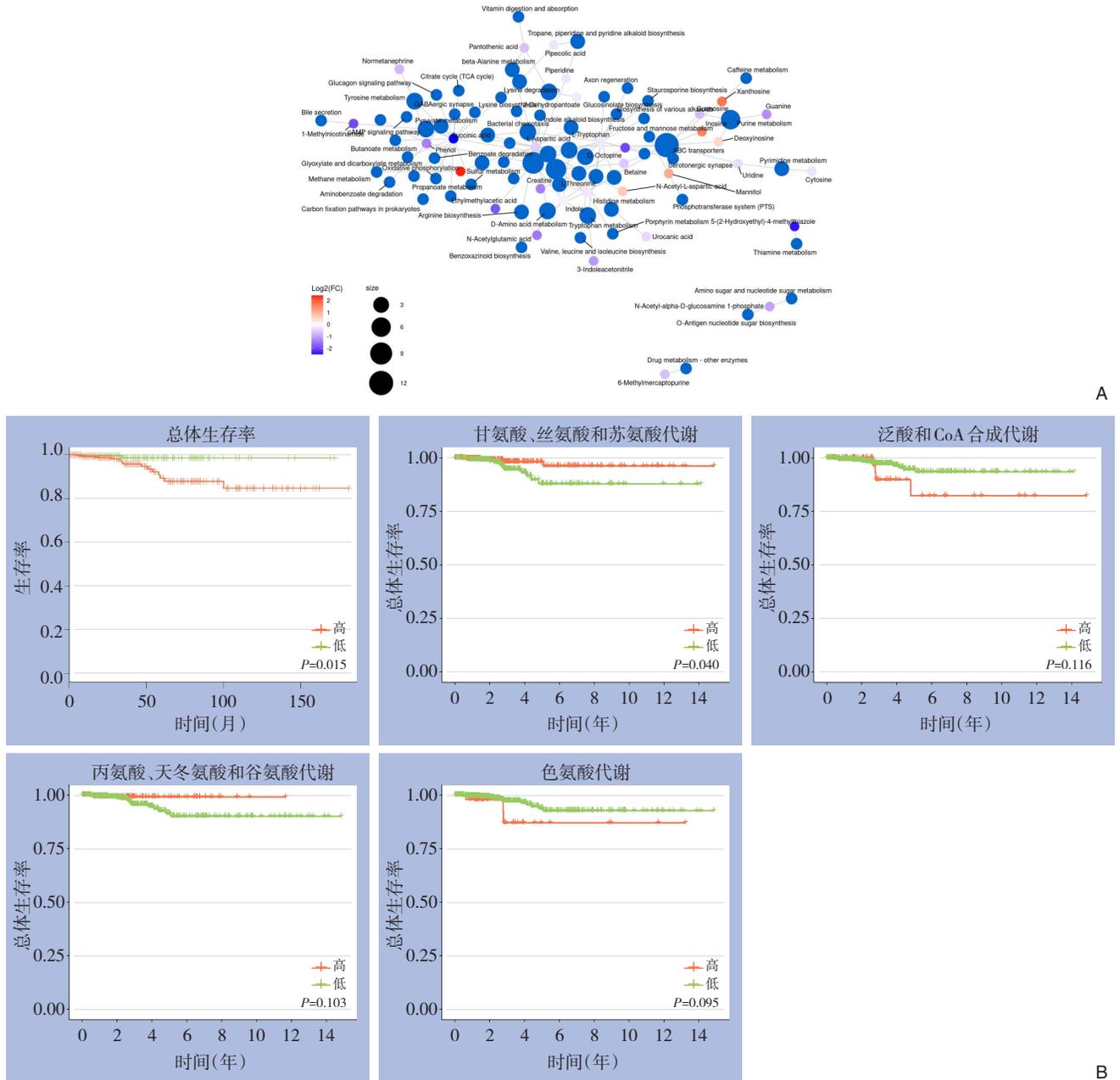


图6 PIM1 和相关代谢通路与甲状腺癌患者预后的相关性分析 A: 代谢网络图, 点表示代谢物, 与之相关联的分子数目越多, 点越大, 分子点可通过渐变色表示 log₂(FC) 值的大小; B: PIM1 及 4 条差异代谢路径与患者总生存率的关系

Figure 6 Correlation analysis of PIM1 and related metabolic pathways with the prognosis of thyroid cancer patients A: Metabolic network diagram, nodes represent metabolites, the larger the node, the greater the number of associated molecules, and the gradient color of the nodes indicates the log₂(FC) value; B: Relationship Between PIM1 and 4 differential metabolic pathways with overall survival of patients

3 讨论

癌症代谢是肿瘤微环境与肿瘤进展之间的重要环节^[19-20]。研究表明, PIM1 与多种肿瘤的能量代谢密切相关。PIM1 能够通过影响葡萄糖和乳酸代谢, 促进结肠直肠癌细胞存活^[21]; 通过促进脂肪酸摄取, 提高髓源性抑制细胞的免疫抑制活性, 影响 PD-L1 治疗的耐药性^[22]; 能够调节肝癌细胞的

糖酵解, 进而维持肿瘤生长并增强肿瘤侵袭^[23]; PIM1 还可以改变前列腺癌细胞中的脂质组成, 是体内外调节前列腺癌细胞脂质谱的关键参与者^[9]。前期研究^[10]中, 笔者团队已证实 PIM1 在 PTC 中的致癌作用, 且 PIM1 与甲状腺癌的发生、发展及预后密切相关。为进一步探讨 PIM1 是否与甲状腺癌的代谢相关, 本研究采用代谢组学的方法研究 PIM1 过表达后 BCPAP 细胞内的代谢变化。

本研究表明, PIM1 过表达后, BCPAP 细胞的代谢谱发生显著变化, 共筛选鉴定出 41 种差异代谢物, 包括苏氨酸、肌酸、色氨酸、天冬氨酸、泛酸、琥珀酸、乳酸等多种氨基酸在内, 提示氨基酸代谢是影响 PTC 的重要因素。氨基酸是构成蛋白质的基本物质, 对于癌症维持其增殖动力十分重要, 它们还可以在能量产生中发挥作用, 驱动核苷的合成和维持细胞氧化还原稳态^[24]。进一步, 本研究根据筛选到的代谢物富集分析, 结果发现较为显著差异的通路有丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 色氨酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 泛酸和 CoA 合成代谢通路, 其中天冬氨酸、琥珀酸和色氨酸等氨基酸水平在 PIM1 过表达细胞株中显著升高。天冬氨酸作为核苷酸合成的前体, 在控制癌细胞增殖速度方面发挥着关键作用, 能够为癌细胞提供整体增殖优势^[25-26]。色氨酸水平的变化, 也会影响肿瘤的发生发展。研究^[27]发现, 肝癌细胞中的色氨酸含量显著高于远端肝组织和癌周肝组织, 癌组织中的色氨酸含量与肿瘤体积有显著正相关关系。琥珀酸是三羧酸循环过程中的重要中间体, 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 能够催化琥珀酸生成延胡索酸^[28]。SDH 缺陷会导致琥珀酸在细胞中堆积, 这不仅可以抑制脯氨酰羟化酶导致 HIF1 α 激活从而介导肿瘤细胞的假性缺氧表型^[29]。由此提示, PIM1 可能通过影响氨基酸水平从而促进 PTC 的发生发展。

基于以上研究结果, 本研究进一步通过生物信息学分析 TCGA 数据库中甲状腺癌相关的公共数据, 分别探讨了 PIM1 和丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 色氨酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 泛酸和 CoA 合成代谢四条差异代谢途径预测甲状腺癌患者预后的潜在临床意义, 结果提示 PIM1 高表达和甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路的活性下调均能够影响甲状腺癌患者的总生存率。代谢通路是由细胞中发生的一系列酶催化的化学反应组成, 通过影响营养获取和脂质、蛋白质、核酸合成等支持肿瘤细胞生长^[30]。研究^[31]发现, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢失调与肿瘤的发生和发展密切相关。本研究的代谢组学结果提示, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路的活性下调; 由此推测, PIM1 可能通过影响甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 从而影响甲状腺癌患者的预后。

本研究不足之处在于选择丙氨酸、天冬氨酸

和谷氨酸代谢, 色氨酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 泛酸和 CoA 合成代谢作为重点关注部分, 但是未进行深入研究, 还需体内体外实验进一步完善代谢组学结果在甲状腺癌中的作用。

综上, 本研究结果提示 PIM1 可能通过多种代谢通路改变肿瘤细胞中代谢水平, 在 PTC 的发生发展中发挥重要作用, 且 PIM1 可能通过调节甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径的活性, 从而影响甲状腺癌患者的预后, 为后续研究 PIM1 如何调节 PTC 的代谢过程促进肿瘤进展的具体机制提供了重要依据。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明: 王佳琦负责实验设计与实施以及文章写作; 许茜茜负责文章写作修改; 唐茜负责数据分析; 朱欣负责实验指导以及文章修改。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.
- [2] 童宁, 刘志波, 邵玉贵, 等. lncRNA MIR31HG 和 miR-101 在分化型甲状腺癌组织中的表达及临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(5):731-738. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.05.013.
- [3] Tong N, Liu ZB, Shao YG, et al. Expressions of lncRNA MIR31HG and miR-101 in differentiated thyroid cancer tissues and their clinical significance[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(5):731-738. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.05.013.
- [4] 赵小慧, 魏明辉, 李正江, 等. 分化型甲状腺癌颈部淋巴结转移相关分子的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(11):1797-1803. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.11.019.
- [5] Zhao XH, Wei MH, Li ZJ, et al. Research progress of molecular signatures associated with cervical lymph node metastasis in differentiated thyroid carcinoma[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(11): 1797-1803. doi: 10.7659/j. issn. 1005-6947.2023.11.019.
- [6] Li H, Xie L, Zhu L, et al. Multicellular immune dynamics implicate PIM1 as a potential therapeutic target for uveitis[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):5866. doi:10.1038/s41467-022-33502-7.
- [7] Liu Z, Han M, Ding K, et al. The role of Pim kinase in immunomodulation[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(12):4085-4097.
- [8] Santio NM, Landor SK, Vahtera L, et al. Phosphorylation of Notch1 by Pim kinases promotes oncogenic signaling in breast and prostate cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28):43220-43238. doi: 10.18632/oncotarget.9215.[PubMed]

- [7] Mahata S, Sahoo PK, Pal R, et al. PIM1/STAT3 axis: a potential co-targeted therapeutic approach in triple-negative breast cancer[J]. *Med Oncol*, 2022, 39(5):74. doi:10.1007/s12032-022-01675-2.
- [8] Merkel AL, Meggers E, Ocker M. PIM1 kinase as a target for cancer therapy[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012, 21(4):425-436. doi:10.1517/13543784.2012.668527.
- [9] Chauhan SS, Casillas AL, Vizzerra AD, et al. PIM1 drives lipid droplet accumulation to promote proliferation and survival in prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2024, 43(6):406-419. doi:10.1038/s41388-023-02914-0.
- [10] Wen QL, Yi HQ, Yang K, et al. Role of oncogene PIM-1 in the development and progression of papillary thyroid carcinoma: involvement of oxidative stress[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 523:111144. doi:10.1016/j.mce.2020.111144.
- [11] Wang YP, Li JT, Qu J, et al. Metabolite sensing and signaling in cancer[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(33):11938-11946. doi:10.1074/jbc.REV119.007624.
- [12] Cararo Lopes E, Sawant A, Moore D, et al. Integrated metabolic and genetic analysis reveals distinct features of human differentiated thyroid cancer[J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(6):e1298. doi:10.1002/ctm2.1298.
- [13] Dhuli K, Medori MC, Donato K, et al. Omics sciences and precision medicine in thyroid cancer[J]. *Clin Ter*, 2023, 174(Suppl 2(6)):11-20. doi:10.7417/CT.2023.2467.
- [14] Yu S, Liu C, Hou Y, et al. Integrative metabolomic characterization identifies plasma metabolomic signature in the diagnosis of papillary thyroid cancer[J]. *Oncogene*, 2022, 41(17):2422-2430. doi:10.1038/s41388-022-02254-5.
- [15] Jajin MG, Abooshahab R, Hooshmand K, et al. Gas chromatography-mass spectrometry-based untargeted metabolomics reveals metabolic perturbations in medullary thyroid carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):8397. doi:10.1038/s41598-022-12590-x.
- [16] Coelho M, Raposo L, Goodfellow BJ, et al. The potential of metabolomics in the diagnosis of thyroid cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15):5272. doi:10.3390/ijms21155272.
- [17] Muthubharathi BC, Gowripriya T, Balamurugan K. Metabolomics: small molecules that matter more[J]. *Mol Omics*, 2021, 17(2):210-229. doi:10.1039/d0mo00176g.
- [18] 黄坤, 何运胜, 李建波, 等. 胰腺癌肝转移核心基因的筛选与验证[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(3):390-399. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.008.
- Huang K, He YS, Li JB, et al. Screening and identification of hub gene involved in hepatic metastasis of carcinoma of pancreas[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(3):390-399. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.008.
- [19] Park JH, Pyun WY, Park HW. Cancer metabolism: phenotype, signaling and therapeutic targets[J]. *Cells*, 2020, 9(10):2308. doi:10.3390/cells9102308.
- [20] Aki S, Nakahara R, Maeda K, et al. Cancer metabolism within tumor microenvironments[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2023, 1867(5):130330. doi:10.1016/j.bbagen.2023.130330.
- [21] Zhang M, Liu T, Sun H, et al. Pim1 supports human colorectal cancer growth during glucose deprivation by enhancing the Warburg effect[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(5):1468-1479. doi:10.1111/cas.13562.
- [22] Xin G, Chen Y, Topchyan P, et al. Targeting PIM1-mediated metabolism in myeloid suppressor cells to treat cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2021, 9(4):454-469. doi:10.1158/2326-6066.CIR-20-0433.
- [23] Leung CO, Wong CC, Fan DN, et al. PIM1 regulates glycolysis and promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(13):10880-10892. doi:10.18632/oncotarget.3534.
- [24] Vettore L, Westbrook RL, Tennant DA. New aspects of amino acid metabolism in cancer[J]. *Br J Cancer*, 2020, 122(2):150-156. doi:10.1038/s41416-019-0620-5.
- [25] Rabinovich S, Adler L, Yizhak K, et al. Diversion of aspartate in ASS1-deficient tumours fosters de novo pyrimidine synthesis[J]. *Nature*, 2015, 527(7578):379-383. doi:10.1038/nature15529.
- [26] Sullivan LB, Gui DY, Hosios AM, et al. Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells[J]. *Cell*, 2015, 162(3):552-563. doi:10.1016/j.cell.2015.07.017.
- [27] Platten M, Nollen EAA, Röhrig UF, et al. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(5):379-401. doi:10.1038/s41573-019-0016-5.
- [28] Xia L, Zhang HR, Wang XZ, et al. The role of succinic acid metabolism in ovarian cancer[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:769196. doi:10.3389/fonc.2021.769196.
- [29] Weber A, Klocker H, Oberacher H, et al. Succinate accumulation is associated with a shift of mitochondrial respiratory control and HIF-1 α upregulation in PTEN negative prostate cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7):2129. doi:10.3390/ijms19072129.
- [30] Zhang D, Guo Y, Xie N. Prognostic value and co-expression patterns of metabolic pathways in cancers[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(Suppl 11):860. doi:10.1186/s12864-020-07251-0.
- [31] Zhao X, Fu J, Hu B, et al. Serine metabolism regulates YAP activity through USP7 in colon cancer[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:639111. doi:10.3389/fcell.2021.639111.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式:王佳琦, 许茜茜, 唐茜, 等. PIM1 过表达对甲状腺乳头状癌细胞代谢组学的影响及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2024, 33(11):1835-1845. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.11.010

Cite this article as: Wang JQ, Xu QQ, Tang X, et al. Impact of PIM1 overexpression on the metabolomics of papillary thyroid carcinoma cells and its significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2024, 33(11):1835-1845. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.11.010