

α -常春藤皂苷调控 SNX10 介导的谷氨酰胺代谢抑制肠上皮细胞恶性转化研究

冯 慧¹, 周婷婷¹, 黎子文¹, 李 柳^{1,2}, 余成涛^{1,2}, 范旻旻^{1,2}, 孙东东^{1,2}, 程海波^{1,2,3}, 沈卫星^{1,2*}

1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 江苏 南京 210023

3. 南京中医药大学附属医院 肿瘤内科, 江苏 南京 210023

摘 要: 目的 研究干扰分选连接蛋白 10 (sorting nexin 10, SNX10) 表达对人正常肠上皮 FHC、NCM460 细胞增殖、谷氨酰胺代谢的影响及 α -常春藤皂苷调控作用的分子机制。方法 利用转染技术构建稳定敲低 SNX10 的 FHC、NCM460 细胞, qRT-PCR 和 Western blotting 检测敲低效率; CCK-8、克隆形成实验检测细胞增殖能力; MTT 筛选 α -常春藤皂苷实验浓度并检测其对 SNX10 表达的影响; 检测细胞内还原型谷胱甘肽含量; Western blotting 检测细胞 SNX10、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)/c-myc 信号通路相关蛋白及下游谷氨酰胺转运蛋白 SLC7A5 表达情况。结果 敲低 SNX10 后 FHC、NCM460 细胞增殖异常加快 ($P < 0.01$), 细胞内还原型谷胱甘肽含量异常升高 ($P < 0.01$), mTORC1/c-myc 通路被激活, 下游 SLC7A5 表达升高; 而 α -常春藤皂苷干预 SNX10 敲低细胞系后, 细胞 SNX10 表达升高 ($P < 0.05, 0.01$), 且上述变化发生逆转并渐趋空载细胞水平。结论 SNX10 有望成为结直肠癌临床诊断及防治的新靶点, α -常春藤皂苷可逆转肠上皮细胞因 SNX10 敲低导致的快速增殖、mTORC1/c-myc 信号通路活化及谷氨酰胺代谢的异常升高, 从而抑制正常肠上皮细胞的恶性转化。

关键词: SNX10; 肠上皮细胞; 增殖; 谷氨酰胺代谢; α -常春藤皂苷; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1/c-myc 信号通路
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)07-2135-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.07.013

α -Hederin inhibits malignant transformation of intestinal epithelial cells by regulating SNX10-mediated glutamine metabolism

FENG Hui¹, ZHOU Ting-ting¹, LI Zi-wen¹, LI Liu^{1,2}, YU Cheng-tao^{1,2}, FAN Min-min^{1,2}, SUN Dong-dong^{1,2}, CHENG Hai-bo^{1,2}, SHEN Wei-xing^{1,2}

1. The First Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine in Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing 210023, China

3. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To investigate the effects of interfering sorting nexin 10 (SNX10) expression on proliferation and glutamine metabolism of human normal intestinal epithelial cells FHC and NCM460 and molecular mechanism of regulation effect of α -hederin. **Methods** FHC and NCM460 cells with SNX10 stably knockdown were constructed using transfection approach. qRT-PCR and Western blotting were used to detect knockdown efficiency. CCK-8 and clone formation assays were used to detect cell proliferation ability. MTT method was used to screen the experimental concentrations of α -hederin and detect its effects on SNX10 expression. The intracellular content of GSH was detected. The expressions of SNX10, mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)/c-myc signaling pathway-related proteins and downstream glutamine transporter protein SLC7A5 were detected by Western blotting. **Results** The proliferation of FHC and NCM460 cells was abnormally accelerated after SNX10 knockdown ($P < 0.01$), intracellular glutathione content was abnormally increased ($P < 0.01$), mTORC1/c-myc pathway was activated, and expression of downstream SLC7A5 was

收稿日期: 2022-10-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973523); 江苏省研究生培养创新工程研究生科研与实践创新计划项目 (SJCX22_0746)

作者简介: 冯 慧 (1997—), 女, 硕士, 研究方向为肿瘤药理。E-mail: 20200801@njucm.edu.cn

*通信作者: 沈卫星 (1969—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中医药防治肿瘤。E-mail: weixingshen@njucm.edu.cn

elevated, whereas after α -hederin intervention in SNX10 knockdown cell lines, both SNX10 gene and protein expression levels were increased ($P < 0.05, 0.01$) and the above changes were reversed and gradually tended to the empty vector group. **Conclusion** SNX10 is expected to be a new target for clinical diagnosis and prevention of colorectal cancer. α -Hederin can reverse the rapid proliferation, activation of the mTORC1/c-myc signaling pathway and abnormal increase of glutamine metabolism of intestinal epithelial cells due to SNX10 knockdown, thus inhibiting the malignant transformation of normal intestinal epithelial cells.

Key words: SNX10; intestinal epithelial cells; proliferation; glutamine metabolism; α -hederin; mammalian target of rapamycin complex 1/ c-myc signaling pathway

结直肠癌是世界上最为严重的恶性肿瘤之一，其发病率在我国呈明显上升趋势，死亡率居恶性肿瘤第 2 位^[1]，俨然成为社会负担，对国民健康造成严重威胁。代谢失常是恶性肿瘤特征之一，肿瘤微环境改变及细胞内基因突变均会促进癌细胞调整代谢模式、改变代谢途径以满足其恶性增殖所需能量^[2]，具体表现为氨基酸代谢、糖代谢、脂质代谢等异常活跃^[3]。结直肠癌发病机制尚未完全阐明，而肠上皮细胞是结直肠癌的始发位点，其基因突变、缺失或表达异常是导致结直肠癌发生的始动因素^[4-5]。氨基酸作为蛋白质的基本组成部分，是核苷酸、谷胱甘肽和多胺的生物合成所必需的，参与细胞代谢，并为细胞的增殖提供所需营养。近年来，靶向氨基酸代谢的抗肿瘤治疗的也成为热点之一^[6-7]。

谷氨酰胺是细胞中重要的氮源，是合成谷胱甘肽不可或缺的原料，也是合成氨基酸、蛋白质和核酸的前体，谷胱甘肽失衡主要见于癌症、心血管疾病和糖尿病^[8]，维持正常的谷胱甘肽水平对于确保细胞生命活动的有序进行至关重要。谷氨酰胺是一种亲水性氨基酸，不能以自由扩散方式被细胞摄取，故需氨基酸转运体的协助。溶质载体家族 7A5 (solute carrier family 7 member 5, SLC7A5) 是氨基酸转运体系中的一员，作为一种氨基酸交换器，主要在细胞内外运输特定氨基酸如亮氨酸、苯丙氨酸和色氨酸等。研究表明，SLC7A5 在如结直肠癌^[9]、乳腺癌^[10]、口腔癌^[11]、非小细胞肺癌^[12]等不同的肿瘤中高表达，并且其表达随癌症进展而增加^[13]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1) 信号通路是细胞内最重要的能量传感器，而氨基酸是激活 mTOR 所必需的^[14]，SLC7A5 是调控 mTORC1 通路的必需氨基酸转运体，其表达升高可激活 mTORC1 信号通路，增强非小细胞肺癌细胞的恶性行为，抑制或促进乳腺癌 MCF-7 细胞增殖^[12,15]。此外，SLC7A5 的启动子具有原癌基因 *c-myc* 结合位点，*c-myc* 可与之结合以维持氨基酸摄取^[16]。既往研究表明谷氨酰胺代

谢过程中 mTOR 信号通路被激活，而激活的 mTOR 信号通路反过来又促进谷氨酰胺代谢^[17]。分选连接蛋白 (sorting nexins, SNXs) 家族是一类在进化上相对保守的调控真核细胞生理过程的家族，参与蛋白质分选及信号转导等，包含 34 个家族成员^[18]。研究显示，SNX10 在结直肠癌组织中显著降低，其表达水平与肿瘤分化程度、肿瘤、淋巴结和转移 (tumor node metastasis, TNM) 分期及肿瘤淋巴结转移等临床病理因素相关，是结直肠癌肿瘤抑制因子^[19-22]。SNX10 的缺失或突变可促进恶性肿瘤的发生发展^[19,23]。因此，靶向 SNX10 有可能成为结直肠癌防治的新靶点。

由于安全、低毒、耐受性良好、能够降低人类患癌的风险等优势，传统中医药在癌症预防方面越来越受重视。 α -常春藤皂苷为五环三萜类皂苷，在木通科和毛茛科等药用植物中广泛分布。研究显示， α -常春藤皂苷可通过胆固醇依赖的机制诱导淋巴瘤细胞凋亡^[24]，干预糖酵解水平抑制肺癌细胞生长^[25]，提示其可能具有调控代谢作用。本研究瞄准结直肠癌的始发位点——正常肠上皮细胞，通过构建 SNX10 敲低的人正常肠上皮细胞，探讨 SNX10 在人正常肠上皮细胞中的生物学功能及其与谷氨酰胺代谢的关系，及 α -常春藤皂苷对 SNX10 的调控作用，以期为肠上皮细胞恶性转化的防治应用提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞、质粒及菌株

人正常肠上皮 FHC 细胞购自上海中乔新舟生物科技有限公司，人正常肠上皮 NCM460 细胞购自北京北纳生物，人结直肠癌 DLD-1、Caco-2、Lovo、SW480、HT-29 细胞及人胚肾 HEK-293T 细胞购自中国科学院细胞库。质粒 pMD2.G (批号 12259)、psPAX2 (批号 12260)、pLVshRNA-EGFP (2A) Puro (批号 10155) 购自武汉淼灵生物科技有限公司。本研究均采用 15 代以内的细胞进行实验。

1.2 药品与试剂

α -常春藤皂苷 (质量分数 > 98%，批号 27013-

91-8) 购自成都瑞芬思生物科技有限公司; T4 DNA 连接酶 (批号 0011705) 购自美国 Biolabs 公司; 限制性内切酶 EcoRI (批号 00309771)、BamHI (批号 00311362) 购自北京全式金生物; 转染试剂 Lipo8000 (批号 060922220390)、嘌呤霉素 (批号 102221211026)、氨苄青霉素 (批号 030221210416) 购自上海碧云天生物技术有限公司; MTT (批号 EZ7890A119) 购自德国 BioFroxx 公司; 蛋白定量试剂盒 (批号 VK312555) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; RNA 逆转录试剂盒 (批号 A3A1403)、qRT-PCR 试剂盒 (批号 A3A1215) 购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; 质粒小量提取试剂盒 (批号 M1127970)、ECL 发光试剂盒 (批号 S1126071) 购自翌圣生物科技 (上海) 有限公司; 还原型谷胱甘肽含量检测试剂盒 (批号 20210622) 购自北京索莱宝科技有限公司; SNX10 抗体 (批号 336AFA77) 购自美国 Invitrogen 公司; β -tubulin (批号 343684)、SLC7A5 抗体 (批号 303865) 购自上海 Abmart 公司; mTOR 抗体 (批号 GR3207489-16)、Raptor 抗体 (批号 GR253791-12)、p70S6K 抗体 (批号 GR53054-44)、真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (eIF4E binding protein 1, 4EBP1) 抗体 (批号 4)、p-4EBP1 抗体 (批号 GR3387091-5) 购自英国 Abcam 公司; p-mTOR 抗体 (批号 9)、G β L 抗体 (批号 4)、c-myc 抗体 (批号 5)、山羊抗小鼠 IgG 抗体 (批号 36)、山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 30) 购自美国 CST 公司; 针对 SNX10 设计的 shRNA 由北京擎科生物科技有限公司合成; qRT-PCR 引物序列由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.3 仪器

XD202 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); HERA cell 150i 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司); 全自动细胞计数器 (美国 Invitrogen 公司); 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); 5500 型化学发光成像仪器 (上

海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

FHC、NCM460 细胞分别用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 双抗的 DMEM、RPMI 1640 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2 qRT-PCR 检测人正常肠上皮细胞和结直肠癌细胞中 SNX10 mRNA 表达

提取人正常肠上皮 NCM460、FHC 细胞和人结直肠癌 DLD-1、Caco-2、Lovo、SW480、HT-29 细胞总 RNA, 检测 SNX10 mRNA 表达情况。引物序列见表 1, 以 β -actin 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 mRNA 相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

引物	序列 (5'-3')
SNX10	F: GCTGAGGCAGAGACTCCAAA R: AAATCTTCCAGACCCTGGCG
SLC7A5	F: TTCTCATTTGAAGGCACCA R: CCTCGGACGACAGCATCT
β -actin	F: GAGCACAGAGCCTCGCCTTT R: TCATCATCCATGGTGAGCTGG

2.3 SNX10 敲低细胞系的构建及验证

2.3.1 干扰重组质粒构建 针对 SNX10 基因设计 3 条 shRNA 的序列见表 2。取正义链和反义链退火, 形成 DNA 双链。用限制性内切酶——BamHI、EcoRI 将干扰空载体 pLVshRNA-EGFP (2A) Puro 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶分离回收得线性化空载体。用 T4 DNA 连接酶将退火处理所得 shSNX10-1、shSNX10-2、shSNX10-3 连接至线性化空载体, 加入含感受态细胞 Stbl3 的菌液中, 冰浴 20 min, 42 °C 热激 1 min, 冰上 2 min。把上述转化菌液均匀涂布于固体琼脂平板上 (含 100 μ g/mL 氨苄青霉素), 37 °C 烘箱中倒扣培养 12~18 h 后, 分别挑取 2 个单克隆菌落至 LB 液体培养基 (含 100 μ g/mL 氨苄青霉素), 37 °C、

表 2 pLVshSNX10 引物序列
Table 2 Primer sequences of pLVshSNX10

shRNA	序列 (5'-3')
shSNX10#1	F: GATCCCTGGCATTCTTACATTGACTACTTCCTGTCAGATAGTCAATGTAAGAATGCCAGTTTTTG R: AATTCAAAAACCTGGCATTCTTACATTGACTATCTGACAGGAAGTAGTCAATGTAAGAATGCCAGG
shSNX10#2	F: GATCCCATCCTGTGTGTACGAAGAAGATCTTCTGTCAGAATCTTCTTCGTACACAGGATGTTTTTG R: AATTCAAAAACATCCTGTGTGTACGAAGAAGATTCTGACAGGAAGATCTTCTTCGTACACAGGATGG
shSNX10#3	F: GATCCCCAAAGTAATGCGTTGCTGGTCTTCTGTCAGAACAGCAACGCATTACTTTGGTTTTTG R: AATTCAAAAACCAAAGTAATGCGTTGCTGGTCTGACAGGAAGACCAGCAACGCATTACTTTGGG

200 r/min 过夜摇菌。使用质粒小量提取试剂盒提取各重组质粒,各命名为 shSNX10-1、shSNX10-2、shSNX10-3,送北京擎科生物科技有限公司测序。

2.3.2 细胞转染及转染效率验证 接种 HEK-293T 细胞于 6 cm 细胞培养皿,在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内培养至 80%~90% 融合度时利用 Lipo8000 转染试剂分别将重组质粒 shSNX10-1~shSNX10-3 (sh1~sh3) 及空载体 pLVshRNA-EGFP (2A) Puro 和 pMD2.G、psPAX2 质粒共转染 HEK-293T 细胞,48、72 h 后收集并合并上清,0.45 μm 滤膜过滤后分别加于达 30%~40% 密度的 FHC、NCM460 细胞中,并加入等体积的基础培养基,24 h 后更换为完全培养基,每 3 天更换 1 次含 2 μg/mL 嘌呤霉素的基础培养基,筛选 2 周左右,提取空载组和敲低组细胞总 RNA,按“2.2”项下操作;收集空载组和敲低组细胞,加适量裂解液冰上裂解,BCA 法测定蛋白浓度,取 20 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转印至 PVDF 膜,加入 5% 脱脂牛奶,室温封闭 2 h;加入一抗,4 ℃ 孵育 24 h;加入二抗,室温孵育 1 h,显色曝光,采用 Image J 软件进行灰度分析。

2.4 SNX10 敲低对肠上皮细胞增殖的影响

2.4.1 CCK-8 法检测细胞活力 将空载(shNC)组、敲低(shSNX10)组细胞以 3000 个/孔细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μL,每组设 6 个复孔。细胞贴壁后计为 1 d,此后 1、2、3、4、5 d,每孔加 10 μL CCK-8 溶液,培养箱内避光孵育 2 h 后,采用酶标仪测定 450 nm 处吸光度(A)值。

2.4.2 集落形成试验 将空载组、敲低组细胞以每孔 800 个接种至 6 孔板,培养 14 d 左右,PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定,2.5% 结晶紫染色,待自然干燥后,拍照并计数大于 50 个细胞的克隆团。

2.5 谷氨酰胺代谢活性的检测

提取空载组、敲低组细胞总 RNA,采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 SNX10、SLC7A5 基因和蛋白表达水平,按照试剂盒说明书检测细胞内还原性谷胱甘肽含量。

2.6 α-常春藤皂苷对 SNX10 敲低细胞系的影响

2.6.1 MTT 法检测对细胞活性的影响 取对数生长期的 SNX10 敲低细胞,胰蛋白酶消化后制备成单细胞悬液,以 8000 个/孔接种于 96 孔板,每孔 100 μL,贴壁后,吸弃孔中培养液,加入 100 μL 含不同浓度(0、5、10、20、40、80 μmol/L) α-常春藤皂苷的培养液,24 h 后每孔加入 10 μL MTT 继续

培养 3 h,采用酶标仪测定 490 nm 处 A 值。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.6.2 qRT-PCR 和 Western blotting 法检测对 SNX10 mRNA 和蛋白表达的影响 空载组、敲低组细胞接种于 6 孔板,达 60%~70% 密度时,FHC sh1 给予 5、10、15 μmol/L α-常春藤皂苷,NCM460 sh2 给予 8、16、24 μmol/L α-常春藤皂苷。处理 24 h 后提取各组细胞总 RNA 和总蛋白,按“2.2”“2.3.2”项下方法操作。

2.6.3 对谷氨酰胺代谢活性的影响 收集“2.6.2”项下细胞,按试剂盒说明书检测细胞内还原性谷胱甘肽含量。

2.6.4 Western blotting 法检测对 mTORC1/c-myc 通路相关蛋白表达的影响 收集“2.6.2”项下细胞,培养 24 h 后收集细胞,按“2.3.2”项下方法操作。

2.7 统计学分析

应用 Graphpad Prism 9.0 软件统计分析实验数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 SNX10 在肠上皮细胞中的表达情况及敲低效率验证

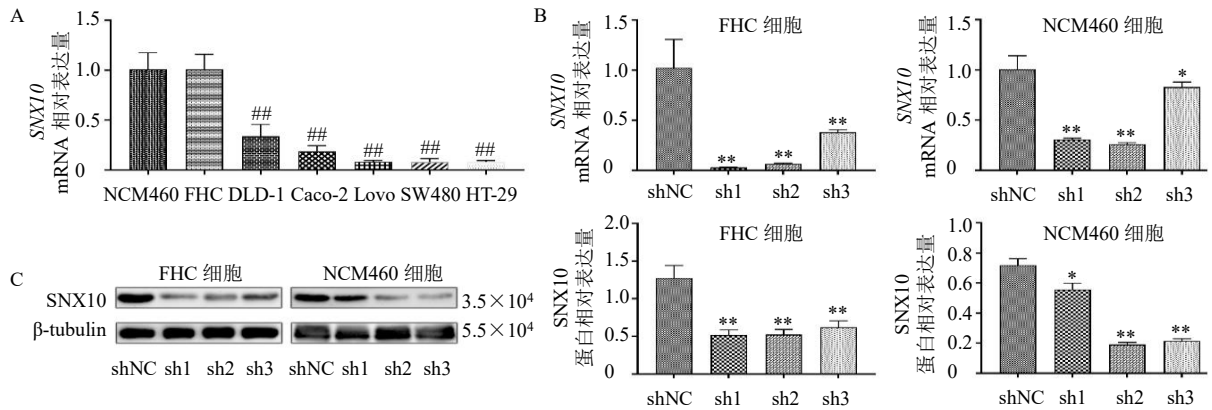
qRT-PCR 结果(图 1-A)表明,SNX10 在人正常肠上皮 FHC、NCM460 细胞中高表达($P < 0.01$),之后利用转染技术稳定敲低 FHC、NCM460 细胞中的 SNX10(图 1-B、C, $P < 0.05$ 、 0.01),FHC 细胞选用敲低效率最好的 sh1,NCM460 细胞则选用 sh2 进行后续实验。

3.2 SNX10 缺失对肠上皮细胞增殖、克隆形成能力的影响

如图 2 所示,与空载细胞相比,SNX10 敲低细胞系增殖加快($P < 0.01$),单个细胞集落形成能力增强($P < 0.01$)。

3.3 SNX10 缺失对细胞氨基酸代谢水平的影响

研究表明,谷氨酰胺能促进增殖信号传导^[26]。如图 3-A、C 所示,FHC、NCM460 细胞在敲低 SNX10 后谷氨酰胺转运因子 SLC7A5 基因和蛋白表达异常增加($P < 0.05$),而谷氨酰胺是谷胱甘肽合成的原料,谷胱甘肽在生理条件下多以还原形式存在,进一步检测空载组、SNX10 敲低组细胞还原型谷胱甘肽的含量,如图 3-B 所示,SNX10 敲低后细胞还原型谷胱甘肽含量升高($P < 0.01$),这或许能够解释 SNX10 敲低后细胞增殖加快的现象。



sh1~sh3-shSNX10 敲低组 与正常肠上皮细胞比较: $^{##}P<0.01$; 与空载组 (shNC) 比较: $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$, 图 2、3 同
sh1—sh3-shSNX10 knockdown group $^{##}P<0.01$ vs normal intestinal epithelial cells; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs empty vector group (shNC), same as fig. 2, 3

图 1 SNX10 在肠上皮细胞中的表达情况 (A) 及敲低效率验证 (B、C) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Expression of SNX10 in intestinal epithelial cells (A) and knock efficiency verification (B, C) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

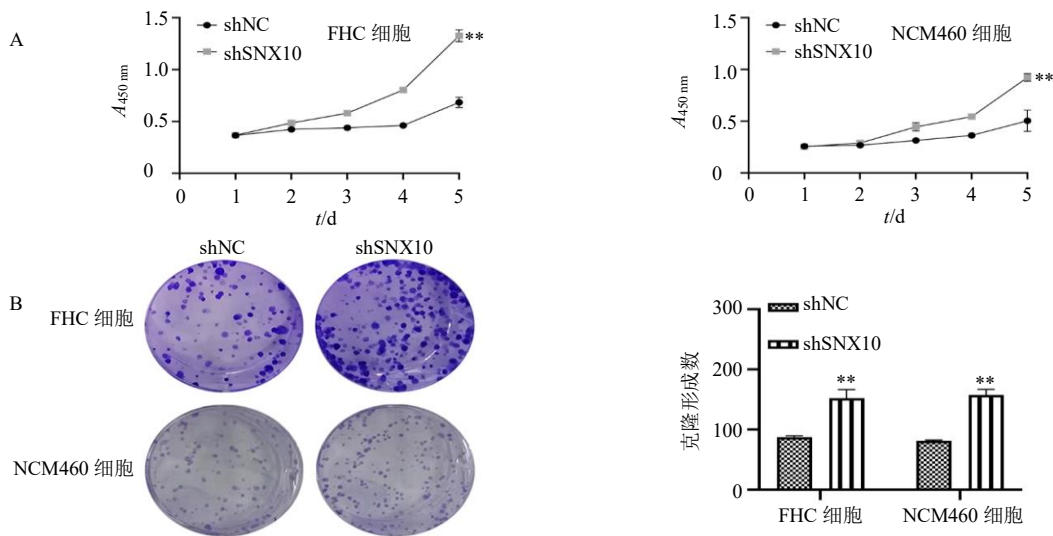
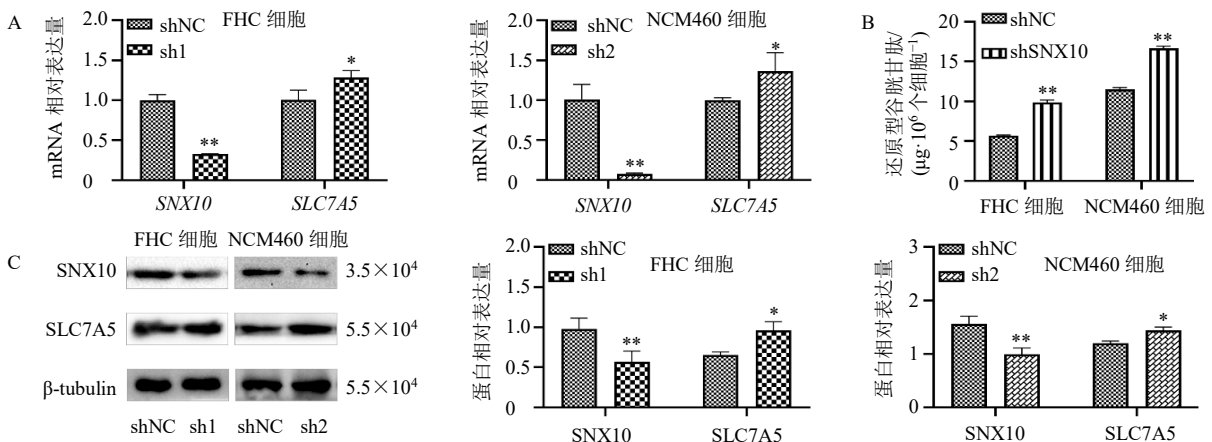


图 2 敲低 SNX10 对 FHC、NCM460 细胞增殖 (A) 和克隆形成能力 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of SNX10 knockdown on proliferation (A) and clone formation capacity (B) of FHC and NCM460 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)



A-各组 SNX10 和 SLC7A5 mRNA 表达 B-各组还原型谷胱甘肽含量 C-各组 SNX10 和 SLC7A5 蛋白表达

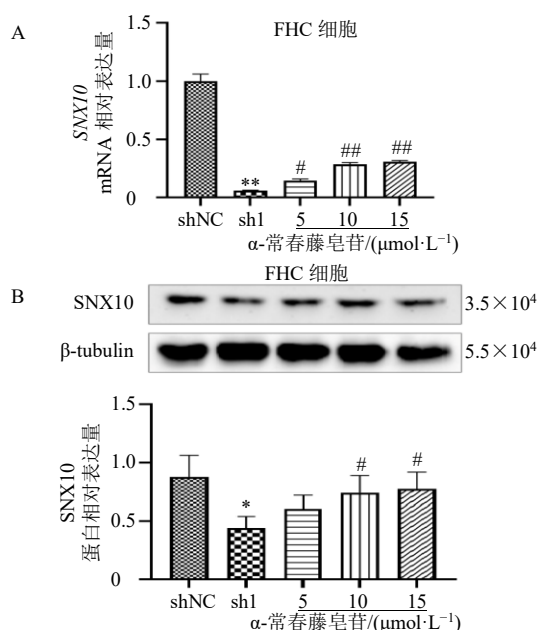
A-SNX10 and SLC7A5 mRNA expressions in each group B-glutathione content in each group C-SNX10 and SLC7A5 protein expressions in each group

图 3 敲低 SNX10 对 FHC、NCM460 细胞谷氨酰胺代谢的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of SNX10 knockdown on amino acid metabolism of FHC and NCM460 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 α -常春藤皂苷对 SNX10 敲低细胞系活力和 SNX10 表达的影响

如表 3 所示, α -常春藤皂苷干预 FHC sh1 及 NCM460 sh2 24 h 后, 在 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下抑制细胞活力 ($P < 0.01$), 半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}) 值分别为 18.80、27.16 $\mu\text{mol/L}$, 在 FHC sh1 中后续实验选用的 α -常春藤皂苷低、中、高浓度分别为 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$, NCM460 sh2 则选用 8、16、24 $\mu\text{mol/L}$ 。qRT-PCR 和 Western blotting 结果 (图 4) 显示, α -常春藤皂苷能升高 SNX10 敲低组细胞 SNX10 mRNA 和蛋白表达水平, 且呈剂量相关性 ($P < 0.05$ 、0.01)。



与空载组 (shNC) 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 SNX10 敲低组 (FHC sh1 或 NCM460 sh2) 比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下图同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs empty vector group (shNC); # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs SNX10 knockdown group (FHC sh1 or NCM460 sh2), same as below figures

图 4 α -常春藤皂苷对 SNX10 敲低细胞系 SNX10 mRNA (A) 及蛋白 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effect of α -hederin on SNX10 mRNA (A) and protein (B) expressions in SNX10 knockdown cell lines ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.5 α -常春藤皂苷对 mTORC1/c-myc 信号通路及谷氨酰胺代谢的影响

mTORC1 信号通路是细胞内能量传感器, 参与细胞内能量代谢、细胞增殖、蛋白质合成等过程^[27], 其活性失调可致肿瘤及多种代谢疾病的发生, mTOR、Raptor 和 G β L 为 mTORC1 信号通路组成部分。如图 5 所示, 与空载组比较, SNX10 敲低组细胞中 mTOR 磷酸化增强 ($P < 0.05$), p-mTOR/mTOR、Raptor、G β L 及 mTORC1 底物 p70S6K 表达升高 ($P < 0.05$), 4EBP1 磷酸化增强 ($P < 0.05$), p-4EBP1/4EBP1 升高 ($P < 0.05$), 说明 SNX10 敲低后细胞内 mTORC1 信号通路被激活。同时发现 c-myc 和

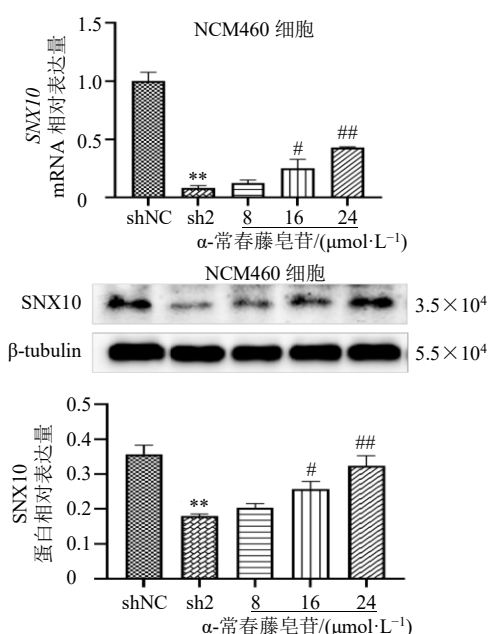
表 3 α -常春藤皂苷对 SNX10 敲低细胞系细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effect of α -hederin on cell viability of SNX10 knockdown cell lines ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞存活率/%	
		FHC sh1	NCM460 sh2
对照	0	100.00 $\pm$ 5.56	100.00 $\pm$ 2.45
α -常春藤皂苷	5	93.30 $\pm$ 17.75	99.23 $\pm$ 6.32
	10	84.47 $\pm$ 5.92	91.65 $\pm$ 4.83
	20	36.29 $\pm$ 4.57 ^{##}	46.67 $\pm$ 2.53 ^{##}
	40	23.19 $\pm$ 2.11 ^{##}	45.35 $\pm$ 2.94 ^{##}
	80	16.14 $\pm$ 1.26 ^{##}	13.12 $\pm$ 0.21 ^{##}

与对照组比较: ## $P < 0.01$

$P < 0.01$ vs control group



SLC7A5 在 SNX10 敲低组细胞中的表达升高 ($P < 0.05$)。SNX10 敲低细胞系在 α -常春藤皂苷作用下, SNX10 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), p-mTOR/mTOR、p-4EBP1/4EBP1、p70S6K、Raptor、G β L、c-myc 和 SLC7A5 蛋白表达逐渐降至空载组水平 ($P < 0.05$), 提示 α -常春藤皂苷可逆转因 SNX10 敲低引起的 mTORC1/c-myc 通路的异常激活。此外, 敲低 SNX10 后细胞内还原型谷胱甘肽含量升高 ($P < 0.05$, 图 6), 给予 α -常春藤皂苷后还原型谷胱甘肽含量逐渐降至空载细胞水平 ($P < 0.05$), 表明 α -常春藤皂苷通过介导 SNX10 表达调控细胞 mTORC1/c-myc 通路活性继而影响下游谷氨酰胺代谢水平。

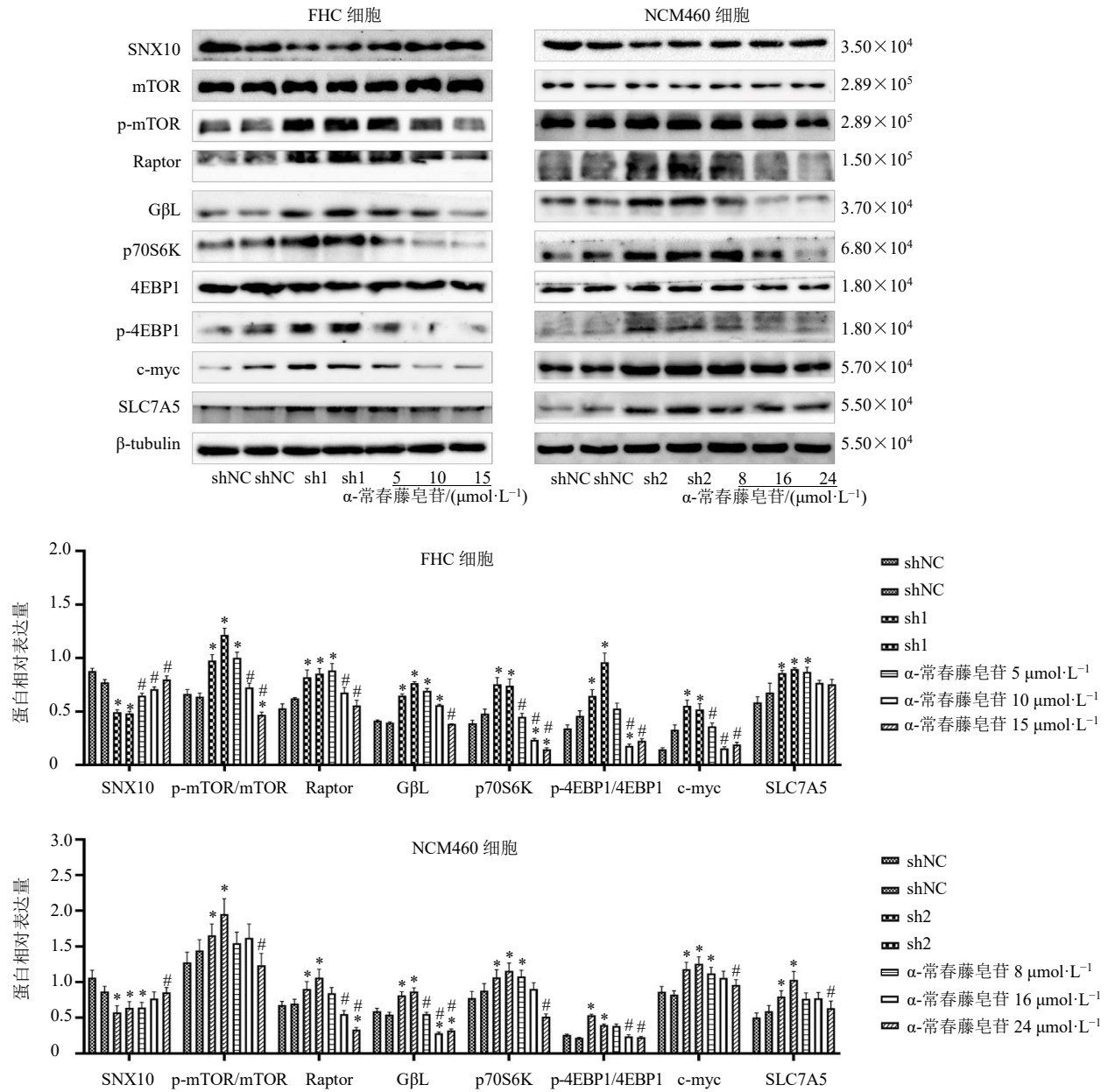


图 5 α-常春藤皂苷对 mTORC1/c-myc 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of α-hederin on expressions of mTORC1/c-myc signaling pathway-related proteins ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

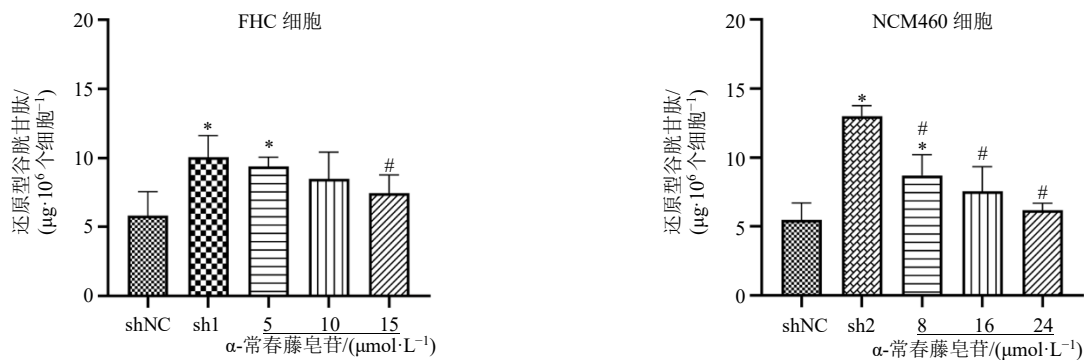


图 6 α-常春藤皂苷对 SNX10 敲低细胞系还原型谷胱甘肽含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of α-hederin on content of glutathione in SNX10 knockdown cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

本团队长期从事国医大师周仲瑛教授的“癌毒”病机理论及其方药研究,在对相关中药的功效物质基础研究中,筛选发现中药预知子的醋酸乙酯提取物具有较好的抑制小鼠炎癌转化效应, α -常春藤皂苷作为预知子醋酸乙酯提取物中的主要成分之一,在抗肿瘤^[28]、免疫调节^[29]等方面发挥重要作用。

代谢在细胞生长过程中起着精准调控的作用,葡萄糖代谢和氨基酸代谢是生物体 2 大主要代谢方式。谷氨酰胺代谢是氨基酸代谢的一种,谷氨酰胺是一种被机体摄取最多的条件必需氨基酸,参与能量代谢及生物大分子合成。mTORC1 信号通路可通过介导 c-myc 等转录因子调控细胞谷氨酰胺代谢进程^[30-32]。以谷氨酰胺转运体为靶点有一定的抗肿瘤作用,谷氨酰胺转运蛋白 SLC7A5 是结直肠癌诊断和治疗的分子靶点,其高表达会促进肿瘤侵袭、转移和谷氨酰胺代谢^[33]。研究表明,SLC7A5 表达上调与 mTORC1 通路的激活密切相关^[34]。

研究显示,SNX10 在人结直肠癌细胞中低表达,同 SNX10 在结直肠癌患者癌组织中的表达低于癌旁的报道一致^[20-21]。本研究对敲低 SNX10 的人正常肠上皮 FHC、NCM460 细胞增殖、细胞内还原型谷胱甘肽含量、mTORC1/c-myc 信号通路蛋白及下游谷氨酰胺转运蛋白 SLC7A5 的表达情况展开一系列体外实验研究。结果显示,SNX10 敲低后细胞增殖加快,细胞内还原型谷胱甘肽含量升高,mTORC1/c-myc 信号通路激活,SLC7A5 表达随之升高。而经 α -常春藤皂苷干预后 mTORC1/c-myc 信号通路的异常激活得以解除,且下游蛋白 SLC7A5 的表达、细胞内还原型谷胱甘肽含量逐渐降至空载细胞水平。提示干扰 SNX10 表达会激活肠上皮细胞 mTORC1/c-myc 通路,导致细胞谷氨酰胺代谢升高,继而引起细胞增殖速率异常加快,而 α -常春藤皂苷能升高 SNX10 的表达逆转肠上皮细胞因 SNX10 敲低所致的种种异常变化,揭示 SNX10 可能是防治肠上皮细胞恶性转化的潜在靶标, α -常春藤皂苷则可作为该类靶向药。但本研究存在一定局限性,应积极开展体内实验进一步阐明 SNX10 与谷氨酰胺代谢的关系及 α -常春藤皂苷对谷氨酰胺代谢调控作用机制。

本研究发现, α -常春藤皂苷通过升高肠上皮细胞中 SNX10 的表达,逆转肠上皮细胞因敲低 SNX10 所致的 mTORC1/c-myc 信号通路及下游谷氨酰胺代

谢的异常活跃,从而抑制肠上皮细胞的恶性转化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *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.
- [2] Hanahan D. Hallmarks of cancer: New dimensions [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 31-46.
- [3] Ghasemishahrestani Z, Melo Mattos L M, Tilli T M, *et al.* Pieces of the complex puzzle of cancer cell energy metabolism: An overview of energy metabolism and alternatives for targeted cancer therapy [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(18): 3514-3534.
- [4] Network C G A. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer [J]. *Nature*, 2012, 487(7407): 330-337.
- [5] Yamagishi H, Kuroda H, Imai Y, *et al.* Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers [J]. *Chin J Cancer*, 2016, 35: 4.
- [6] Tabe Y, Lorenzi P L, Konopleva M. Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy [J]. *Blood*, 2019, 134(13): 1014-1023.
- [7] Scalise M, Console L, Rovella F, *et al.* Membrane transporters for amino acids as players of cancer metabolic rewiring [J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2028.
- [8] Teskey G, Abraham R, Cao R Q, *et al.* Glutathione as a marker for human disease [J]. *Adv Clin Chem*, 2018, 87: 141-159.
- [9] Tang S, Liu Q, Xu M. LINC00857 promotes cell proliferation and migration in colorectal cancer by interacting with YTHDC1 and stabilizing SLC7A5 [J]. *Oncol Lett*, 2021, 22(2): 578.
- [10] El Ansari R, Craze M L, Miligy I, *et al.* The amino acid transporter SLC7A5 confers a poor prognosis in the highly proliferative breast cancer subtypes and is a key therapeutic target in luminal B tumours [J]. *Breast Cancer Res*, 2018, 20(1): 21.
- [11] Yoon J H, Kim I J, Kim H, *et al.* Amino acid transport system L is differently expressed in human normal oral keratinocytes and human oral cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2005, 222(2): 237-245.
- [12] Li Y, Qin G L, Du J Y, *et al.* circRNA LDLRAD3 enhances the malignant behaviors of NSCLC cells via the miR-20a-5p-SLC7A5 axis activating the mTORC1 signaling pathway [J]. *J Healthc Eng*, 2022, 2022: 2373580.
- [13] Lu X J. The role of large neutral amino acid transporter (LAT1) in cancer [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2019,

- 19(11): 863-876.
- [14] Liu G Y, Sabatini D M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(4): 183-203.
- [15] Li Y, Wang W, Wu X, *et al.* SLC7A5 serves as a prognostic factor of breast cancer and promotes cell proliferation through activating AKT/mTORC1 signaling pathway [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(10): 892.
- [16] Yue M, Jiang J, Gao P, *et al.* Oncogenic MYC activates a feedforward regulatory loop promoting essential amino acid metabolism and tumorigenesis [J]. *Cell Rep*, 2017, 21(13): 3819-3832.
- [17] Nicklin P, Bergman P, Zhang B L, *et al.* Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy [J]. *Cell*, 2009, 136(3): 521-534.
- [18] Hanley S E, Cooper K F. Sorting nexins in protein homeostasis [J]. *Cells*, 2020, 10(1): 17.
- [19] Zhang S, Hu B, You Y, *et al.* Sorting nexin 10 acts as a tumor suppressor in tumorigenesis and progression of colorectal cancer through regulating chaperone mediated autophagy degradation of p21Cip1/WAF1 [J]. *Cancer Lett*, 2018, 419: 116-127.
- [20] Zhang S L, Yang Z W, Bao W L, *et al.* SNX10 (sorting nexin 10) inhibits colorectal cancer initiation and progression by controlling autophagic degradation of SRC [J]. *Autophagy*, 2020, 16(4): 735-749.
- [21] 张伟新, 刘莉. 结直肠癌组织 SNX10 表达及临床意义 [J]. *广东医学*, 2010, 31(9): 1173-1174.
- [22] 张伟新, 朱宏, 刘莉. SNX10 对人结直肠癌细胞增殖和 EGFR 表达的影响 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2010, 17(21): 1734-1737.
- [23] Gerber M M, Hampel H, Zhou X P, *et al.* Allele-specific imbalance mapping at human orthologs of mouse susceptibility to colon cancer (Scc) loci [J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(10): 2323-2331.
- [24] Lorent J H, Léonard C, Abouzi M, *et al.* α -hederin induces apoptosis, membrane permeabilization and morphologic changes in two cancer cell lines through a cholesterol-dependent mechanism [J]. *Planta Med*, 2016, 82(18): 1532-1539.
- [25] Fang C, Liu Y H, Chen L Y, *et al.* α -Hederin inhibits the growth of lung cancer A549 cells *in vitro* and *in vivo* by decreasing SIRT6 dependent glycolysis [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1): 11-20.
- [26] Lu S C. Glutathione synthesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(5): 3143-3153.
- [27] Szwed A, Kim E, Jacinto E. Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2 [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(3): 1371-1426.
- [28] Sun D D, Shen W X, Zhang F, *et al.* α -Hederin arrests cell cycle at G₂/M checkpoint and promotes mitochondrial apoptosis by blocking nuclear factor- κ B signaling in colon cancer cells [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 2548378.
- [29] Kulyar M F E A, Li R R, Mehmood K, *et al.* Potential influence of *Nagella sativa* (black cumin) in reinforcing immune system: A hope to decelerate the COVID-19 pandemic [J]. *Phytomedicine*, 2021, 85: 153277.
- [30] Ala M. Target c-Myc to treat pancreatic cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2022, 23(1): 34-50.
- [31] Lu H P, Yin H Y, Qu L L, *et al.* Ginsenoside Rk₁ regulates glutamine metabolism in hepatocellular carcinoma through inhibition of the ERK/c-Myc pathway [J]. *Food Funct*, 2022, 13(7): 3793-3811.
- [32] Cantor J R, Sabatini D M. Cancer cell metabolism: One hallmark, many faces [J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(10): 881-898.
- [33] Song M, Liu J P. Circ_0067717 promotes colorectal cancer cell growth, invasion and glutamine metabolism by serving as a miR-497-5p sponge to upregulate SLC7A5 [J]. *Histol Histopathol*, 2023, 38(1): 53-64.
- [34] Ogawa H, Kaira K, Motegi Y, *et al.* Role of amino acid transporter expression as a prognostic marker in patients with surgically resected colorectal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(5): 2535-2543.

[责任编辑 李亚楠]