

菝葜皂苷元靶向 HIF1 α 蛋白稳定性抑制结直肠癌糖代谢重编程的作用机制

詹向荣¹, 彭文康¹, 杨芳², 刘莹¹, 张旭¹, 陈迎丽¹, 司渊^{1,3*}, 张亮^{1*}

(1. 湖北医药学院 基础医学院, 湖北 十堰 442000; 2. 湖北中医药大学 检验学院, 湖北 武汉 430065; 3. 湖北医药学院 武当特色中药研究湖北省重点实验室, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 探讨菝葜皂苷元(SSG)对结直肠癌(CRC)的作用及分子机制。用不同浓度的SSG处理HRT-18细胞和HCT116细胞后,通过CCK-8法、实时无标记细胞分析(RTCA)技术、平板克隆形成实验、高内涵成像分析及Seahorse糖酵解压力测试分析SSG对CRC细胞增殖、迁移及糖酵解的影响;乳酸检测试剂盒、三磷酸腺苷(ATP)检测试剂盒检测SSG作用下细胞内乳酸释放及ATP含量的变化;利用qPCR和蛋白免疫印迹法检测SSG对糖酵解关键基因缺氧诱导因子1 α (HIF1 α)转录水平和蛋白表达的影响;靶点稳定性药物亲和反应实验鉴定SSG与HIF1 α 的直接结合作用;通过UbiBrowser数据库、微量热泳动实验及分子对接筛选并验证介导HIF1 α 降解的E3泛素连接酶。结果发现SSG剂量依赖性显著抑制CRC细胞的增殖、克隆形成,SSG对HRT-18和HCT116细胞的24 h半数抑制浓度是6.275、7.029 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。2、4、6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SSG处理24 h后,HRT-18和HCT116细胞克隆形成率均明显减少。高内涵成像结果显示SSG能显著抑制CRC细胞的迁移能力。Seahorse糖酵解压力测定和乳酸、ATP水平检测结果显示SSG对CRC细胞的基础糖酵解水平、糖酵解能力、糖酵解储备、乳酸释放和ATP含量均起到抑制作用。qPCR和蛋白免疫印迹法检测发现SSG对HIF1 α 的mRNA的表达无明显影响,但能下调HIF1 α 的蛋白表达。靶点稳定性药物亲和反应实验发现SSG与HIF1 α 存在直接结合。UbiBrowser数据库分析出介导HIF1 α 的5种E3泛素连接酶。微量热泳动实验及分子对接结果显示SSG促进E3泛素连接酶F框/WD40域蛋白(FBXW7)与HIF1 α 的结合。综上所述,SSG通过靶向促进HIF1 α 蛋白发生FBXW7介导的蛋白酶体降解,抑制CRC细胞糖代谢重编程来发挥抗癌作用。

[关键词] 菝葜皂苷元; 结直肠癌; HIF1 α ; 糖代谢重编程

Mechanism of sarsasapogenin targeting HIF1 α protein stability in inhibiting glycolytic metabolic reprogramming in colorectal cancer

ZHAN Xiang-rong¹, PENG Wen-kang¹, YANG Fang², LIU Ying¹, ZHANG Xu¹, CHEN Ying-li¹, SI Yuan^{1,3*}, ZHANG Liang^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; 2. School of Laboratory Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 3. Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

[Abstract] This study investigated the effects and molecular mechanisms of sarsasapogenin (SSG) on colorectal cancer (CRC). After HRT-18 and HCT116 cells were treated with varying concentrations of SSG, the effect of SSG on CRC cell proliferation, migration, and glycolysis was assessed by cell counting kit-8 (CCK-8), real-time cellular analysis (RTCA), colony formation assay, high-content imaging analysis, and Seahorse glycolysis stress test. Changes in intracellular lactate release and adenosine triphosphate (ATP) levels under SSG treatment were measured by lactate and ATP detection kits, respectively. The effects of SSG on the transcription level and protein expression of the key glycolytic gene hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) were evaluated via

[收稿日期] 2025-07-26

[基金项目] 湖北省自然科学基金-中医药创新发展联合基金项目(2025AFD516);国家自然科学基金项目(82473118,82372681);湖北医药学院研究生科技创新项目(YC202506);大学生创新创业训练项目(S202510929021);十堰市科技局引导性项目(25Y006)

[通信作者] * 张亮 副教授, E-mail: zl_hbmu@163.com; * 司渊 副教授 硕士生导师, E-mail: siyuan138@126.com

[作者简介] 詹向荣 硕士研究生, E-mail: Zhanxr1016@163.com

quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and Western blot. Direct binding between SSG and HIF1 α was identified by drug affinity responsive target stability (DARTS). The UbiBrowser database, microscale thermophoresis (MST), and molecular docking simulations were employed to screen and validate the E3 ubiquitin ligase mediating HIF1 α degradation. The results showed that SSG significantly inhibited CRC cell proliferation and colony formation in a dose-dependent manner. The 24-hour half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) of SSG for HRT-18 and HCT116 cells were 6.275 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 7.029 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. After 24 hours of treatment with SSG at concentrations of 2.0, 4.0, and 6.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the HRT-18 and HCT116 clone formation rate was significantly reduced. High-content imaging results showed that SSG significantly inhibited the migration ability of CRC cells. Seahorse glycolysis stress test, along with lactate and ATP measurements, demonstrated that SSG suppressed basal glycolysis, glycolytic capacity, glycolytic reserve, lactate release, and ATP content in CRC cells. The qPCR and Western blot results showed that SSG had no significant effect on HIF1 α mRNA expression, and the HIF1 α protein expression was downregulated. DARTS confirmed the direct binding of SSG to HIF1 α . UbiBrowser analysis identified five E3 ubiquitin ligases potentially targeting HIF1 α . Molecular docking and MST results indicated that the F-box/WD repeat-containing protein 7 (FBXW7) exhibited strong binding affinity to HIF1 α in the presence of SSG. In summary, SSG exerts its anti-cancer effects in CRC by targeting HIF1 α to promote its FBXW7-mediated proteasomal degradation and consequently inhibiting glycolytic reprogramming.

[Key words] sarsasapogenin; colorectal cancer; HIF1 α ; glycolytic reprogramming

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20250905.704

结直肠癌(CRC)是消化道常见的恶性肿瘤,据2022年全球癌症发病率和病死率的统计,CRC发病率9.6%,病死率9.3%^[1]。目前,CRC存在治疗后生存率下降,术后出现肝转移、耐药及复发等问题^[2],亟需寻求新的治疗策略。

葡萄糖代谢重编程是肿瘤细胞最典型的代谢特征之一,表现为即便在氧气充足的环境下,癌细胞也倾向于抑制线粒体氧化磷酸化,转而进行活跃的有氧糖酵解以获取能量,这一现象被称为 Warburg 效应或有氧糖酵解^[3]。这种糖代谢模式的转变在CRC的恶性进展以及治疗反应中扮演着至关重要的角色。研究揭示造血转录因子 SPI1/PU.1 能够通过促进CRC细胞的糖代谢重编程来驱动肿瘤的发生发展及转移^[4]。长链非编码RNA HIF1A-AS2可通过调控 miR-141-3p/叉头框C1 (FOXC1) 信号轴,进而促进CRC的糖代谢重编程与疾病进展^[5]。可见靶向抑制糖代谢重编程是干预CRC进程极具前景的治疗策略。

在调控肿瘤细胞能量代谢的关键因子中,缺氧诱导因子(HIF)1 α 作为核心转录因子发挥着重要作用^[6]。HIF1 α 通常与HIF1 β 或其他辅助因子形成异源二聚体,识别并结合靶基因启动子区的特定缺氧反应元件(HRE)。HIF1 α 能够显著上调一系列糖酵解关键酶基因的表达,包括己糖激酶2(HK2)、丙酮酸激酶M2型(PKM2)、烯醇化酶1(ENO1)和乳酸脱氢酶A(LDHA)等^[7],从而有力驱

动肿瘤细胞的有氧糖酵解进程。因此,针对在糖代谢重编程中起核心作用的关键酶,筛选和开发高效、低毒的新型抗癌药物已成为当前研究的迫切需求。

源自植物的活性化合物,因其结构多样性和丰富的生物活性,一直是发现抗癌新药的重要宝库^[8]。菝葜是百合科菝葜属多年生藤本落叶攀附植物^[9]。其药用部位为根茎,蕴含着丰富的活性成分,有广泛的药理作用,包括抗炎、抑菌、抗肿瘤、降血脂、降血糖等^[10]。菝葜皂苷元(SSG)是从菝葜中分离出来的一种甾体皂苷。研究表明,SSG具有多重药理活性,包括抗炎、抗氧化、抗癌、抗糖尿病等^[11]。此外,SSG作为水通道蛋白的潜在抑制剂用于癌症靶向治疗^[12]。本研究以CRC HRT-18细胞和HCT116细胞为研究对象,旨在探讨SSG在CRC中的作用及其分子机制。

1 材料

1.1 细胞 HRT-18细胞株、HCT116细胞株均购自美国模式培养物积存库(ATCC)公司。HRT-18和HCT116细胞培养于含有10%胎牛血清和双抗生素的DMEM培养基中,置于37℃、5%CO₂恒温培养箱中。

1.2 药物及试剂 胎牛血清(批号SH30396)、DMEM培养基(批号SH30021)均购自美国HyClone公司;SSG(批号126-19-2)购自云南西力生物技术有限公司,溶于二甲基亚砜(DMSO)至3 mmol·L⁻¹并在-20℃冰箱中存储;乳酸检测试剂盒(批号

BC2235) 购自北京索莱宝科技有限公司; 结晶紫染液(批号 C0121-500 mL)、细胞裂解液(批号 P0013)、Lipo8000™转染试剂(批号 C0533)、青霉素和链霉素的双抗生素溶液(100×)(批号 C0222)、PVDF膜(批号 FFP26)、ATP检测试剂盒(批号 S0027)、CCK-8细胞增殖检测试剂盒(批号 C0037)均购自上海碧云天生物技术有限公司; α -tubulin抗体(批号 11224-1-AP)购自美国 Proteintech 公司; HIF1 α 抗体(批号 36169)购自美国 Cell Signal Technology 公司; HRP-兔二抗及鼠二抗(批号 E030120-01、E030110-01)购自美国 EarthOx 公司; Seahorse 糖酵解压力测试试剂盒(批号 103020-100)购自安捷伦科技(中国)有限公司。

1.3 仪器 CO₂的恒温培养箱(美国赛默飞公司,型号 i160);多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司,型号 SpectraMax i3);荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司,型号 CFX96);实时无标记细胞分析(RTCA)系统(美国 xCELLigence 公司,型号 RT-CADP);Seahorse 分析仪(美国 Agilent 公司,型号 XFe24);微量热泳动仪(德国 Nano Temper 公司,型号 Monolith NT115);共聚焦高内涵成像分析系统(阿富汗 Perkin Elmer 公司,型号 Operetta CLS)。

2 方法

2.1 CCK-8 实验 将 HRT-18 细胞(每 90 μ L 1.0×10^4 个)、HCT116 细胞(每 90 μ L 1.0×10^4 个)分别铺于 96 孔板,预培养 24 h,然后加入 SSG (0、2、4、6、8、10、12、14 μ mol·L⁻¹),并设置与 SSG 相同浓度的 DDP 阳性对照组,每组设置 3 个复孔,孵育 24 h。采用 CCK-8 法测定细胞毒性,用酶标仪于 450 nm 处测定样本吸光度(A)。抑制率 = $[1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

2.2 RTCA 技术 按照仪器使用操作规程,于 RTCA 专用孔板,每孔加入 50 μ L 培养基,测量基线。将 HRT-18 细胞(每 150 μ L 1.0×10^4 个)、HCT116 细胞(每 150 μ L 1.0×10^4 个)分别铺于孔板,预培养 24 h,然后加入 SSG (0、1、2、4、6、8、10、12 μ mol·L⁻¹),每组设置 2 个复孔,每隔 15 min,实时监测药物处理 60 h 内的细胞生长状况,绘制细胞生长指数曲线。

2.3 平板克隆形成实验 用 SSG (0、2、4、6 μ mol·L⁻¹) 预处理 HRT-18 细胞、HCT116 细胞 12 h 后,分别将细胞接种到 6 孔板(每孔 2 mL,每毫升 350 个细胞)。2 周后,弃除培养基,用 4% 多聚甲醛固定细

胞 30 min,弃去固定液,0.1% 结晶紫染色后在显微镜下计数克隆数,并通过实验组与空白组克隆数的比值计算克隆形成率。

2.4 共聚焦高内涵成像分析技术 将 HRT-18 细胞、HCT116 细胞接种到 96 孔板(每 100 μ L 0.9×10^4 个)。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h,用 SSG (0、2、4、6 μ mol·L⁻¹) 处理 HRT-18 细胞、HCT116 细胞后,放入高内涵成像分析系统实时监测处理 48 h 内细胞的生长及运动能力的变化,用 Harmony 软件对数据进行分析。

2.5 转录组测序技术分析(RNA-seq) 设置空白对照组并选取 SSG (4 μ mol·L⁻¹) 处理 HRT-18 细胞 24 h,提取总 RNA,并用酶标仪检测纯度和浓度。检测合格后,由北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行 cDNA 文库构建,库检合格后,对转录组文库进行 Illumina 测序,通过 Cluster Profile 软件进行差异表达基因(DEG)热图分析、基因集富集分析(GSEA)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析^[13]。

2.6 糖酵解压力测定 开启 Seahorse 检测仪预热,水化 Seahorse 探针板。取 HRT-18 细胞(每 100 μ L 0.8×10^4 个)、HCT116 细胞(每 100 μ L 0.8×10^4 个),铺于 Seahorse 24 孔板中,贴壁后补加 150 μ L 培养基过夜。第 2 天取出细胞板更换培养基,配制 Seahorse 检测液,实验中使用的化合物终浓度为 10 mmol·L⁻¹ 葡萄糖(glucose)、1 μ mol·L⁻¹ 寡霉素(oligomycin)和 50 mmol·L⁻¹ 的 2-脱氧葡萄糖(2-DG),按 Seahorse 糖酵解压力测试试剂盒说明加入探针板加药孔,上机检测细胞外酸化率(ECAR)^[14]。

2.7 蛋白免疫印迹实验(Western blot) 收集 SSG (0、2、4、6 μ mol·L⁻¹) 处理后的细胞,加 RIPA 裂解液,冰浴 15 min。4 $^{\circ}$ C,12 000 r·min⁻¹ 离心 8 min,取上清液,加相应体积的 loading buffer,混匀,于 99 $^{\circ}$ C 水中煮 5 min。SDS-PAGE 电泳分离后,通过 PVDF 膜进行转膜 1.5 h,用 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜后,用带 HRP 标记的二抗孵育 1.5 h,用 ECL 发光试剂盒显影检测。

2.8 乳酸释放检测 参照乳酸检测试剂盒的说明,使用 SSG (0、2、4、6 μ mol·L⁻¹) 处理 HRT-18 和 HCT116 细胞 24 h 后,加入 1 mL 提取液,冰浴超声波破碎细胞(功率 300 W,超声 3 s,间隔 7 s,总时间 3 min),4 $^{\circ}$ C,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取 0.8 mL

上清液,再加入 0.15 mL 提取液,4 ℃,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后取上清液待测,用酶标仪于 570 nm 处测定样本 A,并通过实验组与空白组的比值计算乳酸释放。

2.9 ATP 释放检测 参照 ATP 检测试剂盒的说明,使用 SSG (0、2、4、6 μmol·L⁻¹) 处理 HRT-18 和 HCT116 细胞 24 h 后,每孔加入 200 μL 裂解液裂解细胞,4 ℃,12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液待测。用 ATP 稀释液按照 1:4 配制 ATP 检测工作液,在检测管中加入 100 μL ATP 检测工作液和 20 μL 待测上清液,快速混匀后用化学发光仪进行测定,并通过实验组与空白组的比值计算 ATP 释放。

2.10 qPCR 检测 SSG (0、2、4、6 μmol·L⁻¹) 处理细胞 24 h 后,每孔用 TRIzol 处理 5 min,提取 RNA 并用酶标仪检测纯度和浓度。根据 Prime ScriptTM RT 转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,选择合适的引物和内参(表 1),按照 SYBR-Green 试剂盒说明书制备反应体系后,在荧光定量 PCR 仪上进行检测。通过 2^{-ΔΔCt} 法进行相对定量分析,每组设置 3 个复孔。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列(5'-3')
HIF1α	F: GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCG
	R: CCTTATCAAGATGCCAACTCACA
HK2	F: CAAAGTGACAGTGGGTGTGG
	R: GCCAGGTCCTTCACTGTCTC
ENO1	F: GCCGTGAACGAGAAGTCCTG
	R: ACGCCTGAAGAGACTCGGT
GAPDH	F: TGTTCGCATCAATGACCCCTT
	R: CTCCACGACGTACTCAGCG

2.11 质粒构建及转染 构建 HA-HIF1α 过表达质粒。使用 Lipo8000TM 转染试剂将 HA-HIF1α 质粒转染到 HRT-18 和 HCT116 细胞中,转染 6 h 后更换培养基,24 h 后经 SSG (4 μmol·L⁻¹) 处理细胞,收集细胞进行后续实验。

2.12 靶点稳定性药物亲和反应实验(DARTS) 将细胞培养于 10 cm 培养皿中,密度约 80%,加入适量细胞裂解液,提取总蛋白。测定蛋白浓度,每组取 250 μg 蛋白进行反应。SSG 处理浓度按照细胞 IC₅₀ 的 5~10 倍加入,并设置对照组。混匀后,37 ℃ 放置摇床上孵育 35 min。加入用 1×TNC buffer 稀释到相

应体积的链霉蛋白酶。混匀样品后,摇床上 37 ℃ 孵育 30 min。用等体积上样缓冲液终止反应,并 98 ℃ 高温裂解 10 min。Western blot 检测蛋白表达。

2.13 泛素化实验 HA-HIF1α 质粒、Myc-Ub 转染 HRT-18 和 HCT116 细胞 24 h 后,加入 SSG (4 μmol·L⁻¹) 和蛋白酶体抑制剂 PS341 (100 nmol·L⁻¹) 共处理细胞 24 h,收细胞之前再加入去泛素化酶抑制剂 PR-619 (20 μmol·L⁻¹) 处理细胞 2 h,然后使用裂解缓冲液裂解细胞,抗 HA 抗体进行免疫沉淀。免疫沉淀物用含 0.1% SDS 的裂解缓冲液洗涤 3 次,然后通过 Western blot 分析泛素化^[15]。

2.14 Ubibrowser 数据库分析和分子对接 利用 Ubibrowser 数据库预测能与 HIF1α 发生相互作用的 E3 泛素化连接酶。HIF1α 蛋白的 HIF1α domain 结构在蛋白质数据库(PDB)中的编号为 1LQB。运用 AutoDock 4.2 程序进行对接实验。采用 0.375 间隔的 70×70×70 点阵模块,使用 Lamarckian 遗传算法进行对接计算,算法如下:150 的群体,最大值 2 500 万次能源评估,最高次数 2 000,交叉率 0.8,突变率 0.02,独立对接运行 50 次。使用公差为 2 的均方根偏差将对接构象聚类,并根据结合自由能评估最终对接结构^[16]。

2.15 微量热泳动实验(MST) 以 pcDNA3.1-mCherry 为载体构建 E3 泛素连接酶过表达质粒,转染 CRC 细胞,48 h 后加入细胞裂解液,提取细胞总蛋白后与 SSG 和梯度稀释的 HIF1α 室温共孵育,再将样品加至标准毛细管中,通过微量热泳动仪检测后得到解离常数(K_d)、信噪比(S/N)等参数,分析 SSG 对 E3 泛素连接酶与 HIF1α 结合力的影响。

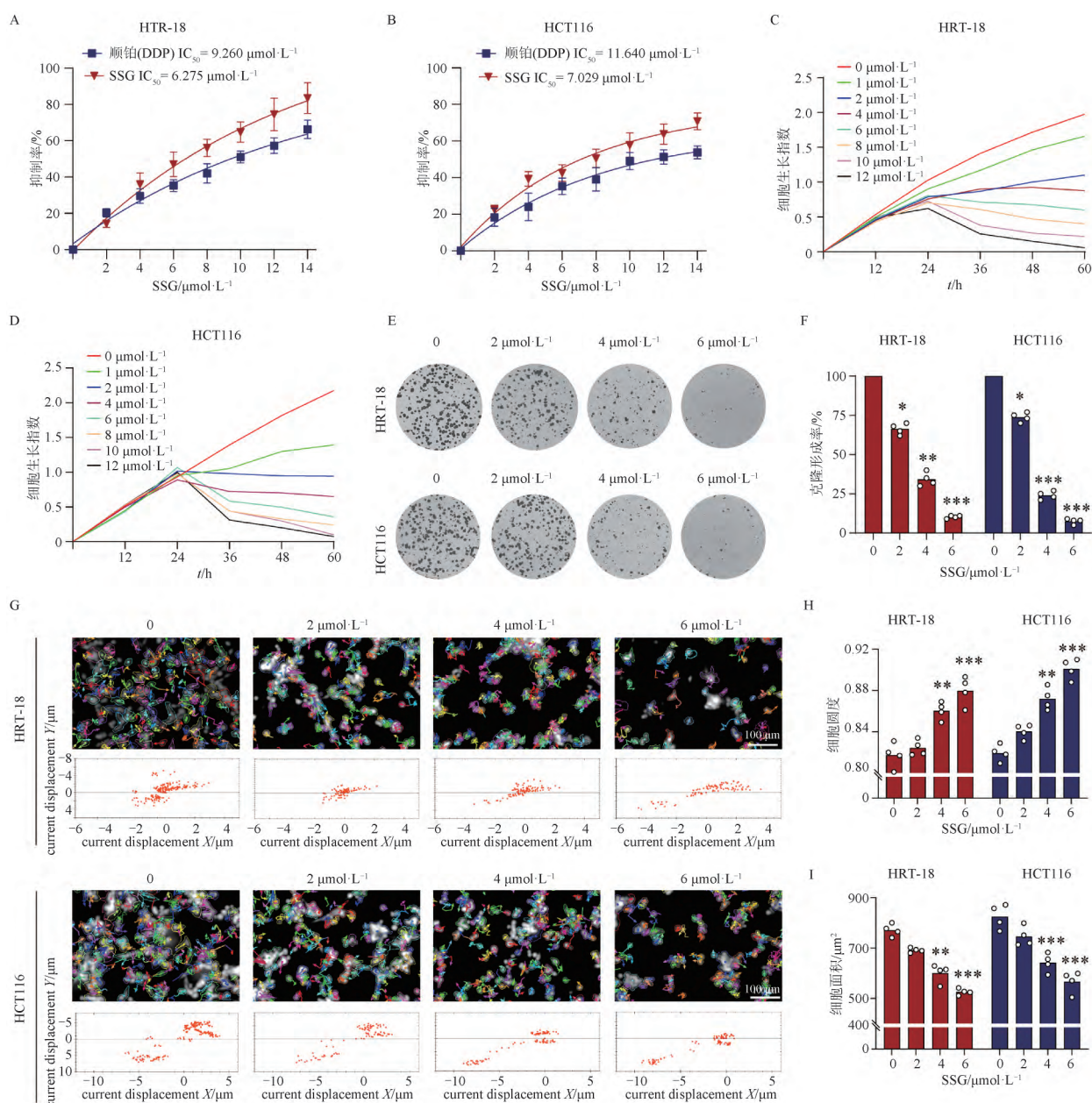
2.16 统计分析 使用 SPSS 22.0、GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析。所有实验均至少独立重复 3 次,数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析, P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 SSG 抑制 CRC 细胞的生长 通过 CCK-8 检测 SSG 对 HRT-18 和 HCT116 细胞增殖的影响,发现 SSG 处理 24 h 后,2 种细胞的抑制率均显著增加,呈一定的剂量依赖性(图 1A、1B)。SSG 对 HRT-18 和 HCT116 细胞的 24 h 半数抑制浓度(IC₅₀)值低于阳性对照药顺铂(DDP)的 IC₅₀,说明 SSG 在低剂量下发挥抑癌作用。采用 RTCA 系统实时监测 SSG 对 HRT18 和 HCT116 细胞生长的影响,结果显示细胞

生长指数随药物浓度的增加呈下降趋势。与空白组($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比,SSG在 $1\sim 12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对HRT-18和HCT116细胞的生长均有抑制作用(图1C、1D)。克隆形成实验结果显示,与空白组($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比,各浓度($2, 4, 6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的SSG处理24 h后HRT-18和HCT116克隆形成率均明显减少,差

异有统计学意义(图1E、1F)。高内涵成像结果显示,与空白组($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比,各浓度($2, 4, 6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的SSG处理24 h后HRT-18、HCT116的迁移能力都被显著抑制,细胞面积减少,细胞圆度增加(图1G、1H、1I)。总之,以上结果表明SSG抑制CRC细胞的生长。



A、B. CCK-8 法检测菝葜皂苷元 (SSG) 对 HRT-18 和 HCT116 细胞的增殖抑制作用; C、D. RTCA 监测 SSG 对 HRT-18 和 HCT116 细胞生长的影响; E、F. 平板克隆形成实验检测 SSG 对 HRT-18 和 HCT116 细胞的克隆形成能力的抑制作用; G、H、I. 高内涵成像分析技术检测 SSG 处理 HRT-18 和 HCT116 细胞后迁移能力、细胞圆度及细胞面积的变化。与空白组($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)比较* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ (图 2~4 同)。C、D、E、G 浓度值为 SSG 浓度。

图 1 菝葜皂苷元对结直肠癌细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$ $n=3$)

Fig.1 Effect of sarsapogenin on proliferation of colorectal cancer cells ($\bar{x}\pm s$ $n=3$)

3.2 SSG 与 CRC 细胞糖酵解途径负相关 KEGG 富集分析发现,糖酵解途径及 HIF1 α 途径是 SSG 调节 CRC 的核心通路(图 2A)。GSEA 分析发现 SSG 与糖酵解途径显著负相关(图 2B)。DEG 热图分析显示,SSG 诱导了糖酵解途径中表达差异最显著的前 10 个基因的 mRNA 水平变化(图 2C)。以上表明,SSG 调控 CRC 细胞糖酵解途径。进一步通过 Seahorse 细胞能量分析检测细胞外酸化率(ECAR)来反映细胞糖酵解水平,结果显示与空白组($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)相比,HRT-18 和 HCT116 细胞的基础糖酵解水平、糖酵解储备及最大糖酵解能力均在 SSG($2, 4, 6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)干预后受到明显抑制(图 2D~2H)。同时,通过乳酸释放和 ATP 试剂盒检测 SSG 对 HRT-18 和 HCT116 细胞乳酸和 ATP 的影响,结果显示 SSG($2, 4, 6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理后对比空白组($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)细胞中乳酸释放明显减少并且 ATP 含量显著降低(图 2I、2J)。另外,从 RNA-seq 分析的 10 个表达差异最显著基因中选取了 2 个糖酵解关键基因烯醇化酶 1(ENO1)和己糖激酶 2(HK2),通过 qPCR 测定其 mRNA 表达水平,结果表明 SSG($0, 2, 4, 6, 0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理后,SSG 呈剂量依赖性下调了 ENO1 和 HK2 在 HRT-18 和 HCT116 细胞中的 mRNA 表达(图 2K、2L)。基于以上实验结果,证实 SSG 能抑制 CRC 细胞的糖酵解途径。

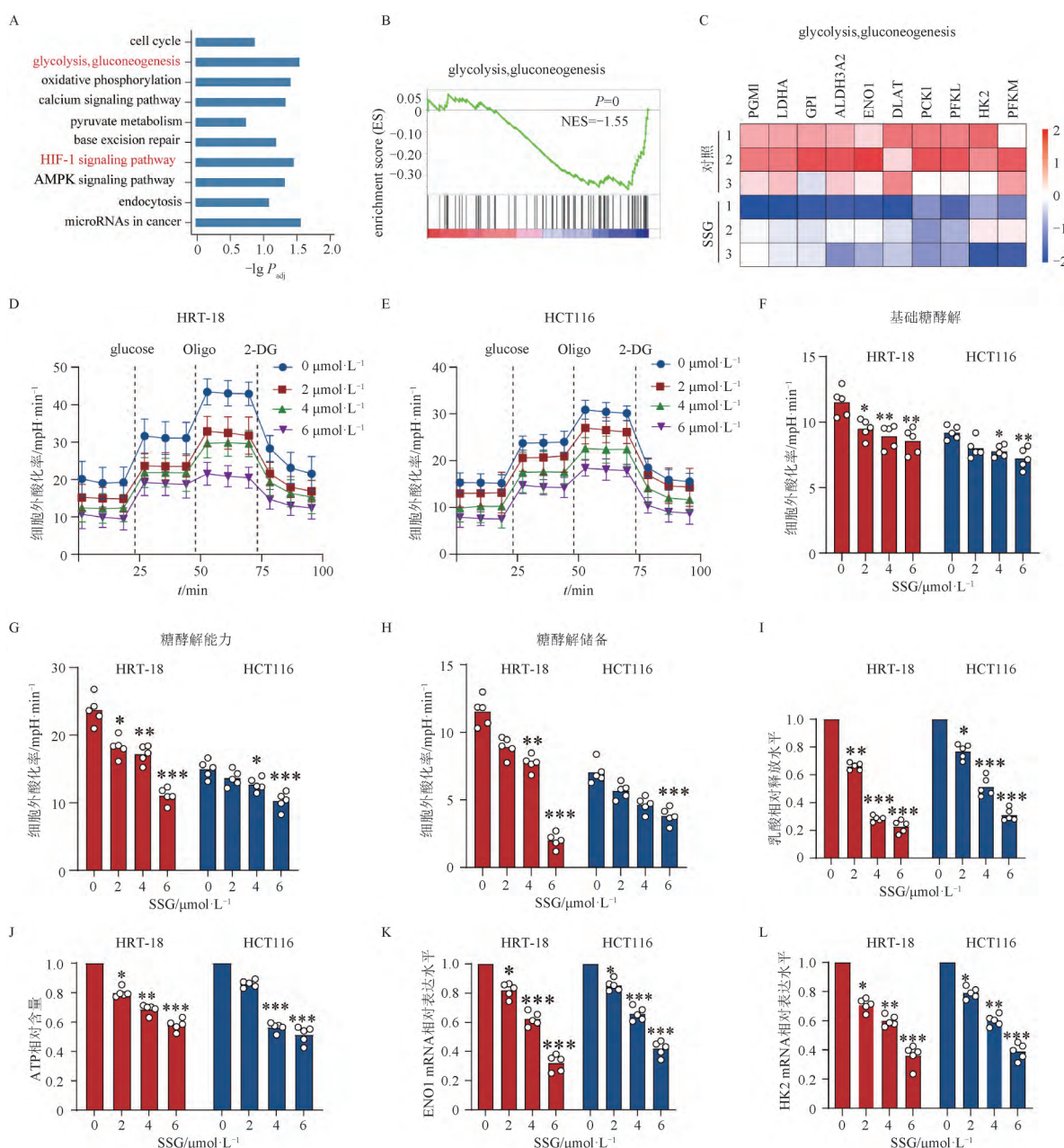
3.3 SSG 通过靶向抑制 HIF1 α 抑制 CRC 细胞糖代谢重编程 为了进一步探究 SSG 的作用靶点,采用 DARTS 实验先对 SSG 的靶标蛋白进行鉴定分析,考马斯亮蓝显示在相对分子质量 120 000 处有蛋白富集(图 3A)。通过 Western blot 筛选发现在 SSG($2, 4, 6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理的 HRT-18 和 HCT116 细胞中相对分子质量 120 000 的 HIF1 α 蛋白表达明显下调(图 3B、3C)。同时,将 HA-HIF1 α 转染至 HRT-18 和 HCT116 细胞中构建过表达模型,通过 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SSG 处理 24 h,Western blot 检测发现,与未过表达 HIF1 α 的对照组相比,SSG 处理后 HIF1 α 蛋白表达明显上调(图 3D、3E)。采用 CCK-8 法检测过表达模型中 SSG 对 HRT-18 和 HCT116 细胞生长抑制的影响,并采用乳酸释放和 ATP 试剂盒检测过表达 HIF1 α 的 HRT-18 和 HCT116 细胞中 SSG 对乳酸和 ATP 的影响,结果显示,与未过表达 HIF1 α 的对照组相比,SSG 处理后细胞生长抑制率降低,乳酸和 ATP 释放增加(图 3F~3H)。以上实

验结果共同表明过表达 HIF1 α 能拮抗 SSG 对 CRC 细胞糖代谢重编程的抑制作用。进一步通过 DARTS 实验检测 SSG 与 HIF1 α 是否存在直接结合。DARTS 实验基于药物-靶标结合以保护靶标蛋白不被蛋白酶水解的原理而设计^[17]。结果显示,SSG 显著阻止了蛋白酶(pronase)对 HIF1 α 的水解作用,证实了 SSG 能靶向结合 HIF1 α (图 3I、3J)。

3.4 SSG 靶向促进 FBXW7 介导的 HIF1 α 蛋白酶体降解 进一步检测 SSG 下调 HIF1 α 的原因。通过 qPCR 检测 SSG 对 HIF1 α 在 HRT-18 和 HCT116 细胞中基因表达的影响,结果表明 SSG($0, 2, 4, 6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理后,HIF1 α 在 HRT-18 和 HCT116 细胞中的 mRNA 表达均无明显变化(图 4A)。假设 SSG 可能会影响 HIF1 α 的稳定性,为证实这一点,将蛋白酶体抑制剂(MG132、PS341)与 SSG($4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)共处理 CRC 细胞后,经 Western blot 检测发现,蛋白酶体抑制剂能阻遏 SSG 引起的 HIF1 α 的下调(图 4B、4C)。另外,通过泛素化实验检测后发现,SSG 能促进 HIF1 α 的泛素化水平(图 4D)。这表明 SSG 通过蛋白酶体降解途径促进 HIF1 α 降解。于是利用 UbiBrowser 数据库分析介导 HIF1 α 降解的 E3 泛素连接酶,分析后得到 5 种潜在的 E3 泛素连接酶(图 4E)。进一步通过 MST 检测 HIF1 α 与这 5 种 E3 泛素连接酶的结合力在有或无 SSG 干预的变化,MST 通常用解离常数(K_d)衡量两者间结合力的强弱, K_d 越小结合越强^[18-19],结果显示,加药后,HIF1 α 与 E3 泛素连接酶 F 框/WD40 域蛋白(FBXW7)的 K_d 由 $3.53 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 降至 $0.76 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,表明 SSG 显著促进了 HIF1 α 与 E3 泛素连接酶 FBXW7 的结合作用(图 4F、4G、表 2)。同时,利用分子对接技术,将 SSG、HIF1 α 及 FBXW7 的三维构象进行分子对接,在对接结果中选择能量最优构象(图 4H)。结果发现 SSG 主要通过疏水作用、范德华力和氢键以非共价结合方式与 HIF1 α 活性位点结合,结合能量为 $-6.87 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。总之,以上结果都表明 SSG 靶向促进 FBXW7 介导的 HIF1 α 蛋白酶体降解。

4 讨论

SSG 作为菝葜主要的活性成分,在 CRC 中的药理作用正日益受到关注^[20-21]。多项研究已初步揭示了 SSG 的抗 CRC 活性^[22-23],本研究首次从 CRC 细胞糖代谢重编程角度切入,揭示了 SSG 通过靶向



A、B、C. 通过 RNA-seq 检测蒺藜皂苷元 (SSG) 处理 HRT-18 细胞后, KEGG 富集分析、GSEA 分析及 DEG 热图分析; D、E、F、G、H. 检测不同浓度 SSG 对细胞 ECAR 的影响并分析细胞的基础糖酵解、糖酵解能力及糖酵解储备; I、J. 将细胞用不同浓度的 SSG 处理 24 h 后, 检测细胞内乳酸释放及 ATP 含量的变化; K、L. 将细胞用不同浓度的 SSG 处理 24 h 后, qPCR 检测糖酵解相关基因 ENO1 和 HK2 的转录表达。D、E 不同浓度组指 SSG 不同浓度组。

图 2 蒺藜皂苷元对结直肠癌细胞糖酵解途径的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.2 Effect of sarsapogenin on glycolytic pathway in colorectal cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

HIF1 α 抑制糖代谢重编程, 发挥抑癌作用的新机制。

糖代谢重编程在 CRC 能量代谢中发挥了重要作用, 影响着肿瘤的发生发展^[24]。梁雨薇等^[25]研究发现安正抗瘤方通过磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /

蛋白激酶 B (Akt) / 雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 抑制糖酵解抗 CRC。蔡蓉等^[26]报道了葛根芩连汤通过抑制糖酵解关键酶的活性, 降低 CRC 细胞糖代谢水平, 抑制增殖并诱导凋亡。刘璨等^[27]使用木兰花碱

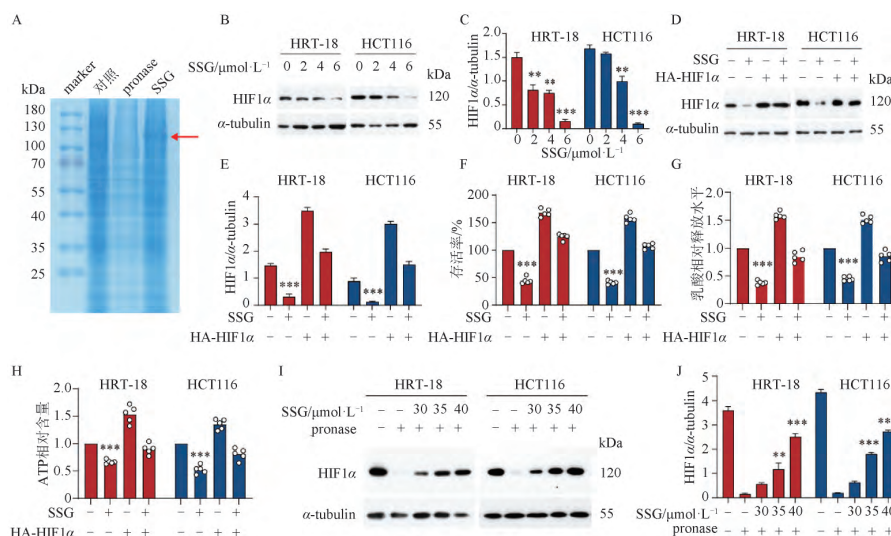


图 3 蒺藜皂苷元靶向抑制 HIF1 α 对结直肠癌细胞糖代谢重编程的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)
Fig.3 Effect of sarsasapogenin on glycometabolic reprogramming in colorectal cancer cells via targeted suppression of HIF1 α ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

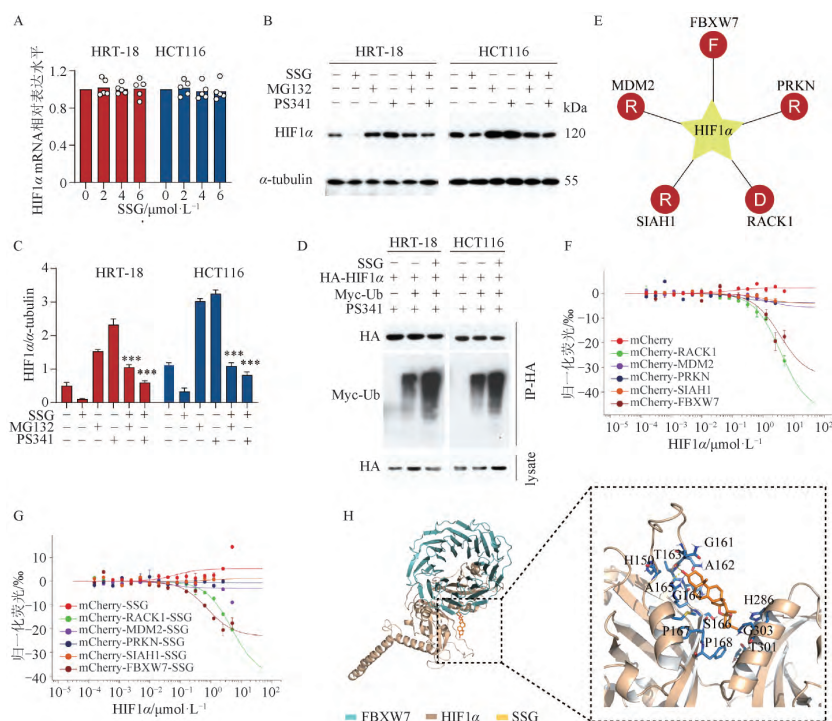


图 4 蒺藜皂苷元靶向促进 HIF1 α 蛋白发生 FBXW7 介导的蛋白酶体降解 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)
Fig.4 FBXW7-mediated proteasomal degradation induced by sarsasapogenin targeting HIF1 α ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

表 2 微量热泳动实验分析

泛素连接酶蛋白	SSG(-) K_d	SSG(+) K_d
mCherry	-	-
RACK1	3. 77	4. 87
MDM2	1. 21	-
PRKN	0. 21	-
SIAH1	1. 02	-
FBXW7	3. 53	0. 76

注: 配体均为 HIF1 α 。

处理结 CRC 细胞 sw480 后 ,能抑制活性氧(ROS) / Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(KRAS) /腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK) 信号介导的糖酵解从而抑制细胞生长。可见 ,靶向抑制肿瘤细胞糖代谢重编程的治疗策略是有效可行的。

HIF1 α 是驱动肿瘤细胞糖代谢重编程的关键转录因子^[28]。通过激活糖酵解关键酶的转录表达 ,促进有氧糖酵解^[29]。鉴于其核心作用 ,HIF1 α 已成为抗肿瘤治疗的重要潜在靶点^[30]。ZHANG Q 等^[31]研究发现丁酸钠通过抑制沉默信息调节蛋白 4 (SIRT4) /HIF1 α 介导的有氧糖酵解来抑制 CRC 的生长。本研究证实 SSG 能靶向抑制 HIF1 α 蛋白表达负调控糖代谢重编程。此外 ,PAN G 等^[32]报道了 CRC 组织中 HIF1 α 高表达的患者预后不良 ,研究发现柚皮苷通过降低 HIF1 α 的转录活性 ,抑制结直肠癌的有氧糖酵解。值得关注的是 ,本研究中 SSG 虽能显著下调 HIF1 α 的蛋白表达水平 ,但对 HIF1 α 的 mRNA 表达无明显影响 ,提示 SSG 可能通过影响 HIF1 α 的蛋白稳定性发挥作用 ,这一过程可能涉及翻译后修饰 ,特别是泛素化介导的蛋白酶体降解途径^[33]。E3 泛素连接酶是泛素-蛋白酶体系统(UPS) 的关键组分 ,负责特异识别蛋白底物并介导泛素化降解 ,从而维持细胞内蛋白质稳态^[33]。FBXW7 是一种重要的 E3 泛素连接酶 ,在多种肿瘤中的作用机制已有报道^[34]。GONG B 等^[35]研究发现 FBXW7 能够识别核小体组蛋白 1-like-1(NAP1L1) 的关键位点 Y233 并促进其泛素化 ,抑制肝癌衍生生长因子 (HDGF) /p62 信号通路 ,诱导自噬并增强顺铂对鼻咽癌化疗的敏感性。本研究证明 FBXW7 能结合 HIF1 α 促进其泛素化 ,抑制 HIF1 α 在糖酵解途径中的作用。WANG Y 等^[36]研究发现 FBXW7 的缺失促进 CRC 细胞的干细胞样特性和上皮间质转化 ,导致

癌细胞迁移侵袭能力的升高。表明 FBXW7 在癌细胞中调控其恶性进展。此外 ,XIE C M 等^[37]报道了支架蛋白家族成员 SHOC2 作为 FBXW7 的新底物 ,通过泛素化降解 SHOC2 来调控 RAS /细胞外调节蛋白激酶(ERK) 与 mTORC1 ,抑制肺癌细胞增殖并诱导自噬。以上报道共同证实 FBXW7 能泛素化降解多种促癌蛋白来调控下游信号通路发挥抑癌作用。本研究中发现 SSG 能增强 HIF1 α 与 FBXW7 的相互作用并促进 HIF1 α 泛素化蛋白酶体降解。

总之 ,本研究从体外实验阐明 SSG 通过靶向结合 HIF1 α ,促进了 FBXW7 介导的 HIF1 α 泛素化降解 ,进而抑制 HIF1 α 驱动的糖代谢重编程 ,最终发挥其抗 CRC 效应。该发现不仅为糖代谢重编程促进 CRC 恶性进展提供了新的实验依据 ,也为中药蒺藜活性成分的抗癌机制贡献了重要的理论依据。本研究仍有不足之处 ,未从体内实验进行研究 ,下一步需要进行相关的验证 ,以期推动基于 SSG 的抗 CRC 药物研发与临床转化 ,为 CRC 的治疗提供更多潜在的选择。

【致谢】 湖北医药学院生物医药研究院刘雪文和喻青青为本论文提供了技术支持。

【参考文献】

[1] BRAY F , LAVERSANNE M , SUNG H , et al. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin , 2024 , 74(3) : 229.

[2] LI J , MA X , CHAKRAVARTI D , et al. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer [J]. Genes Dev , 2021 , 35(11/ 12) : 787.

[3] JONES B C , POHLMANN P R , CLARKE R , et al. Treatment against glucose-dependent cancers through metabolic PFKFB3 targeting of glycolytic flux [J]. Cancer Metast Rev , 2022 , 41 (2) : 447.

[4] WANG J , WANG X , GUO Y , et al. Therapeutic targeting of SPIB/SPI1-facilitated interplay of cancer cells and neutrophils inhibits aerobic glycolysis and cancer progression [J]. Clin Transl Med , 2021 , 11(11) : e588.

[5] ZHONG X , WANG Y , HE X , et al. HIF1A-AS2 promotes the metabolic reprogramming and progression of colorectal cancer via miR-141-3p/FOXC1 axis [J]. Cell Death Dis , 2024 , 15(9) : 645.

[6] INFANTINO V , SANTARSIERO A , CONVERTINI P , et al. Cancer cell metabolism in hypoxia: role of HIF-1 as key regulator and therapeutic target [J]. Int J Mol Sci , 2021 , 22(11) : 5703.

[7] ABDELWAHAB A F , MAHMOUD W , ALHARIZY R M. Targeting glucose metabolism to suppress cancer progression: prospective of anti-glycolytic cancer therapy [J]. Pharmacol Res , 2019 , 150: 104511.

- [8] 丁金峰, 孙雪, 胡波, 等. 基于人工智能的天然产物高效发现研究进展[J]. 中国海洋药物, 2025, 44(3): 87.
- [9] 叶晓燕, 王钰莹, 张雪玲, 等. 菝葜的活性成分与药理作用的研究进展[J]. 药学前沿, 2024, 28(9): 124.
- [10] ALOTAIBI M O, ALOTAIBI N M, ALWAILI M A, et al. Natural sapogenins as potential inhibitors of aquaporins for targeted cancer therapy: computational insights into binding and inhibition mechanism[J]. J Biomol Struct Dyn, 2025, 43(7): 3613.
- [11] 吴源陶, 邹译娴, 张春虎, 等. 菝葜皂苷元对结肠癌细胞 HT-29 凋亡和自噬的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(11): 1645.
- [12] 凌博凡, 王瑞平, 邹玺. 菝葜皂苷元对结肠癌细胞 Lovo 黏附和侵袭能力的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(2): 90.
- [13] 廖钦洪, 邹勇, 李洪雷, 等. 基于 RNA-seq 数据的生姜 NAC 转录因子家族鉴定及分析[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 493.
- [14] ZHONG G, GUO Y, GONG X, et al. Enhanced glycolysis by ATP1F1 gene inactivation increased the anti-bacterial activities of neutrophils through induction of ROS and lactic acid[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2023, 1869(8): 166820.
- [15] 熊艺璇, 钱琛, 吴慧, 等. GPS2 降低表皮生长因子受体稳定性抑制胃癌恶性进展[J]. 湖北医药学院学报, 2023, 42(1): 15.
- [16] WAN F, QIAN C, LIU X W, et al. Sculponeatin A induces mitochondrial dysfunction in non-small cell lung cancer through WWP2-mediated degradation of mitochondrial STAT3[J]. Br J Pharmacol, 2025, 182(12): 2662.
- [17] XIANG Y C, WAN F, REN Y L, et al. Polyphyllin VII induces autophagy-dependent ferroptosis in human gastric cancer through targeting T-lymphokine-activated killer cell-originated protein kinase[J]. Phytother Res, 2023, 37(12): 5803.
- [18] 郭爽, 管祥辰. 微量热泳动技术原理及实验条件优化[J]. 分析测试技术与仪器, 2024, 30(6): 392.
- [19] 段钟琪, 顾曼香, 彭文康, 等. 黄花香茶菜甲素靶向 ETS1 诱导乳腺癌细胞铁死亡的作用机制[J]. 湖北医药学院学报, 2024, 43(5): 476.
- [20] 曹莹莉, 孙妙, 张存莉, 等. 菝葜属植物生物活性研究进展[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(2): 53.
- [21] 高满军, 黄兴琼, 莫启贵, 等. 菝葜的化学成分及药用价值研究进展[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2024, 38(4): 360.
- [22] 凌博凡, 邹玺, 吴坚, 等. 菝葜皂苷元对人结肠癌细胞 LoVo 凋亡的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(3): 256.
- [23] 孙书凯, 黄彦玲, 刘超, 等. 菝葜皂苷抑制结肠癌细胞增殖的机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(5): 540.
- [24] 马旭, 李生龙, 郑光荣, 等. 中药对结肠直肠癌有糖酵解影响的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(6): 1496.
- [25] 梁雨薇, 周洪立, 庄育培, 等. 安正抗瘤方通过 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制糖酵解抗结肠直肠癌作用机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2025, 41(6): 730.
- [26] 蔡蓉, 胡作为, 王上, 等. 葛根芩连汤含药血清对结肠癌细胞增殖及其糖酵解关键酶的影响[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(5): 1106.
- [27] 刘璨, 刘艾鑫, 姜昌锦. 木兰花碱通过 ROS/KRAS/AMPK 抑制结肠癌 sw480 细胞干性特征和糖酵解[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(3): 344.
- [28] ZHU B, CHENG L, HUANG B, et al. Central role of hypoxia-inducible factor-1 α in metabolic reprogramming of cancer cells: a review[J]. Medicine, 2017, 103(44): 40273.
- [29] KIERANS S J, TAYLOR C T. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology[J]. J Physiol, 2021, 599(1): 23.
- [30] SEMENZA G L. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(10): 721.
- [31] ZHANG Q, QIN Y, SUN X, et al. Sodium butyrate blocks the growth of colorectal cancer by inhibiting the aerobic glycolysis mediated by SIRT4/HIF-1 α [J]. Chem Biol Interact, 2024, 403: 111227.
- [32] PAN G, ZHANG P, CHEN A Y, et al. Aerobic glycolysis in colon cancer is repressed by naringin via the HIF1A pathway[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2023, 24(3): 221.
- [33] 杨月美, 李梁和, 陈忠胜, 等. 泛素连接酶 E3 在结肠直肠癌转移中作用的研究进展[J]. 山东医药, 2024, 64(19): 103.
- [34] YE H C H, BELLON M, NICOT C. FBXW7: a critical tumor cancers[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 115.
- [35] GONG B, LIU Y, YAN W, et al. NAPI1L1 degradation by FBXW7 reduces the deubiquitination of HDGF-p62 signaling to stimulate autophagy and induce primary cisplatin chemosensitivity in nasopharyngeal carcinoma[J]. Mol Cancer, 2025, 24(1): 152.
- [36] WANG Y, LIU Y, LU J, et al. Rapamycin inhibits FBXW7 loss-induced epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like characteristics in colorectal cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 434(2): 352.
- [37] XIE C M, TAN M, LIN X T, et al. The FBXW7-SHOC2-raptor axis controls the cross-talks between the RAS-ERK and mTORC1 signaling pathways[J]. Cell Rep, 2019, 26(11): 3037.

[责任编辑 陈玲]