

基于转录组学和细胞实验验证探究药根碱对结直肠癌细胞 SAT1 介导的铁死亡的调控作用

李智育¹, 王松玲¹, 张雯¹, 代欣宇¹, 周明明¹, 彭海燕^{1,2*}

(1. 南京中医药大学 第一临床医学院, 江苏 南京 210023;

2. 南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029)

摘要 探讨黄连提取物药根碱(JAT)通过亚精胺/精胺 N1-乙酰转移酶 1(SAT1)对人结直肠癌(CRC) HT29 和 HCT116 细胞诱导 P53 介导的铁死亡的影响。采用 cell counting kit-8 (CCK-8) 法检测细胞活力; 平板克隆实验检测细胞增殖能力; 流式细胞术检测细胞周期; JC-1 染料检测线粒体膜电位; 用高通量转录组测序(RNA-seq)技术分析 JAT 处理后 HT29 和 HCT116 细胞基因变化。利用慢病毒转染技术构建 SAT1 过表达 HCT116 和 HT29 细胞株, 实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time qPCR)实验检测转染效率。Fe²⁺、活性氧(ROS)、脂质氧化(MDA)、谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒检测 CRC 细胞株中 Fe²⁺、ROS、MDA、GSH 表达, 蛋白免疫印迹(WB)和 qPCR 检测胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白(SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(ACSL4)、肿瘤蛋白 P53(P53)、SAT1 蛋白和 mRNA 在 CRC 细胞株中的表达。结果显示, JAT 可以抑制 HCT116 和 HT29 细胞活力和增殖, 诱导细胞周期停滞, 降低线粒体膜电位。转录组测序可知 JAT 对 HCT116 和 HT29 细胞主要富集的 KEGG 通路有蛋白质消化和吸收, 精氨酸和脯氨酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 铁死亡等。其中精氨酸代谢途径中的 SAT1 经 JAT 处理后 mRNA 显著上调。且 JAT 处理后各剂量组在 HCT116 和 HT29 细胞中 Fe²⁺、ROS、MDA 水平升高, GSH 含量明显降低, SLC7A11、GPX4 蛋白表达降低, ACSL4、SAT1、P53 蛋白表达升高。SAT1 过表达后的 2 种 CRC 细胞株可抑制细胞的增殖, 并可激活 P53 诱导的铁死亡信号通路, 而转染 SAT1 过表达慢病毒(oveSAT1)+JAT 组相较于 oveSAT1 组有更好的效果。综上, JAT 可通过上调脯氨酸代谢中 SAT1 关键分子蛋白激活 P53 诱导的铁死亡信号通路。

关键词 药根碱; 结直肠癌; 铁死亡; SAT1

Transcriptomics and cell experiments reveal regulatory effect of jatrorrhizine on SAT1-mediated ferroptosis in colorectal cancer cell

LI Zhi-yu¹, WANG Song-ling¹, ZHANG Wen¹, DAI Xin-yu¹, ZHOU Ming-ming¹, PENG Hai-yan^{1,2*}

(1. the First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] This study investigates the inducing effects of jatrorrhizine (JAT), a bioactive compound extracted from *Coptidis Rhizoma*, on the p53-mediated ferroptosis in human colorectal cancer (CRC) cell lines HT29 and HCT116, specifically through the modulation of spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 (SAT1). Cell viability was assessed via the cell counting kit-8 (CCK-8) assay, while the colony formation assay was employed to determine the proliferative capacity. Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry, and mitochondrial membrane potential was evaluated via JC-1 dye. High-throughput RNA sequencing (RNA-seq) was performed to analyze transcriptomic changes in JAT-treated HT29 and HCT116 cells. Lentiviral transduction was utilized to generate SAT1-overexpressing HCT116 and HT29 cell lines, with transfection efficiency confirmed by qPCR. The levels of intracellular Fe²⁺,

收稿日期 2025-07-24

基金项目 江苏省自然科学基金项目(BK20201400); 国家中医药管理局全国名中医刘沈林工作室项目(国中医药办人教函[2018]119号); 江苏高校优势学科建设工程项目(苏政办发[2018]87号); 研究生《中医学导论》微课程建设的探索与实践项目(YJS-YB-2023-49)

通信作者 * 彭海燕, 主任中医师, 教授, 博士生导师, 主要从事中医药防治肿瘤研究, E-mail: 260615@njucm.edu.cn

作者简介 李智育, 硕士研究生, E-mail: 18503483111@163.com

reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) were quantified via specific commercial assay kits. The protein and mRNA levels of key ferroptosis-related markers: solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), glutathione peroxidase 4 (GPX4), acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4), tumor protein p53, and SAT1 were determined by Western blot and qPCR, respectively. The results demonstrated that JAT treatment significantly inhibited both cell viability and proliferation, induced cell cycle arrest, and reduced mitochondrial membrane potential in HCT116 and HT29 cells. RNA-seq results revealed that the KEGG pathways most significantly enriched in JAT-treated cells were protein digestion and absorption, arginine and proline metabolism, glycine, serine and threonine metabolism, and ferroptosis. Notably, the mRNA level of SAT1 in the arginine metabolism pathway was significantly upregulated following JAT treatment. Furthermore, JAT treatment increased the levels of Fe^{2+} , ROS, and MDA, while markedly decreasing GSH content in a dose-dependent manner. In addition, the treatment downregulated the protein levels of the ferroptosis inhibitors SLC7A11 and GPX4, and upregulated the expression of the pro-ferroptotic proteins ACSL4, SAT1, and p53. SAT1 overexpression inhibited cell proliferation and activated the p53-mediated ferroptosis signaling pathway. The combination of SAT1 overexpression and JAT treatment (oveSAT1+JAT group) exhibited a synergistic effect, showing superior efficacy over SAT1 overexpression alone (oveSAT1 group). In conclusion, JAT activates the p53-dependent ferroptosis signaling pathway by upregulating the key metabolic enzyme SAT1, which is involved in proline metabolism, thereby inhibiting colorectal cancer cell proliferation.

[Key words] jatrorrhizine; colorectal cancer; ferroptosis; SAT1

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20250905.706

根据世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC) 2020 年的统计数据,结直肠癌(CRC)在全球所有肿瘤疾病中的发病率排名第三,病死率排名第二^[1]。预计到 2035 年,结肠癌和直肠癌死亡总人数将分别增长 71.5% 和 60%^[2]。目前西医治疗 CRC 不良反应大,而中医药新兴研究表明,从植物中提取的药物对 CRC 有多种治疗用途。通过使用天然来源的药物,人类健康得到显著改善^[3]。其中黄连活性成分药根碱(JAT)有清热燥湿、泻火解毒之功,并且被证实一定程度上有抗肿瘤效果^[4]。铁氧化是脂质过氧化诱导细胞死亡的一种形式,可以通过多种方式进行调节,改变抗氧化酶的活性。肿瘤抑制因子肿瘤蛋白 P53(P53)是“基因组的守护者”。除了对细胞凋亡、自噬和细胞周期的影响外,P53 还通过转录或翻译后机制调节铁变态反应。P53 可抑制胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白(SLC7A11)细胞的表达,或增强亚精胺/精胺 N1-乙酰转移酶 1(SAT1)的表达,从而增强铁凋亡^[5]。本研究运用体外验证和转录组学,探讨了 JAT 对 CRC 细胞增殖抑制、细胞周期改变、线粒体膜电位降低及转录组改变,发现 JAT 可诱导脯氨酸代谢中 SAT1 在 CRC 中 mRNA 和蛋白表达及 P53 介导的铁死亡;随后慢病毒转染过表达 SAT1 在体外水平明确 SAT1 可激活 P53 诱导的铁死亡信号通路。这为黄连活性成分 JAT 的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人 CRC 细胞株 HT29(货号 CL-0118)及 HCT116(货号 CL-0096)均来自武汉普诺赛生命科技有限公司。本研究采用传代 20 代以内细胞进行实验。

1.2 药物和试剂 JAT(成都瑞芬思德丹生物科技有限公司,批号 RDD-Y05202007027);胎牛血清(美国 Gibco 公司,货号 10099141C);McCoy's 5A、DMEM 培养基、青霉素-链霉素溶液、磷酸盐缓冲液、胰蛋白酶溶液(上海源培生物科技股份有限公司,货号分别为 L630KJ、L110KJ、H120904、D210903、L430916);结晶紫染料[生工生物工程(上海)有限公司,货号 A6003310100];BCA 蛋白浓度测定试剂盒、裂解液、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为 P0012S、P0013、P1045);PAGE 凝胶快速制备试剂盒、ECL 化学发光超敏显色试剂盒、cell counting kit-8(CCK-8)试剂盒(上海翌圣生物科技有限公司,货号分别为 P5111090、S3115070、40203ES60);SAT1 抗体、P53 抗体、SLC7A11 抗体、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)抗体、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(ACSL4)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为 10708-1-AP、10442-1-AP、26864-1-AP、30388-1-AP、22401-1-AP);甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 CST 公司,货号分别为 5174T、4970T);铁离子与亚

铁离子(Fe^{2+})检测试剂盒、活性氧(ROS)检测试剂盒、脂质氧化(MDA)检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为S1066S、S0033S、S0131S、S0057S);SteadyPure通用型RNA提取试剂盒、EvoM-MLV反转录试剂盒、qPCR试剂盒(湖南爱科瑞生物工程有限公司,货号分别为AG21102、AG11705、AG11701)。

1.3 仪器 多功能酶标仪(瑞士Tecan公司,型号Spark10M);荧光倒置显微镜(日本Nikon公司,型号ECLIPSETi5);化学发光凝胶成像仪器(上海天能科技有限公司,型号Tanon-5500);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,型号XD202);流式细胞仪(美国Beckman公司,型号CytoFlex);实时荧光定量PCR系统(美国ThermoFisher Scientific公司,型号QuantStudio™ 5);检测仪(美国ThermoFisher Scientific公司,型号NanoDrop2000); CO_2 培养箱(美国Thermo公司,型号HERA cell 150i型);全自动细胞计数器(美国Invitrogen公司,型号Countess 3);电泳仪、电泳槽(美国Bio-Rad公司,型号Power-Pac™ Basic)。

2 方法

2.1 细胞培养及传代 人结肠癌细胞HCT116和HT29培养在含有10%胎牛血清、1%青-链霉素的McCoy's 5A培养液中,置于37℃、5% CO_2 培养箱中,待细胞密度达到80%时消化传代。

2.2 CCK-8法和平板克隆实验检测JAT对HCT116和HT29人结肠癌细胞活力及增殖能力的影响 将对数生长期的HCT116和HT29消化、重悬和计数,以10 000个/孔细胞密度均匀铺于96孔板,待其完全贴壁后,给予不同浓度(0、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的JAT,每个浓度设3个复孔,继续培养24 h,弃除孔内液体,每孔加入10% CCK-8工作液100 μL ,37℃培养2 h。将96孔板放入酶标仪,以450 nm波长检测每孔吸光度,计算细胞存活率。

将细胞按照细胞传代的方法处理成细胞悬液,以2 000个/孔细胞密度均匀铺于6孔板,待细胞贴壁生长良好后,按照2.2项下分组结果给药(0、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),每隔48 h观察细胞并换液,待形成肉眼可见的细胞克隆,弃上清液,磷酸盐缓冲液(PBS)小心清洗细胞,4%多聚甲醛溶液固定20

min,结晶紫染色30 min,之后用 dH_2O 洗涤细胞,置于通风处晾干并拍照。

2.3 流式细胞仪检测细胞周期 将HCT116和HT29细胞以每毫升 2.0×10^5 个接种到6孔板中,每孔2 mL,用无血清培养基培养24 h后,分别加入100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ JAT,再次培养24 h后按照细胞周期检测说明书进行操作,收集上清液并消化收集细胞,用70%冷乙醇固定2 h后洗去固定液,用PI染色工作液室温避光60 min后,于流式细胞仪上检测各个细胞周期的分布。

2.4 线粒体膜电位检测 HCT116和HT29细胞以 5×10^5 个/皿接种于6孔板中,培养4 h使其贴壁,0、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ JAT分别孵育24 h,移去上清液,把试剂盒中提供的阳性对照药CCCP(10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)按照1:1 000加入到未加JAT的细胞培养液中,处理细胞20 min。20 min后所有组加入10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ JC-1染料孵育20 min,用37℃预热的PBS缓冲液充分洗涤后加入完全培养基,使用荧光显微镜观察并拍照,ImageJ软件分析荧光强度。

2.5 转录组测序 收集对照组及给药细胞,TRIzol试剂提取总RNA。纯化PCR产物(AMPure XP系统),并在Agilent Bioanalyzer 4150系统上评估文库质量。最后,使用Illumina Novaseq 6000/MGISEQ-T7仪器进行测序。转录组测序分析由上海中科新生命生物科技有限公司负责。

2.6 HCT116和HT29细胞氧化应激指标和 Fe^{2+} 含量检测 各组HCT116和HT29细胞分组干预后,收集细胞并采用细胞裂解液裂解细胞,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,收集上清液,按照检测试剂盒测定细胞中 Fe^{2+} 、ROS、MDA和GSH含量。

2.7 蛋白免疫印迹(WB)法检测P53、SAT1和铁死亡相关通路蛋白 HCT116和HT29以 1×10^6 个/孔分别接种于6孔板中,培养4 h使其完全贴壁,随机分组,每组设置3个复孔,分别用50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ JAT处理细胞24 h。随后用PBS溶液清洗孔板底部贴壁细胞2次,加入适量含有蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液提取细胞中总蛋白质,通过BCA法测量蛋白质浓度。将20 μg 总蛋白质进行凝胶电泳分离,并将凝胶中分离的蛋白质转移至PVDF膜,膜用快速封闭液孵10 min,分别将P53、SAT1、SLC7A11、GPX4、ACSL4一抗在4℃孵育过夜。将膜洗涤后与二抗室温下孵育

2 h,最后用超敏 ECL 化学发光试剂于凝胶成像仪中曝光显影。蛋白表达利用 ImageJ 软件对条带进行量化,以 GAPDH 或 β -actin 为内参,计算目的蛋白。

2.8 SAT1 慢病毒构建 慢病毒的构建及包装由南京科瑞斯生物科技公司完成。基因名称 SAT1 (Gene ID 6303),物种 *Homo sapiens*,元件顺序 CMV-SAT1-PGK-Zs Green (2A) Puro。取对数生长期的 HT29 和 HCT116 细胞,以 5×10^4 个/孔,接种于 24 孔板,至细胞汇合度为 30% 加入对应感染复数 (MOI) 的慢病毒,转染 SAT1 过表达慢病毒 (oveSAT1) 和对照空载过表达慢病毒 (oveNC) 于

HCT116 细胞中,然后用嘌呤霉素筛选获得 SAT1 过表达的稳定感染 HCT116 细胞株。收集慢病毒转染成功的细胞进行后续实验。

2.9 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time qPCR) 收集 SAT1 过表达后的 HCT116、HT29 细胞,按照说明书步骤提取总 RNA,进行 RNA 的浓度测定,然后使用逆转录试剂盒经逆转录合成 cDNA。使用 PCR 试剂盒进行 qPCR 扩增反应。A 以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 SAT1、P53、SLC7A11、GPX4、ACSL4 mRNA 的表达。生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成纯化所需引物。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

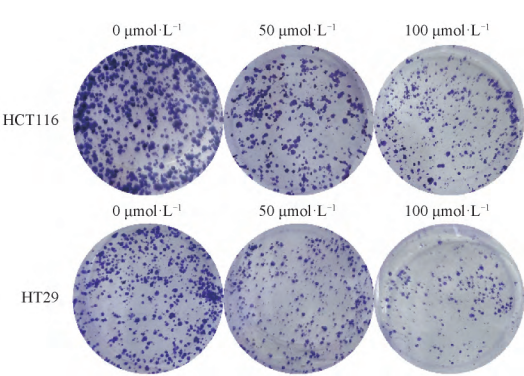
名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
GPX4	ATAAGAACGGCTGCCGTGGTGAAG	TAGAGATAGCACGGCAGGTCCTTC
SLC7A11	ACCACCATCAGTGGGAGGAG	ATGGAGCCGAAGCAGGAGAGG
ACSL4	GCGTTCCTCCAAGTAGACCAACC	AGTTCACGACATGAGCCAAAGG
SAT1	CCGTGGATTGGCAAGTTATT	TCCAACCCTCTTCACTGGAC
P53	GTCAACAAAGTCCGGCCTGA	TGAGTGAATCTGGGATTGTG
GAPDH	GGCAAATTCAACGGCACAGTCAAG	TGGCTCCTGGAAGATGCTGATGG

2.10 统计学分析 所有实验独立地重复 3 次。使用 GraphPad Prism 9.0 将数据表示为平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$)。使用 2 组之间的 student's *t* 检验和 One-way ANOVA,随后两两比较使用最小显著性差异法 (LSD) 进行检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 JAT 对人结肠癌细胞 HCT116 和 HT29 增殖能力的影响 与 JAT $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较,50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 HCT116 和 HT29 细胞的活力明显抑制,呈浓度依赖性。JAT 作用于 HCT116 和 HT29 细胞 24 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 108.69、99.41 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,克隆形成实验发现,与空白组比较,随着 JAT 药物剂量的增高,克隆形成实验中细胞集落形成明显下降。以上表明 JAT 在 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可抑制这 2 种细胞增殖,但不能诱导凋亡,见图 1、表 2。

3.2 JAT 对人结肠癌细胞 HCT116 和 HT29 细胞周期的影响 与 JAT $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比,HCT116 和 HT29 细胞 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ JAT 组 G_1 期比例显著上升,S 期比例显著下降, S/G_1 期比例下降,差异



0、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为药根碱剂量 (图 2、4、5 同)。
图 1 各组 HCT116、HT29 细胞克隆形成能力比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Fig.1 Comparison of colony formation ability of HT29 and HCT116 cells in different groups ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

有统计学意义,说明 JAT 可导致结肠癌细胞周期改变,延长 G_1 期,而细胞在 G_1 期停留时间延长,可能是由于 DNA 损伤、氧化应激或营养缺乏等因素激活了 G_1 期检查点,导致细胞延迟进入 S 期,见表 3。

表 2 药根碱对 HCT116 及 HT29 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of jatrorrhizine on the viability of HT29 and HCT116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

药根碱/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	HCT116 细胞活力/%	HT29 细胞活力/%
0	100.00 $\pm$ 2.55	99.94 $\pm$ 1.45
10	98.17 $\pm$ 8.45	95.54 $\pm$ 1.45
20	91.78 $\pm$ 6.27	90.91 $\pm$ 9.38
40	80.39 $\pm$ 8.35 ¹⁾	81.72 $\pm$ 6.36 ¹⁾
80	67.41 $\pm$ 6.36 ³⁾	65.22 $\pm$ 7.37 ³⁾
160	33.24 $\pm$ 8.34 ³⁾	26.31 $\pm$ 9.36 ³⁾

注:与药根碱 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$,³⁾ $P<0.001$ (表 3~6 同)。

3.3 JAT 对人结肠癌细胞 HCT116 和 HT29 细胞线粒体膜电位的影响 在 HCT116 和 HT29 细胞中,与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ JAT 组相比,100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ JAT 组红/绿荧光强度比值升高,差异有统计学意义,说明 JAT 可使 HCT116 和 HT29 线粒体膜电位降低。线粒体膜电位下降伴随 ROS 积累,可能触发铁死亡,见图 2、表 4。

3.4 转录组学分析 对 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ JAT 培养下的 HCT116 和 HT29 细胞分别行转录组学分析。使用 $|\log_2 \text{fold change}|>1$ 和 $P<0.05$ 作为标准,与对照组相比, JAT 调节了 HCT116 细胞中 3 091 个基因; JAT 调节了 HT29 细胞中 3 392 个基因。火山图展

表 3 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 药根碱对 HCT116、HT29 细胞周期影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ jatrorrhizine on the cell cycles of HCT116 and HT29 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

细胞	药根碱/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	周期/%		
		G ₁	S	G ₂
HCT116	0	50.35 $\pm$ 6.45	26.13 $\pm$ 8.43	19.46 $\pm$ 7.34
	100	58.20 $\pm$ 5.36 ¹⁾	17.94 $\pm$ 10.34 ¹⁾	16.65 $\pm$ 86.47
HT29	0	50.73 $\pm$ 10.12	25.27 $\pm$ 9.76	16.46 $\pm$ 7.24
	100	61.47 $\pm$ 9.54 ¹⁾	17.37 $\pm$ 6.46 ¹⁾	15.33 $\pm$ 8.11

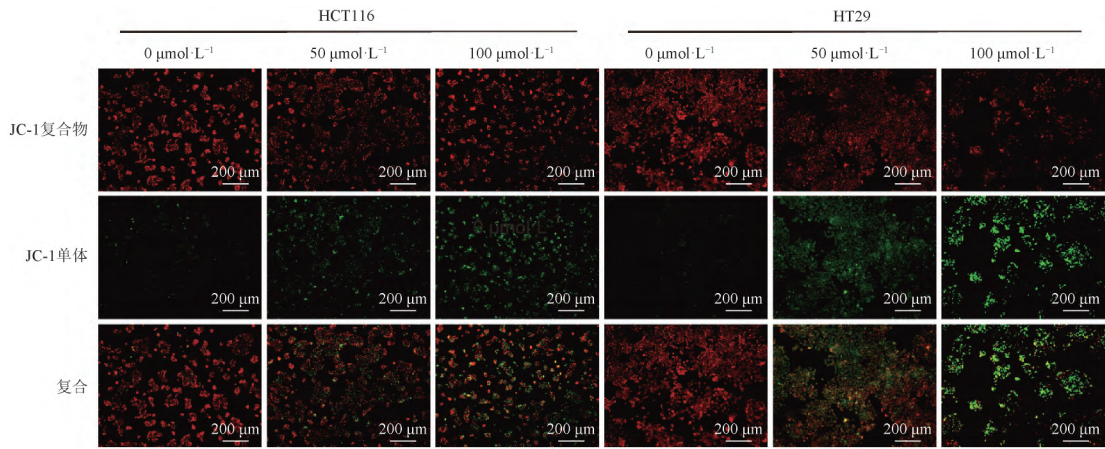


图 2 各组 HCT116、HT29 线粒体膜电位比较(JC-1 染色,×40)

Fig.2 Comparison of mitochondrial membrane potential in HCT116 and HT29 cells in different groups(JC-1 staining,×40)

示了 2 组细胞差异基因的分布以及表达量上、下调情况。KEGG 分析表明 JAT 在 HCT116 和 HT29 细胞中排名前 20 主要富集到的共同的相关通路有蛋白质消化和吸收,精氨酸和脯氨酸代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,铁死亡, HIF-1 信号通路, MAPK 信号通路等,见图 3。接着研究精氨酸和脯氨酸代谢中基因变化,发现 100 μmol

$\cdot \text{L}^{-1}$ JAT 在 2 种 CRC 细胞中都升高了 SAT1 基因表达,见中国知网本文增强出版附加材料。而研究表明 SAT1 基因是 P53 的转录靶点, SAT1 是多胺催化剂中的限速酶,其关键参与亚精胺和精胺转化回腐胺。激活 SAT1 的表达会诱导脂质过氧化反应,并使细胞在 ROS 诱导的压力下发生铁变态反应^[9]。

表 4 各组 HCT116、HT29 细胞线粒体膜电位红/绿荧光强度比值($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Red/green fluorescence intensity ratios of mitochondrial membrane potential in HCT116 and HT29 cells in different group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞	药根碱/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	红/绿荧光强度比值/%
HCT116	0	79.67 $\pm$ 5.45
	50	61.33 $\pm$ 6.88 ²⁾
	100	42.15 $\pm$ 7.43 ³⁾
HT29	0	71.55 $\pm$ 6.77
	50	50.43 $\pm$ 8.45 ²⁾
	100	36.54 $\pm$ 8.44 ³⁾

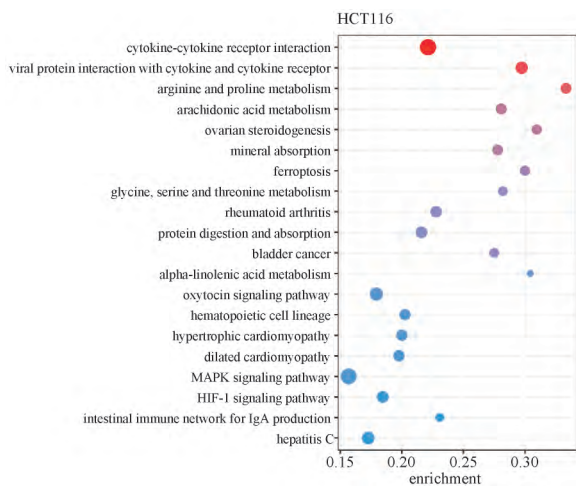


图 3 药根碱对 HCT116 和 HT29 细胞转录组 KEGG 分析

Fig.3 KEGG analysis of the transcriptomes of HCT116 and HT29 cells treated with jatrorrhizine

3.5 JAT 处理后人结肠癌细胞 HCT116 和 HT29 铁死亡情况比较 与 JAT 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, JAT 各剂量组在 HCT116 和 HT29 细胞中 Fe^{2+} 、ROS、MDA 水平升高, GSH 含量明显降低, SLC7A11、GPX4 蛋白表达显著降低, ACSL4 蛋白表达显著升高, 提示 JAT 可诱导这 2 种细胞铁死亡, 见图 4、表 5。

3.6 WB 检测 JAT 处理后 HCT116 和 HT29 细胞 SAT1、P53 蛋白表达变化 与 JAT 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, JAT 各剂量组在 HT29 和 HCT116 细胞中 SAT1 和 P53 水平升高, 与转录组中 JAT 处理组细胞 SAT1 基因表达上升一致, 见图 5、表 6。

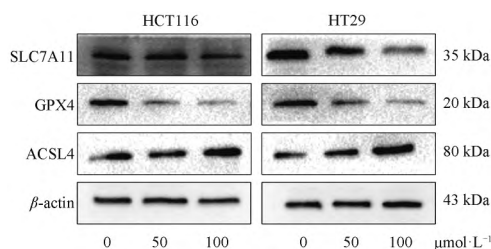
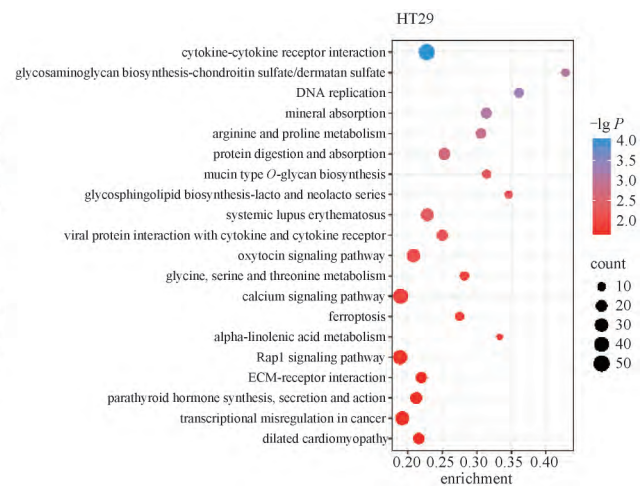


图 4 各组 HCT116、HT29 细胞 SLC7A11、GPX4、ACSL4、 β -actin 蛋白表达电泳

Fig.4 Electrophoresis of SLC7A11, GPX4, ACSL4, and β -actin expression in HCT116 and HT29 cells in different groups

3.7 real-time qPCR 和 WB 验证过表达 CRC 细胞株稳转株构建效率 为了进一步验证脯氨酸代谢中的 SAT1 是否激活 CRC 细胞中的铁死亡通路, 本研究对 HCT116 和 HT29 细胞进行了慢病毒过表达。

过表达稳转株 HCT116 和 HT29 较 oveNC 组 SAT1 的 mRNA 表达水平更高, 过表达倍数分别约为 oveNC 细胞的 2.8、3.0 倍, 证明构建成功, 见表 7。

3.8 CCK-8 和平板克隆法检测 SAT1 过表达 HCT116 和 HT29 细胞株的细胞活力和增殖能力 与 oveNC 组相比, 2 种细胞株 oveSAT1 组细胞活力与单个细胞集落形成能力均显著下降; 与 oveSAT1 组相比, oveSAT1+JAT 组细胞活力与平板克隆形成数目显著降低, 表明过表达 SAT1 确实可抑制 CRC 细胞增殖, 且 JAT 可加强抑制 oveSAT1 细胞的增殖能力, 见图 6、表 8。

3.9 oveSAT1 和 oveSAT1+JAT 处理后人结肠癌细胞 HCT116 和 HT29 细胞铁死亡情况比较 与 oveNC 组比较, oveSAT1 组在 HCT116 和 HT29 细胞中 Fe^{2+} 、ROS、MDA 水平升高, GSH 含量明显降低,

表 5 药根碱处理后人结肠癌细胞 HCT116 和 HT29 细胞 Fe^{2+} 、ROS、MDA、GSH 及铁死亡相关蛋白表达水平($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Levels of Fe^{2+} , ROS, MDA, and GSH and ferroptosis related protein expression in HCT116 and HT29 cells treated with jatrorrhizine ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞	药根碱/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Fe^{2+} / $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$	MDA / $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$	GSH / $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$	ROS / $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$	SLC7A11 / $\beta\text{-actin}$	GPX4 / $\beta\text{-actin}$	ACSL4 / $\beta\text{-actin}$
HCT116	0	0.58 ± 0.12	5.10 ± 1.14	1.94 ± 0.20	87.22 ± 6.53	1.34 ± 0.065	1.21 ± 0.056	0.96 ± 0.045
	50	$0.95\pm0.12^{2)}$	$15.56\pm1.05^{2)}$	$1.25\pm0.13^{1)}$	$156.31\pm13.43^{2)}$	$1.01\pm0.077^{2)}$	$0.66\pm0.062^{3)}$	$1.24\pm0.034^{2)}$
	100	$1.75\pm0.13^{3)}$	$20.65\pm2.03^{3)}$	$0.98\pm0.08^{2)}$	$211\pm13.19^{3)}$	$0.67\pm0.012^{3)}$	$0.45\pm0.055^{4)}$	$1.40\pm0.076^{3)}$
HT29	0	0.33 ± 0.04	4.15 ± 1.09	1.99 ± 0.36	66.46 ± 5.26	1.78 ± 0.020	1.15 ± 0.017	0.96 ± 0.044
	50	$0.76\pm0.10^{2)}$	$14.33\pm1.06^{2)}$	$1.35\pm0.26^{1)}$	$146\pm11.64^{2)}$	$1.43\pm0.061^{2)}$	$0.84\pm0.076^{2)}$	$1.21\pm0.043^{2)}$
	100	$1.53\pm0.16^{3)}$	$20.01\pm2.12^{3)}$	$1.02\pm0.64^{2)}$	$200\pm15.01^{3)}$	$0.97\pm0.034^{3)}$	$0.54\pm0.085^{3)}$	$1.55\pm0.054^{3)}$

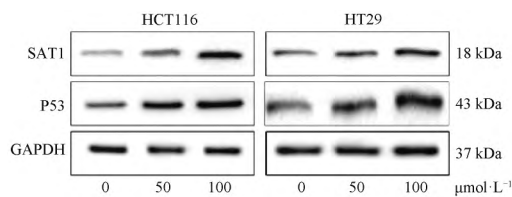


图 5 各组 HCT116、HT29 细胞 SAT1、P53 表达条带

Fig.5 Bands of SAT1 and P53 expression in HCT116 and HT29 cells in different groups

表 6 各组 HCT116、HT29 细胞 SAT1、P53 蛋白表达水平($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Protein levels of SAT1 and P53 in HCT116 and HT29 cells in different groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞	药根碱/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SAT1/GAPDH	P53/GAPDH
HCT116	0	0.35 ± 0.04	0.33 ± 0.05
	50	$0.87\pm0.08^{1)}$	$0.61\pm0.07^{1)}$
	100	$1.24\pm0.03^{2)}$	$1.21\pm0.03^{2)}$
HT29	0	0.42 ± 0.06	0.32 ± 0.08
	50	$0.76\pm0.07^{1)}$	$0.87\pm0.07^{1)}$
	100	$1.14\pm0.03^{2)}$	$1.23\pm0.09^{2)}$

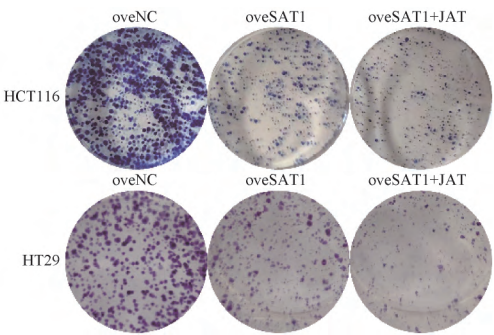
表 7 real-time qPCR 验证稳转株构建效率($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Real-time qPCR validation of construction efficiency of stable transgenic strain($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞	组别	SAT1
HCT116	oveNC	1.00 ± 0.06
	oveSAT1	$2.96\pm0.09^{1)}$
HT29	oveNC	1.00 ± 0.04
	oveSAT1	$3.15\pm0.07^{1)}$

注: oveNC.对照空载过表达慢病毒; oveSAT1.转染 SAT1 过表达慢病毒(图 6、7,表 8~11 同)。与 oveNC 组相比¹⁾ $P<0.01$ 。

表 8 各组 HCT116、HT29 细胞活力比较($\bar{x}\pm s, n=3$)



oveSAT1+JAT.过表达 SAT1+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 药根碱(表 8~11、图 7 同)。

图 6 各组 HCT116、HT29 细胞克隆形成能力比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.6 Comparison of colony formation ability of HCT116 and HT29 cells in different groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Comparison of viability of HCT116 and HT29 cells in different groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞	组别	细胞活力 / %
HCT116	oveNC	100.00 ± 6.40
	oveSAT1	$70.53\pm6.44^{2)}$
	oveSAT1+JAT	$53.76\pm9.39^{4)}$
HT29	oveNC	100.00 ± 4.24
	oveSAT1	$65.32\pm5.65^{2)}$
	oveSAT1+JAT	$51.54\pm8.25^{4)}$

注: 与 oveNC 组相比¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$; 与 oveSAT1 组相比⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$, ⁶⁾ $P<0.001$ (表 9~11 同)。

SLC7A11、GPX4 蛋白和 mRNA 表达降低, ACSL4、P53 蛋白和 mRNA 表达升高; 而 oveSAT1+JAT 处理更加剧了以上结果。这表明增加 SAT1 mRNA 和蛋白水平可部分诱导 P53 介导的铁死亡, 且 JAT 可加强这一作用, 见表 9~11、图 7。

表 9 SAT1 过表达及 SAT1 过表达后 JAT 处理对 HCT116 和 HT29 细胞 Fe^{2+} 、ROS、MDA、GSH 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effects of SAT1 overexpression and subsequent JAT treatment on Fe^{2+} , ROS, MDA, and GSH levels in HCT116 and HT29 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞	组别	Fe^{2+}	MDA	GSH	ROS
HCT116	oveNC	0.60±0.13	5.02±1.01	1.74±0.17	78.22±7.16
	oveSAT1	1.43±0.10 ²⁾	16.86±1.02 ²⁾	1.15±0.06 ¹⁾	159.52±12.64 ²⁾
	oveSAT1+JAT	1.95±0.14 ⁵⁾	23.57±2.29 ⁵⁾	0.56±0.04 ⁵⁾	235.12±15.50 ⁶⁾
HT29	oveNC	0.43±0.04	4.10±1.10	1.89±0.74	59.26±10.66
	oveSAT1	0.97±0.11 ²⁾	16.73±1.24 ³⁾	1.16±0.26 ¹⁾	146.00±14.84 ³⁾
	oveSAT1+JAT	1.73±0.16 ⁵⁾	23.01±2.64 ⁵⁾	0.75±0.64 ⁴⁾	247.00±16.86 ⁶⁾

表 10 各组 HCT116、HT29 细胞 SLC7A11、GPX4、ACSL4、SAT1、P53 mRNA 相对表达水平($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 mRNA relative expression levels of SLC7A11, GPX4, ACSL4, SAT1, and P53 in HCT116 and HT29 cells in different groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞	组别	SLC7A11	GPX4	ACSL4	SAT1	P53
HCT116	oveNC	1.00±0.05	1.00±0.03	1.00±0.06	1.00±0.06	1.00±0.02
	oveSAT1	0.46±0.08 ¹⁾	0.54±0.05 ¹⁾	1.98±0.03 ²⁾	2.28±0.03 ²⁾	2.54±0.04 ²⁾
	oveSAT1+JAT	0.23±0.05 ⁴⁾	0.31±0.01 ⁴⁾	2.88±0.05 ⁴⁾	3.65±0.04 ⁴⁾	3.05±0.08 ⁴⁾
HT29	oveNC	1.00±0.05	1.00±0.02	1.00±0.06	1.00±0.02	1.00±0.03
	oveSAT1	0.62±0.09 ¹⁾	0.66±0.08 ¹⁾	2.41±0.06 ²⁾	2.80±0.04 ³⁾	2.25±0.04 ²⁾
	oveSAT1+JAT	0.22±0.05 ⁴⁾	0.23±0.07 ⁴⁾	3.18±0.03 ⁴⁾	3.15±0.03 ⁴⁾	3.17±0.06 ⁵⁾

表 11 各组 HCT116、HT29 细胞 SLC7A11、GPX4、ACSL4、SAT1、P53 蛋白表达水平($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 11 Protein expression levels of SLC7A11, GPX4, ACSL4, SAT1, and P53 in HCT116 and HT29 cells in different groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞	组别	SLC7A11/ β -actin	GPX4/ β -actin	ACSL4/ β -actin	SAT1/GAPDH	P53/GAPDH
HCT116	oveNC	1.65±0.03	1.77±0.03	1.25±0.04	0.61±0.07	0.75±0.06
	oveSAT1	1.04±0.04 ²⁾	1.24±0.05 ¹⁾	1.41±0.05 ¹⁾	0.98±0.08 ¹⁾	1.44±0.07 ²⁾
	oveSAT1+JAT	0.64±0.04 ⁵⁾	0.65±0.08 ⁶⁾	1.69±0.05 ⁴⁾	1.38±0.09 ⁴⁾	1.68±0.05 ⁴⁾
HT29	oveNC	1.48±0.05	1.55±0.07	1.05±0.06	0.70±0.05	0.92±0.06
	oveSAT1	1.08±0.07 ¹⁾	1.10±0.04 ¹⁾	1.42±0.06 ¹⁾	1.01±0.07 ¹⁾	1.43±0.06 ¹⁾
	oveSAT1+JAT	0.76±0.06 ⁴⁾	0.62±0.03 ⁴⁾	1.65±0.03 ⁴⁾	1.47±0.07 ⁴⁾	1.69±0.05 ⁴⁾

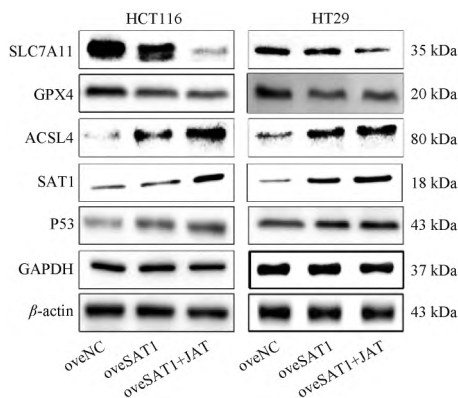


图 7 各组 HCT116、HT29 细胞 SLC7A11、GPX4、ACSL4、SAT1、P53 蛋白表达电泳条带

Fig.7 Electrophoresis bands of SLC7A11, GPX4, ACSL4, SAT1, and P53 expression in HCT116 and HT29 cells in different groups

4 讨论

药根碱是一种原小檗碱型异喹啉生物碱,具有清热燥湿、泻火解毒之功效,青牛胆、延胡索、黄连和黄柏等都是药根碱的重要来源^[7]。现代药理学研究表明,药根碱具有抗糖尿病、抗菌、抗原虫、抗癌、抗肥胖、降血脂以及中枢性系统神经活性^[8]。多项研究表明药根碱具有一定的抗 CRC 的作用, SINGH S 等^[9]发现药根碱可抑制 SW480 细胞增殖和细胞活力;能与 KRAS 启动子 G-四联体结合,对 SW620 细胞的结合性能和抗增殖效果良好^[10]。药根碱可使细胞周期停滞在 S 期、促进细胞凋亡以及时间依赖性抑制细胞迁移和侵袭,抑制细胞上皮-间质转化(EMT)过程,在 HCT116 裸鼠异种移植模型中,JAT 可抑制肿瘤生长和转移,并诱导

肿瘤细胞凋亡^[1]。

2012 年,首次发现铁下垂细胞死亡在功能和形态上与坏死或凋亡不同。这种铁依赖性特征是细胞内的 Fe^{2+} 可催化细胞膜中不饱和脂肪酸的过氧化作用,导致线粒体功能和形态学改变,以及线粒体膜密度增加,最终促进细胞死亡^[2]。通过关键的抗氧化因子,如 GSH、GPX4、SLC7A11 可检测到铁蛋白活性的增强^[3]。P53 蛋白是一种转录因子,在预防恶性肿瘤形成中起着重要作用^[4]。P53 突变存在于超过 50% 的人类癌症中,缺乏 P53 的小鼠易发生早发性自发性肿瘤^[5]。通常 P53 在各种细胞应激时被激活,并作为主调节剂发挥作用,以控制参与细胞生长停滞、凋亡和衰老的下游靶标的表达^[6]。P53 通过下调 SLC7A11 抑制胱氨酸的吸收,并使细胞对铁凋亡敏感^[7]。其他 P53 靶点可能也有助于 P53 诱导铁凋亡,因此需要进一步研究证明 P53 的其他代谢靶点在调节铁凋亡中的作用。

精氨酸和脯氨酸代谢在肿瘤中的作用也非常重要。L-精氨酸代谢在肿瘤生长和免疫调节中发挥关键作用。L-精氨酸是一种条件必需氨基酸,参与多种生化过程,包括多胺生物合成、一氧化氮(NO)的产生和脯氨酸代谢,所有这些都影响肿瘤进展和免疫细胞功能^[8]。精氨酸代谢的失调显著影响肿瘤微环境(TME),调节肿瘤细胞、基质成纤维细胞和免疫细胞之间的相互作用^[9]。多种恶性肿瘤中检测到精氨酸酶活性升高,与不良预后、增加的肿瘤侵袭性和增强的转移潜力相关^[10]。SAT1 催化亚精胺和精胺的乙酰化,形成 N1-乙酰亚精胺和 N1-乙酰精胺,然后从细胞中输出或通过 N1-乙酰多胺氧化酶转化回腐胺或亚精胺^[11]。因此,SAT1 的过表达导致亚精胺和精胺的总体消耗,同时增加腐胺、N1-乙酰亚精胺和 N1-乙酰精胺的水平^[12]。事实上,一种已知可诱导 SAT1 的多胺类似物 N1,N11-di(ethyl) 去甲精胺,已在晚期恶性肿瘤患者的几项临床试验中应用^[13]。SAT1 过表达导致 HeLa 细胞中的快速细胞生长停滞和胶质母细胞瘤细胞中的凋亡^[14]。SAT1 表达在人类肿瘤中下调,CRISPRcas9 介导的 SAT1 表达敲除部分消除了 P53 介导的铁凋亡。此外,SAT1 诱导与花生四烯酸 15-脂氧合酶(ALOX15)的表达水平相关,SAT1 诱导的铁凋亡在 PD146176(ALOX15 的特异性抑制剂)的存在下显著消除^[15]。尽管如此,SAT1 是否在 CRC 中发挥作

用仍然是未知的,精氨酸代谢在调节肿瘤发生中的分子机制也不清楚。

癌毒理论起源于中医对毒邪的认识,国医大师周仲瑛教授认为,癌毒是一种特异的致病因子,素体亏虚、阴阳失调致使经络阻滞、气机不畅、气血津液不能正常输布,凝结为痰湿瘀血所形成,其具有多变、凶顽、损正、难消等特点^[16],在癌毒病机论的指导下研制治疗 CRC 的临床验方中,仙鹤草和黄连是核心药对,临床上常用于抵抗恶性肿瘤^[16-28]。其中黄连提取物 JAT 对 CRC 的作用机制并未完全阐明。

在本研究中,JAT 可抑制 HCT116 和 HT29 细胞的细胞活力、增殖、诱导细胞周期停滞,降低线粒体膜电位。转录组测序发现 JAT 处理后 HCT116 和 HT29 细胞中精氨酸和脯氨酸代谢和铁死亡通路均发生改变,SAT1 基因表达升高。且 JAT 处理后,HCT116 和 HT29 细胞各剂量组 Fe^{2+} 、ROS、MDA 水平升高,GSH 含量明显降低,SLC7A11、GPX4 蛋白表达降低,ACSL4、SAT1、P53 蛋白表达升高,说明 JAT 激活了铁死亡通路。接着通过 WB 和 qPCR 实验证明通过在 HCT116 和 HT29 细胞中过表达 SAT1 蛋白,确定 SAT1 作为 P53 代谢靶基因可诱导 HCT116 和 HT29 细胞 P53 表达,并参与调节 P53 介导的 ROS 反应和铁死亡,而过表达 SAT1 后的 HCT116 和 HT29 细胞联合 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ JAT 处理加剧了以上反应。表明 JAT 可通过增加 SAT1 mRNA 和蛋白水平表达部分诱导 P53 介导的铁死亡。

综上所述,本研究通过体外实验与细胞转录组学深入研究仙鹤草-黄连药对中 JAT 活性成分的作用机制,发现 JAT 可抑制 CRC 细胞增殖、诱导细胞周期停滞,降低线粒体膜电位。机制可能与精氨酸、脯氨酸代谢和铁死亡通路的激活有关。研究结果为中医药及小分子化合物防治 CRC 提供了新的研究思路 and 理论支持。

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.
- [2] DOUAIHER J, RAVIPATI A, GRAMS B, et al. Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations [J]. J Surg Oncol, 2017, 115(5): 619.
- [3] OLIVEIRA A F C D A S, TEIXEIRA R R, OLIVEIRA A S D E, et al. Potential antivirals: natural products targeting

- replication enzymes of dengue and chikungunya viruses [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 505.
- [4] ZHONG F, CHEN Y, CHEN J, et al. Jatrotrrhizine: a review of sources, pharmacology, pharmacokinetics and toxicity [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 783127.
- [5] KANG R, KROEMER G, TANG D. The tumor suppressor protein P53 and the ferroptosis network [J]. *Free Radical Biol Med*, 2019, 133: 162.
- [6] OU Y, WANG S J, LI D, et al. Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(44): E6806.
- [7] 王启龙, 孙达, 黄金文, 等. 药根碱的研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(7): 1844.
- [8] ROLLE J, ASANTE D O, KOK-FONG L L, et al. Jatrotrrhizine: a review of its pharmacological effects [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, 73(6): 709.
- [9] SINGH S, VERMA M, MALHOTRA M, et al. Cytotoxicity of alkaloids isolated from *Argemone mexicana* on SW480 human colon cancer cell line [J]. *Pharmaceut Biol*, 2016, 54(4): 740.
- [10] WEN L N, XIE M X. Spectroscopic investigation of the interaction between G-quadruplex of KRAS promoter sequence and three isoquinoline alkaloids [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2017, 171: 287.
- [11] WANG P, GAO X Y, YANG S Q, et al. Jatrotrrhizine inhibits colorectal carcinoma proliferation and metastasis through Wnt/ β -catenin signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2235.
- [12] DHO S H, CHO M, WOO W, et al. Caspases as master regulators of programmed cell death: apoptosis, pyroptosis and beyond [J]. *Exp Mol Med*, 2025, 57(6): 1121.
- [13] LEE J, ROH J L. Selenium and selenoproteins: key regulators of ferroptosis and therapeutic targets in cancer [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2025, 103(8): 899.
- [14] VOUSDEN K H, PRIVES C. Blinded by the light: the growing complexity of P53 [J]. *Cell*, 2009, 137(3): 413.
- [15] DONEHOWER L A, HARVEY M, SLAGLE B L, et al. Mice deficient for P53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours [J]. *Nature*, 1992, 356(6366): 215.
- [16] LEVINE A J. P53, the cellular gatekeeper for growth and division [J]. *Cell*, 1997, 88(3): 323.
- [17] JIANG L, KON N, LI T, et al. Ferroptosis as a P53-mediated activity during tumour suppression [J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 57.
- [18] GRZYBOWSKI M M, UÇAL Y, MUCHOWICZ A, et al. Metabolomic reprogramming of the tumor microenvironment by dual arginase inhibitor OATD-02 boosts anticancer immunity [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 18741.
- [19] FENG T, XIE F, LYU Y, et al. The arginine metabolism and its deprivation in cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2025, 620: 217680.
- [20] CHEN C L, HSU S C, ANN D K, et al. Arginine signaling and cancer metabolism [J]. *Cancers*, 2021, 13(14): 3541.
- [21] DU T, HAN J. Arginine metabolism and its potential in treatment of colorectal cancer [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 658861.
- [22] MANDAL S, MANDAL A, JOHANSSON H E, et al. Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(6): 2169.
- [23] WOLFF A C, ARMSTRONG D K, FETTING J H, et al. A phase II study of the polyamine analog *N1, N11*-diethylnorspermine (DENSpm) daily for five days every 21 days in patients with previously treated metastatic breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(16 Pt1): 5922.
- [24] TIAN Y, WANG S, WANG B, et al. Overexpression of SSAT by DENSpm treatment induces cell detachment and apoptosis in glioblastoma [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(4): 1227.
- [25] 程海波, 吴勉华. 周仲瑛教授“癌毒”学术思想探析 [J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(6): 866.
- [26] 王俊壹, 李柳, 程海波. 仙连解毒方联合 XELOX 方案治疗 IV 期结直肠癌的临床研究 [J]. *中医药学报*, 2022, 50(2): 77.
- [27] 徐燕茹, 陶李蕙萃, 钱景阳, 等. 仙连解毒方通过调控血管生成抗结直肠癌复发的疗效机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(6): 79.
- [28] 钱景阳, 陶李蕙萃, 张钦畅, 等. 仙连解毒方通过阻断肿瘤相关巨噬细胞 CCL5 分泌抑制 STAT3/ β -catenin 通路抗结直肠癌 EMT 的机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 64(8): 70.

责任编辑 陈琰