DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.02.026

基于单细胞转录组和类器官模型探讨沙蟾毒精通过Notch通路干预结直肠癌增殖的研究

商志浩[1],钱景阳[1],赖岳阳[1,2],程海波[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)

摘要:目的 基于单细胞转录组测序和类器官模型探讨沙蟾毒精(Are)抑制结直肠癌的效果和机制。方法 通过对沙蟾毒精和PBS干预的结直肠癌移植瘤进行单细胞测序,基于测序结果分析占比减少的肿瘤细胞亚群及其生物学功能;5-Ethynyl-2′-deoxyuridine(EDU)实验用于观察沙蟾毒精对于HCT 116细胞增殖的抑制能力;蛋白免疫印迹(Western Blotting)实验用于验证凋亡相关蛋白和Notch通路中相关蛋白在沙蟾毒精干预后的表达改变;最后对类器官进行了苏木精-伊红染色(HE)及免疫组织化学染色(IHC)来评估沙蟾毒精对于类器官的抑制效果。结果 单细胞转录组测序结果显示第二群肿瘤细胞亚群在干预后比例显著降低,PBS组中占比21.57%,Are组中占比14.16%,富集分析显示这群肿瘤细胞与蛋白质运输、由RNA聚合酶Ⅱ调控的转录、囊泡介导的运输、基于DNA模板的转录负向调控、从内质网到高尔基体的囊泡介导运输、细胞凋亡过程、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、癌症中的蛋白多糖、泛素介导的蛋白质降解、癌症途径、Notch信号通路、Wnt信号通路等生物学进程相关,EDU实验显示,与PBS组相比,沙蟾毒精在100~300 nmol/L间浓度依赖性地抑制HCT 116细胞增殖;Western blot结果显示,与PBS组相比,沙蟾毒精显著提高了BAX的表达,并抑制BCL-2的蛋白表达。与Notch通路相关的Notch1、Jagged1、HES1、Cyclin D1和DLL4蛋白都出现了不同程度的表达抑制。结论 沙蟾毒精能够抑制结直肠癌增殖,其机制可能与抑制Notch通路激活有关。

关键词:单细胞转录组;肠癌类器官;NOTCH通路;沙蟾毒精
中图分类号:R277.7 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)02-0112-10

Exploring Arenobufagin Intervention in Colorectal Cancer Proliferation through Notch Pathway Based on Single-cell Transcriptome and Organoid Model

SHANG Zhihao[1], QIAN Jingyang[1], LAI Yueyang[1,2], CHENG Haibo[1,2]
(1. The First College of Clinical Medicine Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, Jiangsu, China;
2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine in Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing 210023, Jiangsu, China)

Abstract: *Objective* To explore the effects and mechanisms of Arenobufagin on colorectal cancer using single-cell transcriptomics and organoid models. *Methods* Single-cell sequencing on colorectal cancer xenografts treated with Arenobufagin and phosphate buffered saline(PBS) was performed. The study analyzed the reduction in specific tumor cell subpopulations and their biological functions. EDU experiments assessed the impact of Arenobufagin on HCT 116 cell proliferation, and Western Blotting verified changes in protein expressions related to the Notch pathway. Organoid models were evaluated using Hematoxylin-Eosin and Immunohistochemistry staining. *Results* The single-cell RNA sequencing results revealed that the proportion of the second tumor cell subpopulation significantly decreased following intervention. The subpopulation accounted for 21.57% in the PBS group and 14.16% in the Are group. Gene enrichment analysis indicated that these tumor cells were associated with biological processes such as protein transport, transcription regulated by RNA polymerase II, vesicle-mediated transport, negative regulation of transcription from DNA templates, vesicle-mediated transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, apoptosis, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, proteoglycans in cancer, ubiquitin-mediated protein degradation,

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFC3500200,2022YFC3500201);国家自然科学基金项目(81902330);国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-C-202208);江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)
作者简介:商志浩(1997-),男,江苏扬州人,硕士在读,研究方向:中医药防治肿瘤。
通讯作者:赖岳阳(1985-),男,江苏南京人,讲师,博士,研究方向:中医药肿瘤防治。E-mail:laiyy@njucm.edu.cn。
程海波(1975-),男,江苏南京人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中医药肿瘤防治。E-mail:haibocheng@njucm.edu.cn。

cancer pathways, Notch signaling pathway, and Wnt signaling pathway. The EDU assay demonstrated that arenobufagin (Are) dose-dependently inhibited the proliferation of HCT116 cells within the concentration range of 100 nm to 300 nm compared to the PBS group. Western blot analysis showed that, compared to the PBS group, arenobufagin significantly increased the expression of BAX while downregulating the expression of BCL-2. Additionally, proteins associated with the Notch pathway, including Notch1, Jagged1, HES1, Cyclin D1, and DLI4, exhibited varying degrees of expression inhibition. *Conclusion* Arenobufagin effectively inhibits the proliferation and migration of colorectal cancer cells, likely through the suppression of the Notch signaling pathway.

Keywords: single-cell transcriptomics; colorectal cancer organoids; NOTCH pathway; arenobufagin

结直肠癌(colorectal cancer,CRC)是全球造成癌症死亡的主要癌种之一,位列肺癌和乳腺癌之后[1]。根据世界卫生组织的数据,CRC 在所有癌症类型中具有较高的年发病率和病死率[2]。近年来,全球人口结构变化和生活方式的转变导致了 CRC 发病率的显著上升。虽然早期 CRC 的治疗因筛查和手术技术的进步而见效,但晚期 CRC 患者的治疗效果依旧不佳,5 年生存率低于 10%[3]。CRC 的发生受到多种因素的影响,包括饮食习惯、体重管理、运动频率以及遗传因素[4]。研究表明,高脂肪和低纤维的饮食与 CRC 发病率的增加有关,同时肠道微生物的变化也可能是一个影响因素[5]。鉴于当前的治疗挑战和流行病学特征,对结直肠癌的发病机制和治疗策略进行创新和加强显得尤为重要。

在结直肠癌中,Notch 信号的激活通常与肿瘤的进展、恶化以及化疗抗性的增加有关。首先,Notch 通路的异常激活可促进结直肠癌细胞的增殖和存活,这通常与调节下游基因有关,如促进细胞周期蛋白和抑制细胞凋亡相关基因的表达来实现[6-7]。其次,Notch 通路在维持肿瘤干细胞的特性方面起着重要作用[8]。肿瘤干细胞被认为是导致肿瘤复发和转移的关键因素,Notch 通路的活化可增强这些细胞的自我更新和多能性。此外,Notch 信号通路还与肿瘤微环境中的其他细胞有关,如促进血管生成和调节免疫细胞的功能,从而为肿瘤的生长和扩散创造有利条件[7,10-12]。因此,Notch 通路不仅在结直肠癌的生长和存活中起作用,还能够通过调节肿瘤微环境来促进癌症的进展。

基于中医药数千年的历史和临床经验,许多中药天然产物的抗肿瘤作用已得到证实,为现代科学研究提供了宝贵线索。与传统的单一靶点药物不同,中药天然产物通常通过作用于多个生物途径来展现其抗肿瘤效果,从而有助于提高疗效和减少药物抗性。沙蟾毒精(Arenobufagin,Are)作为从中华蟾蜍或黑眶蟾蜍后耳腺体及皮肤分泌的毒液中提取的主要活性成分之一,具备多重生物学效应[12-13]。作为一种高效的 Na^+-K^+-ATP 酶抑制剂,沙蟾毒精在心脏中的正性肌力作用与洋地黄类药物相似,对心脏功能调节具有重要影响[13]。此外,沙蟾毒精还显示出抑制多种癌细胞的增殖和转移的能力,尤其是在结直肠癌的干预中展现出了潜在的应用价值[14]。然而,沙蟾毒精在结直肠癌中干预的具体分子作用机制尚未被完全揭示。

本研究旨在深入探索沙蟾毒精诱导结直肠癌细胞凋亡的分子机制,基于单细胞转录组测序与类器官技术,我们期望揭示沙蟾毒精在调控结直肠癌生物学行为中的关键信号通路,为未来的临床新药研发和癌症治疗提供新的选择与策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株与培养方法 本研究所使用的 HCT116 人类结肠癌细胞系从中国科学院上海生命科学研究院细胞库购得。细胞均在含 10% 胎牛血清及青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 g/mL)的 McCoy's 5A 培养基中进行培养,维持于 37 ℃、5% CO_2 的恒温恒湿条件下。

1.1.2 类器官及培养方法 通过手术获取的患者组织样本被无菌剪刀细致切割成极小片段。这些组织片段随后与 Matrigel(康宁,产品编号 356231)按大约 1∶4 的比例在冰上均匀混合。接下来的步骤根据已发布的协议进行(32929210)。简要来说,组织碎片和 Matrigel 的混合物被迅速地分布在多孔板上,形成半球状滴珠,并在 37 ℃下孵化 15~20 min 以促使滴珠凝固。每个孔中加入适量的培养基(KingcultureTM 类器官生长培养基,产品编号 KCW-2),每 2~4 d 更换 1 次培养基。

1.1.3 实验药品 沙蟾毒精(PubChem CID:204810;CAS 号:464-74-4;分子式:$C_{24}H_{32}O_6$;分子量:416.50 g/mol;HPLC≥97%)购自上海源叶生物科技有限公司(中国上海)。

1.2 实验方法

1.2.1 质控与降维聚类分析 在高通量测序中,原始 fastq 格式数据通过 10×Genomics 的 CellRanger-v5.0.0 软件进行质量统计和基因组比对。软件识别细胞标签和唯一分子识别标签(UMI),量化单细胞转录组,提供细胞数量、基因中位值、测序饱和度等质控信息。进一步使用 Seurat v3.1.1 软件包对 Cellranger 结果进行质控和处理,利用广义线性模型筛选异常细胞,并根据 UMI 数、基因数和线粒体基因比例过滤低质量细胞,如双细胞或凋亡细胞。

采用 Seurat 软件的典型相关分析(CCA)整合工具对单细胞数据进行融合处理[15]。运用"FindClusters"功能,在 0.8 的分辨率下实施细胞群聚分析,并依据前 20 个主成分(PC)来确定细胞类型。通过基因表达水平进行主成分分析(PCA),实现线性降维,并借均匀流形近似和投影分析(UMAP)方法,将 PCA 结果在二维空间中展现,以便进行直观的可视化。

1.2.2 拷贝数变异分析 首先使用 inferCNV R 包来评估初步的拷贝数变异(CNVs)[16]。随后,通过分析每个单独细胞的基因表达数据,并设置 0.1 的阈值。对所有细胞类型的 CNVs 进行了计算。这些基因按照它们在染色体上的位置进行排列,然后计算了跨越 101 个基因的基因表达的移动平均值。接下来,

将基因表达量标准化到零均值。在这个过程中,将上皮细胞分类为恶性,其他细胞则被认为是正常的。最后,进行了去噪处理,以获得最终的 CNV 分析结果。

1.2.3 GO、KEGG、Wiki Pathways 富集分析 对第二群肿瘤细胞的前 50 个高变基因进行功能富集分析。为获取最新的 KEGG 通路基因注释,使用了 KEGG rest API(https://www.kegg.jp/kegg/rest/keggapi.html)进行辅助分析。从 Molecular Signatures Database(http://www.gsea-msigdb.org/gsea/downloads.jsp)下载 c2.cp.pid.v7.4.symbols.gmt、c2.cp.wikipathways.v7.4.symbols.gmt 和 c2.cp.reactome.v7.4.symbols.gmt 文件,分别用于 Wiki 通路的富集分析。对于基因本体(GO)的富集分析,下载 c5.go.bp.v7.4.symbols.gmt 文件。以上数据集均用作分析的背景集,将目标基因映射至这些背景集,并采用 R 软件包 clusterProfiler 进行富集分析,以确定基因集的富集结果。所有的富集分析均设置了基因集大小限制:最小 5 个基因,最大 5000 个基因,且将 P 值小于 0.05 作为富集显著性的标准。

1.2.4 EDU 细胞增殖检测试剂盒检测细胞增殖情况 取对数生长期的 HCT-116 细胞(大约含有 2.5×10^4 个细胞)1 mL,均匀接种于 24 孔板中。实验设置包括空白对照组、阳性药 5-FU 组(浓度为 50 nmol/L)和不同浓度的沙蟾毒精处理组(浓度分别为 100、200、300 nmol/L),每个处理组设 3 个重复孔。处理 24 h 后,按照 EDU 细胞增殖检测试剂盒的说明书操作,然后通过显微镜拍照记录结果,并计算 EDU 染色阳性细胞的比率。

1.2.5 HE 染色与免疫组化 将类器官清洗后固定,用琼脂糖包埋。切片经过二甲苯Ⅰ和Ⅱ各 10 min 进行脱蜡,接着依次在无水乙醇Ⅰ和Ⅱ中各处理 5 min,然后经过 95%、90%、80%、70% 的酒精序列,每步骤 5 min,最后用蒸馏水清洗。其次,切片在 Harris 苏木素染液中染色 3~8 min,用自来水冲洗,接着在伊红染液中染色 1~3 min 并再次用水清洗。最后,切片先后放入 95% 酒精Ⅰ和Ⅱ、无水乙醇Ⅰ和Ⅱ、二甲苯Ⅰ和Ⅱ中,每种溶液中各 5 min,进行脱水和透明化处理,最后从二甲苯中取出,晾干后用中性树胶封片。

首先,使用 3% 的 H_2O_2 溶液处理切片 10 min,去除内源性过氧化物酶,接着用清水洗净后在柠檬酸缓冲液中微波加热,用以暴露抗原位点。之后,切片在 PBS 中洗涤并用血清封闭非特异性位点,然后在 37 ℃温箱中孵育 0.5 h。接着,加入初级抗体并在 4 ℃下过夜。次日,用 PBS 清洗切片后加入二级抗体,并再次在 37 ℃孵育 0.5 h。随后,切片经 PBS 清洗后加入链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(streptavidin biotin peroxidase complex,SABC)溶液,并在温箱中孵育 0.5 h。接着进行显色处理,然后用苏木精进行复染。复染后的切片依次经过不同浓度的酒精和二甲苯进行脱水,最后在通风柜中用中性树胶封片并晾干。

1.2.6 蛋白免疫印迹实验 采用对数生长期的细胞,经 0.25% 胰蛋白酶处理后制备成单细胞悬液,并调节细胞浓度至 1×10^5 个/mL。将细胞以每孔 2 mL 的体积均匀分配至 6 孔板中,在培养箱内培养 24 h。细胞贴壁后,向各孔中加入不同浓度的沙蟾毒精处理液(浓度分别为 100、200、300 nmol/L),并设立 3 个重复孔,于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 48 h。弃去上清液,收集细胞后使用 RIPA 裂解液提取蛋白。蛋白经 BCA 法定量后,进行变性处理,并在 12% SDS-PAGE 凝胶中进行电泳。湿转法用于蛋白转移到膜上,随后室温下封闭 2 h,使用兔抗 GAPDH(稀释比 1∶10 000)及 BAX、BCL-2、Notch1、Jagged1、HES1、Cyclin D1 和 DLL4(稀释比 1∶2000)进行一抗孵育,过夜于 4 ℃。用 PBST 洗涤膜 3 次,每次 10 min。加入二抗(稀释比 1∶10 000),在 37 ℃孵育 1 h 后,用 PBST 再次漂洗 3 次,每次 10 min。将膜浸入 ECL 发光液中 2 min,并进行拍照成像。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 沙蟾毒精抑制第二群肿瘤细胞亚群

单细胞转录组测序将肿瘤组织降维聚类成 12 类细胞亚群,包括 7 类肿瘤细胞亚群、巨噬细胞、TNK 细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞以及内皮细胞。CNV 分析显示 7 群肿瘤细胞具有较高的拷贝数变异符合肿瘤细胞的特征,细胞聚类的密度图显示 PBS 组与沙蟾毒精干预组的细胞聚类分布模式存在差异。沙蟾毒精干预后肿瘤细胞较 PBS 组减少,具体占比减少的细胞亚群为 2、6、7 三群肿瘤细胞,其中第二群肿瘤细胞减少显著,PBS 组中占比 21.57%,Are 组中占比 14.16%,见表 1、插页 XV 图 1。

表 1 各亚群细胞数量及占比

细胞类型	细胞数量(Are)	细胞数量(Control)	占比/(%)(Are)	占比/(%)(Control)
Cancer_cell_01	2538	2554	24.25	22.79
Cancer_cell_02	1482	2417	14.16	21.57
Cancer_cell_03	1968	1723	18.80	15.37
Cancer_cell_04	1054	999	10.07	8.91
Cancer_cell_05	973	907	9.30	8.09
Cancer_cell_06	586	900	5.60	8.03
Cancer_cell_07	230	493	2.20	4.40
Endothelial_cell	48	10	0.46	0.09
Fibroblast	169	2	1.61	0.02
Macrophages	1039	897	9.93	8.00
Smooth_muscle_cell	125	67	1.19	0.60
T_NK_cell	254	238	2.43	2.12

2.2 第二群肿瘤细胞的主要生物学功能

针对第二群肿瘤细胞前 50 个高变基因进行了富集分析,以研究这群细胞显著富集的生物学功能。GO 富集显示,这群细胞的前 50 个高变基因主要富集在蛋白质运输、由 RNA 聚合酶Ⅱ调控的转录、囊泡介导的运输、基于 DNA 模板的转录负向调控、从内质网到高尔基体的囊泡介导运输、细胞凋亡过程、高尔基体到内质网的逆行囊泡运输、细胞内蛋白质运输、细胞凋亡过程的负向调控等功能。KEGG 富集显示,这些基因主要富集在胞吞作用、内质网中的蛋白质加工、焦点黏附、肿瘤坏死因

子(TNF)信号通路、癌症中的蛋白多糖、泛素介导的蛋白质降解、癌症途径、Notch 信号通路、Wnt 信号通路等。WikiPathways 富集的主要结果包括 EGFR1 信号通路、焦点黏附、白色脂肪细胞分化、TGF－β 信号通路、Notch 信号通路、Delta－Notch 信号通路、Wnt 信号通路等。富集分析提示了其中一些与肿瘤发生的关键生物学功能可能发挥着重要作用,Notch 通路在 KEGG 富集与 WikiPathways 富集中都被提及,这提示 Notch 通路可能在沙蟾毒精的干预中发挥着重要作用。见插页ⅩⅥ图 2。

2.3 沙蟾毒精抑制结直肠癌细胞增殖

PBS 组 HCT 116 细胞生长状态良好。Are(100 nmol/L)组与 Are(200 nmol/L)组细胞密度降低,细胞状态变差。Are(300 nmol/L)组与 5－FU 组细胞连接疏松,细胞增殖减少且形态发生变化,出现轻微的细胞变圆皱缩等现象,见插页ⅩⅦ图 3。

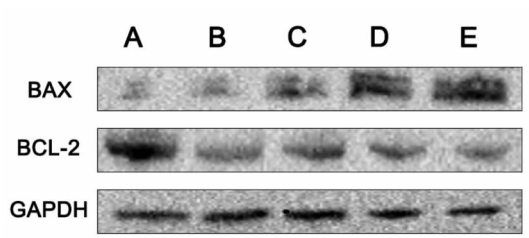
EDU 细胞增殖实验结果表明,与空白组比较,沙蟾毒精在 100～300 nmol/L 浓度区间内可以浓度依赖性地抑制细胞 DNA 合成率,其中 5－FU 组的抑制率略高于 300 nmol/L 浓度的沙蟾毒精组的抑制率,见表 2、插页ⅩⅧ图 4。

表 2 沙蟾毒精对 HCT116 细胞 DNA 合成率的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

组别	浓度/(nmol/L)	DNA 合成率/(%)
PBS 组		70.41±2.64
Are	100	60.54±3.30
Are	200	45.14±1.74
Are	300	24.64±6.29
5－FU	50	21.66±3.01

2.4 沙蟾毒精促使 HCT116 细胞凋亡并抑制 NOTCH 通路

与 PBS 组相比,沙蟾毒精各组和 5－氟尿嘧啶处理的细胞 BAX 蛋白表达显著上调,而 BCL－2 蛋白表达下调,提示沙蟾毒精能通过调控 Bcl－2 与 Bax 蛋白表达,诱导 HCT116 细胞发生凋亡,见图 5。



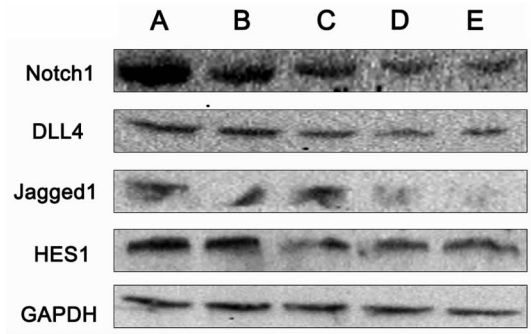
注:A. PBS 组; B. Are(100 nmol/L)组; C. Are(200 nmol/L)组; D. Are(300 nmol/L)组; E. 5－FU(50 nmol/L)组。

图 5 沙蟾毒精对凋亡相关蛋白表达的影响

与 PBS 组相比,沙蟾毒精各组明显下调 Notch1、Jagged1、HES1、DLL4 蛋白表达,沙蟾毒精 200、300 nmol/L 组中 Notch1 蛋白表达明显下调。沙蟾毒精(300 nmol/L)与 5－FU 对 Jagged1 抑制效果显著,见图 6。

2.5 沙蟾毒精杀伤并抑制类器官的增殖

在 HE 染色的肠癌类器官切片中,PBS 对照组展示了良好的组织结构保持。随着沙蟾毒精剂量的增加(100、200、300 nmol/L),组织结构破坏程度逐渐加剧,300 nmol/L 浓度下的组织损伤尤为明显。而在 5－氟尿嘧啶(5－FU)50 nmol/L 处理组中,组织结构损伤尤为显著。这表明沙蟾毒精对肠癌类器官的细胞具有剂量依赖性的细胞毒性作用,且 5－FU 的效力特别强。见插页ⅩⅨ图 7。



注:A. PBS 组; B. Are(100 nmol/L)组; C. Are(200 nmol/L)组; D. Are(300 nmol/L)组; E. 5－FU(50 nmol/L)组。

图 6 沙蟾毒精对 HCT116 细胞 Notch 信号通路相关蛋白表达的影响

PBS 处理组的切片中 Ki－67 阳性细胞数量较多,表明有活跃的细胞增殖。而在用不同浓度的沙蟾毒精(Are)处理的组别中,随着浓度的增加(100 nmol/L,200 nmol/L,300 nmol/L),Ki－67 阳性细胞数量逐渐减少,显示出细胞增殖率的降低。在 5－氟尿嘧啶(5－FU)50 nmol/L 处理的切片中,几乎观察不到 Ki－67 阳性细胞,表明该条件下类器官受到了显著抑制。见插页ⅩⅨ图 8。

3 讨论

结直肠癌(CRC)是一种常见的恶性肿瘤,影响全球数百万患者。它通常与生活方式、遗传因素和环境因素有关。目前,CRC 的治疗主要包括手术、化疗、放疗和靶向治疗。5－氟尿嘧啶(5－FU)是治疗 CRC 的主要化疗药物之一,已被广泛应用多年。它通过干扰细胞的核苷酸代谢来抑制肿瘤生长。然而,5－FU 的使用受到耐药性的限制,许多患者对 5－FU 产生耐药,导致治疗效果下降。此外,5－FU 的不良反应,如骨髓抑制和消化道不良反应,也限制了其使用。寻找并开发疗效优、不良反应低的新抗肿瘤药物有利于更好地防治结直肠癌的发生与发展。

沙蟾毒精主要来源于蟾蜍科动物如中华大蟾蜍或黑眶蟾蜍干燥分泌物,是中药蟾酥中的有效成分之一。其具有广谱的抗肿瘤作用,能够通过促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞侵袭和转移、抑制肿瘤血管生成等途径发挥抗肿瘤作用[17－18]。在肺癌、肝癌、乳腺癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤中均具有很好的抗肿瘤活性[19]。深入了解沙蟾毒精的抗肿瘤机制能够为临床转化应用提供潜在的药物选择,开发更优的治疗方案。

对肿瘤增殖的抑制研究具有重大意义,这一表型直接影响肿瘤的生长和扩散。减缓或停止肿瘤细胞的增殖是治疗癌症的核心策略之一。我们的研究发现沙蟾毒精能够浓度依赖性地影响 HCT 116 细胞的形态与细胞间的连接,EDU 实验发现其能够显著影响 HCT 116 细胞的增殖,不仅如此,我们在更接近人体实际的类器官模型上进行了验证,发现沙蟾毒精对类器

官形态和 Ki－67 都有显著的抑制效应。

单细胞测序结果表明，沙蟾毒精能够显著抑制第二群肿瘤细胞在组织中的丰度，通过对这群细胞前 50 个高变基因进行富集分析发现 Notch 通路是这群细胞中的高度活跃的通路之一，这可能是沙蟾毒精抑制这群细胞的主要途径之一。在 CRC 中，Notch 通路的异常激活与肿瘤的发生、进展和恶化有关。Notch 通路的激活可以促进肿瘤细胞的增殖和生存，抑制细胞凋亡，并有可能与癌症干细胞的维持有关[20－21]。研究发现沙蟾毒精能够抑制 Notch1、Jagged1、HES1、Cyclin D1 和 DLI4 的蛋白表达，这对于结直肠癌的治疗具有重要意义。Notch1 是 Notch 信号通路的关键受体，而 Jagged1 是与 Notch1 结合的配体，它们的相互作用促进了信号传递[22]。HES1 是 Notch 通路的下游靶基因，参与调控细胞分化和增殖[23]。Cyclin D1 是细胞周期中的重要调节蛋白，其过度表达与癌症相关[24]。DLI4 则与血管生成相关[25]。沙蟾毒精通过抑制这些关键蛋白的表达或功能，可能会阻断 Notch 通路的激活，从而抑制肿瘤生长和转移。

综上所述，本研究基于单细胞转录组测序以及在更为接近人体实际的类器官模型上进行了研究，证实了沙蟾毒精能通过下调 Notch 信号通路中关键因子 Notch1、Jagged1、Hes1 等蛋白的表达，并抑制 HCT 116 细胞生长、增殖并诱导其发生凋亡从而对结直肠癌产生治疗作用。本研究挖掘、探明了沙蟾毒精抑制结直肠癌的机制与药效，有望为今后更深入的药理和机制研究提供一定的研究基础。

参考文献

[1] YANG Y, GAO Z Y, HUANG A, et al. Epidemiology and early screening strategies for colorectal cancer in China[J]. Chin J Cancer Res, 2023, 35(6): 606－617.

[2] SATO Y, TSUJINAKA S, MIURA T, et al. Inflammatory bowel disease and colorectal cancer: epidemiology, etiology, surveillance, and management[J]. Cancers (Basel), 2023, 15(16): 4154.

[3] DAHMANI B, BOUBLENZA L, CHABNI N, et al. Colorectal cancer in a region of western of Algeria: results of 581 cases in 5 years [J]. Afr Health Sci, 2023, 23(2): 353－359.

[4] MURPHY C C, ZAKI T A. Changing epidemiology of colorectal cancer—birth cohort effects and emerging risk factors[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2024, 21: 25－34.

[5] 5 个健康习惯降低结肠癌风险[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(7): 1549.

[6] SU X Y, WANG X F, LAI J, et al. Unraveling a novel hippo－associated immunological prognostic signature: the contribution of SERPINE1 in facilitating colorectal cancer progression via the Notch signaling pathway[J]. Genomics, 2024, 116(2): 110794.

[7] WANG M H, TANG L, CHEN S Y, et al. ZNF217－activated Notch signaling mediates sulforaphane－suppressed stem cell properties in colorectal cancer[J]. J Nutr Biochem, 2024, 125: 109551.

[8] ZHOU S H, HUANG H Y, ZHENG Z, et al. MOGS promotes stemness acquisition and invasion via enhancing NOTCH1－glycosylation dependent NOTCH pathway in colorectal cancer[J]. Am J Cancer Res, 2023, 13(12): 5996－6010.

[9] LI R, LIU X F, HUANG X D, et al. Single－cell transcriptomic analysis deciphers heterogenous cancer stem－like cells in colorectal cancer and their organ－specific metastasis[J]. Gut, 2024, 73(3): 470－484.

[10] WANG X M, ZHENG D X, WANG C T, et al. Knockdown of circ_0005615 enhances the radiosensitivity of colorectal cancer by regulating the miR－665/NOTCH1 axis[J]. Open Med (Wars), 2023, 18(1): 20230678.

[11] TANG J W, HUANG M, PENG H, et al. METTL3－mediated Hsa_circ_0000390 downregulation enhances the proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer cells by increasing Notch1 expression[J]. Hum Cell, 2023, 36(2): 703－711.

[12] 李志强. 沙蟾毒精(ARE)通过诱导线粒体损伤导致急性白血病细胞凋亡的作用机制研究[D]. 重庆:陆军军医大学,2023.

[13] 李洲强, 白媛媛, 鲁世金, 等. 蟾酥中主要蟾毒配基类化合物的抗恶性肿瘤作用机制: 基于网络药理学和分子对接的研究[J]. 广西医学, 2022, 44(21): 2504－2510.

[14] 李志强,姜秀星,胡金娇,等. 沙蟾毒精激活 Rho A/ROCK1 信号通路诱导急性白血病细胞凋亡的分子机制研究[J]. 陆军军医大学学报,2022,44(7):700－710.

[15] RICH J M, MOSES L, EINARSSON P H, et al. The impact of package selection and versioning on single－cell RNA－seq analysis [J]. bioRxiv, 2024: 2024.04.04.588111.

[16] XU H, JIANG L, QIN L S, et al. Single－cell transcriptome analysis reveals intratumoral heterogeneity in lung adenocarcinoma[J]. Environ Toxicol, 2024, 39(3): 1847－1857.

[17] 刘倩, 胡春萍, 曹鹏, 等. 沙蟾毒精诱导肺癌 PC－9 细胞的凋亡效应及其作用机制初探[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(12): 2030－2035.

[18] 马建江. 天然产物沙蟾毒精的结构优化和抗肿瘤活性研究[D]. 上海:上海应用技术大学,2019.

[19] 方硕, 余铃, 郭卫春. 沙蟾毒精对骨肉瘤 U2OS 细胞增殖、凋亡、侵袭的影响及机制[J]. 山东医药, 2020, 60(10): 45－48.

[20] 王荣跃, 邱海凡, 戴芬, 等. Notch3/DLI4 信号通路对颈部淋巴水囊瘤后淋巴管发育的影响[J]. 温州医科大学学报, 2024, 54(1): 20－24, 30.

[21] 李晓菲, 崔芳, 刘菲, 等. 白藜芦醇抑制 Notch1 信号通路对抗小鼠急性 T 淋巴细胞白血病[J]. 中国实验血液学杂志, 2024, 32(1): 57－65.

[22] LIAN W Q, XIANG P, YE C J, et al. Single－cell RNA sequencing analysis reveals the role of cancerassociated fibroblasts in skin melanoma[J]. Curr Med Chem, 2024, 31(42): 7015－7029.

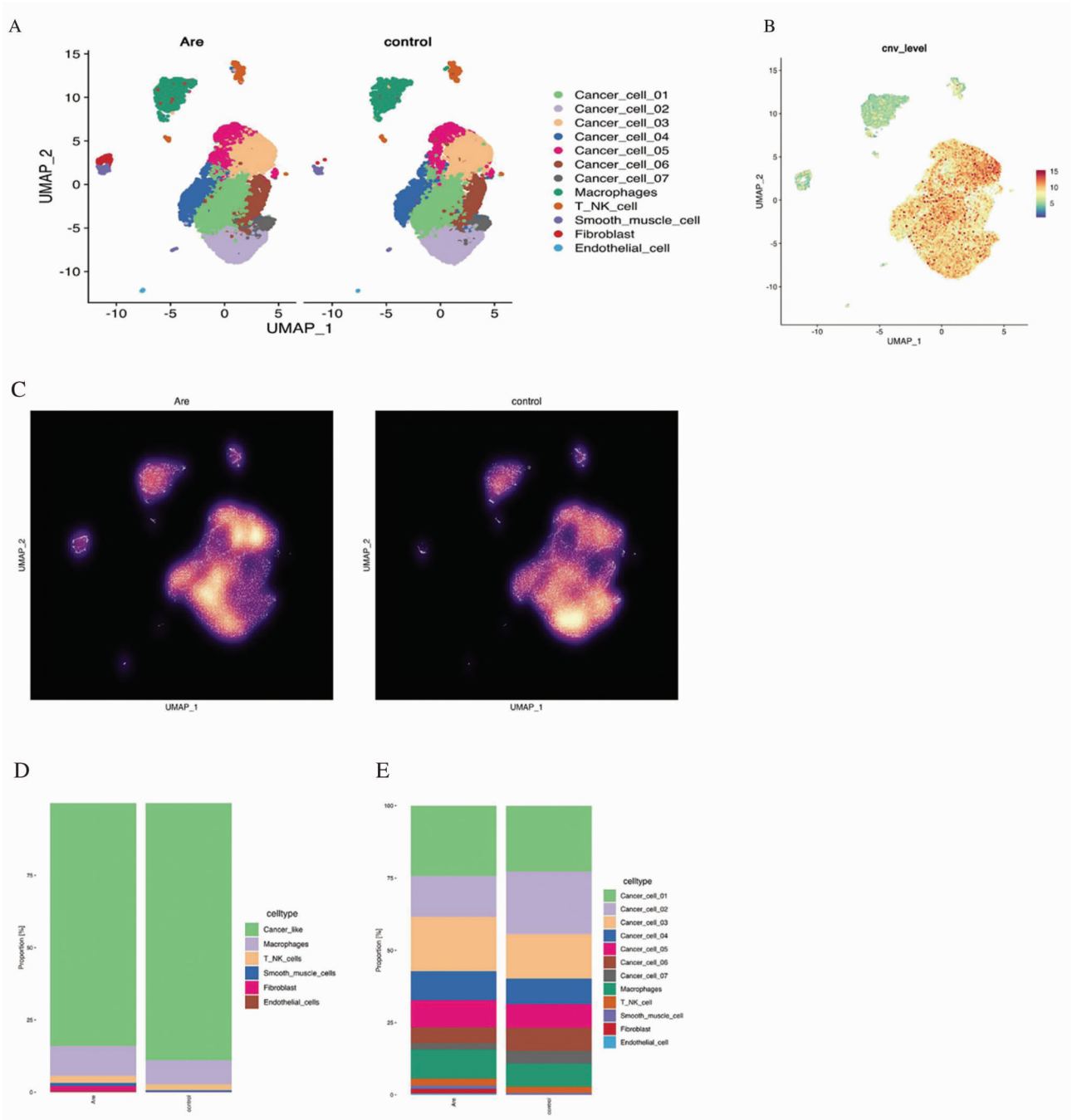
[23] RANI A, GREENLAW R, SMITH RA, et al. HES1 in immunity and cancer [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2016, 30: 113－117.

[24] QIE S, DIEHL J A. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment[J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(12): 1313－1326.

[25] PITULESCU M E, SCHMIDT I, GIAIMO B D, et al. Dll4 and Notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation [J]. Nat Cell Biol, 2017, 19(8): 915－927.

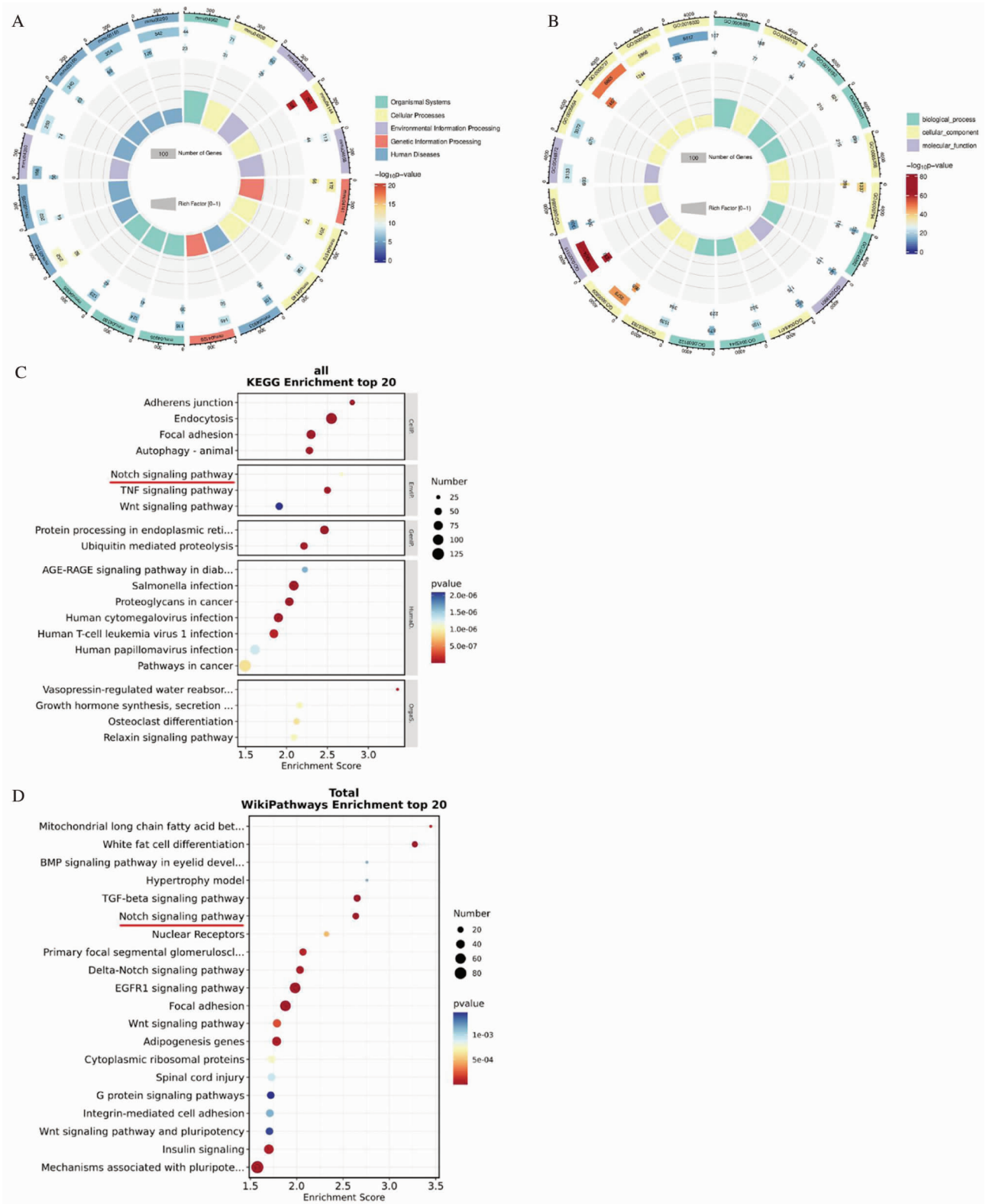
基于单细胞转录组和类器官模型探讨沙蟾毒精通过 Notch 通路干预结直肠癌增殖的研究

（正文见 112－116 页）



注：A. 细胞亚群降维聚类；B. 拷贝数变异分析；C. 细胞聚类密度图；D. 细胞大类含量比例图；E. 细胞亚群含量比例图。

图 1　PBS 与沙蟾毒精（9 mg/kg）分别干预 C57/16J 小鼠皮下移植瘤单细胞转录组测序结果



注：A. GO 富集圈图；B. KEGG 富集圈图；C. KEGG 富集气泡图；WikiPathways 富集气泡图。

图 2　第二群肿瘤细胞亚群前 50 个高变基因的富集分析结果

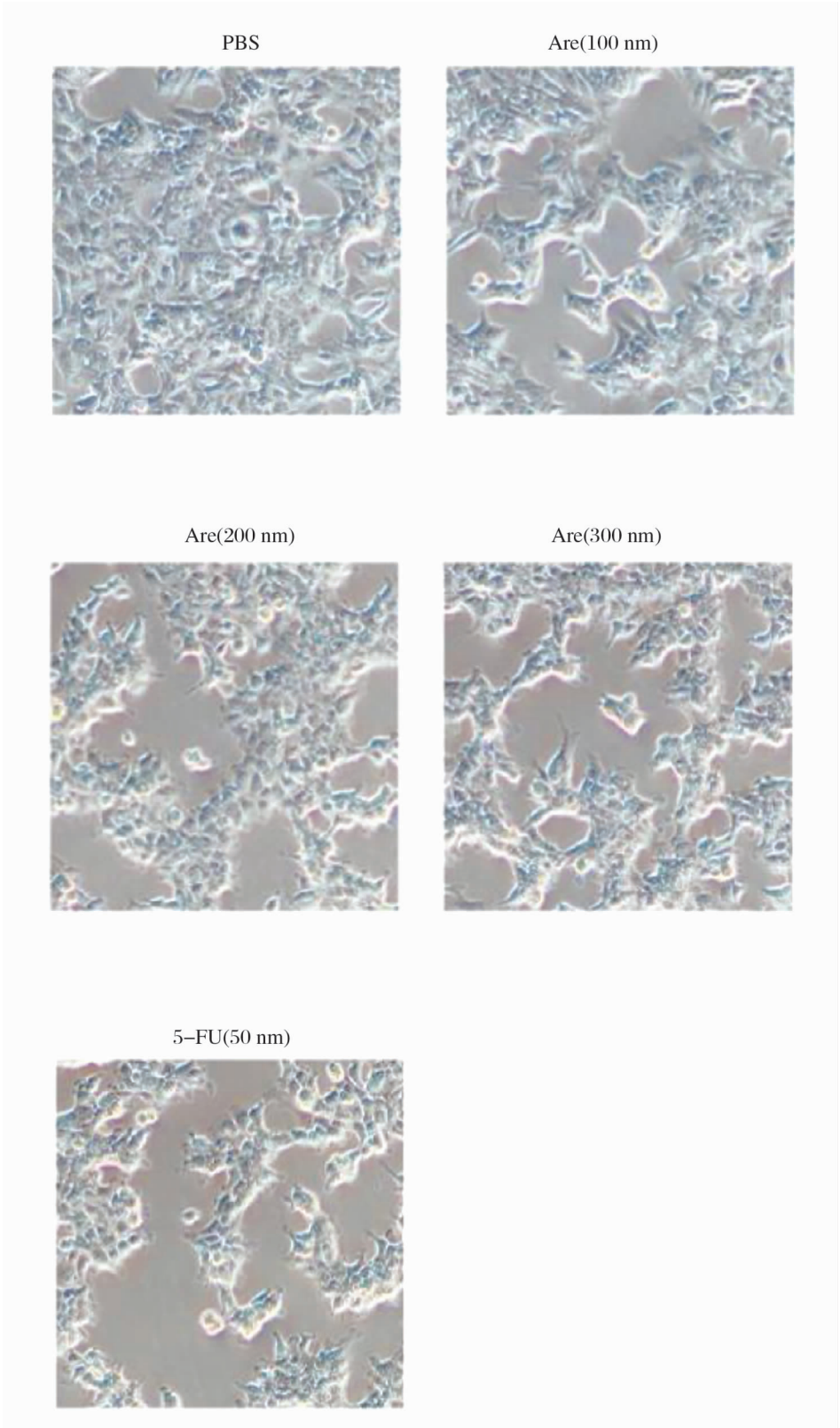


图 3 沙蟾毒精对 HCT116 细胞形态的影响(倒置显微镜,×100)

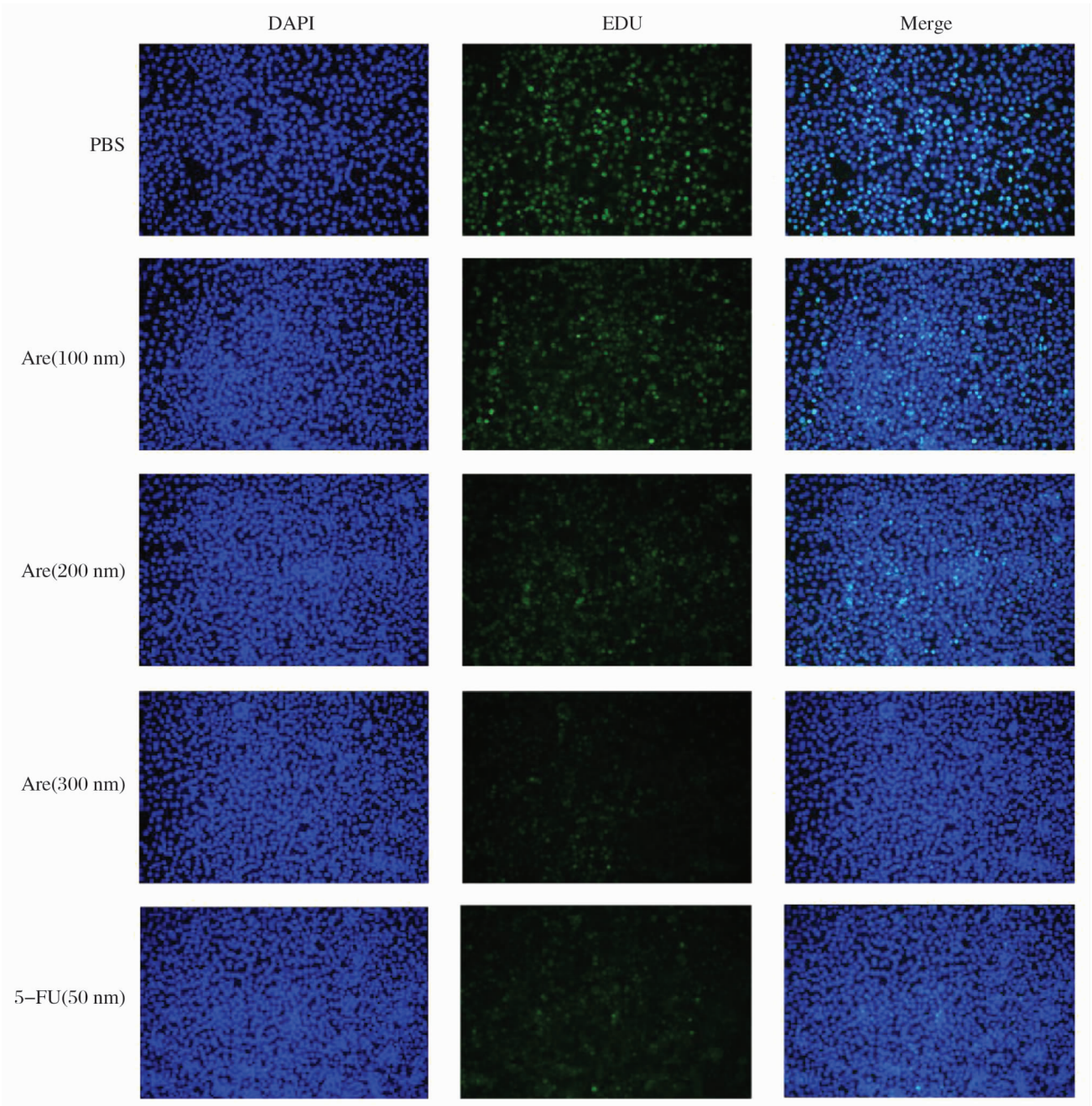


图 4　沙蟾毒精对 HCT116 细胞 DNA 合成率的影响

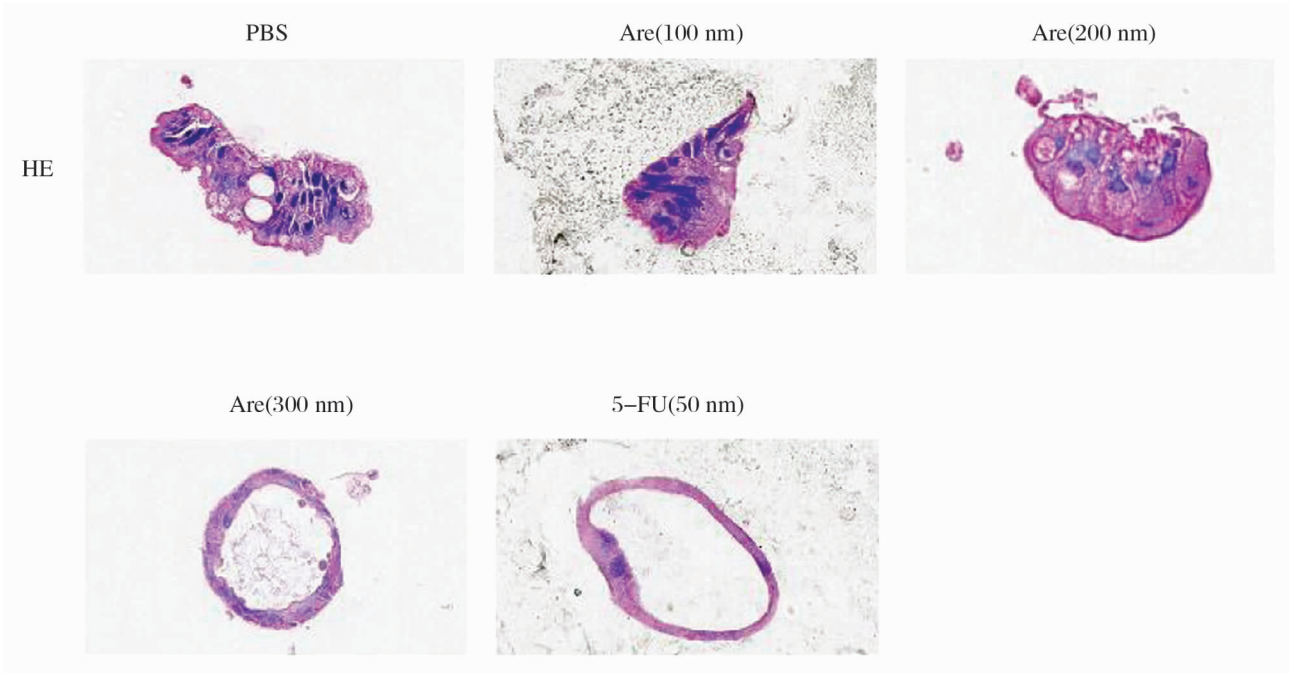


图 7 HE 染色检测各组类器官形态改变

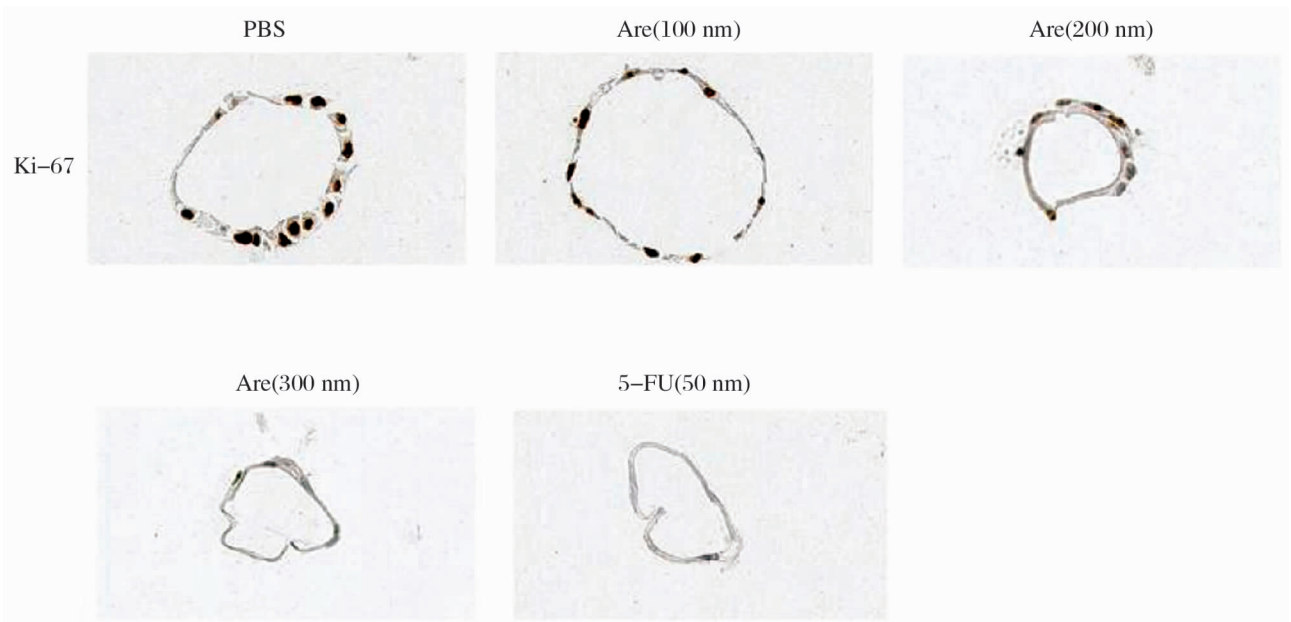


图 8 免疫组化染色检测各组 Ki－67 表达情况