

# 哇巴因通过G6PD通路调节糖酵解影响结肠癌 细胞增殖的机制研究\*

徐建雄<sup>1,2</sup>, 努尔比亚木·达吾提<sup>2</sup>, 萨尼耶·依不拉音<sup>2</sup>, 帕孜来提<sup>2</sup>, 李欣哲<sup>2</sup>, 李文芳<sup>1,2†</sup>

(1. 新疆大学 药学院(药物研究所), 新疆 乌鲁木齐 830017; 2. 新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830017)

**摘要:** 为探究哇巴因(ouabain)抑制结肠癌细胞HCT116增殖的作用机制,采用CCK-8法、细胞克隆形成实验、EdU实验和流式细胞术,分别检测了增殖能力、细胞克隆形成、DNA复制活性及凋亡率,以考察哇巴因对结肠癌细胞HCT116体外细胞活力的影响。为进一步分析哇巴因对结肠癌细胞HCT116糖酵解的影响,使用葡萄糖氧化酶法和乳酸检测试剂盒,检测了细胞葡萄糖消耗水平和乳酸生成水平的变化。此外,还探讨了哇巴因调控结肠癌细胞HCT116糖酵解的机制,通过real-time PCR分析其对相关代谢途径因子mRNA表达的影响,并通过Western Blot检测糖代谢相关蛋白G6PD的表达变化。结果表明:与对照组相比,哇巴因能显著抑制结肠癌细胞HCT116的增殖、克隆形成能力以及DNA复制活性( $P<0.01$ ),其 $IC_{50}$ 值为50 nmol/L,并呈现浓度依赖性。同时,哇巴因能显著诱导结肠癌细胞HCT116凋亡( $P<0.01$ ),并显著抑制结肠癌细胞HCT116的糖酵解,降低此代谢途径中相关因子mRNA的表达水平( $P<0.01$ )。Western Blot、real-time PCR和G6PD酶活力检测实验结果显示:与对照组相比,哇巴因可以显著降低结肠癌细胞HCT116中G6PD的mRNA和蛋白质表达水平以及G6PD酶活性( $P<0.01$ )。综上所述,哇巴因可显著抑制结肠癌细胞HCT116的增殖,促进其凋亡并显著降低其糖酵解水平;其可能的机制与抑制G6PD信号通路有关,提示哇巴因可能成为治疗结肠癌的潜在候选药物,为结肠癌的治疗提供了新的思路和可能。

**关键词:** 哇巴因; 糖酵解; G6PD; 结肠癌; 增殖

**DOI:** 10.13568/j.cnki.651094.651316.2024.08.21.0001

**中图分类号:** R730.23 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-7675(2025)05-0621-011

**引文格式:** 徐建雄, 努尔比亚木·达吾提, 萨尼耶·依不拉音, 帕孜来提, 李欣哲, 李文芳. 哇巴因通过G6PD通路调节糖酵解影响结肠癌细胞增殖的机制研究[J]. 新疆大学学报(自然科学版中英文), 2025, 42(5): 621-631.

**英文引文格式:** XU Jianxiong, NUERBIYAMU Dawuti, SANIYE Yibulayin, Pazilaiti, LI Xinzhe, LI Wenfang. The mechanism of ouabain altering glycolysis and affecting colon cancer cells proliferation by G6PD signaling pathway[J]. Journal of Xinjiang University(Natural Science Edition in Chinese and English), 2025, 42(5): 621-631.

## The Mechanism of Ouabain Altering Glycolysis and Affecting Colon Cancer Cells Proliferation by G6PD Signaling Pathway

XU Jianxiong<sup>1,2</sup>, NUERBIYAMU Dawuti<sup>2</sup>, SANIYE Yibulayin<sup>2</sup>,  
Pazilaiti<sup>2</sup>, LI Xinzhe<sup>2</sup>, LI Wenfang<sup>1,2</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Institute of Materia Medica, Xinjiang University, Urumqi Xinjiang 830017, China;

2. School of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi Xinjiang 830017, China)

\* 收稿日期: 2024-08-21

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目“MdmX促进非小细胞肺癌Mdm2抑制剂获得性耐药作用机理及其结构生物学机制研究”(32471260); 2024级校级大学生创新创业计划项目“老药新用-强心苷类化合物哇巴因抗结肠癌的作用机制研究”(XJU-SRT-24095)。

**作者简介:** 徐建雄(1998—), 男, 硕士生, 从事老药新用及肿瘤分子药理学研究, E-mail: jianxiongxu@stu.xju.edu.cn.

**† 通讯作者:** 李文芳(1992—), 女, 博士, 副教授, 主要从事肿瘤分子药理学、老药新用、新药临床前药理毒理研究, E-mail: liwenfang@xju.edu.cn.

**Abstract :** To elucidate the mechanism of ouabain in the proliferation of colon cancer cells HCT116, the CCK-8 assay, cell colony formation assay, EdU assay, and flow cytometry are employed to detect proliferation capacity, cell colony formation, DNA replication activity, and apoptosis rate, respectively, to investigate the effect of ouabain on the viability of colon cancer cells HCT116 in vitro. To further analyze the influence of ouabain on glycolysis in colon cancer cells HCT116, the glucose oxidase method and lactate detection kit are utilized to measure the changes in glucose consumption level and lactate production level of the cells. Additionally, the mechanism by which ouabain regulates glycolysis in colon cancer cells HCT116 is explored by analyzing the mRNA expression of related metabolic pathway factors via real-time PCR and detecting the expression changes of the glucose metabolism-related protein G6PD through Western Blot. The experimental results reveal that, compared to the control group, ouabain significantly inhibits the proliferation, colony formation ability, and DNA replication activity of colon cancer cells HCT116 ( $P < 0.01$ ), with an  $IC_{50}$  value of 50 nmol/L, and exhibits a concentration-dependent manner. Meanwhile, ouabain also significantly induces apoptosis in colon cancer cells HCT116 ( $P < 0.01$ ). Moreover, ouabain significantly suppresses glycolysis in colon cancer cells HCT116 and downregulates the mRNA levels of glycolytic metabolic pathway-related factors ( $P < 0.01$ ). The results obtained from Western Blot, real-time PCR, and cellular enzyme activity assays indicate that ouabain significantly reduces the mRNA and protein expression levels of G6PD, as well as decreases G6PD enzyme activity in colon cancer cells HCT116 compared to the control group ( $P < 0.01$ ). In conclusion, ouabain significantly inhibits the proliferation of colon cancer cells HCT116, promotes apoptosis, and suppresses glycolysis in these cells. The underlying mechanism appears to involve the inhibition of the G6PD signaling pathway. These findings suggest that ouabain holds potential as a candidate drug for colon cancer treatment, offering new avenues for therapeutic intervention in this disease.

**Key words :** ouabain; glycolysis; G6PD; colon cancer; proliferation

## 0 引言

结肠癌作为消化系统常见的恶性肿瘤之一,其发病率在全球范围居高不下,严重威胁人们的生命健康<sup>[1-2]</sup>. 尽管现代医疗技术在不断进步,但结肠癌的发病机制仍复杂难明,且治疗手段和效果亦面临诸多挑战<sup>[3]</sup>. 故深入探究结肠癌的发病机制,寻找新的治疗靶点,对于提高结肠癌的诊疗水平具有重要意义. 近年来,越来越多的研究聚焦于药物对肿瘤细胞特异性通路的靶向调控,以期实现更为精准、有效的治疗.

哇巴因(ouabain)通常从 *Strophanthus gratus* 和 *Acokanthera schimperi* 的根、茎、叶中提取<sup>[4]</sup>. 研究发现哇巴因是一种强心苷类药物,可通过抑制  $Na^+/K^+$ -ATP酶(钠-钾离子泵)来增强心肌收缩力,从而增加血液输出量,较低剂量的哇巴因在临床上可用于治疗低血压和心律失常<sup>[5]</sup>. 有研究表明哇巴因可以体外诱导人骨髓间充质干细胞的成骨分化,为骨缺损、骨病的治疗提供新思路<sup>[6]</sup>. 此外,哇巴因还能影响大鼠动脉平滑肌细胞分泌血管紧张素 II、心钠素等生物活性物质<sup>[7]</sup>. 哇巴因还是潜力十足的广谱抗衰老药物,其在杀死体内衰老细胞的同时,还具有抗癌作用<sup>[8-9]</sup>. 随着研究的深入,其潜在的抗肿瘤作用也逐渐被揭示. 特别是在结肠癌领域,哇巴因的抗肿瘤效应引起了科研人员的广泛关注<sup>[10-12]</sup>. 现有研究中,哇巴因被证实能够通过多种途径抑制肿瘤细胞的增殖,包括抑制细胞能量代谢、诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期等<sup>[13-15]</sup>. 然而,关于哇巴因在结肠癌细胞增殖中的具体作用机制,其是否通过特定的信号通路发挥作用,仍缺乏深入研究. 故本文旨在深入探究哇巴因对结肠癌细胞增殖的调控机制,特别是其在糖酵解信号通路中的作用.

肿瘤细胞的显著特征之一是其代谢重编程能力. 这种重编程使得肿瘤细胞能够调整代谢路径,以满足其迅速增殖所需的能量和物质,并增强对周围微环境的适应性. 故肿瘤细胞的代谢重编程与肿瘤的发生、进展、耐药性等紧密相关<sup>[16-17]</sup>. 研究显示,肿瘤细胞的这一重编程过程是内外因素共同作用的结果. 内部机制通过激活信号转导组件来维持细胞的基础代谢状态,可以通过直接提升代谢酶的活性或上调转录因子来实现,进而增加代谢调节因子的表达. 外部信号机制则涉及宿主衍生因子,这些因子能够根据代谢物的可获取性和细胞的需求,对代谢过程进行微调,从而进一步推动并放大肿瘤细胞的代谢重编程<sup>[18]</sup>. 葡萄糖代谢重编程,亦称瓦伯格效应,是指肿瘤细胞为满足其能量需求,在常氧环境下仍将主要的葡萄糖代谢途径由氧化磷酸化(OXPHO)转变为有氧糖酵解(aerobic glycolysis)的一种现象<sup>[19]</sup>. 此现象最早在20世纪30年代由德国生物化学家奥托·瓦伯格发现,他观察到肿瘤与正常成体组织在代谢上存在显著差异:肿瘤细胞主要通过糖酵解来产生能量,并伴随大量乳酸的生成<sup>[20]</sup>. 此外,磷酸戊糖途径(PPP)作为糖酵解初始阶段的分支,在葡萄糖的分解代谢中占据重要地位. 该途径由己糖激酶催化启动,并主要将葡萄糖-6-磷酸(G6P)作为底物<sup>[21]</sup>. 值得一提的是,G6PD作为PPP的首个限速酶,在代谢调控中发挥着举足轻重的作用. G6PD不仅参与葡萄糖的新陈代谢,还能维持细

胞内的氧化还原平衡,对肿瘤细胞抵御氧化应激起到关键作用<sup>[22-24]</sup>.

目前,关于哇巴因在肿瘤细胞代谢调控方面的具体机制仍未被阐明.因此,本文将从肿瘤代谢重编程的角度探讨哇巴因对糖代谢重编程的作用机制.

## 1 实验材料和方法

### 1.1 细胞株

p53野生型结肠癌细胞HCT116由课题组实验室保存备用.

### 1.2 主要试剂

高糖培养基DMEM(11965092)购于美国Gibco公司;EdU细胞增殖检测试剂盒(P0012)和BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0012S)购于中国碧云天公司;胎牛血清(11011-8611)购于中国四季清公司;G6PD抗体(66373-1-Ig)购于中国武汉三鹰公司; $\beta$ -actin抗体(AC026)购于中国ABclonal公司;胰蛋白酶(25200-072)购于美国Gibco公司;哇巴因(HY-B0542)购于美国MCE公司;CCK-8 Cell Counting Kit(A311-01)购于中国南京诺唯赞公司;葡萄糖检测试剂盒(E1010)购于中国北京普利莱公司;乳酸检测试剂盒(KGA7401-48)购于中国江苏凯基生物公司;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性试剂盒(D799242-9100)购于中国上海源叶生物公司.

### 1.3 仪器与设备

细胞恒温培养箱(GHP-9050)购于美国Thermo公司;实时定量PCR仪(Roche LightCycler480)购于瑞士Roche公司;流式细胞仪(FACSC)购于美国BD公司;超净台(SW-CJ-2FD)购于美国Beckman公司;超低温冰箱(MDF-U53V)购于美国Beckman公司;全波长酶标仪(ELX808IU)购于美国Bio-Rad公司;台式离心机(CF1524R)购于美国Beckman公司.

## 2 实验方法

### 2.1 HCT116细胞培养

将液氮罐中取出的HCT116细胞置于恒温水浴锅中1 min内迅速溶解,并加入含1%双抗和10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,1 000 r/min离心3 min,弃上清后置于培养箱中培养.

### 2.2 药物配置

使用MCE摩尔计算器称取哇巴因,将其溶解在适量的DMSO中(母液500 mmol/L),使用前将其稀释到0、25、50和100 nmol/L,其中DMSO终浓度低于0.1%.

### 2.3 CCK-8法检测HCT116细胞活力<sup>[25]</sup>

将 $5 \times 10^3$ 个HCT116细胞/孔均匀接种到96孔板中,24 h后分别加入0、25、50和100 nmol/L的哇巴因处理细胞,24、48、72 h后取出,每孔加入10  $\mu$ L的CCK-8检测试剂,避光孵育2.5 h,测定450 nm处的吸光度值(OD),细胞存活率计算方式如下:

$$\text{存活率} = \frac{OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}}{OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}} \times 100\%. \quad (1)$$

### 2.4 平板克隆形成实验

将HCT116细胞接种到6孔板中,每孔接种1 000个细胞,24 h后分别加入0、25、50和100 nmol/L的哇巴因并且每组设置6个复孔,哇巴因作用48 h后去除上清,更换为正常培养基,继续培养14 d,然后取出培养皿,弃除上清,用PBS洗涤3次,4%多聚甲醛固定15 min后去除上清,加入结晶紫染色30 min,用PBS洗涤直至背景干净,计算形成的克隆细胞数<sup>[26]</sup>.

### 2.5 流式细胞术检测细胞凋亡

收集0、25、50和100 nmol/L哇巴因处理24 h的HCT116单细胞悬液,1 000 r/min离心3 min,用PBS洗涤3次后计数.收集 $2 \times 10^6$ 个细胞并用400  $\mu$ L的PBS重悬细胞到1.5 mL的EP管中,使用凋亡检测试剂盒进行后续操作,通过流式细胞仪进行检测并计算细胞凋亡率<sup>[27]</sup>.

## 2.6 EdU检测细胞增殖

采用EdU细胞增殖检测试剂盒进行检测,将对数生长期的HCT116细胞接种 $1 \times 10^5$ 个到24孔板中,通过EdU标记后,弃除培养基并加入4%多聚甲醛进行固定,室温孵育20 min,用含0.5% Triton-100的PBS渗透剂通透细胞.用Azide Alexa Fluor 488进行染色,室温避光孵育20 min,加入Hoechst对细胞核进行染色,室温避光孵育20 min,用PBS洗涤3次,采用荧光显微镜进行荧光检测<sup>[28]</sup>.

## 2.7 实时定量荧光PCR (real-time PCR)

采用Primer 5.0软件设计引物并由有康生物公司合成.总RNA提取后反转录合成cDNA,然后进行real-time PCR检测,以 $\beta$ -actin为内参,并根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算结果<sup>[27]</sup>.引物序列见表1.

表 1 引物序列

基因	序列号	引物序列 (5'→3')	
		正向	反向
<i><math>\beta</math>-actin</i>	NM.001101.5	CGAGCGCGGCTACAGCTT	TCCTTAATGTCACGCACGATTT
<i>G6PD</i>	NM.000402.4	CGTGATGCAGAACCACCTAC	TGCATTTCAACACCTTGACC
<i>PGK1</i>	NM.000291.4	CTGTGGCTTCTGGCATACT	CGAGTGACAGCCTCAGCATA
<i>TIGAR</i>	NM.020375.3	CTCAAGACTTCGGGAAAGGA	GGTGTAACACAGGGCACTCTT
<i>HK2</i>	NM.000189.5	GATGACTTCCGCACAGAATTT	TCTCACCCAGGTACATTCCAC
<i>PKM2</i>	NM.001411081.1	ACGTGGATGATGGGCTTATT	CCAAGGAGCCACCATTTTC
<i>GLUT1</i>	NM.006516.4	ACCATTGGCTCCGGTATCG	GCTCGCTCCACCACAAACA
<i>PFK2</i>	NM.006212.2	GCTATGAAACCAAAACCCCA	TAACGATCAGAGTCGGGGAG
<i>LDHA</i>	NM.005566.4	ACCCAGTTTCCACCATGATT	CCCAAATGCAAGGAACACT
<i>SCO2</i>	NM.005138.3	TCGTGCTTGGTCCACTGAC	TCAGCAGCAGCATGGATCT
<i>PDK1</i>	NM.001278549.2	CTGTGATACGGATCAGAAACCG	TCCACCAAACAATAAAGAGTGCT
<i>PGM1</i>	NM.002633.3	CCGGTTCTACATGAAGGAGG	GAGGATTCCATTCTGTCCGA
<i>FH</i>	NM.000143.4	CGGTCAGGTCTGGGAGAAT	CCATGGTCATTGCTTCACAC
<i>SDHC</i>	NM.003001.5	TCAAACCGTCTCTGTCTCC	AAGAGAGACCCCTGCACTCA

## 2.8 免疫印迹实验检测相关蛋白的表达

收集哇巴因不同浓度处理的细胞于EP管中,加入200  $\mu$ L细胞裂解液裂解30 min,1 000 r/min离心10 min.吸取上清提取总蛋白质并定量,之后进行SDS-PAGE凝胶电泳,开始用60 V电压,待样品进入分离胶后加大电压至120 V,直至待检测蛋白被分离.低温环境下200 mA转膜1 h,转膜结束后,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,然后加入G6PD(稀释比1:1 000)和 $\beta$ -actin(稀释比1:10 000)抗体于4  $^{\circ}$ C孵育过夜,TBST洗膜3次(每次10 min),加入二抗(稀释比1:10 000)室温孵育1 h,TBST洗膜3次(每次10 min),将ECL发光液滴加到PVDF膜上,通过凝胶成像仪曝光并采集图像.

## 2.9 肿瘤细胞形态观察

将 $5 \times 10^3$ 个/毫升细胞悬液接种到96孔板中,每孔100  $\mu$ L,24 h后加入0、25、50和100 nmol/L的哇巴因,24 h后用倒置显微镜观察细胞形态并采集图像.

## 2.10 葡萄糖含量检测

使用葡萄糖氧化酶法测定试剂盒进行测定.1)配制工作混合液.R1:R2=4:1,根据实验样品数量计算所需工作液R1和R2的量.2)制作标准曲线.标准品葡萄糖浓度为10 mmol/L,根据浓度梯度0、15.625、31.25、62.5、125、250、500、1 000和2 000 mmol/L绘制标准曲线.3)葡萄糖含量检测.37  $^{\circ}$ C避光20 min,通过酶标仪在570 nm处测量OD值.

## 2.11 乳酸含量检测

使用乳酸检测试剂盒进行测定.1)配制工作混合液.Buffer A:Buffer B=100:1,现配现用,2~8  $^{\circ}$ C保存24 h有效.2)配制显色剂.将粉剂D加入Buffer C中,使其完全溶解.3)乳酸含量检测.通过酶标仪在530 nm处测量OD值.加样体系见表2.

表 2 乳酸含量检测加样体系

	空白管	标准管	样品管
ddH <sub>2</sub> O/μL	1	-	-
标准液/μL	-	1	-
待测样品/μL	-	-	1
工作液/μL	50	50	50
显色剂D/μL	10	10	10
混匀, 37 °C水浴10 min			
Buffer E/μL	100	100	100

### 2.12 G6PD酶活性检测

使用G6PD检测试剂盒进行测定. 1) 配制NADP储存液. 将9 mg NADP加入1 mL G6PD assay Buffer中, 混合均匀. 2) 配制检测工作液. G6PD assay Buffer : NADP储存液=49 : 1. 3) 配制G-6-P工作液. 用G-6-P工作液溶解G-6-P, 混合均匀. 4) 样品处理. 将样品置于冰上, 超声破碎细胞. 5) G6PD酶活性测定. 通过酶标仪在340 nm处测量OD值. 加样体系见表3.

表 3 G6PD酶活性检测加样体系

	空白管	样品管
检测工作液/μL	220	220
G6PD assay Buffer/μL	5	-
待测样品/μL	-	5
混匀, 37 °C水浴10 min		
G-6-P工作液/μL	25	25
混匀, 37 °C水浴1 min		

### 2.13 统计学处理

采用Prism 6.0软件分析处理数据, 所有数据以“均值±标准差”表示, 两组均值比较采用t检验, 多组均值比较采用单因素方差分析.  $P < 0.01$ 为差异极显著,  $P < 0.05$ 为差异显著,  $P > 0.05$ 为无显著差异.

## 3 实验结果

### 3.1 哇巴因抑制人结肠癌细胞HCT116增殖

通过对人结肠癌细胞HCT116进行哇巴因(图1(a))处理, 发现其形态发生了显著改变: 细胞形态不规则, 折射度降低, 皱缩或漂浮. 处理24 h后, 使用倒置显微镜观察细胞形态, 如图1(b)所示, 与对照组相比, 哇巴因的浓度增加导致死细胞的数量增多. 图1(c)表明, 与对照组相比, 人结肠癌细胞HCT116的存活率和细胞数量呈浓度依赖性下降( $P < 0.01$ ). 为更好探究哇巴因对人结肠癌细胞HCT116的增殖影响机制, 采用EdU作为替代物, 其可代替胸腺嘧啶(T), 从而有效阻断复制DNA分子, 并且利用免疫荧光技术和Apollo荧光染料特异性反应, 检测细胞的增殖状态. 在不同浓度的哇巴因作用下, 各组细胞EdU阳性率均显著下降( $P < 0.01$ , 图1(d~e)). 以上结果表明: 哇巴因可以显著抑制人结肠癌细胞HCT116的增殖. 为更好研究哇巴因对人结肠癌细胞HCT116生长的抑制作用, 后续实验采用50 nmol/L的哇巴因处理24 h.

### 3.2 哇巴因降低人结肠癌细胞HCT116克隆形成的能力

为检测哇巴因对人结肠癌细胞HCT116克隆形成能力的影响, 用不同浓度哇巴因处理人结肠癌细胞HCT116, 如图2所示. 与对照DMSO组相比, 经哇巴因处理的细胞克隆数目和大小均显著下降, 提示哇巴因可抑制HCT116细胞增殖.

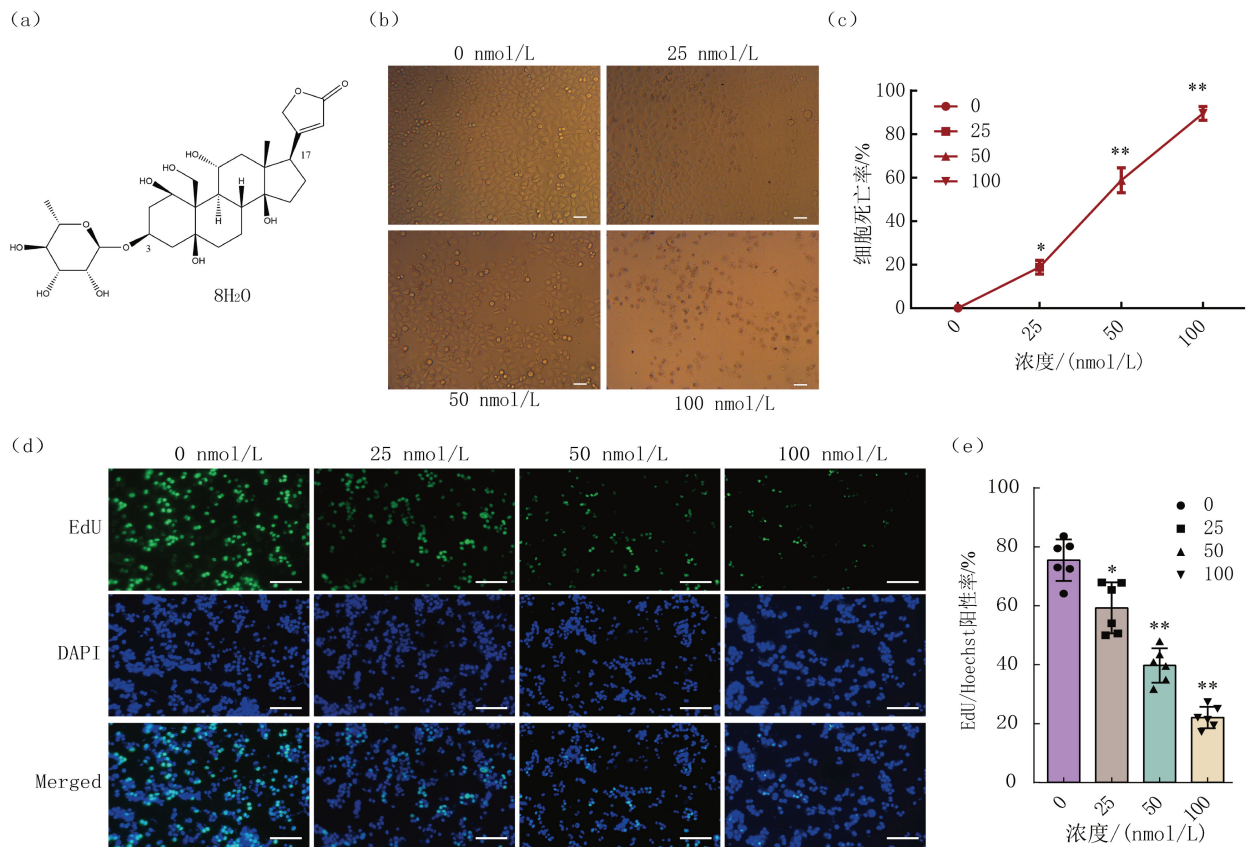


图 1 哇巴因对人结肠癌细胞HCT116增殖的影响

注:(a)哇巴因的化学结构式;(b)细胞形态图显示了不同浓度哇巴因处理后HCT116细胞形态的变化(200倍,10  $\mu\text{m}$ );(c)CCK-8结果显示了不同浓度哇巴因处理后HCT116细胞总数的变化;(d)哇巴因对DNA复制水平的影响;(e)细胞EdU/Hoechst阳性定量分析.与对照组相比,\*表示 $P<0.05$ ,\*\*表示 $P<0.01$ .标尺:200  $\mu\text{m}$

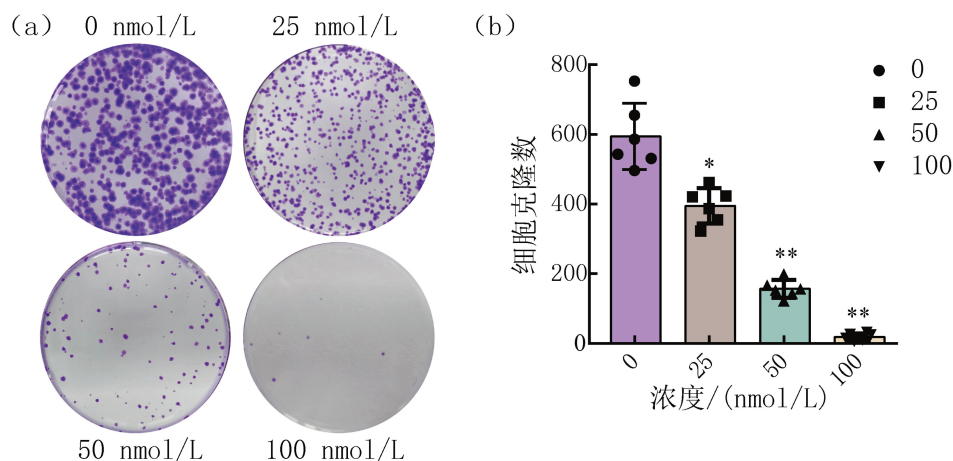


图 2 哇巴因对人结肠癌细胞HCT116克隆形成能力的影响

注:(a)不同浓度哇巴因处理后的结晶紫染色代表性图片;(b)不同浓度哇巴因处理后的结晶紫染色定量( $n=3$ ;与对照组相比,\*表示 $P<0.05$ ,\*\*表示 $P<0.01$ )

### 3.3 哇巴因诱导人结肠癌细胞HCT116凋亡

通过Annexin V-FITC双染并利用流式细胞仪进行检测,给予不同浓度哇巴因处理人结肠癌细胞HCT116 24 h情况下,各组细胞凋亡率均显著升高,且差异有统计学意义( $P<0.01$ ),说明哇巴因能够促进HCT116细胞凋亡(图3)。

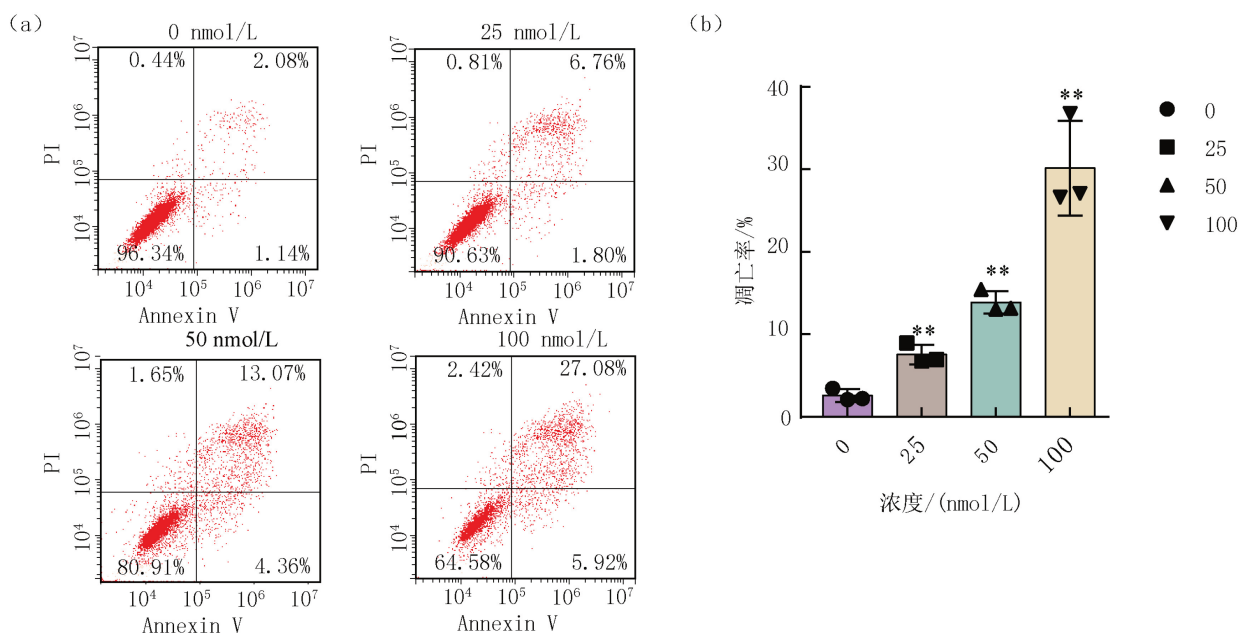


图 3 哇巴因对人结肠癌细胞HCT116凋亡的影响

注:(a) FITC-PI凋亡的代表性图片;(b) FITC-PI凋亡细胞百分比定量 (n=3; 与对照组相比, \*\*表示P<0.01)

### 3.4 哇巴因对人结肠癌细胞HCT116糖代谢的影响

葡萄糖作为维持细胞生长和增殖的主要能源物质, 对肿瘤细胞的发生发展至关重要. 因此, 继续考察哇巴因对HCT116细胞葡萄糖消耗的影响. 采用不同浓度的哇巴因处理HCT116细胞24 h, 然后使用葡萄糖氧化酶法测定试剂盒进行测定, 最后分析哇巴因对HCT116细胞葡萄糖消耗水平的影响. 如图4 (a) 所示, 哇巴因显著降低了HCT116细胞的葡萄糖消耗水平并呈浓度依赖性.

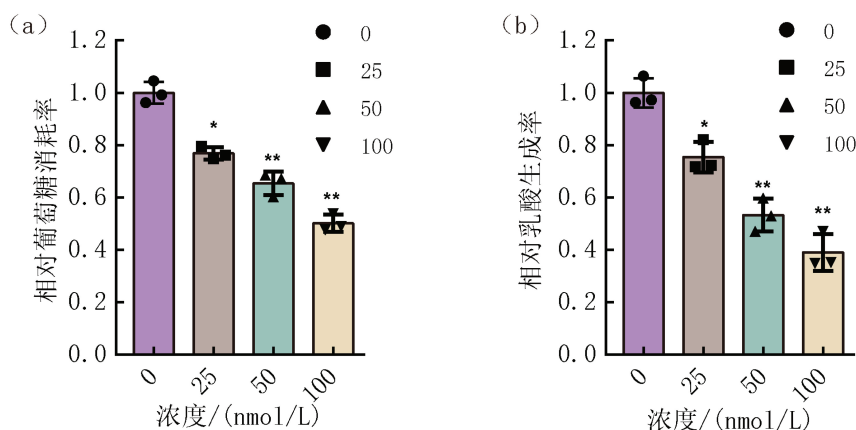


图 4 哇巴因对人结肠癌细胞HCT116糖代谢的影响

注:(a) 哇巴因对HCT116细胞葡萄糖消耗水平的影响;(b) 哇巴因对HCT116细胞乳酸生成水平的影响. 与对照组相比, \*表示P<0.05, \*\*表示P<0.01

有氧情况下, 肿瘤细胞仍偏好糖酵解和乳酸分泌. 此外, 肿瘤细胞通过糖酵解消耗葡萄糖, 可将至少85%的葡萄糖转化为乳酸. 因此, 需考察哇巴因对HCT116细胞乳酸生成的影响. 采用不同浓度的哇巴因处理HCT116细胞, 37 °C培养24 h后收集培养基和细胞, 然后使用乳酸检测试剂盒进行测定, 最后分析哇巴因对HCT116细胞乳酸生成水平的影响. 如图4 (b) 所示, 哇巴因显著降低了HCT116细胞的乳酸生成水平并呈浓度依赖性.

### 3.5 哇巴因对人结肠癌细胞HCT116糖酵解相关因子的调控

为进一步探究哇巴因对HCT116细胞糖酵解的调控机制, 考察分析了已报道与糖酵解代谢途径相关的调控因子, 通过real-time PCR探究哇巴因对糖酵解代谢途径相关因子mRNA的影响. 采用50 nmol/L的哇巴因处理HCT116细胞24 h, 进行real-time PCR实验. 如图5所示, 哇巴因处理HCT116细胞后, 多个糖酵解有关调控因

子的mRNA表达出现不同程度的变化,其中G6PD的变化最显著(约为70%)。鉴于G6PD是磷酸戊糖通路中的关键限速酶,故下一步将重点考察哇巴因对G6PD表达调控水平的影响。

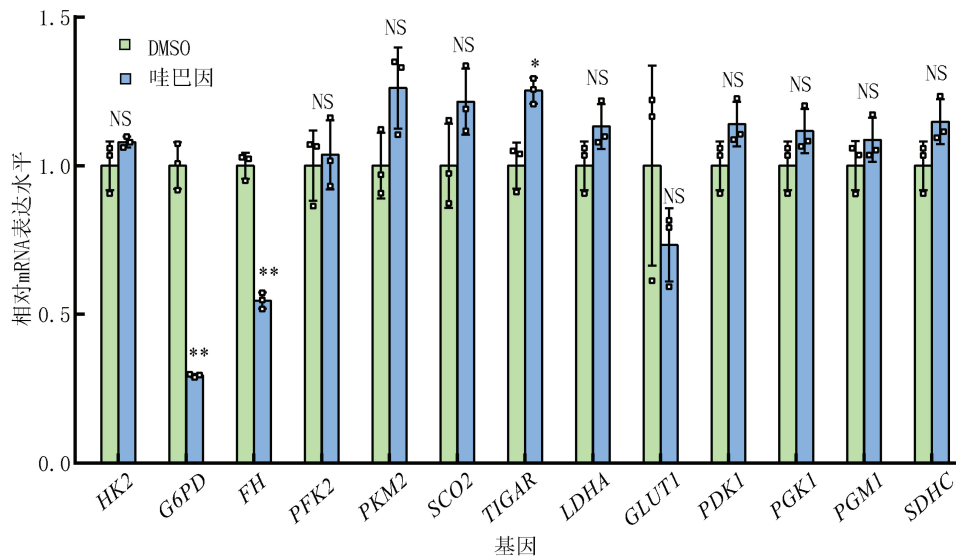


图5 哇巴因对人结肠癌细胞HCT116糖酵解代谢途径中相关因子mRNA表达水平的影响

注: \*表示 $P < 0.05$ , \*\*表示 $P < 0.01$ ; NS表示无显著性差异

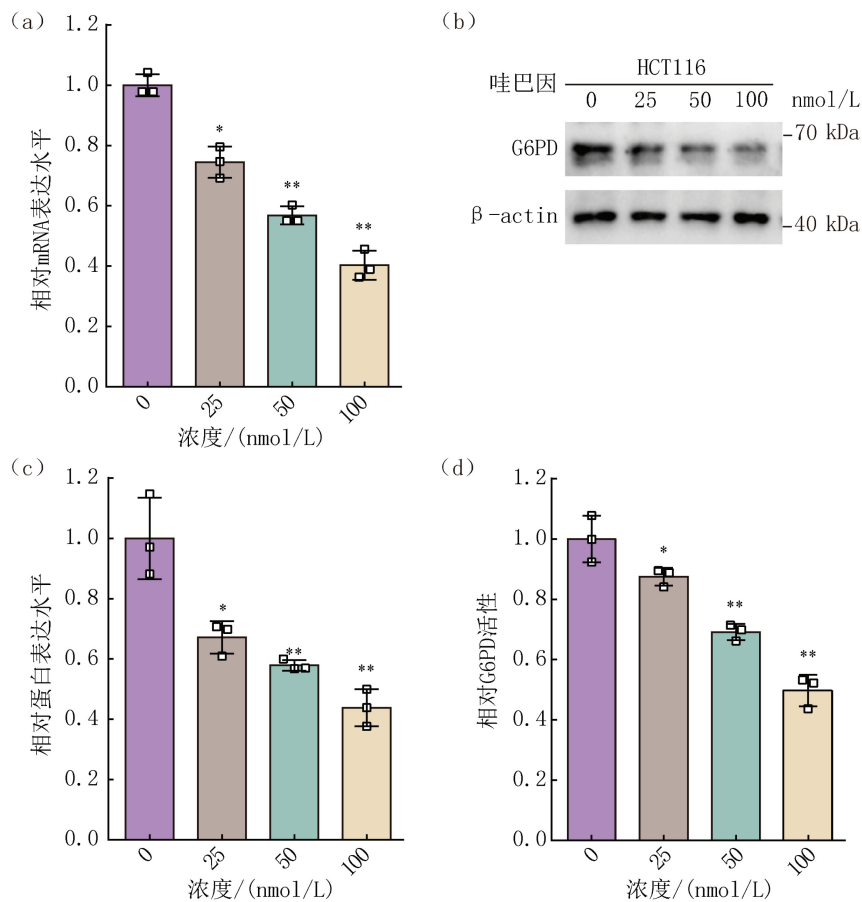


图6 哇巴因对人结肠癌细胞HCT116中G6PD的影响

注:(a)哇巴因对G6PD mRNA表达水平的影响;(b~c)哇巴因对G6PD蛋白质表达水平的影响;(d)哇巴因对G6PD酶活性的影响。\*表示 $P < 0.05$ , \*\*表示 $P < 0.01$

### 3.6 哇巴因对人结肠癌细胞HCT116中G6PD的调控

为再次确认哇巴因对G6PD表达水平的影响,采用不同浓度的哇巴因处理HCT116细胞24 h后,通过real-time PCR(引物序列见表1)、Western Blot以及G6PD酶活性测定实验,检测哇巴因对G6PD的影响.如图6所示,与对照组相比,哇巴因处理后的HCT116细胞中G6PD的mRNA(图6(a))和蛋白质(图6(b~c))表达水平以及G6PD酶活性(图6(d))均显著降低且呈浓度依赖性.

## 4 分析与讨论

癌症源于细胞周期的紊乱与细胞的无限增殖<sup>[29]</sup>,为满足快速增殖的能量需求和减少氧化应激以维持生存,肿瘤细胞会进行葡萄糖代谢的重编程<sup>[30]</sup>.这一特征不仅为肿瘤细胞提供了生物合成所必需的大分子物质和能量<sup>[18,31]</sup>,同时,细胞内外代谢产物的变化也可能直接或间接影响致癌突变,从而增强营养吸收,为肿瘤提供能量和生长的前体,对肿瘤生长具有显著的促进作用<sup>[32-34]</sup>.此外,葡萄糖代谢的重编程与肿瘤细胞的耐药性也密切相关<sup>[35]</sup>.结肠癌作为一种全球高发恶性肿瘤,其发病机理和治疗方法一直是医学界的研究焦点.近年来,某些天然产物(如哇巴因),因出色的抗肿瘤活性而受到广泛关注.本文致力于深入探索哇巴因如何通过调控肿瘤细胞的代谢来影响结肠癌细胞的增殖,以期结肠癌的治疗开辟新途径.

研究结果显示,哇巴因能有效抑制结肠癌细胞葡萄糖消耗和乳酸产生,从而对其糖代谢重编程产生影响.尽管仍需进一步研究哇巴因在各种肿瘤中对糖代谢的调节作用是否具有普遍性,但本文已突显G6PD在肿瘤细胞葡萄糖代谢重编程中的关键作用,并首次揭示了哇巴因与肿瘤糖代谢之间的联系.除对G6PD有显著影响外,哇巴因还可能对其他与葡萄糖代谢相关的基因(如*FH*、*TIGAR*)产生一定影响,表明其可能通过多种途径影响肿瘤的糖代谢重编程.G6PD作为PPP中的关键酶,催化PPP的第一个不可逆反应并生成NADPH,对于维持细胞的氧化平衡和生物合成至关重要.本文发现哇巴因可能通过影响G6PD的活性,然而其是否通过调节PPP中的NADPH生成,从而影响结肠癌细胞的增殖依旧值得探究.NADPH作为一种抗氧化剂,可以避免细胞遭受高水平活性氧(ROS)损伤,促进细胞存活.肿瘤细胞中,ROS通过氧化还原反应促进细胞增殖,而过多的ROS积累可能导致细胞凋亡甚至死亡.哇巴因是否通过G6PD促进NADPH的生成,抑制肿瘤细胞抵抗氧化应激,维持其增殖能力仍需考察.

PPP作为糖酵解的一个分支,由G6PD催化葡萄糖-6-磷酸转化为6-磷酸葡萄糖内酯启动,为肿瘤细胞提供NADPH和核糖-5-磷酸<sup>[36-37]</sup>.鉴于NADPH在脂肪酸合成和ROS清除中的关键作用,以及核糖-5-磷酸为核酸生物合成提供物质的重要性,肿瘤细胞可以利用PPP防御快速代谢引起的ROS水平上升,并满足其对核酸和脂肪酸的需求<sup>[36,38-39]</sup>.考虑到哇巴因对G6PD的影响以及G6PD作为PPP第一个限速酶的角色,未来需要进一步研究哇巴因对PPP的具体调控机制.此外,本文还发现哇巴因在转录和蛋白水平上调控G6PD,鉴于哇巴因的直接作用靶点是钠钾-ATP酶,故还需深入探讨哇巴因是否通过抑制钠钾-ATP酶来参与G6PD的转录和翻译调控.

此外,肿瘤细胞中凋亡与糖代谢之间存在复杂的相互作用关系.肿瘤细胞凋亡过程中,可能伴随一系列代谢途径的调控变化.例如,凋亡相关基因*Bax*的表达变化可能影响糖代谢途径中关键酶G6PD的活性,进而影响肿瘤细胞的糖代谢特征<sup>[40-41]</sup>,该凋亡过程可能触发代谢重编程,使肿瘤细胞从依赖糖酵解转向其他代谢途径以维持生存<sup>[42]</sup>.肿瘤细胞中凋亡与糖代谢的关系还可能为肿瘤患者的预后判断提供新依据.例如,通过观察肿瘤细胞对糖代谢途径的依赖程度以及凋亡相关基因的表达变化,可以预测患者对治疗的反应和生存预后<sup>[43-44]</sup>.

## 5 结论

综上所述,本文揭示了哇巴因通过影响糖代谢途径抑制结肠癌细胞增殖的新机制.目前尚无获批的靶向G6PD结直肠癌药物,但本研究这一发现不仅为结肠癌的治疗提供了新的潜在药物研发基础,也为深入理解结肠癌的发病机制、寻找新的治疗靶点提供了有益的线索.未来,将进一步研究哇巴因在体内的抗肿瘤效果及其与其他药物的联合应用前景,以期临床提供更加有效的治疗方案.

### 参考文献:

- [1] VASAIKAR S, HUANG C, WANG X J, et al. Proteogenomic analysis of human colon cancer reveals new therapeutic opportunities[J]. Cell, 2019, 177(4): 1035-1049.

- [2] CIARDIELLO F, CIARDIELLO D, MARTINI G, et al. Clinical management of metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2022, 72(4): 372-401.
- [3] MORTON D, SEYMOUR M, MAGILL L, et al. Preoperative chemotherapy for operable colon cancer: Mature results of an international randomized controlled trial[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2023, 41(8): 1541-1552.
- [4] SYEDA S S, SÁNCHEZ G, HONG K H, et al. Design, synthesis, and in vitro and in vivo evaluation of ouabain analogues as potent and selective Na, K-ATPase  $\alpha 4$  isoform inhibitors for male contraception[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 61(5): 1800-1820.
- [5] GARNEAU A P, SLIMANI S, TREMBLAY L E, et al.  $K^+-Cl^-$  cotransporter 1 (KCC1): A housekeeping membrane protein that plays key supplemental roles in hematopoietic and cancer cells[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2019, 12: 74.
- [6] KRIEGER N S, TASHJIAN A H. Inhibition by ouabain of parathyroid hormone-stimulated bone-resorption[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1981, 217(3): 586-591.
- [7] LEENEN F H H, WANG H W, HAMLIN J M. Sodium pumps, ouabain and aldosterone in the brain: A neuromodulatory pathway underlying salt-sensitive hypertension and heart failure[J]. *Cell Calcium*, 2020, 86: 102151.
- [8] SILVA E, SERRÃO M P, SOARES-DA-SILVA P. Age-dependent effect of ouabain on renal  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase[J]. *Life Sciences*, 2011, 88(15/16): 719-724.
- [9] MAYR C, KIESSLICH T, BEKRIC D, et al. Ouabain at nanomolar concentrations is cytotoxic for biliary tract cancer cells[J]. *PLoS One*, 2023, 18(6): e0287769.
- [10] GRAHAME-SMITH D G, HIBBLE A G. Inhibition by ouabain of spontaneous DNA synthesis in acute leukaemic leucocytes in vitro[J]. *The Lancet*, 1971, 1(7707): 1026.
- [11] WILEY J S, KRAFT N, COOPER I A. The binding of ouabain to normal and chronic lymphocytic leukemic lymphocytes[J]. *Blood*, 1979, 54(5): 994-1000.
- [12] SOLHEID C, PALLADINI G. Morphological changes induced by ouabain in normal and neoplastic human glia in monolayer culture[J]. *Acta Neuropathologica*, 1974, 28(3): 253-260.
- [13] BANULS L M Y, KATZ A, MIKLOS W, et al. Hellebrin and its aglycone form hellebrigenin display similar in vitro growth inhibitory effects in cancer cells and binding profiles to the alpha subunits of the  $Na^+/K^+$ -ATPase[J]. *Molecular Cancer*, 2013, 12: 33.
- [14] SEN A K, TOBIN T. A cycle for ouabain inhibition of sodium-dependent and potassium-dependent adenosine triphosphatase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1969, 244(24): 6596-6604.
- [15] WANG L, CAI W, HAN B, et al. Ouabain exhibited strong anticancer effects in melanoma cells via induction of apoptosis, G2/M phase arrest, and migration inhibition[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2021, 14: 1261-1273.
- [16] HORN P, TACKE F. Metabolic reprogramming in liver fibrosis[J]. *Cell Metabolism*, 2024, 36(7): 1439-1455.
- [17] BODE D, PRONTO J R D, SCHIATTARELLA G G, et al. Metabolic remodelling in atrial fibrillation: Manifestations, mechanisms and clinical implications[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2024, 21(10): 682-700.
- [18] DEY P, KIMMELMAN A C, DEPINHO R A. Metabolic codependencies in the tumor microenvironment[J]. *Cancer Discovery*, 2021, 11(5): 1067-1081.
- [19] KRIEG S, FERNANDES S I, KOLLIPOULOS C, et al. Metabolic signaling in cancer metastasis[J]. *Cancer Discovery*, 2024, 14(6): 934-952.
- [20] FINLEY L W S. What is cancer metabolism?[J]. *Cell*, 2023, 186(8): 1670-1688.
- [21] SEDLAK J C, YILMAZ Ö H, ROPER J. Metabolism and colorectal cancer[J]. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2023, 18: 467-492.
- [22] BOUGUERRA G, TALBI K, TRABELSI N, et al. Enhanced eryptosis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2021, 55(6): 761-772.
- [23] GARCIA A A, KOPERNIKU A, FERREIRA J C B, et al. Treatment strategies for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: Past and future perspectives[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2021, 42(10): 829-844.
- [24] ALESSANDRO M, FRANCESCA L, ELENA T, et al. Fyn specifically regulates the activity of red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase[J]. *Redox Biology*, 2020, 36: 101639.
- [25] LI W F, HERKILINI A, TANG Y, et al. The transcription factor PBX3 promotes tumor cell growth through transcriptional suppression of the tumor suppressor p53[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2021, 42(11): 1888-1899.
- [26] LI W F, HUANG C, QIU L, et al. p52-ZER6/IGF1R axis maintains cancer stem cell population to promote cancer progression

- by enhancing pro-survival mitophagy[J]. *Oncogene*, 2024, 43(27): 2115-2131.
- [27] TANG Y, LI W F, QIU L, et al. The p52-ZER6/G6PD axis alters aerobic glycolysis and promotes tumor progression by activating the pentose phosphate pathway[J]. *Oncogenesis*, 2023, 12(1): 17.
- [28] LI W F, ALFASON L, HUANG C, et al. p52-ZER6: A determinant of tumor cell sensitivity to MDM2-p53 binding inhibitors[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2023, 44(3): 647-660.
- [29] HAHN W C, WEINBERG R A. Rules for making human tumor cells[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2002, 347(20): 1593-1603.
- [30] MARTÍNEZ-REYES I, CHANDEL N S. Cancer metabolism: Looking forward[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2021, 21: 669-680.
- [31] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: The next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [32] BOROUGHS L K, DEBERARDINIS R J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth[J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(4): 351-359.
- [33] PAVLOVA N N, THOMPSON C B. The emerging hallmarks of cancer metabolism[J]. *Cell Metabolism*, 2016, 23(1): 27-47.
- [34] VANDER-HEIDEN M G, DEBERARDINIS R J. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology[J]. *Cell*, 2017, 168(4): 657-669.
- [35] WANG H, WANG Q Q, CAI G D, et al. Nuclear TIGAR mediates an epigenetic and metabolic autoregulatory loop via NRF2 in cancer therapeutic resistance[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2022, 12(4): 1871-1884.
- [36] PATRA K C, HAY N. The pentose phosphate pathway and cancer[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2014, 39(8): 347-354.
- [37] YUAN L, QIN Y L, ZOU Z C, et al. Enhancing intracellular NADPH bioavailability through improving pentose phosphate pathway flux and its application in biocatalysis asymmetric reduction reaction[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2022, 134(6): 528-533.
- [38] GANAPATHY-KANNIAPPAN S. Molecular intricacies of aerobic glycolysis in cancer: Current insights into the classic metabolic phenotype[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 53(6): 667-682.
- [39] JIANG P, DU W J, WU M A. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer[J]. *Protein & Cell*, 2014, 5(8): 592-602.
- [40] BERMEJO-ALVAREZ P, LONERGAN P, RIZOS D, et al. Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis[J]. *Reproductive BioMedicine Online*, 2010, 20(3): 341-349.
- [41] FU Y K, WANG B J, TSENG J C, et al. Combination treatment of docetaxel with caffeic acid phenethyl ester suppresses the survival and the proliferation of docetaxel-resistant prostate cancer cells via induction of apoptosis and metabolism interference[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2022, 29(1): 16.
- [42] ROCHE M E, KO Y H, DOMINGO-VIDAL M, et al. TP53 induced glycolysis and apoptosis regulator and monocarboxylate transporter 4 drive metabolic reprogramming with c-MYC and NFκB activation in breast cancer[J]. *International Journal of Cancer*, 2023, 153(9): 1671-1683.
- [43] LIN J G, XIA L Z, OUYANG L D, et al. The POU2F1-ALDOA axis promotes the proliferation and chemoresistance of colon cancer cells by enhancing glycolysis and the pentose phosphate pathway activity[J]. *Oncogene*, 2022, 41(7): 1024-1039.
- [44] QI C L, HUANG M L, ZOU Y, et al. The IRF2/CENP-N/AKT signaling axis promotes proliferation, cell cycling and apoptosis resistance in nasopharyngeal carcinoma cells by increasing aerobic glycolysis[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2021, 40(1): 390.

责任编辑: 张自强