



恩格列净通过雷帕霉素靶点蛋白抑制胃癌的分子机制初探*

饶慧玲^{1,2}, 程旺¹, 于娟¹, 安晓彤¹, 邓浩君¹, 张昭阳¹, 武福云¹, 戢福云¹, 李珊^{1△}

1. 湖北医药学院基础医学研究所(十堰 442000); 2. 陆军军医大学第一附属医院医学工程科(重庆 400038)

【摘要】目的 恩格列净(empagliflozin, EMPA)是钠-葡萄糖转运蛋白2(sodium-glucose cotransporter 2, SGLT2)特异性抑制剂。通过综合网络药理学预测EMPA对胃腺癌的干预靶点,并利用细胞生物学和分子生物学实验对其作用及分子机制进行验证。**方法** 使用生物信息学分析胃腺癌预后与SGLT2表达情况的相关性,网络药理学分析EMPA和胃腺癌的共同靶点。用不同浓度的EMPA孵育人胃腺癌细胞AGS 24 h后, CCK8法检测细胞增殖率;选择0、3、6 mmol/L EMPA孵育AGS细胞,实时细胞分析(real-time cell analysis, RTCA)和EdU(5-ethynyl-2-deoxyuridine)检测EMPA对胃腺癌细胞增殖的抑制能力,伤口愈合实验和Transwell实验检测EMPA对胃腺癌细胞迁移和侵袭的抑制能力, Western blot检测雷帕霉素(mammalian target of rapamycin, mTOR)和磷酸化mTOR(phosphorylated mTOR, p-mTOR)表达。BALB/c(nu/nu)裸鼠均于腋下种植 5×10^6 AGS细胞,分为对照组、低剂量组和高剂量组,每组7只,1周后,对照组每日腹腔注射生理盐水,低剂量组和高剂量组每日腹腔注射EMPA 3 mg/kg和5 mg/kg,给药1周后检测肿瘤体积。**结果** 低表达SGLT2的胃腺癌患者生存期和存活率均高于高表达SGLT2的胃腺癌患者。收集了104个EMPA相关潜在靶点和2028个胃腺癌相关靶点,胃腺癌相关的45个靶点和EMPA潜在靶点相重合,从中鉴定出10条相关信号通路和4个核心基因。这4个关键基因分别是细胞周期依赖激酶4基因(cyclin-dependent kinase-4, CDK4)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、雷帕霉素靶点蛋白基因(mammalian target of rapamycin, mTOR)和周期蛋白E1基因(cyclin E1, CCNE1)。CCK-8检测结果示0.39~50 mmol/L EMPA能抑制AGS细胞增殖;与对照组相比, RTCA结果表明3 mmol/L、6 mmol/L EMPA组细胞生长曲线下移。与对照组相比, EdU检测发现3 mmol/L、6 mmol/L EMPA能够抑制AGS细胞的增殖($P < 0.05$),伤口愈合实验和Transwell实验结果表明,3 mmol/L、6 mmol/L EMPA组细胞迁移和侵袭水平下降($P < 0.05$),且6 mmol/L EMPA组较3 mmol/L EMPA组更明显($P < 0.05$)。Western blot结果显示组间mTOR总蛋白的表达量差异无统计学意义;但3 mmol/L、6 mmol/L EMPA组的p-mTOR表达均较对照组下降($P < 0.05$),6 mmol/L EMPA组较3 mmol/L EMPA组更明显($P < 0.05$)。裸鼠荷瘤实验表明,与对照组相比,EMPA组肿瘤体积均减小($P < 0.05$),以高剂量组更为明显($P < 0.05$)。**结论** EMPA能够抑制胃腺癌细胞的异常增殖和迁移,这一效应可能与mTOR蛋白的活化密切相关,该研究能够为胃腺癌治疗提供新的潜在药物和干预靶点。

【关键词】 钠-葡萄糖共转运蛋白2 恩格列净 胃腺癌 整合网络药理学 mTOR

Preliminary Investigation of the Molecular Mechanism of Empagliflozin Suppressing Gastric Cancer Through Mammalian Target of Rapamycin RAO Huiling^{1,2}, CHENG Wang¹, YU Juan¹, AN Xiaotong¹, DENG Haojun¹, ZHANG Zhaoyang¹, WU Fuyun¹, JI Fuyun¹, LI Shan^{1△}. 1. Institute of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; 2. Department of Medical Engineering, The First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China

△ Corresponding author, E-mail: lishanhbmu@126.com

【Abstract】 Objective To predict the intervention targets of empagliflozin (EMPA), a specific inhibitor of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2), in gastric adenocarcinoma through comprehensive network pharmacology, and to validate the effects and the molecular mechanisms of EMPA through cellular and molecular biology experiments. **Methods** Bioinformatics analysis of gastric adenocarcinoma was conducted to assess the correlation between gastric adenocarcinoma prognosis and SGLT2 expression. Network pharmacology was utilized to identify shared targets of EMPA and gastric adenocarcinoma. AGS cells, a human gastric adenocarcinoma cells line, were incubated with EMPA at different concentrations for 24 h and, then, cell proliferation was assessed using the CCK8 assay. After AGS cells were incubated with EMPA at the doses of 0, 3, and 6 mmol/L, real-time cell analysis (RTCA) and 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) incorporation were used to evaluate EMPA's inhibitory effects on the proliferation of the AGS cells. In addition, wound healing and Transwell assays were performed to assess the inhibitory effect of EMPA on the migration and invasion of the APC cells and Western blot analysis was conducted to examine the expression of mammalian target of rapamycin (mTOR) and phosphorylated mTOR (p-mTOR). BALB/c (nu/nu) nude mice were implanted with 5×10^6 AGS cells in the axilla. The mice were divided into three groups, a control group, a low-dose group, and a high-dose group,

* 湖北医药学院自由探索项目(No. FDFR201901)、湖北省教育厅科技项目(No. Q20212103)、基础医学院研究生科技创新项目(No. JC202109)和大学生创新创业训练项目(No. S202110929011)资助

△ 通信作者, E-mail: lishanhbmu@126.com

出版日期: 2023-11-20

each consisting of 7 mice. After one week, the control group received daily intraperitoneal injections of normal saline, while the low-dose group and high-dose group received daily intraperitoneal injections of EMPA at the doses of 3 mg/kg and 5 mg/kg, respectively. The tumor volume was measured one week after the drug intervention started.

Results Gastric adenocarcinoma patients with low expression of SGLT2 exhibited longer survival time and higher survival rate than those with high expression of SGLT2 did. A total of 104 EMPA-related potential targets and 2028 targets associated with gastric adenocarcinoma were identified. Among these, 45 targets associated with gastric adenocarcinoma overlapped with potential targets of EMPA. Further analysis revealed 10 relevant pathways and 4 core genes. The core genes were cyclin-dependent kinase 4 (*CDK4*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), *mTOR*, and cyclin E1 (*CCNE1*). CCK-8 assay revealed that EMPA at concentrations ranging from 0.39 to 50 mmol/L effectively inhibited the proliferation of AGS cells. RTCA results indicated a downward shift in the cell growth curve. In comparison to the findings for the control group, EdU assay demonstrated that EMPA at the concentrations of 3 mmol/L and 6 mmol/L significantly inhibited AGS cell proliferation ($P<0.05$). Results from wound healing and Transwell assays indicated a decrease in the levels of cell migration and invasion ($P<0.05$) and, notably, there was a significant difference between the high and low-dose EMPA groups ($P<0.05$). Western blot showed no statistically significant difference in the expression of total mTOR protein between the groups. However, the expression of p-mTOR in the 3 mmol/L and 6 mmol/L EMPA groups decreased compared to that of the control group ($P<0.05$), with the 6 mmol/L EMPA group exhibiting a more pronounced reduction ($P<0.05$). Nude mice xenograft tumor experiment demonstrated that, compared to that of the control group, the tumor volumes in the EMPA-treatment groups were significantly reduced ($P<0.05$), with the high-dose group showing a more pronounced reduction ($P<0.05$).

Conclusion EMPA inhibits the abnormal proliferation and migration of gastric adenocarcinoma cells, potentially through the modulation of mTOR protein activation. This study provides new potential medication and intervention targets for gastric adenocarcinoma treatment.

【Key words】 Sodium-glucose cotransporter 2 Empagliflozin Gastric adenocarcinoma Integrated network pharmacology mTOR

胃癌是全球常见的恶性肿瘤,平均5年生存率不到20%,主要原因是早期无临床症状导致的诊断不及时^[1]。临床上,超过90%的胃癌属于腺癌^[2]。目前,临床上常用的针对胃腺癌的化疗药物主要包括铂类和紫杉类等^[3],但尚缺乏有效的生物标志物来指导胃腺癌的化疗选择。

恩格列净(empagliflozin, EMPA)属于钠-葡萄糖转运蛋白2抑制剂(sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, SGLT2-i),主要通过抑制肾近端小管对葡萄糖的重吸收而用于治疗2型糖尿病^[4-5]。近期研究显示SGLT2-i能够抑制宫颈癌细胞迁移^[6]、诱导肝癌细胞周期阻滞和凋亡发生^[7]。但是,对于胃腺癌中SGLT2的表达与预后相关性,以及SGLT2i是否能够有效抑制胃腺癌细胞增殖、迁移及潜在靶点,均未见研究报道。本研究的目的是通过网络药理学预测、利用体内外的分子生物实验验证EMPA对胃腺癌的干预作用及分析其可能的分子途径,为临床上胃腺癌的预防和治疗提供潜在药物和关键靶点。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

AGS胃腺癌细胞(中国科学院上海细胞),DMEM高糖培养基(gibco,美国),胎牛血清(四季青,中国),BALB/c(nu/nu)裸鼠(维通利华,中国),EdU检测试剂盒(凯基生物,中国),基质胶(MCE,美国),苏木素染液(索莱宝,中

国), β -actin抗体(三鹰,中国)、mTOR抗体(CST,美国)、p-mTOR抗体(CST,美国)。细胞培养箱(艾森生物,美国),普通光学显微镜(奥林巴斯,日本),荧光显微镜(奥林巴斯),RTCA细胞分析仪(艾森生物),凝胶成像Western分析仪(BIO-RAD,美国)。

1.2 生物信息学分析

以关键词“Gastric adenocarcinoma OR Adenocarcinoma of stomach”从GeneCards数据库、Therapeutic Target数据库、DrugBank、OMIM数据库和PharmGkb数据库收集胃腺癌相关的靶点。通过PubChem数据库、Swiss Target Prediction数据库评估EMPA的生物学信息,获得EMPA相关靶点。然后将疾病相关靶点与EMPA潜在靶点取交集。通过CEO数据库分析胃腺癌和正常人群胃组织SGLT2 mRNA的表达水平,通过Kaplan-Meier Plotter数据库预测SGLT2 mRNA的表达程度与患者生存预后的相关性。通过Metascape数据库对45个交集靶点的基因本体(Gene Ontology, GO)和富集分析(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)进行研究。GO分析包括细胞组成、生物过程和分子功能,而KEGG分析可以描述细胞中基因的代谢途径及功能,统计结果P值使用FDR校正,使用Q值输出。蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建使用检索基因/蛋白质相互作用的搜索工具STRING(Search Tool for the Retrieval of Interacting

Genes/Proteins)。之后核心基因筛选使用Cytoscape 3.7.2软件编辑,并通过NetworkAnalyzer工具计算节点数和边。PPI网络中的蛋白质由圆形节点表示,节点之间的线表示基因之间的相互作用,线越多,两个基因之间的关系越强。

1.3 CCK8检测加药后细胞增殖抑制率

人胃腺癌细胞AGS使用37℃、体积分数5%CO₂的培养箱,添加含10%胎牛血清的DMEM培养。每组细胞接种于96孔板中,用不同浓度的EMPA(0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50 mmol/L)孵育24 h,每一孔中加入10 μL CCK8溶液,在37℃下持续孵育1 h。通过分光光度法在450 nm进行检测,每组重复测定3次。

1.4 实时细胞分析(real-time cell analysis, RTCA)实验记录细胞增殖

EMPA试剂说明书中厂家已说明6 mmol/L浓度能够充分发挥药物的功能作用,查阅文献后也发现以前的研究者使用了该浓度进行实验^[8],并且在本题组其他涉及EMPA的研究中也发现6 mmol/L浓度能够充分发挥药物的功能作用。因此,本研究选用6 mmol/L EMPA进行后续实验,并设0 mmol/L、3 mmol/L EMPA两个剂量组。将AGS细胞接种到E-plate16板中,每孔1 000个细胞,然后用不同浓度的EMPA(0、3、6 mmol/L)处理细胞,在RTCA的SP站上(体积分数5%CO₂, 37℃)进行连续阻抗记录。CI值每10 min测量一次,持续72 h。仪器自动测绘出细胞增殖曲线,增殖曲线斜率越大,说明细胞增殖能力越强。

1.5 细胞迁移实验检测伤口愈合率

将AGS细胞接种于6孔板上,使其完全汇合。用马尾棒损伤单层,然后用不同浓度的EMPA(0、3、6 mmol/L)处理细胞,在时间0 h和24 h拍摄数字图像。Image J分析伤口愈合率,伤口愈合率越高,说明细胞迁移能力越强。

1.6 EdU(5-ethynyl-2-deoxyuridine)检测细胞增殖

将AGS细胞接种于24孔板中,细胞浓度调整为6 000个细胞/孔,以0、3、6 mmol/L EMPA孵育AGS细胞24 h,使用Cell-Light Edu DNA细胞增殖试剂盒测定细胞增殖,使用Image J分析荧光强度。以平均荧光强度来表征细胞增殖,平均荧光强度越高,细胞增殖越强。

1.7 Transwell实验

将AGS细胞接种到铺过基质胶和未铺基质胶的6孔细胞小室中,每孔2×10⁶细胞,用浓度为0、3、6 mmol/L的EMPA孵育24 h后,对穿过小室的细胞进行染色并拍照,使用Image J分析细胞面积和视野总面积,计算细胞面积与视野总面积比率,比率越高说明细胞迁移能力、侵袭能力越强。

1.8 Western blot检测mTOR和p-mTOR表达

AGS细胞接种于6孔板中,用浓度为0、3、6 mmol/L

的EMPA孵育24 h。使用细胞裂解缓冲液,并离心分离蛋白质。用8%SDS凝胶电泳按大小分离蛋白质,转移到PVDF膜上,5%脱脂牛奶封闭2 h,加入β-actin(稀释比例1:200)、mTOR(稀释比例1:1 000)、p-mTOR(稀释比例1:1 000)一抗并孵育过夜。洗涤膜并加入二抗,在室温下反应1 h。使用ECL检测试剂检测灰度值,蛋白表达量计算公式为目的蛋白表达量/内参蛋白表达量。

1.9 裸鼠荷瘤实验

每只裸鼠腋下种植5×10⁶ AGS细胞,荷瘤1周后分组,每组7只裸鼠,分为对照组、低剂量组和高剂量组。对照组腹腔注射生理盐水,低剂量组和高剂量组每日腹腔注射EMPA 3 mg/kg和5 mg/kg,给药1周后解剖裸鼠并取出瘤体,并检测肿瘤体积。

1.10 统计学方法

所有数据采用SPSS 22.0软件作统计学处理。符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,组间两两比较使用 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SGLT2基因表达与胃腺癌患者预后相关性预测和EMPA的作用靶点

虽然GEO数据库显示胃腺癌和正常胃组织SGLT2 RNA表达水平差异无统计学意义(图1A),但预后分析显示低表达SGLT2的胃腺癌患者生存期和存活率均高于高表达SGLT2的胃腺癌患者,低表达SGLT2的胃腺癌患者生存期平均为34.37个月,高表达SGLT2的胃腺癌患者生存期平均为22.2个月(图1B)。EMPA是SGLT2特异性抑制剂,使用Swiss Target Prediction进行预测,发现了104个潜在的EMPA靶点,并从GeneCards、PharmGkb、DrugBank、OMIM和TTD数据库中获得了2 073个胃腺癌靶点,其中,45个交集基因被确定为共作用靶点。由STRING 11.0分析的PPI网络如图1C所示,共输入45个蛋白,其中43个节点相互作用,其他两个节点(CCKBR和CCKAR)与其他节点不相关。

2.2 功能富集分析

使用Metascape对EMPA靶基因和胃腺癌相关基因之间的共同靶点进行功能富集分析(表1)。结果表明,这些共同靶点参与了GO的多种生物学过程,包括衰老、肽基丝氨酸磷酸化、肽基丝氨酸修饰、有丝分裂、细胞周期、激酶活性的正向调节和蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性的调节、细胞对无机物的反应等。KEGG通路参与细胞神化、磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)信号途径、病毒

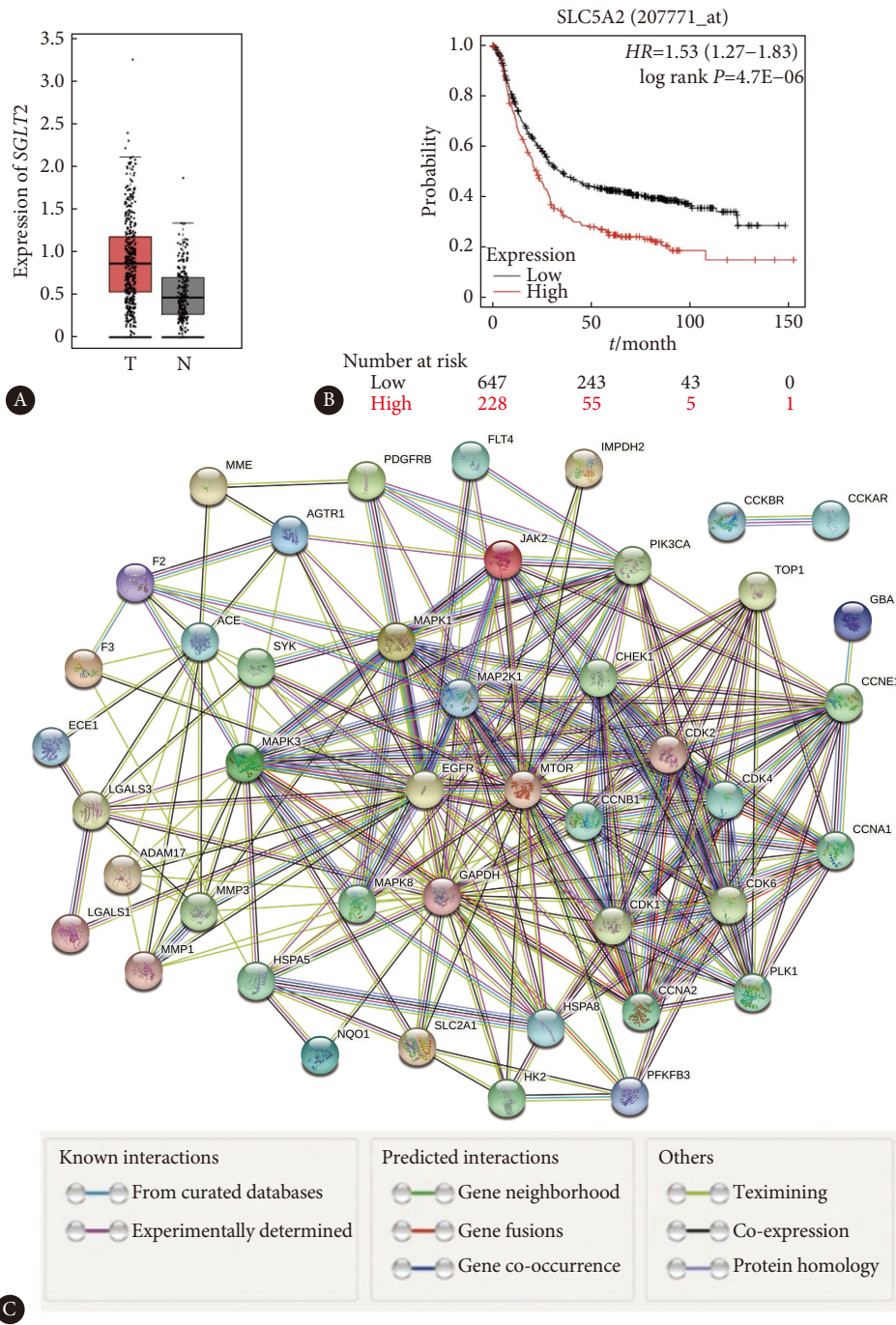


图 1 SGLT2与胃癌患者的预后分析及EMPA在胃癌中的目标预测与网络构建

Fig 1 The correlation between SGLT2 and the prognosis of patients with gastric adenocarcinoma and EMPA targets prediction and network construction in gastric adenocarcinoma

A, The expression of SGLT2 in normal gastric tissue (N, n=211) and gastric adenocarcinoma tissue (T, n=408). B, The negative correlation between the expression level of SGLT2 and the predicted survival period of patients. C, A protein-protein interaction (PPI) network. HR: hazard ratio (95% confidence interval).

癌变、孕激素参与的卵母细胞成熟、前列腺癌、缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)信号通路和细胞周期。

2.3 PPI网络分析

将获得的45个共同基因上传到String数据库,生成PPI网络,利用Cytoscape 3.7.2软件对网络的拓扑参数进行

分析。结果表明,该网络共有43个节点和241条边。通过算法找到EMPA治疗中的枢纽基因,一个包含17个节点和109条边的网络。为了找到核心基因,本研究筛选出具有4个节点和6条边的核心网络。利用工具筛选出的4个核心基因,其度值和中间值如表2所示。这4个关键基因分别是细胞周期依赖激酶4基因(cyclin-dependent kinase-4,

表 1 KEGG富集途径及相关基因

Table 1 The enriched KEGG pathways and the relevant genes

Pathway	Gene	Q value
Cellular senescence	CCNA1, CDK2, CCNB1, CCNA2, CCNE1, MAP2K1, CHEK1, mTOR, PIK3CA, CDK6, CDK1, CDK4, MAPK3, MAPK1	7.86E-13
PI3K-Akt signaling pathway	CDK2, CCNE1, MAP2K1, PDGFRB, SYK, EGFR, FLT4, mTOR, JAK2, PIK3CA, CDK6, CDK4, MAPK3, MAPK1	4.73E-09
Human papillomavirus infection	CCNA1, CDK2, CCNA2, CCNE1, MAP2K1, PDGFRB, EGFR, mTOR, PIK3CA, CDK6, CDK4, MAPK3, MAPK1	1.79E-08
Viral carcinogenesis	CCNA1, CDK2, CCNA2, CCNE1, SYK, CHEK1, PIK3CA, CDK6, CDK1, CDK4, MAPK3, MAPK1	1.60E-09
Human T-cell leukemia virus 1 infection	CCNA1, CDK2, CCNA2, CCNE1, MAP2K1, SLC2A1, CHEK1, PIK3CA, MAPK8, CDK4, MAPK3, MAPK1	2.92E-09
Coronavirus disease - COVID-19	SYK, EGFR, MMP3, MMP1, ADAM17, PIK3CA, ACE, MAPK8, AGTR1, F2, MAPK3, MAPK1	4.73E-09
Progesterone-mediated oocyte maturation	CCNA1, CDK2, CCNB1, CCNA2, MAP2K1, PIK3CA, MAPK8, PLK1, CDK1, MAPK3, MAPK1	4.40E-11
Prostate cancer	CDK2, CCNE1, MAP2K1, PDGFRB, EGFR, MMP3, mTOR, PIK3CA, MAPK3, MAPK1	6.81E-10
HIF-1 signaling pathway	MAP2K1, SLC2A1, GAPDH, EGFR, HK2, mTOR, PFKFB3, PIK3CA, MAPK3, MAPK1	9.48E-10
Cell cycle	CCNA1, CDK2, CCNB1, CCNA2, CCNE1, CHEK1, PLK1, CDK6, CDK1, CDK4	2.68E-09

表 2 核心基因关联度分析

Table 2 Association analysis of the core genes

Target	Degree	Betweenness	Closeness
<i>GAPDH</i>	35	399.9504585	0.318518519
<i>mTOR</i>	28	158.595297	0.302816901
<i>CDK4</i>	18	19.55990934	0.275641026
<i>CCNE1</i>	17	88.6667302	0.277419355

CDK4: cyclin-dependent kinase-4; *GAPDH*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *mTOR*: mammalian target of rapamycin; *CCNE1*: cyclin E1.

CDK4)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)、雷帕霉素靶点蛋白基因(mammalian target of rapamycin, *mTOR*)和周期蛋白E1基因(cyclin E1, *CCNE1*)。

2.4 EMPA抑制胃腺癌细胞增殖

CCK8结果表明,使用EMPA(0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.50、25.00、50.00 mmol/L)孵育24 h后,能够抑制AGS细胞增殖(图2A),抑制率在经历一个平台期后加速上升。与对照组(0 mmol/L)EMPA相比,RTCA结果显示,3 mmol/L、6 mmol/L EMPA诱导的AGS细胞的生长指数呈现下降趋势(图2B),EdU实验显示,AGS细胞的相对荧光强度减少,3 mmol/L EMPA组平均荧光强度下降至对照组的76%,6 mmol/L EMPA组相对荧光强度下降至对照组的53% ($P < 0.05$),提示细胞增殖活性显著降低(图2C);6 mmol/L EMPA组较3 mmol/L EMPA组更明显 ($P < 0.05$)。

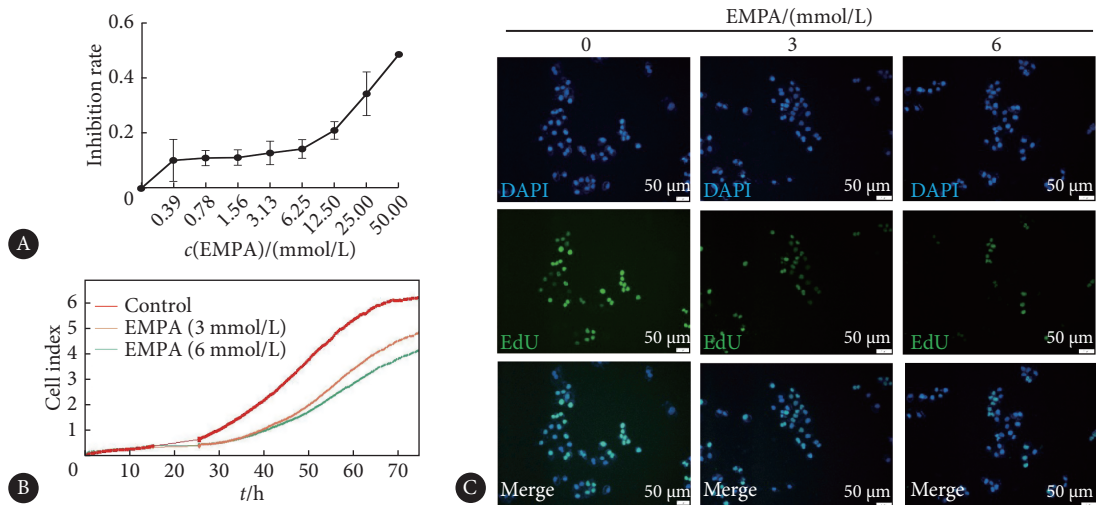


图 2 EMPA抑制胃腺癌细胞的增殖

Fig 2 EMPA inhibited the proliferation of gastric adenocarcinoma cells

A, CCK8 assay to determine the inhibition rate of AGS cells after EMPA treatment at the doses of 0-50 mmol/L at 24 h ($n=5$). B, RTCA assay to determine the cell index of AGS cells after EMPA treatment at the doses of 0, 3, and 6 mmol/L for 0-72 h ($n=3$). C, EdU assay to examine the proliferation ability of AGS cells after EMPA treatment at the doses of 0, 3, and 6 mmol/L at 24 h.

细胞划痕实验和Transwell结果表明, 不同浓度的 EMPA 均能够有效抑制胃腺癌细胞的迁移和侵袭,

6 mmol/L EMPA 组较 3 mmol/L EMPA 组更明显 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$, 图 3)。

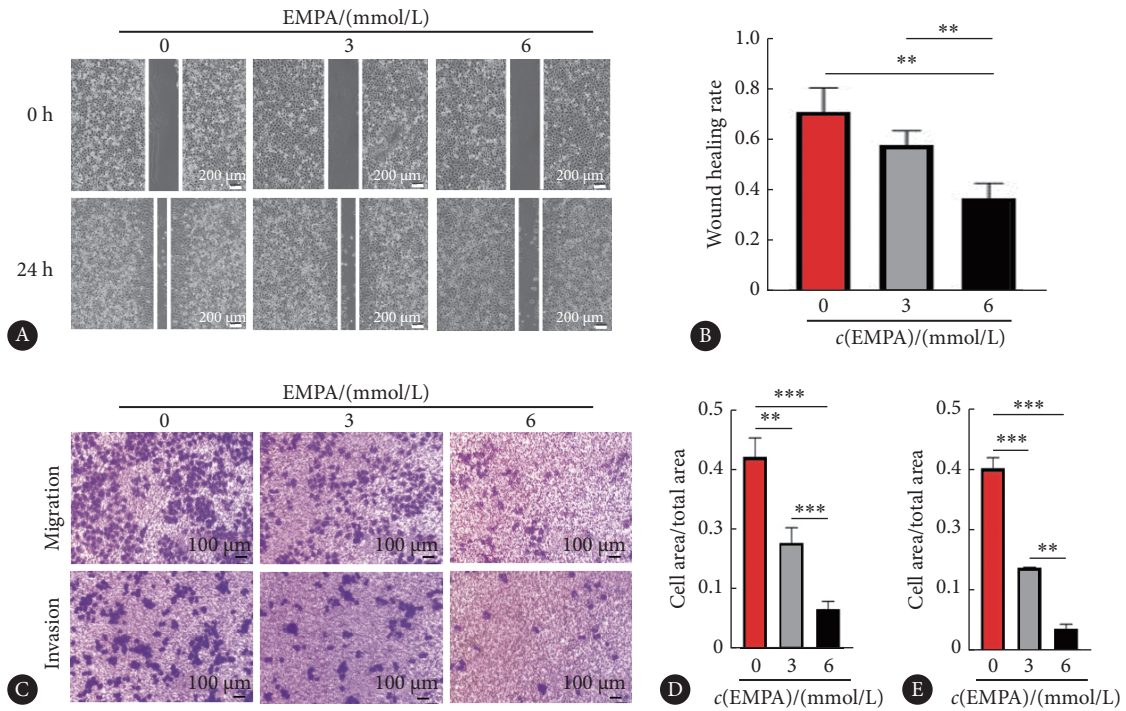


图 3 EMPA 抑制胃腺癌细胞的迁移和侵袭

Fig 3 EMPA inhibited the migration and infiltration of AGS cells

In scratch wound assay (A and B), AGS cells were incubated with EMPA. The migration and invasion of AGS cells were assessed using a Transwell assay after 24 hours of treatment with EMPA at the doses of 0, 3, and 6 mmol/L (C) and the impact of SGLT2 on AGS cell migration (D) and invasion (E) was measured. $n=3$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Western blot结果显示3组胃腺癌细胞间, mTOR总蛋白的表达量差异无统计学意义。但3 mmol/L EMPA能够将p-mTOR的表达水平下降到对照组的76%, 而6 mmol/L EMPA能够使p-mTOR的表达水平下降至对照组的48% ($P < 0.05$), 6 mmol/L EMPA组较3 mmol/L EMPA组更明显 ($P < 0.05$) (图4)。

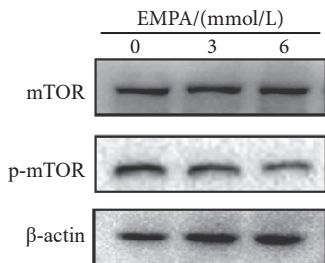


图 4 EMPA 抑制胃腺癌细胞 p-mTOR 的表达

Fig 4 EMPA inhibited the expression levels of p-mTOR in gastric adenocarcinoma cells

裸鼠荷瘤实验表明两个剂量的 EMPA 均能够有效抑制胃腺癌细胞的增殖, 给药组肿瘤体积显著降低, 其中低剂量给药组肿瘤体积降低至对照组的 48%, 而高剂量给

药组下降至对照组的 12%, 高剂量给药组较低剂量给药组抑制效果更明显 ($P < 0.05$) (图 5)。

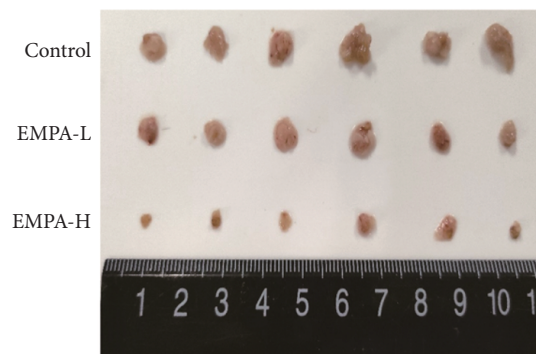


图 5 EMPA 抑制胃腺癌细胞在裸鼠体内的增殖

Fig 5 EMPA inhibited the proliferation of gastric adenocarcinoma cells in nude mice

EMPA-L: EMPA low-dose group; EMPA-H: EMPA high-dose group.

3 讨论

胃癌是一类常见恶性肿瘤, 发病率列于全球前五, 死亡率位于癌症前三^[9]。它是一种由多种因素引起的高侵

袭性疾病。然而,其分子机制目前尚未完全了解。肾脏葡萄糖重吸收的大部分能力由肾近曲小管的SGLT2提供,在之前的报道中发现,SGLT2的表达水平在胰腺癌、前列腺癌、肺癌和乳腺癌组织中升高,其与肿瘤代谢有关,并有助于肿瘤的进展^[10-13]。此外,SGLT2的过表达能够促进乳腺癌和宫颈癌细胞的生长、迁移和侵袭^[6, 14]。SGLT2-i可以降低血糖水平,从而逆转由胰岛素抵抗引起的糖毒性^[15]。最近的关键证据表明SGLT2在胰腺癌和前列腺癌组织中表达,该蛋白的功能是作为癌细胞中的葡萄糖转运体^[10, 16]。有研究表明,SGLT2-i可能通过阻断葡萄糖摄取从而直接抑制胰腺癌细胞的生长^[17]。动物研究表明,SGLT2-i通过降低肥胖率和降低糖尿病小鼠的血糖和游离脂肪酸抑制肝脏肿瘤的发生^[18]。近年来的研究表明,SGLT2i不仅能够对肾及心血管起保护作用,同时还能抵抗肿瘤细胞的发生和发展^[19]。

本研究分析了胃腺癌组织中SGLT2的表达情况及其与患者生存期和预后的关系,结果表明胃腺癌组织中SGLT2的表达虽无明显改变,但SGLT2高表达患者的生存期显著下降,因此,笔者认为EMPA可能通过抑制SGLT2而发挥其抗胃腺癌活性。基于集成网络药理学分析,本研究初步获得了45个相同靶点。KEGG分析显示EMPA抗胃腺癌的途径包括细胞衰老、PI3K-AKT信号通路、HIF-1信号通路与细胞周期等,细胞衰老是由多种形式的细胞应激引起的,包括癌基因的激活和DNA损伤^[20]。一些与细胞衰老相关的基因被用于预测肺腺癌的预后和免疫原性,细胞衰老是部分胃癌细胞停止增殖的原因^[21]。此外,PI3K通路的激活能够促进肿瘤的进程,抑制PI3K-AKT信号通路在几种类型的癌症治疗中被检测为是有效的,可促进包括胃腺癌在内的多种肿瘤细胞增殖抑制、死亡增加^[22]。

本研究筛选出4个EMPA在胃腺癌治疗中的核心基因:CDK4、GAPDH、mTOR和CCNE1。既往研究表明CDK4和CCNE1参与细胞周期进程,参与肿瘤细胞的恶性增殖^[23]。在这4个关键基因中,GAPDH和mTOR与EMPA的相关性较高。糖酵解作为癌细胞能量代谢的关键途径,有利于肿瘤进展和侵袭,导致不少研究者认为GAPDH是特异性抗癌的有效药物靶点^[24-25]。PI3K和AKT信号途径主要参与了增殖、分化、迁移、凋亡和能量代谢等多种细胞生命活动的调控。大量研究证实,AKT能够提高肿瘤细胞的糖酵解水平^[26]。mTOR与其他蛋白质分子相互作用,通过影响包括糖代谢在内的多种生物过程调控肿瘤细胞增殖^[27],研究表明,p-mTOR高表达于胃癌组织中,并与肿瘤的分化程度密切相关^[28]。由

于前期的网络药理学的结果显示,mTOR可能是EMPA发挥胃腺癌抵抗作用的关键靶点,但本研究中Western blot结果显示EMPA并未改变mTOR总蛋白的表达量,而多项研究表明mTOR的活化与其磷酸化程度密切相关,因此,本研究继续检测了EMPA对p-mTOR蛋白水平的影响,结果显示不同浓度EMPA均可影响p-mTOR蛋白水平,且以高浓度更为明显。结合网络药理学实验结果,笔者认为EMPA可能通过靶向抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路进而发挥其抑胃腺癌作用。

广泛的临床前和临床试验已经表明mTOR抑制剂在抑制肿瘤进展方面是安全和有效的^[27]。本研究利用细胞生物学发现EMPA能够有效抑制胃腺癌AGS细胞的增殖水平和迁移、侵袭能力,进一步的裸鼠成瘤实验也验证了EMPA在体内也能够有效抑制胃腺癌细胞的恶性增殖。后续的分子生物学实验显示与对照组相比,EMPA治疗组的总mTOR蛋白表达无显著变化,但p-mTOR蛋白表达明显降低,提示EMPA治疗可能有助于胃腺癌细胞中mTOR的失活。在高剂量下,本研究观察到更显著的p-mTOR蛋白表达下降,表明高剂量EMPA可能更有效地促使mTOR的失活。这提示了EMPA治疗效果可能与剂量相关,需要更深入的研究来确定最佳治疗剂量。与此一致的是,临床前研究已经证明了胃癌细胞和胃癌患者来源的胃癌组织中mTOR异常激活,主要是p-mTOR表达增加,与肿瘤的进展和患者的生存周期呈现出一定的正相关趋势^[27-28]。

综上,本研究通过网络药理学和分子生物学实验发现,在体内外水平,EMPA均能够有效抑制胃腺癌细胞的异常增殖,而这一细胞效应很可能是通过抑制p-mTOR蛋白的表达而实现,该结果为胃腺癌的治疗提供了新的潜在药物和药物干预途径。但是,EMPA对mTOR蛋白的活化抑制是直接效应还是间接效应,以及是否存在其他通路共同调控细胞增殖、凋亡或者恶性转化尚不得而知。研究者需要进一步探究EMPA与mTOR蛋白可能存在的结合靶点,EMPA是否能够作为一种新型的mTOR和SGLT2共抑制剂进而更好地干预肿瘤进程。

* * *

作者贡献声明 饶慧玲负责调查研究、研究方法、验证,程旺负责数据审编、正式分析、软件,于娟负责数据审编,安晓彤负责正式分析,邓浩君负责软件,张昭阳负责验证,武福云负责监督指导,耿福云负责可视化,李珊负责论文构思、经费获取、提供资源、监督指导和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表的版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] CORREA P. Gastric cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 2013, 42(2): 211–217. doi: 10.1016/j.gtc.2013.01.002.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
- [3] LORENZEN S, STAHLI M, HOFHEINZ R D, *et al*. Influence of taxanes on treatment sequence in gastric cancer. *Oncol Res Treat*, 2020, 43(1/2): 42–47. doi: 10.1159/000503428.
- [4] NI L, YUAN C, CHEN G, *et al*. SGLT2i: beyond the glucose-lowering effect. *Cardiovasc Diabetol*, 2020, 19(1): 98. doi: 10.1186/s12933-020-01071-y.
- [5] VALLON V, THOMSON S C. Targeting renal glucose reabsorption to treat hyperglycaemia: the pleiotropic effects of SGLT2 inhibition. *Diabetologia*, 2017, 60(2): 215–225. doi: 10.1007/s00125-016-4157-3.
- [6] XIE Z, WANG F, LIN L, *et al*. An SGLT2 inhibitor modulates SHH expression by activating AMPK to inhibit the migration and induce the apoptosis of cervical carcinoma cells. *Cancer Lett*, 2020, 495: 200–210. doi: 10.1016/j.canlet.2020.09.005.
- [7] JOJIMA T, WAKAMASTU S, KASE M, *et al*. The SGLT2 inhibitor canagliflozin prevents carcinogenesis in a mouse model of diabetes and non-alcoholic steatohepatitis-related hepatocarcinogenesis: association with SGLT2 expression in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5237. doi: 10.3390/ijms20205237.
- [8] QUAGLIARIELLO V, De LAURENTIIS M, REA D, *et al*. The SGLT-2 inhibitor empagliflozin improves myocardial strain, reduces cardiac fibrosis and pro-inflammatory cytokines in non-diabetic mice treated with doxorubicin. *Cardiovasc Diabetol*, 2021, 20(1): 150. doi: 10.1186/s12933-021-01346-y.
- [9] MORGAN E, ARNOLD M, CAMARGO M C, *et al*. The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: a population-based modelling study. *EclinicalMedicine*, 2022, 47: 101404. doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101404.
- [10] SCAFOGLIO C, HIRAYAMA B A, KEPE V, *et al*. Functional expression of sodium-glucose transporters in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(30): E4111–9. doi: 10.1073/pnas.1511698112.
- [11] GRONDA E, JESSUP M, IACOVIELLO M, *et al*. Glucose Metabolism in the kidney: neurohormonal activation and heart failure development. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(23): e018889. doi: 10.1161/jaha.120.018889.
- [12] ZHANG X, ZHANG X, LIU X, *et al*. MicroRNA-296, a suppressor non-coding RNA, downregulates SGLT2 expression in lung cancer. *Int J Oncol*, 2019, 54(1): 199–208. doi: 10.3892/ijo.2018.4599.
- [13] KOMATSU S, NOMIYAMA T, NUMATA T, *et al*. SGLT2 inhibitor ipragliflozin attenuates breast cancer cell proliferation. *Endocr J*, 2020, 67(1): 99–106. doi: 10.1507/endocrj.EJ19-0428.
- [14] DICEMBRINI I, NREU B, MANNUCCI E, *et al*. Sodium-glucose co-transporter-2 (SGLT-2) inhibitors and cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Obes Metab*, 2019, 21(8): 1871–1877. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110821.
- [15] HSIA D S, GROVE O, CEFALU W T. An update on sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors for the treatment of diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2017, 24(1): 73–79. doi: 10.1097/med.0000000000000311.
- [16] TSA K F, CHEN Y L, CHIOU T T, *et al*. Emergence of SGLT2 inhibitors as powerful antioxidants in human diseases. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(8): 1166. doi: 10.3390/antiox10081166.
- [17] WRIGHT E M. SGLT2 and cancer. *Pflugers Arch*, 2020, 472(9): 1407–1414. doi: 10.1007/s00424-020-02448-4.
- [18] OBARA K, SHIRAKAMI Y, MARUTA A, *et al*. Preventive effects of the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor tofogliflozin on diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic mice. *Oncotarget*, 2017, 8(35): 58353–58363. doi: 10.18632/oncotarget.16874.
- [19] 丁百香, 钠-葡萄糖协同转运蛋白2及其抑制剂与相关疾病. *中国生物化学与分子生物报*, 2023, 9: 1–16. doi: 10.13865/j.cnki.cjmb.2023.09.1124.
- [20] DONG X, HU X, CHEN J, *et al*. BRD4 regulates cellular senescence in gastric cancer cells via E2F/miR-106b/p21 axis. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 203. doi: 10.1038/s41419-017-0181-6.
- [21] ZHANG W, LI Y, LYU J, *et al*. An aging-related signature predicts favorable outcome and immunogenicity in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*, 2022, 113(3): 891–903. doi: 10.1111/cas.15254.
- [22] YANG J, NIE J, MA X, *et al*. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 26. doi: 10.1186/s12943-019-0954-x.
- [23] HERRERA-ABREU M T, PALAFOX M, ASGHAR U, *et al*. Early adaptation and acquired resistance to CDK4/6 inhibition in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Res*, 2016, 76(8): 2301–2313. doi: 10.1158/0008-5472.Can-15-0728.
- [24] PACCHIANA R, MULLAPPILLY N, PINTO A, *et al*. 3-bromo-isoxazoline derivatives inhibit GAPDH enzyme in PDAC cells triggering autophagy and apoptotic cell death. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(13): 3153. doi: 10.3390/cancers14133153.
- [25] LIBERTI M V, LOCASALE J W. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(3): 211–218. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001.
- [26] 周立强, 李世豪, 刘力, 等. 重组甲硫氨酸酶调控PI3K/Akt/Glut-1通路抑制有氧糖酵解促进胃癌细胞凋亡. *南方医科大学学报*, 2020, 40(1): 27–33. doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.01.05.
- [27] LANG S A, GAUMANN A, KOEHL G E, *et al*. Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model. *Int J Cancer*, 2007, 120(8): 1803–1810. doi: 10.1002/ijc.22442.
- [28] 张刚, 郭剑, 郝鑫, 等. PI3K/AKT/mTOR信号通路蛋白p-AKT及p-mTOR在胃癌组织中的表达及意义. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32(10): 1149–1151. doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2016.10.017.

(2023-03-02收稿, 2023-10-30修回)

编辑 吕熙



开放获取 本文遵循知识共享署名—非商业性使用

4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 允许第三方对本刊发

表的论文自由共享(即在任何媒介以任何形式复制、发行原文)、演绎(即修改、转换或以原文为基础进行创作), 必须给出适当的署名, 提供指向本文许可协议的链接, 同时标明是否对原文作了修改; 不得将本文用于商业目的。CC BY-NC 4.0许可协议访问<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

© 2023 《四川大学学报(医学版)》编辑部 版权所有