

miR-203a-3p 靶向 GLS1 调控 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭的机制研究

时晓晓^a, 董翔^a, 于若卉^b, 苏君君^a, 齐东东^a, 白杨^a, 董猛^{ab}

(河北省沧州中西医结合医院 a. 肝胆外科; b. 耳鼻咽喉科, 河北沧州 061000)

摘要: 目的 探究微小核糖核酸 (microRNAs, miRNA, miR) -203a-3p 对肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 细胞增殖、迁移、侵袭的影响及其潜在分子机制。方法 采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测 HCC 细胞、人正常肝细胞以及临床 HCC 组织中 miR-203a-3p 相对表达; 采用细胞增殖实验、细胞划痕实验和 Transwell 实验分别检测 miR-203a-3p 对 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭的影响; 生物信息学网站预测 miR-203a-3p 的潜在靶基因 (GLS1), 双荧光素酶实验进行验证; 探究 HCC 细胞对谷氨酰胺的依赖性及其抑制谷氨酰胺酶 1 (glutaminase 1, GLS1) 对 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭的影响; 蛋白免疫印迹 (Western blot) 实验检测 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 β -catenin, p-GSK-3 β 和 c-Myc 表达。结果 HCC 癌组织中 miR-203a-3p (0.32 ± 0.07) 表达明显低于癌旁正常组织 (1.02 ± 0.03), 差异有统计学意义 ($t = 41.105, P < 0.001$); HCC 细胞 HepG2 (0.34 ± 0.05), HCCLM3 (0.58 ± 0.06), Huh7 (0.43 ± 0.05), Hep3B (0.29 ± 0.04) 中 miR-203a-3p 相对表达水平明显低于人正常肝细胞 LO2 (1.01 ± 0.02) 中 miR-203a-3p 表达, 差异有统计学意义 ($F = 119.080, P < 0.001$)。与 Blank 组相比, miR-203a-3p 过表达组 HCC 细胞增殖 (0.61 ± 0.05 vs 1.24 ± 0.06), 迁移率 ($21.43\% \pm 2.01\%$ vs $60.22\% \pm 3.14\%$) 及侵袭能力 (76.54 ± 13.56 vs 221.06 ± 16.54) 均明显降低, 差异有统计学意义 ($t = 14.849, 13.900, 10.562$, 均 $P < 0.001$)。GLS1 是 miR-203a-3p 的靶基因, miR-203a-3p 靶向负调控 GLS1 表达。HCC 细胞中 GLS1 高表达呈现高酶活性, HCC 细胞对谷氨酰胺存在明显依赖性。GLS1 抑制组 α -KG, 谷氨酸水平均较 Blank 组和 siRNA-NC 组明显降低, 差异有统计学意义 ($F = 64.754, 35.627$, 均 $P < 0.001$)。GLS1 抑制组细胞增殖 (0.59 ± 0.04)、迁移率 ($30.15\% \pm 1.02\%$) 和侵袭能力 (69.59 ± 15.74) 较 Blank 组明显降低 ($1.29 \pm 0.07, 59.67\% \pm 1.45\%, 202.14 \pm 13.52$), 差异均有统计学意义 ($t = 16.499, 16.278, 11.215$, 均 $P < 0.001$)。miR-203a-3p 过表达和 GLS1 表达抑制明显抑制了 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 β -catenin, p-GSK-3 β 和 c-Myc 的表达, 差异均有统计学意义 ($t = 11.129 \sim 28.213$, 均 $P < 0.001$)。转染 GLS1 可逆转 miR-203a-3p 对 HCC 细胞生物学行为及 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白表达的抑制作用。结论 HCC 中 miR-203a-3p 显著低表达, 其过表达能够抑制 HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭, 可能与 GLS1 调控谷氨酰胺代谢及 miR-203a-3p 靶向 GLS1 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路活性有关。

关键词: 肝细胞癌; 微小核糖核酸-203a-3p; 肾型谷氨酰胺酶; 增殖; 迁移; 侵袭; 谷氨酰胺代谢; Wnt/ β -catenin 通路

中图分类号: R735.7; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 05-086-08

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.05.018

Mechanism of miR-203a-3p Targeting GLS1 to Regulate the Proliferation, Migration and Invasion of HCC Cells

SHI Xiao-xiao^a, DONG Xiang^a, YU Ruo-hui^b, SU Jun-jun^a, QI Dong-dong^a, BAI Yang^a, DONG Meng^{ab}

(a. Department of Hepatobiliary Surgery; b. Department of Otorhinolaryngology, Hebei Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei Cangzhou 061000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of micro ribonucleic acid (miRNA) -203a-3p on proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma (HCC) cells and its potential molecular mechanism. **Methods** Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the relative expression of miR-203a-3p in HCC cells, human normal liver cells LO2 and clinical HCC tissues. Cell proliferation assay, cell scratch assay and Transwell assay were used to detect the effects of miR-203a-3p on the proliferation, migration and invasion of HCC cells. The potential target gene (GLS1) of miR-203a-3p was predicted by

基金项目: 沧州市重点研发计划指导项目 (204106065)。

作者简介: 时晓晓 (1986-), 男, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 普通外科, 肝胆胰外科, E-mail: shanqiu0819@163.com。

通讯作者: 董猛 (1980-), 男, 副主任医师, 研究方向: 普通外科, 肝胆胰外科。

bioinformatics website and verified by double luciferase assay. The dependence of HCC cells on glutamine was detected to explore the effects of GLS1 expression inhibition on the proliferation, migration and invasion of HCC cells. The expression of key proteins β -catenin, P-GSK-3 β and c-Myc in Wnt/ β -catenin signaling pathway was detected by Western blot. **Results** The expression of miR-203a-3p in HCC cancer tissues was significantly lower than that in adjacent normal tissues (1.02 ± 0.03 vs 0.32 ± 0.07), and the difference was statistically significant ($t=41.105$, $P < 0.001$). The relative expression level of miR-203a-3p in HCC cells HepG2 (0.34 ± 0.05), HCCLM3 (0.58 ± 0.06), Huh7 (0.43 ± 0.05), Hep3B (0.29 ± 0.04) was significantly lower than that of LO2 (1.01 ± 0.02) in human normal liver cells, and the difference was statistically significant ($F=119.080$, $P < 0.001$). Compared with the control group, HCC cell proliferation in miR-203a-3p overexpression group (0.61 ± 0.05 vs 1.24 ± 0.06), the migration rate ($21.43\% \pm 2.01\%$ vs $60.22\% \pm 3.14\%$) and invasion ability (76.54 ± 13.56 vs 221.06 ± 16.54) were significantly decreased, and the difference was statistically significant ($t=14.849, 13.900, 10.562$, all $P < 0.001$). Conversely, the opposite results were obtained after miR-203a-3p expression was down-regulated. GLS1 was the target gene of miR-203a-3p, and miR-203a-3p negatively regulates GLS1 expression. HCC cells showed high expression of GLS1 and high enzyme activity, and HCC cells showed significant dependence on glutamine. The levels of α -KG and glutamate in GLS1 inhibited group were significantly lower than those in Blank group and siRNA-NC group, and the differences were statistically significant ($F=64.754, 35.627$, all $P < 0.001$). GLS1 inhibited cell proliferation (20.59 ± 0.04), the migration rate ($30.15\% \pm 1.02\%$), invasion ability (69.59 ± 15.74) were significantly lower than blank control group ($1.29 \pm 0.07, 59.67\% \pm 1.45\%, 202.14 \pm 13.52$), the differences were statistically significant ($t=16.499, 16.278, 11.215$, all $P < 0.001$). MiR-203a-3p overexpression and GLS1 expression inhibition significantly inhibited the expression of key proteins β -catenin, P-GSK-3 β and c-Myc in the Wnt/ β -catenin signaling pathway, with statistically significant differences ($t=11.129 \sim 28.213$, all $P < 0.001$). Transfection with GLS1 reversed the inhibition of miR-203a-3p on the biological behavior of HCC cells and the expression of key proteins in the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Conclusion** MiR-203a-3p was significantly underexpressed in HCC, and its overexpression could inhibit the proliferation, migration and invasion of HCC cells, which may be related to GLS1 regulation of glutamine metabolism and miR-203a-3p targeting GLS1 regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway activity.

Keywords: hepatocellular carcinoma; miR-203a-3p; renal glutaminase; proliferation; migration; invasion; glutamine metabolism; wnt/ β -catenin pathway

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是临床常见的恶性肿瘤, 约占全部肝癌的 70% ~ 90%, 致病、致死率较高, 患者预后较差^[1]。近年研究表明, 肿瘤的发生发展是多因素、多步骤、多通路异常调控的复杂过程, 涉及致癌基因的异常激活和抑癌基因的失活^[2]。基于分子生物学的大量研究也表明, 微小核糖核酸 (microRNAs, miRNA, miR) 在人类众多肿瘤中异常表达, 可与 mRNA 转录本的 3'-UTR 区结合, 促使 mRNA 降解或抑制其表达翻译, 调控细胞生长、分化及迁移、凋亡等生物学行为^[3]。证实 miRNA 能够调控促癌基因或抑癌基因, 参与肿瘤的发生、发展及转移, 为肿瘤研究提供了新方向^[2]。miR-203a-3p 是近年研究的 miRNA 分子, 大量研究表明其在胃癌、胰腺癌、非小细胞肺癌等多种恶性肿瘤中异常表达, 在肿瘤细胞增殖、侵袭及凋亡、耐药等过程中发挥重要作用, 是许多疾病和癌症的潜在分子标记物^[4-6]。相关研究表明, 细胞内能量代谢改变是肿瘤细胞的特征之一, 肿瘤细胞大多存在谷氨酰胺代谢增加和有氧糖酵解 (Warburg 效应)^[7]。谷氨酰胺酶通过催化谷氨酰胺生成谷氨酸, 提高谷氨酰胺代谢, 为肿瘤细胞增殖提供足够能量, 促进肿瘤的发生发

展^[8]。多数肿瘤细胞中肾型谷氨酰胺酶 (Kidney-type glutaminase, GLS1) 显著高表达, 在细胞谷氨酰胺代谢及肿瘤生长中意义显著^[9]。因此, 本研究拟探究 miR-203a-3p 和 GLS1 对 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭的影响及其调控作用机制, 旨在为临床 HCC 诊疗提供更多参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 HCC 细胞系 HepG2, HCCLM3, Huh7, Hep3B 和人正常肝细胞株 LO2 购自中国科学院, 37℃, 5ml/dl CO₂ 条件下培养在含 10g/dl 胎牛血清、1g/dl 链霉素和青霉素的 DMEM 培养液中。另选取 2021 年 7 ~ 8 月由沧州中西医结合医院病理科留存的 20 例 HCC 患者癌组织及对应癌旁正常组织样本, 均由术中获取经病理确诊后 -80℃ 低温液氮保存; 未并发其他恶性肿瘤, 术前无相关放疗及新辅助治疗史。

1.2 试剂和仪器 胎牛血清、链霉素、青霉素 (四季青生物科技公司); DMEM 培养液、胰蛋白酶 (武汉博士德生物技术有限公司); TRIzol 试剂、Lip 2000 转染试剂 (美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒 (Aidlab 公司); CCK-8 试剂盒, 双重荧光素酶活性测定 (Promega 公司); Transwell 小室 (美

国 BD Biosciences 公司); 酶标仪 (美国 Bio-rad 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); β -catenin, p-GSK-3 β , c-Myc 抗体 (Bio-RAD 公司); 谷氨酰胺代谢产物检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); miR-203a-3p mimic 模拟物、miR-203a-3p inhibitor 抑制物及 GLS1-3'UTR-wt 野生型和 3'UTR-mut 突变型荧光质粒 (广州锐博生物科技有限公司); 谷氨酰胺酶特异性小分子抑制剂 968, 沉默 GLS1 表达 siRNA 载体 (上海吉玛基因生物)。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染及分组: 取生长密度达 80% 时的待测细胞, 参照 Lipo 2000 说明书进行转染, 分组为 miR-203a-3p 过表达组 (mimic 组), miR-203a-3p 过表达阴性组 (mimic-NC 组), miR-203a-3p 低表达组 (inhibitor 组), miR-203a-3p 低表达阴性组 (inhibitor-NC); GLS1 抑制组 (转染谷氨酰胺酶抑制剂 968), GLS1 敲低表达组 (siRNA 组), GLS1 敲低阴性对照组 (siRNA-NC)。转染完成后常规培养 48 h, 行后续实验。

1.3.2 qRT-PCR 检测目的基因表达: 采用 TRIzol 试剂提取细胞、组织总 RNA, 反转录为 cDNA, 以此为模板配置 PCR 反应体系, $2 \times$ SYBR Green Master Mix $5 \mu\text{l}$, 正反向引物各 $2.5 \mu\text{mol/L}$, cDNA $1 \mu\text{l}$, 无 Rnase 双蒸水, 总体积 $20 \mu\text{l}$; 利用实时荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 扩增反应, 反应条件: 95°C 35 s, 95°C 20 s, 72°C 15 s, 循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因 mRNA 表达。引物序列见表 1。

表 1	PCR 引物序列
基因	序 列
miR-203a-3p	正向 5'-CGCCTCGTGAAAGTTACG-3'
	反向 5'-CAGACGAGCCTGCGAGCTA-3'
GLS1	正向 5'-TCGTGCCGTGAGCTGAAACT-3'
	反向 5'-CGAAGCTAGCTAAGACCTGTT-3'
GAPDH	正向 5'-TCTTGCTACTGCGTCTGAAC-3'
	反向 5'-ATCGCATGCACTGTAGTCAT-3'

1.3.3 细胞增殖能力检测: 收集待测细胞接种到 96 孔板, 密度 1×10^4 /孔, 37°C , 5% (v/v) CO_2 孵育 48 h, 每孔加入 CCK-8 溶液 $10 \mu\text{l}$, 孵育 72 h, 450 nm 处用酶标仪测量吸光度 A 值, 绘制增殖曲线, 每孔设 3 个复孔, 实验重复 3 次取平均值。

1.3.4 细胞迁移能力检测: 收集待测细胞接种到 6 孔板, 密度 4×10^6 /孔, 待生长铺满底板, $10 \mu\text{l}$ 枪头垂直孔板划痕, PBS 冲洗 3 次, 去掉划痕碎片, 加入无血清培养基培养 48 h, 拍照观察分析。

1.3.5 细胞侵袭能力检测: Transwell 小室上室底部铺 Matrigel 基质胶, 室温晾干; 取对数生长期待测细胞, 胰酶消化, 重悬, 调整浓度 1×10^5 /ml; 下室加入含 10g/dl 胎牛血清 DMEM 完全培养液 $500 \mu\text{l}$, 上室加入细胞悬液 $200 \mu\text{l}$, 培养 24 h; 取出小室, 吸干培养液, 4g/dl 多聚甲醛固定 20 min, 0.1g/dl 结晶紫染色 15 min, PBS 冲洗 2 次, 去除上室多余细胞, 晾干, 倒置显微镜下观察细胞数量。

1.3.6 Western blot 检测 Wnt/ β -catenin 通路关键蛋白表达: 取待测细胞裂解提取总蛋白, BCA 法检测浓度; 取蛋白样品行 SDS-PAGE 电泳分离, 转移到 PVDF 膜, 5g/dl 脱脂奶粉封闭 2 h, PBST 洗膜 2 次, 加入 β -catenin, p-GSK-3 β , c-Myc 一抗 (1:1000) 孵育过夜; 次日洗膜后加入二抗, 室温孵育 2 h, PBST 洗膜 3 次, ECL 化学显色, 凝胶成像系统观察拍照, Image-J 软件行灰度值定量分析。

1.3.7 双荧光素酶报告基因实验: 取各组细胞接种到 6 孔板, 将 GLS1 野生型和突变型 3'UTR 区序列插入双荧光素酶报告基因质粒, 后将包含 miR-203a-3p 结合位点在内的 GLS1-3'UTR-WT 野生型和 3'UTR-Mut 突变型荧光素酶报告质粒与 miR-203a-3p mimic 共染至待测细胞中培养 48 h, 使用荧光素酶活性测定试剂盒检测各组荧光素酶活性, 实验重复三次取平均值。

1.3.8 生物信息学预测分析: 利用 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 网站预测与 miR-203a-3p 存在结合位点的可能靶基因, 并通过双荧光素酶报告基因实验验证两者的结合关系。

1.3.9 谷氨酰胺饥饿实验: 取待测细胞按 1×10^5 个/孔接种在 12 孔板, 待细胞贴壁后, 分别用含/不含谷氨酰胺的 DMEM 培养液培养 0, 2, 4, 6 天并计数, 每隔一天更换一次培养液, 绘制生长曲线, 实验重复三次取平均值。

1.3.10 GLS1 酶活性测定: 采用线粒体提取试剂盒提取分离细胞得到线粒体, 采用两步法进行酶活性检测; 按说明书配制第一步反应液, 将线粒体提取物加入其中, 37°C 旋转孵育 1 h, 加入 HCl 终止反应; 配制第二步反应液, 将其与终止反应的第一步反应液混合, 室温孵育 45 min, 340 nm 处去离子水作为空白, 测定最终吸光度值。

1.3.11 谷氨酰胺代谢检测: ① α -酮戊二酸 (α -Ketoglutaric acid, α -KG) 检测: 取待测细胞制成细胞悬液, 处理去除悬液中存在的各类酶类; 96 孔板每孔加入 $50 \mu\text{l}$ 相应反应混合液, 37°C 避光反应 30 min, 570 nm 处用酶标仪检测各孔吸光度值, 绘制标准曲线, 计算各组 α -KG 含量。②谷氨酸检测: 取待测细胞同样制成细胞悬液, 离心, 吸去上清,

吹打混匀,离心,弃上清液;重悬细胞,计数,超声破碎仪破碎细胞,离心,留取上清待测;按照检测试剂盒说明书检测计算各组细胞中谷氨酸含量。

1.4 统计学分析 采用软件 SPSS 19.0 进行数据分析,数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验;癌组织及癌旁组织中差异比较采用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC 组织及细胞中 miR-203a-3p 表达 qRT-PCR 检测显示,HCC 癌组织中 miR-203a-3p 表达 (0.32 ± 0.07) 明显低于癌旁正常组织 (1.02 ± 0.03),差异有统计学意义 ($t=41.105, P < 0.001$);HCC 细胞 HepG2 (0.34 ± 0.05), HCCLM3 (0.58 ± 0.06), Huh7 (0.43 ± 0.05), Hep3B (0.29 ± 0.04) 中 miR-203a-3p 相对表达水平亦明显低于人正常肝细胞 LO2 (1.01 ± 0.02) 中 miR-203a-3p 表达水平,

表 2 miR-203a-3p 表达对 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	Blank 组	mimic-NC 组	mimic 组	inhibitor-NC 组	inhibitor 组	F	P
增殖 A 值	1.24 \pm 0.06	1.12 \pm 0.04	0.61 \pm 0.05	1.30 \pm 0.03	1.67 \pm 0.07	162.856	< 0.001
迁移率 (%)	60.22 \pm 3.14	57.79 \pm 2.87	21.43 \pm 2.01	62.21 \pm 3.25	85.32 \pm 5.07	135.133	< 0.001
侵袭数目 (个)	221.06 \pm 16.54	219.43 \pm 17.29	76.54 \pm 13.56	224.03 \pm 15.24	352.11 \pm 20.42	101.491	< 0.001

2.3 miR-203a-3p 靶基因的预测及验证 生物信息学数据库检索显示,miR-203a-3p 与 GLS1 3'UTR 区存在结合位点,见图 1。通过构建 GLS1 3'UTR-野生型和突变型质粒,经双荧光素酶基因报告实验验证发现,转染 miR-203a-3p mimic 组 GLS1 3'UTR-WT 型质粒荧光活性较转染 mimic-NC 组明显降低 (0.43 ± 0.05 vs 1.02 ± 0.01),差异有统计学意义 ($t=20.041, P < 0.001$);转染 miR-203a-3p mimic 组 GLS1 3'UTR-Mut 型质粒荧光活性与转染 mimic-NC 组 (0.98 ± 0.03 vs 1.01 ± 0.01) 未见明显变化,差异无统计学意义 ($t=1.643, P=0.176$),表明 GLS1 是 miR-203a-3p 的靶基因。进一步检测发现,miR-203a-3p mimic 组 (0.34 ± 0.08) 中 GLS1 表达较 Blank 组 (1.01 ± 0.02) 明显降低,差异有统计学意义 ($t=14.073, P < 0.001$);敲降

差异有统计学意义 ($F=119.080, P < 0.001$),其中 Hep3B 细胞表达最低,故选择该细胞用于后续实验。

2.2 miR-203a-3p 对 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭的影响 见表 2。qRT-PCR 检测显示,与 Blank 组 (1.01 ± 0.02) 相比,miR-203a-3p 过表达组细胞中 miR-203a-3p 相对表达 (2.32 ± 0.14) 明显升高,miR-203a-3p 低表达组细胞中 miR-203a-3p 相对表达 (0.26 ± 0.05) 明显降低,差异有统计学意义 ($t=16.044, 24.123$, 均 $P < 0.001$),提示过表达/敲降 miR-203a-3p 细胞系构建成功。细胞实验检测显示,miR-203a-3p 过表达组 Hep3B 细胞增殖、迁移率和侵袭能力较对照组明显抑制,组间差异具有统计学意义 ($t=14.849, 13.900, 10.562$, 均 $P < 0.001$);反之敲降 miR-203a-3p 表达组细胞增殖、迁移和侵袭能力明显增加,组间差异具有统计学意义 ($t=10.135, 8.995, 9.577$, 均 $P < 0.001$)。提示 HCC 中 miR-203a-3p 扮演抑癌基因作用。

miR-203a-3p inhibitor 组 (1.96 ± 0.14) 中 GLS1 表达较 Blank 组 (1.01 ± 0.02) 明显升高,差异有统计学意义 ($t=11.635, P < 0.001$),提示 miR-203a-3p 靶向负调控 GLS1 表达。

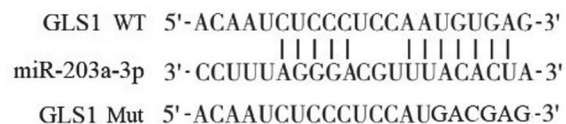


图 1 生物信息学网站检索 miR-203a-3p 的靶基因
 2.4 HCC 细胞对谷氨酰胺的依赖性 见图 2。谷氨酰胺饥饿实验显示,在含谷氨酰胺的培养基中 Hep3B 和 LO2 细胞持续生长,但 LO2 生长缓慢;在不含谷氨酰胺的培养液中 Hep3B 细胞生长明显抑制,LO2 细胞生长不受影响。表明 HCC 细胞对谷氨酰胺存在明显的依赖性。

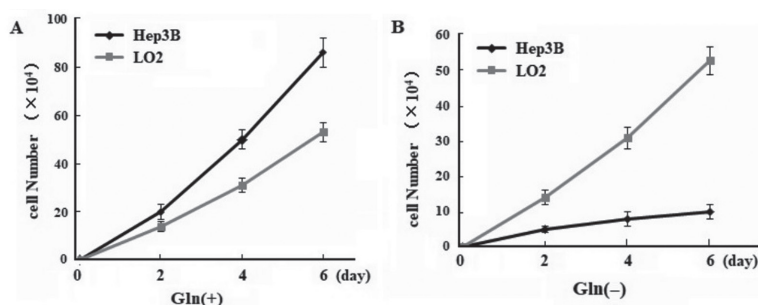


图 2 HCC 细胞对谷氨酰胺的依赖性

2.5 HCC 细胞中 GLS1 表达及活性 qRT-PCR 检测显示, HCC 细胞 HepG2 (2.54 ± 0.04), HCCLM3 (2.02 ± 0.03), Huh7 (1.76 ± 0.05), Hep3B (2.26 ± 0.04) 中 GLS1 相对表达水平明显高于人正常肝细胞 LO2 中 GLS1 表达水平 (1.01 ± 0.01), 差异有统计学意义 ($F=763.254$, $P < 0.001$)。酶活性测定结果显示, HCC 细胞 HepG2 (2.31 ± 0.05), HCCLM3 (1.57 ± 0.03), Huh7 (1.42 ± 0.04), Hep3B (2.25 ± 0.03) 中 GLS1 酶活性明显高于人正常肝细胞 LO2 (1.00 ± 0.01), 差异有统计学意义 ($F=787.125$, $P < 0.001$), 尤以 HepG2、Hep3B 细胞表达最为显著, 表明 HCC 细胞中 GLS1 高表达呈现高酶活性。

2.6 抑制 GLS1 抑制 HCC 细胞谷氨酰胺代谢 qRT-PCR 检测显示, 与 Blank 组 (1.01 ± 0.02) 相比, 转染 siRNA1-GLS1 (0.37 ± 0.06), siRNA2-GLS1 (0.44 ± 0.05) 和 siRNA3-GLS1 (0.21 ± 0.03) 载体组细胞中 GLS1 相对表达明显降低, 差异有统计学

意义 ($F = 197.014$, $P < 0.001$), 其中 siRNA3 组降低最显著。Western blot 实验检测显示, GLS1 抑制组中 GLS1 蛋白 (0.28 ± 0.03) 表达较 Blank 组 (1.00 ± 0.01) 和阴性对照 DMSO 组 (0.98 ± 0.02) 明显降低, 差异有统计学意义 ($F = 1\ 080.857$, $P < 0.001$), 见图 3, 证实 GLS1 表达抑制有效。研究检测各组细胞内谷氨酰胺代谢产物水平发现, 转染 siRNA-GLS1 后, Hep3B 细胞中 α -KG 和谷氨酸水平均较对照组明显降低, 差异有统计学意义 ($t = 10.387, 7.381$, 均 $P < 0.001$), 见表 3。



图3 Western blot 检测加入抑制剂 968 对 GLS1 蛋白表达的影响

表3 抑制 GLS1 对 HCC 细胞谷氨酰胺代谢产物表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	Blank 组	siRNA-NC 组	siRNA 组	F	P
α -KG ($\mu\text{mol/L}$)	12.65 ± 0.76	11.76 ± 0.69	4.73 ± 1.25	64.754	< 0.001
谷氨酸 ($\mu\text{mol/L}/10^6$)	264.35 ± 20.44	262.19 ± 18.79	153.74 ± 15.48	35.627	< 0.001

2.7 miR-203a-3p 靶向 GLS1 对 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭的影响 见表 4。细胞实验检测显示, GLS1 抑制组 Hep3B 细胞增殖、迁移、侵袭能力较对照组明显降低, 差异均有统计学意义 ($t = 16.499, 16.278, 11.215$, 均 $P < 0.001$); 在 miR-

203a-3p inhibitor 组共转染抑制 GLS1 表达后, miR-203a-3p 对 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭的作用被逆转, inhibitor 组、inhibitor+ siRNA 组与 Blank 组比较, 差异均有统计学意义 ($t = 10.371, 16.482, 10.418; 4.950, 13.190, 4.808$, 均 $P < 0.001$)。

表4 miR-203a-3p 调控 GLS1 对 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	Blank 组	siRNA-NC 组	siRNA 组	inhibitor 组	inhibitor+ siRNA 组	F	P
增殖 A 值	1.29 ± 0.07	1.20 ± 0.06	0.59 ± 0.04	1.73 ± 0.05	1.52 ± 0.03	206.033	< 0.001
迁移率 (%)	59.67 ± 1.45	61.03 ± 1.39	30.15 ± 1.02	89.56 ± 3.53	65.64 ± 2.67	272.221	< 0.001
侵袭数目 (个)	202.14 ± 13.52	201.01 ± 12.79	69.59 ± 15.74	325.26 ± 14.57	268.44 ± 15.53	130.670	< 0.001

2.8 miR-203a-3p 靶向 GLS1 对 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白的影响 Western blot 检测显示, miR-203a-3 过表达组和 GLS1 抑制组 β -catenin, p-GSK-3 β , c-Myc 蛋白表达水平较对照组明显降低, 差异有统计学意义 ($t = 14.184, 25.828, 22.323; 11.129, 28.213, 22.961$, 均 $P < 0.001$); GLS1 抑制组 β -catenin, p-GSK-3 β , c-Myc 蛋白表达水平较 siRNA+ inhibitor 组明显降低, 差异有统计学意义 ($t = 9.602, 18.676, 16.902$, 均 $P < 0.001$)。在抑制 GLS1 表达组共转染 miR-203a-3p inhibitor 后, Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白表达水平被逆转恢复, 见图 4 和表 5, 说明 miR-203a-3p 通过靶向 GLS1 调控 Wnt/ β -catenin 信号通

路活性参与 HCC 的发生发展。

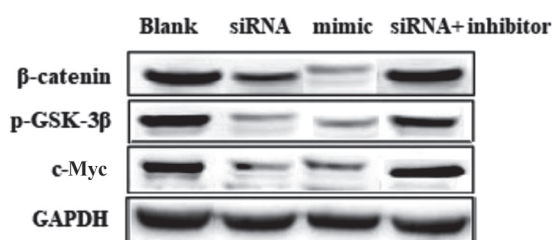


图4 miR-203a-3p 和 GLS1 对 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白的影响

3 讨论

近年发现, 多种非编码 RNA 在疾病的发生发展中具有重要调控作用, 得到临床广泛关注^[2-3]。

研究表明, miRNA 主要参与基因转录后水平, 可通过多种方式和途径调节细胞的分化、代谢及侵袭转移等过程^[3]。不同 miRNAs 在不同肿瘤中的表达调控作用及调控的下游靶基因也不同, 既可以发挥

原癌基因作用, 也可发挥抑癌基因作用, 进而影响不同信号通路的激活或抑制, 参与调节疾病的发生, 是新的肿瘤分子标记物及治疗靶点^[10]。

表 5 miR-203a-3p 调控 GLS1 对 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	Blank 组	GLS1 抑制组	miR-203a-3 过表达组	siRNA+ inhibitor 组	F	P
β -catenin	0.92 \pm 0.04	0.41 \pm 0.06	0.27 \pm 0.05	0.85 \pm 0.07	98.183	< 0.001
p-GSK-3 β	0.87 \pm 0.03	0.16 \pm 0.02	0.22 \pm 0.03	0.63 \pm 0.04	362.316	< 0.001
c-Myc	0.90 \pm 0.03	0.18 \pm 0.04	0.20 \pm 0.03	0.71 \pm 0.05	268.797	< 0.001

研究表明, miR-203a-3p 在多种肿瘤中表达下调, 被认为是肿瘤抑制因子。如研究报道, 胃癌中 miR-203a-3p 靶向胰岛素样生长因子 1 受体 (IGF-1R) 发挥抑癌作用, 参与调控了胃癌细胞的增殖及细胞周期^[4]。MiR-203a-3p 通过调节 SLUG 抑制胰腺癌细胞增殖、上皮细胞-间充质转化 (EMT) 和凋亡^[6]。MiR-203a-3p 通过靶向 ATM 介导 Akt/GSK-3 β /Snail 信号通路, 调控卵巢癌细胞的增殖、迁移、凋亡等生物学行为^[11]。结直肠癌^[12]、非小细胞肺癌 (NSCLC)^[5] 等肿瘤细胞中也发现 miR-203a-3p 表达异常, 参与了疾病的发生发展, 表现出原癌或抑癌基因属性。本研究发现, HCC 组织、细胞中 miR-203a-3p 表达下调, 细胞实验发现 miR-203a-3p 过表达能够抑制 HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭, 提示 miR-203a-3p 发挥抑癌基因作用, 与陈昶舟等^[13] 研究结果一致。

研究利用生物信息学分析证实 GLS1 是 miR-203a-3p 的目标靶基因, miR-203a-3p 靶向负调控 GLS1。研究表明, 基因改变、能量代谢变化及局部微环境改变对肿瘤的发生发展至关重要^[14]。对细胞能量代谢的研究表明, 谷氨酰胺和葡萄糖是肿瘤的主要能量来源, 癌细胞能量代谢除了表现出 Warburg 效应外, 细胞对谷氨酰胺的利用速度远超过于其他氨基酸, 提示谷氨酰胺依赖是肿瘤细胞能量代谢的关键^[14]。并有研究指出, 谷氨酰胺代谢过程中, 谷氨酰胺通过谷氨酰胺酶催化转化为谷氨酸, 谷氨酸在转氨酶作用下又转化生成 α -酮戊二酸 (α -KG)、谷胱甘肽等重要生化代谢中间产物, 为肿瘤细胞提供能量, 降低活性氧 (ROS) 水平, 维持细胞氧化还原^[15]。谷氨酰胺酶表达下调时细胞氧耗减少, 相关性 ATP 及谷胱甘肽水平下降, ROS 水平增高, 细胞凋亡增加^[16]。多种肿瘤细胞内谷氨酰胺代谢异常, 谷氨酰胺酶在谷氨酰胺代谢过程中至关重要^[17]。另有研究报道, GLS1 催化谷氨酰胺转化介导肿瘤细胞能量代谢, 参与了多种肿瘤的 EMT 及侵袭、耐药^[17]。GLS1 通过降低 ROS 水平调节细胞抗氧化防御, 维持了细胞的氧化还原稳定

性^[18]。MiR-23a 通过靶向 GLS1 可调控 H₂O₂ 诱导的视网膜色素上皮细胞的增殖和迁移^[19]。而本研究发现, HCC 细胞生长对谷氨酰胺高度依赖, HCC 细胞中 GLS1 高表达呈现高酶活性, 抑制 GLS1 表达后谷氨酰胺代谢抑制, 提示 GLS1 高酶活性表达, 细胞谷氨酰胺代谢增强, 促进了 HCC 细胞的生长及恶性进展。同时还发现, 抑制 GLS1 表达后 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭能力被抑制, GLS1 能够逆转 miR-203a-3p 对 HCC 细胞生物学的作用, 提示 miR-203a-3p 可通过靶向 GLS1 参与调节 HCC 细胞的生物学行为, 由 GLS1 介导的谷氨酰胺依赖可能是 HCC 的潜在治疗靶点。

相关信号通路的激活或失活是肿瘤基因发挥作用的重要途径, Wnt/ β -catenin 信号通路参与调控细胞的生长、分化及凋亡, 其失调被认为是引起人类恶性肿瘤发生进展的启动因素^[20]。现有研究表明, 谷氨酰胺能激活重要的信号转导通路, 介导维持细胞的存活和增殖, 参与调控肿瘤的发生、转移及耐药, 发现 Wnt/ β -catenin 信号通路可以介导调节肿瘤细胞代谢, 影响 ROS 表达调节, 参与肿瘤进展^[21-22]。Wnt 通路相关 Myc 基因异位表达能增加谷氨酰胺酶的表达, 促进细胞谷氨酰胺代谢, 促进肿瘤细胞对谷氨酰胺的依赖性^[9]。此外, ZHAO 等^[24] 研究报道, 肾癌中 c-Myc 通过增强 GLS1 表达可促进谷氨酰胺降解; QING 等^[25] 研究也表明, 神经母细胞瘤中 ATF4 调节 Myc 介导肿瘤细胞谷氨酰胺剥夺, 促进细胞死亡。基于此本研究经探究 miR-203a-3p 调控 GLS1 对 Wnt/ β -catenin 通路活性的影响, 显示 miR-203a-3 过表达和抑制 GLS1 表达均能使 Wnt/ β -catenin 通路失活, 而 miR-203a-3p 低表达能够逆转 GLS1 对该通路的抑制作用。本研究结果表明, miR-203a-3p 可能通过靶向 GLS1 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路活性参与 HCC 的发生发展。然肿瘤发生发展的作用机制复杂, miR-203a-3p 靶向 GLS1 调控 HCC 发生进展的分子作用还需进一步继续探究。

综上所述, MiR-203a-3p 过表达能够抑制 HCC

细胞的增殖、迁移和侵袭,可能与GLS1调控细胞内谷氨酰胺代谢及miR-203a-3p靶向GLS1调控Wnt/ β -catenin信号通路活性有关。

参考文献:

- [1] O'ROURKE C, JAYARAMAN S, EL-MARAGHI R H, et al. Chronic liver disease and Liver Cancer[J]. Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America, 2021, 29(3): 269-278.
- [2] 吴良银, 李文丽, 刘俊. 基于GEO数据的病毒相关性肝癌潜在生物标志物的筛选及生物信息学分析[J]. 现代检验医学杂志, 2021, 36(6): 106-110.
WU Liangyin, LI Wenli, LIU Jun. Screening and bioinformatics analysis of potential biomarkers for virus-associated Hepatocellular Carcinoma based on GEO data [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021, 36(6): 106-110.
- [3] AGHAEE-BAKHTIARI S H, AREFIAN E, LAU P. MiRandb: A resource of online services for miRNA research[J]. Brief Bioinform, 2018, 19(2): 254-262.
- [4] WANG Zhenzhen, ZHAO Zhenghao, YANG Yang, et al. MiR-99b-5p and miR-203a-3p function as tumor suppressors by targeting IGF-1R in Gastric Cancer[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 10119.
- [5] 张海生, 黄河, 徐震. 微小RNA-203a-3p下调Mink相关肽1基因表达抑制非小细胞肺癌细胞转移潜能的实验研究[J]. 安徽医药, 2021, 25(10): 2080-2085.
ZHANG Haisheng, HUANG He, XU Zhen. MicroRNA-203a-3p (miR-203a-3p) down-regulates the expression of Mink-related peptide 1 (KCNE2) gene to inhibit the metastasis potential of non-small cell lung cancer cells [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2021, 25(10): 2080-2085.
- [6] AN Ning, ZHENG Bo. MiR-203a-3p inhibits pancreatic cancer cell proliferation, EMT, and apoptosis by regulating SLUG[J]. Technology in Cancer Research & Treatment, 2020, 19(19): 1533033819898729.
- [7] HAN Chunlei. Glutamine metabolism: A new target pathway for PET imaging and cancer therapy[J]. Journal of Nutritional Oncology, 2019, 4(2): 54-58.
- [8] 姜洪丽, 蒋学阳, 汤同中, 等. 干预肿瘤代谢的新策略: 氨基酸代谢的调控途径及其药物研究进展[J]. 药理学学报, 2019, 54(3): 407-419.
JIANG Hongli, JIANG Xueyang, TANG Tongzhong, et al. A new strategy to intervene tumor metabolism: Regulatory targets for amino acid metabolism and advances in drug research [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2019, 54(3): 407-419.
- [9] 陈松耀, 陈创奇, 程吕佳, 等. 结直肠癌与肿瘤能量代谢谷氨酰胺旁途径调控进展研究[J]. 消化肿瘤杂志(电子版), 2018, 10(3): 140-143.
CHEN Songyao, CHEN Chuangqi, CHENG Lujia, et al. Research progress in regulation of glutamine metabolism pathway in Colorectal Cancer [J]. Journal of Digestive Oncology (Electronic Version), 2018, 10(3): 140-143.
- [10] EBRAHIMI S, HASHEMY S I. MicroRNA-mediated redox regulation modulates therapy resistance in cancer cells: clinical perspectives[J]. Cellular Oncology (Dordrecht), 2019, 42(2): 131-141.
- [11] LIU Hongyun, ZHANG Yuying, ZHU Baolian, et al. MiR-203a-3p regulates the biological behaviors of Ovarian Cancer cells through mediating the Akt/GSK-3 β /Snail signaling pathway by targeting ATM[J]. Journal of Ovarian Research, 2019, 12(1): 60.
- [12] XIAO Zhigang, QU Zhan, CHEN Zhikang, et al. LncRNA HOTAIR is a prognostic biomarker for the proliferation and chemoresistance of Colorectal Cancer via miR-203a-3p-mediated Wnt/-Catenin signaling pathway[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 46(3): 1275-1285.
- [13] 陈昶舟, 赵海潮, 付西峰, 等. MiR-203-3p在肝癌细胞中的表达及其对细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(18): 3133-3138.
CHEN Changzhou, ZHAO Haichao, FU Xifeng, et al. The expression of miR-203-3p in Hepatocellular Carcinoma cells and the effects of cell proliferation, migration and invasion [J]. Journal of Modern Oncology, 2021, 29(18): 3133-3138.
- [14] STEINBERG G R. Cellular energy sensing and metabolism-implications for treating diabetes: the 2017 outstanding scientific achievement award lecture[J]. Diabetes, 2018, 67(2): 169-179.
- [15] 徐晓霞, 朱华, 杨志. 肿瘤谷氨酰胺代谢变化及诊疗新靶点[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(17): 1306-1310.
XU Xiaoxia, ZHU Hua, YANG Zhi. Altered glutamine metabolism and therapeutic opportunities for cancer [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2019, 26(17): 1306-1310.
- [16] 杨扬, 刘楠. 谷氨酰胺代谢与肿瘤治疗[J]. 药物生物技术, 2019, 26(4): 362-366.
YANG Yang, LIU Nan. Glutamine metabolism and tumor therapy [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2019, 26(4): 362-366.
- [17] CHEN Ping, LIU Xiqiao, LIN Xiang, et al. Targeting YTHDF1 effectively re-sensitizes cisplatin-resistant colon cancer cells by modulating GLS-mediated glutamine metabolism[J]. Molecular Therapy Oncolytics, 2021, 20: 228-239.
- [18] MIAO Yumeng, ZHENG Yun, GENG Yanzhi, et al. The role of GLS1-mediated glutaminolysis/2-HG/H3K4me3 and GSH/ROS signals in Th17 responses counteracted by PPAR γ agonists[J]. Theranostics, 2021, 11(9): 4531-4548.
- [19] 田蕴霖, 周歆, 白淑玮, 等. miR-23a通过靶向GLS1调控H₂O₂诱导的视网膜色素上皮细胞增殖、迁移[J]. 解剖科学进展, 2021, 27(1): 119-124, 128.
TIAN Yunlin, ZHOU Xin, BAI Shuwei, et al. MiR-23a regulates H₂O₂ induced proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells via targeting GLS1 [J]. Progress of Anatomical Sciences, 2021, 27(1): 119-124, 128.
- [20] 丁界先, 张津, 陈永刚, 等. Wnt信号通路与肿瘤发生的研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2019, 33(1): 73-77.

- L, et al. Overview upon miR-21 in lung cancer: focus on NSCLC [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2018, 75(19): 3539-3551.
- [5] DEHDASHTIAN E, TABATABAEIAN H, GHAEDI K, et al. *A. H. pylori*-independent miR-21 overexpression in gastric cancer patients[J]. Gene Reports, 2019, 17:100528.
- [6] TUSONG H, MAOIAKUERBAN N, GUAN Jin, et al. Functional analysis of serum microRNAs miR-21 and miR-106a in renal cell carcinoma [J]. Cancer Biomarkers, 2017, 18(1): 79-85.
- [7] 郝谦, 吴慧琴, 杨捍卫. microRNA-21 对急性心肌梗死早期诊断及短期预后判断的价值 [J]. 西部医学, 2018, 30(9):1356-1360.
- HAO Qian, WU Huiqin, YANG Hanwei. Value of plasma microRNA-21 in the early diagnosis and short-term prognosis of acute myocardial infarction[J]. Medicine Journal of West China, 2018, 30(9): 1356-1360.
- [8] WANG Xinzhen, HANG Yakai, LIU Jinbiao, et al. Anticancer effect of curcumin inhibits cell growth through miR-21/PTEN/Akt pathway in breast cancer cell[J]. Oncology letters, 2017, 13(6): 4825-4831.
- [9] CHAPMAN A R, ANAND A, BOEDDINGHAUS J, et al. Comparison of the efficacy and safety of early rule-out pathways for acute myocardial infarction.[J]. Circulation, 2017, 135(17): 1586-1596.
- [10] HENNING R J. Cardiovascular exosomes and microRNAs in cardiovascular physiology and pathophysiology [J]. Journal of Cardiovascular Translational Research, 2020, 14(2): 195-212.
- [11] WANG Lirong, JIA Qiuji, CHEN Xinnong et al. Role of cardiac progenitor cell derived exosome mediated microRNA-210 in cardiovascular disease[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2019, 23(11):7124-7131.
- [12] KHAN M, NICKOLOFF E, ABRAMOV T, et al. Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction[J]. Circulation Research, 2015, 117(1):52-64.
- [13] HOU Zuoxu, QIN Xinghua, HU Yuanyuan, et al. Longterm exercise-derived exosomal miR-342-5p: A novel exerkine for cardioprotection[J]. Circulation Research, 2019, 124(9): 1386-1400.
- [14] 蒲双双, 李金星. 外泌体在疾病实验诊断和临床治疗中的研究进展 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(4): 160-164.
- PU Shuangshuang, LI Jinxing. Research progress of exosomes in the laboratory diagnosis and clinical treatment of disease[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(4): 160-164.
- [15] LIU Lingzhi, LI Chongyong, CHEN Qi, et al. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression [J]. PLoS One, 2017, 6 (4): 19139.
- [16] ZHOU Xueliang, XU Hua, LIU Zhibo, et al. MiR-21 promotes cardiac fibroblast-to-myofibroblast transformation and myocardial fibrosis by targeting Jagged1[J]. Journal of Cellular & Molecular Medicine, 2018, 22(8):3816-3824.
- [17] CHEN C H, HSU S Y, CHIU C C, et al. MicroRNA-21 mediates the protective effect of cardiomyocyte-derived conditioned medium on ameliorating myocardial infarction in rats[J]. Cells, 2019, 8(8): 935.
- [18] TELKOPARAN-AKILLILAR P, CEVIK D. Identification of miR-17, miR-21, miR-27a, miR-106b and miR-222 as endoplasmic reticulum stress-related potential biomarkers in circulation of patients with atherosclerosis[J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(4):3503-3513.
- [19] GHAFOURI-FARD S, ABAK A, SHOOREI H, et al. Regulatory role of microRNAs on PTEN signaling[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 133: 110986.
- [20] YU Haiying, QI Ningning, ZHOU Qingxia. LncRNA H19 inhibits proliferation and migration of airway smooth muscle cells induced by PDGF-BB through miR-21/PTEN/Akt axis[J]. Journal of Asthma and Allergy, 2021, 14(1): 71-80.
- [21] WU Yanran, QI Haijun, DENG Danfang, et al. MicroRNA-21 promotes cell proliferation, migration, and resistance to apoptosis through PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in esophageal cancer[J]. Tumor Biology, 2016, 37(9):12061-12070.
- [22] PAN J, LING Y, SHANG W, et al. Uric acid promotes cardiomyocyte apoptosis through regulating microRNA-21/PTEN/AKT/eNOS axis in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2017, 10(4): 6303-6312.
- 收稿日期: 2022-03-09
修回日期: 2022-08-03

(上接第92页)

- DING Jiexian, ZHANG Jin, CHEN Yonggang, et al. Progress in Wnt signaling pathway and tumorigenesis [J]. Practical Oncology Journal, 2019, 33(1):73-77.
- [21] 蔡礼仲, 全进毅. 谷氨酰胺代谢与卵巢癌侵袭性、耐药性的关系 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, 36(1):93-96.
- CAI Lizhong, TONG Jinyi. Relationship between glutamine metabolism and aggressiveness and drug resistance of Ovarian Cancer[J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2020, 36(1):93-96.
- [22] ERLYKINA E I. A new glance on energy metabolism investigation in cultured cells[J]. Biological Sciences and Medicine(English), 2020, 8(8): 11.
- [23] 刘雅惠, 高露, 王亚菁, 等. c-Myc 调控肿瘤代谢作用机制的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(3): 379-386.
- LIU Yahui, GAO Lu, WANG Yajing, et al. Advances in the research on mechanism of tumor metabolism regulated by c-Myc [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2021, 52(3):379-386.
- [24] ZHAO Junzhang, ZHOU Rui, HUI Kaiyuan, et al. Selenite inhibits glutamine metabolism and induces apoptosis by regulating GLS1 protein degradation via APC/C-CDH1 pathway in Colorectal Cancer cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(12): 18832-18847.
- [25] QING Guoliang, LI Bo, VU A, et al. ATF4 regulates MYC-mediated neuroblastoma cell death upon glutamine deprivation[J]. Cancer Cell, 2012, 22(5): 631-644.
- 收稿日期: 2021-12-29
修回日期: 2022-06-07