

## 论著·基础研究

## 分选链接蛋白1在胰腺导管腺癌中的表达及其促进胰腺导管腺癌进展的机制研究

潘 泓, 廖颖娜, 盖严支, 钱立恒, 聂惠贞

上海交通大学医学院附属仁济医院上海市肿瘤研究所, 癌基因及相关基因国家重点实验室, 上海 200240

**[摘要]** **目的**·探究分选链接蛋白1 (sorting nexin 1, SNX1) 在胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 发生和发展过程中表达水平的变化, 及其对PDAC细胞增殖、迁移、凋亡和巨胞饮的影响, 并分析其促进PDAC进展的分子机制。 **方法**·分别在癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库和基因型-组织表达 (Genotype-Tissue Expression, GTEx) 数据库、基因表达综合 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库中的GSE15471数据集分析SNX1 mRNA在PDAC及正常胰腺组织中的表达量变化。采用免疫组织化学染色 (immunohistochemistry staining, IHC) 检测PDAC患者的癌组织及癌旁组织中SNX1的表达变化。利用实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 和蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测SNX1在hTERT-HPNE细胞及PDAC细胞中的表达水平。分别采用CCK8实验、平板克隆形成实验、划痕实验和流式细胞术检测由转染siRNA引起SNX1下调导致的AsPC-1、Capan-1细胞的增殖能力、迁移能力、凋亡水平的变化。构建稳定敲除SNX1的Capan-1细胞株, 使用裸鼠皮下成瘤实验检测下调SNX1对细胞在裸鼠体内增殖能力的影响。利用免疫荧光染色 (immunofluorescence, IF) 确定SNX1在PDAC细胞中的分布, 并用四甲基罗丹明-葡聚糖 (TMR-dextran) 检测由转染siRNA引起SNX1下调导致的AsPC-1、Capan-1细胞巨胞饮水平的变化。利用基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) 软件预测与SNX1相关的信号通路, 并选取转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 通路进行后续分析及实验验证。构建稳定过表达SNX1的Capan-1、AsPC-1细胞株, 使用TGF- $\beta$ 通路抑制剂氧化苦参碱 (oxymatrine, Oxy) 处理上述过表达细胞, 并采用CCK8实验、平板克隆形成实验、划痕实验、流式细胞术和TMR-dextran检测Oxy处理对过表达SNX1引起的细胞的增殖、迁移、凋亡、巨胞饮水平变化的影响。 **结果**·TCGA和GTEx数据库的合并分析的结果显示SNX1 mRNA在PDAC组织中的表达高于正常胰腺组织, GSE15471数据集分析的结果显示SNX1 mRNA在PDAC组织中的表达高于癌旁组织 (均 $P=0.000$ )。IHC的结果显示SNX1在PDAC患者的癌组织中的表达亦高于癌旁组织。qPCR和Western blotting的结果显示, 与hTERT-HPNE细胞相比, SNX1在PDAC细胞中的mRNA、蛋白水平均有上调 (均 $P<0.05$ )。下调SNX1能够抑制AsPC-1、Capan-1细胞的增殖、迁移能力, 下调其巨胞饮水平, 促进其凋亡; 过表达SNX1则可产生相反的结果。同时, 敲除SNX1能够抑制Capan-1细胞在裸鼠体内的增殖能力。IF的结果显示SNX1在PDAC细胞中与溶酶体存在共定位。GSEA的结果显示, SNX1的表达与细胞凋亡、三羧酸循环、TGF- $\beta$ 和磷脂酰肌醇3-激酶-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路相关; 在PDAC细胞中下调SNX1能够抑制TGF- $\beta$ 信号通路的激活, 过表达SNX1则可促进该通路的激活, 且加入该通路抑制剂可抑制由过表达SNX1引起的细胞表型变化。 **结论**·SNX1在PDAC细胞和组织中高表达, 其可通过激活TGF- $\beta$ 信号通路增强PDAC细胞的增殖、迁移能力和巨胞饮水平, 并抑制其凋亡。

**[关键词]** 胰腺导管腺癌; 分选链接蛋白1; 巨胞饮; 转化生长因子- $\beta$ 信号通路**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.03.003 **[中图分类号]** R735.9 **[文献标志码]** A

## Expression of sorting nexin 1 in pancreatic ductal adenocarcinoma and its mechanism in promoting PDAC progress

PAN Hong, LIAO Yingna, GAI Yanzhi, QIAN Liheng, NIE Huizhen

State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200240, China

**[基金项目]** 上海市自然科学基金 (21ZR1461400)。**[作者简介]** 潘 泓 (1998—), 男, 硕士生; 电子信箱: panhong123@sjtu.edu.cn。**[通信作者]** 聂惠贞, 电子信箱: hznice@shsci.org。**[Funding Information]** Natural Science Foundation of Shanghai (21ZR1461400)。**[Corresponding Author]** NIE Huizhen, E-mail: hznice@shsci.org。

**[Abstract] Objective** To explore the expression changes of sorting nexin 1 (SNX1) in the occurrence and development of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and its effect on the proliferation, migration, apoptosis and micropinocytosis of PDAC cells, and analyze its molecular mechanism to promote the progression of PDAC. **Methods** The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx) database and the GSE15471 dataset in Gene Expression Omnibus (GEO) database were used to analyze the *SNX1* mRNA expression in PDAC and normal pancreas tissues. Immunohistochemistry staining (IHC) was used to detect the *SNX1* expression in PDAC and para-carcinoma tissues. The mRNA and protein levels of *SNX1* in hTERT-HPNE cells and PDAC cells were detected by quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blotting. CCK8 method, plate clonal formation experiment, cell scratch assays and flow cytometry (FCM) were used to detect changes of the proliferation, migration and apoptosis levels in AsPC-1 and Capan-1 cells caused by transfection siRNAs. Capan-1 cell line with stable knockdown of *SNX1* was constructed, and the subcutaneous tumorigenesis experiment in nude mice was performed to detect the effect of *SNX1* knockdown on the proliferation capacity of cells in nude mice. Immunofluorescence (IF) was used to determine the distribution of *SNX1* in PDAC cells, and TMR-dextran was used to detect the changes of macropinocytosis levels of AsPC-1 and Capan-1 cells induced by transfection siRNAs. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was performed to predict *SNX1* related signaling pathways. The transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling pathway was selected for subsequent analysis and experimental verification. Capan-1 and AsPC-1 cell lines with stable overexpression of *SNX1* were constructed and treated with TGF- $\beta$  signaling pathway inhibitor Oxymatrine (Oxy). CCK8 method, plate clonal formation experiment, cell scratch assays, FCM and TMR-dextran were used to detect the effects of Oxy treatment on the changes of the proliferation, migration, apoptosis and macropinocytosis levels of the cells caused by *SNX1* overexpression. **Results** The results of combined analysis of TCGA and GTEx databases showed that the expression of *SNX1* mRNA in PDAC tissues was higher than that in normal pancreas tissues, and the results of GSE15471 dataset analysis showed that the expression of *SNX1* mRNA in PDAC tissues was higher than that in para-carcinoma tissues (both  $P=0.000$ ). IHC results showed that the expression of *SNX1* in cancer tissues of PDAC patients was also higher than that in para-carcinoma tissues. qPCR and Western blotting results showed that compared with hTERT-HPNE cells, the mRNA and protein levels of *SNX1* in PDAC cells were up-regulated (all  $P<0.05$ ). *SNX1* knockdown could inhibit the proliferation and migration capacity of PDAC cells, down-regulate the macropinocytosis levels of PDAC cells, and promote their apoptosis. On the contrary, *SNX1* overexpression led to opposite phenotype. Meanwhile, *SNX1* knockdown could inhibit the proliferation capacity of Capan-1 cells in nude mice. IF results showed that *SNX1* was colocalized with lysosomes in PDAC cells. GSEA analysis demonstrated that *SNX1* expression was correlated with apoptosis, tricarboxylic acid cycle, TGF- $\beta$  and phosphoinositide 3-kinase-serine/threonine-protein kinase-mammalian target of rapamycin signaling pathway. *SNX1* knockdown in PDAC cells could inhibit the activation of TGF- $\beta$  signaling pathway, *SNX1* overexpression could promote this pathway, and TGF- $\beta$  signaling pathway inhibitor Oxy could inhibit the phenotypic changes caused by *SNX1* overexpression. **Conclusion** *SNX1* is highly expressed in PDAC cells and tissues. *SNX1* promotes the proliferation, migration capacity and macropinocytosis levels, and inhibits cell apoptosis by activating the TGF- $\beta$  signaling pathway in PDAC cells.

**[Key words]** pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC); sorting nexin 1 (SNX1); macropinocytosis; transforming growth factor- $\beta$  signaling pathway

胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 是胰腺癌的主要类型, 其患者的5年生存率低于10%<sup>[1]</sup>。肥胖、吸烟和2型糖尿病等危险因素与PDAC的发生、发展过程密切相关。在PDAC细胞中, 最常发生突变的有癌基因如Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (Kirsten rats arcomaviral oncogene homolog, *KRAS*) 和抑癌基因如细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A, *CDKN2A*)、肿瘤抑制基因 p53 (tumor suppressor gene p53, *TP53*)、SMAD家族成员4 (SMAD family member 4, *SMAD4/DPC4*) 等<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>显示, PDAC组织较为致密, 其细胞被丰富的成纤维间质包围, 该成纤维间质可产生机械屏障, 阻止血管形成并导致免疫细胞浸润不良, 从而使PDAC对传统的化学治疗 (化疗) 和放射治疗 (放疗) 产生很强的抵抗。目前, 有关PDAC发生、发展中关键的分子机制尚未被阐明, 使得探索该疾病进程中的关键因子、寻找治

疗的新靶点十分必要。

分选链接蛋白 (sorting nexins, SNXs) 是一类含有吞噬细胞氧化酶同源性结构域的蛋白的统称, 在哺乳动物中有33个成员<sup>[4]</sup>。SNXs在细胞内吞、蛋白分选、细胞信号转导、膜运输、膜重塑和细胞器运动等方面均发挥了重要作用。SNX1是首个被发现的SNXs家族成员, 体外实验显示其过表达可抑制胃癌细胞的生长、迁移及侵袭, 促进细胞凋亡, 并能够增强胃癌细胞对化疗药物5-氟尿嘧啶的敏感性<sup>[5]</sup>。

巨胞饮 (macropinocytosis) 是一种内体大于0.2  $\mu\text{m}$ 、非网格蛋白依赖的胞饮方式, 可以非选择性地吞噬细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 成分<sup>[6]</sup>。早期, 有关巨胞饮的研究主要集中在巨噬细胞和原核生物中<sup>[7]</sup>。2013年有研究<sup>[8]</sup>发现, 具有RAS突变的胰腺癌细胞能够以巨胞饮的方式摄取细胞外蛋白进入胞内, 降解为氨基酸后参与三羧酸

(tricarboxylic acid cycle, TCA) 循环。由于胰腺癌具有基质致密、营养缺乏的特性<sup>[9]</sup>, PDAC细胞以巨胞饮的方式摄取ECM成分作为营养来支持自身生长, 是一种极其重要的细胞生命活动方式<sup>[10]</sup>。同时, 巨胞饮也可作为一种高效的药物递送方式, 如将纳米白蛋白结合的紫杉醇(化疗药物)送至PDAC细胞内, 实现药物更为高效的利用<sup>[11]</sup>。基于此, 本研究结合生物信息学分析, 检测SNX1在PDAC及癌旁组织中的表达, 通过体外功能实验验证SNX1对PDAC细胞的增殖能力、迁移能力、巨胞饮水平、细胞凋亡的影响并探讨其分子机制, 从而为SNX1作为PDAC的治疗靶标提供理论依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 数据收集和分析

从UCSC Xena数据平台(<https://xenabrowser.net/datapages/>)下载癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中的PDAC患者的癌组织和正常胰腺组织的转录组测序数据; 下载基因型-组织表达(Genotype-Tissue Expression, GTEx)数据库中的正常胰腺组织转录组测序数据, 分析SNX1 mRNA在PDAC组织和正常胰腺组织中的表达; 下载PDAC患者的临床病理信息, 包括肿瘤大小、TNM分期、肿瘤异型性分级, 分析SNX1 mRNA表达与该病理信息的相关性。从基因表达综合(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库中下载GSE15471数据集的转录组测序数据, 分析SNX1 mRNA在PDAC和癌旁组织中的表达。

### 1.2 标本收集

选择2021年9—12月上海交通大学医学院附属仁济医院的5例PDAC手术患者, 从其癌组织、癌旁组织中获取标本, 并保存于4%多聚甲醛中。

### 1.3 实验动物、细胞、主要试剂及仪器

7周龄SPF级雄性BALB/c裸鼠10只购买于上海杰思捷实验动物有限公司, 动物生产许可证为SCXK(沪)2018-0004, 体质量为20~25 g。上述裸鼠饲养于华东师范大学实验动物中心的标准笼中, 使用许可证SYXK(沪)2018-0028。于25℃、湿度50%~60%、12 h明暗交替、噪声<60 dB条件下, 小鼠自由

进食、饮水。

PDAC细胞系AsPC-1、Capan-1、PANC-1、MIA PaCa-2及胰腺导管上皮细胞hTERT-HPNE均购自美国模式菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), HEK293T细胞为本实验室保存。

DMEM培养液、RPMI 1640培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青霉素-链霉素双抗(Gibco, 美国)、四甲基罗丹明-葡聚糖(TMR-dextran)、细胞核染料DAPI(Sigma, 德国)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠/兔IgG(二抗)、Alexa Fluor 488/594标记的山羊抗小鼠/兔IgG(H+L)(上海圣尔生物科技有限公司), SNX1抗体、 $\beta$ -actin抗体、溶酶体相关膜蛋白1(lysosome-associated membrane protein 1, LAMP1)抗体、转化生长因子- $\beta$ 受体2(transforming growth factor- $\beta$  receptor 2, TGFBR2)抗体(Proteintech, 美国), SMAD2抗体、磷酸化SMAD2(phospho-SMAD2, p-SMAD2)抗体、SMAD3抗体、p-SMAD3抗体(Cell Signaling Technology, 美国), 氧化苦参碱(Oxymatrine, Oxy)(MedChemExpress, 美国)。实时荧光定量PCR仪(ABI, 美国), 激光共聚焦显微镜、Aperio数字病理学切片扫描仪(Leica, 德国), 流式细胞仪(BD, 美国), 化学发光成像仪(Bio-Rad, 美国)。

### 1.4 细胞培养及siRNA转染

遵循ATCC的细胞培养标准, 于37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱中, 采用含10%FBS、1%青霉素-链霉素双抗的DMEM培养液培养hTERT-HPNE、Capan-1、PANC-1、MIA PaCa-2、HEK293T细胞, 采用含10%FBS、1%青霉素-链霉素双抗的RPMI 1640培养液培养AsPC-1细胞。每隔2~3 d传代1次, 取对数生长期的细胞进行后续实验。

分别将AsPC-1、Capan-1细胞均匀接种在6孔板中, 待细胞生长到60%~70%融合度时, 使用jetPRIME<sup>®</sup>转染试剂按照其说明书步骤进行瞬时转染, 即分别将NC-siRNA、SNX1-siRNA1、SNX1-siRNA2转染至上述2种细胞中, 于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养12 h后更换培养液继续培养, 经蛋白质印迹法(Western blotting)验证后用于后续研究。其中, 用于转染的siRNA由上海吉玛制药技术有限公司合成, 序列信息见表1。



表1 siRNA序列

Tab 1 Sequences of siRNA

siRNA	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
NC-siRNA	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
<i>SNX1</i> -siRNA1	GAGGAUCAAUUUGAUUUGATT	TTCUCCUAGUUAACUAAACU
<i>SNX1</i> -siRNA2	CAGGCCAACAAUGACUUCUTT	TTGUCCGUUGUUACUGAAGA

### 1.5 细胞中SNX1表达量检测

分别提取野生型hTERT-HPNE、AsPC-1、Capan-1、PANC-1、MIA PaCa-2细胞的总RNA,反转录成cDNA后行实时荧光定量PCR (quantitative real-time

PCR, qPCR) 检测,具体反应条件参照说明书。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算*SNX1*的相对mRNA表达水平,以18s为内参。引物序列见表2。

表2 qPCR引物序列

Tab 2 Primer sequences for qPCR

Primer	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
18s	TGCGAGTACTCAACACCAACA	GCATATCTTCGGCCCAACA
<i>SNX1</i>	AAGCACTCTCAGAATGGCTTC	CGGCCCTCCGTTTTTCAAG

采用Western blotting检测上述5种细胞中SNX1的表达。分别制备细胞的蛋白悬液,按照说明书进行电泳、转膜、封闭、一抗和二抗孵育,最后用化学发光成像仪进行成像。其中,一抗为 $\beta$ -actin、SNX1抗体(稀释比例均为1:1 000),HRP标记的二抗稀释比例为1:5 000。

shRNA、*SNX1*-shRNA)、*SNX1*过表达质粒(*SNX1*-Vector、*SNX1*-OE)分别与辅助包装质粒(psPAX2, pMD2.G)共转染HEK293T细胞,10~12 h后更换新鲜培养液继续培养48 h。收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,经过滤、浓缩后获得慢病毒原液。靶向*SNX1*的shRNA (short hairpin RNA, 短发卡RNA)及阴性对照序列见表3。

### 1.6 慢病毒包装

使用jetPRIME®转染试剂将*SNX1*敲除质粒(NC-

表3 shRNA序列

Tab 3 Sequences of shRNA

shRNA	Sequence (5'→3')
NC-shRNA	CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG
<i>SNX1</i> -shRNA	CCGGTAGGTGGTGGAATTATGGGATCTCGAGATCCCATTAATCCACCACCTATTTTT

### 1.7 慢病毒感染、稳转株构建及效率分析

分别将处于对数生长期的AsPC-1、Capan-1细胞以 $10^6$ 个/mL接种于6孔板,按照慢病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)为20,向Capan-1细胞分别添加NC-shRNA、*SNX1*-shRNA、*SNX1*-Vector、*SNX1*-OE慢病毒液(“1.6”部分获得)进行感染,同时向AsPC-1细胞分别添加*SNX1*-Vector、*SNX1*-OE慢病毒液(“1.6”部分获得)进行感染,48 h后使用2  $\mu$ g/mL嘌呤霉素进行筛选培养,以获取稳定敲除和过表达*SNX1*的Capan-1细胞株、稳定过表达*SNX1*的AsPC-1细胞株。分别提取该6株细胞的总蛋白,采用Western blotting检测SNX1蛋白的下调和过表达效率;使用的一抗为 $\beta$ -actin、SNX1抗体(稀释比例均为1:1 000),HRP标记的二抗稀释比例为1:5 000。

### 1.8 癌组织及癌旁组织中SNX1表达检测

取出已固定完成的PDAC患者的癌组织及癌旁组织,包埋后制作成石蜡切片。根据免疫组织化学染色(immunohistochemistry staining, IHC)说明书,对癌组织及癌旁组织的石蜡切片进行染色,SNX1抗体的稀释比例为1:200。经脱水、封片后于莱卡扫片机下扫描,观察细胞的染色情况,其中棕黄色染色较深的细胞中SNX1的表达较高。

### 1.9 细胞增殖能力检测

采用CCK8法、平板克隆形成实验检测PDAC细胞的增殖能力,具体如下:①分别将“1.4”部分获得的已转染siRNA的6种细胞以 $5\times 10^3$ /孔接种于96孔板中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养。分别于接种后

的第0、1、2、3日弃去培养液,添加CCK8试剂并于37℃反应1h,而后用酶标仪测量细胞的 $D(450\text{ nm})$ ,使用GraphPad软件绘制生长曲线。②分别将上述6种细胞以 $5\times 10^3$ /孔均匀接种在6孔板内,每隔4d更换1次培养液,当培养皿中出现肉眼可见的克隆时终止培养。弃去上清液,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)小心浸洗2次。经4%多聚甲醛固定、结晶紫染液染色、清水润洗并晾干后进行拍照,使用ImageJ软件对克隆的数量和大小进行统计分析。

### 1.10 细胞迁移能力检测

采用细胞划痕实验检测PDAC细胞的迁移能力,即分别将上述6种细胞(密度达70%~80%)均匀接种在6孔板中,保证过夜后刚好能在孔中形成长满的单层细胞。次日,制造细胞划痕后,更换无血清培养基继续培养24h,于倒置显微镜下拍照并使用ImageJ软件对划痕愈合面积进行分析。

### 1.11 细胞凋亡水平检测

采用流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测PDAC细胞的凋亡水平,即分别将上述6种细胞消化、重悬,用碘化丙啶(propidium iodide, PI)和Annexin V-FITC对细胞进行染色(具体步骤参考细胞凋亡检测试剂盒说明书),同时将野生型AsPC-1、Capan-1细胞作为空白对照,于流式细胞仪上检测各种细胞的凋亡水平。

### 1.12 细胞内SNX1的分布和巨胞饮水平检测

采用免疫荧光染色(immunofluorescence, IF)研究SNX1在PDAC细胞内的分布。分别将AsPC-1、Capan-1细胞以 $5\times 10^3$ /孔均匀接种在8孔小室(Ibidi, 德国)中,待细胞贴附在小室底部后,弃去培养液,按照IF说明书进行后续固定、通透、封闭及抗体孵育。PBS洗涤后加入 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$  DAPI避光染色10min, PBS洗涤3次后于激光共聚焦显微镜下采集图像,观察SNX1的分布及其与LAMP1的共定位情况。实验中使用的一抗为LAMP1、SNX1抗体(稀释比例均为1:200),荧光标记的二抗稀释比例为1:500。

分别将上述6种细胞以 $5\times 10^3$ /孔均匀接种在8孔小室中,待细胞生长密度达60%~70%时弃去培养液,

PBS洗涤3次后用无血清培养基培养细胞12~18h,再次弃去培养液,用无血清培养基配制的 $1\text{ mg/mL}$  TMR-dextran培养细胞40min,弃去葡聚糖溶液后用预冷的PBS洗涤3次,经4%多聚甲醛固定、 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$  DAPI避光染色后,在激光共聚焦显微镜下采集图像,观察不同细胞的巨胞饮水平。

### 1.13 细胞在裸鼠体内的增殖能力检测

于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下,将“1.7”部分获得的稳定敲除SNX1的Capan-1细胞(即分别经NC-shRNA质粒、SNX1-shRNA质粒转染)接种至10cm培养皿中进行培养,分别扩增至一定数量(约 $5\times 10^7$ 个细胞)后用胰酶消化并收集细胞,经PBS洗涤后制作细胞悬液。分别向裸鼠皮下注射50 $\mu\text{L}$ (含 $1\times 10^7$ 个细胞)上述细胞悬液以构建裸鼠皮下瘤模型,3周后取出肿瘤,拍照并称重。

### 1.14 SNX1相关信号通路的筛选及通路中关键蛋白的表达分析

针对“1.1”部分中源自TCGA数据库的转录组测序数据,根据SNX1 mRNA表达水平中位数将其分为SNX1高表达组和SNX1低表达组。使用基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)软件对2组数据进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome, KEGG)通路分析,设置标准化富集分数(normalized enrichment score, NES)>1、假发现率(false discovery rate, FDR)<0.05为入选标准。而后,采用Western blotting对筛选得到的通路中由下调SNX1引起的关键蛋白表达量的变化进行分析。

### 1.15 Oxy处理对过表达SNX1细胞、通路中关键蛋白表达变化的影响

使用5mg/mL的转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )信号通路抑制剂Oxy分别处理稳定过表达SNX1的AsPC-1、Capan-1细胞(“1.7”部分获得),并对该6种细胞(包括SNX1-Vector、SNX1-OE、SNX1-OE+Oxy)的增殖能力、迁移能力、凋亡水平和巨胞饮水平进行检测,方法同前。而后,采用Western blotting对过表达SNX1引起的TGF- $\beta$ 信号通路中关键蛋白的表达变化进行分析。

### 1.16 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.0 软件对实验数据进行统计分析,采用 R 语言对下载的数据库数据进行统计分析。所有数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组内比较采用 Student's *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SNX1 在 PDAC 组织和细胞中的表达及其与患者临床病理信息的相关性分析

对源自 TCGA、GTEX 数据库的 PDAC 组织和正常胰腺组织的转录组测序数据进行拟合、标准化后,分析 *SNX1* mRNA 在不同组织中的表达差异,结果显示 *SNX1* mRNA 在 PDAC 组织中的表达水平高于正常胰腺组织 ( $P = 0.000$ , 图 1A); 且对 GSE15471 数据集的转录组数据的分析也得到了相同的结果 (图 1B)。分别采用 qPCR 和 Western blotting 检测 4 种 PDAC 细胞和 hTERT-HPNE 细胞中 *SNX1* 的 mRNA 和蛋白表达水平,结果 (图 1C) 显示 PDAC 细胞中 *SNX1* 的 mRNA 和蛋白水平均高于 hTERT-HPNE 细胞 (均  $P < 0.05$ )。5 例患者的癌组织及癌旁组织标本的 IHC 结果 (图 1D) 显示,相较于癌旁组织,PDAC 组织中的棕黄色更深,即 *SNX1* 的表达水平较高。

在 TCGA 数据库中对 PDAC 患者的 *SNX1* mRNA 表达与其临床病理信息的相关性进行分析,结果 (图 1E、F) 显示,在肿瘤体积较大、TNM 分期较晚的患者中,其 *SNX1* mRNA 的表达更高 (均  $P < 0.05$ ); 同时,在肿瘤异型性分级更高的患者中 *SNX1* mRNA 表达更高,其中 G2、G3 期肿瘤中的 *SNX1* mRNA 表达显著高于 G1 期 (图 1G)。

### 2.2 下调 *SNX1* 对 PDAC 细胞增殖能力的影响

为探究 *SNX1* 对肿瘤细胞增殖能力的影响,分别利用 siRNA 瞬时转染 PDAC 细胞系 AsPC-1 和 Capan-1,并采用 Western blotting 分析 *SNX1* 在细胞中的表达,结果 (图 2A) 显示与转染 NC-siRNA 相比,分别转染 *SNX1*-siRNA1、*SNX1*-siRNA2 的上述细胞中 *SNX1* 的表达有明显下降。随后,分别通过 CCK8 法、平板克隆形成实验对已转染的 AsPC-1、Capan-1 细胞的增殖能力进行检测,结果 (图 2B、C) 显示下调 *SNX1* 的表达能够显著降低该 2 种细胞的增殖能力。

同时,本研究使用 NC-shRNA、*SNX1*-shRNA 慢病毒液感染 Capan-1 细胞,经筛选后得到稳定敲除 *SNX1* 的细胞株,并采用 Western blotting 对 *SNX1* 的表达进行检测,结果 (图 2D) 显示与感染 NC-shRNA 相比,感染 *SNX1*-shRNA 慢病毒液的 Capan-1 细胞中 *SNX1* 表达明显降低。接着,将上述稳定敲除 *SNX1* 的 Capan-1 细胞分别接种到裸鼠皮下,于 3 周后取出肿瘤进行拍照、称重,结果 (图 2E、F) 显示,下调 *SNX1* 能够抑制该模型中肿瘤的生长。

### 2.3 下调 *SNX1* 对 PDAC 细胞凋亡水平、迁移能力的影响

采用 FCM 对已转染的 AsPC-1、Capan-1 细胞的凋亡水平进行检测,结果 (图 3A、B) 显示,与转染 NC-siRNA 相比,分别转染 *SNX1*-siRNA1、*SNX1*-siRNA2 的上述细胞的凋亡水平有显著上调 (均  $P < 0.05$ )。同时,利用划痕实验对已转染的 AsPC-1、Capan-1 细胞的迁移能力进行检测,结果 (图 3C、D) 显示,与转染 NC-siRNA 相比,分别转染 *SNX1*-siRNA1、*SNX1*-siRNA2 的上述细胞的迁移能力有显著下调 (均  $P < 0.05$ )。

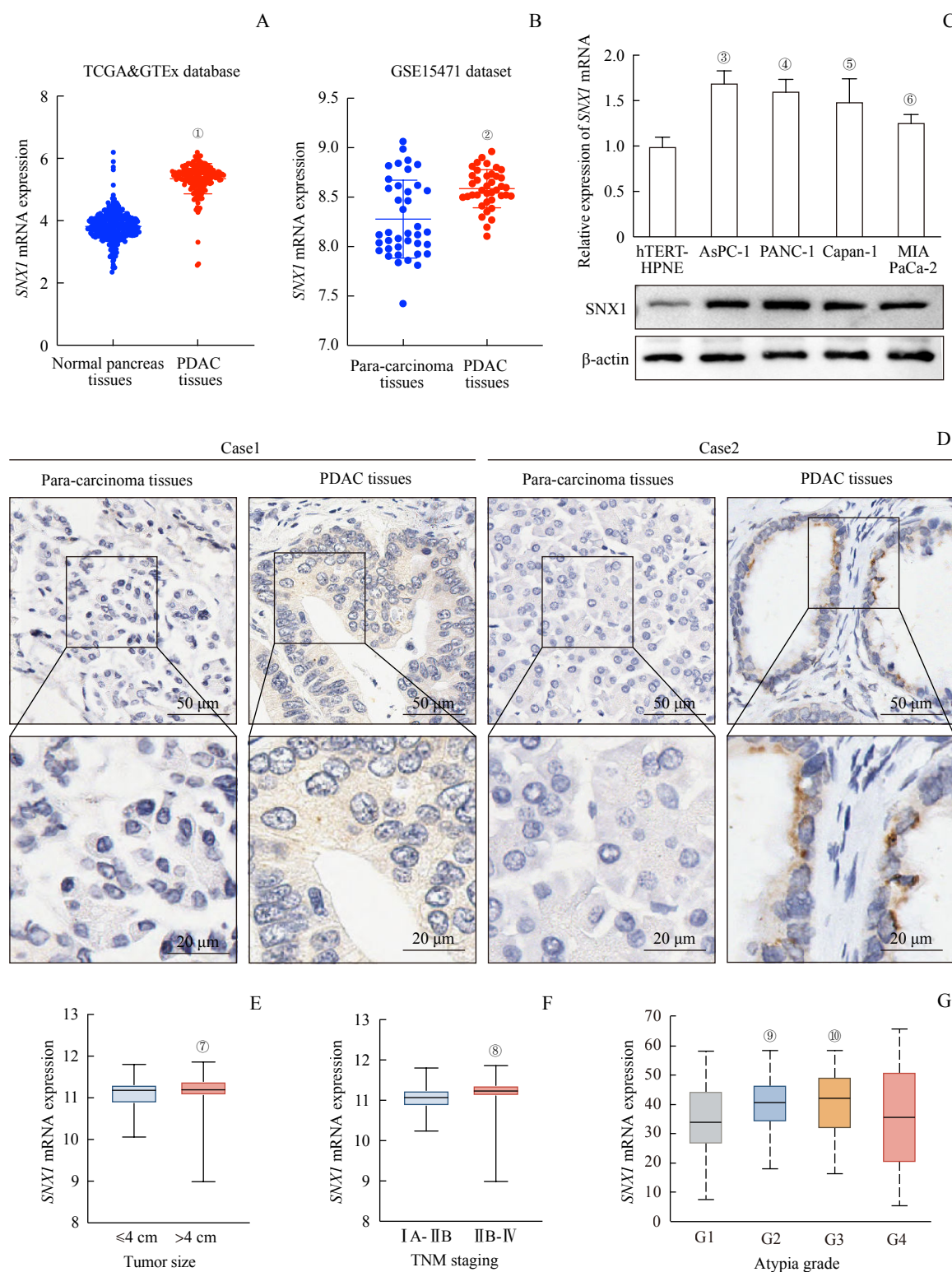
### 2.4 *SNX1* 在 PDAC 细胞中的分布及下调 *SNX1* 对 PDAC 细胞巨胞饮水平的影响

通过 IF 观察 *SNX1* 在 AsPC-1、Capan-1 细胞中的分布情况,结果 (图 4A) 显示 *SNX1* 分布于细胞的胞膜和胞质中,且与 LAMP1 存在共定位的情况。而后,利用 TMR-dextran 对已转染的 AsPC-1、Capan-1 细胞的巨胞饮水平进行检测,结果 (图 4B) 显示,与转染 NC-siRNA 相比,分别转染 *SNX1*-siRNA1、*SNX1*-siRNA2 的上述细胞的巨胞饮水平有显著下调 (均  $P < 0.05$ )。

### 2.5 *SNX1* 相关信号通路的筛选及通路中关键蛋白表达量变化的分析

为进一步研究 *SNX1* 在促进 PDAC 进展过程中的分子机制,本研究对来自 TCGA 数据库的 *SNX1* 高表达组和 *SNX1* 低表达组数据进行 KEGG 通路分析,结果 (图 5A) 显示 *SNX1* 在 PDAC 中的高表达与 TGF- $\beta$ 、磷脂酰肌醇 3-激酶-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (phosphoinositide 3-kinase-serine/threonine-protein kinase-mammalian

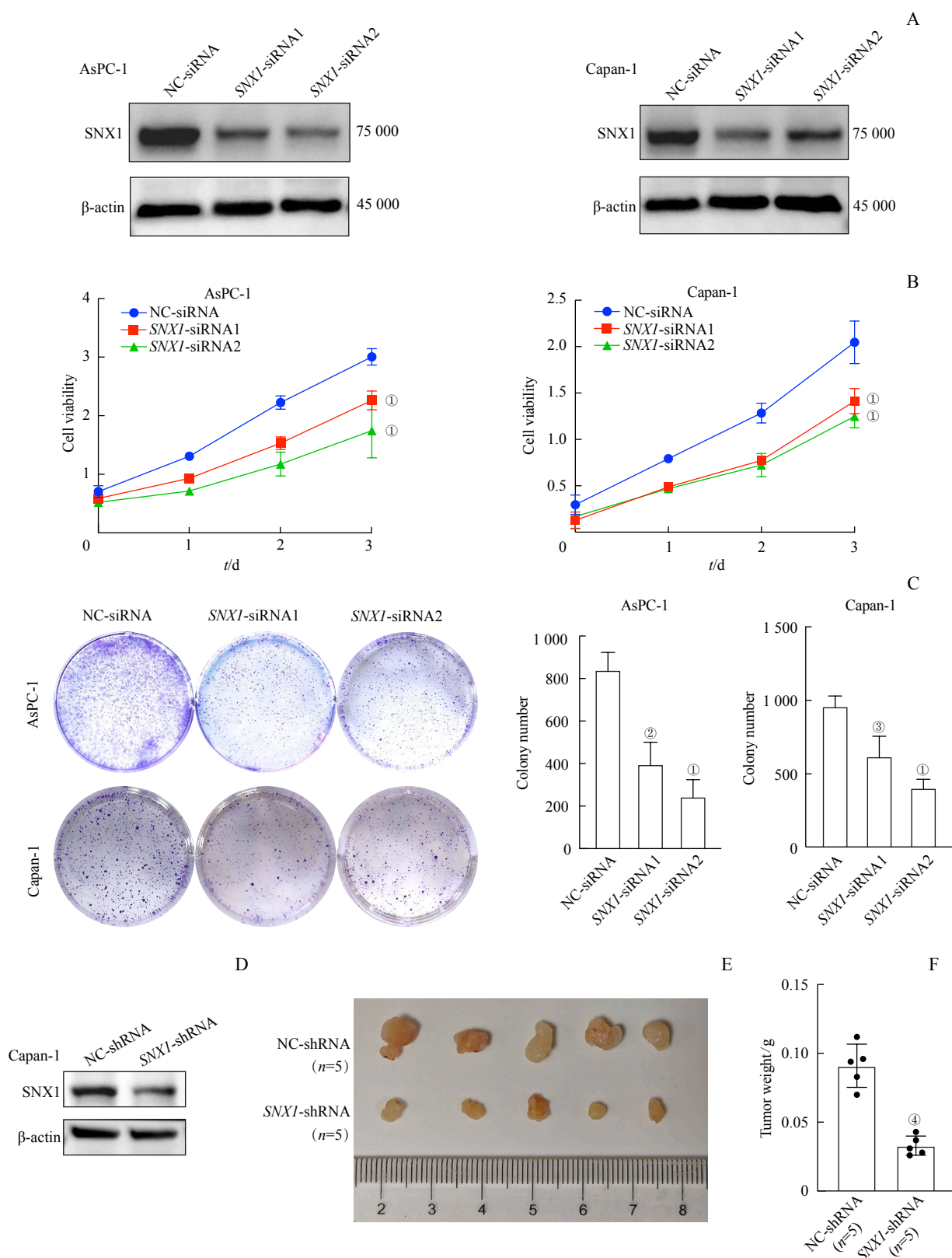




**Note:** A. Expression of *SNX1* mRNA in PDAC tissues and normal pancreas tissues in TCGA&GTEx database. <sup>①</sup> $P=0.000$ , compared with normal pancreas tissues. B. Expression of *SNX1* mRNA in PDAC tissues and para-carcinoma tissues in GSE15471 dataset. <sup>②</sup> $P=0.000$ , compared with para-carcinoma tissues. C. Detection of the mRNA and protein expression of *SNX1* in four PDAC cells and hTERT-HPNE cells by qPCR and Western blotting. <sup>③</sup> $P=0.000$ , <sup>④</sup> $P=0.001$ , <sup>⑤</sup> $P=0.005$ , <sup>⑥</sup> $P=0.045$ , compared with hTERT-HPNE cells. D. Detection of *SNX1* expression in PDAC tissues and para-carcinoma tissues from PDAC patients by IHC. E. Correlation between *SNX1* mRNA expression and tumor size of patients in TCGA database. <sup>⑦</sup> $P=0.024$ , compared with the  $\leq 4$  cm group. F. Correlation between *SNX1* mRNA expression and TNM staging of patients in TCGA database. <sup>⑧</sup> $P=0.003$ , compared with the I A- II B group. G. Correlation between *SNX1* mRNA expression and atypia grades of PDAC patients. <sup>⑨</sup> $P=0.012$ , <sup>⑩</sup> $P=0.015$ , compared with the G1 group.

**图1** SNX1在PDAC细胞和组织中的表达及其与患者临床病理信息的相关性分析

**Fig 1** Expression of SNX1 in PDAC cells and tissues and its correlation with clinical characteristics of patients

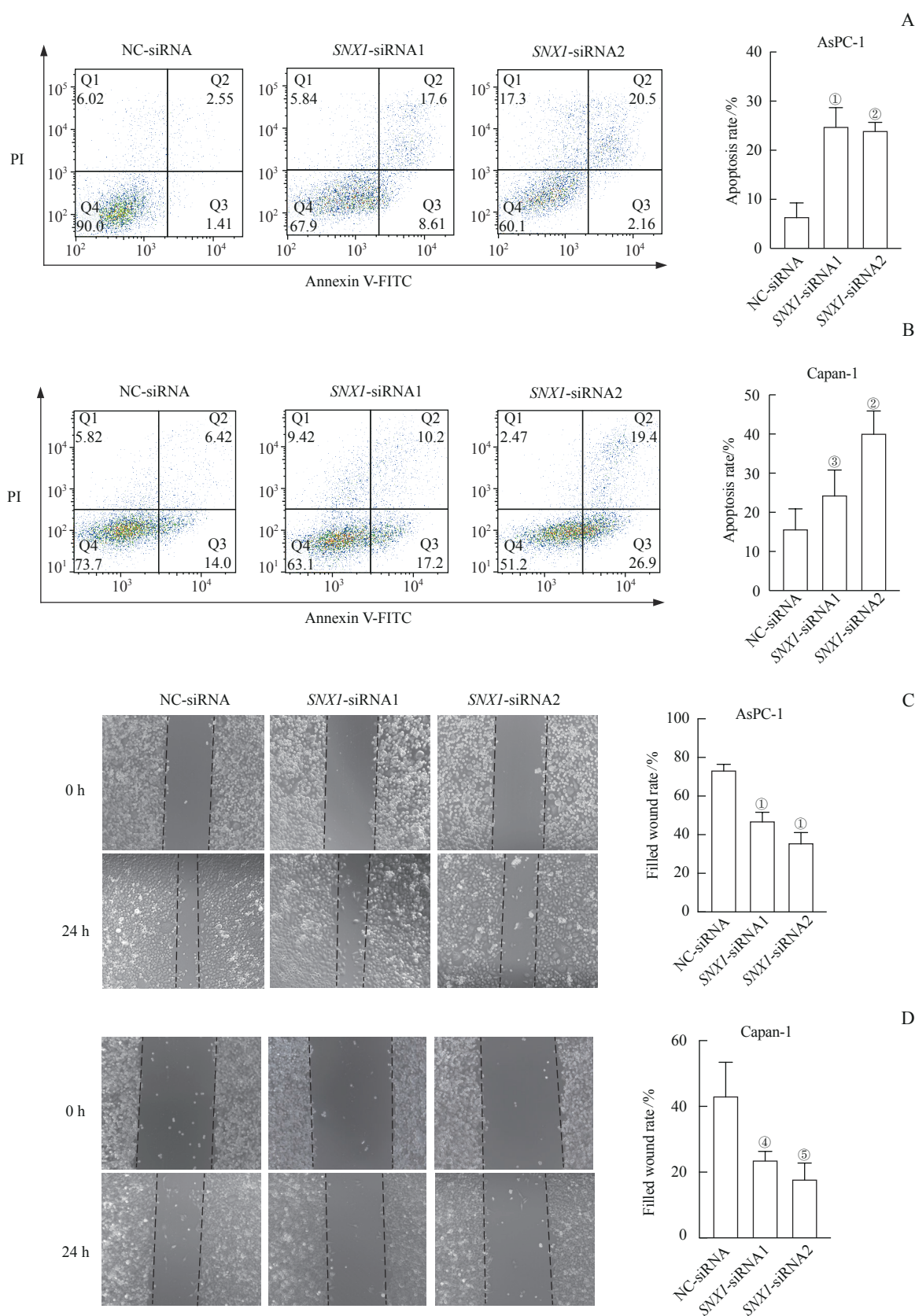


**Note:** A. Detection of SNX1 expression in AsPC-1 and Capan-1 cells by Western blotting. B/C. Detection of the effect of *SNX1* knockdown on the proliferation capacity of AsPC-1 and Capan-1 cells by CCK8 (B) and plate clonal formation experiment (C). <sup>①</sup> $P=0.000$ , <sup>②</sup> $P=0.002$ , <sup>③</sup> $P=0.008$ , compared with the NC-siRNA group. D. Detection of SNX1 expression in Capan-1 cells by Western blotting. E. Photos of subcutaneous xenograft tumors from Capan-1 cells infected with NC-shRNA or *SNX1*-shRNA lentivirus. F. Statistical analysis of tumor weight growth of Capan-1 cells infected with NC-shRNA or *SNX1*-shRNA lentivirus over 3 weeks. <sup>④</sup> $P=0.000$ , compared with the NC-shRNA group.

**图2** 体内、外研究分析下调*SNX1*对PDAC细胞增殖能力的影响

**Fig 2** Effect of *SNX1* knockdown on the proliferation capacity of PDAC cells *in vivo* and *in vitro*

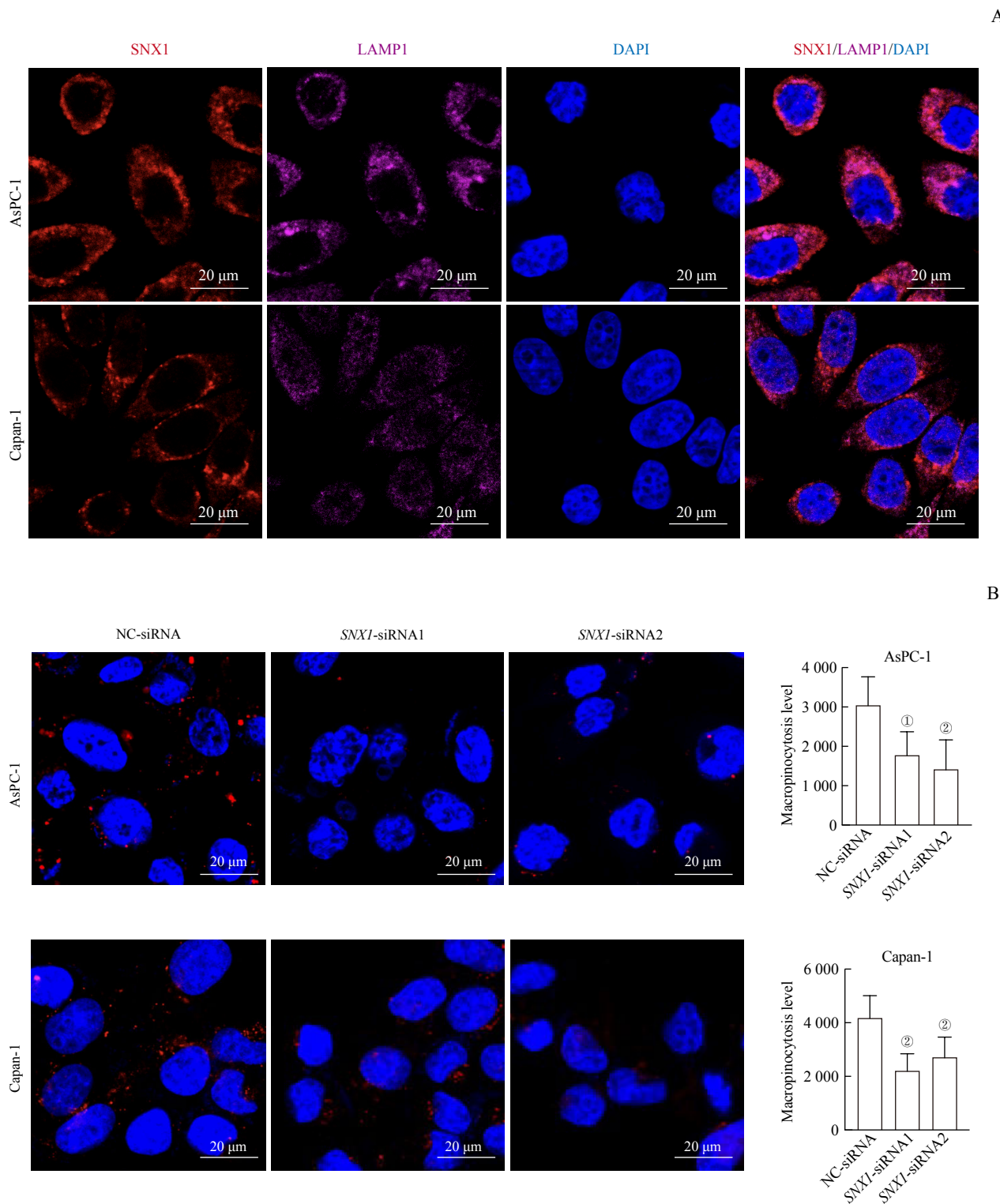




**Note:** A/B. Detection of the effect of *SNX1* knockdown on the apoptosis levels of AsPC-1 cells (A) and Capan-1 cells (B) by FCM. C/D. Detection of the effect of *SNX1* knockdown on the migration capacity of AsPC-1 cells (C) and Capan-1 cells (D) by cell scratch assay. <sup>①</sup> $P=0.000$ , <sup>②</sup> $P=0.001$ , <sup>③</sup> $P=0.019$ , <sup>④</sup> $P=0.020$ , <sup>⑤</sup> $P=0.006$ , compared with the NC-siRNA group.

**图3** 下调 *SNX1* 对 PDAC 细胞凋亡水平和迁移能力的影响

**Fig 3** Effect of *SNX1* knockdown on the apoptosis levels and migration capacity of PDAC cells



**Note:** A. Observation of location and distribution of SNX1 in AsPC-1 and Capan-1 cells by IF. B. Detection of the effect of *SNX1* knockdown on the macropinocytosis levels in AsPC-1 and Capan-1 cells by TMR-dextran. <sup>①</sup> $P=0.009$ , <sup>②</sup> $P=0.001$ , compared with the NC-siRNA group.

**图4** SNX1在PDAC细胞中的分布以及下调*SNX1*对PDAC细胞巨胞饮水平的影响

**Fig 4** Distribution of SNX1 in PDAC cells and the effect of *SNX1* knockdown on the macropinocytosis levels in PDAC cells

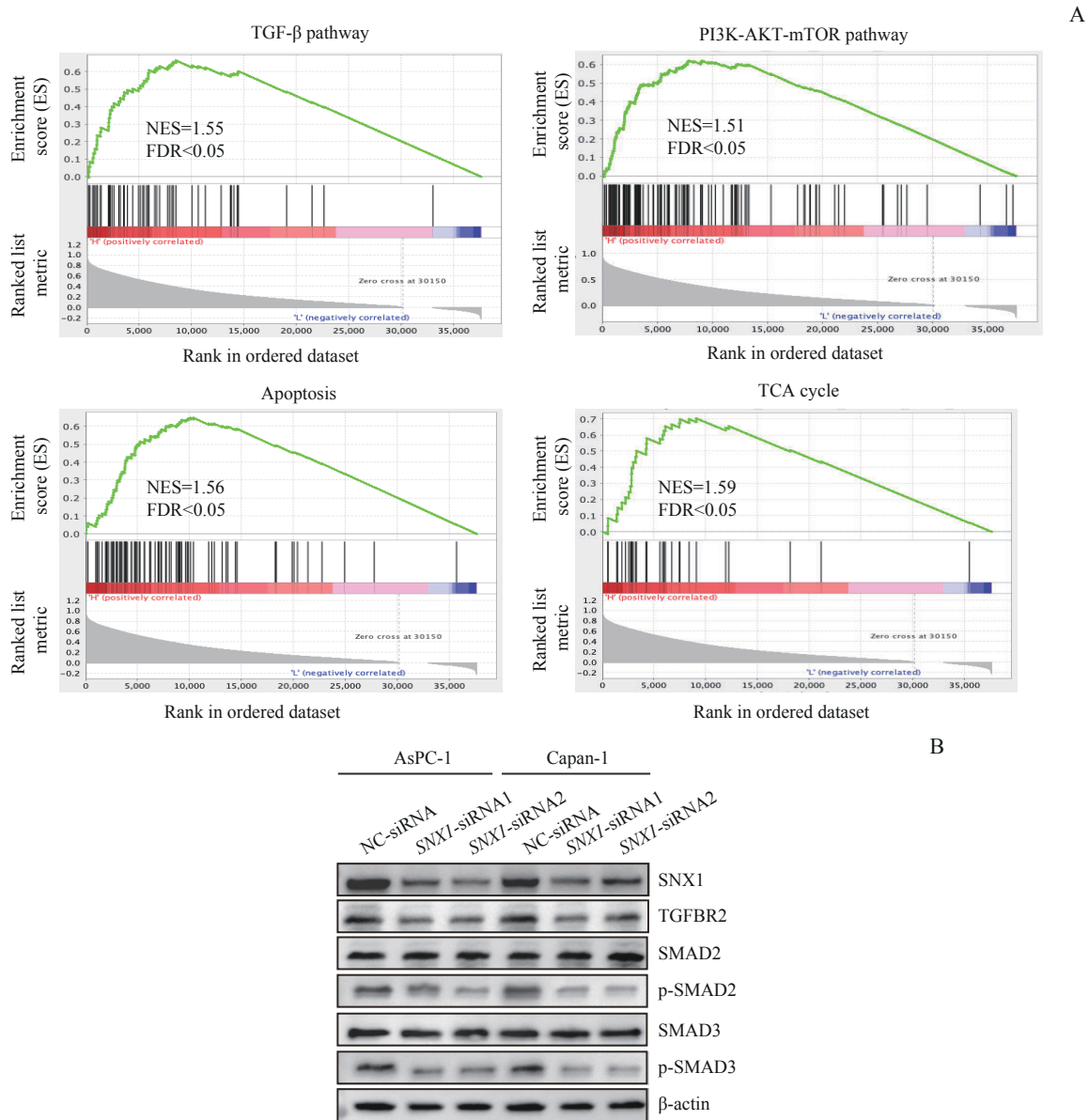
target of rapamycin, PI3K-AKT-mTOR) 等信号通路的激活相关, 也与细胞凋亡、三羧酸(tricarboxylic acid cycle, TCA) 循环等信号通路的

调控相关。

已有研究<sup>[12]</sup>发现, TGF- $\beta$  信号通路在PDAC进程中可发挥重要作用。本研究采用Western blotting对

已转染的 AsPC-1、Capan-1 细胞中的 TGF- $\beta$  通路关键蛋白的表达进行检测, 结果 (图 5B) 显示, 与转染 NC-siRNA 相比, 在分别转染 *SNX1*-siRNA1、*SNX1*-siRNA2 的细胞中下调 *SNX1* 能够降低 TGFR2 的表达

及 SMAD2/SMAD3 的磷酸化水平; 继而表明, 在 AsPC-1、Capan-1 细胞中下调 *SNX1* 能够抑制 TGF- $\beta$  信号通路的活化。



**Note:** A. KEGG pathway analysis of *SNX1* in TCGA database. B. Detection of the effect of *SNX1* knockdown on TGF- $\beta$  signaling pathway by Western blotting.

**图 5** *SNX1* 相关信号通路的筛选及下调 *SNX1* 对通路活化的影响

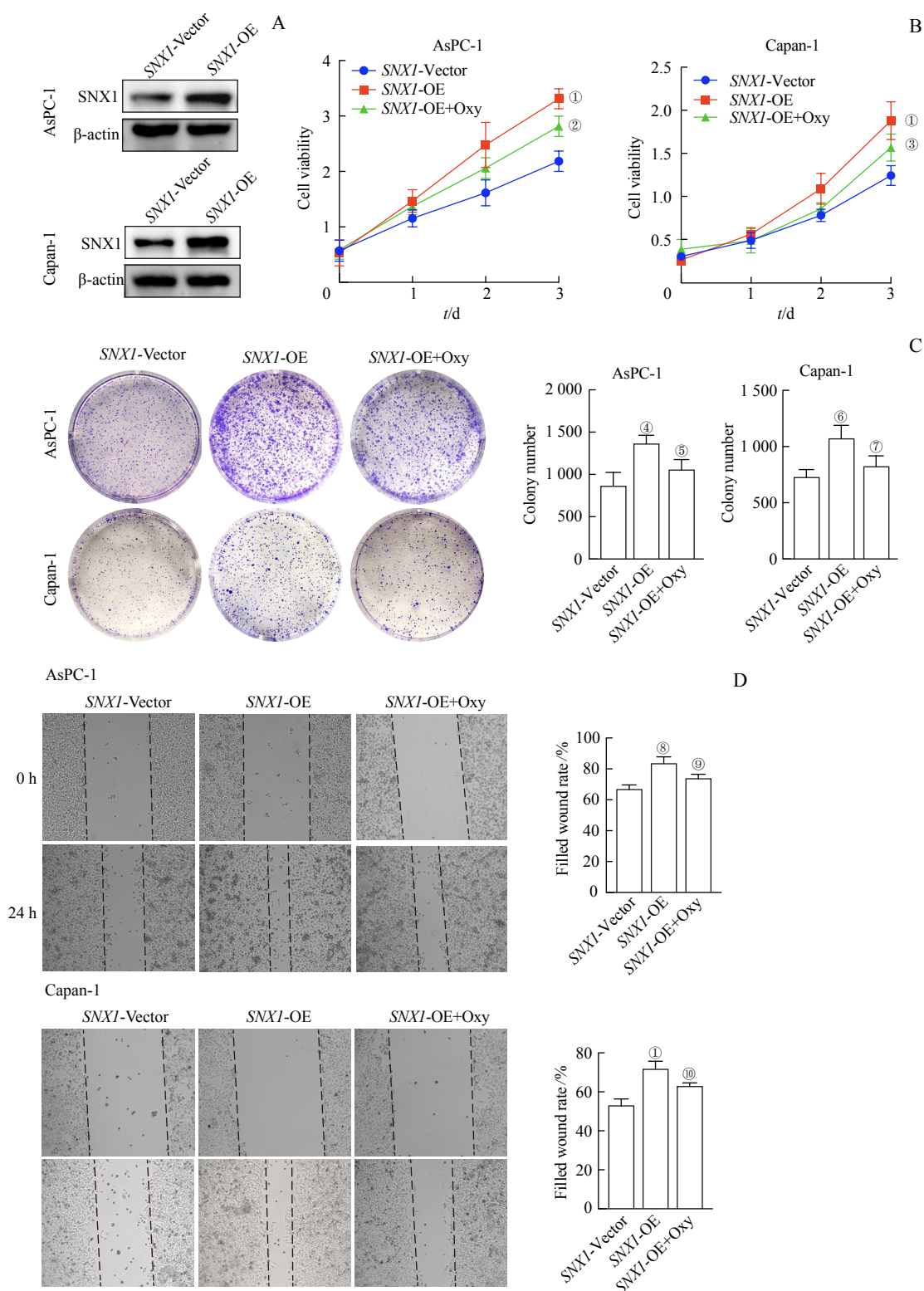
**Fig 5** Screening of *SNX1*-related signaling pathway and the effect of *SNX1* knockdown on pathway activation

## 2.6 Oxy 处理对过表达 *SNX1* 的 PDAC 细胞及 TGF- $\beta$ 通路中关键蛋白表达变化的影响

采用 Western blotting 检测 AsPC-1、Capan-1 细胞中 *SNX1* 的过表达情况, 结果 (图 6A) 显示, 与感染 *SNX1*-Vector 相比, 感染 *SNX1*-OE 慢病毒液的上述细胞 *SNX1* 表达明显增加。随后, 分别采用 CCK8 法、平板克隆形成实验检测稳定过表达 *SNX1* 的 AsPC-1、

Capan-1 细胞的增殖能力, 采用细胞划痕实验、FCM 检测上述细胞的迁移能力和凋亡水平, 采用 TMR-dextran 检测上述细胞的巨胞饮水平; 结果 (图 6B~D, 图 7A、B) 显示, 相较于感染 *SNX1*-Vector, 感染 *SNX1*-OE 慢病毒液的细胞增殖能力、迁移能力、巨胞饮水平均有显著上调, 凋亡水平均有显著下调 (均  $P<0.05$ )。

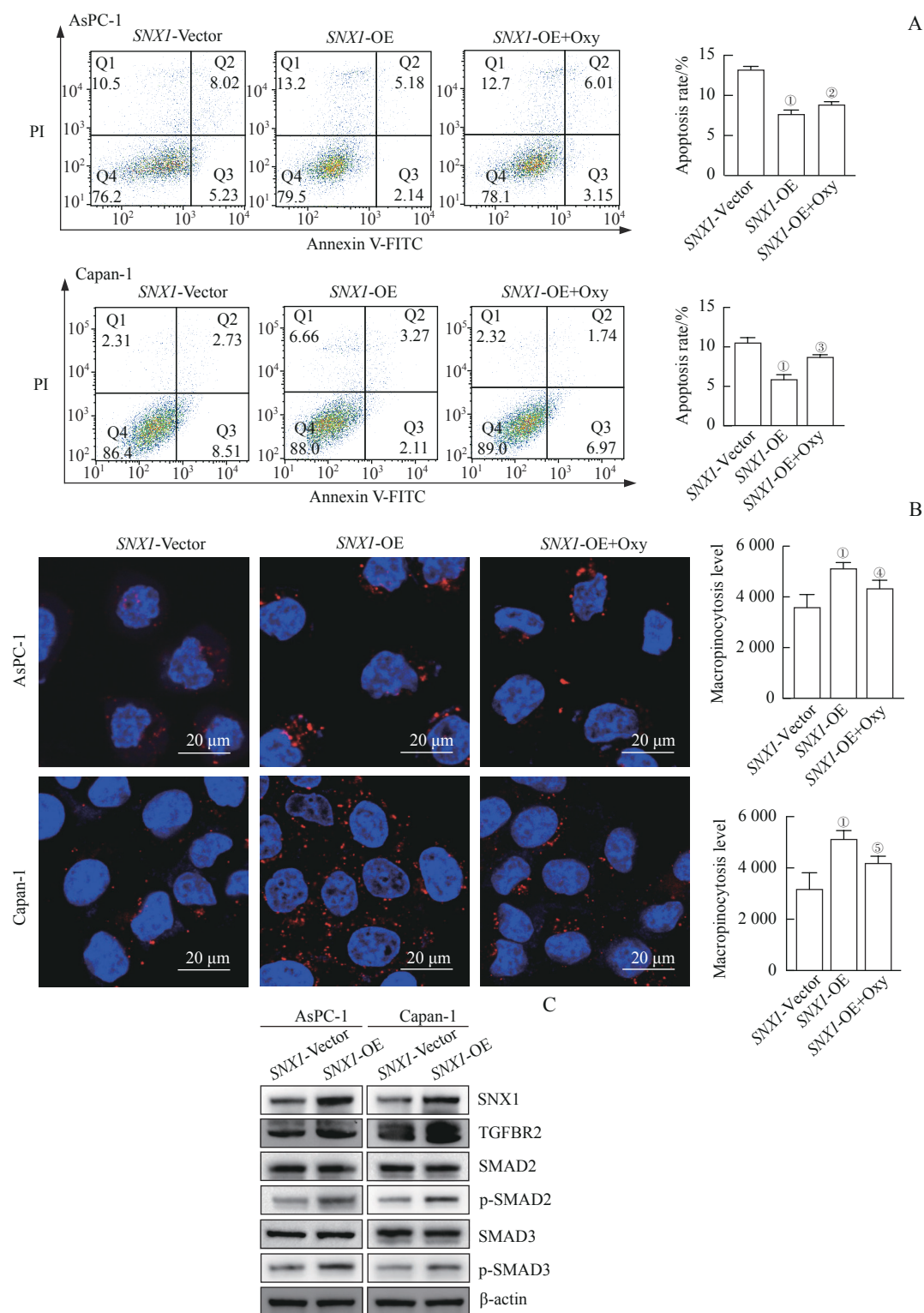




**Note:** A. Detection of *SNX1* overexpression in AsPC-1 and Capan-1 cells by Western blotting. B/C. Detection of the effect of *SNX1* overexpression and Oxy treatment on the proliferation capacity of AsPC-1 and Capan-1 cells by CCK8 (B) and plate clonal formation experiment (C). D. Detection of the effect of *SNX1* overexpression and Oxy treatment on the migration capacity of AsPC-1 and Capan-1 cells by cell scratch assay. <sup>①</sup> $P=0.000$ , <sup>④</sup> $P=0.004$ , <sup>⑥</sup> $P=0.006$ , <sup>⑧</sup> $P=0.001$ , compared with the *SNX1*-Vector group; <sup>②</sup> $P=0.003$ , <sup>③</sup> $P=0.033$ , <sup>⑤</sup> $P=0.037$ , <sup>⑦</sup> $P=0.026$ , <sup>⑨</sup> $P=0.010$ , <sup>⑩</sup> $P=0.015$ , compared with the *SNX1*-OE group.

图6 Oxy处理对过表达*SNX1*的PDAC细胞及TGF- $\beta$ 信号通路中关键蛋白表达的影响(I)

Fig 6 Effects of Oxy treatment on PDAC cells and key proteins expression in TGF- $\beta$  signaling pathway induced by *SNX1* overexpression (I)



**Note:** A. Detection of the effect of *SNX1* overexpression and Oxy treatment on the apoptosis levels of AsPC-1 and Capan-1 cells by FCM. B. Detection of the effect of *SNX1* overexpression and Oxy treatment on the macropinocytosis levels in AsPC-1 and Capan-1 cells by TMR-dextran. C. Detection of the effect of *SNX1* overexpression on TGF- $\beta$  signaling pathway by Western blotting. <sup>①</sup> $P=0.000$ , compared with the *SNX1*-Vector group; <sup>②</sup> $P=0.014$ , <sup>③</sup> $P=0.001$ , <sup>④</sup> $P=0.020$ , <sup>⑤</sup> $P=0.024$ , compared with the *SNX1*-OE group.

图7 Oxy 处理对过表达 *SNX1* 的 PDAC 细胞及 TGF- $\beta$  信号通路中关键蛋白表达的影响 (II)

Fig 7 Effects of Oxy treatment on PDAC cells and key proteins expression in TGF- $\beta$  signaling pathway induced by *SNX1* overexpression (II)

同时,在上述增殖、迁移、巨胞饮、凋亡水平检测的实验中,我们使用TGF- $\beta$ 信号通路抑制剂Oxy (5 mg/mL) 分别处理经SNX1-OE慢病毒液感染的AsPC-1、Capan-1细胞,观察该抑制剂对由SNX1过表达引起的细胞表型变化的影响,结果(图6B~D,图7A、B)显示Oxy能够显著恢复由SNX1过表达引起的上述表型变化(均 $P<0.05$ )。随后,为了研究过表达SNX1对TGF- $\beta$ 信号通路的影响,我们采用Western blotting对稳定过表达SNX1的AsPC-1、Capan-1细胞中的TGF- $\beta$ 信号通路关键蛋白进行检测,结果(图7C)显示,与感染SNX1-Vector相比,在感染SNX1-OE慢病毒液的细胞中TGFB2的表达及SAMD2/SMAD3磷酸化水平均有所上调,继而表明该信号通路被激活。

### 3 讨论

PDAC是一种恶性程度非常高的消化系统肿瘤。由于PDAC细胞被丰富的成纤维细胞间质包围,组织较为致密,临床上传统的化疗和放疗的效果均不理想;同时,其癌症内部营养较为缺乏,非外周区域的癌细胞需通过巨胞饮的方式摄取各种营养物质来维持自身旺盛的生命活动<sup>[13]</sup>,因此抑制癌细胞的巨胞饮或可成为靶向治疗PDAC的一个新的方向。研究<sup>[14]</sup>显示,巨胞饮过程可大致分为以下几个阶段:①细胞膜表面发生凸起,形成伪足。②伪足包裹住胞外基质,以巨胞饮体的形式向胞内运输。③随着向细胞核方向运输,巨胞饮体逐渐收缩、成熟。④巨胞饮体与溶酶体融合,进行分解代谢和部分产物的回收再利用。

在本研究中,我们发现下调SNX1能够抑制PDAC细胞的增殖能力、迁移能力、巨胞饮水平,而增加细胞的凋亡水平;过表达SNX1则产生了相反的结果。通过KEGG通路分析我们发现,SNX1与多种促癌信号通路相关。本课题组最近的研究<sup>[15]</sup>发现,与对照组相比,使用转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGFB1)处理的具有RAS突变的PDAC细胞表现出了更高水平的巨胞饮,而同时使用TGFB1和Oxy处理后的细胞的巨胞饮水平则较TGFB1处理有所下降;继而证明,TGF- $\beta$ 信号通路可以作为上游因素调控PDAC细胞的巨胞饮。

本研究的蛋白水平检测发现,下调SNX1能够抑

制TGF- $\beta$ 信号通路的激活,过表达SNX1则能促进该信号通路的激活;同时,在SNX1过表达组中加入TGF- $\beta$ 信号通路抑制剂Oxy后,我们发现该抑制剂可以显著挽救由SNX1过表达引起的对PDAC细胞增殖能力、迁移能力、凋亡和巨胞饮水平的影响。继而表明,SNX1可通过调控TGF- $\beta$ 信号通路来影响PDAC细胞的增殖能力、迁移能力、凋亡和巨胞饮水平。本研究通过IF发现SNX1与溶酶体存在共定位,且在细胞质中也有分布;同时有研究<sup>[16]</sup>发现SNX1和SNX5可形成异源二聚体,参与到巨胞饮体的成熟过程中。因此我们推测,SNX1可能参与了巨胞饮过程中的多个阶段,进而调控PDAC细胞的巨胞饮水平,但其具体的作用机制仍有待进一步研究。

近年来,越来越多的研究发现巨胞饮是肿瘤发生发展过程中的重要分子生物学机制。如生长停滞特异性蛋白6-酪氨酸蛋白激酶受体(growth arrest-specific protein 6-AXL receptor tyrosine kinase, GAS6-AXL)信号轴可通过影响肌动蛋白重塑及下游PI3K、Rho家族G蛋白成员1(Rac family small GTPase 1, RAC1)的激活来影响细胞动力学、黏附和代谢等多个肌动蛋白依赖性过程,进而触发肿瘤细胞的巨胞饮和侵袭<sup>[17]</sup>;在营养应激的微环境下,磷酸酯酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)缺失的前列腺癌细胞可利用巨胞饮过程维持其存活和细胞增殖,且只有在AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)激活的情况下PTEN的缺失才会促进巨胞饮过程的发生,继而揭示了AMPK在营养应激的情况下促进前列腺癌细胞存活的新机制<sup>[18]</sup>;在氧气、营养均较为缺乏的肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)微环境中,缺氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)可通过激活含EH结构域2(EH domain containing 2, EHD2)的转录来诱导HCC细胞巨胞饮的发生<sup>[19]</sup>;在低谷氨酰胺条件下,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)信号可通过激活P21活化蛋白激酶(p21-activated kinase, Pak)来调节PDAC细胞的巨胞饮,以应对营养缺乏的微环境<sup>[20]</sup>。与此同时,本研究亦探讨了SNX1调控PDAC细胞巨胞饮的分子生物学机制。因此,针对不同癌种及在不同肿瘤细胞中探究巨胞饮是如何发挥功能来影响肿瘤的发生发展机制具有十分重要的科学意义。



综上所述, SNX1能够通过激活TGF- $\beta$ 信号通路来促进PDAC细胞的增殖能力、迁移能力、巨胞饮水水平并抑制其发生凋亡, 继而提示SNX1可能是治疗PDAC的有效靶点。本研究的结果或为PDAC发生和发展的机制研究提供新的思路。

#### 利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

#### 伦理批准和知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究涉及的所有实验均已通过上海交通大学医学院附属仁济医院科学伦理委员会的审核批准(文件号RA-2021-095)。所有实验过程均遵照《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》的条例进行。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

All experimental protocols in this study were reviewed and approved by the Scientific Ethics Committee of Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, (Approval Letter No. RA-2021-095), and all experimental protocols were carried out by following the guidelines of *Measures for Ethical Review of Biomedical Research Involving Humans*. Consent letters have been signed by the research participants or their relatives.

#### 伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过华东师范大学科学伦理委员会的审核批准(文件号20141204)。所有实验过程均遵照美国国家科学院编写的《实验动物管理和使用指南》的条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by the Research Ethics Committee of East China Normal University (Approval Letter No. 20141204), and all experimental animal protocols were carried out by following the guidelines of *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* prepared by United States National Academy of Sciences.

#### 作者贡献/Authors' Contributions

潘泓、廖颖娜、聂惠贞参与了实验设计, 潘泓、盖严支、钱立恒、聂惠贞参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was designed by PAN Hong, LIAO Yingna and NIE Huizhen. The manuscript was drafted and revised by PAN Hong, GAI Yanzhi, QIAN Liheng and NIE Huizhen. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2022-09-06
- Accepted: 2023-03-15
- Published online: 2023-03-28

#### 参 · 考 · 文 · 献

- [1] ENCARNACIÓN-ROSADO J, KIMMELMAN A C. Harnessing metabolic dependencies in pancreatic cancers[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(7): 482-492.
- [2] AMRUTKAR M, GLADHAUG I P. Pancreatic cancer chemoresistance to gemcitabine[J]. *Cancers (Basel)*, 2017, 9(11): 157.
- [3] SALLY Á, MCGOWAN R, FINN K, et al. Current and future therapies for pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(10): 2417.
- [4] CHEN Y H, MA X E, CUI Y Y. The research status of the Sorting Nexins Family[J]. *Chin Sci Bull*, 2014, 59(35): 3442-3449.
- [5] ZHAN X Y, ZHANG Y Q, ZHAI E T, et al. Sorting nexin-1 is a candidate tumor suppressor and potential prognostic marker in gastric cancer[J]. *PeerJ*, 2018, 6: e4829.
- [6] PUCCINI J, BADGLEY M A, BAR-SAGI D. Exploiting cancer's drinking problem: regulation and therapeutic potential of micropinocytosis[J]. *Trends Cancer*, 2022, 8(1): 54-64.
- [7] KAY R R. Macropinocytosis: biology and mechanisms[J]. *Cells Dev*, 2021, 168: 203713.
- [8] COMMISSO C, DAVIDSON S M, SOYDANER-AZELOGLU R G, et al. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells[J]. *Nature*, 2013, 497(7451): 633-637.
- [9] MURANEN T, IWANICKI M P, CURRY N L, et al. Starved epithelial cells uptake extracellular matrix for survival[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 13989.
- [10] DAVIDSON S M, JONAS O, KEIBLER M A, et al. Direct evidence for cancer-cell-autonomous extracellular protein catabolism in pancreatic tumors[J]. *Nat Med*, 2017, 23(2): 235-241.
- [11] LIU H Q, QIAN F. Exploiting macropinocytosis for drug delivery into KRAS mutant cancer[J]. *Theranostics*, 2022, 12(3): 1321-1332.
- [12] PRINCIPE D R, TIMBERS K E, ATIA L G, et al. TGF- $\beta$  signaling in the pancreatic tumor microenvironment[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(20): 5086.
- [13] RAMIREZ C, HAUSER A D, VUCIC E A, et al. Plasma membrane V-ATPase controls oncogenic RAS-induced macropinocytosis[J]. *Nature*, 2019, 576(7787): 477-481.
- [14] SWANSON J A. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(8): 639-649.
- [15] ZHANG Y F, LI Q, HUANG P Q, et al. A low amino acid environment promotes cell macropinocytosis through the YY1-FGD6 axis in Ras-mutant pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Oncogene*, 2022, 41(8): 1203-1215.
- [16] KERR M C, LINDSAY M R, LUETTERFORST R, et al. Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 19): 3967-3980.
- [17] ZDZALIK-BIELECKA D, POŚWIATA A, KOZIK K, et al. The GAS6-AXL signaling pathway triggers actin remodeling that drives membrane ruffling, macropinocytosis, and cancer-cell invasion[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(28): e2024596118.
- [18] KIM S M, NGUYEN T T, RAVI A, et al. PTEN deficiency and AMPK activation promote nutrient scavenging and anabolism in prostate cancer cells[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(7): 866-883.
- [19] ZHANG M S, CUI J D, LEE D, et al. Hypoxia-induced macropinocytosis represents a metabolic route for liver cancer[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 954.
- [20] LEE S W, ZHANG Y J, JUNG M, et al. EGFR-Pak signaling selectively regulates glutamine deprivation-induced macropinocytosis[J]. *Dev Cell*, 2019, 50(3): 381-392.e5.

[本文编辑] 邢宇洋