

**Цитата:** Jo, H.; Lee, D.; Go, C.; Jang, Y.; Bae, S.; Agura, T.; Hong, J.; Kang, D.; Kim, Y.; Kang, J.S. Alloferon Affects the Chemosensitivity of Pancreatic Cancer by Regulating the Expression of SLC6A14. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1113. [https://doi.org/](https://doi.org/10.3390/biomedicines10051113) [10.3390/biomedicines10051113](https://doi.org/10.3390/biomedicines10051113)

*Опубликовано в журнале BIOMEDICINES Biomedicines 2022, 10, 1113*

***Статья***

**Аллоферон влияет на химиочувствительность рака поджелудочной железы посредством регуляции экспрессии LC6A14**

**Hyejung Jo 1, Dahae Lee 1, Cheolhyeon Go 1**[**,**](https://orcid.org/0000-0001-6448-417X) **Yoojin Jang 1, Suhyun Bae 1, Tomoyo Agura 1, Jiye Hong 1,**

**Dongmin Kang 2, Yejin Kim 1,3,\* and Jae Seung Kang 1,3,\***

1. Лаборатория витамина С и антиоксидантной иммунологии, кафедра анатомии и клеточной биологии, Медицинский колледж Сеульского национального университета, Сеул 03080, Корея; luv\_jo@snu.ac.kr (H.J.);

[ddhh12345@snu.ac.kr](mailto:ddhh12345@snu.ac.kr) (D.L.); [rhcjfgus@snu.ac.kr](mailto:rhcjfgus@snu.ac.kr) (C.G.); [pierce52@snu.ac.kr](mailto:pierce52@snu.ac.kr) (Y.J.); [baesh9706@snu.ac.kr](mailto:baesh9706@snu.ac.kr) (S.B.);

[tomoyoagura@gmail.com](mailto:tomoyoagura@gmail.com) (T.A.); [carpediem0912@naver.com](mailto:carpediem0912@naver.com) (J.H.).

1. Laboratory of Vitamin C and Antioxidant Immunology, Department of Anatomy and Cell Biology, Seoul National University College of Medicine, Seoul 03080, Korea; [luv\_jo@snu.ac.kr](mailto:luv_jo@snu.ac.kr) (H.J.);

[ddhh12345@snu.ac.kr](mailto:ddhh12345@snu.ac.kr) (D.L.); [rhcjfgus@snu.ac.kr](mailto:rhcjfgus@snu.ac.kr) (C.G.); [pierce52@snu.ac.kr](mailto:pierce52@snu.ac.kr) (Y.J.); [baesh9706@snu.ac.kr](mailto:baesh9706@snu.ac.kr) (S.B.);

[tomoyoagura@gmail.com](mailto:tomoyoagura@gmail.com) (T.A.); [carpediem0912@naver.com](mailto:carpediem0912@naver.com) (J.H.).

2. Кафедра психологии и наук о мозге, Колледж искусств и наук Бостонского университета, Бостон, Массачусетс 02215, США; [dong1109@bu.edu](mailto:dong1109@bu.edu)..

2. Department of Psychological and Brain Sciences, College of Arts and Sciences, Boston University, Boston, MA 02215, USA; [dong1109@bu.edu](mailto:dong1109@bu.edu).

1. Медицинский исследовательский центр, Институт аллергологии и клинической иммунологии, Сеульский национальный университет, Сеул 03080, Корея.

3. Medical Research Center, Institute of Allergy and Clinical Immunology, Seoul National University, Seoul 03080, Korea.

**\*** Для корреспонденции: [bbambaya921@snu.ac.kr](mailto:bbambaya921@snu.ac.kr) (Y.K.); [genius29@snu.ac.kr](mailto:genius29@snu.ac.kr) (J.S.K.)

**Аннотация:** Рак поджелудочной железы (РПЖ) является одним из наиболее злокачественных солидных опухолей с высоким уровнем смертности. Несмотря на большое количество проведенных испытаний химиотерапевтических препаратов, таких как гемцитабин, показатели смертности остаются существенно выше в сравнении с другими видами рака. Таким образом, существует необходимость в более эффективных методах традиционной терапии РПЖ. Раковые клетки поглощают большое количество глутамина, что приводит к их быстрой пролиферации. Недавние исследования показывают, что переносчик аминокислот SLC6A14 активируется при некоторых видах рака наряду с метаболизмом глутамина. Аллоферон, являющийся пептидом, выделенным из иммунной системы насекомых, оказывает противовирусный и противовоспалительный эффект за счет своей иммуномодулирующей функции. Вдобавок, он обладает противоопухолевым действием, несмотря на то, что лежащие в его основе механизмы по большей части неизвестны. Таким образом, мы проводили исследование влияние аллоферона на клеточные линии РПЖ Panc-1 и AsPC-1. Воздействие на эти клетки аллоферона в течение 3 недель привело к уменьшению экспрессии SLC6A14 и снижению поглощения глутамина. Учитывая роль SLC6A14 в прогрессировании опухоли и выживании, способствуя поглощению глутаминараковыми клетками, аллоферон мог бы стать потенциальным адъювантом для химиотерапевтического препарата гемцитабина.

Получено: 14 марта 2022 года

Принято: 9 мая 2022 года

Опубликовано: 11 мая 2022 года

**Примечание издателя:** MDPI остается нейтральным в отношении юрисдикционных претензий в опубликованных картах и институциональной принадлежности.­

**Ключевые слова:** аллоферон; рак поджелудочной железы; SLC6A14; глутамин; гемцитабин

Научный редактор: Сатоши Вада Научный редактор: Сатоши Вада

 1. Вступление

**Авторское право:** © 2022 авторы. Лицензиат MDPI, Базель, Швейцария. Данная статья является статьей открытого доступа, распространяемой в соответствии с условиями лицензии Creative Commons с указанием авторства (CC BY) [(https://](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) [creativecommons.org/licenses/by /](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) 4.0/).

Рак поджелудочной железы (РПЖ) представляет собой агрессивный рак с высоким уровнем смертности и неблагоприятным прогнозом. В последнее время было проведено множество исследований по новым методам лечения РПЖ, однако, уровень смертности пациентов с РПЖ продолжает расти [[1]](#bookmark33). Согласно статистике Американского онкологического сообщества, известно, что 5-летняя общая выживаемость при РПЖ в целом составляет 11%, несмотря на то, что это зависит от прогрессирования опухоли. При этом если рак прогрессировал до отдаленных метастазов, 5-летняя общая выживаемость составляет всего около 3%. Это говорит о том, что раннее выявление и лечение опухолей критически важны для лечения РПЖ [[1-3](#bookmark33)[]](#bookmark34). В самом деле, заболеваемость РПЖ продолжает расти во всех регионах и группах населения; однако лишь 10% пациентов пригодны для хирургического вмешательства на момент постановки диагноза, поскольку ранняя диагностика представляет собой сложную задачу [[3-6](#bookmark34)[]](#bookmark37). Было выполнено большое количество исследований, направленных на повышение выживаемости пациентов с раковыми заболеваниями; они включали цитотоксическую химиотерапию, низкомолекулярные ингибиторы, моноклональные антитела и программирование адаптивного иммунитета; однако хирургическое удаление по-прежнему является самым результативным методом лечения РПЖ [[4,7,8](#bookmark36)[]](#bookmark39). Гемцитабин является наиболее часто используемым и эффективным химиотерапевтическим средством при РПЖ. К сожалению, последние достижения в терапевтических и хирургических методах лечения РПЖ не привели к улучшению 5-летней выживаемости [[6]](#bookmark37). По этой причине очень необходимы усовершенствованные терапевтические стратегии, основанные на гемцитабине.

Глутамин - это важная аминокислота, играющая решающую роль в поддержании и стимулировании функции раковых клеток. Метаболизм глутамина играет важнейшую роль для клеточной пролиферации и синтеза белка, поскольку аминокислота используется в качестве митохондриального субстрата для производства энергии и биосинтеза. Он также обеспечивает азот для синтеза нуклеотидов и активирует mTORC1 в клетках для регуляции сигнальных путей и поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза [[9-17](#bookmark40)[]](#bookmark41). Роль метаболизма глутамина исследовалась при раке молочной железы, раке печени, раке легких, раке яичников и раке почек [[18-23](#bookmark42)[]](#bookmark43). Фактически, в некоторых опухолях, включая РПЖ, феномен, называемый “глутаминовой зависимостью”, показывает, что рак не способен выживать без экзогенных добавок глутамина [[24,25](#bookmark44)[]](#bookmark45). Вышеупомянутые исследования предполагают, что потенциальные терапевтические подходы следует направить на метаболизм глутамина в раковых клетках.

Транспортеры аминокислот представляют собой белки, связанные с плазматической мембраной, которые избирательно­ переносят определенные аминокислоты в клетки и их органеллы, а также из них [[26](#bookmark46)[,27]](#bookmark47) . Среди этих переносчиков SLC6A14 взаимодействует с широким спектром субстратов, включая все нейтральные и катионные аминокислоты; исключениями являются глутамат и аспартат. Переносчики используют энергию, обеспечиваемую градиентами Na+ и Cl-, а также мембранным потенциалом, для поступления аминокислот в клетки. SLC6A14 играет важную роль в поглощении глутамина и, следовательно, в выживании раковых клеток [[28](#bookmark48)[,29]](#bookmark49). SLC6A14 повышается при многих различных типах рака, включая рак толстой кишки, рак шейки матки, рак молочной железы с положительным рецептором эстрогена, РПЖ и остеосаркому [[30](#bookmark50)[-36]](#bookmark55).

Аллоферон - это короткий пептид, который был впервые выделен из крови личинок *Calliphora* *vincina* после заражения бактериями. Существует два варианта аллоферона, аллоферон 1 и аллоферон 2. Они различаются по количеству аминокислот в пептидной цепи: 13 и 12 соответственно [[37]](#bookmark56). Есть несколько сообщений о роли аллоферона в качестве противовирусного, противовоспалительного и противоопухолевого средства [[38](#bookmark57)[-42]](#bookmark60). Предыдущие исследования показали, что аллоферон имеет противоопухолевый эффект в отношении рака предстательной железы и колоректального рака. Однако его действие в отношении РПЖ неизвестно.

Таким образом, цель данного исследования заключалось в изучении противоопухолевых эффектов аллоферона в качестве адъюванта гемцитабина. Результаты показывают, что аллоферон регулирует экспрессию SLC6A14 на РПЖ, тем самым ингибируя поглощение глутамина. Таким образом, аллоферон является новой многообещающей терапевтической стратегией при РПЖ.

1. **Материалы и методы**
   1. *Культура клеток*

Клеточные линии РПЖ человека Panc-1 и AsPC-1 были приобретены в Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния, США). Panc-1 культивировали в среде DMEM (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США) с добавлением 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; HyClone, Logan, UT, США) и антибиотиков (100 ед/мл пенициллина и 100 мкл г/мл стрептомицина; Welgene, Kyungsan, Корея). AsPC-1 выращивали в среде RPMI1640 (GIBCO, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США); этот состав RPMI был изменен ATCC для добавления 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. В экспериментах в эти среды для культивирования клеток добавляли 4 мкг/мл аллоферона к клеткам в течение 3 недель. Контрольные клетки не подвергались обработке аллофероном. Клеточные линии инкубировали при 37°C в увлажненном инкубаторе, содержащем 5% CO2.

* 1. *Иммунофлуоресцентный микроскопический анализ*

Panc-1 и AsPC-1 обрабатывали в течение 3 недель аллофероном или без него (4 мкг/мл), а затем высевали на покровные листы толщиной 12 мм в 24-луночном планшете. Далее клетки инкубировали в течение ночи и дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), фиксировали в течение 15 мин при 4°C 2% параформальдегидом (PFA). Для иммунофлуоресцентного окрашивания к клеткам на покровных стеклах добавляли пермеабилизирующий раствор (0,1% Triton X-100 в фосфатно-солевом буфере) и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре (КТ). С целью предотвращения неспецифического окрашивания, промытые клетки инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре с блокирующим буфером (0,1% Triton X-100, 0,5% BSA, 5% нормальной козьей сыворотки), а затем подвергали в течение 2 часов при комнатной температуре воздействию кроличьего античеловеческого SLC6A14 (MBL, Нагоя, Япония), разведенного в блокирующем буфере. После этого инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре с конъюгированным с Alexa Fluor 488 козьим антикроличьим IgG (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США), разведенным в блокирующем буфере. Далее клетки помещали в заливочную среду, содержащую DAPI (Immuno Bioscience, Мукилтео, Вашингтон, США). Для этого покровные стекла устанавливали лицевой стороной вниз на предметное стекло, на которое помещали заливочную среду. Клетки подвергались анализу под флуоресцентным микроскопом (EVOS M5000; Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Измерялась средняя интенсивность флуоресценции и нормировалась к сигналу флуоресценции, генерируемому DAPI.

* 1. *Вестерн-блот анализ*

Panc-1 и AsPC-1 обрабатывали (или не обрабатывали) аллофероном (4 мкг /мл), а затем лизировали в буфере RIPA, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 1% NP-40, 0,25% дезоксихолата натрия, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и смесь ингибиторов протеазы. Концентрация белка измерялась с помощью анализа бицинхониновой кислоты (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США). Равное количество белка (30 мкг/образец) загружали в каждую полосу 12% SDS-ПААГ и затем разделяли ­электрофорезом (100 В в течение 4 ч). Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (400 мА в течение 1 ч), которую затем блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре 5% обезжиренным молоком в 0,1% твине 20 в фосфатно-солевом буферном растворе (PBST). После этого заблокированную мембрану инкубировали в течение ночи при 4°C с кроличьими антителами против человеческого SLC6A14 (MBL) и мышиными антителами против человеческого β -актина (Santa Cruz Biotechnology, Даллас, Техас, США). После трехкратной промывки (каждая по 10 мин) PBST мембрану инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с антикроличьим IgG, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) (Cell Signaling Technology, Бостон, Массачусетс, США) для обнаружения SLC6A14, или с HRP-конъюгированным антимышиным IgG (Cell Signaling Technology) для выявления β-актина. Затем мембрану промывали три раза (по 10 мин), и ­иммуноактивные белки визуализировали с помощью системы обнаружения SLC6A14 Lumi Femto (DoGenBio, Сеул, Корея) либо системы обнаружения β-актина Lumi La (DoGenBio). Плотность полосы анализировалась с помощью программного обеспечения Image J (NIH, Bethesda, MD, США). Результаты были выражены в виде интенсивности по отношению к β-актину.

* 1. *Анализ CCK-8*

Клетки Panc-1 и AsPC-1 обрабатывали (или не обрабатывали) аллофероном (4 мкг/мл) в течение 3 недель, после этого высевали в 96-луночный культуральный планшет. После инкубации в течение ночи клетки обрабатывали 100 мкл гемцитабина (0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 50, 100, 500 или 1000 мкМ) в полной среде с 10% фетальной бычьей сывороткой и инкубировали в течение 72 часов. Для исследования жизнеспособности клеток среду аспирировали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора набора для анализа клеточной пролиферации и цитотоксичности (EZ-Cytox; Dogen) (10% раствор EZ-Cytox в фосфатно-солевой буфер). Абсорбция измерялась при 450 нм с помощью считывателя микропланшетов и программного обеспечения SoftMax Pro (Молекулярные устройства). IC50 гемцитабина определяли с помощью нелинейного регрессионного анализа в GraphPad Prism 5 (программное обеспечение GraphPad, Ла-Хойя, Калифорния, США).

* 1. *Анализ поглощения глутамина*

Клетки Panc-1 и AsPC-1 обрабатывались в течение 3 недель аллофероном либо без него (4 мкг/мл), высевали в 6-луночный культуральный планшет и инкубировали в течение ночи. Далее клетки промывали и инкубировали в течение 4 часов в обычной культуральной среде без FBS. Затем среду меняли на RPMI/DMEM без глутамина для уменьшения содержания глутамина. Вслед за инкубацией еще в течение 4 часов среду, не содержащую глутамин, заменили на RPMI1640 или DMEM, с содержанием 2 мм и 4 мм глутамина соответственно. Концентрация внутриклеточного глутамина измерялась с помощью набора для анализа глутамина (Promega, Мэдисон, Висконсин, США). Вкратце, клетки удаляли из чашек с использованием трипсин-ЭДТА и помещали в коническую пробирку объемом 15 мл. Клетки промывали фосфатно-солевом буфером и лизировали в 0,3 N HCl/450 мМ Tris. Анализ проводился в соответствии с инструкциями производителя. Люминесценцию измеряли с помощью программного обеспечения SoftMax Pro (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния, США).

* 1. *Анализ клеточного цикла*

Panc-1 и AsPC-1 обрабатывали аллофероном или без него (4 мкг/мл) в течение 3 недель, а затем высевали в культуральную чашку площадью 100 см2. Клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером, а затем обрабатывали 4 мкг/мл аллофероном и гемцитабином. Для того, чтобы определить, что максимальная доза показала существенно меньшее изменение распределения клеточного цикла, мы обрабатывали гемцитабином в диапазоне концентраций от 0 до IC50 в среде (Panc-1: 0, 0.25, 0.5, 1, 10 мкм; AsPC-1: 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 5 мк М). После инкубации в течение 72 часов клетки собирали с использованием трипсин-ЭДТА. После этого клетки (5 × 10 5) фиксировали в 75% этаноле (добавляли по капле) и инкубировали в течение ночи при -20 °C. Фиксированные клетки Panc-1 и AsPC-1 промывали фосфатно-солевым буфером и буфером для окрашивания проточной цитометрии (фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,5% альбумин бычьей сыворотки и 0,1% азида натрия). Для окрашивания клетки ресуспендировали в течение 15 минут при комнатной температуре в 0,5 мл буфера для окрашивания йодидом пропидия/РНКазой (BD Pharmingen, Сан-Диего, Калифорния, США) и анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием цитометра FACSLyric TM (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния, США). Данные анализировались с помощью программного обеспечения FlowJo (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США).

* 1. *Статистический анализ*

Данные представлены в виде среднего значения ± SD. Для сравнения двух групп использовался непарный двухвостый t-тест. *р*-значения <0,05 считались статистически значимыми. Статистический анализ проводился с использованием GraphPad Prism 5 (программное обеспечение GraphPad).

**3. Результаты**

* 1. *Аллоферон подавляет экспрессию SLC6A14 в клеточных линиях РПЖ*

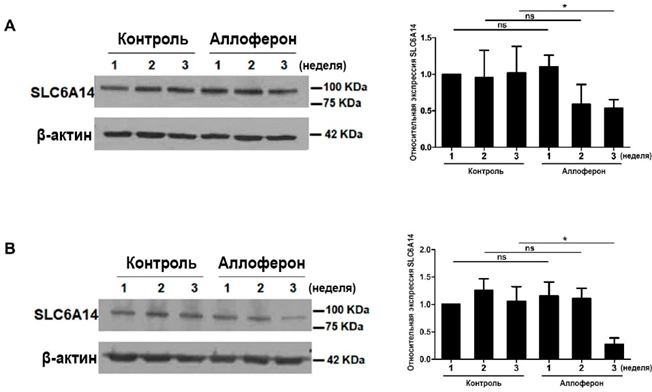
На основании двух предыдущих отчетов, показывающих активацию SLC6A14 в клетках РПЖ [[34,35](#bookmark53)[]](#bookmark54) и нашем предыдущем отчете, касающемся противоопухолевой активности аллоферона против опухолевых клеток посредством активации NK-клеток [[41]](#bookmark59), мы исследовали, влияет ли аллоферон на его прямую противоопухолевую активность через экспрессию SLC6A14 на Panc-1и AsPC-1. После обработки клеток 4 мкг/мл аллоферона изменения в экспрессии SLC6A14 оценивались на 1, 2 и 3 неделях методом иммунофлуоресцентной микроскопии. Как показано на рисунке 1 А, экспрессия SLC6A14 на Panc-1 через 2 недели понизилась, причем понижение было еще более выраженным через 3 недели. Таким же образом, экспрессия SLC6A14 на AsPC-1 заметно снизилась через 2 недели (рис. 1B). Данные иммунофлуоресценции были подтверждены вестерн-блот анализом. Экспрессия ­SLC6A14 снизилась после обработки аллофероном (рис. [2)](#bookmark23). Помимо прочего, мы обнаружили, что базальная экспрессия SLC6A14 была выше в Panc-1, чем в AsPC-1 (Дополнительный Рисунок S1). Взятые вместе, данные свидетельствуют о том, что аллоферон ингибирует экспрессию SLC6A14 в клетках РПЖ. Также, основываясь на этих данных, перед всеми будущими экспериментами мы обрабатывали клетки 4 мкг/мл аллофероном в течение 3 недель.

* 1. *Аллоферон повышает химиочувствительность Panc-1 и AsPC-1*

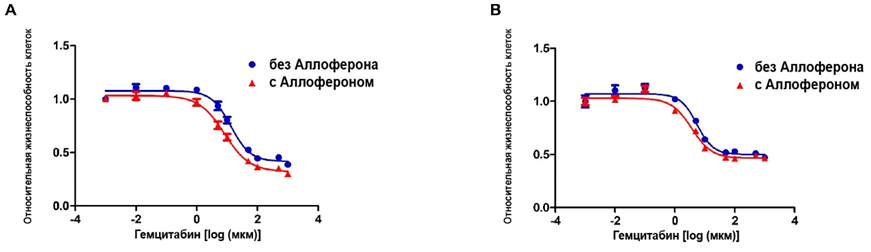
Далее мы исследовали изменения в химиочувствительности клеток Panc-1 и AsPC-1 путем измерения IC50 по отношению к гемцитабину в присутствии/отсутствии аллоферона. Предыдущее исследование предполагает, что блокада SLC6A14 запускает альтернативные метаболические пути, включающие триптофан, аминокислоты с разветвленной цепью, кетоновые тела и мембранные фосфолипиды, и что дисфункция SLC6A14 играет важную роль в повышенной химиочувствительности [[43]](#bookmark61). После культивирования в течение 3 недель в присутствии или отсутствии аллоферона (4 мкг/мл) клетки­ подвергали воздействию гемцитабина (от 0,001 нМ до 1000 мкм) в течение 72 ч. Среднее значение IC50 в Panc-1 снижалось в присутствии аллоферона (без аллоферона: 11,83 ± 1,47 мкмоль; с аллофероном: 9,22 ± 1,01 мкмоль). То же самое было верно для AsPC-1 (без аллоферона: 4,04 ± 1,54 мкм; с аллофероном: 3,12 ± 0,39 мкм) (рис. 3). Таким образом, клеточные линии РПЖ, обработанные аллофероном, имели тенденцию быть более химиочувствительными, чем необработанные. Но при этом, данные результаты свидетельствуют о том, что аллоферон действительно повышает химиочувствительность клеток РПЖ к гемцитабину.



**Рисунок 1.** Иммунофлуоресцентный микроскопический анализ изменений экспрессии SLC6A14 поджелудочной железой­ линии клеток рака Panc-1 и AsPC-1 при воздействии аллоферона. Panc-1 и AsPC-1 культивировали в течение 3 недель в присутствии или в отсутствие аллоферона (4 мкг/мл). Изменения экспрессии SLC6A14 в контрольных (необработанных) и обработанных аллофероном клетках изучались через 1, 2 и 3 недели. Белок SLC6A14 определялся количественно путем измерения флуоресценции GFP (зеленый), а ядра окрашивали с DAPI (синий): (**А**) Panc-1 и (**Б**) AsPC-1. Контроль 2'Ab означает, что была окраска только вторичным антителом. Изображения показаны при 400 -кратном увеличении (масштабная линейка, 125 мкм). Экспрессию SLC6A14 в разное время нормализовали до экспрессии SLC6A14 в контроле Panc-1 и AsPC-1 в течение первой недели (установлено в виде 1). Данные представлены в виде среднего значения ± SD. \* *p* < 0,05; \*\* *p* < 0,01; \*\*\* *p* < 0,001; ns = незначимо.



**Рисунок 2.** Вестерн-блот анализ изменений экспрессии SLC6A14 клеточными линиями рака поджелудочной железы Panc-1 и AsPC-1. Клетки культивировали в течение 3 недель в присутствии и отсутствии аллоферона. Для изучения SLC6A14 был проведен вестерн-блот анализ. β-актин использовали в качестве контроля нагрузки: (**А**) Panc-1, (**B**) AsPC-1. Относительные изменения в экспрессии SLC6A14 указаны на гистограмме. Результаты являются репрезентативными для пяти независимых экспериментов. Данные представлены в виде среднего значения ± SD. \* *p* < 0,05; ns = незначимо.



|  |  |
| --- | --- |
|  | IC50 (мкм) |
| без Аллоферона | 11.67±1.30 |
| с Аллофероном | 9.11 ±0.89\* |

|  |  |
| --- | --- |
|  | IC50 (мкм) |
| без Аллоферона | 4.34±1.43 |
| с Аллофероном | 3.27±0.42† |

Рисунок 3. Аллоферон снижает значение IC50 гемцитабина в отношении раковых клеток поджелудочной железы. Клетки культивировались в течение 3 недель в присутствии и отсутствии 4 мкг/мл аллоферона, а затем высевались в 96-луночный культуральный планшет. Клетки обрабатывались гемцитабином (от 0,001 нМ до 1000 мкм) и затем инкубировались в течение 72 часов. Пролиферацию клеток нормализовали по отношению к клеткам, обработанным 0,001 нМ гемцитабина: (A) Panc-1 и (B) AsPC-1. Результаты являются репрезентативными для четырех независимых экспериментов. Данные представлены в виде среднего значения ± SD. \* p < 0,05 для Panc-1 (A); † p = 0,12 для AsPC-1 (B).

3.3. Аллоферон ингибирует поглощение глутамина в клетках РПЖ

Из-за того, что мы заметили, что экспрессия SLC6A14 снижается после обработки аллофероном, мы провели анализ поглощения глутамина, дабы выяснить, уменьшилось ли также поглощение глутамина у Panc-1 и AsPC-1. Схема анализа показана на рисунке 4 А. Мы выявили, что абсолютная внутриклеточная концентрация глутамина в клетках Panc-1 (5,54 ± 0,48 мкм, рис. 4 Б) была выше, чем в клетках AsPC-1 (1,12 ± 0,08 мкм, рис. 4В) в ­отсутствии аллоферона. После культивирования клеток Panc-1 и AsPC-1 в течение 3 недель в присутствии 4 ­мкг/мл аллоферона мы наблюдали уменьшение внутриклеточной концентрации глутамина в клетках Panc-1 (3,72 ± 0,34 мкм после обработки, рис. 4B). При этом не наблюдалось никакой разницы во внутриклеточной концентрации глутамина в клетках AsPC-1 в присутствии аллоферона (1,05 ± 0,14 после обработки, рис. 4С). Поэтому мы затем исследовали изменения в способности клеток поглощать глутамин после воздействия аллоферона после 4 часов инкубации в культуральной среде, не содержащей глутамин, с последующей еще 4 часовой инкубацией в культуральной среде, содержащей глутамин.

Когда клетки инкубировали в течение 4 часов в культуральной среде без глутамина, внутриклеточная концентрация глутамина в клетках Panc-1 в присутствии аллоферона снизилась до 0,84 ± 0,48 мкм (по сравнению с 1,68 ± 0,07 мкм в отсутствии аллоферона) (рис. 4 Б). Примечательно, несмотря на то, что внутриклеточная концентрация глутамина в Panc-1 в отсутствие аллоферона быстро восстанавливалась (4,75 ± 0,26 мкмоль). Когда же клетки подвергались воздействию среды с содержанием глутамина, восстановление было намного ниже в клетках, культивируемых с 4 мкг/мл аллоферона в течение 3 недель (рис. 4В). С другой стороны, не наблюдалось никакой выраженной разницы во внутриклеточной концентрации глутамина в клетках AsPC-1 в присутствии/отсутствии аллоферона; действительно, мы обнаружили чрезвычайно низкие внутриклеточные концентрации глутамина в AsPC-1 даже в отсутствие аллоферона (рис. 4С). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что аллоферон изменяет поглощение глутамина в некоторых клетках РПЖ.

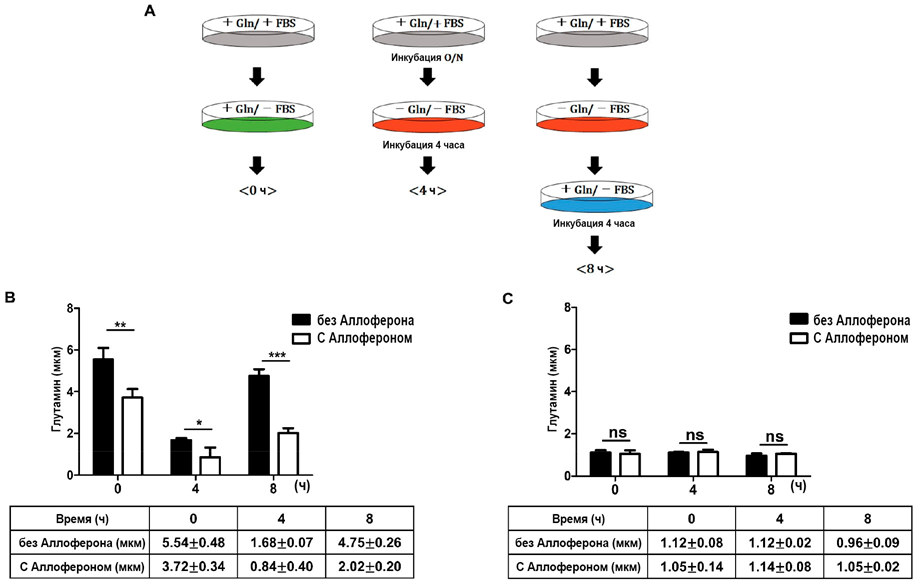
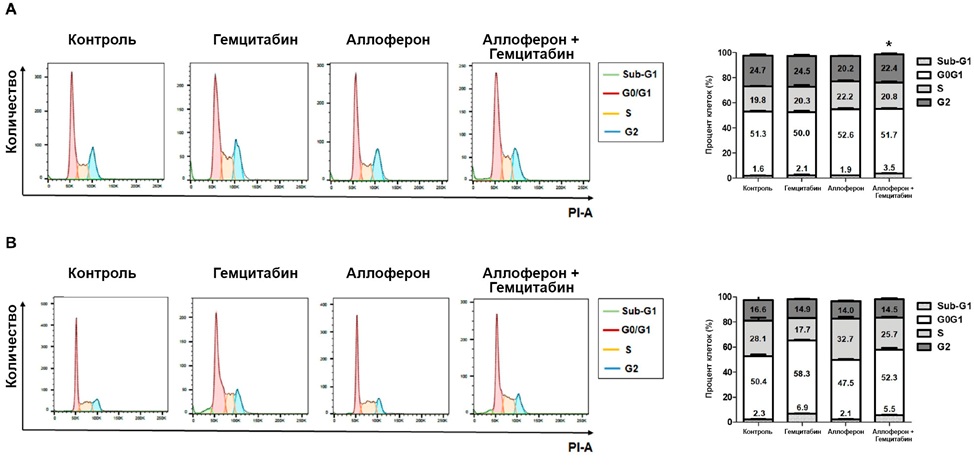


Рисунок 4. Изменения внутриклеточных уровней глутамина в клеточных линиях рака поджелудочной железы, подвергшихся воздействию аллоферона. Клетки Panc-1 и AsPC-1 выращивали в течение ночи в полной среде, содержащей 2 или 4 мм глутамина ­соответственно. Затем клетки культивировали еще в течение 4 часов в среде без содержания глутамина. Затем измеряли внутриклеточную концентрацию глутамина до и после добавления экзогенного глутамина. (А) Схема показывает анализ поглощения глутамина. Внутриклеточная концентрация глутамина измерялась с помощью набора для анализа глутамина. (B) клетки Panc-1 и (C) клетки AsPC-1. Каждый образец был протестирован в трех экземплярах, и данные представлены в виде среднего значения ± SD. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; ns = незначимо.

* 1. *Совместное лечение клеток РПЖ аллофероном и гемцитабином изменяет распределение клеточного цикла*

Поскольку чувствительность клеток Panc-1 и AsPC-1 к гемцитабину повышалась после воздействия аллоферона, мы провели анализ клеточного цикла, чтобы исследовать влияние аллоферона на распределение клеточного цикла в присутствии гемцитабина. Для этого, во-первых, были проведены эксперименты ­по определению самой высокой концентрации гемцитабина, не проявляющей цитотоксических эффектов. Никаких цитотоксических эффектов гемцитабина в отношении клеток Panc-1 и AsPC-1 не наблюдалось при 0,0625 мкм и 0,5 мкм соответственно (дополнительные рисунки S2 и S3). Комбинация гемцитабина с аллофероном увеличило процент апоптотических клеток Panc-1 в фазе sub-G1 (2,1 ± 0,3% в отсутствие аллоферона и 3,5 ± 0,3% в присутствии аллоферона, *р* = 0,02; рис. 5А). Однако аллоферон не оказывал синергического эффекта на суб-G1 популяцию клеток AsPC-1 (рис. 5B). Таким образом, аллоферон увеличивает процент клеток Panc-1 в фазе sub-G1.



**Рисунок 5.** Изменения в распределении клеточного цикла клеток Panc-1 и AsPC-1, подвергшихся воздействию аллоферона или гемцитабина. После обработки аллофероном или без него в течение 3 недель клетки Panc-1 и AsPC-1 высевали в культуральную чашку площадью 100 см2. Затем клетки обрабатывали 4 мкг /мл аллофероном, гемцитабином (Panc-1: 0,5 мкМ; AsPC -1: 0,0625 мкМ) или их комбинацией в течение 72 часов с последующим окрашиванием пропидий йодидом/РНКазой и проточным цитометрическим анализом.: ( **A** ) Panc-1 и ( **B** ) AsPC-1. Процентное содержание клеток в каждой фазе клеточного цикла указано в гистограмме. Результаты являются репрезентативными для трех независимых экспериментов, и данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. \* *p* <0,05 (гемцитабин суб-G1 по сравнению с комбинацией аллоферон + гемцитабин суб-G1).

1. **Обсуждение**

Причина развития РПЖ по-прежнему в до конца неизвестна, и до сих пор не существует эффективных методов лечения (кроме ранней резекции), продлевающих выживаемость [[2]](#bookmark35). На сегодняшний день многие исследования направлены на достижение максимального эффекта гемцитабина в качестве средства для лечения РПЖ путем комбинирования его с другими ­противоопухолевыми препаратами. Однако повышенная токсичность лекарств и индукция резистентности раковых клеток остаются самыми большими препятствиями [[44-47](#bookmark62)[]](#bookmark63). По этой причине целью этого исследования было изучение адъювантных эффектов аллоферона, пептидного препарата, вырабатываемого иммунной системой насекомых и который, как известно, обладает потенциальными противоопухолевыми эффектами [[40,41](#bookmark58)[]](#bookmark59).

Для этого мы исследовали, изменяет ли аллоферон экспрессию SLC6A14, который высоко экспрессируется в клетках РПЖ и тесно связан с метастазированием, пролиферацией и устойчивостью к химиотерапевтическим препаратам [[34]](#bookmark53). Как и ожидалось, экспрессия SLC6A14 на клеточных линиях РПЖ Panc-1 и AsPC-1 была существенно снижена при обработке аллофероном в течение 3 недель, даже несмотря на то, что экспрессия не менялась в течение первой недели (рисунки 1 и [2)](#bookmark23). Находкой стала то, что экспрессия SLC6A14 была выше в Panc-1, чем в AsPC-1, и что изменения в поглощении глутамина и статусе клеточного цикла в ответ на аллоферон были более значимыми для Panc-1, чем для AsPC-1. Основываясь на роли SLC6A14 в метаболизме и росте раковых клеток и обнаружении того, что Panc-1 является более злокачественным, чем AsPC-1 [[48](#bookmark64)[,49]](#bookmark65) , данные позволяют предположить, что аллоферон можно использовать в качестве химиоадъювантного препарата для регуляции метастазирования и распространения более агрессивных видов рака. Глутамин необходим для пролиферации, синтеза белка и химиорезистентности в раковых клетках; таким образом, говорят, что раковые клетки страдают "глутаминовой зависимостью" [[9,17,24,25](#bookmark40)[]](#bookmark45). Глутамин, поглощаемый SLC6A14, используется в качестве митохондриального субстрата для производства энергии и биосинтеза. Помимо прочего, метаболизм глутамина подпитывает цикл трикарбоновых кислот, биосинтез нуклеотидов и жирных кислот и окислительно-восстановительный баланс в раковых клетках. Помимо этого, глутамин активирует передачу сигналов mTOR, тем самым уменьшая нагрузку на эндоплазматический ретикулум и способствуя синтезу белка [[50-53](#bookmark66)[]](#bookmark67). Следовательно, супрессия поглощения глутамина посредством подавления экспрессии SLC6A14 способно повысить эффективность химиотерапии рака [[32,33,35,54](#bookmark51)[–56]](#bookmark69).

Как продемонстрировано на рисунке 4, аллоферон снижал поглощение глутамина в клетках Panc-1, а также понижал его внутриклеточную концентрацию. Это говорит о том, что аллоферон может быть эффективным подавителем “глутаминовой зависимости”. Основная причина сравнения изменения экспрессии SLC6A14 с изменением поглощения глутамина при лечении аллофероном как у Panc-1, так и у AsPC-1 заключается в том, что Panc-1 обладает высокой резистентностью к гемцитабину, в то время как AsPC-1 более чувствителен к нему. Иными словами, предполагалось, что степень экспрессии SLC6A14 в РПЖ против гемцитабина является фактором химиочувствительности к гемцитабину. Считается, что высокая экспрессия SLC6A14 в Panc-1 и возникающее в результате этого увеличение поглощения глутамина являются причиной высокой резистентности к гемцитабину. Как показано на рис. [2 A](#bookmark23), B, можно подтвердить, что относительная экспрессия SLC6A14 значительно ниже в AsPC-1 в сравнении с Panc-1. Данный факт подразумевает прямую корреляцию с меньшим количеством поглощения глутамина в AsPC-1 по сравнению с Panc-1 (рис. 4). Поскольку количество экспрессии SLC6A14 в основном значительно ниже в AsPC-1, чем в Panc-1, несмотря на то, что SLC6A14 был снижен в AsPC- 1 аллофероном (рис. 1B и [2B](#bookmark23) и дополнительный рисунок S1), подразумевается, что нет существенной разницы в количестве поглощаемого глутамина.

Затем мы исследовали, повышается ли химиочувствительность клеточных линий РПЖ к гемцитабину после воздействия аллоферона в течение 3 недель. В отсутствие аллоферона значение IC50 гемцитабина в Panc-1 было выше, чем в AsPC-1 (11,83 ± 1,47 мкм против 4,04 ± 1,54 мкм соответственно; рисунок 3). Более того, IC50 снизился после обработки аллофероном (Panc-1: 9,22 ± 1,01 мкм; AsPC-1: 3,12 ± 0,39 мкм). Предполагается, что разница в IC50 для двух клеточных линий снова обусловлена различиями в экспрессии SLC6A14. Так или иначе, результаты свидетельствуют о том, что аллоферон способен повышать химиочувствительность РПЖ к гемцитабину, особенно клеток РПЖ с высокой экспрессией SLC6A14.

Поскольку гемцитабин имеет цитотоксическое действие, блокируя синтез ДНК, мы изучали изменения в распределении клеточного цикла после обработки гемцитабином в присутствии и отсутствии аллоферона. Клеточные линии РПЖ подвергались воздействию нецитотоксических концентраций гемцитабина после предварительной обработки аллофероном в течение 3 недель. Популяция клеток Panc-1 в суб-G1 увеличилась незначительно, но заметно (2,1 ± 0,3% до по сравнению с 3,5 ± 0,3% после, *р* = 0,02; рисунок 5). Несмотря на то, что мы обнаружили незначительное увеличение количества мертвых клеток на стадии суб-G1 с 2,1 до 3,5 процентов и отсутствие существенных изменений в клетках AsPC–1, мы дополнительно провели анализ TUNEL целью подтверждения этого изменения. Как показано на дополнительных рисунках S4 и S5, TUNEL-позитивные клетки были обнаружены как в “Гемцитабине”, так и в комбинации “Аллоферон + Гемцитабин”, но статистической значимости не было выявлено. Это согласуется с результатами по поглощению глутамина и IC50 гемцитабина; мы не выявили значимых изменений в распределении клеточного цикла клеток AsPC-1. Опять же, это, скорее всего, связано с тем фактом, что экспрессия SLC6A14 в клетках AsPC-1 на порядок ниже, чем в клетках Panc-1. Таким образом, есть смысл дополнительно изучить в экспериментах эффект аллоферона и гемцитабина in vivo с использованием модели ксенотрансплантата.

В совокупности представленные здесь результаты позволяют предположить, что аллоферон может быть полезным адъювантом для химиотерапии на основе гемцитабина при РПЖ, в частности при РПЖ, который экспрессирует высокие уровни SLC6A14 и обладает высокой устойчивостью к гемцитабину. Однако для подтверждения этих данных необходимы дальнейшие исследования с использованием других устойчивых к гемцитабину клеток РПЖ. Ограничением исследования является то, что комбинированный эффект аллоферона и гемцитабина подтвердился только через клеточный цикл.

Несмотря на то, что SLC6A14 является мощным транспортером глутамина, другие транспортеры аминокислот, такие как SLC1A5, SLC38A1, SLC38A3, SLC48A5 и SLC7A5, также играют важную роль [[28,29](#bookmark48)[]](#bookmark49). Действительно, подавление SLC6A14 ингибирует функции SLC7A11 и SLC7A5 [[29]](#bookmark49). Таким образом, необходимо изучать влияние аллоферона на экспрессию других транспортеров аминокислот, дабы понять, блокирует ли он поглощение других незаменимых аминокислот, в которых нуждаются раковые клетки.

**5. Заключение**

Подводя итоги , это исследование продемонстрировало, что (1) аллоферон эффективно снижает экспрессию транспортера глутамина SLC6A14 в клетках рака поджелудочной железы, (2) тем самым уменьшая поглощение глутамина клетками, а также (3) снижение внутриклеточной концентрации глутамина способно повысить чувствительность к гемцитабину и увеличить апоптоз клеток. Это первое исследование, касающееся лечения рака поджелудочной железы с использованием аллоферона в качестве адъюванта к обычным химиотерапевтическим препаратам. Таким образом, настоящее исследование предоставляет доказательства нового потенциального применения аллоферона с гемцитабином для лечения рака поджелудочной железы путем регуляции экспрессии SLC6A14.

**Дополнительные материалы:** следующую вспомогательную информацию можно загрузить по адресу:  [https:](https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines10051113/s1) [//www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines10051113/s1,](https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines10051113/s1)рисунок S1: разница экспрессии SLC6A14 между Panc-1 и AsPC-1, рисунок S2: определение оптимальной концентрации гемцитабина, используемого для анализа клеточного цикла клеток Panc-1, Рисунок S3: Определение оптимальной концентрации гемцитабина, используемого для анализа клеточного цикла клеток AsPC-1, Рисунок S4: TUNEL-положительные клетки Panc-1 после воздействия к аллоферону и гемцитабину, Рисунок S5: TUNEL-положительные клетки AsPC-1 после воздействия аллоферона и гемцитабина.

**Вклад авторов:** Концептуализация, J.S.K.; методология, Y.K. и J.S.K.; формальный анализ, H.J.и Y.K.; исследование, H.J., D.L., C.G., Y.J., S.B., T.A. и JH; ресурсы, Y.K. и J.S.K.; курирование данных, Y.K. и J.S.K.; написание — подготовка первоначального проекта, H.J., Y.K.и J.S.K.; написание - обзор и редактирование, H.J., DK, Y.K. и J.S.K.; визуализация, H.J.; администрирование проекта J.S.K.; приобретение финансирования, Y.K. и J.S.K. Все авторы прочли и согласились с опубликованной версией рукописи.

**Финансирование:** Это исследование финансировалось Национальным фондом Кореи (№: 2017R1A2B2010948, 2017R1A6A3A11032576, 2020R1C1C1009334).

**Заявление Институционального наблюдательного совета:** неприменимо.

**Заявление об информированном согласии:** неприменимо.

**Заявление о доступности данных:** Все наборы данных, сгенерированные для этого исследования, включены в статью или Дополнительный файл.

**Конфликты интересов:** авторы заявляют, что исследование проводилось в отсутствие каких-либо коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть интерпретированы как потенциальный конфликт интересов.

**Список литературы**

1. American Cancer Society. Available online: [www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-](http://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html) [rates.html](http://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html) (accessed on 2 March 2022).
2. Park, W.; Chawla, A.; O’Reilly, E.M. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA* **2021**, *326*, 851–862. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1001/jama.2021.13027) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34547082)
3. Lambert, A.; Schwarz, L.; Borbath, I.; Henry, A.; Van Laethem, J.-L.; Malka, D.; Ducreux, M.; Conroy, T. An update on treatment options for pancreatic adenocarcinoma. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2019**, *11*, 1758835919875568. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1177/1758835919875568) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31598142)
4. Amanam, I.; Chung, V. Targeted therapies for pancreatic cancer. *Cancers* **2018**, *10*, 36. [[CrossRef]](http://doi.org/10.3390/cancers10020036) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29382159)
5. Barros, A.G.; Pulido, C.F.; Machado, M.; Brito, M.J.; Couto, N.; Sousa, O.; Melo, S.A.; Mansinho, H. Treatment optimization of locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *Int. J. Oncol.* **2021**, *59*, 110. [[CrossRef]](http://doi.org/10.3892/ijo.2021.5290) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34859257)
6. Zhao, Z.; Liu, W. Pancreatic cancer: A review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2020**, *19*, 1533033820962117. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1177/1533033820962117)
7. Wang, H.; Liu, J.; Xia, G.; Lei, S.; Huang, X.; Huang, X. Survival of pancreatic cancer patients is negatively correlated with age at diagnosis: A population-based retrospective study. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 7048. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1038/s41598-020-64068-3)
8. Rawla, P.; Sunkara, T.; Gaduputi, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J. Oncol.* **2019**, *10*, 10–27. [[CrossRef]](http://doi.org/10.14740/wjon1166)
9. Phan, L.M.; Yeung, S.-C.J.; Lee, M.-H. Cancer metabolic reprogramming: Importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biol. Med.* **2014**, *11*, 1.
10. Newsholme, P.; Lima, M.; Procopio, J.; Pithon-Curi, T.; Bazotte, R.; Curi, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2003**, *36*, 153–163. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1590/S0100-879X2003000200002)
11. Csibi, A.; Fendt, S.-M.; Li, C.; Poulogiannis, G.; Choo, A.Y.; Chapski, D.J.; Jeong, S.M.; Dempsey, J.M.; Parkhitko, A.; Morrison, T.; et al. The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell* **2013**, *153*, 840–854. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.023)
12. Khan, M.W.; Layden, B.T.; Chakrabarti, P. Inhibition of mTOR complexes protects cancer cells from glutamine starvation induced cell death by restoring Akt stability. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864*, 2040–2052. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.03.013) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29555211)
13. Nicklin, P.; Bergman, P.; Zhang, B.; Triantafellow, E.; Wang, H.; Nyfeler, B.; Yang, H.; Hild, M.; Kung, C.; Wilson, C.; et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **2009**, *136*, 521–534. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.044) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19203585)
14. Jewell, J.L.; Guan, K.-L. Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends Biochem. Sci.* **2013**, *38*, 233–242. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.01.004) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23465396)
15. DeBerardinis, R.J.; Cheng, T. Q’s next: The diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* **2010**, *29*, 313–324. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1038/onc.2009.358)
16. Kovacˇevic´, Z.; Morris, H. The role of glutamine in the oxidative metabolism of malignant cells. *Cancer Res.* **1972**, *32*, 326–333.
17. Nguyen, T.-L.; Durán, R.V. Glutamine metabolism in cancer therapy. *Cancer Drug Resist.* **2018**, *1*, 126–138. [[CrossRef]](http://doi.org/10.20517/cdr.2018.08)
18. El Ansari, R.; McIntyre, A.; Craze, M.L.; Ellis, I.O.; Rakha, E.A.; Green, A.R. Altered glutamine metabolism in breast cancer; subtype dependencies and alternative adaptations. *Histopathology* **2018**, *72*, 183–190. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1111/his.13334)
19. Demas, D.M.; Demo, S.; Fallah, Y.; Clarke, R.; Nephew, K.P.; Althouse, S.; Sandusky, G.; He, W.; Shajahan-Haq, A.N. Glutamine metabolism drives growth in advanced hormone receptor positive breast cancer. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 686. [[CrossRef]](http://doi.org/10.3389/fonc.2019.00686)
20. Nilsson, A.; Haanstra, J.R.; Engqvist, M.; Gerding, A.; Bakker, B.M.; Klingmüller, U.; Teusink, B.; Nielsen, J. Quantitative analysis of amino acid metabolism in liver cancer links glutamate excretion to nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 10294–10304. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1073/pnas.1919250117)
21. Vanhove, K.; Derveaux, E.; Graulus, G.-J.; Mesotten, L.; Thomeer, M.; Noben, J.-P.; Guedens, W.; Adriaensens, P. Glutamine addiction and therapeutic strategies in lung cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 252. [[CrossRef]](http://doi.org/10.3390/ijms20020252)
22. Yuan, L.; Sheng, X.; Willson, A.K.; Roque, D.R.; Stine, J.E.; Guo, H.; Jones, H.M.; Zhou, C.; Bae-Jump, V.L. Glutamine promotes ovarian cancer cell proliferation through the mTOR/S6 pathway. *Endocr.-Relat. Cancer* **2015**, *22*, 577–591. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1530/ERC-15-0192) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26045471)
23. Hampton, T. Blocking Glutamine Metabolism Shrinks Kidney Cancers in Mice. *JAMA* **2015**, *314*, 16. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1001/jama.2015.7175)
24. Wise, D.R.; Thompson, C.B. Glutamine addiction: A new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 427–433. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.003) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570523)
25. Cluntun, A.A.; Lukey, M.J.; Cerione, R.A.; Locasale, J.W. Glutamine metabolism in cancer: Understanding the heterogeneity. *Trends Cancer* **2017**, *3*, 169–180. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.01.005) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28393116)
26. Hyde, R.; Taylor, P.M.; Hundal, H.S. Amino acid transporters: Roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem. J.* **2003**, *373*, 1–18. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1042/bj20030405)
27. Pochini, L.; Scalise, M.; Galluccio, M.; Indiveri, C. Membrane transporters for the special amino acid glutamine: Structure/function relationships and relevance to human health. *Front. Chem.* **2014**, *2*, 61. [[CrossRef]](http://doi.org/10.3389/fchem.2014.00061)
28. Bhutia, Y.D.; Ganapathy, V. Glutamine transporters in mammalian cells and their functions in physiology and cancer. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Res.* **2016**, *1863*, 2531–2539. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.12.017)
29. Bhutia, Y.D.; Babu, E.; Prasad, P.D.; Ganapathy, V. The amino acid transporter SLC6A14 in cancer and its potential use in chemotherapy. *Asian J. Pharm. Sci.* **2014**, *9*, 293–303. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.04.004)
30. Gupta, N.; Miyauchi, S.; Martindale, R.G.; Herdman, A.V.; Podolsky, R.; Miyake, K.; Mager, S.; Prasad, P.D.; Ganapathy, M.E.; Ganapathy, V. Upregulation of the amino acid transporter ATB0,+(SLC6A14) in colorectal cancer and metastasis in humans. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Basis Dis.* **2005**, *1741*, 215–223. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.04.002)
31. Gupta, N.; Prasad, P.D.; Ghamande, S.; Moore-Martin, P.; Herdman, A.V.; Martindale, R.G.; Podolsky, R.; Mager, S.; Ganapathy, M.E.; Ganapathy, V. Up-regulation of the amino acid transporter ATB0,+(SLC6A14) in carcinoma of the cervix. *Gynecol. Oncol.* **2006**, *100*, 8–13. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.08.016)
32. Karunakaran, S.; Umapathy, N.S.; Thangaraju, M.; Hatanaka, T.; Itagaki, S.; Munn, D.H.; Prasad, P.D.; Ganapathy, V. Interaction of tryptophan derivatives with SLC6A14 (ATB0,+) reveals the potential of the transporter as a drug target for cancer chemotherapy. *Biochem. J.* **2008**, *414*, 343–355. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1042/BJ20080622) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18522536)
33. Karunakaran, S.; Ramachandran, S.; Coothankandaswamy, V.; Elangovan, S.; Babu, E.; Periyasamy-Thandavan, S.; Gurav, A.; Gnanaprakasam, J.P.; Singh, N.; Schoenlein, P.V.; et al. SLC6A14 (ATB0,+) protein, a highly concentrative and broad specific amino acid transporter, is a novel and effective drug target for treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 31830–31838. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1074/jbc.M111.229518) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21771784)
34. Penheiter, A.R.; Erdogan, S.; Murphy, S.J.; Hart, S.N.; Felipe Lima, J.; Rakhshan Rohakhtar, F.; O’Brien, D.R.; Bamlet, W.; Wuertz, R.E.; Smyrk, T.C.; et al. Transcriptomic and immunohistochemical profiling of SLC6A14 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 593572. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1155/2015/593572) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26106611)
35. Coothankandaswamy, V.; Cao, S.; Xu, Y.; Prasad, P.; Singh, P.; Reynolds, C.; Yang, S.; Ogura, J.; Ganapathy, V.; Bhutia, Y.D. Amino acid transporter SLC6A14 is a novel and effective drug target for pancreatic cancer. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *173*, 3292–3306. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1111/bph.13616)
36. Zhu, B.; Cheng, D.; Hou, L.; Zhou, S.; Ying, T.; Yang, Q. SLC3A2 is upregulated in human osteosarcoma and promotes tumor growth through the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol. Rep.* **2017**, *37*, 2575–2582. [[CrossRef]](http://doi.org/10.3892/or.2017.5530)
37. Chernysh, S.; Kim, S.; Bekker, G.; Pleskach, V.; Filatova, N.; Anikin, V.; Platonov, V.G.; Bulet, P. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12628–12632. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1073/pnas.192301899)
38. Kuczer, M.; Dziubasik, K.; Midak-Siewirska, A.; Zahorska, R.; Łuczak, M.; Konopin´ ska, D. Studies of insect peptides alloferon, Any-GS and their analogues. Synthesis and antiherpes activity. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* **2010**, *16*, 186–189. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1002/psc.1219)
39. Kim, Y.; Lee, S.K.; Bae, S.; Kim, H.; Park, Y.; Chu, N.K.; Kim, S.G.; Kim, H.-R.; Hwang, Y.-I.; Kang, J.S.; et al. The anti-inflammatory effect of alloferon on UVB-induced skin inflammation through the down-regulation of pro-inflammatory cytokines. *Immunol. Lett.* **2013**, *149*, 110–118. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.09.005)
40. Chernysh, S.; Irina, K.; Irina, A. Anti-tumor activity of immunomodulatory peptide alloferon-1 in mouse tumor transplantation model. *Int. Immunopharmacol.* **2012**, *12*, 312–314. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.10.016)
41. Bae, S.; Oh, K.; Kim, H.; Kim, Y.; Kim, H.-R.; Hwang, Y.-i.; Lee, D.-S.; Kang, J.S.; Lee, W.J. The effect of alloferon on the enhancement of NK cell cytotoxicity against cancer via the up-regulation of perforin/granzyme B secretion. *Immunobiology* **2013**, *218*, 1026–1033. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.12.002)
42. Jeon, J.; Kim, Y.; Kim, H.; Kang, J.S.; Lee, W.J. Anti-inflammatory effect of alloferon on ovalbumin-induced asthma. *Immune Netw.* **2015**, *15*, 304–312. [[CrossRef]](http://doi.org/10.4110/in.2015.15.6.304) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26770184)
43. Cai, A.; Zheng, H.; Chen, Z.; Lin, X.; Li, C.; Yao, Q.; Bhutia, Y.D.; Ganapathy, V.; Chen, R.; Kou, L. Synergism between SLC6A14 blockade and gemcitabine in pancreactic cancer: A 1H-NMR-based metabolomic study in pancreatic cancer cells. *Biochem. J.* **2020**, *477*, 1923–1937. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1042/BCJ20200275) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32379301)
44. Blomstrand, H.; Scheibling, U.; Bratthäll, C.; Green, H.; Elander, N.O. Real world evidence on gemcitabine and nab-paclitaxel combination chemotherapy in advanced pancreatic cancer. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 40. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1186/s12885-018-5244-2) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30621618)
45. Jin, J.; Teng, C.; Li, T. Combination therapy versus gemcitabine monotherapy in the treatment of elderly pancreatic cancer: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Drug Des. Dev. Ther.* **2018**, *12*, 475. [[CrossRef]](http://doi.org/10.2147/DDDT.S156766) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29563772)
46. Huang, D.; Fang, J.; Luo, G. Meta-analysis of gemcitabine and cisplatin combination chemotherapy versus gemcitabine alone for pancreatic cancer. *J. Cancer Res. Ther.* **2016**, *12*, 104.
47. Palacio, S.; Hosein, P.J.; Reis, I.; Akunyili, I.I.; Ernani, V.; Pollack, T.; Macintyre, J.; Restrepo, M.H.; Merchan, J.R.; Lima, C.M.R. The nab-paclitaxel/gemcitabine regimen for patients with refractory advanced pancreatic adenocarcinoma. *J. Gastrointest. Oncol.* **2018**, *9*, 135. [[CrossRef]](http://doi.org/10.21037/jgo.2017.10.12)
48. Huanwen, W.; Zhiyong, L.; Xiaohua, S.; Xinyu, R.; Kai, W.; Tonghua, L. Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines. *Mol. Cancer* **2009**, *8*, 125. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1186/1476-4598-8-125)
49. Moon, S.-U.; Kim, J.W.; Sung, J.H.; Kang, M.H.; Kim, S.-H.; Chang, H.; Lee, J.-O.; Kim, Y.J.; Lee, K.-W.; Kim, J.H.; et al. p21- activated kinase 4 (PAK4) as a predictive marker of gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res. Treat. Off. J. Korean Cancer Assoc.* **2015**, *47*, 501. [[CrossRef]](http://doi.org/10.4143/crt.2014.054)
50. Bott, A.J.; Maimouni, S.; Zong, W.-X. The pleiotropic effects of glutamine metabolism in cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 770. [[CrossRef]](http://doi.org/10.3390/cancers11060770)
51. Altman, B.J.; Stine, Z.E.; Dang, C.V. From Krebs to clinic: Glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 619. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1038/nrc.2016.71)
52. Yang, L.; Venneti, S.; Nagrath, D. Glutaminolysis: A hallmark of cancer metabolism. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2017**, *19*, 163–194. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28301735)
53. Michalak, K.P.; Mac´ kowska-Ke˛ dziora, A.; Sobolewski, B.; Woz´ niak, P. Key roles of glutamine pathways in reprogramming the cancer metabolism. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, 964321. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1155/2015/964321) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26583064)
54. Sikder, M.O.; Sivaprakasam, S.; Brown, T.P.; Thangaraju, M.; Bhutia, Y.D.; Ganapathy, V. SLC6A14, a Na+/Cl--coupled amino acid transporter, functions as a tumor promoter in colon and is a target for Wnt signaling. *Biochem. J.* **2020**, *477*, 1409–1425. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1042/BCJ20200099) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32219372)
55. Sikder, M.O.F.; Yang, S.; Ganapathy, V.; Bhutia, Y.D. The Na+/Cl--coupled, broad-specific, amino acid transporter SLC6A14 (ATB 0,+): Emerging roles in multiple diseases and therapeutic potential for treatment and diagnosis. *AAPS J.* **2018**, *20*, 12. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1208/s12248-017-0164-7) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29204754)
56. Babu, E.; Bhutia, Y.D.; Ramachandran, S.; Gnanaprakasam, J.P.; Prasad, P.D.; Thangaraju, M.; Ganapathy, V. Deletion of the amino acid transporter Slc6a14 suppresses tumour growth in spontaneous mouse models of breast cancer. *Biochem. J.* **2015**, *469*, 17–23. [[CrossRef]](http://doi.org/10.1042/BJ20150437) [[PubMed]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26173258)