

· 药物代谢 ·

运用细胞代谢组学策略探究薯蓣皂苷元的抗肿瘤作用机制

王华, 胡佳慧, 刘翠钗, 刘敏, 刘铮, 孙立新*
(沈阳药科大学药学院, 辽宁本溪 117004)

[摘要] 目的:应用基于UPLC-MS/MS的细胞代谢组学研究策略,从肿瘤细胞整体层面探究薯蓣皂苷元的抗肿瘤作用机制。方法:采用噻唑蓝法考察薯蓣皂苷元对12种肿瘤细胞的抑制作用,获得相应的半抑制浓度(IC₅₀),检测分析薯蓣皂苷元干预48 h后细胞内的代谢物,采用化学计量学和多维数据统计方法比较干预后的细胞与空白组细胞代谢物的差异,并分析其代谢通路。结果:在薯蓣皂苷元的干预下,细胞内共有11种代谢物发生了显著变化,主要涉及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,氨酰-tRNA的生物合成,谷氨酰胺和谷氨酸代谢,嘌呤代谢,精氨酸和脯氨酸代谢5条代谢通路;薯蓣皂苷元对于不同细胞系的抑制作用差异显著。结论:该研究丰富了薯蓣皂苷元的体外抗肿瘤谱,在体外细胞水平和代谢通路上提供了该药物抗肿瘤作用的可能机制,为薯蓣皂苷元的后续肿瘤药理学研究提供实验依据。

[关键词] 薯蓣皂苷元; 细胞代谢组学; 抗肿瘤; 作用机制; 代谢通路; 半抑制浓度

[中图分类号] R22;R969.1;R284;R945;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)20-0095-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181807

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180628.1747.007.html>

[网络出版时间] 2018-06-29 13:12

Analysis of Antitumor Mechanism of Diosgenin by Cell Metabonomics Strategy

WANG Hua, HU Jia-hui, LIU Cui-chai, LIU Min, LIU Zheng, SUN Li-xin*
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Benxi 117004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antitumor mechanism of diosgenin from the overall level of tumor cells by cell metabonomics strategy based on UPLC-MS/MS. **Method:** The anticancer effect of diosgenin on 12 kinds of human tumor cells was determined by methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay and the corresponding half-inhibitory concentration (IC₅₀) was obtained. After treatment with or without diosgenin for 48 h, the cells were collected and analyzed by UPLC-MS/MS, followed by multivariate data analysis and pathway analysis. **Result:** Under the intervention of diosgenin, 11 metabolites were identified as candidates for tumor cells. Pathway analysis revealed that the changes of metabolites mainly related to alanine, aspartate and glutamate metabolism, biosynthesis of aminoacyl-tRNA, glutamine and glutamate metabolism, purine metabolism, arginine and proline metabolism. Meanwhile, the inhibitory effect of diosgenin on 12 kinds of human tumor cells was significantly different. **Conclusion:** These findings enrich the antitumor spectrum of diosgenin and provide its potential antitumor mechanism from *in vitro* cell level and metabolic pathway. This study can provide experimental basis for further tumor pharmacology of diosgenin.

[Key words] diosgenin; cell metabonomics; antitumor; mechanism of action; metabolic pathway; half-inhibitory concentration

[收稿日期] 20180119(004)

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(20170540851)

[第一作者] 王华,在读硕士,从事细胞代谢组学研究,E-mail:woshi200807@sina.com

[通信作者] *孙立新,博士,教授,从事体内药代动力学及代谢组学研究,Tel:024-43520600,E-mail:sunlixin67@yahoo.com

薯蓣皂苷元(Dio)是一种重要的甾体皂苷元,广泛存在于豆科和薯蓣科植物中,具有抗肿瘤、调节免疫、降血脂、抗炎、抗血小板聚集等药理活性^[1],大量研究表明,Dio的抗肿瘤作用广泛,对不同肿瘤均有良好的抑制作用,是潜在的抗肿瘤候选化合物。随着研究的深入,研究者采用了多种方法探讨Dio的抗肿瘤作用机制。Cailleteau等^[2]通过在光学显微镜下观察和沉降场流分离(SdFFF)细胞分选技术,发现Dio诱导人红白血病细胞(HEL)向巨噬细胞分化。通过侵袭检测试剂盒试验、侵袭小室(Transwell)试验和蛋白质免疫印迹法(Western blot)测定相关蛋白等研究,发现Dio对人肺癌细胞H1299^[3],人前列腺癌细胞PC3^[4]和人胃癌细胞BGC-823^[5]有抗侵袭和转移作用。大量的细胞毒试验、细胞流式试验、聚合酶链式反应扩增试验和DNA含量测定试验显示Dio能够通过多条信号转导通路诱导肿瘤细胞凋亡^[6]。然而这些传统研究方法主要是从表观遗传学和形态学进行考察^[7],或进行分子靶标的识别,尚未发现有从细胞代谢整体层面研究Dio抗肿瘤作用机制的报道。

细胞代谢组学描述了胞内调控的最终产物,这些产物是生物系统对遗传因素或外界环境的最终应答^[8],代谢谱的结果作为整体代谢研究的补充,结合基因组及蛋白组数据,丰富了药物通路研究。用细胞代谢组学方法研究化合物作用于肿瘤细胞后引起的相关代谢物变化,发现潜在的差异代谢物和异常生化途径,有利于从代谢角度探索药物靶点及进一步阐明药物的作用机制。本实验采用代谢组学策略,以12种肿瘤细胞系为研究对象,结合多元统计分析方法,对Dio干预后的细胞代谢差异进行比较与分析,探究可能受Dio影响的代谢通路,为全面阐明Dio的抗肿瘤作用机制提供实验依据。

1 材料

MCO-18AIC型二氧化碳细胞培养箱(日本三洋公司),SW-CJ-1F型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),BDS200型倒置生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司),Multiskan Mk3型酶标仪(赛默飞世尔仪器有限公司),UP-250型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),TGL-16型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),ACQUITY™ UPLC型超高效液相色谱仪和Quattro Micro型质谱仪(美国Waters公司)。

RPMI1640培养基、高糖DMEM培养基和胎牛血清(美国Gibco公司,批号分别为1894399,

1889146,NR06611),磷酸盐缓冲液(PBS,北京中杉金桥生物技术有限公司,批号1016K022),4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES,美国Sigma公司,批号921J043),胰蛋白酶(美国Amresco公司,批号825J041),丙酸睾酮(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号17026611),L-甲硫氨酸砷[阿法埃莎(中国)化学有限公司,批号15007111],Dio(天津士兰科技有限公司,批号20150816,纯度98%),噻唑蓝(MTT,纳川生物技术有限公司,批号07983-1),水为娃哈哈纯净水,二氯甲烷、乙腈和甲醇均为色谱纯,其他试剂均为分析纯;人肺癌细胞(A549),人肝癌细胞(HepG2),人横纹肌肉瘤细胞(A204),人卵巢癌细胞(SKOV3),人宫颈癌细胞(HeLa),人前列腺癌细胞(PC3和DU),人胃癌细胞(SGC),人纤维肉瘤细胞(HT),人乳腺癌细胞(MCF-7和T47D)和人口腔上皮癌细胞(KB)均为贴壁细胞,由本实验室传代冻存。

2 方法与结果

2.1 抗肿瘤活性的测定 取对数生长期的细胞,调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,按每孔200 μ L接种于96孔板中,置于37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养24 h,弃去培养液,依次加入含系列浓度药液的培养液,每个浓度设定6个副孔。同时设阳性组(5-氟尿嘧啶),阴性组(只加细胞,不加药物)和空白组(不加细胞和药物,其他与给药组相同),静置培养48 h后每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 20 μ L,继续培养4 h,吸弃培养液,加入二甲基亚砜(DMSO)150 μ L,振荡10 min至结晶溶解,用酶标仪在492 nm处测定吸光度A。所有实验相同条件下重复3次,计算公式为生长抑制率 = $[(A_{\text{阴性组}} - A_{\text{给药组}}) / (A_{\text{阴性组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$,计算生长抑制率,通过SPSS 19.0软件计算半抑制浓度(IC₅₀)。结果Dio对各细胞系(SKOV3, SGC, HT, PC3, A204, KB, HeLa, DU, HepG2, MCF-7, T47D, A549)的IC₅₀分别为3.63, 6.91, 9.41, 19.33, 26.04, 27.08, 29.93, 33.68, 34.76, 36.53, 36.95, 46.46 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 细胞试验 取对数生长期的细胞,接种等量的细胞于T25培养瓶中培养,当细胞长至60%时,按照IC₅₀于12种肿瘤细胞系中加入含药培养液,分别孵育,每份样品平行制备4份。静置培养48 h后其中3份液氮淬灭,加入预冷PBS 1 mL后用细胞刮板刮取细胞,于4 $^{\circ}$ C,1 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心3 min,弃去上清获得细胞团,作为分析用样品^[9]。另外1份用胰蛋白酶消化后细胞计数板计数,每份细胞样品含

2.0×10^6 个细胞, 存储于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 中待处理, 同时设置不加药的空白组。

2.3 样品的制备 至分析前取出样品, 向细胞团中加入二氯甲烷 $300\text{ }\mu\text{L}$, 内标 $20\text{ }\mu\text{L}$ ($50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙酸睾酮甲醇溶液), 涡旋 3 min , 在冰浴条件下细胞破碎 1 min , 冰水浴 20 min ; 涡旋混匀, 离心 ($4\text{ }^\circ\text{C}$, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min , 下同); 吸取上清液, 于 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 温和氮气流下吹干^[10]。同时向残渣中加入甲醇 $300\text{ }\mu\text{L}$, 内标 $20\text{ }\mu\text{L}$ ($50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ L-甲硫氨酸水溶液), 涡旋 3 min , 冰水浴 20 min ; 涡旋混匀, 离心, 吸取上清液, 于 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 温和氮气流下吹干。所有样品进样分析前用乙腈-水 (1:1) 混合液 $100\text{ }\mu\text{L}$ 复溶。

2.4 UPLC-MS/MS 分析

2.4.1 色谱条件 为了获取细胞全面的代谢谱, 在 RP-UPLC 和 HILIC-UPLC 2 种模式下分析细胞样品, 流速均为 $0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量均为 $5\text{ }\mu\text{L}$ 。RP-UPLC 分析条件为 Phenomenex Kinetex XB C_{18} 色谱柱 ($2.1\text{ mm}\times 50\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{m}$), 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A)- 0.1% 甲酸乙腈溶液 (B) 梯度洗脱 ($0\sim 6\text{ min}$, $15\%\sim 25\%$ B; $6\sim 20\text{ min}$, $25\%\sim 50\%$ B; $20\sim 25\text{ min}$, 50% B; $25\sim 40\text{ min}$, $50\%\sim 90\%$ B; $40\sim 45\text{ min}$, 90% B; $45\sim 50\text{ min}$, $90\%\sim 15\%$ B, 平衡 15 min), 柱温 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 。HILIC-UPLC 分析条件为 Waters BEH Amide 色谱柱 ($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{m}$), 柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$, 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A)- 0.1% 甲酸乙腈溶液 (B) 梯度洗脱 ($0\sim 5\text{ min}$, 95% B; $5\sim 15\text{ min}$, $95\%\sim 85\%$ B; $15\sim 25\text{ min}$, 85% B; $25\sim 35\text{ min}$, $85\%\sim 60\%$ B; $35\sim 40\text{ min}$, $60\%\sim 95\%$ B; $40\sim 45\text{ min}$, 95% B; 平衡 20 min)。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 正离子采集模式, 离子源温度 $120\text{ }^\circ\text{C}$, 脱溶剂气温度 $350\text{ }^\circ\text{C}$, 毛细管电压 3.0 kV , 锥孔电压 30 V , 脱溶剂气流速 $600\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, 气帘气流速 $50\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, RP-UPLC 分析时质荷比 (m/z) 扫描范围 $124\sim 1\text{ }000$, HILIC-UPLC 分析时 m/z 扫描范围 $80\sim 1\text{ }000$, 碰撞电压 $20\sim 50\text{ V}$, 碰撞气为氩气。

2.5 方法学考察

2.5.1 仪器精密度 按 2.3 项下方法平行制备 6 份样品, 每个样品进样 3 次, 以 7 个共有峰的保留时间和峰面积 (内标校正) 的相对标准偏差 (RSD) 考察分析方法的精密度。结果 RP-UPLC 分析 7 个共有峰保留时间的 RSD $0.2\%\sim 0.4\%$, 峰面积的 RSD $1.4\%\sim 12.0\%$, 表明该分析方法重复性较好; HILIC-UPLC 分析 7 个共有峰保留时间的 RSD

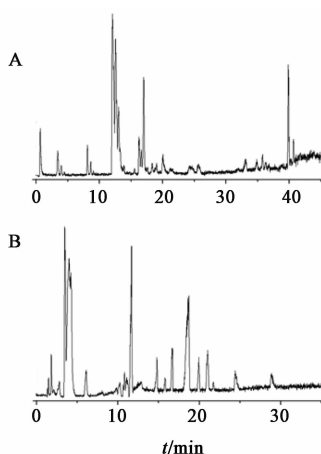
$0.7\%\sim 2.8\%$, 峰面积的 RSD $1.0\%\sim 15.0\%$, 表明该分析方法重复性较好。

2.5.2 系统稳定性 在同 1 个分析批内, 等量吸取待测样品混匀, 制成质量控制 (QC) 样品^[11]。在样品分析开始前以及每分析 6 个待测样品后均插入 QC 样品, 来考察整个分析系统在分析过程中的稳定性。将 QC 样品数据进行主成分分析 (PCA 分析), 在整个分析批中 QC 样品仅有较小程度的偏移, 均控制在 2 倍标准差 (2SD) 以内, 结果表明在整个分析过程中系统稳定性良好。

2.5.3 样品稳定性 按 2.3 项下方法制备样品, 分别在制备后 $0, 2, 4, 8, 12, 24\text{ h}$ 进样分析。结果 RP-UPLC 分析时, 7 个共有峰峰面积的 RSD 分别为 $1.3\%, 0.1\%, 0.1\%, 0.1\%, 3.7\%, 0.3\%, 0.2\%$; HILIC-UPLC 分析时, 7 个共有峰峰面积的 RSD 分别为 $2.6\%, 0.7\%, 0.4\%, 1.5\%, 0.2\%, 3.8\%, 2.2\%$; 表明测试样品在 24 h 内稳定。

2.6 数据预处理 Dio 干预后的细胞样品典型基峰离子流色谱图见图 1。将 LC-MS 获得的原始数据导入 MarkerLynx 4.0 软件进行降噪、峰检测、峰对齐、峰匹配和强度校正等。所得数据参照 80% 规则^[12], 除去零值超过 20% 的变量。预处理后的数据导入 SIMCA 13.0 软件进行 PCA, 见图 2。结果发现样本点发生了明显的分组和聚类。空白组与给药组 (Dio 干预组) 处于不同区域, 提示药物干预前后细胞的代谢情况有明显差异。从整体上看, 药物作用前样品点相对集中, 各细胞系在未被干预前代谢情况比较相近, Dio 干预后样品点离散度较大, 说明 Dio 对于不同细胞系所引起的代谢物改变不尽相同。

2.7 差异代谢物的筛选和结构确证 由于无监督 PCA 只能用来观察实验样品的自然聚类和分布情况, 但不能区别差异是来源于组内还是组间^[13]。故进一步采用正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 模型进行有监督的数据分析, 得分图见图 3 (A), 模型参数 R^2 (反映模型的拟合准确性) = 0.993 , Q^2 (反映模型的预测准确性) = 0.974 , 说明该模型的稳定性和预测能力较高。为了防止模型发生过度拟合, 对模型进行 999 次置换检验, 见图 3 (B), 结果发现 R^2 和 Q^2 与 Y 轴的截距值分别为 $0.619, -0.461$, 说明模型未过度拟合^[14], 模型充分提取了给药前后差异代谢物的信息。通过 OPLS-DA 模型获得代谢物的变量重要性投影值 (VIP 值), 以 VIP 值 > 1.0 为标准筛选对于分类贡献较大



A. RP-UPLC; B. HILIC-UPLC

图 1 Dio 干预后的细胞样品典型基峰离子流色谱

Fig. 1 Typical base peak ion current chromatograms of cell samples after intervention of diosgenin

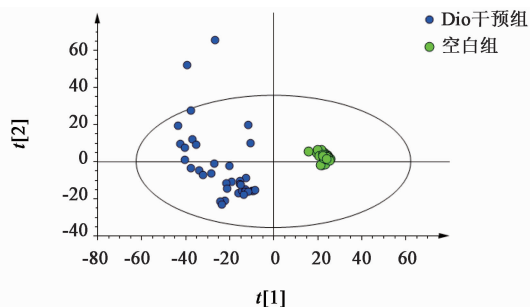


图 2 空白组和 Dio 干预组的 PCA 得分

Fig. 2 PCA score plot of diosgenin-treated group and blank group

的代谢物。采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析,依据 $P < 0.05$ 验证这些代谢物是否有显著性差异。进行受试者工作特征(ROC)曲线分析,以曲线下面积 $AUC > 0.5$ 为标准,进一步筛选出潜在的生物标记物。

经多元统计分析后,参照代谢组学化合物鉴定相关指南进行代谢物的结构确证^[15],共鉴定出 11 种干预前后有明显差异的代谢物,见表 1。倍数变化(FC)表示代谢物在给药组中含量与空白组中含量的比值, $FC > 1$ 时表示代谢物在给药组中含量增加,而 $FC < 1$ 时表示代谢物水平在给药组中下调。其中亮氨酸、天冬氨酸、次黄嘌呤、谷氨酰胺、草酰乙酸、谷氨酸和鸟嘌呤用对照品进行了确认。亮氨酸(m/z 131.9867)的结构确证过程见图 4。图 4(A)是 m/z 131.9867 提取离子流色谱图,保留时间(t_R)13.1201 min;图 4(B)是亮氨酸对照品的色谱图, $t_R = 13.1196$ min,二者保留时间一致,初步确定代谢物为亮氨酸;进一步进行碎片离子扫描,见图 4

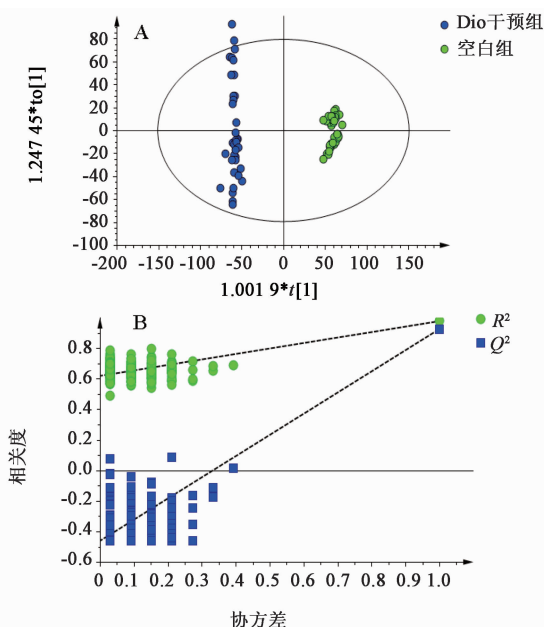


图 3 空白组和 Dio 干预组的 OPLS-DA 得分(A)及置换检验(B)

Fig. 3 OPLS-DA score plot (A) and permutation test (B) of diosgenin-treated group and blank group

(C),与现有文献的相关报道进行对比,推测合理的裂解途径,最终确定代谢物 m/z 131.9867 的结构为亮氨酸。

2.8 代谢通路分析 将确证的生物标志物信息输入至 Metabo Analyst 3.0 通路分析数据库进行代谢通路分析,见图 5。根据通路影响值 > 0.05 ,得到发生显著变化的 5 条代谢通路,包括丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢,氨酰-tRNA 的生物合成,谷氨酰胺和谷氨酸代谢,嘌呤代谢,精氨酸、脯氨酸代谢。这些代谢通路主要涉及氨基酸代谢、核苷酸代谢和能量代谢等。

2.9 Dio 对 12 种肿瘤细胞的不同抑制作用 为了进一步研究 Dio 对各种肿瘤细胞不同抑制作用的小分子物质基础,对 Dio 干预后的 12 种不同细胞系样品进行 OPLS-DA,见图 6。结果发现各细胞系之间发生明显的分组和聚类。样品点的分布情况在一定程度上可以反映 Dio 对于细胞的干预程度,且 IC_{50} 接近的细胞系在得分图上更靠近。图中 A549 样品点的分布明显异于同组其他样品,同时 MTT 测定结果显示 A549 细胞系的 IC_{50} ($46.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与其他细胞系相差较大,说明 Dio 对其抑制作用较弱。

3 讨论

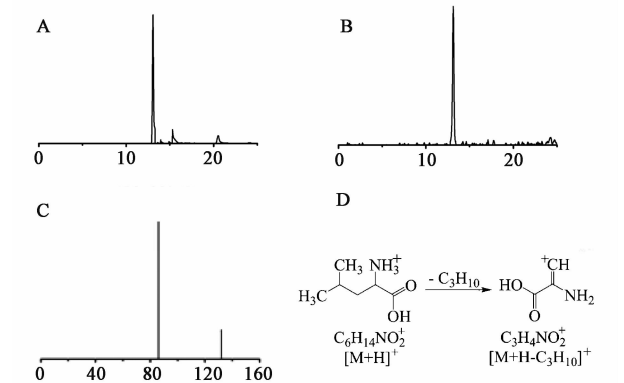
本研究采用细胞代谢组学研究策略,考察 Dio 对 12 种肿瘤细胞系的抑制作用,并结合代谢通路分析,探讨其可能的抗肿瘤作用机制。考虑到贴壁肿

表 1 Dio 干预后细胞中发生显著变化的代谢物信息

Table 1 Information of metabolites with significant changes in cells intervened by diosgenin

No.	t_R /min	代谢物	m/z	P	AUC	FC	趋势	代谢通路
1	13.120 1	亮氨酸	131.986 7	<0.01	0.734	0.166	↓	氨酰-tRNA 生物合成
2	0.698 9	草酰乙酸	133.011 1	<0.01	0.707	0.182	↓	三羧酸循环 (TCA 循环)
3	43.492 1	谷氨酰胺	147.076 2	<0.01	0.693	0.052	↓	谷氨酰胺和谷氨酸代谢
4	0.666 4	鸟嘌呤	152.061 7	<0.01	0.653	1.327	↑	嘌呤代谢
5	39.952 3	核糖酸	167.062 3	<0.05	0.734	6.800	↑	-
6	25.402 4	环腺苷	347.462 5	<0.01	0.613	0.815	↓	嘌呤代谢
7	15.906 6	谷氨酸	148.019 4	<0.05	0.774	0.108	↓	谷氨酰胺和谷氨酸代谢
8	11.168 5	天冬氨酸	133.877 6	<0.05	0.923	0.068	↓	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢
9	11.264 7	次黄嘌呤	136.836 3	<0.01	0.909	6.610	↑	嘌呤代谢
10	1.782 7	脱氧肌苷	253.100 7	<0.05	0.855	8.181	↑	嘌呤代谢
11	6.665 9	鞘氨醇-1-磷酸	380.256 6	<0.01	0.828	2.963	↑	甘油磷脂代谢

注: ↑ 和 ↓ 分别表示 Dio 干预后代代谢物的浓度升高与降低。



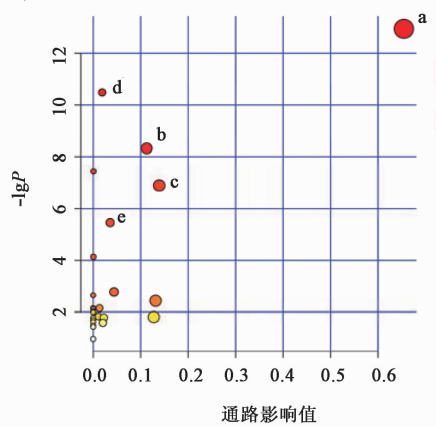
A. m/z 131.986 7 提取离子流色谱; B. 亮氨酸对照品 (相对分子质量 131.172 9) 的总离子流色谱; C. 正离子模式下 m/z 131.986 7 离子的质谱; D. 亮氨酸的裂解途径

图 4 亮氨酸的结构确证过程

Fig. 4 Identification of a selected biomarker candidate

瘤细胞比悬浮细胞状态更稳定,便于对比分析,本研究中选择了 12 种贴壁肿瘤细胞,且细胞系选择上充分考虑了性别的差异 (HeLa 和 PC3),激素的影响 (DU 和 PC3) 以及不同组织部位的差异 (MCF-7 和 T47D),各细胞系均具有代表性。通过延长 Dio 对各种肿瘤细胞系的作用时间及增加药物剂量进行实验浓度梯度考察,使 Dio 对所有细胞系都能引起一定程度的代谢改变,最终选择药物作用时间为 48 h。

经 Dio 干预后,细胞内共有 11 种代谢物发生显著变化,其中与差异代谢物相关性最强且受影响最大的通路是丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢。哺乳动物细胞中,天冬氨酸在酶的催化作用下生成天冬酰胺,同时将谷氨酰胺转变为谷氨酸,而谷氨酸又会在谷氨酰胺合成酶作用下重新生成谷氨酰胺。谷氨



a. 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; b. 氨酰-tRNA 的生物合成; c. 谷氨酰胺和谷氨酸代谢; d. 嘌呤代谢; e. 精氨酸和脯氨酸代谢

图 5 Dio 对肿瘤细胞干预作用的代谢通路分析

Fig. 5 Metabolic pathway analysis for anticancer effect of diosgenin on tumor cells

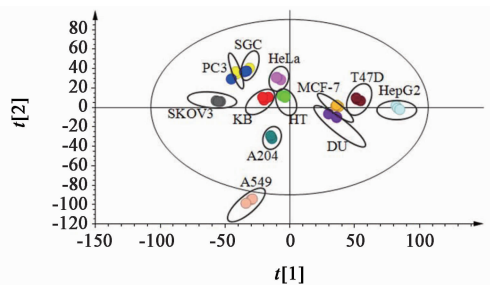


图 6 Dio 干预后 12 种不同细胞系的 OPLS-DA 得分

Fig. 6 OPLS-DA score plot of different cell lines exposed to diosgenin

酰胺是一种重要的能量来源,其代谢产物包括谷氨酸和谷胱甘肽,这些分子在肿瘤增殖和侵袭中发挥着至关重要的作用^[16]。经 Dio 干预后细胞中天冬

氨酸和谷氨酰胺的含量显著降低,产生的谷氨酸减少,他们的含量变化与细胞中氨基酸代谢受到影响有关。此外,谷氨酸是细胞代谢中含量丰富的游离氨基酸,参与了其他氨基酸、蛋白质和核苷酸的合成^[17],谷氨酸含量的降低进一步表明 Dio 抑制了肿瘤细胞的信号转导和增殖活动。

代谢通路分析结果显示,Dio 对肿瘤细胞的嘌呤代谢产生了一定程度的影响,与嘌呤代谢密切相关的差异代谢物有次黄嘌呤和脱氧肌苷,二者都是 DNA 损伤后分解代谢的产物,Dio 干预细胞后,引起细胞凋亡 DNA 损伤,DNA 的分解代谢增强,因此这 2 种代谢物的含量显著上升,分解产生的脱氧腺苷可以扰乱细胞内的嘌呤代谢,进一步诱导细胞凋亡。同时,次黄嘌呤是嘌呤补救合成的底物^[18],对于肿瘤细胞,补救合成是比从头合成更有效的嘌呤核苷酸合成途径^[19],经 Dio 干预后,肿瘤细胞生长受到抑制,嘌呤的从头合成占比增加,补救合成减弱,致使补救合成的原料次黄嘌呤积累。

Dio 干预后也影响了肿瘤细胞的精氨酸和脯氨酸代谢,脯氨酸是谷氨酸和 1-吡咯啉-5-羧酸酯的生物合成衍生物^[20],天冬氨酸参与精氨酸的生物合成,精氨酸、瓜氨酸和鸟氨酸进行尿素循环的同时还会合成脯氨酸^[21]。有文献证明,精氨酸能够促进肿瘤血管生成,促进肿瘤细胞的增殖和转移,对肿瘤的发展具有重要作用^[22];而脯氨酸是生糖氨基酸,可代谢生成丙酮酸或是代谢成参与 TCA 循环的中间产物。因此,Dio 干预后,细胞中天冬氨酸和谷氨酸含量降低,这在一定程度上使得精氨酸和脯氨酸的合成减弱,进一步抑制肿瘤细胞生长和增殖等生命活动。

Dio 干预后,细胞中氨基酰基-tRNA 的生物合成受到显著影响,反映出细胞中蛋白质的生物合成减弱,例如酶、转运蛋白和其他膜蛋白的合成量减少,肿瘤细胞的生命活动处于抑制状态^[23]。Dio 干预后,肿瘤细胞中鞘氨醇-1-磷酸含量升高,鞘氨醇-1-磷酸是肿瘤坏死因子(TNF)受体相关因子 2 (TRAF2)的辅因子,可激活半胱天冬酶-8 并最终导致细胞凋亡,推测鞘氨醇-1-磷酸含量升高与 Dio 诱导细胞凋亡有关。特定的氨基酸依赖性癌细胞代谢异常之一,细胞的恶性行为可能依赖于或与特定的氨基酸有关^[24],亮氨酸在蛋白质合成中起重要作用,并作为丙氨酸和谷氨酰胺合成的主要氮供体。越来越多的证据表明,亮氨酸能够在多种哺乳动物癌症类型中上调哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)

通路的靶标,并且成为癌症靶向治疗临床研究的一部分。Dio 干预后的亮氨酸含量下降,可能是因为 Dio 干预后肿瘤细胞的恶化程度降低。

实验结果证明 Dio 对于 SKOV3,SGC,HT,PC3,A204,KB,HeLa,DU,KB 等 12 种人源性肿瘤细胞系均有不同程度的抑制作用,且与已有文献报道相似^[25-27],其中本研究首次考察了 Dio 对于人卵巢癌细胞和人口腔上皮癌细胞的抑制作用。进一步分析显示,Dio 引起的不同细胞系代谢物改变存在明显的重合和差异,但各细胞系受影响的代谢通路基本相同。然而不足的是,造成不同细胞系代谢物差异的深层机制,仍有待于利用分子生物学、基因组学、转录组学、蛋白质组学等技术进行综合研究与深入分析。

本研究采用 UPLC-MS/MS 进行了 Dio 的细胞代谢组学研究,从胞内代谢物中筛选鉴定出 11 种生物标记物,代谢通路关联表明 Dio 能够显著影响丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,氨酰-tRNA 的生物合成,谷氨酰胺和谷氨酸代谢,嘌呤代谢以及精氨酸和脯氨酸代谢,从整体细胞代谢层面证实了 Dio 能够通过抑制肿瘤细胞的信号转导和增殖、诱导细胞凋亡、抑制侵袭和转移来发挥抗肿瘤作用。同时探讨了 Dio 对于不同肿瘤细胞系抑制作用的差异,丰富了 Dio 的体外抗肿瘤谱,在体外细胞水平和代谢通路上提供了 Dio 抗肿瘤作用的可能机制,可为 Dio 的后续肿瘤药理学研究提供实验依据。

[参考文献]

- [1] Srinivasan S, Koduru S, Kumar R, et al. Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(4):961-967.
- [2] Gailleteau C, Liagre B, Battu S, et al. Increased cyclooxygenase-2 and thromboxane synthase expression is implicated in diosgenin-induced megakaryocytic differentiation in human erythroleukemia cells[J]. *Anal Biochem*, 2008, 380(1):26-34.
- [3] LIU M J, WANG Z, JU Y, et al. Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, 55(1):79-90.
- [4] CHEN P S, Shih Y W, HUANG H C, et al. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer PC-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5):e20164.
- [5] MAO Z J, TANG Q J, ZHANG C A, et al. Anti-

- proliferation and anti-invasion effects of diosgenin on gastric cancer BGC-823 cells with HIF-1 α shRNAs[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(5):6521-6533.
- [6] Al-Daghri N M, Alokail M S, Alkharfy K M, et al. Fenugreek extract as an inducer of cellular death via autophagy in human T lymphoma Jurkat cells[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, doi: 10.1186/1472-6882-12-202.
- [7] Gresham V, McLeod H L. Genomics: applications in mechanism elucidation[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(5):369-374.
- [8] YAO W, LI H, LIU Q, et al. Cellular metabolomics revealed the cytoprotection of amentoflavone, a natural compound, in lipopolysaccharide-induced injury of human umbilical vein endothelial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9):E1514.
- [9] Kapoore R V, Coyle R, Staton C A, et al. Cell line dependence of metabolite leakage in metabolome analyses of adherent normal and cancer cell lines[J]. *Metabolomics*, 2015, 11(6):1743-1755.
- [10] Sheikh K D, Khanna S, Byers S W, et al. Small molecule metabolite extraction strategy for improving LC/MS detection of cancer cell metabolome[J]. *J Biomol Tech*, 2011, 22(1):1-4.
- [11] Ciborowski M, Teul J, Martin-Ventura J L, et al. Metabolomics with LC-QTOF-MS permits the prediction of disease stage in aortic abdominal aneurysm based on plasma metabolic fingerprint[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):e31982.
- [12] Smilde A K, van der Werf M J, Bijlsma S, et al. Fusion of mass spectrometry-based metabolomics data[J]. *Anal Chem*, 2005, 77(20):6729-6736.
- [13] 吴贤波,董培智,周海,等. 基于 HPLC-MS 和主成分分析的乌梅血清药物化学研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(24):118-122.
- [14] CHAN E C, Pasikanti K K, Nicholson J K. Global urinary metabolic profiling procedures using gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(10):1483-1499.
- [15] Sumner L W, Amberg A, Barrett D, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis[J]. *Metabolomics*, 2007, 3(3):211-221.
- [16] Halama A, Möller G, Adamski J. Metabolic signatures in apoptotic human cancer cell lines[J]. *Omics*, 2011, 15(5):325-335.
- [17] Spitzer S, Volbracht K, Lundgaard I, et al. Glutamate signalling: a multifaceted modulator of oligodendrocyte lineage cells in health and disease[J]. *Neuropharmacology*, 2016, doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.06.014.
- [18] Garcia-Gil M, Tozzi M G, Balestri F, et al. Mitochondrial damage and apoptosis induced by adenosine deaminase inhibition and deoxyadenosine in human neuroblastoma cell lines[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(7):1671-1679.
- [19] Singh R, Fouladi-Nashta A A, LI D, et al. Methotrexate induced differentiation in colon cancer cells is primarily due to purine deprivation[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 99(1):146-155.
- [20] Kondo M, Yamaoka T, Honda S, et al. The rate of cell growth is regulated by purine biosynthesis via ATP production and G(1) to S phase transition[J]. *J Biochem*, 2000, 128(1):57-64.
- [21] Plewa S, Horała A, Dereziński P, et al. Usefulness of amino acid profiling in ovarian cancer screening with special emphasis on their role in cancerogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12):E2727.
- [22] MA Q, WANG Z, ZHANG M, et al. Targeting the L-arginine-nitric oxide pathway for cancer treatment[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(4):392-410.
- [23] Roychoudhury S, More T H, Chattopadhyay R, et al. Polycystic ovary syndrome in Indian women: a mass spectrometry based serum metabolomics approach[J]. *Metabolomics*, 2017, doi:10.1007/S11306-017-1253-4.
- [24] Ananieva E. Targeting amino acid metabolism in cancer growth and anti-tumor immune response[J]. *World J Biol Chem*, 2015, 6(4):281-289.
- [25] 宋宇,梁长青,何忠梅,等. 薯蓣皂苷元体外抗肿瘤作用的研究[J]. *中国肿瘤*, 2004, 13(10):651-653.
- [26] Das S, Dey K K, Dey G, et al. Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e46641.
- [27] Moalic S, Liagre B, Corbière C, et al. A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells[J]. *FEBS Lett*, 2001, 506(3):225-230.

[责任编辑 刘德文]