

# 消癌解毒方干预 W256 移植瘤大鼠的 血浆代谢组学分析

杨静<sup>1,2</sup>, 陈海彬<sup>1</sup>, 周红光<sup>1</sup>, 吴勉华<sup>1\*</sup>

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210046; 2. 徐州市中医院, 江苏 徐州 221003)

**[摘要]** **目的:**采用代谢组学方法检测 W256 移植瘤大鼠血浆内源性代谢物异常变化及消癌解毒方对移植瘤大鼠代谢紊乱的调节作用,寻找移植瘤生长可能的生物标志物,探索消癌解毒方代谢性作用机制。**方法:**采用 Wistar 大鼠腹腔接种 Walker-256 瘤株制作腹水瘤模型,移植至大鼠腋下,成移植瘤模型;大鼠分为消癌解毒方低、中、高剂量组和模型组、空白组,收集给药后的第 1,6,11 天的血浆,采用 GC-MS 联用仪对血浆中内源性分子进行测定,采用偏最小二乘法判别分析对多变量数据进行分析并建立模型,结合数据库进行代谢物鉴定,进行 *t* 检验组间比较,并分析关联代谢通路变化。**结果:**与空白组相比,模型组大鼠在第 11 天时,有 30 个化合物发生了显著变化,给予消癌解毒方后,有 10 种内源性物质得到了不同程度的转归。**结论:**血浆中有 30 种内源性物质与 W256 肉瘤的生长密切相关,消癌解毒方可使造模后大鼠血浆中异常变化的化合物水平有不同程度的恢复,这 10 种化合物可能是该复方作用靶点,其发挥药效作用可能与调节相关代谢途径有关。

**[关键词]** 消癌解毒方; W256 移植瘤; 代谢组学; 作用机制; 色氨酸; 鸟氨酸

**[中图分类号]** R945;R969.1;R284.1;Q591.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0077-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230077

## Plasma Metabonomics Analysis in Rats of W256 Sarcocarcinoma Treated by Xiaoi Jiedu Prescription

YANG Jing<sup>1,2</sup>, CHEN Hai-bin<sup>1</sup>, ZHOU Hong-guang<sup>1</sup>, WU Mian-hua<sup>1\*</sup> (1. First College of Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Xuzhou City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xuzhou 221003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate abnormal changes of plasma endogenous metabolic in rats with W256 sarcocarcinoma and regulation of Xiaoi Jiedu prescription (XJP) on metabolic disorder of transplanted tumor rats. To explore mechanisms of XJP on anti-tumor based on metabonomics. **Method:** W256-transplanted tumor rats model were established and were divided into the control group, the model group and XJR treatment groups. Plasma samples were collected on the 1<sup>st</sup>, 6<sup>th</sup> and 11<sup>th</sup> day after administration. Endogenous metabolites of all groups were determined by GC-MS. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) was applied to analyze multivariate data and established model, metabolite identification was adopted database, *t* test was used in significant statistical analysis and metabolic pathways. **Result:** Compared with the control group, rats in the model group on the 11<sup>th</sup> day, 30 endogenous metabolites significantly changed, 10 endogenous metabolites got differently restoration to the normal group after treated XJR. **Conclusion:** Thirty endogenous metabolites may be potential metabolic biomarkers. Abnormal metabolite levels in plasma can be partly recovered by XJR, these 10 endogenous metabolites may be biomarker of XJP working. And potential antitumor effects of XJR may be contributed to regulation of related metabolic pathways.

**[Key words]** Xiaoi Jiedu prescription; W256 transplanted tumor; metabonomics; action mechanism; tryptophan; ornithine

**[收稿日期]** 20150507(024)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81102563);国家教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20113237110001)

**[第一作者]** 杨静,博士,副主任医师,从事中医药抗肿瘤的理论与实验及临床研究,Tel:15852264109,E-mail:yj4633@sina.com

**[通讯作者]** \*吴勉华,教授,博士生导师,从事中医药抗肿瘤的理论与实验研究,Tel:13505399701,E-mail:wmh2006@163.com

消癌解毒方是周仲瑛教授总结的临床长期应用确有疗效的名医方药。方药以“消癌解毒、益气养阴”为治法,选择白花蛇舌草、白僵蚕、蜈蚣、预知子、太子参、麦冬、山慈菇等按一定比例组成,全方扶正祛邪、解毒抗癌。课题组前期大量研究表明消癌解毒方具有确切的抗肿瘤作用<sup>[1-2]</sup>。

代谢组学是一门研究生物体系在内、外多种因素综合作用下所有代谢产物变化的学科<sup>[3]</sup>。采用的是从上到下的策略,通过机体的终端代谢网络的变化来反应机体功能变化,并了解整体物质干预下的机体代谢物变化<sup>[4-5]</sup>。这种特性正好与中医的整体观一致,表明代谢组学有潜力影响人们对循证中医的理解<sup>[6]</sup>。代谢的标记物可能是治疗的靶点<sup>[7]</sup>。代谢组学系统性的思维及其着眼于检测整体功能的策略,为中医现代化研究提供了新的可能。此外,代谢组学是考察代谢有机体的整体成分和机体对内源性、外源性因子的及时反应,故对复杂生物体的研究有利<sup>[8]</sup>。目前尚无研究采用符合中医整体观的代谢组学对消癌解毒方进行循证研究,本实验采用气相色谱-质谱联用技术对各组大鼠血浆中内源性代谢物进行表征及辨识,寻找各组大鼠体内代谢组的差异,探寻移植瘤可能的生物标志物,并分析消癌解毒方抗肿瘤的作用机制,为该制剂的临床应用提供参考。

## 1 材料

HERAcell 150i 型细胞培养箱(美国 Thermo 公司),5810R 型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),DLF560 型超净工作台(荷兰 clearAir Techniek bv 公司),DM4000B 智能型生物倒置显微镜(德国 Leica 公司),6980 型气相色谱仪(美国安捷伦公司),Pegasus III 型飞行时间质谱(TOF-MS)(美国 Leco 公司),SPD2010-230 SpeedVac 型真空浓缩挥发装置(美国 Thermo 公司)。

预知子、白花蛇舌草、山慈菇、白僵蚕、蜈蚣、麦冬、太子参均购自安徽省亳州,经南京中医药大学药理实验室严辉博士鉴定,均符合2010年版《中国药典》相关项下要求。在南京中医药大学药理教研室煎制,浓缩成生药量  $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的药液,  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。Walker-256 瘤株(上海拜力生物公司),罗斯维帕克纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute, RPMI)-1640 培养液(美国 Gibco 公司),小牛血清(美国 Thermo 公司)。

SPF 级 Wistar 雄性大鼠 50 只用于实验建模,体重  $(170 \pm 10) \text{ g}$ ;另购断奶 Wistar 大鼠 2 只,体重

$60 \sim 80 \text{ g}$ ,供传代用,均从上海史莱克实验动物公司购买。动物生产许可证号 SCXK(沪)2013-0005,使用许可证号 SYXK(苏)2013-0030。饲料从南京江宁区青龙山动物繁殖场购买。

## 2 方法与结果

**2.1 动物分组与造模** Wistar 大鼠随机分为 5 组(消癌解毒方低、中、高剂量组和模型组、空白组),每组 10 只,分笼饲养,并分别用苦味酸编号。断奶 Wistar 大鼠腹腔接种瘤株后 5~8 d 长成腹水型荷瘤鼠,无菌抽取腹腔积液 2 mL,腹水以血性为佳;接种 Wistar 大鼠腹腔进行传代,约隔 7 d 传代 1 次于连续试验。无菌抽取瘤性腹水 20 mL,离心  $(1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}, 5 \text{ min})$ ,弃上清液,用生理盐水洗涤,离心 2 次,取稀糊状的瘤细胞悬液种植于  $75 \text{ cm}^2$  培养瓶,加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液 10 mL,常规培养 24 h 后传代,每 2~3 d 传代 1 次,经 2~3 次传代后, W256 癌细胞得以纯化。将纯化后的 W256 癌细胞悬液离心制成  $5 \times 10^7$  个/mL 的细胞悬液,用于移植瘤模型复制。除空白组外,其余大鼠术前禁食 6~8 h,水合氯醛麻醉后仰卧固定,备皮、局部安尔碘消毒后,抽取瘤细胞悬液 0.2 mL,针头与肝脏表面呈 30 度角斜刺入大鼠右前腋下约 0.8 cm,注入瘤细胞悬液 0.2 mL,用棉签适当压迫穿刺点 5 min。

**2.2 给药、样品采集及处理** 于造模 1 周出瘤后开始给药,每天 1 次,连续给药,消癌解毒方低、中、高剂量组分别灌胃,每天给药剂量依次为 1.89, 3.78,  $7.56 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (高剂量组折合成人体临床使用剂量约为 2 倍),药液灌胃量以生理盐水补足体积,空白、模型组分别予等体积生理盐水灌胃,第 1, 6, 11 天给药前采用眼眶后静脉丛取血方法,分别收集大鼠全血,用乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)抗凝,于  $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,标记后置于  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存待用。

血浆样品在  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  解冻,每 100  $\mu\text{L}$  加入甲醇(含内标  $^{13}\text{C}$  标记的甲基肉蔻酸  $1.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 400  $\mu\text{L}$  沉淀蛋白,涡旋提取 5 min,于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  静置 2 h,于  $20000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  高速离心 10 min,取上清液 100  $\mu\text{L}$  至进样瓶中,减压挥发溶剂 2 h,加入  $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  甲氧胺吡啶溶液 30  $\mu\text{L}$ ,涡旋 4 min,室温条件下脲化反应 16 h,加入三甲基硅基三氟乙酰胺(MSTFA)[内含 1% 三甲基氯硅烷(TMCS)作催化剂] 30  $\mu\text{L}$ ,涡旋 3 min,三甲硅烷基化反应 1 h,加入  $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  甲基硬脂酸庚烷液 30  $\mu\text{L}$ ,涡旋 1 min,留作待测样品。

**2.3 GC-MS 分析条件** 色谱条件为进样量 1  $\mu\text{L}$ , 采用不分流进样模式, 载气为氮气, 恒流速度 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 程序升温模式 (70  $^{\circ}\text{C}$  保持 2.0 min, 以 35  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  线性匀速线性升温至 310  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 2.0 min)。质谱条件为进样口温度 250  $^{\circ}\text{C}$ , 清洗时间 1 min, 流速 20  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 离子源温度 200  $^{\circ}\text{C}$ , 离子源电压 70 eV, 电流 3.0 mA, MS 采用全扫描方式进行数据采集, 扫描范围  $m/z$  50 ~ 800, 扫描速度 20  $\text{spectra}\cdot\text{s}^{-1}$ , 检测电压 -1 650 V。

血浆样品经 GC-MS 分析, 通过对内外标特征质量数的响应值分析发现, 其 RSD 均 < 5%, 表明分析测定时仪器稳定, 所得质谱信息准确可靠, 各组大鼠血浆的 GC/TOF-MS 总离子流图见图 1。对比分析可知, 各组色谱峰存在总离子流差异, 在同一保留时间色谱峰大小及高低均有一定的差异, 以时间点 11.2 为例, 模型组较空白组峰面积增高, 而高剂量组却有所降低, 提示移植瘤造成大鼠体内某种代谢物含量增多, 而消癌解毒方 (主要是高剂量组) 可使其含量降低, 起到一定调控作用。

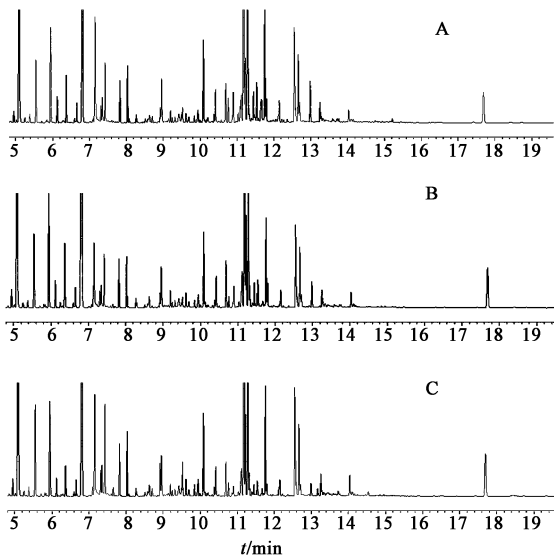


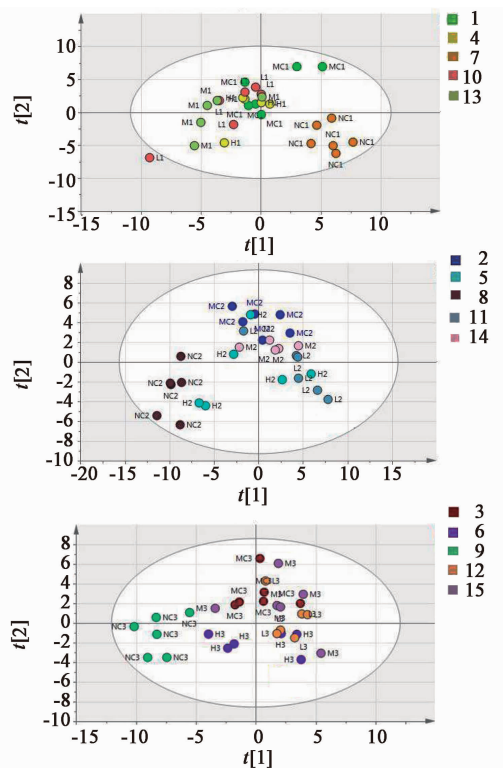
图 1 空白组 (A), 模型组 (B), 消癌解毒方高剂量组 (C) 大鼠血浆样品总离子流

Fig. 1 Total ion chromatograms of rat plasma samples in control group (A), model group (B) and high dose group of Xiaoai Jiedu prescription (C)

**2.4 统计学处理** 利用 Simca-P 11.0 软件对血浆样品进行多元统计分析, 对色谱峰峰面积归一化处理后进行偏最小二乘-判别式分析 (PLS-DA), 样品分布得分图用于展示组间差异, 用  $t$  检验对上述差异变量进行统计检验, 最终有差异的变量 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) 即为可能的生物标志物, 在 NIST 谱库

及本地库中检索鉴别这些化合物的结构并用对照品进行确证。

**2.4.1 模式识别分析** 将同一时间点不同组别的数据进行 PLS-DA 分析, 见图 2。结果显示给药第 1 天, 模型组与空白组区分明显, 但消癌解毒方低、中、高剂量组没有有效将模型组的异常代谢纠正趋向正常。第 11 天模型组与空白组区分更加明显, 但低剂量组没有有效将模型的异常代谢纠正趋向正常 (即靠近空白组), 而是朝右下方移动; 中剂量组时虽然变化较小, 但有向正常变化的趋势; 高剂量组有相对明显的像正常组移动趋势, 提示了比较积极的正面药效作用。



散点图中标本编号 1 表示第 1 天, 2 表示第 6 天; 3 表示第 11 天 MC. 模型组; NC. 空白组; L. 低剂量组; M. 中剂量组; H. 高剂量组

图 2 消癌解毒方给药组大鼠血浆 PLS-DA 模型的散点

Fig. 2 PLS-DA model scatter diagram of rat plasma in administration groups of Xiaoai Jiedu prescription

**2.4.2 潜在生物标志物的鉴定** 在第 1 个时间点 (第 1 天) 的时候模型组与空白组相比, 有 15 个差异化合物, 其中被鉴定出来的有 12 个; 而到第 11 天的时候, 经统计有 30 个化合物发生了显著的变化, 其中被鉴定出来的有 15 个 (色氨酸、棕榈油酸、肌醇、谷氨酰胺、胆固醇、鸟氨酸、古洛糖酸、丙酮酸、尿嘧啶、脯氨酸、葡萄糖、酪氨酸、赖氨酸及 1-氢-3-吡啶丙酸,  $\alpha$ -甘油磷酸盐), 见表 1。

表 1 模型组与正常相相比的差异化合物

Table 1 Different metabolites list between control group and model group

| 化合物                                    |            | 空白组        | 模型组        | P        | 差异倍数  | 模型组-空白组 |
|--|------------|------------|------------|----------|-------|---------|
| 英文名                                    | 中文名        |            |            |          |       |         |
| tryptophan                             | 色氨酸        | 3 365 417  | 1 371 917  | 0.000 14 | 0.408 | ↓       |
| palmitoleic acid                       | 棕榈油酸       | 221 958    | 99 934     | 0.000 19 | 0.450 | ↓       |
| inositol                               | 肌醇         | 153 153    | 44 518     | 0.000 60 | 0.291 | ↓       |
| glutamine                              | 谷氨酰胺       | 234 309    | 123 255    | 0.002 63 | 0.526 | ↓       |
| <sup>1</sup> H-indole-3-propanoic acid | 1-氢-3-吲哚丙酸 | 95 985     | 16 636     | 0.004 97 | 0.173 | ↓       |
| cholesterol                            | 胆固醇        | 442 053    | 736 643    | 0.007 85 | 1.666 | ↑       |
| ornithine                              | 鸟氨酸        | 846 281    | 515 242    | 0.013 14 | 0.609 | ↓       |
| gulonic acid                           | 古洛糖酸       | 444 313    | 246 264    | 0.014 19 | 0.554 | ↓       |
| pyruvic acid                           | 丙酮酸        | 1 119 320  | 1 524 045  | 0.019 46 | 1.362 | ↑       |
| alpha-glycerophosphate                 | α-甘油磷酸盐    | 413 496    | 317 722    | 0.020 58 | 0.768 | ↓       |
| uracil                                 | 尿嘧啶        | 30 787     | 155 498    | 0.030 94 | 5.051 | ↑       |
| proline                                | 脯氨酸        | 248 597    | 302 127    | 0.031 37 | 1.215 | ↑       |
| glucose                                | 葡萄糖        | 19 100 135 | 16 035 219 | 0.035 64 | 0.840 | ↓       |
| tyrosine                               | 酪氨酸        | 2 642 663  | 3 602 695  | 0.040 10 | 1.363 | ↑       |
| lysine                                 | 赖氨酸        | 6 503      | 3 612      | 0.043 87 | 0.555 | ↓       |

由于第 3 个时间点造模产生的变化最明显,故对该时间点下鉴定出的差异化合物通过基于网络工具的代谢通路分析,结果代谢通路分析 (metabolic pathway analysis) 和代谢富集分析 (metabolite

enrichment analysis) 分别见图 3A,B。结果表明模型组中机体代谢异常,其中以蛋白合成、尿素循环、葡萄糖-丙氨酸循环、儿茶酚胺合成等受到的干扰最为严重,主要涉及氨基酸利用、尿素循环和糖代谢。

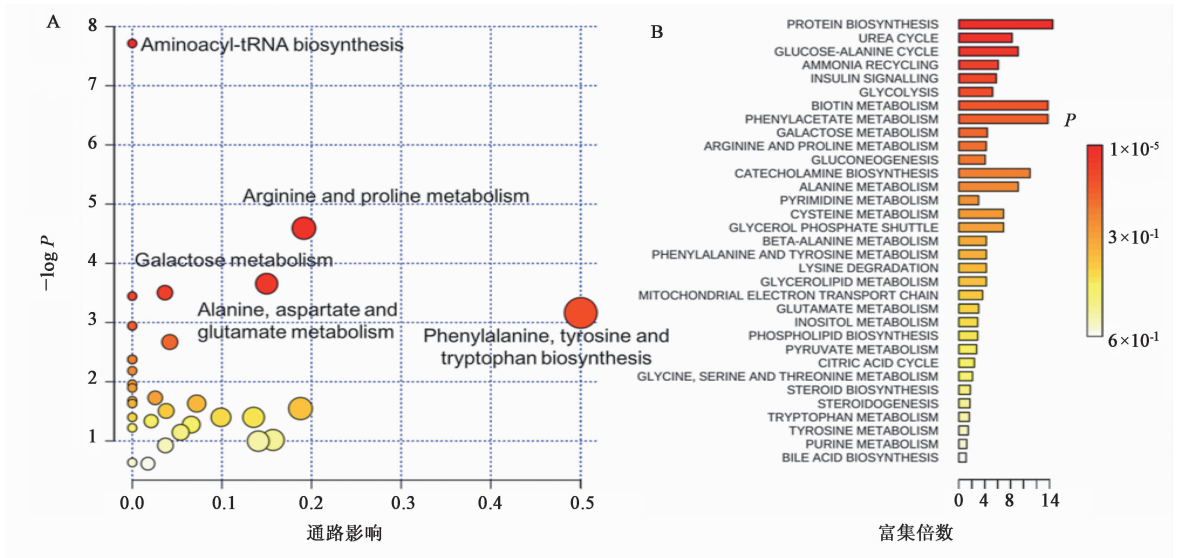


图 3 模型组和空白组基于网络工具的代谢通路分析

Fig.3 Metabolic pathway analysis of control group and model group based on network tools

鉴于得分图的结果,表明消癌解毒方高剂量组长时间作用后,药物显示出了一定的代谢转归作用,消癌解毒方高剂量给予 11 d 后可对模型组中发生异常变化的 30 个代谢物中 10 个产生调

节作用,见表 2。结果发现给予高剂量消癌解毒方后,可对前述鉴定出的 15 个潜在肿瘤生物标记物中的 10 个产生一定的像正常组方向转归的调节作用,具体为 1-氢-3-吲哚丙酸、赖氨酸、色氨

酸、甘油磷酸盐、谷氨酰胺、肌醇、鸟氨酸、丙酮酸有正调控作用,对胆固醇、棕榈油酸有负调控作用,尤其以鸟氨酸、丙酮酸效果明显,提示消癌解

毒方可能通过调节糖代谢、氨基酸代谢和三羧酸循环来发挥其代谢调节作用,从而产生抗肿瘤效应。

表 2 消癌解毒方有效调节的化合物(各组响应值)( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Metabolites list adjusted by Xiaojai Jiedu prescription (Response values of each group) ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 化合物        | 空白组                 | 模型组                               | 高剂量组                              |
|------------|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 色氨酸        | 3 365 417 ± 753 722 | 1 371 917 ± 315 089 <sup>1)</sup> | 1 484 737 ± 345 105 <sup>2)</sup> |
| 丙酮酸        | 221 958 ± 40 822    | 99 934 ± 32 675 <sup>1)</sup>     | 1 366 810 ± 366 922 <sup>2)</sup> |
| 肌醇         | 153 153 ± 34 219    | 44 518 ± 41 822 <sup>1)</sup>     | 71 758 ± 40 566 <sup>2)</sup>     |
| 谷氨酰胺       | 234 309 ± 61 497    | 123 255 ± 30 076 <sup>1)</sup>    | 597 871 ± 121 767 <sup>2)</sup>   |
| 1-氢-3-吡啶丙酸 | 95 985 ± 41 217     | 16 636 ± 5 797 <sup>1)</sup>      | 16 711 ± 6 189 <sup>2)</sup>      |
| 胆固醇        | 442 053 ± 88 965    | 736 643 ± 198 839 <sup>1)</sup>   | 725 501 ± 323 325 <sup>2)</sup>   |
| 鸟氨酸        | 846 281 ± 173 437   | 515 242 ± 206 258 <sup>1)</sup>   | 730 665 ± 302 230 <sup>2)</sup>   |
| 棕榈油酸       | 1 119 320 ± 236 762 | 1 524 045 ± 266 701 <sup>1)</sup> | 1 366 810 ± 366 922 <sup>2)</sup> |
| α-甘油磷酸盐    | 413 496 ± 72 265    | 317 722 ± 45 501 <sup>1)</sup>    | 347 599 ± 69 291 <sup>2)</sup>    |
| 赖氨酸        | 6 503 ± 2 648       | 3 612 ± 1 557 <sup>1)</sup>       | 5 425 ± 3 587 <sup>2)</sup>       |

注:与空白组相比<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

W256 细胞是目前被广泛认可的大鼠可移植肿瘤瘤株,植入皮下能较好地模拟人类恶性肿瘤生长方式。大鼠 W256 细胞皮下移植瘤实验模型被广泛应用于肿瘤相关研究<sup>[9]</sup>。前期研究表明消癌解毒方可显著抑制肿瘤生长,延长大鼠生存期<sup>[10]</sup>,可能与其免疫调节作用有关。

周仲英教授课题组前期研究从分子免疫、蛋白质组学、信号通路等多个层面证实了其有效性和作用机制,凸显出癌毒在恶性肿瘤发病中的重要地位,但从整体层面分析方效的研究还未实施。本文借助符合中医整体观念的代谢组学法来进一步探讨消癌解毒方干预下大鼠移植瘤体内代谢变化,以揭示移植瘤大鼠较正常的代谢紊乱和消癌解毒方对其干预作用,寻找代谢生物靶点和潜在的标志物,从代谢分子化合物和代谢途径层面探寻消癌解毒方的抗肿瘤机制。代谢组学作为系统生物学的分支,是一门从表象揭示内涵的新的研究方法,由于其检测出的物质的种类要远小于基因组学、蛋白组学及转录组学的数目具有灵敏、整体、动态、综合与分析的特点,是一种整体性研究方法<sup>[11]</sup>,代谢组学通过观察药物所引起的内源性代谢物的变化,推测体内生化过程和状态的变化,进而推断中药的作用机制。

实验发现大鼠移植瘤模型组与空白组体内代谢发生变化,主要涉及大鼠体内一些糖类、氨基酸、核酸、脂肪酸等,主要影响的相关的代谢通路有糖代谢、能量代谢、氨基酸代谢等。本文旨在考察不同时间点大鼠血浆代谢的变化,以动态连续地探明消癌

解毒方代谢机制,但是得到的结果是在第 1,2 个时间点消癌解毒方作用不明显,故重点分析了第 3 个时间点结果。

研究发现肿瘤模型大鼠体内的糖代谢发生了显著的异常,表现为血清葡萄糖、葡萄糖酸和 α-甘油磷酸盐水平的显著下降,而丙酮酸含量的显著升高。原因是移植瘤大鼠体内葡萄糖无氧酵解加强,葡萄糖消耗进一步转化成丙酮酸再产生乳酸。肝癌常可见到血糖降低伴有丙酮酸升高,也被证实与胰岛素异位分泌有关。而且肝癌细胞不能制造葡萄糖,却需要大量消耗,这进一步加强了无氧代谢<sup>[12]</sup>。本文研究肿瘤模型用的 W256 细胞作为可移植瘤株,常用作肝癌造模,考虑与本文造模产生的移植瘤具有同源性,故可以等同分析。经过消癌解毒方干预后,在第 3 个时间点高剂量组测到的丙酮酸明显靠近空白组,显示了较好的调控作用,提示了该复方高剂量组具有较好药效,且对糖代谢通路有影响。

本研究鉴定出的代谢物中丙酮酸、色氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺均与三羧酸循环有关,其中除丙酮酸升高外,其他代谢物都降低。三羧酸循环在需氧生物体内普遍存在,既是糖类、脂类、氨基酸三大营养素的最终代谢通路,又是三大营养素代谢联系的枢纽<sup>[13]</sup>。谷氨酰胺是机体的碳源,其消耗是细胞增殖的 1 个基本代谢特征。体内的肿瘤细胞大量消耗谷氨酰胺,体外的肿瘤细胞需要高浓度的谷氨酰胺来维持生存和增殖。研究显示在肿瘤细胞中,谷氨酰胺部分氧化成乳酸,同时为脂肪酸和核苷酸合成提供还原型辅酶 II;谷氨酰胺转化成 α-酮戊二酸进入

三羧酸循环,生成草酰乙酸,有效补充大量用于合成脂类的三羧酸循环的中间代谢物,维持三羧酸循环功能,此过程称为谷氨酰胺补充<sup>[14]</sup>。这与发现的大鼠血浆谷氨酰胺降低相符合。同时丙酮酸的升高考虑与三羧酸循环部分环节功能加强有关。消癌解毒方干预后的结果显示高剂量组在第3个时间点对血浆谷氨酰胺调控作用显著( $P < 0.01$ ),考虑与消癌解毒方诱导肿瘤细胞凋亡有关,对色氨酸、赖氨酸、棕榈油酸、胆固醇有一定的调控作用。

本文研究发现大鼠血清中色氨酸、赖氨酸、鸟氨酸均减少,脯氨酸、酪氨酸(生酮兼生糖氨基酸)含量增加,这一结果与Zhang等<sup>[15]</sup>研究的结论相似。对于肿瘤细胞增殖而言,氨基酸的主要功能是合成蛋白质,而且部分氨基酸是肿瘤细胞的能量来源<sup>[16]</sup>。在恶性肿瘤的生长代谢过程中,大量氨基酸被用于蛋白质合成及糖、能量等各种代谢需要。本文中模型组大鼠血清中色氨酸的含量较空白组大鼠显著降低,可能与之有关。根据文献报道提示肝肿瘤患者,尤其是恶性病变患者中血浆中总色氨酸浓度降低<sup>[17]</sup>,因此在有些研究认为色氨酸是肿瘤相关疾病的一个潜在生物标志物。

本文研究W256转移瘤模型组大鼠血浆内丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、谷氨酸鸟氨酸等系列氨基酸含量发生不同程度的变化,说明转移瘤的大鼠体内氨基酸代谢紊乱。消癌解毒方干预后色氨酸、赖氨酸与造模组有所回升;酪氨酸与造模组有所降低。说明消癌解毒方对上述代谢物有不同程度地像正常组方向转归的调控作用。

#### [参考文献]

[1] 周红光,陈海彬,吴勉华,等. 消癌解毒方配合化疗治疗中晚期恶性肿瘤临床疗效观察[J]. 中华中医药杂志,2010,25(7):1140-1143.

[2] 李栋,周红光,吴勉华,等.“癌毒”学说内涵探讨及消癌解毒方抗癌生物学机制研究[J]. 辽宁中医杂志,2011,38(12):2360-2361.

[3] Sreekumar A, Poisson L M, Rajendiran T M, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression [J]. Nature, 2009,457(7231):910-914.

[4] Nicholson J K. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology [J]. Mol Syst Biol,2008(2):52-57.

[5] Nicholson J K, Lindon J C. Systems biology: Metabonomics [J]. Nature, 2008, 455 (7216): 1054-1056.

[6] Zhang A, Sun H, Wang Z, et al. Metabolomics: towards understanding traditional Chinese medicine [J]. Planta Med,2010,76(17):2026-2035.

[7] Arakaki A K, Skolnick J, McDonald J F. Marker metabolites can be therapeutic targets as well [J]. Nature,2008,456(7221):443.

[8] Wang M, Lamers R J, Korthout H A, et al. Metabolomics in the context of systems biology: bridging traditional Chinese medicine and molecular pharmacology [J]. Phytother Res,2005,19(3):173-182.

[9] Camargo C A, da Silva M E, da Silva R A, et al. Inhibition of tumor growth by quercetin with increase of survival and prevention of cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011,406(4):638-642.

[10] 张玉,陈海彬,周红光,等. 消癌解毒方体内抑瘤作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):234-237.

[11] 唐惠儒,王玉兰. 代谢组学:一个迅速发展的新兴学科[J]. 生物化学与生物物理进展,2006,33(5):401-405.

[12] Ye G, Zhu B, Yao Z, et al. Analysis of urinary metabolic signatures of early hepatocellular carcinoma recurrence after surgical removal using gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Proteome Res, 2012, 11 (8): 4361-4372.

[13] 陈牧,刘锐,翁屹. 三羧酸循环的发现与启示[J]. 医学与哲学,2012,33(1):71-73.

[14] Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, et al. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry [J]. Cancer Res, 2009, 69 (11):4918-4925.

[15] Zhang Q, Takahashi M, Noguchi Y, et al. Plasma amino acid profiles applied for diagnosis of advanced liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C infection [J]. Hepatol Res,2006,34(3):170-177.

[16] Edinger A L, Thompson C B. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake [J]. Mol-Biol Cell,2002,13(7):2276-2288.

[17] 沈耕荣,罗振辉,赵国明. 色氨酸代谢异常在肝昏迷发病机制中的地位[J]. 国外医学:消化疾病分册,1984,4(4):195-197.

[责任编辑 刘德文]