

· 药物代谢 ·

基于代谢组学分析青蒿琥酯治疗肝癌的作用机制

王惠国¹, 王嗣瑶^{1,2}, 韩鑫龙^{1,3}, 李雨桐^{1,3}, 袁立霞³, 谭晓梅³, 汤庆发³,
邢学锋³, 陈飞龙³, 尹雅蕾^{2*}, 唐玲^{3*}

(1. 大连大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116622; 2. 中国科学院 大连化学物理研究所
中国科学院分离分析化学重点实验室, 转化医学科学研究中心, 辽宁 大连 116023;
3. 南方医科大学 中医药学院, 广东省中药制剂重点实验室,
广东省中药制剂技术工程实验室, 广州 510515)

[摘要] 目的: 采用 GC-MS 联用技术探索青蒿琥酯治疗肝癌的作用机制, 为该药物在肝癌治疗中的临床应用提供实验依据。方法: 应用发光法细胞活力检测试剂盒 (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay) 检测不同浓度青蒿琥酯 (0, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用于人肝癌 Huh7, SMMC-7721 细胞 24, 48, 72 h 的活性。采用 GC-MS 联用技术分析青蒿琥酯作用于 2 种肝癌细胞 (Huh7, SMMC-7721) 24 h 后代谢物的变化, 利用 Postrun Analysis 4.41 工作站对数据进行预处理, 采用偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 对两组差异代谢物进行分析, 通过 MetaboAnalyst 3.0 软件对差异代谢物进行代谢通路分析。结果: 与正常组相比, 青蒿琥酯作用于 2 种肝癌细胞后, 细胞内相同代谢物共有 39 种发生了显著变化, 主要涉及到氨基酸-转运 RNA (tRNA) 生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢, 谷胱甘肽代谢 5 条代谢通路。结论: 青蒿琥酯 (12.5 ~ 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 均能够抑制肝癌细胞 (Huh7, SMMC-7721) 的生长, 主要涉及到 5 条代谢通路, 这可能是青蒿琥酯抗肝癌的作用途径。

[关键词] 青蒿琥酯; 代谢组学; 肝癌细胞; Huh7; SMMC-7721; 氨基酸代谢; 能量代谢

[中图分类号] R22; R945; R28; Q2; R969.1; O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)22-0078-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191548

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190408.0925.002.html>

[网络出版时间] 2019-04-09 17:10

Analysis of Mechanism of Artesunate in Treatment of Liver Cancer Based on Metabolomics

WANG Hui-guo¹, WANG Si-yao^{1,2}, HAN Xin-long^{1,3}, LI Yu-tong^{1,3}, YUAN Li-xia³,
TAN Xiao-mei³, TANG Qing-fa³, XING Xue-feng³, CHEN Fei-long³, YIN Ya-lei^{2*}, TANG Ling^{3*}

(1. School of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622, China;

2. Scientific Research Center for Translational Medicine, Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;

3. Guangdong Provincial Engineering Laboratory of Chinese Medicine Preparation Technology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmaceuticals, School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the antitumor mechanism of artesunate in the treatment of liver cancer based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Method:** CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability

[收稿日期] 20181225(013)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573661); 广东省自然科学基金项目(2016A030313621)

[第一作者] 王惠国, 博士, 副教授, 从事天然产物活性成分分离及药理作用研究, Tel: 0411-87402337, E-mail: 903344836@qq.com

[通信作者] *唐玲, 博士, 教授, 从事中药及复方药效物质基础及作用机制研究, Tel: 020-62789112, E-mail: tangyuling6688@163.com;

*尹雅蕾, 博士, 从事肿瘤耐药机制的研究, Tel: 0411-84770960, E-mail: yinyalei1983@dicp.ac.cn

Assay was used to detect activity of artesunate with different concentrations (0, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on human liver cancer Huh7, SMMC-7721 cells for 24, 48, 72 h. GC-MS was employed to analyze the changes of metabolites of artesunate in two kinds of hepatoma cells (Huh7, SMMC-7721) for 24 h. The data was preprocessed by Postrun Analysis 4.41 workstation. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) was used to analyze two sets of differential metabolites and to analyze metabolic pathways of differential metabolites based on MetaboAnalyst 3.0 software. **Result:** Compared with the normal group, after two kinds of liver cancer cells was treated by artesunate, a total of 39 identical metabolites in the cells have undergone significant changes, which were mainly related to five metabolic pathways, including biosynthesis of aminoacyl-transfer RNA (tRNA), metabolism of alanine, aspartic acid and glutamic acid, metabolism of glycine, serine and threonine, metabolism of arginine and proline, metabolism of glutathione. **Conclusion:** Artesunate (12.5-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) can inhibit the growth of liver cancer cells (Huh7, SMMC-7721), it mainly involves five metabolic pathways, which may be the pathway of artesunate against liver cancer.

[**Key words**] artesunate; metabolomics; liver cancer; Huh7; SMMC-7721; amino acid metabolism; energy metabolism

肝脏是人体最大的脏器,是药物和新陈代谢的关键器官,在氨基酸代谢、蛋白质的合成、排泄、解毒、储存、再分配等多方面发挥着重要的作用^[1]。原发性肝癌(HCC)是世界上发病率和死亡率增长最快的癌症之一。肝癌的主要危险因素是乙型肝炎病毒感染、慢性丙型肝炎病毒感染、酒精性肝病和非酒精性脂肪性肝病以及代谢紊乱^[2]。

青蒿琥酯是青蒿素的一种衍生物,青蒿素及其衍生物低毒、疗效好,已经成为临床治疗疟疾的一线药物^[3-4]。近几年的研究发现,青蒿琥酯不仅有抗疟疾的作用,还有抗肿瘤的活性,具有成为高效、低毒抗肿瘤药物的潜力。研究人员从多方面探讨了青蒿琥酯抗肿瘤的作用机制,如 Ilamathi 等^[5]通过调节白细胞介素-6(IL-6)-Janus 激酶-信号转导与转录激活(JAK-STAT)信号传导来消除大鼠实验性肝细胞癌。QIAN 等^[6]通过增强 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞功能和逆转 HepG2 细胞的免疫逃逸来增强 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞介导的抗肿瘤活性。JING 等^[7]发现青蒿琥酯抑制了肝癌细胞 SMMC-7721 的生长,通过对长链非编码 RNA-RP11 的抑制作用来抑制肝癌细胞的微环境、增殖、迁移、侵袭和黏附,但尚未发现有研究者从代谢水平报道青蒿琥酯抗肝癌的作用机制。

代谢组学是功能基因组学的重要组成部分,对基因组学、转录组学和蛋白组学功能研究具有良好的补充作用^[8-9]。近年来,代谢组学技术快速发展,已经广泛应用于生物医药研究的各个领域,尤其是在中药研究、新药研发、疾病标志物发现等诸多方面展现出较好的优势^[10]。GC-MS 是一种发展较为成熟的代谢组学分析技术,具有灵敏度高、分辨率高、

重复性好等优势^[11-12],其主要用于分析自身具有挥发性或经过衍生后具有挥发性且热稳定性好的代谢物^[13]。该方法的代谢物覆盖范围较广,衍生之后可以分析到一些临床研究关注的代谢物,如与糖酵解、三羧酸循环、氨基酸代谢、脂肪酸代谢的关联代谢物。本实验采用 GC-MS 联用技术研究青蒿琥酯作用于肝癌 Huh7, SMMC-7721 细胞后代谢物的变化,探讨青蒿琥酯治疗肝癌的可能代谢途径,为阐释青蒿琥酯抗肝癌的作用机制奠定基础。

1 材料

QP2010 型气相色谱-质谱联用仪[日本岛津公司,配备 5977 型电子轰击离子源(EI),AOC20i 型自动进样器],CENCO 型涡旋仪(荷兰 Breda 公司),Milli-Q Advantage A10 型超纯水系统(德国 Merck 公司),CT15RT 型高速离心机[天美科技(中国)有限公司],7310038 型冷冻干燥机(美国 Labconco 公司),LS-C0150 型二氧化碳恒温培养箱(美国 Thermo 公司),AC2-4S 型二级生物安全柜(新加坡 Esco 公司),DMi1 型倒置显微镜(德国 Leica 公司),Countess™ II Automated Cell Counter 型全自动细胞计数仪(美国 Thermo Fisher 公司),Cytation5 型细胞成像多功能检测仪(美国伯腾仪器有限公司)。

DMEM 高糖培养基,胎牛血清,青霉素-链霉素混合液(100 ×),0.25% 胰蛋白酶,杜氏磷酸缓冲液(DPBS)均购自美国 Gibco 公司,批号分别为 8118199,2010092,1999373,1951049,8118213;通用细胞冻存液和二甲基亚砜(DMSO)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 NO20181029,1213C0343);细胞活力检测试剂盒(CellTiter-Glo®

Luminescent Cell Viability Assay, 美国 Promega 公司, 批号 0000301192); 青蒿琥酯(纯度 ≥98%), 甲氧胺盐酸盐, 吡啶, *N*-甲基-*N*-(三甲基硅烷基)-三氟乙酰胺 (MSTFA) (美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号分别为 WXBC2978V, BCBC3441V, SHBG8498V, BCBV0257); 水为自制超纯水, 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

人肝癌细胞 Huh7, SMMC-7721 (美国 ATCC 细胞库)。

2 方法与结果

2.1 药品的配置 在超净工作台中用 DMSO 0.520 3 mL 与青蒿琥酯粉末 20 mg 混合, 配置浓度为 100 μmol·L⁻¹ 的青蒿琥酯母液, 充分溶解混匀后, 分别分装至 1.5 mL 的小型离心管中, 用封口膜进行密封, -80 °C 保存。实验操作过程中 DMSO 终体积分数低于 0.1%。

2.2 细胞培养 Huh7, SMMC-7721 细胞在含有 10% 胎牛血清和 100 g·L⁻¹ 青霉素-链霉素混合液 (100 ×) 的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱培养, 每 2 d 更换 1 次液体, 待细胞密度长到 80% 以上后进行传代和后续实验。

2.3 细胞活力测定 取出对数生长期的 Huh7 和 SMMC-7721 细胞, 消化后计数, 以 3 000 个/孔接种于 96 孔板中, 每孔加入 DMEM 高糖培养基 100 μL。置于 37 °C, 5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养 24 h, 弃去培养基, 加入青蒿琥酯溶液 (浓度分别为 12.5, 25, 50, 100 μmol·L⁻¹), 以青蒿琥酯溶液浓度为 0 μmol·L⁻¹ 作为正常组, 同时设有空白组 (不加细胞和药物, 其他与给药组相同), 每组设 5 个复孔, 继续培养 24, 48, 72 h 后, 在相应的时间取出, 加入 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 活性试剂 20 μL, 在室温下孵育 10 min 以稳定发光信号, 利用细胞成像多功能检测仪进行细胞活力检测, 发光信号在 135 nm 处进行检测, 按公式存活率 = (Lum_{给药组} - Lum_{空白组}) / (Lum_{正常组} - Lum_{空白组})^[14] 计算细胞存活率, 式中 Lum 表示三磷酸腺苷 (ATP) 的发光信号; 同时, 计算半数抑制浓度 (IC₅₀)。结果 Huh7 细胞 24, 48, 72 h 的 IC₅₀ 分别为 55.88, 18.38, 17.33 μmol·L⁻¹; SMMC-7721 细胞 24, 48, 72 h 的 IC₅₀ 分别为 114.71, 47.73, 38.10 μmol·L⁻¹。说明青蒿琥酯对 Huh7, SMMC-7721 细胞的抑制作用呈时间和浓度依赖性, 见表 1, 2。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 组间比较采用 *t* 检验, 组内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。

表 1 青蒿琥酯对肝癌细胞 Huh7 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度 / μmol·L ⁻¹	24 h	48 h	72 h
正常	-	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.02
青蒿琥酯	12.5	0.81 ± 0.07 ¹⁾	0.58 ± 0.03 ²⁾	0.63 ± 0.07 ²⁾
	25	0.62 ± 0.03 ²⁾	0.41 ± 0.05 ²⁾	0.31 ± 0.02 ²⁾
	50	0.52 ± 0.06 ²⁾	0.36 ± 0.04 ²⁾	0.29 ± 0.02 ²⁾
	100	0.35 ± 0.05 ²⁾	0.20 ± 0.02 ²⁾	0.17 ± 0.02 ²⁾

注: 与正常组同时点比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01 (表 2 同)。

表 2 青蒿琥酯对肝癌细胞 SMMC-7721 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度 / μmol·L ⁻¹	24 h	48 h	72 h
正常	-	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.02
青蒿琥酯	12.5	0.94 ± 0.02	0.82 ± 0.01 ¹⁾	0.86 ± 0.01 ¹⁾
	25	0.91 ± 0.04	0.69 ± 0.02 ²⁾	0.61 ± 0.07 ²⁾
	50	0.72 ± 0.04 ²⁾	0.48 ± 0.02 ²⁾	0.40 ± 0.02 ²⁾
	100	0.55 ± 0.04 ²⁾	0.23 ± 0.01 ²⁾	0.18 ± 0.01 ²⁾

2.4 GC-MS 分析

2.4.1 样品处理 取出对数生长期的 Huh7, SMMC-7721 细胞, 消化后计数, 以密度 2 × 10⁶ 个/孔接种于 10 cm 的平皿中, 在 37 °C, 5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养 24 h, 分成 2 组, 1 组加入 DMEM 高糖培养基 10 mL 继续培养, 另 1 组加入含 25 μmol·L⁻¹ 青蒿琥酯溶液的 DMEM 高糖培养基 10 mL 继续培养, 每组样品平行制备 5 份, 培养 24 h 后取出所有细胞, 用预冷的 DPBS 洗涤 3 次, 每次 10 mL, 液氮淬灭, 加入预冷的甲醇 1 mL 至平皿中, 用细胞刮铲刮下细胞, 转移至 5 mL 离心管中, 涡旋 1 min, 于 30 Hz 超声 2 次, 每次 10 s, 再次涡旋 1 min, 静止 10 min, 离心 (14 000 r·min⁻¹, 15 min, 4 °C), 每个样品取部分上清, 作为 1 份独立样品, 剩余部分取等量混匀, 作为质量控制 (QC) 样本, 将所有样品冻干, 再将冻干样品进行衍生, 在每个冻干样品中加入 15 g·L⁻¹ 甲氧胺吡啶溶液 50 μL, 涡旋 20 s, 超声 5 min, 在 37 °C 水浴中进行脲化反应 1.5 h, 加入 MSTFA 40 μL, 在 37 °C 水浴进行硅烷化反应 1 h, 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清置于进样瓶中进行 GC-MS 分析。

2.4.2 检测条件 DB-5 MS (250 $\mu\text{m} \times 30 \text{ m}$, 0.25 μm), 进样温度 280 $^{\circ}\text{C}$, 进样量和分流比分别设为 1 μL 和 10 : 1, 载气氦气 (He), 线性速度 40 $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 采用恒流模式, 流速 1.19 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温程序升温 (起始温度 70 $^{\circ}\text{C}$, 保持 3 min; 以 5 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升至 300 $^{\circ}\text{C}$, 保持 10 min), 进样口温度、界面温度和离子源温度分别设定为 300, 280, 230 $^{\circ}\text{C}$, 检测电压 0.92 kV。采用电子轰击离子源 (EI, 电压 70 eV) 的离子化方式, 周期设定 0.2 s。采用全扫描方式, 检测范围 m/z 33 ~ 600, 溶剂切割时间 5.5 min, 扫描的离子为各个衍生产物的特征离子。

2.5 数据预处理 利用 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯处理肝癌 Huh7, SMMC-7721 细胞 24 h 后典型总离子流色谱图见图 1。建立包含保留时间和特征离子信息的定量峰表, 导入 Postrun Analysis 4.41 工作站, 建立定量方法, 对数据进行批量积分处理, 获得包含保留时间、特征离子和峰面积的原始峰表, 通过计算每一个样品中每个代谢物的峰面积占总峰面积的比例进行数据的校正, 即细胞样本的校正到总峰面积。

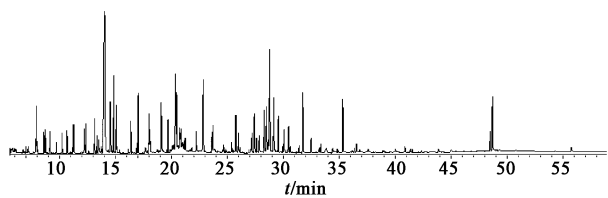


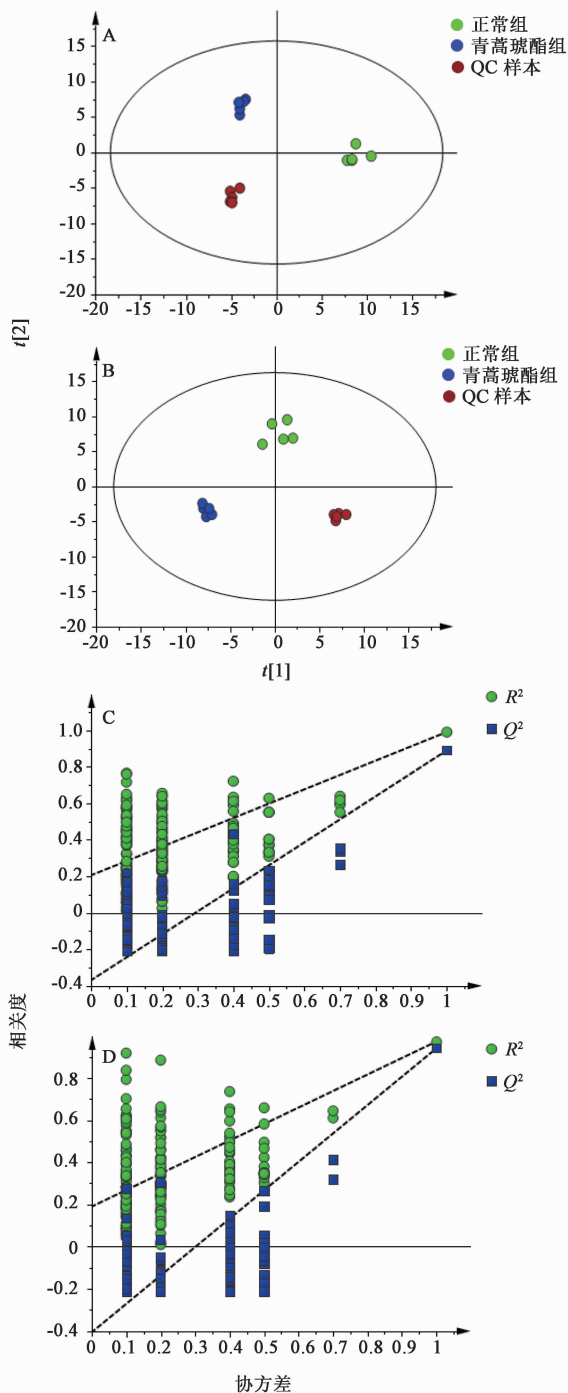
图 1 青蒿琥酯作用于 Huh7, SMMC-7721 细胞的典型总离子流色谱

Fig.1 Typical total ion chromatogram of artesunate acting on Huh7 and SMMC-7721 cells

2.6 系统稳定性考察 在样品检测开始前以及每 4 个样品中间插入 1 个 QC 样本, 以考察整个检测系统在分析过程中的稳定性。将 QC 样本数据进行偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA), 在整个分析过程中 QC 样本仅有较小程度的偏差移动, 均控制在 2 倍标准差以内, 结果表明在整个分析过程中系统稳定性良好^[15]。

2.7 QC 重复性考察 评估重复性时用相对标准偏差 (RSD) 表示, 结果 79.4%, 90.7% 和 98.1% 的代谢特征的 RSD 分别为 < 10%, < 20% 和 < 30%, 表明该方法的重复性适用于代谢谱分析^[16]。

2.8 PLS-DA 处理 构建 PLS-DA 数据模型, 此模型与主成分分析 (PCA) 相比能更大程度地区分组间差异, 为了防止模型发生过拟合, 对模型进行 200 次置换检验, 见图 2。



A, C. Huh7 细胞; B, D. SMMC-7721 细胞

图 2 青蒿琥酯作用于 2 种肝癌细胞后样本的 PLS-DA 得分和置换检验

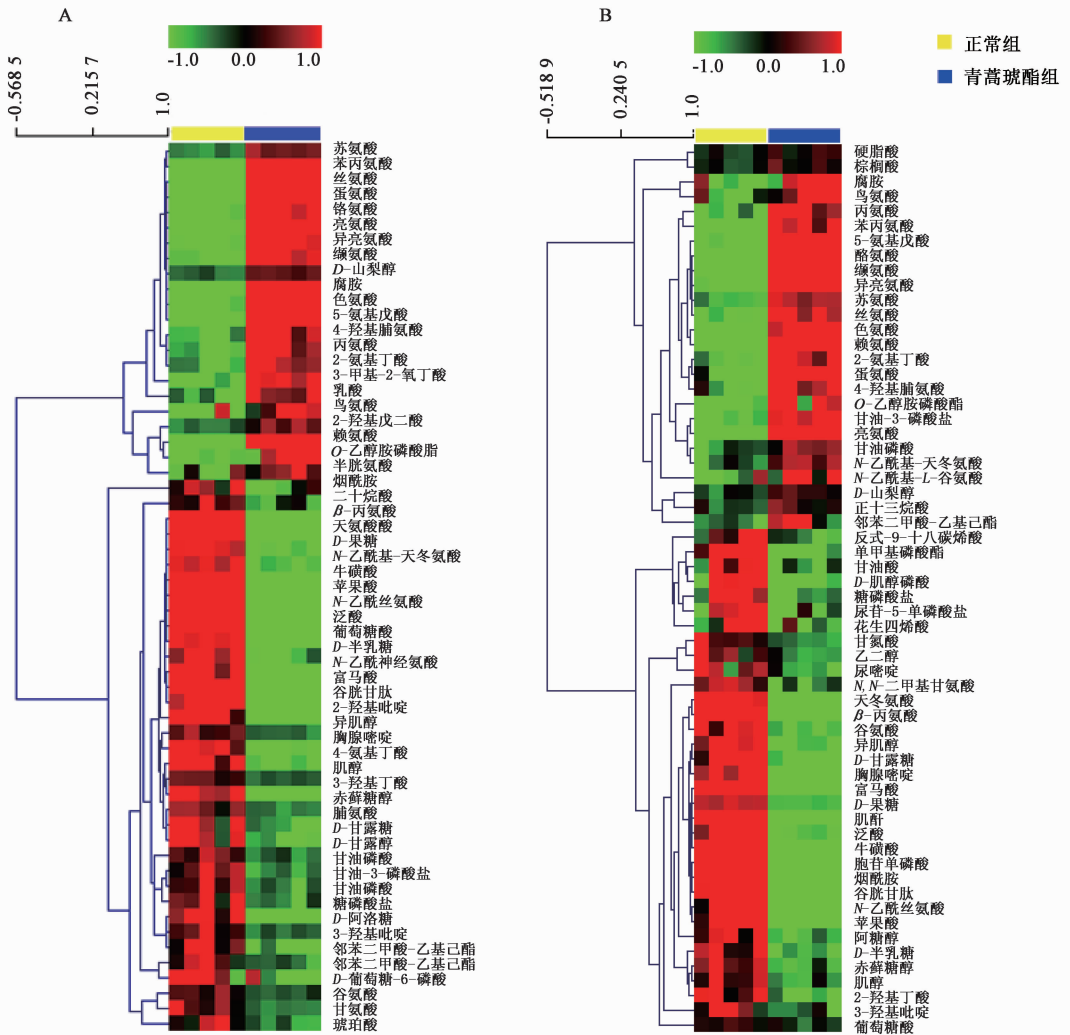
Fig.2 PLS-DA scores and permutation tests for samples of two kinds of liver cancer cells treated with artesunate

在肝癌 Huh7 细胞中 R^2 (反映模型的拟合准确性) 和 Q^2 (反映模型的预测准确性) 与 Y 轴的截距分别为 0.175, -0.387; 在肝癌 SMMC-7721 细胞中 R^2 和 Q^2 与 Y 轴的截距分别为 0.23, -0.396, 结果说明模型未过拟合, 模型充分提取了加青蒿琥酯

药物前后差异代谢物的信息^[15]。由图 2 可知,在 2 种肝癌细胞系 (Huh7, SMMC-7721) 中,正常组与青蒿琥酯组都获得明显的区分,说明正常组与青蒿琥酯组的代谢物存在显著性差异。

2.9 肝癌细胞内差异代谢物的筛选 采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析,如果 $P < 0.05$,说明正常组与青蒿琥酯组存在显著性差异,从 Huh7, SMMC-7721 细胞中共同检测到 39 个差异代谢物,

其中 18 个差异代谢物显著上调,如鸟氨酸、腐胺和 D-山梨醇等,21 个差异代谢物显著下调,如甘氨酸、谷胱甘肽、天冬氨酸、谷氨酸等,为了表征两组差异代谢物之间的聚落关系,对这些差异代谢物的定量信息进行热图分析,见图 3,每行表示代谢物,每列表示样本。结果发现组内各重复颜色相近,说明重复性较好,左侧的树状结构表示差异代谢物之间有密切的聚类关系。



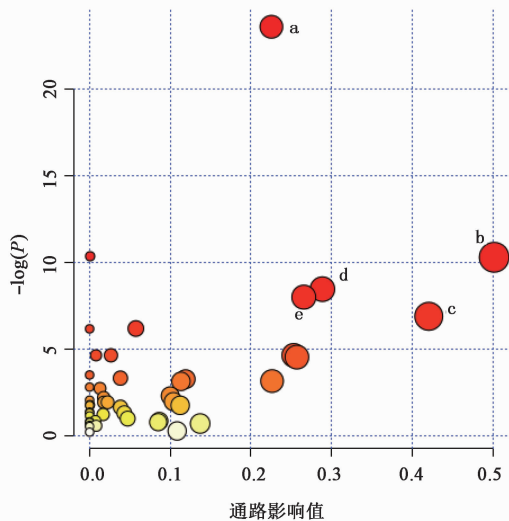
A. Huh7 细胞; B. SMMC-7721 细胞; 颜色表示差异化合物的丰度大小, 丰度越大颜色越深 (红色为上调, 绿色为下调)

图 3 正常组和青蒿琥酯组 2 种肝癌细胞中差异代谢物的热图分析

Fig. 3 Thermographic analysis of differential metabolites in two kinds of liver cancer cells from normal group and artesunate group

2.10 代谢通路分析 将 2 种细胞系 (Huh7, SMMC-7721) 共同的差异代谢物信息输入至 MetaboAnalyst 3.0 软件进行代谢通路分析, 见图 4, 图中每个圆圈对应肝癌相关的通路, 图中圆点越大表明该通路富集到的差异代谢物越多, 颜色越深表示 P 越小, 离坐标越远表明该通路受到影响越大。

结果显示 2 种肝癌细胞中 39 个共同代谢物发生了显著变化, 差异代谢物涉及 46 条代谢通路, 主要涉及氨基酸-转运 RNA (tRNA) 生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢, 谷胱甘肽代谢 5 条代谢通路。这些代谢通路主要涉及氨基酸代谢和能量代谢。



a. 氨基酰-tRNA 生物合成; b. 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; c. 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; d. 精氨酸和脯氨酸代谢; e. 谷胱甘肽代谢

图 4 青蒿琥酯作用于 2 种肝癌细胞的代谢通路分析

Fig. 4 Analysis of metabolic pathway of artesunate acting on two kinds of liver cancer cells

3 讨论

肝癌具有非常高的死亡率,并且高复发率和高转移率导致肝癌患者的预后不良。肿瘤是世界性疾病,也是人类最大的杀手,国内许多研究人员对肿瘤发生机制进行了研究,随着代谢组学的发展,研究者们对肿瘤的代谢特点越来越重视^[17]。恶性肿瘤患者常存在严重的代谢紊乱,这种代谢紊乱涉及到蛋白质、脂肪、碳水化合物和能量代谢等方面。本研究采用 GC-MS 代谢组学技术,考察青蒿琥酯对 Huh7, SMMC-7721 细胞的抑制作用,其中 Huh7 细胞是肝癌中常见的、典型的细胞系^[18-20]; SMMC-7721 细胞在肝癌细胞器中 c-Myc 高表达, c-Myc 与代谢密切相关^[21]。因此,本文选用 Huh7, SMMC-7721 细胞进行代谢组学分析并结合代谢通路进行分析,寻找可能存在的抗肝癌作用机制。

青蒿琥酯作用肝癌细胞后细胞内代谢物发生了显著性变化,其中影响最大的差异代谢途径是氨基酰-tRNA 生物合成,其次丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢也受到了很大的影响。氨基酸是生命活动最基本的物质,是生命代谢的物质基础,肿瘤细胞生长需要大量的氨基酸。其中天冬氨酸是体内合成核苷酸的必须物质之一,肿瘤细胞需要大量的天冬氨酸用于合成核苷酸以促进肿瘤生长^[22]。天冬氨酸在酶的催化作用下生成天冬酰胺,同时可以作为碳源合成脂肪酸。而谷氨酸在谷氨酰胺合成酶作用下生成

谷氨酰胺。在肿瘤细胞中,谷氨酰胺是重要的能源来源,其代谢产物包括谷氨酸和谷胱甘肽,这些代谢产物在肿瘤细胞增殖、侵袭及其药物治疗中起到至关重要的作用^[21,23]。谷氨酸是细胞代谢中含量丰富的游离氨基酸,提供氮源,参与其他生物合成^[24]。甘氨酸是一种非必需氨基酸,但是对肿瘤细胞来说,甘氨酸是肿瘤细胞增殖的必需氨基酸,参与多种蛋白的合成,部分用于细胞快速增殖的嘌呤核苷酸从头生物合成。有文献报道,甘氨酸消耗是转化细胞快速增殖特有的特征^[25]。甘氨酸在肿瘤细胞转移^[26]、细胞转化^[27-28]、细胞增殖^[29]起到尤为重要的作用。当甘氨酸受到外界的刺激,如营养不足,肿瘤细胞的 G1 期会延长,细胞停滞在 G1/G0 期,导致肿瘤细胞停止生长,进而使细胞凋亡^[30]。

精氨酸和脯氨酸代谢通路在肿瘤的生长中提供能量和蛋白质合成,精氨酸不仅在能量代谢和蛋白质的合成中起到重要作用,还参与一氧化氮、脯氨酸、肌酸、谷氨酸等的合成。精氨酸最重要的一个功能是参与尿素循环。研究发现在肿瘤细胞中因缺乏尿素循环的关键酶,所以不能通过尿素循环来合成精氨酸,为了满足自身的生长增殖必须从体外获取^[31]。天冬氨酸参与精氨酸的生物合成,精氨酸、鸟氨酸参与尿素循环的同时还会生成脯氨酸,在营养胁迫的条件下,脯氨酸是一种能源,能够提供肿瘤细胞生长^[32]。谷氨酰胺、谷氨酸和脯氨酸之间存在相互的关系,虽然三者具有不同的功能,谷氨酰胺合成的第一步是通过 ATP 激活谷氨酸的 γ 碳以形成 γ -谷氨酰胺磷酸。这也是 γ -5 羧酸 (P5C) 合成酶催化的第一步, P5C 合成酶是谷氨酸合成脯氨酸的一种酶^[33]。因此,青蒿琥酯作用后,细胞中的天冬氨酸、甘氨酸和谷氨酸的含量降低,从而抑制肿瘤生长及增殖。

本文研究结果显示,青蒿琥酯对人肝癌细胞 Huh7, SMMC-7721 均有一定程度的抑制作用。研究人员曾从多方面探讨了青蒿琥酯抗肿瘤的作用机制,如青蒿琥酯可能通过细胞周期阻滞,抑制肿瘤细胞侵袭、转移以及抑制多条信号通路激活从而诱导肿瘤细胞凋亡。本研究首次从代谢水平研究青蒿琥酯对肝癌细胞代谢的影响,虽然 Huh7 和 SMMC-7721 细胞存在一些差异和重合,但这 2 种细胞系代谢通路相似。后续将对差异代谢物进行分子生物学验证,并结合其他组学(基因组学、转录组学、蛋白质组学)寻找靶点,进一步分析青蒿琥酯抗肿瘤的作用机制。本研究采用 GC-MS 进行青蒿琥酯对

肝癌细胞作用后的代谢组学研究,从不同的肝癌细胞中筛选出共同差异代谢物,通过代谢通路分析,提示青蒿琥酯能够显著性的影响氨基酰-tRNA 生物合成,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,精氨酸和脯氨酸代谢,以及谷胱甘肽代谢,从而抑制肿瘤细胞的生长。从代谢通路上提供了青蒿琥酯抗肿瘤的可能机制,可为青蒿琥酯后续肿瘤药理学研究提供实验依据。

[参考文献]

[1] Wiśniewski J R, Vildhede A, Norén A, et al. In-depth quantitative analysis and comparison of the human hepatocyte and hepatoma cell line HepG2 proteomes [J]. *J Proteomics*, 2016, 136:234-247.

[2] 肖潺潺,陈茂剑,梅凡彪,等. 辣椒碱对肝癌 SMMC-7721 细胞迁移和侵袭的影响及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(18):124-129.

[3] Nzila A, Al-Zahrani I. Drugs for the treatment of malaria in the Kingdom of Saudi Arabia [J]. *Saudi Med J*, 2013, 34(6):569-578.

[4] Karunajeewa H A, Kemiki A, Alpers M P, et al. Safety and therapeutic efficacy of artesunate suppositories for treatment of malaria in children in Papua New Guinea [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2003, 22(3):251-256.

[5] Ilamathi M, Prabu P C, Ayyappa K A, et al. Artesunate obliterates experimental hepatocellular carcinoma in rats through suppression of IL-6-JAK-STAT signalling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 82:72-79.

[6] QIAN P, ZHANG Y W, ZHOU Z H, et al. Artesunate enhances gammadelta T-cell-mediated antitumor activity through augmenting gammadelta T-cell function and reversing immune escape of HepG2 cells [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2018, 40 (2): 107-116.

[7] JING W, DONG H, MIN M, et al. Dependence of artesunate on long noncoding RNA-RP11 to inhibit epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120 (4): 6026-6034.

[8] 王高玉,刘红宁,戈淑超,等. 铁皮石斛水提物对胃癌前病变作用的尿液代谢组学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(21):77-85.

[9] Dunn W B, Broadhurst D I, Atherton H J, et al. Systems level studies of mammalian metabolomes; the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Chem Soc Rev*, 2011, 40 (1): 387-426.

[10] 刘欢,高洁,尹晶晶,等. 不同防腐措施收集大鼠尿液对其内源性代谢物的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(6):120-124.

[11] Pasikanti K K, Ho P C, CHAN E C. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 871(2):202-211.

[12] 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.

[13] Lopes A S, Cruz E C, Sussulini A, et al. Metabolomic strategies involving mass spectrometry combined with liquid and gas chromatography [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 965:77-98.

[14] Park H, Kim Y, Sul J W, et al. Synergistic anticancer efficacy of MEK inhibition and dual PI3K/mTOR inhibition in castration-resistant prostate cancer [J]. *Prostate*, 2015, 75(15):1747-1759.

[15] 王华,胡佳慧,刘翠钗,等. 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 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(20):95-101.

[16] ZHOU Y, SONG R, MA C, et al. Discovery and validation of potential urinary biomarkers for bladder cancer diagnosis using a pseudotargeted GC-MS metabolomics method [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (13): 20719-20728.

[17] LI Z F, WANG J, HUANG C, et al. Gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry-based metabolomics of hepatocarcinoma in rats with lung metastasis; elucidation of the metabolic characteristics of hepatocarcinoma at formation and metastasis [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(18):2765-2775.

[18] WANG Y, YAN L, LIU J, et al. The HNF1 α -regulated lncRNA HNF1 α -AS1 is involved in the regulation of cytochrome P450 expression in human liver tissues and Huh7 cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2019, 368(3): 353-362.

[19] CHEN W, WU J, SHI H, et al. Hepatic stellate cell coculture enables sorafenib resistance in Huh7 cells through HGF/c-Met/Akt and Jak2/Stat3 pathways [J]. *Biomed Res Int*, 2014, doi:10.1155/2014/764981.

[20] Kwon S, Jeon J S, Ahn C, et al. Rapamycin regulates the proliferation of Huh7, a hepatocellular carcinoma cell line, by up-regulating p53 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479(1):74-79.

[21] Halama A, Möller G, Adamski J. Metabolic signatures in apoptotic human cancer cell lines [J]. *OMICS*, 2011, 15

- (5):325-335.
- [22] Nevedomskaya E, Ramautar R, Derks R, et al. CE-MS for metabolic profiling of volume-limited urine samples: application to accelerated aging TTD mice [J]. J Proteome Res, 2010, 9(9):4869-4874.
- [23] 杨婧, 贾彦, 王蔚, 等. 膈下逐瘀汤对大鼠纤维化肝脏组织谷胱甘肽抗氧化系统的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(17):121-126.
- [24] Spitzer S, Volbracht K, Lundgaard I, et al. Glutamate signalling: a multifaceted modulator of oligodendrocyte lineage cells in health and disease [J]. Neuropharmacology, 2016, 110(Pt B):574-585.
- [25] Jain M, Nilsson R, Sharma S, et al. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation [J]. Science, 2012, 336(6084):1040-1044.
- [26] 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.
- [27] ZHANG W C, Shyh-Chang N, YANG H, et al. Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis [J]. Cell, 2012, 148(1/2):259-272.
- [28] Possemato R, Marks K M, Shaul Y D, et al. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer [J]. Nature, 2011, 476(7360):346-350.
- [29] WANG J, Alexander P, WU L, et al. Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine catabolism [J]. Science, 2009, 325(5939):435-439.
- [30] CHEN C Y, Hsu Y L, CHEN Y Y, et al. Isokotomolide A, a new butanolide extracted from the leaves of *Cinnamomum kotoense*, arrests cell cycle progression and induces apoptosis through the induction of p53/p21 and the initiation of mitochondrial system in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 574(2/3):94-102.
- [31] Feun L, YOU M, WU C J, et al. Arginine deprivation as a targeted therapy for cancer [J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(11):1049-1057.
- [32] Phang J M, Pandhare J, LIU Y. The metabolism of proline as microenvironmental stress substrate [J]. J Nutr, 2008, 138(10):2008S-2015S.
- [33] Watford M. Glutamine metabolism and function in relation to proline synthesis and the safety of glutamine and proline supplementation [J]. J Nutr, 2008, 138(10):2003S-2007S.

[责任编辑 刘德文]