

基于细胞代谢组学探讨胡桃醌抑制 BGC-823 和 HepG 3B 细胞增殖的作用机制

孙 栋, 李海龙[#], 秦治伟, 冯文斌, 仝梓莹, 霍金海*

黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036

摘要: **目的** 基于 LC-MS 代谢组学技术研究胡桃醌抑制胃癌细胞 BGC-823 和肝癌细胞 HepG 3B 增殖的机制。**方法** 采用 MTS 法检测胡桃醌 (6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 BGC-823、HepG 3B 细胞活力的影响, 并计算半数抑制浓度 (IC_{50}) 作为后续给药浓度; 使用胡桃醌处理 BGC-823、HepG 3B 细胞, 提取代谢物, 基于 LC-MS 检测样品, 进行代谢组学分析; 使用 Progenesis Q1 软件进行数据处理, 将得到的数据导入 EZinfo 进行多元统计分析, 利用主成分分析 (PCA) 及正交偏最小二乘-判别分析 (OPLS-DA) 得到变量权重值 (VIP), 选取 VIP > 1 且具有统计学意义的差异代谢物 ($P < 0.05$) 作为潜在的生物标记物。通过人类代谢组数据库 (HMDB)、京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 等代谢物数据库对生物标记物进行鉴定, 利用 MetaboAnalyst 平台进行代谢通路分析。**结果** 胡桃醌对 HepG 3B 细胞的 IC_{50} 为 $14.17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 BGC-823 细胞的 IC_{50} 为 $11.19 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。作用于 HepG 3B 细胞, 筛选出尿苷二磷酸葡萄糖、谷胱甘肽、氧化谷胱甘肽、柠檬酸、L-酪氨酸、L-异亮氨酸、L-苯丙氨酸、泛酸、L-色氨酸、花生四烯酸、棕榈酸共 11 个生物标记物, 涉及谷胱甘肽代谢, 泛酸盐和辅酶 A (CoA) 生物合成, 花生四烯酸代谢, 淀粉和蔗糖代谢, 氨基糖和核苷酸糖代谢, 苯丙氨酸代谢, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成, 酪氨酸代谢, 色氨酸代谢, 柠檬酸循环, 脂肪酸代谢共 11 条代谢通路; 作用于胃癌 BGC-823 细胞, 筛选出泛硫乙胺、肌酸、鞘氨醇、丙酰肉碱、异戊酰肉碱、L-苯丙氨酸、L-异亮氨酸、L-色氨酸 8 个生物标记物, 涉及鞘脂类代谢, 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸生物合成, 苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸生物合成, 苯丙氨酸代谢, 色氨酸代谢, 泛酸与辅酶 A 生物合成, 精氨酸与脯氨酸代谢共 7 条代谢通路。**结论** 胡桃醌可抑制 BGC-823、HepG 3B 细胞活力, 其机制与影响多种能量及氨基酸代谢通路相关。

关键词: 胡桃醌; 肿瘤; 代谢组学; 泛酸盐和辅酶 A 生物合成; 苯丙氨酸代谢; 色氨酸代谢; 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸生物合成

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 6376(2025)06-1438-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.06.006

Mechanism of juglone inhibiting BGC-823 and HepG 3B cell proliferation based on cell metabolomics

SUN Dong, LI Hailong, QIN Zhiwei, FENG Wenbin, TONG Ziyang, HUO Jinhai

Heilongjiang Academy of Chinese Medical Sciences, Harbin 150036, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of inhibition of proliferation of gastric cancer cell line BGC-823 and hepatocellular carcinoma cell line HepG 3B by juglone based on LC-MS metabolomics. **Methods** The MTS method was used to detect the effects of juglone (6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the viability of BGC-823 and HepG 3B cells and calculate the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) as the subsequent drug administration concentration. BGC-823 and HepG 3B cells were treated with juglone, and the metabolites were extracted. The samples were detected by LC-MS and subjected to metabolomics analysis. Data processing was performed using Progenesis Q1 software, and the obtained data were imported into EZinfo for multivariate statistical analysis. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares analysis (OPLS-DA) were used to obtain variable importance in projection (VIP) values. Metabolites with VIP > 1 and statistical significance ($P < 0.05$) were

收稿日期: 2024-12-29

基金项目: 黑龙江省中医药学会青年人才托举工程项目 (2022-QNRC1-14)

作者简介: 孙 栋, 男, 硕士研究生, 主要从事中药分析研究。E-mail: sundong9610@163.com

[#]共同第一作者: 李海龙, 男, 硕士研究生, 主要从事中药分析及新药研发。E-mail: 672566098@qq.com

*通信作者: 霍金海, 男, 博士研究生, 主要从事中药分析研究。E-mail: jinhaihuo@126.com

selected as potential biomarkers. The biomarkers were identified using metabolite databases such as HMDB and KEGG, and metabolic pathway analysis was conducted using the MetaboAnalyst platform. **Results** The IC_{50} of juglone for HepG 3B cells was $14.17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and for BGC-823 cells, it was $11.19 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. When acting on HepG 3B cells, 11 biomarkers were screened out, including uridine diphosphate glucose, glutathione, oxidized glutathione, citric acid, *L*-tyrosine, *L*-isoleucine, *L*-phenylalanine, pantothenic acid, *L*-tryptophan, arachidonic acid, and palmitic acid, involving 11 metabolic pathways such as glutathione metabolism, pantothenate and CoA biosynthesis, arachidonic acid metabolism, starch and sucrose metabolism, amino sugar and nucleotide sugar metabolism, phenylalanine metabolism, valine, leucine and isoleucine biosynthesis, tyrosine metabolism, tryptophan metabolism, citric acid cycle, and fatty acid metabolism. When acting on gastric cancer BGC-823 cells, eight biomarkers were screened out, including pantethine, creatine, sphingosine, propionylcarnitine, isovalerylcarnitine, *L*-phenylalanine, *L*-isoleucine, and *L*-tryptophan, involving seven metabolic pathways such as sphingolipid metabolism, valine, leucine and isoleucine biosynthesis, phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, phenylalanine metabolism, tryptophan metabolism, pantothenate and CoA biosynthesis, and arginine and proline metabolism. **Conclusion** Juglone can inhibit the viability of BGC-823 and HepG 3B cells, and its mechanism is related to the influence on multiple energy and amino acid metabolic pathways.

Key words: juglone; anti-tumor; metabolomics; pantothenate and coenzyme A biosynthesis; phenylalanine metabolism; tryptophan metabolism; biosynthesis of valine, leucine and isoleucine

胡桃醌是一种天然萜醌，存在于核桃树的根、叶、坚果壳、树皮和木材中，具有抗肿瘤活性，通过诱导细胞周期停滞^[1]、诱导细胞凋亡^[2]和免疫调节^[3]来发挥抗癌作用，也可以抑制癌细胞中的干性特征和上皮间充质转化，抑制肿瘤转移^[4]。肽基脯氨酰顺反异构酶 (Pin1) 在许多肿瘤组织中过度表达，参与多种癌症信号通路，其过表达破坏 DNA 合成和中心体复制的平衡，导致癌症发生。因此，抑制 Pin1 可以有效抑制这些致癌途径^[5]，胡桃醌作为其抑制剂^[6-7]，有广阔的应用前景。

相对于正常细胞，在许多类型的癌细胞中普遍观察到一些明显改变的代谢特征，包括日益增长的能量代谢和生物合成需求、癌细胞增殖和生存所需的氧化应激等，重新编程的代谢被认为是癌症的标志^[8]。在临床上，根据肿瘤代谢的特性所研发的诊断和治疗手段也得到广泛使用。在肿瘤影像诊断中经常使用 ^{18}F -氟代脱氧葡萄糖 PET/CT (^{18}F -FDG PET/CT)，其原理是检测肿瘤摄取葡萄糖的能力增强^[9]；许多靶向核苷酸代谢抗癌药获批在临床中使用，如甲氨蝶呤靶向二氢叶酸还原酶 (DHFR)、培美曲塞靶向胸苷酸合成酶 (TYMS) 和 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核糖核苷酸 (AICAR) 转化酶；二甲双胍通过抑制线粒体复合物 I 和调节肿瘤免疫而继续被用作癌症预防剂和治疗剂^[10]。细胞代谢组学可对生物样品中的小分子进行全面、系统地分析，可以灵敏捕捉到机体代谢的细微变化，是药物靶标的有力工具。本实验以胡桃醌为研究对象，进行 BGC-823 和 HepG 3B 细胞给药前后的代谢组学研究，在

药效评价的基础之上确定胡桃醌的药效生物标志物并进行代谢通路分析。

1 材料

1.1 细胞株

人胃癌细胞株 BGC-823、人肝癌细胞株 HepG 3B，购自上海富衡生物科技有限公司（复旦大学细胞库）。

1.2 药品与主要试剂

胡桃醌（质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 10187475，北京中西科仪科技有限责任公司）；DMEM 高糖培养基、RPMI 1640 培养基血清、0.25%胰蛋白酶溶液（HyClone 公司）；细胞冻存液、青链霉素混合液（ $100\times$ ）（Solarbio 公司）；磷酸盐缓冲液（PBS，Biotopped 公司）；甲醇、乙腈（色谱级，Merck 公司）；蒸馏水（广州屈臣氏食品饮料有限公司）。

1.3 主要仪器

AB SCIEX ExionLC TM UPLC 超高效液相色谱系统、AB SCIEX Triple TOF 5600⁺型质谱系统、数据采集软件 Analyst TF 1.7.1 software（AB SCIEX 公司）；数据处理软件系统：Progenesis QI 2.0 software（美国 Waters 公司）；Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱（ $100\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$ ， $1.7\text{ }\mu\text{m}$ ）；LDZX-75KB 型立式蒸汽灭菌锅（上海申安医疗器械厂）；DL-CJ-1N 型超净工作台（北京东联哈尔仪器制造有限公司）；DH5000 型电热恒温培养箱（上海一恒仪器有限公司）；BX4-1 型生物显微镜（OLYMPUS 公司）；全能台式高速低温离心机（美国 Biofuge Stratos 公司）；BP211D 型分析天平（德国 Sartorius

公司); Milli-Q 型超纯水仪(美国 Mmillingore 公司); DFD-700 型水浴锅(天津泰斯特有限公司); DW-86L959 型超低温冰箱(青岛海尔特种电器有限公司); CM-12J 型氮吹仪(北京成萌伟业科技有限公司); IKA MS3 digital 型涡旋振荡器(广州仪科实验室技术有限公司); Medel450 型酶标仪(瑞典 Bio-Rod 公司)。

2 方法

2.1 药物配制

胡桃醌母液: 取 3.48 mg 胡桃醌加入 200 μL 二甲基亚砜(DMSO)中配成 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 100 μL 分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

胡桃醌工作液: 取 100 μL 母液加入 9.9 mL RPMI 1640 培养基, 即得 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 工作液, 1 mL 分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞复苏 BGC-823、HepG 3B 细胞用完全培养基(RPMI 1640 培养基+10%胎牛血清+1%青霉素/链霉素)培养; 从液氮罐中取出细胞冻存管, 迅速放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中快速解冻。在超净工作台, 转移至 15 mL 无菌离心管中, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min; 弃去上清液, 加入完全培养基重悬细胞后, 将培养基转移至 T75 细胞培养瓶中, 加入适量完全培养基至 8 mL, 放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱培养, 次日更换 1 次培养基, 继续培养。

2.2.2 细胞传代 显微镜下观察细胞生长至 80% 左右时, 用移液枪吸出原瓶内的培养基弃去。重新向瓶内加入 5 mL 0.25%胰蛋白酶, 轻轻晃动 10 s 使消化液浸润所有细胞表面, 消化 2.5 min。弃去胰酶, 加入完全培养基终止消化, 将消化后的细胞吹打均匀, 按 1:3 比例传代。

2.2.3 MTS 法检测细胞活力 取对数生长期 BGC-823、HepG 3B 细胞, 用胰酶消化后, 制备成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 5×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 接种于 96 孔板内, 每孔 100 μL , 放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中过夜。次日, 取出 96 孔板, 弃去孔内液体, 加入不同质量浓度的胡桃醌(6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 每孔 100 μL , 作用 24 h 后, 小心吸出孔内药液, 每孔加入 100 μL 完全培养基、20 μL MTS 染色液, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件恒温培养箱中。作用 4 h 后, 酶标仪 490 nm 处测定各孔吸光度(A)值, 计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{胡桃醌}}) / A_{\text{对照}}$$

2.3 细胞代谢物提取

将细胞培养在 T 75 细胞培养瓶中, 当细胞长至 70%时, 弃去瓶内培养基。PBS 洗 1 次后, BGC-823、HepG 3B 细胞分别加入 11.19、14.17 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 胡桃醌(完全培养基配制), 作用 48 h 后, 吸弃瓶内药液, 冷 PBS 轻轻洗 1 次。加入 3 mL 预冷的 80%甲醇水(甲醇水比例 4:1)对细胞进行淬灭提取, 用细胞刮将细胞刮下, 转移至 5 mL 冻存管中。向培养瓶中再加入 1 mL 淬灭溶液洗掉残留的细胞, 转移至冻存管中, 总体积为 4 mL, 液氮-室温反复冻融 3 次后, 充分提取细胞内容物, 储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。将冻存管取出, 反复涡旋震荡后, 每个样本取出 1.5 mL 至离心管中, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清, 用氮气吹干, 残渣加入 80% 甲醇 70 μL 复溶, 涡旋, 高速离心, 进行 LC-MS 分析。

2.4 分析条件

2.4.1 质谱条件 采用电喷雾离子源, 正、负离子 2 种模式采集数据, 对 IDA 值超过 100 cps 的 8 个最高峰进行二级质谱扫描, 扣除动态背景(DBS)。质谱参数见表 1。

表 1 质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameter

参数	ESI ⁺	ESI ⁻
喷雾电压 (ISVF)	5 500 V	-4 500 V
离子源温度 (TEM)	350 $^{\circ}\text{C}$	350 $^{\circ}\text{C}$
去簇电压 (DP)	80 V	-80 V
碰撞电压 (CE)	35 eV	-35 eV
碰撞能量扩展 (CES)	15 eV	-15 eV
雾化气 (Gas1)	379.21 kPa	379.21 kPa
辅助气 (Gas2)	379.21 kPa	379.21 kPa
气帘气 (CUR)	241.32 kPa	241.32 kPa
TOF MS 离子扫描范围 m/z	80~1 200	80~1 200
产物离子扫描范围 m/z	50~1 200	50~1 200

2.4.2 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm), AQUITY UPLC BEH C_{18} VanGuard Pre-Column 预柱(5 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm), 柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μL , 流动相: 0.1%甲酸水(A)-0.1%甲酸乙腈(B), 体积流量 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 流动相洗脱梯度见表 2、3。

2.5 数据分析

2.5.1 代谢轮廓分析 将采集的细胞内代谢物样本代谢轮廓数据分别导入 Progenesis QI 软件进行峰

表 2 流动相洗脱梯度 (BGC-823 细胞)

Table 2 Mobile phase elution gradient (BGC-823 cells)

t/min	A/%	B/%
0	90	10
2.0	60	40
4.0	57	43
5.0	23	77
14.0	5	95
14.1	95	5
15.0	95	5

表 3 流动相洗脱梯度 (HepG 3B 细胞)

Table 3 Mobile phase elution gradient (HepG 3B cells)

t/min	A/%	B/%
0	95	5
2.0	60	40
5.0	33	67
13.0	0	100
13.1	95	5
15.0	95	5

匹配、峰提取、数据降维等一系列数据处理过程, 再进一步利用 EZinfo 软件模块对各组数据进行模式识别分析-主成分分析 (PCA), 绘制对照组与胡桃醌组代谢轮廓 PCA 得分图。

2.5.2 生物标记物的查找与鉴定 在确认胡桃醌组与对照组得分图显示 2 组完全分离后, 对胡桃醌组与对照组的代谢数据矩阵进行模式识别分析-正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA), 选取变量重要性投影 (VIP) 值大于 1 且具有显著性差异 ($P < 0.05$) 的原则进行筛选, 获得相应生物标记物。这些标记物进行代谢库的匹配, 对软件所

给出的可能结构进行标记, 同时导出含有相对峰强度的鉴定结果列表, 进行二次鉴定, 主要是通过人类代谢组数据库 (HMDB) (<http://www.hmdb.ca/>)、京都基因和基因组百科全书 (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>) 和 Massbank (<http://www.massbank.jp/>) 等检索数据库, 并结合 MS/MS 数据进行验证, 最终通过色谱保留行为以及 MS/MS 数据来确定标记物的化学结构。

2.5.3 生物标记物的代谢通路分析 将已鉴定的生物标记物的英文名称、KEGG 或 HMDB 号导入代谢通路分析网站 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 进行分析后, 以 impact 大于 0 的标准筛选关注代谢途径, 并绘制相应代谢通路示意图。

2.5.4 核心标记物的生物信息分析与阐述 首先, 对所得到的生物标记物及代谢通路进行归纳、分类。然后以生物标记物名称、疾病名称、靶点名称等与胃癌相关的关键词进行文献搜寻, 综合分析其生物学信息, 最终阐述这些标记物在癌症发生与发展过程的作用。

3 结果

3.1 胡桃醌对肿瘤细胞增殖的影响

随着药物质量浓度的增加, 胡桃醌对细胞增殖的抑制作用呈现逐渐增强的趋势, 胡桃醌对胃癌细胞 BGC-823 半数抑制浓度 (IC_{50}) 值为 $11.19 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 HepG 3B 细胞的 IC_{50} 为 $14.17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 确定该质量浓度为细胞代谢组学的给药浓度, 结果见图 1。

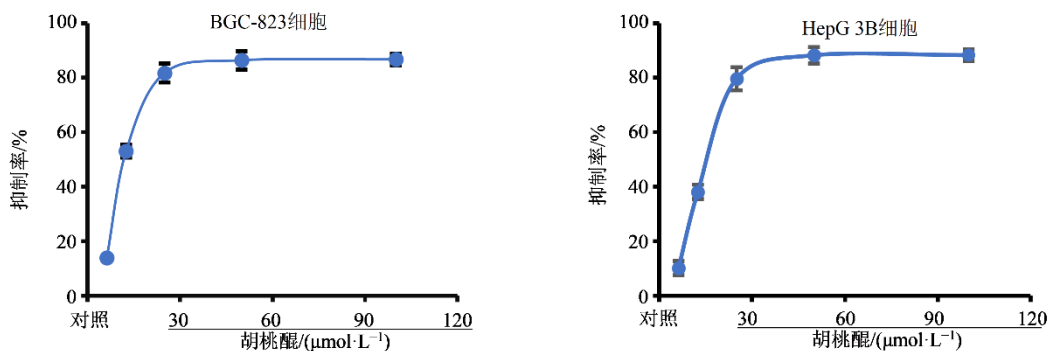


图 1 胡桃醌对 BGC-823、HepG 3B 细胞的增殖抑制率

Fig. 1 Inhibition rate of juglone on proliferation of BGC-823 and HepG 3B tumor cells

3.2 代谢组学结果

3.2.1 PCA BGC-823 和 HepG 3B 细胞正、负离子模式下的总离子流色谱图见图 2、3。利用

UPLC-Q-TOF/MS 质谱分析得到对照组与胡桃醌组的胞内代谢物的三维代谢轮廓数据信息, 从非监督模式下的 PCA 观察到其聚类分组情

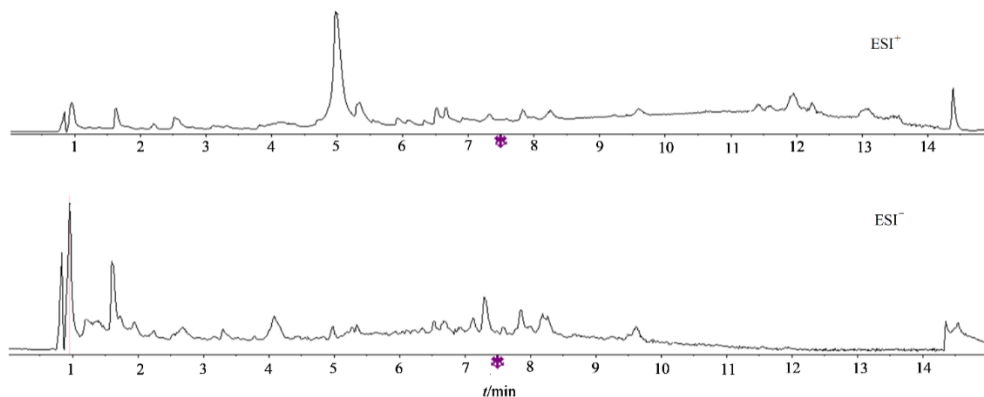


图 2 正、负离子模式下的总离子流色谱图 (BGC-823 细胞)

Fig. 2 Total ion chromatograms in positive and negative ion modes (BGC-823 cell)

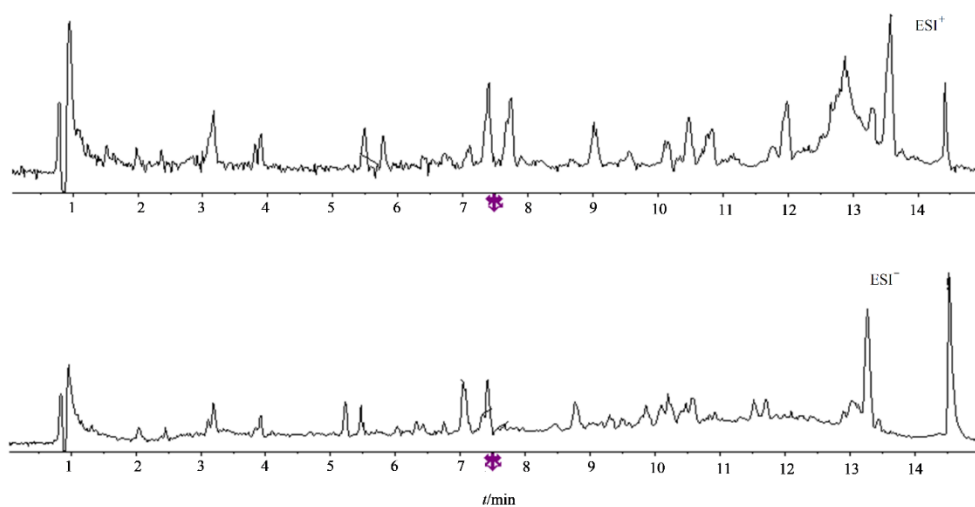


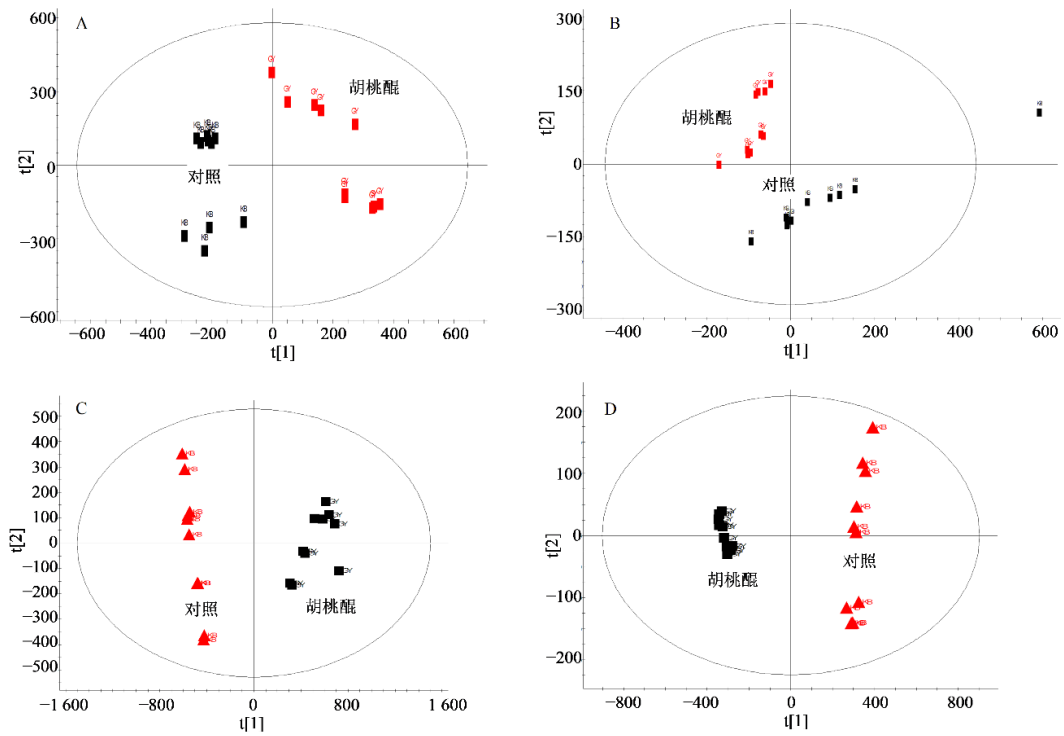
图 3 正、负离子模式下的总离子流色谱图 (HepG 3B 细胞)

Fig. 3 Total ion chromatograms in positive and negative ion modes (HepG 3B cells)

况,并考察胡桃醌干预对胞内代谢物的影响,结果见图 4。从图中可以看出,对照组与胡桃醌组能完全分离,表明对照组与胡桃醌组区分良好。**3.2.2 OPLS-DA** 将 UPLC-Q-TOF/MS 数据导入 Progenesis QI 软件,采用 OPLS-DA 模型进行多维统计分析,筛选 $VIP > 1$,具有统计学意义的离子 ($P < 0.05$) 作为潜在的生物标记物。图 5、6 为对照组与胡桃醌组的 OPLS-DA 得分图和 S-Plot 图。在 OPLS-DA 得分图中可以看到对照组和胡桃醌组分离度良好。在得到的 S-Plot 图中,离中心点越远的点对引起分组差异的贡献率越大,结合能够反映贡献率的 VIP 值进行分析,选取 $VIP > 1$,并且使两组的差异具有统计学意义的离子 ($P < 0.05$) 作为潜在的生物标记物,即在 S-Plot 图中被选中的有红色标记的离子。通过 HMDB 数据库搜索差异物的精确质荷比,鉴定潜在生物标记物,作用于胃癌

BGC-823 细胞,筛选出泛硫乙胺、肌酸、鞘氨醇、丙酰肉碱、异戊酰肉碱、L-苯丙氨酸、L-异亮氨酸、L-色氨酸 8 个生物标记物;作用于 HepG 3B 细胞,筛选出尿苷二磷酸葡萄糖、谷胱甘肽、氧化谷胱甘肽、柠檬酸、L-酪氨酸、L-异亮氨酸、L-苯丙氨酸、泛酸、L-色氨酸、花生四烯酸、棕榈酸共 11 个生物标记物。与对照组比较,胡桃醌组鞘氨醇水平显著升高 ($P < 0.01$),其他指标显著下降 ($P < 0.01$ 、 0.001)。结果见表 4、5,图 7。

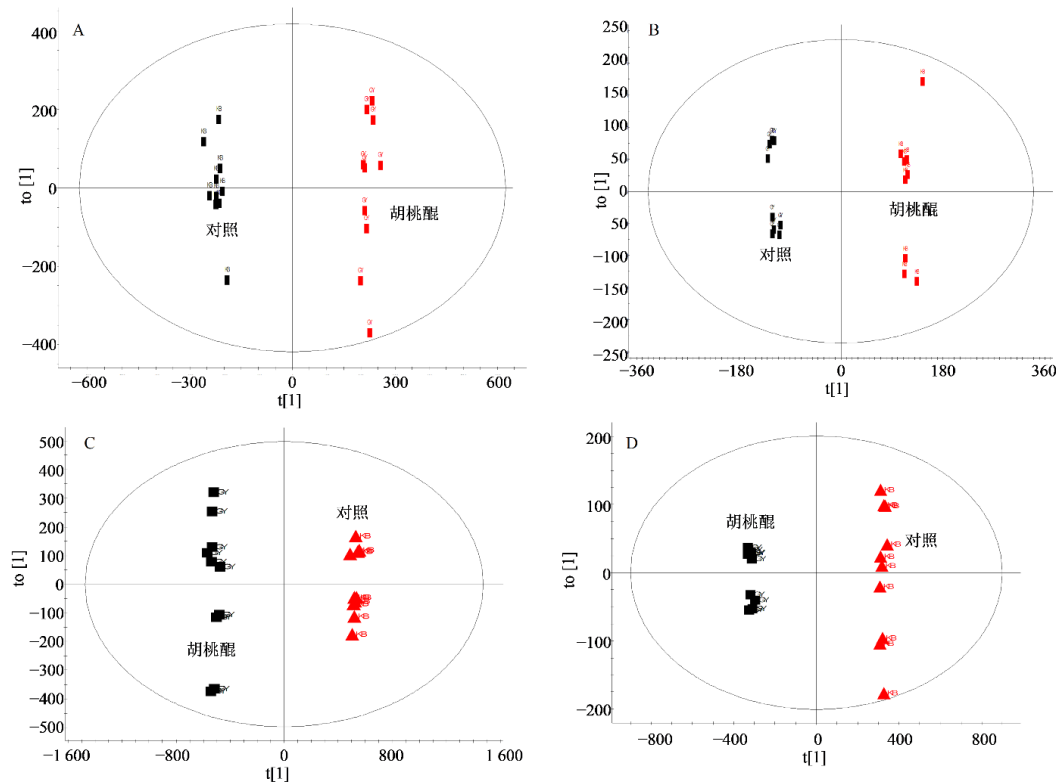
3.2.3 代谢通路分析 肿瘤的本质是失制的细胞增殖,与正常细胞相比,肿瘤细胞会发生代谢重编程,即有氧糖酵解^[11],可以提供用于合成的生物大分子,促进细胞增殖所需的核苷酸、脂质和氨基酸的从头合成^[12-14]。研究表明,三羧酸 (TCA) 循环也是支持癌症小鼠模型和癌症患者肿瘤生长的关键合成代谢枢纽^[15-16]。将得到的标记物的英文名



A-正离子模式 (BGC-823); B-负离子模式 (BGC-823); C-正离子模式 (HepG 3B); D-负离子模式 (HepG 3B)。
A-positive ion mode (BGC-823); B-negative ion mode (BGC-823); C-positive ion mode (HepG 3B); D-negative ion mode (HepG 3B)。

图 4 对照组与胡桃醌组样本 PCA Scores plot 得分图

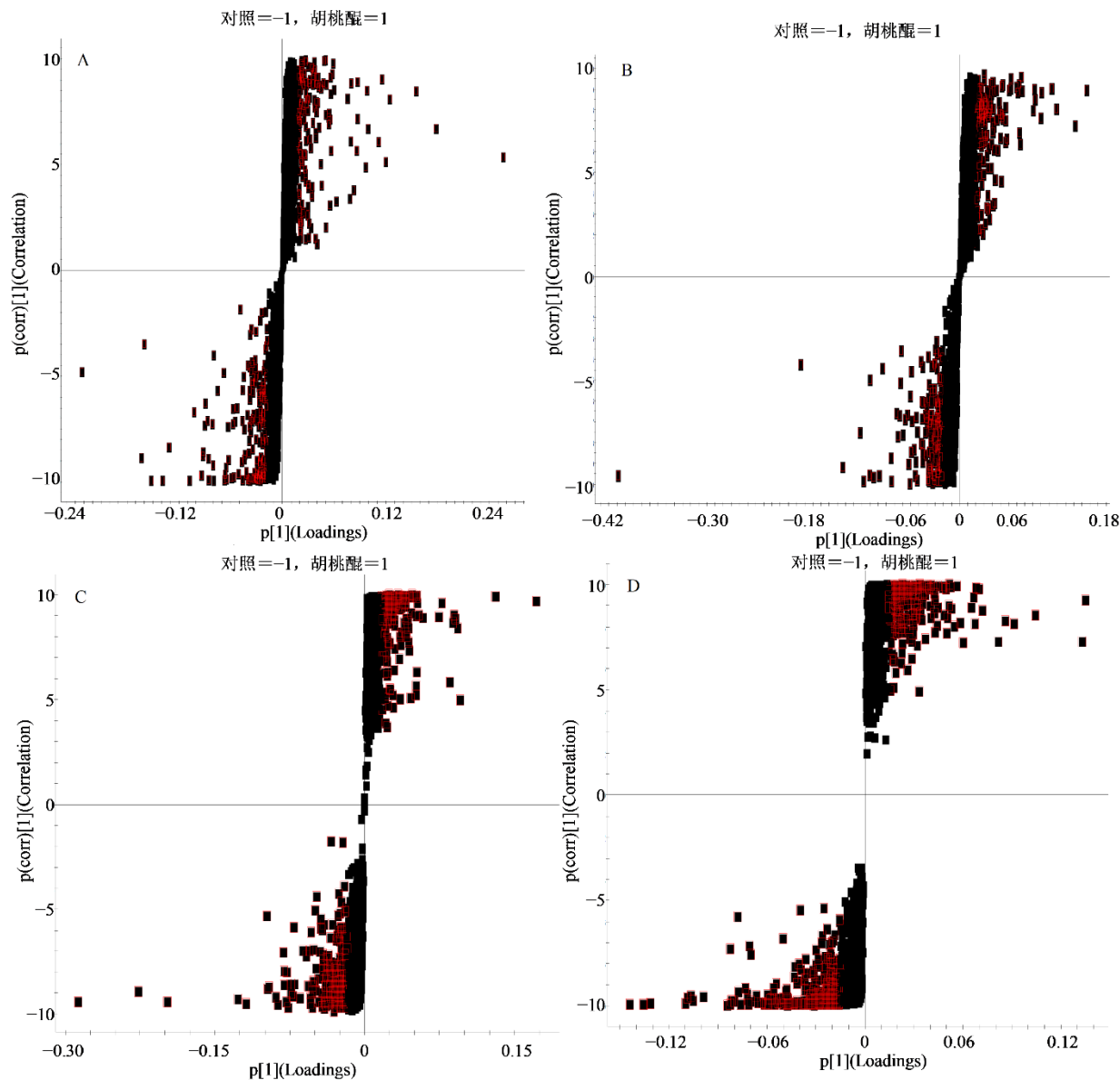
Fig. 4 PCA scores plot of samples in control group and juglone group



A-正离子模式 (BGC-823); B-负离子模式 (BGC-823); C-正离子模式 (HepG 3B); D-负离子模式 (HepG 3B)。
A-positive ion mode (BGC-823); B-negative ion mode (BGC-823); C-positive ion mode (HepG 3B); D-negative ion mode (HepG 3B)。

图 5 对照组与胡桃醌组代谢轨迹样本 OPLS-DA 得分

Fig. 5 OPLS-DA score of intracellular metabolism samples of control group and juglone group



A-正离子模式 (BGC-823); B-负离子模式 (BGC-823); C-正离子模式 (HepG 3B); D-负离子模式 (HepG 3B).
A-positive ion mode (BGC-823); B-negative ion mode (BGC-823); C-positive ion mode (HepG 3B); D-negative ion mode (HepG 3B).

图 6 对照组与胡桃醌组样本 S-Plot 图

Fig. 6 S-Plot picture of intracellular metabolism samples of control group and juglone group

表 4 对照组与胡桃醌组 BGC-823 胞内差异代谢标记物

Table 4 Differential metabolic markers of BGC-823 in blank group and juglone group

编号	t/min	m/z	离子模式	分子式	代谢物名称	变化趋势
1	1.01	132.075 5	[M+H] ⁺	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	creatine (肌酸)	↓
2	1.90	132.101 3	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₃ NO ₂	L-isoleucine (L-异亮氨酸)	↓
3	1.96	218.138 2	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	propionylcarnitine (丙基肉碱)	↓
4	2.10	166.085 8	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₁ NO ₂	L-phenylalanine (L-苯丙氨酸)	↓
5	2.37	205.096 1	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	L-tryptophan (L-色氨酸)	↓
6	2.55	246.169 6	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄	isovalerylcarnitine (异戊酰基肉碱)	↓
7	6.17	302.305 2	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	sphinganine (鞘胺醇)	↑
8	6.78	277.125 6	[M-H] ⁻	C ₁₁ H ₂₂ N ₂ O ₄ S	pantetheine (泛硫乙胺)	↓

表 4 对照组与胡桃醌组 HepG 3B 胞内差异代谢标记物

Table 4 Differential metabolic markers of HepG 3B in control group and juglone group

编号	t/min	m/z	离子模式	分子式	代谢物名称	变化趋势
1	1.20	565.049 0	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₁₇ P ₂	uridine diphosphate glucose (尿苷二磷酸葡萄糖)	↓
2	1.51	308.091 0	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	glutathione (谷胱甘肽)	↓
3	1.51	613.158 9	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	oxidized glutathione (氧化谷胱甘肽)	↓
4	1.51	191.019 7	[M-H] ⁻	C ₆ H ₈ O ₇	citric acid (柠檬酸)	↓
5	1.55	182.080 3	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₁ NO ₃	L-tyrosine (L-酪氨酸)	↓
6	1.71	132.101 2	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₃ NO ₂	L-isoleucine (L-异亮氨酸)	↓
7	1.99	166.085 5	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₁ NO ₂	L-phenylalanine (L-苯丙氨酸)	↓
8	2.07	220.117 3	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₇ NO ₅	pantothenic acid (泛酸)	↓
9	2.35	205.096 2	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	L-tryptophan (L-色氨酸)	↓
10	10.45	305.247 5	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	arachidonic acid (花生四烯酸)	↓
11	11.72	255.232 9	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	palmitic acid (棕榈酸)	↓

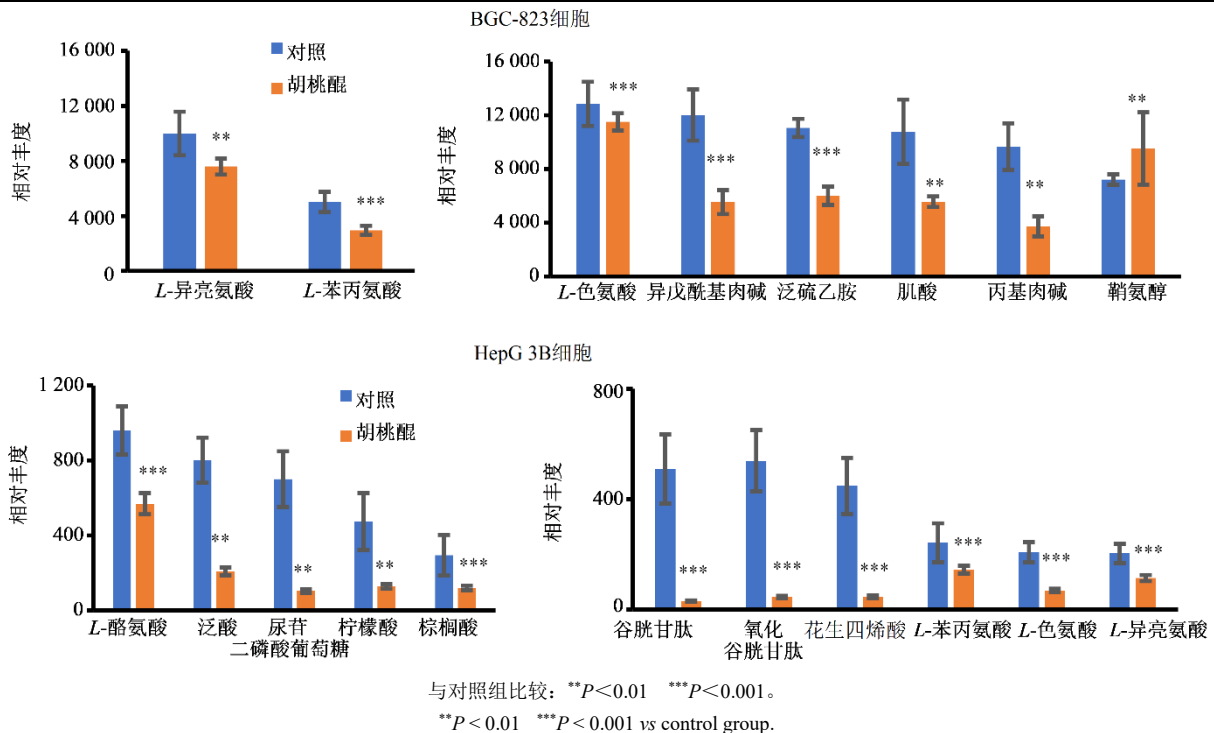


图 7 对照组与胡桃醌组细胞内生物标记物的含量变化趋势

Fig. 7 Changing trends of intracellular biomarker contents in control group and juglone group

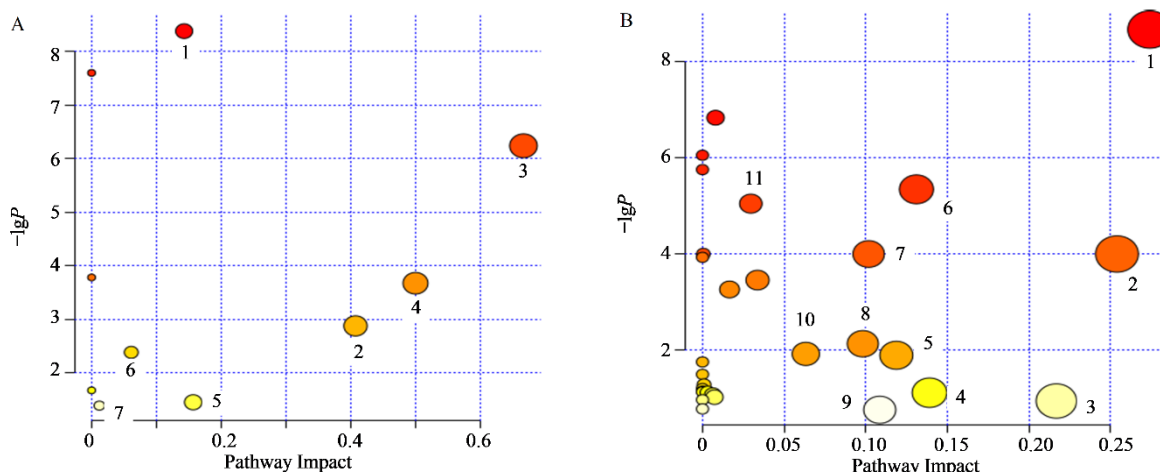
称、KEGG 或 HMDB 编号导入 MetaboAnalyst 5.0 分析代谢通路, 结果表明胡桃醌影响 TCA 循环, 减弱胃癌细胞 BCG-823 和肝癌细胞 HepG 3B 脂代谢和氨基酸合成干扰整个胃癌细胞的代谢, 抑制细胞增殖, 起到抗癌作用, 其中泛酸盐和辅酶 A (CoA) 生物合成, 苯丙氨酸代谢, 色氨酸代谢, 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸生物合成是胡桃醌抑制 2 种细胞的共有代谢通路。结果见图 8、表 6、7。

4 讨论

本研究采用 MTS 法检测不同质量浓度胡桃醌

对胃癌 BGC-823 细胞和肝癌细胞株 HepG 3B 活性的影响并结合 LC-MS 及化学计量学对差异代谢物进行分析, 富集得到相关代谢通路。结果表明胡桃醌可以减弱细胞的能量代谢与生物合成, 抑制细胞增殖, 其中泛酸盐和 CoA 生物合成, 苯丙氨酸的代谢, 色氨酸代谢, 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸生物合成是胡桃醌抑制 2 种细胞的共有代谢通路。

在泛酸盐和 CoA 生物合成通路中主要的标记物为泛酸, 泛酸又称作维生素 B5, 是 CoA 的前体物质, 它的活性形式是 CoA^[17]。CoA 是体内 70 多



A-胡桃醌抑制 BGC-823 细胞代谢的路径分析 (1-鞘脂类代谢; 2-缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸生物合成; 3-苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸生物合成; 4-苯丙氨酸的代谢; 5-色氨酸代谢; 6-泛酸与辅酶 A 生物合成; 7-精氨酸与脯氨酸代谢); B-胡桃醌抑制 HepG 3B 细胞代谢的路径分析 (1-谷胱甘肽代谢; 2-泛酸盐和 CoA 生物合成; 3-花生四烯酸代谢; 4-淀粉和蔗糖代谢; 5-氨基糖和核苷酸糖代谢; 6-苯丙氨酸代谢; 7-缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成; 8-酪氨酸代谢; 9-色氨酸代谢; 10-柠檬酸循环; 11-脂肪酸代谢)。

A-pathway analysis of juglone inhibiting metabolism of BGC-823 cells (1-sphingolipid metabolism; 2-valine, leucine and isoleucine biosynthesis; 3-phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; 4-phenylalanine metabolism; 5-tryptophan metabolism; 6-pantothenate and CoA biosynthesis; 7-arginine and proline metabolism); B-pathway analysis of juglone inhibiting metabolism of HepG 3B cells (1-glutathione metabolism; 2-pantothenate and CoA biosynthesis; 3-arachidonic acid metabolism; 4-starch and sucrose metabolism; 5-amino sugar and nucleotide sugar metabolism; 6-phenylalanine metabolism; 7-valine, leucine and isoleucine biosynthesis; 8-tyrosine metabolism; 9-tryptophan metabolism; 10-citric acid cycle; 11-fatty acid metabolism).

图 8 胡桃醌抑制癌症代谢的路径分析

Fig. 8 Pathway analysis of juglone inhibiting cancer metabolism

表 6 胡桃醌抑制细胞 BGC-823 增殖的代谢通路分析

Table 6 Metabolic pathway analysis of juglone's inhibition on proliferation of BGC-823 cells

编号	代谢通路	P 值	-lgP	Holm P	假发现率 (FDR)	impact
1	鞘脂类代谢	$2.299\ 9 \times 10^{-4}$	8.377 5	0.018 63	0.018 63	0.142 86
2	缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸生物合成	0.001 96	6.236 7	0.154 55	0.052 82	0.666 66
3	苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸生物合成	0.025 46	3.670 7	1.000 00	0.412 43	0.500 00
4	苯丙氨酸代谢	0.056 47	2.874 0	1.000 00	0.762 35	0.407 41
5	色氨酸代谢	0.235 01	1.448 1	1.000 00	1.000 00	0.156 84
6	泛酸盐与辅酶 A(CoA)生物合成	0.092 52	2.380 3	1.000 00	1.000 00	0.061 22
7	精氨酸与脯氨酸代谢	0.250 10	1.385 9	1.000 00	1.000 00	0.011 98

表 7 胡桃醌抑制细胞 HepG 3B 增殖的代谢通路分析

Table 7 Metabolic pathway analysis of juglone's inhibition on proliferation of HepG 3B cells

编号	代谢通路	P 值	-lgP	Holm P	FDR	impact
1	谷胱甘肽代谢	$1.729\ 1 \times 10^{-4}$	8.663	0.014	0.014	0.27
2	泛酸盐和 CoA 生物合成	0.018	3.994	1.000	0.158	0.25
3	花生四烯酸代谢	0.392	0.936	1.000	1.000	0.22
4	淀粉和蔗糖代谢	0.330	1.109	1.000	1.000	0.14
5	氨基糖和核苷酸糖代谢	0.151	1.888	1.000	0.807	0.12
6	苯丙氨酸代谢	0.005	5.339	0.365	0.077	0.13
7	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成	0.018	3.994	1.000	0.158	0.10
8	酪氨酸代谢	0.119	2.127	1.000	0.733	0.10
9	色氨酸代谢	0.471	0.753	1.000	1.000	0.11
10	柠檬酸循环	0.147	1.916	1.000	0.807	0.06
11	脂肪酸代谢	0.006	5.041	0.485	0.086	0.03

种酶反应通路的辅助因子, CoA 参与激发柠檬酸循环过程, 为细胞的增殖提供能量、活性物质; 参与激活脂肪酸代谢, 传递酰基作用等功能^[18]; 作为底物或变构调节剂, 组蛋白和其他蛋白质与酰基 CoA 的翻译后修饰调控着蛋白质的合成^[19]。在癌症中, 被激活的蛋白丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt) 通过调节 2 种泛酸激酶 (PANK) 蛋白的活性来控制 CoA 分子的产生^[20]。PANK2 催化泛酸分子转化为 4-磷酸腺嘌呤, 再通过 COASY 酶转化为 CoA; 同时, Akt 介导的磷酸化抑制 PANK4。活性 PANK4 将 4-磷酸腺嘌呤转化为泛氨酸, 从而阻止 CoA 合成。此外, Akt 激活 ATP-柠檬酸裂解酶^[21], CoA 被用于将柠檬酸盐转化为乙酰 CoA, 乙酰 CoA 是代谢, 基因表达和蛋白质功能的中枢中间体。胡桃醌作用于肿瘤细胞后, 胞内 CoA 合成减少, 从而可能降低肿瘤细胞内脂肪酸的代谢, 干扰柠檬酸循环, 生物合成减弱, 从而影响肿瘤细胞的增殖、分裂, 抑制肿瘤细胞增殖。

苯丙氨酸、色氨酸是生酮氨基酸, 可产生乙酰辅酶 A。其中, 苯丙氨酸由苯丙氨酸-4-单加氧酶催化生成酪氨酸, 后者先转氨生成 4-羟苯丙酮酸, 再氧化、脱羧、开环, 裂解成延胡索酸和乙酰乙酸。延胡索酸进入 TCA 循环, 乙酰乙酸由琥珀酰辅酶 A 活化生成乙酰辅酶 A, 疏解形成 2 个乙酰辅酶 A。色氨酸经过氧化, 脱去甲醛、丙氨酸, 最后形成 α -酮己二酸, 生成乙酰辅酶 A。其中, 犬尿氨酸是一种肿瘤相关代谢物, 由色氨酸 2, 3-双加氧酶 (TDO) 和吲哚胺 2, 3-双加氧酶 (IDO) 从色氨酸分解代谢^[22], 在多种肿瘤中观察到犬尿氨酸与色氨酸比值增加^[23]。研究表明, 色氨酸代谢可以在癌症中发挥重要作用, 通过抑制抗肿瘤免疫反应和增加癌细胞的恶性来促进肿瘤进展^[24]。

缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸属于支链氨基酸 (BCAA), 细胞内的 BCAA 在支链氨基酸转氨酶 (BCAT) 的作用下生成支链 α -酮酸 (BCKA), 包括 α -酮异己酸 (KIC)、 α -酮- β -甲基戊酸 (KMV) 和 α -酮异戊酸 (KIV), 与此同时 BCAA 的氨基转移给 α -酮戊二酸 (α -KG), 生成谷氨酸。 α -KG 是 TCA 循环中的关键中间物, 也是参与低氧应答、代谢以及表观遗传的 α -KG 依赖性双加氧酶的重要底物。谷氨酸可以影响正在增殖的肿瘤细胞的代谢, 包括蛋白合成, 以及核苷酸和其他非必需氨基酸的合成^[25]。BCAA 作为氮供体产生核苷酸等大分子

与癌症进展有关, BCAA 代谢途径中的关键蛋白质可作为人类癌症的可能预后和诊断生物标志物。研究表明, Ras-MEK 信号传导的致癌激活可以维持 mTOR 的激活; 然而, 当亮氨酸被剥夺时, Ras-MEK 信号传导的过度激活无法抑制 mTOR, 导致自噬减弱和细胞死亡增强^[26]。

从以上潜在代谢标志物与相关代谢通路的生物学意义可以看出, 尽管肿瘤具有遗传和组织学异质性, 但胡桃醌能够有效抑制生物大分子的合成, 一定程度上逆转肿瘤细胞的代谢重编程过程, 抑制肿瘤细胞增殖。因此, 可以合理推断胡桃醌通过调节代谢关键酶活性, 抑制了能量代谢和生物大分子合成, 抑制肿瘤细胞增殖发挥治疗作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang P, Gao C, Wang W, et al. Juglone induces apoptosis and autophagy via modulation of mitogen-activated protein kinase pathways in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 116(Pt B): 40-50.
- [2] Seetha A, Devaraj H, Sudhandiran G. Effects of combined treatment with Indomethacin and Juglone on AOM/DSS induced colon carcinogenesis in Balb/c mice: Roles of inflammation and apoptosis [J]. *Life Sci*, 2021, 264: 118657.
- [3] Wang H F, Zou C D, Zhao W Y, et al. Juglone eliminates MDSCs accumulation and enhances antitumor immunity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 73: 118-127.
- [4] Zou C D, Yu Y, Wang H F, et al. Juglone inhibits tumor metastasis by regulating stemness characteristics and the epithelial-to-mesenchymal transition in cancer cells both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2023, 28(2): 26.
- [5] Lee T H, Chen C H, Suizu F, et al. Death-associated protein kinase 1 phosphorylates Pin1 and inhibits its prolyl isomerase activity and cellular function [J]. *Mol Cell*, 2011, 42(2): 147-159.
- [6] Hu Y G, Shen Y F, Li Y. Effect of Pin1 inhibitor juglone on proliferation, migration and angiogenic ability of breast cancer cell line MCF7Adr [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol*, 2015, 35(4): 531-534.
- [7] Kanaoka R, Kushiyama A, Seno Y, et al. Pin1 inhibitor juglone exerts anti-oncogenic effects on LNCaP and DU145 cells despite the patterns of gene regulation by Pin1 differing between these cell lines [J]. *PLoS One*,

- 2015, 10(6): e0127467.
- [8] Pavlova N N, Thompson C B. The emerging hallmarks of cancer metabolism [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(1): 27-47.
- [9] Fonti R, Conson M, Del Vecchio S. PET/CT in radiation oncology [J]. *Semin Oncol*, 2019, 46(3): 202-209.
- [10] Coyle C, Cafferty F H, Vale C, et al. Metformin as an adjuvant treatment for cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(12): 2184-2195.
- [11] Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells [J]. *Science*, 1956, 124(3215): 269-270.
- [12] Vander Heiden M G, Cantley L C, Thompson C B. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-1033.
- [13] Vander Heiden M G, DeBerardinis R J. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology [J]. *Cell*, 2017, 168(4): 657-669.
- [14] Ghergurovich J M, Lang J D, Levin M K, et al. Local production of lactate, ribose phosphate, and amino acids within human triple-negative breast cancer [J]. *Med*, 2021, 2(6): 736-754.
- [15] Krall A S, Mullen P J, Surjono F, et al. Asparagine couples mitochondrial respiration to ATF4 activity and tumor growth [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(5): 1013-1026.
- [16] Martínez-Reyes I, Cardona L R, Kong H, et al. Mitochondrial ubiquinol oxidation is necessary for tumour growth [J]. *Nature*, 2020, 585(7824): 288-292.
- [17] Robishaw J D, Neely J R. Coenzyme A metabolism [J]. *Am J Physiol*, 1985, 248: 1-9.
- [18] Zhyvoloup A, Nemazany I, Babich A, et al. Molecular cloning of CoA Synthase. The missing link in CoA biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(25): 22107-22110.
- [19] Pietrocola F, Galluzzi L, Bravo-San Pedro J M, et al. Acetyl coenzyme A: A central metabolite and second messenger [J]. *Cell Metab*, 2015, 21(6): 805-821.
- [20] Dibble C C, Barritt S A, Perry G E, et al. PI3K drives the de novo synthesis of coenzyme A from vitamin B5 [J]. *Nature*, 2022, 608(7921): 192-198.
- [21] Hosios A M, Manning B D. Cancer signaling drives cancer metabolism: AKT and the Warburg effect [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(19): 4896-4898.
- [22] Badawy A A B. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects [J]. *Int J Tryptophan Res*, 2017, 10: 1178646917691938.
- [23] Suzuki Y, Suda T, Furuhashi K, et al. Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2010, 67(3): 361-365.
- [24] Pilotte L, Larrieu P, Stroobant V, et al. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2, 3-dioxygenase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(7): 2497-2502.
- [25] Peng H, Wang Y F, Luo W B. Multifaceted role of branched-chain amino acid metabolism in cancer [J]. *Oncogene*, 2020, 39(44): 6747-6756.
- [26] Sheen J H, Zoncu R, Kim D, et al. Defective regulation of autophagy upon leucine deprivation reveals a targetable liability of human melanoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(5): 613-628.

[责任编辑 兰新新]