

• 药理与临床 •

苦参碱抗肝癌细胞增殖的¹H-NMR代谢组学研究王珂欣^{1,2}, 高丽^{1*}, 周玉枝¹, 秦雪梅^{1*}, 杜冠华³

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

3. 中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所, 北京 100050

摘要:目的 采用¹H-NMR代谢组学方法,研究苦参碱抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的作用。方法 应用 CCK8 法检测苦参碱抑制 SMMC-7721 细胞增殖的作用,并对细胞裂解液及细胞培养上清液进行¹H-NMR检测,结合多元统计分析和代谢通路分析探讨其作用机制。结果 1、2、4 mg/mL 苦参碱能显著抑制 SMMC-7721 细胞的增殖。与对照组相比,苦参碱作用于 SMMC-7721 细胞后,细胞内外共发现 21 种差异代谢物。苦参碱能显著调节细胞内外亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸等差异代谢物的量,对 SMMC-7721 细胞的氨基酸代谢起到一定的调控作用。结论 苦参碱可能通过调控氨基酸代谢、能量代谢等途径发挥抗肝癌作用。本研究从代谢组学角度为阐释苦参碱抗肝癌的作用机制提供了科学依据。

关键词:苦参碱;肝癌;细胞增殖;代谢组学;氨基酸代谢;能量代谢

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)20-4275-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.20.023

¹H-NMR-based metabolomics study on antiproliferative effect of matrine in human hepatoma cells

WANG Ke-xin^{1,2}, GAO Li¹, ZHOU Yu-zhi¹, QIN Xue-mei¹, DU Guan-hua³

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To investigate the proliferation inhibitory effect of matrine in SMMC-7721 cells using ¹H-NMR metabolomics approach. **Methods** CCK8 method was used to detect the proliferation inhibitory effect of matrine in SMMC-7721 cells, and the cell lysates and cell culture supernatants were detected by ¹H-NMR combined with multivariate statistical analysis and metabolic pathway analysis with the aim of exploring its mechanism of action. **Results** Matrine at the concentration of 1, 2, and 4 mg/mL could significantly inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells. Compared with control group, 21 differential metabolites were confirmed inside and outside the cells after treatment of matrine. Matrine could significantly regulate the contents of differential metabolites such as leucine, valine and glycine inside and outside the cells, and regulate the amino acid metabolism of hepatoma cells. **Conclusion** Matrine plays anti-hepatoma effect likely through regulation of amino acid metabolism and energy metabolism. This study provides a scientific basis for elucidation of the anti-hepatoma mechanism of matrine from the perspective of metabolomics.

Key words: matrine; hepatoma; cell proliferation; metabolomics; amino acid metabolism; energy metabolism

肝癌是常见的恶性肿瘤之一,其死亡率在恶性肿瘤中列第3位。目前肝癌的治疗手段主要有外科手术切除、肝动脉/门静脉化疗栓塞术和放射治疗等,但患者5年内生存率低于30%。在肝癌晚期,

收稿日期: 2017-04-11

基金项目: 山西省研究生联合培养基地人才项目(2016JD05); 山西大学引进人才事业发展经费(226545008, 226545003); 山西省科技创新重点团队(201605D131045-18); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室(201605D111004)

作者简介: 王珂欣(1992—),女,黑龙江人,研究生在读,药物化学专业,主要从事中药药理学研究。E-mail: nmgwskx1992@163.com

*通信作者 高丽 Tel: (0351)7018379 E-mail: gaoli87@sxu.edu.cn

秦雪梅 Tel: (0351)7011501 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

只有肝动脉化疗栓塞术(TACE)和药物索拉非尼(sorafenib)能够提高生存率,但较多患者难以忍受治疗对机体的副作用^[1-6]。

近年来,不断有研究表明中药在治疗肝癌方面有巨大潜力^[1]。大量临床和实验研究表明,复方苦参注射液具有良好的抑制肿瘤作用,配合放化疗药应用可提高抗肿瘤疗效^[7-8]。苦参碱是复方苦参注射液的主要有效成分之一^[9],研究表明,苦参碱具有明显的抗肝癌作用,其作用机制可能与诱导肿瘤细胞凋亡有关^[10]。然而,由于苦参碱抗肝癌作用机制复杂,目前尚未完全阐明。

代谢组学是一种用于综合分析生物基质中内源性代谢物变化的系统性方法,而细胞代谢组学研究细胞受到外界扰动后细胞内所有代谢物的综合表现^[11]。应用代谢组学方法研究药物作用于细胞后内源性代谢物的变化,寻求潜在的生物标记物,进而阐释药物作用机制,已逐渐成为药物作用机制研究的常见手段^[12-13]。本实验应用¹H-NMR代谢组学技术结合多元统计方法分析苦参碱对人肝癌SMMC-7721细胞中内源性代谢产物的变化规律,发现苦参碱抗肝癌的潜在生物标志物,为阐释苦参碱抗肝癌的作用机制奠定基础。

1 材料

1.1 细胞

SMMC-7721细胞由天津肿瘤医院吴雄志教授课题组惠赠。

1.2 药品与试剂

苦参碱(批号JZ20160618,质量分数>98%),购自南京景竹生物科技有限公司;5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)购自北京索莱宝科技有限公司;DMEM高糖培养基、胎牛血清、胰酶、青链霉素及二甲基亚砜(DMSO)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;CCK8试剂盒购自日本东仁化学科技公司;核磁试剂重水、2,3,3-三甲基硅烷基丙酸(TSP)购自美国Norell公司;娃哈哈纯净水。

1.3 仪器

Bruker 600 MHz Avance III NMR Spectrometer (600.13 MHz, 德国 Bruker 公司); Sartorius BSA124S 分析天平(德国 Sartorius 公司); TGL-16 高速台式冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);细胞培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司);低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限

公司); Infinite M200 Pro 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); SCIENTZ-12N 真空冷冻干燥机和 UP-250 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

SMMC-7721 细胞在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度下,于含 10%胎牛血清、100 g/L 青霉素及 100 g/L 链霉素的 DMEM 培养液中培养,细胞生长至对数期进行实验。

2.2 细胞形态学检测

将 SMMC-7721 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板,每孔接种 2 mL。培养 24 h 后,分别加入含 0.5、1.0、2.0 mg/mL 苦参碱的培养基,孵育 24 h 后,倒置显微镜下观察细胞形态并拍照,比较细胞形态变化。

2.3 CCK8 法测定细胞增殖

将 SMMC-7721 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 96 孔板,每孔接种 100 μ L。培养 24 h 后,分别加入含苦参碱 0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL 的培养液,阳性对照组加入含 10 μ g/mL 5-FU 的培养液,对照组只加培养液,每组设 6 个复孔。继续培养 24 h 后,每孔换入含有 CCK8 的培养基,37 °C 孵育 2 h,用酶标仪在 490 nm 处测定其吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{药物}} / A_{\text{对照}}$$

2.4 细胞收集及¹H-NMR 测定样品的制备

将 SMMC-7721 细胞接种于 50 cm² 的培养皿中培养,当细胞生长至 80%时,加入含苦参碱 2.0 mg/mL 的培养基,培养 24 h。细胞计数后,分别收集细胞和培养基。用细胞刮刀刮下培养皿中的细胞($3 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$ 个),4 °C、1 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤沉淀 2 次,收集沉淀于液氮中速冻,-80 °C 保存;细胞培养上清液置于 50 mL 离心管中,4 °C、1 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,于液氮中速冻,-80 °C 保存。

参考文献方法^[14-15],从-80 °C 中取出细胞沉淀和细胞培养上清液于 4 °C 中融化。细胞提取方法:通过反复冻融和超声波对细胞进行破碎,即反复冻融细胞 5 次后,在细胞沉淀中加入 4 °C 预冷的甲醇水溶液(甲醇-水 1:2) 1 mL,反复吹打均匀,于冰上超声破碎 5 min(超 5 s,停 9 s)。4 °C、13 000 r/min 离心 10 min,收集上清,并向沉淀中添加 1 mL 甲醇水溶液,重复以上超声破碎,收集 2 次上清于

5 mL EP 管中冻干。细胞培养上清液提取方法：取 2 mL 培养液于 5 mL EP 管中冻干。

向细胞裂解液和细胞培养上清液冻干粉中加入 600 μ L 重水配制的 0.1 mol/L PBS (pH 7.4)，其中分别含有 0.005% 和 0.02% TSP，4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 10 min，取上清于 5 mm NMR 管中测试。

2.5 ^1H -NMR 测定与谱图处理

样品于 Bruker 600 MHz AVANCE III NMR 仪上测定 (25 $^{\circ}$ C)，采用 1D CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 脉冲序列，检测谱宽 12 345.7 Hz，扫描次数为 64，FID 分辨率 0.188 Hz，脉冲时间 14 s，采样时间 2.654 s，延迟时间 1.0 s，采样间隔 40.5 s，采样点为 65 536。

所有谱图采用 MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostella, Spain) 核磁图谱专业处理软件对 ^1H -NMR 图谱进行傅里叶转换，并进行手动相位、基线调整。谱图中以 TSP 校准化学位移，以 δ 0.01 对化学位移区间 δ 0.50~9.00 进行分段积分，排除 δ 4.5~5.0 区域的水峰不进行积分，并将积分数据进行归一化。将上述数据保存在

Excel 文档中，用于多元统计分析。

运用 SIMCA-P 13.0 (Umetrics 公司，瑞士) 软件将积分数据进行中心化和规格化后，进行偏最小二乘法判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal PLS-DA, OPLS-DA)，找出样品间的差异代谢产物。

2.6 网络构建

根据 MetPA 所富集代谢通路中的代谢物，应用 Cytoscape 软件的 Metscape^[16] 插件构建苦参碱发挥抗肝癌作用的代谢网络。

2.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用统计学软件 Prism GraphPad 5.0 进行统计分析，通过 t 检验比较组间差异。

3 结果

3.1 苦参碱对 SMMC-7721 细胞形态的影响

取对照组细胞及 0.5、1.0、2.0 mg/mL 苦参碱处理 24 h 后的细胞，倒置显微镜下观察。结果如图 1 所示，可见对照组细胞多呈卵圆形、梭形，贴壁生

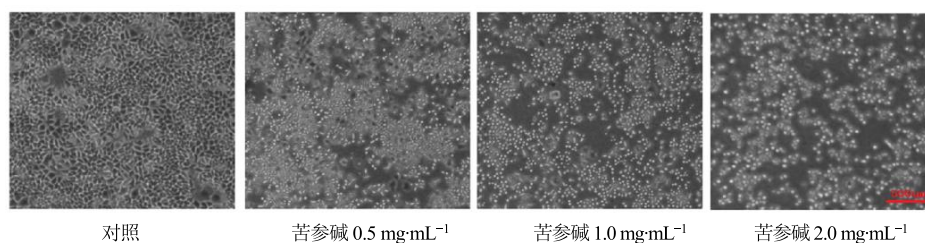


图 1 苦参碱对 SMMC-7721 细胞形态的影响

Fig. 1 Effects of matrine on morphology of SMMC-7721 cells

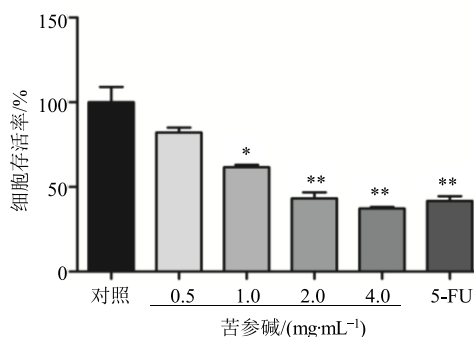
长，而给药组细胞相互分散，细胞数量减少，且随着药物浓度质量增加，凋亡细胞的比例也明显增高，细胞皱缩明显，体积缩小。

3.2 苦参碱对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

CCK8 法结果显示，0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL 苦参碱作用 SMMC-7721 细胞 24 h 后，可剂量依赖性抑制细胞增殖。其中 1.0、2.0、4.0 mg/mL 苦参碱能显著抑制 SMMC-7721 细胞增殖，苦参碱对 SMMC-7721 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 (1.68 $\pm$ 0.28) mg/mL (图 2)。

3.3 图谱指认与分析

参照文献报道^[17-18]并结合公共数据库 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、BMRB (<http://www.bmrbl.wisc.edu/>) 及软件 Chenomx NMR Suite (Chenomx Inc



与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 2 苦参碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of matrine on proliferation of SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

公司),对图谱中的主要化合物进行指认,图 3 为细胞及培养上清液的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱,其中在细胞中共指认出 37 种内源性代谢产物,培养上清液中共指认出 22 种内源性代谢产物,见表 1。

3.4 多元统计分析

为进一步确定各组间代谢物的差异,采用有监督的 PLS-DA 对所有样本进行 $^1\text{H-NMR}$ 代谢轮廓分析,结果见图 4 (PLS-DA 模型参数分别为 A: $R^2_X=0.692$, $R^2_Y=0.997$, $Q^2_Y=0.96$; B: $R^2_X=0.532$, $R^2_Y=0.999$, $Q^2_Y=0.978$)。细胞和培养上清液中,对照组和给药组均沿 $t[1]$ 轴明显分开,进一步说明

苦参碱作用于 SMMC-7721 细胞后,对细胞的代谢产生了比较显著的影响。有监督的模式识别方法需用外部模型验证方法排列实验来证明模型的有效性。由图 4 可知,两条回归线的斜率较大,下方回归线与纵轴截距较小,其中所有的 R^2 和 Q^2 的值均低于原始值,表明模型验证有效。

对结果进行 OPLS-DA 分析,得到 VIP 值,选出 VIP>1 的代谢产物,并结合独立样本 t 检验 $P<0.05$ 筛选出差异代谢物。由表 2 可知,给予苦参碱后,细胞内发现 15 个差异代谢物,培养液中发现 6 个差异代谢物。

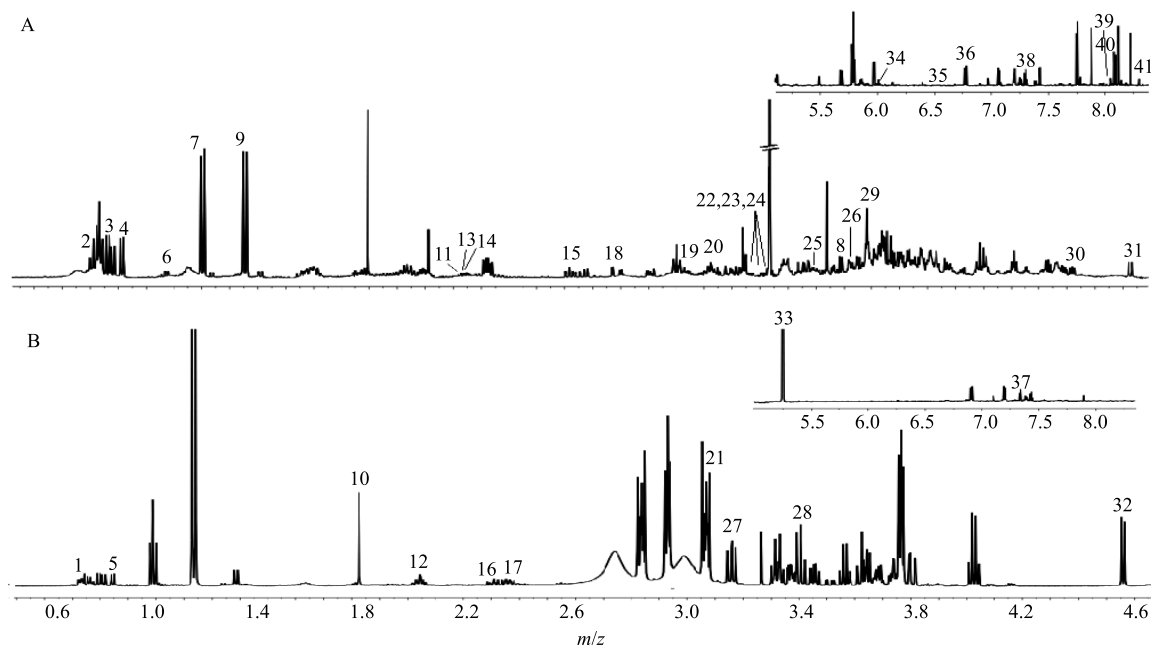


图 3 SMMC-7721 细胞 (A) 和培养上清液 (B) $^1\text{H-NMR}$ 图谱

Fig. 3 Typical $^1\text{H-NMR}$ spectra of SMMC-7721 cells (A) and medium (B)

表 1 SMMC-7721 细胞 (C) 和培养上清液 (M) $^1\text{H-NMR}$ 数据归属

Table 1 $^1\text{H-NMR}$ assignments of major metabolites from SMMC-7721 cells (C) and medium (M)

峰号	代谢物	基团	δ_{H}	样本
1	2-氧代亮氨酸	CH_3, CH_2	0.92 (d, $J=7.8$ Hz)	M
2	异亮氨酸	$\delta\text{-CH}_3, \delta'\text{-CH}_3\delta\text{CH}_3, \gamma\text{-CH}_3$	0.93 (t, $J=7.2$ Hz), 1.01 (d, $J=6.6$ Hz)	C, M
3	亮氨酸	$\text{CH}=\text{CH}$	0.97 (t, $J=6.0$ Hz), 0.99 (d, $J=7.2$ Hz)	C, M
4	缬氨酸	$\gamma\text{-CH}_3, \gamma'\text{-CH}_3$	1.01 (d, $J=6.6$ Hz), 1.04 (d, $J=6.6$ Hz)	C, M
5	2-氧代缬氨酸	CH_3	1.12 (d, $J=7.2$ Hz)	M
6	3-羟丁酸	$\gamma\text{-CH}_3$	1.18 (d, $J=6.6$ Hz)	C
7	乳酸	$\alpha\text{-CH}, \beta\text{-CH}_3$	1.33 (d, $J=6.6$ Hz), 4.12 (q, $J=7.2$ Hz)	C, M
8	苏氨酸	$\gamma\text{-CH}_3, \alpha\text{-CH}, \beta\text{-CH}$	1.33 (d, $J=6.6$ Hz), 3.59 (d, $J=4.8$ Hz), 4.26 (m)	C, M
9	丙氨酸	$\beta\text{-CH}_3$	1.48 (d, $J=7.2$ Hz), 3.78 (d, $J=7.2$ Hz)	C, M
10	醋酸	CH_3	1.92 (s)	C, M
11	脯氨酸	$\gamma\text{-CH}_3, \beta\text{-CH}_2, \alpha\text{-CH}$	2.01 (m), 2.07 (m), 4.13 (m)	C
12	焦谷氨酸	Half $\beta\text{-CH}_2, \gamma\text{-CH}_2$, Half $\beta\text{-CH}_2, \alpha\text{-CH}$	2.04 (m), 2.42 (m), 2.52 (m), 4.18 (dd, $J=3.6, 3.6$ Hz)	M
13	谷氨酸	$\alpha\text{-CH}, \beta\text{-CH}_2, \gamma\text{-CH}_2$	2.09 (m), 2.35 (m), 3.78 (m)	C
14	谷氨酰胺	$\alpha\text{-CH}, \beta\text{-CH}_2, \gamma\text{-CH}_2$	2.15 (m), 2.46 (m), 3.78 (m)	C
15	谷胱甘肽	$\beta\text{-Glu}, \gamma\text{-Glu}, \beta\text{-Cys}, \alpha\text{-Cys}$	2.16 (m), 2.56 (m), 2.94 (m)	C

续表 1

峰号	代谢物	基团	δ_{H}	样本
16	丙酮酸	CH ₃	2.38 (s)	C, M
17	琥珀酸	CH ₂	2.41 (s)	C, M
18	二甲胺	CH ₃	2.73 (s)	C
19	三甲胺	CH ₃	2.91 (s)	C
20	肌酐	CH ₃ , CH ₂	3.04 (s), 3.93 (s)	C
21	乙醇胺	α -CH ₂ , β -CH ₂	3.15 (t, $J = 7.2$ Hz), 3.86 (t)	C, M
22	胆碱	N(CH ₃) ₃	3.20 (s)	C
23	磷酸胆碱	N(CH ₃) ₃	3.22 (s)	C
24	甘磷酸胆碱	N(CH ₃) ₃	3.23 (s)	C
25	牛磺酸	CH ₂ SO ₃ , NCH ₂	3.25 (t, $J = 6.0$ Hz), 3.43 (t, $J = 6.0$ Hz)	C
26	肌醇	5-CH, 1,3-CH ₃ , 4,6-CH, 2-CH	3.28 (t, $J = 9.0$ Hz), 3.54 (dd, $J = 3.0, 6.6$ Hz), 3.63 (t, $J = 9.6$ Hz), 4.07 (t, $J = 3.0$ Hz)	C
27	甲醇	CH ₃	3.36 (s)	C, M
28	甘油	β -CH ₂ , β' -CH ₂	3.56 (dd, $J = 9.6, 3.6$ Hz), 3.66 (dd, $J = 11.4, 4.2$ Hz)	C, M
29	甘氨酸	CH ₂	3.56 (s)	C, M
30	1,3-二羟基丙酮	β -CH ₂ , β' -CH ₂	3.58 (s), 4.41 (s)	C
31	腺苷单磷酸	5-CH-ribose, 4-CH-ribose, 3-CH-ribose, CH-ribose, CH-ring, CH-ring	4.01 (m), 4.37 (m), 4.51 (m), 6.14 (m), 8.27 (s), 8.61 (s)	C
32	β -葡萄糖	β -C ₁ H	4.65 (d, $J = 7.8$ Hz)	C, M
33	α -葡萄糖	CH	5.23 (d, $J = 3.6$ Hz)	C, M
34	肌苷	CH-ribose, CH-ring, CH-ring	6.11 (d, $J = 6.0$ Hz), 8.24 (s), 8.35 (s)	C
35	延胡索酸	CH = CH	6.53 (s)	C
36	酪氨酸	3 or 5-CH, 2 or 6-CH	6.91 (d, $J = 8.4$ Hz), 7.19 (d, $J = 4.2$ Hz)	C, M
37	组氨酸	5-CH, 3-CH	7.09 (s), 7.38 (s)	M
38	苯丙氨酸	2-CH, 4-CH, 3-CH	7.33 (m), 7.38 (m), 7.43 (m)	C, M
39	羟嘌呤醇	CH	8.18 (s)	C
40	次黄嘌呤	N-(2)CH = N, N-(7)CH = N	8.20 (s), 8.22 (s)	C
41	甲酸盐	CH	8.46 (s)	C, M

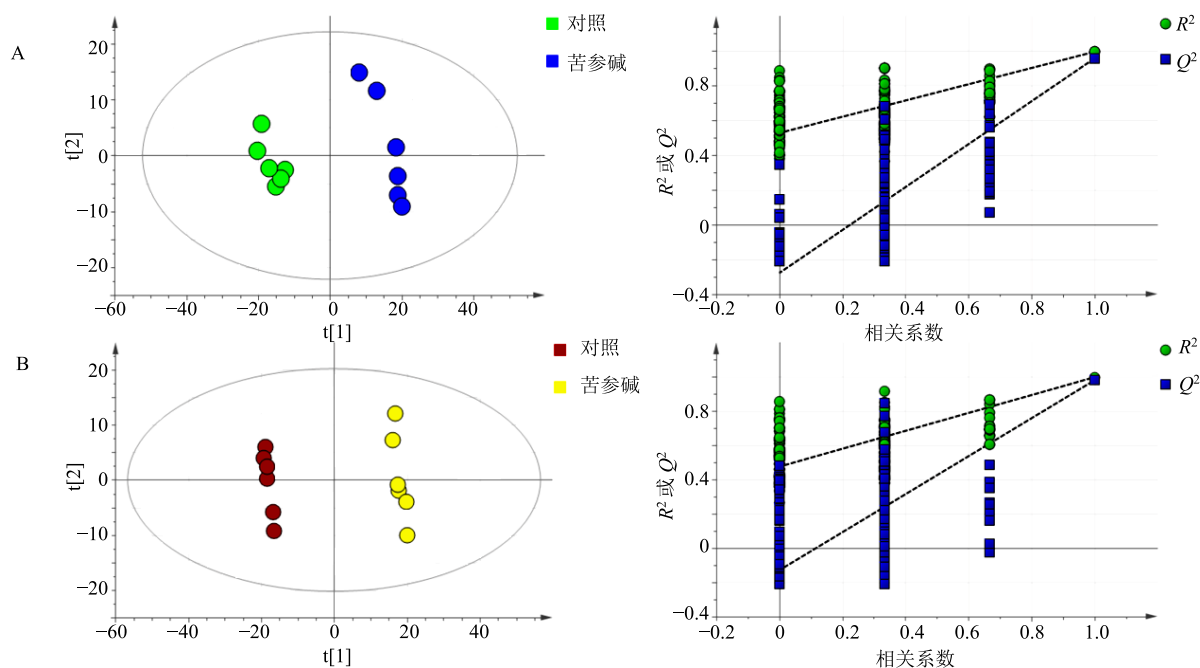


图 4 SMMC-7721 细胞 (A) 和培养上清液 (B) PLS-DA 散点图和相应的模型验证图

Fig. 4 PLS-DA and corresponding validation plot derived from SMMC-7721 cells (A) and medium (B)

表 2 苦参碱干预 SMMC-7721 细胞后的差异代谢物

Table 2 Differential metabolites in SMMC-7721 cells and medium after treatment of matrine

编号	代谢物	细胞	培养基
1	异亮氨酸	↑ **	—
2	亮氨酸	↑ ***	↓ ***
3	缬氨酸	↑ ***	↓ ***
4	醋酸	↑ ***	—
5	谷氨酸	↓ ***	—
6	谷氨酰胺	↑ **	—
7	琥珀酸	—	↑ ***
8	肌酐	↓ **	—
9	乙醇胺	—	↑ ***
10	甘氨酸	↓ ***	—
11	肌醇	↓ ***	—
12	牛磺酸	↓ ***	—
13	甘氨酸	↓ ***	↓ ***
14	丙氨酸	—	↓ ***
15	苏氨酸	↓ **	—
16	酪氨酸	↑ ***	—
17	苯丙氨酸	↑ ***	—
18	次黄嘌呤	↓ ***	—

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; ↑ 上调 ↓ 下调** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; ↑ upregulation ↓ downregulation

3.5 差异代谢物的相关性分析

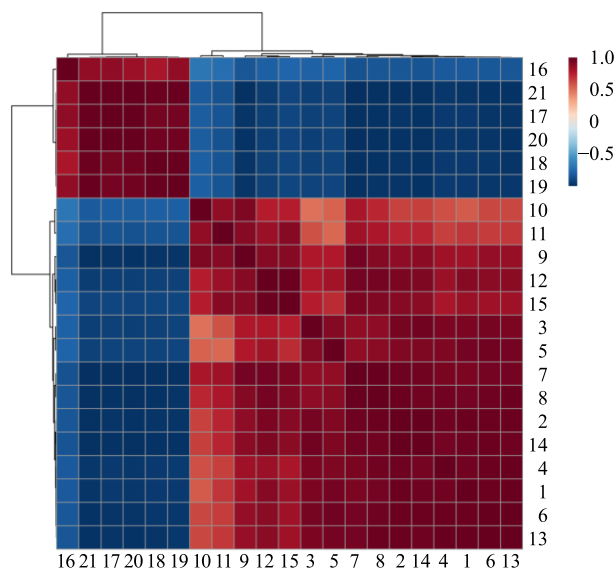
相关性分析结果如图 5 所示, 可以看出细胞内外代谢产物的相关性。结合表 1, 可以看出细胞外缬氨酸、琥珀酸、乙醇胺、甘氨酸、丙氨酸与细胞内苯丙氨酸、酪氨酸、肌酐、甘氨酸胆碱、肌醇负相关性较强。细胞内苏氨酸、次黄嘌呤之间正相关性较强; 细胞外缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸之间正相关性较强。可见苦参碱抗肝癌的作用机制可能与多条代谢通路相关, 且这些代谢物与代谢途径相互关联、相互影响。

3.6 代谢通路分析

将这些差异代谢物输入 metaboanalyst 中进行通路富集分析, MetPA 通路分析结果如图 6 所示。苦参碱干预后, 15 条代谢通路发生显著变化, 综合 Holm P 值、FDR (false discovery rate) 和 Impact 值共发现苦参碱干预 SMMC-7721 细胞的 6 条代谢通路: 牛磺酸和亚牛磺酸代谢, D -谷氨酰胺和 D -谷氨酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 苯丙氨酸代谢, 肌醇磷酸代谢。

3.7 苦参碱抗肝癌代谢网络构建

根据 MetPA 富集代谢通路中的代谢物, 构建与苦参碱抗肝癌相关的代谢网络。整个代谢网络包括



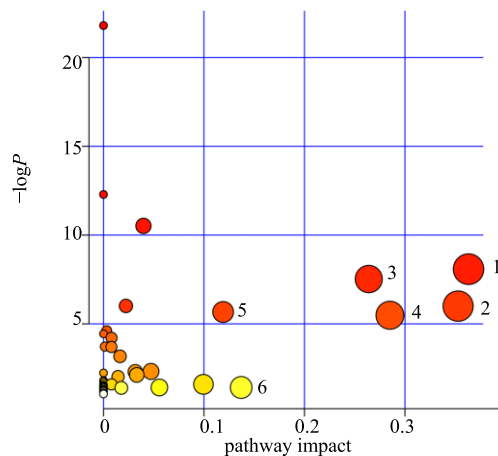
细胞: 1-异亮氨酸 2-亮氨酸 3-缬氨酸 4-醋酸 5-谷氨酸 6-谷氨酰胺 7-肌酐 8-甘氨酸胆碱 9-肌醇 10-牛磺酸 11-甘氨酸 12-苏氨酸 13-酪氨酸 14-苯丙氨酸 15-次黄嘌呤
培养基上清液: 16-亮氨酸 17-缬氨酸 18-琥珀酸 19-乙醇胺 20-甘氨酸 21-丙氨酸

cell: 1-isoleucine 2-leucine 3-valine 4-acetate 5-glutamate 6-glutamine 7-creatine 8-GPC^C 9-myo-inositol 10-taurine 11-glycine 12-threonine 13-tyrosine 14-phenylalanine 15-hypoxanthine

medium: 16-leucine 17-valine 18-succinate 19-ethanolamine 20-glycine 21-alanine

图 5 差异代谢物相关性分析

Fig. 5 Correlation analysis results of differential metabolites



1-牛磺酸和亚牛磺酸代谢 2- D -谷氨酰胺和 D -谷氨酸代谢 3-甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 4-丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 5-苯丙氨酸代谢 6-肌醇磷酸代谢

1-taurine and hypotaurine metabolism 2- D -glutamine and D -glutamate metabolism 3-glycine, serine and threonine metabolism 4-alanine, aspartate and glutamate metabolism 5-phenylalanine metabolism 6-inositol phosphate metabolism

图 6 代谢通路 MetPA 分析

Fig. 6 MetPA analysis of metabolic pathway

138 个节点（主要化合物）和 252 个边缘（主要反应），在同一数据库中包含 193 个反应通路（图 7）。

4 讨论

已有研究表明，氨基酸代谢紊乱与肿瘤发生发展密切相关^[19-20]。氨基酸分解代谢后，可转化为 α -酮酸，进而转变为葡萄糖、酮体等物质，最终参与三羧酸循环。在肝线粒体中，谷氨酸由谷氨酸脱氢酶催化氧化脱氨后再水解生成 α -酮戊二酸。肝癌发生过程中，由于细胞增殖、能量需求旺盛、三羧酸循环等供能途径加强，导致肿瘤细胞对谷氨酸有很高摄取率^[21]。因此，在肝癌细胞中谷氨酸的量增加，

而苦参碱能显著下调细胞内谷氨酸的量。细胞外琥珀酸的量上升，可能是苦参碱破坏了 SMMC-7721 细胞能量代谢途径三羧酸循环造成的。免疫系统是体内主要的抗肿瘤防御系统，在体内谷氨酰胺维持着免疫系统的基本功能。另外，谷氨酰胺还保护细胞、组织和器官免受自由基的损害^[22]。给予苦参碱后谷氨酰胺水平的升高提示苦参碱可能增强了细胞的抗氧化活性，改善了细胞膜损伤、免疫功能障碍和自由基损伤。

支链氨基酸即亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸为体内必需氨基酸，与蛋白质的生物合成与降解有关，

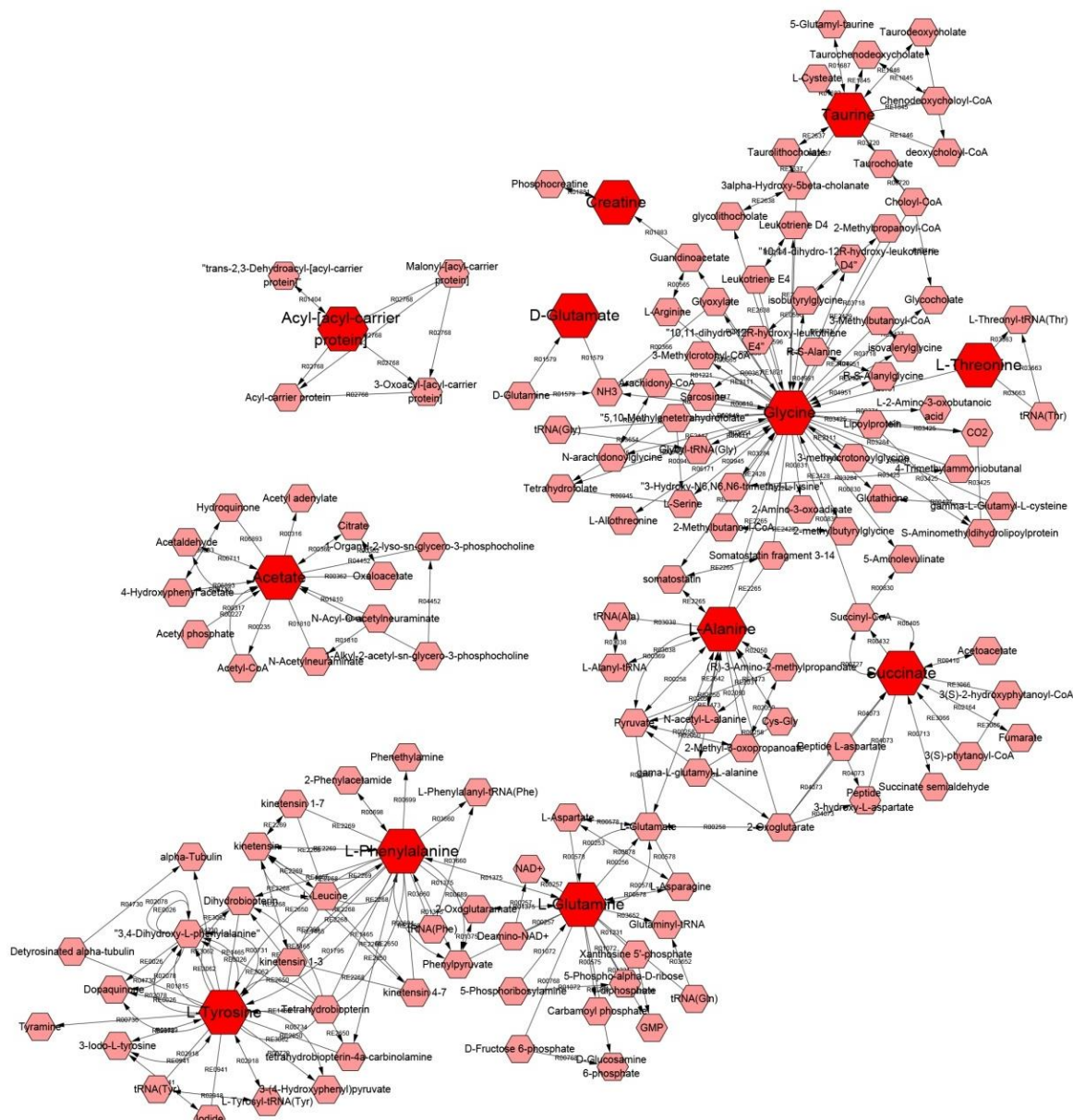


图 7 Metscape 分析苦参碱抗肝癌相关的潜在生物标志物网络

Fig. 7 Network of potential biomarkers of matrine against hepatoma by metscape analysis

不仅具有增强免疫防护的作用^[23],其产生 ATP 的效率也远高于其他氨基酸^[24]。研究表明,支链氨基酸可能通过参与机体能量代谢过程来加速糖异生,这有利于能量供应^[25]。与对照组相比,给予苦参碱能明显上调细胞中亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的量,提示苦参碱可能通过参与能量代谢来抑制肝癌细胞的增殖。非必需氨基酸在肿瘤细胞代谢过程中发挥重要的作用。甘氨酸作为非必需氨基酸,是合成代谢过程中一碳单位的提供者,也是合成嘌呤及核酸的重要原料^[26]。甘氨酸可经甘氨酸羟甲基转移酶催化反应,生成丝氨酸和四氢叶酸,后者是 DNA 合成过程中重要的辅酶^[27]。本研究发现苦参碱能显著降低细胞内外甘氨酸的量,进而使四氢叶酸合成减少,抑制 DNA 合成,最终抑制肝癌细胞增殖。

本研究对苦参碱调节 SMMC-7721 细胞后的差异代谢物进行相关性分析,发现肌醇和丙氨酸与多数差异代谢物具有显著相关性。肌醇量与体内免疫系统的功能密切相关,提示苦参碱可能通过调节免疫系统来发挥抗肝癌作用。丙氨酸可转运新陈代谢过程中所产生的氨、增加糖异生,并维持血中葡萄糖量保持正常水平^[28-29]。另外,有研究表明^[26]伴随肝癌细胞的增殖,丙氨酸量明显升高,而苦参碱能明显降低丙氨酸的量,提示苦参碱可能通过调节糖代谢和能量代谢发挥作用。

代谢途径是细胞内发生的一系列化学反应,与一定的生物学功能有关。代谢途径分析对于鉴别和量化生化反应网络中的代谢物具有重要意义^[30]。Metscape 是人类代谢网络环境下实验代谢组学和基因表达数据交互式探索和可视化的工具,允许用户构建和分析基因或化合物网络,并可视化代谢物数据的变化^[31]。为了进一步了解代谢物之间的关系,将苦参碱调控的 6 条代谢通路的代谢物映射到京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库:牛磺酸和亚牛磺酸代谢, D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,苯丙氨酸代谢,肌醇磷酸代谢,并构建了代表生化反应的节点(代谢物)和边缘的复合网络,可以看出苦参碱抗肝癌的作用具有多环节、多层次综合作用的特点。

本研究从整体代谢水平研究苦参碱抑制 SMMC-7721 细胞增殖的作用,结果表明苦参碱能够显著调节 SMMC-7721 细胞中差异代谢物的量,改善细胞的代谢紊乱。

参考文献

- [1] Gao L, Wang X D, Niu Y Y, *et al.* Molecular targets of Chinese herbs: A clinical study of hepatoma based on network pharmacology [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep24944.
- [2] Simard E P, Ward E M, Siegel R, *et al.* Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008 [J]. *Ca-Cancer J Clin*, 2012, 62(2): 118-128.
- [3] Lee J O, Lee K W, Oh D Y, *et al.* Combination chemotherapy with capecitabine and cisplatin for patients with metastatic hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(8): 1402-1407.
- [4] Nakamura M, Nagano H, Marubashi S, *et al.* Pilot study of combination chemotherapy of S-1, a novel oral DPD inhibitor, and interferon-alpha for advanced hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis [J]. *Cancer*, 2008, 112(8): 1765-1771.
- [5] Yong K L, Kim S U, Kim D Y, *et al.* Prognostic value of α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin responses in patients with hepatocellular carcinoma treated with transarterial chemoembolization [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13(1): 5.
- [6] Koshiol J, Pawlish K, Goodman M T, *et al.* Risk of hepatobiliary cancer after solid organ transplant in the United States [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014, 12(9): 1541-1549.
- [7] Qu Z, Cui J, Haratalee Y, *et al.* Identification of candidate anti-cancer molecular mechanisms of compound kushen injection using functional genomics [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40): 66003-66020.
- [8] Zhao Z, Fan H, Higgins T, *et al.* Fufang Kushen injection inhibits sarcoma growth and tumor-induced hyperalgesia via TRPV1 signaling pathways [J]. *Cancer Letters*, 2011, 355(2): 232-241.
- [9] Ma Y, Gao H M, Liu J, *et al.* Identification and determination of the chemical constituents in a herbal preparation, compound kushen injection, by HPLC and LC-DAD-MS/MS [J]. *J Liq Chromatogr*, 2014, 37(2): 207-220.
- [10] 查勇, 寸英丽, 黄云超. 苦参碱对肝癌细胞株 SMMC-7721 凋亡和自噬相关基因表达的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(29): 3078-3083.
- [11] 周炜, 周颖, 齐激扬. 代谢组学在肿瘤标志物的研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(4): 313-316.
- [12] Ma T, Fan B Y, Zhang C, *et al.* Metabonomics applied in exploring the antitumour mechanism of physapubenolide

- on hepatocellular carcinoma cells by targeting glycolysis through the Akt-p53 pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep29926.
- [13] D'Alessandro A, Zolla L. Metabolomics and cancer drug discovery: Let the cells do the talking [J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17(1/2): 3-9.
- [14] Cuperlovic Culf M, Cormier K, Touaibia M, *et al.* ^1H -NMR metabolomics analysis of renal cell carcinoma cells: Effect of VHL inactivation on metabolism [J]. *Int J Cancer*, 2016, 138(10): 2439-2449.
- [15] 何小燕, 陈建丽, 向欢, 等. 谷氨酸和皮质酮诱导的PC12抑郁症细胞模型差异性的 ^1H -NMR代谢组学研究[J]. *药学学报*, 2017, 52(2): 245-252.
- [16] Gao J, Tarcea V G, Karnovsky A, *et al.* Metscape: A cytoscape plug-in for visualizing and interpreting metabolomic data in the context of human metabolic networks [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(7): 971-973.
- [17] 王珂欣, 高丽, 段丹丹, 等. 基于 ^1H -NMR代谢组学的黄芩素干预D-半乳糖致衰老大鼠作用研究[J]. *中草药*, 2017, 48(3): 511-518.
- [18] 闫明亮, 周玉枝, 李明花, 等. 基于 ^1H -NMR代谢组学的黄芩醇提取物延长果蝇寿命研究[J]. *中草药*, 2016, 47(10): 1714-1722.
- [19] Hasim A, Aili A, Maimaiti A, *et al.* Plasma-free amino acid profiling of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia patients and its application for early detection [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(10): 5853-5859.
- [20] Ma H, Hasim A, Mamtimin B, *et al.* Plasma free amino acid profiling of esophageal cancer using high-performance liquid chromatography spectroscopy [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(26): 8653-8659.
- [21] 史栋栋, 王桂明, 况媛媛, 等. 细胞代谢组学用于木犀草素抑制MCF-7细胞的机制研究[J]. *分析化学*, 2014, 42(8): 1088-1093.
- [22] Goenka A. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype [J]. *Nature*, 2011, 483(7390): 479-483.
- [23] 顾军, 李宁, 吴国豪, 等. 支链氨基酸对创伤后代谢影响的研究[J]. *肠外与肠内营养*, 2004, 11(2): 93-96.
- [24] Xu C, Li Y, Xia C, *et al.* ^1H -NMR-based plasma metabolic profiling of dairy cows with type I and type II ketosis [J]. *Pharm Anal Acta*, 2015, 6(2): 1-7.
- [25] Shimomura Y, Murakami T, Nakai N, *et al.* Suppression of glycogen consumption during acute exercise by dietary branched-chain amino acids in rats [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2000, 46(2): 71-74.
- [26] 陆伟, 钱绍诚, 王凤梅, 等. 人肝癌细胞体外氨基酸代谢[J]. *天津医药*, 2002, 30(11): 643-645.
- [27] 郑庆辉. 细胞代谢组学用于辐照干预肺癌细胞A549的机制研究[J]. *浙江临床医学*, 2016, 18(1): 26-28.
- [28] Valdes P A, Kim A, Leblond F, *et al.* Combined fluorescence and reflectance spectroscopy for *in vivo* quantification of cancer biomarkers in low-and high-grade glioma surgery [J]. *J Biomed Opt*, 2011, 16(11): e116007.
- [29] Grabowski M M, Recinos P F, Nowacki A S, *et al.* Residual tumor volume versus extent of resection: Predictors of survival after surgery for glioblastoma [J]. *J Neurosurg*, 2014, 121(5): 1-9.
- [30] Yan Z, Guo Z, Zhang L, *et al.* System-wide assembly of pathways and modules hierarchically reveal metabolic mechanism of cerebral ischemia [J]. *Sci Rep*, 2015, doi: 10.1038/srep17068.
- [31] Li Z, Li A, Gao J, *et al.* Kidney tissue targeted metabolic profiling of unilateral ureteral obstruction rats by NMR [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 307.