

银杏黄酮苷元联合阿霉素协同抗肝癌的 细胞代谢组学研究

陆苑^{1,2}, 王艳丽³, 宋忠军³, 朱晓青³, 刘春花⁴, 陈际宇¹, 李勇军⁴, 何艳^{1*}

(1. 贵州医科大学附属医院 临床试验研究中心, 贵州 贵阳 550001; 2. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 药学院, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 该研究基于高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱联用仪探究银杏黄酮苷元(ginkgo flavone aglycone, GA)联合阿霉素(doxorubicin, DOX)对H22肝癌细胞的抑制作用及作用机制。首先考察不同浓度GA和DOX对H22细胞存活率的影响,以组合指数(combination index, CI)对两者的联合用药进行评价。将实验分为对照组(CON)、DOX组、GA组、联合用药组(GDOX),通过代谢组学策略探寻联合用药较单独用药后显著改变的代谢标志物,分析可能的代谢通路和作用机制。结果显示,以 $30\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GA与 $0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX作为联合给药浓度,CI为0.808,表明两者联合发挥协同抗肿瘤作用。代谢组学分析鉴定出L-精氨酸、L-酪氨酸和L-缬氨酸等23种代谢标志物,以氨基酸类物质为主。与CON组相比,DOX治疗后22种代谢标志物被显著下调,GA治疗后17种代谢标志物被显著下调。相较于DOX和GA组,GDOX联合用药进一步下调了这些代谢标志物在肝癌中的水平,这可能是两者联合起到增效作用的原因。通路富集分析中找到5条关键代谢通路,包括谷胱甘肽代谢,苯丙氨酸代谢,精氨酸和脯氨酸代谢, β -丙氨酸代谢,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解。这表明GA联合DOX的协同抗肿瘤作用,可能是通过干预多种氨基酸的代谢,进而影响肿瘤细胞的能量供应实现。

[关键词] 银杏黄酮苷元; 阿霉素; H22细胞; 肝细胞癌; 细胞代谢组学; 协同作用

Cell metabolomics study of ginkgo flavone aglycone combined with doxorubicin against liver cancer in synergy

LU Yuan^{1,2}, WANG Yan-li³, SONG Zhong-jun³, ZHU Xiao-qing³, LIU Chun-hua⁴, CHEN Ji-yu¹, LI Yong-jun⁴, HE Yan^{1*}

(1. Clinical Trial Research Center, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550001, China; 2. Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 4. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] Ultra-high-performance liquid chromatography-Q exactive orbitrap tandem mass spectrometry (UHPLC-QEOrbitrap-MS/MS) was used to explore the inhibitory effect and mechanism of ginkgo flavone aglycone (GA) combined with doxorubicin (DOX) on H22 cells. The effects of different concentrations of GA and DOX on the viability of H22 cells were investigated, and combination index (CI) was used to evaluate the effects. In the experiments, control (CON) group, DOX group, GA group, and combined GA and DOX

[收稿日期] 2022-04-11

[基金项目] 贵州省科技厅项目(黔科合基础-ZK[2022]一般374,黔科合基础[2020]1Y381);贵州医科大学项目(新苗计划19NSP056);贵州医科大学附属医院项目(NFSC培育计划GYFYNSFC-2021-56);贵州省普通高等学校科技拔尖人才项目(KY[2021]033);贵州省优秀青年科技人才项目(黔科合平台人才[2021]5619号)

[通信作者] *何艳,教授,主要从事药理研究,E-mail: Yanhe_Submission@163.com

[作者简介] 陆苑,副教授,主要从事中药抗肿瘤药理研究,E-mail: luyuan@gmc.edu.cn

(GDOX) group were constructed. Then the metabolomics strategy was employed to explore the metabolic markers that were significantly changed after combination therapy on the basis of single medication treatment, and by analyzing their biological significance, the effect and mechanism of the anti-tumor effect of GA combined with DOX were explained. The results revealed that when $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ GA and $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DOX was determined as the co-administration concentration, the CI value was 0.808, indicating that the combination of GA and DOX had a synergistic anti-tumor effect. Metabolomics analysis identified 23 metabolic markers, including L-arginine, L-tyrosine and L-valine, mostly amino acids. Compared with the CON group, 22 and 17 metabolic markers were significantly down-regulated after DOX treatment and GA treatment, respectively. Compared with the DOX and GA groups, the treatment of GA combined with DOX further down-regulated the levels of these metabolic markers in liver cancer, which might contribute to the synergistic effect of the two. Five key metabolic pathways were found in pathway enrichment analysis, including glutathione metabolism, phenylalanine metabolism, arginine and proline metabolism, β -alanine metabolism, and valine, leucine and isoleucine degradation. These findings demonstrated that the combination of GA and DOX remarkably inhibited the viability of H22 cells and exerted a synergistic anti-tumor effect. The mechanism might be related to the influence of the energy supply of tumor cells by interfering with the metabolism of various amino acids.

[**Key words**] ginkgo flavone aglycone; doxorubicin; H22 cell; hepatocellular carcinoma; cell metabolomics; synergy

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20220506.401

原发性肝癌主要包括肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)、肝内胆管癌和肝细胞癌-胆管细胞癌混合型等不同病理类型。其中 HCC 占比大于 85%^[1], 已发展成为全球发病率第六, 病死率第二的恶性肿瘤疾病^[2]。尽管临床治疗措施取决于不同的肿瘤分期, 但是手术切除和肝脏移植始终被认为是 HCC 治疗最有效的方法^[3-4]。然而, 由于 HCC 病因复杂, 隐匿性强等特点, 大多数患者在确诊时病情已达中晚期, 丧失根治性的手术治疗机会, 此时以药物化疗为主的全身治疗最被推荐^[3]。

阿霉素 (doxorubicin, DOX) 是临床上常见的化疗药物, 可通过抑制 DNA 和 RNA 的合成诱导肿瘤细胞发生凋亡, 从而发挥抗肿瘤作用, 但由于肝癌治疗过程中的耐药性, 加之不可逆转的心脏毒性, 使得 DOX 的临床应用受到一定限制^[5-6]。现阶段, 联合药物疗法是最具前景的肿瘤治疗策略^[7], 通过调节异常细胞的多个信号通路来获得协同治疗效果, 同时减少耐药现象的发生, 预后良好且不良反应较少^[8], 特别是随着中药现代化研究的不断深入, 许多中药制剂被批准纳入 HCC 诊疗规范, 多年的临床应用也都取得了较好的效果^[3]。

银杏叶提取物是从银杏中提取的主要药用成分之一, 其中银杏黄酮被发现具有多方面的药理活性, 对包括肿瘤和心血管疾病在内的多种复杂疾病均具有较好的应用前景^[9-10]。银杏黄酮苷元 (ginkgo flavone aglycone, GA) 是将银杏黄酮苷通过酶水解法去除糖基后获得的新型提取物, 主要由槲皮素、山

柞酚和异鼠李素组成。有研究指出槲皮素可通过干扰 PI3K/Akt/mTOR 通路, 抑制肿瘤细胞糖酵解和葡萄糖摄取的关键酶, 同时还可以降低细胞血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 分泌和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 水平来预防癌细胞转移^[11]。一项对槲皮素抗肝癌的作用评价指出槲皮素联合化疗药物 (如索拉非尼、5-氟尿嘧啶和顺铂等) 可作为治疗 HCC 的常规策略^[12]。山柞酚通过激活 AMPK 信号诱导肝癌细胞自噬性细胞死亡、调节 P-gp 表达和功能, 已成为肝癌细胞化学增敏死亡的良好选择^[13-14]。异鼠李素的抗肿瘤效果也在很多不同类型的癌症中都有报道, 其中在对 HepG2 细胞影响的研究中发现, 它可以有效阻滞细胞周期, 诱导细胞凋亡, 具有一定抗肝癌作用^[15-16]。因此笔者推测 GA 与 DOX 联用可能会发挥协同抗肿瘤作用。鉴于目前 GA 与 DOX 联用是否发挥协同抗肿瘤作用, 尚无相关报道和有关作用机制方面研究, 需进一步探究。故本课题将采用高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱联用仪 (ultra-high-performance liquid chromatography electrospray ionization orbitrap tandem mass spectrometry, UHPLC QE Orbitrap-MS/MS) 的代谢组学分析方法, 探究 GA 联合 DOX 协同抗肿瘤的代谢通路和可能机制。

1 材料

二氧化碳细胞培养箱 (型号 8000DH, 美国 Thermo 公司); 倒置显微镜 (型号 TS100, 日本 Nikon

公司);双人超净工作台(型号 DL-CJ-2 N,北京东联哈尔仪器制造有限公司);酶标仪(型号 680,美国 Bio-Rad 公司);Vanquish 型超高效液相色谱系统配备 Q Exactive Plus 型高分辨质谱仪(美国 ThermoFisher 公司);低速离心机(型号 ALLEGRA X-30R,美国 Beckman Coulter 公司);全自动雪花制冰机(型号 IMS-20,常熟市雪科电器有限公司);涡旋混合器(型号 ZH-2,天津药典标准仪器厂);氮吹仪氮气发生器(型号 XYN-15LP,上海析友分析仪器有限公司)。

H22 小鼠肝癌细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司;银杏黄酮苷元(GA)由贵州省生化工程中心何珺副教授惠赠(槲皮素 46.61%,山柰酚 44.23%,异鼠李素 4.77%,总黄酮苷元 95.61%);阿霉素(纯度>98%,批号 NO625A,大连美仑生物科技有限公司);RPMI-1640 培养基(批号 8120301,美国 Gibco 公司);胎牛血清(批号 20200328,北京赛澳美细胞技术有限公司);CCK-8(批号 K101812133EF5E,美国 APEX BIO 生物科技有限公司);质谱级甲酸购自美国 ThermoFisher 公司;质谱级乙腈购自德国 Merck 公司;实验用水为超纯水;其余溶剂均为分析纯。

2 方法

2.1 细胞培养

H22 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青链霉素的 RPMI-1640 培养基,在 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养传代,细胞悬浮生长,每 2~3 d 传代 1 次。传代时将细胞收集至离心管中,于 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,离心后吸去上清液,管底细胞沉淀加入适量培养基重悬后置于培养箱中培养。

2.2 细胞活力测定

2.2.1 不同浓度 GA 对 H22 细胞存活率的影响

取对数生长期的 H22 肝癌细胞,进行细胞计数,并调整细胞密度。将 50 μL 细胞悬液和 50 μL GA 药液接种于 96 孔板中(细胞密度为 2×10⁵ 个/mL,GA 药液质量浓度为 5、10、20、30、40、50 μg·mL⁻¹),同时设置空白组(不含细胞和药液)、药液组(不含细胞,含对应浓度 GA 药液)和对照组(含细胞,不含 GA 药液),分别加入等体积的新鲜培养基,每组 3 个复孔,孵育 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 培养 2 h。酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A),计算细胞存活率。细胞存活率 = (A_{实验组} - A_{药液组}) / (A_{对照组} -

A_{空白组}) × 100%。

2.2.2 不同浓度 DOX 对 H22 细胞存活率的影响 取对数生长期的 H22 肝癌细胞,进行细胞计数,并调整细胞密度。将 50 μL 细胞悬液和 50 μL DOX 药液接种于 96 孔板中(细胞密度为 2×10⁵ 个/mL,DOX 药液浓度为 0.2、0.5、1、2、5、10 μmol·L⁻¹),同时设置空白组(不含细胞和药液)和对照组(含细胞,不含 DOX 药液),分别加入等体积的新鲜培养基,每组设置 3 个复孔,孵育 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 培养 2 h。酶标仪测定 450 nm 处的 A,计算细胞存活率。细胞存活率 = (A_{实验组} - A_{空白组}) / (A_{对照组} - A_{空白组}) × 100%。

2.2.3 GA 联合 DOX 对 H22 细胞的抑制作用 取对数生长期的 H22 肝癌细胞,进行细胞计数,并调整细胞密度。然后用不同浓度 GA 药液与不同浓度 DOX 药液组合成混合药液,将 50 μL 细胞悬液和 50 μL 混合药液接种于 96 孔板中(细胞密度为 2×10⁵ 个/mL,GA 药液质量浓度为 30、40 μg·mL⁻¹,DOX 药液浓度为 0.5、1、2、5 μmol·L⁻¹),同时设置空白组(不含细胞和药液)、药液组(不含细胞,含对应浓度混合药液)和对照组(含细胞,不含混合药液),分别加入等体积的新鲜培养基,每组设置 3 个复孔,孵育 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 培养 2 h。酶标仪测定 450 nm 处的 A,计算细胞存活率。利用 Chou-Talalay 方法^[17]以组合指数(combination index, CI)进行评价。CI<1 表示协同作用,CI=1 表示在没有协同作用和拮抗作用的情况下的累加效应,CI>1 表示拮抗作用。

2.3 分组给药

取对数生长期的细胞,进行细胞计数,用培养基调整细胞密度。取 1 mL 细胞悬液和 1 mL 药液接种于 6 孔板中,分为对照组(不含药液)、GA 组(含 30 μg·mL⁻¹ 的 GA)、DOX 组(含 0.5 μmol·L⁻¹ 的 DOX)、GDOX 组(含 30 μg·mL⁻¹ GA 和 0.5 μmol·L⁻¹ DOX),每组设置 6 个复孔。孵育 24 h 后,混匀,取 1.6 mL 置于 2 mL 的 EP 管(提前置于冰上),然后 4 ℃、1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,去除上清液。同时,各组每个平行样取 100 μL 混匀进行细胞计数。下层细胞沉淀立即放入液氮中淬灭约 30 min,随后放置 -80 ℃ 冷冻保存备用。

2.4 样品处理

临用前将细胞样品置于 4 ℃ 下解冻,随后加入

提前置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻的80%甲醇(含1%甲酸)400 μL ,涡混1 min,液氮速冻30 min。反复冻融循环3次后,于 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,收集上清液用氮气吹干。进样前,将样品复溶于150 μL 的50%甲醇溶液中, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min后取上清进样分析。另取各样品上清液10 μL 混合均匀以制备质控(quality control, QC)样品。

2.5 分析条件

2.5.1 色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm);流动相0.1%甲酸乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~1 min, 98% A;1~13 min, 98%~2% A;13~14 min, 2% A;14~14.5 min, 2%~98% A;14.5~18 min, 98% A);柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$;流速 $0.3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样体积3 μL 。

2.5.2 质谱条件

电喷雾电离源,正、负离子同时检测模式。鞘气流量35 arb,辅助气体流量10 arb,毛细管温度 $320\text{ }^{\circ}\text{C}$,喷雾电压3.5 kV(+)、2.5 kV(-)。采集范围 $m/z\ 70\sim 1\ 050$,全扫描分辨率(full MS)70 000,二级分辨率(MS/MS)17 500,碰撞能量(多级模式)20 V/40 V/60 V。

2.6 数据处理与分析

原始数据使用 Thermo Compound Discover 3.2 (Thermo, MA, USA) 软件进行峰识别、峰对齐、峰提取、缺失值过滤及填充、QC 校正等预处理,最终获得包括峰保留时间、峰面积和质荷比在内的三维数据矩阵。对得到的数据矩阵进行峰面积归一化及细胞数量标准化后,利用 SIMCA 17.0 软件进行多元统计分析,主成分分析(principal component analysis, PCA)用以观察样本组间分离和组内聚集的总体趋势,偏最小二乘法判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)用以进一步评估组间代谢轮廓的差异。选择变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP) ≥ 1 、 $P < 0.05$ 以及差异变化倍数(fold change, FC) > 1.2 的变量作为潜在差异代谢物,通过 METLIN (<https://metlin.scripps.edu>)、HMDB (<http://www.hmdb.ca/metabolites>)、PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 MetaboLights (<https://www.ebi.ac.uk/metabolights/>) 等在线数据库进行差异代谢物的鉴定。通过绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)和聚类热图,进一步明确两者联合用药对代谢标志物的调节作用。

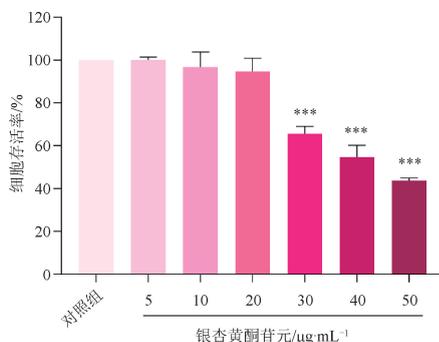
最后运用 MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 和 KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) 在线平台对差异代谢物进行代谢通路富集和关联,阐明 GA 联合 DOX 抗肝癌的作用机制。

3 结果

3.1 细胞活力的检测

3.1.1 GA 对 H22 细胞存活率的影响

不同浓度 GA 药液对 H22 肝癌细胞存活率的影响见图 1。与对照组相比,小于 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GA 药液对细胞活性基本无影响;随着 GA 给药质量浓度增加至 $30\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,细胞存活率显著降低($P < 0.001$),并在 $40\sim 50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞存活率降低至约 50%,因此后续实验使用 GA 药液 $30、40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 考察联合给药对 H22 细胞的影响。



与对照组相比 * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (图 2 同)。

图 1 不同浓度银杏黄酮苷元(GA)对 H22 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of ginkgo flavone aglycone (GA) with different concentrations on cell viability of H22 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.1.2 DOX 对 H22 细胞存活率的影响

不同浓度的 DOX 药液对 H22 细胞存活率的影响见图 2。与对照组相比,当 DOX 的浓度大于 $0.2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞活力随 DOX 浓度的增加而显著降低,在 $2\sim 5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 细胞存活率降低至约 50%,因此后续实验使用 DOX $0.5、1、2、5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 GA 联用考察对 H22 细胞的抑制作用。

3.1.3 GA 联合 DOX 对 H22 细胞存活率的影响

GA 联合 DOX 对 H22 细胞存活率的影响见表 1。当不同质量浓度 GA ($30、40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与 DOX ($0.5、1、2、5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 联用时, H22 细胞存活率均小于 50%,表明两者联用对 H22 肝癌细胞的生长具有明显抑制作用。且两者联用的 CI 均小于 1,表明二者

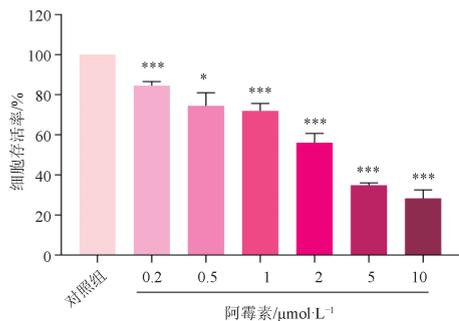


图2 不同浓度阿霉素 (DOX) 对 H22 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of doxorubicin (DOX) with different concentrations on cell viability of H22 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

以该比例联合用药时,具有协同抗肿瘤作用。为保证后续代谢组学研究的顺利进行,选择 $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GA 与 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX 作为给药浓度。

表1 H22 细胞存活率和组合指数 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 The survival rate and combination index of H22 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

GA/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	DOX/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%	CI
30	0.5	30.26±1.98	0.808
	1	24.13±1.08	0.792
	2	17.17±5.01	0.756
	5	2.10±0.75	0.498
40	0.5	18.55±2.40	0.935
	1	10.77±3.10	0.853
	2	3.37±0.75	0.996
	5	2.15±0.91	0.664

注:GA. 银杏黄酮苷元;DOX. 阿霉素;CI. 组合指数。

3.2 代谢组学方法学考察

3.2.1 仪器精密度考察 进样前选取一个 QC 样本连续分析 6 次,用以评价仪器精密度。Hotelling's T² 检验通过定义 95% 和 99% 置信区间,用于对多元变量建模的样本进行评估。结果表明所有 QC 样本均在 95% 置信区间内,说明仪器具有良好的重复性,见图 3。

3.2.2 方法精密度考察 平行配制 6 个 QC 样本分别进样分析,用以评价方法精密度。将 Spearman 相关分析用于描述 2 个 QC 样本间的相关性,结果表明 QC 样本间的相关系数都在 0.9 以上,说明实验重复性较好,见图 4。

3.2.3 数据质量评估 进样期间每 5 个样品后随

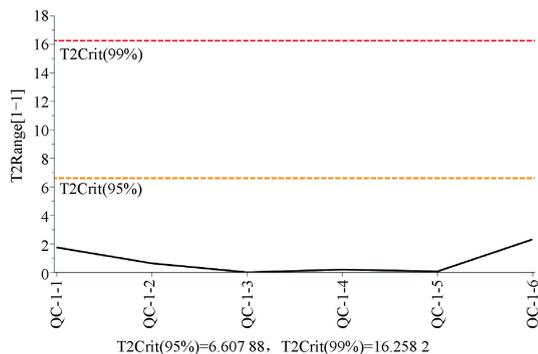


图3 QC 样本的 Hotelling's T² plot 检验 (n=6)

Fig. 3 Hotelling's T² plot examination of QC samples (n=6)

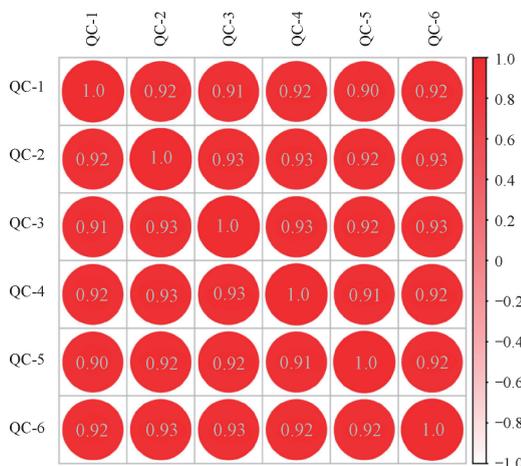


图4 QC 样本相关性分析热图 (n=6)

Fig. 4 Heatmap of correlation analysis of quality control (QC) samples (n=6)

行 1 个 QC 样本,用以监测数据质量可靠性。QC 样品的总离子流 (total ion current, TIC) 图基本重叠,说明分析体系相对稳定,仪器状态维持良好,见图 5。同时对 QC 样本做 PCA, QC 样本紧密聚集,说明实验重复性好,见图 6。

3.3 代谢轮廓分析

原始数据经预处理后,共得到 4 119 个化合物信息。样本 PCA 结果见图 6。结果显示,对照组、DOX 组、GA 组和 GDOX 组均能明显分开,且各实验组组内样本均能较好地聚集,说明药物治疗能显著改变细胞内的代谢物,相较于 DOX 组和 GA 组, GDOX 组与对照组的距离最远,说明联合给药对代谢物变化的影响最大,抗肿瘤作用明显。PLS-DA 结果见图 7,结果显示各实验组在所建立的数据模

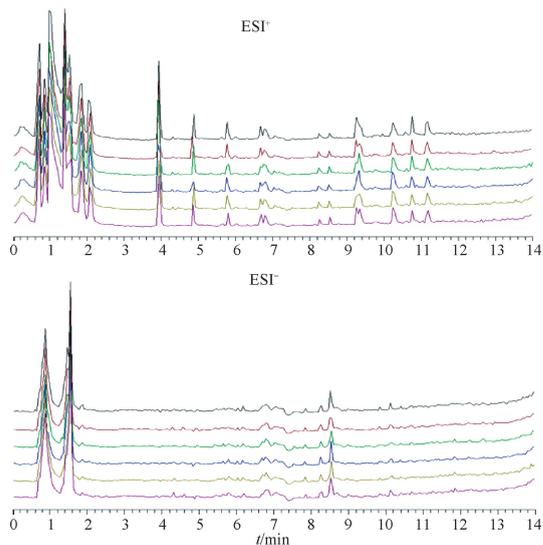
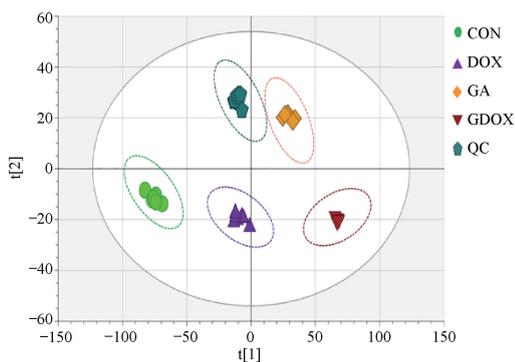


图 5 QC 样本总离子流(TIC)图 (n=6)

Fig. 5 Total ion current (TIC) chromatograms of quality control (QC) samples (n=6)

型中表现出良好的拟合度和预测能力 ($R^2 = 0.993$,

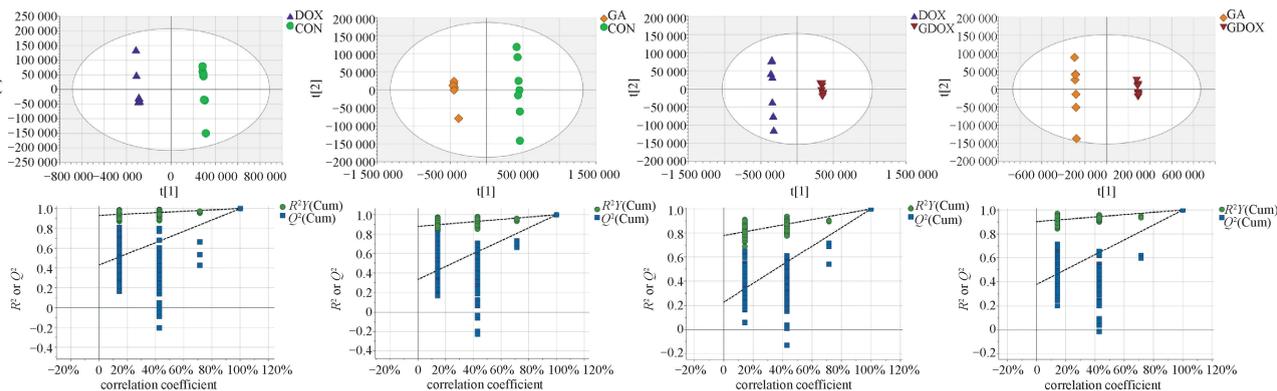


CON. 对照组; DOX. 阿霉素组; GA. 银杏黄酮苷元组; GDOX. 阿霉素联合银杏黄酮苷元组; QC. 质控样本(图 7、8、10、表 2 同)。

图 6 各实验组样本 PCA 得分图

Fig. 6 PCA score plot of samples in each experimental group

$Q^2 = 0.991$)。为了进一步确认模型的可靠性,进行了排列实验的验证,结果显示 R^2 和 Q^2 均大于 0.9,说明所建模型未出现过拟合现象,具有良好的预测能力和可靠性。



图中上侧分别代表 2 组相比的 PLS-DA 得分图;下侧为相应的 PLS-DA 模型置换检验。

图 7 各实验组样本 PLS-DA 得分图及验证

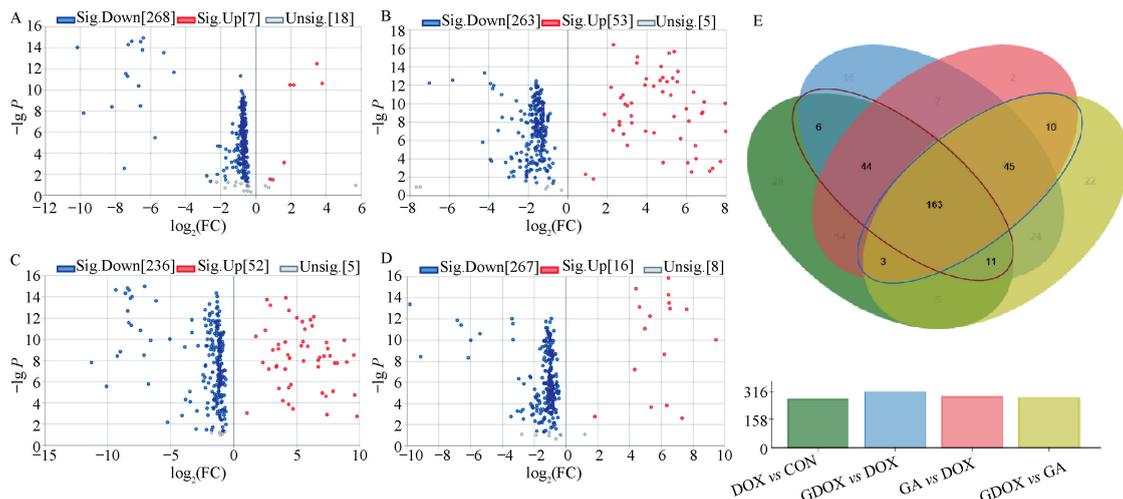
Fig. 7 PLS-DA score plot and verification of samples in each experimental group

3.4 差异代谢物的筛选和鉴定

经过验证的 PLS-DA 模型具有良好的解释和预测能力,被用于后续差异代谢物的确定。首先以 $VIP \geq 1$ 筛选出在分组贡献中较为重要的变量,再进而以 $FC > 1.2, P < 0.05$ 筛选用于后续鉴定的差异代谢物。GDOX 组在 DOX 和 GA 治疗的基础上被改变代谢物的筛选过程见图 8。结果显示, GDOX 组中有 224 个代谢物是在 DOX 治疗基础上被进一步调控, 221 个代谢物是在 GA 治疗基础上被进一步调

控,两者取并集后发现 163 个代谢物能够同时被 DOX 和 GA 调控, GDOX 治疗后进而增强了调控作用,这提示 GDOX 治疗能够综合 GA 和 DOX 治疗的优势,进一步调节这些代谢物在肝癌中的水平。

上述筛选得到的差异代谢物通过 METLIN、HMDB、PubChem 以及 MetaboLights 等在线数据库进行分析鉴别,最终共鉴定出 23 个内源性代谢标志物,见表 2。与对照组相比, DOX 和 GA 治疗后 23 个代谢标志物在肝细胞癌中的水平显著下调



火山图中的代谢物以散点表示,红色代表上调,蓝色代表下调。A、B分别为DOX组 vs CON组和GDOX组 vs DOX组筛选出的代谢物;C、D分别为GA组 vs CON组和GDOX组 vs GA组筛选出的代谢物。E中红色方框中的代谢物为GDOX组在DOX治疗基础上进一步调节的代谢物;蓝色方框为GDOX组在GA治疗基础上进一步调节的代谢物,其中有163个代谢物由DOX和GA共同调控。

图8 差异代谢物的筛选

Fig. 8 Screening of differential metabolites

($FC < 1$);相较于DOX和GA治疗,GDOX联合用药又进一步下调了它们的水平($FC < 1$),这可能是GDOX起到增效作用的原因。

3.5 代谢标志物分析

ROC一般用于判断代谢物是否具有诊断相关疾病的能力,本研究采用ROC曲线分别反映23个代谢标志物在DOX及GA治疗肝癌过程中的重要性,从而说明GA和DOX联合用药对这些代谢标志物的调节作用。以参考线作为DOX及GA治疗是否能显著调节代谢标志物的分界线,所有代谢物的曲线均具有较大的敏感度和较小的误报率(1-特异性),且曲线下面积均大于0.7,说明DOX及GA治疗对这些代谢标志物具有显著调节作用,见图9。在此基础上,两者联合通过进一步影响代谢标志物的变化,进而起到“增效”作用。

代谢标志物的聚类热图分析可以更直观地表征不同实验组之间的差异,这些代谢标志物能够显著区分不同实验组,相较于对照组,各治疗组均显著下调了代谢标志物的表达,其中以GDOX组的下调变化最大,说明两者的联合进一步增强了对肝癌的治疗作用,见图10。

3.6 代谢通路分析

通过MetaboAnalyst进行代谢通路分析,将 $\text{impact} \geq 0.01$ 、 $P < 0.05$ 作为筛选条件,最终获得5046

条潜在的关键通路,见表3、图11。代谢通路主要以氨基酸代谢为主,分别涉及谷胱甘肽代谢,苯丙氨酸代谢,精氨酸和脯氨酸代谢,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解, β -丙氨酸代谢。同时结合KEGG数据库和MetaboAnalyst构建代谢通路网络,对重要信号通路进行关联分析,见图12,整体上解释GA联合DOX增强肿瘤治疗效果的可能作用机制。

4 讨论

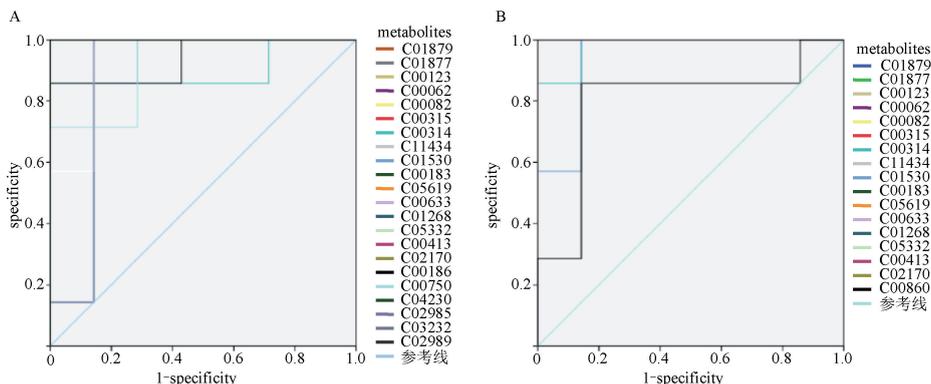
代谢组学通过测定某一时期机体内源性代谢物的水平,对探究代谢物与生理病理变化之间的相互关系,以及药物治疗机制具有一定的指导意义^[18]。细胞作为生物体结构和功能的基本单位,直接反映细胞生命活动的生物标志物信息,被广泛运用于疾病作用机制和药理学研究等领域^[19]。对细胞内源性代谢物的检测和鉴定可以精准揭示细胞内的代谢途径和过程,为研究疾病的发病机制、预防和治疗提供新思路。相比于其他生物样本,细胞受外界因素影响较少,实验变化易于控制,实验重复性高,成本较低,结果更易解释,其代谢组学研究已被应用于多种疾病的机制研究中^[20-21]。当前代谢组学常用的分析手段有核磁(nuclear magnetic resonance, NMR)、液质联用(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS)、气质联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)和毛细管电泳

表 2 基于 UPLC-MS 的潜在代谢标志物的鉴定

Table 2 Identification of potential metabolic markers based on UPLC-MS

No.	化合物	KEGG 编号	分子式	t_R /min	相对分子质量	离子模式	FC			
							DOX <i>vs</i> CON	GDOX <i>vs</i> DOX	GA <i>vs</i> CON	GDOX <i>vs</i> GA
1 ¹⁾	pyroglutamic acid	C01879	C ₅ H ₇ NO ₃	1.66	129.042 59	[M+H] ⁺ 、 [M-H] ⁻	0.59	0.39	0.32	0.70
2 ¹⁾	4-oxoproline	C01877	C ₅ H ₇ NO ₃	1.61	129.041 31	[M+H] ⁺ 、 [M-H] ⁻	0.63	0.41	0.41	0.63
3 ¹⁾	L-leucine	C00123	C ₆ H ₁₃ NO ₂	1.85	131.094 08	[M+H] ⁺ 、 [M-H] ⁻	0.65	0.45	0.62	0.47
4 ¹⁾	L-arginine	C00062	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	0.85	174.111 70	[M+H] ⁺	0.59	0.45	0.55	0.49
5 ¹⁾	L-tyrosine	C00082	C ₉ H ₁₁ NO ₃	1.82	181.073 81	[M-H] ⁻	0.60	0.50	0.45	0.65
6 ¹⁾	spermidine	C00315	C ₇ H ₁₉ N ₃	0.72	145.157 35	[M+H] ⁺	0.57	0.26	0.32	0.47
7 ¹⁾	pyridoxine	C00314	C ₈ H ₁₁ NO ₃	1.52	169.073 78	[M+H] ⁺	0.61	0.60	0.60	0.61
8 ¹⁾	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate	C11434	C ₅ H ₁₃ O ₇ P	1.05	216.039 41	[M-H] ⁻	0.60	0.42	0.47	0.54
9 ¹⁾	stearic acid	C01530	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	10.39	284.270 98	[M+NH ₄] ⁺	0.68	0.36	0.47	0.52
10 ¹⁾	L-valine	C00183	C ₅ H ₁₁ NO ₂	1.07	117.079 14	[M+H] ⁺	0.57	0.37	0.48	0.44
11 ¹⁾	5-hydroxyferulic acid	C05619	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	6.13	210.052 23	[M-H] ⁻	0.66	0.37	0.49	0.49
12 ¹⁾	4-hydroxybenzaldehyde	C00633	C ₇ H ₆ O ₂	1.94	122.036 92	[M+H] ⁺	0.57	0.50	0.43	0.66
13 ¹⁾	5-amino-6-(5'-phosphoribosylamino)uracil	C01268	C ₉ H ₁₅ N ₄ O ₉ P	7.43	354.056 19	[M+H] ⁺	0.63	0.46	0.55	0.53
14 ¹⁾	phenethylamine	C05332	C ₈ H ₁₁ N	5.20	121.089 41	[M+H] ⁺	0.63	0.39	0.51	0.48
15 ¹⁾	streptomycin	C00413	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂	0.81	581.265 17	[M+H] ⁺	0.68	0.32	0.41	0.53
16 ¹⁾	methylnmalonic acid	C02170	C ₄ H ₆ O ₄	1.80	118.025 42	[M+H] ⁺	0.60	0.47	0.43	0.66
17 ²⁾	L-lactate	C00186	C ₃ H ₆ O ₃	1.50	90.030 36	[M-H] ⁻	0.67	0.28	-	-
18 ²⁾	spermine	C00750	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	0.76	202.215 77	[M+H] ⁺	0.60	0.23	-	-
19 ²⁾	LysoPC(16:0/0;0)	C04230	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	11.83	495.332 36	[M+H] ⁺	0.61	0.48	-	-
20 ²⁾	l-fucose 1-phosphate	C02985	C ₆ H ₁₃ O ₈ P	0.96	244.034 59	[M-H] ⁻	0.56	0.10	-	-
21 ²⁾	3-phosphonoxyppyrivate	C03232	C ₃ H ₅ O ₇ P	13.33	183.978 20	[M+H] ⁺	0.61	0.37	-	-
22 ²⁾	L-methionine S-oxide	C02989	C ₅ H ₁₁ NO ₃ S	1.57	165.045 89	[M+H-2H ₂ O] ⁺	0.62	0.34	-	-
23 ³⁾	L-histidinol	C00860	C ₆ H ₁₁ N ₃ O	13.79	141.090 34	[M+H-H ₂ O] ⁺	-	0.56	0.39	-

注: ¹⁾ DOX 和 GA 共同调控的代谢物; ²⁾ DOX 单独调控的代谢物; ³⁾ GA 单独调控的代谢物。



A. 阿霉素调节代谢标志物的 ROC 曲线图; B. 银杏黄酮苷元调节代谢标志物的 ROC 曲线图。

图 9 代谢标志物的 ROC 曲线分析

Fig. 9 ROC curve analysis of metabolic markers

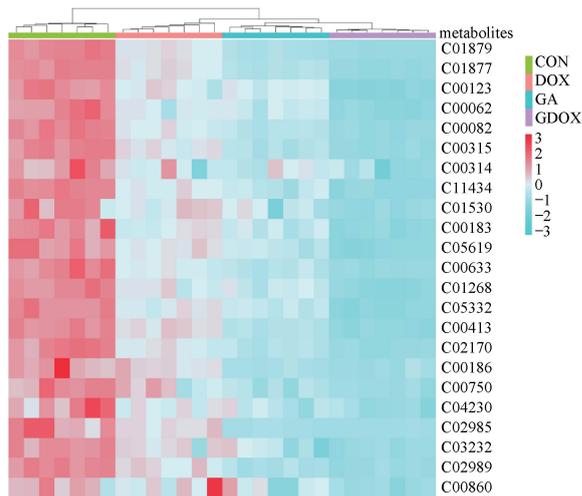


图 10 代谢标志物的聚类热图

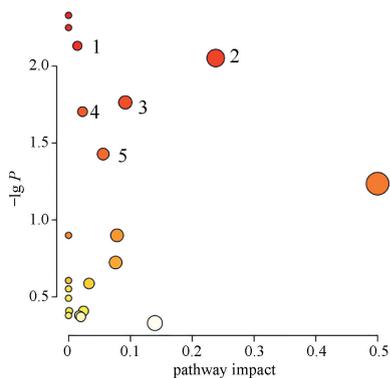
Fig. 10 Cluster heatmap of metabolic markers

表 3 代谢通路信息

Table 3 Information of the metabolic pathways

No.	通路	total metabolites	Hits	P	pathway impact
1	谷胱甘肽代谢	28	3	0.007 3	0.014 3
2	苯丙氨酸代谢	10	2	0.008 8	0.238 1
3	精氨酸和脯氨酸代谢	38	3	0.017 2	0.091 8
4	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	40	3	0.019 7	0.022 6
5	β -丙氨酸代谢	21	2	0.037 3	0.056 0

注:total metabolites 表示该代谢通路中总的代谢物数量;Hits 代表实验中代谢标志物匹配到该通路的数目;P 表示显著性水平;pathway impact 代表通路在生物代谢网络中的重要性。



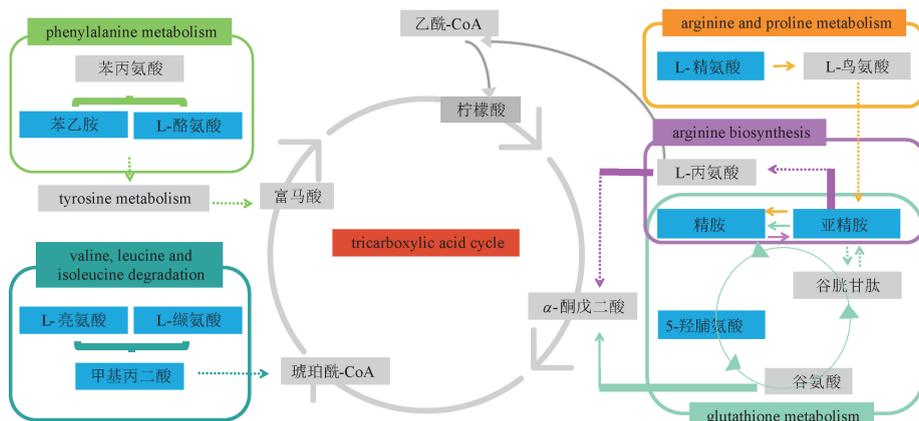
图中数字分别对应表 3 中各信号通路序号。

图 11 信号通路分析

Fig. 11 Analysis of signaling pathways

(capillary electrophoresis, CE)等^[22]。其中基于 LC-MS 的代谢组学因样品前处理简单、代谢物数据库信息全面而被广泛应用^[20],尤其是 UHPLC QE Orbitrap-MS/MS 平台将高性能四极杆前体选择与高分辨率、精确质量 Orbitrap 检测相结合,具有灵敏度高、选择性强,并且在正、负离子同时扫描下还能保持优异的质量数准确度和稳定的响应值等优势,成为代谢组学研究的强大技术手段^[23-25]。

LC-MS 测定时,为了得到更全面的代谢轮廓信息,可选用不同类型的色谱柱相互补充(如 C₁₈ 反相柱和 HILIC 亲水柱)^[22]。由于本课题重点考察与抗肿瘤作用和能量代谢相关的糖类和氨基酸类物质,属于极性较大物质,因此选用亲水柱。前期预实验



代谢物信息用蓝色和灰色的方框表示,其中蓝色方框代表实验中鉴定到的代谢标志物,灰色方框代表与代谢标志物有间接关联的通路或代谢物;代谢标志物富集的重要通路以不同颜色的方框表示,每条通路对应一种颜色。

图 12 重要信号通路关联分析

Fig. 12 Correlation analysis of key signaling pathways

中,对比考察了 T3 和 HILIC 亲水柱,结果表明同样洗脱条件下的 T3 柱较 HILIC 柱具有更好的代谢轮廓,而不影响代谢物的种类和数量,因此本实验最终选用 T3 柱进行分析。

细胞代谢组学研究中,样品归一化处理是不容忽视的问题。代谢组学最终是通过比较多组间各代谢物的浓度差异,找出与疾病发生和治疗相关的关键代谢物来解释作用机制,然而由于细胞密度和处理条件的变化使得细胞增殖不同,难以确保在同一水平上进行代谢物浓度的比较,因此需要进行归一化处理^[26-27],其中细胞数量归一化被认为是最合适的方法^[27],也被应用于本实验中。如若不归一化处理很可能导致结果发生偏离。

实验结果表明,联合用药显著下调了部分代谢物在 H22 肝癌细胞中的水平,主要影响了氨基酸类代谢。除了作为蛋白质合成底物外,氨基酸是肿瘤代谢重编程的重要能量来源,而且也是连接糖、脂质以及核苷酸的中间物质^[22,28]。酪氨酸是一种非必需氨基酸,可通过苯丙氨酸转化而成^[29],它既是构成生物体的基本物质,也是合成生命体众多神经递质和重要化合物的前体物质,研究发现癌症患者中普遍存在酪氨酸代谢紊乱^[30]。肝脏是酪氨酸的主要代谢场所,肝癌患者的肝脏严重病变,酪氨酸代谢受到影响,其含量显著升高^[31-33]。本研究发现,相比于对照组,DOX 给药治疗后,L-酪氨酸的含量显著下降,而联合用药后又进一步下调了这种趋势,表明联合用药可能通过影响苯丙氨酸和酪氨酸的代谢起到治疗作用。亮氨酸和缬氨酸是人体必需的支链氨基酸(branched chain amino acids, BCAA),其代谢重编程的重要性在许多癌症中都得到了证实^[34],一方面 BCAA 可以分解成谷氨酸参与肿瘤细胞的增殖^[35];另一方面还可以代谢为三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环的中间产物(如乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A)为肿瘤细胞的生长提供能量,同时激活 mTOR 信号通路促进肿瘤发展^[34]。通路富集分析发现了 BCAA 的下游代谢物甲基丙二酸,它可以在以维生素 B12 作为辅助因子的反应中被转化为琥珀酰辅酶 A,为 TCA 循环提供燃料^[36]。包括 HCC 在内的肿瘤中发现 BCAA 和甲基丙二酸的水平均有不同程度升高^[36-37],这符合实验中药物治疗后下调的结果。精氨酸是一种多功能的半必需氨基酸,对于维持肿瘤细胞的增殖有重要意义,其在体内的生

成主要依赖于精氨酸琥珀酸合成酶(argininosuccinate synthase, ASS1)、精氨酸琥珀酸裂解酶(argininosuccinatelyase, ASL)和鸟氨酸转羧甲酰酶(ornithine transcarbamylase, OTC)^[22,38]。研究指出包括 HCC 在内的多种实体瘤中,由于 ASS1、ASL 和 OTC 表达的缺乏,表现出外源精氨酸依赖性(即从血液中获得精氨酸)^[38-39],因此促进体内精氨酸的降解成为癌症治疗的一个方向^[40]。目前,除了针对精氨酸脱亚氨基酶(arginine deiminase, ADI)开发出的 ADI-聚乙二醇 20 和重组人精氨酸酶 I 已被用于部分癌症的治疗外^[41],精氨酸最终分解为精胺也可能是一个新的治疗策略^[42],多胺包括精胺和亚精胺,它们在体内可以相互转化,共同调控肿瘤细胞的生长转移^[40,43],研究发现肝癌模型小鼠中多胺浓度显著升高^[42-44],这与药物治疗后,精氨酸和脯氨酸代谢通路上相应代谢物的变化一致。焦谷氨酸是谷氨酸的环状内酰胺,其水平升高可能与谷胱甘肽(GSH)的代谢有关。作为 GSH 的合成底物,已经观察到 HCC 模型小鼠中焦谷氨酸的含量显著增加^[45],继而导致高水平 GSH 下的肿瘤进展^[46]。本次实验结果中,GA 联合 DOX 可显著下调肝癌细胞中的焦谷氨酸,推测这可能影响 GSH 代谢,进而提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,从而发挥协同作用。此外,研究还指出肿瘤发展中观察到溶血磷脂 LysoPC(16:0/0:0)^[47]、L-缬氨酸^[48]、L-乳酸^[49]和 3-磷酸羟基丙酮酸^[50]的显著升高,而实验结果中,联合给药均显著降低了这些代谢物的水平。为了探索标志代谢物以及代谢通路间的联系,继续利用 KEGG 数据库构建关联图,结果表明 5 条富集通路均与 TCA 循环有联系。TCA 循环是线粒体中糖、脂质和氨基酸代谢的核心途径^[51],而肝癌细胞具有更高的 TCA 循环活性,以满足细胞生长增殖需求^[52]。TCA 循环效率与众多中间产物有关,实验中鉴定到的标志代谢物可作为这些中间产物的前体物质,通过影响中间产物的生成,进而影响肿瘤细胞的能量供应链。

综上,本研究从代谢组学角度证明 GA 联合 DOX 可显著抑制 H22 细胞活力,发挥协同抗肿瘤作用,其作用机制可能与通过干预多种氨基酸的代谢,从而影响肿瘤细胞的能量供应有关。

[参考文献]

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer

- Statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209.
- [2] KIM D W, TALATI C, KIM R. Hepatocellular carcinoma (HCC): beyond sorafenib-chemotherapy [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2017, 8(2): 256.
- [3] LU Y, WANG Y L, HE Y, et al. Aidi Injection altered the activity of CYP2D4, CYP1A2, CYP2C19, CYP3A2, CYP2E1 and CYP2C11 in normal and diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 286: 114930.
- [4] 周玟, 周元, 程晔, 等. 基于网络药理学探讨葛根治疗肝癌的分子机制 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(17): 4089.
- [5] PISKA K, KOCZURKIEWICZ P, BUCKI A, et al. Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines-role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents [J]. *Invest New Drugs*, 2017, 35(3): 375.
- [6] 李龙飞, 马增春, 王宇光, 等. 人参皂苷 Rb₁ 减轻阿霉素诱导心肌细胞自噬的保护作用 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(7): 1365.
- [7] VAN HASSELT J G C, IYENGAR R. Systems pharmacology: defining the interactions of drug combinations [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2019, 59: 21.
- [8] 石金凤, 罗尧尧, 李佳鑫, 等. 雷公藤甲素单用及联合用药抗肿瘤的作用及机制研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(16): 3391.
- [9] 张立虎, 吴婷婷, 赵林果, 等. 银杏叶提取物中黄酮类化合物抗肿瘤活性研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2019, 54(6): 444.
- [10] 杨慧萍, 高睿. 银杏药用成分及药理作用研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2017, 38(8): 96.
- [11] REYES F M, CARRASCO P C. The anti-cancer effect of quercetin: molecular implications in cancer metabolism [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3177.
- [12] FERNANDEZ P P, FONDEVILA F, MENDEZ-BLANCO C, et al. Antitumor effects of quercetin in hepatocarcinoma *in vitro* and *in vivo* models; a systematic review [J]. *Nutrients*, 2019, 11(12): 2875.
- [13] HAN B, YU Y Q, YANG Q L, et al. Kaempferol induces autophagic cell death of hepatocellular carcinoma cells via activating AMPK signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49): 86227.
- [14] BABY J, DEVAN A R, KUMAR A R, et al. Cogent role of flavonoids as key orchestrators of chemoprevention of hepatocellular carcinoma: a review [J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(7): e13761.
- [15] 赵方舒, 侯林, 杨颖, 等. 异鼠李素抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. *中国药房*, 2021, 32(24): 3054.
- [16] 蒋晨春, 向义, 钟勇. 异鼠李素对人肝癌 HepG-2 细胞增殖与凋亡影响的实验研究 [J]. *西南军医*, 2012, 14(3): 432.
- [17] 王士群, 朱宇珍, 郑学宝. Chou-Talalay 在抗肿瘤联合用药中的研究应用概况 [J]. *中国现代应用药学*, 2013, 30(4): 449.
- [18] STEFFENS D C, WEI J, KRISHNAN K R, et al. Metabolomic differences in heart failure patients with and without major depression [J]. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 2010, 23(2): 138.
- [19] 李维薇, 杨燕, 汪受传, 等. 细胞代谢组学研究进展 [J]. *南京中医药大学学报*, 2017, 33(2): 187.
- [20] ZHANG A, SUN H, XU H, et al. Cell metabolomics [J]. *Omics*, 2013, 17(10): 495.
- [21] 满瑾, 韩培, 高孜博, 等. 运用细胞代谢组学策略探究蒲公英提取物的抗肿瘤作用机制 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2021, 56(5): 603.
- [22] HAYTON S, MAKER G L, MULLANEY I, et al. Experimental design and reporting standards for metabolomics studies of mammalian cell lines [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(24): 4421.
- [23] SEGERS K, DECLERCK S, MANGELINGS D, et al. Analytical techniques for metabolomic studies; a review [J]. *Bioanalysis*, 2019, 11(24): 2297.
- [24] XIAO J F, ZHOU B, RESSOM H W. Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics [J]. *Trends Analyt Chem*, 2012, 32: 1.
- [25] XU Y, LIANG P L, CHEN X L, et al. The impact of citrus-tea cofermentation process on chemical composition and contents of pu-erh tea: an integrated metabolomics study [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 737539.
- [26] GARCIA-CANAVERAS J C, LOPEZ S, CASTELL J V, et al. Extending metabolome coverage for untargeted metabolite profiling of adherent cultured hepatic cells [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(4): 1217.
- [27] CAO B, AA J, WANG G, et al. GC-TOFMS analysis of metabolites in adherent MDCK cells and a novel strategy for identifying intracellular metabolic markers for use as cell amount indicators in data normalization [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(9): 2983.
- [28] 胡桂慧, 许盼盼, 侯丽娟, 等. 细胞代谢轮廓分析策略研究姜黄素抗肿瘤作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(11): 2359.
- [29] 赵孟甲, 毛优翔, 徐畅, 等. 肿瘤代谢研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(7): 1236.
- [30] WIGGINS T, KUMAR S, MARKAR S R, et al. Tyrosine, phenylalanine, and tryptophan in gastroesophageal malignancy: a systematic review [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2015, 24(1): 32.
- [31] 郭岚, 孙玄, 鄢爱平, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定大鼠尿液中五种可能的癌症标志物 [J]. *分析科学学报*, 2015, 31(5): 611.
- [32] 温晓静. 血浆氨基酸变化对肝癌患者的影响 [J]. *临床合理用药杂志*, 2014, 7(13): 126.

- [33] 蔺晓娟,黄平,陈进,等. 反相高效液相色谱法同时测定肝癌相关酪氨酸、缬氨酸对映体[J]. 重庆医科大学学报,2014,39(12):1718.
- [34] LIANG K H, CHENG M L, LO C J, et al. Plasma phenylalanine and glutamine concentrations correlate with subsequent hepatocellular carcinoma occurrence in liver cirrhosis patients: an exploratory study[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 10926.
- [35] PENG H, WANG Y, LUO W. Multifaceted role of branched-chain amino acid metabolism in cancer[J]. *Oncogene*, 2020, 39(44): 6747.
- [36] CLUNTUN A A, LUKEY M J, CERIONE R A, et al. Glutamine metabolism in cancer: understanding the heterogeneity [J]. *Trends Cancer*, 2017, 3(3): 169.
- [37] GOMES A P, ILTER D, LOW V, et al. Age-induced accumulation of methylmalonic acid promotes tumour progression [J]. *Nature*, 2020, 585(7824): 283.
- [38] ERICKSEN R E, LIM S L, MCDONNELL E, et al. Loss of BCAA catabolism during carcinogenesis enhances mTORC1 activity and promotes tumor development and progression [J]. *Cell Metab*, 2019, 29(5): 1151.
- [39] CHOW A K, YAU S W, NG L. Novel molecular targets in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Clin Oncol*, 2020, 11(8): 589.
- [40] WANG C, RUAN P, ZHAO Y, et al. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase regulates cell growth and metastasis via AKT/ β -catenin signaling pathways in hepatocellular and colorectal carcinoma cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 1092.
- [41] NI Y, SCHWANEBERG U, SUN Z H. Arginine deiminase, a potential anti-tumor drug [J]. *Cancer Lett*, 2008, 261(1): 1.
- [42] HUDSON E A, HOWELLS L M, GALLACHER-HORLEY B, et al. Growth-inhibitory effects of the chemopreventive agent indole-3-carbinol are increased in combination with the polyamine putrescine in the SW480 colon tumour cell line [J]. *BMC Cancer*, 2003, 3:2.
- [43] 边照朝. 精氨酸饥饿导致肝癌细胞系统性功能紊乱的分子机制研究[D]. 武汉:武汉大学,2017.
- [44] 侯九洲. 亚精胺对巨噬细胞极化的影响及其调控肝癌转移研究[D]. 开封:河南大学,2019.
- [45] KUBO S, TAMORI A, NISHIGUCHI S, et al. Relationship of polyamine metabolism to degree of malignancy of human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 1998, 5(6): 1385.
- [46] FAN T, RONG Z, DONG J, et al. Metabolomic and transcriptomic profiling of hepatocellular carcinomas in Hras12V transgenic mice [J]. *Cancer Med*, 2017, 6(10): 2370.
- [47] LV H, ZHEN C, LIU J, et al. Unraveling the potential role of glutathione in multiple forms of cell death in cancer therapy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 3150145.
- [48] RESSOM H W, XIAO J F, TULI L, et al. Utilization of metabolomics to identify serum biomarkers for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 743: 90.
- [49] GONG Z G, ZHAO W, ZHANG J, et al. Metabolomics and eicosanoid analysis identified serum biomarkers for distinguishing hepatocellular carcinoma from hepatitis B virus-related cirrhosis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(38): 63890.
- [50] 张慧芳,曾志军,周艳宏. 乳酸代谢:肿瘤治疗新靶点 [J]. *生物化学与生物物理进展*,2021,48(2): 147.
- [51] ZHANG Y, YU H, ZHANG J, et al. Cul4A-DDB1-mediated monoubiquitination of phosphoglycerate dehydrogenase promotes colorectal cancer metastasis via increased S-adenosylmethionine [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(21): e146187.
- [52] RAIMUNDO N, BAYSAL B E, SHADEL G S. Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation [J]. *Trends Mol Med*, 2011, 17(11): 641.

[责任编辑 马超一]