

知母皂苷 A III 调控代谢抗脑胶质瘤生长的机制研究

常青祺¹, 陈龙², 廖雅芳¹, 袁春露¹, 章丹丹^{1*}

(1. 上海中医药大学 交叉科学研究院, 上海 201203;

2. 上海中医药大学 科技实验中心, 上海 201203)

[摘要] 该研究利用非靶向代谢组学技术考察知母皂苷 A III (timosaponin A III, TIA) 干预脑胶质瘤原位荷瘤小鼠血清中的代谢物变化, 探究脑胶质瘤颅内生长及 TIA 干预的代谢相关机制。小鼠随机分为空白组、脑胶质瘤原位荷瘤模型组及 TIA 组。HPLC-LTQ-Orbitrap Elite 液质联用检测以上 3 组小鼠处理 4 周后各组小鼠血清中的代谢产物变化, 对检测到的代谢物进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 后, 根据变量重要性投影 (variable important in projection, VIP) 和 $P(P < 0.05)$ 遴选差异代谢物。结果显示, TIA 显著抑制脑胶质瘤的体内生长, 对体质量影响不大。血清样本组间可明显区分, 与空白组相比, 模型组中神经酰胺、琥珀酸、 α -酮戊二酸、柠檬酸、硫酸吲哚酚、3a, 6b, 7b-三羟基-5b-胆酸共 6 个差异代谢物的水平均降低。与模型组相比, TIA 组中 5 种差异代谢物, 除苯酚硫酸盐含量降低之外, PC[20:4(5Z, 7E, 11Z, 14Z)-OH(9)/DiMe(9, 3)]、邻棕榈酰肉碱、 α -酮戊二酸、柠檬酸的水平均显著提高。通过 MetaboAnalyst 进行通路分析, 以上差异代谢物富集于三羧酸循环, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢途径。结果表明, 脑胶质瘤在颅内生长过程中 α -酮戊二酸、柠檬酸等代谢物水平降低, TIA 通过调控三羧酸循环, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢途径, 提高 α -酮戊二酸、柠檬酸等代谢产物水平, 发挥抗脑胶质瘤颅内生长的作用。

[关键词] 知母皂苷 A III; 脑胶质瘤; 代谢组学; 三羧酸循环; 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢

Mechanism of timosaponin A III in regulation of metabolism against glioblastoma growth

CHANG Qing-qi¹, CHEN Long², LIAO Ya-fang¹, YUAN Chun-lu¹, ZHANG Dan-dan^{1*}

(1. *Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;* 2. *Experiment Center for Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China*)

[Abstract] Non-targeted metabolomics was used to investigate the metabolite changes in the glioblastoma orthotopic tumor-bearing mice after timosaponin A III (TIA) intervention to explore the metabolic relevant mechanism of glioblastoma and TIA intervention. The mice were randomly divided into a blank group, a model group, and a TIA group. HPLC-LTQ-Orbitrap Elite liquid chromatography-mass spectrometry was used to detect the metabolite changes in the serum of rats in the three groups after treatment for 4 weeks. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were performed on the metabolites, and the differential metabolites were selected based on VIP values and P values ($P < 0.05$). The results showed that TIA significantly inhibited the *in vivo* glioblastoma growth, but it had limited influence on body weight. Serum samples were clearly distinguishable among groups. As compared with the blank group, six metabolites including ceramide, succinic acid, α -ketoglutarate acid (α KG), citric acid, indophenol sulfate, and 3a, 6b, 7b-trihydroxy-5b-cholic acid in the model group significantly decreased. As compared with the model group, five metabolites except phenol sulfate, PC[20:4(5Z, 7E, 11Z, 14Z)-OH(9)/diMe(9, 3)], *o*-palmitoyl carnitine, α -ketoglutarate acid, and citric acid in the TIA group significantly increased. According to the MetaboAnalyst

[收稿日期] 2022-06-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773946, 81573673, 81001666)

[通信作者] * 章丹丹, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药干预肿瘤微环境的机制研究, E-mail: izhangdd@126.com

[作者简介] 常青祺, E-mail: 18286791286@163.com

enrichment analysis, the metabolic pathways were enriched in the tricarboxylic acid cycle, and alanine, aspartic acid, and glutamate metabolism. These results show that during the glioblastoma growth process, the metabolites including α KG and citric acid are down-regulated, and TIA exerts the anti-glioblastoma growth effect through the regulation of tricarboxylic acid cycle, and alanine, aspartic acid, and glutamate metabolism to elevate the levels of α KG, citric acid, and other metabolites.

[Key words] timosaponin A III; glioblastoma; metabolomics; tricarboxylic acid cycle; alanine, aspartic acid, and glutamate metabolism

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20220728.401

多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是最恶性的原发性脑肿瘤^[1]。现有治疗方法有手术切除联合放疗和化疗等,但新诊断患者存活不到15个月,而复发患者存活不到6个月^[2],预后极差。知母皂苷 A III (timosaponin A III) 是知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge 中发现的甾体皂苷,具有抗糖尿病、抗炎、抗血小板聚集和抗抑郁等多种活性^[3]。研究表明,知母皂苷 A III 对肺癌、乳腺癌、肝癌等多种肿瘤细胞都具有抗增殖活性^[4]。代谢组学是对生物体液、细胞和组织中代谢物的分析,其数据表征作为特定生物系统表型的反映,用于了解疾病关键进程中代谢全景的变化以及寻找疾病诊断或预后的生物标志物^[5]。本研究利用脑胶质瘤原位荷瘤小鼠模型考察知母皂苷 A III 的体内药效,并结合血清非靶向代谢组学探究相关分子机制。

1 材料

C57BL/6 雄性小鼠 15 只,5 周龄,体质量 20~22 g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。饲养于上海中医药大学实验动物中心,饲养许可证号 SCXK(沪)2017-0005。室温 20~26 ℃,相对湿度 40%~60%,光照周期 12 h,自由进水进食。本动物实验通过上海中医药大学动物伦理审核,伦理证号 PZSHUTCM18120717。

小鼠脑胶质瘤细胞系 GL261 购自广州吉妮欧生物科技有限公司。

知母皂苷 A III 购自上海同田生物科技有限公司,批号 21102221, HPLC 纯度 $\geq 98\%$; DMEM 培养基干粉、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司,批号分别为 2126362、1751588、2120822; 2-氯苯丙氨酸购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号 D1404053; 甲醇购自国药集团化学试剂有限公司,分析纯,批号 N20G1H。

HPLC-LTQ (美国 Thermo 公司,型号 Orbitrap Elite); CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司,型号 HEPA CLASS100); 脑定位仪(中国瑞沃德公司,型号 6680

E05230-003); 倒置显微镜(日本 Olympus 株式会社,型号 IX71); 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司,型号 5810R)。

2 方法

2.1 造模

小鼠适应性饲养 1 周后, GL261 细胞经胰酶消化后计数,按 1×10^6 个/只进行胶质瘤细胞在脑部的原位荷瘤。小鼠麻醉后固定头部,在头部皮肤的中线处开 2~3 cm 的小口; 使用骨针于前囟右侧 2 mm, 往上 1 mm 处(尾状核区) 打孔; 使用微量进样器, 吸取 10 μ L 的细胞悬液(即 1×10^6 个细胞), 使用脑定位仪进行垂直进针, 进针深度 3.5 mm, 退 0.5 mm; 进针后, 固定注射器, 每格注射 15 s, 共 100 格, 全部注射完成后留针 3 min, 缓慢轻柔拔出, 创口处滴 1~2 滴骨蜡, 缝合伤口。

2.2 分组与给药

15 只小鼠荷瘤后, 随机分为空白组、模型组和知母皂苷 A III 组, 每组 5 只。知母皂苷 A III 组给予知母皂苷 A III $7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (0.5% 羧甲基纤维素钠配制) 灌胃处理, 模型组和空白组均给予等体积溶酶对照, 每日 1 次, 连续 4 周。

2.3 样品采集和指标检测

2.3.1 小鼠取材 每天记录小鼠体质量, 给药 4 周后处死小鼠, 取脑部肿瘤; 小鼠摘眼球取血, 血液样本 4 ℃ 静置 1 h, 于 4 ℃, $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取血清-80 ℃ 保存备用。

2.3.2 血清非靶向代谢组学 血清样品前处理: 取 50 μ L 血清加入 200 μ L 甲醇, 后加入 5 μ L 的 2-氯苯丙氨酸($0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 振荡涡旋混匀, 4 ℃, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 并将离心好的样品取 200 μ L 装入液相进样小瓶内管内, 备用待测。

色谱条件: ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m); 流动相纯水(含 0.1% 甲酸, A)-乙腈(含 0.1% 甲酸, B), 梯度洗脱 (0~1 min, 95% A; 1~2 min, 95%~60% A; 2~7 min,

60%~20% A; 7~11 min, 20%~5% A; 11~15 min, 5% A; 15~15.5 min, 5%~95% A; 15.5~19.5 min, 95% A); 体积流量 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量 $4 \mu\text{L}$; 柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

质谱条件: 离子源喷雾电压在正、负离子模式下分别为 3.5 、 -3.2 kV ; 毛细管加热温度 $350 \text{ }^\circ\text{C}$, 鞘气、辅助气体积流量分别为 35 、 15 arb , 均为氮气, 尾气体积流量 1 arb ; 离子源雾化温度 $300 \text{ }^\circ\text{C}$ 。S-Lens 级别为 60 , 离子检测方式为全扫描, 分辨率 $60\ 000$, 二级采用 10 个峰的数据依赖分析模式 (data dependent acquisition, DDA) 进行检测, 分辨率 $15\ 000$, 碰撞能 50 V , 动态排除为 10 s 。

2.3.3 差异代谢物的鉴定 通过 CD 2.1 软件得到代谢物的精确质量数和二级谱图, 与 CD 自带的数据库以及自建数据库中的质量数与谱图进行对比, 对差异代谢物进行结构鉴定。

2.4 统计学处理

采用 Compound Discover 2.1 软件对所得的原始数据进行提取和预处理, 并使用 Excel 软件进行归一化, 最后整理成二维数据矩阵形式, 使用 SIMCA 13.0 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 并根据 OPLS-DA 模型所得的变量重要性投影 (variable important in projection, VIP) 和 t 检验所得的 $P(P < 0.05)$ 为标准, 遴选差异代谢物。采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

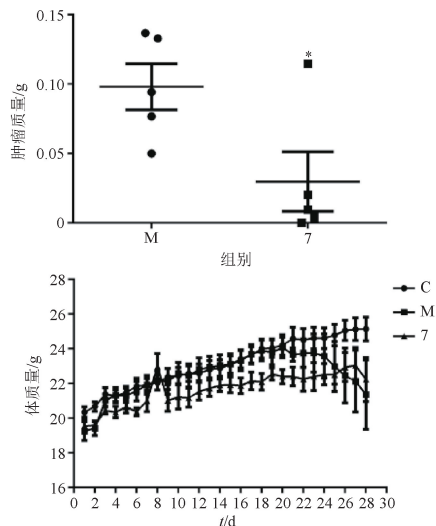
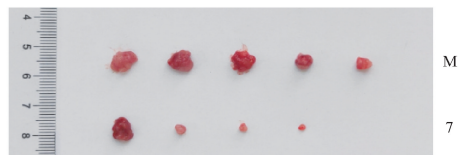
3 结果

3.1 知母皂苷 A III 抑制 GL261 脑胶质瘤原位荷瘤小鼠模型中的肿瘤生长

与模型组比较, 知母皂苷 A III 以 $7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃给药 4 周后, 给药组瘤重显著降低 ($P < 0.05$), 抑瘤率为 69.72% , 而小鼠体质量组间无明显差异 (图 1)。

3.2 各组小鼠血清中代谢物的检测和分析

3.2.1 PCA 正、负离子模式下的 PCA 得分图显示, 3 组血清样本有着明显区分, 差异较大, 且分布聚集在不同的象限中, 表明各组以及质控样品得到较完全分离; 在正离子模式下 3 组样本 R_x^2 分别为 0.737 、 0.700 , Q^2 分别为 0.324 、 0.326 ; 在负离子模



C. 空白组; M. 模型组; 7. 知母皂苷 A III $7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 (图 2~5、表 1 同)。

图 1 知母皂苷 A III 对脑胶质瘤原位荷瘤小鼠中肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

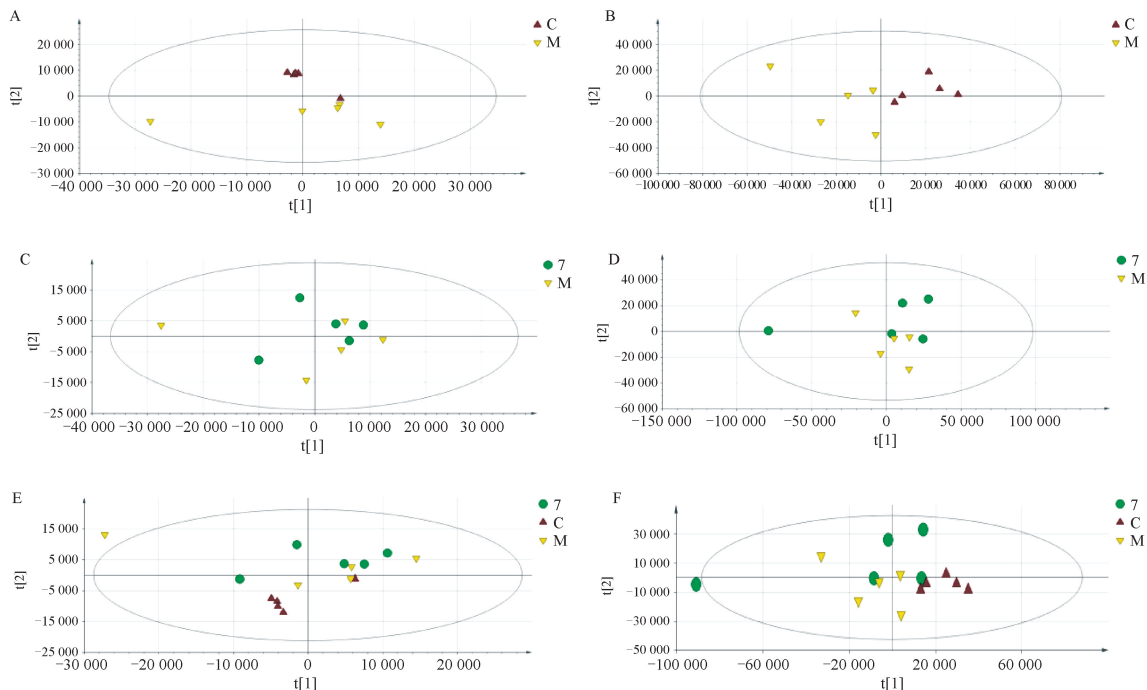
Fig. 1 Effect of timosaponin A III on intracranial growth of the glioblastoma orthotopic tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

式下 R_x^2 分别为 0.614 、 0.599 , Q^2 分别为 0.213 、 0.077 (图 2)。

3.2.2 OPLS-DA OPLS-DA 模型分析的结果显示, 3 组样品间区分明显, 表明该模型拟合度和预测能力较理想; 3 组样品在正离子模式下 R_x^2 分别为 0.683 、 0.644 , Q^2 分别为 0.106 、 0.805 ; 在负离子模式下 R_x^2 分别为 0.517 、 0.288 , Q^2 分别为 0.267 、 0.699 (图 3)。

3.2.3 置换检验 OPLS-DA 模型可以由置换检验图进行检验, 通过对样品的 Y 值进行多次交叉顺序验证, 从而获得随机模型的 R^2 和 Q^2 , 进一步确保模型无拟合风险, 说明该模型可靠, 可在此模型上寻找差异代谢物 (图 4)。

3.2.4 S-plot 分析 通过对 OPLS-DA 得到的 2 组间各个代谢物的协方差与可靠性绘制成 S-plot 图, 其离原点越偏离且分散在两端, 即处于“S”两端的代谢物, 具有较大的差异且重要性越高, 在 2 组间产生的影响越大, 可认为具有潜在的研究价值 (图 5)。



A、C、E 为负离子模式；B、D、F 为正离子模式(图 3~5 同)。

图 2 血清组间差异代谢物的 PCA 得分图

Fig. 2 PCA score plot of differential metabolites in serum among groups

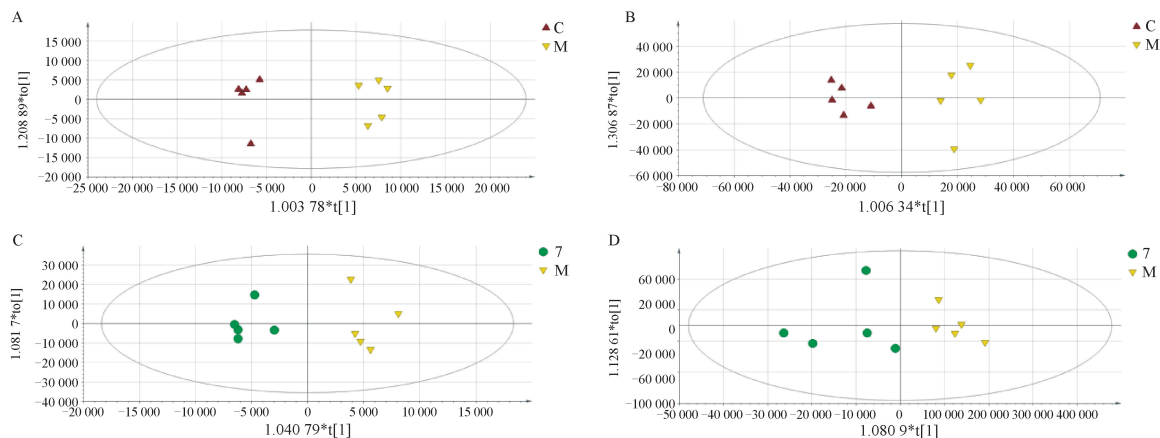
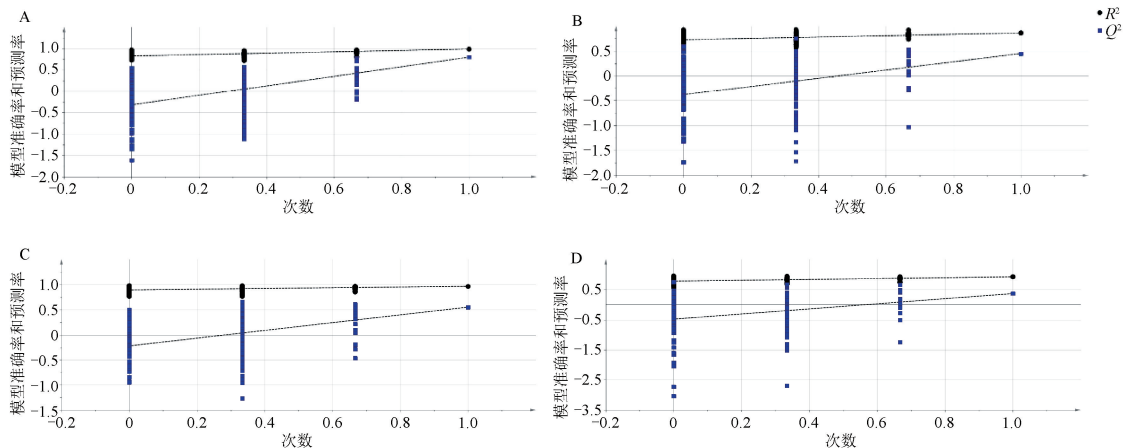


图 3 血清组间差异代谢物的 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 OPLS-DA score plot of differential metabolites in serum among groups

3.2.5 差异代谢物分析 结合 OPLS-DA 模型中变量权重 VIP 参数和组间比较的 *t* 检验结果,以 VIP>1 且 *P*<0.05 为筛选条件,经检索筛选,以倍数变化(fold change, FC)代表各组之间血清代谢物含量的比值,以 FC≥1.5 或 FC≤0.5 的条件,综合筛选 3 组样品中的差异代谢物质。结果显示,与空白组相比,模型组存在 6 个差异代谢物,神经酰胺、琥

珀酸、 α -酮戊二酸、柠檬酸、硫酸吡啶酚、3a, 6b, 7b-三羟基-5b-胆酸的水平均显著下降(*P*<0.05);与模型组相比,知母皂苷 A Ⅲ组共有 5 个差异代谢物,其中苯酚硫酸盐水平降低,PC [20:4 (5Z, 7E, 11Z, 14Z)-OH(9)/DiMe(9, 3)]、邻棕榈酰肉碱、 α -酮戊二酸、柠檬酸 4 个差异代谢物的水平提高(*P*<0.05)(表 1)。



各图对应分组同图 3(图 5 同)。

图 4 OPLS-DA 模型的置换检验

Fig. 4 Permutation test for OPLS-DA models

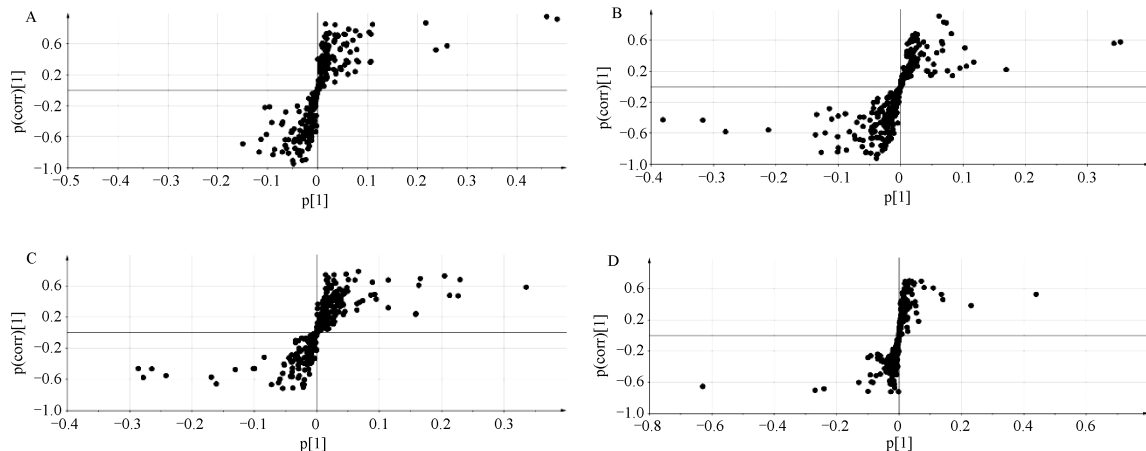


图 5 血清组间差异代谢物的 S-plot 分析

Fig. 5 S-plot analysis on differential metabolites in serum among groups

表 1 组间差异代谢物信息

Table 1 Information of differential metabolites among groups

组别	代谢物名称	t_R /min	VIP	FC	采集模式
M vs C	神经酰胺(cervonoyl ethanolamide)	6.11	1.76	0.10 ²⁾	ESI ⁺
	琥珀酸(succinic acid)	1.43	1.90	0.39 ¹⁾	ESI ⁻
	α -酮戊二酸(alpha-ketoglutarate acid)	0.96	1.35	0.48 ²⁾	ESI ⁻
	柠檬酸(citric acid)	0.99	1.37	0.47 ²⁾	ESI ⁻
	硫酸吲哚酚(indoxyl sulfate)	4.04	2.32	0.58 ²⁾	ESI ⁻
	3a,6b,7b-三羟基-5b-胆酸(3a,6b,7b-trihydroxy-5b-cholanoic acid)	5.35	1.10	0.33 ²⁾	ESI ⁻
7 vs M	苯酚硫酸盐(phenol sulphate)	3.89	2.78	0.39 ¹⁾	ESI ⁻
	PC[20:4(5Z,7E,11Z,14Z)-OH(9)/DiMe(9,3)]	4.72	1.03	16.49 ²⁾	ESI ⁻
	邻棕榈酰肉碱(o-palmitoylcarnitine)	7.21	1.35	1.56 ²⁾	ESI ⁺
	α -酮戊二酸(alpha-ketoglutarate acid)	0.96	1.67	1.81 ¹⁾	ESI ⁻
	柠檬酸(citric acid)	0.99	1.67	1.80 ¹⁾	ESI ⁻

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2.6 代谢通路分析 将3组血清样品的差异代谢物通过 MetaboAnalyst 进行通路分析,以 $P < 0.05$ 为标准筛选,代谢途径富集于三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle),丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(alanine, aspartate and glutamate metabolism)(图6)。

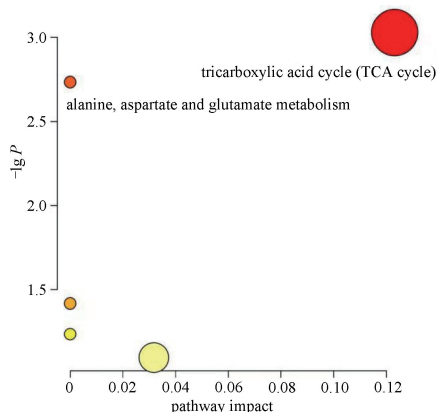


图6 代谢通路分析

Fig. 6 Analysis of metabolites pathway

4 讨论

4.1 知母皂苷 A III 的抗肿瘤作用

知母皂苷 A III 具有强细胞毒性,可调控多种肿瘤细胞的侵袭、迁移、凋亡、自噬及逆转耐药。例如知母皂苷 A III 通过干预 MAPK 及 Wnt/ β -catenin 信号通路而抑制脑胶质瘤 U87MG 细胞的体外增殖^[6];诱导非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡和迁移侵袭^[7];通过抑制 Src、FAK、MAPK、CREB 和 β -catenin 等信号通路抑制骨肉瘤 MG63 细胞迁移侵袭^[8];通过抑制 COX-2、NF- κ B、PGE2 和 PGE2 受体的表达抑制黑色素瘤细胞迁移等^[9],有望作为抗癌药物开发。本研究考察知母皂苷 A III 对脑胶质瘤体内生长的影响,结果表明,知母皂苷 A III 可显著抑制 GL261 原位脑胶质瘤荷瘤小鼠模型中的肿瘤生长,且对体质量影响不大。

4.2 三羧酸循环通路

三羧酸循环是对糖、蛋白质和脂肪分解和能量产生至关重要的代谢途径^[10],由8种酶即柠檬酸合酶、乌头酸酶、异柠檬酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶、琥珀酰辅酶 A 合成酶、琥珀酸脱氢酶、富马酶和苹果酸脱氢酶组成,在线粒体中循环反应^[11],是细胞氧化磷酸化的核心途径,满足其生物能量、生物合成

和氧化还原平衡要求^[12]。异常三羧酸循环在肿瘤发生中起关键作用,癌细胞不局限利用糖酵解途径,也依赖三羧酸循环产生能量和合成大分子^[13]。

α -酮戊二酸也称为 2-氧代戊二酸(α -ketoglutarate acid, α KG),是决定三羧酸循环总体速率的关键分子^[14]。 α KG 不仅参与氧化防御、胶原蛋白和骨骼维持、发育和免疫的广泛生理反应,它还构成了 α KG 依赖性双加氧酶家族酶的限制底物,参与缺氧传感和形成细胞表观遗传景观的致癌转化病理进程^[15]。胶质瘤中异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)1 和 2 的突变介导 α KG 转变为致癌代谢物 2-羟基戊二酸(2-hydroxyglutarate, 2-HG),2-HG 的积累抑制甲基胞嘧啶双加氧酶(ten-eleven translocation, TET)家族和含 Jumonji-C 结构域的组蛋白去甲基化酶,从而导致组蛋白和 DNA 高甲基化表型^[16],而突变 IDH1 的抑制剂可减少体外胶质瘤细胞的生长^[17]。 α KG 在三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)产生以及补充三羧酸循环中间物的回补过程中发挥作用。在缺氧或线粒体功能障碍期间, α KG 在 IDH2 催化的还原性羧化反应中被转换为柠檬酸。 α KG 抑制结直肠癌中 Wnt 信号传导并促进癌细胞分化,从而显著抑制肿瘤生长并延长生存期^[18]。 α KG 是 p53 介导肿瘤抑制的效应因子,其在 p53 缺陷的胰管腺癌中的积累可驱动肿瘤细胞分化并拮抗恶性进展^[19]。

实验结果显示,与空白组相比,模型组血清中 α KG、琥珀酸和柠檬酸的水平明显降低,而知母皂苷 A III 给药后血清中 α KG 和柠檬酸水平明显提高,可能通过调节三羧酸循环抑制脑胶质瘤的生长。

4.3 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢

氨基酸既是蛋白质合成的基石,也是促进其他生物合成反应的中间代谢物。对临床胶质瘤样本的代谢途径分析中,谷氨酸、丙氨酸、谷氨酰胺、2-羟戊二酸、丝氨酸等具有高 VIP 评分,主要代谢途径集中于丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢,甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢等^[20]。本实验结果显示,知母皂苷 A III 干预脑胶质瘤生长的信号通路富集于丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢这一脑胶质瘤关键代谢途径。

氨基酸途径可能含有胶质瘤的可药靶标,脑肿瘤中氨基酸代谢酶具有不同的基因表达模式,为治疗开发提供有效的靶标。在丙氨酸、天冬酰胺、谷氨

酰胺网络中的代谢酶天冬酰胺酶和谷氨酸-草酰乙酸转氨酶 1 在 GBM 中的表达较低,且与不良结局相关^[21]。胶质母细胞瘤细胞产生富含谷氨酸的肿瘤微环境。在胶质瘤周围组织中,细胞外谷氨酸水平升高至未受累大脑的 100 倍,高水平的谷氨酸刺激胶质瘤细胞的增殖和侵袭。支链氨基酸转氨酶 1 将 α -氨基从支链氨基酸转移至 α -KG,从而产生谷氨酸和相应的支链 α -酮酸,导致肿瘤细胞质内谷氨酸水平升高,其高表达与生存率低相关^[22]。*N*-甲基-D-天冬氨酸受体 (*N*-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR) 作为谷氨酸受体对谷氨酸盐具有高亲和力,*N*-甲基-D-天冬氨酸刺激导致 LN18、U251MG 和患者来源的胶质母细胞瘤细胞的侵袭增强,而使用 NMDAR 的非竞争性拮抗剂 MK-801 抑制 NMDAR 显著降低了侵袭能力^[23]。氨基酸生物合成是各种癌症细胞必需的,也是针对癌症代谢的潜力靶点。利用癌症对外源氨基酸的需求增加导致依赖这一特性,使用天冬酰胺酶治疗急性淋巴细胞白血病,L-天冬酰胺酶将天冬酰胺水解成天冬氨酸并消耗天冬酰胺,提高外源性天冬酰胺的消耗导致癌细胞死亡^[24]。

4.4 三羧酸循环和氨基酸代谢的交互作用

三羧酸循环和氨基酸代谢密切相关,例如三羧酸循环中间产物如草酰乙酸、 α -KG 分别是天冬氨酸和谷氨酸的前体。丙酮酸在胰腺导管腺癌中与葡萄糖和谷氨酰胺衍生的碳竞争,为三羧酸循环提供燃料,这种燃料来源的转变减少了肿瘤对葡萄糖和血清衍生营养素的依赖^[25]。谷氨酸被谷氨酰胺脱氢酶或天冬氨酸转氨酶转化为三羧酸循环中间物 α -KG^[26]。

综上所述,代谢组学结果提示知母皂苷 A III 影响脑胶质瘤中三羧酸循环,丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢而发挥抗脑胶质瘤生长的作用。知母皂苷 A III 干预三羧酸循环,丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢交互作用中的关键酶类值得进一步深入研究。

[参考文献]

[1] BATASH R, ASNA N, SCHAFFER P, et al. Glioblastoma multiforme, diagnosis and treatment; recent literature review [J]. *Curr Med Chem*, 2017,24(27):3002.

[2] CUI X, MORALES R T, QIAN W, et al. Hacking macrophage-associated immunosuppression for regulating glioblastoma angiogenesis[J]. *Biomaterials*, 2018,161:164.

[3] 陈燕芳,卞卡. 知母皂苷 A III 药理活性及机制研究进展[J].

上海中医药杂志, 2016,50(11):102.

[4] HAN F Y, SONGX Y, CHEN J J, et al. Timosaponin A III: a novel potential anti-tumor compound from *Anemarrhena asphodeloides*[J]. *Steroids*, 2018,140:125.

[5] BUJAK R, STRUCK-LEWICKA W, MARKUSZEWSKI M J, et al. Metabolomics for laboratory diagnostics[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015,113:108.

[6] 谭希,潘会君,吴伟达,等. 知母皂苷 A III 抑制人脑胶质瘤增殖生长的机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2017,42(6):1160.

[7] JUNG O, LEE J, LEE Y J, et al. Timosaponin A III inhibits migration and invasion of A549 human non-small-cell lung cancer cells via attenuations of MMP-2 and MMP-9 by inhibitions of ERK1/2, Src/FAK and beta-catenin signaling pathways [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016,26(16):3963.

[8] JUNG O, LEE S Y. Synergistic anticancer effects of timosaponin A III and ginsenosides in MG63 human osteosarcoma cells[J]. *J Ginseng Res*, 2019,43(3):488.

[9] KIM K M, IM A R, KIM S H, et al. Timosaponin A III inhibits melanoma cell migration by suppressing COX-2 and *in vivo* tumor metastasis[J]. *Cancer Sci*, 2016,107(2):181.

[10] SCAGLIOLA A, MAININI F, CARDACI S. The tricarboxylic acid cycle at the crossroad between cancer and immunity [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020,32(12):834.

[11] BRIERE J J, FAVIER J, GIMENEZ-ROQUEPLO A P, et al. Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006,291(6):C1114.

[12] ANDERSON N M, MUCKA P, KERN J G, et al. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism [J]. *Protein Cell*, 2018,9(2):216.

[13] SAJNANI K, ISLAM F, SMITH R A, et al. Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis [J]. *Biochimie*, 2017,135:164.

[14] WU N, YANG M, GAUR U, et al. Alpha-ketoglutarate: physiological functions and applications [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2016,24(1):1.

[15] ABLA H, SOLLAZZO M, GASPARRE G, et al. The multifaceted contribution of α -ketoglutarate to tumor progression: an opportunity to exploit [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 98:26.

[16] XU W, YANG H, LIU Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases [J]. *Cancer Cell*, 2011,19(1):17.

[17] TRAN T Q, HANSE E A, HABOWSKI A N, et al. Alpha-ketoglutarate attenuates Wnt signaling and drives differentiation in colorectal cancer [J]. *Nat Cancer*, 2020,1(3):345.

[18] MORRIS J P, YASHINSKIE J J, KOCHE R, et al. α -Ketoglutarate links p53 to cell fate during tumour suppression [J]. *Nature*, 2019,573(7775):595.

- [19] SMITH H Q, LI C, STANLEY C A, et al. Glutamate dehydrogenase, a complex enzyme at a crucial metabolic branch point[J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(1):117.
- [20] LEE J E, JEUN S S, KIM S H, et al. Metabolic profiling of human gliomas assessed with NMR[J]. *J Clin Neurosci*, 2019, 68:275.
- [21] PANOSYAN E H, LIN H J, KOSTER J, et al. In search of druggable targets for GBM amino acid metabolism [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1):162.
- [22] LANGE F, HORNSCHEMEYER J, KIRSCHSTEIN T. Glutamatergic mechanisms in glioblastoma and tumor-associated epilepsy[J]. *Cells*, 2021, 10(5):1226.
- [23] NANDAKUMAR D N, RAMASWAMY P, PRASAD C, et al. Glioblastoma invasion and NMDA receptors: a novel prospect [J]. *Physiol Int*, 2019, 106(3):250.
- [24] ENDICOTT M, JONES M, HULL J. Amino acid metabolism as a therapeutic target in cancer: a review[J]. *Amino Acids*, 2021, 53(8):1169.
- [25] SOUSA C M, BIANCUR D E, WANG X, et al. Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion[J]. *Nature*, 2016, 536(7617):479.
- [26] MAUSA, PETERS G J. Glutamate and alpha-ketoglutarate: key players in glioma metabolism[J]. *Amino Acids*, 2017, 49(1):21.

[责任编辑 马超一]