

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20230807

基于代谢组学技术研究冬凌草甲素抑制 乳腺癌细胞4T1生长的分子机制

张玮杰, 时磊, 韩景兰

(郑州大学第五附属医院, 河南 郑州 450052)

【摘要】目的:采用代谢组学技术研究冬凌草甲素对乳腺癌细胞4T1代谢产物的影响,探讨冬凌草甲素抑制乳腺癌细胞生长的作用机制。方法:采用MTT法确认冬凌草甲素对4T1细胞的抑制作用,并确定代谢组学的分组及给药浓度,采用高效液相色谱质谱联用技术对4T1细胞中的代谢产物进行鉴定,SIMCA软件对数据进行分析,筛选出差异代谢物,使用MetaboAnalyst 5.0软件对差异代谢物富集分析,找出差异代谢物涉及的代谢通路。结果:冬凌草甲素对4T1细胞的生长有显著性抑制作用,24 h的 IC_{50} 值为 $2.45 \mu\text{g/mL}$ 。模式识别分析筛选出33个差异代谢物,其中包含较多的是氨基酸类化合物,包括D-蛋氨酸,D-苯丙氨酸,L-组氨酸,L-异亮氨酸和L-色氨酸等。代谢通路分析显示,冬凌草甲素对多种氨基酸的代谢及生物合成有较大影响,包括氨酰-tRNA的生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,组氨酸代谢, β -丙氨酸代谢,谷胱甘肽代谢等。结论:冬凌草甲素可能通过改变氨基酸的代谢及生物合成,抑制乳腺癌细胞4T1的生长。

【关键词】乳腺癌;代谢组学;冬凌草甲素;分子机制

【引用格式】

张玮杰,时磊,韩景兰. 基于代谢组学技术研究冬凌草甲素抑制乳腺癌细胞4T1生长的分子机制[J]. 中医药信息, 2023, 40(8): 44-50, 58.

ZHANG W J, SHI L, HAN J L. Molecular mechanism of oridonin inhibiting growth of breast cancer cells 4T1 based on metabonomics[J]. Information on TCM, 2023, 40(8):44-50, 58.

乳腺癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤,也是导致妇女癌症死亡相关的主要原因^[1]。乳腺癌具有不同的分型,其中尤以三阴性乳腺癌的治疗最为棘手^[2]。目前,乳腺癌的治疗方式主要有化疗、放疗、内分泌治疗等。由于乳腺癌的分子亚型不同,使用化疗药物进行治疗时,结果不尽理想^[3]。放疗的目的是损伤肿瘤而保留正常组织,但是由于器官运动等不可避免的因素,常会对乳腺癌的放疗产生负面影响,尤其是对左侧乳房影响较大^[4]。内分泌治疗需要抑制雌激素受体信号,从而防止复发,降低乳腺癌的死亡风险,然而选择性雌激素受体调节剂(如他莫昔芬)和抑制雌激素合成剂(如芳香化酶抑制剂)都有增加更年期症状的风险,可能对患

者的生活质量造成不利影响^[5]。近年来,中药提取物在乳腺癌的治疗上受到越来越多的关注。冬凌草甲素(Oridonin)是从唇形科香茶菜属植物冬凌草[*Isodon rubescens* (Hemsl.) Hara.]分离出来的一种活性物质,具有较高的抗肿瘤活性。冬凌草最早记载于明《救荒本草》,是一种药食同源的植物,在河南省冬凌草用于治疗食管癌有50多年的历史^[6],根据河南本草记载,冬凌草常被用于治疗咽痛、感冒头痛、支气管炎、慢性肝炎、风湿关节痛、毒蛇咬伤,以及食管癌、贲门癌、肝癌、肺癌和前列腺癌等多种癌症^[7]。冬凌草甲素在前列腺癌、肺癌等多种癌症中有较好的抗肿瘤效果^[8-9],而受到关注。然而其对乳腺癌的治疗及其作用机制尚不清楚,因此,

基金项目:河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20210494)

第一作者简介:张玮杰(1993-),女,主管中药师,主要研究方向:药物分析学。

本研究对冬凌草甲素抗乳腺癌的作用机制进行研究。

代谢组学技术是近些年新兴起的实验技术,因其可以对生物体内整体的代谢水平做系统性研究,可以以更直观的方式表现生理或病理表型^[10],反应生物体整体的变化。其在生物标志物的筛选,分子靶标的确定以及分子机制的研究中发挥重要作用^[11-12]。LC-MS因其良好的分辨率和灵敏度,被应用于小分子代谢产物的检测。本研究基于UPLC-MS/MS的高通量分析方法,鉴定冬凌草甲素作用于乳腺癌细胞4T1后代代谢产物的变化,筛选出差异常代谢物,并找出相关代谢通路,进一步探究冬凌草甲素抑制乳腺癌生长的分子机制。

1 实验材料

超高效液相色谱仪(UltiMate3000,美国赛默飞世尔科技公司);四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(Q-Exactive,美国赛默飞世尔科技公司);酶标仪(Multiskan FC,美国赛默飞世尔科技公司);低温高速离心机(Centrifuge 5920 R,德国Eppendorf);冬凌草甲素(批号:L2103140,纯度98%,上海阿拉丁生化科技有限公司);MTT试剂(武汉塞维尔生物科技有限公司);质谱级甲醇、乙腈、甲酸和碳酸氢铵(美国赛默飞世尔科技公司);混合同位素内标材料(中国科学院大连化学物理研究所);4T1细胞(中科院上海细胞库);胎牛血清和1640培养基(北京索莱宝);0.25%胰蛋白酶消化液(上海碧云天生物技术公司)。

2 方法

2.1 MTT实验

采用MTT实验法检测冬凌草甲素对4T1细胞生长的抑制作用。取对数生长期细胞,用胰蛋白酶消化细胞,将细胞混匀并稀释后用细胞板进行细胞计数。取96孔板进行细胞铺板,最外圈孔加入PBS溶液,其余每孔加入200 μ L细胞液,细胞数8 000,待细胞贴壁后,弃去细胞培养基,加入200 μ L系列浓度冬凌草甲素的培养基(0、1、2、3、4、6、8、12、18 μ g/mL),在培养箱中孵育24 h后(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)取出,避光加入20 μ L配制好的MTT溶液(5 mg/mL),在培养箱中避光孵育4 h,终止培养,弃去细胞培养基,加入二甲基亚砜150 μ L,在摇床上避光震荡约10 min,取出96孔板,用酶标仪在490 nm处测量各孔的吸光度。

2.2 代谢组学样品的制备

取对数生长期细胞,将细胞进行消化并计数,取6孔板进行细胞铺板,每孔细胞数20万,随机分为对照组(Control group)和给药组(Oridonin group),每组有6个孔,其中1个孔用来细胞计数,另外5个孔用作代谢组学样品收集。待细胞贴壁后,进行加药处理,对照组

更换新的空白培养基,给药组给予浓度2 μ g/mL冬凌草甲素,待细胞培养24 h后,提取细胞。弃去细胞培养基,用PBS缓冲液洗涤3次,加入预冷的甲醇:水(体积比4:1)溶液,迅速放入-80 $^{\circ}$ C冰箱,30 min后取出,快速刮取细胞,收集细胞后,冰浴下用超声波将细胞破碎,随后加入氯仿溶液500 μ L,涡旋仪将液体混匀,在4 $^{\circ}$ C, 12 000 rpm离心15 min,取上清液1 mL用真空干燥机进行浓缩干燥,待液体挥发完,用100 μ L甲醇溶液溶解,并经过0.22 μ m滤膜过滤后,注入样品瓶。同时,每个样品取10 μ L,混合均匀,作为质控样品(QC)。

2.3 UPLC/MS/MS实验条件

使用超高效液相色谱仪UltiMate3000和Q-Exactive四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪进行化合物的检测,正离子模式色谱柱Waters ACQUITY UPLC BEH C8(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μ m),负离子模式色谱柱ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μ m)。液相色谱条件,正离子模式为0~1 min: 0.1%甲酸-水(95%),0.1%甲酸-乙腈(5%);24~28 min:0.1%甲酸-乙腈(100%);28.1~30 min: 0.1%甲酸-水(95%),0.1%甲酸-乙腈(5%);负离子模式为0~1 min: 6.5 mmol/L碳酸氢铵-水(98%),6.5 mmol/L碳酸氢铵-95%甲醇-水(2%);18~22 min: 6.5 mmol/L碳酸氢铵-95%甲醇-水(100%);22.1~25 min: 6.5 mmol/L碳酸氢铵-水(95%),6.5 mmol/L碳酸氢铵-95%甲醇-水(5%)。质谱条件,离子源:电喷雾离子源(ESI),离子源温度320 $^{\circ}$ C,扫描范围m/z 60~900,扫描模式Full MS和Full MS/dd-MS2。

2.4 代谢组学数据处理

采用OSI-SMMS软件对原始数据(raw文件)进行初步处理,将提取得到的化合物进行定性和定量处理。接着用SIMCA软件对数据进行分析。PCA(主成分分析技术)和OPLS-DA(正交偏最小二乘法判别分析)对模型好坏进行判别。通过VIP > 1, P < 0.05对数据进行筛选,并将其作为潜在的差异代谢物,将得到的差异代谢物输入HMDB(<https://hmdb.ca/>)进行验证,最终确定差异代谢物。将差异代谢物的峰面积数据输入MeV4.9.0软件进行热图分析。将差异代谢物输入MetaboAnalyst 5.0(<http://www.metaboanalyst.ca/>)进行通路分析,获取差异代谢物所涉及的代谢通路。

2.5 统计学方法

数据用均数 $\pm$ 标准差表示,采用GraphPad Prism 8.0.2软件进行数据的统计分析。差异代谢物的筛选条件是VIP > 1, P < 0.05。P < 0.05为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 冬凌草甲素对4T1细胞增殖的抑制作用

MTT实验结果表明,冬凌草甲素作用于4T1细胞24 h的 IC_{50} 值为 $2.45 \mu\text{g/mL}$,绘制细胞生长图,可以看出,冬凌草甲素对4T1细胞生长有显著抑制作用,随着冬凌草甲素浓度的升高,细胞的生长率逐渐下降。见图1。

3.2 质谱检测结果

正离子模式和负离子模式下样品经UPLC-MS/MS检测所获取的总离子流图见图2。从结果中可以看出,两组样品在正负离子模式下,基线均较为平稳,

每个时间点代表了同一质荷比响应强度的加和,正、负离子模式下响应强度均达到 e^9 ,这表明仪器的状态较好,实验结果可靠。

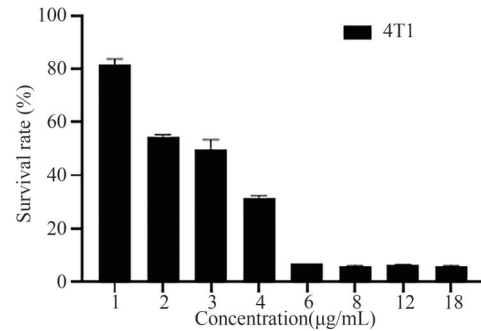
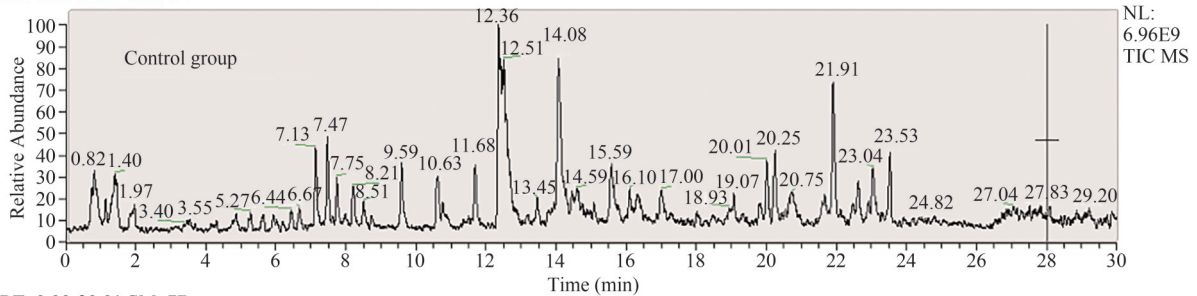
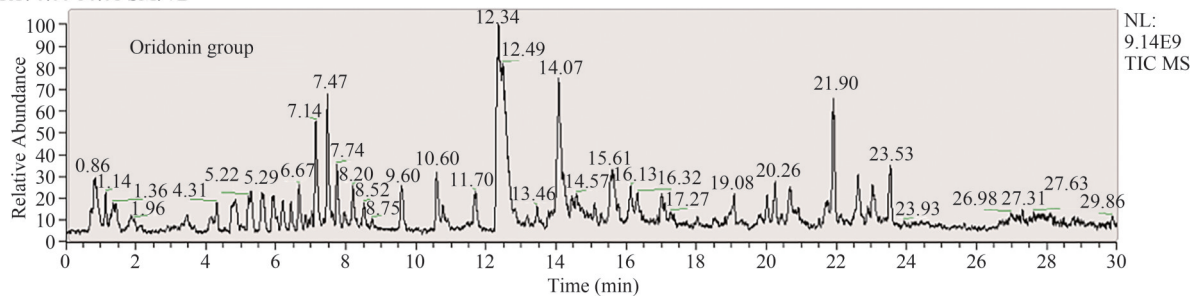


图1 冬凌草甲素对4T1细胞的抑制作用

A RT: 0.00-30.01 SM: 7B

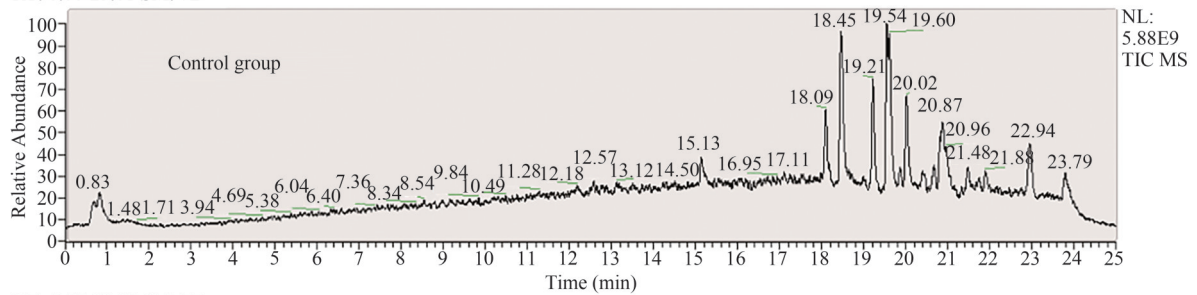


RT: 0.00-30.01 SM: 7B

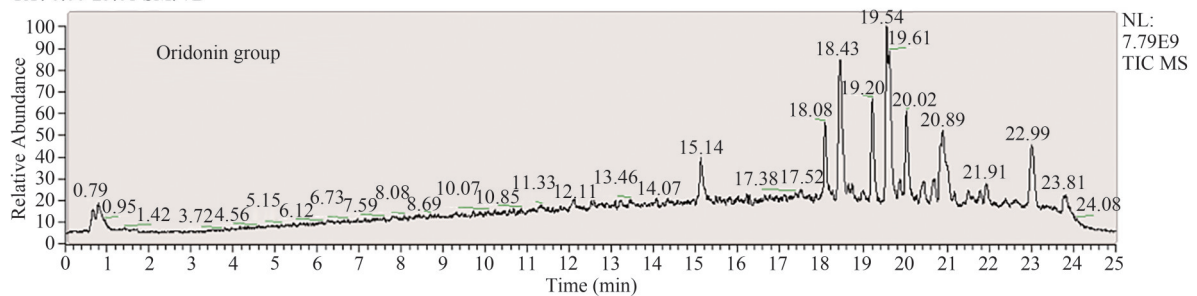


B

RT: 0.00-25.01 SM: 7B



RT: 0.00-25.01 SM: 7B



注:A为ESI+;B为ESI-。

图2 正、负离子模式下细胞样品的总离子流图

3.3 代谢组学数据模式识别

为了判断代谢组学模型建立的优劣,使用SIMCA软件采用PCA和OPLS-DA两种模式进行分析,见图3。OPLS-DA是一种有监督的模式判别分析方法,可以更直观地显示各样品的聚类状态和变化轨迹。在正负离子两种模式下,各样品组内有很好的聚集性,而两组之间又有较强的分离性;同时进行置换检验分析,结果显示回归线在Y轴上的截距小于0,即 Q^2 小于0,证明该模型建立良好。

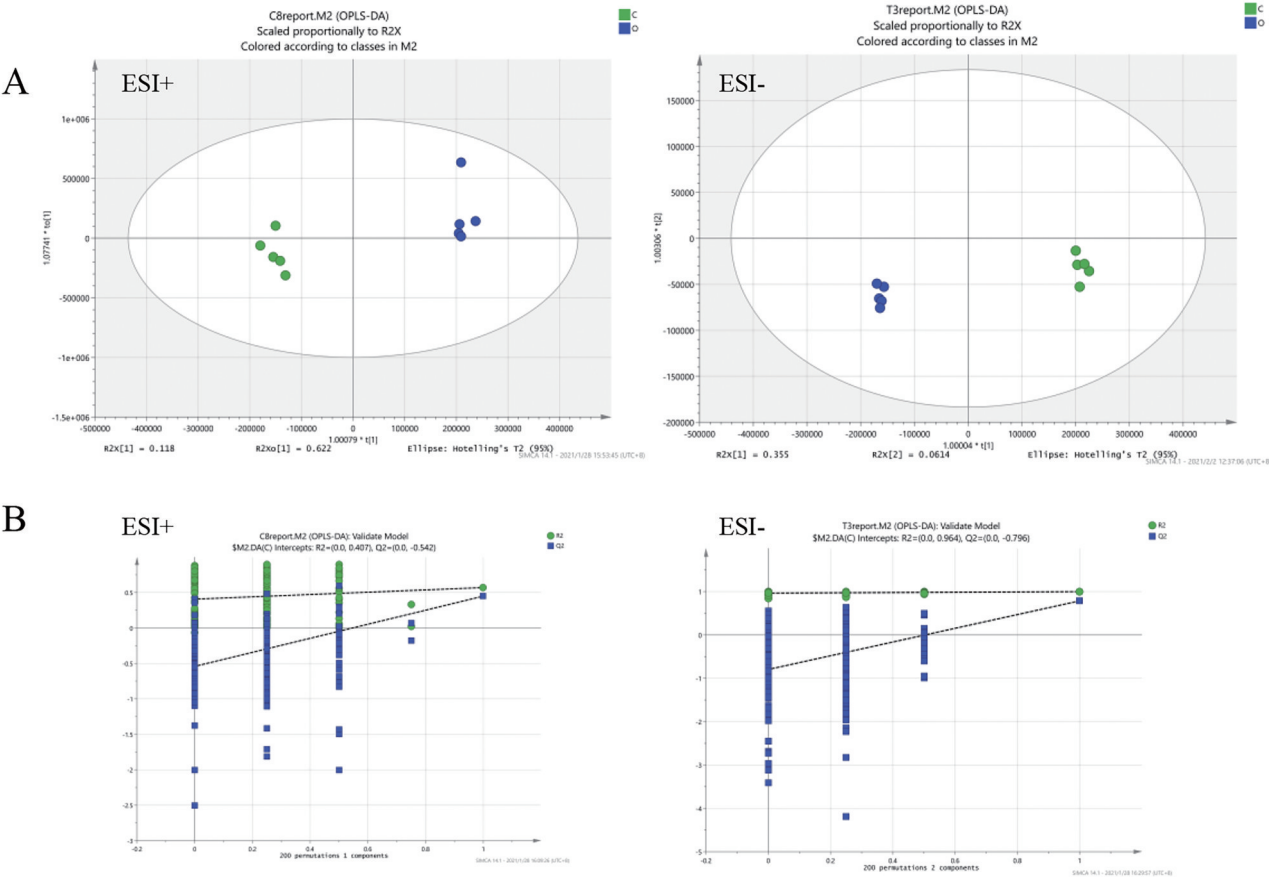
3.4 差异代谢物的筛选

在数据进行初步分析的基础上,通过 $VIP > 1$, $P < 0.05$ 对数据进行筛选,并经过HMDB数据库进行验证,最终得到内源性差异代谢物33个,见表1。为了更直观地表示这些化合物含量的变化,采用热图进行表示,从结果中可以看出冬凌草甲素作用于4T1细胞后,

多种氨基酸的含量下降,包括D-蛋氨酸、D-苯丙氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和L-缬氨酸,见图4和图5。

3.5 代谢通路分析

将数据分析所得的差异代谢物输入MetaboAnalyst 5.0(<http://www.metaboanalyst.ca/>)网站进行代谢通路分析,分析结果见图6。根据代谢通路的 P 值及影响力值,将最有价值的代谢通路列出,分别是氨酰-tRNA生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,组氨酸代谢, β -丙氨酸代谢,谷胱甘肽代谢,丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢,苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸的生物合成。可以看出,这几条重要的代谢通路均与氨基酸代谢有关。因此冬凌草甲素抑制乳腺癌细胞生长的机制应与氨基酸代谢密切相关。



注:A为OPLS-DA分析结果;B为置换检验分析结果。

图3 两种模式分析结果

表1 差异代谢物信息

保留时间/min	质荷比/Da	英文名称	分子式	P 值
18.00	325.183 51	13-Ci-Acitretnin	C ₂₁ H ₂₆ O ₃	0.015 728 862
1.80	101.059 48	2-Methylbutyric acid	C ₅ H ₁₀ O ₂	0.000 986 759
3.06	298.096 43	5'-Methylthioadenosine	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S	0.000 293 269
8.49	134.045 90	Adenine	C ₅ H ₅ N ₅	5.977 38E-05

续表 1

保留时间/min	质荷比/Da	英文名称	分子式	P 值
19.60	179.03663	Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	0.024 597 704
19.23	283.26368	Cholesteryl laurate	C ₃₉ H ₆₈ O ₂	0.003 791 890
0.82	104.10735	Choline	C ₅ H ₁₃ NO	4.936 63E-08
0.98	114.06644	Creatinine	C ₄ H ₇ N ₃ O	0.002 155 095
16.89	279.15867	Dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0.006 227 684
1.11	150.05936	D-Methionine	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	6.999 88E-07
1.87	166.08618	D-Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	1.855 54E-05
19.23	329.26958	Glycerol 1-hexadecanoate	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	0.008 741 682
20.45	269.24763	Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	0.005 374 121
19.02	254.24732	Hexadecanamide	C ₁₆ H ₃₃ NO	0.000 128 926
1.59	181.04958	Hydroxyphenyllactic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	0.000 244 583
3.47	188.07047	Indolelactic acid	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	0.000 229 328
20.88	131.05085	L-Asparagine	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	0.001 636 177
0.67	146.04456	L-Glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	0.003 190 159
0.91	154.06104	L-Histidine	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	0.000 244 444
1.48	130.08619	L-Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	7.666 57E-05
5.60	203.08141	l-Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	0.003 842 991
1.51	180.06556	l-Tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	0.000 190 334
1.00	118.08648	l-Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	2.745 47E-05
19.21	227.20078	Myristic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0.001 421 495
19.09	282.27861	Oleamide	C ₁₈ H ₃₅ NO	0.002 083 365
18.49	255.23229	Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0.008 367 067
14.82	300.28913	Palmitoylethanolamide	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	0.008 494 938
0.69	72.08157	Pyrrolidine	C ₄ H ₉ N	4.545 97E-06
0.71	146.16467	Spermidine	C ₇ H ₁₉ N ₃	0.000 377 226
19.93	300.29006	Sphinganine	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	9.261 73E-05
20.24	284.29418	Stearamide	C ₁₈ H ₃₇ NO	0.002 432 235
20.96	313.07829	Sulfaphenazole	C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	0.007 343 149
0.96	102.12798	Triethylamine	C ₆ H ₁₅ N	0.025 584 919

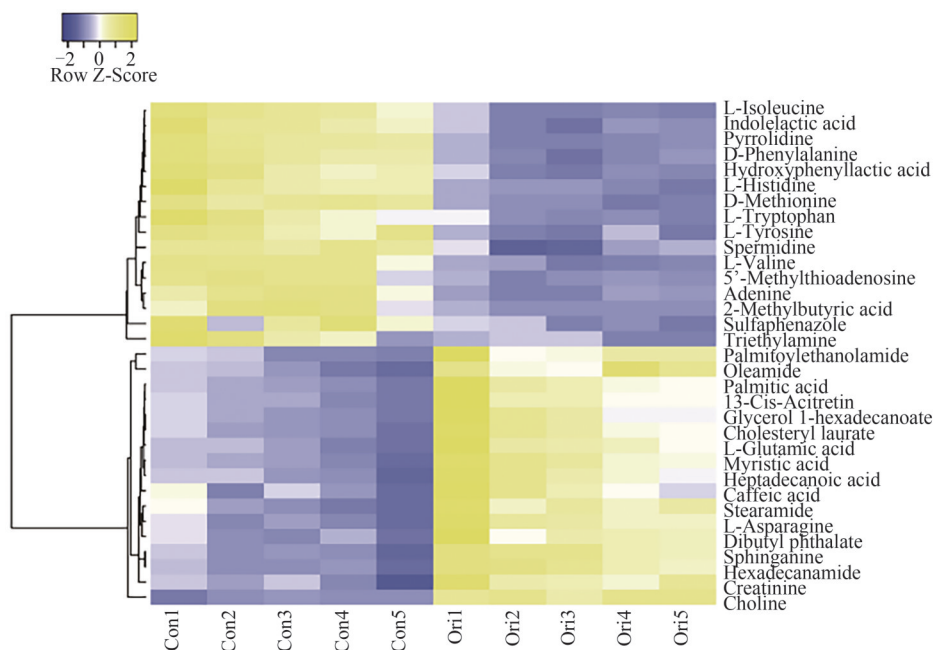


图4 差异代谢物的热图表现

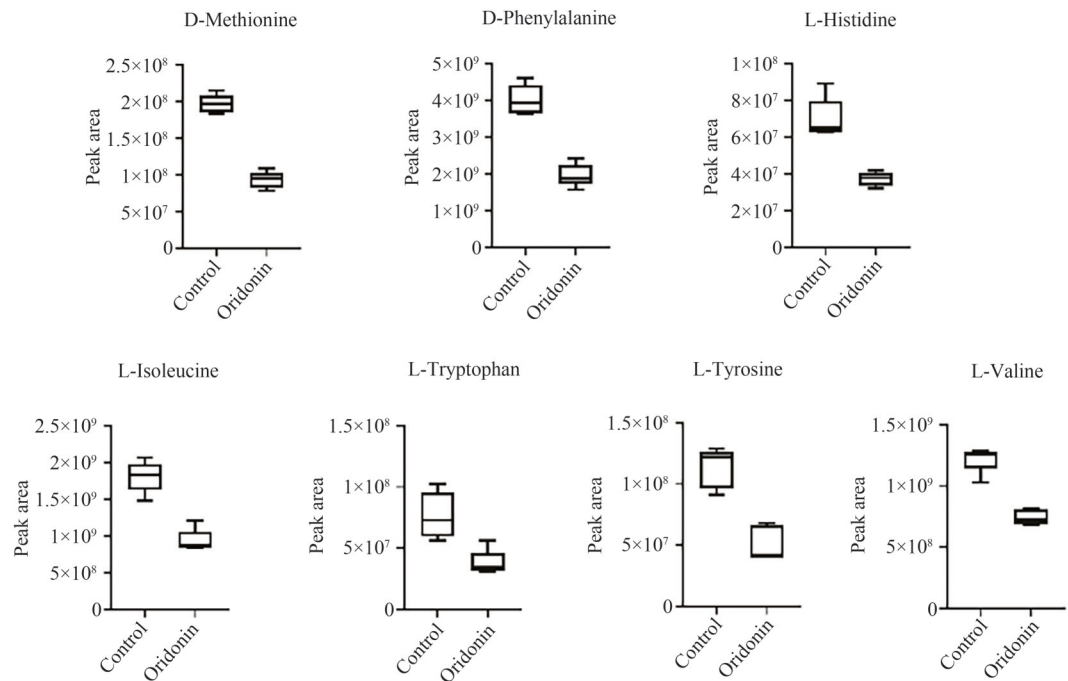
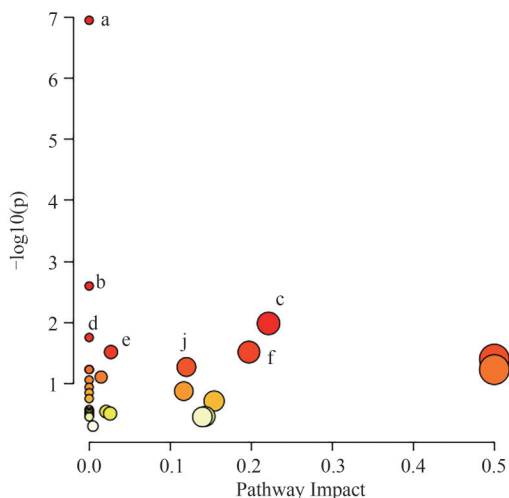


图 5 4T1 细胞内氨基酸含量的变化情况



注: a 为氨酰-tRNA 生物合成; b 为缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成; c 为组氨酸代谢; d 为 β -丙氨酸代谢; e 为谷胱甘肽代谢; f 为丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢; j 为苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸的生物合成。

图 6 代谢通路分析结果

4 讨论

4T1 细胞在 BALB/c 小鼠中可以自发地发展成高转移肿瘤,其在小鼠体内的生长和转移与人体乳腺癌的生长和转移非常相近,本研究选用 4T1 细胞,正是利用了 4T1 细胞这一特性,同时这也为下一步在小鼠体内的研究奠定基础。本研究首先对冬凌草甲素在体外对乳腺癌细胞 4T1 的抑制作用进行研究,结果表明冬凌草甲素对 4T1 细胞有较强的抑制作用。代谢组学分析结果筛选出 33 个差异代谢物,包括 13-顺式-阿维 A 酸、腺嘌呤、胆碱、D-蛋氨酸、L-色氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸和亚精胺等,其中氨基酸类化合物占

较大比例。同样,通过代谢通路富集分析,多种氨基酸的代谢和生物合成通路受到影响,如氨酰-tRNA 生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,组氨酸代谢, β -丙氨酸代谢,谷胱甘肽代谢等。

氨基酸是生命活动的物质基础,参与蛋白质的生物合成,是动物获取营养的基础,并且氨基酸参与细胞内信号传导及能量代谢,是生物合成的物质基础^[13-15]。在本研究中冬凌草甲素作用于 4T1 细胞后,多种氨基酸的含量下降,包括 D-蛋氨酸、D-苯丙氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和 L-缬氨酸。其中 L-异亮氨酸、L-缬氨酸是支链氨基酸,同时也是人体必不可少的氨基酸,其自身不能合成,需要从外界摄取,然而它们却发挥着不可替代的作用,如只有异亮氨酸和缬氨酸能够提供碳前体,可用于合成葡萄糖或任何其他由乙酰辅酶 A 以外的前体衍生的分子微粒^[16],另外支链氨基酸的分解可以为其他物质的合成提供碳分子,例如支链氨基酸氧化可以为三羧酸循环提供燃料^[17]。然而本研究中冬凌草甲素降低了这两种氨基酸的含量,这也意味着葡萄糖合成及三羧酸循环碳源供应链的减少。D-蛋氨酸、D-苯丙氨酸和 L-色氨酸是支链氨基酸外其他必需氨基酸,同样需要从外界摄取,D-蛋氨酸是唯一含有硫的必需氨基酸,其与生物体内含硫化合物的代谢密切相关,D-蛋氨酸必须转化为 L-蛋氨酸才能为生物利用。L-蛋氨酸是人体内生化反应的甲基供体,参与人体内各种甲基化反应^[18],而 D-蛋氨酸含量的降低,可能对细胞内正常的甲基化反应减少物质供应。癌细胞以其无限增殖

的特性,需要更多的能量和物质供应,其通过能量代谢重编程,为细胞更快速地提供燃料,最著名的“Warburg效应”,即有氧糖酵解,虽然糖酵解产生ATP的数量减少,但是糖酵解的增强可以增加核苷酸、氨基酸等生物质的合成^[19]。癌细胞为应对细胞的迅速扩散对氨基酸的需求强烈增加,其中就包括必需氨基酸和非必需氨基酸等,然而本研究中多种氨基酸含量的降低,这必将导致细胞能源供应的不及时,从而导致细胞死亡。

氨酰tRNA是一种与之对应的氨基酸相结合的tRNA^[20]。它可以将氨基酸转移到核糖体上,在那里氨基酸会与正在延伸中的多肽链结合,从而完成蛋白质的合成。在本实验中,氨酰tRNA的生物合成受到严重影响,结合细胞中多种氨基酸含量下降,可见tRNA生物合成的抑制及蛋白质合成底物氨基酸的减少,极大程度干扰细胞中蛋白质的合成。另外,本研究中缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,组氨酸代谢, β -丙氨酸代谢,谷胱甘肽代谢等,也都受到影响,缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸均为支链氨基酸,支链氨基酸不仅是合成含氮化合物的底物,它们还作为信号分子,通过特殊的信号网络调节葡萄糖,脂质和蛋白质合成的代谢,增强肠道健康和免疫力^[21],组氨酸的生物合成与氮代谢和嘌呤的从头合成密切联系^[22],而谷胱甘肽代谢是细胞内抗氧化和解毒的关键途径,可以避免细胞中蛋白质和酶等大分子中的巯基被有害物质氧化,为蛋白质和酶正常生理功能的发挥提供保障^[23]。冬凌草甲素能极大改变这些代谢途径,不仅会导致细胞能量供应的不足,同时也会造成细胞内的氧化反应、炎症反应,从而使癌细胞受损。

综上所述,冬凌草甲素可能通过降低细胞内氨基酸的含量,抑制氨基酸的生物合成及代谢,从而导致细胞内的物质及能量供应不足,进一步杀死乳腺癌细胞。

【参考文献】

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65: 87 – 108.
- [2] MATTA J, ORTIZ C, ENCARNACION J, et al. Variability in DNA repair capacity levels among molecular breast cancer subtypes: triple negative breast cancer shows lowest repair[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(7): 1505.
- [3] FISUSI F A, AKALA E O. Drug combinations in breast cancer therapy[J]. Pharm Nanotechnol, 2019, 7(1): 3 – 23.
- [4] PIRUZAN E, VOSOUGHI N, MAHDAVI S R, et al. Target motion management in breast cancer radiation therapy[J]. Radiol Oncol, 2021, 55(4): 393 – 408.
- [5] BENOIT L, CAMBRA C, ROUZIER R, et al. Quality of life in an e – Cohort of women treated by endocrine therapy for early breast cancer[J]. Clin Breast Cancer, 2022, 22(3): e352 – e361.
- [6] XIONG H. Study on modern pharmacological and chemical components and clinical medication of isodon rubescens[J]. Inner

Mongolia Traditional China, Med, 2014, 33 (22): 2.

- [7] CHEN X, DAI X, LIU Y, et al. *Isodon rubescens* (Hemsl.) Hara.: a comprehensive review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities[J]. Frontiers In Pharmacology, 2022, 13: 766 – 581.
- [8] LU J, CHEN X, QU S, et al. Oridonin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway in hormone – independent prostate cancer cells[J]. Oncol Lett, 2017, 13 (4): 2838 – 2846.
- [9] GUI Y, CHENG J, CHEN Z. Oridonin improves the therapeutic effect of lentinan on lung cancer[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(2): 886.
- [10] BJERRUM J T, NIELSEN O H. Metabonomics in gastroenterology and hepatology[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(15): 3638.
- [11] JOHNSON C H, IVANISEVIC J, SIUZDAK G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(7): 451 – 459.
- [12] RINSCHEN M M, IVANISEVIC J, GIERA M, et al. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(6): 353 – 367.
- [13] SUN H P, WANG Y B. Branched chain amino acid metabolic reprogramming in heart failure[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis, 2016, 1862(12): 2270 – 2275.
- [14] KUBYSHKIN V, BUDISA N. The alanine world model for the development of the amino acid repertoire in protein biosynthesis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5507.
- [15] NOWOSAD A, JEANNOT P, CALLOT C, et al. p27 controls ragulator and mTOR activity in amino acid – deprived cells to regulate the autophagy – lysosomal pathway and coordinate cell cycle and cell growth[J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(9): 1076 – 1090.
- [16] SIVANAND S, VANDER HEIDEN M G. Emerging roles for Branched – Chain amino acid metabolism in cancer[J]. Cancer Cell, 2020, 37(2): 147 – 156.
- [17] ANANIEVA E A, WILKINSON A C. Branched – chain amino acid metabolism in cancer[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2018, 21(1): 64 – 70.
- [18] 刘钟栋, 刘学军. 食品添加剂[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2015: 260 – 263.
- [19] LI Z, ZHANG H. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(2): 377 – 392.
- [20] LING J, REYNOLDS N, IBBA M. Aminoacyl – tRNA synthesis and translational quality control[J]. Annu Rev Microbiol, 2009, 63: 61 – 78.
- [21] NIE C, HE T, ZHANG W, et al. Branched chain amino acids: beyond nutrition metabolism[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 954.
- [22] CHIOCCIOLI S, DEL DUCA S, VASSALLO A, et al. Exploring the role of the histidine biosynthetic hisF gene in cellular metabolism and in the evolution of (ancestral) genes: from LUCA to the extant (micro)organisms[J]. Microbiol Res, 2020, 240: 126555.
- [23] 吴梧桐. 生物化学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 27

(收稿日期: 2022 – 11 – 14)

(下转第58页)

药大学学报, 2022, 45(11): 1081 – 1088.

探讨[J]. 中医杂志, 2018, 59(15): 1279 – 1283, 1287.

[15] 陈澈, 周晟, 孟庆刚. 量表在中医临床疗效评价中的设计与应用

(收稿日期: 2022 – 12 – 04)

Development and Evaluation of Chinese Medicine Syndrome Scale for Lymphoma

GONG Mingxia¹, KONG Xiangtu², YU Hui², CHEN Xiaoli², NI Haiwen^{2✉}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

【Abstract】 Objective: To design traditional Chinese medicine syndrome scale for lymphoma based on the theory of cancer toxicity of Professor Zhou Zhongying, and combining the symptoms and pathogenesis factors of lymphoma in the real world. Method: The scale item pool was established by consulting the literature related to TCM syndromes and symptomatology of lymphoma, and combining with the data mining results of lymphoma clinical symptoms. Lymphoma patients were selected from Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine for formal investigation. The reliability and validity of the scale were evaluated from four aspects: discrete trend method, Cronbach's alpha method, factor analysis method, and correlation coefficient method. Result: A total of 129 patients were included, and the survey results were analyzed and summarized using the above statistical methods. Items that did not pass the screening were deleted, and a final scale consisting of 5 dimensions and 25 items was determined. Conclusion: The preliminary efficacy evaluation scale developed in this study has good reliability and validity, which can objectively guide the clinical treatment of traditional Chinese medicine and provide a basis for the generation of high-level clinical evidence.

【Key words】 Item selection; Lymphoma; Traditional Chinese medicine syndrome scale; Efficacy evaluation

(上接第 50 页)

Molecular Mechanism of Oridonin Inhibiting Growth of Breast Cancer Cells 4T1 Based on Metabonomics

ZHANG Weijie, SHI Lei, HAN Jinglan

(The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of oridonin on the metabolites of 4T1 breast cancer cells by metabonomics, and to explore its mechanism in inhibiting the growth of breast cancer cells. Methods: MTT assay was used to confirm the inhibitory effect of oridonin on 4T1 cells. The metabolites in 4T1 cells were identified by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. The data were analyzed by SIMCA software to screen out the differential metabolites. MetaboAnalyst 5.0 analyzed the enrichment of differential metabolites to find out the metabolic pathways involved in differential metabolites. Results: Oridonin had a significant inhibitory effect on the growth of 4T1 cells, the IC₅₀ value of 24 h was 2.45 μg/mL. Pattern recognition analysis screened out 33 different metabolites, it contains more amino acid compounds, including D – methionine, D – phenylalanine, L – histidine, L – isoleucine and L – tryptophan. Metabolic pathway analysis showed that oridonin had a great effect on the metabolism and biosynthesis of various amino acids, including the biosyntheses of aminoacyl – tRNA, valine, leucine and isoleucine, the metabolisms of histidine, β – alanine and glutathione. Conclusion: Oridonin may inhibit the growth of breast cancer cells 4T1 by altering amino acid metabolism and biosynthesis.

【Key words】 Breast cancer; Metabonomics; Oridonin; Molecular mechanism