

氯硝柳胺下调CLOCK引起胃癌细胞节律紊乱诱发支链氨基酸代谢失调的机制研究

陈通钻^{1#} 戴瑞霞^{2#} 金高巍² 梁琪² 朱晓晖² 戴纪辰² 洪培彬² 张加骥²
陈通克³ 方合志⁴ 陈祥建¹ 谢彬涛^{5*}

(¹温州医科大学附属第一医院, 温州 325000; ²温州医科大学第二临床医学院, 温州 325000;

³温州医科大学实验动物中心, 温州 325000; ⁴温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 温州 325000;

⁵温州医科大学附属眼视光医院基础研究中心, 温州 325000)

摘要 生物节律是周期性的生命活动现象。肿瘤细胞内普遍存在代谢重编程, 有研究表明生物节律与代谢调控密切相关。氯硝柳胺(Niclosamide)是一种传统抗蠕虫药, 具有氧化磷酸化解偶联的特性, 近年来已步入抗癌药物研究领域。为探究氯硝柳胺抑制胃癌发生发展的具体机制, 该研究通过CCK-8增殖、ROS和凋亡等实验发现氯硝柳胺可抑制增殖促进凋亡。通过生物信息学筛选出胃癌与癌旁生物节律差异基因Clock、Per、Dbp等, Western blot实验检测发现它们所编码的蛋白在药物作用后表达均有明显变化, 其中CLOCK变化最为显著, 提示药物作用后胞内生物节律紊乱。通过海马能量代谢和代谢组学分析进一步探讨药物作用后细胞代谢特性及其与生物节律的相关性, 结果提示细胞内氧化磷酸化整体趋势呈药物浓度依赖性下降, 同时证实了三羧酸循环中间产物延胡索酸在氯硝柳胺抑癌机制中的重要度。通过Western blot实验发现药物作用后支链氨基酸相关蛋白下调, CLOCK敲低与加药联合作用可进一步抑制支链氨基酸转氨酶1(BCAT1)的表达。综上, 该研究认为氯硝柳胺可通过紊乱胃癌细胞节律, 诱导支链氨基酸代谢失调从而发挥抑癌效应, 有望成为抗癌药物的新星。

关键词 氯硝柳胺; 生物节律; 代谢重编程; 支链氨基酸代谢; CLOCK

Mechanism Research of Niclosamide Induced Maladjustment of BCAA through Circadian Disorder by Down-Regulating CLOCK

CHEN Tongzuan^{1#}, DAI Ruixia^{2#}, JIN Gaowei², LIANG Qi², ZHU Xiaohui², DAI Jichen², HONG Peibin²,
ZHANG Jiaqi², CHEN Tongke³, FANG Hezhi⁴, CHEN Xiangjian¹, XIE Bintao^{5*}

(¹The First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; ²Second School of Clinical Medicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; ³Laboratory Animal Centre, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; ⁴College of Laboratory Medicine and Life sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China;

⁵Basic Research Center, Eye Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

Abstract Circadian rhythm is deemed a cyclical phenomenon of lives, while metabolic reprogramming exists in cancer cells at large. Some researches have found relationship between circadian and metabolic regula-

收稿日期: 2021-12-13 接受日期: 2022-02-09

国家自然科学基金(批准号: 82103367)和温州市基础科学研究项目(批准号: Y20190055、Y20190085)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 15822710691, E-mail: xbt@eye.ac.cn

Received: December 13, 2021 Accepted: February 9, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82103367) and the Basic Scientific Research Project of Wenzhou (Grant No.Y20190055, Y20190085)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-15822710691, E-mail: xbt@eye.ac.cn

tion. Niclosamide, a traditional anti-worm drugs, armed with properties to uncouple oxidative phosphorylation, is marching to the researching field of anti-tumour drugs. To illuminate mechanisms of its anti-tumour properties, cell counting, reactive oxygen species and apoptosis assay were performed to find that niclosamide could inhibit proliferation and promote apoptosis. *Clock*, *Per*, *Dbp* were selected as circadian differential expression genes through bioinformatics analyses, and expressions of these proteins were in disorder by Western blot, especially CLOCK, after treatment with Niclosamide. The study went deeper into discussing relevance between circadian disorder and metabolism through seahorse analyses and metabonomics analyses. Intracellular oxidative phosphorylation was tested to be suppressed after treatment with niclosamide in a concentration-dependent way. Besides, the importance of fumaric acid in mechanisms of niclosamide's anti-tumour effect were also found. Western blot was performed to figure out that BCAA (branched amino acid)-related protein were inhibited after treatment with niclosamide, and combination of niclosamide with knockdown of CLOCK could further suppress the expression of BCAT1 (branched chain amino acid transaminase 1). Taken altogether, this research displayed that niclosamide could contribute to maladjustment of BCAA through circadian disorder to suppress tumour, which had a promising future as a new star of the anti-tumour.

Keywords Niclosamide; circadian rhythm; reprogramming metabolism; BCAA; CLOCK

胃癌是全球性的消化道恶性肿瘤之一,在癌症相关死亡原因中占有举足轻重的地位。胃癌的治疗方式主要为胃切除手术,但大多数患者不能被完全治愈,切除后复发率较高。对于失去手术机会的中晚期患者而言,为控制其病情发展,药物治疗成为主要的治疗方法。但目前的抗胃癌药物普遍存在选择性不高、癌细胞易产生多药耐药性等问题^[1]。

2017年诺贝尔生理学或医学奖授予关于生物节律蛋白PER对果蝇生物节律产生关键调控研究的科学家,这成为人们认识内源性生物节律的一个良好开端。生物节律是一种保守进化的时间维持系统,其调节中枢位于下丘脑的视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN),其调节核心机制由转录-翻译正负反馈回路(transcriptional-translational feedback loop, TTFL)建立的自动调节网络构成^[2]。作为生物节律的核心之一的*Clock*基因^[3],其表达水平与前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌和胰腺癌的发生密切相关^[4],但关于CLOCK在胃癌中作用的研究却非常有限。

与正常细胞依赖线粒体氧化磷酸化所产生的能量不同,大多数癌细胞主要依赖糖酵解或通过改变氨基酸及脂质代谢等方式来满足能量及生物合成的需求,这种现象称为代谢重编程^[5]。有研究表明,生物节律紊乱与代谢综合征和肿瘤发展密切相关^[6]。

氯硝柳胺(Niclosamide)最早于1953年在BAYER实验室^[7]被发现,后来成为靶向氧化磷酸化的抗蠕虫药物,致使蠕虫代谢紊乱。近年来,氯硝柳胺成为老

药新用的有力候选,有研究表明氯硝柳胺作用于多种信号通路,发挥抑制肿瘤增殖的抗癌作用^[8]。但目前针对氯硝柳胺抑制胃癌恶性进展的机制研究甚少。

为探究氯硝柳胺作用后胃癌细胞内生物节律和代谢水平的改变情况,及其对胃癌发生发展抑制作用的内在机制,我们开展了如下实验。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人胃癌SGC-7901细胞由温州大学张婷婷老师赠予;CLOCK抗体、DBP抗体、BCKDK抗体、BCAT2抗体、GAPDH抗体和 β -actin抗体均购自Abclonal公司;BCAT1抗体和PER1抗体均购自Proteintech公司;Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司,Thermo Fisher Scientific公司;海马能量代谢微型细胞板和探针板购自Agilent公司;活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒与凋亡检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8实验 将胃癌SGC-7901细胞接种至96孔板中,各实验组分别设置6个复孔,置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养过夜。待细胞长至60%左右,分别设置组别为DMSO组, Niclosamide(2 μ mol/L)组、4 μ mol/L组、8 μ mol/L组以及16 μ mol/L组,药物作用24 h后于波长为450 nm处检测吸光度(D)值,计算抑制率。

1.2.2 流式细胞术检测活性氧 设置DMSO组,

Niclosamide(2 $\mu\text{mol/L}$ 组、4 $\mu\text{mol/L}$ 组、8 $\mu\text{mol/L}$ 组, 将细胞接种于6孔板中, 汇合度达70%后进行加药处理。药物处理4 h后收集细胞, 用DCFH-DA于37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min后上机检测, 分析药物对胃癌细胞内ROS水平的影响。

1.2.3 流式细胞术检测凋亡 设置DMSO组, Niclosamide(2 $\mu\text{mol/L}$ 组、4 $\mu\text{mol/L}$ 组、8 $\mu\text{mol/L}$ 组, 将胃癌SGC-7901细胞接种于6孔板中, 汇合度达80%后进行药物处理。药物处理24 h收集细胞, 配制单染管, 在室温避光下用Annexin V-FITC标记5 min后再用PI染色10 min, 上机检测。

1.2.4 生物信息学分析 从TCGA数据库下载相应数据集, 导入R语言后进行质量控制, 根据矩阵信息及临床信息通过limma包进行差异分析, 筛选差异表达基因。运用R语言和ggplot2包绘制箱线图, 对差异分析结果可视化。

1.2.5 Western blot 制备SDS-PAGE胶, 将提取的蛋白样品加入胶孔中, 进行电泳。按所需条带大小裁剪PVDF膜活化, 根据目的蛋白所在位置切取胶条, 将其转移至印迹滤纸, 覆盖PVDF膜, 合盖转膜三明治, 并于电转槽中电转。电转结束后, 取出条带在室温下进行封闭后孵育相应一抗(其稀释比例DBP为1:200, CLOCK、PER1、BCAT2、BCKDK均为1:500, BCAT1为1:1 000, GAPDH为1:5 000, β -actin为1:10 000), 于4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜。一抗孵育完毕后, 再次TBST洗脱, 并置于室温下孵育兔二抗(稀释比例为1:2 000), 后TBST再次洗脱, 曝光。

1.2.6 海马能量代谢 设置DMSO组, Niclosamide

(2 $\mu\text{mol/L}$ 组、4 $\mu\text{mol/L}$ 组、8 $\mu\text{mol/L}$ 组, 接种20 000个/孔于96孔生物能量分析仪细胞培养微型板中, 将探针板水化后置入Prep Station培养装置中过夜。第2天上机前将培养板细胞液换液为生物能量分析仪分析培养基, 将事先配制好的寡霉素、FCCP、鱼藤酮和抗霉素A工作液加入到相对应的孔中, 使这4种药物的最终浓度均为1 $\mu\text{mol/L}$, 按照说明书运行程序, 后续使用海马软件和GraphPad Prism 8统计。

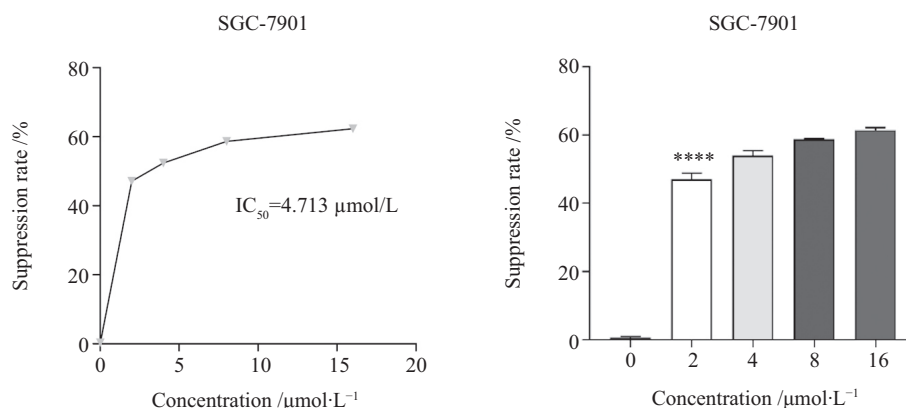
1.2.7 代谢产物检测及代谢组学分析 目标代谢物分析采用XevoG2-XSQT质谱结合超性能液相色谱(UPLC)系统进行目标代谢物分析。用氯仿:甲醇:水以8:4:3的比例提取 1×10^7 细胞匀浆中的代谢物, 并在1%乙腈中重悬。对于UPLC, 样品注入HSST3柱(2.1 mm $\times$ 100.0 mm, 1.8 μm), 使用流相A(0.1%甲酸水)和流相B(0.1%甲酸乙腈), 流速为0.5 mL/min。对于负离子模式, 毛细管能和样品锥分别设置为2 000 V和20 V。其他代谢组学研究如下。(1) 95%水: 5%乙腈+10 mmol/L醋酸铵+氢氧化铵(pH=10); (2) 95%乙腈: 5%水+10 mmol/L醋酸铵+氢氧化铵(pH=10)。检测获得的数据通过在线数据库MetaboAnalyst分析。

1.2.8 统计学分析 从重复实验中收集的数据计算平均值 $\pm$ 标准差测试(双尾)用于比较两组数据的差异, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 氯硝柳胺可抑制胃癌SGC-7901细胞的增殖能力

CCK-8实验结果(图1)显示, 随着氯硝柳胺浓



通过CCK-8增殖实验不同浓度药物作用后细胞增殖水平。**** $P < 0.000 1$, 与DMSO组相比。

Proliferation levels after treatment with different concentrations of niclosamide were detected through cell counting assay. **** $P < 0.000 1$ compared with DMSO group.

图1 氯硝柳胺可抑制胃癌SGC-7901细胞增殖
Fig.1 Niclosamide inhibited proliferation of SGC-7901 cells

度的增加, 药物对细胞增殖抑制率逐渐升高, 浓度 4.713 $\mu\text{mol/L}$ 时达到其半数抑制率, 即 IC_{50} 。

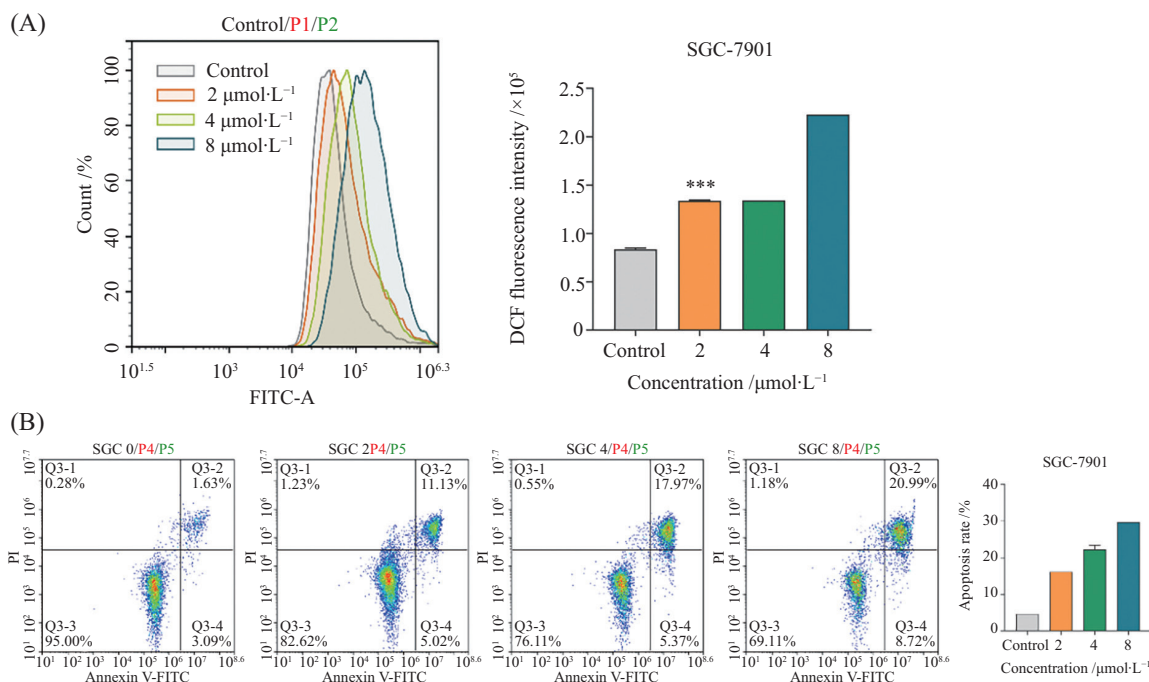
2.2 氯硝柳胺可影响SGC-7901细胞的氧化应激和凋亡

正常活性氧(ROS)水平对机体氧还平衡和增殖促进有积极意义, 而过量氧化应激可破坏细胞成分, 或通过铁依赖性脂质过氧化诱发铁死亡等^[9-10]。流式细胞术检测胞内ROS改变情况发现, 随着药物浓度的上升, 胞内ROS产生水平逐级上升, 且显著高于阴性对照组, 这说明药物处理后胞内氧化应激水平显著升高

(图2A)。流式细胞术检测药物处理后细胞的凋亡情况, 发现SGC-7901凋亡率随着药物浓度的升高逐渐增大, 说明氯硝柳胺可以促进胃癌细胞发生凋亡(图2B)。

2.3 生物信息学分析胃癌样本中生物节律相关基因的差异表达

通过对TCGA数据库的筛选检索, 对胃癌与癌旁样本进行差异分析, 得 P 值和 $\log \text{FC}$ 值后选定生物节律相关基因进行下一步研究探讨。生物信息学分析(图3)显示, *Clock*、*Per*、*Dbp* 这三个核心生物节律基因在胃癌与癌旁间存在较显著的差异, 其中 *Clock*

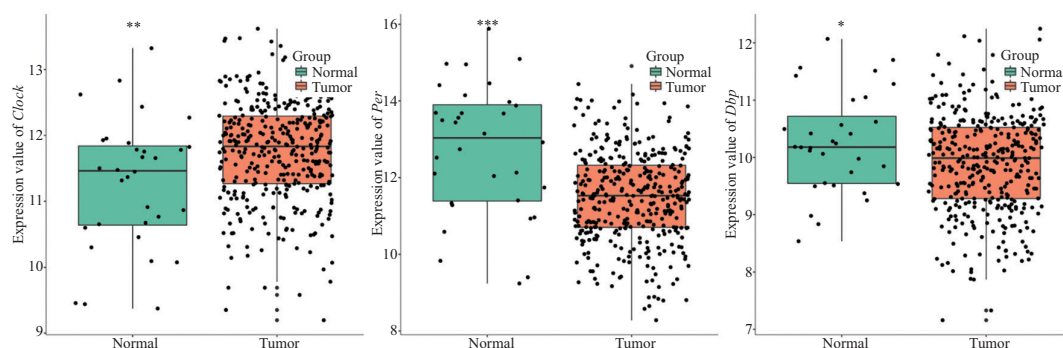


A: 通过流式细胞仪检测胞内活性氧水平; B: 通过流式细胞术检测药物作用后细胞凋亡率。*** $P < 0.001$, 与DMSO组相比。

A: the level of reactive oxygen species was measured utilising flow cytometre; B: apoptosis rates of gastric cancer cell SGC-7901 after treatment with Niclosamide were determined through flow cytometre. *** $P < 0.001$ compared with DMSO group.

图2 氯硝柳胺可诱导氧化应激, 促进凋亡

Fig.2 Niclosamide induced oxidative stress and promoted apoptosis



生物信息学分析通过箱线图显示生物节律相关差异基因。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与癌旁组相比。

Circadian DEGs (differential expression genes) were displayed in boxplots by means of bioinformatics. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with normal group.

图3 生物信息学分析筛选差异基因

Fig.3 DEGs were selected by means of bioinformatics

基因在胃癌中显著上调, 而 *Per* 与 *Dbp* 则显著下调。

2.4 氯硝柳胺可影响胃癌SGC-7901细胞中生物节律相关蛋白的水平

通过Western blot实验检测氯硝柳胺对生物节律相关蛋白表达水平的影响, 结果显示CLOCK蛋白表达呈药物浓度依赖性下降, 而PER1与DBP蛋白表达呈依赖性上升(图4), 结合上述生信预测结果, 提示与对照组相比, 氯硝柳胺作用后, 细胞生物节律发生紊乱, 且呈现浓度依赖性。

2.5 氯硝柳胺影响胃癌SGC-7901细胞的氧化磷酸化

通过海马能量代谢实验检测不同处理组的细胞内氧耗率差异, 以反映胞内氧化磷酸化水平。结果(图5)显示, 氧耗率即OCR整体趋势呈现药物浓度依赖性下降, 由海马代谢数据处理汇总所得的基础呼吸, 最大呼吸以及ATP产生量也呈现浓度依赖性的下调。上述结果均提示氯硝柳胺可引起SGC-7901细胞氧化磷酸化途径紊乱。

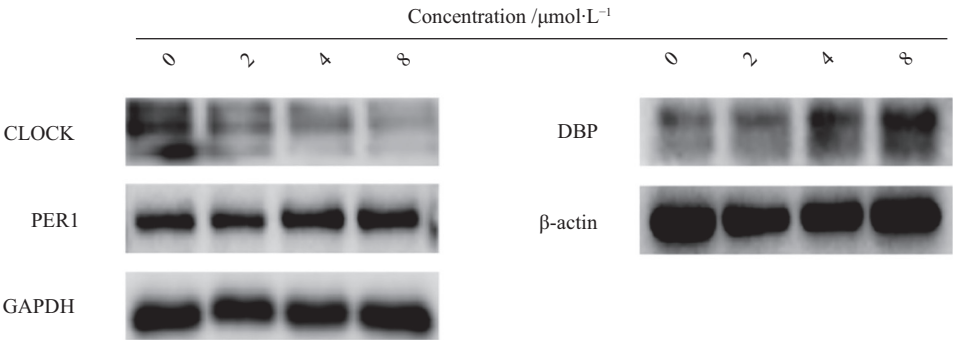
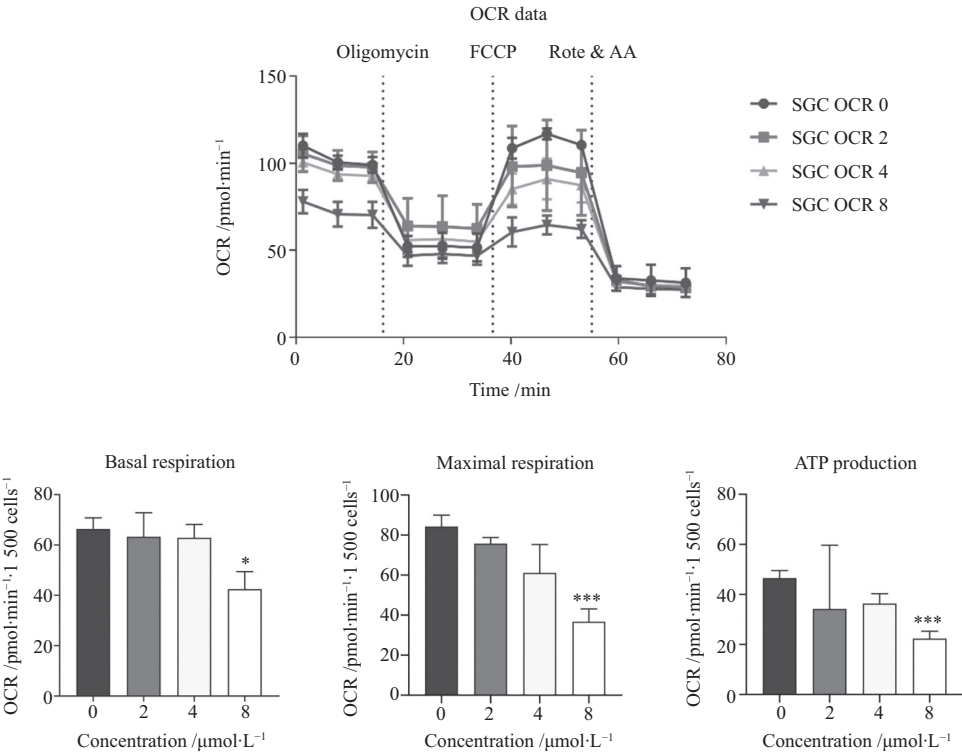


图4 氯硝柳胺可紊乱生物节律相关蛋白的表达水平

Fig.4 Circadian-related protein were disordered after treatment with Niclosamide



通过XF96海马生物能量测定仪检测氧化磷酸化水平, 并将所得数据汇总处理的基础呼吸、最大呼吸和ATP产生量。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, 与DMSO组相比。

Level of oxidative phosphorylation was detected with XF96 Seahorse Extracellular Flux Analyzer, and basal respiration, maximal respiration and ATP production were calculated. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ compared with DMSO group.

图5 氯硝柳胺可抑制细胞内氧化磷酸化途径

Fig.5 Niclosamide could retard oxidative phosphorylation pathway

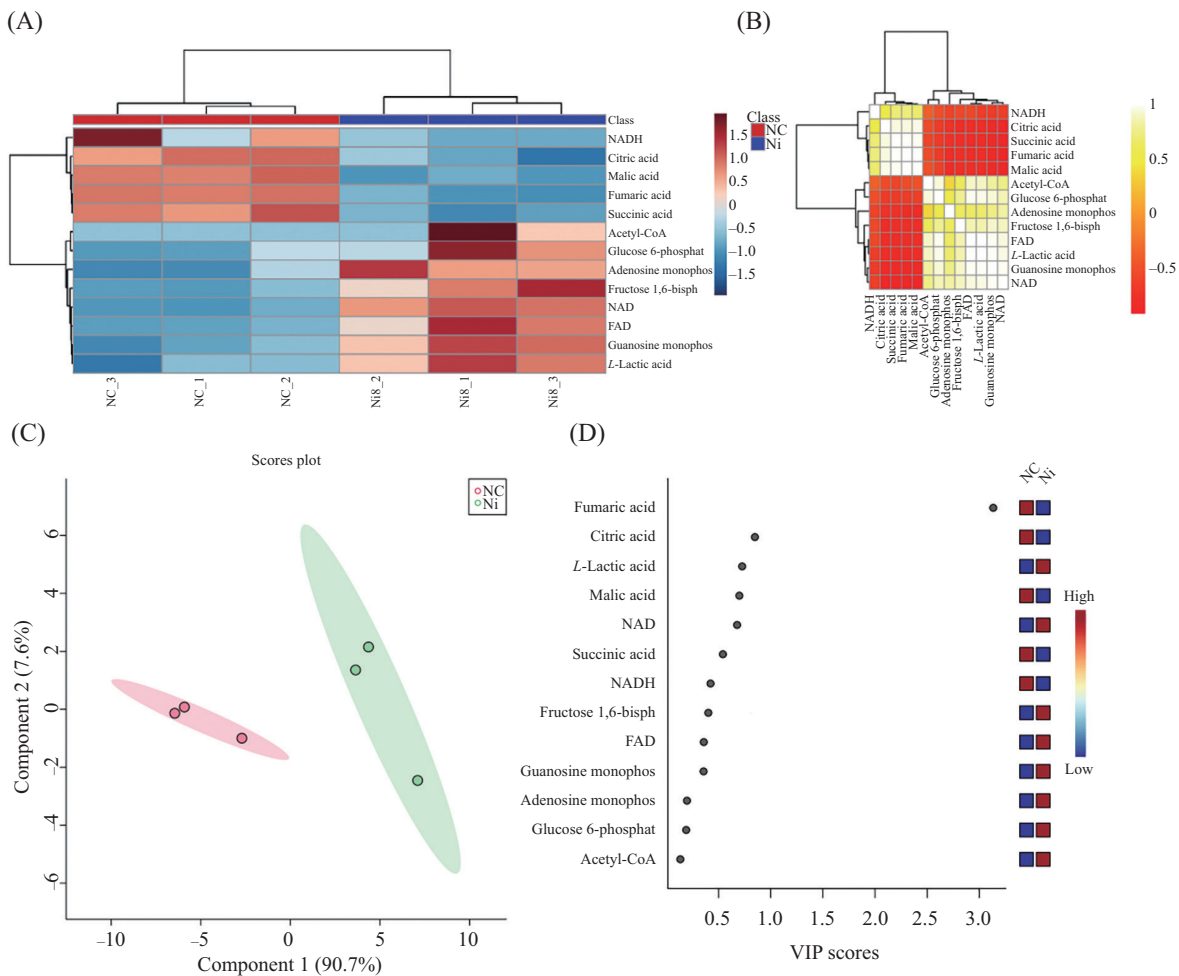
2.6 代谢组学分析氯硝柳胺在代谢组层面对胃癌SGC-7901细胞的影响

代谢质谱表达量热图显示, 药物作用后, 三羧酸循环中间产物如柠檬酸、苹果酸、延胡索酸、琥珀酸以及代谢产物NADH均显著下调, 提示下游氧化磷酸化受到明显抑制; 此外有氧糖酵解第一步反应的产物葡萄糖-6-磷酸显著升高, 亦提示有氧糖酵解的抑制; 而乳酸及乙酰辅酶A有所上升(图6A)。相关性热图展示了上述代谢物两两之间的相关性表达关系(图6B)。此外, PLSDA分析结果(图6C)显示, 阴性对照组与加药组在主成分1中分离明显(90.7%), 即组间代谢差异明显。通过变量投影重要度(VIP)进一步分析组间代谢特征, 延胡索酸对于组间样本

分类判别具有最佳解释能力(图6D), 提示氯硝柳胺对胃癌中TCA及其下游氧化磷酸化通路的重要作用以及氯硝柳胺作用于氧化磷酸化治疗胃癌的理论可行性, 这与上述海马能量代谢结果相符。

2.7 药物与CLOCK下调单独或联合作用对相关蛋白表达水平的影响

Western blot实验结果显示, BCAT1、BCAT2、BCKDK等支链氨基酸代谢核心蛋白的表达水平均受到明显抑制(图7A), BCAT2可将支链氨基酸转经过转氨反应合成支链酮酸, 后者为乙酰辅酶A的合成来源之一^[11], BCAT2蛋白的下调导致乙酰辅酶A合成进一步减少。在胃癌SGC-7901细胞中敲低Clock后检测BCAT1的表达水平, 发现BCAT1在敲低

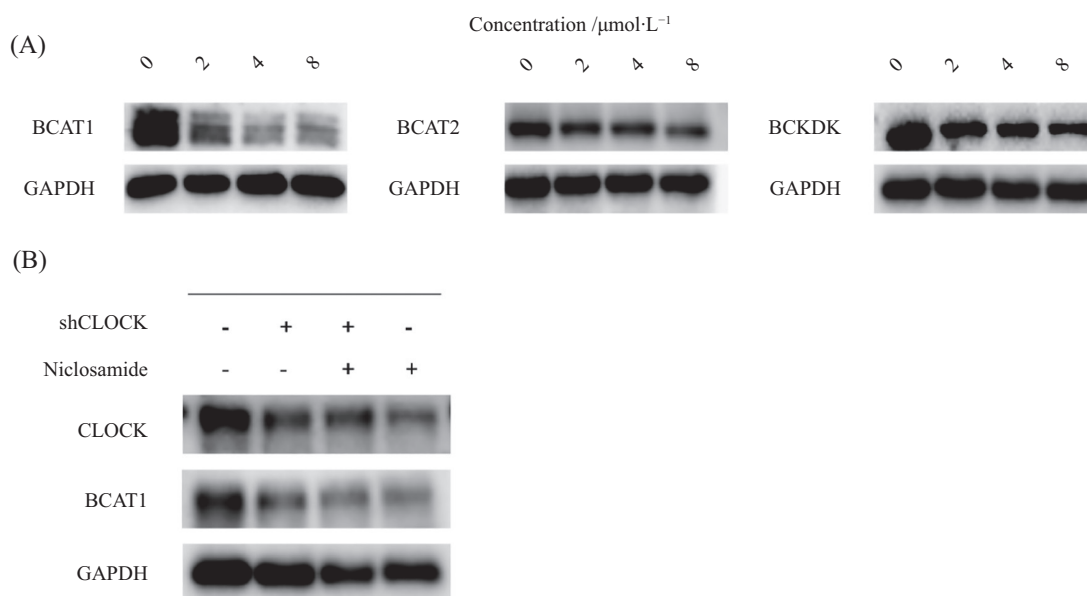


A: 热图显示加药前后差异代谢物; B: 相关性热图展示不同代谢物表达水平的相关性; C: PLSDA分析组间差异趋势; D: PLSDA分析组间差异代谢物及其重要度(VIP)投影。

A: metabolites and its different expressions were shown in heatmap; B: relevance degree among expressions of different metabolites were displayed in correlation heatmap; C: trends of distinctions were shown with PLSDA analyses; D: metabolites of differences and their VIP (variance importance projection) were displayed with PLSDA analyses.

图6 氯硝柳胺可紊乱胃癌细胞代谢组

Fig.6 Niclosamide disordered metabonomics in gastric cancer cells



A: 通过Western blot检测支链氨基酸代谢相关蛋白表达水平; B: 通过Western blot检测CLOCK敲低与药物联合作用后BCAA代表性蛋白BCAT1的表达水平。

A: the level of BCAA-related proteins were detected utilising Western blot; B: the level of BCAT1, typical protein of BCAA, was detected utilising Western blot with combination of shCLOCK and niclosamide.

图7 下调CLOCK引起胃癌细胞节律紊乱诱发支链氨基酸代谢失调的机制研究

Fig.7 Niclosamide inhibited levels of BCAA-related proteins and suppressed BCAT1 by down-regulating CLOCK

和药物单独作用后均有所下调, 联合作用与单独药物作用的结果相似(图7B), 说明氯硝柳胺可通过紊乱胃癌细胞生物节律诱发支链氨基酸代谢失调。

3 讨论

氯硝柳胺由于其成本低廉且临床安全性高以及毒副作用小, 因此其在临床抗肿瘤研究的应用前景可观, 但其在抗肿瘤机制方面仍有待深入研究。基于此, 我们首先探究了氯硝柳胺对胃癌SGC-7901细胞增殖、凋亡、氧化应激、周期等多种表型的影响, 初步验证了其体外抗肿瘤活性。

*Clock*基因是生物节律的核心基因之一。有研究表明, *CLOCK*/*BMAL1*可以通过控制*WEE2*转录的方式阻滞细胞周期^[12]; *KANG*等^[13]研究表明, *CLOCK*干扰会导致DNA损伤的积累和致癌风险的增加。然而, 另有研究表明, 敲除*Clock*基因后, 小鼠肿瘤发生和癌症进程受抑制, 其鼠胚胎成纤维细胞不易成瘤^[14]。近来研究表明, *Clock*基因单核苷酸多态性与胃癌患者总生存率和无复发生存率显著相关, 并且是影响患者预后的危险因素, 但其潜在的分子机制仍未阐明^[15]。由此, 我们首先通过生物信息学分析挖掘胃癌与癌旁组织中生物节律相关差异基因

Clock、*Per*、*Dbp*, 根据Western blot结果表明在氯硝柳胺作用后, 细胞内*CLOCK*、*PER1*、*DBP*这三种蛋白表达水平都发生了明显的变化, 且*CLOCK*下调最为显著, 这一结果提示药物使胃癌SGC-7901胞内的节律调控发生紊乱, *CLOCK*蛋白在其中应该发挥了重要的调节作用。

代谢重编程是肿瘤发生发展的重要标志之一。过去人们常认为癌细胞依赖于有氧糖酵解供能与合成生物大分子, 但这种理论一直存在争议, 肿瘤细胞本身的代谢调控决定于其包括低氧和免疫微环境在内的肿瘤微环境以及“重要器官”肠道菌群的微生态平衡, 且癌细胞可利用非糖类物质, 如谷氨酰胺、脂肪酸等作为主要营养来源^[16-18]。在我们的研究中, 由于氯硝柳胺氧化磷酸化解偶联的特性, 我们通过海马实验检测了不同浓度药物作用后的OCR以反映氧化磷酸化水平, 结果显示其水平呈药物浓度依赖性下降。不仅如此, 我们通过代谢质谱和利用代谢组学深入分析了药物作用后胞内相关代谢物的差异表达与相关性。热图与相关性热图显示了在药物作用后TCA中间产物和终产物NADH的抑制, 提示氧化磷酸化受限, 下述PLSDA结果图亦说明了TCA循环及其下游氧化磷酸化途径对于组间代谢特征分类

的重要性。另外,无氧糖酵解产物乳酸表达量上升,提示氧化磷酸化水平受抑制后,无氧糖酵解的异常激活,导致乳酸应激性上升。有趣的是,作为糖代谢、脂质代谢和氨基酸代谢的关键连接介质乙酰辅酶A在药物作用后表达量却有所上升,说明乙酰辅酶A合成代谢与分解代谢的失衡。乙酰辅酶A来源之一的糖有氧化阻滞,其主要去路TCA循环亦受抑制,故其表达量升高原因仍有待探讨。另有研究表明,支链氨基酸转氨酶1(BCAT1)的过度表达与许多类型的肿瘤例如结直肠癌、乳腺癌、肝癌、卵巢癌等的不良预后相关;在胃癌中,BCAT1表达水平显著增加,并且其可作为影响患者预后的独立因素,提示支链氨基酸代谢在胃癌中被异常激活,其关键催化酶BCAT1在胃癌的发生发展中发挥了关键作用^[19]。由此,我们将视线转向乙酰辅酶A另一来源支链氨基酸代谢,发现在药物作用后,支链氨基酸转氨酶BCAT1/2和支链酮酸脱氢酶激酶BCKDK均受明显抑制,由此可引发乙酰辅酶A合成量的减少^[11,20]。由此可见,乙酰辅酶A的两大来源均受阻滞,主要去路TCA亦然,但其表达量相对于对照组仍呈升高状态,可侧面反映出氯硝柳胺对三羧酸循环及其下游氧化磷酸化途径阻滞程度之深,提示其作为抗癌药物的可观效应及前景。但乙酰辅酶A还有一重要来源,即脂肪酸 β -氧化(FAO),在未来的实验中,我们或将涉足脂质代谢进一步讨论在药物作用后乙酰辅酶A表达水平上升的原因。

紊乱的生物节律功能可增加肿瘤细胞内谷氨酰胺的消耗^[21],且近来有研究发现,支链氨基酸代谢和昼夜节律调控或可存在中间调节物质KLF15,影响禁食状态下从糖异生到氮稳定的平衡^[22]。基于此,为了深入探究生物节律与支链氨基酸代谢的相关性,我们通过敲低CLOCK联合Western blot实验发现,BCAT1可作为氯硝柳胺调控生物节律功能的下游,其表达下调可引起胞质谷氨酸合成量的减少,或可造成体内抗氧化剂GSH的合成量减少导致细胞过氧化的困境,或可致使谷氨酰胺合成代谢受到抑制进而抑制核苷从头合成途径。

综上所述,我们的研究表明,氯硝柳胺可通过抑制胃癌SGC-7901细胞的氧化磷酸化途径,同时抑制糖酵解和三羧酸循环,进而造成胞内代谢组紊乱。此外,氯硝柳胺可通过介导生物节律相关蛋白CLOCK抑制BCAT1的表达,引起支链氨基酸代谢紊

乱,导致后续谷氨酰胺的合成代谢以及核苷合成代谢的阻滞,显著影响胃癌发生发展。因此,氯硝柳胺作为胃癌靶向治疗药物具有重要的研究价值。

参考文献 (References)

- [1] KATSANOS K, KITROU P, SPILIOPOULOS S, et al. Comparative effectiveness of different transarterial embolization therapies alone or in combination with local ablative or adjuvant systemic treatments for unresectable hepatocellular carcinoma: a network meta-analysis of randomized controlled trials [J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0184597.
- [2] SHAFI A A, KNUDSEN K E. Cancer and the circadian clock [J]. Cancer Res, 2019, 79(15): 3806-14.
- [3] MALAGUARNERA R, LEDDA C, FILIPPELLO A, et al. Thyroid cancer and circadian clock disruption [J]. Cancers, 2020, 12(11): 3109.
- [4] SULLI G, LAM M T Y, PANDA S. Interplay between circadian clock and cancer: new frontiers for cancer treatment [J]. Trends Cancer, 2019, 5(8): 475-94.
- [5] 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): 1029-33.
- [6] FURNESS J B. The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections [J]. Auton Neurosci, 2006, 130(1/2): 1-5.
- [7] LAUDISI F, MARÔNEK M, DI GRAZIA A, et al. Repositioning of anthelmintic drugs for the treatment of cancers of the digestive system [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(14): 4957.
- [8] FAN X, LI H, DING X, et al. Contributions of hepatic and intestinal metabolism to the disposition of niclosamide, a repurposed drug with poor bioavailability [J]. Drug Metab Dispos, 2019, 47(7): 756-63.
- [9] WANG Y, QI H, LIU Y, et al. The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy [J]. Theranostics, 2021, 11(10): 4839-57.
- [10] JIANG X, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(4): 266-82.
- [11] SIVANAND S, VANDER HEIDEN M G. Emerging roles for branched-chain amino acid metabolism in cancer [J]. Cancer cell, 2020, 37(2): 147-56.
- [12] LEVENS D. Disentangling the MYC web [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(9): 5757-9.
- [13] KANG T H, REARDON J T, SANCAR A. Regulation of nucleotide excision repair activity by transcriptional and post-transcriptional control of the XPA protein [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(8): 3176-87.
- [14] KATAMUNE C, KOYANAGI S, SHIROMIZU S, et al. Different roles of negative and positive components of the circadian clock in oncogene-induced neoplastic transformation [J]. J Biol Chem, 2016, 291(20): 10541-50.
- [15] CHEN Y, WANG D, SONG Y, et al. Functional polymorphisms in circadian positive feedback loop genes predict postsurgical prognosis of gastric cancer [J]. Cancer Med, 2019, 8(4): 1919-29.
- [16] REINFELD B I, MADDEN M Z, WOLF M M, et al. Cell-programmed nutrient partitioning in the tumour microenvironment

- [J]. *Nature*, 2021, 593(7858): 282-8.
- [17] SUN L, SUO C, LI S T, et al. Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment: beyond the Warburg effect [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2018, 1870(1): 51-66.
- [18] SCHWABE R F, GRETEN T F. Gut microbiome in HCC-mechanisms, diagnosis and therapy [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(2): 230-8.
- [19] XU Y, YU W, YANG T, et al. Overexpression of BCAT1 is a prognostic marker in gastric cancer [J]. *Hum Pathol*, 2018, 75: 41-6.
- [20] 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.
- [21] ALTMAN B J, HSIEH A L, SENGUPTA A, et al. MYC disrupts the circadian clock and metabolism in cancer cells [J]. *Cell Metab*, 2015, 22(6): 1009-19.
- [22] FAN L, HSIEH P N, SWEET D R, et al. Krüppel-like factor 15: regulator of BCAA metabolism and circadian protein rhythmicity [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 130: 123-6.