

脂氧素受体激动剂BML-111对H22细胞 增殖、代谢的作用及其机制研究

胡泉东^{1,2*} 李美静³ 周斌¹ 杨玉娟¹

(¹绍兴职业技术学院医学院, 绍兴 312000; ²南昌大学基础医学院, 南昌 330006;

³烟台毓璜顶医院肝胆外科, 烟台 264000)

摘要 该文旨在探讨脂氧素受体激动剂BML-111对H22细胞的影响及机制。利用小鼠肝癌细胞株H22, 构建肿瘤相关体内外模型, 并给予脂氧素受体激动剂BML-111和脂氧素受体阻断剂BOC-2分别作为治疗组和阻断剂组。体内实验, 测定小鼠皮下肿瘤质量、体积。体外实验, CCK8法检测细胞活力, 试剂盒检测细胞乳酸含量、葡萄糖含量、ATP含量、谷氨酰胺代谢情况, Western blot检测磷酸酶张力蛋白同源物基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)的蛋白含量, qRT-PCR法检测PTEN mRNA表达情况。治疗组较CON组和阻断剂组皮下肿瘤质量和体积均有所减小。与CON组相比, BML-111可以抑制肝癌细胞活力, 可明显降低H22细胞葡萄糖含量、乳酸含量以及谷氨酰胺含量($P<0.05$)。同时BML-111可以提高PTEN的表达水平, 而脂氧素受体阻滞剂BOC-2可以逆转所有这些现象。BML-111通过降低肝癌细胞糖酵解及谷氨酰胺代谢水平, 抑制肝癌细胞的增殖, 降低肝癌细胞的能量代谢水平, 其作用机制可能与调控PTEN的表达相关。

关键词 脂氧素; 肝癌; 能量代谢; 磷酸酶张力蛋白同源物基因

Research on the Effects and Mechanisms of Lipoxin-Receptor Agonist BML-111 on H22 Cell Proliferation and Metabolism

HU Quandong^{1,2*}, LI Meijing³, ZHOU Bin¹, YANG Yujuan¹

(¹Medical School of Shaoxing Vocational & Technical College, Shaoxing 312000, China; ²Basic Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, China; ³Hepatobiliary Surgery Department of Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, China)

Abstract This study aims to investigate the effects and mechanisms of lipoxin-receptor agonist BML-111 on H22 cells. Mouse liver cancer cell line H22 was used to construct tumor related *in vitro* and *in vivo* models, and lipoxin-receptor agonist BML-111 and lipoxin-receptor blocker BOC-2 were administered as the treatment group and blocker group, respectively. *In vivo* experiments were conducted to determine the mass and volume of subcutaneous tumors in mice. For *in vitro* experiments, CCK8 method was used to detect cell viability, kit method was used to detect cell lactate content, glucose content, ATP content, and glutamine metabolism. Western blot was used to detect the protein content of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten). qRT-PCR method was used to detect PTEN mRNA expression. The mass and volume of subcutaneous tumors in the treatment group decreased compared with the CON group and the blocker group. Compared with the CON group, BML-111 could inhibit the vitality

收稿日期: 2024-10-24

接受日期: 2024-12-09

浙江省教育厅科研项目(批准号: Y202456093)资助的课题

*通信作者。Tel: 0575-88340809, E-mail: huqd@sxvtc.edu.cn

Received: October 24, 2024

Accepted: December 9, 2024

This work was supported by the Research Project of Zhejiang Provincial Department of Education (Grant No. Y202456093)

*Corresponding author. Tel: +86-575-88340809, E-mail: huqd@sxvtc.edu.cn

of liver cancer cells, significantly reduce glucose content, lactate content, and glutamine content in H22 cells ($P < 0.05$). Meanwhile, BML-111 could increase the expression level of PTEN, while the lipoxin-receptor blocker BOC-2 could reverse all of these phenomena. BML-111 inhibits the proliferation and energy metabolism of liver cancer cells by reducing glycolysis and glutamine metabolism. Its mechanism of action may be related to the regulation of PTEN expression.

Keywords lipoxins; liver cancer; energy metabolism; PTEN

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤,预后不佳,其中原发性肝癌占75%~85%^[1]。肝脏恶性肿瘤在全球最常见的恶性肿瘤中发病率排在第6位,致死率高居第4位,每年新发病例超过80多万,且50%发生在中国^[2]。脂氧素(lipoxins, LXs)作为花生四烯酸代谢产物的一种,具备特异的抗炎及促炎症消退作用,且该作用经由LXs受体所介导,通过对LXs及受体机制的深入研究,可为肿瘤疾病的临床治疗提供新思路。但是天然LXs在化学上不稳定,在体内通过脱氢和氧化(取决于局部环境)容易被代谢^[3-4],许多稳定的LXs类似物被研究合成并广泛应用。5(S),6(R),7-三羟基庚酸甲酯[5(S),6(R),7-trihydroxyheptanoic acid methyl ester, BML-111]是最典型的生物合成LXs受体激动剂,常用于LXs的替代治疗研究。体内外研究均表明,LXs能增强免疫细胞在抗肿瘤免疫中的作用,抑制乳腺癌细胞、前列腺癌细胞的生长,且能够抑制肿瘤细胞增殖并促进其凋亡,属于内源性炎症反应“刹车信号”家族成员^[5]。1924年,德国生物化学家WARBURG等^[6]研究发现肝癌细胞较正常细胞能够更多地摄取葡萄糖,这一发现即为著名的Warburg效应,Warburg效应是肿瘤的重要代谢特征。肿瘤细胞在增殖、分化过程中,糖酵解增强,乳酸生成增多。随着现代医学技术的发展,临床上通过检测机体对葡萄糖的摄取情况来辅助诊断、监测肿瘤^[7]。磷酸酶张力蛋白同源物基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, *PTEN*)是重要的肿瘤抑制基因,经由PI3K/AKT信号通路实现对细胞生长、增殖的调控作用,是上世纪末首次发现的首个具备双重活性的抑癌基因,临床已经证实其在细胞周期阻滞、细胞增殖调控方面均有显著作用^[8-9]。

以上研究表明能量代谢与肿瘤的发生发展有密切关系,PTEN参与肿瘤细胞的生长。但是,脂氧素在体内是否抑制肿瘤的生长、PTEN与肝癌的发生发展是否存在关联,脂氧素是否通过调控能量代

谢干扰肿瘤增殖,脂氧素是否可以激活PTEN都还不清楚。本研究通过小鼠肝癌细胞株H22,在能量代谢基础之上探讨脂氧素受体激动剂BML-111对肝癌的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取40只健康状态SPF级雄性昆明小鼠,生长周期4~6周,平均(5.12±0.45)周,体质量16~25 g,平均(20.37±2.08) g,小鼠培养期间所用饲料及饮用水均采用高压蒸汽灭菌,南昌大学实验动物中心专人进行日常饲养,饲养环境保持25~27 °C恒温,湿度环境保持45%~50%。所有动物护理和实验程序均按照中国实验动物福利立法进行,并经南昌大学实验动物伦理委员会批准(批准号:2020-0006)。

1.2 细胞

肝癌H22细胞株购自中国科学院上海细胞库,在液氮中保存。

1.3 实验试剂

BML-111购自武汉艾美捷科技有限公司。BOC-2购自金斯瑞科技生物股份有限公司。葡萄糖含量检测试剂盒、乳酸含量检测试剂盒、ATP含量检测试剂盒、谷氨酰胺检测试剂盒、CCK8试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司。BCA蛋白定量试剂盒购自武汉博士德生物有限公司。 β -actin抗体购自美国Abcam公司。PTEN抗体购自美国CLOUD-CLONE公司。RNA提取试剂盒、cDNA合成试剂盒、荧光定量PCR试剂盒购自北京全式金生物技术公司。

1.4 主要设备

净化工作台购自吴江市友诚净化设备厂。倒置显微镜购自深圳市三诺仪器设备厂。离心机购自美国ThermoFisher Scientific公司。电泳仪购自北京六一生物科技有限公司。高压灭菌锅购自上海博谊生物科技有限公司。CO₂培养箱购自上海木森生物科技有限公司。游标卡尺购自成都成量工具集团有

限公司。分析天平购自天津市精拓仪器科技有限公司。多功能酶标仪购自美国 Agilent 公司。荧光定量 PCR 仪购自北京北嘉美仪生物科技有限公司。EPC-G500 全自动凝胶成像系统购自安徽埃帕柯仪器有限公司。

1.5 肿瘤建模

①将增殖情况较好的对数周期 H22 细胞去除上清液后,用酶消化法进行酶解(室温、30 min)。在此基础上,加入高温灭活的 DMEM 培养基(10% FBS, pH7.4)进行离心(1 200 r/min、5 min)分离。以锥虫蓝为例,经 PBS 洗涤 2 次后,锥虫蓝染色法计算细胞的存活率,并以平板计数法,调节悬浮液浓度到 1×10^6 /mL。②取 30 只 SPF 级正常雄性小鼠,将 0.2 mL 的细胞悬液接种至小鼠右侧腋窝下,进行移植。③在种植区域内出现的明显肿块(瘤体直径大于 5 mm)即为种植体。

1.6 体内实验分组及实验方法

将造模成功的小鼠随机分为 3 组: CON 组(12 只)、BML-111 组(12 只)和 BOC-2 组(12 只),每周皮下注射 2 次持续 4 周,荷瘤小鼠的质量和肿瘤大小在用药之前没有显著的差别($P > 0.05$)。PBS 组小鼠体内经肿瘤长轴注入 PBS(0.1 mL/kg)。BML-111 治疗组荷瘤小鼠皮下注射 BML-111(1 mg/kg)。BOC-2 阻断剂组给予脂氧素受体阻滞剂 BOC-2(50 μ g/kg),30 min 后皮下注射 BML-111(1 mg/kg)。最后一次给药后,剥离小鼠腋下肿瘤,分析天平称取每只小鼠的肿瘤质量,用游标卡尺测量每只小鼠的肿瘤长、短径并计算肿瘤体积,肿瘤体积=(肿瘤长径 $\times$ 肿瘤短径²)/2^[10]。

1.7 细胞培养

H22 细胞在含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、0.1 mg/L 链霉素的 DMEM/F12 培养基中进行培养,并将其放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的孵化箱内进行孵化;每日对细胞的生长状况进行监测,并执行细胞的传代培养工作;选取处于对数增长期的细胞,以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种到 6 孔培养板中,继续进行孵化。构建缺乏谷氨酰胺的细胞模型:移除常规的 DMEM 培养基,并对正常细胞进行清洗;加入不含谷氨酰胺的 DMEM 培养基,并将细胞在此培养基中孵化 24 h。

1.8 细胞分组

将细胞分为 3 组,(1) CON 组:根据实验需要将细胞接种到 96 孔板中,接种密度为 1×10^6 /mL,加入 PBS 作为对照;(2) BML-111 组:接种密度为 1×10^6 /mL,加入 BML-111(终浓度为 100 nmol/L);(3) BOC-2 组:接种密度为

1×10^6 /mL,同时加入 BML-111(终浓度为 100 nmol/L)和 BOC-2(终浓度为 10 μ mol/L)^[11]。

1.9 肿瘤组织匀浆液的制备

取 100 mg 肝癌组织,用冰 PBS 清洗 3 次,然后在匀浆器中加入 1 mL 冰 PBS 并充分研磨肝癌组织。-80 $^{\circ}$ C 速冻,并在 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中解冻,反复冻融 2 次。10 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min。取上清,-80 $^{\circ}$ C 保存,以备后续实验使用。

1.10 皮下肿瘤质量和体积的测量

最后一次给药后,剥离小鼠腋下肿瘤,分析天平称取每只小鼠的肿瘤质量,借助游标卡测量小鼠肿瘤组织长、短径,并计算瘤体体积。

1.11 CCK8 法检测细胞活力

采用 DEEM/F12 法将 H22 细胞制成单个悬浮液,每孔 5 000 个/孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱中,按预先试验的剂量分别添加 BML-111(终浓度 100 nmol/L)、BOC-2(终浓度 10 μ mol/L),并按预先试验浓度梯度添加 BML-111(终浓度 100 nmol/L)。分别测定 24、48、72 h 的细胞活性。培养 24 h、48 h、72 h 后,去除初始培养液,加入 100 μ L CCK8 工作溶液(1:10)于每个孔中。将平板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱中,保温时间为 60 min,在 450 nm 波长下测量其吸光度(D)值。

1.12 细胞 ATP 含量及谷氨酰胺含量检测

提取培养液中的细胞群,向每孔注入 200 μ L 的 ATP 分解溶液,随后将细胞加入其中,并在冰上不断搅拌,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min,随后分离上清液。将 ATP 检测试剂按照 1:5 的比例稀释,制备成 ATP 检测专用溶液。将 100 μ L 的检测专用溶液倒入检测孔中,在室温下静置 5 min,然后向每个孔中加入 50 μ L 的样品,快速混合均匀。利用多功能酶标检测仪测量吸光度。根据试剂盒的指导,分别对 CON 组、BML-111 组、BOC-2 组进行操作,按照试剂盒的详细步骤添加相应试剂,混合均匀后,在 37 $^{\circ}$ C 的水浴中孵育 15 min,于 630 nm 波长下读取 D 值。计算谷氨酰胺的浓度,谷氨酰胺浓度=[(测量 D 值-空白 D 值)/(标准 D 值-空白 D 值)] $\times$ 标准品浓度,其中标准品浓度为 2 mmol $\cdot$ L⁻¹。

1.13 乳酸分泌与葡萄糖利用情况检测

用荧光素酶微液滴技术检测细胞培养基中乳酸含量,乳酸及葡萄糖含量检测依照试剂盒说明进行。细胞造模完成后,去除培养液,PBS 清洗 1 次,用胰蛋白酶将其溶解(37 $^{\circ}$ C、30 min),1 000 r/min、

室温离心10 min, 去除上清液, 得到的是细胞沉淀。在PBS洗涤2次之后, 添加100 μL PBS/孔进行超声波细胞粉碎处理, 每次超声5 s, 间隔30 s, 重复5次, 并对其进行BCA检测。葡萄糖含量检测: 将5 μL 的细胞介质与195 μL 的工作液混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理20 min后, 充分混匀并取反应液250 μL /管于96孔板中, 使用酶标仪于570 nm波长处测定吸收度(D_{570})。乳酸含量检测: 将20 μL 的细胞溶解上清与200 μL 的显色剂混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min, 添加2 mL终止溶液, 搅拌均匀后取反应液250 μL /管于96孔板中, 使用酶标仪于530 nm波长处测定吸光度(D_{530})值。

1.14 qRT-PCR检测肿瘤组织中PTEN基因表达情况

PTEN以GAPDH为内参, 它们用于qRT-PCR的引物序列由上海捷瑞生物工程有限公司设计和合成。使用Easstep Super Total RNA提取试剂盒从肿瘤组织中分离RNA, 用反转录试剂盒逆转录合成cDNA, 并以此为模板进行qRT-PCR检测。热循环参数为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 s; 然后是95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 s, 共循环40次。据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算组织中PTEN mRNA的相对表达量。引物序列如下: PTEN上游引物5'-AGG GAC GAA CTG GTG TAA TGA-3', 下游引物5'-CTG GTC CTT ACT TCC CCA TAG AA-3'; GAPDH上游引物5'-GTG GCA AAG TGG AGA TTG TTG-3', 下游引物5'-CGT TGA ATT TGC CGT GAG TG-3'。

1.15 免疫蛋白印迹法检测肿瘤组织中PTEN蛋白表达情况

将肿瘤组织(100 mg)在1 000 μL RIPA中进行裂解。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心20 min, 获得上清液。BCA试剂盒测定蛋白质浓度。制备10 mL的分离剂与3 mL的5%浓缩胶。将肿瘤组织蛋白质样本在100 $^{\circ}\text{C}$ 下煮沸5 min, 然后在冰上冷却10 min。首先添加4 μL Marker蛋白, 再按照预先确定的次序添加40 μg 的蛋白质, 在60 V恒压下进行30 min的电泳, 然后用100 V恒压进行电泳直到将目的蛋白质分离出来。进一步将其电转移至PVDF膜上。5%脱脂奶粉封闭液室温孵育PVDF膜1 h, 用TBST洗1次封闭后的PVDF膜, 然后将PVDF膜放在一抗稀释液(1:300)中, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 下慢摇过夜。TBST清洗3次, 每次10 min, 然后与对应的辣根过氧化物酶标记的二抗工作液(1:6 000)室温孵育1 h。TBST清洗3次, 每次10 min, 用辣根过氧化物酶发光

液, 于Image Lab凝胶成像系统曝光, 用Image-Pro Plus 6.0软件进行灰度分析。

1.16 统计学分析

借助SPSS 25.0软件开展数据分析, 计量资料以($\bar{x}\pm s$)形式表述, 组间比较采用 t 检验, 三组间统计使用方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。GraphPad Prism为本次所用作图软件。

2 结果

2.1 BML-111对肝癌细胞生长具有显著的抑制作用

在本项研究中, 我们观察到BML-111处理组的肿瘤体积在视觉上明显小于CON组、BOC-2组肿瘤体积(图1), BML-111组肿瘤形状多呈不规则扁平; CON组、BOC-2组肿瘤形状呈不规则圆形, 表面有明显出血坏死(图2A)。BML-111组肿瘤的体积和质量与CON组相比明显减小($P<0.05$), BML-111组体积和质量与BOC-2组相比也明显减小($P<0.05$)(图2B和图3)。

2.2 BML-111对H22细胞活力的影响

各组H22细胞培养24、48和72 h后, 分别测定细胞活性。与CON组相比, BML-111组细胞在24、48和72 h后的细胞活力均显著降低($P<0.01$)。与BML-111组相比, BOC-2组各时段H22细胞活力明显升高($P<0.01$), 见表1和图3。

2.3 BML-111对H22细胞谷氨酰胺和ATP代谢的影响

BML-111组H22细胞谷氨酰胺含量和ATP浓度明显低于CON、BOC-2组($P<0.01$), 见表2和图4。结果提示BML-111干扰了H22细胞的能量代谢。

2.4 BML-111对H22细胞葡萄糖代谢和乳酸分泌的影响

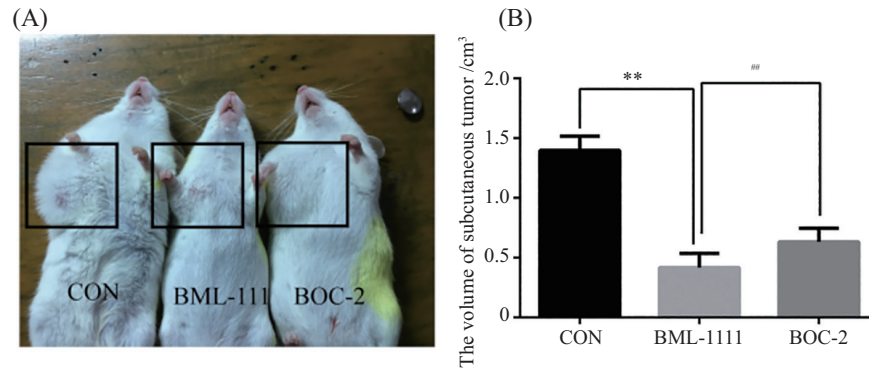
BML-111组H22细胞葡萄糖和乳酸含量明显低于CON、BOC-2组($P<0.01$), 见表3和图5。这些结果显示BML-111可促进H22细胞对葡萄糖的利用, 减少乳酸生成, 说明BML-111具有一定的促进H22细胞有氧氧化的作用。

2.5 BML-111促进肿瘤组织中PTEN的mRNA表达

结果显示, BML-111可促进肿瘤组织中PTEN的mRNA表达($P<0.01$); 阻断剂BOC-2可以逆转BML-111的效应(图6)。

2.6 BML-111促进肿瘤组织中PTEN的蛋白表达

经Western blot法检测证实, BML-111组PTEN的

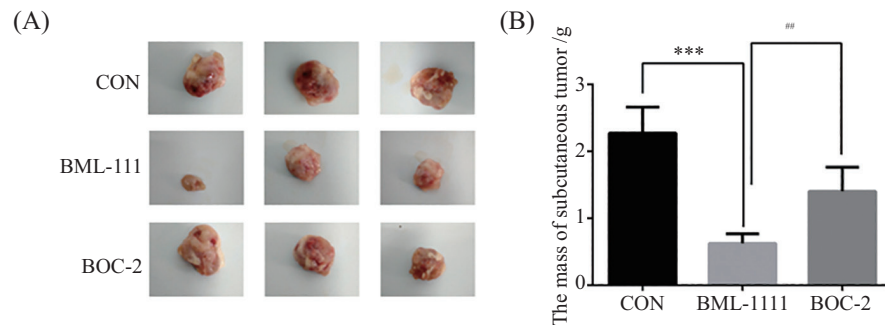


A: H22细胞于小鼠右腋下接种成功后, 观察每组小鼠肿瘤组织生长情况。图中黑色方框内为接种部位的肿瘤组织。B: 测量小鼠肿瘤组织体积。*** $P<0.01$, ## $P<0.01$ 。

A: after successful inoculation of H22 cells into the right axilla of mice, observe the growth of tumor tissue in each group of mice. The black box in the picture represents the tumor tissue at the inoculation site. B: measure the volume of mouse tumor tissue. *** $P<0.01$, ## $P<0.01$.

图1 BML-111作用下肿瘤体积缩小

Fig.1 Tumor volume reduction under the action of BML-111



A: 小鼠肿瘤组织外观。B: 小鼠各肿瘤组织称重。*** $P<0.001$, ## $P<0.01$ 。

A: appearance of mouse tumor tissues. B: weigh the tumor tissues of mice. *** $P<0.001$, ## $P<0.01$.

图2 BML-111作用下肿瘤质量减轻

Fig.2 Tumor mass is reduced under the action of BML-111

表1 BML-111对H22细胞活力的影响

Table 1 The effect of BML-111 on the viability of H22 cells

组别 Group	D值 D value		
	24 h	48 h	72 h
CON	0.239±0.009	0.421±0.025	0.638±0.021
BML-111	0.141±0.007**	0.312±0.026**	0.507±0.018**
BOC-2	0.221±0.005##	0.411±0.019##	0.625±0.011##

** $P<0.01$, 与CON组相比; ## $P<0.01$, 与BML-111组相比。

** $P<0.01$ compared with CON group; ## $P<0.01$ compared with BML-111 group.

蛋白表达量显著高于对照组, 而阻断剂BOC-2逆转了BML-111的作用效应(图7和表4)。

3 讨论

HCC患者具有生存周期短且生存质量低下的特点^[12]。当前HCC临床治疗主要以切除、移植、放化疗和外科手术综合治疗为主, 五年生存率低于5%,

总体上预后情况不理想^[13]。

前期研究发现采用小鼠模型, 能较好地模拟人类肿瘤进展期的组织学特点, 更有利于判断肿瘤的发生以及免疫系统对肿瘤的作用, 所以本研究实验对象选择小鼠模型^[14]以观察药物对肿瘤的作用效果。本研究结果显示, 外观上BML-111组肿瘤体积明显小于CON组、BOC-2组肿瘤体积, BML-111组

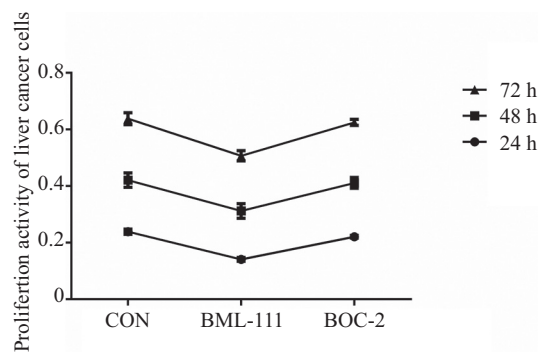
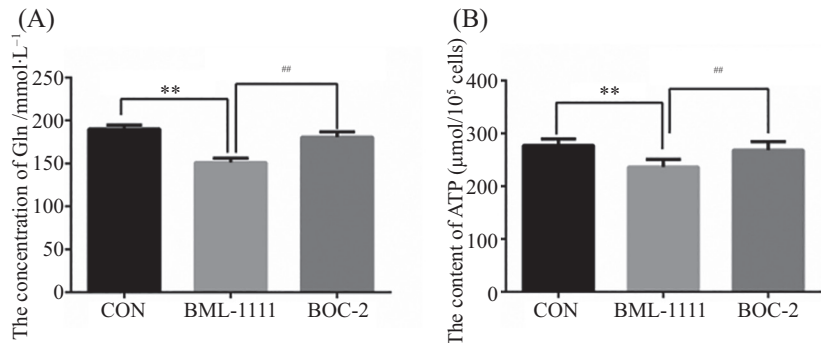


图3 BML-111对H22细胞活力的影响
Fig.3 The effect of BML-111 on H22 cell viability

表2 BML-111降低谷氨酰胺的生成和能量代谢
Table 2 BML-111 reduces glutamine production and energy metabolism

组别 Group	Gln / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	ATP / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
CON	190.06 $\pm$ 4.27	277.37 $\pm$ 11.22
BML-111	151.15 $\pm$ 4.65**	236.35 $\pm$ 13.09**
BOC-2	180.82 $\pm$ 5.43 ^{##}	268.61 $\pm$ 14.61 ^{##}

** $P<0.01$, 与CON组相比; ^{##} $P<0.01$, 与BML-111组相比。
** $P<0.01$ compared with CON group; ^{##} $P<0.01$ compared with BML-111 group.



A: 各组中谷氨酰胺含量; B: 各组中ATP含量。 ** $P<0.01$, ^{##} $P<0.01$, $n=6$ 。
A: glutamine content in each group; B: ATP content in each group. ** $P<0.01$, ^{##} $P<0.01$, $n=6$.

图4 BML-111减少H22细胞谷氨酰胺和ATP的生成
Fig.4 BML-111 reduces the production of glutamine and ATP in H22 cells

形状多呈不规则扁平; CON组、BOC-2组形状呈不规则圆形, 表面有明显出血坏死。BML-111组肿瘤的体积和质量与CON组相比明显减小, BML-111组体积和质量与BOC-2组相比也明显减小。

Gln代谢在肿瘤发生发展中起着关键作用, 而Gln是由细胞膜上的Gln转运体介导的。最新研究表明, 肿瘤细胞能量代谢的分子机制已成为研究癌症治疗的新方向^[15]。已有研究表明, Gln为生命活动所需的能源, 而在肿瘤发生发展时, 则需消耗较多的Gln, 提示Gln可能参与了肿瘤的代谢^[16]。传统的肿瘤细胞能量代谢方式主要有两种: (1) 葡萄糖有氧糖

酵解(糖酵解), (2) 以补充Gln为基础的三羧酸循环。其中, 谷氨酸可以补充三羧酸循环, 同时也可以为生物大分子的合成提供充足的氮源。同时, 它也是谷胱甘肽的前体物, 具有抵抗氧化的功能^[17]。谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS)作为谷氨酰胺酵解限速酶, 可调控机体的谷氨酰胺代谢。已有研究表明, GLS能将Gln转化为谷氨酸, 从而影响癌细胞的生长和转移^[18]。GRINDE等^[19]利用乳腺癌细胞(MAS98.06)建立裸鼠荷瘤动物, 每日2次给予GLS1抑制剂(CB-839) 200 mg/kg, 28天后, 裸鼠体内成瘤速度变慢, 说明GLS1抑制剂具有明显的抗癌作用, 其机制与调控

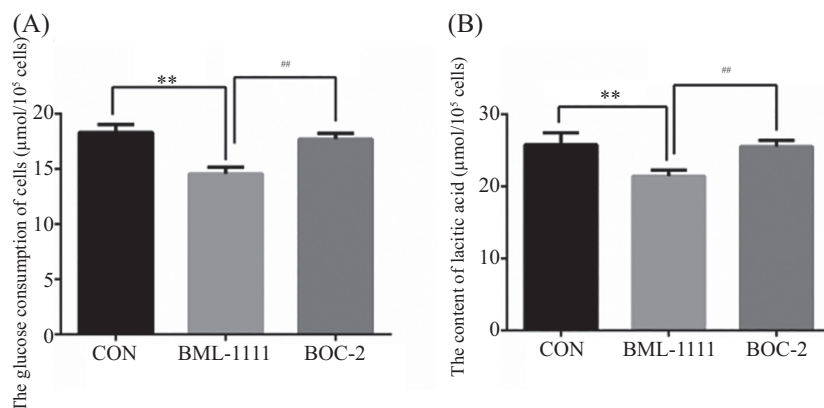
表3 BML-111促进H22细胞有氧氧化

Table 3 BML-111 promotes aerobic oxidation in H22 cells

组别 Group	葡萄糖含量($\mu\text{mol}/10^5$ 细胞) Glucose content ($\mu\text{mol}/10^5$ cells)	乳酸含量($\mu\text{mol}/10^5$ 细胞) Lactic acid content ($\mu\text{mol}/10^5$ cells)
CON	18.32 $\pm$ 0.646	25.78 $\pm$ 1.521
BML-111	14.57 $\pm$ 0.541**	21.45 $\pm$ 0.751**
BOC-2	17.70 $\pm$ 0.473 ^{##}	25.53 $\pm$ 0.774 ^{##}

** $P < 0.01$, 与CON组相比; ^{##} $P < 0.01$, 与BML-111组相比。

** $P < 0.01$ compared with CON group; ^{##} $P < 0.01$ compared with BML-111 group.

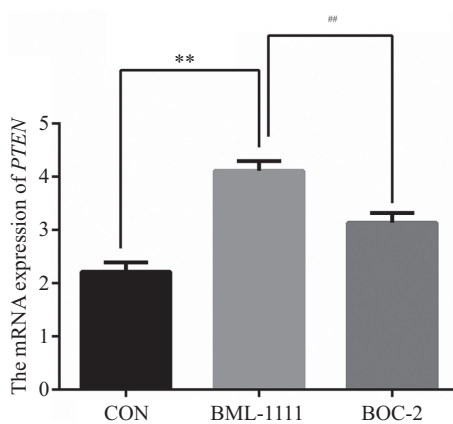


A: 各组中葡萄糖含量; B: 各组中乳酸含量。 ** $P < 0.01$, ^{##} $P < 0.01$, $n = 6$ 。

A: glucose content in each group; B: lactic acid content in each group. ** $P < 0.01$, ^{##} $P < 0.01$, $n = 6$.

图5 BML-111促进H22细胞有氧氧化

Fig.5 BML-111 promotes aerobic oxidation in H22 cells



** $P < 0.01$, ^{##} $P < 0.01$.

图6 BML-111促进肿瘤组织中PTEN的mRNA表达

Fig.6 BML-111 promotes PTEN mRNA expression in tumor tissues

Gln代谢相关。GWANGWA等^[20]将乳腺癌细胞(MCF-7、MDA-MB-231、MCF-10A)与未添加Gln的培养液共培养24、48、72 h; 流式细胞仪分析显示, 在96 h后, 随着谷氨酸浓度的升高, 肿瘤细胞的凋亡率逐渐升高, 说明缺乏Gln能够促进肿瘤细胞的凋亡。研究表明GLS1在肺癌中的低表达可以显著促进肿瘤的生长, 而过高浓度的GLS2则可以有效地抑制肿瘤的

生长, 提示GLS2具有潜在的肿瘤抑制功能^[21]。最新研究表明, GLS2具有抗肿瘤作用, 可通过下调Ras相关C3肉毒杆菌毒素底物1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, RAC1)的活性, 进而抑制HCC的侵袭转移^[22]。

已有多项临床试验证实, LXs类似物BML-111能抑制肿瘤细胞增殖, 下调H22荷瘤小鼠肿瘤组织

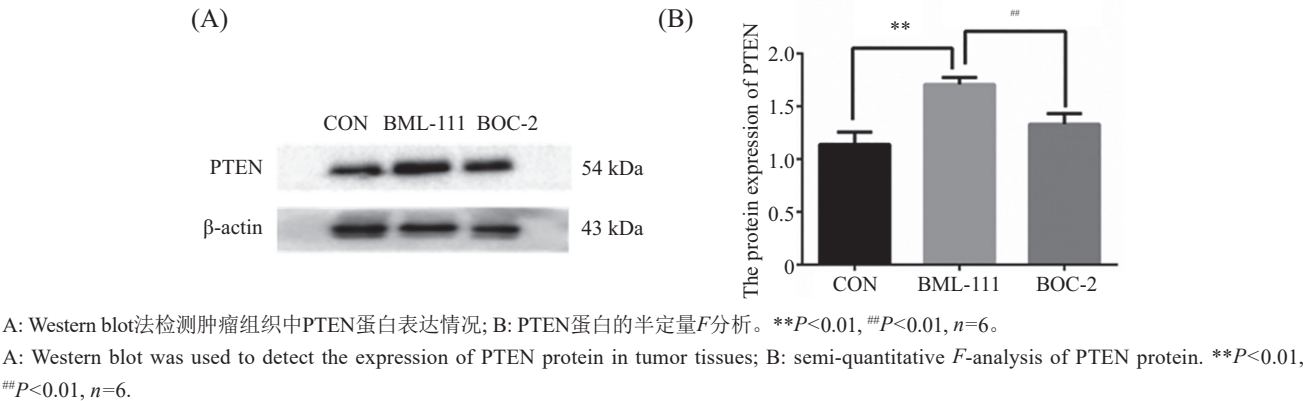


图7 BML-111促进肿瘤组织中PTEN的蛋白表达
Fig.7 BML-111 promotes PTEN protein expression in tumor tissues

表4 BML-111促进肿瘤组织中PTEN的蛋白表达
Table 4 BML-111 promotes PTEN protein expression in tumor tissues

组别 Group	PTEN
CON	1.23±0.22
BML-111	1.78±0.31**
BOC-2	1.34±0.26##

** $P<0.01$, 与CON组相比; ## $P<0.01$, 与BML-111组相比。
** $P<0.01$ compared with CON group; ## $P<0.01$ compared with BML-111 group.

内谷氨酰胺含量^[23], 本实验结果与该研究结果一致。有研究表明 LXs 及其脂氧素受体激动剂 BML-111 通过干扰内皮细胞生长, 抑制肿瘤侵袭^[24]。LXs 与脂氧素 A4 受体(lipoxin A4 receptor, ALXR)相结合后, 可对炎症微环境进行重塑, 从而进一步导致缺氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)水平下调, 产生对癌细胞 PC3 增殖及转移的抑制作用, 其主要机制可能与下调 JNK 通路并影响炎症介质表达有关^[25-26]。氧化应激反应与炎症的发生存在密切关联, 在肿瘤生长过程中的多步骤中均发挥着重要影响作用, 且抗炎过程可对氧化应激反应产生相应抑制作用^[25]。LXs 作为内源性的抗炎介质, 通过促进 Nrf2 的核转位, 抑制肿瘤细胞内抗炎抗氧化酶活性, 干扰肿瘤组织的生长^[23]。

新近研究表明, 糖酵解增强现象存在各种不同组织来源的肿瘤细胞中, 而且这种代谢方式的改变在肿瘤中很常见^[27]。为了评价 LX 类似物 BML-111 的作用效果, 我们检测了肝癌细胞在脂氧素受体激动剂 BML-111 干预 24 h、48 h、72 h 后的细胞活力。在本研究中对照组肝癌细胞活力、糖酵解水平以及细胞中乳酸、谷氨酰胺含量、ATP 含量明显增加。

脂氧素受体激动剂 BML-111 能降低癌细胞活力, 尤其在 24 h 对抑制癌细胞增殖效果最显著。细胞糖酵解水平直接影响乳酸、谷氨酰胺、ATP 含量。脂氧素受体激动剂 BML-111 干扰了肝癌细胞能量代谢以及能量代谢产物(乳酸、谷氨酰胺)的产生, 造成肿瘤微环境的变化, 抑制肿瘤细胞生长。上述研究结果, 与前期研究发现的结肠癌细胞中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD) mRNA 相对表达水平显著升高, 而且该癌细胞增殖的情况与多胺代谢酶活性高低有关系^[28-29]的结论相一致。

PTEN 是 1997 年首次发现的基因, 它具备蛋白和脂质磷酸酶的双重功能, 定位于 10 号染色体的 q23.3 区域, 通过去磷酸化参与细胞调控。*PTEN* 基因的激活能够反向调节 PI3K/AKT 以及 FAK/ERK 信号路径, 从而抑制肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化, 降低其生存能力, 导致细胞周期在 G₀/G₁ 和 G₂/M 阶段停滞, 进而抑制 HSC 的增殖并促进其凋亡^[30]。为进一步探索 LX 类似物 BML-111 对肝癌作用的机制, 本研究通过 qRT-PCR、蛋白印迹法检测 PTEN 的表达情况。结果显示, 对照组中肿瘤组织 PTEN 表达水平明显较低, BML-111 可促进肿瘤组织中 PTEN 的

mRNA、蛋白表达。有研究证明PTEN的活性丧失与乳腺癌、前列腺癌及胆囊癌等多种原发性及转移性恶性肿瘤有关^[31-33]。PTEN可调节PI3K依赖途径和其他独立途径来调控代谢转换,并负性调节肿瘤细胞的糖酵解和谷氨酰胺分解过程^[34]。部分学术成果显示,PTEN功能的降低与多种恶性疾病,包括乳腺癌、前列腺癌以及胆囊癌等原发和转移性肿瘤的发生有着密切联系^[31-33]。PTEN能够通过PI3K相关途径以及其他独立路径对细胞代谢的转变进行调节,同时PTEN水平的提升对肿瘤细胞的糖酵解作用和谷氨酰胺的代谢过程起到抑制作用^[34]。

CHEN等^[35]在相关报道中指出,作为重要的肿瘤抑制基因,PTEN活性变化同乳腺肿瘤、前列腺癌等发生发展及转移均具有密切关联,其活性降低可造成PI3K/AKT信号通路过度激活,从而导致细胞增殖失控,肿瘤发生及转移风险进一步增加。研究还发现,PTEN通过调节PI3K相关途径以及其他独立路径来影响代谢转换,同时它还能负向调节肿瘤细胞的糖酵解和谷氨酰胺代谢过程^[36-37]。

本次通过基础实验研究证实了BML-111对H22肿瘤细胞增殖具有一定抑制,同时也论证了LXs激动剂BML-111对H22小鼠肿瘤细胞能量代谢、PTEN表达水平的影响,旨在为肝细胞癌的后续治疗提供借鉴。在经脂氧素受体激动剂BML-111干预后,肝癌细胞葡萄糖含量逐渐降低,细胞中乳酸、ATP、谷氨酰胺含量均明显减少,同时肿瘤细胞活力降低。BML-111可显著抑制H22细胞在小鼠体内的生长,猜测其可能是通过上调PTEN的表达而抑制肿瘤细胞生长的,但其具体机制尚待商榷。实验结果表明BML-111通过干扰肿瘤细胞的能量代谢,抑制肿瘤细胞的增殖,PTEN的表达水平也受到BML-111的影响,同时PTEN与肝癌的发生发展存在关联。然而PETN调控肝癌细胞能量代谢与增殖的具体机制还未进行深入研究,需要实验进一步验证。

参考文献 (References)

- [1] REBECCA L S, KIMBERLY D M, AHMEDIN J. Cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] FREDDIE B, JACQUES F, ISABELLE S, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] GONZALEZ B, MAAYEH M, KNISS D, et al. Low-dose aspirin increases 15-epi-lipoxins A4 in pregnancies at high-risk for developing preeclampsia [J]. *Pregnancy Hypertens*, 2021, 26(6): 75-8.
- [4] CEKICI A, SAHINKAYA S, DONMEZ M F, et al. Sirtuin6 and Lipoxin A4 levels are decreased in severe periodontitis [J]. *Clin Oral Invest*, 2023, 27(12): 7407-15.
- [5] XU F, ZHOU X, HAO H, et al. Lipoxin A4 and its analog suppress hepatocarcinoma cell epithelial-mesenchymal transition, migration and metastasis via regulating integrin-linked kinase axis [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2018, 137: 9-19.
- [6] WARBURG O, POSENER K, NEGELEIN E. On the metabolism of carcinoma cells [J]. *Biochem Z*, 1924, 152: 309-44.
- [7] HN X, WANG D, YANG L, et al. Activation of polyamine catabolism promotes glutamine metabolism and creates a targetable vulnerability in lung cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121(13): e2319429121.
- [8] JARAZO J, BARMPI K, MODAMIO J, et al. Parkinson's disease phenotypes in patient neuronal cultures and brain organoids improved by 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin treatment [J]. *Mov Disord*, 2022, 37(1): 80-94.
- [9] LEE Y R, CHEN M. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(9): 547-62.
- [10] 沈艳, 毛建华, 王华枫, 等. 砷剂对吉非替尼耐药非小细胞肺癌小鼠皮下肿瘤的作用 [J]. 畜牧与兽医 (SHEN Y, MAO J H, WANG H F, et al. Effects of arsenic on the gefitinib-resistant non-small cell lung cancer in nude mice [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*), 2022, 54(10): 65-73.
- [11] PEH H Y, NSHIMIYIMANA R, SERHAN C N, et al. 15-epi-lipoxin A5 promotes neutrophil exit from exudates for clearance by splenic macrophages [J]. *FASEB J*, 2024, 38(14): e23807.
- [12] PINERO F, DIRCHWOLF M, PESSOA M G. Biomarkers in hepatocellular carcinoma: diagnosis, prognosis and treatment response assessment [J]. *Cells*, 2020, 9(6): 1-27.
- [13] LI J J, LIANG Q, SUN G C. Traditional Chinese medicine for prevention and treatment of hepatocellular carcinoma: a focus on epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Integr Med*, 2021, 19(6): 469-77.
- [14] BOIX M P, SORIANO T P M, ARMINN A, et al. The past, present, and future of breast cancer models for nanomedicine development [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 173: 306-30.
- [15] BRAGAZZI M C, VENERE R, RIBICHINI E, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: evolving strategies in management and treatment [J]. *Dig Liver Dis*, 2024, 56(3): 383-93.
- [16] QUIRICO L, ORSO F, CUCINELLI S, et al. miRNA-guided reprogramming of glucose and glutamine metabolism and its impact on cell adhesion/migration during solid tumor progression [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(4): 216.
- [17] ZHEN Y, LIU K, SHI L, et al. FGFR inhibition blocks NF- κ B-dependent glucose metabolism and confers metabolic vulnerabilities in cholangiocarcinoma [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 3805.
- [18] LI X, LIU M, LIU H, et al. Tumor metabolic reprogramming in lung cancer progression [J]. *Oncol Lett*, 2022, 24(2): 287.
- [19] GRINDE M T, HILMARSDOTTIR B, TUNSET H M, et al. Glutamine to proline conversion is associated with response to glutaminase inhibition in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2019, 21(1): 61.

- [20] GWANGWA M V, JOUBERT A M, VISAGIE M H. Effects of glutamine deprivation on oxidative stress and cell survival in breast cell lines [J]. *Biol Res*, 2019, 52(1): 15.
- [21] GAO C C, XU Q Q, XIAO F J, et al. NUDT21 suppresses the growth of small cell lung cancer by modulating GLS1 splicing [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526(2): 431-8.
- [22] XI J, SUN Y, ZHANG M, et al. GLS1 promotes proliferation in hepatocellular carcinoma cells via AKT/GSK3 β /CyclinD1 pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 381(1): 1-9.
- [23] LI Y, FAN W, LINK F, et al. Transforming growth factor β latency: a mechanism of cytokine storage and signalling regulation in liver homeostasis and disease [J]. *JHEP Rep*, 2021, 4(2): 100397.
- [24] VIEIRA A M, NEETO E H, FIGUEIREDO C C, et al. ATL-1a synthetic analog of lipoxin modulates endothelial permeability and interaction with tumor cells through a VEGF-dependent mechanism [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 90(4): 388-96.
- [25] SUCHITHA G P, DEVASAHAYAM A, PRASAD T S K, et al. A signaling network map of Lipoxin (LXA4): an anti-inflammatory molecule [J]. *Inflamm Res*, 2024, 73(7): 1099-106.
- [26] LI X Y, WANG S L, CHEN D H, et al. Construction and validation of a m7G-related gene-based prognostic model for gastric cancer [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 861412.
- [27] ANDO R, SHIRAKI Y, ENOMOTO A, et al. Mefflin is a marker of pancreatic stellate cells involved in fibrosis and epithelial regeneration in the pancreas [J]. *J Pathol*, 2024, 262(1): 61-75.
- [28] KRISHNA P S, NAIR P S, SURISHKUMAR G K, et al. Shear stress and microRNAs for better metastatic cancer management [J]. *Biotechnol Prog*, 2024, 40(1): e3396.
- [29] DU H, WU H, KANG Q, et al. Polyphyllin I attenuates the invasion and metastasis via downregulating GRP78 in drug-resistant hepatocellular carcinoma cells [J]. *Aging*, 2023, 15(21): 12251-63.
- [30] LI J, YEN C, LIAW D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine-phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer [J]. *Science*, 1997, 275(5308): 1943-7.
- [31] KECHAGIOGLOU P, PAPI R M, PROVATOPOULOU X, et al. Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(3): 1387-400.
- [32] WISE H M, HERMIDA M A. Prostate cancer, PI3K, PTEN and prognosis [J]. *Clin Sci*, 2017, 131(3): 197-210.
- [33] ROA I, GONZALO D T, FERNANDEZ F, et al. Inactivation of tumor suppressor gene pten in early and advanced gallbladder cancer [J]. *Diagn Pathol*, 2015, 10: 148.
- [34] GARCIA C I, SONG M S, HOBBSRM, et al. Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state [J]. *Cell*, 2012, 149(1): 49-62.
- [35] CHEN L. The functions of tumor suppressor PTEN in innate and adaptive immunity [J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(7): 581-9.
- [36] 杨建林, 田家俊, 张浩, 等. 新型精胺氧化酶抑制剂SI-4650对人卵巢癌SKVO-3细胞增殖和上皮细胞间质化的影响[J]. *中国应用生理学杂志*(YANG J L, TIAN J J, ZHANG H, et al. Effects of a novel spermine oxidase inhibitor SI-4650 on proliferation and EMT of human ovarian cancer SKVO-3 cells [J]. *Chin J Appl Physiol*), 2022, 38(2): 175-80,192.
- [37] CHAUDAGAR K, HIEROMNIMON H M, PATNAIK A, et al. Reversal of lactate and PD-1-mediated macrophage immunosuppression controls growth of PTEN/p53-deficient prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2023, 29(10): 1952-68.