

论著·基础研究

支链氨基酸分解代谢在肺癌细胞中的功能

贺艳琪^{1,2}, 迟锐^{1,2}, 陈梦萍^{1,2}, 陈思^{1,2}, 刘春良^{1,2}, 刘云霞^{1,2}, 孙海鹏^{1,2}

1. 上海交通大学基础医学院病理生理学系, 细胞分化与凋亡教育部重点实验室, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院附属同仁医院虹桥国际医学研究院, 上海 200050

[摘要] **目的**·探索支链氨基酸 (branched-chain amino acid, BCAA) 分解代谢在肺癌细胞中的功能和作用机制。**方法**·采用瞬时转染法分别向非小细胞肺癌细胞 H1299、A549 和 HCC827 转染含无义序列的小干扰 RNA (small interfering negative control, siNC)、支链酮酸脱氢酶激酶 (branched-chain keto acid dehydrogenase kinase, BCKDK) 基因的小干扰 RNA (small interfering BCKDK, siBCKDK), 并采用蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测 siNC 组和 siBCKDK 组中 BCKDK 表达水平、支链酮酸脱氢酶亚基 E1 α (branched-chain keto acid dehydrogenase e1, α polypeptide, BCKDE1 α) 及其磷酸化水平。采用 CCK-8 法检测上述 2 组细胞的增殖活力。用含 0、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的 BCKDK 小分子抑制剂 BT2 (3,6-二氯-2-苯并噻吩羧酸) 培养液分别培养上述 3 种细胞, 采用 Western blotting 检测 3 种浓度 BT2 组细胞中 BCKDE1 α 及其磷酸化水平。用 CCK-8 法检测 0 $\mu\text{mol/L}$ BT2 组和 200 $\mu\text{mol/L}$ BT2 组细胞的增殖活力。采用台盼蓝染色计算 H1299 和 A549 细胞中 siNC 组和 siBCKDK 组、0 $\mu\text{mol/L}$ BT2 组和 200 $\mu\text{mol/L}$ BT2 组的细胞活率; 并用碘化丙啶染色检测细胞周期, 而后行 Western blotting 检测细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, P21) 的表达水平。**结果**·在 H1299、A549、HCC827 细胞中, 与 siNC 组相比, siBCKDK 组的 BCKDK 表达下调, BCKDE1 α 磷酸化水平下调, 且细胞的增殖活力减弱 (均 $P=0.000$)。与 0 $\mu\text{mol/L}$ BT2 组相比, 100 $\mu\text{mol/L}$ BT2 组和 200 $\mu\text{mol/L}$ BT2 组的上述 3 种细胞中 BCKDE1 α 磷酸化水平下调, 且 200 $\mu\text{mol/L}$ BT2 组下调更明显; 200 $\mu\text{mol/L}$ BT2 组较 0 $\mu\text{mol/L}$ BT2 组的细胞增殖活力减弱 (均 $P=0.000$)。在 H1299、A549 细胞中, 分别与 siNC 组、0 $\mu\text{mol/L}$ BT2 组相比, siBCKDK 组、200 $\mu\text{mol/L}$ BT2 组的细胞活率均无差异, 但发生了 G0/G1 期细胞周期阻滞 (均 $P<0.05$), 且该 2 组的 P21 表达水平升高。**结论**·siBCKDK 和 BT2 能够促进 BCKDE1 α 去磷酸化, 加快 BCAA 分解代谢, 可能通过上调 P21、阻滞细胞周期来抑制肺癌细胞的增殖。

[关键词] 支链氨基酸; 肺癌; 细胞增殖**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.07.003 **[中图分类号]** R363.2¹ **[文献标志码]** A

Function of branched-chain amino acid catabolism in lung cancer cells

HE Yan-qi^{1,2}, CHI Rui^{1,2}, CHEN Meng-ping^{1,2}, CHEN Si^{1,2}, LIU Chun-liang^{1,2}, LIU Yun-xia^{1,2}, SUN Hai-peng^{1,2}

1. Key Laboratory of Cell Differentiation and Apoptosis of the Chinese Ministry of Education, Department of Pathophysiology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China; 2. Hongqiao International Institute of Medicine, Tongren Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200050

[Abstract] **Objective**·To explore the function and mechanism of branched-chain amino acid (BCAA) catabolism in lung cancer cells. **Methods**·Small interfering negative control (siNC) and small interfering branched-chain keto acid dehydrogenase kinase (siBCKDK) were transfected into non-small cell lung cancer cells H1299, A549 and HCC827 by instantaneous transfection. The expression of BCKDK, branched-chain keto acid dehydrogenase e1, α polypeptide (BCKDE1 α) and its phosphorylation in siNC group and siBCKDK group were detected by Western blotting. The proliferation activity of the above two groups of cells was detected by CCK-8 assay. The above three kinds of cells were cultured in culture medium containing 0, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ BT2 (3, 6-dichlorobenzo[b]thiophene-2-carboxylic acid), respectively. The expression of BCKDE1 α and its phosphorylation were detected by Western blotting. The proliferation activity of 0 $\mu\text{mol/L}$ BT2 group and 200 $\mu\text{mol/L}$ BT2 group was detected by CCK-8 assay. The cell viability of siNC group and siBCKDK group, 0 $\mu\text{mol/L}$ BT2 group and 200 $\mu\text{mol/L}$ BT2 group in H1299 and A549 cells was calculated by trypan blue staining. Cell number at different phases of cell cycle was detected by propidium iodide staining. Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) expression was detected by Western blotting. **Results**·In H1299, A549 and HCC827 cells, compared with siNC group, expression of BCKDK and phosphorylation of BCKDE1 α in siBCKDK group were down-regulated, and the proliferation activity was decreased (all $P=0.000$). Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ BT2 group, the phosphorylation of BCKDE1 α was down-regulated in H1299, A549 and HCC827 cells in both 100 $\mu\text{mol/L}$ BT2 group and 200 $\mu\text{mol/L}$ BT2 group, but more obviously in 200 $\mu\text{mol/L}$ BT2 group. The cell proliferation activity in 200 $\mu\text{mol/L}$ BT2 group was decreased compared with that in 0 $\mu\text{mol/L}$ BT2 group (all $P=0.000$). There was no significant difference in the cell viability of H1299 and A549 cells between siBCKDK group and siNC group, 200

[基金项目] 国家自然科学基金 (81570717, 31900819); 上海市科技创新行动计划基础研究领域项目 (16JC1404400)。**[作者简介]** 贺艳琪 (1996—), 女, 硕士生; 电子邮箱: jenniehq@163.com。**[通信作者]** 孙海鹏, 电子邮箱: sun.haipeng@yahoo.com。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81570717, 31900819); Basic Research Projects of Shanghai Science and Technology Innovation Action Plan (16JC1404400)。**[Corresponding Author]** SUN Hai-peng, E-mail: sun.haipeng@yahoo.com。**[网络首发]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2045.R.20210629.1044.022.html> (2021-06-29 14:25:47)。

$\mu\text{mol/L}$ BT2 group and 0 $\mu\text{mol/L}$ BT2 group, but G0/G1 cell cycle arrest occurred (all $P<0.05$) with the expression of P21 increasing. **Conclusion** • siBCKDK and BT2 can promote the dephosphorylation of BCKDE1 α and accelerate the catabolism of BCAA, which may inhibit the proliferation of lung cancer cells by up-regulating P21 and blocking cell cycle.

[Key words] branched-chain amino acids (BCAA); lung cancer; cell proliferation

在世界范围内,肺癌是癌症患者死亡的主要病因之一。根据世界卫生组织国际癌症研究中心发布的最新统计数据显示,2020年全球新发癌症病例1 929万例,其中肺癌病例220万(我国有82万)^[1]。肺癌从形态学上分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)两大类,其中NSCLC占比80%~85%且患者的5年生存率不足20%^[2]。

支链氨基酸(branched-chain amino acid, BCAA)是一类R基团含有支链的必需氨基酸,包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸3种。在哺乳动物中,BCAA只能通过食物获取。支链酮酸脱氢酶(branched-chain keto acid dehydrogenase, BCKDH)是BCAA分解代谢的限速酶,为一种由多个亚基组成的复合物,其活性受到亚基支链酮酸脱氢酶E1 α (branched-chain keto acid dehydrogenase e1, α polypeptide, BCKDE1 α)磷酸化的调节。而支链酮酸脱氢酶激酶(branched-chain keto acid dehydrogenase kinase, BCKDK)可磷酸化BCKDE1 α ,降低BCKDH活性,从而抑制BCAA的分解代谢。BCKDK抑制剂——3,6-二氯-2-苯并噻吩羧酸(3,6-dichlorobenzo[b]thiophene-2-carboxylic acid,简称BT2)是Tso等^[3]发现的一种靶向BCKDK的新型小分子化合物,其能够有效下调BCKDE1 α 的磷酸化,以促进BCAA的分解代谢^[4-5]。

P21又叫P21^{Waf1/Cip1}或CDKN1A(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)^[6],是周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent-kinase inhibitor, CKI)家族的成员之一,也是细胞周期的负调控因子,可通过抑制细胞周期的关键调节因子——周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)使细胞周期发生阻滞^[7]。

近些年人们发现,BCAA与一些肿瘤的发生与发展有关。Mayers等^[8]发现胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)患者血浆中BCAA水平升高,与未来胰腺癌诊断风险增加有关。Ericksen等^[9]发现BCAA的分解代谢在肝癌中被抑制,且这种抑制状态可促进肝肿瘤的形成。Li等^[10]发现在小鼠模型和人类PDAC中BCAA转氨酶水平明显升高,使得肿瘤细胞对BCAA的摄取增加,从而维持线粒体呼吸。上述研究均提示,在部分肿瘤的发生与发展中BCAA的分解代谢发挥了一定的作用。然而目前,关于肺癌和BCAA代谢之

间的研究并不多。本研究采用NSCLC细胞株进行体外实验,探索BCAA分解代谢在肺癌细胞中的功能,以期为肺癌的临床治疗或药物开发提供实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

A549、H1299、HCC827细胞株均购自美国模式培养物集存库。主要试剂: β -actin抗体(上海泊湾生物科技有限公司),磷酸化BCKDE1 α (P-BCKDE1 α)抗体(Bethyl,美国),BCKDK抗体、BCKDE1 α 抗体(Santa Cruz Biotechnology,美国),P21抗体(Cell Signaling Technology,美国),CCK-8试剂盒[东仁化学科技(上海)有限公司],台盼蓝染色液(0.4%)(北京普利莱基因技术有限公司),碘化丙啶(propidium iodide, PI)(Sigma,美国),小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)、BCKDK的小干扰RNA(small interfering BCKDK, siBCKDK,序列为5'-CUGACUUUGUCGGCAUCAUTT-3')(由上海吉玛制药技术有限公司合成),Lipo 2000转染试剂(Invitrogen,美国),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM培养基(Gibco,美国),RPMI-1640培养基(上海源培生物科技股份有限公司),BCKDK的小分子抑制剂BT2(Caymanchem,美国)。

1.2 细胞培养

于37℃、5% CO₂的恒温培养箱中,采用含10% FBS的DMEM培养基对A549和HCC827细胞进行培养,采用含10% FBS的RPMI-1640培养基对H1299细胞进行培养。定期观察细胞状态,每2~3 d进行1次传代。

1.3 细胞处理及分组

将处于对数生长期的上述3种细胞按照(1~2)×10⁶的密度种板,设置3个复孔。①siRNA转染:待细胞贴壁生长后,按照Lipo 2000说明书操作步骤进行转染和换液。对照组细胞转染无义序列的siNC,处理组细胞转染siBCKDK。待细胞生长48~72 h后,收集细胞和蛋白做后续实验。②BT2处理:待细胞贴壁生长后,更换为含0 $\mu\text{mol/L}$ BT2、100 $\mu\text{mol/L}$ BT2、200 $\mu\text{mol/L}$ BT2的培养

基,继续培养48~72 h后收集细胞及蛋白用于后续检测。

1.4 BCKDK表达、BCKDE1 α 及其磷酸化水平检测

分别收集经 siNC、siBCKDK 转染的 H1299、A549、HCC827 细胞,于磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)中清洗,而后加入细胞裂解液进行充分裂解。收集裂解后的细胞悬液于 100 ℃加热 10 min,再于 4 ℃下 12 000 \times g 离心 10 min,取上清液即为蛋白样品。采用 BCA 试剂盒测定蛋白样品浓度,具体步骤参见该试剂盒说明书。而后,将其制成含溴酚蓝的统一浓度的蛋白样品,行蛋白质印迹法(Western blotting)检测,具体步骤参照常规操作,使用抗体包括 β -actin 抗体、BCKDK 抗体、P-BCKDE1 α 抗体、BCKDE1 α 抗体。分别收集经 0 μ mol/L BT2、100 μ mol/L BT2、200 μ mol/L BT2 处理的上述 3 种细胞的蛋白,行 Western blotting 检测 BCKDE1 α 及其磷酸化水平,具体检测步骤同前。

1.5 细胞增殖能力检测

①将转染 siNC、siBCKDK 后的 H1299、A549、HCC827 细胞分别按照 2 000 个/孔进行种板,设置 5 个复孔进行培养。②将上述 3 种细胞分别按照 2 000 个/孔进行种板(设置 5 个复孔),待细胞贴壁生长后,更换为含 0 μ mol/L BT2、200 μ mol/L BT2 的培养基继续培养。分别于 0、24、48、72 h 向①、②实验的每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,孵育 2 h 后检测吸光度值 [$D(450\text{ nm})$],并以时间为横坐标、吸光度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。具体步骤参照 CCK-8 试剂盒说明书进行。

1.6 细胞活率检测

将 H1299、A549 细胞按照 1×10^5 进行种板,设置 3 个复孔。待细胞贴壁生长后,分别做如下处理:①转染 siNC、siBCKDK。②更换为含 0 μ mol/L BT2、200 μ mol/L BT2 的培养基。于 37 ℃恒温培养箱中继续培养 48~72 h。分别收集上述处理后的细胞,将其制备成 1 mL 细胞悬液,与 0.2% 台盼蓝溶液(先用 PBS 将 0.4% 台盼蓝溶液按照 1:1 稀释)进行混匀(比例为 1:1)。取 20 μ L 细胞混合液轻轻加入计数板中,用 Countstar 自动细胞计数仪进行计数,统计细胞活率并分析作图。具体步骤参考台盼蓝染料说明书。

1.7 细胞周期不同阶段的占比及 P21 蛋白的检测

将 H1299、A549 细胞分别按照 4×10^5 个/皿进行种板。待细胞贴壁生长后,分别行如下处理:①转染 siNC、

siBCKDK。②更换为含 0 μ mol/L BT2、200 μ mol/L BT2 的培养基。于 37 ℃恒温培养箱中培养 48~72 h。分别收集上述细胞并用终浓度为 70% 的乙醇固定过夜,室温下采用 PI 进行避光染色 15 min。而后,用流式细胞仪检测处于细胞周期不同阶段的细胞占比,采用 FLOWJO_v (10.6.2) 软件对细胞周期占比进行拟合作图,并在 GraphPad Prism 8 中计算不同阶段的细胞占比、绘制柱状图。

分别收集经 siNC、siBCKDK 转染的 H1299、A549 细胞的蛋白,以及经 0 μ mol/L BT2、200 μ mol/L BT2 处理的该 2 种细胞的蛋白,而后行 Western blotting 检测 P21 的表达,具体检测步骤同前。

1.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行统计分析。所有定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间采用独立样本 t 检验进行比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blotting 检测 siBCKDK 对 NSCLC 细胞中 BCKDK 表达及 BCKDE1 α 磷酸化的影响

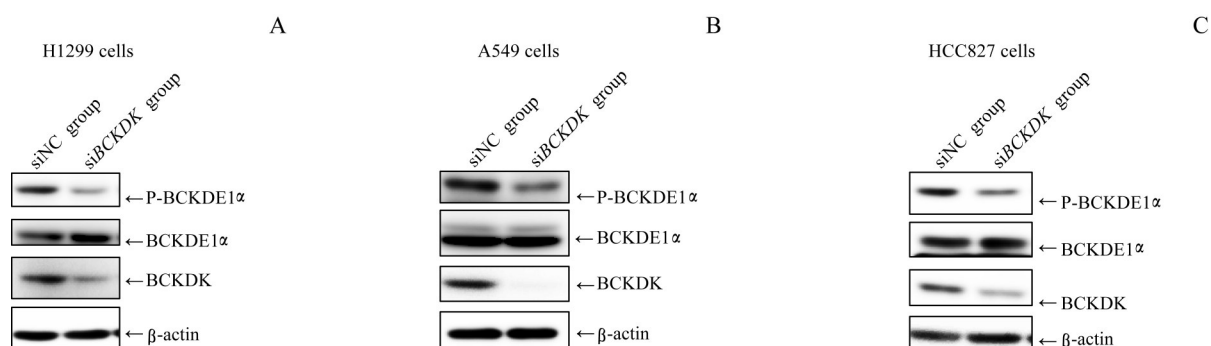
采用 Western blotting 检测经 siNC、siBCKDK 转染后 3 种 NSCLC 细胞中 BCKDK 的表达和 BCKDE1 α 磷酸化水平的变化。结果(图 1)显示,与 siNC 组相比,siBCKDK 组 BCKDK 的水平受到明显抑制;同时,由 BCKDK 调控的 BCKDE1 α 磷酸化水平亦有明显下调。

2.2 CCK-8 法检测 siBCKDK 对 NSCLC 细胞增殖能力的影响

采用 CCK-8 法检测经 siNC、siBCKDK 转染后对 3 种 NSCLC 细胞的增殖能力的影响。结果(图 2)显示,在培养 72 h 时,与 siNC 组相比,siBCKDK 组的细胞增殖明显下降(均 $P=0.000$)。

2.3 Western blotting 检测 BT2 对 NSCLC 细胞 BCKDE1 α 磷酸化的影响

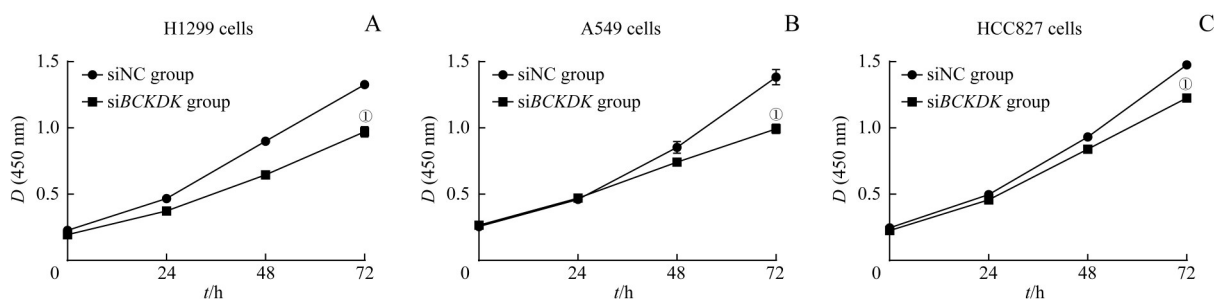
采用 Western blotting 法检测 BCKDK 小分子抑制剂 BT2 对 3 种 NSCLC 细胞中 BCKDE1 α 磷酸化的影响。结果(图 3)显示,在 H1299 细胞中,相较于 0 μ mol/L BT2 组,100 μ mol/L BT2 组、200 μ mol/L BT2 组中 BCKDE1 α 表达水平没有变化,但 BCKDE1 α 磷酸化水平有所下调;在 A549 细胞、HCC827 细胞中,相较于 0 μ mol/L BT2 组,100 μ mol/L BT2 组、200 μ mol/L BT2 组中 BCKDE1 α 磷酸化水平亦下调显著。



Note: A–C. Expression levels of BCKDK protein and BCKDE1 α phosphorylation in H1299 cells (A), A549 cells (B) and HCC827 cells (C) treated by siBCKDK.

图1 siBCKDK对NSCLC细胞中BCKDK蛋白表达及BCKDE1 α 磷酸化水平的影响

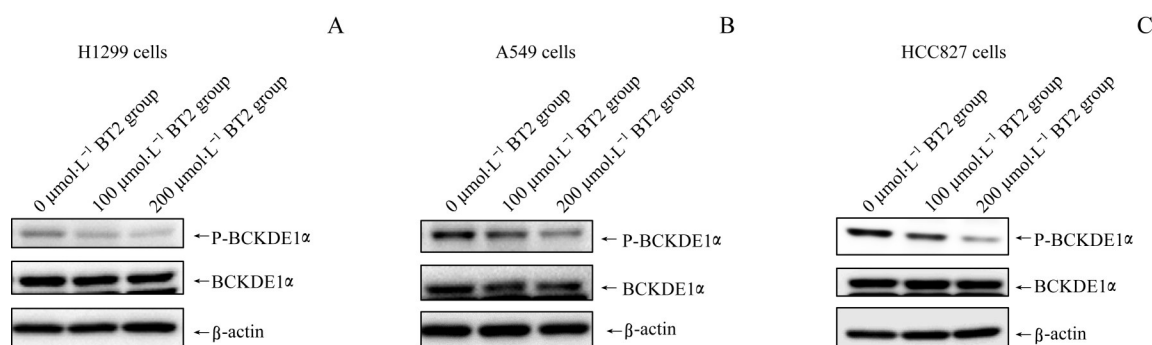
Fig 1 Effect of siBCKDK on BCKDK protein expression and BCKDE1 α phosphorylation in NSCLC cells



Note: A–C. Growth curves of H1299 cells (A), A549 cells (B) and HCC827 cells (C) after BCKDK was knocked down by siBCKDK. ^① $P=0.000$, compared with the siNC group.

图2 siBCKDK对NSCLC细胞增殖能力的影响

Fig 2 Effect of siBCKDK on proliferation of NSCLC cells



Note: A–C. Expression of BCKDE1 α phosphorylation in H1299 cells (A), A549 cells (B) and HCC827 cells (C) after BT2 treatment.

图3 BT2对NSCLC细胞中BCKDE1 α 磷酸化水平的影响

Fig 3 Effect of BT2 on phosphorylation of BCKDE1 α in NSCLC cells

2.4 CCK-8法检测BT2对NSCLC细胞增殖能力的影响

采用CCK-8法检测BCKDK小分子抑制剂BT2对3种NSCLC细胞增殖能力的影响。结果(图4)显示,将H1299细胞培养72 h时,200 $\mu\text{mol/L}$ BT2组相较于0 $\mu\text{mol/L}$ BT2组的细胞增殖能力显著下降($P=0.000$);在A549细胞、HCC827细胞中,200 $\mu\text{mol/L}$ BT2组相较于0 $\mu\text{mol/L}$ BT2组的细胞增殖能力亦明显下降(均 $P=0.000$)。

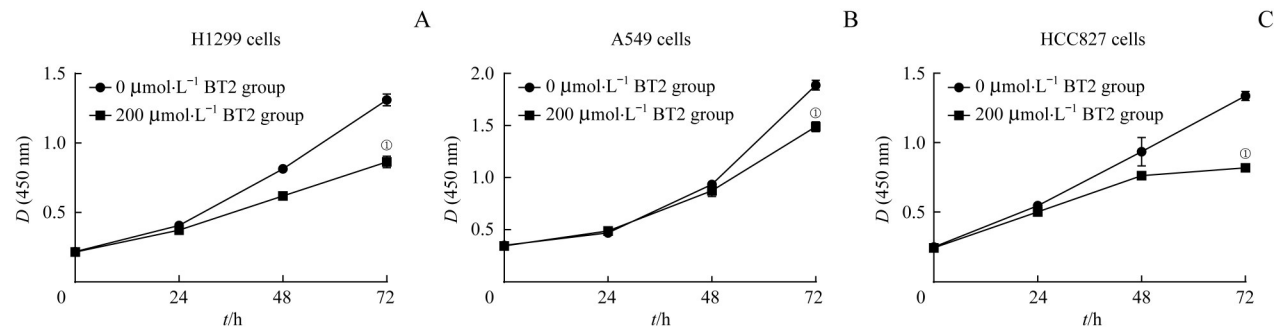
2.5 台盼蓝染色检测siBCKDK或BT2对NSCLC细胞活率的影响

分别采用台盼蓝染色检测siBCKDK或BT2对NSCLC细胞活率的影响。结果(图5)显示,在H1299细胞中,

siBCKDK组相较于siNC组细胞的活率无差异,且200 $\mu\text{mol/L}$ BT2组与0 $\mu\text{mol/L}$ BT2组的活率间差异亦无统计学意义;在A549细胞中,siBCKDK和200 $\mu\text{mol/L}$ BT2亦未影响细胞的活率。

2.6 流式细胞术检测siBCKDK或BT2对NSCLC细胞周期的影响

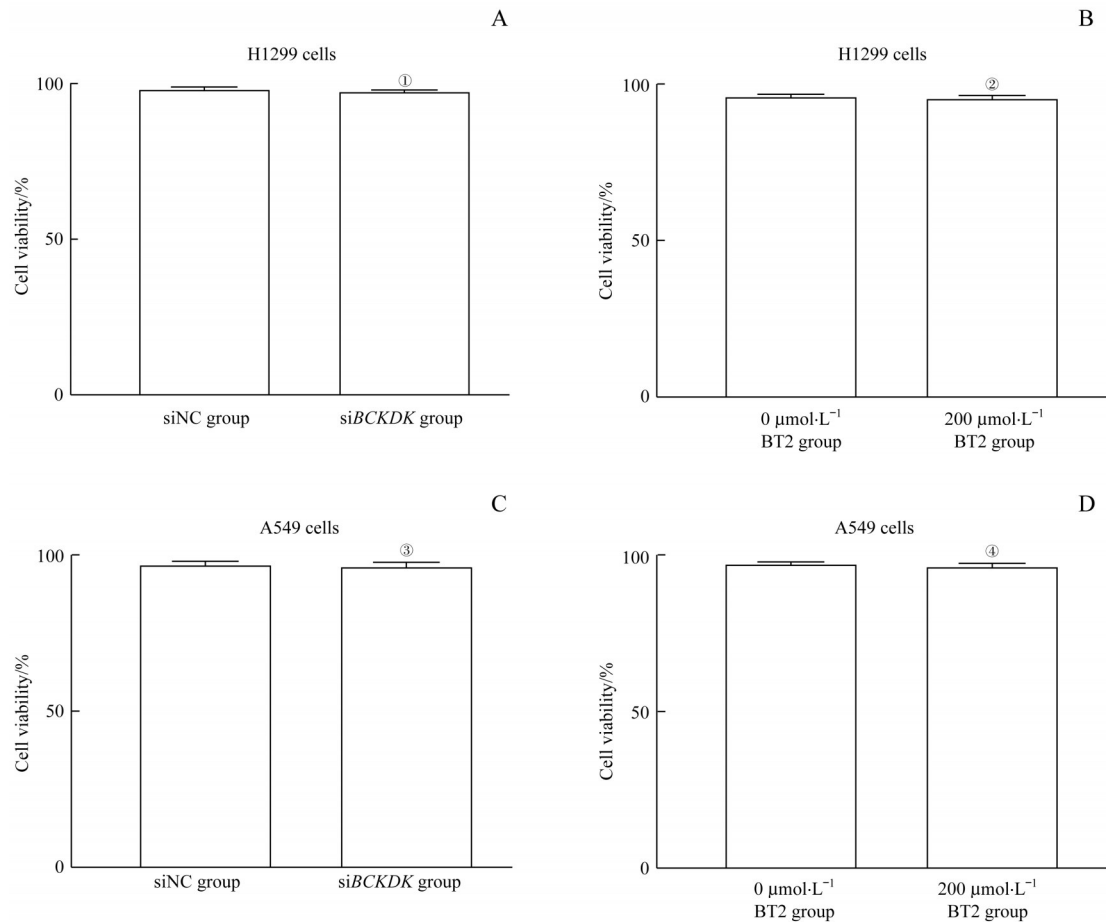
采用流式细胞术检测经0、200 $\mu\text{mol/L}$ BT2和siNC、siBCKDK处理后H1299、A549细胞的细胞周期,并计算处于细胞周期不同阶段的细胞占比。结果显示,在H1299细胞(图6A、B)和A549细胞(图6C、D)中,200 $\mu\text{mol/L}$ BT2组较0 $\mu\text{mol/L}$ BT2组在G0/G1期细胞比



Note: A–C. Growth curves of H1299 cells (A), A549 cells (B) and HCC827 cells (C) after BT2 treatment. ① $P=0.000$, compared with the $0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BT2 group.

图4 BT2对NSCLC细胞增殖能力的影响

Fig 4 Effect of BT2 on proliferation of NSCLC cells



Note: A/B. Cell viability of H1299 cells treated with siBCKDK (A) or $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BT2 (B). C/D. Cell viability of A549 cells treated with siBCKDK (C) or $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BT2 (D). ① $P=0.0811$, ② $P=0.477$, compared with the siNC group; ③ $P=0.226$, ④ $P=0.175$, compared with the $0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BT2 group.

图5 siBCKDK或BT2对NSCLC细胞活率的影响

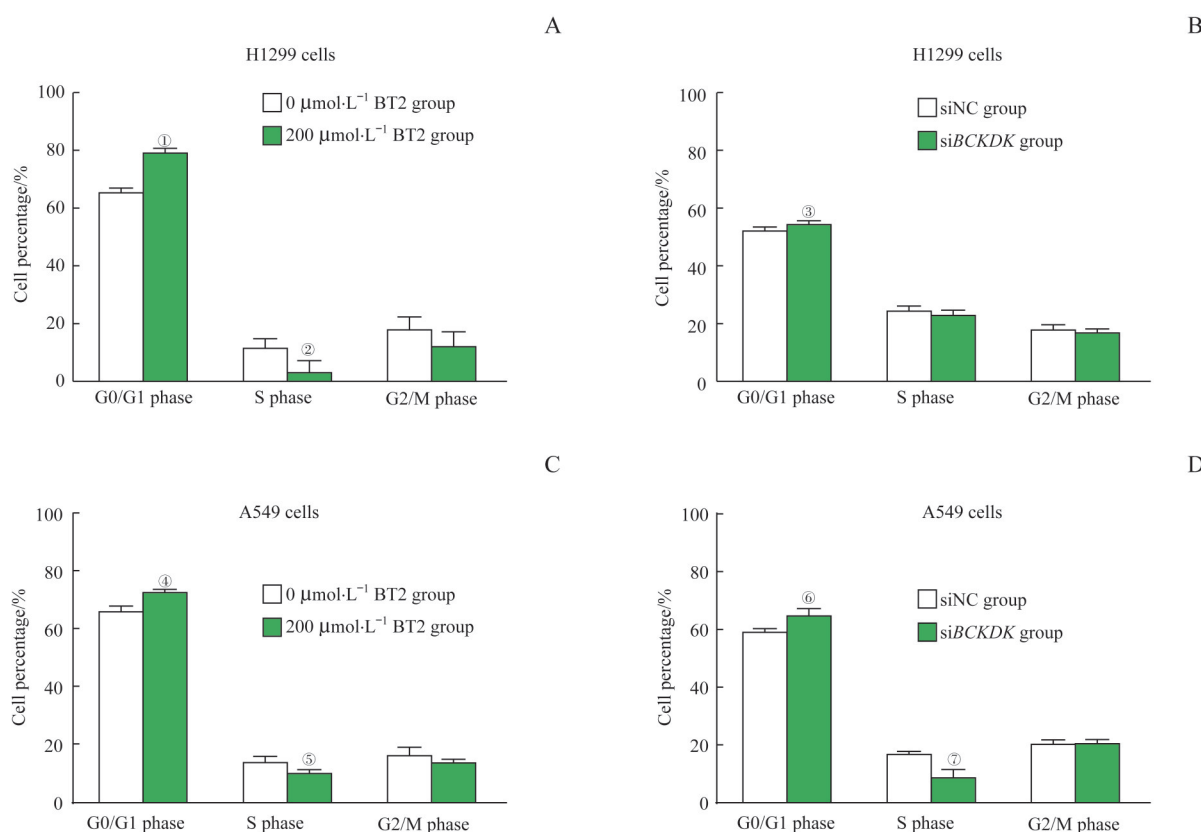
Fig 5 Effects of siBCKDK or BT2 on the survival rate of NSCLC cells

例有所上调，处于S期的细胞比例下降，siBCKDK组较siNC组也出表现相同趋势。

2.7 Western blotting检测siBCKDK或BT2对NSCLC细胞内P21水平的影响

采用 Western blotting 检测经 siBCKDK 转染或 200

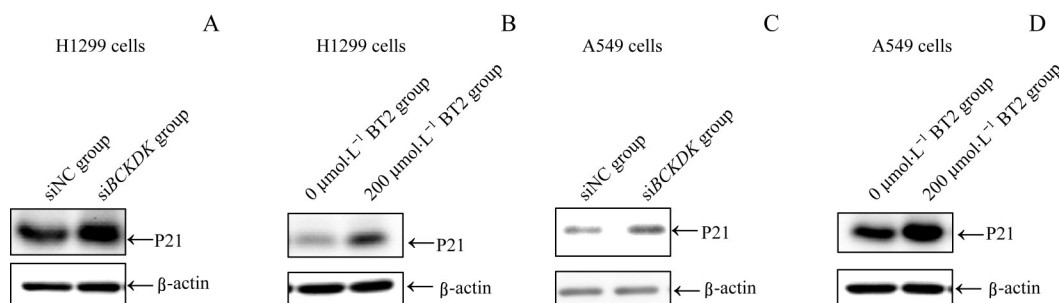
$\mu\text{mol/L}$ BT2 抑制 BCKDK 后，BCAA 分解代谢加快对 NSCLC 细胞中 P21 水平的影响。结果（图 7）显示，在 H1299 细胞中及 A549 细胞中，siBCKDK 组相较于 siNC 组、 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ BT2 组相较于 $0\text{ }\mu\text{mol/L}$ BT2 组的 P21 水平均有所上调。



Note: A/B. Cell percentage of H1299 cell cycle at different stages after BT2 (A) or siBCKDK (B) treatment. C/D. Cell percentage of A549 cell cycle at different stages after BT2 (C) or siBCKDK (D) treatment. ^① $P=0.000$, ^② $P=0.031$, compared with the 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BT2 group; ^③ $P=0.015$, compared with the siNC group; ^④ $P=0.008$, ^⑤ $P=0.030$, compared with the 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BT2 group; ^⑥ $P=0.025$, ^⑦ $P=0.021$, compared with the siNC group.

图6 siBCKDK或BT2对NSCLC细胞周期的影响

Fig 6 Effect of siBCKDK or BT2 on cell cycle of NSCLC cells



Note: A/B. Expression of P21 in H1299 cells treated with siBCKDK (A) or 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BT2 (B). C/D. Expression of P21 in A549 cells treated with siBCKDK (C) or 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BT2 (D).

图7 siBCKDK或BT2对NSCLC细胞内P21表达水平的影响

Fig 7 Effects of siBCKDK or BT2 on expression of P21 in NSCLC cells

3 讨论

肿瘤细胞具有无限分裂、增殖的能力,在这一过程中该类细胞需依赖肿瘤微环境中的必需营养物质维持其生物合成和生存发展^[11]。作为必需氨基酸之一,BCAA可参与蛋白质的合成和机体能量代谢。近年来,多项研究表明BCAA及其分解代谢过程在结直肠癌^[12]、胰腺导管癌^[8]、肝癌^[13]、神经胶质瘤^[14]、慢性髓样白血病^[15]和乳腺癌^[16]等的发生与发展中扮演着重要的角色。

为探究BCAA的分解代谢在肺癌细胞中的功能,本研究在H1299、A549、HCC827共3种NSCLC细胞中,分析siBCKDK和BT2抑制BCKDK对BCKDH活性的影响以及对细胞增殖活力的影响,并在H1299、A549肺癌细胞中进行siBCKDK和BT2对肺癌细胞增殖影响的机制探索。结果表明,siBCKDK和BT2均能显著下调BCKDE1 α 磷酸化水平,达到促进BCAA分解代谢的目的;抑制BCKDK不会影响肺癌细胞的活率,但会抑制细胞的增殖;抑制BCKDK可上调细胞周期负调控因子P21的表

达, 导致细胞周期阻滞。上述结果与在肝癌细胞中 BCAA 分解代谢受到抑制会促进肿瘤进展的情况相一致^[9]。

目前, 有关肺癌和 BCAA 分解代谢的研究相对较少。Mayers 等^[8]发现 BCAA 在肺癌小鼠血浆中的水平低于正常小鼠; 随后, 在肺癌或胰腺癌动物中用同位素追踪 BCAA 发现, NSCLC 组织比正常肺组织吸收了更多的游离 BCAA, 且 NSCLC 组织将这些氨基酸结合到蛋白质中, 用其来源的氮合成非必需氨基酸和核苷酸。本研究发现促进 BCAA 分解代谢可以导致肺癌细胞分裂周期阻滞, 进而抑制增殖, 但 BCAA 分解代谢的变化如何影响细胞分裂尚需进行更深入的研究。上述研究提示, BCAA 的分解代谢对肺癌的发生、发展或可起到重要作用。

大部分研究^[17-19]表明, 诱导 P21 的表达能够抑制肿瘤细胞增殖, 而抑制其表达可促进肿瘤的发生与发展。本研究显示, 在促进 BCAA 分解代谢后, 细胞周期阻滞、P21 表达增加。Liu 等^[20]发现, 抑制 BCAA 分解代谢可下调 P21 的表达。该结果与本研究获得的结果相一致, 即促进 BCAA 分解代谢可上调 P21 的表达。

综上所述, 本研究发现促进肺癌细胞内 BCAA 的分解代谢可明显抑制肺癌细胞的增殖, 使细胞周期发生阻滞, 上调 P21 的表达。这些结果为 BCAA 在肺癌发生、发展过程中的功能研究提供了新思路, 同时也提示在 BCAA 的分解代谢通路中 BCKDK 可能成为一个潜在的治疗靶点, 即通过抑制 BCKDK 来促进 BCAA 的分解代谢, 从而干预肺癌的发生与发展。

参·考·文·献

- [1] World Health Organization. Cancer today[DB/OL]. [2020-11-23]. <https://gco.iarc.fr/today>.
- [2] Osmani L, Askin F, Gabrielson E, et al. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): moving from targeted therapy to immunotherapy[J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 52(Pt 1): 103-109.
- [3] Tso SC, Gui WJ, Wu CY, et al. Benzothioephene carboxylate derivatives as novel allosteric inhibitors of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(30): 20583-20593.
- [4] Sun H, Olson KC, Gao C, et al. Catabolic defect of branched-chain amino acids promotes heart failure[J]. *Circulation*, 2016, 133(21): 2038-2049.
- [5] Zhou M, Shao J, Wu CY, et al. Targeting BCAA catabolism to treat obesity-associated insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2019, 68(9): 1730-1746.
- [6] Fu T, Liang AL, Liu YJ. Role of P21 in resistance of lung cancer[J]. *Chin J Lung Cancer*, 2020, 23(7): 597-602.
- [7] Al-Sharaky DR, Kandil MAE, Aiad HAS, et al. ROC-1, P21 and CAIX as markers of tumor aggressiveness in bladder carcinoma in Egyptian patients[J]. *Diagn Pathol*, 2020, 15(1): 33.
- [8] Mayers JR, Wu C, Clish CB, et al. Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development[J]. *Nat Med*, 2014, 20(10): 1193-1198.
- [9] Ericksen RE, Lim SL, 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): 1151-1165. e6.
- [10] Li JT, Yin M, Wang D, et al. BCAT2-mediated BCAA catabolism is critical for development of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(2): 167-174.
- [11] Reina-Campos M, Moscat J, Diaz-Meco M. Metabolism shapes the tumor microenvironment[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 48: 47-53.
- [12] Budhathoki S, Iwasaki M, Yamaji T, et al. Association of plasma concentrations of branched-chain amino acids with risk of colorectal adenoma in a large Japanese population[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(4): 818-823.
- [13] Nezami Ranjbar MR, Luo Y, di Poto C, et al. GC-MS based plasma metabolomics for identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma in Egyptian cohort[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0127299.
- [14] Tönjes M, Barbus S, Park YJ, et al. BCAT1 promotes cell proliferation through amino acid catabolism in gliomas carrying wild-type IDH1[J]. *Nat Med*, 2013, 19(7): 901-908.
- [15] Hattori A, Tsunoda M, Konuma T, et al. Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukaemia[J]. *Nature*, 2017, 545(7655): 500-504.
- [16] Zhang L, Han JQ. Branched-chain amino acid transaminase 1 (BCAT1) promotes the growth of breast cancer cells through improving mTOR-mediated mitochondrial biogenesis and function[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(2): 224-231.
- [17] Chen M, Zhang H, Zhang G, et al. Targeting TPX2 suppresses proliferation and promotes apoptosis via repression of the PI3k/AKT/P21 signaling pathway and activation of p53 pathway in breast cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 507(1/2/3/4): 74-82.
- [18] Zhou L, Sheng WW, Jia C, et al. Musashi2 promotes the progression of pancreatic cancer through a novel ISYNA1-p21/ZEB-1 pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(18): 10560-10572.
- [19] Zhou XY, Liu H, Ding ZB, et al. lncRNA SNHG16 exerts oncogenic functions in promoting proliferation of glioma through suppressing p21[J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(2): 1021-1028.
- [20] Liu X, Zhang F, Zhang Y, et al. PPM1K regulates hematopoiesis and leukemogenesis through CDC20-mediated ubiquitination of MEIS1 and p21[J]. *Cell Rep*, 2018, 23(5): 1461-1475.

[收稿日期] 2020-11-23

[本文编辑] 邢宇洋