

## • 研究论文 •

## 化合物 C19 抑制谷氨酰胺酶 C 活性研究

杜婷婷, 刘羿晨, 张智慧, 王伟达, 季鸣\*, 陈晓光\*

(中国医学科学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室/创新药物非临床药物代谢及 PK/PD 北京市重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 线粒体中的谷氨酰胺酶 C (GAC) 在多种肿瘤中高表达, 导致谷氨酰胺代谢增强而促进癌症发生发展, 因此成为具有巨大潜力的抗肿瘤药物研发靶点。目前已发现的 GAC 抑制剂结构特征较为集中, 鲜有全新结构骨架的抑制剂报道。本文构建了大肠杆菌原核表达体系, 通过溶菌酶与超声方法裂解菌体, 结合钴离子磁珠分离纯化技术得到了高纯度的人源 GAC 蛋白。在此基础上, 建立热漂移检测、药物亲和反应的靶点稳定性分析、蛋白质交联技术和 GAC 酶活性检测方法, 完善小分子与 GAC 蛋白的相互作用验证体系。利用这一体系, 对最新报道自 Enamine 数据库中筛选到的化合物 C19 进行全面的分子-蛋白间相互作用确证和体外药效学研究。实验结果表明, C19 直接与 GAC 蛋白相互作用, 干扰 GAC 活性四聚体形成, 进而降低其酶催化活性。通过抑制 GAC 的生物学功能, C19 剂量依赖性降低 GAC 介导的谷氨酰胺代谢, 减少肿瘤细胞中 GAC 酶催化产物谷氨酸的含量, 进而显著抑制 A549 和 NCI-H1299 非小细胞肺癌细胞增殖。综上, C19 可作为先导化合物, 对后续靶向 GAC 药物的结构设计提供新的思路。

**关键词:** 谷氨酰胺酶 C; 抑制剂; C19; 肿瘤代谢; 谷氨酰胺代谢; 先导化合物

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)06-1801-07

## Validation of compound C19 as a glutaminase C inhibitor

DU Ting-ting, LIU Yi-chen, ZHANG Zhi-hui, WANG Wei-da, JI Ming\*, CHEN Xiao-guang\*

(State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines/Beijing Key Laboratory of Non-clinical Drug Metabolism and PK/PD Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**Abstract:** The mitochondrial enzyme glutaminase C (GAC) is highly expressed in a variety of cancer cells, resulting in increased glutamine metabolism and cancer development. Therefore, GAC has become a potential target for anti-tumor drug development. However, current GAC inhibitors shared similar structural characteristics, few new scaffolds were reported. By conducting a prokaryotic *Escherichia coli* expression system, human GAC protein of high-purity was obtained through lysozyme digestion combined with ultrasound dissociation, and cobalt magnetic beads purification. Moreover, we performed studies to validate interaction between small molecules and GAC protein through thermal shift assay, drug affinity responsive target stability assay, protein crosslinking and GAC enzyme activity detection. Meanwhile, a comprehensive small molecule-protein interaction confirmation and systematic pharmacodynamic study *in vitro* were carried out on compound C19, which was a reported GAC inhibitor screened from the Enamine database. Results showed that C19 directly bind to GAC protein, disturbed GAC tetramers formation, and inhibited its enzyme catalytic activity. By interfering GAC function, C19 dose-dependently suppressed GAC-mediated glutamine metabolism, reduced glutamate in cancer cells, and thus alleviated A549 and NCI-H1299 non-small cell lung cancer cell growth. Together, C19 was identified as a lead compound, providing a new strategy for the structural design of drugs targeting GAC.

收稿日期: 2022-03-14; 修回日期: 2022-04-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82104202); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目 (2021-I2M-1-028).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165207, E-mail: jiming@imm.ac.cn; chxg@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0323

**Key words:** glutaminase C; inhibitor; C19; cancer metabolism; glutamine metabolism; lead compound

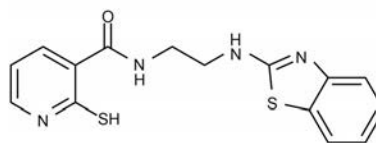
谷氨酰胺是人体内丰度最高的氨基酸,是细胞生命活动重要的碳源和氮源。谷氨酰胺不仅通过糖回补途径为细胞的三羧酸循环提供物质来源,同时也是氨基酸和谷胱甘肽合成的原料<sup>[1]</sup>。谷氨酰胺分解生成的谷氨酸可在谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase, GDH) 或者谷氨酸转氨酶的作用下生成  $\alpha$ -酮戊二酸,从而进入三羧酸循环参与中心碳代谢。同时,谷氨酸在转氨酶的作用下产生包括丙氨酸和天冬氨酸在内的非必需氨基酸<sup>[2]</sup>。谷胱甘肽是维持细胞内氧化还原平衡的重要物质,谷氨酸与甘氨酸、半胱氨酸一同参与了谷胱甘肽的合成。不仅如此,谷氨酰胺代谢还与嘌呤、嘧啶和脂肪酸的合成密切相关<sup>[2]</sup>。

多种类型的肿瘤细胞表现出对谷氨酰胺需求和利用增加,更加依靠谷氨酰胺分解维持其快速无限增殖,显示出谷氨酰胺依赖的代谢特性<sup>[3,4]</sup>。细胞内谷氨酰胺分解的首步和限速步骤是由谷氨酰胺酶 (glutaminase, GLS) 催化的谷氨酰胺生成谷氨酸和氨的生化反应。人类细胞中存在 GLS1 和 GLS2 两种亚型。GLS2 又称肝型谷氨酰胺酶,仅在肝脏中表达<sup>[5]</sup>。GLS1 也称肾型谷氨酰胺酶 (kidney-type glutaminase, KGA), 不仅存在于肾脏,同时也在小肠、大脑、淋巴细胞和肿瘤细胞中表达。研究表明, GLS1 存在转录剪切变体谷氨酰胺酶 C (glutaminase C, GAC), 主要在线粒体分布,且于胶质瘤、结直肠癌、前列腺癌和乳腺癌等肿瘤中高表达<sup>[6-10]</sup>。在磷酸盐缓冲液条件下, GAC 的活性是所有谷氨酰胺酶中最高的<sup>[6]</sup>。结构生物学研究通过比较 GAC 结合或非结合配体 (谷氨酸或磷酸基团) 的结构发现,四聚体是 GAC 发挥酶催化作用的活性形式,通过门控环结构开关控制底物谷氨酰胺能否进入活性部位<sup>[11]</sup>。研究表明,相比于正常细胞,  $\epsilon$ -型蛋白激酶 C 促进的 GAC 磷酸化和活性升高对于肿瘤细胞的增殖更加关键,因此 GAC 是非常理想的抗肿瘤靶点<sup>[12]</sup>。

除谷氨酰胺类似物 6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸外,目前发现的 GAC 抑制剂大多是以 CB-839 为代表的变构调节剂,以发卡型结构结合于 GAC 四聚体的中心,通过影响四聚体结构的调节从而抑制蛋白功能<sup>[11]</sup>。作为唯一处于临床研究阶段的 GAC 抑制剂, CB-839 的临床前和临床研究结果表明, GAC 抑制剂可增敏放疗和化疗的效果,对特定基因突变的肿瘤效果显著<sup>[13,14]</sup>。然而,目前新结构 GAC 抑制剂与 CB-839 具有相似的结构骨架,呈现对称性的基本结构,主要差别集中在取代基团和连接结构上的差异<sup>[15]</sup>。新结构骨架特征的先

导化合物的发现可能为 GAC 抑制剂的研发带来新的突破。因此,开发更多具有结构多样性的 GAC 抑制剂是目前的研究热点。

Cederkvist 等<sup>[16]</sup>通过对 Enamine 化合物库中的 28 000 个化合物进行筛选,发现化合物 C19 (图 1) 剂量依赖性降低 GAC 酶催化活性,是潜在的 GAC 抑制剂。与大多数具有对称结构特征、结构相对复杂的 GAC 抑制剂不同, C19 呈非对称结构,分子量较小,可能具有与现有化合物不同的理化性质和药理作用特性。然而,目前对 C19 与 GAC 相互作用的研究仅限于检测其对非全长 GAC 蛋白酶活性的影响,缺乏系统的蛋白-分子间相互作用验证,也未进行其对谷氨酰胺依赖肿瘤的药理作用研究<sup>[16]</sup>。



**Figure 1** Structure of compound C19

为了新结构骨架 GAC 抑制剂的发现和确证,本研究围绕化合物 C19 进行研究,通过大肠杆菌原核表达体系得到高纯度的人全长 GAC 蛋白,结合热漂移检测 (thermal shift assay, TSA)、药物亲和反应的靶点稳定性 (drug affinity responsive target stability, DARTS) 分析、蛋白质交联和 GAC 酶活性检测方法,发现 C19 与 GAC 蛋白具有直接的相互作用,显著抑制 GAC 四聚体形成和酶催化活性。同时, C19 剂量依赖性抑制非小细胞肺癌 A549 和 NCI-H1299 细胞增殖,可能成为 GAC 抑制剂研发的先导化合物。

## 材料与方法

**细胞** A549 和 NCI-H1299 细胞均购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

**化合物** C19 购自 Enamine 公司,溶解于二甲基亚砜中配置成 50 mmol·L<sup>-1</sup> 储液。

**材料与试剂** 大肠杆菌 *E. coli* (DE3) 购自北京全式金生物技术有限公司;胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂糖购自 OXIDE 公司;限制性内切酶和 T4 连接酶购自 New England Biolabs 公司; GLS 活性检测试剂盒购自 Biovision 公司;哺乳动物蛋白提取试剂 (mammalian protein extraction reagent, M-PER) 缓冲液和双琥珀酰亚胺辛二酸酯 (disuccinimidyl suberate, DSS) 购自 Invitrogen 公

司;链霉菌蛋白酶 Pronase 购自上海罗氏制药有限公司;异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)、溶菌酶、脱氧核糖核酸酶 I、苯甲基磺酰氟、咪唑、脱氧胆酸钠和  $\beta$ -巯基乙醇均购自北京索莱宝科技有限公司;预染蛋白质分子量标准、化学发光显色试剂盒购自上海天能科技有限公司;钴离子磁珠和磁性分离器购自苏州海狸生物医学工程有限公司;细胞 RPMI-1640 培养基购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;胎牛血清购自 Gemini Bio 公司;胰酶、磷酸盐缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 和青链霉素购自北京利维宁生物科技有限公司;SDS-PAGE 快速凝胶配制试剂盒购自北京达科为生物技术有限公司;考马斯亮蓝快速染色液购自北京聚德安泰科技有限公司;脱脂奶粉购自 BD Biosciences 公司;PVDF 膜和超滤管购自 Millipore 公司;GAC 抗体购自 Proteintech 公司;山羊抗兔抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;其余分析纯试剂均购自北京化学工业集团有限公司或中国医药集团有限公司。

**仪器** 电子天平购自赛多利斯(上海)贸易有限公司;超纯水系统购自美国 Millipore 公司;Biotek Synergy H1 全波长酶标仪购自 BioTek Instruments 公司;微量台式离心机购自 Eppendorf 公司;PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司;电泳和转膜仪器设备购自 Bio-Rad 公司。

**细胞培养** A549 和 NCI-H1299 培养于含有 10% 灭活胎牛血清和青链霉素的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 °C、5% 二氧化碳的培养箱中培养和传代。

**质粒构建** 通过全合成的方法获得编码成熟 GAC 蛋白 (NP\_001106854.1, 73~598 位氨基酸) 的片段,使用 *Xba* I 和 *Xho* I 对 pET28a 质粒载体进行双酶切,并通过 T4 连接酶进行连接。通过 PCR 和质粒酶切鉴定后,获得编码人源 GAC 蛋白融合组蛋白标签的 pET28a 重组表达载体。

**GAC 蛋白诱导** 将获得的 pET28a-GAC 重组表达载体转化至 *E. coli* (DE3)。取阳性单菌落过夜扩增后,培养至吸光度 (OD) 值达 0.6。在 18 °C 的条件下,加入 0、0.05、0.1、0.5 和 1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 进行诱导,以确定最佳诱导浓度。取诱导后的菌液 1 mL, 14 000 r·min<sup>-1</sup> 离心收集菌体。将沉淀用 SDS 上样缓冲液进行煮沸裂解,用于 SDS-PAGE 检测。

**GAC 分离纯化** 4 000 × g 离心 20 min 收集菌体,并通过超声或溶菌酶的方法进行裂解。4 °C、12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心后取上清,与钴离子磁珠 4 °C 孵育 30 min 后,利用含有梯度浓度咪唑的缓冲液通过磁性分离器进行洗脱。合并纯度较高的洗脱液,并同 15 kDa 的超滤管进

行超滤浓缩。

**Western blot** 配制 SDS-PAGE 凝胶,将样本逐一加至相应的样品孔中。设置恒压 85 V、20 min, 120 V、1 h 的电泳条件。将电泳完毕的 PAGE 胶进行湿法转膜,恒流 200 mA 条件下电转 1 h。转膜完成后的 PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶进行室温封闭。4 °C 过夜孵育一抗,次日 TBST 洗脱后室温孵育山羊抗兔二抗 45 min。最后采用化学发光显色试剂盒及天能凝胶成像系统获取免疫印迹结果。对于需要考马斯亮蓝染色的样本,将电泳完毕的凝胶取出后水洗,再用考马斯亮蓝快速染色液室温染色 20 min 即可。

**TSA** 纯化后的 hGAC 蛋白分散至 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris、500 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、pH 7.4 的溶液中。将加入或不加入 C19 化合物的蛋白样品分别置于 PCR 八联管中,通过 PCR 仪分别于 55、60、65 和 70 °C 的条件下加热 5 min,再于室温放置 3 min 后,2 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min。取上清,加入 SDS 上样缓冲液煮沸裂解后上样,通过 Western blot 检测 C19 对 hGAC 蛋白热稳定性的影响。

**DARTS** 将 A549 细胞用预冷 PBS 洗两次,然后加入预冷的 M-PER 缓冲液裂解,4 °C、12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心后取上清。将细胞裂解液调节至 1 mg·mL<sup>-1</sup> 蛋白浓度,并按比例加入 10× 缓冲液 (500 mmol·L<sup>-1</sup> Tris, 500 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 100 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0)。向管中分别加入 C19 或等量二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO),于 4 °C 孵育 1 h。将 Pronase 储液稀释至合适浓度,加入样品中,室温孵育 20 min 进行蛋白酶水解。最后,加入 SDS 上样缓冲液终止反应,煮沸变性制备电泳样品。

**GAC 活性检测** 将纯化的 hGAC 蛋白分别与 CB-839、C19 和等量 DMSO 于室温孵育 20 min。将 hGAC 蛋白与化合物混合溶液加入黑色 96 孔平底板中,并按照 Biovision 谷氨酰胺酶活性检测试剂盒的说明书,向反应体系中加入谷氨酰胺、酶混合液和探针,持续在激发光 535 nm 和发射光 587 nm 的条件下检测荧光值。

**蛋白多聚体检测** 将收集的 A549 细胞重悬于 PBS 中,液氮反复冻融 3 次裂解。4 °C、12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心后取上清。将细胞裂解液的蛋白浓度调节至 1 mg·mL<sup>-1</sup>,加入 C19 冰上孵育 1 h。孵育完成后,加入 DSS 室温交联 20 min,终止反应后用 SDS 上样缓冲液煮沸制备样本,进行 Western blot 检测。

**细胞内谷氨酸的含量测定** 将 1×10<sup>6</sup> 个 A549 细胞铺至 60 mm 培养皿中,次日加入不同浓度 C19 处理 24 h。收集细胞后,按照谷氨酸检测试剂盒 (Sigma 公司, MAK004) 的说明书进行实验,用于检测肿瘤细胞内谷

氨酸含量。

**结晶紫染色法检测细胞增殖** 将 A549 或 HCl-H1299 细胞以 5 000 个/孔的密度接种至 24 孔板中, 24 h 后加入 0.5 和 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  化合物 C19。每 48 h 重新换一次含化合物的培养基。6 天后, PBS 洗两次细胞并用多聚甲醛进行固定。加入 0.1% 结晶紫溶液染色 30 min, 用水洗脱后进行拍摄获取图像。定量统计时, 用 10% 醋酸溶解结晶紫沉积, 并于 590 nm 波长条件下测定 OD 值。

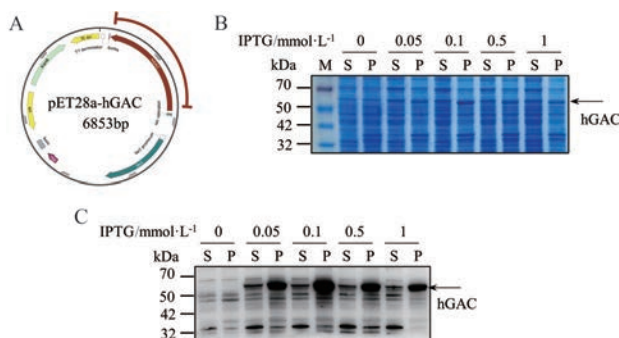
**统计学方法** 每组样本均设置 3 次重复, 定量数据以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。使用 ANOVA 进行统计学分析,  $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

## 结果

### 1 GAC 的诱导表达

GAC 是人谷氨酰胺酶的转录剪切变体之一, 由编码 GLS1 的第 1~15 外显子组成, 与 KGA 的主要差异存在于羧基端。翻译完成后的 GAC 前体转入线粒体中, 在线粒体加工肽酶作用下于 72~73 位氨基酸中间水解去掉转运肽, 形成成熟具有功能的 GAC 蛋白。全合成编码 73~598 位氨基酸 GAC 全长蛋白的片段, 并在其两端添加 6 $\times$  his 片段, 构建至 pET28a 原核表达载体中 (图 2A)。对构建完成的质粒进行 PCR 测序和酶切验证后, 将其转入 *E. coli* (DE3) 中, 加入不同剂量的 IPTG 在低温条件下进行蛋白诱导表达。诱导完成后, 通过超声破碎的方法裂解菌体分别制备上清和沉淀样本, 利用 SDS-PAGE 和 Western blot 的方法对 GAC 的表达进行检测 (图 2B、C)。实验结果表明, 0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

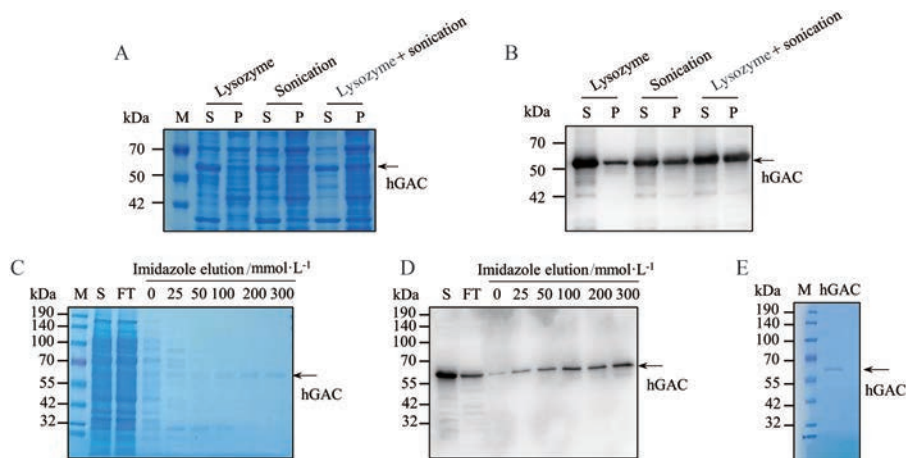
IPTG 诱导前后的样本中 GAC 含量最多。然而, 大多 GAC 蛋白分布于裂解后的沉淀中, 可能与蛋白表达聚集形成包涵体有关。



**Figure 2** Construction of human glutaminase C (GAC) prokaryotic expression system. A: The diagram of recombinant plasmid pET28a-hGAC; B: GAC induction by isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). SDS-PAGE gel was stained with Coomassie brilliant blue; C: GAC expression in IPTG-induced bacteria was detected by Western blot. M: Protein marker ladder; S: Supernatant; P: Pellet

### 2 GAC 的分离纯化

有研究表明, 利用溶菌酶裂解菌体的方法能够更多地获得包涵体中的蛋白。收集诱导表达的菌体后分别利用超声、溶菌酶、溶菌酶合并超声 3 种方式进行裂解。结果显示, 溶菌酶加超声破碎的方案能够使更多 GAC 蛋白溶解至上清中 (图 3A、B)。对菌株进行扩大培养, 并利用优化后的方法裂解菌体, 得到更多上清中可溶性 GAC 蛋白。通过固定化金属离子亲和和层析的方法能够利用金属离子吸附表面带组氨酸残基的蛋白的原理对融合表达 his 标签的 GAC 蛋白进行分离和纯



**Figure 3** GAC protein isolation and purification. A, B: GAC-expressing bacteria were lysed by lysozyme, sonication or both. Separated supernatant (S) and pellet (P) were detected by SDS-PAGE (A) and Western blot (B); C, D: GAC protein in bacteria was isolated by BeaverBeads™ IDA-Cobalt enrichment and eluted with imidazole. Flow-through and elution were detected by SDS-PAGE (C) and Western blot (D). FT: Flow through; E: GAC protein was concentrated from 200 and 300  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  imidazole elution, following by SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue staining

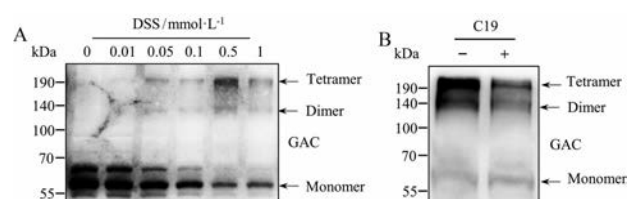
化。研究发现, 琼脂糖磁珠固相载体螯合钴离子比镍离子对 GAC 融合蛋白具有更强的亲和力, 因而选用钴离子螯合磁珠进行下一步的蛋白纯化。用梯度浓度含咪唑的洗脱液对结合于钴离子磁珠的 GAC 蛋白进行洗脱, 发现低浓度咪唑的洗脱液能够洗脱非特异性结合至磁珠的杂蛋白, 随着咪唑浓度逐渐升高, 洗脱液中 GAC 蛋白的纯度和含量显著增加 (图 3C、D)。合并 200 和 300 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑洗脱液, 并使用超滤管去除咪唑更换缓冲溶液, 同时对蛋白进行浓缩。利用考马斯亮蓝染色对浓缩后的蛋白进行检测发现, 其仅在 58 kDa 处显示出单一条带, 提示分离纯化 GAC 蛋白纯度较高, 可用于体外检测化合物对 GAC 酶活性的影响及二者相互作用的研究 (图 3E)。

### 3 C19 直接作用于 GAC

TSA 是基于小分子与蛋白相互作用时会改变蛋白热稳定性的原理, 通过检测小分子作用后蛋白的稳定性随温度升高的变化反映两者是否有相互作用的研究方法。自 55 °C 开始, GAC 蛋白随着温度的升高稳定性逐渐降低。化合物 C19 的加入使得 GAC 蛋白在 65 和 70 °C 的较高温度条件下仍相对稳定 (图 4A)。DARTS 技术是近年来发展的一项用于小分子药物与靶点相互作用分析的技术, 其原理是结合了小分子的蛋白稳定性提高, 更不易被蛋白酶降解。这种方法能够利用细胞裂解液进行小分子结合鉴定实验, 在较为复杂的体系中检测分子与蛋白是否存在相互作用。收集 NCI-H1299 细胞制备裂解液样本, 实验结果表明, 化合物 C19 在一定程度上使得 GAC 蛋白在 2.5 和 5 μg·mL<sup>-1</sup> 链霉菌蛋白酶作用下免于被酶解 (图 4B)。在 2.5 μg·mL<sup>-1</sup> 链霉菌蛋白酶的条件下, C19 可剂量依赖性增加细胞中 GAC 蛋白的稳定性, 减少其由于链霉菌蛋白酶导致的水解 (图 4C)。化合物 C19 对 KGA 的稳定性也有一定改善作用, 但 GAC 的稳定性增加更为显著, 提示 C19 对 GAC 的亲和力很可能强于 KGA。

DSS 能够与氨基酸中的伯胺分子迅速反应, 实现细胞内或细胞裂解液系统中蛋白质化学的交联, 方便

识别蛋白质多聚体和蛋白相互作用。对 NCI-H1299 细胞裂解液交联样本进行检测, 发现 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> DSS 能够较好地偶联 GAC 蛋白, 形成易于检测的多聚体偶联物 (图 5A)。以 CB-839、BPTES 为代表的 GAC 抑制剂通过结合于 GAC 四聚体, 使其形成稳定非催化构象而调节 GAC 酶促反应活性<sup>[11]</sup>。而进一步研究发现, 与现有的 GAC 抑制剂不同, C19 具有减少 GAC 二聚体和四聚体、增加 GAC 单体的作用特点。以上结果提示, 化合物 C19 可能并不通过变构效应降低 GAC 酶活性, 而是通过调节单体、二聚体和四聚体的动态变化发挥抑制作用 (图 5B)。



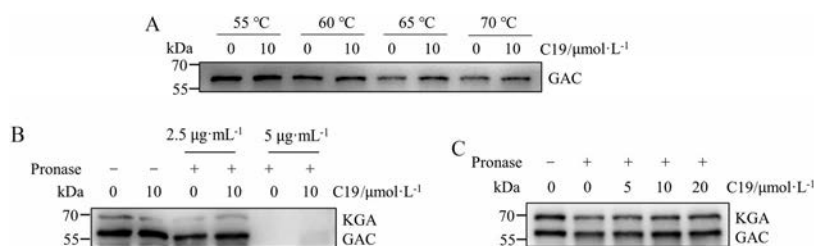
**Figure 5** C19 bound to GAC and inhibited its tetramer formation. A: Disuccinimidyl suberate (DSS) cross-linked GAC dimer and tetramer of NCI-H1299 cell lysates; B: 10 μmol·L<sup>-1</sup> C19 significantly suppressed GAC tetramer and increased monomer

### 4 C19 降低 GAC 酶活性

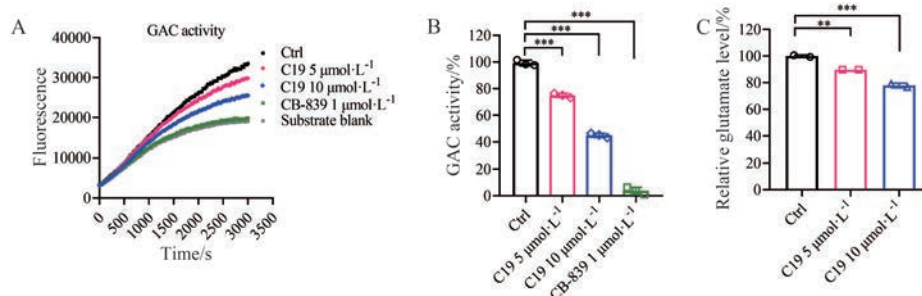
借助 GAC 具有催化谷氨酰胺反应生成谷氨酸的作用特性, 在加入 GDH 及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 特异性的荧光探针的反应体系中, 能够通过探针荧光值间接反映谷氨酸的生成量, 进而表征 GAC 的酶催化活性。实验结果表明, C19 与 GAC 蛋白的结合显著降低了其酶催化活性, 但其作用强度相对 CB-839 较低 (图 6A、B)。通过影响肿瘤细胞中 GAC 酶活性, C19 还显著降低了细胞内谷氨酸的含量 (图 6C)。

### 5 C19 抑制非小细胞肺癌的增殖

通过直接结合于 GAC 蛋白, C19 影响其多聚体的形成而达到降低 GAC 酶催化活性的作用。对 C19 处理的细胞固定后进行结晶紫染色, C19 显著抑制非小细胞肺



**Figure 4** Analysis of the binding of C19 to GAC. A: Thermostable GAC under indicated heat shocks in the presence of 10 μmol·L<sup>-1</sup> C19; B: C19 protected GAC from proteolysis by pronase in native NCI-H1299 cell lysates; C: Increasing concentrations of C19 were test to study its interaction with GAC in the treatment of 2.5 μg·mL<sup>-1</sup> pronase by DARTS. KGA: Kidney-type glutaminase



**Figure 6** GAC activity was reduced by C19. A: GAC activity was determined after CB-839 or C19 incubation; B: CB-839 and C19 treated GAC activities were calculated; C: Glutamate level in A549 cells was reduced by C19 treatment.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

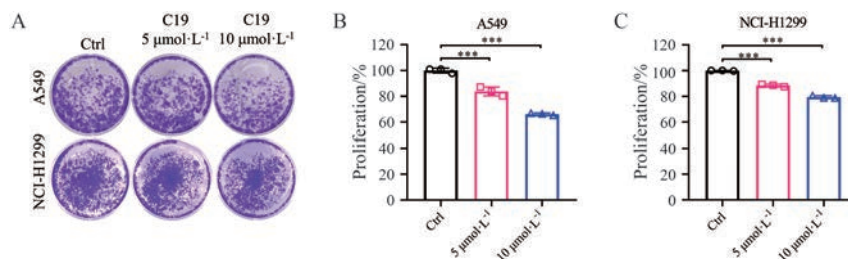
癌细胞 A549 和 NCI-H1299 肿瘤细胞增殖 (图 7A)。将结晶紫溶解于 10% 醋酸中, 通过检测 590 nm 处的 OD 值, 能够定量统计化合物对肿瘤细胞增殖的影响。结果显示, C19 处理对 A549 的影响更为明显, 可使其增殖比例降低约 40% (图 7B、C)。

## 讨论

肿瘤代谢是抗肿瘤药物的研究热点, 而 GAC 是谷氨酰胺代谢中至关重要的限速酶, 因此靶向 GAC 的候选化合物是强有力的肿瘤代谢干预手段。然而, 作用于 GAC 的化合物筛选和验证难度较高。首先, 高通量 GAC 抑制剂筛选的最佳方法基于酶活性检测体系进行。该检测体系采用两步法, 第一步反应是 GAC 催化底物谷氨酰胺产生谷氨酸; 第二步反应是 GDH 催化谷氨酸产生  $\alpha$ -酮戊二酸的同时产生 NADH。最终, 通过 NADH 的特征性吸收或特异性探针信号来反映 GAC 的酶活性<sup>[17]</sup>。这一体系成分复杂, 不仅有谷氨酰胺、腺苷二磷酸、NADH 等参与反应的重要物质, 而且有 GAC 和 GDH 两种催化酶, 可能产生干扰的因素较多。其次, 初步筛选得到 GAC 抑制剂的验证方法有限。目前, 大多数细胞水平验证方法仅进行肿瘤细胞增殖抑制或谷氨酰胺消耗量的变化检测, 难以在体外实验阶段迅速确定化合物对于 GAC 蛋白的直接相互作用和靶点特异性<sup>[17,18]</sup>。本论文探索了 TSA、DARTS 和蛋白质交联等方法, 进一步确证了化合物 C19 与 GAC 蛋白

之间的相互作用, 更好地补充了 GAC 抑制剂的验证体系, 为后续研发新结构类型的候选化合物提供有力支持。

肿瘤细胞内的 GAC 表达和谷氨酰胺依赖程度与驱动基因密切相关。有研究表明, 细胞原癌基因 v 型髓细胞瘤病毒同源癌基因 (cellular proto-oncogene v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog, c-myc) 扩增可通过 miR-23a/b 促进 GAC 在前列腺癌和 B 淋巴瘤中的表达<sup>[9]</sup>。相比较消耗葡萄糖, c-myc 驱动的肿瘤更多地倾向于依赖谷氨酰胺分解回补三羧酸循环, 进而促进肿瘤增殖<sup>[19]</sup>。鼠类肉瘤病毒癌基因 (Kirsten rat sarcoma viral oncogene, KRAS) 是突变率最高的致癌基因之一, 有研究表明 KRAS 突变合并 Kelch 样环氧丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1) 基因突变、丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 11 (serine-threonine kinase 11, STK11) 基因缺失的肺腺癌表现出更强的能量代谢和氧化还原压力, 主要表现为活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 增加、三磷酸腺苷降低、还原型与非还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸比值降低<sup>[20]</sup>。这类肿瘤类型更加依靠谷氨酰胺维持能量和氧化还原平衡, 也对 GAC 抑制剂的作用更敏感<sup>[20]</sup>。A549 肺腺癌细胞具有 KRAS、KEAP1 基因突变的同时, 也存在 STK11 缺失, 是研究谷氨酰胺代谢和 GAC 抑制剂药理学作用的合适细胞系。相比较同为非小细胞肺癌的 NCI-H1299 细胞, C19 对 A549 细胞的增殖抑制作用更



**Figure 7** C19 suppressed the proliferation of A549 and NCI-H1299 non-small cell lung cancer cells. A: Crystal violet staining of C19-treated A549 and NCI-H1299 cells; B, C: Crystal violet staining of proliferated A549 (B) and NCI-H1299 (C) cells was dissolved in 10% acetic acid.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$

为明显,也从侧面验证了该化合物通过作用于GAC调节谷氨酰胺代谢的特点。

本研究以探索GAC蛋白与小分子抑制剂直接相互作用的验证方法为侧重点。然而,在实际的研究过程中,还应该关注化合物降低GAC酶催化功能带来的肿瘤细胞谷氨酰胺代谢降低和氧化还原状态失衡<sup>[21]</sup>。值得注意的是,联合用药是GAC抑制剂未来的发展方向。肿瘤具有代谢可塑性的特征,能够根据不同的营养状况调整能源物质利用的能力。有研究表明,在转氨酶和糖代谢的补偿作用下,由GLS/GAC抑制带来的谷氨酰胺来源的代谢物降低程度减弱<sup>[22,23]</sup>。在抑制GLS/GAC的同时,通过化学手段干预转氨酶和糖代谢关键酶己糖激酶2都显著增加肿瘤抑制效果<sup>[22]</sup>。同样地,也有报道指出,通过抑制丙氨酸-丝氨酸-半胱氨酸转运载体2降低肿瘤细胞对谷氨酰胺的摄取,也能够起到增敏GLS1抑制剂的作用<sup>[24]</sup>。因此,在GAC抑制剂的临床前研究过程中,应该从多个维度考虑化合物的靶点验证和应用策略。

**作者贡献:** 杜婷婷负责主要的实验设计、部分实验操作和论文撰写;刘羿晨负责部分实验操作;张智慧和王伟达负责文献检索和数据分析;季鸣和陈晓光负责指导实验设计、论文撰写与修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Krall AS, Christofk HR. Rethinking glutamine addiction [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17: 1515-1517.
- [2] Yang L, Venneti S, Nagrath D. Glutaminolysis: a hallmark of cancer metabolism [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2017, 19: 163-194.
- [3] Tong Y, Guo D, Lin SH, et al. SUCLA2-coupled regulation of GLS succinylation and activity counteracts oxidative stress in tumor cells [J]. *Mol Cell*, 2021, 81: 2303-2316.e8.
- [4] Bolzoni M, Chiu M, Accardi F, et al. Dependence on glutamine uptake and glutamine addiction characterize myeloma cells: a new attractive target [J]. *Blood*, 2016, 128: 667-679.
- [5] Curthoys NP, Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism [J]. *Annu Rev Nutr*, 1995, 15: 133-159.
- [6] Cassago A, Ferreira AP, Ferreira IM, et al. Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of glutaminase C with implications for cancer metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: 1092-1097.
- [7] Xu L, Yin Y, Li Y, et al. A glutaminase isoform switch drives therapeutic resistance and disease progression of prostate cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118: e2012748118.
- [8] Wang JB, Erickson JW, Fuji R, et al. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation [J]. *Cancer Cell*, 2010, 18: 207-219.
- [9] Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism [J]. *Nature*, 2009, 458: 762-765.
- [10] Ascencao CFR, Nagampalli RSK, Islam Z, et al. N-terminal phosphorylation of glutaminase C decreases its enzymatic activity and cancer cell migration [J]. *Biochimie*, 2018, 154: 69-76.
- [11] Stalneck CA, Ulrich SM, Li Y, et al. Mechanism by which a recently discovered allosteric inhibitor blocks glutamine metabolism in transformed cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 394-399.
- [12] Han T, Zhan W, Gan M, et al. Phosphorylation of glutaminase by PKC $\epsilon$  is essential for its enzymatic activity and critically contributes to tumorigenesis [J]. *Cell Res*, 2018, 28: 655-669.
- [13] Riess JW, Frankel P, Shackelford D, et al. Phase 1 trial of MLN0128 (sapanisertib) and CB-839 HCl (telaglenastat) in patients with advanced NSCLC (NCI 10327): rationale and study design [J]. *Clin Lung Cancer*, 2021, 22: 67-70.
- [14] Chakrabarti G, Moore ZR, Luo X, et al. Targeting glutamine metabolism sensitizes pancreatic cancer to PARP-driven metabolic catastrophe induced by  $\beta$ -lapachone [J]. *Cancer Metab*, 2015, 3: 12.
- [15] Xu X, Meng Y, Li L, et al. Overview of the development of glutaminase inhibitors: achievements and future directions [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 1096-1115.
- [16] Cederkvist H, Kolan SS, Wik JA, et al. Identification and characterization of a novel glutaminase inhibitor [J]. *FEBS Open Bio*, 2022, 12: 163-174.
- [17] Costa RKE, Rodrigues CT, Campos JCH, et al. High-throughput screening reveals new glutaminase inhibitor molecules [J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2021, 4: 1849-1866.
- [18] Soth MJ, Le K, Di Francesco ME, et al. Discovery of IPN60090, a clinical stage selective glutaminase-1 (GLS-1) inhibitor with excellent pharmacokinetic and physicochemical properties [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 12957-12977.
- [19] Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 18782-18787.
- [20] Galan-Cobo A, Sitthideatphaiboon P, Qu X, et al. LKB1 and KEAP1/NRF2 pathways cooperatively promote metabolic reprogramming with enhanced glutamine dependence in KRAS-mutant lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2019, 79: 3251-3267.
- [21] Zhang T, Liu J, Ding Y. Research advances of glutamine metabolism-related targets in tumor treatment [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 813-820.
- [22] Mendez-Lucas A, Lin W, Driscoll PC, et al. Identifying strategies to target the metabolic flexibility of tumours [J]. *Nat Metab*, 2020, 2: 335-350.
- [23] Cheng T, Sudderth J, Yang C, et al. Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 8674-8679.
- [24] Feng Y, Pathria G, Heynen-Genel S, et al. Identification and characterization of IMD-0354 as a glutamine carrier protein inhibitor in melanoma [J]. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20: 816-832.