

角鲨烯环氧化酶新型抑制剂的筛选及其抗肝癌的作用

郭良琦^{1#}, 刘雅丽^{1#}, 谭 潇¹, 翟 婷², 盛德乔^{1*}, 刘亚云^{1,2*}

(1. 三峡大学基础医学院, 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002; 2. 湖北大学, 中药生物技术湖北省重点实验室, 药物高通量筛选技术国家地方联合工程研究中心, 湖北 武汉 430062)

摘要: 角鲨烯环氧化酶 (squalene epoxidase, SQLE) 是治疗肝癌的潜在靶点, 生信分析表明 SQLE 的高表达与肝癌患者的临床分期和不良预后密切相关, 但现有的针对 SQLE 第 195 位酪氨酸残基 (Y195) 的抑制剂由于毒副作用严重而无法用于临床。本研究通过计算机虚拟筛选得到 35 个靶向 SQLE 第 335 位酪氨酸残基 (Y335) 的小分子化合物, 结合 MTT 实验得到 3 个对肝癌细胞系 Huh7 的增殖具有显著抑制作用的候选化合物 (编号 19[#]、31[#] 和 35[#])。进一步研究发现这 3 个化合物均能抑制 Huh7 细胞的迁移, 减少胞内总胆固醇和游离胆固醇的含量, 上调抑癌基因 PTEN 的表达, 下调 PI3K 和 AKT 的蛋白表达。研究结果表明, 靶向 SQLE Y335 位点的新型抑制剂, 可降低 Huh7 细胞内胆固醇含量, 抑制细胞的增殖与迁移, 进而发挥抗肝癌作用。

关键词: 角鲨烯环氧化酶; 新型抑制剂; 肝癌; 胆固醇; 增殖; 迁移

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)09-2707-08

Screening novel inhibitors of squalene epoxidase and their effects on hepatocellular carcinoma

GUO Liang-qi^{1#}, LIU Ya-li^{1#}, TAN Xiao¹, ZHAI Ting², SHENG De-qiao^{1*}, LIU Ya-yun^{1,2*}

(1. Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, College of Basic Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, China; 2. Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, National & Local Joint Engineering Research Center of High Throughput Drug Screening Technology, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: Squalene epoxidase (SQLE) is a potential target for the treatment of liver cancer. Bioinformatics analysis indicated that the high expression of SQLE was closely related to the clinical stage and poor prognosis of patients with liver cancer. However, the existing inhibitors against SQLE 195 tyrosine residue (Y195) cannot be used clinically due to severe side effects. In this study, 35 small-molecule compounds targeting SQLE 335 tyrosine residue (Y335) were selected by computer virtual screening. Combined with MTT assay, 3 candidate compounds (19[#], 31[#] and 35[#]) with significant inhibitory effects on the proliferation of Huh7 cell line were obtained. Further studies showed that these 3 compounds could inhibit the migration of Huh7 cells, reduce the contents of total and free cholesterol, up-regulate the expression of tumor suppressor gene PTEN, and down-regulate the expression of PI3K and AKT proteins. The results showed that the novel inhibitors 19[#], 31[#] and 35[#] targeting SQLE Y335 could reduce cholesterol content, inhibit the proliferation and migration of Huh7, thus playing an anti-liver cancer role.

Key words: squalene epoxidase; novel inhibitor; liver cancer; cholesterol; proliferation; migration

收稿日期: 2023-06-26; 修回日期: 2023-07-27.

基金项目: 2021 年湖北省科技厅自然科学基金青年基金项目 (2021CFB065); 2020 年药物高通量筛选技术国家地方联合工程研究中心 (湖北大学) 开放研究基金重大项目 (M20201001); 2022 年中药生物技术湖北省重点实验室 (湖北大学) 开放课题 (KF2022003).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 13986028744, E-mail: liuyyctgu@ctgu.edu.cn;

Tel: 15871617998, E-mail: shengdq@ctgu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0788

角鲨烯环氧化酶 (squalene epoxidase, SQLE) 属于黄素蛋白单加氧酶家族, 是胆固醇合成中的限速酶之一, 主要催化角鲨烯氧化生成 2,3(S)-氧化鲨烯, 其活性依赖于黄素腺苷二核苷酸 (flavin adenosine dinucleotide, FAD)^[1]。SQLE 定位于细胞的内质网, 主要存在于肝脏、神经组织和皮肤等^[2]。SQLE 的异常表达被证实与包括肝癌在内的多种癌症有直接的关系, 在促进肿瘤细胞增殖、迁移、维持肿瘤细胞干性等方面都发挥重要作用^[3-5], 已成为临床上判断预后不良的分子标志物^[1]。SQLE 过表达是可造成胆固醇累积并激活 PI3K/AKT 信号通路, 调节下游与细胞周期调控、细胞凋亡、迁移和侵袭等相关靶点的表达, 最终导致肝癌细胞的增殖^[6,7]。用 SQLE 的抑制剂特比萘芬处理肝癌模型, 可明显减少肿瘤的体积和数量, 降低肝癌的转移率, 抑制细胞的增殖和克隆形成^[7,8]。因此, 筛选具有抗肝癌活性的 SQLE 抑制剂, 对肝癌治疗有着重要的理论和应用价值。

由于 SQLE 的不稳定性以及易形成聚集物等因素, 给其结构的解析带来很大的困扰, 导致了 SQLE 抑制剂研究进展缓慢^[9]。2019 年 SQLE 的晶体结构解析出来后, 给 SQLE 新型抑制剂的开发提供了新思路^[10,11]。据报道, SQLE 的催化活性与第 195 位酪氨酸残基 (Y195) 和第 335 位酪氨酸残基 (Y335) 有关^[10]。SQLE 先与辅基 FAD 结合形成活性状态, 再催化角鲨烯生成 2,3(S)-氧化鲨烯。在 SQLE 与 FAD 结合时, Y195 与 168 位的谷氨酰胺 (Q168) 形成氢键, 使 SQLE 转化为活性状态。Y335 侧链羟基可通过桥联水分子与 FAD 的 N5 原子相互作用, 保证在催化角鲨烯发生氧化反应的过程中氧转移的顺利进行。目前, 已知的 SQLE 的抑制剂 NB-598 和特比萘芬的作用位点都是 Y195, 抑制剂结构中的叔胺基团与 Y195 之间形成氢键, 阻止 Y195 与 Q168 的作用, 抑制 SQLE 的活化, 进而抑制 SQLE 的所有催化反应, 所以其产生的神经和皮肤毒性较大^[12-14]。若抑制 Y335, 则仅抑制角鲨烯反应中间体的形成, 可特异性地抑制对角鲨烯的催化反应, 而不影响 SQLE 的其他催化反应, 因而减少了毒副作用的发生。

本研究根据 SQLE 的晶体结构, 通过计算机虚拟筛选技术和体外抗肿瘤活性评价, 筛选了针对 SQLE 蛋白 Y335 位点的小分子化合物, 并研究了它们对肝癌的抑制效果与作用机制。

材料与amp;方法

药品与试剂 小分子化合物 (上海陶术生物公司); 特比萘芬 (terbinafine) (T859226, 上海麦克林生化科技有限公司); 人肝癌细胞系 Huh7 (湖北顺康生物科

技有限公司); DMEM 培养基 (21013024, 美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (C2910-0500, 上海逍鹏生物科技有限公司); 双抗 (GNM15140)、胰酶 (GNM25200) (浙江吉诺赛百尔生物科技有限公司); protease inhibitor cocktail (HY-K0010, 美国 MedChemExpress); DMSO (D806645)、EB (E7637) (美国 Sigma 公司); RIPA 裂解液 (R0020, 北京 Solarbio 公司); 蛋白定量分析试剂盒 (P0011)、ECL 化学发光试剂盒 (P0018AS) (上海碧云天生物科技有限公司); 胆固醇检测试剂盒 (A12216, 美国 ThermoFisher 公司); 30% 丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺 (AR1161, 武汉博士德生物公司); TEMED (AR1165, 美国 Life Technologies 公司); PVDF 膜 (IPVH00010, 德国 Millipore 公司); 磷酸酶基因 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 抗体 (WL01901)、磷酸肌醇 3-激酶基因 (phosphoinositide3-kinase, PI3K) 抗体 (WL03380)、蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 抗体 (WL0003b) (万类生物公司); 5× protein loading buffer (G2013)、TBS 粉末 (G0001) (武汉赛维尔生物科技公司)。

细胞培养 用 DMEM 完全培养基 (含 10% 胎牛血清, 1% 的青霉素/链霉素) 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞恒温培养箱内培养。当细胞密度达到 90% 时进行传代, 每 3 天传代 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

MTT 用 DMEM 完全培养基稀释化合物至所需浓度, 处理细胞 24、48 和 72 h。处理结束后, 加入 0.5 mg·mL⁻¹ MTT 工作液, 4 h 后弃上清, 每孔加入 DMSO 溶液 150 μL。室温振荡 240 s 后, 酶标仪检测 570 nm 处的吸光度值, 并进行统计分析。

细胞划痕实验 6 孔板背面做横向直线用以标记, 接种细胞, 确保细胞贴壁后, 枪头垂直于标记线均匀划线, 吸去培养基, 用 PBS 润洗, 加入化合物处理, 根据划痕与标记线定位拍照。拍照后放入细胞培养箱中继续培养, 于 24、48 和 72 h 拍照, 拍照部位一致。利用 ImageJ 计算各组划痕愈合面积, 进行结果分析, 绘制统计图。

Transwell 实验 用无血清 DMEM 培养基饥饿细胞 24 h, 处理完成后, 胰酶消化, 无血清培养基重悬, 取 500 μL 含有 5×10⁵ 个细胞的培养悬液, 加入 transwell 小室, 下室加入 1 mL 含 20% FBS 的培养基。按所需浓度将药物加入小室内。培养 24 h 后清洁小室, 染色, 风干。第二天拍照, 进行统计学分析。

胆固醇含量检测 将细胞接种于 6 cm 皿, 药物处理 48 h, 消化后 PBS 重悬, 取部分细胞悬液检测蛋白浓度, 其余细胞加入配好的脂质萃取液 (甲醇:氯仿 = 2:1), 超声破碎, 14 000 r·min⁻¹, 离心 10 min, 取下层有机相冷冻挥发干后, 按照试剂盒说明书操作, 得到胆固醇标准品及样品的荧光值。根据标准曲线计算样品中胆

固醇含量, 除去样品蛋白浓度以排除细胞数量对结果的影响。

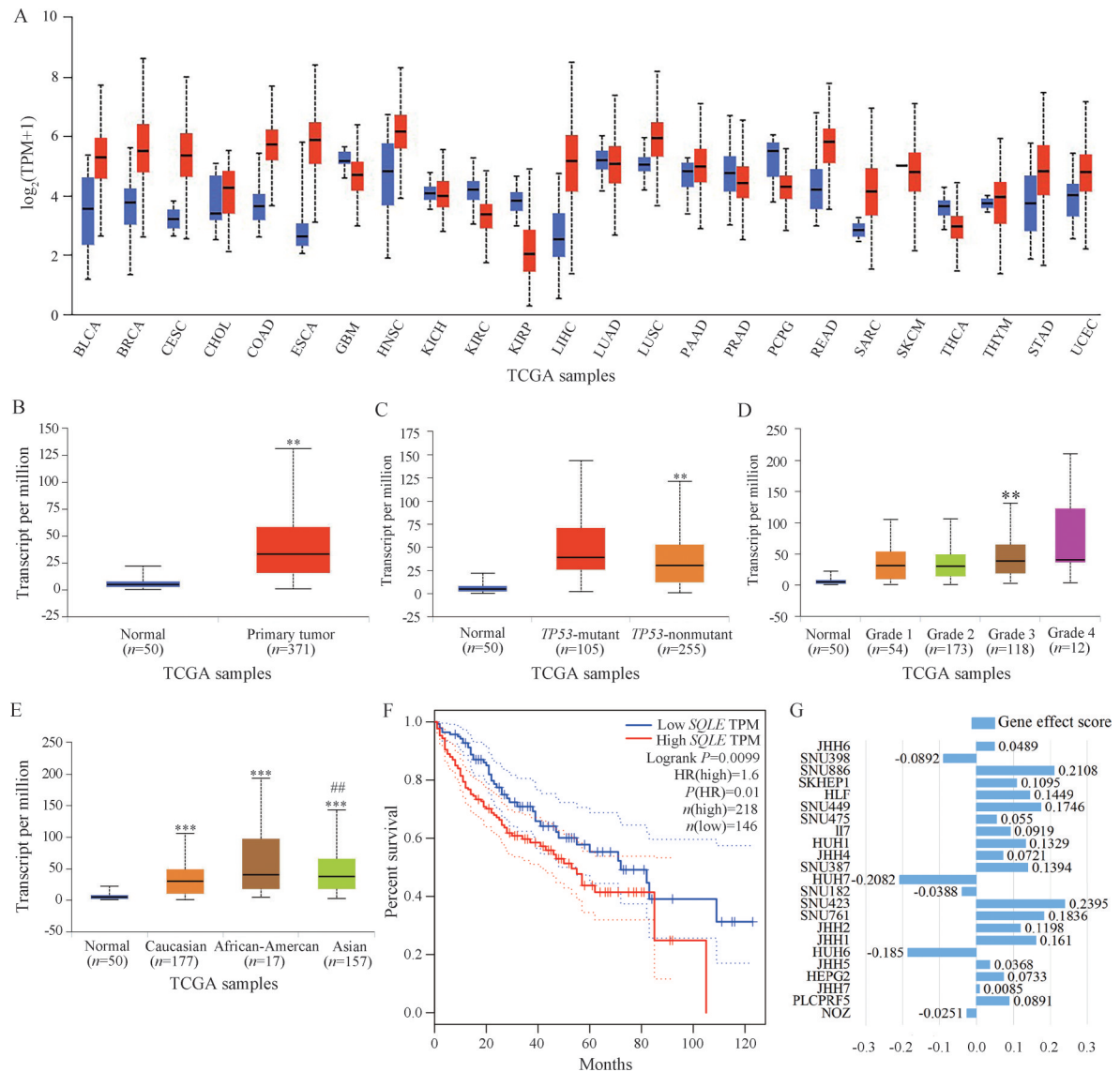
Western blot 将细胞接种于6孔板, 药物处理48 h, 处理完成后收集并裂解细胞, 检测蛋白浓度, 然后金属浴变性。取变性蛋白质经SDS-PAGE电泳、转膜、5%牛奶封闭、一抗4 °C孵育过夜、二抗37 °C孵育1 h、ECL试剂盒发光显色后进行成像采集, ImageJ对条带进行灰度分析, 以 β -actin作为内参。

统计学分析 文中数据均用SPSS22.0分析并处理, 每组数据均进行3次独立重复实验, 用平均值 \pm 标准差表示; 采用 t 检验比较两样本均数, $P < 0.05$ 则认为结果有统计学意义。

结果

1 生信分析 *SQLE* 在肝癌中的表达情况

首先通过在线网站UALCAN分析得到*SQLE* mRNA在多种癌症中表达上调(图1A), 其中在肝癌(liver hepatocellular carcinoma, LIHC)中*SQLE*的mRNA水平比正常组织高5倍以上, 呈极显著性差异($P < 0.01$, 图1B)。通过UALCAN分析发现在LIHC患者组织中,*SQLE*表达越高,*TP53*突变率越高(图1C), 肿瘤的恶性程度也越高(图1D)。LIHC患者的种族分析发现,*SQLE*在白种人、亚洲人和非裔美国人中的表达量依次增加(图1E)。GEPIA生存分析显示,*SQLE*与肝癌患者的总生存率呈负相关(图1F)。通过



UALCAN 数据库的基因效应评分发现, 敲除 *SQLE* 后, 肝癌细胞系中 Huh7 细胞增殖抑制及死亡最为明显 (图 1G), 所以后续实验选择 Huh7 进行深入研究。

2 计算机高通量筛选靶向 *SQLE* Y335 的化合物

通过 Discovery Studio 软件对商用化合物数据库 Chemdiv 中的小分子化合物进行筛选, 排除掉不适合成药的化合物。然后与 *SQLE* 的晶体结构 (PDB ID: 6C6R) 的 Y335 位点进行分子对接, 依次用 LibDock、CDOCKER、CLC Drug Discovery Workbench 程序进行打分和评价, 每次取前 10% 进行下一轮。按照 3 次结果的一致性和化合物的结构特点, 挑选出 35 个进行后续的生物实验, 编号为 1[#]~35[#], 筛选流程如图 2 所示。

3 MTT 法筛选对肝癌细胞具有杀伤作用的化合物

为了研究 35 个化合物对肝癌的杀伤作用, 首先通

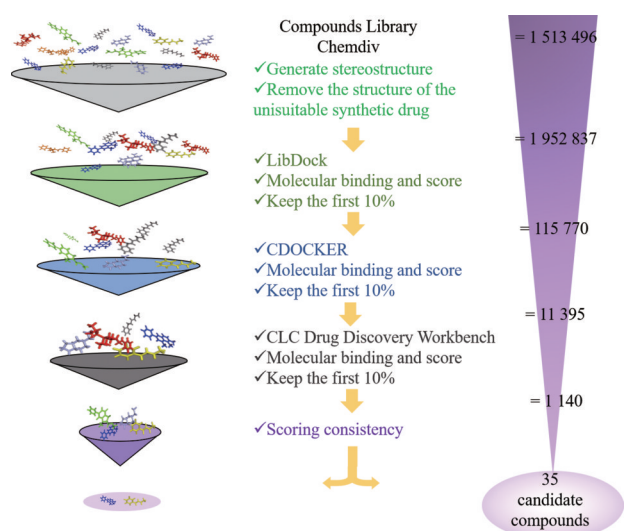


Figure 2 Molecular screening process by Discovery Studio

Table 1 Compounds information

Number	ID	Molecular formula	Relative molecular weight	Structural formula
19 [#]	D430-2307	C ₂₄ H ₂₁ F ₂ N ₃ O ₂ S	481.53	
31 [#]	S723-2271	C ₂₇ H ₂₉ FN ₂ O ₂	432.54	
35 [#]	V027-9225	C ₂₂ H ₂₁ F ₃ N ₂ O ₅ S	482.48	

过 MTT 法检测 50 μmol·L⁻¹ 1[#]~35[#] 化合物作用于 Huh7 细胞 48 h 后细胞的存活率, 结果发现 19[#]、31[#]、35[#] 化合物处理后细胞存活率低于 50%。因此选择 19[#]、31[#]、35[#] 为候选小分子化合物, 化合物相关信息见表 1。化合物对肝癌细胞的杀伤作用已申请相关专利 (申请号 202310643102.4 和 202310643103.9)。

进一步使用 19[#]、31[#]、35[#] 化合物处理 Huh7 细胞, 结果如图 3 所示。随着化合物给药浓度和处理时间的增加, 对 Huh7 细胞增殖的抑制作用越来越显著。19[#] 化合物处理 Huh7 细胞 24、48、72 h 后 IC₅₀ 分别为 83.6、27.2、23.3 μmol·L⁻¹; 31[#] 化合物处理 Huh7 细胞 48、72 h 后 IC₅₀ 分别为 25.7、5.1 μmol·L⁻¹; 35[#] 化合物处理 Huh7 细胞 48、72 h 后 IC₅₀ 分别为 29.4、6.2 μmol·L⁻¹。因此, 后续实验选择处理浓度为 25 和 6.25 μmol·L⁻¹。

4 划痕实验和 Transwell 实验检测化合物对 Huh7 迁移能力的影响

为研究化合物对肝癌细胞迁移能力的影响, 用化合物处理 Huh7 细胞 24、48 和 72 h, 发现划痕的面积随着处理浓度增加和处理时间延长而增加, 说明 3 种化合物均可抑制细胞的迁移能力 (图 4A)。

用化合物处理 Huh7 细胞 24 h 后, 统计穿过 transwell 小室的细胞数量, 发现药物处理组穿过的细胞数量明显少于对照组, 说明化合物均可抑制细胞的迁移, 其中 19[#] 和 35[#] 比 31[#] 的抑制效果要更明显 (图 4B)。

5 化合物对 Huh7 细胞中胆固醇含量的影响

为研究化合物对细胞内胆固醇含量的影响, 用化合物处理 Huh7 细胞 48 h 后, 检测细胞内总胆固醇及游离胆固醇水平, 结果如图 5A~C 所示。25 μmol·L⁻¹ 处

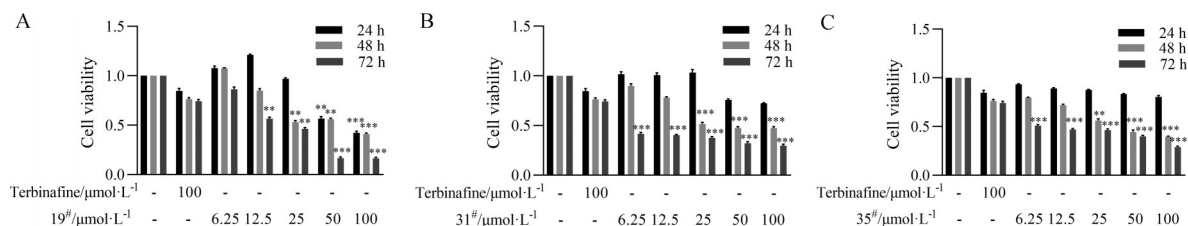


Figure 3 Suppressive effect of compounds 19[#] (A), 31[#] (B), 35[#] (C) and terbinafine on Huh7 cell proliferation. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control

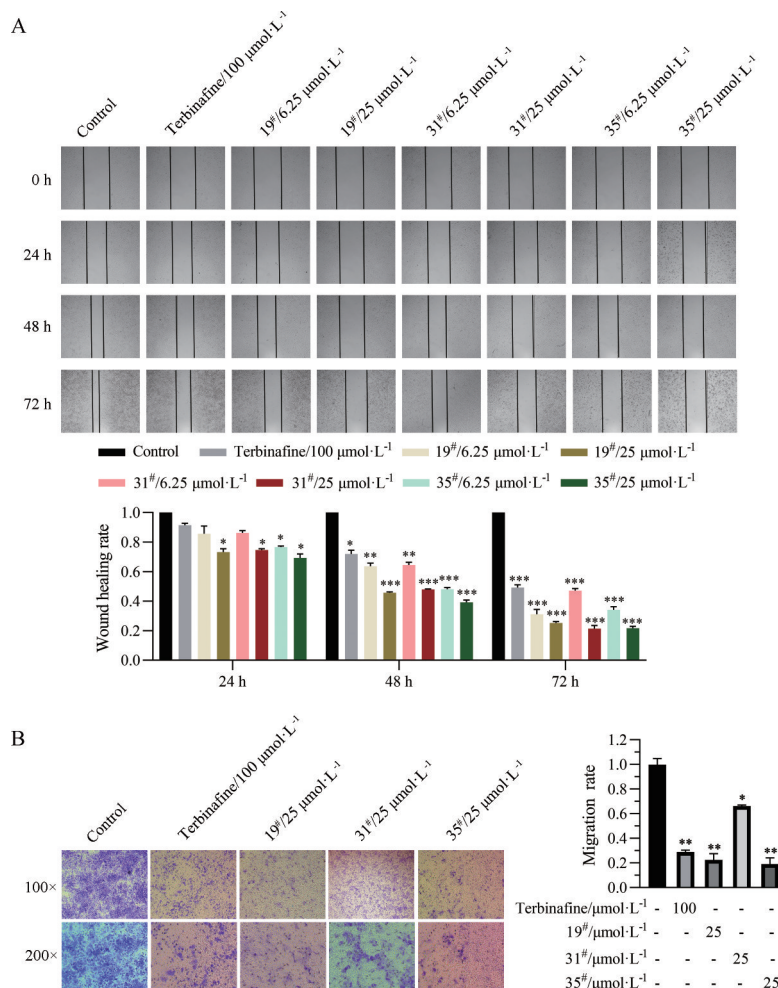


Figure 4 Wound healing assay (A) and transwell assay (B) were used to detect the suppressive effects of the compounds 19[#], 31[#] and 35[#] on the migration ability of Huh7 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control

理组的3种化合物对胞内胆固醇含量均有抑制作用,其中19[#]化合物处理后,胞内游离胆固醇和总胆固醇水平分别下降至对照组的56% ($P < 0.05$)和54% ($P < 0.05$);31[#]化合物处理后,胞内游离胆固醇和总胆固醇水平分别下降至对照组的60% ($P < 0.05$)和58% ($P < 0.05$);35[#]化合物处理后,胞内游离胆固醇和总胆固醇水平分别下降至对照组的32% ($P < 0.05$)和36% ($P < 0.05$)。35[#]比19[#]和31[#]的抑制效果更明显。

6 化合物对Huh7细胞中PI3K/AKT信号通路的影响

为了研究化合物能否通过PTEN调节PI3K/AKT

相关通路,本研究使用化合物处理Huh7细胞48 h,检测细胞内PTEN、PI3K和AKT蛋白表达水平,结果如图6所示。化合物19[#]、31[#]、35[#]能够显著性增加抑癌基因PTEN的表达水平并降低PI3K和AKT的蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。

讨论

针对致癌靶点的靶向治疗药物能有效减少对正常组织细胞的伤害,促进肿瘤细胞的特异性死亡,是肿瘤药物发展的未来方向。SQLE是胆固醇合成限速酶之

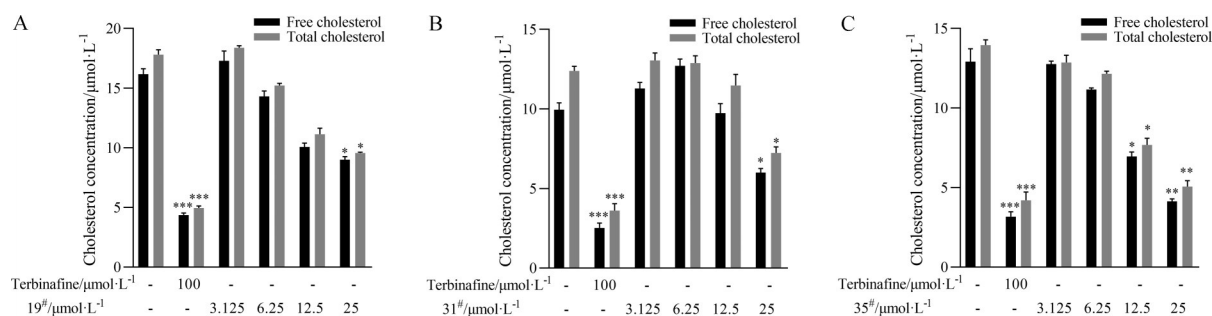


Figure 5 The effects of compounds 19[#] (A), 31[#] (B) and 35[#] (C) on total cholesterol and free cholesterol content in Huh7 cells. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs control

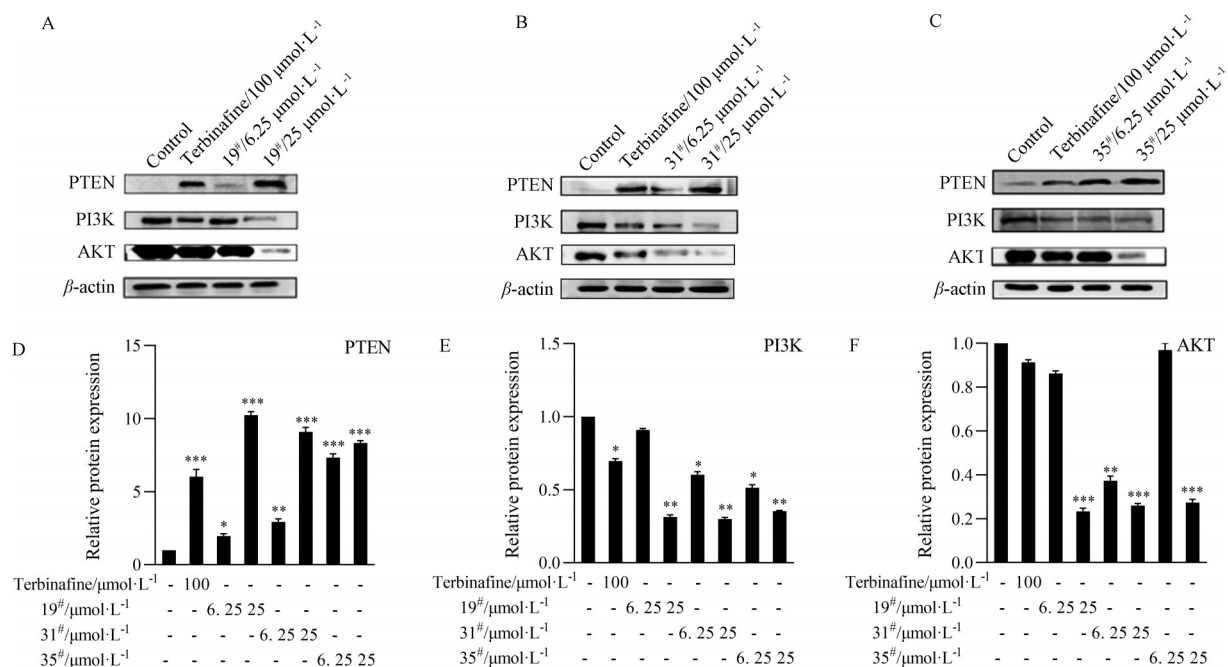


Figure 6 The effects of compounds 19[#] (A), 31[#] (B) and 35[#] (C) on the protein expression of PTEN (D), PI3K (E) and AKT (F). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs control

一, 在包括肝癌、乳腺癌、结直肠癌、肺癌等多种癌组织中的表达明显高于正常组织^[4,8,15,16]。SQLE 过表达不仅能促进癌细胞增殖、抑制癌细胞凋亡、维持癌细胞的干性、促进上皮细胞间充质转化, 还与癌细胞的放化疗耐受密切相关^[3,5,7], 也能通过干扰肠道菌群而导致肿瘤的发生^[17]。本文通过 UALCAN、GEPIA 等在线网站分析发现 SQLE 基因在 LIHC 患者中高表达, 且 SQLE 在非裔美国人和亚洲人种的 LIHC 患者中表达高于白种人。同时, 高表达的 SQLE 不仅与 TP53 的突变率呈正相关, 还是肝癌患者肿瘤分级的重要依据, 表明 SQLE 可能是肝癌治疗的潜在靶点。

早期受限于不甚明了 SQLE 蛋白晶体结构, 很难有效地改进或研发新的 SQLE 抑制剂。2019 年 SQLE 的晶体结构被 Padyana 的团队^[10]成功解析, 显示 SQLE 的活性与 Y195 和 Y335 有关。现有的 SQLE 抑制剂特

比萘芬及其衍生物 NB-598 均是阻止 Y195 与 168 位谷氨酰胺残基 (Q168) 形成氢键, 导致 SQLE 不能被活化而抑制 SQLE 的所有反应, 这是特比萘芬及其衍生物 NB-598 产生毒副作用的主要原因^[14]。而 Y335 为 SQLE 催化氧化反应所必需, 基于该位点的抑制剂仅抑制角鲨烯反应中间体的形成^[10], 因而可降低毒副作用的发生。本文基于 SQLE 的晶体结构, 利用计算机虚拟筛选技术筛选出了 35 个针对 SQLE Y335 位点的抑制剂, 结合它们对肝癌细胞系 Huh7 的活性研究, 得到了 3 个能显著抑制 Huh7 细胞增殖与迁移的化合物。

流行病学的研究发现, 胆固醇的摄入超标是肝硬化及肝癌的独立相关因素^[18]。癌细胞往往表现出大量胆固醇积累, 以增强膜受体信号转导、改变线粒体膜活性、影响肿瘤免疫等^[6]。细胞内胆固醇水平上调可促进癌细胞的侵袭性和骨转移^[19-22], 而减少细胞内胆固醇

醇的含量,可有效促进肿瘤细胞的死亡^[23-25]。在肝癌细胞中,胆固醇水平升高还可导致癌细胞对凋亡信号的抵抗,降低癌细胞对化疗药物的敏感性^[26]。此外, SQLE 可通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进非酒精性脂肪肝病诱导的肝细胞癌患者的胆固醇的合成,加速肝癌细胞的增殖与迁移^[7]。本研究检测了上述 3 个 SQLE Y335 抑制剂处理 Huh7 细胞后对胆固醇含量和 PTEN、PI3K、AKT 蛋白表达的影响,发现它们均可降低细胞内胆固醇含量,上调 PTEN 蛋白表达水平,下调 PI3K 和 AKT 蛋白表达水平。

综上所述,本研究针对 SQLE 的 Y335 位点,利用药物开发软件结合 MTT 实验,筛选得到 3 个具有抑制 Huh7 细胞增殖和迁移作用的小分子化合物。体外实验的研究结果表明,3 个化合物可通过上调 Huh7 细胞中 PTEN 的表达,抑制 PI3K/AKT 信号通路,减少胞内胆固醇积累,最终抑制肝癌细胞的增殖和迁移,发挥抗肝癌的作用。本文的研究结果为筛选治疗肝癌的高效低毒的靶向药物提供了理论与实验基础。

致谢:感谢湖北大学中药生物技术湖北省重点实验室陈勇教授对本文的指导。

作者贡献:郭良琦是本文的主要撰写者,收集资料并分析,完善相关实验;刘雅丽、翟婷、谭潇是实验参与者;刘亚云、盛德乔负责技术指导并修改论文。所有作者阅读并认可终稿。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Cirmena G, Franceschelli P, Isnaldi E, et al. Squalene epoxidase as a promising metabolic target in cancer treatment [J]. *Cancer Lett*, 2018, 425: 13-20.
- [2] Astruc M, Tabacik C, Descomps B, et al. Squalene epoxidase and oxidosqualene lanosterol-cyclase activities in cholesterologenic and non-cholesterologenic tissues [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1977, 487: 204-211.
- [3] Sun H, Li L, Li W, et al. p53 transcriptionally regulates SQLE to repress cholesterol synthesis and tumor growth [J]. *EMBO Rep*, 2021, 22: e52537.
- [4] Ge H, Zhao Y, Shi X, et al. Squalene epoxidase promotes the proliferation and metastasis of lung squamous cell carcinoma cells through extracellular signal-regulated kinase signaling [J]. *Thorac Cancer*, 2019, 10: 428-436.
- [5] Qin Y, Hou Y, Liu S, et al. A novel long non-coding RNA lnc030 maintains breast cancer stem cell stemness by stabilizing SQLE mRNA and increasing cholesterol synthesis [J]. *Adv Sci*, 2022, 9: e2204046.
- [6] Xu H, Zhou S, Tang Q, et al. Cholesterol metabolism: new functions and therapeutic approaches in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1874: 188394.
- [7] Liu D, Wong CC, Fu L, et al. Squalene epoxidase drives NAFLD-induced hepatocellular carcinoma and is a pharmaceutical target [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10: eaap9840.
- [8] Sui Z, Zhou J, Cheng Z, et al. Squalene epoxidase (SQLE) promotes the growth and migration of the hepatocellular carcinoma cells [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36: 6173-6179.
- [9] Feltrin S, Ravera F, Traversone N, et al. Sterol synthesis pathway inhibition as a target for cancer treatment [J]. *Cancer Lett*, 2020, 493: 19-30.
- [10] Padyana AK, Gross S, Jin L, et al. Structure and inhibition mechanism of the catalytic domain of human squalene epoxidase [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 97.
- [11] Jiang X, Jin W, Li Z, et al. Discovery of a small-molecule inhibitor of carbamoyl phosphate synthase 1 and its anti-colorectal cancer mechanism [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 2671-2681.
- [12] Belter A, Skupinska M, Giel-Pietraszuk M, et al. Squalene monooxygenase-a target for hypercholesterolemic therapy [J]. *Biol Chem*, 2011, 392: 1053-1075.
- [13] Trapani L, Segatto M, Ascenzi P, et al. Potential role of nonstatin cholesterol lowering agents [J]. *IUBMB Life*, 2011, 63: 964-971.
- [14] Nagaraja R, Olaharski A, Narayanaswamy R, et al. Preclinical toxicology profile of squalene epoxidase inhibitors [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 401: 115103.
- [15] Brown DN, Caffa I, Cirmena G, et al. Squalene epoxidase is a bona fide oncogene by amplification with clinical relevance in breast cancer [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19435.
- [16] Kim JH, Kim CN, Kang DW. Squalene epoxidase correlates E-cadherin expression and overall survival in colorectal cancer patients: the impact on prognosis and correlation to clinicopathologic features [J]. *J Clin Med*, 2019, 8: 632.
- [17] Li C, Wang Y, Liu D, et al. Squalene epoxidase drives cancer cell proliferation and promotes gut dysbiosis to accelerate colorectal carcinogenesis [J]. *Gut*, 2022, 71: 2253-2265.
- [18] Ioannou GN, Morrow OB, Connole ML, et al. Association between dietary nutrient composition and the incidence of cirrhosis or liver cancer in the United States population [J]. *Hepatology*, 2009, 50: 175-184.
- [19] Mayengbam SS, Singh A, Pillai AD, et al. Influence of cholesterol on cancer progression and therapy [J]. *Transl Oncol*, 2021, 14: 101043.
- [20] Jamnagerwalla J, Howard LE, Allott EH, et al. Serum cholesterol and risk of high-grade prostate cancer: results from the REDUCE study [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2018, 21: 252-259.
- [21] Tao M, Luo J, Gu T, et al. LPCAT1 reprogramming cholesterol metabolism promotes the progression of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12: 845.

- [22] Liu Y, Fang L, Liu W. High SQLE expression and gene amplification correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 4709-4723.
- [23] Huang B, Song BL, Xu C. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Nat Metab*, 2020, 2: 132-141.
- [24] Costa GA, de Souza SB, da Silva Teixeira LR, et al. Tumor cell cholesterol depletion and V-ATPase inhibition as an inhibitory mechanism to prevent cell migration and invasiveness in melanoma [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018, 1862: 684-691.
- [25] Chua NK, Coates HW, Brown AJ. Squalene monooxygenase: a journey to the heart of cholesterol synthesis [J]. *Prog Lipid Res*, 2020, 79: 101033.
- [26] Montero J, Morales A, Llacuna L, et al. Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 5246-5256.