

## 新型吡咯并嘧啶衍生物 N67 对 3T3-L1 细胞的抑制作用及机制初探

易晓红<sup>1</sup>, 李文峰<sup>2</sup>, 钟占琼<sup>3</sup>, 贺玉萍<sup>2</sup>, 谢璐霜<sup>1</sup>, 陈继兰<sup>3</sup>, 李敏<sup>1</sup>, 龚圆渊<sup>1</sup>, 杨岚<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨新型吡咯类小分子化合物 N67 对小鼠前脂肪细胞 3T3-L1 的作用效果和机制。方法 培养 Swiss 小鼠 3T3-L1 细胞, 设对照组, 将 N67 以不同时间的浓度作用于 3T3-L1 细胞, 采用 MTT 细胞毒性检测, 求出 IC<sub>50</sub>; 流式细胞术检测细胞凋亡情况; Western blot 检测相关蛋白表达。结果 N67 对 3T3-L1 细胞的生长有显著抑制作用, 流式细胞术显示能诱导其凋亡, 且有时间和浓度依赖性。Western blot 结果证明其可能通过 ABHD6 靶点发挥作用。结论 新型小分子化合物 N67 可诱导 3T3-L1 凋亡, 作用机制可能是通过抑制 ABHD6 表达, 证明 N67 有可能作为新的 ABHD6 抑制剂。

**关键词** 新型小分子化合物 N67; 前脂肪细胞 3T3-L1; 凋亡; ABHD6; 抑制剂

中图分类号 R 961

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0380-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.009

2018-11-05 接收

基金项目: 四川省教育厅自然科学基金(编号: 16ZB0124); 成都中医药大学自然科学基金(编号: ZRMS201232)

作者单位: 成都中医药大学基础医学院<sup>1</sup> 组胚教研室、<sup>2</sup> 方剂学教研室、<sup>3</sup> 实验科研中心 成都 611137

作者简介: 易晓红, 女, 讲师, 硕士;

杨岚, 女, 教授, 博士, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lanyang72@163.com

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指患者在无过量饮酒史的条件下, 以肝细胞内脂肪过度沉积并超过 5%~10% 的肝重量为主要特征的临床病理综合征。如不及时治疗, 可演变为脂肪性肝炎、肝硬化、肝纤维化、甚至发展成肝细胞癌<sup>[1]</sup>。全球流行病学调查表明, 我国非酒精性脂肪肝的发病率约为 15%<sup>[2]</sup>。而上海地区的患病率更是高达 17.29%<sup>[3]</sup>。NAFLD 不仅给患者带来沉重的疾病痛苦和经济压力, 而且为国家带来沉重的经济负担和人才损失。目前, 尚无推荐用于 NAFLD 常规治疗的药物, 只能通过改变不良生活方式<sup>[4]</sup> 或服用胰岛素增敏剂、减肥药、调脂药、血管紧张素受体拮抗剂、抗氧化剂等防治糖代谢紊乱, 间接改善 NAFLD 病情<sup>[5]</sup>。因而, 针对 NAFLD 新靶点创新药物的研究具有重要意义。研究<sup>[6-7]</sup>表明,  $\alpha$ -水解酶域包含蛋白 6( $\alpha$ / $\beta$ -Hydrolase domain containing 6, ABHD6)在 NAFLD 的发生发展过程中扮演着重要角色, 是脂肪代谢的关键酶之一。研究<sup>[8-9]</sup>显示在 NAFLD 患者中, ABHD6 的表达很高, ABHD6 可以水解几个脂质底物, 在甘油磷脂代谢和脂质信号转导的过程中起到重要作用。ABHD6 抑

**Methods** MDA-MB-231 3D tumor micro-tissue culture model based on Matrigel (3D-M) was constructed by drop overlap method in the low-adsorption U-bottom 96-well plate. The cell proliferation of tumor cells in 2D, 3D and 3D-M culture conditions and their sensitivities to commonly used drugs in clinical breast cancer treatment were detected by alamar blue assay. The cell uptake of epirubicin was measured by flow cytometry. **Results** MDA-MB-231 cells formed more tighter 3D spheroids with the addition of Matrigel, which could promote the proliferation of MDA-MB-231 cells. Cell cytotoxicity assays showed that cancer cells in the 3D-M model showed higher drug resistance compared to 2D and 3D cultures. The evaluation of cellular uptake showed that the positive cell rate and the median fluorescence intensity of endocytosis drugs in 3D spheroids were lower than those in 2D culture. After treatment with epirubicin for 30 minute, the percentage of 3D-M positive cells and the median fluorescence intensity were lower at 3D with 80% and 25%, respectively, with the treatment of epirubicin for 30 minutes. **Conclusion** The *in vitro* 3D cancer cell culture model promoted by Matrigel with breast cancer cells could form a tumor-like micro tissue, in which the permeability of drugs could be recude compared with 2D and 3D cultures. In this case, 3D-M model could more accurately reflect the reactivity of anticancer drugs and be a potential model for the assessment of anticancer drugs effect *in vitro*.

**Key words** Matrigel; tumor micro-tissue; three-dimensional culture; anti-cancer drug

制剂报道目前较少 2015 年 Abide et al 发现了吡咯类和唑酮类的小分子 ABHD6 抑制剂<sup>[9-12]</sup>。本课题前期研究工作中基于和这类化合物结构相似的 38 个活性已知的 ABHD6 小分子抑制剂(0.04  $\mu\text{mol/L}$  <  $\text{IC}_{50}$ (50% 抑制浓度) < 7  $\mu\text{mol/L}$ ) ,使用 Discovery Studio 3.1 软件的 Catalyst Hypothesis 模块来构建药效团模型。所构建的药效团包含四个药效特征 ,两个氢键受体 ,一个疏水特征 ,一个疏水芳香环特征。进一步用该药效团模型对 10 000 个化合物的数据库进行虚拟筛选 ,得到一个活性较好的化合物 ( $\text{IC}_{50}$  约为 0.66) ,命名为 N67(图 1)。本实验观察 N67 对 3T3-L1 细胞的作用效果 ,并初步探讨其作用机制 ,为开发治疗 NAFLD 的新型抑制剂提供理论依据。

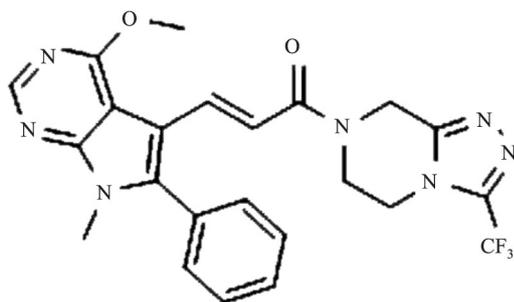


图 1 N67 结构式(分子量:483.16)

## 1 材料与方法

**1.1 细胞与试剂** Swiss 小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞来自美国 ATCC 细胞库;磷酸盐缓冲溶液(PBS)、胎牛血清(FBS)、十二烷基磺酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)和 MTT、多聚甲醛(成都科龙试剂公司);DMEM 培养基、辅酶 I(NADH)、碘化丙啶(PI)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)和丙酮酸钠(美国 Sigma 公司);胰蛋白酶-EDTA 溶液(0.25% ,EDTA 0.52 mmol/L)、青霉素-链霉素溶液、兔单抗  $\beta$ -actin(sc-4778)、兔多抗 ABHD6 Polyclonal Antibody(美国 Millipore 公司);Annexin V-EGFP/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);显影化学发光剂 ECL,BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术研究所)。

**1.2 仪器与设备** BIO-RAD680 酶标仪、Powerpas Basic 蛋白电泳仪器(美国伯乐公司);流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养** Swiss 小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞在 DMEM 培养液(含有 10% 胎牛血清、100 U/L 青霉素、100  $\mu\text{g/ml}$  链霉素)中(以下简称 DMEM10) ,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱环境下常规培养。当细胞生长至大部分融合时 ,用胰蛋白酶-EDTA 溶液进行细胞传代。

**1.3.2 细胞毒性试验** 取 96 孔培养板 ,每孔加入浓度为  $5 \times 10^4$  个细胞/ml 的 100  $\mu\text{l}$  的 3T3-L1 前脂肪细胞悬液 ,然后放入 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中进行培养。24 h 后弃去培养液 ,每孔加入 100  $\mu\text{l}$  含有不同浓度的 N65 溶液 ,用不含样品的 DMEM10 作为空白对照 ,孵箱孵育 72 h。弃去培养液 ,加入 0.5 mg/ml MTT 的 DMEM10 孵育 4 h ,再加入 100  $\mu\text{l}$  的 0.1 g/ml 的 SDS 溶液过夜。酶标仪在 570 nm 处测定吸光度值。重复 3 次。以药物浓度为横坐标 ,细胞存活率为纵坐标进行直线回归并求出  $\text{IC}_{50}$ 。

**1.3.3 细胞形态观察** 用 90 mm 直径培养 3T3-L1 前脂肪细胞。贴壁培养 24 h 后弃去培养液 ,向皿中加入 5 ml 含有相应  $\text{IC}_{50}$  的 N67 营养液 ,用不含样品的 DMEM10 为空白对照。孵育 72 h 后弃去培养液 ,用 5 ml PBS 溶液轻柔清洗细胞层 ,重复 1 次。于超净台上放置至干燥 ,于显微镜下放大 200 倍观察凋亡的细胞形态。实验重复 3 次。

**1.3.4 Annexin-FITC/PI 双染法流式细胞术测细胞凋亡** 取 24 孔培养板 ,每孔加入浓度为  $5 \times 10^4$  个细胞/ml 的 3T3-L1 细胞悬液 1 ml ,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养。24 h 后弃去培养液 ,每孔加入 1 ml 不同浓度的 N65 的培养液孵育 ,以不含样品的 DMEM 为空白对照 ,于 48 h 弃去培养液 ,PBS 溶液清洗细胞层 ,洗液收集至离心管中。每孔加入 500  $\mu\text{l}$  胰蛋白酶-EDTA 消化液 ,将细胞消化后其悬液打匀后加入离心管中。用 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 70% 冷乙醇固定 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。调整细胞浓度为  $10^6$  细胞/ml ,取 1 ml 细胞悬液 ,用 PBS 洗 3 次 ,细胞重悬于 1 ml 染液中 ,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 即可进行流式分析。实验重复 3 次。于贝特曼库尔特流式细胞仪检测细胞凋亡 ,用贝特曼库尔特软件处理数据。

**1.3.5 Western blot 实验** 预冷 RIPA 蛋白抽提试剂 ,加入蛋白酶抑制剂。细胞计数 ,以细胞数量  $1 \times 10^7$  加入 1 ml 裂解液 ,用枪头吹打充分悬起细胞 ,完成后在冰上孵育 20 min 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 ,离心完成后取上清 ,分装保存 ,待测。BCA 试剂测定蛋白浓度 ,根据目的蛋白的分子量 ,配制 12% 分离胶 ,5% 分离胶。待检测蛋白样品上样 15  $\mu\text{g}$ 。浓缩胶恒压 90V ,约

20 min 溴酚蓝进行分离胶界面;分离胶恒压 160V ,电泳至溴酚蓝到凝胶底部。湿转法转膜,将胶完全浸没封闭液中室温轻摇 60 min。用 TBST 稀释一抗,室温孵育 10 min 放 4 °C 过夜。第 2 天从冰箱拿出膜,在室温孵育 30 min。洗膜:TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。二抗孵育,显影,曝光。实验重复 3 次。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析,组间比较选用  $\chi^2$  或 Fisher 确切概率法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 N67 作用于 3T3-L1 细胞的细胞形态观察**

分别将 0.625、1.25、2.5、5 mg/ml N67 处理的 3T3-L1 前脂肪细胞固定,并设对照组,24 h 后利用显微镜观察细胞形态。如图 2 所示,第一行的图片示显微镜下各组细胞的图像,为方便观察和计数,第二行在第一行的图片上用绿色标记活细胞,列入计数范围,红色标记为非活细胞。对照组的细胞生长状况良好,结构完整,形态正常,细胞核居中。而处理组

的细胞相对分散,细胞数量随着 N67 浓度升高而减少,细胞失去纤维状形态,细胞具有典型的凋亡形态特征:体积缩小、细胞核固缩、核染色质边集聚,甚至核碎裂。计数每个实验组 5 个视野的细胞数进行统计分析,实验组与 control 组差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 3。

**2.2 N67 对 3T3-L1 前脂肪细胞生长抑制作用**

由图 4 可知,N67 对 3T3-L1 前脂肪细胞有明显生长抑制作用。随着 N67 浓度的升高(0.6 ~ 5) mg/ml,细胞的存活率下降,剂量效应关系明显。从图 4 可以看出,N67 的浓度从 0.6 mg/ml 到 5 mg/ml,细胞存活率从约 75% 降至 10%。以细胞存活率与 N67 的浓度进行直线回归并求出  $IC_{50}$ 。经计算,N67 对 3T3-L1 前脂肪细胞的  $IC_{50}$  为  $(0.66 \pm 10)$  mg/ml。

**2.3 N67 诱导 3T3-L1 细胞的凋亡**

3T3-L1 前脂肪细胞经不同浓度的 N67 处理,24 h 后分别在流式细胞仪上测定细胞凋亡的变化。用贝特曼库尔特软件进行细胞周期分析。图 5 中四个象限 Q1 区域的细胞为坏死细胞。也可能有少数的晚期凋亡细胞在

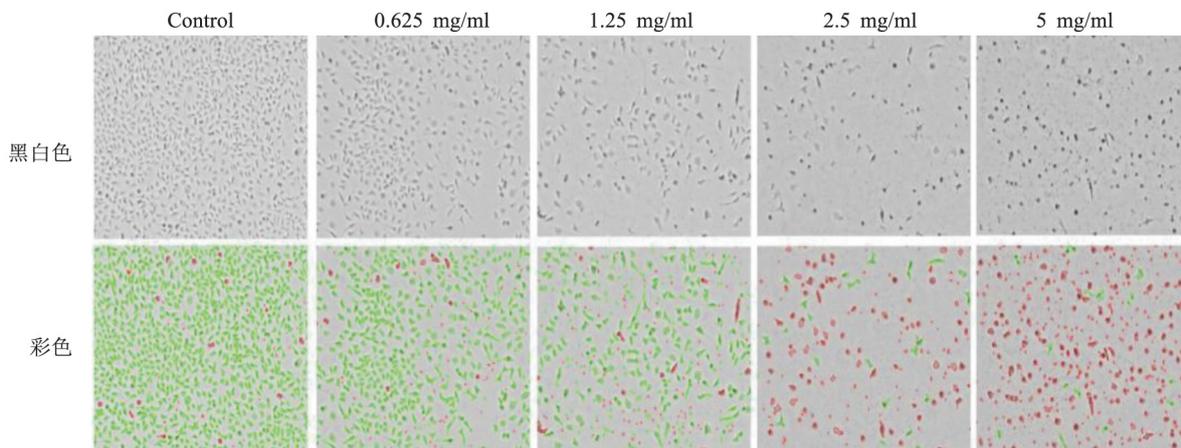


图 2 不同浓度 N67 对 3T3-L1 细胞形态的影响

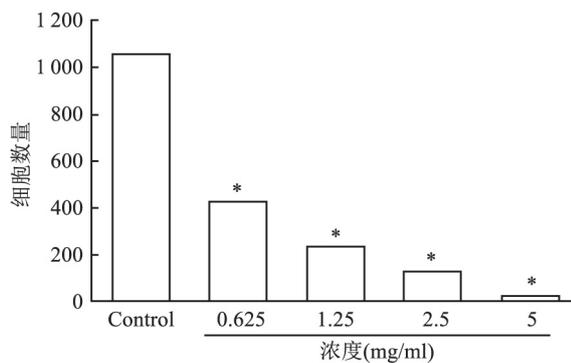


图 3 不同浓度 N67 对 3T3-L1 细胞作用后的形态计数与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$

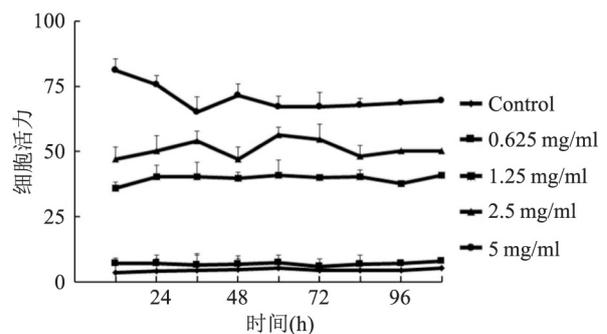


图 4 N67 对 3T3-L1 细胞生长抑制作用的剂量效应关系

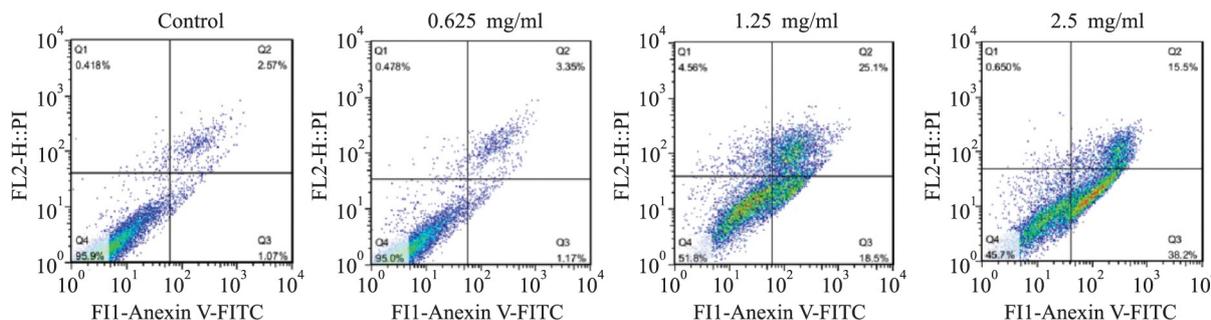


图5 N67 诱导 3T3-L1 细胞凋亡

其中。Q2 区域的细胞为晚期凋亡细胞。Q3 区域的细胞为早期凋亡细胞。Q4 区域的细胞为活细胞。从图 5 可看出 3T3-L1 前脂肪细胞随 N67 浓度早期凋亡细胞明显增多。0.625 mg/ml 浓度到 2.5 mg/ml 浓度凋亡细胞比例从 1.17% 上升至 38.2%，说明 N67 对 3T3-L1 前脂肪细胞有诱导凋亡的作用。

**2.4 Western blot 实验结果分析** 如图 6 所示，已知 ABHD6 的分子量为 38.3 ku，结果显示在此范围出现目的条带，并且随着浓度的升高，蛋白表达降低。实验组与 control 组差异均有意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。说明药物对 3T3-L1 前脂肪细胞有抑制作用，并且靶点为 ABHD6。

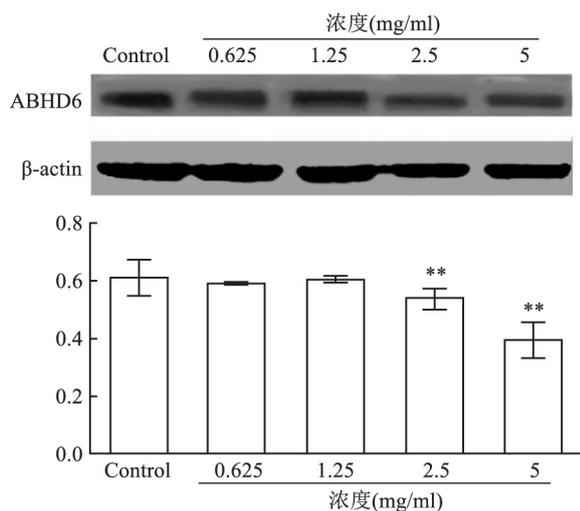


图6 N67 抑制 ABHD6 的表达并具备浓度依赖性  
与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

Swiss 小鼠前脂肪细胞 3T3-L1 是来源于小鼠的前脂肪细胞的细胞株，具有接触性抑制生长特征且可向脂肪样细胞分化特性，是国际上公认的研究脂肪细胞分化的细胞模型。ABHD6 是由 337 个氨基

酸组成的蛋白质，相对分子量为 38.3 ku。ABHD6 基因属于  $\alpha/\beta$  水解酶超家族，这一家族也是目前所知最大的蛋白超家族之一，它们具有相似的高级结构，即共有  $\alpha/\beta$  水解酶折叠结构<sup>[6]</sup>。此前的一些研究<sup>[13-15]</sup>表明，ABHD6 可以水解单酰甘油，从而调节脂类代谢和胰岛素的分泌，因此在治疗非酒精性脂肪肝以及糖尿病的过程中，它们起着重要的作用。

Discovery Studio 是一个面向生命科学领域的新一代分子建模和模拟环境的软件，它的 Catalyst Hypothesis 模块可对一组化合物进行基于特性结构的比对，并且自动生成药效团模型。若能提供具体的活性数据，则可产生 3D-QSAR 药效团并预测新化合物的活性，节约大量的实验时间和成本。所以此款软件在药物筛选和模拟有效活性团模型构件上被广泛应用，在疾病治疗的创新药物研发上取得了很好的效果。结构和 N67 类似的化合物已经有相应的报道，笔者在之前的研究基础上进一步用该药效团模型对 10 000 个化合物的数据库进行虚拟筛选，得到一个活性较好的化合物，命名为 N67。

本实验证明新型小分子化合物 N67 对 Swiss 小鼠前脂肪细胞 3T3-L1 具有明显的生长抑制作用，且呈剂量依赖效应， $IC_{50}$  为  $(0.66 \pm 10)$  mg/ml。对其生长抑制机制进行研究发现，N67 可通过调节其表达来发挥作用，诱导 3T3-L1 前脂肪细胞凋亡。其机制可能是通过作用于 ABHD6 靶点。由于细胞凋亡过程中多条通路在发挥作用而且交叉。相同的药物作用不同的细胞系所启动的信号通路可能不同，不同的药物作用于同一个细胞系启动的也不同，本实验只是初步发掘 N67 对 ABHD6 的作用机制，具体的凋亡机制研究具有进一步研究的潜在价值。同时实验亦说明 ABHD6 是治疗非酒精性脂肪肝的潜在靶点之一，对非酒精性脂肪肝的治疗研究有一定临床

意义,值得进一步研究。此外值得肯定的是,实验选择的化合物研究表明,利用 Discovery Studio 软件的 Catalyst Hypothesis 模块来构建药效团模型具有可操作性和临床应用的可能性。

### 参考文献

- [1] 徐建华,石群,顾红霞,等. 2型糖尿病与非酒精性脂肪肝相关性研究[J]. 中华全科医学, 2014, 12(7): 1082-3.
- [2] 范建高,朱军,李新建,等. 上海市成人脂肪肝患病率及其危险因素流行病学调查[J]. 中华肝病杂志, 2005, 12(2): 83-8.
- [3] 兰静,单丽华,胡小华. 健康教育改善脂肪肝患者不良生活方式的效果[J]. 当代护士(学术版), 2011(10): 149-50.
- [4] 贾继东,白启轩. 非酒精性脂肪肝性肝病治疗[J]. 临床内科杂志, 2008, 25(11): 733-5.
- [5] 柳嘉, David G. Popovich, 景浩. 笃斯越橘花青素提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞生长的抑制作用[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 248-53.
- [6] Pribasnig M A, Mrak I, Grabner G F, et al. Alpha/beta hydrolase domain-containing 6 (ABHD6) degrades the late endosomal/lysosomal lipid bis(monoacylglycerol) phosphate [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(50): 29869-81.
- [7] Hsu K L, Tsuboi K, London R, et al. Discovery and optimization of piperidyl-2- $\beta$ -triazole ureas as potent, selective, and *in vivo*-active inhibitors of alpha/beta-hydrolase domain containing 6 (ABHD6) [J]. *J Medical Chem* 2013, 56(21): 8270-9.
- [8] Thomas G, Betters J L, Lord C C, et al. The serine hydrolase ABHD6 is a critical regulator of the metabolic syndrome [J]. *Cell Rep* 2013, 5(2): 508-20.
- [9] Patel J Z, Nevalainen T J, Savinainen J R, et al. Optimization of 1,2,5-thiadiazole carbamates as potent and selective ABHD6 inhibitors [J]. *ChemMedChem* 2015, 10(2): 253-65.
- [10] Zhao S, Mugabo Y, Ballentine G, et al. Alpha/beta-hydrolase domain 6 deletion induces adipose browning and prevents obesity and type 2 diabetes [J]. *Cell Rep* 2016, 14(12): 2872-88.
- [11] Ahn K, Boehm M, Brown M F, et al. Discovery of a selective covalent inhibitor of lysophospholipase-like 1 (LYPLAL1) as a tool to evaluate the role of this serine hydrolase in metabolism [J]. *ACS Chem Bio* 2016, 11(9): 2529-40.
- [12] Wei M, Jia M, Zhang J, et al. The inhibitory effect of alpha/beta-hydrolase domain-containing 6 (ABHD6) on the surface targeting of glua2-and glua3-containing AMPA receptors [J]. *Front Mol Neurosci* 2017, 10(55): 245-61.
- [13] Yang X, Liu X, Li Y, et al. The negative effect of silica nanoparticles on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015, 7(42): 341-8.
- [14] Kong L, Yang L, Zhang G B, et al. High fluorescence of carbazole derivatives for bioimaging of endoplasmic reticulum and lysosome: the influence of molecular structure on optical properties and cell uptake [J]. *J Mater Sci* 2017, 53(2): 921-36.
- [15] Poursharif P, Madiraju S R M, Prentki M, et al. Monoacylglycerol signalling and ABHD6 in health and disease [J]. *Diabetes Obes Metab* 2017, 19 Suppl 1: 76-89.

## Inhibitory effect and mechanism of a novel pyrrolopyrimidine derivative N67 on 3T3-L1 cells

Yi Xiaohong<sup>1</sup>, Li Wenfeng<sup>2</sup>, Zhong Zhanqiong<sup>3</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Embryology, <sup>2</sup>Dept of Science Pf Prescription, <sup>3</sup>Experimental Science Center, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137)

**Abstract Objective** To explore the pharmacological action and its mechanism of a new small molecule compounds N67 on the Swiss 3T3-L1 preadipocytes. **Methods** 3T3-L1 cells were cultured, and control group and match group were divided. MTT assay was used to detect cell viability, flow cytometry was used to detect apoptosis, and Western blot was used to detect protein expression. **Results** The N67 inhibited 3T3-L1 cells' proliferation with time and dose dependent manner. N67 induced apoptosis of 3T3-L1 cells and decreased the expression of ABHD6. **Conclusion** Inconsideration of ABHD6 is one of the potential targets for treatment of nonalcoholic fatty liver disease. The results proved that N67 could be used as one of the ABHD6 inhibitor, meanwhile, N67 may serve as a new therapeutic agent of fatty transformation diseases.

**Key words** new small molecule compounds N67; 3T3-L1 preadipocytes; apoptosis; ABHD6; inhibitor