

以二氢吡唑为先导的新型化合物靶向 hTERT 抑制 SMMC-7721 的增殖

何旭^{1,2,3}, 黄成^{1,2,3}, 孟晓明^{1,2,3}, 刘新华¹, 李俊^{1,2,3}

摘要 目的 观察以二氢吡唑为先导的新型化合物对人肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖抑制的影响。方法 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法筛选对 SMMC-7721 细胞株增殖的抑制作用较强的小分子化合物,并用流式细胞周期实验观察化合物对细胞周期的影响,采用改良的端粒重复序列扩增程序 (TRAP) 实验检测端粒酶的活性,Western blot 法检测化合物对 hTERT 蛋白表达的影响。结果 与香豆素类衍生物相对比,新型二氢吡唑类化合物显示出较好的抑制肿瘤细胞增殖的作用;流式细胞周期检测结果显示该化合物通过 S 期阻滞影响细胞增殖;改良的 TRAP 实验结果显示该化合物对端粒酶的活性具有较明显的抑制作用;Western blot 法结果显示该化合物可以显著降低 hTERT 蛋白的表达。结论 以二氢吡唑为先导的新型化合物具有抑制 SMMC-7721 细胞的增殖的作用和周期阻滞作用,初步发现这主要是通过靶向 hTERT 抑制端粒酶的活性实现的。

关键词 二氢吡唑; 香豆素; 人肝癌细胞株 SMMC-7721; 增殖抑制; hTERT

中图分类号 R 962

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)08-1053-05

2015-04-14 接收

基金项目 安徽省科技攻关计划项目(编号: 1301042212)

作者单位: ¹安徽医科大学药学院, ²安徽医科大学肝病研究所, ³安徽省高校产业共性技术研究院, 合肥 230032

作者简介: 何旭,女,硕士研究生;

李俊,男,博士,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: lj@ahmu.edu.cn

人端粒酶是由人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)、人端粒酶 RNA(human telomerase RNA, hTR) 以及人端粒酶相关蛋白(human telomerase-associated protein1, hTP1) 等部分组成。研究^[1-3]显示端粒酶与肿瘤细胞的永生性关系密切。而肿瘤细胞的永生性是导致肿瘤发生发展的关键因素。因此,近年来端粒酶已成为抗肿瘤药物筛选的新靶点,但由于其结构的复杂性至今仍未找到一个既高活性又高选择性的先导结构。端粒酶的 3 个亚单位中, hTR 和 hTP1 在癌细胞中为高表达,在癌旁组织内也有表达;然而 hTERT 仅在癌细胞内高表达,在癌旁组织内表达极少,且其表达水平与端粒酶活性及肿瘤的恶性程度呈正相关性^[3-4]。因此,设想以端粒酶结构明确部位 hTERT 为靶点将能取得更好的抑制肿瘤效果。据此,该课题设计合成了以二氢吡唑及新型香豆素类衍生物等一系列小分子化合物经过筛选以寻找可以通过靶向 hTERT 抑制肿瘤细胞增殖的小分子化合物。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 细胞株 人肝癌细胞株 SMMC-7721、人肝癌细胞株 HepG2、人胃腺癌细胞株(human gastric cancer cell line-7901, SGC-7901) 以及人乳腺癌细胞株(michigan cancer foundation-7, MCF-7) 均购自中

by Western blot. **Results** ① Compared with the sham operation group, nephropathy group showed that 24UPr, BUN, Cr, total cholesterol (TC), total triglyceride (TG), very low density lipoprotein (VLDL-C), low density lipoprotein (LDL-C), apolipoprotein B100 (ApoB100) were increased ($P < 0.05$), but Alb was decreased ($P < 0.05$). ② Compared with the nephropathy group, Apobec-1 treatment group showed that TC, TG, VLDL-C, LDL-C, ApoB100, ApoB48 were decreased ($P < 0.05$). ③ Compared with the sham operation group, Apobec-1 treatment group showed that 24UPr, BUN, Cr were increased ($P < 0.05$), but Alb, ApoB48 were decreased ($P < 0.05$). ④ Compared with the sham operation group and nephropathy group, Apobec-1 treatment group showed that the expression of Apobec-1 and ApoB48 were up-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** When liver acquires expression of Apobec-1 in hyperlipidemia of renal disease, it can reconstruct ApoB mRNA, increase the synthesis of ApoB48-lipoprotein, and play a certain lipid-lowering effect.

Key words hyperlipidemia; apolipoprotein B editing catalytic polypeptide-1; apolipoprotein B100; apolipoprotein B48

国科学院上海细胞库。

1.1.2 试剂 胎牛血清(杭州四季青公司); RPMI-1640 培养基(美国 Hyclone 公司); 胰酶细胞消化液(上海碧云天生物技术有限公司); hTERT 兔抗人单克隆抗体(英国 Abcam 公司); 小鼠抗 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司); 蛋白上样缓冲液、蛋白 Marker、ECL Western blot Detection 化学发光试剂盒(美国 Thermo 公司); 端粒酶活性检测试剂盒(美国 Millipore 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、流式细胞周期试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 5-氟尿嘧啶注射液(5-fluorouracil, 5-Fu)(天津金耀氨基酸有限公司); 溴化乙锭、3'-叠氮-3'-脱氧胸苷(3'-azido-3'-deoxythymidine, AZT)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)(美国 Sigma 公司)。

1.1.3 实验器材 Muliskan MK3 型酶标仪(上海雷勃分析仪器公司); SW-CJ-IF 型医用超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); 2306-Z 型细胞培养箱(美国 Shellab 公司); 5415R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); Powker Pac Basic 电泳仪、半干转仪(美国 Bio-rad 公司); EPICS XL-MCL 型流式细胞仪(美国 COULTER 公司); WD-9405B 型水平摇床(北京沃德生物公司); AF100 型制冰机(意大利 Scotsman 公司); 电热鼓风干燥箱(上海市仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 SMMC-7721 细胞的培养 用含 10% 热灭活胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 以及饱和湿度条件下培养, 待细胞生长至 24 h 换液 1 次, 长至密度为 70% ~ 80% 时进行传代培养, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 细胞增殖实验

1.2.2.1 实验分组 设置正常组、加药组、5-Fu 阳性对照组和 DMSO 阴性对照组。

1.2.2.2 细胞培养 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞制成约 1×10^5 /ml 单细胞悬液, 每孔加入 100 μ l 接种于 96 孔板以使每孔约 2 000 ~ 5 000 个细胞, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内孵育 6 ~ 8 h 后加含药的培养基 100 μ l, 继续培养 48 h 后, 每孔加入 20 μ l 0.5% 现配 MTT (5 mg/ml), 在细胞培养箱内继续孵育 4 h 后, 终止培养。用 5 ml 注射器小心吸去孔内的培养液, 再在每孔加入 150 μ l 的 DMSO 溶解结晶, 室温摇床低速振荡待结晶完全溶解后, 于酶标仪 490 nm 波长处测吸光度(absorbance, A) 值。

并计算抑制率及 IC₅₀ 值。以空白组作为对照组, 其细胞存活率为 100%, 其余各组按如下公式计算: 存活率 = (各实验组 A 值/对照组 A 值) $\times$ 100%。重复以上实验操作至少 3 次。

1.2.3 流式细胞术检测细胞周期 将细胞以 1×10^4 /瓶接种于培养瓶中, 培养约 12 h 后加药处理 48 h, 弃去培养液, 用胰酶适度消化细胞, 加入培养基轻轻吹打; 转速 1 200 r/min 离心 5 min, 收集细胞; 用 PBS 洗 2 ~ 3 遍, 加约 0.5 ml 的 PBS 缓慢吹匀细胞, 离心弃上清液; 加约 1 ml 70% 冷乙醇溶液, -20 °C 下固定过夜; 1 200 r/min 离心 5 min, 收集固定细胞, PBS 洗 2 ~ 3 遍; 加入碘化丙啶(100 μ g/ml) 和 RNase (50 μ g/ml), 置于 4 °C 下避光染色 30 min, 将流式细胞管中放在流式细胞仪上检测, 用 ModFit 软件分析 DNA 倍体及细胞周期各时相, 所有实验重复至少 3 次。

1.2.4 端粒酶的活性检测

1.2.4.1 细胞培养及细胞抽提物制备 从 RPMI-1640 细胞培养液中, 收集约 10^6 个 SMMC-7721 细胞, 放入 1.5 ml 的 Ep 管中, 洗涤。4 °C 用离心机离心 5 min (1 200 r/min) 后弃除上清液, 洗涤 2 次; 然后加入 200 μ l 的 CHAPS 裂解液震荡混匀后, 在冰浴中静置 30 min 后, 再用 14 000 r/min 的转速离心 20 min 后收集上清液, 取出部分检测蛋白浓度后保存于 -80 °C 下。

1.2.4.2 端粒重复序列扩增程序 (telomeric repeat amplification protocol, TRAP) 实验 取细胞抽提物 2.0 μ l 加入 5.0 μ l 的 10 $\times$ TRAP Reaction buffer、1.0 μ l 的 50 $\times$ dNTP Mix、1.0 μ l 的 TS Primer、1.0 μ l 的 TRAP Primer Mix、0.4 μ l 的 Taq Polymerase (5 U/ μ l)、39.6 μ l 的 dH₂O 共 50 μ l。然后将 PCR 管置于 PCR 扩增仪上, 30 °C 下静置 30 min, 然后进行 PCR 扩增, 94 °C 变性 30 s、59 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 待 33 个循环后, 取 PCR 扩增产物 25 μ l, 利用 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后将胶用 EB 或 SYBR (10 mg/ml) 染色 30 min。拍照观察结果。

1.2.5 Western blot 法检测 hTERT 蛋白的表达

1.2.5.1 蛋白提取 取经给药处理 48 h 后细胞, 用 PBS 洗涤 2 ~ 3 次后, 用吸水纸吸干 PBS, 在每瓶细胞加入含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液 500 μ l, 于冰上轻轻摇晃 30 min 后转移到 1.5 ml 的 EP 管中, 在 4 °C、12 000 r/min 下离心 15 min 后缓慢吸取上清液至新的 1.5 ml EP 管后用 BCA 法进行蛋白定量。再按 4 : 1 的比例加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液

于 100 °C 使蛋白变性 10 min。

1.2.5.2 实验分组 设置空白对照组、阳性对照组及加药组。

1.2.5.3 Western blot 检测实验 将蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后用电转移法将凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜上。在常温下用 5% 的脱脂奶粉将转移后的 PVDF 膜封闭 3 h,并用 TBST 缓冲液清洗 3~4 次,再在 4 °C 环境下的已稀释适当比例的一抗中孵育过夜。孵育后的 PVDF 膜经 TBST 洗涤 3~4 次后在辣根过氧化物酶标记的二抗(按 1:10 000 稀释)中室温孵育 1 h,再经 TBST 洗涤 3~4 次后用 ECL 发光试剂盒显影,以 β -actin 为内参,以各蛋白与 β -actin 的光密度(optical density, OD)比值表示蛋白的相对表达量。重复实验操作 3 次以上。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,根据研究目的和数据类型不同分别进行 t 检验、单因素方差分析等统计学分析。

2 结果

2.1 小分子化合物的设计合成及抗癌活性筛选

2.1.1 小分子化合物的合成 基于合理的药物分子设计的基础,本课题组设计并合成了二氢吡唑及新型香豆素类衍生物共 5 个,依次命名为 2- β -甲基-1-(4-硝基苯)-4,5-二氢吡唑酮、1-甲基-2,3-吡唑酰胺、N-(2-甲氧基苯基)-2-香豆素-3-酰胺、N',N'-二己基-2H-香豆素-3-酰胺、6,8-二溴- β -(三氟甲基)苯基-2-香豆素-3-酰胺,并分别用代号化合物 1、2、3、4、5 表示,分子结构式见图 1。

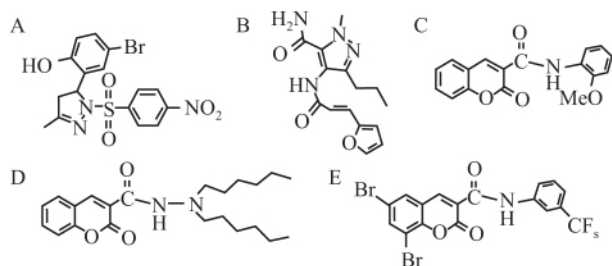


图 1 化合物的分子结构式

A: 2- β -甲基-1-(4-硝基苯)-4,5-二氢吡唑酮(化合物 1); B: 1-甲基-2,3-吡唑酰胺(化合物 2); C: N-(2-甲氧基苯基)-2-香豆素-3-酰胺(化合物 3); D: N',N'-二己基-2H-香豆素-3-酰胺(化合物 4); E: 6,8-二溴- β -(三氟甲基)苯基-2-香豆素-3-酰胺(化合物 5)

2.1.2 化合物抗癌活性筛选 半数抑制浓度

(IC_{50}) 是指抑制 50% 细胞增殖时所使用的化合物浓度,其值越小即表明抗癌活性越高。为了观察所合成化合物的抗癌活性,现采用 100、20、4、0.8、0.16 $\mu\text{mol/L}$ 5 个浓度,在人肝癌细胞株 SMMC-7721、人乳腺癌细胞株 MCF-7、人胃癌细胞株 SGC-7901 以及人肝癌细胞株 HepG2 这 4 种细胞株上进行初筛。结果显示,化合物 1 对肿瘤细胞增殖具有较好的抑制作用,尤其是对 SMMC-7721 细胞株体现出很好的抑制增殖效果。见表 1。

表 1 化合物 1 在 SMMC-7721、MCF-7、SGC-7901 以及 HepG2 细胞上的 IC_{50} 值($n=3, \bar{x} \pm s$)

细胞株	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	
	化合物 1	5-FU
SMMC-7721	4.49 ± 0.33	15.74 ± 0.93
MCF-7	8.15 ± 0.14	33.97 ± 0.82
SGC-7901	58.20 ± 1.67	38.43 ± 1.13
HepG2	5.88 ± 1.14	12.47 ± 0.87

2.2 化合物 1 对 SMMC-7721 肝癌细胞增殖的抑制作用

2.2.1 MTT 比色法实验结果 通过 MTT 法实验筛选出的小分子化合物 1 对 SMMC-7721 具有较强的抑制增殖的作用,与阳性对照 5-FU 组相比,其 IC_{50} 值更低,提示化合物 1 对 SMMC-7721 具有较强的抗癌活性作用。

2.2.2 流式细胞周期实验结果 细胞周期实验结果显示小分子化合物 1 (4.49 $\mu\text{mol/L}$) 处理 SMMC-7721 细胞 48 h 后, G0/G1 期细胞显著减少 ($F=48.811, P<0.05$), S 期显著增多 ($F=783.097, P<0.01$), 提示化合物 1 抑制肿瘤细胞增殖,主要是通过阻滞细胞周期于 S 期实现的。见图 2。

2.3 端粒酶活性 通过改良的 TRAP 实验检测 SMMC-7721 细胞中端粒酶活性以观察化合物 1 对端粒酶活性的影响,结果显示,化合物 1 表现出较高的端粒酶活性抑制作用, IC_{50} 值为 (7.81 ± 1.32) $\mu\text{mol/L}$, 略低于阳性对照药溴化乙锭, IC_{50} 值为 (2.21 ± 0.50) $\mu\text{mol/L}$ 。

2.4 化合物 1 对 SMMC-7721 细胞中 hTERT 表达的影响 SMMC-7721 在化合物 1 (4.49 $\mu\text{mol/L}$) 和 AZT(阳性对照药, 20.0 mmol) 处理 48 h 后, 阳性对照药 AZT 组中 hTERT 的表达量明显下降 ($F=530.551, P<0.01$); 化合物 1 组中 hTERT 的表达量显著下降 ($F=106.896, P<0.01$), 提示化合物 1 对 hTERT 的表达具有明显的抑制作用, 见图 3。

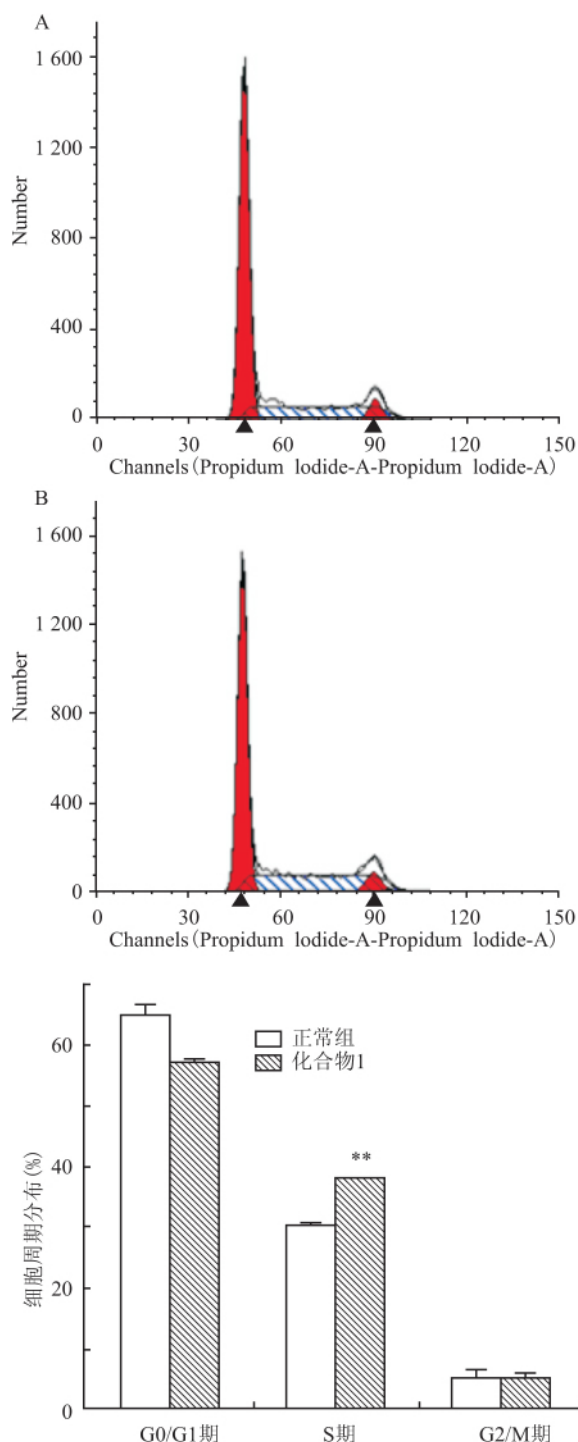


图2 化合物1对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞周期的影响($n=3$)
与正常组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

端粒酶自被发现以来,由于其在负责维持的染色体的完整性、细胞永生化和肿瘤发生发展方面的关键作用而被广泛研究^[8]。因此,以端粒酶作为

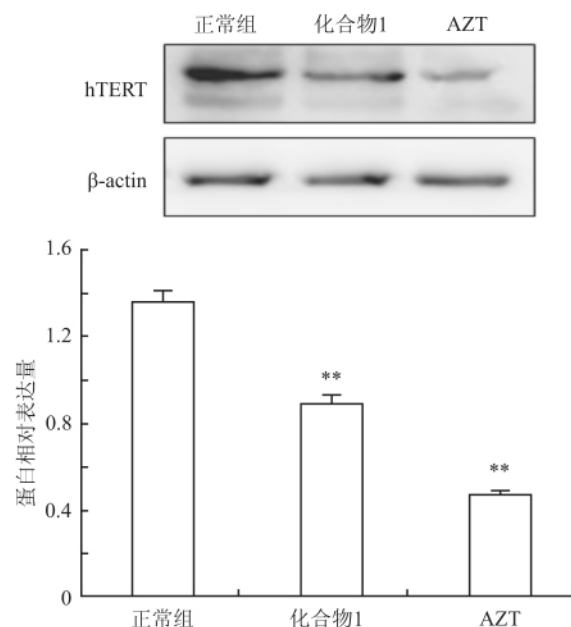


图3 化合物1对SMMC-7721细胞中hTERT表达的影响($n=3$)
与正常组比较: ** $P < 0.01$

抗肿瘤药物筛选的新靶点也成为了当下研究的热点^[9]。其中,作为端粒酶活性的主要限制因素之一的hTERT^[10]由于其在癌细胞内高表达但在癌旁组织中表达极少而被认为更适合作为明确部位的靶点。

研究^[8-9]发现二氢吡唑类化合物以及香豆素类衍生物是具有多种突出生物活性的先导化合物。最近同时被发现在抑制细胞增殖作用和潜在的抗癌活性方面具有良好的药理学活性^[10-12]。因此,在基于合理的药物分子设计的基础上,本研究以端粒酶hTERT蛋白的晶体结构为基础通过计算机模拟、设计并合成一系列新型二氢吡唑类化合物和香豆素类衍生物,并对其进行抗癌活性筛选和初步药理学作用探讨。

体外抗增殖活性实验结果表明受试的5个化合物中,以二氢吡唑为先导的化合物1体现出较好的抑制肿瘤细胞尤其是人肝癌细胞株SMMC-7721增殖的活性。通过进一步的流式细胞周期实验发现在化合物1的作用下SMMC-7721细胞在S期细胞数目显著增多,而在G0/G1期细胞显著减少,提示其主要是通过将细胞阻滞在S期而发挥抑制人肝癌细胞增殖的作用。而改良的TRAP实验显示其对端粒酶的活性抑制作用明显,同时Western blot法结果显示化合物可以显著降低hTERT蛋白的表达。

综上所述,本课题组设计合成的化合物1通过靶向hTERT抑制端粒酶活性和hTERT蛋白表达,

并阻滞细胞周期于 S 期,最终抑制 SMMC-7721 细胞增殖。这些结果对我们进一步合理优化设计二氢吡唑类化合物以寻找更有效的端粒酶抑制剂指明了方向。然而化合物 1 是如何通过靶向 hTERT 产生抑制细胞增殖作用的具体药理学机制尚不明确,仍需要进一步深入探讨。

参考文献

- [1] Shay J W, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer [J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33(5): 787-91.
- [2] Artandi S E, DePinho R A. Telomeres and telomerase in cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(1): 9-18.
- [3] 陈陵, 杨仕明, 蔡永国, 等. 针对端粒酶蛋白催化亚单位的肿瘤免疫治疗研究 [J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(4): 528-33.
- [4] Landen C N, Klingelhutz A, Coffin J E, et al. Genomic instability is associated with lack of telomerase activation in ovarian cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3(12): 1250-3.
- [5] Daniel M, Peek G W, Tollefsbol T O. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT) [J]. *Gene*, 2012, 498(2): 135-46.
- [6] Shinohara K, Sannohe Y, Kaieda S, et al. A chiral wedge molecule inhibits telomerase activity [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(11): 3778-82.
- [7] Guo X L, Ma N N, Zhou F G, et al. Up-regulation of hTERT expression by low-dose cisplatin contributes to chemotherapy resistance in human hepatocellular cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(3): 549-56.
- [8] Ramiro V, María E R, Mónica V, et al. Toddaculin, a natural coumarin from *Toddalia asiatica*, induces differentiation and apoptosis in U-937 leukemic cells [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(8-9): 737-46.
- [9] Ahmed A A, Redha I H A, Kawkab Y S, et al. Cytotoxicity, antioxidant, and antimicrobial activities of novel 2-quinolone derivatives derived from coumarin [J]. *Res Chem Intermed*, 2012, 38(2): 559-69.
- [10] Amin K M, Eissa A A, Abou-Seri S M, et al. Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-pyrazoline hybrids endowed with phenylsulfonyl moiety as antitumor agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2012, 60: 187-98.
- [11] Sashidhara K V, Avula S R, Sharma K, et al. Discovery of coumarin-monastral hybrid as potential antibreast tumor-specific agent [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, 60: 120-7.
- [12] Liu X H, Ruan B F, Li J, et al. Synthesis and biological activity of chiral dihydropyrazole: potential lead for drug design [J]. *Med Chem*, 2011, 11(9): 771-821.

Novel compound containing dihydropyrazole moiety inhibits the proliferation of SMMC-7721 by targeting hTERT

He Xu^{1,2,3}, Huang Cheng^{1,2,3}, Meng Xiaoming^{1,2,3}, et al

(¹*School of Pharmacy, Anhui Medical University*, ²*Institute of Liver Diseases of Anhui Medical University*, ³*Anhui Institute of Innovative Drugs, Hefei 230032*)

Abstract Objective To investigate the inhibitory effect of novel compound containing dihydropyrazole moiety on the proliferation of SMMC-7721 by targeting hTERT melittin. **Methods** The inhibition rate of proliferation of cells treated with novel compounds was measured by MTT assay. And the novel compounds' effect on cell cycle was tested by flow cytometry cell cycle experiment. Telomerase activity was determined through modified Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) assays. The protein expression level of hTERT was observed by Western blot. **Results** Compared with the heterocyclic compounds, novel compound containing dihydropyrazole moiety had obvious inhibitory effect on the proliferation of cell lines, especially on the human hepatoma cell line SMMC-7721. The result of flow cytometric cell cycle analysis showed that the number of cells in S phase was markedly increased. After the treatment with novel compound containing dihydropyrazole moiety, the results of modified TRAP assays predicted that the telomerase activity was inhibited. And the results of western blot showed that the protein expression level of hTERT decreased obviously. **Conclusion** Novel compound containing dihydropyrazole moiety inhibits the proliferation of SMMC-7721 and makes them arrested at S phase. This initial discovery is mainly achieved through the inhibition of telomerase activity by targeting hTERT.

Key words dihydropyrazole; coumarin; human hepatoma cell line SMMC-7721; proliferation inhibition; hTERT