

· 基础研究 ·

YN33 系列化合物抗肿瘤作用的初步研究*

娄伦美¹, 董志^{1△}, 傅洁民², 曾凡新², 姜立花²

(1. 重庆医科大学药学院 400016; 2. 重庆复创医药研究有限公司 400061)

摘要:目的 从 8 个 YN33 系列表皮生长因子受体(EGFR)蛋白酪氨酸酶抑制剂中筛选具有抗肿瘤活性的化合物,并进一步评价其在体外的抗肿瘤效果。方法 首先采用体外激酶实验对 YN33 系列化合物进行初步筛选,观察它们对 EGFR 蛋白酪氨酸酶的抑制作用;采用 MTS 法观察筛选出的活性化合物在体外对人表皮癌 A431 细胞株、人胃癌 N87 细胞株和人乳腺癌 BT474 细胞株的增殖抑制作用,以及体外筛选出的 YN33-5 化合物对人正常胚肺成纤维 MRC-5 细胞增殖的抑制作用。结果 激酶实验结果,发现 4 个具有抑制 EGFR 活性的化合物:YN33-3,YN33-5,YN33-6,YN33-8。YN33-5 对 A431、BT474、N87 细胞株的半数抑瘤浓度(IC₅₀)分别为:(9.743 3±2.795 9)μmol/L,(4.611 7±2.222 5)nmol/L 和(44.048 3±21.793 1)nmol/L,抑制效应呈剂量依赖性。结论 YN33-5 具有较好抗肿瘤活性,可抑制多种肿瘤细胞的增殖。

关键词:受体,表皮生长因子;抗肿瘤活性;MTS 法

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.33.015

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)33-3498-03

Preliminary study on the anti-tumor role of YN33 series compounds*

Lou Lunmei¹, Dong Zhi^{1△}, Fu Jiemin², Zeng Fanxin², Jiang Lihua²

(1. School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Chongqing Fuchuang Pharmaceutical Research Institute, Chongqing 400061, China)

Abstract: Objective To screen 8 series of YN33 compounds, which are EGFR tyrosine kinase inhibitors, and evaluate their anti-tumor effect *in vitro*. Methods Preliminary screening was carried out by detecting the EGFR kinase phosphorylation inhibition activity of the compounds. MTS assay was adopted for secondary anti-tumor screen of the selected compounds using A431, N87 and BT474 cell lines *in vitro*. And we investigated the influence caused by the screened compound YN33-5 in normal cells, MTS assay was carried out in MRC-5 cell line as well. Results According to the kinase assay, 4 compounds were selected, which were YN33-3, YN33-5, YN33-6, and YN33-8. The IC₅₀ of YN33-5 in inhibition of A431, BT474 and N87 cell lines proliferation *in vitro* was (9.743 3±2.795 9)μmol/L, (4.6117±2.222 5)nmol/L and (44.048 3±21.793 1)nmol/L, and the inhibition effect were dose-dependent. Conclusion YN33-5 is probably an effective EGFR tyrosine kinase inhibitor with significant anti-tumor activity.

Key words: recetptor, epidermal growth factor; anti-tumor activity; MTS assay

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)属于 erbB 家族成员之一,是由胞外配体结合区,跨膜区具有酪氨酸激酶活性的胞内区 3 个部分组成的跨膜糖蛋白。EGFR 在多种恶性肿瘤存在表达,如神经胶质细胞瘤、乳腺癌等恶性肿瘤细胞中都有过度表达,激活 EGFR 会促进肿瘤细胞增殖,肿瘤血管生成及肿瘤转移,阻碍肿瘤凋亡^[1]。国外已开发了多种临床疗效较好的酪氨酸激酶靶向药物,但目前这些药物有诸多缺点,如抗癌谱窄、仅对部分肿瘤有效、远期疗效和安全性尚不明确,而且价格昂贵导致这些药物的临床应用受到很大限制。为研发更有效的 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂,以 Lapatinib 为母核进行结构改造,合成了 YN33 系列化合物。本研究通过对该系列化合物进行体外筛选,期望发现具有较强抗肿瘤活性的化合物。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞株 人表皮癌 A431 细胞株、人乳腺导管癌 BT474 及人胃癌 N87 细胞株和人正常胚肺成纤维 MRC-5 细胞株,均购自上海中科院细胞库。A431、BT474 和 MRC-5 细胞株用 DMEM 培养液培养,在 BT474 和 MRC-5 细胞株的培

养液需加入 1.0 mmol/L 的丙酮酸钠;N87 细胞株用 RPMI1640 培养液培养,需加入 110 mg/L 的丙酮酸钠及 10 mmol/L 的羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES)。均置于 5%CO₂、37℃培养箱中培养,每隔 3~4 d 传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验研究。

1.1.2 试剂与试剂 YN33 系列化合物共 8 个样品和阳性对照药 Lapatinib,均由重庆复创医药有限公司提供,纯度为 95%,呈黄色粉末状,用二甲亚砜(DMSO)溶解,配制 20 mmol/L 溶液,−80℃保存备用使用前用超纯水或培养液配制成所需浓度。ADP-Glo™ 激酶检测试剂盒及 MTS 为 Promega 公司产品;DMEM 培养基、RPMI1640 培养基及胎牛血清(FBS)为 Gibco 公司产品;胰蛋白酶和台盼蓝为 Sigma 公司产品;DMSO 为国药公司产品。

1.2 方法

1.2.1 ADP-Glo™ 激酶检测 YN33 系列化合物对 EGFR 激酶活性的影响 运用 ADP-Glo™ 激酶检测试剂盒检测 YN33 系列化合物对 EGFR 激酶的抑制活性测定,以 Lapatinib 作为阳性对照药物验证筛选模型的灵敏度和稳定性。所有反应均在 96 孔酶标板中完成,经过酶浓度筛选每孔分别加入 0.5 U/mL

表 1 培养时间和给药浓度对照表

细胞名称	细胞悬液浓度(/mL)	种板后培养时间(h)	给药后培养时间(d)	给药浓度(mol/L)
A431	3×10 ⁴	24	3	以 1×10 ⁻⁴ mol/L 为首浓度 10 倍稀释
BT474	1×10 ⁵	48	7	以 1×10 ⁻⁵ mol/L 为首浓度 10 倍稀释
N87	1×10 ⁵	24	3	以 1×10 ⁻⁶ mol/L 为首浓度 3 倍稀释
MRC-5	3×10 ⁴	24	3	以 2×10 ⁻⁴ mol/L 为首浓度 3 倍稀释

的酶液 10 μL。为减少加样时的误差,将酶以外的其余试剂混合,分别加入超纯水 2.5 μL、反应缓冲液(5 倍)5 μL、ATP(1 μmol/L)2.5 μL 及底物(500 μmol/L)2.5 μL,混匀后,取 12 μL 混合物后,加入待测化合物(100 nmol/L)2.5 μL,最后加入酶液,反应总体积为 25 μL。实验分组为:实验组、化合物组、无酶对照组及阴性对照组。将化合物组,无酶对照组及阴性对照组在 30 ℃保温反应 60 min 后,避光加入荧光素酶/荧光素反应检测试剂 25 μL。在 450 nm 吸光处测定吸光值(OD 值),计算抑制率(CI),公式如下:CI(%)=(化合物 OD 值-阴性对照孔 OD 值)/(无酶对照孔 OD 值-阴性对照孔 OD 值)×100%。

1.2.2 YN33 系列化合物对肿瘤细胞及 MRC-5 细胞的增殖抑制实验 将 A431, BT474 和 N87 肿瘤细胞株及 MRC-5 正常细胞株按照常规方法传代,取对数生长期的细胞,用 0.25% 胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(EDTA)消化后配成单细胞悬液(细胞悬液浓度表 1),接种于 96 孔板,每孔 100 μL,置 37 ℃和 5% CO₂ 的培养箱中培养各自对应的时间(培养时间表 1)后, A431 和 N87 细胞株需要将培养液吸出,再加入 100 μL 含不同浓度待测化合物和对照药的培养液(给药浓度见表 1), BT474 和 MRC-5 细胞株是直接加入,3 种细胞均为 9 个浓度梯度。实验设药物处理组、实验对照组和空白对照组,每组均设 3 个复孔。置 37 ℃和 5% CO₂ 的培养箱中培养各自对应的时间后(表 1),吸出培养液,用 PBS 轻轻冲洗几次后,加入 100 μL 的无血清培养基,再加入 10 μL 的 MTS,继续培养 2 h,于多功能酶标仪 490 nm 波长处测吸收度值(A490 nm),按下式计算 CI,并采用 GraphPad Prism5 软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)值。肿瘤细胞生长 CI(%)=[1-(药物处理组 OD 值-空白对照组 OD 值)/(实验对照组 OD 值-空白对照组 OD 值)]×100。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计件进行统计学分析。数据 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数比较用单因素方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 YN33 系列化合物对 EGFR 激酶活性的影响 在筛选中发现, YN33 系列化合物对 EGFR 激酶均表现出不同的抑制作用,以 Lapatinib 为对照,从实验结果显示, YN33-5 化合物能明显抑制 EGFR 激酶的活性,而 YN33-4 抑制 EGFR 激酶活性很弱,与 Lapatinib 比较,差异有统计学意义(P<0.05)。见表 2。

2.2 对肿瘤细胞生长的影响 经过数据分析,选定 YN33-3, YN33-5, YN33-6, YN33-8 化合物进行肿瘤细胞增殖抑制实验。从筛选中发现, YN33 系列化合物对 A431、BT474 及 N87 细胞株均表现出了不同程度的抑制作用,表现为浓度依赖性(表 3)。以 Lapatinib 为对照,其中 YN33-5 化合物对 3 种细胞具有较强的增殖抑制作用,同时表现了良好的量效关系。

2.3 对正常细胞生长的影响 通过肿瘤细胞增殖抑制实验,发现 YN33-5 化合物具有较强的抗肿瘤活性,故选定 YN33-5 化合物检测其对正常胚肺成纤维 MRC-5 细胞的影响,以

Lapatinib 为对照,实验结果显示, Lapatinib 和 YN33-5 对 MRC-5 细胞 IC₅₀ 为 (40.541 7 ± 8.061 6) μmol/L 和 (28.345 0 ± 3.651 4) μmol/L。YN33-5 化合物对 MRC-5 细胞的杀伤作用相对 Lapatinib 较强,差异有统计学意义(P<0.05)。

表 2 对 EGFR 激酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

待测物	CI(%)	P
Lapatinib	38.738 9 ± 3.368 3	-
YN33-2	30.500 0 ± 9.502 6	<0.05
YN33-3	32.166 7 ± 8.727 4	-
YN33-4	0.233 3 ± 0.135 5	<0.05
YN33-5	42.000 0 ± 11.781 3	<0.01
YN33-6	19.729 7 ± 3.668 4	-
YN33-7	18.833 3 ± 7.884 6	<0.05
YN33-8	31.212 0 ± 3.593 4	-
YN33-9	0.351 0 ± 0.234 8	<0.05

-:表示无数据。

表 3 对肿瘤细胞的生长抑制作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

待测物	A431 细胞 IC ₅₀ (μmol/L)	BT474 细胞 IC ₅₀ (nmol/L)	N87 细胞 IC ₅₀ (nmol/L)
Lapatinib	22.540 0 ± 7.436 8	5.713 3 ± 4.027 8	47.750 0 ± 8.539 8
YN33-3	34.768 3 ± 17.785 3 ^a	14.882 8 ± 5.843 1 ^a	80.113 3 ± 18.458 4 ^a
YN33-5	9.743 3 ± 2.795 9 ^a	4.611 7 ± 2.222 5 ^b	44.048 3 ± 21.779 3 ^a
YN33-6	62.953 3 ± 18.296 2 ^a	10.337 8 ± 2.533 5 ^a	99.880 0 ± 17.640 8
YN33-8	21.851 7 ± 11.050 7 ^a	5.748 2 ± 1.549 8 ^b	56.525 0 ± 24.083 0 ^a

^a: P<0.05; ^b: P<0.01, 与 Lapatinib 比较。

3 讨 论

抗肿瘤药物抑制作用的体外实验是整个抗肿瘤药物药理研究过程中的重要环节,在筛选有效的抗癌药物,辅助判断抗癌药物的抗癌谱等方面均有重要价值。乳腺癌细胞中存在 EGFR 的高表达可用于预测其病情的发展与疗效及预后的判定^[1]。EGFR 胞内结构的酪氨酸激酶活性是 EGFR 发挥生物学作用的主要途径,抑制该酶活性可获得相似的抗肿瘤作用。Lapatinib(GW572016)为 6-噻唑基喹唑啉,是一个可逆性的酪氨酸激酶抑制剂,生化试验中表现出选择性抑制 EGFR 家族激酶 EGFR 和 HER-2,是由 Glaxo Wellcome 公司研发针对 EGFR/HER-2 的双重抑制剂^[2]。

Lapatinib 可抑制 EGFR 和 HER-2 磷酸化激活及细胞增殖。有文献报道, Lapatinib 的抗增殖作用在高表达 HER-2 的细胞中较强,而在低表达 HER-2 或表达 EGFR 的细胞中较

弱^[3]。Lapatinib 对乳腺癌细胞增生的抑制呈浓度依赖性,不同细胞株的 IC₅₀ 不同,在某些乳腺癌细胞株中,IC₅₀ < 0.2 μmol/L 时,Lapatinib 即可发挥作用,显示出强大的抗增殖作用^[4]。有研究显示,Lapatinib 可明显抑制 BT474(HER2 过表达的乳腺癌细胞株^[5])细胞中 p95 的磷酸化及移植瘤的生长^[6],A431 细胞为 EGFR 过表达细胞株^[7]。

在抗肿瘤增殖抑制实验中,设定了相应 DMSO 浓度的阴性对照,以消除 DMSO 对细胞活性的影响,同时将各实验组的 DMSO 浓度控制在 0.1% 以内,以尽量减少对实验的影响。从实验结果中发现,虽然 A431 细胞株的 EGFR 水平都比较高,但 Lapatinib 对 A431 细胞的 IC₅₀ 在 (22.540 0 ± 7.436 8) μmol/L。在文献中报道,Lapatinib 对 EGFR/HER-2 的 IC₅₀ 分别为 10.2 nmol/L 和 9.8 nmol/L^[8],对 A431、BT474、N87 细胞株的 IC₅₀ 小于 1.6 × 10² nmol/L^[2]。Lapatinib 在 BT474、N87 细胞株中的 IC₅₀ 分别为 (5.713 3 ± 4.027 8) nmol/L 和 (45.750 0 ± 8.539 8) nmol/L,均小于 1.6 × 10² nmol/L。提示肿瘤细胞对活性化合物的敏感性可能与 EGFR 表达水平无明显相关性,或者并不仅仅与之相关。经过对 YN33 系列化合物的体外筛选,本研究发现 YN33 系列化合物对 A431、BT474、N87 3 个肿瘤细胞株均表现出不同程度的抑制作用,而且呈明显的量效关系,在所设浓度范围内,其抑制作用随浓度的增加而增强,并从中发现 YN33-5 化合物具有显著的抗肿瘤活性,与初步筛选实验结果相符。

在实验筛选中,发现 YN33-5 化合物的作用与 Lapatinib 相当,但在正常细胞生长抑制实验中发现,YN33-5 化合物对 MRC-5 细胞株的杀伤作用略高于 Lapatinib,差异有统计学意义。由于只选用了一种正常细胞株来检测 YN33-5 化合物对正常细胞的细胞毒作用,还不足以说明 YN33-5 化合物的毒副作用。

综上所述,在本研究中,进行体外初步筛选,发现了 YN33-5 化合物是具有显著抗肿瘤活性的化合物。但对于化合物对肿瘤的治疗效果不能仅仅依靠对肿瘤细胞的抑制作用,还必须确认其能够在复杂的体内环境中抑制肿瘤的生长。本研究只表明了 YN33-5 化合物在体外有显著的抗肿瘤活性,其通过抑制 EGFR 激酶而抑制肿瘤细胞生长的确切机制,需要对其在体内的抗肿瘤活性作进一步的研究。

参考文献:

[1] 谢富华,王润秀,梁念慈.表皮生长因子受体家族信号转

(上接第 3497 页)

- [7] Shen ZY, Hu B, Wu MF. Correlation between blood flow signal of color flow imaging and Nottingham prognostic index in patients with breast carcinoma[J]. Breast Care, 2012, 7(2): 126-130.
- [8] Koo K SH, Park HW, Lee YR, et al. Evaluation of solid breast lesions with power Doppler sonography[J]. J Clin Ultrasound, 1999, 27(5): 231-237.
- [9] Cho N, Jang M, Lyou CY, et al. Distinguishing benign from malignant masses at breast US: combined US elas-

导途径与乳腺癌关系的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(11): 1004-1005.

- [2] 陶黎阳,符立梧. EGFR/HER-2 双受体酪氨酸激酶抑制剂拉帕替尼的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(12): 1541-1544.
- [3] Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib(GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(3): 1630-1639.
- [4] Xia W, Mullin RJ, Keith BR, et al. Anti-tumor activity of GW572016; a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of E8GFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways[J]. Oncogene, 2002, 21(41): 6225-6263.
- [5] Evans AH, Pancholi S, Farmer I, et al. EGFR/HER2 inhibitor AEE788 increases ER-mediated transcription in HER2/ER-positive breast cancer cells but functions synergistically with endocrine therapy[J]. Br J Cancer, 2010, 102(8): 1235-1243.
- [6] Xia W, Liu LH, Ho P, et al. Truncated ErbB2 receptor (p95 ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016 [J]. Oncogene, 2004, 23(3): 646-653.
- [7] Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, et al. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD1839(Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6: 2053-2063.
- [8] Rusnak DW, Lackey K, Affleck K, et al. The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW572016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo[J]. Mol Cancer Ther, 2001, 1(2): 85-94.

(收稿日期: 2012-04-04 修回日期: 2012-06-18)

tography and color doppler US-influence on radiologist accuracy[J]. Radiology, 2012, 262(1): 80-90.

- [10] Heijblom M, Klaase JM, van den Engh FM, et al. Imaging tumor vascularization for detection and diagnosis of breast tumor[J]. Invest Radial, 2012, 47(3): 167-174.
- [11] Horvath E, Silva C, Fasce G, et al. Parallel artery and vein: sign of benign nature of breast masses[J]. AJR Am J Roentgenol, 2012, 198(1): 76-82.

(收稿日期: 2012-03-09 修回日期: 2012-07-19)