

LZ-106 诱导人肺癌 NCI-H2228 细胞凋亡的研究

蒙飞, 顾万建*

江苏省中医院 南京中医药大学附属医院 检验科, 江苏 南京 210029

摘要:目的 研究 LZ-106 对间变性淋巴瘤激酶 (ALK) 激酶活性的抑制作用, 及对 ALK 阳性细胞的生长抑制作用。方法 采用分子对接模拟 LZ-106 与 ALK 的结合, 通过体外激酶活性实验检测其对 ALK 激酶活性的影响, 通过 CCK-8 实验检测其对 H2228 细胞的生长抑制作用, 通过 Annexin V/PI 细胞凋亡实验检测其对 H2228 细胞的凋亡作用, 通过 Western blotting 检测其对 H2228 细胞 p-ALK 及下游信号通路关键激酶表达的影响。结果 LZ-106 能抑制 ALK 激酶活性, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 (15.51 ± 2.09) nmol/L, 其能显著抑制 H2228 细胞存活率, 并能浓度相关性地诱导细胞凋亡。Western blotting 实验显示 LZ-106 可以显著抑制 p-ALK、p-蛋白激酶 B (Akt) 及 p-信号转导因子和转录激活因子 3 (STAT3) 的表达, 且 Akt 及 STAT3 激活剂可以明显削弱 LZ-106 的凋亡诱导作用。结论 LZ-106 显著抑制 ALK 激酶活性, 诱导 ALK 阳性细胞凋亡, 激活 Akt 及 STAT3 可以逆转 LZ-106 所致的细胞凋亡。

关键词: 肺癌; 细胞凋亡; 间变性淋巴瘤激酶; 信号转导因子和转录激活因子 3; 蛋白激酶 B

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2024)03 - 0557 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.03.003

Study on apoptosis induced by LZ-106 in human lung cancer NCI-H2228 cells

MENG Fei, GU Wanjian

Clinical laboratory, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of LZ-106 on ALK activity and growth inhibition of ALK positive cells. **Methods** The binding of LZ-106 to ALK was simulated by molecular docking, its effect on ALK kinase activity was detected by *in vitro* kinase activity assay, its growth inhibition effect on H2228 cells was detected by CCK-8 assay, and its apoptosis effect on H2228 cells was detected by Annexin V/PI apoptosis assay. Western blotting was used to detect its effects on the expression of p-ALK and key kinases in the downstream signaling pathway of H2228 cells. **Results** LZ-106 can inhibit the activity of ALK kinase with IC₅₀ of 15.51 ± 2.09 nmol/L, which can significantly inhibit the survival rate of H2228 cells and induce cell apoptosis in a concentration-dependent manner. Western blotting experiments showed that LZ-106 could significantly inhibit the expression of p-ALK, p-Akt, and p-STAT3, and Akt and STAT3 activators could significantly weaken the apoptosis-inducing effect of LZ-106. **Conclusion** LZ-106 significantly inhibits ALK kinase activity and induces apoptosis of ALK-positive cells. Activation of Akt and STAT3 can reverse the apoptosis caused by LZ-106.

Key words: lung cancer; apoptosis; ALK; STAT3; Akt

肺癌是当今世界上最常见的恶性肿瘤之一,也是排名第 1 位的肿瘤死因。非小细胞肺癌是鳞癌、腺癌和大细胞癌 3 种组织分型的总称,约占肺癌发生病例的 85%,大多数患者确诊时已是晚期失去手术机会,整体 5 年生存率仅 20%^[1]。近年来靶向治

疗因效率高、不良反应低而成为肺癌热门的研究领域及治疗方式,靶向生物标记物的开发及临床检测、靶向药物的研究和发展以及评估靶向抑制剂疗效的临床前/临床研究取得了显著进展^[2]。在非吸烟肺癌中常见的驱动突变间变性淋巴瘤激酶 (ALK)

收稿日期: 2023-12-20

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20151443), 江苏省中医院院级课题 (Y20038)

作者简介: 蒙飞, 女, 主管技师, 硕士, 研究方向为肿瘤药理学。E-mail: meng914fei@163.com

*通信作者: 顾万建, 男, 主任技师, 博士, 研究方向为肿瘤生物学。E-mail: arrowsgu@163.com

占非小细胞肺癌患者的 5%~7%，其异常活化如基因突变、重排及扩增可激活下游的蛋白激酶 B (Akt)、蛋白酪氨酸激酶 (JAK)/信号转导及激活转录因子 (STAT)、细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 1/2 等信号通路，从而导致细胞恶性转化，是非小细胞肺癌等肿瘤的致癌驱动突变基因^[3]。针对该靶点的抑制剂研究已是当前抗肿瘤药物研究领域的热门方向。最先上市的是辉瑞制药公司开发的克唑替尼，在 ALK 阳性的晚期非小细胞肺癌治疗中取得了良好的疗效。但其严重的不良反应也逐渐引起人们的重视，如难透过血脑屏障阻碍了其在转移患者中的疗效，易原发及继发性耐药，心率不齐、脱发、胃肠不良反应及视觉障碍等严重不良反应^[4]。目前，新型 2、3 代 ALK 抑制剂已取得较好的临床实验效果或已经走上临床^[5-6]。此外，第 4 代的 ALK-酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) (TPX-0131、NUV-655、Repotrectinib) 也处于不同研发阶段，初步结果显示其能较好地克服复合突变，并有优越的脑渗透性。

美国食品药品监督管理局 (FDA) 于 2017 年批准阿来替尼为 ALK 阳性患者的一线用药，临床证据表明其可显著降低疾病进展或死亡风险达 57%，延长患者无疾病生存时间达 34.8 个月，延缓脑转移的发生，给 ALK 阳性非小细胞肺癌患者带来明显的生存获益。阿来替尼-ALK 的复合物晶体结构表明，其苯并咪唑的 C-11 位羰基和 ALK 的 Met1199 的氨基形成的氢键是它们相互作用的关键，此外其 5 位的 NH 和 3 位的氰基也与相邻 Lys1150、Glu1167、Gly1269、Glu1270 及 Arg1253 形成氢键^[7]。研究表明，喹诺酮依诺沙星在多种肿瘤中具有较好的体内抗肿瘤作用，其作用与 TRBP 蛋白介导的 microRNA 加工有关^[8]。本研究通过分子对接发现在喹诺酮依诺沙星的 C-3 位修饰苯并咪唑的新化合物 LZ-106，结构式见图 1，具有相似的阿来替尼-ALK 结合特征，并通过多种分子细胞生物学手段评估了其 ALK 激酶抑制能力、探讨了其对 ALK 阳性细胞

凋亡的影响及机制，对于 ALK 抑制剂自主研发有一定参考意义。

1 材料与方法

1.1 化合物及细胞系

LZ-106[2-(1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydro-1,8-naphthyridin-3-yl)-1H-benzimidazole-6-carbonitrile]由中国药科大学江苏省肿瘤发生与干预重点实验室合成，为浅黄色粉末，质量分数 98.5%，经 DMSO 配制成 0.05 mol/L 母液备用。阿来替尼 (质量分数 99.99%，货号 S5232)、Akt 激活剂 (SC79，质量分数 97%，货号 S7863) 购自 Selleck Chemicals 公司，STAT3 激活多肽 (Colivelin TFA，质量分数 98.86%，货号 HY-P1061A) 购自 MedChemExpress (MCE) 公司。

NCI-H2228 细胞系购自中国科学院上海生科院细胞资源中心，采用含 10% 胎牛血清 [维森特生物技术 (南京) 有限公司，货号 086-150] 的 RPMI-1640 培养基进行培养。

1.2 分子对接

从蛋白质数据库下载 ALK 的蛋白结构 (pdb ID: 7MK7)，经 AutoDock 程序 (V 4.2) 模拟 ALK 与 LZ-106 结合构象。为了尽可能完整地搜索配体的构象空间，保持蛋白质结构此期间保持固定的分子对接。进行了 100 次单独的遗传算法进行构象搜索，以生成 100 个配体的对接构象。以配体位置的质心为中心 Docking box 的大小为 6 nm×6 nm×6 nm。Grid box 设置为 0.0375 nm 的足够包围 ALK 中观察到的最大结合口袋。

1.3 分子水平激酶活性实验

根据 Promega 公司的 ALK Kinase Enzyme System 及 ADP-Glo™ Kinase Assay 试剂盒完成。将 LZ-106、阿来替尼分别自 20 nmol/L 往下 4 倍倍比稀释 10 个系列梯度浓度，然后每个浓度抑制剂取 1 μL 加入 2 ng ALK 蛋白及 2 μL 底物室温反应 60 min。加 5 μL ADP-Glo™ Reagent 混匀，室温反应 40 min 终止反应，并消耗残留 ATP，然后再加 10 μL 激酶检测试剂室温反应 30 min 后经 Varioskan LUX 化学发光酶标仪读数。

1.4 CCK-8 细胞增殖实验

将处于对数生长期的 H2228 细胞消化后制备成 2×10⁴ 个/mL 的细胞悬液。设置 LZ-106 浓度梯度 (0.25、0.5、1、2、4、8、10、12、16、24 μmol/L) 并配制双倍浓度药液，将细胞悬液和药液等体积混

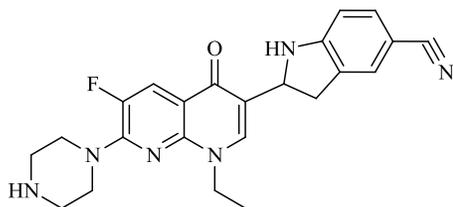


图 1 LZ-106 化学结构

Fig. 1 Chemical structure of LZ-106

匀, 每孔液体体积为 100 μL (即每孔 1×10^4 个细胞), 接种于超低黏附 96 孔细胞培养板内, 每个浓度设置 6 个复孔, 同时设置对照 (仅加细胞) 和 3 个空白孔。药物作用 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱作用 1~2 h 后于 450 nm 处激发波长读取其吸光度 (A) 值。

$$\text{存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.5 Annexin V/PI 细胞凋亡实验

将处于对数生长期的 H2228 细胞以 2×10^5 个/孔的细胞浓度, 接种于 6 孔细胞培养板, 待其贴壁并生长至适宜细胞密度 (约为 70%) 时, 设置对照组和 LZ-106 (1、2、4 $\mu\text{mol/L}$) 组对细胞进行药物处理 24 h, 随后用 0.25% 胰蛋白酶消化并收集细胞, 以 PBS 溶液清洗并重悬。然后依据 Annexin V-FITC/PI 双染凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司) 使用说明, 用缓冲 Buffer 溶液重悬细胞, 并将 Annexin-V 和 PI 染料分别加入样品管中, 避光染色 20 min 后经流式细胞仪 (BD FACSCalibur) 检测。实验数据通过 Flowjo 7.6.1 软件进行分析。同法检测 Akt 激活剂 SC79 (8 $\mu\text{g/mL}$) 和 STAT3 激活剂 Colivelin (10 $\mu\text{mol/L}$) 共同处理 H2228 细胞的诱导凋亡作用。

1.6 Western blotting 法检测蛋白水平

将处于对数生长期的 H2228 细胞以 2×10^5 个/孔的细胞浓度接种于 6 孔细胞培养板, 待其贴壁并生长至细胞密度约为 70% 时, 分别加入 1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 的 LZ-106 处理 24 h。常规方法进行 p-ALK^{Y1604}、p-STAT^{3Y705}、p-ERK1/2^{T202/Y204}、Akt、p-Akt^{S473} (Cell signaling 公司), ERK1/2、Tubulin、羊抗兔二抗 (ABclonal 公司), ALK、STAT3 (Proteintech 公司) 蛋白水平检测。

1.7 数据统计

计量资料采用 3 次以上独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异通过 Graphpad prism 9 的单因素方差分析。

2 结果

2.1 LZ-106 与 ALK 的分子对接

应用 AutoDock 软件对 LZ-106 和 ALK 的分子对接构象进行模拟, 结果证实了该化合物基本构型与阿来替尼基本保持一致, LZ-106 化学结构图见图 1。其羰基能够和 ALK 的关键铰链区 (hinge reign) 的 Met1199 形成氢键, 7 位哌嗪取代基的氨基可以与 Arg1120 形成氢键^[7]。此外该化合物萘啶环还可以和 Arg1120 和 Leu1122 形成 p- π 共轭作用, 这一

作用是先导化合物阿来替尼所不具备的 (图 2)。因此推测依诺沙星衍生物 LZ-106 能够和 ALK 有效地结合并发挥作用。

2.2 LZ-106 的体外 ALK 激酶抑制作用

用 4 倍倍比 (20 nmol/L 起始) 稀释梯度浓度的 LZ-106 和阿来替尼进行 ALK 激酶活性检测。如图 3 所示, 二者均能浓度相关性抑制 ALK 的激酶活性, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 (15.51 \pm 2.09)、(0.60 \pm 0.12) nmol/L, 表明 LZ-106 能在无细胞体系中有有效抑制 ALK 激酶活性。

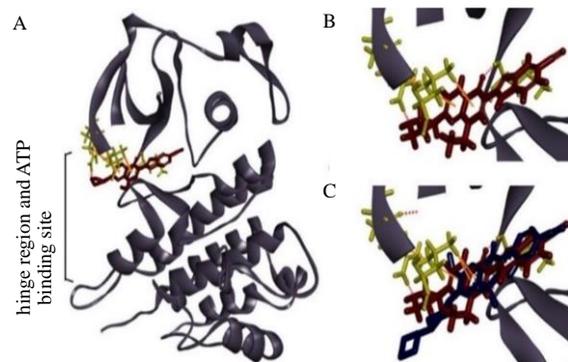


图 2 LZ-106 和 ALK 模拟结构构象 (A)、结构构象局部放大图 (B)、LZ-106 和阿来替尼在 ALK 蛋白中的构象叠合图 (C)

Fig. 2 Simulated structural conformation of LZ-106 and ALK (A), local magnification of structural conformation (B), conformation superposition of LZ-106 and aletinib in ALK protein (C)

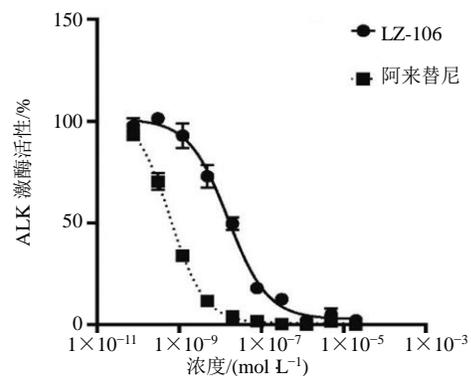


图 3 LZ-106 和阿来替尼对 ALK 激酶活性影响

Fig. 3 Effect of LZ-106 and alectinib on ALK kinase activity

2.3 LZ-106 对细胞存活率的检测

分别用 0.25、0.5、1、2、4、8、10、12、16、24 $\mu\text{mol/L}$ LZ-106 孵育 H2228 细胞 12、24 h。CCK-8 实验显示, 不同浓度的 LZ-106 作用后, 均表现出

对 H2228 细胞的活力抑制作用, 且其作用强度具有浓度相关性 (图 4), 其 IC₅₀ 分别为 (2.256±0.206) μmol/L (12 h)、(0.977±0.110) μmol/L (24 h)。

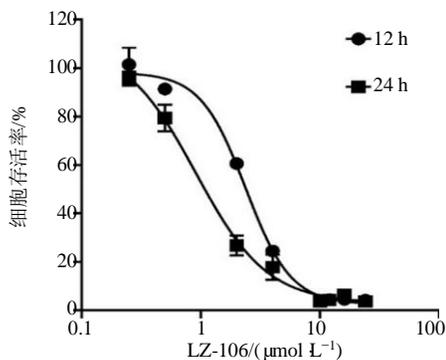


图 4 LZ-106 对 H2228 细胞存活率的影响

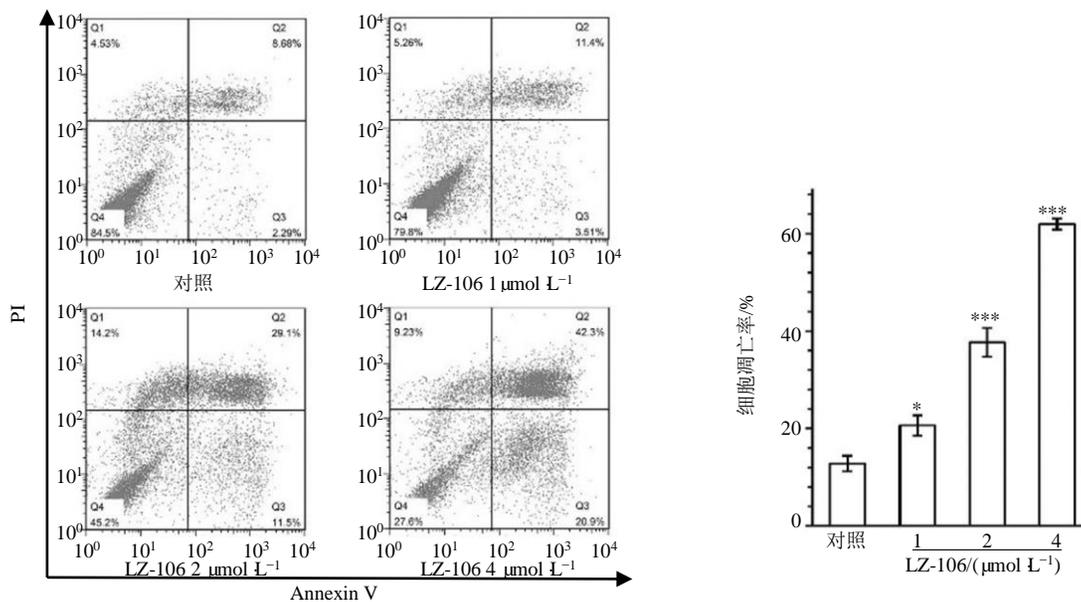
Fig. 4 Effect of LZ-106 on H2228 cell survival rate

2.4 LZ-106 诱导 H2228 细胞凋亡

分别用 0、1、2、4 μmol/L LZ-106 处理 H2228 细胞 24 h, 经 Annexin V/PI 细胞凋亡实验检测发现, 能明显浓度相关性地诱导 H2228 细胞凋亡 (图 5), 其凋亡率分别为 (12.78±2.56) %、(20.59±2.96) %、(37.66±4.16) % ($P<0.05, 0.001$)。

2.5 Western blotting 检测 LZ-106 对 ALK 及相关下游通路关键激酶表达的影响

如图 6 所示, LZ-106 可以显著降低 p-ALK 的水平, 抑制 ALK 的磷酸化 ($P<0.001$)。此外研究表明, EML4-ALK 通过激活下游 Ras/ERK、PI3K/AKT 和 JAK3/STAT3 通路以促进细胞恶性增殖及转移^[9]。因此本研究也检测了相关通路的关键激酶表达水平, 如图 6 所示, LZ-106 处理 H2228 细



与对照组比较: * $P<0.05$ *** $P<0.001$ 。

* $P<0.05$ *** $P<0.001$ vs control group.

图 5 LZ-106 对 H2228 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of LZ-106 on apoptosis of H2228 cells

胞后, p-ERK1/2、p-STAT3 的表达水平下降 ($P<0.05, 0.001$), 表明 LZ-106 能够浓度相关地抑制 PI3K/Akt 和 JAK3/STAT3 通路。

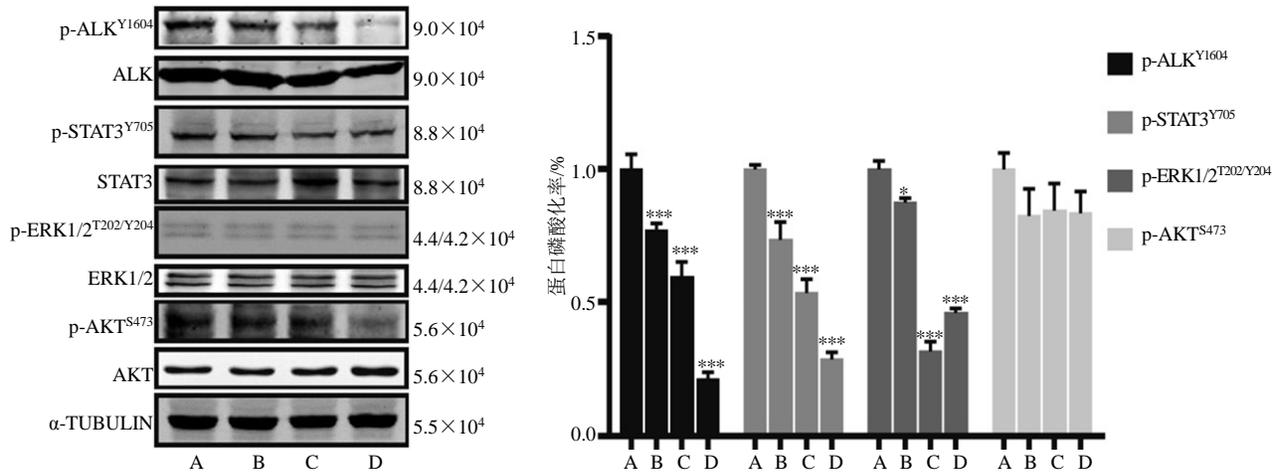
2.6 LZ-106 通过 PI3K/Akt 和 JAK3/STAT3 通路诱导 H2228 细胞凋亡

为了进一步验证 LZ-106 诱导 H2228 细胞凋亡的作用机制, 本研究采用 LZ-106 (4 μmol/L) 与 Akt 激活剂 SC79 (8 μg/mL)、STAT3 激活剂 Colivelin (10 μmol/L) 共同处理 H2228 细胞^[10]。如图 7 所示, 通过 Annexin V/PI 染色经流式分析可观察到 SC79

和 Colivelin 可削弱 LZ-106 的凋亡诱导作用, 而 SC79 和 Colivelin 单独处理对细胞凋亡无明显影响。由此表明 LZ-106 可能通过 PI3K/Akt 和 JAK3/STAT3 通路诱导 H2228 细胞凋亡。

3 讨论

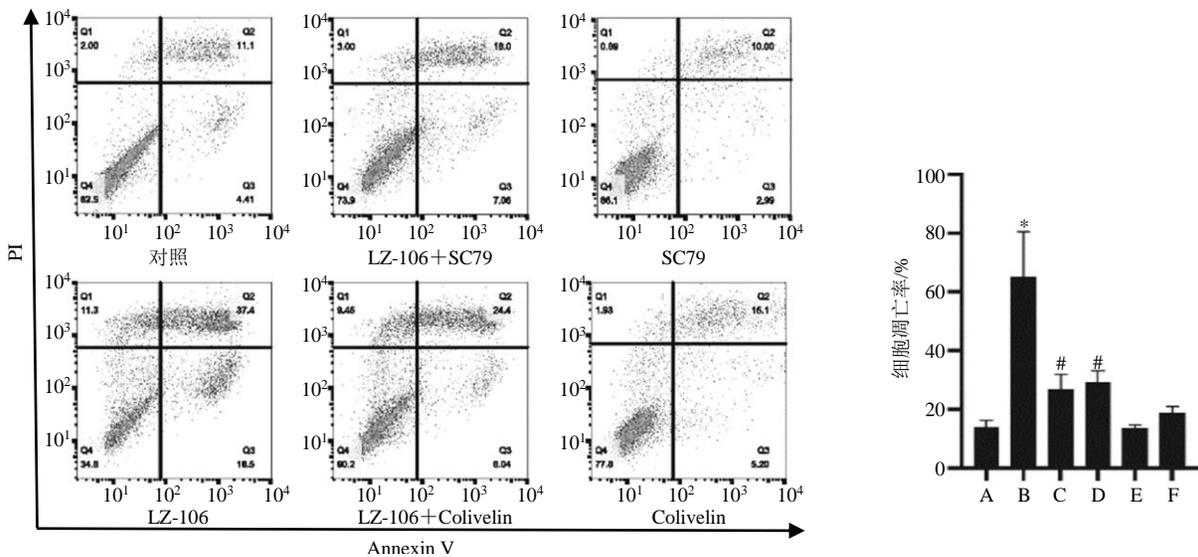
ALK 激活与数十种肿瘤的发生、发展密切相关, 以 ALK 激酶为靶标的分子靶向药物研究逐渐成为国内外抗肿瘤药物研究的热点。LZ-106 是根据阿来替尼的结构特点, 在依诺沙星的结构基础上全新合成的抗肿瘤先导化合物。本研究经分子对接模



A-对照, B-LZ-106 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, C-LZ-106 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, D-LZ-106 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 与对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。
A-control, B-LZ-106 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, C-LZ-106 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, D-LZ-106 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control group.

图 6 LZ-106 对 H2228 细胞中 ALK 及下游通路关键激酶活性的影响

Fig. 6 Effect of LZ-106 on the activity of key kinases in ALK and downstream pathways in H2228 cells



A-对照, B-LZ-106, C-LZ-106+SC79, D-LZ-106+Colivelin, E-SC79, F-Colivelin, 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 LZ-106 组比较: # $P < 0.05$ 。
A-control, B-LZ-106, C-LZ-106+SC79, D-LZ-106+Colivelin, E-SC79, F-Colivelin, * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs LZ-106 group.

图 7 LZ-106 与 SC79、Colivelin 共同处理对 H2228 细胞凋亡的影响

Fig. 7 Effect of LZ-106 combined with SC79 and Colivelin on apoptosis of H2228 cells

拟、体外激酶实验及细胞水平等实验证实了 LZ-106 能显著地抑制 ALK 激酶活性, 抑制 EML4-ALK 融合 NSCLC 的活力诱导其凋亡。且通过 Western blotting 以及信号通路激动剂联合处理, 发现其作用机制可能是通过 PI3K/Akt, JAK3/STAT3 信号通路而发挥作用, 但精细的作用机制还有待于进一步深入研究。

值得注意的是, 本研究发现的该先导化合物虽然能与 ALK 结合, 且具有一定的 ALK 激酶抑制活

性, 但是酶活抑制能力低于阿来替尼 26 倍, 说明其药物结构优化与改造还有很长的路要走。此外本研究还有一些缺陷, 如细胞系的选择仅仅针对 1 种 ALK 阳性细胞, 后续的实验需要增加更多的细胞系; 且后续需要开展异种移植瘤等动物实验进一步验证其体内的抗肿瘤效果。

综上所述, LZ-106 为新一代 ALK 靶向药物研发提供了全新的先导化合物, 能较好地抑制 ALK 激酶活性, 促进 ALK 阳性细胞凋亡作用, 且其对

PI3K/Akt, JAK3/STAT3 通路的调控可能是其作用的关键分子机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Govindan R, Ding L, Griffith M, *et al.* Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers [J]. *Cell*, 2012, 150(6): 1121-1134.
- [3] Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, *et al.* The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(1): 11-23.
- [4] Choi Y L, Soda M, Yamashita Y, *et al.* EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(18): 1734-1739.
- [5] Gridelli C, Peters S, Sgambato A, *et al.* ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC [J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(2): 300-306.
- [6] Reckamp K L. Future of ALK inhibition in non-small-cell lung cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(10): 1047-1049.
- [7] Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, *et al.* CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant [J]. *Cancer cell*, 2011, 19(5): 679-690.
- [8] Melo S, Villanueva A, Moutinho C, *et al.* Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(11): 4394-4399.
- [9] Chuang C H, Chen H L, Chang H M, *et al.* Systematic review and network meta-analysis of anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors for treatment-naive ALK-positive lung cancer [J]. *Cancers*, 2021, 13(8): 1966.
- [10] Kitz A, de Marcken M, Gautron A S, *et al.* AKT isoforms modulate Th1-like Treg generation and function in human autoimmune disease [J]. *EMBO Rep*, 2019, 20(8): e48624.

[责任编辑 高源]