

【药效学评价】

Desmosdumotin-C B 环衍生物抑制 MCF-7 细胞增殖及其作用机制研究

郭宏举¹, 常李荣¹, 史宁¹, 张捷¹, 向卓², 梁海¹, 吴久鸿^{1*}

1. 解放军第306医院 药学部, 北京 100101

2. 解放军第401医院 药剂科, 山东 青岛 266071

摘要: 目的 研究 desmosdumotin-C (Des-C) B 环对位氟修饰衍生物 TPP 对人乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖抑制作用, 并探讨其作用机制。方法 MTT 法检测质量浓度为 1.0、2.5、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 TPP 作用 48 h 后, 对 MCF-7 细胞的增殖抑制率; 流式细胞术检测 20.0 $\mu\text{g/mL}$ TPP 作用 0、24、48 h 诱导 MCF-7 细胞的凋亡程度; 流式细胞术检测 20.0 $\mu\text{g/mL}$ TPP 作用 0、24、48 h 对 MCF-7 细胞中 NF- κ B P65 阳性细胞表达率的影响。结果 作用 48 h 后, 2.5、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 TPP 对 MCF-7 细胞增殖均有显著抑制作用, 且抑制率随着浓度的升高而增大; 20 $\mu\text{g/mL}$ TPP 作用 24、48 h 均可诱导细胞凋亡; 作用 48 h 后, 20 $\mu\text{g/mL}$ TPP 可显著减少 MCF-7 中 NF- κ B P65 阳性细胞率。结论 TPP 显著抑制 MCF-7 细胞增殖, 诱导 MCF-7 细胞凋亡, 作用机制可能与下调 NF- κ B 表达有关。

关键词: 毛叶假鹰爪素 C; 衍生物; MCF-7; 凋亡; NF- κ B

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)02-0179-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.02.007

Inhibitory effect and mechanism of Desmosdumotin-C B ring derivative on MCF-7 cell proliferation

GUO Hong-ju¹, CHANG Li-rong¹, SHI Ning¹, ZHANG Jie¹, XIANG Zhuo², LIANG Hai¹, WU Jiu-hong¹

1. Department of Pharmacy, The 306th Hospital of P.L.A, Beijing 100101, China

2. Department of Pharmacy, The 401th Hospital of P.L.A, Qingdao 266071, China

Abstract: Objective To study the inhibitory effects of TPP, a desmosdumotin-C B ring para-fluoro modified derivative, on human breast cancer MCF-7 cell proliferation, and investigate the possible mechanisms. **Methods** MTT assay was used to measure the proliferation suppression of MCF-7 cells after treated with 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, and 20.0 $\mu\text{g/mL}$ TPP for 48 h, and then the cell apoptosis rate and expression rate of NF- κ B P65 positive cells were tested by flow cytometry after 20.0 $\mu\text{g/mL}$ TPP treatment for 0, 24, and 48 h. **Results** MTT assay showed that, after treatment for 48 h, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, and 20.0 $\mu\text{g/mL}$ TPP all exhibited the inhibitory effects and showed a dose-dependent relationship. Flow cytometry results showed that 20.0 $\mu\text{g/mL}$ TPP induced cell apoptosis after treatment for 24 and 48 h. TPP (20.0 $\mu\text{g/mL}$) significantly reduced the rate of NF- κ B P65-positive cells in MCF-7 cells after treatment for 48 h. **Conclusion** TPP could inhibit the proliferation of MCF-7 cells, which may be induced by cell apoptosis. Down-regulation of NF- κ B is possible to be related with apoptosis.

Key words: desmosdumotin-C, derivative, MCF-7, apoptosis, NF- κ B

乳腺癌是一种严重威胁女性生命和健康的恶性肿瘤疾病, 近年来我国每年女性乳腺癌发病高达数十万, 发病率占女性常见恶性肿瘤第二位, 且发病率和死亡率都有逐年递增的趋势。

Desmosdumotin C (Des-C) 是本课题组首次从药用植物毛叶假鹰爪根中提取分离出的一种单体活

性成分, 其化学结构图 1 中 A 环为多甲基取代的环己烯二酮, B 环的苯环无取代基, 是具有全新化学骨架结构的天然活性产物。前期研究证实, 该化合物及其衍生物对多种肿瘤细胞具有增殖抑制作用^[1-2], 其作用机制可能和抑制 TNF- α 诱导的 NF- κ B 信号通路^[3]、选择性地作用于肿瘤细胞 G2/M 期^[4]

收稿日期: 2016-09-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81072546; 81470156)

*通信作者 吴久鸿, Tel: (010)64879825 E-mail: jiuHongwu2015@163.com

有关。向卓等^[5]通过对 Des-C B 环衍生物构效关系研究分析后发现, B 环的邻位或对位引入硝基的衍生物能够上调 HeLa 细胞 Bax 的表达, 同时降低 Bcl-2 表达。使得 Bcl-2/Bax 的比例显著下调, 诱导了 HeLa 细胞的凋亡。

本研究以 B 环氟修饰衍生物 (E)-2-[(E)-3-(4-氟-苯基)-1-羟基-2-丙烯亚基]-4,6,6-三丙基-5-丙氧基-4-环己烯-1,3-二酮 (TPP) 为研究对象, 首次考察其对人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖抑制及诱导凋亡作用, 进一步探讨其可能的作用机制, 为此类活性抗肿瘤化合物后续开发和利用提供理论指导。

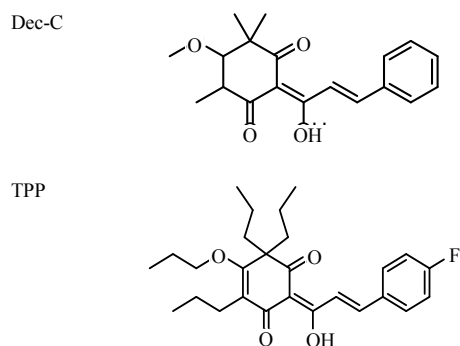


图 1 Des-C 和 TPP 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of Des-C and TPP

1 材料

1.1 细胞

人乳腺癌细胞株 MCF-7, ATCC Number: HTB-22, 购自北京嘉美臻元生物技术有限公司。

1.2 药物及主要试剂

Des-C、Des-C B 环对位氟取代衍生物 TPP, 均由解放军 306 医院药学部向卓博士、梁海硕士合成并提供^[5], 质量分数 >95%; 紫杉醇注射液, 扬子江药业集团有限公司, 批号 16030811。

FITC-Annexin V/PI 双染试剂盒、APC Annexin V/7-AAD 双染凋亡试剂盒, 批号分别为 LHK-601-020、LHK-801-032; Anti-Human NF-κB P65 PE、Anti-Rabbit IgG, Abcam 公司产品, 批号分别为 YN0921908PS、ab6720; 均购自北京嘉美臻元生物技术有限公司。MTT、二甲基亚砜 (DMSO), Amresco 公司产品, 批号分别为 T0973-1G、D0231-100ML; 10×Binding Buffer、5%胎牛血清 (FBS)、DMEM 培养基、超级新生 FBS、PBS 缓冲液、胰酶等, 均购自北京百奥森泰生物技术有限公司。

公司产品。青霉素 (山东鲁抗集团, 160 wu, 批号 150705); 硫酸链霉素 (深圳华南制药有限公司, 批号 141103)。

1.3 主要仪器

十万分之一电子天平, 德国 sartorius 科学仪器公司; MULISKAN ASCENT MK3 酶标仪、CO₂ 培养箱, 美国 Thermo 公司; CKX41 倒置相差显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; 移液器, 芬兰 Finnpiptette 公司; ZS2 型医用离心机, 白洋离心机制造厂; BDFACSCalibur 流式细胞仪, 美国 BD 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

MCF-7 细胞种于含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养, 每 2 天换液 1 次, 待细胞生长至对数生长期时进行实验。

2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制率

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 调整细胞悬液浓度为 5×10^4 /mL, 细胞数目为 1×10^4 /孔接种于 96 孔细胞培养板中, 置 37 °C、5% CO₂ 温箱培养 24 h。实验设 Des-C、TPP、紫杉醇 3 组, 每组药物终质量浓度设置均为 1.0、2.5、5.0、10.0、20.0 μg/mL, 每个浓度设置 3 个复孔, 同时设 3 个对照孔, 对照孔加入相同体积的培养液。各组加药作用 48 h 后, 加入终质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h 弃去上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 终止培养。振荡器上充分低速震荡 10 min, 待结晶物充分溶解后, 在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = (A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{对照组}}$$

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期的乳腺癌细胞 MCF-7, 1×10^4 /孔接种于 96 孔培养板中, 37 °C、5% CO₂ 温箱培养 24 h 后, 加入终质量浓度为 20 μg/mL 的 TPP 作用 0、24、48 h。细胞消化, 制成单细胞悬液, 调整细胞密度至 1×10^9 /L。取 1 mL 细胞悬液 4 °C、 $1\,000 \times g$ 离心 10 min, 小心完全吸弃上清液, 而后加入预冷的磷酸缓冲液 (PBS), 轻轻震荡使细胞悬浮, 4 °C、 $1\,000 \times g$ 离心 10 min, 弃去上清液。再将细胞重悬浮于 500 μL 结合缓冲液中, 加入 10 μL Annexin V-FITC, 混匀后 4 °C 下避光孵育 30 min,

加入 5 μL PI, 避光放置 30 min, BDFACSCalibur 流式细胞仪上机检测, Flowjo 流式细胞分析软件进行数据分析, 计算正常凋亡、早期凋亡、晚期凋亡、死亡细胞所占的比例。

2.4 流式细胞仪检测细胞内 NF- κB 水平

取对数生长期的乳腺癌细胞 MCF-7, 接种于培养板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 温箱培养 24 h 后, 加入终浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 TPP 作用 0、24、48 h。加入 Anti-Human NF- κB P65 PE 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min 后 PBS 洗涤 2 次, 再加入 FITC 标记的二抗, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 暗处孵育 30 min 后, PBS 洗涤 2 次, 随即上流式细胞仪检测, 定量分析 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 TPP 作

用 0、24、48 h 后 MCF-7 细胞中 NF- κB 阳性细胞的百分率。

2.5 统计学处理

数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS13.0 软件进行统计学处理分析, 对所测定结果进行方差齐性检验, 各组间比较使用单因素方差分析检验。

3 结果

3.1 对 MCF-7 细胞增殖的影响

TPP 在浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 时即对 MCF-7 细胞产生增殖抑制作用, 随着浓度的升高, 抑制率逐渐增加, 与浓度呈正相关, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01), 结果见表 1。

表 1 TPP 对 MCF-7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effect of TPP on MCF-7 cell proliferation ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值	抑制率/%
对照	—	0.745 ± 0.046	—
Des-C	1.0	$0.588 \pm 0.017^*$	$20.72 \pm 5.71^*$
	2.5	$0.511 \pm 0.010^{**}$	$31.16 \pm 3.95^{**}$
	5.0	$0.425 \pm 0.007^{**}$	$42.68 \pm 3.29^{**}$
	10.0	$0.411 \pm 0.036^{**}$	$44.91 \pm 1.50^{**}$
	20.0	$0.347 \pm 0.032^{**}$	$53.34 \pm 3.41^{**}$
对照	—	0.752 ± 0.037	—
TPP	1.0	0.627 ± 0.028	16.45 ± 4.71
	2.5	$0.590 \pm 0.031^*$	$21.31 \pm 5.60^*$
	5.0	$0.535 \pm 0.039^{**}$	$28.80 \pm 4.65^{**}$
	10.0	$0.453 \pm 0.029^{**}$	$39.72 \pm 2.71^{**}$
	20.0	$0.390 \pm 0.019^{**}$	$48.14 \pm 0.17^{**}$
对照	—	0.746 ± 0.066	—
紫杉醇	1.0	$0.494 \pm 0.029^{**}$	$33.45 \pm 4.42^{**}$
	2.5	$0.433 \pm 0.030^{**}$	$41.96 \pm 1.26^{**}$
	5.0	$0.344 \pm 0.036^{**}$	$53.07 \pm 8.82^{**}$
	10.0	$0.248 \pm 0.023^{**}$	$66.20 \pm 5.96^{**}$
	20.0	$0.174 \pm 0.044^{**}$	$76.71 \pm 5.84^{**}$

与对照组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

$^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs control group

3.2 TPP 作用后 MCF-7 细胞凋亡变化

图 2 是 MCF-7 细胞凋亡流式图, 一般认为, 左下是正常细胞, 右下是早期凋亡细胞, 右上是中晚期凋亡细胞, 左上为坏死细胞。20 $\mu\text{g/mL}$ TPP 作用 24、48 h 后 MCF-7 细胞均出现凋亡现象, 细胞凋亡率随着作用时间的延长而升高。TPP 作用 48 h 后的

MCF-7 细胞凋亡率远高于 0 h。

3.3 TPP 作用后 MCF-7 中 NF- κB 阳性细胞变化

流式细胞术检测结果表明, 20 $\mu\text{g/mL}$ TPP 作用 24、48 h 后 MCF-7 细胞中 NF- κB P65 阳性细胞率开始减少, 减少程度随作用时间的延长而升高, 作用 48 h 后的 NF- κB P65 阳性细胞率低于 0 h。见图 3。

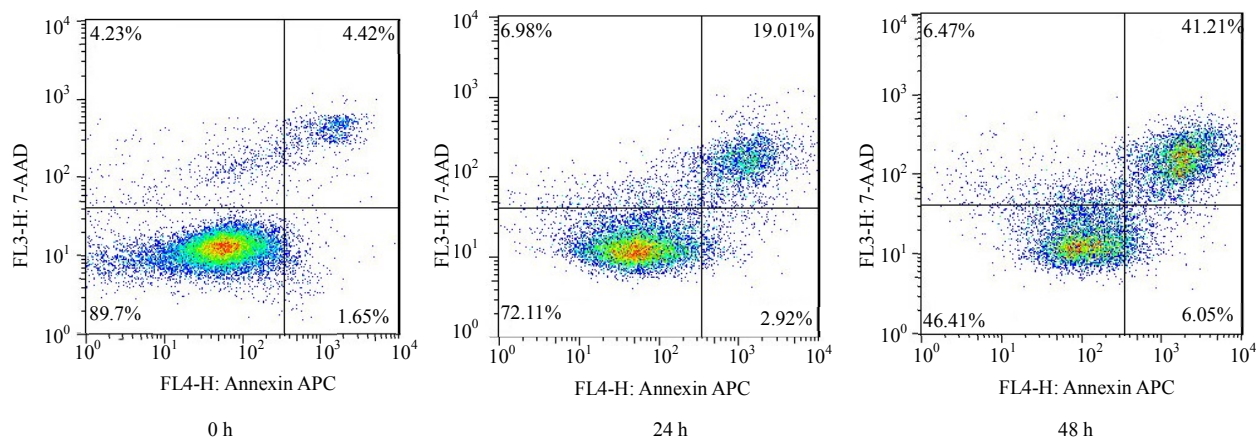


图2 20 µg/mL TPP 作用 0、24、48 h 后的 MCF-7 细胞凋亡情况

Fig. 2 MCF-7 cell apoptosis after 20 µg/mL TPP treatment for 0, 24, and 48 h

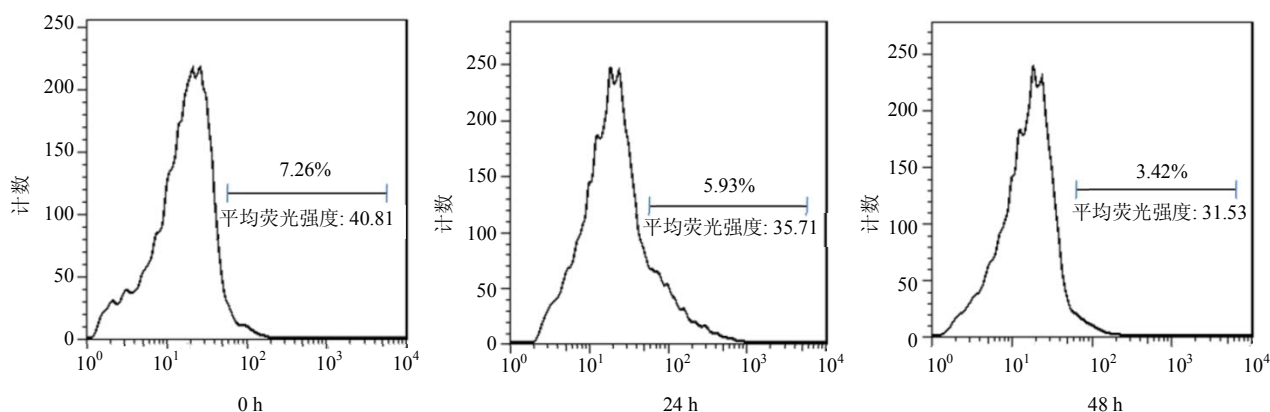


图3 20 µg/mL TPP 作用 0、24、48 h 后的 MCF-7 细胞中 NF-κB 阳性细胞百分率

Fig. 3 NF-κB positive percentages of MCF-7 cells after 20 µg/mL TPP treatment for 0, 24, and 48 h

4 讨论

毛叶假鹰爪 *Desmos dumosus* (Roxb.) Saff. 属于番荔枝科假鹰爪属植物, 广泛分布在我国西南地区, 关于其记载报道最早出现于我国民族民间药著作《岭南采药录》。民间治疗中多用其根叶治疗跌打、皮癣、风湿、骨痛、产后腹痛等症^[6-7]。本实验室首次从该属植物中分离得到两个具有全新骨架、结构新奇的类黄酮化合物 Des-B 和 Des-C^[7]。体外活性研究表明, Des-B、Des-C 及其衍生物具有抗肿瘤^[8]、抗氧化^[9]、神经元损伤保护^[10]等多种功能。宋明玉^[3]等以 293 细胞中建立含有报告基因荧光素酶的质粒, 报告基因的上游含有核转录因子-κB (NF-κB) 转录因子的结合序列, 用肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 诱导报告基因的表达, 发现 Des-C 对 TNF-α 诱导的 NF-κB 信号通路有抑制作用, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 1.5 µg/mL。Goto 等^[4]以 Des-C 的 B 环 4 位 Br 取代衍生物作用于非小细胞肺癌为研究对象, 发现

Des-C 衍生物能调节纺锤体和染色体分离, 判断该化合物选择性作用于肿瘤细胞 G2/M 期。

最近的科学研究表明, NF-κB 是一种重要的转录蛋白, 在细胞浆中产生, 转移到细胞核内发挥重要作用, 其对肿瘤发展过程中多种基因表达上调起到关键作用。NF-κB 能促进周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 的表达和 G1/S 期转换, 推进细胞周期演变, 表现为细胞无限增殖和自主分裂^[11]; 同时可以上调 TRAF1、TRAF2 等抗凋亡基因表达及抑制促凋亡癌基因表达等产生抗凋亡效应^[12], 还能诱导 VEGF 的表达, 促进血管生成。综上所述, NF-κB 在肿瘤细胞的无限增殖以及抑制细胞凋亡的过程中扮演着重要角色。

以人乳腺癌细胞株 MCF-7 作为研究对象, 探讨 TPP 对人乳腺癌的作用及其机制, 结果显示, TPP 对 MCF-7 具有增殖抑制作用, 20 µg/mL 浓度的 TPP 作用 48 h 后抑制率达到 48.14%。流式结果显示其

诱导了 MCF-7 的凋亡,作用 48 h 后的凋亡率高于 0 h; NF- κ B 阳性细胞率由 0 h 的 7.26%, 48 h 后降低为 3.42%。TPP 作用前后, MCF-7 细胞中 NF- κ B 阳性细胞表达率显著降低。因此推测 TPP 具有下调 NF- κ B 在 MCF-7 细胞中表达的作用,这种作用可能是其抑制细胞增殖诱导细胞凋亡的机制之一,有关此类化合物的抗肿瘤作用机制,本课题组还将进一步做深入研究。

参考文献

- [1] 厉恩振,宋明玉,向卓,等.毛叶假鹰爪素 CB 环衍生物的合成与抗肿瘤活性评价 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(11): 924-929.
- [2] 舒彦松,张学辉,向卓,等.毛叶假鹰爪素 C 衍生物的合成与抗肿瘤活性评价 [J]. 解放军药理学学报, 2013, 29(05): 403-406.
- [3] 宋明玉. 活性先导化合物毛叶假鹰爪素 C 衍生物的设计与合成 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.
- [4] Nakagawa-Goto K, Wu P C, Bastow K F, et al. Antitumor agents 283. Further elaboration of desmosdumotin C analogs as potent antitumor agents: activation of spindle assembly checkpoint as possible mode of action [J]. Bioorg Med Chem, 2011, 19(5): 1816-1822.
- [5] 向卓. 新型类查尔酮化合物 Des-C、FMC 衍生物的设计合成及其体外抗肿瘤、抗氧化研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2014.
- [6] 吴久鸿,史宁,潘敏翔,等.毛叶假鹰爪根化学成分及其抗艾滋病病毒活性的研究 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(07): 495-497.
- [7] 吴久鸿,廖时萱,毛士龙,等.毛叶假鹰爪根化学成分的研究 [J]. 药学报, 1999, 34(09): 682-684.
- [8] 梁海,向卓,郭宏举,等. Desmosdumotin-C B 环氨基酸酰胺修饰衍生物的合成与抗肿瘤活性评价 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(23): 2128-2135.
- [9] 罗艳,焦杨,邱莉,等.假鹰爪属植物化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(06): 1929-1934.
- [10] 郭宏举,梁海,向卓,等.查尔酮类衍生物 G01 对 H₂O₂ 诱导小鼠皮层神经元氧化损伤保护作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(12): 2138-2141.
- [11] Guttridge D C, Albanese C, Reuther J Y, et al. NF-kappa B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1 [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(8): 5785-5799.
- [12] Wang C Y, Mayo M W, Korneluk R G, et al. NF-kappa B anti-apoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and C-TAP1 and C-IAP2 to suppress caspase-8 activation [J]. Science, 1998, 281(5383): 1680-1683.