

去甲二氢愈创木酸类似物26C基于活性氧簇诱导细胞凋亡的体外抗肺癌活性研究

李倩^{1#}, 赵祺^{2, 4#}, 秦宇雯^{2, 4}, 吴建章¹, 吴晓萍^{1, 3*}, 姜程曦^{2, 4*}

1. 温州医科大学 药学院, 浙江 温州 325035
2. 温州大学 生命科学研究院, 浙江 温州 325035
3. 暨南大学 组织移植与免疫研究中心, 广东 广州 510632
4. 浙江省生物医药协同创新中心, 浙江 温州 325035

摘要: 目的 研究去甲二氢愈创木酸(NDGA)类似物26C的抗肺癌活性与初步机制。方法 利用MTT实验评价26C对肺癌细胞NCI-H460的细胞毒性;用集落克隆、划痕实验分别检测26C对NCI-H460细胞生长、迁移的影响;流式细胞仪检测26C对NCI-H460细胞的周期阻滞及诱导凋亡情况;活性氧簇(ROS)实验探究26C引起细胞凋亡的作用机制。结果 26C对NCI-H460的 IC_{50} 为 (4.7 ± 0.5) $\mu\text{mol/L}$,对NCI-H460的集落形成、迁移有较强的抑制作用,其活性明显优于先导化合物NDGA;26C可将细胞周期阻滞在 G_2/M 期,并通过升高ROS水平的作用机制诱导NCI-H460细胞凋亡。结论 化合物26C为具有研发前景的抗肺癌候选化合物,其通过提高ROS水平、阻滞细胞周期来抑制细胞生长和诱导细胞凋亡。

关键词: NDGA类似物;肺癌;ROS;周期阻滞;凋亡

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)11-2153-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.11.005

Anti-lung cancer activity of NDGA analogue 26C based on ROS-induced apoptosis *in vitro*

LI Qian¹, ZHAO Qi^{2,4}, QIN Yuwen^{2,4}, WU Jianzhang¹, WU Xiaoping^{1,3}, JIANG Chengxi^{2,4}

1. Department of Pharmacy, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China
2. Institute of Life Sciences, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China
3. Institute of Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China
4. Biomedical Collaborative Innovation Center of Zhejiang, Wenzhou 325035, China

Abstract: Objective To study the anti-lung cancer activity and preliminary mechanism of NDGA analogue 26C. **Methods** MTT assay was employed to evaluate the cytotoxicity of 26C to lung cancer cells NCI-H460. Clonogenicity assay and scratch assay were used to investigate the role of 26C on proliferation and migration of NCI-H460 cells, respectively. Flow cytometry detected cycle arrest and apoptosis induction of NCI-H460 cells by 26C, and the intracellular accumulation of ROS was examined to explore the mechanism of 26C inducing apoptosis. **Results** 26C own an IC_{50} value of (4.7 ± 0.5) $\mu\text{mol/L}$, and displayed a potent inhibition on clonogenicity and migration in NCI-H460 cells. Additionally, its activity was obviously better than the leading compound NDGA. 26C could arrest the cell cycle in the G_2/M phase and induce apoptosis by accumulating the intracellular ROS. **Conclusion** With activities of inhibit cell growth and induce apoptosis by increasing ROS levels and arresting the cell cycle, compound 26C could be considered as a potential anti-lung cancer candidate with promising prospects.

Key words: NDGA analogue; lung cancer; ROS; cycle arrest; apoptosis

收稿日期: 2019-06-20

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(LY15H280014); 云南大理药业股份有限公司横向课题(KJHX1603)

*并列第一作者: 李倩(1995—), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 研究方向为药理学。Tel: (0577)86699891

赵祺(1994—), 女, 湖北枣阳人, 硕士研究生。Tel: (0577)86699891

*通信作者: 姜程曦(1971—), 男, 安徽青阳人, 博士, 研究员, 研究方向为中药学。Tel: 18969715696 E-mail: jiangchengxi@126.com

吴晓萍(1971—), 女, 广东廉江人, 博士, 研究员, 研究方向为抗肿瘤药物药理。Tel: 13902309246 E-mail: wxpjnu@163.com

肺癌是对人类健康最具威胁性的恶性肿瘤之一,每年的新发病例高达180万例^[1]。由于肺癌早右^[2-4]。目前化学疗法是肺癌晚期治疗的重要手段^[5],但临床上的化疗药物常会出现肾毒性、药效低、治疗周期长等诸多缺陷^[6]。随着各种癌症特异性分子生物标志物的发现,靶向疗法逐渐成为肺癌治疗的热点^[1,3],但是由于其价格昂贵且靶点易突变,靶向疗法的使用受限^[7-8]。因此,寻找新的高效低毒的抗肺癌药物与新机制,已成为当下最为迫切的需求。

以天然产物为先导,设计新的抗癌药物是当今药物研发的热点^[9]。去甲二氢愈创木酸(NDGA,结构见图1)为从常青灌木(Larreatridentata)中提取的

期症状不典型且缺乏有效的诊断方法,超过50%的患者确诊时已为肺癌晚期,5年生存率仅为15%左一种天然酚类化合物,具有抗肿瘤、抗氧化、神经保护等广泛的药理活性^[10-13]。NDGA已被描述为多种致癌背景下的抗肿瘤化合物,可通过不同的机制和信号传导途径阻断细胞增殖并诱导肿瘤细胞的凋亡^[14-17]。但NDGA抗肿瘤活性较低^[10],限制了其在临床中进一步的应用。因此,以NDGA为先导,进行结构优化,以期获得抗肿瘤活性更好的类似物,是该研究领域的热点。本论文以NDGA为先导,设计并筛选得到具有良好抗肿瘤活性的NDGA类似物26C(结构见图1),并对其抗肿瘤活性和机制进行初步研究。

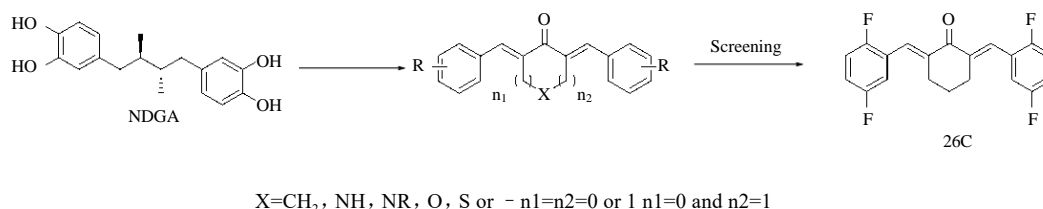


图1 26C的发现及结构

Fig. 1 The discovery and structure of 26C

1 材料

1.1 细胞株

人肺癌 NCI-H460 细胞购买于中国科学院上海生命科学院。

1.2 药品与试剂

去甲二氢愈创木酸类似物 26C [自制,质量分数 >95%, 2,6-双(2,5-二氟亚苄基)环己烷-1-酮,黄色粉末,产率 78.9%,熔点 136.3~137.8 °C. ¹H NMR (500 MHz, d-DMSO), δ: 7.581 (s, 2H, β-H×2), 7.429~7.314 (m, 6H, Ar-H³×2, Ar-H⁴×2, Ar-H⁶×2), 2.811 (t, J=5.5 Hz, 4H, CH₂-C-CH₂), 1.723 (t, J=5.5 Hz, 2H, C-CH₂-C). EI-MS m/z: 347.30[M+1]⁺, calcd for C₂₀H₁₄F₄O: 346.10]

去甲二氢愈创木酸 NDGA (AlfaAesar, 货号 10192279)、NAC(阿拉丁,货号 N133726)、RPMI-1640 培养基(美国 GIBCO 公司),其中添加的胎牛血清(GIBCO)的浓度为 10%,青霉素/链霉素双抗(GIBCO)的浓度为 1%、PBS 缓冲液(GIBCO)、0.25%胰蛋白酶(含 EDTA)(GIBCO)、0.25%胰蛋白酶(无 EDTA)(GIBCO)、多聚甲醛(阿拉丁)、结晶紫染色液(上海碧云天)、二甲基亚砜 DMSO(美国 Sigma 公司)、MTT 粉末(北京索莱宝生物科技公司)、凋亡试剂盒(BD Biosciences Clontech)、周期试

剂盒(BD Biosciences Clontech)、ROS 试剂盒(上海碧云天)。

1.3 仪器

细胞培养箱(Thermo 美国热电集团)、低温离心机(Thermo 美国热电集团)、超低温冰箱(Thermo)、Spectra Max M2 多功能酶标仪(Molecular Devices)、正置相差显微镜(Nikon)、倒置相差显微镜(Nikon)、流式细胞仪(BD Biosciences Clontech)、振荡器(Thermo)。

2 方法

2.1 MTT 方法

将处于对数期的 NCI-H460 细胞以每孔 2 000 个细胞及 100 μL 完全培养基接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后分别加入不同浓度的药物 26C 及 NDGA(终浓度为 40、20、10、5、2.5、1.25 μmol/L),设置溶剂 DMSO 组。药物作用 72 h 后,每孔加 20 μL MTT(5 mg/mL)。继续培养 4 h,弃去原培养基,每孔加 150 μL DMSO 溶解结晶。然后用酶标仪(波长为 490 nm)测其吸光度(A)值,用 GraphPad 计算 IC₅₀。重复 3 次。

$$\text{细胞抑制率} = (1 - \text{实验组 } A \text{ 值} / \text{DMSO 组 } A \text{ 值}) \times 100\%$$

2.2 集落克隆实验

将处于对数期的 NCI-H460 细胞以 1 000 个/孔

的密度接种至6孔板,放入培养箱中培养过夜。次日分别加入不同浓度的药物**26C**(终浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 和10 $\mu\text{mol/L}$)及NDGA(终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$),并且设置溶剂DMSO对照组。药物作用48 h后更换新的完全培养基,在培养箱中继续培养10 d后终止培养。用4%多聚甲醛固定20 min,结晶紫染色20 min后拍照。

2.3 细胞划痕实验

将处于对数期的NCI-H460细胞以 6×10^5 /孔的密度接种至6孔板,放入培养箱中培养过夜。次日更换成无血清培养基培养24 h,每孔各均匀地划3条竖直的线,分别加入不同浓度的药物,浓度及分组设置同上,药物作用0、24 h后分别拍照。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡实验

将处于对数期的NCI-H460细胞以 3×10^5 /孔的密度接种至6孔板,放入培养箱中培养。待细胞贴壁后加药,药物浓度及分组设置同上。培养48 h后收集细胞及上清液,每管加3 μL Annexin V及2 μL PI,染色后用流式细胞仪进行收集检测。

2.5 流式细胞术检测药物对细胞周期的影响

将处于对数期的NCI-H460细胞以 3×10^5 /孔的密度接种至6孔板,放入培养箱中培养过夜。次日分别加入不同浓度的药物,浓度及分组设置同上。继续培养24 h后胰酶消化收集样品,加入3 mL 预冷无水乙醇, -20°C 固定过夜。固定结束后加入500 μL PI染色液重悬细胞,用流式细胞仪检测细胞周期阻滞情况。

2.6 流式细胞仪检测ROS实验

将处于对数期的NCI-H460细胞以 3×10^5 /孔的密度接种至6孔板,放入培养箱中培养过夜。次日提前2 h加入NAC(5 mmol/L)后加药物**26C**(10 $\mu\text{mol/L}$)。9 h后弃上清培养基,加入DCFH-DA荧光探针(比例为1:2 000),继续孵育30 min后收集细胞,用流式细胞仪上机检测。

3 结果

3.1 化合物**26C**对NCI-H460细胞生长及迁移的影响

首先用MTT法测试了**26C**对肺癌细胞NCI-H460细胞生长的影响,其对NCI-H460细胞的半数抑制浓度 IC_{50} 值为 $(4.7 \pm 0.5) \mu\text{mol/L}$,其活性明显强于先导化合物NDGA(图2A)。随后的(图2B)显示,化合物**26C**以剂量依赖性方式抑制细胞集落的形成,与NDGA相比,**26C**在10 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下有较强的抑制作用,其抑制作用明显优于NDGA。进一步用划痕实验,观察5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的**26C**对NCI-H460细胞体外迁移能力的影响。结果发现药物作

用24 h后,与对照组相比,**26C**可有效抑制NCI-H460细胞的迁移(图2C),且效果优于NDGA。以上结果表明化合物**26C**具有体外抑制NCI-H460细胞生长及迁移的能力。

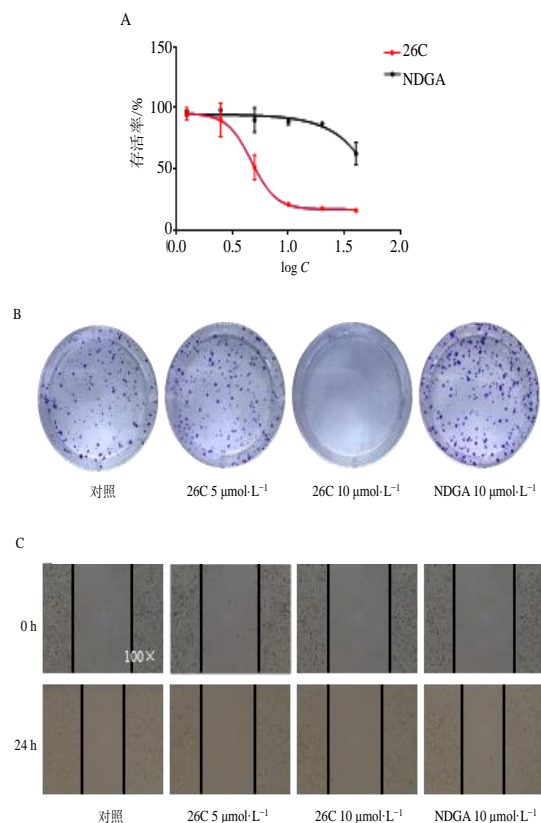


图2 化合物**26C**对NCI-H460细胞生长与迁移的影响
Fig. 2 Effects of compound 26C on growth and migration of NCI-H460 cells

3.2 化合物**26C**阻滞NCI-H460的细胞周期进程和诱导细胞凋亡

为了进一步研究**26C**对肺癌细胞抑制作用的机制,利用流式细胞术分析其对细胞周期和细胞凋亡的影响。如图3A所示,10 $\mu\text{mol/L}$ 的**26C**可对肺癌细胞NCI-H460产生了明显的周期阻滞作用,与对照组相比 G_2/M 期细胞增加了9%,而相同浓度的NDGA对细胞周期无明显影响。同时,**26C**对NCI-H460具有促凋亡作用,且呈浓度相关关系(图3B)。因此,**26C**通过阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡在体外起到抗肺癌作用。

3.3 化合物**26C**通过升高活性氧(ROS)引起NCI-H460细胞凋亡

ROS是许多细胞信号传导事件的关键因素,包括细胞凋亡和坏死。较高水平的ROS能够诱导肺

瘤细胞凋亡,寻找ROS诱导剂已被认为是一种具有前景的抗肿瘤药物研发策略^[18]。通过流式细胞术会如何影响NCI-H460细胞中的ROS水平。结果显示26C(10 μmol/L)孵育细胞9 h后,细胞内ROS水平明显升高。而ROS清除剂NAC(5 mmol/L)预处理细胞2 h后,26C诱导ROS升高的能力大大减

使用ROS荧光探针染料(二氯二氢荧光素二乙酸钠,DCFH-DA)检测细胞内ROS水平,以研究26C弱(图4A),同时其抑制细胞生长(图4B)和诱导细胞凋亡(图4C)的能力均明显减弱。这些结果表明ROS产生是26C诱导细胞凋亡过程中的重要环节。

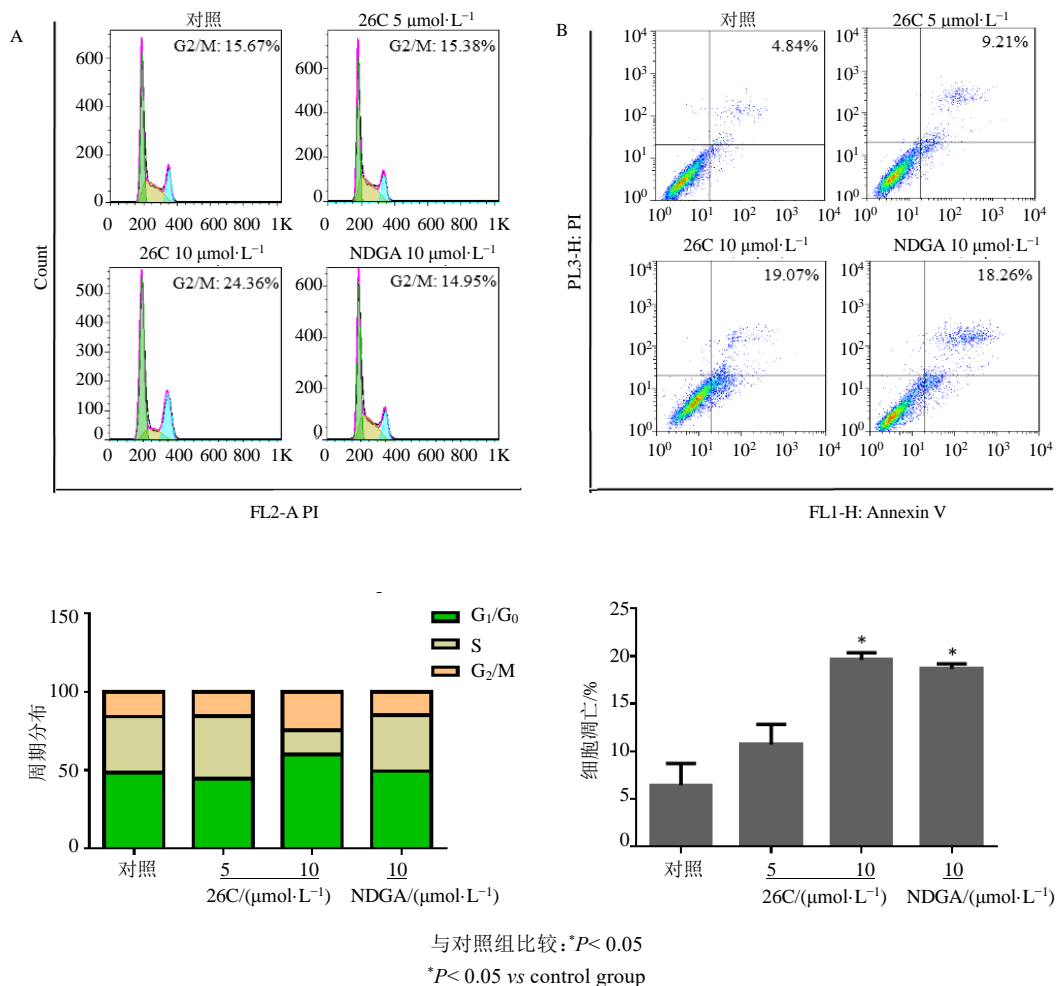


图3 化合物26C引起NCI-H460细胞的G₂/M期阻滞及凋亡

Fig. 3 Compound 26C induced cell cycle arrest of G₂/M phase and apoptosis in NCI-H460 cells

4 讨论

基于天然产物骨架改造的化学药物,几乎占据了抗癌药物的60%^[19]。NDGA是一种从常青灌木中提取的天然药物,已被证明对多种肿瘤细胞均具有抑制作用,如皮肤癌、前列腺癌、直肠癌、宫颈癌细胞等^[14-17]。但是药理活性低的特点限制了其在临床中的应用^[10]。因此,对NDGA的结构进行改造以提高其药理活性成为一个研究热点。Chen^[20]改造的多种NDGA类似物均可以显著提高抗癌活性;Wu等^[21]报道NDGA类似物Af23和Ad23可以通过抑制成纤维生长因子受体1(FGFR1)在体外和体内

都具有良好的抗肺癌活性。本研究合成了比NDGA抗肿瘤活性强的NDGA类似物26C,可显著抑制肺癌细胞的生长。

细胞在生长过程中涉及到一系列程序,其中细胞周期阻滞及细胞凋亡在细胞存活中有着非常重要的作用。近年来,一些研究报道了NDGA及其类似物可以阻滞细胞周期及诱导细胞凋亡,这可能是其抗癌作用中影响肿瘤细胞活力的重要机制。Rowe等^[22]指出NDGA可以诱导乳腺癌细胞中聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)的裂解及caspase-3的激活,从而促进肿瘤细胞凋亡;Zhao等^[23]报道

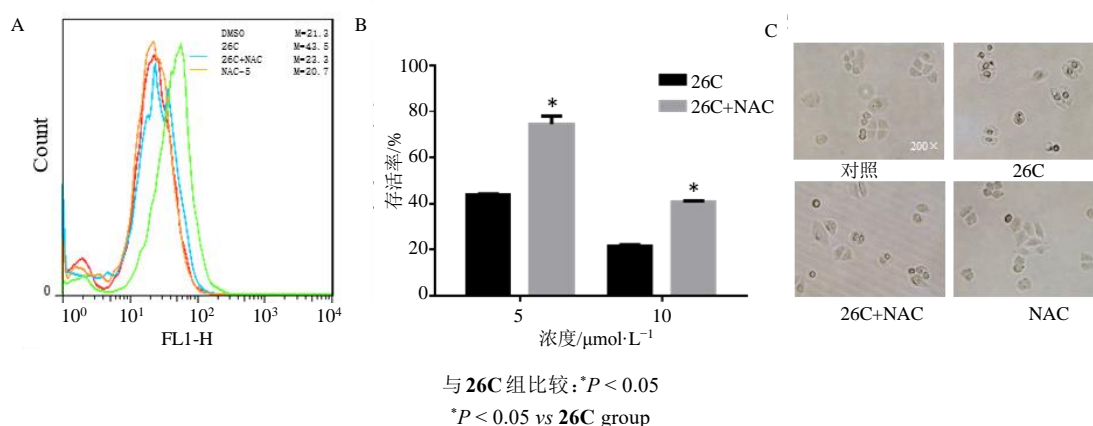


图4 26C通过升高ROS水平引起NCI-H460细胞的凋亡

Fig. 4 26C induced apoptosis in NCI-H460 cells by improving the levels of ROS

NDGA类似物可通过抑制细胞周期调节蛋白E1(CCNE1)、周期蛋白依赖性激酶(CDK2)的表达使胶质瘤细胞周期阻滞于G₀/G₁期,从而抑制细胞增殖。本研究将细胞周期及细胞凋亡作为26C抗肺癌的潜在机制,通过流式细胞仪分析发现26C可将细胞阻滞在G₂/M期,且呈浓度相关性诱导细胞凋亡。

ROS是需氧细胞在代谢过程中产生一系列活性氧簇,被发现可双向调控某些肿瘤细胞的凋亡及与细胞信号转导之间存在关联^[24]。已经证明较高水平的ROS能够诱导肿瘤细胞凋亡,然而,NDGA结构中酚羟基的氢原子可与ROS反应,使NDGA成为了一个具有强抗氧化特性的分子,这可能是NDGA药理活性低的原因^[10,25]。本课题组将NDGA结构中酚羟基去除后修饰得到26C,发现其可以明显提高细胞内ROS水平,由此猜测NDGA结构中酚羟基的改造是提高其抗肿瘤活性的关键原因。

综上所述,甲二氢愈创木酸类似物26C具有很好的阻滞肺癌细胞生长周期,抑制肺癌细胞生长和迁移的活性,并能通过升高ROS来诱导肺癌细胞凋亡。26C为具有较好研发前景的抗肿瘤候选化合物,但其深入抗肿瘤活性和机制还有待进一步深入研究。

参考文献

[1] Hirsch F R, Scagliotti G V, Mulshine J L, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments [J]. The Lancet, 2017, 389(10066): 299-311.
[2] Shallwani S M, Simmonds M J, Kasymjanova G, et al. Quality of life, symptom status and physical performance in patients with advanced non-small cell lung cancer undergoing chemotherapy: an exploratory analysis of secondary data [J]. Lung Cancer, 2016, 99: 69-75.

[3] Chen Z, Fillmore C M, Hammerman P S, et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases [J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(8): 535-546.
[4] David S E, Douglas E W, Wallace A, et al. Non - small cell lung cancer, version 4. 2016: Featured updates to the NCCN guidelines [J]. JNCCN, 2016, 14(3): 255-264.
[5] Hellmann M D, Li B T, Chaft J E, et al. Chemotherapy remains an essential element of personalized care for persons with lung cancers [J]. Ann Oncol, 2016, 27(10): 1829-1835.
[6] Wagland R, Richardson A, Ewings S, et al. Prevalence of cancer chemotherapy-related problems, their relation to health-related quality of life and associated supportive care: a cross-sectional survey [J]. Support Care Cancer, 2016, 24(12): 4901-4911.
[7] Hill A, Gotham D, Fortunak J, et al. Target prices for mass production of tyrosine kinase inhibitors for global cancer treatment [J]. BMJ Open, 2016, 6(1): e009586.
[8] Sun J M, Hwang D W, Ahn J S, et al. Prognostic and predictive value of KRAS mutations in advanced non-small cell lung cancer [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64816.
[9] Rodrigues T, Reker D, Schneider P, et al. Counting on natural products for drug design [J]. Nat Chem, 2016, 8(6): 531-541.
[10] Hernández-Damián J, Andérica-Romero A C, Pedraza-Chaverri J. Paradoxical cellular effects and biological role of the multifaceted compound nordihydroguaiaretic acid [J]. Arch Pharm Chem Life Sci, 2014, 347(10): 685-697.
[11] Lu J M, Nurko J, Weakley SM, et al. Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: an update [J]. Med Sci Monit, 2010, 16(5): 93-100.
[12] Zhang H Y, Shen W J, Li Y H, et al. Microarray analysis

- of gene expression in liver, adipose tissue and skeletal muscle in response to chronic dietary administration of NDGA to high-fructose fed dyslipidemic rats [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2016, 13: 63.
- [13] Sadagurski M, Cady G, Miller R A. Anti-aging drugs reduce hypothalamic inflammation in a sex-specific manner [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(4): 652-660.
- [14] Rahman S, Farooque A, Anjum S, et al. Nordihydroguaiaretic acid attenuates skin tumorigenesis in Swiss albino mice with the condition of topical co-administration of an immunosuppressant [J]. *Chem-Biol Interact*, 2015, 233: 106-114.
- [15] Ryan C J, Zavodovskaya M, Youngren J F, et al. Inhibitory effects of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on the IGF-1 receptor and androgen dependent growth of LAPC-4 prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2008, 68(11): 1232-1240.
- [16] Liao F, Liu M, Lv L, et al. Hepatoma-derived growth factor promotes the resistance to anti-tumor effects of nordihydroguaiaretic acid in colorectal cancer cells [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 645(1/2/3): 55-62.
- [17] Seufferlein T, Seckl J, Schwarz E, et al. Mechanisms of nordihydroguaiaretic acid-induced growth inhibition and apoptosis in human cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(7): 1188-1196.
- [18] Gorrini C, Harris I S, Mak T W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(12): 931-947.
- [19] Newman D J, Cragg G M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014 [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(3): 629-661.
- [20] Chen Q Q. Nordihydroguaiaretic acid analogues: their chemical synthesis and biological activities [J]. *Curr Top Med Chem*, 2009, 9(17): 1636-1659.
- [21] Wu J Z, Wei T, Tang Q Q, et al. Discovery and anti-cancer evaluation of two novel non-ATP-competitive FGFR1 inhibitors in non-small-cell lung cancer [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 276.
- [22] Rowe D L, Ozbay T, Bender L M, et al. Nordihydroguaiaretic acid, a cytotoxic insulin-like growth factor-I receptor/HER2 inhibitor in trastuzumab-resistant breast cancer [J]. *Mol Cancer Therap*, 2008, 7(7): 1900-1908.
- [23] Zhao Q W, Lin Y, Xu C R, et al. NDGA-P₂₁, a novel derivative of nordihydroguaiaretic acid, inhibits glioma cell proliferation and stemness [J]. *Lab Invest*, 2017, 97(10): 1180-1187.
- [24] Moloney J N, Cotter T G. ROS signalling in the biology of cancer [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 80: 50-64.
- [25] Floriano-Sánchez E, Floriano-Sánchez E, Villanueva C, et al. Nordihydroguaiaretic acid is a potent *in vitro* scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents *in vivo* ozone-induced tyrosine nitration in lungs [J]. *Free Radical Res*, 2006, 40(5): 523-533.