

吡唑并[4- β -d]嘧啶衍生物的抗肿瘤筛选及其机制研究

陈冉, 王宝石, 刘明明, 刘新华, 石静波

摘要 目的 对一系列吡唑并[4- β -d]嘧啶衍生物进行抗肿瘤活性评价, 选取显著抑制神经胶质瘤 U87-MG 细胞增殖的化合物 9, 研究其体外对 U87-MG 细胞的抗肿瘤活性及机制。方法 采用 MTT 比色法观察化合物 1-10 对四种肿瘤细胞(人肝癌 SMMC-7721 细胞、人胃癌 SGC-7901 细胞、人胃癌 MGC-803 细胞和人神经胶质瘤 U87-MG 细胞)增殖的影响。采用流式细胞仪检测化合物 9 诱导的 U87-MG 细胞凋亡率, 以及 Western blot 法检测细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达和相关通路蛋白 p-Akt、Akt、p-mTOR 和 mTOR 的表达情况。结果 MTT 结果显示, 化合物 4、5、8 和 9 对四种肿瘤细胞株的增殖均具有一定抑制作用, 其中, 化合物 9 抑制神经胶质瘤 U87-MG 细胞增殖的能力最强; 化合物 9 体外抑制 U87-MG 细胞增殖的作用具有时间-剂量依赖性; 流式细胞仪检测结果显示, U87-MG 细胞凋亡率随着化合物 9 浓度增加而升高, 呈剂量依赖性。Western blot 结果显示, 随着化合物 9 浓度增加, Bcl-2 蛋白表达下调, Bax 蛋白表达上调; 同时 Akt 和 mTOR 蛋白表达量基本不变, p-Akt 和 p-mTOR 蛋白表达均下调。结论 吡唑并[4- β -d]嘧啶衍生物 9 明显抑制神经胶质瘤 U87-MG 细胞增殖, 并且诱导细胞凋亡, 其诱导凋亡可能机制为通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路达到的。

关键词 神经胶质瘤; 吡唑并[4- β -d]嘧啶; Akt; mTOR

中图分类号 R 961

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0452-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.023

神经胶质瘤是中枢神经系统内最常见的颅内恶性肿瘤, 占有颅内肿瘤发生率的 40%~50%, 并且有着高复发率、高致死率和低治愈率的特点^[1]。尽管采用放射治疗联合替莫唑胺(temozolomide, TMZ)的标准治疗方案, 神经胶质瘤患者的存活率 5 年内仍然低于 5%^[2]。化学疗法作为肿瘤三大治疗方案之一, 近年来在神经胶质瘤治疗中受到的关注越来越多^[3]。化疗药物结构多样, 很多药物都是以

杂环骨架为结构母核设计合成得到的。其中, 氮取代的稠杂环化合物在抗肿瘤治疗中有极大的研究价值^[4], 如 FDA 已经批准上市的氮取代稠杂环类抗肿瘤药物艾乐替尼、帕比司他、甲磺酸乐伐替尼等^[5]。吡唑并[4- β -d]嘧啶是常见的氮取代稠杂环化合物之一, 其作为潜在的抗肿瘤化疗药物受到了药物化学领域的广泛关注^[6]。PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与多种恶性肿瘤的发生^[7], 研究^[8]证明, 抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路是治疗神经胶质瘤的潜在方案。因此, 该研究对合成得到的吡唑并[4- β -d]嘧啶衍生物进行抗肿瘤活性筛选, 选取神经胶质瘤 U87-MG 细胞, 研究化合物 9 的体外抗肿瘤作用, 初步探讨其作用机制, 为吡唑并[4- β -d]嘧啶衍生物的抗肿瘤研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肝癌 SMMC-7721 细胞、人胃癌 SGC-7901 细胞、人神经胶质瘤 U87-MG 细胞和人胃癌 MGC-803 细胞均由安徽医科大学药学院提供。

1.1.2 主要试剂 化合物 1~10 由安徽医科大学药学院药化教研室合成提供; DMEM 高糖培养基、二甲基亚砷购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物材料有限公司; 胰酶购自上海生工生物工程股份有限公司; 噻唑蓝购自北京奇华盛生物技术有限公司; 兔抗 Bax、Bcl-2、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR 购自美国 Abcam 公司; 抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Annexin V-FITC 购自美国贝博公司。

1.1.3 主要仪器 Multiskan MK3 酶标仪购自荷兰 Thermo forma 仪器有限公司; NAPCO-6100 型细胞培养箱购自美国 SHELLAB 公司; Sigma3-16K 高速离心机购自美国 Sigma 公司; Bio-Rad powerpac 164-5070 电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 稳定传 2~3 代后, 取对数生长期的细胞做

2018-12-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 21572003); 安徽高校自然科学研究重点项目(编号: KJ2017A831)

作者单位: 安徽医科大学药学院, 合肥 230032

作者简介: 陈冉, 女, 硕士研究生;

石静波, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: sjbo616@126.com

后续实验。

1.2.2 细胞增殖实验 收集对数期细胞,计数,调整细胞悬液浓度,以4 000个/100 μ l/孔,接种于96孔板,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养24 h后至细胞单层铺满孔底面积的2/3。从孔边缘小心吸弃培养基,各加入一定浓度梯度的化合物,100 μ l/孔,每组设4个平行复孔,分别培养24、48、72 h。避光条件下,加入MTT溶液20 μ l/孔,继续放入培养箱中培养4 h。小心吸去孔内培养液,加入DMSO,150 μ l/孔,置摇床上低速振荡15 min。在酶标仪492 nm处测量各孔的吸光度值(optical density, OD),以对照孔调零。记录结果并计算细胞抑制率,抑制率(inhibitory concentration IC) (%) = $[(1 - (\text{实验组 OD 均值} - \text{空白组 OD 均值}) / (\text{对照组 OD 均值} - \text{空白组 OD 均值})) \times 100 \%$,实验重复操作3次,并计算均值和半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.3 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡 取对数生长期的U87-MG细胞,分别予以相应浓度的化合物9(2、4、8 μ mol/L)处理24 h,用4 $^{\circ}$ C预冷的PBS洗涤并收集所有细胞,制备单细胞悬液,离心弃去上清液,加入400 μ l的Annexin V Buffer工作液重悬细胞,再加入5 μ l Annexin-V-FITC染色液,4 $^{\circ}$ C避光孵育15 min,加入10 μ l PI染色液同条件下孵育10 min,在1 h内进行流式细胞仪检测。

1.2.4 Western blot 检测 将U87-MG细胞接种于六孔板中(0.25 \times 10⁶/ml) 2 ml/孔,待细胞贴壁后,加入上述三种浓度的化合物9,处理24 h。收集细胞,并用4 $^{\circ}$ C预冷的PBS洗涤细胞,按照1 ml裂解液加入10 μ l PMSF的配方,加入适量裂解液,摇匀

置于冰上裂解30 min,4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min离心5 min,取上清液采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定样品中蛋白含量,并稀释配平。蛋白样品采用10%~12%的SDS-PAGE电泳,200 mA恒流条件下将凝胶上的蛋白转移至PVDF膜上。5%脱脂牛奶室温封闭1~2 h,置于摇床上缓慢震荡,TBST洗膜3次后,4 $^{\circ}$ C孵育一抗(按照1:1 000比例稀释)过夜,TRIS-HCL-Tween TBST洗膜3次后,室温孵育二抗(按照1:10 000比例稀释)1 h,TBST洗膜3次后,采用ECL化学发光法观察蛋白表达情况。

1.3 统计学处理 采用SPSS 17.0进行统计分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数之间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吡唑并[4,3-d]嘧啶衍生物的抗肿瘤活性评价 MTT法检测10个化合物对四株肿瘤细胞株(人肝癌SMMC-7721细胞、人胃癌SGC-7901细胞、人胃癌MGC-803细胞和人神经胶质瘤U87-MG细胞)的增殖抑制情况,化合物处理时间为48 h,阿霉素(ADM)做阳性对照药,见图1。数据经SPSS 17.0分析,得到具有较好抗肿瘤活性(IC₅₀ \leq 60 μ mol/L)的化合物,见表1。结果显示,化合物4、5、8和9对四株肿瘤细胞株均有明显增殖抑制作用,其中,化合物9抑制神经胶质瘤U87-MG细胞增殖作用最强,IC₅₀仅为(2.22 \pm 0.67) μ mol/L,小于神经胶质瘤细胞阳性药TMZ的IC₅₀。表明化合物9可能是治疗神经胶质瘤的潜在先导物。因此,就该化合物9的抗神经胶质瘤的作用机制开展了初步的研究。

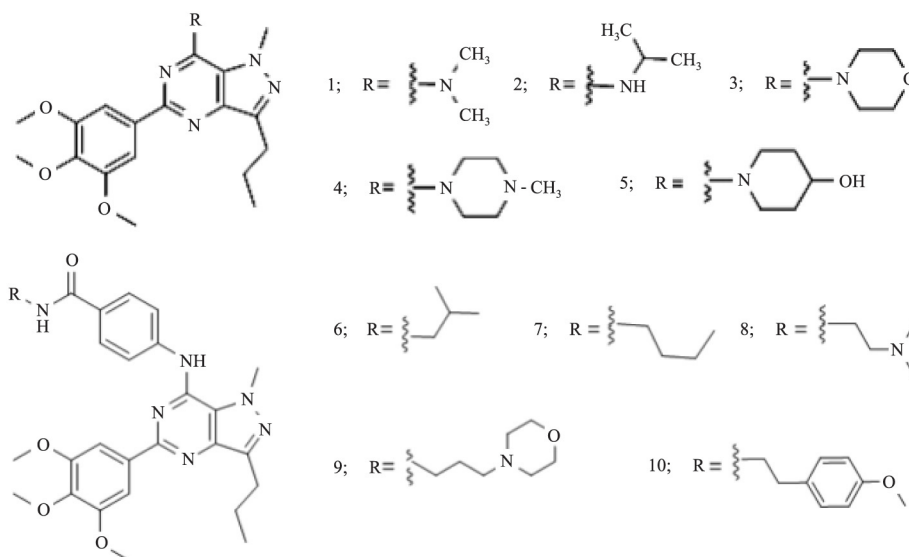


图1 化合物1~10的化学结构

表1 化合物对不同肿瘤细胞株的 IC₅₀ (μmol/L, $\bar{x} \pm s$, n=3)

化合物	SMMC-7721	SGC-7901	MGC-803	U87-MG
1	-	-	36.89 ± 0.25	33.44 ± 0.46
4	53.17 ± 1.29	51.79 ± 1.46	27.17 ± 0.47	18.48 ± 0.73
5	42.18 ± 0.82	36.53 ± 0.72	21.96 ± 0.29	22.19 ± 0.75
8	3.16 ± 0.92	6.48 ± 0.22	4.08 ± 0.52	3.34 ± 0.26
9	4.70 ± 0.28	6.19 ± 0.62	2.66 ± 0.52	2.22 ± 0.67
10	58.72 ± 0.36	58.92 ± 0.26	-	-
TMZ	NT	NT	NT	372.46 ± 0.75
ADM	0.53 ± 0.19	0.69 ± 0.16	0.31 ± 0.05	0.43 ± 0.21

-: 表示半数抑制率 IC₅₀ > 60 μmol/L; NT: 表示不具有检测意义

2.2 化合物9对神经胶质瘤U87-MG细胞增殖的影响 MTT法检测结果显示: 化合物9处理U87-MG细胞24h后, 浓度在2、4、8 μmol/L时, 增殖已经有显著抑制($t = 3.283, P < 0.01$), IC₅₀为(4.37 ± 1.13) μmol/L; 处理U87-MG细胞48h后, 细胞抑制率升高($t = 2.945, P < 0.01$), IC₅₀为(2.22 ± 0.67) μmol/L; 处理U87-MG细胞72h后, 细胞增殖普遍被抑制($t = 3.174, P < 0.01$)。见图2。表明化合物9对神经胶质瘤U87-MG细胞增殖具有显著抑制作用, 并呈现时间-剂量依赖性。因此, 本实验选定2、4、8 μmol/L 3个浓度作为后续实验的给药浓度, 给药时间为24h。

2.3 化合物9对神经胶质瘤U87-MG细胞凋亡率及凋亡相关蛋白表达的影响 采用不同浓度(2、4、8 μmol/L)的化合物9处理U87-MG细胞24h后, 用Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒检测各组细胞凋亡率。检测结果显示: 细胞凋亡率随着化合物9浓度升高而增加, 呈剂量依赖关系。当化合物9浓度达到8 μmol/L时, 细胞凋亡率与对照组的相比显著增加。见图3。提取各组总蛋白, 用Western blot检测技术检测U87-MG细胞凋亡相关因子的表达情况。结果显示, 随着药物浓度增大, 抗凋亡蛋白Bcl-2表达量减少, 促凋亡蛋白Bax的表达上调。见图4。

2.4 化合物9对神经胶质瘤U87-MG细胞相关信号通路蛋白表达的影响 U87-MG细胞分别经2、4、8 μmol/L 3个浓度处理24h后, 采用Western blot技术检测信号通路蛋白(p-mTOR、mTOR、p-Akt和Akt)的表达情况。p-mTOR蛋白和p-Akt蛋白的表达量都随着化合物9浓度增加而减少, 与此同时, mTOR蛋白和Akt蛋白的表达量没有受到化合物9浓度改变的影响, 基本保持不变。见图5。提示化

合物9可能通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路诱导神经胶质瘤U87-MG细胞发生凋亡。

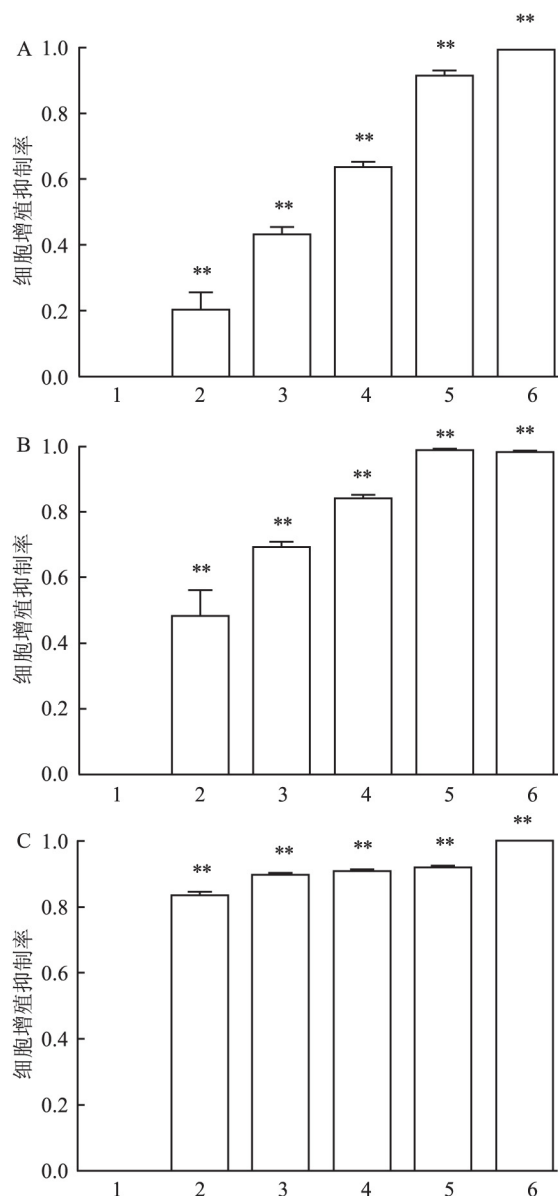


图2 化合物9对神经胶质瘤U87-MG细胞增殖的影响
A: 24 h组; B: 48 h组; C: 72 h组; 1: 对照组; 2: 化合物9组(2 μmol/L); 3: 化合物9组(4 μmol/L); 4: 化合物9组(8 μmol/L); 5: 化合物9组(16 μmol/L); 6: 化合物9组(32 μmol/L); 与对照组比较: ** P < 0.01

3 讨论

脑神经胶质瘤是由大脑胶质细胞癌变所产生的、最常见的原发性颅内肿瘤^[9], 为了克服这一难题, 近年来国内外相继展开了大量关于神经胶质瘤化疗药物的研究。化疗药物结构类型多, 基于基本结构骨架进行结构修饰, 是寻找新型化疗药物的

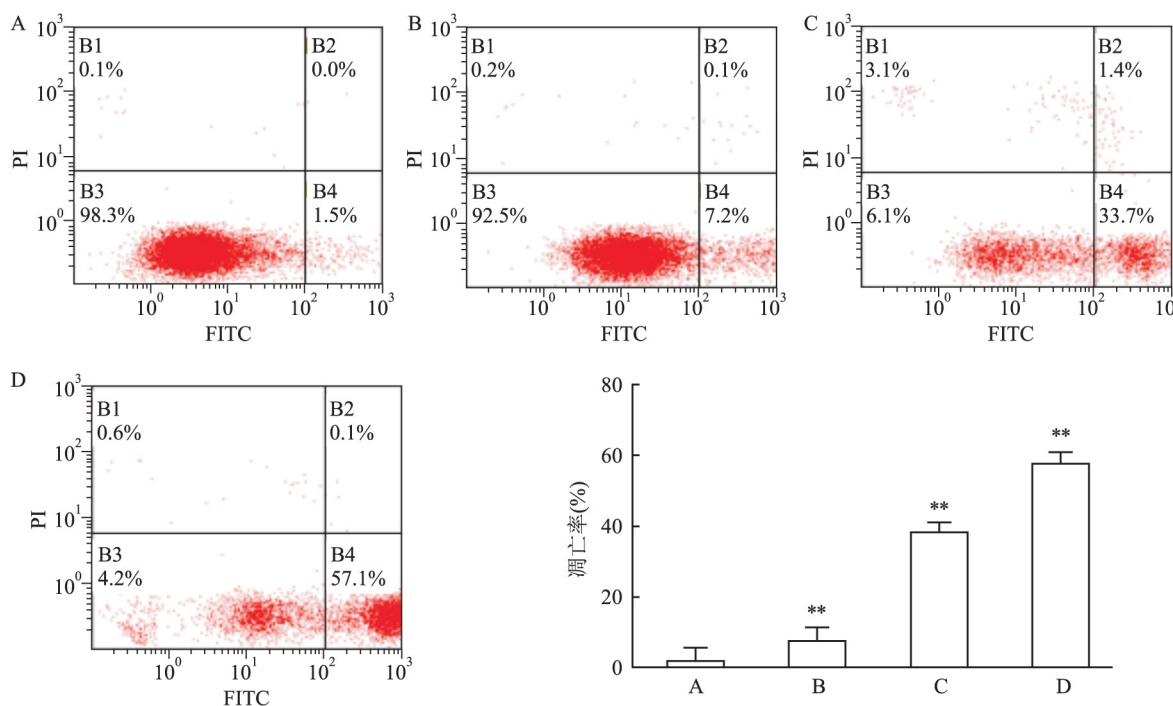


图3 化合物9对神经胶质瘤U87-MG细胞凋亡率的影响

A: 对照组; B: 化合物9组(2 μmol/L); C: 化合物9组(4 μmol/L); D: 化合物9组(8 μmol/L); 与对照组比较: ** P < 0.01

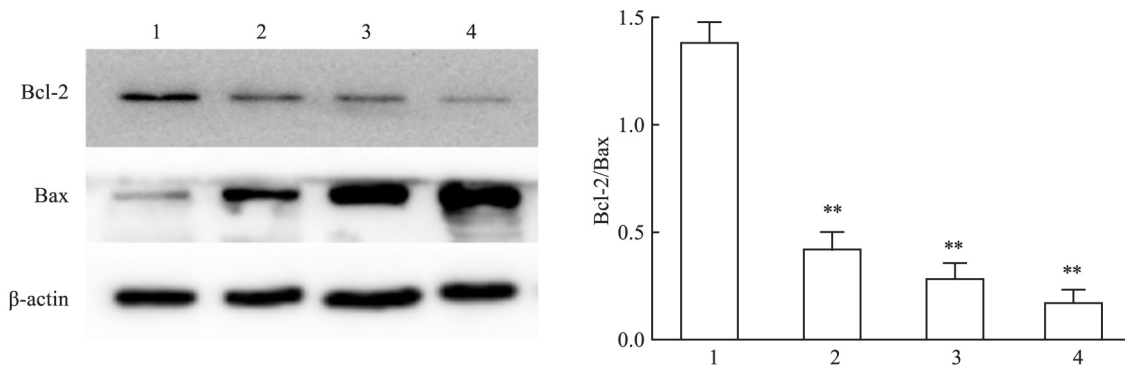


图4 化合物9对神经胶质瘤U87-MG细胞凋亡相关蛋白的影响

1: 对照组; 2: 化合物9组(2 μmol/L); 3: 化合物9组(4 μmol/L); 4: 化合物9组(8 μmol/L); 与对照组比较: ** P < 0.01

常用手段。文献研究表明许多药物是基于吡唑并嘧啶母核结构进行结构改造或者修饰产生的,例如别嘌呤醇^[10]、扎来普隆、茚地普隆^[11]等。吡唑并嘧啶有多个同分异构体,包括吡唑并[1,5-a]嘧啶、吡唑并[5,1-b]嘧啶、吡唑并[4,3-d]嘧啶和吡唑并[3,4-d]嘧啶等,均具有重要且广泛的药理学研究价值。其中,吡唑并[3,4-d]嘧啶衍生物被证实具有明显的抑制肿瘤细胞增殖的作用,可作为抗肿瘤药物骨架被修饰。因此,大量的吡唑并[4,3-d]嘧啶衍生物被合成出来,以评价其抗肿瘤活性并研究其作用机制,然而其在神经胶质瘤上的抗肿瘤研究却很少被报道。本研究选取4种肿瘤细胞株(人肝癌 SMMC-

7721细胞,人胃癌 SGC-7901细胞,人神经胶质瘤 U87-MG细胞和人胃癌 MGC-803细胞),对合成的吡唑并[4,3-d]嘧啶衍生物进行体外抗肿瘤活性筛选。结果表明,化合物9在神经胶质瘤 U87-MG细胞上的抗肿瘤活性最强,有望作为抗神经胶质瘤的先导物展开进一步研究。因此,该研究以神经胶质瘤 U87-MG细胞为研究对象,观察化合物9对该细胞的增殖和凋亡的影响。结果表明,化合物9显著抑制神经胶质瘤 U87-MG细胞增殖,并且促进其凋亡。

在肿瘤细胞内,磷脂酰肌醇3-激酶(PI3Ks)会被激素、生长因子和其他刺激因子激活,活化的PI3K激酶会生成第二信使即三磷酸肌醇

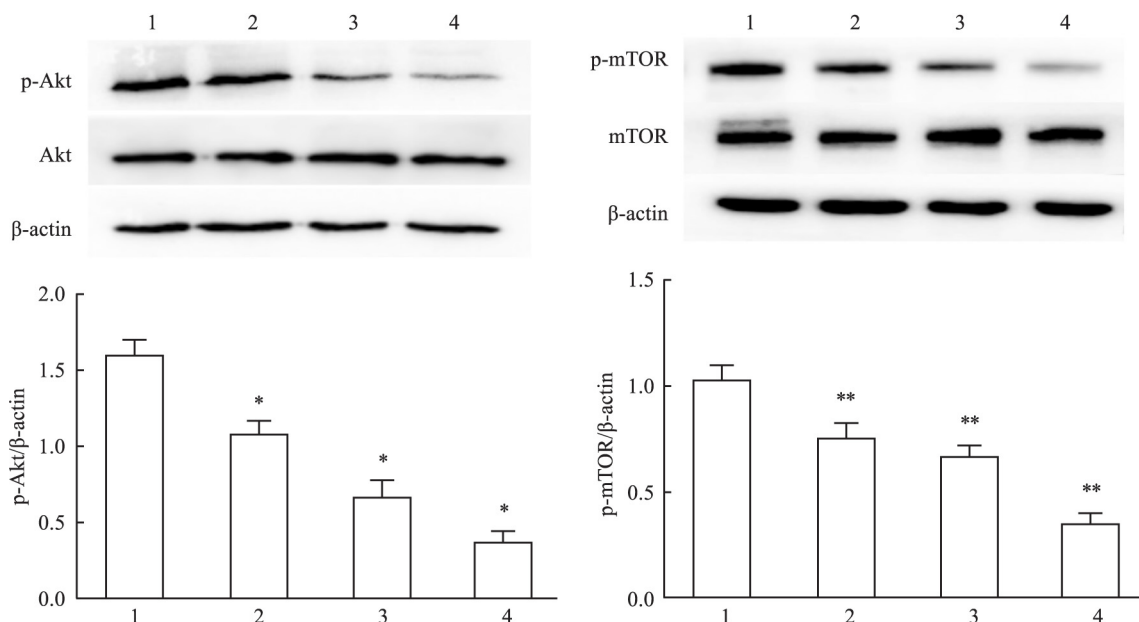


图5 化合物9对神经胶质瘤U87-MG细胞凋亡相关信号通路蛋白的影响

1: 对照组; 2: 化合物9组(2 μ mol/L); 3: 化合物9组(4 μ mol/L); 4: 化合物9组(8 μ mol/L); 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

(3-phosphoinositide, PIP3), 三磷脂酰肌醇作用于下游的信号分子Akt, 导致Akt构象改变, 同时磷酸化Akt蛋白上的Ser124/Thr450和Thr308/Ser473两个位点, 继而使Akt激活, 活化的Akt进一步激活下游信号分子mTOR, 激活的mTOR通过调控两个下游分子核糖体S6蛋白激酶(S6K)和真核生物启动因子4E结合蛋白1(4E-BP1)从而调控肿瘤细胞的增殖和凋亡。据报道^[12], 活化的PI3K/Akt/mTOR信号通路会使细胞产生抗药性从而削弱神经胶质瘤化疗药物TMZ的治疗效果。因此, 抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路是治疗神经胶质瘤极有潜力的研究方向^[13]。本研究显示, 化合物9处理24h后的神经胶质瘤U87-MG细胞中, 在Akt和mTOR总蛋白的表达量基本无变化的前提下, 它们的下游通路蛋白p-Akt和p-mTOR的蛋白含量都减少。化合物9可能是通过抑制PI3K/Akt/mTOR通路促进神经胶质瘤U87-MG细胞凋亡。

综上所述, 化合物9可作为治疗神经胶质瘤的潜在新型先导物。该研究为吡唑并[4,3-d]嘧啶衍生物的抗肿瘤研究提供了一定的实验依据。

参考文献

[1] Jovčevska I, Kočevar N, Komel R. Glioma and glioblastoma – how much do we (not) know? [J]. Mol Clin Oncol, 2013, 1(6): 935–41.
 [2] Stupp R, Brada M, van den Bent M J, et al. High-grade glioma:

ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. Ann Oncol, 2014, 25(Suppl 3): iii93–101.
 [3] Sathornsumetee S, Rich J N, Reardon D A. Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma [J]. Neurol Clin, 2007, 25(4): 1111–39.
 [4] Bozorov K, Zhao J Y, Elmuradov B, et al. Recent developments regarding the use of thieno[2,3-d]pyrimidin-4-one derivatives in medicinal chemistry, with a focus on their synthesis and anticancer properties [J]. Eur J Med Chem, 2015, 102: 552–73.
 [5] Akhtar J, Khan A A, Ali Z, et al. Structure-activity relationship (SAR) study and design strategies of nitrogen-containing heterocyclic moieties for their anticancer activities [J]. Eur J Med Chem, 2017, 125: 143–89.
 [6] Vymětalová L, Havlíček L, Šture A, et al. 5-Substituted 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2H)-pyrazolo[4,3-d]pyrimidines with anti-proliferative activity as potent and selective inhibitors of cyclin-dependent kinases [J]. Eur J Med Chem, 2016, 110: 291–301.
 [7] Liu M, Li C M, Chen Z F, et al. Celecoxib regulates apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt signaling pathway in SGC-7901 gastric cancer cells [J]. Int J Mol Med, 2014, 33(6): 1451–8.
 [8] Burris HA 3rd. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Cancer Chemother Pharmacol 2013, 71(4): 829–42.
 [9] 尹春, 高广忠, 殷荣健. 神经胶质瘤手术治疗68例疗效分析[J]. 中国现代药物应用 2012, 6(22): 29–30.
 [10] Krenitsky T A, Elion G B, Strelitz R A, et al. Ribonucleosides of allopurinol and oxallopurinol. Isolation from human urine, enzymatic synthesis, and characterization [J]. J Biol Chem, 1967, 242(11): 2675–82.
 [11] Hassan A S, Hafez T S, Osman S A. Synthesis, characterization,

- and cytotoxicity of some new 5-aminopyrazole and pyrazolo[4-*β*-d]pyrimidine derivatives [J]. *Sci Pharm*, 2015, 83(1): 27-39.
- [12] Choi E J, Cho B J, Lee D J, et al. Enhanced cytotoxic effect of radiation and temozolomide in malignant glioma cells: targeting PI3K-AKT-mTOR signaling, HSP90 and histone deacetylases [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 17.
- [13] Li X, Wu C, Chen N, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 33440-50.

Study on antitumor screening and mechanism of pyrazolo [4-*β*-d]pyrimidine derivatives

Chen Ran, Wang Baoshi, Liu Mingming, et al

(School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To evaluate the *in vitro* anti-proliferative activity of a series of pyrazolo [4-*β*-d]pyrimidine derivatives, and to study the preliminary antitumor mechanism of compound 9, which exhibits the strongest activities among synthesized compounds in glioma U87-MG cells. **Methods** MTT assay was used to observe the effect of compound 1-10 on the proliferation of four tumor cells (human liver cancer SMMC-7721 cells, human gastric cancer SGC-7901 cells, human gastric cancer MGC-803 cells and human glioma U87-MG cells). Annexin-V/PI double staining was used to detect the cell apoptosis induced by compound 9, and the expressions of apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax and the related pathway proteins p-Akt, Akt, p-mTOR and mTOR were detected by Western blot. **Results** MTT results showed that compounds 4, 5, 8 and 9 had inhibitory effects on the proliferation of four tumor cell lines. Among them, compound 9 had the strongest ability to inhibit the proliferation of glioma U87-MG cells in a time- and dose-dependent manner; Flow cytometry results showed that the apoptosis rate of U87-MG cells increased with the increase of compound 9 concentration, showing a dose-dependent manner. Western blot results showed that as the concentration of compound 9 increased, the expression of Bcl-2 protein was down-regulated and the expression of Bax protein was up-regulated. Meanwhile, the expression of Akt and mTOR protein remained basically unchanged, and the expression of p-Akt and p-mTOR protein was down-regulated. **Conclusion** Pyrazolo [4-*β*-d]pyrimidine derivative 9 significantly inhibits the proliferation of glioma U87-MG cells and induces apoptosis, and its possible mechanism of inducing apoptosis is achieved through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway.

Key words glioblastoma; pyrazolo [4-*β*-d]pyrimidine; Akt; mTOR

(上接第 451 页)

invasion and migration activities of gastric carcinoma cells after the administration of curcumin. The gene transcription and protein expression of Hsp90, JAK2 and STAT3 were determined by RT-qPCR and Western blot. **Results** Curcumin resulted in significant decrease in proliferation of SGC-7901 cells ($P < 0.01$). The invasion and migration of tested cells was also significantly inhibited ($P < 0.01$) by the curcumin treatment. Moreover, the Hsp90 expression, the activation JAK2 and STAT3 were decreased ($P < 0.01$) by the curcumin administration. All tested indexes showed obviously dose-dependent. **Conclusion** Curcumin could significantly reduce the proliferation ability of gastric cancer cell and inhibit its invasion and migration, which might be related to its inhibition of the activation of Hsp90-JAK/STAT3 signaling pathway. Curcumin may play an important role in the treatment of gastric cancer.

Key words curcumin; gastric carcinoma cells; proliferation; invasion and migration; Hsp90-JAK/STAT3