

一种新型多环螺环氧化吲哚类化合物对肺癌细胞系的生长抑制作用及其机制

周巧巧^{1,2}, 张彬^{1,2}, 匡政坤^{1,2}, 周诗毅^{1,2}, 谭芬^{1,2*} (1.湖北第二师范学院化学与生命科学学院, 武汉 430205; 2.湖北第二师范学院化学与生命科学学院植物抗癌活性物质提纯与应用湖北省重点实验室, 武汉 430205)

摘要: **目的** 探究一种新型多环螺环氧化吲哚化合物对肺细胞系生长抑制的作用与机制。**方法** 首先通过 MTT 试验、流式细胞技术与细胞划痕试验检测化合物对肺癌细胞系的增殖、细胞凋亡以及细胞迁移的影响。接着通过 PharmMapper 平台预测其靶标蛋白, 通过 GEPIA 平台预测与该靶蛋白具有较强相关性的蛋白, 最后分别通过双荧光素酶报告基因试验, qPCR 试验以及免疫印迹试验, 在启动子水平、转录水平和表达水平检测化合物对目的基因的影响。**结果** 实验结果表明化合物能够显著抑制 SKLU1 细胞系的增殖, IC_{50} 值为 $11.38 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 化合物浓度 $>2.85 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 即能够抑制 SKLU1 的细胞迁移, 浓度 $>5.69 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能够诱导细胞凋亡。其分子机理可能是通过靶向 RhoGEF7 蛋白, 下调下游的 Rac1 蛋白表达量, 从而下调 E-cadherin 蛋白表达量, 抑制细胞迁移; 并且, 下调的 Rac1 蛋白还能抑制 NF- κ B 的激活, 下调下游基因 *IL-6* 和 *IL-8* 的转录; 下调的 Rac1 蛋白还能抑制 IL-6/JAK/STAT3 通路。**结论** 本研究为这种新型多环螺环氧化吲哚化合物靶向肺癌细胞的分子机制提供理论依据。

关键词: 多环螺环氧化吲哚; SKLU1; RhoGEF7; IL-6/JAK/STAT3; NF- κ B 激活

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)12-1720-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221919

引用本文: 周巧巧, 张彬, 匡政坤, 等. 一种新型多环螺环氧化吲哚类化合物对肺癌细胞系的生长抑制作用及其机制[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(12): 1720-1727.

Inhibitory Effect and Mechanism of a Novel Polycyclic Spiro-epoxy Indole Compound on Lung Cell Lines Proliferation

ZHOU Qiaoqiao^{1,2}, ZHANG Bin^{1,2}, KUANG Zhengkun^{1,2}, ZHOU Shiyi^{1,2}, TAN Fen^{1,2*} (1.School of Chemistry and Life Sciences, Hubei University of Education, Wuhan 430205, China; 2.Hubei Key Laboratory of Purification and Application of Plant Anti-cancer Active Ingredients, School of Chemistry and Life Sciences, Hubei University of Education, Wuhan 430205, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect and mechanism of a novel polycyclic spiro-epoxy indole compound on suppression of lung cell lines proliferation. **METHODS** The compound's effect on cellular proliferation, apoptosis, and cellular migration was determined using the MTT assays, flow cytometry, and cell scratch test. The target proteins of this compound were then predicted using the PharmMapper platform, while the associated proteins in lung adenocarcinoma were predicted using the GEPIA platform. In order to determine the effect of this compound on the target gene at the promoter level, transcription level, and expression level, reporter gene assay, qPCR assay and Western blotting test were also performed. **RESULTS** The results showed that this compound inhibited the proliferation of SKLU1 cell line with an IC_{50} value of $11.38 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, inhibited the cell migration of SKLU1 above the concentration of $2.85 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and induced the apoptosis above the concentration of $5.69 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Additionally, this compound might target the RhoGEF7 and inhibit the cellular migration by down-regulating the expression of Rac1 protein and E-cadherin protein. Then the down-regulated Rac1 protein suppressed the activation of NF- κ B, which reduced the transcription of downstream genes *IL-6* and *IL-8*. Moreover, the IL-6/JAK/STAT3 pathway was inhibited when Rac1 protein was down-regulated. **CONCLUSION** This study provides theoretical basis for the molecular mechanism of targeting lung cancer cells with this novel polycyclic spiro epoxidized indole compound.

KEYWORDS: polycyclic spiro-epoxy indole; SKLU1; RhoGEF7; IL-6/JAK/STAT3; NF- κ B activation

肺癌是全球范围内发病率和死亡率第一的恶性肿瘤, 2000 年第 1 代表皮生长因子受体-酪氨酸

激酶抑制剂吉非替尼获批, 从此开启了肺癌靶向治疗的新阶段^[1]。尽管有 60% 的肺癌患者得到缓

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2022CFB413); 湖北省教育厅科研计划项目(Q20233004)

作者简介: 周巧巧, 女, 博士, 讲师 E-mail: Zhouqq83@163.com *通信作者: 谭芬, 女, 博士, 副教授 E-mail: tanfen@hue.edu.cn

解,但是高复发性和耐药性问题依然严峻,肺癌的5年生存率仅为20%,因此新型肺癌靶向药物亟待开发^[2]。

Rho鸟嘌呤核苷酸交换因子7(Rho guanine nucleotide exchange factor, RhoGEF7)通过调节肌动蛋白影响细胞骨架的重塑,肿瘤细胞转移也是导致患者预后不良的重要原因^[3]。RhoGEF7在细胞迁移、附着和细胞扩散中发挥作用,它的编码基因是*ARHGEF7*^[4]。RhoGEF7能够通过调控下游的小GTP酶Rac1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)的表达,影响Rac1与效应因子的相互作用,进而调控多种信号通路,影响细胞的迁移、增殖、存活等过程^[5]。首先,Rac1能通过调控蛋白E-cadherin的表达,调控肿瘤细胞发生上皮-间充质转变,进而影响肿瘤细胞的侵袭性^[6]。其次,Rac1也可以通过直接或间接影响转录因子STAT3的激活,从而影响肿瘤进程。例如部分肿瘤患者体内Rac1可能通过增加IL-6水平,使得IL-6/JAK/STAT3通路过度激活,启动Cyclin D1, Bcl-2等细胞周期与细胞凋亡相关蛋白表达,从而促进肿瘤细胞增殖,这种情况下患者往往预后不良^[7]。另外,Rac1还可以影响NF- κ B的激活,I κ B α 是NF- κ B信号通路的下游蛋白,I κ B α 磷酸化后被降解,释放出NF- κ B转录因子,进入细胞核,启动下游基因表达。因此I κ B α 的磷酸化水平,即p-I κ B α 的表达量常常作为NF- κ B激活的检测指标^[8]。在没有炎症诱导情况下,细胞中的I κ B α 往往不会发生磷酸化,然而当人体处于病理状态下,细胞的NF- κ B往往会异常激活^[9]。

吡啶类化合物属于含氮杂环家族,被广泛用于生产各种医药制剂,其中多环吡啶具有显著的生理、药理活性,因此被认为是新型药物先导分子的“优势结构”^[10]。默克公司在1963推出的吡啶美辛就是一类重要的抗炎药,同时也可以抑制多形核白细胞的运动,并且可在肝细胞线粒体中抑制氧化磷酸化,发挥解偶联剂的作用^[11]。2005年首次发现螺环吡啶类化合物能抑制p53的E3泛素化酶MDM2,此后相继发现螺环吡啶类化合物能抑制乳腺癌细胞的增殖^[12]。尽管研究显示螺环吡啶类具有抗炎、抗肿瘤活性,但是不良反应大这一缺点限制了其用作药物研发的可能性,因此特异性强的新型多环螺环吡啶类化合物的合成与药理活性亟待研究,作为抗肿瘤、抗炎类药物的候选化合物^[10]。本研究通过前期筛查发现一种新

型多环螺环吡啶类化合物具有抑制肺癌细胞系增殖的效应,其分子式为C₂₃H₁₇N₃O₄S,英文全称3S,3aS,11aS)-1'-methyl-11a-nitro-1-thioxo-1,2,3a,11a-tetrahydro-11H-spiro[benzo[7,8]chromeno[3,4-c]pyrrole-3,3'-indolin]-2'-one,简称3ka,化学结构式见图1,其合成流程参见文献^[13]。随后本研究通过一系列分子生物学与生物信息学方法,进一步探究其抑制肺癌细胞增殖的机制。

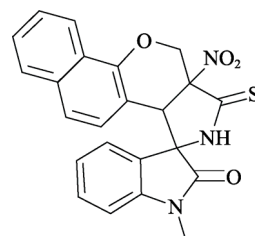


图1 新型多环螺环吡啶类化合物化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of the novel polycyclic spiro-epoxy indole

1 材料与方法

1.1 仪器

NovoCyt流式细胞仪系统(美国Agilent);化学发光凝胶成像系统(Chemidoc XRS+,美国Biorad);双荧光素酶报告基因试验所用发光检测仪(GloMax[®] 20/20 Luminometer,美国Promega);CFX384 Touch实时定量荧光PCR仪、免疫印迹试验用电泳槽、转膜用电源及转膜槽购自Bio-rad公司。

1.2 材料与试剂

新型多环螺环吡啶类化合物为笔者所在课题组自行制备;MRC5、A549、NCI-H460与SKLU1细胞购自武汉大学细胞保藏中心;JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、IKK α / β 、p-IKK α / β 、I κ B α 、p-I κ B α 、E-cadherin抗体均购自美国Cell Signal Technology公司,货号分别为3230、3771、9139、9145、8943、2697、4812、2859、3195;GAPDH、RhoGEF7、Rac1抗体均购自英国Abcam公司,货号分别为ab8245、ab236103、ab155938;双荧光素酶报告基因试剂盒(Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System,美国Promega公司,货号:E1910);qPCR相关RNA提取、逆转录与检测等相关试剂购于南京诺唯赞生物技术有限公司,货号分别为R701-01, RL201-01, Q441-02;RPMI-1640培养基、DMEM培养基、0.25%胰酶、青霉素链霉素溶液、胎牛血清均购于美国HyClone公司,货号分别为SH30255.02, SH30285.01, SV30010, SV30208.03;

一次性细胞培养皿、培养瓶、一次性移液管等细胞培养一次性耗材均购于美国 NEST 公司, 货号分别为 704001, 707001, 703001; 免疫印迹实验相关化学试剂: RIPA 裂解液(强)(货号: P0013B)、蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(货号: ST505)、彩色预染蛋白分子量标准(15~120 kDa)(货号: P0078)、超敏 ECL 化学发光试剂盒(货号: P0018S)、细胞凋亡检测双染法试剂盒(货号: C1062M)均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 MTT 检测 将对数生长期的 MRC5、SKLU1、NCI-H460 与 A549 细胞系, 以 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 体积为每孔 100 μL , 置于 37°C CO_2 培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁良好以后分别加入不同浓度的 3ka 溶液, 使其终浓度分别为 0, 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 继续培养 24 h, 根据检测得到的 570 nm 光吸收值结果计算细胞的存活率: $\text{存活率}(\%) = A_{\text{实验组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$, 通过 GraphPad 统计软件拟合出该化合物对各种细胞的半数抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC_{50})。

1.3.2 流式细胞检测 将 SKLU1 细胞以 2×10^6 个接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后分别加入不同浓度的 3ka 溶液, 使其终浓度分别为 0, 2.85, 5.69, 11.38 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过 Annexin V-FITC 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)对细胞进行染色, 利用流式细胞仪检测处于不同状态的细胞所占的比例。

1.3.3 生物信息学分析 PharmMap(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)是基于药效团匹配的靶标预测平台, 输入化合物的药效团与数据库中的药效团模型进行匹配来进行靶标预测。PharmMapper 的数据主要来自 TargetBank、DrugBank、BindingDB 和 PDTD 数据库。本研究中将该化合物 3ka 的结构文件上传, 靶标范围设置为 “Pharmacophore Models whose $\text{pKd} \geq 6.0$ ”, 其余参数保持默认设置。PharmMapper 预测结果按照 Normalized Fit Score 进行排序, 给出了靶标名称、PDB ID 和药效团匹配情况等信息, 而 Normalized Fit Score 评分 > 0.9 的靶标成为潜在靶标的可能性较大。PharmMapper 是通过化合物的药效基团来进行匹配, 只要蛋白活性位点可以和化合物具有的药效基团匹配度较高, 就有可能被预测为化合物的潜在靶标。

临床肿瘤样本中的基因分析数据来源于 GEPIA, 该平台包括来自 TCGA 和 GTEx 数据库的 9 736 个肿瘤组织和 8 587 个正常组织。临床样本的分析包括 2 个不同基因在某一肿瘤中的表达情况相关性分析。

1.3.4 细胞划痕试验 细胞划痕试验用于检测 3ka 对细胞迁移的影响。将 SKLU1 细胞以 4×10^5 个接种于 6 孔板中, 置于 37°C CO_2 培养箱中 24 h, 待细胞贴壁后进行划线, 加入不同浓度的 3ka 溶液, 使其终浓度分别为 0, 2.85 和 5.69 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养 24 h 与 48 h 后通过显微镜进行检测, 每个浓度随机选取不同视野拍照 4 次, 用 Image J 软件对划痕宽度进行统计分析。S 代表划痕面积, 计算细胞迁移率: $\text{细胞迁移率}(\%) = (S_0 - S_t) / S_0 \times 100\%$ 。

1.3.5 免疫印迹检测 将 SKLU1 细胞以 2×10^6 个接种到 6 孔板中, 待细胞贴壁后加入 0, 2.85, 5.69, 11.38 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3ka 溶液, 将细胞培养 24 h, 收集并处理细胞, 提取蛋白, 进行蛋白定量, 通过免疫印迹法检测相应蛋白, 以及内参蛋白 GAPDH 表达情况。

1.3.6 双荧光素酶报告基因检测 在 48 孔板中接种 5×10^2 个 293T 细胞, 待细胞贴壁后, 将连接着 NF- κB 启动子的萤火虫荧光素酶报告基因质粒, 以海肾荧光素酶报告基因为内参, 通过磷酸钙转法转到 293T 细胞中, 12 h 后加入 0, 2.85, 5.69, 11.38 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3ka 溶液, 以及炎症刺激因子 TNF- α 激活 NF- κB 信号通路, 12 h 后吸弃培养基, 后续操作步骤按试剂说明书进行。

1.3.7 实时荧光定量 PCR 使用 RNA 提取试剂从细胞中分离总 RNA, 通过两步法将 mRNA 逆转录为 cDNA, 通过特异性引物对目的基因进行扩增。本实验采用 M-MLV 逆转录酶将 RNA 反转录成 cDNA, 操作步骤参考 M-MLV 逆转录定量 PCR。后期数据分析以 GAPDH 为内参, 实时荧光定量 PCR 试验中所使用的引物见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 试验的引物序列
Tab. 1 Primer sequence of RT-qPCR test

基因	引物
IL-8	5'-GAGAGTGATTGAGAGTGACCAC-3'
	5'-CACAACCCCTGACCCAGTTT-3'
IL-6	5'-GGCCCTTGCTTTCTCTTCG-3'
	5'-ATAATAAAGTTTGTATTATGT-3'
GAPDH	5'-GAGTCAACGGATTGGTCGT-3'
	5'-GACAAGCTTCCGTTCTCAG-3'

1.3.8 统计分析 利用 Excel 与 GraphPad 软件进行统计分析与作图, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 细胞迁移实验通过 Image J 软件进行统计分析, 单尾 ANOVA 检验用于分析实验数据的差异, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3ka 对 SKLU1 细胞具有显著生长抑制作用

3ka 对肺正常细胞系 MRC5 与 3 种不同肺癌细胞系均显示出生长抑制效应, 通过 GraphPad 软件拟合出各自的 IC_{50} 值。结果显示, $IC_{50}(MRC5) = 43.44 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $IC_{50}(SKLU1) = 11.38 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $IC_{50}(NCL-H460) = 35.22 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $IC_{50}(A549) = 38.54 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。MTT 试验结果显示 3ka 对 SKLU1 细胞的生长抑制效应最显著。结果见图 2。

2.2 3ka 促进细胞凋亡

为了进一步探究化合物 3ka 抑制细胞增殖的细胞学机制, 本研究通过流式细胞试验检测化合物对 SKLU1 细胞凋亡的影响。检测的数据图像分为 4 个象限, 第 1 象限(左上角)为坏死的细胞, 第 2 象限(右上角)为晚期凋亡细胞, 第 3 象限(左下角)为正常存活的细胞, 第 4 象限(右下角)为早期凋亡细胞, 结果见图 3A。浓度为 0, 2.85, 5.69, $11.38 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的化合物 3ka 处理后的正常存活的细胞比率不断下降, 分别为 $(96.49 \pm 2.40)\%$, $(90.62 \pm 6.78)\%$, $(72.91 \pm 5.11)\%$ 和 $(63.62 \pm 0.10)\%$;

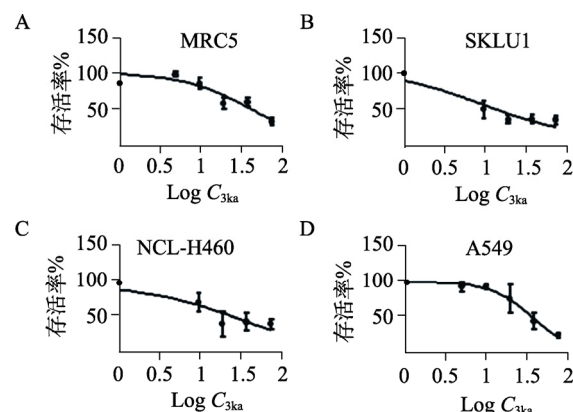


图 2 化合物 3ka 对 4 种肺细胞系的生长抑制效应 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A—不同浓度化合物作用下 MRC5 细胞的存活率; B—不同浓度化合物作用下 SKLU1 细胞的存活率; C—不同浓度化合物作用下 NCL-H460 细胞的存活率; D—不同浓度化合物作用下 A549 细胞的存活率。

Fig. 2 Growth-inhibitory effects of the compound 3ka on four lung cell lines ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A—survival rate of MRC5 cells under different concentrations of the compound; B—survival rate of SKLU1 cells under different concentrations of the compound; C—survival rate of NCL-H460 cells under different concentrations of the compound; D—survival rate of A549 cells under different concentrations of the compound.

而晚期凋亡细胞的比率不断增加, 分别为 $(1.59 \pm 1.13)\%$, $(5.47 \pm 4.15)\%$, $(18.09 \pm 4.09)\%$ 和 $(24.47 \pm 2.65)\%$ 。4 种不同浓度 3ka 作用下不同状态细胞百分比统计见图 3B, 实验结果表明化合物能够显著诱导 SKLU1 细胞凋亡, 并且随着化合物浓度的增加, 促进细胞凋亡效应越显著, 即存在剂量依赖效应。

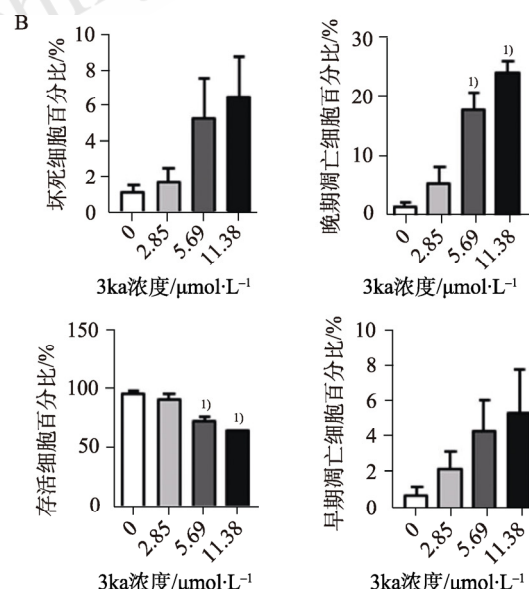
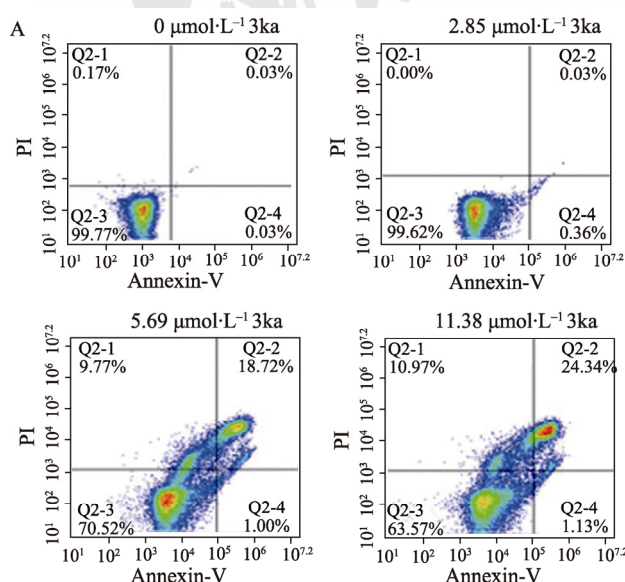


图 3 化合物 3ka 诱导 SKLU1 细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A—0, 2.85, 5.69, $11.38 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 化合物作用 24 h 后不同状态细胞百分比; B—流式细胞检测的数据分析。与对照组 ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3ka) 比较, $^{1)}P < 0.01$ 。

Fig. 3 Compound 3ka induced apoptosis in SKLU1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A—percentage of different cells after incubated with the compound at the concentrations of 0, 2.85, 5.69 and $11.38 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h; B—data analysis of the flow cytometry assays. Compared with control group ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3ka), $^{1)}P < 0.01$.

2.3 3ka 可能靶向 RhoGEF7

根据生物信息学分析, Normalized Fit Score 评分排名前 10 的蛋白见表 2, 其中人源性的蛋白只有排名第 7 的 RhoGEF7, 其编码基因为 *ARHGEF7*, 见图 4。从 PharmMapper 给出的此螺环吡啶类化合物与预测靶标匹配的药效团示意图可以看出, 化合物与预测出的靶标都是匹配了 3 个疏水基团。人源性 RhoGEF 蛋白家族有 70 个成员, 它们的表达失调和激活往往引起 Rho 的异常激活。而 *ARHGEF7* 又通过影响细胞骨架的重塑, 影响肿瘤细胞迁移和侵袭。

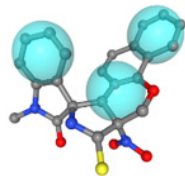


图 4 3ka 与靶标匹配的药效基团

Fig. 4 Pharmacophore to which the 3ka matched the target

表 2 分子对接分析结果

Tab. 2 Analysis of the molecular docking

排名	PDB ID	靶标蛋白	物种	化合物	分子对接得分*/kcal·mol ⁻¹
1	6x10	N-乙酰基转移酶	结核分枝杆菌	3ka	-8.1
2	4DJK	谷氨酸-γ-氨基丁酸反向转运蛋白	大肠杆菌 K-12	3ka	-7.7
3	2YXR	蛋白质前体转位酶亚基 secY	詹氏甲烷球菌	3ka	-10.1
4	2NQ2	可能的 ABC 转运器渗透酶蛋白 HI1471	流感嗜血杆菌	3ka	-8.1
5	1O96	电子转移黄素蛋白亚基 beta	甲基嗜酸乳杆菌	3ka	-8
6	2A7S	可能的丙酰辅酶 A 羧化酶 β 链 5	结核分枝杆菌	3ka	-8.1
7	1by1	Rho 鸟嘌呤核苷酸交换因子 7	智人	3ka	-7.5
8	1IGW	异柠檬酸裂解酶	大肠杆菌	3ka	-8.4
9	1E0Y	香草醇氧化酶	青霉菌	3ka	-11.8
10	3F5C	核受体亚家族 5 组 A 成员 2	小鼠	3ka	-11.3

注: *分子对接打分的分数代表分子对接预测的化合物与蛋白质口袋之间的结合自由能分数, 该值为负数, 绝对值越大, 结合能力越好。

Note: *Vina score represented the binding free energy score between the compound and protein pocket predicted by molecular docking. The value was a negative number. The larger the absolute value, the better the binding ability.

2.4 3ka 抑制 SKLU1 细胞迁移

为了进一步探究 SKLU1 细胞对 3ka 敏感的机制, 通过划痕试验检测其对 SKLU1 细胞迁移的影响。实验组中加入了不同浓度的 3ka, 培养 24 h 与 48 h 后通过显微镜拍照与图像分析, 结果见图

5A, 细胞迁移率统计分析见图 5B, 表明化合物对 SKLU1 细胞迁移的影响效果显著。在 3ka 浓度为 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, SKLU1 细胞在 24 h 与 48 h 后划痕宽度减小十分明显, 细胞迁移率分别为 $(49.82\pm 9.12)\%$ 和 $(74.80\pm 6.54)\%$; 2.85 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3ka 作用下细胞在 24 h 后划痕宽度略有减小, 48 h 后划痕宽度减小明显, 细胞迁移率分别为 $(42.20\pm 9.62)\%$ 和 $(57.56\pm 3.78)\%$; 5.69 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3ka 作用下细胞划痕宽度变化不明显, 24 h 和 48 h 细胞迁移率分别为 $(24.27\pm 6.00)\%$ 和 $(36.59\pm 11.9)\%$ 。实验结果表明随着化合物 3ka 浓度的增加, 其对 SKLU1 细胞迁移的抑制效应越显著, 且存在剂量依赖效应。通过免疫印迹检测发现, 相较于对照组 (0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3ka), 细胞与 2.85 和 5.69 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 3ka 共孵育 24 h 后, 细胞迁移相关蛋白 E-cadherin 表达量下调, 结果见图 5C。

2.5 3ka 抑制 JAK/STAT3 和 TNF- α 诱导的 NF- κ B 激活

进一步通过 GEPIA 数据库相关性分析发现, ARHGEF7 与 JAK2、STAT3 均存在正相关, 见图 6A~B。ARHGEF7 与 STAT3 的相关性分析 *R* 值为 0.62, ARHGEF7 与 JAK2 的相关性分析 *R* 值为 0.70。这表明 ARHGEF7 与 JAK/STAT3 通路可能受到共同的因素调节。为了检测化合物对 JAK/STAT3 通路的影响, 本研究将 0, 2.85, 5.69, 11.38 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 3ka 与 SKLU1 细胞共孵育 24 h 后收集蛋白, 通过免疫印迹试验发现, 化合物 3ka 不影响 JAK2 与 STAT3 蛋白表达量, 但是 5.69 与 11.38 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 3ka 能显著抑制 JAK2 和 STAT3 的蛋白磷酸化, 即抑制 JAK/STAT3 通路的激活, 结果见图 6C。

由于 IL-6/JAK/STAT3 通路与 NF- κ B 通路存在交叉, NF- κ B 激活后能促进炎症因子 IL-6 的转录, 而 IL-6 又能激活 JAK/STAT3 通路, 因此, 本研究进一步探索化合物 3ka 是否影响 TNF- α 诱导的 NF- κ B 的激活。首先, 在启动子水平, 通过双荧光素酶报告基因试验表明, 0, 2.85, 5.69 和 11.38 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 3ka 在 TNF- α 诱导下的启动子激活水平分别为 10.09 ± 1.07 , 6.78 ± 0.18 , 5.30 ± 0.01 和 4.44 ± 0.06 , 结果见图 6D。其次, 在转录水平, 通过 qPCR 试验表明与 0, 2.85, 5.69 和 11.38 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 3ka 共同孵育 24 h 后, TNF- α 诱导基因 *IL-6* 转录水平分别为 54.05 ± 7.08 ,

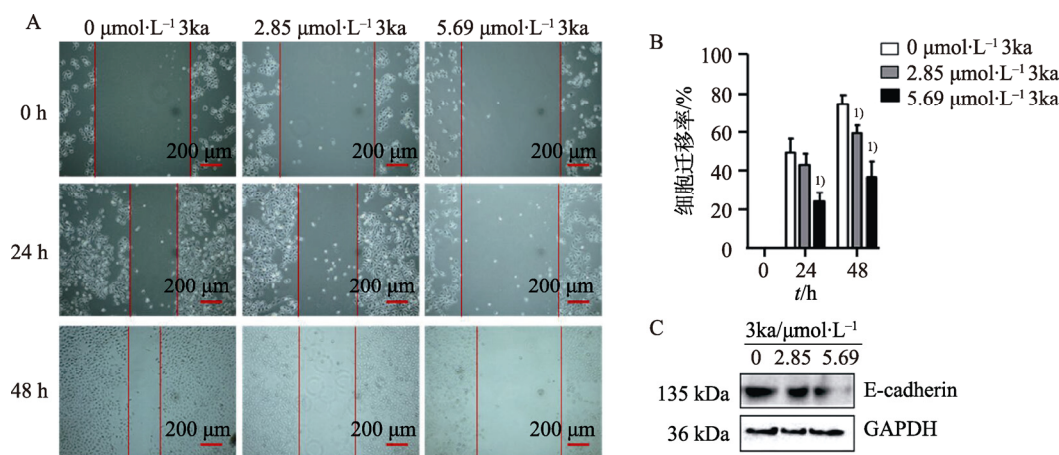


图5 化合物 3ka 抑制 SKLU1 的细胞迁移($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A-0, 2.85, 5.69 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物作用于 SKLU1 细胞 0 h, 24 h 与 48 h 的划痕图片; B-0 h, 24 h 与 48 h 化合物对 SKLU1 细胞的迁移抑制率; C-3ka 抑制 E-cadherin 表达。与对照组(0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3ka)比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 5 Compound 3ka inhibited cellular migration of SKLU1($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A-scratch pictures of SKLU1 cells after incubated with the compound at the concentrations of 0, 2.85, 5.69 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 0, 24 and 48 h; B-migration inhibition rate of the compound on SKLU1 cells at 0, 24 and 48 h; C-3ka inhibited the expression of E-cadherin. Compared with control group (0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3ka), ¹⁾ $P<0.05$.

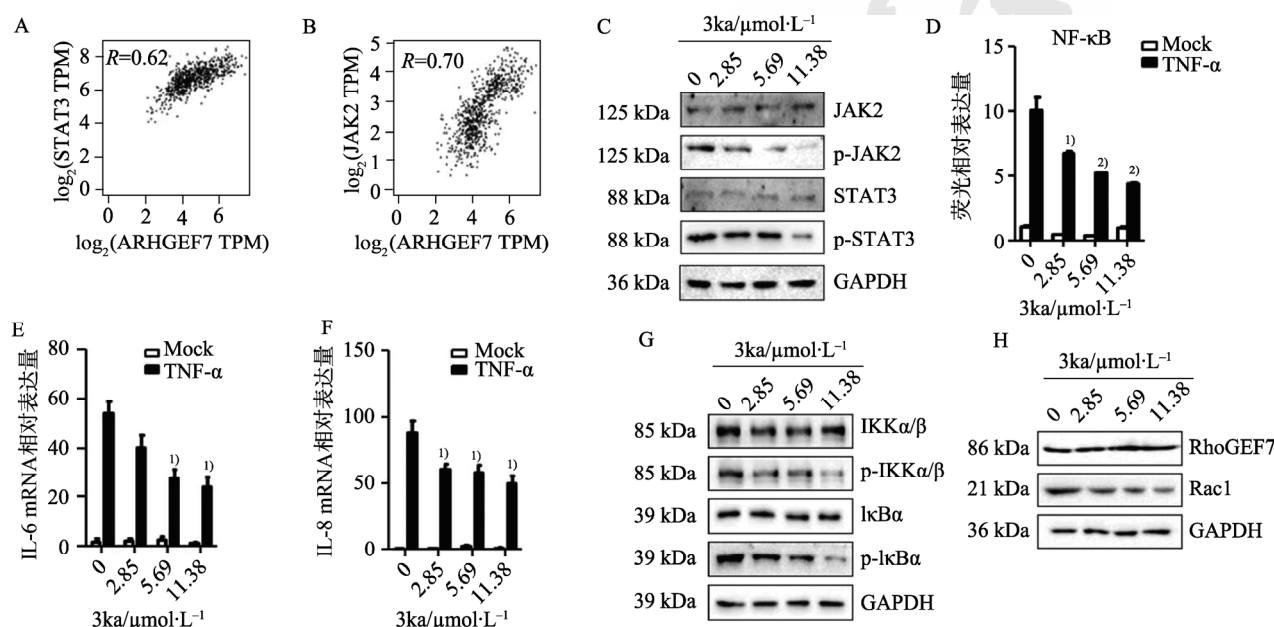


图6 化合物 3ka 抑制 JAK/STAT3 和 TNF- α 诱导的 NF- κ B 激活($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A-ARHGEF7 与 STAT3 存在正相关性, R 值为 0.62; B-ARHGEF7 与 JAK2 存在正相关性, R 值为 0.70; C-化合物抑制 JAK2 和 STAT3 的蛋白磷酸化; D-双荧光素酶报告基因试验检测化合物抑制 TNF- α 诱导的 NF- κ B 激活; E-化合物抑制 TNF- α 诱导的 NF- κ B 下游基因 *IL-6* 转录; F-化合物抑制 TNF- α 诱导的 NF- κ B 下游基因 *IL-8* 的转录; G-化合物下调 TNF- α 诱导的 IKK α / β 与 I κ B α 的蛋白磷酸化; H-化合物下调 Rac1。与对照组(0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3ka)比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Compound 3ka inhibited the TNF- α -induced NF- κ B activation($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A-correlation analysis between ARHGEF and STAT3, the R value was 0.62; B-correlation analysis between ARHGEF and JAK2, the R value was 0.70; C-compound inhibited phosphorylation of JAK2 and STAT3; D-compound inhibited the TNF- α -induced NF- κ B activation through dual-luciferase reporter gene assays; E-compound inhibited TNF- α -induced transcription of NF- κ B downstream gene *IL-6*; F-compound inhibited TNF- α -induced transcription of NF- κ B downstream gene *IL-8*; G-compound down-regulated TNF- α -induced phosphorylation of IKK α / β and I κ B α ; H-compound down-regulated Rac1. Compared with control group(0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3ka), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

40.12 $\pm$ 6.89, 27.53 $\pm$ 5.17 和 24.18 $\pm$ 5.73, 诱导基因 *IL-8* 转录水平分别为 90.57 $\pm$ 9.70, 65.86 $\pm$ 7.11, 57.89 $\pm$ 8.10 和 49.65 $\pm$ 8.24, 这表明该化合物能抑制 TNF- α 诱导的 NF- κ B 下游基因 *IL-6* 和 *IL-8* 的转录,

结果见图 6E 和 6F。最后, 在蛋白水平, 该化合物能下调 TNF- α 诱导的 IKK α / β 与 I κ B α 的磷酸化水平, 且具有剂量依赖效应, 结果见图 6G。为了探究 3ka 是否通过预测的靶蛋白发挥效应, 随后通过

免疫印迹试验进行检测, 结果发现与对照组相比, 2.85, 5.69 和 11.38 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物 3ka 虽然不影响 RhoGEF7 表达水平, 但是能够抑制下游 Rac1 蛋白表达量, 结果见图 6H。

3 讨论

本研究发现一种新型螺环吡啶化合物 3ka 能显著地抑制肺癌细胞系 SKLU1 的生长。在细胞水平, 3ka 浓度 $>2.85 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 即能够抑制 SKLU1 的细胞迁移, 并且 3ka 浓度 $>5.69 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能够诱导肿瘤细胞的细胞凋亡。在分子水平, 该化合物可能通过靶向 RhoGEF7 蛋白, 影响它对下游 Rac1 的调控, 进而下调 Rac1 的表达量, 结果抑制 E-cadherin 表达量, 以及 IL-6/JAK/STAT3 与 TNF- α 诱导的 NF- κ B 激活, 抑制炎症信号通路的激活与扩大, 从而诱导细胞凋亡, 抑制细胞增殖与迁移^[14]。以往对螺环吡啶类化合物的抑肿瘤机制大多聚焦于影响 MDM2 与 p53 的相互作用, 例如 Zhang 等^[15]发现一种多环螺环吡啶衍生物能显著性增加剪切的 caspase-3, p53 和 MDM2 的蛋白质水平。并且分子对接结果显示, 这种化合物可以与 MDM2 上的 p53 结合位点结合, 表明它可能通过阻断 MDM2-p53 相互作用而抑制肿瘤细胞增殖^[15]。另外 Saxena 等^[16]发现一种螺环吡啶衍生物通过在乳腺癌细胞中增加野生型 p53 的表达, 抑制 MDM2 和 p53 的相互作用, 使得促进凋亡的蛋白高表达, 诱导细胞凋亡, 抑制乳腺癌细胞生长。本研究发现螺环吡啶类化合物的抗肿瘤新机制, 即可能通过靶向 RhoGEF7 蛋白, 抑制小 GTP 酶 Rac1 的表达量, 进而干扰 Rac1 对效应分子的调控, 造成 E-cadherin 表达量下调, 影响了细胞骨架的运动, 抑制细胞迁移^[5]。另外, Rac1 的表达量下调还抑制了其调控的 STAT3 激活, 以及 TNF- α 诱导的 NF- κ B 激活, 结果下调 IL-6 等炎症因子转录表达, 而这些炎症因子又能调控其他信号通路的激活, 例如 IL-6/JAK/STAT3 通路, 形成正反馈效应, 从而扩大化合物 3ka 的影响^[17-18]。由于 IL-6/JAK/STAT3 与 NF- κ B 激活影响着肿瘤与炎症的发生发展, 因此本研究中的化合物 3ka 可能具有抗肿瘤及抗炎的潜在效应。在一些肿瘤中, 慢性炎症是促进肿瘤发展的一个重要因素, 即慢性炎症患者中肿瘤的发病率显著增加, 其分子机理可能是炎症细胞产生的促炎细胞因子, 直接或间接促进肿瘤细胞的生长^[19]。De 等^[20]也发现肿瘤浸润性白细胞的培养液通过其中的 IL-6 与

TNF- α 等细胞因子, 促进 STAT3 与 NF- κ B 激活, 进而促进结直肠癌细胞生长, 相应的靶向 JAK/STAT3 与 NF- κ B 通路的药物 BP-1-102 能抑制这 2 个通路的激活, 进而在动物水平抑制结直肠癌的进展。炎症是肿瘤的特征之一, 炎症转化也是目前国际研究的前沿领域^[21-22]。因此本研究在分子水平、细胞水平为研究新型靶向肺癌药物提供理论依据。

REFERENCES

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021[J]. CA A Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33.
- [2] THAI A A, SOLOMON B J, SEQUIST L V, et al. Lung cancer[J]. Lancet, 2021, 398(10299): 535-554.
- [3] LEI X, DENG L, LIU D N, et al. ARHGEF7 promotes metastasis of colorectal adenocarcinoma by regulating the motility of cancer cells[J]. Int J Oncol, 2018, 53(5): 1980-1996.
- [4] CHENG K R, LARABEE S M, TOLAYMAT M, et al. Targeted intestinal deletion of Rho guanine nucleotide exchange factor 7, β PIX, impairs enterocyte proliferation, villus maturation, and mucosal defenses in mice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2021, 320(4): G627-G643.
- [5] KOTELEVETS L, CHASTRE E. Rac1 signaling: From intestinal homeostasis to colorectal cancer metastasis[J]. Cancers, 2020, 12(3): 665.
- [6] SHIN M S, SONG S H, SHIN J E, et al. Src-mediated phosphorylation of β Pix-b regulates dendritic spine morphogenesis[J]. J Cell Sci, 2019, 132(5): jcs224980.
- [7] JOHNSON D E, O'KEEFE R A, GRANDIS J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(4): 234-248.
- [8] ZHOU Q Q, CHENG C, WEI Y J, et al. USP15 potentiates NF- κ B activation by differentially stabilizing TAB2 and TAB3[J]. FEBS J, 2020, 287(15): 3165-3183.
- [9] KORTEKAAS R K, BURGESS J K, VAN ORSOY R, et al. Therapeutic targeting of IL-11 for chronic lung disease[J]. Trends Pharmacol Sci, 2021, 42(5): 354-366.
- [10] XU D, XU Z. Indole alkaloids with potential anticancer activity[J]. Curr Top Med Chem, 2020, 20(21): 1938-1949.
- [11] MOLLY J, INGVARI B, I. SAIFUDDIN R, et al. A study of the effects of indometacin on liver mitochondria from rats, mice and humans[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2001, 15(11): 1837-1842.
- [12] GOLLNER A, WEINSTABL H, FUCHS J E, et al. Targeted synthesis of complex spiro[3H-indole-3,2'-pyrrolidin]-2(1H)-ones by intramolecular cyclization of azomethine ylides: Highly potent MDM2-p53 inhibitors[J]. ChemMedChem, 2019, 14(1): 88-93.
- [13] TAN F, LU L Q, YANG Q Q, et al. Enantioselective cascade Michael addition/cyclization reactions of 3-nitro-2H-chromenes with 3-isothiocyanato oxindoles: Efficient synthesis of functionalized polycyclic spirooxindoles[J]. Chemistry, 2014, 20(12): 3415-3420.

- [14] ZHANG X, HU B, SUN Y F, et al. Arsenic trioxide induces differentiation of cancer stem cells in hepatocellular carcinoma through inhibition of LIF/JAK1/STAT3 and NF- κ B signaling pathways synergistically[J]. Clin Transl Med, 2021, 11(2): e335.
- [15] ZHANG L D, REN W, WANG X Y, et al. Discovery of novel polycyclic spiro-fused carbocycloindole-based anticancer agents[J]. Eur J Med Chem, 2017, 126: 1071-1082.
- [16] SAXENA R, GUPTA G, MANOHAR M, et al. Spiro-oxindole derivative 5-chloro-4',5'-diphenyl-3'-(4-(2-(piperidin-1-yl)ethoxy) benzoyl) spiro[indoline-3,2'-pyrrolidin]-2-one triggers apoptosis in breast cancer cells via restoration of p53 function[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 70: 105-117.
- [17] JIANG F, LIU M H, WANG H D, et al. Wu Mei Wan attenuates CAC by regulating gut microbiota and the NF- κ B/IL6-STAT3 signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109982.
- [18] DAI R R, JIANG Q P, ZHOU Y, et al. Lnc-STYK1-2 regulates bladder cancer cell proliferation, migration, and invasion by targeting miR-146b-5p expression and AKT/STAT3/NF- κ B signaling[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 408.
- [19] PARK J H, SEO Y H, JANG J H, et al. Asiatic acid attenuates methamphetamine-induced neuroinflammation and neurotoxicity through blocking of NF- κ B/STAT3/ERK and mitochondria-mediated apoptosis pathway[J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 240.
- [20] DE SIMONE V, FRANZÈ E, RONCHETTI G, et al. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF- κ B to promote colorectal cancer cell growth[J]. Oncogene, 2015, 34(27): 3493-3503.
- [21] WANG B L. Network pharmacology study of anticancer mechanism of three main components in kanglaite injection[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(1): 58-63.
- [22] SHENG Y N, WANG C Y. Research progress on the mechanism of vitexin in preventing and treating diseases[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(17): 2156-2161.

收稿日期: 2022-05-25
(本文责编: 陈怡心)