

环化小檗碱类似物 A55 的抗肿瘤活性及其机制研究

赵午莉 李阳彪 何红伟 宋丹青 邵荣光

摘要 目的 研究环化小檗碱衍生物(CBBR)A55 的抗肿瘤活性及其初步抗肿瘤机制。方法 利用磺酰罗丹明 B(SRB)法来检测化合物的抑瘤率和半数抑制浓度(IC_{50}),采用流式细胞分析法来检测细胞周期分布,采用拓扑异构酶抑制实验来检测 A55 对拓扑异构酶 I 活性的抑制,采用 Hoechst 和 Western blot 实验来检测细胞凋亡以及与细胞 DNA 断裂修复和凋亡相关的蛋白。结果 化合物 A55 具有较强的抗肿瘤活性,主要是通过抑制拓扑异构酶 I 的活性来引起 DNA 断裂,使细胞阻滞在 S 期并启动凋亡来抑制细胞增殖。结论 环化小檗碱新型衍生物 A55 是一类结构新颖,抑瘤率强,值得进一步开发的新型化合物。

关键词 抗肿瘤 拓扑异构酶 DNA 断裂 凋亡 环化小檗碱类似物 A55

[中图分类号] R979.1 [文献标识码] A

Anticancer Activity and Primary Mechanism of Cycloberberine Derivative A55. Zhao Wuli, Li Yangbiao, He Hongwei, et al. Institute of Medicinal Biotechnology, China Academy of Medical Science Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract Objective To investigate the anticancer activity and the primary mechanism of cycloberberine (CBBR) derivative A55. **Methods** Inhibition rate and IC_{50} (half - inhibitory concentration) were analyzed by SRB. Flow cytometry was used to detect cell cycle distribution. Topoisomerase I (Top I) inhibition assay was used to analyze the effect of A55 on Top I. Hoechst and Western blot assays were used to detect apoptosis and the protein associated with apoptosis and DNA break repair. **Results** Compound A55 inhibited significantly cancer cells growth. The anticancer activity could be finished by cell apoptosis and cell cycle blockade at S phase induced by DNA strand break mediated by Top I inhibition. **Conclusion** Cycloberberine derivative A55 is a novel structure and can inhibit strongly cell proliferation. A55 could be developed and study further.

Key words Anti - cancer; Topoisomerase; DNA break; Apoptosis; Cycloberberine A55

小檗碱(berberine)又叫黄连素,为中药黄连中的主要生物碱。有多种药理作用,临床主要用于清热、解毒、抗肠道细菌抗感染以及糖尿病的治疗^[1-3]。近年研究发现小檗碱(BBR)还具有抗肿瘤活性,体内外的抗肿瘤活性检测表明其能够特异性地抑制白血病、黑色素瘤、表皮样癌、肝癌、口腔癌、恶性胶质瘤等癌细胞的增殖而不影响正常细胞的生长^[4-8]。本研究所在长期进行小檗碱类衍生物的研究中,基于对相关有机反应的深刻理解,合成并构建了一类未见报道的全新化合物结构——环化小檗碱(CBBR),即在 BBR 分子中又并联了一个芳香环。结构分析后发现 CBBR 不但与另一类具有显著抗癌作用的生物碱——苯并菲里啉类化合物结构相似,而且本身还具备 BBR 的分子结构,因此我们推测 CBBR 有可能为一类具有

较强抗肿瘤作用的化合物,初步研究结果表明其对 HCT116 细胞的 IC_{50} 为 $1.0\mu\text{mol/L}$ 左右。基于此,笔者以 CBBR 为先导化合物较为系统地合成了 30 个化合物并对其抑瘤率进行了检测,结果发现 CBBR 的 8 - 位经基进行芳香酰化后,引入邻氟苯甲酰基合成的化合物 A55 具有更强的抗肿瘤活性,因此我们着重对 A55 的抗肿瘤活性以及其相应机制做了进一步的研究^[9]。

材料与方法

1. 细胞系及化合物:人肝癌细胞系 HepG₂、SMMC7721、BEL7402、BEL7404、人乳腺癌细胞 MCF - 7、人肺癌细胞系 A549 及人大肠癌细胞系 HCT116 和 HT29 由本实验室保存;环化小檗碱及合成的相应衍生物 A10 ~ A50 由笔者单位合成,结构及其合成路线见参考文献[9]。

2. 主要试剂:RPMI1640 培养基(GIBCO);新生胎牛血清(Hyclone 公司);SRB(sulforhodamine B, Sigma 公司);PI(propidium iodide, Sigma 公司);预染蛋白 Marker(New England Biolabs 公司);DNA 拓扑异构酶 I(Topgen);质粒 pBR322DNA(Takara);兔抗人抗体 p - ATM、r - H2AX 和 Cleaved Parp 等抗体购自 Cell Signal Technology 公司。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81102464);国家重大新药创新科技重大专项基金资助项目(2012ZX09301002 - 001)

作者单位:100050 北京,中国医学科学院/北京协和医学院医药生物技术研究所

通讯作者:邵荣光,教授、博士生导师,电子信箱:shaor@bbn.cn

3. 化合物对肿瘤细胞的抑制率及 IC_{50} 的测定: 在 96 孔板上孔接种不同的肿瘤细胞, 24h 后采用不同浓度的化合物进行增殖抑制实验。细胞增殖 48h 后, 用 50% 三氯乙酸 (TCA) 固定, 并用 SRB (0.4%) 稀醋酸溶液染色。室温静置 10min, 未与细胞结合的 SRB 用 1% 稀醋酸溶液 5 遍, 空气干燥。结合的 SRB 用 10mmol/L 非缓冲 Tris 碱液 (pH 值 10.5) 振荡溶解, 酶标仪测定各孔光吸收, 测定波长为 492nm。根据各孔 OD 值计算药物对细胞增殖的抑制率。计算公式为抑制率 (%) = $(1 - \text{化合物 OD}_{492} / \text{对照 OD}_{492}) \times 100\%$ 。采用 Sigmaplot 计算化合物的 IC_{50} 。

4. 流式细胞仪测定方法: 用 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的化合物 A55 处理 HepG2 细胞, 分别在 0、4、8、12 和 24h 收集药物处理后的细胞, PBS 洗两次, 加入预冷的 75% 乙醇, -20°C 固定过夜, 离心除去乙醇, PBS 洗两次, 加入 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 RNA 酶, 37°C 消化 30min, 加碘化丙啶 (PI) 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4°C 避光染色 30min 后, 流式细胞仪检测细胞周期变化^[10]。

5. 拓扑异构酶抑制实验: 将 1U 拓扑异构酶 I 和不同浓度的药物在 37°C 反应 20min, 再加入 0.5 μg 的 pBR322DNA 在 37°C 继续反应 30min, 加入 0.5% 的 SDS, 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的溴酚兰, 15% 的甘油终止反应。在 TBE 电泳缓冲液中进行琼脂糖电泳, 40V 电压下, 电泳 4h。溴化乙锭溶液染色 30min, 置于紫外线下观察 DNA 的电泳区带, 并摄片记录。

6. Western blot: 将 A55 加入到 HepG₂ 细胞中, 使 A55 的终浓度达到 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 24h 后取实验组和对照组细胞, 加入细胞裂解液, 提取细胞总蛋白, 蛋白定量后加热变性。每组取 40 μg 蛋白经 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离后, 采用半干转电转移将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2h, 加入一抗 (1:1000) 4°C 孵育过夜, 采用 TBST 洗膜 5 次, 加入 HRP 标记二抗 (1:5000), 室温下孵育 1h, 增强化学发光法 (ECL) 发光显色。以 β -actin 作为内参。

结 果

1. 化合物 A55 的抗肿瘤活性筛选: 首先采用 HCT116 细胞对先导化合物 CBBR 及其 30 个衍生物 (A10 ~ A50) 的抗肿瘤活性进行筛选, 筛选浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。结果表明有 15 个化合物的抑制率达到了 85% 以上。接着采用 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度对这 15 个化合物继续筛选。结果表明, 化合物 A55 的抑制率最高, 达到了 90% 左右, 化合物 A32 和 A45 的抑制率分别为 62% 和 68%, 高于其他化合物。对化合物 A55、A32 和 A45 的 IC_{50} 进行检测, 结果表明其 IC_{50} 分别为 0.18 ± 0.01 、 0.46 ± 0.03 和 $0.4 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$, A55 的活性最高。此后笔者选用 A55 (图 1) 对其抗肿瘤活性进行了进一步的研究并初步探讨了其抗肿瘤机制。

2. A55 对多种肿瘤细胞具有较强的抑制作用: 笔者采用 BEL7402、BEL7404 SMC7721、HT29、A549 以

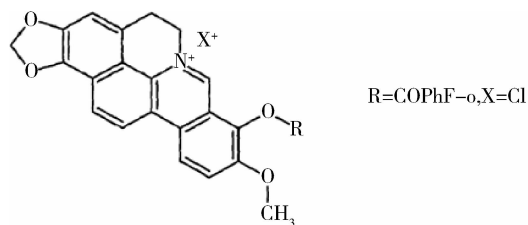


图 1 A55 结构

及 MCF-7 等肿瘤细胞对环化小檗碱 CBBR 及其衍生物 A55 的 IC_{50} 进行了检测, 结果表明 A55 对多种类型的肿瘤均具有良好的抑制作用, 抑制效果明显强于先导化合物 CBBR, 结果见表 1 和图 2。

表 1 化合物 CBBR 及 A55 对不同肿瘤细胞系的 IC_{50}

细胞系	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	CBBR	A55
HCT116	0.68 ± 0.07	0.18 ± 0.01
BEL7402	3.01 ± 0.21	0.67 ± 0.02
BEL7404	3.42 ± 0.14	1.02 ± 0.07
SMC7721	3.55 ± 0.35	0.9 ± 0.08
HT29	3.05 ± 0.23	0.933 ± 0.13
A549	2.31 ± 0.11	1.06 ± 0.06
MCF-7	2.15 ± 0.21	0.57 ± 0.04
Hela	2.54 ± 0.19	0.923 ± 0.12

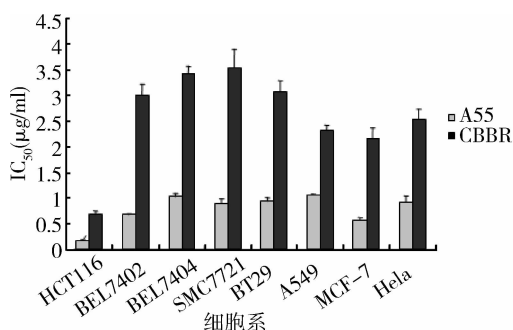


图 2 A55 对不同肿瘤细胞系的 IC_{50}

3. A55 对拓扑异构酶 I 具有较强的抑制作用: Top I 在体外可使 DNA 双链中的单链断裂, 使另一单链从缺口处穿过, 催化超螺旋的 DNA 松弛解旋。本实验中 A55 对拓扑异构酶 I 的解螺旋活性抑制实验结果表明, A55 在和 pBR322DNA 以及拓扑异构酶 I 共同孵育时, 可完全逆转拓扑异构酶 I 对底物 pBR322DNA 的解螺旋作用, 而其直接和底物 pBR322DNA 作用时, pBR322DNA 并无明显的改变, 因此我们认为 A55 可有效地抑制拓扑异构酶 I 活性 (图 3)。

4. A55 可将细胞周期阻滞于 S 期: 为了进一步探

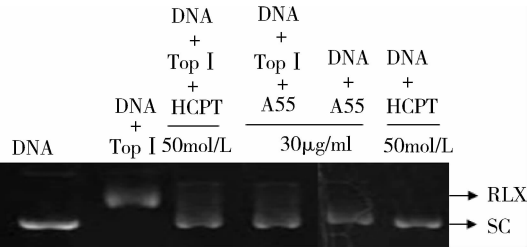


图 3 A55 对 Top I 的抑制作用

DNA. pBR322DNA;RLX. 松弛型 pBR322DNA;
SC. 超螺旋型 pBR322DNA

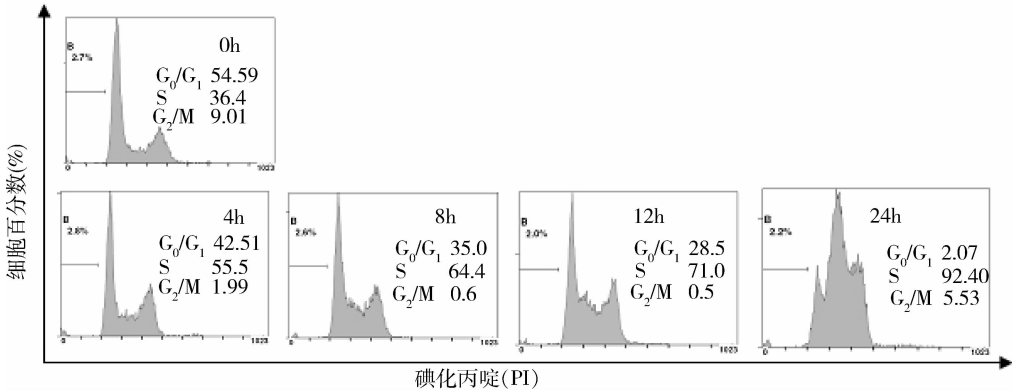


图 4 A55 对 HepG₂ 细胞周期分布的影响

DNA 断裂相关蛋白的表达情况。结果表明,A55 可明显引起 HepG₂ 细胞凋亡(图 5A),如细胞核浓缩、碎裂及溶解等现象。Western blot 结果表明,在 A55 作用于 HepG₂ 细胞 24h 后,与 DNA 断裂相关的蛋白 p - ATM 和 γ - H2AX 明显增加,凋亡相关蛋白 cleaved parp 和 cleaved caspase - 3 明显增加(图 5B)。

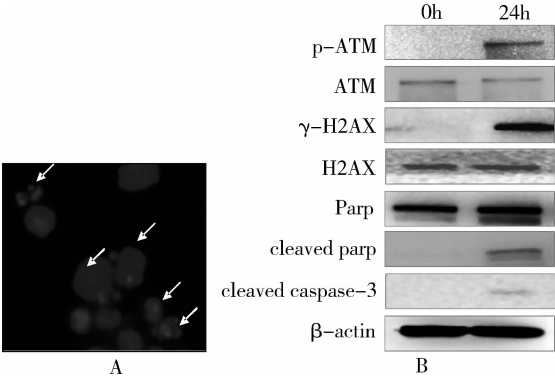


图 5 A55 引起细胞凋亡并激活 DNA 修复通路

A. 细胞凋亡 Hoechst 33342 细胞核染色;B. Western blot

讨 论

拓扑异构酶 I 是一种核酶,可松解 DNA 超螺旋,在 DNA 的复制、转录、重组和修复等重要过程中发挥重要的作用。研究发现,肿瘤细胞中 Top I 的含量和

化合物 A55 的抗肿瘤机制,笔者检测了 A55 对 HepG₂ 细胞周期分布的影响。结果表明,化合物 A55 作用于 HepG₂ 细胞 4h 后,细胞的周期开始阻滞于 S 期,并随着时间的增加,S 期阻滞不断加强,到 24h,阻滞达到最强(图 4)。

5. A55 通过促进 DNA 链断裂引起凋亡:由于 A55 抑制了拓扑异构酶 I 的活性,阻止了 DNA 断端的再连接,引起了 DNA 断裂和细胞凋亡。因此我们检测了 A55 处理细胞后细胞的凋亡以及与凋亡和

活性要明显高于正常细胞,如果能选择性抑制 Top I 的生理作用,便能有效抑制肿瘤细胞的 DNA 的复制和转录,从而引起细胞凋亡进而抑制细胞增殖^[11]。因此,Top I 成为抗肿瘤药物作用的重要靶点。目前在临床使用和处于研发阶段的 Top I 抑制剂主要包括喜树碱类(camptothecines)和吲哚并咪唑类(indolocarbazoles)等化合物但由于水溶性差、不良反应强以及耐药使得这些药物的应用受到了限制,因此开发结构新且药效强的新型抗肿瘤药物非常重要^[12]。Li 等^[13]报道小檗碱能与 Top I 结合,使 S 期细胞合成受阻,阻止细胞增殖。CBBR 是一类全新结构骨架的化合物——环化小檗碱,由于其具有更好的平面性结构特征,更加容易嵌入双链 DNA 碱基对里,推测可能具有更好的抗肿瘤作用。采用 HepG₂ 细胞对 CBBR 的 IC₅₀检测,IC₅₀在 1.2 μmol/L 左右,活性显著强于 BBR^[9]。A55 是在 CBBR 结构的基础上进行改造而形成的一类衍生物,即在 CBBR 的 8 - 位经基进行芳香酰化,引入邻氟苯甲酰基。改造后的 A55 对 HCT116 的抗肿瘤活性显著强于 CBBR,IC₅₀达到了 0.18 μg/ml,对其他肿瘤的结果也表明其 IC₅₀在 1 μg/ml 左右,显示了良好的抗肿瘤活性。

在 DNA 复制过程中,拓扑异构酶 I 在 DNA 双链

上产生单链断裂,使另一单链从缺口处穿过,使得 DNA 从超螺旋变为疏松型,进而一些与 DNA 复制相关的酶结合到 DNA 上,启动了染色体的复制。拓扑异构酶抑制剂与拓扑异构酶结合后抑制了 DNA 拓扑异构酶的催化活性,使得断裂的 DNA 不能重新进行连接,进而导致 DNA 链发生致命性的破坏,造成 DNA 损伤,从而激活 DNA 损伤检验点及相应的 DNA 损伤应答修复通路(DNA damage response,DDR)进行修复^[14,15]。这些通路包括细胞内的感应器如 ATM 的快速识别损伤,启动下游多种效应成分如 H2AX 及引起周期阻滞的蛋白通路,提供时间进行损伤修复。其中最为显著和具有标志意义的是 H2AX 的磷酸化,如损伤不能正确修复或不能修复,凋亡和非凋亡性死亡(apoptosis and non-apoptotic death)程序将被启动^[16]。环化小檗碱衍生物 A55 在和拓扑异构酶 I 以及底物 DNA 共同作用时可显著抑制拓扑异构酶 I 的解螺旋作用,但其单独和超螺旋 DNA 反应并不影响 pBR322DNA 的构型改变,表明 A55 是通过抑制拓扑异构酶的活性来影响 pBR322DNA 的构型。由于拓扑异构酶 I 活性受到抑制,使得 DNA 链在解旋后不能再连接而引起 DNA 断裂,因此我们观察到与 DNA 断裂相关的蛋白如 ATM 和 H2AX 被磷酸化激活。

细胞在进行 DNA 复制时,需要拓扑异构酶来解螺旋并在 DNA 复制结束后再改变双链 DNA 拓扑再形成超螺旋,因此拓扑酶在细胞的 S 期的活性和表达量最高,因此,当拓扑酶受到抑制时,细胞的 DNA 复制过程会严重受阻并使得细胞可能停滞在 S 期。本实验中,化合物 A55 通过主要通过抑制拓扑异构酶的活性而引起的 DNA 损伤的修复,周期分布实验也证实了细胞停滞在 S 期,这也同样与通过抑制拓扑异构酶 I 的活性而致 DNA 损伤的羟基喜树碱衍生物引起的 S 期阻滞是一样的^[17]。化合物 A55 具体是通过激活或抑制了哪些通路而导致了 S 期阻滞,今后我们也将进一步进行研究。肿瘤细胞在 A55 的持续作用下,由于修复不能完全进而活化了促使细胞凋亡的一系列酶如 caspase-3,活化后的 caspase-3 裂解了 parp 从而最终引起细胞凋亡。

总之,环化小檗碱衍生物 A55 是一类靶点明确、结构新颖以及抗肿瘤活性强的新型抗肿瘤化合物,且本所可以自主合成开发。随着对其作用机制研究的逐渐深入,这一类从生物碱中发现高效低毒的抗肿瘤新药的前景将会更加广阔。

参考文献

- 1 蔡少平,刘泽. 黄连素抑制结肠癌细胞中 PGE2 表达作用的研究[J]. 中国医药学报, 2004, 19(2):95-97
- 2 丁阳平,叶小利,周洁,等. 小檗碱衍生物合成及生理活性研究进展[J]. 有机化学, 2012, 32(4):677-685
- 3 赵午莉,李阳彪,李迎红,等. 13-取代小檗碱衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究[J]. 中国医药导报, 2013, 296(10):17-20
- 4 Eom KS, Hong JM, Youn MJ, *et al.* Berberine induces G1 arrest and apoptosis in human glioblastoma T98G cells through mitochondrial/caspases pathway[J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(4):558-562
- 5 Hwang JM, Kuo HC, Tseng TH, *et al.* Berberine induces apoptosis through a mitochondria/caspases pathway in human hepatoma cells[J]. Arch Toxicol, 2006, 80(2):62-73
- 6 Letasiova S, Jantova S, Cipak L, *et al.* Berberine - antiproliferative activity in vitro and induction of apoptosis/necrosis of the U937 and B16 cells[J]. Cancer Lett, 2006, 239(2):254-262
- 7 Lin CC, Lin SY, Chung JG, *et al.* Down-regulation of cyclin B1 and up-regulation of Wee1 by berberine promotes entry of leukemia cells into the G₂/M-phase of the cell cycle[J]. Anticancer Res, 2006, 26(2A):1097-1104
- 8 Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberine inhibits growth, induces G1 arrest and apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells by regulating Cdk1-Cdk-cyclin cascade, disruption of mitochondrial membrane potential and cleavage of caspase 3 and PARP[J]. Carcinogenesis, 2006, 27(10):2018-2027
- 9 Li YB, Zhao WL, Wang YX, *et al.* Discovery, synthesis and biological evaluation of cycloprotoberberine derivatives as potential antitumor agents[J]. Eur J Med Chem, 2013, 68(10):463-472
- 10 Zhao W, He H, Ren K, *et al.* MR-1 blocks the megakaryocytic differentiation and transition of CML from chronic phase to blast crisis through MEK dephosphorylation[J]. Blood Cancer J, 2013, 3(3):e107
- 11 郭晓鹏,冯思良,王金辉,等. 拓扑异构酶 I 及其喜树碱类抑制剂的临床研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(4):405-414
- 12 洪鸣凰,裴元英. 羟基喜树碱及其制剂的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2008, 17(4):255-258
- 13 Li TK, Bathory E, LaVoie EJ, *et al.* Human topoisomerase I poisoning by protoberberines: potential roles for both drug-DNA and drug-enzyme interactions[J]. Biochemistry, 2000, 39(24):7107-7116
- 14 马云彤. 拓扑异构酶 I 抑制剂介导的 DNA 损伤,修复和检验点应答[J]. 西安文理学院学报:自然科学版, 2010, 13(1):44-47
- 15 Winter E, Levy D, Gordon JS. Changes in the H-1 histone complement during myogenesis I. Establishment by differential coupling of H-1 species synthesis to DNA replication[J]. J Cell Biol, 1985, 101(1):167-174
- 16 李俊英,张士猛,周平坤. H2AX 磷酸化与去磷酸化的分子机制及其对 DNA 损伤修复反应的调节作用[J]. 军事医学, 2013, 37(3):227-230
- 17 Veltkamp SA, Witteveen EO, Capriati A, *et al.* Clinical and pharmacologic study of the novel prodrug delimotecan (MEN 4901/T-0128) in patients with solid tumors[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(11):7535-7544

(收稿日期:2013-12-12)

(修回日期:2014-01-08)