

新型双芳基脲类化合物对非小细胞肺癌 A549 细胞的影响

黄 耀,姚 欣*

南京医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科,江苏 南京 210029

[摘 要] 目的:探讨一种新型双芳基脲类化合物(代号 N69B)对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖、周期和凋亡的影响。方法:选择 A549 非小细胞肺癌细胞系,在不同浓度的 N69B 作用下,采用 CCK-8 法测定细胞增殖率、流式细胞仪测定细胞周期变化、Annexin V/PI 双染法测定细胞凋亡率、Western blot 法测定天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3,8,9 活性产物(Cleaved caspase-3,8,9)的相对表达量。结果:与对照组比较,N69B 可抑制 A549 细胞的增殖,且存在明显剂量-效应和时间-效应关系($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);分别采用 0.5、1.0 和 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 N69B 作用 A549 细胞 24 h 后,各药物组 G2 期细胞比例均显著性升高($P < 0.01$);Annexin V/PI 双染结果显示,各药物组细胞凋亡率均有不同程度的升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);Western blot 结果显示,随药物浓度的升高,A549 细胞内 Cleaved caspase-3、8、9 表达量均逐渐升高。结论:N69B 对 A549 细胞的增殖具有抑制作用,其机制可能与诱导细胞周期 G2-M 期阻滞及 caspase 介导的细胞凋亡有关。

[关键词] 双芳基脲;化合物 N69B;A549 细胞;增殖;凋亡

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)12-1683-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20181204

Effects of a new bis-aryl urea compound on proliferation, cell cycle and apoptosis of lung cancer A549 cells

Huang Yao, Yao Xin*

Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To explore anti-cancer activities of a novel bis-aryl urea compound (code name: N69B) using non-small cell lung cancer A549 cells. **Methods:** The non-small cell lung cancer A549 cells were choosed and treated by N69B at different concentrations. The cell proliferation was quantified by CCK-8 method; the cell cycle was determined by flow cytometry; the apoptosis rate were detected by Annexin V/PI double staining; and the relative expression of Cleaved caspase-3, 8, 9 was measured by the Western blot. **Results:** Compared with the DMSO control group, N69B inhibited the proliferation of A549 cells in manners that are time- and dose-dependent ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Twenty-four hours after the treatment with N69B at 0.5, 1.0 and 1.5 μM , respectively, the number of cells in G2 phase significantly increased ($P < 0.01$); the apoptosis rate increased in different degrees; Cleaved caspase-3, 8, 9 expression showed a dose-dependent elevation. **Conclusion:** N69B inhibits the proliferation of A549 cells, possibly through cell cycle arrest in G2-M phase and apoptosis induced by caspase activation.

[Key words] bis-aryl urea; compound N69B; A549 cell; proliferation; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(12): 1683-1687]

随着第一种双芳基脲类药物索拉非尼(sorafenib)上市以来,双芳基脲类小分子化合物已成为抗肿瘤药物研究的新热点^[1]。索拉非尼属于多靶点激酶抑制剂,对多个与肿瘤相关的激酶,如 Raf-1, B-Raf 和 血管内皮细胞生长因子受体-2(VEGFR-

[基金项目] 江苏省兴卫工程(RC201164)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yaoxin@njmu.edu.cn

2), 都有较强的抑制能力;其所含的二芳基脲基团是其他多种生物活性物质的组成部分,也是构建新型抗肿瘤化合物的重要的药效基团^[2]。大量由二芳基脲衍生的新型结构的化合物被相继合成和优化^[3-4];一些化合物针对多种肿瘤的临床试验正在积极推进,如利尼伐尼(Linifanib, ABT-869)^[5], 替沃扎尼(又称 KRN951)^[6]等。N69B 是美国 Aluda Pharma-

ceuticals 公司研究开发的一种多靶向、具有抗肿瘤活性的新型化合物,其结构除了含有二芳基脲基团外,还整合了其他重要的抗肿瘤药效基团,如饱和氮氧杂环和芳乙烯基取代的均三嗪基团等,因此推测该化合物具有良好的抗肿瘤作用。鉴于肺癌在我国以及世界范围内的高发病率和致死率,本研究拟选择 A549 非小细胞肺癌细胞,探讨该化合物对其增殖、周期及凋亡的影响,并初步研究其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

A549 人非小细胞肺癌细胞(中国科学院干细胞库),培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 和 100 mg/L 的 F-12K 培养液中,置于 37 ℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中。每 3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

化合物 N69B, 分子式为 C₃₄H₃₇N₉O₃, 化学名为 (E)-1-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲酰基)苯基)-3-(4-(4-(吗啉-1-基)-6-苯乙烯基-1,3,5-三嗪基-2-氨基)苯基)脲,由北京六合宁远科技有限公司合成(纯度 >95%);F-12K 培养液(×1)、青霉素、链霉素(Gibco 公司,美国);胎牛血清、预染 Marker(Thermo Fisher Scientific 公司,美国);0.25% 胰蛋白酶(Biological Industries 公司,以色列);Cell Counting Kit -8(CCK-8)试剂盒(Dojindo 公司,日本);细胞周期测定试剂盒(南京凯基生物科技有限公司);FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I 试剂盒(BD Biosciences 公司,美国);二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司,美国);脱脂奶粉、PVDF 膜(Biosharp 公司,韩国);Caspase-9 p35 Rabbit IgG、β-actin Rabbit IgG、Goat anti-Rabbit IgG、Goat anti-Mouse IgG(Bioworld 公司,美国);Caspase-3 p17 mouse monoclonal antibody (SANTA CRUZ 公司,美国)、Caspase-8 p10 Rabbit IgG(Cell Signaling Technology 公司,美国)。

二氧化碳恒温培养箱(311)、高速低温离心机(MicroCL 17R)(Thermo Fisher Scientific 公司,美国);洁净工作台(SW-CJ-2F,苏州安泰空气技术有限公司);酶标仪(ELx800,伯腾仪器有限公司,美国);倒置光学显微镜(DMI3000B,莱卡公司,德国);流式细胞仪(Accuri C6, BD Biosciences 公司,美国);凝胶成像系统(5300,上海天能科技有限公司);荧光显微镜(3H06225, Olympus 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖率的测定

N69B 采用 DMSO 配制成不同浓度浓缩储存液,

加药前按 1:1 000 采用培养液稀释成不同浓度。待 A549 细胞生长至对数期,采用胰酶消化后收集细胞,计数后细胞按 3×10³ 个/孔接种至 96 孔板。24 h 后, N69B 按 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μmol/L 浓度梯度分别加入细胞中,同时设置 DMSO 对照组和空白对照组,各药物浓度均设 4 复孔。加药后分别于 24 h、48 h 和 72 h,弃去上清,按每 100 μL 加 10 μL CCK-8 的比例稀释 CCK-8,每孔加 110 μL 稀释后的 CCK-8,1~4 h 测定 450 nm 处 OD 值,计算细胞增殖率。

细胞增殖率=[(实验组 OD 值-空白对照组 OD 值)/(DMSO 对照组 OD 值-空白对照组 OD 值)]×100%。

1.2.2 细胞周期测定

待 A549 细胞生长至对数期,消化收集细胞,计数后,按 5×10⁵ 个/孔接种至 6 孔板。每组设置 3 复孔, N69B 按浓度不同分 4 组,分别为 0 μmol/L (即 DMSO 对照组)、0.5、1.0 和 1.5 μmol/L 组。24 h 后按组别加入药物。加药 24 h 后,消化收集细胞。用 PBS 洗涤细胞 1 次,2 000 r/min 离心 5 min,收集并调整细胞浓度为 1×10⁶ 个/mL。离心后,弃上清,500 μL 70% 冷乙醇 4 ℃ 固定 24 h。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀加 PBS 清洗后混匀,200 目筛网过滤至检测管。加 100 μL RNA 酶 A(RNase A)37 ℃ 水浴 30 min。再加入 400 μL 碘化乙啶(PI)染色混匀,4 ℃ 避光 30 min,流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.3 细胞凋亡测定

待 A549 细胞生长至对数期,消化收集细胞,计数后,按 3×10⁵ 个/孔接种至 6 孔板内,每组设置 3 个复孔。种板 24 h 后,按组别加入药物。加药 24 h 后,弃上清,用 0.25% 无乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化收集细胞,用冰 PBS 洗 2 遍(2 000 r/min,离心 5 min)。按 1×10⁶ 个/mL 加入 Binding Buffer,轻轻涡旋混匀后取 100 μL,分别加入 5 μL 的 Annexin V 和 PI,室温孵育 15 min,加入 400 μL Binding Buffer,于 1 h 内上流式细胞仪检测。

1.2.4 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3,8,9 活性产物(Cleaved caspase-3,8,9)表达的测定

待 A549 细胞生长至对数期,消化收集细胞,计数后,按 1×10⁵ 个/孔接种至 6 孔板内,每孔 2 mL,每组设置 3 个复孔。种板 24 h 后,按组别加入药物。药物作用 24 h 后,加入 RIPA 裂解液和苯甲基磺酰氟(PMSF)蛋白酶抑制剂,冰上吹打均匀。BCA 法测定蛋白浓度。加入 Loading Buffer,混匀,煮沸 5 min 灭活蛋白,保存于 -20 ℃ 待用。SDS-聚丙烯酰胺凝

胶电泳(SDS-PAGE)分离总蛋白,每孔按总蛋白 40 μg 上样,体积不足 30 μL 的用 1 $\times$ Loading Buffer 补齐,蛋白预染 Marker 5 μL ;转至 PVDF 膜,在含 5% 脱脂奶粉的 PBST 中室温轻摇封闭 1 h;加一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入二抗。避光条件下,将膜置于凝胶成像系统内,显色液均匀加在 PVDF 膜上,运行凝胶成像系统的软件,拍照并保存。

1.3 统计学方法

结果均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 STA-TA 软件进行统计分析,各浓度药物组与 DMSO 组的比较采用 t 检验,3 个药物组之间的比较采用方差分析; $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 N69B 对 A549 细胞增殖率的影响

CCK-8 结果显示,与 DMSO 组比较,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 N69B 作用 24 h 后即可明显抑制 A549 细胞的增殖率($P < 0.05$)。随着 N69B 药物浓度的增高和作用时间的延长,对 A549 细胞增殖的抑制作用越显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。药物作用 48 h 以上,浓度 $> 1.5 \mu\text{mol/L}$ 时,细胞增殖率呈指数降低(图 1)。

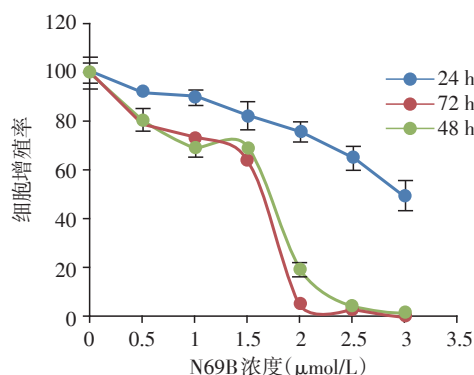


图1 N69B 对 A549 细胞增殖率的影响($n=4$)

Figure 1 Effect of N69B on proliferation of A549 cells

2.2 N69B 对 A549 细胞周期的影响

与 DMSO 组比较,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞周期无明显变化,1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组和 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 组 G1 期所占比例均有明显降低($P < 0.01$),G2 期均有明显升高($P < 0.01$),且存在一定的浓度效应关系(图 2)。

2.3 N69B 对 A549 细胞凋亡的影响

Annexin V/PI 双染流式细胞仪检测显示,与 DMSO 组比较,1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组和 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 组早期凋亡细胞比率升高,3 个给药组凋亡和坏死总比率均升高,且差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 3)。

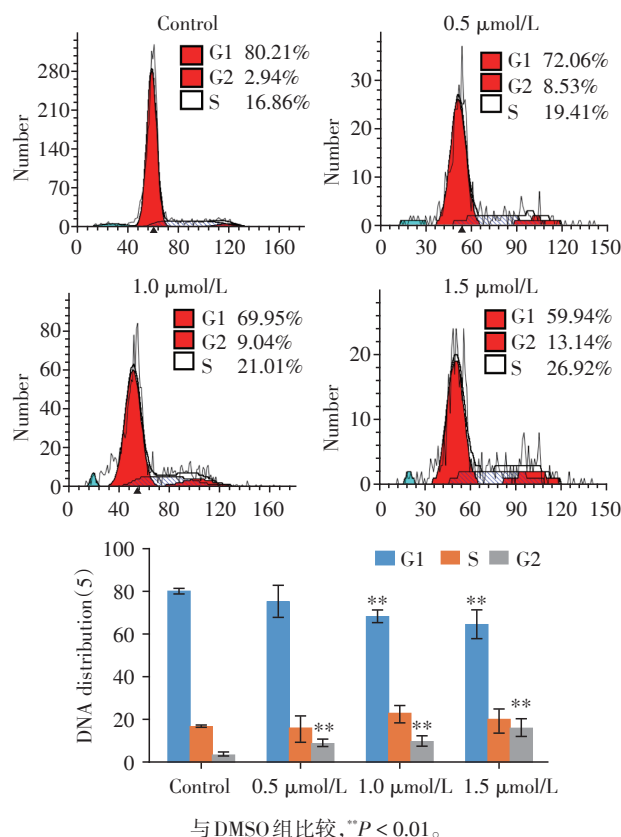


图2 N69B 对 A549 细胞周期的影响($n=3$)

Figure 2 Effect of N69B on cell cycle of A549 cells

2.4 N69B 对 A549 细胞 Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-8 和 Cleaved caspase-9 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,与 DMSO 组比较,不同浓度 N69B 作用后 A549 细胞内 Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 蛋白表达量均升高,且存在明显的剂量-效应关系,Cleaved caspase-8 表达量也有一定程度的升高(图 4)。

3 讨论

随着具有多靶向的索拉非尼^[1]、ABT-869^[5]、KRN951^[6]等双芳基脲类化合物的抗肿瘤作用被相继报道,整合双芳基脲这一关键药效基因已成为设计新型多靶点抗肿瘤药物的一条有效途径。N69B 是一类新型化合物,含有包括双芳基脲在内的多种抗肿瘤的药效基因,因此可能作用于肿瘤细胞赖以生存和快速增殖多条信号通路而发挥抗肿瘤作用。本研究选择非小细胞肺癌 A549 细胞,观察 N69B 对其体外增殖的影响,同时测定药物对细胞周期和凋亡的影响,初步探讨其可能的作用机制。

细胞增殖率是体外评价药物抑瘤作用的直接指标。本研究结果显示,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 N69B 即可显

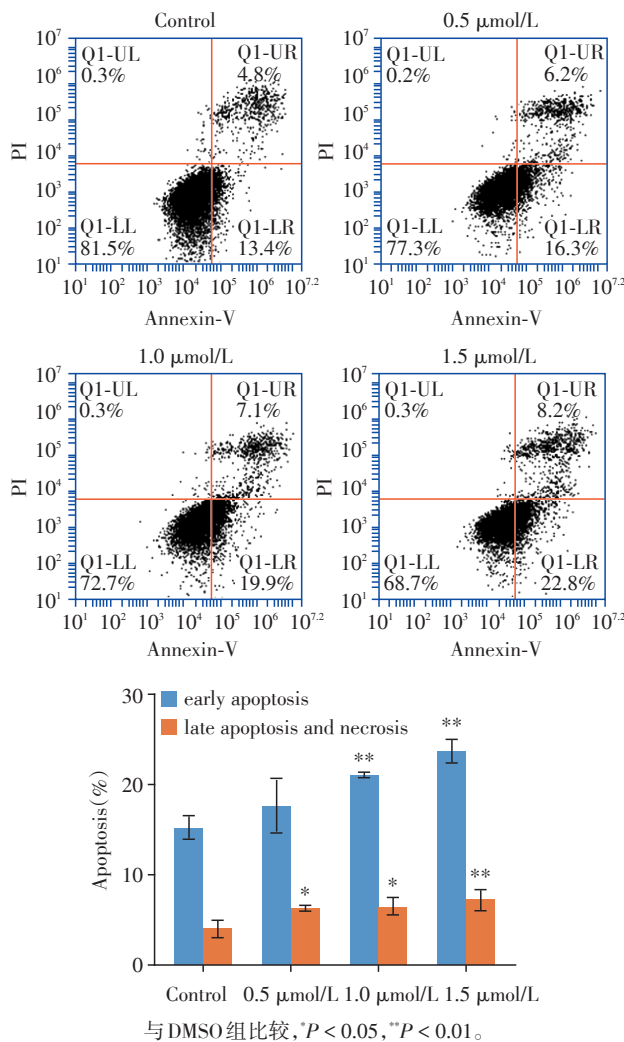


图3 N69B对A549细胞凋亡的影响(n=3)

Figure 3 Effect of N69B on apoptosis of A549 cells

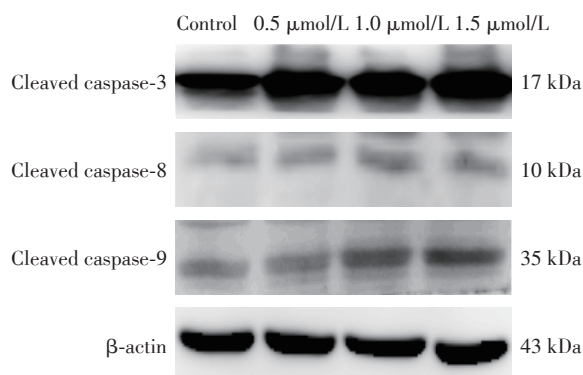


图4 N69B对A549细胞Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-8和Cleaved caspase-9蛋白表达的影响

Figure 4 Effects of N69B on Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-8 and Cleaved caspase-9 protein expression of A549 cells

显示出明显的剂量-效应和时间-效应关系。同时, N69B作用24 h内,随着药物浓度的增加,对细胞增殖率的影响趋于线性关系。而N69B作用48 h以上,低浓度时对细胞增殖的抑制也趋于线性关系,但药物浓度高于1.5 μmol/L时,细胞增殖率呈现指数降低。提示随着药物作用时间的延长,药物的敏感性随之显著增强。同时,细胞周期结果显示,随着药物浓度的升高,G2期细胞比例逐渐增加,提示药物引起了细胞G2-M期的阻滞,提示细胞增殖受抑主要发生在G2期,抑制了细胞的有丝分裂。

凋亡即细胞程序性死亡。为进一步探讨N69B是否通过诱导细胞凋亡的方式抑制细胞增殖,本研究采用流式细胞仪通过Annexin V/PI双染法测定细胞凋亡情况。研究发现,1.0 μmol/L即可引起细胞早期凋亡率的升高,随着药物浓度增加,细胞凋亡率有逐渐升高趋势,呈现出一定的剂量效应关系,提示N69B可能是通过诱导细胞凋亡的方式抑制细胞增殖。细胞凋亡主要有两种途径:死亡受体(外源性)途径和线粒体(内源性)途径^[7]。Caspase-8主要参与死亡受体介导的细胞凋亡途径,以死亡信号复合物(DISC)的形成特征;Caspase-9主要参与线粒体途径诱导的细胞凋亡途径,以线粒体膜电位受损为特征^[8]。Caspase-3在Caspase家族中属于效应型,被认为是凋亡级联酶促反应下游最关键的激酶,为凋亡的主要执行者之一^[9]。上游Caspase-8和Caspase-9活化后,均通过进一步激活下游的Caspase-3,引发不可逆的凋亡级联反应^[10]。本研究显示,随着N69B药物浓度的升高,A549细胞内Caspase-9和Caspase-3活性产物(Cleaved caspase-9和Cleaved caspase-3)的表达量均显著升高,Caspase-8活性产物(Cleaved caspase-8)的表达量也有一定程度的升高,但升高程度较弱。提示N69B可通过死亡受体和线粒体两种途径激活A549细胞凋亡通路,但主要是通过线粒体途径诱导凋亡的发生,同时药物浓度越高,对细胞凋亡的诱导作用越强。

综上所述,化合物N69B体外能显著抑制A549细胞的增殖,其机制可能是通过诱导细胞周期G2-M期阻滞和细胞凋亡来介导,但具体的信号通路机制有待进一步研究。鉴于N69B对肺癌细胞体外显著的抗增殖活性,该化合物有望成为治疗肺癌的新型良药。下一步我们将进一步探讨该化合物的体内抗肿瘤作用。

[参考文献]

[1] Wilhelm S, Carter C, Lynch M, et al. Discovery and devel-

著抑制A549细胞的增殖率,且随药物浓度的增加及作用时间的延长,对细胞增殖的抑制作用越显著,

- opment of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(10):835
- [2] Garuti L, Roberti M, Bottegoni G, et al. Diaryl urea: a privileged structure in anticancer agents[J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(15):1528-1548
- [3] Chen JN, Wang XF, Li T, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel quinazolinyl-diaryl urea derivatives as potential anticancer agents[J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 107(1):12-25
- [4] Zuo SJ, Zhang S, Mao S, et al. Combination of 4-anilinoquinazoline, arylurea and tertiary amine moiety to discover novel anticancer agents[J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(2):179-190
- [5] Caterina A, Francesco L, Giorgia Z, et al. Linifanib: current status and future potential in cancer therapy[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2015, 15(6):677-687
- [6] Jamil MO, Hathaway A, Mehta A. Tivozanib: status of development[J]. *Curr Oncol Rep*, 2015, 17(6):24
- [7] Chou HY, Chueh FS, Ma YS, et al. Bufalin induced apoptosis in SCC-4 human tongue cancer cells by decreasing Bcl-2 and increasing Bax expression via the mitochondria-dependent pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6):7959-7966
- [8] 李晖,李文静,马荣,等. 大黄素甲醚 8-O- β -吡喃葡萄糖苷对皮肤黑色素瘤 A375 细胞凋亡的影响及机制研究[J]. *中国药房*, 2017, 28(28):3941-3945
- [9] Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(4):821
- [10] Lu MR, Huang HL, Chiou WF, et al. Induction of apoptosis by tithonia diversifolia in human hepatoma cells[J]. *Pharmacogn Mag*, 2017, 13(52):702-706
- [收稿日期] 2018-03-23

(上接第 1682 页)

为了进一步研究 TSG 治疗高脂性脂肪肝的作用机制,预先使用 PPAR α 拮抗剂 MK886, 结果发现 TSG 降低脂肪肝大鼠血脂和肝脂的作用明显减弱或消失,同时对自噬相关蛋白表达的调控作用明显被阻断,说明 TSG 调节肝脏脂质代谢的作用通过激活 PPAR α 信号通路而产生。综上所述, TSG 主要通过 PPAR α 信号通路, 激活肝细胞自噬, 促进脂滴降解, 从而降低脂肪肝大鼠血脂和肝脂水平, 减轻肝脏脂肪变性。

[参考文献]

- [1] Hsu CS, Kao JH. Non-alcoholic fatty liver disease: An emerging liver disease in Taiwan[J]. *J Formos Med Assoc*, 2012, 111(10):527-535
- [2] Bodzin AS, Busuttil RW. Hepatocellular carcinoma: Advances in diagnosis, management, and long term outcome[J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(9):1157-1167
- [3] Zhou XX, Yang Q, Xie YH, et al. Protective effect of tetrahydroxystilbene glucoside against d-galactose induced aging process in mice[J]. *Phytochem Lett*, 2013, 6(3):372-378
- [4] Yao WJ, Fan WJ, Huang C, et al. Proteomic analysis for anti-atherosclerotic effect of tetrahydroxystilbene glucoside in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2013, 67(2):140-145
- [5] Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines[J]. *Curr Mol Med*, 2009, 9(3):299-314
- [6] Pace S, Pergola C, Dehm F, et al. Androgen-mediated sex bias impairs efficiency of leukotriene biosynthesis inhibitors in males[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(8):3167-3176
- [7] Paschos P, Paletas K. Nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome[J]. *Hippokratia*, 2009, 13(1):9-19
- [8] Ju J, Huang Q, Sun J, et al. Correlation between PPAR- α methylation level in peripheral blood and atherosclerosis of NAFLD patients with DM[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(3):2727-2730
- [9] Barbosa-da-Silva S, Souza-Mello V, Magliano DC, et al. Singular effects of PPAR agonists on nonalcoholic fatty liver disease of diet-induced obese mice[J]. *Life Sci*, 2015, 127(1):73-81
- [10] Dossi CG, Tapia GS, Espinosa A, et al. Reversal of high-fat diet-induced hepatic steatosis by n-3 LCPUFA: Role of PPAR- α and SREBP-1c[J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25(9):977-984
- [11] Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, et al. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor α/δ agonist, GFT505, in rodent models of non-alcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatology*, 2013, 58(6):1941-1952
- [12] Singh, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism[J]. *Nature*, 2009, 458(6):1131-1135
- [13] Lee JM, Wagner M, Xiao R, et al. Nutrient sensing nuclear receptors coordinate autophagy[J]. *Nature*, 2014, 516(7529):112-115
- [收稿日期] 2018-08-13