

# 海鞘素简易结构类似物 GJ7-1 和 GJ7-2 的抗肿瘤活性及分子靶向研究<sup>△</sup>

刘力力\*, 闫征, 郭举, 刘站柱, 王楠<sup>#</sup>(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

中图分类号 R965;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)29-2705-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.29.06

**摘要** 目的:研究依照特有DNA靶向性的抗肿瘤海洋天然产物海鞘素(Ecteinascidins, ETs)合成的简易结构类似物GJ7-1和GJ7-2的抗肿瘤活性及分子靶向。方法:MTT法检测0.012 5~1.6 μmol/L的GJ7-1、GJ7-2作用72 h对10种体外培养的肿瘤细胞的增殖抑制作用;荧光结合竞争法测定0.01~100 μmol/L的GJ7-1、GJ7-2与DNA的结合情况;流式细胞仪检测0.01、0.1、1 μmol/L的GJ7-1、GJ7-2对A549细胞周期(作用24、48 h)的影响;Hochest33342染色和Annexin V/PI双染检测0.01、0.1、1 μmol/L的GJ7-1、GJ7-2对A549细胞凋亡(作用24、48、72 h)的影响。结果:GJ7-1和GJ7-2对10种肿瘤细胞均有增殖抑制作用,但无明显肿瘤类型选择性;浓度增加到100 μmol/L时也与DNA无明显结合;仅1 μmol/L的GJ7-1、GJ7-2对A549细胞周期有一定的影响,但均不能诱导其明显凋亡。结论:GJ7-1和GJ7-2虽有一定的抗肿瘤活性,但较ETs大幅降低,部分原因是其完全丧失了与DNA的结合活性。**关键词** Ecteinascidins; GJ7-1; GJ7-2; DNA结合; 细胞周期; 细胞凋亡

## Anti-tumor Activity and Molecular Targeting of Simplified Ecteinascidins Analogues GJ7-1 and GJ7-2

LIU Li-li, YAN Zheng, GUO Ju, LIU Zhan-zhu, WANG Nan (Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study anti-tumor activity and molecular targeting of simplified analogues GJ7-1 and GJ7-2 synthesized with anti-tumor marine products Ecteinascidins (ETs) which target to DNA. METHODS: The inhibitory effects of GJ7-1 or GJ7-2 (0.012 5-1.6 μmol/L, incubating for 72 h) on the proliferation of 10 kinds of tumor cells were tested by MTT assay. GJ7-1 or GJ7-2 (0.01-100 μmol/L) binding to DNA was determined by the fluorescent probe competition assay. The effects of 0.01, 0.1 and 1 μmol/L GJ7-1 and GJ7-2 on A549 cell cycle (incubating for 24, 48 h) were observed with flow cytometry. The effects of 0.01, 0.1 and 1 μmol/L GJ7-1 and GJ7-2 on A549 cell apoptosis (incubating for 24, 48, 72 h) were observed with Hochest33342 staining and Annexin V/PI staining. RESULTS: Both GJ7-1 and GJ7-2 showed anti-proliferation effect on 10 kinds of tumor cells cultured *in vitro* without obvious tumor type selectivity. 100 μmol/L GJ7-1 and GJ7-2 did not compete for fluorescent probe binding to DNA. 1 μmol/L GJ7-1 and GJ7-2 influenced cell cycle of A549 cells to some extent and didn't induce obvious apoptosis. CONCLUSIONS: GJ7-1 and GJ7-2 show anti-tumor activity but ETs has decreased, partly because GJ7-1 and GJ7-2 lose their ability of targeting to DNA completely.

**KEYWORDS** Ecteinascidins; GJ7-1; GJ7-2; DNA binding; Cell cycle; Apoptosis

海鞘素(Ecteinascidins, ETs)是一类来源于海洋生物的具有脱氧核糖核酸(DNA)烷化作用的化合物<sup>[1]</sup>。其分子一般由3个四氢异喹啉基团(A、B和C)组成,其中A和B构成固定的五并环骨架,而C部分有一定的可变性。ETs通常具有极高的肿瘤细胞杀伤作用和独特的肿瘤类型选择性<sup>[2]</sup>。与一般的DNA烷化剂不同,ETs对DNA的结合有一定的序列特异性,主要与DNA小沟结合,干扰特定转录因子如NF- $\kappa$ B与DNA的结合,由

此导致其下游基因的转录抑制<sup>[3]</sup>;并能诱导细胞周期停滞和凋亡<sup>[4]</sup>。

ETs天然来源稀缺,由于结构复杂,人工合成极其困难。工业上主要通过半合成方法获得,成本昂贵,难以满足需求。研究ETs新的合成方法,发现其新的结构类似物是这类药物的发展趋向。以左旋多巴(L-dopa)为起始物质,采用简单的路线可以合成一系列ETs简易结构类似物<sup>[5]</sup>。与其他合成的ETs活性类似物<sup>[6-7]</sup>相仿,保留了A-B五并环骨架和关键的C21位氰基,而对C部分及连接A-B骨架和C部分的侧链进行改造,能够获得一定抗肿瘤活性,但对C部分进一步优化得到的系列化合物活性未获得明显提升。本课题组按照上述方法合成了ETs简易结构类似物GJ7-1和GJ7-2,本文就ETs、GJ7-1和GJ7-2的化学结构药理效应特征及其DNA靶点专一性进行了

<sup>△</sup>基金项目:国家新药创制重大项目资助(十二五综合大平台成药性关键技术子课题, No.2012ZX09301002-001-002;药效学评价子课题, No.2012ZX09301002-002-006)

\* 硕士研究生。研究方向:肿瘤药理学。电话:010-63165175。E-mail: lililiu@imm.ac.cn

<sup>#</sup> 通信作者:研究员,博士研究生导师。研究方向:分子肿瘤学、肿瘤药理学。电话:010-83172984。E-mail: wangnan@imm.ac.cn

研究,以探讨这类化合物抗肿瘤活性较低的药理学机制,为进一步合成简易高效的ETs类似的抗肿瘤药物提供依据。ETs、GJ7-1和GJ7-2的化学结构式见图1。

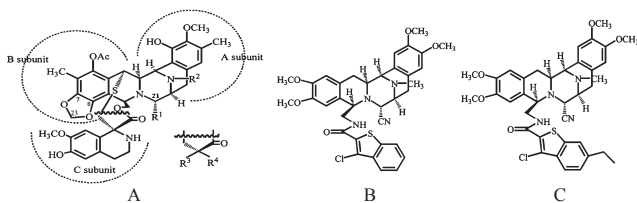


图1 化学结构式

A. ETs; B. GJ7-1; C. GJ7-2

Fig 1 Chemical structures

A. Ecteinascidins; B. GJ7-1; C. GJ7-2

## 1 材料

### 1.1 仪器

IX70型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);ImageQuant LAS 4000型凝胶成像系统(美国GE公司);流式细胞仪(美国BD公司);荧光酶标仪(美国Perkin-Elmer公司)。

### 1.2 药品与试剂

GJ7-1和GJ7-2(本课题组合成,纯度: $>98\%$ );4',6-二甲基-2-苯基吲哚(DAPI)、染料Hoechst33342、吖啶橙、乙酰甘氨酸二脒那啶(Berenil)、鲑鱼精DNA(美国Sigma-Aldrich公司);碘化丙啶(PI,北京百灵威科技有限公司);MTT、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)(美国Amresco公司);Annexin V/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(北京威格拉斯生物技术有限公司);新生牛血清(杭州天杭生物技术有限公司);RPMI1640培养基(美国Gibco公司);其他常规化学试剂均为国产分析纯。

### 1.3 细胞株

肺癌细胞株A549、卵巢癌细胞株A2780、肝癌细胞株BEL-7402、胃癌细胞株BGC-823、口腔表皮样癌细胞株KB、肾癌细胞株Ketr3、乳腺癌细胞株MCF-7、纤维肉瘤细胞株HT-1080、结肠癌细胞株HT-29等9种人肿瘤细胞株以及小鼠黑色素瘤细胞株B16,均由本实验室传代保存。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

所有细胞均采用含10%新生牛血清、100 u/ml青霉素、100 u/ml链霉素的RPMI 1640培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养。

### 2.2 GJ7-1和GJ7-2对10种肿瘤细胞的增殖抑制作用

制备10种细胞的对数生长期细胞悬液,在96孔板接种细胞每孔1 800~2 000个,37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,贴壁过夜后,分别加入GJ7-1和GJ7-2,给药浓度为0、0.012 5、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 μmol/L。作用72 h后更换含0.5 mg/ml MTT的培养基,继续培养4 h后用150 μl二甲基亚砜(DMSO)溶解活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶与MTT反应生成的难溶性蓝紫色结晶,测定570 nm波长处的光密度(OD),参考波长为655 nm,用细胞增殖抑制率拟合量效曲线并计算半数抑菌浓度(IC<sub>50</sub>)。

### 2.3 GJ7-1和GJ7-2对A549细胞周期分布的影响

按照每瓶 $8 \times 10^5$ 个细胞接种对数生长期A549细胞于培养瓶内,37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,贴壁过夜后,分别加入GJ7-1和GJ7-2,给药浓度为0、0.01、0.1、1 μmol/L,各设3个复孔。分别作用24、48 h后使用不含乙二胺四乙酸二钠(EDTA)的胰酶消化细胞制备单细胞悬液,以离心半径10 cm、1 500 r/min离心5 min,去上清,用冰冷的磷酸盐缓冲液(PBS)润洗细胞,加入1 ml 70%冰乙醇于4℃下固定过夜;第2天以离心半径10 cm、1 000 r/min离心5 min,沉淀用PBS轻轻润洗3次,彻底除去乙醇后,加入50 μl RNase A(终浓度为50 μg/ml),37℃孵育30 min;加入50 μl PI,用300 μl PBS补足至0.5 ml(PI终浓度为50 μg/ml),室温避光静置30 min;过400目筛网,在流式细胞仪上488 nm激发波长下检测细胞各期DNA含量,分析细胞周期分布。

### 2.4 GJ7-1和GJ7-2对A549细胞凋亡的影响

2.4.1 Hoechst33342染色。按照每孔4 500~5 000个细胞接种对数生长期A549细胞于96孔板内,37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,贴壁过夜后,设空白对照组、GJ7-1组和GJ7-2组,给药浓度为0.01、0.1、1 μmol/L。分别作用24、48、72 h后吸出培养基,用2 μg/ml的Hoechst33342染色,采用荧光倒置显微镜经紫外激发,观察细胞核蓝色荧光及其形态变化。

2.4.2 Annexin V/PI双染。取“2.4.1”项下分别作用24、48、72 h后的细胞,按照Annexin V/PI双染细胞凋亡检测试剂盒说明进行操作,用冰冷的PBS轻轻洗涤细胞,加入100 μl Annexin V-EGFP染色液,室温孵育15 min;吸除染色液,加入PI染色液0.5 ml,室温孵育5 min,在荧光倒置显微镜用蓝光激发,观察细胞膜绿色荧光和细胞核红色荧光。用0.01% Triton X-100透化处理的细胞,作为双阳性荧光着色对照。

### 2.5 GJ7-1和GJ7-2的DNA结合作用

参照文献<sup>[8]</sup>方法并作修改。(1)吖啶橙与DNA结合荧光,用100 μl含有2 μmol/L吖啶橙、10 μmol/L鲑鱼精DNA(指碱基对的摩尔浓度,相当于质量浓度6.49 μg/ml)的反应体系,经488 nm激发,在发射波长515 nm下测定;(2)DAPI和DNA结合荧光,用100 μl含有2 μmol/L DAPI、20 μmol/L鲑鱼精DNA的反应体系,经358 nm激发,在发射波长461 nm下测定。检测0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100 μmol/L的GJ7-1、GJ7-2、阳性对照(Berenil、PI)在反应体系中的荧光强度值( $F$ ),按照公式 $(F - F_D)/(F_{max} - F_D)$ 计算标准化荧光值,拟合量效曲线。式中, $F_{max}$ 指体系中含有荧光探针(吖啶橙或DAPI)和DNA时的荧光强度值, $F_D$ 指体系中只有荧光探针时的荧光强度值。

### 2.6 数据处理

试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经SPSS 13.0软件处理,细胞周期分布组间比较采用非配对 $t$ 检验,量效曲线采用SigmaPlot 10.0拟合分析。

## 3 结果

### 3.1 肿瘤细胞的增殖抑制作用

GJ7-1和GJ7-2作用72 h,对检测的10种体外培养的肿瘤

细胞均具有增殖抑制作用,并呈现明显的剂量依赖关系。不同种类细胞系对GJ7-1和GJ7-2的敏感性差别不大,GJ7-1的IC<sub>50</sub>约为0.09~0.35 μmol/L,GJ7-2的IC<sub>50</sub>约为0.05~0.17 μmol/L,GJ7-2抗肿瘤活性稍高于GJ7-1。GJ7-1、GJ7-2对不同肿瘤细胞的IC<sub>50</sub>见表1。

表1 GJ7-1和GJ7-2对不同肿瘤细胞的IC<sub>50</sub>( $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}, n=3$ )

Tab 1 IC<sub>50</sub> of GJ7-1 and GJ7-2 on the growth of different cancer cells( $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}, n=3$ )

肿瘤类型	细胞株	GJ7-1	GJ7-2
肾癌	Ketr3	0.26±0.01	0.11±0.03
肝癌	BEL-7402	0.35±0.06	0.12±0.01
胃癌	BGC-823	0.23±0.08	0.11±0.03
口腔表皮样癌	KB	0.24±0.02	0.11±0.05
结肠癌	HT-29	0.10±0.02	0.07±0.02
乳腺癌	MCF-7	0.22±0.01	0.17±0.07
卵巢癌	A2780	0.09±0.03	0.05±0.02
肺癌	A549	0.28±0.08	0.13±0.02
纤维肉瘤	HT-1080	0.14±0.01	0.10±0.04
小鼠黑色素瘤	B16	0.14±0.03	0.10±0.02

### 3.2 细胞周期变化

GJ7-1和GJ7-2在0.01、0.1 μmol/L时作用24、48 h对A549细胞周期均无明显影响。1 μmol/L的GJ7-1作用24 h时A549细胞出现明显S期阻滞,DNA含量可达50%;作用48 h后S期细胞恢复正常,而G<sub>2</sub>/M期细胞略有增加,约占20%。1 μmol/L的GJ7-2对A549细胞S期没有明显影响;作用24 h时G<sub>2</sub>/M期细胞略有增加,达18%;作用48 h时G<sub>2</sub>/M期细胞DNA含量又下降至10%。显然,GJ7-1和GJ7-2作用于A549细胞,没有出现由DNA交联导致的典型G<sub>2</sub>/M期阻滞,推测其未发生ETs样DNA交联反应。GJ7-1和GJ7-2对A549细胞周期的影响见表2。

表2 GJ7-1和GJ7-2对A549细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, \%, n=3$ )  
Tab 2 Effects of GJ7-1 and GJ7-2 on cell cycle of A549 cells ( $\bar{x} \pm s, \%, n=3$ )

时间,h	浓度, μmol/L	GJ7-1			GJ7-2		
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
24	0	73.0±8.4	17.4±3.8	9.6±4.7	73.0±8.4	17.4±3.8	9.6±4.7
	0.01	72.2±3.2	17.5±1.8	10.3±4.2	73.7±4.9	17.9±3.6	8.4±2.1
	0.1	69.6±2.8	21.6±1.5	8.9±1.6	72.2±4.3	20.6±3.3	7.2±1.1
	1	47.4±12.7*	48.0±16.4*	4.6±4.0	61.0±2.1	20.5±2.9	18.5±3.2*
48	0	70.2±9.4	23.2±13.5	6.6±5.8	70.2±9.4	23.2±4.3	6.6±5.8
	0.01	71.1±8.2	18.4±4.3	10.4±6.6	75.2±2.4	15.2±4.2	9.6±2.0
	0.1	73.6±4.8	19.7±4.5	6.8±0.7	69.4±5.4	20.6±5.0	10.0±4.7
	1	53.1±2.2*	27.7±3.2	19.1±1.3*	79.5±5.7	10.1±2.0	10.4±3.8*

与0 μmol/L比较: \*P<0.05

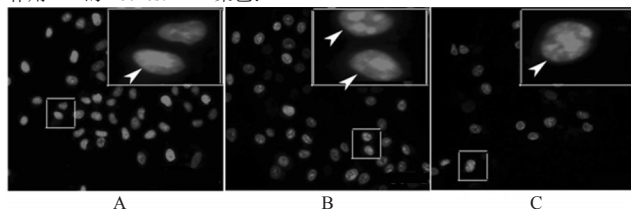
vs. 0 μmol/L: \*P<0.05

### 3.3 细胞凋亡情况

诱导凋亡是ETs产生细胞毒性的主要途径<sup>[4,9]</sup>。0.01、0.1 μmol/L GJ7-1和GJ7-2作用于A549细胞24、48、72 h后,经Hoechst33342染色均未观察到核固缩、核碎裂及荧光染色异常增强等典型凋亡征象,与空白对照组比较细胞核形态无明显差别。Annexin V/PI双染试验中,Triton X-100组细胞呈明显

的双阳性染色,说明双染试验可行。经Annexin V/PI双染也未观察到早期凋亡细胞(Annexin V阳性/PI阴性)出现,仅可见少量细胞双阳性染色(Annexin V阳性/PI阳性),但其数量与空白对照组细胞比较无明显差别。1 μmol/L GJ7-1和GJ7-2作用于A549细胞24、48 h时与0.1 mol/L作用于细胞特征基本一致;而作用72 h时细胞存活很少,主要为残留的细胞碎片。0.1 mol/L GJ7-1和GJ7-2作用于A549细胞48、72 h的荧光染色图见图2(其余图片略)。由此可见,GJ7-1和GJ7-2处理未导致细胞明显凋亡,与ETs的凋亡诱导特征完全不同。

作用72 h的Hoechst33342染色:



作用48 h的Annexin-V/PI双染:

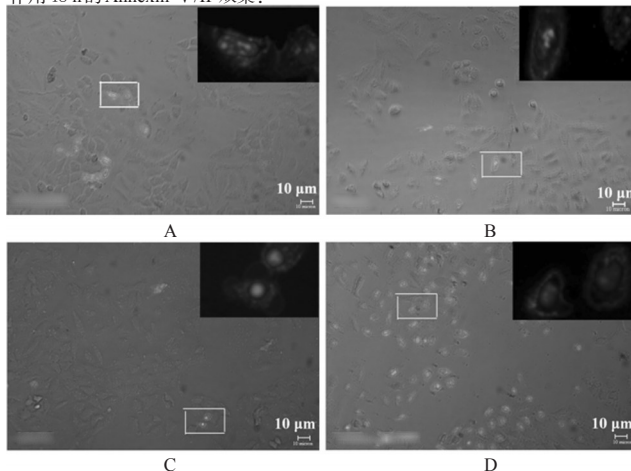


图2 0.1 μmol/L GJ7-1和GJ7-2作用于A549细胞48、72 h的荧光染色图

A. 空白对照组;B. GJ7-1;C.GJ7-2;D. Triton X-100

Fig 2 Fluorescent staining of A549 cell treated with 0.1 μmol/L GJ7-1 and GJ7-2 for 48 and 72 hours

A. blank control group; B. GJ7-1;C.GJ7-2;D. Triton X-100

### 3.4 化合物与DNA的结合

在与吖啶橙的竞争试验中,PI比Berenil有更强的荧光抑制作用;而与DAPI的竞争时,Berenil则显示更强的结合抑制活性。GJ7-1和GJ7-2对吖啶橙和DAPI的DNA结合没有明显的竞争作用,对吖啶橙和DAPI探针的DNA结合荧光均无明显抑制。提示GJ7-1和GJ7-2与DNA无明显结合。不同化合物与DNA的结合荧光变化曲线见图3。

## 4 讨论

GJ7-1和GJ7-2结构上包含C21位氨基活性基团,具备与DNA交联的条件,若与DNA交联的分子较少,则可能无法用DNA荧光结合竞争试验测得。ETs共价交联DNA后,引起多数细胞典型的G<sub>2</sub>/M期阻滞<sup>[4,9]</sup>;在报道较多的A549细胞中,G<sub>2</sub>/M期累积可达到40%~70%<sup>[9]</sup>。因此,本文研究细胞周期

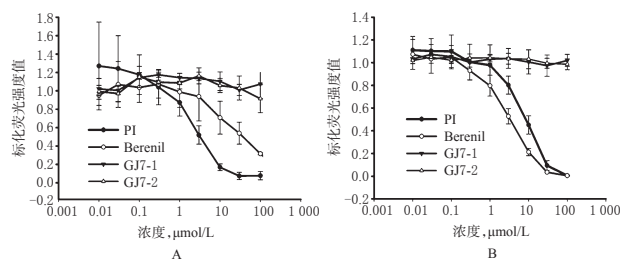


图3 不同化合物与DNA的结合荧光变化曲线  
A.吖啶橙探针;B.DAPI探针

Fig 3 Fluorescent curves of different compounds binding to DNA

A. acridine orange probe; B. DAPI probe

以及与DNA的结合情况都选用A549细胞。

化合物的细胞毒性较低,可能与其对DNA靶点的亲和力降低或结合方式改变有关。通过琼脂糖凝胶电泳观察DNA迁移阻滞,可检测ETs与DNA的结合<sup>[9]</sup>;但预试验中GJ7-1和GJ7-2未对DNA迁移产生影响。为此,笔者用两种荧光探针吖啶橙和DAPI,通过竞争方法检测药物与DNA的结合方式。药物与DNA结合主要有嵌入(如吖啶橙<sup>[10]</sup>)和小沟结合(如DAPI<sup>[11]</sup>)两种方式。PI和Berenil是典型的DNA结合试剂,PI主要以嵌入方式结合,Berenil则以结合于DNA小沟为主<sup>[12]</sup>。

ETs及其合成的高效类似物<sup>[9]</sup>作用于DNA靶点,引起细胞周期阻滞,诱导细胞凋亡;并通过干扰特定转录因子,抑制其下游基因转录;其由于独特的作用机制,产生极强的选择性细胞毒性及抗肿瘤活性。GJ7-1和GJ7-2与其系列化合物<sup>[5]</sup>一样,具有一定的细胞毒作用,但二者对各种肿瘤细胞杀伤作用相差不大。DNA结合竞争试验结果显示,GJ7-1和GJ7-2完全丧失了与DNA结合的活性;相应地,两个化合物对细胞周期产生的影响,与ETs的特征完全不同,二者都没有确定的凋亡诱导作用。GJ7-1和GJ7-2细胞毒作用的大幅减弱及其药理效应特征的改变或丢失,可部分归结于其DNA结合活性的丧失。

### 参考文献

[1] Scott JD, Williams RM. Chemistry and biology of the tetrahydroisoquinoline antitumor antibiotics[J]. *Chem Rev*, 2002,102(5):1 669.  
[2] Stevens EV, Nishizuka S, Antony S, et al. Predicting cisplatin and trabectedin drug sensitivity in ovarian and colon cancers[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008,7(1):10.  
[3] Vincenzi B, Napolitano A, Frezza AM, et al. Wide-spec-

trum characterization of trabectedin: biology, clinical activity and future perspectives[J]. *Pharmacogenomics*, 2010, 11(6):865.

[4] Gajate C, An F, Mollinedo F. Differential cytostatic and apoptotic effects of ecteinascidin-743 in cancer cells: transcription-dependent cell cycle arrest and transcription-independent JNK and mitochondrial mediated apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2002,277(44):41 580.  
[5] Guo J, Dong WF, Liu W, et al. Synthesis and cytotoxicity of 3-aryl acrylic amide derivatives of the simplified safarimycin-ecteinascidin skeleton prepared from l-dopa[J]. *Eur J Med Chem*, 2013(62):670.  
[6] Leal JFM, García-Hernández V, Monen V, et al. Molecular pharmacology and antitumor activity of Zalypsis in several human cancer cell lines[J]. *Biochem Pharmacol*, 2009,78(2):162.  
[7] Leal JFM, Martínez-Díez M, García-Hernández V, et al. PM01183, a new DNA minor groove covalent binder with potent in vitro and in vivo anti-tumor activity[J]. *Br J Pharmacol*, 2010,161(5):1 099.  
[8] Williams AK, Dasilva SC, Bhatta A, et al. Determination of the drug-DNA binding modes using fluorescence-based assays[J]. *Anal Biochem*, 2012,422(2):66.  
[9] David-Cordonnier MH, Gajate C, Olmea O, et al. DNA and non-DNA targets in the mechanism of action of the antitumor drug trabectedin[J]. *Chem Biol*, 2005, 12(11): 1 201.  
[10] Lyles MB, Cameron IL. Interactions of the DNA intercalator acridine orange, with itself, with caffeine, and with double stranded DNA[J]. *Biophys Chem*, 2002,96(1):53.  
[11] Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe [J]. *Biotech Histochem*, 1995,70(5):220.  
[12] Trent JO, Clark GR, Kumar A, et al. Targeting the minor groove of DNA: crystal structures of two complexes between furan derivatives of berenil and the DNA dodecamer d (CGCGAATTCGCG) 2[J]. *J Med Chem*, 1996, 39(23):4 554.

(收稿日期:2014-04-10 修回日期:2014-05-10)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅