

· 论著 ·

吲哚查尔酮衍生物 FC58 的抗白血病多药耐药活性研究

戴佳炜¹, 施赛健², 宋璆蔚³, 王志斌², 庄春林², 夏春年¹ (1. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014; 2. 海军军医大学药学院, 上海 200433; 3. 上海蒙特沃德学院)

[摘要] 目的 合成吲哚查尔酮衍生物 FC58, 考察其对白血病细胞的抑制活性。方法 以 3,4,5-三甲氧基苯乙酮和吲哚-3-甲醛为原料, 经羟醛缩合得到目标化合物。采用 CellTiter-Blue 法测试体外抗肿瘤活性, 并通过细胞周期实验分析其作用特点。结果 FC58 对多种白血病细胞均有较强活性, 活性抗耐药指数远高于传统微管蛋白抑制剂紫杉醇、长春碱和多柔比星, 并使细胞周期停滞在 G2/M 期。结论 FC58 是一个极具潜力的抗耐药白血病的先导化合物。

[关键词] 吲哚查尔酮; 白血病; 多药耐药; 抗肿瘤活性; 微管蛋白

[中图分类号] R914 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2021)04-0305-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202012008

Cytotoxicity study on FC58, an indole-chalcone, against multi-drug resistant leukemia cells

DAI Jiawei¹, SHI Saijian², SONG Aiwei³, WANG Zhibin², ZHUANG Chunlin², XIA Chunnian¹ (1. School of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Montverde Academy Shanghai, Shanghai 201201, China)

[Abstract] **Objective** To synthesize and investigate cytotoxicity of an indole-chalcone derivative FC58. **Methods** The target compound was synthesized through the Aldol condensation with 1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethan-1-one and 1*H*-indole-3-carbaldehyde. The Cell Titer-Blue method was used to determine in vitro cytotoxicity. The cell cycle experiment was performed to analyze the action characteristics of FC58. **Results** FC58 exhibited high cytotoxicity against various leukemia cells and resulted in G2/M phase arrest. It showed stronger drug resistant index than traditional tubulin inhibitors such as paclitaxel, vinblastine and doxorubicin. **Conclusion** FC58 represents a promising lead compound for multi-drug resistant leukemia.

[Key words] indole-chalcone; anti-leukemia; multi-drug resistance; cytotoxicity; tubulin

癌症对人类是仅次于心血管疾病的第二大“杀手”, 严重威胁着人类的生命健康^[1]。相关统计表明, 2018 年, 全球新增癌症病例 1 810 万, 死亡病例 960 万^[2-3]。预计到 2030 年, 新增癌症病例和死亡人数将增长约 1.5 倍, 其防治形势十分严峻^[4]。目前, 治疗恶性肿瘤的方法主要有手术切除、放射疗法、生物治疗以及药物治疗等^[5]。其中, 药物治疗仍是肿瘤治疗的重要手段。但一半以上的癌症对传统化疗药物已产生明显耐药。临床证据显示, 90% 以上转移性癌症患者死于不同程度的耐药^[6], 肿瘤耐药已成为目前临床化疗失败的首要原因。因此, 开发多药耐药的抗肿瘤化疗药物已迫在眉睫。

微管蛋白抑制剂一直是抗肿瘤药物研发的热点之一^[7]。微管是由 α/β 微管蛋白组成的异二聚体, 是细胞骨架的主要组成部分^[8]。微管具有多种生物学功能, 能参与细胞增殖、分裂等一系列过程^[9-13], 在细胞生命周期中起重要作用, 是肿瘤细胞中的重要治疗靶标。紫杉醇、长春碱等微管蛋白抑制剂已广泛用于治疗多种癌症。然而, 它们显示出治疗窗窄、选择性差以及多药耐药性问题, 通常是由于 P 糖蛋白^[14] 或微管相关蛋白的过表达引起的^[15]。因此, 选择性好的低毒小分子靶向微管蛋白抑制剂仍有很大需求。

查尔酮衍生物是类黄酮中一类重要的化合物, 分子结构简单, 以 1,3-二苯基丙烯酮为基本骨架, 具有广泛的生物学活性, 如抗肿瘤、抗氧化、抗炎、降血糖、抗菌等^[16-19]。吲哚查尔酮是本课题组研究发现的一类新型查尔酮衍生物, 相比经典的查尔酮, 其抗肿瘤活性显著提高, 作用机制研究表明该类化合物作用于 β 微管蛋白上的秋水仙碱位点^[20],

[基金项目] 上海市卫健委优秀青年人才培养计划 (2017YQ052)

[作者简介] 戴佳炜, 硕士研究生, Email: dai684125@163.com

[通信作者] 庄春林, 教授, 研究方向: 药物设计, Tel: (021)81871258, Email: zcunathan@163.com; 夏春年, 副教授, 研究方向: 药物合成工艺研究, Email: xcn77@zjut.edu.cn

规避了 P 糖蛋白调控的肿瘤多药耐药机制^[21] 以及 β -III 型微管蛋白过表达的影响^[22], 具有良好的抗肿瘤耐药活性。化合物 FC58 是本课题组前期合成的查尔酮类衍生物之一, 具有非常好的抗肿瘤活性 (A_{549} , $GI_{50} = 38 \text{ nmol/L}$)^[23]。课题组以此化合物为研究对象, 考察其对多种白血病细胞株的生长抑制活性, 特别是耐药白血病细胞的活性, 并通过细胞周期实验分析其作用特点, 现报道如下。

1 仪器与试剂

全自动酶标仪 (BioTek, 型号: Synergy 2); 流式细胞仪 (BD, 型号: Accuri C6); 熔点测试仪 (上海精科, 型号: WRR); 核磁共振仪 (Bruker, 型号: Ascend 400); 高分辨质谱仪 (Waters, 型号: UPLC G2-XS Q-TOF); 薄层色谱硅胶板 (烟台江友, 型号: HSGF254)。实验所用试剂均为分析纯 (伊诺凯)。紫杉醇、长春碱、多柔比星 (Sigma-Aldrich), 纯度 >98%。HL60、HL60/DOX、K562、K562/HHT300、CCRF-CEM、CCRF-CEM/VLB100 由海军军医大学药学院天然药物化学教研室传代和冻存。

2 实验方法

2.1 (E)-3-(1H-吲哚-3-基)-1-(3,4,5-三甲氧基苯基) 丙-2-烯-1-酮的合成^[24]

将 1-(3,4,5-三甲氧基苯基) 乙-1-酮 (**1**, 0.21 g, 1.0 mmol) 与 1H-吲哚-3-甲醛 (**2**, 0.07 g, 0.5 mmol) 溶于乙醇 (4 ml) 溶液中, 加入哌啶 (0.11 ml, 1.2 mmol), 加热至 95 °C 搅拌 48 h, 然后加入盐酸调节 pH = 6 淬灭反应, 用乙酸乙酯萃取, 饱和碳酸氢钠溶液、水和饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥、过滤、旋干有机相, 剩余粗品经乙醇在 -20 °C 重结晶, 得到目标化合物 FC58 0.017g, 重结晶产率: 10%, 黄色固体, 熔点: 175.1 ~ 176.8 °C, 路线见图 1。¹H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ : 8.71 (1H, br, NH), 8.13 (1H, d, $J = 15.6 \text{ Hz}$, =CH), 8.00 (1H, m, Ar-H), 7.63 (1H, s, Ar-H), 7.55 (1H, d, $J = 15.2 \text{ Hz}$, =CH), 7.46 (1H, m, Ar-H), 7.31 (4H, m, Ar-H), 3.96 (9H, s, 3×OCH₃)。 ¹³C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ : 189.86, 153.10, 138.78, 137.23, 134.44, 130.08, 123.57, 120.54, 117.82, 114.52, 111.99, 105.96, 60.97, 56.40。ESI-MS (m/z): $C_{20}H_{19}NO_4$ [$M+H$]⁺, 理论值:

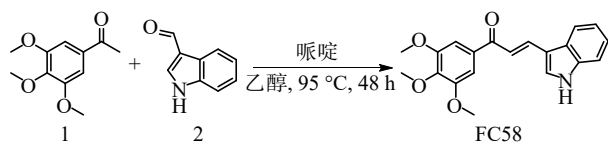


图 1 FC58 的合成路线

338.1387, 实际值: 338.1385。

2.2 体外抗肿瘤活性测试^[23]

样品配制: 用适量 DMSO (Sigma, C6295) 溶解后, 配成 50 mmol/L 的母液备用。取一定量的母液, 用完全培养基将其稀释成一定浓度的溶液, 作为初浓度。将初浓度溶液用完全培养基 3 倍稀释, 共设置 6 个浓度梯度。

CellTiter-Blue 法测试体外抗肿瘤活性。具体方法简述如下: 96 孔板每孔加入浓度为 $(2 \sim 4) \times 10^4$ 个/ml 的细胞悬液 200 μ l, 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱内。24 h 后, 加入配制好的一定浓度梯度的待测物溶液, 每孔 200 μ l, 设置 3 个复孔, 空白对照组加入 200 μ l 的含 1% DMSO 的完全培养基, 置于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱内 48 h。每孔加入含 10% CellTiter-Blue (Promega, G8081) 的完全培养基, 用全自动酶标仪测 530/40 nm 和 590/35 nm 处的荧光值 (FV) 作为背景值。置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内 1 ~ 4 h, 再用酶标仪在相同条件下读取荧光值。

细胞存活率 (%) = 给药孔 Δ FV / 空白对照组 Δ FV。

根据各个浓度的细胞存活率值, 使用 GraphPad Prism 5 软件对数据进行拟合可得到量效曲线和抑制细胞生长 50% 的药物浓度, 即 GI_{50} 。

根据药物对非耐药母代细胞和对耐药细胞的 GI_{50} 计算药物的耐药指数 (DRI)。公式: $DRI = GI_{50}(\text{耐药细胞}) / GI_{50}(\text{母代细胞})$ 。

2.3 细胞周期试验^[23]

取对数生长的 HL60 和 HL60/DOX 细胞, 用胰酶消化分散成单细胞悬液, 以 (5×10^5) 个/孔接种于 96 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h。加入不同浓度的待测药物继续培养 24 h。弃上清液, 用 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, 25200056) 消化, 1000 r/min 离心 5 min 收集细胞。用 1 ml 预冷的 PBS (Hyclone, SH30256.FS) 润洗细胞 1 次, 离心收集细胞。细胞沉淀用 9 ml 预冷的 70% 乙醇轻轻混匀, 4 °C 固定过夜。次日, 离心沉淀细胞后, 弃固定液, 用 1 ml 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 再次离心收集细胞。加入 1 ml PI (50 μ g/ml PI, 0.1 mg/ml RNase A, 0.05 % TritonX-100, 碧云天) 染液染色, 4 °C 下避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测, 激发波长为 488 nm, 用 EXPO32 ADC 软件进行分析。

3 结果与讨论

3.1 体外抗肿瘤活性研究

课题组选择多种白血病细胞及其耐药细胞 (HL60、HL60/DOX、K562、K562/HHT300、CCRF-

CEM、CCRF-CEM/VLB100)对紫杉醇、长春碱、多柔比星以及查尔酮衍生物 FC58 进行体外抗肿瘤活性测试。结果如表 1 所示,紫杉醇、长春碱和多柔比星对 HL60、K562、CCRF-CEM 细胞均有较强活性,GI₅₀ 在 0.12 ~ 135.30 nmol/L。而各耐药细胞对上述 3 种药物明显耐药,GI₅₀ 在 17.16 ~ 1398 nmol/L。耐药指数 DRI 在 3.85 ~ 684.4。与紫杉醇、长春碱、多柔比星相比,虽然查尔酮衍生物 FC58 对以上白血病细胞的活性相对较弱,GI₅₀ 在 30.23 ~ 44.20 nmol/L,但对耐药白血病细胞具有优异活性,GI₅₀ 在 17.56 ~ 51.77 nmol/L,较亲代细胞更为敏感(图 2)。DRI 分别是 0.40、0.90、1.71。其中,CCRF-CEM/VLB100 细胞对 FC58 仅轻微耐药 (DRI=1.71),远低于其他几种化疗药。

表 1 几种化合物的体外抗肿瘤活性的比较 (GI₅₀, nmol/L)

细胞系	化合物			
	紫杉醇	长春碱	多柔比星	FC58
HL60	6.68	2.90	40.27	44.20
HL60/DOX	292.50	89.52	1398	17.56
耐药指数	43.79	30.87	34.72	0.40
K562	12.15	0.12	135.30	31.72
K562/HHT300	98.31	17.16	521.40	28.65
耐药指数	8.09	143	3.85	0.90
CCRF-CEM	<1	<1	—	30.23
CCRF-CEM/VLB100	159.3	684.4	—	51.77
耐药指数	>159.3	>684.4	—	1.71

注:“—”表示未检测。

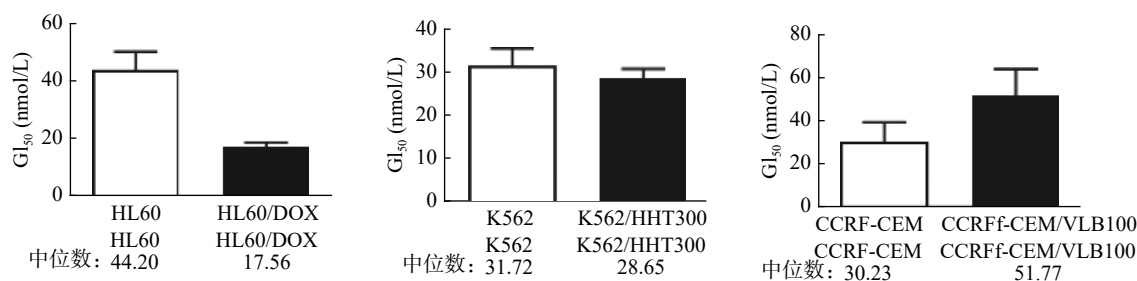


图 2 FC58 对耐药和非耐药白血病细胞的 GI₅₀ 值

3.2 细胞周期分析

微管蛋白抑制剂可干扰微管蛋白-微管之间的平衡,阻断有丝分裂 M 期纺锤体的形成,导致有丝分裂停滞于 G2/M 期,从而诱导细胞凋亡^[25]。利用流式细胞技术检测 FC58、多柔比星、紫杉醇和长春碱对 HL60 和 HL60/DOX 细胞周期的影响,考察其作用机制。

如图 3 所示,与空白组相比,经 1.3 倍 IC₅₀ FC58 处理的组,停滞在 G2/M 期的细胞明显增多。其作用强于紫杉醇,弱于长春碱。经多柔比星

处理的组,停滞在 S 期和 G2/M 期的细胞较空白组有一定程度的增多。FC58、紫杉醇和长春碱的耐药细胞组的结果与非耐药细胞组结果基本相同。经 FC58 处理的组,停滞在 G2/M 期的细胞明显增多,且作用强于其余药物。多柔比星使细胞周期停滞在 S 期的耐药细胞明显增多。上述结果提示,FC58 的作用靶点为微管蛋白。同时,FC58 对细胞周期的影响结果与长春碱较相似,间接证明了 FC58 和长春碱作用机制相似。这可能是 FC58 对 CCRF-CEM/VLB100 细胞轻微耐药的原因。

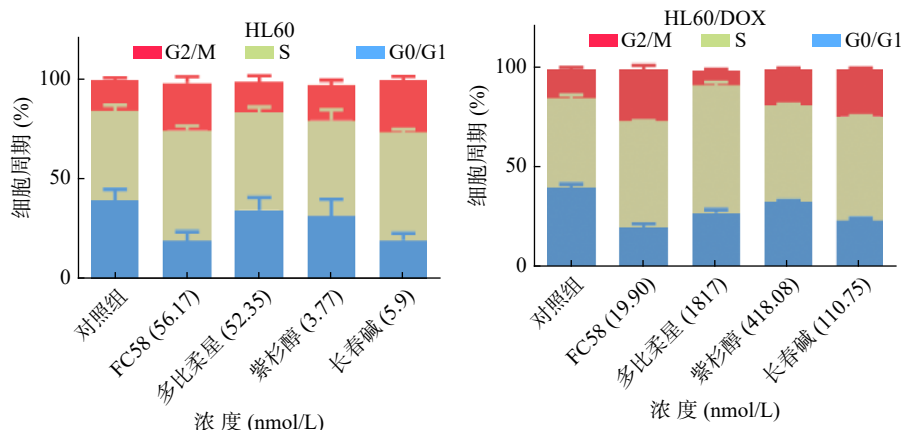


图 3 FC58、多柔比星、紫杉醇和长春碱作用 24 h 后对 HL60 和 HL60/DOX 细胞周期的影响

4 结论

吡啶查尔酮类衍生物 FC58 对多种白血病细胞均有较强活性, GI_{50} 达纳摩尔级。对耐药的白血病细胞同样具有较强的活性, 比亲代白血病细胞更为敏感, 活性抗耐药指数远强于紫杉醇、长春碱和多柔比星。FC58 和其他微管蛋白抑制剂一样都能使细胞周期停滞在 G2/M 期, 间接验证其作用靶点为微管蛋白。FC58 作为一个潜在的抗耐药白血病的先导化合物, 有必要进一步研究其体内的抗肿瘤活性。

【参考文献】

- [1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-1953.
- [4] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
- [5] ALY H A. Cancer therapy and vaccination[J]. *J Immunol Methods*, 2012, 382(1-2): 1-23.
- [6] LONGLEY D B, ALLEN W L, JOHNSTON P G. Drug resistance, predictive markers and pharmacogenomics in colorectal cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1766(2): 184-196.
- [7] TEICHER B A. Newer cytotoxic agents: attacking cancer broadly[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(6): 1610-1617.
- [8] 刁磊, 刘明一, 鲍岚. 微管蛋白亚型及其功能[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(3): 322-332.
- [9] NOGALES E. Structural insights into microtubule function[J]. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 277-302.
- [10] WITTMANN T, HYMAN A, DESAI A. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(1): E28-E34.
- [11] NEWTON C N, WAGENBACH M, OVECHKINA Y, et al. MCAK, a kin I kinesin, increases the catastrophe frequency of steady-state HeLa cell microtubules in an ATP-dependent manner in vitro[J]. *FEBS Lett*, 2004, 572(1-3): 80-84.
- [12] SOBIERAJSKA K, GŁOS J, DĄBOROWSKA J, et al. Visualization of the interaction between G $\beta\gamma$ and tubulin during light-induced cell elongation of *Blepharisma japonicum*[J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2010, 9(8): 1101.
- [13] PORTAN D, ZOCCOLER M, GAILLARD J, et al. MAP65/Ase1 promote microtubule flexibility[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(12): 1964-1973.
- [14] KAVALLARIS M, ANNAREAU J P, BARRET J M. Potential mechanisms of resistance to microtubule inhibitors[J]. *Semin Oncol*, 2008, 35(3 suppl 3): S22-S27.
- [15] KAVALLARIS M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(3): 194-204.
- [16] SINGH P, ANAND A, KUMAR V. Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review[J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 85: 758-777.
- [17] BATOVSKA D I, TODOROVA I T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones[J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2010, 5(1): 1-29.
- [18] SAHU N K, BALBHADRA S S, CHOUDHARY J, et al. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review[J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(2): 209-225.
- [19] ZHUANG C L, ZHANG W, SHENG C Q, et al. Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry[J]. *Chem Rev*, 2017, 117(12): 7762-7810.
- [20] ZHOU B, YU X, ZHUANG C, et al. Unambiguous identification of β -tubulin as the direct cellular target responsible for the cytotoxicity of chalcone by photoaffinity labeling[J]. *ChemMedChem*, 2016, 11(13): 1436-1445.
- [21] HU T, LI Z, GAO C Y, et al. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(30): 6876-6889.
- [22] GAN P P, MCCARROLL J A, PO'UHA S T, et al. Microtubule dynamics, mitotic arrest, and apoptosis: drug-induced differential effects of betaIII-tubulin[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(5): 1339-1348.
- [23] CONG H, ZHAO X, CASTLE B T, et al. An indole-chalcone inhibits multidrug-resistant cancer cell growth by targeting microtubules[J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(9): 3892-3900.
- [24] LI J, WU Y, GUO Z, et al. Discovery of 1-arylpyrrolidone derivatives as potent p53-MDM2 inhibitors based on molecule fusing strategy[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(12): 2648-2650.
- [25] NEGI A S, GAUTAM Y, ALAM S, et al. Natural antitubulin agents: Importance of 3,4,5-trimethoxyphenyl fragment[J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(3): 373-389.

[收稿日期] 2020-12-16 [修回日期] 2021-02-26

[本文编辑] 李睿旻