

3-取代芳基氧化吲哚(PH II-7)对肿瘤细胞周期的影响

谭耀红, 杨纯正*, 齐 静, 王金宏, 王彩云, 彭 辉

(中国医学科学院、中国协和医科大学 血液学研究所 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

摘要: 目的 观察 3-取代芳基氧化吲哚(PH II-7)对肿瘤细胞周期分布的影响,明确 PH II-7 的抗敏感肿瘤和耐药肿瘤的共同机制。方法 用流式细胞仪检测细胞周期分布,Western 印迹分析细胞周期相关蛋白的表达,³H-TdR 参入法检测细胞 DNA 合成,ELISA 测定酪氨酸激酶的活性。结果 PH II-7 对多种肿瘤细胞(包括耐药细胞)的周期分布均有影响,阻滞细胞 G₁ 期至 S 期的移行,细胞周期相关蛋白 CDK2, Rb 和 c-myc 的表达被抑制,Cyclin E 的表达升高。PH II-7 还可抑制³H-TdR 的参入,抑制 EGFR 的酪氨酸激酶的活性。结论 抗耐药肿瘤新药 PH II-7 是一种细胞周期阻滞剂,可能是通过抑制 CDK2 而使肿瘤细胞阻滞在 G₁ 期,同时也说明细胞周期阻滞可能是抗耐药肿瘤的新方向。

关键词: 氧化吲哚衍生物; 细胞周期; 多药耐药; 肿瘤细胞株

中图分类号: R329.251 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)11-0805-04

Effects of 3-substituted aryl oxindole(PH II-7) on cell cycle of tumor cells

TAN Yao-hong, YANG Chun-zheng*, QI Jing, WANG Jin-hong, WANG Cai-yun, PENG Hui

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract: **Aim** To study the antitumor mechanism of 3-substituted aryl oxindole (PH II-7) and determine its effects on cell cycle distribution of tumor cells. **Methods** The cell cycle distributions were determined with FACS. The cell cycle regulation-related proteins of K562 lysates were analyzed with Western Blot. The inhibition of PH II-7 on DNA synthesis of tumor cells were estimated through ³H-thymidine incorporation and the tyrosine kinase activity of EGFR of A431 lysates was measured with ELISA. **Results** PH II-7 effected cell cycle distribution of several tumor cells, including multidrug resistant tumor cell lines, and accumulation of cells in the G₁-G₁ stages was observed. The cell cycle regulation-related proteins CDK2, Rb and c-myc were inhibited by PH II-7 in a dose dependent manner, whereas the expression of CyclinE was increased after exposure to PH II-7. Furthermore, PH II-7 2.0 mg•L⁻¹ was shown to inhibit the incorporation of ³H-thymidine into DNA, and 21.89% - 41.29% of the PTK activity of EGFR in A431 lysates was inhibited by PH II-7 2 - 8 mg•L⁻¹ in a dose-dependant manner. **Conclusion** PH II-7, a new anti-tumor agent, blocks the transition of cell cycle of tumor cells from G₁ to S phase by inhibition CDK2.

Key words: oxindoles; cell cycle; multidrug resistance; tumor cell lines

本实验室以靛玉红为模板,设计合成了 3 类氧化吲哚化合物,并采用定量构效关系分析法(QSAR,

quantitative structural-activity relationship analysis)开展了 3-取代芳基氧化吲哚定量构效研究,从合成的几十个化合物中筛选出了具有较高抗肿瘤活性和较低毒性的一种化合物,将其命名为 3-取代芳基氧化吲哚(3-substituted aryl oxindole, PH II-7)。实验结果表明,PH II-7 对多种人肿瘤细胞的生长有抑制作用,

收稿日期: 2002-11-04.

基金项目: “十五”国家高技术研究发展计划(863 计划,2002 AA2Z346D);国家自然科学基金资助项目(30271515)。

* 通讯作者 Tel: 86 - 22 - 27230740, Fax: 86 - 22 - 27230740, E-mail: czyang@public.tpt.tj.cn

并且对于阿霉素等抗肿瘤药无效的多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 肿瘤细胞 PH II-7 同样显示出较强的抑制作用^[1]。为了阐明 PH II-7 的抗耐药机制, 检测了 PH II-7 对耐药相关基因表达的影响, 结果发现 PH II-7 能在不同程度上抑制 *mdr1* 和 *sorcin* 基因的表达, 并表现出剂量依赖性。另外, 用 DNA 芯片技术比较分析了 PH II-7 作用前后 K562 和 K562/A02 细胞 176 个基因的表达情况^[2], 发现在耐药细胞 K562/A02 中高表达的 5 个基因均能被 PH II-7 抑制, 这些可能是 PH II-7 抗肿瘤耐药性的主要原因之一。本文观察了 PH II-7 对细胞周期的影响, 进一步探讨 PH II-7 的作用机制。

材料与方法

试剂 PH II-7 由本实验室合成组合成, 干燥室温下可稳定保存, 实验前先溶于 DMSO 中, 配成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, 使用时用生理盐水稀释至需要的浓度。细胞周期检测试剂盒 cycle TESTTM plus DNA reagent kit 购于 Becton Dickinson; 抗 CDK2, Cyclin E, Rb, *c-myc* 抗体和抗 EGFR 抗体购于 Santa Cruz; 抗磷酸化酪氨酸抗体购于 Sigma。³H TdR 购于中国原子能研究所, 比放射强度为 $37 \text{ GBq} \cdot \text{L}^{-1}$; EGF 购于 PeproTech EC LTD。

细胞株及细胞培养 9 种人肿瘤细胞分别是白血病细胞株 HL60 和 K562, 以及这两种细胞的多药耐药细胞株 HL60/ADR 和 K562/A02; A549, M21, SF188 和 SGC7901 分别是来源于肺腺癌、黑色素瘤、神经母细胞瘤和胃癌的细胞株, A431 为表皮癌细胞。细胞培养于含 10% 新生牛血清的培养液中, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 饱和湿度的培养箱中培养, A431 细胞用 F12 (Gibco BRL), 其他细胞用 RPMI 1640 (Gibco BRL)。人表皮癌细胞 A431 购于上海细胞库; K562/A02 是本实验室用阿霉素诱导的多药耐药细胞株, 表达 Pgp (P-glycoprotein)^[3]; HL60/ADR 来自日本细胞库, 表达 MRP/gp180 蛋白。在细胞培养的过程中, 为了维持耐药细胞的耐药性, 向 K562/A02 和 HL60/ADR 的培养液中分别加入 1 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的阿霉素, 实验前 3 d 换为新鲜培养液。

细胞周期的检测 按细胞周期检测试剂盒说明进行, 收集细胞 5×10^5 , Buffer Solution 1 mL 洗 3 次, 按说明依次加入 Solution A 250 μL , Solution B 200 μL 和 Solution C 200 μL 。用 50 μm 尼龙网过滤样品, $2 \sim 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 黑暗中保存, 3 h 内 EPICS 流式细胞仪 (Coulter Co. USA) 进行检测分析。

Western 印迹 取 5×10^6 K562 细胞, 经不同浓度的 PH II-7 处理 24 h 后收集细胞, 加入裂解液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, pH 6.8, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 2% SDS, 10% 甘油, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Aprotinin, $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Leupeptin) 200 μL , 超声碎细胞。取总蛋白 200 μg 12% SDS-PAGE 电泳。电泳结束后将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶封闭后与相应的一抗 (1:100 ~ 200) 室温孵育 2 h, 再与二抗室温孵育 1 h, DAB 显色。

³H 标记物参入实验 不同浓度的 PH II-7 分别处理 K562 和 K562/A02 细胞 24 h, 收获前 6 h 加入 ³H TdR, 使终放射活性为 $37 \text{ MBq} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用细胞收获仪将细胞转移到玻璃纤维滤膜上, 干燥后, 加入闪烁液 5 mL, 测量放射性核素闪烁记数并计算 ³H 参入抑制率。

EGFR 酪氨酸激酶活性的测定 按文献 [4] 用 ELISA 进行检测。取经不同浓度的 PH II-7 处理 10 h 的 A431 细胞, 经 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EGF 作用 30 min 后超声裂解。取等量总蛋白加入包被 EGFR 抗体的酶标板中, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育, 再依次加入抗磷酸化酪氨酸抗体和 HRP 标记的三抗后显色。

统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 显著性差异用 *t* 检验。

结果

1 PH II-7 对肿瘤细胞周期的影响

结果表明 PH II-7 对这 9 种肿瘤细胞的周期分布均有影响, 除 HL60 细胞 S 期明显升高外, 其他细胞均是 G_0 - G_1 升高, S 期和 G_2 -M 期下降 (表 1)。其中对 K562 细胞的周期分布影响最明显, 对 A549 和 M21 的细胞周期影响最小, 这与 PH II-7 对肿瘤细胞的细胞毒作用结果是一致的。

2 PH II-7 对 K562 中 Rb, CDK2, Cyclin E, P27 和 *c-myc* 表达的影响

Western 印迹分析显示, 当 K562 细胞分别经过 0, 0.2, 0.5, 1.0 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PH II-7 处理 24 h 后, CDK2 的表达受到抑制, 并表现出剂量依赖性, 而 Cyclin E 在 K562 细胞中的表达较低, 经过 PH II-7 处理后 Cyclin E 反而升高, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其表达水平有所升高, 0.5 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时升高明显, 这与 PH II-7 处理后 K562 细胞的周期分布是一致的, G_1 期剂量依赖性细胞周期阻滞导致 Cyclin E 的积累, 而 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PH II-7 处理后 Cyclin E 的表达量反而下降, 这可能是药物剂量过大, 细胞死亡所致。Rb 和

c-myc 的表达可被 PH II-7 以剂量依赖方式所抑制 (图 1)。

Table 1 Cell cycle distribution of various cell lines following exposure to 3-substituted aryl oxindole (PH II-7)

Cell line	Treatment(for 24 h)	G ₀ -G ₁ / %	S / %	G ₂ -M / %
HL60	Control	38.60	51.21	10.19
	0.1 mg·L ⁻¹	17.55	71.25	11.20
HL60/ADR	Control	44.43	44.15	11.43
	0.4 mg·L ⁻¹	60.12	35.36	4.53
K562	Control	28.84	62.08	9.07
	0.5 mg·L ⁻¹	72.32	27.68	0.00
K562/A02	Control	35.85	59.79	4.36
	0.5 mg·L ⁻¹	62.35	37.65	0.00
A549	Control	63.22	29.62	7.16
	4 mg·L ⁻¹	67.02	20.54	12.44
M21	Control	61.77	25.68	12.55
	8.0 mg·L ⁻¹	70.79	18.09	11.12
SF188	Control	51.73	36.04	12.33
	4.0 mg·L ⁻¹	61.10	24.63	14.47
SGC7901	Control	66.78	26.65	6.57
	1.0 mg·L ⁻¹	86.87	9.81	3.33
A431	Control	66.10	27.24	6.66
	1.0 mg·L ⁻¹	75.29	19.52	5.20

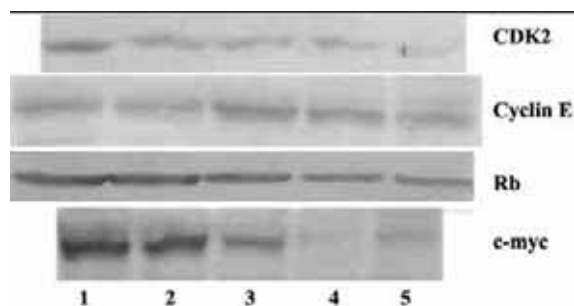


Figure 1 Western blot assay of total cell lysates with anti-CDK2, anti-Cyclin E, anti-Rb, anti-c-myc antibodies. Lane 1-lane 5 are K562 cells following treatment with 0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg·L⁻¹ PH II-7 for 24 h, respectively

3 PH II-7 对 K562 和 K562/A02 细胞 DNA 合成的影响

在细胞生长过程中³H-TdR 参与到 DNA 中,通过计算³H 标记物参入量来判断细胞 DNA 合成和增殖的情况。由表 2 可以看出 2.0 mg·L⁻¹ PH II-7 对 K562 和 K562/A02 细胞³H-TdR 的参入均有抑制作用。

4 PH II-7 对 A431 细胞 EGFR 酪氨酸激酶活性的抑制作用

A431 细胞是来自于表皮癌的皮肤株,EGFR 有

较高水平的表达。本实验用夹心 ELISA 法检测 EGFR 酪氨酸激酶活性,结果发现无血清培养的 A431 细胞经 50 μg·L⁻¹ EGF 诱导 30 min 后,EGFR 酪氨酸激酶活性明显升高,而 PH II-7 对这种升高的 EGFR 酪氨酸激酶活性又有抑制作用,并呈现出剂量依赖性,2, 4, 8 mg·L⁻¹ 的 PH II-7 抑制率分别为 21.89%, 28.72% (P < 0.05) 和 41.29% (P < 0.01)。

Table 2 Estimation of DNA synthesis of K562, K562/A02 cells though ³H thymidine incorporation following treatment with increasing concentrations of PH II-7 for 24 h

Treatment/ mg·L ⁻¹	K562		K562/A02	
	CPM	Inhibition rate/ %	CPM	Inhibition rate/ %
PH II-7(0.5)	16 593 ± 2 511	18.63	14 477 ± 1 200	3.12
PH II-7(1.0)	15 736 ± 3 308	22.83	12 724 ± 2 377	14.86
PH II-7(2.0)	5 904 ± 2 451*	71.05	7 273 ± 1 586	51.33*
Positive control	6 156 ± 1 953*	69.81	5 557 ± 913	62.81*
Negative control	20 391 ± 3 255		14 944 ± 540	

The positive control of K562 cells and K562/A02 cells are 1 mg·L⁻¹ of Ara-C for 24 h and 2 mg·L⁻¹ of Ara-C for 24 h, respectively. Negative control is saline. $\bar{x} \pm s$, n = 3. * P < 0.01 vs negative control group

讨论

细胞周期是细胞生命活动的基本过程,利用流式细胞仪观察了 8 种肿瘤细胞的周期分布,发现 PH II-7 对这 8 种肿瘤细胞的周期分布均有影响。除 HL60 细胞 S 期明显升高外,其他细胞均是 G₀-G₁ 升高, S 期和 G₂-M 期下降,说明 PH II-7 阻滞肿瘤细胞 G₁ 期至 S 期的移行。另外,还观察了不同剂量的 PH II-7 对同一种细胞周期的影响,发现这种 G₁ 期阻滞作用具有剂量依赖性,随着剂量的增加 G₀-G₁ 的累积也越来越明显。尤其值得注意的是,无论是敏感肿瘤细胞还是耐药肿瘤细胞,PH II-7 对其周期的影响几乎是相同的。因此可以认为对细胞周期的阻滞作用是 PH II-7 对敏感肿瘤和耐药肿瘤的共同的作用机制。参与 G₁ 调控的因子有多种,主要为 CDK2 和 Cyclin E^[5]。为了寻找 PH II-7 具体作用在细胞周期的靶点,用 Western 印迹观察了 PH II-7 对 CDK2, Cyclin E, Rb 和 c-myc 的影响,发现 PH II-7 可抑制 CDK2, Rb 和 c-myc 的表达,并有剂量依赖性,而 Cyclin E 的表达不仅未被抑制,反而明显升高,这与细胞周期的分布是一致的。Cyclin E 主要在 G₁ 期表达,细胞被阻滞在 G₁ 期可导致 Cyclin E 的积累^[6]。从实验结果观察到 Cyclin E 的积累随着 PH

IF-7 的剂量的增加而增高,但到了 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后不再增加,反而有下降的趋势,这可能与剂量有关,剂量过大,死亡细胞也会明显增加。综上所述,认为 PH IF-7 是通过以下通路来影响细胞周期的:PH IF-7 抑制了 CDK2,导致 Rb 的活性受到抑制,不释放 E2F,游离的 E2F 含量下降,与一系列具有特殊序列的基因启动子区(如 c-myc)结合的 E2F 减少,所以 c-myc 的表达下降,细胞的 G_1 期至 S 期的移行被阻滞。

细胞周期被阻滞在 G_1 期可导致细胞 DNA 合成障碍,选择 ^3H TdR 参入实验来判断 PH IF-7 处理后细胞 DNA 合成和增殖的情况。结果发现 PH IF-7 对 K562 和 K562/A02 细胞 ^3H TdR 的参入均有抑制作用,并呈现出剂量依赖性。这与细胞周期的 G_1 期至 S 期的移行阻滞是相符的。

表皮生长因子受体 EGFR 属于 erbB 生长因子受体家族,据报道,EGFR 的功能与细胞周期调控紧密相关,EGFR 通路的阻断可引起多种肿瘤细胞的周期阻滞在 G_0 - G_1 期^[7,8]。实验结果提示 PH IF-7 对 A431 细胞 EGFR 酪氨酸激酶的活性有抑制作用,并呈剂量依赖性,这可能也是 PH IF-7 阻滞肿瘤细胞周期的原因之一。

从上述结果可以提示,有效抗耐药肿瘤新药 PH IF-7 通过抑制细胞周期分布而对敏感肿瘤细胞和耐药肿瘤细胞均具有生长抑制作用,靶点可能是通过抑制 CDK2 而导致肿瘤细胞 G_1 期至 S 期的移行阻

滞,同时也提示 G_1 期阻滞有可能成为克服敏感肿瘤和耐药肿瘤的共同方向。

References:

- [1] Tan YH, Qi J, Liu WJ, *et al.* Preliminary studies on the mechanism of a new anti-tumor agent PH IF-7 with special preference to multidrug resistant tumor cells [J]. *Acta Acad Med Sin* (中国医学科学院学报), 2002, **24**(2): 134 - 139.
- [2] Tan YH, Li GY, Zhao CH, *et al.* Expression of sorcin predicts poor outcome in acute myeloid leukemia [J]. *Leuk Res*, 2003, **27**(2): 125 - 131.
- [3] Yang CZ, Luan FJ, Xiong DS, *et al.* Multidrug resistance in leukemia cell line K562/A02 induced by doxorubicin [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1995, **16**(4): 333 - 337.
- [4] Hoffmann T, Hafner D, Ballo H, *et al.* Antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies and cisplatin in ten human head and neck squamous cell carcinoma lines [J]. *Anticancer Res*, 1997, **17**(6D): 4419 - 4425.
- [5] Sherr CJ. Cancer cell cycles [J]. *Science*, 1996, **274**(5293): 1672 - 1677.
- [6] Sherr CJ. The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited [J]. *Cancer Res*, 2000, **60**(14): 3689 - 3695.
- [7] Lui VW, Grandis JR. EGFR-mediated cell cycle regulation [J]. *Anticancer Res*, 2002, **22**(1A): 1 - 12.
- [8] Raftery MA, Fenton JE, Jones AS. An overview of the role and interrelationship of epidermal growth factor receptor, cyclin D and retinoblastoma protein on the carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the larynx [J]. *Clin Otolaryngol*, 2001, **26**(4): 317 - 320.