

吩噻嗪类化合物抑制肿瘤细胞多药耐药及蛋白激酶 C 活性的三维构效关系研究

彭 晖, 杨纯正*, 梁 巍, 齐 静, 黄 牛¹, 郭宗儒¹

(中国医学科学院·中国协和医科大学血液学研究所, 天津 300020;

¹ 中国医学科学院·中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 目的: 利用本室诱导建立的耐药细胞株 K562/A02, 研究在体外条件下吩噻嗪类衍生物(PTZs) 逆转多药耐药(MDR) 活性的构效关系。方法与结果: 利用已知 PKC Cys 2 功能区晶体结构, 结合计算化学和分子图形学手段对 PKC 抑制剂与 PKC 蛋白分子间可能的相互作用模式进行探讨。结果表明, 2 位取代各种基团逆转 MDR 作用强度依次为: $\text{COC}_3\text{H}_7 > \text{CF}_3 > \text{COCH}_3 > \text{H}$ 。边链哌嗪环 4'-位取代基作用强度为: $\text{CH}_3 > \text{COOC}_2\text{H}_5 > \text{C}_2\text{H}_4\text{OH}$ 。结论: 选出代表性化合物测定对鼠脑的抑制活性, 初步三维构效关系研究表明, PTZs 抑制 PKC 活性确实与特定的立体结构特征有关。本研究为进一步探索 PTZs, PKC 和 MDR 三者间的内在机制和设计有效 PKC 抑制剂或多药耐药逆转剂提供了新的途径。

关键词 吩噻嗪类衍生物; 多药耐药; 逆转剂; 蛋白激酶 C

肿瘤细胞的多药耐药(multidrug resistance, MDR) 是肿瘤化疗失败的主要原因。所谓肿瘤多药耐药性, 是指患者接受化疗药物治疗后, 对原来药物产生耐药, 并且对其它的药物产生交叉耐药, 从而出现临床疗效的降低或无效的现象。MDR 的产生与 *mdr1* 基因的过度表达有关, *mdr1* 基因的产物 P-糖蛋白(Pgp 或 P-170) 是位于细胞膜表面的能量依赖性药物外排泵, 可将各种不同的细胞毒药物泵出细胞外, 从而减少细胞内药物聚集, 防止药物杀伤细胞的作用^[1]。因此, 开发针对肿瘤细胞耐药的逆转剂是当前研究主流之一。

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是一种 Ca^{2+} 、磷脂依赖性蛋白激酶, 已经证实, 激活的 PKC 使蛋白质磷酸化, 从而产生各种生物学效应, 在细胞的信号传递中起重要作用, 尤其是证实 PKC 可通过影响 Pgp 磷酸化水平而影响其转运功能, 更引起人们的极大重视。新近研究表明, PKC 可诱导和加速 Pgp 的磷酸化而导致 MDR 的发生和发展^[2,3]。因此, PKC 自然就成为一个非常重要的逆转 MDR 研究的靶点。

吩噻嗪类衍生物对 MDR 有较强的逆转作用,

且被广泛用于体外多种肿瘤耐药细胞系的逆转研究中。虽然吩噻嗪类衍生物逆转 MDR 机制仍不清楚, 但是一个主要假设机制已被提出^[4,5]: 吩噻嗪类衍生物是通过与细胞毒药物竞争 Pgp 的同一结合位点而阻止药物外排, 或者是通过抑制 PKC 酶, 从而阻断 Pgp 的磷酸化来达到抑制 MDR 产生。

为阐明吩噻嗪类衍生物逆转多药耐药与抑制 PKC 的结构特征, 我们利用本室诱导建立的耐药细胞株 K562/A02^[6] 研究吩噻嗪类衍生物逆转 MDR 过程中 PKC 的作用。

为进一步研究吩噻嗪类衍生物与 PKC 生物活性机制, 我们利用 DOCK 软件—分子对接软件, 直观地在三维空间中考察配体小分子与受体大分子相互作用时的结合模式特征, 并结合生物活性初步探讨吩噻嗪类衍生物、PKC 和 MDR 三者间可能的内在机制, 为设计新的 PKC 抑制剂或多药耐药逆转剂提供新型结构信息。

材 料 和 方 法

材料、PKC 蛋白酶的分离纯化、PKC 蛋白酶活性的测定和细胞毒实验以及逆转阿霉素耐药作用测定 见另文^[7]。

吩噻嗪类衍生物和 PKC 的结合 所有化合物用 Tripos 公司分子模拟软件系统 Alchemy 2000 中

收稿日期: 1998-01-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39470816)

* 联系人

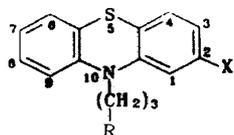
“Alchemy minimizer”程序进行能量优化,原子点电荷采用 Gasteiger-Huckel 体系,收敛到能量变化 $< 0.02 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。分子对接研究是在 SGI RZ 4000 图形工作站上用 Tripos 公司的 SYBYL 6.04 软件包完成的,所有参数均为 SYBYL 缺省值。DOCK 步骤如下:从 PMA(phorbol myristic acetate)-PKC 复合物中抽提出 PMA,将吩噻嗪类生物分子与 PMA 进行分子叠合,以保证它们的空间取向一致,把叠合后的吩噻嗪类生物分子导入 PKC 结合腔中,优化分子间的相互作用能量,过程中保持受体位点构象不变,只改变配体构象。

结 果

1 吩噻嗪类生物对 MDR 细胞耐药逆转作用

吩噻嗪类生物分子结构和实验结果见表 1。以生物对阿霉素(ADR)对 MDR 细胞耐药逆转倍数($IC_{50} \text{ ADR} / IC_{50}(\text{ADR} + \text{药物})$)比较各种基团变化对 MDR 细胞耐药逆转强度的情况。结果为 $2\text{-COC}_3\text{H}_7 > 2\text{-CF}_3 > 2\text{-COCH}_3 > \text{H}$ 。

Tab 1 Structure of phenothiazines and effect on K562/ A02



Name	X	R	5-position	MDR Ratio
PTZ1	COCH ₃	PTZ1 COCH ₃	SO ₂	5.18
PTZ2	COCH ₃	PTZ2 COCH ₃	S	1.29
PTZ4	COC ₃ H ₇	PTZ4 COC ₃ H ₇	S	4.67
PTZ5	COC ₃ H ₇	PTZ5 COC ₃ H ₇	S	2.94
PTZ6	COCH ₃	PTZ6 COCH ₃	SO ₂	2.49
PTZ7	CF ₃	PTZ7 CF ₃	SO ₂	36.58
PTZ11	COC ₃ H ₇	PTZ11 COC ₃ H ₇	S	75.78
PTZ13	Cl	PTZ13 Cl	S	17.32
PTZ14	H	PTZ14 H	S	3.40
PTZ15	COCH ₃	PTZ15 COCH ₃	S	8.04
TFP	CF ₃	TFP CF ₃	S	3.97

K562/ A02: MDR cell line; MDR: Multidrug resistance; PTZ: Phenothiazines; TFP: Trifluoperazine.

结合表 1 中各种结构式可见: (1) PTZ14 与

PTZ15 比较,除 2 位基团外,其余部分完全相同,PTZ14 逆转 MDR 细胞作用强度明显减弱,可见 2 位 COCH₃ 比无取代作用强。(2) 同样有相似结构的 PTZ6 与 PTZ7 比较,2 位取代 CF₃ 基团远远优于 COCH₃ 基团。(3) 与对照品三氟拉嗪(TFP)比较,PTZ11 的 2 位取代 COC₃H₇ 基团大大优于 CF₃ 基团。

另外,同样有吩噻嗪环主结构的 PTZ4,PTZ5 和 PTZ11 之间,若边链 4 位哌嗪环取代基不同,其逆转作用强度仍有明显差异(表 1),实验结果如下: CH₃ > COOC₂H₅ > C₂H₄OH。

2 吩噻嗪类生物对鼠脑 PKC 活性抑制作用

按试剂盒说明测定 4 种吩噻嗪类生物(PTZ6,PTZ7,PTZ11 和 TFP)对 PKC 酶活性的影响,结果见表 2,以 IC₅₀(使 50%鼠脑 PKC 酶活性受到抑制的吩噻嗪类生物的浓度(mol·L⁻¹))比较抑制作用强度,其中 PTZ11 与 TFP 抑制作用强度大于 PTZ6 与 PTZ7。

Tab 2 Inhibition of PKC(rat brain) by PTZs

Che mosensitizer	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	Activity
TFP	100.00 ± 30.00	High
PTZ11	133.00 ± 9.64	High
PTZ6	489.77 ± 31.40	Poor
PTZ7	> 500	Poor

PKC: Protein kinase C.

3 PMA 存在下,PTZ11 对 PKC 活性抑制

结果见图 1,表明在 PKC 激动剂 PMA 存在下,PTZ11 仍能抑制 PKC 活性,但抑制率降低,提示 PTZ11 可能和 PMA 竞争性地结合 PKC,从而抑制 PMA 激活作用。

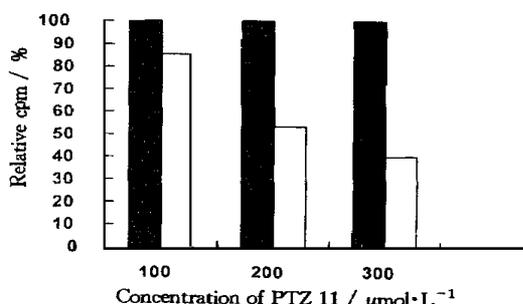
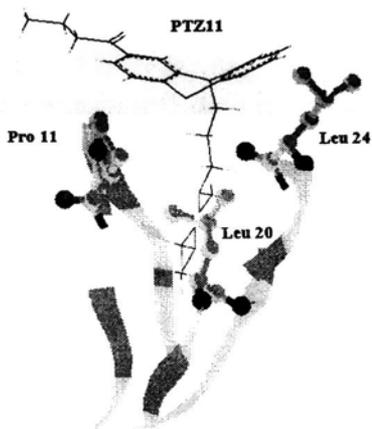


Fig 1 Inhibition of PKC *in vitro* by PTZ11 in the presence of PMA(10 μmol·L⁻¹). PKC activity was determined in the presence of various concentrations of PTZ11(100, 200 and 300 μmol·L⁻¹). ■ PMA: Phorbol myristic acetate; □ PMA + PTZ: Phorbol myristic acetate and phenothiazines.

4 PTZ11 对 K562/ A02 细胞 PKC 活性抑制作用

结果表明, PTZ11 存在时, 细胞内的 PKC 活性为 $229 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 而阴性对照 K562/ A02 细胞内 PKC 活性为 $2761 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 两者差别有显著意义 ($P < 0.05$), 提示 PTZ11 能抑制细胞内 PKC 活性。

5 吩噻嗪类衍生物与 PKC 相互作用的分子图形



利用 Tripos 公司的 SYBYL 6.04 软件包, 我们模拟了有结构代表性的两个化合物 PTZ11 和 PTZ6 与 PKC Cys 2 功能区可能的结合模型, 如图 2 所示, 从不同配体和受体相互作用模式的区别有显著意义方面阐明 PTZ11 和 PTZ6 抑制 PKC 活性(实验数据)。另外, 通过 Alchemy“RMS Fit”程序对这 4 个化合物进行叠合, 见图 3 和图 4。

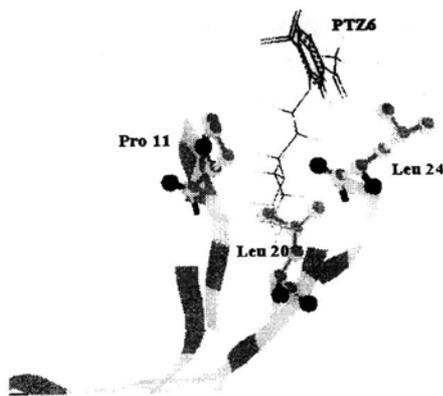


Fig 2 Overall features of the binding model for PTZ11 and PTZ6 in complex with PKC δ Cys 2. The protein backbone is shown in a ribbon diagram. The ligand is displayed as a stick model, and three hydrophobic residues in close contact with the ligand are displayed as a stick and ball model.

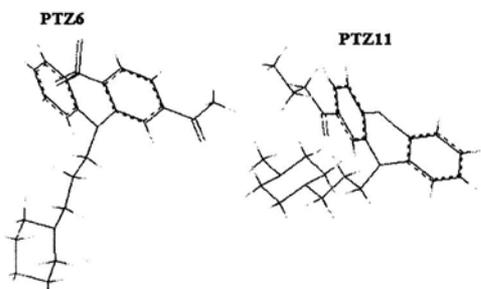


Fig 3 Comparison of the conformation of PTZ6 and PTZ11.

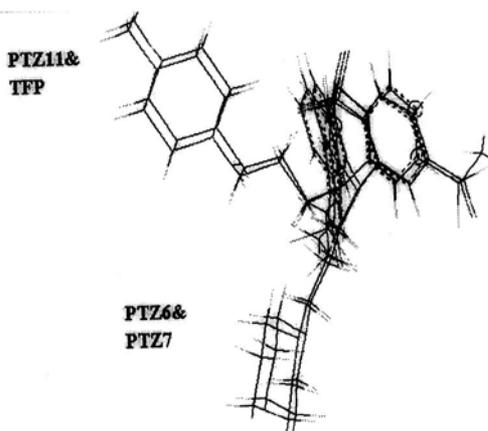


Fig 4 Comparison of the conformation of PTZ6, PTZ7, PTZ11 and TFP.

讨 论

目前已应用于逆转 MDR 的药物, 最主要的一大类为膜转运调节剂, 如钙离子通道拮抗剂和钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 抑制剂等。吩噻嗪类衍生物是一种较典型的 CaM 抑制剂。我们的研究表明, 新的吩噻嗪类衍生物都有一定的逆转 MDR 活性的作用, 但作用强度差别很大。吩噻嗪环上 2-位和边链哌嗪环 4'-位取代基团不同, 逆转 MDR 活性有明

显差异。具 2-位取代基团化学结构的逆转作用强度依次为 $\text{COC}_3\text{H}_7 > \text{CF}_3 > \text{COCH}_3 > \text{H}$ 。具边链哌嗪环 4'-位取代基的逆转作用强度为 $\text{CH}_3 > \text{COOC}_2\text{H}_5 > \text{C}_2\text{H}_4\text{OH}$ 。可见 4'-位带有羰基和羟基的极性取代基团不利于活性, 而 CH_3 这种疏水烷基有利于逆转活性。推测可能是药物分子边链与受体的某疏水区域相互作用的结果。另外, 从 PTZ1 和 PTZ6 活性比较来看, 边链 4'-取代烷基哌嗪环比哌啶环有利于逆转 MDR 活性。

有报道^[9],吩噻嗪类衍生物也可抑制 PKC 活性,这是否与逆转 MDR 相关尚未见报道。我们选择 4 个代表性化合物测定对鼠脑 PKC 酶的抑制活性。结果表明:PTZ11 与 TFP 活性高,而 PTZ6 与 PTZ7 活性较低。通过 Alchemy “RMS Fit”程序对这 4 个化合物进行叠合,发现主要区别在于 10 位氮原子上边链的走向不一致,见图 4,PTZ11 和 TFP 取向一致,而 PTZ6 与 PTZ7 取向相同。恰巧与上面抑制 PKC 活性结果一致,提示吩噻嗪类衍生物抑制 PKC 确实与特定的立体结构特征有关。见图 3,造成 PTZ6 与 PTZ11 构象不同的主要原因为 5 位取代基团,PTZ11 是硫醚键,而 PTZ6 的 5 位氧化为砜。

通过研究在 PKC 激动剂 PMA 存在下 PTZ11 对 PKC 活性的影响,发现其抑制 PKC 活性能力下降,且与 PTZ11 浓度呈正相关,提示 PTZ11 可能通过与 PMA 竞争 PKC 的结合位点而起作用。这为利用已知 PKC Cys 2 功能区晶体结构来探索与抑制剂结合模型提供实验依据。利用 Tripos 公司的 SYBYL 6.04 软件包进行分子图形学研究。PKC Cys 2 功能区的原子坐标来源于 PDB (Brookhaven Protein Data Bank) 数据库,经 DOCK 研究,得到 PTZ11,PTZ6 与 PKC Cys 2 相互作用的模式,由图 2 可见,PTZ11 中的两个苯环与一个长烷基边链可分别与 PKC 中的 3 个疏水作用区域紧密结合,也进一步证实 Kozikowski 等^[8]提出抑制剂与 3 个疏水区域相互作用模型,而活性较差的 PTZ6 仅边链与 PKC 一个疏水区域相互作用,从分子图形学研究可明显解释活性差异(实验数据)与相互作用模式相关性。由于 PTZ6 与 PTZ11 结构上差异,造成构象的不同,使得两者在与 PKC 相互作用时产生不同强度的疏水作用,从而抑制 PKC 活性的程度有很大差别。另外,这种作用模型也部分解释了哌嗪环 4' 位疏水取代基 CH_3 作用大于极性取代基 COOC_2H_5 和 $\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}$ 作用的结果。结合前面 MDR 研究,发现 PTZ11 与 PTZ6 逆转 MDR 细胞(K562/A02)对阿霉素耐药倍数分别为 75.78 和 2.49,提示吩噻嗪类衍生物抑制 PKC 与逆转 MDR 之间可能有某些关联。本研究应用计算机辅助分子图形学初步探索了 PKC 酶与抑制剂相互作用模式,为进一步设计有效的 PKC 抑制剂提供了新的途径。

PKC 与 MDR 关系的研究起步较晚,有些问题还未搞清或未被完全证实,但其在 MDR 发生发展

的作用基本上是可以肯定的。吩噻嗪类衍生物是否通过抑制 PKC 酶从而间接作用于 Pgp 蛋白,逆转多药耐药? 我们的初步探索结果不能作为结论。首先,PKC 酶活性的抑制实验都是在离体的鼠脑组织中测定的。其次,我们还需要更多吩噻嗪类衍生物进行 MDR 和 PKC 构效关系分析。通过系列化合物(配体)与受体结合的相互作用能计算值与实验生物活性相关性,来研究分子作用机制。我们只是试图从三维分子图形角度阐明吩噻嗪类衍生物抑制 PKC 活性差异,而且尝试利用已知 PKC Cys 2 功能区晶体结构来探索与抑制剂结合的模型,为深入研究吩噻嗪类衍生物的作用机制,进一步设计受体选择性配体探索一条可行途径。

参 考 文 献

- Bradley G, Juranka PF, Ling V. Mechanism of multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **948**: 87
- Fine RL, Patel J, Chabner BA. Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 582
- Posada JA, McKeegan EM, Worthington KF, et al. Human multidrug resistant KB cells overexpress protein kinase C: involvement in drug resistance. *Cancer Commun*, 1989, **1**: 285
- Ford JM, Prozialeck WC, Hait WN. Structural features determining activity of phenothiazines and related drugs for inhibition of cell growth and reversal of multidrug resistance. *Mol Pharmacol*, 1989, **35**: 105
- Ford JM, Bruggeman EP, Pastan I, et al. Cellular and biochemical characterization of Thioxanthenes for reversal of multidrug resistance in human and murine cell lines. *Cancer Research*, 1990, **50**: 1748
- 梁凤君,杨纯正,马建国,等.一株人红白血病多药耐药细胞系 K562/A02 的建立及其耐药特性的研究. *中华肿瘤杂志*, 1993, **15**: 101
- 梁巍,杨纯正,齐静,等.吩噻嗪类衍生物对蛋白激酶 C 及肿瘤细胞多药耐药的作用研究. *科学通报*, 1998, **43**: 1196
- Kozikowski AP, Wang S, Ma D, et al. Modeling, chemistry, and biology of the benzolactam analogues of indolactam V (ILV). 2. Identification of the binding site of the benzolactams in the CRD2 activator-binding domain of PKC δ and discovery of an ILV analogue of improved isozyme selectivity. *J Med Chem*, 1997, **40**: 1316
- Aftab DT, Ballas LM, Loomis CR, et al. Structure-activity relationships of phenothiazines and related drugs for inhibition of protein kinase C. *Mol Pharmacol*, 1991, **40**: 798

STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIP OF PHENOTHIAZINES FOR INHIBITION OF PROTEIN KINASE C AND REVERSAL OF MULTIDRUG RESISTANCE

Peng Hui(Peng H) , Yang Chunzheng(Yang CZ) , Liang Wei(Liang W) ,
Qi Jing(Qi J) , Huang Niu(Huang N)¹ and Guo Zongru(Guo ZR)¹

(Institute of Hematology , Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College ,
Tianjin 300020 ; ¹Institute of Materia Medica , Chinese Academy of Medical Sciences and
Peking Union Medical College , Beijing 100050)

ABSTRACT **AIM:** To study the structure-activity relationship of phenothiazines(PTZs) for inhibition of protein kinase C (PKC) and reversal of multidrug resistance (MDR) *in vitro*. **METHODS and RESULTS:** The possible binding model of PTZs to PKC based upon the X-ray structure of PMA(phorbol myristic acetate) in complex with PKC Cys 2 with DOCK program was explored. The results showed that the order of potency of reversal effect of PTZs on MDR is as follows: 2-COC₃H₇ > 2-CF₃ > 2-COCH₃ > H. The type of piperazinyl substitution also significantly affected potency against MDR. The result showed the order: CH₃ > COOC₂H₅ > C₂H₄OH. **CONCLUSION:** Some derivatives of PTZ was tested for inhibition of PKC. The observation indicates that PTZs inhibit PKC in a manner related to specific structural feature. Our molecular modeling study suggests preliminarily how these PTZs bind to PKC and provide a structural basis for the design of high affinity PKC modulator. Our structure-activity studies offer a way to understand which molecular structure affects activity, and this information may be used in the rational design of more effective drugs.

KEY WORDS phenothiazines ; multidrug resistance ; reversal agent ; protein kinase C