

新合成的 7-氮杂异靛蓝抑制 A549 细胞增殖的作用及可能机制

徐晶晶 高静* 戴小敏 李静 李文赟¹ 王朝晖¹ 姚其正¹

(江苏大学药学院, 镇江 212013; ¹中国药科大学药学院, 南京 210009)

摘要 研究新合成的 *N*¹-(正-丁基)-7-氮杂异靛蓝(*N*¹-(*n*-butyl)-7-azaisoindigo, 7-AI-b)抑制人非小型肺癌细胞 A549 的增殖, 初步探索其抗肿瘤的机制。以不同浓度的 7-AI-b 作用于 A549, MTT 检测与相差显微镜观察相结合, 分析 7-AI-b 对细胞增殖的影响; MDC 染色和 Western 印迹检测自噬标志蛋白(LC3)的表达, 研究药物处理后细胞是否发生了自噬。PI 单染, 流式检测细胞周期的变化; Fluo-3-AM 荧光探针检测细胞中 Ca²⁺ 的含量。结果发现, 7-AI-b 以时间和剂量依赖性方式抑制细胞的增殖; MDC 染色后, 自噬小泡增多, LC3 的总表达量增加, 且由 LC3-I 向 LC3-II 的转变量升高。流式细胞检测发现细胞被阻滞在 G₀/G₁ 期; 同时, 药物处理后, 细胞内 Ca²⁺ 出现了超载。由此, 新合成的 7-AI-b 有很好的抑制肿瘤细胞增殖的作用, 其机制与引起细胞周期阻滞、诱导细胞自噬有关, 胞内 Ca²⁺ 超载也参与了该作用。

关键词 7-氮杂靛玉红衍生物; 抗肿瘤; 细胞周期; 自噬; Ca²⁺

靛玉红是中国医学院科学家在 60 年代中期发现的具有新型结构的抗肿瘤新药, 它是传统中成药“当归龙荟丸”中青黛抗肿瘤的有效成分。过去一直被用于治疗慢性白血病^[1]。但是它并没有得到很好的开发利用, 主要是因为它具有一定的副作用^[2], 然而, 它的同分异构体异靛蓝却引起越来越多学者的兴趣^[3], 其结构的优化越来越受到关注^[4]。

自噬(autophagy)是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程, 是真核细胞特有的生命现象, 是细胞生长发育、成熟分化及死亡的重要调控机制^[5]。研究表明, 自噬作用在机体的生理和病理过程中都能见到, 与人类的多种疾病, 尤其是恶性肿瘤存在密切关系^[6]。

很多细胞应激都能导致细胞自噬, 比如线粒体功能的损伤^[7]。线粒体普遍存在于真核细胞中, 是细胞的“能量工厂”。目前, 线粒体已经成为筛选新型抗肿瘤药物的重要靶位之一^[8,9]。同时线粒体也是细胞的钙库, Ca²⁺ 超载将会影响细胞的信号通路, 也是引起细胞自噬的一个很重要的原因^[10]。

靛玉红以及其结构的优化已被国外的公司抢先申请了专利, 故本实验对新合成的 *N*¹-(正-丁基)-7-氮杂异靛蓝 [*N*¹-(*n*-butyl)-7-azaisoindigo, 7-AI-b, 见图 1] 的抗肿瘤活性以及机制的进行了初步探索, 为研发具有自主知识产权的靛玉红类抗肿瘤新药打下基础。

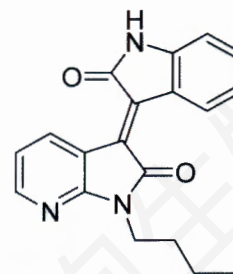


Fig.1 The structure of *N*¹-(*n*-butyl)-7-azaisoindigo

1 材料与方法

1.1 试剂

*N*¹-(正-丁基)-7-氮杂异靛蓝由中国药科大学药学院姚其正教授研究组合成, 暗红色针状纤维, 贮存液(10 mmol/L)用二甲亚砜(DMSO)配制。应用液以含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 (Gibco) 配制。

1.2 细胞株及培养

A549(人肺腺癌细胞)细胞购于中科院上海细胞库; 用含 10% 小牛血清(四季青)的 RPMI1640 (Gibco) 培养液在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养。

收稿日期: 2010-01-19 接受日期: 2010-03-08

科技部“重大新药创新”资助项目(No.2009ZX09103-149)

* 通讯作者。Tel/Fax: 0511-88791552, E-mail: jinggao@uj.s.edu.cn

cn, jinggao@nju.edu.cn

1.3 主要仪器及试剂

Thermo CO₂培养箱; MD SpectraMax 190 酶标仪; BD FACS Calibur流式细胞仪; Nikon eclipse TE2000-5 荧光显微镜; PI 单染试剂盒(联科生物); Fluo-3-AM 荧光探针(碧云天); 自噬荧光染料mono dansylcadaverine (MDC) (Sigma); β -actin/LC3 一抗(Abcam), 羊抗兔、羊抗鼠二抗(博士德)。

1.4 MTT 法检测细胞活性

96 孔板对数生长期细胞 (4×10^4 个/ml), 药物处理 48 h 后加 MTT (1 mg/ml), 37 °C, 4 h, 加 100 μ l DMSO, 酶标仪于 570 nm 处测光吸收值。相对抑制率(%)=(1- 吸光值给药组 / 吸光值对照组)×100%。

1.5 MDC 染色、自噬标志蛋白(LC3)的表达检测细胞的自噬

自噬囊泡的检测按 Mizushima^[11]的方法用 MDC 染色进行。30 μ mol/L 7-AI-b 作用不同时间, 加入浓度为 50 μ mol/L MDC 染料, 37 °C 温育 15 min, PBS 洗两次, 荧光显微镜观察。6 孔板培养 A549 细胞, 不同时间给药后, 提取细胞总蛋白, Western 印迹检测 LC3 的表达情况。

1.6 流式细胞术分析细胞周期

6 孔板培养 A549 细胞, 24 h 后加入 7-AI-b (10、20、30、40 μ mol/L), 24 h 后, 收集细胞, PI 染色, 温育 30 min, 流式细胞仪检测。

1.7 Fluo-3-AM 探针法检测细胞内 Ca²⁺ 水平

不同浓度的 7-AI-b 作用不同时间, 加入 3 μ g/ml Fluo-3-AM, 37 °C 温育 30 min, PBS 洗两次。荧光显

微镜观察, 并收集细胞通过流式细胞仪检测。

1.8 统计方法

采用 SAS 统计软件, ANOVA 方差分析, 组间比较采用 *q* 检验, 数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各实验至少重复 3 次。

2 结果

2.1 7-AI-b 抑制肿瘤细胞增殖

结果显示, 7-AI-b 呈时间和剂量依赖性抑制 A549 细胞增殖, 40 μ mol/L 的 7-AI-b 对 A549 细胞作用 48 h 时的抑制率达到 91.20% (图 2A)。倒置相差显微镜下观察可见, 作用 48 h 后, 细胞形态明显改变。未经药物处理的细胞轮廓清晰, 呈梭形, 贴壁生长。药物作用后, 出现少数皱缩、变圆、变小的损伤细胞, 随着药物浓度的增高, 可见损伤、死亡的细胞增多, 最后几乎所有细胞发生了形态学改变, 呈现脱落、漂浮的生长状态(图 2B)。

2.2 7-AI-b 诱导 A549 细胞周期阻滞

采用 PI 单染, 流式细胞术分析细胞周期, 由图 3 看出, 7-AI-b 作用 24 h 后, 随着药物浓度的升高, 停留在 G₀/G₁ 期的细胞逐渐增多, 40 μ mol/L 的药物处理后, 被阻滞在 G₀/G₁ 期的细胞已达到 80%, 说明 A549 细胞被有效的阻滞在 G₀/G₁ 期。

2.3 7-AI-b 诱导细胞发生自噬

从图 4 可以看出, 30 μ mol/L 7-AI-b 处理 A549 细胞 6 h, 经 MDC 染色, 正常组细胞中的荧光呈弥散状态, 药物处理 6 h 后, 细胞内出现点状荧光, 并发生聚

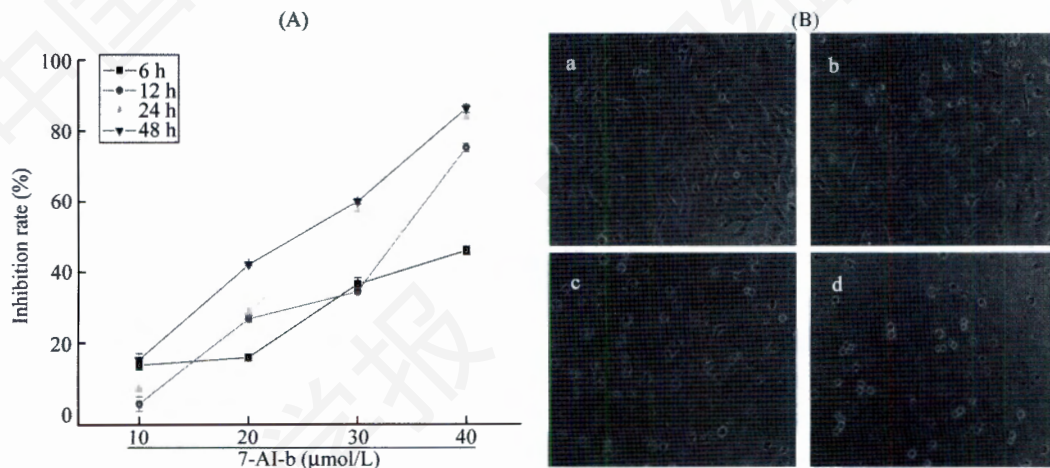


Fig.2 Dose- and time-dependent anticancer effect of 7-AI-b

A: cell proliferation was determined by MTT assay at different time and doses ($\bar{x} \pm s$, $n=5$); B: the morphological changes were induced by 7-AI-b in A549 cells for 48 h (200 \times). a: control; b: 20 mmol/L; c: 30 mmol/L; d: 40 mmol/L

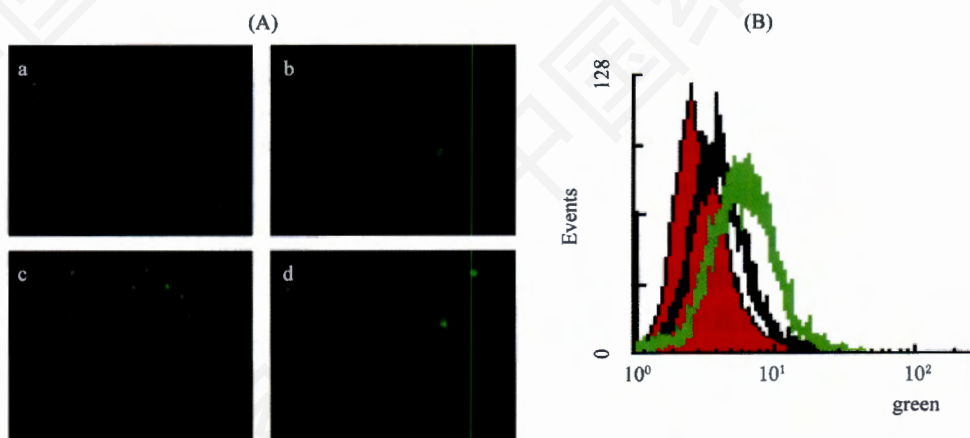
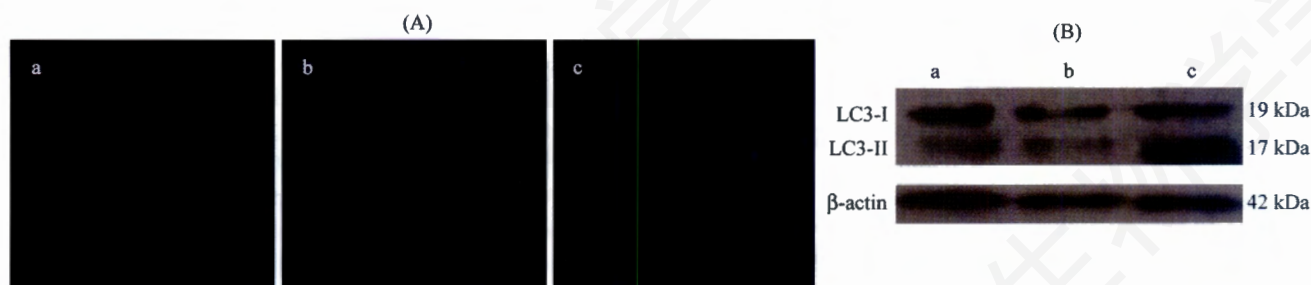
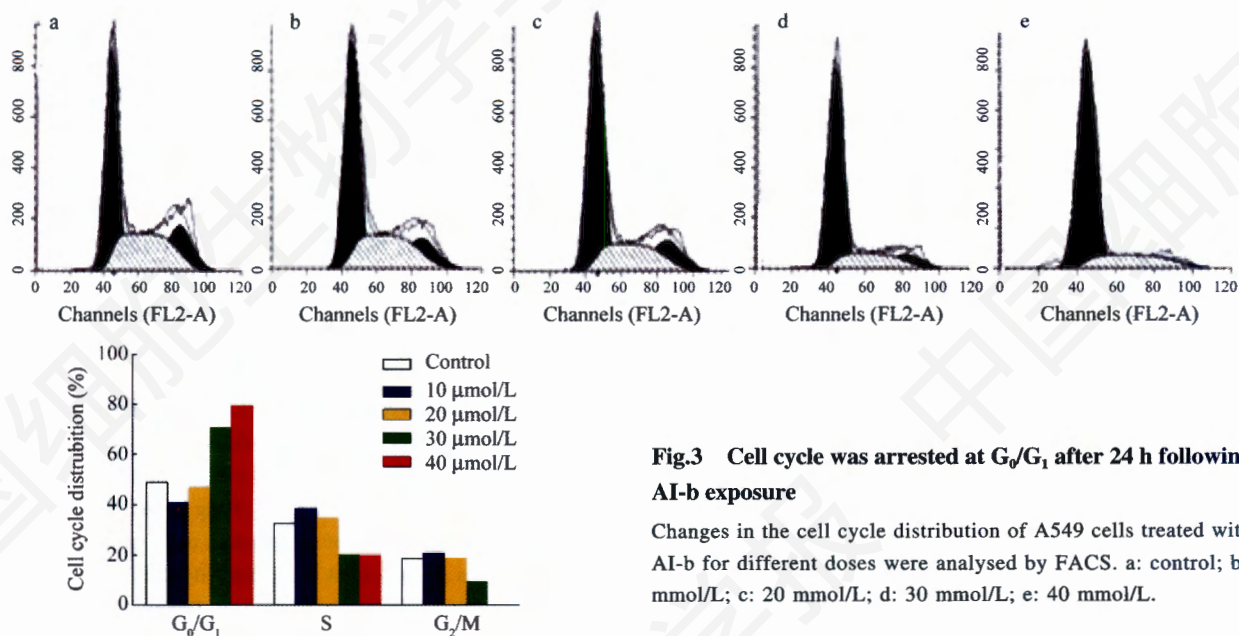


Fig.3 Cell cycle was arrested at G₀/G₁ after 24 h following 7-AI-b exposure
Changes in the cell cycle distribution of A549 cells treated with 7-AI-b for different doses were analysed by FACS. a: control; b: 10 mmol/L; c: 20 mmol/L; d: 30 mmol/L; e: 40 mmol/L.

Fig.4 Autophagy of A549 cells were induced by 30 μmol/L 7-AI-b
A: MDC staining enhanced by 7-AI-b treatment (200×). B: expression of LC3-I and LC3-II in cells treated with 30 mmol/L 7-AI-b. a: control; b: 6 h; c: 12 h.

Fig.5 Intracellular Ca²⁺ overloading was induced by 7-AI-b
A: 30 mmol/L 7-AI-b enhanced the fluorescent intensity of Fluor-3 (200×). a: control; b: 3 h; c: 6 h; d: 12 h. B: the intracellular Ca²⁺ level was detected by FACS. Red peak: control; Black peak: 3 h; Green peak: 6 h.

集,显示细胞已处于自噬活化状态。Western 印迹检测 LC3 表达,结果发现,药物处理后,LC3 的总表达量增加,且由 LC3-I 向 LC3-II 的转变量升高。以上结果说明,7-AI-b 可以诱导细胞发生自噬。

2.4 7-AI-b 导致胞内 Ca^{2+} 水平升高

由图 5 (A)可见,7-AI-b 作用后,细胞内的 Ca^{2+} 水平随着时间的增加而升高,在药物作用 12 h 后,出现明显升高。图 5 (B)流式细胞仪检测也出现一致的结果,药物处理 3 h 后,主峰出现了右移,荧光强度增强,6 h 后右移比较明显。

3 讨论

靛玉红是我国传统的抗肿瘤药,由于它的溶解吸收较差,以及缺乏强有力的基础研究积累的结果,我国在这方面的研究出现了停滞现象,但是它在临床上所表现出的很好的抗肿瘤活性,还是引起了国内外很多学者的关注^[12],近年来有关靛玉红及其同分异构体异靛蓝的结构优化和改进的化合物越来越受到人们的关注,国外公司抢先申请了专利,为了打破国外对靛玉红及其异构体研究的垄断,中国药科大学姚其正教授合成了这类新型化合物^[13],相对于传统靛玉红,新化合物的溶解性要好很多,且发现其中的一种化合物 7-AI-b 具有较好的抗肿瘤活性。

由于靛玉红类化合物可以明显阻滞肿瘤细胞的增殖周期^[14],本实验首先检测了 A549 细胞周期的变化,和靛玉红类化合物一样,新合成的 7-AI-b 能有效的将细胞阻滞在 G_0/G_1 期,说明新合成的化合物和传统靛玉红一样,是有效的细胞周期阻滞剂。

另外,本研究发现靛玉红类化合物 7-AI-b 能引起细胞的自噬(图 4)。自噬是新近发现的一种细胞死亡方式^[15]。有关自噬的机制目前国内外研究的还不是很透彻,但是很多文献指出,自噬和线粒体有着非常密切的关系^[7,16,17]。而线粒体是一个钙库,调节着细胞内 Ca^{2+} 的平衡,故本实验又检测了用药处理后细胞内的 Ca^{2+} 浓度的变化,发现在给药 3 h 后, Ca^{2+} 浓度出现升高,给药 12 h 后 Ca^{2+} 水平增强明显,说明在细胞死亡过程中, Ca^{2+} 可能也参与其中,并发挥了一定的作用,但有关它们之间具体的联系还有待进一步的研究。

由此,本实验结果证明新合成的靛玉红类衍生物(7-AI-b)对肿瘤细胞存在抑制作用,其抗肿瘤机制与细胞周期阻滞、诱导肿瘤细胞自噬, Ca^{2+} 超载有关。但有关 Ca^{2+} 调控作用,是否直接参与细胞周期阻滞和

细胞自噬,以及这种化合物毒性和在体抗肿瘤效果还有待于进一步的研究。

而据文献报道,靛玉红对各系骨髓造血细胞无抑制作用^[12],故靛玉红及其衍生物将成为肿瘤治疗领域内的新一代具有更新作用机制的抗肿瘤药物。本实验探索了新合成靛玉红衍生物的抗肿瘤作用及部分机制,为研发具有我国自主知识产权的靛玉红类抗肿瘤新药提供了初步理论基础。

参考文献(References)

- 1 Xiao ZJ, Hao YS, Liu BC, Qian LS. Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China. *Leuk Lymphoma* 2002; 43(9): 1763-8.
- 2 Xiao ZJ, Wang Y, Lu L, Li ZJ, Peng Z, Han ZC, *et al.* Anti-angiogenesis effects of meisoindigo on chronic myelogenous leukemia *in vitro*. *Leuk Res* 2006; 30(1): 54-9.
- 3 Tang W, Eisenbrand G. *Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine*. New York, Heidelberg: Springer, 1992, 1081.
- 4 Kim SA, Kim YC, Kim SW, Lee SH, Min JJ, Ahn SG, *et al.* Antitumor activity of novel indirubin derivatives in rat tumor model. *Clin Cancer Res* 2007; 13(1): 253-9.
- 5 叶青, 郑民华. 自噬调控机制及与肿瘤关系研究进展. *现代肿瘤医学* 2008; 16(7): 1227-30.
- 6 王树彦, 周易明, 陈宗祐. 自噬与肿瘤的发生和治疗研究进展. *复旦学报: 医学版* 2008; 35(6): 928-31, 34.
- 7 Scherz-Shouval R, Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* 2007; 17(9): 422-7.
- 8 Galluzzi L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25(34): 4812-30.
- 9 Hagland H, Nikolaisen J, Hodneland LI, Gjertsen BT, Bruserud Ø, Tronstad KJ. Targeting mitochondria in the treatment of human cancer: a coordinated attack against cancer cell energy metabolism and signalling. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11(8): 1055-69.
- 10 Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai T, Bianchi K, *et al.* Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and bcl-2. *Mol Cell* 2007; 25(2): 193-205.
- 11 Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(12): 2491-502.
- 12 Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, Nobel ME, Lawrie A, Tunnah P, *et al.* Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* 1999; 1(1): 60-7.
- 13 Wang ZH, Li WY, Li FL, Zhang L, Hua WY, Cheng JC, *et al.* Synthesis and antitumor activity of 7-azaindirubin. *Chin Chem Lett* 2009; 20(5): 542-4.
- 14 Marko D, Schatzle S, Friedel A, Genzlinger A, Zankl H, Meijer L, *et al.* Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. *Brit J Cancer* 2001;

- 84(2): 283-9.
- 15 Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, *et al.* A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 2000; 403(6770): 623-7.
- 16 Guo WJ, Ye SS, Cao N, Huang J, Gao J, Chen QY. ROS-mediated autophagy was involved in cancer cell death induced by novel copper (II) complex. *Exp Toxicol Pathol* 2009; Epub ahead of print.
- 17 Rodriguez-Enriquez S, He L, Lemasters JJ. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(12): 2463-72.

The Inhibitory Effect and Possible Mechanism of a Novel 7-azaisoindigo on Proliferation of A549 Cells

Jing-Jing Xu, Jing Gao*, Xiao-Min Dai, Jing Li, Wen-Bin Li¹, Chao-Hui Wang¹, Qi-Zheng Yao¹

(School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; ¹School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract The anticancer effect of a newly synthesized 7-azaisoindigo derivative (namely *N*¹-(*n*-butyl)-7-azaisoindigo, 7-AI-b) was investigated in human lung cell line A549, and the underlying mechanism of action was analysed. Cell proliferation was assessed by MTT assay; Autophagy induced by 7-AI-b was evaluated by MDC staining and the expression of LC3 by Western blot; Cell cycle was detected by flow cytometry (FCM) following PI staining; The alteration of intracellular Ca²⁺ level was detected following Fluo-3-AM loading. It was found that 7-AI-b inhibited A549 cell proliferation in a dose- and time-dependent way. 7-AI-b-induced autophagy occurred showing enhanced MDC staining, and increased in both expressions of LC3 and conversion of LC3-I to LC3-II; Cell cycle was arrested in the G₀/G₁ phase; Meanwhile, 7-AI-b was found to increase intracellular Ca²⁺ level. Generally speaking, the novel compound 7-AI-b could inhibit the proliferation of cancer cells effectively. Its mechanism might be related to arrest cell cycle and induce cell autophagy. The intracellular Ca²⁺ overloading was involved in cell death process.

Key words 7-azaisoindigo derivative; anti-tumor; cell cycle; autophagy; Ca²⁺

Received: January 19, 2010 Accepted: March 8, 2010

This work was supported by the "Significant New Drug Innovation" Project of the Ministry of Science and Technology of China (No. 2009ZX09103-149)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-511-88791552, E-mail: jinggao@ujs.edu.cn, jinggao@nju.edu.cn