

芒柄花素三氮唑衍生物对HGC-27细胞的抗肿瘤作用

崔焕杰¹ 唐泽² 赵岩¹ 韩佳宏¹ 蔡恩博^{1*}

(¹吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; ²吉林大学第一医院胸外科, 长春 130021)

摘要 该研究运用药物分子片段原理及拼合原理, 开发了一种新的芒柄花素三氮唑衍生物, 采用MTT法对5种癌细胞进行了活性筛选, 选取抗肿瘤活性最强的化合物及其对应的细胞株进行进一步的抗肿瘤活性研究。通过检测化合物对肿瘤细胞增殖、迁移、周期、凋亡、自噬等方面的影响, 综合评价化合物的抗肿瘤活性, 并通过分子对接实验预测相关通路, 对相关蛋白进行检测。结果表明7-[7-(2H-1,2,3-三氮唑-2-基)庚基]芒柄花素醚(FN.12)对人胃癌细胞HGC-27的活性较为突出, IC₅₀值达到8.52 μmol/L。此外FN.12对HGC-27细胞有较强的增殖、迁移抑制作用, 能阻滞HGC-27细胞于S期, 还可诱导HGC-27细胞的凋亡和自噬, 且这些影响可能是通过PI3K/Akt/mTOR信号通路实现的。

关键词 芒柄花素三氮唑衍生物; HGC-27细胞; 增殖; 迁移; 周期; 凋亡; 自噬; PI3K/Akt/mTOR信号通路

Anti-Tumor Effect of Formononetin Triazole Derivatives on HGC-27 Cells

CUI Huanjie¹, TANG Ze², ZHAO Yan¹, HAN Jiahong¹, CAI Enbo^{1*}

(¹College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

²Department of Thoracic Surgery, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract In this study, a new triazole derivative of formononetin was developed based on the principle of drug molecular fragments and combination. Five kinds of cancer cells were screened by MTT method, and the compounds with the strongest anti-tumor activity and their corresponding cell lines were selected for further anti-tumor activity study. By detecting the effects of the compounds on tumor cell proliferation, migration, cycle, apoptosis and autophagy, the anti-tumor activity of the compounds was comprehensively evaluated, and the related pathways were predicted by molecular docking experiments, and the related proteins were detected. The results showed that the activity of 7-[7-(2H-1,2,3-triazole-2-yl) heptyl] formononetin ether (FN.12) on human gastric cancer cell line HGC-27 was prominent, and the IC₅₀ value was 8.52 μmol/L. Besides, FN.12 can inhibit the proliferation and migration of HGC-27 cells, block HGC-27 cells in S phase, induce apoptosis and autophagy of HGC-27 cells, and these effects may be achieved through PI3K/Akt/mTOR signal pathway.

Keywords formononetin triazole derivative; HGC-27 cells; proliferation; migration; cycle; apoptosis; autophagy; PI3K/Akt/mTOR signal pathway

癌症的治疗一直是医学上难以攻克的难题, 尽管目前的癌症治疗手段和抗癌药物已有多种, 但寻找毒副作用低、抗癌效果强、原材料低价易得的抗

癌药物仍是目前研究的重点、热点^[1]。近年来, 黄酮类化合物被证明在治疗肿瘤、抑制肿瘤的增殖、迁移、侵袭等方面显示出广阔的应用前景^[2]。因此

收稿日期: 2024-03-30

接受日期: 2024-04-28

吉林省科技发展计划(批准号: 20210101234JC)资助的课题

*通信作者。Tel: 13944816620, E-mail: caienbo126621@126.com

Received: March 30, 2024

Accepted: April 28, 2024

This work was supported by the Jilin Science and Technology Development Plan Project (Grant No.20210101234JC)

*Corresponding author. Tel: +86-13944816620, E-mail: caienbo126621@126.com

以黄酮类化合物为基础,设计合成新的具有更优抗肿瘤活性的化合物是非常有研究价值的。

黄酮类化合物芒柄花素(7-羟基-4'-甲氧基异黄酮),是黄芪中异黄酮类化合物的代表成分^[3-4]。芒柄花素(formononetin, FN)具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等多种生物活性,对乳腺癌、宫颈癌、胃癌、肺癌、卵巢癌等都有良好的治疗作用^[5-6]。虽然芒柄花素具有广泛的抗肿瘤活性且毒副作用低,但它们的水溶性差、口服吸收差、生物利用率低,限制了其实际应用^[7],为改变这些问题,部分学者对其7位、3'位、8位等位点进行了结构修饰及分子杂交,成功提高了芒柄花素的生物活性^[8-9]。

1H-1,2,3-三氮唑是含有三个相连的氮原子、两个碳原子的五元杂环化合物。不同于其他芳香环类,1H-1,2,3-三氮唑在生理条件下非常稳定,对酸碱水解、氧化还原反应、高温环境甚至代谢降解作用都有抵抗性^[10-12]。1H-1,2,3-三氮唑在药物化学中是一个作用显著的药效团^[13],能表现出多种生物活性,如抗癌、抗细菌和真菌、抗病毒、抗结核和抗癫痫等。其中具有抗癌活性的1H-1,2,3-三氮唑的代表化合物羧胺三唑(carboxyamidotriazole, CAI)不仅能抑制癌细胞增殖,诱导细胞的自噬,且毒副作用极低。目前抗肿瘤药物羧胺三唑软胶囊已经上市。由此可见,药物分子与1H-1,2,3-三氮唑结合不仅可以增强药物的药理活性和稳定性,还可以降低毒副作用。

本研究以芒柄花素和1H-1,2,3-三氮唑为原料,合成一系列三氮唑衍生物,并探究了它们对A549、MCF-7、SiHa、HGC-27和PANC-1等5种癌细胞的体外抗增殖活性,并通过对细胞增殖、迁移、周期、凋亡、自噬及相关蛋白的检测进一步对最优化化合物的抗肿瘤作用机制进行初探,以期发现新型、高效的抗肿瘤化合物,为抗肿瘤药物芒柄花素三氮唑衍生物的研发提供新的理论依据。

1 材料及方法

1.1 试剂与仪器

芒柄花素(纯度 $\geq 98\%$)购自成都钠钬锂生物科技有限公司;1H-1,2,3-三氮唑、各种二溴化合物、二甲基亚砜(DMSO)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)购自北京索莱宝生物科技有限公司;细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI

试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。其余所用试剂均为市售化学纯或分析纯。

A549、MCF-7细胞株购自北京北纳创联生物技术有限公司;SiHa、HGC-27、PANC-1购自大连美伦生物技术有限公司。

流式细胞仪流式细胞仪购自美国BD公司;倒置生物显微镜购自重庆奥特光学仪器有限公司;水浴旋转蒸发仪购自上海亚荣生化仪器厂;智能磁力加热搅拌器购自巩义市予华仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 衍生物的合成 如图1所示,本实验通过两步法制备芒柄花素三氮唑衍生物。第一步芒柄花素中间体的制备:在碳酸钾存在下,以丙酮为反应溶剂,将芒柄花素与二溴化合物进行醚化反应,得到芒柄花素中间体Intermediate.1~6^[14]。第二步芒柄花素三氮唑衍生物的合成:1H-1,2,3-三氮唑(1 mmol)、 K_2CO_3 (0.4 mmol)和各种中间体(0.2 mmol)依次加入到50 mL反应瓶中,20 mL丙酮作反应溶剂,室温静置24~30 h。通过TLC薄层板进行检测,确定反应完全后,加入适量的水,并用乙酸乙酯萃取3次,收集有机层用水洗涤2次后用无水 $MgSO_4$ 干燥,回收试剂,将得到的反应物经硅胶柱(三氯甲烷:甲醇=80:1或50:1)分离纯化,得到衍生物FN.1~12。

1.2.2 MTT法测定细胞活力 将5种癌细胞以 5×10^3 个/孔的密度均匀接种于96孔板中,每孔100 μL ,并置于37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养,待细胞过夜贴壁后加入不同浓度的样品溶液(0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 $\mu mol/L$)。48 h后弃去上清液, PBS轻洗后,每孔加入新鲜配制的完全培养基,在避光条件下每孔加入MTT溶液10 μL ,并置于37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养,4 h后在避光条件下弃去上清液,加入150 μL DMSO溶解甲瓚,振荡10 min,待紫色结晶完全溶解至显色均匀后,利用酶标仪(490 nm)测定其吸光度(D)值。目标化合物对各肿瘤细胞的抑制率(%)用以下公式进行计算:细胞增殖抑制率 $\% = (空白组D值 - 给药组D值) / (空白组D值 - 调零组D值)$ 。

1.2.3 平板克隆实验检验FN.12对HGC-27细胞增殖的影响 将HGC-27细胞以 3×10^3 个/孔接种于6孔板中,待细胞贴壁后,加入不同浓度的FN.12(3.125、6.25、12.5 $\mu mol/L$)处理细胞,并设置对照组。继续培养7天后用PBS小心清洗2次,每孔加1 mL 4%多聚甲醛,室温静止孵育20 min固定细胞,

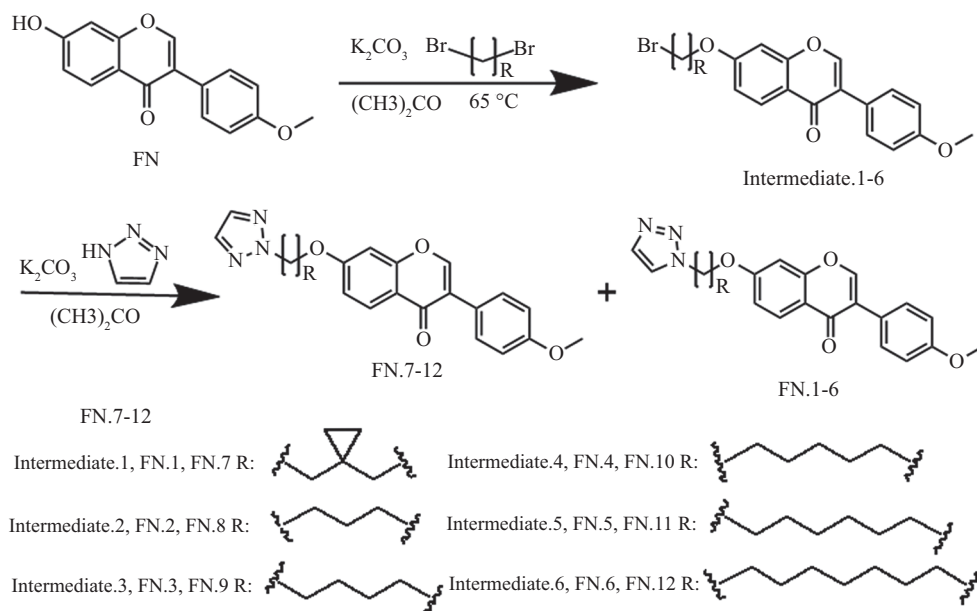


图1 芒柄花素三氮唑衍生物的合成路线图

Fig.1 Roadmap for synthesis of formononetin triazole derivatives

随后PBS洗涤3次, 每孔加适量的1%结晶紫染液, 在避光条件下摇床慢速孵育10 min, 洗净染色液, 在室温下晾干拍照。

1.2.4 细胞划痕实验检验FN.12对HGC-27细胞迁移的影响 将HGC-27细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔培养板中, 并于37 °C、5%CO₂培养箱中培养。细胞贴壁后用枪头笔直划线, PBS冲洗细胞3次, 除去划下的细胞, 进行拍照。用不同浓度的FN.12(0、3.125、6.25、12.5 μmol/L)处理细胞。48 h后, PBS洗涤2次, 再次拍照并计算迁移率。

1.2.5 PI单染法检验FN.12对HGC-27细胞周期的影响 将HGC-27细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于6孔培养板, 并于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。贴壁后, 用不同浓度的FN.12(0、3.125、6.25、12.5 μmol/L)处理细胞。48 h后, 37 °C下用不含EDTA的胰酶消化1 min, 在4 °C、1 000 ×g条件下离心5 min, 弃上清, 加入1 mL预冷的PBS(4 °C预冷)重悬细胞, 相同离心条件下再次离心去上清, 加入1 mL预冷的70%乙醇, 轻轻吹打混匀, 4 °C过夜后收集细胞, 预冷的PBS重悬细胞, 相同离心条件下再次离心去上清, 每管细胞样品中加入0.5 mL PI/RNase染液, 缓慢并充分重悬细胞, 37 °C避光温浴30 min, 200目的微孔滤膜过滤, 上机检测。

1.2.6 Annexin V-FITC/PI双染法检验FN.12对HGC-27细胞凋亡的影响 将HGC-27细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于6孔培养板, 并于37 °C、5%

CO₂培养箱中培养。贴壁后, 用不同浓度的FN.12(0、3.125、6.25、12.5 μmol/L)处理细胞。48 h后, 用不含EDTA的胰酶消化在4 °C、1 000 ×g条件下离心5 min, 弃上清。加入1 mL预冷的PBS(4 °C预冷)重悬细胞, 再次离心弃上清。用结合缓冲液(1×)重悬细胞, 调节细胞浓度为 1×10^6 个/mL。取100 μL的细胞悬液于流式管中, 加入5 μL Annexin V-FITC溶液混匀, 室温避光孵育5 min后, 加入5 μL PI溶液并加入400 μL PBS, 上机检测。

1.2.7 吖啶橙染色法检验FN.12对HGC-27细胞自噬的影响 将HGC-27细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔培养板中。贴壁后, 用不同浓度的FN.12(3.125、6.25、12.5 μmol/L)处理细胞, 并设置对照组。48 h后弃上清。1 mL PBS清洗2次, 加入1 mL 吖啶橙染色液并充分混匀, 避光室温孵育20 min后, 移液枪小心去除染液, 1 mL的PBS轻柔清洗2~3次, 每次3 min, 荧光显微镜下进行拍照。

1.2.8 分子对接 采用Auto Dock Tools-1.5.6软件进行分子对接。首先从PDB蛋白质数据库中(PDB ID:7U8D)获得mTOR蛋白的晶体结构, 将删除多余配合物与水分子的mTOR蛋白作为靶蛋白受体, 再通过ChemDraw和Chem 3D对小分子配体进行可视化, 最后将化合物的分子配体与得到的靶蛋白受体进行分子模拟对接并将结果通过Discovery Studio Visualizer 2019和Pymol软件进行结果可视化分析^[14]。

1.2.9 Western blot实验检测相关蛋白 将HGC-27细胞以 1×10^5 个/孔接种于6孔培养板中。贴壁后,用不同浓度的FN.12(3.125、6.25、12.5 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞,并设置对照组。48 h后弃上清,预冷的PBS(4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷)清洗2次,加适量裂解液并置于冰上,充分裂解后,在4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\times g$ 条件下离心5 min,取上清,BCA法测定蛋白浓度并计算出上样量。用SDS-PAGE体系进行电泳、转膜。结束后,用脱脂牛奶室温下封闭2 h, TBST洗膜后加入对应一抗(稀释比例1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。取出PVDF膜, TBST洗膜后加入对应二抗(稀释比例1:5 000)室温孵育2 h后,置于化学发光成像系统中显影拍照,使用ImageJ软件进行分析。

1.2.10 统计学分析 采用SPSS 26统计软件进行分析。GraphPad Prism 6.0用于绘图。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)。组间比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芒柄花素三氮唑衍生物的体外抗肿瘤活性筛选

为确定抗肿瘤活性最优的芒柄花素三氮唑衍生物及其对应的细胞株,本实验通过MTT实验对人非小细胞肺癌细胞A549、人宫颈鳞癌细胞SiHa、人胃癌细胞HGC-27、人胰腺癌细胞PANC-1和人乳腺癌细胞MCF-7这5种癌细胞进行活性筛选,以芒柄

花素和5-氟尿嘧啶(5-FU)为阳性对照^[9]。结果如表1所示,其中化合物FN.12对HGC-27细胞的抗肿瘤活性最强,IC₅₀值为(8.52 $\pm$ 0.25) $\mu\text{mol/L}$,同时优于阳性对照药芒柄花素和5-氟尿嘧啶($P<0.05$)。

2.2 FN.12对HGC-27细胞增殖的影响

如图2所示,与对照组相比, FN.12明显抑制了HGC-27细胞的增殖,且随着给药浓度的增加,增殖抑制作用越明显。

2.3 FN.12对HGC-27细胞迁移的影响

癌细胞的迁移能力直接影响了癌症的扩散和转移,因此为了解化合物FN.12对HGC-27细胞迁移的影响,本研究进行了划痕实验,结果如图3所示,与对照组相比,给药组明显抑制了HGC-27细胞的迁移($P<0.01$),并且随着浓度的增加划痕愈合程度逐渐降低。

2.4 FN.12对HGC-27细胞周期的影响

PI单染实验结果如图4所示, FN.12阻滞HGC-27细胞周期于S期。具体而言, FN.12高浓度组(12.5 $\mu\text{mol/L}$)的S期细胞百分比为36.58%,比对照组高约20%。

2.5 FN.12对HGC-27细胞凋亡的影响

如图5所示,对照组细胞的凋亡率是5.3%;给药浓度为3.125 $\mu\text{mol/L}$ 时, FN.12组的凋亡率是8.3%;随着给药浓度的增加,当给药浓度增加至12.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, HGC-27细胞凋亡率上升至29.4%。

表1 芒柄花素衍生物对5种癌细胞的抗肿瘤活性

Table 1 Antitumor activity of formononetin derivatives against five kinds of cancer cells

化合物 Compound	IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$				
	A549	Siha	HGC-27	MCF-7	PANC-1
FN.1	107.98 $\pm$ 2.46 ^{aBb}	> 120	44.94 $\pm$ 4.68 ^{aabb}	102.88 $\pm$ 3.2 ^{aabb}	> 120
FN.2	12.28 $\pm$ 1.92 ^{Aab}	21.35 $\pm$ 0.96 ^{AaBb}	24.71 $\pm$ 4.63	> 120	113.27 $\pm$ 5.61 ^{Bb}
FN.3	63.86 $\pm$ 6.34 ^{Bb}	113.55 $\pm$ 9.21	17.7 $\pm$ 5.46	84.22 $\pm$ 4.61	> 120
FN.4	78.56 $\pm$ 4.23 ^{Bb}	> 120	> 120	72.21 $\pm$ 2.19	> 120
FN.5	53.27 $\pm$ 5.65 ^{Bb}	> 120	13.48 $\pm$ 3.68 ^a	> 120	> 120
FN.6	14.09 $\pm$ 2.88 ^{Aa}	16.45 $\pm$ 1.95 ^{AaBb}	30.23 $\pm$ 2.52 ^{aabb}	> 120	> 120
FN.7	68.24 $\pm$ 1.8 ^{Bb}	> 120	12.85 $\pm$ 3.34 ^a	48.59 $\pm$ 2.88 ^{aabb}	> 120
FN.8	58.52 $\pm$ 2.01 ^{aBb}	> 120	23.74 $\pm$ 1.99 ^b	100.89 $\pm$ 5.35 ^{aab}	> 120
FN.9	103.64 $\pm$ 2.91 ^{aBb}	> 120	31.29 $\pm$ 0.99 ^{aab}	> 120	> 120
FN.10	79.59 $\pm$ 3.59 ^{Bb}	> 120	17.66 $\pm$ 5.01	> 120	> 120
FN.11	55.45 $\pm$ 3.8 ^{aBb}	> 120	12.14 $\pm$ 1.98 ^{aa}	> 120	61.57 $\pm$ 12.63 ^{Aab}
FN.12	40.00 $\pm$ 3.00 ^{aabBb}	46.41 $\pm$ 4.14 ^{AaBb}	8.52 $\pm$ 0.25 ^{aab}	> 120	39.74 $\pm$ 4.91 ^{Aa}
FN	81.09 $\pm$ 10.00	> 120	23.56 $\pm$ 3.28	74.12 $\pm$ 7.68	> 120
5-FU	16.29 $\pm$ 0.81	> 120	16.93 $\pm$ 3.3	80.55 $\pm$ 4.08	44.27 $\pm$ 4.22

^a $P<0.05$, ^{aa} $P<0.01$, ^{Aa} $P<0.001$, 与FN组相比; ^b $P<0.05$, ^{bb} $P<0.01$, ^{Bb} $P<0.001$, 与5-FU组相比。
^a $P<0.05$, ^{aa} $P<0.01$, ^{Aa} $P<0.001$ compared with FN group; ^b $P<0.05$, ^{bb} $P<0.01$, ^{Bb} $P<0.001$ compared with 5-FU group.

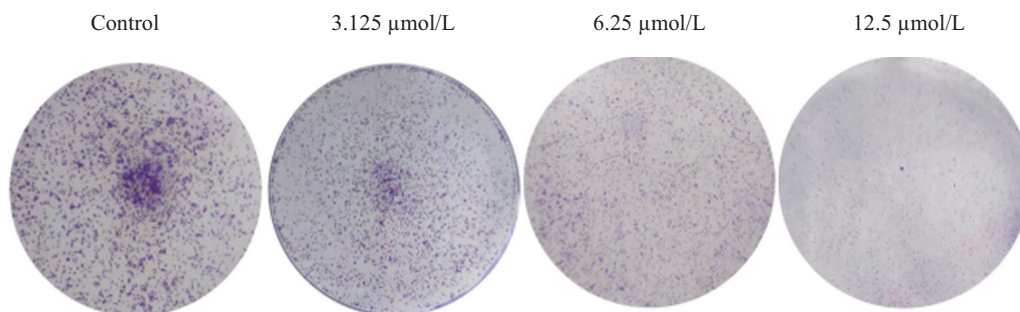
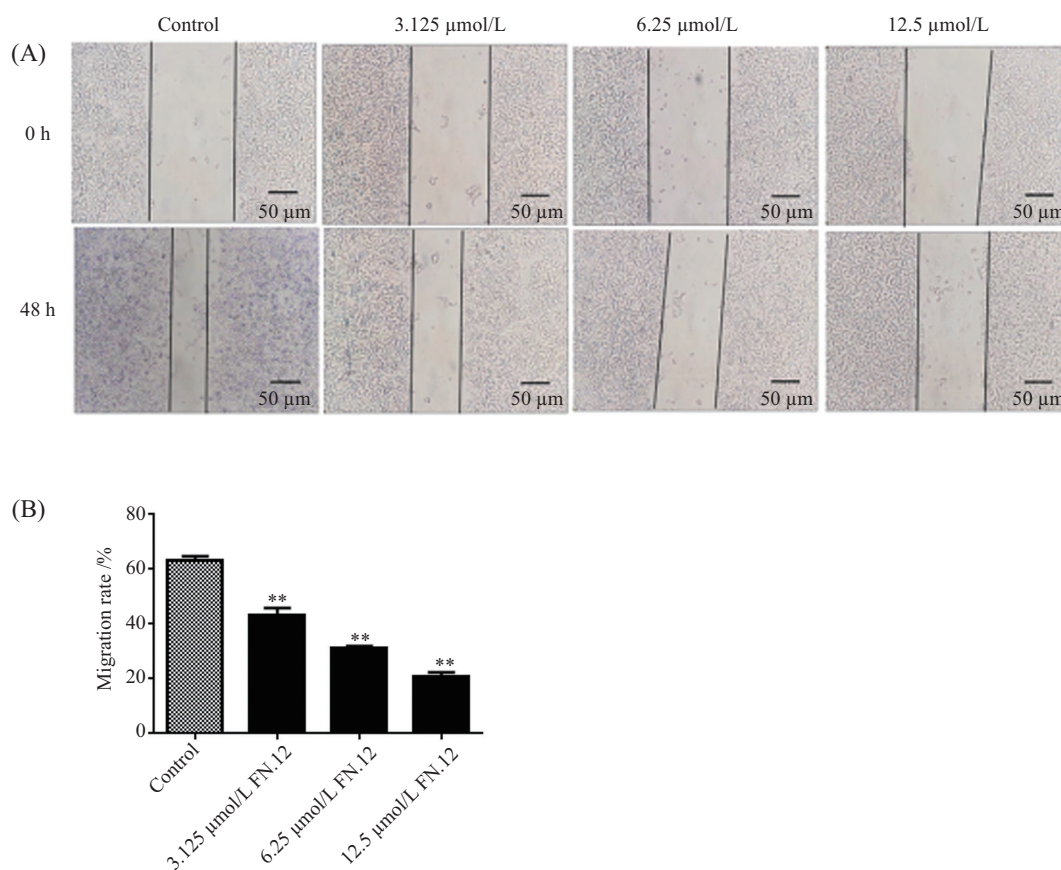


图2 FN.12对HGC-27细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of FN.12 on the proliferation of HGC-27 cells



A: 细胞划痕实验检测不同浓度的FN.12处理HGC-27细胞后细胞迁移的情况; B: 统计学分析细胞迁移率; ** $P < 0.01$, 与对照组相比。

A: cell scratch test was used to detect the cell migration of HGC-27 cells treated with different concentrations of FN.12; B: statistical analysis of cell migration rate; ** $P < 0.01$ compared with the control group.

图3 FN.12对HGC-27细胞迁移的影响

Fig.3 Effects of FN and FN.12 on migration of HGC-27 cells

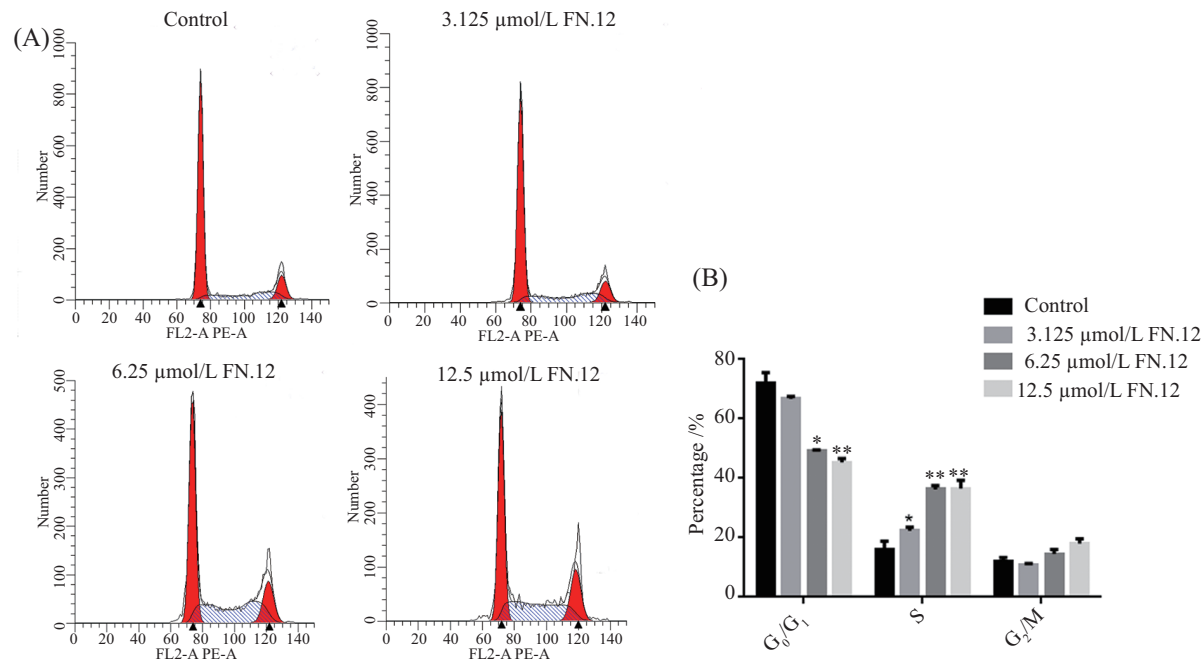
2.6 FN.12对HGC-27细胞自噬的影响

如图6所示, 对照组呈绿色荧光, 这表明对照组溶酶体数量相对较低。与对照组相比, 给药组出现了不同程度的桔红色荧光, 这表明给药组的溶酶体数量出现了不同程度的增加, 并且随着给药浓度的增加, 橘红色荧光强度增加。

2.7 分子对接及FN.12对相关信号通路蛋白的影响

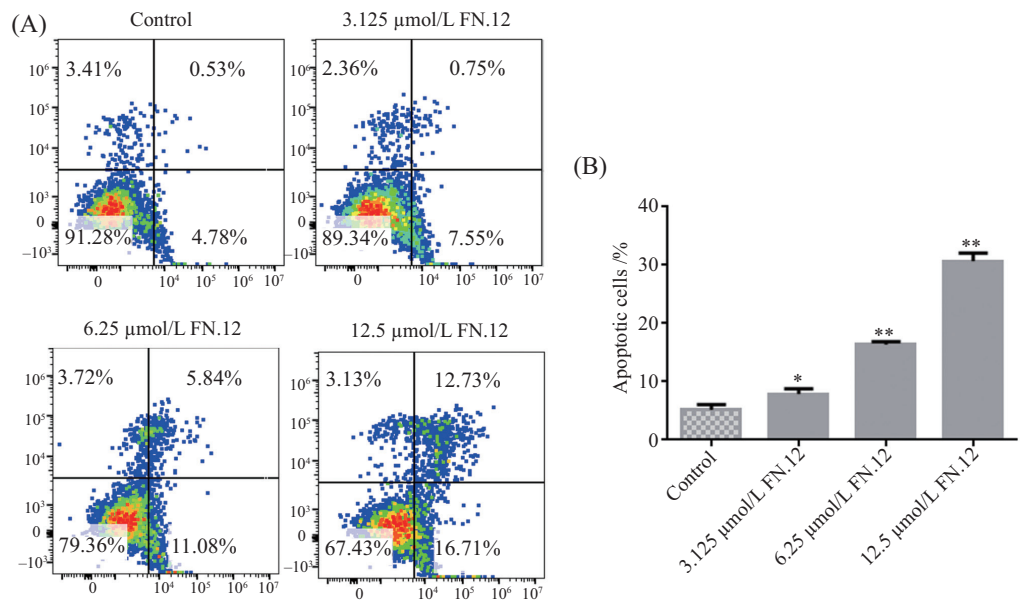
由于PI3K/Akt/mTOR信号通路与肿瘤的凋亡、

迁移、自噬等都有着密切的关系^[15], 结合本文平板克隆、细胞划痕、凋亡和自噬等实验的结果, 最终选择PI3K/Akt/mTOR信号通路中的mTOR蛋白进行分子模拟对接。结果与如图7A和图7B所示, FN.12可与氨基酸残基LYS49形成氢键, 与ASP34、GLU109形成离子相互作用力, 与PRO47、GLY35形成碳氢键, 与GLN55、THR23形成 π -氢键, 最终结合能为 -6.21 kcal/mol。这表明FN.12能够与mTOR蛋白形成稳定的分子构象,



A: FN.12对HGC-27细胞周期影响的流式检测图; B: FN.12处理后HGC-27细胞周期百分比; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组相比。
A: the flow chart of the effect of FN.12 on HGC-27 cell cycle; B: the percentage of HGC-27 cell cycle after FN and FN.12 treatment; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the control group.

图4 FN.12对HGC-27细胞周期的影响。
Fig.4 Effects of FN.12 on HGC-27 cell cycle



A: 通过流式细胞仪分析得到的细胞凋亡示意图; B: 细胞凋亡百分比; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组相比。
A: the schematic diagram of apoptosis analyzed by flow cytometry; B: the percentage of apoptosis; group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the control group.

图5 Annexin V-FITC/PI双染法检测FN.12对HGC-27细胞凋亡的影响
Fig.5 The effect of FN.12 on apoptosis of HGC-27 cells was detected by Annexin V-FITC/PI double staining

FN.12可与mTOR蛋白稳定结合。

为进一步探讨FN.12对PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响, 本文对通路相关蛋白表达水平进行测定, 结

果如图7C和图7D所示, 与对照组相比, p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR的蛋白表达量明显降低($P<0.01$), 说明FN.12可抑制PI3K/Akt/mTOR信号

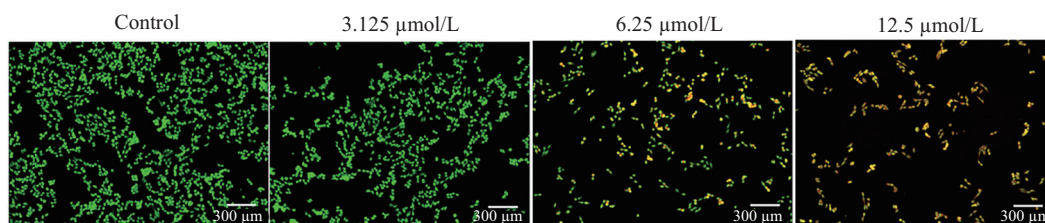
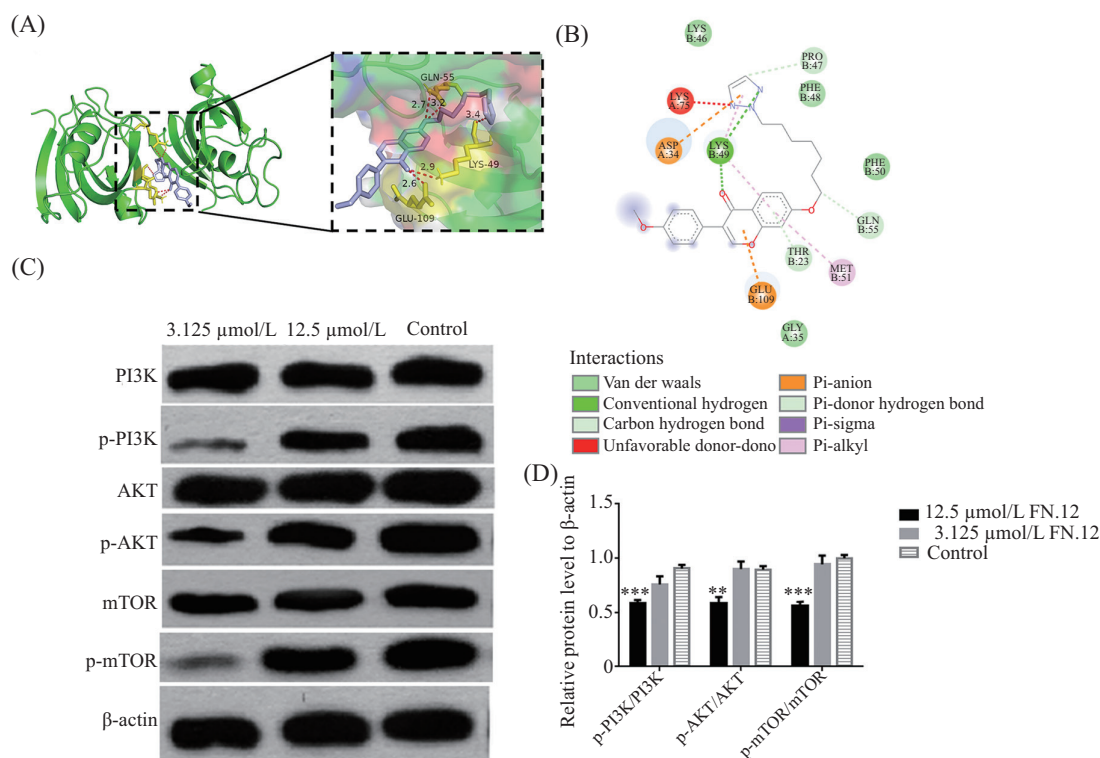


图6 吖啶橙染色法检测FN.12对HGC-27细胞自噬的影响

Fig.6 The effect of FN.12 on autophagy of HGC-27 cells was detected by acridine orange staining



A: 分子对接结合模式图; B: 分子对接2D图; C: FN.12对PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达水平的影响; D: 统计学分析蛋白表达水平; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组相比。

A: molecular docking binding pattern map; B: molecular docking 2D map; C: the effect of FN.12 on the expression level of proteins related to PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; D: statistical analysis of protein expression level; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ compared with the control group.

图7 分子对接及FN.12对PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响

Fig.7 Molecular docking and the effect of FN.12 on PI3K/Akt/mTOR signal pathway

通路。

3 讨论

胃癌是一种全球性的重要疾病。据估计胃癌每年新发病例超过100万例,是全球第五大恶性肿瘤,并且其死亡率很高,是癌症相关死亡的第三大常见原因,然而目前针对于胃癌的治疗手段仍然以手术和内镜切除为主^[16]。因此,开发高疗效的抗胃癌药物迫在眉睫。

芒柄花素属于II类低溶解性、高渗透性药物,

这限制了芒柄花素的吸收,是造成其生物利用度低的主要原因之一^[17]。本文虽未对所得芒柄花素衍生物的平衡溶解度和油水分配系数进行测定,但在实验过程中我们发现室温条件下芒柄花素几乎不溶于水、甲醇、乙醇、丙酮、四氢呋喃、乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷等溶剂,但芒柄花素三氮唑衍生物FN.1~12可较好地溶于丙酮、四氢呋喃、乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷。本文中1H-1,2,3-三氮唑的引入在一定程度上增加了芒柄花素的溶解性。

芒柄花素作为一种天然产物,对SGC7901、

MKN45和MGC803等胃癌细胞显示出微弱的活性或无活性,但在其7位上引入香豆素单元后可提高其对SGC7901细胞的抗肿瘤活性^[18]。本研究同样在芒柄花素7位上引入药效团,得到芒柄花素三氮唑衍生物FN.12。同时相关研究表明,芒柄花素或芒柄花素衍生物对人胃癌细胞HGC-27(未分化,恶性程度高)的抗肿瘤作用鲜有研究,而本研究MTT实验结果表明经过结构修饰所得的芒柄花素三氮唑衍生物FN.12对HGC-27细胞活性的抑制能力(IC₅₀值)优于芒柄花素($P<0.01$)和阳性对照药5-氟尿嘧啶($P<0.05$)。本研究使用不同浓度的FN.12处理HGC-27细胞,发现HGC-27细胞集落数量减少、划痕愈合率降低、S期细胞百分比增加、凋亡率和自噬溶酶体数量增加。由此可见FN.12可抑制胃癌细胞的增殖和迁移,阻滞细胞周期于S期,并促进细胞的凋亡和自噬。这说明FN.12对胃癌具有抗肿瘤作用。基于此,我们对FN.12在胃癌中的抗肿瘤作用机制进行初步探索。

AKT的活化可通过PI3K催化产生的PIP3和mTOR的磷酸化来实现,活化后可通过促进细胞抗凋亡蛋白的产生、激活相关线粒体通路、抑制凋亡诱导因子AIF等方式促进细胞代谢和增殖^[19],通过阻断FOXO介导的许多蛋白质如Fas配体(FASL)、p27和p21的转录来防止细胞周期停滞^[20-21]。不仅如此,AKT在许多类型癌症的转移和侵袭中也扮演着重要角色^[22]。mTOR作为AKT的下游蛋白,激活后可通过磷酸化下游效应因子S6K和4E-BF促进合成代谢,同时通过ULK1和TEFB抑制分解代谢,从而抑制自噬^[23]。抑制mTOR可使下游靶蛋白ULK1自磷酸化而变得活跃,促使自噬小体的产生^[24]。PI3K/Akt/mTOR通路参与调节细胞的增殖、生长、新陈代谢和运动性等^[25],对癌症细胞的凋亡、自噬和迁移等方面有着重要的调节作用,抑制该途径可达到抑制肿瘤的效果。

研究表明胃癌细胞中也存在PI3K/Akt/mTOR通路的异常,蛋白p-AKT、p-mTOR可在胃癌患者中存在过度表达并参与胃癌的恶性进展^[26]。乔丹等^[27]发现黄芩素可通过调控PI3K/Akt信号通路抑制HGC-27细胞的增殖和迁移;张莹莹^[28]实验结果表明类叶牡丹提取物可通过PI3K/Akt/mTOR信号通路诱导HGC-27细胞的凋亡和自噬;何锋等^[29]证明了银杏内酯可通过阻抑PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制HGC-27细胞的增殖、迁移与侵袭并诱导细胞凋亡。根据这些研究结果的提示,以PI3K/AKT/mTOR通路为靶

点进行新型胃癌药物的研发是非常有意义的。

分子对接是通过受体的特征以及受体和药物分子之间的相互作用方式来进行药物设计的方法。主要研究分子间(如配体和受体)相互作用,并预测其结合模式和亲合力的一种理论模拟方法,是计算机辅助药物研究领域的一项重要技术。结合前期实验结果,为进一步探索FN.12对HGC-27细胞的抗肿瘤作用机制,本研究选择PI3K/Akt/mTOR通路中的关键蛋白mTOR进行分子对接实验,随后进一步对PI3K/Akt/mTOR信号通路的相关蛋白进行检测,实验结果证明了FN.12能够与mTOR蛋白稳定结合,并可能通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路来发挥对HGC-27细胞的增殖抑制、迁移抑制、周期阻滞、凋亡及自噬诱导等作用。

综上所述,芒柄花素三氮唑衍生物FN.12能够抑制人胃癌细胞HGC-27的增殖和迁移,阻滞HGC-27细胞于S期,诱导HGC-27细胞的凋亡和自噬,且对HGC-27细胞的抗肿瘤作用可能是通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路实现的。关于是否有其他信号通路参与FN.12对HGC-27细胞的抗肿瘤作用以及动物层面的论证,后续研究可进一步进行探索。本研究可为天然产物小分子作为抗胃癌药物的设计、开发提供一定参考。

参考文献 (References)

- [1] HASHEM S, ALI T A, AKHTAR S, et al. Targeting cancer signaling pathways by natural products: exploring promising anti-cancer agents [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 150: 113054.
- [2] ZHOU Z G, Li D D, CHEN Y, et al. Discussion on the structural modification and anti-tumor activity of flavonoids [J]. Curr Top Med Chem, 2022, 22(7): 561-77.
- [3] 戴瑜婷, 张雪燕, 王艺璇, 等. 黄芪的现代研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志(DAI Y T, ZHANG X Y, WANG Y X, et al. Modern research progress of radix astragali and prediction and analysis of its quality markers [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine), 2022, 47(7): 1754-64.
- [4] TAY K C, TAN L T, CHAN C K, et al. Formononetin: a review of its anticancer potentials and mechanisms [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 820.
- [5] 张晶蕾. 芒柄花素在围绝经期妇女中的药用价值研究[J]. 中国现代应用药学(ZHANG J L. Study on the medicinal value of formononetin in peri-menopausal women [J]. Modern Applied Pharmacy in China), 2022, 39(7): 989-95.
- [6] ONG S K L, SHANMUGAM M K, FAN L, et al. Focus on formononetin: anticancer potential and molecular targets [J]. Cancers, 2019, 11(5): 611.
- [7] SINGH S P, WAHAJUDDIN, TEWARI D, et al. PAMPA permeability, plasma protein binding, blood partition, pharmacokinetics and metabolism of formononetin, a methoxylated isoflavone [J].

- Food Chem Toxicol, 2011, 49(5): 1056-62.
- [8] REN J, XU H J, CHEN H, et al. Synthesis and antitumor activity of formononetin nitrogen mustard derivatives [J]. Eur J Med Chem, 2012, 54: 175-87.
- [9] FU D J, ZHANG L, SONG J, et al. Design and synthesis of formononetin-dithiocarbamate hybrids that inhibit growth and migration of PC-3 cells via MAPK/Wnt signaling pathways [J]. Eur J Med Chem, 2017, 127: 87-99.
- [10] BOURNE Y, KOLB H C, RADIC Z, et al. Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(6): 1449-54.
- [11] TORNOE C W, SANDERSON S J, MOTTRAM J C, et al. Combinatorial library of peptidotriazoles: identification of [1,2,3]-triazole inhibitors against a recombinant leishmania mexicana cysteine protease [J]. Comb Chem, 2004, 6(3): 312-24.
- [12] WHITING M, MUIDOON J, LIN Y C, et al. Inhibitors of HIV-1 protease by using *in situ* click chemistry [J]. Angew Chem Int Edit, 2006, 45(9): 1435-9.
- [13] AGALAVE S G, MAUJAN S R, PORE V S. Click chemistry: 1,2,3-triazoles as pharmacophores [J]. Chem Asian J, 2011, 6(10): 2696-718.
- [14] HOU Y, BAI Y, LU C, et al. Applying molecular docking to pesticides [J]. Pest Manag Sci, 2023, 79(11): 4140-52.
- [15] 李卫胜, 王婷婷, 何文强. PI3K/Akt/mTOR通路与自噬调控及相关疾病的研究进展[J/OL]. 重庆医学(LI W X, WANG T T, HE W Q, et al. Research progress of PI3K/Akt/mTOR pathway and autophagy regulation and related diseases [J/OL]. Chongqing medicine), 2024, 1-15.
- [16] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, et al. Gastric cancer [J]. The Lancet, 2020, 396: 635-48.
- [17] 廖灿城, 许丹翘, 刘晓红, 等. 芒柄花素平衡溶解度和油水分配系数的测定[J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版)(LIAO C C, XU D Q, LIU X H, et al. Determination of equilibrium solubility and oil-water partition coefficient of formononetin [J]. Journal of Foshan Institute of Science and Technology, Natural Science Edition), 2017, 35(6): 71-5.
- [18] YAO J N, ZHANG X X, ZHANG Y Z, et al. Discovery and anticancer evaluation of a formononetin derivative against gastric cancer SGC7901 cells [J]. Invest New Drugs, 2019, 37(6): 1300-8.
- [19] LÜ C, YANG S, CHEN X, et al. Micro RNA-21 promotes bone mesenchymal stem cells migration *in vitro* by activating PI3K/Akt/MMPs pathway [J]. J Clin Neurosci. 2017, 46: 156-62.
- [20] YIP P Y. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. Transl Lung Cancer Res. 2015, 4(2): 165-76.
- [21] ACCILI D, ARDEN K C. Arden FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation [J]. Cell, 2004, 117(4): 421-6.
- [22] CHIN Y R, TOKER A. Toker function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer [J]. Cell Signal, 2009, 21(4): 470-6.
- [23] DOSSOU A S, BASU A. The emerging roles of mTORC1 in macromanaging autophagy [J]. Cancers, 2019, 11(10): 1422.
- [24] ARYAL P, KIM K, PARK P H, et al. Baicalein induces autophagic cell death through AMPK/ULK1 activation and downregulation of mTORC1 complex components in human cancer cell [J]. FEBS J, 2014, 281(20): 4644-58.
- [25] ALZHRANI A S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: at the bench and bedside [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 125-32.
- [26] 宋晓婧. PI3K/AKT/mTOR通路在胃癌中的研究进展[J]. 临床医学进展(SONG X J. Research progress of PI3K/AKT/mTOR pathway in gastric cancer [J]. Progress in Clinical Medicine), 2023, 13(12): 18653-8.
- [27] 乔丹, 张晟郡, 王时玉, 等. 黄芩素介导FAK蛋白调控PI3K/Akt信号通路抑制胃癌HGC-27细胞增殖和迁移[J]. 中国实验方剂学杂志(QIAO D, ZHANG S J, WANG S Y, et al. Baicalein mediates FAK protein regulating PI3K/Akt signal pathway to inhibit the proliferation and migration of gastric cancer HGC-27 cells [J]. Chinese Journal of Experimental Pharmaceutics), 2022, 28(7): 73-80.
- [28] 张莹莹. 类叶牡丹提取物介导FAK/PI3K/mTOR信号通路抑制胃癌HGC-27细胞的分子机制研究[D]. 延边大学(ZHANG Y Y. Molecular mechanism of inhibition of gastric cancer HGC-27 cells by FAK/PI3K/mTOR signal pathway mediated by *Paeonia suffruticosa* extract [D]. Yanbian University), 2022.
- [29] 何锋, 狐鸣, 冯世林, 等. 银杏内酯B通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制胃癌HGC-27细胞的恶性生物学行为[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志(HE F, HU M, FENG S L, et al. Ginkgolide B inhibits the malignant biological behavior of gastric cancer HGC-27 cells by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signal pathway [J]. Chinese Journal of Oncology Biotherapy), 2023, 30(10): 874-80.