

[文章编号] 1000-2200(2009)07-0563-03

· 基础医学 ·

## 吡唑衍生物体外抗肿瘤活性研究

李 宁<sup>1</sup>, 欧阳贵平<sup>1</sup>, 金林红<sup>1</sup>, 黄银久<sup>1,2</sup>

**[摘要]** 目的: 研究吡唑衍生物对 PC3、Bcap37、BGC823 3 种肿瘤细胞株生长的影响及其作用机制。方法: 采用 MTT 比色法测定吡唑衍生物对 3 种肿瘤细胞生长的影响; AO/EB 双染色, 荧光显微镜观察细胞凋亡形态; 利用 Western Blot 检测化合物对蛋白激酶磷酸化的影响。结果: 吡唑衍生物对 3 种肿瘤细胞生长有一定的抑制作用, 且具有浓度依赖性; 吡啶橙/溴化乙锭 (AO/EB) 双染色可见吡唑衍生物 F 分别使 PC3 细胞变小、变圆, 核染色质凝集, Bcap37 细胞周围呈现亮绿色的荧光凋亡小体; Western Blot 检测可知吡唑衍生物对 EGF 诱导的 Erk1/2 磷酸化没有抑制效果。结论: 吡唑衍生物对 3 种肿瘤细胞生长有抑制作用, 化合物 F 诱导 PC3 和 Bcap37 细胞凋亡, 吡唑衍生物不能通过阻断 Erk1/2 磷酸化来抑制细胞增殖。

[关键词] 肿瘤/化学诱导; 吡唑类衍生物; 肿瘤, 实验性; 细胞株; 凋亡

[中国图书资料分类法分类号] R 730.2311; O 626.21

[文献标识码] A

Anti-tumor activities of pyrazole derivatives *in vitro*Li Ning<sup>1</sup>, OUYANG Gui-ping<sup>1</sup>, JIN Lin-hong<sup>1</sup>, HUANG Yin-jiu<sup>1,2</sup>

(1. Research and Development Centre for Fine Chemicals, Guizhou University, Guiyang Guizhou 550025;

2. Department of Bioscience, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the anti-tumor activities of pyrazole derivatives against PC3, Bcap37 and BGC823 cells, and the mechanism of action. **Methods:** The inhibition effects of pyrazole derivatives on PC3, Bcap37 and BGC823 cells *in vitro* were tested through MTT colorimetric assay and the apoptotic morphology was observed by staining the PC3 cells with AO/EB. The inhibition effects of the compounds on the phosphorylation of Erk1/2 were determined by Western Blot analysis. **Results:** Pyrazole derivatives showed inhibition activities against PC3, Bcap37 and BGC823 cells in a concentration dependent manner; compound F could induce the apoptosis of PC3 and Bcap37 cells; Western Blot analysis showed that pyrazole derivatives could not inhibit the phosphorylation of Erk1/2 induced by EGF. **Conclusions:** Pyrazole derivatives can inhibit the activities of PC3, Bcap37 and BGC823 cells, and compound F may induce the apoptosis of PC3 and Bcap37 cells; pyrazole derivatives can not inhibit the proliferation of PC3 cell through Erk1/2 mediated signal pathway.

[Key words] neoplasms/chemically induced; pyrazole derivatives; neoplasms, experimental; cell line; apoptosis

吡唑类化合物是含氮杂环化合物的一种, 具有消炎、抗真菌、抗肿瘤、抗病毒等广泛的生物活性, 所以该类化合物的研究受到人们的广泛关注。本文研究并观察 7 个吡唑类化合物对 PC3、Bcap37、BGC823 3 种细胞体外增殖和凋亡的影响, 进一步以 PC3 细胞为研究对象, 检测它们对 Erk1/2 蛋白磷酸化的影响, 初步探讨其对 3 种肿瘤细胞的作用机制。

## 1 材料与方 法

1.1 化学试剂 MTT(北京鼎国生物技术发展有限公司)溶解在过滤除菌的 1 × PBS (pH 7.4, NaCl 0.8%, KCl 0.02%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.144%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.024%), 终浓度 0.5 mg/ml; SDS(北京鼎国生物技术发展有限公司)溶解在 10 mmol/L 的盐酸中, 终浓

度为 10%; 二甲基亚砜 (DMSO) 购自生工生物工程 (上海) 有限公司; 注射用盐酸阿霉素 (adriamycin, ADM) 购自浙江海正药业股份有限公司, 10% 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司), RPMI-1640 培养基 (美国 GIBCO 公司), AO/EB 染料, Protein Marker (晶美生物工程有限公司), HRP-mouse (KPL), HRP-rabbit (KPL), ECL (PIERCE), PVDF 膜 (Bio-Rad), TEMED (Sigma), Tween-20 (Sigma)。

1.2 实验药品 吡唑类化合物 A、B、C、D、E、F、G 均为本中心合成。

1.3 细胞株 前列腺癌细胞株 PC3, 乳腺癌细胞株 Bcap37, 人胃癌细胞株 BGC823 (均购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库)。

1.4 细胞抑制率的检测 MTT 比色法<sup>[1,2]</sup>。取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶 1 ml 消化贴壁的肿瘤细胞, 含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液配制细胞悬液, 于 96 孔培养板内每孔接种 100 μl (含 2 000 个肿瘤细胞), 37 °C 培养 24 h。实验组加入含有不同

[收稿日期] 2008-11-18

[作者单位] 1. 贵州大学 精细化工研究开发中心, 贵州 贵阳 550025; 2. 蚌埠医学院 生物科学系, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 李 宁 (1982 -), 男, 硕士研究生。

[通讯作者] 欧阳贵平, 博士, 研究生导师, 教授。

浓度药物,每个药设5个剂量组,每组设6个平行孔。对照组加入与药等体积的溶剂。置37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养3天后弃去培养液,每孔加100 μl 0.5 mg/ml MTT溶液(1×PBS配制)。37℃保温4 h,弃去上清,每孔加入10% SDS 100 μl 溶解Formazan颗粒,12 h后经轻度振荡,用酶标仪,在检测波长595 nm条件下测定吸光度(OD)。以溶剂处理的肿瘤细胞为对照组,计算供试化合物对肿瘤细胞的抑制率。以药物的不同浓度及对细胞的抑制率作图可得到剂量反应曲线,从中求出药物的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。

1.5 染色法观察细胞凋亡的形态学变化 吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)染色法<sup>[3,4]</sup>。把无菌盖玻片放入6孔板中,接种细胞于6孔板中,放入37℃培养箱。取对数生长期的细胞消化制成单细胞悬液,以2×10<sup>5</sup>/ml接种于6孔板,每孔2 ml。将培养板置于37℃、5% CO<sub>2</sub>、95%湿度的培养箱中培养24 h,细胞贴壁后弃原培养基,更换含吡唑类化合物(40 μmol/L)的带药培养基,继续培养24 h。在载玻片上滴一滴含AO/EB染料的1×PBS,盖上贴有细胞的盖玻片,尽量避免气泡,加盖玻片后立即置于荧光显微镜下观察凋亡细胞的形态学变化。

1.6 Western blot 检测化合物对 pErk 的影响 取对数生长期的供试细胞接种于12孔板中,培养(37℃,5% CO<sub>2</sub>,95%湿度)至细胞长满,吸掉培养基,更换无血清培养基饥饿6 h,换含有设定浓度待测化合物的新鲜培养基,继续培养30 min,然后每孔加入3 μl EGF生长因子,继续培养10 min,吸掉上清,每孔加100 μl 2×Sample Buffer充分裂解细胞。细胞裂解液转至1 ml离心管,以超声波细胞破碎仪处理,于90℃水浴变性处理5 min后制成蛋白样品。按配方配制10%分离胶20 ml和4%凝胶胶10 ml,灌胶。蛋白样品经10 000 g离心10 min,上样至10% SDS-PAGE胶孔中,同时加10 μl标准分子量蛋白,利用电泳缓冲液(running buffer)进行电泳分离(50 mA,恒流),当样品条迁移到距PAGE胶底边1 cm时,停止电泳。SDS-PAGE完成后,需要进行蛋白转膜。PVDF膜以甲醇浸泡30 min,并用蒸馏水反复洗涤使之能与水浸润,将Bio-Rad电转移夹板、电泳完成的PAGE胶、滤纸等装成“三明治”状,安装到转移槽中,加入转移缓冲液(transfer buffer),100 V恒流转移120 min(1.5 mm厚度PAGE胶),将胶体上的蛋白质转移到PVDF膜上。电转移后的PVDF膜用封闭缓冲液(blocking buffer)室温封闭1 h后,分别先后上一抗(pErk, α-actin),4℃孵育过夜,以1×PBS于摇床上洗涤3次,每次

3 min。将PVDF膜浸入含有辣根过氧化物酶标记的二抗缓冲液中,在室温下摇晃孵育1 h。再以1×PBS洗涤3次,每次3 min。最后用ECL化学发光检测蛋白质印迹,X光片用凝胶成像系统记录数据。

## 2 结果

2.1 吡唑衍生物对供试细胞的增殖影响 吡唑衍生物A、B、C、D、E、F、G在40 μmol/L浓度下对PC3、Bcap37、BGC823细胞72 h的抑制率分别为75.3%、75.4%、80.3%、86.2%、95.2%、98.4%、45.3%;94.8%、21.9%、97.4%、89.4%、99.9%、99.4%、17.9%;88.4%、51.5%、88.6%、83.2%、92.9%、92.2%、55.7%。IC<sub>50</sub>见表1。量效关系研究表明,随着以上化合物浓度的升高,化合物对供试肿瘤细胞的增殖抑制活性表现出增强的趋势。

表1 化合物A~G对PC3、Bcap37、BGC823细胞72 h的IC<sub>50</sub>

细胞株	IC <sub>50</sub> (μmol/L)						
	A	B	C	D	E	F	G
PC3	27.8	12.9	12.2	20.8	11.8	9.7	46.8
Bcap37	12.0	238.3	6.7	9.4	1.8	13.6	206.2
BGC823	12.1	43.0	12.9	15.7	10.4	11.5	38.4

2.2 化合物对细胞的形态学影响 对照组和实验组经AO/EB染色后,在荧光显微镜下观察,对照组细胞呈均匀绿色,细胞结构正常(见图1、2)。在这7个化合物中,A、B、C、D、E、G无变化,而化合物F作用的PC3细胞,细胞体积变小、变圆,核染色质凝集(见图3)。经化合物F作用的Bcap37细胞,细胞周围有呈亮绿色的荧光凋亡小体(见图4)。

2.3 Western blots 检测吡唑类衍生物对PC3细胞中pErk的影响 吡唑类衍生物对PC3细胞中E、G、F诱导的Erk1/2磷酸化无抑制效果(见图5)。

## 3 讨论

作为杂环化合物中的一个重要分支,吡唑类杂环化合物因其具有多变的结构类型和广泛的生物活性而倍受人们关注。近年来,合成不同基团修饰的吡唑衍生物并进行抗肿瘤药物筛选及作用机制的探索成为该领域的研究热点<sup>[5,6]</sup>。鉴于此,本课题组合成了一系列吡唑类化合物,并对其中的7个进行了体外抗肿瘤细胞增殖以及作用机制的初步研究。结果表明,随着测试化合物A、B、C、D、E、F、G浓度的不断提高,化合物对供试细胞PC3和BGC823的抑制率也分别相应升高,说明这两个化合物对PC3细胞、BGC823细胞增殖抑制作用具有浓度依赖的特征;而化合物A、C、D、E、F对Bcap37细胞也表现

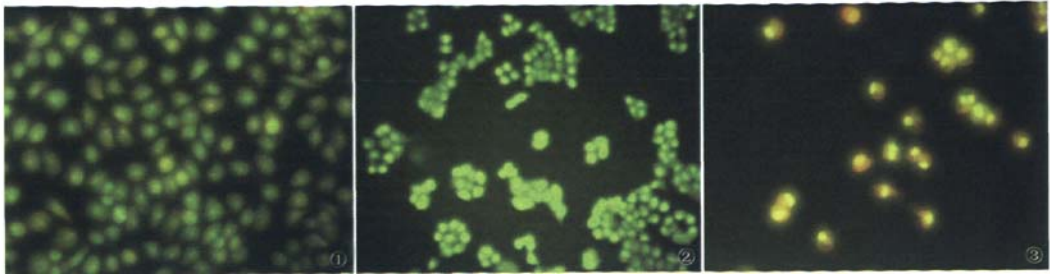


图 1 阳性对照PC3细胞 图 2 阴性对照 Bcap37细胞 图 3 化合物F在40 μmol/L浓度下对PC3细胞的形态学影响 (×200)



图 4 化合物F在40 μmol/L浓度下对 Bcap37细胞的形态学影响 (×200)

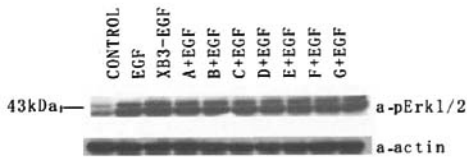


图 5 化合物对PC3细胞pErk1/2磷酸化的影响

出量效关系特征的增殖抑制作用。AO 能透过胞膜完整的细胞,嵌入细胞核 DNA,使之发出明亮的绿色荧光。EB 仅能透过胞膜受损的细胞,嵌入核 DNA,发橘红色荧光。凋亡的细胞呈现为染色增强,荧光更为明亮,均匀一致的圆状或固缩状、团块状结构。非凋亡细胞核呈现荧光深浅不一的结构样特征<sup>[7]</sup>。此项研究的 AO/EB 双染色细胞形态观察结果表明,化合物 F 在 40 μmol/L 下作用 PC3 和 Bcap37 细胞 24 h,PC3 细胞体积变小、变圆,核染色质凝集;经化合物 F 作用的 Bcap37 细胞,细胞周围有呈亮绿色的荧光凋亡小体。因此,本研究初步说明化合物 F 可能通过肿瘤细胞的凋亡诱导作用发挥细胞增殖抑制作用,而其它几个化合物的作用机制不明。

Erk1/2 信号通路的活化是将信号从细胞膜表面受体转导至核内的关键,参与这一转导过程的有 GTPase、Ras、Raf-1、丝/苏氨酸激酶和 MEK1/2 双特异性激酶等;Erk1/2 信号通路是由一个小 GTP 蛋白连接活化的受体酪氨酸激酶和胞质蛋白组成的级联反应,其活化的中心是使 Ras 进行鸟苷酸交换变成

其活化形式 RasGTP,并需要 Ras、Raf-1 蛋白参与。平时 Erk1/2 位于胞质内,一旦被激活,Erk1/2 迅速穿过核膜并通过磷酸化反应调节某些转录因子的活性如 AP-1、NF-κB 等,这些转录因子进一步调节它们各自靶基因的转录,引起特定蛋白的表达或活性改变,最终调节细胞代谢和功能并影响细胞产生特定的生物学效应,如细胞的活化、增殖、凋亡的抑制,说明这些化合物不是通过阻断 Erk1/2 信号通路来抑制细胞增值<sup>[8]</sup>。本研究考察了以上 7 个吡唑衍生物对 EGF 诱导的 Erk1/2 磷酸化的影响,结果表明它们没有抑制效果。

综上所述,以上 7 个吡唑衍生物对 3 种细胞均有一定的抑制作用,但是这种活性的发挥不是通过阻断 Erk1/2 信号通路来抑制细胞增殖;初步的凋亡诱导实验说明,吡唑衍生物 F 可能通过诱导细胞凋亡发挥增殖抑制活性;但是,以上吡唑衍生物对 3 种细胞的具体调控机制还有待进一步深入研究,这将为以该类化合物为先导,进行结构优化,设计、合成、开发有更好活性的新型抗肿瘤药物提供实验依据。

[ 参 考 文 献 ]

[1] Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and Reliability [J]. Journal Immunological Methods, 1986, 89 (2): 271 - 277.

[2] 方 蓉,李芳秋,武建国. MTT 比色法的条件探讨[J]. 临床检验杂志, 2003, 21 (1): 34 - 35.

[3] 陈丽娟,盛瑞兰,汪承亚. AO/EB 荧光染色法测定阿糖胞苷诱导 HL-60 细胞凋亡[J]. 中华血液学杂志, 1998, 1 (1): 41 - 42.

[4] 吴 兴,陈峥嵘,张光健. AO/EB 双重染色法检测人骨肉瘤细胞凋亡[J]. 肿瘤, 2004, 24 (1): 88 - 89.

[5] 李 冶,刘亚婧,袁孝焯,等. 吡唑并 [1,5-a] 嘧啶类化合物的合成及其抗肿瘤活性[J]. 中国药物化学杂志, 2006, 16 (6): 352 - 355.

[6] 李 冶,刘亚婧,袁孝焯,等. 5,7-二取代吡唑并 [1,5-a] 嘧啶类化合物的合成及其抗肿瘤活性[J]. 中国药物化学杂志, 2007, 17 (1): 18 - 22.

[7] 林永明,赵 毅,余克强,等. 青藤碱对 THP-1 细胞增殖、凋亡的影响[J]. 实用医学杂志, 2006, 22 (13): 1477 - 1479.

[8] Noonberg SB, Benz CC. Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents[J]. Drugs, 2000, 59 (4): 753 - 767.