

中国生物化学与分子生物学报

Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology

ISSN 1007-7626, CN 11-3870/Q

《中国生物化学与分子生物学报》网络首发论文

题目: 苯胺嘧啶衍生物 X-9 通过下调整合素 β 1 表达抑制肝细胞癌迁移侵袭
作者: 周彤彤, 段继燕, 吴志贤, 徐剑文, 陈坤, 侯培锋, 曾锦章, 刘杰
DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2019.10.1404
收稿日期: 2019-10-07
网络首发日期: 2019-12-31
引用格式: 周彤彤, 段继燕, 吴志贤, 徐剑文, 陈坤, 侯培锋, 曾锦章, 刘杰. 苯胺嘧啶衍生物 X-9 通过下调整合素 β 1 表达抑制肝细胞癌迁移侵袭. 中国生物化学与分子生物学报. <https://doi.org/10.13865/j.cnki.cjbmb.2019.10.1404>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

苯胺嘧啶衍生物 X-9 通过下调整合素 $\beta 1$ 表达抑制肝细胞癌迁移侵袭

周彤彤¹⁾, 段继燕¹⁾, 吴志贤²⁾, 徐剑文¹⁾, 陈 坤¹⁾, 侯培锋^{3,4,5)}, 曾锦章¹⁾, 刘 杰^{1)*}

(¹⁾ 厦门大学药学院福建省靶点药物重点实验室, 福建 厦门 361102; ²⁾ 中国人民解放军福州总医院肝胆内科, 福州 350025; ³⁾ 福建医科大学协和医院肿瘤内科, 福州 350000; ⁴⁾ 福建医科大学干细胞研究中心, 福州 350000; ⁵⁾ 福建省转化肿瘤医学重点实验室, 福州 350000)

摘要 整合素在许多肿瘤细胞中高表达, 并且参与肿瘤细胞的侵袭转移。在肝细胞癌中, 整合素 $\beta 1$ 被报导高表达, 并促进肿瘤细胞的侵袭。目前, 对于整合素的表达调控癌细胞机制以及干预其表达进而抑制肿瘤细胞转移的研究较少。本研究探讨利用小分子化合物抑制整合素表达来抑制肿瘤细胞迁移和侵袭的可能。首先, 对临床肝癌细胞患者癌组织和癌旁组织中的整合素 $\beta 1$ 的表达进行检测, 发现其在癌组织中的表达显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。对 TCGA 肿瘤数据库的生物信息学分析结果同样显示, 整合素 $\beta 1$ 的高表达与肝癌的分期 ($P = 0.019$) 和预后 ($P = 0.013$) 相关。通过筛选发现, 苯胺嘧啶衍生物 X-9 可以抑制肝癌细胞中整合素 $\beta 1$ 的 mRNA 和蛋白质的表达 ($P < 0.01$)。细胞划痕愈合实验和细胞穿孔结果显示, 苯胺嘧啶衍生物 X-9 能够抑制肝癌细胞的迁移和侵袭 ($P < 0.01$)。进一步的研究证实, 在肝癌细胞中外源表达整合素 $\beta 1$ 可以逆转 X-9 对肝癌细胞迁移和侵袭的抑制; 而在敲除整合素 $\beta 1$ 的细胞中, X-9 对细胞的迁移和侵袭的抑制被消除。因此, 鉴定出苯胺嘧啶衍生物 X-9 可以通过下调整合素 $\beta 1$ 表达, 进而抑制肝癌细胞的迁移和侵袭。

关键词 整合素 $\beta 1$; 苯胺嘧啶衍生物; 肝细胞癌; 癌细胞迁移; 癌细胞侵袭

中图分类号 Q966

收稿日期: 2019-10-07; 修回日期: 2019-11-05; 接受日期: 2019-11-27

福建省自然科学基金 (No. 2016J05087, No. 2017J01201); 福建省卫计委医疗创新项目 (No. 2015-CXB-15)

*通讯作者 Tel: 0592-2187221; E-mail: liujie@xmu.edu.cn

Received: October 7, 2019; Revised: November 5, 2019; Accepted: November 27, 2019

Supported by Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2016J05087, No. 2017J01201); Medical Innovation Project of Fujian Provincial Health Commission (No. 2015-CXB-15)

*Corresponding author Tel: 0592-2187221; E-mail: liujie@xmu.edu.cn

Aniline Pyrimidine Derivative X-9 Inhibits the Migration and Invasion of Hepatocellular Carcinoma by Down-regulating the Expression of Integrin β 1

ZHOU Tong-Tong¹, DUAN Ji-Yan¹, WU Zhi-Xian², XU Jian-Wen¹,
CHEN Kun¹, HOU Pei-Feng^{3,4,5}, ZENG Jin-Zhang¹, LIU Jie¹*

¹Key Laboratory of Innovative Drug Target Research of Fujian Province, School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China; ²Department of Hepatobiliary Disease, Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350025, China; ³Department of Medical Oncology, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350000, China; ⁴Fujian Medical University Stem Cell Research Institute, Fuzhou 350000, China; ⁵Key Laboratory of Translational Cancer Medicine of Fujian Province, Fuzhou 350000, China)

Abstract Integrins are highly expressed in many tumors and involved in tumor invasion and metastasis. In hepatocellular carcinoma (HCC), overexpression of integrin β 1 is reported to promote tumor cell invasion. To date, studies on the mechanism of regulation and interference of integrin expression to inhibit cancer metastasis is still scanty. This study investigates the possibility of inhibiting tumor cell migration and invasion by inhibiting integrin expression with small molecule compounds. Firstly, we examined the expression of integrin β 1 in tumor and para-tumor tissues from clinical HCC patients and found that expression of integrin β 1 in tumor tissues is significantly higher than that in para-tumor tissues. The analysis results of correlation between integrin β 1 and tumor stage and over survival rate of LIHC data set from TCGA database also showed that high expression of integrin β 1 was positive correlated with tumor stage ($P=0.019$) and over survival rate ($P=0.013$). Then we identified aniline pyrimidine derivative X-9 down-regulated integrin β 1 at both mRNA and protein levels. The wound healing and transwell invasion assay showed that aniline pyrimidine derivative X-9 inhibited hepatocellular carcinoma migration and invasion ($P<0.01$). Further studies indicated that expression of exogenous integrin β 1 could reverse the inhibition of hepatocellular carcinoma migration and invasion induced by aniline pyrimidine derivative X-9; and the inhibition of cell migration and invasion induced by aniline pyrimidine derivative X-9 was eliminated in cells with integrin β 1 knock-down. Thus, we identified that aniline pyrimidine derivative X-9 inhibited hepatocellular carcinoma migration and invasion via down-regulating integrin β 1 expression.

Key words integrin β 1; aniline pyrimidine derivative; hepatocellular carcinoma(HCC); cell migration; cell invasion

肝癌是目前世界第6大常见的肿瘤,同时也是第3位的肿瘤致死病因,而中国是肝癌高发

的第 1 大国^[1]。肝细胞癌是肝癌的最常见类型，转移和复发率高是导致主要死因之一。癌症的转移过程包括肿瘤细胞突破基底膜离开原发部位，进入血液或淋巴循环，穿出血管或淋巴管，在新的组织中定植和生长等多个过程^[2]。因此，研究肝癌转移的分子机制，进而开发抑制肝癌转移的药物具有重要的意义。

肿瘤细胞的迁移与侵袭能力的增强是肿瘤细胞发生转移的一个重要特征^[3]。整合素(integrin)是介导细胞迁移和侵袭的一类重要的黏附分子。在肿瘤细胞中，整合素通常高表达，介导肿瘤细胞的迁移和侵袭，进而促进肿瘤细胞的转移^[4, 5]。整合素 $\beta 1$ 被报导在肝细胞癌中高表达，并且能够促进肝癌细胞的迁移和侵袭^[6, 7]。整合素 $\beta 1$ 可通过与胞外基质结合，向细胞内传递信号，进而介导肿瘤细胞的迁移和侵袭。寻找干扰整合素与配体相互作用或减少整合素在肿瘤中表达的化合物，从而阻断肝细胞癌的侵袭与转移，对抗肝癌药物开发具有深远的影响。

苯胺嘧啶衍生物是一种有效的药物载体，已被报道在许多已获批准的抗癌药物中使用，如伊马替尼和尼洛替尼^[8-10]。根据其抗肿瘤活性，本文设计合成了一系列新型苯胺嘧啶衍生物，并进行了初步探索，发现苯胺嘧啶衍生物 X-9 能够抑制肝细胞癌的迁移和侵袭，进一步的研究发现，苯胺嘧啶衍生物 X-9 通过下调整合素 $\beta 1$ 表达来抑制肝细胞癌的迁移和侵袭。

1 材料与amp;方法

1.1 肝癌患者的资料

收集中国人民解放军福州总医院肝胆科肝细胞癌患者的癌组织和癌旁组织 17 例。患者术前未经过任何化疗和放疗，临床资料完整。所有的患者均已经签署知情同意书。

1.2 数据库的生物信息学分析

使用 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>)^[11]对 TCGA 数据库中肝细胞癌(LIHC)数据进行分析，分别分析了整合素 $\beta 1$ 基因(integrin subunit beta 1, *ITGB1*)与肝细胞癌的分期的关系，以及整合素 $\beta 1$ 基因表达和肝细胞癌预后的关系。

1.3 细胞和试剂

肝癌细胞系 HepG2 和 SMMC7721 由本实验室保存，并通过细胞鉴定。DMEM 培养基，胰酶，血清购于美国 GIBCO 公司；基质胶(BD Bioscience, CA)；整合素 $\beta 1$ 的抗体(EPR1040Y, Abcam)； β -肌动蛋白的抗体(A5441, Santa Cruz)；HRP 偶联的二抗 (Pierce)。

1.4 MTT 检测

细胞按等量密度 5 000 个细胞每孔接种在 96 孔板，苯胺嘧啶衍生物处理和 DMSO 对照处理的细胞相应时间后，细胞用 MTT 染色，随后在 570nm 处测量吸光值。

1.5 RT-PCR 分析

用 Trizol LS (Invitrogen)提取肝细胞癌患者的癌组织及癌旁组织或细胞的总 RNA，用全式金的 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits 进行第 1 条 cDNA 链的反转录。RT-PCR

采用条件为 95 °C 5 s、62 °C 30 s、72 °C 30 s 进行 25 个循环。qPCR 采用全式金公司的 SYBR premix EX Taq 的试剂盒进行实时定量 PCR。PCR 条件为 95 °C 5 s、65 °C 30 s、72 °C 30 s 进行 40 个循环。其中， β -肌动蛋白作为内参对照。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相关基因 mRNA 水平的相对表达量，分析各基因 mRNA 表达情况，结果用差异倍数平均值及标准误表示。PCR 所用引物见 Table 1。

Table 1 Sequence of the primers

Gene	Primer sequence
<i>ITGB1</i>	Forward 5'-GAAGGGTTGCCCTCCAGA-3' Reverse 5'-GCTTGAGCTTCTCTGCTGTT-3'
<i>MMP2</i>	Forward 5'-CAGGCTCTTCTCCTTTCACAAC-3' Reverse 5'-AAGCCACGGCTTGGTTTTTCCTC-3'
<i>MMP9</i>	Forward 5'-CCTGGAGACCTGAGAACCAATC-3' Reverse 5'-CCACCCGAGTGTAACCATAGC-3'
<i>ACTB</i>	Forward 5'-CTGGAGAAGAGCTACGAG-3' Reverse 5'-TGATGGAGTTGAAGGTAG-3'

1.6 shRNA 蛋白质敲低

整合素 $\beta 1$ 的 shRNA: 将相互序列为 GCCTTGCATTACTGCTGATAT 和 scramble 对照克隆到 PLKO.1 载体，然后转染 HEK293T 细胞产生慢病毒。经收集含有慢病毒的培养基，转染 HepG2 细胞。用 Western 印迹检测敲除效率。

1.7 Western 印迹检测

将各个组织或各组细胞抽提总蛋白质，各组蛋白质样品经定量后，取等量蛋白质样品经电泳、转膜、封闭 1 h 后，敷一抗 4 °C 过夜，再经洗膜 3 次，常温敷二抗 1 h 后洗膜 3 次，ECL 试剂显色并曝光。所用抗体浓度如下： β -肌动蛋白(1 : 2 000)、整合素 $\beta 1$ (1 : 2 000)。

1.8 细胞迁移实验

取对数生长期 HepG2 细胞，以 4.0×10^5 细胞/孔量接种于 6 孔培养板，待细胞长到 80%~90%后，用 10 μ L 的无菌枪头在每个孔的中央划一条直线，每孔加入 2 mL 由无血清的 DMEM 培养基配制的不同浓度的苯胺嘧啶衍生物 X-9，以及 DMSO 对照，培养 48 h，在倒置荧光显微镜(ZEISS,德国)下采图，观察各组细胞由划痕边缘向划痕中央迁移后剩下的距离(200 \times)。统计计算相对迁移率，计算公式如下：

相对迁移率 (%) = (0 h 的划痕宽度-- 48 h 的划痕宽度) / 0 h 的划痕宽度 × 100。

1.9 Transwell 细胞侵袭实验

Transwell 小室(聚碳酸酯膜, 膜孔径 8 μm)预先用无血清 DMEM 稀释的基质胶 (1:4) 处理, 取对数生长期 HepG2 细胞, 用无血清培养基 (加入不同浓度的苯胺嘧啶衍生物 X-9 以及 DMSO 对照)调整细胞浓度为 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$,按 100 μL /孔细胞量接种于 Transwell 小室的上室, 下室加入 700 μL 的正常培养液, 37 $^\circ\text{C}$ 继续培养 24 h。用棉签擦去滤膜上层的细胞, PBS 洗 2 遍, 将上室置于 4%多聚甲醛中固定 15 min, PBS 清洗 3 次, 结晶紫染色 30 min, PBS 清洗 3 次, 倒置荧光显微镜(ZEISS,德国)下, 对 5 个不同视野的穿过膜细胞计数, 求平均值。

1.10 统计学分析方法

每个实验至少重复 3 次, 应用 PRISM (version 6, GraphPad Software)软件进行统计学分析。结果采用平均值加减标准误表示, 多组之间的统计分析采用 one-way anova。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

2 结果

2.1 整合素 $\beta 1$ 在肝癌中高表达

整合素 $\beta 1$ 已经被报导与肝细胞癌的进展有关。为进一步确定整合素 $\beta 1$ 与肝细胞癌的关系, 收集了临床上的肝细胞癌患者的癌组织和癌旁组织 17 例, 对其中 6 例样本的组织进行裂解, 提取蛋白质, Western 印迹检测蛋白质整合素 $\beta 1$ 的表达。结果显示, 6 例样本中, 癌组织中的表达显著高于癌旁组织 (Fig. 1A)。为了解整合素 $\beta 1$ 转录水平的表达, 对 11 例样本组织进行 RNA 提取, qRT-PCR 检测整合素 $\beta 1$ 的 mRNA 的表达。结果表明, 整合素 $\beta 1$ 的 mRNA 的表达, 在肝癌组织中显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$) (Fig. 1B)。以上结果表明, 整合素 $\beta 1$ 在肝癌组织中高表达, 预示其可能参与肝细胞癌的发生。

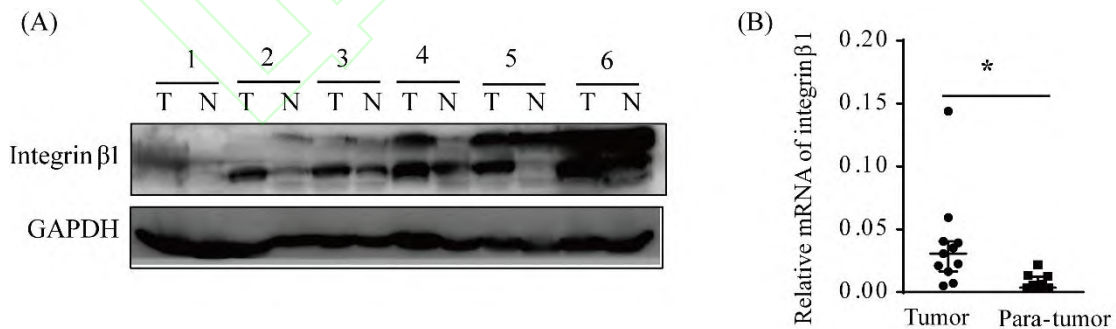


Fig. 1 Expression of integrin $\beta 1$ in HCC tissues (A) Western blot was used to examine integrin $\beta 1$ in 6 cases of clinical tumor (T) and adjacent normal tissues (N). GAPDH was used as an internal control. (B) Real-time PCR was performed to test integrin $\beta 1$ mRNA in 11 cases of clinical HCC tumor and adjacent normal tissues. GAPDH was used as an internal control. The data were presented as median \pm range, * $P < 0.05$

2.2 整合素 $\beta 1$ 与肝癌的分期和预后相关

用 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 在线数据库对 TCGA 数据库里的肝癌样本 (LIHC) 中整合素 $\beta 1$ (*ITGB1*) 的 mRNA 的表达与肝癌分期的关系进行分析。结果显示, III 期和 IV 期肿瘤中整合素 $\beta 1$ 的表达高于 I 期和 II 期, 并且整合素 $\beta 1$ 的表达与肿瘤的分期有显著的相关性 ($P=0.019$) (Fig. 2A)。同时还将整合素 $\beta 1$ 的表达分为高低两组, 分析其表达高低与病人的总体生存率的关系。结果显示, 高表达整合素 $\beta 1$ 组的生存率显著低于低表达整合素 $\beta 1$ 组, 表明高表达 $\beta 1$ 的肝癌病人预后较差 (Fig. 2B)。从数据库中 364 例肝癌病例的分析可以表明, 整合素 $\beta 1$ 的表达与肝癌的进展和预后相关。

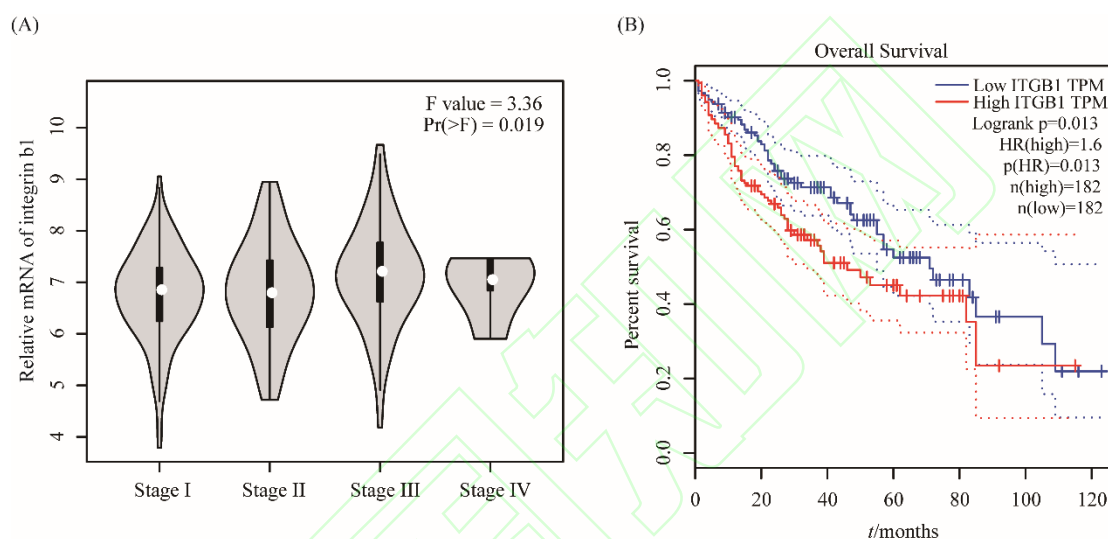


Fig. 2 Integrin $\beta 1$ correlates with hepatocellular carcinoma stage and over survival rate (A) Violin plots based on pathological stages from GEPIA outputs. (B) The overall survival of *ITGB1* gene from GEPIA outputs

2.3 苯胺嘧啶衍生物 X-9 抑制整合素 $\beta 1$ 的表达

苯胺嘧啶被用于多种抗癌药物的骨架。根据其活性基团设计了一系列的苯胺嘧啶衍生物, 并对其抗肿瘤活性进行筛选, 最后获得苯胺嘧啶衍生物。苯胺嘧啶衍生物 X-9 具有良好的抑制细胞增殖的作用(见 Table 2)。

Table 2 Inhibition of HepG2 cell viability by aniline pyrimidine derivatives

Aniline pyrimidine derivatives	Inhibition of cell viability (mean \pm SEM)
X-1	52.84 \pm 0.66
X-2	38.52 \pm 3.88
X-3	28.65 \pm 2.24

X-4	22.91±1.68
X-5	63.21±1.10
X-6	61.17±0.67
X-7	59.09±2.56
X-8	57.60±2.10
X-9	64.21±1.71
X-10	35.47±1.60

HepG2 cells were treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ aniline pyrimidine derivatives for 24 hours. The cell viability were tested by MTT assay. The inhibition of cell viability by each aniline pyrimidine derivative were calculated, and presented as mean \pm SEM, $n=6$

用不同浓度苯胺嘧啶衍生物 X-9 (见 Fig.3A) 处理 HepG2 细胞 24 h。结果显示, 随着 X-9 浓度梯度增加, 对细胞活力的抑制也梯度增加。在 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 2 $\mu\text{mol/L}$ 时, 苯胺嘧啶衍生物 X-9 对细胞增殖无显著抑制, 当浓度高于 4 $\mu\text{mol/L}$ 时, 可显著抑制细胞增殖(Fig. 3B)。为了避免高浓度 X-9 诱导的细胞增殖抑制, 用 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 2 $\mu\text{mol/L}$ 苯胺嘧啶衍生物 X-9 处理细胞, 检测其对整合素 $\beta 1$ 以及细胞迁移和侵袭的影响。结果发现, 苯胺嘧啶衍生物 X-9 可显著抑制整合素 $\beta 1$ 表达。通过 Western 印迹检测整合素 $\beta 1$ 的蛋白表达。结果显示, X-9 可以浓度梯度依赖的方式降低整合素 $\beta 1$ 的表达 (Fig. 3C)。为了更进一步了解 X-9 对整合素 $\beta 1$ 蛋白的调控是转录调控还是转录后调控, 通过 RT-PCR 对 X-9 处理和未处理的 HepG2 细胞中整合素 $\beta 1$ 的 mRNA 进行检测。结果显示, X-9 显著抑制整合素 $\beta 1$ 的 mRNA 表达, 而对另外 2 个参与肿瘤细胞侵袭的基因 *MMP2* 和 *MMP9* 未见显著影响 ($P>0.05$) (Fig. 3D)^[12, 13]。由此表明, 苯胺嘧啶衍生物 X-9 在转录水平抑制整合素 $\beta 1$ 的表达。

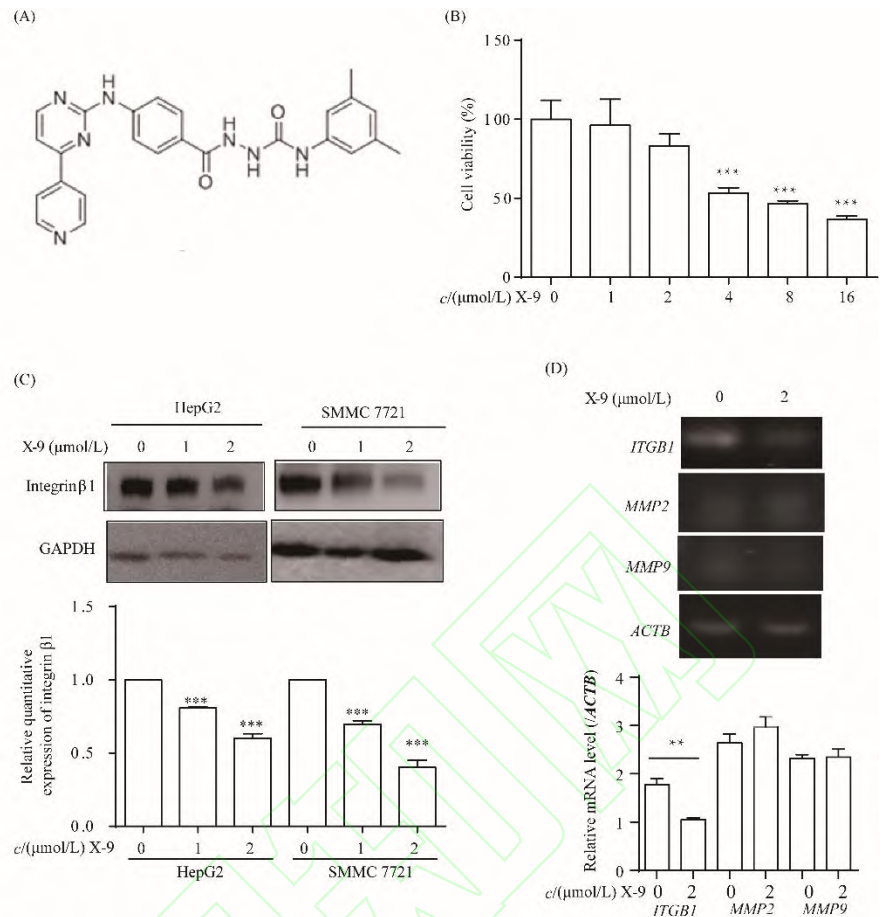


Fig. 3 Aniline pyrimidine derivative X-9 inhibits integrin $\beta 1$ expression (A) The structure of aniline pyrimidine derivative X-9. (B) Cell viability of HepG2 cell treated with different concentration of X-9 or DMSO control for 24 hours. $n=5$, *** $P<0.001$, vs 0 $\mu\text{mol/L}$ X-9. (C) Western blotting for integrin $\beta 1$ protein expression. HepG2 and SMMC7721 cells were treated with different doses of X-9 and DMSO control for 12 hours, then Western blot was performed to test integrin $\beta 1$ expression. GAPDH was used as an internal control. The histogram in the low panel showed the relative integrin $\beta 1$ protein levels. Data represent mean \pm SEM ($n=3$). *** $P<0.001$, vs 0 $\mu\text{mol/L}$ X-9. (D) Agarose gel electrophoresis for identifying the PCR products of different genes. HepG2 cells were treated with 2 $\mu\text{mol/L}$ X-9 or DMSO control for 12 hours, RT-PCR to test mRNA expression of integrin $\beta 1$ (ITGB1), MMP2 and MMP9. β -actin (ACTB) was used as internal control. Relative gene mRNA expression was quantitated by ImageJ in lower panel. $n=3$, *** $P<0.001$, vs 0 $\mu\text{mol/L}$ X-9

2.4 苯胺嘧啶衍生物 X-9 抑制肝细胞癌的迁移和侵袭

整合素 $\beta 1$ 被报导参与肝细胞癌的迁移和侵袭，于是进一步探讨了苯胺嘧啶衍生物 X-9 是否能抑制肝细胞癌的迁移侵袭。首先用划痕愈合实验检测不同浓度的 X-9 处理后，细胞迁移能力的改变，结果表明，1 $\mu\text{mol/L}$ 和 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 X-9 均能有效抑制 HepG2 细胞的迁移 ($P<0.001$) (Fig. 4A, B)。肿瘤细胞在体内穿过基底膜的过程对于肿瘤细胞的转移至关重要

[14, 15], 基底膜为包括层黏连蛋白质, 胶原蛋白在内的胞外基质蛋白质^[16]。为了模拟这一过程, 用胞外基质(matrigel)对穿孔小室 (Transwell) 进行包被, 用 Transwell 穿孔实验检测细胞穿过胞外基质的侵袭能力。与细胞迁移实验结果一致, X-9 显著抑制了穿过小孔的细胞数目($P<0.01$)。结果表明, 苯胺嘧啶衍生物 X-9 能够显著抑制肝癌细胞的侵袭能力(Fig. 4C,D)。

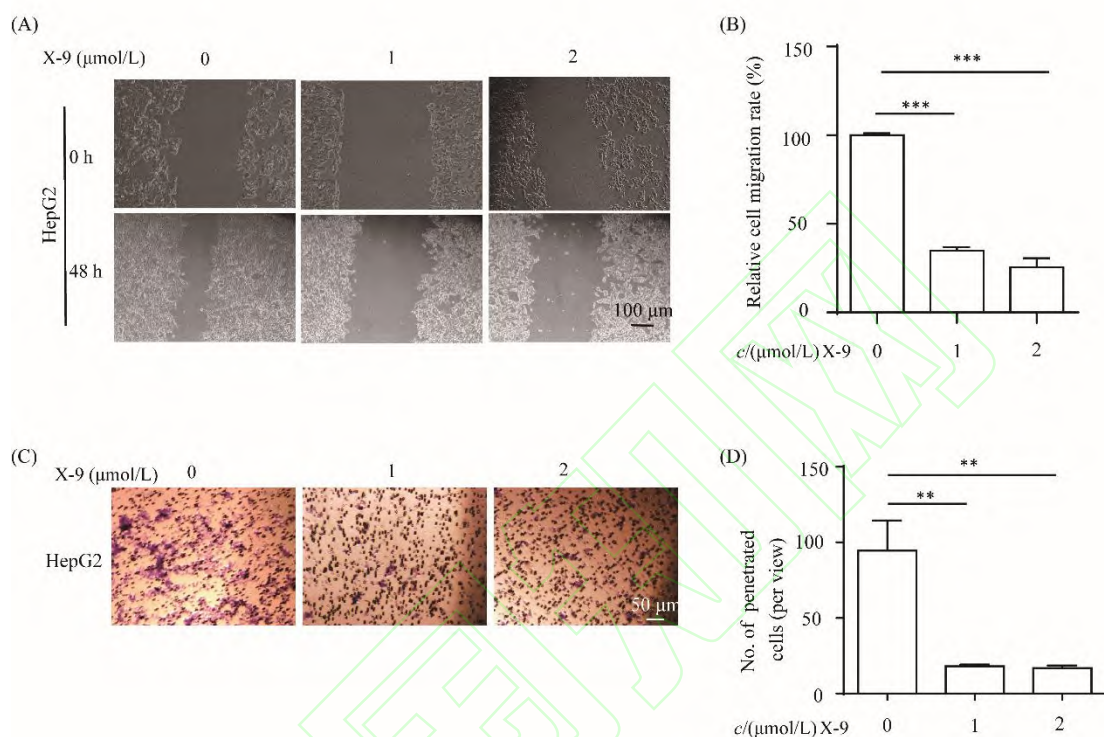


Fig. 4 Aniline pyrimidine derivative X-9 inhibits hepatocellular carcinoma migration and invasion (A) Photograph of cell wound healing in cells treated with or without X-9. HepG2 cells treated with or without X-9 were subjected to wound-healing assay. The wound space was photographed at 0 hour and 48 hours. Scale bar, 100 μm. (B) The migration rate of cells in panel (A). Data represent mean \pm SEM ($n=3$). *** $P<0.001$, vs 0 μmol/L X-9. (C) Photograph of penetrated cells treated with or without X-9 in trans-well assay. Scale bar, 50 μm. (D) Quantitative analysis of cell invasion in panel (C). Average penetrated cell number of three views was counted and three independent repeats were quantitated. Data represent mean \pm SEM ($n=3$). ** $P<0.01$, vs 0 μmol/L X-9

2.5 整合素 $\beta 1$ 介导 X-9 对肝细胞癌的迁移和侵袭的抑制

为了证明苯胺嘧啶衍生物 X-9 对肝细胞癌迁移和侵袭的抑制是由整合素 $\beta 1$ 的表达降低所致, 在 HepG2 细胞中转染整合素 $\beta 1$, 以增加整合素 $\beta 1$ 的表达。然后, 再用 X-9 处理细胞。结果如 Fig. 5A 显示, 与对照组相比, X-9 显著抑制了整合素 $\beta 1$ 的表达; 而转染整合素 $\beta 1$ 的细胞中, X-9 处理后, 整合素 $\beta 1$ 的表达与 X-9 处理的未转染的细胞相比, 显著增加 ($P<0.001$)。然后, 分别用细胞划痕实验和 Transwell 穿孔实验对这 3 组细胞的迁移和侵袭

能力进行检测。结果表明，在同样的 X-9 处理情况下，转染了整合素 $\beta 1$ 的细胞的迁移和侵袭能力与未转染组的细胞相比，显著升高 ($P < 0.01$) (Fig. 5B,C, D, E)。

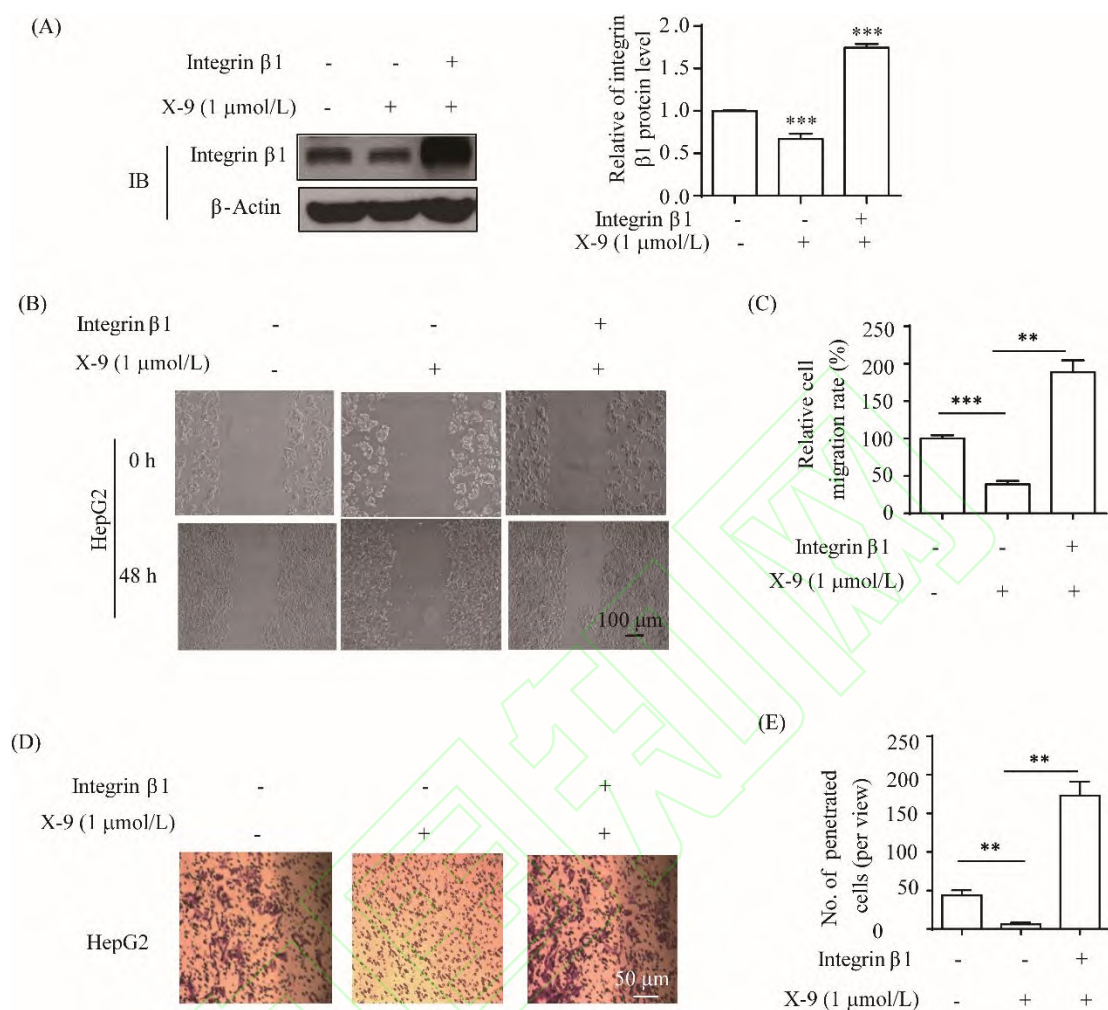


Fig.5 Integrin $\beta 1$ mediates aniline pyrimidine derivative X-9 induced inhibition of hepatocellular carcinoma migration and invasion (A) Integrin $\beta 1$ protein expression in HepG2 cells were transfected with integrin $\beta 1$ or empty vector control, then treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ X-9 or DMSO for 12 hours. β -actin was used as an internal control. The histogram in the right panel showing the relative integrin $\beta 1$ protein levels. Data represent mean \pm SEM ($n=3$). *** $P < 0.001$, vs 0 $\mu\text{mol/L}$ X-9. (B) Photograph of cell wound healing. Wounding healing assay carried out using HepG2 cells which were treated as same as described in (A). Scale bar, 100 μm . (C) The relative migration rate of cells in panel (B). Data represent mean \pm SEM ($n=3$). ** $P < 0.01$, vs 0 $\mu\text{mol/L}$ X-9. (D) Photograph of penetrated cells treated with or without X-9 in trans-well assay. Scale bar, 50 μm . (E) Quantitative analysis of cell invasion in panel (D). Average penetrated cell number of three views was counted and three independent repeats were quantitated. Data represent mean \pm SEM ($n=3$). ** $P < 0.01$, vs 0 $\mu\text{mol/L}$ X-9

为了更进一步的说明苯胺嘧啶衍生物 X-9 对细胞迁移和侵袭的抑制依赖于整合素 $\beta 1$,

本文利用 shRNA 敲低了整合素 $\beta 1$ 的表达, 随后用 X-9 处理细胞。Fig.6A 的结果显示, shRNA 能够有效敲低整合素 $\beta 1$ 的表达 ($P < 0.001$)。随后, 用细胞划痕愈合实验以及穿孔实验检测敲低整合素 $\beta 1$, 以及在敲低整合素 $\beta 1$ 的情况下, 苯胺嘧啶衍生物 X-9 对细胞迁移和侵袭的影响。结果和分析显示, 敲低整合素 $\beta 1$ 的细胞迁移和侵袭能力与对照组相比显著降低 ($P < 0.001$), 并且在敲低整合素 $\beta 1$ 的细胞中, 苯胺嘧啶衍生物 X-9 处理和对照处理组比较, 细胞的迁移和侵袭能力未见显著降低 ($P > 0.05$) (Fig. 6B, 6C, 6D, 6E)。这进一步证明, 整合素 $\beta 1$ 是细胞迁移和侵袭所必须的, 并且介导苯胺嘧啶衍生物 X-9 诱导的细胞迁移和侵袭抑制。

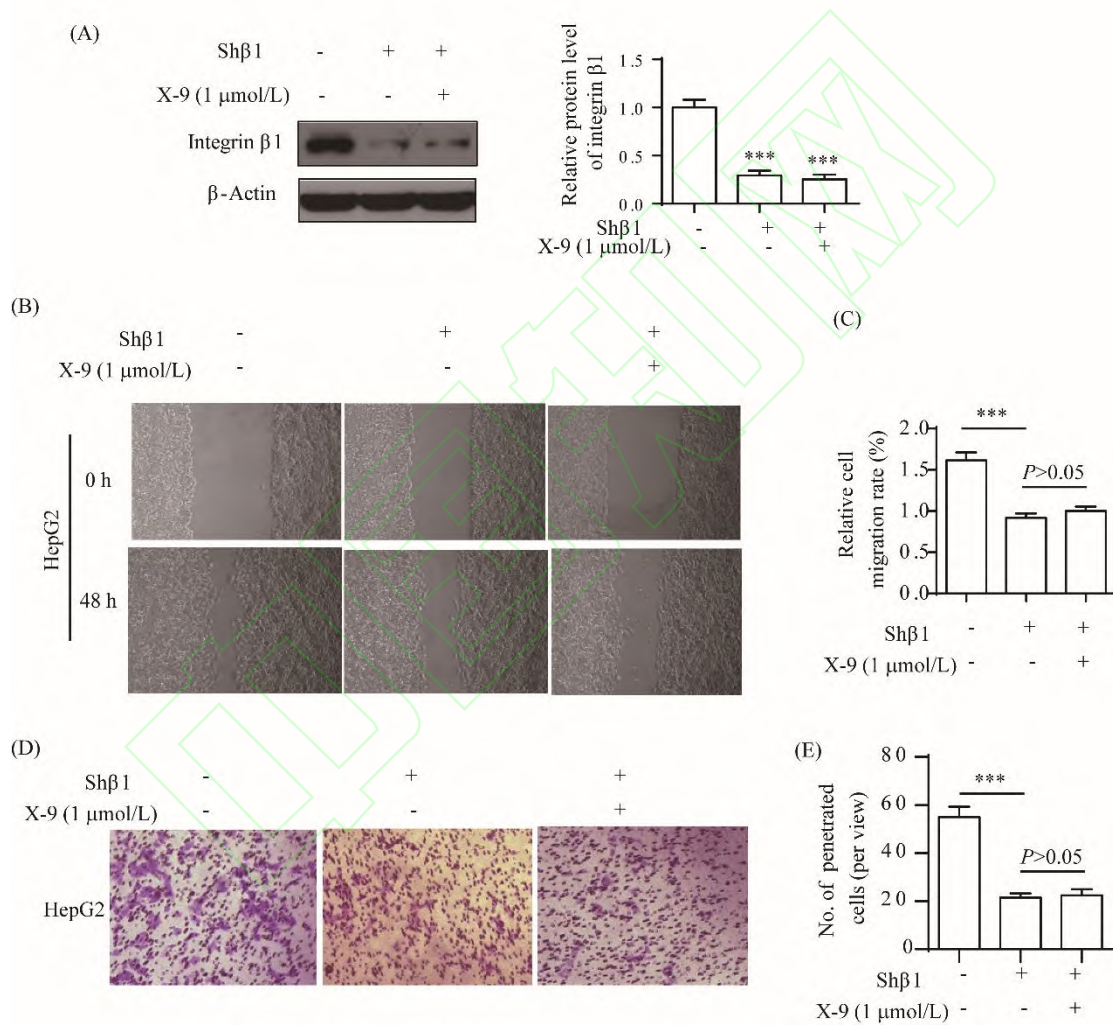


Fig. 6 Integrin $\beta 1$ is required for aniline pyrimidine derivative X-9 induced inhibition of hepatocellular carcinoma migration and invasion (A) Integrin $\beta 1$ protein expression in HepG2 cells were transfected with integrin $\beta 1$ shRNA or scramble control, then treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ X-9 or DMSO for 12 hours, β -actin was used as internal control. The histogram in the right panel showing the relative integrin $\beta 1$ protein levels. Data represent mean \pm SEM ($n=3$). *** $P < 0.001$, vs 0 $\mu\text{mol/L}$ X-9. (B) Photograph of cell wound healing. HepG2 cells were treated as same as described in (A). Scale bar, 100 μm . (C) The relative migration rate of cells in panel (B). Data

represent mean \pm SEM ($n=3$). $**P<0.01$, vs 0 $\mu\text{mol/L}$ X-9. (D) Photograph of penetrated cells treated with or without X-9 in trans-well assay. Scale bar, 50 μm . (E) Quantitative analysis of cell invasion in panel (D). Average penetrated cell number of three views was counted and three independent repeats were quantitated. Data represent mean \pm SEM ($n=3$). $**P<0.01$, vs 0 $\mu\text{mol/L}$ X-9

3 讨论

整合素是介导细胞运动的一类重要的粘附分子。恶性肿瘤细胞在发生转移的过程中，通常会上调整合素的表达，上调的整合素与胞外配体结合，介导细胞迁移和侵袭，使其离开原发灶。因此，开发能够阻断整合素和配体结合的小分子化合物或抗体，来抑制肿瘤的转移，一直是肿瘤药物研发的热点。然而，目前临床上仍无针对整合素的抗肿瘤药物^[17]。那么，对整合素表达调控的研究，以及开发调整合素表达的抗肿瘤药物，将是抗肿瘤药物研发的一个新思路。本文通过筛选发现了苯胺嘧啶衍生物 X-9 可以通过调整合素 $\beta 1$ 的表达，进而抑制肝细胞癌的迁移和侵袭，为肝细胞癌的药物开发提供了思路。

肝细胞癌因其复发率高，预后差的特征，在我国是死亡率第 3 位的恶性肿瘤。整合素 $\beta 1$ 被报导在肝细胞癌中高表达，并参与肝细胞癌的增殖、迁移和耐药等多个过程^[18-20]。本研究首先通过临床肝细胞癌患者的肿瘤和正常组织，对整合素 $\beta 1$ 的 mRNA 和蛋白质进行表达分析。结果进一步证实了和配对的癌旁组织相比，整合素 $\beta 1$ 在癌组织中高表达。通过 GEPIA 数据库对 TCGA 数据库中的 364 例肝细胞癌样本的数据进行分析。结果显示，整合素 $\beta 1$ 的表达与肝细胞癌的分期和预后显著相关。这些分析与先前报导的结果一致。进一步提示，整合素 $\beta 1$ 在肝细胞癌的进展和预后中发挥了一定作用。

苯胺嘧啶类化合物是多种抗肿瘤药物的载体。本课题组通过对一系列的苯胺嘧啶衍生物的抗肿瘤活性筛选，获得苯胺嘧啶衍生物 X-9 具有较好的抗肿瘤活性，可以抑制肝癌细胞的增殖和迁移。本研究发现，苯胺嘧啶衍生物 X-9 抑制肝癌细胞的迁移和侵袭，是通过抑制整合素 $\beta 1$ 的表达来实现的。苯胺嘧啶衍生物 X-9 会在转录水平抑制整合素 $\beta 1$ 的表达。当增加整合素 $\beta 1$ 的表达时，X-9 抑制的细胞迁移和侵袭也被逆转。整合素 $\beta 1$ 在转录水平的表达受多种因素的调控。先前已经有报导，转录因子 SP1，核受体 NR4A1 以及小 RNA 等都直接参与整合素 $\beta 1$ 的转录表达^[21-23]。苯胺嘧啶衍生物 X-9 通过作用于哪些靶分子，参与整合素 $\beta 1$ 的转录表达的分子机制尚有待进一步的深入研究。

参考文献(References)

- [1] Klungboonkrong V, Das D, McLennan G. Molecular Mechanisms and Targets of Therapy for Hepatocellular Carcinoma [J]. J Vasc Interv Radiol, 2017, **28**(7): 949-955
- [2] Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms [J].

- Cell, 2011, **147**(2): 275-292
- [3] Bravo-Cordero JJ, Hodgson L, Condeelis J. Directed cell invasion and migration during metastasis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2012, **24**(2): 277-283
- [4] Felding-Habermann B. Integrin adhesion receptors in tumor metastasis [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003, **20**(3): 203-213
- [5] Shao S, Zhu Y, Meng T, *et al.* Targeting High Expressed alpha5beta1 Integrin in Liver Metastatic Lesions To Resist Metastasis of Colorectal Cancer by RPM Peptide-Modified Chitosan-Stearic Micelles [J]. *Mol Pharm*, 2018, **15**(4): 1653-1663
- [6] Zhao G, Cui J, Qin Q, *et al.* [The expression of integrin beta 1 in normal hepatic tissues, hepatic cirrhosis tissues and hepatocellular carcinoma] [J]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2010, **18**(5): 353-356
- [7] Patman G. Liver: loss of integrin beta1 impairs liver regeneration and HCC progression [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, **11**(7): 392
- [8] Zhang M, Jiang L, Tao J, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 4-aniline-thieno[2,3-d]pyrimidine derivatives as MNK1 inhibitors against renal cell carcinoma and nasopharyngeal carcinoma [J]. *Bioorg Med Chem*, 2019, **27**(11): 2268-2279
- [9] 黄俊杰, 廖明毅, 郭起, 等. 盐酸尼洛替尼有关物质的合成 [J]. *中国医药工业杂志* (Huang JJ, Liao MY, Guo Q, *et al.* Synthesis of the Related Substances of Nilotinib Hydrochloride [J]. *Chin J Pharm*), 2016, **47**(2): 142-146
- [10] 吴立红, 何元, 张彦巧, 等. 甲磺酸伊马替尼有关物质的合成 [J]. *中国医药工业杂志* (Wu LH, He Y, Zhang YQ, *et al.* Synthesis of the Related Substances of Imatinib Hydrochloride [J]. *Chin J Pharm*), 2011, **42**(10): 728-731
- [11] Tang Z, Li C, Kang B, *et al.* GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, **45**(W1): W98-W102
- [12] Liu L, Ye Y, Zhu X. MMP-9 secreted by tumor associated macrophages promoted gastric cancer metastasis through a PI3K/AKT/Snail pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, **117**: 109096
- [13] 张红霞, 李洪利. 乳腺浸润性导管癌中 PTTG 与 MMP-2 和 MMP-9 的表达及相关性 [J]. *中国生物化学与分子生物学报* (Zhang HX, Li HL. Expression and Relationship of PTTG, MMP-2 and MMP-9 in the Invasive Ductal Carcinoma of Breast [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2015, **31**(6): 616-623
- [14] Cernea CR, Ferraz AR, De Castro IV, *et al.* Evaluation of basement membrane status in aggressive skin carcinomas with skull base invasion: a case-control study [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2005, **9**(3): 130-133
- [15] Tian B, Li Y, Ji XN, *et al.* Basement membrane proteins play an active role in the invasive

- process of human hepatocellular carcinoma cells with high metastasis potential [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, **131**(2): 80-86
- [16] Klobucar M, Sedic M, Gehrig P, *et al.* Basement membrane protein laminin-1 and the MIF-CD44-beta1 integrin signaling axis are implicated in laryngeal cancer metastasis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, **1862**(10): 1938-1954
- [17] Barkan D, Chambers AF. beta1-integrin: a potential therapeutic target in the battle against cancer recurrence [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, **17**(23): 7219-7223
- [18] Masumoto A, Arao S, Otsuki M. Role of beta1 integrins in adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 1999, **29**(1): 68-74
- [19] Shang M, Xu X, Zhang M, *et al.* Long non-coding RNA linc-ITGB1 promotes cell proliferation and migration in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Exp Ther Med*, 2017, **14**(5): 4687-4692
- [20] Jiang X, Wang J, Zhang K, *et al.* The role of CD29-ILK-Akt signaling-mediated epithelial-mesenchymal transition of liver epithelial cells and chemoresistance and radioresistance in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Med Oncol*, 2015, **32**(5): 141
- [21] Hedrick E, Lee SO, Safe S. The nuclear orphan receptor NR4A1 regulates beta1-integrin expression in pancreatic and colon cancer cells and can be targeted by NR4A1 antagonists [J]. *Mol Carcinog*, 2017, **56**(9): 2066-2075
- [22] Li W, Wang H, Zhang J, *et al.* miR-199a-5p regulates beta1 integrin through Ets-1 to suppress invasion in breast cancer [J]. *Cancer Sci*, 2016, **107**(7): 916-923
- [23] Wang Y, Wang J, Guo T, *et al.* Screening of schizophrenia associated miRNAs and the regulation of miR-320a-3p on integrin beta1 [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, **98**(8): e14332