

## 靶向 EGFR 的新型喹啉类衍生物抗食管癌作用的特征

王雪玉<sup>1</sup>, 邱飞<sup>1</sup>, 唐明清<sup>1</sup>, 吴振<sup>2</sup>, 张勇<sup>3</sup>, 王立强<sup>1</sup>

(1 华侨大学生物医学学院, 泉州 362021; 2 厦门大学药学院, 厦门 361101;

3 美国北卡罗来纳大学药学院, 教堂山 27599)

**[摘要]** 目的: 评价 EGFR 抑制剂 4-取代-7-氯喹啉衍生物(TW9183) 的体内外抗肿瘤生物活性。方法: 采用分子对接技术探讨其与 EGFR 之间的相互作用模式, 蛋白免疫印迹法评价在蛋白水平的直接作用, 体外细胞生物学及体内裸鼠移植瘤模型探讨 TW9183 的活性。结果: EGFR 受体的氨基酸残基 MET769, PRO770, LYS721 可与 TW9183 间形成氢键, 蛋白免疫印迹法表明化合物抑制 EGFR 的磷酸化; 体外细胞实验显示 TW9183 有明显抑制食管癌细胞增殖、周期阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期及促进凋亡的效果; 裸鼠食管癌移植瘤模型验证其在体内同样具有抑制肿瘤生长促进凋亡的作用。结论: TW9183 在体内外实验中显示具有潜在的抗食管癌作用。

**[关键词]** 4-取代-7-氯喹啉衍生物; 分子对接; 表皮生长因子受体; 食管癌

**[中图分类号]** R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2014)09-1070-05

### Antitumor effects of a novel chloroquinoline derivative as EGFR inhibitor on human esophageal carcinoma

WANG Xue-yu<sup>1</sup>, QIU Fei<sup>1</sup>, TANG Ming-qing<sup>1</sup>, WU Zhen<sup>2</sup>, ZHANG Yong<sup>3</sup>, WANG Li-qiang<sup>1</sup>

(1 School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2 School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China;

3 School of Pharmacy, The University of North Carolina, Chapel Hill 27599, USA)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the underlying mechanism of 4-substituent-7-chloroquinoline derivative (TW9183), which has a selective anti-tumor effect *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** Docking simulation was performed to position compounds into the EGFR structure active site to determine a possible binding model. We also used Western blot assay to directly evaluate the interaction. Cell cultures and tumor xenografts were utilized to test the effect of TW9183. **Results:** TW9183 was nice bound to the EGFR with the amino hydrogens of MET769, PRO770 and LYS721, forming optimal H-bonds interaction. Western blot assay showed that the compound inhibited EGFR phosphorylation. TW9183 treatment increased typical apoptosis and the number of cells in the G<sub>2</sub>/M phase in ECA-109 cells. In ECA-109 xenograft model in nude mice, TW9183 inhibited tumor growth and promoted apoptosis. **Conclusion:** TW9183 has potential antitumor activity *in vitro* and *in vivo*.

**[Key words]** 4-substituent-7-chloroquinoline derivative; docking; EGFR; esophageal cancer

蛋白激酶在肿瘤细胞的生长、转移以及凋亡中起到直接或间接的作用, 是抗肿瘤药物研究中的重要靶点<sup>[1-2]</sup>。目前以酪氨酸激酶为靶点的肿瘤靶向

治疗药物是国际上抗肿瘤药物研发的热点<sup>[3]</sup>。作为蛋白络氨酸激酶家族(PTKs) 一员的表皮生长因子受体(EGFR) 是一种跨膜蛋白, 其膜外结合区域与 EGF 和 TGF- $\alpha$  等配体结合后受体二聚化, 胞内络氨酸激酶与 ATP 结合, 使自身络氨酸残基磷酸化进而 TK 激活, 催化 cas 等一系列蛋白磷酸化, 激活 cyclinD1 等若干核蛋白, 引起细胞增殖<sup>[4-5]</sup>。EGFR 家族可在多种上皮间叶、神经起源组织中表达, 是涉及

**[基金项目]** 泉州市科技计划重点项目(2013Z35)

**[作者简介]** 王雪玉, 女, 硕士研究生, 研究方向为新药筛选与药理学研究。联系电话: 18750573078, E-mail: wxyhappy9@163.com。

**[通讯作者]** 王立强, 男, 教授, 研究方向为药剂学和新药开发。联系电话: 13359870132, E-mail: wlq3701@163.com。



细胞增殖和肿瘤发生及发展中的极为重要的受体信号系统<sup>[6]</sup>。在肿瘤细胞中 EGFR 过表达可增强肿瘤细胞的增殖及对胞外基质的黏附作用,促进肿瘤细胞分解基底膜和远处转移,有研究表明表皮生长因子受体在大多数食管癌中呈现过表达,并与食管癌的增殖、浸润、转移和血管生长等有关<sup>[7-8]</sup>。

本课题组最新合成一系列小分子化合物,并从中筛选出了具有靶向抗肿瘤作用的新型化合物 TW9183,它是一种喹啉衍生物,分子式为  $C_{32}H_{24}ClN_7O$ ,相对分子质量为 557.2,化学名称为 4-(7-氯喹啉-4-氨基)-N-(4-甲基-3-[4-(4-吡啶)嘧啶-2-氨基]苯基)苯甲酰胺,本文通过将合成的小分子化合物配体放置于受体大分子的活性位点处,寻找合理的配体-受体结合构象<sup>[9-10]</sup>。根据受体和药物分子之间空间互补、化学环境互补和静电匹配等原则来寻找较优势的化合物,为后面实验提供参考。

## 材 料

### 1 药物与试剂

TW9183<sup>[11]</sup>由厦门大学药学院合成实验室制备(批号:120705 纯度:97.5%);舒尼替尼(美国辉瑞公司);MTT(北京索莱宝科技公司);1640 培养基购于(美国 Gibco 公司);新生牛血清(美国 Hyclone 公司);细胞周期试剂盒与细胞凋亡检测试剂购于联科生物;P-EGFR 抗体购于 Epitomics 公司;EGF 购于 R&D 公司;CD34 购于 Epitomics 公司;KI67(福建迈新生物公司);Tunel 购于武汉博士德。

### 2 仪器

Forma Class II 生物安全柜(美国 Thermo 公司);培养箱(美国 Shel Lab 公司);TS100 倒置显微镜(日本 Nikon 公司);Infinite M200 多功能酶标仪(美国 Tecan 公司);BSA124S - CW 型电子分析天平(德国赛多利斯公司);FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);FRESCO 21 离心机(美国 Thermo 公司);Sybyl 6.9 软件来自于上海源资源公司。

### 3 细胞株与动物

人宫颈癌 Hela 细胞株、非小细胞肺癌 A549 细胞株、食管癌 ECA-109 细胞株和人脐静脉内皮细胞 HUVEC 细胞株均购自上海中科院细胞库;裸鼠购于吴氏实验动物,动物许可证号:SCXK(沪)2013-0007,在 21~23℃ 恒温、45%~65% 恒湿条件下自由进食和饮水。

## 方 法

### 1 细胞增殖率测定

采用 MTT 比色法进行检测。细胞以每孔  $5 \times 10^3$  个密度接种于 96 孔培养板,贴壁后用不同浓度的化合物处理,每个浓度设 6 个平行孔。处理 48 h 后,每孔加入 MTT,采用酶标仪测定 570 nm 吸收度 A 值。细胞存活率/% = (加药组 A/对照组 A) × 100,通过软件 SPSS 17 计算  $IC_{50}$  值。

### 2 蛋白免疫印迹实验

采用 MTT 实验结果中  $IC_{50}$  值最小的 ECA-109 食管癌细胞进行检验,细胞以每孔  $4 \times 10^5$  个密度接种于细胞培养皿中,细胞贴壁后,加入不同浓度化合物处理 2 h,后加入 EGF 刺激细胞 10 min,从培养箱取出后用细胞刮刀刮下细胞,冰上裂解细胞离心,用 BCA 蛋白定量试剂盒定量后,按同样量上样待分离胶分离完全后转膜,抗体孵育后显影拍照。

### 3 流式细胞术检测细胞周期阻滞及凋亡

细胞以每孔  $4 \times 10^5$  个接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后用不同浓度药物处理细胞培养 48 h 后用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,并与原培养液一起离心收集细胞;将离心细胞采用 PI 单染试剂盒进行染色,上流式细胞仪检验细胞周期阻滞;同样选取离心细胞,采用 Annexin V/PI 双染色法检测药物作用后细胞凋亡情况。

### 4 裸鼠移植瘤的抑瘤作用研究

收集对数生长期 ECA-109 细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度至每毫升  $1 \times 10^8$  个,接种于裸鼠右前腋下皮肤,每只裸鼠右前腋部皮下接种 0.2 mL (含细胞数  $2 \times 10^7$  个),肿瘤体积大于  $100 \text{ mm}^3$  后随机分成 5 组,每组 6 只,分别为溶媒对照组(羧甲基纤维素钠),阳性药对照组(舒尼替尼  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),TW9183 10 20 40  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量组,每日灌胃给药,每 3 d 测量 1 次裸鼠体重,d 22 处死动物,解剖瘤块称重,计算抑瘤率。抑瘤率/% = (对照组平均瘤重 - 治疗组平均瘤重)/对照组平均瘤重 × 100。对剪切下的移植瘤进行包埋后石蜡切片,采用 Tunel 检测及 KI67,CD34 免疫组化实验检测化合物作用后对肿瘤增殖凋亡的影响。

## 结 果

### 1 化合物结构及分子对接图

根据受体和药物分子之间空间互补、化学环境互

补和静电匹配原则 我们通过 Sybyl 6.9 软件 运用分子力学方法进行构象优化 ,对接图谱见图 1 ,灰白色分子 TW9183 与残基 MET769 ,PRO770 ,LYS721 之间有氢键相互作用 ,对接打分为 7.71 结果提示化合物 TW9183 与 EGFR 分子间具有潜在的相互作用。

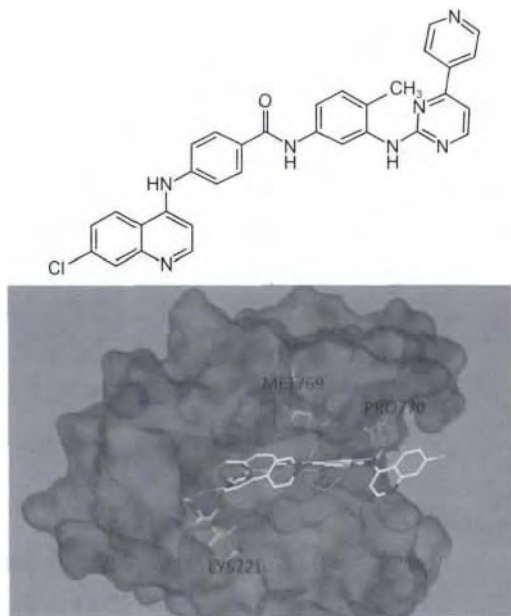


图 1 TW9183 的化学结构式及分子对接图

## 2 MTT 实验

TW9183 对 ECA-109 ,HELA ,A549 细胞均有良好的抑制作用 ,其中对 ECA-109 细胞作用效果明显 (见表 1);人脐静脉内皮细胞 HUVEC 中的活性测定结果显示 ,TW9183 在作用范围内对正常细胞没有毒害作用(见图 2)。

表 1 TW9183 对 ECA-109 ,A549 及 HELA 细胞的 IC<sub>50</sub>值 n = 6 μmol·L<sup>-1</sup>

组别	ECA-109	HELA	A549
TW9183	5.97	14.40	11.12
舒尼替尼	10.98	12.34	14.11

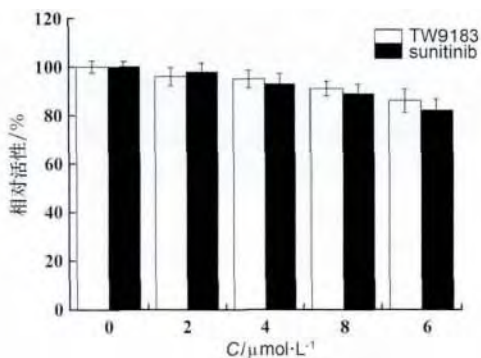
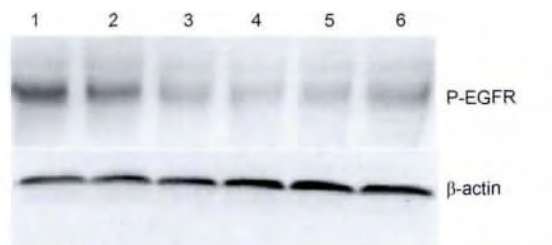


图 2 TW9183 对 HUVEC 增殖活性的影响

## 3 TW9183 抑制 EGFR 磷酸化

为确切评价 TW9183 对 EGFR 磷酸化作用的抑制效果 ,本文选取药物作用明显的 ECA-109 细胞 ,讨论 TW9183 对表皮生长因子 (EGF) 刺激后 EGFR 磷酸化的作用情况。由图 3 可知 ,TW9183 能明显抑制 EGF 刺激引起的磷酸化 EGFR 表达上调 ,并且呈浓度依赖性。



1 :DMSO;2 ~5 :TW9183 2 4 8 16 μmol·L<sup>-1</sup> ;  
6 :舒尼替尼 16 μmol·L<sup>-1</sup>

图 3 TW9183 对加入 EGF 因子后 EGFR 磷酸化的表达变化的影响

## 4 TW9183 诱导 ECA-109 细胞周期阻滞

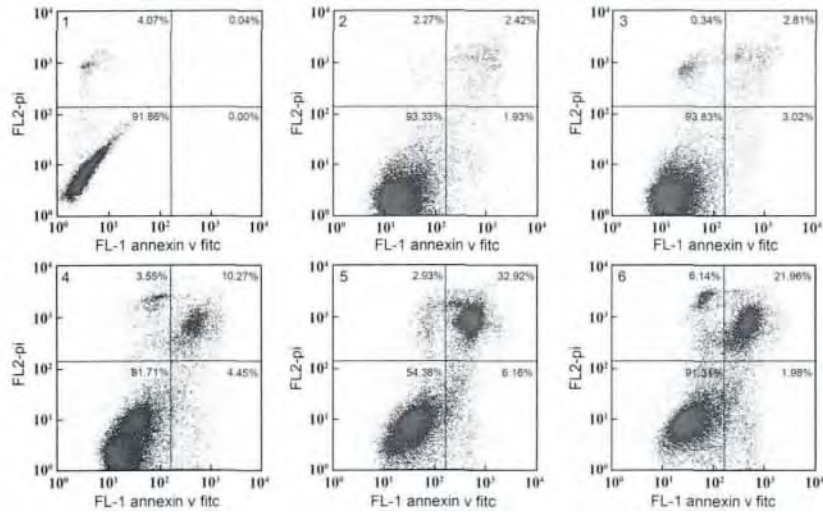
TW9183 对食管癌细胞非常敏感。当药物浓度为 16 μmol·L<sup>-1</sup> 时 ,阻断在 G<sub>2</sub>/M 期的细胞增加量大于 50% ,说明药物通过阻滞细胞于 G<sub>2</sub>/M 期 ,跟 MTT 凋亡结果正相关;舒尼替尼组阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的细胞增加了 20% 左右 ,说明 TW9183 与舒尼替尼的周期阻滞作用不同 ,具体机制有待进一步研究。

表 2 不同浓度 TW9183 处理 ECA-109 细胞 48 h 后细胞周期阻滞情况 n = 6 ,%

组别	剂量 /μmol·L <sup>-1</sup>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
阴性对照组	—	51.4 ± 10.1	14.9 ± 4.2	13.7 ± 3.1
舒尼替尼	16	72.5 ± 16.9 <sup>a</sup>	25.1 ± 5.0	2.4 ± 5.2
TW9183	4	33.3 ± 9.5	18.0 ± 3.1	48.7 ± 9.8 <sup>a</sup>
	8	31.3 ± 4.6	11.7 ± 3.2	57.0 ± 10.1 <sup>a</sup>
	16	20.9 ± 7.5	8.5 ± 2.3	70.6 ± 16.3 <sup>a</sup>

与阴性对照组相比 a :P < 0.01

采用流式细胞术对化合物作用后 ECA-109 细胞凋亡检测情况如下图 4 ,结果表明 TW9183 浓度为 16 μmol·L<sup>-1</sup> 时 ,凋亡初期细胞比舒尼替尼少 1.37% ,但凋亡末期比例舒尼替尼高 7.97% ;TW9183 16 μmol·L<sup>-1</sup> 组凋亡末期细胞比例分别为 29.55% ,7.85% ,较阴性对照组明显增高 ,可以看出细胞凋亡随着化合物浓度的增加而逐渐增大 ,呈现浓度依赖性。



1:PI 单染;2:DMSO;3~5:TW9183 2, 4, 16  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;6:舒尼替尼 16  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图4 流式细胞术检测 ECA-409 细胞凋亡图

2.5 TW9183 对裸鼠 ECA-409 移植瘤的抑制作用

TW9183 10, 20, 40  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组和舒尼替尼 40  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组抑瘤率如表 3 所示 其中 TW9183 20, 40  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量组与阴性对照组有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

表 3 TW9183 对裸鼠 ECA-409 细胞移植瘤的抑制作用  $n = 6$

组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	瘤重 / g	抑瘤率 / %
阴性对照组		1.23 $\pm$ 0.32	
舒尼替尼	40	0.35 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	71.54
TW9183	40	0.29 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	76.42
	20	0.56 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	54.47
	10	0.91 $\pm$ 0.28	26.02

a:与阴性对照组相比  $P < 0.01$  且用药期间裸鼠体重无显著性变化 无死亡

TW9183 对裸鼠移植瘤的增殖 肿瘤微血管密度及凋亡作用分别通过 KI67, CD34 的表达情况及 TUNEL 检测来对比观察研究 实验结果如图 5。CD34 在肿瘤血管内皮细胞上的表达情况 微血管染色为棕黄色,与其他组织能清晰地分辨,TW9183 组中 CD34 的表达明显小于媒介组,即 TW9183 对于肿瘤组织中微血管生成的具有抑制情况;KI67 可有效反映肿瘤细胞的增殖情况,KI67 在媒介组中阳性表达即被染色成黄色或棕黄色非常明显;TUNEL 检测中,同样与媒介组比较,TW9183 组中凋亡细胞即细胞核出现棕黄色或者黑色的比例明显较高,且均具有浓度差异。

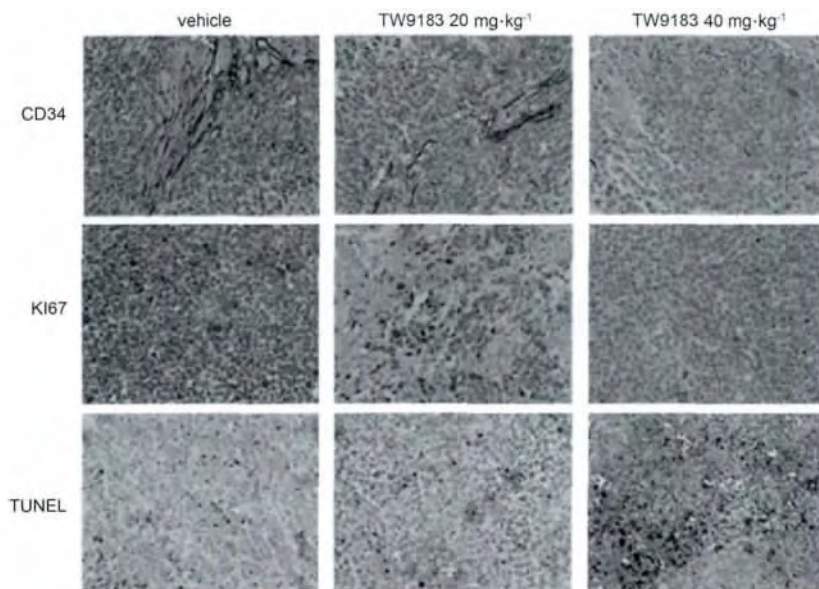


图 5 免疫组化及 TUNEL 检验结果图

## 讨 论

小分子化合物 TW9183 是一种具有新化学结构的喹啉衍生物类高选择性蛋白激酶抑制剂。分子对接技术结果显示 EGFR 中氨基酸残基 PRO770, MET769, LYS721 分别能与 TW9183 化合物的氨基喹啉上的氨基、苯环上取代的氨基及嘧啶上的氮原子间形成氢键;蛋白免疫印迹法实验说明该化合物对 EGF 刺激的 EGFR 磷酸化上调具有抑制作用,化合物详尽作用机制将从 EGFR 下游的信号转导通路 Ras/Raf/MEK/ERK-MAPK 和 PI3K/Akt/mTOR 着手继续研究;该实验研究有助于后期运用分子对接从小分子数据库中找出有机小分子,为后期该抑制剂的优化、分子设计、合成提供理论参考。

EGF 通过诱导 EGFR 胞外区进行构象变化,进而促进激酶活性,完成胞内酪氨酸残基磷酸化,促进下游信号通路各细胞因子的表达,是肿瘤增殖、凋亡以及血管新生的重要原因。首先通过测定细胞活力来研究细胞的增殖,结果显示 TW9183 对 HeLa 细胞、A549 细胞和 ECA-109 细胞均具有显著的增殖抑制作用;通过流式细胞术可以发现,随着化合物浓度的增加, $G_1/G_0$  期的比例逐渐减少, $G_2/M$  期比例逐渐增大,可明显引起 ECA-109 细胞周期阻滞于  $G_2/M$  期,并能极大促进细胞的凋亡且具有剂量依赖性。

本研究通过建立裸鼠移植瘤模型,探讨了 TW9183 的体内抗肿瘤效果及其初步作用机制研究。我国抗癌药物筛选疗效评价标准中认为抑瘤率在 30% 以上有意义,本研究通过抑瘤率对比发现 TW9183 在裸鼠体内发挥明显的抑制肿瘤生长的作用,KI67,CD34 及 Tunel 检测提示化合物通过促进肿瘤细胞凋亡及抑制其增殖进而达到抗肿瘤生长的效果,这与体外细胞实验结果相一致。本研究还通过体内外生物学实验明显证明化合物通过诱导细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖及血管新生进而抑制肿瘤生长,可以初步证明该化合物具有潜在的抗肿瘤活性。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] SLATTERY ML, JOHN EM, STERN MC, *et al.* Associations with growth factor genes (*FGF1*, *FGF2*, *PDGFB*, *FGFR2*, *NRG2*, *EGF*, *ERBB2*) with breast cancer risk and survival: the breast cancer health disparities study [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 140(3): 587-601.
- [2] KITAO K, YOSHIDA S, KENNEDY S, *et al.* Epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor 2 gene polymorphisms in endometrial cancer in a Japanese population [J]. *Reprod Sci*, 2007, 14(4): 349-357.
- [3] AMANO M, YOSHIDA S, KENNEDY S, *et al.* Association study of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in endometrial carcinomas in a Japanese population [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2008, 29(4): 333-337.
- [4] CIARDIELLO F, TORTORA G. EGFR antagonists in cancer treatment [J]. *N Engl J Med*, 2008, 5(13): 1160-1174.
- [5] SIDDIK S, ABHIJIT M, RUPESH D, *et al.* ZD6474 enhances paclitaxel antiproliferative and apoptotic effects in breast carcinoma cells [J]. *J Cellular physiol*, 2011, 2(26): 375-384.
- [6] FENG JIN, CHAO GAO, LEI ZHAO, *et al.* Using CD133 positive U251 glioblastoma stem cells to establish nude mice model of transplanted tumor [J]. *Brain Research*, 2011, 13(8): 82-90.
- [7] KIM IY, KANG YS, LEE DS, *et al.* Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice [J]. *J Control Release*, 2009, 140(1): 55-60.
- [8] 李强, 杨哲, 赵瑛, 等. EGFR 对食管癌同步放化疗敏感性预测价值的初步观察 [J]. 山东大学学报(医学版), 2012, 3(22): 1671-1675.
- [9] LU S, LUO Q, HAO X, *et al.* Synthesis and docking study of 2-phenylaminopyrimidine Abl tyrosine kinase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Letts*, 2011, 21(1): 6964-6968.
- [10] BALLESTER PJ, WESTWOOD I, LAURIERI N, *et al.* Prospective virtual screening with ultrafast shape recognition: the identification of novel inhibitors of arylamine N-acetyltransferases [J]. *J R Soc Interface*, 2010, 7(11): 335-342.
- [11] 王立强, 吴振. N-取代-4-(7-氯喹啉-4-氨基)-苯甲酰胺衍生物的制备方法和应用: 中国, 102775389 [P]. 2012-11-14.

编辑: 郭超伟/接受日期: 2014-01-21

欢迎订阅 2014 年《中国新药杂志》



1074

中国新药杂志 2014 年第 23 卷第 9 期