

DOI:10.3969/j.issn.2096-8248.2024.04.006

WXJ-112 靶向 CDK4/6 在乳腺癌细胞中的作用及机制*

左玲怡^a, 何景梁^a, 成文浩^a, 张思懿^a, 李寒雪^a, 周娇娇^a, 张美琪^a,
刘媛媛^a, 覃静婷^a, 钱其兰^a, 敬爱新^a, 王秀军^{a,b}, 刘彬^{a,b}

(江苏海洋大学 a. 药学院; b. 江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室, 江苏 连云港 222005)

摘要: 三阴性乳腺癌是一种异质性复发性癌症, 与转移率高、预后差和缺乏治疗靶点有关, 而抑制 CDK4/6 靶点可产生抗肿瘤作用。设计并合成了一种新型的 Abemaciclib 衍生物, 命名为 WXJ-112, 探讨了化合物 WXJ-112 对 TNBC 生物学等方面的影响。用甲基噻唑四唑法测定细胞活力, 通过克隆形成试验、划痕试验和侵袭试验检测克隆形成、迁移和侵袭能力。Western blot 分析检测 CDK4/6-Rb-E2F 通路相关蛋白的表达, 在鸡胚移植肿瘤模型中探讨其肿瘤抑制作用。试验结果表明, WXJ-112 可抑制 MDA-MB-231 细胞增殖、集落形成、迁移和侵袭, 诱导周期阻滞, 并且在鸡胚移植肿瘤模型中具有显著的抗肿瘤活性作用。综上所述, 化合物 WXJ-112 具有良好的抗肿瘤细胞增殖作用, 可作为一种很有前途的乳腺癌治疗的候选药物。

关键词: CDK4/6 抑制剂; 细胞周期; 乳腺癌; 细胞周期蛋白; D1; E2F1

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 2096-8248(2024)04-0040-11

引用格式: 左玲怡, 何景梁, 成文浩, 等. WXJ-112 靶向 CDK4/6 在乳腺癌细胞中的作用及机制[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2024, 33(4): 40-50.

Role and Mechanism of WXJ-112 Targeting CDK4/6 in Breast Cancer Cells

ZUO Lingyi^a, HE Jingliang^a, CHENG Wenhao^a, ZHANG Siyi^a, LI Hanxue^a, ZHOU Jiaojiao^a,
ZHANG Meiqi^a, LIU Yuanyuan^a, QIN Jingting^a, QIAN Qilan^a, JING Aixin^a, WANG Xiujuan^{a,b}, LIU Bin^{a,b}

(a. School of Pharmacy; b. Jiangsu Key Laboratory of Marine Drug Active Molecular Screening,
Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Triple-negative breast cancer (TNBC) is a heterogeneous recurrent cancer associated with high metastasis, poor prognosis, and a lack of therapeutic targets, while inhibition of CDK4/6 targets produces anti-tumor effects. In the present study, a novel Abemaciclib derivative named WXJ-112 was designed and synthesized. The effect of compound WXJ-112 on several aspects of TNBC biology was investigated. Cell viability was measured by the methylthiazolium tetrazolium (MTT) assay and clone formation, migration, and invasion ability was detected by clone formation assay, scratch assay, and invasion assay. Western blot analysis was performed to detect the expression of proteins related to the CDK4/6-Rb-E2F pathway. The tumor suppressor effect was investigated in a chicken embryo transplantation tumor model. The experimental results showed that WXJ-112 inhibited the proliferation, colony formation, migration, and invasion of MDA-MB-231 cells, induced cycle blockade, and acted as a significant anti-tumor activity in the chicken embryo transplantation tumor model. In summary, compound WXJ-112 has good an-

* 收稿日期: 2024-03-04; 修订日期: 2024-04-01

作者简介: 左玲怡(1998—), 女, 江苏淮安人, 硕士研究生, 研究方向为药理, (E-mail) 2021226107@jou.edu.cn.

通信作者: 刘彬(1984—), 男, 湖北武汉人, 教授, 博士, 研究方向为蛋白质的翻译后修饰及其在疾病中的作用, (E-mail) liubin@jou.edu.cn.

ti-tumor cell proliferation effects and can be used as a promising drug candidate for breast cancer treatment.

Key words: CDK4/6 inhibitor; cell cycle; breast cancer; cyclin; D1; E2F1

0 引言

乳腺癌被认为是女性中最常见的癌症之一,并且仍然是仅次于肺癌的第二大癌症相关死亡原因^[1]。3种主要的肿瘤亚型有激素受体阳性、富含人表皮生长因子受体 2 和三阴性^[2]。三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)是一种异质性复发性癌症,与转移率高、预后差和缺乏治疗靶点有关^[3]。TNBC 的特征是缺乏雌激素和孕激素受体表达,缺乏 HER2 过表达或基因扩增,占乳腺癌发病率的 10%~15%,预后最差^[4]。TNBC 通常比其他乳腺癌亚型更具侵略性,与激素受体阳性乳腺癌患者相比, TNBC 患者的乳腺癌特异性生存率和总生存期更差,诊断后 2 年内死亡率急剧增加^[5]。

不受控制的细胞分裂引起的持续细胞增殖是癌症转化的关键病理表现之一^[6]。因此,抑制异常细胞分裂和增殖是癌症治疗中一种有前途的策略。特别是,细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDK)在细胞分裂和增殖调节中至关重要^[7]。在乳腺癌病例中经常观察到细胞周期蛋白 D-CDK4/6-INK4-Rb 通路失调,导致不受控制的细胞增殖^[8]。细胞周期蛋白 D-CDK4/6-INK4-Rb 是细胞周期 G1-S 转变的关键调节因子,CDK4/6 激酶在细胞周期从 G1 期到 S 期的过渡过程中与细胞周期蛋白 D 蛋白相关联。细胞周期蛋白 D-CDK4/6 复合物磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, Rb),与 E2F 转录因子分离,最终 E2F 转录因子导致细胞周期发展^[9]。此外,细胞周期蛋白 D 的过表达、CDK4/6 的突变或扩增以及细胞周期蛋白 D-CDK4/6 负调控因子的缺失,激活了细胞周期蛋白 D-CDK4/6,使 Rb 过度磷酸化,最终导致不受控制的细胞增殖^[10]。

细胞周期异常在癌症中很常见,长期以来一直被认为是潜在的治疗靶点。CDK 是控制细胞周期转换和最终细胞分裂的关键调节酶^[11-14]。而 Rb 蛋白,控制从 G1 期到 S 期的关键转变^[15]。Rb 通过结合 E2F 转录因子阻止 G1/S 转变来控制早期细胞分裂,而 Rb 的失活将导致细胞分裂^[16]。在 G1 期间,

多种生长信号可导致细胞周期蛋白 D 与 CDK4 或 CDK 6 结合,从而导致 Rb 磷酸化和 E2F 的最终释放^[15]。而 CDK4/6-Rb 轴在许多恶性肿瘤中发挥了重要作用,尤其是雌激素受体阳性乳腺癌,其中雌激素已被证明可以加快 G1 期到 S 期的发展^[17-19]。因为,雌激素与 ER- α 结合驱动细胞周期蛋白 D1 转录,CDK4/6 的活化和 Rb 的磷酸化会导致细胞循环^[20-22]。所以,选择性抑制 CDK4/6 会使 G1 期细胞周期停滞,导致细胞活力和肿瘤反应降低^[23]。

CDK4/6 抑制剂属于一类新的药物,通过抑制细胞周期进展来中断恶性细胞的增殖^[24]。3种 CDK4/6 抑制剂(Palbociclib, Ribociclib 和 Abemaciclib)可用于治疗激素受体阳性、人表皮生长因子受体 2 阴性晚期或转移性乳腺癌的女性^[25]。Ribociclib 是一种口服给药的小分子抑制剂,生物利用度高、选择性强,可同时抑制 CDK4/cyclin-D1 和 CDK6/cyclin-D3 酶复合物。基于 Ribociclib 的复方制剂已在全球获批用于绝经前绝经后妇女乳腺癌的一线 and 二线治疗^[26]。

本研究旨在研究一种新型 Abemaciclib 衍生物 WXJ-112。基于分子拼合原理,保留了 Abemaciclib 的优势片段(苯并咪唑部分),引入了 AST487 的优势片段,得到了化合物 WXJ-112。通过分子对接,发现 WXJ-112 对 CDK4/6 具有较强的结合能力,并可能具有与 Abemaciclib 相似的抑制 CDKs 的潜力。鉴于 WXJ-112 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的体内外作用,有望开发出一种新的 CDK4/6 抑制剂,为乳腺癌治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 化学合成

实验装置包括若干仪器和试剂,有 Vazhi Electronic Technology Co 和 Vazhi Electronic Technology Co 等。柱层析使用粒度为 45~75 $\mu\text{mol/L}$ 的硅胶粉末,薄层色谱(TLC)选用硅胶 GF254 为固定相。使用紫外灯(UV-IIB 型)促进 TLC 显色,质谱分析使用赛默飞世尔科技公司的 Q Exactive HF LC-MS 系统。使用布鲁克科技公司的 Avance III

500 MHz NMR 光谱仪进行光谱分析。以 TMS(四甲基硅烷)为内标,作为 NMR 图谱中化学位移的参考。所有试剂均为分析纯。

1.2 分子建模方法

使用 AutoDockTools-1.5.6 和 PyMOL-1.7.0.0.win32-py2.7 分子建模程序。分子对接试验使用从 PDB 库中获得的人 CDK4/6 的 X 射线共晶体结构作为模板。为了对蛋白质进行预处理,使用 PyMOL 消除结构中的水分子和金属离子,配体结构使用 Chem3D 软件生成。

1.3 细胞培养

MDA-MB-231 细胞、A498 细胞和 HeLa 细胞,分别购自中国医学科学院基础医学院、基础研究所和北京协和医学院基础医学院细胞资源中心。在含体积分数 10% 胎牛血清(FBS)和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 或 MEM 培养基中培养,细胞在 37 °C,体积分数 5% 的 CO₂ 的培养箱中孵育。选择对数生长期生长状态良好的细胞。

1.4 细胞增殖试验

通过 MTT 比色法评价 WXJ-112, Imatinib, Ribociclib 和 Abemaciclib 的细胞毒性。MDA-MB-231, A498 细胞和 HeLa 细胞接种于 96 孔板。每孔培养 1×10^4 个细胞,细胞贴壁后,取出 96 孔板中的培养基。在不同组中,分别加入不同浓度的化合物 WXJ-112 和阳性药物的细胞培养液。细胞处理 24 h,每孔加入 10 μ L 的 MTT 溶液,继续孵育 4 h。取上清液后,每孔加入 100 μ L 二甲基亚砷(DMSO)显色,使用全波长酶标仪在 490 nm 处测定各组的吸光度(OD)。

根据从全波长酶标仪上获得的 OD 值,用下式来确定抑制率,如果抑制率 $\leq 0\%$,则记录为 0%。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{试验组 OD}}{\text{对照组 OD}}\right) \times 100\%。$$

1.5 细胞形态学

通过形态学变化判断 WXJ-112 对 MDA-MB-231 细胞的影响。MDA-MB-231 细胞(1×10^5 个细胞/孔)接种于 12 孔板,在 37 °C 和体积分数 5% 的 CO₂ 条件下保存过夜。然后分别用不同浓度的 WXJ-112(0.5, 1, 2 μ mol/L)和阳性药物处理细胞。使用倒置显微镜(Gangnam XD-202)拍摄图像。

1.6 细胞黏附试验

稀释 10 μ g/ μ L 基质胶至 200~300 μ g/mL,将 50 μ L 稀释后的基质胶加入到 96 孔板的每个孔中。在 37 °C,体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱中孵育 1 h,用 PBS 洗涤 2 次。重复上述步骤,加入质量分数 0.1%

BSA 100 μ L,37 °C 孵育 2 h。将用不同浓度的 WXJ-112(0.5, 1 和 2 μ mol/L), Imatinib(2 μ mol/L) 和 Ribociclib(2 μ mol/L) 预处理的 MDA-MB-231 细胞接种于 96 孔板(1×10^5 个细胞/孔)。在 37 °C,体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱中孵育 1 h 后,用 PBS 洗涤细胞 2 次。每孔加入 10 μ L MTT(5 mg/mL),继续培养 4 h。将其中的液体丢弃,加入 120 μ L DMSO,摇匀 10 min,使晶体完全溶解,测量 490 nm 处 OD 值。

1.7 划痕试验

将 MDA-MB-231 细胞分别以 1.5×10^5 个细胞/孔的密度,接种到 12 孔细胞培养板中,过夜孵育使它们作为单细胞层生长。用无菌移液管尖端在每个孔的中央部分的细胞层上划,形成划痕。细胞在含有不同浓度 WXJ-112(0.5, 1 和 2 μ mol/L), Imatinib(2 μ mol/L), Ribociclib(2 μ mol/L) 和 Abemaciclib(2 μ mol/L) 的完全培养基中培养 24 h。使用倒置光学显微镜(Gangnam XD-202)在 0, 24 和 48 h 拍摄图像,观察划痕随时间的愈合情况。使用 Image J 软件从迁移细胞的封闭区域计算 24 和 48 h 时伤口闭合的百分比。划痕愈合率的计算公式为

$$\text{划痕愈合率}(\%) = \frac{0 \text{ h 划痕区域} - \text{时间点划痕区域}}{0 \text{ h 划痕区域}} \times 100\%。$$

1.8 细胞侵袭试验

基质胶(康宁 Biocoat, 354234)在 4 °C 预解冻一夜,将 10 μ g/ μ L 基质胶稀释至 200~300 μ g/mL。取 100 μ L 包裹在 Transwell 上室表面底部,在 37 °C 和体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱中孵育过夜。在 MDA-MB-231 细胞中分别加入不同浓度的化合物 WXJ-112(0.5, 1 和 2 μ mol/L)以及阳性药物。24 h 后离心收集细胞,用含 0.2% BSA 的无血清培养液配制成 100 μ L 的单细胞悬液,滴加至上室。同时,将含体积分数 10% 胎牛血清(FBS)的 650 μ L 培养基作为趋化入侵诱导物加入下室。之后,用棉签从未被侵入的上腔室表面取出细胞,侵入下腔室的细胞用 4% 多聚甲醛固定,用 Giemsa 染色液(染色液混合稀释液体积比 1:1)染色。使用 Image J 软件计算细胞入侵数量,将 WXJ-112 治疗组与侵袭性阳性对照组(体积分数 1% 的 DMSO,体积分数 10% 胎牛血清)进行比较。

1.9 克隆形成试验

把对数生长期的 MDA-MB-231 细胞接种到 6 孔培养板中,将细胞均匀分散,在 37 °C,体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱中培养。然后,每孔分别加入不

同浓度化合物 WXJ-112(0.5, 1 和 2 $\mu\text{mol/L}$)以及阳性药物处理。处理 12 h 后,用正常培养基替换培养基,并继续培养 2 周,每 3 d 更换一次培养基。克隆形成后,用 PBS 洗涤并用 4% 多聚甲醛固定。然后用 Giemsa 染色 30 min,并观察菌落的形成。最后,用 Image J 软件对孔板进行倒置、拍照和计数。

1.10 Western blot 分析

将 MDA-MB-231 细胞(1×10^6 个/孔)接种于 6 孔板中,加入不同浓度的 WXJ-112 和阳性药物处理。培养 24 h 后,收集细胞,提取总蛋白。取适量的蛋白质,在 1 \times SDS-PAGE 缓冲液中电泳,用“湿转移法”转移到甲醇预处理后的 PVDF 膜上。用质量分数 5% 脱脂牛奶封闭 45 min,然后加入一抗(体积比 1:1 000);CDK4(AB95255)、CDK6(AB241554)、细胞周期蛋白 D1(AB1663)、E2F1(AB4070)、Rb(AB32513)、*p*-Rb(EPR17624)、Caspase-3(AB32150)、pro-Caspase-3(AB303716)、 β -actin(AB6276),在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。第二天,用 PBST 洗涤 4 次,5 min/次,加入相应的二抗稀释液(体积稀释比 1:10 000),室温孵育 45 min。用 PBST 洗涤 4 次,5 min/次。用辣根过氧化物增强化学发光法观察,数据用 Image J 软件进行处理。

1.11 鸡胚绒毛尿囊膜模型

受精蛋采购于江西吉安的泰和养鸡场,且所有动物实验均遵循动物伦理委员会的标准。受精蛋在 37 $^{\circ}\text{C}$ 无菌环境中孵育 7 d,然后将气室转移到离脐带血管 1 cm 处。窗口用无菌保鲜膜密封,方便以后使用。用基质胶和 DMEM 的混合悬液(体积比 1:1)重悬细胞,将其调整至($1.2 \sim 1.5$) $\times 10^6$ 个/mL,重悬的细胞被植入血管中。植入 4 d 后,设置阴性对照组(DMSO)、阳性对照组和试验组,每组设置 6 个鸡胚($n=6$)。之后,在鸡胚尿囊膜中分别加入不同浓度的 WXJ-112 和阳性药物。在使用该药物治疗 3 d 后,取出肿瘤,拍照,称质量,并记录。

1.12 分析统计

所有数据均以平均数 \pm SD 表示,采用 Graph-Pad Prism 9 (version 9.0, La Jolla, California, USA)软件进行数据统计。使用 *t* 检验来比较两组

数据,每组试验独立重复 3 次,以确保结果的可靠性和重现性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 化合物 WXJ-112 的合成路线

WXJ-112 的化学名称为 5-氟-4-(4-氟-1-异丙基-2-甲基-1H-苯并[d]咪唑-6-基)-N-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)-3-(三氟甲基)苯基)嘧啶-2-胺。在氮气保护下,将 4-(4-甲基哌嗪-1-基)甲基-3-(三氟甲基)苯胺(0.273 g)、6-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-4-氟-1-异丙基-2-甲基-1H-苯并[d]咪唑(0.322 g)、Pd(OAc)₂(0.0565 g)、Cs₂CO₃(0.978 g)、Xantphos(0.289 g)和 1,4-二恶烷(25 mL)在 250 mL 圆底烧瓶中制备。将混合物在 110 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 5 h,使反应继续进行。并使用二氯甲烷、甲醇(体积比 20:1)的显影溶剂监测反应进展,直到起始原料完全消耗为止。减压除去溶剂后,得到深棕色油状物。以 200~300 目硅胶为固定相,二氯甲烷、甲醇(体积比 80:1)为流动相,对粗反应混合物进行快速柱层析分离。结果得到所需的淡黄色固体(0.204 g),产率为 36.5% (见图 1)。m. p. 198.6 ~ 204.1 $^{\circ}\text{C}$; IR (cm^{-1}): 3 426, 3 096, 2 982, 1 586, 1 451。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ : 8.39(s, 1H), 8.15(s, 1H), 8.05(s, 1H), 7.79(d, $J=11.0$ Hz, 2H), 7.73(d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.55(s, 1H), 4.75(dt, $J=14.0$, 7.0 Hz, 1H), 3.64(s, 2H), 2.71(s, 3H), 2.52(d, $J=24.5$ Hz, 6H), 2.29(d, $J=24.6$ Hz, 5H), 1.70(d, $J=7.0$ Hz, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃), δ : 155.92(d, $J=2.8$ Hz), 154.27, 153.63, 152.27, 151.90, 151.58, 149.88, 147.32, 147.10, 138.48, 136.60, 134.01, 131.21, 129.25, 129.01, 127.39, 125.42, 123.24, 121.52, 115.98, 108.47, 108.13, 77.30, 77.05, 76.79, 57.85, 55.26, 53.08, 48.56, 46.03, 21.46, 15.22。HRMS: (ESI, m/z): [M+H]⁺, C₂₈H₃₁N₇F₅ 计算值为 560.2561, 实验值为 560.2563。HPLC: 纯度为 97.831%。

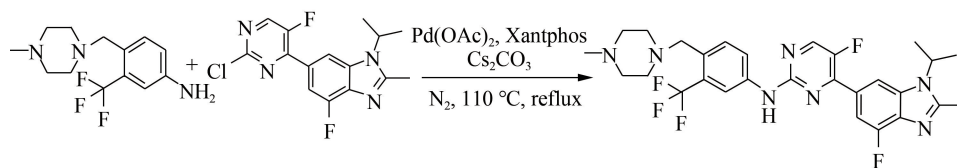


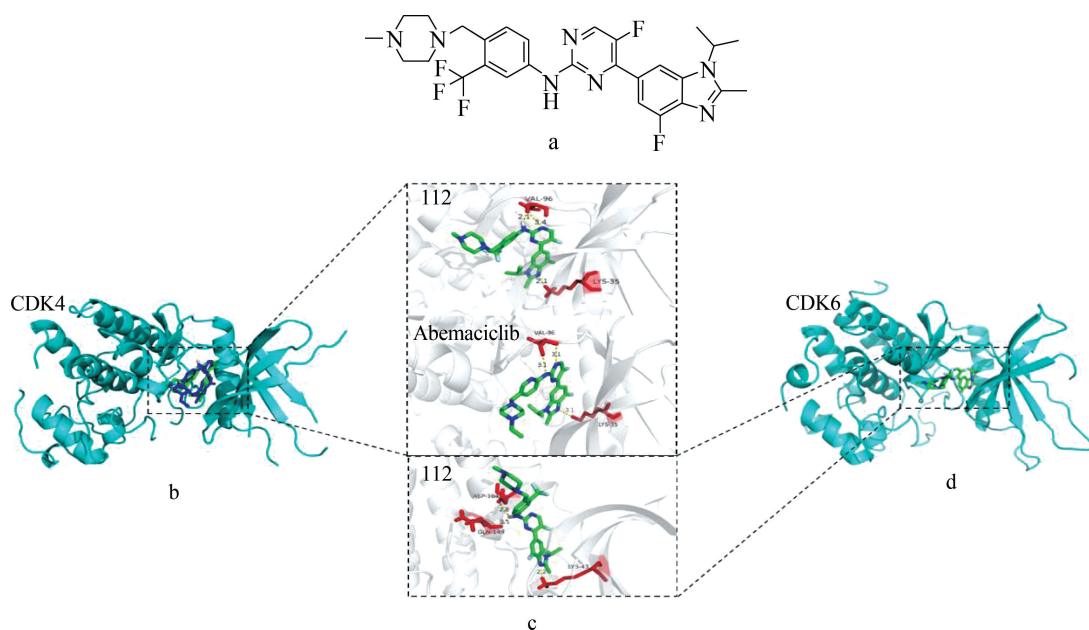
图1 化合物 WXJ-112 的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of compound WXJ-112

2.2 WXJ-112 的分子对接

为探索 CDK4 和 CDK6 与 WXJ-112 的相互作用,使用 AutoDockTools 1.5.6 软件进行分子对接研究。对接结果(见图 2)表明,WXJ-112 与 CDK4 和 CDK6 均结合紧密,并形成了多种氢键相互作用。在 CDK4 中,WXJ-112 与 VAL-96 和 LYS-35 形成了氢

键。而在 CDK6 中,WXJ-112 与 ASP-104, GLN-149 及 LYS-43 形成了氢键。这些结果表明,CDK4 和 CDK6 与 WXJ-112 之间存在很强的相互结合作用。此外,通过比较 Abemaciclib 和 WXJ-112 在 CDK4 结合袋中的结合构型,可以观察到当它们相互叠加时,在同一结合袋中保持着相似的构型(图 2a 和 b)。



注:a 为化合物 112 与 CDK4 蛋白激酶的二维相互作用图。b 为 CDK4 活性结合位点与化合物 WXJ-112 之间的相互作用。c 为 CDK6 活性结合位点与化合物 WXJ-112 之间的相互作用。CDK4(蓝色)和 CyclinD(绿色)的复杂模型取自 PDB 数据库(ID:2W9Z);CDK6-CyclinD 的复杂模型(绿色)取自 PDB 数据库(ID:1XO2)。作为参考,CDK6(蓝色,ID:5L2T)的晶体结构也与蛋白-蛋白复合物对齐。其中,与抑制剂形成氢键的残基用蓝色棒表示,其余的残基用蓝线表示,红色虚线表示氢键。

图 2 化合物 WXJ-112 与 CDK4 和 CDK6 的分子对接

Fig. 2 WXJ-112 molecularly docking with CDK4 and CDK6

2.3 化合物 WXJ-112 的抗增殖活性

为了研究化合物 WXJ-112 对癌细胞生长活性的影响,采用 MTT 法检测。以 Abemaciclib, Ribociclib 和 Imatinib 为阳性对照,检测不同浓度化合物 WXJ-112 对 MDA-MB-231, A498 和 HeLa 细胞的毒性作用,结果如表 1 所示。在处理 24 h 后,化合物 WXJ-112 与对照组相比,对 4 种细胞类型的抑制作用逐渐增加。分析计算 IC_{50} ,见表 1。化合物 WXJ-112 对 MDA-MB-231 细胞的 IC_{50} 为 $(1.66 \pm 0.62) \mu\text{mol/L}$,对 A498 细胞的 IC_{50} 为 $(5.16 \pm 0.56) \mu\text{mol/L}$,对 HeLa 细胞的 IC_{50} 则为 $(3.76 \pm 0.65) \mu\text{mol/L}$,均优于 Ribociclib 和 Imatinib。化合物 WXJ-112 对 MDA-MB-231 细胞的 IC_{50} ($(1.66 \pm 0.62) \mu\text{mol/L}$) 低于 Imatinib ($(19.23 \pm 3.08) \mu\text{mol/L}$), Ribociclib ($(13.99 \pm 2.43) \mu\text{mol/L}$) 和 Abemaciclib

($(18.97 \pm 4.08) \mu\text{mol/L}$)。

表 1 化合物 WXJ-112 和阳性药物 (Abemaciclib, Ribociclib 和 Imatinib) 对 MDA-MB-231, A498 和 HeLa 细胞系的细胞毒性作用

Table 1 Cytotoxic effects of compound WXJ-112 and positive drugs (Abemaciclib, Ribociclib and Imatinib) on MDA-MB-231, A498 and HeLa cell lines

化合物	$IC_{50} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
	MDA-MB-231	A498	HeLa
WXJ-112	1.66 ± 0.62	5.16 ± 0.56	3.76 ± 0.65
Abemaciclib	18.97 ± 4.08	18.36 ± 1.16	19.11 ± 3.41
Ribociclib	13.99 ± 2.43	25.87 ± 1.91	25.34 ± 0.96
Imatinib	19.23 ± 3.08	16.97 ± 0.77	21.83 ± 2.37

注:数据表示为至少 3 个独立试验的剂量-反应曲线的平均 \pm SE,且每个试验都有 3 个测定结果。

此外,通过比较 0, 24, 48 h 不同浓度处理的 MDA-MB-231 细胞形态(见图 3),发现 WXJ-112 低、中、高浓度(0.5, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$)随作用时间的增

加,MDA-MB-231 细胞形态逐渐呈圆形。结果表明,化合物 WXJ-112 作用于 MDA-MB-231 细胞后,细胞形态发生了破坏。

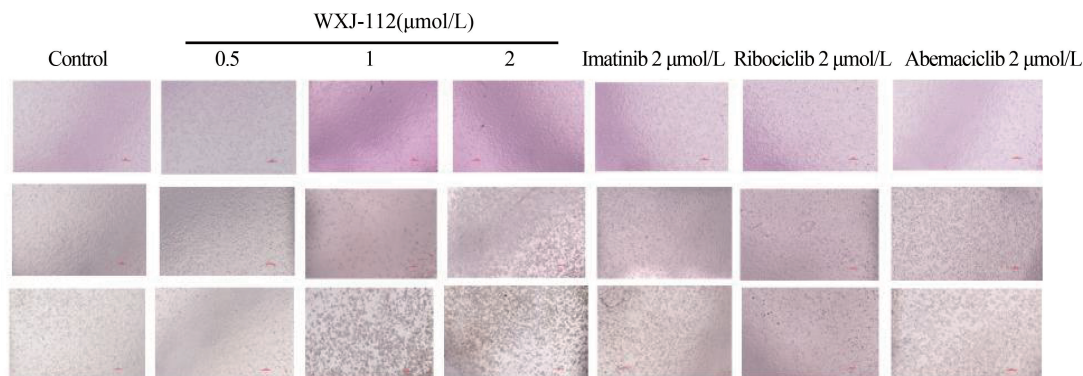


图3 不同浓度化合物 WXJ-112 对 MDA-MB-231 细胞形态的影响

Fig. 3 Effects of various doses of WXJ-112 on the morphology of MDA-MB-231 cells

2.4 化合物 WXJ-112 可抑制 MDA-MB-231 细胞的黏附、迁移和侵袭

细胞毒性试验的初步结果表明,化合物 WXJ-112 在 MDA-MB-231 细胞中具有细胞毒性潜力。因此,进一步研究化合物 WXJ-112 对 MDA-MB-231 细胞黏附、迁移和侵袭能力的影响。通过检查化合物 WXJ-112 处理细胞的黏附能力,将不同浓度的 WXJ-112 分别加入 MDA-MB-231 细胞,采用 MTT 法检测细胞黏附能力。与相同浓度的 Ribociclib 和 Imatinib 相比,化合物 WXJ-112 对 MDA-MB-231 细胞的黏附抑制最显著(图 4a 和 b)。本研究通过创面愈合试验和 Transwell 试验进一步检测 WXJ-112 对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭的影响。数据显示,WXJ-112 在 24 h 时,2 $\mu\text{mol/L}$ 为(24.49±10.61)%,1 $\mu\text{mol/L}$ 为(36.46±2.61)%,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 为(39.26±7.23)%;在 48 h 时,2 $\mu\text{mol/L}$ 为(14.34±11.72)%,1 $\mu\text{mol/L}$ 为(38.99±6.15)%,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 为(44.71±15.10)%。侵袭试验可以评估 WXJ-112 是否能降低肿瘤细胞侵袭组织的能力。数据表明,化合物 WXJ-112 低、中、高浓度组分别为(8.58±0.58)%, (3.86±1.90)%和(0.08±0.06)%,抑制作用均比相同浓度的 Ribociclib ((44.63±3.41)%) 和 Imatinib ((65.15±3.95)%)更显著(图 4c 和 d)。WXJ-112 对 MDA-MB-231 细胞的迁移能力表现出显著的抑制作用,且这种抑制作用比同等浓度的 Ribociclib 和 Imatinib 更强(图 4e 和 f)。以上结果表明,化合

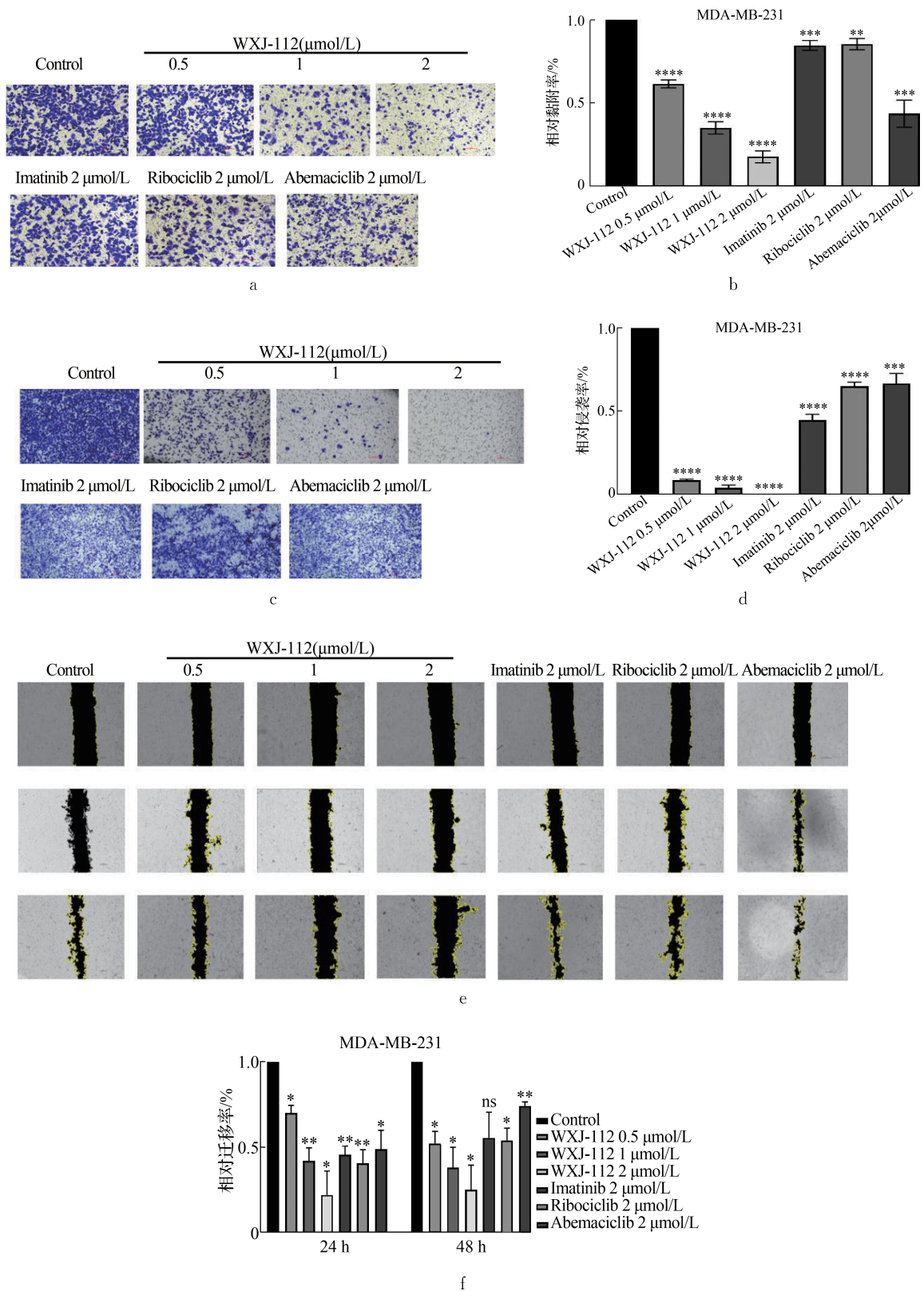
物 WXJ-112 显著抑制了 MDA-MB-231 细胞的黏附、迁移和侵袭。

2.5 化合物 WXJ-112 对 MDA-MB-231 细胞克隆形成的影响

将不同浓度的化合物 WXJ-112 和阳性药物,分别加入 MDA-MB-231 细胞形成克隆。图 5 中结果显示,随着化合物 WXJ-112 浓度增加,MDA-MB-231 细胞的增殖能力降低。化合物 WXJ-112 在低、中、高剂量下的增殖能力分别为(73.60±2.18)%, (63.12±9.47)%和(24.16±2.39)%。此外,与阳性药物 Imatinib ((79.08±1.33)%) 和 Ribociclib ((53.77±4.40)%)相比,化合物 WXJ-112 在 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 2 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下的细胞克隆数量显著减少。以上结果表明,化合物 WXJ-112 能显著抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖。

2.6 化合物 WXJ-112 调控 MDA-MB-231 细胞相关细胞周期蛋白的表达

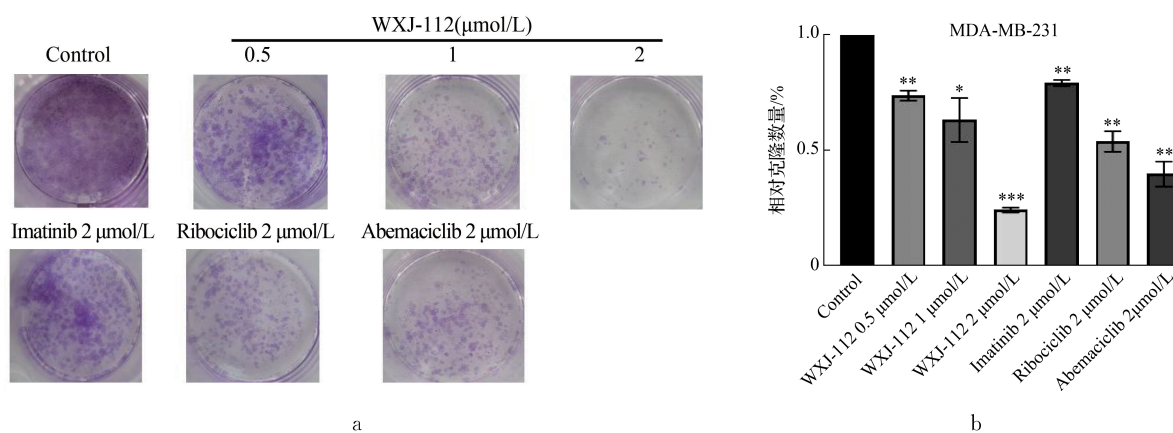
细胞周期由细胞周期蛋白和 CDKs 相互作用驱动,从 G1 期向 S 期过渡是正常细胞复制的关键时期。Cyclin D 与 CDK4/6 形成复合物,磷酸化视网膜母细胞瘤(Rb)蛋白,从而释放腺病毒早期区域 2 结合因子(E2F),将细胞周期从 G1 期驱动到 S 期。本研究采用免疫印迹分析方法进一步研究其细胞周期阻滞机制。结果显示,化合物 WXJ-112 使 MDA-MB-231 细胞周期相关蛋白 CDK4, CDK6, Cyclin D1 和 E2F1 的蛋白水平明显受到抑制,p-Rb/Rb 比值呈剂量依赖性降低(见图 6)。



注: a 和 b 为化合物 WXJ-112, Imatinib, Ribociclib 和 Abemaciclib 对 MDA-MB-231 细胞黏附能力的影响。c 和 d 为化合物 WXJ-112, Imatinib, Ribociclib 和 Abemaciclib 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响。e 和 f 为化合物 WXJ-112, Imatinib, Ribociclib 和 Abemaciclib 对 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 4 化合物 WXJ-112 对 MDA-MB-231 细胞的黏附、迁移和侵袭的影响

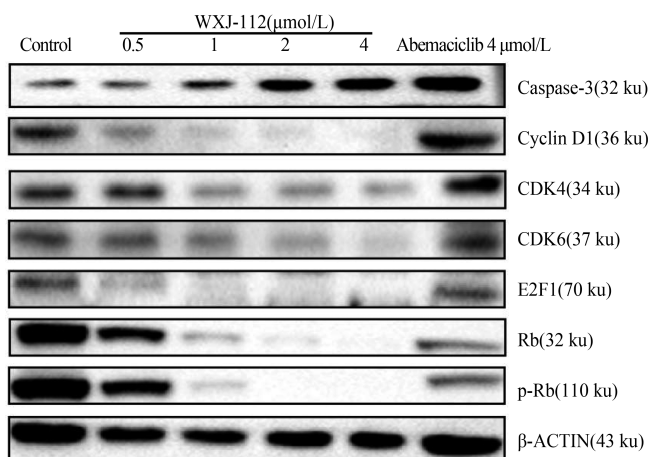
Fig. 4 Effects of the compound WXJ-112 on the adhesion, migration, and invasion of MDA-MB-231



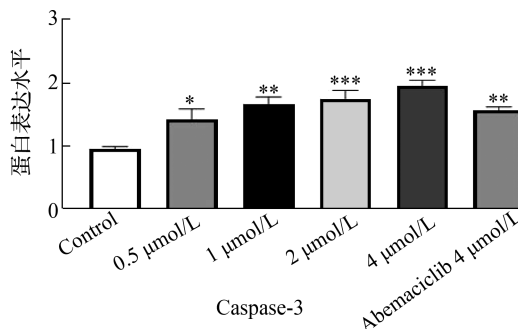
注:a 和 b 为化合物 WXJ-112, Imatinib, Ribociclib 和 Abemaciclib 对 MDA-MB-231 细胞增殖能力的影响。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 5 化合物 WXJ-112 对 MDA-MB-231 细胞集落形成的影响

Fig. 5 Effects of compound WXJ-112 on colony formation of MDA-MB-231



a

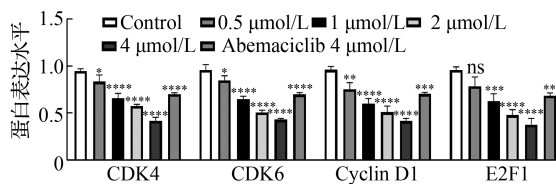


d

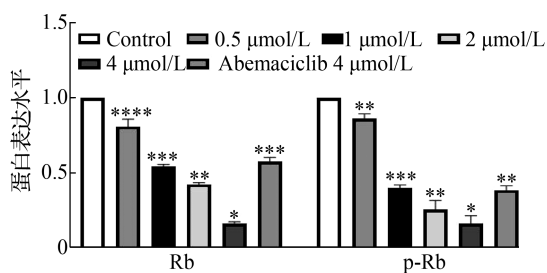
注:a~d 为采用 Western blot 法分析 MDA-MB-231 细胞中细胞凋亡相关蛋白和细胞周期相关蛋白的表达。结果代表了至少 3 个独立的试验,显示了相似的结果。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 6 化合物 WXJ-112 对 MDA-MB-231 细胞中 CDK4/6-Rb-E2F 通路相关蛋白的影响

Fig. 6 Effects of compound WXJ-112 on CDK4/6-Rb-E2F pathway-related proteins in MDA-MB-231 cells



b



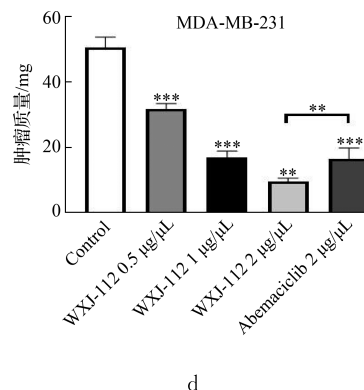
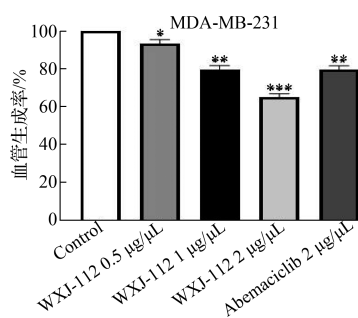
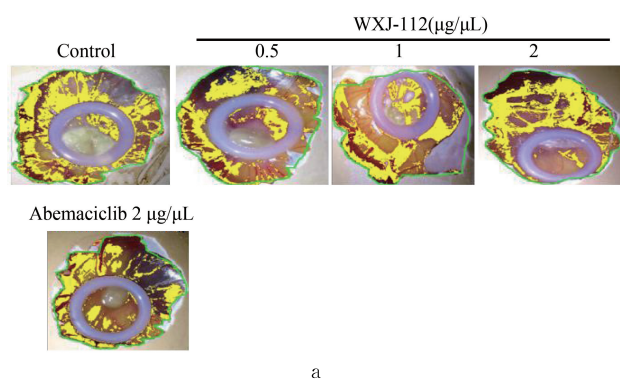
c

因此,化合物 WXJ-112 的抗肿瘤活性可能依赖于抑制 CDK4/6-CyclinD-Rb-E2F 通路。当 CDK4 和 CDK6 被抑制时, p-Rb 和 E2F1 的表达也减少了,阻止相关肿瘤细胞从 G1 期进入 S 期,从而抑制肿瘤细胞的过度增殖,防止肿瘤细胞异常复制。

2.7 化合物 WXJ-112 的体内抗增殖活性

鸡胚绒毛膜尿囊膜(CAM)是一种检测血管生成和肿瘤侵袭能力的模型,建立 CAM 模型,以确定化合物的作用。为了研究化合物 WXJ-112 的体内抗肿瘤活性,构建了含有 MDA-MB-231 细胞的 CAM 模型。将不同浓度的化合物 WXJ-112(0.5, 1

和 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) 和阳性药物处理后, 加入到 MDA-MB-231 细胞构建的鸡胚移植瘤中, 继续培养。不同浓度的 WXJ-112 ($0.5, 1$ 和 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) 血管生成率分别为 $(91.84 \pm 19.77)\%$, $(78.68 \pm 15.31)\%$ 和 $(63.34 \pm 5.40)\%$, 抑制肿瘤血管生成的能力显著增强, 抑制效果强于相同浓度的阳性药物 $(79.31 \pm 16.76)\%$ 。同时, 试验结果表明, $0.5, 1$ 和 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 质量浓度的化合物 WXJ-112 处理后的鸡胚肿瘤质量分别为 (28.50 ± 1.05) , (14.00 ± 2.28) 和 (8.00 ± 1.10) mg, 对照组为 (43.50 ± 2.43) mg。试验结果表明, 随着化合物 WXJ-112 给药浓度的增加, 抑制肿瘤生长的能力增强。综上所述, 化合物 WXJ-112 能显著抑制鸡胚移植瘤 MDA-MB-231 细胞生长。



注: a 和 b 为血管生成情况和血管数量的统计图 ($n=3$)。c 和 d 为各组肿瘤生长情况及肿瘤质量统计图 ($n=6$)。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 7 化合物 WXJ-112 和 Abemaciclib 对鸡胚绒毛膜尿囊膜模型的影响

Fig. 7 Effects of compound WXJ-112 and Abemaciclib on the chick embryo chorioallantoic membrane model

3 讨论

TNBC 的特征是雌激素受体、孕激素受体和人表皮生长因子受体 2 缺失。TNBC 的肿瘤通常分化不良, 导致转移和复发率高于其他乳腺癌亚型^[27]。而细胞周期机制失调是许多癌症病例中常观察到的现象, 不受控制的细胞增殖是癌症的典型标志^[28]。细胞周期蛋白依赖性激酶是一类丝氨酸苏氨酸蛋白激酶, 与调节亚基-细胞周期蛋白 (cyclin) 结合后产生激酶活性, 在细胞周期的启动和各时期的转换调节中发挥着关键作用^[29]。Cyclin D 激活 CDK4/6 形成 CDK4/6-Cyclin 复合物, 该复合物磷酸化 Rb^[30], 从而释放 E2F 转录因子。该因子可以激活和转录进入 S 期所需的基因^[31], 一旦这些平衡被某些因素干扰, 细胞增殖就会失控, 从而促进肿瘤的进展。

CDK4/6 抑制已成为一类重要的药物治疗方法, 目前已测试其在多种肿瘤类型中的疗效^[28,32]。例如 Palbociclib 是 2015 年 2 月 3 日获美国食品药品监督管理局加速批准的乳腺癌新药, 联合来曲唑作为以内分泌治疗为基础的初始方案, 用于治疗绝经期女性雌激素受体阳性 (ER+)、人表皮生长因子受体 2 阴性 (HER2-) 的绝经期女性晚期乳腺癌。虽然 Palbociclib 有效, 但每日治疗会导致严重的中性粒细胞减少^[33-34]。因此, 开发和鉴定新的靶向乳腺癌的抗肿瘤药物仍是临床面临的重要挑战。

本研究筛选了一系列衍生物, 通过分子对接发现了一种名为 WXJ-112 的化合物, 并对其抗肿瘤活

性进行了深入研究。试验中发现,使用不同浓度 WXJ-112 处理后,不仅乳腺癌细胞 IC_{50} 值明显优于 Imatinib, Ribociclib 以及 Abemaciclib, 并且肺癌细胞、宫颈癌细胞的 IC_{50} 值也明显要优于其他 3 种阳性药物。化合物 WXJ-112 对乳腺癌、肺癌以及宫颈癌细胞均有较强的抑制作用,后续将进一步研究其在肺癌、宫颈癌中的抗肿瘤作用,为癌症治疗带来更多的希望。此外,化合物 WXJ-112 能够有效地抑制细胞的增殖、迁移、侵袭、黏附,与同等浓度的阳性药物相比,效果更好。体外试验中也可以看出,化合物 WXJ-112 对鸡胚移植瘤的体积、质量和血管生成有着较好的抑制作用,效果同样优于同等浓度的阳性药,说明 WXJ-112 在体内外均有显著的抗肿瘤效果。细胞周期的调控对于细胞功能的正常进行和组织结构的维持至关重要,细胞的增殖、迁移、侵袭和黏附也受到细胞周期调控因子的影响。而细胞周期机制的失调,会引起不受控制的细胞增殖,进而导致癌症产生。因此 CDK6, CDK4, Cyclin E1, Rb, p-Rb 和 E2F1 蛋白的表达变化间接影响着细胞的增殖、迁移、侵袭、黏附。从试验中发现, WXJ-112 能显著抑制周期相关蛋白 CDK6, CDK4, Cyclin E1, Rb, p-Rb 和 E2F1 的表达。但 WXJ-112 对以上蛋白的调控还需要进一步研究,之后,将通过 RNA-seq 和生物信息学手段分析 CDK4 相关的差异表达基因。从已有文献中得知, CDK4 上游调控因子有 p16INK4a, p15INK4b 和 p18INK4c 等,这些因子的过表达会抑制 CDK4 的表达,从而影响细胞周期,间接影响乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭、黏附。后续将研究 WXJ-112 与上述靶基因的结合情况,并通过过表达或敲低目标基因检测 CDK4/6 信号通路的表达情况,以寻找 WXJ-112 调控细胞周期蛋白以及乳腺癌细胞侵袭、迁移和黏附的作用靶点。

综上所述,本试验证明 WXJ-112 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移和侵袭具有较强的抑制作用,并具有明显的 G1 期阻滞作用。此外, WXJ-112 抑制 CDK4/6-Cyclin D-Rb-E2F 通路相关蛋白水平。因此,新化合物 WXJ-112 可能通过抑制 CDK4/6-Cyclin D-Rb-E2F 通路而产生抗肿瘤作用。

参考文献:

- [1] CERSOSIMO R J. Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors for the management of advanced or metastatic breast cancer in women [J]. American Journal of Health-System Pharmacy, 2019, 76(16): 1183-1202.
- [2] VAGIA E, MAHALINGAM D, CRISTOFANILLI M. The landscape of targeted therapies in TNBC [J]. Cancers, 2020, 12(4): 12040916.
- [3] SINGH D D, YADAV D K. TNBC: potential targeting of multiple receptors for a therapeutic breakthrough, nanomedicine, and immunotherapy [J]. Biomedicines, 2021, 9(8): 9080876.
- [4] ZAGAMI P, CAREY L A. Triple negative breast cancer: pitfalls and progress [J]. NPJ Breast Cancer, 2022, 8(1): 95.
- [5] LI Xiaoxian, YANG Jing, PENG Limin, et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer [J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2017, 161(2): 279-287.
- [6] ASGHAR U, WITKIEWICZ A K, TURNER N C, et al. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2015, 14(2): 130-146.
- [7] YUAN Kai, WANG Xiao, DONG Haojie, et al. Selective inhibition of CDK4/6: a safe and effective strategy for developing anticancer drugs [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2021, 11(1): 30-54.
- [8] PANDEY K, AN H J, KIM S K, et al. Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: a review [J]. International Journal of Cancer, 2019, 145(5): 1179-1188.
- [9] CLARK A S, KARASIC T B, DEMICHELE A, et al. Palbociclib (PD 0332991)—a selective and potent cyclin-dependent kinase inhibitor: a review of pharmacodynamics and clinical development [J]. JAMA Oncology, 2016, 2(2): 253-260.
- [10] HAMILTON E, INFANTE J R. Targeting CDK4/6 in patients with cancer [J]. Cancer Treatment Reviews, 2016, 45: 129-138.
- [11] NURSE P, MASUI Y, HARTWELL L. Understanding the cell cycle [J]. Nature Medicine, 1998, 4(10): 1103-1106.
- [12] SHERR C J. Cancer cell cycles [J]. Science, 1996, 274(5293): 1672-1677.
- [13] MALUMBRES M. Therapeutic opportunities to control tumor cell cycles [J]. Clinical & Translational Oncology, 2006, 8(6): 399-408.
- [14] HUNT T, NASMYTH K, NOVAK B. The cell cycle [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2011, 366(1584): 3494-3497.
- [15] WEINBERG R A. The retinoblastoma protein and

- cell cycle control[J]. *Cell*, 1995, 81(3): 323-330.
- [16] WANG J Y, KNUDSEN E S, WELCH P J. The retinoblastoma tumor suppressor protein[J]. *Advances in Cancer Research*, 1994, 64: 25-85.
- [17] BUTT A J, MCNEIL C M, MUSGROVE E A, et al. Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E[J]. *Endocrine-related Cancer*, 2005, 12(Suppl 1): S47-59.
- [18] MUSGROVE E A, LEE C S, BUCKLEY M F, et al. Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(17): 8022-8026.
- [19] NAIR B C, VADLAMUDI R K. Regulation of hormonal therapy resistance by cell cycle machinery[J]. *Gene Therapy & Molecular Biology*, 2008, 12: 395.
- [20] ALTUCCI L, ADDEO R, CICATIELLO L, et al. Estrogen induces early and timed activation of cyclin-dependent kinases 4, 5, and 6 and increases cyclin messenger ribonucleic acid expression in rat uterus [J]. *Endocrinology*, 1997, 138(3): 978-984.
- [21] GEUM D, SUN W, PAIK S K, et al. Estrogen-induced cyclin D1 and D3 gene expressions during mouse uterine cell proliferation in vivo: differential induction mechanism of cyclin D1 and D3[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1997, 46(4): 450-458.
- [22] THANGAVEL C, DEAN J L, ERTEL A, et al. Therapeutically activating RB: reestablishing cell cycle control in endocrine therapy-resistant breast cancer[J]. *Endocrine-related Cancer*, 2011, 18(3): 333-345.
- [23] SPRING L M, WANDER S A, ZANGARDI M, et al. CDK 4/6 inhibitors in breast cancer: current controversies and future directions[J]. *Current Oncology Reports*, 2019, 21(3): 25.
- [24] BRAAL C L, JONGBLOED E M, WILTING S M, et al. Inhibiting CDK4/6 in breast cancer with palbociclib, ribociclib, and abemaciclib: similarities and differences[J]. *Drugs*, 2021, 81(3): 317-331.
- [25] CERSOSIMO R J. Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors for the management of advanced or metastatic breast cancer in women[J]. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 2019, 76(16): 1183-1202.
- [26] JI Yan, SCHILLER H, YANG Shu, et al. Use of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to develop the CDK4/6 inhibitor ribociclib for patients with advanced breast cancer[J]. *Clinical Pharmacokinetics*, 2024, 63(2): 155-170.
- [27] BAI X, NI J, BERETOV J, et al. Triple-negative breast cancer therapeutic resistance: where is the achilles' heel? [J]. *Cancer Letters*, 2021, 497: 100-111.
- [28] CHONG Qingyun, KOK Z H, BUI N L, et al. A unique CDK4/6 inhibitor: current and future therapeutic strategies of abemaciclib[J]. *Pharmacological Research*, 2020, 156: 104686.
- [29] GELBERT L M, CAI S, LIN X, et al. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine[J]. *Investigational New Drugs*, 2014, 32(5): 825-837.
- [30] WAGNER V, GIL J. Senescence as a therapeutically relevant response to CDK4/6 inhibitors[J]. *Oncogene*, 2020, 39(29): 5165-5176.
- [31] PINES J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1993, 18(6): 195-197.
- [32] ADAMS J M, CORY S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy[J]. *Oncogene*, 2007, 26(9): 1324-1337.
- [33] BISI J E, SORRENTINO J A, JORDAN J L, et al. Preclinical development of GIT38: a novel, potent and selective inhibitor of cyclin dependent kinases 4/6 for use as an oral antineoplastic in patients with CDK4/6 sensitive tumors[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 42343-42358.
- [34] FLAHERTY K T, LORUSSO P M, DEMICHELE A, et al. Phase I, dose-escalation trial of the oral cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor PD 0332991, administered using a 21-day schedule in patients with advanced cancer[J]. *Clinical Cancer Research*, 2012, 18(2): 568-576.

(责任编辑:褚金红 实习编辑:易圣杰)