

DOI: 10.3969/j.issn.2096-8248.2024.01.009

引用格式: 刘媛媛, 李寒雪, 张思懿, 等. LA-D 靶向 CDK4/6-Cyclin D1-Rb-E2F 通路对乳腺癌细胞的抑制功能[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2025, 34(1): 71-80.

## LA-D 靶向 CDK4/6-Cyclin D1-Rb-E2F 通路对 乳腺癌细胞的抑制功能

刘媛媛<sup>a</sup>, 李寒雪<sup>a</sup>, 张思懿<sup>a</sup>, 左玲怡<sup>a</sup>, 周娇娇<sup>a</sup>, 姜文韬<sup>a</sup>, 刘志晴<sup>a</sup>,  
张美琪<sup>a</sup>, 成文浩<sup>a</sup>, 敬爱新<sup>a</sup>, 袁庆<sup>a, b</sup>, 刘彬<sup>a, b</sup>

(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:** 乳腺癌是一种常见的恶性肿瘤, 发病率较高, 主要发生在女性乳腺组织中。设计并合成了一种新型 Abemaciclib 衍生物 6-((2-氯-4-((5-氟-4-(4-氟-1-异丙基-2-甲基-1H-苯并[d]咪唑-6-基)嘧啶-2-基)氨基)苯氧基)甲基)吡啶腈(LA-D)。通过 MTT 试验分析细胞的活力, 伤口愈合试验、Transwell 试验分析化合物 LA-D 对乳腺癌细胞侵袭迁移的抑制作用。采用鸡胚绒毛尿囊膜体内试验进一步评价化合物 LA-D 的生物学意义以及功能作用。采用 Western blot 分析周期相关 CDK4/6-Cyclin D1-Rb-E2F 通路各蛋白的表达, 进一步确定化合物 LA-D 抑制乳腺癌的作用机制。结果显示, 化合物 LA-D 对 CDK4 具有较强的亲和力, 且能够影响乳腺癌细胞的细胞形态, 抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭、黏附。综上, LA-D 对乳腺癌细胞具有较强的抗肿瘤作用, 其抗肿瘤活性可能依赖于抑制 CDK4/6-Cyclin D1-Rb-E2F 通路相关蛋白的表达。因此, 化合物 LA-D 可能是一种乳腺癌的潜在治疗药物。

**关键词:** LA-D; 乳腺癌; 迁移; 侵袭; 抗肿瘤活性

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 2096-8248(2025)01-0071-10

## Inhibition of LA-D on breast cancer cells via the CDK4/6- Cyclin D1-Rb-E2F pathway

LIU Yuanyuan<sup>a</sup>, LI Hanxue<sup>a</sup>, ZHANG Siyi<sup>a</sup>, ZUO Lingyi<sup>a</sup>, ZHOU Jiaojiao<sup>a</sup>, JIANG Wentao<sup>a</sup>,  
LIU Zhiqing<sup>a</sup>, ZHANG Meiqi<sup>a</sup>, CHENG Wenhao<sup>a</sup>, JING Aixin<sup>a</sup>, YUAN Qing<sup>a, b</sup>, LIU Bin<sup>a, b</sup>

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

**Abstract:** Breast cancer is a common malignancy with a high incidence, mainly occurring in female breast tissue. This study designed and synthesized a novel Abemaciclib derivative 6-((2-chlorine-4-((5-fluorine-4-(4-fluorine-1-isol-2-methyl-1H-benzene [d] imidazole-6-group) pyrimidine-2-group) amino) methyl) pyridine nitrile (LA-D). The viability of the cells was analyzed by MTT assay, and the wound healing assay and Transwell assay analyzed the inhibitory effect of the compound LA-D on the invasion and migration of breast cancer cells. The in vivo experiments used the membrane of chick embryo to further evaluate the biological significance and functional role of the compound LA-D. The mechanism

收稿日期: 2024-03-06; 修订日期: 2024-04-28

作者简介: 刘媛媛(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药理, (E-mail) 865127954@qq.com。

通信作者: 刘彬(1982—), 男, 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。

of action of the compound LA-D in inhibiting breast cancer was further determined by Western blot by analyzing the expression of each protein of the CDK4/6-Cyclin D1-Rb-E2F pathway. The results showed that the compound LA-D had a strong affinity for CDK4 and could affect the cell morphology of breast cancer cells and inhibit the proliferation, migration, invasion and adhesion. In conclusion, LA-D has a strong anti-tumor effect on breast cancer cells, and its anti-tumor activity may depend on inhibiting the expression of proteins involved in the CDK4/6-Cyclin D1-Rb-E2F pathway. Thus, the compound LA-D may be a potential therapeutic agent for breast cancer.

**Key words:** LA-D; breast cancer; migration; invasion; anti-tumor activity

## 0 引言

乳腺癌是女性中发病率最高的恶性肿瘤,全球发病率位居第二,其主要由乳腺上皮细胞异常生长引起。生活方式和环境因素,如高脂肪饮食、饮酒及缺乏运动,显著影响其发生。过去5年,780万女性被诊断为乳腺癌,突出其全球性影响。早期乳腺癌可控可治,但一旦转移,5年生存率显著下降。

约24%的乳腺癌为三阴性乳腺癌(TNBC),15%~20%为HER2阳性,60%~75%为激素受体阳性(ER+, PR+)。乳腺癌具有高度侵袭性且复发率高,尤其在术后1~3年内。尽管靶向治疗应用逐渐增多,但现有针对乳腺癌的靶向药物有限,因此亟需开发新的有效治疗药物<sup>[1]</sup>。

癌症病理的潜在机制涉及细胞不受控制地增殖,这是由细胞周期调节机制的破坏和细胞周期蛋白依赖性激酶的激活引起的<sup>[2-3]</sup>。其所产生的持续增殖信号是癌症公认的特征<sup>[4]</sup>。CDK4/6是CDK家族中的关键成员,对细胞周期调控有着重大影响,是驱动细胞周期进程的关键推动者<sup>[5-6]</sup>。该蛋白显著影响多种癌症肿瘤的发生和进展<sup>[7-8]</sup>。广泛的研究表明,靶向CDK4/6的药理抑制剂对多种实体肿瘤都有显著的影响。这些抑制剂通过抑制视网膜母细胞瘤(RB)肿瘤抑制因子的磷酸化,有效地诱导了肿瘤细胞中的G1细胞周期暂停<sup>[9]</sup>。Abemaciclib是一种典型的抗乳腺癌药物,通过抑制CDK4/6来实现其抗肿瘤作用。由于Abemaciclib在使用时会产生一定的副作用,如恶心腹泻、肝功能损害等,为了减少Abemaciclib对患者的副作用,基于Abemaciclib的活性结构,成功地开发并合成了Abemaciclib的一种衍生物,称为LA-D。LA-D的显著特征在于其化学组成,为6-((2-chloro-4-((5-fluoro-4-(4-fluoro-1-isopro-

pyl-2-methyl-1H-benzo[d]imidazol-6-yl)咪唑-2-烷基)氨基)苯氧基)甲基)吡啶甲腈。由于LA-D的半抑制浓度远低于Abemaciclib,且在体内体外实验中,用较低的浓度就可以较好地抑制乳腺癌的克隆、迁移、侵袭、黏附,说明LA-D具有更好的疗效和更低的毒性。分子对接分析结果表明,化合物LA-D对CDK4具有较高的结合亲和力。

综上所述,本研究的目的是评估化合物LA-D对不同肿瘤细胞增殖的影响,探索其抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和产生抗肿瘤作用的潜力。结果显示,化合物LA-D有望成为治疗乳腺癌疾病的候选药物。

## 1 材料和方法

### 1.1 化学

采用贝尔分析仪器有限公司(大连)的WRS数字熔点装置确定化合物的熔点。核磁共振谱使用量子设计EFT-60(60 MHz)液体核磁共振谱仪(Bruker,加利福尼亚,美国)测量。使用了塞勒姆仪器公司的电子天平。对于柱色谱,使用粒径为45~75 μmol/L的硅胶粉末。采用硅凝胶GF254(默克KGaA,达姆施塔特,德国)进行薄层色谱分析(TLC)。最后,采用紫外线光(ES-UVZJ-80W,ESLIGHT,广州)来诱导显色。采用Q-active HF LC-MS(Waltham, MA, 美国)进行质谱分析,其他试剂均为分析纯度,使用前不需要额外处理。

### 1.2 分子建模方法

使用软件AutoDockTools-1.5.6和Pymol-1.7.0.0 win32-py2.7建模。在对接前,使用Pymol对蛋白质进行预处理,以消除水分子和金属离子。此外,配体的结构的利用Chem3D技术生成的。随后,对接结果进行分析,以评估化合物与活性位点的结合能力<sup>[10]</sup>。

### 1.3 细胞培养

所有细胞均从湖北武汉 Punose 生命技术有限公司购买 (MDA-MB-231, MCF-7, A498 和 HeLa)。细胞保存在培养基 (DMEM) (KeyGEN BioTECH, 江苏) 中, 添加体积分数 10% 胎牛血清 (FBS) (KeyGEN BioTECH, 江苏) (FBS 配制体积比为  $V(\text{FBS}):V(\text{DMEM})=1:9$ ) 和 1% 青霉素-链霉素溶液 (阿拉丁, 上海)。在 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的潮湿环境中进行培养<sup>[11-12]</sup>。

### 1.4 甲基噻唑基四唑 (MTT) 测定

细胞在 96 孔板中培养, 并在生长培养基中用不同浓度的 LA-D 和 Abemaciclib 处理。24 h 后, 抽取培养基, 每孔应用 5 μmol/L MTT, 然后孵育 4 h。加入 100 μL 二甲亚砜 (DMSO)。使用酶标仪 (分子器件, DMINI, 上海) 在 490 nm 处测定定量吸光度, 评估相对于对照组 (DMSO) 的细胞毒性。使用 GraphPad Prism 9.3.1 进行曲线拟合分析。使用曲线拟合算法和非线性回归以图形化方式确定细胞生长被抑制 50% 的浓度<sup>[13]</sup>, 即

$$\text{抑制率}(\%) = 1 - \frac{\text{实验组的 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%。$$

### 1.5 细胞形态

MDA-MB-231 细胞 (1×10<sup>6</sup> 个/孔) 在 37 °C、CO<sub>2</sub> 体积分数为 5% 的条件下孵育过夜。整个孵育期间, 将这些细胞暴露于不同浓度 (0, 0.25, 0.5, 1, 2 μmol/L) 的 LA-D 和 Abemaciclib 中。随后, 密切观察细胞状态, 并记录在 0, 12 和 24 h 时的形态学变化。最后, 使用倒置显微镜 (ECLIPSE Ni Series, 尼康, 日本) 拍摄细胞图像。

### 1.6 细胞黏附试验

为了研究 LA-D 化合物对 MDA-MB-231 细胞的影响, 将两种细胞接种于 12 孔培养板中, 37 °C、CO<sub>2</sub> 体积分数为 5%, 固定水平孵育 1 d。去除多余液体后, 用不同浓度的 LA-D 化合物和 2 μmol/L Abemaciclib 处理细胞。将得到的含药物培养基加入细胞中, 孵育 24 h。用离心法收集细胞。在 96 孔板上预涂基质凝胶, 计数后每孔中加入约 1 000 个细胞。然后, 在每孔中加入 100 μL 多聚甲醛固定细胞, 加入结晶紫促进其显色。拍照, 用 Image J 软件计数。

### 1.7 伤口愈合、划痕试验

将 MDA-MB-231 以每孔 1.5×10<sup>5</sup> 个细胞的密

度接种到 12 孔细胞培养板中。经过夜培养后, 这些细胞完全粘附壁。使用无菌移液管, 轻轻刮除中心的细胞层, 造成划痕。随后, 通过无菌磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 冲洗, 清除细胞碎片。将细胞与不同浓度的化合物 LA-D 或 Abemaciclib 在含有胎牛血清的培养基中孵育。使用倒置光显微镜 (ECLIPSE Ni Series, 尼康, 日本) 分别在 12 h 和 24 h 的时间点获得图像。通过监测, 可以观察到随着时间推移, 划痕逐渐恢复<sup>[14]</sup>。愈合率的计算公式为

$$\text{划痕率}(\%) = \frac{0 \text{ h 划痕面积} - \text{时间点划痕面积}}{0 \text{ h 划痕面积}} \times 100\%。$$

### 1.8 细胞侵袭试验

评估细胞侵袭潜力最广泛使用的实验技术是 Transwell 侵袭试验。将 MDA-MB-231 暴露于不同浓度 (0.25, 0.5, 1 和 2 μmol/L) 的化合物 LA-D 中, 连续培养 1 d。将基质凝胶 (康宁, AZ, 美国) 溶解, 然后用 DMEM 将基质凝胶稀释至 0.04 μmol/L, 取 100 μL 稀释的基质凝胶孵育 4 h。这些细胞被重悬, 计数并稀释。在上部腔室中加入 100 μL 细胞悬液 (约 50 000 个细胞), 孵育 48 h, 用棉签擦拭未被入侵的细胞。24 孔板中加入 500 μL 结晶紫 (Beyotime, 上海), 放入小腔, 使膜浸入, 固定染色 30 min, 用 PBS 轻轻洗 2 次, 倒置, 风干, 在显微镜下观察照片计数。

### 1.9 菌落形成试验

将 MDA-MB-231 (1 000 个/孔) 接种于 6 孔板中, 分别用指定浓度 (0.25, 0.5, 1 和 2 μmol/L) 的化合物 LA-D、Abemaciclib (2 μmol/L) 处理 2 周, 每 3 d 更换一次培养基。用多聚甲醛固定细胞 20 min, 然后用 Giemsa 染色 30 min。拍照, 用 Image J 软件计数。

### 1.10 Western blot 分析

用不同浓度的 LA-D 化合物或 Abemaciclib 处理 MDA-MB-231 细胞后, 培养 24 h, 收集细胞样本。采用 BCA 测定法进行蛋白质定量。用“湿转移法”, 将适当数量的在 SDS-PAGE 缓冲液中预分离的蛋白质转移到甲醇预处理的硝化纤维素膜上。随后, 将膜与质量分数为 2.5% 的脱脂牛奶溶液孵育 1 h, 与适当稀释的一抗孵育。一抗分别是: CDK4 (ABclonal, A23521, 武汉), CDK6 (ABclonal, A0106, 武汉), Cyclin D1 (ABclonal,

A11022, 武汉), Rb (Abcam, ab32513, 上海), E2F transcription factor 1 (E2F1) (ABclonal, A2067, 武汉), p-Rb (Abcam, ab279906, 上海), Caspase-3 (ABclonal, A0214, 武汉), 以及 GAPDH (ABclonal, A19056, 武汉)。放上摇瓶, 在冰箱里孵化过夜。用 PBS 总共洗 4 次 5 min。随后, 加入二抗。在室温下孵育 45 min 以上。用 4×PBST 清洗 5 min 后, 用显影液 (Tanon, 上海) 显影。采用 Image J 软件进行分析。

### 1.11 鸡胚绒毛尿囊膜模型

孵化蛋购于安徽蚌埠彭农牧业有限公司。所有动物实验都严格遵守动物实验伦理委员会的规程。孵化出的卵在 37 °C 孵育 7 d。随后将空气室移到离脐带血管 1 cm 位置。为保持新鲜, 窗户用无菌保鲜膜密封。将细胞 (MDA-MB-231) 在基质凝胶和 DMEM 的混合物中重悬, 并调整到浓度为  $(1.2\sim 1.5) \times 10^6$  cells/mL。将重悬的细胞注射到鸡胚的高血管化区域。在 4 d 的孵育以允许肿瘤发展后, 建立时间匹配的阴性对照组和阳性对照组。每组共 6 个鸡胚 ( $n=6$ )。分别用 0, 0.5, 1, 2  $\mu\text{mol/L}$  浓度的 LA-D 和 2  $\mu\text{mol/L}$  Abemaciclb 处理鸡胚尿囊膜。3 d 药物治疗后, 手术切除肿瘤, 拍照, 称质量, 记录结果。

### 1.12 统计分析

使用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析。数据以由 3 个独立实验得出的平均数  $\pm$  标准差表示。多组比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两组间比较采用 *t*-检验。  $P < 0.05$  为显著性水平被认为有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 化合物 LA-D 的合成路线

试验开始时, 在 250 mL 三颈瓶中加入甲基 6-

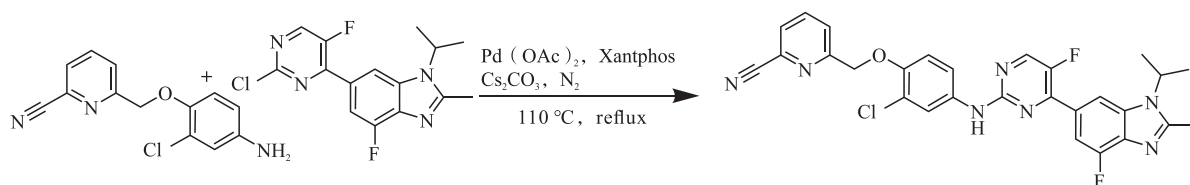


图 1 化合物 LA-D 的合成路线  
Fig.1 Synthesis route of compound LA-D

### 2.2 化合物 LA-D 的分子对接

使用 AutoDockTools-1.5.6 软件检测 CDK4 和

(4-氨基-2-氯苯氧)吡啶甲腈 (0.57 mmol, 147 mg), 6-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-4-氟-1-异丙基-2-甲基-1H-苯并[d]咪唑 (0.63 mmol, 204 mg)。随后, 将  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (0.15 mmol, 34 mg),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (1.80 mmol, 587 mg), XantPhos (0.30 mmol, 187 mg) 和 1, 4-二氧烷 (45 mL) 导入烧瓶中。将混合物用氮气净化 3 次, 以产生惰性气氛。然后将反应温度提高到 110 °C, 并在持续搅拌下保持回流 5 h (投料反应后, 每隔 1 h 经薄层色谱点板确认反应进度, 5 h 时反应基本停止, 故选择 5 h 作为反应时间)。通过薄层色谱分析跟踪反应的进展, 结果表明充分利用了原料 (洗脱液 DCM 和 MeOH 体积比为 20:1)。然后将反应混合物进行旋转蒸发, 进行柱层析。结果分离出 47 mg 的浅黄色固体, 产率为 15.12% (见图 1)。m.p. 218.6~220.1 °C。IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3 421, 3 083, 2 982, 1 586, 1 500, 1 435。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 8.48 (d,  $J=4.6$  Hz, 1H), 8.35 (d,  $J=3.8$  Hz, 1H), 8.17 (d,  $J=4.4$  Hz, 1H), 7.88 (d,  $J=2.6$  Hz, 1H), 7.76 (d,  $J=11.7$  Hz, 1H), 7.47 (t,  $J=8.9$  Hz, 1H), 7.36 (ddd,  $J=12.8, 8.9, 3.5$  Hz, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.14 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 5.33 (d,  $J=1.5$  Hz, 2H), 4.75 (dq,  $J=13.6, 6.8$  Hz, 1H), 2.71 (d,  $J=3.7$  Hz, 3H), 1.71 (t,  $J=5.7$  Hz, 6H)。 $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 156.96, 156.14, 154.22, 153.56, 152.22, 151.78, 151.43, 149.76, 149.51, 149.07, 147.31, 147.09, 136.99, 136.60, 136.53, 134.04, 133.90, 127.47, 123.22, 122.72, 121.64, 121.25, 118.72, 114.39, 108.40, 108.25, 108.15, 108.09, 77.28, 77.03, 76.78, 71.81, 48.60, 21.54, 15.16。HRMS (ESI,  $m/z$ ):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  计算值为  $\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{OF}_2\text{Cl}$  546.162 1, 实验值为 546.162 8。

化合物 LA-D 之间的相互作用。图 2 显示了化合物 LA-D 在 CDK4 蛋白激酶中的对接结合位置, LA-D

与 CDK4 之间形成了 3 个氢键, 具有很强的结合亲和力和。对化合物 LA-D 在 CDK4 蛋白激酶中结合位置的分析表明, LA-D 的吡啶端可以延伸到位于口袋外侧的凹槽中。此外, 在 CDK4 结合袋中, LA-D 和

Abemaciclib 的结合结构被重叠, 以便进行视觉比较。研究表明, Abemaciclib 和 LA-D 在同一结合袋内具有相似的构象。

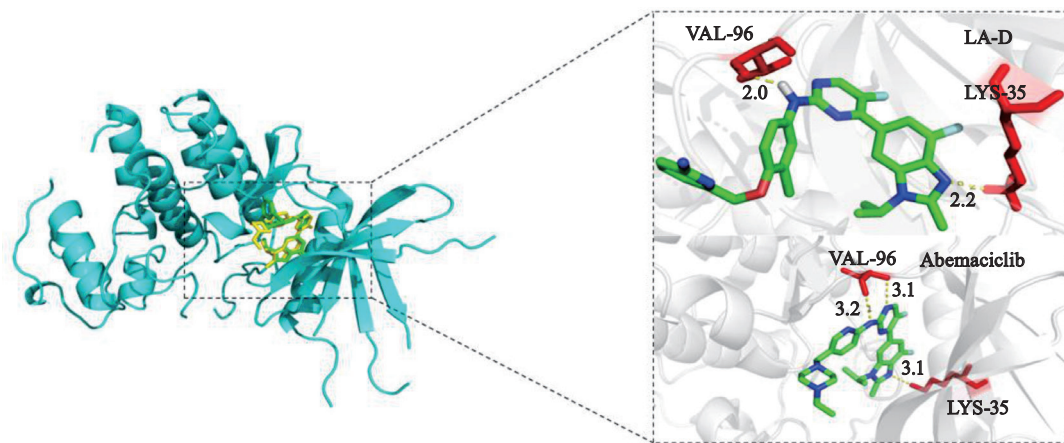


图 2 化合物 LA-D 的分子对接图

Fig.2 Molecular docking diagram of compound LA-D

### 2.3 化合物 LA-D 的抗增殖活性

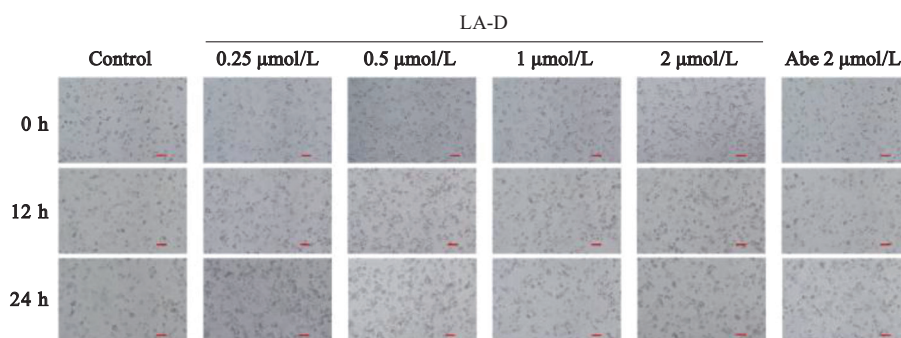
以 Abemaciclib 为阳性对照, 评价不同浓度 LA-D 化合物对各细胞系的毒性作用。表 1 显示了计算出的半抑制浓度值。LA-D 化合物在 MDA-MB-231 细胞上的半抑制浓度值为  $(2.88 \pm 0.18) \mu\text{mol/L}$ , 显著低于 Abemaciclib  $(94.08 \pm 2.00) \mu\text{mol/L}$ 。此外, 对不同浓度 LA-D 处理的乳腺癌细胞进行比较分析, 如图 3

所示。为了保证 100% 的细胞活力, 选择最大浓度为  $2 \mu\text{mol/L}$ 。在 0, 12 和 24 h 时, MDA-MB-231 细胞体积缩小, 外观皱褶, 呈尖状。结果显示, LA-D 在 24 h 内对细胞形态的改变显著多于 Abemaciclib。数据表示为至少 3 个独立实验的剂量反应曲线的平均值  $\pm$ SE, 每个实验进行 3 次测定。

表 1 化合物 LA-D 对不同癌细胞的半抑制浓度

Table 1 Half inhibitory concentration of compound LA-D on different cancer cells

化合物	$IC_{50} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$			
	MDA-MB-231	MCF-7	A498	Hela
LA-D	$2.88 \pm 0.18$	$3.75 \pm 0.06$	$0.38 \pm 0.06$	$0.99 \pm 0.10$
Abemaciclib	$94.08 \pm 2.00$	$6.80 \pm 0.41$	$0.49 \pm 0.06$	$0.93 \pm 0.29$



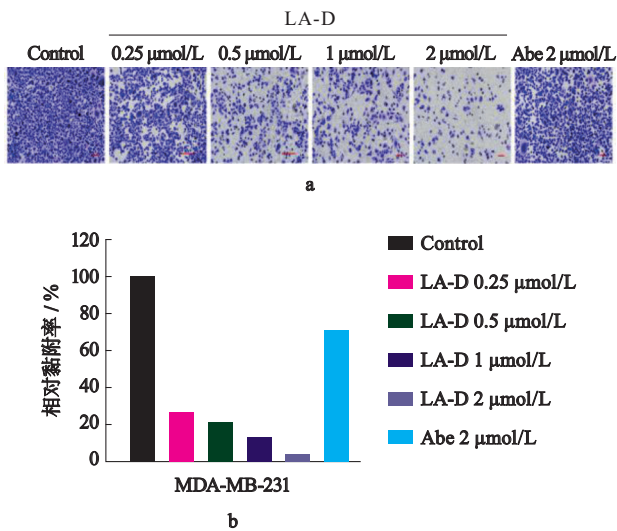
注: 标尺大小为  $100 \mu\text{m}$ 。

图 3 化合物 LA-D 对细胞形态的影响

Fig.3 Effect of compound LA-D on cell morphology

## 2.4 化合物 LA-D 对乳腺癌细胞黏附能力的影响

上皮组织中机械完整性的维持主要依赖于细胞和细胞外基质之间的黏附作用。如图 4 所示,在评价给药化合物 LA-D 的细胞黏附能力后,观察到 LA-D 抑制乳腺癌细胞黏附能力为  $(71.87 \pm 4.43)\%$  和  $(86.43 \pm 5.25)\%$ , 而 Abemaciclib 的等效浓度为  $(6.15 \pm 1.01)\%$  和  $(32.76 \pm 6.15)\%$ 。因此,与同等浓度的 Abemaciclib 相比,LA-D 对乳腺癌细胞黏附有更强的抑制作用。

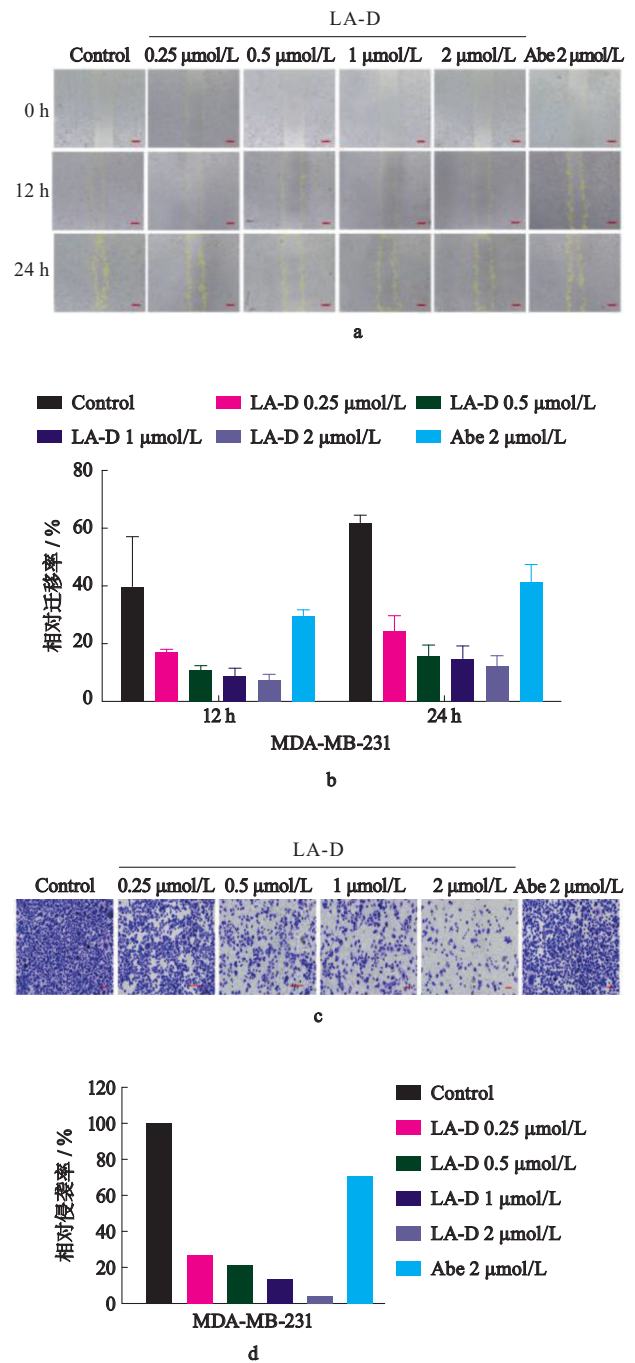


注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。标尺大小为  $100 \mu\text{m}$ 。

图 4 化合物 LA-D 对 MDA-MB-231 细胞黏附能力的影响  
Fig.4 Effect of compound LA-D on the adhesion ability of MDA-MB-231 cells

## 2.5 化合物 LA-D 对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭能力的影响

伤口愈合试验经常被用来评估细胞的迁移潜能。其中一个显著的发现是乳腺癌细胞的迁移能力降低。如图 5a~d 所示,与同等浓度的 Abemaciclib ( $2 \mu\text{mol/L}$ ,  $24 \text{ h}$ :  $(32.04 \pm 1.81)\%$ ,  $(29.08 \pm 3.74)\%$ ) 相比,LA-D ( $(14.74 \pm 2.06)\%$ ,  $(13.31 \pm 1.59)\%$ ) 在  $2 \mu\text{mol/L}$  浓度下的  $24 \text{ h}$  抑制作用更为明显。细胞侵袭试验用于评估化合物和参考药物减轻肿瘤细胞在基质微环境中降解和浸润细胞外基质蛋白的侵袭潜力的能力。在图 5a~d 中,数据表明化合物 LA-D 对乳腺癌细胞具有显著的抗侵袭特性。此外,值得注意的是,在同等剂量下,随着浓度梯度的增加,侵入细胞的数量也在减少。因此,与 Abemaciclib 相比,LA-D 抗迁移和侵袭乳腺癌细胞的能力更为明显。



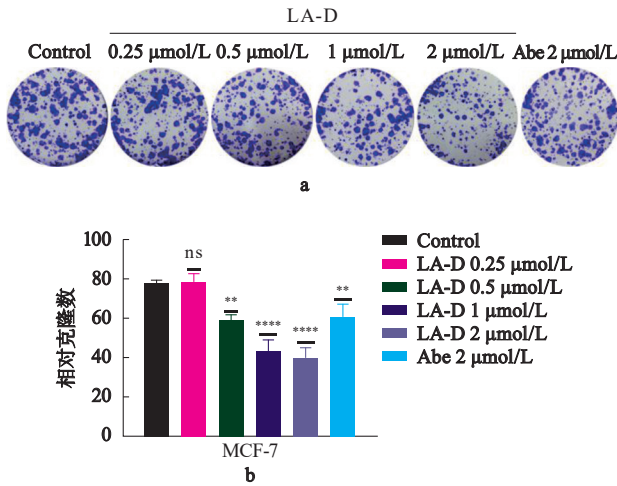
注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;\*\* $P < 0.01$ ;\*\*\* $P < 0.001$ ;\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。标尺大小  $100 \mu\text{m}$ 。

图 5 化合物 LA-D 对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭能力的影响  
Fig.5 Effect of compound LA-D on the migration and invasion capacity of MDA-MB-231 cells

## 2.6 化合物 LA-D 抑制 MDA-MB-231 集落的形成

乳腺癌细胞接受不同浓度的 LA-D 和 Abemaciclib,以诱导集落形成。图 6a~b 所示的试验结果表明,随着 LA-D 浓度的增加,乳腺癌细胞的克隆能力明显降低。与对照组相比, $0.25, 0.5, 1, 2 \mu\text{mol/L}$

LA-D 处理的细胞增殖能力会减弱。此外, 与浓度为 2  $\mu\text{mol/L}$  的 Abemaciclib 治疗组相比, 浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$  和 2  $\mu\text{mol/L}$  的 LA-D 治疗组的细胞克隆数量明显减少 ((52.00 $\pm$ 1.73)%, (81.33 $\pm$ 8.14)%)。因此, 试验结果表明, 化合物 LA-D 抑制了乳腺癌细胞的增殖能力。

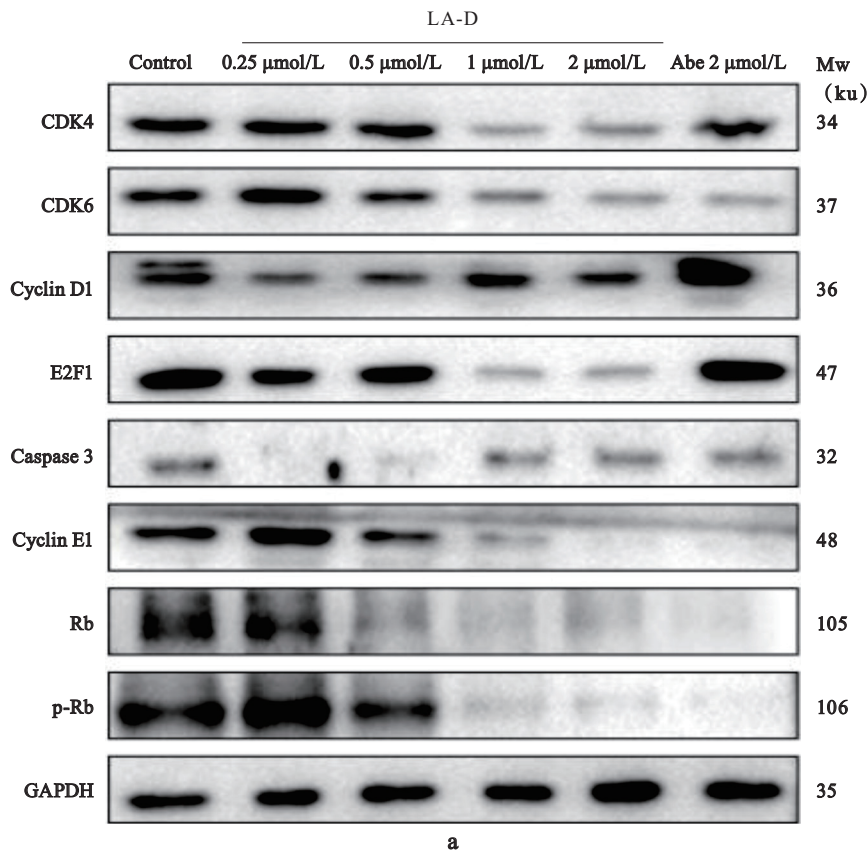


注: 与对照组相比, \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图 6 化合物 LA-D 对 MDA-MB-231 集落形成的抑制作用  
Fig.6 Inhibition of compound LA-D on MDA-MB-231 colony formation

### 2.7 化合物 LA-D 调控乳腺癌细胞中相关蛋白的表达

为了检测 LA-D 的抗肿瘤活性, 检测了细胞周期经典通路 CDK4/6-Cyclin D1-Rb-E2F1。根据结果 (图 7) 可以看出, 化合物 LA-D 对 MDA-MB-231 细胞中 CDK4, CDK6, Cyclin D1 和 E2F 转录因子 1 (E2F1) 的表达有下调作用, 如图 7b 所示。此外, 还观察到 p-Rb/Rb 比值的剂量依赖性降低, 如图 7c 所示。Caspase 3 是一种半胱氨酸蛋白酶, 是细胞凋亡途径中的关键调节因子。在细胞受到凋亡信号时, Caspase 3 被激活并参与一系列的蛋白质裂解反应, 最终导致细胞凋亡。Caspase 3 蛋白表达的增加说明 LA-D 能够诱导乳腺癌细胞凋亡。CDK4/6-Cyclin D1-Rb-E2F 通路在细胞周期调控和癌症发展中扮演着重要角色。这一结果证明药物可以通过 CDK4/6-Cyclin D1-Rb-E2F1 通路影响癌细胞的周期。CDK4 和 CDK6 的过度活化与乳腺癌的发展和进展有关, 因此, 降低它们的表达对抗癌活性有一定影响。CDK4, CDK6 和 Cyclin D1 是细胞周期蛋白, 其表达降低表明, CDK4 和 CDK6 的下调会导致细胞周期减缓, 从而抑制癌细胞增殖。Caspase 3 下调说明, CDK4 和 CDK6 的下调导致细胞周期异常, 进而诱导癌细胞凋亡, 抑制癌症的发展。



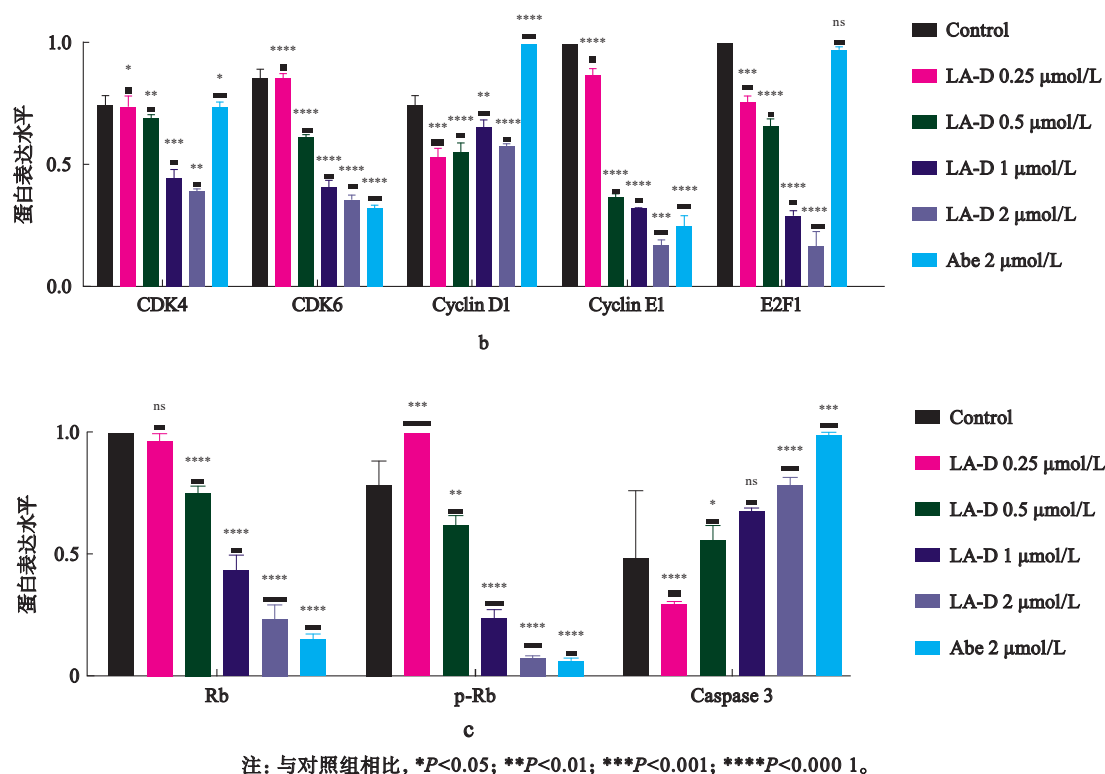
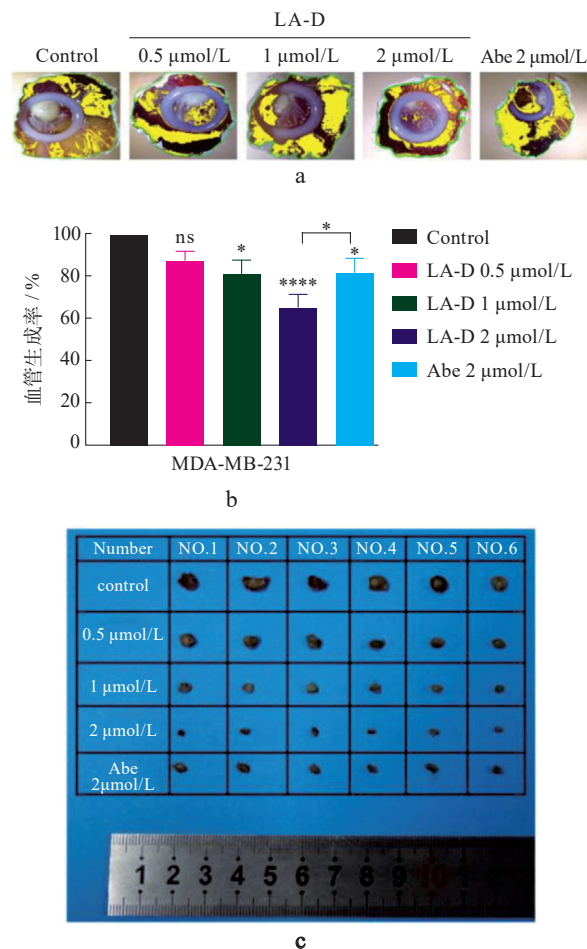


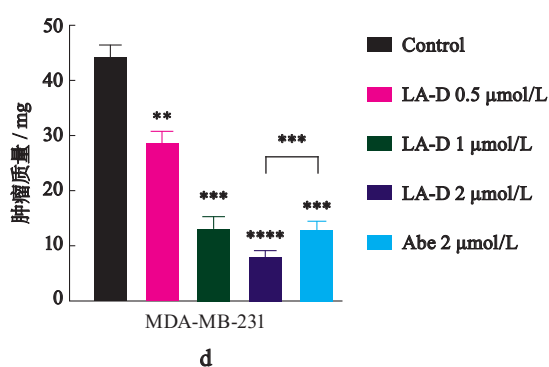
图7 化合物 LA-D 调控乳腺癌细胞中相关细胞周期蛋白的表达

Fig.7 Compound LA-D regulating the expression of relevant cell cycle proteins in breast cancer cells

## 2.8 化合物 LA-D 的体内抗增殖活性

为了全面评价 LA-D 化合物在体内的抗癌效果, 利用 MDA-MB-231 细胞系在禽胚胎中建立异种移植瘤模型。使用浓度为 0.5, 1 和 2  $\mu\text{mol/L}$  的 LA-D 后, 血管生成率分别为 ((87.64 $\pm$ 4.24)%, (87.74 $\pm$ 2.40)%), ((81.24 $\pm$ 6.72)%, (79.43 $\pm$ 1.98)%) 和 ((65.45 $\pm$ 5.65)%, (63.56 $\pm$ 2.59)%)。如图 8a~d 所示, 与阳性药物 Abemaciclib 相比, 即使浓度相当, LA-D 对肿瘤血管生成的抑制作用也明显更强。同时, 设置 LA-D 的浓度为 0, 0.5, 1, 2  $\mu\text{mol/L}$ , 从结果中能够看出, 随着 LA-D 浓度增加, 鸡胚肿瘤模型的质量和大小都呈现梯度依赖性减小。同时, 设置 2  $\mu\text{mol/L}$  的 LA-D 和 Abemaciclib 两组实验, 比较相同浓度下 LA-D 与 Abemaciclib 对于肿瘤质量和大小的影响, 结果发现, 在相同浓度下, LA-D 组的肿瘤质量和大小都小于 Abemaciclib 组。实验结果显示, 随着化合物 LA-D 给药浓度的增加, 肿瘤生长抑制作用明显增强。在鸡胚中发生的异种移植瘤中, 化合物 LA-D 在抑制 MDA-MB-231 的生长方面有显著的效果。这表明其具有良好的体内抗肿瘤细胞增殖活性。





注: 与对照组相比, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图 8 化合物 LA-D 的体内抗增殖活性

Fig.8 In vivo anti-proliferative activity of compound LA-D

### 3 讨论

乳腺癌是一种涉及遗传和环境因素的异质性疾病, 目前还没有可行的完全治愈的方法。鉴于传统治疗方法的局限性, 探索新的方法来克服固有的或获得性的耐药性至关重要。近年来, 为治疗乳腺癌, 人们研究并开发了多种小分子药物。Abemaciclib 是一种选择性 CDK4/6 抑制剂, 已获得食品药品监督管理局批准, 有临床样本支持其安全性和有效性。LA-D 的半抑制浓度远低于 Abemaciclib, 说明 LA-D 具有更好的疗效和更低的毒性。因此, LA-D 可能成为替代 Abemaciclib 的 CDK4/6 抑制剂, 用于治疗乳腺癌。

本研究评估了 Abemaciclib 的疗效, 成功设计并合成了 LA-D。随后, 进行了更多的研究来评估 LA-D 对乳腺癌细胞的抗肿瘤活性的影响。抗肿瘤治疗是通过干预肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和黏附等过程, 阻止肿瘤的生长、扩散和转移, 从而达到治疗肿瘤的目的。与之前研究对比发现, 与同等浓度的 Abemaciclib 相比, LA-D 抑制乳腺癌细胞的效果更好。化合物 LA-D 能够有效地抑制细胞的增殖、迁移、侵袭、黏附, 说明 LA-D 药效更好。体内实验中也可以看出, 化合物 LA-D 对鸡胚的体积、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 Abemaciclib, 说明化合物 LA-D 对肿瘤血管生成的抑制效果更好。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, 而细胞的增殖、迁移、侵袭和黏附也受到细胞周期调控因子的影响。异常的细胞周期可能导致细胞功能异常, 进而影响细胞的增殖、迁移、侵袭和黏附能

力。为了评估细胞周期的经典通路 CDK4/6-Cyclin D1-Rb-E2F1, 试验发现, LA-D 也能显著抑制周期相关蛋白 CDK6, CDK4, Cyclin E1, Rb, p-Rb 和 E2F1 的表达, 说明 LA-D 可能通过 CDK4/6-Cyclin D1-Rb-E2F1 通路对乳腺癌细胞发挥抑制作用, 但 LA-D 对以上蛋白的调控仍然需要更深入的研究。接下来将通过 RNA-seq 和生物信息学手段分析 CDK4 相关的差异表达基因。CDK4/6-Cyclin D1-Rb-E2F 通路是细胞周期调控中的重要信号传导通路, 分子机制为 CDK4/6 与 Cyclin D1 形成复合物。这个复合物在细胞周期 G1 期起到重要作用, 促进细胞周期的进程。CDK4/6-Cyclin D1 复合物磷酸化 Retinoblastoma 蛋白 (Rb), 使其失去对转录因子 E2F 的抑制作用。Rb 是一种抑癌基因, 通常处于活化状态抑制 E2F 的活性。当 Rb 被 CDK4/6-Cyclin D1 复合物磷酸化后, 释放出 E2F。E2F 是一种转录因子, 可以促进细胞周期的进程, 包括促进 S 期基因的转录和细胞进入 S 期。在未来, 通过监测患者中 CDK4/6 的生物标志物的动态变化, 制定个性化的治疗策略, 改善癌症患者的预后。从已有的文献中得知, 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。计划研究 LA-D 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 LA-D 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。由于化合物 LA-D 的  $IC_{50}$  低于 Abemaciclib, 如果 LA-D 临床用药, 副作用和耐药性可能会低于 Abemaciclib, 未来, LA-D 可能会与他莫昔芬联合用药, 用于治疗激素受体阳性乳腺癌, 与 LA-D 联合使用有可能增强激素治疗的效果。也可以与赫赛汀用于治疗 HER2 阳性乳腺癌, 提高对乳腺癌的耐药性和治疗效果。因此, 对于 LA-D 的治疗策略, 与 LA-D 耐药途径相关的靶向药物和免疫治疗值得在后续的前瞻性研究中进一步探索。

综上所述, 化合物 LA-D 可能抑制 CDK4/6-Cyclin D1-Rb-E2F 信号通路, 以及乳腺癌细胞侵袭、迁移和黏附的生物学过程, 对乳腺癌具有潜在的抗肿瘤作用。LA-D 作为一种潜在的治疗药物, 为乳腺癌患者提供了新的希望。

## 参考文献:

- [1] BORRI F, GRANAGLIA A. Pathology of triple negative breast cancer [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2021, 72: 136-145.
- [2] BYTAUTAITE M, PETRIKAITE V. Comparative study of lipophilic statin activity in 2D and 3D in vitro models of human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 [J]. *Onco Targets and Therapy*, 2020, 13: 13201-13209.
- [3] CETIN B, WABL C A, GUMUSAY O. CDK4/6 inhibitors: mechanisms of resistance and potential biomarkers of responsiveness in breast cancer [J]. *Future Oncology* (London, England), 2022, 18 (9): 1143-1157.
- [4] FU N Y, NOLAN E, LINDEMAN G J, et al. Stem cells and the differentiation hierarchy in mammary gland development [J]. *Physiological Reviews*, 2020, 100 (2): 489-523.
- [5] LI Tianqi, XIONG Yudi, WANG Qingqing, et al. Ribociclib (LEE011) suppresses cell proliferation and induces apoptosis of MDA-MB-231 by inhibiting CDK4/6-cyclin D-Rb-E2F pathway [J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47 (1): 4001-4011.
- [6] WOLF J M, WOLF L M, BELLO G L, et al. Molecular evolution of SARS-CoV-2 from December 2019 to August 2022 [J]. *Journal of Medical Virology*, 2023, 95 (1): e28366.
- [7] WANG Yajie, YE Fangzhou, LIANG Yiran, et al. Breast cancer brain metastasis: insight into molecular mechanisms and therapeutic strategies [J]. *British Journal of Cancer*, 2021, 125 (8): 1056-1067.
- [8] QU Fei, LIU Qian, LU Rongrong, et al. Disitamab Vedotin (RC48) combined with bevacizumab for treatment of HR-negative/HER2-positive metastatic breast cancer with liver and brain involvement: a case report [J]. *Frontiers in Oncology*, 2023, 13: 1245701.
- [9] LOIBL S, POORTMANS P, MORROW M, et al. Breast cancer [J]. *Lancet* (London, England), 2021, 397 (10286): 1750-1769.
- [10] KOLAK A, KAMIŃSKA M, SYGIT K, et al. Primary and secondary prevention of breast cancer [J]. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2017, 24 (4): 549-553.
- [11] LI Yin, DUAN Jiangjie, BIAN Xiuwu, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress [J]. *Breast Cancer Research*, 2020, 22 (1): 61.
- [12] LYONS T G. Targeted therapies for triple-negative breast cancer [J]. *Current Treatment Options in Oncology*, 2019, 20 (11): 82.
- [13] SHEN Meiyang, PAN Huawen, CHEN Yuxia, et al. A review of current progress in triple-negative breast cancer therapy [J]. *Open Medicine* (Warsaw, Poland), 2020, 15 (1): 1143-1149.
- [14] UCHIMIĄK K, BADOWSKA-KOZAKIEWICZ A M, SOBIBOROWICZ-SADOWSKA A, et al. Current state of knowledge on the immune checkpoint inhibitors in triple-negative breast cancer treatment: approaches, efficacy, and challenges [J]. *Clinical Medicine Insights Oncology*, 2022, 16: 11795549221099869.

(责任编辑:褚金红)