

## 新型微管抑制剂IMB5046的合成及抗血管生成活性

郑艳波, 弓建华, 许先栋, 甄永苏\*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

**摘要:** IMB5046是新发现的硝基苯甲酸类微管抑制剂, 本文报道了IMB5046的合成过程及其体外抗血管生成活性。本研究以2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酸与4-甲硫基苄醇通过两步反应生成IMB5046, 终产物结构经<sup>1</sup>H NMR和HR-MS确证。MTT法检测化合物对细胞增殖的影响; 荧光法检测化合物对细胞骨架的影响; 流式细胞术检测IMB5046对细胞周期的影响; 划痕及Transwell实验检测细胞的运动能力; 内皮小管形成实验检测IMB5046对血管生成的影响。结果显示IMB5046可诱导血管内皮细胞的收缩及微管骨架的解聚, 抑制内皮细胞及肿瘤细胞的增殖。两种原料药对细胞形态、微管结构及细胞生长均没有明显影响。IMB5046将内皮细胞阻滞于G<sub>2</sub>/M期。较低细胞毒浓度的IMB5046即可显著抑制内皮细胞的运动能力。IMB5046可抑制内皮小管的形成, 使内皮小管数及节点数显著减少。以上结果表明, IMB5046有望成为一种具有抗血管生成活性的靶向微管药物。

**关键词:** 微管抑制剂; IMB5046; 合成; 抗血管生成

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)03-0469-06

## Synthesis and anti-angiogenic activity of a novel microtubule inhibitor IMB5046

ZHENG Yan-bo, GONG Jian-hua, XU Xian-dong, ZHEN Yong-su\*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** IMB5046 is a newly discovered nitrobenzoate functioning as a microtubule inhibitor. Here we report its synthesis and *in vitro* anti-angiogenic activity. IMB5046 was synthesized by conjugation of 2-morpholin-4-yl-5-nitrobenzoic acid with 4-(methylthio)benzyl alcohol via two-step reactions. The structure of the end product was verified using <sup>1</sup>H NMR and HR-MS spectroscopy. The effect of these compounds on cell proliferation was determined using MTT assay, and their impact on cytoskeleton was investigated using fluorescence assay. Flow cytometry was performed to examine the effect of IMB5046 on cell cycle. Cell wound scratch assay and Transwell assay were performed to examine cell migration. Endothelial tube formation assay was used to evaluate the anti-angiogenic activity of IMB5046. The results indicated that IMB5046 induced endothelial cell contraction and microtubule depolymerization, and inhibited the proliferation of endothelial cells and tumor cells, while two raw materials showed no obvious effects. IMB5046 arrested cell cycle at G<sub>2</sub>/M phase, even at low-cytotoxic concentrations it significantly inhibited the motility of endothelial cells. IMB5046 inhibited the tube formation of endothelial cells according to the number of tubes and junctions. In conclusion, IMB5046 is a promising microtubule-targeting drug with anti-angiogenic activity.

**Key words:** microtubule inhibitor; IMB5046; synthesis; anti-angiogenesis

收稿日期: 2018-12-04; 修回日期: 2019-01-09.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2016-I2M-2-002, 2017-I2M-1-010).

\*通讯作者 Tel: 86-10-83158065, E-mail: zhenys@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-1083

微管是由 $\alpha$ 和 $\beta$ 球蛋白构成的中空管状结构, 是细胞骨架的重要组成部分, 在维持细胞形态、细胞分裂、胞内运输及细胞运动等过程中发挥着重要作用<sup>[1,2]</sup>。微管抑制剂能改变微管的聚合状态和动力学, 从而导

致细胞周期阻滞,并诱导细胞凋亡<sup>[3,4]</sup>。根据对微管聚合量的影响,微管抑制剂可分为微管解聚剂(如秋水仙碱、长春新碱)和微管稳定剂(如紫杉醇)。微管蛋白有3个常见的药物结合位点,即紫杉醇位点、长春碱位点和秋水仙碱位点<sup>[4]</sup>。多种微管抑制剂已被用于肿瘤的一线治疗,如紫杉醇用于治疗卵巢癌、乳腺癌及肺癌等,长春新碱用于治疗急性白血病和恶性淋巴瘤等,微管是肿瘤化疗中最成功的靶点之一<sup>[4]</sup>。近年来的研究显示微管抑制剂还可通过抑制肿瘤血管生成和破坏肿瘤血管而发挥抗肿瘤活性<sup>[5]</sup>。尽管微管抑制剂广泛用于癌症的治疗,但肿瘤非常普遍地存在耐药性<sup>[6,7]</sup>。另外很多微管抑制剂是植物或微生物来源的次生代谢产物,其自身产量极低,且化合物结构复杂,难于合成,产量一直受到限制<sup>[8,9]</sup>。临床常用微管抑制剂还存在其他缺陷,例如具有神经毒性、水溶性差等<sup>[3,9-11]</sup>。寻找新型微管蛋白抑制剂有望克服这些不足。

2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酸4-甲硫基苄酯(IMB5046)是本课题组从化合物库中筛选得到的一种具有全新结构的微管蛋白聚合抑制剂<sup>[12]</sup>。之前的研究显示IMB5046结合于秋水仙碱位点上,对秋水仙碱、长春新碱及紫杉醇耐受的细胞株表现出较强的杀伤活性<sup>[12]</sup>。本文报道了IMB5046的合成线路及其体外抗血管生成活性。根据IMB5046的结构特点,本研究以2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酸(化合物**1**)与4-甲硫基苄醇(化合物**2**)反应生成IMB5046。采用荧光法、MTT法、流式细胞术、划痕实验、Transwell实验及内皮小管生成实验等检测化合物对血管内皮细胞微管聚合、增殖、周期、运动及血管生成的影响。实验结果显示两种原料药均不具备微管聚合抑制活性及细胞增殖抑制活性。IMB5046将内皮细胞阻滞于G<sub>2</sub>/M期,可显著抑制内皮细胞的增殖、运动及内皮小管的生成,表明IMB5046有望成为一种具有抗血管生成活性的靶向微管药物。

## 材料与方 法

**仪器** 质谱分析: Q-TOF串联质谱仪(美国AB Sciex公司,型号QSTAR),APCI源,分辨率调节为8 000,溶剂: 甲醇,NC为2,温度300 °C;核磁共振分析: Bruker AV500-III核磁共振仪(德国Bruker公司),<sup>1</sup>H NMR核磁共振频率为500 MHz,TMS为内标,溶剂CDCl<sub>3</sub>;高效液相色谱分析: UltiMate 3000液相色谱系统(美国Thermo Fisher Scientific公司),色谱柱采用资生堂CAPCELL PAK C18反相色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相: 乙腈-水(0.1% TFA)溶液,将约1 mg IMB5046样品溶解于3 mL流动相中,得到测试液,

柱温40 °C,进样量5 μL,流速1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长400 nm,采用面积归一化法计算化合物纯度;全波长扫描采用DU800型紫外/可见分光光度计(美国Beckman公司)。

**制备 2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酰氯** 将2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酸溶于由甲苯与二甲基甲酰胺按照体积比1:0.1~1:0.2组成的混合溶剂中,得到浓度为1.0%~2.5%的2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酸溶液(以重量计),然后在温度50~80 °C的条件下搅拌0.8~1.2 h,接着滴加浓度为50%~70%的亚硫酸氯甲苯溶液(以重量计),其中2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酸与亚硫酸氯的摩尔比为1:1~1:6,在同样的温度下继续反应4~8 h,得到的反应液进行减压蒸干,得到一种蒸干物W1;按照蒸干物W1(以克计)与乙醚的比为1:50~1:80(以毫升计),让蒸干物W1在乙醚中于室温条件下进行重结晶,分离的结晶物在红外灯下于温度50~60 °C的条件下进行干燥,得到2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酰氯。

**制备 2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酸4-甲硫基苄酯** 在温度0 °C与搅拌的条件下,将4-甲硫基苄醇完全溶于吡啶中得到浓度为3%~10%的溶液I(以重量计),同时将步骤“制备2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酰氯”得到的2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酰氯溶于二氯甲烷中得到浓度为10%~20%的溶液II(以重量计);然后,按照4-甲硫基苄醇与2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酰氯的摩尔比1:1.0~1:1.2把溶液II滴加到溶液I中,在温度2~-2 °C的条件下搅拌0.8~1.2 h,接着在室温下反应一夜,该反应液再减压蒸干,得到一种蒸干物W2;按照蒸干物W2与硅胶的质量比1:1~1:3,将蒸干物W2与硅胶混合,然后按照蒸干物W2(以克计)和硅胶混合物与二氯甲烷(以毫升计)的比为1:2.0~1:6.0,将蒸干物W2和硅胶混合物加入二氯甲烷溶剂中,然后在温度40~50 °C的条件下蒸干得到蒸干物,把这种蒸干物加到硅胶柱上层,再使用苯与乙酸乙酯按照体积比3:0.4~3:0.6组成的混合溶剂在室温、减压的条件下进行洗脱,收集的洗脱液进行减压蒸干,得到一种蒸干物W3;按照蒸干物W3(以克计)与乙醚(以毫升计)的比为1:20~1:30,让蒸干物W3在乙醚和室温条件下进行重结晶,分离的结晶物在红外灯下在温度50~60 °C的条件下干燥,得到化合物2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酸4-甲硫基苄酯。

**细胞培养** 人微血管内皮细胞HMEC-1为本实验室保存,用含10%胎牛血清的DMEM培养基(Hyclone公司)培养于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱。人肝癌细胞HepG2及肺癌细胞NCI-H460为本实验室保存,用含

10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (Hyclone 公司) 培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱。

**MTT 检测** 取对数生长期的细胞消化、计数, 按细胞数 4 000 个/孔接种于 96 孔板, 培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱 24 h 后, 分别加入不同浓度的药物, 每个药物浓度设 3 个平行孔。继续培养 48 h 后, 每孔加入以磷酸盐缓冲液溶解的四唑盐 (MTT, 5 mg·mL<sup>-1</sup>) 20 μL, 37 °C 继续培养 4 h 后, 吸弃上清液, 加入 150 μL DMSO, 室温下摇床振摇 10 min, 酶标仪上测定 570 nm 的光吸收值 (A)。每次实验均设无药对照孔和无细胞空白孔各 3 个。按公式 [抑制率%=(A<sub>对照组</sub>-A<sub>给药组</sub>)/(A<sub>对照组</sub>-A<sub>空白组</sub>)×100%] 计算药物对细胞的增殖抑制率。

**荧光实验** HMEC-1 细胞按 1.5×10<sup>4</sup> 个/孔种 4 腔室 35 mm 玻底培养皿 (Cellvis 公司), 待细胞长至 80% 满, 加入终浓度 100 nmol·L<sup>-1</sup> SiR-tubulin (Cytoskeleton 公司), 继续培养 12 h 后, 加入待测药物 1 h, 荧光显微镜拍照 (Olympus IX81), 观察微管骨架及细胞形态。

**细胞周期检测** 取对数生长期的 HMEC-1 细胞消化、计数, 按细胞数 2×10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板, 培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱; 24 h 后, 加入 IMB5046, 继续培养 24 h 后, 消化、收集细胞, 用磷酸盐缓冲液洗 2 遍, 70% 乙醇 4 °C 固定过夜; 加入终浓度为 50 μg·mL<sup>-1</sup> 碘化丙啶 (PI) 及 100 μg·mL<sup>-1</sup> RNA 酶 A, 室温下避光放置 30 min 后, 流式细胞仪检测细胞周期 (BD FACS Calibur Cytometer)。

**划痕实验** HMEC-1 细胞按 5×10<sup>5</sup> 个/孔种 6 孔板, 待细胞长满孔板 (约 24 h) 用 200 μL 移液器头划痕, 磷酸盐缓冲液洗 3 次, 去除划下的细胞; 加入含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 同时加入不同浓度的药物继续培养, 在加药时及加药后 24 h 分别拍照 (Motic AE31 显微镜)。Image J 软件 (version 1.49, National Institutes of Health) 分析细胞迁移的面积, 计算抑制率。

**Transwell 实验** 取对数生长期的 HMEC-1 细胞, 胰酶消化并收集细胞, 用含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液洗涤细胞 3 次, 用无血清的 DMEM 培养液重悬细胞 (每毫升细胞数 1×10<sup>6</sup> 个)。取 100 μL 细胞悬液加入 Transwell (Millipore 公司) 上室, 同时加入不同浓度的药物; 在 Transwell 的下室加入含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液 600 μL, 37 °C 培养 4 h。取出上室, 用棉签擦掉上层细胞, 加入甲醇固定 3 min, 弃固定液, 加入 0.1% 结晶紫染液, 染色 20 min, 双蒸水洗 3 遍, 显微镜下拍照 (Motic AE31 显微镜); 随机统计 5 个视野的跨膜细胞数, 计算跨膜抑制率。

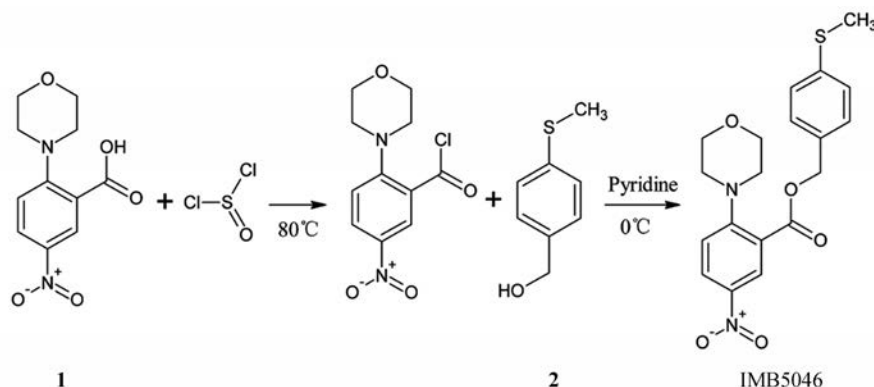
**内皮小管生成实验** 基质胶 (威格拉斯生物技术有限公司) 4 °C 溶解过夜, 按每孔 150 μL 加入预冷的 48 孔板, 37 °C 聚合 4~6 h。HMEC-1 细胞按 4×10<sup>4</sup> 个/孔种板, 加入不同浓度的药物, 继续培养 16 h 后, 显微镜拍照 (Motic AE31)。Image J 软件 (version 1.49, National Institutes of Health) 分析小管长度及节点数目。

**统计学方法** 统计分析运用 Excel 软件进行 (Microsoft Office Standard 2013), *t* 检验用于分析组间的差异。*P*<0.05 被认为在统计学上有差异, *P*<0.01 为显著性差异。

## 结果

### 1 IMB5046 的合成及鉴定

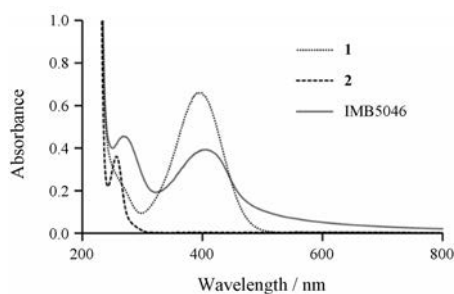
IMB5046 的合成过程见路线 1。首先, 将 2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酸与亚硫酸氯反应转化成 2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酰氯; 接着与 4-甲硫基苄醇反应制得 2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酸 4-甲硫基苄酯。终产物结构经 <sup>1</sup>H NMR、HR-MS 确证, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 2.49 (s, 3H, S-Me), 3.15 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H, 2N(CH<sub>2</sub>)), 3.75 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H, 2O(CH<sub>2</sub>)), 5.31 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 6.96 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, ArH), 7.27 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ArH), 7.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ArH), 8.22 (dd, *J* = 9.0,



Scheme 1 Synthetic route of IMB5046

2.5 Hz, 1H, ArH), 8.61 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, ArH)。质谱结果表明终产物的分子离子峰 389.117 0  $[M+H]^+$  (Calcd. for  $C_{19}H_{21}N_2O_5S$  389.116 6)。由这些测定数据可以确定, 这个步骤所得到的终产物即是 IMB5046。HPLC 分析表明终产物的纯度为 99.86%。

全波长扫描显示化合物 **1** 在 393 nm 处存在最大吸收峰, 化合物 **2** 在 257 nm 处存在最大吸收峰, IMB5046 在 269 nm 及 406 nm 处均存在吸收峰 (图 1)。



**Figure 1** Full wavelength scan of compound **1**, **2** and IMB5046

## 2 三种化合物对细胞增殖的影响

MTT 法检测 3 种化合物对血管内皮细胞及肿瘤细胞增殖的影响。10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  化合物 **1**、**2** 处理细胞 48 h 后, 对人微血管内皮细胞 HMEC-1、人肝癌细胞 HepG2 及人肺癌细胞 NCI-H460 的生长没有明显影响。10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  IMB5046 对 HMEC-1 细胞的增殖抑制率为 45.9%。IMB5046 对 HepG2 细胞及 NCI-H460 细胞的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.102\pm 0.020$  及  $0.165\pm 0.046$   $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (表 1)。

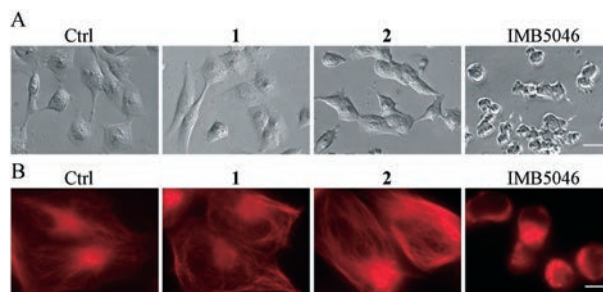
**Table 1** Effect of three compounds on cell proliferation.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $>10$  indicates that 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  compound shows no obvious effect on cell proliferation. \*Inhibitory rates of 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  IMB5046

| Compd.   | $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ |                   |                   |
|----------|---|-------------------|-------------------|
|          | HMEC-1                                    | HepG2             | NCI-H460          |
| <b>1</b> | > 10                                      | > 10              | > 10              |
| <b>2</b> | > 10                                      | > 10              | > 10              |
| IMB5046  | 45.9%*                                    | $0.102 \pm 0.020$ | $0.165 \pm 0.046$ |

## 3 三种化合物对血管内皮细胞形态及微管骨架的影响

微管抑制剂作用于细胞时, 会引起细胞形态的改变, 本研究比较了两种原料药及 IMB5046 对血管内皮细胞形态的影响。HMEC-1 运用药物处理 1 h 后, 观察细胞形态。10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  化合物 **1**、**2** 对细胞形态没有明显影响。1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  IMB5046 处理后细胞收缩变圆, 且可观察到明显的细胞膜出泡现象 (图 2A)。

荧光法检测 3 种化合物对血管内皮细胞微管骨架的影响。SiR-tubulin 可在活细胞中标记微管, HMEC-1

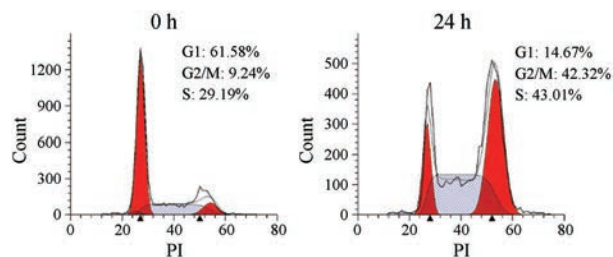


**Figure 2** Effect of three compounds on morphology and microtubule structure in HMEC-1 cells. A: HMEC-1 cells were treated with 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  compound **1**, **2** or 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  IMB5046, respectively, for 1 h, then visualized by phase contrast microscopy. White arrow indicates the membrane blebs. (bar = 30  $\mu\text{m}$ ); B: HMEC-1 cells were labeled with SiR-tubulin for 12 h, then treated with 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  compound **1**, **2** or 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  IMB5046, respectively, for 1 h, and photographed under fluorescence microscopy (bar = 10  $\mu\text{m}$ )

细胞与 SiR-tubulin 孵育 12 h 后, 加入不同浓度的药物处理细胞 1 h, 荧光显微镜检测。结果显示 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  化合物 **1**、**2** 对微管骨架无明显影响, 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  IMB5046 引起微管骨架的解聚 (图 2B)。

## 4 IMB5046 将内皮细胞阻滞于 $G_2/M$ 期

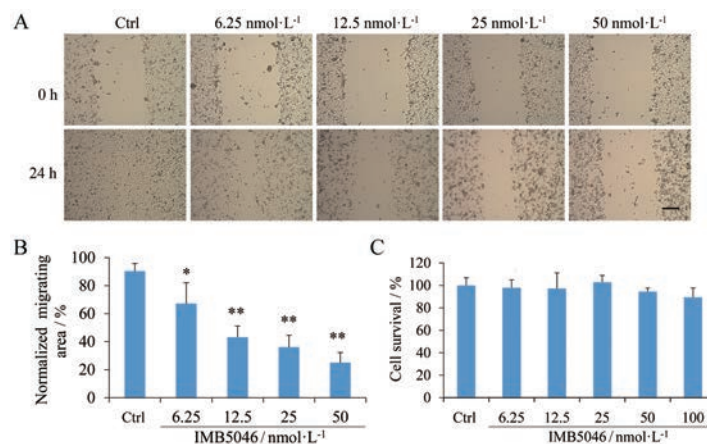
微管抑制剂可诱导细胞周期的阻滞, 本研究探讨了 IMB5046 对 HMEC-1 细胞周期的影响。1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  IMB5046 作用 24 h 后, 流式细胞术检测细胞周期的变化。结果显示,  $G_2/M$  期细胞的比例由 9.24% 上升至 42.32%,  $G_1$  期细胞的比例由 61.58% 下降至 14.67%。说明 IMB5046 将细胞周期阻滞于  $G_2/M$  期 (图 3)。



**Figure 3** IMB5046 arrests HMEC-1 cells at  $G_2/M$  phase. HMEC-1 cells were treated with 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  IMB5046 for 24 h, then stained with PI and analyzed by flow cytometry

## 5 IMB5046 抑制内皮细胞的运动

内皮细胞的增殖、运动及内皮小管的形成在新生血管的生成过程中发挥着重要<sup>[13]</sup>, 划痕实验可检测药物对细胞运动能力的影响。HMEC-1 细胞接种 6 孔板, 细胞贴壁 24 h 后, 划痕并加入不同浓度的 IMB5046, 24 h 后检测划痕愈合情况。结果显示, IMB5046 可显著抑制划痕的愈合 (图 4A), 且呈明显的浓度依赖性



**Figure 4** IMB5046 suppresses the migration of HMEC-1 cells evaluated by scratch assay. Representative results (A) and quantitative data (B) of scratch wound-healing migration in cells treated with IMB5046 were shown.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group (Ctrl). (bar = 200  $\mu\text{m}$ ). C: Effect of IMB5046 on the proliferation of HMEC-1 cells after 24-h treatment.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

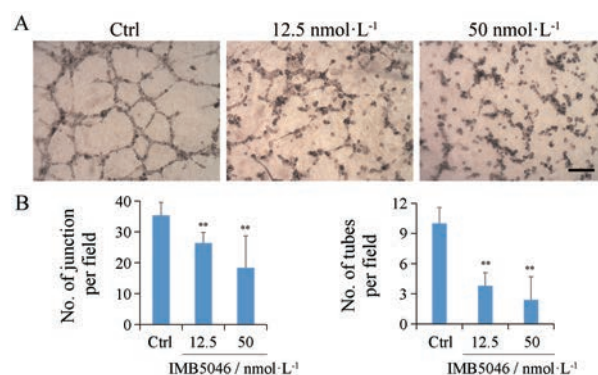
(图4B)。按细胞迁移的面积计算 50 nmol·L<sup>-1</sup> IMB5046 抑制率为 72.3%。MTT 结果显示, 50 和 100 nmol·L<sup>-1</sup> IMB5046 作用 24 h 后, 对 HMEC-1 细胞增殖抑制率为 5.6% 和 10.6% (图 4C), 与对照组相比细胞存活率均无显著差异, 说明 IMB5046 能特异性地抑制 HMEC-1 细胞的运动能力。

本研究进一步运用 Transwell 实验检测了 IMB5046 对 HMEC-1 细胞跨膜运动能力的影响。将 HMEC-1 细胞接种于 Transwell 上室, 12.5 和 50 nmol·L<sup>-1</sup> IMB5046 作用 4 h 后, 跨膜细胞数分别减少了 30% 和 47% (图 5A, B)。

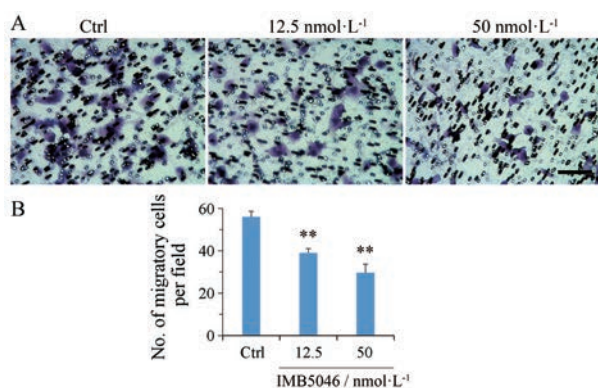
## 6 IMB5046 体外抑制内皮小管生成

内皮小管形成实验可在体外检测药物对血管生成的影响。HMEC-1 细胞接种于基质胶上, 同时加入不同浓度的 IMB5046, 继续培养 16 h 后, 显微镜观察。结果如图 6 所示, IMB5046 破坏内皮小管的生成, 12.5 和

50 nmol·L<sup>-1</sup> IMB5046 分别使小管数减少了 62% 及 77%, 节点数减少了 25.4% 及 48%。由于 12.5 和 50 nmol·L<sup>-1</sup> IMB5046 对 HMEC-1 细胞无明显细胞毒活性, 说明 IMB5046 可特异性抑制内皮小管的生成。



**Figure 6** IMB5046 inhibits tube formation of endothelial cells. A: The effects of IMB5046 on tube formation of HMEC-1 cells on matrigel (bar = 200  $\mu\text{m}$ ); B: Statistical analysis of the number of junctions and tubes after treatment. Data are expressed as  $\bar{x} \pm s$  from five random fields. \*\* $P < 0.01$  vs Ctrl



**Figure 5** IMB5046 inhibits the migration of HMEC-1 cells evaluated by Transwell assay. A: Representative results; B: Statistical analysis of the number of migratory cells. Data are expressed as  $\bar{x} \pm s$  from five random fields. \*\* $P < 0.01$  vs Ctrl (bar = 100  $\mu\text{m}$ )

## 讨论

微管是除 DNA 外, 抗肿瘤药物最重要的靶点<sup>[3]</sup>。微管抑制剂广泛用于肿瘤的治疗, 但都不可避免地存在耐药性, 且这些化合物合成困难、水溶性差, 筛选新型微管抑制剂尤为必要。IMB5046 是本课题组从约 4 万个化合物中筛选得到的具有全新结构的微管蛋白聚合抑制剂, 先前的研究显示 IMB5046 能显著抑制人异种移植瘤的生长<sup>[12]</sup>, 且由于其较小的分子量, IMB5046 是很有潜力的抗肿瘤药物。本研究以 2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酸与 4-甲硫基苄醇通过两步反应生成 IMB5046, 具有方法简单易于纯化的特点。本文对比研究了 2 种

原料药与 IMB5046 的药理活性, 结果表明两种原料药均不具备微管抑制活性及细胞增殖抑制活性, 只有生成 IMB5046 后才具备活性, 说明 IMB5046 的两部分结构对其与微管蛋白结合并发挥聚合抑制活性缺一不可。

研究显示, 微管抑制剂可抑制肿瘤新生血管的生成, 且可破坏已形成的血管<sup>[5,14]</sup>。本研究表明, IMB5046 可抑制血管内皮细胞的增殖、运动及内皮小管的形成, 说明 IMB5046 体外具备血管生成抑制活性。由于 IMB5046 能强烈抑制肿瘤细胞的增殖并诱导细胞凋亡<sup>[12]</sup>, 同时能抑制肿瘤血管的生成, IMB5046 可通过直接杀伤肿瘤细胞和间接饿死肿瘤细胞而发挥双重抗肿瘤活性。肿瘤血管为肿瘤细胞的转移提供了通道, IMB5046 可通过破坏肿瘤血管而抑制肿瘤细胞的转移。肿瘤血管内皮细胞通常为正常细胞, 基因组相对稳定, 不易产生耐药性; 且 IMB5046 不是 P-gp 糖蛋白底物, 对耐药肿瘤细胞具有较强的杀伤活性<sup>[12]</sup>, IMB5046 有望为耐药及复发的肿瘤患者提供新的治疗选择。

本文侧重于 IMB5046 的合成及体外抗血管生成活性研究, 其体内抗血管生成活性仍需进一步实验证实。课题组将在后续实验中运用鸡胚绒毛尿囊膜实验、动物模型等研究 IMB5046 的体内抗血管生成活性, 并对其在体内生物学效应、代谢动力学和毒副作用等进行研究。另外, 由于 IMB5046 具有较强的细胞毒活性, 导致其用药窗较窄, 且水溶性较差, 改进 IMB5046 的剂型如制备白蛋白结合型纳米粒、抗体药物偶联物及脂质体药物等有望进一步提高 IMB5046 的疗效, 为其临床应用提供基础。

本研究以 2-(4-吗啉基)-5-硝基苯甲酸与 4-甲硫基苄醇通过两步反应生成 IMB5046, 具有方法简单易于纯化的特点。两种原料药均不具备微管抑制活性及细胞增殖抑制活性。IMB5046 体外具备血管生成抑制活性, 有望在克服肿瘤耐药及抑制肿瘤转移领域发挥作用。

## References

[1] Parker AL, Kavallaris M, McCarroll JA. Microtubules and their

role in cellular stress in cancer [J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 153.

- [2] Howard J, Hyman AA. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end [J]. *Nature*, 2003, 422: 753-758.
- [3] Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 790-803.
- [4] Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 253-265.
- [5] Kanthou C, Tozer GM. Microtubule depolymerizing vascular disrupting agents: novel therapeutic agents for oncology and other pathologies [J]. *Int J Exp Pathol*, 2009, 90: 284-294.
- [6] Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 194-204.
- [7] Dumontet C, Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17: 1061-1070.
- [8] Pabla N, Sparreboom A. CCR 20th anniversary commentary: BMS-247550—microtubule stabilization as successful targeted therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21: 1237-1239.
- [9] Arora S, Wang XI, Keenan SM, et al. Novel microtubule polymerization inhibitor with potent antiproliferative and antitumor activity [J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 1910-1915.
- [10] Cavaletti G, Cavalletti E, Oggioni N, et al. Distribution of paclitaxel within the nervous system of the rat after repeated intravenous administration [J]. *Neurotoxicology*, 2000, 21: 389-393.
- [11] Ohsumi K, Nakagawa R, Fukuda Y, et al. Novel combretastatin analogues effective against murine solid tumors: design and structure-activity relationships [J]. *J Med Chem*, 1998, 41: 3022-3032.
- [12] Zheng YB, Gong JH, Liu XJ, et al. A novel nitrobenzoate microtubule inhibitor that overcomes multidrug resistance exhibits antitumor activity [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31472.
- [13] Su M, Huang J, Li J, et al. ZLM-7 exhibits anti-angiogenic effects via impaired endothelial cell function and blockade of VEGF / VEGFR-2 signaling [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 19018-19030.
- [14] Pasquier E, Honoré S, Braguer D. Microtubule-targeting agents in angiogenesis: where do we stand? [J]. *Drug Resist Updat*, 2006, 9: 74-86.