

## 咖啡酸苯乙酯衍生物 PEC01 抗小鼠 G422 神经胶质瘤 药效学作用及其机制

郑凯露<sup>1</sup>, 唐梅<sup>1</sup>, 邓海东<sup>1</sup>, 刘思齐<sup>1</sup>, 刘晓宇<sup>2\*</sup>, 李燕<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室, 北京 100050;  
2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 活性物质发现与适药  
化研究北京市重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 本研究旨在初步探索 PEC01 抑制小鼠 G422 神经胶质瘤的活性及其作用机制。采用 MTT 法、流式细胞术 (FCM)、细胞划痕实验和 Transwell 细胞穿膜实验分别检测 PEC01 对 G422 细胞增殖、凋亡、迁移能力的影响。采用皮下移植的小鼠 G422 胶质瘤模型评价 PEC01 的体内药效学。动物福利和实验过程均遵循中国医学科学院北京协和医学院药物研究所动物伦理委员会的规定。Western blot 检测 PEC01 作用 2、96 h 的 G422 细胞及 30.0 mg·kg<sup>-1</sup> PEC01 给药后的小鼠 G422 肿瘤组织中 EGFR、Src 及下游 MAPK/ERK、PI3K/Akt/mTOR 通路蛋白水平。结果显示, PEC01 以时间和剂量依赖性方式明显抑制体外 G422 细胞增殖, 96 h 作用时的 IC<sub>50</sub> 为 (9.02 ± 0.36) μmol·L<sup>-1</sup>; PEC01 (10.0 和 20.0 μmol·L<sup>-1</sup>) 作用 96 h 后, 可明显诱导 G422 细胞发生早期和晚期凋亡; PEC01 [(0.625~5.0) μmol·L<sup>-1</sup>] 在 12~48 h 剂量依赖性显著抑制 G422 细胞划痕愈合能力; 与 DMSO 组相比, 不同浓度 PEC01 (5.0、10.0 和 20.0 μmol·L<sup>-1</sup>) 作用 8 h 后 Transwell 穿膜的 G422 细胞数量明显减少。体内药效学实验中, PEC01 (30.0 和 60.0 mg·kg<sup>-1</sup>) 作用 14 天后的瘤重抑制率分别为 72.29% 和 59.44%。Western blot 结果显示, 与 DMSO 组相比, PEC01 在 2 和 96 h 作用时, G422 细胞中 p-EGFR、p-Src 蛋白表达明显降低; PEC01 作用 96 h 后 G422 细胞中 MAPK/ERK、PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白以及 c-myc 和 HIF-1α 表达下调; 侵袭转移相关蛋白 Snail、N-cadherin 和 MMP-9 表达明显降低; cyclin E1、cyclin B1/CDK1 蛋白水平明显下调。研究结果表明, 咖啡酸苯乙酯衍生物 PEC01 具有较好的体内外抗小鼠 G422 胶质瘤活性, 其抗肿瘤作用可能是通过抑制 EGFR、Src 激酶活性和表达水平, 调控下游 MAPK/ERK、PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 进而通过抑制肿瘤细胞增殖, 促进肿瘤细胞凋亡、抑制侵袭转移等作用实现的。

**关键词:** 神经胶质瘤; 咖啡酸苯乙酯; 表皮生长因子受体; Src; MAPK/ERK 信号通路; PI3K/Akt/mTOR 信号通路  
中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)04-1063-10

## The antitumor activity and mechanisms of action caffeic acid phenethyl ester derivative PEC01 in mouse G422 glioma

ZHENG Kai-lu<sup>1</sup>, TANG Mei<sup>1</sup>, DENG Hai-dong<sup>1</sup>, LIU Si-qi<sup>1</sup>, LIU Xiao-yu<sup>2\*</sup>, LI Yan<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Beijing Key Laboratory of Active Substance Discovery and Druggability Evaluation, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** This study aimed to research the antitumor activity and mechanisms of caffeic acid phenethyl ester derivative PEC01 in mouse G422 glioma. MTT assay, flow cytometry (FCM) and Transwell migration assay were

收稿日期: 2022-02-25; 修回日期: 2022-03-23.

\*通讯作者 Tel: 86-10-63169181, E-mail: liyanxiao@imm.ac.cn; lxya@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0248

used to detect the effects of PEC01 on proliferation, apoptosis, and migration of G422 cells respectively. Mouse subcutaneously transplanted G422 tumor model was used to analyse the effect of PEC01 on the growth of glioma *in vivo*. Animal welfare and experimental procedure are in accordance with the regulations of the Animal Ethics Committee of institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College. Western blot was used to detect the protein levels of epidermal growth factor receptor (EGFR), Src and their downstream signaling pathways in G422 cells and tumor tissue. The results showed that PEC01 inhibited proliferation of G422 cells in a time- and dose-dependent manner, with  $IC_{50}$  of  $(9.02 \pm 0.36) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  at 96 h. PEC01 significantly induced early apoptosis and late apoptosis of G422 cells at 10.0 and 20.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  concentrations for 96 h. Scratch healing rate of G422 cells reduced after treated with different concentrations (0.625–5.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of PEC01 for 12–48 h in scratch healing assay. The number of transmembrane G422 cells decreased in groups treated with PEC01 for 8 h compared with DMSO group. The average tumor weight of groups treated with 30.0 and 60.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  PEC01 was significantly reduced in G422 insubcutaneously transplanted tumor model, and the inhibition rate of tumor weight was 72.29% and 59.44%, respectively. Protein levels of EGFR, Src, c-myc and hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ) decreased significantly in G422 cells and tumor tissue. The mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway related proteins were down-regulated. Related proteins of invasion, metastasis and cell cyclin were significantly down-regulated. PEC01 can suppress the growth of G422 glioma *in vitro* and *in vivo*. The antitumor activity of PEC01 in mouse subcutaneously transplanted G422 tumor model might be related to the blockade of PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK signaling pathways.

**Key words:** glioma; caffeic acid phenethyl ester; epidermal growth factor receptor; Src; MAPK/ERK pathway; PI3K/Akt/mTOR pathway

2015年我国脑瘤发病率和死亡率分别位于恶性肿瘤第8位(7.72/10万)和第9位(4.10/10万)<sup>[1]</sup>。胶质瘤(glioma)是最常见的原发性颅内肿瘤,约占所有恶性脑肿瘤的81%<sup>[2]</sup>,而其中约57%为恶性程度最高(WHO 2021 IV级)<sup>[3]</sup>的胶质母细胞瘤(glioblastoma)<sup>[4]</sup>。神经胶质瘤预后和生存期望根据肿瘤亚型和分级的不同存在巨大差异,其中最常见且危险程度最高的胶质母细胞瘤预后极差,尽管近年来其综合治疗手段不断强化[包括手术治疗、放射治疗和化学药物治疗(以替莫唑胺为代表)],胶质母细胞瘤患者的生存期望并没有明显改善,其5年生存率仅为4.7%<sup>[2]</sup>。神经胶质瘤治疗药物的研究具有广阔的开发应用前景。

咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)是天然产物蜂胶提取物的主要活性成分之一,具有多种重要的生物学特性,包括抗癌、抗炎、抗病毒及免疫调节等<sup>[5]</sup>。药代动力学研究表明,CAPE易在大鼠体内水解为其主要的代谢产物咖啡酸,因此设计更稳定且生物活性更高的CAPE衍生物对其在抗肿瘤方面的开发应用具有重要意义。PEC01(图1A)是根据CAPE的结构母核设计合成的查尔酮骨架衍生物,目的在于提高CAPE抗肿瘤活性和代谢稳定性。前期分子对接和QTRP(quantitative thiol reactivity profiling)的分析方法显示PEC01为多靶点化合物,初步的体内外药效学研究表明PEC01对肝癌、肺癌和结肠癌移植瘤均具

有明显的生长抑制作用<sup>[6]</sup>。基于前期研究结果,本研究旨在初步探索PEC01对胶质瘤的体内外抗肿瘤活性和作用机制,为其进一步开发提供理论和实验依据。

## 材料与amp;方法

**试剂及仪器** DMEM高糖培养基(美国Gibco公司);胰蛋白酶和MTT(北京索莱宝生物科技有限公司);Annexin V-APC/PI细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);Transwell嵌套件(美国Corning公司);伤口愈合插件(美国ibidi公司);fibronectin(0.2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、高效RIPA组织/细胞快速裂解液和BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司);Western blot抗体(美国Cell Signal Technology和英国Abcam公司)。美国Thermo Forma CO<sub>2</sub>细胞培养箱;Thermo Fisher Multiskan MK3酶标仪;美国BD Accuri C6流式细胞分析仪;日本Olympus IX70倒置显微镜;美国通用电气公司GE Image Quant LAS4000超敏发光仪。

**细胞系与细胞培养** 处于对数生长期的小鼠G422神经胶质瘤细胞株(购自广州吉妮欧生物技术有限公司)经0.25%胰蛋白酶消化液消化后悬于含15%胎牛血清(FBS)、100  $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的DMEM完全培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,每2~3天传代备用。

**药物与化合物** 替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 购自上海博朗生物科技有限公司。化合物PEC01为中国医学科学院药物研究所药物化学合成室谢平研究员课题组合成。体外实验中, PEC01溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 并置于4 °C避光保存。DMSO作为体外实验的溶剂对照, 终浓度为0.1%。体内动物实验中, PEC01和TMZ以25% PEG400为溶剂, -20 °C避光保存。

**实验动物** BALB/c小鼠30只, 雄性, SPF级, 体重16~18 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 合格证号: 110322211101491268, 动物实验伦理审查表编号: 00003259。动物福利和实验过程均遵循中国医学科学院北京协和医学院药物研究所动物伦理委员会的规定。

**MTT法检测胶质瘤细胞存活率** 处于对数生长期的G422胶质瘤细胞用胰蛋白酶消化后重悬, 镜下计数后配成每毫升 $1.5 \times 10^4$ 个的单细胞悬液, 每孔100  $\mu\text{L}$ 接种于96孔板中, 置于含5%  $\text{CO}_2$ 的37 °C培养箱中培养。24 h后加入100  $\mu\text{L}$ 含不同浓度PEC01的DMEM培养基 (DMSO终浓度为0.1%), 溶剂对照组加入含等量DMSO的培养基, 每个浓度设3个平行孔。于5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C条件下分别培养24、48、72和96 h后, 每孔加入 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的MTT溶液50  $\mu\text{L}$ 。

继续于培养箱中反应2 h后, 每孔加入200  $\mu\text{L}$  DMSO溶解甲臞结晶沉淀并混匀, 酶标仪于570 nm处检测吸光度值 ( $A_{570}$ )。以DMSO处理的肿瘤细胞为对照组, 按下列公式计算化合物对肿瘤细胞的抑制率 (IR), 并按中效方程计算 $\text{IC}_{50}$ 。细胞抑制率IR (%) =  $(A_{570 \text{ 溶剂对照组}} - A_{570 \text{ 加药组}}) / A_{570 \text{ 溶剂对照组}} \times 100\%$ 。以上实验经3次重复。

**克隆平板形成法检测集落形成** 处于对数生长期的G422胶质瘤细胞消化后制成单细胞悬液, 镜下计数后调整细胞数为每毫升150个, 按每孔2 mL接种于6孔板中。于5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C条件培养24 h后加入不同浓度的PEC01 (终浓度分别为0.078、0.156、0.312、0.625、1.25、2.5、5.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , DMSO终浓度为0.1%), 溶剂对照组加入等量DMSO, 每个浓度设置3个平行孔。继续培养10天后弃去培养基, 每孔用预冷的1×磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗2次后, 无水甲醇固定15 min, 吸弃无水甲醇, 静置风干。每孔加入1 mL吉姆萨染色液染色20 min, 洗净多余染料后室温干燥并拍照。计数每孔中染色的集落数, 以DMSO处理的肿瘤细胞为对照, 按下列公式计算化合物对肿瘤细胞集落形成抑制率 (%)。集落形成抑制率 (%) =  $(\text{集落数}_{\text{溶剂对照组}} - \text{集落数}_{\text{给药组}}) / \text{集落数}_{\text{溶剂对照组}} \times 100\%$ 。以上实验经3次重复。

**流式细胞计数法检测细胞凋亡** 采用Annexin V-

APC/PI双染方法检测PEC01对小鼠G422细胞凋亡的影响。处于对数生长期的G422细胞以每毫升 $5 \times 10^4$ 个接种于100 mL培养瓶中, 5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C条件下培养24 h后于各培养瓶中加入等体积不同浓度PEC01 (终浓度分别为2.5、5.0、10.0、20.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , DMSO终浓度为0.1%), 溶剂对照组加入等体积DMSO, 每个浓度设3瓶。继续培养96 h后, 收集并用预冷1×PBS清洗细胞。于1.5 mL EP管中加入500  $\mu\text{L}$  binding buffer重悬细胞, 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-APC染液混匀后加入5  $\mu\text{L}$  PI染液混匀。避光反应5~15 min后300目筛网过筛, Accuri C6流式细胞仪计数10 000个细胞并分析。以上实验经3次重复。

**细胞划痕实验** 收集对数生长期的G422细胞, 悬浮于含4% FBS的DMEM培养基中, 镜下计数后将细胞悬液按每孔 $5.6 \times 10^4$ 个接种于含伤口愈合插件的24孔板中。于37 °C、5%  $\text{CO}_2$ 条件培养24 h后取出伤口愈合插件, 于倒置显微镜下观察并拍照 ( $\times 100$ )。于24孔板中加入不同浓度的PEC01 (终浓度分别为0.625、1.25、2.5、5.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , DMSO终浓度为0.1%), 溶剂对照组加入等体积DMSO, 每组设3个平行孔。继续培养12、24、36、48 h后分别于镜下观察细胞迁移状态并拍照 ( $\times 100$ )。采用Image J软件进行图片处理分析, 以伤口愈合面积表示肿瘤细胞迁移能力, 并按下列公式计算伤口愈合百分比 (%)。伤口愈合百分比 (%) =  $(0 \text{ h 划痕面积} - X \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积} \times 100\%$ 。

**Transwell细胞穿膜实验** Transwell细胞培养小室的PE膜外表面涂抹10  $\mu\text{L}$  fibronectin ( $0.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 后风干, 小室中加入50  $\mu\text{L}$ 含1%牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的DMEM培养基 (不含血清和抗生素), 37 °C、5%  $\text{CO}_2$ 条件下活化30 min后吸弃。无血清培养基6 h饥饿处理对数生长期肿瘤细胞, 0.25%胰酶消化后悬浮于含0.1% BSA的DMEM培养基中 (不含血清和抗生素), 镜下计数后调整细胞数为每毫升 $7 \times 10^5$ 个。细胞悬液中加入不同浓度的PEC01 (2.5、5.0、10.0、20.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , DMSO终浓度为0.1%) 后以每孔200  $\mu\text{L}$ 接种于Transwell上腔室, 对照组加入等体积DMSO, 每组设3个平行孔。Transwell下腔加入600  $\mu\text{L}$ 含20% FBS的DMEM培养基。37 °C、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中孵育8 h后将Transwell嵌套件置于无水甲醇中固定, 后棉签擦除小室内表面细胞, 苏木精和伊红染料染色外表面细胞。倒置显微镜下计数每个Transwell膜4个视野中穿膜细胞数并计算平均数 ( $\times 200$ ), 以每孔迁移细胞数表示肿瘤细胞迁移能力, 计算化合物对肿瘤细胞的迁移抑制率 (%)。抑制率 (%) =  $(\text{迁移细胞数}_{\text{溶剂对照组}} - \text{迁移细胞数}_{\text{给药组}}) / \text{迁移细胞数}_{\text{溶剂对照组}} \times 100\%$ 。

**小鼠 G422 异位移植瘤模型** 无菌条件下取传代小鼠生长良好的 G422 肿瘤组织, 剪碎研磨, 无菌生理盐水按 1:3 比例稀释制成肿瘤细胞悬液, 按 0.2 mL 每只接种于实验小鼠左侧腋背部皮下, 接种第 2 天随机分组、称重并开始灌胃给药, 每组 5 只动物。PEC01 给药组设 30.0 和 60.0 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量组, 以 30.0 mg·kg<sup>-1</sup> TMZ 为阳性对照, 25% PEG400 为溶剂对照。TMZ 对照组灌胃给药 3 天后停药, 溶剂对照组和给药组每天 1 次连续给药。在小鼠肿瘤体积不超过 1 500 mm<sup>3</sup> 时结束实验, 所有实验动物颈椎脱臼处死, 称重, 剥取实验动物肿瘤组织并称重。根据瘤重计算肿瘤生长抑制率(%), 肿瘤生长抑制率(%) = (瘤重<sub>溶剂对照组</sub> - 瘤重<sub>给药组</sub>) / 瘤重<sub>溶剂对照组</sub> × 100%, 并进行给药组与溶剂对照组之间的统计学检验。

**Western blot 检测** 处于对数生长期的 G422 细胞消化重悬后接种于培养瓶中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 后加入等体积不同浓度的 PEC01 (终浓度分别为 1.25、2.5、5.0、10.0 μmol·L<sup>-1</sup>, DMSO 终浓度为 0.1%), 对照组加入等体积 DMSO。作用 2 和 96 h 后收集 G422 细胞。溶剂对照组和 PEC01 30.0 mg·kg<sup>-1</sup> 给药组随机选取 3 只动物肿瘤组织, 剪碎、混匀后各称取少量组织裂解。G422 细胞和肿瘤组织裂解 30 min 后于 4 °C、12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 收集蛋白, BCA 法测定蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳及转膜。含 5% 脱脂奶粉的 1×Tris 缓冲盐溶液 (Tris buffered saline with Tween-20, TBST) 室温 1 h 封闭非特异性结合位

点, 4 °C 过夜孵育一抗, 次日复温后洗膜, 二抗孵育 1 h 后清洗, 增强化学发光法曝光条带, 选择细胞骨架蛋白 β-actin 作为内参对照。每个蛋白条带均经过 3 次实验重复。

**统计学分析** 使用 SPSS Statistics 20.0 软件进行统计分析。数据以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。两组样品间数据分析采用 Student's *t*-test 检验, 多组样品间数分析采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 中的 Tukey 检验, *P* < 0.05 认为有统计学意义。

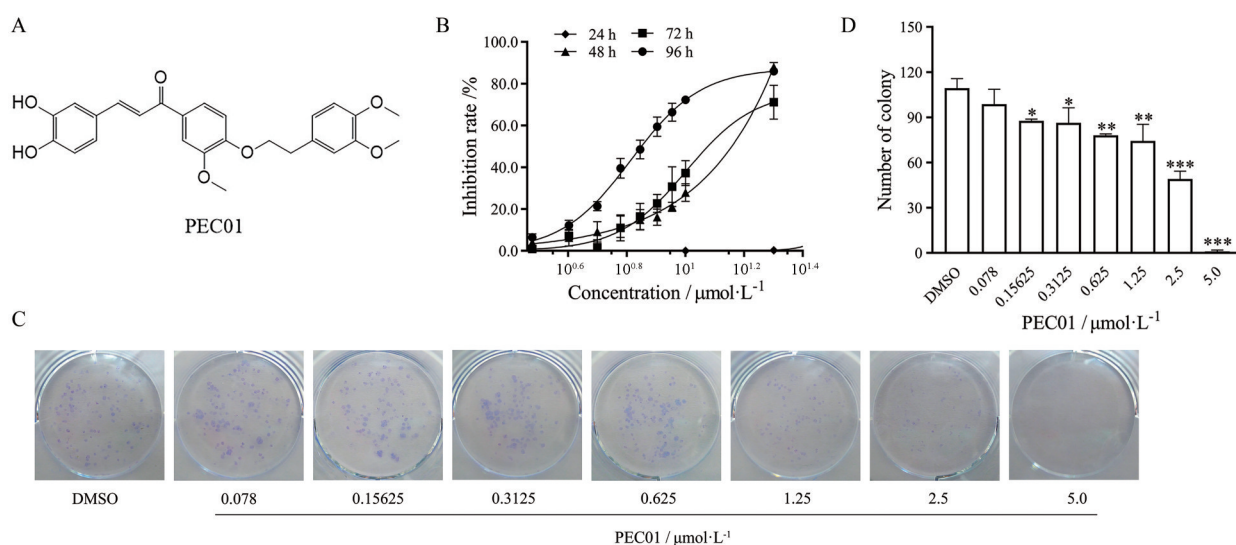
## 结果

### 1 PEC01 对小鼠 G422 细胞增殖的影响

MTT 法检测不同浓度和作用时间 PEC01 (1.0~50.0 μmol·L<sup>-1</sup>, 化学结构式见图 1A) 对小鼠 G422 胶质瘤细胞的增殖抑制作用。结果显示, PEC01 呈时间和剂量依赖地抑制 G422 细胞的增殖, PEC01 作用 96 h 后的 IC<sub>50</sub> 值为 (9.02 ± 0.36) μmol·L<sup>-1</sup> (图 1B)。平板克隆形成法进一步检测 PEC01 对小鼠 G422 细胞增殖的影响。结果显示, 0.078~5.0 μmol·L<sup>-1</sup> 时, PEC01 剂量依赖性抑制 G422 细胞集落形成 (图 1C、D)。

### 2 PEC01 对 G422 细胞凋亡的影响

FCM 检测不同浓度 PEC01 对 G422 细胞凋亡的影响。结果显示 (图 2), 10.0 和 20.0 μmol·L<sup>-1</sup> PEC01 作用 96 h 后, G422 细胞凋亡率分别为 (12.57 ± 2.69) % (早期凋亡)、(26.33 ± 1.52) % (晚期凋亡, *P* < 0.01) 和 (47.98 ± 6.11) % (早期凋亡, *P* < 0.05)、(42.10 ± 5.08) %



**Figure 1** A: Chemical structure of PEC01. B: The effect of PEC01 on the proliferation of mouse G422 cells analyzed by MTT assay ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3). PEC01 inhibited the proliferation of G422 cells in a time- and dose-dependent manner after treated with increasing doses of PEC01 (1.0–50.0 μmol·L<sup>-1</sup>) for 24, 48, 72 and 96 h. C, D: Effect of PEC01 on colony formation of G422 cells. The number of colony of G422 cells were decreased after treated with PEC01 for 11 days. The result were measured as  $\bar{x} \pm s$ , and were shown from three independent experiments performed in triplicate. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs DMSO

(晚期凋亡,  $P < 0.05$ ), 而DMSO对照组的早期凋亡和晚期凋亡率分别为  $(3.00 \pm 0.93)\%$  和  $(2.64 \pm 0.64)\%$ , 提示PEC01明显促进G422细胞发生早期凋亡和晚期凋亡。

### 3 PEC01对G422细胞迁移的影响

细胞划痕实验和Transwell细胞穿膜实验检测PEC01对小鼠G422细胞迁移能力的影响。结果显示, 细胞划痕实验中, 与溶剂对照组相比, 0.625、1.25、2.5、5.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PEC01作用12、24、36、48 h后G422细胞划痕区域的愈合速度较DMSO对照组明显减慢 ( $P < 0.05$ ), 且抑制效应呈时间和剂量依赖性(图3)。Transwell细胞迁移实验中, PEC01作用8 h后检测G422细胞穿膜情况, 结果显示, 5.0、10.0、20.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度PEC01作用下G422细胞穿膜数量明显减少, 细胞迁移抑制率分别为48.06% ( $P < 0.05$ )、47.40% ( $P < 0.01$ ) 和83.80% ( $P < 0.01$ ) (图4)。在MTT法检测G422细胞增殖实验中(图1B), PEC01在0.625~20.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下作用24 h内对G422细胞增殖无明显抑制作用, 5.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PEC01作用48 h对G422细胞增殖抑制率小于10%, 提示PEC01在不影响细胞增殖剂量下明显抑制G422细胞迁移。

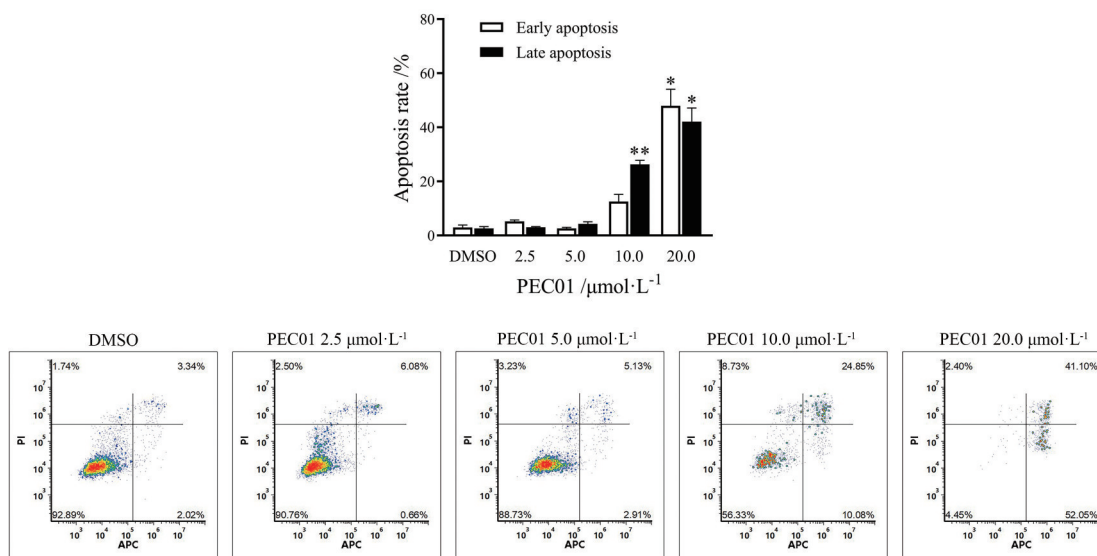
### 4 PEC01体内抗G422胶质瘤作用

采用皮下移植G422肿瘤模型评价PEC01在体内的抗肿瘤活性。结果显示(表1、图5), PEC01对小鼠G422胶质瘤具有明显生长抑制作用, PEC01 30.0和60.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量下瘤重抑制率分别达72.29% ( $P < 0.01$ ) 和59.44% ( $P < 0.05$ )。

### 5 PEC01对G422细胞及肿瘤组织中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、Src及下游相关信号通路蛋白表达水平的影响

采用Western blot方法检测PEC01作用后G422细胞和30.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  PEC01作用后肿瘤组织中EGFR、Src及下游相关信号通路蛋白表达水平。首先检测不同浓度PEC01作用2 h后G422细胞中的EGFR和Src蛋白水平。结果显示, 与DMSO对照组相比, 1.25~10.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PEC01作用2 h后G422细胞中p-EGFR和p-Src水平明显降低(图6A), 总蛋白EGFR、Src水平在10.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  剂量下有明显下降。

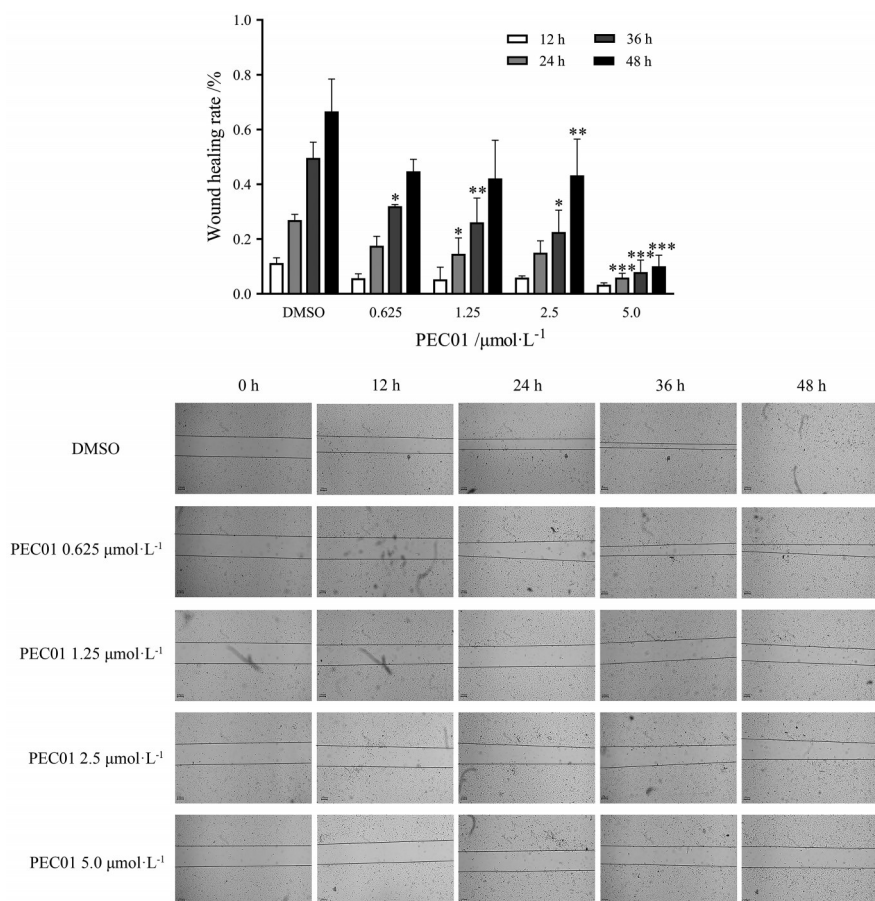
检测不同浓度PEC01 96 h作用后G422细胞中EGFR、Src蛋白水平(图6B)。磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/Akt/哺乳动物雷



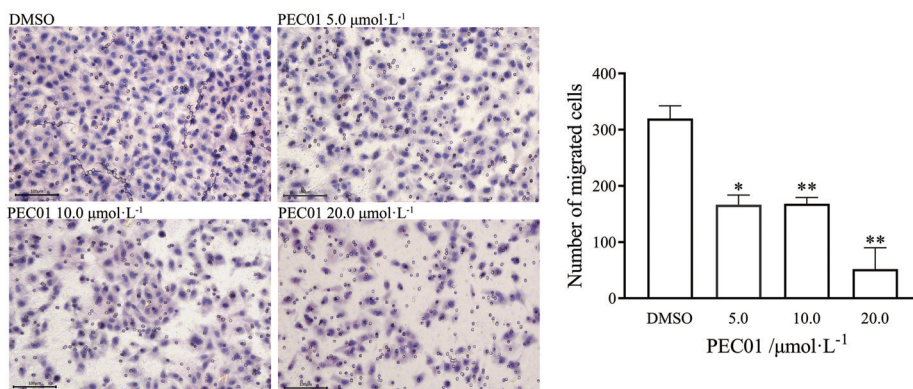
**Figure 2** Effect of PEC01 on the apoptosis of G422 cells. The result was presented with representative scatter diagrams of G422 cells staining with Annexin V-allophycocyanin (APC)/propidium iodide (PI) and quantitative bar graphs. Early apoptosis and late apoptosis of G422 cells were decreased after treated with PEC01 for 96 h. The result of quantitative bar graphs were shown from three independent experiments performed in triplicate. The result were measured as  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs DMSO

**Table 1** The effect of PEC01 on the tumor growth in the subcutaneously transplanted G422 model. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control. TMZ: Temozolomide

Group	Dose/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Schedule of administration/day	Animal	Body weight/g		Tumor weight/g	Inhibition rate/%
				Begin	End		
Control	-	-	5/5	19.0 ± 1.2	19.9 ± 1.4	1.29 ± 0.45	
TMZ	30.0	1-3	5/5	18.6 ± 0.9	20.4 ± 1.4	0.30 ± 0.18**	77.09
PEC01	30.0	1-14	5/5	18.9 ± 1.4	19.8 ± 1.7	0.36 ± 0.20**	72.29
	60.0	1-14	5/5	18.4 ± 1.3	21.6 ± 1.4	0.52 ± 0.34*	59.44



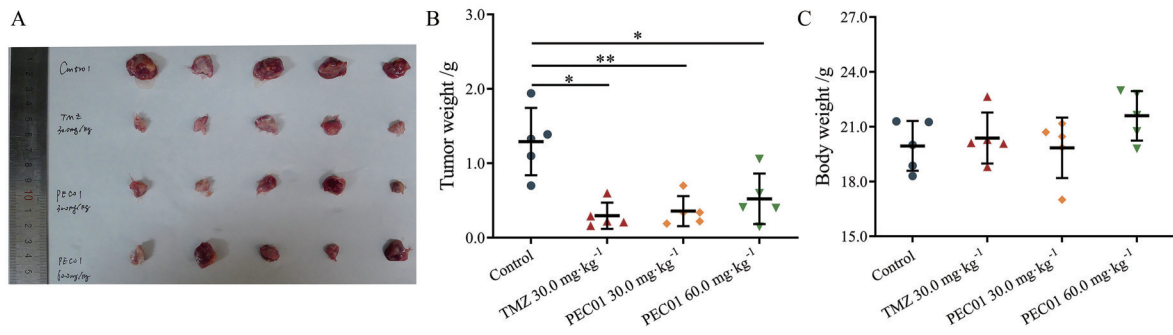
**Figure 3** Effect of PEC01 on the migration of G422 cells. The scratch area of G422 cells were measured after treated with different concentrations of PEC01 for 12, 24, 36 and 48 h and the result was counted by scratch wound healing assay related to DMSO.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . Original magnification,  $\times 100$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs DMSO. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$



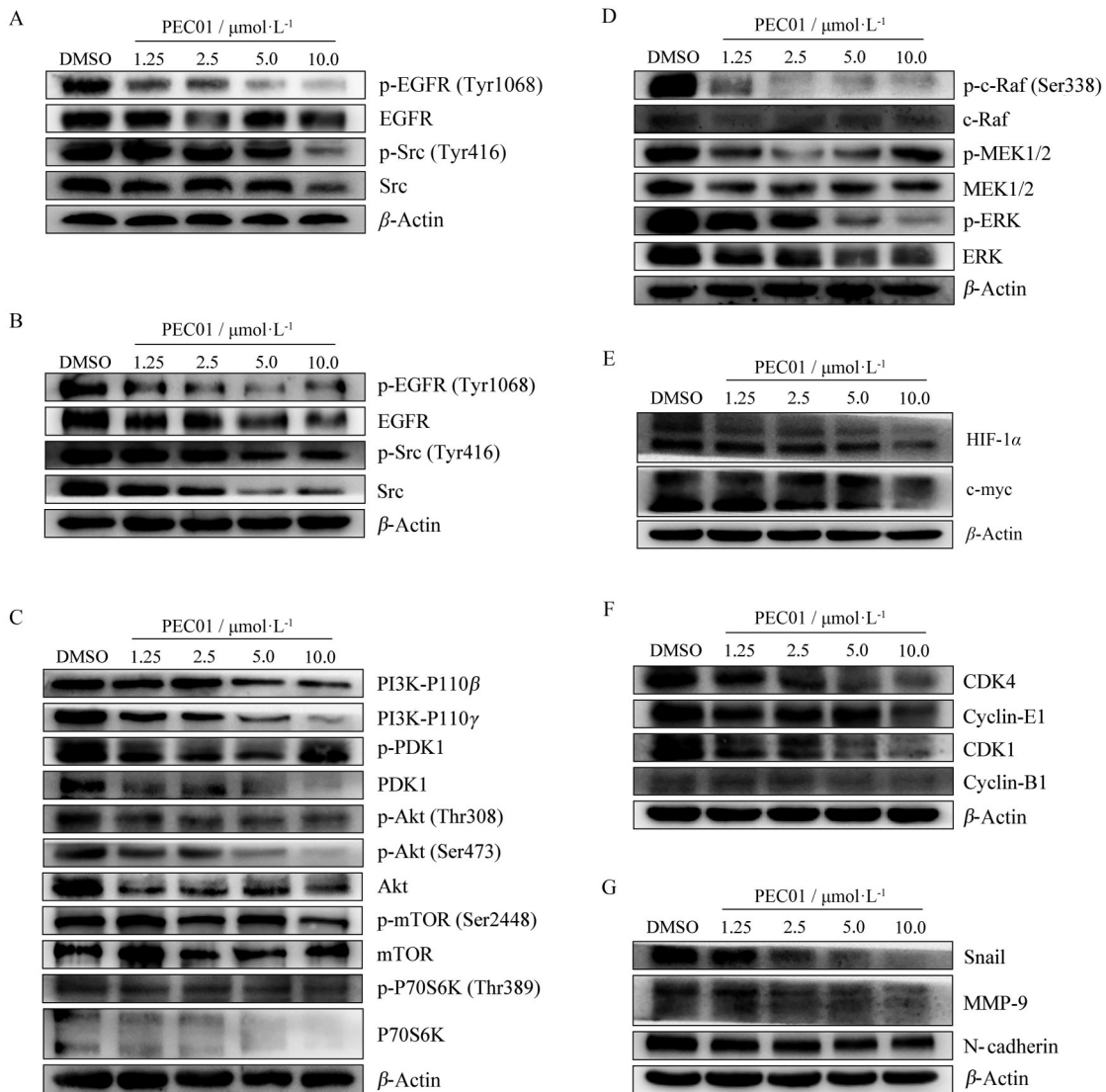
**Figure 4** Effect of PEC01 on the migration of G422 cells. The mean of migrated cells in the four fields of each sample was calculated after treated with different concentrations of PEC01 for 8 h.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . Original magnification,  $\times 200$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs DMSO. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$

帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)/细胞外调节蛋白激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 信号通路是 EGFR 下游经典信号通路, 与肿瘤的发生发展过程密切相关<sup>[7,8]</sup>。Thr389 是调控 P70S6K 体内激酶活性最重要的磷酸化

位点之一, mTORC1 激活后催化 P70S6K Thr389 位点磷酸化激活, 从而参与细胞生长、蛋白合成等多个生物学过程<sup>[9]</sup>。ERK 激活后以二聚体形式转位至细胞核中, 通过磷酸化调节多种转录因子活性, 对细胞增殖、分化、凋亡等功能进行调控<sup>[10]</sup>。检测 G422 细胞中 MAPK/ERK 和 PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白水平, 结



**Figure 5** Effect PEC01 on the tumor growth in the subcutaneously transplanted G422 model. Animals were treated with 14 days of continuous administration of PEC01 30.0 and 60.0 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively. A: Representative image of the tumors; B: The corresponding tumor weight; C: The corresponding body weight.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$



**Figure 6** The effect of PEC01 on the proteins in G422 cells. A: The effect of PEC01 on the EGFR, Src in G422 cells treated with different concentrations of PEC01 for 2 h; B-G: The effect of PEC01 on epidermal growth factor receptor (EGFR), Src (B), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway (C), mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway (D), hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ), c-myc (E), cyclin/cyclin-dependent kinases (CDKs, F), tumor invasion and migration related proteins Snail, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and N-cadherin (G) in G422 cells treated with different concentrations of PEC01 for 96 h. MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase

果显示 (图 6C、D), 不同浓度 PEC01 作用后, G422 细胞中 p-EGFR、p-Src 和总蛋白 EGFR 和 Src 水平均明显降低; PI3K 催化亚基 P110 $\beta$  和 P110 $\gamma$  及下游调控蛋白磷酸化磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 (phospho-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, p-PDK1)、p-Akt、p-mTOR、p-P70S6K 和总蛋白 PDK1、Akt、mTOR 水平均明显降低, MAPK/ERK 通路 p-c-Raf、p-MEK (phospho-mitogen-activated protein kinase kinase)、p-ERK 及总蛋白 c-Raf、MEK、ERK 表达均明显下调。

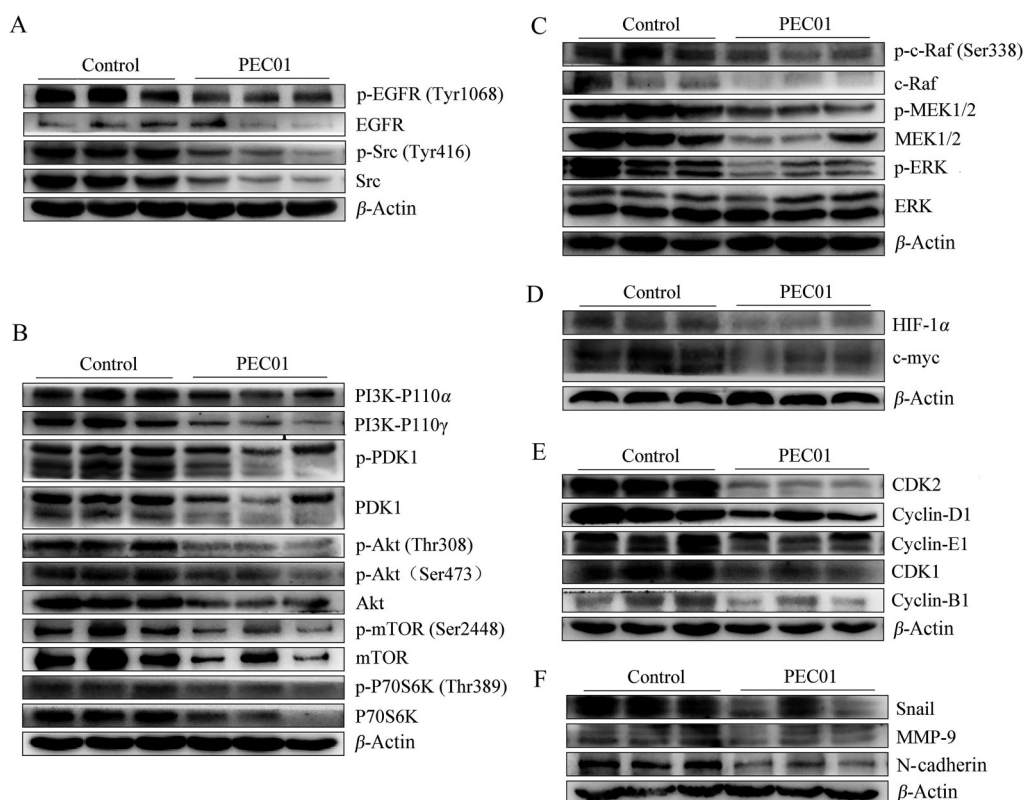
转录因子 c-myc 与细胞生长、侵袭转移、能量代谢等过程密切相关, MAPK/ERK 和 PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活可诱导 c-myc 表达和蛋白稳定<sup>[11,12]</sup>。酸性缺氧是肿瘤微环境普遍特征, 缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1 $\alpha$ ) 介导细胞对组织氧浓度变化的适应性反应, 其合成受 PI3K/Akt/mTOR 和 MAPK/ERK 信号通路的调节, HIF-1 $\alpha$  活性的增加可上调与肿瘤进展相关的多种基因, 包括代谢适应、血管生成和转移等<sup>[13,14]</sup>。Western blot 结果显示 (图 6E), 1.25~10.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PEC01 作用 96 h 后, c-myc 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达明显下调。

在包括 EGFR 在内的 RTKs 介导的生长因子信号的刺激下, PI3K/Akt/mTOR 和 MAPK/ERK 通路密切相

互作用共同调节细胞周期的进展<sup>[15]</sup>。激活的 ERK 介导包括 c-myc 在内的多种转录因子的合成, 这些转录因子控制调控细胞周期进展的多种基因的表达, 如 cyclin D1 等<sup>[16]</sup>。活化的 Akt 激活下游包括转录因子和激酶在内的多种底物, 刺激细胞 G1 期 DNA 合成和周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinases, CDKs) 活性, 并诱导 cyclin D1/CDK4 和 cyclin D1/CDK6 复合物组装和活化<sup>[17]</sup>。检测 PEC01 作用 96 h 后的 G422 细胞中细胞周期相关蛋白表达状况, 结果显示 (图 6F), CDK4、cyclin E1、cyclin B1/CDK1 蛋白水平显著降低。

肿瘤侵袭和转移是恶性肿瘤发生发展的重要特征, PI3K/Akt/mTOR 和 MAPK/ERK 信号通路在肿瘤侵袭转移过程中发挥了重要作用<sup>[18]</sup>, Src 还可通过磷酸化黏附分子和细胞骨架重排参与诱导上皮间充质转化, 促进肿瘤侵袭和转移<sup>[19]</sup>。检测 PEC01 作用后 G422 细胞中肿瘤侵袭转移相关蛋白的表达, 结果显示 (图 6G), 锌指转录因子 Snail、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 和钙黏蛋白 N-cadherin 表达水平明显降低。

检测 PEC01 作用后 G422 肿瘤组织中蛋白水平。结果显示, p-EGFR、p-Src、总蛋白 EGFR 和 Src 水平均明显降低 (图 7A); PI3K 催化亚基 P110 $\alpha$  和 P110 $\gamma$  表达降



**Figure 7** The effect of PEC01 on EGFR, Src (A), PI3K/Akt/mTOR pathway (B), MAPK/ERK signaling pathway (C), HIF-1 $\alpha$ , c-myc (D), cyclin/CDK (E), and tumor invasion and migration related proteins (F) in G422 tumor tissues

低, 下游调控蛋白 p-PDK1、p-Akt、p-mTOR 和 p-P70S6K 以及总蛋白 PDK1、Akt、mTOR、P70S6K 水平均明显降低, MAPK/ERK 通路 p-c-Raf、p-MEK、p-ERK 及总蛋白 c-Raf、MEK 表达明显下调 (图 7B、C); 细胞缺氧相关因子 HIF-1 $\alpha$  和 c-myc 表达水平明显下降 (图 7D); 细胞周期调控蛋白 cyclin-D1、CDK2/cyclin-E1 和 CDK1/cyclin-B1 蛋白表达明显下调 (图 7E); 侵袭迁移相关蛋白 Snail、MMP-9 和 N-cadherin 蛋白表达明显下调 (图 7F)。

## 讨论

胶质瘤中常存在 EGFR 和其他 RTK 家族配体的过表达, 而在恶性程度最高的胶质母细胞瘤中, EGFR 的基因扩增或突变率高达 60%<sup>[20,21]</sup>。Src 作为多种 RTKs 信号传导网络共享的节点蛋白, 它的激活触发许多底物的磷酸化, 从而参与促进细胞生存、黏附、增殖、运动和血管生成的多种不同途径的调控<sup>[22]</sup>。鉴于异常激活的 EGFR 和 Src 在胶质瘤发生发展分子机制中的关键作用, 靶向 EGFR 和 Src 的抗胶质瘤抑制剂的研究和开发具有重要的应用价值。而大多数恶性胶质瘤中同时存在酪氨酸激酶的多种突变和多个信号通路的共同激活和相互作用, 目前临床试验中分子靶向药物单独治疗或联合放射治疗并未明显延长脑胶质瘤患者的总生存期<sup>[23]</sup>。因此同时针对多个信号通路、多靶点激酶抑制剂的研发对胶质瘤治疗和预后具有重要意义。

多项研究表明<sup>[5,24,25]</sup>, CAPE 对多种肿瘤细胞具有细胞毒性且不侵犯正常细胞, 同时还能抑制肿瘤细胞的增殖、浸润和转移。有报道显示<sup>[26]</sup>, CAPE 在体内外 C6 神经胶质瘤细胞和大鼠 C6 异位移植瘤实验中也表现出良好的肿瘤抗性, 结果呈明显时间和剂量依赖性, 提示 CAPE 在治疗神经胶质瘤方面有较大的潜力。CAPE 的抗肿瘤活性涉及诱导周期停滞和细胞凋亡、抑制生长和转录因子表达、抑制侵袭转移和血管生成等多个方面, 其作用分子机制与 PI3K/Akt、p38MAPK、JNK 和非经典 Wnt 等多条信号传导信号通路密切相关<sup>[24]</sup>。

前期的研究结果显示<sup>[6]</sup>, PEC01 在多种小鼠肿瘤模型中均显现出良好的抗肿瘤活性, 后续分子对接和 QTRP 分析结果显示 PEC01 为多靶点化合物, 在此基础上, 本研究对 PEC01 的抗胶质瘤作用进行了考察, 并对前期 PEC01 作用后的 QTRP 定量蛋白质组学结果做了进一步挖掘和分析, 挑选出差异显著且在胶质瘤中普遍激活的 EGFR 和 Src 靶点, 并使用 Western blot 进行验证和分析。本研究表明 PEC01 对小鼠 G422 胶质瘤具有明显的体内外抗肿瘤活性, 其抗肿瘤作用可能是通过作用于 EGFR 和 Src 激酶, 下调下游 MAPK/ERK 和 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 从而发挥抑制制

殖、诱导凋亡、抑制侵袭转移等作用实现的。前期的研究结果中, 低浓度 PEC01 ( $< 1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 可明显促进体外培养的 CTIL-2 小鼠淋巴细胞的增殖, 小鼠 H22 肝癌移植瘤模型中, PEC01 可通过抑制 CSK 磷酸化增强 T 细胞增殖<sup>[6]</sup>, 提示 PEC01 可能在抗肿瘤增殖的同时发挥免疫调节作用。

PEC01 的多靶作用和免疫调节活性使其有望在抗胶质瘤方面拥有巨大的潜力和优势。基于胶质瘤的免疫抑制性微环境, PEC01 对胶质瘤中免疫细胞的作用及作用机制将是后续研究重点之一, 其抗胶质瘤作用也正在进行深入研究和进一步评价。本研究为 PEC01 的继续研发提供了一定的理论和实验依据。

**作者贡献:** 郑凯露主要完成全部实验内容与结果处理, 并负责文章撰写与修改; 唐梅负责细胞实验指导及辅助完成动物实验; 邓海东辅助完成动物实验及文章修改; 刘思齐负责文章修改; 刘晓宇负责化合物 PEC01 合成及化学部分内容指导; 李燕负责实验方案设计、实验指导与结果审核、文章修改与审核。

**利益冲突:** 所有作者声明无任何利益冲突。

## References

- [1] Zheng RS, Sun KX, Zhang SW, et al. Report of cancer epidemiology in China, 2015 [J]. Chin J Oncol (中华肿瘤杂志), 2019, 41: 19-28.
- [2] Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, et al. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review [J]. Neuro-oncology, 2014, 16: 896-913.
- [3] Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary [J]. Neuro Oncol, 2021, 23: 1231-1251.
- [4] Tan AC, Ashley DM, Lopez GY, et al. Management of glioblastoma: state of the art and future directions [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70: 299-312.
- [5] Murtaza G, Karim S, Akram MR, et al. Caffeic acid phenethyl ester and therapeutic potentials [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 145342.
- [6] Liu X, Du Q, Tian C, et al. Discovery of CAPE derivatives as dual EGFR and CSK inhibitors with anticancer activity in a murine model of hepatocellular carcinoma [J]. Bioorg Chem, 2021, 107: 104536.
- [7] Liu X, Wang P, Zhang C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR): a rising star in the era of precision medicine of lung cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8: 50209-50220.
- [8] Sheng Q, Liu J. The therapeutic potential of targeting the EGFR family in epithelial ovarian cancer [J]. Br J Cancer, 2011, 104: 1241-1245.
- [9] Hua H, Kong Q, Zhang H, et al. Targeting mTOR for cancer

- therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12: 71.
- [10] Guo YJ, Pan WW, Liu SB, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19: 1997-2007.
- [11] Sears R, Nuckolls F, Haura E, et al. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability [J]. *Genes Dev*, 2000, 14: 2501-2514.
- [12] Gustafson WC, Weiss WA. Myc proteins as therapeutic targets [J]. *Oncogene*, 2010, 29: 1249-1259.
- [13] Wan J, Wu W. Hyperthermia induced HIF-1 $\alpha$  expression of lung cancer through AKT and ERK signaling pathways [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 119.
- [14] Strickland M, Stoll EA. Metabolic reprogramming in glioma [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2017, 5: 43.
- [15] Chen JY, Lin JR, Cimprich KA, et al. A two-dimensional ERK-AKT signaling code for an NGF-triggered cell-fate decision [J]. *Mol Cell*, 2012, 45: 196-209.
- [16] MacCorkle RA, Tan TH. Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2005, 43: 451-461.
- [17] Wang Z. Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling [J]. *Cells*, 2021, 10: 3327.
- [18] Yang G, Qiu ZJ. Research progress on signaling pathways and mechanisms of tumor invasion and metastasis [J]. *Mod Oncol (现代肿瘤医学)*, 2009, 17: 362-364.
- [19] Huang XD, Li GZ. Epithelial-mesenchymal transition in tumor invasion and metastasis [J]. *J Med Postgra (医学研究生学报)*, 2010, 23: 319-322.
- [20] Liu F, Hon GC, Villa GR, et al. EGFR mutation promotes glioblastoma through epigenome and transcription factor network remodeling [J]. *Mol Cell*, 2015, 60: 307-318.
- [21] Nicholas MK, Lukas RV, Jafri NF, et al. Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 7261-7270.
- [22] Cirotti C, Contadini C, Barila D. SRC kinase in glioblastoma news from an old acquaintance [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12: 1558.
- [23] Zhang Y, Ding X, Lu HJ, et al. Research progress of targeted therapy for malignant glioma [J]. *Chin J Cancer Prev Treat (中华肿瘤防治)*, 2017, 24: 350-356.
- [24] Li HP, Liu KW, Hao YQ. Research advances in anti-tumor activity of caffeic acid phenethyl ester [J]. *Med Recapit (医学综述)*, 2020, 26: 480-485, 490.
- [25] Wang D, Xiang DB, He YJ, et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells *in vitro* [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 4008-4012.
- [26] Kuo HC, Kuo WH, Lee YJ, et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer lett*, 2006, 234: 199-208.