

新型 c-KIT 抑制剂 PN17-1 对胃肠道间质瘤 GIST-882 细胞的体外抗肿瘤作用及机制研究

沈继伟^{1,2}, 吴爽¹, 李军¹, 周云鹏^{1,2}, 陈烨^{1,2*}, 刘举^{1,2*}

(1. 辽宁大学药学院, 辽宁 沈阳 110036; 2. 辽宁省小分子靶向药物研发工程研究中心, 辽宁 沈阳 110036)

摘要: 近年来, 胃肠道间质瘤 (gastrointestinal stromal tumor, GIST) 具有上升的发病率和死亡率, 大多数 GIST 是由 c-KIT 基因的激活突变引起的, 因此, c-KIT 已成为 GIST 有前景的治疗靶点。目前, 批准用于治疗 GIST 的药物包括伊马替尼、舒尼替尼、瑞戈非尼和瑞派替尼等大多易产生耐药性并伴有不同程度的不良反应, 因此迫切需要开发新型 c-KIT 抑制剂来解决耐药问题。本研究探究了新型 c-KIT 抑制剂 PN17-1 在体外对胃肠道间质瘤 GIST-882 细胞的抗肿瘤作用, 发现 PN17-1 能够显著抑制 GIST-882 细胞增殖、克隆形成和迁移能力, 并且能够显著下调 GIST-882 细胞 p-c-KIT 及其下游信号蛋白 p-AKT、p-STAT5 和 p-ERK 的表达水平。此外, PN17-1 还可诱导 GIST-882 细胞发生凋亡, PN17-1 诱导的凋亡可能主要与线粒体依赖的内源性途径有关。综上所述, 新型 c-KIT 抑制剂 PN17-1 是一个有潜力的抗胃肠道间质瘤药物, 本研究为今后进一步开发 c-KIT 抑制剂提供了新的思路。

关键词: 胃肠道间质瘤; c-KIT 抑制剂; GIST-882 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)02-0379-09

In vitro anti-tumor effects and mechanisms of a novel c-KIT inhibitor PN17-1 on gastrointestinal stromal tumor GIST-882 cells

SHEN Ji-wei^{1,2}, WU Shuang¹, LI Jun¹, ZHOU Yun-peng^{1,2}, CHEN Ye^{1,2*}, LIU Ju^{1,2*}

(1. College of Pharmacy of Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2. Small Molecular Targeted Drug R&D Engineering Research Center of Liaoning Province, Shenyang 110036, China)

Abstract: In recent years, gastrointestinal stromal tumors (GIST) have increased incidence and mortality, and most GIST is caused by the activation mutation of the c-KIT gene. Therefore, c-KIT has become a promising therapeutic target of GIST. At present, the drugs approved for the treatment of GIST including imatinib, sunitinib, regorafenib and ripretinib, are mostly prone to developing resistance and accompanied by various degrees of adverse reactions. Therefore, there is an urgent need to develop new c-KIT inhibitors to solve the problem of resistance. In this study, we investigated the anti-tumor effect of a novel c-KIT inhibitor PN17-1 on gastrointestinal stromal tumor GIST-882 cells *in vitro*. We found that PN17-1 significantly inhibited the proliferation, colony formation and migration ability of GIST-882 cells, and significantly downregulated the protein expression levels of p-c-KIT and its downstream signals p-AKT, p-STAT5 and p-ERK in GIST-882 cells. In addition, PN17-1 induced apoptosis in GIST-882 cells, and the apoptosis may be mainly related to the mitochondrial-dependent endogenous pathway. In conclusion, the novel c-KIT inhibitor PN17-1 is a promising anti-GIST drug, and this study provides new ideas for further development of c-KIT inhibitors in the future.

收稿日期: 2024-08-13; 修回日期: 2024-11-07.

基金项目: 辽宁省科技厅应用基础研究计划项目 (2022JH2/101300090); 辽宁省教育厅基本科研项目 (LJKFZ20220177); 沈阳市自然科学基金基础研究项目 (23-503-6-12).

*通讯作者 Tel: 13998821581, E-mail: sy-chenye@163.com;

Tel: 13840579525, E-mail: liuju1216@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0779

Key words: gastrointestinal stromal tumor; c-KIT inhibitor; GIST-882 cell; proliferation; apoptosis

胃肠道间质瘤 (gastrointestinal stromal tumor, GIST) 是胃肠道中最常见的间叶性肿瘤, 从间质 Cajal 细胞发展而来^[1], 全球患病率约为每百万人中有 10~15 例^[2], 其高发人群主要是 40 岁以上的中老年人, 主要的发生部位在胃 (55%~60%) 和小肠 (30%~35%), 偶发于结肠和食道, 少部分患者的发病在直肠 (4%~5%) 和十二指肠 (4%~5%), 极少数病例发生在食管 (<1%)^[3]。胃肠道间质瘤的早期诊断通常很困难, 手术切除仍然是最有效的治疗方法, 但术后经常发生复发和转移, 此外, GIST 对放疗化疗不敏感, 预后较差。

c-KIT 受体 (CD117) 是一种跨膜蛋白, 最初被鉴定为 Hardy-Zuckerman 4-猫科肉瘤病毒中逆转录病毒癌基因 v-KIT 的细胞同源物, 它是 III 型受体酪氨酸激酶家族的重要成员, 由胞外结构域、跨膜蛋白、近膜结构域和细胞质区域组成^[4], 在与其配体结合后能激活自身酪氨酸蛋白酶活性, 通过一系列反应激活下游信号转导通路, 从而调节细胞的生长与增殖。越来越多的证据表明, c-KIT 的过表达或突变引起的 c-KIT 功能失调, 促进了各种癌症的发生和发展^[5,6]。据报道 GIST 肿瘤的发生绝大多数是 c-KIT 基因突变驱动的, 在所有病例中约占 80%~85%, 而 PDGFRA 基因突变占 5%~10%^[7]。因此, c-KIT 已成为治疗 GIST 药物开发的一个有希望的靶标。

伊马替尼 (imatinib) 作为 GIST 的一线治疗药物, 显著改善了 GIST 患者的预后, 但仍有部分患者对伊马替尼具有原发性耐药性, 且约有一半的患者在治疗后 2 年内出现获得性耐药^[8-10]。目前, 已被批准用于治疗胃肠道间质瘤的其他药物包括舒尼替尼、瑞戈非尼和瑞派替尼等虽然能够显著改善患者的无进展生存期和总生存期^[11-14], 但都伴有严重的不良反应且最终都不可避免地产生耐药性^[15,16], 因此迫切需要开发靶向 c-KIT 的新型酪氨酸激酶抑制剂, 为 GIST 患者带来更多的治疗选择和希望。

本研究初步探讨了新型 c-KIT 抑制剂 PN17-1 在体外对胃肠道间质瘤 GIST-882 细胞增殖抑制效果及作用机制, 发现 PN17-1 能够显著抑制 GIST-882 细胞增殖、克隆形成和迁移能力, 并诱导 GIST-882 细胞以线粒体依赖的内源性途径发生凋亡, 为今后进一步开发 c-KIT 抑制剂提供了新的思路。

材料与方法

细胞与试剂 人胃肠道间质瘤 GIST-882 细胞、人

胃癌 MKN45 细胞、人非小细胞肺癌 A549 细胞、人肺腺癌 H1975 细胞、人肝癌 HepG2 细胞和人胚胎肾细胞 HEK-293T 均购自上海 ATCC 细胞库; imatinib (HY-15463) 购自美国 MedChemExpress 公司; PN17-1 由辽宁省小分子靶向药物研发工程研究中心提供, 淡黄色粉末、化学式 $C_{31}H_{32}N_6O$, 分子量 504.64, 熔点 219.7~221.4 °C, HPLC 测定纯度 $\geq 98\%$; MTT 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 结晶紫染色液 (C0121)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P0010)、超敏 ECL 化学发光试剂盒 (P0018S)、rhodamine 123 (C2007)、细胞线粒体分离试剂盒 (C3601) 和 Hoechst 33258 染色液 (C1018) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒 (KGA1102) 购自江苏凯基生物技术有限公司; 抗 c-KIT (3074) 和 p-c-KIT (3073) 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 抗 p-AKT (66444-1-Ig)、p-STAT5 (28951-1-AP)、p-ERK (28733-1-AP)、PARP (66520-1-Ig)、caspase 9 (10380-1-AP)、caspase 3 (66470-2-Ig)、Bax (50599-2-Ig)、Bcl-2 (12789-1-AP)、cytochrome C (66264-1-Ig) 和 β -actin (60008-1-Ig) 抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

细胞培养 GIST-882 细胞、MKN45 细胞、A549 细胞、H1975 细胞和 HEK-293T 细胞培养于含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 及 100 $u \cdot mL^{-1}$ 青霉素、100 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 链霉素的 1640 培养基中, HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清及 100 $u \cdot mL^{-1}$ 青霉素、100 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 链霉素的 DMEM 培养基中, 所有细胞放置在含 5% CO_2 、37 °C 培养箱内培养, 视细胞生长情况, 每 2~3 天进行传代。

MTT 法^[17] 取对数生长期且生长状态良好的细胞, 接种于 96 孔板中, 细胞密度为 4×10^3 个/孔, 培养箱中孵育过夜。次日, 加入不同浓度的 PN17-1 及阳性对照药 imatinib, 继续培养 72 h, 每孔加入 20 μL 浓度为 5 $mg \cdot mL^{-1}$ MTT 溶液, 孵育 4 h 后加入 150 μL DMSO 溶液, 震荡至甲瓩完全溶解后使用多功能酶标仪在波长 490 nm 处测定吸光度 (A) 值, 最后通过 SPSS 软件计算 IC_{50} 值。

平板克隆形成实验^[18] 不同浓度的 PN17-1 及阳性对照药 imatinib 处理 GIST-882 细胞 24 h 后, 换成新鲜培养液继续培养 14 天, 待克隆形成后, 吸去原培养液, 用 1.5 mL 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 1.5 mL 结晶紫染色液染色 20 min, PBS 洗涤细胞数次后室温晾干, 拍照观察。

细胞划痕实验 以 2×10^5 个/孔的密度将对数生长期且生长状态良好的 GIST-882 细胞接种在 6 孔板中, 当细胞生长至单层平铺板底后用 200 μL 枪头垂直在每孔中划“十”字, PBS 洗涤两遍, 加入新鲜的完全培养液, 同时加入指定浓度的 PN17-1, 显微镜下拍照后放入培养箱中, 继续培养 24 h 后拍照并用 Image J 软件计算划痕面积。

Transwell 实验^[19] 收集生长状态良好的 GIST-882 细胞, 用无血清培养基重悬后调整细胞密度, 以 2×10^4 个/200 μL 的密度接种到上室中, 加入指定浓度的 PN17-1, 放于培养箱中继续培养 24 h。将上室取出, 用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 再用结晶紫室温染色 20 min, PBS 洗涤细胞数次后将小室倒置晾干, 光学显微镜下观察拍照。

凋亡细胞形态观察 GIST-882 细胞经过指定浓度的 PN17-1 处理 48 h。

Hoechst 33258 染色: 弃去培养液, 每孔加入 1.5 mL 浓度为 4% 的多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤细胞, 每孔加入 Hoechst 33258 染色液 0.5 mL, 染色 20 min 后用 PBS 洗涤细胞 2 次, 倒置荧光显微镜下观察、拍照。

AO/EB 染色: 弃去培养液, 每孔加入 500 μL PBS, 同时加入 20 μL AO/EB 工作液, 室温避光染色 20 min, 于倒置荧光显微镜下观察、拍照。

Western blot^[20] 收集 PN17-1 处理后的 GIST-882 细胞, 提取细胞总蛋白并定量, 然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 将蛋白转移到 PVDF 膜上, 封闭液封闭 30 min 后加入相应的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日, 用 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 加入 HRP 标记的相应二抗, 室温孵育 2 h, 用 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 滴加适量 ECL 发光液后通过凝胶成像拍照, 并使用 Image J 计算蛋白条带灰度值。

线粒体膜电位检测^[21] 收集 PN17-1 处理 48 h 后的 GIST-882 细胞, PBS 洗涤细胞 1 次, 加入 2 mL 浓度为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ rhodamine 123 染色液, 室温避光孵育 30 min 后过 200 目筛网到上样管中, 通过流式细胞仪检测。

细胞凋亡实验^[22] 收集 PN17-1 处理 48 h 后的 GIST-882 细胞, 按照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书进行染色, 最后用流式细胞仪检测分析。

ADME 参数预测分析 PN17-1 的吸收、分布、代谢、排泄等特性通过 ADMETLAB 3.0 数据库进行分析 (<https://admetlab3.scbdd.com/>)。

The Human Protein Atlas 数据库 MKN45 细胞、A549 细胞、HepG2 细胞、H1975 细胞和 GIST-882 细胞中的 c-KIT 表达情况来源于一个交互式开放获取数据库 (<https://www.proteinatlas.org/>)。

统计学分析 所有结果均表示为平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$), 数据分析通过 SPSS 22.0 软件完成, 两组间比较采用 *t* 检验分析, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA), $P < 0.05$ 代表具有显著性差异。

结果

1 PN17-1 抑制 GIST-882 细胞增殖活性

本研究通过 The Human Protein Atlas 数据库筛查, 选取了几种 c-KIT 表达水平不同的肿瘤细胞, 包括人胃癌 MKN45 细胞、人非小细胞肺癌 A549 细胞、人肝癌 HepG2 细胞、人肺腺癌 H1975 细胞及人胃肠道间质瘤 GIST-882 细胞, 采用 MTT 法检测了 PN17-1 对几种肿瘤细胞的增殖抑制活性。结果如表 1 所示, PN17-1 能够显著抑制 c-KIT 高表达的人胃肠道间质瘤 GIST-882 细胞增殖 (IC_{50} 为 $0.37 \pm 0.06 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 但 PN17-1 对其他 c-KIT 表达水平较低或几乎不表达的肿瘤细胞的细胞毒性较弱, 表明 PN17-1 可能对 c-KIT 高表达的胃肠道间质瘤 GIST-882 细胞具有一定的选择性, 且抑制活性明显优于阳性对照药 imatinib (IC_{50} 为 $2.17 \pm 0.91 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。此外, 本研究还考察了 PN17-1 对人胚胎肾细胞 HEK-293T 的毒性影响, 结果显示, 与阳性对照药 imatinib 相比, PN17-1 对 HEK-293T 细胞的 IC_{50} 值 ($8.59 \pm 0.87 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 较高, 提示 PN17-1 对胃肠道间质瘤的治疗可能具有一定的安全性。

2 PN17-1 显著抑制 GIST-882 细胞克隆和生长

光学显微镜下观察发现, GIST-882 细胞空白组贴壁生长, 形态呈梭形, 边界清晰, 经 PN17-1 (图 1A) 处理 48 h 后, 细胞逐渐变圆、变小, 而随着 PN17-1 作用浓度的增加, 细胞甚至皱缩, 呈破裂状 (图 1B), 进一步表明 PN17-1 能够抑制 GIST-882 细胞增殖、生长。

Table 1 Cytotoxic effects of PN17-1 on different cell lines. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Cell line	c-KIT RNA expression (RNA-seq TPM)	c-KIT protein expression (IHC score)	$\text{IC}_{50} / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	
			PN17-1	Imatinib
GIST-882	125.5	High	0.37 ± 0.06	2.17 ± 0.91
MKN45	0.5	None	5.14 ± 0.29	8.56 ± 1.31
A549	0	None	9.44 ± 1.45	15.31 ± 0.52
HepG2	1.2	Low	6.82 ± 0.27	8.43 ± 1.06
H1975	0	None	11.97 ± 0.18	12.21 ± 1.31
HEK-293T			8.59 ± 0.87	6.70 ± 0.67

平板克隆实验结果显示, GIST-882细胞空白组克隆数量较多, 而经PN17-1处理后细胞克隆数量明显减少(图1C), 且呈浓度依赖性, 表明PN17-1能够抑制GIST-882细胞的克隆形成能力。

3 PN17-1抑制c-KIT及其下游信号蛋白活化

已知KIT突变通常导致下游信号PI3K/AKT/mTOR、JAK/STAT、MAPK/ERK通路的异常活化, 介导细胞增殖和抗凋亡反应, 从而促使肿瘤的发展^[23]。本研究探讨了PN17-1是否能抑制c-KIT及其下游信号通路的活化。结果显示, PN17-1显著下调了GIST-882细胞中p-c-KIT、p-AKT、p-STAT5和p-ERK的蛋白表

达水平(图2), 且呈浓度依赖性, 也进一步证明了PN17-1是一种c-KIT选择性抑制剂, 能够抑制GIST-882细胞c-KIT及其下游信号通路蛋白的活化。

4 PN17-1诱导GIST-882细胞发生凋亡

为了进一步探究PN17-1对GIST-882细胞的作用机制, 本研究考察了PN17-1对GIST-882细胞凋亡的影响。AO/EB染色结果显示空白组GIST-882细胞呈均一的绿色荧光, 经PN17-1处理48 h后, 细胞呈现橙红色的凋亡样特征并且细胞数量明显减少。Hoechst 33258染色结果显示, 空白组GIST-882细胞核呈均一的蓝色荧光, 经PN17-1处理48 h后, 染色质浓缩, 细胞

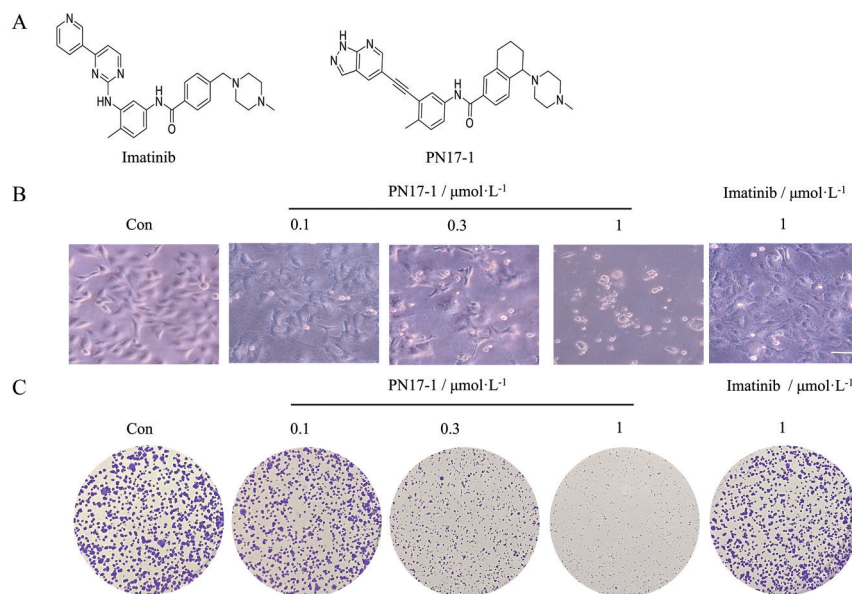


Figure 1 The inhibitory effect of PN17-1 on cell proliferation and morphology of GIST-882 cells. A: Chemical structures of imatinib and PN17-1; B: Cellular morphology of GIST-882 cells after treatment with PN17-1 (0.1, 0.3 and 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) or imatinib (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 48 h (scale bars = 50 μm , $\times 200$); C: GIST-882 cells were treated with PN17-1 (0.1, 0.3 and 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) or imatinib (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 14 days, and cell proliferation was analyzed using clonogenic assay

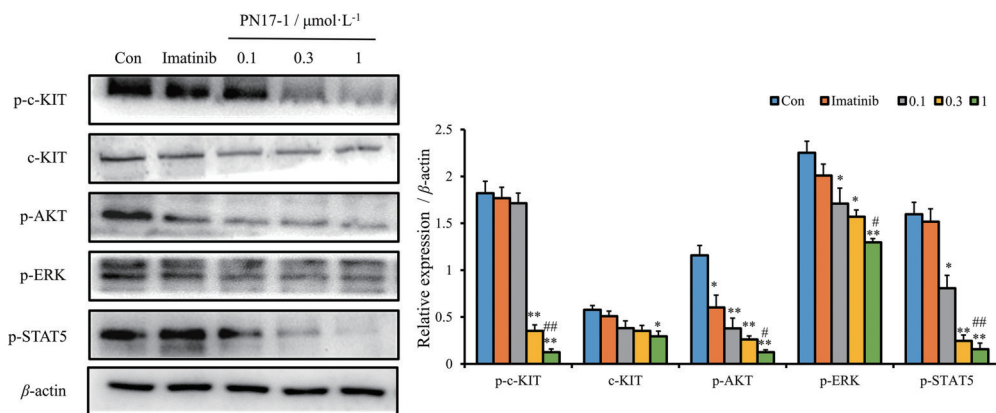


Figure 2 PN17-1 suppresses c-KIT and its downstream signaling pathways in GIST-882 cells. The levels of c-KIT and its downstream signaling pathway proteins were detected *via* Western blot in GIST-882 cells exposure to PN17-1 (0.1, 0.3 and 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) or imatinib (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h. The histogram (right) in each panel indicated the relative band intensity generated from densitometric scans of three independent experiments on arbitrary densitometric units. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs imatinib

核呈碎片化并出现浓染的块状荧光(图3A)。

Annexin V-FITC/PI 流式结果显示, 随着 PN17-1 作用浓度的增加, GIST-882 细胞的凋亡比例逐渐增加, 在 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 细胞凋亡率为 63.7% (图 3B)。此外, Western blot 实验结果显示, PN17-1 浓度依赖性上调了 GIST-882 细胞凋亡标志蛋白 cleaved PARP 和 cleaved caspase 3 的表达水平 (图 3C), 以上结果表明 PN17-1 能够以浓度依赖的方式诱导 GIST-882 细胞发

生凋亡。

5 PN17-1 诱导 GIST-882 细胞线粒体破坏和细胞色素 c 的释放

Rhodamine 123 染色结果如图 4A 所示, GIST-882 细胞经 PN17-1 处理 48 h 后, 细胞线粒体膜电位逐渐降低, 且呈浓度依赖性。线粒体膜电位的改变与细胞线粒体凋亡通路密切相关, 随后采用 Western blot 考察了 PN17-1 对线粒体凋亡途径相关蛋白表达的影响。

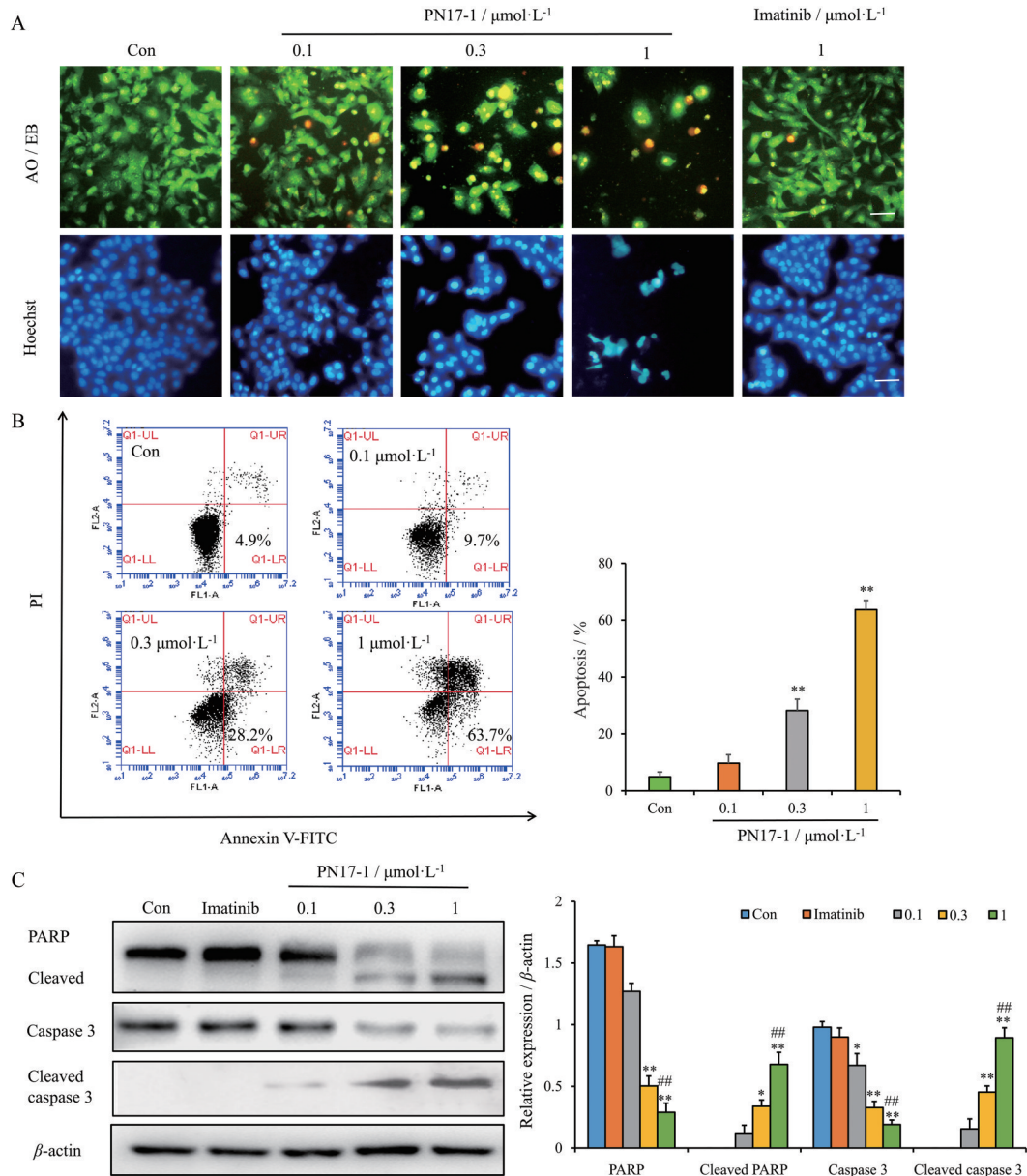


Figure 3 PN17-1 induces apoptosis in GIST-882 cells. A: GIST-882 cells were treated with PN17-1 ($0.1, 0.3$ and $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) or imatinib ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 48 h, stained with AO/EB (the upper part) or Hoechst 33258 (the lower part), and photographed by Olympus inverted fluorescence microscope (scale bars = $50 \mu\text{m}$, $\times 200$); B: The apoptosis of GIST-882 cells treated with PN17-1 ($0.1, 0.3$ and $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was measured by flow cytometry with Annexin V-FITC/PI staining. Quantification values are shown in right; C: Changes of the expression of cell apoptosis-related proteins in GIST-882 cells treated with PN17-1 ($0.1, 0.3$ and $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) or imatinib ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 48 h. The histogram in each panel shows the relative band intensity ratios generated from three independent experiments. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; ## $P < 0.01$ vs imatinib

结果显示, GIST-882 细胞经 PN17-1 处理后, 线粒体中 cytochrome c 蛋白表达逐渐降低, 而细胞质中的 cytochrome c 蛋白表达显著增加, 且呈浓度依赖性 (图 4B)。与此同时, cleaved caspase 9 和促凋亡蛋白 Bax 的表达水平逐渐增加, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平逐渐降低 (图 5), 以上结果表明 PN17-1 诱导的细胞凋亡可能是通过线粒体凋亡途径所执行的。

6 PN17-1 抑制 GIST-882 细胞迁移能力

划痕实验结果如图 6A 所示, GIST-882 空白对照组的细胞明显向中间划痕生长, 细胞愈合率高达 73%, 随着 PN17-1 浓度的增加, 伤口愈合率逐渐降低。

Transwell 实验结果显示, GIST-882 细胞经 PN17-1 处理 24 h 后, 随着 PN17-1 作用浓度的增加, GIST-882 细胞的迁移数量逐渐减少, 且呈浓度依赖性 (图 6B), 以上结果表明 PN17-1 能够抑制 GIST-882 细胞的迁移能力。

7 PN17-1 物理化学和 ADME 参数

通过 ADMETLAB 3.0 数据库对 PN17-1 的吸收、分布、代谢、排泄 (ADME) 参数进行预测, 根据分子量、log P 值、氢键供体和受体数量以及拓扑极性表面积等参数发现 PN17-1 符合 Lipinski 规则, 意味着 PN17-1 可能具有良好的吸收性或渗透性, 此外, 基于 GASA 的预测评估表明合成 PN17-1 相对容易 (表 2)。表 3 预测结果

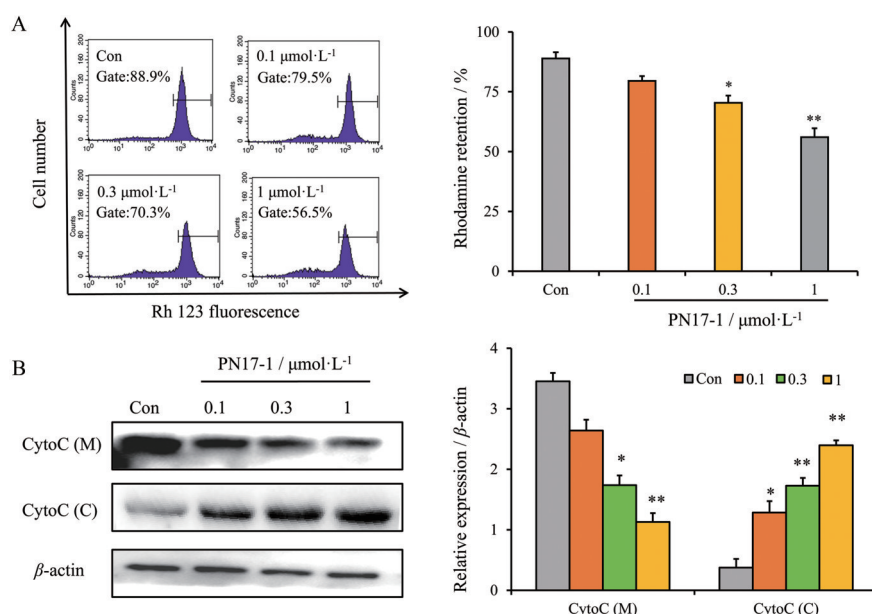


Figure 4 Mitochondrial apoptotic pathway is activated in PN17-1-treated GIST-882 cells. A: Changes of the mitochondrial membrane potential in GIST-882 cells treated with PN17-1 (0.1, 0.3 and 1 μmol·L⁻¹) for 48 h. Quantification values are shown on the right; B: GIST-882 cells were treated with PN17-1 (0.1, 0.3 and 1 μmol·L⁻¹) for 48 h, then the levels of cytochrome c (CytoC) in the mitochondria (M) and cytoplasm (C) were detected by Western blot. The histogram in each panel indicated the relative band intensity generated from densitometric scans of three independent experiments on arbitrary densitometric units. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

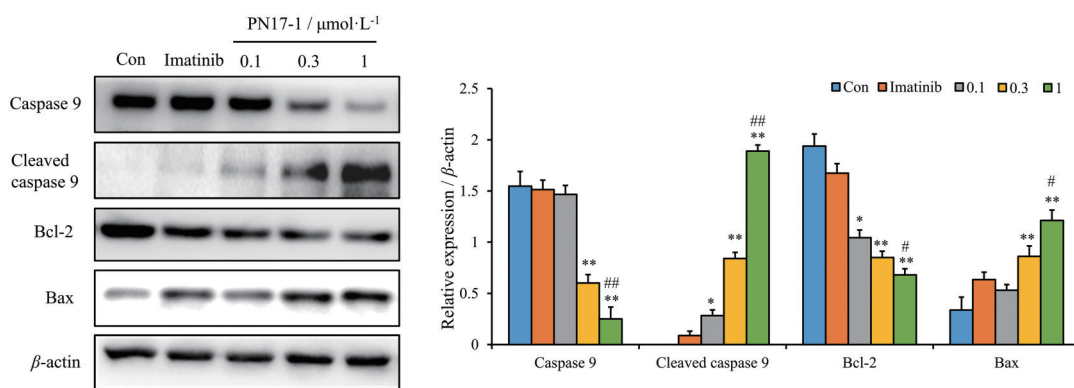


Figure 5 PN17-1 induces mitochondrial apoptosis-related proteins in GIST-882 cells treated with PN17-1 (0.1, 0.3 and 1 μmol·L⁻¹) or imatinib (1 μmol·L⁻¹) for 48 h. The histogram in each panel indicated the relative band intensity generated from densitometric scans of three independent experiments on arbitrary densitometric units. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs imatinib

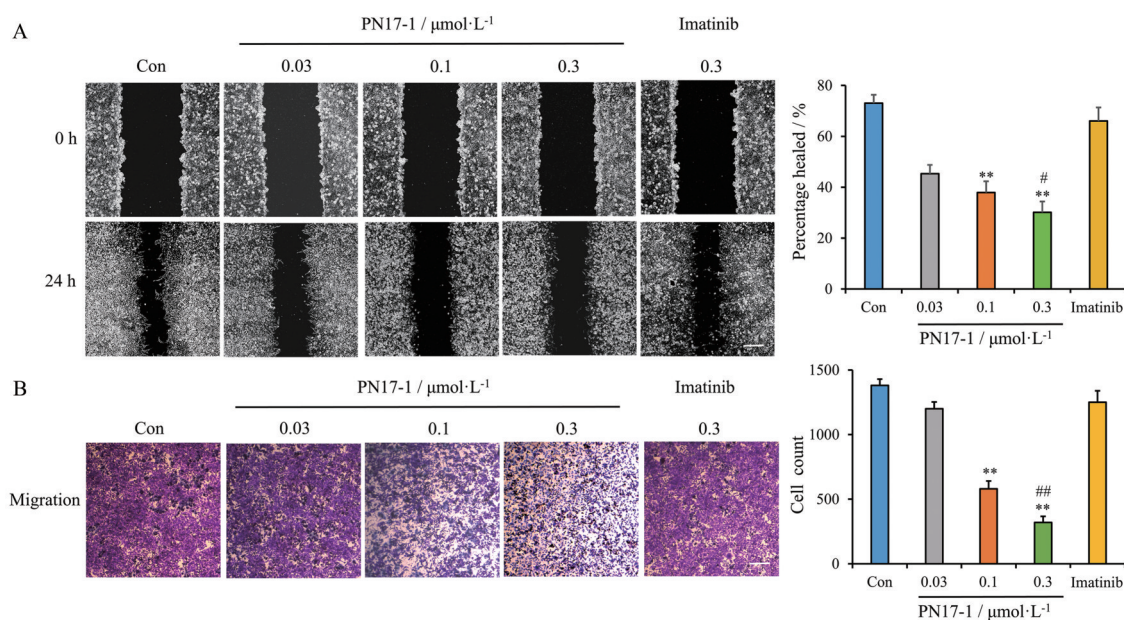


Figure 6 PN17-1 suppresses the migration ability of GIST-882 cells. A: GIST-882 cells were treated with PN17-1 (0.03, 0.1 and 0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) or imatinib (0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h, and then the cell migration ability was analyzed by the wound healing assay. Migration ratio (%) = (0 h area-24 h area)/0 h area \times 100%; B: Representative images of the Transwell assay showing the inhibition of PN17-1 on the migratory ability in GIST-882 cells. The mean data of fields on the lower side were counted. scale bars = 200 μm , $\times 40$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs imatinib

Table 2 The selected physicochemical properties and medicinal chemistry properties of PN17-1 and imatinib. M_w : Molecular weight; nHA: Number of hydrogen bond acceptor; nHD: Number of hydrogen bond donor; TPSA: Topological polar surface area (optimal: < 140); $\log P$: The logarithm of the *n*-octanol/water distribution coefficient at pH = 7.4; GASA: Graph attention-based assessment of synthetic accessibility (probability of being difficult to synthesize from easy to hard: 0-1); Lipinski rule: $M_w \leq 500$, $\log P \leq 5$, Hacc ≤ 10 , Hdon ≤ 5 , if one property is out of range, it is acceptable

Compd.	M_w	nHA	nHD	TPSA	$\log P$	GASA	Lipinski rule
PN17-1	504.64	7.0	2.0	77.15	4.28	0.0	0.0
Imatinib	493.26	8.0	2.0	86.28	2.59	0.0	0.0

显示, PN17-1 的血脑屏障穿透性几乎为0, 与 imatinib 一样, 其是 P-gp 和 MRP1 的抑制剂, 同时口服生物利用度

与 imatinib 相当, 在肠道吸收的效果较好。如表 4 预测, PN17-1 不是 P450 酶的抑制剂, 与 imatinib 相比, PN17-1 具有较好的人肝微粒体稳定性和较长的半衰期。

讨论

原癌基因蛋白 c-KIT 在调节细胞转化和分化过程中起着至关重要的作用, 如增殖、存活、黏附和趋化性。c-KIT 的过度表达和突变可导致其失调, 并促进各种癌症发生, 特别是胃肠道间质瘤, 抑制 c-KIT 已经成为胃肠道间质瘤有希望的治疗靶点^[24]。

酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKIs) 的出现显著改善了 GIST 患者的预后, 包括 imatinib 作为复发、转移和不可切除 GIST 的一线治疗^[25,26], 然而, 尽管临床受益率为 80%, 但大多数 GIST 患者在 imatinib 治疗 2~3 年后会经历疾病进展, 虽然 TKIs 已经发展

Table 3 The selected adsorption and distribution parameters of PN17-1 and imatinib. PAMPA: Parallel artificial membrane permeability assay (category 0: low-permeability; category 1: high-permeability); P-gp: P-glycoprotein (category inhibitor: yes; category non-inhibitor: no); HIA: Human intestinal absorption (category 1: HIA $< 30\%$ means positive, category 0: HIA $\geq 30\%$ means negative); $F_{30\%}$: 30% oral bioavailability (category 1: $F_{30\%} < 30\%$ means positive, category 0: $F_{30\%} \geq 30\%$ means negative); BBB: Blood brain barrier (category 1: BBB positive, category 0: BBB negative); OATP1B1: Organic anion transporting polypeptides glycoprotein (category inhibitor: yes, category non-inhibitor: no); MRP1: Multidrug resistance-associated protein 1 (category inhibitor: yes, category non-inhibitor: no)

Compd.	PAMPA	P-gp inhibitor	HIA	$F_{30\%}$	BBB	OATP1B1 inhibitor	OATP1B3 inhibitor	MRP1 inhibitor
PN17-1	0.01	Yes	0.0	0.002	0.004	Yes	Yes	Yes
Imatinib	0.0	Yes	0.0	0.002	0.031	No	No	Yes

Table 4 The selected metabolism and excretion parameters of PN17-1 and imatinib. CYP: Cytochrome P450 (category inhibitor: yes, category non-inhibitor: no); HLM stability: Human liver microsomal stability (category 0: stable⁺, category 1: unstable⁻); CL_{plasma}: Drug clearance; T_{1/2}: Half-life of drug plasma concentration to decrease by 50%

Compd.	CYP1A2 inhibitor	CYP2C19 inhibitor	CYP2C9 inhibitor	CYP2D6 inhibitor	CYP3A4 inhibitor	CYP2B6 inhibitor	HLM stability	CL _{plasma}	T _{1/2}
PN17-1	No	No	No	No	No	No	0.18	3.57	1.03
Imatinib	No	No	No	Yes	No	Yes	0.30	2.74	0.91

到第四代,但是获得性耐药仍然是一个问题^[27,28],目前,研究者们正在积极探索新的GIST的治疗策略^[29,30]。

本研究探究了新型c-KIT抑制剂PN17-1,其通过imatinib结构修饰改造合成,对胃肠道间质瘤GIST-882细胞的体外抗肿瘤活性及作用机制。细胞毒性实验发现,PN17-1对几种c-KIT表达水平不同的肿瘤细胞包括MKN45细胞、A549细胞、HepG2细胞、H1975细胞和GIST-882细胞的增殖抑制活性与细胞内c-KIT的表达情况具有一定的相关性,PN17-1对c-KIT高表达的GIST-882细胞IC₅₀值 < c-KIT低表达的HepG2细胞IC₅₀值 < c-KIT不表达的A549细胞和H1975细胞IC₅₀值。非常有趣的是,PN17-1对c-KIT蛋白不表达的MKN45细胞的抑制活性好于c-KIT蛋白低表达的HepG2细胞,这可能与MKN45细胞中c-KIT mRNA的表达水平有关,这值得研究者今后进一步探究。PN17-1对正常HEK293T细胞的毒性低于imatinib,提示PN17-1可能具有较好的安全性,但是其安全性今后还需进一步验证。此外,PN17-1能够显著抑制p-c-KIT及其下游信号p-AKT、p-ERK和p-STAT5蛋白的表达水平,诱导GIST-882细胞发生凋亡,并且抑制GIST-882细胞的迁移能力。据预测,PN17-1具有良好的吸收、分布、代谢和排泄特性,符合Lipinski规则^[31]。此外,GASA预测表明PN17-1的合成相对容易,如果最终被批准为可上市的药物,成本会更低。

在后续的研究中,本课题组会通过建立动物模型考察PN17-1的体内抗肿瘤活性,并通过多种胃肠道间质瘤细胞株进行验证。值得注意的是,本研究还发现PN17-1对imatinib耐药的胃肠道间质瘤GIST-1210细胞具有较好的增殖抑制活性,提示PN17-1可能具有一定的克服耐药能力,有望在克服耐药领域发挥作用,今后本课题组将继续深入探究PN17-1克服耐药的能力及其克服耐药的潜在机制。综上,本研究为今后开发PN17-1成为一个有潜力的抗胃肠道间质瘤药物提供了前期的实验依据,为胃肠道间质瘤患者的临床治疗带来了新的希望。

作者贡献: 沈继伟负责实验研究、文章撰写;吴爽完成部分实验操作、数据分析;李军负责化合物合成及结构改造;周云鹏负责部分实验设计、提供技术支持;陈焯提出研究思路、

实验指导与文章校对;刘举负责化合物合成、实验指导与文章修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Candelaria M, de la Garza J, Duenas-Gonzalez A. A clinical and biological overview of gastrointestinal stromal tumors [J]. *Med Oncol*, 2005, 22: 1-10.
- [2] Soreide K, Sandvik OM, Soreide JA, et al. Global epidemiology of gastrointestinal stromal tumours (GIST): a systematic review of population-based cohort studies [J]. *Cancer Epidemiol*, 2016, 40: 39-46.
- [3] Nepal P, Mori S, Kita Y, et al. Management of a case of high-risk gastrointestinal stromal tumor in rectum by transanal minimal invasive surgery [J]. *World J Surg Oncol*, 2018, 16: 165.
- [4] Lennartsson J, Ronnstrand L. Stem cell factor receptor/c-KIT: from basic science to clinical implications [J]. *Physiol Rev*, 2012, 92: 1619-1649.
- [5] Cardoso HJ, Figueira MI, Socorro S. The stem cell factor (SCF)/c-KIT signalling in testis and prostate cancer [J]. *J Cell Commun Signal*, 2017, 11: 297-307.
- [6] Marech I, Gadaleta CD, Ranieri G. Possible prognostic and therapeutic significance of c-KIT expression, mast cell count and microvessel density in renal cell carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 13060-13076.
- [7] Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors [J]. *Science*, 2003, 299: 708-710.
- [8] Oxnard GR, Arcila ME, Chmielecki J, et al. New strategies in overcoming acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 5530-5537.
- [9] Rutkowski P, Nowecki Z, Nyczkowski P, et al. Surgical treatment of patients with initially inoperable and/or metastatic gastrointestinal stromal tumors (GIST) during therapy with imatinib mesylate [J]. *J Surg Oncol*, 2006, 93: 304-311.
- [10] Blanke CD, Demetri GD, von Mehren M, et al. Long-term results from a randomized phase II trial of standard-*versus* higher-dose imatinib mesylate for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing KIT [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 620-625.

- [11] George S, Blay JY, Casali PG, et al. Clinical evaluation of continuous daily dosing of sunitinib malate in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after imatinib failure [J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45: 1959-1968.
- [12] George S, Wang Q, Heinrich MC, et al. Efficacy and safety of regorafenib in patients with metastatic and/or unresectable GI stromal tumor after failure of imatinib and sunitinib: a multicenter phase II trial [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30: 2401-2407.
- [13] Serrano C, Leal A, Kuang Y, et al. Phase I study of rapid alternation of sunitinib and regorafenib for the treatment of tyrosine kinase inhibitor refractory gastrointestinal stromal tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25: 7287-7293.
- [14] Blay JY, Serrano C, Heinrich MC, et al. Ripretinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours (INVICTUS): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21: 923-934.
- [15] Cicala CM, Olivares-Rivas I, Aguirre-Carrillo JA, et al. KIT/PDGFR α inhibitors for the treatment of gastrointestinal stromal tumors: getting to the gist of the problem [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2024, 33: 159-170.
- [16] Liu J, Li J, Zhu Y, et al. Advances in drug therapy for gastrointestinal stromal tumour [J]. *Curr Med Chem*, 2024, 31: 3057-3073.
- [17] Wen X, Zhao D, Chen F. *In vitro* anti-tumor activities and mechanisms of phenothiazines in combined treatment with temozolomide in human glioma cell lines [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 918-929.
- [18] Perumal E, So Youn K, Sun S, et al. PTEN inactivation induces epithelial-mesenchymal transition and metastasis by intranuclear translocation of beta-catenin and snail/slug in non-small cell lung carcinoma cells [J]. *Lung Cancer*, 2019, 130: 25-34.
- [19] Gower A, Hsu WH, Hsu ST, et al. EMT is associated with, but does not drive resistance to ALK inhibitors among EML4-ALK non-small cell lung cancer [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10: 601-609.
- [20] Deng J, Du T, Zhou J, et al. Anti-glioblastoma study of YHP-836, a novel PARP1/2 inhibitor, in combination with temozolomide [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 1656-1663.
- [21] Shen J, Wang J, Du J, et al. A novel ALK inhibitor ZYY inhibits Karpas299 cell growth *in vitro* and in a mouse xenograft model and induces protective autophagy [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 383: 114781.
- [22] Chen M, Huai R, Yang D, et al. Preliminary study on the mechanism of halofuginone inhibiting the activity of HepG2 cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 368-373.
- [23] Stankov K, Popovic S, Mikov M. c-KIT signaling in cancer treatment [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20: 2849-2880.
- [24] Godesi S, Lee J, Nada H, et al. Small molecule c-KIT inhibitors for the treatment of gastrointestinal stromal tumors: a review on synthesis, design strategies, and structure-activity relationship (SAR) [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 9450.
- [25] Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347: 472-480.
- [26] Kee D, Zalcberg JR. Current and emerging strategies for the management of imatinib-refractory advanced gastrointestinal stromal tumors [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2012, 4: 255-270.
- [27] Serrano C, Martín-Broto J, Asencio-Pascual JM, et al. 2023 GEIS guidelines for gastrointestinal stromal tumors [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2023, 15: 17588359231192388.
- [28] Cao L, Zheng K, Liu Y, et al. Identification of novel imatinib-resistant genes in gastrointestinal stromal tumors [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 878145.
- [29] Klug LR, Khosroyani HM, Kent JD, et al. New treatment strategies for advanced-stage gastrointestinal stromal tumours [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19: 328-341.
- [30] Nada H, Kim S, Godesi S, et al. Discovery and optimization of natural-based nanomolar c-KIT inhibitors *via in silico* and *in vitro* studies [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2023, 41: 11904-11915.
- [31] Haritha M, Sreerag M, Suresh CH. Quantifying the hydrogen-bond propensity of drugs and its relationship with Lipinski's rule of five [J]. *New J Chem*, 2024, 48: 4896-4908.