

化合物C17通过抑制肿瘤干细胞抗胰腺癌的药效学及机制研究

薛钧升^{1#}, 冯瑶瑶^{1#}, 焦佩丽², 严晓雪³, 陈国术^{3*}, 周田彦^{1*}

(1. 北京大学医学部药学院, 分子药剂学与新药递送系统北京市重点实验室, 北京 100191; 2. 北京大学医学部药学院, 天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100191; 3. 广州大学化学化工学院, 广东 广州 510006)

摘要: C17是一种包含2,4-二氨基喹唑啉和芳基哌嗪的小分子化合物。本研究首先利用分子对接 (docking) 考察C17与多巴胺D1受体 (D1 dopamine receptor, D1DR) 等5种DR亚型的结合情况, 结果显示, 在5个DR亚型中, C17最有可能与D1DR结合。随后采用胰腺癌细胞SW1990及PANC-1进行体内内外实验: 免疫荧光结果显示, C17可上调两种细胞中的D1DR表达; 由细胞毒实验可知C17对SW1990、PANC-1细胞的 IC_{50} 值分别为12.56和10.56 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 克隆形成实验显示C17可以剂量依赖性地抑制两种细胞的克隆形成能力; 分别采用CD133和ALDH标记SW1990和PANC-1细胞中肿瘤干细胞 (cancer stem-like cell, CSC) 亚群, 并用流式细胞术证明C17可剂量依赖性地抑制两种细胞的CSC比例; 将C17预处理的SW1990细胞接种至nu/nu裸鼠体内, 结果显示C17可抑制其体内致瘤性, 且与CSC比例相关; 进一步体内实验显示, C17单用及与舒尼替尼 (sunitinib, SUN) 联用具有良好的体内药效和安全性。所有动物实验均严格遵循北京大学生物医学伦理委员会的规定。上述结果提示, C17可能具有用于胰腺癌治疗的潜力。

关键词: 胰腺癌; 肿瘤干细胞; 多巴胺D1受体; C17; 舒尼替尼

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)10-2381-11

The anti-tumor efficacy and mechanism of C17 in pancreatic cancer: inhibition of cancer stem-like cells

XUE Jun-sheng^{1#}, FENG Yao-yao^{1#}, JIAO Pei-li², YAN Xiao-xue³, CHEN Guo-shu^{3*}, ZHOU Tian-yan^{1*}

(1. Beijing Key Laboratory of Molecular Pharmaceutics and New Drug Delivery System, School of Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Peking University, Beijing 100191, China; 2. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Peking University, Beijing 100191, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: C17 is a small molecule containing 2,4-diaminoquinazoline and aryl piperazine. Docking was used to compare the affinity of C17 for five dopamine receptor (DR) subtypes. Pancreatic cancer SW1990 and PANC-1 cell lines were used in *in vitro* and *in vivo* studies. The effect of C17 on the expression level of D1DR was investigated by immunofluorescence. A cytotoxicity assay, clone formation assay and flow cytometry were used to investigate the ability of C17 to inhibit on cell survival, clone formation, and to suppress cancer stem-like cells (CSCs). The ability to suppress tumorigenesis was investigated by inoculating nude mice with SW1990 cells pre-treated with different concentrations of C17. Finally, the anti-tumor efficacy and safety of C17 and its combination with the multitarget tyrosine kinase inhibitor sunitinib (SUN) were evaluated in SW1990 xenograft mice. Our results

收稿日期: 2020-03-27; 修回日期: 2020-05-21.

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (7192100); 教育部创新团队项目 (BMU2017TD003).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-82801717, E-mail: tianyanzhou@bjmu.edu.cn;

Tel: 86-20-39366902, E-mail: gdgschen@gzhu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0426

demonstrate that C17 is most likely to bind to D1DR among the five DR subtypes. D1DR expression was increased in C17-treated cells, which could be reversed by SCH23390, a D1DR-specific antagonist. The IC_{50} values of C17 on the survival of SW1990 and PANC-1 cells were 12.56 and 10.56 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. C17 could suppress clone formation ability, CSC frequency and *in vivo* tumorigenesis in a dose-dependent manner. In the SW1990 xenograft model, 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of C17 could weakly inhibit the tumor growth, and the tumor volume with 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of C17 in combination with 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of SUN group was smaller than that in SUN 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, SUN 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group and gemcitabine (GEM) group. In addition, body weight, blood test, and organ index results showed good safety with all dosing regimens. All animal experiments were in strict accordance with the regulations of the Biomedical Ethics Committee of Peking University. C17 may be a promising candidate for the treatment of pancreatic cancer.

Key words: pancreatic cancer; cancer stem-like cell; D1 dopamine receptor; C17; sunitinib

胰腺癌是一种具有极高致死率的恶性肿瘤, 绝大多数患者在手术后仍会出现转移、复发, 且现有药物对患者生存期的延长十分有限^[1,2]。因此, 亟待寻找更多能够防止胰腺癌转移、复发和延长患者生存期的新药物。

肿瘤干细胞 (cancer stem-like cell, CSC) 是肿瘤中具有自我更新和分化潜能的细胞, 与肿瘤的转移、复发与耐药密切相关^[3-5]。在胰腺癌中, CSC 同样在肿瘤的发生发展中扮演重要角色^[6,7]。已有研究发现, 多巴胺受体 (dopamine receptor, DR) 的 5 个亚型 (D1DR~D5DR) 特异性表达于 CSC 表面, 而在人正常多能干细胞中无表达, 提示 DR 是可用于靶向 CSC 的重要靶点^[8]。此后不少研究证明, 甲硫哒嗪、三氟拉嗪和舒必利等 D2DR 拮抗剂类抗精神病药物^[9,10]、D1DR 激动剂如非诺多泮^[11]、神经递质多巴胺等^[12-14]均可抑制多种肿瘤中的 CSC。然而, 抗精神病类药物会跨过血脑屏障^[15], 非诺多泮、多巴胺等药物不能口服^[16,17], 一定程度上限制了其在肿瘤患者中的应用。基于此, 本实验室与广州大学陈国术教授团队合作, 合成了一系列可口服的小分子化合物如 C2、C17 等。前期研究发现, C2 可以激动 D1DR 而抑制胰腺癌中的 CSC 比例、显著提升小分子酪氨酸激酶抑制剂舒尼替尼 (sunitinib, SUN) 的抗肿瘤药效, 显示了其用于胰腺癌治疗的潜力^[18]。此外, C17 (结构如图 1A 所示) 也可降低乳腺癌中的 CSC 比例、上皮-间质转化通路进而抑制乳腺癌的肺转移^[19], 但其在胰腺癌中的抗肿瘤作用仍有待探索。

因此, 本研究利用胰腺癌细胞 SW1990 和 PANC-1 进行了体内外实验, 探索 C17 能否通过 D1DR 抑制胰腺癌 CSC、增强 SUN 的抗肿瘤药效, 为今后 C17 可能用于胰腺癌临床治疗奠定基础。

材料与方法

细胞和试剂 胰腺癌细胞 SW1990 和 PANC-1 由北京大学肿瘤医院郝纯毅教授馈赠。C17 由广州大学

陈国术副教授合成 (纯度 >95%); 舒尼替尼碱 (纯度 >98%)、盐酸吉西他滨 (gemcitabine, GEM, 纯度 >98%) (中国大连美仑生物技术有限公司); RPMI-1640 培养基、胰酶 (北京中科迈晨科技有限公司); 青霉素-链霉素双抗 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (德国 PAN-Biotech 公司); 三氯乙酸、磺酰罗丹明 B (sulforhodamine B, SRB)、Tris 碱、D1DR 特异性拮抗剂 SCH23390、Hoechst33342 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 冰醋酸 (北京化工厂); 甲醇 (北京市通广精细化工公司); 结晶紫 (西陇化工厂); 牛血清白蛋白 (北京宝瑞杰科技有限公司); D1DR 抗体、山羊抗兔二抗-FITC (美国 Abcam 公司); Anti-mouse CD133-PE、mouse-IgG2b-PE 抗体 (德国 Miltenyi Biotec 公司); ALDEFLUOR 试剂盒 (加拿大 Stemcell Technologies 公司)。

仪器 HF90 型二氧化碳培养箱 (上海力申科学仪器有限公司); TY-CJ-2ND 型超净工作台 (北京亚泰科隆仪器技术有限公司); BDS200 型生物倒置显微镜 (重庆奥特光学仪器有限公司); YC-300L 型 4 °C 冰箱、DW-YL270 型 -20 °C 冰箱 (中国中科美菱低温科技股份有限公司); MDF-U53V 型 -80 °C 冰箱 (日本 SANYO 公司); 1-14K 型冷冻离心机 (美国 Sigma 公司); Model 680 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); L2-5k 型台式低速离心机 (湖南可成仪器设备有限公司); BT 25S 型十万分之一电子天平 (德国 Sartorius 公司); Leica Microsystems TCS-SP8 STED 3X 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司); FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司); MEK-6318K 血项分析仪 (日本光电公司)。

分子对接 由于在 DR 的 5 个亚型中, D1DR 和 D5DR 的晶体结构尚未得到解析, 因此需要采用同源建模进行构建。对比 5 个 DR 亚型的全长蛋白序列后, 采用 Schrodinger 软件中的 Prime 组件构建 D1DR、D5DR 的三维起始模型并进行评价和优化。借助 MUBD-DecoyMaker 构建 DR 评价数据集 MUBD-

Dopamine, 依次经过配体处理器、初步过滤器、精细过滤器处理, 得到由21~30个最优分子构成的目标诱饵分子集, 上传至 dude.docking.org 形成诱饵分子, 以评价蛋白结构的可靠性。基于评价数据集、以对接为手段进行小规模虚拟筛选, 以评估配体富集能力。根据蛋白质数据库, 以 D2DR 作为 D1DR 的模板蛋白, 以 D3DR 作为 D5DR 的模板蛋白, 分别选择依替必利 (图 1B)、利培酮 (图 1C) 作为 D1DR、D5DR 的模式分子, 构建蛋白-配体复合物模型。采用 Schrodinger 软件以标准精度进行对接。计算不同模型-打分函数组合基于受试者曲线的富集率以及整体富集率, 选择富集率最高的模型与 C17 进行对接, 分析对接结合模式以评价 C17 与各 DR 亚型的结合能力。

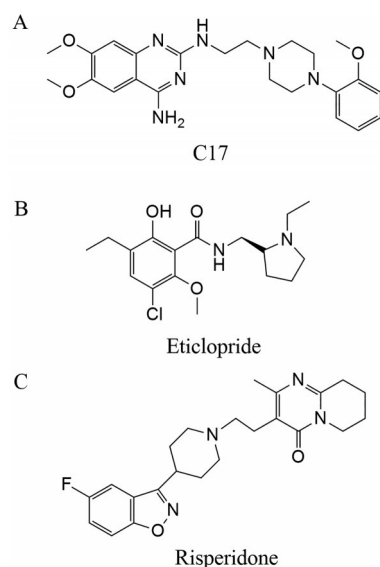


Figure 1 The molecular structure of C17 (A), eticlopride (B) and risperidone (C)

免疫荧光考察 C17 对 D1DR 表达的影响 分别取处于对数生长期的 SW1990 和 PANC-1 细胞, 以每皿 8×10^4 个、 1×10^5 个的密度接种于 15 mm 直径的 confocal 小皿中培养 12 h。用 DMSO 溶解 C17、SCH23390, 制得如下分组含药培养基: 空白对照 (0.5% DMSO)、C17 ($4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、SCH23390 ($2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、C17+SCH23390 ($4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。继续培养 24 h 后, 用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 20 min。用 D1DR 抗体 (1:500) 在 4°C 条件下孵育过夜, 之后加入 FITC 标记的二抗 (1:1 000) 在室温下孵育 1 h。最后加入 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hoechst33342 染液染色 30 min, 封片后在激光共聚焦显微镜下观察。

细胞毒实验 将处于对数生长期的 SW1990 和 PANC-1 细胞, 以 6 000 个/孔的密度分别接种于 96 孔板中。培养 24 h 后更换 0、1、5、10、15、20、25、30、50、

$100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (SW1990), 0、2、4、8、10、12、15、20、30、 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (PANC-1) 的含药培养基, 继续培养 48 h。弃去含药培养基后, 使用 10% 三氯乙酸在 4°C 条件下固定 1 h。用蒸馏水清洗后自然晾干, 加入 0.4% SRB 染液室温下染色 30 min。用 1% 冰醋酸溶液清洗后自然晾干, 每孔加入 $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 碱溶液 $200 \mu\text{L}$ 震荡 10 min。最后在酶标仪中读取 540 nm 波长下各孔的吸光度 (OD) 值。细胞生存率 (%) = $100 \times \text{OD}_{\text{给药组}} / \text{OD}_{\text{空白对照组}}$ 。用 GraphPad 软件计算 IC_{50} 值。

克隆形成实验 将处于对数生长期的 SW1990 和 PANC-1 细胞分别以 1 500 个/孔的密度接种于 6 孔板中。培养 24 h 后, 加入终浓度为 0、0.5、1、2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (SW1990), 0、1、2、4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (PANC-1) 的含药培养基给药 48 h。之后用不含药的培养基继续培养, 直至每个克隆团含有 100~200 个细胞。吸弃培养基, 加入甲醇室温固定 10 min。弃去甲醇后用结晶紫溶液室温染色 8 min。最后用蒸馏水洗净多余染液, 自然晾干后拍照。用 ImageQuant TL 7.0 软件对克隆团进行计数。相对克隆数目 (%) = $100 \times \text{给药组克隆数目} / \text{空白对照组克隆数目}$ 。

流式细胞术检测 CSC 比例 对于 SW1990, 使用 0、2、4、8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ C17 给药 48 h 后, 用 PBS 洗涤并计数, 调整细胞密度为 1×10^6 个/样。加入 CD133-PE (1:500) 或其同型抗体 (1:110), 在冰上孵育 10 min 后用 PBS 终止, 洗涤 3 次, 过 200 目流式筛后用流式细胞仪检测, 并用 Flowjo 软件进行分析。对于 PANC-1 细胞, 使用 0、2、4、8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ C17 给药 48 h。制成细胞悬液后, 用台盼蓝排除死细胞, 随后用 ALDEFLUOR® 缓冲液调整细胞密度为每毫升 1×10^6 个。取每个细胞样品两份各 0.05 mL, 分别标记为该样品的对照管和检测管。对照管中加入 $1.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二乙氨基苯甲醛 (DEAB) $5 \mu\text{L}$ 。对照管、检测管中分别加入活化的 ALDEFLUOR® 底物 $2.5 \mu\text{L}$ 并立即混匀, 37°C 水浴孵育 45 min。用 ALDEFLUOR® 缓冲液重悬细胞, 过 200 目流式筛后用流式细胞仪检测, 并用 CELLQUEST 软件进行分析。

C17 预处理对 SW1990 细胞体内致瘤性的影响 5 周龄雌性 nu/nu 裸鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 [实验动物使用许可证编号 SCXK (京)-2016-0041], 并饲养于独立通风笼盒。笼内温度控制为 $22 \sim 25^\circ\text{C}$, 湿度控制为 50%~60%, 12 h 光照/12 h 黑暗交替, 自由饮水进食。所有实验操作均严格遵守北京大学生物医学伦理委员会相关规定。分别使用 0、2、4、8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ C17 预处理 SW1990 细胞 6 天, 取出少量细胞用上述方法测定 CSC 比例。剩余每组细胞分别以 3×10^6 个/只的数量, 接种至同一只裸鼠皮下, 左

上 ($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、右上 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、左下 ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、右下 ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), $n = 5$ 。接种 16 天后, 处死裸鼠、解剖取得肿瘤, 称重并拍照。

C17 在 SW1990 移植瘤中的药效及机制初探 将 3×10^6 个 SW1990 细胞接种至 5 周龄 nu/nu 裸鼠右腋下, 平均肿瘤体积达到 $50 \sim 100 \text{ mm}^3$ 时, 将裸鼠随机分组: 空白对照、C17 (20 或 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、SUN (10 或 $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、GEM ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot 3\text{d}^{-1}$)、C17 $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ +SUN $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、C17 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ +SUN $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、SCH23390 ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、C17 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ +SCH23390 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。其中, C17 和 SUN 采用灌胃给药, GEM 采用静脉注射给药, SCH23390 采用瘤内注射给药。从给药当天起, 每两天测量肿瘤长径与短径, 并对动物进行称重。肿瘤体积 = $0.5 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$ 。用 GraphPad 软件绘制肿瘤体积-时间曲线和体重-时间曲线。

SW1990 移植瘤中各给药方案的安全性研究 除监测动物体重外, 还采用血常规检查和脏器指数分别考察各给药方案的血液毒性和器官毒性。在实验结束当天, 通过眼眶取血得到 $20 \mu\text{L}$ 血液并进行血常规分析。处死动物后取得心、肝、脾、肺、肾等主要器官并称重。脏器指数 (%) = $100 \times \text{器官重量} / (\text{裸鼠体重} - \text{肿瘤重量})$ 。

统计学分析 实验结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示, 两组数据间的统计学检验采用 t 检验, 多组数据间的统计学检验采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 以 *、** 和 *** 分别表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 的显著性差异。

结果

1 C17 与各 DR 亚型的结合能力

选择富集率最高的 D1DR~D5DR 蛋白模型与 C17 进行对接, 并分析结合模式, 结果如图 2 所示。C17 的哌嗪、苯并嘧啶等结构与 D1DR 蛋白的 103 位天冬氨酸 (aspartic acid, Asp) 的结合作用更多、更稳定。在对评价数据集的标准精度对接中, 103 位 Asp 显示出非常重要的作用, 大多数阳性分子均与该位点形成了较强的相互作用。C17 两个六元氮杂环中的叔胺可形成铵盐, 也可与 D1DR 中 103 位的 Asp 形成较强的盐桥作用和氢键作用。此外, C17 的嘧啶环可与 D1DR 中 194 位酪氨酸 (tyrosine, Tyr) 形成 π - π 堆积, 嘧啶环和哌嗪环之间的氨基还可与 103 位的 Asp 形成氢键作用。相比之下, C17 与其他 DR 亚型的结合构象不存在此类特征。另外, D1DR 的第 416 位为精氨酸 (arginine, Arg), 其侧链取向面向结合口袋外侧, 因而位阻较小; 而 D2DR~D4DR 的 416 位为 Tyr, 其朝向结合口袋内侧, 位阻极大。综上, 在 5 个 DR 亚型中, C17 最有可能与

D1DR 结合。

2 C17 对 SW1990 和 PANC-1 细胞 D1DR 表达的影响

如图 3A 和 C 所示, 在 SW1990 和 PANC-1 细胞中, 以绿色荧光标记 D1DR, 以蓝色荧光标记细胞核。 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C17 给药后绿色荧光显著增强, $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SCH23390 给药后绿色荧光略微变弱, 且两药联用时绿色荧光与空白对照组无显著差异。荧光强度定量结果分别如图 3B 和 D 所示。上述结果显示, C17 可以显著上调两种细胞中的 D1DR 表达, 且可被 SCH23390 逆转。

3 C17 对 SW1990 和 PANC-1 细胞的细胞毒作用

图 4A 和 B 分别为不同浓度 C17 给药 48 h 后, SW1990 和 PANC-1 细胞的存活率曲线。运用 GraphPad 软件拟合可得 C17 抑制 SW1990 和 PANC-1 细胞存活的 IC_{50} 值分别为 12.56 和 $10.56 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 提示 C17 对两种细胞有一定的细胞毒作用, 且作用强度相近。

4 C17 对 SW1990 和 PANC-1 细胞克隆形成能力的影响

如图 5 所示, 0.5 、 1 和 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C17 给药 48 h 后, SW1990 细胞所形成的克隆团数目依次为对照组的 78.10% 、 69.40% 和 35.03% , 而 1 、 2 和 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C17 可分别使 PANC-1 细胞的克隆团数目下降为对照组的 72.37% 、 72.67% 和 45.71% 。此外, C17 不仅可以抑制克隆团数目, 也可使克隆团直径显著减小。上述结果显示, C17 可以剂量依赖性方式抑制两种细胞的克隆形成能力。

5 C17 对 SW1990 和 PANC-1 细胞中 CSC 比例的影响

分别采用 CD133 和 ALDH 标记 SW1990 和 PANC-1 细胞中的 CSC。如图 6A 和 B 所示, 与空白对照组相比, 虽然在 2 、 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C17 给药 48 h 后, SW1990 细胞中 CD133⁺ 的 CSC 比例略有下降, 无统计学显著性差异。但 $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C17 则可显著抑制 CSC。在 PANC-1 细胞中, 4 、 $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C17 给药后 CSC 比例由 26.68% 分别降至 8.02% 、 7.28% (图 6C 和 D)。上述结果提示, C17 可显著抑制两种细胞中的 CSC 比例, 且基本呈现剂量依赖性。

6 C17 预处理对 SW1990 细胞体内致瘤性的影响

用 0 、 2 、 4 、 $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C17 处理 SW1990 细胞 6 天后, 测定 CD133⁺ 的 CSC 比例, 结果如图 7A 所示。与空白对照组相比, $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的 CSC 比例略有下降, 为 63.49% 。而 4 和 $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的 CSC 比例分别下降至 47.69% 和 22.79% 。上述结果表明, C17 给药 6 天也可剂量依赖性地抑制 SW1990 细胞中的 CSC 比例。

将这些预处理细胞分别以相同数目 (3×10^6 个) 同时接种至裸鼠的 4 个部位。16 天后的成瘤情况如图

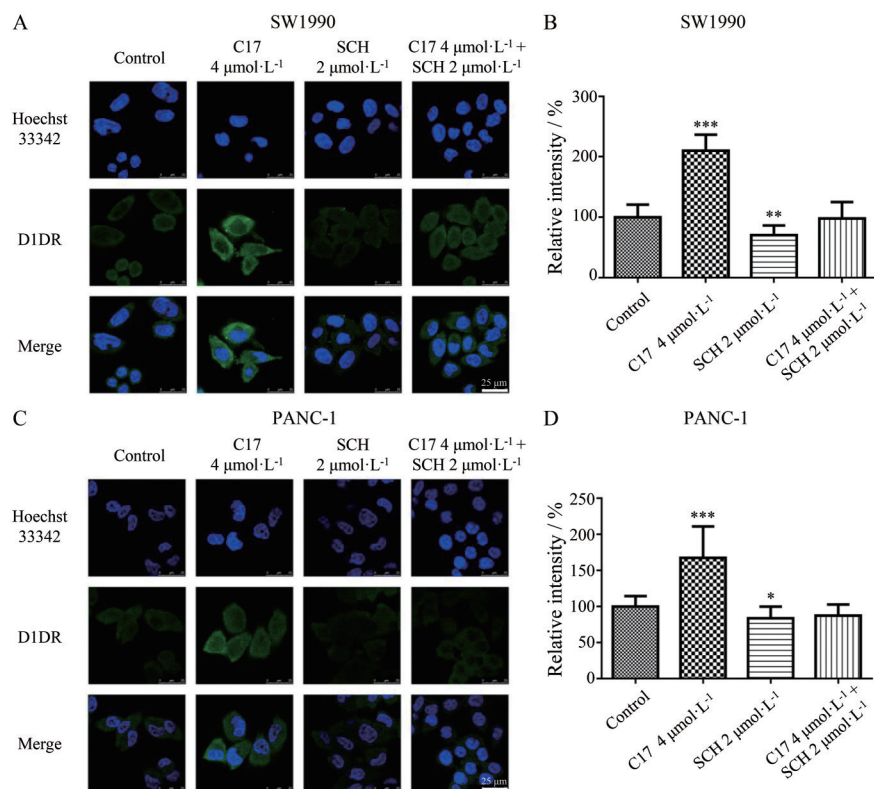


Figure 3 C17 could increase the expression of D1DR in SW1990 and PANC-1 cells, which was reversed by SCH23390 (SCH). Immunofluorescence analysis of D1DR expression in SW1990 and PANC-1 cells treated with $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C17, $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SCH23390 or their combination. The white scale bars represent $25 \mu\text{m}$. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control

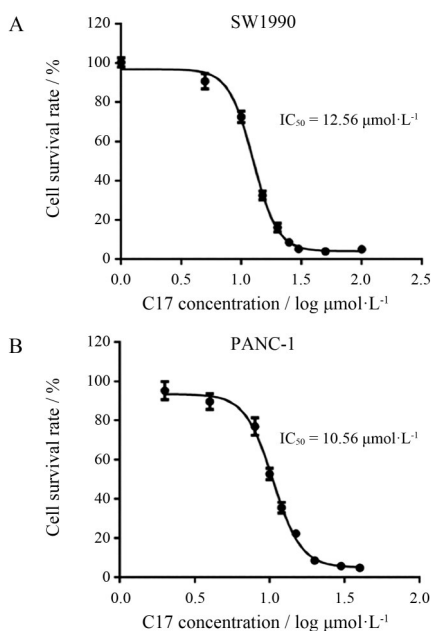


Figure 4 The cell survival rate of SW1990 (A) and PANC-1 (B) cells incubated with a series of concentration levels of C17 for 48 h. $n = 6, \bar{x} \pm s$

7B所示。解剖取得肿瘤拍照可见肿瘤体积随C17浓度增大而减小(图7C)。由称重结果可知,空白对照组

的平均瘤重为0.58 g,而2、4和 $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的平均瘤重分别为0.42、0.24和0.14 g(图7D)。上述结果显示,C17可以通过抑制SW1990细胞中的CSC比例而显著抑制SW1990细胞的体内致瘤性,且呈现剂量依赖性。

7 C17在SW1990移植瘤模型中的药效及机制初探

采用SW1990细胞在nu/nu裸鼠中构建异种移植瘤模型,考察各给药方案对肿瘤体积的抑制作用,并使用D1DR特异性拮抗剂SCH23390进一步确认C17的作用机制。肿瘤生长曲线及最后一天取得肿瘤组织的拍照结果分别如图8A和B所示。 $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ C17可使肿瘤体积略有减小,而 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ C17则可明显抑制肿瘤体积,但C17单药的抑制作用有限。

本课题组前期研究发现,在耐药性乳腺癌和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中,多巴胺(dopamine, DA)可通过激动D1DR抑制CSC,进而显著提升SUN、阿昔替尼(axitinib, AX)等抗血管生成药物的抗肿瘤药效^[12-14],且同系列化合物也可增强SUN在胰腺癌中的药效^[18]。基于此,本研究也将C17与SUN联用。结果显示,尽管 $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ C17未显著增强 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ SUN的药效,但 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ C17与 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

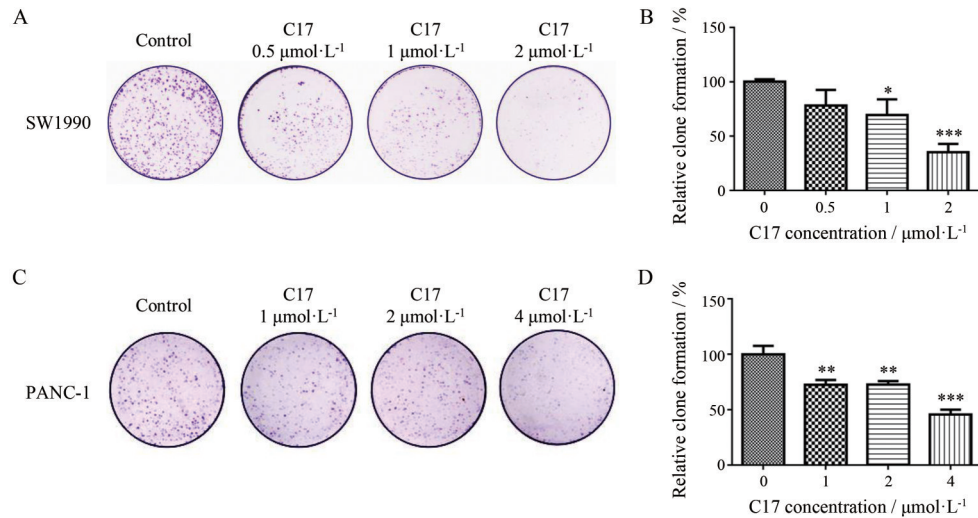


Figure 5 C17 could suppress the clone formation ability of SW1990 and PANC-1 cells. The representative photo of the clones formed by SW1990 (A) and PANC-1 cells (C), and corresponding quantification results (B, D). $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control

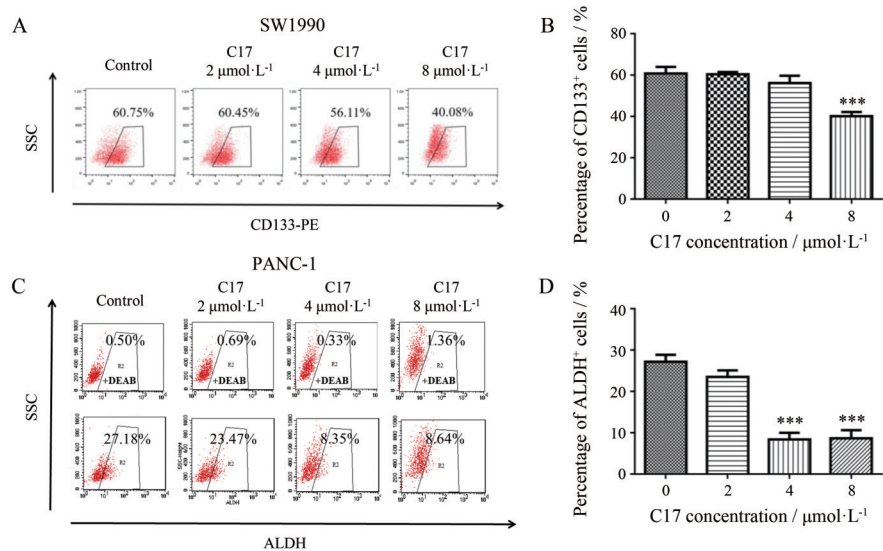


Figure 6 C17 could inhibit the CD133⁺ CSC frequency in SW1990 cells and ALDH⁺ CSC frequency in PANC-1 cells incubated with 0, 2, 4 or 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C17 for 48 h. A, C: The flow cytometry results; B, D: The quantification results of CSC frequency. $n = 3, \bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control

SUN联用时肿瘤体积显著减小, 明显优于10、20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ SUN组, 且略优于阳性对照药物GEM。

此外, 0.05 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ SCH23390可略微促进肿瘤生长, 但与50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ C17联用时, C17的肿瘤抑制作用被逆转, 表明C17抑制SW1990肿瘤生长的作用与激动D1DR相关。

8 SW1990移植瘤中各给药方案的安全性研究

考察了SW1990移植瘤模型中各给药方案下的体重、血常规检查及主要器官的脏器指数, 从全身、血液及器官3个方面评估各给药方案的安全性。由补充图1可知, 给药期间各组裸鼠的体重均稳定在20 g左右,

表明各方案的全身安全性良好。而血常规结果显示, 给药组的各项血液指标与空白对照组均无明显差异, 提示血液安全性良好(补充图2)。给药组的脏器指数也与空白对照组无明显差异, 提示各方案无明显器官毒性(补充图3)。综上, 在SW1990移植瘤模型中, 各给药方案安全性良好。

讨论

CSC是肿瘤细胞中一群具有自我更新和分化能力的细胞, 既可自我复制形成与自身相似的子代细胞, 又可分化为普通肿瘤细胞以保持肿瘤的增殖状态^[20]。尽

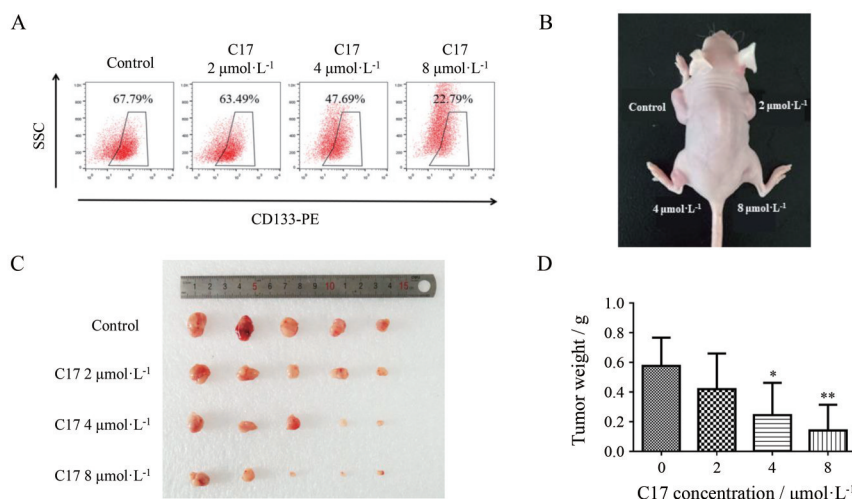


Figure 7 C17 pre-treatment could inhibit the tumorigenesis ability of SW1990 cells *in vivo*. A: The CD133⁺ CSC frequency in SW1990 cells treated with 0, 2, 4 or 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 6 days; B: The photo of SW1990 tumor-bearing mice after 16 days; C: The photo of tumor tissues gained from SW1990 tumor-bearing mice after 16 days; D: The tumor weights of different concentration groups. $n = 5, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

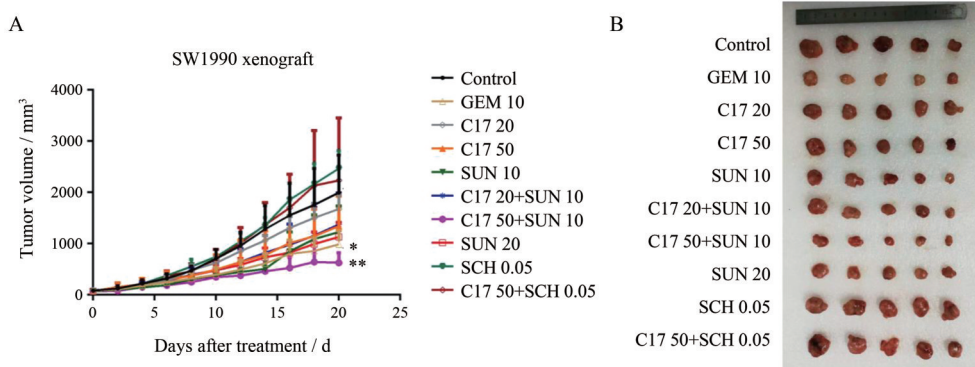


Figure 8 The anti-tumor efficacy and primary mechanism study of C17 monotherapy and in combination with SUN in SW1990 xenograft. A: The tumor volume-time curves of all groups; B: The photo of tumor tissues gained from tumor-bearing mice after 20 days. $n = 5, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control. GEM: Gemcitabine; SUN: Sunitinib

管化疗药物可以杀伤普通肿瘤细胞、减小肿瘤负荷,但CSC通过外排药物、抗凋亡、修复损伤等机制^[21],使得放、化疗等治疗方式无法根除CSC,往往造成肿瘤的发生发展、耐药、复发与转移^[3]。当前,治愈胰腺癌的唯一手段是手术切除,但是大部分患者在手术后仍会出现复发和转移^[2]。此外,目前可用于胰腺癌治疗的药物如GEM、氟尿嘧啶和奥沙利铂等均无法显著延长患者生存期^[1],且常常会产生耐药^[22,23]。因此,寻找可以抑制CSC的药物有望改善胰腺癌患者对药物的响应、延长患者的生存期。

DR是一类G-蛋白偶联受体,特异性表达在CSC表面,是一类可用于抑制CSC而不影响人体正常干细胞的潜在靶点^[8]。DR共有5个亚型,其中激动D1DR和D5DR可使细胞内环磷酸腺苷(cyclic adenosine

monophosphate, cAMP)增加,激动D2DR、D3DR和D4DR使得cAMP减少。因此,D1DR、D5DR统称D1样DR,D2DR、D3DR和D4DR为D2样DR,激动D1样受体与拮抗D2样受体效果相似^[24]。课题组前期研究发现,DA可以激动D1DR而提高细胞内cAMP水平,进而抑制耐药性乳腺癌、NSCLC中的CSC^[12-14]。此外,还发现D1DR激动剂非诺多泮^[11]、D2DR拮抗剂舒必利^[10]等也具有抑制CSC的效果。此外,C2、C17等可口服的小分子化合物分别初步显示了抑制胰腺癌、转移性乳腺癌中CSC的功能,并分别起到增效SUN或抑制乳腺癌肺转移的作用^[18,19]。这提示它们今后有望作为抗CSC药物用于多种肿瘤治疗的临床实践之中。值得一提的是,尽管C2和C17可以部分通过激动D1DR而抑制CSC^[18,19],然而研究表明,它们也具有一

定的拮抗肾上腺素能受体的作用^[25], 但该受体与CSC的关系鲜有报道。因此, C2和C17抑制CSC的其他机制仍有待探寻。

本研究首先通过分子对接确认了在所有DR亚型中, C17最有可能的作用靶点为D1DR, 随后通过一系列体外实验考查其抗胰腺癌活性。实验结果显示, C17可以抑制SW1990和PANC-1的克隆形成能力、CSC比例及SW1990细胞的体内致瘤性, 这些体外结果与C2效果相似^[18]。其中, 克隆形成实验反映了单个细胞在体外分裂而形成克隆团的能力, 既可评价细胞的体外成瘤性, 也可部分反映CSC自我复制和分化的特性^[26,27]。本研究以C17在两种细胞中的IC₅₀值为依据, 选择几乎无细胞毒作用的浓度进行实验, 结果显示C17对SW1990和PANC-1细胞的克隆形成能力均有显著抑制作用, 与C17抑制CSC的功能相吻合。类似地, 在C17预处理接种实验中, 随着C17浓度的升高, SW1990细胞中的CSC比例下降, 相同细胞数目接种后所形成的肿瘤体积也更小, 说明CSC的数量是肿瘤形成的关键因素之一。

目前有多种表面标志物可以标记胰腺癌的CSC亚群, 包括CD133、ALDH、CD44、CD24、EpCAM等^[28]。本研究选用CD133表征SW1990细胞中的CSC, 结果显示SW1990中的CSC比例与文献报道相近^[29,30]。而对于PANC-1细胞, 却鲜有以CD133标记其中CSC的文献报道。本研究也曾尝试采用CD133标记PANC-1细胞中的CSC, 但结果显示CD133阳性的细胞比例很低。因此, 本研究最终选用ALDH标记PANC-1中的CSC, 以考察C17对PANC-1细胞中CSC的作用。悬浮培养法也是筛选肿瘤细胞中CSC亚群的重要方法^[11]。课题组此前发现, 悬浮培养的4T1细胞中CSC表面标记物的含量显著上升, 且D1DR特异性激动剂非诺多泮可以显著抑制悬浮培养法所筛选出的CSC^[11]。由于C17也具有激动D1DR而抑制CSC的潜能, 因此今后有必要进一步考察C17对悬浮培养CSC的作用。此外, 胰腺癌的浸润和转移也是亟待解决的临床问题。课题组曾发现C17可以抑制转移性乳腺癌4T1移植瘤中CSC以及与肿瘤转移密切相关的上皮-间质转化通路^[19]。当前的研究初步确认了C17对胰腺癌CSC的抑制作用, 可能也具有抑制胰腺癌浸润和转移的潜能, 但仍需进一步考察C17对肿瘤转移相关蛋白的影响。

SUN、AX等药物虽可抑制血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)而起到抑制肿瘤生长、减小肿瘤负荷的作用, 是包括胰腺癌在内多种肿瘤的潜在治疗靶点^[31,32]。但肿瘤血管

密度降低的同时会造成瘤内缺氧, 进而使肿瘤内CSC增加, 一定程度上削弱了其抗肿瘤药效^[33]。因此, 本研究将C17与SUN联用, 以期在减小肿瘤负荷的同时抑制CSC, 增强SUN的药效并防止肿瘤的复发。此前课题组的研究也显示了此类联用方案的优越性^[10,12-14,18]。本研究显示, 50 mg·kg⁻¹ C17与10 mg·kg⁻¹ SUN联用对肿瘤生长的抑制作用不仅显著优于10 mg·kg⁻¹和20 mg·kg⁻¹ SUN, 也稍强于阳性对照药GEM, 且未见明显血液、器官毒性, 实验期间动物的生存状态良好。而GEM是传统的细胞毒类化疗药, 临床上常见厌食、中性粒细胞减少、白细胞降低等不良反应^[34]。因此, 当前药效和安全性结果提示C17+SUN的联合用药方案在胰腺癌治疗中具有潜在应用价值。

除C2之外, 课题组此前也发现, 尽管DA、非诺多泮和舒必利等DR激动剂/拮抗剂可以抑制多种肿瘤中的CSC比例而显著增强SUN、AX等抗癌药物的抗肿瘤药效, 但其单独使用时对肿瘤生长几乎无影响^[10-14]。相比之下, 本研究发现C17单药即可在一定程度上抑制肿瘤体积, 提示C17除了通过激动D1DR抑制CSC外, 还具有其他潜在抗肿瘤机制。除cAMP以外, D1DR的信号通路还存在cAMP非依赖性的信号传导过程, 通过磷脂酶C(phospholipase C, PLC)调节下游的肌醇三磷酸酯(inositol triphosphate, IP3)和磷脂酰甘油(diacylglycerol, DAG)等多种信号分子^[35]。如激动D1DR可抑制细胞外调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)和磷脂酰肌醇激酶(phosphatidylinositol kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B)相关通路, 进而抑制骨肉瘤细胞的增殖^[36]。另有研究报道, 激动D1DR也可通过环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)-蛋白激酶G(protein kinase G, PKG)等途径诱导乳腺癌细胞凋亡^[37]。因此, C17抑制SW1990肿瘤生长的其他信号通路还有待深入研究。

综上, 本研究显示C17作为一种可口服的小分子药物, 可以抑制胰腺癌细胞的克隆形成能力和体内致瘤性, 并可能与激动D1DR而抑制CSC相关。此外, C17也可增强SUN的抗肿瘤药效, 且该联用方案安全性良好。因此, C17具有用于胰腺癌治疗的潜力。

本文中补充图1、补充图2、补充图3见网页: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2163.R.20200602.1359.001.html>。

作者贡献: 周田彦和陈国术设计实验; 冯瑶瑶、薛钧升、焦佩丽和严晓雪进行实验; 薛钧升、冯瑶瑶和焦佩丽进行数据分析; 薛钧升进行文章撰写。

利益冲突: 本文作者之间无利益冲突。

References

- [1] Gupta R, Amanam I, Chung V. Current and future therapies for advanced pancreatic cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2017, 116: 25-34.
- [2] Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, et al. Pancreatic cancer [J]. *Lancet*, 2016, 388: 73-85.
- [3] Adorno-Cruz V, Kibria G, Liu X, et al. Cancer stem cells: targeting the roots of cancer, seeds of metastasis, and sources of therapy resistance [J]. *Cancer Res*, 2015, 75: 924-929.
- [4] Li M, Wu CF, Zhang JY, et al. Biological characteristics of drug induced tumor cells and its medicine prevention and treatment [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 182-188.
- [5] Ma HY, He M, Wei MJ. Research progress on targeting effect and regulating mechanisms of the stemness of cancer stem cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 189-196.
- [6] Hermann PC, Sainz B. Pancreatic cancer stem cells: a state or an entity? [J] *Semin Cancer Biol*, 2018, 53: 223-231.
- [7] Liu JB, Qi M, Li QQ, et al. The mechanism of cordycepin in inhibition of pancreatic cancer stem cells proliferation and metastasis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 1404-1409.
- [8] Sachlos E, Risueno RM, Laronde S, et al. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells [J]. *Cell*, 2012, 149: 1284-1297.
- [9] Roney MSI, Park SK. Antipsychotic dopamine receptor antagonists, cancer, and cancer stem cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41: 384-408.
- [10] Li J, Yao QY, Xue JS, et al. Dopamine D2 receptor antagonist sulpiride enhances dexamethasone responses in the treatment of drug-resistant and metastatic breast cancer [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38: 1282-1296.
- [11] Yang L, Yao Y, Yong L, et al. Dopamine D1 receptor agonists inhibit lung metastasis of breast cancer reducing cancer stemness [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 859: 172499.
- [12] Hao FR, Wang SY, Zhu X, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the anti-tumor effect of sunitinib combined with dopamine in the human non-small cell lung cancer xenograft [J]. *Pharm Res*, 2017, 34: 408-418.
- [13] Ma YH, Wang SY, Ren YP, et al. Antitumor effect of axitinib combined with dopamine and PK-PD modeling in the treatment of human breast cancer xenograft [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40: 243-256.
- [14] Wang SY, Mou ZZ, Ma YH, et al. Dopamine enhances the response of sunitinib in the treatment of drug-resistant breast cancer: involvement of eradicating cancer stem-like cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 95: 98-109.
- [15] Pollak TA, Drndarski S, Stone JM, et al. The blood-brain barrier in psychosis [J]. *Lancet Psychiatry*, 2018, 5: 79-92.
- [16] O'Hara JF, Mahboobi R, Novak SM, et al. Fenoldopam and renal function after partial nephrectomy in a solitary kidney: a randomized, blinded trial [J]. *Urology*, 2013, 81: 340-345.
- [17] Kostrzewa RM, Kostrzewa JP, Brown RW, et al. Dopamine receptor supersensitivity: development, mechanisms, presentation, and clinical applicability [J]. *Neurotox Res*, 2008, 14: 121-128.
- [18] Su H, Xue ZX, Feng YY, et al. *N*-Arylpiperazine-containing compound (C2): an enhancer of sunitinib in the treatment of pancreatic cancer, involving D1DR activation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 384: 114789.
- [19] Feng YY, Jiao PL, Yan XX, et al. Compound C17 inhibits the lung metastasis of breast cancer [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2019, 28: 716-727.
- [20] Nassar D, Blanpain C. Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications [J]. *Annu Rev Pathol*, 2016, 11: 47-76.
- [21] Zhao J. Cancer stem cells and chemoresistance: the smartest survives the raid [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 160: 145-158.
- [22] Smigiel JM, Parameswaran N, Jackson MW. Potent EMT and CSC phenotypes are induced by oncostatin-M in pancreatic cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2017, 15: 478-488.
- [23] Wang L, Dong P, Wang WG, et al. Gemcitabine treatment causes resistance and malignancy of pancreatic cancer stem-like cells via induction of lncRNA HOTAIR [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14: 4773-4780.
- [24] Pivonello R, Ferone D, Lombardi G, et al. Novel insights in dopamine receptor physiology [J]. *Eur J Endocrinol*, 2007, 156 Suppl 1: S13-S21.
- [25] Fang H, Li MY, Xia L. Pharmacophore-guided design, synthesis and evaluation of quinazoline-arylpiperazines as new α_1 -adrenoceptor antagonists [J]. *Chin Chem Lett*, 2007, 18: 41-44.
- [26] Rahn S, Zimmermann V, Viol F, et al. Diabetes as risk factor for pancreatic cancer: hyperglycemia promotes epithelial-mesenchymal-transition and stem cell properties in pancreatic ductal epithelial cells [J]. *Cancer Lett*, 2018, 415: 129-150.
- [27] Wu XB, Liu Y, Wang GH, et al. Mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through AMPK/mTOR-mediated NF-kappaB activation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21420.
- [28] Ishiwata T, Matsuda Y, Yoshimura H, et al. Pancreatic cancer stem cells: features and detection methods [J]. *Pathol Oncol Res*, 2018, 24: 797-805.
- [29] Chen C, Yu G, Xiao W, et al. Thalidomide inhibits proliferation and epithelial-mesenchymal transition by modulating CD133 expression in pancreatic cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14: 8206-8212.
- [30] Huang J, Li C, Wang Y, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells bound with anti-CD3/anti-CD133 bispecific antibodies target CD133(high) cancer stem cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Immunol*, 2013, 149: 156-168.
- [31] Lu Z, Weniger M, Jiang K, et al. Therapies targeting the tumor stroma and the VEGF/VEGFR axis in pancreatic ductal adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis [J]. *Target Oncol*, 2018, 13: 447-459.

- [32] Siveen KS, Prabhu K, Krishnankutty R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumour vascularization: potential and challenges [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, 15: 339-351.
- [33] Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, et al. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells *via* the generation of tumor hypoxia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: 2784-2789.
- [34] Ikeda M, Takahashi H, Kondo S, et al. Phase 1b study of galunisertib in combination with gemcitabine in Japanese patients with metastatic or locally advanced pancreatic cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79: 1169-1177.
- [35] Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13[J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172: 1-23.
- [36] Gao J, Zhang C, Gao F, et al. The effect and mechanism of dopamine D1 receptors on the proliferation of osteosarcoma cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 430: 31-36.
- [37] Borcherding DC, Tong W, Hugo ER, et al. Expression and therapeutic targeting of dopamine receptor-1 (D1R) in breast cancer [J]. *Oncogene*, 2016, 35: 3103-3113.