

质子型双菲啰啉的特异性抗肿瘤活性及其机制研究

赵梓圳, 付琛, 崔志鸿, 李晓荣, 张颖颖, 张雨萍, 杨晓茜, 付爱玲*

(西南大学药学院, 重庆 400716)

摘要: 肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是常见的恶性肿瘤, 其发病率高且极易转移复发, 严重影响人类健康。传统药物治疗存在不良反应大、多药耐药等问题, 因此亟须寻找新的药物和作用靶点。本研究合成了质子型的双菲啰啉 (protonic bis-phenanthroline, H-BP), 结果显示 H-BP 可选择性地抑制肿瘤细胞增殖, 引起肝癌细胞凋亡; 在 HCC 荷瘤小鼠体内, H-BP 能够有效阻止瘤块的生长, 在中剂量 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和高剂量 ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 时可完全消除肿瘤, 并对小鼠体重没有明显影响。实验方案由西南大学动物实验伦理委员会批准, 严格按照动物使用和护理的伦理原则进行实验操作。机制研究表明, H-BP 引起 HCC 凋亡的原因与 H-BP 降低了原癌基因转录因子多形性腺瘤基因样蛋白 2 (pleomorphic adenoma gene like-2, PLAGL2) 的表达有关, 造成 PLAGL2 下游蛋白缺氧诱导因子和 β 连环蛋白的下调, 从而引发癌细胞死亡。本研究不仅使用氢键二聚化方法合成化合物, 为药物的设计提供新的思路, 而且实验结果表明 PLAGL2 可能是肿瘤治疗中的一个有效靶标。

关键词: 肝细胞癌; 质子型双菲啰啉; 多形性腺瘤基因样蛋白 2; 凋亡; 氢键

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)05-1344-08

Specific antitumor activity and mechanism of protonic bis-phenanthroline

ZHAO Zi-zhen, FU Chen, CUI Zhi-hong, LI Xiao-rong, ZHANG Ying-ying,
ZHANG Yu-ping, YANG Xiao-xi, FU Ai-ling*

(College of Pharmaceutical Science, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common malignant tumor worldwide. The incidence rate of HCC is high and is easy to metastasis and recurrence, which seriously affects human health. Traditional chemical drugs have some challenges such as toxicity, side effects, and multidrug resistance, thus it is urgent to find new drugs and effective targets. Here we synthesized a novel chemical, protonic bis-phenanthroline (H-BP), and the antitumor effect was investigated in the study. The results showed that H-BP could selectively inhibit the proliferation of tumor cells and cause HCC apoptosis. And also, in HCC tumor-bearing mice, H-BP could effectively prevent the growth of tumor mass, even completely eliminate the tumor at medium dose ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and high dose ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and meanwhile H-BP has no significant effect on the body weight of mice. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Southwest University, and the experimental operation was strictly carried out in accordance with the ethical principles of animal use and care. Mechanism studies showed that H-BP induced HCC apoptosis was related to down-regulation the expression of pleomorphic adenoma gene like-2 (PLAGL2), a oncogene transcription factor, resulting in the down-regulation of PLAGL2 downstream proteins hypoxia inducible factor and β -catenin. This study not only introduces the dimerization method to form novel compounds that will provide a new

收稿日期: 2021-10-31; 修回日期: 2021-12-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82073830); 重庆市基础研究与前沿探索重点项目 (cstc2019jcyj-zdxmX0035); 中央高校基本业务费项目 (7110100301).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-23-68251225, E-mail: fal@swu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1553

approach for drug design, but also suggests that PLAGL2 may be an effective target in tumor therapy.

Key words: hepatocellular carcinoma; protonic bis-phenanthroline; pleomorphic adenoma gene like-2; apoptosis; hydrogen bond

最近, 针对癌症特征的各种抗癌方法不断推陈出新, 但遵守的基本原则依然是在尽量不影响正常细胞功能的条件下, 选择性杀伤肿瘤细胞。在抗癌药物的研究中, 发现或合成新结构的化合物是消除肿瘤对现有药物的耐药性、降低不良反应的必要途径。

氢键是生物体中最基本的化学键之一, 广泛存在生物体的生化反应中, 参与分子识别、遗传信息的表达、调控代谢过程等生命活动。氢键键能介于共价键和非共价键之间。本研究通过本实验室建立的氢键二聚化的制备技术^[1], 将两个 1,10-菲啰啉分子进行连接, 形成稳定的质子型双菲啰啉 (protonic bis-phenanthroline, H-BP) 化合物, 体外和体内实验阐明该化合物具有选择性的抗肿瘤活性及其分子机制。本研究利用氢键连接的二聚化方法, 可能为抗癌药物的设计和合成提供新的思路。

材料与方法

实验试剂和材料 肺癌 A549 细胞、小鼠肝癌 H22 细胞、神经胶质瘤 U251 细胞、肝脏 L02 细胞和人胚肾 293 细胞 (HEK293) 等细胞系为本实验室保存。1,10-菲啰啉、六氟硅酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SiF}_6]$ 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 纯度大于 99.9%。 β 肌动蛋白 (β -actin) 抗体、缺氧诱导因子 (hypoxia inducible factor, HIF) 抗体、 β 连环蛋白 (β -catenin) 抗体及辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔二抗等购于武汉赛维尔生物科技有限公司; 多形性腺瘤基因样蛋白 2 (pleomorphic adenoma gene like-2, PLAGL2) 抗体、Bcl2 相关 X 蛋白 (Bcl2 associated X protein, BAX) 抗体和 Bcl2 相互作用蛋白 3 (Bcl2 interacting protein 3, BNIP3) 抗体购于上海生工生物工程有限公司; CCK-8、TUNEL 凋亡试剂盒购于碧云天生物技术有限公司; 细胞培养试剂和材料购于 Gibco 公司。

动物 昆明种小鼠, 雌雄各半, 购自重庆医科大学动物中心 (生产许可证号: SCXK [京 2009-0015])。动物实验经西南大学实验动物伦理审查委员会批准。取 1.5 月龄的小鼠用于皮下肿瘤模型的制作。

H-BP 的合成 将 1 g 1,10-菲啰啉溶于 10 mL 的水醇溶液中, 然后在充满 N_2 的反应瓶中加入适量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SiF}_6$ 溶液, 在室温下搅拌溶液约 2 h。所得到的产物在真空中冷冻干燥后加入适量乙腈溶解产物, 过

滤取上清, 真空干燥即可得到粉红色的 H-BP 产物。化合物熔点使用熔点测定仪进行测定。化合物结构分别通过傅里叶变换红外光谱 (FTIR; Thermo Scientific Nicolet)、核磁共振光谱 (NMR; Bruker AVANCE NEO) 和高分辨率质谱 (HRMS; Finnigan LTQ-FT instrument) 进行鉴定。

稳定性分析 将合成的 H-BP 分别放置于不同温度下 1 周后, 测定其熔点以初步判断其稳定性。然后将 H-BP 溶于纯水中, 分别放置于 25、37、60 和 100 °C 1 周, 检测其紫外吸收光谱的变化。此外, 将 H-BP 的溶液分别用 HCl 和 NaOH 调节到 pH 3、6、9 后, 检测溶液紫外吸收光谱的改变。

细胞培养 将细胞从液氮罐中取出, 放入 42 °C 水浴锅中快速溶解, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清液, H22 细胞使用 RPMI-1640 完全培养基重悬细胞, 而肺癌 A549 细胞、神经胶质瘤 U251 细胞、肝脏 L02 细胞和人胚肾 293 细胞 (HEK293) 使用 DMEM 完全培养基重悬细胞。将细胞悬液转移至 6 cm 培养皿中, 补充完全培养基至 5 mL, 细胞培养箱中培养。

细胞活力及凋亡的测定 将细胞接种于 96 孔培养板内, 待细胞生长至 80%~90% 时, 分别配制相同浓度的 H-BP 或菲啰啉溶液, 将 10 μL 的 H-BP 或菲啰啉分别加入到 100 μL 细胞培养基中, 每个浓度设置复孔, 对照组加入等量的 PBS。将 96 孔板放入细胞培养箱中孵育 6 h 后, 进行细胞活力测定。每孔加入 CCK-8 工作液 10 μL , 并继续孵育 1 h, 最后于酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。细胞增殖活力% = $[(A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$ 。

使用 TUNEL 染色试剂盒测定细胞凋亡。将加入 H-BP 的 6 孔板放入培养箱中孵育 6 h 后, 根据试剂盒相关说明进行染色, 荧光显微镜下观察细胞染色情况。

蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 收集待测细胞并加入配制好的 RIPA 细胞裂解工作液, 冰上静置 30 min, 4 °C、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min。取上清液, 加入蛋白上样缓冲液, 于沸水浴中煮沸 5 min 即得蛋白样品。将样品进行 SDS-PAGE 蛋白电泳后转移至 PVDF 膜上, 然后用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。将 PVDF 膜放入配制好的一抗溶液, 4 °C 过夜后, 使用 TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min。然后将 PVDF 膜在室温用二抗孵育 90 min, TBST 洗涤 3 次后, 使用 ECL 显影并

进行化学发光成像。

动物模型的制作及 H-BP 的治疗研究 将培养的 H22 细胞皮下接种给小鼠 3 天后 (10^7 个细胞/只), 皮下出现较为明显肿瘤团块, 随着天数增加, 瘤块体积逐渐增长^[2-4]。当体积增大至约 0.3 cm^3 后, 将小鼠随机分为 5 组, 每组 8 只。H-BP 治疗组是将剂量为 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (低剂量组)、 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (中剂量组) 和 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (高剂量组) 的 H-BP 分别经静脉注射给予小鼠, 每日 1 次, 共给予 10 天。阳性对照组采用静脉给予 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 顺铂。模型对照组给予等量的生理盐水。待模型对照组小鼠的瘤块体积增长至约 3.0 cm^3 后, 将各组小鼠处死, 分离瘤块, 称重。

肿瘤切片的 HE 染色和免疫组化染色 将各组小鼠的瘤块分别用多聚甲醛固定后, 进行石蜡包埋、组织切片和 HE 染色, 光学显微镜下观察组织切片。此外, 将瘤块进行冷冻切片, 然后用 TUNEL 细胞凋亡试剂进行免疫组化染色, 在荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

统计学分析 数据结果用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用 GraphPad Prism 7.0 对数据进行统计分析。使用 *t* 检验 (Student's test) 用于检验两组样本的差异; 使用 one-way ANOVA 比较多组样品之间的差异。

结果

1 H-BP 的结构鉴定

本实验采用分子间质子转移的方法^[5], 将 $(\text{NH}_4)_2\text{SiF}_6$ 中铵的一个 H 转移到两个菲啰啉的 N 原子上, 形成 N-H⁺...N 的氢键结构。红外光谱显示合成的化合物在

3 500~3 200 nm 间有一个强烈的氢键光谱峰 (图 1A)。氟谱核磁 (^{19}F -NMR) 图谱中出现氟吸收峰, 表明化合物结构中含有氟原子 (图 1B)。 ^3H 核磁图谱 (^3H -NMR) 和高分辨质谱的结果也显示, 化合物的分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{N}_4$, 分子质量为 361.14 (图 1C、D)。结构解析表明, H-BP 的结构为 N-H...N 氢键连接的双菲啰啉 (图 1E)。H-BP 的熔点为 $167\sim 168 \text{ }^\circ\text{C}$, 比原料 1,10-菲啰啉 (熔点为 $93\sim 94 \text{ }^\circ\text{C}$) 高 $74 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2 稳定性研究

H-BP 在 $-80\sim 100 \text{ }^\circ\text{C}$ 长期放置时, 其熔点保持不变。为进一步验证 H-BP 的稳定性, 本研究使用紫外分光光度法研究了在不同温度、不同 pH 时, H-BP 紫外吸收光谱的情况。结果表明, H-BP 在大约 300 nm 处有最高吸收峰; 将 H-BP 放置在 25、37、60 和 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, 其紫外吸收光谱没有显著改变 (图 2A); 将 H-BP 水溶液调至 pH 为 6 和 9 时, 紫外吸收光谱没有变化, 但在 pH 为 3 时, 紫外吸收有所增强 (图 2B)。这些结果表明, H-BP 在不同温度下具有高度的稳定性, 在 pH 呈弱酸性和碱性时, 也能保持较高的稳定性。

3 H-BP 选择性抑制肿瘤细胞增殖

将不同浓度的 H-BP 和原料菲啰啉分别加入到 U251 胶质瘤细胞、A549 肺癌细胞和 H22 肝癌细胞的培养基中, 细胞活力检测 H-BP 和菲啰啉对各种肿瘤细胞增殖的影响。结果显示, H-BP 可对 3 种不同类型的肿瘤细胞均有不同程度的抑制作用, 并呈剂量依赖性 (图 3A)。但将 H-BP 加入到正常人肝脏细胞和 HEK293 细胞中后, 显微镜下细胞状态依然良好, 实验

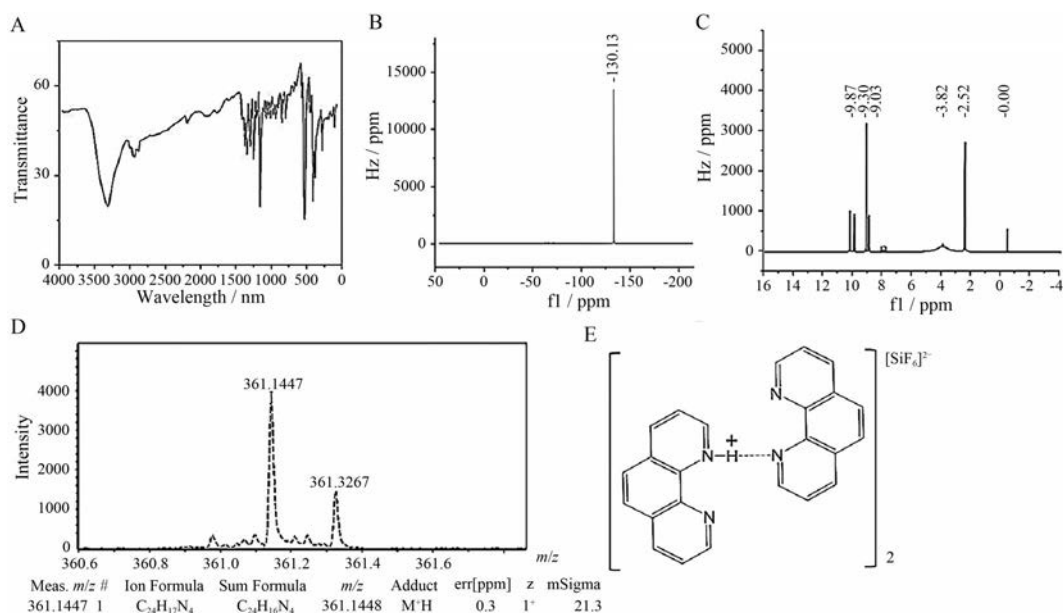


Figure 1 Chemical structure and identification spectra of H-BP. A: Infrared spectrum; B: ^{19}F -NMR spectrum; C: ^3H -NMR spectrum; D: High resolution mass spectrometry; E: Structure of H-BP

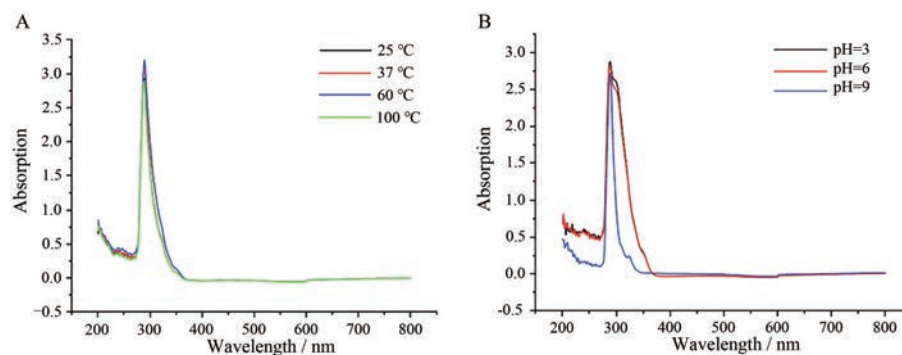


Figure 2 Stability study H-BP. A: UV absorption spectra of H-BP at different temperatures; B: UV absorption spectra of H-BP at different pH values

检测不同浓度的 H-BP 均不影响细胞的生长 (图 3B), 表明 H-BP 对肿瘤细胞具有选择性抑制作用。然而, 当原料菲啰啉加入到细胞培养基后, 各种细胞的活力均降低: 菲啰啉可使肿瘤细胞的活力降低至 60% 左右, 但菲啰啉降低正常细胞的活力更为明显, 可使细胞活力下降至约 45%。这个结果表明, H-BP 对细胞的作用与原料菲啰啉不同。

4 H-BP 可引起肝癌细胞凋亡

当 H-BP 加入到肿瘤细胞培养基一段时间后, 可明显观察到细胞皱缩、变圆变小 (图 4A), 显示出典型的凋亡特征。使用 TUNEL 细胞凋亡试剂 FITC-dUTP 检

测后, 在荧光显微镜下细胞呈现大量的凋亡阳性细胞 (图 4B), 进一步证明了 H-BP 可诱导细胞出现凋亡。

5 H-BP 调节 PLAGL2 及下游信号分子的表达

为阐明 H-BP 选择性诱导癌细胞凋亡的机制, 本研究根据文献报道, 尝试了不同的癌细胞和正常细胞的差异表达蛋白, 结果发现 H-BP 可快速下调原癌基因转录因子 PLAGL2 的表达 (图 5A、B)。在 H-BP 加入到 H22 细胞培养基 30 min 后, PLAGL2 蛋白水平即显著下降, 随着时间延长, PLAGL2 含量越低。此外, 与癌细胞中 PLAGL2 密切相关的下游信号分子 HIF 和 β -catenin 也显著下降 (图 5A、C 和 D), 而促凋亡蛋白

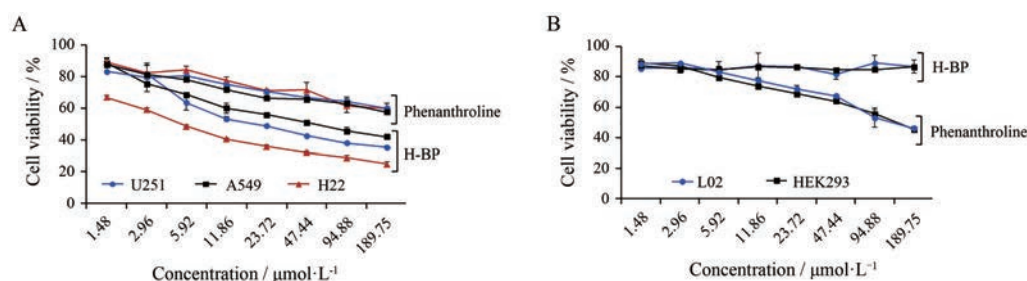


Figure 3 H-BP selectively inhibited the proliferation of tumor cells. A: Cell viability of U251 glioma cells, A549 lung cancer cells and H22 liver cancer cells after treated by H-BP and phenanthroline; B: Cell viability of L02 hepatocytes and HEK293 cells

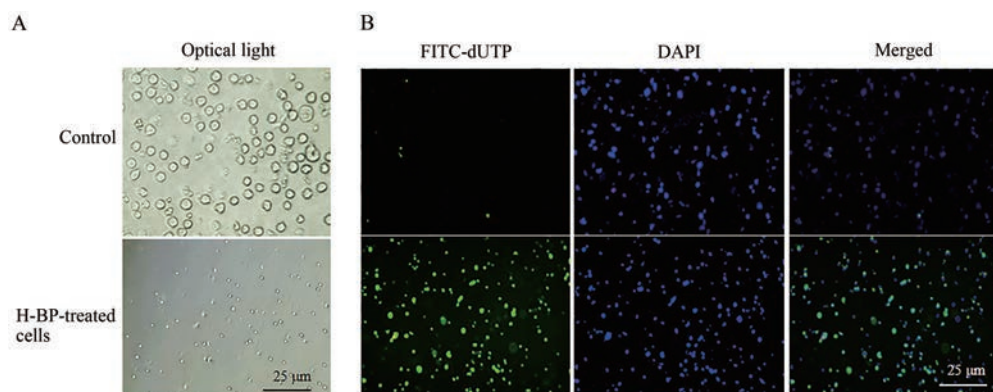


Figure 4 HCC apoptosis induced by H-BP. A: Morphological changes of H22 cells before and after H-BP treatment under light microscope. H-BP ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) was added into the cell media for 4 h; B: Large numbers of apoptosis-positive cells appeared in H22 cells under fluorescence microscope. Apoptotic cells were stained with FITC-dUTP (green), and cell nuclei were stained with DAPI (blue)

BNIP3和BAX的水平则明显升高(图5A、E和F)。该结果表明,H-BP可能通过PLAGL2抑制癌细胞增殖及引发细胞凋亡。

6 H-BP在荷瘤小鼠体内抑制皮下瘤的生长

小鼠皮下接种H22细胞后,模型对照组小鼠皮下的肿瘤逐日增长,活动渐渐受限。顺铂治疗组小鼠虽然肿瘤体积有所缩小,但动物瘦弱无力,活动减少,精神萎靡,毛发稀疏。而H-BP给药组小鼠状态良好,饮食、活动均正常。统计学结果显示,顺铂组小鼠体重明显低于模型对照组,而H-BP给药组小鼠体重与模型对照组没有差别(图6A)。当模型对照组体内的瘤块增长至 3.0 cm^3 后处死小鼠,分离瘤块,肉眼可见模型对照小鼠的瘤块呈粉红或者暗红色,有明显的血管分布,而H-BP给药组小鼠体内的瘤块呈粉白或者肉色(图6B),表面几乎没有明显的血管分布。当给予小鼠 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的H-BP 10天后,有一只小鼠皮下的肿瘤完全消退(1/8);当剂量增加到 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后,肿瘤体积更为缩小,有两只小鼠的肿瘤消退(2/8)。将肿瘤称重后,H-BP给药组小鼠的肿瘤与模型对照组相比,均有极显著差异,肿瘤重量呈剂量依赖性的减少(图6C)。这些结果表明,H-BP在体内可明显抑制肿瘤生长,甚至能够完全消除肿瘤。

7 H-BP可引起肿瘤组织中细胞凋亡

组织切片经HE染色后,在光学显微镜下可见模型对照组的肿瘤组织内充满了肿瘤细胞,顺铂组的瘤组织切片上肿瘤细胞数量减少。此外,随着H-BP剂量

的增加,瘤组织切片上的细胞数量明显减少(图7A)。TUNEL染色后显示,H-BP给药组的肿瘤组织中出现了大量的凋亡阳性细胞,并且随着H-BP剂量的增加,凋亡细胞明显增多(图7B),表明H-BP通过诱导肿瘤细胞凋亡,从而抑制肿瘤组织的生长。

8 H-BP抑制肿瘤生长的组织学观察

由于H-BP可使荷瘤小鼠皮下肿瘤完全消退,因此本研究观察了给予H-BP后的肿瘤的整体形态。模型对照组的肿瘤表面和内部均分布有大量血管,使瘤块有充足的血液供应。而H-BP给药组没有明显血管分布,并且瘤块缩小且呈中空状(图8A)。此外,在显微镜下可观察到H-BP给药组的实质结构与中空结构之间,没有完整的细胞结构,细胞黏结断裂(图8B),出现大量的凋亡细胞(图8C)。对每组各张切片比较后发现,模型对照组的肿瘤切片上肿瘤细胞呈致密分布,但在给药组的肿瘤血管周围,出现了未能核染的细胞碎片(图8D),表明H-BP通透血管后,即可诱导肿瘤细胞凋亡,并且随着剂量增加出现细胞碎片的面积增大,TUNEL免疫组化也显示在血管周围出现大量的凋亡细胞(图8E)。由于肿瘤内有丰富的血管,H-BP透过血管后可发挥诱导肿瘤细胞凋亡的作用,并且由于肿瘤中部血管增生较为旺盛,因此造成了瘤块中空化。

9 H-BP抑制肿瘤生长的作用机制

取小鼠肿瘤组织进行PLAGL2、HIF、 β -catenin、BNIP3和BAX等蛋白的WB分析。结果如图9所示,与模型对照组相比,H-BP给药组小鼠的肿瘤组织中

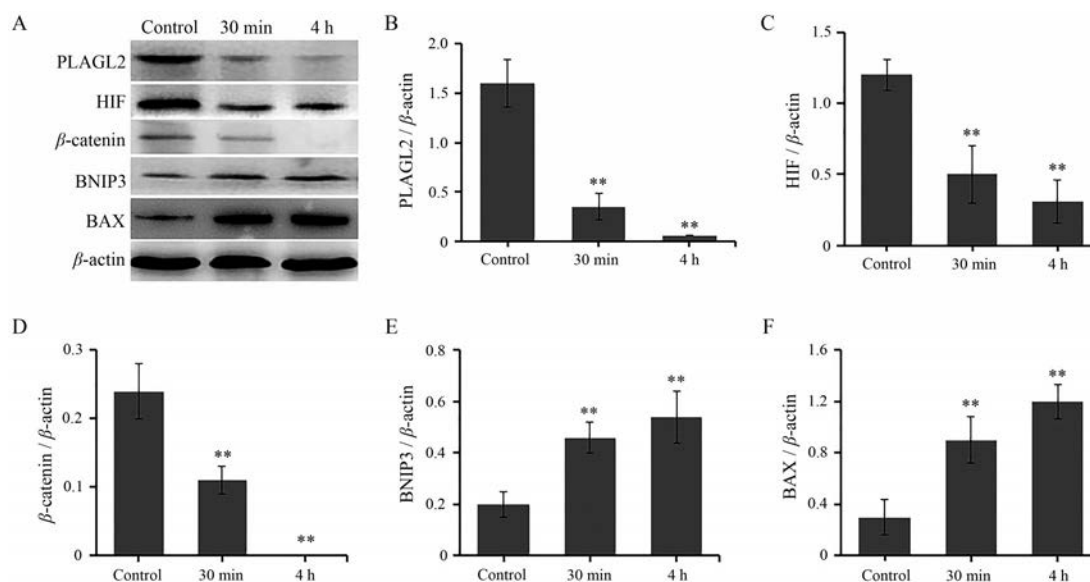


Figure 5 H-BP could down-regulate the expressions of pleomorphic adenoma gene like-2 (PLAGL2) and its downstream signal molecules, and up-regulate the expression of pro-apoptotic proteins in H22 cells. A: Western blot results showed changes of protein levels after H-BP was added to the culture media for 30 min and 4 h, respectively; B–F: Gray value of Western blot results. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group. HIF: Hypoxia inducible factor; BNIP3: Bcl2 interacting protein 3; BAX: Bcl2 associated X protein

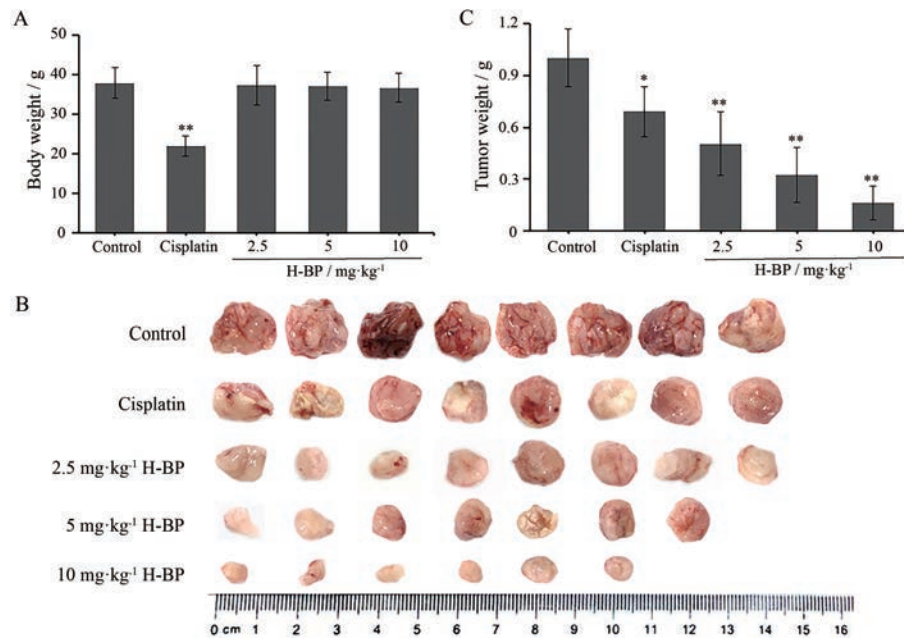


Figure 6 H-BP inhibited the growth of tumor in tumor-bearing mice. A: Mouse weight of each group ($n = 8$ in each group); B: Tumor mass isolated from tumor-bearing mice; C: Tumor weight of each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

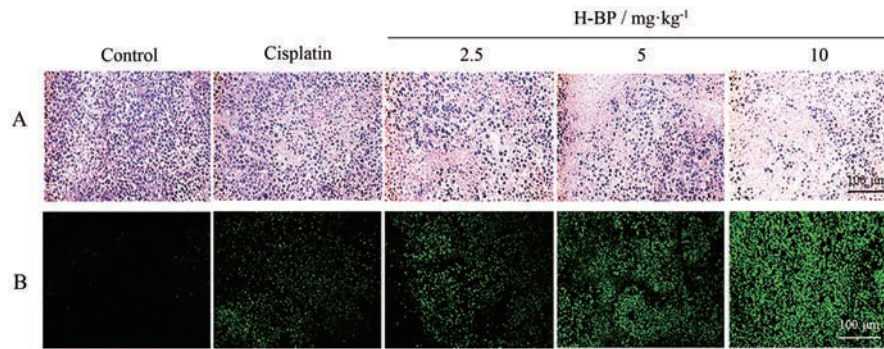


Figure 7 H-BP could induce cell apoptosis in tumor tissue of tumor-bearing mice. A: HE staining; B: TUNEL staining of tumor tissue sections

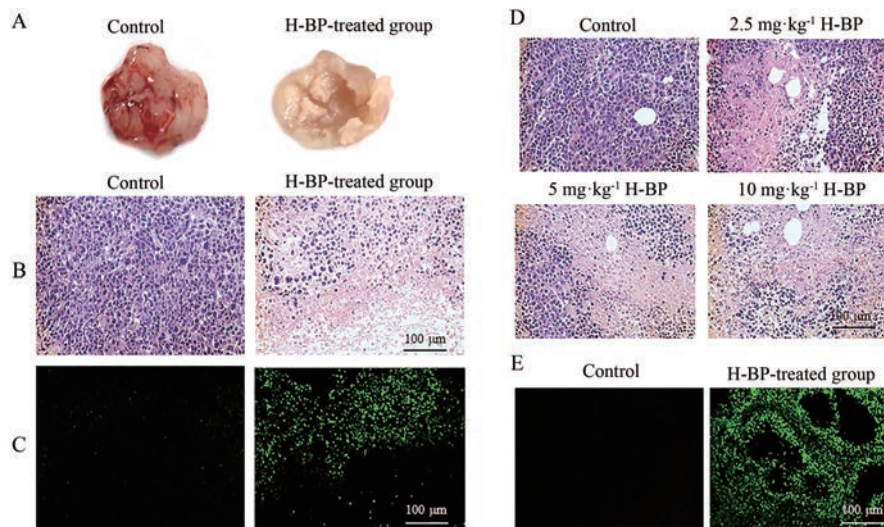


Figure 8 H-BP could cross blood vessels, induce cell apoptosis and cause cavitation in tumor tissue. A: Representative images of tumor in model control group and H-BP-treated group; B: Rupture of cell adhesion in tumor tissue of H-BP-treated group; C: TUNEL apoptosis staining showed that there were a large number of apoptotic cells in tumor tissue near the hollow in H-BP-treated group; D, E: Cell fragments (D) and apoptotic cells (E) outside blood vessels of tumor tissue after H-BP administration

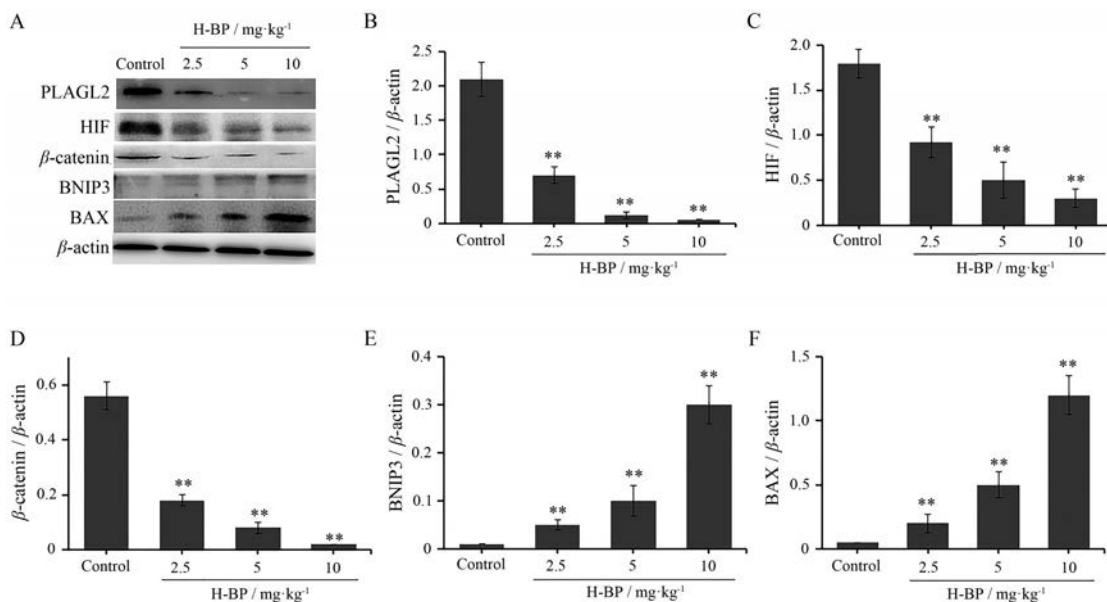


Figure 9 H-BP could regulate the expression of PLAGL2 and its downstream proteins in tumor tissues in a dose-dependent manner ($n = 6-8$ in each group). ** $P < 0.01$ vs control group

PLAGL2、HIF 和 β -catenin 的蛋白水平显著降低, 并呈剂量依赖性 (图 9A~D), 而促凋亡蛋白 BNIP3 和 BAX 的蛋白含量则显著升高 (图 9E、F), 说明 H-BP 能够引发肿瘤组织的细胞凋亡, 并具有剂量依赖性。

讨论

本实验采用分子间质子转移的技术, 合成了氢键连接的 H-BP, 实验证明了 H-BP 可选择性抑制肿瘤细胞的增殖, 但不影响正常细胞活性。其分子机制为下调肿瘤细胞的原癌基因转录因子 PLAGL2 及其下游分子 HIF 和 β -catenin 癌相关基因的表达, 并升高促凋亡蛋白的含量, 从而引发肿瘤细胞凋亡。

以往认为, 质子转移形成的分子海绵 ($N-H^+\cdots N$) 只能在分子内部产生^[5], 但本实验证明了在室温下 1,10-菲啶即能通过接收铵离子的质子, 形成较为稳定的二聚体, 推测 1,10-菲啶间形成的氢键为具有较高键能的低势垒氢键^[6,7]。该发现将可能拓宽了对分子海绵的认识, 也可能会导致新活性化合物的出现。

PLAGL2 是 PLAG 锌指蛋白转录因子的一个成员, 是参与各种恶性肿瘤的癌蛋白, 与肿瘤的发生发展、侵袭、转移、耐药以及不良预后等密切相关^[8,9]。PLAGL2 作为转录因子, 可调节涉及肿瘤增殖、血管生成、肿瘤转移等多种基因, 被认为是肿瘤治疗中极具潜力的靶标之一^[10-12]。在目前已有的报道中, PLAGL2 在 HCC、胃癌、结肠癌、淋巴瘤、神经母细胞瘤、前列腺癌和肺癌等肿瘤细胞中呈高水平表达, 但 PLAGL2 在正常组织中表达量很低, 甚至几乎不表达^[13]。有报道

认为, 针对 PLAGL2 的靶向抑制剂将会为特异性靶向抗肿瘤药物的开发提供新策略^[14]。

在本实验中, H-BP 可显著性下调 PLAGL2 蛋白的表达水平, 这可能是 H-BP 选择性抗肿瘤的分子机制。PLAGL2 调控的下游基因中, HIF 和 β -catenin 是两个典型的与肿瘤发展、恶化密切相关的蛋白质: HIF 是在肿瘤缺氧微环境中过量表达的一种蛋白, 可促进肿瘤细胞生长增殖, 并刺激肿瘤血管增生^[15]; β -catenin 是一种信号转导分子和细胞间黏附分子, 在肿瘤的浸润、侵袭和转移中起重要的作用^[16]。PLAGL2 可通过 EGFR/PI3K/AKT 上调 HIF 的表达^[17], 而 PLAGL2 通过 PLAGL2/Wnt/ β -catenin 信号通路调控 β -catenin 的表达^[18]。本实验中 H-BP 在显著下调 PLAGL2 蛋白水平的同时, 降低 HIF 和 β -catenin 的表达, 抑制肿瘤细胞的生长增殖, 减少细胞间黏连, 促进细胞凋亡。在肿瘤组织中, H-BP 通过抑制 PLAGL2 表达及下游分子的蛋白水平, 造成血管周围肿瘤细胞的大量死亡, 在肿瘤内部形成了中空状。

总之, 本研究报道了氢键连接的 H-BP 的合成方法, 证明通过该方法合成的 H-BP 具有较强的稳定性, 并具有选择性抗肿瘤的活性。分子机制研究表明, H-BP 可通过调节 PLAGL2 及其下游肿瘤相关蛋白的表达, 引起肿瘤细胞凋亡。由于目前尚没有 PLAGL2 的特异性抑制剂的报道, 本实验为发展靶向作用于该通路的药物及为肿瘤的特异性治疗提供新的证据。

作者贡献: 赵梓圳完成了细胞和动物实验; 赵梓圳、付琛和张雨萍合成了化合物并进行结构鉴定; 崔志鸿和李晓荣对

论文进行了指导并提供了支持; 张颖颖负责化合物稳定性的实验; 杨晓茜进行了化合物纯度的测定; 付爱玲进行了实验设计并撰写论文。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Zhao Z, Fu C, Zhang Y, et al. Dimeric histidine as a novel free radical scavenger alleviates non-alcoholic liver injury [J]. *Antioxidants*, 2021, 10: 1529.
- [2] Xun HR, Liu B, Wang SQ, et al. Sodium nitrite improves epithelial-mesenchymal transition of hepatoma cells in mice bearing H22 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47: 1470-1476.
- [3] Chen XY, Liu JT, Deng HM, et al. Effect on tumor growth inhibition activity of *Gekkoswinhonis Guenther* with different extent of broiling on H22 tumor-bearing mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1048-1053.
- [4] Ji G, Ma L, Yao H, et al. Precise delivery of obeticholic acid via nanoapproach for triggering natural killer T cell-mediated liver cancer immunotherapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 2171-2182.
- [5] Ozeryanskii VA, Marchenko AV, Pozharskii F, et al. Combination of "buttressing" and "clothespin" effects for reaching the shortest NHN hydrogen bond in proton sponge cations [J]. *J Org Chem*, 2021, 4: 3637-3647.
- [6] Alder RW, Bowman PS, Steele WRS, et al. The remarkable basicity of 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene [J]. *Chem Comm*, 1968, 13: 723-724.
- [7] Karas LJ, Wu CH, Das R, et al. Hydrogen bond design principles [J]. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*, 2020, 10:e1477.
- [8] Strubberg AM, Paniagua DAV, Zhao T, et al. The zinc finger transcription factor PLAGL2 enhances stem cell fate and activates expression of ASCL2 in intestinal epithelial cells [J]. *Stem Cell Rep*, 2018, 11: 410-424.
- [9] Hu W, Zheng S, Guo H, et al. PLAGL2-EGFR-HIF-1/2 α signaling loop promotes HCC progression and erlotinib insensitivity [J]. *Hepatology*, 2020, 73: 674-691.
- [10] Cao Y, Tao Q, Kao X, et al. Hsa-circRNA-103809 promotes hepatocellular carcinoma development via microRNA-1270/PLAG1 like zinc finger 2 axis [J]. *Dig Dis Sci*, 2021, 66: 1524-1532.
- [11] Su C, Li D, Li N, et al. Studying the mechanism of PLAGL2 overexpression and its carcinogenic characteristics based on 3'-untranslated region in colorectal cancer [J]. *Int J Oncol*, 2018, 52: 1479-1490.
- [12] Liu B, Lu C, Song YX, et al. The role of pleomorphic adenoma gene-like 2 in gastrointestinal cancer development, progression, and prognosis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7: 3089-3100.
- [13] Yang T, Huo J, Xu R, et al. Selenium sulfide disrupts the PLAGL2/C-MET/STAT3-induced resistance against mitochondrial apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11: e536.
- [14] Li T, Mao C, Wang X, et al. Epigenetic crosstalk between hypoxia and tumor driven by HIF regulation [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39: 224.
- [15] Kim E, Lisby A, Ma C, et al. Promotion of growth factor signaling as a critical function of β -catenin during HCC progression [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 1909.
- [16] Wang L, Sun L, Liu R, et al. Long non-coding RNA MAPKAPK5-AS1/PLAGL2/HIF-1 α signaling loop promotes hepatocellular carcinoma progression [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40: 72.
- [17] Wu L, Zhou Z, Han S, et al. PLAGL2 promotes epithelial-mesenchymal transition and mediates colorectal cancer metastasis via β -catenin-dependent regulation of ZEB1 [J]. *Br J Cancer*, 2020, 122: 578-589.
- [18] Wang YP, Guo PT, Zhu Z, et al. Pleomorphic adenoma gene like-2 induces epithelial-mesenchymal transition via Wnt/ β -catenin signaling pathway in human colorectal adenocarcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37: 1961-1970.