

## 小白菊内酯降解剂的设计、合成及生物学研究

高桐<sup>1</sup>, 张文涛<sup>2</sup>, 宋姗姗<sup>3</sup>, 周棣<sup>1</sup>, 刘同超<sup>3\*</sup>, 缪泽鸿<sup>3</sup>, 熊兵<sup>3\*</sup>

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230031; 2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016;  
3. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

**摘要:** 小白菊内酯作为药用历史悠久的天然产物, 引起了化学家和生物学家的浓厚兴趣。现有的研究表明其具有抗炎、抗肿瘤等药理活性, 也揭示了其作用于NF- $\kappa$ B信号通路、DNMT1酶及Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路等的生物调控功能, 但其确切的生物学靶点仍有待系统阐明。蛋白降解剂为天然产物的靶点发现提供了新的策略, 可通过蛋白组学的考察, 探究细胞中蛋白的全景变化, 从而分析其潜在的靶点。本研究基于这一思路, 以小白菊内酯为母体结构, 设计、合成了20个小白菊内酯降解剂, 测定了其体外抗肿瘤增殖活性, 并优选化合物开展蛋白组学实验, 鉴定出139个下调的差异表达蛋白(DEPs), 对小白菊内酯的作用靶点发现进行了初步探索。

**关键词:** 小白菊内酯; PROTAC; 靶点; 抗肿瘤; 蛋白组学

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)09-2715-12

## Synthesis, evaluation and proteomic analysis of PROTAC based on parthenolide

GAO Tong<sup>1</sup>, ZHANG Wen-tao<sup>2</sup>, SONG Shan-shan<sup>3</sup>, ZHOU Di<sup>1</sup>, LIU Tong-chao<sup>3\*</sup>,  
MIAO Ze-hong<sup>3</sup>, XIONG Bing<sup>3\*</sup>

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** As a natural product with a long history of medicinal use, parthenolide has aroused great interest of chemists and biologists. Existing studies have shown that it has anti-inflammatory, antitumor and other pharmacological activities, and also revealed its action on NF- $\kappa$ B signaling pathway, DNMT1 enzyme and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. But its biological targets remain to be elucidated systematically. Proteolysis Targeting Chimeras (PROTAC) provides a new strategy for target discovery of natural products, which can be used to explore the panorama of protein changes in cells through proteomic investigation, so as to analyze their potential targets. Based on this idea, current study designed and synthesized 20 parthenolide-derived degraders. After measured their antitumor activity *in vitro*, selected compounds were carried out the proteomic experiment. Finally, 139 down-regulated differentially expressed proteins were identified and the discovery of parthenolide interacting protein was preliminarily explored.

**Key words:** parthenolide; PROTAC; target; antitumor; proteomics

小白菊内酯 (parthenolide, PTL) 是一种倍半萜烯内酯类天然产物, 常提取于菊科 (雏菊) 和木兰科 (木

兰属) 等药用植物中。大量研究阐述了其在抗炎、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化等方面的生物活性<sup>[1]</sup>。小白菊内酯及其衍生物在肺癌<sup>[2]</sup>、结直肠癌<sup>[3]</sup>、肝癌<sup>[4]</sup>、骨肉瘤<sup>[5]</sup>等多种癌症中也表现出一定的治疗潜力, 其中候选药物 DMAPT 已开展临床试验, 探索其替代常规化疗的治疗价值<sup>[6]</sup>。

收稿日期: 2023-02-27; 修回日期: 2023-03-28.

\*通讯作者 Tel: 86-21-50806600-5412, E-mail: bxiong@simm.ac.cn;

Tel: 86-21-50806600-5407, E-mail: tongchao\_liu@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0228

但同很多天然产物类似, PTL 具有广泛的药理活性, 对 NF- $\kappa$ B 信号通路、DNA 甲基化及细胞内氧化还原状态等生化过程均起到一定程度的调节作用<sup>[7,8]</sup>。由于其含有  $\alpha$ -亚甲基- $\gamma$ -内酯环骨架和环氧结构 (图 1), PTL 可以与蛋白的亲核位点形成共价结合, 故其潜在的靶点复杂多样。Michael 课题组<sup>[9]</sup>发现 PTL 通过泛素-蛋白酶体降解机制特异性地消耗 HDAC1 蛋白, 从而特异性靶向癌症干细胞; Li 课题组<sup>[10]</sup>报道了 PTL 抑制细胞增殖和抑制 KSHV 感染细胞中的 NF- $\kappa$ B 信号通路来降低 KSHV 致病性; Liu 等<sup>[11]</sup>在 2022 年首次发现了 PTL 能够浓度依赖性降低了 HepG2 细胞中 NPC1L1 的表达, 这表明 PTL 作为一种潜在的 NPC1L1 抑制剂, 具有抗高胆固醇血症的治疗潜力。尽管现有研究揭示了 PTL 在调控生化过程中的一些作用机制, 但系统探索其确切的作用靶点仍鲜见报道。

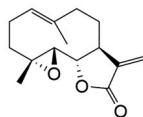


Figure 1 Structure of parthenolide (PTL)

蛋白降解靶向联合体 (proteolysis targeting chimeras, PROTAC) 是一类新型药物模态 (modality), 可通过生物体内的泛素-蛋白酶体系统来降解目标蛋白。故其化学结构通常由 3 部分组成: 目标蛋白配体分子、泛素系统中 E3 连接酶配体及将两者相连的连接子<sup>[12]</sup>。与传统的小分子药物不同, 它不需要高浓度的药物剂量来占据靶点的结合口袋, 而是遵循“驱动模式”, 只需循环利用微量药物将 E3 连接酶与目标蛋白形成三元复合物, 进而泛素化标记目标蛋白, 通过蛋白酶体进行降解<sup>[13-15]</sup>。随着一系列 PROTAC 分子 (ARV-110、ARV-471、KT-474 等) 进入 I/II 期临床试验, 进一步表明该类药物具有巨大的应用价值。近年来针对天然产物进行相应 PROTAC 分子探针的设计合成及生物活性研究也逐渐出现了<sup>[16]</sup>。Cao 课题组<sup>[17]</sup>基于天然产物靛红 (indirubin) 开发了一系列 indirubin-PROTACs, 并在小鼠体内初步证实了其对 HDAC6 的靶向降解作用。Huang 课题组<sup>[18]</sup>设计并合成了以索拉菲尼 (sorafenib) 为蛋白抑制剂的 PROTACs, 通过生物学实验证实了 PDE $\delta$  与索拉菲尼的直接结合作用; Chen 课题组<sup>[19]</sup>报道了以乙烯二萜 ZCY-001 为核心支架结构, 合成 ZCY-PROTACs, 发现并鉴定了 MAFF 是乙烯二萜的靶点。

本文针对小白菊内酯, 开展了其降解剂的设计合成, 期望通过靶向蛋白降解策略, 并结合蛋白组学初步探究其细胞中的靶点全景, 以期天然产物靶点发现

提供一个新颖的思路。

## 结果与讨论

### 1 化合物的设计

由于萜类化合物特殊的骨架以及 PTL 不饱和内酯, 使其具有较大的改造空间。迄今, 在对 PTL 各个位点处进行修饰的衍生物均已得到不同程度的报道, 其中当属在 C13 和 C14 这两个位点处的改造工作居多 (图 2)。Crooks 课题组<sup>[20]</sup>早在 2006 年, 通过 Michael 加成的方式在 C13 位点处引入二甲氨基, 大大改善了 PTL 的水溶性。随后 Crooks 和 Jangananati 课题组<sup>[21,22]</sup>又引入了不同的胺类基团, 进一步完善在 C13 位点进行修饰的小白菊内酯衍生物的机制研究。Zhang 课题组<sup>[23]</sup>将 C14 位点处的甲基通过氧化反应得到 PTL 羧酸衍生物; 随后 Ding 等<sup>[24]</sup>首次引入了叠氮基团, 通过 Click 反应合成了三唑类衍生物, 并对 60 种肿瘤细胞系进行了筛选, 表现出了很好的抗增殖活性。基于以上研究, 设想以 PTL 作为目标蛋白配体设计 PROTAC 分子, 选择泊马度胺作为 E3 连接酶配体, 通过不同类型的 Linker 将其与 PTL 的 C13 位点及 C14 位点处的衍生物连接起来, 合成一系列 PTL-PROTACs (图 2)。

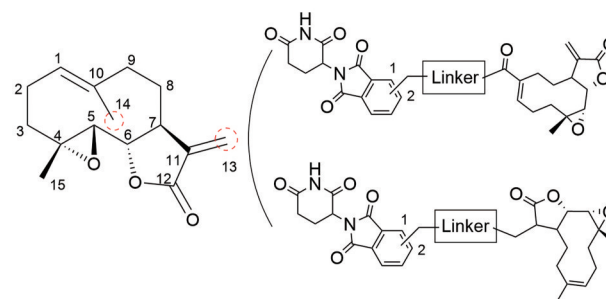


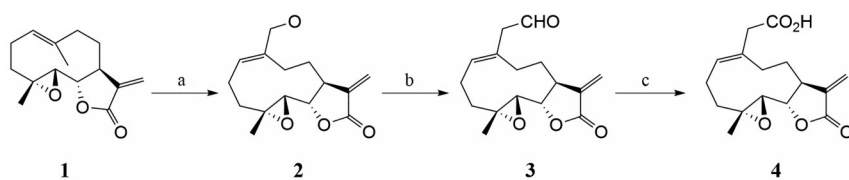
Figure 2 Conjugation sites of PTL-PROTACs

### 2 化合物的合成

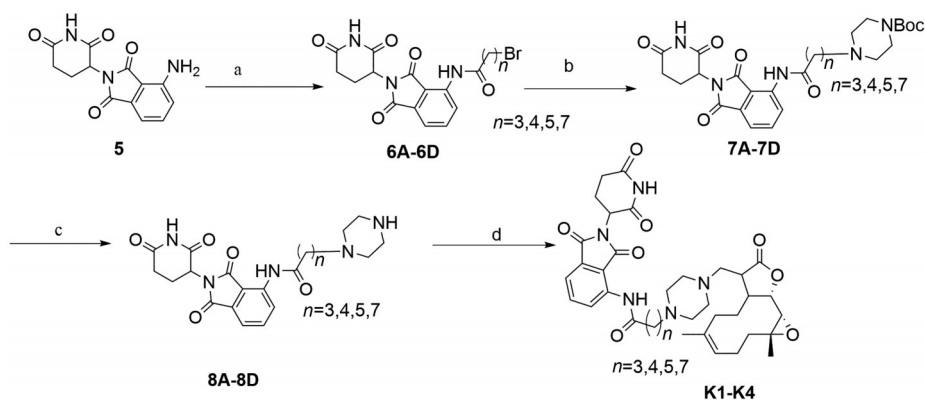
PTL 羧酸衍生物参考已有报道的路线进行合成<sup>[22]</sup>。在合成路线 1 中, 以小白菊内酯为原料, 用二氧化硒和过氧化叔丁醇进行氧化反应, 得到中间体 2; 再通过 Dess-Martin 试剂进一步氧化, 得到醛基中间体 3; 加入亚氯酸钠和 2-甲基-2-丁烯进一步氧化, 得到羧酸中间体 4。

目标化合物 K1~K4 的合成如路线 2 所示。商业可得原料 5 与不同长度的溴代酰氯通过酰化得到中间体 6A~6D; 中间体 6A~6D 与 Boc 保护的哌嗪进行取代反应得到中间体 7A~7D; 在酸性条件脱保护基得到中间体 8A~8D; 最后在碱性环境下与 PTL 进行迈克尔加成反应, 得到化合物 K1~K4。

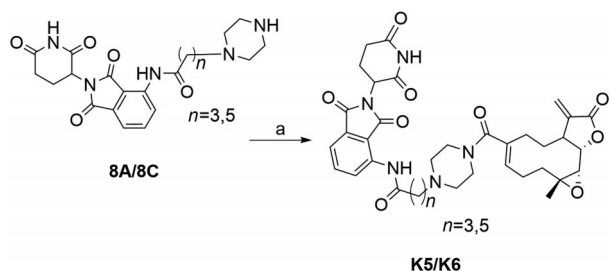
中间体 8A 和 8C 分别与中间体 4 在碱性环境下进



**Scheme 1** Synthesis of PTL derivative carboxylic acid: (a)  $\text{SeO}_2$ , *t*-BuOOH, DCM, 12 h, rt; (b) Dess-Martin periodinane,  $\text{NaHCO}_3$ , DCM, rt, 1.5 h; (c)  $\text{NaClO}_2$ , *t*-BuOH/ $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2-methyl-2-butene, 12 h, rt



**Scheme 2** (a) Acyl chloride with different carbon numbers, THF, 70 °C, 6 h; (b) 1-*N*-Boc-piperazine, TEA, ACN, 60 °C, 4 h, rt; (c) DCM, 4 mol·L<sup>-1</sup> HCl in 1,4-dioxane, 1 h, rt; (d) **1**, TEA, anhydrous ethanol, 12 h, rt



**Scheme 3** (a) **4**, HATU, DIPEA, DCM, 12 h, rt

行酰胺缩合得到化合物 **K5**~**K6**。合成步骤见路线3。

选取化合物 **9** 为起始原料, 通过与 Boc 保护的 PEG、烷基链、饱和杂环片段进行取代反应得到中间体 **10A**~**10K**; 在酸性条件下脱去保护基得到中间体 **11A**~**11K**; 最后与小白菊内酯的羧酸衍生物进行酰胺缩合, 得到化合物 **K7**~**K17**。合成路线4如下。

以化合物 **12** 为起始原料, 以化合物 **K7**~**K17** 类似的反应路线得到化合物 **K18**。合成步骤见路线5。

化合物 **K19** 和 **K20** 的合成如路线6所示, 以化合物 **15** 为起始原料, 反应条件参考化合物 **K7**~**K17** 的合成。

化合物结构经 MS 和 <sup>1</sup>H NMR 确认, 数据见表1。

### 3 活性评价

**3.1 体外抗增殖活性** Li 课题组<sup>[25]</sup>在2019年揭示了 PTL 能够抑制 USP7 的活性, 并在人结肠癌细胞株 HCT-116 和 SW480 上展现了促进细胞凋亡的作用。

本实验选择人结肠癌 HCT-116 和 HT29 细胞, 将文献报道的 USP7 抑制剂 FT671<sup>[25]</sup>作为阳性对照化合物, 采用 SRB 法对 20 个目标化合物进行 HCT-116 和 HT29 细胞增殖活性评价。表2数据显示, 20 个目标化合物对所测试的细胞均有不同程度的增殖抑制作用。其中化合物 **K1**、**K9**、**K10**、**K15**、**K16**、**K17**、**K18**、**K20** 对 HCT-116 细胞均表现出强于 FT671 的抗增殖活性, IC<sub>50</sub> 值为 2.03~6.45 μmol·L<sup>-1</sup>。

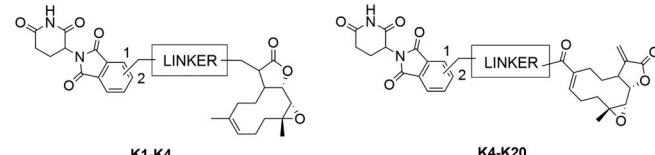
在已报道的 PROTAC 连接链构效关系的考察中, PEG 基团常作为提高分子亲水性的优良选择<sup>[26,27]</sup>。在本实验中, 化合物 **K11**~**K14** 相较于其他目标化合物并没有对所测细胞株展现出一定的抑制活性; 化合物 **K15**、**K16**、**K17** 具有饱和杂环片段作为连接链, 分子具有较强的刚性结构, 表现出较好的细胞增殖抑制活性。同时, 采用烷基直链作为连接链的化合物 **K9** 和 **K10** 对 HCT-116 和 HT29 均表现出较好的抑制活性, 其中化合物 **K10** 对 HCT-116 和 HT29 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 2.03 和 2.50 μmol·L<sup>-1</sup>。

从细胞增殖活性实验的测试结果中选出抗细胞增殖能力较强的化合物 **K10**, 进行蛋白组学考察。处理组从定量蛋白中鉴定出 165 个上调的差异表达蛋白 (DEPs) 和 139 个下调的 DEPs。筛选样本组内重复实验数据中至少有一半为非空值的数据, 对药物处理组 (3 次测定) 峰强度 (intensity) 和对照组 (3 次测定) 峰强度进行 *t* 检验, 符合表达差异倍数大于 1.5 倍 (上下调)



**Table 1** MS and <sup>1</sup>H NMR elemental analysis data of target compounds

Compd.	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	ESI-MS ( <i>m/z</i> ) [M+H] <sup>+</sup>
<b>K1</b>	11.16 (s, 1H), 9.69 (s, 1H), 8.51 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.84 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 7.61 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 5.26–5.12 (m, 2H), 3.94 (t, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 2.77 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 2.59 (m, 4H), 2.47 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H), 2.25–1.56 (m, 17H), 1.32 (d, <i>J</i> = 15.5 Hz, 2H), 1.25 (d, <i>J</i> = 10.2 Hz, 6H), 1.20 (s, 3H), 1.12 (m, 2H)	675.46
<b>K2</b>	11.15 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 8.48 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.87–7.81 (m, 1H), 7.62 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz, 1H), 5.22–5.07 (m, 2H), 3.96 (t, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 2.78 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 2.61 (m, 5H), 2.43–1.92 (m, 17H), 1.63 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 6H), 1.55–1.48 (m, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.20 (s, 2H), 0.89–0.81 (m, 2H)	689.57
<b>K3</b>	11.15 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 8.48 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.92–7.80 (m, 1H), 7.62 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 5.26–5.11 (m, 2H), 3.96 (t, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 2.96–2.85 (m, 1H), 2.78 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 2.60 (m, 6H), 2.48–1.91 (m, 17H), 1.74–1.56 (m, 6H), 1.48 (s, 2H), 1.33 (m, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.11 (m, 2H)	703.64
<b>K4</b>	11.16 (s, 1H), 9.69 (s, 1H), 8.48 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.89–7.78 (m, 1H), 7.62 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 1H), 5.24–5.10 (m, 2H), 3.96 (t, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 2.79 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 2.67–2.58 (m, 4H), 2.49–2.44 (m, 4H), 2.42–1.91 (m, 14H), 1.69–1.23 (m, 19H), 1.20 (s, 3H)	732.60
<b>K5</b>	11.15 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 8.50 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.90–7.79 (m, 1H), 7.62 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 6.03 (d, <i>J</i> = 3.4 Hz, 1H), 5.65–5.53 (m, 2H), 5.15 (m, 1H), 4.14 (t, <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H), 3.18 (s, 1H), 2.96–2.83 (m, 2H), 2.61 (m, 2H), 2.48–1.57 (m, 19H), 1.50 (s, 2H), 1.43–1.29 (m, 1H), 1.28–1.21 (m, 2H), 1.16–0.98 (m, 2H)	687.30
<b>K6</b>	11.16 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 8.48 (t, <i>J</i> = 6.9 Hz, 1H), 7.84 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 7.62 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 6.68 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 6.03 (d, <i>J</i> = 3.4 Hz, 1H), 5.57 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H), 5.15 (m, 1H), 4.15 (t, <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H), 2.37–1.98 (m, 14H), 1.64 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 4H), 1.32 (d, <i>J</i> = 14.5 Hz, 6H), 1.25 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 11H)	715.30
<b>K7</b>	11.10 (s, 1H), 8.09 (t, <i>J</i> = 5.7 Hz, 1H), 7.64–7.52 (m, 1H), 7.08–6.99 (m, 2H), 6.66 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 1H), 5.98 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H), 5.54 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H), 4.17 (m, 3H), 3.14 (m, 2H), 2.65–2.54 (m, 2H), 2.15 (m, 7H), 1.74–1.62 (m, 4H), 1.49 (s, 3H), 1.25 (m, 4H)	591.20
<b>K8</b>	11.09 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.65–7.52 (m, 1H), 7.06 (m, 2H), 6.51 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H), 6.02 (d, <i>J</i> = 3.4 Hz, 1H), 5.97–5.87 (m, 1H), 5.56 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 5.05 (m, 1H), 4.11 (t, <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H), 3.27–3.15 (m, 3H), 2.95–2.82 (m, 1H), 2.65–2.53 (m, 2H), 2.36–1.53 (m, 10H), 1.48 (s, 3H), 1.45–1.23 (m, 8H)	647.50
<b>K9</b>	11.09 (s, 1H), 7.59 (m, 1H), 7.06 (m, 2H), 6.02 (d, <i>J</i> = 3.4 Hz, 1H), 5.92 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 5.54 (d, <i>J</i> = 3.1 Hz, 1H), 5.05 (m, 1H), 4.10 (t, <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H), 3.30–2.56 (m, 12H), 2.35–1.52 (m, 12H), 1.48 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.03 (t, <i>J</i> = 12.6 Hz, 1H), 0.88–0.80 (m, 2H)	646.74
<b>K10</b>	11.09 (s, 1H), 8.14–7.83 (m, 1H), 7.58 (m, 2H), 7.06 (m, 3H), 6.51 (d, <i>J</i> = 5.3 Hz, 1H), 6.14–5.80 (m, 3H), 5.76 (s, 1H), 5.53 (d, <i>J</i> = 3.1 Hz, 2H), 5.03 (m, 2H), 4.05 (m, 2H), 3.31–3.25 (m, 3H), 3.24–3.11 (m, 2H), 3.03–2.91 (m, 2H), 2.91–2.81 (m, 1H), 2.80–2.65 (m, 2H), 2.65–2.54 (m, 3H), 2.32 (d, <i>J</i> = 12.1 Hz, 2H), 2.24 (m, 3H), 2.22–2.14 (m, 2H), 2.10 (m, 2H), 2.04 (m, 1H), 1.59 (t, <i>J</i> = 15.4 Hz, 5H), 1.48 (s, 4H), 0.84 (m, 2H)	716.75
<b>K11</b>	11.10 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.60 (m, 1H), 7.09 (m, 2H), 6.58 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 1H), 6.01 (m, 1H), 5.95 (s, 1H), 5.57 (m, 1H), 5.06 (m, 1H), 4.09 (t, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 3.57 (d, <i>J</i> = 5.2 Hz, 2H), 3.44 (m, 3H), 3.30–2.53 (m, 8H), 2.14 (m, 7H), 1.48 (s, 3H), 1.25 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H), 1.00 (m, 1H)	621.30
<b>K12</b>	11.09 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.59 (m, 1H), 7.15 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 7.05 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 1H), 6.02 (d, <i>J</i> = 3.4 Hz, 1H), 5.95 (t, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 5.57 (d, <i>J</i> = 3.1 Hz, 1H), 5.06 (m, 1H), 4.08 (t, <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H), 3.60 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H), 3.54–3.38 (m, 9H), 3.22–2.54 (m, 7H), 2.37–2.00 (m, 8H), 1.47 (s, 3H), 1.02 (t, <i>J</i> = 11.8 Hz, 1H)	664.51
<b>K13</b>	11.09 (s, 1H), 8.12 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H), 7.59 (m, 1H), 7.15 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 7.05 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 1H), 6.02 (d, <i>J</i> = 3.4 Hz, 1H), 5.95 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.57 (d, <i>J</i> = 3.1 Hz, 1H), 5.06 (m, 1H), 4.08 (t, <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H), 3.65–3.36 (m, 15H), 2.77–2.57 (m, 3H), 2.37–1.52 (m, 10H), 1.47 (s, 3H), 1.28–1.21 (m, 2H)	709.40
<b>K14</b>	11.09 (s, 1H), 8.13 (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H), 7.59 (m, 1H), 7.15 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 7.05 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 1H), 6.04–5.89 (m, 2H), 5.57 (d, <i>J</i> = 3.1 Hz, 1H), 5.08–5.00 (m, 1H), 4.08 (t, <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H), 3.63 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H), 3.57–3.46 (m, 10H), 3.44 (s, 3H), 3.23–2.56 (m, 8H), 2.37–1.99 (m, 10H), 1.47 (s, 3H), 1.25 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 2H)	752.49
<b>K15</b>	11.07 (s, 1H), 7.57 (m, 1H), 7.13 (t, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2H), 6.03 (d, <i>J</i> = 3.5 Hz, 1H), 5.67–5.56 (m, 2H), 5.06 (m, 1H), 4.14 (t, <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H), 3.55 (m, 6H), 2.88 (m, 3H), 2.74 (s, 1H), 2.34 (m, 3H), 2.22–1.52 (m, 11H), 1.50 (s, 3H), 1.42–1.01 (m, 4H)	656.56
<b>K16</b>	11.10 (s, 1H), 7.59 (m, 1H), 7.04 (m, 2H), 6.49 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz, 1H), 6.02 (d, <i>J</i> = 3.5 Hz, 1H), 5.59 (m, 2H), 5.06 (m, 1H), 4.14 (t, <i>J</i> = 9.4 Hz, 2H), 2.96–2.82 (m, 2H), 2.69–2.55 (m, 2H), 2.35 (m, 6H), 2.23–1.96 (m, 5H), 1.76 (t, <i>J</i> = 9.3 Hz, 3H), 1.63 (m, 4H), 1.50 (s, 2H), 1.39 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 1.27–1.23 (m, 3H)	656.73
<b>K17</b>	11.08 (s, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.33 (m, 2H), 6.03 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 5.65–5.51 (m, 2H), 5.09 (m, 1H), 4.14 (t, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H), 3.74 (d, <i>J</i> = 11.6 Hz, 2H), 2.87–2.81 (m, 3H), 2.66–2.54 (m, 3H), 2.44–1.72 (m, 13H), 1.51 (s, 3H), 1.44–1.36 (m, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.13–1.00 (m, 3H)	684.59
<b>K18</b>	11.10 (s, 1H), 8.00 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H), 7.81 (m, 1H), 7.48 (m, 2H), 6.02 (d, <i>J</i> = 3.4 Hz, 1H), 5.92 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 5.54 (d, <i>J</i> = 2.9 Hz, 1H), 5.09 (m, 1H), 4.20 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 4.10 (t, <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H), 3.22 (m, 1H), 3.16 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 3.01–2.56 (m, 5H), 2.55–2.52 (m, 1H), 2.34–2.00 (m, 7H), 1.79–1.72 (m, 2H), 1.58 (t, <i>J</i> = 11.3 Hz, 3H), 1.45–1.26 (m, 9H), 1.02 (m, 2H)	662.40
<b>K19</b>	11.06 (s, 1H), 8.00 (t, <i>J</i> = 5.7 Hz, 1H), 7.56 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.08 (t, <i>J</i> = 5.3 Hz, 1H), 6.95 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.03 (d, <i>J</i> = 3.5 Hz, 1H), 5.92 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 5.54 (d, <i>J</i> = 3.1 Hz, 1H), 5.03 (m, 1H), 4.10 (t, <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H), 3.26–3.12 (m, 4H), 3.02–2.52 (m, 6H), 2.37–1.51 (m, 9H), 1.48 (s, 3H), 1.34 (m, 6H), 1.24 (s, 3H)	647.50
<b>K20</b>	11.06 (s, 1H), 7.99 (t, <i>J</i> = 5.7 Hz, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.09 (t, <i>J</i> = 5.2 Hz, 1H), 6.95 (d, <i>J</i> = 1.7 Hz, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.02 (d, <i>J</i> = 3.5 Hz, 1H), 5.92 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 5.54 (d, <i>J</i> = 3.1 Hz, 1H), 5.03 (m, 1H), 4.10 (t, <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H), 3.25–2.52 (m, 14H), 2.37–1.96 (m, 8H), 1.64–1.53 (m, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.21–1.16 (m, 3H), 1.02 (m, 2H)	661.80

**Table 2** The inhibitory activities of compounds **K1–K20** on HCT-116 and HT-29 cells. <sup>a</sup>: Average value by two independent experiments; <sup>b</sup>: Not detected


Compd.	Linker	Site	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup> (mean ± SD) (n = 2) <sup>a</sup>		
			HCT-116	HT29	
<b>K1</b>		n = 3	1	6.45	10.60
<b>K2</b>		n = 4	1	8.85	14.41
<b>K3</b>		n = 5	1	19.09	19.25
<b>K4</b>		n = 7	1	18.83	34.13
<b>K5</b>		n = 3	1	N.D. <sup>b</sup>	N.D.
<b>K6</b>		n = 5	1	N.D.	N.D.
<b>K7</b>		n = 3	1	N.D.	N.D.
<b>K8</b>		n = 5	1	26.16	30.63
<b>K9</b>		n = 7	1	2.81	4.67
<b>K10</b>		n = 12	1	2.03	2.50
<b>K11</b>		n = 1	1	38.29	N.D.
<b>K12</b>		n = 2	1	11.67	N.D.
<b>K13</b>		n = 3	1	41.67	N.D.
<b>K14</b>		n = 4	1	N.D.	N.D.
<b>K15</b>			1	4.57	9.89
<b>K16</b>			1	4.29	6.63
<b>K17</b>			1	2.11	4.60
<b>K18</b>		n = 8	1	3.63	5.85
<b>K19</b>		n = 7	2	33.81	38.06
<b>K20</b>		n = 8	2	5.18	8.01
FT671	--	--	--	8.32	N.D.

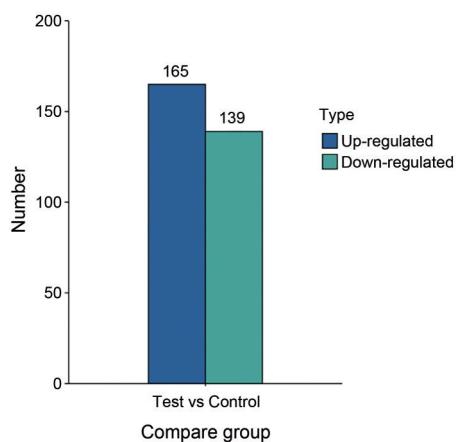
且 *t* 检验小于 0.05 筛选标准的蛋白质视为差异表达蛋白质 (图 3)。

用 BIOGRID 结果进行文本搜索, 发现下调蛋白与所有差异蛋白之间的 PPI (protein-protein interaction networks) (图 4)。

将下调倍数排名前九的蛋白绘制散点图 (图 5)。

其中 CYP24A1 是细胞色素 P450 酶家族的氧化酶之一, 负责催化 1,25-双羟基维生素 D<sub>3</sub> (vitamin D<sub>3</sub>, 1,25-

VD<sub>3</sub>, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, [1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]) 的羟基化, 将其转化为活性较低的中间产物, 并最终经一系列代谢步骤传导后排出体外, 参与了细胞增殖、分化、凋亡以及 DNA 修复等多个生物学环节<sup>[28]</sup>。CYP24A1 作为一种潜在的致癌基因, 它的过度表达可以激活多个信号级联反应<sup>[29]</sup>。已有越来越多的文献报道了 CYP24A1 与 NF- $\kappa$ B、VDR 等信号通路之间的相互作用与关联<sup>[30]</sup>。Li 课题组<sup>[28]</sup>发现 CYP24A1 可能通过



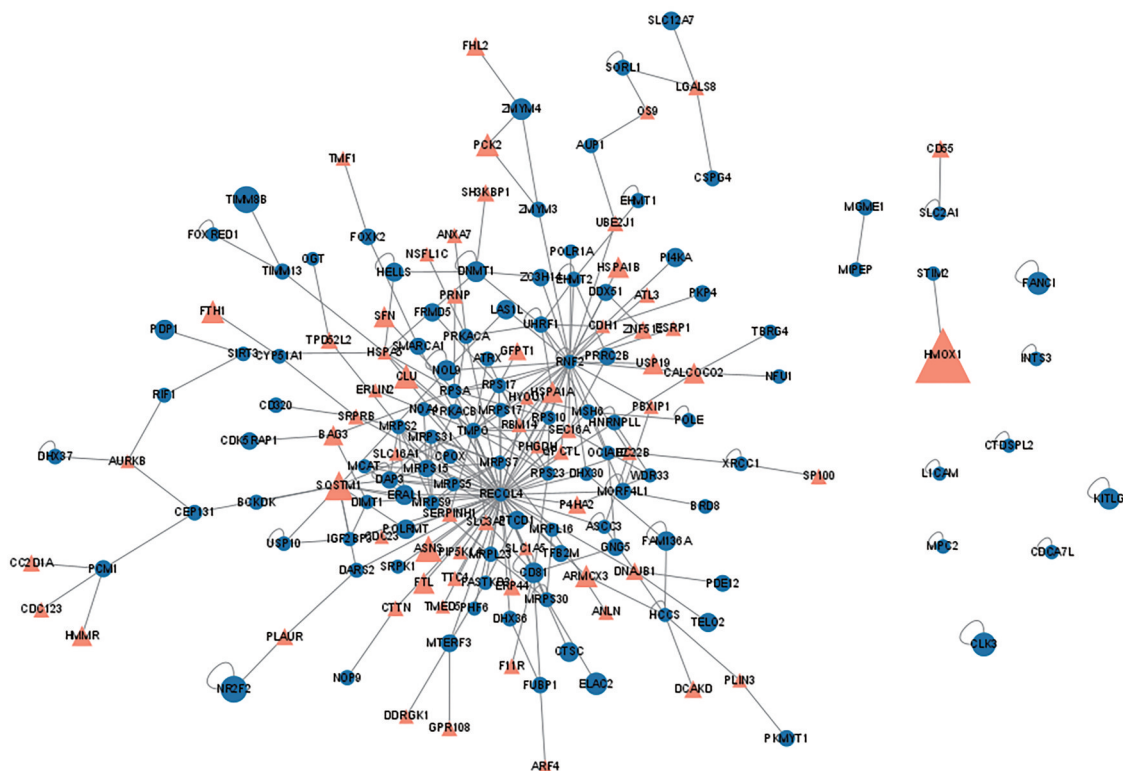
**Figure 3** Quantitative results of differential expression proteins by comparing test group vs control group

NF- $\kappa$ B 信号通路实现对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的调控; Zhu 等<sup>[31]</sup> 研究人员发现 PTL 可以通过结合人核糖体蛋白 L10 (RPL10) 降低转录调节因子 TCF4/LEF1 的表达, 从而对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路产生抑制作用。本研究通过蛋白组学的考察, 发现 PTL 降解剂能够下调 CYP24A1 的表达, 不仅确证了 PTL 与 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路之间的关联性, 同时也猜想, PTL 可能基于下调 CYP24A1 的表达从而抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的作用机制, 产生结肠癌细胞的抗增殖活性。

癌细胞中表观遗传格局的变化会改变基因组的结

构和稳定性, 并直接导致恶性肿瘤的形成与发展。DNA 甲基化是影响基因表达的主要表观遗传机制之一, 在基因表达调控、基因组印迹、X 染色体失活等事件中发挥关键作用<sup>[32]</sup>。哺乳动物 DNA 甲基化主要由 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferases, DNMTs) 催化甲基从 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 转移至胞嘧啶第 5 位碳原子<sup>[33]</sup>。其中, DNMT1 是十分关键的 DNA 甲基转移酶。已有文献<sup>[34]</sup> 报道了乳腺癌、胃癌常常伴随着部分肿瘤细胞中 DNMT1 的过表达。在 Michael Goggins 的研究中发现, 相较于正常细胞, 大部分胰腺癌细胞中的 DNMT1 数量水平显著增高<sup>[35]</sup>。Liu 等<sup>[36]</sup> 研究人员论述了 PTL 可以与 DNA 甲基转移酶活性位点共价结合并下调 DNMT1 蛋白的表达。本研究发现 PTL 降解剂显著下调了 DNMT1 蛋白的水平, 推测 PTL 可能通过抑制 DNMT1 从而发挥抗肿瘤作用。

双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 (CDC-like Kinases, CLK) 是一种作用于丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸的双特异性激酶。其中 CLK3 作为 CDK 家族的一个亚型, 通过磷酸化富含丝氨酸/精氨酸的蛋白质如 SRSF1 和 SRSF3 来调节 RNA 剪接, 多项研究表明这一过程的失调与癌症、神经疾病以及多种遗传疾病息息相关<sup>[37]</sup>。Zhang 课题组<sup>[38]</sup> 发现胆管癌细胞中常常伴随着 CLK3 的异常表达, 揭示了 CLK3 突变体通过激活



**Figure 4** Protein-protein interaction networks

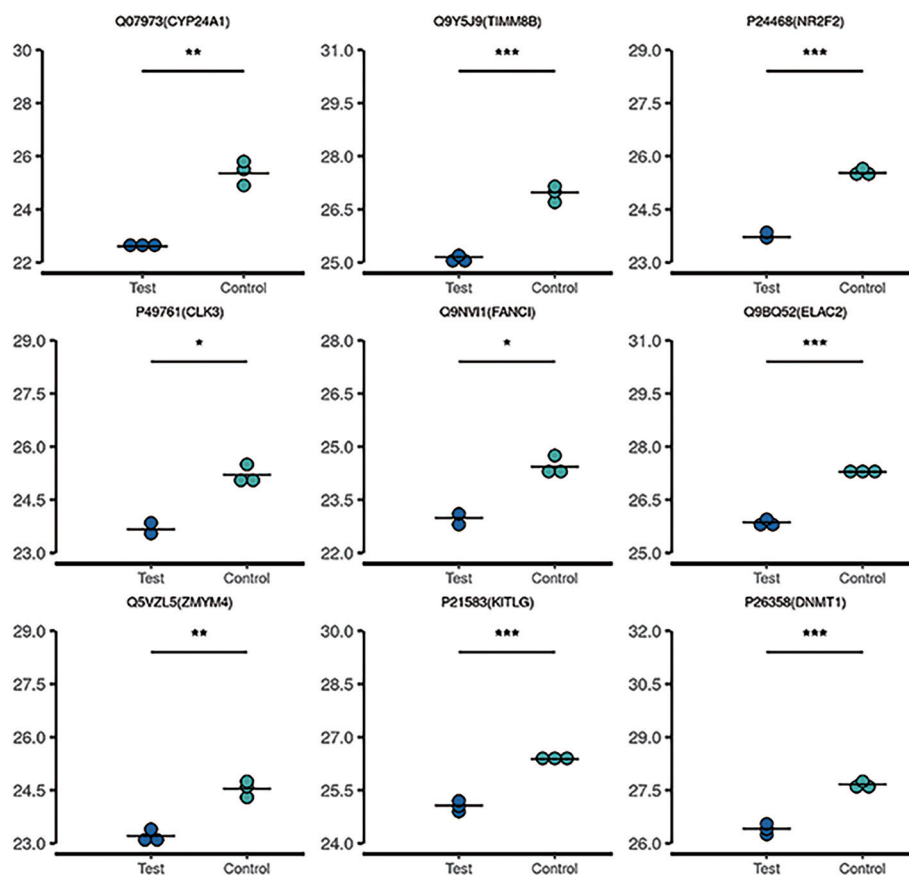


Figure 5 Scatter diagram of the down proteins (top 9). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

呤合成信号通路促进胆管癌细胞发育的相关机制。本研究中,小白菊内酯降解剂下调 CLK3 蛋白的表达水平也说明小白菊内酯可能通过抑制 CLK3 发挥抗结肠癌细胞功能。

用 DAVID 网站对下调蛋白进行在线富集分析,获得每个蛋白相关的功能词条,发现这些蛋白的功能比较集中于线粒体和核糖体功能,以及 RNA 结合区域。结合 Wang 课题组<sup>[39]</sup>对 PTL 代谢组学的考察,推测 PTL 可能通过能量代谢的方式参与对肿瘤细胞的调控。此外, Li 课题组<sup>[40, 41]</sup>相继报道了 PTL 对 USP7 和 USP47 的抑制作用。USP10 是泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 中的去泛素化酶之一,发现 PTL 降解剂同样对其产生了一定程度上的抑制。基于此,推测 PTL 抑制结肠癌细胞活性的同时,也能够借助 UPS 系统在一定程度上促进肿瘤细胞的凋亡。

## 小结

基于小白菊内酯的化学结构及已有报道针对其衍生物所进行的合成工作的报道,本实验设计并合成了 20 个小白菊内酯降解剂。采用 SRB 法评价化合物对人结肠癌 HCT-116 和 HT29 细胞的增殖抑制作用。结果

表明,大多数化合物具有一定的抗肿瘤增殖活性,其中化合物 K10 对 HCT-116 细胞的  $IC_{50}$  值为  $2.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在细胞水平上,选用 Exploris 480 对 K10 进行蛋白组学分析,从定量蛋白中鉴定出 165 个上调的 DEPs 和 139 个下调的 DEPs,发现了 DNMT1、CLK3、MRPs 等鲜有报道的相关蛋白,为小白菊内酯作用靶点的发现提供了新颖的思路。

## 实验部分

柱色谱硅胶 (200~300 目) 为青岛海洋化工厂生产,薄层色谱板采用 254 nm 紫外灯检测。<sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 采用 Bruker 400 和 Bruker 101 核磁共振仪测定。所有试剂均为市售分析纯或化学纯,除特别说明外,一般不经纯化处理直接使用。

### 1 化学合成

**1.1 中间体 2 的合成** 取单口瓶,依次加入小白菊内酯 (1 g, 4.02 mmol)、干燥二氯甲烷 25 mL、二氧化硒 (716 mg, 6.40 mmol),在氮气保护下加入预干燥的过氧化叔丁醇 (1.50 mL, 9.70 mmol),继续反应 18 h, TLC 监测反应完毕,加入二氯甲烷将反应液稀释至 80 mL,饱和硫代硫酸钠水溶液 20 mL 洗 3 次,无水硫酸钠干燥,

抽滤, 减压蒸干溶剂, 得到粗品。硅胶色谱 [ $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}} = 1:1$ ] 纯化得到白色固体即为中间体 **2**, 产率为 60%。

**1.2 中间体 3 的合成** 取单口瓶依次按顺序加入中间体 **2** (100 mg, 0.37 mmol)、干燥二氯甲烷 15 mL、碳酸氢钠 (320 mg, 3.8 mmol), 在氮气保护下分批加入 Dess-Martin 试剂 (240 mg, 0.57 mmol)。室温搅拌 2 h 反应完毕。加入二氯甲烷将反应液稀释至 80 mL, 饱和硫代硫酸钠水溶液 20 mL 洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压蒸干溶剂, 得到粗品。硅胶色谱 [ $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}} = 2:1$ ] 纯化得到白色固体即为中间体 **3**, 产率 70%。

**1.3 中间体 4 的合成** 取单口瓶依次按顺序加入中间体 **3** (200 mg, 0.76 mmol)、叔丁醇 10 mL、纯水 3.5 mL、2-甲基-2-丁烯 220  $\mu\text{L}$ 、亚氯酸钠 (140 mg, 1.54 mmol)、磷酸二氢钠 (900 mg, 7.50 mmol), 在氮气保护下过夜搅拌。反应结束后向反应液中加入纯水 40 mL, 加入乙酸乙酯 80 mL, 萃取 3 次。无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压蒸干溶剂, 得到粗品。硅胶色谱 [ $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}} = 1:1\sim 2$ ] 得到白色固体即为中间体 **4**, 产率 70%。

**1.4 中间体 6A~6D 的合成** 向三口烧瓶中加入化合物 **5** (250 mg, 0.92 mmol)、干燥四氢呋喃 5 mL, 氮气保护下缓慢加入相应的溴代酰氯 (3.66 mmol), 加毕升温至 70  $^{\circ}\text{C}$  回流, 反应 1 h, TLC 监测反应进程。反应结束后体系自然回温至室温, 加入甲醇搅拌 30 min, 搅拌过程中逐渐有固体析出。将固液混合物转移至单口瓶减压蒸干溶剂得到固体, 加入乙酸乙酯 5 mL, 石油醚 1 mL 打浆, 抽滤, 得到中间体 **6A~6D**, 均为淡黄色固体, 产率 60%。

**1.5 中间体 7A~7D 的合成** 取三口瓶, 依次按顺序加入中间体 **6A/6B/6C/6D** (300 mg)、1-*N*-Boc-哌嗪 (3.39 mmol)、无水乙腈 8 mL、三乙胺 (1.02 mmol), 升温至 60  $^{\circ}\text{C}$  回流, 3 h 反应完毕。向反应体系加入乙酸乙酯 40 mL, 饱和氯化铵水溶液 5 mL, 洗 2 次, 有机相无水硫酸钠干燥, 抽滤。减压蒸干溶剂, 硅胶色谱 [ $V_{\text{二氯甲烷}}:V_{\text{甲醇}} = 100:1$ ] 分离得到淡黄色固体, 产率 50%。

**1.6 中间体 8A~8D 的合成** 取单口瓶, 依次加入中间体 **7A/7B/7C/7D** (80 mg)、无水二氯甲烷 2 mL、盐酸二氧六环 1.5 mL, 室温反应 1 h, 反应完毕。减压蒸干溶剂, 得到淡黄色固体, 产率 90%。

**1.7 化合物 K1~K4 的合成** 取单口瓶, 依次加入小白菊内酯 (25 mg, 0.10 mmol)、中间体 **8A~8D** (0.10 mmol)、无水乙醇 4 mL、三乙胺 (15  $\mu\text{L}$ , 0.10 mmol), 氮气保护下搅拌过夜。加入二氯甲烷将反应液稀释至 60 mL, 饱和氯化铵水溶液 15 mL 洗 3 次。无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压蒸干溶剂得到粗品。柱色谱纯化

[ $V_{\text{二氯甲烷}}:V_{\text{甲醇}} = 50:1\sim 40:1$ ] 得到化合物 **K1~K4**, 均为白色固体, 产率 60%。

**1.8 化合物 K5、K6 的合成** 取单口瓶, 依次加入中间体 **4** (30 mg, 0.11 mmol)、无水二氯甲烷 3 mL、*N,N*-二异丙基乙胺 (40  $\mu\text{L}$ , 0.22 mmol), 室温搅拌 20 min, 加入中间体 **8A~8D** (50 mg, 0.11 mmol)、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯 (82 mg, 0.22 mmol), 氮气保护下过夜搅拌。反应完毕, 向反应液中加入二氯甲烷 80 mL, 饱和氯化铵水溶液 20 mL 洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压蒸干溶剂, 得到粗品。柱色谱纯化 [ $V_{\text{二氯甲烷}}:V_{\text{甲醇}} = 50:1\sim 40:1$ ] 得到化合物 **K5** 和 **K6**, 均为白色固体, 产率 60%。

**1.9 中间体 10A~10K 的合成** 取单口瓶依次加入中间体 **10** (250 mg, 0.91 mmol), 干燥 *N,N*-二甲基甲酰胺 5 mL, Boc 保护的 PEG-烷基链、饱和杂环结构 (0.91 mmol), *N,N*-二异丙基乙胺升温至 80  $^{\circ}\text{C}$  回流。搅拌 12 h, 反应结束。反应装置回温至室温, 加入乙酸乙酯 80 mL, 饱和氯化锂水溶液洗 (6~8 次), 直至将反应体系中的 *N,N*-二甲基甲酰胺除净。无水硫酸钠干燥有机相, 抽滤, 减压蒸干溶剂, 得到粗品。柱色谱纯化 [ $V_{\text{二氯甲烷}}:V_{\text{甲醇}} = 90:1\sim 80:1$ ] 得到中间体 **10A~10K**, 均为黄绿色固体, 产率 60%。

**1.10 中间体 11A~11K 的合成** 取单口瓶, 依次加入中间体 **10A~10K** (100 mg)、无水二氯甲烷 2 mL、盐酸二氧六环 1.5 mL, 室温反应 1 h, 反应完毕。减压蒸干溶剂, 得到中间体 **11A~11K**, 均为淡黄色固体, 产率 90%。

**1.11 化合物 K7~K17 的合成** 采用与化合物 **K5** 和 **K6** 类似的方法, 得到化合物 **K7~K17**, 均为淡黄色固体, 产率 60%。

**1.12 中间体 13 的合成** 取单口瓶, 依次加入中间体 **12** (225 mg, 0.76 mmol)、*N,N*-二甲基甲酰胺 3 mL、碘化钾 (13 mg, 0.08 mmol)、碳酸氢钾 (114 mg, 1.14 mmol)、1-叔丁氧羰基-1,8-二氨基辛烷 (250 mg, 0.96 mmol)。升温至 60  $^{\circ}\text{C}$ , 回流 4 h, 反应结束。反应装置回温至室温, 反应液中加入乙酸乙酯 80 mL, 饱和氯化锂水溶液 12 mL 洗 (6~8 次), 直至将反应体系中的 *N,N*-二甲基甲酰胺除净。无水硫酸钠干燥有机相, 抽滤, 减压蒸干溶剂, 得到粗品。柱色谱纯化 [ $V_{\text{二氯甲烷}}:V_{\text{甲醇}} = 90:1\sim 80:1$ ] 得到黄绿色固体, 产率 60%。

**1.13 中间体 14 的合成** 取单口瓶, 依次加入中间体 **13** (100 mg, 0.19 mmol)、无水二氯甲烷 2 mL、盐酸二氧六环 1.5 mL, 室温反应 1 h, 反应完毕。减压蒸干溶剂, 得到淡黄色固体, 产率 90%。

**1.14 化合物 K18 的合成** 取单口瓶, 依次加入中间

体 **4** (30 mg, 0.11 mmol)、无水二氯甲烷 3 mL、*N,N*-二异丙基乙胺 (40  $\mu$ L, 0.22 mmol), 室温搅拌 20 min, 加入中间体 **14** (45 mg, 0.11 mmol)、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯 (82 mg, 0.22 mmol), 氮气保护下过夜搅拌。反应完毕, 向反应液中加入二氯甲烷 80 mL, 饱和氯化铵水溶液 20 mL 洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压蒸干溶剂, 得到粗品。柱色谱纯化 [ $V_{\text{二氯甲烷}}:V_{\text{甲醇}} = 50:1 \sim 40:1$ ] 得到淡黄色固体, 产率 60%。

**1.15 化合物 K19、K20 的合成** 与化合物 **K7~K17** 类似的方法, 得到淡黄色固体 **K19** 和 **K20**, 产率 60%。

## 2 生物部分

**2.1 体外抗增殖作用评价** McCoy's 5A 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 磺酰罗单明 B (sulforodamine B, SRB) 购自 Sigma-Aldrich 公司; 三氯醋酸 (TCA)、冰醋酸 (HAC) 及 Tris 均购自国药集团。人结肠癌细胞 HCT-116 及 HT29 均购自 American type culture collection (ATCC) 并按要求培养。

采用 SRB 法进行体外抗增殖活性研究, 具体步骤如下: 将处于对数生长期的 HCT-116 和 HT29 细胞以 90  $\mu$ L (每孔 1 200 个和 1 500 个) 接种于 96 孔培养板, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。每孔加入 10  $\mu$ L 一定稀释浓度的药物, 每个浓度设 3 个重复, 并设相应浓度的生理盐水溶媒对照及无细胞调零孔。加药后肿瘤细胞在 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 3 天。弃去培养液, 加入 4  $^{\circ}$ C 预冷的 10% 的三氯醋酸 (TCA) (每孔 100  $\mu$ L), 4  $^{\circ}$ C 固定 1 h 后用蒸馏水洗涤 5 次, 65  $^{\circ}$ C 烘箱热风干燥 1 h。再加入由 1% 冰醋酸配制的 SRB (4 mg·mL<sup>-1</sup>) 溶液 (每孔 100  $\mu$ L), 室温中染色 15 min。而后去上清液, 用 1% 醋酸洗涤 5 次, 65  $^{\circ}$ C 烘箱热风干燥 1 h。每孔加入 150  $\mu$ L 的 Tris (10 mmol·L<sup>-1</sup>) 溶液, 室温放置 15 min。SPECTAR MAX190 酶标仪 560 nm 波长下测定 OD 值。按下列公式计算被测物对癌细胞生长的抑制率, 半数抑制量 IC<sub>50</sub> 值采用 Logit 法计算。抑制率 = (对照组 OD 值 - 给药组 OD 值) / 对照组 OD 值  $\times$  100%, 计算 IC<sub>50</sub>。

**2.2 蛋白组学细胞处理** 细胞样品准备: 将处于对数生长期的 HCT-116 细胞以每孔  $4.5 \times 10^5$  个接种于 6 孔细胞培养板中, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜待细胞贴壁。每孔更换 1 800  $\mu$ L 新鲜培养基后加入 200  $\mu$ L **K10** (终浓度为 10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>), 设 3 个重复并设置 3 个 DMSO 对照孔。加药后细胞在 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 min。弃掉培养液, 加入 4  $^{\circ}$ C 预冷的生理盐水, 平放轻轻摇动 1 min 洗涤细胞, 倒掉生理盐水。重复清洗两次后, 将培养皿置于冰上, 继续加入 4  $^{\circ}$ C 预冷的生理盐水, 然后用干净的细胞刮棒快速收集细胞, 移液管吸取至预冷

的冻存管内。最后, 4  $^{\circ}$ C、1 000 g 离心 5 min, 去上清, 最终收集细胞沉淀于冻存管中。

**2.3 质谱分析** 提取肽段在 C18 容器上脱盐, 然后真空离心浓缩, 在 40  $\mu$ L 0.1% (v/v) 甲酸中重建。根据脊椎动物蛋白质中色氨酸和酪氨酸的频率计算, 在 0.1% (g·L<sup>-1</sup>) 溶液中使用 1.1 的消光系数, 在 280 nm 处通过紫外光谱密度估算肽含量。LC-MS/MS 分析在 Orbitrap Exploris 480 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific) 上进行, 该质谱仪与 Easy nLC (Thermo Fisher Scientific) 耦合。2  $\mu$ L 肽在缓冲液 A (0.1% 甲酸) 中加载到 C18 反相分析柱 (Thermo Fisher Scientific, Acclaim PepMap RSLC 50  $\mu$ m X 150 mm, nano viper, P/N164943) 上, 以缓冲液 B (80% 乙腈和 0.1% 甲酸) 线性梯度分离, 流速为 300 nL·min<sup>-1</sup>。

使用数据依赖的 top10 方法获取 MS 数据, 从调查扫描 (350~1 200  $m/z$ ) 中动态选择最丰富的前体离子用于 HCD 碎片。MS1 扫描在  $m/z$  200 的分辨率为 120 000, AGC 目标为 300%, 最大 IT 为 50 ms。数据依赖模式为周期时间, 周期时间设置为 1.5 s。MS2 扫描在  $m/z$  200 的分辨率为 15 000, AGC 目标为 75%, 最大 IT 为 35 ms, 隔离宽度为 1.6  $m/z$ 。Microscans 设置为 1。只有电荷在 2~6 之间的离子。所选离子的动态排除时间为 30 秒。归一化碰撞能量为 33%。

**2.4 数据分析** MS 数据采用 MaxQuant 软件版本 1.6.17.0 进行分析。在数据库中搜索 MS 数据 (由项目确定)。最初的搜索设定在 6 ppm 的前体质量窗口。搜索遵循胰蛋白酶/P 的酶促裂解规则, 允许最大两个缺失的裂解位点和对片段离子的质量耐受为 20 ppm。将半胱氨酸氨基甲基化定义为固定修饰, 将蛋白质 N 端乙酰化和蛋氨酸氧化定义为可变修饰, 便于数据库检索。肽和蛋白质鉴定的全球错误发现率 (FDR) 的截止值设置为 0.01。蛋白质丰度根据归一化光谱蛋白质强度 (LFQ 强度) 计算。Fold 变化为 2 或 0.5,  $P$  值为 0.05 的蛋白被认为是差异表达蛋白。

**2.5 生物信息学** 在 Linux 服务器上使用 NCBI BLAST+ (NCBI - BLAST -2.3.0+) 将所有蛋白质序列比对到数据库, 只保留前 10 位和 E-value < 1e-3 的序列。其次, 选择 GO 术语 (数据库版本: go\_20190701。由 Blast2GO 的顶级比特分数序列的 obo)。然后通过 Blast2GO Command Line 完成 GO 术语到蛋白质的标注。在基本注释完成后, 利用 InterProScan 根据 motif 搜索 EBI 数据库, 然后将 motif 的功能信息添加到蛋白质中以提高注释, 再由 ANNEX 对 GO 术语之间的注释和连接进行了进一步的改进。采用 Fisher 精确检验 (Fisher's Exact Test), 通过比较与 GO 项相关的差异表

达蛋白数量和总蛋白数量来丰富GO项。

通过KEGG数据库[数据库版本: KO\_INFO\_END.txt (2022.11.05)]进行通路分析。通过比较与通路相关的差异表达蛋白数量和总蛋白数量,使用Fisher's Exact Test来识别显著富集的通路。

**作者贡献:** 高桐负责完成相关实验合成工作; 张文涛协助完成合成工作及化合物鉴定工作; 宋姗姗负责活性测定实验; 周棣协助完成化合物鉴定工作; 刘同超协助完成论文撰写等工作; 缪泽鸿和熊兵负责选题、实验指导和论文撰写。

**利益冲突:** 作者声明本文不存在任何利益冲突。

## References

- [1] Végh K, Alberti Á, Riethmüller E, et al. Supercritical fluid extraction and convergence chromatographic determination of parthenolide in *Tanacetum parthenium* L.: experimental design, modeling and optimization [J]. *J Supercrit Fluids*, 2014, 95: 84-91.
- [2] Talib WH, Al Kury LT. Parthenolide inhibits tumor-promoting effects of nicotine in lung cancer by inducing P53-dependent apoptosis and inhibiting VEGF expression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 1488-1495.
- [3] Kim SL, Trang KT, Kim SH, et al. Parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of colorectal cancer cells by inducing mitochondrial dysfunction and apoptosis [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41: 1547-1553.
- [4] Carlisi D, D'Anneo A, Angileri L, et al. Parthenolide sensitizes hepatocellular carcinoma cells to trail by inducing the expression of death receptors through inhibition of STAT3 activation [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226: 1632-1641.
- [5] Mendonca MS, Turchan WT, Alpuche ME, et al. DMAPT inhibits NF-kappa B activity and increases sensitivity of prostate cancer cells to X-rays *in vitro* and in tumor xenografts *in vivo* [J]. *Free Radical Biol Med*, 2017, 112: 318-326.
- [6] Liu X, Wang X. Recent advances on the structural modification of parthenolide and its derivatives as anticancer agents [J]. *Chin J Nat Med*, 2022, 20: 814-829.
- [7] Freund RRA, Gobrecht P, Fischer D, et al. Advances in chemistry and bioactivity of parthenolide [J]. *Nat Prod Rep*, 2020, 37: 541-565.
- [8] Freund RRA, Gobrecht P, Rao Z, et al. Stereoselective total synthesis of parthenolides indicates target selectivity for tubulin carboxypeptidase activity [J]. *Chem Sci*, 2019, 10: 7358-7364.
- [9] Gopal YV, Arora TS, Van Dyke MW. Parthenolide specifically depletes histone deacetylase 1 protein and induces cell death through ataxia telangiectasia mutated [J]. *Chem Biol*, 2007, 14: 813-823.
- [10] Li Y, Xu H, Tan X, et al. Parthenolide inhibits proliferation of cells infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by suppression of the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Arch Virol*, 2023, 168: 39.
- [11] Liu W, Liang B, Zeng J, et al. First discovery of cholesterol-lowering activity of parthenolide as NPC1L1 inhibitor [J]. *Molecules*, 2022, 27: 6270.
- [12] Li XY, Pu WC, Zheng QQ, et al. Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21: 99.
- [13] Bekes M, Langley DR, Crews CM. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21: 181-200.
- [14] Fisher SL, Phillips AJ. Targeted protein degradation and the enzymology of degraders [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 44: 47-55.
- [15] Kozicka Z, Thoma NH. Haven't got a glue: protein surface variation for the design of molecular glue degraders [J]. *Cell Chem Biol*, 2021, 28: 1032-1047.
- [16] Bian J, Ren J, Li Y, et al. Discovery of Wogonin-based PROTACs against CDK9 and capable of achieving antitumor activity [J]. *Bioorg Chem*, 2018, 81: 373-381.
- [17] Cao ZX, Gu ZC, Lin SX, et al. Attenuation of NLRP3 inflammasome activation by indirubin-derived PROTAC targeting HDAC6 [J]. *ACS Chem Biol*, 2021, 16: 2746-2751.
- [18] Li Y, Meng Q, Wang P, et al. Identification of PDE6D as a potential target of sorafenib *via* PROTAC technology [J]. *bioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.05.06.079947.
- [19] Wu YL, Yang YY, Wang W, et al. PROTAC technology as a novel tool to identify the target of lathyrane diterpenoids [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 4262-4265.
- [20] Nasim S, Crooks PA. Antileukemic activity of aminoparthenolide analogs [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 3870-3873.
- [21] Janganati V, Penthala NR, Cragle CE, et al. Heterocyclic aminoparthenolide derivatives modulate G(2)-M cell cycle progression during *Xenopus oocyte* maturation [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24: 1963-1967.
- [22] Yang ZJ, Ge WZ, Li QY, et al. Syntheses and biological evaluation of costunolide, parthenolide, and their fluorinated analogues [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 7007-7020.
- [23] Zeng BL, Cheng Y, Zheng KL, et al. Design, synthesis and *in vivo* anticancer activity of novel parthenolide and micheliolide derivatives as NF- $\kappa$ B and STAT3 inhibitors [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 111: 104973.
- [24] Ding YH, Li SZ, Ge Z, et al. Design and synthesis of parthenolide and 5-fluorouracil conjugates as potential anticancer agents against drug resistant hepatocellular carcinoma [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 183: 111706.
- [25] Li X, Kong L, Yang Q, et al. Parthenolide inhibits ubiquitin-specific peptidase 7 (USP7), Wnt signaling, and colorectal cancer cell growth [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295: 3576-3589.
- [26] Turnbull AP, Ioannidis S, Krajewski WW, et al. Molecular basis of USP7 inhibition by selective small-molecule inhibitors [J].

- Nature, 2017, 550: 481-486.
- [27] Rana S, Bendjennat M, Kour S, et al. Selective degradation of CDK6 by a palbociclib based PROTAC [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29: 1375-1379.
- [28] Chen XQ, Mao JY, Wang CS, et al. CYP24A1 involvement in inflammatory factor regulation occurs *via* the Wnt signaling pathway [J]. *Curr Med Sci*, 2022, 42: 1022-1032.
- [29] Sun H, Jiang C, Cong L, et al. CYP24A1 inhibition facilitates the antiproliferative effect of 1,25(OH)2D3 through downregulation of the WNT/ $\beta$ -catenin pathway and methylation-mediated regulation of CYP24A1 in colorectal cancer cells [J]. *DNA Cell Biol*, 2018, 37: 742-749.
- [30] Anderson MG, Nakane M, Ruan X, et al. Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 57: 234-240.
- [31] Zhu X, Yuan C, Tian C, et al. The plant sesquiterpene lactone parthenolide inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by blocking synthesis of the transcriptional regulators TCF4/LEF1 [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293: 5335-5344.
- [32] Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, et al. DNA methylation in cancer and aging [J]. *Cancer Res*, 2016, 76: 3446-3450.
- [33] Ren W, Gao L, Song J. Structural basis of DNMT1 and DNMT3A-mediated DNA methylation [J]. *Genes (Basel)*, 2018, 9: 620-639.
- [34] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144: 646-674.
- [35] Li A, Omura N, Hong SM, et al. Pancreatic cancer DNMT1 expression and sensitivity to DNMT1 inhibitors [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9: 321-329.
- [36] Liu Z, Liu S, Xie Z, et al. Modulation of DNA methylation by a sesquiterpene lactone parthenolide [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329: 505-514.
- [37] Lee JY, Yun JS, Kim WK, et al. Structural basis for the selective inhibition of Cdc2-like kinases by CX-4945 [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 6125068.
- [38] Zhou Q, Lin M, Feng X, et al. Targeting CLK3 inhibits the progression of cholangiocarcinoma by reprogramming nucleotide metabolism [J]. *J Exp Med*, 2020, 217: e20191779.
- [39] Yuan L, Wang Z, Zhang D, et al. Metabonomic study of the intervention effects of parthenolide on anti-thyroid cancer activity [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, 1150: 122179.
- [40] Li X, Kong L, Yang Q, et al. Parthenolide inhibits ubiquitin-specific peptidase 7 (USP7), Wnt signaling, and colorectal cancer cell growth [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295: 3576-3589.
- [41] Zhang S, Ju X, Yang Q, et al. USP47 maintains the stemness of colorectal cancer cells and is inhibited by parthenolide [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 562: 21-28.