

## 新型 PARP1/2 抑制剂 YHP-836 与替莫唑胺联用的抗脑胶质瘤研究

邓佳玲, 杜婷婷, 周洁, 徐柏玲, 陈晓光, 季鸣\*

(中国医学科学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室/创新药物非临床药物代谢及 PK/PD 研究  
北京市重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 本文研究和评价一种新型多聚 (ADP-核糖) 聚合酶 [poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]-1 和 PARP2 抑制剂 YHP-836 与替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 联用的抗脑胶质瘤 (glioblastoma, GBM) 作用。体外采用 MTT、蛋白免疫印迹法、流式细胞术, 测定化合物单用和与 TMZ 联用对多株脑胶质瘤细胞的细胞杀伤活性和 DNA 损伤修复标志物磷酸化组蛋白 H2AX (histone H2AX phosphorylation,  $\gamma$ H2AX) 水平以及细胞周期的影响。通过脑胶质瘤异体移植模型和原位移植瘤模型, 评价 YHP-836 与 TMZ 联用的体内药效。动物实验按照中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所实验动物伦理委员会操作规范严格执行 (00009138)。结果显示, YHP-836 与 TMZ 联用增加了对人脑胶质瘤细胞的细胞杀伤活性和  $\gamma$ H2AX 的表达水平, 使细胞周期阻滞在 S 期。体内动物模型结果表明, 单独使用 YHP-836 对 U251/TMZ 肿瘤的治疗作用较差, 而在与 TMZ 联用时, 发现其能显著增加 TMZ 的抗肿瘤作用, 且未显著增加化疗药物毒性。综上所述, 新型 PARP1/2 抑制剂 YHP-836 可以增敏化疗药物 TMZ 的作用, 并为下一步研究其作用机制奠定了基础。提示 PARP1/2 抑制剂 YHP-836 可能成为 TMZ 耐药患者联合 TMZ 治疗的候选药物之一。

**关键词:** 替莫唑胺; PARP 抑制剂; 脑胶质瘤; 多聚 (ADP-核糖) 聚合酶; 药物联用

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)06-1656-08

## Anti-glioblastoma study of YHP-836, a novel PARP1/2 inhibitor, in combination with temozolomide

DENG Jia-ling, DU Ting-ting, ZHOU Jie, XU Bai-ling, CHEN Xiao-guang, JI Ming\*

(State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines/Beijing Key Laboratory of Non-clinical Drug Metabolism and PK/PD Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate and evaluate the antitumor effects of a novel poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 1/2 inhibitor, YHP-836, in combination with temozolomide (TMZ) for the treatment of glioblastoma (GBM). The cytotoxicity of YHP-836 was tested alone or in combination with TMZ using MTT assay. Immunoblotting and flow cytometry were also employed to assess the combination activity of YHP-836 and TMZ in multiply GBM cell lines. Further, the antitumor activity of YHP-836 and TMZ was evaluated using subcutaneous and orthotopic mice xenograft tumor models. All procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments of the Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College and conducted under the Guidelines for Animal Experiments of Peking Union Medical College. The approval number is 00009138. It was demonstrated that the combination of YHP-836 and TMZ increased the cytotoxicity against GBM cells and upregulated histone H2AX phosphorylation ( $\gamma$ H2AX) expression levels compared to TMZ treatment alone. The combination also led to the S-phase cell cycle arrest. Moreover,

收稿日期: 2023-12-28; 修回日期: 2024-02-02.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82073891).

\*通讯作者 Tel: 86-10-63165207, E-mail: jiming@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1455

YHP-836 significantly enhanced TMZ antitumor effects without significantly increasing chemotherapy drug toxicity *in vivo*, whereas YHP-836 alone showed limited therapeutic efficacy against GBM. In conclusion, the novel PARP1/2 inhibitor, YHP-836, sensitizes TMZ and provides a basis for further investigation into its mechanism of action. These findings suggest that YHP-836 may be a potential candidate for combination therapy with TMZ in patients with TMZ resistance.

**Key words:** temozolomide; PARP inhibitor; glioblastoma; poly(ADP-ribose) polymerase; drug combination

脑胶质瘤 (glioblastoma brain, GBM) 形成于神经上皮组织, 占脑肿瘤的 40%~50%<sup>[1]</sup>, 是最常见和最具侵袭性的原发性脑肿瘤<sup>[2]</sup>。根据 CBTRUS 统计报告, 胶质瘤患者的平均生存时间为 12~15 个月<sup>[3]</sup>。目前, GBM 患者的标准治疗为手术切除, 之后进行放射治疗和替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 为主的化学药物治疗<sup>[4]</sup>。其中, TMZ 是第二代咪唑并四嗪衍生物, 易透过血脑屏障, 是临床治疗脑胶质瘤的一线化疗药物<sup>[5]</sup>, 其通过甲基化 DNA 分子以干扰 DNA 复制, 从而抑制肿瘤细胞增殖<sup>[6,7]</sup>。然而, 近半数接受 TMZ 治疗的患者均对 TMZ 产生耐药以致中止治疗。其中, 约 55% 的 GBM 患者因其 DNA 修复系统异常而对 TMZ 天然耐药<sup>[8]</sup>。此外, 对 TMZ 敏感的患者也会因获得性耐药而导致治疗失败<sup>[4]</sup>。因此, 增强 TMZ 疗效, 克服其耐药性是临床亟需解决的问题。

多聚 (ADP-核糖) 聚合酶 [poly(ADP-ribose) polymerase, PARP] 是一类存在于真核细胞中的蛋白修饰酶, 通过将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NAD<sup>+</sup> 中的 ADP-核糖转移到自身或其他靶蛋白上, 从而调控各种细胞反应。PARP 家族由 18 个成员组成, 它们的催化结构域具有高度的相似性<sup>[9]</sup>。其中, PARP1 和 PARP2 的结构和功能已被广泛研究, 两者通过碱基切除修复途径 (base excision repair, BER) 对 DNA 单链损伤 (single strand breaks, SSB) 进行修复, 以此在维持基因的稳定性中起着关键作用<sup>[10]</sup>。抑制 PARP1/2 不仅可以选择性抑制因同源重组而受损的肿瘤细胞生长, 如 BRCA1/2 基因突变的肿瘤<sup>[11,12]</sup>, 还可以增强肿瘤细胞对放疗和化疗的敏感性。目前, 已有多个 PARP1 抑制剂被批准用于临床, 如 olaparib、rucaparib、niraparib、talazoparib、fluzoparib 和 pamiparib<sup>[13-15]</sup>。

本研究针对新型 PARP1/2 抑制剂噻唑啉二酮类化合物 YHP-836<sup>[16]</sup> 开展了其与 TMZ 联用治疗脑胶质瘤的体内外研究。在多株脑胶质瘤细胞上, YHP-836 均对 TMZ 具有良好的增敏效果, 同时对于 TMZ 耐药的脑胶质瘤细胞, YHP-836 与 TMZ 联用还可逆转其耐药性。在裸鼠皮下和原位异体移植人脑胶质瘤细胞模型上, YHP-836 与 TMZ 联用显示了良好的抑瘤作用。

## 材料与方法

**细胞** U87MG、U251、A172 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心, MX-1、U343、U343/TMZ、U251/TMZ 由实验室保存。

**试剂及仪器** Olaparib 由科莱博公司合成并赠与, 纯度为 98% 以上; TMZ 购自百灵威公司; YHP-836 由中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所 (中国北京) 徐柏玲课题组合成和提供。

抗聚 ADP-核糖 [poly(ADP-ribose), PAR] 抗体购自美国 Trevigen 公司; 抗磷酸化组蛋白 H2AX (histone H2AX phosphorylation,  $\gamma$ H2AX) 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; MTT 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; BCA 定量试剂盒购于北京康为试剂生物技术有限公司; RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂均购于北京索莱宝生物技术有限公司; mouse  $\beta$ -actin antibody 购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

小动物核磁共振成像仪 BRUKER PharmaScan 7.0T/16 US (德国 BRUKER 公司); GE ImageQuant LAS 4000mini 凝胶成像仪 (美国 GE 公司); 全自动化学发光图像分析仪 Tanon 5200Multi (中国上海天能科技有限公司); BD FACSVerser 流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司); SYNERGY H1 多功能酶标仪 (美国 BIO-TEK 公司); Bio-RAD 凝胶电泳系统 (美国 Bio-RAD 公司); XM-650DT 一体式超声波细胞破碎仪 (中国小美超声仪器有限公司)。

**MTT 检测** 取对数生长期的肿瘤细胞用胰酶消化后配制浓度为每毫升  $2.5 \times 10^4$  个细胞的细胞液, 每孔 100  $\mu$ L (2 500 个细胞) 接种于 96 孔板。次日每孔加入不同浓度 YHP-836 或 olaparib (为 PARP1/2 抑制剂, 用作阳性对照药) 及相应溶剂对照的新鲜培养基 100  $\mu$ L (DMSO 终浓度 < 0.5%), 每组设 3 个平行孔, 于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内继续培养 72 h 后, 每孔加入浓度为 50  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> MTT 20  $\mu$ L, 总体积为 220  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后弃上清, 加入 DMSO 100  $\mu$ L, 振荡混匀后, 用酶标仪在 570 nm 波长下测定光吸收值 ( $A$ )。细胞生存抑制率 (%) =  $(1 - A_{\text{test}}/A_{\text{con}}) \times 100\%$ , 其中,  $A_{\text{test}}$  为待测

化合物组吸光度值,  $A_{\text{con}}$  为空白对照组吸光度值。

**增敏作用检测** 参照上述方法, 每孔加入不同浓度的化疗药物 TMZ 和固定浓度的 YHP-836 或 olaparib 及相应溶剂对照的新鲜培养基 100  $\mu\text{L}$  (DMSO 终浓度  $< 0.5\%$ ), 于 37  $^{\circ}\text{C}$  继续培养 72 h 后, 按照“MTT 检测”方法测定光吸收值 ( $A$ )。

**蛋白免疫印迹法检测蛋白表达** 向肿瘤细胞中加入不同浓度的 YHP-836 和 TMZ 处理 24 h 后, 每个样本加入含 1% 蛋白酶抑制剂和 1% 磷酸酶抑制剂的高效 RIPA 裂解液 100  $\mu\text{L}$ , 用细胞超声破碎仪在 40 W 功率下充分裂解细胞, 并冰上裂解 30 min。超速离心机在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000  $\times g$  下离心 20 min 后, 收集细胞裂解液进行蛋白定量。电泳转膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 缓冲液室温封闭非特异性结合位点 1 h, TBS-T 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min。加入 1:1 000 稀释的一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日, TBS-T 缓冲液洗膜 3 次, 加 1:2 000 稀释的 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h 后加入 TBS-T 缓冲液洗膜 3 次, 加入 ECL 化学发光底物反应液进行凝胶成像检测。

**异体移植瘤模型的建立** 无菌条件下收集人胶质瘤 U251/TMZ 细胞, 用无菌生理盐水调整至每毫升  $1 \times 10^7$  个细胞, 取 0.2 mL 接种于雌性 BALB/c 裸鼠腋背部皮下, 待肿瘤生长至直径 1 cm 大小, 无菌条件下取出, 匀浆后均匀接种于裸鼠腋背部皮下 ( $2 \times 10^6$  个细胞, 0.2 mL)。7 日后待肿瘤生长至 100~300  $\text{mm}^3$ , 将动物随机分组, 每组 5 只, 开始给药 (记为第 0 天)。TMZ 口服给予 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  连续 5 天; 单药 YHP-836 组分别给予 25 和 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  连续 11 天; 联合给药组 TMZ 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  与 YHP-836 25 和 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  分别联用均连续口服给药 5 天 (两种药物给药间隔时间为 1 h)。所有化合物均混悬于 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液中。每周 3 次称量体重, 并用游标卡尺测量肿瘤的长度 ( $a$ ) 和宽度 ( $b$ ), 给药第 11 天将裸鼠脱臼处死, 剥离肿瘤组织, 称重并拍照。肿瘤体积 ( $V$ ) =  $1/2 \times a \times b^2$ , 计算抑瘤率 TGI (%) =  $(1 - W_{\text{test}}/W_{\text{con}}) \times 100\%$ ,  $W_{\text{test}}$  为 YHP-836 组肿瘤重量,  $W_{\text{con}}$  为阴性对照组或 TMZ 组肿瘤重量, 以抑瘤率评价 YHP-836 抗肿瘤作用强度。动物来源斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 (动物合格证号: No.11401500009976)。

**原位移植瘤模型的建立** 无菌条件下收集人胶质瘤 U87MG 细胞, 用无菌生理盐水调整至每毫升  $2 \times 10^8$  个细胞。雌性 BALB/c 裸鼠用 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 将动物俯卧位固定于小鼠脑立体定位仪上。用酒精消毒裸鼠头皮后, 手术刀矢状切开裸鼠头皮, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  清洁切口, 暴露颅骨。延前囟后 2 mm, 旁开右侧 1.5 mm, 牙科钻打孔。26 号微量注射

器手动注射 5  $\mu\text{L}$  细胞悬液 ( $1 \times 10^6$  个细胞), 进针深度 3 mm, 退针 0.5 mm, 注射时间约 30 s。停针 5 min 后, 缓慢拔针, 消毒缝合切口。腹腔注射 5 万单位青霉素抗感染<sup>[17]</sup>。原位移植 U87MG 荷瘤小鼠造模 5 天后分组给药, 每组 6 只, 共 30 只。模型组每天口服给予生理盐水, 连续给药 5 天; TMZ 组每天口服给予 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 连续给药 5 天; YHP-836 单药给药组每天口服给予 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 连续给药 5 天; YHP-836 (每天口服给予 25  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 与 TMZ (每天口服给予 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 联用组和 YHP-836 (每天口服给予 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 与 TMZ (每天口服给予 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 联用组, 连续给药 5 天。动物来源北京维通利华实验动物技术有限公司 (动物合格证号: No.11400700092087)。

实验均由中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所实验动物管理与动物福利委员会审核并批准 (00009138), 按照动物实验中心标准操作规程执行。

**MRI 检测** 裸鼠用异氟烷麻醉后, 利用小动物核磁共振成像仪进行 MRI 检测。检测参数为: T2\_TurboRARE, TR/TE = 5 000/40, 6 averages, 20 $\times$ 20 视野, 0.5 mm 层厚。肿瘤体积 =  $L_{\text{max}} \times W \times T$ , 其中  $L_{\text{max}}$  为肿瘤最大直径,  $W$  为肿瘤最大直径垂直对应的短径,  $T$  为 MRI 扫描到的肿瘤断层数乘以层厚 0.5  $\text{mm}$ <sup>[17]</sup>。

**统计学方法** 实验结果用平均值  $\pm$  标准差表示, 采用 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 多组间组内比较采用 two way ANOVA 分析。  $P < 0.05$  认为有统计学意义差异。

## 结果

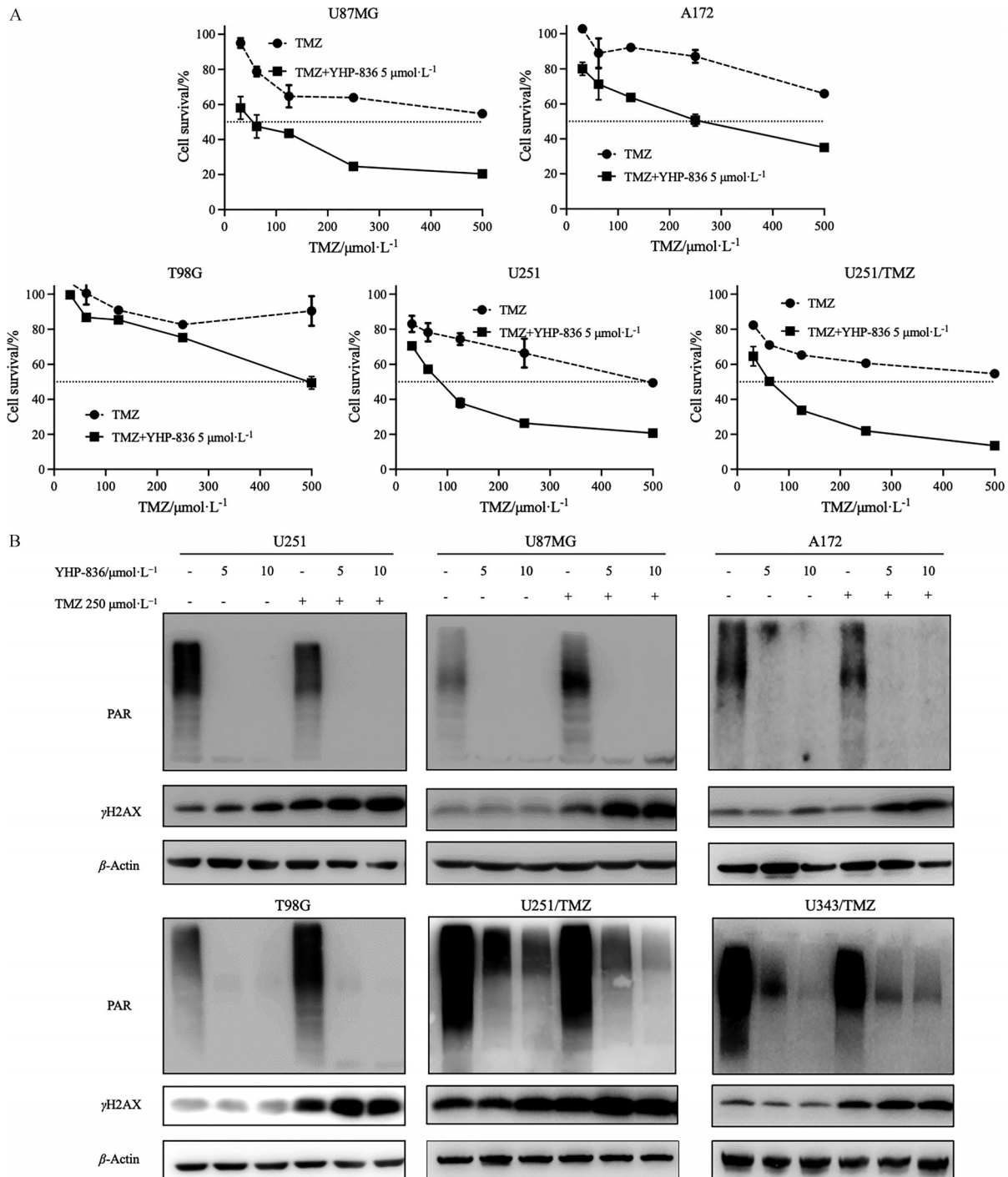
### 1 YHP-836 体外对 TMZ 的增敏作用

前期研究显示, YHP-836 是一种高活性选择性的 PARP1/2 抑制剂<sup>[6]</sup>, 其在 BRCA 缺陷的肿瘤中显示了良好的抗肿瘤活性。已有文献报道, PARP1/2 抑制剂在脑胶质瘤中对 TMZ 有增敏作用, 为此首先评价了 YHP-836 对多种人脑胶质瘤细胞的增殖抑制作用, 并选用同为 PARP1/2 抑制剂的 olaparib 用作 YHP-836 的阳性对照药。YHP-836 处理不同的人脑胶质瘤细胞 72 h 后, 结果显示单独使用 YHP-836 对胶质瘤细胞的杀伤作用较弱, 其中对 U87MG 细胞的  $\text{IC}_{50}$  仅为  $26.34 \pm 3.24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 且对其他 6 株胶质瘤细胞 A172、U251、U251/T、U343、U343/T、T98G 的  $\text{IC}_{50}$  均大于 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而 olaparib 对 U87MG 肿瘤细胞杀伤的  $\text{IC}_{50}$  为  $64.28 \pm 2.44 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 对其他 6 株胶质瘤细胞的  $\text{IC}_{50}$  也均大于 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 提示 YHP-836 抗 U87MG 作用较 olaparib 强。

由于该 7 株人脑胶质瘤细胞都不存在 BRCA 突变, 为此进一步考察了 YHP-836 与化疗药物 TMZ 联用的增殖抑制作用, 如图 1A 所示, YHP-836 在 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下与 TMZ 联用对 U87MG、U251 和 A172 都展现显著的抑制肿瘤细胞增殖作用。同时, 对于 TMZ 获得

性耐药的 U251/TMZ 细胞和天然耐药的 T98G 细胞, YHP-836 与 TMZ 联用也有非常好的协调作用。

蛋白免疫印迹结果显示, YHP-836 与 TMZ 联用通过抑制细胞内的 PAR 水平, 增加了 DNA 损伤标志物  $\gamma\text{H2AX}$  (图 1B), 从而增强了 TMZ 的杀伤肿瘤细胞的



**Figure 1** The potentiation effects of YHP-836 on temozolomide (TMZ) in various glioblastoma (GBM) cells. A: U251, U87MG, A172, U251/TMZ and T98G cells were treated with indicated concentrations of TMZ combined with fixed concentrations of YHP-836 for 72 h, respectively. The cell viability was calculated and shown as cell survival curve.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ ; B: YHP-836 increased the DNA damage marker histone H2AX phosphorylation ( $\gamma\text{H2AX}$ ) in GBM cells. The levels of  $\gamma\text{H2AX}$  increased in both U87MG, U251, A172, U251/TMZ, T98G and U343/TMZ cells treated with TMZ (250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) combined with different concentrations of YHP-836 (5 and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h

活性。

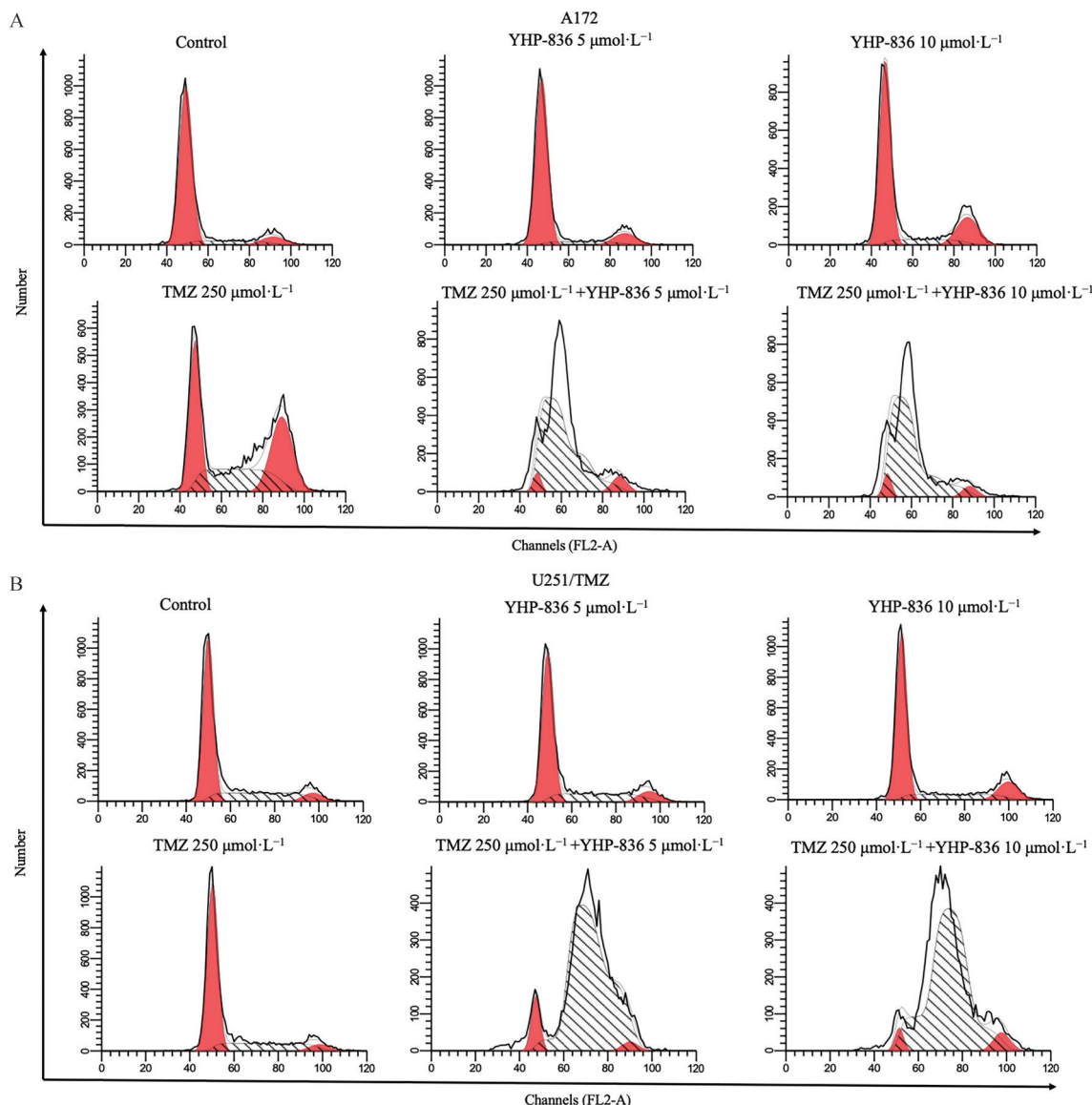
## 2 YHP-836通过改善细胞周期阻滞克服TMZ耐药

TMZ是一种DNA烷化剂,其可诱导细胞周期阻滞在G2/M期并最终导致细胞凋亡<sup>[18]</sup>,但是G2/M期长期停滞在一定程度上会使肿瘤细胞对TMZ产生耐药性<sup>[19,20]</sup>。为此,进一步评价YHP-836是否可以通过抑制细胞周期来增强TMZ的药效。由图2A可见,YHP-836单独处理人胶质瘤细胞A172,随着浓度的增加,细胞周期被阻滞在G2/M期,TMZ在250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下也导致G2/M期细胞周期阻滞;而YHP-836联用后细胞周期被阻滞在S期,YHP-836(5和10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )分别与TMZ联合用药,S期的细胞比例相较于TMZ单药组明显上调(88.67%、88.78%比31.82%)。同时,在TMZ耐药的人脑胶质瘤细胞U251/TMZ上,也评价了YHP-

836与TMZ联用对细胞周期的影响。由图2B可见,TMZ在250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对细胞周期没有影响(S期比例为31.82%),YHP-836分别在5和10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下与TMZ联用后,细胞周期被显著抑制在S期,联用组S期比例分别为89.77%、91.23%。以上结果提示,YHP-836与TMZ联合用药能克服TMZ耐药导致的G2/M期细胞周期停滞,而将细胞周期阻滞在S期,从而克服TMZ的耐药。

## 3 YHP-836与TMZ联用对原位脑胶质瘤的生长抑制作用

目前,抗肿瘤药物的临床前药效学评价通常采用皮下移植瘤模型,但由于血脑屏障的缘故,该模型不能充分评价药物透过血脑屏障发挥抗肿瘤的作用,也不能有效反映体内肿瘤的生物进程,如血管生成、浸润



**Figure 2** YHP-836 combined with TMZ can cause S phase arrest to overcome TMZ resistance. Exposure to YHP-836 at the indicated concentrations (5 and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) or combined with TMZ (250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h. A: A172 cells; B: U251/TMZ cells

和转移<sup>[17]</sup>。相比之下,原位移植瘤模型能更为直观且有效地验证化合物的抗脑胶质瘤效果。因此,采用人脑胶质瘤细胞 U87MG 原位移植瘤模型评价了 YHP-836 与 TMZ 联用的抗肿瘤作用。

由图 3A 荷瘤裸鼠的 MRI 影像结果可见,每天口服给予 YHP-836 50 mg·kg<sup>-1</sup> 并未显著抑制小鼠原位胶质瘤的生长,而连续口服给予 TMZ 5 天,小鼠原位胶质瘤的生长明显受到抑制。同样, YHP-836 与 TMZ 联用组核磁共振影像结果均未显示有明显肿瘤。各组停药后,溶剂对照组和 YHP-836 单独给药组由于小鼠颅内肿瘤生长逐渐死亡。第 30 天核磁影像结果显示, TMZ 组肿瘤明显增大,但联用组仍未观察到明显的肿瘤影像。生存期观察也证实 YHP-836 与 TMZ 联用可增加 TMZ 的抑瘤效果并显著延长荷瘤裸鼠的总生存期(图 3B)。

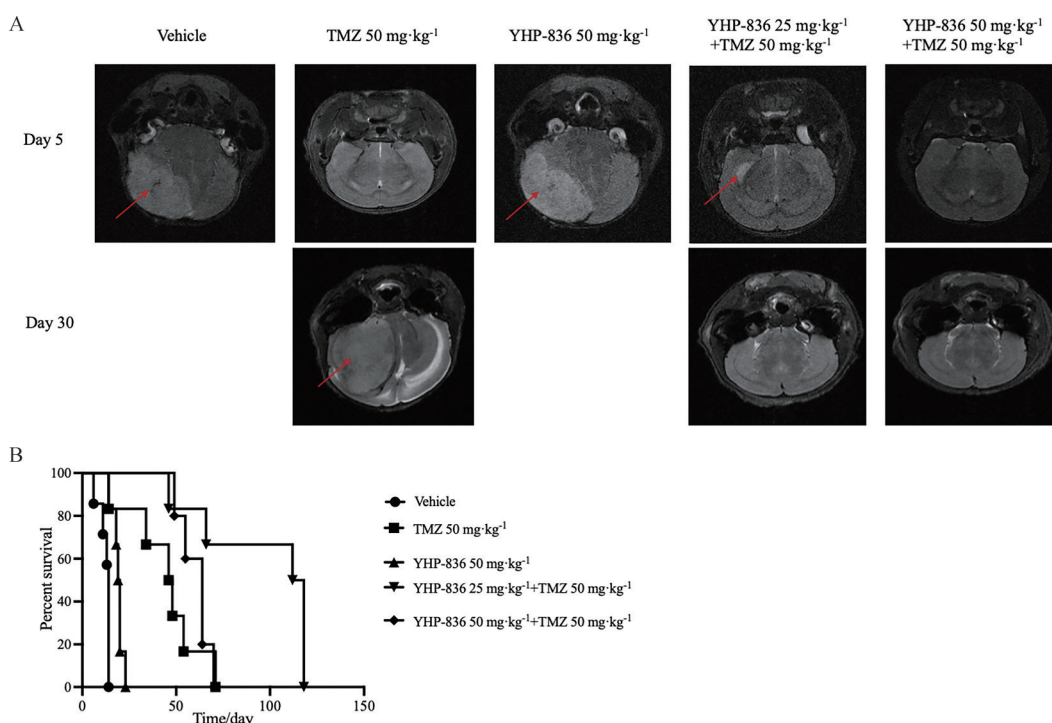
#### 4 YHP-836 与 TMZ 联用对 TMZ 耐药脑胶质瘤的生长抑制作用

在 TMZ 耐药的 U251/TMZ 裸鼠异体移植瘤模型

上,进一步考察了 YHP-836 单药以及与 TMZ 联合用药对体内肿瘤生长的抑制作用。由图 4 可见,联合给药组 YHP-836 和 TMZ 连续口服给药 11 天后可显著抑制肿瘤的生长。YHP-836 在 25 和 50 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量下与 TMZ 合用,相对于溶剂组的抑瘤率分别为 45% 和 80%,相对于 TMZ 组的抑瘤率分别为 7% 和 67% (表 1)。同样, YHP-836 单药给药组未见明显的抑制肿瘤生长的作用, TMZ 组相对于溶剂组的抑瘤率为 40%。在实验过程中,联用组与 TMZ 组相比小鼠体重未出现显著性降低。

#### 讨论

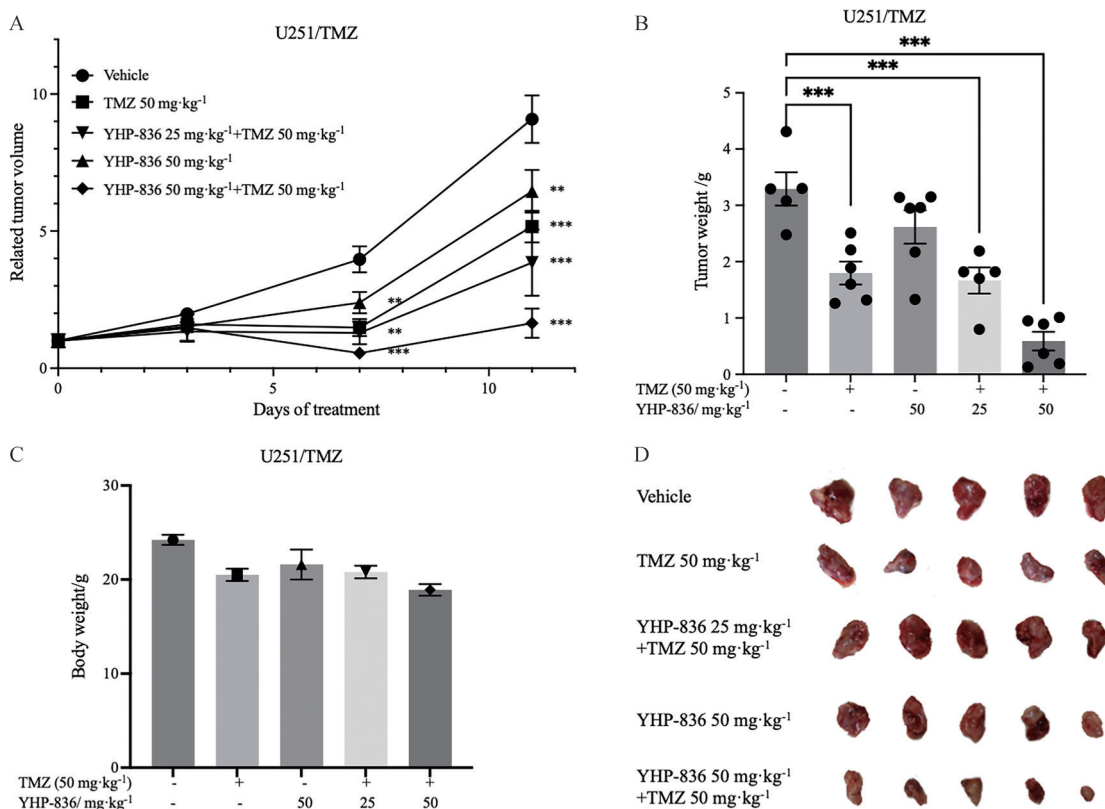
脑胶质瘤是恶性程度最高、预后最差的脑肿瘤,具有极易复发和转移的特点。目前, TMZ 是唯一被批准用于脑胶质瘤治疗的药物。然而, TMZ 在治疗过程中经常出现耐药性,从而限制了治疗效果。已有研究发现 TMZ 耐药与 DNA 损伤修复相关,且 PARP1/2 在



**Figure 3** *In vivo* monitoring of tumor growth in orthotopic xenograft model. A: MRI monitoring of tumor growth; B: Life curve in orthotopic xenograft model.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

**Table 1** Antitumor activity of YHP-836 in an U251/TMZ subcutaneous xenograft model.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs vehicle group. TGI: Tumor growth inhibition;  $TGI_{veh}$ : 1 - mean tumor volume of treated group/mean tumor volume of vehicle group;  $TGI_{TMZ}$ : 1 - mean tumor volume of treated group/mean tumor volume of TMZ group

Group	Dose/mg·kg <sup>-1</sup> ×day	Number (end/start)	Tumor weight/g	$TGI_{veh}/\%$	$TGI_{TMZ}/\%$
Vehicle	-	5/5	3.02 ± 0.38	-	-
TMZ	50×5	5/5	1.80 ± 0.46***	40	-
YHP-836	50×11	5/5	2.62 ± 0.66	13	-
YHP-836/TMZ	25×5, 50×5	5/5	1.67 ± 0.46***	45	6
	50×5, 50×5	5/5	0.59 ± 0.37***	80	67



**Figure 4** The sensitizing effects of YHP-836 to TMZ on tumor growth in U251/TMZ xenograft model. A: Antitumor activity of YHP-836 in an U251/TMZ subcutaneous xenograft model.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  vs the vehicle group; B: Tumor weight in an U251/TMZ xenograft model.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $***P < 0.001$ ; C: The body weight of mice in an U251/TMZ subcutaneous xenograft model; D: After the tumors were implantation for 15 days, the mice were sacrificed and the photos of the tumor were presented

TMZ 耐药中发挥重要作用<sup>[21]</sup>。因此, 本文选用一种全新结构的 PARP1/2 抑制剂以探究其对 TMZ 的增敏作用。

本文研究了新型 PARP1/2 抑制剂 YHP-836 对于脑胶质瘤的体内外单药抗肿瘤效果和对 TMZ 的增敏活性。YHP-836 的抗肿瘤效果在细胞上表现为可以抑制 PAR 水平、增加  $\gamma$ H2AX 水平。在 U87MG、U251、A172、U251/TMZ 和 T98G 5 种胶质瘤细胞上, YHP-836 单独使用抑制胶质瘤细胞增殖的能力不明显, 但与 TMZ 联用可显著增强 TMZ 杀伤肿瘤细胞的作用。同时, 基于胶质瘤细胞长期滞留在 G2/M 期导致 TMZ 耐药的机制, 研究结果表明 YHP-836 与 TMZ 联用可以使细胞周期阻滞在 S 期, 提示 YHP-836 可能通过此机制克服 TMZ 耐药从而增敏 TMZ。

PARP 抑制剂单药由于合成致死原理, 对于 BRCA1/2 以及 PTEN 功能缺陷的乳腺癌有较好的体外抑制率, 一般  $IC_{50}$  可以达到微摩尔水平<sup>[22]</sup>。在本研究中, 初步的体外实验发现, YHP-836 单药对多种胶质瘤细胞的  $IC_{50}$  最小达到  $26.34 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 这表明 YHP-836 单药对脑胶质瘤的抗肿瘤作用不是很理想, 而即便是

作为阳性对照的 olaparib 对各脑胶质瘤细胞的抑制作用也不明显, 也提示这几种脑胶质瘤细胞并不是一个 BRCA/PTEN 缺陷或者突变的肿瘤。但是在联用化疗药物 TMZ 后发现 YHP-836 对 TMZ 的增敏作用非常明显, 而进一步的体内结果也证实了这一点。

在体内, YHP-836 与 TMZ 联用具有显著的抑制肿瘤生长作用, 在  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量下与 TMZ 合用相对于 TMZ 组的抑瘤率为 67%。但是 YHP-836 单药未见明显抑制肿瘤生长的作用。此外, 在实验过程中, YHP-836 与 TMZ 联合给药组与 TMZ 组相比, 动物的总生存期明显延长且未出现明显体重变化, 初步证明 YHP-836 与 TMZ 联用在动物模型水平上具有较好的安全性。

研究发现, 无论是在体内还是体外, 单独使用 YHP-836 对 U251/TMZ 肿瘤的治疗作用较差, 而在联合 TMZ 使用时, 能显著增敏 TMZ 的抗肿瘤作用。因此, 下一步将考察 YHP-836 等新型 PARP 抑制剂单药和联用化疗药物对 U251/TMZ 侵袭和转移能力的影响, 这对于 PARP 抑制剂的抗脑胶质瘤作用研究有重要意义。

作者贡献: 邓佳玲负责实验操作、数据处理及文章撰写;

杜婷婷协助动物实验及流式数据分析;周洁负责合成制备化合物 YHP-836;陈晓光、徐柏玲和季鸣负责提供研究思路和文章的修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Zhang L, Yan Y, Jiang Y, et al. Knockdown of SALL4 expression using RNA interference induces cell cycle arrest, enhances early apoptosis, inhibits invasion and increases chemosensitivity to temozolomide in U251 glioma cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14: 4263-4269.
- [2] Gao SF, Sha Z, Zhou JB, et al. BYSL contributes to tumor growth by cooperating with the mTORC2 complex in gliomas [J]. *Cancer Biol Med*, 2021, 18: 88-104.
- [3] Bi S, Li X, Wei C, et al. The antitumour growth and antiangiogenesis effects of xanthatin in murine glioma dynamically evaluated by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging [J]. *Phytother Res*, 2019, 33: 149-158.
- [4] Karachi A, Dastmalchi F, Mitchell DA, et al. Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma [J]. *Neuro Oncol*, 2018, 20: 1566-1572.
- [5] Xu X, Wang Z, Liu N, et al. Association between SOX9 and CA9 in glioma, and its effects on chemosensitivity to TMZ [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53: 189-202.
- [6] Bi Y, Li H, Yi D, et al.  $\beta$ -Catenin contributes to cordycepin-induced MGMT inhibition and reduction of temozolomide resistance in glioma cells by increasing intracellular reactive oxygen species [J]. *Cancer Lett*, 2018, 435: 66-79.
- [7] Kohsaka S, Wang L, Yachi K, et al. STAT3 inhibition overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by downregulating MGMT expression [J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11: 1289-1299.
- [8] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma [J]. *New Engl J Med*, 2005, 352: 997-1003.
- [9] Pascal JM. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage [J]. *DNA Repair*, 2018, 71: 177-182.
- [10] Sodhi RK, Singh N, Jaggi AS. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications [J]. *Vascul Pharmacol*, 2010, 53: 77-87.
- [11] Gupte R, Lin KY, Nandu T, et al. Combinatorial treatment with PARP-1 inhibitors and cisplatin attenuates cervical cancer growth through Fos-driven changes in gene expression [J]. *Mol Cancer Res*, 2022, 20: 1183-1192.
- [12] Luo L, Keyomarsi K. PARP inhibitors as single agents and in combination therapy: the most promising treatment strategies in clinical trials for BRCA-mutant ovarian and triple-negative breast cancers [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2022, 31: 607-631.
- [13] Yu L, Yan Z, Wang Y, et al. Recent advances in structural types and medicinal chemistry of PARP-1 inhibitors [J]. *Med Chem Res*, 2022, 31: 1265-1276.
- [14] Deeks ED. Olaparib: first global approval [J]. *Drugs*, 2015, 75: 231-240.
- [15] Lai FF, Li J, Ji M, et al. Olaparib potentiates the antitumor effect of taxol on 4T1 breast cancer [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 907-912.
- [16] Du T, Zhang Z, Zhou J, et al. A novel PARP inhibitor YHP-836 for the treatment of BRCA-deficiency cancers [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 865085.
- [17] Ji M, Wang LY, Lü YH, et al. Establishment of a glioma orthotopic xenograft model based on imaging technology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1245-1249.
- [18] Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme [J]. *Genes Dis*, 2016, 3: 198-210.
- [19] Alonso MM, Gomez-Manzano C, Bekele BN, et al. Adenovirus-based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase promoter [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 11499-11504.
- [20] Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. Abrogation of the Chk1-mediated G2 checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 5843-5849.
- [21] Han B, Meng X, Wu P, et al. ATRX/EZH2 complex epigenetically regulates FADD/PARP1 axis, contributing to TMZ resistance in glioma [J]. *Theranostics*, 2020, 10: 3351-3365.
- [22] Dedes KJ, Wetterskog D, Mendes-Pereira AM, et al. PTEN deficiency in endometrioid endometrial adenocarcinomas predicts sensitivity to PARP inhibitors [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2: 53ra75.