

基于 GSTs 抑制剂的新型四价铂配合物逆转肺癌耐药作用及机制研究

陈飞虹, 吴佳妮, 温 鑫, 苟少华*

(东南大学化学化工学院, 江苏省生物药物高技术研究重点实验室, 江苏 南京 211189)

摘要: 基于八面体的可修饰结构和动力学惰性, Pt(IV) 配合物成为逆转 Pt(II) 类药物耐药性和毒性的抗癌前药候选药物。硝基苯并恶二唑衍生物 (NBDHEX) 能够抑制谷胱甘肽 S 转移酶 (GSTs) 活性, 将 NBDHEX 与 Pt(II) 配合物 DN603、DN604 接合获得两个 Pt(IV) 配合物 DN603-NBD 和 DN604-NBD。体外实验表明, DN603/DN604-NBD 能够有效抑制顺铂敏感 A549 细胞和耐药 A549/cDDP 细胞增殖, 对细胞的铂摄取量均高于顺铂, 诱导较高细胞凋亡率和 Bax/Bcl-2 比值, 激活 caspase-3 并裂解 DNA 修复酶 (PARP), 诱导线粒体依赖性的细胞凋亡通路。DN603/DN604-NBD 能够产生较高活性氧 (ROS) 水平, 增强磷酸化 H2AX (γ -H2AX) 的荧光强度, 引发严重 DNA 双链损伤。研究发现, GSTs 激酶 GSTP1 在耐药肿瘤细胞中高表达, DN603/DN604-NBD 能够靶向 GSTP1 并抑制其表达水平。提前给予 ROS 和 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 抑制剂后发现, 药物能够显著增加活细胞数量并降低 JNK 及 c-Jun 磷酸化水平。结果表明, DN603/DN604-NBD 通过上调 ROS 来激活 JNK 相关信号通路而诱导细胞凋亡, 产生逆转顺铂耐药作用。动物福利和实验过程均遵循东南大学动物伦理委员会的规定 (批准号: 20210303025)。体内研究表明, DN603/DN604-NBD 能够抑制 A549 异种移植瘤生长且无明显毒副作用。所有结果表明, DN603-NBD 和 DN604-NBD 是两种潜在的新型 Pt(IV) 抗肿瘤前药候选药物。

关键词: Pt(IV) 类前药; GSTs 抑制剂; 铂药耐药性; 活性氧; c-Jun 氨基末端激酶; c-Jun

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)12-3261-12

The effect of reversing drug resistance and exact mechanism of novel platinum(IV) hybrids based on GSTs inhibitors

CHEN Fei-hong, WU Jia-ni, WEN Xin, GOU Shao-hua*

(Jiangsu Province Hi-Tech Key Laboratory for Biomedical Research, Southeast University, Nanjing 211189, China)

Abstract: Based on the octahedral modifiable structures and kinetic inertness, platinum (IV) complexes have become antitumor prodrug candidates to mitigate platinum (II) drug resistance and side effects. The nitrobenzoxadiazole derivative (NBDHEX) can inhibit the activity of glutathione S-transferases (GSTs) and be introduced to conjugate with platinum(II) complexes DN603 and DN604 to yield two platinum (IV) complexes DN603/DN604-NBD. *In vitro* assays demonstrated that DN603/DN604-NBD could significantly inhibit the proliferation of cisplatin-sensitive A549 and resistant A549/cDDP cancer cells. The uptake of DN603/DN604-NBD in A549/cDDP cells was much higher than that of cisplatin, causing a higher rate of cell apoptosis and a greater ratio of Bax/Bcl-2, the activation of caspase-3 and cleavage of DNA repair enzyme (PARP), inducing the mitochondria-dependent cell apoptosis pathway. DN603/DN604-NBD could induce higher reactive oxygen species (ROS) levels, significantly enhance phosphorylation of histone H2AX on Ser-139 (γ -H2AX) fluorescence intensity and cause a greater degree of DNA double-stranded damage. Studies have shown that GSTs kinase GSTP1 was

收稿日期: 2024-04-19; 修回日期: 2024-06-22.

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (82173852, 21571033).

*通讯作者 Tel: 18013981481, E-mail: sgou@seu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0384

highly expressed in cisplatin-resistant cancer cells. Moreover, **DN603/DN604-NBD** targeted GSTP1 to suppress its expression level. By using the ROS scavenger NAC and the c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor SP600125 in advance, it was found that **DN603/DN604-NBD** could significantly increase the number of living cells and decrease the phosphorylation levels of JNK and c-Jun. The results indicated that **DN603/DN604-NBD** could produce higher levels of ROS to activate JNK-mediated signaling pathway, induce apoptosis in tumor cells to overcome cisplatin resistance. All the animal experiments were approved by Animal Ethics Committee of Southeast University (grant No. 20210303025). *In vivo* assays confirmed that **DN603/DN604-NBD** could inhibit the growth of A549 xenograft tumors with nearly no toxicity and fewer side effects. Taken together, **DN603/DN604-NBD** are investigated as two potential novel platinum (IV) prodrug candidates for anticancer therapy.

Key words: platinum(IV) prodrug; GSTs inhibitor; cisplatin resistance; reactive oxygen species; c-Jun N-terminal kinase; c-Jun

肺癌起源于肺部支气管黏膜或腺体, 具有极高发病率和死亡率, 是常见恶性肿瘤之一^[1]。肺癌主要分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌 (NSCLC), 其中 NSCLC 约占肺癌的 80%^[2], 晚期 NSCLC 患者 5 年预后约为 4%^[3]。临床肿瘤治疗方法包括手术、放疗和化疗等, 其中化疗是全身性的治疗手段^[4]。早期 NSCLC 患者通过手术和辅助铂类化疗来治疗^[5,6]。超过 70% NSCLC 患者确诊时已发展至晚期, 化疗是晚期 NSCLC 患者重要的治疗手段。作为晚期 NSCLC 化疗的首选药物, 铂类药物常与吉西他滨、多西他赛等联合使用^[7]。目前, 获得性耐药已成为临床 NSCLC 患者治疗失败的主要原因^[8], 因此需要研发新药来克服铂类耐药性^[9,10]。

作为癌症化疗的主要药物^[11], 经典二价铂药以顺铂、卡铂和奥沙利铂为代表被广泛应用于实体瘤化疗。但长期服用铂药会使患者产生耐药性和骨髓抑制、神经毒性等严重毒不良反应^[12,13]。本课题组前期研发新型铂(II) 类配合物 **DN603** 和 **DN604** (图 1), 抗肿瘤活性较强, 水溶性较好, 细胞毒性较小且耐药性较低^[14]。在铂(II) 配合物基础上合成稳定八面体构型的铂(IV) 配合物, 具有动力学惰性, 不易与体内亲核物质反应^[15], 对顺铂耐药肿瘤细胞具有细胞毒性, 逐渐成为最有希望克服铂(II) 药物耐药性的替代者。

作为一种参与机体解毒功能的同工酶, 谷胱甘肽 S 转移酶 (GSTs) 能够促进体内细胞癌变。研究发现, NSCLC 癌组织中 GSTs 蛋白表达 (78.33%) 明显高于癌旁组织 (30%)^[16]。NSCLC 中 GSTs 高表达患者的平均生存期低于 GSTs 低表达患者, 显示 NSCLC 预后不良^[17]。作为肿瘤耐药基因, GSTs 显著降低 NSCLC 治疗效果。研发靶向 GSTs 抑制剂有望克服顺铂耐药性。6-(7-硝基-2,1,3-苯并恶二唑-4-巯基) 己醇是 GSTs 激酶家族 GSTP1 抑制剂 NBDHEX, 属于硝基苯并恶二唑 (NBD) 衍生物, 能够强效抑制 GSTs 激酶活性和催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 与致癌物、药物、毒素等结合作用^[18,19]。本课题组将 NBDHEX 与 Pt(II) 类药物 **DN603** 和 **DN604** 偶联生成 **DN603/DN604-NBD** (图 1), 对顺铂敏感 A549 细胞和顺铂耐受 A549/cDDP 细胞进行体外活性研究, 并构建体内 A549 异种移植瘤模型, 检测 **DN603/DN604-NBD** 对体内肿瘤生长作用, 探究其克服顺铂耐药作用的确切机制。

材料与方法

化合物设计 铂(IV) 配合物由平面上载体基团 (Am)、离去基团 (L) 和位于轴向上的功能基团组成, 轴向基团一端以丁二酸连接一分子 NBDHEX, 另一端为

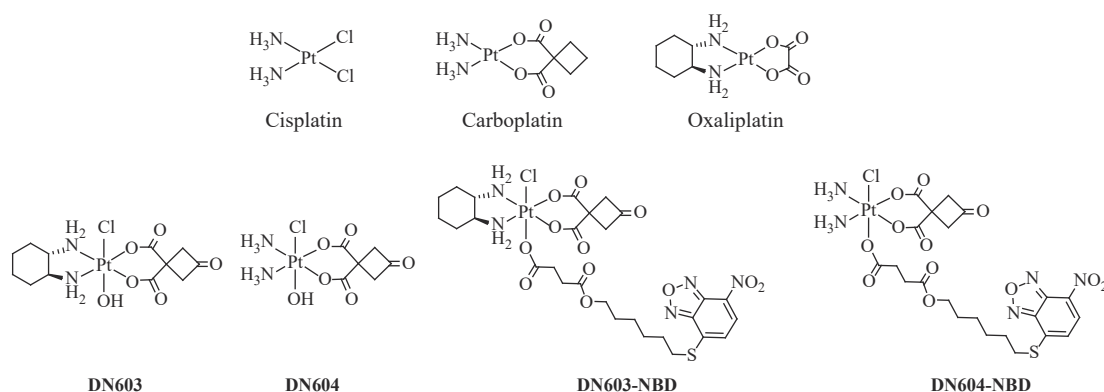


Figure 1 The molecular structures of representative Pt(II) antitumor drugs and **DN603/DN604**, **DN603/DN604-NBD**

氯离子、羟基或丁二酸连接第二个 NBDHEX 分子, 如图 2 所示。

NBDHEX 及其衍生物的合成 以 4-氯-7-硝基苯咪唑 (**1-1**) 和 6-巯基-1-己醇 (**1-2**) 为起始原料合成 NBDHEX (**1-3**) 及其丁二酸衍生物 **1-4**, 如图 3 所示。

NBDHEX (1-3) 的合成: 称取 1.0 g 化合物 **1-1** 于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 80 mL 乙醇/0.1 mol·L⁻¹ 磷酸钾缓冲液 (pH = 7.0, v:v = 1:1), 室温下搅拌均匀。量取 1.4 mL 化合物 **1-2** 加入其中, 用 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钾溶液调节 pH 至中性, 容器密闭, 室温搅拌反应 6 h。反应完毕后, 称取 1.3 g 3-溴丙酮加入上述反应体系, 室温搅拌 10 min, 静置 1 h, 过滤收集沉淀, 适量水洗, 40 °C 真空干燥, 得金黄色化合物 1.20 g, 产率 80.5%。ESI-MS (*m/z*): [M-H]⁻ = 296.09。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.42 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.69 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.89 (m, 2H), 1.70~1.45 (m, 6H), 1.40 (s, 1H)。将 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钾溶液 61.5 mL 和 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 38.5 mL 混合, 即可配制成 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸钾缓冲液 100 mL (pH = 7.0)。

化合物 1-4 的合成: 称取 1.2 g 化合物 **1-3**, 1.2 g 丁二酸酐和 1.4 g 4-二甲氨基吡啶于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入适量二氯甲烷 (DCM) 作溶剂, 回流反应 6 h, 薄层色谱法 (TLC) (DCM:MeOH = 10:1, v:v) 监测反应。待化合物 **1-1** 反应完全后, 冷却至室温, 以 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液洗涤 1 次, 饱和氯化钠溶液洗涤 2 次, 无水硫酸钠干燥后硅胶柱层析纯化, 洗脱液为 PE:DCM:MeOH = 20:10:1 (v:v:v), 得黄色化合物 1.3 g, 产率 81.3%。ESI-MS (*m/z*): [M-H]⁻ = 396.08。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.43 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.14 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.30 (t, *J* = 7.5 Hz,

2H), 2.73~2.61 (m, 4H), 1.95~1.82 (m, 2H), 1.75~1.67 (m, 2H), 1.67~1.53 (m, 2H), 1.53~1.42 (m, 2H)。

铂(IV) 抗肿瘤配合物的合成与表征 以 **DN603** 和 **DN604** 为起始原料, 在纯化水中以 *N*-氯代丁二酰亚胺 (NCS) 作为氧化剂制备铂(IV) 配合物前体。铂(IV) 抗肿瘤配合物 **DN603-NBD (1-5)** 和 **DN604-NBD (1-6)** 的合成方法如图 4 所示, 目标化合物的结构采用高分辨质谱 (ESI-MS)、元素分析 (EA)、氢谱 (¹H-NMR)、碳谱 (¹³C-NMR) 和铂谱 (¹⁹⁵Pt-NMR) 进行表征。

化合物 DN603-NBD (1-5) 的合成: 黄色固体 243.9 mg, 产率 54.2%。ESI-MS (*m/z*): [M-H]⁻ = 896.14。Anal. calcd (%): C 37.48, H 4.04, N 7.81, found: C 37.53, H 4.09, N 7.79。¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.50~7.55 (DACH-NH₂, 4H), 7.52 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.51~3.42 (4H), 3.36 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.75~2.52 (m, 4H), 2.15~1.95 (m, 2H), 1.83~1.72 (m, 2H), 1.65~1.00 (m, 14H)。¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 203.42, 178.76, 175.90, 175.78, 172.23, 149.12, 142.60, 139.93, 132.25, 132.04, 122.16, 63.79, 61.60, 61.27, 59.64, 59.02, 45.69, 31.30, 31.03, 30.82, 30.56, 30.48, 29.47, 27.89, 27.75, 27.27, 24.80, 23.44。¹⁹⁵Pt-NMR (129 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 1 004.17。

化合物 DN604-NBD (1-6) 的合成: 黄色固体 278.0 mg, 产率 68.1%。ESI-MS (*m/z*): [M-H]⁻ = 816.07, [M+Cl]⁻ = 852.05。Anal. calcd (%): C 32.34, H 3.45, N 8.57, found: C 32.42, H 3.48, N 8.61。¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.57 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.25 (-NH₃, 6H), 4.01 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.51 (4H), 3.37 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.40~2.60 (m, 4H), 1.85~1.70 (m, 2H), 1.65~1.30 (m, 6H)。¹³C-NMR (75 MHz,

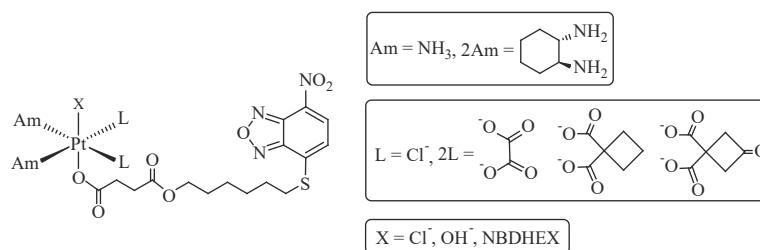


Figure 2 Design of Pt(IV) antitumor complex with glutathione S-transferases (GSTs) inhibition

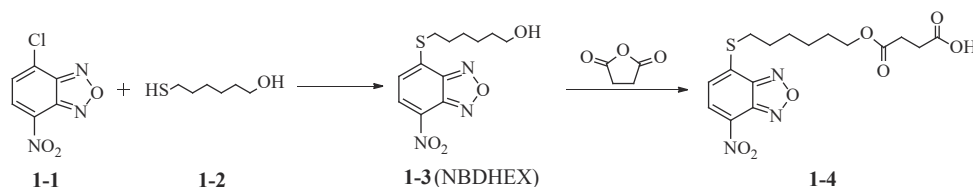


Figure 3 Synthesis of NBDHEX and its derivatives

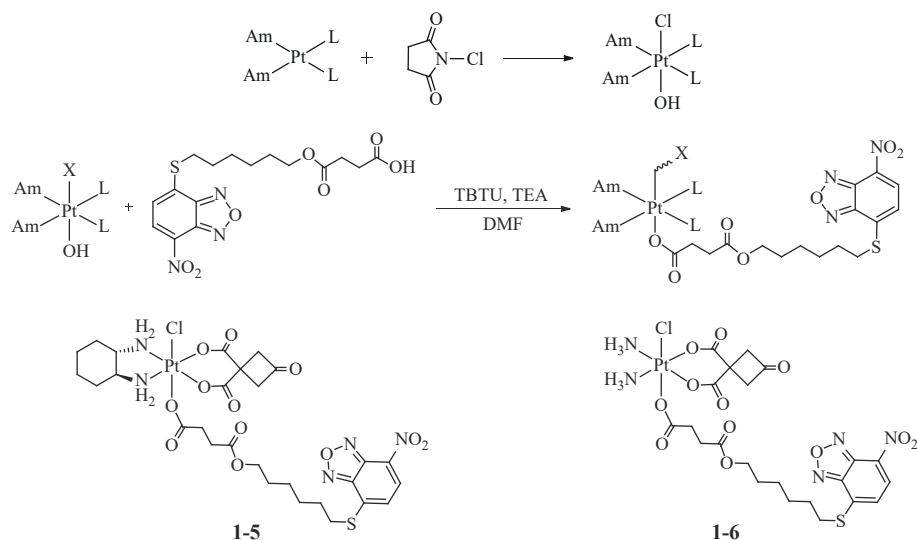


Figure 4 Design of Pt(IV) antitumor complex with GSTs inhibition

DMSO- d_6) δ : 203.50, 177.84, 175.62, 172.23, 149.12, 142.60, 139.95, 132.26, 132.04, 122.15, 63.77, 59.76, 59.22, 45.46, 30.56, 30.45, 29.65, 27.87, 27.75, 27.27, 24.81. ^{195}Pt -NMR (129 MHz, DMSO- d_6) δ = 1 338.67.

细胞 NSCLC 细胞株 A549、A549/cDDP 购自上海 ATCC 细胞库。

动物 BALB/c 裸鼠, 周龄为 6~7 周, 体重 18~22 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物生产许可证: SCXK (沪) 2013-0018; 合格证编号: 2013001803704。实验动物使用许可证: SYXK (苏) 2012-0047。本实验获得东南大学动物实验伦理委员会批准 (批准号: No. 20210303025)。本课题中动物实验严格按照《中华人民共和国动物伦理指南》操作。

药物 DN603 和 DN604、DN603-NBD 和 DN604-NBD 皆由本课题组制备获得。

试剂与仪器 PBS 缓冲液、胰蛋白酶、RPMI-1640 培养基、多聚甲醛溶液、细胞通透液 Triton X-100、RIPA 裂解液、PMSF、DAPI、MTT、凋亡检测试剂盒 (Annexin V-FITC/PI)、周期检测试剂盒 (RNase A/PI)、活性氧 (ROS) 荧光探针 (DCFH-DA) 和线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 均购自江苏凯基生物技术有限公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物技术有限公司; DMSO 购自阿拉丁试剂公司。

MTT 细胞毒检测 收集处于对数生长期的细胞, 将细胞与适量的 RPMI-1640 完全培养基混合均匀后, 接种于 96 孔板, 每孔的细胞数目保持在 5 000 个左右, 置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱内培养 24 h, 待细胞贴壁后, 更换培养基并将呈浓度梯度的药物稀释液加入到 96 孔板内, 孵育 72 h 后, 每孔加入 10 μL 浓度为

5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 溶液, 孵育 4 h 后, 吸去上清液, 每孔加入 130 μL DMSO 溶解 MTT 甲臜沉淀, 置于摇床上 5 min 使沉淀完全溶解, 使用酶标仪测定 490 nm 条件下每个孔吸光度值 (A), 并通过 SPSS 软件计算出半数抑制浓度 (IC_{50}), 最终结果取 3 次平行实验的平均值。抑制率的计算方法: 抑制率 (%) = $(A_{\text{空白组}} - A_{\text{给药组}}) / A_{\text{空白组}}$ 。

铂摄取 为探究药物积累与细胞毒作用的关联, 本研究检测铂类配合物细胞摄取作用。将细胞接种于 6 孔板, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。贴壁后吸去旧培养基, 每孔加入培养基配置的顺铂、DN603 和 DN604、DN603/DN604-NBD (15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 2 mL)。12 h 后收集细胞, 加入 1 mL PBS 后计数。离心弃上清, 每组加入 200 μL 浓硝酸, 65 $^\circ\text{C}$ 裂解过夜, 用 ICP-MS 检测铂含量。

Annexin V-FITC/PI 双染法 将 A549 和 A549/cDDP 细胞复苏并于 RPMI-1640 培养基中培养过夜。将细胞接种于 6 孔板中培养 12 h, 每孔分别加入顺铂、DN603、DN604、NBDHEX 和 DN603/DN604-NBD (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。将细胞收集于离心管中, 1 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清重复 2 次。加入 binding buffer 缓冲液 500 μL 重悬, 加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μL , 避光染色 15 min, 使用流式细胞仪进行凋亡检测。

免疫印迹 为探究 DN603/DN604-NBD 诱导细胞凋亡机制, 本研究检测两种新型铂(IV) 配合物对凋亡蛋白表达水平的影响。将细胞接种至 6 孔板中, 贴壁后加入预先配制的药物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。作用 24 h 后收集细胞, 加入裂解液冰上裂解 50 min, 13 300 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 收集上清液, 用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白含量。取适量蛋白样品于 SDS-PAGE 凝胶中电泳, 将目的蛋白转移至 PVDF 膜。用一抗处理和漂洗, 再用

标记的二抗进行酶免疫定位。用X-ray底片曝光进行显影分析。

周期阻滞研究 将细胞接种至6孔板, 孵箱孵育12 h。弃上清换液, 分别加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 顺铂、**DN603**、**DN604**、**NBDHEX**、**DN603-NBD**与**DN604-NBD**。作用24 h后将上清转到离心管中, 用胰蛋白酶消化细胞并收集, $1\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min。弃上清, 用PBS洗涤细胞($2\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min)。加入500 μL 预冷的75%乙醇, $4\ ^\circ\text{C}$ 固定过夜。PBS洗涤细胞($1\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min), 加入500 μL 染液(RNase A:PI = 1:9)避光染色45 min。使用流式细胞仪检测并分析细胞周期分布情况。

ROS水平研究 通过检测ROS产生来探究**DN603/DN604-NBD**抗肿瘤作用机制。细胞接种至6孔板中孵育12 h至贴壁。吸去上清并加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ **DN603-NBD**与**DN604-NBD**作用24 h。去除培养液, 每孔加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DCFH-DA 1 mL混匀染色30 min, 洗涤细胞, 荧光显微镜拍照观察, 流式细胞仪分析ROS水平。

彗星实验 6孔板接种适量细胞, 待贴壁后给药。药物终浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 作用24 h。将细胞消化, PBS洗涤并离心, 再将细胞重悬。载玻片第一层为正常熔点琼脂糖NMA, 第二层为混有细胞的低熔点琼脂糖LMA, 第三层铺上低熔点琼脂糖LMA。加入裂解缓冲液裂解50 min。将载玻片放入碱性缓冲液($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, $300 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH)静置30 min, 促进DNA解旋。 25 V 电压下电泳30 min, $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5)缓冲液中和3次, PI染色, 使用共聚焦显微镜进行荧光拍照。

免疫荧光实验 DNA双链断裂(DSB)是最具致死性损伤类型^[20,21]。磷酸化的H2AX (phosphorylation of histone H2AX on Ser-139, γ -H2AX)募集诱导双链DNA修复^[22,23]。通过检测 γ -H2AX来研究**DN603/DN604-NBD**对DNA损伤修复作用。取预先浸泡在75%乙醇48 h的盖玻片, 铺在6孔板后接种细胞, 孵育至贴壁, 加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ **DN603/DN604-NBD**继续孵育24 h。弃上清用PBS洗涤, 加入4%多聚甲醛固定, 20 min后用PBS洗涤。加入0.5% TritonX-100进行细胞透化, 20 min后用PBS洗涤3次。5% BSA封闭处理40 min, 加入一抗 $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜, PBST清洗3次。加入相应二抗避光孵育1 h, DAPI染色10 min, 荧光显微镜拍照分析图像。

GSTP1表达水平和活性检测 GSTP1通过抑制c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)而减少细胞凋亡^[24]。**DN603/DN604-NBD**轴向偶联

NBDHEX, 本研究通过免疫印记检测A549和A549/cDDP中GSTP1表达水平来评估药物对GSTP1抑制作用。GSTs能够催化GSH与1-氯-2,4-二硝基苯结合。使用GSTs激酶试剂盒研究**DN603-NBD**和**DN604-NBD**对GSTP1的调控作用。预先配置A、B、C、D工作液。取30 μL 基质液(A工作液: $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH标准品溶液 = 1:1)加入96孔板。用DMSO溶解**DN603/DN604-NBD**并配制成不同浓度: 0.1、0.5、1、2.5、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。取20 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSTP1蛋白分别与5种浓度溶液配置成10 μL 混合液, $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴反应10 min。每组加入200 μL C液和50 μL D液, 空白组加入200 μL B液, 标准组加入200 μL GSH标准品溶液($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)均匀混合。室温反应15 min, 412 nm测定各组A值。以NBDHEX为阳性组, 计算药物对GSTP1激酶抑制率。

JNK信号通路研究 顺铂通过激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路而诱导细胞凋亡^[24,25]。研究表明GSTs同工酶GSTP1与MAPK JNK结合并抑制其活化^[26,27]。本课题组研究药物对JNK及c-Jun的磷酸化水平影响, 引入外源性JNK抑制剂吡唑蒽酮(1,9-pyrazoloanthrone, SP600125)及ROS抑制剂N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)来探究GSTP1调节JNK信号通路的确切机制。通过活死细胞双染试剂盒(calcein AM/PI双染)检测SP600125和NAC预处理后给药诱导细胞增殖情况。通过免疫印记检测JNK及c-Jun的蛋白和磷酸化水平, 采用SP600125和NAC处理来探究药物对JNK通路作用。

裸鼠移植瘤体内药效实验 构建A549裸鼠异种移植瘤模型, 观察肿瘤大小及形态学变化。收集处于对数生长期的A549细胞, PBS清洗2次后计数, 将细胞重悬并接种于裸鼠右侧腋下。当肿瘤体积增长到150 mm^3 时, 将裸鼠随机分成7组, 每组5只。每周1次腹腔注射给药($8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 共4次。测量肿瘤长宽等指标, 计算肿瘤体积: $V=0.5LW^2$ (V/mm^3 , L/mm , W/mm), 绘制生长曲线。处死小鼠, 检测瘤重和瘤体积来评估药物抗肿瘤活性。收集重要脏器和肿瘤组织进行免疫组化IHC分析。以小鼠体重和状态为全身毒性指标。

统计学方法 通过SPSS 16.0进行统计学分析, 计量数据为 $\bar{x} \pm s$, 组间采用独立样本t检验, 多组间采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为数据差异, 有统计学意义。

结果

1 **DN603/DN604-NBD**对顺铂敏感A549和顺铂耐药A549/cDDP细胞生长抑制作用

与其他受试化合物相比, **DN603/DN604-NBD**对

A549细胞生长抑制作用较强,且显著抑制A549/cDDP细胞生长作用(表1)。在A549细胞中, **DN603-NBD** IC_{50} 值为 $3.77 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 细胞毒作用优于 **DN603** 和 **NBDHEX** 的 4.44 和 1.49 倍。 **DN604-NBD** IC_{50} 值为 $3.94 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 优于 **DN604** 和 **NBDHEX** 的 7.90 和 1.43 倍。 **DN603-NBD** 和 **DN604-NBD** 的 A549/cDDP 细胞毒性分别强于 **DN603** 和 **DN604**, 并以 15.77 和 14.96 倍强于顺铂, 耐药因子 RF 从 7.94 降至 0.73 和 0.74。结果表明, 相较于其他 4 种化合物, **DN603-NBD** 和 **DN604-NBD** 能有效抑制 A549 和 A549/cDDP 增殖, 表明二者能够克服顺铂耐药性。对于人正常肝癌细胞 L02, **DN603-NBD** 和 **DN604-NBD** 细胞毒性较低。结果表明, **DN603-NBD** 和 **DN604-NBD** 具有优于其他化合物的抗肿瘤活性, 可能的原因是在铂(IV) 前药中引入了 **NBDHEX**。

Table 1 The IC_{50} values of the tested compounds after 72 h on A549, A549/cDDP and L02 cells. ^aResistance factor (RF) = IC_{50} (A549/cDDP)/ IC_{50} (A549)

Compound	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			RF ^a
	A549	A549/cDDP	L02	
Cisplatin	5.50 ± 0.31	43.68 ± 0.71	16.09 ± 1.34	7.94
DN603	16.75 ± 1.22	50.78 ± 4.25	18.07 ± 0.46	/
DN604	31.11 ± 0.74	93.13 ± 5.04	55.50 ± 1.20	/
NBDHEX	5.63 ± 0.13	4.12 ± 0.32	5.58 ± 0.29	/
DN603-NBD	3.77 ± 0.12	2.77 ± 0.23	6.56 ± 0.30	0.73
DN604-NBD	3.94 ± 0.13	2.92 ± 0.19	5.88 ± 0.26	0.74

2 DN603/DN604-NBD对A549和A549/cDDP铂摄取作用

给药 12 h 后, A549 细胞对 **DN603** 和 **DN604** 的摄取量低于顺铂, 但 A549/cDDP 细胞对 **DN603** 和 **DN604** 的摄取量高于顺铂, 说明 **DN603** 和 **DN604** 具有潜在克服顺铂耐药作用。而 **DN603-NBD** 在 A549 和 A549/cDDP 摄取量是顺铂的 1.13 和 3.78 倍。A549/cDDP 中 **DN604-NBD** 的铂摄取量是顺铂的 3.33 倍, 且 **DN603-NBD** 和 **DN604-NBD** 积累量远高于顺铂, 在 10^6 个细胞中分别达到 34 和 30 ng。结果表明, 顺铂耐药肿瘤细胞对铂摄取量增加是 Pt(IV) 配合物克服耐药的原因之一, **DN603-NBD** 和 **DN604-NBD** 能够克服顺铂耐药作用(表2)。

Table 2 The platinum uptake of the tested compounds in A549 and A549/cDDP cells

Compound	Pt content in 10^6 cells/ng	
	A549	A549/cDDP
Cisplatin	15 ± 0.40	9 ± 0.06
DN603	12 ± 0.25	10 ± 0.12
DN604	13 ± 0.28	11 ± 0.15
DN603-NBD	17 ± 0.40	34 ± 0.50
DN604-NBD	14 ± 0.19	30 ± 0.48

3 DN603/DN604-NBD诱导A549和A549/cDDP细胞凋亡作用

与对照组相比, 顺铂引起 A549 细胞较高凋亡率 (61.30%), **DN603** 与 **DN604** 诱导凋亡低于顺铂, **DN603/DN604-NBD** 能够引发较高凋亡率 (96.37%, 95.10%), 而 **NBDHEX** 产生的凋亡率最高 (97.61%)。此外, 顺铂诱导 A549/cDDP 细胞的凋亡率明显降低 (12.95%)。 **DN603** 和 **DN604** 诱导凋亡率略低于顺铂, **NBDHEX** 诱导凋亡率为 93.23%。 **DN603-NBD** 能够显著诱发细胞凋亡 (95.38%) 且优于 **DN604-NBD** (89.95%) (图5)。结果表明, **DN603/DN604-NBD** 均可诱导 A549 细胞凋亡。 **DN603-NBD** 诱导 A549/cDDP 凋亡作用强于 **DN604-NBD**, 与细胞摄取量呈正相关。

4 DN603/DN604-NBD对A549和A549/cDDP细胞凋亡相关蛋白调控作用

在 A549 细胞中, 顺铂能够提高促凋亡蛋白 Bax 并下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平。而 **DN603/DN604-NBD** 作用程度与顺铂相当且优于其他化合物。顺铂通过激活半胱氨酸蛋白酶 caspase-3 并上调其表达, 裂解与 DNA 修复相关的聚 (ADP) 核糖聚合酶 (PARP) 而诱导细胞凋亡。在 A549/cDDP 细胞中, 顺铂对 Bcl-2 表达水平的下调作用降低。 **DN603/DN604-NBD** 能显著提高 Bax/Bcl-2 比例和 caspase-3 的表达水平, 使 PARP 裂解而诱导顺铂耐药细胞凋亡(图6)。 **DN603-NBD** 和 **DN604-NBD** 诱导 A549/cDDP 细胞凋亡效果优于 **DN603**、**DN604** 和顺铂, 表明两者具有较强的克服顺铂耐药能力。

5 DN603/DN604-NBD阻滞A549和A549/cDDP细胞周期作用

顺铂诱导细胞周期阻滞在 S 期, **DN603** 和 **DN604** 诱导细胞阻滞在 S 或 G2/M 期。 **NBDHEX** 诱导 A549 细胞阻滞 S 期, 诱导 A549/cDDP 细胞阻滞在 S 或 G2/M 期。研究表明, **DN603-NBD** 和 **DN604-NBD** 诱导细胞周期阻滞在 S 期, 它们将 A549 细胞中处于 S 期的细胞由 17.97% 提高至 51.07% 和 42.30%, 提升幅度较大(图7)。 **DN603-NBD** 和 **DN604-NBD** 将细胞周期主要阻滞在 S 期, 阻滞效果优于 **NBDHEX**。

6 DN603/DN604-NBD调控A549和A549/cDDP的ROS水平

在 A549 细胞中, 顺铂显著提高 ROS 水平, 而 **DN603** 和 **DN604** 提高 ROS 水平作用较弱。在 A549 细胞中, **NBDHEX** 激活 ROS 作用低于顺铂; 而在 A549/cDDP 中强于顺铂, 表明 **NBDHEX** 具有潜在克服顺铂耐药作用。 **DN603-NBD** 和 **DN604-NBD** 引起较强荧光强度, 诱导 A549 和 A549/cDDP 细胞 ROS 水平显著

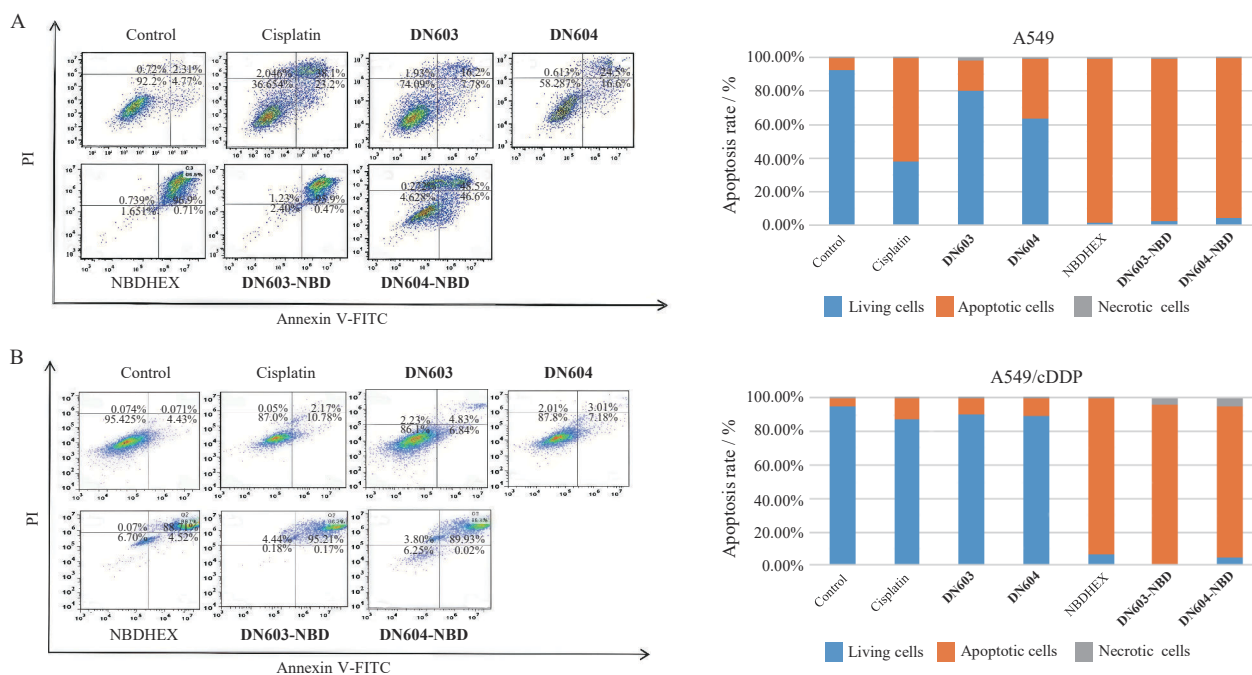


Figure 5 The apoptotic effect induced by the tested compounds in A549 (A) and A549/cDDP (B) cells

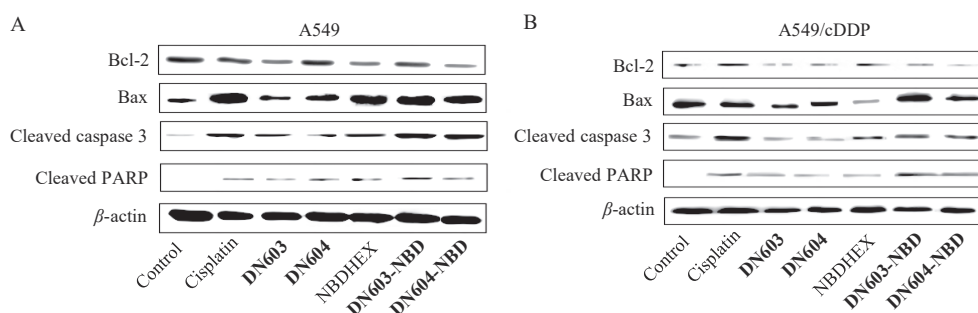


Figure 6 Analysis of apoptosis-related protein expression in A549 (A) and A549/cDDP (B) cells

增加,并高于顺铂(图8)。结果表明, **DN603-NBD** 和 **DN604-NBD** 通过提高细胞 ROS 水平来诱导 A549 和 A549/cDDP 细胞凋亡,具有潜在克服顺铂耐药作用。

7 DN603/DN604-NBD 诱导 A549 和 A549/cDDP 的 DNA 损伤作用

顺铂能够显著诱导 A549 细胞 DNA 损伤,该作用在 A549/cDDP 细胞中明显减弱。用 **DN603-NBD** 和 **DN604-NBD** 处理过的细胞都呈现明显拖尾现象,尤其在耐药细胞中更长(图9),表明由于铂在细胞中积累增加,导致药物作用顺铂耐药细胞后的 DNA 损伤水平显著增加。

8 DN603/DN604-NBD 调控 A549 和 A549/cDDP 细胞中 γ -H2AX 水平作用

顺铂能够引起 γ -H2AX 磷酸化水平增加,而 **DN603/DN604-NBD** 能够提高 γ -H2AX 磷酸化水平,其中 **DN603-NBD** 组最为显著(图10)。结果表明,相比顺铂及 NBDHEX, **DN603-NBD** 和 **DN604-NBD** 更能够

引起 A549 和 A549/cDDP 的 DNA 双链断裂损伤。

9 DN603/DN604-NBD 对 A549 和 A549/cDDP 细胞 GSTP1 蛋白水平影响

研究表明, GSTP1 在 A549 细胞中表达水平高于正常细胞 L02,且在 A549/cDDP 细胞中表达水平最高(图11A)。结果表明, GSTP1 过表达是 NSCLC 细胞产生耐药性的原因之一。

A549/cDDP 细胞的 GSTP1 绿色荧光较 A549 更强。顺铂作用后肿瘤细胞绿色荧光均明显减弱。**DN603** 及 **DN604** 组的荧光强度强于顺铂但弱于对照组。给药处理后 A549 细胞的绿色荧光要强于 A549/cDDP,表明顺铂、**DN603** 和 **DN604** 能够抑制 A549/cDDP 细胞 GSTP1 表达。A549 的 NBDHEX 组与顺铂组的绿色荧光水平相当,而 A549/cDDP 的 NBDHEX 组基本无绿色荧光,表明 NBDHEX 靶向并抑制 GSTP1。而 **DN603-NBD** 和 **DN604-NBD** 处理后基本无绿色荧光表达,表明 **DN603/DN604-NBD** 能够靶向

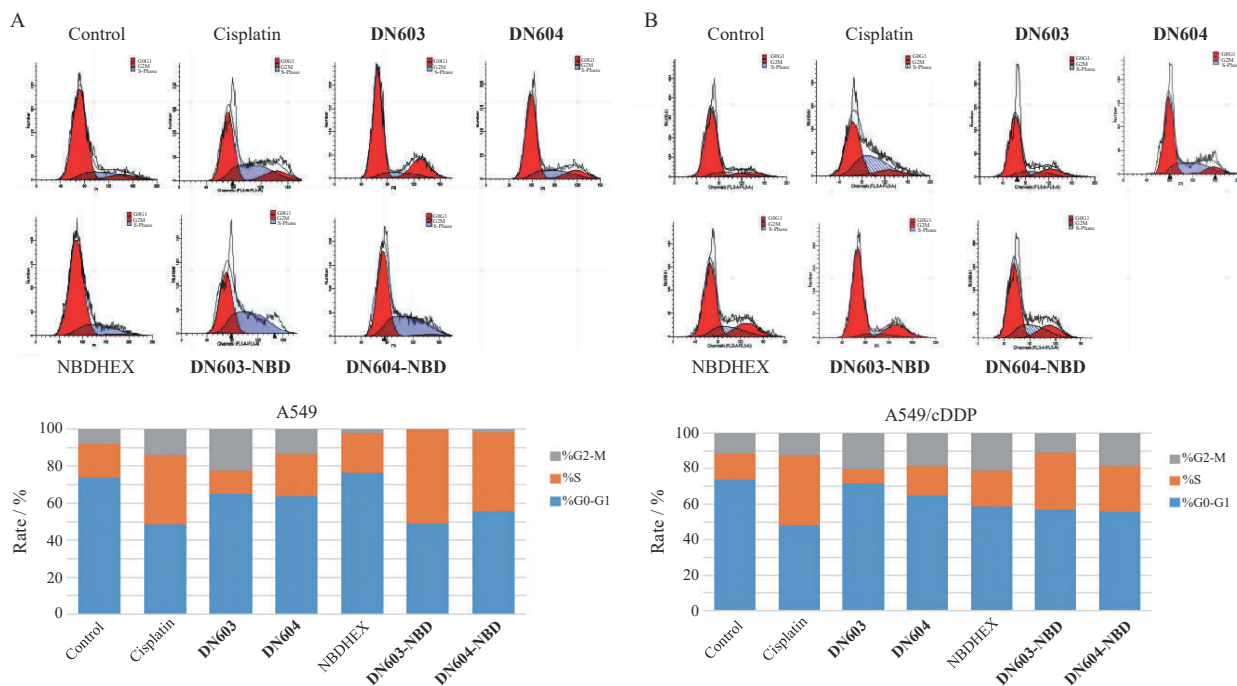


Figure 7 Induction of cell cycle arrest by the tested compounds. A: A549 cells; B: A549/cDDP cells

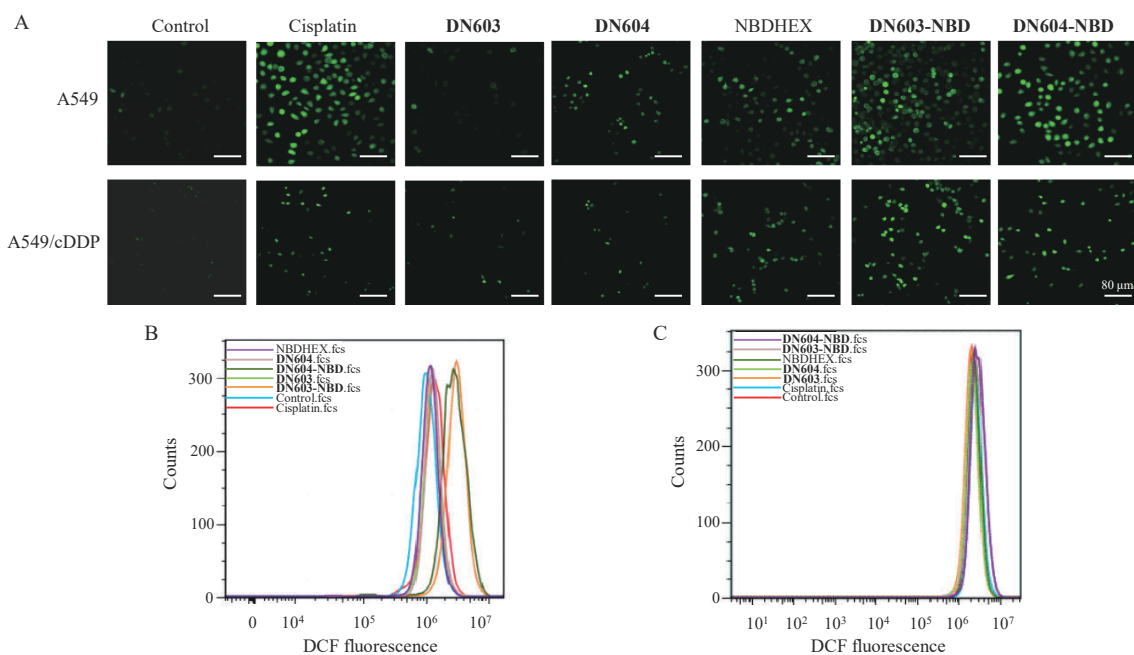


Figure 8 Levels of reactive oxygen species (ROS, A) in A549 (B) and A549/cDDP (C) cells under the influence of the tested compounds

GSTP1 并抑制其表达, 且效果优于NBDHEX 及二价铂配合物 (图 11B、C)。

如图 11D 所示, DN603/DN604-NBD 能够显著抑制 GSTs 活性, 呈浓度依赖性降低。DN603-NBD 对 GSTs 抑制作用要优于 DN604-NBD。结果表明, NBDHEX 与二价铂类衍生物偶联后能够提高对 GSTs 激酶抑制作用。

钙黄素标记绿色荧光 (活细胞), 碘化丙啶标记红色荧光 (死细胞)。DN603-NBD 和 DN604-NBD 组红

色荧光明显增强, 且 DN603-NBD 红色荧光较强, 表明二者有效抑制细胞增殖并诱导细胞死亡。经 ROS 抑制剂 NAC 及 JNK 抑制剂 SP600125 预处理后活细胞数量有所增加, 表明 ROS 及 JNK 表达水平对新型 Pt(IV) 配合物诱导细胞死亡至关重要 (图 12)。结果表明, 新型 Pt(IV) 配合物对 A549 和 A549/cDDP 细胞均有较强杀伤作用, 而 SP600125 及 NAC 预处理能够减弱新型 Pt(IV) 配合物杀死肿瘤细胞能力, 表明新型 Pt(IV) 配合物通过产生过量 ROS 来诱导 JNK 信号通路活化而

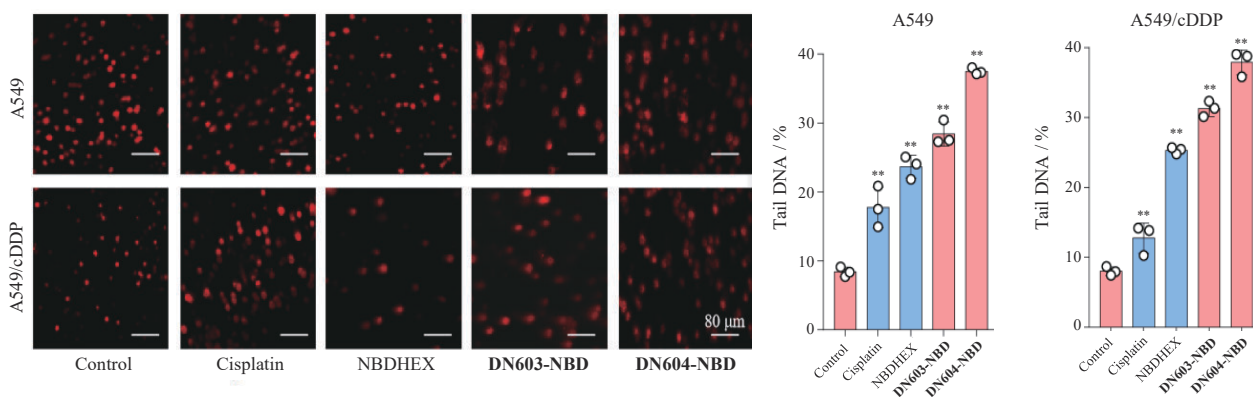


Figure 9 The effect of DNA damage in A549 and A549/cDDP cells induced by the tested compounds. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control

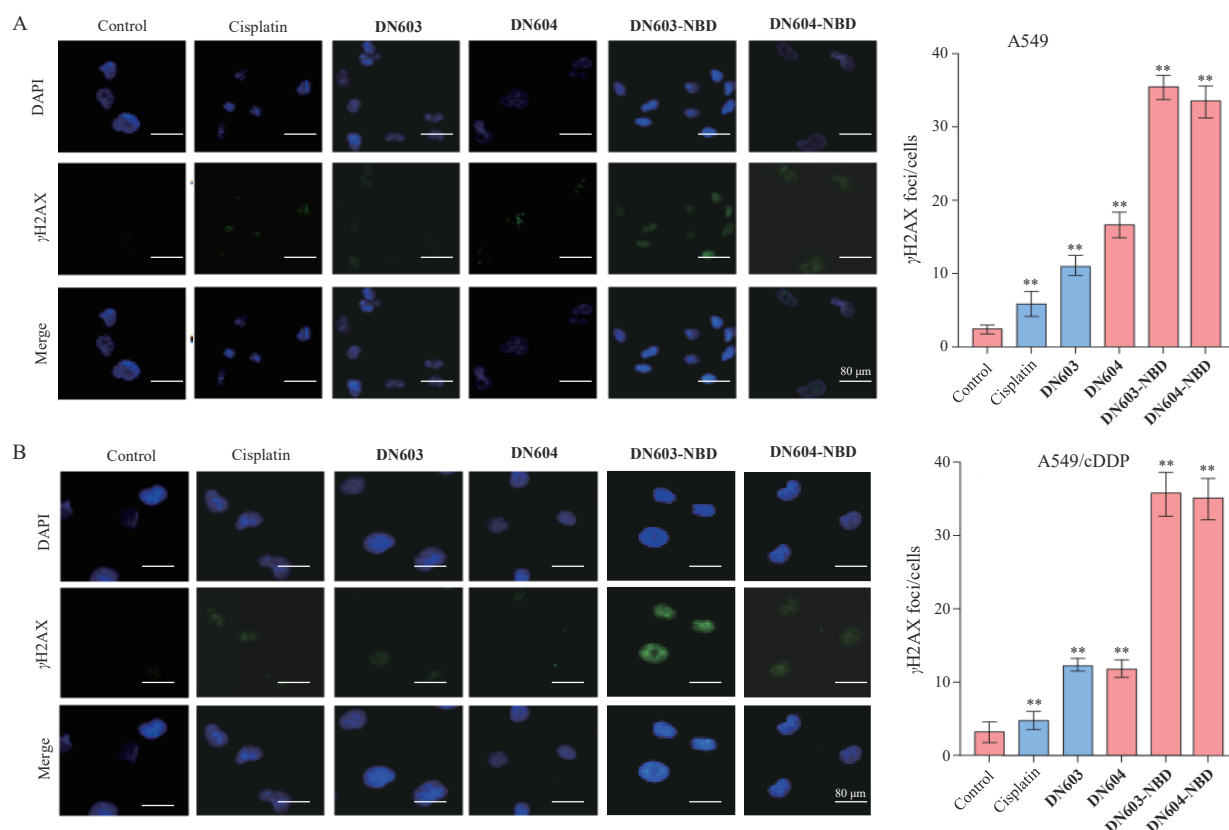


Figure 10 Expression of phosphorylation of histone H2AX on Ser-139 (γ -H2AX) in A549 (A) and A549/cDDP (B) cells under the influence of the tested compounds. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control

诱导肿瘤细胞死亡。

10 DN603/DN604-NBD 对 A549 和 A549/cDDP 的 JNK 信号通路蛋白水平影响

结果表明, 顺铂促进 JNK 及 c-Jun 磷酸化水平上调, Pt(IV) 配合物显著提高其磷酸化水平, 降低 JNK-GSTP1 复合物表达水平, 激活 JNK 信号通路而引发细胞凋亡。用 NAC 及 SP600125 预处理细胞后 JNK 及 c-Jun 磷酸化水平显著降低, 表明 NAC 能抑制 GSTP1 多聚体形成, 抑制 GSTP1 与 JNK-c-Jun 解离, 维持 JNK 活性。在 A549/cDDP 细胞中, 顺铂提高 JNK 及 c-Jun

蛋白的磷酸化水平, 新型 Pt(IV) 配合物显著引起 JNK 及其下游靶蛋白活化。NAC 使 GSTP1 保持对 JNK 的抑制活性, 维持 JNK 活性水平 (图 13)。结果证实, GSTP1 能够参与肿瘤细胞应激反应, 调节 JNK 信号通路。DN603-NBD 和 DN604-NBD 产生过量 ROS, 抑制 GSTP1-JNK-c-Jun 复合物形成, 激活 JNK 并促进 c-Jun 磷酸化, 诱导肿瘤耐药细胞凋亡。DN603-NBD 和 DN604-NBD 不仅保留 Pt(II) 类药物与 NBDHEX 的抗肿瘤活性, 还增加细胞铂摄取, 诱导 DNA 损伤, 抑制 GSTP1 而激活 JNK 信号通路, 克服铂药耐药性而诱导

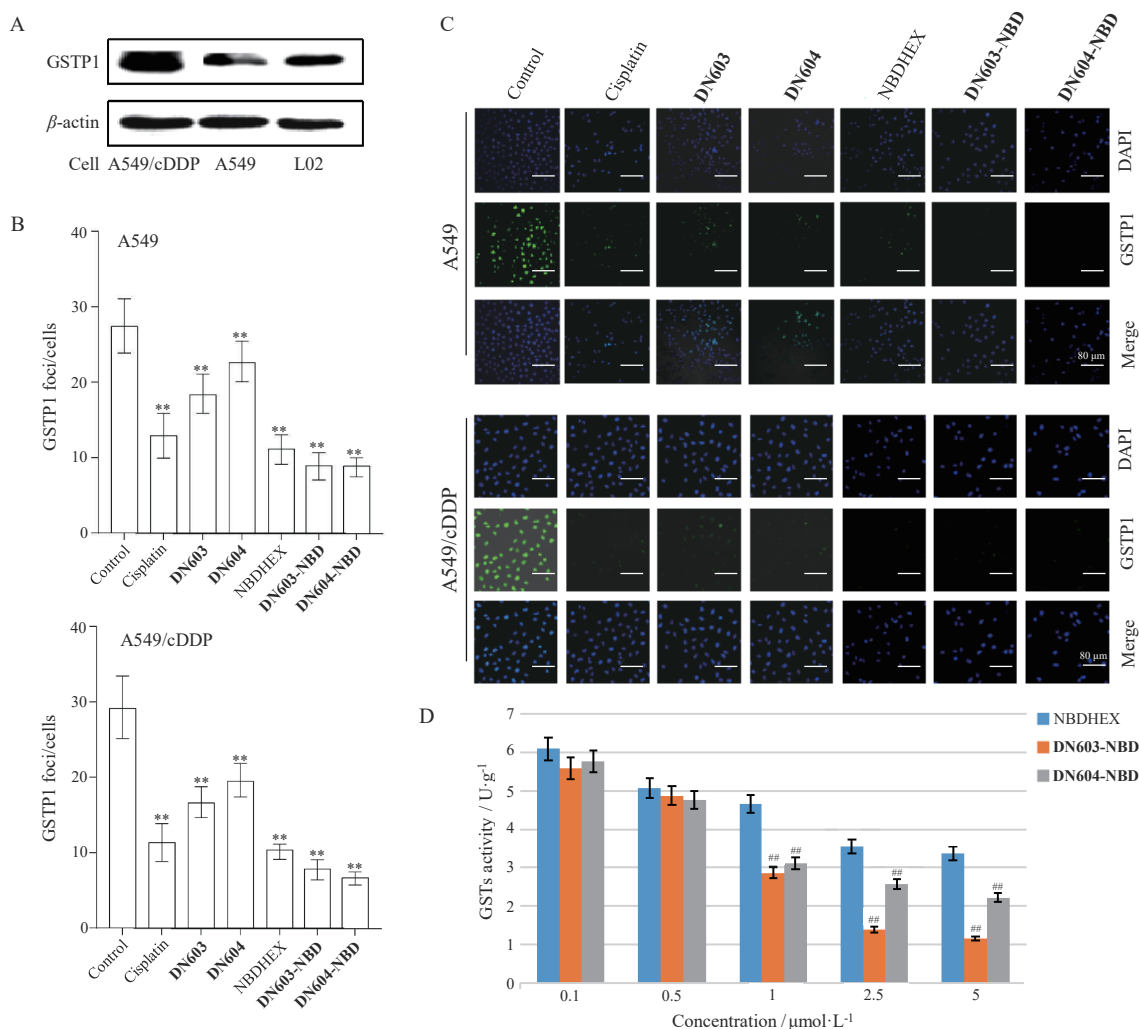


Figure 11 Expression levels and kinase activity of the glutathione *S*-transferase pi-1 (GSTP1) protein in A549 and A549/cDDP cells with treatment of the tested compounds. A – C: Expression levels of GSTP1 protein in the corresponding groups using Western blot (A) and immunofluorescence (IF, B and C). $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control; D: Inhibition of GSTP kinase activity. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ### $P < 0.01$ vs NBDHEX-treated group

细胞凋亡。

11 DN603/DN604-NBD 对体内异种移植瘤的抗肿瘤作用和机制研究

如图 14A 所示, DN603、DN604 及 NBDHEX 实验组的肿瘤体积增速明显降低, 表明 DN603、DN604 及 NBDHEX 能有效抑制肿瘤生长, 顺铂对实体瘤抑制作用最佳。DN604-NBD 虽能明显抑制肿瘤体积增长, 却略微弱于顺铂。和 DN604-NBD 相比, DN603-NBD 抑瘤率更高, 且与顺铂相当。图 14B 表明, 相同剂量下, 顺铂抑瘤率达到 59.83%, DN603 和 DN604 抑瘤率分别为 14.41% 和 9.09%。DN604-NBD 抑瘤率达到 30.75%, 与 NBDHEX (31.69%) 相当。而 DN603-NBD 抑瘤率为 48.32%, 优于 DN604-NBD。结果表明, DN603-NBD 治疗体内实体瘤的效果与顺铂相当。由于顺铂处理后裸鼠体重降低, 因此本研究还监测了 DN603-

NBD 和 DN604-NBD 对裸鼠异种移植瘤模型的毒性作用。从图 14C 看出, DN603/DN604-NBD 对小鼠体重无明显作用。DN603/DN604-NBD 具有显著体内抗肿瘤作用且无明显毒副作用。

讨论

人非小细胞肺癌 NSCLC 约占肺癌的 80%, 晚期 NSCLC 患者 5 年预后较低。临床 NSCLC 治疗方法主要包括手术治疗、放疗和化疗。早期 NSCLC 患者使用手术治疗和辅助铂类化疗等手段。化疗是晚期 NSCLC 患者重要治疗手段。其中, 铂类药物成为晚期 NSCLC 患者化疗的首选药物。作为肿瘤化疗主要手段, 铂类药物通常与其他药物如吉西他滨、多西他赛等联合使用。但铂药诱发的获得性耐药成为临床 NSCLC 患者治疗失败的重要原因, 亟需研发新型药物

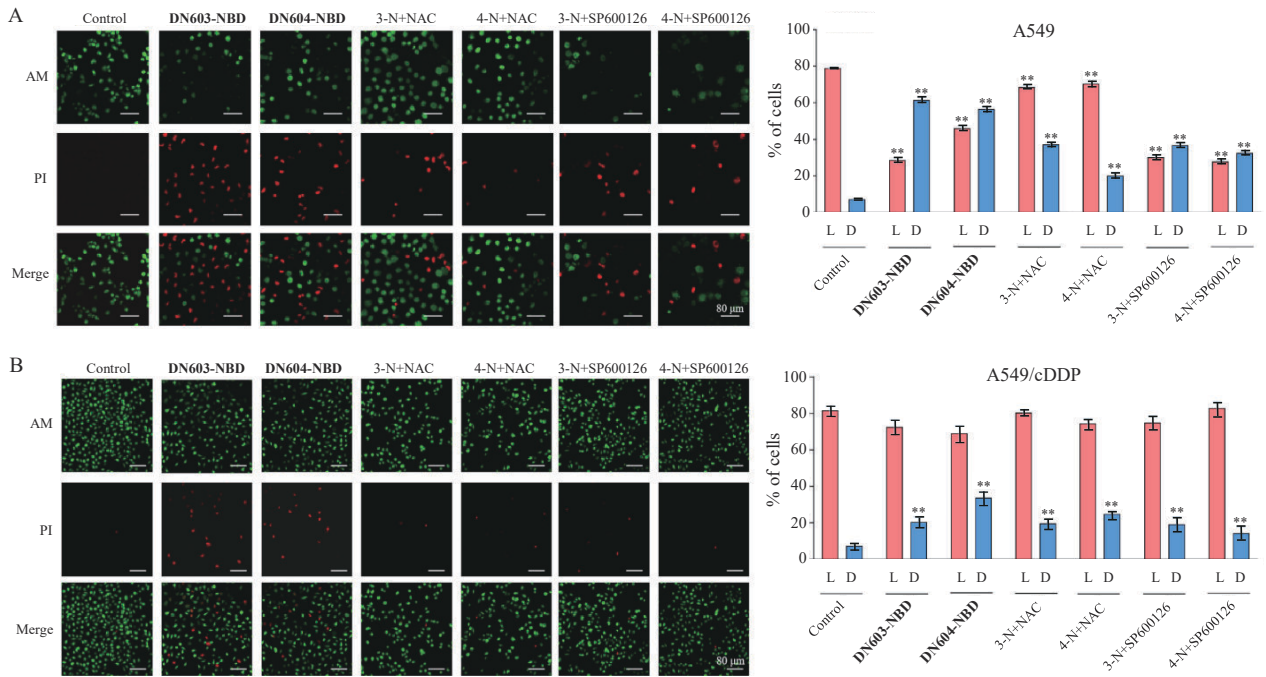


Figure 12 Viability and cytotoxicity assessment of the selected cells *via* live-dead staining in A549 (A) and A549/cDDP (B) cancer cells. Green represents live cells, and red represents dead cells. 3-N stands for DN603-NBD, while 4-N stands for DN604-NBD. L stands for live cells, D stands for dead cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control of live cells and dead cells, respectively

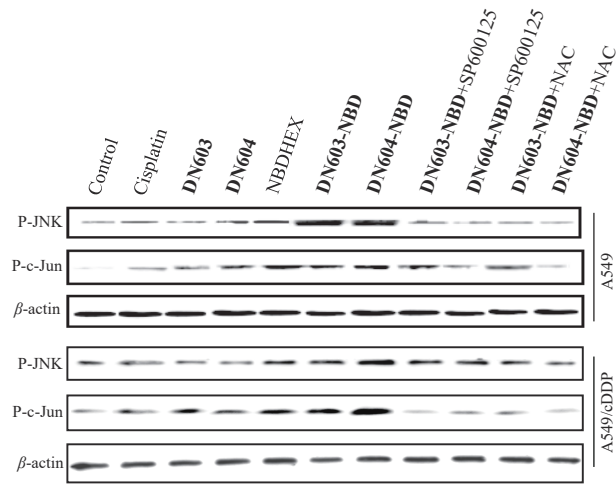


Figure 13 Analysis of protein levels related to the JNK signaling pathway

来克服铂类耐药作用。本研究将 GSTs 抑制剂 NBDHEX 与两种铂(II) 配合物 DN603 和 DN604 轴向配位, 合成两种新型铂(IV) 配合物 DN603-NBD 和 DN604-NBD。这两种铂(IV) 配合物既具有 GSTP1 激酶抑制作用, 又保留了铂药抗肿瘤效果。和顺铂相比, DN603-NBD 和 DN604-NBD 显著抑制 A549 和 A549/cDDP 细胞增殖, 通过产生过量 ROS 来诱导更严重 DNA 双链断裂损伤。研究表明, GSTP1 能够诱导体内细胞癌变。NSCLC 中 GSTP1 高表达患者显示肿瘤预后不良。因此, GSTP1 过表达是导致人肿瘤细胞对铂类药物耐药的重要原因, 抑制 GSTP1 的表达和活性能够逆转铂药耐药作用。DN603-NBD 和 DN604-NBD 靶向 GSTP1 并抑制其表达, 从而克服铂耐药。两种铂(IV) 配合物通过产生过量 ROS 来阻止 GSTP1-JNK-c-

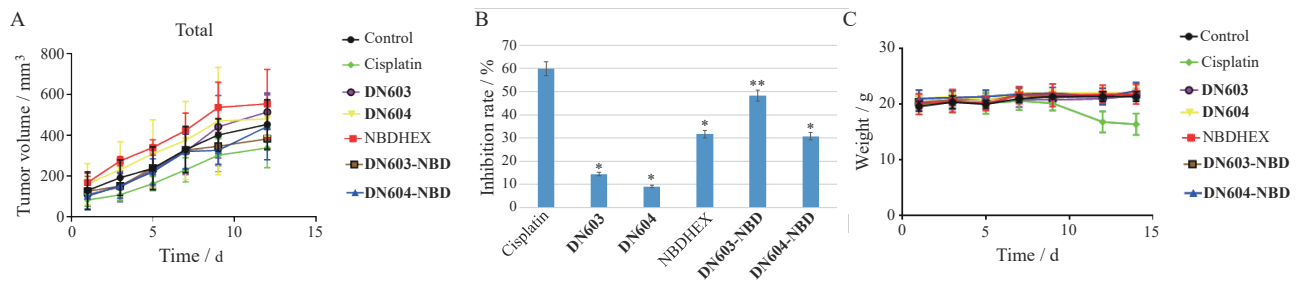


Figure 14 The effect of the tested compounds on the tumor growth volume changes (A) and the percentage inhibition of tumor growth (B) in A549 xenografted nude mice; C: The impact of the tested compounds on the weight of nude mice with A549 xenografted tumors. $n = 5, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs cisplatin-treated group

Jun 复合物形成, 诱导 JNK 信号通路活化而引发肿瘤细胞死亡。此外, 两种铂(IV) 配合物能够显著抑制体内异种移植瘤生长, 且无明显毒副作用。

综上所述, 将 GSTs 抑制剂 NBDHEX 与铂(II) 类药物的铂(IV) 衍生物接合, 得到具备研究潜力的新型抗肿瘤化合物 DN603-NBD 和 DN604-NBD。这两种化合物不仅保留了 NBDHEX 对耐药因子 GSTP1 的抑制作用, 同时继承铂(II) 类药物的抗肿瘤效果。尽管 DN603-NBD 和 DN604-NBD 在体内表现显著的抗肿瘤效果, 展现出作为新型抗癌药物的巨大潜力, 但为了充分证实它们的研究与应用价值, 仍需开展更多的体内异种移植瘤模型实验和体外实验, 进一步研究其克服化疗耐药作用和机制。

作者贡献: 陈飞虹负责实验研究、文章撰写与修改; 吴佳妮负责体外实验研究; 温鑫负责体内实验研究; 苟少华负责实验方案设计、实验指导、文章撰写、修改与审核。

利益冲突: 所有作者声明无利益冲突。

References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 7-30.
- [2] Miller KD, Nogueira L, Devasia T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72: 409-436.
- [3] Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 271-289.
- [4] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 115-132.
- [5] Arriagada R, Bergman B, Dunant A, et al. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350: 351-360.
- [6] Winton T, Livingston R, Johnson D, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs observation in resected non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352: 2589-2597.
- [7] Chang A. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC [J]. *Lung Cancer*, 2011, 71: 3-10.
- [8] Kim ES. Chemotherapy resistance in lung cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 893: 189-209.
- [9] Davidoff AJ, Tang M, Seal B, et al. Chemotherapy and survival benefit in elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28: 2191-2197.
- [10] Sullivan I, Salazar J, Majem M, et al. Pharmacogenetics of the DNA repair pathways in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy [J]. *Cancer Lett*, 2014, 353: 160-166.
- [11] Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs [J]. *Chem Rev*, 2016, 116: 3436-3486.
- [12] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 573-584.
- [13] Dilruba S, Kalayda GV. Platinum-based drugs: past, present and future [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 77: 1103-1124.
- [14] Liu QF, Li X, Su Q, et al. Investigation on pharmacokinetics, tissue distribution and excretion of a novel anticancer platinum compound by inductively coupled plasma mass spectrometry after intravenous administration to rats [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32: 1621-1628.
- [15] Ravera M, Gabano E, Zanellato I, et al. Synthesis, characterization and antiproliferative activity on mesothelioma cell lines of bis(carboxylato) platinum(IV) complexes based on picoplatin [J]. *Dalton Trans*, 2012, 41: 3313-3320.
- [16] Bai L, Li LH. Expression of RP, P-gp and GST- π proteins in non-small cell lung cancer and their clinical significance [J]. *Pract J Cancer (实用癌症杂志)*, 2017, 32: 204-206.
- [17] Han YY, Shi Q, Ge LL. Changes in the levels of p53, to Po-II and GST- π in the peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer before and after chemotherapy and their relationship with prognosis [J]. *Exp Lab Med (实验与检验医学)*, 2021, 39: 1452-1455.
- [18] Tew KD, Monks A, Barone L, et al. Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program [J]. *Mol Pharmacol*, 1996, 50: 149-159.
- [19] Tew KD, Schultz M, Dutta S. Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 26: 91-104.
- [20] Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective [J]. *Nature*, 2000, 408: 433-439.
- [21] Branzei D, Szakal B. DNA damage tolerance by recombination: molecular pathways and DNA structures [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2016, 44: 68-75.
- [22] Madabhushi R, Pan L, Tsai LH. DNA damage and its links to neurodegeneration [J]. *Neuron*, 2014, 83: 266-282.
- [23] Myung NH, Zhu X, Kruman II, et al. Evidence of DNA damage in Alzheimer disease: phosphorylation of histone H2AX in astrocytes [J]. *Age (Dordr)*, 2008, 30: 209-215.
- [24] Brozovic A, Osmak M. Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance [J]. *Cancer Lett*, 2007, 251: 1-16.
- [25] Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function [J]. *Cell Signal*, 2000, 12: 1-13.
- [26] De Luca A, Federici L, De Canio M, et al. New insights into the mechanism of JNK1 inhibition by glutathione transferase P1-1 [J]. *Biochemistry*, 2012, 51: 7304-7312.
- [27] Turella P, Cerella C, Filomeni G, et al. Proapoptotic activity of new glutathione S-transferase inhibitors [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 3751-3761.