

以 Hsp90 为靶点的 4-(4-羟基-3-甲氧基苯亚甲基)姜黄素抗肿瘤活性研究

刘洋¹,李娜²,吴丽贤³,许建华^{4*}

¹福建医科大学药学院药物化学系,福州 350108;²福建医科大学附属协和医院药剂科,福州 350001;

³福建医科大学药学院药理学系;⁴福建省天然药物药理学重点实验室 福建医科大学新药研究所,福州 350108

摘要:合成 4-(4-羟基-3-甲氧基苯亚甲基)姜黄素(C085),研究其体外抗肿瘤活性和抑制 Hsp90 作用。以香草醛和姜黄素为原料,微波条件下 Knoevenagel 缩合反应合成了 4-(4-羟基-3-甲氧基苯亚甲基)姜黄素(C085)。以姜黄素为对照,MTT 法考察目标化合物对人乳腺癌细胞 SKBr3、人慢性粒细胞白血病急变细胞株 K562、人急性髓系白血病细胞株 HL-60、人肝肿瘤细胞株 HepG2、小鼠黑色素瘤细胞株 B-16、人结肠癌细胞株 SW480、人胰腺癌细胞株 Bxpc-3、人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y、人胃癌细胞株 MGC80-3 的抑制活性。对上述细胞株的 IC₅₀ 值依次为 0.51、1.26、2.90、0.81、1.77、1.31、8.22、1.93、7.41 μmol/L,对多种肿瘤细胞抑制活性明显强于 Cur。Western Blot 结果表明 C085 明显下调 Hsp90 的客户蛋白 Her2 和 AKT 的表达水平。分子对接分析也支持 C085 是 Hsp90 抑制剂。

关键词:热休克蛋白 90;姜黄素;4-芳亚甲基姜黄素;抗肿瘤活性;分子对接

中图分类号:R966

文献标识码:A

Synthesis and Evaluation of 4-(4-Hydroxy-3-methoxybenzylidene) curcumin as Potential Hsp90 Inhibitors

LIU Yang¹, LI Na², WU Li-xian³, XU Jian-hua^{4*}

¹Department of Medical Chemistry, School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China;

²Department of Pharmacy, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China;

³Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Fujian Medical University;

⁴Fujian Provincial Key Laboratory of Natural Medicine Pharmacology, Institute of Materia Medica, School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China

Abstract: 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) methyl curcumin (C085) was synthesized and evaluated for its antitumor activity. C085 was synthesized by Knoevenagel condensation. The *in vitro* antitumor activity of C085 was evaluated by MTT assay against SKBr3, K562, HL-60, HepG2, B-16, SW480, Bxpc-3, SH-SY5Y and MGC80-3 cells. The results showed that C085 inhibited the proliferation of cancer cells (IC₅₀: 0.51, 1.26, 2.90, 0.81, 1.77, 1.31, 8.22, 1.93, 7.41 μmol/L). Western blotting analyses showed that Her2 and AKT degradation were observed upon administration of C085, suggesting this compound exerted activity through Hsp90 inhibition. Molecular docking study also supported C085 as an Hsp90 inhibitor.

Key words: Hsp90; curcumin; 4-arylidene curcumin; antitumor; molecular docking

热休克蛋白 90 (Hsp90) 是 ATP 依赖的分子伴侣,能够稳定很多客户蛋白,其中有肿瘤生长增值所必需的许多蛋白,例如 Her2、BCR-ABL 和 IKK 等。Hsp90 已成为重要的抗肿瘤靶点^[1]。第一代天然

Hsp90 抑制剂有格尔德霉素 (GDA), 根赤壳菌素 Radicol (RD) 及它们的衍生物。第二代合成 Hsp90 抑制剂主要是以嘌呤或间苯二酚为骨架的小分子化合物,有 17 个已进入临床研究^[2]。但由于有毒性大,生物利用度和水溶性差等缺点,至今没有一个 Hsp90 抑制剂被批准上市。发现新化学骨架的 Hsp90 抑制剂具有重要意义。

姜黄素 (curcumin, Cur) 为天然植物姜黄中的主

收稿日期:2014-03-18 接受日期:2014-07-09

基金项目:福建省科技厅项目(2011J01189);福建省教育厅项目(JA12138);国家自然科学基金项目(81173096)

* 通讯作者 Tel:86-591-22862054; E-mail: xjh@fjmu.edu.cn

要抗肿瘤活性成分。姜黄素能上调 Hsp70^[3], 下调 Hsp90 客户蛋白如 BCL-ABL^[4], NF- κ B, AKT, 分解 Hsp90 辅伴侣 p23^[5]。虽然姜黄素具有安全低毒广谱的优点, 但由于其水溶性差、体内代谢快、活性偏低和靶点过多等缺点影响其成药性^[6]。设计合成姜黄素衍生物, 提高其选择性、活性和成药性, 具有重要的理论和实际意义^[7]。

姜黄素结构为分子重复的同生型萜药, 4-羟基-3-甲氧基苯基和共扼 β -二酮为其活性结构。作者运用拼合原理在 Cur 4 位活泼亚甲基(图 1 中用虚线圈出)处引入活性药效团 4-羟基-3-甲氧基苯亚甲基, 使 Cur 原有的共扼 β -二酮与烯醇式互变的结构固定为酮式, 设计合成了 4-(4-羟基-3-甲氧基苯亚

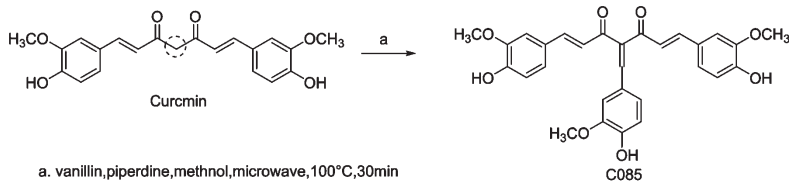


图 1 姜黄素和 C085 的化学结构与合成路线

Fig. 1 Chemical structures of curcumin and C085 and the synthetic route of C085

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

姜黄素、香草醛、哌啶和甲醇等溶剂均购自国药集团化学试剂有限公司。细胞株均购自中科院上海细胞库, 由福建医科大学新药研究所常规体外细胞传代。Western Blot 中蛋白质浓度测定用 Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA), 显影剂为 SuperSignal WestPico (Thermo Scientific, USA)。

1.2 仪器

熔点用上海精密仪器厂 X-4 型显微熔点仪测定, 温度未经校正。核磁数据采用 Bruker Avance III 型核磁共振仪 (400 MHz) 测定, TMS 为内标。质谱采用 Agilent 6410 Triple Quad LC/MS 测定。微波合成使用美国 CEM 微波合成仪。美国 BIO-RAD 公司全自动酶标仪。

2 实验方法

2.1 4-(4-羟基-3-甲氧基苯亚甲基)姜黄素 (C085) 的合成

10 mL 微波反应管中依次加入姜黄素 368 mg (1 mmol), 香草醛 304 mg (2 mmol), 无水甲醇 3 mL, 哌

啶)姜黄素 (C085, 见图 1), 并于 2008 年先申报抗癌专利^[8]。中山大学卜宪章等随后报道 C085 等 4-芳亚甲基姜黄素衍生物为 NF- κ B 抑制剂^[9]和乙二醛酶 I 抑制剂^[10], 国外印度 Avadhesha Suroliya 先报道过 C085 有抗疟活性^[11], 后发现与微管蛋白也有很好的亲合结合^[12]。但目前姜黄素衍生物未有 Hsp90 抑制活性报道。

本文先微波合成了 C085, 然后 MTT 法考察 C085 对多种肿瘤细胞的抑制活性, Western Blot 法研究其对 SKBr3 细胞中 Hsp90 和客户蛋白 Her2、AKT 的影响。分子对接研究 C085 与 Hsp90 结合模式。

啶 30 μ L, 微波 100 $^{\circ}$ C 下反应 30 min, 浓缩移去溶剂, 残余物上硅胶柱分离纯化, 洗脱剂为乙酸乙酯: 石油醚 = 1:3, 得黄色粉末 150 mg, 收率 33%, mp. 96 ~ 98 $^{\circ}$ C。

2.2 MTT 法检测 C085 对细胞增殖的抑制作用

选用 9 株人肿瘤细胞: 人乳腺癌细胞 SKBr3、人慢性粒细胞白血病急变细胞株 K562、人急性髓系白血病细胞株 HL-60、人肝肿瘤细胞株 HepG2、小鼠黑色素瘤细胞株 B-16、人结肠癌细胞株 SW480、人胰腺癌细胞株 Bxpc-3、人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y、人胃癌细胞株 MGC80-3。将细胞 (10000 个/孔) 接入 96 孔培养板培养过夜, 实验组分别加入不同浓度的 C085 (DMSO 为空白对照) 和姜黄素, 对照组不加药。另设空白组 (只加培养基, 无细胞), 每组设三个平行孔, 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L/孔, 继续培养 4 h 后, 离心弃上清, 加入 DMSO 150 μ L, 振荡 10 min, 充分裂解后, 用全自动酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司生产) 检测 570 nm 处的吸光度 (OD570) 值。根据吸光度计算细胞生长抑制率。

细胞生长抑制率 = [OD 对照 - OD 实验] / [OD 对照 - OD 空白] \times 100%

以同一药物的不同浓度对肿瘤细胞生长抑制率

作图,可得到剂量反应曲线,根据线性回归方程求出该药物的半数抑制浓度 IC_{50} ,即细胞存活率减少 50% 时的药物浓度。

2.3 C085 对 Hsp90 客户蛋白的降解作用

用 C085 (0.5、2.5、10 μM 三个浓度), Cur (5、25、50 μM 三个浓度) 处理人乳腺癌 SKBr3 细胞 24 h, 0.5 μM 的 GDA 作为阳性对照, 等量的 DMSO 作为阴性对照。吸去培养液, 收集 SKBR3 细胞, PBS 漂洗 1 次, 加入 NP-40 细胞裂解液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 30 min, 12000 rpm 离心 15 min 取上清, 测定蛋白质浓度, 调整蛋白浓度一致, 进行 SDS-PAGE 电泳。再转膜到 PVDF 膜上。一抗室温封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤后用显影剂显影观察。

2.4 分子对接模拟 C085 与 Hsp90 蛋白结合模式

C085 对接入 Hsp90 α 和 NVP-AUY922 的复合物晶体结构 (PDB 编码: 2VCI)。所有对接操作在 SybylX1.3 药物设计软件中的 surflex-dock 程序下按默认值完成。

3 实验结果

3.1 C085 结构鉴定数据

黄色粉末; mp. 96 ~ 98 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.79 (s, 1H), 7.74 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J = 8.4, 2$ Hz, 1H), 7.09 (dd, $J = 8.1, 2$ Hz, 1H), 7.04 ~ 7.02 (m, 3H), 6.99-6.96 (m, 2H), 6.95 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.88 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.83 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 198.7, 186.9, 148.9, 148.5, 148.1, 147.2, 146.8, 146.8, 146.5, 145.1, 140.9, 138.6, 127.4, 126.7, 125.9, 125.7, 125.3, 124.0, 123.6, 119.9, 114.8, 114.8, 114.8, 112.4, 110.4, 110.0, 56.1, 56.0, 56.0; ESI-MS m/z [M-H]⁻ 501.1333。

3.2 C085 抗肿瘤活性测定结果

C085 对人乳腺癌细胞 SKBr3、人慢性粒细胞白血病急变细胞株 K562、人急性髓系白血病细胞株 HL-60、人肝肿瘤细胞株 HepG2、小鼠黑色素瘤细胞株 B-16、人结肠癌细胞株 SW480、人胰腺癌细胞株 Bxpc-3、人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y、人胃癌细

胞株 MGC80-3 的 IC_{50} 值依次为 0.51、1.26、2.90、0.81、1.77、1.31、8.22、1.93、7.41 $\mu\text{mol/L}$ (见表 1)。C085 对上述各细胞株都表现出比母体药物 Cur 更强的细胞毒作用。特别是对 SKBr3 和 HepG2 分别比姜黄素强 36 倍和 16 倍。以上结果表明 C085 对体外肿瘤细胞增殖抑制作用比其母体药物 Cur 的抑制作用明显增强。

表 1 C085 和姜黄素抑制肿瘤细胞增殖活性

Table 1 Cytotoxicity of C085 and Cur on tumor cell lines

| 肿瘤细胞 Tumor cell lines | IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) | |
|--------------------------|---------------------------------|------|
| | C085 | Cur |
| SKBr3 | 0.514 | 18.8 |
| K562 | 1.26 | 10.4 |
| HL-60 | 2.90 | 10.9 |
| HepG2 | 0.81 | 13.0 |
| B-16 | 1.77 | 24.7 |
| SW480 | 1.31 | 14.9 |
| Bxpc-3 | 8.22 | 34.7 |
| SH-SY5Y | 1.93 | 11.6 |
| MGC80-3 | 7.41 | 22.4 |

3.3 C085 对 Hsp90 客户蛋白的降解作用

不同浓度的 C085 处理 SKBr3 细胞 24 h 后, 相关蛋白表达的 Western blot 分析结果见图 2。图 2 表明随着 C085 浓度的增加, Hsp90 的客户蛋白 Her2 和 AKT 在 24 h 的作用时间下, 均呈现明显降解趋势, 而 Hsp90 的表达量基本不变, 即 C085 对 Hsp90 的客户蛋白有降解抑制作用。这一方式与阳性对照的 Hsp90 抑制剂格尔德霉素 (GDA, 0.5 μM) 一致。

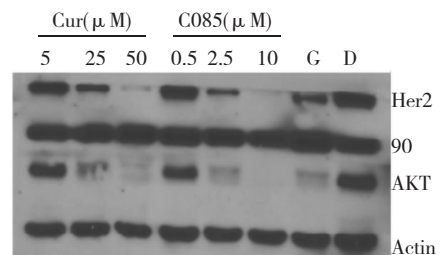


图 2 C085 对 Hsp90 客户蛋白的 Western blot 分析结果
Fig. 2 Western blot analyses of SkBr3 cell lysates for Hsp90 client protein degradation.

Cur (5, 25, 50 μM), C085 (0.5, 2.5, 10 μM), Geldanamycin (GDA, G, 0.5 μM), DMSO (D) for control.

3.4 分子对接模拟 C085 与 Hsp90 蛋白结合模式

C085 与 Hsp90 蛋白结合模式图见图 3。C085 和 Hsp90 α 中的氨基酸残基 Ser50、ASN51、LYS58、Asp102、PHE138 形成 5 个氢键,并且在 ATP 结合口袋中 C086(黄色分子)与 NVP-AUY922(红色分子)重叠得很好。

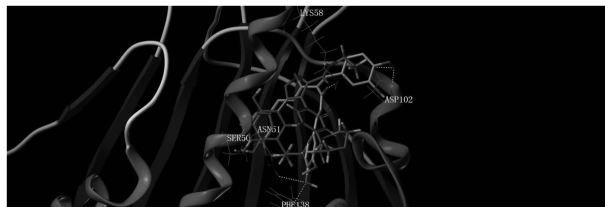


图 3 C085(黄色分子)对接模式图和与 NVP-AUY922(红色分子)重叠

Fig. 3 A docking model of C085 (yellow) bound to the ATP binding site of human Hsp90 α overlapped with NVP-AUY922 (red)

4 讨论

本论文通过体外 MTT 法,Western bolt 方法和分子对接模拟,首次提出 4-(4-羟基-3-甲氧基苯亚甲基)姜黄素(C085)很可能是 Hsp90 抑制剂。Hsp90 抑制剂可分为 N 端抑制剂,C 端抑制剂和影响 Hsp90 与辅伴侣结合三类。C085 其具体作用方式还需用免疫共沉淀和 FP 等方法进一步研究。

致谢:感谢福建省教育厅 2012 出国留学奖学金资助。感谢美国 kansas 大学药物化学系 Brain S. J. Blagg 教授提供访学研究机会。

参考文献

- 1 Neckers L, Workman P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin Cancer Res*, 2012, 18:64-76.
- 2 Soga S, Akinaga S, Shiotsu Y. Hsp90 inhibitors as anti-cancer agents, from basic discoveries to clinical development. *Curr Pharm Design*, 2013, 19:366-376.
- 3 Angelo LS, Maxwell DS, Wu JY, *et al.* Binding partners for curcumin in human schwannoma cells; Biologic implications. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21:932-939.
- 4 Wu LX(吴丽贤), Xu JH(许建华), Chen YZ(陈元仲), *et al.* Down-regulation of P210bcrl/abl by curcumin involves disrupting the molecular chaperone functions of Hsp90. *Acta Pharm Sin* (中国药理学报), 2006, 27:694-699.
- 5 Lee JH, Chung IK. Curcumin inhibits nuclear localization of telomerase by dissociating the Hsp90 co-chaperone p23 from hTERT. *Cancer Lett*, 2009, 290:76-86.
- 6 Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, *et al.* Bioavailability of curcumin; problems and promises Aggarwal. *Mol Pharm*, 2007, 4:807-818.
- 7 Esatbeyoglu T, Huebbe P, Erms IMI, *et al.* Curcumin--from molecule to biological function. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 52:5308-5332.
- 8 Xu JH(许建华), Liu Y(刘洋), Li Na(李娜), *et al.* 4-(4-羟基-3-甲氧基苯亚甲基)姜黄素及其制备方法和在制备抗癌药物的应用, 专利号 ZL200810071178. X, 2008-06-05.
- 9 Qiu X, Du YH, Lou B, *et al.* Synthesis and identification of new 4-arylidene curcumin analogues as potential anticancer agents targeting nuclear factor-KB signaling pathway. *J Med Chem*, 2010, 53:8260-8273.
- 10 Yuan MG, Luo MX, Song Y, *et al.* Identification of curcumin derivatives as human glyoxalase I inhibitors; A combination of biological evaluation, molecular docking, 3D-QSAR and molecular dynamics simulation studies. *Bioorgan Med Chem*, 2011, 19:1189-1196.
- 11 Mishra S, Karmodiya K, Surolia N. Synthesis and exploration of novel curcumin analogues as anti-malarial agents. *Bioorgan Med Chem*, 2008, 16:2894-2902.
- 12 Chakraborti S, Das L, Kapoor Neha. Curcumin recognizes an unique binding site of tubulin. *J Med Chem*, 2011, 54:6183-6196.