

# 瑞香素及噁唑类小分子 抑制吲哚胺-2,3-双加氧酶 1 (IDO1) 的研究

李 晟<sup>1#</sup>, 李焱鑫<sup>2#</sup>, Emmanuel Mfotie Njoya<sup>1</sup>, 蒋 黎<sup>2</sup>, 李 霖<sup>2\*</sup>, 王 飞<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院成都生物研究所天然产物及临床转化重点实验室, 成都 610041;

<sup>2</sup>四川省医学科学院 四川省人民医院检验医学研究所, 成都 610072

**摘要:** 吲哚胺-2,3-双加氧酶 1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1) 在肿瘤免疫中发挥了重要作用, 为了获得新型的 IDO1 小分子抑制剂, 本研究利用 HeLa 细胞系建立了 IDO1 抑制剂筛选模型, 筛选抑制 IDO1 活性的天然小分子化合物。将 HeLa 细胞接种于 48 孔板中, 加入干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 诱导 HeLa 细胞中 IDO1 的表达, 检测 HeLa 细胞分泌 IDO1 的酶代谢活性。对化合物库筛选后发现瑞香素 (Daphnetin) 和一个噁唑类小分子 ZH-26 能够抑制 IDO1 酶活性, 采用 GraphPad Prism 计算瑞香素和 ZH-26 的  $IC_{50}$  值, 结果显示瑞香素的  $IC_{50}$  为  $16.50 \pm 0.33 \mu\text{M}$ , ZH-26 的  $IC_{50}$  为  $4.68 \pm 0.21 \mu\text{M}$ 。进一步在 HEK-293A 细胞中过表达 IDO1, 不同浓度瑞香素和 ZH-26 处理细胞后也表现出对 IDO1 活性的抑制作用。采用 Western blot 方法发现瑞香素显著下调 IFN- $\gamma$  诱导的 IDO1 蛋白表达, 而 ZH-26 则对 IFN- $\gamma$  诱导的 IDO1 的表达没有影响。综上, 瑞香素和 ZH-26 在 HeLa 细胞内没有发现明显的细胞毒作用。本实验首次发现了瑞香素和 ZH-26 具有抑制 IDO1 的活性, 不但为了解瑞香素这一天然来源临床药物的抗肿瘤机制提供新的视角, 也为开发新的靶向 IDO1 的肿瘤免疫治疗候选药物奠定了基础。

**关键词:** 吲哚胺-2,3-双加氧酶 1; 筛选; 瑞香素; 噁唑类化合物

中图分类号: R966

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.12.014

## Daphnetin and An Oxazole Compound Inhibit Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1

LI Sheng<sup>1#</sup>, LI Yan-xin<sup>2#</sup>, Emmanuel Mfotie Njoya<sup>1</sup>, JIANG Li<sup>2</sup>, LI Lin<sup>2\*</sup>, WANG Fei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Natural Medicine and Clinical Translation, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China;

<sup>2</sup>Clinical Laboratory Department, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China

**Abstract:** Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) plays a key role in cancer immunity, the aim of this study was to discover new IDO1 inhibitors. The inhibitor screening model of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) was established by using HeLa cell line, and two small molecule compounds inhibit IDO1 activity were screened out. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) was added to induce the expression of IDO1 in HeLa cells seeded in 48-well plates, to reflect the enzymatic activity of IDO1 secreted by HeLa cells. Screening of the compound library revealed that daphnetin and an oxazole compound ZH-26 inhibited IDO1 activity, and the  $IC_{50}$  values of daphnetin and ZH-26 were analyzed using GraphPad Prism software. The  $IC_{50}$  of daphnetin was  $16.50 \pm 0.33 \mu\text{M}$ , and the  $IC_{50}$  of ZH-26 was  $4.68 \pm 0.21 \mu\text{M}$ . In addition, the inhibitory effects on IDO1 activity which was overexpressed in HEK-293A cells were also observed after treatment with different concentrations of daphnetin and ZH-26. Western blot assay showed that daphnetin significantly down-regulated the expression of IDO1 induced by IFN- $\gamma$  whereas ZH-26 had no such effect. Daphnetin and ZH-26 did not show obvious cytotoxic effect in HeLa cells. In conclusion, daphnetin and ZH-26 were firstly found to inhibit IDO1 activity in this study, which not only provided new insight into the understanding of anti-tumor effect of daphnetin, but also warranted further development of both compounds as new drug candidates for tumor immunotherapy by targeting IDO1.

**Key words:** indoleamine 2,3-dioxygenase 1; screen; daphnetin; oxazoles

收稿日期: 2018-09-11 接受日期: 2018-12-03

基金项目: 国家自然科学基金 (81670893); 四川省科技支撑计划 (2016JZ0022); 中国科学院国际人才计划 (2015PB049)

\* 通信作者 Tel: 86-28-87394642, 82890651; E-mail: llaimar@163.com, wangfei@cib.ac.cn

# 共同第一作者

吲哚胺-2,3-双加氧酶 1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1) 是广泛分布于肝脏以外, 含亚铁血红素的单体蛋白质, 能够催化色氨酸沿着犬尿氨酸途径 (kynurenine pathway, KP) 代谢的限速酶, 可催

化色氨酸分解产生 L-犬尿氨酸、喹啉酸等具有生物活性的代谢产物<sup>[1]</sup>。IDO1 由 *IDO1* 基因编码,IDO1 基因启动子含有 2 个 IFN- $\gamma$  激活位点<sup>[2]</sup>,IFN- $\gamma$  可以诱导 IDO1 高水平表达。有研究表明,IDO1 在多数组织中处于沉默状态,但是在多种肿瘤细胞中高表达<sup>[3]</sup>,IDO1 的过表达与癌症的发展和预后相关<sup>[4]</sup>,抑制 IDO1 活性在肿瘤疾病的治疗中有着举足轻重的作用,因此 IDO1 也被认为是一个具有极大开发潜力的靶标。

目前,已经进入抗肿瘤临床试验的 IDO 抑制剂主要包括 INCB024360、NLG-919、1-甲基-色氨酸等<sup>[5]</sup>,但是现有抑制剂存在活性低、选择性差、分子骨架单一或毒副作用等缺点<sup>[6]</sup>,世界上还未有 IDO1 抑制剂药物问世。作为免疫治疗的热门靶点,IDO1 抑制剂的类型和数量都处于一个很低的水平,IDO1 及其抑制剂仍然有巨大的研究价值和应用前景。

瑞香素 (Daphnetin) 是从瑞香属植物长白瑞香 (*Daphne Korean Nakai*) 中提取出来的有效成分,又名祖师麻甲素,其为我国首创的新药,化学名为 7,8-二羟基香豆素 (7,8-dithydroxycoumarin),为香豆素类化合物,主要存在于瑞香科属植物中。临床上瑞香素主要用于血栓闭塞性脉管炎、冠心病心绞痛、类风湿性关节炎等疾病<sup>[7]</sup>。近年来的研究发现,瑞香素也具有抗肿瘤作用<sup>[8]</sup>,但是其作用机制有待进一步的研究。另外,噁唑类小分子在天然产物和有机合成化合物中广泛存在,具有该基团的小分子表现出一系列重要的生物活性,包括抗肿瘤、抗真菌、抗炎和抗病毒等,受到了学界和业界的广泛关注<sup>[9]</sup>,但是该类化合物发挥其活性的作用靶点和机制还尚不清楚。本研究参考文献<sup>[10]</sup>报道的检测 IDO1 代谢色氨酸吸光光度法,利用 HeLa 细胞建立体外筛选 IDO1 小分子抑制剂模型,并通过过表达 IDO1 和 Western blot 等方法,评价筛选到的小分子化合物 IDO1 抑制活性。实验结果首次发现了瑞香素和 ZH-26 具有抑制 IDO1 的活性,不但为了解瑞香素这一天然来源临床药物的抗肿瘤机制提供新的视角,也为开发新的靶向 IDO1 的肿瘤免疫治疗候选药物奠定了基础。

## 1 实验材料

### 1.1 细胞和质粒

人宫颈癌细胞 HeLa、人胚肾细胞 HEK-293A 购自中国科学院上海生命科学院细胞资源中心,由中

国科学院成都生物研究所天然产物中心实验室保存;IDO cDNA 购自北京义翘神州科技有限公司。

### 1.2 试剂

瑞香素 (Daphnetin) 购自上海源叶生物科技有限公司;Epacadostat 购自上海蓝木化工有限公司;人干扰素 IFN- $\gamma$  购自南京金斯瑞生物科技有限公司;IDO1 兔多抗、GAPDH 兔多抗购自武汉三鹰生物技术有限公司;转染试剂 LIPOFECTAMINE 2000 购自赛默飞世尔科技公司;EasySee Western Blot Kit 发光液购自北京全式金生物技术有限公司;增强型 CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.3 试剂

Verioskan Flash 多功能读数仪 (Thermo Fisher); ImageQuantLAS500 一体化成像仪 (GE Healthcare)。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养

人宫颈癌细胞 HeLa、人胚肾细胞 HEK-293A 均在 DMEM-高糖培养基 (10% 新生牛血清,100 U/mL 氨苄青霉素及 100 mg/mL 链霉素),5% CO<sub>2</sub>,37 °C 细胞培养箱中培养。

### 2.2 IDO1 抑制剂筛选

HeLa 细胞按  $1.0 \times 10^5$  个/孔接种至 48 孔板,37 °C 培养过夜。每孔加入适量待测试药物,Epacadostat 作为阳性对照药,培养 24 h。每孔加入 50 ng/mL IFN- $\gamma$  培养 24 h 以诱导细胞内 IDO 产生。取 100  $\mu$ L 细胞培养液至离心管中,加入 25  $\mu$ L 30% 的 TCA,50 °C 水浴 30 min,10 000 rpm 离心 10 min,取 100  $\mu$ L 上清液至 96 孔板中,每孔加入 100  $\mu$ L 2% 的对二甲氨基苯甲醛 (PDAB),混匀后室温静置 10 min,多功能读数仪检测 A492。

### 2.3 免疫印迹分析

HeLa 细胞按  $1.0 \times 10^6$  个/孔接种至 6 孔板,37 °C 培养过夜。每孔加入不同浓度瑞香素或 ZH-26,Epacadostat 作为阳性对照药,培养 24 h。每孔加入 50 ng/mL IFN- $\gamma$  培养 24 h 以诱导细胞内 IDO 产生。吸去培养基,PBS 漂洗细胞 3 次,加入适量 RIPA 裂解液,冰浴 30 min 裂解细胞,用细胞刮刀将细胞刮下,12 000 rpm 离心,收集上清液为蛋白提取液。加入  $5 \times$  loading buffer 沸水浴 5 min,制得蛋白样品。12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,用半干法将蛋白转印至 NC 膜。转膜结束后,放入 TBST 配置的 5% BSA 中封闭 2 h。封闭后膜与一抗 (1:1 000 稀释)4

℃ 孵育过夜,用 TBST 漂洗 3 次,与 HRP 标记的二抗 (1:5 000 稀释) 在室温孵育 2 h 后, TBST 漂洗 3 次,按照 EasySee Western Blot Kit 发光液说明书进行显色,通过 GE Health 成像系统进行成像。

## 2.4 HEK-293A 过表达 IDO

HEK-293A 细胞按  $1.0 \times 10^6$  个/孔接种至 6 孔板,37 ℃ 培养过夜。在转染前 2 h 将培养液更换为无血清无双抗培养液。用 125  $\mu$ L Opti-MEM 稀释 2.5  $\mu$ g IDO cDNA,另用 125  $\mu$ L Opti-MEM 稀释 5  $\mu$ L LIPOFECTAMINE2000,轻轻混匀,室温静置 5 min。将质粒稀释液滴加至稀释好的转染试剂中,室温静置 20 min,将混合液滴加至稀释好的转染试剂中,室温静置 20 min,将混合液滴加至 6 孔板中,37 ℃ 培养 6 h 更换为完全培养基,37 ℃ 继续培养 24 h 过表达 IDO。

## 2.5 HeLa 细胞增殖

HeLa 细胞按 5 000 个/孔接种至 96 孔板,37 ℃ 培养过夜。加入不同浓度瑞香素或 ZH-26,培养 24 h,每孔加入 10% 增强型 CCK-8 溶液,在 37 ℃ 继续培养 0.5 ~ 1 h。当培养液颜色变黄时,多功能读数仪检测 450 nm 吸光度。

## 2.6 数据统计与处理

所有实验均重复三遍,结果表示为平均值  $\pm$  标准

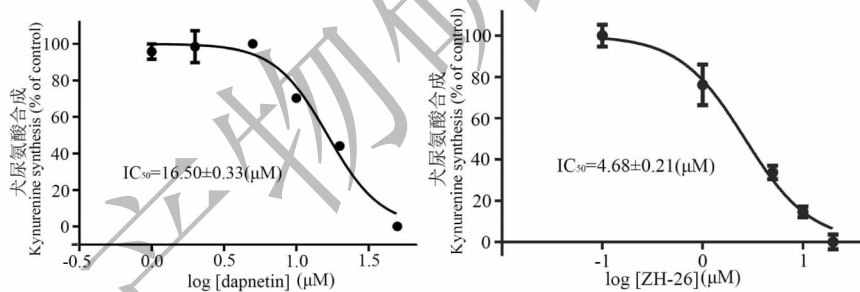


图2 瑞香素和 ZH-26 对 IFN- $\gamma$  诱导的 HeLa 细胞表达 IDO1 酶抑制的 IC<sub>50</sub> 值

Fig. 2 The IC<sub>50</sub> value of daphnetin and ZH-26 inhibiting the expression of IDO1 in HeLa cells induced by IFN- $\gamma$

## 3.2 HEK-293A 过表达 IDO1

IDO1 在肿瘤细胞中高表达,而在多数细胞之中处于沉默状态。在 HEK-293A 中过表达 IDO1,检测瑞香素和 ZH-26 对 IDO1 酶的抑制作用。pCMV3-IDO1 质粒转染至 HEK-293A 细胞 24 h 后,加入不同浓度的瑞香素和 ZH-26 处理 6 h,细胞上清液检测 IDO1 活性,结果如图 3 所示,瑞香素和 ZH-26 均能够抑制过表达的 IDO1 酶活性,并且随着浓度增加该抑制作用加强。以上结果表明,瑞香素和 ZH-26 可以直接抑制 IDO1 的活性。

## 3.3 IDO1 的免疫印迹

不同浓度的瑞香素和 ZH-26 处理 HeLa 细胞,

准差,运用 GraphPad Prism 软件进行单因素方差分析 (One way-ANOVA),  $P < 0.05$  为具有显著性差异。

## 3 实验结果

### 3.1 IDO1 抑制剂筛选

通过以上建立的基于 IFN- $\gamma$  诱导 HeLa 细胞高表达 IDO1 模型,对本实验室 771 个化合物进行筛选,发现化合物瑞香素和 ZH-26 (图 1) 具有显著的 IDO1 活性抑制作用。

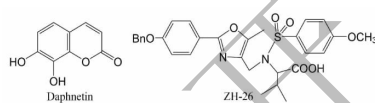


图1 化合物瑞香素和 ZH-26 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of daphnetin and ZH-26

用不同浓度的瑞香素和 ZH-26 检测对 IFN- $\gamma$  诱导的 HeLa 细胞表达 IDO1 酶抑制作用,采用 GraphPad Prism 软件对 IC<sub>50</sub> 值进行计算,结果如图 2 所示。其中瑞香素的 IC<sub>50</sub> 值为  $16.50 \pm 0.33 \mu\text{M}$ , ZH-26 的 IC<sub>50</sub> 值为  $4.68 \pm 0.21 \mu\text{M}$ ,说明这两个化合物在体外具有良好的 IDO1 酶抑制作用。

Western blot 检测 IDO1 蛋白的表达情况,结果如图 4 所示。50 ng/mL 的 IFN- $\gamma$  可以促进 IDO1 蛋白显著表达,而瑞香素可以明显地抑制 IFN- $\gamma$  上调 IDO1 的作用,并且随着化合物浓度的增加,抑制作用越明显,但是 ZH26 则对 IDO1 的表达没明显的作用。以上结果表明,瑞香素抑制 IDO1 活性很有可能是通过下调 IDO1 的表达。

### 3.4 HeLa 细胞增殖

为了排除化合物对 HeLa 细胞中 IDO1 的抑制活性是由于其细胞毒所导致,我们进一步分别用不同浓度的瑞香素和 ZH-26 处理 HeLa 细胞 24 h, CCK-8 检测化合物对 HeLa 细胞增殖的影响,结果

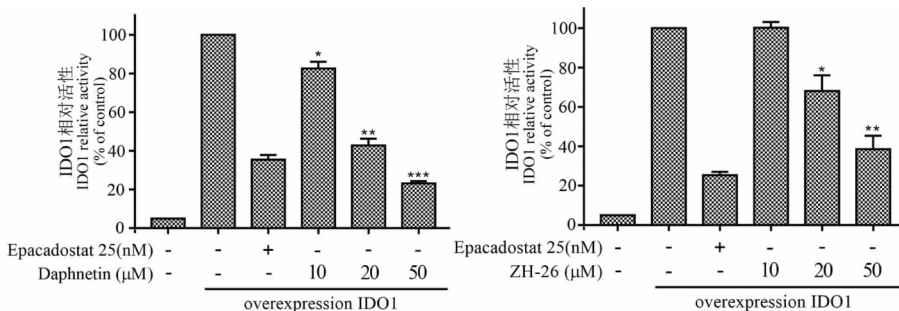


图 3 瑞香素和 ZH-26 在过表达细胞中抑制 IDO1 活性

Fig. 3 Daphnetin and ZH-26 inhibit IDO1 activity in overexpressed cells

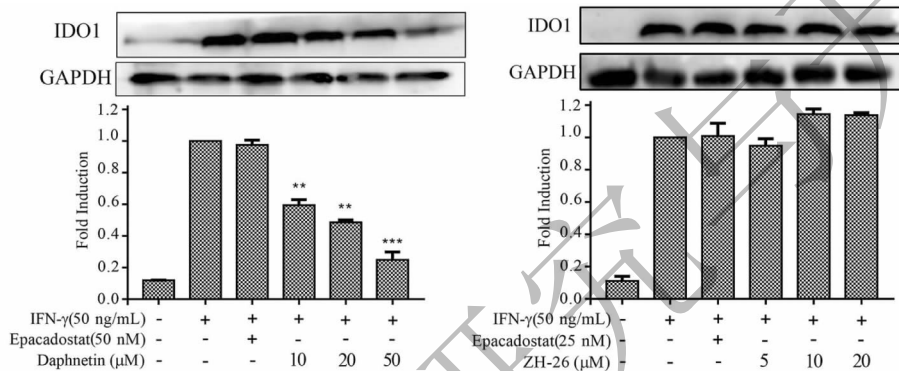


图 4 瑞香素和 ZH-26 下调 IDO1 表达

Fig. 4 Daphnetin and ZH-26 down regulated the IDO1 expression

如图 5 所示。在低浓度下,瑞香素和 ZH-26 对 HeLa 细胞均没有明显的细胞毒作用,表明在低浓度的条

件下,化合物下调 HeLa 细胞的 IDO1 的表达并不是因为对细胞的毒性作用引起的。

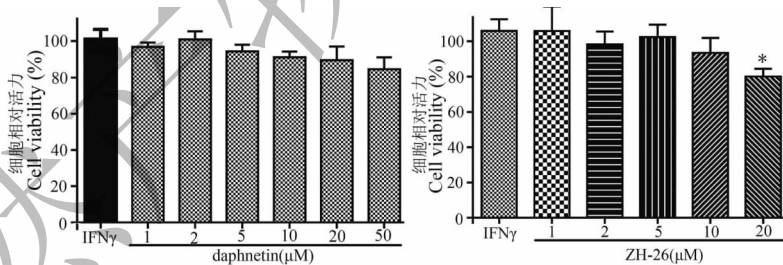


图 5 瑞香素和 ZH-26 对 HeLa 细胞的增殖作用

Fig. 5 Inhibition of cell proliferation by daphnetin and ZH-26 in HeLa cells

## 4 结论

由于 IDO1 在肿瘤的发生转移以及肿瘤免疫耐受过程起到重要的作用,IDO1 被证实是抑制恶性肿瘤形成,提高免疫治疗效果的重要靶点<sup>[11]</sup>,同时 IDO1 也与阿兹海默病、抑郁症等多种疾病的发病机制密切相关<sup>[12]</sup>,因此 IDO1 抑制剂的开发具有十分广阔的前景。

部分抑制剂进入了临床研究阶段,但仍存在活性低、选择性差、分子骨架单一或毒副作用等缺点。1-甲基色氨酸(1-MT)是一个以色氨酸为模板化学合成的 IDO1 竞争性抑制剂,其对 IDO1 的抑制活性并不高 ( $K_i = 19 \sim 35 \mu\text{M}$ )<sup>[13]</sup>。INCB024360 也是临床中运用的测试药,细胞测试其对 IDO1 的  $IC_{50}$  为 7.1 nM,不能抑制吲哚胺 2,3-双加氧酶-2 (Indoleamine 2,3-dioxygenase-2, IDO2) 和色氨酸双加氧酶 (tryptophan 2,3-dioxygenase, TDO),但是 INCB024360 治疗

目前,已有大量关于 IDO1 抑制剂的相关报道,

癌症的同时也带来不小的毒副作用。天然产物是药物筛选的宝库,也是重要来源之一,针对天然产物的IDO1 抑制剂筛选报道中,色胺酮的衍生物对IDO1 有抑制活性( $K_{i50} = 180 \mu\text{M}$ )<sup>[14]</sup>。基于荧光素酶报告基因筛选得到的川楝素(Toosendanin)可以下调IFN- $\gamma$  诱导的肿瘤细胞IDO1 表达,促进NK 细胞对A549 细胞的杀伤作用<sup>[15]</sup>。槲皮素(Quercetin)可能通过抑制IDO1 活性,影响色氨酸代谢发挥抗肿瘤作用<sup>[16]</sup>。

促炎因子IFN- $\gamma$  能够诱导HeLa 细胞表达大量的内源性IDO,因而在细胞上清中可以检测到犬尿氨酸的含量变化。在HeLa 细胞中,IFN- $\gamma$  只能诱导IDO1 的表达,不能诱导IDO2 或TDO 的表达<sup>[16]</sup>。以此建立了IDO1 小分子抑制剂体外筛选模型,并在实验室化合物库中得到了天然小分子瑞香素和ZH-26 两个具有潜在抑制IDO1 活性的化合物<sup>[17]</sup>。其中,ZH-26 与靶向基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase, MMP)进入临床I 期研究的抗肿瘤转移药物CGS 27023A 的结构类似<sup>[18]</sup>。

本研究首次发现瑞香素和ZH-26 可以直接抑制IDO1 的活性,从而为基于香豆素类和噁唑类结构开展新型IDO1 抑制剂的药物设计提供了药物前体,也为进一步了解其生物活性机制提供了新的思路。瑞香素过去也被发现是一种蛋白酶抑制剂,能够抑制EGFR、PKA 和PKC<sup>[19]</sup>。因此,瑞香素可能通过抑制EGFR 等蛋白激酶进而影响干扰素介导的JAK/STAT 信号传导及IDO1 表达。本研究发现瑞香素和ZH-26 是新型高效的IDO1 抑制剂,在体外可以下调IFN- $\gamma$  诱导的IDO1 表达或抑制IDO1 的活性,不但为了解瑞香素这一临床药物的抗肿瘤机制提供新的视角,也为开发新的靶向IDO1 的肿瘤免疫治疗候选药物奠定了基础。

## 参考文献

- Jiang TZ, Sun YY, Yin ZC, *et al.* Research progress of indoleamine 2, 3-dioxygenase inhibitors [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7:185-201.
- Darnell JE, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins[J]. *Science*, 1994, 264:1415-1420.
- Godin-Ethier J, Hanafi LA, Piccirillo CA, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 6985-6991.
- Opitz CA, Litzemberger UM, Sahm F, *et al.* An endogenous

- tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor[J]. *Nature*, 2011, 478:197-203.
- Fruento G, Rotondo R, Tonetti M, *et al.* Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase[J]. *J Exp Med*, 2002, 196:459-468.
- Peng YH, Ueng SH, Tseng CT, *et al.* Important hydrogen bond networks in indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor design revealed by crystal structures of imidazoleisoindole derivatives with IDO1 [J]. *J MedChem*, 2015, 59: 282-293.
- Gao Q, Shan JJ, Di LQ, *et al.* Therapeutic effects of daphnetin on adjuvant-induced arthritic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 120:259-263.
- Wang Y, Li CF, Pan LM, *et al.* 7,8-Dihydroxycoumarin inhibits A549 human lung adenocarcinoma cell proliferation by inducing apoptosis via suppression of Akt/NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5:1770-1774.
- Xie J, Jiang H, Cheng Y, *et al.* Metal-free, organocatalytic cascade formation of C-N and C-O bonds through dual sp<sup>3</sup> C-H activation: oxidative synthesis of oxazole derivatives [J]. *Chem Commun*, 2012, 48:979-981.
- Na T, Wang P, Liu J, *et al.* Development and optimization of an indoleamine 2,3-dioxygenase 1 activity-based absorption photometry for evaluation of immunomodulatory activity of human mesenchymal stem cell [J]. *Chin J Biol* (中国生物制品学杂志), 2016, 29:954-960.
- Munn DH. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation [J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18:220-225.
- Kwidzinski E, Ingo B. IDO expression in the brain: a double-edged sword [J]. *J Mol Med*, 2007, 85:1351-1359.
- Carr G, Chung MK, Mauk AG, *et al.* Synthesis of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory analogues of the sponge alkaloid exiguanine A [J]. *J Med Chem*, 2008, 51:2634-2637.
- Yang S, Li X, Hu F, *et al.* Discovery of tryptanthrin derivatives as potent inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase with therapeutic activity in Lewis lung cancer (LLC) tumor-bearing mice [J]. *J Med Chem*, 2013, 56:8321-8331.
- Pang WQ, Gao L, Dou YY, *et al.* Screening of natural small molecule IDO-1 inhibitors with anti-tumor role [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2017, 52:1416-1423.
- Zhang W, He L, Liu XY, *et al.* Quercetin inhibits proliferation of human cervical carcinoma HeLa cell through affecting tryptophan metabolism [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2018, 34:219-224.