

肉桂醛氧氟沙星酰肼诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的作用

任 争^{1,2}, 康玉华², 石贞玉¹, 皇甫超申¹, 胡国强³, 刘 彬^{1*}

(河南大学 1. 护理学院神经生物学研究所, 2. 淮河临床学院, 3. 化学生物学研究所, 河南 开封 475004)

摘要: 为观察喹诺酮类化合物肉桂醛氧氟沙星酰肼化合物诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的作用, 用不同浓度的 *N*-(3-苯亚丙烯基)-6-氟-1, 8-(2, 1-丙氧基)-7-(4-甲基哌嗪-1-基)-喹啉-4(1*H*)-酮-3-甲酰肼 (FQ16) 与 SMMC-7721 细胞体外培养。MTT 法检测 FQ16 对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用; Hoechst 33258/PI 双染荧光染色法、TUNEL 法及琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡变化; 以 pBR322 DNA 为底物, 采用琼脂糖凝胶电泳法测定 FQ16 对人 DNA 拓扑异构酶 II 活性的影响; 高内涵活细胞成像系统测定细胞线粒体膜电位 ($\Delta\psi_m$) 变化; RT-PCR 方法观察 Bcl-2、Bax mRNA 的表达变化; Western blotting 方法测定 caspase-9、caspase-8、caspase-3、p53、Bcl-2、Bax 蛋白表达。结果显示, FQ16 在 0.625~10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围能抑制细胞增殖, 呈时间、浓度依赖性; 各组 FQ16 作用 24 h 后, 细胞凋亡率显著高于对照组 ($P < 0.05$); 琼脂糖凝胶电泳可见凋亡细胞典型的梯状 DNA 条带, 并伴有线粒体膜电位降低。与对照组比较, FQ16 能抑制 DNA 拓扑异构酶 II 的活性, 使细胞 Bax mRNA 表达增高, Bcl-2 mRNA 表达水平下降, p53、Bax、caspase-9、caspase-3 蛋白表达量增加, 其中 caspase-9、caspase-3 活性裂解片段显著增加, caspase-8 无变化, 而 Bcl-2 蛋白表达水平下降。结果提示, 肉桂醛氧氟沙星酰肼能够抑制 DNA 拓扑异构酶 II 活性, 造成 DNA 损伤并激活线粒体凋亡通路, 诱导人肝癌细胞凋亡。

关键词: 喹诺酮衍生物; 细胞凋亡; 拓扑异构酶 II; 线粒体膜电位

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 09-1109-07

Cinnamaldehyde ofloxacin-3-ylhydrazine induces apoptosis of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells

REN Zheng^{1,2}, KANG Yu-hua², SHI Zhen-yu¹, HUANG-FU Chao-shen¹, HU Guo-qiang³, LIU Bin^{1*}

(1. Institute of Neurobiology, College of Nursing, 2. Huai-he Clinical College,
3. Institute of Chemical Biology, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: This study is to observe the effect of *N*-(3-phenylallylidene)-6-fluoro-1, 8-(2, 1-propoxy)-7-(4-methylpiperazin-1-yl)-quinolin-4(1*H*)-one-3-carbonyl hyarazine (FQ16) on apoptosis of hepatocarcinoma SMMC-7721 cells *in vitro*. With different concentrations of FQ16 at different times used to treat SMMC-7721 cells *in vitro*, the proliferation of the cells and the inhibition effect of FQ16 on the cell proliferation were examined by MTT assay. Cell apoptosis was determined by Hoechst 33258/PI fluorescence staining, TUNEL and agarose gel electrophoresis method. The effect of FQ16 on topoisomerase II activity was measured by agarose gel electrophoresis using Plasmid pBR322 DNA as the substrate. Mitochondrial membrane potential (MMP, $\Delta\psi_m$) was measured by high content screening image system. The reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression changes of Bcl-2 mRNA and Bax mRNA. The

收稿日期: 2010-03-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20872028); 河南省教育厅自然科学研究计划项目 (2009B310001, 2010B310002); 开封市科技发展计划项目 (080312); 河南大学科技攻关项目 (07YBGG004).

*通讯作者 Tel: 86-15803787376, Fax: 86-378-3880388, E-mail: lbgood5912@sina.com

caspase-9, caspase-8, caspase-3, p53, Bcl-2 and Bax protein expressions were detected by Western blotting analysis. The results showed that the cell proliferation was inhibited by FQ16 at $0.625 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in a time-dose dependent manner. Treatment of SMMC-7721 cells with different concentrations of FQ16 for 24 h increased the percentage of the apoptosis cells obviously ($P < 0.05$), the typical ladder DNA in apoptotic cells and a concomitant dissipation of the mitochondrial membrane potential. Compared with control group, FQ16 influenced obviously DNA topoisomerase II activity, stimulated DNA cleavage and inhibited DNA reunion mediated by topoisomerase II. In addition, FQ16 ($3 - 7.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) increased mRNA expression of Bax and protein expression of p53, Bax, caspase-9, caspase-3, separately, and induced cytosolic accumulation of activities caspase-9 and caspase-3, whereas the mRNA and protein expression of Bcl-2 decreased with no change of caspase-8. Therefore it can be concluded that the effects of inhibited topoisomerase II and mitochondrial-dependent pathways were involved in FQ16 induction of apoptosis of SMMC-7721 cells.

Key words: quinolone derivative; apoptosis; topoisomerase II; mitochondrial membrane potential

抗菌氟喹诺酮羧酸是临床常用的抗菌药物, 主要作用于 DNA 回旋酶 (gyrase), 抑制细菌增殖^[1], 此酶与真核生物的拓扑异构酶 II (topoisomerase II, Topo II) 的活性部位序列有同源性^[2], 部分抗菌氟喹诺酮羧酸对真核细胞增殖有较弱的抑制作用。此外, 抗菌氟喹诺酮羧酸结构与蒽醌类抗肿瘤药物有相似性^[3]。基于此, 人们试图把抗菌氟喹诺酮羧酸改造成为抗肿瘤氟喹诺酮药物。依据抗菌活性的构-效关系, 目前研究多集中于氟喹诺酮羧酸骨架喹啉环 N-1 和 C-7 取代基的变化上, 并设计合成了二环氟喹诺酮、三环氟喹诺酮、四环氟喹诺酮、手性氟喹诺酮、类黄酮氟喹诺酮等化合物, 遗憾的是大量候选化合物存在体内活性与毒性相平行或生物相容性差、易代谢失活等问题, 未能进入临床评价^[4]。研究发现, 抗菌氟喹诺酮羧酸分子中的 C-3 位羧基对抗菌活性是必需的, 但对抗肿瘤活性并非必要, 可以被一些电子等排体如杂环或稠杂环取代^[5, 6], 这为寻找新结构的抗肿瘤氟喹诺酮候选物提供了新思路。本课题组在寻找新的结构修饰途径方面, 有幸发现氟喹诺酮羧酸的 C-3 羧基与许多酰肼类化合物结合, 具有潜在的抗肿瘤活性^[7]。用此结构单元替代抗菌氟喹诺酮氧氟沙星分子结构的 C-3 羧基, 合成了系列氧氟沙星 C-3 酰肼衍生物, 得到一些具有抗肿瘤活性的化合物, 其 IC_{50} 值均低于 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其中肉桂醛氧氟沙星酰肼化合物 *N*-(3-苯亚丙烯基)-6-氟-1, 8-(2, 1-丙氧基)-7-(4-甲基哌嗪-1-基)-喹啉-4(1*H*)-酮-3-甲酰肼 (FQ16, 图 1) 活性最强, IC_{50} 值达 $3.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 具有进一步开发的潜力。本研究利用人肝癌细胞株 SMMC-7721, 对该化合物抑制细胞增殖作用的机制进行了初步研究, 为进一步的开发和应用提供实验依据。

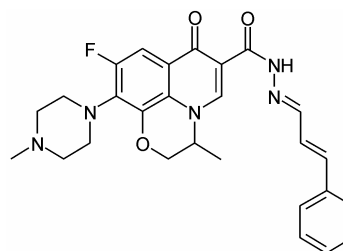


Figure 1 Chemical structure of *N*-(3-phenylallylidene)-6-fluoro-1, 8-(2, 1-propoxy)-7-(4-methylpiperazin-1-yl)-quinolin-4(1*H*)-one-3-carbonyl hydrazone

材料与方法

药品和试剂 氟喹诺酮衍生物肉桂醛氧氟沙星酰肼 (FQ16) 由河南大学化学生物学研究所合成, 经 HPLC 法测定纯度 >99%, HP5989A 质谱仪测得相对分子质量为 489.55, 用 Enraf-Nonius CAD-4 型 X-射线单晶衍射仪分析晶体结构, 贮存在二甲基亚砜 (DMSO, Solarbi 公司) 中, 浓度为 $1 \times 10^{-2} \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; caspase-9、caspase-8、caspase-3、p53、Bcl-2、Bax 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc); β -actin 抗体和 HRP 标记的羊抗兔 IgG (碧云天生物技术研究所); HRP 标记的羊抗鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); 四甲基偶氮唑盐 (MTT), DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, Reverse Transcription System 试剂盒 (Promega Biotech Co., Ltd.); Bcl-2、Bax、GAPDH 引物由美国英杰生命技术有限公司合成。Hoechst 33258 及人重组拓扑异构酶 II (topoisomerase II α human, Sigma-Aldrich Co.)。其余试剂为国产分析纯产品。

细胞培养 肝癌细胞系 SMMC-7721 购自中国医学科学院基础医学研究所, 生长在含 10% 热灭活胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司) 的 DMEM 培养基 (Gibco 公司) 中, 置 5% CO_2 、37 °C 恒温密闭

式孵箱内培养。取对数生长期的细胞用于实验。

MTT 法检测 FQ16 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响 以细胞数 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 接种细胞到 96 孔细胞培养板, 0.2 mL/孔, 培养 24 h 后换液, 分别用加入不同浓度 FQ16 的含血清 DMEM 培养液处理细胞 (每个浓度 5 个复孔), 对照组只加培养液。继续培养细胞 24、48 和 72 h 后, 每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT $20 \mu\text{L}$ 培养 4 h 后吸去培养液, 每孔加入 DMSO $150 \mu\text{L}$ 振荡至蓝色晶体完全溶解, 测定 570 nm 吸收度 (A) 值并计算抑制率。以含有等体积的培养液和 DMSO 的无细胞孔吸收度值为空白对照。根据以下方程式: 细胞生长抑制率 = $[1 - (\text{处理组吸收度} - \text{空白对照组吸收度}) / (\text{对照组吸收度} - \text{空白对照组吸收度})] \times 100\%$, 计算出半数抑制率 (IC_{50}) 值。

Hoechst 33258/PI 双染色法观察细胞凋亡形态变化 取对数生长期细胞, 按细胞数 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于盖玻片。不同浓度的 FQ16 处理 24 h 后, PBS 洗涤 2 次, 先加入终质量浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Hoechst 33258 染液 37°C 避光染色 10 min, 再加入终质量浓度为 $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PI 染液 4°C 避光 10 min, 弃去染液, 加入 4% 多聚甲醛 4°C 固定 5 min。荧光显微镜下观察拍摄。

TUNEL 法测定细胞凋亡率 以细胞数 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 接种细胞于放有盖玻片的 6 孔板中, 培养至对数生长期, 加入不同浓度的 FQ16, 与对照组细胞同时收集, 按 Promega 公司的试剂盒说明书进行检测。应用 ImageJ 计算单位面积细胞总数后, 统计细胞凋亡率。

DNA 琼脂糖凝胶电泳 以细胞数 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种细胞于培养瓶中, 培养至对数生长期, 加入不同浓度的 FQ16 作用 24 h, 0.25% 胰酶消化细胞, PBS 洗涤, 按细胞凋亡-DNA Ladder 抽提试剂盒 (碧云天生物技术有限公司) 要求提取 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 每个泳道的上样量为 $10 \mu\text{L}$, 电压 $4 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, EB 染色, 紫外灯下观察拍照。

电泳法检测拓扑异构酶 II 的活性 在断裂缓冲液 ($200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.5, $340 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP) $5 \mu\text{L}$ 中, 加入超螺旋 pBR322 DNA $1 \mu\text{g}$, 人重组拓扑异构酶 II $0.2 \mu\text{L}$, 不同浓度的 FQ16 (对照组仅加入等体积 FQ16 溶剂 DMSO, 阳性对照组仅加入拓扑异构酶 II 抑制剂依托泊苷) 至终反应体系为 $20 \mu\text{L}$, 37°C 反应 30 min, 用 10% SDS $2 \mu\text{L}$ 和蛋白酶 K ($1 \times 10^4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$ 终止反应。温育 30 min 后, 1% 琼脂糖凝胶电泳,

EB 染色, 紫外灯下拍照。

高内涵活细胞成像系统测定细胞线粒体膜电位 ($\Delta\psi\text{m}$) 变化 在对数生长期细胞培养液中, 加入不同浓度的 FQ16 作用 24 h, PBS 洗涤, 加入细胞培养液 1 mL 和 JC-1 染色工作液 1 mL, 37°C 孵育 20 min, 预冷 JC-1 染色缓冲液 ($1 \times$) 洗涤 2 次, 加入终质量浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Hoechst 33258 避光染色 10 min, PBS 洗涤 2 次, 高内涵活细胞成像系统观察、分析。

RT-PCR 检测 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达 不同浓度 FQ16 作用 24 h 后, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 按 Promega 公司的逆转录系统试剂盒说明书进行逆转录。Bcl-2 上下游引物序列分别是 5'-GATGTCCAGCCAGCTGCACCTG-3' 和 5'-CACAAAGGCATCCCA GCCTCC-3', PCR 产物为 255 bp^[8]。Bax 上下游引物序列分别是 5'-CTGACATGTTTTCTGACGGC-3' 和 5'-TCAGCCCATCTTCTTCCAGA-3', PCR 产物为 289 bp^[9]。GAPDH 上下游引物序列分别是 5'-AGGTCGGA GTCAACGGATTG-3' 和 5'-GAGATGGCATGGACTG TGGT-3', PCR 产物为 532 bp。PCR 反应的条件: 94°C 30 s, 58°C 45 s, 72°C 45 s, 30 个循环, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶图像分析系统拍照。

Western blotting 检测蛋白质表达 不同浓度 FQ16 作用细胞 24 h, RIPA 裂解液 $200 \mu\text{L}$ 充分裂解提取蛋白, 考马斯亮蓝 G250 法测样品蛋白浓度, 均衡每组蛋白浓度后, 以 12% SDS-PAGE 分离。电转移蛋白至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗 ($1:200$) 4°C 封闭过夜, 二抗 ($1:4000$) 孵育 1 h。化学发光法显示结果, 压片曝光。

统计学分析 所有资料均采用 SPSS 14.0 软件包进行统计学处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验分析。

结果

1 FQ16 对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用

FQ16 对 SMMC-7721 细胞有增殖抑制作用, 呈现时间-剂量依赖关系 (图 2)。计算得 24、48 和 72 h 的 IC_{50} 值分别为 $(4.48 \pm 0.43) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r^2 = 0.9185$), $(3.74 \pm 0.37) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r^2 = 0.8998$) 和 $(3.70 \pm 0.41) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r^2 = 0.8063$)。

2 FQ16 诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的测定

如图 3 所示, FQ16 作用于 SMMC-7721 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 细胞出现染色质凝集、核碎裂等凋亡形态学变化, 晚期凋亡细胞可见特异性 PI 染色。

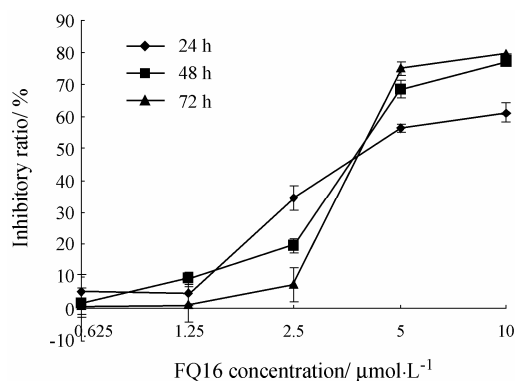


Figure 2 The proliferation inhibition effect of FQ16 on SMMC-7721 cells. $n = 5$

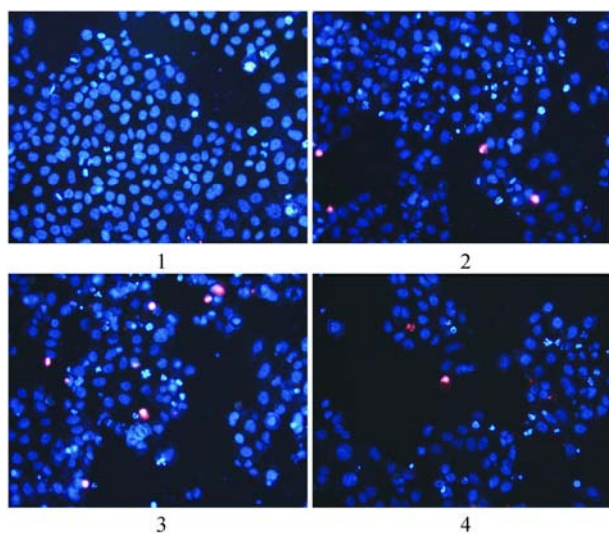


Figure 3 SMMC-7721 cells apoptosis under fluorescent microscope stained by Hoechst 33258/PI ($\times 200$). 1: Control; 2: FQ16 ($3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 3: FQ16 ($4.48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 4: FQ16 ($7.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

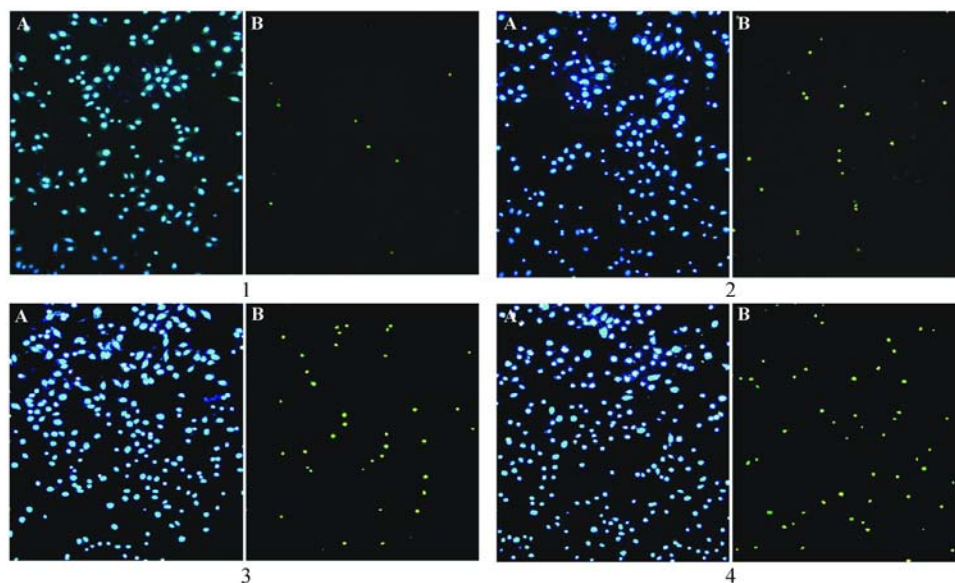


Figure 4 Induction of apoptosis of SMMC-7721 cells treated with FQ16 for 24 h was evaluated by TUNEL assay. Representative images were taken, nuclear stain (DAPI, A) and apoptotic stain (TUNEL, B) overlaid. 1: Control; 2: FQ16 ($3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 3: FQ16 ($4.48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 4: FQ16 ($7.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Magnification, $200\times$

TUNEL 实验结果显示, 随着 FQ16 作用浓度的增加, 凋亡细胞增多, 呈剂量依赖性 (图 4), 各剂量组与对照组相比均有显著性差异 ($P < 0.05$), 见表 1。DNA 琼脂糖凝胶电泳显示, FQ16 ($7.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组的基因组 DNA 呈现典型的梯状凋亡细胞条带, 而对对照组细胞 DNA 完整 (图 5)。

Table 1 Apoptosis effect of FQ16 on SMMC-7721 cells. $n = 9$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control group

Group	Concentration / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Total cell	Apoptotic cell	Apoptosis ratio / %
Control		209.71 ± 21.55	12.74 ± 3.77	6.20 ± 2.12
FQ16	3	208.34 ± 10.96	33.40 ± 8.57	$16.03 \pm 4.81^*$
	4.48	159.09 ± 13.08	37.54 ± 6.14	$23.59 \pm 2.40^*$
	7.39	119.49 ± 10.08	45.45 ± 7.66	$38.04 \pm 4.15^*$

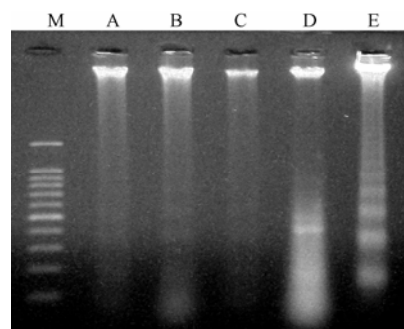


Figure 5 DNA fragmentation in SMMC-7721 cells. Cells were treated with 3, 4.48, 6, and $7.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FQ16 separately for 24 h. DNA from 1×10^5 cells was treated by electrophoresis through 1% agarose gels and stained with $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ethidium bromide. Lane M: Standard marker of DNA ladder; Lane A: DNA from untreated SMMC-7721 cells; Lane B-E: DNA from SMMC-7721 cells treated with 3, 4.48, 6, and $7.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FQ16 separately for 24 h

3 FQ16 对 DNA 拓扑异构酶 II 活性的影响

琼脂糖凝胶电泳结果显示, 对照组泳道与 F 泳道 (加 $4.48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FQ16, 而不加入酶) 相似; 随着 FQ16 浓度增加, 超螺旋 DNA (Form I) 逐渐减少, 缺口环状 (Form II)、线性 DNA (Form III) 逐渐增多, 与加依托泊苷的阳性对照组一致 (图 6)。说明 FQ16 促进 DNA 拓扑异构酶 II 介导的 DNA 解旋或断裂, 抑制 DNA 再连接反应。

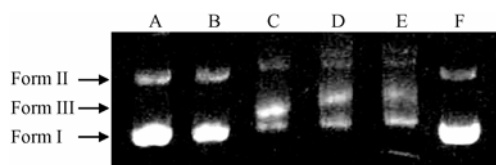


Figure 6 Inhibition effects of FQ16 on the DNA topoisomerase II activity. A: Control; B: $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FQ16; C: $4.48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FQ16; D: $7.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FQ16; E: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ etoposide; F: $4.48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FQ16 without topoisomerase II

4 FQ16 对线粒体膜电位的影响

正常细胞内, $\Delta\psi_m$ JC-1 聚集在线粒体形成多聚体, 呈红色荧光。凋亡细胞的 $\Delta\psi_m$ 破坏, JC-1 不能聚集在线粒体内, 以单体形式存在于细胞质呈绿色荧光, 荧光强度比值的变化反映 $\Delta\psi_m$ 的变化。SMMC-7721 细胞经 $3, 4.48$ 和 $7.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FQ16 作用 24 h 后, 绿色荧光与红色荧光强度比值随药物浓度增加而增大, 表明细胞线粒体膜电位降低, 与对照组相比分别降低 $(9.52 \pm 5.62)\%$ 、 $(37.32 \pm 5.52)\%$ 和 $(45.59 \pm 3.17)\%$, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 7。

5 FQ16 对 SMMC-7721 细胞 Bcl-2 和 Bax mRNA 水平的影响

加入 $3, 4.48$ 和 $7.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FQ16 作用 SMMC-7721 细胞 24 h 后, Bcl-2 mRNA 相对含量比值分别为 9.47% 、 9.25% 和 4.46% , 显著低于对照组 (42.92%) 水平 ($P < 0.05$); Bax mRNA 相对含量比值分别为 7.06% 、 31.86% 和 64.92% , 显著高于对照组 (2.44%) 水平 ($P < 0.05$), 说明 FQ16 在转录水平调节 Bcl-2 家族的表达 (图 8)。

6 FQ16 对 SMMC-7721 细胞 caspase-9、caspase-8、caspase-3、Bcl-2、Bax 和 p53 蛋白水平表达的影响

以 $3, 4.48$ 和 $7.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FQ16 分别作用于 SMMC-7721 细胞 24 h 后, 采用 Western blotting 法检测 caspase-9、caspase-8、caspase-3、Bcl-2、Bax 和 p53 的表达。与对照组相比, FQ16 作用后细胞 p53 蛋白表达显著增加, 并且呈明显的浓度依赖关系; Bcl-2 家族中促凋亡蛋白 Bax 在对照组几乎不表达, 而在

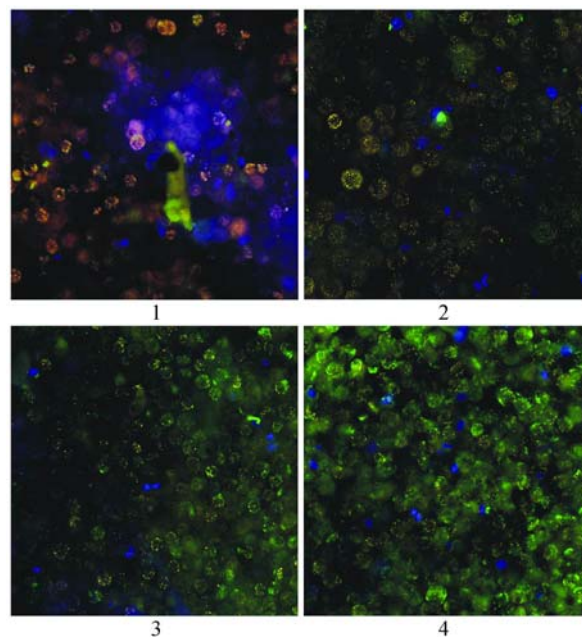


Figure 7 Changes in the MMP of SMMC-7721 cells induced by FQ16 for 24 h and analyzed by HCS after staining with JC-1. 1: Control; 2: FQ16 ($3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 3: FQ16 ($4.48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 4: FQ16 ($7.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

FQ16 浓度达 4.48 和 $7.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 处理组 Bax 蛋白的表达量随加药浓度的增高而增加, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达则被下调。细胞凋亡可通过两条途径实现, 一条是线粒体途径, 另一条是膜死亡受体介导途径。前者主要通过激活 caspase-9 诱导细胞凋亡, 而后者主要通过激活 caspase-8 实现细胞凋亡。FQ16 作用后 caspase-9 蛋白总体表达水平增高, 活化裂解片段增多, 同时 caspase-3 活化片段亦有增加, 而 caspase-8 变化不明显 (图 9), 说明 FQ16 诱导 SMMC-7721 细胞凋亡作用仅与线粒体凋亡通路有关。

讨论

氟喹诺酮类化合物抑制肿瘤细胞增殖及诱导细胞凋亡的作用已见报道^[10, 11]。本研究 MTT 检测结果显示, FQ16 对人肝癌细胞 SMMC-7721 有较强的增殖抑制作用, 且抑制作用具有时间、浓度依赖性, 有可能成为一种有价值的临床候选抗肿瘤药物。研究中发现, 在低浓度条件下, FQ16 对 SMMC-7721 细胞的杀伤作用不足, 残存少量耐药细胞密度适中, 能够很快进入对数生长期, 导致长时间 (72 和 48 h) 处理组的增殖抑制率低于 24 h 处理组 (图 2), 值得注意。

临床常用抗菌氟喹诺酮类药物作用于细菌的 DNA 回旋酶, 此酶与真核生物拓扑异构酶 II 在活性部位酪氨酸附近的序列有同源性^[12, 13], 部分氟喹诺

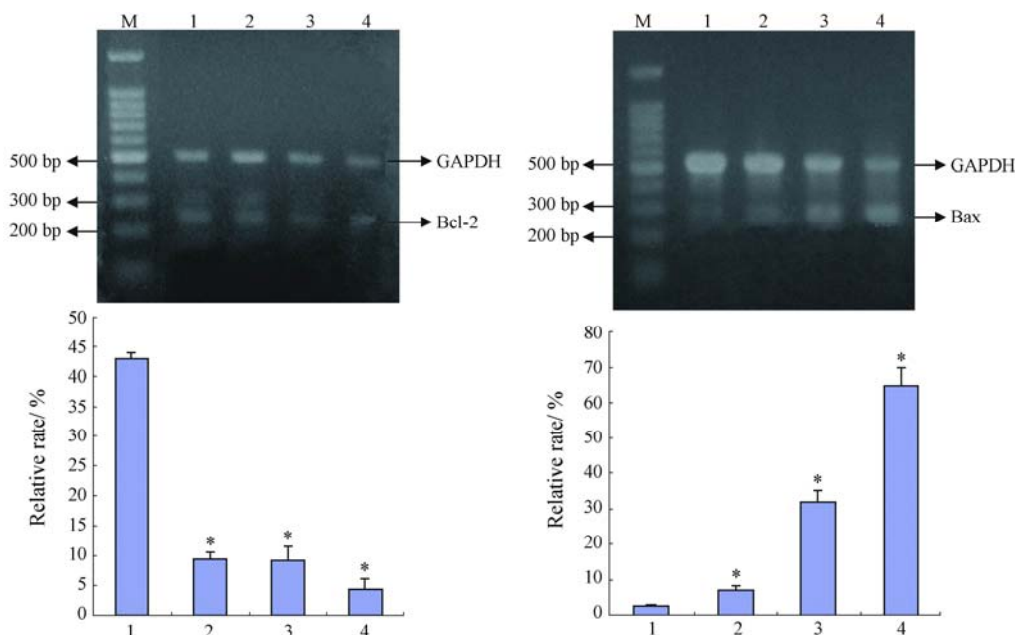


Figure 8 The level of Bcl-2 and Bax mRNA in SMMC-7721 cells treated with FQ16 for 24 h was detected by RT-PCR. Total RNA was extracted and Bcl-2 and Bax mRNA were amplified by RT-PCR and detected by agarose gel electrophoresis. M: Marker; 1: Control; 2: FQ16 (3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 3: FQ16 (4.48 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 4: FQ16 (7.39 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

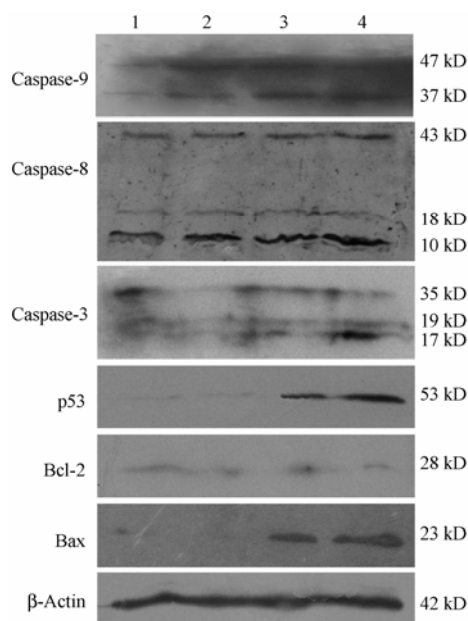


Figure 9 The protein expression of caspase-9, caspase-8, caspase-3, Bcl-2, Bax and p53 in SMMC-7721 cells treated with different FQ16 concentrations for 24 h. 1: Control; 2: FQ16 (3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 3: FQ16 (4.48 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 4: FQ16 (7.39 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

酮类药物如氧氟沙星、环丙沙星等,对拓扑异构酶 II 抑制作用很弱^[14],但经结构改造后,某些药物显示出较强的拓扑异构酶 II 抑制作用^[15, 16],作用机制类似于抗癌药物依托泊苷,主要是通过与单链 DNA 结合,形成 DNA 剪切底物,激发拓扑异构酶 II 的剪切速度,造成 DNA 双链断裂,并防止重新连接^[17-19]。本研究采用 FQ16 和 DNA 拓扑异构酶 II 共同作用于

pBR322 DNA,可见 pBR322 DNA 超螺旋形式 (Form I) 逐渐减少,缺口环状形式 (Form II)、线性 DNA 形式 (Form III) 逐渐增多,作用效果类似于依托泊苷。说明 FQ16 以类似的作用机制,促进拓扑异构酶 II 介导的 DNA 解旋或断裂,抑制其再连接反应,造成细胞 DNA 损伤。资料显示,喹诺酮类化合物致 DNA 损伤多通过激活 p53 蛋白诱导细胞凋亡^[11, 20, 21]。本研究 Western blotting 检测结果显示, FQ16 可使 p53 蛋白表达显著增多,同时细胞凋亡率也随 FQ16 浓度增加显著升高,说明 FQ16 诱导细胞凋亡作用与激活 p53 蛋白有关。

一般认为,由于对拓扑异构酶 II 的毒性作用造成的 DNA 损伤,可能激活线粒体凋亡途径和膜死亡受体途径造成细胞凋亡,线粒体途径受 Bcl-2 家族控制^[22]。本研究结果显示, FQ16 在 mRNA 和蛋白质水平可上调促凋亡 Bax 的表达,下调 Bcl-2 的表达,这种调节作用与 FQ16 浓度一致,说明 FQ16 诱导 SMMC-7721 细胞凋亡作用与线粒体凋亡通路有关^[20, 23, 24]。通过高内涵活细胞成像系统测定发现, FQ16 可以引起 SMMC-7721 细胞线粒体膜电位降低。这种变化主要由线粒体膜通透性增加所致,结果可造成线粒体内细胞色素 c 释放到细胞质中,经过 caspase-9 和 caspase-3 激活途径,诱导细胞凋亡。已有报道,喹诺酮类化合物可经膜死亡受体途径诱导细胞凋亡,但 FQ16 对 caspase-8 的影响并不显著,其诱导细胞凋亡作用可能与膜死亡受体途径无关^[25]。

综上所述, 喹诺酮类化合物肉桂醛氧氟沙星酰胺可作用于真核细胞 DNA 拓扑异构酶 II, 抑制细胞增殖, 造成 DNA 损伤, 经 p53 蛋白作用激活线粒体凋亡通路, 诱导人肝癌细胞凋亡。

References

- [1] Sugino A, Peebles CL, Kreuzer KN, et al. Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 4767–4771.
- [2] Rajabalian S, Foroumadi A, Shafiee A, et al. Functionalized *N*-(2-oxyiminoethyl) piperazinyl quinolones as new cytotoxic agents [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2007, 10: 153–158.
- [3] Das SG, Doshi JM, Tian D, et al. Structure-activity relationship and molecular mechanisms of ethyl 2-amino-4-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-6-phenyl-4*H*-chromene-3-carboxylate (sha14-1) and its analogues [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 5937–5949.
- [4] Wang XT, Zhang JB, Lei YJ. An advance of study in antitumor quinolone drugs [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2004, 39: 890–894.
- [5] Hu GQ, Wu XK, Wang X, et al. Synthesis and antitumor activity of C3 heterocyclic-substituted fluoroquinolone derivatives (I): ciprofloxacin aminothiodiazole Schiff-bases [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 1112–1115.
- [6] You QD, Li ZY, Huang CH, et al. Discovery of a novel series of quinolone and naphthyridine derivatives as potential topoisomerase I inhibitors by scaffold modification [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 5649–5661.
- [7] Kumar D, Sundaree S, Johnson EO, et al. An efficient synthesis and biological study of novel indolyl-1, 3, 4-oxadiazoles as potent anticancer agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 4492–4494.
- [8] Dewson G, Walsh GM, Wardlaw AJ. Expression of Bcl-2 and its homologues in human eosinophils. Modulation by interleukin-5 [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 20: 720–728.
- [9] Weinmann P, Gaehtgens P, Walzog B. Bcl-Xl and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3 [J]. *Blood*, 1999, 93: 3106–3115.
- [10] Efthimiadou EK, Thomadaki H, Sanakis Y, et al. Structure and biological properties of the copper (II) complex with the quinolone antibacterial drug *N*-propyl-norfloxacin and 2, 2'-bipyridine [J]. *J Inorg Biochem*, 2007, 101: 64–73.
- [11] DoganKoruznjak J, Slade N, Zamola B, et al. Synthesis, photochemical synthesis and antitumor evaluation of novel derivatives of thieno (3', 2': 4, 5) thieno (2, 3-c) quinolones [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50: 656–660.
- [12] Berger JM, Gamblin SJ, Harrison SC, et al. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II [J]. *Nature*, 1996, 379: 225–232.
- [13] Yang YS, Ji RY, Chen KX, et al. Studies on synthesis antibacterial and antitumor activity of (*S*)-(-)-ofloxacin analogues [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1999, 34: 119–124.
- [14] Kamat AM, De Haven JI, Lamm DL. A potential adjunct to intravesical chemotherapy for bladder cancer [J]. *Urology*, 1999, 54: 56–61.
- [15] Robinson MJ, Martin BA, Gootz TD, et al. Effects of quinolone derivatives on eukaryotic topoisomerase II. A novel mechanism for enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 14585–14592.
- [16] Elsea SH, Osherooff N, Nitiss JL. Cytotoxicity of quinolones toward eukaryotic cells. Identification of topoisomerase II as the primary cellular target for the quinolone CP-115, 953 in yeast [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 13150–13153.
- [17] Yogeewari P, Sriram D, Kavya R, et al. Synthesis and *in-vitro* cytotoxicity evaluation of gatifloxacin Mannich bases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2005, 59: 501–510.
- [18] Lin KJ, You QD, Liu ZH. 2D-QSAR studies on antitumor quinolones with the modification on site C-3 [J]. *Chin J Med Chem (中国药物化学杂志)*, 2003, 13: 316–319.
- [19] Hammonds TR, Foster SR, Maxwell A. Increased sensitivity to quinolone antibacterials can be engineered in human topoisomerase II alpha by selective mutagenesis [J]. *J Mol Biol*, 2000, 300: 481–491.
- [20] Sheng Z, Cao X, Peng S, et al. Ofloxacin induces apoptosis in microencapsulated juvenile rabbit chondrocytes by caspase-8-dependent mitochondrial pathway [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 226: 119–127.
- [21] Smart DJ, Halicka HD, Traganos F, et al. Ciprofloxacin-induced G2 arrest and apoptosis in TK6 lymphoblastoid cells is not dependent on DNA double-strand break formation [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7: 113–119.
- [22] Xie CY, Zhu H, Lin LP, et al. MFTZ-1, an actinomycetes subspecies derived antitumor macrolide, functions as a novel topoisomerase II poison [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 3059–3070.
- [23] Chen YC, Lu PH, Pan SL, et al. Quinolone analogue inhibits tubulin polymerization and induces apoptosis via Cdk1-involved signaling pathways [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74: 10–19.
- [24] Hsu SC, Yang JS, Kuo CL, et al. Novel quinolone CHM-1 induces apoptosis and inhibits metastasis in a human osteogenic sarcoma cell line [J]. *J Orthop Res*, 2009, 27: 1637–1644.
- [25] Wang SW, Pan SL, Huang YC, et al. CHM-1, a novel synthetic quinolone with potent and selective antimitotic antitumor activity against human hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7: 350–360.