

REFERENCES

- [1] FA L J, LIU N F. Research progress on the relationship between apoptosis and atherosclerosis [J]. J Southeast Univ(Med Sci Ed)(东南大学学报 医学版), 2010, 29(1): 107-110.
- [2] ABIKO M, RODGERS K, CAMPEAU J D, et al. Alterations of angiotensin II receptor levels in sutured wounds in rat skin [J]. J Invest Surg, 1996, 9(6): 447-453.
- [3] SELMAN M, PARDO A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder [J]. Respir Res, 2002, 3(1): 3.
- [4] KATHLEEN R, SHIQUAN X, JUNA F, et al. Development of angiotensin(1-7) as an agent to accelerate demral repair [J]. Wound Repair Regen, 2001, 9(3): 238-247.
- [5] HUANG H H, GUO S B, LIANG Y, et al. *In vitro* study of the effect of telmisartan on platelet aggregation [J]. Guide China Med(中国医药指南), 2011, 9(26): 196-197.
- [6] CHENG L, ZHANG L J. Mechanisms and advances in use of angiotensin II receptor antagonist telmisartan in improving glucose, lipid metabolism and anti-atherosclerosis [J]. Adv Cardiovasc Dis(心血管病学进展), 2008, 29(3): 494-496.
- [7] FENG W Q. The effect of telmisartan and amlodipine on function of artery elastic in hypertension patients [J]. Chin J Clin Res(中国临床研究), 2011, 24(9): 810-811.
- [8] HUANG H H, ZHENG S M, MEI Z R, et al. Effect of telmisartan treatment on artery elasticity in essential hypertension [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(6): 554-557.
- [9] YANG Y Z. Basic and Clinical of Atherosclerotic Cardiovascular Disease(动脉粥样硬化性心血管病基础与临床) [M]. Vol 2. Beijing: Science Press, 2009: 60-61.
- [10] SONG Y, WEI X B, DING H, et al. Protection of effective parts of *Zingiber officinale* on ECV-304 cells oxidative stress injury induced by H₂O₂ [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2007, 38(10): 1538-1541.
- [11] MACZEWSKI M, BERSEWICZ A. Role of nitric oxide and free radicals in cardioprotection by blocking Na⁺/H⁺ and Na⁺/Ca²⁺ exchange in rat heart [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 461(2/3): 139-147.
- [12] AARONSON P I, ROBERTSON T P, KNOCK G A, et al. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies [J]. J Physiol, 2006, 570(Pt 1): 53-58.

收稿日期: 2013-01-29

雷公藤甲素对肺癌 A549/DDP 细胞多药耐药的逆转作用及机制

王中华(天津中医药大学第一附属医院药剂部, 天津 300193)

摘要: 目的 探讨雷公藤甲素(triptolide, TPL)对肺癌 A549/DDP 多药耐药的逆转作用及机制。方法 TPL 作用于肺癌 A549/DDP 细胞后, 应用 MTS 法检测细胞生长抑制率, 流式细胞术检测细胞内罗丹明-123(Rhodamine-123, Rh-123)及细胞表面 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)表达, 应用 Western blot 法和 real time PCR 检测肿瘤细胞多药耐药蛋白(MDR1)和肺耐药相关蛋白(LRP)表达变化, 应用报告基因技术检测细胞 NF- κ B 启动子活性, 应用 Western blot 法检测肿瘤细胞 Akt 磷酸化。结果 TPL 可提高肺癌 A549/DDP 细胞药物敏感性, 经 2, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL 作用后, 顺铂逆转倍数(RF)分别为 2.09 倍和 2.93 倍, 肿瘤细胞中 Rh-123 含量分别提高了 1.38 倍和 2.88 倍, P-gp 表达分别是对照组的 57.1%和 32.1%, MDR1 和 LRP 蛋白表达水平显著下降, MDR1 mRNA 表达分别是对照组的 64.2%和 22.6%, LRP mRNA 表达分别是对照组的 54.8%和 34.7%, NF- κ B 启动子活性分别是对照组的 55.6%和 23.6%, Akt 磷酸化水平显著下降。结论 TPL 可逆转肺癌 A549/DDP 细胞多药耐药性, 提高肿瘤细胞药物敏感性, 抑制药物外排, 降低细胞 MDR1 和 LRP 表达, 其机制可能与抑制 Akt 磷酸化水平, 下调 NF- κ B 启动子活性有关。

关键词: 雷公藤甲素; 肺癌; 多药耐药

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)01-0026-06

Effects and Mechanisms of Triptolide on Reverse the Multi-drug Resistance of A549/DDP Lung Cancer

WANG Zhonghua(Department of Pharmacy, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects and mechanisms of triptolide on reverse the multi-drug resistance of lung cancer cell line A549/DDP. **METHODS** After treating A549/DDP cells with triptolide, cells proliferation inhibition ratio was determined by MTS assay, the intracellular concentration of rhodamine-123(Rh-123) and cells surface expression of P-glycoprotein (P-gp) by flow cytometry, the expression of multi-drug resistance protein(MDR1) and lung resistance related

作者简介: 王中华, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (022)27432297 E-mail: dazhizhi@hotmail.com

protein(LRP) by Western blot and real time PCR, and the activity of NF- κ B by report gene system. The phosphorylation of Akt was also determined by Western blot. **RESULTS** Treatment with triptolide was able to increase the drug sensitivity of A549/DDP cells. After treatment with 2 or 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ triptolide, the reverse folds(RF) to cisplatin were 2.09 and 2.93, respectively. The intracellular concentration of Rh-123 was elevated by 1.38 and 2.88 folds, and the P-gp level was 57.1% and 32.1% of the control, respectively. The expression of MDR1 and LRP was downregulated significantly. Accordingly, the mRNA level of MDR1 was 64.2% and 22.6% of control, and the mRNA level of LRP was 54.8% and 34.7% of control, respectively. Furthermore, the transcriptional activity of NF- κ B was reduced to 55.6% and 23.6% of the control, and the phosphorylation of Akt was also decreased significantly. **CONCLUSION** Triptolide is potential to reverse the multi-drug resistance of A549/DDP and increase its drug sensitivity. Triptolide can inhibit the drug efflux, downregulate the expression of MDR1 and LRP. The possible mechanisms may be related to inhibition of Akt phosphorylation and NF- κ B activity by triptolide.

KEYWORDS: triptolide; lung cancer; multi-drug resistance

肺癌是最常见的肺原发性恶性肿瘤, 目前全球癌症死因排名第一^[1]。近年来“化疗”在肺癌中的应用已不再限于不能手术的晚期肺癌患者, 而是作为全身治疗列入肺癌的综合治疗方案, 成为目前治疗肿瘤的主要手段之一。但肿瘤细胞对化疗药物的耐药性往往是治疗失败的主要原因之一, 最终导致肿瘤复发甚至患者死亡。雷公藤甲素(triptolide, TPL)是从中药雷公藤中提取的环氧化二萜内酯化合物, 是雷公藤发挥抗肿瘤作用的主要活性成分, 具有广谱高效的抗肿瘤作用。除了可直接抑制肿瘤细胞生长外, TPL 还可逆转某些肿瘤的耐药性。研究发现, TPL 可提高人慢性髓系白血病 K562/A02 耐药细胞株的化疗敏感性, 该作用可能与其下调 K562/A02 细胞中 microRNA21 水平有关。为探索 TPL 逆转肿瘤耐药的作用是否同样适用于其他肿瘤, 本实验考察了 TPL 对人肺癌 A549/DDP 耐药细胞株的多药耐药性的逆转作用, 并通过肿瘤耐药机制相关环节探讨 TPL 逆转耐药的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人肺癌细胞株 A549 和人肺癌多药耐药细胞株 A549/DDP 购自上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所; MTS(批号: G1112)、罗丹明-123(Rhodamine-123, Rh-123, 批号: G1112)、RT-PCR 试剂盒(批号: A1260)和 NF- κ B 报告基因检测试剂盒(批号: E3291)均购自 Promega 公司; P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)流式检测试剂盒(美国 BD 公司, 批号: 557003); 磷酸化 Akt(p-Akt, 批号: G1708)、MDR1 单抗(批号: 55510)和 LRP 单抗(批号: 57351)均购自 SantaCruz 公司; ECL 免疫印迹底物试剂盒(美国 Millipore 公司, 批号: 1035601); TPL(批号: T3652)、顺铂(批号: P4394)

均购自美国 Sigma 公司。FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司); Multiskan MK3 酶标仪(美国 Thermo); Piko Real PCR 仪(美国 Thermo)。

1.2 细胞与细胞培养

A549 和 A549/DDP 细胞培养于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 饱和湿度的培养箱中, 培养基为 RPMI 1640(含 10%小牛血清)。0.25%胰酶-EDTA 消化传代, 所有实验均采用对数生长期细胞。

1.3 MTS 法检测 TPL 和顺铂对 A549/DDP 细胞的抑制作用

1.3.1 MTS 法检测 TPL 对 A549/DDP 细胞的抑制作用 取对数生长期的 A549/DDP 细胞, 以 5×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种到 96 孔微孔板中, 每孔 100 μL , 培养过夜使细胞贴壁。向相应的试验孔中加入 0, 2, 5, 10, 20, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL, 继续培养 72 h, 吸去培养基, 按照试剂说明书的要求加入 MTS, 继续培养 4 h。最后用酶标仪测定 490 nm 波长下的 OD 值, 并计算药物对细胞的抑制率。抑制率=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.3.2 MTS 法检测顺铂对 A549/DDP 细胞的抑制作用 取对数生长期的 A549 细胞 1 组, 和 A549/DDP 细胞 3 组, 均以 5×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种到 96 孔微孔板中, 每孔 100 μL , 培养过夜使细胞贴壁。向相应的试验孔中加入加入 0, 2, 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 顺铂(其中 2 组 A549/DDP 细胞组中分别加入 2, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL, 加入 TPL 的同时加入不同浓度的顺铂), 继续培养 72 h, 吸去培养基, 按照试剂说明书的要求加入 MTS, 继续培养 4 h。最后用酶标仪测定 490 nm 波长下的 OD 值, 并计算药物对细胞的抑制率。抑制率=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。以顺铂浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标作图, 通过 GraphPad Prism5.0 软件拟合抑制曲线计算 IC_{50} 值。逆转倍数(RF)=

IC₅₀(对照组)/IC₅₀(TPL 处理组)。

1.4 流式细胞术检测 A549/DPP 细胞内 Rh-123 含量和细胞表面 P-gp 表达

取对数生长期的 A549/DPP 细胞,向相应的试验孔中分别加入 2 和 10 μmol·L⁻¹TPL,继续于培养箱内培养 24 h,加入 10 μmol·L⁻¹Rh-123 染液,培养 1 h 后收集细胞,用流式细胞仪检测细胞中 Rh-123 的荧光强度(488 nm 激发光,560 nm 发射光),以反映细胞中 Rh-123 的含量。取经过相同 TPL 处理的细胞进行 P-gp 表达的流式细胞检测,具体方法为,每个样品需收集 10⁶ 个细胞于 0.1 mL 培养基中,根据试剂盒的说明进行染色,最后用流式细胞仪检测细胞的荧光强度(488 nm 激发光,575 nm 发射光)以反映 P-gp 的表达量。

1.5 Western blot 法检测 A549/DPP 细胞中 p-Akt、MDR1 和 LRP 蛋白的表达

取对数生长期的 A549/DPP 细胞,分别加入 2, 10 μmol·L⁻¹ TPL,继续于培养箱内培养 24 h,收集细胞裂解提取蛋白。BCA 法测定细胞裂解物的蛋白含量,取等量蛋白质以 12% SDS-PAGE 法分离,然后转移至 PVDF 膜上,以不同的抗体检测目标蛋白(4 °C 过夜)。洗去一抗,以 HRP 连接的二抗温育 1 h,洗涤,以 ECL 试剂盒显示免疫反应条带。β-actin 作为内参。

1.6 RT-PCR 检测 A549/DPP 肿瘤细胞中 MDR1 和 LRP 基因的 mRNA 水平

取对数生长期的 A549/DPP 细胞,向相应的试验孔中分别加入 2, 10 μmol·L⁻¹TPL,继续于培养箱内培养 24 h,收集细胞,用 Trizol 法提取各组总 RNA,用 Real-Time PCR 试剂盒进行逆转录得到 cDNA。MDR1 上游引物序列: 5'-AAAAAGATCAACTCGTACCACTC-3',下游引物序列: 5'-GCACA AAATACACCAACAA-3'; LRP 上游引物序列: 5'-AGTCAGAAGCCGAGAAAG-3',下游引物序列: 5'-CCCAGCCACAGCAAGGT-3'。94 °C 变性 3 min 后,按下述条件扩增 40 个循环: 95 °C 5 s, 65 °C 35 s, 72 °C 60 s,循环后 72 °C 延伸 5 min。

1.7 报告基因技术检测 A549/DPP 细胞中 NF-κB 启动子活性

将细胞按每孔 10⁴ 个接种于 96 孔板中,培养 24 h 使细胞贴壁。加入 2 或 10 μmol·L⁻¹ TPL,继续于培养箱内培养 24 h。然后每孔加入 0.1 μg 的 pGL 4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hypro]质粒转染细胞,

继续培养 24 h,最后用试剂盒提供的显色剂来反应荧光酶的活性,并用荧光酶标仪进行检测。

1.8 数据统计

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 13.0 软件进行分析。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行比较,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TPL 对 A549/DDP 生长的影响

MTS 试验结果显示,TPL 浓度为 2, 10 μmol·L⁻¹ 时分别为 A549/DDP 细胞增殖的无毒浓度(抑制率 < 5%)及低毒浓度(抑制率 < 15%),A549/DDP 的细胞生长速率与对照组比较未发生显著性改变,故在此浓度下进行后续的研究,结果见图 1。

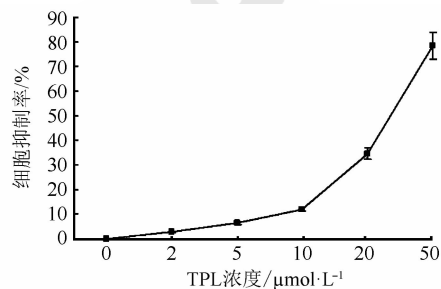


图 1 TPL 对 A549/DDP 细胞抑制率的影响

Fig 1 The effect of TPL on A549/DDP cells proliferation

2.2 TPL 对 A549/DPP 细胞对顺铂敏感性的影响

在 2 或 10 μmol·L⁻¹ TPL 的作用下,顺铂对 A549/DPP 细胞增殖的抑制率均高于对照组,说明 TPL 可提高 A549/DPP 细胞对顺铂的敏感性。根据 IC₅₀ 值算得 2 和 10 μmol·L⁻¹TPL 所产生的 RF 分别为 2.09 倍和 2.93 倍,结果见图 2。

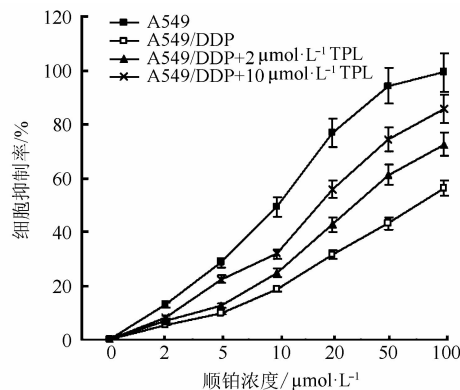


图 2 TPL 对 A549/DDP 细胞顺铂敏感性的逆转作用

Fig 2 Reversal effect of triptolide on A549/DDP cells cisplatin sensitivity

2.3 TPL 对 A549/DPP 细胞中 Rh-123 含量和 P-gp 表达的影响

流式细胞术检测结果显示,在 2 和 10 μmol·L⁻¹

TPL 的作用下, A549/DDP 细胞中 Rh-123 的荧光强度分别较对照组提高了 1.38 倍和 2.88 倍。相反地, P-gp 的表达均有所下调, 分别是对照组的

57.1%和 32.1%, 说明 TPL 可提高 A549/DDP 细胞中 Rh-123 的含量, 下调 P-gp 的表达, 从而提高细胞对顺铂的敏感性, 结果见图 3, 4。

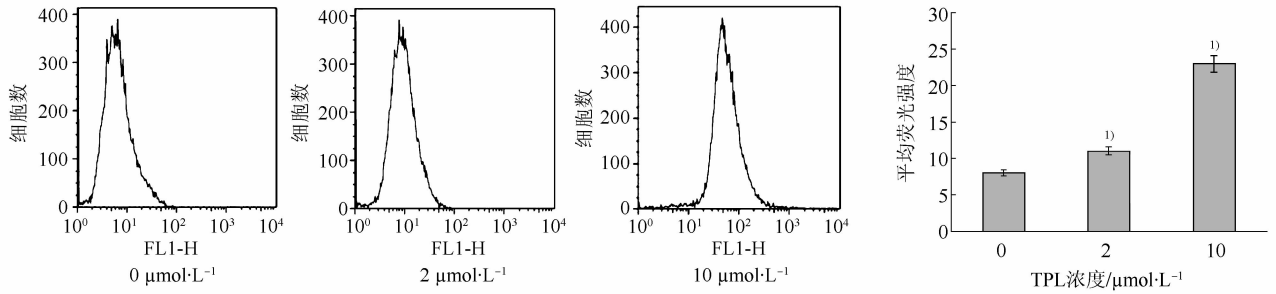


图 3 TPL 对 A549/DDP 细胞 Rh-123 蓄积的影响
与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL 组比较, $^{11}P<0.05$

Fig 3 The effect of TPL on the intracellular accumulation of Rh-123 of A549/DDP cells
Compared to $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL group, $^{11}P<0.05$

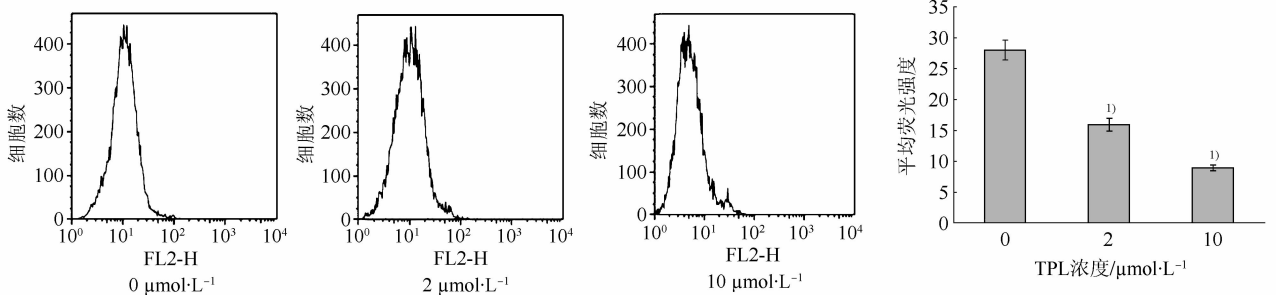


图 4 TPL 对 A549/DDP 细胞 P-gp 表达的影响
与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL 组比较, $^{11}P<0.05$

Fig 4 The effect of TPL on the expression of P-gp of A549/DDP cells
Compared to $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL group, $^{11}P<0.05$

2.4 TPL 对 A549/DDP 细胞中 p-Akt、MDR1 和 LRP 蛋白表达的影响

Western Blot 检测结果显示, 与对照组相比,

经 TPL 作用后的 A549/DDP 细胞中 Akt 的磷酸化水平降低, MDR1 和 LRP 蛋白的表达量下降, 结果见图 5。

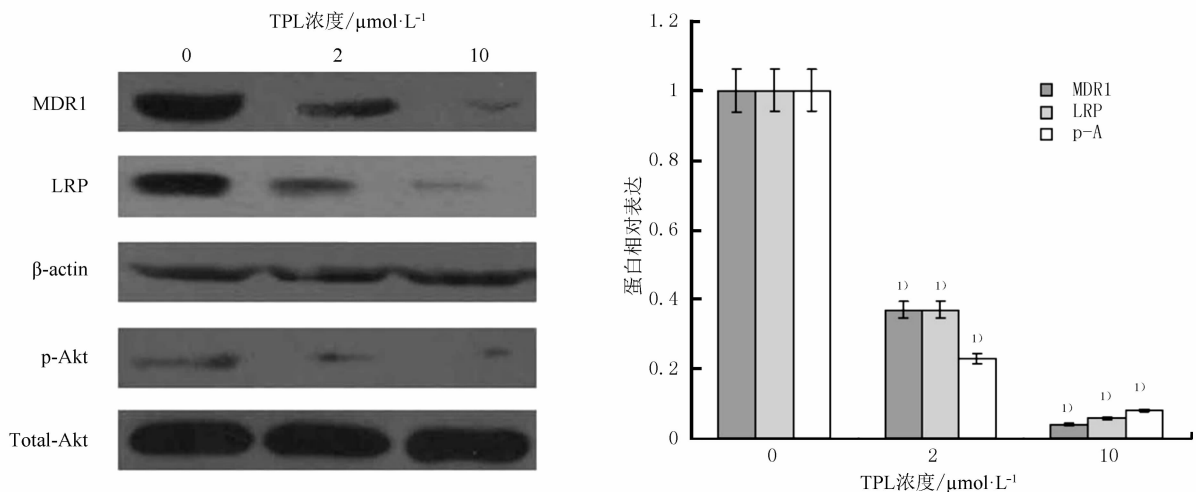


图 5 TPL 对 A549/DDP 细胞 MDR1 和 LRP 蛋白表达的影响
与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL 组比较, $^{11}P<0.05$

Fig 5 The effect of triptolide on the protein expression of MDR1 and LRP in A549/DDP cells
Compared to $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL group, $^{11}P<0.05$

2.5 TPL 对 A549/DDP 细胞中 MDR1 和 LRP 基因的 mRNA 水平的影响

RT-PCR 结果显示,经 TPL 作用后,A549/DDP 细胞中的 MDR1 和 LRP 基因的 mRNA 水平均有所下降,2, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的 MDR1 的 mRNA 表达分别是对照组的 64.2%和 22.6%,LRP 的 mRNA 表达分别是对照组的 54.8%和 34.7%,说明 TPL 可通过调节相关基因的转录而调节对应蛋白的表达,结果见图 6。

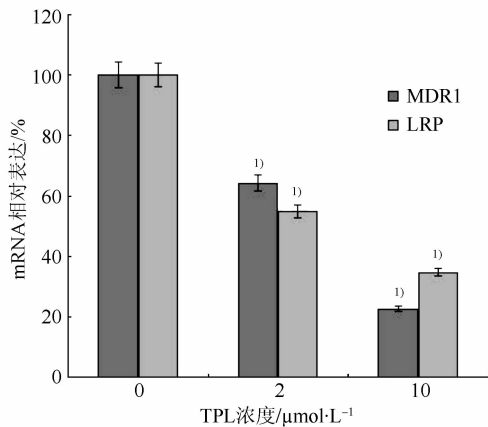


图 6 TPL 对 A549/DDP 细胞 MDR1 和 LRP mRNA 表达的影响
与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL 组比较, $^{1)}P<0.05$

Fig 6 The effect of triptolide on the mRNA expression of MDR1 and LRP in A549/DDP cells
Compared to 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL group, $^{1)}P<0.05$

2.6 TPL 可降低 A549/DDP 细胞中 NF- κ B 启动子的活性

NF- κ B 报告基因系统的检测结果显示,2 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL 处理后,A549/DDP 细胞的 NF- κ B 转录活性显著下降,分别为对照组的 55.6%和 23.6%,结果见图 7。

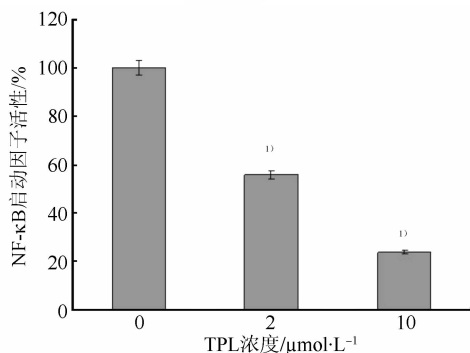


图 7 TPL 对 A549/DDP 细胞 NF- κ B 启动子活性的影响
与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL 组比较, $^{1)}P<0.05$

Fig 7 The effect of triptolide on the transcriptional activity of NF- κ B in A549/DDP cells
Compared to 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL group, $^{1)}P<0.05$

3 讨论

肺癌是全球癌症的第一原因,也是癌症的第一死因。虽然以铂类药物为主的化疗方案在肺癌治疗中占据重要地位,但随着治疗时间的推移,肿瘤往往发展出耐药性,导致治疗失败。研究克服多药耐药性的办法是提高化疗药物临床有效性的根本。

A549/DDP 细胞是由非耐药人肺癌细胞系 A549 经体外持续的顺铂暴露诱导而成,除对顺铂耐药外,同时也耐受 VP-16 和 CBP。TPL 是一个具有多重生物活性的天然产物,具有抗氧化、抗类风湿和抗癌等功效。最近还发现其具有逆转肿瘤细胞耐药性的作用,这些肿瘤细胞包括白血病 K562/A02^[2],口腔癌 KB-7D 和 KB-Tax 细胞,慢性髓性白血病 KBM5-T3151^[3],引发广泛关注。但 TPL 逆转多药耐药的机制尚不十分清楚,且未得到广泛研究,特别是在肺癌耐药细胞系中的作用尚未见报告。

由于 TPL 具有直接抗肿瘤作用,本研究先检测其对 A549/DDP 的抑制作用,确定 2, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 这 2 个对细胞生长无明显作用的浓度进行后续的研究。进一步的 MTS 试验发现,存在 2, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPL 时,A549/DDP 对顺铂的敏感性增加,表现为 IC_{50} 值下降,计算所得逆转倍数分别为 2.09 倍和 2.93 倍。肺癌细胞产生耐药性的机制多种多样,其中最常见的机制是多药耐药基因(MDR1)及其编码的 P-gp 蛋白或者肺耐药相关蛋白(LRP)的表达增加,降低药物在细胞内的积累,这种耐药机制一般可导致多药耐药。流式细胞术检测显示,TPL 处理后,A549/DDP 细胞内 Rh-123 的含量升高,相应地,细胞表面 P-gp 的表达水平下降。Rh-123 作为 P-gp 等蛋白的底物,可表征肿瘤细胞对药物的外排作用^[4],流式细胞术的试验结果正说明 A549/DDP 的耐药机制之一是增加抗肿瘤药物的外排,而 TPL 可抑制这一过程以逆转其耐药性。Western blot 研究显示 MDR1 的表达水平受 TPL 的负调控,这一结果与流式细胞术的结果一致。RT-PCR 研究显示这一调控很可能通过下调 mRNA 的转录而实现。同样,另一个与肺癌多药耐药相关的蛋白 LRP 的表达也受 TPL 的负调节。已知 NF- κ B 可调节 MDR1 的表达^[5],笔者通过报告基因系统检测到 TPL 确实抑制了 NF- κ B 转录活性,而很可能正是这一抑制作用导致了 MDR1 表

达下降。NF- κ B 的活性由 PI3K/Akt 正面调节^[6]，而磷酸化是 Akt 活性的表现。通过 Western blot，观察到在 TPL 处理后，细胞 Akt 的磷酸化水平下降，与 NF- κ B 的活性下降一致。根据最新的研究结果，TPL 可通过降解截短的类视色素 X 受体 α (tRXR α) 发挥抑制 Akt 的作用^[7]。

总之，本研究显示 TPL 可逆转 A549/DDP 细胞多药耐药性，其机制可能通过抑制 Akt/NF- κ B 的活性，从而下调 MDR1 和 LRP 等多药耐药蛋白的表达，增加药物在肿瘤细胞内的浓度。这项研究支持 TPL 在临床上与化疗药物联合使用治疗肺癌。

REFERENCES

- [1] DELA CRUZ C S, TANOUE L T, MATTHAY R A. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention [J]. Clin Chest Med, 2011, 32(4): 605-644.
- [2] CHEN Y W, LIN G J, CHUANG Y P, et al. Triptolide

- circumvents drug-resistant effect and enhances 5-fluorouracil antitumor effect on KB cells [J]. Anti Cancer Drugs, 2010, 21(5): 502-513.
- [3] SHI X, JIN Y, CHENG C, et al. Triptolide inhibits Bcr-Abl transcription and induces apoptosis in STI571-resistant chronic myelogenous leukemia cells harboring T315I mutation [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(5): 1686-1697.
- [4] MUNIĆ V, KELNERIĆ Z, MIKAC L, et al. Differences in assessment of macrolide interaction with human MDR1(ABCB1, P-gp) using rhodamine-123 efflux, ATPase activity and cellular accumulation assays [J]. Eur J Pharm Sci, 2010, 41(1): 86-95.
- [5] IOSEF C, ALASTALO T P, HOU Y, et al. Inhibiting NF- κ B in the developing lung disrupts angiogenesis and alveolarization [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302(10): L1023-1036
- [6] SAFAYA S, STEINBERG M H, KLINGS E S. Monocytes from sickle cell disease patients induce differential pulmonary endothelial gene expression via activation of NF- κ B signaling pathway [J]. Mol Immunol, 2012, 50(1-2): 117-123.
- [7] LU N, LIU J, LIU J, et al. Antagonist effect of triptolide on AKT activation by truncated retinoid X receptor-alpha [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35722.

收稿日期: 2013-02-11

新型脂肪酰胺水解酶抑制剂的设计、合成和活性评价

王中奎, 李燕婷, 赵东升, 韩大雄* (厦门大学药学院, 福建 厦门 361102)

摘要: 目的 设计合成新型的脂肪酰胺水解酶(FAAH)抑制剂, 并对其活性进行评价。方法 通过已有 FAAH 酶抑制剂的结构和活性构建药效团模型, 对部分 ZINC 数据库粗筛; 通过与 FAAH 酶分子对接, 对粗筛所获得的小分子化合物的活性进行打分评价, 确定拟合成目标化合物的母核结构(2-氧代苯并吡喃-7-酯); 采用酰化、缩合反应, 合成系列目标化合物; 通过体外酶抑制活性实验检测其活性。结果 化合物(±)-2-(2-苯氧基乙酰氨基)-丙酸-2-氧代苯并吡喃-7-酯(**2b**)的 IC₅₀ 值为 95.24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (±)-1-(2-苯氧基-乙酰基)-吡咯烷-2-羧酸-2-氧代苯并吡喃-7-酯(**2g**)的 IC₅₀ 值为 17.34 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 具有较好的抑制 FAAH 酶活性的作用。结论 活性化合物的结构与目前报道的脂肪酰胺水解酶抑制剂结构差异较大, 有望成为新类型先导化合物。

关键词: 脂肪酰胺水解酶抑制剂; 计算机辅助药物设计; 合成; 活性测定

中图分类号: TQ464.8 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2014)01-0031-06

Design, Synthesis and Enzyme Assay of Novel Fatty Acid Amide Hydrolase(FAAH) Inhibitors

WANG Zhongkui, LI Yanting, ZHAO Dongsheng, HAN Daxiong* (School of Pharmaceutical Science, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To discover novel fatty acid amide hydrolase inhibitors and evaluate their enzymatic activity. **METHODS** The pharmacophore model was based on the compounds carefully selected from the published literatures. This model was used to screen part of ZINC Nature Products database to get a series of compounds which were used to do a superimposition analysis of the FAAH X-ray crystal structure. Through the virtual screening and the structure-activity analysis of the compounds published in the literatures, the hitting compound structure(2-oxygen-benzo pyran-7-ester) was selected to do the transformation. The acylation and condensation reactions were used to get a series of novel compounds. The enzymatic activity

基金项目: 国家自然科学基金项目(81373407); 福建省自然科学基金项目(2013J01386)

作者简介: 王中奎, 男, 硕士 Tel: 18030179806 E-mail: wzk19870512@sina.com *通信作者: 韩大雄, 男, 博士, 副教授 Tel: (0592)2188681 E-mail: daxiong@xmu.edu.cn