论著

文章编号:1000-5404(2014)05-0422-05

人工合成钠离子通道阻断剂抑制前列腺癌细胞的生长及侵袭

周 蕊[1,2],卢宗亮[1,2],刘 凯[2],杨柳娜[1],胡叶敏[3],常 徽[2],周 永[2],糜漫天[2],李雁武[3],许红霞[1,2] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所营养科[1];400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆市医学营养研究中心[2];400016 重庆,重庆医科大学药学院[3])

[摘要] **目的** 研究人工合成钠离子通道阻断剂(sodium channel amine ligands,SCALs)对前列腺癌细胞株(PC3细胞、DU145细胞)生长及侵袭的影响,以筛选高效的抗肿瘤药物。**方法** 四甲基偶唑氮(MTT)法检测SCALs对肿瘤细胞的存活率的影响;Transwell侵袭实验检测SCALs干预后肿瘤细胞体外侵袭能力的变化;流式细胞仪检测SCALs促进细胞凋亡及阻滞细胞周期的能力,蛋白免疫印迹实验检测SCALs对钠离子通道蛋白α亚基Nav 1.7蛋白表达的影响。**结果** 7种SCALs中的3种(S1127、S1169、S1180)对前列腺癌细胞敏感,在低浓度时对肿瘤细胞具有杀伤效应,且其抑制率与药物浓度呈剂量-效应关系,其中S1180对PC3和DU145细胞的IC_{50}分别为2.9 μmol/L和2.5 μmol/L,在10 μmol/L时能促进12.89%的肿瘤细胞凋亡、抑制75.53%的细胞侵袭,并具有阻滞细胞周期的能力,以及能下调Nav 1.7蛋白的表达水平。**结论** 合成的钠离子通道阻断剂中3种SCALs尤其是S1180具有显著杀伤前列腺癌细胞效应,将来可能成为治疗肿瘤的一类新型药物。

[关键词] 电压门控性钠离子通道;钠离子通道胺类配体;前列腺癌;PC3细胞;肿瘤侵袭
[中图法分类号] R329.25;R737.25;R979.1 [文献标志码] A

Artificial sodium channel amine ligands suppress growth and invasion in prostate cancer cells *in vitro*

Zhou Rui[1,2], Lu Zongliang[1,2], Liu Kai[2], Yang Liuna[1], Hu Yemin[3], Chang Hui[2], Zhou Yong[2], Mi Mantian[2], Li Yanwu[3], Xu Hongxia[1,2] ([1]Department of Nutrition, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Department of Nutrition and Food Safety, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing Center of Medical Nutrition, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [3]College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of artificially synthesized sodium channel amine ligands (SCALs) on the growth and invasion of prostate cancer cell lines. **Methods** SCALs compounds, S1127, S1156, S1169, S1170, S1178, S1180, and S1182 were synthesized and confirmed. Prostate cancer cell lines, PC3 and DU145, were used in this study. The cell viability was assessed by MTT assay in the cells after the treatment of SCALs respectively. The cell apoptosis and cell cycle progression were assessed by flow cytometry. The cancer cell invasion was assessed by Transwell chamber assay. The protein expression of prostate cancer sodium channel α subunit, Nav 1.7 was determined by Western blotting. **Results** Three compounds, S1127, S1169, and S1180, inhibited the growth of tumor cells in a dose-dependent manner. S1180 was found to be the most potent among the 7 compounds. The IC_{50} values of S1180 were 2.9 and 2.5 μmol/L respectively for PC3 and DU145 cells. At 10 μmol/L, S1180 improved cell apoptosis in 12.89% PC3 cells, and suppressed the cell invasion in 75.53% cells, and exerted significant effects on cell arrest, and down-regulated Nav 1.7 protein expression. **Conclusion** Three SCALs compounds, especially S1180, have obvious anti-tumor effect on prostate cancer cells, and might be a potential therapeutic agent for prostate cancer.

[**Key words**] voltage-gated sodium channels; sodium channel amine ligands; prostate cancer; PC3 cells; neoplasm invasiveness

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2011BB5027) and the Project of Science and Technolog Activities for Talents Studying Abroad of Chongqing (2011). Corresponding author: Xu Hongxia, E-mail: clara.red9@gmail.com

[基金项目] 重庆市自然科学基金(2011BB5027);重庆市留学人员科技活动项目(2011)
[通信作者] 许红霞,E-mail:clara.red9@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131220.1105.002.html(2013-12-20)

前列腺癌是男性生殖系常见的恶性肿瘤,居男性癌症死亡第 2 位。欧美各国发病率较高,亚洲国家发病率比较低。但近几年,我国前列腺癌发病率呈逐渐上升趋势,且发现时多数已是中晚期。前列腺癌以内分泌治疗为主,去势治疗对多数前列腺癌有效,但经过一段缓解期后,往往转换为激素难治性前列腺癌(hormone-refractory prostate cancer, HRPC)。约 80% 的前列腺癌患者尸检时发现存在骨转移,常累及脊柱、骨盆、肋骨、颅骨、股骨和肱骨[1]。目前化学疗法成为 HRPC 尤其是有骨转移患者的主要治疗方法;紫杉醇、米托蒽醌等是目前被证实对 HRPC 有效的化疗药物,但价格昂贵,毒副作用大,亟需开发新的化疗药物。

电压门控钠离子通道(voltage-gated sodium channels, VGSCs)是一大类的电压依赖性跨膜蛋白,其作用是调节兴奋细胞动作电位的上升区段,担负着重要的生理功能。VGSCs 作为肿瘤化疗的新靶标,近年来在前列腺癌及其转移的研究中取得较快进展。研究表明,VGSCs 的阻断剂能抑制肿瘤细胞的转移,如河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)可抑制多种人类及啮齿类动物的前列腺癌、乳腺癌及肺癌细胞的转移[2]。因而 VGSCs 阻断剂作为抗肿瘤药物尤其是抗肿瘤转移药物具有巨大的开发前景。

本研究以人前列腺癌细胞(PC3 细胞、DU145 细胞)为研究对象,检测前期合成的钠离子通道胺类配体(sodium channel amine ligands, SCALs)对前列腺癌细胞的杀伤活性,以及其对肿瘤细胞凋亡、细胞周期的影响;检测筛选出的 SCALs 影响前列腺癌细胞侵袭的能力,以及对钠离子通道蛋白 α 亚基 7(Nav 1.7)蛋白表达的影响,为进一步研发 SCALs 作为抗肿瘤生长及抗肿瘤转移药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

2 株人前列腺癌细胞 PC3、DU145 均为本实验室保存。DU145 细胞培养于改良型 RPMI1640 培养液中,PC3 细胞用 F12 培养液培养。培养基均含 10% 胎牛血清,于 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养,2 ~ 3 d 传代。

钠离子通道胺类配体:S1127、S1156、S1169、S1170、S1178、S1180、S1182 从重庆医科大学药学院李雁武教授处获得;改良型 RPMI1640(HyClone 公司,美国),HAM'S/F-12 培养基(HyClone 公司,美国);胎牛血清(HyClone 公司,美国);四甲基偶唑氮(Sigma 公司,美国);二甲基亚砜(Sigma 公司,美国);磷酸盐缓冲液(北京中杉金桥生物技术有限公司);胰酶(祥盛生物技术有限公司);凋亡试剂盒(上海贝博生物);Matrigel 胶(BD 公司,美国);Transwell 小室(Corning 公司,美国);蛋白定量试剂盒(Bio-Rad 公司,美国),多功能酶标仪(Tecan 公司,infinite M200);凝胶成像系统(Viber Lourmat 公司,法国)。

1.2 SCALs 的合成

重庆医科大学药学院李雁武教授团队利用结构模拟软件 3D QSAR 的 CoMFA(Comparative Molecular Field Analysis)的构效关系(structural activity relationship, SAR)分析方法,建立了以钠离子通道蛋白为靶点的高预测性的药物结合模型并通过氮烃基化反应,在苯妥英的构效关系的基础上,设计出新型的非苯妥英类钠离子通道抑制剂,建立了以钠离子通道蛋白为靶点的高预测性的药物结合模型并合成了一系列的此类 SCALs,共 7 种,分别编号为 S1127、S1156、S1169、S1170、S1178、S1180、S1182。这一类化合物尚未报道,其结构特点是在氢键结合中心的 NH 中心上,链接 2 个不同大小疏水基团的胺类化合物。

1.3 MTT 法检测细胞存活率

将细胞分别接种在 96 孔板中[(4 ~ 5) × 10^3/孔],在 37 ℃ 培养 24 h 后,分别加入 S1127、S1156、S1169、S1170、S1178、S1180、S1182(1、2.5、5、10、25、50 μmol/L)。SCALs 用 DMSO 溶解配成储备液,培养基稀释 1 000 倍后加药,同时用稀释 1 000 倍的 DMSO 处理作为对照组。每个浓度设 3 个平行孔。加药后培养 72 h 后,每孔分别加入 10 μL MTT 溶液(5 mg/mL),在 37 ℃ 培养 3 h 后立即去除上清液,用 100 μL 的二甲基亚砜(DMSO)充分溶解甲臜晶体。用多功能酶标仪在波长 490 nm 处记录光密度值。细胞存活率用实验孔的光密度除以对照孔的光密度来计算。每次试验均重复 3 次或 3 次以上。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期的 PC3 细胞,接种在 6 孔板中,加入 MTT 法筛选出的效果最理想的 S1180(1、2.5、5、10 μmol/L)进行处理,每组两个平行,48 h 后收集各组细胞和上清,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 PBS 洗涤 2 次,以 200 μL 1 × 结合液重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 染色液,混匀后避光 15 min,再加入 10 μL PI,2 ~ 8℃ 避光孵育 5 min。

凋亡指数 = 干预组凋亡百分比/对照组凋亡百分比 × 100%

1.5 流式细胞仪检测细胞周期

收集经 S1180(2.5、5、10 μmol/L)处理后的 PC3 细胞各 6 × 10^5/mL,用 PBS 洗 2 次,加入 70% 乙醇固定 4 ℃ 过夜,弃去固定液,PBS 洗后重悬于含 100 μg/mL RNAase 及 50 μg/mL PI 的 0.5 mL 染色液中,4 ℃ 避光染 30 min 后流式细胞仪检测细胞 DNA 含量,计算各期细胞的比例。

1.6 Transwell 体外侵袭实验

采用 Corning 公司 8 μm 规格带基质胶的 Transwell 小室,以无血清培养基稀释 Matrigel 胶(8∶1),50 μL 铺上室底部,放入孵箱过夜。正常消化 PC3 细胞后,在上室中加入 100 μL 含血清培养基(含细胞 2 × 10^4 个),孵育过夜后加药,同时在小室的下室中加入 600 μL 含 10% 胎牛血清的培养基作为趋化剂并将上室换成无血清培养基,继续培养 48 h 后,取出小室,用棉签轻轻擦除上室底部细胞,用 PBS 漂洗 3 次,4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,PBS 洗涤 3 次,然后用 0.1% 结晶紫染色 20 min。每组在显微镜下(放大 20 倍)依次选取 10 个视野照相保存,并进行

计数及结果分析。

1.7 Western blot 检测细胞 Nav 1.7 蛋白表达

PC3 细胞经 S1180(0、5、10 μmol/L)处理 24 h 后,冰上加入蛋白裂解液收集细胞蛋白,4 ℃,12 000 r/min 离心 30 min,弃上清,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量后,加入 5 × SDS 上样缓冲液,95 ℃煮沸 5 min 使蛋白变性,进行 SDS-PAGE 电泳,然后通过湿转(220 mA,2 h)转移至 0.22 μm 的 PVDF 膜上。使用脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,用 1∶400 稀释的 Nav 1.7 一抗 4 ℃孵育过夜。第 2 天室温复温 1 h 后每 10 分钟用 TBST 洗膜 1 次,共 3 次,然后用生物素标记二抗室温孵育 1 h 后洗膜,于凝胶成像系统成像扫描分析。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同 SCALs 对前列腺癌细胞的杀伤效应

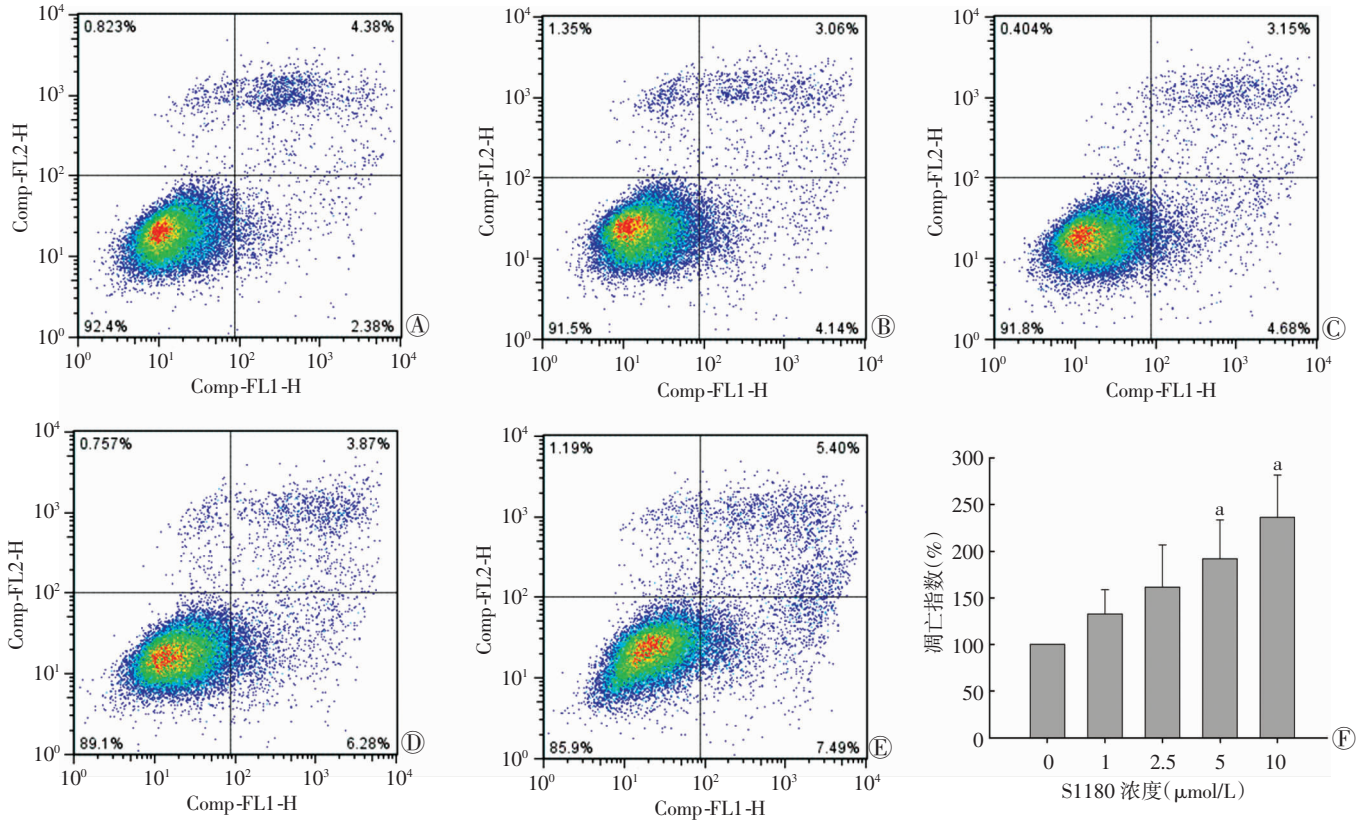
如表 1 所示,不同浓度的 7 种 SCALs 处理肿瘤细胞 72 h 后,PC3 及 DU145 细胞均对 S1170、S1178、S1182 不敏感。而 S1172、S1156、S1169、S1180 对细胞的活力均有影响,且随处理浓度增加,对细胞活力的影响更为明显,呈明显剂量-效应关系。在 PC3 细胞和 DU145 细胞中,其对药物的敏感性顺序为:S1180 > S1127 > S1169 > S1156。经过 MTT 的筛选发现,S1180 在 7 种 SCALs 中杀伤效果最强,后续实验将以 S1180 为干预药物进行。

表 1 7 种 SCALs 对 PC3 细胞、DU145 细胞的杀伤效应(μmol/L)

SCALs	PC3 细胞			DU145 细胞		
	IC_{20}	IC_{50}	IC_{80}	IC_{20}	IC_{50}	IC_{80}
S1127	1.1	4.4	9.4	2.6	4.9	10.3
S1156	5.2	9.4	17.6	2.8	15.23	22
S1169	1.8	3.5	11.6	9.9	17	24.8
S1170	24.8	>50	>50	16.67	>50	>50
S1178	22.3	>50	>50	4.8	>50	>50
S1180	0.8	2.9	6.8	0.8	2.5	11.3
S1182	10.7	>50	>50	9.6	>50	>50

2.2 S1180 促进 PC3 细胞凋亡

本实验结果显示:不同浓度的 S1180 处理 48 h 后,细胞凋亡指数显著增加($P < 0.05$)。5、10 μmol/L S1180 处理组的凋亡指数显著高于对照组($P < 0.05$,图 1)。本结果 S1180 有明显促 PC3 细胞凋亡作用,呈剂量-效应关系。



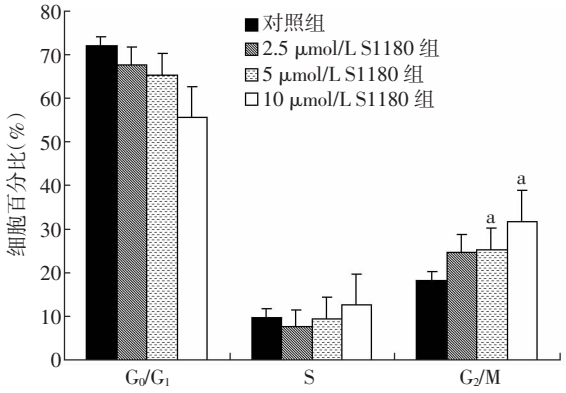
A:对照组;B:1 μmol/L S1180 组;C:2.5 μmol/L S1180 组;D:5 μmol/L S1180 组;E:10 μmol/L S1180 组;F:各组的凋亡指数比较

a:$P < 0.05$,与对照组(0 μmol/L S1180)比较

图 1 不同浓度 S1180 对 PC3 细胞凋亡的影响

2.3 S1180 对 PC3 细胞周期进程的阻滞作用

不同浓度的 S1180 处理 48 h 后，流式细胞仪检测结果显示，G_2/M 期细胞比例在 5、10 μmol/L S1180 处理时上升，与对照组相比，差异有统计学意义（$P<0.05$），表明 5、10 μmol/L S1180 引起 PC3 细胞周期阻滞于 G_2/M 期（图 2）。



a：$P<0.05$，与对照组比较

图 2 不同浓度 S1180 对 PC3 细胞周期进程的影响

2.4 S1180 抑制 PC3 细胞体外侵袭能力

Transwell 侵袭实验结果显示：加入不同浓度的 S1180 对 PC3 细胞进行干预后，与对照组（DMSO）相比，加入 5、10 μmol/L S1180 后均降低前列腺癌细胞的侵袭能力（表 2、图 3）。

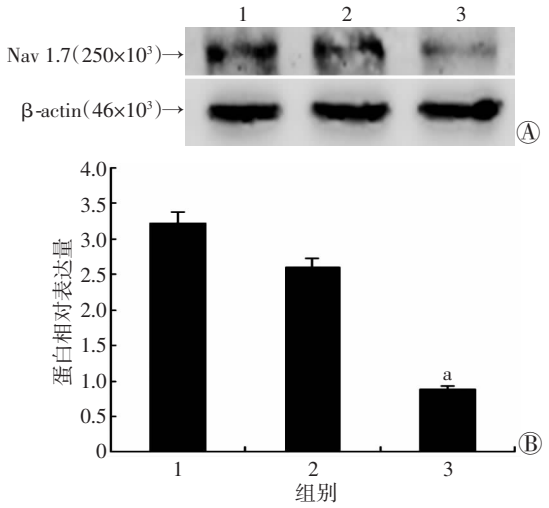
表 2 S1180 对 PC3 细胞体外侵袭率的影响（$n=10, \bar{x}\pm s$）

组别	侵袭率(%)
对照组	100.00 ± 0.00
5 μmol/L S1180 组	36.26 ± 2.76[a]
10 μmol/L S1180 组	26.47 ± 1.30[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.5 S1180 抑制 PC3 细胞的 Nav 1.7 蛋白表达

不同浓度的 S1180 处理 24 h 后，PC3 细胞的 Nav 1.7 蛋白表达水平较对照组显著降低，10 μmol/L S1180 处理组对 Nav 1.7 蛋白表达有显著抑制作用（图 4）。表明 S1180 能明显抑制 Nav 1.7 蛋白的表达，抑制细胞的侵袭。



1：对照组；2：5 μmol/L S1180 组；3：10 μmol/L S1180 组

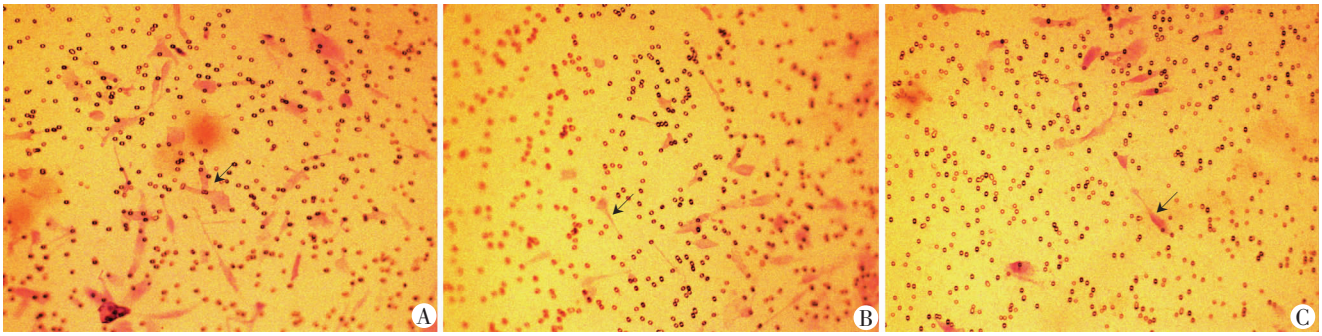
A：Western blot 检测结果；B：半定量分析 a：$P<0.05$，与对照组比较

图 4 S1180 对 PC-3 细胞的 Nav 1.7 蛋白表达水平

3 讨论

近年来，电压门控钠离子通道（VGSCs）作为肿瘤化疗的新靶标备受关注。在 20 世纪 90 年代，“离子通道与肿瘤的研究”已经开始。VGSCs 是位于细胞膜的离子通道，由 α 亚单位和 β 亚单位组成。α 亚单位有 9 种：Nav1.1 ~ 1.9，由基因 SCN1A-11A 编码。其中，亚单位 Nav1.1 ~ 1.4、Nav1.6 和 Nav1.7 对河豚毒素（TTX）敏感，尤其是 Nav1.7（TTX 以 nmol/L 浓度阻断）。VGSCs 的 α 亚单位有四个区域（D1 ~ 4），每个区域由 6 个 α 螺旋组成的跨膜片段组成 S1 ~ 6。在神经细胞、骨骼肌细胞中，VGSCs 通过电压依赖的离子通道的开放，对兴奋性信号发生去极化电位，从而产生动作电位，传递兴奋性信号[2]。

研究发现电压激活的钠离子电流与前列腺癌细胞的侵袭有关[3]。进一步研究显示，VGSCs 的上调与几种强转移性肿瘤的病理变化相关，尤其在乳腺癌及前列



A：对照组；B：5 μmol/L S1180 组；C：10 μmol/L S1180 组

图 3 Transwell 侵袭实验检测 S1180 对 PC3 细胞体外侵袭能力的影响 （×20）

腺癌的研究中取得较快进展。转移性肿瘤细胞的细胞膜可能具有“可兴奋性”,功能性的 VGSCs 表达可使肿瘤细胞兴奋并加速其转移过程。有证据表明,VGSCs 的激动剂促进肿瘤细胞的转移[4]。高转移性大鼠前列腺癌细胞(Mat-LyLu 细胞)及高转移性人前列腺癌细胞(PC3 细胞)分别相对于弱转移性 AT-2 细胞及 LNCaP 细胞,其 VGSCs 的 α 亚单位 SCN9A(Nav1.7) mRNA 表达上调到 1 000 倍[5]。同时发现,TTX 敏感的钠离子电流仅存在于高转移性前列腺癌细胞上[6]。

针对前列腺癌及其他肿瘤的 VGSCs 功能与肿瘤转移的密切相关性,一些药物作为 VGSCs 通道阻断剂而抑制肿瘤转移。研究显示,TTX 可抑制多种人类及啮齿类动物的乳腺癌、前列腺癌及肺癌细胞的转移[2]。抗惊厥药苯妥因(VGSCs 阻断剂)抑制前列腺癌细胞分泌前列腺特异抗原 PSA 及 IL-6[7]。目前,针对转移性乳腺癌 VGSCs 的 α 亚单位 Nav1.5 的研究获得进展,认为 Nav1.5 可作为乳腺癌新的药物靶标[9],而 Nav1.7 是前列腺癌的选择性及敏感性指标。体内研究显示,人体前列腺癌病理切片的实时定量 PCR 发现 Nav1.7 的 mRNA 表达水平显著上调[10],前列腺癌组织的基因芯片检测结果同样显示 VGSCs 的表达上调。因而以 Nav1.7 作为转移性前列腺癌新的药物靶标是新药研发的一个新的方向[11]。

人工合成的小分子化合物是肿瘤化疗药物的重要来源。通过计算机辅助药物设计(computer-aided drug design,CADD)出针对靶标的结构模拟化合物,人工合成后,经体内外药效学、毒理学、临床前药理学等研究,同时在此过程中不断进行化合物改构,希望找到抑制肿瘤生长的化合物。

本研究以前列腺癌细胞钠离子通道为靶标,利用 3D 的 CoMFA 构效关系结构模拟软件,在前期人工化学合成了一系列的钠离子通道胺类配体,得到 7 种化合物:S1127、S1156、S1169、S1170、S1178、S1180、S1182。通过前列腺癌细胞的体外模型来研究人工合成的胺类配体抑制前列腺癌细胞生长的效果,以筛选出高效的抑制前列腺癌细胞生长的化学备选药物。实验结果显示 S1127、S1156、S1169、S1180,尤其是 S1180 对前列腺癌细胞的杀伤作用强,以 PC3 细胞更加敏感。随后我们通过 Transwell 侵袭实验检测 S1180 对 PC3 细胞侵袭能力的影响,用流式细胞仪检测其促进细胞凋亡及阻滞细胞周期的能力,以及它对 Nav 1.7 蛋白表达的影响,提示此药物可能成为治疗 HRPC 的一种药物,但需要更多后续实验的深入研究。

综上所述,钠离子通道胺类配体中 S1127、S1169、S1180 这 3 种化合物均在≤17 μmol/L 浓度内表现出对前列腺癌细胞株(PC3 细胞、DU145 细胞)有明显的生长抑制作用,并且 S1180 能有效影响细胞侵袭,促进细胞凋亡,阻断细胞周期进展,下调细胞 Nav 1.7 蛋白表达,为 SCALs 成为抗肿瘤药物奠定坚实基础。

参考文献:

[1] Bubendorf L, Schopfer A, Wagner U, *et al*. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1, 589 patients[J]. Hum Pathol, 2000, 31(5): 578 - 583.

[2] Suy S, Hansen T P, Auto H D, *et al*. Expression of Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.8 in Human Prostate Cancer is Associated with High Histological Grade[J]. J Clin Exp Oncol, 2012, 1(2): 1000102.

[3] Brown M L, Eidam H A, Paige M, *et al*. Comparative molecular field analysis and synthetic validation of a hydroxyamide-propofol binding and functional block of neuronal voltage-dependent sodium channels [J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17(19): 7056 - 7063.

[4] Gillet L, Roger S, Besson P, *et al*. Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(13): 8680 - 8691.

[5] Fraser S P, Diss J K, Chioni A M, *et al*. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(15): 5381 - 5389.

[6] Yildirim S, Altun S, Gumushan H, *et al*. Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis *in vivo*[J]. Cancer Lett, 2012, 323(1): 58 - 61.

[7] Brackenbury W J, Djamgoz M B. Activity-dependent regulation of voltage-gated Na^+ channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line[J]. J Physiol, 2006, 573(Pt 2): 343 - 356.

[8] Davis G C, Kong Y, Paige M, *et al*. Asymmetric synthesis and evaluation of a hydroxyphenylamide voltage-gated sodium channel blocker in human prostate cancer xenografts[J]. Bioorg Med Chem, 2012, 20(6): 2180 - 2188.

[9] Onkal R, Djamgoz M B. Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 625(1/3): 206 - 219.

[10] Diss J K, Stewart D, Pani F, *et al*. A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression *in vivo* [J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2005, 8(3): 266 - 273.

[11] Patino G A, Isom L L. Electrophysiology and beyond: multiple roles of Na^+ channel β subunits in development and disease[J]. Neurosci Lett, 2010, 486(2): 53 - 59.

(收稿:2013-10-11;修回:2013-11-15)

(编辑 汪勤俭)