



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2024.01.09

文章编号: 2095-1264(2024)01-0053-06

新型双胍衍生物 1-正戊基-5-(4-三氟甲氧基苯基)双胍联合奥希替尼抑制膀胱癌细胞增殖^{*}

彭妍, 周晓辰[#], 谢乐静, 章行健, 肖迪^{*}, 杨小平^{*}

(湖南师范大学医学院小分子靶向药物研究与创制湖南省重点实验室, 湖南长沙, 410013)

摘要: **目的** 探讨新型双胍衍生物 1-正戊基-5-(4-三氟甲氧基苯基)双胍(5C)、奥希替尼单用及联用对膀胱癌的抑制作用及机制。**方法** 采用 MTT 实验、细胞克隆实验检测 5C、奥希替尼单用及联用对膀胱癌细胞增殖、集落形成的影响。采用 Western blotting 检测 5C 联合奥希替尼对表皮生长因子受体(EGFR)及其下游信号通路的影响。**结果** 5C、奥希替尼单用均可显著抑制膀胱癌细胞增殖和集落形成,且二者联用能更好地抑制膀胱癌细胞的增殖与集落形成能力。机制研究表明,5C 与奥希替尼联用能显著抑制 EGFR 及其下游信号通路 Akt/Erk 的磷酸化。**结论** 5C 联合奥希替尼可通过下调 EGFR 及其下游信号通路抑制膀胱癌细胞生长。

关键词: 膀胱癌; 奥希替尼; 双胍类衍生物; 联合用药; EGFR

中图分类号: R737.14 **文献标识码:** A

A novel guanidine derivative 1-n-pentyl-5-(4-trifluoromethoxyphenyl) biguanide combined with osimertinib inhibited the proliferation of bladder cancer cells^{*}

PENG Yan, ZHOU Xiaochen[#], XIE Lejing, ZHANG Xingjian, XIAO Di^{*}, YANG Xiaoping^{*}

(Key Laboratory of Study and Discovery of Small Targeted Molecules of Hunan Province, School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha, 410013, Hunan, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect and mechanism of a novel guanidine derivative, 1-n-pentyl-5-(4-trifluoromethoxyphenyl) biguanide (5C) and osimertinib alone or in combination on bladder cancer. **Methods** MTT assay and cell colony formation assay were used to detect the effects of 5C and osimertinib alone or in combination on the proliferation and colony formation of bladder cancer cells. Western blotting was used to detect the effects of 5C combined with osimertinib on the epidermal growth factor receptor (EGFR) and its downstream signaling pathways. **Results** 5C or osimertinib alone significantly inhibited the proliferation and colony formation of bladder cancer cells, and the combination of 5C and osimertinib could better inhibit the proliferation and colony formation of bladder cancer cells. Mechanism studies showed that 5C combined with osimertinib could significantly inhibit the phosphorylation of EGFR and its downstream signaling pathway Akt/Erk. **Conclusion** 5C combined with osimertinib could inhibit the growth of bladder cancer cells by down-regulating EGFR and its downstream signaling pathway.

Keywords: Bladder cancer; Osimertinib; Guanidine derivative; Drug combination; EGFR

^{*}基金项目:国家级大学生创新创业训练计划支持项目(202210542030、S202310542006)。

作者简介:彭妍,女,本科生,研究方向:肿瘤药理及小分子靶向药物创制。

[#]并列第一作者:周晓辰,女,硕士研究生,研究方向:肿瘤药理及小分子靶向药物创制。

^{*}通信作者:肖迪,男,博士,实验师,研究方向:肿瘤药理及小分子靶向药物创制;杨小平,男,博士,教授,研究方向:肿瘤药理及小分子靶向药物创制。

0 前言

膀胱癌是指发生于膀胱黏膜的恶性肿瘤,是泌尿系统最常见的恶性肿瘤。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)发布的2020年全球癌症统计数据显示,膀胱癌的发病率居第十位,而且在男性中其新发病例与死亡率均位于前十^[1]。近年来,膀胱癌发病率不断增长^[2],各种治疗手段也层出不穷。膀胱癌分为非肌层浸润型和肌层浸润型,目前的主要治疗措施是手术治疗,如激光、电切、全膀胱切除等,但均具有较高的复发率及严重的不良反应,且患者在手术治疗后还需要进行药物灌注以预防复发^[3]。自从30多年前卡介苗免疫保守治疗发展以来,很少有新的膀胱癌治疗方法被发现,而目前全球正在面临着卡介苗短缺的问题^[4]。因此,寻找治疗膀胱癌的新型药物十分重要。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)家族是一类重要的酪氨酸激酶受体,可通过介导细胞外信号的反应调控细胞增殖、分化和迁移,在膀胱癌、肺癌、肠癌、头颈部肿瘤等多种肿瘤组织中高表达^[5]。研究表明,EGFR下游信号通路PI3K/Akt/mTOR及RAS/RAF/Erk异常激活可促进细胞生长和增殖^[6-7]。以奥希替尼为主的第三代EGFR-酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)具有强效的不可逆性和选择性,对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)具有良好的治疗效果^[8-9],但在膀胱癌中暂无相关报道。

以二甲双胍为主的双胍类药物是目前临床治疗2型糖尿病的一线用药。近年来,在肿瘤细胞体外实验和小鼠实验中发现,双胍类药物具有显著的抗肿瘤作用^[10]。尽管目前已有大量研究结果证实二甲双胍治疗膀胱癌有显著疗效^[11-12];并且二甲双胍联合EGFR通道阻滞剂吉非替尼对NSCLC合并2型糖尿病患者预后影响的研究结果表明,二甲双胍既可延长患者的生存期,也可延缓吉非替尼获得性耐药的发生进程^[13];二甲双胍联合厄洛替尼对人肺癌细胞也表现出良好的抑制作用^[14],但目前二甲双胍治疗膀胱癌的适应证仍未获批。最主要的原因是,二甲双胍发挥抑制肿瘤作用的最低浓度为 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,而二甲双胍多采用传统的口服给药,这种给药模式使膀胱局部有效药物浓度低于治疗浓度,无法达到抑制膀胱癌细胞生长所需浓度^[15],并且口服二甲双胍会导致血液中乳酸含量增加,造成

乳酸中毒^[16]。

为了优化双胍类药物,本实验室前期合成了一系列新型含氟双胍衍生物,并发现新型双胍衍生物1-正戊基-5-(4-三氟甲氧基苯基)双胍(5C)对膀胱癌具有极好的生物活性。本研究旨在研究5C、奥希替尼单用及联用对于膀胱癌的抑制作用和机制。

1 材料与方法

1.1 化学合成

将50 g (0.56 mol) $\text{NaN}(\text{CN})_2$ 溶于430 mL水中配制成溶液,在80 °C条件下加入4-三氟甲氧基苯胺溶液[将45 g (0.3 mol) 4-三氟甲氧基苯胺溶于132 mL水和23.5 mL浓HCl],维持80 °C持续反应1 h。待反应液中逐渐析出白色粉末状固体,TLC检测显示反应液中不含4-三氟甲氧基苯胺,即为反应结束。将反应液过滤、真空干燥,得1-(4-三氟甲氧基)苯基-3-氰基胍,收率为95.5%。

在25~35 °C条件下将9.12 g (0.04 mol) 1-(4-三氟甲氧基)苯基-3-氰基胍边搅拌边加入48 mL四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)和40 mL水中,随后加入6.8 g (0.085 mol)五水硫酸铜和16 mL(0.16 mol)正戊胺,加热至40 °C,持续搅拌反应。TLC检测显示反应液中不含1-(4-三氟甲氧基)苯基-3-氰基胍后,减压蒸馏将四氢呋喃蒸干。待反应物冷却至25~30 °C,加入HCl溶液(取20 mL浓HCl溶于32 mL水)并搅拌30 min,滴加冷却的氨性乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)溶液[32 mL水、15 mL氨水(25%) and 14 g EDTA二钠盐]至反应混合物中,保持温度为15~20 °C,然后在相同温度下搅拌30 min。过滤分离的产物,用冷水反复洗涤,90~95 °C干燥,得到白色固体6.85 g,收率为56.9%。

1.2 细胞培养与处理

本研究所使用的膀胱癌细胞株T24和J82均购自上海赛百慷生物。将细胞培养于37 °C、5% CO_2 恒温培养箱中。传代时,首先去除培养瓶中的原有培养基,PBS清洗2遍,加入适量胰蛋白酶并使其均匀覆盖培养瓶底部,置于培养箱中约1 min。待细胞消化完成后,加入适量完全培养基,吹打均匀瓶内细胞,再全部转移至15 mL离心管中, $1\ 200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min。弃上清,用培养基再次将沉淀细胞吹打均匀后转移至新培养瓶中,再加适量培养基用于传代;保留对数生长期细胞用于后续实验种板。

1.3 MTT实验

将细胞以 6.0×10^3 个/孔加入 96 孔板,在含 10% 胎牛血清的培养基中培养 12 h 后,单独用药组分别使用 0.5 、 1 、 2 、 4 、 $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5C、奥希替尼处理;联合用药组使用 0 、 1 、 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5C 和 0.5 、 1 、 2 、 4 、 $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的奥希替尼处理 72 h。随后,将 MTT(Sigma 公司)溶于 PBS 使其终浓度为 $2 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,取 $50 \mu\text{L}$ 加入 96 孔板,孵育 5 h。最后,向平板中加入 $150 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解晶体,用酶标仪(BioTek 公司)测定 490nm 波长处吸光度。

1.4 克隆实验

将细胞以 8.0×10^3 个/孔加入 24 孔板中培养 24 h 后,单独用药组分别使用 0 、 1 、 2 、 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5C、奥希替尼处理细胞,联合用药组使用 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5C 和奥希替尼处理细胞,继续培养 6~8 d。随后,去除 24 孔板中的培养基和药物,并用 PBS 清洗剩余的死细胞。向孔中加入 10% 甲醛溶液固定细胞 1 h,最后加入 0.1% 结晶紫观察 1 h,用酶标仪测定 550nm 波长处吸光度。

1.5 Western blotting

分别使用 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5C、奥希替尼单独或联合处理细胞,提取细胞中的总蛋白,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白,然后转移到聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,加入 5% 脱脂牛奶封闭,然后与 p-EGFR、p-Akt、p-Erk1/2 和 β -actin 在 4°C 下孵育过夜, TBST 洗涤 30 min 后加二抗孵育, PBS 冲洗, Chemi-

Doc 系统观察抗原-抗体反应, Image J 定量条带强度。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析,实验数据以“均数 \pm 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5C 抑制膀胱癌细胞增殖与集落形成

MTT 结果显示,随着 5C 浓度增加,膀胱癌细胞增殖活力显著降低(图 1A),而克隆实验结果进一步证明 5C 可抑制膀胱癌细胞集落形成(图 1B),表明 5C 对膀胱癌细胞的增殖与集落形成能力有显著抑制作用。

2.2 奥希替尼抑制膀胱癌细胞增殖与集落形成

MTT 结果显示,经奥希替尼处理后,膀胱癌细胞增殖活力明显减弱,并呈浓度依赖性(图 2A);克隆实验结果显示,奥希替尼能够明显抑制膀胱癌细胞的集落形成能力,并与药物浓度呈正相关(图 2B),表明奥希替尼能够显著抑制膀胱癌细胞的增殖与集落形成能力。

2.3 5C 联合奥希替尼抑制膀胱癌细胞增殖与集落形成

MTT 结果显示,5C 与奥希替尼在多个联用浓度下对膀胱癌细胞的增殖均具有良好的抑制效果(图 3A~图 3D);克隆实验结果显示,联合用药能够更加明显地抑制膀胱癌细胞的集落形成能力(图 3E),表

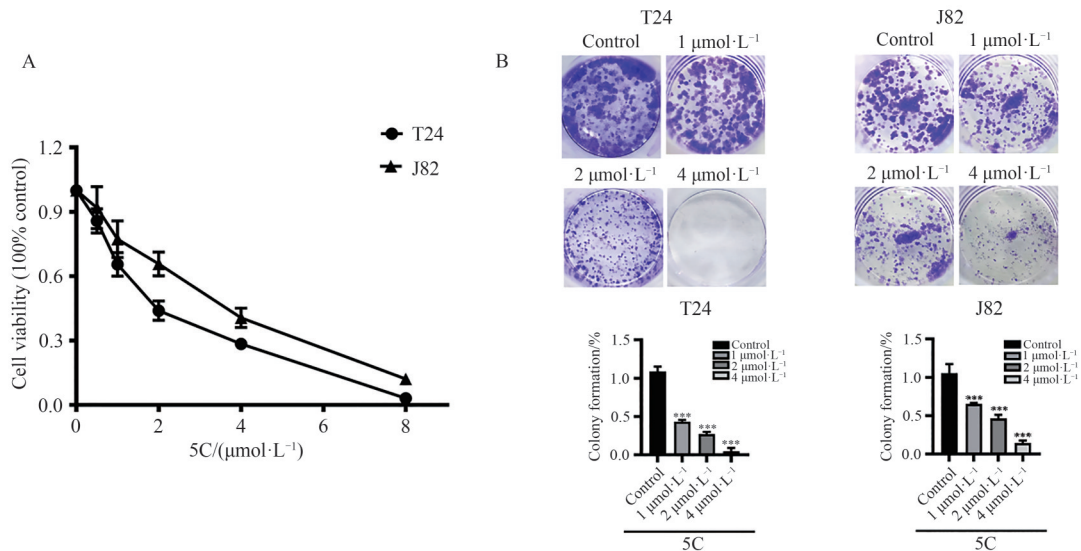


图 1 5C 抑制膀胱癌细胞增殖与活力($n=3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)

Fig. 1 5C inhibits the proliferation and viability of bladder cancer cell lines ($n=3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)

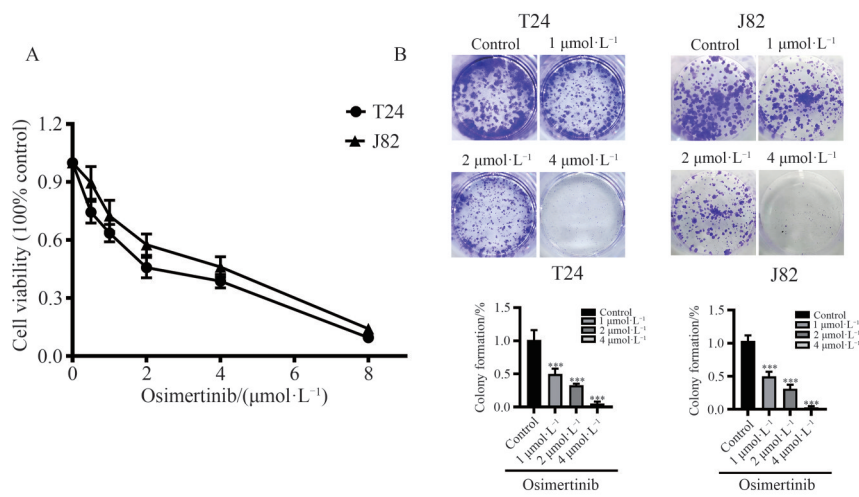


图 2 奥希替尼抑制膀胱癌细胞增殖与活力 ($n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$)

Fig. 2 Osimertinib inhibits the proliferation and viability of bladder cancer cell lines ($n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$)

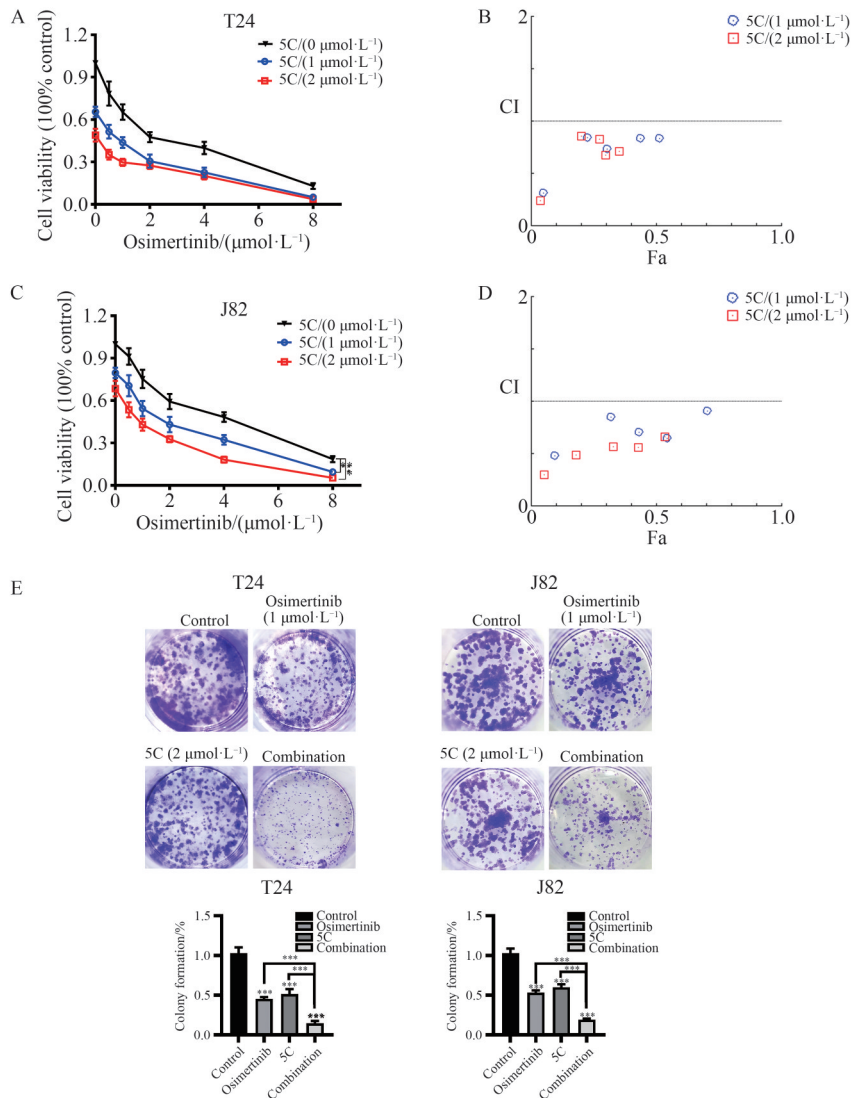


图 3 5C 增强膀胱癌细胞对奥希替尼的敏感性 ($n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$)

Fig. 3 5C enhances the sensitivity of bladder cancer cells to osimertinib ($n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$)

明 5C 联合奥希替尼是膀胱癌的潜在治疗方案。

2.4 5C 联合奥希替尼下调 EGFR 及其下游信号通路抑制膀胱癌细胞生长

Western blotting 结果表明, 5C 与奥希替尼均可

下调 EGFR 及 Akt、Erk1/2 的磷酸化水平, 且二者联用效果更为显著(图 4), 表明 5C 与奥希替尼可通过下调 EGFR 及其下游信号通路抑制膀胱癌细胞生长。

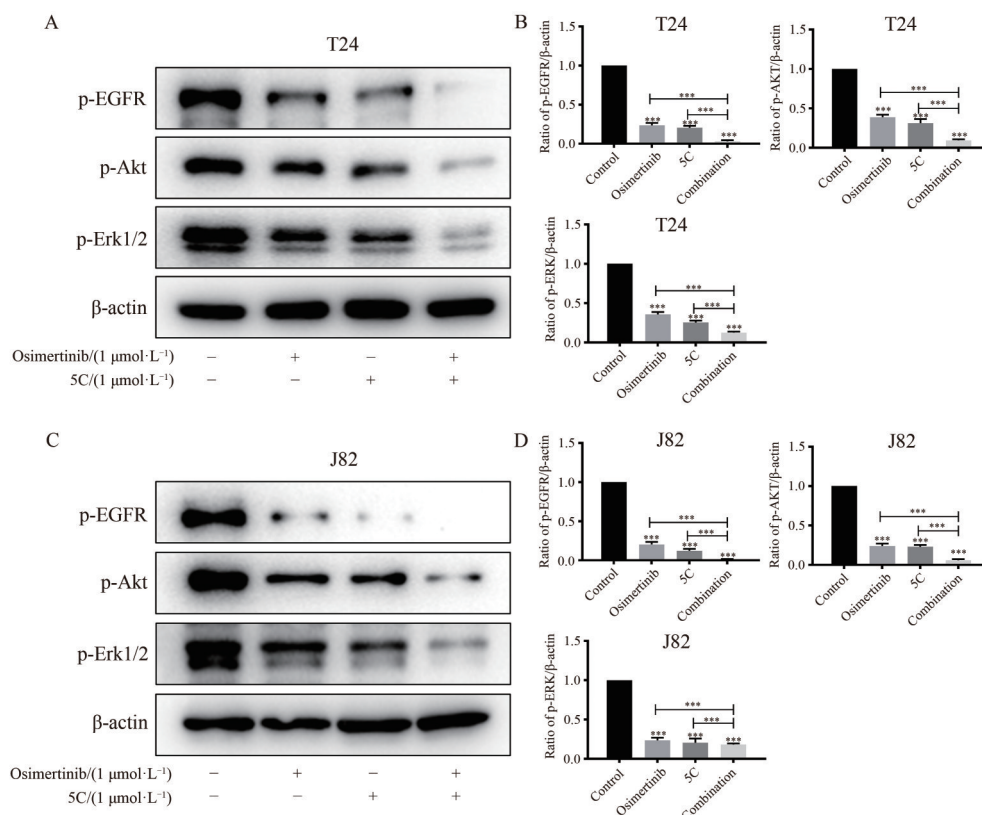


图 4 各组膀胱癌细胞中 p-EGFR、p-Akt、p-Erk1/2 蛋白表达水平比较 ($n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$)

Fig. 4 Comparison of the protein expression levels of p-EGFR, p-Akt, p-Erk1/2 in bladder cancer cells in different treatment groups ($n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$)

3 讨论

膀胱癌具有较高的发病率与死亡率。目前, 临床主要通过手术及卡介苗保守治疗等手段来治疗膀胱癌, 但复发率与不良反应发生率极高。近年来, 有研究表明, 双胍类药物对恶性肿瘤具有良好的抑制作用^[6]。双胍类药物因其治疗膀胱癌疗效好、不良反应少的优势而备受关注^[17]。本研究首先探究了实验室设计的新型双胍类衍生物 5C 对膀胱癌细胞的作用, 通过 MTT 实验和克隆实验观察到, 5C 既能够抑制膀胱癌细胞的增殖活力, 也能抑制其克隆形成能力, 且这种抑制作用呈现明显的浓度依赖性; Western blotting 结果显示, 5C 可以抑制 EGFR 的磷酸化, 从而下调其下游增殖相关蛋白 Akt、Erk 的磷酸化水平, 最终达到抑制膀胱癌细胞增殖的目的。

的。EGFR 家族是在肿瘤中研究比较多的一类重要的酪氨酸激酶受体 (receptor tyrosine kinase, RTK), 有研究表明其在膀胱癌组织中过表达^[18-19]。奥希替尼与 EGFR 相关基因结合后, 可以通过阻断突变 EGFR 同源二聚化或诱导 EGFR 突变细胞降解来阻断 EGFR 下游信号传递, 从而起到抑制肿瘤细胞生长的作用^[20], 但其在膀胱癌中的研究较少。为了探究奥希替尼在膀胱癌中的作用, 我们使用奥希替尼处理膀胱癌细胞, MTT 实验和克隆实验结果显示, 其能明显抑制膀胱癌细胞的增殖活力与集落形成能力, 并与浓度呈正相关; Western blotting 结果也表明, 奥希替尼可通过抑制 EGFR 及其下游信号通路抑制膀胱癌细胞增殖。由于 5C 及奥希替尼均通过抑制 EGFR 及其下游信号通路抑制膀胱癌细胞增殖, 我们进一步探讨了 5C 能否增强膀胱癌细胞对奥

希替尼的敏感性。正如我们预期的那样,5C 联合奥希替尼可进一步抑制膀胱癌细胞增殖。

综上所述,5C 联合奥希替尼可通过抑制 EGFR 及其下游信号通路的活化抑制膀胱癌细胞增殖,这可能为膀胱癌提供新的潜在治疗方案。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] LOBO N, AFFERI L, MOSCHINI M, et al. Epidemiology, screening, and prevention of bladder cancer [J]. Eur Urol Oncol, 2022, 5(6): 628–39. DOI: 10.1016/j.euo.2022.10.003.
- [3] DOBRUCH J, OSZCZUDŁOWSKI M. Bladder cancer: current challenges and future directions [J]. Medicina, 2021, 57(8): 749. DOI: 10.3390/medicina57080749.
- [4] GONTERO P, BOHLE A, MALMSTROM P U, et al. The role of Bacillus Calmette–Guérin in the treatment of non–muscle–invasive bladder cancer [J]. Eur Urol, 2010, 57(3): 410–429. DOI: 10.1016/j.eururo.2009.11.023.
- [5] WYKOSKY J, FENTON T, FURNARI F, et al. Therapeutic targeting of epidermal growth factor receptor in human cancer: successes and limitations [J]. Chin J Cancer, 2011, 30(1): 5–12. DOI: 10.5732/cjc.010.10542.
- [6] PENG M, HUANG Y J, TAO T, et al. Metformin and gefitinib cooperate to inhibit bladder cancer growth via both AMPK and EGFR pathways joining at Akt and Erk [J]. Sci Rep, 2016, 6: 28611. DOI: 10.1038/srep28611.
- [7] HOWE L R, BROWN P H. Targeting the HER/EGFR/ErbB family to prevent breast cancer [J]. Cancer Prev Res, 2011, 4(8): 1149–1157. DOI: 10.1158/1940–6207.CAPR–11–0334.
- [8] 国家卫生健康委员会. 新型抗肿瘤药物临床应用指导原则(2020 年版) [EB/OL]. (2020–12–30) [2021–02–18]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7659/202012/6c00e8559ee54cd29585c7f39e8a23c4.shtml>.
- [9] 钟锐, 邹麟, 江美林, 等. EGFR-TKIs 获得性耐药的机制及其治疗的研究进展[J]. 肿瘤药学, 2017, 7(6): 641–647. DOI: 10.3969/j.issn.2095–1264.2017.06.01.
- [10] ZHAO H Y, SWANSON K D, ZHENG B. Therapeutic repurposing of biguanides in cancer [J]. Trends Cancer, 2021, 7(8): 714–730. DOI: 10.1016/j.trecan.2021.03.001.
- [11] ZHANG T, GUO P, ZHANG Y, et al. The antidiabetic drug metformin inhibits the proliferation of bladder cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(12):24603–24618. DOI: 10.3390/ijms141224603.

- [12] SAYYID R K, FLESHNER N E. Potential role for metformin in urologic oncology [J]. Investig Clin Urol, 2016, 57(3):157–164. DOI:10.4111/icu.2016.57.3.157.
- [13] CHEN H Y, YAO W X, CHU Q, et al. Synergistic effects of metformin in combination with EGFR-TKI in the treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer and type 2 diabetes [J]. Cancer Lett, 2015, 369(1): 97–102. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.08.024.
- [14] 赵清梅, 王瑜, 彭鹏, 等. 厄洛替尼联合二甲双胍对肺癌细胞的抑制作用及其凋亡机制研究[J]. 肿瘤药学, 2020, 10(4): 423–428. DOI: 10.3969/j.issn.2095–1264.2020.04.08.
- [15] CHEN Y Q, CHEN G. Combined therapeutic effect and molecular mechanisms of metformin and cisplatin in human lung cancer xenografts in nude mice [J]. J Cancer Res Ther, 2015, 11(2): 324–330. DOI: 10.4103/0973–1482.151444.
- [16] NANGIA-MAKKER P, YU Y J, VASUDEVAN A, et al. Metformin: a potential therapeutic agent for recurrent colon cancer [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84369. DOI: 10.1371/journal.pone.0084369.
- [17] FENG Y Z, JIA B Z, SHEN Z Y. Metformin and bladder cancer: drug repurposing as a potential tool for novel therapy: a review [J]. Medicine, 2022, 101(45): e31635. DOI: 10.1097/MD.00000000000031635.
- [18] REBOUSSOU S, BERNARD-PIERROT I, DE REYNIÈS A, et al. EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype [J]. Sci Transl Med, 2014, 6(244): 244ra91. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008970.
- [19] CHOW N H, CHAN S H, TZAI T S, et al. Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(7): 1957–1962.
- [20] REMON J, STEUER C E, RAMALINGAM S S, et al. Osimertinib and other third-generation EGFR TKI in EGFR-mutant NSCLC patients [J]. Annals of Oncology, 2018, 29(suppl_1): i20–i27. DOI:10.1093/annonc/mdx704.

校稿: 刘颖 李征

本文引用格式: 彭妍, 周晓辰, 谢乐静, 等. 新型双胍衍生物 1-正戊基-5-(4-(3-氟甲氧基苯基)双胍)联合奥希替尼抑制膀胱癌细胞增殖[J]. 肿瘤药学, 2024, 14(1): 53–58. DOI: 10.3969/j.issn.2095–1264.2024.01.09.

Cite this article as: PENG Yan, ZHOU Xiaochen, XIE Leijing, et al. A novel guanidine derivative 1-n-pentyl-5-(4-trifluoromethoxyphenyl) biguanide combined with osimertinib inhibited the proliferation of bladder cancer cells[J]. Anti-tumor Pharmacy, 2024, 14(1): 53–58. DOI: 10.3969/j.issn.2095–1264.2024.01.09.