

## · 论著 ·

## 靶向肺癌干细胞的海绵抗肿瘤活性化合物的发现

刘 曼,刘丽云,孙 凡,林厚文(上海交通大学医学院附属仁济医院药学部,上海 200127)

**[摘要]** **目的** 追踪并分离海绵 *A aptos aptos* 中靶向抑制肺癌干细胞的活性化合物。**方法** 首先构建肺癌干细胞 A549-Nanog-GFP 的药物筛选模型,用 Western blot 和免疫荧光验证构建的肺癌干细胞模型中干性基因的表达。利用肺癌干细胞模型对海绵 *A aptos aptos* 二氯甲烷萃取物的 8 个组分进行活性初筛,采用多种色谱分离手段对活性部位进行分离,用 CCK8 法对分离得到的化合物进行体外抗肺癌干细胞活性筛选。**结果** 成功构建了高表达 CD44 和 ALDH1A1 蛋白的肺癌干细胞模型;初筛发现组分 D6 具有显著的肺癌干细胞抑制活性( $P < 0.01$ );从组分 D6 中分离得到 4 个 aaptamine 类生物碱,化合物 AP-1 具有显著的抗肺癌干细胞活性( $P < 0.01$ ),其  $IC_{50}$  值为  $(3.84 \pm 0.12) \mu\text{mol/L}$ 。**结论** 海绵 *A aptos aptos* 提取物中分离得到的 aaptamine 类生物碱 AP-1 具有良好的抗肺癌干细胞活性。

**[关键词]** aaptamine 类生物碱;肺癌干细胞;增殖;AP-1

**[中图分类号]** R284;R734

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2017)04-0304-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.005

## The discovery of antitumor compounds from marine sponge targeting lung cancer stem cells

LIU Man, LIU Liyun, SUN Fan, LIN Houwen (Department of Pharmacy, Renji Hospital Affiliated to School of Medicine, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200127, China)

**[Abstract]** **Objective** To screen the active compounds targeting lung cancer stem cells (LCSCs) from the sponge *A aptos aptos*. **Methods** The A549-Nanog-GFP model of LCSCs was constructed. Western blot and immunofluorescence were used to examine the expression of pluripotency markers in screening model. The established LCSCs model was used to screen 8 fractions of *A aptos aptos* dichloromethane extract. The active fraction was separated by various chromatographic methods. CCK8 assay was used to screen the compounds for anti-LCSCs activity *in vitro*. **Results** LCSCs model with high expression of CD44 and ALDH1A1 protein was successfully constructed. The fraction D6 showed significant inhibitory activity in LCSCs ( $P < 0.01$ ). Four aaptamine alkaloids were isolated from this fraction. Compound AP-1 has good activity against LCSCs ( $P < 0.01$ ) with  $IC_{50}$  value  $(3.84 \pm 0.12) \mu\text{mol/L}$ . **Conclusion** AP-1 isolated from the sponge *A aptos aptos* exhibited significant activity against LCSCs.

**[Key words]** aaptamine alkaloid; lung cancer stem cell; proliferation; AP-1

我国肺癌的发病率和病死率位居所有肿瘤前列,且肺癌的治疗困难重重。肺癌干细胞(lung cancer stem cells, LCSCs)是肿瘤耐药、复发及转移的重要原因<sup>[1,2]</sup>。最早报道的肺癌干细胞是 Kim 等<sup>[3]</sup>从小鼠支气管肺泡导管连接处分离出一群  $Sca^+ CD45^- Pecam^- CD34^+$  的细胞,命名为支气管

肺泡干细胞(ronchioalveolar stem cells, BASCs)。研究者对 ALDH1 和 CD44 均高表达( $ALDH1^+ CD44^+$ )的肺癌细胞进行分析,发现该细胞亚群的干细胞特性表型均强于  $ALDH1^+ CD44^-$ 、 $ALDH1^- CD44^+$ 、 $ALDH1^- CD44^-$  及未分选的细胞群,并且  $ALDH1^+ CD44^+$  细胞具有更强的致瘤性,且对化疗抵抗<sup>[4]</sup>。将干性基因 *SSEA1*、*Nanog*、*Oct4* 等导入肿瘤细胞,获得干细胞样肿瘤细胞作为体外药物筛选模型技术已日趋成熟<sup>[5]</sup>。Chiou 等<sup>[6]</sup>在体外共表达 *Nanog* 和 *Oct4* 于肺腺癌细胞,该细胞表现出明显的干细胞特性,具有较强的体内成瘤能力及诱导细胞发生上皮细胞间质化改变。因此,利用高表达干细胞标志物的肺癌细胞对靶向肺癌干细胞进行药

**[基金项目]** 国家自然科学基金-联合基金项(U1605221);国家自然科学基金青年基金项目(81502936);上海交通大学医学院转化医学协同创新中心(TM201509)

**[作者简介]** 刘 曼,硕士研究生。研究方向:药理学。Tel: (021) 68383339; Email: cpuliuman@126.com

**[通讯作者]** 孙 凡,博士,助理研究员。研究方向:药理学。Tel: (021)68383339; Email: sunfan2017@163.com

物筛选与研究更有意义。

海绵属于多孔动物门(Porifera),是最原始的多细胞动物。在其漫长的生存竞争过程中,为了捕食、争夺领地、驱赶捕食者,形成了复杂而强大的化学防御体系,体内产生并积累了大量具有特殊化学结构和生理活性的次生代谢产物,已成为海洋抗肿瘤活性先导化合物的首要来源<sup>[7,8]</sup>。在国内外已上市的7个海洋药物分子中,有3种源自海绵:Ara-A、Ara-C和Halaven<sup>[9]</sup>。随着肿瘤干细胞筛选模型的日渐成熟,从海绵中发现新型靶向干细胞的抗肿瘤先导化合物具有重要的临床价值和良好的应用前景。本研究通过构建肺癌干细胞模型,对海绵 *Aaptos aaptos* 提取物进行活性筛选,并进一步对活性部位进行分离筛选,最终得到1个具有显著抗肺癌干细胞活性的 *aapatmine* 类生物碱。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 海绵 *Aaptos aaptos* 二氯甲烷层的8个组分及化合物单体由本课题组提供;人肺癌细胞株 A549(上海中科院细胞库);F12K 培养基、胎牛血清、谷氨酰胺、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);DM-SO 和嘌呤霉素(美国 Sigma 公司);CCK8(日本东仁化学公司);shRNA-Nanog-GFP(上海吉玛制药有限公司);Polybrene 助转剂(美国 Snata Cruz 公司);ALDH1A1、CD44、Nanog、GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(美国 CST 公司)。生物安全柜(美国 Thermo Fisher 公司);二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司);多功能酶标仪 SpectraMax M3(美国 Molecular Devices 公司);Odyssey 双色红外成像系统(美国 LI-COR 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 肺癌干细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 谷氨酰胺的 F12K 培养基(37 °C 培养箱, 5% CO<sub>2</sub>)。

**1.2.2 慢病毒转染稳定高表达 Nanog-GFP 于 A549 细胞系** 将生长稳定的 A549 细胞以  $1 \times 10^4$  /孔铺于 6 孔板中,使细胞在慢病毒转染时的融合度在 50% 左右。24 h 后,用含 6 μg/ml polybrene 的 1 ml 新鲜培养基替换原培养基,加入适量病毒悬液,37 °C 孵育。4 h 后加入 1 ml 新鲜培养基以稀释 polybrene。继续培养 24 h,用新鲜培养基替换含有病毒的培养基。一般转染 48 h 后可见明显荧光表达,72 h 后更加明显。如需 FACS 检测转染效率,可在转染后 72 ~ 96 h 进行。24 孔板中,每孔加入

嘌呤霉素杀死未转染细胞。使用无嘌呤霉素培养基,继续培养,每隔 1 周需加嘌呤霉素杀死未转染细胞。

**1.2.3 免疫荧光染色** 将合适浓度的细胞悬液接种于 10 mm 培养皿中,培养过夜后加入预热的 4% 多聚甲醛,室温固定 10 min。弃掉固定液,洗涤 2 次。加入 0.4% Triton-X100 通透液,室温孵育 15 min。加入 1% BSA 封闭,湿盒中 37 °C 孵育 30 min。过夜孵育一抗(Nanog)。洗涤 3 次,荧光二抗湿盒中避光孵育 1 h。再洗涤 3 次。加入含 DAPI 的封片剂(mounting medium)500 μl,静置 10 min 左右,4 °C 避光保存,防止荧光淬灭。于暗处用荧光显微镜观察。

**1.2.4 Western blot 检测 Nanog、CD44、ALDH1A1 的表达水平** 提取各组细胞蛋白,通过 BCA 法进行蛋白定量,蛋白变性后上样、电泳,待溴酚蓝接近胶底部时停止、转膜,室温用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,PBS 洗 3 次,4 °C 过夜孵育一抗(Nanog、CD44、ALDH1A1、GAPDH),洗膜,二抗室温摇床上孵育 1 h 后,经 ECL 显色并应用 Quantity One 软件进行分析。

**1.2.5 CCK8 法检测细胞增殖活力** 将  $5 \times 10^3$  个/孔细胞接种于 96 孔板中,每孔 100 μl。细胞培养过夜后加入等比稀释的组分或化合物并设置空白组。每组 6 个复孔,作用 72 h 后,弃培养基。每孔加入 10 μl 的 CCK8 溶液,培养箱内孵育 0.5~1 h,用酶标仪测定在 450 nm 下的吸光度(A)值。细胞存活率(%)=(加药组 A 值-空白组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值)×100%。

**1.2.6 数据处理** 所有数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,使用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行统计学分析并制作图表。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnett's *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 高表达 Nanog-GFP 的 A549 细胞中干性标志物表达增加** 通过慢病毒转染稳定高表达 Nanog-GFP 于 A549 细胞系,筛选得到稳定表达 Nanog 的肺癌干细胞系。免疫荧光结果显示,与对照组 shRNA 相比,shRNA Nanog 慢病毒转染组中 95% 以上的 A549 细胞带绿色荧光,说明 Nanog-GFP 已成功转入 A549 细胞(图 1)。Western blot 检测发现,与对照组 shRNA 相比,shRNA Nanog 慢病毒转染组中 Nanog 蛋白水平显著增加,CD44 和 AL-

DH1A1 蛋白表达水平也相应提高 ( $P < 0.05$ ), 提示该类细胞具有肺癌干细胞特征(图 2)。

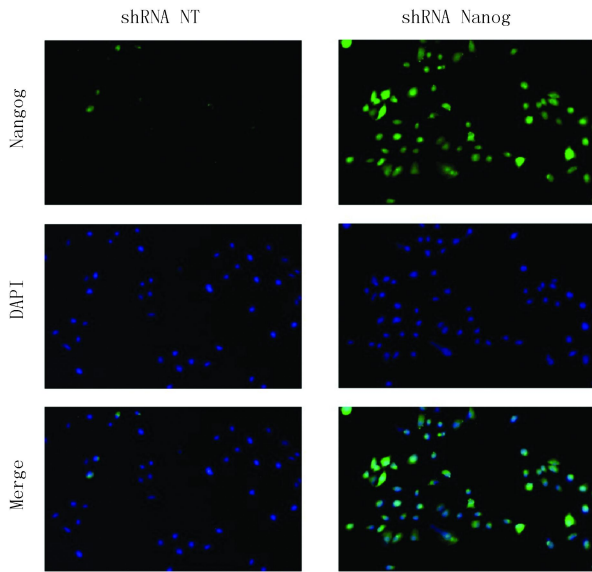


图 1 免疫荧光检测 A549-Nanog 中 Nanog 表达增加

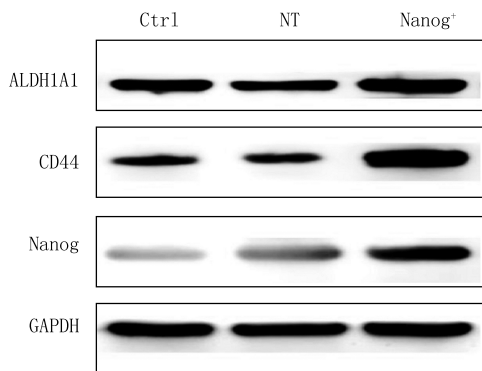


图 2 Western blot 检测 A549-Nanog 中干性标志物 ALDH1A1、CD44 和 Nanog 的表达

**2.2 二氯甲烷萃取物分离得到的 8 个组分抗肺癌干细胞的活性** 课题组前期研究发现 *Aaptos aaptos* 海绵中活性成分主要集中在低极性的二氯甲烷层, 经过减压柱分离得到 8 个组分 D1~D8, 不同浓度的组分 (1、10、100 mg/L) 作用于肺癌干细胞 48 h 后, 检测其细胞活力(图 3)。组分 D1~D5 对肺癌干细胞无明显的抑制作用; 组分 D6~D8 对肺癌干细胞有抑制作用, 组分 D6 的抑制作用最为显著。组分 D6 在浓度 1、10 和 100 mg/L 时, 对肺癌干细胞的抑制率分别为  $(23.07 \pm 1.8)\%$  ( $P < 0.01$ )、 $(60.46 \pm 0.9)\%$  ( $P < 0.01$ ) 和  $(85.67 \pm 1.2)\%$  ( $P < 0.01$ )。

**2.3 4 个 aapatmine 类生物碱对肺癌干细胞的抑制作用** 使用凝胶柱色谱、正相硅胶柱色谱、反相硅胶柱色谱以及高效液相色谱对组分 D6 进行分离, 得

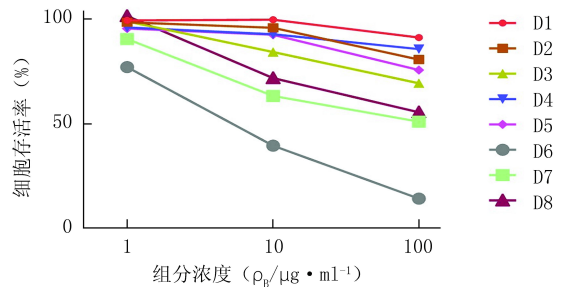


图 3 不同组分对肺癌干细胞增殖的影响

到 4 个 aapatmine 类生物碱 AP1~AP4, 其结构式见图 4。用不同浓度的 AP1、AP2、AP3 和 AP4 (0.37、1.11、3.33、10.00  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用肺癌干细胞 48 h, 检测其细胞活力。AP-1、AP-3 和 AP-4 对肺癌干细胞均有抑制作用, 其中 AP-1 的作用最明显(图 5)。AP-1 在浓度为 1.11、3.33 和 10.00  $\mu\text{mol/L}$  时, 对肺癌干细胞的抑制率分别为  $(14.67 \pm 0.3)\%$  ( $P < 0.05$ )、 $(42.13 \pm 0.8)\%$  ( $P < 0.01$ ) 和  $(91.57 \pm 2.8)\%$  ( $P < 0.01$ )。经计算, AP-1 作用肺癌干细胞 48 h 的  $\text{IC}_{50}$  值是  $(3.84 \pm 0.12) \mu\text{mol/L}$  (图 6)。

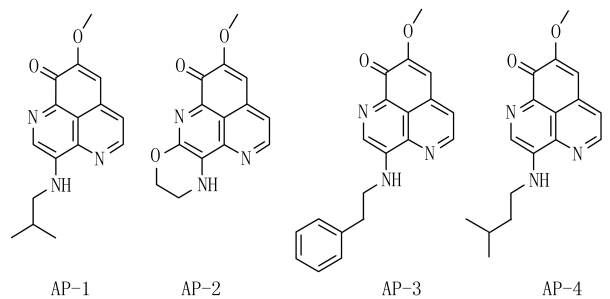


图 4 4 个 aapatmine 类生物碱的结构图

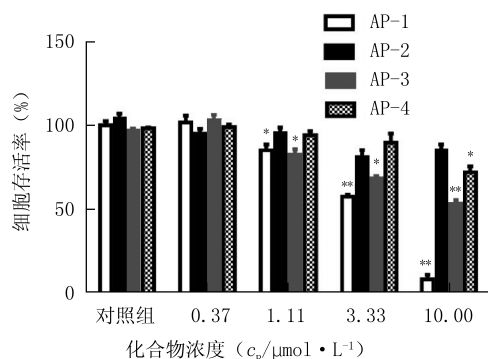


图 5 AP-1~AP-4 对肺癌干细胞增殖的影响  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与对照组比较

### 3 讨论

越来越多的研究证据表明, 肿瘤可能是一种干细胞疾病<sup>[10]</sup>。肿瘤细胞在增殖和分化方面与干细胞具有相似之处。自 Lapidot 首次基于特异细胞表面标志物分离出人急性粒细胞白血病干细胞以来,

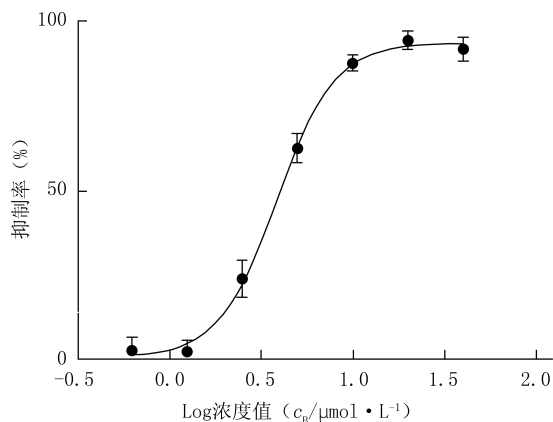


图6 AP-1对肺癌干细胞的抑制率曲线

研究者陆续从胶质瘤、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、结肠癌等临床肿瘤标本中鉴定出了具有特异表面标志物的肿瘤干细胞,为肿瘤干细胞在实体瘤中的存在提供了有力的证据<sup>[11]</sup>。

海绵作为海洋药物先导分子最丰富的来源之一,研究者从中分离得到了多种抗肿瘤效果显著的先导分子。但是,目前有关海绵来源具有肿瘤干细胞抑制活性的分子研究报道很少。2011年,Ottinger首次开展了海绵抗肿瘤干细胞活性研究。对采自地中海海域的11种海绵提取物进行了抗前列腺癌和胰腺癌肿瘤干细胞的活性筛选。结果表明,在0.2 mg/ml浓度下,11种海绵提取物均能有效抑制肿瘤干细胞 PaCa2 和 PC3 的生长。其中,海绵 *Crambe crambe* 的提取物活性最强,在 2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  浓度下依然具有显著的抑制作用,并对正常成纤维细胞和内皮细胞毒性较小。体内成瘤实验发现,该海绵提取物的抑瘤效果强于吉西他滨,两者联用时,体内肿瘤可被完全清除<sup>[10]</sup>。由此可见,从海绵中寻找具有靶向抑制肿瘤干细胞活性的药物先导分子具有较大的潜力和良好前景。本实验成功构建了稳定表达 Nanog-GFP 的肺癌干细胞 A549-Nanog-GFP 药物筛选模型,Western blot 结果表明,A549-Nanog-GFP 高表达 ALDH1A1 和 CD44 两种干性标记物。利用稳定表达 Nanog-GFP 的肺癌干细胞模型,对海绵 *Aptos aptos* 二氯甲烷层的8个馏分进行体外抗肿瘤干细胞活性评价,发现 D6 对肺癌干细胞有良好的抑制作用,提示 D6 中存在抑制肺癌干细胞的活性成分。使用多种色谱分离技术手段对组分 D6 进行分离,得到4个 aaptamine 类生物碱 AP1~AP4,对其进行体外抗肿瘤干细胞活性评价发现,AP-1 对肺癌干细胞增殖具有显著的抑制作用,IC<sub>50</sub> 值为  $(3.84 \pm 0.12) \mu\text{mol}/\text{L}$ 。课题组初步认

为 AP-1 具有靶向抑制肺癌干细胞的作用,其具体作用机制还需进一步研究。

综上所述,海绵 *Aptos aptos* 中分离筛选得到的 aaptamine 类生物碱 AP-1 具有靶向抑制肺癌干细胞的活性,这为从海绵中靶向筛选具有特异性抗肺癌干细胞的活性化合物提供了科研思路,进一步帮助研究人员了解海绵抗肿瘤活性的物质基础,丰富靶向肿瘤干细胞的药物分子来源,同时有望获得新型抗肺癌干细胞的先导分子。

### 【参考文献】

- [1] Kaiser J. The cancer stem cell gamble [J]. Science, 2015, 347 (6219): 226-229.
- [2] Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13 (10): 727-738.
- [3] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer [J]. Cell, 2005, 121 (6): 823-835.
- [4] Barr MP, Gray SG, Hoffmann AC, et al. Generation and characterisation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature [J]. PLoS ONE, 2013, 8 (1): e54193.
- [5] Nishi M, Akutsu H, Kudoh A, et al. Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell [J]. Oncotarget, 2014, 5 (18): 8665-8680.
- [6] Chiou SH, Wang ML, Chou YT, et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation [J]. Cancer Res, 2010, 70 (24): 10433-10444.
- [7] Roue M, Quevrain E, Domart-Coulon I, et al. Assessing calcareous sponges and their associated bacteria for the discovery of new bioactive natural products [J]. Nat Prod Rep, 2012, 29 (7): 739-751.
- [8] Martins A, Vieira H, Gaspar H, et al. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success [J]. Marine Drugs, 2014, 12 (2): 1066-1101.
- [9] Glaser KB, Mayer AM. A renaissance in marine pharmacology: from preclinical curiosity to clinical reality [J]. Biochem Pharmacol, 2009, 78 (5): 440-448.
- [10] Ottinger S, Kloppel A, Rausch V, et al. Targeting of pancreatic and prostate cancer stem cell characteristics by *Crambe crambe* marine sponge extract [J]. Int J Cancer, 2012, 130 (7): 1671-1681.
- [11] Deshmukh A, Deshpande K, Arfuso F, et al. Cancer stem cell metabolism: a potential target for cancer therapy [J]. Mol Cancer, 2016, 15 (1): 69.

【收稿日期】 2017-03-28 【修回日期】 2017-05-10  
【本文编辑】 李睿旻