

# 一种新型 PI3K 抑制剂 JN-65 的抗肿瘤活性及其分子模拟机制研究

柯 珂,蒋雯丽,王 雨,朱景宇\*,金 坚\*\*

(江南大学药学院药物设计与分子药理学实验室,无锡 214122)

**摘要** 在恶性血液肿瘤中,PI3K 信号通路往往呈现过度表达的紊乱状态,开发 PI3K 抑制剂治疗恶性血液肿瘤具有广阔的应用前景。本研究通过恶性血液肿瘤的特异性筛选,得到了一个 PI3K 靶向抑制剂 JN-65。MTT 检测发现 JN-65 可以有效抑制血液肿瘤的增殖,其中对白血病细胞特异性较强。体外酶活性检测发现 JN-65 对 PI3K 具有一定的抑制活性且对 PI3K $\gamma$  表现出较强的特异性抑制作用,Western blot 实验表明,JN-65 能有效抑制 PI3K/Akt 信号通路,细胞流式实验证明,JN-65 通过抑制 PI3K 信号通路有效地诱导肿瘤细胞的凋亡。本研究采用分子对接模拟方法研究 JN-65 与 PI3K 相互作用关系,在分子水平对 PI3K 的抑制机制进行了研究。JN-65 有望成为一个潜在的 PI3K 抑制剂,能特异性地抑制恶性血液肿瘤。

**关键词** PI3K 抑制剂;JN-65;恶性血液肿瘤;白血病;分子对接

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2019)04-0410-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190405

**引用本文** 柯珂,蒋雯丽,王雨,等.一种新型 PI3K 抑制剂 JN-65 的抗肿瘤活性及其分子模拟机制研究[J].中国药科大学学报,2019,50(4):410-416.

**Cite this article as:** KE Ke,JIANG Wenli,WANG Yu,*et al*. Study on the bioactivity against hematologic malignancies and theoretical binding mechanism of a novel PI3K inhibitor JN-65[J]. *J China Pharm Univ*,2019,50(4):410-416.

## Study on the bioactivity against hematologic malignancies and theoretical binding mechanism of a novel PI3K inhibitor JN-65

KE Ke,JIANG Wenli,WANG Yu,ZHU Jingyu\*,JIN Jian\*\*

*Laboratory of Drug Design and Molecular Pharmacology, School of Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China*

**Abstract** The PI3K signaling pathway is frequently over-expressed in a variety of hematologic malignancies, so the development of PI3K inhibitors for the treatment of hematologic malignancies has broad application prospects. In this study, a novel PI3K inhibitor, JN-65, was identified through the investigation effects in the inhibition to hematologic malignancies. By MTT assays, JN-65 was found to effectively suppress the proliferation of hematologic malignancies, especially leukemia cell lines. The cell-free enzymatic studies demonstrated that JN-65 could inhibit PI3K and specifically inhibited PI3K $\gamma$  at low micromolar concentrations. Western blot confirmed that JN-65 could effectively inhibit the PI3K/Akt signaling pathway and the flow cytometry assays verified that JN-65 could induce the apoptosis of tumor cells through the suppression of PI3K signaling pathway. Finally, the molecular docking simulation method was used to explore the interaction between JN-65 and PI3K, and the inhibition mechanism of PI3K was revealed at the molecular level. In general, JN-65 would be a potential PI3K inhibitor for the treatment of hematologic malignancies.

**Key words** PI3K inhibitor; JN-65; hematologic malignancies; leukemia; molecular docking

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21807049)

收稿日期 2019-03-18 通信作者 \* Tel:15850181870 E-mail:jingyuzhu@jiangnan.edu.cn

\*\* Tel:0510-85918219 E-mail:jinjian31@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 21807049)

恶性血液肿瘤 (hematological malignancies, HMs) 是由血液细胞恶性增殖引起的一大类血液疾病, 主要包括白血病 (leukemia)、淋巴瘤 (lymphomas) 以及多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM)。HMs 约占所有肿瘤疾病的 9%, 为第 4 大恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。HMs 的临床治疗目前仍以联合化疗为主, 如免疫调节剂 lenalidomid 以及蛋白酶体抑制剂 bortezomib 等。这些治疗方案虽然取得了一定的效果, 但是由于这类药物特异性缺失, 现已出现明显的多药耐药问题以及严重的不良反应, 因此新的治疗药物亟待开发<sup>[2]</sup>。研究表明, HMs 扩散迅速且经常规避治疗, 使得该类疾病难以治愈, 复发率较高, 因此防止血液肿瘤细胞的快速增殖成为该疾病治疗的一个重要手段。目前, HMs 特异性靶点的确定及靶向治疗成为新的研究方向。其中, 磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 信号通路因其对细胞的增殖、代谢、存活、抗凋亡的关键调控而备受关注<sup>[3]</sup>。大量研究表明, PI3K 的过度激活与多种肿瘤 (如乳腺癌、结直肠癌、肺癌、恶性血液肿瘤等) 的发生、发展和预后密切相关, 因此 PI3K 逐渐发展成为抗肿瘤领域的一个重要靶点<sup>[4-9]</sup>。PI3K 具有丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 激酶特性, 同时还具有磷脂酰肌醇激酶的活性。根据结构和底物特异性, PI3K 主要分为 I、II、III 类, 其中 I 类 PI3K 因其在肿瘤中的重要作用而受到最广泛的研究<sup>[10-11]</sup>。I 类 PI3K 又分为 I A 和 I B 两个亚类, 其中 I A 类主要由受体酪氨酸激活, 基于催化亚基的不同又分为 PI3K $\alpha$ 、PI3K $\beta$  和 PI3K $\delta$  3 个亚型; I B 类即为 PI3K $\gamma$  亚型, 由 G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 激活<sup>[12]</sup>。激活的 PI3K 将 PI(4,5)P<sub>2</sub> 转化为 PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, 从而募集 PDK1、Akt 等分子并使之磷酸化, 将活化信号向下传递, 从而影响细胞的生长、分裂、增殖和存活<sup>[13]</sup>。

在多种恶性血液肿瘤中, 如 T-细胞急性淋巴细胞白血病 (T-ALL)、急性髓系白血病 (AML)、多发性骨髓瘤 (MM) 中, PI3K 信号通路往往呈现过度表达的紊乱状态, 因此开发 PI3K 抑制剂治疗恶性血液肿瘤具有广阔的应用前景<sup>[14-16]</sup>。第一个成功上市的 PI3K 抑制剂为 idelalisib (CAL-101), 于 2014 年被 FDA 批准用于治疗慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 和小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL)<sup>[17]</sup>。随后, duvelisib (IPI-145) 也于 2018 年成功上市, 主要用

于治疗复发性或难治性滤泡性淋巴瘤<sup>[18]</sup>。因此本研究拟通过对本课题组前期工作得到的 82 个潜在 PI3K 抑制剂进行抗恶性血液肿瘤活性研究, 并采用计算机模拟的方法在分子水平研究活性化合物 JN-65 与 PI3K 的结合机制。

## 1 材 料

### 1.1 试 剂

82 个化合物购自美国 ChemBridge 公司; 阳性药 PI-103 (美国 Selleck Chemicals 公司); MTT 粉末 (美国 Sigma 公司); Annexin V-凋亡检测试剂盒 (美国 BD 公司); SDS-PAGE 上样缓冲液、蛋白裂解液 (上海碧云天生物技术公司); ADP-Glo 发光检测试剂盒 (美国 Promega 公司, 试剂盒含有 PI3K $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$  及 PIP2 底物蛋白); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (中国 Biosharp 公司); ECL 发光液 (上海 Tanon 公司); RPMI-1640 培养基、IMDM 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 抗体 Phospho-Akt Ser473、抗体 Total-Akt (上海 Abcam 公司); 抗体 GAPDH (美国 Proteintech 公司)。7-(1-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)-1(2H)-异喹啉酮 (JN-65, 美国 ChemBridge 公司)。

### 1.2 细胞株

白血病细胞 (HL-60、U937、K562、Jurkat), 多发性骨髓瘤细胞 (OCI-My5、KMS11、U266) 均购自 ATCC 细胞库。

### 1.3 仪器及计算软件

T7500 高性能计算工作站 (美国戴尔公司); Discovery Studio 3.5 (美国 Biovia 公司); PyMOL (美国 DeLano Scientific LLC 公司), Prism 分析软件 (美国 GraphPad Software 公司); 凝胶成像仪 (上海 Tanon 公司); Infinite 200 PRO 酶标仪 (中国 Tecan 公司); 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

## 2 方 法

### 2.1 细胞筛选模型建立

将白血病细胞 (HL-60、U937、K562、Jurkat) 和多发性骨髓瘤细胞 (OCI-My5、KMS11、U266) 复苏后, 分别加入含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基和含有 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基, 将细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。当

细胞的生长密度达到 70% ~ 80% 时, 收集后于 1 000 r/min 离心 5 min 后重悬传代培养。

## 2.2 MTT 方法测定化合物抑制细胞增殖

取细胞状态良好的恶性血液肿瘤细胞 U937 以密度为每毫升  $8 \times 10^4$  个细胞接种于 96 孔板, 每孔共 95  $\mu\text{L}$ 。将 82 个化合物溶液用培养基稀释至 10  $\mu\text{mol/L}$  分别以每孔 5  $\mu\text{L}$  加入含细胞的 96 孔板中, 后放入培养箱中孵育 72 h。培养结束后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 10  $\mu\text{L}$ , 继续孵育 4 h。随后每孔加入 DMSO 100  $\mu\text{L}$ , 培养箱中孵育过夜。最后在波长为 490 nm 处, 用酶标仪检测吸收度。

## 2.3 JN-65 抑制多种恶性血液肿瘤细胞的增殖

取细胞状态良好的多种恶性血液肿瘤细胞, 其中包括白血病细胞 (HL-60/U937/K562/Jurkat) 和多发性骨髓瘤细胞 (OCI-My5/KMS11/U266)。计数稀释后, 每种细胞以密度为每毫升  $8 \times 10^4$  个细胞接种于 96 孔板, 每孔共 95  $\mu\text{L}$ 。采用倍稀法稀释 JN-65 浓度 (0 ~ 25  $\mu\text{mol/L}$ ), 分别将药物 5  $\mu\text{L}$  加入到细胞孔板中, 放入培养箱中, 分别孵育 24、48 和 72 h。培养结束后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 10  $\mu\text{L}$ , 继续孵育 4 h。随后每孔加入 DMSO 100  $\mu\text{L}$ , 培养箱中孵育过夜。最后在波长为 490 nm 处, 用酶标仪检测吸收度。

## 2.4 体外酶活性实验检测 JN-65 的 PI3K 抑制活性

使用 ADP-Glo 试剂盒检测 JN-65 的 PI3K 抑制活性:首先设置 JN-65 终浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ , 采用倍稀法稀释 JN-65 浓度, 设置 10 个浓度梯度 (0 ~ 20  $\mu\text{mol/L}$ )。按照 ADP-Glo 试剂盒说明书分别配制 PI3K $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$  酶反应溶液, 每孔 2  $\mu\text{L}$ , 随后每孔加入 JN-65 0.5  $\mu\text{L}$ , 最后加入 PI3K 底物蛋白 PIP2 2  $\mu\text{L}$ , 空白组加入相应量的 DMSO, 所有溶液配制于 384 孔白板中并设置 3 个复孔;第二步加入 ATP 溶液 0.5  $\mu\text{L}$  启动反应, 室温孵育 45 min;随后加入 ADP-Glo 检测溶液 5  $\mu\text{L}$ , 室温孵育 40 min 后加入激酶检测缓冲液 10  $\mu\text{L}$ , 23 °C 孵育 50 min;最后, 利用酶标仪检测荧光信号强度, 使用 Prism 拟合  $\text{IC}_{50}$ 。

## 2.5 免疫印迹法检测 JN-65 抑制 PI3K/Akt 信号通路

将白血病细胞 Jurkat 培养于细胞培养瓶中, 待细胞密度为 80%, 收集离心处理后, 计数稀释至密度为每毫升  $2 \times 10^6$  个细胞接种于 6 孔板, 每孔共

2 mL。JN-65 浓度为:0, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{mol/L}$ 。共同孵育 24 h 后, 离心收集并用 4 °C PBS 重悬吹洗细胞两次。弃上清液加入细胞裂解液 100  $\mu\text{L}$ , 放置于冰上超声破碎, 随后 4 °C 静置反应 20 min。最后使用 4 °C 离心机, 12 000 r/min, 离心 20 min。

离心后取上清液, 用 BCA 蛋白浓度测试试剂盒测定蛋白浓度, 取总蛋白 30  $\mu\text{g}$  进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。上层浓缩选取 80 V 电泳 0.5 h, 下层分离胶选取 100 V 电泳 1 h, 转膜选取 100 V 电压运行 1 h, 5% 脱脂奶粉封闭 90 min, 一抗孵育 (Phospho-AKT<sup>Ser473</sup>, GAPDH), 4 °C 过夜, TBST 洗膜 4 次, 每次 10 min, 二抗孵育 60 min, TBST 洗膜 4 次, 每次 10 min。最后利用 ECL 发光显影液, 将 NC 膜放置于凝胶成像仪中发光成像。

## 2.6 细胞流式法检测 JN-65 对白血病细胞的促凋亡作用

将白血病细胞 Jurkat 培养于细胞培养瓶中, 待细胞密度为 80%, 收集离心处理后, 计数稀释至密度为每毫升  $1 \times 10^5$  个细胞接种于 12 孔板, 每孔共 1 mL。JN-65 以浓度梯度:0, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{mol/L}$  分别作用 24 h。先加入 Annexin V Binding Buffer 100  $\mu\text{L}$  重悬细胞, 再依次加入 Annexin V-FITC 溶液 5  $\mu\text{L}$  和 PI 溶液 5  $\mu\text{L}$ , 避光反应 10 min。打开流式细胞仪, 准备上样时, 每个样品加入结合缓冲液 200  $\mu\text{L}$  终止反应并重悬细胞, 开始检测。

## 2.7 计算机模拟 JN-65 与 I 类 PI3K 相互作用

从 PDB 数据库中选择分辨率最高的含有抑制剂配体的 PI3K 晶体结构: PI3K $\alpha$  (5XSC)<sup>[19]</sup>、PI3K $\beta$  (2Y3A)<sup>[20]</sup>、PI3K $\delta$  (4XEO)<sup>[21]</sup>、PI3K $\gamma$  (4KZC)<sup>[22]</sup>。使用 DS 3.5 绘制 JN-65, 并通过 Ligand Preparation 模块基于 CHARMM 力场对其进行优化。使用 DS 3.5 软件中的 Protein Preparation 模块对 4 个蛋白进行预处理, 包括: 删除所有存在的结晶水分子、修正键级、添加氢原子、基于 CHARMM 力场分配局部电荷、分配质子化状态、优化体系的结构并在 RMSD 达到 0.3 Å 时停止优化。通过 Define and Find Binding Site 模块, 以蛋白晶体结构原有小分子抑制剂配体作为参照中心, 生成活性口袋格点用于对接。采用 CDOCKER 模块将 JN-65 分别对接到 4 个亚型中, 保留对接结果最好的复合物进行分析, 其余参数均为默认值。

### 3 结果

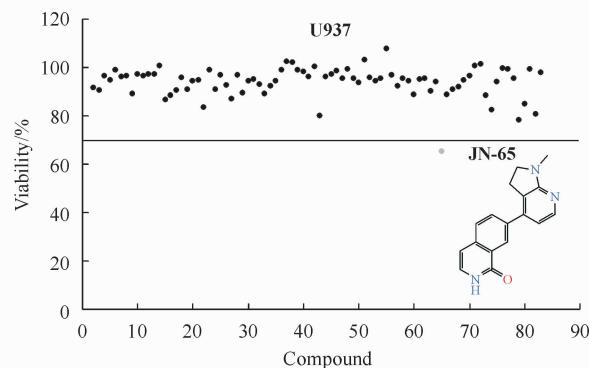
#### 3.1 JN-65 对血液肿瘤细胞的毒性作用

为了寻找能够特异性抑制恶性血液肿瘤的PI3K抑制剂,本研究首先使用U937白血病细胞对前期得到的82个化合物进行细胞水平初筛。初筛药物浓度为10  $\mu\text{mol/L}$ ,作用时间为72 h,最后使用MTT法分析细胞的存活率,进而检测化合物对细胞的抗增殖作用,结果见图1。从图中可见,部分化合物对U937具有一定的抑制活性(对U937细胞抑制率在70%以下)。以抑制率70%为阈值,可以发现JN-65(结构见图1)对U937表现出较强的毒性作用,表明JN-65具有较强的抗白血病细胞的增殖作用。

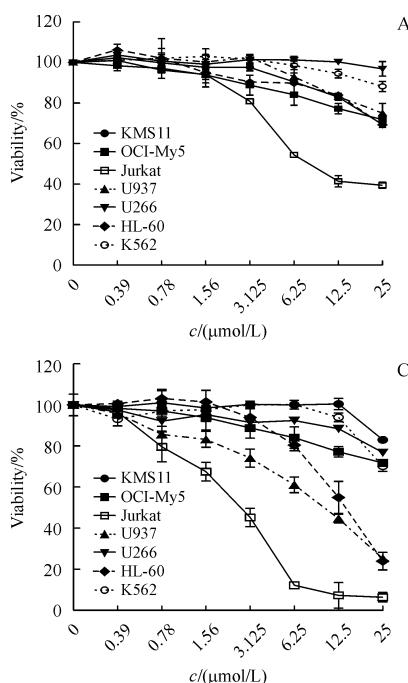
#### 3.2 JN-65 有效抑制恶性肿瘤细胞的增殖

为了进一步证实JN-65对血液肿瘤细胞的抑制作用,将JN-65作用于多种血液肿瘤细胞系。采用倍稀法将JN-65按照一定浓度梯度(0~25  $\mu\text{mol/L}$ )作用于多种细胞,包括白血病细胞(HL-60/U937/K562/Jurkat)和多发性骨髓瘤细胞(OCI-My5/KMS11/U266),同时孵育不同时间(24,48,72 h),结果如图2。图2A、2B、2C表明,随着JN-65作用浓度和作用时间的增加,细胞的增殖均呈现逐渐下降的趋势,对部分细胞表现出了较强的

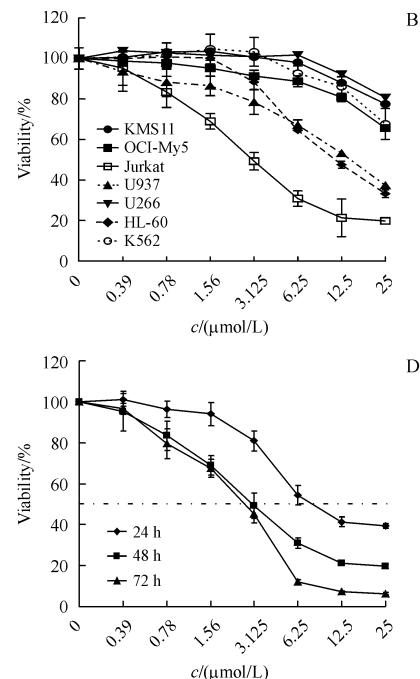
抑制作用,包括HL-60、U937、Jurkat白血病细胞,表明了JN-65可能对白血病细胞具有更强的抑制作用。随着JN-65作用浓度的升高(图2-D),Jurkat细胞的增殖生长受到极强的抑制,仅在24 h作用后细胞存活率就低于50%;作用24 h的JN-65的 $\text{IC}_{50}$ 为8.33  $\mu\text{mol/L}$ ;作用48 h的JN-65的 $\text{IC}_{50}$ 为4.68  $\mu\text{mol/L}$ ;作用72 h的JN-65的 $\text{IC}_{50}$ 为3.12  $\mu\text{mol/L}$ ;对U937作用72 h的JN-65的 $\text{IC}_{50}$ 为10.46  $\mu\text{mol/L}$ 。因此JN-65能高效抑制恶性血液肿瘤细胞,尤其是白血病细胞的增殖和生长,并且这种抑制呈现一定的剂量与时间依赖关系。



**Figure 1** MTT methods for screening the active inhibitor and the chemical structure of JN-65  
JN-65: 7-(1-Methyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)isoquinolin-1(2*H*)-one



**Figure 2** JN-65 effectively inhibits the proliferation of malignant tumor cells. Various hematologic malignancies cells were treated with different concentrations of JN-65 for (A) 24 h; (B) 48 h; (C) 72 h; (D) Jurkat cells were treated with different times and concentrations of JN-65 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



### 3.3 JN-65 抑制 PI3K 功能并有效抑制 PI3K 信号通路

以上实验结果表明了在细胞水平 JN-65 对多种恶性血液肿瘤细胞的增殖具有显著的抑制作用,为了进一步验证 JN-65 对 PI3K 的抑制效果,采用 ADP-Glo 发光试剂盒进行体外 PI3K 激酶检测。结果表明,JN-65 对 PI3K 具有一定的抑制活性,IC<sub>50</sub> 分别为:PI3K $\alpha$  > 20  $\mu\text{mol/L}$ ; PI3K $\beta$  = (15.24 ± 1.02)  $\mu\text{mol/L}$ ; PI3K $\delta$  = (18.24 ± 1.43)  $\mu\text{mol/L}$ ; PI3K $\gamma$  = (10.13 ± 0.92)  $\mu\text{mol/L}$ 。由此可见 JN-65 对 PI3K 具有一定的抑制活性,其中对 PI3K $\gamma$  的抑制活性较高,表现出一定的 PI3K 亚型选择性抑制效果。为了进一步检测 JN-65 在蛋白水平对 PI3K 信号通路的抑制作用,采用 Western blot 方法检测在不同浓度的 JN-65 作用下 PI3K 信号通路关键蛋白 Akt 磷酸化 (p-Akt<sup>Ser473</sup>) 水平,分析活性化合物对 PI3K/Akt 信号通路相关因子的影响,进一步揭示候选化合物抑制白血病细胞的作用机制。选用 Jurkat 细胞作为实验对象,结果见图 3,结果表明随着化合物作用浓度的加大,p-Akt 表达受到的抑制作用增强,同时化合物对 total-Akt 没有明显抑制作用。在 Jurkat 细胞中,JN-65 表现出比阳性化合物更强的抑制效果,且这种抑制效果也呈现出一定的浓度依赖关系。证明了在蛋白水平 JN-65 确实能够有效地抑制 PI3K 的表达。

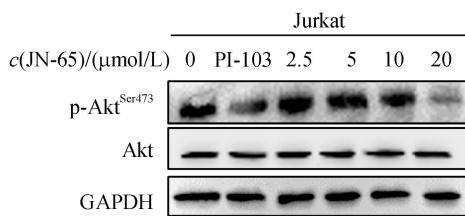


Figure 3 JN-65 inhibits the expression of PI3K/Akt signaling pathway

### 3.4 JN-65 有效促进恶性血液肿瘤细胞的凋亡

上述实验证明了 JN-65 对 PI3K 具有明显的抑制作用,为了进一步观察化合物对肿瘤细胞的促凋亡作用,运用流式细胞术来检测化合物对肿瘤细胞的促凋亡作用。以 Jurkat 细胞作为实验对象,将候选化合物作用于 Jurkat 细胞株孵育 24 h 后,经 Annexin V-FITC 和碘化乙啶 (PI) 染色,用流式细胞仪分析 Annexin V 细胞的阳性率,分析 Jurkat 细胞的凋亡情况,结果见图 4。可以看出随着 JN-65 作用浓度的增大,细胞出现了显著的凋亡。当 JN-65

作用浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  时,有超过一半的 Jurkat 肿瘤细胞发生凋亡,并在 20  $\mu\text{mol/L}$  发生凋亡的细胞已高达 74.1%。这表明 JN-65 能有效促进肿瘤细胞发生凋亡。

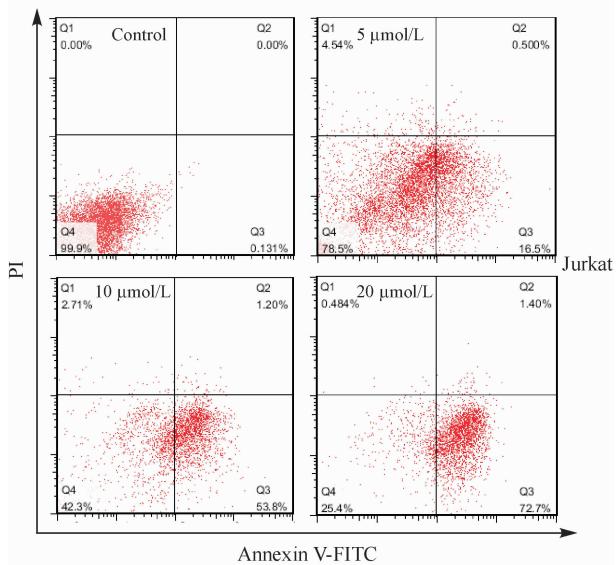


Figure 4 JN-65 induces the apoptosis of malignant hematological tumor cells

### 3.5 JN-65 与 PI3K 活性口袋相互作用分析

上述生物学活性实验已经表明 JN-65 能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路进而诱导恶性血液肿瘤细胞发生凋亡从而抑制肿瘤细胞的增殖,为了在分子水平深入研究 JN-65 与 I 类 PI3K 的相互作用关系,通过分子对接技术将 JN-65 分别对接到 4 个 PI3K 亚型蛋白中,对接得分结果分别为 PI3K $\alpha$  = -5.60 kcal/mol, PI3K $\beta$  = -10.23 kcal/mol, PI3K $\delta$  = -6.18 kcal/mol, PI3K $\gamma$  = -11.40 kcal/mol。对接结果表明,JN-65 与 PI3K $\gamma$  的结合作用最强,显著高于对 PI3K $\alpha$  及 PI3K $\delta$  的结合强度,该模拟结果也符合上述体外酶活性结果。对接结果如图 5 所示,图 5A 显示 PI3K $\alpha$  活性口袋内有一个残基 Lys656 与 JN-65 的吡咯环形成  $\pi$ -H 键,对比 PI3K $\alpha$  活性结合口袋,JN-65 的吡咯环也与 PI3K $\delta$  的残基 Met752 形成了  $\pi$ -H 键(图 5C)。除此之外,JN-65 异喹啉酮上的酮基与 PI3K $\delta$  的残基 Val828 形成了氢键,这增强了 JN-65 与 PI3K $\delta$  的相互作用。观察图 5B,在 PI3K $\beta$  活性结合口袋内,JN-65 周围有大量氨基酸,并且 JN-65 的吡啶环与 Val847 形成了  $\pi$ -H 键,除此之外与残基 Val848 通过氢键形成较强的相互作用。此外,JN-65 异喹啉酮上的吡啶 N

与PI3K $\beta$ 的氨基酸Asp807形成氢键,酮基和氨基酸Tyr833形成氢键相互作用,这些氢键作用帮助JN-65稳定在PI3K $\beta$ 的活性口袋内,极大地改善了JN-65与PI3K $\beta$ 的结合亲和力。分析PI3K $\gamma$ 活性口袋(图5D),发现JN-65围绕着更多的非极性氨基酸,如Phe961、Ile831、Trp812和Lys833,这些氨基酸将JN-65紧紧包围在PI3K $\gamma$ 活性口袋内。PI3K $\gamma$ 的残基Ala885和Ile879均和JN-65形成了 $\pi$ -H相互作用,尤其是氨基酸Val882与异喹啉酮上的吡啶N和酮基均形成了氢键相互作用。有趣

的是,这些关键性氨基酸都是非极性氨基酸,因此非极性作用是JN-65与PI3K结合的关键作用。通过对4个亚型在吡咯并吡啶环上和异喹啉酮上的吡啶环上与JN-65形成的 $\pi$ -H相互作用,研究发现在异喹啉酮的吡啶环上形成的 $\pi$ -H相互作用对JN-65结合PI3K活性口袋具有重要影响,这意味着异喹啉酮的吡啶环对JN-65与PI3K的亲和力起到关键作用,为后期化合物结构改造提供了一定的理论基础。

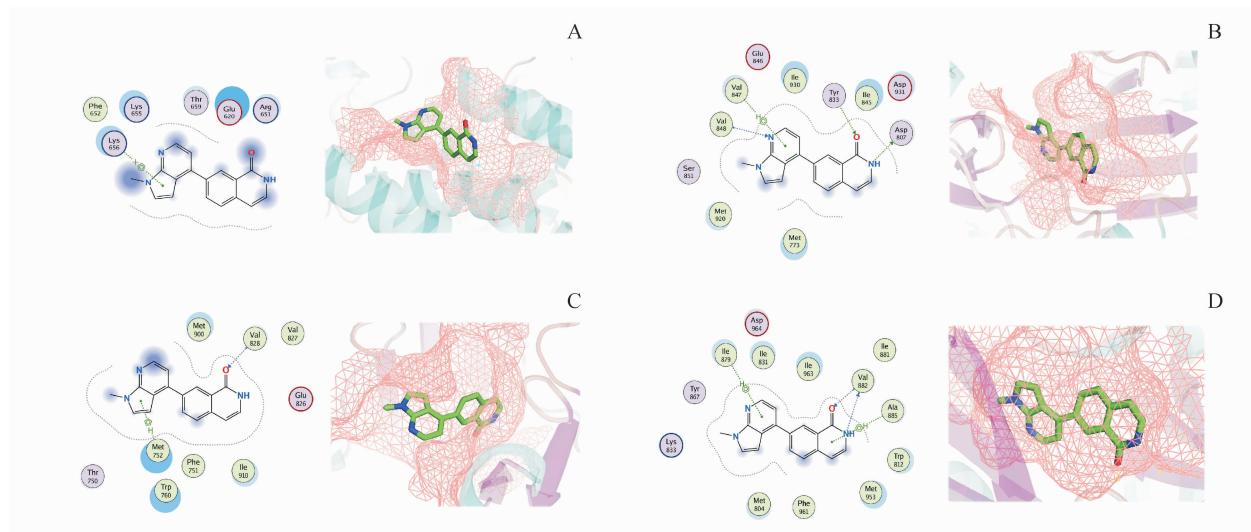


Figure 5 Presentation of JN-65 interacting with four isoforms of PI3Ks by 2D (left) and 3D (right)  
A:PI3K $\alpha$ ;B:PI3K $\beta$ ;C:PI3K $\delta$ ;D:PI3K $\gamma$

#### 4 讨 论

在对82个化合物细胞筛选实验中,化合物JN-65的抗肿瘤活性效果突出。随后对包括白血病细胞和多发性骨髓瘤细胞在内的多种恶性血液肿瘤细胞的增殖抑制作用检测结果表明,JN-65能有效抑制恶性血液肿瘤细胞的生长和增殖,尤其是对白血病细胞抑制效果更强,其IC<sub>50</sub>最高可达3.125  $\mu$ mol/L,并且其抑制作用呈现出浓度和时间依赖性。通过体外酶实验发现JN-65对PI3K具有显著的抑制作用,且对PI3K $\gamma$ 表现出一定的选择性抑制作用。大量研究表明PI3K $\gamma$ 主要表达于白血球中,对PI3K $\gamma$ 的选择性抑制往往有助于恶性血液肿瘤的治疗<sup>[1]</sup>,上述细胞实验表明JN-65对白血病细胞具有特异性抗增殖作用,因此推测这种特异性作用来源于JN-65对PI3K $\gamma$ 的选择性抑制。免疫印迹实验结果证明,JN-65在蛋白水平能有效地

抑制PI3K,进而阻滞p-Akt表达,最后通过这种抑制作用显著地诱导肿瘤细胞凋亡。上述生物学实验表明,JN-65可能成为一种潜在的PI3K抑制剂,用于治疗恶性血液肿瘤。随后,通过分子对接方法深入研究了JN-65与PI3K 4种亚型的结合机制,分子对接得分与上述酶实验结果较为吻合,JN-65与PI3K $\gamma$ 表现出较强的结合能力。通过构象关系研究发现非极性作用是JN-65与PI3K结合的关键作用,且异喹啉酮的吡啶环作为JN-65的结构特征,对保持JN-65与PI3K的高亲和性具有重要作用,为后期化合物设计及改造提供了一定的理论基础。

#### 参 考 文 献

- [1] Zhu JY, Wang M, Cao BY, et al. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway for the treatment of multiple myeloma [J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(27): 3173–3187.
- [2] Naymagon L, Abdul-Hay M. Novel agents in the treatment of mul-

- multiple myeloma: a review about the future [J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9(1):52.
- [3] Zhu JY, Hou TJ, Mao XL. Discovery of selective phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors to treat hematological malignancies [J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20(8):988-994.
- [4] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. *Science*, 2002, 296(5573):1655-1657.
- [5] Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(2):140-156.
- [6] Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks [J]. *Oncogene*, 2008, 27(41):5527-5541.
- [7] Liu PX, Cheng HL, Roberts TM, et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(8):627-644.
- [8] Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme [J]. *Oncogene*, 2008, 27(41):5497-5510.
- [9] Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis [J]. *Adv Cancer Res*, 2009, 102:19-65.
- [10] Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30(2):193-204.
- [11] Xin MH, Zhang SQ. Advances in PI3Kδ selective inhibitors [J]. *China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2016, 47(5):503-510.
- [12] Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, et al. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(12):988-1004.
- [13] Lien EC, Dibble CC, Toker A. PI3K signaling in cancer: beyond AKT [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45:62-71.
- [14] Silva A, Yunes JA, Cardoso BA, et al. PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(11):3762-3774.
- [15] Min YH, Eom JI, Cheong JW, et al. Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable [J]. *Leukemia*, 2003, 17(5):995-997.
- [16] Hyun T, Yam A, Pece S, et al. Loss of PTEN expression leading to high Akt activation in human multiple myelomas [J]. *Blood*, 2000, 96(10):3560-3568.
- [17] Miller BW, Przepiorka D, de Claro RA, et al. FDA approval: idelalisib monotherapy for the treatment of patients with follicular lymphoma and small lymphocytic lymphoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(7):1525-1529.
- [18] Blair HA. Duvelisib: first global approval [J]. *Drugs*, 2018, 78(17):1847-1853.
- [19] Miller MS, Maheshwari S, McRobb FM, et al. Identification of allosteric binding sites for PI3K $\alpha$  oncogenic mutant specific inhibitor design [J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(4):1481-1486.
- [20] Zhang XX, Vadas O, Perisic O, et al. Structure of lipid kinase p110 $\beta$ /p85 $\beta$  elucidates an unusual SH2-domain-mediated inhibitory mechanism [J]. *Mol Cell*, 2011, 41(5):567-578.
- [21] Somoza JR, Koditek D, Villaseñor AG, et al. Structural, biochemical, and biophysical characterization of idelalisib binding to phosphoinositide 3-kinase  $\delta$  [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(13):8439-8446.
- [22] Pecchi S, Ni ZJ, Han W, et al. Structure guided optimization of a fragment hit to imidazopyridine inhibitors of PI3K [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(16):4652-4656.