

小分子靶向受体酪氨酸激酶抑制剂 TW9183 的合成及体外抗肿瘤活性

雷春花¹, 王雪玉¹, 杨育才², 吴振³, 王立强¹

(1. 华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021;

2. 台湾大学 生化科学系, 台湾 台北 106170;

3. 厦门大学 药学院, 福建 厦门 361101)

摘要: 合成一系列喹啉类衍生物, 初步筛选出候选药物 TW9183, 并对其体外抗肿瘤活性进行研究. 4,7-二氯喹啉通过亲核取代、酰氯化及缩合反应得到 TW9183. 采用四甲基偶氮唑盐法(MTT)、平板克隆、划痕法、Hoechst 33342 染色、蛋白免疫印迹及流式细胞术研究 TW9183 对 3 种人类肿瘤细胞(Hela, A549, SMMC-7721)的体外抑制作用. 产物结构经红外光谱、核磁共振氢谱、碳谱、电喷雾质谱和元素分析表征确证. 实验结果表明: TW9183 能有效抑制 3 种肿瘤细胞的增殖, 但对正常人脐静脉内皮细胞(HUVEC)无影响; Hoechst 染色可见肿瘤细胞凋亡明显; TW9183 能促进 caspase-3 活化形式的表达; 划痕实验中肿瘤细胞迁移能力显著下降; 流式细胞术表明其能将 3 种肿瘤细胞阻滞于 G2/M 期.

关键词: 喹啉衍生物; 受体酪氨酸激酶抑制剂; 合成反应; 抗肿瘤活性

中图分类号: R 916

文献标志码: A

目前, 酪氨酸激酶是国际上抗肿瘤药物研发的重要靶点^[1]. 吉非替尼是一种苯胺喹啉类酪氨酸激酶抑制剂^[2], 于 2003 年获美国食品和药物管理局批准上市, 作为非小细胞肺癌的靶向治疗药物. 喹啉类化合物的构效关系表明, 药效母核喹啉环上 3-位的 N 原子可被 C 取代, 形成具有较强药理活性的喹啉类化合物^[3]. 研究表明, 苯胺嘧啶类化合物也是一类重要的蛋白激酶抑制剂, 对多种蛋白激酶有较好的抑制效果, 许多已上市和临床阶段的药物中含有此结构单元^[4]. 课题组以吉非替尼为先导, 以喹啉环替代喹啉, 在外侧苯环的 4-位引入不同的苯胺嘧啶化合物, 合成了一系列结构新颖的喹啉衍生物. 经前期体外活性验证与计算机辅助的结构优化, 筛选出候选药物 TW9183, 其化学名称为 4-(7-氯喹啉-4-氨基)-N-{4-甲基-3-[4-(4-吡啶)嘧啶-2-氨基]苯基}苯甲酰胺, 分子式为 $C_{32}H_{24}ClN_7O$. 本文对 TW9183 的合成方法及其对 3 种人类肿瘤细胞株的体外抗肿瘤作用进行研究.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

人宫颈癌 Hela、人非小细胞肺癌 A549、人肝癌 SMMC-7721、HUVEC 细胞株(上海中科院细胞库); MEM, F-12K 和 RPMI-1640 培养基(美国 Invitrogen 公司); 四甲基偶氮唑盐(MTT, 美国 Sigma 公司); 胎牛血清(美国 Hyclone 公司); 二甲基亚砜(DMSO, 美国 Amresco 公司); 结晶紫、Hoechst 33342 染色液、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒(上海市碧云天生物技术研究); 兔抗人 Caspase-3 抗体、兔抗人 Actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(美国 Abcam 公司); 吉非替尼(辽宁省大连美仑生物技术有限公司); 其他合成试剂(上海泰坦科技股份有限公司).

PB-10 型 pH 计、BS 224 S 型电子天平(德国 Sartorius 公司); Infinite M200 型多功能酶标仪(西班牙

收稿日期: 2014-06-07

通信作者: 王立强(1970-), 男, 教授, 博士, 主要从事药剂学和新药开发的研究. E-mail: wlq1599@163.com.

基金项目: 福建省泉州市科技计划重点项目(2013Z35)

牙 Tecan Iberica 公司);Eclipse TE2000-U 型荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司);ChemiDoc XRS 型凝胶成像系统;Mini-PROTEAN Tetra C 型垂直板电泳和转膜装置(美国 Bio-Rad 公司);FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);FRESCO 21 型离心机(美国 Thermo 公司);WRR 型熔点仪(上海精密科学仪器有限公司);Vario EL III 型元素分析仪(德国 Elementar 公司);N-1001 型旋转蒸发仪(日本东京理化器械株式会社);UNION 400 型氢谱、碳谱(美国 Varian 公司);Esquire 3000 plus 型质谱仪(美国 Bruker 公司)。

1.2 TW9183 的合成

化合物 TW9183 的合成路线,如图 1 所示。

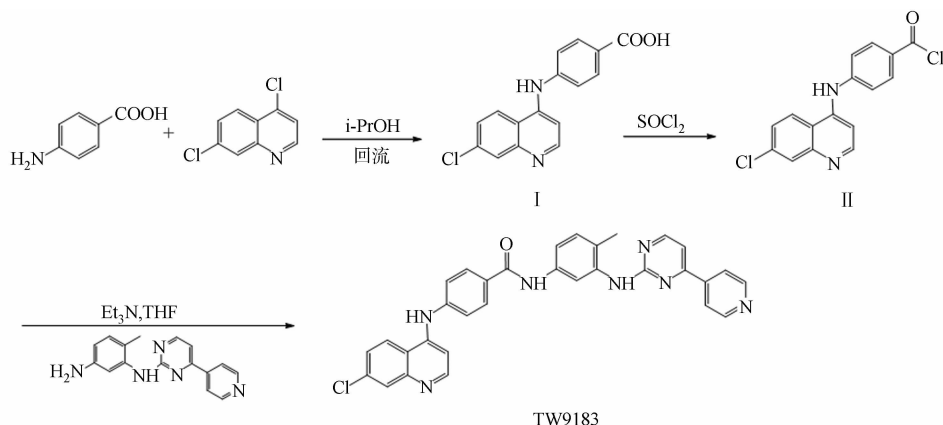


图 1 TW9183 的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of TW9183

1.2.1 4-(7-氯喹啉-4-氨基)苯甲酸(I)的合成 在 100 mL 的圆底烧瓶中加入 4,7-二氯喹啉 1.96 g (10 mmol)、对氨基苯甲酸 1.36 g (10 mmol) 和异丙醇(*i*-PrOH) 20 mL, 搅拌使其充分溶解。缓慢升温至 85 ℃, 搅拌回流 5 h, 薄层色谱(TLC)监测反应完全后, 将反应液冷却至室温, 减压蒸干, 残留固体用 30 mL 二氯甲烷洗涤 2 次, 抽滤得黄色固体中间件(I)4-(7-氯喹啉-4-氨基)苯甲酸 2.68 g, 收率为 90%。

1.2.2 4-(7-氯喹啉-4-氨基)苯甲酰氯(II)的合成 在 100 mL 干燥的圆底烧瓶中加入含 2.982 g (10 mmol) 中间件 I 的干燥二氯甲烷溶液 15 mL, 搅拌, 0 ℃ 冰浴下缓慢滴加氯化亚砷 5.35 g (45 mmol), 回流 3 h, 减压蒸馏, 得到淡黄色固体中间件(II)4-(7-氯喹啉-4-氨基)苯甲酰氯 2.71 g, 收率为 95%。

1.2.3 TW9183 的合成 在 100 mL 干燥的圆底烧瓶中加入含中间件 II 3.162 g (10 mmol) 及 2-(5-氨基-2-甲基苯胺)-4-(4-吡啶)嘧啶 2.35 g (8.5 mmol) 的四氢呋喃溶液 40 mL, 搅拌, 0 ℃ 冰浴下缓慢滴加三乙胺(Et_3N) 1.717 g (17 mmol), 搅拌 30 min, 45 ℃ 下反应 7 h。TLC 检测反应完全后, 抽滤, 滤液减压蒸馏, 固体用 50 mL 乙酸乙酯溶解, 80 mL 水萃取 2 次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸馏, 用二氯甲烷/甲醇重结晶, 得目标产物(TW9183) 4.02 g, 收率为 85%, 熔点为 292~296 ℃。

1.3 细胞培养

Hela, SMMC-7721, A549 和 HUVEC 细胞株分别接种于含体积分数为 10% 胎牛血清的 MEM, RPMI-1640, F-12K 培养基中, 置于 37 ℃, 体积分数为 5% 的二氧化碳培养箱中培养, 所有实验均采用对数生长期细胞。

1.4 MTT 法测定细胞的增殖能力

将 Hela, A549, SMMC-7721, HUVEC 细胞以 4×10^3 个 \cdot 孔⁻¹ 接种于 96 孔培养板中, 细胞完全贴壁后, 分别给予不同浓度的 TW9183 (2, 4, 8, 16 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。阳性对照组给予相同浓度的吉非替尼, 阴性对照组给予相同体积的 DMSO, 培养 48 h 后加 MTT 检测, 计算半数抑制浓度(IC_{50})和相对细胞增殖率(RGR), 实验重复 3 次。

1.5 平板克隆法测定细胞的克隆形成能力

将 Hela, A549, SMMC-7721 细胞以 300 个 \cdot 孔⁻¹ 接种于 6 孔板中, 细胞完全贴壁后, 药物处理同节 1.4。48 h 后更换培养液, 培养至培养板中出现肉眼可见的集落时终止, 弃培养液, 用磷酸盐缓冲液

(PBS)洗 1 次,加入 1 mL 质量分数为 4% 的多聚甲醛固定 10 min,弃多聚甲醛,PBS 洗 2~3 次,加 600 μL 结晶紫染色液染色 10 min,流水洗去结晶紫,空气中干燥,计算克隆形成率,实验重复 3 次。

1.6 划痕法测定细胞的迁移能力

将 HeLa, A549, SMMC-7721 细胞以 1×10^5 个 \cdot 孔⁻¹ 接种于 24 孔板中. 细胞完全贴壁后,用 200 μL 移液枪枪头在单层细胞上呈"一"字划痕,弃培养液,PBS 洗 2 次,药物处理同节 1.4.48 h 后,置于倒置显微镜下观察并测量细胞发生迁移后的损伤距离,计算迁移率,实验重复 3 次。

1.7 Hoechst 33342 法检测凋亡细胞形态

将 HeLa, A549, SMMC-7721 细胞以 4×10^3 个 \cdot 孔⁻¹ 接种于 96 孔板中. 细胞完全贴壁后,药物处理同节 1.4.48 h 后吸弃培养液,每孔加入 100 μL 质量分数为 4% 的多聚甲醛固定 30 min,吸弃多聚甲醛,PBS 荡洗,每孔加入 80 μL Hoechst 33342 染色 10 min,吸弃染色液,PBS 荡洗,于荧光显微镜下观察,实验重复 3 次。

1.8 蛋白免疫印迹检测 caspase-3 蛋白的表达

将 HeLa, A549, SMMC-7721 细胞以 5×10^5 个 \cdot 孔⁻¹ 接种于 96 孔板中. 细胞完全贴壁后,分别给予不同浓度的 TW9183(4, 8, 16 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),阴性对照组给予同体积的 DMSO. 48 h 后吸弃培养基,PBS 洗涤 2 次,每孔加入 150 μL Western 及 IP 细胞裂解液,冰浴裂解 30 min,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集上清液,凝胶电泳分离蛋白. 将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜上,质量分数为 5% 脱脂奶粉封闭后,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜,二抗室温封闭 2 h, ECL 显色 1~2 min,荧光成像仪内曝光、检测,实验重复 3 次。

1.9 流式细胞术检测细胞周期分布

将 HeLa, A549, SMMC-7721 细胞以 2×10^5 个 \cdot 孔⁻¹ 接种于 6 孔板中. 细胞完全贴壁后,药物处理同节 1.4.48 h 后消化并收集细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,加入 0.5 mL 配制好的染色液(含 PI, RNA 酶,染色缓冲液),缓慢并充分重悬细胞沉淀,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温浴 30 min,用流式细胞仪检测,实验重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 TW9183 的合成及结构鉴定

TW9183 的详细合成路线,如图 1 所示. 中间体 I 的结构经 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 和 ESI-MS 表征确证,目标产物的结构经 IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ESI-MS 和元素分析表征确证,具体结果如下所述。

4-(7-氯喹啉-4-氨基)苯甲酸(I)为黄色固体粉末,收率为 90%. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ 值: 8.61(d, $J=9.29$ Hz, 1H), 8.47(d, $J=7.03$ Hz, 1H), 8.23~8.26 (m, 2H), 8.00(d, $J=2.01$ Hz, 1H), 7.86(dd, $J=9.29$ Hz, 2.26 Hz, 1H), 7.63(dd, $J=6.78$ Hz, 2.01 Hz, 2H), 7.11(d, $J=7.03$ Hz, 1H). ¹³C-NMR(400 MHz, DMSO-d₆), δ 值: 168.41, 150.39, 149.52, 148.36, 147.21, 136.12, 132.15, 130.21, 126.83, 123.29, 21.38, 18.26, 115.17, 112.85. ESI-MS, m/z 为 298.7 [M-H]⁻.

4-(7-氯喹啉-4-氨基)苯甲酰氯(II)为淡黄色固体粉末,收率为 95%。

4-(7-氯喹啉-4-氨基)-N-{4-甲基-3-[4-(4-吡啶)嘧啶-2-氨基]苯基}苯甲酰胺(TW9183)为淡黄色的固体粉末,收率为 85%,其熔点为 292~296 $^{\circ}\text{C}$. IR(KBr), σ/cm^{-1} : 3 447, 3 427, 3 372, 3 226, 3 065, 3 014, 1 625, 1 595, 1 574, 1 507, 1 427, 1 386, 1 361, 1 313, 1 225, 1 166, 1 020, 746. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ 值: 2.25(s, 3H), 7.01(d, $J=7.00$ Hz, 1H), 7.24(d, $J=8.54$ Hz, 1H), 7.47(d, $J=5.26$ Hz, 1H), 7.51(dd, $J=8.04$ Hz, 2.04 Hz, 1H), 7.64(d, $J=7.76$ Hz, 1H), 7.65(d, $J=8.76$ Hz, 2H), 7.93(dd, $J=9.04$ Hz, 2.00 Hz, 1H), 8.12(d, $J=2.24$ Hz, 1H), 8.14(d, $J=2.04$ Hz, 1H), 8.18(d, $J=8.54$ Hz, 2H), 8.55(d, $J=5.26$ Hz, 1H), 8.62(dd, $J=6.14$ Hz, 2.00 Hz, 1H), 8.63(d, $J=6.8$ Hz, 1H), 8.76(d, $J=4.76$ Hz, 1H), 8.79(d, $J=9.04$ Hz, 1H), 9.06(s, 1H), 9.34(s, 1H), 10.36(s, 1H), 11.14(s, 1H). ¹³C-NMR(400 MHz, DMSO-d₆), δ 值: 18.11, 101.36, 108.11, 116.73, 117.36, 117.78, 119.96, 124.79, 125.06, 126.37, 128.14, 128.27, 129.92, 130.58, 133.19, 134.04, 136.25, 137.52, 138.23, 139.14, 139.59, 140.35, 144.47, 147.57, 150.63, 155.00, 158.68, 159.02, 160.01, 161.58, 161.64, 164.88. ESI-MS, m/z 为 558.2 [M+H]⁺. Anal. (C₃₂H₂₄ClN₇O): calcd C 68.87, H 4.30, Cl 6.37, N 17.58, O 2.87; found C 68.79, H 4.32, Cl 6.35, N 17.56, O 2.88.

2.2 TW9183 对肿瘤细胞和 HUVEC 细胞增殖的影响

给药 48 h 后,阴性对照组细胞均贴壁生长旺盛,细胞呈多角形,胞质饱满,相邻细胞生长融合成片,而给药组细胞随着给药浓度的增加细胞数明显减少,Hela 细胞发生皱缩,逐渐漂浮起来,A549 和 SMMC-7721 细胞体积变大,扁平铺展.以细胞膨大为特征的细胞衰老是一种重要的抑瘤机制^[4].因此,TW9183 可能通过促进 A549 和 SMMC-7721 细胞的衰老达到抑制肿瘤的效果.TW9183 对人肿瘤细胞的抗增殖作用,如表 1 所示.由表 1 可知:TW9183 对 Hela,A549 和 SMMC-7721 肿瘤细胞株表现出比吉非替尼更高的抑制力,表明 TW9183 可能具有潜在对宫颈癌、肺癌和肝癌的治疗作用.TW9183 对 HUVEC 细胞相对增殖率的影响,如图 2 所示.由图 2 可知:TW9183 作用后的 HUVEC 细胞相对增殖率较大,与阴性对照组差异无统计学意义($P>0.05$),表明 TW9183 对正常 HUVEC 细胞在化合物作用范围内没有毒性.

2.3 TW9183 对肿瘤细胞克隆形成的影响

肿瘤细胞的克隆形成能力反映了细胞的群体依赖性和增殖能力,是肿瘤细胞成瘤的一个重要因素.TW9183 作用于肿瘤细胞后,细胞的克隆形成能力不同程度地减弱,其中,TW9183 降低 Hela 肿瘤细胞集落形成能力最为显著.对 3 种肿瘤细胞集落形成的统计值(η_1),如图 3 所示.图 3 中:横坐标 1~5 分别代表 0,2,4,8,16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TW9183,6 代表 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的吉非替尼;与阴性对照组相比,a 代表 $P<0.05$,b 代表 $P<0.01$;与相同浓度吉非替尼组(16.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比,c 代表 $P<0.01$.由图 3 可知:TW9183 抑制 Hela,A549 和 SMMC-7721 克隆形成的作用效果强于吉非替尼.

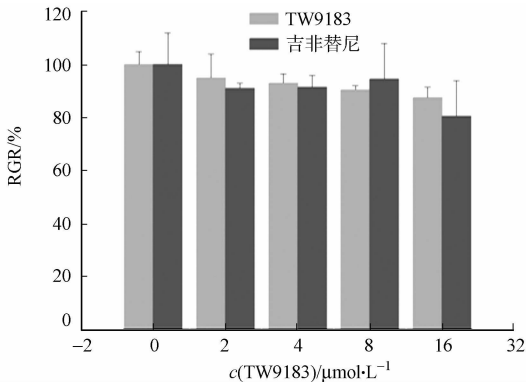


图 2 TW9183 对 HUVEC 细胞相对增殖率的影响

Fig. 2 Effects of TW9183 on relative growth rate in HUVEC cell

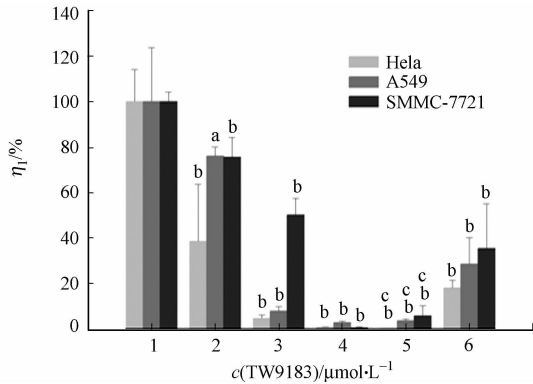


图 3 TW9183 对 Hela,A549 和 SMMC-7721 细胞克隆形成的影响

Fig. 3 Effects of TW9183 on colony formation in Hela,A549 and SMMC-7721 cells

2.4 TW9183 对肿瘤细胞迁移的影响

肿瘤转移是肿瘤致死的主要原因^[5-6],也是人们防治肿瘤时关注的重要因素.TW9183 能不同程度地抑制 Hela,A549 和 SMMC-7721 细胞的迁移,其影响如图 4 所示.图 4 中:A,B,C,D,E 分别为 0,2,4,8,16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TW9183,F 为 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的吉非替尼($\times 100$).给药 48 h 后,阴性对照组的划痕宽度不断缩小,而给药组随着给药浓度的增加,划痕愈合程度逐渐降低,细胞迁移率(η_2)明显降低,与阴性对照组相比具有统计学意义($P<0.01$),且高剂量组 TW9183(16.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用后的 Hela 细胞迁移率明显低于吉非替尼对照组($P<0.05$),但对 A549 和 SMMC-7721 细胞的迁移抑制作用与吉非替尼组无统计学意义.TW9183 对 Hela,A549 和 SMMC-7721 细胞迁移率的影响,如图 5 所示.图 5 中:1~5 分别代表浓度为 0,2,4,8,16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TW9183,6 代表浓度为 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的吉非替尼;与阴性对照组相比,b 代表 $P<0.01$;与相同浓度吉非替尼(16.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组相比,c 代表 $P<0.05$.

2.5 TW9183 对肿瘤细胞凋亡的影响

TW9183 作用于 3 种肿瘤细胞后,细胞数明显减少,荧光强度增加,而阴性对照组细胞的细胞核形态规则,荧光较弱,且着色均匀.不同浓度的 TW9183 和吉非替尼可使部分细胞出现致密浓染或碎块状

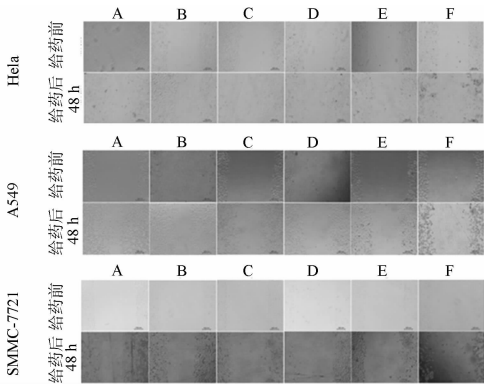


图 4 TW9183 对 HeLa, A549 和 SMMC-7721 细胞迁移的影响

Fig. 4 Effects of TW9183 on migration in HeLa, A549, and SMMC-7721 cells

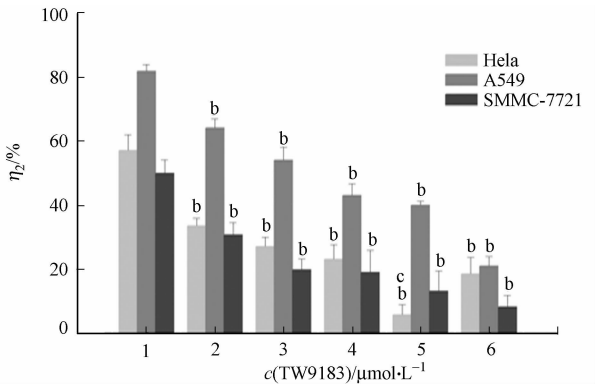


图 5 TW9183 对 HeLa, A549 和 SMMC-7721 细胞迁移率的影响

Fig. 5 Effects of TW9183 on migration rate in HeLa, A549, and SMMC-7721 cells

致密浓染,表明药物作用后细胞凋亡增加.其中,HeLa 细胞凋亡效果较明显,其结果如图 6 所示.图 6 中:A~E 分别为 0,2,4,8,16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TW9183, F 为 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的吉非替尼($\times 100$).

2.6 TW9183 对肿瘤细胞 caspase-3 蛋白表达的影响

细胞凋亡有多种因素参与,其中,caspase-3 蛋白酶在凋亡信号传导中起核心作用^[7].它在细胞内以无活性的前体(酶原)形式存在,激活后导致凋亡的发生. TW9183 对 HeLa, A549 和 SMMC-7721 细胞 caspase-3 蛋白表达的影响,如图 7 所示.由图 7 可知:不同浓度的 TW9183 作用 3 种肿瘤细胞 48 h 后,随 TW9183 浓度的增大,caspase-3 蛋白相对分子量 32 kD 的酶原表达量逐渐减少,17 kD 的活性成分表达量逐渐增加,提示 TW9183 作用于肿瘤细胞后可激活 caspase-3,发挥促进肿瘤细胞凋亡的效应.

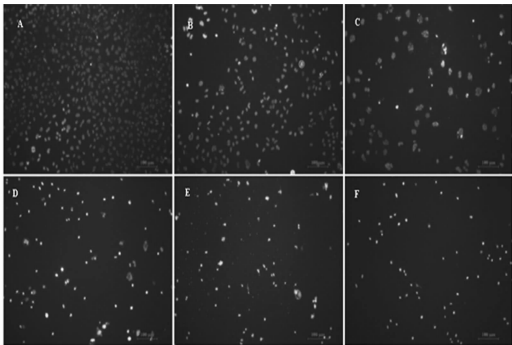


图 6 TW9183 对 HeLa 细胞凋亡的影响

Fig. 6 Effects of TW9183 on nuclear apoptosis in HeLa cells

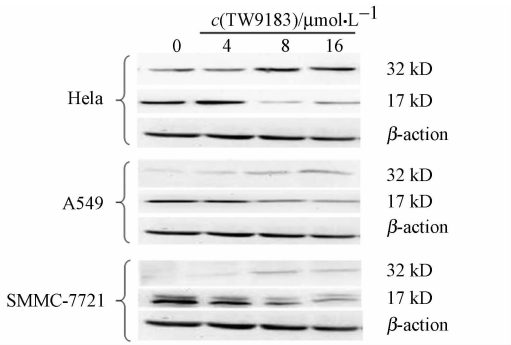


图 7 TW9183 对 HeLa, A549 和 SMMC-7721 细胞 caspase-3 蛋白表达的影响

Fig. 7 Effects of TW9183 on expression of caspase-3 protein in HeLa, A549 and SMMC-7721 cells

2.7 TW9183 对肿瘤细胞周期分布的影响

与阴性对照组相比,各浓度 TW9183 作用后,肿瘤细胞的 G2/M 期细胞比率均有不同程度的增加,且该结果呈现剂量依赖性,表明 TW9183 主要诱导肿瘤细胞阻滞于 G2/M 期;而吉非替尼主要将细胞周期阻滞于 G0/G1 期,二者阻滞的细胞周期不同,有待进一步研究.

3 结论

文中合成的目标化合物是一种新的喹啉衍生物.红外光谱、碳谱、氢谱、电喷雾质谱及元素分析结果证实该化合物与所设计的 TW9183 结构相符,其收率达到 85%.此法操作简便,原料便宜易得,反应效率高,易于进行工业化生产.

细胞异常增殖、迁移以及细胞去分化都是肿瘤形成的重要原因^[8].通过 MTT、平板克隆、划痕实验

等证实,TW9183 对 HeLa,A549 和 SMMC-7721 细胞的增殖、迁移均有一定的抑制作用. Hoechst 33342 染色、Western blot 和流式细胞术还表明:TW9183 不同程度地促进这 3 种细胞的凋亡,将细胞周期阻滞在 G2/M 期. 所有实验均证实 TW9183 较吉非替尼表现出更强的体外抗肿瘤活性,但其抗肿瘤作用机制及体内动物实验还需后续继续研究.

参考文献:

[1] WEI L,MALHOTRA S V. Recent development of cyclic amide (pyridone/lactam) moiety containing heterocycles as protein kinase inhibitors[J]. Current Medicine Chemistry,2010,17(3):234-253.

[2] WEICKHARDT A J,TEBBUTT N C,MARIADASON J M. Strategies for overcoming inherent and acquires resistance to EGFR inhibitors by targeting downstream effectors in the RAS/PI3K pathway[J]. Current Cancer Drug Targets,2010,10(8):824-833.

[3] SAVAGE D G,ANTIMAN K H. Imatinib mesylate: A new oral targeted therapy[J]. New England Journal of Medicine,2002,346(9):683-693.

[4] CHEN H Y,LEE Y R,CHEN R H. The functions and regulations of DAPK in cancer metastasis[J]. Apoptosis, 2014,19(2):364-370.

[5] TANAKA T,YUI Y,NAKA N,et al. Dynamic analysis of lung metastasis by mouse osteosarcoma LM8: VEGF is a candidate for anti-metastasis therapy[J]. Clinical and Experimental Metastasis,2013,30(4):369-379.

[6] MATTHEW B,LUIS R M,REBEKA L D G,et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis[J]. BMC Cell Biology,2013(14):32.

[7] ANTO R J, MUKHOPADHYAY A, DENNING K, et al. Curaim in(diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8 BID cleavage and cytochrome C release its suppression by ectopic expression of bcl-2 and bcl-xl[J]. Carcinogenesis,2002,23(1):143-150.

[8] EOM Y W,KIM M A,PARK S S,et al. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: Apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype[J]. Oncogene,2005,24(30):4765-4777.

Synthesis and Anti-Tumor Activities in Vitro of Small Molecule Targeted Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor TW9183

LEI Chun-hua¹, WANG Xue-yu¹, YANG Yu-cai²,
WU Zhen³, WANG Li-qiang¹

(1. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;
2. Department of Biochemical and Technology, National Taiwan University, Taipei 106170, China;
3. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361101, China)

Abstract: In this paper, a series of quinoline derivatives were synthesized. A lead compound, TW9183, was screened out preliminarily and investigated the anti-tumor activities in vitro. By nucleophilic substitution, acylchloride and condensation reaction, TW9183 could form from 4,7-dichloro quinoline. MTT plate cloning, scratching assay, Hoechst 33342 staining, western blot and flow cytometry were utilized to test the inhibitory effects of TW9183 against three types of human tumor cells (HeLa,A549, and SMMC-7721) in vitro. The structure of the product was characterized by IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, ESI-MS and elemental analysis. The results of assay showed that TW9183 could inhibit the proliferation of three types of tumor cells effectively, but have no effect on HUVEC; Hoechst 33342 staining revealed the obvious apoptosis of tumor cells; TW9183 could promote the expression of caspase-3 activation form; scratching assay suggested that the migration ability of tumor cells decreased dramatically; and flow cytometry detection demonstrated that cell cycle of tumor cells were arrested in the G2/M phase after treated with TW9183.

Keywords: quinoline derivatives; receptor tyrosine kinase inhibitor; synthesis reaction; anti-tumor activity