



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106727461 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611265126.7

(22)申请日 2016.12.30

(71)申请人 上海市肺科医院

地址 200082 上海市杨浦区政民路507号

(72)发明人 张鹏 张帆

(74)专利代理机构 上海申新律师事务所 31272

代理人 竺路玲

(51) Int. Cl.

A61K 31/135(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

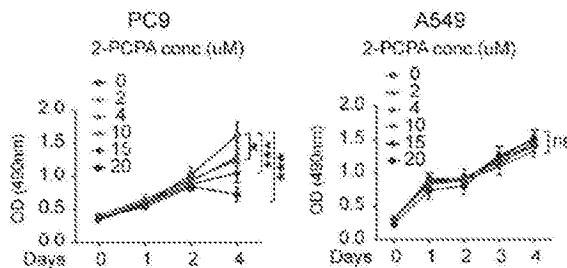
权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54)发明名称

一种KDM1A小分子抑制剂在抑制肿瘤细胞生长和转移中的应用

(57)摘要

本发明涉及一种KDM1A小分子抑制剂在制备抑制肿瘤细胞生长和转移药物中的应用,所述KDM1A小分子抑制剂可抑制细胞内组蛋白去甲基酶KDM1A的活性,并抑制组蛋白H3K4me2的去甲基化,从而导致TIMP3表达上调,促使细胞外MMP2表达的下调,同时抑制细胞内JNK激酶活性,有效地抑制了肿瘤细胞的侵袭和转移;所述KDM1A小分子抑制剂为2-PCPA。与现有技术相比,本发明阐明了KDM1A小分子抑制剂2-PCPA抑制肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制,并在此基础上研究其治疗肺癌的效果,填补了用表观遗传药物治疗肺癌领域的空白,2-PCPA可用于制备抑制肺癌细胞增殖和转移的小分子药物,从而提高肺癌的治疗效果,延长肺癌患者的生命。



1. 一种KDM1A小分子抑制剂在制备抑制肿瘤细胞生长和转移药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述KDM1A小分子抑制剂为2-PCPA。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述肿瘤细胞为癌症细胞。
4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述肿瘤细胞为肺癌细胞。
5. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述肿瘤细胞为人NSCLC细胞系中的PC9和A549。

一种KDM1A小分子抑制剂在抑制肿瘤细胞生长和转移中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤治疗领域,尤其涉及一种KDM1A小分子抑制剂在抑制肿瘤细胞生长和转移中的应用,特别是在制备抑制肿瘤细胞生长和转移药物中的应用。

背景技术

[0002] 肺癌是世界范围内,增长速率最快,患者人数最多,也是死亡率最高的癌症之一。目前,常用的肺癌治疗的手段主要包括:手术切除,放疗和化疗,靶向药物治疗,以及刚刚兴起的免疫细胞治疗等。尽管如此,由于早期肺癌不易被发现,大多数患者的肺癌被发现时已经是中晚期了,导致肺癌治疗的效果十分有限,患者因无法控制肺癌的复发和转移而去世。因此,深入研究肺癌细胞增殖,迁移,和转移的分子机制,将有助于发现新的治疗肺癌的药物靶点。

[0003] 表观遗传是调控肿瘤细胞产生,增殖和转移的重要机制之一。表观遗传调控主要包括以下几个方面:组蛋白修饰,DNA甲基化和去甲基化,非编码RNA等。其中,很多参与组蛋白修饰的酶,包括组蛋白H3K4me2去甲基酶KDM1A,组蛋白H3K27me3甲基转移酶EZH2等,在肿瘤细胞中表达异常升高。但其作用机制还不十分清楚,且目前尚无KDM1A小分子抑制剂在抑制肿瘤细胞生长和转移中的应用报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术中的缺陷,提供一种KDM1A小分子抑制剂在制备抑制肿瘤细胞生长和转移药物中的应用。

[0005] 本发明采用如下技术方案:

[0006] 一种KDM1A小分子抑制剂在制备抑制肿瘤细胞生长和转移药物中的应用。

[0007] 优选的,所述KDM1A小分子抑制剂为2-PCPA。

[0008] 优选的,所述肿瘤细胞为癌症细胞。

[0009] 优选的,所述肿瘤细胞为肺癌细胞。

[0010] 优选的,所述肿瘤细胞为人NSCLC细胞系中的PC9和A549。

[0011] 优选的,所述小分子抑制剂2-PCPA的细胞给药量为 $2\mu\text{m}$ ~ $20\mu\text{m}$ 。

[0012] 2-PCPA,全称为Tranlycypromine hydrochloride,是不可逆的单胺氧化酶(monoamine oxidase,MAO)抑制剂。它可以增加血清中去甲肾上腺素的活性(noradrenergic activity)和增强多巴胺的传递,用于镇静和抗抑郁药。此外,2-PCPA还可以抑制组蛋白去甲基酶KDM1A(又称为:LSD1,BHC110)的活性,并抑制组蛋白H3K4me2的去甲基化($\text{IC}_{50} > 50\mu\text{M}$)

[0013] 本发明研究了组蛋白H3K4me2去甲基酶KDM1A在肿瘤细胞的生长和转移中的作用机制。KDM1A主要是通过抑制TIMP3(一种基质金属蛋白酶抑制因子)的表达,来促进肿瘤细胞的迁移和侵袭。细胞外基质中的基质金属蛋白酶MMP2在肿瘤细胞的迁移和侵袭过程中发

挥了重要作用,而TIMP3可以抑制MMP2的活性或蛋白水平,从而抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。

[0014] 本发明还研究了采用KDM1A小分子抑制剂2-PCPA,可抑制细胞内KDM1A的活性,并抑制组蛋白H3K4me2的去甲基化,从而导致TIMP3表达上调,促使细胞外MMP2表达的下调,同时抑制细胞内JNK激酶活性,有效地抑制了肿瘤细胞的侵袭和转移。

[0015] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0016] 本发明明确阐明了小分子抑制剂2-PCPA抑制肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制,尤其是抑制肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制,并在此基础上研究其治疗肺癌的效果,填补了用表观遗传药物治疗肺癌领域的空白,小分子抑制剂2-PCPA可用于制备抑制肺癌细胞增殖和转移的小分子药物,从而提高肺癌的治疗效果,延长肺癌患者的生命;

附图说明

[0017] 图1为KDM1A小分子抑制剂(2-PCPA)对肺癌细胞增殖能力的影响结果图;

[0018] 图2为KDM1A小分子抑制剂(2-PCPA)对肺癌细胞侵袭能力的影响结果图;

[0019] 图3为KDM1A小分子抑制剂(2-PCPA)对肺癌细胞迁移能力的影响结果图;

[0020] 图4为KDM1A小分子抑制剂(2-PCPA)对肺癌细胞凋亡的影响结果图;

[0021] 图5为KDM1A小分子抑制剂(2-PCPA)对体内肺癌细胞增殖能力的影响结果图;

[0022] 图6为KDM1A小分子抑制剂(2-PCPA)对肺癌细胞中JNK信号通路的影响结果图;

[0023] 图7为KDM1A小分子抑制剂(2-PCPA)对肺癌细胞中组蛋白修饰(H3K4me2)水平的影响结果图;

[0024] 图8为过表达TIMP3对JNK激酶磷酸化和MMP2表达的影响结果图;

[0025] 图9为消减TIMP3对JNK激酶磷酸化和MMP2表达的影响结果图。

具体实施方式

[0026] 下面结合附图和实施例,对本发明的具体实施方式作进一步描述。以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案,而不能以此来限制本发明的保护范围。以下实施例中所用方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0027] 本发明所述的KDM1A小分子抑制剂,可抑制各类肿瘤细胞的增殖和转移,包括肺癌、胃癌、淋巴瘤、肠癌、肝癌、胃癌、肺癌、肾癌、食道癌等;KDM1A小分子抑制剂包括2-PCPA、环丙胺衍生物等。

[0028] 以下仅举例说明KDM1A小分子抑制剂2-PCPA对肺癌细胞的增殖和转移影响。

[0029] 1. 肺癌细胞的培养、扩增和传代;

[0030] 选用人NSCLC细胞系中PC9和A549,在DMEM培养基(HyClone公司)中生长。包括H1650、H292、H1975、95D和HCC827的人NSCLC细胞系在RPMI-1640培养基(Hyclone公司)中生长。所述DMEM培养基和所述RPMI-1640培养基中均含有青霉素(100U/ml)及链霉素(100mg/ml)(Life Technologies公司)和10%FBS(Gibco公司)。将上述细胞在37°C、在5%CO₂的潮湿气氛中温育。

[0031] 2. 小分子抑制剂2-PCPA的使用;

[0032] 从Selleck公司订购吉非替尼(#S1025)。从Enzo Life Science公司订购

Tranylcyromine (Parnate或2-PCPA) (#EI-217)。

[0033] PC9和A549细胞在6孔板进行培养,直至细胞密度达到30-40%。实验测试组将细胞密度为30-40%的细胞用不同浓度的2-PCPA处理48小时,浓度包括0 μ m、2 μ m、4 μ m、10 μ m、15 μ m、20 μ m。采用2-PCPA处理后的细胞来制备细胞裂解物并用于Western blotting的分析。另外,采用2-PCPA处理后的细胞也将用于细胞增殖、侵袭和迁移实验中。

[0034] 3. 检测KDM1A小分子抑制剂(2-PCPA)对肺癌细胞增殖能力的影响;

[0035] 采用2-PCPA处理后的细胞以每孔1000个细胞的密度接种到96孔板中。采用不同的条件进行处理,每个条件处理后复制6倍。在不同时间点,根据制造商的说明使用CellTiter96Aqueous单溶液细胞增殖测定(MTS)(Promega公司G3580)进行MTS细胞增殖测定。可替代地,细胞数适当稀释后进行计数。

[0036] 2-PCPA对肺癌细胞增殖能力的影响结果如图1所示,通过图1可知2-PCPA可有效抑制肺癌细胞增殖。

[0037] 4. 检测KDM1A小分子抑制剂(2-PCPA)对肺癌细胞侵袭能力的影响;

[0038] 在24孔板(BD Biosciences公司,货号:353504)中的每个底部具有8微米孔径的膜(BD353097)的Transwell小室中,加入100微升稀释(用无血清培养基进行1:8的稀释)的Matrigel(BD Biosciences公司,货号:356234)。采用胰蛋白酶消化贴壁的细胞,并将细胞重新悬浮于含有1%FBS的培养基中。将 5×10^4 个细胞悬浮在在100微升的培养基中,并把细胞悬液铺在膜上的小室。膜下的小室部分加入含有20%FBS的600微升的培养基。把细胞在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂的条件下培养48小时,然后,用棉签把每个Transwell小室的膜上小室中没有侵入的细胞除去。而对于附着在膜下表面的侵入的细胞,在含有0.1%结晶紫的甲醇中,在37 $^{\circ}$ C下,染色30分钟,随后用1xPBS溶液洗涤两次。染色的细胞在显微镜(放大倍数:100x)下进行观察,并记录所有迁移细胞的数目。每个实验条件重复三次。

[0039] 2-PCPA对肺癌细胞侵袭能力的影响结果如图2所示,通过图2可知与对照组相比,本发明所述的采用2-PCPA处理后的PC9和A549的侵袭细胞数均大幅小于对照组的侵袭细胞数,即2-PCPA可有效抑制肺癌细胞的侵袭。

[0040] 5. 检测KDM1A小分子抑制剂(2-PCPA)对肺癌细胞迁移能力的影响;

[0041] 在6孔板中培养细胞,直到细胞的密度达到80%。然后,用一个无菌的10微升的枪头进行水平方向的划痕。用磷酸盐缓冲盐水(1xPBS)轻微地洗涤细胞以去除细胞碎片。选择每个培养皿的三个不同的区域进行类似的划痕,并比较细胞边界迁移的程度和距离。分别在0,24,48,和72小时对划痕进行拍摄的,以评估和计算细胞迁移的程度。每个实验条件重复三次。

[0042] 2-PCPA对肺癌细胞迁移能力的影响结果如图3所示,通过图3可知与对照组相比,本发明所述的采用2-PCPA处理后的PC9和A549的细胞迁移程度均小于对照组的细胞迁移程度,即2-PCPA可有效抑制肺癌细胞的迁移。

[0043] 6. 检测KDM1A小分子抑制剂(2-PCPA)对肺癌细胞克隆形成能力的影响;

[0044] 把细胞以每个培养皿1000个细胞的密度接种到10厘米的培养皿中,连续培养12天。然后,将细胞固定在冰冷的甲醇溶剂中,并用结晶紫溶液染色。把培养皿的底部放在上面进行拍照,并对可以肉眼看见的菌落进行计数。每个实验条件重复三次。

[0045] 7. 检测KDM1A小分子抑制剂(2-PCPA)对肺癌细胞凋亡的影响;

[0046] 细胞在冷的磷酸盐缓冲盐水 (1xPBS) 洗涤两次。然后,再悬浮在1×结合缓冲液中,每毫升含有 1×10^6 细胞,将100微升的细胞悬浮液与5微升的FITC和使用FITC膜联蛋白V凋亡检测试剂盒5微升的PI (BD556547) 中混合,根据制造商的说明。使用Accuri C6流式细胞仪 (BD Biosciences公司,美国) 染色的细胞进行分析。

[0047] 2-PCPA对肺癌细胞凋亡的影响结果如图4所示,通过图4可知2-PCPA对肺癌细胞凋亡基本无影响。

[0048] 8. 检测KDM1A小分子抑制剂 (2-PCPA) 对肺癌细胞周期的影响;

[0049] 将细胞离心,用PBS洗涤两次,并在4℃下用冷的70%乙醇温育过夜。细胞根据制造商的说明用PI-RNA酶染色缓冲液 (BD Pharmingen公司,#550825) 混合。使用BD Accuri C6流式细胞染色的细胞进行分析。结果采用的FlowJo7.6.1软件绘制。

[0050] 9. 检测KDM1A小分子抑制剂 (2-PCPA) 对体内肺癌细胞增殖能力的影响;

[0051] 将悬浮在100微升1xPBS溶液中的 2×10^6 个肺癌细胞皮下注射到5周大的裸鼠的右侧腋窝区域。然后,每隔5至7天测定肿瘤大小,使用数字仪测量,并基于此公式计算肿瘤组织的体积 (V): $V = 0.5 * A * B^2$,其中A=长径和B=短径。5周后,将异体移植的肿瘤组织进行分离,拍照,并存储在液氮中。

[0052] 2-PCPA对体内肺癌细胞增殖能力的影响结果如图5所示,通过图5可知,对照组肿瘤的体积变化及重量变化幅度均大于实验组,从图5也可看出对照组肿瘤的体积明显大于实验组,即2-PCPA能够较好地抑制体内肺癌细胞的增殖。

[0053] 10. 检测KDM1A小分子抑制剂 (2-PCPA) 对肺癌细胞中JNK信号通路的影响;

[0054] 开展Western blotting检测2-PCPA对肺癌细胞中磷酸化JNK激酶的表达水平。2-PCPA对肺癌细胞中JNK信号通路的影响结果如图6所示,由图6可知,2-PCPA可抑制细胞内JNK激酶活性。

[0055] 11. 检测KDM1A小分子抑制剂 (2-PCPA) 对肺癌细胞中MMP2表达的影响;

[0056] 开展Western blotting检测2-PCPA对肺癌细胞中MMP2的表达水平。由检测结果可得2-PCPA可使肺癌细胞中外的MMP2表达下调。

[0057] 12. 检测KDM1A小分子抑制剂 (2-PCPA) 对肺癌细胞中H3K4me2水平的影响;

[0058] 开展Western blotting检测2-PCPA对肺癌细胞中H3K4me2的表达水平的影响。2-PCPA对肺癌细胞中H3K4me2水平的影响结果如图7所示,由图7可知2-PCPA可使肺癌细胞中KDM1A的表达水平降低,TIMP3的表达水平升高,而组蛋白修饰H3K4me2的水平升高。

[0059] 13. 检测过表达TIMP3对JNK激酶磷酸化和MMP2表达的影响;

[0060] 开展Western blotting检测过表达TIMP3对肺癌细胞中JNK激酶磷酸化和MMP2的表达水平的影响。其结果如图8所示,由图8可知过表达TIMP3可使肺癌细胞中JNK激酶磷酸化减弱,细胞外的MMP2表达下调。

[0061] 14. 检测消减TIMP3对JNK激酶磷酸化和MMP2表达的影响

[0062] 开展Western blotting检测消减TIMP3对肺癌细胞中JNK激酶磷酸化和MMP2的表达水平的影响。其结果如图9所示,由图9可知消减TIMP3可使肺癌细胞中JNK激酶磷酸化升高,细胞外的MMP2表达增强。

[0063] 由上述实施例可知,KDM1A的小分子抑制剂2-PCPA,可抑制细胞内KDM1A的活性,并抑制组蛋白H3K4me2的去甲基化,从而导致TIMP3表达上调,促使细胞外MMP2表达的下调,同

时抑制细胞内JNK激酶活性,有效地抑制了肺癌细胞的侵袭和转移,填补了用表观遗传药物治疗肺癌领域的空白,同时也为其他肿瘤细胞的治疗提供依据。

[0064] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只作为范例,本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对该实用进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

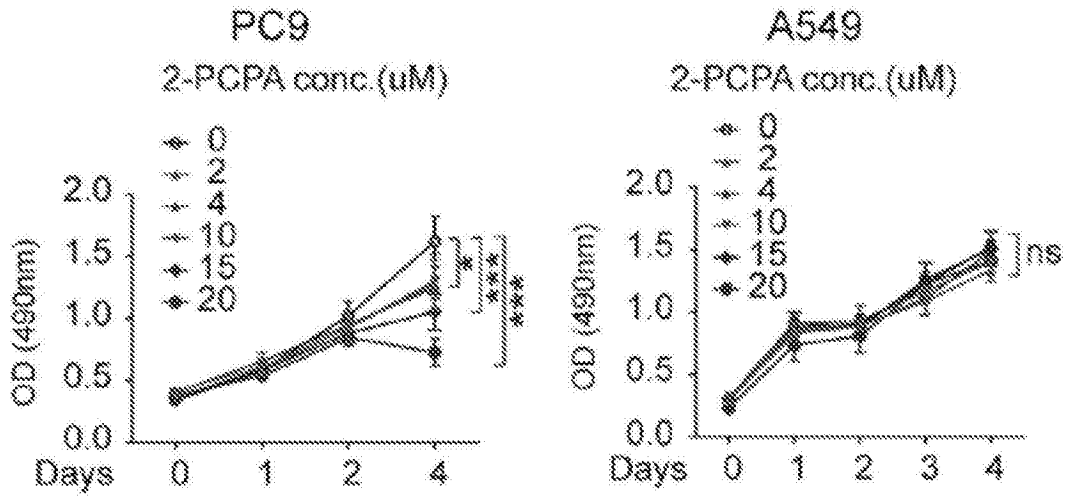


图1

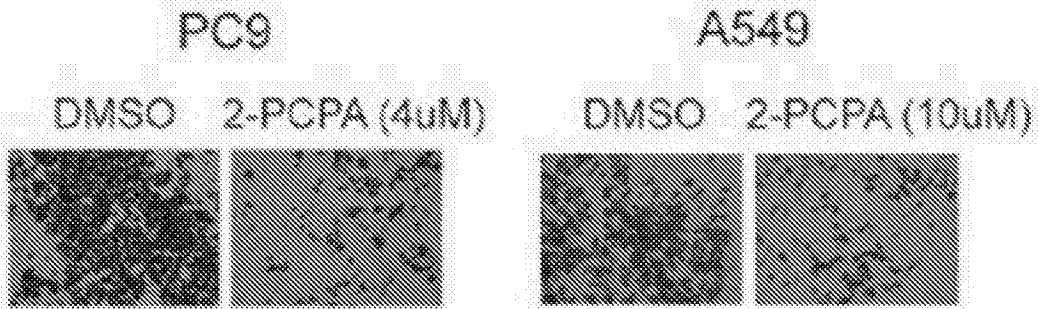


图2

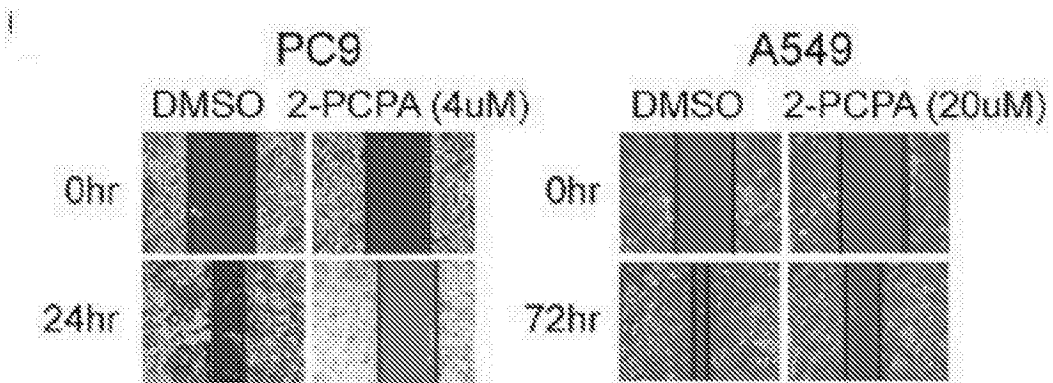


图3

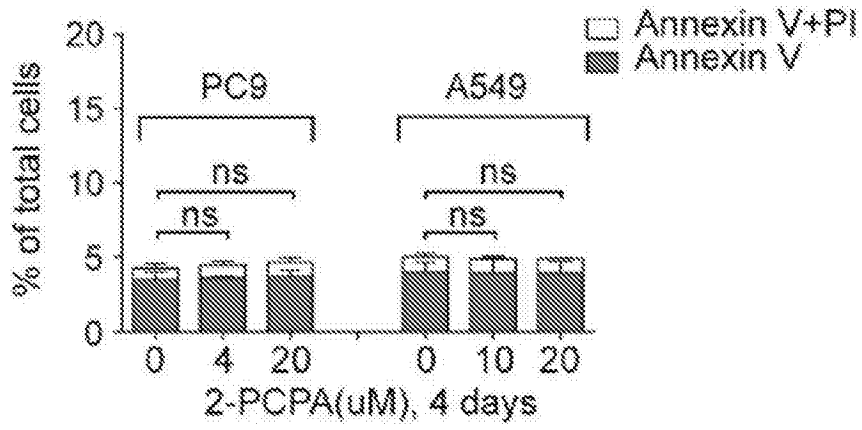


图4

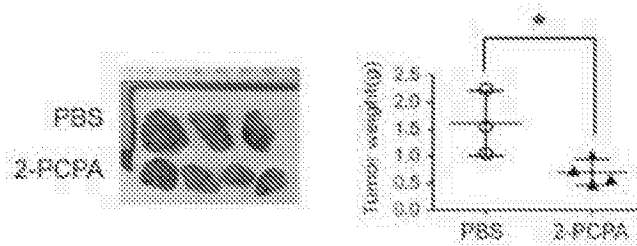
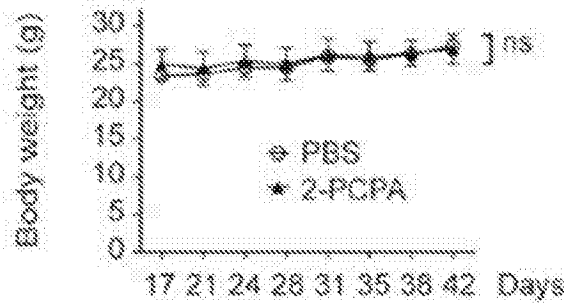
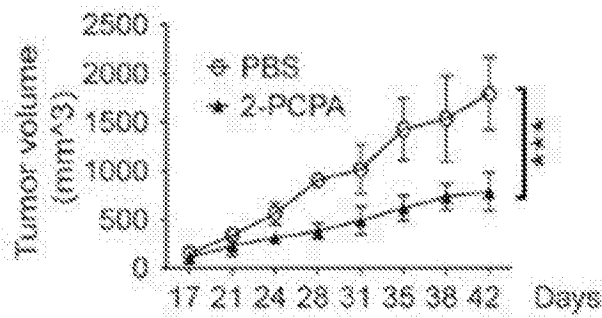


图5



图6

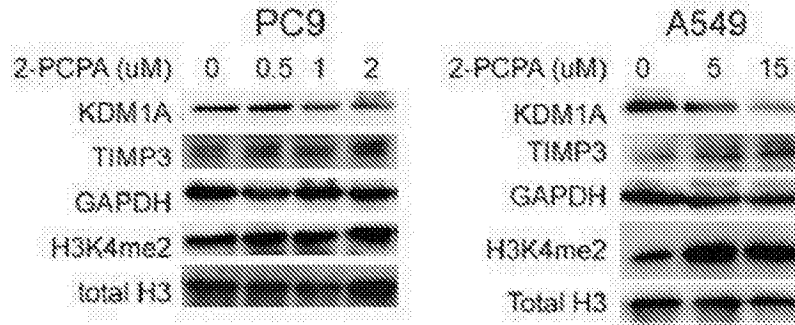


图7

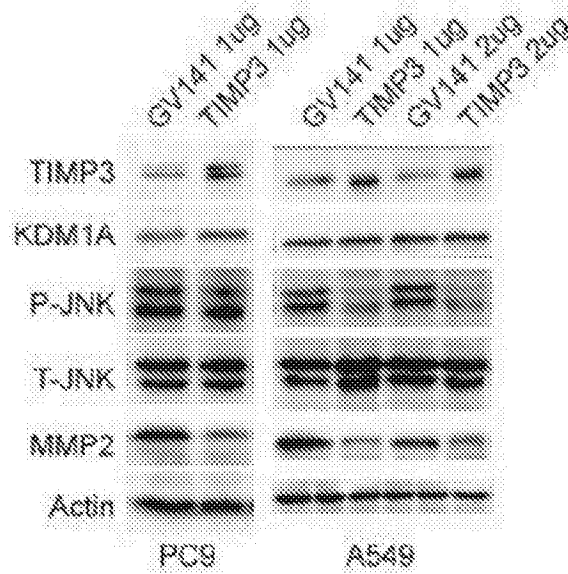


图8

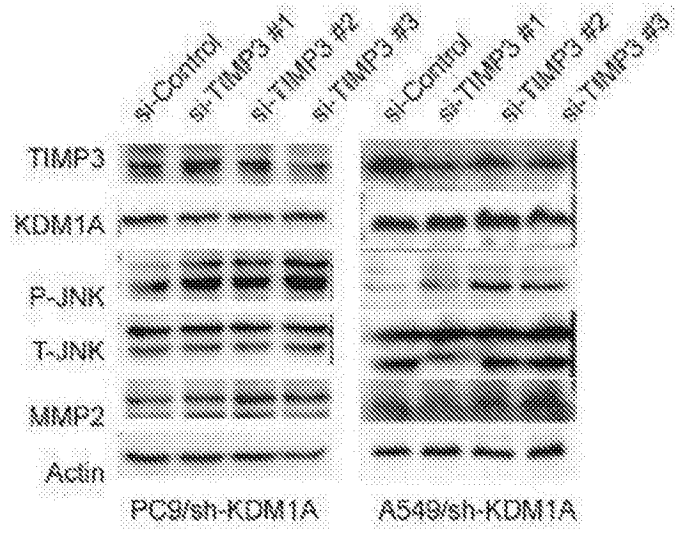


图9