



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2025.02.04
文章编号: 2095-1264(2025)02-0169-09

抗实体瘤小分子靶向药物 基础研究与临床实践专栏

新型 KRAS 突变体抑制剂抗胰腺癌的作用研究^{*}

罗桂芳^{1,2}, 陈攀¹, 刘晓雨², 胡舒洁², 杨小平^{1*}

(¹湖南师范大学医学部 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;

²湖南九典制药股份有限公司, 湖南长沙, 410205)

摘要: **目的** 探究新型 KRAS 突变体抑制剂 JQC 系列化合物(JQC-001~JQC-006)对胰腺癌的作用。**方法** 采用 MTT 法检测 JQC 系列化合物对 KRAS 突变型肿瘤细胞(DU 145、A549、PANC-1、HCT-116)增殖的抑制作用;通过 RT-qPCR 法检测 JQC-005 对 PANC-1 细胞 KRAS mRNA 表达水平的影响;建立 PANC-1 荷瘤裸鼠模型评估 JQC-005 的体内抗肿瘤活性。**结果** 除 JQC-004 外,其余 JQC 化合物均呈剂量依赖性抑制人前列腺癌 DU 145 细胞、人非小细胞肺癌 A549 细胞、人胰腺癌 PANC-1 细胞、人结肠癌 HCT-116 细胞的增殖。JQC-005 可显著下调 PANC-1 细胞 KRAS mRNA 表达,并对 PANC-1 荷瘤裸鼠肿瘤生长具有明显的抑制作用。**结论** JQC 系列化合物(特别是 JQC-005)具有显著的抗胰腺癌作用,其机制可能与调控 KRAS 突变体活性相关。

关键词: JQC 系列化合物;胰腺癌;KRAS 突变体;新型 KRAS 突变体抑制剂

中图分类号: R735.9;R979.1 **文献标识码:** A

Study on the effects of novel KRAS mutant inhibitors on pancreatic cancer^{*}

LUO Guifang^{1,2}, CHEN Pan¹, LIU Xiaoyu², HU Shujie², YANG Xiaoping^{1*}

(¹Key Laboratory of Small Molecule Targeted Drug Research and Development in Hunan Province, Health Science Center, Hunan Normal University, Changsha, 410013, Hunan, China; ²Hunan Jiudian Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha, 410205, Hunan, China)

Abstract: **Objective** To delineate the effects of the novel KRAS mutant inhibitor JQC series compounds (JQC-001 to JQC-006) on pancreatic cancer. **Methods** The inhibitory effects of JQC compounds on the proliferation of KRAS-mutant tumor cells (DU 145, A549, PANC-1, HCT-116) were evaluated using the MTT assay. RT-qPCR was performed to assess the impact of JQC-005 on KRAS mRNA expression in PANC-1 cells. A PANC-1 xenograft nude mouse model was established to evaluate the in vivo antitumor activity of JQC-005. **Results** With the exception of JQC-004, the remaining JQC series compounds (JQC-001, JQC-002, JQC-003, JQC-005, JQC-006) were found to inhibit the proliferation of human prostate cancer DU 145 cells, human non-small cell lung cancer A549 cells, human pancreatic cancer PANC-1 cells, and human colon cancer HCT-116 cells in a dose-dependent manner. JQC-005 significantly down-regulated the expression of KRAS mRNA in PANC-1 cells, and markedly suppressed tumor growth in the PANC-1 xenograft nude mouse model. **Conclusion** The JQC series compounds, particularly JQC-005, exhibit significant anti-pancreatic cancer effects, potentially mediated through regulation of KRAS mutant activity.

Keywords: JQC series compounds; Pancreatic cancer; KRAS mutant; Novel KRAS mutant inhibitors

^{*}基金项目:湖南师范大学生殖健康与转化医学研究团队资助项目(2023JC101)。

作者简介:罗桂芳,男,硕士研究生,研究方向为肿瘤药效机制研究。

^{*}通信作者:杨小平,男,教授,博士研究生导师,研究方向为肿瘤药理及小分子靶向药物创制。

0 前言

胰腺癌(pancreatic cancer, PC)是一种高致命性的实体肿瘤,约80%的胰腺癌患者缺乏有效的治疗方案,其5年生存率仅为12%^[1-2]。胰腺导管癌(pancreatic ductal adenocarcinomas, PDAC)是胰腺癌的主要病理类型,占胰腺癌的90%^[3]。在临床实践中,手术切除和化疗是PDAC的主要治疗手段。常用的化疗方案包括FOLFIRINOX^[4]、AG^[5]和NALIRIFOX^[6]等。Kirsten大鼠肉瘤病毒癌同源基因(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS)作为人类最早被鉴定的原癌基因(oncogene),编码一种小GTP酶(small GTPase)。其活性受表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)及其配体形成的二聚体调节^[7],进而调控肿瘤细胞的生长^[8]。在静息状态下,KRAS通过其内在GTP酶活性催化GTP水解为GDP,形成KRAS-GDP复合物,维持非活化构象^[9];当EGFR与其配体结合并形成二聚体后,可诱导KRAS发生GDP/GTP交换,引发构象改变至活化状态^[10-11],进而激活RAF-MEK-ERK、PI3K等下游信号通路,促进肿瘤细胞增殖、迁移及肿瘤的发生发展^[12]。KRAS是目前已知突变率最高的癌基因,与胰腺癌^[13]、结直肠癌^[14]、肺癌^[15]等一系列高危肿瘤密切相关^[16]。值得注意的是,98%的KRAS突变集中于第12、13、61密码子^[18],这些突变可直接促进肿瘤细胞的增殖和生存^[19-20],并介导EGFR靶向治疗耐药。因此,KRAS基因的激活突变体已被作为抗肿瘤药物的随诊指标^[21]和治疗靶点。

在PDAC中,KRAS突变呈现显著的亚型分布异质性,其中G12D(44%)、G12V(34%)和G12R(20%)是最常见的突变类型^[22]。然而,现有KRAS^{G12C}特异性抑制剂(如Sotorasib、Adagrasib)对上述高发突变亚型无效^[23]。尽管Sotorasib在经治的KRAS^{G12C}突变

晚期PDAC患者中展现良好的疗效与安全性^[13],但G12C突变仅占PDAC的2%~3%^[24-25]。MRTX1133是在Sotorasib基础上研发的KRAS^{G12D}抑制剂,已用于G12D突变PC的临床治疗^[26-27],但PC细胞对Sotorasib、Adagrasib及MRTX1133均已产生获得性耐药^[28-31]。为提高患者的生存质量,需要不断开发新的KRAS突变体抑制剂,以应对肿瘤细胞产生的耐药性。JQC系列化合物是以KRAS^{G12D}为靶点设计的新型含卤素和含氮芳杂环化合物。根据AutoDock分子对接结果,筛选出6个与KRAS^{G12D}突变体具有高亲和力的潜在活性分子,通过体内外实验,考察JQC系列化合物对KRAS突变体PC的作用,旨在为开发新的KRAS突变体抑制剂提供新的研究策略。

1 材料

1.1 化合物与对照药

JQC系列化合物JQC-001~JQC-006,由广东石油化工学院合成并提供,分子量等信息见表1;阳性对照药:AMG-510(分子量:560.59,批号:159450,纯度≥99.9%,MCE公司);溶媒对照品:0.5%羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na)(批号:20230711,纯度≥99.0%,国药集团化学试剂有限公司)。JQC系列化合物和AMG-510均用0.5% CMC-Na溶液配制,经超声处理至完全分散均匀后使用。

1.2 细胞及培养方法

人前列腺癌细胞DU 145(KRAS野生型, KRAS^{WT})^[32]使用MEM培养基培养;人非小细胞肺癌细胞A549(KRAS^{G12S}突变型)^[33]使用Ham's F-12K培养基培养;人胰腺癌细胞PANC-1(KRAS^{G12D}突变型)^[34]使用DMEM培养基培养;人结肠癌细胞HCT-116(KRAS^{G13D}突变型)^[35]使用McCoy's 5A培养基培养。所有细胞系均购自武汉普诺赛生命科技有限

表1 JQC系列化合物信息表

Tab. 1 JQC series compounds information sheet

化合物代号	分子式	分子量	纯度	结合自由能绝对值/(kcal·mol ⁻¹)
AMG-510	C ₃₀ H ₃₀ F ₂ N ₆ O ₃	560.59	99.9%	3.578
JQC-001	C ₃₇ H ₄₈ BrN ₅ O ₄	706.73	96.7%	6.281
JQC-002	C ₃₈ H ₄₉ BrN ₄ O ₄	705.74	98.2%	6.722
JQC-003	C ₄₃ H ₅₅ ClN ₄ O ₅	743.39	95.4%	6.876
JQC-004	C ₃₉ H ₅₁ BrN ₄ O ₄	719.76	98.6%	6.067
JQC-005	C ₄₃ H ₅₆ N ₄ O ₅	708.94	95.5%	7.667
JQC-006	C ₄₁ H ₅₂ ClN ₅ O ₅	730.35	95.2%	7.556

公司。各培养基均补充 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),并于 37℃、5% CO₂条件下培养。当细胞融合度达到约 90% 时进行传代。

1.3 实验动物

SPF 级 BALB/c-nu 无胸腺裸鼠 40 只,雄性,体重 18~20 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[实验动物合格证号:No.430727240101332362,生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004]。裸鼠饲养于湖南普瑞玛药物研究中心有限公司屏障环境内[使用许可证号:SYXK(湘)2020-0015],饲养温度 22~26℃,相对湿度 40%~70%,自由摄食、饮水,适应性饲养 3 d 后进行实验。本研究所有实验操作均经湖南普瑞玛药物研究中心有限公司实验动物福利伦理委员会批准(批准号:IACUC-KY-20210028)。

1.4 主要试剂

DMEM 培养基(货号:WH01122012XP)、McCoy's 5A 培养基(货号:WH01122007SP)、Ham's F-12K 培养基(货号:WH00162106SP)、MEM 培养基(货号:WH0112106SP)、0.25% 胰蛋白酶溶液(货号:WH0121Z271)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)(货号:KIQ9TXQD,上海毕臣生化科技有限公司);二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(货号:98951950, CNW Technologies);胎牛血清(fetal calf serum, FBS)(货号:2324371, GIBCO);SYBR Green Realtime PCR Master Mix(货号:E096-01A, Novoprotein);RevertAid RT 反转录试剂盒(货号:K1691, Thermo Fisher);RNAprep Pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒[货号:DP431,天根生化科技(北京)有限公司];兔 Ki67 单克隆抗体(货号:A20018, 武汉 Abclonal 公司);二步法免疫组织化学检测系统(货号:2417I0413)、DAB 显色试剂盒(20×)(货号:240010622)均购自北京中杉金桥。KRAS 引物:hKRAS-F ACACAAAACAGGCTCAGGACT, hKRAS-R AGCATCCTCCACTCTCTGTCT;内参引物:hGAPDH-F CTGACTTCAACAGCGACACC, hGAPDH-R GTG-GTCCAGGGGTCTTACTC。所有引物均由华大基因合成。

1.5 主要仪器

3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);DMIL 型倒置显微镜(德国 Leica 公司);1300 型生物安全柜(美国 Thermo Fisher 公司);Nano-200 型微量核酸分析仪(杭州奥盛仪器有限公司);7500 型实

时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

2 实验方法

2.1 计算 JQC 系列化合物与 KRAS^{G12D} 突变体的结合自由能

使用 KingDraw 软件绘制 6 个 JQC 系列化合物及阳性对照 AMG-510 的结构,构建 MOL2 格式数据库并转换为 pdbqt 格式;从蛋白质数据库(Protein Data Bank, PDB)获取 KRAS^{G12D} 突变体晶体结构(PDB ID: 7RPZ)^[36],利用 PyMol 软件去除配体、水分子及金属离子,保存为 7RPZ.pdb 格式,再通过 AutoDock 软件添加氢原子、计算电荷并设置原子类型为 Assign AD4 type,最终生成 7RPZ.pdbqt 文件;以 AMG-510 的活性位点为中心定义对接搜索空间,网格间距设为 0.375 Å,生成 grid.gpf 参数文件,并在 AutoDock 的 Docking 模块中采用遗传算法(Genetic Algorithm)进行分子对接,设定 Number of GA Runs 为 10, Maximum Number of evals 为 250 000,输出 dock.dpf 文件并执行运算;最后分析 grid.glg 文件,筛选最优构象,并基于该对接模型对 JQC 系列化合物进行虚拟筛选,以 docking score 作为结合自由能评分,其绝对值越大,表明化合物与 KRAS^{G12D} 的结合能力越强。

2.2 MTT 法检测细胞增殖

取对数生长期的 DU 145、A549、PANC-1 和 HCT-116 细胞,经胰酶消化后分别用相应培养基配制成单细胞悬液,调整细胞密度分别为 3×10⁴个/mL(DU 145、A549)、6×10⁴个/mL(PANC-1)和 2×10⁴个/mL(HCT-116),按 100 μL/孔接种至 96 孔板,使每孔细胞数分别为 3 000 个(DU 145、A549)、6 000 个(PANC-1)和 2 000 个(HCT-116)。采用十字振荡法使细胞均匀分布后,置于 37℃、5% CO₂培养箱中孵育过夜。将 JQC001~JQC006 及 AMG-510 用 DMSO 配制成 100 mmol·L⁻¹母液,经相应培养基梯度稀释为 200、60、20、6、2、0.6 μmol·L⁻¹工作液。每孔加入 100 μL 工作液,使终浓度分别为 100、30、10、3、1、0.3 μmol·L⁻¹,同时设立溶媒对照组(含等体积培养基),每组均设 4 个复孔。继续培养 72 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液,37℃、5% CO₂条件下继续孵育 4 h 后弃上清,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min 后于酶标仪 492 nm 波长下测定吸光度(optical density, OD)值,其中 A1~H1 孔作为调零孔。实验独立重复 3 次。数据以溶媒对照组 OD 值作为

100% 细胞活力基准,计算各给药组相对细胞活力。以细胞增殖抑制率表示化合物对 DU 145、A549、PANC-1、HCT-116 细胞增殖的抑制作用,以半数抑制浓度(median inhibitory concentration, IC_{50})比较各化合物的活性。当抑制率>100%时视为系统误差并按 100% 处理。抑制率计算公式为: $IC_{50} = \left(1 - \frac{OD_{\text{样品}} - OD_{\text{调零}}}{OD_{\text{溶媒}} - OD_{\text{调零}}}\right) \times 100\%$ 。

2.3 RT-qPCR 法检测 KRAS 基因表达

取对数生长期的 PANC-1、HCT-116 和 A549 细胞接种于 6 孔板,待细胞融合度达 70% 时,分别加入细胞增殖抑制实验中活性最佳的化合物(终浓度为 $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)及阳性对照 AMG-510,同时设立溶媒对照组。培养 24 h 后收集细胞,采用 RNAprep Pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,使用 Nano-200 型超微量核酸分析仪测定 RNA 浓度及纯度。取 $5 \mu\text{g}$ 总 RNA,按照 RevertAid RT 反转录试剂盒说明书进行 cDNA 合成。采用 SYBR Green 法进行 RT-qPCR 检测,反应体系含 $0.2 \mu\text{L}$ cDNA 模板。PCR 扩增程序设置为 95°C 预变性 1 min, 95°C 变性 15 s, 59°C 退火 15 s, 72°C 延伸 30 s,共 40 个循环。扩增后进行熔解曲线分析: 95°C 变性 15 s, 60°C 起始维持 1 min,随后以 $0.05^\circ\text{C} \cdot \text{s}^{-1}$ 升温至 95°C 维持 15 s。以 GAPDH 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 KRAS mRNA 相对表达量。具体计算公式:KRAS 表达量 $= 2^{-\Delta C_t} = 2^{-[C_t(\text{KRAS}) - C_t(\text{GAPDH})]}$ 。与溶媒对照组相比,KRAS 相对表达量 $= 2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-[\Delta C_t(\text{样品}) - \Delta C_t(\text{溶媒})]}$ 。

2.4 化合物对 PANC-1 细胞移植瘤裸鼠的影响

取对数生长期 PANC-1 细胞悬液(1×10^7 个/mL) 0.2 mL 接种于 BALB/c-nu 裸鼠(40 只)右侧腋下,剔除成瘤失败的裸鼠后,待剩余裸鼠肿瘤平均体积达 100 mm^3 以上时,选取 24 只荷瘤裸鼠按肿瘤体积随机分为 4 组($n=6$):模型对照组(等体积溶媒)、AMG-510 组($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[37]、JQC-005 高剂量组($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,参照 AMG-510 剂量)及 JQC-005 低剂量组($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,按 3 倍间距设计)。各组经口灌胃给药($20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),每日 1 次,连续 28 d,给药期间每 4 d 用游标卡尺测量肿瘤长径(L)和短径(W),计算肿瘤体积及相对肿瘤增殖率,并记录体重。末次给药 24 h 后处死裸鼠,取肿瘤组织测定体积。采用免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)法检测肿瘤组织中 Ki67⁺ 细胞比例:肿瘤组织经 10% 中性福尔

马林固定、PBS 漂洗 3 次后制成 $3 \mu\text{m}$ 石蜡切片,经脱蜡、水化后,在 Tris-EDTA 抗原修复液中加热修复抗原,冷却洗涤后用 2% Triton X-100 溶液处理 5 min;以 1:50 Ki67 抗体 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 孵育过夜,HRP 标记二抗室温孵育 2 h 后 DAB 显色,显微镜下观察 Ki67⁺ 的表达及分布,计算 Ki67⁺ 细胞比例。肿瘤体积(tumor volume, TV) $= 1/2 \times L \times W^2$ 。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 20 和 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析和作图,计量资料以“均数 $\pm$ 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示;在 SPSS 软件的“分析(analyze)”栏目下选择“描述统计(descriptive statistics)”中的“探索(explore)”项目检测各组数据的正态性(normality)和方差齐性(homogeneity of variance),对符合正态分布且方差齐性的数据采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组间比较,对不符合正态分布的数据采用非参数检验(Kruskal-Wallis 检验),以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 分子对接结合自由能分析

通过虚拟筛选评估化合物与 KRAS^{G12D} 的结合能力,结果显示,JQC001~JQC006 系列化合物的结合能分别为 -6.281 、 -6.722 、 -6.876 、 -6.067 、 -7.667 、 $-7.556 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,其结合能绝对值分别为 6.281 、 6.722 、 6.876 、 6.067 、 7.667 、 $7.556 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,均优于 AMG-510 的结合能绝对值($3.578 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$),推测 JQC 系列化合物相较于 AMG-510,具有更强的 KRAS^{G12D} 结合活性。在 JQC 系列化合物中,JQC-004 的结合自由能最低,由此推测其与 KRAS^{G12D} 的结合活性相对较弱,进而可能导致其对细胞增殖的抑制活性也较低(图 1)。

3.2 JQC 系列化合物对肿瘤细胞增殖的抑制作用

以化合物浓度(取以 10 为底的对数)为横坐标,相对细胞增殖抑制率(%)为纵坐标,绘制不同浓度 JQC 系列化合物及 AMG-510 对各细胞增殖抑制作用的曲线图,并在曲线两侧用虚线表示 95% 置信区间(95% CI)。结果显示,在 $0.3 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内,除 JQC-004 外,其他 JQC 化合物和 AMG-510 对 4 种肿瘤细胞的增殖均呈现浓度依赖性抑制作用,而 JQC-004 在各浓度下对 4 种肿瘤细胞的增殖均无明显抑制作用(图 2)。

除 JQC-004 外,其余 JQC 系列化合物对 KRAS

突变型肿瘤细胞的增殖抑制活性显著高于 KRAS 野生型细胞 ($P<0.001$) ; 其中 JQC-005 在 $0.3\sim100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内对 4 种肿瘤细胞均呈现浓度依

赖性增殖抑制作用,其 IC_{50} 值最小且抑制活性显著优于 AMG-510($P<0.001$)(表 2)。

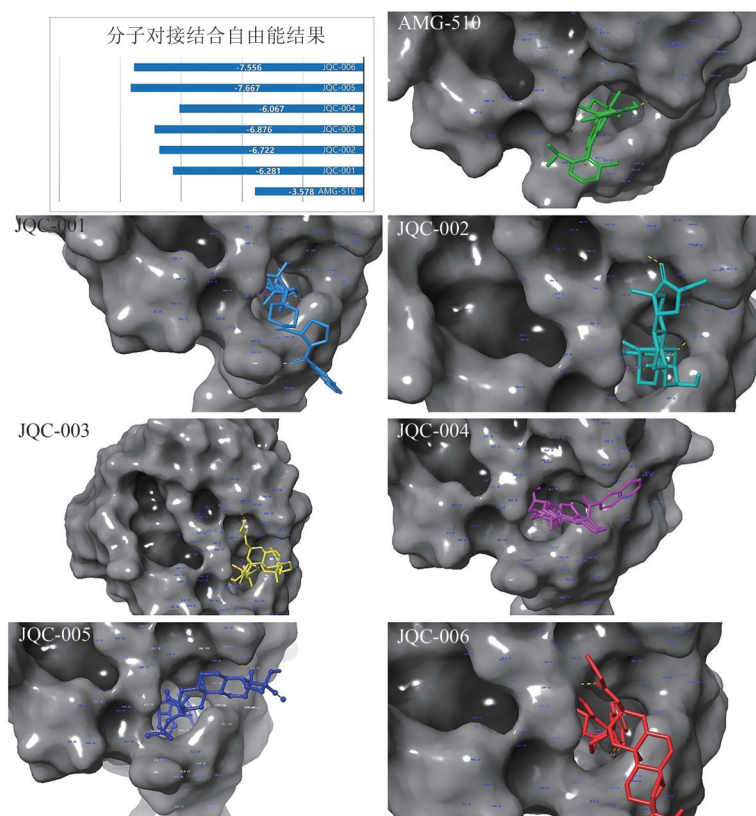


图 1 JQC 系列化合物与 KRAS^{G12D} 分子对接计算结果

Fig. 1 The computational results of molecular docking between JQC series compounds and KRAS^{G12D}

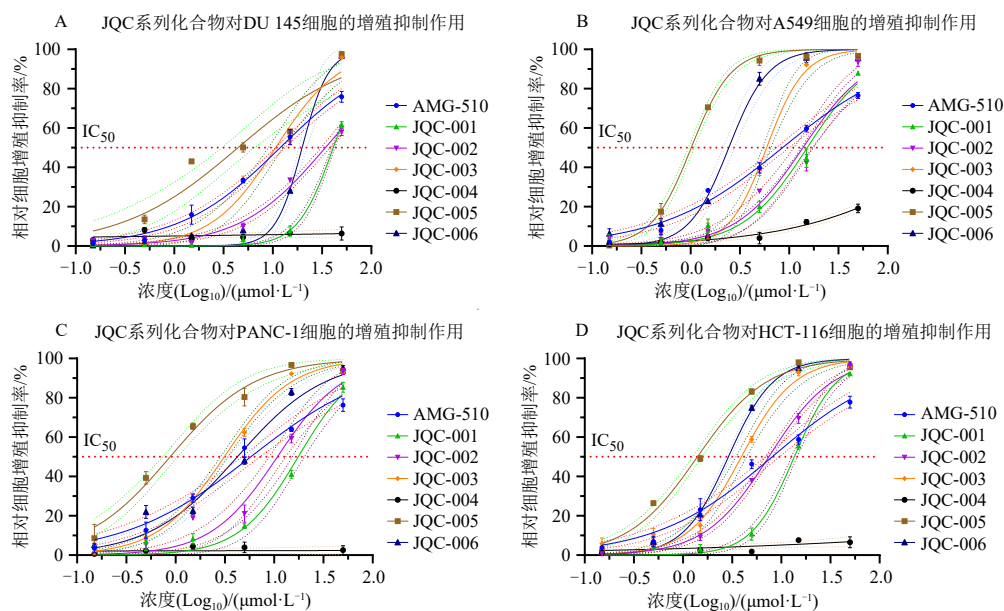


图 2 JQC 系列化合物对 4 种肿瘤细胞增殖抑制的影响 ($n=3$)

Fig. 2 The inhibiting effects of JQC series compounds on the proliferation of four tumor cell lines ($n=3$)

表 2 JQC 系列化合物对肿瘤细胞的增殖抑制作用($n=3$)

Tab. 2 The inhibition of JQC series compounds on the proliferation of tumor cells ($n=3$)

化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)			
	DU 145	A549	PANC-1	HCT-116
AMG-510	24.095±2.164	17.318±1.192	12.637±1.371	16.620±0.379
JQC-001	98.261±12.434	27.230±2.627***	32.551±2.463***	25.150±1.317***
JQC-002	81.294±9.841	23.273±1.627***	17.900±1.174***	23.687±0.118***
JQC-003	19.856±1.321	10.396±0.960***	6.394±0.450***	6.841±1.052***
JQC-004	>100	>100	>100	>100
JQC-005	8.587±0.647###	2.286±0.198****	1.992±0.332****	2.983±0.116****
JQC-006	33.959±0.977	4.492±0.451***	7.184±0.380***	5.748±0.175***

注:与 DU 145 细胞比较,* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$;与 AMG-510 比较,# $P<0.05$ 、## $P<0.01$ 、### $P<0.001$ 。

Note: Compared with the group of DU 145 cells, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; Compared with the group with AMG-510, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

3.3 JQC-005 对胰腺癌细胞 KRAS mRNA 表达的影响

由于 JQC-005 对 PANC-1 细胞具有最小 IC₅₀ 值,进一步检测其对 PANC-1 细胞 KRAS mRNA 表达的影响,结果显示 AMG-510 组和 JQC-005 组 PANC-1

细胞的 KRAS mRNA 表达水平均显著低于溶媒对照组($P<0.001$),但 JQC-005 组 KRAS mRNA 表达水平与 AMG-510 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)(图 3)。

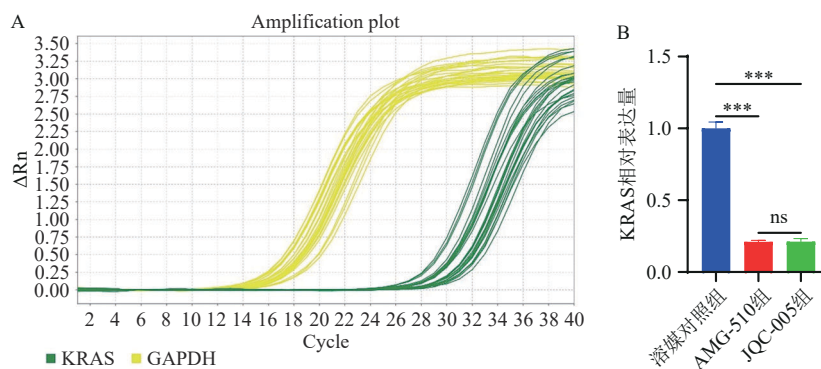


图 3 JQC-005 对 PANC-1 细胞 KRAS mRNA 表达的影响($n=3$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

Fig. 3 The effects of JQC-005 on KRAS mRNA expression in PANC-1 cells ($n=3$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

3.4 JQC-005 对 PANC-1 荷瘤裸鼠模型肿瘤生长的抑制作用

末次给药 24 h 后处死荷瘤裸鼠并剥离肿瘤,发现给药组裸鼠肿瘤体积均小于模型对照组,且 AMG-510 组裸鼠肿瘤体积缩小更为显著(图 4A)。经计算,AMG-510 组、JQC-005 高剂量组裸鼠肿瘤体积均显著小于模型对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$)(图 4B)。体重监测结果显示,模型对照组裸鼠体重从给药第 16 天开始逐渐下降,而 AMG-510 组和 JQC-005 低剂量组裸鼠体重较给药前略有上升,与模型对照组比较,差异均具有统计学意义($P<0.05$); JQC-005 高剂量组裸鼠在给药 24 d 内体重变化较

小,而在末次给药后体重下降约 0.8 g,但与 AMG-510 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)(图 4C);免疫组化检测显示,AMG-510 组和 JQC-005 组裸鼠肿瘤组织 Ki67⁺细胞比例均显著低于模型对照组($P<0.05$)(图 5)。

4 讨论

KRAS 作为多个关键信号网络的核心调控因子^[38-39],在多种恶性肿瘤中普遍存在突变^[12],其突变可导致针对 KRAS 及其上游靶点的治疗失效,因此优化 KRAS 突变体抑制剂结构并筛选靶向 KRAS 突变体的抗肿瘤药物具有重要临床价值。

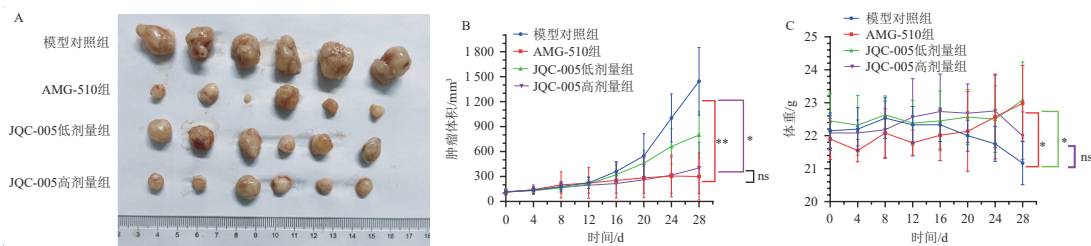


图4 JQC-005对PANC-1荷瘤裸鼠肿瘤生长的影响($n=6$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Fig. 4 The effects of JQC-005 on tumor growth in PANC-1 tumor-bearing nude mice ($n=6$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

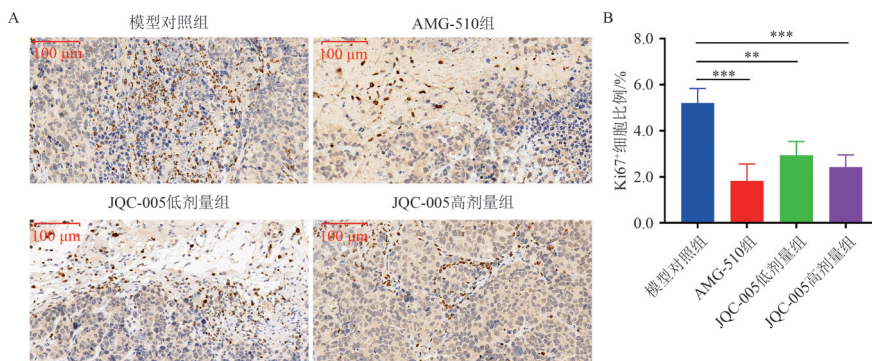


图5 JQC-005对肿瘤组织Ki67⁺细胞比例的影响($n=5$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

Fig. 5 The effects of JQC-005 on the proportion of Ki67⁺ cells in tumor tissue ($n=5$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

本研究以KRAS野生型前列腺癌细胞DU145为对照,探究JQC系列化合物对携带KRAS突变的PANC-1、HCT-116及A549细胞的体外抗肿瘤活性。细胞增殖抑制实验显示,除JQC-004外,JQC系列化合物对KRAS突变型细胞的增殖抑制作用均显著优于其对KRAS野生型细胞的作用,且抑制活性强于AMG-510,表明该系列化合物可能具有KRAS突变选择性抗肿瘤活性,其中JQC-005对4种肿瘤细胞的 IC_{50} 值最小且对PANC-1细胞最为敏感,而JQC-004对所有测试细胞系均未表现出显著增殖抑制效果。

KRAS^{G12C}抑制剂AMG-510通过结合半胱氨酸残基的巯基^[40],在GTP结合状态下暴露可与Switch II口袋结合的2E07和6H05^[41],占据该口袋后将KRAS^{G12C}突变体锁定在失活状态;而KRAS^{G12D}突变体因缺乏靠近Switch II口袋的硫醇基团^[42],需与Gly60形成氢键以稳定Switch II口袋并使Switch I口袋维持动态非活性构象,从而抑制KRAS^{G12D}活性^[43]。AMG-510因其分子结构与KRAS^{G12D}结合不稳定,故对携带KRAS^{G12D}突变的PANC-1细胞增殖抑制作用较弱,这与AutoDock分子对接结果一致。虽然JQC-004与KRAS^{G12D}的结合自由能低于AMG-510,但其体外抗肿瘤活性较AMG-510差,这种差异

可能源于JQC-004仅能与KRAS^{G12D}的12种构象中的部分构象稳定结合,而构象的动态变化导致分子对接计算结果与实际抗肿瘤活性不一致^[43]。

RT-qPCR检测结果显示,JQC-005可显著下调PANC-1细胞中KRAS mRNA的表达水平,抑制率为78.8%;该效应与AMG-510(抑制率78.9%)相当,表明JQC-005在体外对KRAS mRNA具有与KRAS^{G12C}选择性抑制剂AMG-510相近的抑制作用。在PANC-1细胞移植瘤裸鼠模型中,JQC-005以 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量给药时均表现出显著的肿瘤生长抑制作用,且呈剂量依赖性。其中, $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ JQC-005与AMG-510均达到预设的有效性标准,但前者的肿瘤体积抑制效果略低于AMG-510^[40]。值得注意的是,AMG-510除直接抑制KRAS^{G12C}外,还可通过增加CD3⁺ T细胞数量及促进其增殖发挥免疫调节作用,而JQC-005可能缺乏该机制。因此,推测JQC-005在体内抑制肿瘤生长的效果可能与其免疫调节功能缺失相关,但该推论需通过后续实验加以验证。

体重变化数据分析显示,JQC-005高剂量组裸鼠在给药初期(1~24 d)体重未出现显著性变化,但在给药第28天观察到较第24天体重下降,提示JQC-005可能在裸鼠体内产生蓄积毒性,建议后续

研究通过测定药物半衰期等药代动力学参数,系统评估其早期安全性特征。

Ki67 是评估肿瘤细胞增殖活性的重要标志物,其表达水平与胰腺癌的复发及患者预后显著相关^[44]。本研究中,JQC-005 组和 AMG-510 组的 Ki67 阳性细胞比例显著低于模型对照组,提示这两种化合物可能通过抑制肿瘤细胞增殖改善 PANC-1 荷瘤裸鼠的生存预后。这一发现不仅验证了 JQC-005 与 AMG-510 在抑制肿瘤细胞增殖方面的潜在作用,同时也为后续临床转化研究提供了重要的实验依据。

KRAS 基因存在多个高频突变位点(如 G12、G13、Q61 等),其突变导致的信号转导通路异常及蛋白构象变化显著增加了特异性抑制剂的开发难度。虽然本研究未系统验证 JQC 系列化合物是否具有泛 KRAS 突变抑制活性,但结合现有数据推测,其作用机制可能不依赖于直接靶向 KRAS 突变体。参考已上市的 KRAS^{G12C} 共价抑制剂(如 Sotorasib 和 Adagrasib)的作用模式,JQC 系列化合物可能通过作用于 KRAS 蛋白的 Switch I 或 Switch II 变构区域,间接调控其活性状态。具体而言,该类化合物可能通过稳定 KRAS 的非活性构象,抑制其与下游效应蛋白的结合,从而阻断肿瘤细胞的增殖和生存信号通路。此外,鉴于 KRAS 突变体可调控肿瘤微环境的免疫功能(如 AMG-510 的免疫调节作用),JQC 系列化合物亦可能通过影响 KRAS 的细胞膜定位或与免疫相关蛋白的相互作用,干扰肿瘤细胞的免疫逃逸机制。

综上所述,JQC 系列化合物作为新型 KRAS 突变体抑制剂的候选分子,可能通过多重机制(包括直接或间接调控 KRAS 突变体的活性构象、影响其细胞膜定位及调节肿瘤免疫微环境)发挥作用。该系列化合物的发现为开发靶向 KRAS 突变体的创新药物提供了新的研究思路和潜在治疗策略,对改善 KRAS 突变型肿瘤患者的临床预后具有重要价值。未来的研究需要进一步探索 JQC 系列化合物的具体作用机制,包括其对 KRAS 蛋白构象的影响、对下游信号通路的调控,以及对肿瘤微环境的调节,以全面评估其作为 KRAS 突变体靶向抑制剂的潜力。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. CA A Cancer J Clinicians, 2023, 73(1): 17-48. DOI: 10.3322/caac.21763.

[2] RAHIB L, WEHNER M R, MATRISIAN L M, et al. Estimated projection of US cancer incidence and death to 2040 [J]. JAMA Netw Open, 2021, 4(4): e214708. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.4708.

[3] KLEEFF J, KORC M, APTE M, et al. Pancreatic cancer [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16022. DOI: 10.1038/nrdp.2016.22.

[4] WATERS A M, DER C J. KRAS: the critical driver and therapeutic target for pancreatic cancer [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018, 8(9): a031435. DOI: 10.1101/cshperspect.a031435.

[5] CONROY T, DESSEIGNE F, YCHOU M, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer [J]. N Engl J Med, 2011, 364(19): 1817-1825. DOI: 10.1056/NEJMoa1011923.

[6] WANG-GILLAM A, HUBNER R A, SIVEKE J T, et al. NAPOLI-1 phase 3 study of liposomal irinotecan in metastatic pancreatic cancer: Final overall survival analysis and characteristics of long-term survivors [J]. Eur J Cancer, 2019, 108: 78-87. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.12.007.

[7] AVRUCH J, KHOKHLATCHEV A, KYRIAKIS J M, et al. Ras activation of the raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade [J]. Recent Prog Horm Res, 2001, 56: 127-155. DOI: 10.1210/rp.56.1.127.

[8] KONTOMANOLIS E N, KOUTRAS A, SYLLAIOS A, et al. Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: a review [J]. Anticancer Res, 2020, 40(11): 6009-6015. DOI: 10.21873/anticancer.14622.

[9] BOS J L, REHMANN H, WITTINGHOFFER A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins [J]. Cell, 2007, 129(5): 865-877. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.018.

[10] MOORE A R, ROSENBERG S C, MCCORMICK F, et al. RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? [J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19(8): 533-552. DOI: 10.1038/s41573-020-0068-6.

[11] IVERSEN L, TU H L, LIN W C, et al. Molecular kinetics. ras activation by SOS: allosteric regulation by altered fluctuation dynamics [J]. Science, 2014, 345(6192): 50-54. DOI: 10.1126/science.1250373.

[12] PRIOR I A, HOOD F E, HARTLEY J L. The frequency of ras mutations in cancer [J]. Cancer Res, 2020, 80(14): 2969-2974. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3682.

[13] STRICKLER J H, SATAKE H, GEORGE T J, et al. Sotorasib in KRAS advanced pancreatic cancer [J]. N Engl J Med, 2023, 388(1): 33-43. DOI: 10.1056/nejmoa2208470.

[14] YAEGER R, CHATILA W K, LIPSYC M D, et al. Clinical sequencing defines the genomic landscape of metastatic colorectal cancer [J]. Cancer Cell, 2018, 33(1): 125-136. e3. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.12.004.

[15] CAMPBELL J D, ALEXANDROV A, KIM J, et al. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas [J]. Nat Genet, 2016, 48(6): 607-616. DOI: 10.1038/ng.3564.

[16] HUANG L M, GUO Z X, WANG F, et al. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 386. DOI: 10.1038/s41392-021-00780-4.

[17] BAILEY P, CHANG D K, NONES K, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer [J]. Nature, 2016, 531(7592): 47-52. DOI: 10.1038/nature16965.

- [18] WOOD K, HENSING T, MALIK R, et al. Prognostic and predictive value in *KRAS* in non-small-cell lung cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2016, 2(6): 805. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.0405.
- [19] YANG Y K, ZHANG H, HUANG S S, et al. *KRAS* mutations in solid tumors: characteristics, current therapeutic strategy, and potential treatment exploration [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(2): 709. DOI: 10.3390/jcm12020709.
- [20] YOUSEF A, YOUSEF M, CHOWDHURY S, et al. Impact of *KRAS* mutations and co-mutations on clinical outcomes in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *NPJ Precis Oncol*, 2024, 8(1): 27. DOI: 10.1038/s41698-024-00505-0.
- [21] ZHOU Y, TAO L, QIU J H, et al. Tumor biomarkers for diagnosis, prognosis and targeted therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 132. DOI: 10.1038/s41392-024-01823-2.
- [22] STICKLER S, RATH B, HAMILTON G. Targeting *KRAS* in pancreatic cancer [J]. *Oncol Res*, 2024, 32(5): 799-805. DOI: 10.32604/or.2024.045356.
- [23] 张芝榕, 王伟帆, 肖迪, 等. 氯胍增强索托拉西布抑制 *KRAS*^{G12C} 野生型膀胱癌细胞增殖和迁移的作用机制[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2023, 20(6): 9-13.
- [24] HAFEZI S, SABER-AYAD M, ABDEL-RAHMAN W M. Highlights on the role of *KRAS* mutations in reshaping the microenvironment of pancreatic adenocarcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10219. DOI: 10.3390/ijms221910219.
- [25] LOGSDON C D, LU W Q. The significance of ras activity in pancreatic cancer initiation [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(3): 338-346. DOI: 10.7150/ijbs.15020.
- [26] JI X, LI Y, KONG X Q, et al. Discovery of prodrug of MRTX1133 as an oral therapy for cancers with *KRAS*^{G12D} mutation [J]. *ACS Omega*, 2023, 8(7): 7211-7221. DOI: 10.1021/acsomega.3c00329.
- [27] KEMP S B, CHENG N, MARKOSYAN N, et al. Efficacy of a small-molecule inhibitor of *Kras*^{G12D} in immunocompetent models of pancreatic cancer [J]. *Cancer Discov*, 2023, 13(2): 298-311. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-22-1066.
- [28] KOGA T, SUDA K, FUJINO T, et al. *KRAS* secondary mutations that confer acquired resistance to *KRAS*^{G12C} inhibitors, sotorasib and adagrasib, and overcoming strategies: insights from *in vitro* experiments [J]. *J Thorac Oncol*, 2021, 16(8): 1321-1332. DOI: 10.1016/j.jtho.2021.04.015.
- [29] AWAD M M, LIU S W, RYBKIN I I, et al. Acquired resistance to *KRAS*^{G12C} inhibition in cancer [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(25): 2382-2393. DOI: 10.1056/NEJMoa2105281.
- [30] DILLY J, HOFFMAN M T, ABBASSI L, et al. Mechanisms of resistance to oncogenic *KRAS* inhibition in pancreatic cancer [J]. *Cancer Discov*, 2024, 14(11): 2135-2161. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-24-0177.
- [31] CHEN P Y, MUZUMDAR M D, DORANS K J, et al. Adaptive and reversible resistance to *Kras* inhibition in pancreatic cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(4): 985-1002. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2129.
- [32] WANG X S, SHANKAR S, DHANASEKARAN S M, et al. Characterization of *KRAS* rearrangements in metastatic prostate cancer [J]. *Cancer Discov*, 2011, 1(1): 35-43. DOI: 10.1158/2159-8274.CD-10-0022.
- [33] GAO Q Q, OUYANG W J, KANG B, et al. Selective targeting of the oncogenic *KRAS*^{G12S} mutant allele by CRISPR/Cas9 induces efficient tumor regression [J]. *Theranostics*, 2020, 10(11): 5137-5153. DOI: 10.7150/thno.42325.
- [34] MAO Z W, XIAO H Y, SHEN P P, et al. *KRAS*(G12D) can be targeted by potent inhibitors *via* formation of salt bridge [J]. *Cell Discov*, 2022, 8(1): 5. DOI: 10.1038/s41421-021-00368-w.
- [35] CHEN X, FU X Q, ZHAO W K, et al. Loss of tyrosine phosphatase SHP2 activity promotes growth of colorectal carcinoma HCT-116 cells [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 83. DOI: 10.1038/s41392-020-0192-0.
- [36] WANG X L, ALLEN S, BLAKE J F, et al. Identification of MRTX1133, a noncovalent, potent, and selective *KRAS*^{G12D} inhibitor [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(4): 3123-3133. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c01688.
- [37] LANMAN B A, ALLEN J R, ALLEN J G, et al. Discovery of a covalent inhibitor of *KRAS*^{G12C} (AMG 510) for the treatment of solid tumors [J]. *J Med Chem*, 2020, 63(1): 52-65. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01180.
- [38] SUDA K, TOMIZAWA K, MITSUDOMI T. Biological and clinical significance of *KRAS* mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29(1): 49-60. DOI: 10.1007/s10555-010-9209-4.
- [39] MOLINA J R, ADJEI A A. The Ras/Raf/MAPK pathway [J]. *J Thorac Oncol*, 2006, 1(1): 7-9. DOI: 10.1016/s1556-0864(15)31506-9.
- [40] CANON J, REX K, SAIKI A Y, et al. The clinical *KRAS* (G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity [J]. *Nature*, 2019, 575(7781): 217-223. DOI: 10.1038/s41586-019-1694-1.
- [41] GOEBEL L, MÜLLER M P, GOODY R S, et al. *KRAS*^{G12C} inhibitors in clinical trials: a short historical perspective [J]. *RSC Med Chem*, 2020, 11(7): 760-770. DOI: 10.1039/d0md00096e.
- [42] ZHOU C C, LI C Y, LUO L B, et al. Anti-tumor efficacy of HRS-4642 and its potential combination with proteasome inhibition in *KRAS*^{G12D}-mutant cancer [J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(7): 1286-1300.e8. DOI: 10.1016/j.ccell.2024.06.001.
- [43] LIANG F L, KANG Z Z, SUN X Q, et al. Inhibition mechanism of MRTX1133 on *KRAS*^{G12D}: a molecular dynamics simulation and Markov state model study [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2023, 37(3): 157-166. DOI: 10.1007/s10822-023-00498-1.
- [44] QIN R, SMYRK T C, REED N R, et al. Combining clinicopathological predictors and molecular biomarkers in the oncogenic K-RAS/Ki67/HIF-1 α pathway to predict survival in resectable pancreatic cancer [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(3): 514-522. DOI: 10.1038/bjc.2014.659.

校稿: 李征 刘颖

本文引用格式: 罗桂芳, 陈攀, 刘晓雨, 等. 新型 *KRAS* 突变体抑制剂抗胰腺癌的作用研究[J]. 肿瘤药学, 2025, 15(2): 169-177. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2025.02.04.

Cite this article as: LUO Guifang, CHEN Pan, LIU Xiaoyu, et al. A Study on the effects of novel *KRAS* mutant inhibitors on pancreatic cancer [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2025, 15(2): 169-177. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2025.02.04.