

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910134759.8

[51] Int. Cl.

A61K 31/365 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 12 月 23 日

[11] 公开号 CN 101606929A

[22] 申请日 2002.6.19

[21] 申请号 200910134759.8

分案原申请号 02816190.4

[30] 优先权

[32] 2001.6.19 [33] SE [31] 0102168-2

[32] 2001.6.26 [33] US [31] 60/300,431

[71] 申请人 阿克塞拉公司

地址 瑞典斯德哥尔摩

[72] 发明人 奥利·拉森 马格努斯·阿克塞尔森

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 邹宗亮

权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图 8 页

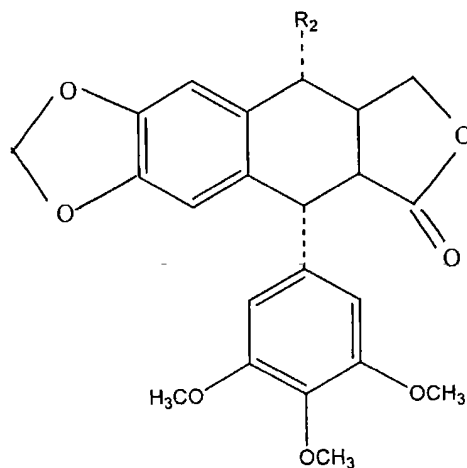
[54] 发明名称

苦鬼白脂素的用途

[57] 摘要

本发明涉及苦鬼白脂素在制备用于预防或者治疗银屑病、再狭窄以及动脉粥样硬化症的药物中的用途。

1. 式 II 化合物在制备用于预防或者治疗银屑病、再狭窄以及动脉粥样硬化症的药物中的用途,



II

其中 R₂ 为 OH, 并且其中 9 及 9' 位的碳原子具有顺式构型并且 8-9 以及 8'-9' 键为 β 键, 其中苯环在 α -位, 其为苦鬼白脂素。

2. 权利要求 1 的用途, 其中所述的化合物与细胞增殖抑制剂组合给药。

3. 权利要求 1 或 2 的用途, 在制备用于预防或者治疗银屑病的药物中的用途。

4. 权利要求 1 或 2 的用途, 在制备用于预防或者治疗再狭窄的药物中的用途。

5. 权利要求 1 或 2 的用途, 在制备用于预防或者治疗动脉粥样硬化症的药物中的用途。

苦鬼白脂素的用途

本申请为中国发明申请(发明名称: 特定环木脂体的新用途; 申请号: 02816190.4; 申请日: 2002 年 06 月 19 日)的分案申请。

技术领域

本发明涉及特定环木脂体用于抑制胰岛素样生长因子-1 受体 IGF-1R, 用于治疗 IGF-1R 依赖性疾病尤其是癌症的用途。

发明背景

胰岛素样生长因子-1 受体(IGF-1R)在恶性细胞的增生、对抗细胞凋亡及其转变中起着重要作用。此外, IGF-1R 对保持肿瘤细胞的恶性表型也非常重要, 并参与肿瘤细胞对抗肿瘤药物耐药性的产生。与之相反, IGF-1R 对完整细胞的生长似乎并非绝对需要。

IGF-1R 由负责配体结合的两个同样的细胞外 α -亚基, 以及包含跨膜结构域的 β -亚基及细胞内的酪氨酸激酶结构域组成。配体-受体的相互作用导致酪氨酸激酶结构域的酪氨酸残基的磷酸化, 其跨越 β -亚基的 973 ~ 1229 位氨基酸。磷酸化的主要位点为在第 1131、1135 及 1136 位的簇聚酪氨酸 (LeRoith, D., 等, Endocr Rev 1995 April; 16(2), 143-63)。自磷酸化后, 受体激酶磷酸化细胞内蛋白质, 如胰岛素受体底物及 Shc, 该蛋白质又分别激活磷脂酰肌醇-3 激酶及具促分裂原活化蛋白激酶的信号通路。

基于 IGF-1R 在恶性细胞中的关键性作用, 其作为癌症治疗的靶标正日益明确 (Baserga, R., 等, Endocrine Vol.7, no.1, 99-102, August 1997)。一种阻滞 IGF-1R 活性的策略是诱导 IGF-1R 酪氨酸激酶的选择性抑制。然而, 迄今为止仍无可用的选择性 IGF-1R 抑制剂。

包括众所周知的毒性环木脂体鬼臼毒素药物的使用已逾百年, 其抗癌活性尤为引人注目。然而, 鬼臼毒素的副作用阻碍了其用作抗癌药物。鬼臼毒素的细胞毒性机制归因于其与 β -微管蛋白的结合引起微管聚集的抑制以及细胞有丝分裂的停顿。已经知道鬼臼毒素内酯环的反式构型是其与 β -微管蛋白结合所必需的。与此形成鲜明对比的是, 在内酯环上具有顺式构型

的其立体异构体苦鬼白脂素(picropodophyllotoxin)对微管的亲和力下降 50 倍,在大鼠中的 LD₅₀ 高出 35 倍。由于苦鬼白脂素对微管的低亲和力,该化合物一直没有引起注意。在过去的数十年间,对鬼白毒素衍生物的兴趣集中在依托泊苷,其为 4'-去甲基-表鬼白毒素的亚乙基葡萄糖苷衍生物。依托泊苷为 DNA 拓扑异构酶 II 抑制剂,对微管无活性,当前正用于癌症的治疗。

背景技术

Parrizas M 等(Endocrinology 1997, Vol.138, No.4, 1427-1433)从事了许多合成的酪氨酸激酶抑制剂的研究,该类抑制剂为酪氨酸磷酸化抑制剂。IGF-1R 为酪氨酸激酶受体家族的成员,该家族包括胰岛素受体、表皮生长因子受体(EGF)、神经生长因子受体(NGF)及血小板衍生生长因子受体(PDGF)。所有对 IGF-1R 有活性的酪氨酸磷酸化抑制剂对胰岛素受体有交叉活性,尽管其中有两种对 IGF-1R 表现出中度的选择性。因而该结果暗示设计并合成能够区分这两种受体的小分子是可能的。

Blum, G 等 Biochemistry 2000, 39, 15705-15712 讨论了 IGF-1 受体激酶的底物竞争抑制剂。已经报道了许多为分离的 IGF-1R 激酶抑制剂的先导化合物。寻找这些化合物借助了胰岛素受体激酶结构域的三维结构知识,该结构与 IGF-1R 激酶结构有 84% 同源性。已发现的最强效的抑制剂为酪氨酸磷酸化抑制剂 AG538, 其 IC₅₀ 为 400nM。然而,该抑制剂也阻滞胰岛素受体激酶。

Kanter-Lewensohn, L., 等 Molecular and Cell Endocrinology 165(2000), 131-137 中考察了他莫西芬(TAM)对黑素瘤细胞的细胞毒性是否依赖于干扰胰岛素样生长因子-1 受体的表达或功能。研究发现,尽管 TAM 并不能强烈影响 IGF-1 的结合以及细胞表面 IGF-1R 的表达,但 TAM 有效地阻滞 IGF-1R 的 β -亚基的酪氨酸磷酸化。

在 J.L. Hartwell 等的鬼白根化学(Chemistry of Podophyllum)中, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe 15, 1958, 83-166, 概述了鬼白毒素及其不同衍生物,该衍生物来源于两种商业化的植物足叶草(Podophyllum peltatum)及桃儿七(Podophyllum emodi)。

苦鬼白脂素通常被视为无生物活性, Ayres, D.C., 和 Loike, J.D., Lignana. Chemical, biological and clinical properties. Cambridge University Press, Cambridge, 1990。

发明目的

本发明目的是发现一种通过抑制胰岛素样生长因子-1 受体的酪氨酸激酶治疗 IGF-1R 依赖性疾病尤其是癌症的新方法。

附图概述

图 1 显示了包括 IGF-1 受体的第 1131、1135 和 1136 位酪氨酸的 12 个氨基酸肽的计算机模型。

图 2A 显示了化合物苦鬼白脂素及鬼白毒素的结构式，图 2B 为去氧鬼白毒素及 β -阿朴苦鬼白脂素(apopicrodophyllin)的结构式。

图 3 为苦鬼白脂素对不同受体的酪氨酸磷酸化作用的曲线图。

图 4 为苦鬼白脂素对 IGF-1R 自磷酸化作用的曲线图。

图 5A 及 5B 为苦鬼白脂素对 4 种不同细胞系存活力的剂量反应效果曲线图。图 5A 分别显示了对黑素瘤细胞系 FM55 及对肉瘤细胞系 RD-ES 的作用，图 5B 为对两种受控(manipulated)细胞系 R-及 P6 的作用。

图 6A 及 6B 为苦鬼白脂素对小鼠瘤重作用的图表。

发明描述

利用计算机程序分析了 IGF-1R 酪氨酸结构域 12 个氨基酸序列的三维结构，该序列包括第 1131、1135 以及 1136 位的酪氨酸残基，以期发现能够模拟酪氨酸残基及干扰其磷酸化的化合物。随后发现，当使用 12 个氨基酸的肽时，3 个关键酪氨酸中必须在 IGF-1R 中自磷酸化活化的第 1135 及 1136 两个酪氨酸，彼此间隔可近达 0.95nm(9.5Å)，这些基团间的明显角度约为 60°。该序列的构型如图 1 所示。如此近的间隔在胰岛素受体相应的酪氨酸中并没有观察到。图 1 也描绘了鬼白毒素及苦鬼白脂素的空间结构。

分子模拟表明，具有抑制活性的分子可被仅由一个碳原子分开的两个苯环组成。当更换为两个碳原子桥时，苯环取代基间的距离则太长，约 1.3nm(13Å)。

相应于酪氨酸中羟基的抑制剂取代基选择为甲氧基或亚甲基二氧基，由于它们化学上相对稳定，即不易被氧化或磷酸化。这些取代基间的距离应当约 $0.95 \pm 0.10\text{nm}(9.5 \pm 1.0\text{Å})$ 。

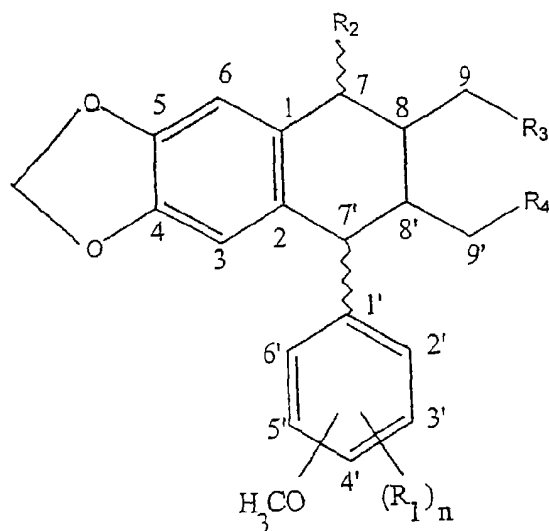
然后令人吃惊地发现，包括鬼白毒素和苦鬼白脂素的环木脂体类的两个

呈一定角度的取代苯环,几乎可以正好适合第 1135 及 1136 位酪氨酸之间的口袋,表明所述化合物可干扰这些酪氨酸残基的自磷酸化。与对微管作用不同的是,对 IGF-IR 的抑制不限于在内酯环上有反式构型的环木脂体类。

为进入受体,具有抑制活性的分子必须为小分子。当例如鬼臼毒素结合葡萄糖苷衍生物时,鬼臼毒素-4,6-O-苯亚甲基- β -D-吡喃葡萄糖,对 IGF-1R 的作用完全消失。此外,将内酯环还原为二醇结构,由于还原的取代基突出分子导致分子的体积增大,而最终导致还原化合物的活性剧降。通过形成鬼臼毒素二醇的亚甲基二氧基衍生物或丙酮化合物(acetonides)增大分子体积也可导致化合物活性的减小或丧失。

抑制剂分子还必须为相对地非极性,如此方可自由穿透细胞膜及 IGF-1 受体,但也必需足够的极性以保证合理的水溶性。分子的极性由氧基团的数量及性质决定。当水溶性介于去氧鬼臼毒素的水溶性,即约 0.01mM,及鬼臼毒素的水溶性,约 0.1-0.2mM 之间时,极性似乎最佳。分子不带电或不含有强极性基团。

本发明涉及式 I 化合物用作胰岛素样生长因子-1 受体酪氨酸磷酸化的抑制剂的用途,

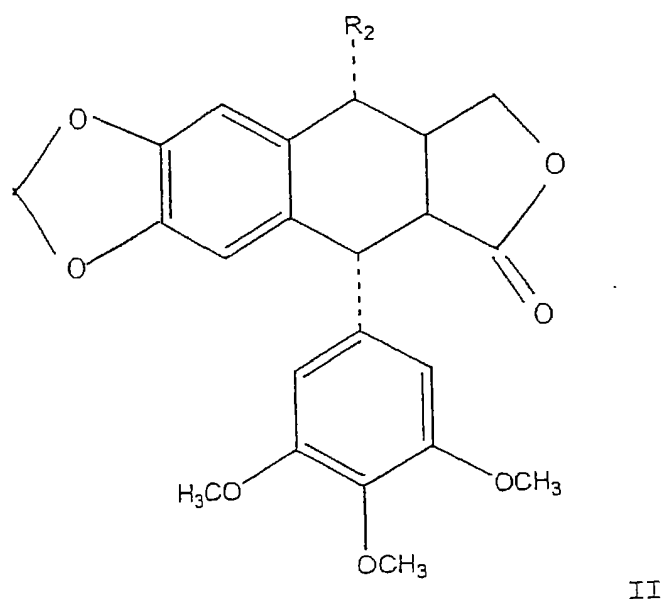


其中, R_1 可相同或不同, 为 OH 或 OCH_3 , n 为 0、1 或 2, R_2 、 R_3 及 R_4 可相同或不同, 为 H、OH、O、 $OOCH_3$ 、 $OOCH_2CH_3$ 、 OCH_3 或 OC_2H_5 , 或 R_3 及 R_4 共同形成醚或内酯, 并任选包含双键 $\Delta^{7(8)}$ 或 $\Delta^{8(9)}$ 。

特别地, 所有式 I 化合物的 9 及 9' 位的碳原子具有顺式构型, 即 8-9 及

8'-9'键位于碳环平面或平面上(β 键),如式 I 实线所示。诸如碳 1'及 7'间的波形线表明该键可为 α 或 β 键。 α 键位于碳环平面的下面,如虚线所示。苯环优选为 α 位,如所示的苦鬼白脂素、去氧苦鬼白脂素、 α -及 β -阿朴苦鬼白脂素。

本发明特别涉及式 II 化合物用作药物,

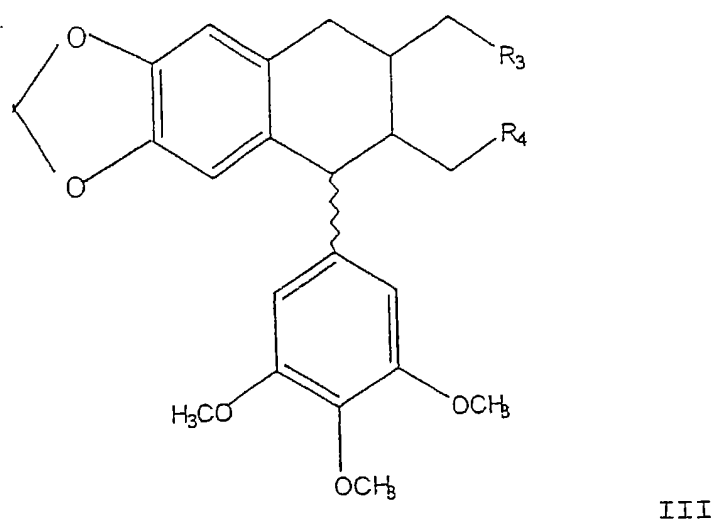


其中 R_2 如式 I 所定义。优选化合物为苦鬼白脂素或苦鬼白脂素。所述化合物的化学结构如图 2 所示。

天然产物鬼臼毒素及去氧鬼臼毒素,用作合成所述苦类衍生物的起始原料。为制备纯净形式的该类物质,以有机溶剂萃取诸如足叶草或桃儿七的精细粉碎的干燥根茎。然后将萃取物过滤,并在硅胶上浓缩。收集包含目标物质的流份,再经酸性三氧化二铝及硅胶等层析,最后重结晶。

去氧苦鬼白脂素及苦鬼白脂素可分别由去氧鬼臼毒素及鬼臼毒素制得。将 1mg 后者物质溶于 70% 的甲醇水溶液中。向该溶液中加入 20mg 的乙酸钠后,将混合物 55℃ 温化 20 小时。将醇蒸干后,以乙酸乙酯萃取所得产品,然后以硅胶层析纯化,流动相: 己烷-乙酸乙酯混合物,和/或十八硅烷键合硅胶,流动相: 甲醇水溶液; HPLC)。

用作药物的本发明特别感兴趣的其它化合物,可以下式 III 描述



其中 R_3 及 R_4 如式 I 中所定义, 其另外包含双键 $\Delta^{7(8)}$ 或 $\Delta^{8(9)}$, 用作药物。优选的式 III 化合物为 α -阿朴苦鬼白脂素及 β -阿朴苦鬼白脂素。

α -及 β -阿朴苦鬼白脂素可经鬼白毒素在高温下于缓冲的乙醇溶液中温化制备, 如 Buchardt, O. 等, J Pharmaceut Sci 75, 1076-1080, 1986 中所述。苦鬼白脂素及其阿朴衍生物的全合成如 Gensler, J.W. 等, J Am Chem Soc 82, 1714-1727, 1960 所述。

式 I 化合物中其它可提及的实例: 表苦鬼白脂素、苦鬼白脂素酮 (picropodophyllone)、4'-去甲基苦鬼白脂素, 及苦鬼白脂素乙酸酯衍生物, 苦鬼白脂素酸 (picropodophyllic acid) 的甲酯及乙酯衍生物。

本发明具体地涉及式 I 化合物用于抑制胰岛素样生长因子-1 受体的酪氨酸磷酸化的药物制备中的用途。

为了设计用于治疗目的的 IGF-1R 酪氨酸激酶抑制剂, 非常重要的是, 该抑制剂不与胰岛素受体激酶产生交叉反应, 后者与 IGF-1R 高度同源。同时抑制胰岛素受体将导致体内的致糖尿病性反应。该反应包括极其严重的副作用, 由于受体激酶被阻滞, 该副作用不能经胰岛素治疗克服。但是现在已经证实, 参见图 3, 苦鬼白脂素为远较酪氨酸磷酸化抑制剂类化合物强的 IGF-1R 抑制剂, 且完全不干扰胰岛素受体酪氨酸激酶。其也不干扰表皮生长因子、血小板衍生生长因子或成纤维细胞生长因子受体的酪氨酸磷酸化。

本发明的优选方面涉及上述化合物在药物制备中的用途, 该药物用于预防或治疗 IGF-1R 依赖性疾, 如癌症、动脉粥样硬化症, 包括预防血管手

术后冠状动脉的再狭窄、银屑病及肢端肥大症。

鬼臼毒素长期以来一直被用于治疗癌症，然而其具有难以接受的副作用。鬼臼毒素抗癌效果及其副作用都源于其对微管聚集的抑制以及细胞的有丝分裂的停顿。现已证实，鬼臼毒素及其无毒性的异构体苦鬼臼脂素为极强的特异性胰岛素样生长因子-1 受体酪氨酸磷酸化抑制剂，苦鬼臼脂素通常被认为无生物活性，该受体对癌症细胞的存活发挥着关键的作用。最重要的是，具有顺式构型内酯环的苦鬼臼脂素或其它苦类衍生物都不抑制胰岛素受体，胰岛素受体与 IGF-1R 高度同源。它们也不抑制其它重要的生长因子受体激酶。与鬼臼毒素相比，苦鬼臼脂素具有低细胞毒性，这表明，苦鬼臼脂素为高度选择性的 IGF-1R 抑制剂。

生物实验结果显示，亚微摩尔浓度的苦鬼臼脂素或其它苦类衍生物足以引起肿瘤细胞的死亡。然而，为达到最佳治疗效果，据信长期保持相对恒定的抑制剂血浆浓度是重要的，这可使其持续饱和所有的 IGF-1Rs，也因此最终杀死尽可能多的恶性细胞。因而，在持续输液苦鬼臼脂素衍生物，并同时监测化合物的血浆浓度为一种代替反复(例如，每日)注射的治疗策略，反复给药可引起治疗间隔中 IGF-1R 的反复重新激活。

先前以鬼臼毒素治疗人及动物的尝试证实，其为相对较强的全身毒性(大鼠的 LD_{50} 为 14mg/kg)及局部毒性(组织损伤)的化合物。其细胞毒性与其结合 β -微管有关，但体外测定时这仅在远高于 IGF-1R 抑制需要的浓度的高浓度下发生(IC_{50} 分别为 0.5~1.0 μ M 及 0.001 μ M)。该毒性使其不能用作经肠胃外、口服及局部给药的药物。

本发明特别涉及上述化合物用于制备药物的用途，该药物用于预防或治疗不同类型癌症，例如恶性黑素瘤；原发性神经外胚层瘤，如尤因氏肉瘤；神经胶质瘤，如恶性胶质瘤及星细胞瘤；前列腺癌；乳腺癌；骨髓增生性及淋巴组织增生性疾病，如白血病、淋巴瘤；胃肠肿瘤，如胃癌、结肠癌及胰腺癌；妇科癌症，如卵巢癌及子宫瘤。

至于不完全依赖 IGF-1R 的肿瘤，本发明化合物可增强其它抗癌药物的效果。因而，本发明也涉及式 I 化合物与其它细胞增殖抑制剂(cytostaticum)合用。可以与本发明环木脂体合用的细胞增殖抑制剂(cytostatica)的实例可为长春新碱、紫杉醇及依托泊苷。

本发明特别涉及式 III 化合物在用于治疗白血病的药物制备中的用途。

除了治疗癌症，环木脂体可用于治疗其它发病机理涉及 IGF-1/IGF-1R 的疾病，如动脉粥样硬化及银屑病，参见例如 Bayes-Genis, A 等, *Circ Res* 86, 125-30(2000)。

本发明特别涉及式 I 化合物用于治疗银屑病的药物制备中的用途。表皮增生为常见皮肤病银屑病的重要特征。IGF-1 刺激表皮角化细胞是细胞分化的基本条件，因而，对 IGF-1 敏感性的增加可发生银屑病。在近期研究中，将 IGF-1 反义寡核苷酸注入人银屑病病变部位，这种治疗引起增生的表皮显著地恢复正常，Wraight, C.J., 等, *Nat Biotechnol* 18, 521-6(2000)。该结果有力地表明，IGF-1R 刺激为银屑病表皮增生的限速步骤，选择性抑制剂靶向 IGF-1R 可形成新的潜在银屑病治疗的基础。

本发明特别涉及式 I 化合物在制备药物中的用途，该药物用于治疗动脉粥样硬化及冠状动脉成形术后的再狭窄。IGF-1 为动脉细胞生长促进因子，并为诸如动脉粥样硬化斑块的发展及冠状动脉成形术后的再狭窄之类的心血管疾病的中介蛋白。IGF-1 促进了巨噬细胞的趋化性、过度的 LDL 胆固醇的摄取及促炎细胞因子的释放。此外，IGF-1 刺激了血管平滑肌细胞 (VSMC) 的增生及转移形成新内膜。因而，IGF-1 在这些进程中似乎起着关键的作用，为了限制或逆转斑块增长、动脉粥样硬化中的脆性及再狭窄的新内膜增生，可使用 IGF-1 抑制剂抑制 IGF-1 的活性 (Bayes-Genis, A., 等, *Circ Res* 86, 125-130, 2000)。

本发明还涉及包含式 I 化合物以及生理上可接受的载体的药学组合物。任选包含常规添加剂的药学组合物，视疾病及患者情况，可以任何合适的途径施用于患者。

进行非胃肠给药时，所述化合物可以注射剂量进行给药，或通过静脉连续输液化合物在生理可接受的稀释剂中形成的溶液、悬液或乳化液，作为载体的稀释剂可为无菌液体，如水、醇、油及其它可接受的有机溶剂，添加或不添加表面活性剂及其它可药用佐剂。

化合物也可以储存注射剂 (depot injection) 或植入片制剂形式使用，该制剂可以实现活性成份缓释的方式进行配制。

口服使用时，化合物可制成固体或液体制剂，如胶囊、丸剂、片剂、锭剂、散剂、溶液、混悬剂或乳剂。

至于局部用药，化合物以油膏、乳膏、软膏、洗剂或贴片剂的形式进行

给药。

本发明因此还涉及一种治疗哺乳动物癌症的方法，包括使用药学组合物，该组合物包含式 I 化合物及生理上可接受的载体，在恒速给肿瘤患者注射给药时，应控制化合物的血浆水平，调整给药速率以在足够肿瘤控制或消失的时间内保持 0.05-5.0 μM 的血浆浓度。

实验

材料

化学材料

培养基、胎牛血清及抗生素等细胞培养试剂购自 Gibco, Sweden。除非另有说明，所有其他化学试剂均购自 Sigma(St. Louis, MO, USA)。抗磷酸酪氨酸的小鼠单克隆抗体(PY99)、抗 IGF-1R α 亚基及胰岛素受体的多克隆抗体(N20)，及抗血小板衍生生长因子受体的多克隆抗体自 Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA, USA)获得。IGF-1R α 亚基的单克隆抗体(α IR-3)及抗成纤维细胞生长因子受体的单克隆抗体购自 Oncogene Science(Manhasset, NY, USA)。抗表皮生长因子受体的鼠单克隆抗体购自 Life Science，抗 IRS-1 琼脂糖结合物抗体购自 UBI(Lake Placid, NY, USA)。

(^3H)胸苷及(^3H)亮氨酸购自 Amersham Int.(UK)及抗 α 平滑肌肌动蛋白的单克隆抗体购自 Sigma Immuno Chemicals (La Jolla, CA, USA)。重组 IGF-1 由 Pharmacia Upjohn(Stockholm, Sweden)馈赠。去氧鬼臼毒素及鬼臼毒素(纯度 99.97%)、 α -阿朴苦鬼臼脂素及 β -阿朴苦鬼臼脂素由 Analytecon SA, PreJorat, Switzerland 惠赠，鬼臼毒素-4,6-O-苯亚甲基- β -D-吡喃葡萄糖甙由 Conpharm AB, Uppsala, Sweden 惠赠。依托泊苷购自 Sigma。

细胞培养

人黑色素细胞系 SK-MEL-2、SK-MEL-5 及 SK-MEL28、尤因氏肉瘤细胞系 RD-ES 及 ES-1、肝细胞瘤细胞系 HepG2、前列腺癌细胞系 PC-3 及乳腺癌细胞系 MCF-7 购自 American Tissue Culture Collection, USA。恶性黑色素瘤细胞系 BE、DWB 及 FM55 由 CCK, Karolinska Hospital, Stockholm, Sweden 的 R Kiessling 教授处获得。R-及 P6 细胞系由 R.Baserga 教授(Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA)惠赠。R-细胞为 IGF-1R 阴性，而

P6 细胞过度表达 IGF-1R。

角化细胞(HaCaT 细胞)由 MonaBackdahl 教授(Department of Dermatology, Karolinska Hospital, Stockholm, Sweden)提供并共同测定。HaCaT 细胞系为自发的永生化人角化细胞细胞系(Boukamp P, 等, J Cell Biol 106:761-771, 1988), 其经常用作银屑病模型(Wright, C.J., 等 Nat Biotechnol 18:521~526, 2000)。HaCaT 细胞在 Dulbecco's Modified Eagle's 培养基中培养, 该培养基包含 10%胎牛血清、谷氨酰胺、苜青霉素及链霉素。

人血管平滑肌细胞(VSMC)基本上如前述的方法(Ross R., J Cell Biol 50:172-186, 1971)自人肾动脉手术标本分离并进行培养。简而言之, VSMC 可自原始外植体移出, 随后在融合时传代。将细胞保持在 F12 培养基中, 该培养基包含 15%的胎牛血清、0.05mg/ml 维生素 C、2 μ g/ml 两性霉素及 200IU/ml 青霉素。培养细胞为均一的人平滑肌细胞, 可由其形态学及平滑肌特异性 α 肌动蛋白免疫染色确定, 该肌动蛋白识别独特的抗原表位。培养温度为 37 $^{\circ}$ C, 湿度 85%, 空气中二氧化碳的浓度为 5%。培养基每周更换 2 次, 细胞在第 2~8 代以胰蛋白酶(0.25%)及 EDTA(0.02%)溶液进行富集。

人慢性髓性白血病细胞系 K562/S 及 K562/Vcr30 以及急性髓性白血病细胞系 HL60/0 及 HL60/Nov 获自 ATCC。K562/S 及 K562/VcR₃0 为野生型(无抗性)细胞, 而 K562/Vcr30 及 HL60/Nov 为细胞静止抗性亚系。所有白血病细胞系在 RPMI1640 培养基中培养, 该培养基另外加入 10%的胎牛血清、2mM 的谷氨酰胺、苜青霉素(100U/ml)及链霉素(100 μ g/ml)。细胞生长于组织培养烧瓶中, 该烧瓶保持 95%空气/5%CO₂ 的气氛中, 置于 37 $^{\circ}$ C 的湿度培养箱中。实验细胞在 60mm 塑料皿或 96 孔塑料板中培养。

所有其它细胞系在 Minimal Essential Medium 中培养, 该培养基包含 10%的胎牛血清、谷氨酰胺、1%苜青霉素及链霉素。细胞呈单层生长于组织培养烧瓶中, 该烧瓶保持 95%空气/5%CO₂ 气氛中, 置于 37 $^{\circ}$ C 的湿度培养箱中。实验细胞在 35mm 或 60mm 塑料皿或 96 孔塑料板中培养。实验于亚融合生长条件下开始。

方法

体外酪氨酸激酶测定

IGF-1R 催化的 polyTyrGlu(pTG)底物磷酸化的操作方法基本上如前所述

[Parrizas M.,等, *ibid.*, 及 Blum G. ,等,*ibid.*]. 免疫沉淀的 IR 源自 Hepg2, IGF-1R 源自 P6 细胞萃取物, 免疫耗竭的上清液以分析非 IGF-1R 酪氨酸激酶。磷酸化聚合物底物以纯的磷酸酪氨酸特异性单克隆抗体进行检测, 该单克隆抗体与辣根过氧化酶(HARP)结合。颜色由 HRP 生色底物邻苯二胺二盐酸盐(OPD)显色。颜色以分光光度测定法定量(ELISA reader), 并反应了酪氨酸激酶的相对量。用 IGF-1R 及 IR 抗体对沉淀进行免疫印迹以验证受体的存在。使用了一系列的稀释液, 以测定相对于 IGF-1R 及 IR 量的最佳条件。线性信号持续 30 分钟, 为上限达 75ng/孔的 IGF-1R 浓度的函数。

简而言之, 4℃下, 以 1μg/ml 小鼠抗 IGF-1R β 亚基的单克隆抗体 (LabVision)包被 96 孔板(Immunolon, Nunc)过夜。板以 BSA 的 PBS(ELISA 封闭缓冲液, Pierce)封闭, 加入源于 P6 细胞系的 80μg/ml 总蛋白裂解产物。将板温育 1 小时后, 以 PBS Tween 洗涤。在以 IGF-1 激活激酶之前, 室温向 PBS 中加入待考察的化合物并孵育 30 分钟。按照厂家说明, 用 Sigma 试剂盒测定激酶体外磷酸化。以分光光度测定法测定后, 以统计软件的回归函数确定抑制剂的 IC₅₀ 值。

IGF-1R 酪氨酸自磷酸化以夹心 ELISA 测定进行分析。简而言之, 4℃下, 以 1μg/ml 鼠抗 IGF-1R β 亚基的单克隆抗体 Ab-5(LabVision)包被 96 孔板(Immunolon, Nunc)过夜。将板以 BSA 的 PBS Tween 封闭 1 小时, 加入源于 P6 细胞系的 80 g/ml 总蛋白裂解产物。阴性对照组使用源于 R-细胞系的总蛋白裂解产物。在以 ATP 激活激酶之前, 向不含 ATP 的酪氨酸激酶缓冲液中加入待考察的化合物, 室温孵育 30 分钟。使用 Sigma 试剂盒进行激酶分析。以分光光度测定法测定后, 以统计软件的回归函数确定抑制剂的 IC₅₀ 值。

细胞生长及存活测定

细胞增殖试剂盒 II(Roche Inc.)基于经由活力细胞的呼吸链所致的甲基橙染料(orange formazan dye)中黄色四唑盐 XTT 色度的变化(Roehm, NW 等, *J Immunol Methods* 142: 257-265, 1991)。将细胞以 5000/孔浓度的接种于每孔含有 100 μl 培养基的 96 孔板中, 然后以不同浓度的药物处理。将细胞培养 24 或 48 小时后, 按照厂家操作规范, 与 XTT 标记混合液孵育。4 小时后, 以带有 495nm 滤器的多孔扫描分光光度计定量甲基橙染料。将吸收度

与活力细胞数直接相关。绘制接种浓度为 1000 ~ 10000 细胞/孔(以 1000 细胞/孔的速率递增)的未处理细胞的标准吸收度曲线。所有标准组及实验组皆重复 3 次。

完整细胞受体的酪氨酸磷酸化测定

将细胞在 6cm 板中培养至亚融合状态, 然后加入包含 10%FBS 及所需化合物的新鲜培养基, 并孵育 1 小时。再将细胞裂解, 以特异性抗体进行免疫沉淀反应。免疫沉淀物以十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 然后转移至硝酸纤维素膜上, 并与抗磷酸酪氨酸抗体孵育。肌动蛋白(细胞萃取物)或 IGF-1R β 亚基的抗体载入作为对照。检测后, 将膜扫描定量。

免疫沉淀及蛋白含量测定

将分离的细胞在 10ml 包含蛋白酶抑制剂的冰冷 PBSTDS 中裂解(Carlberg, M.等, J Biol Chem 271: 17453-17462, 1996)。在 1ml 样品中加入 50 μ l 蛋白 A 或 G 琼脂糖, 并在定轨摇床 4℃温育 15 分钟。以 10,000r/分 4℃离心 10 分钟, 保存上清液。使用购自 Bio-Rad 的试剂染色结合检测法测定蛋白含量。将胎牛血清用作标准。加入 15 μ l 蛋白 G 琼脂糖及 5 μ l 抗 IGF-1R 抗体。在定轨摇床 4℃温育 3 小时后, 以 14,000 \times g 微型离心机脉冲离心 10 秒钟收集沉淀。弃去上清液, 并将沉淀以 PBSTDS 洗涤 3 次。

十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

将蛋白样品溶解在 2 \times 样品缓冲液中, 该缓冲液包括 Laemmli 缓冲液及 0.5%甲醇, 然后 96℃煮 5 分钟。样品以 SDS-PAGE 分离, 使用 4%浓缩凝胶及 7.5%分离凝胶。在所有的实验中同时运行标准分子量物质(BioRad, Sweden)。

蛋白质印迹

SDS-PAGE 分离后, 将蛋白转移过夜至硝基纤维素膜(Hybond, Amersham, UK)上, 然后, 室温下于包含 4%脱脂奶粉及 0.02% Tween20 的 PBS、pH 为 7.5 的溶液中封闭 1 小时。以一级抗体室温孵育 1 小时后, 以

Tween 的 PBS 洗涤 3 次, 然后, 再以二级抗体室温孵育 1 小时。洗涤 3 次后, 将膜以链亲和素标记的辣根过氧化酶温育 30 分钟, 再以 Amersham ECL system(Amersham,UK)检测。膜以 Fluor-S(BioRad)扫描。

实验 1. 鬼臼毒素衍生物对培养的黑素瘤细胞的 IGF-1R 磷酸化的影响

将 FM55 黑素瘤细胞接种于 6cm 皿中, 使其在 Minimal Essential 培养基中的浓度达 $10,000$ 细胞/ cm^2 , 该培养基加入 10% 胎牛血清(FCS)。当皿中细胞密度达到 $65,000$ 细胞/ cm^2 时, 以 $0.05\mu\text{M}$ 鬼臼毒素、去氧鬼臼毒素、苦鬼臼脂素、去氧苦鬼臼脂素、4'-去甲基-7-(4,6-O-亚乙基- β -D-吡喃葡萄糖基)表鬼臼毒素(依托泊苷)及鬼臼毒素-4,6-O-苯亚甲基- β -D-吡喃葡萄糖甙(pf-4,6-O)处理 1 小时。同时还用 $15\mu\text{M}$ 依托泊苷及 pf-4,6-O 进行处理。然后, 按照方法部分所述的方法富集细胞以进行测定及定量 IGF-1R 磷酸化。表 1 中的值表示 3 次实验的平均值。

表 1. 完整细胞中 IGF-1R 磷酸化水平(%OD)

鬼臼毒素	5
去氧鬼臼毒素	2
苦鬼臼脂素	8
去氧苦鬼臼脂素	5
依托泊苷(0.05M)	102
依托泊苷($15\mu\text{M}$)	105
Pf-4,6-O($0.05\mu\text{M}$)	100
Pf-4,6-O($15\mu\text{M}$)	102

该结果表明, 除依托泊苷及 Pf-4,6-O 外, 鬼臼毒素、去氧鬼臼毒素、苦鬼臼脂素及去氧苦鬼臼脂素皆为 IGF-1R 磷酸化强抑制剂。

实验 2. 苦鬼臼脂素对无细胞系统中 IGF-1R 磷酸化的剂量反应效果

在完整细胞的所有这些数据表明, 苦鬼臼脂素及鬼臼毒素防止 IGF-1R 磷酸化, 但不能表明其是直接或间接作用于酪氨酸激酶。因而, 我们分离出受体, 测定了体外苦鬼臼脂素对 IGF-1R 催化的底物酪氨酸磷酸化及 IGF-1R 自磷酸化的影响。苦鬼臼脂素有效地降低了 pTG 底物的磷酸化(IC₅₀

值 0.006 μ M, 见图 3)。与之相反, 它并不能干扰 EGFR 及 IR 酪氨酸激酶底物磷酸化, 同时也不能阻滞其它“非 IGF-1R 激酶”的磷酸化(图 3), 其由 IGF-1R 的免疫耗竭(immunodepletion)获得。鬼臼毒素产生与苦鬼臼脂素类似的结果。

在下一组无细胞体系的实验中, 我们证实了 PPP 有效抑制 IGF-1R 的自磷酸化(详见方法), IC₅₀ 值约 0.001 μ M(见图 4)。PPT 获得类似反应(未显示数据)。为考察 PPP 在 ATP 水平或在底物水平(即 IGF-1R β 亚基的酪氨酸激酶结构域)干扰酪氨酸自磷酸化, 在测定中向反应缓冲液加入不同浓度的 ATP (19-300 μ M)。正如结果所示, 这并不改变 PPP 的 IC₅₀ 值, 该值保持在 0.001~0.002 μ M(图 4)。这些结果意味着, ATP 并不干扰 IGF-1R 自磷酸化抑制剂的作用, 而是抑制了 IGF-1R 酪氨酸激酶底物的磷酸化。

实验 3. 苦鬼臼脂素及鬼臼毒素对培养细胞的多种受体酪氨酸激酶的特性

将 FM55 黑素瘤细胞如实验 1 所述的方法培养。当皿中细胞密度达到 65,000 细胞/cm² 时, 分别以 0(对照)及 0.05 μ M 苦鬼臼脂素及鬼臼毒素处理。然后分离细胞, 以各自的抗体分别进行 IGF-1R、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、表皮生长因子受体(EGFR)、胰岛素受体(IR)及胰岛素底物-1(IRS-1) 免疫沉淀反应。IRS-1 为 IGF-1R 的底物, 因而其磷酸化依赖于磷酸化的 IGF-1R。如上述方法进行凝胶电泳、蛋白质印迹杂交及不同信号的定量。

表 2.完整细胞 IGF-1R 磷酸化水平(%OD)

底物	苦鬼臼脂素(PPP)及鬼臼毒素(PPT)	
	0.05 μ M	
	PPT	PPP
IGF-1R	7	20
FGFR	105	100
PDGFR	100	104
EGFR	107	106
IR	101	100
IRS-1	10	17

这表明苦鬼白脂素及鬼白毒素对 IGF-1R 是特异的。

实验 4. 鬼白毒素及苦鬼白脂素对不同类型恶性细胞 IGF-1R 磷酸化的影响

将 12 种不同的细胞系接种于 6cm 皿中, 使其在 Minimal Essential 培养基中的浓度达 10,000 细胞/cm², 该培养基加入 10% 胎牛血清(FCS)。当皿中细胞密度达到 65,000 细胞/cm²时, 以 0、0.01、0.025、0.05、0.1 或 1.0μM 剂量的鬼白毒素及苦鬼白脂素处理 1 小时。该细胞然后如上述方法收集进行测定并进行 IGF-1R 磷酸化定量。然后计算 EC₅₀ 值, 其指 50%有效浓度, 即对每种抑制剂及细胞系而言磷酸化降低 50%所需的浓度。其值如表 3 所示, 结果基于两次不同实验。

表 3. IGF-1R 磷酸化的 EC₅₀ 值

细胞系	来源	鬼白毒素	苦鬼白脂素
SK-MEL-2	黑素瘤	0.04	Nd
SK-MEL-5	黑素瘤	0.03	0.04
SK-MEL-28	黑素瘤	0.03	0.04
BE	黑素瘤	0.04	nd
FM55	黑素瘤	0.04	0.06
DWB	黑素瘤	0.03	nd
MCF-7	乳腺癌	0.05	0.04
PC-3	前列腺癌	0.06	0.09
RD-ES	尤因氏肉瘤	0.03	0.05
HepG2	肝胚细胞瘤	-*	-*
R-	IGF-1R 阴性成纤维细胞	-*	-*
P6	IGF-1R 过度表达成纤维细胞	0.02	0.03

*表示对照组无 IGF-1R 活性, nd 指未检测

这表明鬼白毒素及苦鬼白脂素抑制不同癌症细胞的 IGF-1R 磷酸化。

实验 5. 鬼白毒素及苦鬼白脂素对大量恶性细胞类型生存力的影响

将 12 类不同的细胞系接种于 96 孔板(培养基体积为每孔 100 μl), 使其

在 Minimal Essential 培养基中的浓度达 $10,000$ 细胞/ cm^2 , 该培养基加入胎牛血清。当皿中细胞密度达到 $65,000$ 细胞/ cm^2 时, 以不同剂量鬼臼毒素及苦鬼白脂素处理 48 小时。然后, 测定细胞活力(见上)。将各抑制剂及细胞系 EC_{50} 计算为浓度值, 该值为引起细胞存活率下降 50%, 结果如表 4 所示。以苦鬼白脂素处理黑素瘤细胞系 FM55 及尤因氏肉瘤细胞系 RD-ES 的剂量反应曲线如图 5A 所示。两种肿瘤细胞系活力随苦鬼白脂素浓度下降。图 5B 表明鼠成纤维细胞细胞系的剂量反应曲线, 该细胞系或为缺失(R-), 或为过度表达人 IGF-1R(P6)。P6 细胞活力随苦鬼白脂素剂量下降, R-细胞无反应。这表明苦鬼白脂素选择性阻滞 IGF-1R。表 4 及图 5 的所有结果基于 4 组不同的实验。

表 4. 细胞活力的 $\text{EC}_{50}(\mu\text{M})$

细胞系	来源	鬼臼毒素	苦鬼白脂素
SK-MEL-2	黑素瘤	0.05	Nd
SK-MEL-5	黑素瘤	0.02	0.05
SK-MEL-28	黑素瘤	0.02	0.02
BE	黑素瘤	0.05	nd
FM55	黑素瘤	0.04	0.07
DWB	黑素瘤	0.04	nd
MCF-7	乳腺癌	0.07	0.09
PC-3	前列腺癌	0.06	0.09
RD-ES	尤因氏肉瘤	0.10	0.10
HepG2	肝胚细胞瘤	>15	>15
R-	IGF-1R 阴性成纤维细胞	>15	>15
P6	IGF-1R 过度表达成纤维细胞	0.03	0.02

*nd 指未检测

这表明鬼臼毒素及苦鬼白脂素为肿瘤细胞活力的极强抑制剂。

实验 6. 体内恶性细胞生长抑制

将 4~5 周龄的无病原的裸鼠(nu/nu)圈养于无菌的塑料隔离笼中。以 10^7 细胞/鼠的剂量, 皮下注射尤因氏肉瘤细胞系 ES-1 及黑素瘤细胞系 BE(已知两者皆表达 IGF-1R)的 0.2ml 无菌生理盐水溶液。实验处理组每日腹膜内注

射 100 μ l 鬼臼毒素、去氧鬼臼毒素或苦鬼臼脂素溶液，溶剂为 DMSO 及生理盐水的混合溶液(8:2)。对照小鼠以溶剂处理，每组 3~6 只动物。每周监测动物三次，观察病症及肿瘤生长情况。肿瘤大小以公式($d^2 \times D$)/2 估计，其中 d 及 D 分别表示肿瘤的小、大直径。仔细观察小鼠的副作用情况，实验结束后，将动物处死作病变组织学分析。所有实验遵循研究机构伦理委员会提供的实验动物使用伦理规范。

第一批实验考察鬼臼毒素、去氧鬼臼毒素及苦鬼臼脂素对裸鼠的全身及局部毒性。第一次实验时，在鼠侧腹植入不含药物的溶剂、鬼臼毒素(0.25mg)、去氧鬼臼毒素(0.25mg)或苦鬼臼脂素(0.25mg)的渗透泵。7 天内，药物以 0.6 μ l/小时自皮下恒速输出。泵的体积为 100 μ l。7 天后，将小鼠处死，分析泵出口处的皮肤及其邻近皮下组织，并由有经验的病理学家给组织反应评分。每组 3 只动物。以溶剂处理(对照组)不引起任何损伤。与之相反，鬼臼毒素导致严重的组织反应，如坏死、出血及发炎(表 5)。以去氧鬼臼毒素处理小鼠造成轻微损伤，然而苦鬼臼脂素处理的动物无明显反应(表 5)。

在随后的实验中，我们每天经腹腔注射每种化合物 100 μ l，给药 5 天，分析了药物的全身效果。注射了两个剂量(7 或 28mg/kg/天)，每种药物每个剂量使用 3-6 只小鼠。每天仔细检查小鼠的不适、病况及体重减轻情况。首次证实了小鼠对不含药物的溶剂耐受良好。然而，低剂量和高剂量鬼臼毒素处理的小鼠都发病，两天内分别有 67%和 100%的动物死亡(表 6)。低剂量去氧鬼臼毒素处理的小鼠 3 天后显示出严重的患病症状。由于病况严重或死亡，两天后停止了高剂量实验。与之相反，每种剂量苦鬼臼脂素处理的小鼠在整个 5 天实验中仍然存活，未显示出任何患病症状(表 6)。

由于鬼臼毒素及去氧鬼臼毒素的毒性，我们仅使用了苦鬼臼脂素来分析其对肿瘤异种移植物的影响。为此，在裸鼠中建立了 ES-1(尤因氏肉瘤细胞)及 BE(黑素瘤细胞)异种移植。当 ES-1 及 BE 肿瘤开始在皮下生长且可测量时，每天经腹腔给小鼠注射苦鬼臼脂素(28mg/kg，产生高于约 0.05 μ M 的平均血浆浓度所必需)或 80%DMSO 生理盐水溶液作为载体处理 4~6，随后的 4~6 天不作处理。然后处死小鼠，由富有经验的病理学者分析肿瘤。苦鬼臼脂素明显抑制了两类肿瘤的生长并导致其退化(见图 6A 及 6B)，肿瘤样本的组织学分析显示出大面积的坏死。

该结果表明，与鬼臼毒素及去氧鬼臼毒素相反，动物对苦鬼臼脂素耐受

良好并引起肿瘤退化。

表 5. 局部毒性

化合物	对皮肤及皮下组织的作用*
溶剂	0
鬼臼毒素(7mg/kg/天)	+++
去氧鬼臼毒素(7mg/kg/天)	+
苦鬼臼脂素(7mg/kg/天)	0

0, 表示无组织反应; *伴有充血及轻微炎症的轻微组织反应; **伴有强烈炎症的中等组织反应; ***伴有坏死及出血的强烈组织反应

表 6. 全身毒性

化合物及剂量 mg/kg/天	存活小鼠/考察小鼠				
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
溶剂	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
鬼臼毒素, 7mg	3/3	1/3	0/3	-	-
鬼臼毒素, 28mg	2/6	0/6	-	-	-
去氧鬼臼毒素, 7mg	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
去氧鬼臼毒素, 28mg	6/6	4/6	0/6	-	-
苦鬼臼脂素, 7mg	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
苦鬼臼脂素, 28mg	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

实验 7. 苦鬼臼脂素及其衍生物对人类白血病细胞存活的影响

按照方法及实验 1 和 2 中所述的方法, 以蛋白质印迹杂交测定白血病细胞系(K562/S、K562/Vcr30、HL60/0 及 HL60/Nov)表达的 IGF-1R。

将上述细胞系接种于 96-孔板(25000 细胞/孔, 每孔培养基体积为 100 μ l)的 RPMI40 培养基中, 该培养基中补充胎牛血清。24 小时后, 加入不同浓度的苦鬼臼脂素及其衍生物 α -阿朴苦鬼臼脂素及 β -阿朴苦鬼臼脂素, 将细胞培养 72 小时。然后测定细胞活力(见上)。每个化合物及细胞系的 EC50 值见下表(表 7)。该结果基于 3 次不同实验。

表 7 中的结果表明, 需要 $0.11 \sim 0.32 \mu\text{M}$ 苦鬼白脂素来引起 4 种细胞系中 3 种的 50% 细胞死亡, 然而, 对于长春新碱抗性细胞系 K562/Vcr30 需要高于 $0.5 \mu\text{M}$ 的浓度。与之相反, α -及 β -阿朴苦鬼白脂素的 IC_{50} 值低至 $0.01\text{--}0.05 \mu\text{M}$ 。

表 7. 细胞活力的 $\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$

	K562/S	K562/Vcr30	HL60	HL60/Nov
苦鬼白脂素	0.32	>0.50	0.17	0.11
α -阿朴苦鬼白脂素	0.04	0.05	0.02	0.02
β -阿朴苦鬼白脂素	0.01	0.01	0.01	0.01

可以总结出苦鬼白脂素衍生物 α -及 β -阿朴苦鬼白脂素为白血病细胞及存活的高效抑制剂。

实验 8. 苦鬼白脂素对用细胞增殖抑制剂处理的恶性细胞的交互作用

白血病细胞系 K562/S、K562/Nov、HL60/0 及 HL60/Nov 按照实验 7 所述的 96-孔板中培养。24 小时后, 以不同浓度的抗癌药物长春新碱处理细胞 72 小时, 加入或不加入 $0.05 \mu\text{M}$ 苦鬼白脂素共培养。已经证实, 该浓度的苦鬼白脂素不会引起肿瘤细胞的任何可检测的细胞死亡。然后测定了细胞活力。每一抑制剂及细胞系的 IC_{50} 值如下表所示(表 8)。该结果基于 3 次不同实验。

如表所示, 用苦鬼白脂素共培养降低所有 4 个细胞系细胞活力的 IC_{50} 值。

表 8. 细胞活力的 $\text{IC}_{50}(\text{nM})$

细胞系	长春新碱 (IC_{50} , nM)	苦鬼白脂素($0.05 \mu\text{M}$)+长春新碱 (IC_{50} , nM)
K562/S	1.6	0.6
K562/Vcr30	5.0	0.3
HL60/0	0.8	0.4
HL60/Nov	1.2	0.8

该结果表明苦鬼白脂素可增加恶性细胞对传统抗肿瘤药物的敏感性。

实验 9. 苦鬼白脂素及鬼臼毒素对人银屑病模型细胞系 IGF-1R 磷酸化及细胞存活的影响

HaCaT 细胞为一种永生化的角质化细胞，代表了一种银屑病细胞系模型，将其接种于 6cm 培养皿或 96-孔板(每孔培养基体积 100 μ l)，使其在包含 10% 胎牛血清的 Dulbecco's Modified Eagle's 培养基中的浓度为 7,000 细胞/cm²。当细胞浓度到达 50,000 细胞/cm²时，以在培养基中的终浓度为 0 或 0.05 μ M 鬼臼毒素或苦鬼白脂素培养。0 μ M 表示对照的未处理对照组。培养 1 小时后，如实验 1 所述的方法，收集 6cm 培养皿中细胞以供测定并定量 IGF1R 磷酸化。培养 48 小时后，如上述方法，以细胞增生试剂盒 II 测定 96-孔板培养的细胞活力。

该结果表明，鬼臼毒素及苦鬼白脂素均为 HaCaT 细胞的 IGF-1R 磷酸化及细胞活力有效抑制剂。

表 9. 0.05 μ M 鬼臼毒素及苦鬼白脂素对 HaCaT 细胞 IGF-1R 磷酸化(1 小时)及细胞存活水平(48 小时)的影响

化合物	IGF-1R 磷酸化	细胞活力
对照	100	100
鬼臼毒素	45	30
苦鬼白脂素	35	35

实验 10. 鬼臼毒素及苦鬼白脂素在动脉粥样硬化及再狭窄模型中对培养的人血管平滑肌细胞(VSMC)的 IGF-1R 磷酸化及细胞增生的影响

IGF-1 为动脉细胞生长促进因子，为诸如动脉粥样硬化斑块的发展及冠状动脉成形术后的再狭窄之类的心血管疾病的中介蛋白。血管壁中的 VSMC 过度生长在这些事件中起着关键的作用，其由 IGF-1 引起(Bayes-Genis A,等, *ibid.*)。为了进行实验，将分离并培养的 VSMC 并置于 24-孔板(20,000-40,000 细胞/孔)中培养，基本上按照实验 9 所述的方法，研究鬼臼毒素及苦鬼白脂素对 IGF-1R 磷酸化及 VSMC 生长、存活的影响。此外，通过测量掺入(³H)胸苷的 DNA(DNA 合成)及掺入(³H)亮氨酸的蛋白质(蛋白合成)，评定了细胞增生。在前一种情况下，细胞 (20,000 ~ 40,000 细胞/孔)在 24-孔板中生长，并加入 1 μ Ci/ml(³H)胸苷和 IGF-1(nM ~ μ M 浓度；单独或存在胎牛血清)，加

入或不加入不同浓度($0 \sim 1.0\mu\text{M}$)鬼臼毒素或苦鬼臼脂素条件下培养 24 小时。然后,以 F12-培养基洗涤细胞,以 5%的冰冷三氯乙酸(TCA)沉淀 DNA。将 DNA 溶于 0.1M KOH 中,将每孔 $500\mu\text{l}$ 溶液加入至液体闪烁体(scintillation liquid)中,以液体闪烁计数器检测其放射活性。在后一种情况下,将细胞如上述方法培养 24 小时,但不加入(^3H)胸苷。相反,将(^3H)亮氨酸加入使浓度达 $1\mu\text{Ci/ml}$,但仅在温育的后 90 分钟进行。用冷磷酸盐缓冲液($\text{pH}=7.4$)洗涤细胞,在冰冷 TCA 中沉淀蛋白质。将蛋白质溶解在含有 5% 十二烷基磺酸钠、 $20\text{mM Na}_2\text{CO}_3$ 及 2mM EDTA 的溶液中。用液体闪烁计数器检测其放射活性。VSMC 中的 DNA 及蛋白质合成结果以对照细胞的 % 表示,对照细胞即那些未用鬼臼毒素或苦鬼臼脂素培养的细胞。

结论

已经证实,苦鬼臼脂素及其在内酯环上具有顺式构型的衍生物,为 IGF-1R 酪氨酸激酶的特异性强抑制剂。

苦鬼臼脂素诱导胰岛素样生长因子-1 受体的失活引起恶性细胞的大量死亡,而缺乏胰岛素样生长因子-1 受体的细胞具有抗性。苦鬼臼脂素及其衍生物的新机制可用于治疗癌症及其它 IGF-1R 依赖性疾病。

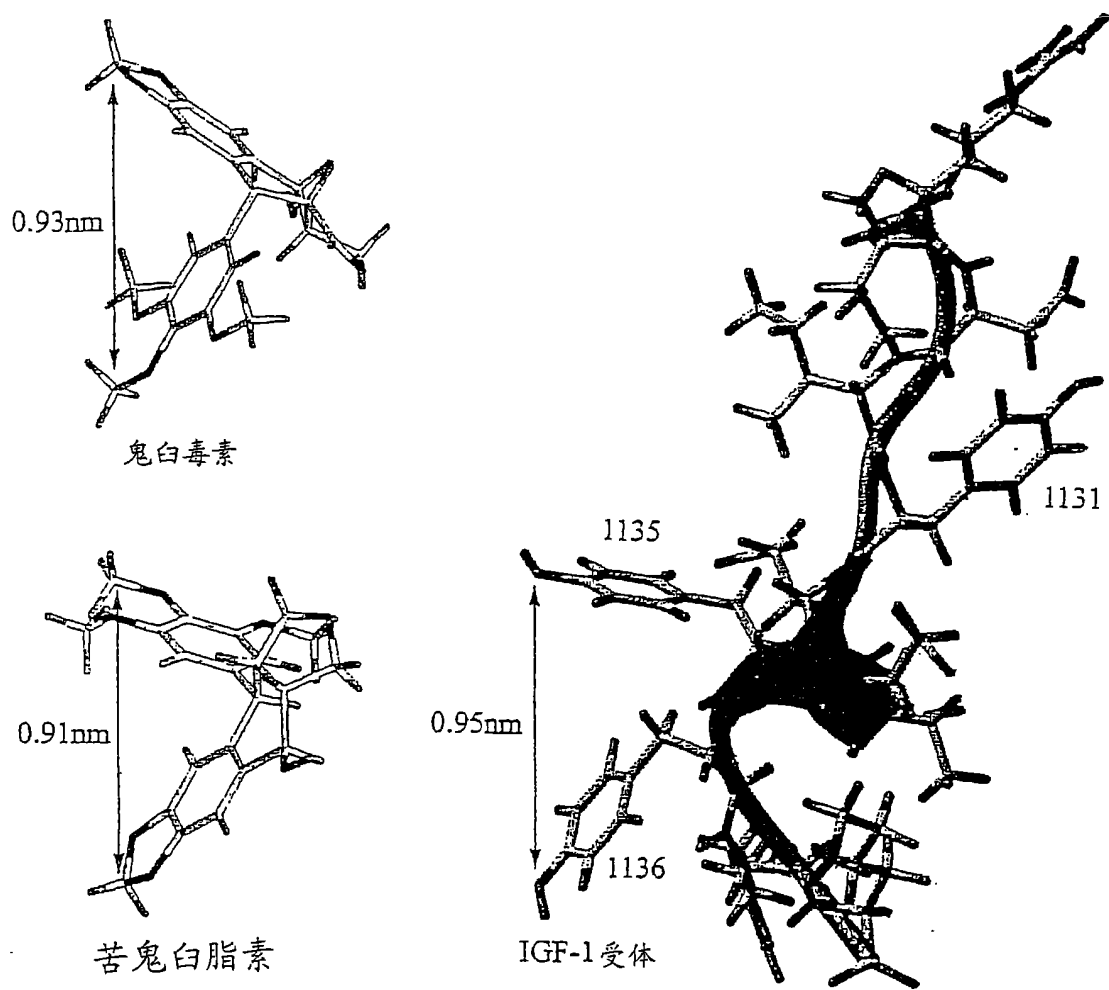


图 1

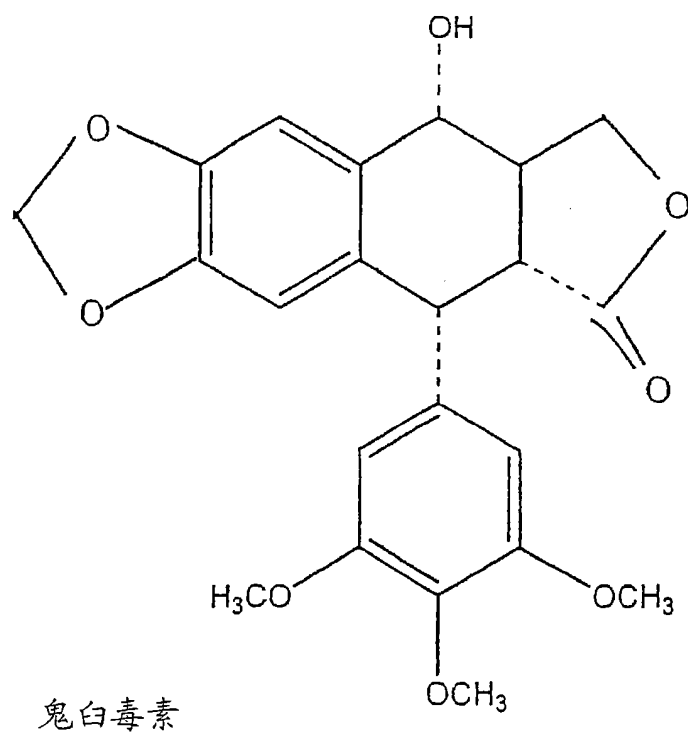
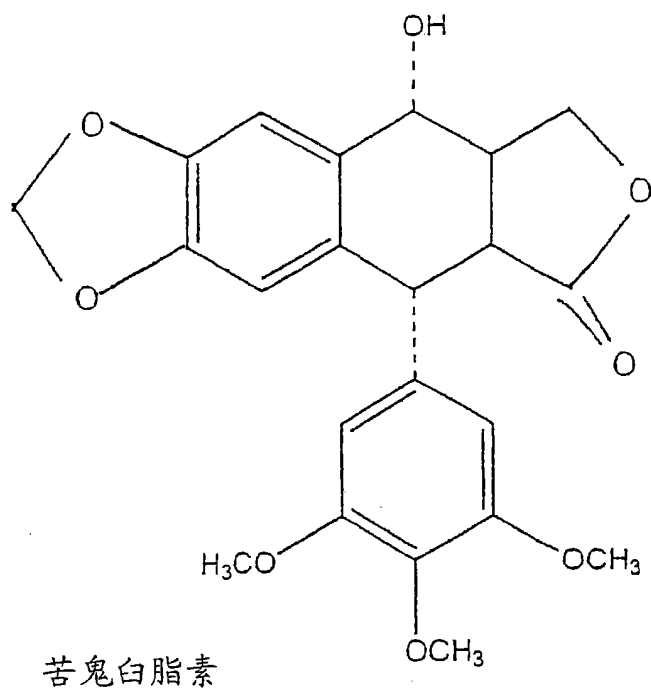
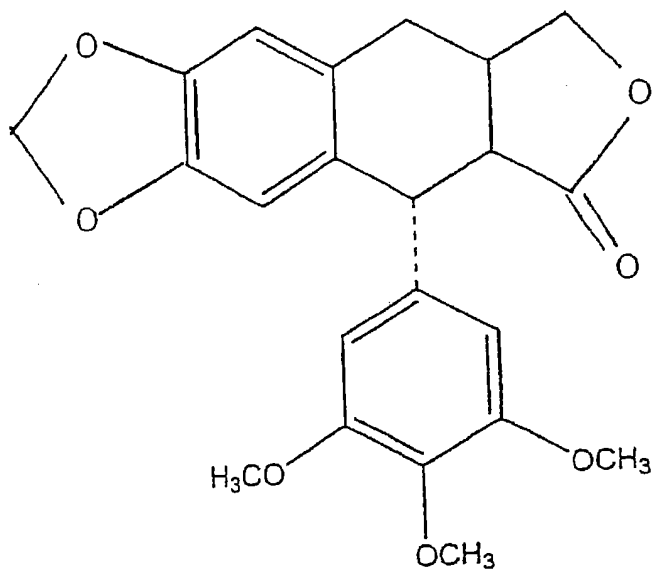
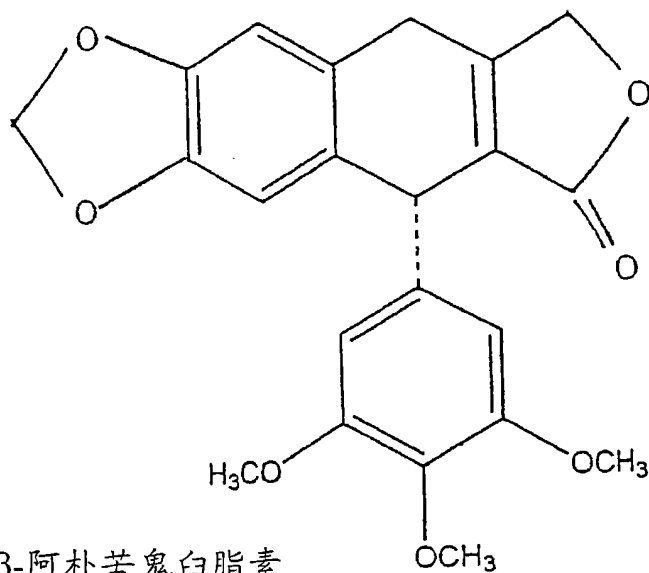


图 2A



去氧苦鬼白脂素



β -阿朴苦鬼白脂素

图 2B

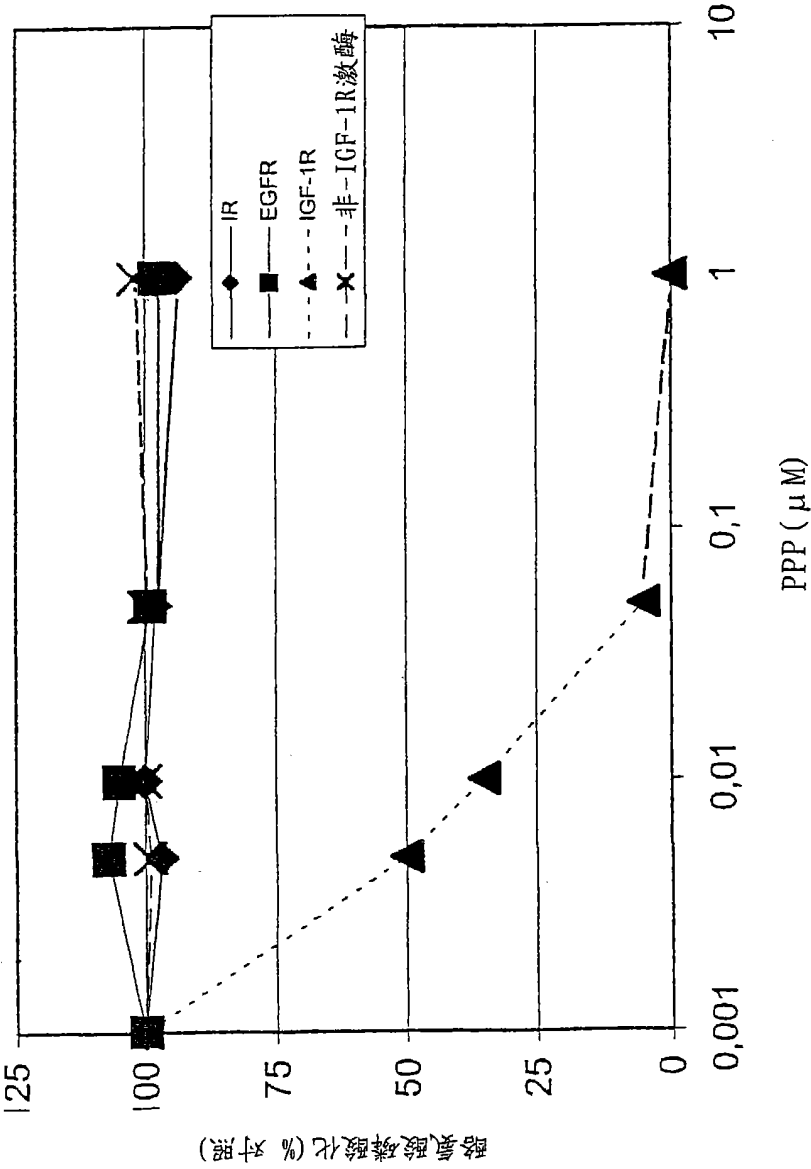


图 3

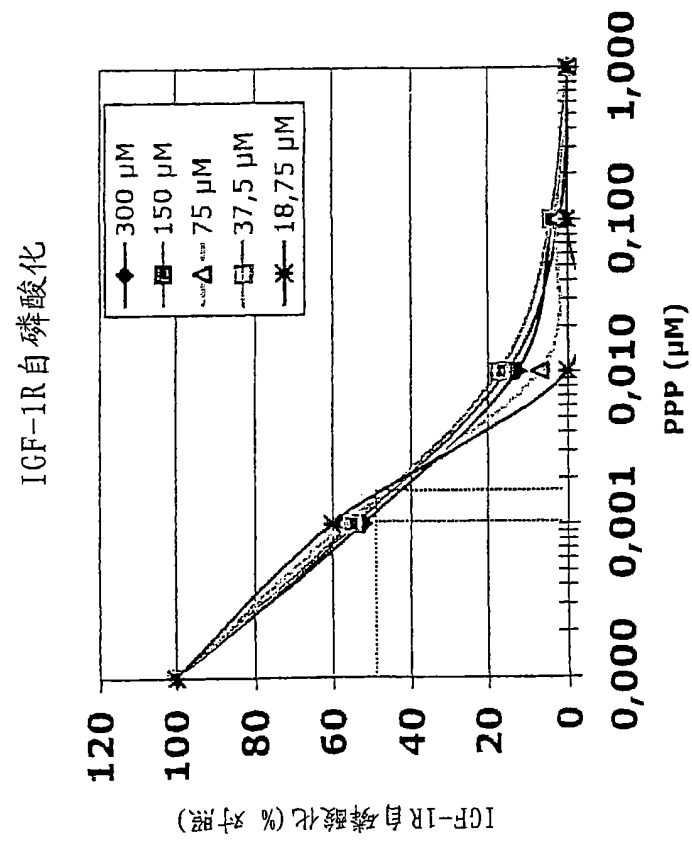


图 4

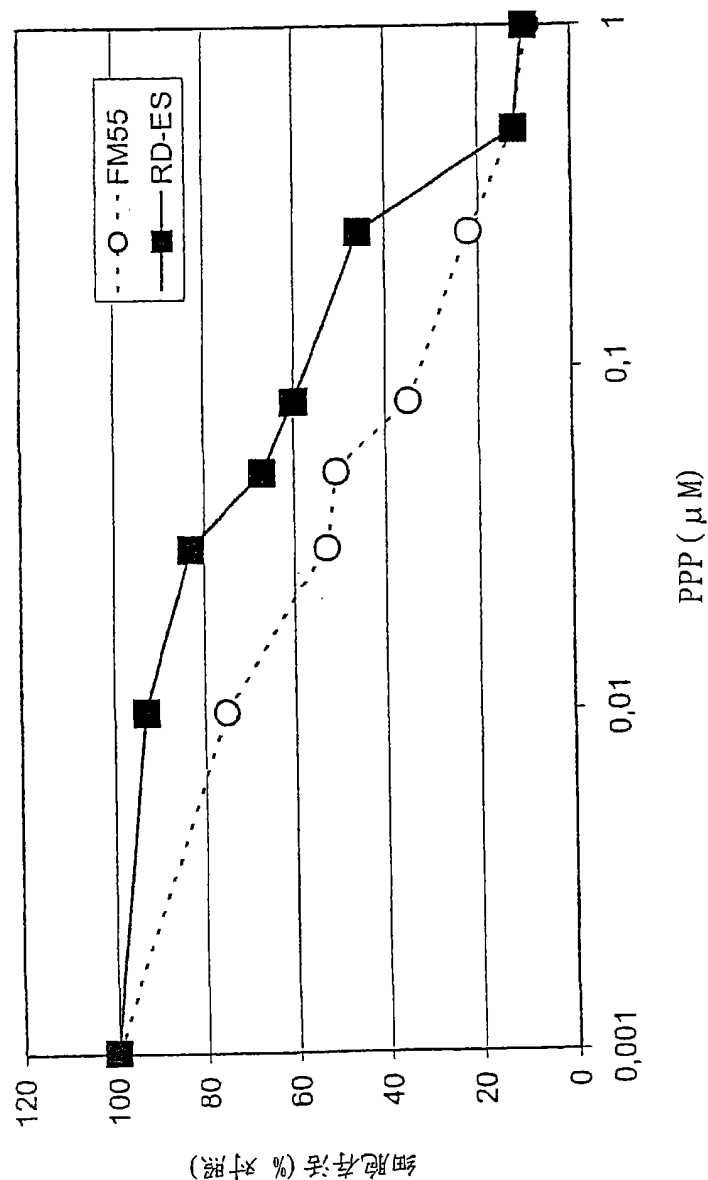


图 5A

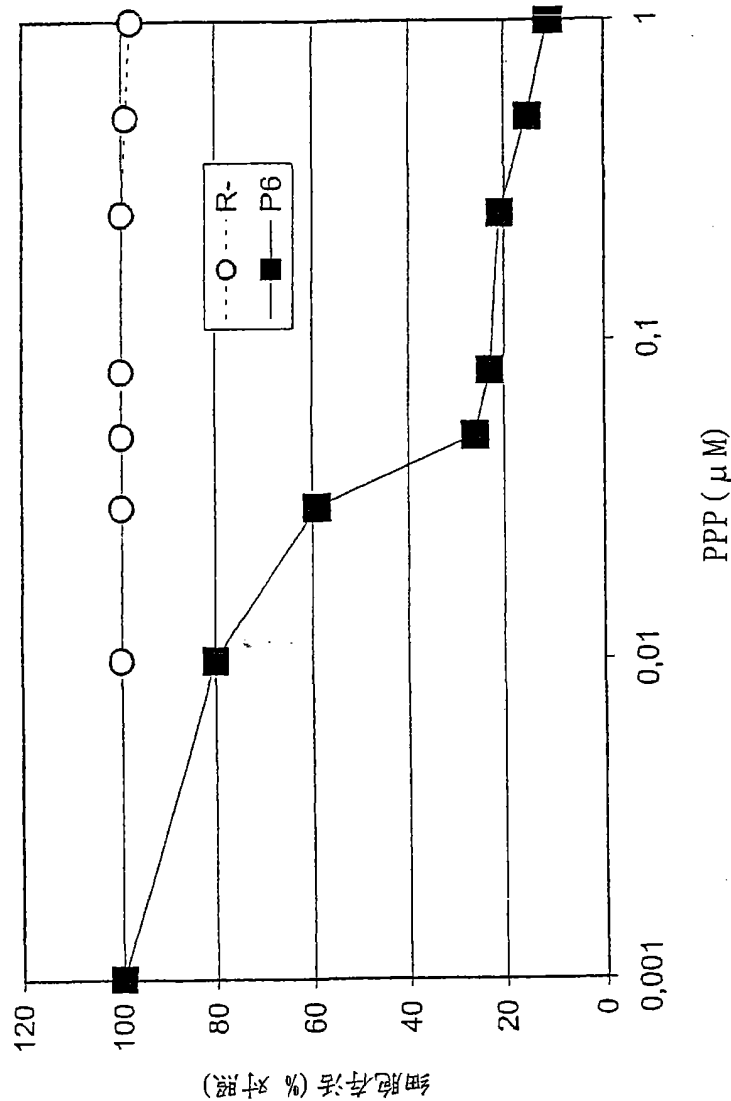


图 5B

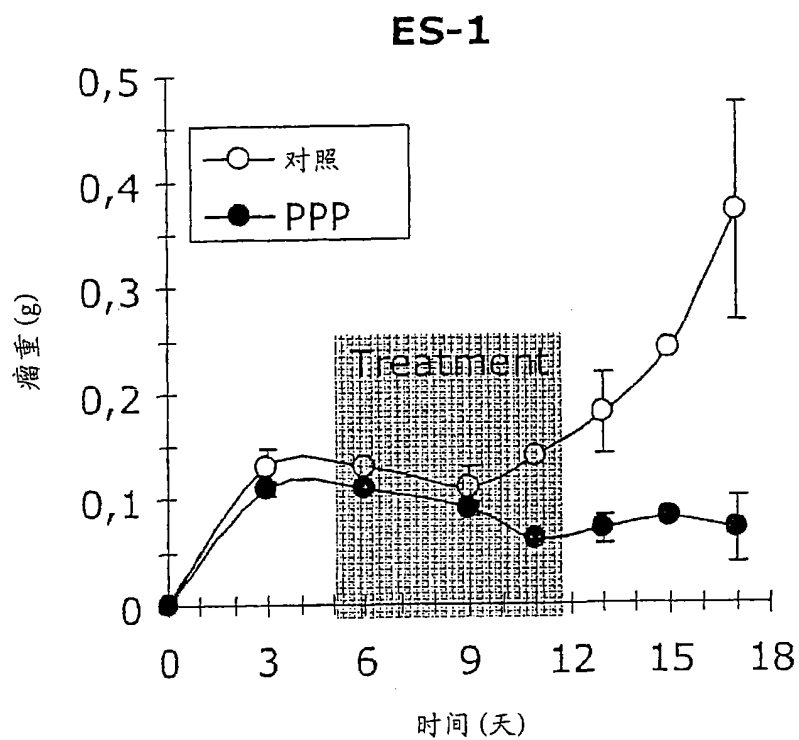


图 6A

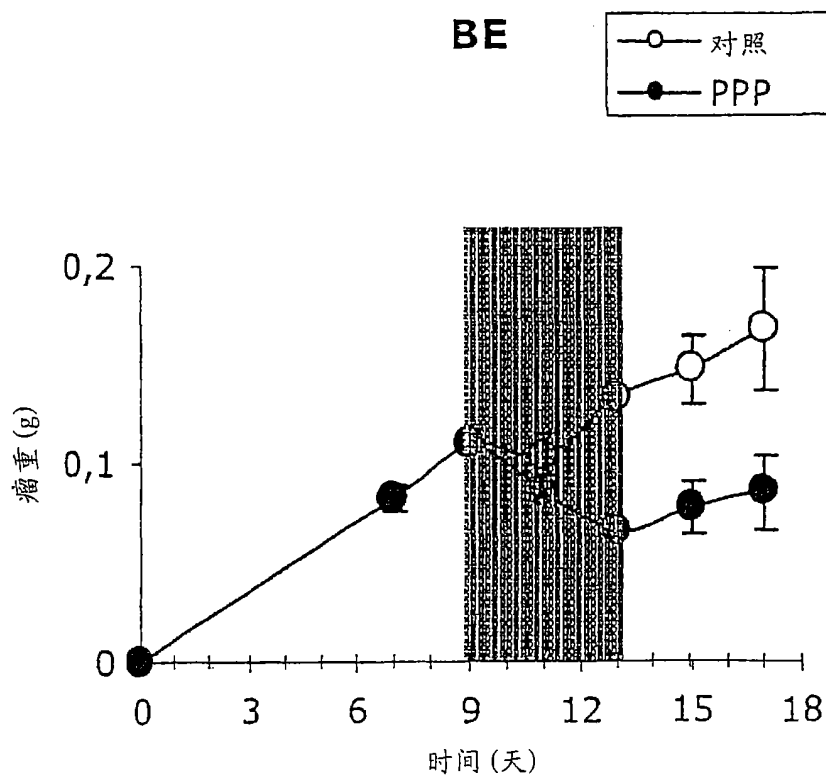


图 6B