

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610076298.X

[43] 公开日 2007 年 10 月 24 日

[11] 公开号 CN 101058578A

[22] 申请日 2006.4.21

[21] 申请号 200610076298.X

[71] 申请人 中国医学科学院药物研究所

地址 100050 北京市宣武区先农坛街 1 号

[72] 发明人 庾石山 陈晓光 黄学石 李 燕
郜 嵩 高 琪 胡友财 丁 岩
甄月英

[74] 专利代理机构 北京三高永信知识产权代理有限公司

代理人 何文彬

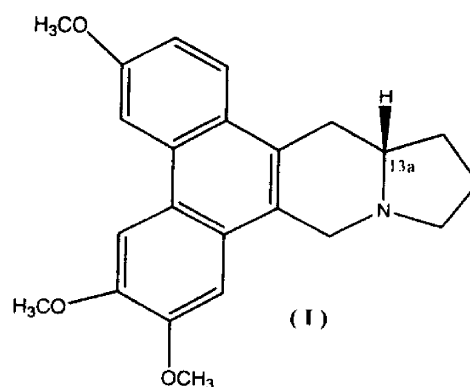
权利要求书 2 页 说明书 25 页 附图 8 页

[54] 发明名称

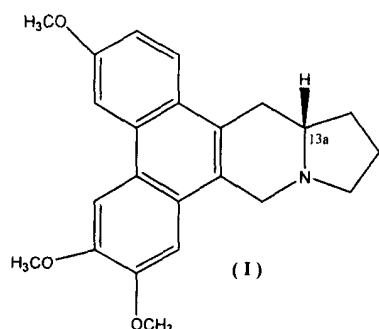
右旋去氧娃儿藤宁、其制法和其药物组合物与用途

[57] 摘要

本发明公开了式(I)所示的(+)-13a-去氧娃儿藤宁, (+)-13a-去氧娃儿藤宁的制备方法, 包含它的药物组合物以及(+)-13a-去氧娃儿藤宁作为药物, 尤其是作为抗肿瘤药物的应用。



1、如式 (I) 所示的(+)-13a-去氧娃儿藤宁



- 2、制备权利要求 1 的化合物的方法，其特征在于，包括如下步骤：
- a) 萝藦科植物的根用有机溶剂提取后浓缩得浸膏，
 - b) 所得浸膏用酸溶液溶解，酸水液脱脂后用碱碱化，用有机溶剂萃取得总生物碱，浓缩得到总生物碱浸膏，
 - c) 所得浸膏经硅胶柱层析，得(+)-13a-去氧娃儿藤宁粗品，
 - d) (+)-13a-去氧娃儿藤宁粗品通过重结晶得到(+)-13a-去氧娃儿藤宁纯品。
- 3、根据权利要求 2 的制备方法，其特征在于，所述的萝藦科植物选自是娃儿藤（*Tlophora ovata*）和三分丹（*Tylophora antrofolculata*）。
- 4、根据权利要求 2 的制备方法，其特征在于，步骤 a) 中所述的有机溶剂是乙醇。
- 5、根据权利要求 2 的制备方法，其特征在于，步骤 b) 萃取后的水层还可以选择性的用酸调 pH=7.0，之后再用有机溶剂萃取得总生物碱，减压浓缩得到总生物碱浸膏。
- 6、根据权利要求 2 的制备方法，其特征在于，步骤 c) 中所述的硅胶孔径是 200~300 目，硅胶量与样品量的比例是 50~200: 1。
- 7、根据权利要求 2 的制备方法，其特征在于，步骤 c) 中所述的层析所

用的洗脱液是氯仿-甲醇。

- 8、根据权利要求 2 的制备方法，其特征在于，步骤 d)中所述的重结晶以丙酮作为溶剂。
- 9、一种药物组合物，其特征在于，包括作为活性成分的权利要求 1 所述的化合物和药效学上可接受的载体。
- 10、权利要求 1 所述的化合物在制备抗肿瘤药物的应用。
- 11、根据权利要求 10 的应用，其特征在于，所述的肿瘤包括：肝癌、纤维母细胞瘤、非小细胞肺癌、口腔上皮癌、口腔表皮样癌、乳腺癌、阿霉素耐药乳腺癌、前列腺癌、 卵巢癌、卵巢癌、胃癌、肾癌、黑色素瘤以及结肠癌。

右旋去氧娃儿藤宁、其制法和其药物组合物与用途

技术领域

本发明涉及式 (I) 所示的(+)-13a-去氧娃儿藤宁, (+)-13a-去氧娃儿藤宁的制备方法, 包含它的药物组合物以及(+)-13a-去氧娃儿藤宁作为药物的用途。

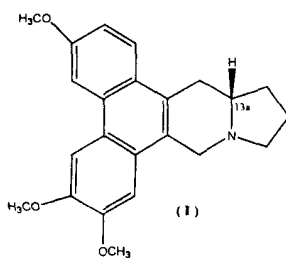
技术背景

Govindachari TR 和 Stephane Lebrun 分别于 1962 年和 1999 年合成了(±)-deoxypergularinine, 即[(±)-13a-去氧娃儿藤宁, 但未将两个光学异物体进行拆分, 因此得到的是左旋和右旋的混合物, 没有得到单体化合物, 也未进行抗肿瘤活性的研究 (Stephane L, et al., *Tetrahedron*, 1999; 55: 2659-2670; Govindachari TR, et al. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1962; 1357-1360)。

目前使用的抗癌药物大多数作用机理都涉及肿瘤细胞核酸代谢, 以 DNA 为作用靶点。但化疗药物经常产生严重的毒性反应, 在杀死癌细胞的同时杀死正常细胞, 以及杀灭癌细胞不彻底。且现在多数常见实体瘤如肺癌、肝癌、结肠癌及胰腺癌等还缺乏有效药物, 不少抗肿瘤药在临床应用过程中产生耐药性。

发明内容

本发明要解决的技术问题是提供一种如式 (I) 所示新的化合物(+)-13a-S-去氧娃儿藤宁 (英文名: *S-(+)-desoxytylophorinine*, 本发明中简称 CAT)。



本发明另一方面还涉及制备(+)-13a-去氧娃儿藤宁的方法。

本发明又一方面还涉及包含(+)-13a-去氧娃儿藤宁的药物组合物。

本发明再一方面还涉及(+)-13a-去氧娃儿藤宁在制备抗肿瘤制剂药物中的应用。

本发明提供的(+)-13a-去氧娃儿藤宁的制备方法，包括如下步骤：

a)萝藦科植物的根用有机溶剂提取后浓缩得浸膏，

b)所得浸膏用酸溶液溶解，酸水液脱脂后用碱碱化，用有机溶剂萃取得总生物碱，浓缩得到总生物碱浸膏，

c)所得浸膏经硅胶柱层析，得(+)-13a-去氧娃儿藤宁粗品，

d)(+)-13a-去氧娃儿藤宁粗品通过重结晶得到(+)-13a-去氧娃儿藤宁纯品。

步骤c)萃取后的水层还可以选择性的用酸调pH=7.0，之后再用有机溶剂萃取得总生物碱，减压浓缩得到总生物碱浸膏。

具体而言，本发明的(+)-13a-去氧娃儿藤宁从萝藦科植物中通过各种提取分离纯化获得，所述的萝藦科植物优选是娃儿藤（*Tlophora ovata*）和三分丹（*Tylophora antrofoculata*）。

前处理：植物根经过适当干燥，粉碎，过60目筛；

用有机溶剂提取，优选的有机溶剂是醇，优选的低级烷基醇，更优选的是甲醇、乙醇、丙醇，最优选的是乙醇，乙醇浓度为体积比50%—100%；优选的浓度为体积比70%—100%，更优选的浓度为体积比90%—100%，最优选的浓度为体积比95%乙醇；

所述溶剂的量优选为1500-5000ml/kg，更优选为2000-3500 ml/kg，最优选为2500—3000ml/kg；

提取的温度从室温到溶剂回流的温度，优选为20-100℃，更优选为50-100℃，最优选是溶剂回流的温度；

提取的时间，优选是0.5-8小时，更优选是1-5小时，最优选是2小时。

减压浓缩有机溶剂提取液得浸膏，

浸膏用酸溶液溶解，优选的酸是无机酸，优选的无机酸是盐酸，硫酸，磷酸，最优选的是盐酸，酸的浓度优选是 0.1-2.0%，更优选是 0.3-1.0%，最优选是 0.5%，

酸水液经石油醚脱脂，优选为脱脂三次；每次所用的石油醚与酸水液的体积比优选是 0.5-2: 1，更优选是 0.7-1.5: 1，最优选为 1: 1；

水层用碱，优选是有机碱和无机碱，更优选是无机碱，最优选是浓氨水，优选的浓度是 20-35%，更优选的浓度是 25-30%，最优选的浓度是 30%，调节 pH 值为 8.5-10.5，优选为 9-10。

再用有机溶剂萃取得总生物碱，优选的有机溶剂是二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、乙酸乙酯、正丁醇，更优选是二氯甲烷、氯仿，最优选是氯仿；萃取至氯仿中无明显生物碱反应为止。

减压回收有机溶剂，得到总生物碱。

水层还可以选择性的用 36.5%浓盐酸调 pH=7.0，之后再用有机溶剂，优选是二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、乙酸乙酯、正丁醇，更优选是二氯甲烷、氯仿，最优选是氯仿萃取，该氯仿层经减压浓缩得总生物碱。

所得总生物碱经硅胶柱层析，所用的硅胶孔径优选是 200~300 目，所用硅胶量与样品量的比例优选是 50~200: 1，更优选是的 90~150: 1，最优选是 100: 1。

用混合有机溶剂梯度洗脱，溶剂系统任意选自卤代烷（如二氯甲烷、氯仿、四氯化碳）、低级烷基醇（如甲醇、乙醇、丙醇、正丁醇）、饱和烷烃和环烷烃（正己烷、环己烷）、酯（如乙酸乙酯）、酮（如丙酮）、醚（如石油醚、乙醚）或其组合，优选是卤代烷与低级烷基醇，最优选是氯代烷与低级烷基醇。其中优选的氯代烷是二氯甲烷、氯仿、四氯化碳，更优选是二氯甲烷、氯仿，最优选是氯仿。优选的低级烷基醇是甲醇、乙醇、丙醇，更优选是甲醇；最优选用氯仿-甲醇梯度洗脱，先氯仿后氯仿-甲醇=19: 1。

氯仿-甲醇洗脱液浓缩得白色固体，优选在减压状态下浓缩

纯化，重结晶，优选使用丙酮重结晶，得白色针晶状的(+)-13a-去氧娃儿藤宁。

本发明还涉及以本发明化合物作为活性成份的药物组合物。该药物组合物可根据本领域公知的方法制备。可通过将本发明化合物与一种或多种药学上可接受的固体或液体赋形剂和/或辅剂结合，制成适于人或动物使用的任何剂型。本发明化合物在其药物组合物中的含量通常为 0.1-95 重量%。

本发明化合物或含有它的药物组合物可以单位剂量形式给药，给药途径可为肠道或非肠道，如口服、静脉注射、肌肉注射、皮下注射、鼻腔、口腔粘膜、眼、肺和呼吸道、皮肤、阴道、直肠等。

给药剂型可以是液体剂型、固体剂型或半固体剂型。液体剂型可以是溶液剂（包括真溶液和胶体溶液）、乳剂（包括 o/w 型、w/o 型和复乳）、混悬剂、注射剂（包括水针剂、粉针剂和输液）、滴眼剂、滴鼻剂、洗剂和搽剂等；固体剂型可以是片剂（包括普通片、肠溶片、含片、分散片、咀嚼片、泡腾片、口腔崩解片）、胶囊剂（包括硬胶囊、软胶囊、肠溶胶囊）、颗粒剂、散剂、微丸、滴丸、栓剂、膜剂、贴片、气（粉）雾剂、喷雾剂等；半固体剂型可以是软膏剂、凝胶剂、糊剂等。

本发明化合物可以制成普通制剂、也制成是缓释制剂、控释制剂、靶向制剂及各种微粒给药系统。

为了将本发明化合物制成片剂，可以广泛使用本领域公知的各种赋形剂，包括稀释剂、黏合剂、润湿剂、崩解剂、润滑剂、助流剂。稀释剂可以是淀粉、糊精、蔗糖、葡萄糖、乳糖、甘露醇、山梨醇、木糖醇、微晶纤维素、硫酸钙、磷酸氢钙、碳酸钙等；湿润剂可以是水、乙醇、异丙醇等；粘合剂可以是淀粉浆、糊精、糖浆、蜂蜜、葡萄糖溶液、微晶纤维素、阿拉伯胶浆、明胶浆、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、丙烯酸树脂、卡波姆、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇等；崩解剂可以是干淀粉、微晶纤维素、低取代羟丙基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、交联羧甲基纤维素钠、羧甲基淀粉钠、碳酸氢钠与枸橼酸、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、十二烷基磺酸钠等；润滑剂和助流剂可以是滑石粉、二氧化硅、硬脂酸盐、酒石酸、液体石蜡、聚乙二醇等。

还可以将片剂进一步制成包衣片, 例如糖包衣片、薄膜包衣片、肠溶包衣片, 或双层片和多层片。

为了将给药单元制成胶囊剂, 可以将有效成分本发明化合物与稀释剂、助流剂混合, 将混合物直接置于硬胶囊或软胶囊中。也可将有效成分本发明化合物先与稀释剂、黏合剂、崩解剂制成颗粒或微丸, 再置于硬胶囊或软胶囊中。用于制备本发明化合物片剂的各种稀释剂、黏合剂、润湿剂、崩解剂、助流剂品种也可用于制备本发明化合物的胶囊剂。

为将本发明化合物制成注射剂, 可以用水、乙醇、异丙醇、丙二醇或它们的混合物作溶剂并加入适量本领域常用的增溶剂、助溶剂、pH 调剂剂、渗透压调节剂。增溶剂或助溶剂可以是泊洛沙姆、卵磷脂、羟丙基- β -环糊精等; pH 调剂剂可以是磷酸盐、醋酸盐、盐酸、氢氧化钠等; 渗透压调节剂可以是氯化钠、甘露醇、葡萄糖、磷酸盐、醋酸盐等。如制备冻干粉针剂, 还可加入甘露醇、葡萄糖等作为支撑剂。

此外, 如需要, 也可以向药物制剂中添加着色剂、防腐剂、香料、矫味剂或其它添加剂。

用 MTT 法发现(+)-13a-去氧娃儿藤宁可抑制多种体外培养的肿瘤细胞的生长, 在体外的半数抑制浓度 IC_{50} 范围在 $0.044 \sim 0.286 \mu\text{mol/L}$ 。

用 SRB 法观察(+)-13a-去氧娃儿藤宁对这些肿瘤细胞生长的影响, 结果表明(+)-13a-去氧娃儿藤宁可不同程度地抑制这些细胞的生长, 半数抑制浓度 GI_{50} 范围在 $0.023 \sim 0.103 \mu\text{mol/L}$, 完全抑制浓度 TGI 范围在 $0.079 \sim 0.390 \mu\text{mol/L}$ 。

细胞生长曲线和集落形成实验表明, (+)-13a-去氧娃儿藤宁可剂量依赖性地抑制人肝癌细胞 Bel7402 和人结肠癌细胞 HCT-8 的生长和集落形成能力。

体内移植肿瘤实验亦观察到(+)-13a-去氧娃儿藤宁对小鼠实体型肝癌 H22 及 Lewis 肺癌有一定的治疗作用。连续口服给予(+)-13a-去氧娃儿藤宁 2.0 mg/kg/d 及 5.0 mg/kg/d , 共 8 天, 对小鼠 H22 肝癌的生长抑制率分别为 51.1% 和 80.0%, 与对照组相比具有显著性差异

($P < 0.01$); 连续 8 天口服给予 2.0 mg/kg/d 和 6.0 mg/kg/d, 对小鼠 Lewis 肺癌的生长抑制率分别为 36.8% 和 64.6%, 与对照组相比均具有显著的统计学意义 ($P < 0.01$), 说明 (+)-13a-去氧娃儿藤宁体内试验亦表现出良好的肿瘤抑制作用

流式细胞分析表明, (+)-13a-去氧娃儿藤宁使 Bel7402 细胞阻断于 G1 和 S 期。

Western Blot 分析表明 (+)-13a-去氧娃儿藤宁处理 Bel7402 细胞 12h, 可使 P53 蛋白表达量增加, 处理 Bel7402 细胞 24h 可使 P16、P21 和 CyclinA 蛋白的表达量明显升高。

将 (+)-13a-去氧娃儿藤宁与 DNA Topo I 及 pBR322 DNA 在体外共同孵育可观察到对酶活性的抑制作用, 结果表明 (+)-13a-去氧娃儿藤宁可明显抑制 DNA Topo I 的解旋活性, 使超螺旋型 DNA 的量明显增加, 同时加入 (+)-13a-去氧娃儿藤宁的 DNA 条带位移明显滞后。这一结果提示, (+)-13a-去氧娃儿藤宁可能通过嵌入 DNA, 抑制 DNA 解聚及断裂 DNA 重新连接而发挥作用。

(+)-13a-去氧娃儿藤宁作用小鼠黑色素瘤 B16-BL6 细胞 15h, 使 B16-BL6 细胞侵袭穿过重组基底膜的能力明显下降, 0.02、0.04 和 0.08 $\mu\text{mol/L}$ (+)-13a-去氧娃儿藤宁使 B16-BL6 细胞的侵袭能力分别降低 57%、75% 和 86% ($P < 0.01$)。

经不同浓度 (+)-13a-去氧娃儿藤宁作用 2h 后, B16-BL6 细胞与基底膜成分的粘附受到不同程度的抑制, 并呈一定的剂量依赖关系。

用底物酶谱法观察 (+)-13a-去氧娃儿藤宁对人肉瘤细胞 HT-1080 分泌基质金属蛋白酶能力的影响, 结果表明不同浓度 (+)-13a-去氧娃儿藤宁作用 24h, 可以剂量依赖性地抑制 MMP-2 的分泌。以上结果均表明 (+)-13a-去氧娃儿藤宁在体外可有效作用于肿瘤细胞侵袭转移的各环节, 阻断侵袭转移的发生。

(+)-13a-去氧娃儿藤宁对人胚胎脐静脉血管内皮细胞 ECV304 的增殖具有明显的抑制作用, MTT 试验测得其半数抑制浓度 IC_{50} 为 0.088 $\mu\text{mol/L}$, SRB 试验测得其半数抑制浓度 GI_{50} 为 0.10 $\mu\text{mol/L}$, 完全抑制浓度 TGI 为 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 。采用 fibronectin 作趋化剂, 观察了 (+)-13a-

去氧娃儿藤宁对 ECV304 细胞迁移能力的影响。结果表明, 0.02、0.04 和 0.08 $\mu\text{mol/L}$ (+)-13a-去氧娃儿藤宁可明显抑制 ECV304 细胞的迁移, 对 ECV304 细胞的趋化性运动能力的抑制率分别为 55%、65%和 82% ($P<0.01$)。用底物酶谱法观察(+)-13a-去氧娃儿藤宁对 ECV304 细胞分泌基质金属蛋白酶能力的影响, 结果表明不同浓度(+)-13a-去氧娃儿藤宁作用 24h, 可以剂量依赖性地抑制 MMP-2 和 MMP-9 的分泌。(+)-13a-去氧娃儿藤宁在体外表现出较强的抑制血管生成的作用, 明显抑制 ECV304 细胞在 Matrigel 基质上形成的管腔结构。0.02、0.04 和 0.08 $\mu\text{mol/L}$ (+)-13a-去氧娃儿藤宁处理 ECV304 细胞 24h, 可使其在 Matrigel 基质上形成管腔结构的能力分别降低至对照组的 81.8%、54.6% 和 16.1%。另外(+)-13a-去氧娃儿藤宁还可抑制 KDR 及 MMP-9 基因的表达。(+)-13a-去氧娃儿藤宁对血管生成的抑制作用可能是其体内抑制肿瘤生长和侵袭转移的一个重要原因。

综上所述, (+)-13a-去氧娃儿藤宁在体外可广泛抑制不同组织来源的肿瘤细胞的生长, 其作用机理可能与(+)-13a-去氧娃儿藤宁嵌入 DNA, 抑制 DNA Topo I 的解旋活性, 使细胞内与细胞周期调控相关的蛋白 P53、P21、P16 和 CyclinA 表达增加, 细胞停滞于 G1 和 S 期有关。同时(+)-13a-去氧娃儿藤宁在体内亦表现出一定的抗肿瘤作用。

为达到用药目的, 增强治疗效果, 本发明的药物或药物组合物可用任何公知的给药方法给药。

本发明化合物药物组合物的给药剂量依照所要预防或治疗疾病的性质和严重程度, 患者或动物的个体情况, 给药途径和剂型等可以有大范围的变化。一般来讲, 本发明化合物的每天的合适剂量范围为 0.001-150mg/Kg 体重, 优选为 0.1-100mg/Kg 体重, 更优选为 1-60mg/Kg 体重, 最优选为 2-30mg/Kg 体重。上述剂量可以一个剂量单位或分成几个剂量单位给药, 这取决于医生的临床经验以及包括运用其它治疗手段的给药方案。

本发明的化合物或组合物可单独服用, 或与其他治疗药物或对症药物合并使用。当本发明的化合物与其它治疗药物存在协同作用时, 应根据实际情况调整它的剂量。

附图说明

图 1、(+)-13a-去氧娃儿藤宁对 Bel7402 细胞的抑制作用。

图 2、(+)-13a-去氧娃儿藤宁对 HCT-8 细胞的抑制作用。

图. 3(+)-13a-去氧娃儿藤宁对 Bel7402 细胞集落形成的影响 ; ** $P < 0.01$, 与对照组相比。

图. 4 (+)-13a-去氧娃儿藤宁对 HCT-8 细胞集落形成的影响 ; ** $P < 0.01$, 与对照组相比。

图 5. CAT 在 Bel7402 细胞对 P53、P21、P16 和 CyclinA 蛋白表达的影响。

图 6. CAT 在体外对 DNA Topo I 异构酶活性的影响。

图 7. CAT 对 B16-BL6 细胞穿过重组基底膜能力的影响; B16-BL6 细胞与 0 (A), 0.02 (B), 0.04 (C), 0.08 $\mu\text{mol/L}$ (D) CAT 共孵育 15 小时。

图 8. CAT 对 B16-BL6 细胞与基底膜成分粘附能力的影响; $\bar{X} \pm \text{SD}$ ($n=3$). ** $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 9. CAT 在 HT-1080 细胞对底物酶谱法分析 IV 型胶原酶的分泌及活性的影响; A: Lane 2-4, 分别为 0.02, 0.04, 0.08 $\mu\text{mol/L}$ CAT 处理组. B: MMP-2 和 C: MMP-9 的密度扫描相对定量。

图 10. CAT 对 ECV304 细胞穿过重组基质膜能力的影响; CAT: 0 (A), 0.02 (B), 0.04 (C), 0.08 (D) $\mu\text{mol/L}$ 处理细胞 24 小时。

图 11. CAT 对 ECV304 细胞分泌基质金属蛋白酶能力的影响; (A). Lane 1, 对照组. Lane 2-4, 0.02, 0.04 and 0.08 $\mu\text{mol/L}$ CAT 处理细胞 24 小时; B: MMP-2 和 C: MMP-9 密度扫描相对定量。

图 12. CAT 对 ECV304 细胞体外管腔形成能力的抑制作用($\times 100$); A: CAT : 0; B: 0.02 $\mu\text{mol/L}$; C: 0.04 $\mu\text{mol/L}$; (C) 和(D): 0.08 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 13. CAT 在 ECV304 细胞对 KDR 和 MMP-9 mRNA 表达的影响。

图 14. CAT 在 ECV304 对 VEGF mRNA 表达的影响。

具体实施方式

(+)-13a-去氧娃儿藤宁的制备

实施例 1、从萝藦科植物卵叶娃儿藤 (*Tylophora ovata*) 中分离制备

(+)-13a-去氧娃儿藤宁 (CAT)

取卵叶娃儿藤 (*Tylophora ovata*) 的干燥根 11.0 Kg, 经粉碎, 过 60 目筛, 用 95%乙醇 30000ml 浸泡三天, 之后回流提取三次, 每次两小时, 每次溶剂 (95%乙醇) 用量 30000ml。提取液在减压下浓缩得棕褐色稠膏 1.1Kg (出膏率 10%)。将浸膏用 0.5%盐酸反复捏溶, 共得 2000ml (PH = 2~3) 酸水溶液。将该酸水液用石油醚 (2000ml×3) 脱脂后, 水层用 30%浓氨水约 100ml 调至 pH = 9~10, 再用氯仿 (2000ml×4) 萃取至氯仿中无明显生物碱反应为止。氯仿层经减压浓缩得浸膏 25.0g。水层用 36.5%浓盐酸调 pH = 7.0, 之后再用氯仿 (2000ml×3) 萃取, 该氯仿层经减压浓缩得浸膏 10.0g, 合并两次氯仿层的浓缩物的总生物碱 35g。再经硅胶柱层析 (200~300 目, 3 Kg), 用氯仿-甲醇梯度洗脱 (氯仿, 7L; 氯仿-甲醇, 19: 1, 9L), 氯仿-甲醇洗脱液减压浓缩得白色固体, 经丙酮重结晶得白色针晶状的 (+)-13a-去氧娃儿藤宁 (1.1g)。

m.p. 214~216°C, $[\alpha]_D^{23} +132$ (c 0.25, CHCl₃)。EIMS m/z : 363 (M⁺), 294 (100)。UV λ_{\max} : 257 (4.60), 284 (4.35), 312 (sh, 3.76), 340 (3.15) nm; IR_{vmax} (KBr): 2960, 2914, 2875, 2790, 1616, 1512, 1469, 1415, 1259, 1232, 1205, 1032, 841, 783 cm⁻¹。¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.92 (1H, d, $J=9$ Hz), 7.20 (1H, dd, $J=9, 2$ Hz), 7.86 (1H, d, $J=2$ Hz), 7.88 (1H, s), 7.12 (1H, s), 4.00 (3H, s), 4.08 (3H, s), 4.04 (3H, s), 4.57 (1H, d, $J=18$ Hz), 3.61 (1H, d, $J=18$ Hz), 3.45 (1H, m), 3.38 (1H, m), 2.91 (1H, m), 2.45 (1H, m), 2.43 (1H, m), 2.18 (1H, m), 2.00 (1H, m), 1.90 (1H, m), 1.74 (1H, m)。¹³C NMR (CDCl₃, 125MHz): δ 125.08, 114.70, 157.50, 104.50, 103.86, 149.33, 148.17, 103.05, 53.84, 55.08, 21.58, 31.17, 60.09, 33.46, 55.46, 55.93, 55.86, 123.26, 125.49, 125.52, 126.91, 130.30。

实施例 2、从萝藦科植物三分丹 (*Tylophora antrofoliata*) 中分离制备(+)-13a-去氧娃儿藤宁 (CAT)

三分丹 (*Tylophora antrofoliata*) 的干燥根 23.0 Kg, 用 95%乙醇回流提取三次(60000ml×3), 合并提取液并减压浓缩成棕褐色浸膏 (2.6Kg,

出膏率 11.3%)。将浸膏用 0.5%盐酸反复捏溶, 共得 4000ml (PH = 2~3) 酸水溶液。将该酸水液用石油醚脱脂后, 水层用 25%浓氨水 100ml 调至 PH=9,再用氯仿萃取至氯仿中无明显生物碱反应为止 (共四次)。减压回收氯仿, 得到总生物碱 80g。再经硅胶柱层析 (200~300 目, 8Kg), 用氯仿-甲醇梯度洗脱 (氯仿, 7L; 氯仿-甲醇, 19: 1, 9L), 氯仿-甲醇洗脱液减压浓缩得白色固体, 经丙酮重结晶得白色针晶状的(+)-13a-去氧娃儿藤宁 (800mg)。

m.p. 214~216°C, $[\alpha]_D^{23} +132$ (c 0.25, CHCl₃)。EIMS m/z : 363 (M^+), 294 (100)。UV λ_{max} : 257 (4.60), 284 (4.35), 312 (sh, 3.76), 340 (3.15) nm; IR_{vmax} (KBr): 2960, 2914, 2875, 2790, 1616, 1512, 1469, 1415, 1259, 1232, 1205, 1032, 841, 783 cm⁻¹。¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.92 (1H, d, $J=9$ Hz), 7.20 (1H, dd, $J=9, 2$ Hz), 7.86 (1H, d, $J=2$ Hz), 7.88 (1H, s), 7.12 (1H, s), 4.00 (3H, s), 4.08 (3H, s), 4.04 (3H, s), 4.57 (1H, d, $J=18$ Hz), 3.61 (1H, d, $J=18$ Hz), 3.45 (1H, m), 3.38 (1H, m), 2.91 (1H, m), 2.45 (1H, m), 2.43 (1H, m), 2.18 (1H, m), 2.00 (1H, m), 1.90 (1H, m), 1.74 (1H, m)。¹³C NMR (CDCl₃, 125MHz): δ 125.08, 114.70, 157.50, 104.50, 103.86, 149.33, 148.17, 103.05, 53.84, 55.08, 21.58, 31.17, 60.09, 33.46, 55.46, 55.93, 55.86, 123.26, 125.49, 125.52, 126.91, 130.30.

药理实验

实验例 1

MTT法检测化合物对肿瘤细胞的抑制作用

取对数生长期细胞培养于 96 孔培养板内, 每孔 100 μ l (含 1000-1200 个肿瘤细胞)。次日, 给药组加入含有不同浓度化合物, 每药设 4~5 个剂量组, 每组至少设三个平行孔。对照组加入与化合物等体积的溶剂。置 37°C, 5%CO₂ 温箱中培养, 4 天后弃去培养液, 每孔加入 200 μ l 0.2% MTT 溶液(RPMI 1640 配制)。37°C 孵育 4 小时, 弃去上清, 每孔加入 DMSO 150 μ l 溶解甲簪颗粒, 轻度振荡后, 用酶标仪, 在参考波长 450nm、检测波长 570nm 条件下测定光密度值(OD)。以溶剂对照处理的肿瘤细胞为对照组, 用下面公式计算药物对肿瘤

细胞的抑制率，并计算IC₅₀：

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组平均OD值} - \text{给药组平均OD值}}{\text{对照组平均OD值}} \times 100\%$$

结果表明(+)-13a-去氧娃儿藤宁可抑制不同来源肿瘤细胞的生长，如人肝癌细胞 Bel7402，人结肠癌细胞 HCT-8，人肺腺癌细胞 A549，人胃癌细胞 BGC823，人纤维肉瘤细胞 HT-1080，人前列腺癌细胞 PC-3M，人卵巢癌细胞 A2780，人卵巢癌细胞 SKOV3，人肾癌细胞 Ketr-3，人口腔上皮癌细胞 KB，人口腔上皮癌细胞耐药株 KBv200，人乳腺癌细胞 MCF-7，人乳腺癌细胞耐药株 MCF/Adr，小鼠黑色素瘤细胞 B16，小鼠黑色素瘤细胞高转移株 B16-BL6，其在体外的半数抑制浓度 IC₅₀ 约为 0.044~0.286μmol/L（表 1），

表 1、MTT 法检测(+)-13a-去氧娃儿藤宁对多种肿瘤细胞和正常细胞的抑制作用

| 细胞株 | IC ₅₀ (μmol/L) | 细胞株 | IC ₅₀ (μmol/L) |
|----------|---------------------------|--------|---------------------------|
| HEL F | 0.030 | PC3M | 0.122 |
| Bel-7402 | 0.044 | SKOV3 | 0.098 |
| HT-1080 | 0.099 | A2780 | 0.063 |
| A549 | 0.087 | BGC823 | 1.948 |
| KB | 0.109 | Ketr3 | 0.211 |
| KBv200 | 0.103 | B16BL6 | 0.082 |
| MCF-7 | 0.286 | B16 | 0.052 |
| MCF/Adr | 0.148 | HCT-8 | 0.060 |

HEL F=人胚肺成纤维细胞; Bel-7402=人肝癌细胞; HT-1080=人纤维母细胞瘤; A549=人非小细胞肺癌细胞; KB=人口腔上皮癌细胞; KBV200=人口腔表皮样癌细胞; MCF-7=人乳腺癌; MCF/Adr= 人乳腺癌阿霉素耐药细胞; PC3M=人前列腺癌细胞; SKOV3= 卵巢癌细胞系; A2780=人卵巢癌细胞; BGC823=人胃癌细胞; Ketr3=肾癌细胞; B16BL6= 小鼠黑色素瘤细胞; B16=人黑色素瘤; HCT-8=人结肠癌细胞;

实验例 2 、SRB 法检测(+)-13a-去氧娃儿藤宁对肿瘤细胞的抑制作用

将对数生长期的细胞用胰酶消化后配制成浓度为 1×10⁴ 细胞/mL 的细胞液，按 1000 个/孔接种于 96 孔板，每孔加 100μL。培养 24h 后加入待测药物，同时测定此时细胞的 OD₅₁₅ 值（T₀）。加药 72h 后进行测定：每孔加预冷的 50% TCA 液 50μL 固定（TCA 终浓度 10%），

静置 5 分钟，将 96 孔板移至 4℃放置 1h；倒掉固定液，去离子水洗 5 遍，每孔加 SRB 液 100μL（用 1%醋酸配成 4mg/mL 溶液），室温放置 10 分钟；1%醋酸洗 5 遍，吸干；加 150μL 10mmol/L 非缓冲 Tris 碱液(pH 10.5)溶解，稳定 10min 后测定 OD_{515nm} 值。按中效方程计算细胞 50%生长抑制所需的药物浓度(GI₅₀)；细胞完全生长抑制所需的浓度(TGI)；杀死 50%细胞所需药物浓度(LC₅₀)。

公式：生长率%=[(T-T₀) / (C-T₀)]×100%

细胞杀死率%=[(T-T₀) /T₀]×100%

GI₅₀: 即[(T-T₀) / (C-T₀)]=50% 时的药物浓度

TGI: 即 T=T₀时的药物浓度

LC₅₀: 即[(T-T₀) /T₀]= - 50% 时的药物浓度

注：C 表示对照组细胞的 OD 值

T 表示加药组细胞的 OD 值

T₀ 表示加药时对照平板细胞的 OD 值

结果表明(+)-13a-去氧娃儿藤宁可不同程度地抑制上述肿瘤细胞的生长，其半数抑制浓度 GI₅₀ 范围在 0.023~0.103μmol/L，完全抑制浓度 TGI 范围在 0.079~0.390μmol/L（表 2）。其中人肝癌 Bel7402 细胞对 (+)-13a-去氧娃儿藤宁最为敏感。

表 2、SRB 法检测(+)-13a-去氧娃儿藤宁对肿瘤细胞的抑制作用

| 细胞株 | GI ₅₀ (μmol/L) | TGI (μmol/L) | 细胞株 | GI ₅₀ (μmol/L) | TGI (μmol/L) |
|---------|------------------------------|-----------------|--------|------------------------------|-----------------|
| HEL F | 0.023 | 0.079 | A2780 | 0.026 | 0.085 |
| BEL7402 | 0.032 | 0.126 | BGC823 | 0.050 | 0.274 |
| HT-1080 | 0.069 | 0.179 | KETR3 | 0.103 | 0.219 |
| A549 | 0.032 | 0.238 | HCT-8 | 0.044 | 0.183 |
| KB | 0.057 | 0.186 | PC3M | 0.037 | 0.122 |
| KBv200 | 0.038 | 0.215 | SKOV3 | 0.036 | 0.151 |
| MCF-7 | 0.036 | 0.390 | B16BL6 | 0.054 | 0.162 |
| MCF/Adr | 0.052 | 0.270 | B16 | 0.035 | 0.132 |

HEL F=人胚肺成纤维细胞; Bel-7402=人肝癌细胞; HT-1080=人纤维母细胞瘤; A549=人非小细胞肺癌细胞; KB=人口腔上皮癌细胞; KBV200=人口腔表皮样癌细胞; MCF-7=人乳腺癌; MCF/Adr= 人乳腺癌阿霉素耐药细胞; PC3M=人前列腺癌细胞; SKOV3= 卵巢癌细胞系; A2780=人卵巢癌细胞; BGC823=人胃癌细胞; Ketr3=肾癌细胞; B16BL6= 小鼠黑色素瘤细胞; B16=人黑色素瘤; HCT-8=人结肠癌细胞;

实验例 3 、(+)-13a-去氧娃儿藤宁对肿瘤细胞生长曲线及肿瘤克隆原细胞集落形成能力的测定的影响

取对数生长期细胞，按 1×10^4 个/孔接种于 6 孔培养板中，每组平行 3 孔，24 h 后加入药物，对照组加入等体积的溶媒，置于含 5% CO_2 的培养箱中 37°C 培养，于给药后每天各取出 3 孔细胞，消化并用台盼蓝染色后光镜下计数活细胞数。

取对数生长期的细胞，稀释至终浓度为 50 个细胞/mL 单个分散的细胞悬液。按每孔 4mL 细胞悬液接种于 6 孔板，每组平行 3 孔。24h 后加药，设阴性对照组（溶剂组）及给药组。 37°C ，5% CO_2 继续培养 10 天后，弃去培养基，PBS 洗两遍，Giemsa（Giemsa 粉 0.5g，甘油 22mL，甲醇 33mL，用时以 1：9 与 Sorensen 缓冲液混合）染色，计数每孔含 50 个细胞以上的克隆原细胞集落。计算集落形成抑制百分率及化合物的半数抑制浓度 IC_{50} 。

结果表明：用不同浓度的(+)-13a-去氧娃儿藤宁处理 Bel7402 和 HCT-8 细胞，可见(+)-13a-去氧娃儿藤宁对 Bel7402 和 HCT-8 细胞的生长及集落形成能力有明显抑制作用。(+) -13a-去氧娃儿藤宁可剂量依赖性地抑制 Bel7402 和 HCT-8 细胞的生长（图 1,图.2）以及集落形成能力（图.3,图.4）。

实验例 4 体内，(+)-13a-去氧娃儿藤宁对小鼠肝癌 H22 的抑制作用

取生长良好的荷瘤小鼠，颈椎脱臼处死。无菌条件下抽出腹水，生理盐水 1:2 稀释，接种于 18-22g 昆明种小鼠腋窝皮下，每鼠接种瘤液 0.2ml。接种次日，将动物随机分组、称重，设阴性对照组及阳性对照（环磷酰胺）组，(+)-13a-去氧娃儿藤宁设二个剂量组，每组 10 只动物。按 2.0mg/kg、8.0mg/kg，两个剂量以等体积(0.4ml)不同浓度给动物灌喂，每天一次，连续给药 8 天。阳性对照组于接种后次日以 100mg/kg 剂量给动物腹腔注射环磷酰胺 1 次。9 天后颈椎脱臼处死动物，分别称体重、瘤重，计算肿瘤抑制率。并将各组结果进行统计学处理。公式如下：

对照组平均瘤重—治疗组平均瘤重

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{治疗组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

对照组平均瘤重

连续口服 8 天给予 5.0mg / kg/d (+)-13a-去氧娃儿藤宁对 H22 的生长具有明显的抑制作用，抑制率为 80.0%，与对照组相比具有显著的统计学意义 (P<0.01)。连续口服 8 天给予 2.0mg/kg/d (+)-13a-去氧娃儿藤宁对 H22 的生长抑制率为 51.1%，与对照组相比仍具有显著性差异 (P<0.01)。结果见表 3。

表 3. (+)-13a-去氧娃儿藤宁灌胃给药对小鼠肝癌 H22 的抑制作用

| 组 别 | 剂 量 mg/kg | 动物数 始末 | 体 重(g) | | 瘤 重 (g) | 抑制率 (%) |
|------|--------------|-----------|-----------|-----------|--------------|------------|
| | | | 给药前 | 给药后 | | |
| 对照 | | 10/10 | 18.6±0.98 | 28.5±2.49 | 2.86±0.68 | |
| 环磷酰胺 | 100×1 | 10/10 | 19.2±1.31 | 22.5±1.72 | 0.11±0.0738* | 96.2 |
| CAT | 2.0×8 | 10/10 | 18.8±1.58 | 26.7±2.00 | 1.40±0.56* | 51.1 |
| | 5.0×8 | 10/10 | 20.0±1.02 | 17.9±3.43 | 0.60±0.52* | 80.0 |

注： *P<0.05，与对照组比较

实验例 5、体内，(+)-13a-去氧娃儿藤宁对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用
取生长良好的荷瘤小鼠，无菌条件下剥取长势良好的瘤块，研磨，用生理盐水 1：3 稀释，接种于 18-22g 的 C57BL/6 小鼠腋下，分组方法同上，(+)-13a-去氧娃儿藤宁灌胃给药 8 天，9 天后处死动物，同上法计算药物的抑瘤率。

连续口服 8 天给予 2.0mg/kg/d 和 6.0mg/kg/d (+)-13a-去氧娃儿藤宁，对小鼠 Lewis 肺癌的生长抑制率分别为 36.8%和 64.6%，与对照组相比均具有显著的统计学意义 (P<0.01)。结果见表 4。

表 4. (+)-13a-去氧娃儿藤宁灌胃给药对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用

| 组 别 | 剂 量 mg/kg | 动物数 | | 体 重(g) | | 瘤 重(g) X±SD | 抑制率 (%) |
|------|--------------|-----|----|-----------|------------|----------------|------------|
| | | 始 | 末 | 给药前 | 给药后 | | |
| 对照 | | 10 | 10 | 20.3±1.11 | 23.3±1.21 | 3.72±0.363 | |
| 环磷酰胺 | 100×1 | 10 | 10 | 19.9±0.85 | 19.6±0.86 | 0.38±0.190* | 90.0 |
| CAT | 2.0×8 | 10 | 10 | 18.3±1.73 | 22.2±0.931 | 2.35±0.524* | 36.8 |
| | 6.0×8 | 10 | 10 | 19.5±1.53 | 17.7±2.44 | 1.23±0.662* | 64.6 |

注： *P<0.05，与对照组比较

实验例 6、对流式细胞仪分析细胞周期的影响

收集 Bel7402 细胞，离心后去上清，PBS 洗涤一次。将细胞弹开，每管加 70%乙醇约 2mL 固定，4℃ 过夜。次日 1,000rpm 离心 5 分钟，

去乙醇, PBS 洗涤 2 次, 1,000rpm 离心 5 分钟, 重复离心洗涤两次。弃上清, 保留约 0.1mL 液体。加 RNAase 50 μ L (终浓度为 60 μ g/mL), 涡旋, 37°C 温育 30 分钟。加 PI (碘化丙啶) (终浓度为 50 μ g/mL) 至 0.5mL, 摇匀, 4°C 避光, 作用 60 分钟。经尼龙网过滤, 在 COULTER EPICS-XL 型流式细胞光度仪上测定细胞各期 DNA 含量并进行细胞周期分析。结果见表 5。

表 5. CAT 对细胞周期分布的影响

| | Con (μ mol/L) | % of cell population in different phase | | |
|---------|-----------------------|---|-----------------|-----------------|
| | | G0/G1 | S | G2/M |
| Control | | 34.1 \pm 2.68 | 37.6 \pm 2.47 | 28.1 \pm 0.28 |
| CPT | 1 | 44.2 \pm 1.34 | 34.6 \pm 4.45 | 21.3 \pm 3.25 |
| CAT | 0.45 | 40.8 \pm 0.07 | 27.9 \pm 0.77 | 31.3 \pm 0.77 |
| CAT | 1.8 | 41.7 \pm 0.01 | 36.1 \pm 1.06 | 22.2 \pm 1.06 |
| CAT | 3.75 | 43.3 \pm 0.07 | 39.0 \pm 0.70 | 17.7 \pm 0.78 |

流式细胞分析表明, (+)-13a-去氧娃儿藤宁使 Bel7402 细胞阻断于 G1 和 S 期。

实验例 7、Western Blot 杂交分析 P53、P16、P21 和 CyclinA 蛋白表达
(1) 提取总蛋白

细胞用细胞刮子刮下后, 1500rpm 离心 5min 收集细胞, 冷 PBS 洗两次, 加入 500 μ l 细胞裂解液 (10mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 5 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 0.1mmol/L PMSF (用前加)), 涡旋, 置冰浴中裂解 20 min, 4°C, 12000g 离心 10min, 收集上清液, 于-20°C 储存备用。

(2) 蛋白含量测定

采用 Lowry 法, 以一定浓度梯度的牛血清白蛋白液为标准液在 510nm 处测定吸光度, 绘制标准曲线, 同时测定样品的吸光度, 计算蛋白含量, 并用细胞裂解液将各样品调至相同浓度。

(3) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白电转移

配制 5%的浓缩胶及 10%的分离胶。各取含相同蛋白浓度的细胞裂解上清液与 5×SDS 上样缓冲液(250mmol/L Tris-HCl, pH6.8, 10% SDS, 500mmol/L DTT (用前加), 50%甘油, 0.5%溴酚兰)混合后, 100℃水浴煮沸 5min。冷却后上样, 蛋白上样量为 80μg, 80V 电泳。待样品前沿进入分离胶后, 调电压至 110V, 继续电泳约 2h。电泳结束后剥离凝胶, 以去离子水漂洗。切 6 层 Whatman 3MM 滤纸及一张 Hybond-C 硝酸纤维素膜 (Amersham LIFE SCIENCE), 大小与凝胶相同, 滤纸和硝酸纤维素膜分别在电转缓冲液 (39mmol/L 甘氨酸, 48mmol/L Tris, 0.037% SDS, 20%甲醇) 和去离子水中浸泡 5min。用半干电转法转膜, 在阳极与阴极间依次放置 3 层滤纸、硝酸纤维素膜、凝胶、3 层滤纸, 转膜电流为 $0.65\text{mA}/\text{cm}^2$, 2hr。

| | 10ml 10%分离胶 (ml) | 5ml 5%浓缩胶 (ml) |
|----------------------|------------------|----------------|
| H ₂ O | 3 | 3.4 |
| 30%丙烯酰胺 | 3.3 | 0.83 |
| 1.5M Tris-HCl(pH8.8) | 2.5 | |
| 1.0M Tris-HCl(pH6.8) | | 0.63 |
| 10%SDS | 0.1 | 0.05 |
| 10%过硫酸铵 (APS) | 0.1 | 0.05 |
| TEMED | 0.004 | 0.005 |

(4) 免疫杂交检测靶蛋白

电转后的硝酸纤维素膜用丽春红 S 染液 (3%丽春红, 30%TCA, 30%5-磺基水杨酸) 染色 1min, 待蛋白条带显出后, 水洗, 观察电转移效率, 标记标准蛋白条带的位置。硝酸纤维素膜以含有 3%BSA 的 TTBS (0.1% Tween-20; 10mmol/L Tris-Cl, PH7.5; 150mmol/L NaCl) 4℃封闭非特异结合位点过夜。用上述 TTBS 液洗膜, 15min/次×3 次。将膜与稀释的一抗 (用 TTBS 液按 1: 200 稀释第一抗体) 室温孵育 2h, TTBS 液洗膜, 15min/次×3 次。将膜移入二抗工作液 (用 TTBS 液按 1: 1000 稀释 AP 标记的二抗), 室温反应 2hr。TTBS 液洗膜, 15min/次×3 次。取出 NC 膜与 Western 显色底物室温下反应 10min, 偶联有碱性磷酸酶的抗体用 BCIP/NBT 显色系统来显示 (Promega), 数码相机照相。用 Gel-Pro Analyzer 3.1 密度分析软件分析杂交条带, 进行量化分析。

Western Blot 分析表明(+) -13a-去氧娃儿藤宁处理 Bel7402 细胞 12h, 可使 P53 蛋白的表达剂量依赖性增加, 处理 Bel7402 细胞 24h 可使 P16、P21 和 CyclinA 蛋白的表达剂量依赖性升高。

实验例 8、DNA 拓扑异构酶 I 活性检测 (松弛试验)

以 pBR322 DNA 作底物, 依据质粒的松弛和超螺旋形式在琼脂糖电泳上泳动度的不同来对药物抑制解旋的作用进行定性和半定量分析。反应体系的组成: 总反应体积为 20 μ L, 依次加入 10 \times 松弛反应缓冲液(100mmol/L Tris \cdot Cl (pH 7.9), 1.5mol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 5mmol/L DTT, 1% (w/v) BSA, 1mmol/L 亚精胺, 50% (v/v) 甘油), 0.25 μ g pBR322 DNA, 不同浓度的待测药物, 1u Topo I, 其余体积以 Milli Q 超纯水补齐(此处 1u 指在 37 $^{\circ}$ C 时 15 分钟内松弛 0.25 μ g 超螺旋质粒 DNA 的酶量)。将微量试管分组为空白管、阴性对照管(不加药)、待测药物管, 除空白管外其余各管均需加入酶液。加样完毕, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 然后以 5 μ L 终止缓冲液(5%十二烷基肌氨酸钠(sarkosyl), 0.125%溴酚蓝, 25%甘油)终止反应, 终产物加到 TAE (40mmol/L Tris-乙酸, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 配制的 1%的琼脂糖凝胶中, 室温电压为 1.5v/cm 的条件下在 TAE 中电泳 6~8h, 然后用 EB (0.5 μ g/mL) 染色 30min, 蒸馏水充分脱色 30min 后, 于紫外灯下观察并照相。注意: 所有操作均须在冰水浴中进行, 最后一步加入 Topo I, 以免酶失活。

将 CAT 与 DNA Topo I 及 pBR322 DNA 在体外共同孵育可观察其对酶活性的抑制作用, 结果表明 CAT 可明显抑制 DNA Topo I 的解旋活性, 使超螺旋型 DNA 量明显增加(图 6), 同时加入 CAT 的 DNA 条带位移明显滞后。这一结果提示, CAT 可能通过嵌入 DNA, 抑制其解聚及断裂 DNA 重新连接而发挥作用。

实验例 9、对重组基质膜侵袭运动的影响

将 PVPF 滤膜(8.0 μ m 孔径, 25 \times 80mm 大小)悬空放置, 在滤膜的粗糙面涂 Fibronectin (50 μ g/100 μ l) 作趋化剂, 置超净台内风干后,

将 Matrigel 稀释成 0.5mg/ml, 以 100 μ l 铺在滤膜光洁面, 干燥后, 再铺以 100 μ l 稀释的 Matrigel, 使之干燥, 形成一个基质屏障层。在 AP48 chamber 的下孔内加入含 0.1%BSA 的无血清 RPMI 1640 培养基, 每孔 30 μ l。装好 chamber, 收集对数生长期的细胞, 以 2mmol/L EDTA/PBS 消化细胞, 悬浮于含 0.1%BSA 的无血清 RPMI 1640 培养基中, 终浓度为 2×10^6 /ml。将细胞悬液加到 AP48 chamber 的上孔内, 每孔 50 μ l; 在加入细胞的同时加入不同浓度的药液。将 chamber 置于 37°C, 5% CO₂ 温箱内孵育 14hr。将 chamber 取出, 拆下滤膜, 用甲醇固定 10min, 苏木精-伊红染色或 Giemsa 染色, 水洗, 用棉签擦掉未穿过膜的细胞, 用二甲苯透明后将膜用 Histomount 胶封于载玻片上, 于 200 倍显微镜下计数侵袭细胞数, 每膜计数上中下左右 5 个不同视野的透过细胞数, 计算平均值, 每组平行设 3 孔。以侵袭细胞的相对数目表示肿瘤细胞的侵袭能力。

在肿瘤转移形成过程中, 肿瘤细胞侵袭基底膜是重要环节。Matrigel 是从小鼠 EHS 肉瘤中提取的基质成分, 含有 Laminin, IV型胶原等。将 Matrigel 铺在 8 μ m 孔径的 PVPF 滤膜上, 能在培养基中重组形成与天然基底膜极为相似的膜结构, 具有侵袭能力的细胞在趋化剂 FN 诱导下可穿过滤膜。将 B16-BL6 细胞与一定浓度 CAT 同时加入 AP48 chamber 的上孔中, 15h 后, B16-BL6 细胞侵袭穿过重组基底膜的能力明显下降(图 7), 0.02、0.04、0.08 μ mol/L CAT 使 B16-BL6 细胞的侵袭能力分别降低 57%、75%及 86% ($P < 0.01$, 表 6)。而相同浓度 CAT 作用相同时间对 B16-BL6 细胞的存活却没有明显影响, 仅在 0.08 μ mol/L CAT 作用时抑制 11%细胞生长(表 7), 远远不及其对 B16-BL6 细胞侵袭的抑制率。

表 6. CAT 对 B16-BL6 细胞穿过重组基底膜能力的影响

| CAT (μ mol/L) | 穿过细胞数(个) | 抑制率(%) |
|--------------------|---------------------------|--------|
| 对照组 | 150 \pm 12 | |
| 0.02 | 65 \pm 11 ^{**} | 57 |
| 0.04 | 37 \pm 8 ^{**} | 75 |

| | | |
|------|--------|----|
| 0.08 | 21±5** | 86 |
|------|--------|----|

注：X±SD (n=3). **P<0.001,与对照组比较。

表 7. SRB 法检测 CAT 处理 B16-BL6 细胞 15 小时对其成活的影响

| CAT(μ mol/L) | OD510 | Growth Rate(%) |
|--------------|-------------|----------------|
| control | 0.162±0.006 | |
| 0.02 | 0.152±0.007 | 94.15% |
| 0.04 | 0.149±0.008 | 91.78% |
| 0.08 | 0.144±0.008 | 89.00% |

实验例 10、对肿瘤细胞与基底膜成分的粘附能力的影响

将 Matrigel 稀释为 0.5μg/μl，10μl/孔铺于 96 孔培养板中，室温干燥后，用含 2%牛血清白蛋白（BSA）的无血清 RPMI 1640 培养液 20μl 于 37℃ 封闭 1 小时，PBS 洗三次。取对数生长期的 B16、PB16 和 M1B16 细胞以 2mmol/L EDTA/PBS 消化后悬浮于含 0.1% BSA 的 RPMI 1640 无血清培养液，96 孔板每孔加入 5×10⁴ 细胞，混匀后，37℃ 培养 2 小时，受试药物组在加入细胞的同时加入不同浓度的药液。弃去培养液，每孔加入 200μl PBS 反复抽吸吹打 10 次，共冲洗 3 遍，以去除未粘附的细胞。弃去 PBS，每孔加入 0.5mg/ml MTT 100μl，37℃ 孵育 4 小时后，弃去 MTT，吸水纸吸去残液，每孔加入 200μl DMSO，震荡 3min，用 MK3 型酶标仪在参考波长 450nm，检测波长 570nm 条件下测定光密度值(OD)。细胞粘附率以处理组粘附细胞与对照组粘附细胞 OD₅₇₀₋₄₅₀ 的比值表示。

粘附是癌细胞侵袭的始动步骤。高侵袭的肿瘤细胞与基底膜成分的异质性粘附能力通常增高，而肿瘤细胞间的同质性粘附能力则会下降。经不同浓度 CAT 作用 2h 后，B16-BL6 细胞与基底膜成分的粘附受到不同程度的抑制，并有一定的剂量依赖关系（图 8）。

实验例 11、对底物酶谱法分析 IV 型胶原酶的分泌及活性的影响

根据 Heussen et al 的方法加以改进。取对数生长期的 HT-1080 或 ECV304 细胞，消化后进行细胞计数，以 1×10⁵/孔的密度接种于 24 孔

培养板中，培养过夜。次日每孔加入含有一定浓度药物和对照溶剂的培养基培养 12h。弃培养上清，PBS 洗三次，然后换无血清加药培养基 300 μ l 继续培养 12h。收集细胞培养上清，4 $^{\circ}$ C，200g 离心 10min 去除细胞碎片，上清液于-20 $^{\circ}$ C 储存备用，细胞则消化计数。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。配制一定体积的 8% 分离胶和 5%浓缩胶，分离胶中含 0.1% (w/v)明胶。按细胞数折算出相同细胞数所对应的培养上清体积，并按此体积加样电泳（上样缓冲液中不含 DTT）。电泳完毕后，剥离凝胶，以蒸馏水漂洗后，移入 100mL 2.5% TritonX-100 溶液中，在摇床上低速摇动以洗脱 SDS。30min 后，换新的 TritonX-100 溶液继续洗脱 30min。凝胶移入 100mL 明胶酶缓冲液（50mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 10mmol/L CaCl₂, 200mmol/L NaCl, 1 μ mol/L ZnCl₂）中，37 $^{\circ}$ C 恒温温育 16h。蒸馏水漂洗后，凝胶以 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 染液染色 4h，蒸馏水漂洗后，在脱色液（冰醋酸：甲醇：水：=10：45：45）中脱色 1-2h，至对照组出现明显、清晰的负染条带。凝胶扫描照相，负染条带的宽度和亮度反映 IV 型胶原酶的活性。

IV型胶原是细胞外基质的重要组成成分，明胶酶（gelatinase）或称IV型胶原酶能降解组成基质膜的IV型胶原，其活性是影响肿瘤细胞侵袭和转移的重要因素之一。未经药物作用的 HT-1080 细胞的无血清培养上清中通常含 MMP-2（72kD）和 MMP-9（92kD）两种明胶酶，一般 72kD 形式的酶分泌量较大，在温育时间足够长时还可出现 68kD 酶带，这是 72kD 酶的激活形式。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳可以将肿瘤细胞分泌到培养上清中的明胶酶和它们的活性形式按分子量大小分开，经 TritonX-100 去除和蛋白结合的 SDS 后，明胶酶能恢复其蛋白降解活性。药物作用细胞后，如果影响到明胶酶表达和分泌的调节通路，则分泌到培养上清中的各种形式的明胶酶的含量将发生变化。如果把明胶掺入到凝胶液中使之与丙烯酰胺共价聚合，在适宜的反应条件下，明胶酶就能降解其周围的明胶，蛋白降解区不能被考马斯亮蓝染色，所以在明胶酶的活性区域附近就能出现一条负染带。肿瘤细胞分泌的明胶酶越多，带的亮度和宽度也就越大。用这种底物酶谱法（Zymography）观察 CAT 对 HT-1080 细胞分泌基质金属蛋白酶能力的

影响,结果表明:不同浓度 CAT 作用 24h,可以剂量依赖地抑制 MMP-2 的分泌(图 9)。

实验例 12、对人胚胎脐静脉血管内皮细胞 ECV304 增殖、穿过重组基质膜能力、分泌基质金属蛋白酶能力和体外管腔形成的影响

细胞增殖、穿过重组基质膜和分泌基质金属蛋白酶实验方法同前。
体外管腔形成试验

制备大鼠骨髓干细胞无血清培养 72h 上清液于-20℃ 储存备用。以 Matrigel 包被 96 孔板,100μl/孔,于 37℃ 孵育 30min 待 Matrigel 凝固后,对照组上层铺 ECV304 细胞(约 20,000 细胞/孔);待测组则同时加入细胞及受试药物,150μl/孔。各组用 50%大鼠骨髓干细胞培养上清(IMDM)及 50%含 10%FCS 的 RPMI1640 混合培养 ECV304 细胞,可在体外形成微血管网,加入不同浓度受试化合物后可观察其对微血管网形成的抑制作用。利用显微照相系统于不同时间点(3h、5h、8h、12h、24h、48h、72h)照像,用 Adobe Photoshop 软件处理结果,按公式 $APL(T) = \sum i \times \pi / 4 \times d$ ($APL(T)$: Total Vessel Actual Perimeter Length; $\sum i$: 微血管网与参考网格的交叉点数; d : 网格边长相当于标尺长度)计算体外形成微血管的总长度并进行统计学处理。

血管生成(angiogenesis)是指在既存血管的基础上以“发芽(sprouting)”的方式生成新血管的过程。自从 Folkman 于 1971 年提出了“肿瘤血管生成依赖学说”以来,大量研究证明血管生成是恶性肿瘤赖以生长、转移的基础。肿瘤血管生成是一个受促进血管生成的正调节因子和抑制血管生成的负调节因子严密调控的多步骤、连续复杂过程。其大致可分为既存血管外周基底膜的降解、内皮细胞的迁移和增殖、内皮细胞形成初级血管——管腔网状结构(tube network)以及外周细胞和平滑肌细胞包裹 tube 形成成熟血管等步骤。本实验以人脐静脉血管内皮细胞 ECV304 为观察对象,观察了 CAT 对 ECV304 细胞在体外形成管腔结构的影响。

(1) CAT 对 ECV304 细胞增殖的抑制作用

CAT 对 ECV304 细胞的增殖具有明显抑制作用,MTT 试验测得其

半数抑制浓度 IC₅₀ 为 0.088 μmol/L, SRB 试验测得其半数抑制浓度 GI₅₀ 为 0.10 μmol/L, 完全抑制浓度 TGI 为 0.22 μmol/L。

(2) CAT 对 ECV304 细胞穿过重组基质膜能力的影响

采用 FN 作趋化剂, 观察了 CAT 对 ECV304 细胞迁移能力的影响。结果表明, 0.02、0.04 和 0.08 μmol/L CAT 可明显抑制 ECV304 细胞的迁移(图 10), 对 ECV304 细胞的趋化性运动能力的抑制率分别为 55%、65%和 82%(P<0.01, 表 8)。而相同浓度 CAT 作用相同时间对 ECV304 细胞存活的影响却较小, 0.08 μmol/LCAT 作用时抑制率仅为 21.9%(表 9), 远不及其对 ECV304 细胞迁移的抑制。

表 8. CAT 对 ECV304 细胞穿过重组基质膜能力的影响

| CAT (μmol/L) | 穿过细胞数 (个) | 抑制率(%) |
|--------------|--------------|--------|
| Control | 383±4 | |
| 0.02 | 174±10** | 55 |
| 0.04 | 133±10** | 65 |
| 0.08 | 70±5** | 82 |

表 9. MTT 法检测 CAT 对 ECV304 细胞存活的影响

| CAT (μmol/L) | OD (570-450) | Inhibition rate(%) |
|--------------|--------------|--------------------|
| Control | 1.038±0.078 | |
| 0.02 | 0.962±0.021 | 7.3 |
| 0.04 | 0.871±0.051 | 16.1 |
| 0.08 | 0.811±0.006 | 21.9 |

(3) CAT 对 ECV304 细胞分泌基质金属蛋白酶能力的影响

用底物酶谱法观察 CAT 对 ECV304 细胞分泌基质金属蛋白酶能力的影响, 结果表明: 不同浓度 CAT 作用 24h, 可以剂量依赖地抑制 MMP-2 和 MMP-9 的分泌(图 11)。

(4) CAT 对 ECV304 细胞体外管腔形成能力的抑制作用

以 Matrigel 为基质, 用 50%大鼠骨髓干细胞无血清培养上清及 50%

含 10%FCS 的 RPMI1640 混合培养 ECV304 细胞，可在体外形成微血管网。加入不同浓度 CAT 后可抑制微血管的形成，CAT（0.02、0.04 和 0.08 μ mol/L）可明显抑制 ECV304 在体外形成微血管网（图 12）。用 Adobe Photoshop 软件处理图象，按公式 $APL(T) = \sum i \times \pi/4 \times d$ ($APL(T)$: Total Vessel Actual Perimeter Length; $\sum i$: 微血管网与参考网格的交叉点数; d : 网格边长相当于标尺长度) 计算体外形成微血管的总长度并进行统计学处理。0.02、0.04 和 0.08 μ mol/L CAT 处理 ECV304 细胞 24h, 可使其在 Matrigel 基质上形成管腔结构的能力分别降低至对照组的 81.8%、54.6%和 16.1%（表 10）。

表 10. CAT 对 ECV304 细胞体外管腔形成能力的抑制作用(24h).

| 组别 | $APL_T \pm SD (\mu m)$ | 抑制率(%) |
|-----------------------|------------------------|--------|
| 对照组 | 682.2 \pm 12.2 | |
| CAT(0.02 μ mol/L) | 558.3 \pm 27.5* | 81.8% |
| CAT(0.04 μ mol/L) | 372.7 \pm 29.8** | 54.6% |
| CAT(0.08 μ mol/L) | 109.8 \pm 13.2** | 16.1% |

注: $APL(T) = \sum i \times \pi/4 \times d = \sum i \times 0.785 \times 12\mu m$, APL :总血管周长, $\sum i$:血管交叉点.X $\pm SD$ (n=3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较。

实验例 13、对人胚胎脐静脉血管内皮细胞 ECV304 相关基因表达的影响

RT-PCR 及基因表达分析

RNA 提取

细胞总 RNA 用 TRIZOL Reagent 按说明书方法提取。细胞用胰酶消化，300g 离心 5min，吸尽上清，用 DEPC 处理的 PBS 洗一次，加入 1mL TRIZOL，充分震荡混匀，15-30 $^{\circ}C$ 放置 5min。加入 0.2mL 氯仿，充分震荡 15s 或上下来回颠倒数次，15-30 $^{\circ}C$ 静置 2-3min，于 4 $^{\circ}C$ ， $\leq 12,000g$ 离心 15min，将上层无色水相（RNA）转移至另一 eppendorf

管中。加入 0.5mL 异丙醇，混匀，15-30℃放置 10min，于 4℃， $\leq 12,000g$ 离心 10min，沉淀即为总 RNA。加入 1mL 75%乙醇，震荡洗涤一次，于 4℃、 $\leq 7,500g$ 离心 5min，小心吸干乙醇，空气干燥。加入 50 μ L nuclease-free 水于 55-60℃，10min 溶解 RNA，并测定其在 260nm 及 280nm 的吸光度值，计算总 RNA 浓度，于 -20℃ 储存备用。

RT-PCR 反应

引物设计

采用 Primer Premier 5 引物设计软件设计引物序列，引物由上海申友生物技术有限公司合成， β -actin 引物由北京鼎国生物技术发展中心提供。

RT-PCR 反应程序

参考 Promega 公司 Promega A3500 Reverse Transcription System 试剂盒说明书进行。取 2 μ g 总 RNA，加入 Random Primer (500ng/ μ L) 1 μ L，dNTPs (10mmol/L) 2 μ L，无 Rnase 的水至 13 μ L。70℃加热 10min，4℃静置 5min 将随机引物与总 RNA 退火。加入 10 \times buffer 2 μ L，AMV 0.75 μ L，于 PCR 仪中 42℃ 60min 合成 cDNA 第一链，95℃ 5min 灭活 AMV。取 1 μ L cDNA 进行 PCR 反应扩增 cDNA。反应体系为 RT 产物 1 μ L，10 \times Buffer 2.5 μ L，dNTPs (10mmol/L) 0.45 μ L，Antisense Primer (10 μ mol/l) 1 μ L，Sense Primer (10 μ mol/l) 1 μ L，Taq 酶 0.5 μ L，H₂O 补足体积至 25 μ L。扩增条件为 94℃变性 45s，T_m 值退火 45s，72℃延伸 1min，25-28 个循环。72℃末次延伸 5min。所用引物的模版，目标产物长度，T_m 值和序列见表。

| | 引物序列 | 扩增片段 长度 (bp) | 退火温度 (℃) |
|-------|--|-----------------|-------------|
| KDR | 5'-AAACTTGTAACCGAGACCTA 5'-CTGCCAATACCAGTGGATGT | 573 | 50 |
| MMP-9 | 5'-CGGCACGGCAATGCTGAT 5'-AGGGCGAGGACCATAGAGG | 507 | 55 |
| VEGF | 5'-TCCAGGAGTACCCTGATGAG 5'-ATTACATTTGTGTGCTGT | 204 | 49 |

| | | | |
|----------------|---|-----|----|
| β -actin | 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA 5'-CTTCCTTAATGTCAVGCACGATTTC | 540 | 55 |
| TIMP-1 | 5'-CTGTTGGCTGTGAGGAATGCA 5'-CGGAGGAAAGATGGGAGTGGG | 261 | 59 |

反应完成后，取 10 μ l PCR 扩增产物与上样缓冲液混匀，加样至 2%琼脂糖凝胶（含 EB），30V 电泳约 2h。紫外照像，用 Gel-Pro Analyzer 3.1 密度分析软件分析 PCR 产物条带，以 PCR 产物与 β -actin 相对密度之比进行半定量分析。

以 β -actin 水平为内标，采用 RT-PCR 方法检测了与血管生成相关基因 mRNA 的水平。结果表明 CAT 可抑制内皮细胞 KDR，MMP-9 基因表达(图 13)，使 VEGF 表达略有升高(图 14)，对 TIMP，u-PA mRNA 水平无明显影响(结果略)。0.02，0.04 和 0.08 μ mol/L CAT 作用 24h 可使 ECV304 细胞 KDR mRNA 水平分别降低为对照组的 40%、17%和 13%（图 13）。

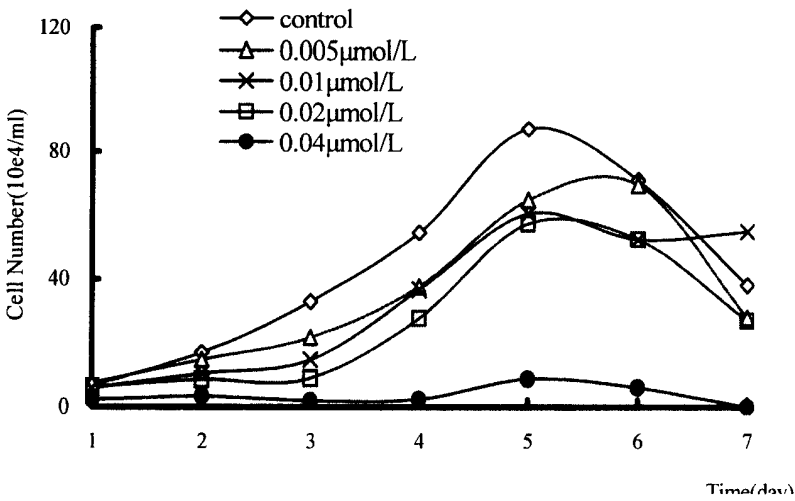


图 1

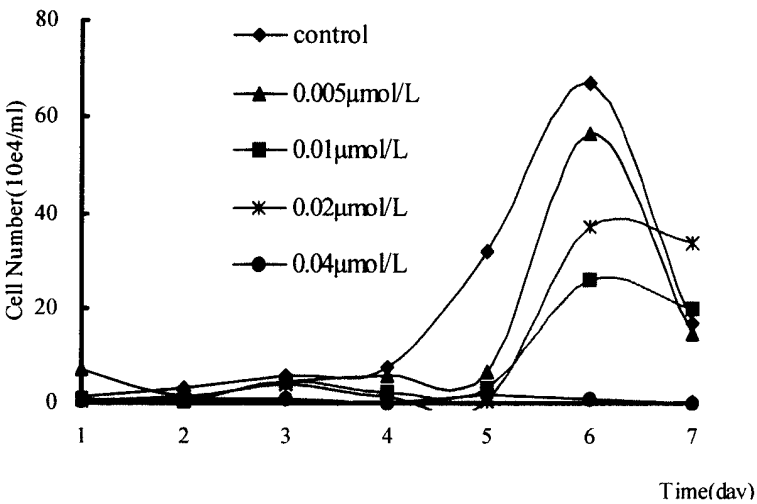


图 2

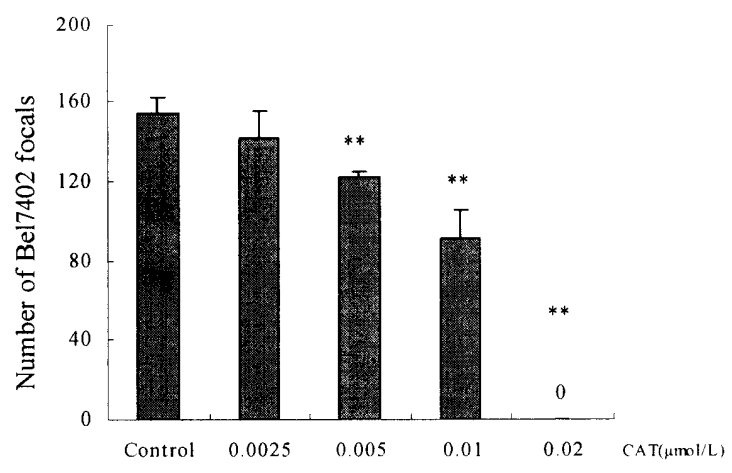


图 3

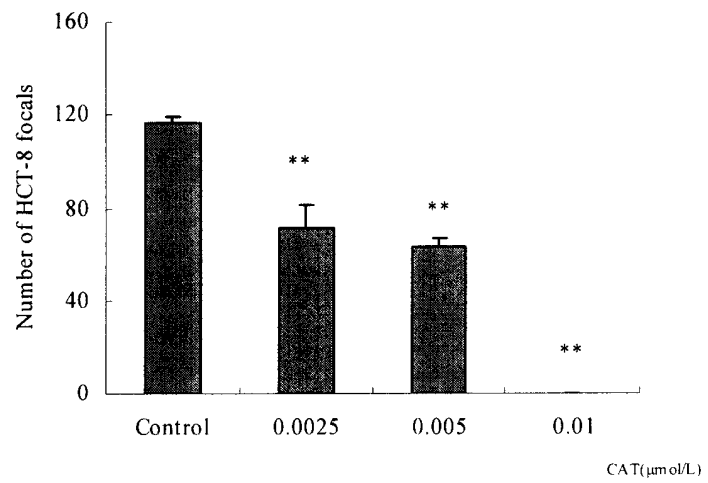


图. 4

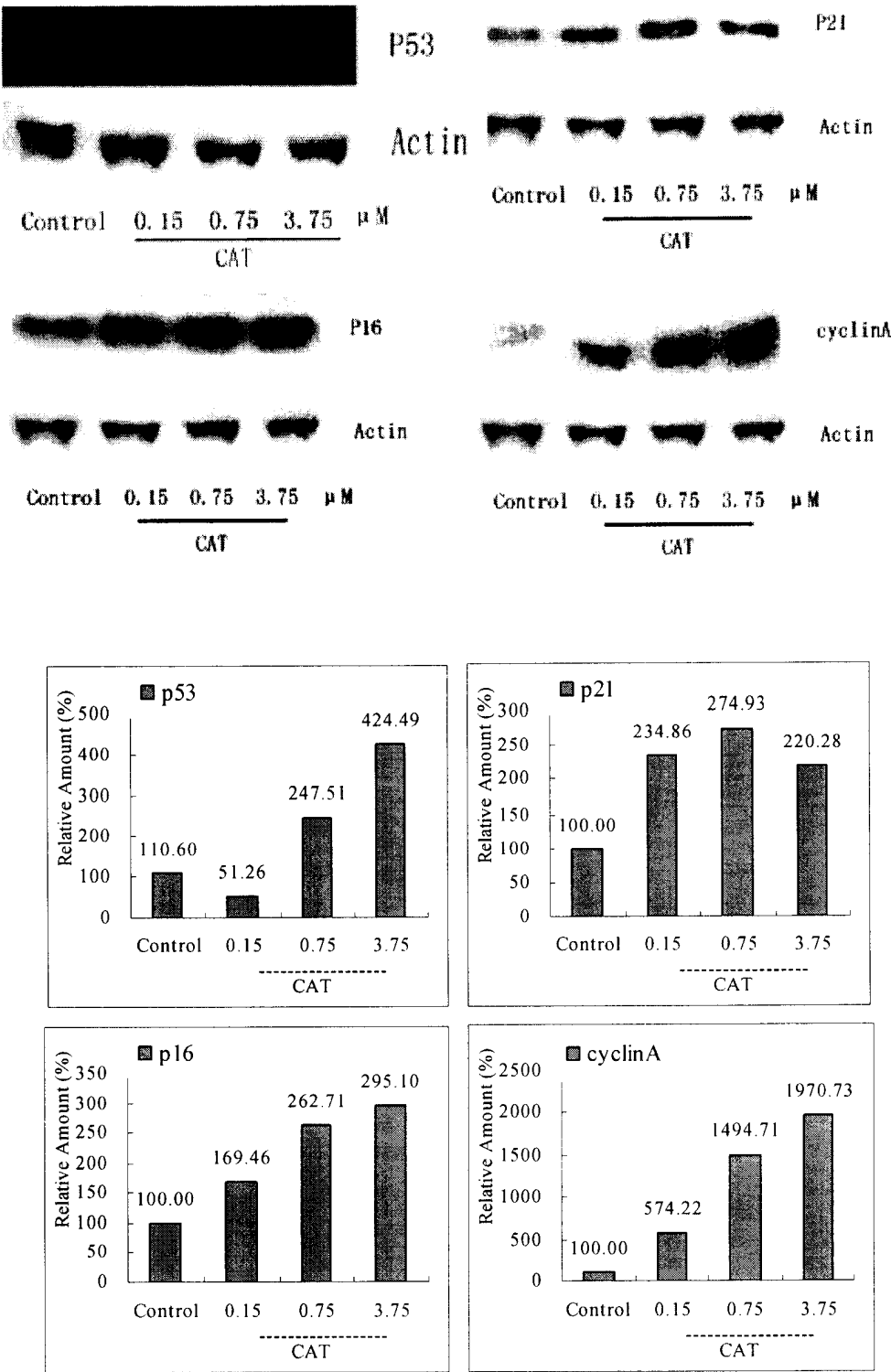


图 5

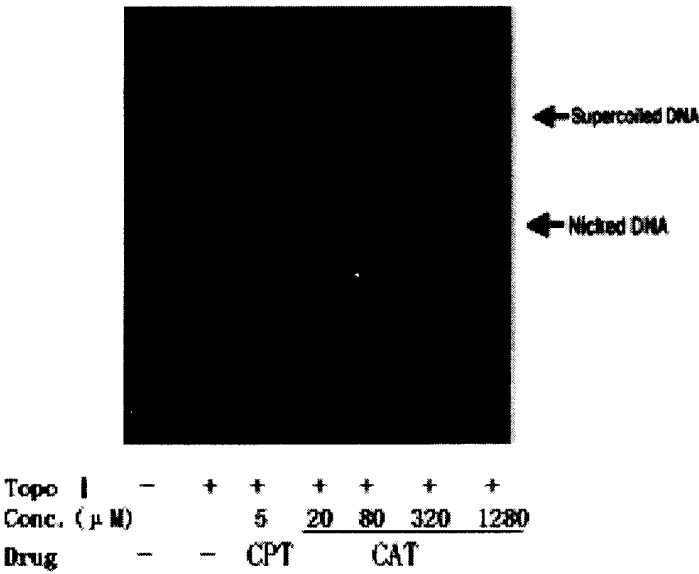


图 6.

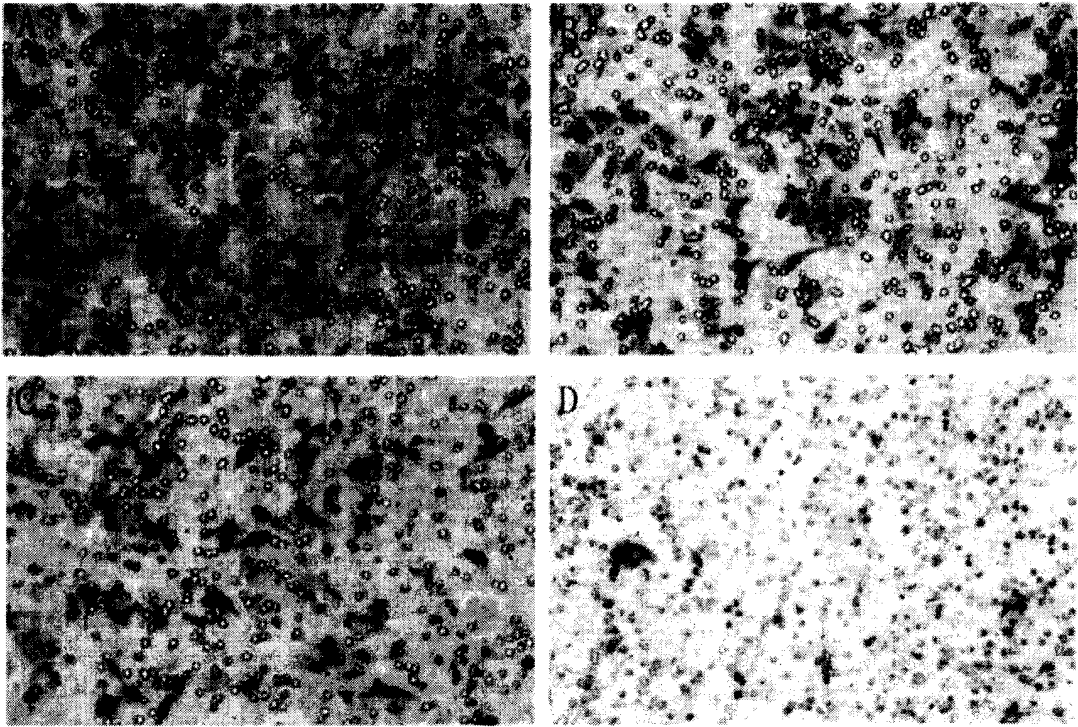


图 7

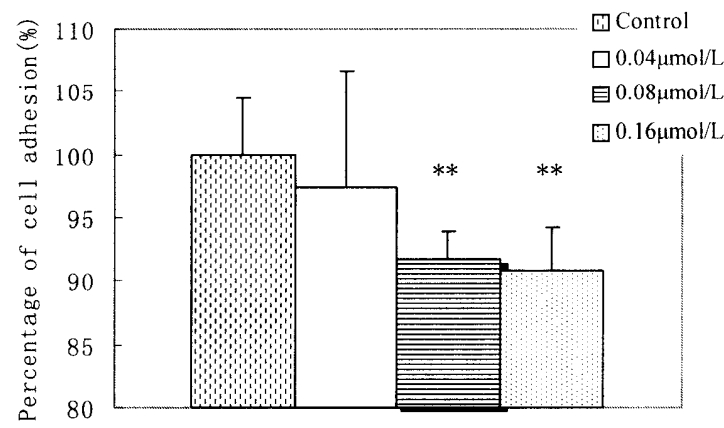
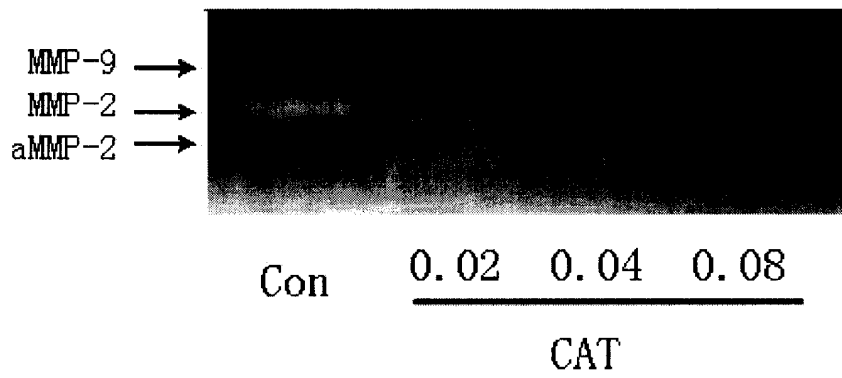
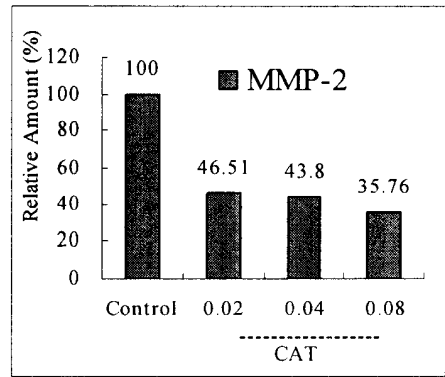


图 8.

A.



B.



C.

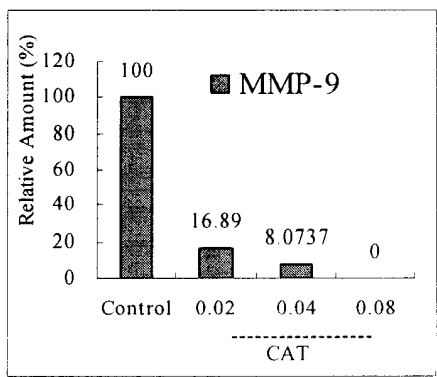


图 9

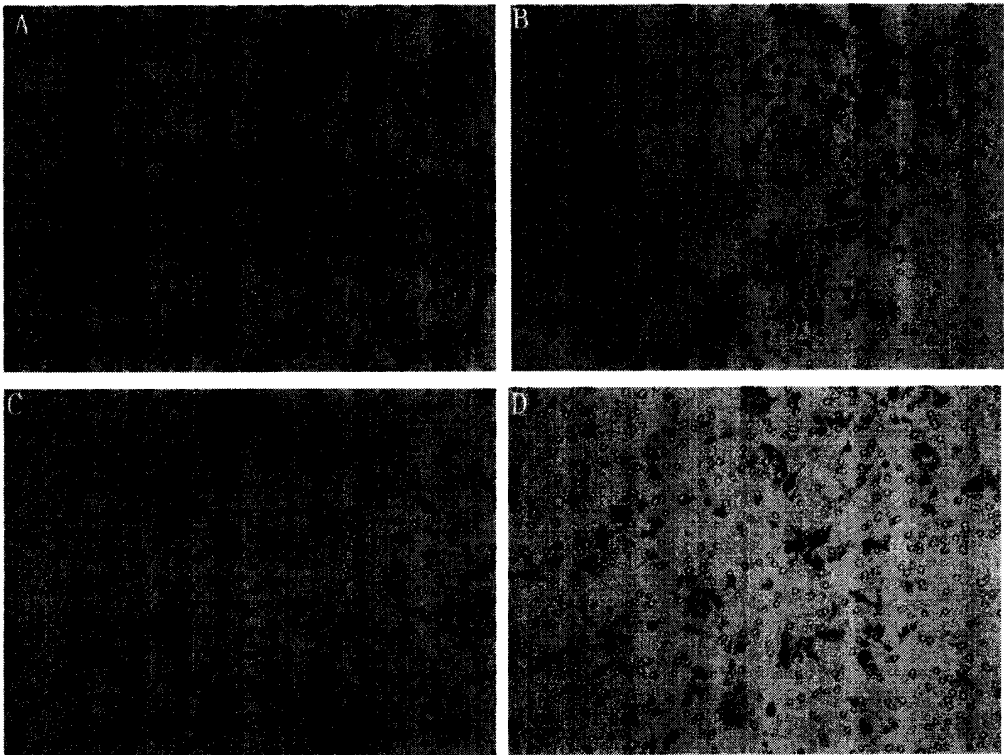


图 10.

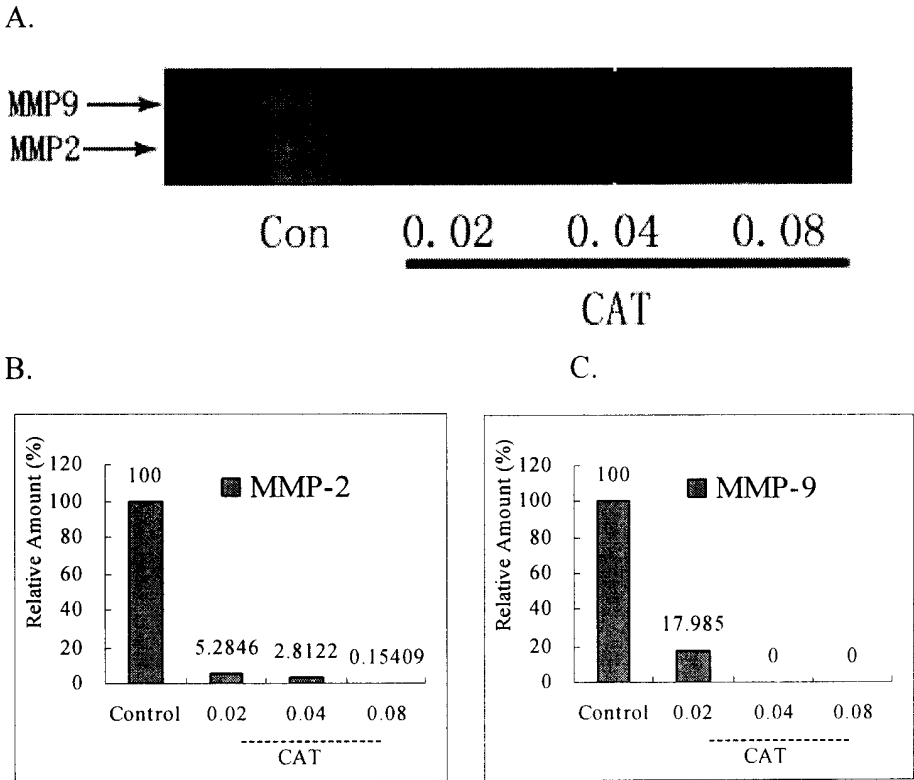


图 11

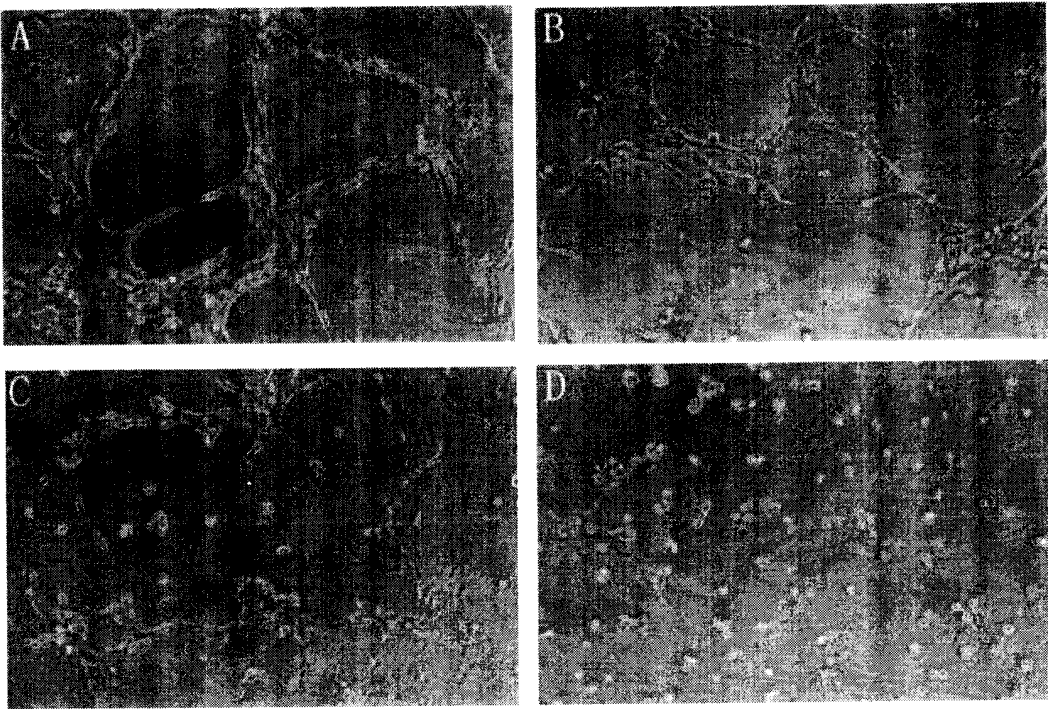


图 12.

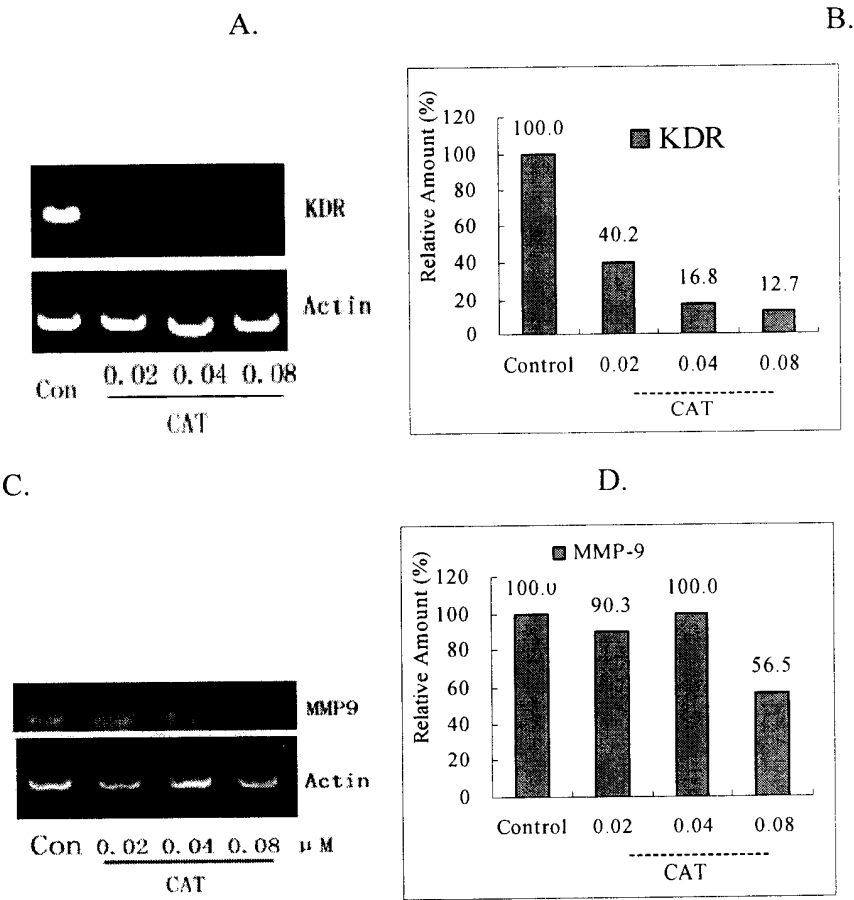
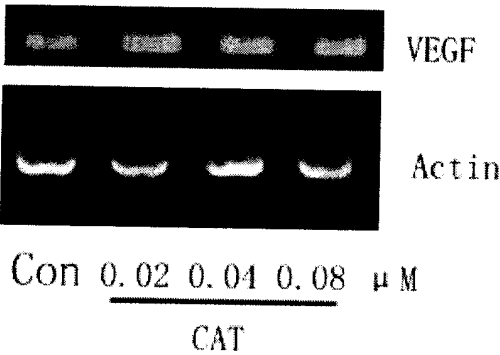


图 13

A.



B.

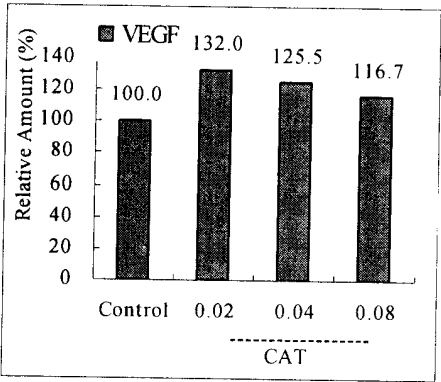


图 14