

[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 200910029483.7

[51] Int. Cl.

A61K 31/4245 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 9 月 16 日

[11] 公开号 CN 101530411A

[22] 申请日 2009.4.14

[21] 申请号 200910029483.7

[71] 申请人 中国药科大学

地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眠大道
639 号

[72] 发明人 王广基 张奕华 艾 华 吴晓兰
周 芳 孙建国 张经纬 孔祥文

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 3 页

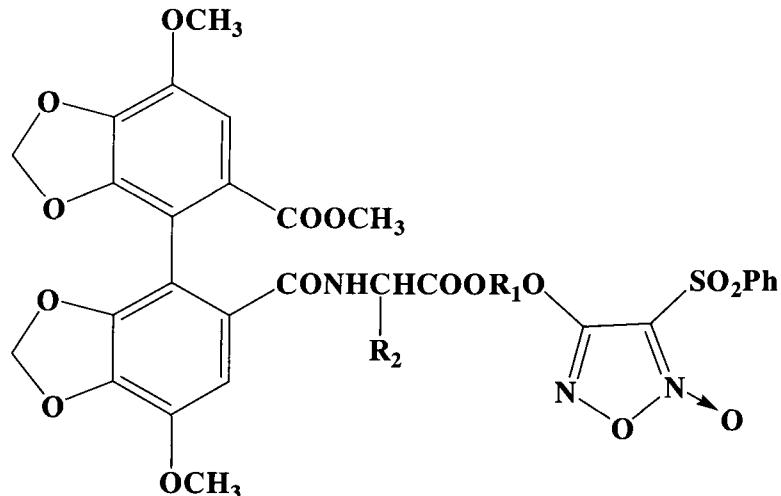
[54] 发明名称

一种 NO 供体型化合物作为 P - 糖蛋白抑制剂
和肿瘤多药耐药逆转剂的应用

[57] 摘要

本发明涉及增敏抗肿瘤药物和逆转肿瘤多药耐药的医学领域，具体涉及一氧化氮供体型烷氧基联苯羧酸类化合物对 P - 糖蛋白功能的抑制作用及其在逆转肿瘤多药耐药中的应用。本发明特征总结为：一氧化氮供体型烷氧基联苯类化合物，特征是具有烷氧基联苯羧酸母体骨架和呋咱氮氧化物类一氧化氮供体基团，通过长度不等的氨基酸连接基团连接而成，可以作为 P - gp 抑制剂和肿瘤多药耐药逆转剂，能显著提高 P - gp 底物的细胞摄取量、减少底物外排，下调 P - gp 的表达，也可以与抗肿瘤药物联合使用提高其在多药耐药肿瘤细胞中的浓度，耐药性逆转倍数可达数百倍，使多药耐药细胞株对化疗药物恢复敏感性，具有广泛的应用前景。

1. NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物作为 P-糖蛋白 (P-gp) 抑制剂和肿瘤多药耐药 (MDR) 逆转剂的用途。
2. 按权利要求 1 所述的 MDR, 主要是指由于 P-gp 过度表达而引发的内在多药耐药性和获得性多药耐药性。
3. 按权利要求 1 所述的 NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物其结构通式为:



$R_1 = (CH_2)_2, (CH_2)_4, CH_2C \equiv CCH_2,$
 $CH(CH_3)(CH_2)_2, (CH_2)_2O(CH_2)_2$

$R_2 = H, CH_3, CH_2CH(CH_3)_2,$
 $CH_2Ph, CH(CH_3)C_2H_5$

4. 按权利要求 3 所述的 NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物, 其优选化学结构为 14c ($R_1=(CH_2)_4, R_2=CH_3$) 和 14j ($R_1=(CH_2)_2O(CH_2)_2, R_2=CH_3$)。

一种 NO 供体型化合物作为 P-糖蛋白抑制剂和肿瘤多药耐药逆转剂的应用 技术领域

本发明涉及增敏抗肿瘤药物和逆转肿瘤多药耐药的医学领域，具体涉及 NO 供体型烷氧基联苯羧酸类化合物对 P-糖蛋白功能的抑制作用及其在逆转肿瘤多药耐药中的应用。

背景技术

多药耐药（Multi-drug resistance, MDR）是当前肿瘤临床化疗失败的主要原因之一。在临床治疗中，由于 MDR 现象的存在，导致肿瘤细胞对功能和结构不相关的化疗药物产生普遍抗性，这不但会导致治疗效果下降，还会造成肿瘤复发率增高。引起肿瘤 MDR 的重要原因之一就是抗性的肿瘤细胞过度表达 ATP-结合转运体（ATP-binding cassette family transporters, ABC transporters），包括 P-糖蛋白（P-gp）、乳腺癌耐药蛋白（BCRP）和多药耐药相关蛋白（MRP）等。这些转运体分布在细胞膜上，利用水解 ATP 释放的能量将进入细胞的内源性和外源性物质泵出细胞。由于转运体的外排作用，降低了药物在肿瘤细胞内的浓度，从而使肿瘤细胞对化疗药物产生耐受，依旧保持较高的存活率。

目前临床治疗肿瘤的重要策略之一就是减弱或逆转 MDR 现象。有许多化合物已经被证明具有减弱或者逆转 MDR 的作用，例如维拉帕米（Verapamil）、尼莫地平（Nimodipine）、奎尼丁（Quinine）、双嘧达莫（Dipyridamole）、环孢素 A（Cyclosporin A）、紫杉烷类（Taxanes）、三氟拉嗪（Trifluoperazine）、普罗帕酮（Propafenone）、胺碘酮（Amiodarone），以及黄酮苷类（Flavonoid）、生物碱类（Alkaloids）、萜类（Terpenes）和甾体（Steroid）等等。可见，与转运体的广谱转运相对应，这些 MDR 逆转剂也没有固定的结构和模式。近几年，越来越多的新型 MDR 逆转剂被发现并逐渐应用于临床，有希望为肿瘤病人寻找到更加光明的治疗前景。

联苯双酯（4,4'-二甲氧基-5,6,5',6'-二次甲二氧-2,2'-二甲酸甲酯联苯，Bifendate）近几年被发现也具有逆转 MDR 的作用，能够促进化疗药物在肿瘤细胞和组织中的积累，具有明显的逆转 MDR 作用，而这种作用是通过抑制肿瘤细胞上 P-gp 的功能和表达来实现的（Jin J., Sun H., Wei HL, et al. The anti-hepatitis drug DDB chemosensitizes multidrug resistant cancer cells in vitro and in vivo by inhibiting P-gp and enhancing apoptosis[J]. *Invest New Drugs*, 2007, 25(2): 95-105.）。一氧化氮（Nitric Oxide, NO）是一种性质非常活泼而且半衰期非常短的气体小分子化合物，在哺乳动物细胞内，由 L-精氨酸经 NO 合酶（NO synthase, NOS）催化生成，发挥多种生理作用。近几年，研究者发现 NO 在肿瘤发生、发展和预防、治疗中也扮演着十分重要的角色，高浓度的 NO（几十到几百 nM）表现出显著的抗肿瘤活性，如能够扩

张肿瘤血管使化疗药物深入肿瘤内部，抑制低氧诱导因子（HIF-1a），激活 p53 蛋白，促进肿瘤细胞凋亡，对免疫疗法、化学疗法、放射疗法具有普遍的增敏作用。相应的治疗手段主要基于两个方面：其中一方面是间接增加肿瘤部位 NO 生成水平的方法，主要包括诱导 NOS 的表达或者其他刺激 NOS 的手段，例如他汀类的阿托伐他汀（Atorvastatin）；另一方面是直接增加肿瘤部位的 NO 浓度，例如各种类型的 NO 供体化合物（NO donors），这种向特定部位直接补充 NO 的方法已经被广泛采用，NO 供体化合物含有能够释放 NO 的基团，这些基团能够作为载体，将化学性质不稳定的 NO 承载至特定的部位发挥作用。

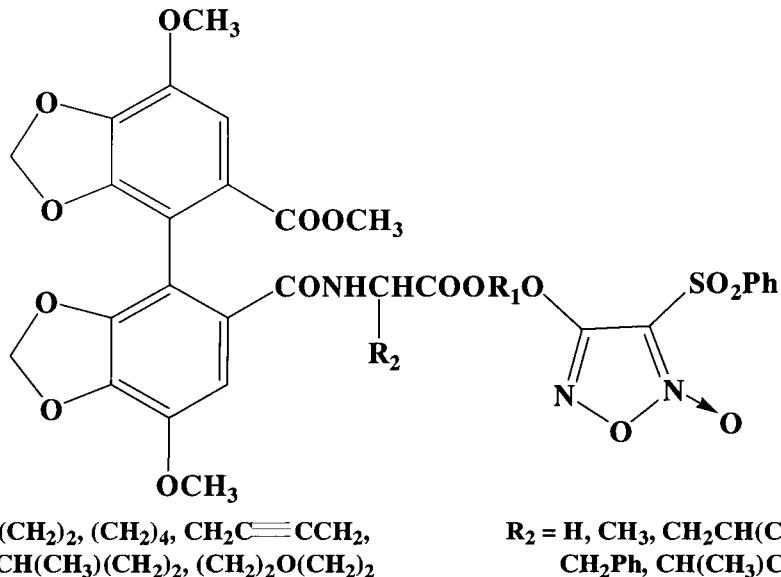
基于联苯双酯和 NO 显著的抗肿瘤活性，我们合成了一系列以烷氧基联苯为母核结构的 NO 供体型化合物（Nitric oxide-releasing six alkoxy biphenyl derivatives），这些化合物具有相同的六烷氧基联苯结构（母核），通过一系列长度不等的氨基酸链（连接基团）与各种类型的 NO 供体基团（NO-donating moiety）相连。初步的体外研究表明，这些新型的 NO 供体型烷氧基联苯类化合物普遍具有抗肿瘤细胞增殖的活性（Kong XW, Zhang YH, Dai L, et al. Synthesis and biological evaluation of nitric oxide-releasing six alkoxy biphenyl derivatives as anticancer agents[J]. Chinese Chem Lett, 2008, 19(2):149-152. Kong XW, Zhang YH, Wang T, et al. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Novel Dimethyl [1,1'-Biphenyl]-2,2'-dicarboxylates Bearing 1,3,4-Thiadiazole Moieties[J]. Chem Bio divers, 2008, 5(9): 1743-52.），对 HepG 2 细胞（人肝癌细胞株）、KB 细胞（口腔上皮癌细胞株）、A549（人肺腺癌细胞株）、K562（髓性白血病细胞系）和 MCF-7（人乳腺癌细胞系）均有明显的杀伤作用，其中一些化合物的抗肿瘤作用甚至强于氟尿嘧啶（5-Fluorouracil, 5-FU），而且这种显著的抗肿瘤作用与化合物释放 NO 的能力正相关，即释放 NO 能力强的化合物其抗肿瘤细胞增殖的活性往往也比较强。

国内外未见 NO 供体型烷氧基联苯羧酸类化合物作为 P-gp 抑制剂和肿瘤多药耐药逆转剂的研究报道和相关专利公开。

发明内容

本发明描述新型 NO 供体型烷氧基联苯羧酸类化合物的新用途，即对 P-gp 功能的抑制作用及其在肿瘤多药耐药逆转中的应用，具有开发成癌症治疗辅助药物（多药耐药逆转剂）的前途。

所述的新型 NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物，其特征是具有烷氧基联苯羧酸母体骨架和 NO 释放基团，通过不同长度的氨基酸连接而成，其结构通式为：



这些新型 NO 供体型化合物对 P-gp 的抑制作用表现在能够增加肿瘤细胞对 P-gp 底物的摄取，降低底物的外排比，而且能够明显增强耐药细胞株对抗肿瘤药物的敏感性，增加抗肿瘤药物在细胞内的积累，发挥逆转肿瘤多药耐药的作用，而且这一作用明显强于已知的 P-gp 抑制剂联苯双酯和维拉帕米。由此可见，NO 供体型烷氧基联苯羧酸类化合物能够作为 P-gp 的抑制剂和肿瘤协同增敏、逆转多药耐药的化合物进行开发。

本发明公开的 NO 供体型烷氧基联苯羧酸类化合物 14c 和 14j 作为 P-gp 抑制剂，在 $25\mu\text{M}$ 时均能使特异 P-gp 底物地高辛的外排比明显降低，表现为 $P_{app, A-B}$ 值与对照组相比有所上升，而其 $P_{app, B-A}$ 值均有明显的下降，表现出对地高辛双向外排的明显抑制，使地高辛的外排比明显降低。14c 和 14j 作用均比联苯双酯（DDB）强，其中 14j 强于经典的 P-gp 抑制剂维拉帕米（VER）；能特异地增加 Caco-2 细胞对 P-gp 底物地高辛的摄取量且呈明显的剂量依赖性，增加幅度明显高于相同浓度的联苯双酯(DDB)，同时强于经典的 P-gp 抑制剂维拉帕米（中等抑制强度）；能特异增加 P-gp 高表达的 MCF-7/Adr 细胞对多柔比星的摄取量，使耐药型细胞株对多柔比星的摄取量接近于其在敏感型 MCF-7 细胞中的浓度，不影响敏感型 MCF-7 细胞对多柔比星的摄取。

本发明公开的 NO 供体型烷氧基联苯羧酸类化合物 14c 和 14j 作为肿瘤多药耐药逆转剂，无毒或低毒剂量下，在不表达 P-gp 的 MCF-7 细胞中，除 14c 在 $10\mu\text{M}$ 的浓度下能够将 IC_{50} 降为 $0.026\mu\text{M}$ 外，各化合物对多柔比星引起的细胞毒作用均无明显影响。在高表达 P-gp 的 MCF-7/Adr 细胞中， $0.1\sim10\mu\text{M}$ 浓度时联苯双酯尚未对多柔比星的细胞毒作用产生明显影响，而在此浓度下 14c，14j 则能够明显降低耐药肿瘤细胞的存活率，显著降低多柔比星的用量，14c 和 14j 在 $10\mu\text{M}$ 的浓度时能使多柔比星的 IC_{50} 从 $41.98\mu\text{M}$ 分别降低为 $0.26\mu\text{M}$ 和 $0.41\mu\text{M}$ ，逆转倍数分别为 158.8 和 101.6，达到与敏感细胞株相似的药敏程度 (IC_{50} 约为 $0.293\mu\text{M}$)。由

于 14c 和 14j 对 P-gp 的强效抑制作用，使这两种化合物对 P-gp 高表达的肿瘤细胞的化疗增敏作用明显强于母体化合物联苯双酯。

本发明公开的 NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物能够下调多药耐药蛋白 P-gp 的表达。在 MCF-7/Adr 细胞中， $20\mu\text{M}$ 的多柔比星能够明显上调 P-gp 的表达，P-gp 的表达水平约为未处理组的 2 倍左右；而合用 $25\mu\text{M}$ 浓度的 14c 和 14j 后，多柔比星的上调作用被明显减弱，联合给药组的 P-gp 表达量明显下降，达到或接近于 control 组水平。

本发明公开的 NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物可以作为 P-gp 抑制剂和肿瘤多药耐药逆转剂，不但能显著提高 P-gp 底物的细胞摄取量、减少底物外排，还能下调 P-gp 的表达，也可以与抗肿瘤药物联合使用，提高抗肿瘤药物的在多药耐药肿瘤细胞中的浓度，对肿瘤化疗产生明显的协同作用，耐药性逆转倍数获得数百倍的提高，使多药耐药细胞株对化疗药物恢复敏感性，具有广泛的应用前景。

附图说明

图 1 NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物增强肿瘤细胞对 P-gp 底物地高辛的摄取

图 2 NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物增加耐药型肿瘤细胞对抗肿瘤药物多柔比星的摄取

图 3 NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物对抗癌药物多柔比星的化疗增敏作用

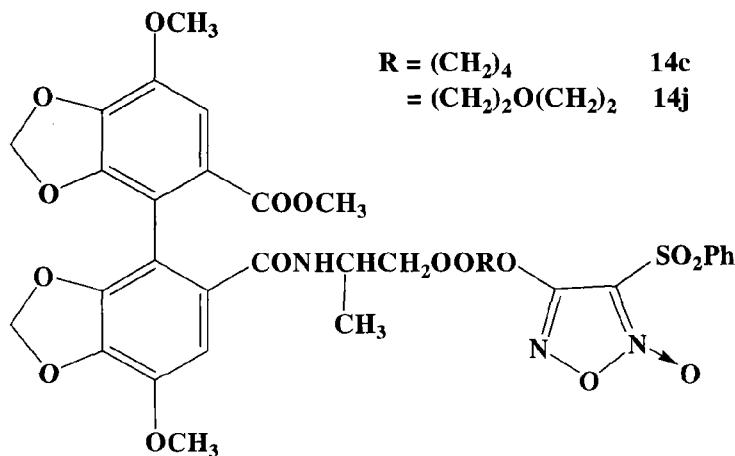
图 4 NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物逆转多柔比星诱导的 P-gp 表达上调

具体实施方式

下面的实施例用来进一步说明本发明，但并不意味着对本发明的任何限制。

实施例 1

NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物降低 P-gp 底物地高辛的外排比，以 14c 和 14j 两个化合物为例，具体结构如下：



实验方法:

Caco-2 细胞按 1×10^5 个/ml 接种于 Millicell 小篮中 (12 mm, 0.4 μm , Millicell-PCF, Millipore, USA), 培养基隔日更换, 当细胞培养至 19~25 天时细胞融合形成致密单层, 用 EVOMTM 上皮电压欧姆计 (World Precision Instrument, Sarasota, FL) 测定, 只有 TEER 大于 400 $\Omega\times\text{cm}^2$ 的细胞单层才用于转运实验。试验开始时, 将每孔内培养基吸干, 用 37°C Hank's 溶液小心冲洗 2 次, 小篮内加 0.4ml, 外加 0.6ml 空白 Hank's 溶液, 于 37°C 预平衡 30 分钟。将小篮内、外侧溶液均吸干, 加入含有联苯双酯 (DDB)、维拉帕米、14c 和 14j 的溶液, 浓度均为 25 μM 。37°C 孵育 60 分钟后, 将小篮内或者外侧的溶液吸干, 加入终浓度为 5 μM 的地高辛溶液。每个小篮含有地高辛的一侧称为“供体侧”, 相应的另一侧为“受体侧”。90 分钟后, 分别从“受体侧”取样, 测定样品中地高辛的含量。

地高辛含量测定方法: 精密量取细胞悬液 200 μl , 加入内标洋地黄毒昔工作液 (40nmol/L) 10 μl , 振荡 30 秒混匀, 再加入乙酸乙酯 800 μl , 涡旋 3min, 15000rmp 离心 10min, 取上层有机相 720 μl 于 45°C 真空挥干, 残渣用 80 μl 乙腈溶解, 21000rpm 离心 10min, 取上清 10 μl 进样分析。LC-MS/MS 分析采用 Finnigan Surveyor™ HPLC, 色谱柱采用 Gemini(150mm×2.0mm, 3 μm , Phenomenex, USA), 柱温和自动进样器温度分别设定为 40 °C 和 4 °C。流动相流速和梯度洗脱程序见表 1:

表1 地高辛梯度洗脱程序

Time (min)	B% (乙腈)	D% (0.02%氨水)	流速 ($\mu\text{l}/\text{min}$)
0.00	20.0	80.0	200.0
0.50	20.0	80.0	200.0
0.80	65.0	35.0	200.0
3.00	65.0	35.0	200.0
4.50	20.0	80.0	200.0
7.00	20.0	80.0	200.0

质谱分析采用 Finnigan TSQ Quantum Discovery max system (Thermo Electron, San Jose, CA, USA), ESI源, 负离子, SRM模式, 优化后的质谱参数为: Spray voltage: 4000V; Sheath gas pressure: 15 Arb; Aux gas pressure: 19 Arb; Ion transfer capillary temperature: 380°C; Tube lens: -134; Collision pressure: 1.8; 检测离子为 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 地高辛: m/z 779.4→649.2 (35eV), 内标洋地黄毒昔: m/z 763.5→633.2 (29eV)。数据采集和处理分别采用 Xcalibur 1.2 software (Thermo Finnigan, USA) 和 LCQuan software (Thermo Finnigan, USA)。用内标法随行标准曲线计算样品浓度。本方法线性范围为 0.5~50nmol/L。

按下式计算表观通透系数 Papp:

$$Papp (\text{cm/s}) = (\Delta Q / \Delta t) / (A \times C_0)$$

其中: ΔQ (μmol) 为单位时间 Δt (min) 内通过单层的药物的量; A (cm^2) 为细胞单层的表面积; C_0 (μmol) 为试验开始时“供体侧药物的浓度”。药物的外排比按 $Papp, B-A / Papp, A-B$ 计算。

实验结果见表 2。结果显示, 作为 P-gp 抑制剂 NO 供体型烷氧基联苯羧酸类化合物 14c 和 14j 均能使特异 P-gp 底物地高辛的外排比明显降低, 表现为 $P_{app, A-B}$ 值与对照组相比有一定程度的上升, 而其 $P_{app, B-A}$ 值均有不同程度的下降。地高辛的外排比下降, 表明地高辛经转运体作用的外排过程被抑制。本试验中 NO 供体型烷氧基联苯羧酸类化合物表现出对地高辛双向外排的明显抑制, 使地高辛的外排比明显降低。14c 和 14j 作用均比联苯双酯 (DDB) 强, 其中 14j 强于经典的 P-gp 抑制剂维拉帕米 (VER)。

表 2 NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物对 Caco-2 细胞地高辛双向转运的 Papp 值和外排比

Group	$P_{app} (\times 10^{-5} \text{ cm/s})$		Efflux Ratio
	A-to-B	B-to-A	
Control	0.35±0.06	2.94±0.13	8.47
VER	0.61±0.07**	1.81±0.18**	2.96
DDB	0.39±0.06	2.47±0.32	6.33
14c	0.34±0.05	2.08±0.10**	6.20
14j	0.39±0.07	0.93±0.13**	2.37

(* p<0.05, ** p<0.01 与对应 control 组相比)

实施例 2

NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物增强 P-gp 底物地高辛的摄取, 以 14c 和 14j 为例。

实验方法:

Caco-2 细胞接种于 24 孔培养板上, 培养 3 天左右更换一次培养基, 当细胞单层完全融合后, 可以进行摄取试验。进行摄取实验前, 先将 24 孔板内的培养基吸出, 贴壁加入 37°C 空白 Hank's 液荡洗细胞 3 次, 轻轻吸干孔内液体, 加入用 Hank's 液稀释的药物溶液 1ml, 各药物终浓度分别为 5 μM , 10 μM , 25 μM 。将细胞板置于 37°C 培养箱中, 记时。90 分钟后取出细胞板, 立即吸出孔内溶液, 对应加入用上述含药溶液稀释的地高辛溶液 1ml, 使体系中地高辛终浓度为 5 μM 。将细胞板继续置于 37°C 培养箱中孵育, 记时。90 分钟后取出细胞板, 立即吸出孔内溶

液, 用4°C的Hank's液荡洗3次, 每次1ml, 最后加入超纯水1 ml, 超声破碎细胞(10 amplitude microns, 1min)。取30 μ l细胞悬液, 用考马斯亮蓝法测定中蛋白含量。剩余细胞悬液置-20°C保存, 留测地高辛浓度。最终地高辛浓度用蛋白含量校正, 表示为 nmol/mg protein。每组平行操作3份样本。同时设定不加药物的空白对照组, 观察无其他药物影响的情况下, 细胞对地高辛的摄取情况。地高辛的测定方法详见实施例1。

实验结果见图1。结果显示, 作为P-gp抑制剂NO供体型烷氧基联苯羧酸类化合物14c和14j均能特异地增加P-gp底物地高辛的摄取量, 增加幅度明显高于相同浓度的联苯双酯(DDB), 同时强于经典的P-gp抑制剂维拉帕米(中等抑制强度)。由于NO供体型烷氧基联苯羧酸类化合物对P-gp的强烈抑制作用, 而使地高辛细胞摄取量显著增加。

实施例3

NO供体型烷氧基联苯羧酸化合物增强肿瘤耐药细胞对P-gp底物多柔比星的摄取, 以14c和14j为例。

实验方法:

MCF-7和MCF-7/Adr细胞接种于24孔培养板上, 隔日更换培养基, 当细胞单层完全融合后, 可以进行摄取试验。进行摄取实验前, 先将24孔板内的培养基吸出, 贴壁加入37°C空白Hank's液荡洗细胞3次, 轻轻吸干孔内液体, 加入用Hank's液稀释的药物溶液1ml, 各药物终浓度均为25 μ M。将细胞板置于37°C培养箱中, 记时。90分钟后取出细胞板, 立即吸出孔内溶液, 对应加入用上述含药溶液稀释的多柔比星溶液1ml, 使体系中多柔比星终浓度为5。将细胞板继续置于37°C培养箱中孵育, 记时。90分钟后取出细胞板, 立即吸出孔内溶液, 用4°C的Hank's液荡洗3次, 每次1ml, 最后加入超纯水1 ml, 超声破碎细胞(10 amplitude microns, 1min)。取30 μ l细胞悬液, 用考马斯亮蓝法测定中蛋白含量。剩余细胞悬液置-20°C保存, 留测地高辛浓度。最终地高辛浓度用蛋白含量校正, 表示为 nmol/mg protein。每组平行操作3份样本。同时设定不加药物的空白对照组, 观察无其他药物影响的情况下, 细胞对多柔比星的摄取情况。

多柔比星的测定方法如下: 精密量取细胞悬液100 μ l, 加入2倍体积的甲醇沉淀蛋白, 涡旋3min, 20000rmp离心10min, 取上清20 μ l进样分析。HPLC分析采用HITACHI 1601液相色谱仪, 色谱柱采用BDS C18 (200mm×4.6mm, 5 μ m), 柱温和自动进样器温度分别设定为40 °C和4 °C。流动相为甲醇: 0.2%乙酸=30: 70 (v/v), 采用荧光检测器检测, 激发波长为495nm, 发射波长为560nm。

实验结果见图2。结果显示, 在P-gp高表达的MCF-7/Adr细胞中, NO供体型烷氧基联

苯羧酸类化合物 14c, 14j 均能特异地增加多柔比星在细胞内的摄取量。而在不表达 P-gp 的 MCF-7 细胞中, 几种化合物对多柔比星在细胞内的摄取量均无明显影响。由于多柔比星是 P-gp 底物, 它的外排是由 P-gp 介导的, 因此, 耐药株中多柔比星细胞摄取量增加而敏感株不出现这一现象, 说明加入的新型 NO 供体型烷氧基联苯羧酸类化合物抑制了 P-gp 的功能, 最终导致耐药肿瘤细胞株对 P-gp 底物多柔比星的摄取量明显增加的。由于在耐药型 MCF-7/Adr 细胞中 14c, 14j 均能特异地增加多柔比星在细胞内的摄取量, 而使细胞内多柔比星浓度接近于在敏感型 MCF-7 细胞中的浓度, 而使耐药现象得以逆转。

实施例 4

NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物对抗癌药物多柔比星的化疗增敏作用, 以 14c 和 14j 为例。

实验方法:

取对数生长期的 MCF-7 和 MCF-7/Adr 细胞按 2000 个/孔接种于 96 孔培养板上, 接种后 24 小时, 加入不同浓度的多柔比星, 多药耐药逆转剂 14c 和 14j 及对照溶剂。继续培养 48 小时后, 小心吸出各孔中培养基, 更换为新鲜的等体积无血清培养基, 加入 MTT 试液 (5mg/ml) 20 μ l, 于 37°C 孵育 4 小时。小心吸出各孔中溶液, 加入二甲基亚砜 150 μ l 溶解结晶, 37°C 孵育 10 分钟后, 采用酶标仪(Spectra Fluor plate reader, Tecan, Austria)测定各孔在 590nm 处的吸收值, 按下式计算细胞存活率:

$$\text{Survival Rate (\%)} = \frac{\text{Sample Absorbance} - \text{Blank Plate Absorbance}}{\text{Control Absorbance} - \text{Blank Plate Absorbance}} \times 100\%$$

用存活率评价多柔比星及不同浓度 14c, 14j, 联苯双酯对 MCF-7 和 MCF-7/Adr 细胞生存活力的影响, 每组设三至四个复孔取其平均值, 计算 IC₅₀ 及增敏剂的增敏倍数。

实验结果见图 3。结果显示, 在不表达 P-gp 的 MCF-7 细胞中, 除 14c 在 10 μ M 的浓度下能够将 IC₅₀ 降为 0.026 μ M 外, 各化合物对多柔比星引起的细胞毒作用均无明显影响。在高表达 P-gp 的 MCF-7/Adr 细胞中, 0.1~10 μ M 浓度时联苯双酯尚未对多柔比星的细胞毒作用产生明显影响, 而在此浓度下 14c, 14j 能够明显降低耐药肿瘤细胞的存活率, 显著降低多柔比星的用量, 14c 和 14j 在 10 μ M 的浓度时能使多柔比星的 IC₅₀ 从 41.98 μ M 分别降低为 0.26 μ M 和 0.41 μ M, 逆转倍数分别为 158.8 和 101.6, 达到与敏感细胞株相似的药敏程度 (IC₅₀ 约为 0.293 μ M), 见表 3。由于 14c 和 14j 对 P-gp 的强效抑制作用, 使这两种化合物对 P-gp 高表达的肿瘤细胞的化疗增敏作用明显强于联苯双酯。

表3 NO供体型烷氧基联苯羧酸化合物14c和14j对MCF-7及MCF-7/Adr细胞对Adr敏感性的影响

药 物	浓度 (μM)	MCF-7		MCF-7/Adr	
		Adr IC ₅₀ (μM)	逆转倍数	Adr IC ₅₀ (μM)	逆转倍数
对照	—	0.293±0.083	1.0	41.98±5.85	1.0
14c	0.1	0.224±0.087	1.3	46.28±7.42	0.9
	1	0.066±0.005	4.4	23.17±1.27	1.8
	10	0.026±0.002	11.1	0.26±0.01	158.8
14j	0.1	0.265±0.035	1.1	41.90±1.99	1.0
	1	0.183±0.013	1.6	9.98±0.95	4.2
	10	0.155±0.005	1.9	0.41±0.03	101.6
联苯双酯	0.1	0.132±0.003	2.2	37.22±3.59	1.13
	1	0.114±0.006	2.6	38.79±4.27	1.08
	10	0.227±0.008	1.3	41.32±3.75	1.02

注：逆转倍数=IC₅₀（抗肿瘤药）/IC₅₀（抗肿瘤药+受试逆转药）；Adr IC₅₀通过计算机中效分析软件计算得到，表式为三次试验结果的平均值±标准差。

实施例 5

NO供体型烷氧基联苯羧酸化合物能够逆转由于肿瘤细胞长期暴露于多柔比星所产生的P-gp表达上调，以14c和14j为例。

实验方法：

处于对数生长期的MCF-7/Adr细胞按 1×10^5 个/ml密度5ml培养基接种于 25cm^2 底面积的曲颈培养瓶中，当细胞融合度达90%左右时，更换培养基为无血清1640培养基，培养基中加入 $20\mu\text{M}$ 多柔比星，同时分别含有 $25\mu\text{M}$ 的14c和14j。二甲亚砜和无水乙醇的混合溶液作为空白溶剂按相应比例与无血清1640培养基混合，作为溶剂对照，有机溶剂的总量不超过总体积的1%。12h后，将瓶中培养基倾出，用细胞刮轻轻刮下细胞，收集细胞悬液，按蛋白含量约为 $80\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理分离目的蛋白(P-gp)和β-actin。采用8%的SDS-PAGE分离蛋白，蛋白转移至PVDF膜后用5%脱脂牛奶(Tris-HCl)封闭，P-gp按1:800滴度加入抗P-gp I抗，β-actin按1:1000滴度加入抗β-actin I抗，孵育一段时间后，于37℃用TBST清洗10min×3次；P-gp和β-actin按1:1500滴度加入II抗，孵育一段时间后用TBST清洗，蛋白显影使用增强型化学发光法(ECL法)，显影胶片用Image-Pro Plus(IPP)软件进行黑度分析。

实验结果见图4。结果显示，在MCF-7/Adr细胞中， $20\mu\text{M}$ 的多柔比星能够明显上调P-gp的表达，P-gp的表达水平约为未处理组的2倍左右；而合用 $25\mu\text{M}$ 浓度的14c和14j后，多柔比星的上调作用被明显减弱，联合给药组的P-gp表达量明显下降，达到或接近于control组水平。

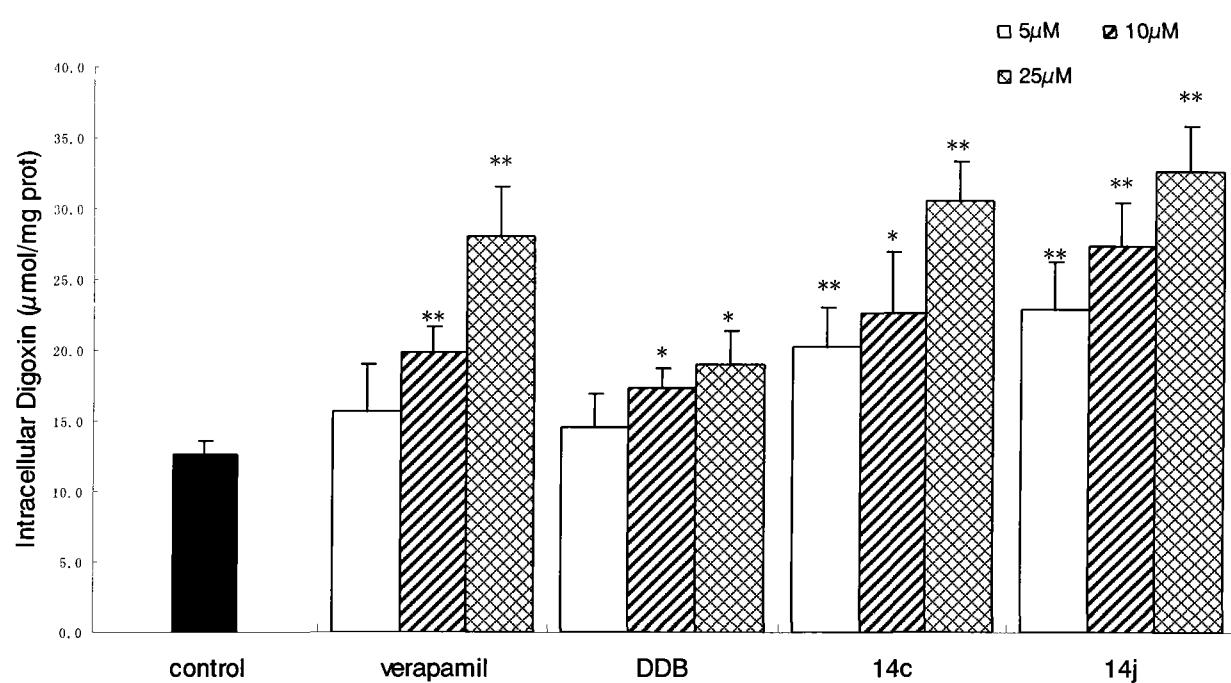


图 1 NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物增强肿瘤细胞对 P-gp 底物地高辛的摄取
 (* p<0.05, ** p<0.01 与 control 组相比)

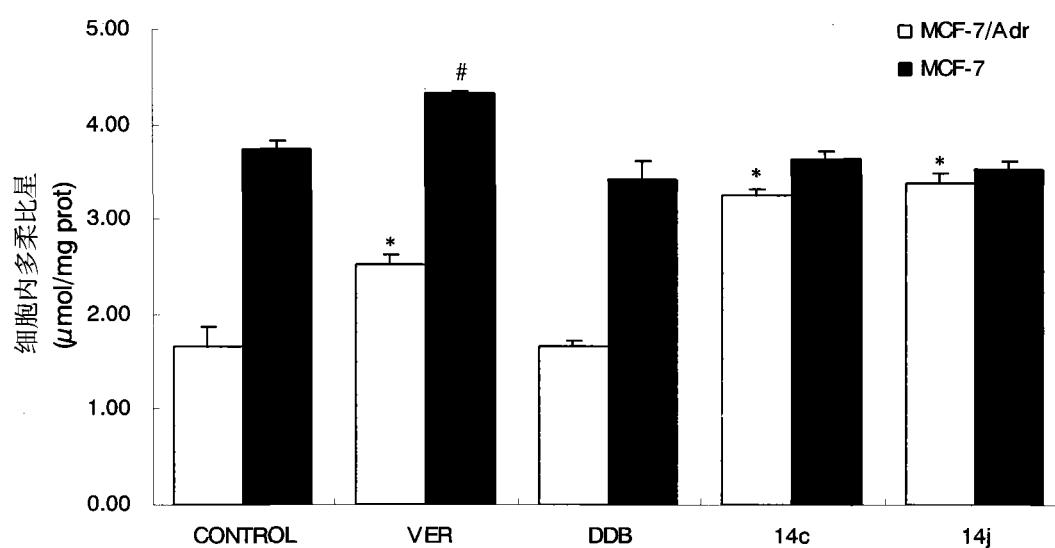


图 2 NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物增加耐药型肿瘤细胞对抗肿瘤药物多柔比星的摄取
 (* p<0.01 与 MCF-7/Adr 细胞 control 组相比, # p<0.01 与 MCF-7 细胞 control 组相比)

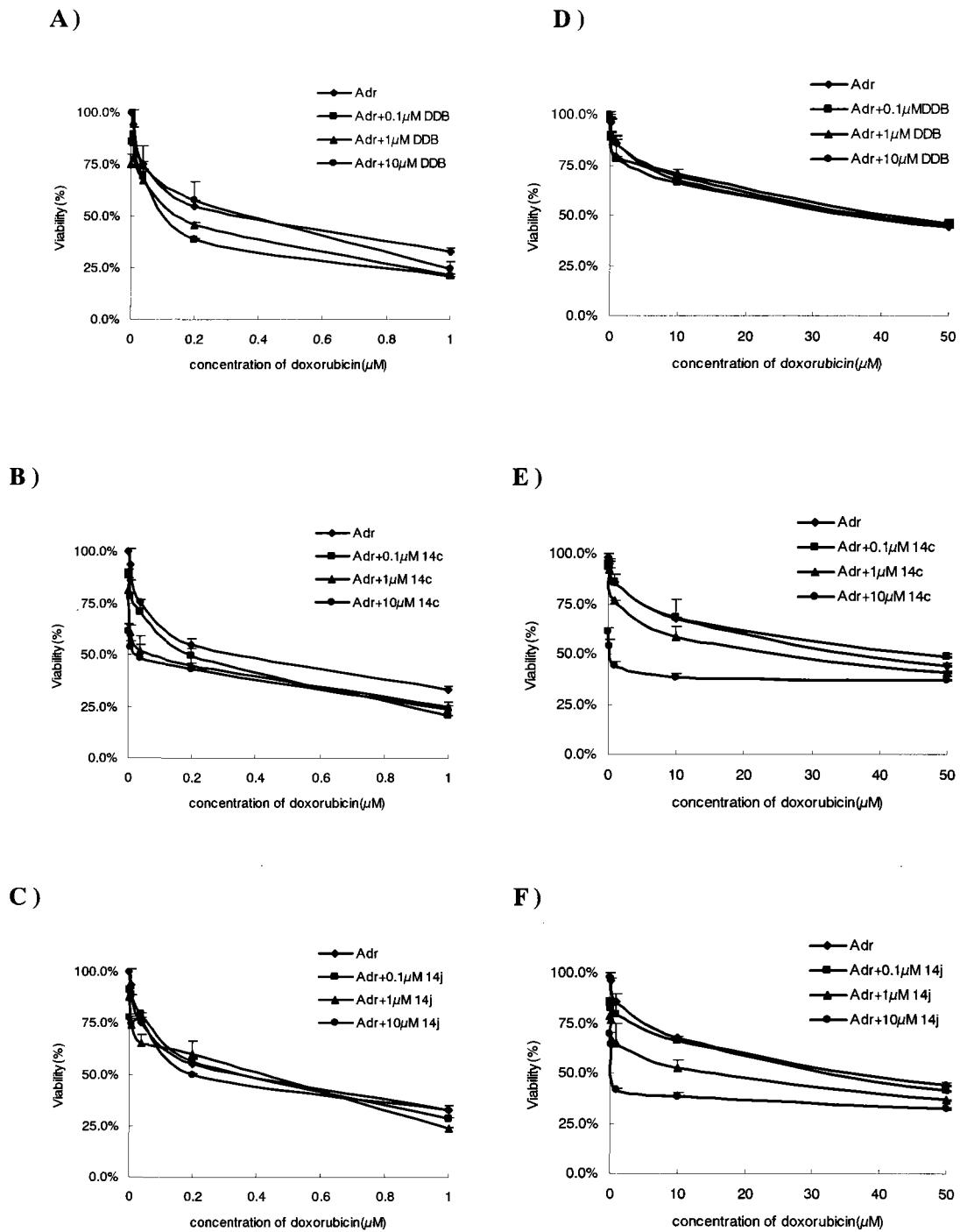


图 3 NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物对抗癌药物多柔比星的化疗增敏作用
(A—C 为 MCF-7 细胞, D—F 为 MCF-7/Adr 细胞)

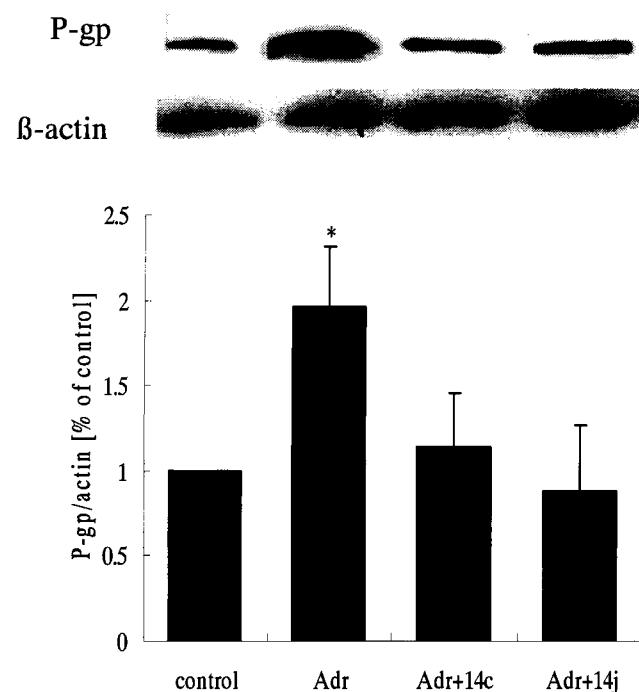


图 4 NO 供体型烷氧基联苯羧酸化合物逆转多柔比星诱导的 P-gp 表达上调