



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105218552 B

(45)授权公告日 2018.02.27

(21)申请号 201510641370.8

A61P 35/02(2006.01)

(22)申请日 2015.09.30

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105218552 A

W0 2004018475 A2, 2004.03.04, 权利要求
44-45、59-60, 第[000184]段, Scheme VII, 第58
页表1, 第33页第[000142]段.

(43)申请公布日 2016.01.06

US 20140335048 A1, 2014.11.13, 全文.

(73)专利权人 中国人民解放军军事医学科学院
野战输血研究所

W0 2014151304 A1, 2014.09.25, 全文.

地址 100850 北京市海淀区太平路27号

W0 2010118339 A2, 2010.10.14, 全文.

(72)发明人 章金刚 王文敬 吕茂民 赵雄

W0 2006047716 A2, 2006.05.04, 全文.

审查员 房长进

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限
公司 11322

代理人 鲁兵 郭凡

(51)Int.Cl.

C07D 487/04(2006.01)

A61K 31/403(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

一种取代苯基二氢吡啶唑啉衍生物及其制
备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种取代苯基二氢吡啶唑啉
衍生物及其制备方法与应用, 结构式如式I所示:

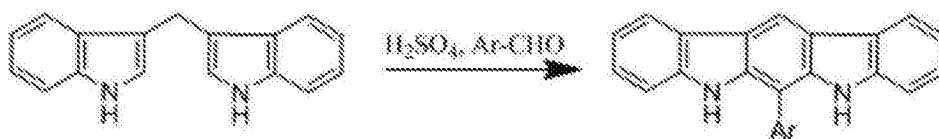


其中, Ar为对羟基

式 I,

苯基、3-羧基-4-羟基苯基或3,5-二甲氧基-4-羟
基苯基。本发明化合物可以显著降低白血病细胞
内的ROS水平, 可作为抗肿瘤药物和/或抗白血病
化疗剂和/或白血病分化诱导剂的候选化合物。

1. 一种制备取代苯基二氢吡啶唑生物的方法, 其特征在于, 反应方程式如式 II 所示:



式 II;

所述取代苯基二氢吡啶唑生物, 结构式如式 I 所示:



式 I,

其中, Ar 为对羟基苯基、3-羧基-4-羟基苯基、3,5-二甲氧基-4-羟基苯基、对氯苯基、对硝基苯基、对甲氧基苯基或 3-甲氧基-4-羟基苯基。

2. 根据权利要求 1 所述方法, 其特征在于, 所述取代苯基二氢吡啶唑生物为结构式如式 I 所示化合物药学上可接受的盐。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述方法, 其特征在于, 在浓硫酸的存在下, 双吡啶甲烷和芳香苯甲醛缩合, 得到式 I 化合物, 其中芳香苯甲醛即 Ar-CHO, 选自对羟基苯甲醛、丁香醛、3-羧基-4-羟基苯甲醛、对氯苯甲醛、对硝基苯甲醛、茴香醛或香草醛中的一种。

4. 根据权利要求 3 所述方法, 其特征在于, 是将双吡啶甲烷与芳香苯甲醛按摩尔比 2:(1-1.5) 加入溶剂中搅拌溶解, 冰浴下滴加浓硫酸, 充分搅拌后室温反应。

5. 根据权利要求 4 所述方法, 其特征在于, 所述溶剂为无水乙醇。

6. 根据权利要求 5 所述方法, 其特征在于, 浓硫酸的体积数为双吡啶甲烷摩尔数的 0.05-0.2 倍。

7. 根据权利要求 6 所述方法, 其特征在于, 还包括以下过程:

反应完毕后, 减压去除反应液中的溶剂, 用乙酸乙酯萃取、碱洗、干燥、减压蒸馏得到式 I 化合物的粗品; 再经柱层析纯化得到式 I 化合物。

一种取代苯基二氢吡啶唑生物及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,特别是涉及一种取代苯基二氢吡啶唑生物及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 据世界卫生组织2002年统计,全球每年白血病新发病例约30万例,死亡人数约22万,高踞致命恶性肿瘤第九位。白血病在我国属十大高发恶性肿瘤之一,占肿瘤发病率的第六位。我国白血病发病率约为3/10万-4/10万人口。随着白血病治疗学的不断发展,自体骨髓移植、异体骨髓移植、干细胞移植以及基因治疗等手段都有了长足发展,但所有这些治疗手段都需要有效的化疗作为基础。

[0003] 目前用于治疗白血病的化疗药已有30多种,其中常用的有:

[0004] 1、干扰核酸生物合成的药物:这类药又称抗代谢药,它们通过各自的特异性干扰白血病细胞的分裂和繁殖。具体品种有:阿糖胞苷、环胞苷、氨甲喋呤、羟基脲、6-巯基嘌呤(乐疾宁)、硫鸟嘌呤。

[0005] 2、直接影响癌细胞DNA结构与功能的药物:它们包括烷化剂、拓扑异构酶抑制剂、抗生素类的一些品种,其作用是使癌细胞DNA链断裂,碱基配对错码,功能失效等。品种有:白消安(白血福安、马利兰、麦里浪)、足叶乙甙(VP-16)鬼臼素衍生物、威猛(尼替泊甙,新一代鬼臼衍生物)、丝裂霉素、苯丁酸氮芥(瘤可宁)、苯丙氨酸氮芥(马法兰、左旋溶肉瘤素)、卞氮芥(双氯己亚硝脲)、环磷酰胺、环己亚硝脲。

[0006] 3、干扰转录过程和阻止RNA合成的药物:能嵌入DNA碱基对之间,抑制RNA合成,阻止DNA复制,并呈细胞毒作用,属蒽环类抗生素。具体有:柔红霉素、多柔比星(去甲基柔红霉素)、阿霉素、表阿霉素(阿霉素的同分异构体)、吡喃阿霉素(吡柔比星)、阿克拉霉素。

[0007] 4、抑制蛋白质合成与功能的药物:主要有长春新碱,植物长春花中提取的有效成分,为微管蛋白抑制剂,其在抑制微管聚合时,使纺锤丝不能形成,癌细胞停止分裂。长春地辛(长春花碱酰胺、西艾克),为半合成长春碱衍生物。高三尖杉酯碱,为三尖杉植物中提取的生物碱,为干扰核蛋白形成,抑制癌细胞分裂的药物。L-左旋门冬酰胺酶,为影响氨基酸供应的药物,急淋癌细胞自身不能合成L-门冬酰胺,需从细胞外吸取,此药能将门冬酰胺水解,使癌细胞缺乏营养而不能存活,其最大缺点是会诱发糖尿病。

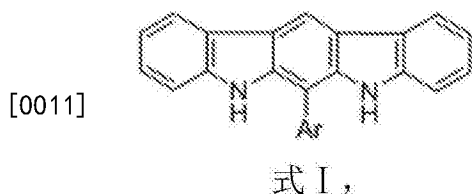
[0008] 5、其它:全反式维甲酸,诱导细胞分化,抑制白血病细胞的增殖。三氧化二砷(As_2O_3),有诱导细胞分化和凋亡的双重作用,对维甲酸治疗无效的病例仍可有效。格列卫(甲磺酸伊马替尼),阻断癌细胞某些蛋白质的合成,从而抑制其复制增殖和耐药机制,对心脏可能有毒害作用,且价格昂贵,每日费用上千元,普通患者承受不了。米托蒽醌,为合成的蒽环类抗癌药。糖皮质激素,用于白血病治疗的主要品种是强的松和地塞米松,其抗白血病的主要作用机制是溶解淋巴细胞,使淋巴组织萎缩。干扰素,是人体细胞受病毒等物质刺激后释放出来的免疫物质,但连续用药时间一般不超过1年,而且容易发生不良反应和后遗症,所以不能适应长期防急变的要求。环孢菌素A,为作用于T淋巴细胞的强力免疫抑制剂,

对骨髓无明显抑制作用,主要用于器官或组织移植后的移植物抗宿主反应,也用于某些自体免疫性疾病和难治性白血病。亚叶酸钙(亚乙酸,甲酰四氢叶酸钙),无抗肿瘤作用,主要用于高剂量甲氨喋呤滴注时解救;与氟脲嘧啶合用可以加强后者的治疗作用。恩丹西酮(枢复宁),专用于预防和治疗化疗或放疗引起的恶心和呕吐。此外,还有氨苯吡啶和拓扑替康。

[0009] 尽管白血病化疗的水平和疗效不断提高,但对化疗药物不敏感以及缓解后复发即难治性白血病的效果仍差强人意(目前足叶乙甙(VP-16)鬼臼素衍生物是难治性白血病的重要治疗药,但有骨髓抑制、胃肠道反应、皮肤反应、神经毒性等不良反应),普遍存在的问题是毒副作用大、产生耐药以及疗效不理想等。新型化疗药物的研发仍然为白血病临床治疗所迫切需要。

发明内容

[0010] 本发明的目的是针对现有技术中存在的技术缺陷,提供一种对治疗白血病有效的取代苯基二氢吡啶唑啉衍生物,结构式如式I所示:



[0012] 其中,Ar为对羟基苯基、3-羧基-4-羟基苯基、3,5-二甲氧基-4-羟基苯基、对氯苯基、对硝基苯基、对甲氧基苯基或3-甲氧基-4-羟基苯基。

[0013] 或为结构式如式I所示化合物药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0014] 本发明第二个方面在于提供一种药物组合物,其含有上述的化合物、其药学上可接受的盐、其水合物或溶剂化合物以及可药用载体或赋形剂。

[0015] 本发明第三个方面在于提供一种制备上述取代苯基二氢吡啶唑啉衍生物的方法,反应方程式如式II所示:



[0017] 在浓硫酸的存在下,双吡啶甲烷和芳香苯甲醛缩合,得到式I化合物,其中芳香苯甲醛即Ar-CHO,选自对羟基苯甲醛、丁香醛、水杨醛、对氯苯甲醛、对硝基苯甲醛、茴香醛或香草醛中的一种。

[0018] 是将双吡啶甲烷与芳香苯甲醛按摩尔比2:(1-1.5)加入溶剂(优选无水乙醇)中搅拌溶解,冰浴下滴加浓硫酸(体积数为双吡啶甲烷摩尔数的0.05-0.2倍),充分搅拌后室温反应。

[0019] 还包括以下过程:

[0020] 反应完毕后,减压去除反应液中的溶剂,用乙酸乙酯萃取、碱洗、干燥、减压蒸馏得到式I化合物的粗品;再经柱层析纯化得到式I化合物。

[0021] 本发明第四个方面在于提供一种上述取代苯基二氢吡啶唑啉衍生物或上述药物

组合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0022] 所述肿瘤为白血病。

[0023] 本发明第五个方面在于提供一种上述取代苯基二氢吡啶类衍生物或上述药物组合物在制备抗白血病化疗剂或白血病分化诱导剂中的应用。

[0024] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0025] 本发明提供的取代苯基二氢吡啶类衍生物合成方法简便,可以通过一步反应制得,节约合成成本;此外,本发明提供的取代苯基二氢吡啶类衍生物可以显著降低白血病细胞内的ROS水平,诱导白血病细胞发生凋亡和自噬,抑制其增殖。因此作为抗白血病化疗药物研究颇具前景。

附图说明

[0026] 图1为本发明化合物对HL-60细胞和正常细胞HaCa T细胞增殖的抑制活性;

[0027] 图2为本发明化合物分别作用于HL-60细胞12h、24h、36h、48h后HL-60细胞内活性氧(ROS)水平变化流式检测结果;

[0028] 图3为本发明化合物作用于HL-60细胞48h后HL-60细胞的透射电子显微镜观察结果;

[0029] 图4为本发明化合物作用于HL-60细胞72h后HL-60细胞凋亡的检测结果;

[0030] 图5为本发明化合物作用于HL-60细胞48h后HL-60细胞周期PI标记流式检测结果;

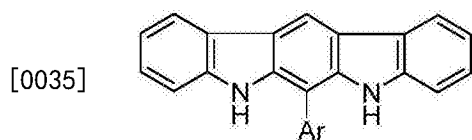
[0031] 图6为本发明化合物分别作用于HL-60细胞48h及72h后HL-60细胞表面CD11b抗原表达的检测结果。

具体实施方式

[0032] 吡啶类化合物是近年来研究较多的一类天然来源的生物碱,由于其独特的结构和良好的生物活性引起了许多有机化学家和药物化学家浓厚的兴趣和热切的关注。目前,对二氢吡啶类化合物作为抗肿瘤药物的研究较少,本发明以二氢吡啶为母核,以期得到新型吡啶类抗白血病化合物。

[0033] ROS(reactive oxygen species),即细胞在代谢过程中产生一系列活性氧簇,ROS作为一种信号分子参与细胞的多个生理过程。最新研究发现,ROS除了具有引起细胞凋亡、坏死的功能,低浓度的ROS更广泛的生理意义在于其对转录因子的激活以及对细胞增殖、分化的促进。这一作用与ROS诱导白血病细胞向成熟粒细胞分化、凋亡及过度自噬相关。其中,自噬是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程,是细胞生长发育、分化及死亡的重要调控机制,自噬行为导致细胞内大量蛋白及细胞器包括产生ROS的线粒体被破坏降解,从而导致细胞内ROS水平下降,低水平的ROS进一步诱导细胞内自噬发生,使得细胞内自噬行为失控进而诱导细胞凋亡的发生及向成熟粒细胞分化。

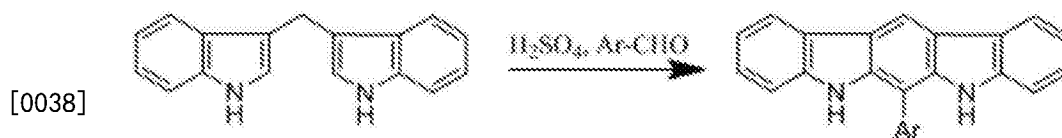
[0034] 本发明以降低细胞内ROS水平为目标,提出了一种取代苯基二氢吡啶类衍生物以及其药学上可接受的盐或溶剂化物,其结构如式I所示,并发现这类化合物是一类具有抗白血病活性的小分子化合物。



式 I

[0036] 式中:Ar选自对羟基苯基,3-羧基-4-羟基苯基,3,5-二甲氧基-4-羟基苯基,对氯苯基,对硝基苯基,对甲氧基苯基或3-甲氧基-4-羟基苯基。

[0037] 制备本发明取代苯基二氢吡啶唑衍生物的方法如式 II 所示:



式 II

[0039] 双吲哚甲烷与芳香醛在浓硫酸的作用下,双吲哚环之间成环,形成吡啶唑衍生物。芳香醛可以是对羟基苯甲醛、丁香醛、水杨醛、对氯苯甲醛、对硝基苯甲醛、茴香醛、香草醛等。

[0040] 以下结合具体实施例,更具体地说明本发明的内容,并对本发明作进一步阐述,但这些实施例绝非对本发明进行限制。

[0041] 实施例1:制备二氢吡啶唑酚(Ar为对羟基苯基,编号为ZW2-1)

[0042] 向50mL圆底烧瓶中加入492mg (2mmol) 双吲哚甲烷,146mg (1.2mmol) 对羟基苯甲醛,加入30mL无水乙醇搅拌溶解。冰浴下滴加浓硫酸0.2mL,充分搅拌5分钟。室温反应24小时后TLC检测双吲哚甲烷原料点消失,停止反应,反应液减压浓缩至干。残余物以30mL乙酸乙酯溶解,转移至100mL分液漏斗中,依次用饱和碳酸氢钠水溶液洗(10mL×3)、饱和氯化钠水溶液洗(10mL×3),乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥2小时、过滤、滤液减压浓缩至干,得到褐色油状粗品。

[0043] 该粗品用干法拌样,石油醚湿法装柱,进行纯化(石油醚:丙酮=10:1),得130mg (产率:37%) 化合物ZW2-1。Rf=0.3 (石油醚:丙酮=2:1)。ESI-MS (m/e) 349 [M+H]⁺; ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ=10.65 (s, 2H), 8.74 (s, 1H), 7.15 (d, J=8.0Hz, 2H), 8.15 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.56 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.43 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.28 (t, J=8.0Hz, J=8.0Hz, 2H), 7.13 (t, J=8.0Hz, J=8.0Hz, 2H), 7.07 (d, J=8.0Hz, 4H)。¹³CNMR (DMSO-d₆, 100MHz) δ/ppm=156.92, 140.75, 137.77, 130.81, 125.49, 124.33, 123.39, 119.22, 118.28, 117.62, 116.62, 110.9, 109.89, 105.87。纯度98.9%, 流动相:CH₃CN:H₂O=85:15, 保留时间:12.51min。

[0044] 实施例2:制备二氢吡啶唑酚(Ar为3-羧基-4-羟基苯基,编号为ZW2-2)

[0045] 向50mL圆底烧瓶中加入492mg (2mmol) 双吲哚甲烷,218mg (1.2mmol) 丁香醛,加入30mL无水乙醇搅拌溶解。冰浴下滴加浓硫酸0.2mL,充分搅拌5分钟。室温反应24小时后TLC检测双吲哚甲烷原料点消失,停止反应,反应液减压浓缩至干。残余物以30mL乙酸乙酯溶解,转移至100mL分液漏斗中,依次用饱和碳酸氢钠水溶液洗(10mL×3)、饱和氯化钠水溶液洗(10mL×3),乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥2小时、过滤、滤液减压浓缩至干,得到褐色油状粗品。

[0046] 该粗品用干法拌样,石油醚湿法装柱,进行纯化(石油醚:丙酮=15:1),得150mg

(产率:36.8%) 化合物ZW2-2。Rf=0.37 (石油醚:丙酮=2:1)。ESI-MS (m/e) 409 [M+H]⁺; ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ=10.78 (s, 2H), 8.78 (s, 1H), 8.16 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.46 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.29 (t, J=4.0Hz, 2H), 7.15 (t, J=4.0Hz, J=4.0Hz, 2H), 6.95 (s, 2H), 3.88 (s, 6H)。¹³CNMR (DMSO-d₆, 100MHz) δ/ppm=148.48, 140.68, 137.65, 135.02, 124.7, 124.32, 123.35, 119.23, 118.27, 117.55, 116.62, 110.88, 109.99, 106.74, 106.24, 55.83。纯度98.8%, 流动相:CH₃CN:H₂O=85:15, 保留时间:17.96min。

[0047] 实施例3:制备二氢吡啶唑啉酮(Ar为3,5-二甲氧基-4-羟基苯基,编号为ZW2-3)

[0048] 向50mL圆底烧瓶中加入492mg (2mmol) 双吡啶甲烷, 180mg (1.1mmol) 水杨醛, 加入30mL无水乙醇搅拌溶解。冰浴下滴加浓硫酸0.2mL, 充分搅拌5分钟。室温反应24小时后TLC检测双吡啶甲烷原料点消失, 停止反应, 反应液减压浓缩至干。残余物以30mL乙酸乙酯溶解, 转移至100mL分液漏斗中, 依次用饱和碳酸氢钠水溶液洗(10mL×3)、饱和氯化钠水溶液洗(10mL×3), 乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥2小时、过滤、滤液减压浓缩至干, 得到褐色油状粗品。

[0049] 该粗品用干法拌样, 石油醚湿法装柱, 进行纯化(石油醚:丙酮=10:1), 得40mg (产率:10.2%) 化合物ZW2-3。Rf=0.25 (石油醚:丙酮=2:1)。ESI-MS (m/e) 393 [M+H]⁺; ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ=11.47 (s, 1H), 10.78 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.18 (d, J=8.0Hz, 2H), 8.11 (s, 1H), 7.87 (dd, J=4.0Hz, J=10.0Hz, 1H), 7.44 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.29 (m, 3H), 7.16 (t, J=8.0Hz, J=12.0Hz, 2H)。 ¹³CNMR (DMSO-d₆, 100MHz) δ/ppm=206.58, 172.11, 140.7, 127.92, 137.38, 131.76, 125.96, 124.45, 123.39, 119.3, 118.43, 118.24, 117.59, 113.77, 110.82, 110.57, 106.4。纯度99.1%, 流动相:CH₃CN:H₂O=90:10 (含0.1% TFA), 保留时间:4.58min。

[0050] 在工业应用中, 以上制备规模可等比例放大。

[0051] 利用以上制备得到的化合物进行活性实验。实验例中所涉及的细胞购自美国标准菌种收藏所(ATCC)。PBS缓冲液(0.1M), RPMI-1640或DMEM/F12培养基溶液购自Hyclone公司。胎牛血清购自Gibco公司, 0.25%胰酶溶液购自Hyclone公司。青霉素和链霉素购自solarbio公司。MTS检测试剂盒购自PROMEGA公司, 避光保存。其余均为实验室常规试剂。

[0052] 实验例1:本发明化合物抑制肿瘤细胞增殖活性的测定

[0053] 用MTS法进行本发明化合物抑制肿瘤细胞增殖活性的测定。具体为:将实施例1-3得到的化合物ZW2-1、ZW2-2和ZW2-3分别用含0.05% (体积百分比, v/v) DMSO的PBS缓冲液将RPMI-1640培养基或DMEM/F12培养基配制成所需浓度。

[0054] 将生长状态良好, 处于对数生长期的HL-60细胞(人粒细胞性白血病细胞)、HaCa T细胞(永生化人皮肤角质细胞) 分别按4×10⁴个/mL的密度接种于96孔板中, 每孔100μL。37℃下96孔板置于5%CO₂培养箱中培养12小时。实验组按预设的浓度梯度分别向96孔板中加入经灭菌处理的ZW2-1溶液、ZW2-2溶液和ZW2-3溶液(加入后终浓度分别为0、2、4、8、10、12μM), 每孔25μL, 平行6孔; 阴性对照孔加入25μL含相同浓度DMSO的培养基, 平行6孔; 空白组仅加入25μL含相同浓度DMSO的培养基, 不含HL-60细胞或HaCa T细胞, 平行6孔。37℃下96孔板置于5%CO₂培养箱中培养48小时。之后每孔加入10μL的MTS溶液, 继续培养2小时。平板振荡15分钟使沉淀全部溶解, 于酶标仪上测定O.D.值(吸光度), 波长490nm。

[0055] 实验平行重复3次, 按照公式“细胞存活率=100-(D含药-D空白)/(D阴性对照-D空

白) $\times 100\%$ ”计算每一个样品浓度下的样品作用后细胞存活率。以细胞存活率为纵坐标,样品的浓度为横坐标作图,结果如图1所示,图1显示了本发明的化合物对HL-60细胞和HaCa T细胞增殖的抑制活性。

[0056] 图1中的A幅显示了母核化合物二喹啉甲烷(DIM)、本发明化合物ZW2-1、ZW2-2和ZW2-3分别作用HL-60细胞后,细胞存活率;其中,化合物ZW2-1、ZW2-2在浓度为 $10\mu\text{M}$ 时就能使HL-60细胞的存活率从 100% 降至 40% 左右;母核化合物和ZW2-3在浓度为 $50\mu\text{M}$ 时也能使HL-60细胞的存活率从 100% 降至 50% 左右。从B幅可以看出,本发明化合物ZW2-1在终浓度为 $8\mu\text{M}$ 时,白血病细胞(HL-60细胞)的细胞存活率为 60% ,而正常细胞(HaCa T细胞)的细胞存活率为 100% ;当终浓度提高至 $12\mu\text{M}$ 时,白血病细胞存活率仅有 30% ,而正常细胞能维持在 80% 以上。C幅也表明了同样的实验结论,本发明化合物ZW2-2在终浓度为 $8\mu\text{M}$ 时,白血病细胞存活率为 60% ,而正常细胞存活率为 100% ;当终浓度提高至 $12\mu\text{M}$ 时,白血病细胞存活率仅有 30% ,而正常细胞能维持在 70% 左右。可见,本发明的化合物可以显著抑制白血病细胞(HL-60)增殖的活性,而在同样浓度范围内对正常细胞(HaCa T)增殖的活性影响非常弱,表明了本发明化合物在细胞水平上具有抗癌特异性。

[0057] 实验例2:HL-60细胞内ROS水平的测定

[0058] 为检测本发明化合物对HL-60细胞内ROS水平的影响,采用DCFH-DA探针标记法标记用本发明化合物作用HL-60细胞前、后HL-60细胞内ROS水平,流式细胞仪检测平均荧光强度,以说明ROS水平变化。

[0059] 将生长状态良好,处于对数生长期的HL-60细胞按 1×10^5 个/mL的密度接种于96孔板中,每孔 2mL 。 37°C 下96孔板置于 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养12小时。实验组分别加入经灭菌处理的ZW2-1溶液和ZW2-2溶液(用含 0.05% DMSO的RPMI-1640培养基配制得到),每孔 $500\mu\text{L}$,使终浓度为 $8\mu\text{M}$,平行3孔。阴性对照组加入含等量DMSO的RPMI-1640培养基,平行3孔。分别于作用12h、24h、36h、48h后收集HL-60细胞,按照活性氧检测试剂盒(购自南京凯基生物科技发展有限公司)说明书中操作步骤处理细胞,具体如下:

[0060] 按照1:1000的比例用无血清培养基稀释DCFH-DA,使DCFH-DA终浓度为 $10\mu\text{M}$,得到DCFH-DA溶液。分别收集各组细胞, $1000\text{r}/\text{min}$ 离心5min,弃去上清,将细胞悬浮于稀释好的DCFH-DA溶液中,计数并稀释细胞至浓度为 1×10^6 个/mL。 37°C 下培养箱中避光培养20min。每隔3-5min颠倒混匀,使探针与细胞充分接触。孵育结束后,用无血清细胞培养基洗涤细胞3次,以除去未充分进入细胞内的DCFH-DA。流式细胞仪检测细胞平均荧光强度。参数设置为:激发光 488nm ,发射波长为 525nm ,每组计数10000个细胞。

[0061] 以ZW2-1和ZW2-2为例,结果如图2所示,终浓度为 $8\mu\text{M}$ 的本发明化合物ZW2-1组作用不同时间后,HL-60细胞内ROS水平依次从作用12h后的75降至24h后的60、36h后的40、在48h后达到最低值25。终浓度为 $8\mu\text{M}$ 的化合物ZW2-2组也有相同的趋势,在作用12h后,就由起始的70降至45;随着时间的延长,HL-60细胞内ROS水平也在不断降低,在48h达到最低值20。本实验例结果说明本发明化合物能够有效降低白血病细胞内ROS的水平,进而低水平的ROS进一步诱导细胞内自噬发生,使得细胞内自噬行为失控进而诱导细胞凋亡的发生及向成熟粒细胞分化,最终起到消灭白血病细胞,抗癌的功效。

[0062] 化合物ZW2-3组在高浓度(终浓度为 $50\mu\text{M}$)时也有相同的结果,不再赘述。

[0063] 实验例3:HL-60细胞自噬水平的测定

[0064] 将处于对数生长期的HL-60细胞按 1×10^5 个/mL的密度接种于10cm的培养皿中,每皿10mL。37℃下培养皿置于5%CO₂培养箱中培养12小时。实验组加入经灭菌处理的ZW2-1溶液和ZW2-2溶液(用含0.05%DMSO的RPMI-1640培养基配制),每皿2.5mL,使终浓度为8μM。阴性对照组加入了含等量DMSO的RPMI-1640培养基,于作用48h后分别收集各组HL-60细胞。收集的HL-60细胞离心(转速1000r/min,离心5min),弃去上清并用PBS缓冲液洗涤1次,离心弃上清,得到的HL-60细胞依次用3% (w/w) 戊二醛溶液、1% (w/w) 四氧化锇(锇酸)溶液固定,用戊二醛溶液和四氧化锇(锇酸)溶液固定之间的间隔期用0.1M磷酸缓冲液(PB缓冲液)漂洗3次,每次15min。在室温环境下按乙醇的浓度分梯度(50%,70%,80%,90%,100%)脱水(15min/次)(每个浓度梯度的乙醇脱水1次)。再用临界点干燥仪干燥后包埋、修块、定位、切片,醋酸铀、硝酸铅双重染色,电镜下观察并拍照记录。

[0065] 以ZW2-1和ZW2-2为例,图3是通过电镜观察各组细胞后先后三次拍下来的照片(各行针对同一细胞的照片,电镜的条件是根据观察区域放大7000-10000倍),可以看出ZW2-1组和ZW2-2组作用HL-60细胞内后,会产生大量自噬泡(图中用白色箭头标出),核浆比(核浆比是指细胞核和细胞浆之间的相对大小比)较阴性对照组变小,可观察到胞浆(胞浆是指细胞浆)中肿胀的线粒体(图中用黑色箭头标出)以及自噬体中尚未完全降解的自噬体。这表明本发明的化合物ZW2-1和ZW2-2可以诱导白血病细胞HL-60过度自噬并破坏线粒体等细胞器。

[0066] 化合物ZW2-3组在高浓度(终浓度为50μM)时也有相同的结果,不再赘述。

[0067] 实验例4:HL-60细胞凋亡的测定

[0068] 将生长状态良好,处于对数生长期的HL-60细胞按 1×10^5 个/mL的密度接种于96孔板中,每孔2mL。37℃下96孔板置于5%CO₂培养箱中培养12小时。实验组分别加入经灭菌处理的ZW2-1溶液、ZW2-2溶液和ZW2-3溶液(用含0.05%DMSO的RPMI-1640培养基配制得到),每孔500μL,使终浓度为8μM,平行3孔。阴性对照组加入含等量DMSO的1640完全培养基,平行3孔。分别于作用12h、24h、36h、48h后收集HL-60细胞,按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(购自南京凯基生物科技发展有限公司)说明书中的操作步骤处理HL-60细胞,具体如下:

[0069] 1000r/min离心5min,弃上清,用4℃预冷的PBS缓冲液洗涤沉淀,重复离心、洗涤步骤后,加入500μL的Binding Buffer悬浮细胞,避光加入5μL Annexin V-FITC轻轻混匀,避光染色10min,加入5μL Propidium Iodide轻轻混匀,避光染色5min后用流式细胞仪检测HL-60细胞凋亡的数量,检测在30min内进行。流式细胞仪参数设置为:激发光488nm,发射波长为530nm,Annexin V-FITC的绿色荧光通过FITC通道(FL1)检测;PI红色荧光通过PI通道(FL3)检测。阴性对照组细胞作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重迭和设定十字门位置,每组计数10000个细胞。

[0070] 以ZW2-1和ZW2-2为例,结果如图4所示,A、B、C幅中左上角的Q1区表示因操作过程中机械损伤的细胞数量,左下角的Q3区显示了存活的细胞数量,右上角Q2区和右下角的Q4区显示了凋亡细胞的数量。在实际操作过程中,细胞的机械损伤在所难免,因此不考虑这一区域的细胞数量,对比图中A、B、C幅中Q2、Q3、Q4的各组细胞数量后,可以得到D幅所示的柱状图,图中表明ZW2-1组和ZW2-2组中化合物的终浓度为8μM的情况下,作用48h后HL-60细胞凋亡现象明显,凋亡比例(Q2+Q4)分别为38%和45%,而阴性对照组为8.19%(给出的数据

是每组3个样品计算出的平均值,图中的数据是每组随机挑选出的一张作为代表,所以数字上不完全一样。);活细胞比例(Q3)分别为59.71%和51%,而阴性对照组为91.51%。以上每组实验都做了平行的三组,最终取三组实验数据的平均值,图4是以其中一组实验结果为例,进行说明。可见本发明化合物ZW2-1和ZW2-2可诱导HL-60细胞发生凋亡,进而发挥抗癌效果。

[0071] 化合物ZW2-3组在高浓度(终浓度为50 μ M)时也有相同的结果,不再赘述。

[0072] 实验例5:HL-60细胞周期分布的测定

[0073] 将生长状态良好,处于对数生长期的HL-60细胞按 1×10^5 个/mL的密度接种于96孔板中,每孔2mL。37 $^{\circ}$ C下96孔板置于5%CO₂培养箱中培养12小时。实验组分别加入经灭菌处理的ZW2-1溶液、ZW2-2溶液和ZW2-3溶液(用含0.05%DMSO的RPMI-1640培养基配制得到),每孔500 μ L,使终浓度为8 μ M,平行3孔。阴性对照组加入含等量DMSO的RPMI-1640培养基。分别于作用12h、24h、36h、48h后收集HL-60细胞,按照细胞DNA含量检测试剂盒(细胞周期分布)(购自南京凯基生物科技发展有限公司)说明书中的操作步骤处理细胞,具体如下:

[0074] 1000r/min离心5min,弃上清,用4 $^{\circ}$ C预冷的PBS缓冲液洗涤沉淀,重复离心、洗涤步骤后,加入PBS缓冲液悬浮细胞计数并稀释成 1×10^6 个/mL,取1mL,1000r/min离心5min,弃上清,加入体积分数为70%的4 $^{\circ}$ C预冷乙醇(固定液)500 μ L,4 $^{\circ}$ C固定过夜。离心去除固定液(转速1000r/min,离心5min),收集细胞加入100 μ L RNase A 37 $^{\circ}$ C水浴30min,避光加入400 μ L PI染色液并混匀,4 $^{\circ}$ C避光染色30min后用流式细胞仪检测,记录激发波长488nm处红色荧光,每份样品计数10000个细胞。

[0075] 以ZW2-1和ZW2-2为例,图5是ZW2-1和ZW2-2作用48h后HL-60细胞周期PI标记流式检测结果,将各细胞周期下的峰面积进行比较(B幅与A幅比较,D幅与C幅比较),得到E幅和F幅的柱状图。可见,ZW2-1组和ZW2-2组与阴性对照组各细胞周期下的峰面积均无显著差异,这就意味着本发明化合物ZW2-1和ZW2-2并不影响HL-60细胞的周期分布,表明本发明化合物对HL-60的作用为非周期依赖性。

[0076] 化合物ZW2-3组在高浓度(终浓度为50 μ M)时也有相同的结果,不再赘述。

[0077] 实验例6:本发明化合物诱导HL-60细胞表面CD11b表达的检测

[0078] CD11b是急性髓系白血病向粒系分化的标志之一,通过检测HL-60细胞中CD11b的表达量,可以反映其分化程度。将生长状态良好,处于对数生长期的HL-60细胞按 1×10^5 个/mL的密度接种于96孔板中,每孔2mL。37 $^{\circ}$ C下96孔板置于5%CO₂培养箱中培养12小时。实验组分别加入经灭菌处理的ZW2-1溶液、ZW2-2溶液和ZW2-3溶液(用含0.05%DMSO的RPMI-1640培养基配制得到),每孔500 μ L,使终浓度为8 μ M,平行3孔。阴性对照组加入含等量DMSO的RPMI-1640培养基。分别于作用48h(B幅)、72h(C幅)后收集HL-60细胞,1000r/min离心5min,弃上清,用4 $^{\circ}$ C预冷的PBS缓冲液洗涤沉淀,重复离心、洗涤步骤后,避光加入标记CD11b-FITC抗体,避光室温染色30min,用4 $^{\circ}$ C预冷的PBS缓冲液洗涤、离心(1000r/min,5min)HL-60细胞2次,去除未结合的CD11b-FITC抗体,HL-60细胞用500 μ L PBS缓冲液重悬,流式细胞仪检测。参数设置为:激发光488nm,发射波长为525nm,每组计数10000个细胞。

[0079] 以ZW2-1为例,图6为化合物ZW2-1在终浓度为4 μ M的情况下分别作用48h和72h后HL-60细胞表面CD11b抗原表达流式细胞仪检测结果。CD11b是急性髓系白血病细胞向粒细胞分化的表面标志。流式细胞仪检测发现,如图6所示,终浓度为4 μ M的化合物ZW2-1可诱导

HL-60细胞表面分化抗原CD11b表达,并CD11b表达的比例随时间的延长而提高,作用48h和72h后,CD11b表达的比例分别为8.41%和22%,而阴性对照组(A幅)仅为4.61%。

[0080] 化合物ZW2-2组在终浓度为4 μ M时有相同的结果,化合物ZW2-3组在高浓度(终浓度为50 μ M)时也有相同的结果,不再赘述。

[0081] 以上实验表明,本发明化合物对白血病细胞(HL-60细胞)的抑制作用明显,而对正常细胞(HaCa T细胞)的抑制作用则很弱,说明白血病细胞对本发明化合物很敏感。此外,本发明化合物还能够有效降低白血病细胞内ROS水平,诱导细胞内自噬从而发生凋亡及向粒细胞分化,为难治性白血病的治疗药物、抗白血病化疗剂和白血病分化诱导剂提供了新的研发思路。

[0082] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出的是,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

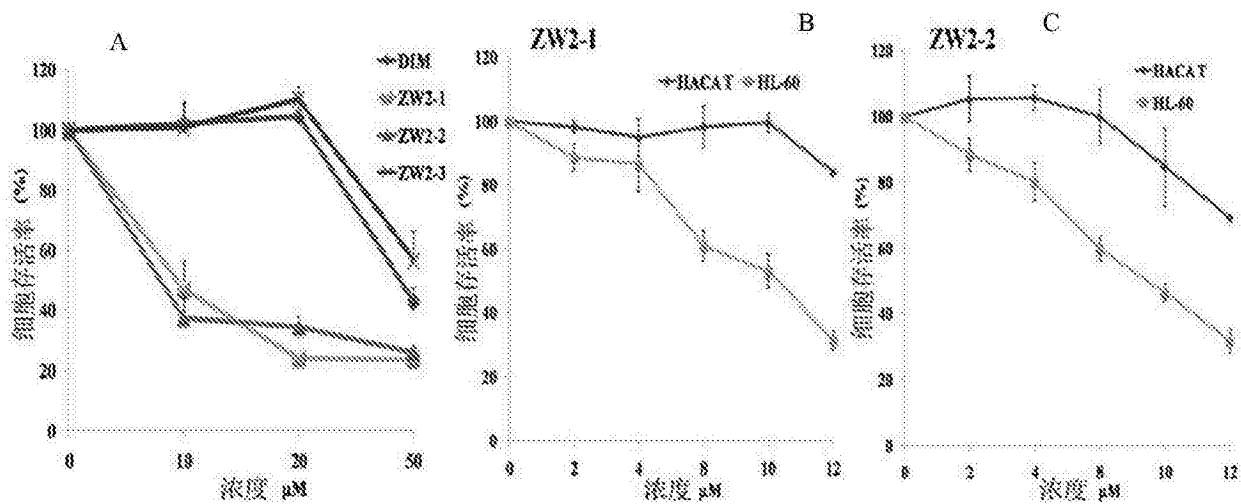


图1

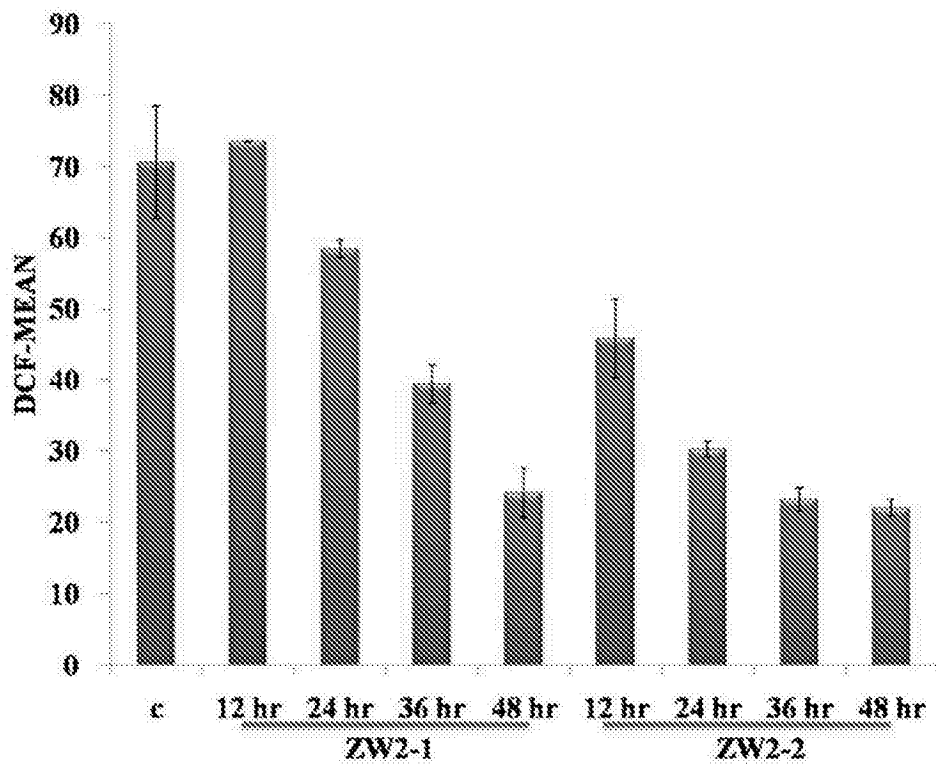


图2

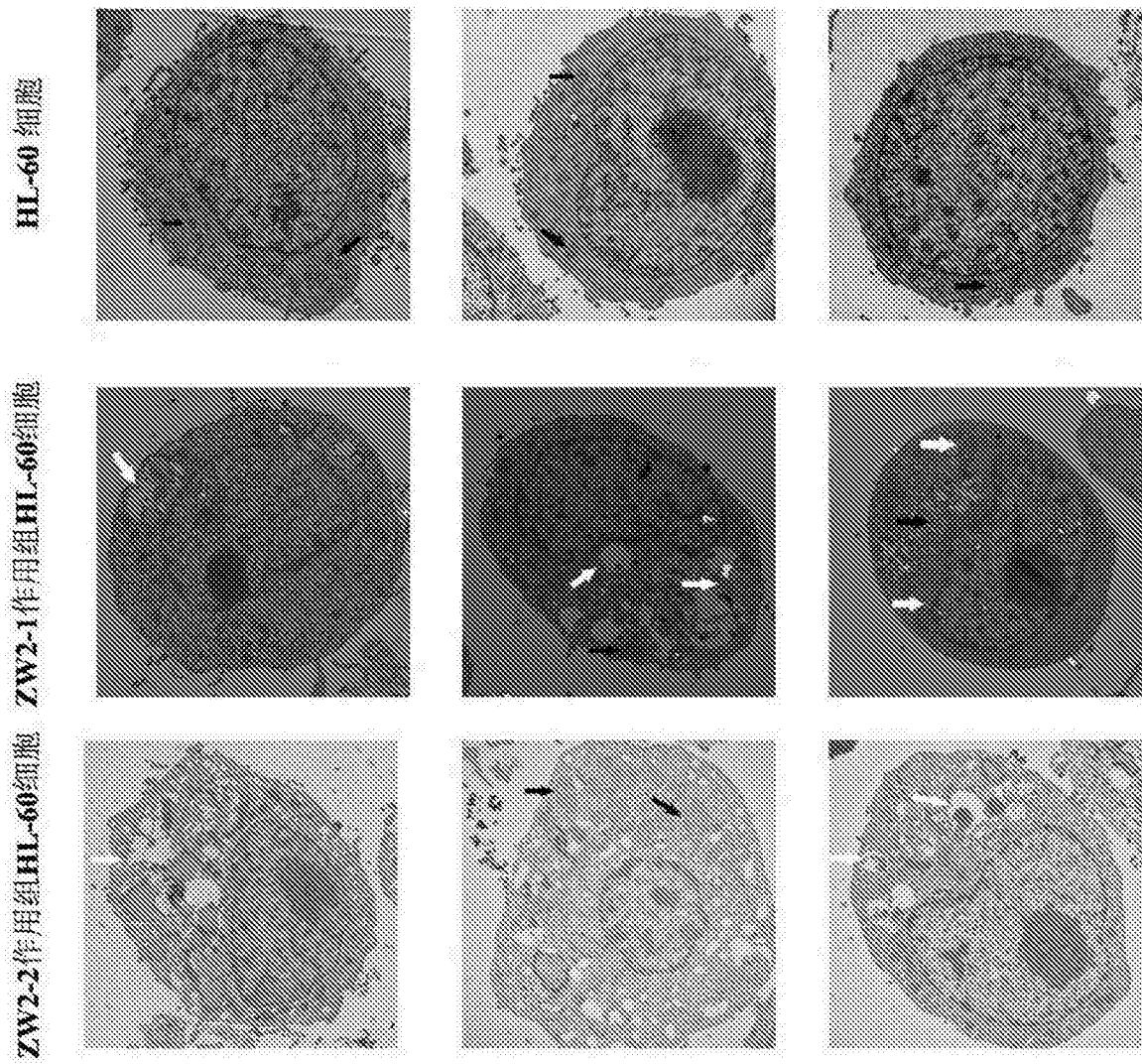


图3

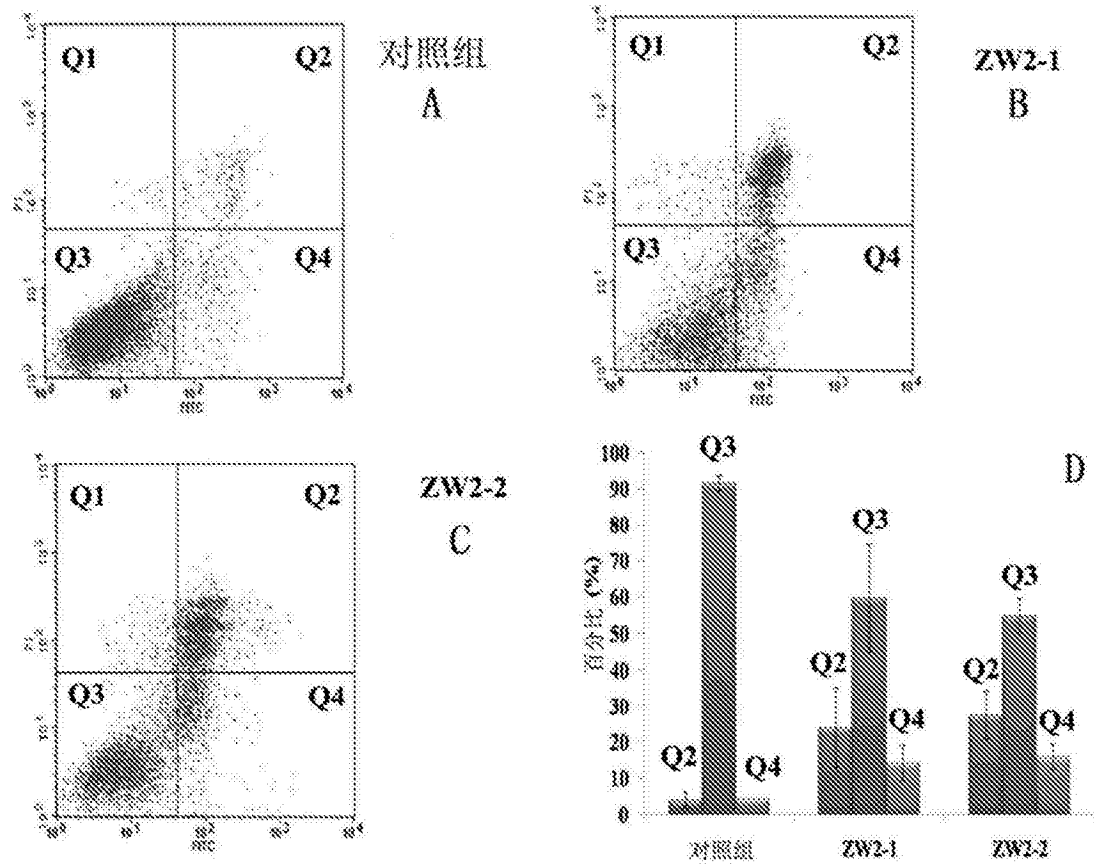


图4

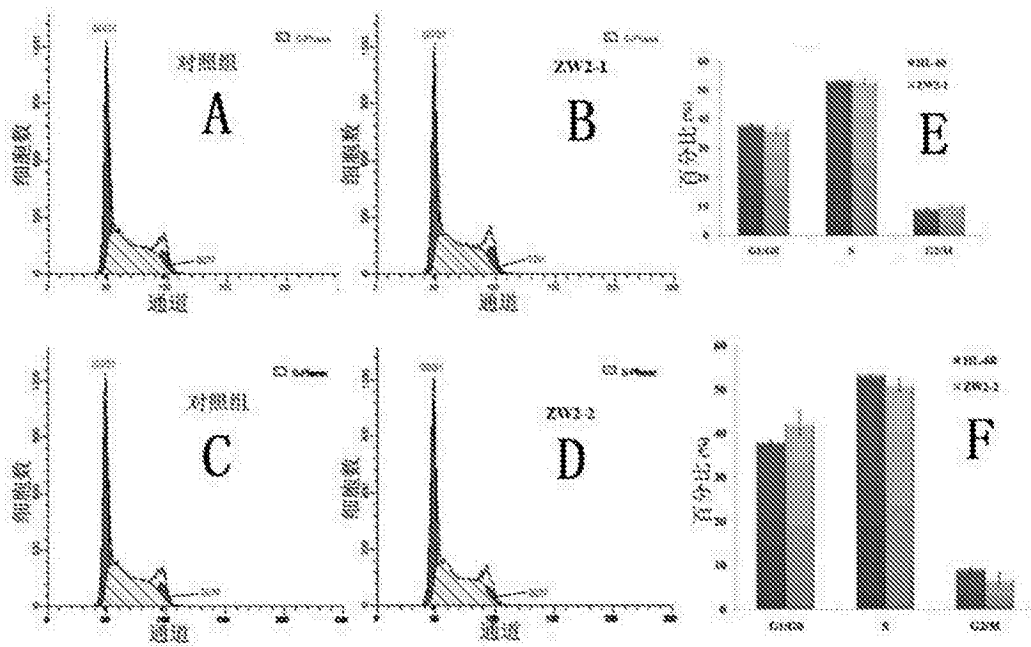


图5

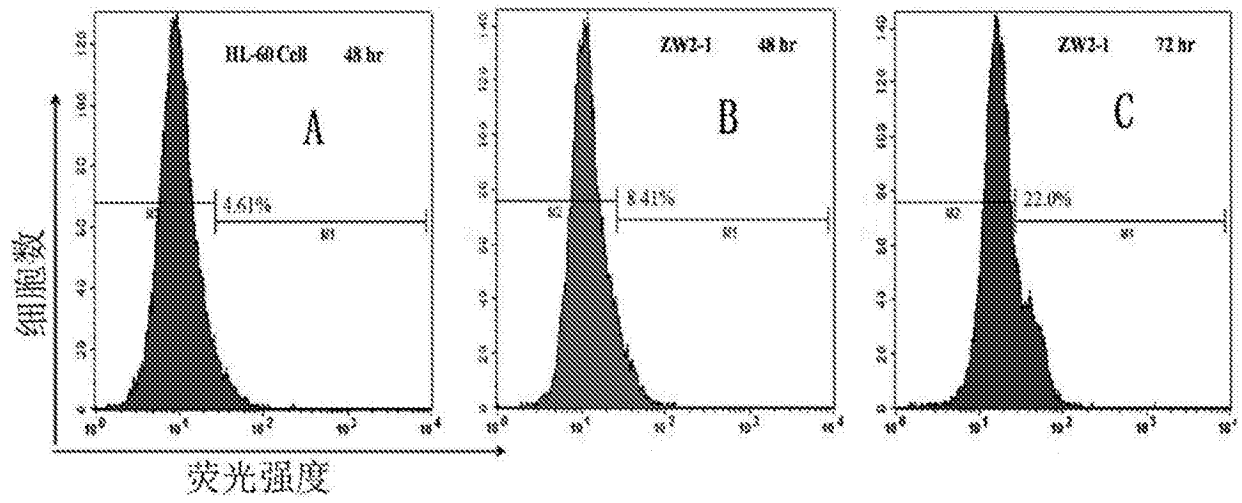


图6