

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/56 (2006.01)

A61K 31/565 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 97194505.5

[45] 授权公告日 2006 年 3 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 1245982C

[22] 申请日 1997.5.9 [21] 申请号 97194505.5

[30] 优先权

[32] 1996. 5. 9 [33] AU [31] PN9766

[32] 1996. 5. 20 [33] AU [31] PN9918

[86] 国际申请 PCT/AU1997/000286 1997.5.9

[87] 国际公布 WO1997/042958 英 1997.11.20

[85] 进入国家阶段日期 1998.11.9

[71] 专利权人 阿姆瑞德手术有限公司

地址 澳大利亚维多利亚州

[72] 发明人 阿拉斯泰尔·乔治·斯图加特

审查员 唐晓帆

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 1 页 说明书 30 页 附图 15 页

[54] 发明名称

哮喘和气道疾病的治疗

[57] 摘要

本发明涉及载体或载体类似物在治疗慢性和急性气管炎症、特别是哮喘中的应用。还涉及调节气管组织改变的化合物和组合物。在优选实施方案中，所述载体是 2-甲氧基雌二醇。

1、甾体或甾体类似物在制备用于治疗以慢性或急性气道炎症为特征之疾病的药物中的应用，其中所述甾体或甾体类似物选自：2-甲氧基雌二醇、2-羟基雌二醇、2-甲氧基雌酮、2-甲氧基雌二醇-3-甲氧基醚和4-甲氧基雌二醇。

2、如权利要求1所述的应用，其中所述甾体是2-甲氧基雌二醇。

3、如权利要求1或2所述的应用，其中所述疾病选自：哮喘、气道高应答性、支气管收缩、肺气肿、肺炎、特异反应性疾病和肺感染。

4、如权利要求3所述的应用，其中所述特异反应性疾病是过敏性鼻炎。

5、如权利要求1所述的应用，其中所述药物为适合于吸入给药的剂型。

哮喘和气道疾病的治疗

技术领域

本发明涉及治疗慢性和急性气道炎症包括哮喘病的方法。本发明还涉及用于上述治疗中的甾体或甾体类似物，以及包含这些化合物作为活性成分的药物组合物。在优选实施方案中，活性成分抑制气道壁中的炎症以及平滑肌细胞的增殖。它还可具有至少一种选自抗血管生成、抗氧化和破坏微管形成中的其他活性。

背景技术

在治疗哮喘中目前有两类截然不同的药物。使用支气管舒张剂可提供对症缓解，所述支气管舒张剂包括 β_2 -肾上腺素受体激动剂如舒喘宁（salbutamol）和沙美特罗（salmeterol）。其他具有支气管舒张剂性质的药物包括毒蕈碱受体拮抗剂、异丙托溴铵、和磷酸二酯酶抑制剂如茶碱（theophylline）。

第二类药物是预防性的，包括糖皮质激素如氯地米松二丙酸盐。也可使用色甘酸二钠和萘多罗米（nedocromil）钠，但是这些药物比糖皮质激素的效用低。

然而，以上药物中没有一个可以完全反转气道的高应答性或者防止所有病人的哮喘灾害性致命和致死期。这些病症普遍存在而且有时是致死原因的事实说明以上药物的作用并不是最佳的。

现在认为哮喘是一种慢性气道炎症疾病，其特征是嗜曙红性支气管炎（Frigas 等人，1991）。与其他慢性炎症疾病一样，哮喘中的炎症也诱发组织改变，这已被记载于气道的尸体解剖研究（Dunnill 等人，1969）中以及活供体的支气管活体解剖（Brewster 等人，1990；Bai 和 Pare，1995）中。该组织改变包括：上皮脱落；嗜曙红细胞明显过滤至粘膜中；

肥大细胞和淋巴细胞的活化；粘液腺的增大；外伤型胶原立即沉降至上皮的真基膜以下并存在与粘膜中；以及肌成纤维细胞（myofibroblast）数量的增加。另外，在哮喘气道中血管的体积和数量也增加，这表明该组织改变中还伴随着血管生成（Kuwano 等人，1993）。气道壁的总容积随着气道平滑肌体积的增加也增加（Kuwano 等人，1993），这是肥大性和增生性应答的结果（Ebina 等人，1993）。

气道高应答性（AHR）是哮喘患者对各种刺激产生过度的支气管收缩肌应答。气道壁增厚是 AHR 发展的中心这一概念在最近 10 年已被接受。气道增厚已用放大平滑肌缩短之后果的数学模型研究来表现，即计算一定量的平滑肌缩短以与健康受试者相比在哮喘病患者中产生更大的气道阻力（例如 40% 缩短在健康受试者中产生 15 倍的增加，但在哮喘患者中产生 290 倍的增加）（James 等人，1989）。气道壁面积增加 50—250%，在更大的气道中可观察到更多的增加（James 等人，1989）。肌肉体积增加 2—3 倍，而且其增加的幅度与哮喘的严重程度有关（Kuwano 等人，1993）。变化的本质尚未进行广泛的研究，但其包括增生和肥大（Ebina 等人，1993）。过敏性哮喘患者中延长对过敏原的回避，证明气道中的应答性降低至在健康受试者中所观察到的水平，而且伴随着症状的缓解（Platts-Mills 等人，1987）。以上这些研究与哮喘气道中结构的改变也是可逆的这一概念是相一致的。

哮喘气道中此等长期变化为治疗性介入提供了新目标（Stewart 等人，1993）。因此，主要的兴趣集中在鉴别出该气道壁组织变化应答的机理以及现存的抗哮喘药物对这些过程的影响。许多因子已被确认为各种来源包括人的经培养的平滑肌的有丝分裂因子（参考 Stewart 等人，1995a）。正如所希望的，属于生长因子族的刺激，包括基本成纤维细胞生长因子（bFGF）、血小板衍生的生长因子（PDGF_{BB}）和表皮生长因子（EGF），是最有效的增殖剂（Hirst 等人，1992；Stewart 等人，1995a）。凝血酶也是有效的生长因子（Tomlinson 等人，1994），其中如内皮素-1 和血栓烷 A₂ 模拟物、U46619 的支气管收缩剂，其活性较弱，而且一

些其他收缩剂如组胺和神经激肽是完全无活性的(Stewart 等人, 1995a)。

在经培养的人气道平滑肌中, 连续地暴露在 β - 肾上腺素受体激动剂可降低对宽范围之有丝分裂因子的增殖性应答, 所述有丝分裂因子包括凝血酶、EGF 和血栓烷 A_2 类似物、U46619 (Tomlinson 等人, 1994; 1995)。而且, 地塞米松和其他抗炎甾体药物也具有抗经培养之气道平滑肌增殖的作用 (Stewart 等人, 1995b), 但是抑制作用的幅度取决于首先刺激增殖作用的有丝分裂因子。还应注意的是, 通过吸入抗炎甾体药物进行的长期治疗仅中等程度地降低 AHR (Sotomayor 等人, 1984; Lungren 等人, 1988), 其中据报道 β_2 -激动剂既没有作用也不能增加 AHR (Wahedna 等人, 1993)。因此, 两类最经常使用而且最有效的治疗哮喘的药物对 AHR 具有亚最佳作用, 而且因此不可能有效地调节与气道组织改变有关的结构变化, 所述气道组织改变对病症的前进和发展有作用。

我们已研究了使组织改变过程停止或者调节该过程的潜在方式, 并已令人惊奇地发现适用于该目的的甾体及其类似物。

发明内容

2-甲氧基雌二醇是人生理雌激素——17 β - 雌二醇的天然代谢物。

该物质是分两步产生的, 其涉及雌激素的羟基化, 产生儿茶酚雌激素, 然后通过可诱导的细胞色素 p450 通路进行甲氧基化, 产生相应的甲氧基雌激素 (Spink 等人, 1994)。目前认为是无生理活性的 (Rosner 等人, 1991), 但在细胞培养研究中已确认 2-甲氧基雌二醇抑制某些变形细胞系的增殖作用 (Lottering 等人, 1992), 并抑制活动性内皮细胞和成纤维细胞的活性增殖 (Fotsis 等人, 1994)。Fotsis 等人还表明给药 2-甲氧基雌二醇可通过抑制肿瘤诱导的血管生成来抑制肿瘤的生长, 但它并不是直接抑制肿瘤细胞的增殖。有人提出该化合物可减少基膜损坏, 因此可防止细胞迁移至细胞外基质中, 并使其具有潜在的抗血管生

成药物的作用,用于治疗实体瘤或血管生成疾病。在 Klauber 等人, 1997 中证实了对肿瘤新血管形成的抑制作用。

2-甲氧基雌二醇对经培养之兔主动脉平滑肌细胞的抗增殖作用 (Nishigaki 等人, 1995) 也表明该化合物可用于防止动脉粥样硬化的发展, 该疾病中的细胞变化与哮喘和 AHR 中的不同。

抗增殖作用的机理尚未确定。Lottering 等人 (1992) 提出环腺苷一磷酸 (cAMP) 的升高可解释 2-甲氧基雌二醇对 DNA 合成的抑制作用, 其中在有丝分裂的纺锤体形成期间对微血管形成的抑制作用可用于解释对细胞分裂的抑制作用 (Fotsis 等人, 1994)。2-甲氧基雌二醇的其他生理作用没有被广泛表征。在猪子宫内膜细胞培养物中, 2-甲氧基雌二醇抑制 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的合成 (Zhang 和 Davis, 1992)。2-甲氧基雌二醇的非基因组作用包括通过在秋水仙素位点处与微管素的结合产生的微管破裂作用 (D'Amato 等人, 1994; Aizu-Yokota 等人, 1995) 以及血管平滑肌的松弛作用 (Goyache 等人, 1995)。

在国际专利申请公开 WO 95/04535 中, 描述了通过抑制微管素在体外的聚合作用而具有抗有丝分裂作用的雌二醇衍生物。在该体外研究中可推导出, 所述化合物抑制内皮细胞增殖。

本发明涉及 2-甲氧基雌二醇的作用以及对炎性细胞活化的抑制。其特别是涉及对如哮喘的气道疾病进行治疗或预防。

没有一份文献提到上述设想或公开了本发明。例如, 在气道中抑制平滑肌细胞增殖和炎性细胞的活化并不能经由 WO 95/04535 的体外观察而被预测到, 而且这些活性的机理似乎与对微管形成的作用无关。

2-甲氧基雌二醇对兔血管平滑肌的抗增殖作用 (Nishigaki 等人, 同上) 也不能外推至气道平滑肌, 这是因为这两种来源的细胞的应答性不同。

一些增加内皮细胞增殖的药物如肝素, 实际上抑制气道平滑肌细胞的增殖。因此, 2-甲氧基雌二醇在内皮细胞中的抗增殖作用 (Fotsis 等人, WO 95/04535, 同上) 不能说明平滑肌以相同的方式进行应答。

我们发现 2-甲氧基雌二醇抑制髓过氧化酶从人外周血之多形核白细胞中的释放以及对这些细胞的细胞吞噬活性。在这些细胞中降低细胞吞噬活性可证明其抗炎性质。这是非常令人惊奇的，特别是因为已知 2-甲氧基雌二醇对糖皮质激素或者雌激素受体没有明显的亲和性（Merriam 等人，1980）。

这些性质使 2-甲氧基雌二醇以及相关化合物有利于治疗包括但不限于哮喘、慢性阻塞性气道疾病和其他以炎症为特征的气道疾病。适合于本发明方法治疗的其他疾病包括例如肺气肿、肺炎或以增殖性和炎性病症如中性白细胞过滤为特征的气道疾病、或者其症状或后遗症导致残留炎性细胞活化的肺感染疾病。

还可治疗如过敏性鼻炎的病症，这是因为发现 2-甲氧基雌二醇抑制与肥大细胞有关的细胞系——RBL2H3 的脱粒。2-甲氧基雌二醇的抑制作用对抗原刺激的释放是选择性的，因为对蛋白激酶 C 刺激剂、PMA 以及对钙离子载体 A23187 的应答不受影响。因此，对抗原释放的作用不是由于对微管依赖性的颗粒挤压作用产生非特异性作用的结果。我们实验的结果表明 2-甲氧基雌二醇和具有这些活性的相关甾体可用于治疗过敏性疾病，该疾病包括但不限于鼻炎和特异反应性的皮肤疾病。不希望受限于任何具体的作用机理，这些数据表明与涉及受体的特异性信号传导机理有关，而且该机理对抑制气道炎症是有作用的。

我们进一步发现 2-甲氧基雌二醇抑制 DNA 合成以及用宽范围之包括 FCS 和 bFGF 的生长因子刺激的气道平滑肌中的细胞分裂。另外，血清素刺激的蛋白合成速率增加被 2-甲氧基雌二醇抑制，除抑制细胞增殖外，还提高了抗肥大作用的可能性。与 2-甲氧基雌二醇的抗血管生成活性一起，我们的观察表明该化合物及其相关化合物在治疗以炎症为特征的上述气道疾病中有治疗价值，特别是治疗慢性哮喘，其对气道壁组织改变有特别的作用并因而对气道高应答性产生影响。还测试了 2-甲氧基雌二醇的类似物抑制 DNA 合成的作用，其结果表明这些化合物也是有治疗价值的。

在第一方面中，本发明提供治疗以慢性或急性气道炎症为特征的疾病的方法，其包括向需要此等治疗的哺乳动物给药具有调节气道组织改变之活性的甾体或甾体类似物。优选的是，所述哺乳动物是人、猫、马或牛，更优选的是人。甾体 2-甲氧基雌二醇特别优选用于本发明方法中。在本发明所用剂量水平时没有有效糖皮质激素活性的甾体或其类似物是特别希望的。

在第二方面中，本发明提供治疗以慢性或急性气道炎症为特征的疾病的方法，其包括向需要此等治疗的哺乳动物给药甾体或甾体类似物，其中，所述甾体或类似物抑制多形核白细胞的细胞吞噬作用。优选的是，髓过氧化酶从白细胞中的释放也被抑制。还抑制巨噬细胞的活化。

在一个实施方案中，根据本发明的方法进一步通过抑制平滑肌细胞的增殖和炎症来调节气道壁的组织改变。所述组织改变进一步通过抑制以下一种或多种活性来调节：气道壁中血管生成、氧化剂的形成和微管功能的形成。

在一个特别优选的实施方案中，本发明的方法用于治疗以下疾病：哮喘、气道高应答性、支气管收缩、肺气肿、肺炎、特异反应性疾病如过敏性鼻炎和肺感染。

在第三方面中，本发明提供通过抑制气道壁的炎症来调节气道组织改变的甾体或甾体类似物。优选的是，所述化合物还具有抑制气道平滑肌细胞增殖的活性、特别是应答有丝分裂因子刺激的活性。

在第四方面中，本发明涉及通过抑制细胞吞噬活性来调节气道组织改变的甾体或甾体类似物，在一个优选实施方案中，用 2-甲氧基雌二醇抑制多形核白细胞的细胞吞噬活性。在另一个实施方案中，还抑制髓过氧化酶从多形核白细胞中的释放。在一个特别优选的实施方案中，所述甾体或甾体类似物不具有糖皮质激素活性。

在第五方面中，本发明提供的上述甾体或甾体类似物进一步具有抗血管生成活性和/或抗氧化活性。在一个特别优选的实施方案中，本发明的甾体或甾体类似物还具有破裂气道壁中的微管的活性。

在第六方面中，本发明提供包括上述甾体或甾体类似物、任选一种或多种药物学上可接受的载体和赋形剂的组合物。所述载体和赋形剂的例子包括但不限于干燥的微粉化粉末和乳糖或者最近研制出的氢氟烷烃。本发明的组合物可成型为通过治疗气道疾病或哮喘中所用的常规途径例如局部、口服、鼻腔给药或吸入给药的制剂。这些制剂可为任何常规的剂型，如胶囊剂、扁囊剂、片剂、气雾剂、粉末颗粒剂、微粉化颗粒剂或溶液剂。任选地，所述甾体或甾体类似物可与环糊精复合，也可与药物学上可接受的酸形成酯的形式，所述酸例如是硫酸、乙酸、苯甲酸等。本领域普通技术人员可参考标准教材，如 Remington's Pharmaceutical Sciences 17th 版，来确定制剂所采用的剂型以及如何给药。

甾体或甾体类似物的给药剂量取决于待治疗的病症和给药途径，而且这对普通住院医生或兽医来说这是显而易见的。此类普通技术人员可容易地确定合适的给药剂量、方式和频率。本发明的组合物可用于治疗慢性或急性气道炎症，包括哮喘、气道高应答性（AHR）或支气管收缩。

在本发明的一个特别优选实施方案中，通过给药包含 2-甲氧基雌二醇的组合物可抑制哮喘病人之气道壁平滑肌细胞的炎症和增殖。

虽然具体参考 2-甲氧基雌二醇来描述本发明，但可理解的是也可在本发明中使用具有所需生理活性的该化合物的类似物。这些类似物包括但不限于 2-羟基雌二醇、2-甲氧基雌二醇-3-甲基醚和 4-甲氧基雌二醇。

已鉴别出许多雌二醇衍生物的化合物在其他组织中具有抗增殖和/或抗血管生成活性。例如见 WO 95/04535，其整个内容在此并入作为参考。

此等化合物也是适用于本发明中的候选药物，并在本发明的甾体、甾体类似物或甾体类似化合物的意思范围内。优选的化合物在甾体骨架的 2 位上具有甲氧基。

另外，可设想到目前尚未知晓的其他化合物也有可能具有与本发明

之 2-甲氧基甾体或甾体类似化合物相似的结构，并具有本发明范围内的生理活性。在本发明说明书中，术语“甾体”、“甾体类似物”或“甾体类似化合物”可理解为包括 2-甲氧基雌二醇、2-羟基雌二醇、2-甲氧基雌二醇-3-甲基醚、4-甲氧基雌二醇以及其他基于具有与本发明目的相关生理活性的甾核的化合物。其他化合物可具有与 2-甲氧基雌二醇足够的结构和/或电（电荷分布）相似性，并具有本发明范围内的生理活性，而不被限制具有甾核，此等化合物可被认为是本发明的甾体类似物，例如 WO 95/04535 中的化合物。具有此等活性的化合物可容易地通过使用能够指示本发明说明书中其他处所描述类型的活性的试验来鉴别出来。例如，可通过测定气道平滑肌细胞增殖作用来测试化合物对慢性呼吸阻塞性疾病的作用；通过确定对炎性细胞活化的抑制来测试对过敏性鼻炎和感染性疾病的作用，对鼻炎测试肥大细胞，而对感染性疾病测试中性白细胞。

本领域技术人员还可利用其他测试，并容易地筛选出适合于本发明的化合物。

附图说明

现参考附图并根据实施例来详细描述本发明，图中：

图 1 显示 2-甲氧基雌二醇对辣根过氧化酶介导的四甲基联苯胺氧化没有作用。

图 2 显示 2-甲氧基雌二醇（0.3—10 μ M，30 分钟预处理）对有丝分裂因子诱导的 [3 H]-胸苷插入经培养之人气道平滑肌细胞中的作用。测试的有丝分裂因子是 0.3 U/ml 的凝血酶、1% 的 FCS、300 pM 的 bFGF（图 2a）和 10% 的 FCS、3 nM 的 EGF（图 2b）。进行与图 2a 和 2b 相同设计的附加实验，并且在图 2c 中显示的是该后一个结果与图 2a 和 2b 中的结果组合的图。还研究了 2-甲氧基雌二醇（3 μ M）对凝血酶（0.3 U/ml）诱导的 DNA 合成随时间的作用（图 2d）。数据以 3 个不同培养基中的 3 个实验的平均值及平均值的标准误差来表示，并以在未经预处

理的细胞中 $[^3\text{H}]$ —胸甬插入的百分数来表示。

图 3 显示 2—甲氧基雌二醇 ($0.3-10\ \mu\text{M}$, 30 分钟预处理) 对有丝分裂因子诱导的 $[^3\text{H}]$ —白氨酸插入的作用。数据以 3 个不同培养基中的 3 个实验的平均值及平均值的标准误差来表示, 并以在未经预处理的细胞中 $[^3\text{H}]$ —白氨酸插入的百分数来表示。

图 4 显示 2—甲氧基雌二醇 ($0.3-10\ \mu\text{M}$, 30 分钟预处理) 在 (a) FCS (1%) 或 (b) bFGF (300 pM) 存在时对细胞数量的作用。数据以 3 个不同培养基中的 3 个实验的平均值及平均值的标准误差来表示, 并以在未经预处理的细胞中细胞数量增加的百分数来表示。

图 5 显示甾体受体拮抗剂——RU 486 ($1\ \mu\text{M}$) 对 2—甲氧基雌二醇 ($3\ \mu\text{M}$) 抑制 FCS (1%) 诱导 DNA 合成的作用。数据以 3 个不同培养基中的 3 个实验的平均值及平均值的标准误差来表示, 并以在未经预处理的细胞中 $[^3\text{H}]$ —胸甬插入的百分数来表示。RU 486 在 2—甲氧基雌二醇前 30 分钟加入, 而 2—甲氧基雌二醇在 FCS 前 30 分钟加入。

图 6 显示 17β —雌二醇和 2—羟基雌二醇 ($0.3-10\ \mu\text{M}$, 30 分钟预处理) 对 FCS (1%) 诱导的 $[^3\text{H}]$ —胸甬插入的作用。数据以 3 个不同培养基中的 3 个实验的平均值及平均值的标准误差来表示, 并以在未经预处理的细胞中 $[^3\text{H}]$ —胸甬插入的百分数来表示。有关 2—甲氧基雌二醇的数据从图 1 中复制以易于对比。

图 7 显示 2—甲氧基雌酮和 2—甲氧基雌三醇 ($0.3-10\ \mu\text{M}$, 30 分钟预处理) 对凝血酶 ($0.3\ \text{U/ml}$) 诱导 $[^3\text{H}]$ —胸甬插入的作用。数据以 3 个不同培养基中的 3 个实验的平均值及平均值的标准误差来表示, 并以在未经预处理的细胞中 $[^3\text{H}]$ —胸甬插入的百分数来表示。有关 2—甲氧基雌二醇的数据从图 2a 中复制以易于对比。

图 8 显示 2—甲氧基雌二醇对豚鼠腹膜巨噬细胞中超氧化物阴离子释放的作用。该化合物完全阻断巨噬细胞对酵母多糖的超氧化物阴离子应答, 并降低对 fMLP 的应答。

图 9 显示 2—甲氧基雌二醇对豚鼠腹膜巨噬细胞中前列环素释放的

作用。结果表明该雌二醇完全阻断对 fMLP 的巨噬细胞应答，并抑制对 PMA 的应答 50%。

图 10 是显示各种浓度的卵白蛋白（DNP-OA）对肥大细胞（RBL2H3）脱粒的作用、以及 2-甲氧基雌二醇的抑制作用的图。

图 11 显示 2-甲氧基雌二醇降低卵白蛋白（DNP-OA）刺激的^[3H]-5HT 从豚鼠腹膜巨噬细胞中的释放，但对 PMA 的应答没有作用。

具体实施方式

缩写

本发明所用缩写如下：

AHR：气道高应答性

bFGF：基本成纤维细胞生长因子

DNP-OA：经二硝基-苯酚处理的卵白蛋白

EGF：表皮生长因子

fMLP：甲酰基甲硫氨酰亮氨酰苯丙氨酸

PDGF：血小板衍生的生长因子

PMA：佛波醇肉豆蔻酸酯乙酸盐

5HT：血清素

常规方法

细胞培养

从 Alfred 医院（Melbourne）的肺移植供体或受体的宏观正常肺切除样品中得到人支气管平滑肌。按以前所述具体制备培养物（Tomlinson 等人，1994）。简言之，在 37℃ 下将组织部分消化在包含 3 mg/ml 胶原酶的 Dulbeco 改良 Eagle 培养基（DMEM）（补充有 2 mM L-谷酰胺、100 μg/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素 G、2 μg/ml 两性霉素 B、和 0.25 w/v% 牛血清白蛋白（BSA））中 30 分钟，然后在 0.5 mg/ml 弹性蛋白酶中温育 2 小时进一步消化约 0.5g 平滑肌，接着于 37℃ 在胶原酶（3 mg/ml）

中温育 18 小时。离心细胞悬浮液（10 分钟， $100\times g$ ， 25°C ），在经补充的 DMEM 中洗涤三次，重新悬浮在 25 ml 包含 10%（v/v）经热灭活的胎牛血清（FCS）的 DMEM 中，接种在 25 cm^2 Falcon 培养烧瓶中，并温育（ 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ ）7—10 天，直至达到单层融合。通过 10 分钟接触 0.5% 肝素和 1 mM EDTA 来每周收集细胞，并按 1:3 分流比在 75 cm^2 Falcon 培养烧瓶中传代。在实验中使用第 3—15 代的细胞。

免疫细胞化学

将细胞次代培养在 8 孔室式组织培养玻片（Labtek）中，并在 DMEM（10% FCS）中培养至 100% 融合。在冰冷丙酮中固定 20 秒前，在 PBS 中洗涤三次玻片，在染色前于 4°C 下储存最多至 4 周。在 PBS/BSA（0.25%）中再水化 20 分钟，然后在 0.5% Triton X-100（于 PBS）中温育，由此使细胞渗透，接着在 22°C 下与原发抗体温育至少 60 分钟。用 0.25% BSA 之 PBS 溶液洗涤 3 次，由此除去原发抗体，然后于 22°C 使细胞与次生抗体接触至少 60 分钟（辣根过氧化物酶（HRP）-缀合的羊抗鼠 IgG（ab'）2 片段或羊抗兔 IgG）。用 PBS/BSA（0.25%）代替原发抗体，由此制备对照溶液。用光显微镜（连接在 VideoPro 32 影象分析系统上的 Olympus BH2, Faulding Imaging, Clayton, Victoria）分析经固定细胞的染色。用于在培养基中鉴别平滑肌的抗体的特征建立在天然气道壁样品上。所用的抗体可对抗 α -肌动蛋白、肌凝蛋白、calponin（对平滑肌都是特异性的）、细胞发育素（cytokeratin）（上皮细胞）和 PECAM-1（CD31，其是内皮细胞标记物）。

在所有用于本研究的培养基中都观察到平滑肌 α -肌动蛋白、肌凝蛋白和 calponin 的表达。这些培养基没有表达可检测到的 PECAM-1 染色，而且少于 5% 的细胞对于用抗细胞发育素的单克隆抗体的染色是阳性的。用于产生培养物的气道附近的包埋石蜡的气道部分正性染色仅在气道平滑肌和血管束中的平滑肌 α -肌动蛋白以及肌凝蛋白。抗 PECAM-1 的抗体染色血管内皮，而抗细胞发育素的抗体仅染色上皮，

这证明这些抗体对靶抗原的特异性。

DNA 和蛋白质的合成

按 1:3 的比例将细胞次代培养在 24 孔板中,并在 37°C 下于 5%CO₂ 的大气环境下培养 72—96 小时至单层融合。用无血清的 DMEM 替换含血清的培养基 24 小时,产生生长停止。在某些实验中,在添加有丝分裂因子前用 2-甲氧基雌二醇对细胞进行预处理 30 分钟。在适当的孔中加入刺激剂(有丝分裂因子)以及包含胰岛素、转铁蛋白和硒(Monomed A, 1%v/v)的补充液。加入 Monomed A 是为了提供前进因子,这些因子对如凝血酶、表皮生长因子(EGF)和基本成纤维细胞生长因子(bGF)的生长因子的有丝分裂活性是最基本的(Stewart 等人, 1995a)。在添加时使有丝分裂因子和抑制剂与细胞相接触,直至实验结束,除非另有说明。根据以前的研究(Stewart 等人, 1995),在用 [³H]-胸苷(1 μCi/ml, 4 小时)脉冲以测定放射标记插入新合成之 DNA 前,温育细胞 24 小时(37°C, 5%CO₂)。放射活性的插入通过在脉冲一标记阶段结束时的过滤来确定。抽出包含放射活性的培养基,通过添加 200 μl 的 0.1M NaOH 使细胞溶解。在结合收集器(Packard Filtermate 196)中于玻璃纤维过滤器(Packard, 标准)上进行过滤,由此固定 DNA,用 3×3 ml 体积的蒸馏水和单次 1 ml 体积的 100%乙醇洗涤该过滤器。经干燥的过滤器在 Packard Topcount 液体闪烁计数器中计数。蛋白质合成速率在与上述实验类似的实验中确定,但是在 4 小时的脉冲温育中 [³H]-白氨酸代替 [³H]-胸苷。而且,在确定有丝分裂因子和 2-甲氧基雌二醇对蛋白质合成速率的作用的实验中,与有丝分裂因子的温育进行 48 小时。这些实验需要持续更长的时间,以便有足够的时间使细胞分裂发生。

细胞计数

测量与上述 DNA 合成类似的实验中细胞数量的变化,由此确定气道平滑肌细胞通过细胞循环至有丝分裂的前进过程,不同的是继续与有

丝分裂因子温育 48 小时。曝露在 200 μ l 的 0.5 %胰蛋白酶之 PBS 溶液中 30—45 分钟，该 PBS 包含 1 Mm EDTA，以确保细胞完全地相互分开，并与培养板分开，以便能够进行精确的计数，由此将细胞从实验所用的 6 孔培养板的各孔中移出。在该时间段终止后，进一步添加 200 μ l 的 PBS (20%FCS)，以防止细胞被胰蛋白酶溶解，然后在血细胞计数器中直接计数细胞。

统计学分析

对于 DNA 和蛋白质合成实验，每个实验的各项处理重复 4 次。各实验至少在从 3 个不同的个体中得到的 3 个不同培养基中进行。在细胞计数时，在 3 个培养基中进行单独的温育。结果以从多个培养基中得到的分组数据表示，然后以 n 个培养基的平均值 $\pm$ SE 来表示。经处理细胞的应答除以在相同 24 孔板上的对照的应答，由此计算出增加度。在对数转化进行回归后，通过成对 t-检验来分析分组数据。在必要时使用多重比较的 Bonferroni 调节。如果 $p < 0.05$ ，则认为差异显著。

材料

所用的化学品都是分析级的或者更高级别的。所用的化合物及其来源如下：2-甲氧基雌二醇 (1, 3, 5-[10]-雌三烯-2, 3, 17-三醇 2-甲基醚，商品编号 83H4065)；17 β -雌二醇 (1, 3, 5[10]-雌三烯-3, 17 β -二醇，商品编号 E8876)；2-甲氧基雌三醇 (1, 3, 5-雌三烯-2, 3, 16 α , 17 β -四醇，商品编号 26F 4038)；2-甲氧基雌酮 (2, 3-二羟基-1, 3, 5[10]-雌三烯-17-酮，商品编号 110F4003)；2-羟基雌二醇 (1, 3, 5[10]-雌三烯-2, 3, 17 β -三醇，商品编号 75H0853)；L-谷酰胺、基本上无脂肪酸的牛血清白蛋白部分 V(BSA)、凝血酶(牛血浆)，得自于 Sigma 公司，美国；两性霉素 B (Fungizone)、人重组基本 FGF (bFGF)，得自于 Promega 公司，美国；CLS 1 型胶原酶、弹性蛋白酶，得自于 Worthington Biochemical 公司，美国；Dulbecco

‘A’磷酸盐缓冲盐水 (RBS), 得自于 Oxoid 公司, 英国; 胰蛋白酶、依地酸、青霉素-G、链霉素、Monomed A, 得自于 CSL, 澳大利亚; 胎牛血清 (FCS), 得自于 Flow Laboratories, 澳大利亚; Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM), 得自于 Flow Laboratories, 苏格兰。[6-³H]-胸甙 (185 GBq/mmol, 5 Ci/mmol), 得自于 Amersham, 英国; Microscint-O 闪烁体, 得自于 Canberra-Packard, 澳大利亚。用于免疫细胞化学中的抗体是抗平滑肌 α -肌动蛋白 (鼠单克隆) (Dako M851)、单克隆鼠抗 PECAM-1 (DAKO-CD31, JC/70A) (Dako M823), 得自于 Dako 公司, 美国; 抗细胞发育素 (鼠单克隆 CY90, Sigma, 美国) 抗鼠 Ig F (ab')₂ 片段 FITC-缀合物 (宿主羊)、羊抗兔 Ig HRP-缀合物 (Silenus DDAF), 得自于 Silenus 公司, 澳大利亚, 以及抗平滑肌 myosin (兔多克隆), 由 M Sparrow 教授 (Perth, WA) 提供。

实施例 1

2-甲氧基雌二醇对白细胞活性的作用

白细胞激活是哮喘病理学的一个特征。2-甲氧基雌二醇与微管素上的秋水仙素结合位点的结合产生该化合物干扰白细胞功能如细胞吞噬作用和移动作用的可能性。

2-甲氧基雌二醇的功能作用在由人外周血中得到的多形核白细胞 (PMN) 和粘性单核细胞上进行检查。超氧化物阴离子的产生通过超氧化物歧化酶敏感性还原细胞色素 C 来确定 (Stewart 和 Harris, 1992)。髓过氧化酶的释放通过四甲基-联苯胺的氧化反应来确定 (Menegazzi 等人, 1992)。细胞吞噬作用通过酵母多糖颗粒的放射性碘化来确定 (Shelton 和 Hosking, 1975)。

根据我们以前的研究收集并培养豚鼠腹膜巨噬细胞 (Stewart 和 Phillips, 1989)。细胞与刺激剂在有或没有 2-甲氧基雌二醇 (10 μ M) 存在时温育 30 分钟, 所述刺激剂包括向化性的三肽、甲酰基甲硫氨酰亮氨酰苯丙氨酸 (fMLP, 100 nM)、酵母多糖 (400 μ g/ml) 或佛波醇

肉豆蔻酸酯乙酸盐 (PMA, 100 nm), 而 2-甲氧基雌二醇在刺激剂前 15 分钟加入。通过超氧化物歧化酶敏感的细胞色素 C 还原来确定超氧化物阴离子 (Stewart 和 Harris, 1992), 而前列环素的稳定代谢物——6-氧-PGF₁ 通过放射性免疫测定法来测定 (Stewart 和 Phillips, 1989)。所有的单独培养重复进行两次, 并在来自于 5 只豚鼠的巨噬细胞中进行实验。

RBL2H3 细胞在包含 10%FCS 的 RPMI 1640 培养基中培养, 并在 24 孔板中传代用于实验。与从分泌抗 DNP 卵白蛋白抗体的淋巴细胞系中得到的 50% (v/v) 调制的培养基一起温育 48 小时, 由此致敏化细胞。在该温育的最后 24 小时中, 在各孔中加入 [³H]-5HT (1 μ Ci/ml), 以标记粒状胺储存。在温育结束后, 抽出培养基, 在 RPMI 1640 中洗涤两次细胞, 在有或没有 2-甲氧基雌二醇存在下在 RPMI 1640 (0.25% BSA) 中培养 15 分钟, 然后用经 DNP 处理的卵白蛋白、A23187 或 PMA 刺激 30 分钟, 此时收集上清液, 离心上清液 (100 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 5 分钟), 并取样以确定 [³H]-5HT 的释放量。所有实验重复 4 次。

结果表明, 如表 1 所示, 2-甲氧基雌二醇 (3 μ M) 降低用酵母多糖 (400 μ g/ml) 或 fMLP 刺激的白细胞中四甲基-联苯胺的氧化。通过四甲基-联苯胺氧化反应测定出, 从经 fMLP 刺激的白细胞中得到的无细胞的上清液仍包含髓超氧化酶活性。但是该活性仅被最高浓度的 2-甲氧基雌二醇 (10 μ M) 降低。另外, 用经纯化的辣根过氧化酶进行实验, 以检查 2-甲氧基雌二醇对四甲基联苯胺的氧化反应是否有直接作用。2-甲氧基雌二醇 (10 μ M) 在该测定中没有作用。结果见图 1。

表 1: 人多形核白细胞的四甲基联苯胺氧化反应

	对照	fMLP 100 nm	酵母多糖 400 μ g/ml
基线	-0.001 $\pm$ 0.002	-0.057 $\pm$ 0.021	-0.26 $\pm$ 0.009
2-甲氧基雌二醇 3 μ M	-0.004 $\pm$ 0.001	-0.028 $\pm$ 0.03	-0.013 $\pm$ 0.012

数据以吸收值的变化来表示。测定使用 2×10^6 PMN 在 0.5 ml 缓冲液中进行。

在 PMN 中, 最高至 10 μ M 的 2-甲氧基雌二醇没有降低在 fMLP (100 nm) 或酵母多糖 (400 μ g/ml) 应答中超氧化物阴离子的产生。在细胞吞噬作用试验中, 2-甲氧基雌二醇降低了以 PNM 对酵母多糖颗粒的放射性碘化, 在 3 和 10 μ M 时都观察到显著的作用, 见表 2。

表 2: 人多形核白细胞对 ^{125}I 的吸收

	无 PHS		PHS*	
	对照	酵母多糖	对照	酵母多糖
基线	1.80 $\pm$ 0.09	2.83 $\pm$ 0.09	2.13 $\pm$ 0.24	4.33 $\pm$ 0.51
2-甲氧基雌二醇 3 μ M	1.97 $\pm$ 0.44	1.97 $\pm$ 0.48	1.87 $\pm$ 0.46	3.27 $\pm$ 0.64
2-甲氧基雌二醇 10 μ M	2.05 $\pm$ 0.44	1.80 $\pm$ 0.49	1.75 $\pm$ 0.45	1.65 $\pm$ 0.15

*PHS=储存的人血清

数据以在可玻璃纤维过滤的材料中 ^{125}I 插入的百分数来表示。测定使用 1×10^6 PMN 来进行。

在粘性单核细胞中, 10 μ M 的 2-甲氧基雌二醇对相应于佛波醇肉豆蔻酸酯乙酸盐 (1 μ M) PMA 或酵母多糖 (400 μ g/ml) 的应答的四甲基-联苯胺氧化反应没有作用。而且, 该细胞类型中在对 PMA 应答中

超氧化物阴离子的产生没有作用。但是,在至少某些供体的单核细胞中,酵母多糖刺激的超氧化物阴离子产生明显被 2-甲氧基雌二醇($10\mu\text{M}$)抑制。

如图 8 所示,豚鼠巨噬细胞对酵母多糖或 fMLP 的超氧化物阴离子应答被 2-甲氧基雌二醇降低。但是,对 PMA (100 nM) 的应答未被影响。另外, fMLP (100 nM) 诱导的 6-氧-PGF 1α 产生增加完全被 2-甲氧基雌二醇阻断,而对 PMA 的诱导仅被降低 50%,而且如图 9 所示,酵母多糖没有刺激前列环素代谢物水平的增加。

卵白蛋白(DNP-OA)诱导浓度依赖性的 $[^3\text{H}]$ -HT 释放,如图 10 所示,该释放可被 $10\mu\text{M}$ 的 2-甲氧基雌二醇降低。但是,如图 11 所示, $[^3\text{H}]$ -HT 的基线释放以及应答 PMA(100 nM)或钙离子载体 A23187 ($10\mu\text{M}$) 中的释放未被 2-甲氧基雌二醇影响。

2-甲氧基雌二醇对 PMN 髓过氧化物酶释放和活性的抑制作用以及对细胞吞噬作用的降低表明,该化合物具有体内抗炎作用。对经酵母多糖刺激的超氧化物阴离子产生的选择性抑制作用说明对该吞噬刺激物的特异性作用。这些现象和我们说明对巨噬细胞功能的抑制作用的试验都提供了有益于哮喘和其他慢性阻塞性气道疾病、特别是那些明显有 PMN 参与的气道疾病的抗炎作用的证据。

实施例 2

2-甲氧基雌二醇对 DNA 合成的作用

在添加有丝分裂因子前使经培养的人气道平滑肌细胞于 $0.3-10\mu\text{M}$ 的 2-甲氧基雌二醇温育 30 分钟,并如图 2a 所示,在剩余的 28 小时实验期间使凝血酶刺激的 $[^3\text{H}]$ -胸苷插入产生浓度依赖性的降低。在 2-甲氧基雌二醇的最高浓度 ($10\mu\text{M}$) 时,对凝血酶的应答被降低至大约为对照水平的 10%。2-甲氧基雌二醇对 DNA 合成的抑制作用不限于凝血酶的存在,因为在 DNA 合成被胎牛血清(FCS, 1%v/v)或基本成纤维细胞生长因子(bFGF, 300 pM)刺激的细胞中(图 2a 和 2b),

观察到了 2-甲氧基雌二醇类似的浓度相关性抑制作用。但是, EGF (3 nM) 或 10%FCS 存在时的 DNA 合成被显著抑制, 其程度更甚于对凝血酶、bFGF 或更低浓度的 FCS 的应答(图 2c)。10%FCS 应答中的 DNA 合成(比未经刺激的 $[^3\text{H}]$ -胸苷插入水平高 27.2 ± 7.8 倍)显著大于($p < 0.05$, 成对 Student's t-检验)对 0.3 U/ml 凝血酶(8.4 ± 3.1 倍)、3 nm EGF (4.5 ± 0.7) 或 1%FCS (12.7 ± 0.4) 的应答, 但是与对 300 pM 的 bFGF (22.5 ± 0.4) 的应答没有显著差异。

还进行了随时间的研究, 以确定在与有丝分裂因子接触后添加 2-甲氧基雌二醇是否仍抑制 DNA 的合成。当在凝血酶后最多 4 小时添加 2-甲氧基雌二醇 (3 μM) 时, 凝血酶 (0.3 U/ml) 刺激的 DNA 合成被抑制, 在添加凝血酶后 2 小时观察到最大抑制作用。在凝血酶后 4-14 小时之间添加 2-甲氧基雌二醇产生较小的抑制作用(约 20%), 而如图 2d 所示, 在 18 小时或更后的添加对该有丝分裂因子存在时的 DNA 合成没有作用。随后检查另外的时间点, 这些研究表明在凝血酶的同时或在其后 1 小时添加 2-甲氧基雌二醇时可观察到最高水平的活性, 但是显著的抑制作用可持续至凝血酶添加后的 6 小时(图 2d)。

实施例 3

2-甲氧基雌二醇对蛋白质合成和细胞数量的作用

为确定对 DNA 合成的抑制作用是否也导致细胞循环发展的停止以及对有丝分裂的抑制, 在与有丝分裂因子温育 48 小时后进行蛋白质合成和细胞数量的测定。在凝血酶 (0.3 U/ml)、FCS (1% v/v) 或 bFGF (300 pM) 存在时, 抑制 $[^3\text{H}]$ -白氨酸插入的阈浓度是 1 μM , 而且与抑制 $[^3\text{H}]$ -胸苷插入的结果类似。大约 30% 应答时的最大百分降低低于 DNA 合成时观察到的值, 并发生在 3 μM 。在 10 μM 时, 如图 3 所示, 在凝血酶或 bFGF 存在时, 没有显著的抑制作用。2-甲氧基雌二醇单独在 0.3 μM 时对 $[^3\text{H}]$ -白氨酸插入产生小的刺激作用。更高的浓度 (1 和 3 μM) 具有小的抑制作用, 而在 10 μM 时没有作用。这些结果见表

3. 相反地, 应答 FCS (1%, v/v) 或 bFGF (300 pM) 时细胞数量的增加对 2-甲氧基雌二醇的抑制作用更敏感, 超过对蛋白质或 DNA 合成的作用, 如图 4a 和 4b 所示, 在 3 μ M 观察到增殖应答被完全抑制。

表 3: 2-甲氧基雌二醇对未经刺激的平滑肌细胞中蛋白质合成速率的作用

2-甲氧基雌二醇 (μ M)	[³ H]-白氨酸插入 (%对照) 平均值 $\pm$ SEM
—	100
0.3	135 $\pm$ 3*
1.0	84 $\pm$ 4*
3.0	77 $\pm$ 3*
10.0	113 $\pm$ 9

*p < 0.05 成对 Student's t-检验, 与 100%相比 (无预处理)

实施例 4

血清素刺激的 [³H]-白氨酸在平滑肌细胞中的插入

浓度为 0.1 nM—10 μ M 的血清素 (5HT) 对 [³H]-胸甙的插入没有作用, 但是 10 nM 的 5HT 可增加 [³H]-白氨酸的插入。与 0.3—10 μ M 的 2-甲氧基雌二醇预先温育可按照浓度依赖性方式降低 5HT (10 nM) 刺激的蛋白合成的增加, 结果见表 4。

表 4: 2-甲氧基雌二醇对经 5HT 刺激的平滑肌细胞中蛋白质合成速率的作用

2-甲氧基雌二醇 (μM)	$[\text{H}]$ -白氨酸插入 (%对照) 平均值 $\pm$ SEM
—	100
0.3	91 $\pm$ 5
1.0	62 $\pm$ 2*
3.0	56 $\pm$ 2*
10.0	51 $\pm$ 6*

* $p < 0.05$ 成对 Student's t -检验, 与 100% 相比 (无预处理)

实施例 5

2-甲氧基雌二醇的形态学作用

浓度为 3 和 10 μM 的 2-甲氧基雌二醇可观察到包括显示正常纺锤形细胞的圆形外观的形态学变化。形状变化在开始时相对较快, 在 6 小时内即可观察到, 而且在温育期间都保持。这些形状变化与用微管解聚剂——秋水仙素 (0.1–10 μM) 温育细胞时诱导的形状变化类似。甾体受体拮抗剂——RU 486 (Stewart 等人, 1995b) 降低应答秋水仙素或 2-甲氧基雌二醇时产生的形状变化, 但是对 2-甲氧基雌二醇抑制 DNA 合成没有作用。这些结果如图 5 所示。

实施例 6

2-甲氧基雌二醇类似物的作用

检查几种与 2-甲氧基雌二醇有关的化合物对经 FCS (1%, v/v) 刺激的 DNA 合成的抑制作用, 包括母体化合物——17 β -雌二醇和立即的前体化合物——2-羟基雌二醇。如图 6 所示, 较低浓度的这些化合物都可增加经 FCS (1%) 刺激的 DNA 合成。在更高浓度时, 增加作用被反转, 并在 10 μM 的这些化合物浓度时观察到抑制作用。2-羟基

雌二醇（10 μ M）的抑制作用等于 2—甲氧基雌二醇（10 μ M）。用包括 2—甲氧基雌酮和 2—甲氧基雌三醇的类似物观察到双相作用，这些化合物在最高至 3 μ M 的浓度时增加经凝血酶刺激的 DNA 合成，但是在 10 μ M 时增加水平下降，参见图 7。17 β —雌二醇和 2—羟基雌二醇对蛋白质合成的作用见表 5。

表 5：2—甲氧基雌二醇对未经刺激的平滑肌细胞中蛋白质合成速率的作用

浓度	[³ H]—白氨酸插入（%对照） 平均值±SEM	
	17 β —雌二醇	2—羟基雌二醇
	100	100
0.3	103 ± 6	107 ± 3
1.0	89 ± 4	94 ± 10
3.0	87 ± 6	56 ± 8*
10.0	100 ± 9	51 ± 10*

*p < 0.05 成对 Student’s t—检验，与 100%相比（无预处理）

我们发现 2—甲氧基雌二醇具有抗炎活性并抑制 DNA 合成和随后的从人支气管培养出来的气道平滑肌细胞的分裂，2—甲氧基雌二醇是 17 β —雌二醇的天然代谢物，而以前认为 17 β —雌二醇是无活性的。

抗炎活性使该化合物及其类似物可用于炎性疾病的治疗，如哮喘和其他慢性阻塞性气道疾病、特别是具有明显 PMN 参与的那些疾病的治疗。

对 DNA 合成的抑制作用不是细胞毒性的结果，这是因为细胞与最高浓度的 2—甲氧基雌二醇（10 μ M）一起温育时蛋白质合成速率没有被改变，而且在该浓度时没有观察到细胞从培养板上脱落。不希望使观察到的优点囿于任何机理的限制，可能的情况是，甾体在细胞循环的 G1 阶段（有丝分裂因子后 2 小时）即早期抑制细胞，产生最大的 DNA

合成抑制作用。尚未确定有丝分裂因子后添加 2-甲氧基雌二醇是否仍可维持其抗增殖作用。2-甲氧基雌二醇以相同的效力抑制对 bFGF、凝血酶和 FCS (1%) 的应答, 这说明对任何有丝分裂因子没有特异性抑制作用。该观察的结果暗示 2-甲氧基雌二醇作用在使用各有丝分裂因子的早期分子内发送信号步骤中。然而, 对 DNA 合成的抑制作用是可克服的, 用 2-甲氧基雌二醇预先温育, 较高浓度的 FCS (10%) 被明显地较少抑制。该耐受性可用对高浓度 FCS 的更大应答来解释, 但是当有丝分裂因子是 EGF 时, 类似的理由不能用于对抑制作用的耐受, 因为该 EGF 诱导小的应答, 低于凝血酶、FCS 1% 或 bFGF 诱导的应答。但是, EGF 和 10% FCS 的增殖作用可被 2-甲氧基雌二醇抑制。我们尚未发现任何将对 DNA 合成的抑制作用与对细胞增殖的抑制作用联系在一起的证据。然而, 在较低浓度的 2-甲氧基雌二醇时观察到的后期作用说明 2-甲氧基雌二醇除对 DNA 合成的抑制作用外的其他作用对抗增殖作用也是有贡献的。

检查了几种 2-甲氧基雌二醇的类似物, 以确定它们是否具有相同的抗增殖作用。母体化合物 17β -雌二醇和立即的前体化合物 2-羟基雌二醇在较低浓度时增加应答 FCS (1%) 的 DNA 合成, 但在 3 和 $10\mu\text{M}$ 时抑制 DNA 合成。尚未确定 DNA 合成中的这些变化是否导致相应的细胞增殖的变化。2-甲氧基雌酮和 2-甲氧基雌三醇对经凝血酶刺激的 DNA 合成的增加显示出铃形的浓度应答曲线, 在较高浓度时具有较低的作用。总而言之, 我们观察的结果表明 2-甲氧基雌二醇是所有已检查化合物中效力最高的, 这与以前对内皮细胞的增殖应答的观察结果一致 (Fotsis 等人, 1994)。

还有可能的是与诱导代谢至活性化合物的药物一起给药母体化合物 17β -雌二醇。例如, 可使用 p450 细胞色素以及儿茶胺甲基转移酶的诱导剂。芳基硫酸酯酶的抑制剂也可考虑。

2-甲氧基雌二醇的抗增殖作用及其降低 5HT 诱导的蛋白质合成增加表明其同时具有抗增生和抗肥大的作用。在哮喘气道中有许多增生和

肥大现象 (Ebina 等人, 1993), 它们是 AHR 现象的主要部分 (James 等人, 1989)。降低 AHR 与完全缓解某些哮喘病患者中的症状有关 (Platts-Mills 等人, 1987)。而且, 在所有哮喘气道壁组织改变应答时的结构变化中, 气道平滑肌的增加是最重要的 (Pare 和 Bai, 1995)。如 2-甲氧基雌二醇的化合物可防止气道平滑肌的生长应答, 因此可降低 AHR 并缓解哮喘症状。另外, 2-甲氧基雌二醇的抗血管生成活性 (Fotsis 等人, 1994) 也有可能限制气道组织改变应答, 这是因为已经确定在组织改变中有血管生成发生 (Kuwano 等人, 1993)。看来需要用血管生成作用来支持组织质量增加的代谢需求。因此, 防止血管生成作用可使组织改变应答停止, 这与 2-甲氧基雌二醇对平滑肌和其他细胞类型的任何直接抑制作用是不相关的。

2-甲氧基雌二醇的许多其他性质对于治疗哮喘也是有益的, 这包括其已知的破坏微管形成的作用 (D'Amato 等人, 1994), 该作用可降低炎性介质从肥大细胞、巨噬细胞和嗜曙红细胞中的细胞排粒性释放。

我们的数据表明 2-甲氧基雌二醇抑制抗原诱导的肥大细胞脱粒作用。该活性支持在更广范围的过敏性疾病中使用 2-甲氧基雌二醇, 所述过敏性疾病包括过敏性鼻炎和特异反应性皮肤疾病。fMLP 对豚鼠腹膜巨噬细胞活化的抑制作用表明 2-甲氧基雌二醇的作用可增加至与肌肉骨架有关的情况中, 这是因为 fMLP 活化与 G-蛋白质有关的受体, 而不是细胞吞噬作用。

另外, 2-甲氧基雌二醇的抗氧化活性也是有益的, 因为在气道炎症中涉及的三种关键的炎性细胞类型都具有产生大量氧自由基的能力, 而且与氧化氮一起可导致明显的氧化剂损坏。这些活性还支持 2-甲氧基雌二醇在治疗慢性阻塞性气道疾病中的应用, 在该疾病中已确定了氧自由基的主要作用而且有气道壁组织改变的证据 (Kuwano 等人, 1993)。最后, 几个研究表明 2-甲氧基雌二醇和相关化合物可减少钙向平滑肌中的流入 (Goyache 等人, 1995), 如果该现象也在气道平滑肌中得到证实, 这将对抗哮喘中的支气管痉挛。

虽然为清除和理解的目的已具体地描述了一些实施例，但它们仅是指导性的。本领域普通技术人员应认识到，在不偏离本发明范围的情况下还可对在此描述的实施方案进行各种的改进和变化。

本文中所引用的文献如下。

Aizu-Yokotta, E., Susaki, A.和 Sato, Y. (1995), 天然雌激素诱导对培养基中中国仓鼠 V79 细胞之微管的调节 (Natural estrogens induce modulation of microtubules in chinese hamster V79 cells in culture), *Cancer Research*, 55, 1863。

Brewster, C.E.P., Howarth, P.H., Djukanovic, R., Wilson, J., Holgate, S.T.和 Roche, W.R. (1990), 支气管哮喘中的肌成纤维细胞和上皮下的变性 (Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma), *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3, 507。

Goyache, F.M., Gutierrez, M., Hidalgo, A.和 Cantabrana, B. (1995), 儿茶酚雌激素在体内鼠子宫收缩中的非基因组作用 (Non-genomic effects of catecholestrogens in the in vivo rat uterine contraction), *General Pharmacology*, 26, 219。

D'Amato, R.J., Lin, C.M., Flynn, E., Folkman, J.和 Hamel, E. (1994), 2-甲氧基雌二醇，一种内源性哺乳动物代谢物，通过在秋水仙素位点处的相互作用抑制微管素的聚合 (2-Methoxyoestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site), *Proceedings of the National Academy of Sciences (美国)*, 91, 3964。

Dunhill, M.S., Massarella, G.R., Anderson, J.A. (1969), 正常受试者、哮喘

喘病患者、慢性支气管炎和肺气肿中的支气管定量解剖比较 (A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema), *Throax*, 24, 176。

Ebina, M., Takahashi, T., Chiba, T., Motomiya, M. (1993), 支气管哮喘的气道平滑肌的细胞肥大和增生。3-D 形态学研究。(Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscle underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study), *Am. Rev. Resp. Dis.*, 148, 720。

Fotsis, T., Zhang, Y., Pepper, M.S., Adlcrutz, H., Montesano, R., Nawroth, P.和 Schweiger, L. (1994), 内源性雌激素代谢物 2-甲氧基雌二醇抑制血管生成和肿瘤生长 (The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth), *Nature*, 368, 237。

Frigas, E., Motojima, S.和 Gleich, G.J. (1991), 支气管哮喘的发病机理中嗜曙红细胞对气道粘膜的损伤 (The eosinophilic injury to the mucosa of the airways in the pathogenesis of bronchial asthma), *Eur. J. Respir. Dis.*, 13, 123S。

Hirst, S.J., Barnes, P.J., Twort, C.H.C. (1992), 定量应答血清和血小板衍生的生长因子中经培养的人和兔气道平滑肌细胞的增殖 (Quantifying proliferation of cultured human and rabbit airway smooth muscle cells in response to serum and platelet-derived growth factor), *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.*, 7, 574。

James, A.J., Pare, P.D., Hogg, J.C. (1989), 哮喘中气道狭窄的机理 (The

mechanics of airway narrowing in asthma), *Am. Rev. Respir. Dis.*, 139, 242。

Klauber, N., Panangi, S., Flynn, E., Hanel, E.和 D'Amato, R.J. (1997), 微管抑制剂 2-甲氧基雌二醇和紫杉酚对鼠血管生成和乳腺癌的抑制作用 (Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyoestradiol and taxol), *Cancer Research* 57: 81-86。

Kuwano, K., Bosken, C.H., Pase, P.D., Bai, T.R., Wiggs, B.R.和 Hogg, J.C. (1993), 哮喘中小气道体积和慢性气道阻塞性肺疾病 (Small airways dimensions in asthma and chronic airway obstructive pulmonary disease), *Am. Rev. Respir. Dis.*, 148, 1220。

Lottering, M.L., Haag, M.和 Seegers, J.C. (1992), 17 β -雌二醇代谢物对 MCF-7 细胞中细胞循环过程的作用 (Effects of 17 β -oestradiol metabolites on cell cycle events in MCF-7 cells), *Cancer Research*, 52, 5926。

Lungren, R., Soderberg, M., Horstedt, P.和 Stenling, R. (1989), 在吸入甾体治疗 10 年之前和之后哮喘患者支气管粘膜活体解剖的形态学研究 (Morphological studies on bronchial mucosa biopsies from asthmatics before and after ten years of treatment with inhaled steroids), *Eur. Respir. J.*, 1, 883。

Menegazzi, R., Zaborchi, G., Knowles, A., Cramer, C.和 Patrarca, P. (1992), 总细胞悬浮液中测定人中性白细胞和嗜曙红细胞分泌的过氧化酶的新一步法 (A new one-step assay on whole cell suspensions for peroxidase secretion by human neutrophils and eosinophils), *J. Leuk-Biol.*, 52: 612。

Merriam, G.R., Machusky, N.J., Picard, M.K.和 Naftolin, F. (1980), 儿茶酚雌激素的比较性质, I: 儿茶酚-O-甲基转移酶的甲基化以及与胞液雌激素受体的结合 (Comparative properties of the catecholestrogens, I: methylation by catechol-O-methyltransferase and binding to cytosol estrogen receptors), *Steroids*, 36: 1—11。

Nishigaki, I., Sasguri, Y.和 Yagi, K. (1995), 2-甲氧基雌二醇对经培养的兔主动脉平滑肌细胞的抗增殖作用 (Anti-proliferative effect of 2-methoxyoestradiol on cultured smooth muscle cells from rabbit aorta), *Atherosclerosis*, 113, 167。

Pare, P.和 Bai, T.R. (1995), 慢性过敏炎症的后果 (The consequences of chronic allergic inflammation), *Thorax*, 50, 328。

Platts-Mills, T.A.E.和 Chapman, M.D. (1987), 尘螨: 免疫学、过敏性疾病和环境控制 (Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 80, 755。

Rosner, W., Hryb, D.J., Khan, M.S., Nakhla, A.M.和 Ronmas, N.A. (1991), 结合性激素的球蛋白: 新调节系统的解剖和生理学 (Sex-hormone binding globulin: anatomy and physiology of a new regulatory system), *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 40, 813。

Shelton, M.J.和 Hosking s. (1975), 复发感染的儿童中的中性白细胞和调理功能。I 中性白细胞碘化 (Neutrophil and Opsonic function in children with recurrent infections I. Neurophil iodination.) , *Aust. J. Med. Tech.*, 6: 54。

Sotomayor, H., Badier, M.M., Vervloet, D., Orehek, J. (1984), 对植物花粉过敏的病人中卡巴可气道应答性的季节性增加。用皮质类甾醇治疗 (Seasonal increase of carbachol airway responsiveness in patients allergic to grass pollen. Reversal by corticosteroids), *Am. Rev. Resp. Dis.*, 130, 56。

Spink, D.C., Hayes, C.L., Young, N.R., Christou, M., Sutter, T.R., Jefcoate, C.R.和 Gierthy, J.F. (1994), 2, 3, 7, 8-四氯二苯并-p-二噁英对 MCF-7 乳腺癌细胞中雌激素代谢的作用: 新型 17 β -雌二醇 4-羟基酶诱导作用的证据 (The effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on estrogen metabolism in MCF-7 breast cancer cells: evidence for induction of a novel 17-beta estradiol 4-hydroxylase), *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 51, 251。

Stewart AG, 和 Harris T. (1992), 腺苷抑制血小板活化因子而不是肿瘤坏死因子 α 诱导的人中性白细胞的引发 (Adenosine inhibits platelet-activating factor but not tumour necrosis factor α -induced priming of human neutrophils), *Immunology* 78: 152—158。

Stewart AG, Tomlinson PRT 和 Wilson JW. (1995a), 调节气道壁组织改变: 发展新型抗哮喘药物的前途 (Regulation of airway wall remodelling: prospects for the development of novel anti-asthma drugs), *Advances in Pharmacology* 33, 200。

Stewart AG, Fernandes DJ 和 Tomlinson PRT (1995b), 糖皮质激素抑制经培养的人气道平滑肌的促有丝分裂应答 (Glucocorticoids inhibit mitogenic responses of human cultured airway smooth muscle), *British*

Journal of Pharmacology, 116, 3219。

Stewart, A.G和 Phillips, W.A. (1989), 细胞内血小板活化因子调节豚鼠腹膜巨噬细胞中二十碳酸化合物的产生 (Intracellular platelet-activating factor regulates eicosanoid generation in guinea-pig peritoneal macrophages), British Journal of Pharmacology, 98: 141—148。

Stewart, A.G, Tomlinson PR, Fernandes DJ, Wilon J 和 Harris T (1995c), 肿瘤坏死因子 α 调节经培养的人气道平滑肌的促有丝分裂应答 (Tumour necrosis factor α modulates mitogenic responses of human cultured airway smooth muscle), Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 12, 110。

Stewart AG, Tomlinson PRT 和 Wilson, J. (1993), 哮喘中的气道壁组织改变: 发展抗哮喘药物的新目标 (Airway wall remodelling in asthma: a novel target for the development of anti-asthma drugs), Trends in Pharmacological Sciences, 14, 275。

Stewart AG, Schachte L 和 Tomlinson PR (1997), 在“哮喘发病机理中的气道壁组织改变” (Airway wall remodelling in the pathogenesis of asthma) (Stewart 编辑)一书中的“ β_2 -肾上腺素受体激动剂对气道平滑肌增殖作用的调节” (Regulation of airway smooth muscle proliferation by β_2 -adrenoceptor agonists), CRC Press, Boca Raton, 第11章第195—335页。

Tomlinson PRT, Wilson J 和 Stewart AG (1994), 舒喘宁对培养基中培养的人气道平滑肌细胞增殖的抑制作用 (Inhibition by salbutamol of the proliferation of human airway smooth muscle cells grown in culture), British Journal of Pharmacology, 111, 641。

Tomlinson PRT, Wilson JW 和 Stewart AG (1995), 舒喘宁抑制培养基中培养的人气道平滑肌细胞的增殖: 与高水平的 cAMP 的关系 (Salbutamol inhibits the proliferation of human airway smooth muscle cells grown in culture: relationship to elevated cAMP levels), *Biochemical Pharmacology*, 49, 1809。

Wahedna, I, Wong, C.S., Wisniewski, A.F.Z., Pavord, I.D.和 Tattersfield, A.E. (1993), 常规 β_2 -激动剂治疗期间和停止之后对哮喘的控制 (Asthma control during and after cessation of regular β_2 -agonist treatment), *Am. Rev. Respir. Dis.*, 148, 707。

Zhang, Z 和 Davis, D.L. (1992), 从用儿茶酚雌激素、甲氧基雌激素和黄体酮处理的猪子宫内膜得到的腺细胞和基质细胞对前列腺素分泌的细胞类型特异性应答 (Cell-type specific responses in prostaglandin secretion by glandular and stromal cells from pig endometrium treated with catecholestrogens, methoxyestrogens and progesterone), *Prostaglandins*, 44, 53—64。

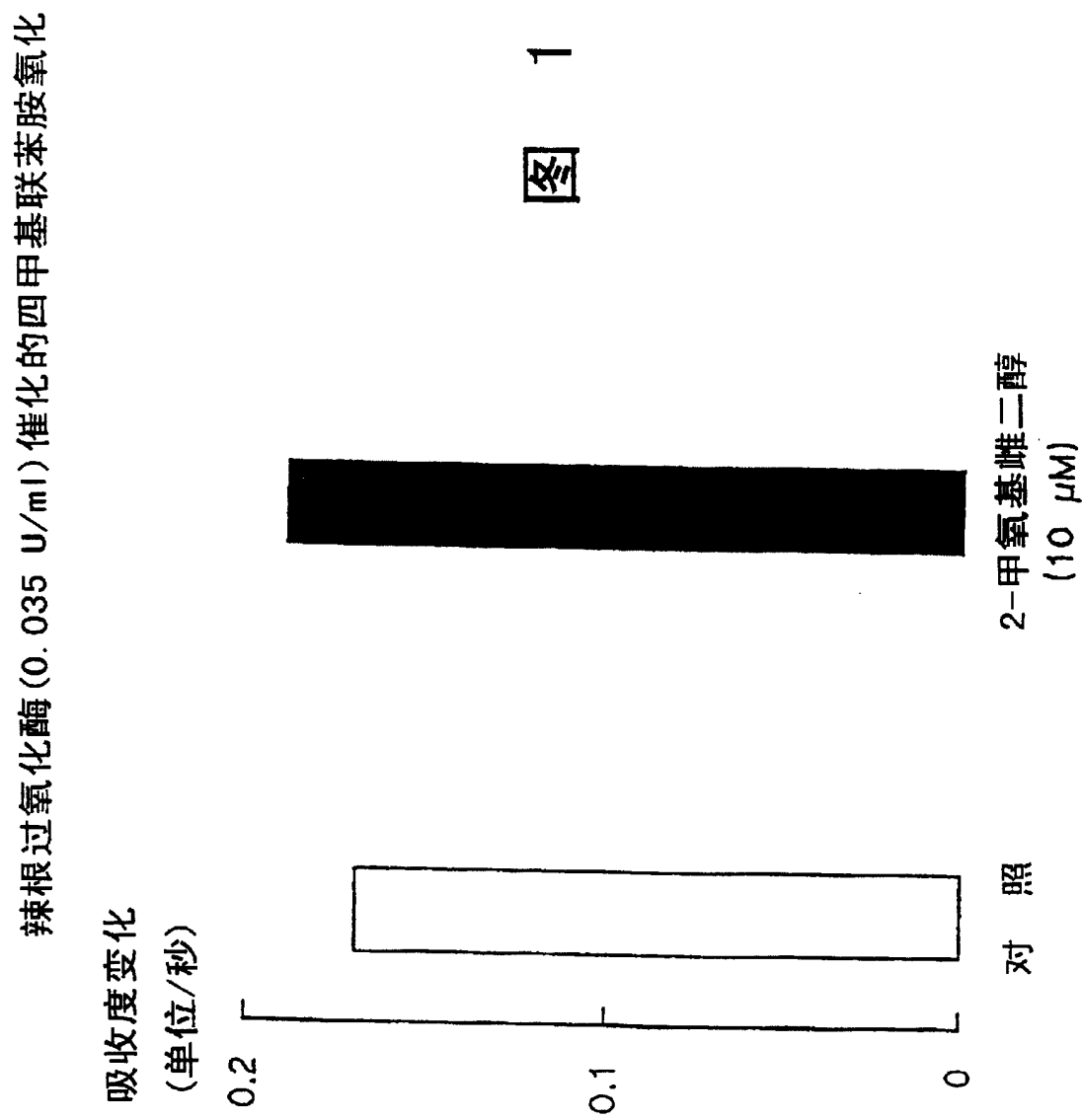


图 1

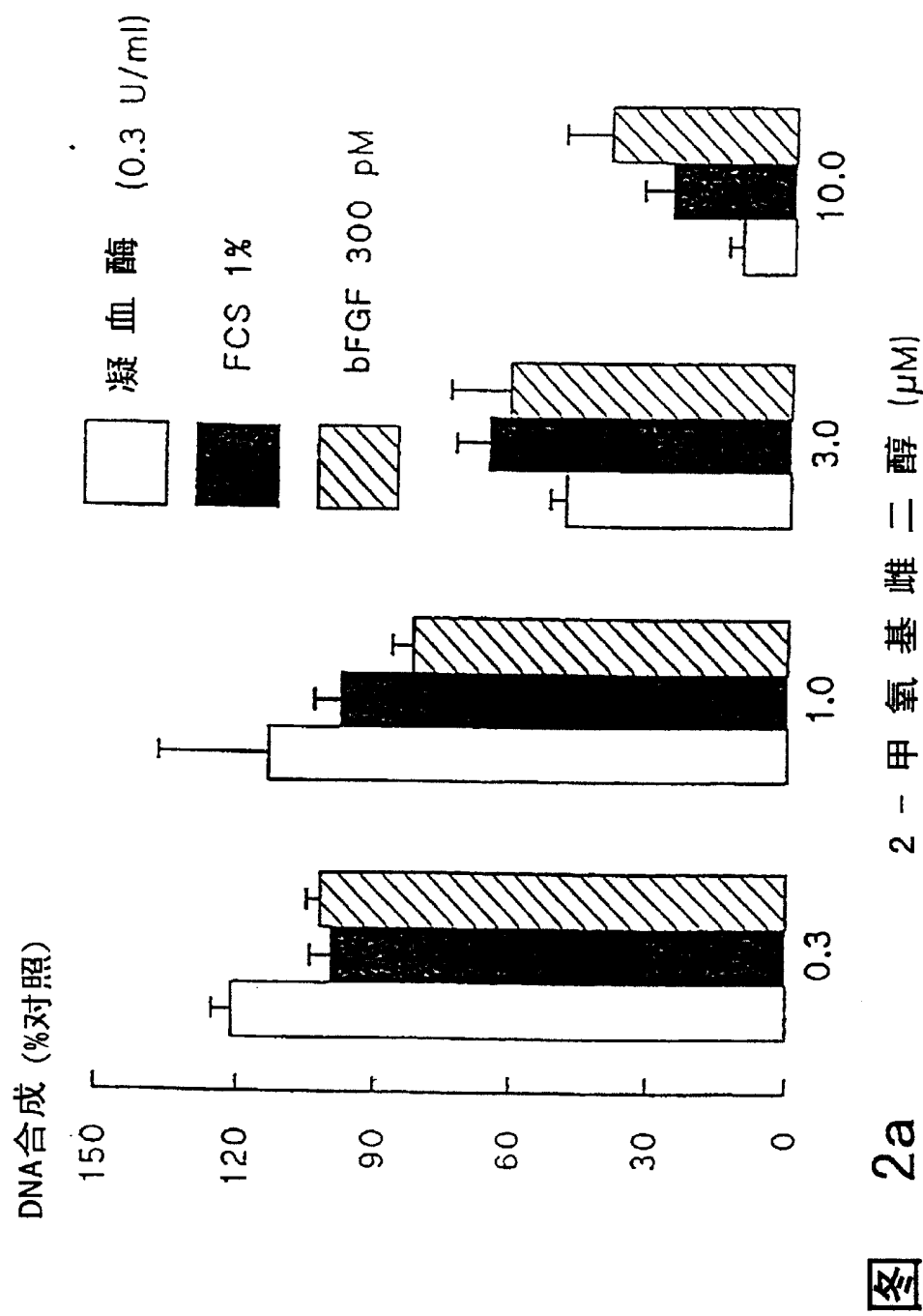
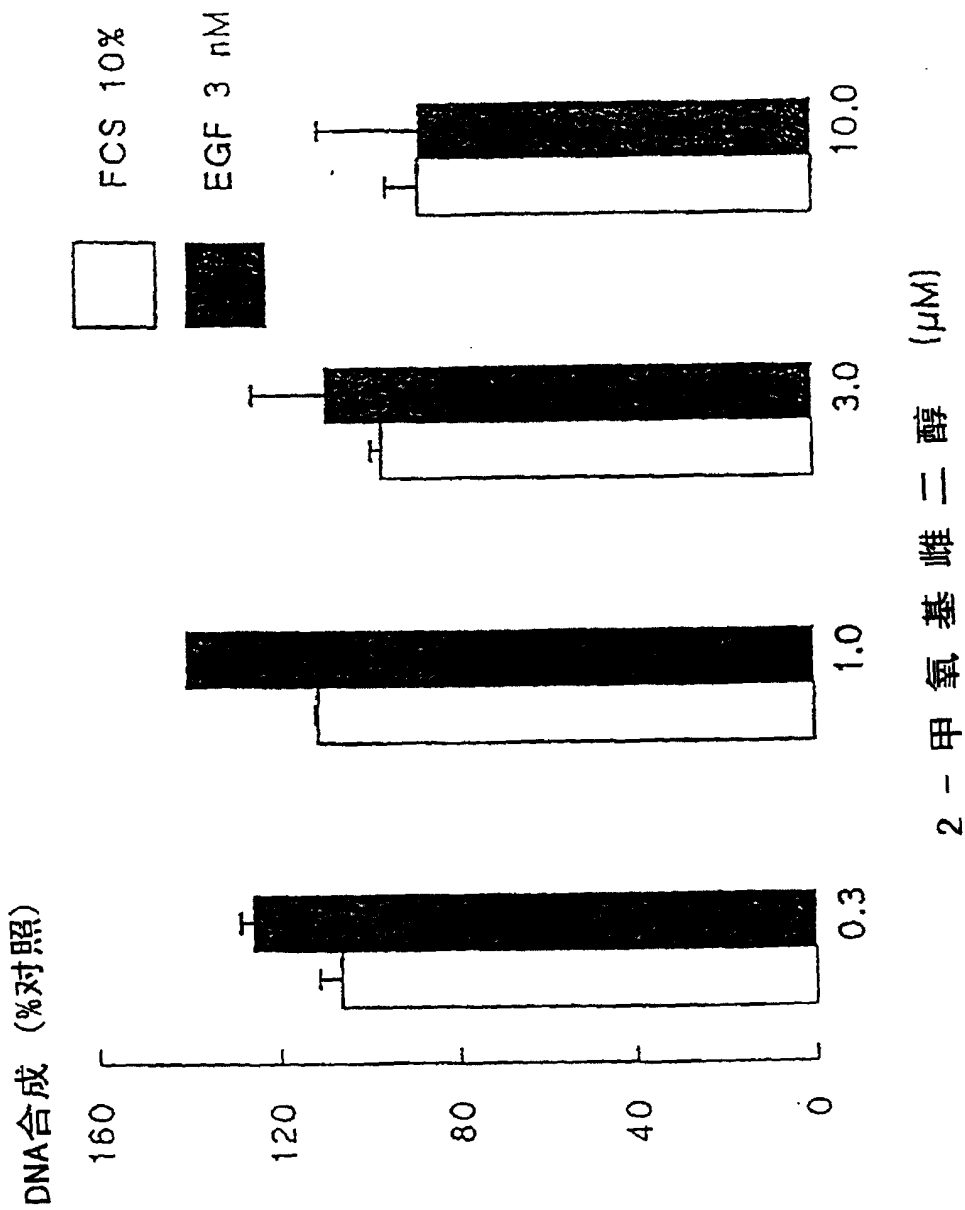


图 2a

图 2b



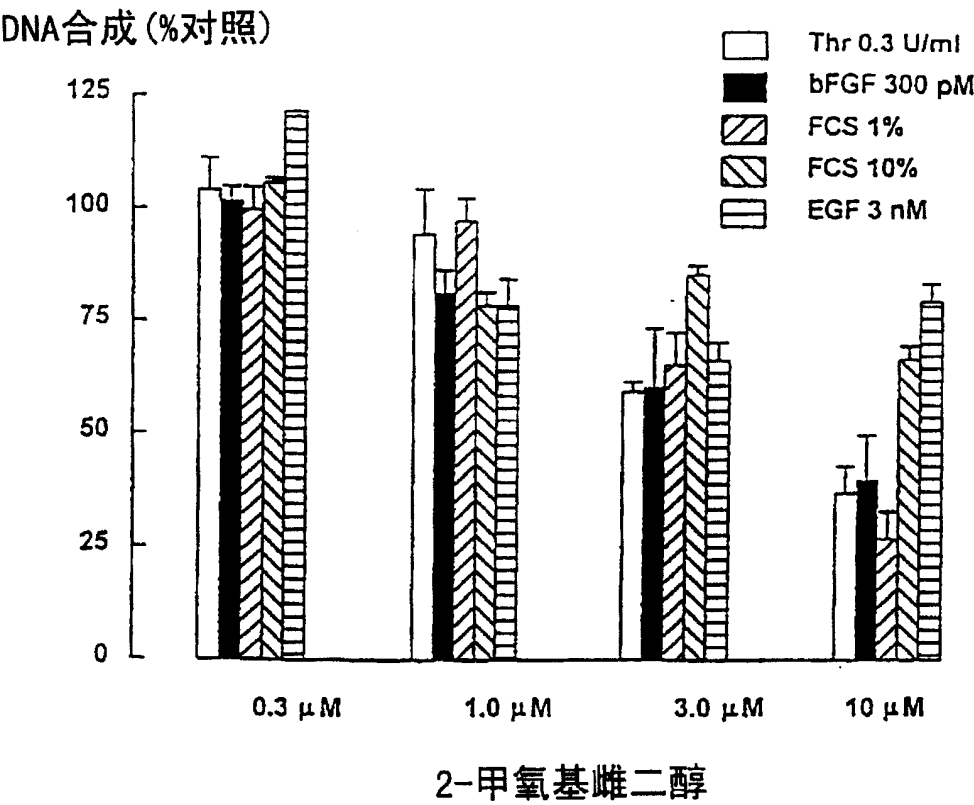


图 2c

2-甲氧基雌二醇随时间对DNA合成的抑制作用

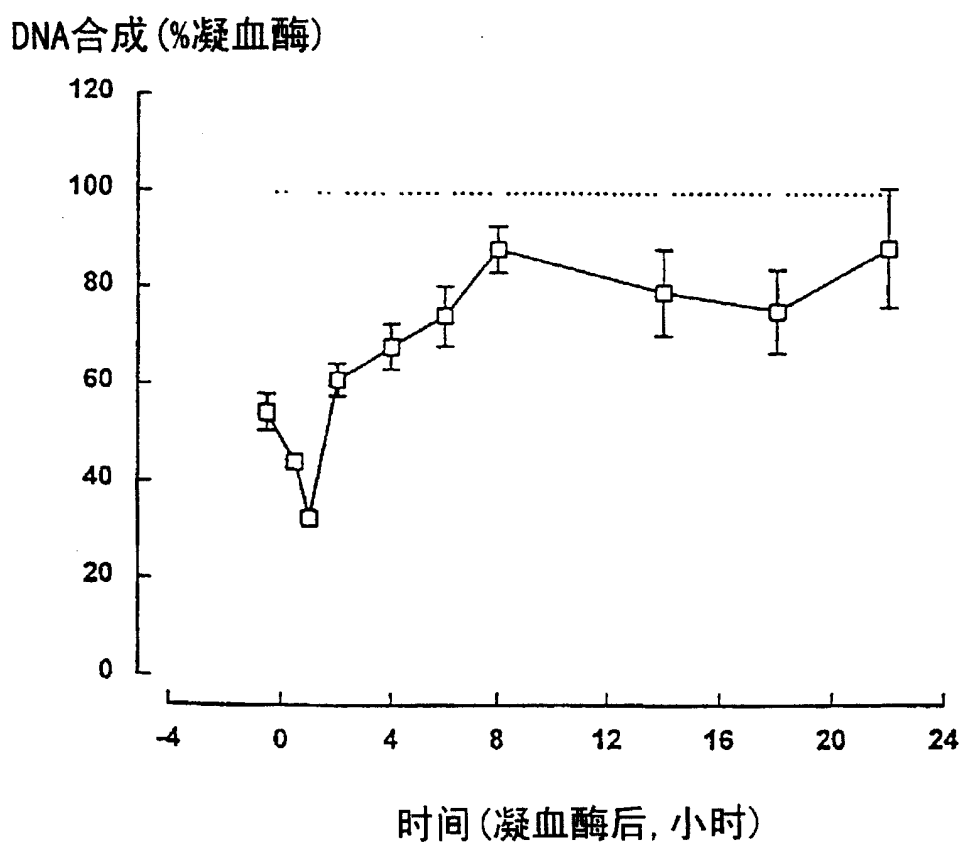
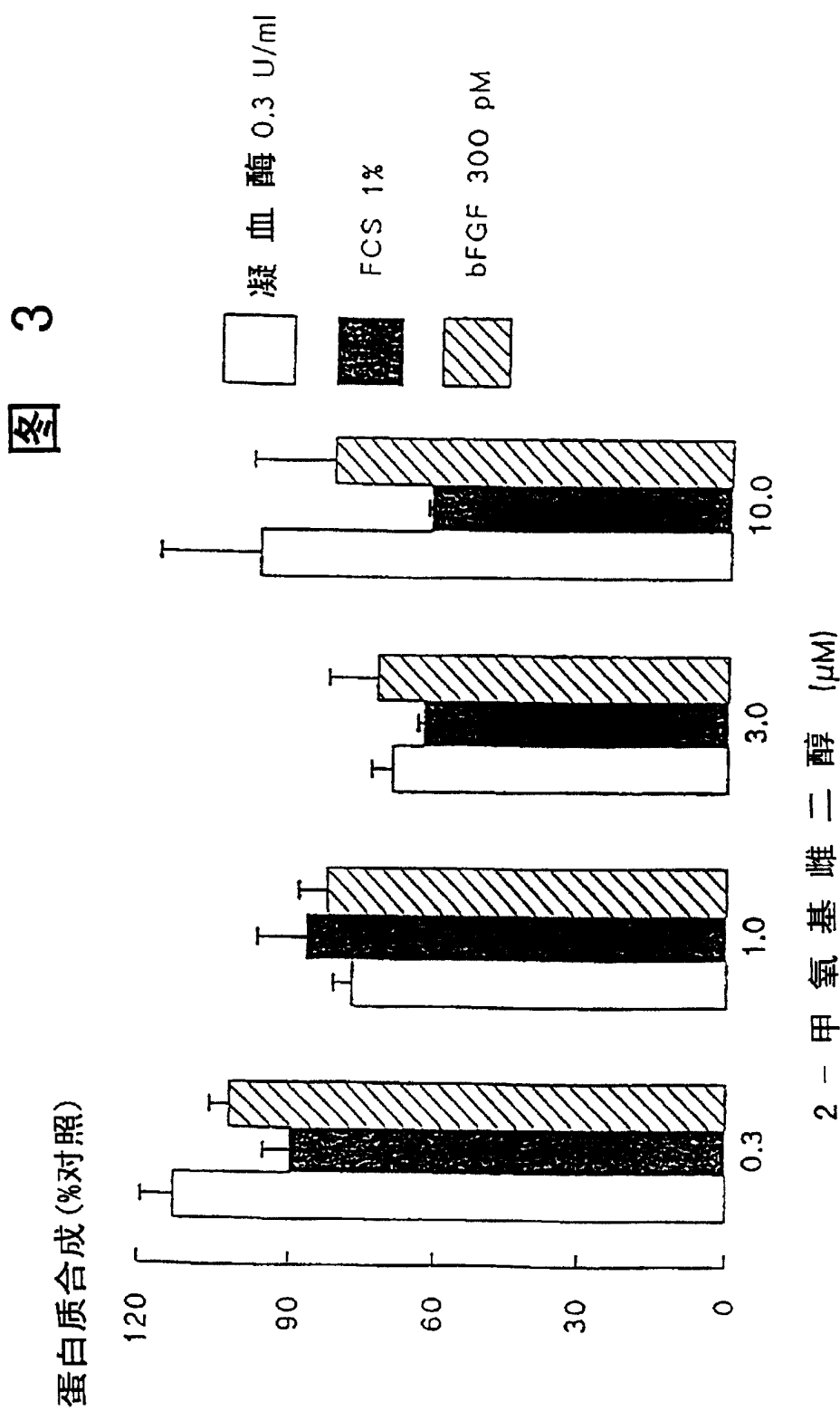
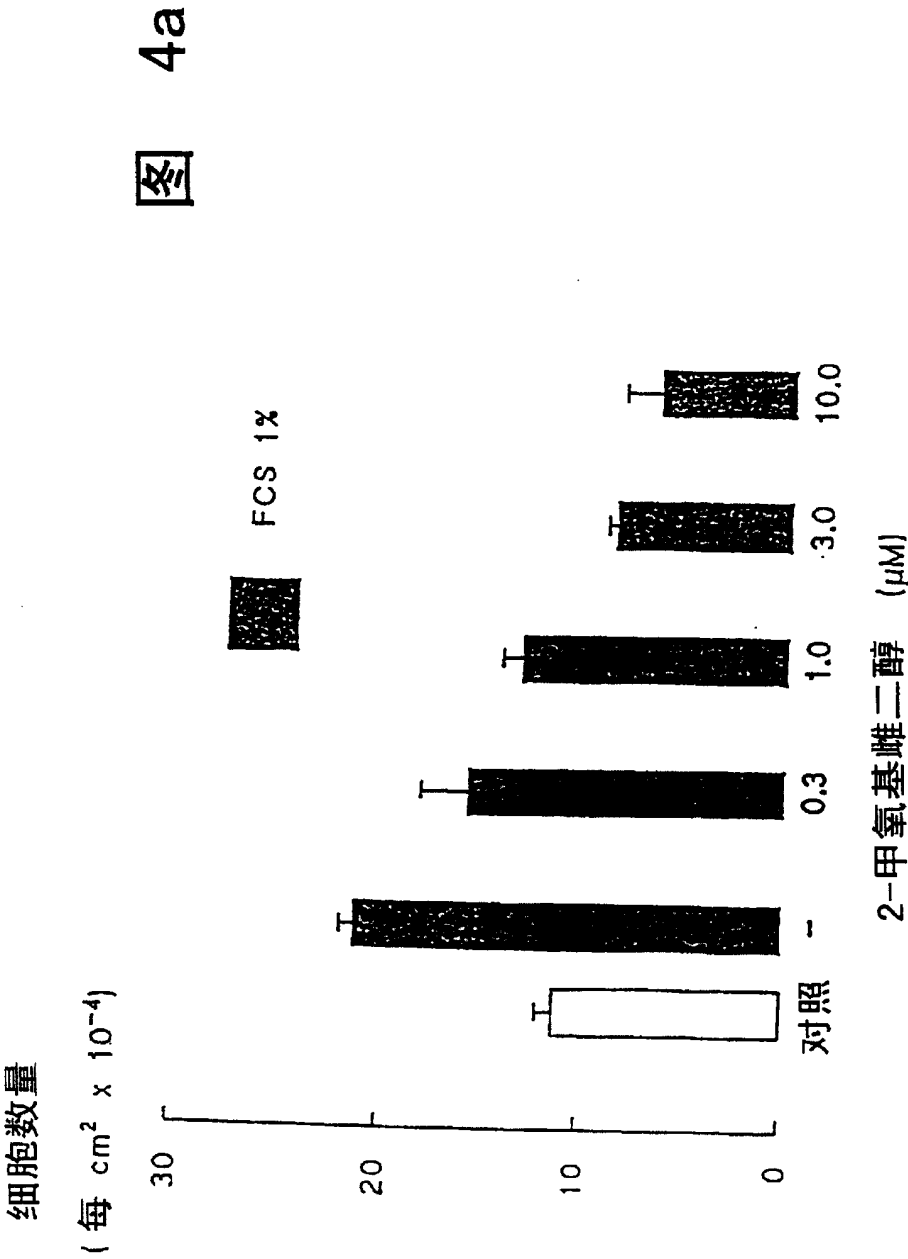
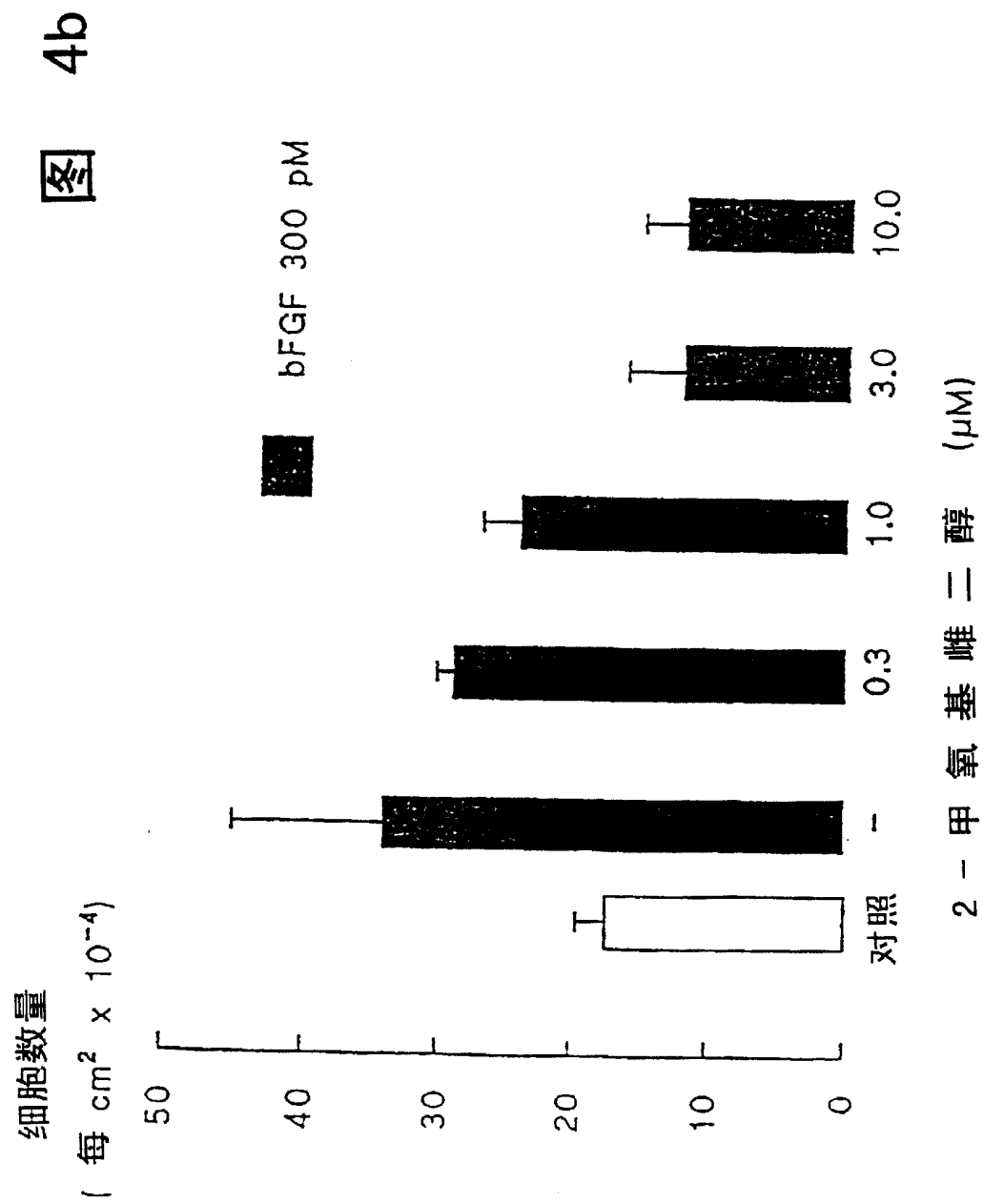
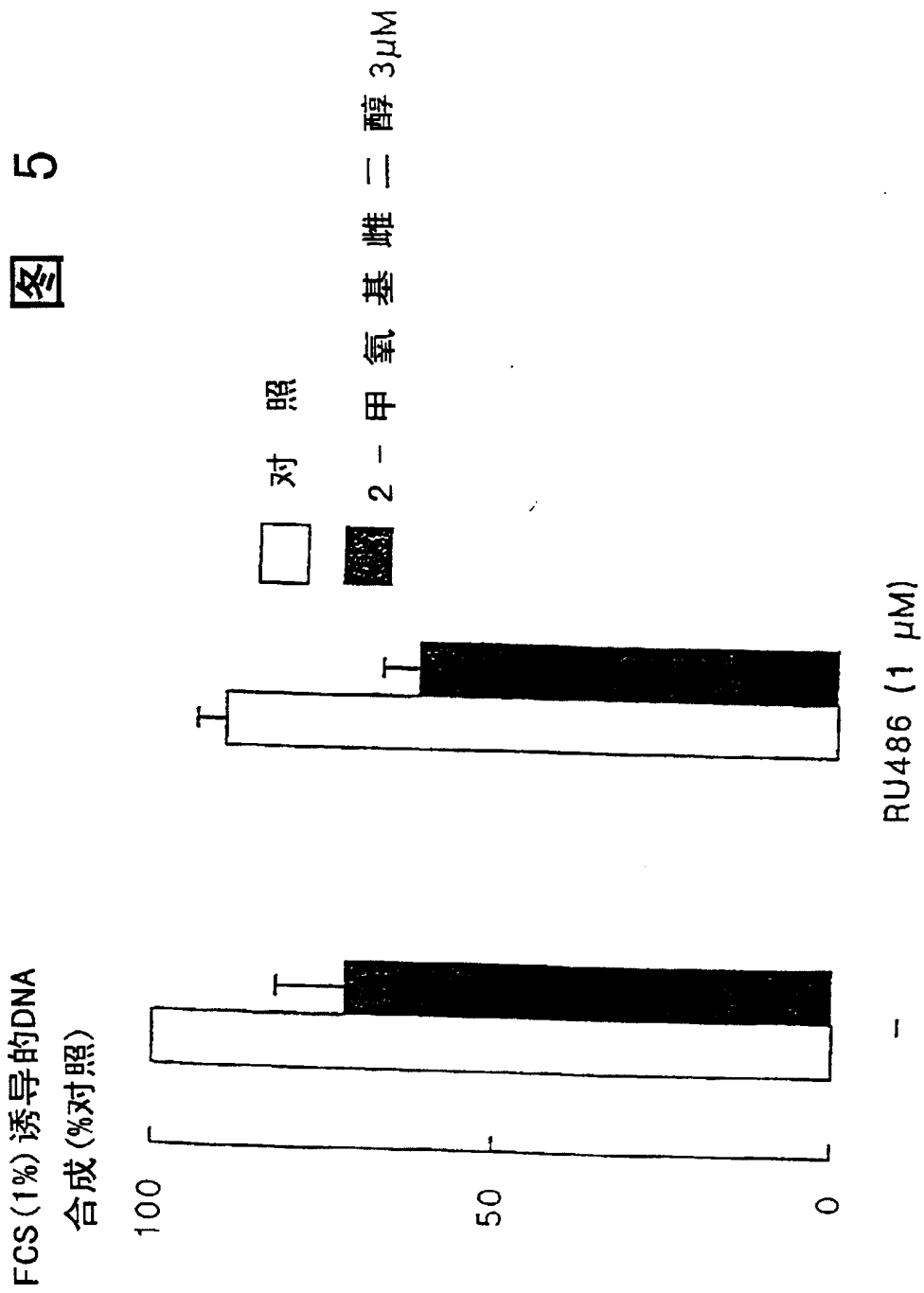


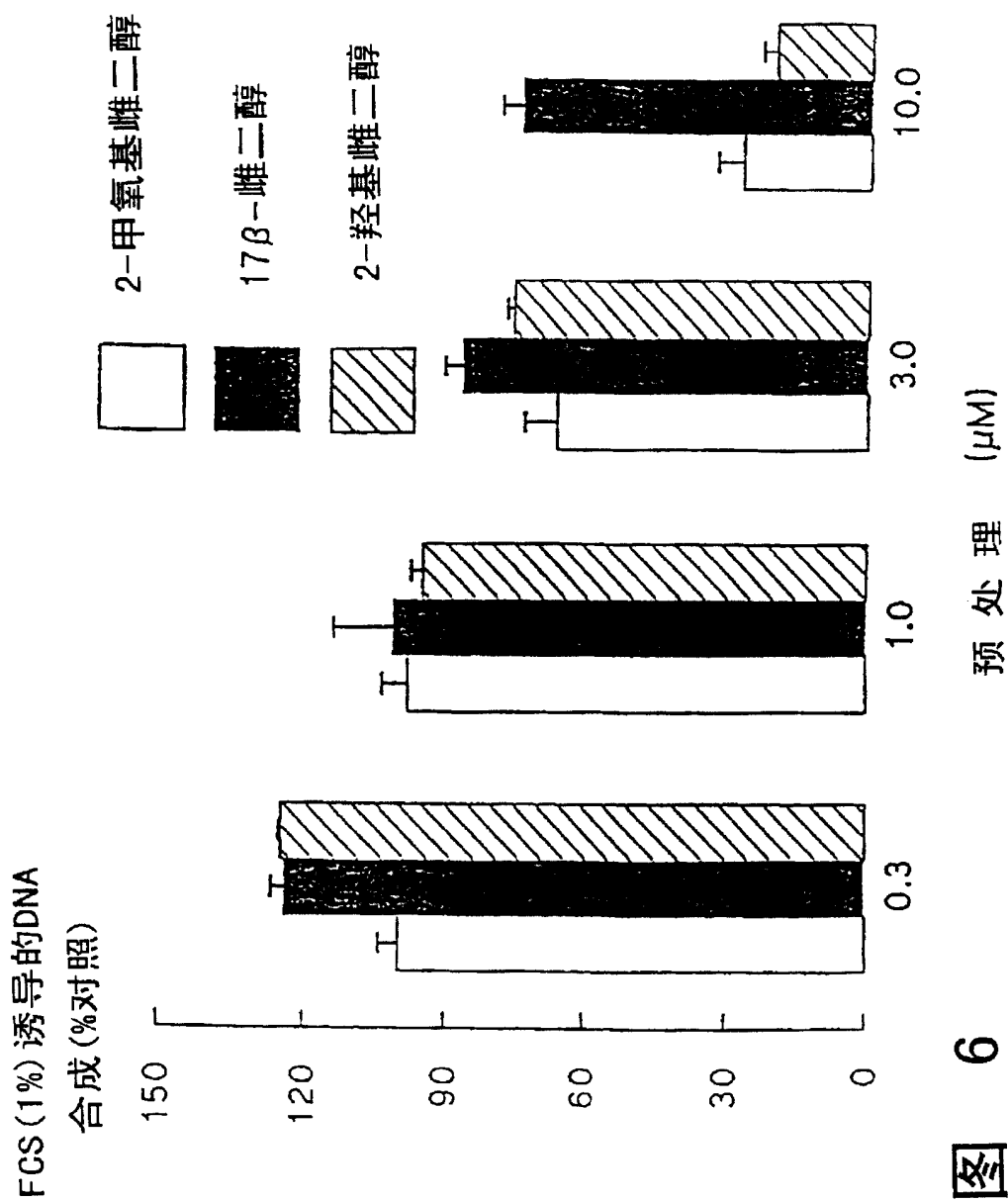
图 2d











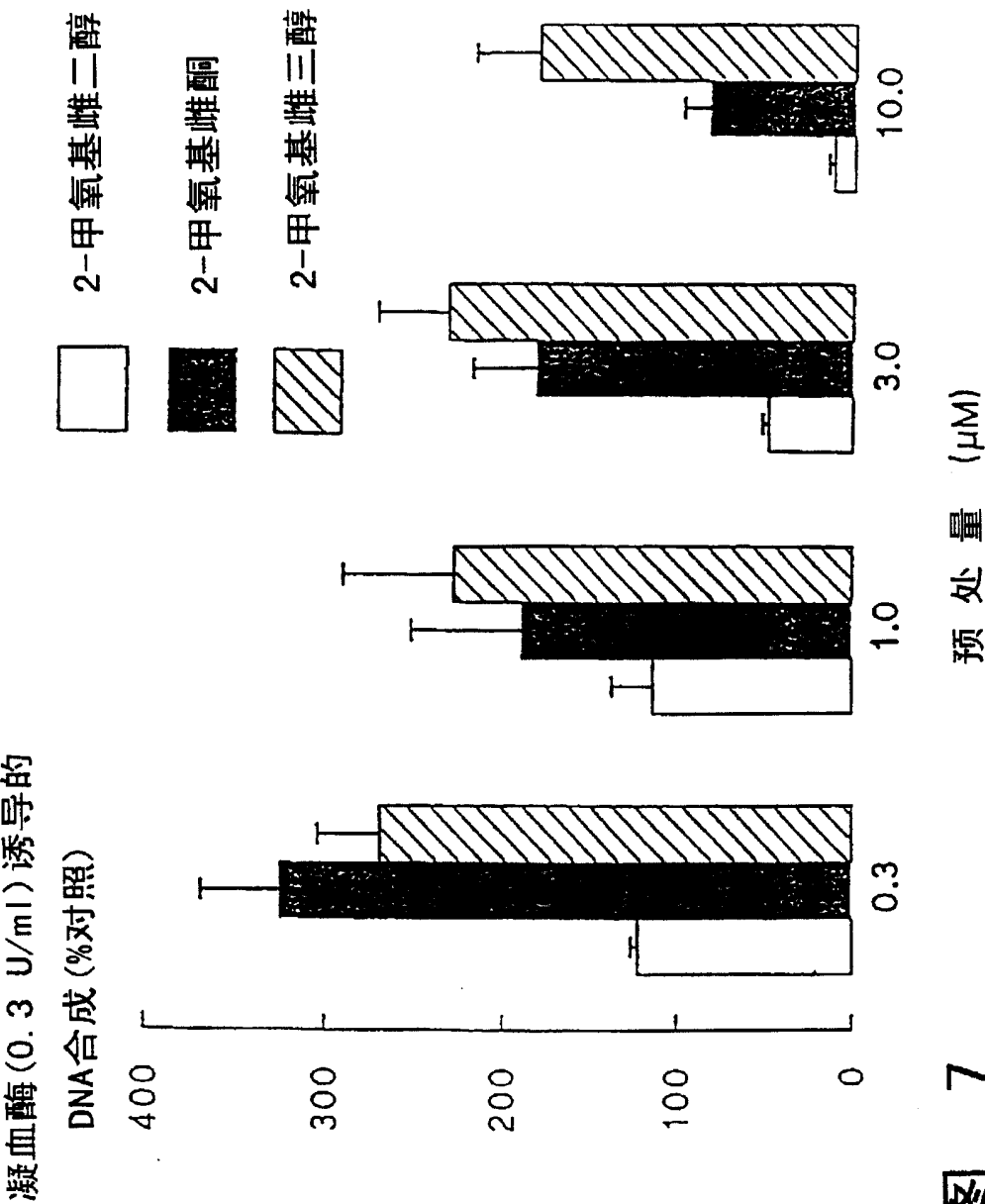


图 7

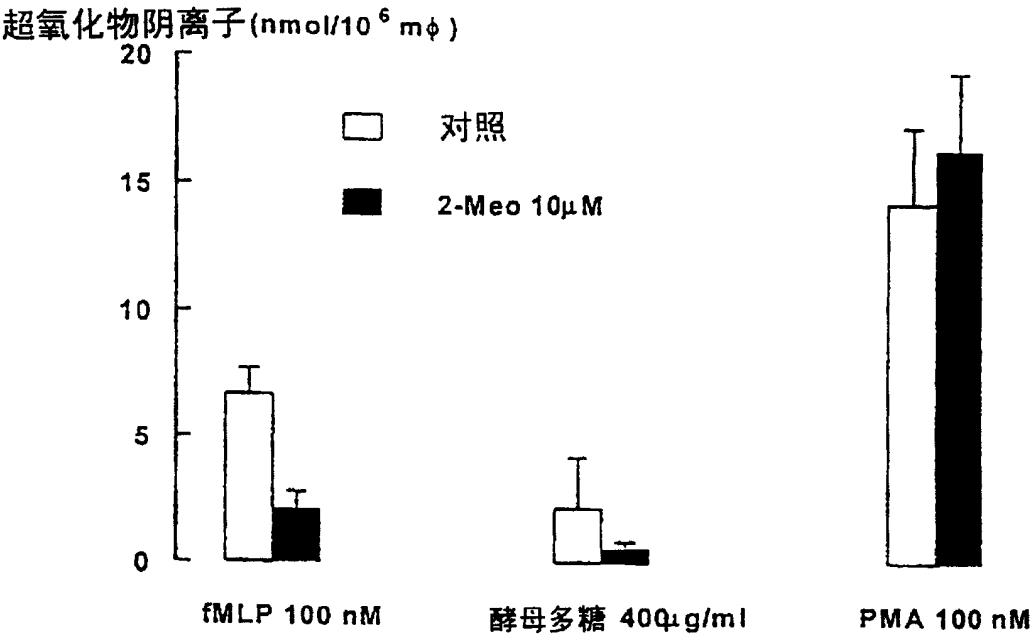


图 8

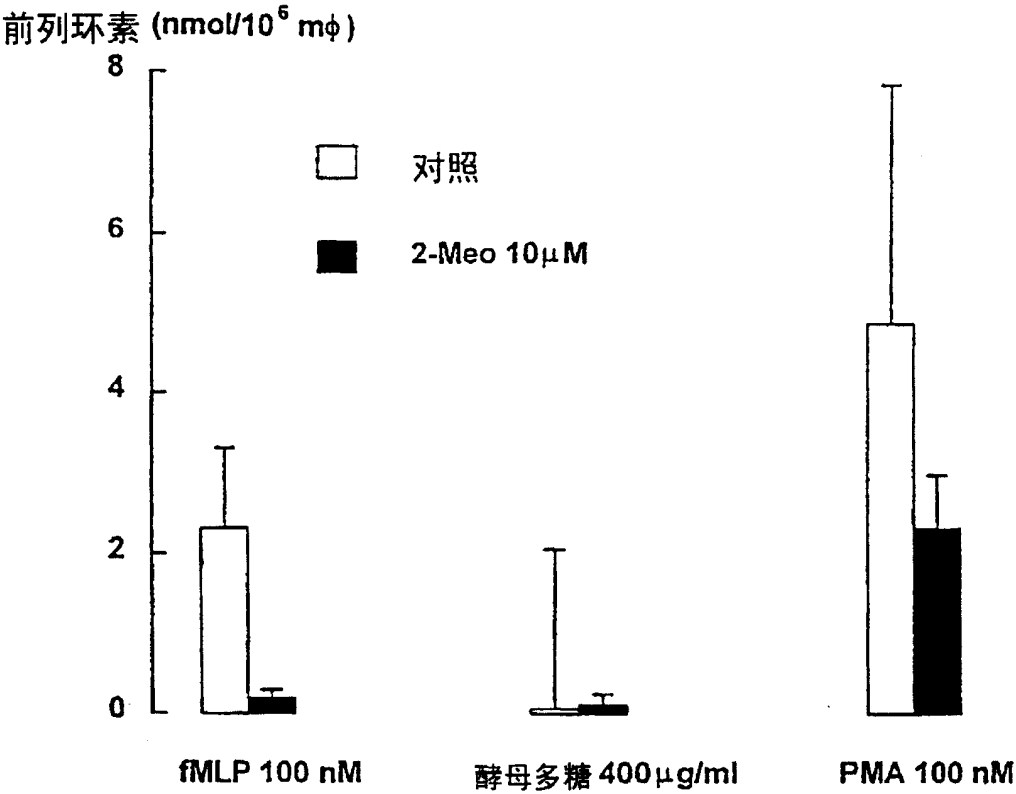


图 9

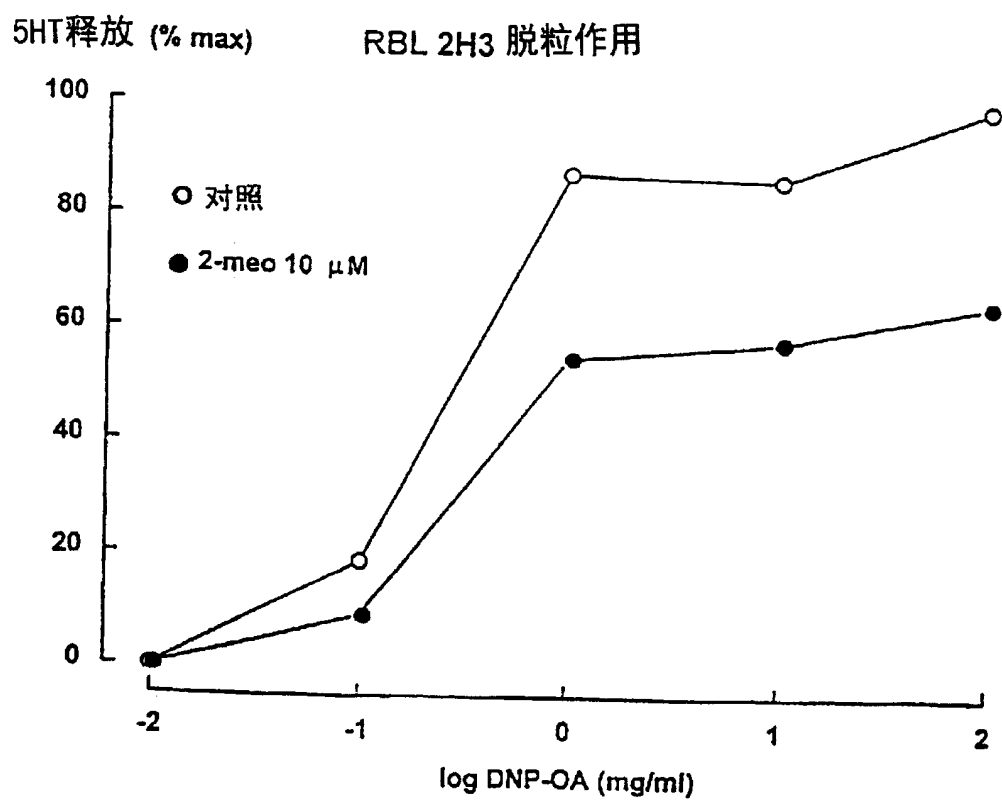


图 10

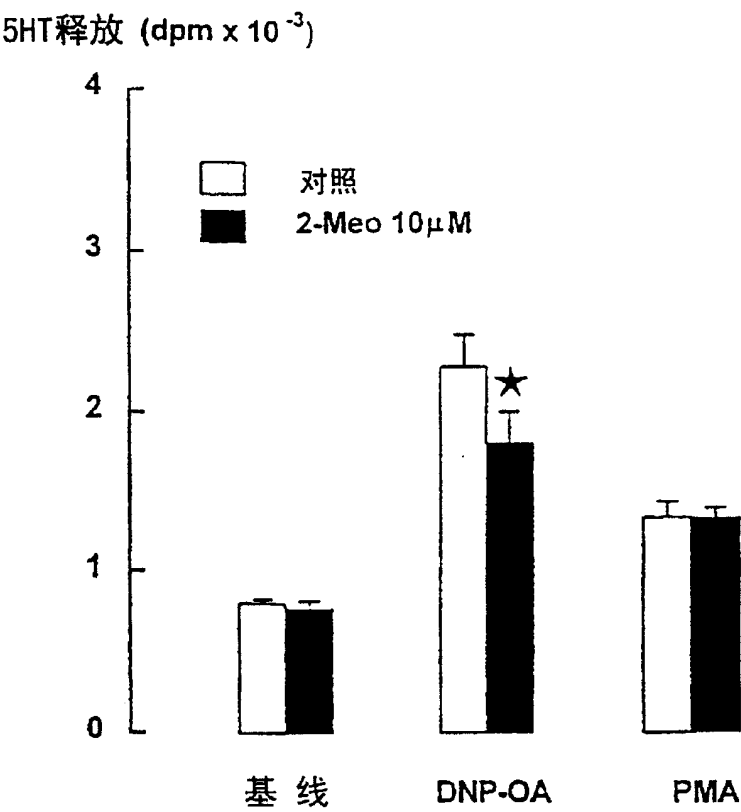


图 11