

# 新合成的7-氮杂异靛蓝的体内外抗肿瘤作用

李 香<sup>1</sup> 高 静<sup>1\*</sup> 徐晶晶<sup>1</sup> 李文赟<sup>2</sup> 王朝晖<sup>2</sup> 姚其正<sup>2</sup><sup>(1</sup>江苏大学药学院, 镇江 212013; <sup>2</sup>中国药科大学药学院, 南京 210009)

**摘要** 对新合成的7-氮杂靛玉红类衍生物 $N^1$ -(正-丁基)-7-氮杂异靛蓝[ $N^1$ -(*n*-butyl)-7-azaisoindigo, 7-AI-b]的体内外抗肿瘤作用的研究, 为研发具有自主知识产权的靛玉红类抗肿瘤新药打下基础。以不同浓度的7-AI-b作用于肿瘤细胞, MTT法检测细胞活性; 建立Heps肝癌荷瘤小鼠模型, 评价7-AI-b的体内抗肿瘤作用; 计算肝脏指数(liver index, LI)、胸腺指数(thymus index, TI)、脾脏指数(spleen index, SI), 评价化合物的毒副作用; 紫外法检测小鼠血清丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)的含量; HE染色观察肿瘤组织的变化; 试剂盒检测细胞周期激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)的活性。结果发现, 7-AI-b抑制肿瘤细胞增殖的 $IC_{50}$ 值为28~40  $\mu\text{mol/L}$ , 并以时间和剂量依赖性方式抑制A549细胞的增殖。7-AI-b对Heps肝癌具有抑制作用且抑瘤率达到61.85%, 与5-Fu的相近; 而7-AI-b对于小鼠的毒副作用明显小于后者, 表现为体重正常增长, TI、SI和LI均无明显降低; 等剂量的7-AI-b效果也明显优于靛玉红; 并且7-AI-b能增强荷瘤小鼠的抗氧化能力, 使得MDA水平降低, GSH水平升高。另外, 7-AI-b对于正常肝细胞株WRL-68和肝癌细胞HepG-2的毒性作用有明显差别, 即具有一定的肿瘤细胞选择性。然而, 7-AI-b对CDK2/cyclinA的抑制作用较弱。由此, 7-AI-b可有效地抑制肿瘤的生长, 且毒副作用较小, 其机制可能与抑制细胞周期激酶CDKs有关, 所以7-AI-b可以作为新型抗肿瘤药物进行研究。

**关键词** 靛玉红; 7-氮杂异靛蓝; 抗肿瘤; CDKs

## The Antitumor Effect of a Novel 7-azaisoindigo *in vitro* and *in vivo*

Li Xiang<sup>1</sup>, Gao Jing<sup>1\*</sup>, Xu Jingjing<sup>1</sup>, Li Wenyun<sup>2</sup>, Wang Chaohui<sup>2</sup>, Yao Qizheng<sup>2</sup><sup>(1</sup>School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;<sup>2</sup>School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract** The anticancer effect of a newly synthesized 7-azaisoindigo derivative (namely  $N^1$ -(*n*-butyl)-7-azaisoindigo, 7-AI-b) *in vitro* and *in vivo* were investigated, and the underlying mechanism of action was analyzed, which will be helpful for developing new anticancer agents with self-dominated intellectual property right. Cells proliferation was detected by MTT assay. The activity of 7-AI-b against human hepatoma carcinoma (Heps) xenografts was examined. The thymus index (TI), spleen index (SI) and liver index (LI) were calculated. The quantity of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) in the serum were measured by the MDA and GSH kits. HE staining was used to observe the tumor tissue. The activity of the cyclin-

收稿日期: 2012-11-13 接受日期: 2012-12-13

科技部“重大新药创新”项目(批准号: 2009ZX09103-149)和江苏省自然科学基金(批准号: BK2012710)资助的课题

\*通讯作者。Tel/Fax: 0511-88791552, E-mail: jinggao@ujs.edu.cn

Received: November 13, 2012 Accepted: December 13, 2012

This work was supported by the “Significant New Drug Innovation” (Grant No.2009ZX09103-149) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (Grant No.BK2012710)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-511-88791552, E-mail: jinggao@ujs.edu.cn

网络出版时间: 2013-03-04 16:11 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130304.1611.009.html

dependent kinases (CDKs) was measured by kit. It was found that the  $IC_{50}$  of 7-AI-b on different cells were between 28~40  $\mu\text{mol/L}$ . 7-AI-b exhibited significant inhibition on cancer cell proliferation, especially on A549 cell proliferation in a dose- and time-dependent way. The anticancer activity of 7-AI-b against human hepatoma carcinoma (Heps) xenografts was comparable to that of 5-Fu and superior to indirubin standard substance, which was reached to 61.85%. 7-AI-b caused no significant adverse effects showing that the body weight grew commonly, and the TI, SI and LI were not decreased significantly. Also, 7-AI-b could elevate the oxidation resistance of the tumor-bearing mice indicated by the quantity of MDA decrease and GSH increase. In addition, 7-AI-b showed significantly stronger cytotoxicity on cancer cells HepG-2 than normal cells WRL-68. However, it exerted low inhibited effect on the CDK2/cyclinD. These data suggest that 7-AI-b inhibits proliferation of human cancer cells *in vitro* and human hepatoma cancer xenograft *in vivo*. Also it has selective antitumor effects, and the mechanism may be related to inhibit the CDKs. So it would be a potential antitumor candidate.

**Key words** indirubin; 7-azaisoindigo derivative; anti-tumor; CDKs

近年来, 由中国30多年前自主开发的具有抗肿瘤作用的一类新药靛玉红(indirubin)及其衍生物受到国外医药界的高度重视。该化合物对慢性粒细胞白血病具有明显的抑制作用, 且具有临床疗效可靠、毒副作用小等特点, 是一个较有特点的抗癌药物<sup>[1]</sup>。现在, 国外公司已将靛玉红、靛青和靛蓝三种双吡啶化合物进行了较全面的修饰, 并极大范围地对结构和相应医药应用申请了专利保护<sup>[2]</sup>。本着“人无我有, 人有我优”的策略思想, 综合多方因素, 决定在不改变靛玉红优良结构型式的基础上合成全新的7-氮杂靛玉红, 并成功申请专利<sup>[3]</sup>。近年的查新结果表明, 7-氮杂靛玉红衍生物是国内外至今无人涉足的研究领域, 为形成该领域中我国新的知识产权提供了物质基础。

前期实验对新合成的 $N'$ -(正-丁基)-7-氮杂异靛蓝( $N'$ -(n-butyl)-7-azaisoindigo, 7-AI-b)的体外抗肿瘤活性以及机制进行了初步探索<sup>[4-5]</sup>。但是, 7-AI-b的体内抗肿瘤作用还不明确。故本实验主要研究了其体内抗肿瘤活性及简单机制, 为研发具有自主知识产权的靛玉红类抗肿瘤新药打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

7-AI-b(7-氮杂靛玉红衍生物中筛选得到, 纯度>98%)由中国药科大学姚其正教授合成; MTT购自Amresco公司; DMEM/MEM/1640培养基购自Gibco公司; 新生牛血清购自杭州四季青生物工程公司; 0.25%胰蛋白酶购自Amresco公司; 靛玉红标准品

(纯度>98%)购自中国药物生物制品检定所; 5-氟尿嘧啶购自江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 国药准字H32020857; 吐温80(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司; 丙二醛(MDA)测定试剂盒、谷胱甘肽(GSH)(除蛋白)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; CDK2/cyclinA Z'-LYTE试剂盒购自Invitrogen公司。

### 1.2 细胞株及培养

人肝癌细胞(HepG2)、宫颈癌细胞(HeLa)、食管癌细胞(Eca109)和非小细胞肺癌细胞(A549)由南京大学徐力致老师惠赠。分别用含10%小牛血清(杭州四季青生物工程公司)MEM(Gibco)培养液, 10%胎牛血清(杭州四季青生物工程公司), DMEM(Gibco)培养液, 10%胎牛血清DMEM培养液, 10%小牛血清RPMI1640(Gibco)培养液在37 °C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中培养。

### 1.3 MTT法检测细胞活力

取对数生长期细胞(HepG2、HeLa、Eca109、A549), 消化、计数, 以 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于96孔培养板中, 每孔100  $\mu\text{L}$ 。培养24 h后, 以不同浓度化合物处理肿瘤细胞。实验组每个浓度设5个复孔, 以含0.4% DMSO的培养液作对照。药物作用48 h后, 去上清, 每孔加入100  $\mu\text{L}$  MTT(1 mg/mL), 继续培养4 h, 弃上清, 每孔加入100  $\mu\text{L}$  DMSO, 振荡混匀, 用酶标仪在570 nm处测定吸光度值。计算抑制率。计算公式: 抑制率(%)=(1-给药组吸光度值/对照组吸光度值)×100%。采用 $IC_{50}$ 计算软件(中国药科大学)求出半数抑制浓度( $IC_{50}$ )。

表1 7-AI-b对抗Heps实体瘤的实验设计  
Table 1 The design of 7-AI-b against Heps solid tumor

组别 Groups	数量 Quantities	给药方式及剂量 Mode and dose of administration	时间(天) Time(d)
Normal	7		10
Control(Solvent N.S)	7	Ig 0.4 mL	10
5-Fu	7	Ip 0.2 mL(25 mg/kg)	10
Indirubin	7	Ig 0.4 mL(30 mg/kg)	10
7-AI-b-1	7	Ig 0.4 mL(30 mg/kg)	10
7-AI-b-2	7	Ig 0.4 mL(60 mg/kg)	10

#### 1.4 实验动物及喂养

ICR小鼠(雌性), 18~22 g, 均购自扬州大学比较医学中心, 合格证号: SCXK(苏)2002-0009。肝癌(Heps)小鼠源自江苏省肿瘤医院。小鼠分笼饲养在温度27℃左右、湿度55%~65%的层流柜中, 自由饮水摄食, 并保证每天换垫料一次, 昼夜循环。

#### 1.5 接瘤

随机将42只小鼠分成6组, 每组7只(表1)。Heps腹水瘤株在腹水瘤模型鼠腹腔内培养13天(两代)后, 将腹水瘤模型鼠处死, 处死后浸泡75%乙醇5 min, 腹腔穿刺取腹水瘤模型鼠的腹水, 生理盐水稀释细胞浓度达 $2 \times 10^7$  mL, 无菌条件下, 取0.2 mL/只( $4 \times 10^6$ /只)Heps瘤细胞悬液接种于35只ICR小鼠腋下。接种后第二天开始给药, 每天一次, 给药10天, 每天观察小鼠的生活、生长情况: 体重变化、饮食变化、活动度以及肿瘤大小等情况。

#### 1.6 制备样本, 计算抑瘤率

按表1中的给药方法进行实验。给药10天后称重, 小鼠眼底静脉丛取血, 然后颈椎脱臼处死小鼠后, 剥离肿瘤。取小鼠肝脏、脾脏、胸腺并称重。将每组小鼠剥离肿瘤并冲洗干净, 滤纸吸干, 称重, 计算平均瘤重、抑瘤率。抑瘤率(%) = [(对照组平均瘤重 - 给药组平均瘤重) / 对照组平均瘤重] × 100%。

#### 1.7 检测毒性指标

对各组小鼠免疫功能以及药物毒性进行各方面检测。小鼠器官重量: 肝脏、胸腺和脾脏, 称重计算: (1) 肝脏指数(liver index, LI) = 肝脏重量(g) / 体重(g); (2) 胸腺指数(thymus index, SI) = 胸腺重量(g) / 体重(g); (3) 脾脏指数(spleen index, SI) = 脾脏重量(g) / 体重(g)。

#### 1.8 氧化还原指标的测定

小鼠血清MDA和GSH(除蛋白)测定, 实验步骤

严格按照MDA测定试剂盒和GSH(除蛋白)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所提供)说明书进行。

#### 1.9 小鼠肿瘤切片观察

中性福尔马林溶液固定瘤块, 石蜡包埋、切片、HE染色, 显微镜下观察。

#### 1.10 MTT法检测细胞活力评价7-AI-b的选择性抗肿瘤作用

取对数生长期细胞(HepG2、WRL-68), 消化、计数, 以 $2 \times 10^4$  / mL的密度接种于96孔培养板中, 每孔100  $\mu$ L。培养24 h后, 以不同浓度化合物处理细胞。实验组每个浓度设5个复孔, 以含0.4% DMSO的培养液作对照。MTT法检测细胞活力并计算抑制率(具体方法见1.3)。

#### 1.11 7-AI-b对细胞周期激酶(cyclin-dependent kinases, CDK)抑制作用的测定

A549细胞以100/孔的密度接入384孔黑板, 20  $\mu$ mol/L 7-AI-b及阳性对照药物甲异靛处理1 h后测定。具体实验方法见CDK-2/cyclinA, Z'-LYTE测定试剂盒(美国Invitrogen)说明书。

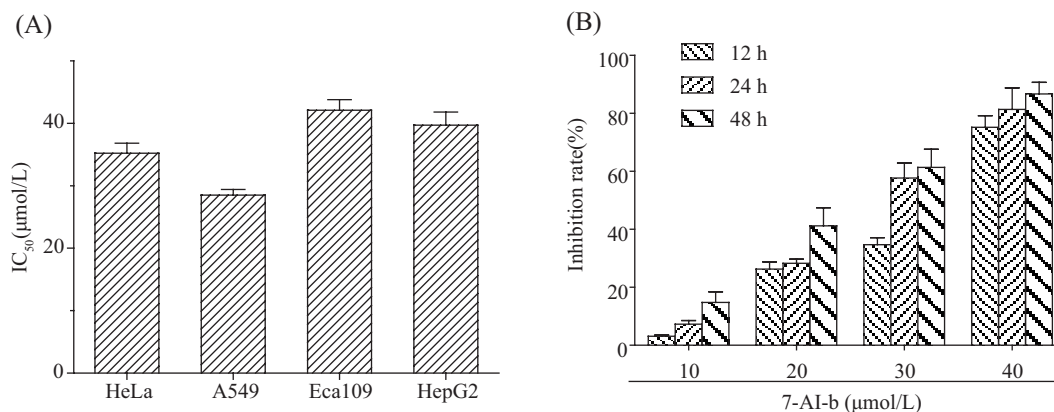
#### 1.12 统计学方法

采用SAS统计软件, ANOVA方差分析, 组间比较采用 $q$ 检验, 数据以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )或标准误( $\bar{x} \pm SEM$ )表示,  $P < 0.05$ 为差异具有显著性。各实验至少重复3次。

## 2 结果

### 2.1 7-AI-b抑制肿瘤细胞增殖

从图1A可以看出, 化合物对不同肿瘤细胞的作用效果不同, 7-AI-b对A549细胞作用最敏感,  $IC_{50}$ 值最低, 为28.5  $\mu$ mol/L。以不同浓度的7-AI-b分别作用于A549细胞6, 12, 24, 48 h, 结果如图1B, 化合物以

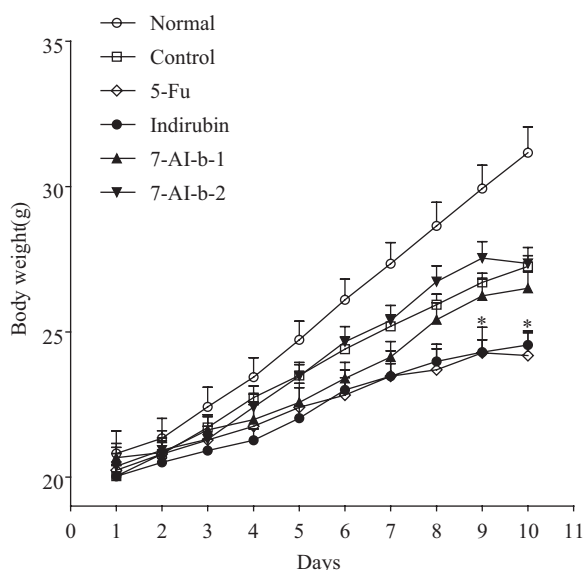


A: 7-AI-b对HeLa、A549、Eca109和HepG2细胞的抑制作用; B: A549以 $4 \times 10^3$ 孔接入96孔板, 7-AI-b(0~40  $\mu\text{mol/L}$ )处理细胞。MTT法检测特定处理后时间细胞的活性。  $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ,  $n=5$ 。

A: the inhibitory effect of 7-AI-b on HeLa, A549, Eca109 and HepG2 cells; B: A549 cells at  $4 \times 10^3$  cells/well were exposed to 7-AI-b (0~40  $\mu\text{mol/L}$ ) in 1640 media in a 96-well plate. Cell proliferation was determined by MTT assay for indicated hours.  $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ,  $n=5$ 。

图1 7-AI-b抑制不同肿瘤细胞株的增殖

Fig.1 7-AI-b inhibits the viabilities of various tumor cell lines



Normal: 正常组; Control: 溶剂对照; 5-Fu: 25 mg/kg 5-Fu; Indirubin: 30 mg/kg 靛玉红; 7-AI-b-1: 30 mg/kg 7-AI-b; 7-AI-b-2: 60 mg/kg 7-AI-b.  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n=7$ ,  $*P < 0.05$ , 与对照组进行比较。

Normal: normal group; Control: solvent control; 5-Fu: 25 mg/kg 5-Fu; indirubin: 30 mg/kg Indirubin; 7-AI-b-1: 30 mg/kg 7-AI-b; 7-AI-b-2: 60 mg/kg 7-AI-b.  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n=7$ ,  $*P < 0.05$  vs control.

图2 7-AI-b对荷瘤小鼠体重的影响

Fig.2 Effects of 7-AI-b on tumor mouse body weight

时间、剂量依赖性抑制A549细胞增殖, 在最高浓度40  $\mu\text{mol/L}$ 时, 抑制率达到90%。

## 2.2 7-AI-b对荷瘤小鼠体重的影响

首先, 分析给药过程中小鼠体重变化的情况, 由图2可见, 正常组小鼠的平均体重从20.6 g增长至31.7 g, 体重增加了10.9 g左右; 对照组的小鼠的平均

体重从20.5 g增长至26.8 g, 体重增加了6.3 g; 5-Fu组小鼠平均体重增长趋势最弱, 仅增长了3.5 g; 其中, 7-AI-b(60 mg/kg)组小鼠平均体重在给药组中增长趋势最强, 达到7 g, 超过了正常组; 靛玉红(30 mg/kg)组增重只有4 g。

## 2.3 7-AI-b对小鼠Heps实体瘤的抑制作用

分析各组肿瘤生长的情况(图3), 对照组平均瘤重为1.6 g; 阳性对照药5-Fu组小鼠平均瘤重为0.48 g, 7-AI-b(30 mg/kg)给药组小鼠瘤重为0.58 g, 与对照组相比明显下降。各个给药组的抑瘤率结果显示, 7-AI-b(30 mg/kg)组抑瘤率为61.8%, 接近于5-Fu组的68%, 表明7-AI-b具有良好的抗肿瘤作用。7-AI-b(60 mg/kg)组与7-AI-b(30 mg/kg)组无明显差异, 可能30 mg/kg已达到最适剂量(表2)。

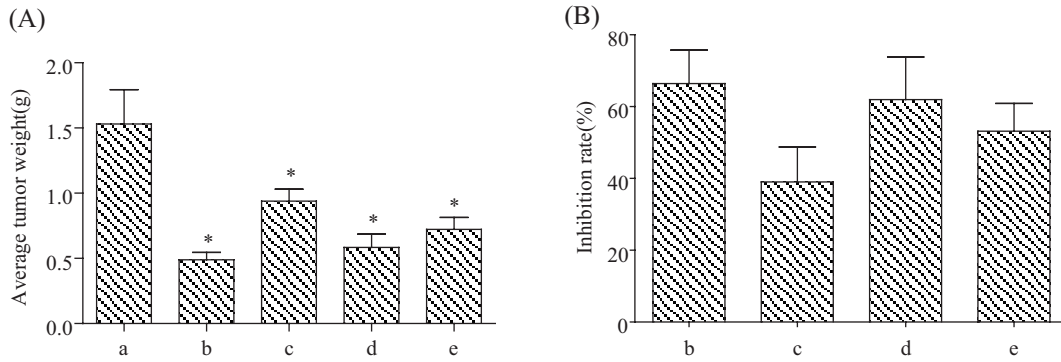
## 2.4 7-AI-b对荷瘤小鼠各脏器的影响

进一步分析7-AI-b给药组对小鼠免疫器官的影响, 结果发现, 与溶剂对照组相比, 5-Fu对小鼠的SI和TI有显著的抑制作用, 具有较严重的免疫抑制毒性; 靛玉红组TI有轻微的下降, 而7-AI-b组TI无明显变化, 说明它没有明显的免疫抑制毒性(图4)。

分析7-AI-b对小鼠肝脏的影响, 发现与溶剂对照组相比, 5-Fu组LI明显下降; 靛玉红及其7-AI-b对小鼠肝脏无明显影响。

## 2.5 7-AI-b对小鼠血清氧化还原指标的影响

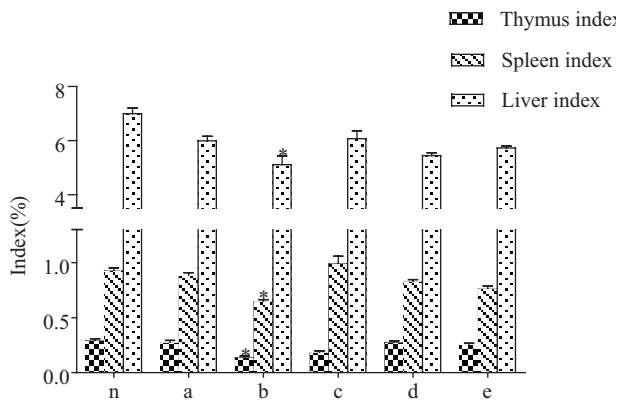
由图5可知, 与溶剂对照组相比, 5-Fu组小鼠血清中MDA含量显著升高, 说明小鼠体内有氧化损伤;



A: 对肿瘤重量的影响; B: 抑瘤率。a: 溶剂对照; b: 25 mg/kg 5-Fu; c: 30 mg/kg indirubin; d: 30 mg/kg 7-AI-b; e: 60 mg/kg 7-AI-b。  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n=7$ , \* $P < 0.05$ , 与对照组比较。

A: effect on tumor weight; B: inhibition rate of tumor. a: control; b: 25 mg/kg 5-Fu; c: 30 mg/kg indirubin; d: 30 mg/kg 7-AI-b; e: 60 mg/kg 7-AI-b.  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n=7$ , \* $P < 0.05$  vs control.

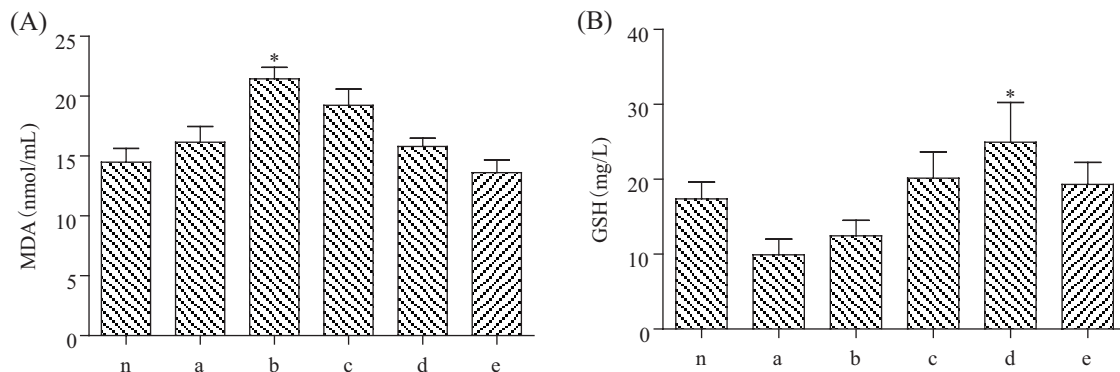
图3 7-AI-b的抗肿瘤作用  
Fig.3 Antitumor effects of 7-AI-b



n: 正常组; a: 溶剂对照; b: 25 mg/kg 5-Fu; c: 30 mg/kg 靛玉红; d: 30 mg/kg 7-AI-b; e: 60 mg/kg 7-AI-b。 \* $P < 0.05$ , 与对照组比较。

n: normal; a: control; b: 25 mg/kg 5-Fu; c: 30 mg/kg indirubin; d: 30 mg/kg 7-AI-b; e: 60 mg/kg 7-AI-b.  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n=7$ , \* $P < 0.05$  vs control.

图4 7-AI-b对小鼠脏器指数的影响  
Fig.4 Effects of 7-AI-b on mice organ index



A: MDA; B: GSH. n: 正常组; a: 溶剂对照; b: 25 mg/kg 5-Fu; c: 30 mg/kg 靛玉红; d: 30 mg/kg 7-AI-b; e: 60 mg/kg 7-AI-b。  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n=7$ , \* $P < 0.05$ , 与对照组比较。

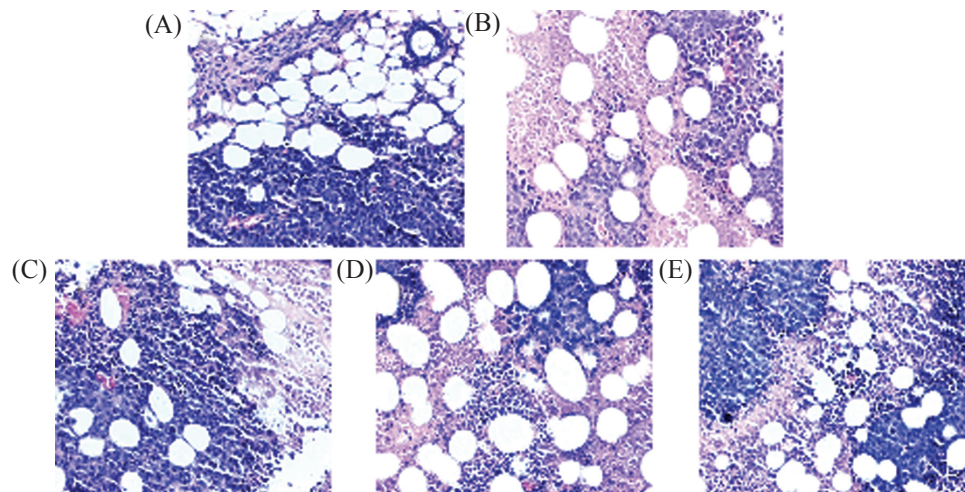
A: MDA; B: GSH. n: normal; a: control; b: 25 mg/kg 5-Fu; c: 30 mg/kg indirubin; d: 30 mg/kg 7-AI-b; e: 60 mg/kg 7-AI-b.  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n=7$ , \* $P < 0.05$  vs control.

图5 7-AI-b对血清中MDA和GSH含量的影响  
Fig.5 Effects of 7-AI-b on blood serum MDA and GSH levels

靛玉红及7-AI-b组没有明显差异, 但有下降趋势。仅低浓度给药组小鼠血清中GSH含量与对照组相比显著升高, 反映7-AI-b使小鼠机体抗氧化能力升高; 其余组与对照组相比虽未有显著性差异, 但有升高的趋势。

## 2.6 7-AI-b对小鼠肿瘤组织的影响

在荷瘤对照组中瘤细胞生长旺盛, 呈多边形, 大小不等, 排列紧密, 胞核大, 染色质呈深蓝色, 核分裂象多见, 瘤组织呈浸润性生长, 大量浸润至肌肉组织; 5-Fu组, 瘤细胞排列稀疏, 可见片状坏死区, 细胞结构严重受损, 核固缩、破碎、溶解、坏死较多见, 胞质边界不明显, 亦见瘤细胞向周围肌肉组织浸润; 靛玉红组, 瘤组织边缘的瘤细胞有少量坏死, 镜下可见大小不一坏死灶, 出现核固缩、核碎裂, 并伴有炎



A: 溶剂对照; B: 25 mg/kg 5-Fu; C: 30 mg/kg 靛玉红; D: 30 mg/kg 7-AI-b; E: 60 mg/kg 7-AI-b。

A: control; B: 25 mg/kg 5-Fu; C: 30 mg/kg indirubin; D: 30 mg/kg 7-AI-b; E: 60 mg/kg 7-AI-b。

图6 7-AI-b对肿瘤组织的影响(HE染色, 200×)

Fig.6 Effects of 7-AI-b on tumor sections(HE staining, 200×)

性细胞浸润; 7-AI-b组, 瘤组织内均出现大面积坏死区, 且坏死区呈网络状, 部分肿瘤细胞发生核碎裂、核溶解(图6)。

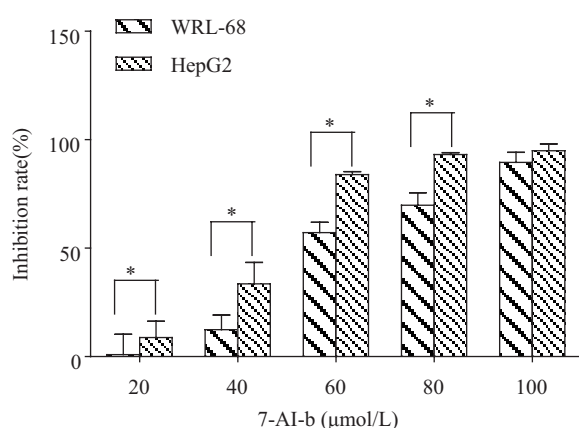
### 2.7 7-AI-b的选择性抗肿瘤作用

7-AI-b对于正常肝细胞WRL-68的毒性作用明显小于肝癌HepG-2细胞, 提示7-AI-b具有一定的肿瘤选择性。结果显示, 虽然100  $\mu\text{mol/L}$ 的7-AI-b对于HepG2和WRL-68的抑制率都达到100%左右, 但是

在低浓度(20~80  $\mu\text{mol/L}$ )时, 7-AI-b对于WRL-68细胞的抑制率明显小于对HepG2细胞的抑制率(图7)。

### 2.8 7-AI-b对CDK2/cyclinA的抑制作用

对7-AI-b及阳性药甲异靛(methylisoidigo)进行CDK2/cyclinA活性测试, 结果显示, 甲异靛对CDK2/cyclinA的抑制率为66.4% $\pm$ 1.4%, 而化合物7-AI-b对CDK2/cyclinA的抑制率仅有12.2% $\pm$ 2.0%。7-AI-b对CDK2/cyclinA的抑制作用不大。



用不同浓度的7-AI-b分别作用于HepG2和WRL-68细胞, MTT法检测细胞活性。  $\bar{x}\pm\text{S.D.}$ ,  $n=5$ , \* $P<0.05$ 。

HepG2 cells and WRL-68 cells were treated by different concentration of 7-AI-b.  $\bar{x}\pm\text{S.D.}$ ,  $n=5$ , \* $P<0.05$ 。

图7 7-AI-b抑制HepG2和WRL-68细胞的增殖

Fig.7 Proliferation inhibition of 7-AI-b on HepG2 cells and WRL-68 cells

## 3 讨论

靛玉红是我国传统的抗肿瘤药, 且临床上表现出很好的抗肿瘤活性, 故引起了国内外很多学者的关注<sup>[2]</sup>。相对于传统靛玉红, 新化合物的溶解性要好很多<sup>[3]</sup>。

在先前的研究中, 我们发现7-AI-b在体外可以显著抑制肿瘤细胞的增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡和自噬, 引起肿瘤细胞线粒体损伤<sup>[4-5]</sup>。有研究表明, 靛玉红类衍生物也可作为细胞周期因子CDKs的抑制剂, 使肿瘤细胞阻滞于G<sub>2</sub>/M期或G<sub>1</sub>期<sup>[7]</sup>, 如3'-靛玉红肟(indirubin-3'-monoxime)作用于HBL-100细胞后使细胞阻滞于G<sub>2</sub>/M期, 作用于MCF-7细胞后使细胞阻滞于G<sub>1</sub>期<sup>[8]</sup>。5'-硝基靛玉红肟(5'-nitro-indirubinoxime)既能够诱导人KB细胞G<sub>2</sub>/M期阻滞, 又能诱导线粒体依赖性凋亡<sup>[9]</sup>。

本文则主要从整体的角度观察了7-AI-b作用于

Heps实体瘤小鼠的抑瘤作用,发现其抑瘤率高于“抗癌药体内药效试验规程”的标准<sup>[10]</sup>,且无明显的毒副作用。临床上,肿瘤患者均存在免疫缺陷,常规化疗药物多为细胞毒性药物,在杀伤瘤细胞同时也损害机体免疫监视系统的功能,需要通过应用一些增强免疫功能的药物来使肿瘤消退或延缓其发展。胸腺和脾脏为机体的主要免疫器官,可作为观察药物对免疫系统影响的指标。杜德极等<sup>[11]</sup>对荷瓦克瘤(W256)大鼠的肿瘤、肝、脾组织进行核酸含量的测定,提示靛玉红在抑制肿瘤生长的情况下,并不影响核酸的含量。籍秀娟等<sup>[12]</sup>以同样瘤株进行实验,支持此观点。

本研究中,5-Fu组荷瘤小鼠胸腺萎缩,脾指数下降,对免疫系统有较强的副作用,而7-AI-b能增加荷瘤小鼠免疫器官重量,提高其TI和SI,证明7-AI-b不仅是有效的肿瘤抑制剂,而且对免疫系统没有明显抑制作用。我们还系统考察了7-AI-b对Heps实体瘤小鼠血的抗氧化指标以及肝毒性。发现5-Fu组荷瘤小鼠血清中GSH水平降低,5-Fu使得小鼠机体内脂质过氧化程度升高,说明细胞损伤严重;而7-AI-b组小鼠血清中GSH含量与对照组相比,高且有显著性差异,反映7-AI-b使小鼠机体抗氧化能力升高。综上所述,7-AI-b对Heps实体瘤具有明显的抑瘤作用,并且没有出现化疗药常见的副作用。

由于其副作用较小,我们将其作用于WRL-68和HepG2细胞检测其活性,证实7-AI-b对于肿瘤细胞有一定的选择性作用。由于肿瘤细胞具有无限增殖的特点,所以CDKs在肿瘤细胞中高表达<sup>[13]</sup>。因此,7-AI-b的选择性可能与抑制CDKs的活性有关。但实验表明,7-AI-b对CDK2/cyclinA的抑制作用并不大,故其有较强的抗肿瘤作用且有一定的选择性,可能与抑制其他CDKs的活性有关。

据文献报道,靛玉红对各系骨髓造血细胞无抑制作用<sup>[2]</sup>,故靛玉红及其衍生物将成为肿瘤治疗领域内的新一代具有更新作用机制的抗肿瘤药物。本实验探索了新合成靛玉红衍生物的体内外抗肿瘤作用及部分机制,发现其抗肿瘤效果较好,副作用较小,为7-AI-b应用于临床癌症的治疗提供一定的实验依据,为研发具有我国自主知识产权的靛玉红类抗肿瘤新药积累了实验数据。

## 参考文献 (References)

- 1 Biseqna PG, Caruso G, Andreucci D, Shen L, Gurevich W, Hamm HE, *et al.* Diffusion of the second messengers in the cytoplasm acts as a variability suppressor of the single photon response in vertebrate phototransduction. *Biophys J* 2008; 94(9): 3363-83.
- 2 Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, Nobel ME, Lawrie A, Tunnah P, *et al.* Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* 1999; 1(1): 60-7.
- 3 Wang ZH, Li WY, Li FL, Zhang L, Hua WY, Cheng JC, *et al.* Synthesis and antitumor activity of 7-azaindirubin. *Chin Chem Lett* 2009; 20(5): 542-4.
- 4 Xu JJ, Dai XM, Liu HL, Guo WJ, Gao J, Wang CH, *et al.* A novel 7-azaisoindigo derivative-induced cancer cell apoptosis and mitochondrial dysfunction mediated by oxidative stress. *J Appl Toxicol*, 2011, 31: 164-72.
- 5 徐晶晶, 高静, 戴小敏, 李静, 李文赞, 王朝晖, 等. 新合成的7-氮杂异靛蓝抑制A549细胞增殖的作用及可能机制. *中国细胞生物学学报*(Xu Jingjing, Gao Jing, Dai Xiaomin, Li Jing, Li Wenyun, Wang Chaohui, *et al.* The inhibitory effect and possible mechanism of a novel 7-azaisoindigo on proliferation of A549 cells. *Chineses Journal of Cell Biology*) 2010; 32(2): 205-9.
- 6 Nagaraj NS, Vigneswaran N, Zacharias W. Hypoxia inhibits TRAIL-induced tumor cell apoptosis: Involvement of lysosomal cathepsins. *Apoptosis* 2007; 12(1): 125-39.
- 7 Marko D, Schatzle S, Friedel A, Genzlinger A, Zankl H, Meijer L, *et al.* Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. *Brit J Cancer* 2001; 84(2): 283-9.
- 8 Xiao ZJ, Hao YS, Liu BC, Qian LS. Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China. *Leuk Lymphoma* 2002; 43(9): 1763-8.
- 9 Kim SA, Kim SW, Chang S, Yoon JH, Ahn SG. 5'-nitroindirubinoxime induces G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest and apoptosis in human KB oral carcinoma cells. *Cancer Lett* 2009; 274(1): 72-7.
- 10 金亚宏, 王意忠, 苏丹. Mc002对a-549、Ht-1080荷瘤小鼠肿瘤生长抑制作用的研究. *中国药理学通报*(Jin Yahong, Wang Yizhong, Su Dan. Anti-tumor activity of Mc002 on mice with transplanted human A549 and HT-1080. *Chin Pharmacol Bull*) 2008; 24(9): 1196-9.
- 11 杜德极, 曾庆田, 杨世兰. 靛玉红抗癌作用原理的探讨. *中草药研究资料*(Du Deji, Zeng Qingtian, Yang Shilan. Investigation the principle of anti-cancer effect of Indirubin. *Chinese Herbal Medicine Research Data*) 1979; 17: 43-8.
- 12 籍秀娟, 张福荣. 靛玉红类化合物的抗肿瘤作用及构效关系的研究. *药学报*(Ji Xiujuan, Zhang Furong. Studies on antineoplastic action of indirubin derivatives and analogues and their structure-activity relationships. *Acta Pharm Sin*) 1985; 20(2): 137-9.
- 13 Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(8): 558-72.