



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101199534 B

(45) 授权公告日 2011.04.20

(21) 申请号 200610147363.3

(22) 申请日 2006.12.15

(73) 专利权人 中国科学院上海生命科学研究院
地址 200031 上海市徐汇区岳阳路 320 号

(72) 发明人 赵余庆 张瑞稳 王伟 韩凌
王慧 孙宝山

(74) 专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限公司 31204

代理人 肖剑南

(51) Int. Cl.

A61K 31/575(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 1/18(2006.01)

A61P 11/00(2006.01)

A61P 13/08(2006.01)

A61P 15/14(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1418633 A, 2003.05.21, 摘要.

马晓宁, 柴瑞华, 赵余庆. 西洋参茎叶皂苷

水解产物中稀有抗肿瘤成分的化学研究. 《中草药》. 2008, 第 39 卷 (第 9 期), 1291-1294.

赵余庆 等. 人参茎叶中微量三萜化合物的化学研究. 《药学学报》. 1990, 第 25 卷 (第 4 期), 297-300.

Wei Junxian et.al..Zwei neue Dammaran-Sapogenine aus den Blättern vonPanax notoginseng. 《Planta medica》. 1982, 第 45 卷 167-171.

李杰 综述;宋淑霞,吕占军 审阅. 人参皂苷抗肿瘤作用的研究. 《中国肿瘤生物治疗杂志》. 2004, 第 11 卷 (第 1 期), 61-63.

审查员 李林

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 7 页

(54) 发明名称

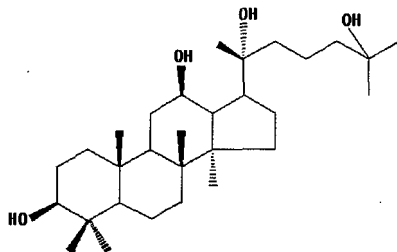
一种原人参二醇衍生物的抗肿瘤用途

(57) 摘要

本发明公布了一种原人参二醇衍生物化合物 25hdt, 即 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3β, 12β, 20-三醇, 在制备抗癌症药物。该化合物 25hdt 具有优于 PPD、人参皂苷-Rg3 和 Rh2 的对人体外肿瘤细胞系的抑制效果, 同时, 25hdt 对人体肿瘤细胞具有抑制调控、诱导凋亡、抑制增殖作用, 且 25hdt 对人肿瘤细胞具有特异性抑制生长作用, 使用 25hdt 治疗癌症, 没有导致实验动物体重明显的变化, 也没有任何的毒性作用, 和其他化疗方法或放疗方法同时配合治疗癌症, 更能提高治疗效果。

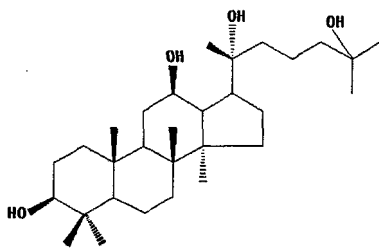
CN 101199534 B

1. 具有结构式为



的原人参二醇衍生物化合物 25hdt、即 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β , 12 β , 20-三醇的应用, 其特征在于, 用于制备治疗癌症的药物。

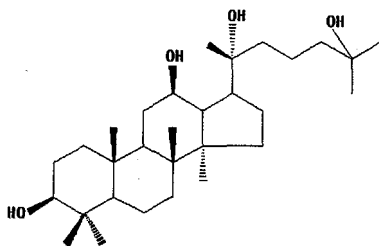
2. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 所述癌症为前列腺癌。
3. 如权利要求 2 所述的应用, 其特征在于, 用于制备抑制前列腺癌细胞生长的药物。
4. 如权利要求 2 所述的应用, 其特征在于, 用于制备特异性抑制前列腺癌细胞生长的药物。
5. 如权利要求 2 所述的应用, 其特征在于, 用于制备诱导前列腺癌细胞凋亡的药物。
6. 如权利要求 2 所述的应用, 其特征在于, 用于制备抑制前列腺癌细胞增殖的药物。
7. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 所述癌症为肺癌。
8. 如权利要求 7 所述的应用, 其特征在于, 用于制备抑制肺癌细胞生长的药物。
9. 如权利要求 7 所述的应用, 其特征在于, 用于制备特异性抑制肺癌细胞生长的药物。
10. 如权利要求 7 所述的应用, 其特征在于, 用于制备诱导肺癌细胞凋亡的药物。
11. 如权利要求 7 所述的应用, 其特征在于, 用于制备抑制肺癌细胞增殖的药物。
12. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 所述癌症为神经胶质瘤。
13. 如权利要求 12 所述的应用, 其特征在于, 用于制备抑制神经胶质瘤细胞生长的药物。
14. 如权利要求 12 所述的应用, 其特征在于, 用于制备特异性抑制神经胶质瘤细胞的药物。
15. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 所述癌症为胰腺癌。
16. 如权利要求 15 所述的应用, 其特征在于, 用于制备抑制胰腺癌细胞生长的药物。
17. 如权利要求 15 所述的应用, 其特征在于, 用于制备特异性抑制胰腺癌细胞生长的药物。
18. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 所述癌症为乳腺癌。
19. 如权利要求 18 所述的应用, 其特征在于, 用于制备抑制乳腺癌细胞生长的药物。
20. 如权利要求 18 所述的应用, 其特征在于, 用于制备特异性抑制乳腺癌细胞生长的药物。
21. 一种治疗癌症的药物, 其特征在于, 该药物以具有结构式为



的原人参二醇衍生物化合物 25hdt, 即 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β , 12 β , 20-三醇为有效成分。

22. 如权利要求 21 所述的治疗癌症的药物, 其特征在于, 所述癌症包括: 前列腺癌、肺癌、神经胶质瘤、乳腺癌和胰腺癌。

23. 一种治疗癌症的药物组合物, 其特征在于, 该药物含有具有结构式为



的原人参二醇衍生物化合物 25hdt, 即 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β , 12 β , 20-三醇以及至少一种化疗药物, 所述化疗药物为吉西他滨或多西紫杉醇。

24. 如权利要求 23 所述的治疗癌症的药物组合物, 其特征在于, 所述癌症包括: 前列腺癌、肺癌、神经胶质瘤、乳腺癌和胰腺癌。

一种原人参二醇衍生物的抗肿瘤用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域，具体涉及一种原人参二醇衍生物 25hdt，更具体地，是关于原人参二醇衍生物 25hdt 在制备治疗癌症的药物方面的应用。

背景技术

[0002] 癌症是残害人类生命的世界第二大疾病，死亡率仅次于心脑血管疾病，是人类死亡的最主要因素之一。在全世界 60 亿人口中，目前约有各类癌症患者 3500 万。在全世界范围内，癌症每年造成的死亡人数约为 630 万人；另据国际权威调查机构统计，到 2020 年癌症死亡人数将翻一番，达到 1000 万人以上。

[0003] 近年来，工业大生产导致人类生存环境不断恶化，化学、病毒、物理辐射等各种致癌因素逐渐增多，我国的癌症发病率也逐年上升。据国家卫生部卫生统计信息中心报道，1999 年全国城市恶性肿瘤患病率男性为 169.58 人/万人、女性为 110.05 人/万人、大城市中患病率为 148.90 人/万人、中小城市为 110.70 人/万人。按我国 13 亿人口计算，每年恶性肿瘤的新发病例达 200 万人。

[0004] 目前，治疗癌症的常用方法有手术治疗、放疗、化疗和生物治疗等。经过 50、60 年代主要依靠外科治疗及放射治疗的进步提高癌症病人相对存活率，到现在已有 40 多年，外科手术及放射治疗的进步也已近顶峰，很难再期待有更大的突破，而化疗能成功地治愈或明显延长病人的生命，在癌症的治疗中占有越来越主要的地位；然而，化疗基本上着眼于直接杀伤肿瘤细胞，这一治疗模式往往存在以下问题：对增长缓慢的实体瘤效果差或几乎无影响；药物选择性很小，毒副作用多且严重。肿瘤的生物治疗主要通过肿瘤宿主防御机制或生物制剂的作用以调节机体自身的生物学反应，从而抑制或消除肿瘤。虽然没有太大毒副作用，但由于技术要求严、工艺复杂、价格高，众多癌症患者及家属难以承受，影响其在癌症治疗领域的普及。

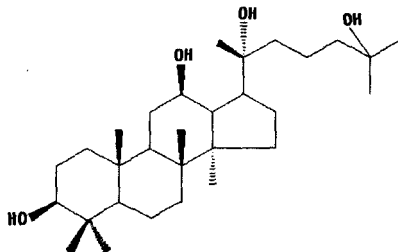
[0005] 鉴于上述原因，人们开始把目光转向天然抗肿瘤药物的研发上。无论是抑制或杀伤肿瘤细胞、调整机体免疫功能、减轻放化疗毒副作用，还是肿瘤的病后调理，天然抗癌药物都具有重要作用，天然植物新疗法将成为继手术、放疗、化疗、生物疗法之后的肿瘤第五大治疗方法。

[0006] 现有研究表明，人参皂苷具有明显的抗肿瘤和免疫调节、改善微循环、提高生命质量等多种生物活性。但是，由于天然人参皂苷较难吸收，而由天然皂苷转化而来的低极性皂苷、苷元或二者的衍生物是天然人参皂苷发挥其药效的原型。因此，有关低极性皂苷、苷元或二者的衍生物的制备与抗肿瘤活性的研究非常活跃。迄今，已发现多种低极性皂苷、苷元或二者的衍生物具有抗肿瘤活性，且基本无毒副作用，这些低极性皂苷、苷元或它们的衍生物包括：人参皂苷-Rg3、人参皂苷-Rh2、人参皂苷 C-K、人参皂苷 Mc、原人参萜二醇 (PPD) 以及 $3\beta, 12\beta$ -二羟-20(22), 24(25)，二烯达玛烷 [dammar- $3\beta, 12\beta$ -dihydroxyl-20(22), 24(25)-diene] 和 $3\beta, 6\alpha, 12\beta$ -三羟-20(22), 24(25)-二烯达玛烷 [dammar- $3\beta, 6\alpha, 12\beta$ -trihydroxyl-20(22),

24(25)-diene] 等。现已上市的抗肿瘤药物有参一胶囊（主要成分是人参皂苷 -Rg3）；正在用于临床实验研究的抗肿瘤药物有人参皂苷 -Rh2 和人参皂苷 -C-K。

[0007] 原人参二醇衍生物 25hdt，即 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β ，12 β ，20-三醇，其结构如以下结构式 I 所示：

[0008]



I

[0009] 该化合物也是 PPD 的一种衍生物，在赵余庆等的文献（赵余庆等，*Acta. Pharmaceutica.Sinica.*, 25(4) : 297-301, 1990) 中已有报道，但目前对 25hdt 的研究较少，尚未见到有关该化合物可用于相关肿瘤治疗的报道。

发明内容

[0010] 发明人在抗肿瘤细胞的研究中，发现原人参二醇衍生物 25hdt 具有抗人癌细胞的活性。随后，发明人通过对 25hdt 在体内外的抗肿瘤的研究，评价了 25hdt 在体内外的抗肿瘤效果。

[0011] 研究发现，25hdt 对体外培养的人癌细胞的抑制作用优于 PPD、人参皂苷 -Rg3、Rh2 和 25-OH-PPT，且 25hdt 对肿瘤细胞具有特异性的抑制生长、诱导凋亡、抑制增殖等作用。同时，在进行体内实验时，没有引起实验鼠体重的明显变化，也没有观察到任何毒性反应。

[0012] 因此，本发明的第一个目的，就在于提供一种原人参二醇衍生物 25hdt，即 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β ，12 β ，20-三醇，用于制备抗癌药物的应用。

[0013] 在本发明的一个优选的实施例中，25hdt 对人体外前列腺肿瘤细胞的抑制效果，优于 PPD 和人参皂苷 -Rh2 对人体外前列腺肿瘤细胞系的抑制效果，明显优于人参皂苷 -Rg3 和 25-OH-PPT 对人体外前列腺肿瘤细胞系的抑制效果。

[0014] 在本发明的另一个优选的实施例中，25hdt 对人体外神经胶质瘤细胞的抑制效果，优于 PPD 和人参皂苷 -Rh2 对人体外神经胶质瘤细胞系的抑制效果，明显优于人参皂苷 -Rg3 和 25-OH-PPT 对人体外神经胶质瘤细胞系的抑制效果。

[0015] 在本发明的另一个优选的实施例中，25hdt 对人体外胰腺癌细胞的抑制效果，优于 PPD 和人参皂苷 -Rh2 对人体外胰腺癌细胞系的抑制效果，明显优于人参皂苷 -Rg3 和 25-OH-PPT 对人体外胰腺癌细胞系的抑制效果。

[0016] 在本发明的另一个优选的实施例中，25hdt 对人体外肺癌细胞的抑制效果，优于 PPD 和人参皂苷 -Rh2 对人体外肺癌细胞系的抑制效果，明显优于人参皂苷 -Rg3 和 25-OH-PPT 对人体外肺癌细胞系的抑制效果。

[0017] 在本发明的另一个优选的实施例中，25hdt 对人体外乳腺癌细胞的抑制效果，优于 PPD 和人参皂苷-Rh2 对人体外乳腺癌细胞系的抑制效果，明显优于人参皂苷-Rg3 和 25-OH-PPT 对人体外乳腺癌细胞系的抑制效果。

[0018] 在本发明的另一个优选的实施例中，25hdt 对人体前列腺肿瘤细胞具有诱导凋亡作用。

[0019] 在本发明的另一个优选的实施例中，25hdt 对人体前列腺肿瘤细胞具有抑制增殖作用。

[0020] 在本发明的另一个优选的实施例中，25hdt 对人体前列腺肿瘤细胞具有抑制生长作用。

[0021] 在本发明的另一个优选的实施例中，25hdt 对人体前列腺肿瘤细胞基因表达具有调控作用。

[0022] 在本发明的另一个特别优选的实施例中，25hdt 对人体前列腺肿瘤细胞具有特异性抑制生长作用。

[0023] 在本发明的另一个优选的实施例中，在体内抑制前列腺肿瘤细胞生长同时，25hdt 没有导致实验动物体重明显的变化，也没有观察到有任何的毒性作用。

[0024] 在本发明的另一个更优选的实施例中，25hdt 与常规临床抗癌药吉西他滨和 / 或多西紫杉醇联合使用，能够提高对前列腺癌的治疗效果。

[0025] 在本发明的另一个更优选的实施例中，25hdt 能够提高临床放射线治疗前列腺癌的治疗效果。

[0026] 因此，本发明的 25hdt 显然可用于制备癌症药物化合物或药物组合物，也可以用于制备体外抗癌细胞药物。

[0027] 本发明所提供的新型抗肿瘤制剂中，以 25hdt 为有效成分，其总有效剂量为 1-50mg/kg/d。

[0028] 本发明所提供的新型抗肿瘤制剂中，25hdt 可与任何法定药用配合剂和赋形剂制成各种药用剂型的制剂。

[0029] 本发明所提供的新型抗肿瘤制剂中，25hdt 可与目前市场上的任何化疗药、生物制剂，包括激素类、烷化剂类、铂类、抗代谢类、拓扑异构酶抑制剂类、抗微丝微管类、诱导分化类、抗肿瘤生长类、提高机体免疫类及其他药物，制备成复方制剂。

[0030] 本发明所提供的新型抗肿瘤制剂中，制剂剂型为口服、注射或局部用药剂型。

[0031] 本发明所提供的新型抗肿瘤制剂中，口服剂型包括片剂、粉剂、悬浊液、乳浊液、胶囊、颗粒剂、糖衣片、药丸、液体、糖浆和柠檬水剂等。

[0032] 所述注射剂包括水剂、冻干粉针、静脉乳剂、多相质脂体制剂、静脉微乳剂、悬浊液等；

[0033] 本发明所提供的新型抗肿瘤制剂中，局部用药剂型包括软膏、固体、悬浊液、水剂、粉剂、糊剂、栓剂、气溶胶、泥敷剂、涂抹剂、灌肠剂和乳剂等。

附图说明

[0034] 图 1 是 5 种人参皂苷化合物 25hdt、25-OH-PPT、PPD、Rh2 和 Rg3 对人肺癌细胞的细胞毒性的影响。

[0035] 图 2 是 5 种人参皂苷化合物 25hdt、25-OH-PPT、PPD、Rh2 和 Rg3 对肺癌细胞凋亡活性的影响。

[0036] 图 3 是 5 种人参皂苷化合物 25hdt、25-OH-PPT、PPD、Rh2 和 Rg3 对肺癌细胞抑制增殖活性的影响。

[0037] 图 4 是 5 种人参皂苷化合物 25hdt、25-OH-PPT、PPD、Rh2 和 Rg3 对肺癌细胞的细胞周期分布的影响。

[0038] 图 5 是 25-OH-PPT 和 25hdt 对人前列腺癌细胞 (A) LNCaP 和 (B) PC3 以及对人原代成纤维细胞 (C) IMR90-EEA 和 (D) IMR90-E1A 的细胞毒性的影响。

[0039] 图 6 是 25-OH-PPT 和 25hdt 对前列腺癌细胞凋亡活性的影响。

[0040] 图 7 是 25-OH-PPT 和 25hdt 对前列腺癌细胞增殖的影响。

[0041] 图 8 是 25-OH-PPT 和 25hdt 对前列腺癌细胞周期分布的影响。

[0042] 图 9 是 25-OH-PPT 和 25hdt 对前列腺癌细胞基因表达的影响。

[0043] 图 10 是 25hdt 单独使用或与多西紫杉醇、吉西他滨、放疗联合使用对前列腺腺异体移植瘤活性及体重的影响。

具体实施方式

[0044] 本发明分别在体外癌细胞系和癌症模型动物体内进行了抗癌细胞实验。实验结果显示, 25hdt 对体内外癌细胞的抑制作用均优于 PPD、人参皂苷-Rg3 和 Rh2。另外, 25hdt 对人癌细胞具有特异性抑制作用, 且无毒副作用。25hdt 与常规临床抗癌药联合使用, 能提高对前列腺癌的治疗效果, 还能提高临床放射线治疗的疗效。

[0045] 以下结合具体实施例, 对本发明作进一步说明。应理解为, 以下实施例仅用于说明本发明, 而非用于限定本发明的范围。

[0046] 本申请的发明人采用赵余庆等人(赵余庆等, *Acta.Pharmaceutica.Sinica.*, 25(4), 297-301, 1990) 的文献中所述的提取工艺, 首先制备人参果总皂苷初提液, 然后经氯仿萃取、反向 HPLC 纯化获得了 25hdt, 通过电子电离质谱 (EI-MS), 红外光谱 (IR), ^1H 核磁共振谱 ($^1\text{H-NMR}$) 和 ^{13}C 核磁共振谱 ($^{13}\text{C-NMR}$) 等方法鉴定, 确定所获得的物质为 25hdt 纯品。以下实施例中所使用的 25hdt, 为发明人纯化制备获得的纯品。

[0047] 以下实施例中所用的各细胞系, 均购自美国模式培养物收集中心 (ATCC, Rockville, MD, USA)。

[0048] 实施例 1、25hdt 对体外癌细胞的特异性生长抑制

[0049] 1.1、人参皂苷化合物 25hdt, 25-OH-PPT、PPD、Rh2 和 Rg3 抑制人癌细胞体外生长实验研究

[0050] 在本实施例中, 以人参皂苷化合物 25-OH-PPT、PPD、Rh2 和 Rg3 为参照, 考察了 25hdt 对人癌细胞体外生长的抑制作用。

[0051] 分别配制浓度依次为 0、 $1\ \mu\text{M}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ 、 $25\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \mu\text{M}$ 、 $250\ \mu\text{M}$ 和 $500\ \mu\text{M}$ 的 25hdt, 25-OH-PPT、PPD、Rh2 和 Rg3。

[0052] 采用配制好的以上溶液, 针对人神经胶质瘤细胞系 A172(p53 野生 / 突变型杂合子, p53wt/mt) 和 T98G(p53 突变型, p53mt)、人胰腺癌细胞系 HPAC(p53 野生型, p53wt) 和 Panc-1(p53mt)、人肺癌细胞系 A549(p53wt)、H1299(p53 缺失

型、p53null)、H358(p53wt)和H838(p53null)、人乳腺癌细胞系MCF7(p53wt)和MDA-MB-468(p53mt)、人前列腺癌细胞系LNCaP(p53wt)和PC3(p53null), 37°C, 培养72h。具体培养方式如下:

[0053] 将上述细胞分别接种96孔细胞培养板, 每孔细胞浓度为 $4-5 \times 10^3$, 37°C, 培养72h。

[0054] 再采用甲基偶氮唑盐(MTT)比色法, 测定各细胞系半数细胞生长抑制浓度(IC₅₀)。具体测定方法为:

[0055] 每孔分别加入10 μ L的MTT溶液, 37°C培养2-4小时后, 去上清, 用100 μ L DMSO溶解剩余的甲月膈结晶, 读取570nm处的吸光值, 计算细胞存活率和IC₅₀。结果如表1所示。

[0056] 表1、25hdt、25-OH-PPT、PPD、Rh2和Rg3对人癌细胞生长的影响

[0057]

癌症类型	细胞系	IC ₅₀ (μ M)				
		25hdt	25-OH-PPT	PPD	Rh ₂	Rg ₃
神经胶质瘤	A172	49.4	>500	77.6	56.0	303.0
	T98G	27.5	125.9	72.8	71.8	397.0
胰腺癌	HPAC	22.5	>500	63.9	66.4	>500
	Panc-1	21.2	>500	30.2	41.3	180.3
肺癌	A549	22.5	>500	27.2	33.9	369.1
	H1299	11.6	>500	20.3	20.4	357.2
	H358	22.9	>500	50.4	65.8	470.0
	H838	25.9	>500	77.4	64.4	293.0
乳腺癌	MCF7	59.8	>500	68.4	41.5	361.2
	MDA-MB-468	68.7	>500	69.0	43.0	153.1
前列腺癌	LNCaP	35.7	>500	44.8	46.7	302.1
	PC3	59.8	>500	29.3	29.3	266.5

[0058] 由表1的结果可见, 25hdt对于人神经胶质瘤细胞、胰腺癌细胞、肺癌细胞、乳腺癌细胞和前列腺癌细胞, 大多数细胞系的IC₅₀值在10-60 μ M的范围, 具有明显的抑制生长作用。对于人神经胶质瘤细胞、胰腺癌细胞、肺癌细胞的抑制效果, 25hdt明显优于PPD和Rh₂, 对于乳腺癌细胞和前列腺癌细胞的抑制效果与PPD和Rh₂相当; 对于人神经胶质瘤细胞、胰腺癌细胞、肺癌细胞、乳腺癌细胞和前列腺癌细胞的抑制效果, 25hdt明显优于Rg₃和25-OH-PPT。

[0059] 1.2、25hdt与25-OH-PPT对正常人成纤维细胞系IMR90-EEA和IMR90-E1A细胞的体外毒性实验

[0060] 在本实施例中, 以25-OH-PPT为对照, 考察了25hdt对正常人成纤维细胞系IMR90-EEA和IMR90-E1A细胞的体外细胞毒性。

[0061] 按实施例1.1的方法, 分别用配制好的浓度依次为0、1 μ M、10 μ M、

25 μ M、100 μ M、250 μ M 和 500 μ M 的 25hdt 和 25-OH-PPT 处理正常人成纤维细胞系 IMR90-EEA 和 IMR90-E1A 细胞 72 小时后，采用甲基偶氮唑盐比色法，测定正常人成纤维细胞 IMR90-EEA 和 IMR90-E1A 的生长状况，实验结果见图 5C 和图 5D。

[0062] 图 5C 和图 5D 的结果显示，25-OH-PPT 对正常人成纤维细胞的存活率降低幅度的影响与对前列腺癌细胞的存活率降低幅度的影响差异不大；而 25hdt 对正常人成纤维细胞的存活率的影响则不如前列腺癌细胞敏感。因此，25hdt 对人癌细胞具有特异性抑制作用。

[0063] 实施例 2、25hdt 在体外肺癌细胞系中的抗肺癌实验

[0064] 在以下实施例中，用 25-OH-PPT、PPD、Rh2 和 Rg3 为参照，考察了 25hdt 在体外肺癌细胞系 H838 和 H358 中的抗肺癌效果。

[0065] 2.1、25hdt 在体外诱导人肺癌细胞凋亡

[0066] 按照实施例 1.1 的方法，分别用配制好的浓度依次为 0、1 μ M、10 μ M、25 μ M 和 50 μ M 的 25hdt 和其它 4 种人参皂苷化合物 25-OH-PPT、PPD、Rh2 和 Rg3 处理人肺癌细胞系 H838 和 H358，待处理细胞 48 小时后，以 AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒（购自 Biovision 公司）检测凋亡细胞发生率，采用与文献 (Li M, Zhang Z, Hill D, Chen X, Wang H, Zhang R. *Cancer Res.*, 65 : 8200-8208.2005) 相同的方法检测。根据早期和晚期凋亡的检测数据，相对于未用药处理的正常细胞，计算凋亡指数 AI (凋亡指数 AI 是指，随机计数一定量的细胞中，凋亡形态的细胞所占的百分数)，并进行比较分析。结果如图 2 所示。

[0067] 图 2 的结果显示，化合物 25hdt、PPD 及 Rh2 均以剂量依存的方式诱导细胞凋亡。在不同的浓度水平，25hdt 均比其他化合物具更强的细胞凋亡诱导活性，而 PPD 和 Rh2 在高浓度时有一定活性，Rg3 的活性很小，25-OH-PPT 无明显活性。

[0068] 2.2、25hdt 在体外抑制细胞增殖

[0069] 按照实施例 1.1 的方法，分别用配制好的浓度依次为 0、1 μ M、10 μ M、25 μ M 和 50 μ M 的 25hdt 和其它 4 种人参皂苷化合物 25-OH-PPT、PPD、Rh2 和 Rg3 处理人肺癌细胞系 H838 和 H358，待处理细胞 24 小时后，用溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 核素掺入法（使用 BrdUrd cell proliferation assay kit 试剂盒，购自 Oncogene Science, La Jolla, CA），测定细胞增殖率，计算增殖指数 PI (增殖指数 PI 是指，随机计数一定量的细胞中，BrdU 阳性细胞所占的百分数)，结果如图 3 所示。

[0070] 图 3 的结果显示，25hdt 对人肺癌细胞系 H838 和 H358 细胞均能以剂量依存的方式抑制细胞增殖活性。

[0071] 2.3、25hdt 在体外阻滞细胞在 G1 期

[0072] 按照实施例 1.1 的方法，分别用配制好的浓度依次为 0、1 μ M、10 μ M、25 μ M 和 50 μ M 的 25hdt 和其它 4 种人参皂苷化合物 25-OH-PPT、PPD、Rh2 和 Rg3 处理人肺癌细胞系 H838 和 H358，待处理细胞 24 小时后，使用流式细胞仪测定人肺癌细胞周期分布，结果如图 4 所示。

[0073] 图 4 的结果显示，25hdt 对人肺癌细胞系 H838 和 H358 细胞均能以剂量依存的方式阻滞细胞周期在 G1 期，而且 25hdt 的阻滞细胞周期在 G1 期的能力要比实验中所用的其它四种人参皂苷化合物的能力更强。

[0074] 因此, 25hdt 能将人肺癌细胞系 H838 和 H358 细胞阻滞在 G1 期, 从而抑制肿瘤细胞的增殖。

[0075] 综合本实施例和实施例 1 的体外实验结果可见, 对于人肺癌细胞, 25hdt 具有抑制肺癌细胞生长、诱导肺癌细胞凋亡、抑制肺癌细胞增殖和阻滞肺癌细胞于 G1 期的作用。

[0076] 实施例 3、25hdt 在体外前列腺癌细胞系的抗前列腺癌实验

[0077] 在本实施例中, 用 25-OH-PPT 做参照, 考察了 25hdt 在体外前列腺癌细胞系 LNCaP 和 PC3 的抗前列腺癌的效果。

[0078] 3.1、25hdt 在体外诱导人前列腺癌细胞凋亡

[0079] 采用实施例 1.1 的方法, 分别用配制好的浓度依次为 0、1 μ M、10 μ M、25 μ M 和 50 μ M 的 25hdt 和 25-OH-PPT 处理人前列腺癌细胞系 LNCaP 和 PC3 的细胞, 待处理细胞 48 小时后, 以 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒检测凋亡细胞发生率, 采用与文献 (Li M, Zhang Z, Hill D, Chen X, Wang H, Zhang R. Cancer Res., 65 : 8200-8208.2005) 相同的方法检测。根据早期和晚期凋亡的检测数据, 相对于未用药处理的正常细胞, 计算凋亡指数 AI, 并进行比较。结果如图 6 所示。

[0080] 图 6 的结果显示, 25hdt 以剂量依存的方式诱导细胞凋亡, 且在所有的测试浓度下, 25hdt 均具有较强的细胞凋亡诱导活性, 而 25-OH-PPT 的细胞凋亡诱导活性则很低。因此, 25hdt 对前列腺癌细胞具有诱导凋亡作用, 即其对前列腺癌细胞具有杀伤作用。

[0081] 3.2、25hdt 在体外抑制人前列腺癌细胞增殖

[0082] 采用实施例 1.1 的方法, 分别用配制好的浓度依次为 0、1 μ M、10 μ M、25 μ M 和 50 μ M 的 25hdt 和 25-OH-PPT 处理人前列腺癌细胞系 LNCaP 和 PC3 的细胞, 待处理细胞 24 小时后, 采用溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 核素掺入法, 参照文献 (Li M, Zhang Z, Hill D, Chen X, Wang H, Zhang R. Cancer Res., 65 : 8200-8208.2005) 中所述的方法, 检测人前列腺癌细胞增殖率, 并计算增殖指数 PI, 结果如图 7 所示。

[0083] 图 7 的结果显示, 25hdt 对细胞系 LNCaP 有剂量依存的抑制细胞增殖活性。在所测试的浓度水平中, 25hdt 均显示出很强的抑制细胞增殖的活性, 而 25-OH-PPT 对细胞增殖则无明显影响。

[0084] 3.3、25hdt 在体外阻滞人前列腺癌细胞在 G1 期

[0085] 采用实施例 1.1 的方法, 分别用配制好的浓度依次为 0、1 μ M、10 μ M、25 μ M 和 50 μ M 的 25hdt 和 25-OH-PPT 处理人前列腺癌细胞系 LNCaP 和 PC3, 待处理细胞 24 小时后, 使用流式细胞仪测定人前列腺癌细胞周期分布, 结果如图 8 所示。

[0086] 图 8 的结果显示, 在处理前列腺癌细胞系 LNCaP 细胞 24 小时后, 25hdt 均以剂量依存的方式将前列腺癌细胞阻滞在 G1 期。25hdt (在最高浓度 25 μ M) 对细胞系 LNCaP 具更强的活性; 而 25-OH-PPT (在最高浓度 50 μ M) 对细胞周期分布无明显影响。

[0087] 3.4、25hdt 调控人前列腺癌细胞基因表达

[0088] 采用以上 1.1 的方法, 分别用配制好的浓度依次为 0、1 μ M、10 μ M、25 μ M 和 50 μ M 的 25hdt 和 25-OH-PPT 处理人前列腺癌细胞系 LNCaP 和 PC3 的细胞 24 小时, 然后用不同的特异性抗体作免疫印迹来检测目标蛋白, 结果如图 9A 和 B 所示。所检测的目标蛋白包括与癌细胞的增殖密切相关的以下因子:

[0089] 原癌基因蛋白：MDM2、Bcl2；

[0090] 抑癌基因蛋白：p53、p21、p27、BAX；

[0091] 转录因子：E2F1、cleaved PARP；

[0092] 细胞周期调控因子：cdk2、cdk4、cdk6 和 cyclin D1。

[0093] 图 9A 和 B 的结果显示，在 LNCaP 细胞中，25hdt 导致 p21WAF/CIP 和 p27KIP1 及 Bax 的增加，同时降低了 MDM2、Bcl2、E2F1、cdk2、cdk4 和 cyclin D1 的表达水平。

25-OH-PPT 在 LNCaP 细胞中可适度提高 p21 的表达、降低 cdk2 的表达。

[0094] 综合本实施例和实施例 1 的体外实验结果，对于前列腺癌细胞，25hdt 具有抑制前列腺癌细胞生长、诱导前列腺癌细胞凋亡、抑制前列腺癌细胞增殖和阻滞前列腺癌细胞于 G1 期的作用，且 25hdt 还能调控人前列腺癌细胞基因表达。

[0095] 实施例 4、25hdt 在癌症模型动物体内的抗肿瘤实验

[0096] 4.1、25hdt 单独抑制前列腺异体移植瘤的生长。

[0097] 在本实施例中，在前列腺异体移植瘤模型鼠 (Zhang Z, Li M, Wang H, Agrawal S, Zhang R. Proc Natl Acad Sci USA 100 : 11636-11641.2003) 体内，腹腔注射 25hdt 抑制前列腺癌生长作用实验。本实验采取了以下给药方案：

[0098] 以 5mg/kg 体重 / 次，或 10mg/kg 体重 / 次的剂量给实验组老鼠腹腔注射 25hdt (溶剂为 PEG400)，每周给药 5 次，连续给药 4 周；同时以相同的剂量给对照组老鼠腹腔注射生理盐水，每周给药 5 次，连续给药 4 周。每天观察实验动物生存状态，并测量体重和肿瘤大小，结果如图 10B1、图 10B2 所示。

[0099] 图 10B1 的结果显示，在给药 4 周后，以 5mg/kg 体重 / 次的剂量给药的小鼠，其肿瘤大小只有对照组肿瘤大小的一半；而以 10mg/kg 体重 / 次的剂量给药的小鼠，其肿瘤大小更是只有对照组肿瘤大小的 16%。

[0100] 图 10B2 的结果显示，这种给药方案没有引起小鼠体重的明显变化，也没有观察到任何毒性反应。

[0101] 根据图 10B1 和 10B2 的结果，腹腔注射 25hdt 在对前列腺癌取得良好的抑制作用的同时，没有引起实验动物体重的明显变化，也没有观察到任何不良的毒性反应。

[0102] 因此，根据上述结果，25hdt 能在体内抑制前列腺癌细胞生长，有制备成抗前列腺癌的药物的良好前景。

[0103] 4.2、25hdt 与常规临床抗癌药联合使用，提高对前列腺癌的治疗效果

[0104] 本实施例中，在前列腺异体移植瘤模型鼠体内，观察了 25hdt 分别和吉西他滨、多西紫杉醇的联合使用的效果。其中，吉西他滨为雄激素依赖的治疗前列腺癌的一线药物。

[0105] 实验鼠的处理方法：以 10mg/kg 体重 / 天的剂量，对实验鼠采用腹腔注射方式注射 25hdt，每周注射 5 天，持续注射 4 周，并在第 5、12 天对实验鼠腹腔注射多西紫杉醇 (15mg/kg) 或吉西他滨 (160mg/kg)。

[0106] 同时，对实验对照鼠进行处理，具体处理方法为：对照组鼠除注射药物为生理盐水外，其余操作与实验组相同。

[0107] 检测体重、肿瘤大小及其他常见毒性反应指标 (如进食量、呼吸、心电图、血尿粪常规等)，实验结果如图 10C1、10D1 所示。

[0108] 图 10C1 和 10D1 的结果显示, 25hdt 可提高临床抗癌药的疗效。多西紫杉醇单独使用可抑制肿瘤生长 69%, 与 25hdt 联合使用肿瘤生长几乎完全抑制 (> 98%)。同样, 与给予药物媒介物的小鼠相比, 吉西他滨单独使用会抑制肿瘤生长 80%, 与 25hdt 联合使用时, 可导致肿瘤生长抑制达 92%。接受化疗的实验动物出现暂时的体重降低, 但之后又有所恢复, 并且没有观察到其它毒性反应。

[0109] 根据本实验的结果可见, 与常规临床抗癌药联合使用, 25hdt 能提高对前列腺癌的治疗效果。

[0110] 4.3、25mdt 提高临床放射线治疗的疗效

[0111] 本实施例中, 在前列腺异体移植瘤模型鼠体内, 观察了 25hdt 对临床放射线治疗的影响。

[0112] 实验鼠的处理方法: 以 10mg/kg 体重 / 天的剂量, 对实验鼠采用腹腔注射方式注射 25hdt, 每周注射 5 天, 持续注射 4 周, 并在第 5、12 和 19 天以 3Gy 的放射量对实验鼠进行放射治疗。对照组的模型鼠接受放疗, 但是不注射 25hdt。

[0113] 检测体重、肿瘤大小及其他常见毒性反应指标 (如进食量、呼吸、心电图、血尿粪常规等), 结果如图 10E1 和 10E2 所示,

[0114] 图 10E1 和 10E2 的结果显示, 单独放射线治疗可降低约 40% 的异体移植瘤的生长, 与 25hdt 联合使用使肿瘤生长抑制提高到 75%。接受放疗的实验动物出现暂时的体重降低, 但之后又有所恢复, 并且没有观察到其它毒性反应。

[0115] 根据本实验的结果可见, 25hdt 可提高临床放射线治疗的疗效。

[0116] 综上所述, 25hdt 具有优于 PPD、人参皂苷-Rg3 和 Rh2 的对人体外癌细胞系的抑制效果, 且 25hdt 对人癌细胞具有抑制调控、诱导凋亡、抑制增殖作用, 此外, 25hdt 对人癌细胞具有特异性抑制生长作用, 在体内抑制前列腺肿瘤细胞生长实验时, 25hdt 没有导致实验动物体重发生明显的变化, 也没有观察到 25hdt 对实验动物有任何毒性作用。

[0117] 因此, 本发明的 25hdt 显然可制备为抗癌症, 特别是神经胶质瘤、胰腺癌、肺癌、乳腺癌和前列腺癌的药物化合物, 或作为抗这些抗癌症的药物组合物的活性成分, 或与其他药用配合剂和 / 或赋形剂等制成各种药用制剂。

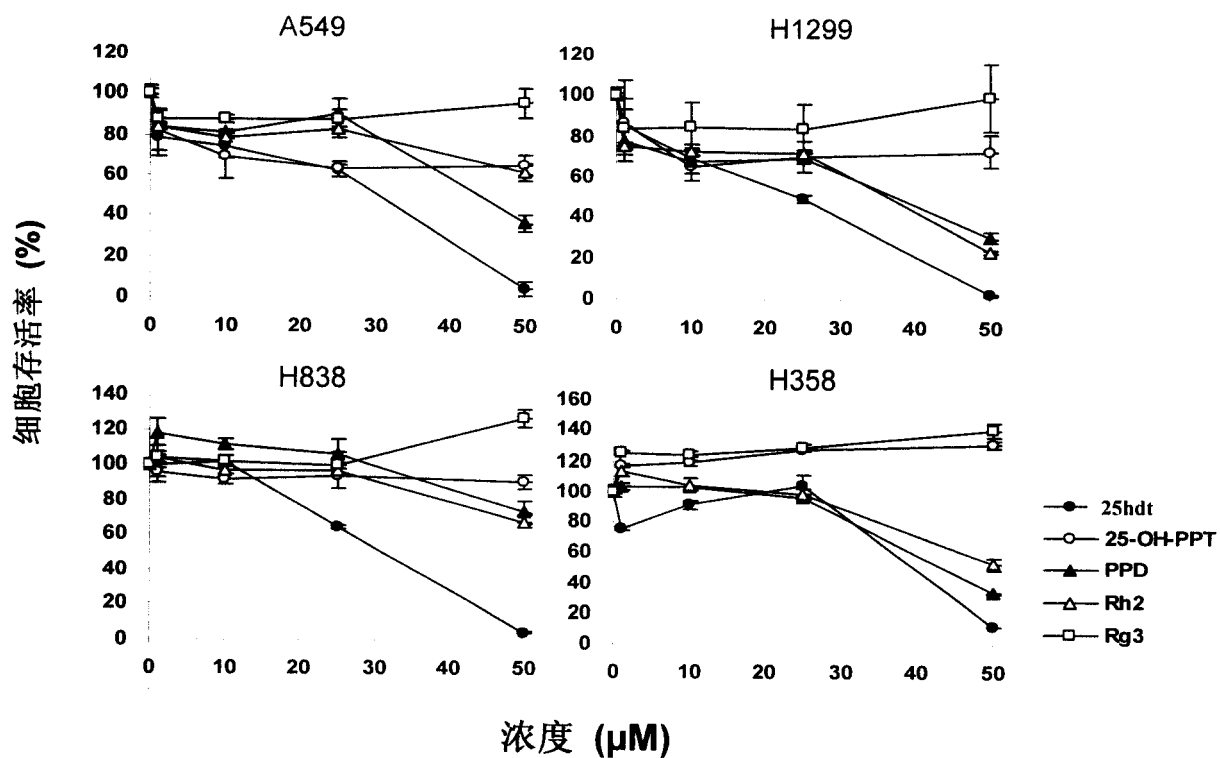


图 1

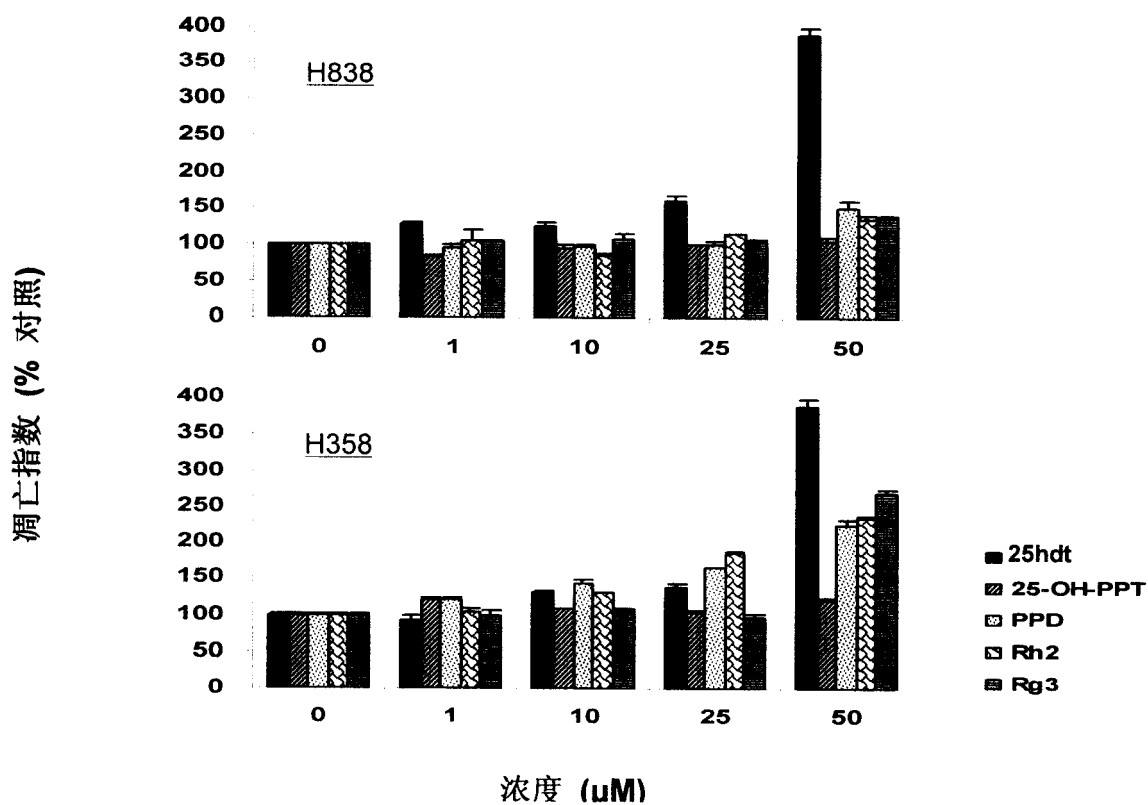


图 2

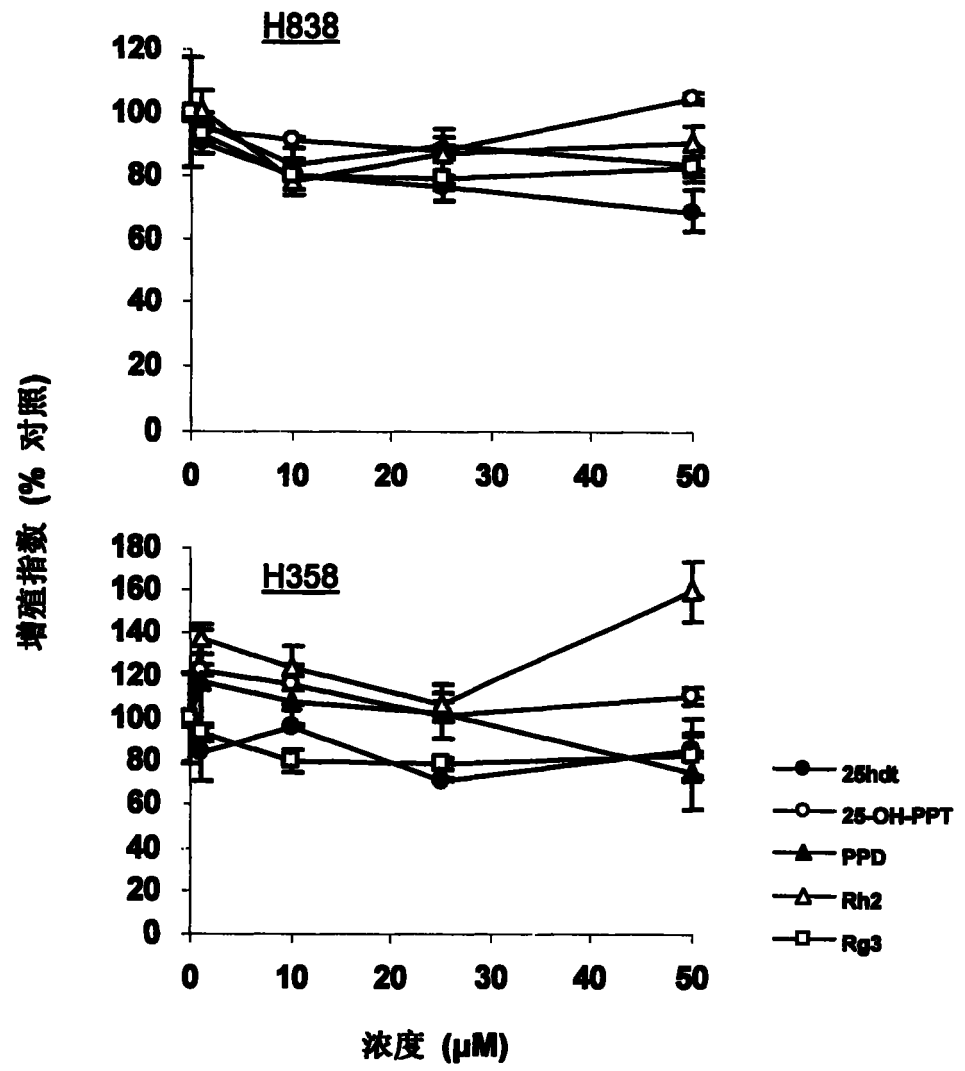
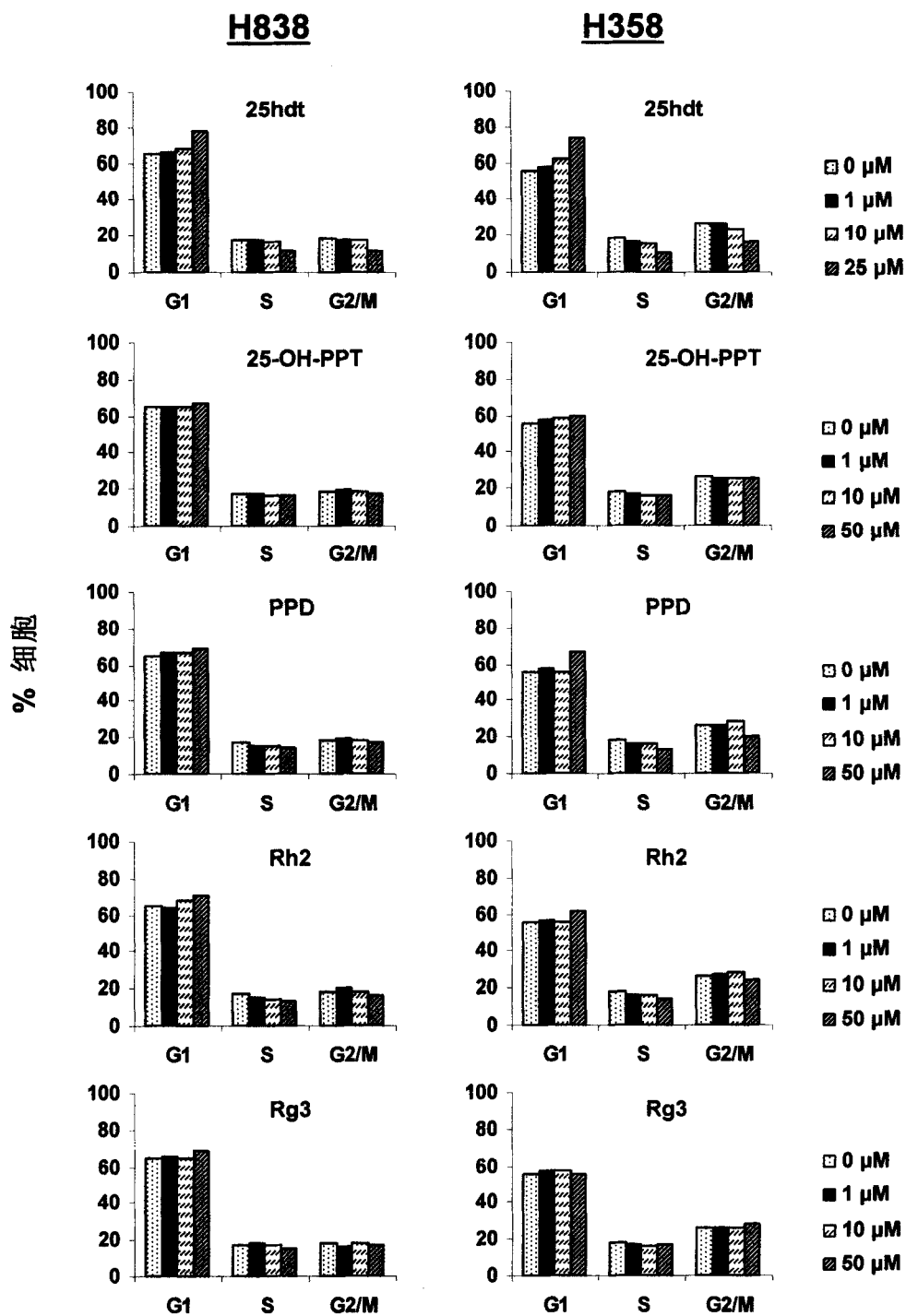


图 3



细胞周期分布

图 4

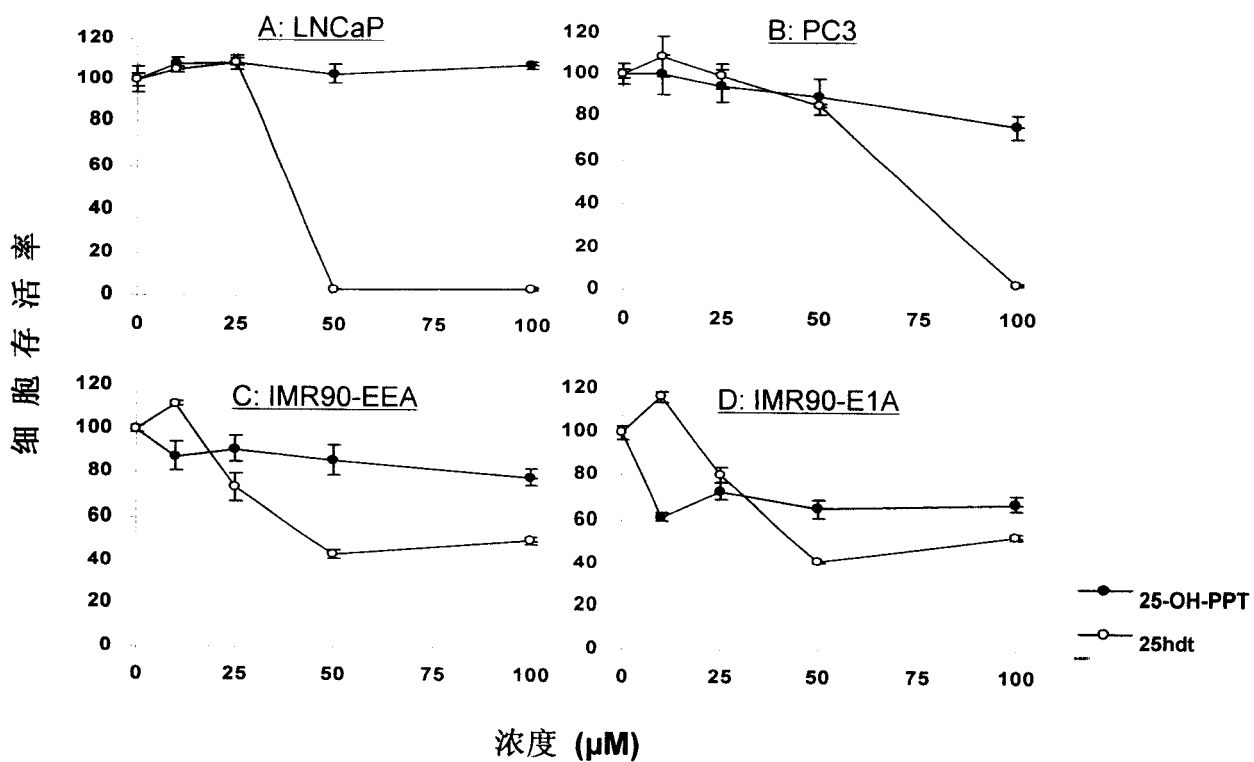


图 5

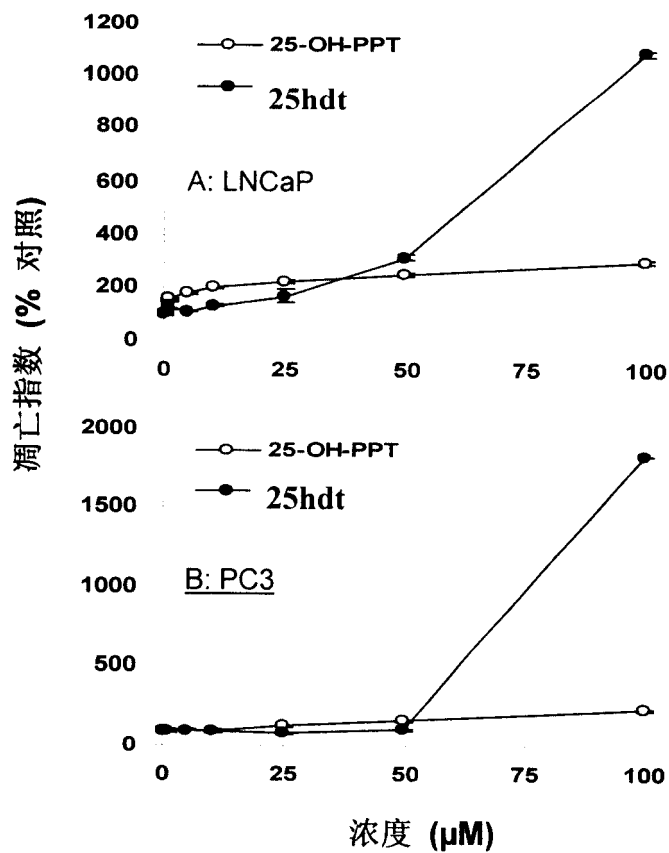


图 6

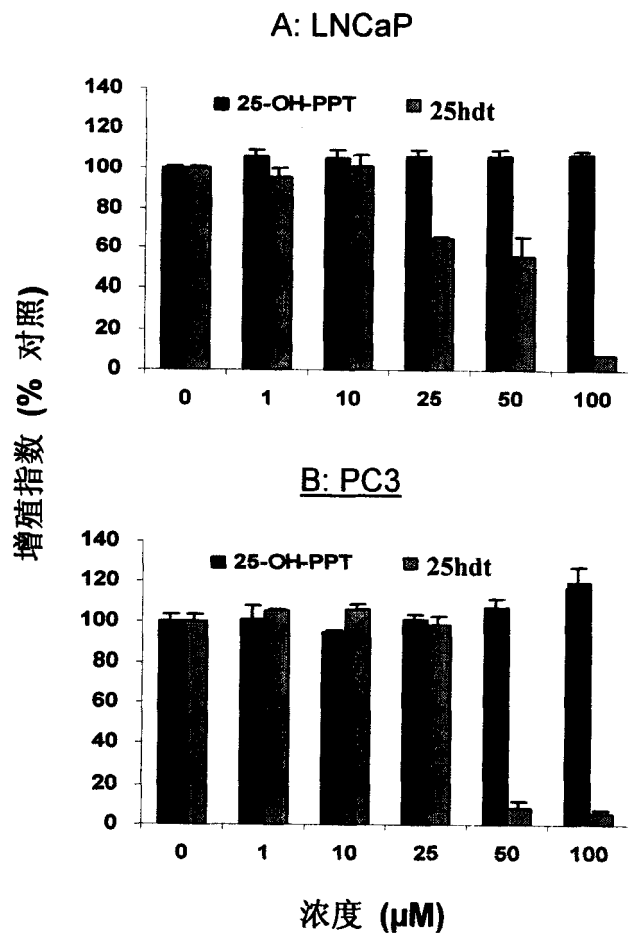


图 7

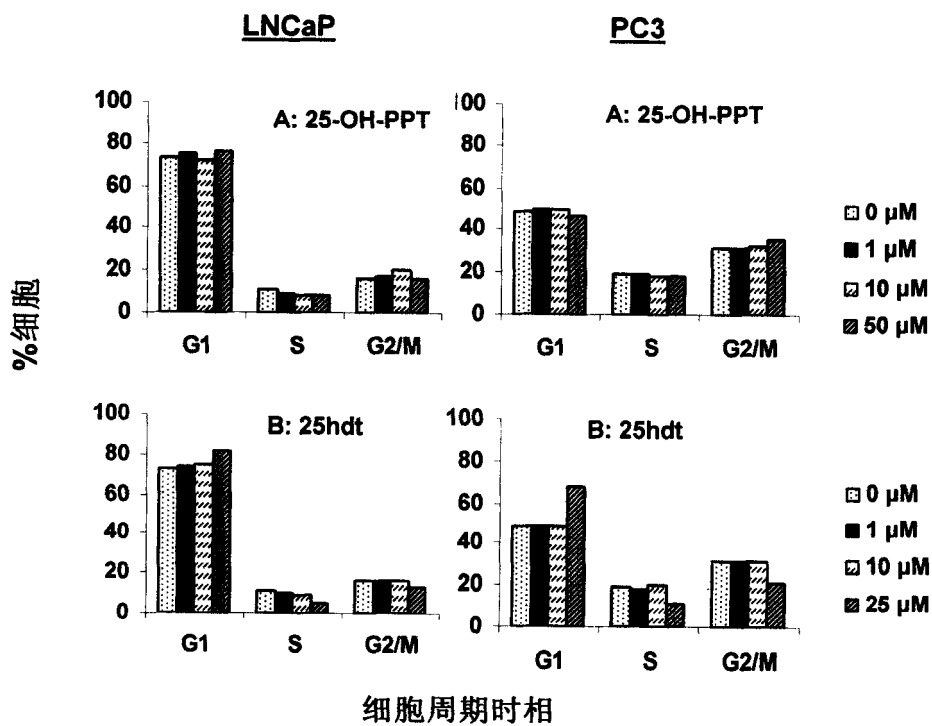


图 8

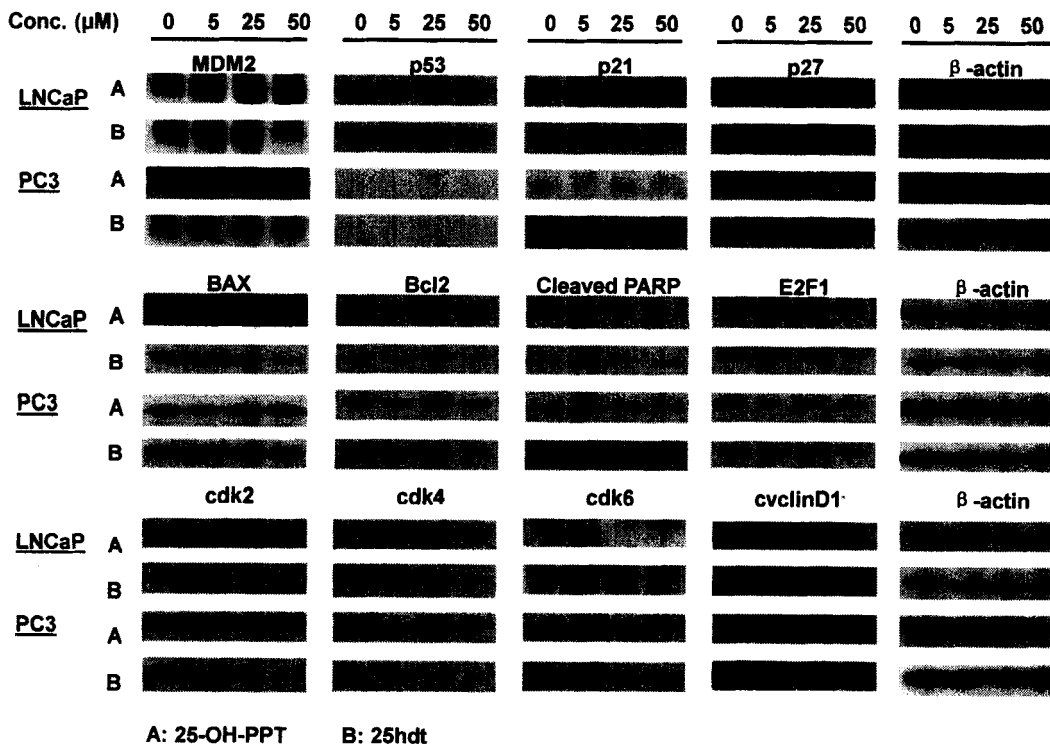


图 9

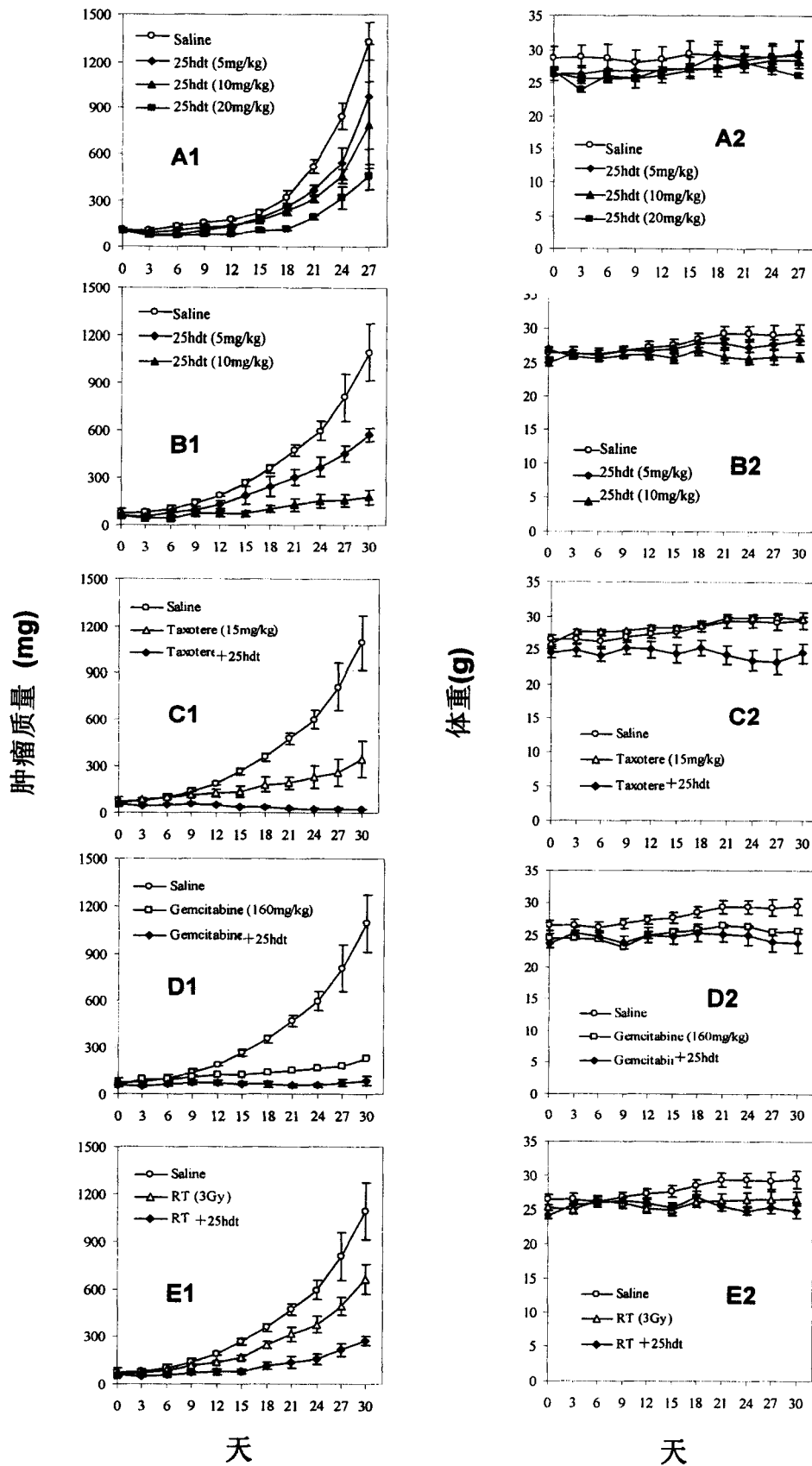


图 10