文章编号:1000-5404(2006)13-1393-04

论著

新型异黄酮及甾体类化合物体外抗癌细胞增殖活性的初步筛选

张丽龙[1],粟永萍[1],刘晓宏[1],程天民[1],郑 虎[2],翁玲玲[2],艾国平[1] ([1]第三军医大学预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2]四川大学华西药学院,成都 610041)

提 要:目的 研究改构后的异黄酮及甾体类化合物是否具较好的体外抗细胞增殖的活性。**方法** 采用MTT法,以5,7,4'-三羟基异黄酮(Genistein,GEN)作为对照,研究28个改构后的异黄酮和甾体化合物对Hela细胞、MCF-7细胞的抗增殖作用,并在此基础上,分析其构效关系。**结果** 通过对28种化合物采用MTT的方法对其体外活性进行初筛,初步认为异黄酮类化合物F11、ZF3、ZF4、ZF7以及甾体类化合物ZE2均对Hela细胞、MCF-7细胞增殖有显著的抑制作用,效果均优于Genistein。**结论** 异黄酮和甾体类化合物经过结构改造和修饰,其大部分对Hela细胞、MCF-7细胞的增殖有显著的抑制作用,有进一步研究的潜在价值。

关键词: 异黄酮;甾体;MTT

中图法分类号: R285.5;R329.28;R730.52 **文献标识码:** A

Screening cell proliferation activity of novel isoflavone and steroid derivatives

ZHANG Li-long[1], SU Yong-ping[1], LIU Xiao-hong[1], CHENG Tian-min[1], ZHENG Hu[2], WENG Ling-ling[2], AI Guo-ping[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To investigate whether novel isoflavone and steroid derivatives have better anti-tumor activity. **Methods** The anti-proliferation activities of 28 novel isoflavone and steroid derivatives upon Hela cells and MCF-7 cells were analyzed by MTT, then compared with that of Genistein. **Results** Raw screening of the 28 compounds by MTT indicated isoflavone derivatives F11, ZF3, ZF4, ZF7 and steroid derivatives ZE2 exerted more obvious suppression on the proliferation of tumor cell lines than Genistein. **Conclusion** Most of the novel isoflavone and steroid derivatives inhibit the proliferation of tumor cell lines. The compounds obtained from the screening have more potent cytotoxicity on tumor cells than Genistein and are worth further investigation.

Key words: isoflavone; steroid; MTT

大豆异黄酮是一组多酚类的混合物,由于它能与雌激素受体结合,具有弱雌激素样作用,故称之为植物雌激素。本研究所杨峥嵘等[1]前期研究证实,5,7,4'-三羟基异黄酮(Genistein, GEN)具有抗癌作用,同时能减轻放疗所致的造血损伤,提示该类化合物有独特的研发价值。值得注意的是,大多数的异黄酮化合物需在较大剂量时才能显示出抗癌活性,但在该剂量时,对机体正常细胞也造成损伤,故用化学合成方法制备异黄酮类化合物,或以其为先导化合物,改造其结构,以增强其生物活性是十分必要的。

甾体雌激素是一类四环脂烃化合物,具有环戊烷多氢菲母核[2]。通过对甾体类化合物的结构修饰,可降低或去除其雌活性,使其与体内雌激素竞争结合雌激素受体,从而可减轻雌激素的促细胞增殖作用,降低与雌激素有关的癌症发病危险,对于防治雌激素相关肿瘤具有重要的意义。

本研究旨在通过对异黄酮和甾体类化合物的化学结构改造和修饰,并结合体外抗细胞增殖实验,对目标化合物进行生物活性鉴定,以期找到具有抗肿瘤活性高、抑瘤谱广和毒副作用低的新型化合物,并为开发具有抗肿瘤活性的化合物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人宫颈癌细胞Hela,人乳腺癌细胞MCF-7,购自中科院上海细胞所。

基金项目: 重庆市院士基金资助项目(2004BC5006)
Supported by the Academician Foundation of Chongqing (2004BC5006)

作者简介: 张丽龙(1977-),男,河北省藁城市人,博士研究生,助教,主要从事抗肿瘤药物方面的研究。电话:(023)68771720, E-mail:longtm-mu@hotmail.com

通讯作者: 艾国平,电话:(023)68752279, E-mail: aigping@yahoo.com

收稿日期: 2006-01-03;**修回日期:** 2006-04-23

1.1.2 药品与试剂 第一批合成的12个新型异黄酮类化合物ZF1～ZF12和2个新型甾体类化合物ZE1、ZE2；第二批合成的12个新型异黄酮类化合物F1～F12和2个新型甾体类化合物E1、E2，均由华西医科大学药物化学教研室合成并提供。Genistein(纯度≥98.0%，HPLC，sigma，美国)，四甲基偶氮唑蓝(MTT，sigma)，二甲基亚砜(DMSO，上海生工)，IMDM(PAA，美国)。小牛血清(TBD，天津)

1.1.3 仪器 超净工作台，为安泰LS-2型产品；CO_2培养箱，为Forma scientific公司产品；倒置显微镜，为Olympus公司产品；酶标仪550型，为BIO-RAD公司产品；96孔培养板，为Coaster公司产品。

1.2 方法

1.2.1 癌细胞培养 Hela细胞、MCF-7细胞分别培养在含10%小牛血清的IMDM培养液中，培养条件为5% CO_2，37 ℃，饱和湿度。

1.2.2 化合物与试剂配制 ①实验化合物溶液：将24种新型异黄酮类化合物和4种新型甾体类化合物药物，GEN称量后，均分别溶于DMSO中，配成储存液，-20 ℃保存。临用时，用含10%小牛血清的IMDM培养液将其分别稀释成5、10 mmol/L的工作液，用直径为0.22 μm的微孔滤膜过滤除菌置于4 ℃保存。②溶剂对照溶液：采用DMSO。③MTT溶液：将MTT用PBS配成5 mg/ml的溶液，磁力搅拌器搅拌30 min，直径为0.22 μm的微孔滤膜过滤除菌后4 ℃保存，2周内有效。

1.2.3 实验分组 将培养的细胞分成：①溶剂对照组，在培养液中加入与实验组等体积的DMSO；②GEN对照组，在培养液中的终浓度分别为50、100 μmol/L；③实验组(24个新型异黄酮类化合物，4个新型甾体类化合物)，每1种药物在培养液中的终浓度分别为50、100 μmol/L。

1.2.4 MTT比色法测定癌细胞存活率 取对数生长期的Hela细胞或MCF-7细胞，按常规方法分别制成单细胞悬液，调整细胞数，以2.5×10^4/ml的细胞量接种于96孔培养板中，每孔198 μl，培养24 h后，随机分成溶剂对照组，阳性药物对照组和实验化合物组。按分组要求，实验化合物组加入5 mmol/L或10 mmol/L新型异黄酮类或新型甾体类化合物(24个新型异黄酮类，4个新型甾体类化合物)溶液2 μl/孔，阳性药物对照组加入与实验化合物组等浓度、等体积的GEN溶液，溶剂对照组加入等体积的DMSO溶液，各化合物或药物组终浓度分别为50 μmol/L，100 μmol/L，每组设4个复孔。继续培养48 h后，每孔加入MTT溶液20 μl，再培养4 h。终止培养后小心吸去培养液，每孔加入DMSO 150 μl，振荡，待紫色结晶完全溶解，以DMSO调零，用酶联免疫检测仪以490 nm波长测各孔吸光度值[D(490)值]，计算各组平均D(490)值和细胞存活率，存活率=[实验组D(490)值/溶剂对照组D(490)值]×100%。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件进行t检验和单因素方差分析。

2 结果

不同化合物、不同剂量对细胞的增殖活性有不同影响，不同细胞对同一化合物的敏感性也不完全一致。

2.1 第一批化合物对几种细胞体外增殖活性的影响

2.1.1 对Hela细胞增殖活性的影响 处理浓度为50 μmol/L时，各化合物(除ZE1)均对Hela细胞的增殖具有不同的抑制作用，以ZF7和ZE2的作用最为显著，此两组细胞存活率均低于60%；当处理浓度增至100 μmol/L，ZE2、ZF7、ZF4对细胞的增殖抑制作用更加明显，细胞存活率均低于30%，以ZE2效果最为明显，见表1。

表1 第一批化合物对Hela细胞增殖的影响(%，$\bar{x}\pm s$)

化合物	终浓度	
	50 μmol/L	100 μmol/L
ZF1	71.72±4.22[b]	62.45±3.23[b]
ZF2	73.93±3.26[b]	89.94±4.32
ZF3	68.47±4.54[b]	33.88±3.21[b]
ZF4	65.31±4.32[b]	26.42±3.16[b]
ZF5	72.46±4.12[b]	65.39±4.18[b]
ZF6	68.21±3.56[b]	59.12±3.18[b]
ZF7	58.16±4.62[b]	27.65±2.88[b]
ZF8	83.72±4.32[a]	73.12±3.46[b]
ZF9	77.22±3.96[b]	53.58±3.22[b]
ZF10	72.46±3.56[b]	113.69±4.39
ZF11	84.15±3.29[b]	98.47±3.56
ZF12	84.58±3.41[b]	88.45±3.23
ZE1	94.93±4.52	98.09±4.21
ZE2	55.35±3.11[b]	15.11±2.78[b]

溶剂对照组细胞存活率为100%；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与溶剂对照组比较

2.1.2 对MCF-7细胞增殖的影响 当处理浓度为50 μmol/L时，各化合物(除ZF11)均对MCF-7细胞的增殖具有一定的抑制作用，尤以ZF7、ZE1和ZE2的作用显著，此三组细胞存活率均低于70%，当处理浓度增至100 μmol/L，ZE1、ZE2、ZF7对细胞的增殖抑制作用显著增强，以ZE1、ZE2抑制效果最为明显(表2)。

表2 第一批化合物对MCF-7细胞增殖的影响(%，$\bar{x}\pm s$)

化合物	终浓度	
	50 μmol/L	100 μmol/L
ZF1	85.80±4.23	84.13±3.57
ZF2	80.24±3.76[b]	79.22±3.29[b]
ZF3	78.05±4.17[b]	60.40±3.59[b]
ZF4	75.42±3.56[b]	51.99±3.45[b]
ZF5	86.42±4.17[a]	82.59±3.57[a]
ZF6	86.07±3.26[b]	73.20±3.45[b]
ZF7	62.02±2.18[b]	49.20±3.23[b]
ZF8	85.80±3.78	85.44±3.56[a]
ZF9	74.71±2.39[b]	62.72±2.56[b]
ZF10	84.09±3.59[b]	77.81±3.47[b]
ZF11	116.42±3.89	97.50±3.65
ZF12	94.07±3.12	78.86±3.48[b]
ZE1	35.16±3.09[b]	27.54±4.17[b]
ZE2	53.52±4.51[b]	30.66±3.58[b]

溶剂对照组细胞存活率为100%；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与溶剂对照组比较

2.2　第二批化合物对细胞体外增殖活性的影响

2.2.1　对 Hela 细胞增殖的影响　　当处理浓度为 50 μmol/L，各化合物（除 F12）均对 Hela 细胞的增殖有显著的抑制作用，其中以 E2、F8、F11 对细胞的增殖抑制作用较好，此 3 组细胞存活率均低于 60%，当处理浓度增至 100 μmol/L，F11、F8、E2 对细胞的增殖抑制作用进一步增强，细胞存活率均低于 50%，以 E2 和 F11 效果最为明显（表 3）。

表 3　第二批化合物对 Hela 细胞增殖的影响（%，$\bar{x} \pm s$）

化合物	终浓度	
	50 μmol/L	100 μmol/L
F1	67.39 ± 4.32[b]	64.13 ± 3.86[b]
F2	88.80 ± 4.18[b]	83.52 ± 4.51[b]
F3	68.41 ± 3.68[b]	77.80 ± 4.27[b]
F4	76.40 ± 4.15[b]	59.45 ± 3.68[b]
F5	75.19 ± 4.12[b]	70.94 ± 4.35[b]
F6	76.04 ± 3.27[b]	64.21 ± 2.59[b]
F7	77.46 ± 4.18[b]	55.65 ± 3.78[b]
F8	54.49 ± 4.37[b]	40.02 ± 3.27[b]
F9	61.59 ± 3.78[b]	51.82 ± 4.32[b]
F10	82.72 ± 4.75[b]	93.91 ± 4.76
F11	28.59 ± 3.97[b]	26.59 ± 4.32[b]
F12	117.17 ± 3.25[b]	105.34 ± 4.16
E1	62.19 ± 4.65[b]	57.67 ± 3.28[b]
E2	43.14 ± 4.58[b]	10.32 ± 4.77[b]

溶剂对照组细胞存活率为 100%；b：$P<0.01$，与溶剂对照组比较

2.2.2　对 MCF-7 细胞增殖的影响　　当处理浓度为 50 μmol/L，仅 F1、F11 对 MCF-7 细胞的增殖有抑制作用，当处理浓度增至 100 μmol/L，F11、E2 对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用增强，细胞存活率均低于 60%。值得注意的是 F12 在此两个处理浓度均对 MCF-7 细胞增殖有显著的促进作用（表 4）。

表 4　第二批化合物对 MCF-7 细胞增殖的影响（%，$\bar{x} \pm s$）

化合物	终浓度	
	50 μmol/L	100 μmol/L
F1	85.99 ± 4.89[b]	103.63 ± 3.24
F2	108.99 ± 3.27	101.44 ± 2.17
F3	113.49 ± 4.89	103.09 ± 4.56
F4	109.45 ± 3.24[a]	90.90 ± 3.25[a]
F5	122.29 ± 4.57[b]	92.85 ± 3.68[a]
F6	115.48 ± 2.48[b]	96.21 ± 3.56
F7	107.22 ± 5.24	84.11 ± 3.93[b]
F8	106.96 ± 6.53	82.43 ± 3.27[b]
F9	116.51 ± 5.87[b]	88.07 ± 4.86[b]
F10	113.32 ± 3.21[b]	95.63 ± 3.86
F11	80.79 ± 4.96[b]	58.24 ± 3.21[b]
F12	184.93 ± 3.68[b]	185.12 ± 3.79[b]
E1	121.02 ± 3.35[b]	92.58 ± 2.47[a]
E2	97.39 ± 4.12	52.57 ± 3.27[b]

溶剂对照组细胞存活率为 100%；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与溶剂对照组比较

2.3　比较所筛选化合物与 GEN 的抑制 Hela 细胞、MCF-7 细胞增殖活性

化合物 F8、F11、ZF3、ZF4、ZF7、ZE2 在处理浓度为 50 μmol/L和 100 μmol/L 时，对 MCF-7 细胞（F8 在处理浓度为 50 μmol/L 时除外）和 Hela 细胞的增殖有显著的抑制作用；效果均优于 Genistein（表 5、6）。

表 5　抑制作用较强的化合物与 GEN 对 Hela 细胞增殖影响的比较（%，$\bar{x} \pm s$）

化合物	终浓度	
	50 μmol/L	100 μmol/L
F8	69.85 ± 4.56[bc]	39.69 ± 3.78[bc]
F11	37.98 ± 4.37[bc]	20.61 ± 4.02[bc]
ZF3	67.75 ± 3.78[bc]	28.82 ± 2.39[bc]
ZF4	73.09 ± 4.35[bc]	21.37 ± 3.26[bc]
ZF7	61.07 ± 4.23[bc]	28.05 ± 3.26[bc]
ZE2	73.85 ± 3.68[bc]	14.89 ± 2.13[bc]
GEN	88.23 ± 3.65[a]	79.81 ± 2.34[a]

溶剂对照组细胞存活率为 100%；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与溶剂对照组比较；c：$P<0.05$，与 GEN 对照组比较

表 6　抑制作用较强的化合物与 GEN 对 MCF-7 细胞增殖影响的比较（%，$\bar{x} \pm s$）

化合物	终浓度	
	50 μmol/L	100 μmol/L
F8	102.65 ± 4.35[ac]	79.38 ± 3.17[b]
F11	78.98 ± 3.65[bc]	56.34 ± 3.59[bc]
ZF3	76.38 ± 4.38[bc]	57.96 ± 3.57[bc]
ZF4	73.19 ± 3.67[bc]	53.47 ± 4.26[bc]
ZF7	64.28 ± 3.32[bc]	53.28 ± 3.96[bc]
ZE2	51.67 ± 4.65[bc]	28.37 ± 3.83[bc]
GEN	87.75 ± 3.65[a]	77.81 ± 2.34[b]

溶剂对照组细胞存活率为 100%；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与溶剂对照组比较；c：$P<0.05$，与 GEN 对照组比较

3　讨论

据报道，Genistein 抑制肿瘤细胞生长的剂量因肿瘤细胞的种类不同而有所差异。当 Genistein 浓度达到 20～30 μmol/L 以上时，可对多种肿瘤细胞如人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7、人胃癌细胞 HGC-27、人早幼粒白血病细胞 HL-60、人淋巴细胞性白血病细胞 MOLT-4、人纤维肉瘤细胞 HT1080 等的生长产生抑制作用，浓度较低时，抑瘤作用不明显[3-7]。说明选择化合物的浓度十分重要。本研究在 10～500 μmol/L 预实验结果基础上，选用了 50、100 μmol/L 作为正式实验的处理浓度。采用 MTT 法观察了 24 个异黄酮类化合物及 4 个甾体类化合物对 Hela、MCF-7 两种细胞株的增殖活性的影响，以细胞增殖活性为检测指标，

对28个化合物进行了初步体外生物活性筛选。

通过采用MTT法检测第一批化合物对上述2种细胞体外增殖活性的影响，初步筛选出了效果较好的异黄酮类化合物ZF3、ZF4、ZF7和甾体类化合物ZE2，其中以甾体类化合物ZE2效果最好，ZE2对以上两种种细胞的增殖活性，在给定的处理浓度下均有显著的抑制作用($P<0.01$)。进一步从化学结构上分析化合物ZE2的分子特征，比较它与第一批中其他化合物分子结构的区别，初步推测其3位的碱性侧链可能为其活性基团。

碱性基团常存在于一些药物分子中，它是药物分子发挥某些特定作用所必需的基团。如1962年Lesher发现萘啶酸具有抗菌活性，但其抗菌作用低、抗菌谱窄。在进行大量结构修饰和初步筛选后，认为理想的喹诺酮类化合物在7位上应有一个碱性基团，于是合成了在7位引入碱性基团的化合物诺氟沙星和吡咯酸等，并在临床研究中证实其抗菌能力远大于萘啶酸。又如氯丙嗪是临床上常用的抗精神病药，但是其毒副作用也较大，将N^{10}侧链的二甲基用碱性的杂环进行取代，则可降低其毒副作用，提高其疗效。若以哌嗪衍生物取代，则可得到抗精神失常作用更强的药物，如以羟已基哌嗪取代的药物奋乃静、以甲基哌嗪取代的药物三氟拉嗪等。另外，选择性雌激素受体调节剂——雷洛替芬，作为与雌激素结构相似的骨质疏松防治药物，在一定程度上降低了雌性激素样活性和致癌危险性，实现了雌激素的药理作用分离[8]。Grese等[9]研究发现，雷洛替芬分子中含有的碱性侧链为活性必需基团，若以其他基团取代则活性明显削弱或消失。

根据以往众多药物工作者的经验以及第一批化合物初筛的结果，我们将碱性侧链引入异黄酮及甾体化合物的结构中，设计并合成了第二批化合物，其中包括12个异黄酮类化合物(F1～F12)和两个甾体类化合物(E1、E2)，选择与第一批化合物抗增殖实验相同的两种细胞株，两个处理浓度，MTT法对其体外活性进行了初筛，以观察碱性基团对异黄酮及甾体类衍生物的生物活性有何种影响，希望得到对肿瘤细胞杀伤效果更显著的化合物。我们初步筛选出了效果较好的异黄酮类化合物F8和F11，对以上两种细胞的增殖活性，在给定的处理浓度下均有显著的抑制作用($P<0.01$)。

通过对两批化合物采用MTT的方法对其体外活性进行初筛，综合比较，我们初步认为异黄酮类化合物F8、F11、ZF3、ZF4、ZF7以及甾体类化合物ZE2体外活性较好，进一步与研究的较为深入和广泛的Genistein进行体外活性的对比。采用MTT法检测以上化合物对Hela细胞和MCF-7细胞体外增殖活性的影响，结果表明，筛选所得的化合物在给定的浓度时，均对细胞增殖有显著的抑制作用，效果均优于Genistein。

综上所述，我们对异黄酮和甾体类化合物的结构改造和修饰，得到了一系列新型的化合物。体外抗细胞增殖实验表明，大部分化合物对肿瘤细胞的增殖有显著的抑制作用。综合评价效果较好的化合物F8、F11、ZF3、ZF4、ZF7在给定的浓度下，体外抗肿瘤细胞增殖活性均强于Genistein，有值得进一步研究的潜在价值。

参考文献：

[1] 杨峥嵘，程天民，粟永萍，等. genistein对人乳腺癌抑瘤效应及造血辐射防护作用的实验研究[J]. 中华肿瘤杂志，2002，24(6)：548.

[2] 郑 虎. 药物化学[M]. 第4版. 北京：人民卫生出版社，2000：395.

[3] 郑 杰. 金雀异黄素[J]. 国外医学：卫生学分册，1998，25(5)：260－263.

[4] YAN C, HAN R. Genistein suppresses adhesion-induced protein tyrosine phosphorylation and invasion of B16-BL6 melanoma cells[J]. Cancer Lett, 1998, 129(1): 117－124.

[5] YANAGIHARA K, ITO A, TOGE T, *et al*. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract[J]. Cancer Res, 1993, 53(23): 5815－5821.

[6] CAPPELLETTI V, FIORAVANTI L, MIODINI P, *et al*. Genistein blocks breast cancer cells in the G(2)M phase of the cell cycle[J]. J Cell Biochem, 2000, 79(4): 594－600.

[7] 颜春洪，韩 锐. Genistein抑制HT1080人纤维肉瘤细胞的体外侵袭作用[J]. 中华肿瘤杂志，1999，21(3)：171－174.

[8] 郑 虎，邹 永，翁玲玲. 苯并二氢吡喃类非甾体雌激素衍生物的合成[J]. 中国药物化学杂志，1999，9(4)：285－289.

[9] GRESE T A, PENNINGTON L D, SLUKA J P, *et al*. Synthesis and pharmacology of conformationally restricted raloxifene analogues: highly potent selective estrogen receptor modulators[J]. J Med Chem, 1998, 41(8): 1272－1283.

（编辑 薛国文）