

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/00



[12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/53 G01N 33/567
G01N 33/574 G01N 33/537
G01N 33/543 A01N 61/00
A01N 37/18 A61K 31/00
A61K 38/00

[21] 申请号 01815671.1

[43] 公开日 2003 年 11 月 26 日

[11] 公开号 CN 1458978A

[22] 申请日 2001.7.12 [21] 申请号 01815671.1

[30] 优先权

[32] 2000.7.14 [33] US [31] 60/218,942

[86] 国际申请 PCT/US01/21975 2001.7.12

[87] 国际公布 WO02/06514 英 2002.1.24

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.14

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港

[72] 发明人 钟森文

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

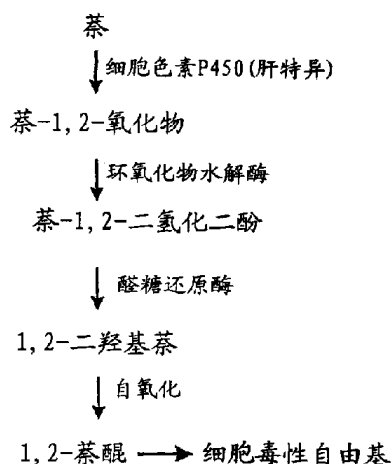
代理人 张广育 刘 玥

权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 3 页

[54] 发明名称 肝癌的酶激活化疗

[57] 摘要

本发明提供了筛选抗癌药物的方法，该方法是基于由癌细胞过量表达的酶的活性，这些酶能够将无毒的化合物转化成可特异地杀死这些癌细胞的细胞毒性药物。本发明特别提供了能够治疗肝癌，尤其是肝细胞癌的抗癌药物的筛选方法。本发明还提供了通过对个体施用由本发明的筛选方法选择的药物来治疗癌症，特别是肝癌，尤其是肝细胞癌的方法。在一种特定实施方案中，对个体施用萘或其衍生物。本发明还提供了用于治疗或减轻肝癌的药物组合物以及包含这些组合物的试剂盒。



ISSN 1008-4274

1. 一种筛选抗癌药物的方法，包括：
将过量表达一种酶的癌细胞在这种酶的抑制剂存在或不存在的条件下与候选药物接触；
- 5 测量一种物质的水平，这一物质的水平与将细胞暴露于药物所导致的细胞死亡的水平相关；并且
比较抑制剂存在或不存在时这一物质的水平；
其中抑制剂不存在时这一物质的水平的不同表示该药物对过量表达该酶的癌细胞具有抗癌活性。
- 10 2. 根据权利要求1的方法，其中癌细胞是肝癌。
3. 根据权利要求2的方法，其中癌细胞是肝细胞癌细胞。
4. 根据权利要求2或3的方法，其中酶是醛糖还原酶或 ARL-1或是这两者。
5. 根据权利要求4的方法，其中抑制剂是 AL1567。
- 15 6. 根据权利要求1、2或3的方法，其中所要测量的物质是 LDH。
7. 一种治疗或减轻癌症的方法，包括向需要治疗的个体施用治疗有效量的药物，该药物具有由权利要求1的方法所测定的抗癌活性。
8. 根据权利要求7的方法，其中癌是肝癌。
9. 根据权利要求8的方法，其中癌是肝细胞癌。
- 20 10. 根据权利要求7、8或9的方法，其中药物是经口服给药的。
11. 根据权利要求7、8或9的方法，其中药物是肠胃外给药的。
12. 根据权利要求11的方法，其中药物是静脉内、皮下或肌肉内给药的。
13. 根据权利要求8或9的方法，其中药物是经肝动脉内给药的。
- 25 14. 根据权利要求8或9的方法，其中药物是经化学栓塞给药的。
15. 一种治疗或减轻肝癌的方法，包含向需要治疗的个体施用治疗有效量的茶或其衍生物。
16. 根据权利要求15的方法，其中肝癌是肝细胞癌。
17. 根据权利要求15或16的方法，其中茶或其衍生物是经口服
- 30 给药的。
18. 根据权利要求17的方法，其中茶衍生物是茶-1,2-二氢化二酚。

19. 根据权利要求 15 或 16 的方法，其中萘或其衍生物是肠胃外给药的。
20. 根据权利要求 19 的方法，其中萘或其衍生物是静脉内、皮下或肌肉内给药的。
- 5 21. 根据权利要求 19 的方法，其中萘衍生物是萘-1,2-二氢化二酚。
22. 根据权利要求 15 或 16 的方法，其中萘或其衍生物是经肝动脉内给药的。
23. 根据权利要求 15 或 16 的方法，其中萘或其衍生物是经化学
10 栓塞给药的。
24. 一种治疗或减轻癌症的药物组合物，包含治疗有效量的药物，以及一种药学上可接受的载体，该药物具有由权利要求 1 的方法所测定的抗癌活性。
25. 根据权利要求 24 的药物组合物，其中癌是肝癌。
- 15 26. 根据权利要求 25 的药物组合物，其中肝癌是肝细胞癌。
27. 一种治疗或减轻肝癌的药物组合物，包含治疗有效量的萘或其衍生物，以及一种药学上可接受的载体。
28. 根据权利要求 27 的药物组合物，其中肝癌是肝细胞癌。
29. 根据权利要求 27 或 28 的药物组合物，其中萘衍生物是萘-1,2-
20 二氢化二酚。
30. 根据权利要求 24、25、26、27 或 28 的药物组合物，其中组合物是用于口服的固体形式。
31. 根据权利要求 30 的药物组合物，其中用于口服的固体形式是片剂。
- 25 32. 根据权利要求 30 的药物组合物，其中用于口服的固体形式是胶囊。
33. 根据权利要求 24、25、26、27 或 28 的药物组合物，其中组合物是液体形式。
34. 根据权利要求 24、25、26、27 或 28 的药物组合物，其中载
30 体是碘化罂粟油。
35. 根据权利要求 29 的药物组合物，其中载体是碘化罂粟油。
36. 一种试剂盒，该试剂盒在一个或多个容器中包含权利要求

24、25、26、27 或 28 的药物组合物以及试剂盒的使用说明书。

37. 一种试剂盒，该试剂盒在一个或多个容器中包含权利要求 29 的药物组合物以及试剂盒的使用说明书。

肝癌的酶激活化疗

1. 介绍

5 本发明涉及抗癌药物的筛选方法，该方法是基于由癌细胞过量表达的酶的活性，这些酶能够将无毒的化学物质或化合物转化成可特异地杀死这些癌细胞的细胞毒性药物。本发明特别涉及能够治疗肝癌，尤其是肝细胞癌的抗癌药物的筛选方法。本发明还涉及通过应用由本发
10 明筛选方法选择的药物来治疗、减少癌症，特别是肝癌，尤其是肝细胞癌的方法。除此之外，本发明还涉及治疗或减轻肝癌的药物组合物以及包含这些组合物的试剂盒。

2. 背景技术

肝癌，尤其是肝细胞癌（HCC），在香港和中国是主要的导致死亡的癌症之一。在许多其他国家，包括美国和欧洲，它也是重要的健康
15 问题。目前唯一有效的治疗方法是通过外科手术将癌组织切除，条件是癌症在早期发现，癌组织比较小，并且它没有转移到其他部位。然而，在大多数情况下，肝细胞癌在早期是无症状的，一旦病人被诊断患有HCC，外科手术为时晚矣。很多化疗方案，包括肝动脉内化疗（HIA）和传统化疗试剂的化学栓塞法，疗效都有限（Venook, A. P., 2000, Regional strategies for managing hepatocellular carcinoma, Oncology (Huntingt) 14: 347-54)。

醛糖还原酶（AR）是一种尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）依赖性酶。最初，这种酶是由于它存在于肾组织、睾丸以及其他组织中，并且能将葡萄糖还原成山梨糖醇而被鉴定的。这种酶对还原各种
25 芳香醛和脂肪醛很有效，如甘油醛，安息香醛，吡啶醛（Inazu, N., et al., 1994, J. Biochem. (Tokyo) 115: 991-999），醛糖还原酶还可能对氧化应激下产生的毒性脂肪醛以及细胞新陈代谢中产生的其他有害醛类的解毒有关（V. Jagt et al., 1992, J. Biol. Chem., 267: 4364-4369; V. Jagt et al., 1995, Biochem. Biophys. Acta 1249: 117-126）。另一方面，有报道说醛糖还原酶在胃癌细胞系（Ax, et al., 2000, Biochem. Pharmacol. 59: 293-300）和直肠癌细胞系中过量表达（Akashi, et al., 2000, Int. J. Cancer 88 : 873-80）。除此以

外, 以前的文献表明约有 29% 的肝细胞癌过量表达醛糖还原酶, 54% 过量表达 ARL-1, 后者是一种类醛糖还原酶蛋白, 这种蛋白在氨基酸序列上有 71% 与醛糖还原酶同源, 并有相似的酶活性。(Cao, D. L. Fan, S. T., and Chung, S. S. M., 1998, Identification and
5 characterization of a novel human aldose reductase-like gene. J. Biol. Chem. 273a : 11429-35)。如上所述, 醛糖还原酶与 ARL-1 有广泛的底物特异性, 这两种酶能还原多种脂肪醛与芳香醛。因此, 它们通常被看作能使抗癌药物解毒的酶类。(Hyndman, et al., 1999, Erazymol. Molec. Biol. Carbonyl Metab 7: 427434, Weiner et al.
10 ed., Kluwer Academic/Plenum Pub. New York)。而且, 有证据表明, 这些酶类确实可以让癌细胞对抗癌药物更具有抗性(Lee, et al., 2001, Anti-cancer Drugs 12: 129-132)。然而, 这些酶类被用来将非毒性化学物质转化成细胞毒性药物以杀死那些过量表达此酶的癌细胞的潜能并没有广泛的研究。

15 在一个不相关的研究萘诱导的白内障的项目中, Lee 等人发现醛糖还原酶参与了将相对无毒的萘-1, 2-二氢化二酚转化为 1, 2-二羟基萘, 后者然后自我氧化生成 1, 2-萘醌, 此萘醌有很强的细胞毒性。(Lee, A. Y. W. and Chung, S. S. M., 1998, Involvement of aldose reductase in naphthalene cataract. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.
20 39: 193-97, 在此整篇被引用作为参考)。假设的萘白内障的机制如图 1 所示(Lee, A. Y. W. et al., 1998, supra; van Heyningen, R., 1967, The metabolism of naphthalene and its toxic effect on the eye. Biochem. J. 102: 842-852)。

3. 发明概述

25 本发明部分地基于发明者对大比率肝细胞癌过量表达醛糖还原酶或相关的 ARL-1 酶的观察以及对醛糖还原酶和 ARL-1 能够将非毒性的 ND 转化成高度细胞毒性的 NQ 的观察(见图 1)。因此, 萘或者其非毒性衍生物可以作为一种药物, 特异性杀死分别过量表达编码醛糖还原酶和 ARL-1 的两种基因的肝癌细胞。这样, 本发明提供了
30 筛选抗癌药物的方法, 这些药物是某些癌细胞过量表达的酶的底物, 并且可以被酶的活性转化为细胞毒性药物; 这样, 根据癌细胞过量产生这些酶类的特征, 就可以特异性杀死癌细胞。本发明提供了一

种简单的，有效的，最重要的是靶向特异的抗癌药物的筛选。也即，本发明提供的抗癌药物的筛选方法包括：将过量表达一种酶的癌细胞在这种酶的抑制剂存在或不存在的条件下与候选药物接触；测量一种物质的水平，这一物质的水平与将细胞暴露于药物所导致的细胞死亡的水平相关；并且比较抑制剂存在或不存在时这一物质的水平；其中抑制剂不存在时这一物质的水平的不同表示该药物对过量表达该酶的癌细胞具有抗癌活性。在一个特定的实施方案中，本发明提供了筛选抗癌药物的方法，以治疗过量表达醛糖还原酶和/或 ARL-1 的肝细胞癌。

10 本发明也提供了治疗或减轻癌症的方法，包括对一个需要治疗的主体施用治疗有效量的药物，此药物具有上述本发明的筛选方法确定的抗癌活性。在一个特定的实施方案中，被治疗的癌症是过量表达醛糖还原酶和/或 ARL-1 的肝细胞癌。在另一个特定的实施方案中，治疗肝细胞癌的药物是萘或者它的一种衍生物，如萘-1, 2-氧化物和萘 1, 2-二氧化二酚。

15 本发明还包括被用来治疗或者减轻癌症的药物组合物，包含治疗有效量的具有由本发明的筛选方法确定的具备抗癌活性的药物。在一种特定的实施方案中，被治疗的癌症是过量表达醛糖还原酶和/或 ARL-1 的肝细胞癌。在另一个特定的实施方案中，具有抗癌活性的药物是萘或它的衍生物。并且，本发明提供了一种试剂盒，该试剂盒在一个或多个容器中包含本发明的药物组合物。

3.1 定义

25 这里所使用的“具有抗癌活性的药物”是指一种药物，其本身对于正常细胞或癌细胞具有很低的毒性，却可以被癌细胞过量表达的酶转化为对癌细胞有高毒性的物质，以至于这种药物能阻止癌细胞的生长和/或选择性杀死癌细胞，并且对正常细胞无害或具有很低的毒性。

30 这里提到的“肝癌”是指肝脏中发现的癌症，可能来源于肝脏（在此称为“肝细胞癌”或“HCC”）或者产生于其他组织，通过转移到达肝脏。

这里提到的“治疗有效量”是指一种药物或其衍生物的剂量能够减少或减轻个体中癌症的严重程度、持续时期和/或症状。

这里提到的“药学上可接受的载体”是指一种惰性辅助物质，它形成这种药物的赋形剂，并且被联邦或州政府的管理部門批准，或者列在美国药典，或其他公认的用于动物尤其是人类的药典中。

4. 附图说明

5 图 1: 显示了假设的生物转化机制，涉及醛糖还原酶 (AR)，它将无毒的萘转化为高细胞毒性的 1, 2 - 萘醌。

图 2: 显示了 HepG2 细胞中 AR 基因在高渗培养基中的不同时间的表达。2.37kb 的条带显示的是非正常加工的 AR mRNA; 1.35kb 的条带显示的是功能性的 AR mRNA。GADPH 是一个不因高渗诱导的基因，用来表明每一道加载的 mRNA 的相对的量。道 C 显示的是等渗对照。

10 图 3: 显示的是萘 1, 2 - 二氢化二酚对在等渗 (I) 或高渗 (H) 培养基中，存在和不存在醛糖还原酶抑制剂 (ARI) AL1576 (Alcon Laboratories, Fort Worth, TX) 的条件下培养的 HepG2 细胞的毒性图。LDH 在培养基中的释放是在加入 ND 后 5 小时测定的。数据用均值 \pm S. D. (n=3) 来表达，使用单向 ANOVA 来进行统计分析 (*显示 $p < 0.001$)。

5. 发明详述

5.1 筛选实验

20 已知，不同的癌细胞相对与正常细胞有不同的基因表达水平。当癌细胞中某种酶类的表达增加的时候，通过使用本发明的筛选方法，可以有效利用这些酶的催化活性，以具有强选择性的方式将无毒化合物转化为高度细胞毒性的化合物。

目前的用于筛选可能的抗癌药物的方法不仅可以避免使用对正常细胞有高度毒性的化疗试剂，还可以选择出有效的抗癌试剂，这些试剂可以由于癌细胞中某种酶的过量表达而特异于癌细胞。

应用本发明的筛选方法，萘和它的某些衍生物被发现对于癌细胞具有很强的抗癌活性，比如过量表达醛糖还原酶和 ARL-1 的肝细胞癌 (见 7.2.2; 和图 3)。图 1 显示了生物转化机制，涉及醛糖还原酶，它将无毒的萘转化为高细胞毒性的 1, 2 - 萘醌 (NQ)。

30 在图 3 中，ND 转化为 NQ 的毒性作用是与 HepG2 细胞所表达的醛糖还原酶量增加有关的；被培养在不影响 HepG2 细胞醛糖还原酶表达的含有 500 μ M ND 等渗培养基中的 HepG2 细胞 (对照细胞) 没有毒性

作用的表现，而培养在能够增加醛糖还原酶表达的、含有相同量 ND 的高渗培养基中的细胞释放的 LDH 超过对照细胞的十倍。并且，醛糖还原酶抑制剂的存在保护了 HepG2 细胞免受 ND 毒性作用。

因此，本发明提供了一种抗癌药物的筛选方法，包含：

5 将过量表达一种酶的癌细胞在这种酶的抑制剂存在或不存在的条件下与候选药物接触；

测量某一物质的水平，这一物质的水平与将细胞暴露于药物所导致的细胞死亡的水平相关；并且

比较抑制剂存在或不存在时这一物质的水平；

10 其中抑制剂不存在时这一物质的水平的不同表示该药物对过量表达该酶的癌细胞具有抗癌活性。

在一个特定的实施方案中，癌症是肝癌，包括由其他器官转移的和产生于肝的，优选是过量表达醛糖还原酶和/或 ARL-1 的肝细胞癌。抑制剂可以是醛糖还原酶和/或 ARL-1 的拮抗剂，包括
15 AL1576 (2,7-二氟代螺茛-9,5'-咪唑烷基-2'4'-二酮；Alcon Laboratories, FortWorth, TX), Eparestat (E-3-羧甲基-5-[(2E-甲基)-3-苯基亚丙烯基]-绕丹宁；Ono Pharmaceutical Co. Ltd., Japan), 索比尼尔 (S-6-氟代螺茛并二氢吡喃-4,5'咪唑烷基-2',4'-二酮；Pfizer Inc., New York), Zopolrestat (3,4-二氢-4-氧代-
20 3-[[5 (三氟甲基)-2-苯并噻唑基]甲基]-1,2,3-二氮杂萘乙酸；Pfizer), 托瑞司他 (N [5- (三氟甲基)-6-甲氧基-1-萘基]-N-甲基甘氨酸；Wyeth-Ayest Laboratories) 和 Fidarestat ((+)-(2S,4S)-6-氟-2'5'二氧代螺茛并二氢吡喃-4,4'-咪唑烷基-2-羧基酰胺；Sanwa, Japan)。

25 候选药物的细胞毒性能够用现有技术中不同的方法测定，包括，但不限于，LDH-释放实验和 Cr^{51} -释放实验。

通过使用不同的癌细胞培养物，这些细胞能够过量表达具有广泛底物的特定的酶，本发明的筛选方法能够应用于其他非肝癌类癌症的药物的开发。

30

5.2 用筛选方法选择的药物的治疗用途

由于肝病病因潜在的多变性，比如乙型肝炎，丙型肝炎，肝硬化，

等等，治疗肝细胞癌(HCC)往往是很困难的。而且手术和/或各种化学治疗的治疗效果受到肿瘤生长和足够肝保留之间的平衡的很大的影响(A. Venook, 2000, Regional strategies for managing hepatocellular carcinoma, *Oncology* 14 (3): 347-354, 在这里全部引用作为参考)。

5 由于对于正常细胞的普遍毒性，全身化疗通常是不合适的。因此局部肝脏药物递送成为治疗 HCC 的一个优选方法。局部治疗的例子有肝动脉内化疗(HIA)，化学栓塞，和内部放射治疗。但是一般化疗药物的毒性，比如氟尿苷和丝裂霉素以及放射治疗的毒性仍然使肝保留不足的患者要冒肝衰竭的危险，即使是局部治疗也是如此。

10 本发明的方法选择的抗癌药物对某些特殊的癌细胞更有针对性，因此与传统化疗试剂相比更加安全和有效，特别是在局部治疗中。比如，药物可能用一个植入的泵直接注入患 HCC 的个体的肝动脉内(HIA方法)。这种方法可能会有特殊的效果，因为据报导肝肿瘤 80%的血液来源于肝动脉，而正常肝组织大部分的血液是由门静脉提供的

15 (Venook, 2000, supra; Breedis et al., 1954, The blood supply of neoplasms in the liver. *Am. J Pathol.* 30: 969-985)。或者，本发明的药物可与其它化疗药物在 HIA 化学治疗法中一起使用，比如氟尿苷，甲酰四氢叶酸，阿霉素，顺铂(FLAP)，5-氟尿嘧啶(PIAF)和丝裂霉素。

20 化学栓塞法是本发明的另外一种可以用于局部递送药物的方法。这种方法将血管阻塞和 HIA 化疗结合起来。在这种方法中，对肝动脉的阻塞导致肿瘤动脉血液供应的阻断，因而造成肿瘤缺血而不会影响肝的其它部分。而且，同时在动脉内给药会提高药物在受影响区域内的分布和保留时间(Venook, 2000, supra)。作为栓塞材料

25 有明胶海绵(Venook, et al., 1990, Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 8 (6): 1108-1114)，胶原蛋白(Daniels et al., 1988, Collagen chemoembolization: Pharmacokinetics and tissue tolerance of cisplatin in liver and kidney. *Cancer Res.* 48: 2446-2450)，聚乙烯醇(Ajani et al.,

30 1988, Islet cell tumors metastatic to the liver: Effective palliation by sequential hepatic artery embolization. *Ann. Intern. Med.* 108: 340-344)，微球体(Ho et al., 1997, Tumour-

to-normal uptake ratio of 90-Y microspheres in hepatic cancer assessed with 99Tcm macroaggregated albumin. Br. J. Radiol. 70: 823-828).

5 本发明的药物同样可以与碘化罂粟油 (Lipiodol) 一起使用。碘化罂粟油是一种用于淋巴造影的造影材料。这是罂粟种子油中脂肪酸的乙酯, 含有 38 重量%的碘 (Venook, 2000, supra)。当它在经肝动脉内施用时会集中在肝肿瘤病灶上, 因此它可以提高药物的递送。因此本发明的药物可以溶解在碘化罂粟油中, 用 HIA 法施用或者伴随使用化学栓塞法。

10 进一步, 用本发明的筛选法选出来的药物可以全身施用, 如采用口服 (比如片剂和胶囊剂) 或者肠胃外给药 (比如静脉, 肌肉内, 皮下注射), 因为它们的全局毒性降低了。

这些治疗特别适用于对于全局毒性高度敏感的病人和/或者有多发肿瘤从而排除手术治疗可能性的病人。此外, 这些治疗可以用于等待接受器官移植的病人, 以便阻止肿瘤的生长或癌细胞向身体其他部分的扩散。

本发明的药物的适用剂量可由各种类型癌症的多种动物模型实验来决定, 比如一种鼠肝细胞瘤模型, 它使用 N-亚硝基-N-甲脒 (Diwan, B. A. et al., 1985, N-Nitroso-N-methylurea initiation in multiple
20 tissues for organ-specific tumor promotion in rats by phenobarbital. J. Natl. Cancer Inst. 75 : 1099-1105) 或者 2-乙酰基氨基芴 (Hadjiolov, N. et al., 1995, Early initiating and promoting effects in 2-AAF-induced rat liver carcinogenesis: an immunohistochemical study. Cancer lett. 98 : 39-46)。已经知道, 类似于人类的 HCC, 鼠肝细胞瘤同样过量表达醛糖还原酶
25 (Takahashi, M. et al., 1995, Elevation of aldose reductase gene expression in rat primary hepatoma and hepatoma cell lines: implication in detoxification of cytotoxic aldehydes. Int. J. Cancer 62 (6): 749-54) 和醛糖还原酶样蛋白 ARL-1 (Zeindl-
30 Eberhart, E. et al., 1997, Further characterization of a rat hepatoma-derived aldose-reductase-like protein--organ distribution and modulation in vitro. Eur. J. Biochem. 247:

792-800)。而且，人类 HCC 的样品可以被直接植入裸鼠，在后者体内它们会发展成为肝癌 (Sun, F. X. et al., 1996, Metastatic models of human liver cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122 (7): 397-402)。裸鼠模型具有可以测试真正的人类 HCC 的优点。

在兔白内障模型中，约 1 g/kg 体重的萘造成白内障以及视网膜的退化 (van Heyningen, R. et al., 1967, The metabolism of naphthalene and its toxic effect on the eye. Biochem. J. 102: 842-852)。因此，这最有可能是人类口服萘的毒性水平。更高水平的药物可以用化学栓塞的方法施用，药物被直接递送到受癌症侵袭的肝叶。

6. 实施例

已知那些没有从根本上改变本发明的实施方案的基本活性的改进同样包括在本发明的范围内。因此，下面的例子是打算描述而不是限制本发明。

6.1 材料和方法

6.1.1 化学品

1,4-萘醌 (NQ) 购自 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI); 萘-1,2-二氢化二酚 (ND) 来自 BioMol Research Laboratories (Plymouth, PA); 萘和甜菜碱来自 Sigma (St. Louis, MO); 醛糖还原酶抑制剂 (ARI) AL1567 是由 Alcon Laboratories (Fort Worth, TX) 赠送。MEM 培养基，含 4.5 g/L 蔗糖、胎牛血清、青霉素、链霉素、非必需氨基酸和丙酮酸钠的 Dulbecco's 改良伊格尔氏培养基来自 Life Technologies (Gaithersburg, MD)。细胞毒性检测试剂盒 (LDH) 来自于 Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany)。

6.1.2 细胞培养

HepG2 细胞，一种人类肝细胞系，购自 ATCC (Rockville, MD)。基

本（等渗的）培养基是添加了 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、0.1 mM MEM 非基本氨基酸和 1 mM 丙酮酸钠的 MEM 培养基。培养基添加 NaCl 至 100 mM 使之成为高渗，渗透压为大约 500 mosmol/kg（用渗透压计测量）。ND 溶解在 20%的乙醇中而制成 50 mM 储备液。NQ 溶解在 100%的乙醇中而制成 50 mM 储备液。AL1576 溶解在 20 mM 的 NaOH 中制成 20 mM 的储备液。

细胞首先在等渗培养基中培养至 70%满板。在培养基中添加 NaCl 使之成为高渗，孵育 72 小时。然后细胞以 8×10^4 细胞/孔的密度铺于 24-孔培养板上，在高渗培养基中孵育 24 小时。等渗条件下的对照细胞除了不加 NaCl 之外是在相同的条件处理。按指示添加 ND 和醛糖还原酶抑制剂 AL1576。

6.1.3 LDH 测定

细胞毒性由释放到培养基中的 LDH(乳酸脱氢酶)的比例来测量。LDH 的活性由细胞毒性检测试剂盒测定。被染色产物的光密度在 492 和 690 nm 用 SpectraMax 340 微量滴定板读数器(Molecular Devices)测定。通过取出培养基中的样品来测定释放到培养基中的 LDH 量。用最终浓度 1%的 Triton X-100 溶解细胞，通过提取细胞裂解物的样品测量总 LDH。

20

6.2 结果

6.2.1 HepG2 细胞中醛糖还原酶的诱导

为了模拟在细胞培养的肝癌中的过量表达，将 HepG2 细胞在含有 100 mM NaCl 的高渗培养基中培养。与等渗培养基相比，高渗培养基诱导的 HepG2 细胞醛糖还原酶的表达约高出 15 倍 (Nadkarni, V., Gabbay, K. H., Bohren, K. M., and SheikhHamad, D., 1999, Osmotic response element enhancer activity. *JBiol Chem.* 274: 20185-90, 在此全文引作参考)。如在图 2 中显示的，在上面描述的细胞培养条件下，高渗培养基的确诱导了醛糖还原酶的过量表达。

25

6.2.2 ND 的细胞毒性

萘不能溶于水。即使它首先被溶解于乙醇或者 DMSO 中，当把它

加入培养基中时它迅速沉淀。因此，茶的代谢产物 ND（见图 1），不同于茶，可用于测量由于 HepG2 细胞过量产生醛糖还原酶而被活化的药物的细胞毒性。

在图 3 中显示，3, 500 μ M 的 ND 对于在等渗培养基中培养的 HepG2 细胞没有毒性。但是，同等浓度的 ND 在高渗培养基中与在等渗培养基中相比对于 HepG2 细胞的毒性更大，这是由用 ND 孵育 5 小时后释放到培养基中的 LDH 更多所显示的。高渗培养基中培养的 HepG2 细胞对 ND 的敏感性增高，其原因在于过量表达 AR。以下事实支持了这一论点：AL1576，一种醛糖还原酶抑制物（ARI），可以保护这些细胞免受 ND 的毒性。当浓度为 50 μ M 时，ND 对于高渗或者等渗培养基中培养的 HepG2 细胞都没有毒性。

6.3 结论

细胞培养证实了这一观点，即可以利用在肝癌中过量表达的酶的活性，将非毒性化学物质转化为细胞毒性药物。ND 被用于显示：醛糖还原酶可以将相对无毒性化学物质转化为强细胞毒性药物。HepG2 细胞在高渗培养基中与等渗培养基中相比，对 ND 的敏感性提高 10 倍。醛糖还原酶抑制剂可以保护高渗的 HepG2 细胞免受 ND 的毒性，这一事实显示对这一化学物质敏感性的提高是过量表达醛糖还原酶的结果，后者使 ND 转化为高毒性的 NQ。基于相同理念的这些方法在设计

和/或筛选新药上具有很大用途，这些药物用于治疗 HCC 以及其他种类的癌症，这些癌症过量表达特殊的酶，后者能将非细胞毒性化合物转化为高细胞毒性的化合物。

ND 是一个治疗 HCC 的潜在的候选药物。虽然 ND 是茶的代谢产物（茶在动物模型中可造成白内障），但可以测定 ND 的适当剂量，从而特异性地杀死 HCC，而不会造成白内障或者破坏其他组织。此外，ND 可以作为化学栓塞治疗的一部分。

虽然，由于溶解度的问题，没有在以上提到的细胞培养系统中对茶进行测试，茶可能仍然是一个更好的治疗 HCC 的候选药物，因为它到 ND 的转化只发生在肝中。这可以在动物模型中进行测试，在这些模型中可口服茶，并以油作为溶剂。

在此全文引入在这个申请中所引用的多种出版物的公开内容作为

参考，目的是为了更全面地描述与这个发明相关的技术。

本领域技术人员将可通过常规试验认识到或确定本发明的特定实施方式的许多等同物。这些等同物也应该被下面的权利要求所包括。

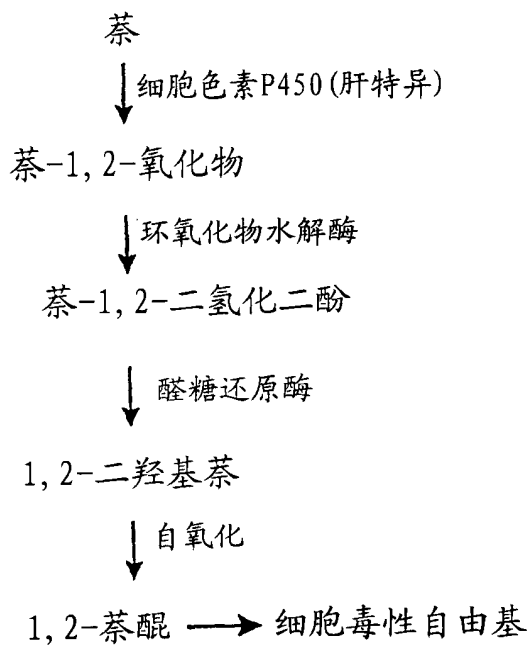


图 1

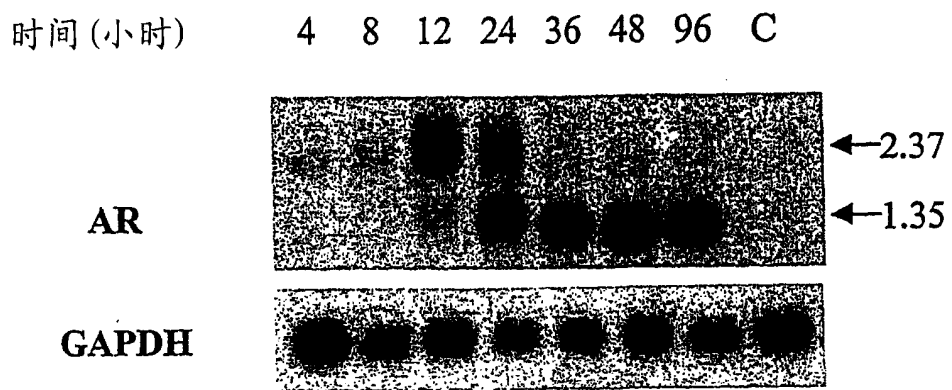


图 2

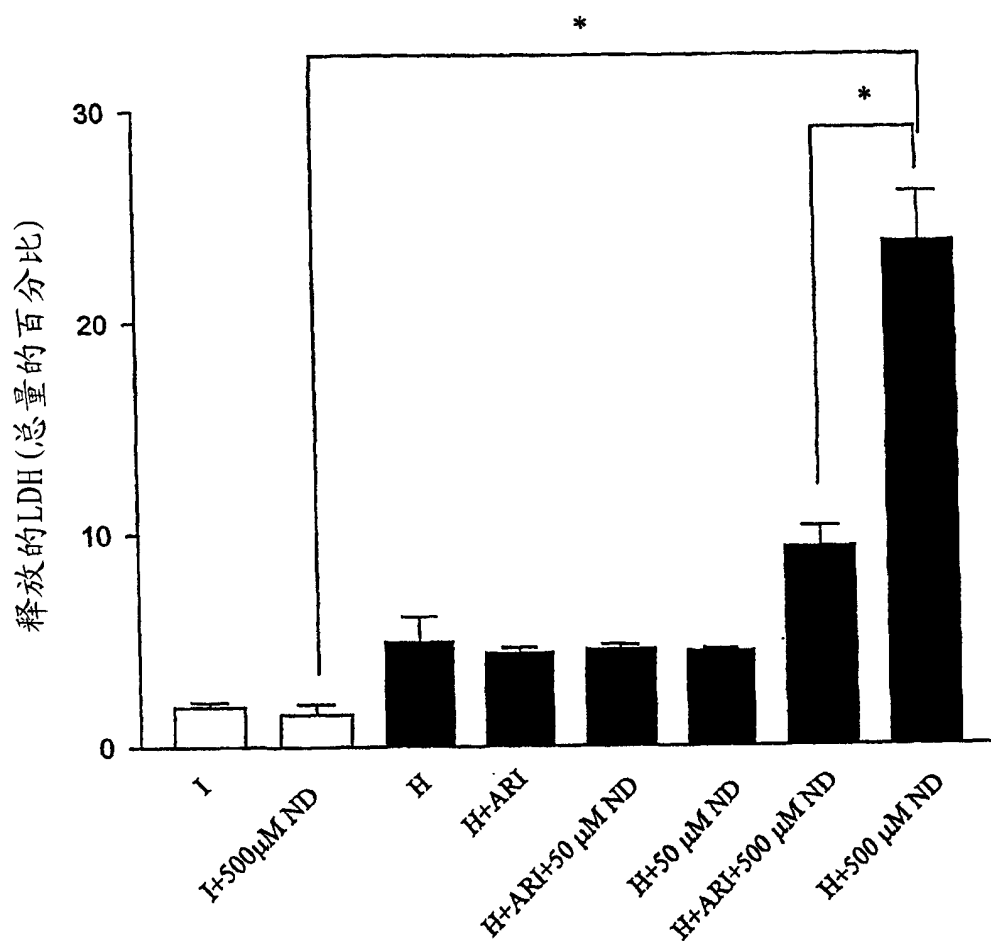


图 3