

文章编号 1006-8147(2016)05-0377-04

论著

重组 hIFN- α -2b-BCG 抗肿瘤效应的体外研究

王丽宁,范晓东,孙二琳,李娜,卢炳新,雷铭德,丁娜,孙岩,韩瑞发

(天津市泌尿外科研究所,天津医科大学第二医院泌尿外科,天津 300211)

摘要 目的:了解重组 hIFN- α -2b-BCG (rBCG) 体外抗肿瘤的作用效果和作用机制。方法:体外共培养后,透射电镜观察不同时间点 rBCG 对人膀胱肿瘤 EJ 细胞的影响。吖啶橙染色观察各组肿瘤细胞形态。MTT 法检测 rBCG 对肿瘤细胞生长抑制率。ELISA 检测 rBCG 作用后淋巴细胞分泌 Th1 型细胞因子水平。LDH 释放试验检测 rBCG 激活的淋巴细胞对肿瘤细胞杀伤效应。结果:BCG 和 rBCG 作用后的肿瘤细胞在透射电镜下和吖啶橙染色后均有显著变化。MTT 显示 rBCG 的生长抑制率显著高于 BCG 和 BCG+IFN- α -2b 组。rBCG 对淋巴细胞分泌 Th1 型细胞因子有影响,同时 rBCG 激活的淋巴细胞对膀胱肿瘤细胞有杀伤作用。结论:重组 BCG 在体外有优于 BCG 的免疫调节特性、抗肿瘤作用和直接细胞毒作用。

关键词 重组 BCG; IFN- α -2b; 膀胱肿瘤; 免疫疗法

中图分类号 R737.14

文献标志码 A

Study on antitumor effect of recombinant hIFN- α -2b-BCG *in vitro*

WANG Li-ning, FAN Xiao-dong, SUN Er-lin, LI Na, LU Bing-xin, LEI Ming-de, DING Na, SUN Yan, HAN Rui-fa

(Tianjin Institute of Urology, Department of Urology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract **Objective:** To study antitumor effect and mechanism of action on recombinant IFN- α -2b-BCG (rBCG) *in vitro*.

Methods: Effect of rBCG on bladder tumor cells was observed through transmission electron microscopy and microscope. Acridine orange staining was used to observe the tumor cell morphology by fluorescence microscope. Growth inhibition rate on tumor cell was detected by MTT assay. Effect of rBCG cultures on secretion of Th1-type cytokines was detected by ELISA assay. LDH release assay was applied to determine the lethal effect of active lymphocyte which was stimulated by BCG on tumor cells. **Results:** The rBCG group showed significant changes. MTT showed rBCG inhibited the proliferation of bladder cancer cell, and more active other groups. RBCG cultures affected the secretion of Th1 cytokines. And rBCG could enhanced the lethal effect of lymphocyte on tumor cells. **Conclusion:** The rBCG may have more immunomodulatory properties, anti-tumor effects and cytotoxicity *in vitro*.

Key words recombinant BCG; IFN- α -2b; bladder tumor; immunotherapy

膀胱癌是最常见的泌尿系恶性肿瘤^[1]。在我国,膀胱癌居泌尿系恶性肿瘤发病第1位,近年来发病率及死亡率有增高的趋势^[2]。卡介苗(BCG)膀胱腔内灌注用于预防和治疗浅表膀胱癌,是膀胱肿瘤最有效的生物疗法之一^[3],同时与膀胱化疗相比 BCG 在预防肿瘤复发上有明显的优势^[4-5]。但因 BCG 的毒副作用和大约 40% 的患者对 BCG 的耐药^[6],限制了其广泛应用。近年来,干扰素- α (IFN- α) 作为二线药物用于膀胱灌注治疗膀胱肿瘤,对 BCG 无反应的部分患者有效,且局部和全身毒性较小^[7]。IFN- α 除了单独应用或与 BCG 联合应用在体内和体外的实验中均已得到证实的优点外,也存在费用昂贵、半衰期短、水溶性易随尿液流失等缺点^[8]。因此,能够

合成具有持续表达分泌 IFN- α 功能的重组 BCG 即可克服上述缺点。重组 BCG 是应用基因工程技术,将 BCG 改造成具有携带和表达外源基因的能力。前期笔者已经构建一种重组 hIFN- α -2b-BCG (rBCG),以期能够发挥二者优势,同时去除联合应用中的一些不利因素。本文将重组 hIFN- α -2b-BCG 和人膀胱癌株 EJ 在体外共同培养,采用透射电镜、荧光染色和流式细胞仪等方法,了解其体外抗肿瘤的作用效果和作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 丹麦 2 株 BCG D2BP302 来自北京生物制品研究所;重组 hIFN- α -2b-BCG 为本所自行构建保存^[9];人膀胱癌细胞为 EJ 细胞系传代培养,本所保存。主要试剂:胰蛋白酶,中国医药集团上海化学试剂公司;青霉素 100 U/ μ L+链霉素 100 μ g/ μ L;吖啶橙,上海远慕生物科技有限公司;乳酸脱氢酶试剂盒,中生北控生物科技股份有限公司;MTT 试剂,Sigma 公司。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81402095);天津市科委抗癌重大科技专项基金资助项目(12zcdzsy16900);天津市卫计委科技基金资助项目(2014KZ104)

作者简介 王丽宁(1989-),女,研究实习生,学士,研究方向:泌尿外科基础医学;通信作者:孙二琳,E-mail:irene-sunsun@163.com。

1.2 方法

1.2.1 细菌和细胞培养 BCG 的培养:7H9 培养基 50 mL 加入 1 mL rBCG 或 BCG,37℃,饱和湿度,150 r/min 摇床内连续震荡培养;7 d 左右传一代,根据需要选取不同时期的菌液,洗涤后溶于 PBS,测定 A600 值 1.0(约 2.7×10^7 CFU)用于实验。

外周血淋巴细胞分离培养:采集健康成人志愿者新鲜外周血;密度梯度离心分离单个核细胞,37℃、饱和湿度、5%CO₂ 培养箱静置 4 h,收集非附壁细胞,台盼蓝染液检查所分离的细胞活性:计数 200 个细胞,活性在 95%以上。

膀胱癌株 EJ 的培养:按常规方法培养(含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基+双抗),实验前两天换用不含抗生素的 RPMI-1640 培养基培养,以消除双抗对 BCG 活性的影响。

取对数生长期肿瘤细胞,培养完全贴壁后,以实验终浓度 0.01OD 分别加入 rBCG 和 BCG,于 37℃,5%CO₂,饱和湿度孵箱中培养 24、48 和 72 h。以加 PBS 的细胞作为空白对照,分别在透射电镜和荧光倒置显微镜下观察。

1.2.2 透射电镜形态学观测 倒置显微镜下观察不同时间点重组 BCG 对膀胱肿瘤细胞的影响。透射电镜观察:制备单细胞悬液,离心收集沉淀,2.5%戊二醛磷酸缓冲液固定过夜,0.2 mol/L 蔗糖磷酸缓冲液漂洗,1%锇酸后固定,脱水,环氧树脂 618 包埋,超薄切片后醋酸铀-柠檬酸铅双重电子染色,JEM-2000EX 透射电镜下观察。

1.2.3 荧光染色 细胞爬片吖啶橙染色:盖玻片置 6 孔板中,加肿瘤细胞悬液,待细胞完全贴壁后,每孔加 3 mL RPMI-1640 液,过夜,倒置显微镜观察细胞形态完全正常后,加入 0.01OD 重组 BCG 或野生 BCG,培养环境同上。4%多聚甲醛常温固定 20 min,(1)吖啶橙染色 3~5 min,PBS 漂洗;(2)1%盐酸泡 5 s,PBS 漂洗;(3)CaCl₂ 脱色 3~5 min;(4)荧光显微镜观察。

1.2.4 MTT 法检测重组 BCG 对肿瘤细胞生长抑制率 (1)对数生长期 EJ 膀胱肿瘤细胞 1×10^5 /mL 密度接种于 96 孔板中,培养 6 h 完全贴壁后分别加入 rBCG、BCG、BCG 加干扰素的混合成分(外源性 IFN- α -2b 按照 rBCG 上清液中干扰素的相当量加入),浓度为 0.01OD,设只加培养基的肿瘤细胞为空白对照组,于 37℃,5%CO₂ 中培养 24、48 和 72 h。(2)每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μ L,培养 4 h,离心弃上清,加 DMSO 充分溶解。酶联免疫检测仪测定各孔 570 nm 光吸收值,取每组 6 的均值。(3)细胞生长抑制率 (%)=(对照组 MTT 值-处理组 MTT 值)/

对照组 MTT 值 $\times 100\%$ 。

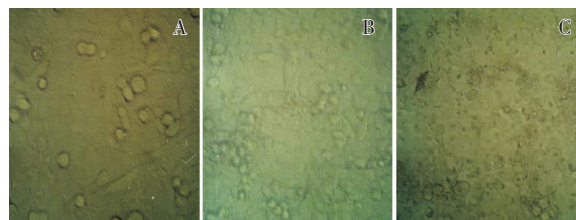
1.2.5 ELISA 检测 rBCG 对 PBMC 分泌 Th1 型细胞因子的作用 从健康受试者新鲜血液中提取 PBMC,rBCG、BCG 和 BCG+IFN- α -2b 分别在 24 孔板中与 PBMC 共培养。最终菌浓度为 1.4×10^6 CFU/mL,细胞浓度为 1.0×10^5 cells/mL。仅包含 PBMC 样品的作为空白对照。在 CO₂ 培养箱中培养,在 12、24、48 和 72 h 分别收集上清液并储存在 -70℃。用 ELISA 方法检测细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-12。

1.2.6 LDH 释放试验检测 BCG 激活的淋巴细胞对肿瘤细胞杀伤效应 (1)分离淋巴细胞,常规培养 2 h,调整浓度至 4×10^5 /mL;和重组 BCG 及野生型 BCG 共同培养(浓度同上),37℃、5%CO₂、饱和湿度培养 72 h。(2)乳酸脱氢酶释放实验的效应细胞为激活的实验组和对照组淋巴细胞,靶细胞为 EJ 膀胱癌细胞,效靶比例为 50:1。(3)取增殖淋巴细胞与 EJ 细胞各 0.1 mL 混匀,37℃、5%CO₂ 孵育 4 h;(4)上清 37℃预温 10 min,加新配的底物液,紫外分光仪在 340 nm 波长下读取 30 s,1 min,2 min,3 min 的 A 值。(5)杀伤活性 (%)=实验组 LDH-L-自然释放 LDH-L/最大释放 LDH-L-自然释放 LDH-L $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 one way-ANOVA 法分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有极显著意义。

2 结果

2.1 光镜下重组 BCG 影响 EJ 细胞形态学变化 空白对照组:光镜下,传代培养后,EJ 细胞逐渐贴壁生长,12 h 后细胞陆续有突起伸出,细胞核变大同时核浆比例变大,染色质不均匀,可见核分裂相。rBCG 或 BCG 与之共培养组:细胞折光性逐渐降低,胞浆内颗粒状物质、胞突逐步消失而细胞逐渐变粗变短,核浆比例变小。48 h 后细胞明显变小且变圆,胞突消失,部分细胞悬浮生长并聚集成团状,可见其周围有菌群包绕。72 h 变化明显,胞浆可见大量颗粒状物质和空泡,细胞分布稀疏,部分细胞有溶解坏死表现(图 1)。

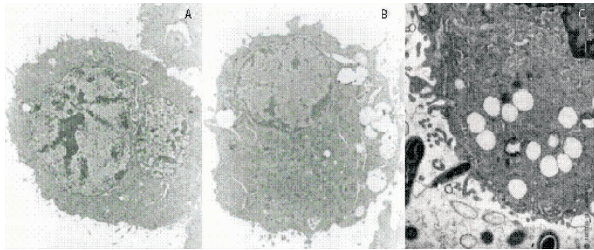


A:对照组 EJ 细胞;B:重组 BCG 作用 48 h;C:重组 BCG 作用 72 h(倒置显微镜 $\times 200$)

图 1 光镜下 EJ 细胞的形态

Fig 1 Cellular morphology under invert microscope

2.2 透射电镜下肿瘤细胞形态变化 正常 EJ 细胞呈圆形或不规则形,表面有大量的微绒毛,胞浆内有丰富线粒体,可见发达的粗面内质网,染色质分布均匀,细胞核大且有清晰的核仁,有的可见多个核仁(图 2A)。BCG 或 rBCG 作用后 48 h 可见细胞表面微绒毛减少(图 2B),72 h 可见细胞胞浆内线粒体肿胀,出现空泡样变性,细胞核染色质溶解,细胞质坏死,细胞表面微绒毛减少(图 2C)。

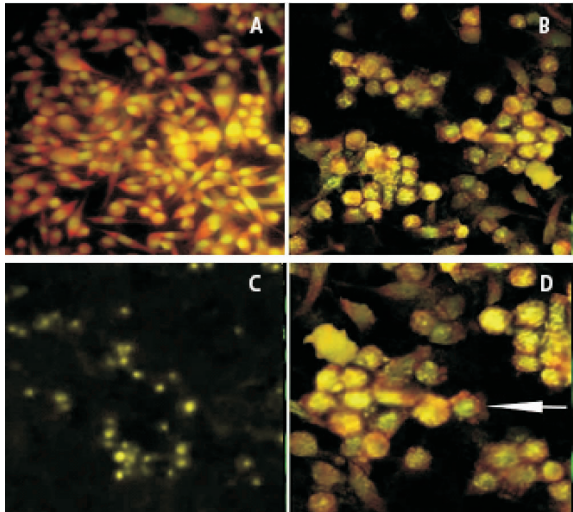


A: 正常 EJ 细胞;B:rBCG 作用 48 h 的 EJ 细胞;C:rBCG 作用 72 h 的 EJ 细胞(TEM×3 000)

图 2 透射电子显微镜下 EJ 细胞的形态

Fig 2 Cellular morphology under transmission electron microscope

2.3 荧光染色的结果观察 正常细胞体积较小,胞核呈黄绿色荧光,有核分裂相出现,胞质呈橘红色荧光,核浆比例大,细胞贴壁生长。rBCG 或 BCG 作用后,24 h 变化不明显,48 h 后细胞增殖减慢,并聚集成团状,胞突逐渐消失而胞体逐渐变短变粗,细胞核逐渐缩小,核浆比例变小,可见细胞膜呈泡状突出。72 h 后细胞逐渐分布稀疏,染色时极易脱片(图 3)。凋亡细胞周围出现典型的花瓣样结构(图 3D 箭头所示)。



A:正常 EJ 细胞;B:rBCG 作用 48 h;C:rBCG 作用 72 h(×200);D:rBCG 作用后凋亡肿瘤细胞周围出现典型花瓣样结构(×400)

图 3 经吖啶橙染色后荧光显微镜下 EJ 细胞的形态

Fig 3 Cellular morphology under fluorescence microscope by acridine orange staining

2.4 rBCG 对肿瘤细胞增殖抑制实验结果 表 1 示 rBCG 与 BCG 相比对膀胱肿瘤细胞有明显的抑瘤效果($P<0.05$),与 BCG 加干扰素组相比,24 和 48 h 二者无明显差异(P 均 >0.05)。可见生长抑制率随时间延长而增高,72 h 点 rBCG 的生长抑制率显著高于其他各组(P 均 <0.05)。

表 1 膀胱肿瘤细胞抑制率(%)

Tab 1 Inhibition rate of bladder cancer cell(%)

时间	rBCG	BCG	BCG+IFN-α-2b
24 h	29.10*	20.52	30.42*
48 h	57.21*	44.32	53.42
72 h	75.12*#	59.30	68.87*

与 BCG 组比,* $P<0.05$;与 BCG+IFN-α-2b 比,* $P<0.05$

2.5 ELISA 检测 rBCG 对 PBMC 分泌 Th1 型细胞因子的作用 与 BCG 组和 BCG+IFN-α-2b 组相比,rBCG 诱导的 PBMC 产生的 hIFN-γ 水平显著增加(P 均 $=0.00$)。各组间 12 h 和 24 h 的 IL-12 水平无明显差异($P>0.05$);2 d 和 3 d 时,rBCG 组显著高于其他 2 组(P 均 <0.05)。TNF-α 在 12 h 的表达量各组均有显著增加,但无明显差异($P>0.05$);随后 3 个时间点 rBCG 组 TNF-α 的水平明显高于其他组(P 均 <0.05)。见表 2~4。

表 2 各组诱导的 PBMC 产生的 hIFN-γ 的水平(pg/mL)

Tab 2 The hIFN-γ secretion from induced PBMC of every group (pg/mL)

项目	0.5 d	1 d	2 d	3 d
BCG	305.2±16.3	307.7±20.1	323.5±12.7	809.4±23.2
rBCG	418.4±15.6	675.8±33.5	753.5±33.4	2 130.4±42.1
BCG+IFN	253.5±13.2	319.4±13.7	327.1±17.3	732.0±12.4
PBS	185.4±11.7	264.8±11.0	213.7±15.1	209.5±5.7

表 3 各组诱导的 PBMC 产生的 IL-12 的水平(pg/mL)

Tab 3 The IL-12 secretion from induced PBMC of every group (pg/mL)

项目	0.5 d	1 d	2 d	3 d
BCG	223.2±12.7	358.4±14.2	314.2±9.87	235.2±15.2
rBCG	234.4±20.1	342.1±17.3	415.2±11.5	331.7±11.7
BCG+IFN	239.7±11.0	361.2±11.0	305.7±12.8	237.1±13.4
PBS	135.6±9.7	121.3±5.1	156.5±9.8	123.7±9.7

表 4 各组诱导的 PBMC 产生的 TNF-α 的水平(pg/mL)

Tab 4 The TNF-α secretion from induced PBMC of every group (pg/mL)

项目	0.5 d	1 d	2 d	3 d
BCG	2 251.4±26.7	3 249.2±35.7	2 876.5±24.7	1 376.2±11.4
rBCG	2 248.5±21.7	4 192.7±38.7	3 559.1±33.8	1 889.4±17.5
BCG+IFN	2 263.4±18.9	3 462.8±20.3	2 789.3±21.7	1 412.7±11.7
PBS	1 568.0±15.6	2 074.4±16.7	1 134.6±19.7	770.5±9.8

2.6 rBCG 激活淋巴细胞对膀胱肿瘤细胞的作用 rBCG 和 BCG 激活的淋巴细胞杀伤活性见表 5, rBCG 激活的淋巴细胞的杀伤活性是单纯淋巴细胞的 2.67~6.74 倍, 是 BCG 的 1.64~2.45 倍, 是 BCG+IFN 的 1.25~1.66 倍。单纯未经诱导的淋巴细胞活性较低, 对 EJ 细胞的杀伤活性明显低下 (7.60%); 淋巴细胞经过不同浓度 BCG 刺激培养后被激活, 对 EJ 细胞的杀伤活性明显增强 (12.38%~20.89%) ($P<0.05$); 淋巴细胞经过外源性 IFN- α +BCG 作用后, 其杀伤活性作用 (15.78%~34.72%) 又较 BCG 明显增强 ($P<0.05$); rBCG 杀伤活性为实验组最高 (20.31%~51.22%) ($P<0.05$)。各不同成分组都随着剂量从 2.5~10 μ L 升高 BAK 杀伤活性也增高, 20 μ L 均降低, 10.0 μ L 组的 BAK 杀伤活性最高 ($P<0.05$)。

表 5 不同浓度各种成分刺激淋巴细胞杀伤活性比较 (%)

Tab 5 Cell killing activity of lymphocyte stimulated by different concentration of each element (%)

组别	rBCG	BCG	BCG+IFN- α -2b
2.5 μ L 组	20.31	12.38	15.78
5.0 μ L 组	32.73	16.24	22.92
10.0 μ L 组	51.22	20.89	34.72
20.0 μ L 组	30.19	17.46	24.11

3 讨论

BCG 作为一种活的、减毒分支杆菌, 具有很强的免疫佐剂功能, 对膀胱肿瘤有较好的治疗效果^[10]。BCG 被认为通过调节免疫效应来发挥其抗肿瘤作用^[11]。根据体外实验结果, rBCG 或 BCG 单独作用于培养的肿瘤细胞, 可以产生细胞毒作用, 直接杀伤膀胱肿瘤细胞, 与 Rajala 等^[12]结论一致。研究表明, BCG 具有直接的细胞毒性作用^[13], 可能与 BCG 影响溶酶体膜蛋白的表达参与凋亡过程有关^[14]。有研究表明 BCG 能够通过影响与侵犯线粒体膜, 进而影响细胞呼吸和能量代谢^[15]破坏细胞内环境致细胞死亡。

此外, 无论 BCG 还是 rBCG 对肿瘤细胞的杀伤都体现出时间依赖性, 也就是说, 随着时间的延长 BCG 对肿瘤细胞的杀伤效果逐渐加强。实验中对肿瘤细胞形态的观察说明 BCG 和 rBCG 直接接触均对肿瘤细胞有明显破坏作用。以往研究发现 BCG 可以附着于靶细胞, 竞争宿主细胞营养从而抑制肿瘤细胞生长, BCG 的细胞毒能够破坏肿瘤细胞内环境^[16]。细胞膜的完整及正常的通透性在维持细胞正常生命活动中起重要作用, 微绒毛是细胞膜的一部分, 其作用是增加细胞膜表面积, 增加细胞膜内外物质及信息的交换。本实验中, rBCG 的细胞毒造成细胞

膜微绒毛脱落减少、细胞膜表面出泡, 影响了细胞正常的代谢, 结果就是细胞死亡和细胞数量的减少。这同膀胱肿瘤细胞生长抑制率 MTT 测定结果一致, 膀胱肿瘤细胞的生长随着时间的延长不同程度的被抑制。与 BCG 相比, rBCG 对膀胱肿瘤细胞有更明显的抑瘤效果, 与 BCG 加干扰素对肿瘤细胞抑制率一致, 但随着时间的继续延长, rBCG 的膀胱肿瘤细胞生长抑制率明显高于其他两组。在刺激 PBMC 分泌 Th1 型细胞因子方面 rBCG 远大于 BCG 和 BCG 加干扰素组。同时 rBCG 在激活淋巴细胞对膀胱肿瘤细胞的杀伤作用上也明显高于其他两组。研究提示多种细胞因子如 IFN- γ 、TNF- α 、IL-12、IL-18 等本身对癌细胞也起抗增殖作用^[17], 可经由多种信号途径诱发膀胱肿瘤细胞凋亡。故此提示, 分泌人 IFN- α -2b 的 rBCG 可能有更强的抗肿瘤免疫作用。

上述一系列实验结果提示, 该重组 BCG 对膀胱肿瘤细胞有明显的抗瘤效果, 不但自身表现出抗瘤活性, 还可以提高免疫细胞抗肿瘤免疫的能力。重组 BCG 的发展前景令人鼓舞, 需要对其作用和机制等问题进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5):E359
- [2] 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国膀胱癌发病现状及流行趋势分析[J]. 癌症进展, 2013, 11(1):89
- [3] Kamat A M, Porten S. Myths and mysteries surrounding bacillus Calmette-Guérin therapy for bladder cancer[J]. Eur Urol, 2014, 65 (2): 267
- [4] Lamm D L. Bacille Calmette-Guérin immunotherapy for bladder Cancer[J]. J Urol, 1985, 134(1):40
- [5] Herr H W, Waringer D D, Fair W R, et al. Bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer: a 10-year followup[J]. J Urol, 1992, 147(4):1020
- [6] Sylvester R J, van der Meijden A P, Lamm D L. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials[J]. J Urol, 2002, 168(5):1964
- [7] von Rundstedt F C, Lerner S P. Bacille-Calmette-Guerin non-responders: how to manage[J]. Transl Androl Urol, 2015, 4(3):244
- [8] Xiao Z, Hanel E, Mak A, et al. Antitumor efficacy of intravesical BCG, gemcitabine, interferon- α and interleukin-2 as mono- or Combination-Therapy for bladder cancer in an orthotopic tumor model[J]. Clin Med Insights Oncol, 2011, 5(5):315
- [9] 孙二琳, 刘春雨, 韩瑞发, 等. 重组 hIFN- α -2B-BCG 的生物学特性的观察[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2010, 30(1):46
- [10] Herr H W, Morales A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder Cancer: an immunotherapy success story[J]. J Urol, 2008, 179(1):53

(下转第 385 页)

表1 目标化合物对 HeLa, K562 和 K562/A02 细胞增殖的抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Inhibiting activity of target compounds against HeLa, K562 and K562/A02 proliferation($\bar{x} \pm s, n=3$)

Com.	R ₁	R ₂	IC ₅₀ / (μmol/L)		
			HeLa	K562	K562/A02
7a	-H		1.01±0.21	>100	>1 000
7b	-H		18.98±0.98	45.46±2.06	157.29±5.23
7c	-H		1.02±0.25	7.01±1.01	29.40±3.21
11a	-CH ₃		8.34±0.77	13.24±1.21	109.36±5.55
11b	-CH ₃		8.34±0.82	8.99±0.99	21.12±1.51
VP-16			6.27±0.62	3.39±0.45	234.7±6.67

3 讨论

以天然产物鬼臼毒素结构为基础,设计并合成了5个未见文献报道的4β-N-取代呋喃鬼臼毒素衍生物,化合物结构经¹H-NMR和¹³C-NMR和HR-ESI-MS确证,以依托泊苷为阳性对照,MTT法测试了所合成的5个4β-N-取代呋喃鬼臼毒素衍生物对HeLa, K562和K562/A02肿瘤细胞的细胞毒活性,结果表明,与阳性对照VP-16相比,所合成化合物细胞毒活性均较强,其中末端取代基为NO₂的化合物,对于耐药的K562/A02细胞具有较强的活性,值得进一步研究。

参考文献:

- [1] 柳青.全球影响癌症发病的9种行为与环境危险因素[J].中华医学杂志, 2006, 86(1):44

- [2] Imbert T F. Discovery of podophyllotoxins[J]. Biochimie,1998, 80(3): 207
- [3] Gordaliza M, García P A, del Corral J M, et al. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives [J]. Toxicon, 2004, 44(4):441
- [4] Hande K R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor[J]. Eur J Cancer, 1998, 34(10):1514
- [5] Xiao Z, Xiao Y D, Feng J, et al. Antitumor agents. 213. Modeling of epipodophyllotoxin derivatives using variable selection k nearest neighbor QSAR method[J]. J Med Chem, 2002, 45(11):2294
- [6] Vanvliet D S, Tachibana Y, Bastow K F, et al. Antitumor agents. 207. Design, synthesis, and biological testing of 4β-anilino-2-fluoro-4'-demethylpodophyllotoxin analogues as cytotoxic and antiviral agents[J]. J Med Chem, 2001, 44(9):1422
- [7] Zhou X M, Wang Z Q, Chang J Y, et al. Antitumor agents. 120. New 4-substituted benzylamine and benzyl ether derivatives of 4'-O-demethylepipodophyllotoxin as potent inhibitors of human DNA topoisomerase II[J]. J Med Chem,1991,34(12):3346
- [8] Cheng W H, Cao B, Shang H, et al. Synthesis and evaluation of novel podophyllotoxin derivatives as potential antitumor agents[J]. Eur J Med Chem, 2014,85:498
- [9] Cheng W H, Shang H, Niu C, et al. Synthesis and evaluation of new podophyllotoxin derivatives with in vitro anticancer activity [J]. Molecules, 2015, 20(7):12266
- [10] Kamal A, Laxman N, Ramesh G. Facile and efficient one-pot synthesis of 4 beta-arylamino podophyllotoxins:synthesis of DNA topoisomerase II inhibitors(NPF and W-68)[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2000,10(18):2059
- [11] Jin J M, Zhang Y J, Yang C R. Spirostanol and furostanol glycosides from the fresh tubers of Polianthes tuberosa[J]. J Nat Prod, 2004,67(1):5

(2016-03-01 收稿)

(上接第 380 页)

- [11] Thompson D B, Siref L E, Feloney M P, et al. Immunological basis in the pathogenesis and treatment of bladder cancer[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2015, 11(2):265
- [12] Rajala P, Kaasinen E, Rintala E, et al. Cytostatic effect of different strains of Bacillus Calmette-Guérin on human bladder cancer cells in vitro alone and in combination with mitomycin C and interferon-α[J]. Urol Res, 1992, 20(3):215
- [13] Garcia C, Jina H, Bergersen P, et al. Bladder contracture - A rare and serious side effect of intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy[J]. Urol Case Rep, 2016,4:22
- [14] Moriawaki Y, Begum N A, Kobayashi M, et al. Mycobacterium bovis

- Bacillus calmette-Guerin and its cell wall complex induce a novel lysosolipopo-lysaccharide and p53-inducible gene, LITAF (PIG7), and estrogen-inducible gene, EET-1[J]. J Biol Chem, 2001, 276(25): 23065
- [15] Ryll R, Watanabe K, Fujiwara N, et al. Mycobacterial cord factor, but not sulfolipid, causes depletion of NKT cells and upregulation of CD1d1 on murine macrophages[J]. Microbes Infect, 2001, 3(8):611
- [16] 董亚利, 白景文, 沈伟, 等. BCG 对体外培养人癌细胞直接作用的扫描电镜观察[J]. 天津医科大学学报, 1995, 1(2):23

(2016-03-08 收稿)