



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105796549 A

(43)申请公布日 2016.07.27

(21)申请号 201610258552.1

(22)申请日 2016.04.22

(71)申请人 中国医学科学院基础医学研究所

地址 100005 北京市东城区东单三条5号

(72)发明人 彭小忠 胡艳 韩为 强伯勤

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司

11314

代理人 程伟

(51)Int.Cl.

A61K 31/352(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图14页

(54)发明名称

藤黄酰胺用于制备治疗人神经胶质瘤的药物的用途

(57)摘要

本发明公开了藤黄酰胺用于制备治疗人神经胶质瘤的药物的用途,所述藤黄酰胺是一种TrkA激动剂和神经营养因子NGF类似物,相对于人神经胶质瘤细胞及人正常星形胶质细胞,可显著特异性抑制胶质瘤干细胞活性,且经藤黄酰胺处理后胶质瘤干细胞的自我更新、肿瘤球形成、裸鼠体内成瘤能力也明显降低。经体内实验,利用斑马鱼胶质瘤移植瘤模型、裸鼠胶质瘤移植瘤模型,在体验证该药物对胶质瘤的治疗效果。具体而言,本发明发现了小分子化合物藤黄酰胺可通过靶向性抑制胶质瘤干细胞达到用于制备治疗人神经胶质瘤的药物目的。本发明为人神经胶质瘤的治疗提供了新的治疗药物。

1. 藤黄酰胺用于制备治疗人神经胶质瘤的药物的用途。
2. 根据权利要求1所述的藤黄酰胺用于制备治疗人神经胶质瘤的药物的用途,其中所述药物通过抑制胶质瘤干细胞的细胞活性以治疗所述人神经胶质瘤。
3. 根据权利要求1所述的藤黄酰胺用于制备治疗人神经胶质瘤的药物的用途,其中所述药物通过抑制胶质瘤干细胞的自我更新、肿瘤球形成,体内肿瘤形成的能力,及体内肿瘤的生长以治疗所述人神经胶质瘤。
4. 根据权利要求1所述的藤黄酰胺用于制备治疗人神经胶质瘤的药物的用途,其中所述药物通过诱导胶质瘤干细胞凋亡以治疗所述人神经胶质瘤。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的藤黄酰胺用于制备治疗人神经胶质瘤的药物的用途,其中,所述药物对胶质瘤干细胞的抑制效果可被TrkA抑制剂部分回复。
6. 根据权利要求1至4中任一项所述的藤黄酰胺用于制备治疗人神经胶质瘤的药物的用途,其中,所述胶质瘤干细胞包括但不限于:U87MG SLC、U251SLC、GSC2、GSC5。
7. 根据权利要求1所述的藤黄酰胺用于制备治疗人神经胶质瘤的药物的用途,其中所述药物还通过抑制胶质瘤细胞以治疗所述人神经胶质瘤。
8. 根据权利要求7所述的藤黄酰胺用于制备治疗人神经胶质瘤的药物的用途,其中,所述胶质瘤细胞包括但不限于:U251、U87MG、N3。
9. 根据权利要求1所述的藤黄酰胺用于制备治疗人神经胶质瘤的药物的用途,其中,所述人神经胶质瘤处于I到IV级。

藤黄酰胺用于制备治疗人神经胶质瘤的药物的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤治疗领域,具体涉及藤黄酰胺用于制备治疗人神经胶质瘤的药物的用途。

背景技术

[0002] 神经胶质瘤是最常见的来源于神经上皮的原发性颅内恶性肿瘤,其恶性程度高、生长迅速、浸润性强,具有高发病率的特点。虽然目前肿瘤综合治疗技术已取得长足进步,但因其位于脑部重要位置,且伴随微血管增生,呈现明显的浸润性生长等特点,传统的手术、放疗都无法彻底根治,而导致其复发率高、病死率高和治愈率低。目前临床上化疗的药物以烷化药物为主,但传统烷化剂副作用大,易产生耐药性;新型烷化剂替莫唑胺(temozolomide, TMZ)虽毒副作用小,且长时间用药耐受性好,但TMZ治疗后引起的骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)、急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)以及急性成淋巴细胞性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)的报道与日俱增,具体原因也在进一步研究中。因此,寻找新一代治疗神经胶质瘤的有效药物,改善神经胶质瘤的治疗迫在眉睫。

[0003] 近年来,科学家们结合胶质瘤的发生发展的机理,在其新药探索与开发方面做出了诸多努力。研究显示,神经胶质瘤的发生发展主要与RTK/RAS/PI3K通路, p53通路, RB通路中的相应关键分子的异常表达或突变相关。因而近年来的研究都在开发相应的药物分子的抑制剂用以抵消某种关键分子的作用效果,但都只是在临床前研究结果中表现出强的治疗前景,在I、II期临床结果,或是批准上市后表现得不尽人意或疗效颇微。如EGFR的抑制剂:吉非替尼和埃罗替尼被证实患者服用后极易产生耐药,而且有疗效的患者非常罕见,并且病人服用之后无进展生存期皆未有所延长。同时EGFR/Her2抑制剂拉帕替尼, EGFR的单克隆抗体西妥昔单抗都被证实对胶质瘤的治疗效果颇微;除此以外还有mTOR相关抑制剂:雷帕霉素、替西罗莫司、依维莫司、地磷莫司, 脱乙酰酶(Histone deacetylase, HDAC)抑制剂:伏立诺他等单独治疗或与替莫唑胺联合治疗都被证实没有或只有极小的作用效果。与此同时,研究还针对胶质瘤微血管形成丰富的特点,开发了被证实有部分效果的抗血管生成的分子如贝伐单抗、西地尼布,它们可以快速的减少癌旁水肿,有效的延长了患者的无进展生存期,但是也无法逆转病程的进展。接受抗血管疗法的患者最终也无法成功治愈,还是无法改变大多数患者在诊断后数月死亡的现状。总体而言,尽管国内外科学家,药物公司在胶质瘤的新药探索中付出诸多人力物力,目前都没有找到一种新的,有效的药物分子。由于胶质瘤复杂的发病机制,目前我们尚不知道在不同发病机理导致的胶质瘤患者中哪个关键分子需要被抑制。此外,另一些科学家提出,胶质瘤组织内细胞存在异质性,以上探索的药物分子之所以结果颇微,可能与我们没有针对对胶质瘤的发生、发展起到重要作用的细胞类型有关。

[0004] 1994年, Lapidot等从白血病患者身上首次分离获得肿瘤干细胞,肿瘤干细胞理论逐渐被接受。随后Singh等在胶质瘤中分离得到极少数具有自我更新及分化能力的CD133⁺

胶质瘤干细胞,且其相对于CD133的细胞具有更强的体内成瘤能力,仅100个细胞就可在裸鼠内诱导形成肿瘤。Jian Chen等通过细胞体内示踪技术,从在体的水平,证明了胶质瘤干细胞的存在。随着研究的深入,胶质瘤干细胞的特点性质,以及与胶质瘤的关系逐渐被揭示。研究表明胶质瘤干细胞是胶质瘤发生发展的根本原因,且胶质瘤干细胞可通过激活Wnt信号通路诱导肿瘤血管形成,增强肿瘤的低氧应激以及侵袭能力等。不仅如此,Bao等证实胶质瘤干细胞也能产生放化疗抗性。然而,目前神经胶质瘤的化疗药物只针对整个肿瘤组织,病人在接受一段时间的治疗后,肿瘤组织缩小取得一定的效果,但是对化疗产生抵抗的胶质瘤干细胞可通过增殖和分化进一步形成新的肿瘤组织,从而促使肿瘤复发。由此可见,胶质瘤干细胞与胶质瘤的发生发展,及放化疗抗性的形成,肿瘤的复发息息相关,是胶质瘤难以攻克的一个重要因素。因此,我们设想,是否可以通过获得靶向性胶质瘤干细胞的药物,并结合传统的放化疗,达到最终彻底消灭整个肿瘤组织的目的?

[0005] 近几年,国内外科学家分别在不同肿瘤中报道了几种能靶向肿瘤干细胞的药物,其中包括一些新的药物分子和已在临床上使用的药物分子。如天然的多酚白藜芦醇,具有抗菌活性的离子载体盐霉素,衣霉素,灭绦虫活性的药物氯硝柳胺,以及用以治疗糖尿病的药物二甲双胍及用以治疗肝癌的药物索拉非尼,都利用裸鼠成瘤模型,验证了药物相对于目前的一线药物TMZ更具抑瘤效果。但是以上药物都无法在保证安全性的前提下,发挥靶向肿瘤干细胞的功能,因而效果有限。

[0006] 2007年Keqiang Ye实验室通过药物筛选发现的一种化学特征稳定的神经营养因子(Nerve growth factor,NGF)的类似物——藤黄酰胺,发现其可NGF特异性的受体TrkA的胞内近膜区域相互结合而使TrkA发生二聚化进而自磷酸化,从而激活TrkA及其下游的Akt、MAPKs信号通路。并证明藤黄酰胺可通过以上途径在体外体内水平明显的抑制神经元细胞死亡,并具有促进PC12细胞的神经发生作用。提示其可能在神经退行性疾病、脑卒中的治疗发挥一定作用。与NGF不同,藤黄酰胺还可特异性地促进TrkA的转录和翻译。实验显示,NGF可迅速激活TrkA及其下游信号通路,但是60分钟后会由于TrkA的显著降解,TrkA及其下游相关蛋白的磷酸化水平下降,而藤黄酰胺可促进TrkA的转录和翻译,其对TrkA及其下游信号的活化可维持较长时间(>72小时)。该实验通过体外体内实验表明,藤黄酰胺可明显的抑制神经元细胞死亡及促进PC12细胞的神经发生的作用效果。随后Keqiang Ye实验室发现藤黄酰胺、NGF可通过促进AcinS与CtBP2结合而后抑制周期蛋白(cyclin)A1的转录明显抑制K562细胞的增殖,并明显抑制K562细胞裸鼠移植瘤的肿瘤生长,提示藤黄酰胺具有一定的抑瘤效果。

[0007] 本发明发现相对于胶质瘤细胞株、人正常星形胶质细胞株,藤黄酰胺在细胞水平对实验室分离得到的四株胶质瘤干细胞株具有特异性抑制效果。在此基础上,本发明从细胞水平验证了藤黄酰胺可特异性抑制胶质瘤干细胞的自我更新能力,肿瘤球形成能力;并通过斑马鱼、裸鼠胶质瘤移植模型验证了藤黄酰胺对胶质瘤的治疗效果。由此,藤黄酰胺将很有可能成为神经胶质瘤的治疗提供新的有力治疗药物。

发明内容

[0008] 基于上述目的,本发明提供了一种藤黄酰胺用于制备治疗人神经胶质瘤的药物的用途。

- [0009] 优选的,所述药物通过抑制胶质瘤干细胞的细胞活性以治疗所述人神经胶质瘤。
- [0010] 优选的,所述药物通过抑制胶质瘤干细胞的自我更新、肿瘤球形成,及体内肿瘤形成的能力以治疗所述人神经胶质瘤。
- [0011] 优选的,所述药物通过诱导胶质瘤干细胞凋亡以治疗所述人神经胶质瘤。
- [0012] 可选的,所述药物对胶质瘤干细胞的抑制效果可被TrkA抑制剂部分回复。
- [0013] 可选的,所述胶质瘤干细胞包括但不限于:U87MG SLC、U251SLC、GSC2、GSC5。
- [0014] 可选的,所述药物还通过抑制胶质瘤细胞以治疗所述人神经胶质瘤。
- [0015] 可选的,所述胶质瘤细胞包括但不限于:U251、U87MG、N3。
- [0016] 可选的,所述人神经胶质瘤处于I到IV级。
- [0017] 术语的定义
- [0018] “胶质瘤干细胞”存在于胶质瘤组织内存在的一类极少数的具有自我更新能力,多项分化能力,体内成瘤能力的细胞,它与胶质瘤的发生发展,复发以及胶质瘤对放疗化疗抗性形成密切相关。
- [0019] “MTS方法”:一种用比色法来检测细胞增殖和细胞毒实验中的活细胞数量的检测试剂。MTS是一种新型四唑化合物,PMS是一种电子偶联剂。PMS具有增强的化学稳定性,这使它与MTS混合形成稳定的溶液。MTS被细胞生物还原成为一种有色的甲臞产物,可直接溶解于培养基中。这种转化很可能是在代谢活跃的细胞中的脱氢酶产生的NADPH或NADH的作用下完成的。在490nm处检测到的甲臞产物的量与培养中的活细胞数成正比。
- [0020] “相对细胞存活率”:运用据上MTS方法检测吸光度值后,根据吸光值A计算相对细胞存活率,相对细胞存活率=(实验组A/对照组A)×100%。
- [0021] “自我更新”:指干细胞(此处特指胶质瘤干细胞)通过对称或者不对称分裂产生至少一个保留干细胞特性子细胞的过程,自我更新能够维持干细胞具有多分化的潜能,对于组织特异性干细胞而言,自我更新是维持其终生具有分化潜能的基础。
- [0022] “肿瘤球形成能力”:指肿瘤干细胞(此处特指胶质瘤干细胞)在体外含EGF,bFGF的培养基中培养,会形成肿瘤球的能力。
- [0023] 综上,本发明发现藤黄酰胺可用于制备治疗人神经胶质瘤的药物,从而为人神经胶质瘤的治疗提供新的有力药物,具有显著的社会效益和经济效益。

附图说明

[0024] 图1:藤黄酰胺特异性抑制胶质瘤干细胞的细胞活性。MTS方法检测藤黄酰胺在不同浓度(0.03 μ M、0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M、10 μ M、30 μ M)下对四株胶质瘤干细胞株(U87MG SLC、U251SLC、GSC2、GSC5),三株胶质瘤细胞株(U251、U87MG、N3(从病人肿瘤组织分离得到的原代胶质瘤细胞))、人神经干细胞(H1P56NSC)作用48小时后细胞存活率,“—”表示IC₅₀值>10⁶ μ M。

[0025] 图2A至图2D:藤黄酰胺特异性抑制胶质瘤干细胞。将带由绿色荧光标记的GSC2-GFP与不带荧光标记的HA 1:1混匀于体系中,而后藤黄酰胺分别在0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M浓度下作用4小时(图2A)、12小时(图2B)、24小时(图2C)、48小时(图2D),而后流式细胞仪分析不同处理组下GSC2-GFP、U87MG SLC、HA的比例,并结合共培养模型在不同浓度、不同作用时间下的细胞存活率,统计分析共培养模型中各细胞成分的相对细胞存活率。

[0026] 图3A至图3C:藤黄酰胺特异性抑制胶质瘤干细胞。将带由绿色荧光标记的U87MG SLC-GFP与不带荧光标记的HA 1:1混匀于体系中,而后藤黄酰胺分别在0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M浓度下作用12小时(图3A)、24小时(图3B)、48小时(图3C),而后流式细胞仪分析不同处理组下GSC2-GFP、U87MG SLC、HA的比例,并结合共培养模型在不同浓度、不同作用时间下的细胞存活率,统计分析共培养模型中各细胞成分的相对细胞存活率。

[0027] 图4A至图4F:藤黄酰胺抑制胶质瘤干细胞肿瘤球的生长与维持。96孔细胞培养皿包被后每孔加入100 μ L含5000个GSC2单细胞悬浮液,自然生长4天后,吸去原培养基,每孔加入含各浓度药物的100 μ L新鲜培养基,并使其药物浓度分别为:0 μ M(对照,图4A)、0.03 μ M(图4B)、0.1 μ M(图4C)、0.3 μ M(图4D)、1 μ M(图4E)、3 μ M(图4F),药物作用时间为48小时,利用体外实验模拟临床上胶质瘤干细胞形成肿瘤后检测藤黄酰胺的抑制效果。藤黄酰胺可显著减小肿瘤球的体积、数量,并使肿瘤球边缘细胞死亡直至整个肿瘤球,图4A至图4F为光镜下检测形态改变。

[0028] 图5:图4A至图4F中实验的统计数据结果。

[0029] 图6:藤黄酰胺抑制胶质瘤干细胞自我更新能力。将GSC5细胞稀释为25、50、100、200个/100 μ L,藤黄酰胺在0.1 μ M浓度下处理2周,而后统计无肿瘤球孔百分比,纵坐标表示无肿瘤球孔百分比的对数值。

[0030] 图7:藤黄酰胺在低浓度(0.1 μ M、0.3 μ M)下对胶质瘤干细胞作用4小时对其细胞活性影响较小,仅高浓度(1 μ M、3 μ M)下对胶质瘤干细胞的细胞活性具有一定影响。将GSC2细胞铺于预先包被的96孔细胞培养板,10000个细胞/孔,过夜后加药,使藤黄酰胺的浓度分别为0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M,药物作用4小时后MTS检测各处理条件下的相对细胞存活率。

[0031] 图8A至图8C-5:藤黄酰胺在低浓度(0.1 μ M、0.3 μ M)下对胶质瘤干细胞作用4小时对其细胞活性影响较小,仅高浓度(1 μ M、3 μ M)下对胶质瘤干细胞的细胞活性具有一定影响,但皆可显著抑制胶质瘤干细胞的二次肿瘤球形成能力。藤黄酰胺分别在0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M浓度下处理GSC2细胞4小时,撤去药物,PBS洗两遍,台盼蓝染色后细胞计数,各浓度下各细胞重新铺于96孔细胞培养板,5000个细胞/孔。自然生长4天后。光镜下统计各处理组肿瘤球形成情况(图8A和图8B),图8C-1至图8C-5为光镜下观察的结果,其中分别为对照组(图8C-1)、藤黄酰胺浓度0.1 μ M(图8C-2)、0.3 μ M(图8C-3)、1 μ M(图8C-4)、3 μ M(图8C-5)组。

[0032] 图9:藤黄酰胺对胶质瘤干细胞的影响在一定程度上是不可逆的。藤黄酰胺处理GSC2细胞4小时后,撤药物,重新将细胞铺板,5000个细胞/孔,自然生长4天后,MTS检测各处理组的细胞存活率。

[0033] 图10:藤黄酰胺可明显抑制胶质瘤干细胞自我更新能力。藤黄酰胺分别在0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M浓度下处理GSC2细胞4小时,而后撤去药物,台盼蓝染色后将细胞稀释为25、50、100、200个/100 μ L,自然生长8天,而后统计无肿瘤球孔百分比,纵坐标表示无肿瘤球孔百分比的对数值。

[0034] 图11A至图11C-3:藤黄酰胺在低浓度(0.1 μ M、0.3 μ M)下对胶质瘤干细胞作用4小时对其细胞活性影响较小,仅高浓度(1 μ M、3 μ M)下对胶质瘤干细胞的细胞活性具有一定影响,但皆可显著抑制胶质瘤干细胞的三次肿瘤球形成能力。藤黄酰胺分别在0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M浓度下处理GSC2细胞4小时,撤去药物,PBS洗两遍,继续培养细胞至形成约100 μ m肿瘤球,收集细胞,细胞消化后,台盼蓝染色后细胞计数(发现1 μ M、3 μ M浓度下细胞存活率很低,

故不再继续后续实验),各浓度下各细胞重新铺于96孔细胞培养板,5000个细胞/孔。自然生长4天后。光镜下统计各处理组肿瘤球形成情况(图11A和图11B),图11C-1至图11C-3为光镜下观察的结果,其中图11C-1为对照组,图11C-2为藤黄酰胺0.1 μ M,图11C-3为藤黄酰胺0.3 μ M。

[0035] 图12A和图12B:藤黄酰胺对胶质瘤干细胞的作用效果一定程度上是不可逆的。药物处理GSC2 24小时,48小时后分别撤药物,换上新鲜培养基继续培养48小时后利用MTS的方法检测各处理组细胞存活率,并比较其与一直用药物处理组的细胞活性改变。“1天”、“2天”表示药物处理24小时或48小时后MTS检测;“药物继续作用”表示药物处理24小时、48小时后撤药物,并继续加入相应药物浓度的新鲜培养基培养48小时后MTS检测;“撤去药物”表示药物处理24小时、48小时后撤药物,并加入不含药物的新鲜培养基继续培养48小时后MTS检测。

[0036] 图13A和图13B:藤黄酰胺1 μ M浓度下预处理GSC2,可明显抑制其裸鼠原位肿瘤球形成能力。藤黄酰胺在1 μ M浓度下对GSC2预处理时间24小时,而后收集活细胞,取部分细胞台盼蓝染色后细胞计数,细胞颅内成瘤,10⁵个活细胞/只(5只裸鼠),并设置DMSO对照组(5只裸鼠),DMSO处理组(图13A),及藤黄酰胺预处理组(图13B)裸鼠原位成瘤后HE染色结果。

[0037] 图14A和图14B:藤黄酰胺可显著抑制斑马鱼胶质瘤移植瘤模型的肿瘤生长。48小时斑马鱼胚胎的卵黄囊内注射3000个带有绿色荧光标记的U87MG SLC-GFP,自然生长48小时后,藤黄酰胺1 μ M浓度(图14B)下对其治疗48小时,荧光显微镜检测斑马鱼卵黄囊部位绿色荧光的强弱,用以判断藤黄酰胺对斑马鱼移植瘤模型的抑瘤效果,图14A为对照组。

[0038] 图15A至图15C:藤黄酰胺可显著抑制斑裸鼠移植瘤模型的肿瘤生长,且副作用较小。将GSC2细胞接种于15只7周大的Ba1b/C裸鼠腋下皮下,接种数目为5*10⁴个/只,当裸鼠皮下肿瘤长至约100mm³,将其分为DMSO组、及藤黄酰胺药物给药组,给药剂量为2mg/kg,腹腔注射给药,给药时间为11天,期间记录两组裸鼠肿瘤的体积(图15A和图15B)及体重(图15C)变化。

[0039] 图16A至16B:藤黄酰胺可诱导胶质瘤干细胞凋亡,对胶质瘤干细胞的细胞周期影响不大。(图16A)藤黄酰胺分别在0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M浓度下处理四株胶质瘤干细胞株4小时,而后western blot检测凋亡相关抗体(PARP、胱天冬酶3(Caspase3)、活化的半胱天冬酶3(Cleaved caspase3))、细胞周期相关抗体(p27、p21)蛋白的表达,发现经藤黄酰胺处理后凋亡相关抗体的表达明显上调(图16B)藤黄酰胺在0.3 μ M浓度下处理胶质瘤干细胞株GSC2不同时间后,凋亡相关蛋白(PARP、Caspase3、Cleaved caspase3)、细胞周期相关抗体(p27、p21)蛋白的表达,发现经藤黄酰胺处理后凋亡相关抗体的表达明显上调。

[0040] 图17A-1至图17A-5:利用Annexin V/PI双染法检测,发现藤黄酰胺可诱导胶质瘤干细胞凋亡。藤黄酰胺在0 μ M(对照组,图17A-1)、0.1 μ M(图17A-2)、0.3 μ M(图17A-3)、1 μ M(图17A-4)、3 μ M(图17A-5)浓度下处理GSC2 12小时,Annexin V/PI双染,流式分析各处理组内细胞的凋亡情况,图17A-1至图17A-5(门:P2)发现藤黄酰胺可明显诱导胶质瘤干细胞的凋亡。

[0041] 图17B-1至图17B-5:利用Annexin V/PI双染法检测,发现藤黄酰胺可诱导胶质瘤干细胞凋亡。藤黄酰胺在0 μ M(对照组,图17B-1)、0.1 μ M(图17B-2)、0.3 μ M(图17B-3)、1 μ M(图17B-4)、3 μ M(图17B-5)浓度下处理GSC2 24小时,Annexin V/PI双染,流式分析各处理组内

细胞的凋亡情况,图17B-1至图17B-5中(门:P2)发现藤黄酰胺可明显诱导胶质瘤干细胞的凋亡。

[0042] 图18:TrkA抑制剂GW44176对藤黄酰胺发挥对胶质瘤干细胞的抑制有部分回复作用。胶质瘤干细胞铺板后用GW44176(800nM),K252a(30nM)预先处理2小时,而后加入不同浓度下的11#药物共同作用于胶质瘤干细胞株(GSC2)4小时,而后用MTS的方法检测细胞存活率。

具体实施方式

[0043] 下面将通过下述非限制性实施例进一步说明本发明,本领域技术人员公知,在不背离本发明精神的情况下,可以对本发明做出许多修改,这样的修改也落入本发明的范围。

[0044] 下述实验方法如无特别说明,均为常规方法,所使用的实验材料如无特别说明,均可容易地从商业公司获取。

[0045] 实施例1:MTS法检测细胞存活率

[0046] (1)按照产品说明书配制以下溶液:

[0047] a、DPBS:依次加入0.2gKCl,8.0gNaCl,0.2gKH₂PO₄,1.15gNa₂HPO₄至1L,调pH至7.35,之后加入0.1gMgCl₂·6H₂O,充分混匀至溶液清澈后,加入0.133gCaCl₂·2H₂O后,在此充分混匀至溶液清澈。用0.2μM滤器过滤除菌两次后,分装保存在4℃。

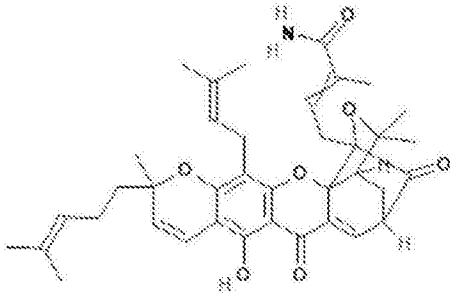
[0048] b、PMS溶液的配制:使用DPBS配制0.92mg/mL的PMS溶液,用0.2μM滤器过滤除菌两次后,分装于用锡箔纸包裹好的EP管中,避光保存-20℃。

[0049] c、MTS溶液的配制:按照1mg MTS粉末用0.5mLDPBS来溶解的比例配制,轻轻混匀,约15min,至MTS完全溶解。测量pH,使其保存在6.0—6.5之间。用0.2μM滤器过滤除菌两次后,分装于用锡箔纸包裹好的EP管中,避光保存-20℃。

[0050] d、MTS/PMS溶液的配制:分别融化MTS和PMS,37℃孵育15min,之后按照4.2mg MTS粉末溶于2.1mL DPBS中,使用时加入0.1mL PMS的比例来配制。

[0051] (2)对于藤黄酰胺对胶质瘤干细胞细胞活性的影响检测,实验用96孔细胞培养板用100ug/mL多聚赖氨酸包被过夜,次日生理盐水洗两遍,晾干后待用。将细胞消化后重悬为单细胞悬液,细胞计数,铺于96孔细胞培养板内(U87MG SLC(5000个/孔)、U251SLC(10000个/孔)、GSC2(10000个/孔)、GSC5(10000个/孔)),H1P56NSC(10000个/孔)生长过夜。次日加入藤黄酰胺(购自美国MicroSource公司,及SantaCruzBio,sc-221655A,USA),其化学式如式I所示,其化学分子式为(C₃₈H₄₅N₇),其结构简式为CC(=CCCC1(C=CC2=C(O1)C(=C3C(=C20)C(=O)C4=CC5CC6C4(O3)C(C5=O)(OC6(C)C)CC=C(C)C(=O)N)CC=C(C)C)C。并设置如下浓度梯度:0.03μM、0.1μM、0.3μM、1μM、3μM、10μM、30μM,每个药物浓度3个复孔,作用48小时。

[0052]



式I

[0053] (3)对于三株胶质瘤细胞株(U251(购自美国ATCC)、U87MG(购自美国ATCC)、N3(从病人肿瘤组织分离得到的原代胶质瘤细胞,获赠于天坛医院江涛老师实验室))、则无需包被实验用96孔细胞进行包被。其细胞铺板浓度均为:5000个/孔、5000个/孔、5000个/孔、10000个/孔。其它操作如上。

[0054] (4)藤黄酰胺作用48小时后,根据需要配制相应体积的MTS/PMS检测液,然后按照检测液:培养基=1:5的比例加入无血清培养基。最终每孔体系120 μ L,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂孵育2小时。根据MTS还原后产生的甲臜产物的吸光度光谱,在吸收峰490nm读取数据。并减去630nm所读取的数据,用以减去细胞碎片等造成的噪音值,以及其它非特异性吸光度值。

[0055] (5)根据吸光值A计算细胞存活率,细胞存活率=(实验组A/对照组) \times 100%。计算IC₅₀值,并绘制剂量反应曲线。

[0056] 结果见图1,藤黄酰胺特异性抑制胶质瘤干细胞的细胞活性;

[0057] 图7,藤黄酰胺在低浓度(0.1 μ M、0.3 μ M)下对胶质瘤干细胞作用4小时对其细胞活性影响较小,仅高浓度(1 μ M、3 μ M)下对胶质瘤干细胞的细胞活性具有一定影响;

[0058] 以及图9,藤黄酰胺对胶质瘤干细胞的影响在一定程度上是不可逆的。

[0059] 实施例2:真核细胞慢病毒感染

[0060] 具体步骤如下:

[0061] (1)感染前将GSC2、U87MG SLC、HA细胞消化为单细胞悬液,计数后以相应密度(1-3 \times 10⁵个/mL)接种于6孔细胞培养板内,体系为2mL,让GSC2、U87MG SLC自然生长2小时,HA细胞自然生长直至细胞贴壁(大约4小时);

[0062] (2)分别往GSC2细胞培养基中加入带有绿色荧光的含LV3载体(带嘌呤霉素筛选标记),往U87MG SLC细胞培养基中加入带有绿色荧光的含pLenti6载体(带杀稻瘟素(Blasticidin)筛选标记,购自Promega公司)的慢病毒2 μ L,往HA细胞培养基中加入带有红色荧光的慢病毒(不带筛选标记)2 μ L,充分混匀,过夜培养;

[0063] (3)次日上午,移去含病毒培养基,各加入新鲜培养基2mL,让其自然生长;

[0064] (4)48小时~72小时,荧光显微镜下观察细胞,检测是否有相应荧光表达,以确定是否感染成功;

[0065] (5)确定有荧光表达后,用相应浓度的杀稻瘟素筛选稳定表达绿色荧光的U87MG SLC细胞,用相应浓度的嘌呤霉素筛选稳定表达绿色荧光的GSC2细胞,并通过挑选单克隆的方法筛选稳定表达红色荧光的HA细胞。

[0066] 实施例3:流式细胞分析

[0067] 预先用100 μ g/mL的多聚赖氨酸包被6孔及96孔细胞培养板,37 $^{\circ}$ C过夜,生理盐水洗

两遍,晾干。将稳定表达绿色荧光的GSC2-GFP细胞及稳定表达红色荧光的HA细胞,消化为单细胞,新鲜培养基重悬,细胞计数,均稀释为 5×10^4 个/mL,两种细胞1:1充分混匀,分为五管,分别加入藤黄酰胺,混匀,使其浓度分别为0 μ M、0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M。分别加入6孔细胞培养板(2mL)及96孔细胞培养板(100 μ L,每组3个复孔),分别待其作用4小时、12小时、24小时、48小时,MTS方法检测96孔细胞培养板中各处理组细胞活性,并分别收集6孔细胞培养板中细胞,PBS洗两遍,各用100 μ L重悬细胞,流式分析各处理组活细胞中GSC2-GFP、HA-RFP所占比例。并结合共培养模型经药物处理后细胞活性变化,统计分析共培养模型中各细胞成分的相对细胞存活率。共培养模型——U87MG SLC-GFP+HA-RFP的操作如上;

[0068] 结果见图2A至图3C,相对于人正常星形胶质细胞,藤黄酰胺可特异性的抑制共培养模型中胶质瘤干细胞的细胞活性。

[0069] 实施例4:肿瘤球形成实验

[0070] 96孔细胞培养皿包被后每孔加入100 μ L含5000个GSC2单细胞悬浮液,自然生长4天后,吸去原培养基,每孔加入各浓度藤黄酰胺的100 μ L新鲜培养基,药物浓度分别为:0.03 μ M、0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M、10 μ M、30 μ M,药物作用时间为处理48小时后镜下观察各处理组肿瘤球的形态变化,并同时统计各处理组肿瘤球数目。

[0071] 结果见图4A至图4F和图5,利用该体外实验模拟临床上胶质瘤干细胞形成肿瘤后检测藤黄酰胺的抑制效果,发现藤黄酰胺可显著减小肿瘤球的体积、数量,并使肿瘤球边缘细胞死亡直至整个肿瘤球。

[0072] 实施例5:有限稀释实验

[0073] 步骤如下:

[0074] (1)将悬浮培养的GSCs肿瘤球细胞收集到15mL离心管中,加入0.5mL ACCUTASE酶(购自sigma公司)37 $^{\circ}$ C消化5mins,将细胞吹成单细胞,离心去上清;

[0075] (2)加入新鲜的Neurobasal培养基(购自gibco公司),并取部分细胞台盼蓝染色后细胞计数;

[0076] (3)计算所需细胞液的体积,设置细胞浓度梯度,200,100,50,25个/孔,每种浓度设置10个重复孔。设置DMSO对照组,及藤黄酰胺0.1 μ M药物处理组;

[0077] (4)将细胞接种于96孔板中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂,孵箱中培养,2周后统计无肿瘤球孔的比例;

[0078] 结果见图6,藤黄酰胺在低浓度0.1 μ M浓度下可显著抑制胶质瘤干细胞克隆形成,即能明显抑制胶质瘤干细胞的自我更新能力;及图10,藤黄酰胺在0.1 μ M,0.3 μ M,1 μ M,3 μ M浓度下处理GSC2细胞4小时,去药物后也可明显抑制胶质瘤干细胞自我更新能力。

[0079] 实施例6:二次(Secondly, 2nd)肿瘤球形成实验

[0080] 藤黄酰胺在0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M浓度下处理GSC2细胞4小时,离心收集细胞去带药物培养基,PBS洗两次并用新鲜培养基重悬细胞,分别取部分细胞台盼蓝染色后细胞计数,各处理组细胞铺于96孔板,每组3个复孔,每孔5000个活细胞,4天后光镜下观察各处理组肿瘤球形成情况,并统计各处理组肿瘤球的数目。

[0081] 结果见图8A、8B和图8C-1至图8C-5,藤黄酰胺处理胶质瘤干细胞4小时,撤药后,其肿瘤球形成能力也明显被抑制。

[0082] 实施例7:三次(Thirdly, 3rd)肿瘤球形成实验

[0083] 藤黄酰胺在0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M浓度下处理GSC2细胞4小时，离心收集细胞去带药物培养基，PBS洗两次并用新鲜培养基重悬细胞，使细胞自然生长至可传代，分别取部分细胞台盼蓝染色后细胞计数，各处理组细胞铺于96孔板，每组3个复孔，每孔5000个活细胞，4天后光镜下观察各处理组肿瘤球形成情况，并统计各处理组肿瘤球的数目。

[0084] 结果见图11A、11B和图11C-1至图11C-3，藤黄酰胺处理胶质瘤干细胞4小时，撤药后，细胞传一代，仍然可明显抑制肿瘤球形成能力。

[0085] 实施例8:回复试验(Recovery assay)

[0086] (1)用100ug/mL多聚赖氨酸包被96孔细胞培养板

[0087] (2)ACUTASE酶将GSCs消化为单细胞，新鲜Neurobasal培养基重悬，将细胞铺于预先包被的96孔细胞培养板，过夜；

[0088] (3)加入藤黄酰胺，使其浓度为0.03 μ M、0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M、10 μ M、30 μ M，每个浓度9个复孔；

[0089] (4)作用24小时后，往每个浓度的3个复孔中加入20uL MTS/PMS混合试剂，检测其细胞活性。吸去其它6个复孔加药培养基，往其中3个孔中加入新鲜培养基，另外3个复孔中加入相同浓度的含藤黄酰胺培养基；

[0090] (5)继续培养48小时后，MTS检测细胞活性，药物作用48小时，而后检测恢复48小时的情况，操作如上；

[0091] 结果见图12A和图12B，藤黄酰胺在0.3 μ M及以上浓度，对细胞作用24小时，48小时后撤药，GSC2的细胞活性将无法回复。

[0092] 实施例9:裸鼠原位成瘤

[0093] 收集经藤黄酰胺1 μ M浓度下预处理24小时后细胞，PBS洗两遍，部分细胞台盼蓝染色，细胞计数。取细胞原位注射于5~7周龄Ba1b/C裸鼠颅内纹状体，10⁵个细胞/只，每组5只，并设置DMSO对照组。

[0094] 结果见表1、图13A和图13B，藤黄酰胺预处理胶质瘤干细胞GSC2，可显著抑制其裸鼠原位成瘤能力。

[0095] 表1

[0096]

#细胞(GSC2)	对照	藤黄酰胺-1 μ M
1*10 ⁵	5/5	1/5

[0097] 实施例10:斑马鱼胶质瘤移植模型给药实验

[0098] 往48小时斑马鱼胚胎的卵黄囊内注射3000个带有绿色荧光标记的U87MG SLC-GFP，让其自然生长48小时，利用荧光显微镜检测斑马鱼体内肿瘤形成情况，而后往斑马鱼孵化液中加入藤黄酰胺，使其浓度为1 μ M，药物处理48小时，荧光显微镜检测斑马鱼卵黄囊部位绿色荧光的强弱，用以判断藤黄酰胺对斑马鱼移植瘤模型体内肿瘤的抑制效果；

[0099] 结果见图14A和图14B，藤黄酰胺可显著抑制斑马鱼移植瘤模型体内肿瘤的生长。

[0100] 实施例11:裸鼠腋下皮下成瘤

[0101] 将离心消化后的重悬于PBS的GSC2单细胞接种于15只7周大的Ba1b/C裸鼠腋下皮下，接种数目为5*10⁴个/只，记录裸鼠的肿瘤大小(裸鼠肿瘤体积=长*宽²/2)，当裸鼠皮下肿瘤长至约100mm³时，将其分为DMSO组、及藤黄酰胺药物给药组，给药剂量为2mg/kg，腹腔

注射给药,给药时间为11天,期间记录两组裸鼠肿瘤的体积及体重变化。

[0102] 结果见图15A至图15C,藤黄酰胺可显著抑制斑裸鼠移植瘤模型的肿瘤生长,且其副作用较小。

[0103] 实施例12:蛋白质印记(Western Blotting)

[0104] 以10%分离胶进行SDS-PAGE电泳,然后凝胶小心转移至电转缓冲液中转硝酸纤维素膜,封闭非特异性结合位点后加入一抗抗体(PARP、Caspase3、Cleaved caspase3)、细胞周期相关抗体(p27、p21)抗体购自Cell signaling公司,货号分别为:#9542L;#9665S;#9661L;#3686S;#2947S,4℃孵育过夜,然后用辣根过氧化物酶标记的二抗:山羊抗兔抗体(购自中山金桥)室温结合1-2h。然后用ECL法进行显色。

[0105] 结果见图16A、图16B,藤黄酰胺可诱导胶质瘤干细胞凋亡,对胶质瘤干细胞的细胞周期影响不大。

[0106] 实施例13:Annexin V/PI双染检测细胞凋亡

[0107] 具体步骤如下:

[0108] (1)藤黄酰胺在0.1μM、0.3μM、1μM、3μM浓度下处理GSC2 12小时或24小时;

[0109] (2)收集细胞,PBS洗两遍;

[0110] (3)取50uL 1*结合缓冲液(binding buffer)重悬细胞,使细胞密度约为 1×10^6 个/mL;

[0111] (4)加入2.5uL FITC Annexin V 和2.5uL PI;

[0112] (5)避光情况下,室温孵育15min;

[0113] (6)往体系中加入200uL 1*结合缓冲液(binding buffer),各处理管分别过细胞筛;

[0114] (7)流式细胞仪分析;

[0115] 所用Annexin V/PI双染试剂盒购自BD pharmingen,产品批号为556547。

[0116] 结果见图17A-1至图17B-5,藤黄酰胺可诱导胶质瘤干细胞细胞凋亡。

[0117] 实施例14:拯救实验

[0118] 具体步骤如下:

[0119] (1)收集GSC2细胞,将细胞消化后重悬为单细胞悬液,细胞计数;

[0120] (2)将细胞稀释为100000个细胞/mL;

[0121] (3)分别往稀释后的GSC2细胞液中加入GW44176,K252a,使其浓度分别为800nM,30nM;

[0122] (4)将分别加有GW44176(Selleck公司,800nM),K252a(abcam公司,30nM)的细胞液加入96孔细胞培养板内,每孔100uL;

[0123] (5)放入细胞培养箱内,培养2小时;

[0124] (6)而后分别往每种药物添加组内加入藤黄酰胺,并使其浓度为0.1uM,0.3uM,1uM,3uM;

[0125] (7)继续培养4小时后,MTS方法检测细胞存活率。

[0126] 结果见图18,TrkA抑制剂GW44176对藤黄酰胺发挥对胶质瘤干细胞的抑制有部分回复作用。

[0127] 综上,本发明在细胞水平证实藤黄酰胺相对于胶质瘤细胞(U251、U87MG、N3(从病

人肿瘤组织分离得到的原代胶质瘤细胞)、人正常星形胶质细胞(HA),人神经干细胞(H1P56NSC)对实验室分离得到的四株胶质瘤干细胞(U87MG SLC、U251SLC、GSC2、GSC5)具有明显的特异性抑制效果(48小时作用的 IC_{50} 值为:0.01~0.64 μ M)。并进一步通过克隆形成实验,肿瘤球抑制实验,2nd肿瘤球形成实验,3rd肿瘤球形成实验,原位成瘤实验等证实藤黄酰胺可明显抑制胶质瘤干细胞的自我更新,肿瘤球形成及在体肿瘤形成能力。而后本发明利用斑马鱼胶质瘤移植瘤模型、裸鼠胶质瘤皮下移植瘤模型,在体水平证明了藤黄酰胺对胶质瘤的治疗作用。且本发明发现作为人神经营养因子NGF类似物,藤黄酰胺对胶质瘤干细胞的抑制作用可被TrkA抑制剂部分回复,在一定程度上解释了藤黄酰胺发挥对胶质瘤干细胞抑制作用及其发挥对胶质瘤抑瘤效果的机制。

[0128] 因此,本发明发现了小分子化合物藤黄酰胺可通过激活TrkA及其下游信号通路,抑制人神经胶质瘤干细胞从而达到治疗人神经胶质瘤的目的。众所周知,小分子化合物在体内发挥功能都需倚靠相关的关键基团,而在此基础上其它基团的改变虽能产生不同的化合物,但也能发挥其目的功能。因此,任何在此基础上对藤黄酰胺的修饰,修改而后达到与本发明相同效果的研究均用于本发明。此外,如人神经营养因子NGF,或利用高通量筛选技术从化合物库中小分子化合物库中筛选获得特异性激活TrkA及其下游信号通路,进而达到抑制胶质瘤干细胞,并达到治疗胶质瘤的目的的其它化合物,也落入本发明的范围。

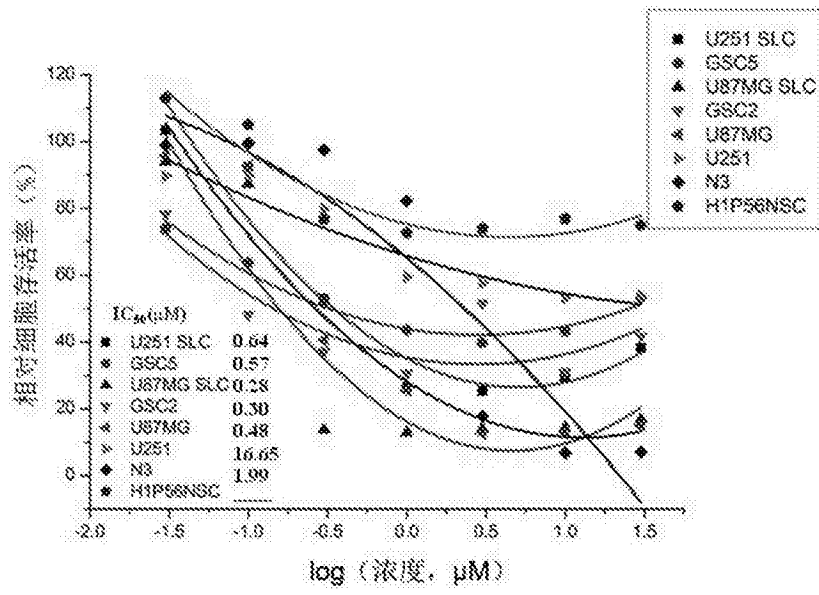


图1

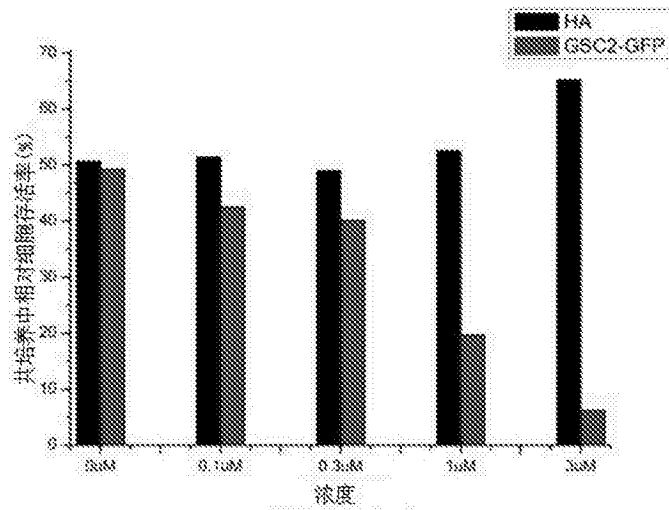


图2A

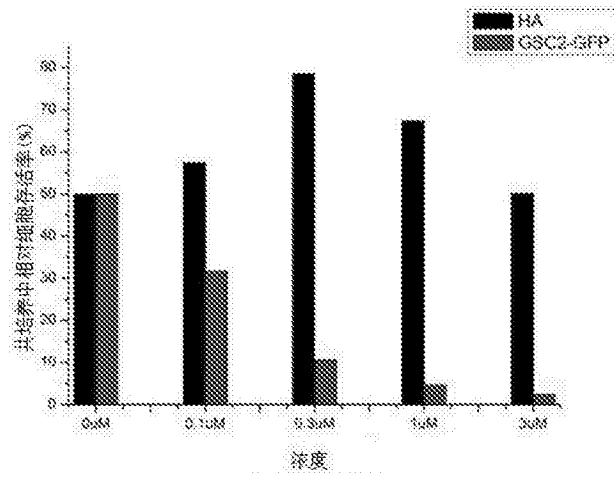


图2B

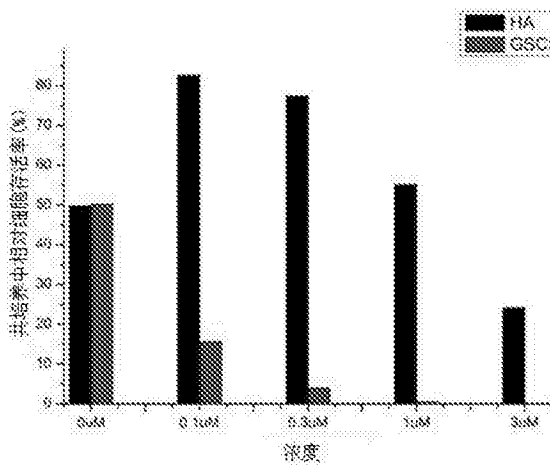


图2C

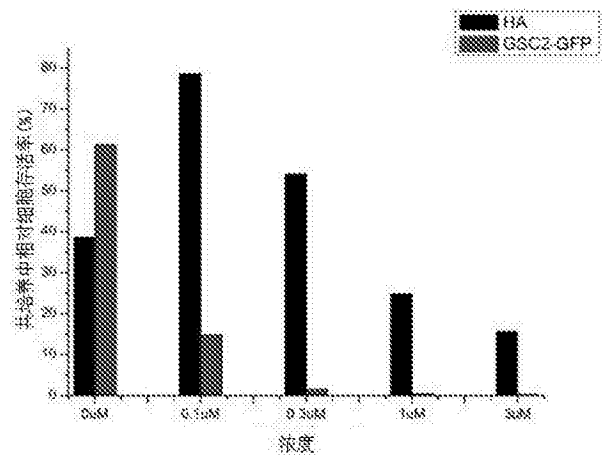


图2D

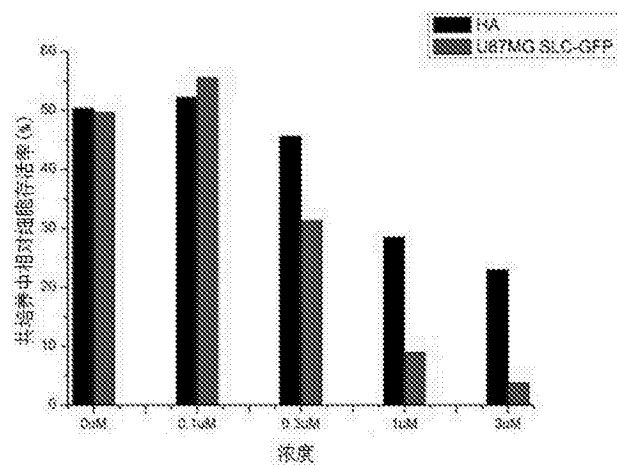


图3A

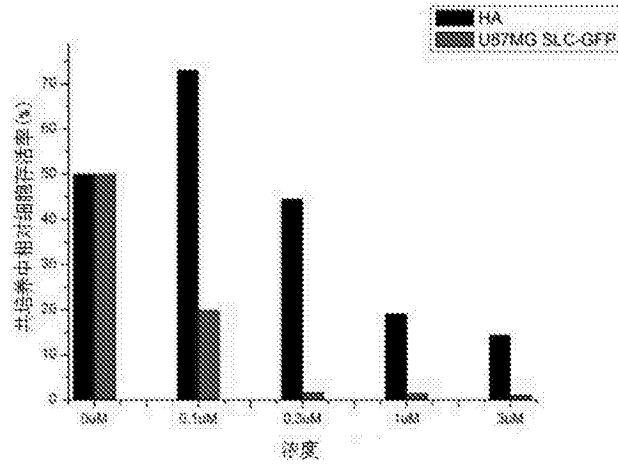


图3B

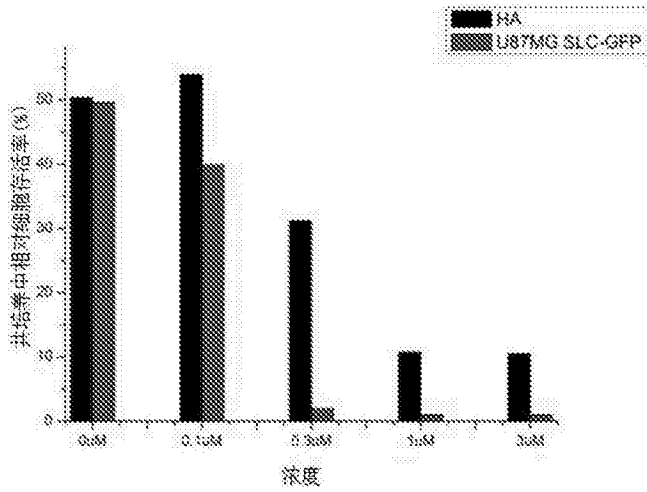


图3C

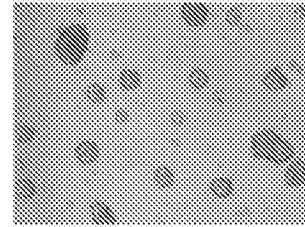


图4A

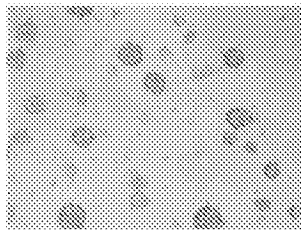


图4B

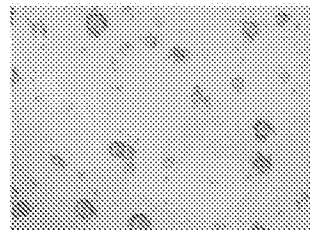


图4C

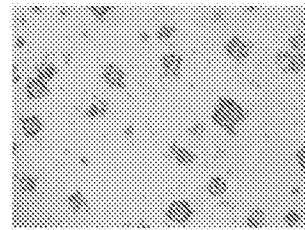


图4D

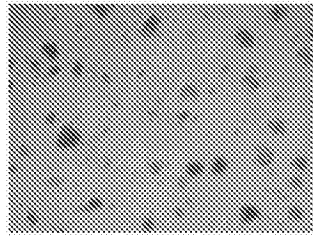


图4E

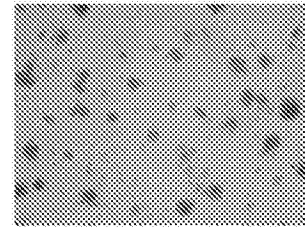


图4F

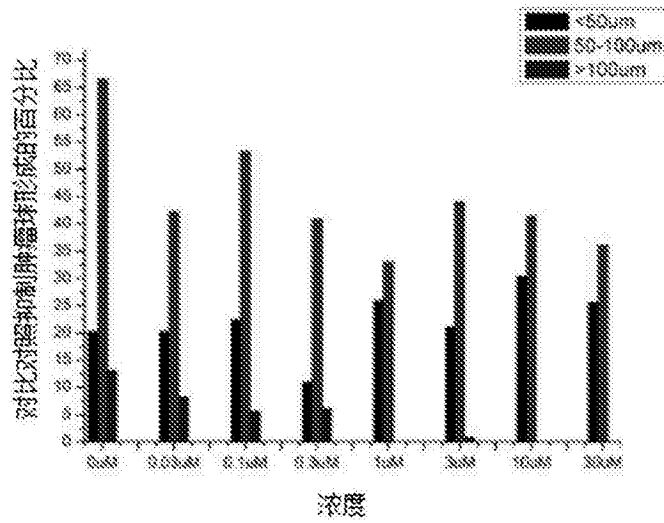


图5

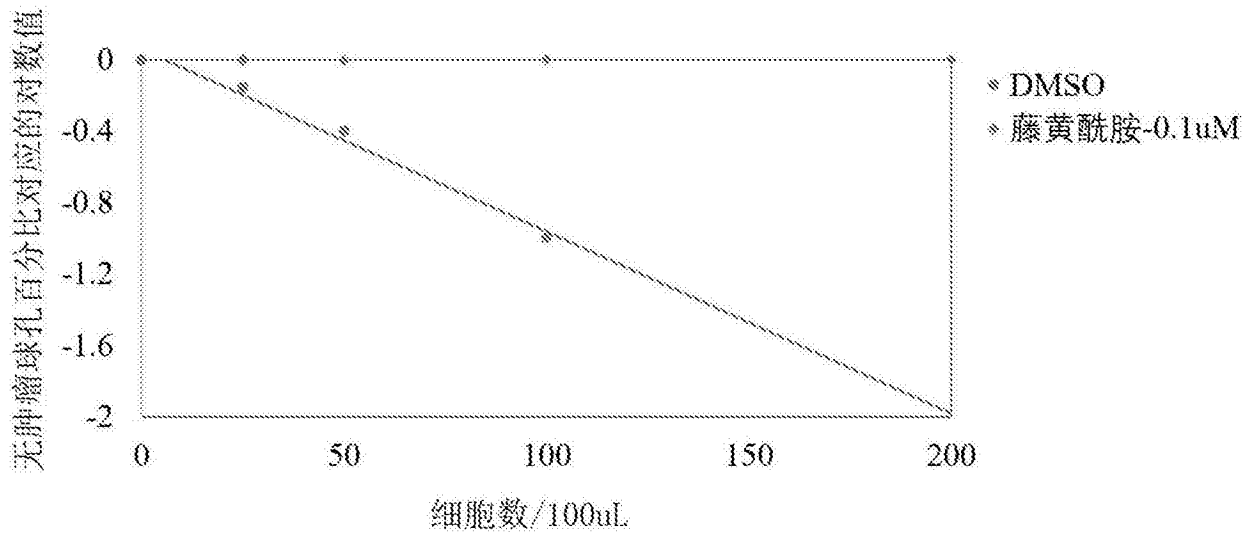


图6

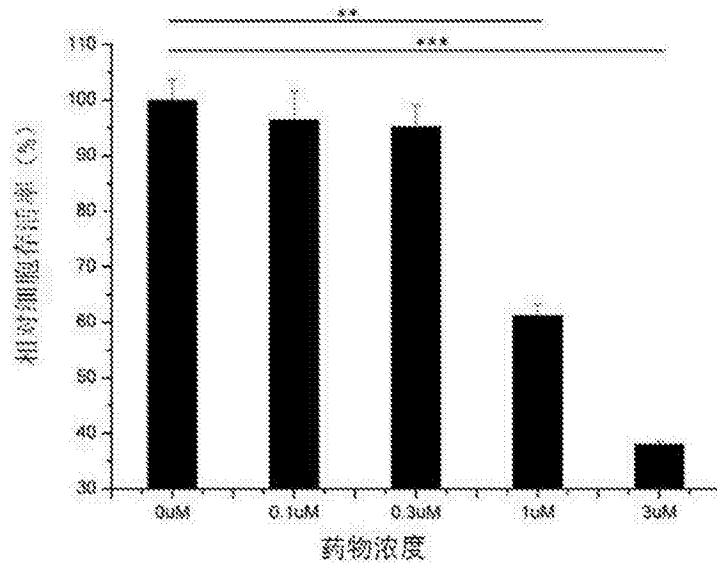


图7

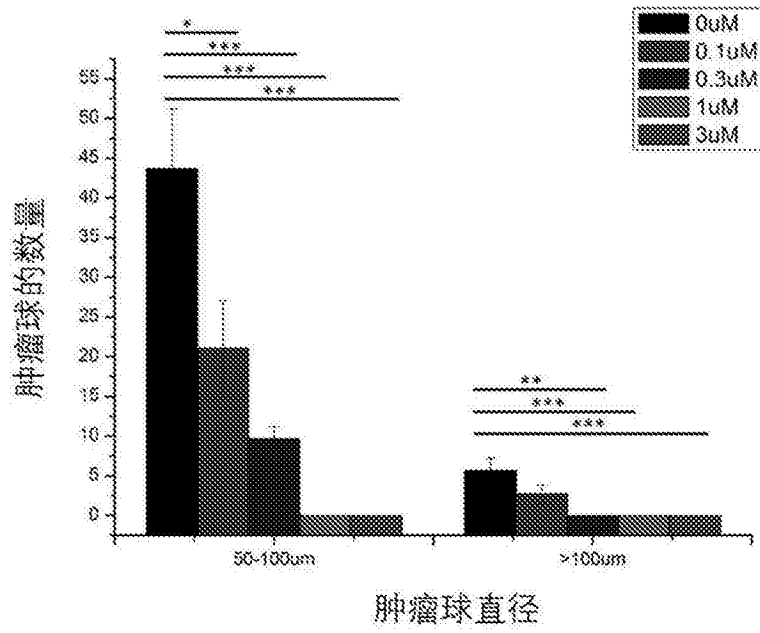


图8A

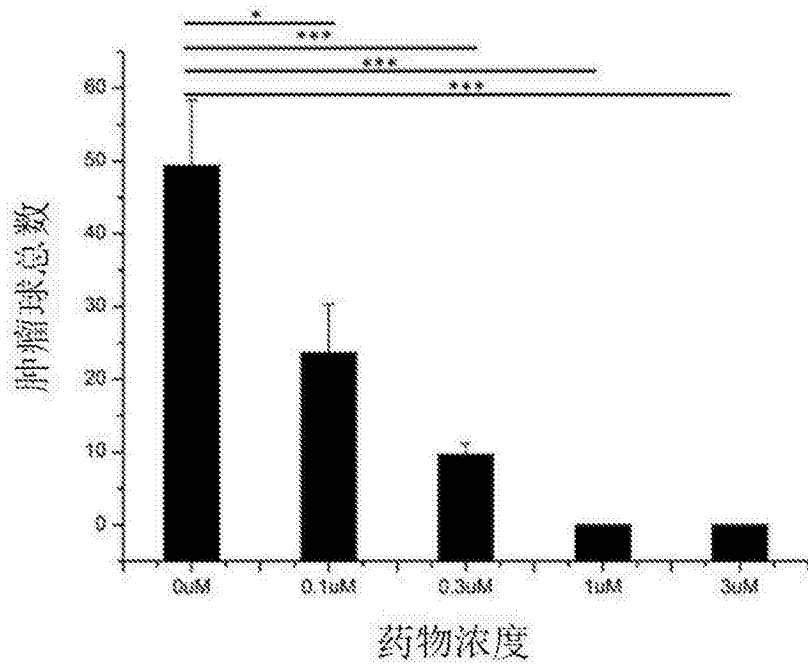


图8B

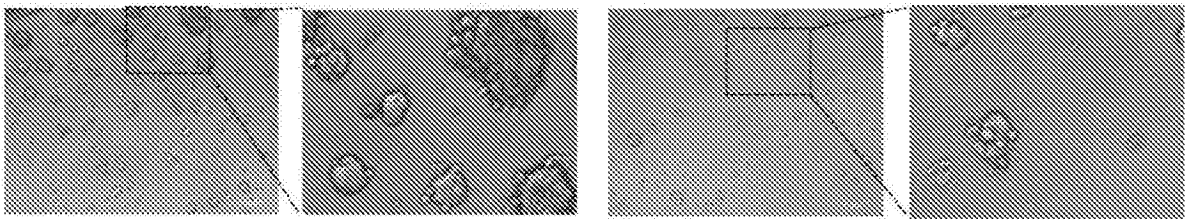


图8C-1

图8C-2

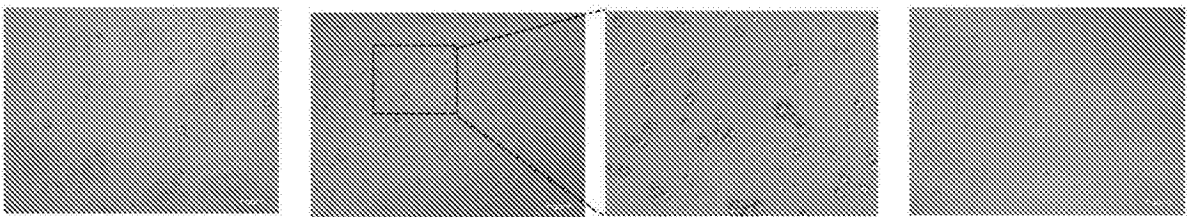


图8C-3

图8C-4

图8C-5

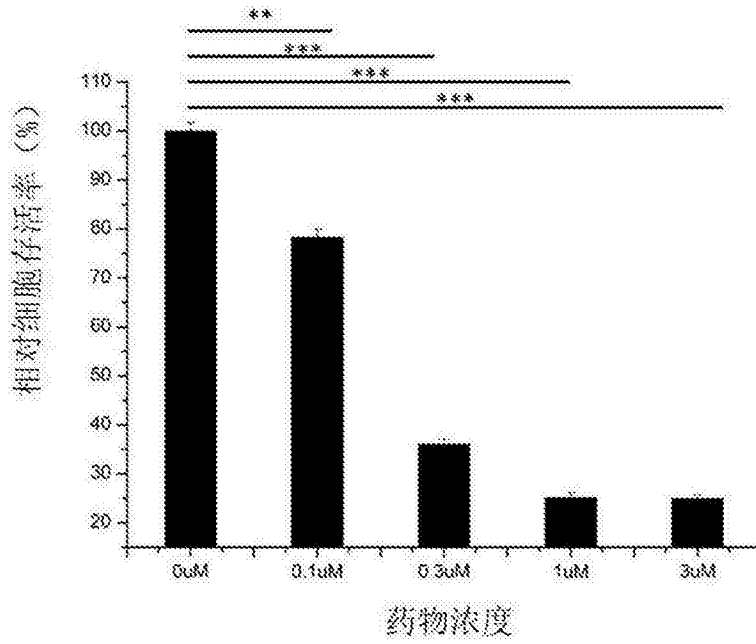


图9

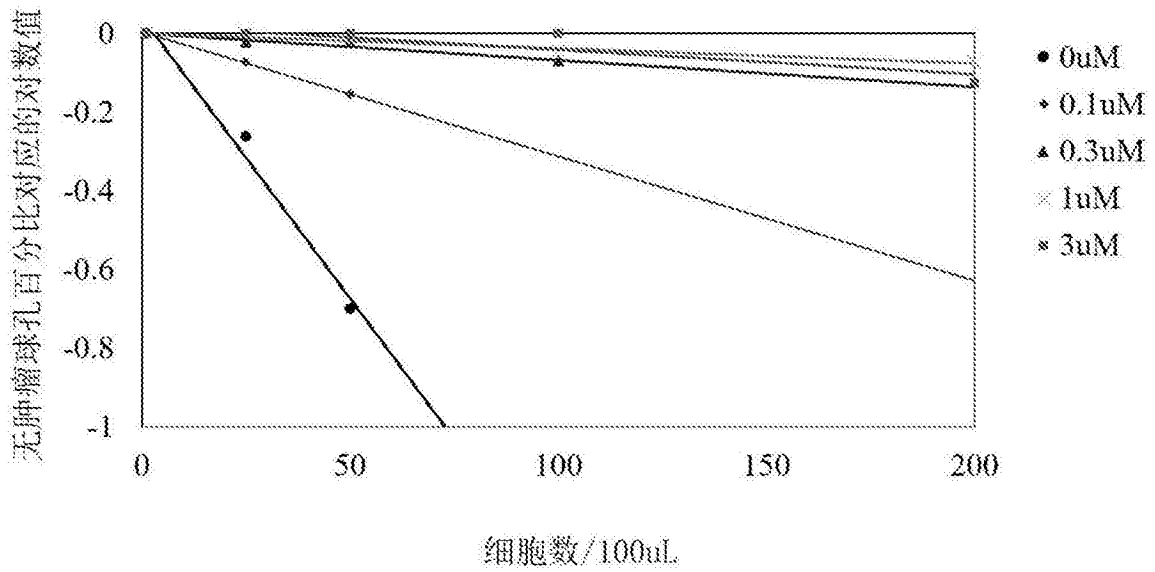


图10

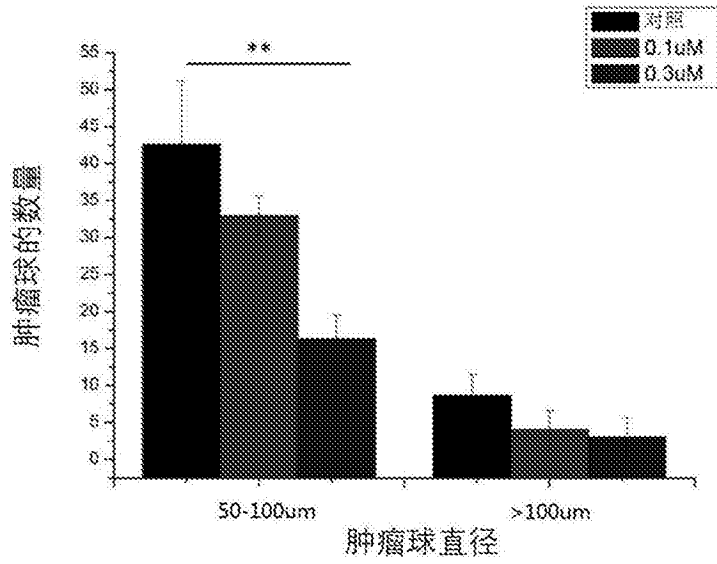


图11A

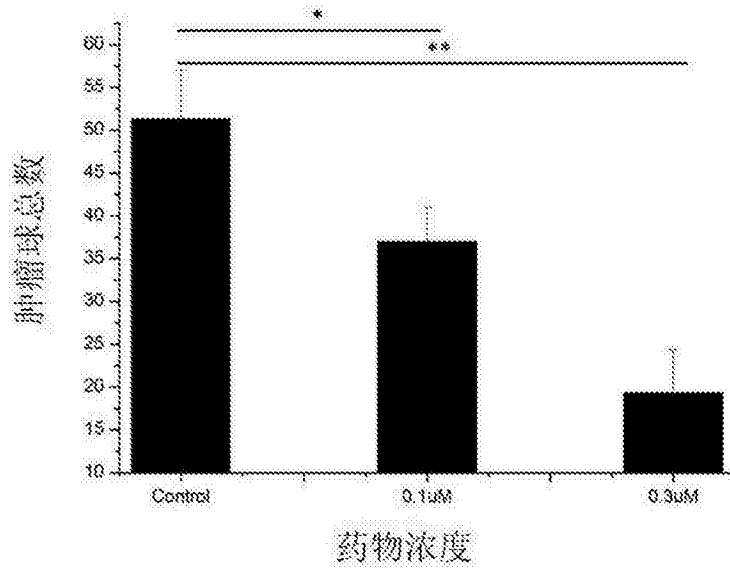


图11B

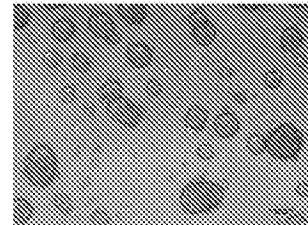


图11C-1

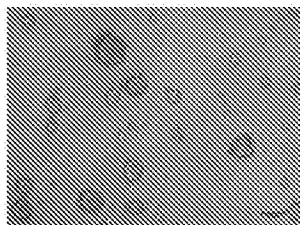


图11C-2

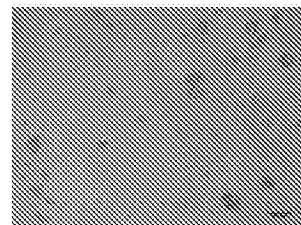


图11C-3

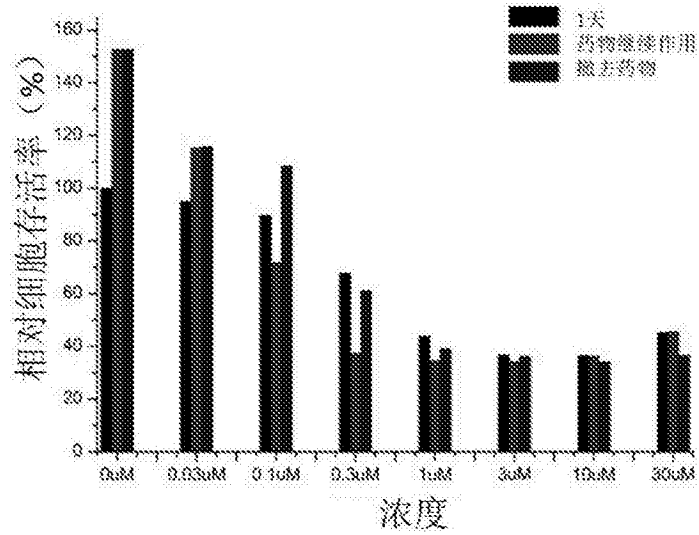


图12A

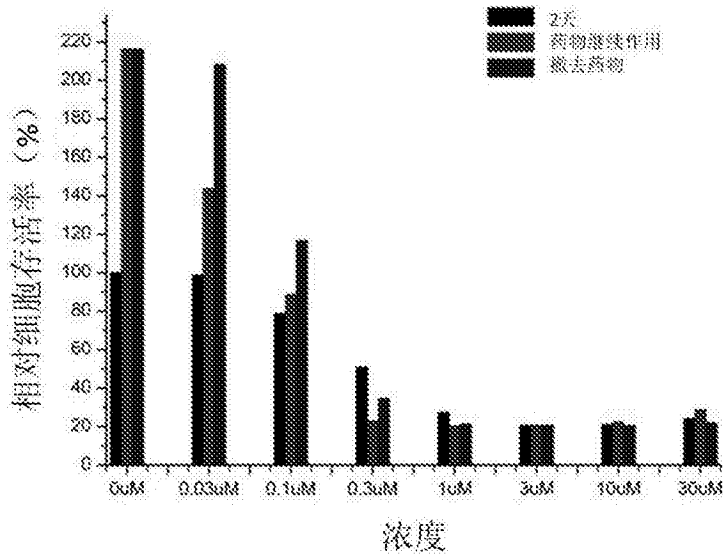


图13A

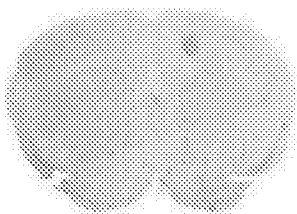


图13B

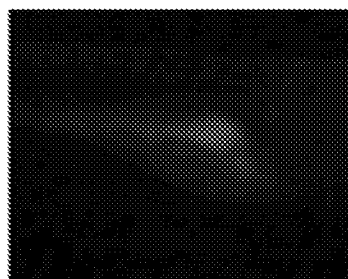


图14A

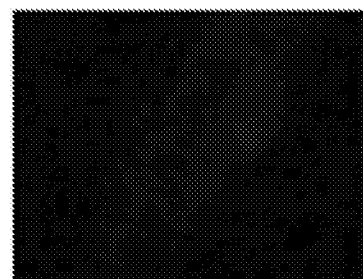


图14B

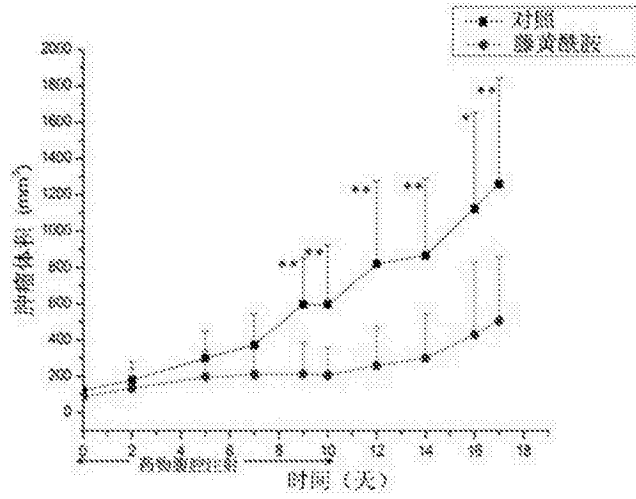


图15A

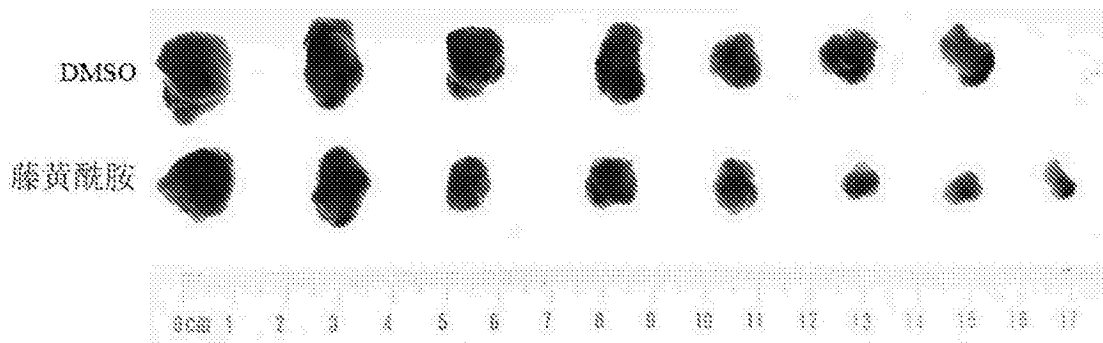


图15B

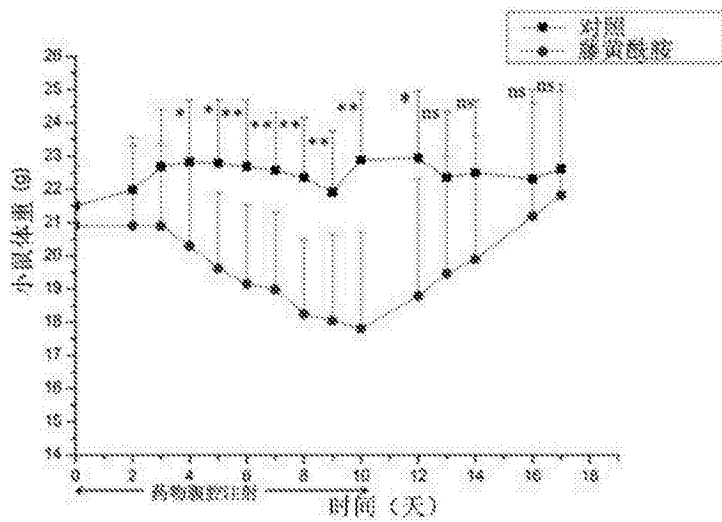


图15C

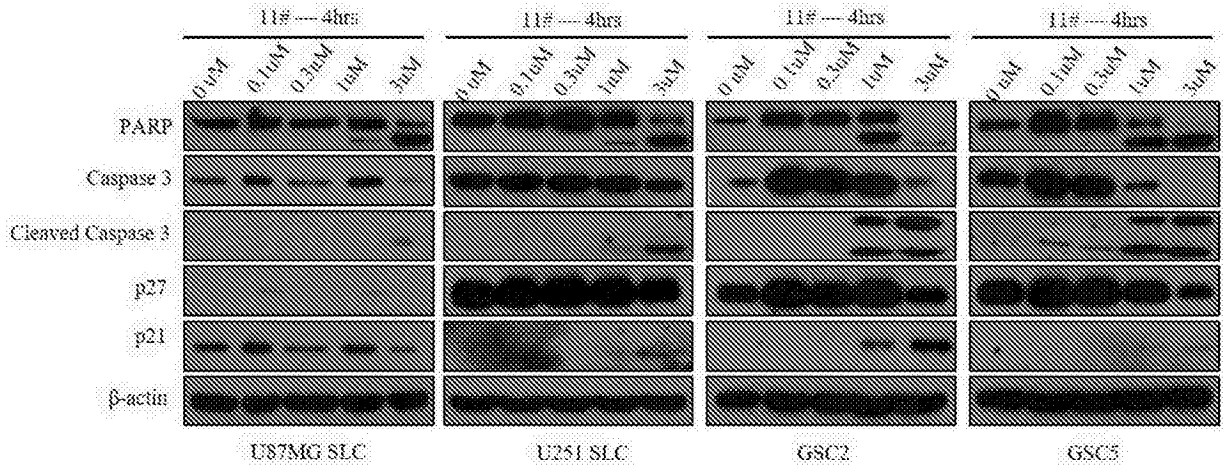


图16A

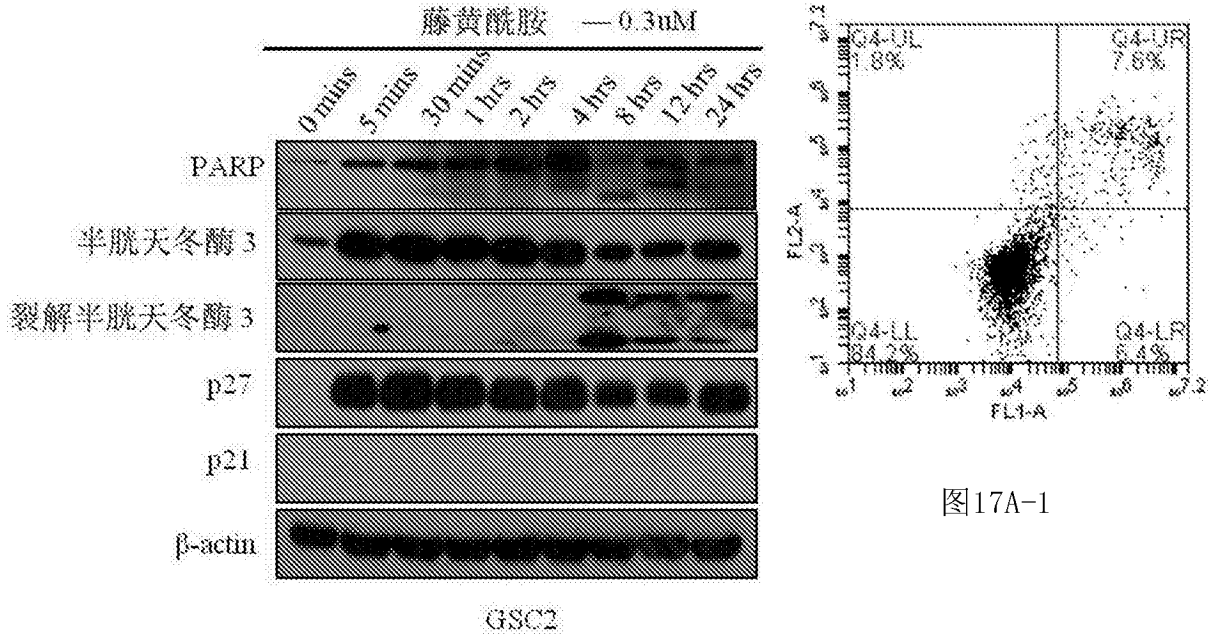


图17A-1

图16B

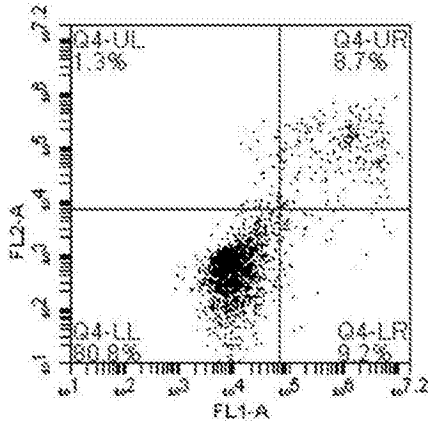


图17A-2

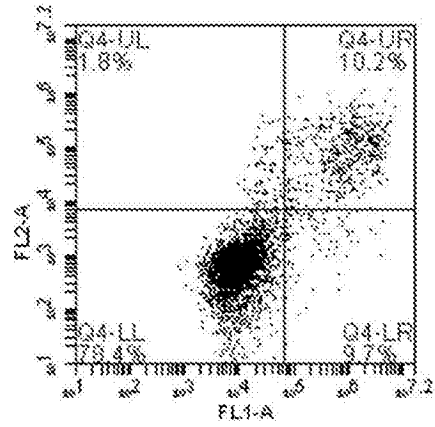


图17A-3

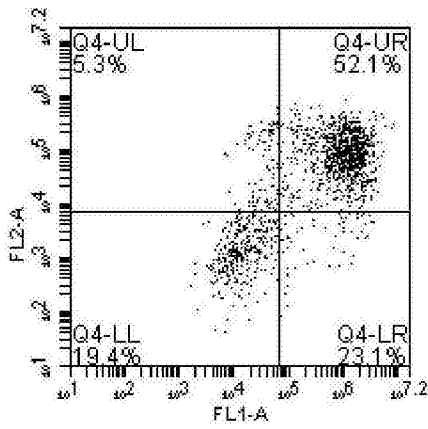


图17A-4

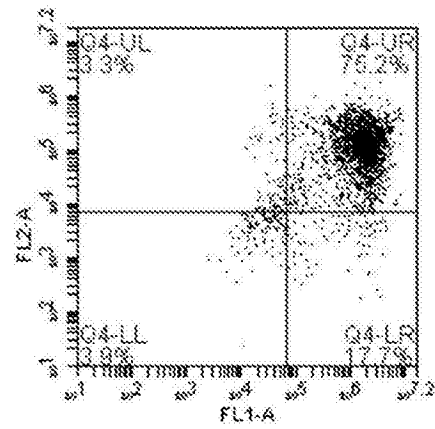


图17A-5

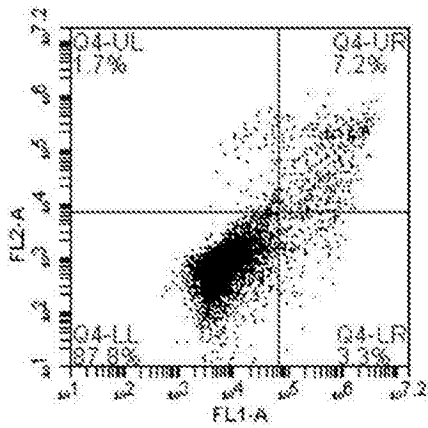


图17B-1

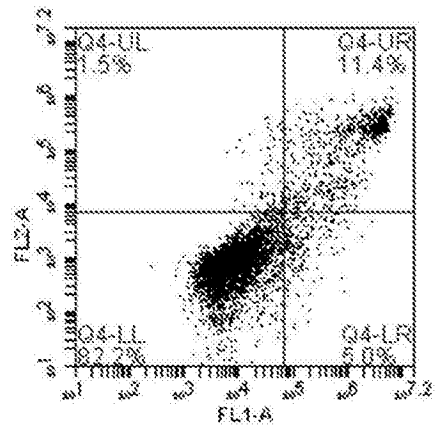


图17B-2

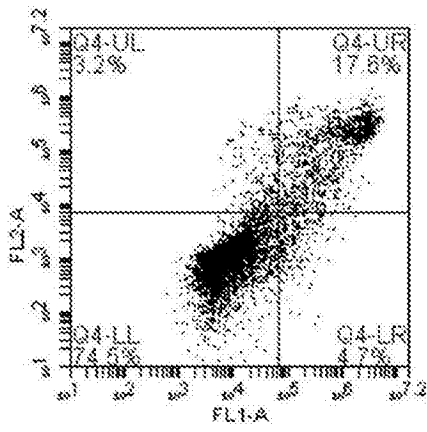


图17B-3

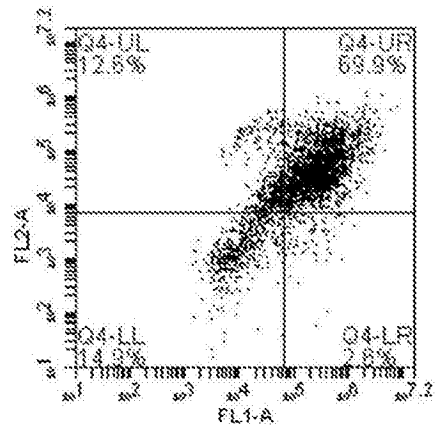


图17B-4

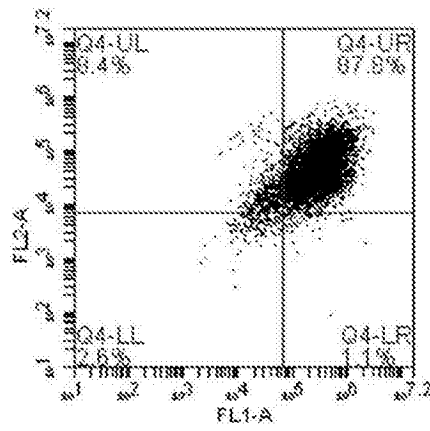


图17B-5

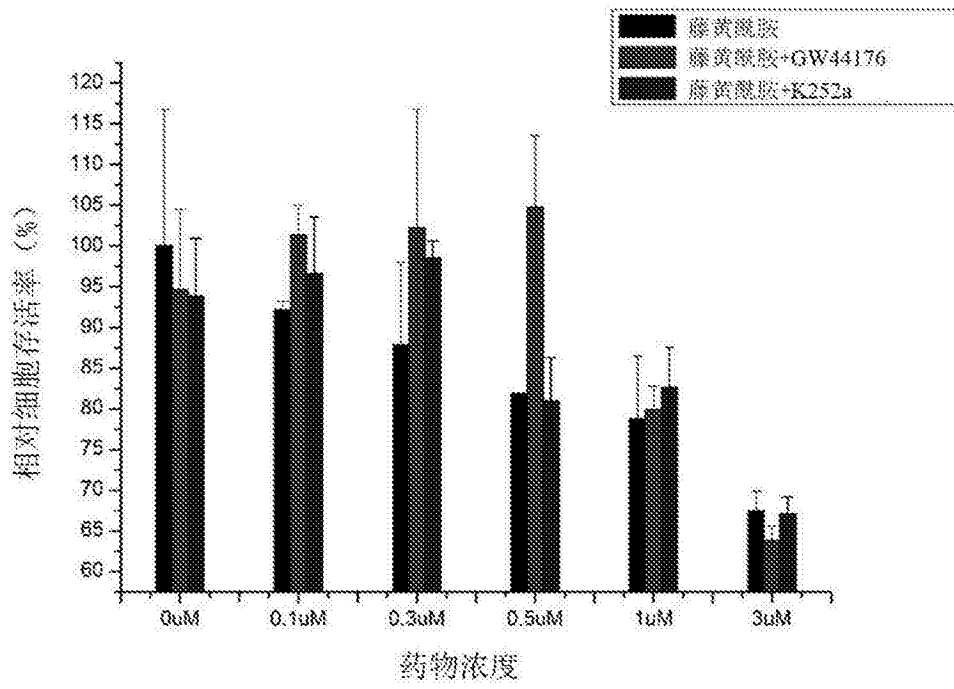


图18