



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93116259.9

[45] 授权公告日 2004 年 4 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1144586C

[22] 申请日 1993.8.7 [21] 申请号 93116259.9

[30] 优先权

[32] 1992. 9. 18 [33] JP [31] 249340/1992

[32] 1993. 2. 24 [33] JP [31] 35251/1993

[71] 专利权人 太日保日本株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 上田伸一 德田春邦 平井圭一

畠中平八

审查员 吴顺华

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

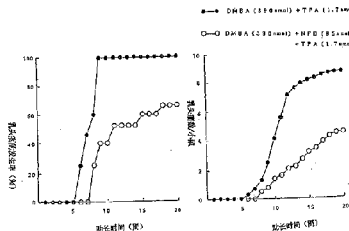
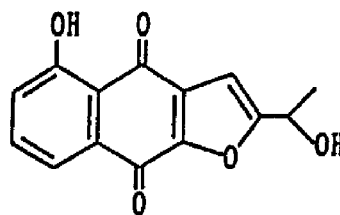
代理人 罗才希 田舍人

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 29 页

[54] 发明名称 2-(1-羟乙基)-5-羟基萘并
[2,3-b]呋喃-4,9-二酮和含
该化合物的抗肿瘤剂

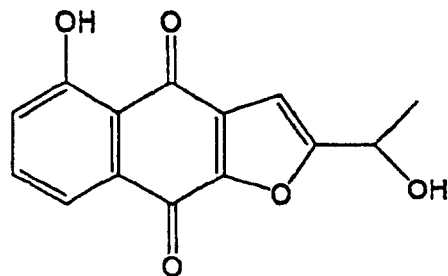
[57] 摘要

本发明提供具有下式结构的新的抗肿瘤剂 2-(1-羟乙基)-5-羟基萘并 [2,3-b]呋喃-4,9-二酮。



ISSN 1008-4274

1. 下式 2-(1-羟基乙基)-5-羟基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮
化合物在制备致癌促进作用的抑制剂方面的用途:



2-(1-羟乙基)-5-羟基萘并[2,3-b]
呋喃-4,9-二酮和含该化合物的抗肿瘤剂

本发明涉及具有抗肿瘤作用的一种新化合物以及含该化合物的抗肿瘤剂。

每年癌症的死亡率不断增加，在发展中国家癌症是死亡的主要原因。因此，在医学领域癌症的控制是至关重要的。抗肿瘤药的开发早已是重要的癌症的治疗的课题之一。目前已经开发出多种抗肿瘤药。因此，已开发出许多抗肿瘤的抗生素和其它直接作用于肿瘤细胞并对该细胞产生一种杀细胞作用的抗肿瘤剂。然而，这些药对正常的细胞或组织也有很强的细胞毒性，并且在多数情况下严重的副作用已经不可避免。因此，对肿瘤细胞具有选择性的细胞毒性而又很少出现副作用的抗肿瘤药的开发长期以来一直是研究者的目标。

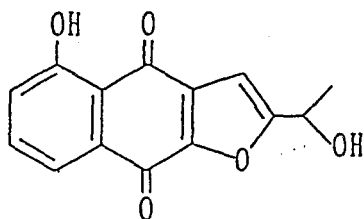
尽管人们并没有充分认识肿瘤细胞的特性，但一般认为它作为由致癌化学制品、辐射、紫外线或致癌病毒刺激的结果在染色体上暂时不活动的致癌基因被表达；或者相反，因上述刺激因素引起肿瘤抑制基因失活的结果。据信，致癌基因或其细胞膜附着体的表达产物的内外细胞的分泌物与肿瘤细胞的瘤的特征性例如：转移、浸润能力及非正常的增生的显示有关。若能抑制引起不正常表达过程其中之一的任何方法行之有效，那么，这样的方法可能会成为控制癌症的有效的方法。

在日本，根据NIC(美国国家癌症研究所)用小鼠白血病细胞系L1210和P388的抗肿瘤药筛选规定，对抗肿瘤剂的有效性进行了筛选。然而，筛选试验的结果常与癌症患者的相应的治疗结果不一致。最

近, 新修改的NCI 筛选规定用人类癌细胞系。已经发现新的实验结果和临床研究中的治疗结果之间具有良好的相关性[G. B. Grindey: *Cancer Cells* 第2卷, 第6期, 163-171页, 1990; N. Saijo, *Clinician* 第17卷, 第6期, 4-9页, 1991]。

本发明人采取使用人类癌细胞系的新的NIC 筛选规定对多种化合物进行了抗肿瘤活性的筛选, 结果发现2-(1-羟乙基)-5-羟基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮(以下称为NFD) 具有极好的抗肿瘤活性, 它是从紫葳科 *Tabebuia avellanedae* Lorentz, ex Griseb. 中提取出来的一个新化合物。依据该发现, 完成了本发明。

因此, 本发明的一个目的是提供具有下式(1) 结构的新化合物 NFD:



本发明的第二个目的是提供含作为活性成分的NFD的抗肿瘤剂。

本发明第三个目的是提供生产NFD的方法, 它包括下述几个步骤: 用热甲醇提取 *Tabebuia avellanedae* Lorentz, ex Griseb. 的干燥树皮; 将提取物经蒸发后得到的残留物用冷氯仿提取; 并用制备薄层层析以甲苯/乙酸乙酯(4:1) 为展开剂分离氯仿可溶的成分。

NFD(分子式: $C_{14}H_{10}O_5$; 分子量: 258.230) 是一种黄色针状结晶, 熔点为181℃, 易溶于二甲亚砜和氯仿, 微溶于水。

在低浓度时NFD显著地抑制下述肿瘤细胞的生长, 并且对这些肿瘤细胞显示出选择性的毒性作用: 培养的人的肺腺癌细胞系A-549、V MRC-LCD和SK-LU-1, 人肺鳞状上皮细胞癌Calu-1细胞, 人结肠腺癌

Wi Dr 细胞, 人的前列腺癌LNCaP细胞, 人的阴道鳞状上皮细胞癌A-431细胞, 人的颈部癌HeLa细胞, 人胆道癌HuCC-T1细胞, 小鼠皮肤癌黑色素瘤B16(M4)细胞, 人的恶性B细胞淋巴瘤细胞, 人慢性骨髓性的白血病K562细胞, 人的胰腺癌ASPC-1细胞, 人的成神经细胞瘤IMR-132细胞, 人肺小细胞癌SCCH-194细胞, 人膀胱癌T24细胞, 人肾细胞癌VMRC-RCW细胞, 人胃癌NUGC-2细胞, 人的甲状腺癌8305C细胞, 人乳腺癌MRK-nu-1细胞, 人的肝细胞瘤HuH-7细胞, 人的卵巢癌TYK-nu细胞, 人的绒毛膜癌BeWo细胞。

对于上述恶性肿瘤细胞, NFD的LD₅₀值(50%生长抑制剂量; 与IC₅₀相同) 大约在5.5-25 ng/ml 范围内。同时, 对培养的正常人的N6KA成纤维细胞、气管上皮细胞、肾细胞和淋巴细胞的LD₅₀值(IC₅₀值) 在55-84 ng/ml 范围内。就普通毒理学而言, 腹腔内用药时, 对ICR小鼠(雄) 的NFD的LD₅₀值为0.73 mg/100克体重; 口腔给药时为0.84 mg/100克体重。

如上所述, NFD是一种能抗各种类型的癌症且副作用极小的极好抗肿瘤药。也发现NFD干扰由化学致癌因素或病毒引起正常细胞向癌细胞转变的最重要的过程—促进阶段, 在致癌过程中起到抗致癌启动子的作用。在本说明书中所说的“抗肿瘤剂”是指包括能有效地治疗或缓解所有类型的恶性肿瘤如固形肿瘤、血癌、肉瘤及预防这些恶性肿瘤的产生的药物。

在附图中:

图1表示NFD对人肺腺癌A-549细胞的生长抑制和致死作用。

图2表示NFD对人肺腺癌VMRC-LCD细胞的生长抑制和致死作用。

图3表示NFD对人肺腺癌SK-LU-1细胞的生长抑制和致死作用。

图4表示NFD对人肺鳞状上皮细胞癌Calu-1细胞的生长抑制和致死作用。

图5表示NFD对人结肠腺癌Wi Dr细胞的生长抑制和致死作用。

图6表示NFD对人前列腺癌LNCaP细胞的生长抑制和致死作用。

图7表示NFD对人阴道鳞状上皮细胞癌A-431细胞的生长抑制和致死作用。

图8表示NFD对人颈部癌He La细胞的生长抑制和致死作用。

图9表示NFD对人胆道癌HuCC-T1细胞的生长抑制和致死作用。

图10表示NFD对小鼠皮肤黑色素瘤B16(M4)细胞的生长抑制和致死作用。

图11表示NFD对人恶性B细胞淋巴瘤细胞的生长抑制和致死作用。

图12表示NFD对人慢性骨髓性白血病K562细胞的生长抑制和致死作用。

图13表示NFD对人胰腺癌ASPC-1细胞的生长抑制和致死作用。

图14表示NFD对人成神经细胞瘤IMR-132细胞的生长抑制和致死作用。

图15表示NFD对人肺小细胞癌SCCH-194细胞的生长抑制和致死作用。

图16表示NFD对人膀胱癌T24细胞的生长抑制和致死作用。

图17表示NFD对人肾细胞癌VMRC-RCW细胞的生长抑制和致死作用。

图18表示NFD对人胃癌NUGC-2细胞的生长抑制和致死作用。

图19表示NFD对人甲状腺癌8305C细胞的生长抑制和致死作用。

图20表示NFD对人乳腺癌MRK-nu-1细胞的生长抑制和致死作用。

图21表示NFD对人肝细胞瘤HuH-7细胞的生长抑制和致死作用。

图22表示NFD对人卵巢癌TYK-nu细胞的生长抑制和致死作用。

图23表示NFD对人绒毛膜癌Be Wo细胞的生长抑制和致死作用。

图24表示NFD对正常人N6KA成纤维细胞的生长抑制和致死作用。

图25表示NFD对正常人气管上皮细胞的生长抑制和致死作用。

图26表示NFD对正常人末梢血淋巴细胞的生长抑制和致死作用。

图27表示NFD对正常人肾细胞的生长抑制和致死作用。

图28表示NFD对致癌促进因子的抑制作用。

图29表示Lapacoal对致癌促进因子的抑制作用，为活性对照。

下述实施例详细解释本发明。

实施例1 NFD的制作

将 *Tabebuia avellanedae* Lorentz, ex Griseb. 的干燥树皮(出产国: 巴西; 可从日本的 Tahebo Japan Co.Ltd 买到) 切成碎片, 用三份1000毫升的甲醇回流提取30分钟; 减压蒸除溶剂。将剩余物(145克) 浸泡于三份400毫升的氯仿中。氯仿层用水洗涤并用无水硫酸镁干燥, 蒸发溶剂后得1g 残留物。将残留物在厚度为0.5mm的硅胶 60F₂₅₄薄层层析板上进行制备薄层层析, 用甲苯: 乙酸乙酯(4:1, 体积/体积) 的混合物作展开剂。将R_f = 0.24的斑点刮下来并用氯仿-甲醇(9:1, 体积/体积) 的混合物提取, 得NFD。重复此TLC过程, 得到总量为0.8毫克的NFD, 熔点为181℃。

实施例2 NFD对包括人的固形肿瘤细胞、血癌和肉瘤在内各种类型恶性肿瘤细胞的抗肿瘤活性

(1) 实验样品的制备

将适量的NFD溶于二甲亚砜, 制成1.0mg/ml的贮备液, 根据需要, 使用前将其稀释。

(2) NFD体外抗肿瘤实验(生长抑制作用和致死能力)

按照下述方法测定NFD对人癌细胞和小鼠癌细胞的抗癌作用。

用胰蛋白酶钠(含0.25%胰蛋白酶钠和0.02%乙二胺四醋酸,

37℃, 3分钟) 处理后, 下列细胞在后对数相被收集用于本实验: 人肺腺癌A-549、VMRC-LCD和SK-LU-1细胞, 人肺鳞状上皮细胞癌Calu-1细胞, 人结肠腺癌Wi Dr细胞, 人前列腺癌LNCaP细胞, 人阴道鳞状上皮细胞癌A-431细胞, 人颈部癌HeLa细胞, 人胆道癌HuCC-T1细胞, 小鼠皮肤癌黑色素瘤B16(M4)细胞, 人胰腺癌ASPC-1细胞, 人成神经细胞瘤IMR-132细胞, 人肺小细胞癌SCCH-194细胞, 人膀胱癌T24细胞, 人肾细胞癌VMRC-RCW细胞, 人胃癌NUGC-2细胞, 人甲状腺癌8305C细胞, 人肝细胞瘤HuH-7细胞, 人卵巢癌TYK-nu细胞和人绒毛膜癌BeWo细胞。人乳腺癌MRK-nu-1细胞, 人恶性B细胞淋巴瘤细胞和人慢性骨髓性白血病k562细胞的悬浮培养液用于收集这些用于实验的细胞。同时, 在胰蛋白酶化后于后对数相收集正常人N6KA成纤维细胞, 直接由气管和肾组织采集正常人气管上皮细胞和肾细胞, 从正常成人捐献者的末梢血中采集正常人的淋巴细胞。将这些细胞用含10%胎牛血清的DMEM或RPMI-1640培养基以 $5-10 \times 10^3$ 细胞/cm²的密度移植到一个96孔的微平皿中, 用通常方式培养24小时, 然后将溶于二甲亚砷的预定量的NFD加到每个孔中。培养是连续的, 并且在24、48和72小时后数存活细胞的数目。为了排除作为NFD溶剂的二甲亚砷的可能的有害作用, 将培养基中二甲亚砷的终浓度调至0.5%或更低, 使其不出现毒性, 并且用只加入二甲亚砷的孔作为对照。

(3) 存活细胞的计数

在胰蛋白酶作用后收集生长在96孔微平皿上的肿瘤细胞, 并向其中加入0.25%台盼兰液。没有染上色的细胞被认为是活细胞, 被染成兰色的细胞被认为是死细胞(台盼兰排斥实验)。

(4) 用于实验的肿瘤细胞和正常细胞

a) 人肺腺癌(A-549细胞)

从Flow Labo Inc. 获得人肺腺癌A-549细胞。在每毫升含50国际

单位青霉素和50微克链霉素，并用10%胎牛血清补充的DMEM培养基中，在37℃，含5%CO₂的大气压下，这些细胞被传代培养，并用于实验。

b) 人肺腺癌(VMRC-LCD细胞)

从国家卫生科学研究所获得人肺腺癌VMRC-LCD细胞。在每毫升含50国际单位青霉素和50微克链霉素，并用10%胎牛血清补充的DMEM培养基中，于37℃，在含5%CO₂的大气压下，这些细胞被传代培养，并用于实验。

c) 人肺腺癌(SK-LU-1细胞)

从放射性危害研究所获得人肺腺癌SK-LU-1细胞。在每毫升含50国际单位青霉素和50微克链霉素，并用10%胎牛血清补充的DMEM培养基中，于37℃，在含5%CO₂的气压下，这些细胞被传代培养，并用于实验。

d) 人肺鳞状上皮细胞癌(Calu-1细胞)

从放射性危害研究所获得人肺鳞状上皮细胞癌Calu-1细胞。在每毫升含50国际单位青霉素和50微克链霉素，并用10%胎牛血清补充的DMEM培养基中，于37℃，在含5%CO₂的大气压下，这些细胞被传代培养，并用于实验。

e) 人结肠腺癌(Wi Dr 细胞)

从食物和药品的生物安全研究中心，Hatano实验室获得人结肠腺癌Wi Dr 细胞。在每毫升含50国际单位青霉素和50微克链霉素，并用10%胎牛血清补充的DMEM培养基中，于37℃，在含5%CO₂的大气压下，这些细胞被传代培养，并用于实验。

f) 人前列腺癌(LNCaP 细胞)

从Kagawa医学院内分泌学系获得人前列腺癌LNCaP细胞。在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中，于37℃，在含5%CO₂的大气压

下, 对这些细胞进行培养并用于实验。

g) 人阴道鳞状上皮细胞癌A-431细胞

从Kanazawa医科大学生化系获得人阴道鳞状上皮细胞癌A-431细胞。在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中, 于37℃, 在含5%CO₂的大气压下, 对这些细胞进行培养并用于实验。

h) 人颈部癌(HeLa细胞)

从Flow实验有限公司获得人颈部癌HeLa细胞。在含10%胎牛血清的DMEM培养基中, 于37℃, 在含5%CO₂的大气压下, 对这些细胞进行培养并用于实验。

i) 人胆道癌(HuCC-T1细胞)

从Kanazawa医科大学生化系获得人胆道癌HuCC-T1细胞。在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中, 于37℃, 在含5%CO₂的大气压下, 对这些细胞进行培养并用于实验。

j) 小鼠皮肤瘤(黑色素瘤)

从Kanazawa医科大学生化系获得小鼠黑色素瘤B16(M4)细胞。在含有10%胎牛血清的DMEM培养基中, 于37℃, 在含5%CO₂的大气压下, 对这些细胞进行培养并用于实验。

k) 人恶性淋巴瘤

从Kanazawa医科大学内科系获得人恶性B细胞淋巴瘤细胞。在含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中, 于37℃, 在含5%CO₂的大气压下, 对这些细胞进行培养并用于实验。

l) 人慢性骨髓性白血病K562细胞

从Kanazawa医科大学内科系获得人慢性骨髓性白血病K562细胞。在含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中, 于37℃, 在含5%CO₂的大气压下, 对这些细胞进行培养并用于实验。

m) 人胰腺癌(ASPC-1细胞)

从Flow实验有限公司获得人胰腺癌ASPC-1细胞。在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中，于37℃，在含5%CO₂的大气压下，对这些细胞进行培养并用于实验。

n) 人成神经细胞瘤(IMR-132细胞)

从国家卫生科学研究所获得人成神经细胞瘤IMR-132细胞。在含有10%NEAA，每ml含50国际单位青霉素和50μg链霉素，并用10%胎牛血清补充的DMEM培养基中，于37℃，在含5%CO₂的大气压下，这些细胞被传代培养并用于实验。

o) 人肺小细胞癌(SCCH-194细胞)

从放射性危害研究所获得人肺小细胞癌SCCH-194细胞。在每ml含60μg的卡那霉素硫酸盐并用10%胎牛血清补充的ES培养基中，于37℃，在含5%CO₂的大气压下，这些细胞被传代培养并用于实验。

p) 人膀胱癌T24细胞

从横滨市立大学Kihara生物研究院获得人膀胱癌T24细胞。在含10%胎牛血清的MEM培养基中，于37℃，在含5%CO₂的大气压下，这些细胞被传代培养并用于实验。

q) 人肾细胞癌(VMRC-RCW细胞)

从放射性危害研究所获得人肾细胞癌VMRC-RCW细胞。在含1%NEAA、4mM HEPES并用10%胎牛血清补充的MEM培养基中，于37℃，在含5%CO₂的大气压下，这些细胞被传代培养，并用于实验。

r) 人胃癌(NUGC-2细胞)

从放射性危害研究所获得人胃癌NUGC-2细胞。在含有4mM HEPES和用10%胎牛血清补充的RPMI-1640培养基中，于37℃，在含5%CO₂的大气压下，这些细胞被传代培养并用于实验。

s) 人甲状腺癌(8305C细胞)

从放射性危害研究所获得人甲状腺癌8305C细胞。在含1%NEAA、

4 mM HEPES和用10%胎牛血清补充的MEM培养基中, 于37℃, 在含5% CO₂的大气压下, 这些细胞被传代培养并用于实验。

t) 人乳腺癌(MRK-nu-1细胞)

从东京大学医学科学研究所获得人乳腺癌MRK-nu-1细胞。在含10%胎牛血清的DM-160培养基中, 于37℃, 在含5%CO₂的大气压下, 对这些细胞进行培养并用于实验。

u) 人肝细胞瘤(HuH-7细胞)

从Okayama大学癌症研究所获得人肝细胞瘤HuH-7细胞。在含有0.2%乳白蛋白水解产物和用1%胎牛血清补充的培养基中, 于37℃, 在含5%CO₂的大气压下, 对这些细胞进行培养并用于实验。

v) 人卵巢癌(TYK-nu细胞)

从食物和药品的生物安全研究中心Hatano实验室获得人卵巢癌TYK-nu细胞。在含有10%胎牛血清的MEM培养基中, 于37℃, 在含5% CO₂的大气压下, 对这些细胞进行培养并用于实验。

w) 人绒毛膜癌(BeWo细胞)

从国家卫生科学研究所获得人绒毛膜癌BeWo细胞。在含有15%胎牛血清的Ham's F12(K)培养基中, 于37℃, 在含5%CO₂的大气压下, 对这些细胞进行培养并用于实验。

x) 正常人成纤维细胞(N6KA细胞)

从Kanazawa医科大学生化系获得正常人N6KA成纤维细胞。在每ml含50国际单位青霉素和50 μg链霉素并用10%胎牛血清补充的DMEM培养基中, 于37℃, 在含5%CO₂的大气压下, 这些细胞被传代培养并用于实验。

y) 正常人气管上皮细胞

从Kanazawa医科大学医院的尸体解剖样本中获得气管上皮, 经胰蛋白酶化后收集到正常人气管上皮细胞。在每ml含50国际单位青霉素

和50 μ g 链霉素并用10%胎牛血清补充的DMEM培养基中, 于37 $^{\circ}$ C, 在含5%CO₂的大气压下, 这些细胞被传代培养并用于实验。

z) 正常人末梢血淋巴细胞

从正常成人捐献者获得的末梢血样品, 经Ficoll-Hypaque梯度离心作用分离出正常人末梢血淋巴细胞。将这些淋巴细胞用含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基按 5×10^3 细胞/cm²的密度移植到一个96孔的微平皿中, 于37 $^{\circ}$ C, 在含5%CO₂的大气压下, 这些细胞被传代培养并用于实验。

aa) 正常人肾细胞

在Kanazawa医科大学泌尿学系, 由于肿瘤或其它原因切除的肾, 经胶原酶处理后, 分离出正常人肾细胞。在含有1%NEAA, 4mMHEPES和60 μ g/ml 卡那霉素硫酸盐并用10%胎牛血清补充的MEM培养基中, 于37 $^{\circ}$ C, 在含5%CO₂的大气压下, 这些细胞被传代培养并用于实验。

(5) 实验结果

NFD对上述各种类型的恶性肿瘤细胞和正常的人细胞的生长抑制作用和致死能力, 通过计数96孔微平皿的每一个孔中存活细胞的数目来评估。将在不含NFD的培养基中培养生长的细胞用做对照。结果如图1-27所示, 这些图中所用的符号含意如下。

图1中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 5.6 ng/ml;

□-□: 11.2 ng/ml; ■-■: 22.4 ng/ml; △-△: 33.5 ng/ml; ▲-▲:

44.7 ng/ml。

图2中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 5.6 ng/ml;

□-□: 16.8 ng/ml; ■-■: 27.9 ng/ml; △-△: 44.7 ng/ml; ▲-▲:

55.9 ng/ml。

图3中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 11.2 ng/ml;

□-□: 22.4 ng/ml; ■-■: 33.5 ng/ml; △-△: 44.7 ng/ml; ▲-▲: 55.9 ng/ml。

图4中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 11.2 ng/ml;

□-□: 22.4 ng/ml; ■-■: 33.5 ng/ml; △-△: 44.7 ng/ml; ▲-▲: 55.9 ng/ml。

如图1-4所示, NFD在11.2~16.8 ng/ml时, 几乎完全地抑制人肺癌细胞的生长, 并且在33.5~55.4 ng/ml时使几乎所有的肿瘤细胞坏死。

图5中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 11.2 ng/ml;

□-□: 22.4 ng/ml; ■-■: 33.5 ng/ml; △-△: 44.7 ng/ml; ▲-▲: 55.9 ng/ml。

如图5所示, NFD在22.4~33.5 ng/ml时, 几乎完全地抑制人结肠腺癌细胞的生长, 并且在44.7~55.9 ng/ml时使几乎所有的肿瘤细胞坏死。

图6中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 11.2 ng/ml;

□-□: 22.4 ng/ml; ■-■: 33.5 ng/ml; △-△: 44.7 ng/ml; ▲-▲: 55.9 ng/ml。

如图6所示, NFD在11.2 ng/ml时, 几乎完全地抑制人结肠腺癌细胞的生长, 并且在22.4~55.9 ng/ml时使几乎所有的肿瘤细胞坏死。

图7中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 16.8 ng/ml;

●-●: 16.8 ng/ml;

□-□: 22.8 ng/ml; ■-■: 27.9 ng/ml。

如图7所示, NFD在27.9 ng/ml时, 几乎完全地抑制人阴道鳞状上皮细胞癌细胞的生长。

图8中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 5.6 ng/ml;

□-□: 11.2 ng/ml; ■-■: 16.8 ng/ml; △-△: 22.4 ng/ml; ▲-▲: 27.9 ng/ml。

如图8所示, NFD在22.4 ng/ml时, 几乎完全地抑制人颈部癌细胞的生长, 并且在27.9 ng/ml时, 使这些细胞坏死。

图9中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 11.2 ng/ml; □-□:

16.8 ng/ml; ■-■: 22.4 ng/ml; △-△: 27.9 ng/ml。

如图9所示, NFD在22.4 ng/ml时, 几乎完全地抑制人胆道癌细胞的生长, 并且在27.9 ng/ml时, 使这些细胞坏死。

图10中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 5.6 ng/ml; □-□:

11.2 ng/ml; ■-■: 16.8 ng/ml; △-△: 22.4 ng/ml; ▲-▲: 33.5 ng/ml。

如图10所示, NFD在11.2 ng/ml时, 几乎完全地抑制小鼠皮肤黑色素瘤细胞的生长, 并且在16.8~33.5 ng/ml时, 使几乎所有的肿瘤细胞坏死。

图11中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 11.2 ng/ml; □-□:

22.4 ng/ml; ■-■: 33.5 ng/ml; △-△: 44.7 ng/ml; ▲-▲: 55.9 ng/ml。

如图11所示, NFD在11.2~55.9 ng/ml时使人恶性B细胞淋巴瘤细胞坏死。

图12中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 11.2 ng/ml; □-□:
22.4 ng/ml; ■-■: 27.9 ng/ml; △-△: 33.5 ng/ml; ▲-▲: 44.7
ng/ml; x-x: 55.9 ng/ml。

如图12所示, NFD在11.2~22.4 ng/ml时, 抑制人慢性骨髓性白血病细胞的生长, 而在27.9~55.9 ng/ml时使这些细胞坏死。

图13中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 5.6 ng/ml; □-□:
11.2 ng/ml; ■-■: 22.4 ng/ml; △-△: 27.9 ng/ml; ▲-▲: 33.5
ng/ml; x-x: 44.7 ng/ml。

如图13所示, NFD在33.5 ng/ml时, 几乎完全抑制人胰腺癌细胞的生长, 而在44.7 ng/ml时使这些细胞坏死。

图14中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 5.6 ng/ml; □-□:
16.8 ng/ml; ■-■: 27.9 ng/ml; △-△: 44.7 ng/ml; ▲-▲: 55.9
ng/ml。

如图14所示, NFD在44.7 ng/ml时, 几乎完全抑制人成神经细胞瘤细胞的生长, 而在55.9 ng/ml时使这些细胞坏死。

图15中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 10 ng/ml; □-□: 20
ng/ml; ■-■: 30 ng/ml; △-△: 40 ng/ml; ▲-▲: 50 ng/ml。

如图15所示, NFD在30 ng/ml时, 几乎完全抑制人肺小细胞癌细胞的生长, 而在40~60 ng/ml时使这些细胞坏死。

图16中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 5.7 ng/ml; □-□: 11
ng/ml; ■-■: 23 ng/ml; △-△: 46 ng/ml; ▲-▲: 68 ng/ml。

如图16所示, NFD在23 ng/ml时, 几乎完全抑制人膀胱癌细胞的生长, 而在46 ng/ml时使这些细胞坏死。

图17中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 17 ng/ml; □-□: 33 ng/ml; ■-■: 50 ng/ml; ▲-▲: 90 ng/ml; △-△: 280 ng/ml。

如图17所示, NFD在17 ng/ml时, 几乎完全抑制人肾细胞癌细胞的生长, 而在50 ng/ml时使几乎所有的肿瘤细胞发生坏死。

图18中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 17 ng/ml; □-□: 33 ng/ml; ■-■: 50 ng/ml; ▲-▲: 90 ng/ml; △-△: 170 ng/ml。

如图18所示, NFD在33 ng/ml时, 几乎完全抑制人胃癌细胞的生长, 而在50 ng/ml时使这些肿瘤细胞发生坏死。

图19中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 17 ng/ml; □-□: 33 ng/ml; ■-■: 50 ng/ml; ▲-▲: 90 ng/ml; △-△: 280 ng/ml。

如图19所示, NFD在28 ng/ml时, 几乎完全抑制人甲状腺癌细胞的生长, 而在51 ng/ml时使这些肿瘤细胞发生坏死。

图20中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 17 ng/ml; □-□: 33 ng/ml; ■-■: 50 ng/ml; ▲-▲: 90 ng/ml; △-△: 280 ng/ml。

如图20所示, NFD在33 ng/ml时, 几乎完全抑制人乳腺癌细胞的生长, 而在50 ng/ml或>50 ng/ml时使这些肿瘤细胞发生坏死。

图21中, 培养基中NFD的浓度如下: 0-0: 无NFD的对照(C);

●-●: 5.0 ng/ml; □-□: 7.5 ng/ml; ■-■: 20 ng/ml; ▲-▲: 30 ng/ml; △-△: 40 ng/ml。

如图21所示, NFD在20 ng/ml时, 几乎完全抑制人肝癌细胞的生长

，而在30 ng/ml 或 >50 ng/ml 时使这些肿瘤细胞发生坏死。

图22中，培养基中NFD的浓度如下：0-0：无NFD的对照（C）；

●-●： 10 ng/ml；□-□： 20
ng/ml；■-■： 40 ng/ml；△-△： 60 ng/ml；▲-▲： 80 ng/ml。

如图22所示，NFD在20 ng/ml 时，几乎完全抑制人卵巢癌细胞的生长，而在40 ng/ml 或 >40 ng/ml 时使几乎所有这些肿瘤细胞发生坏死。

图23中，培养基中NFD的浓度如下：0-0：无NFD的对照（C）；

●-●： 5.7 ng/ml；□-□：
11.4 ng/ml；■-■： 22.8 ng/ml；△-△： 34.3 ng/ml；▲-▲： 45.7
ng/ml。

如图23所示，NFD在34.3 ng/ml 时，几乎完全抑制人绒毛膜癌细胞的生长，而在45.7 ng/ml 时使这些肿瘤细胞发生坏死。

图24中，培养基中NFD的浓度是：0-0：无NFD的对照（C）；

●-●： 55.9 ng/ml。

图25中，培养基中NFD的浓度是：0-0：无NFD的对照（C）；

●-●： 55.9 ng/ml。

图26中，培养基中NFD的浓度如下：0-0：无NFD的对照（C）；

●-●： 16.8 ng/ml；□-□：
33.5 ng/ml；■-■： 55.9 ng/ml。

图27中，培养基中NFD的浓度如下：0-0：无NFD的对照（C）；

●-●： 30 ng/ml；□-□： 50
ng/ml；■-■： 100 ng/ml。

如图27所示，NFD仅在100 ng/ml 的较高浓度时才抑制正常肾细胞的生长。

如图24、25、26和27所示，NFD在使上述肿瘤细胞坏死的浓度时，对正常人成纤维细胞、气管上皮细胞、末梢血淋巴细胞或肾细胞的

生长没有有害作用。

(6) 50%生长抑制剂量(LD₅₀, IC₅₀)

表1总结了NFD对每个细胞系的50%生长抑制剂量(LD₅₀、IC₅₀)，该剂量依据图1-12由在培养基中与NFD一同培养3天后的细胞的活力来测定；所述的活力由实验孔中活细胞数相对于对照孔中(无NFD的培养基) 活细胞数的百分比来表示。

[表1] NFD对人和小鼠恶性和正常细胞的50%
生长抑制剂量(LD₅₀, IC₅₀)

细胞系	LD ₅₀ (IC ₅₀) (ng/ml)
人肺腺癌A-549细胞	9.5
人肺腺癌VMRC-LCD细胞	13
人肺腺癌SK-LU-1细胞	17
人肺鳞状上皮细胞癌Calu-1细胞	17
人结肠腺癌Wi Dr细胞	11
人前列腺癌LNCaP细胞	1.7
人阴道鳞状上皮细胞癌A-431细胞	21
人颈部癌HeLa细胞	18
人胆道癌HuCC-T1细胞	20
小鼠皮肤黑色素瘤B16(M4)细胞	6.7
人恶性B细胞淋巴瘤细胞	5.6
人慢性骨髓性白血病K562细胞	14
人胰腺癌ASPC-1细胞	17
人成神经细胞瘤IMR-132细胞	10
人肺小细胞癌SCCH-194细胞	10

人膀胱癌T24 细胞	21
人肾细胞癌VMRC-RCW细胞	19
人胃癌NUGC-2 细胞	17
人甲状腺癌8305C 细胞	25
人乳腺癌MRK-nu-1 细胞	12
人肝细胞瘤HuH-7 细胞	5.5
人卵巢癌TYK-nu 细胞	17
人绒毛膜癌Be Wo 细胞	18

正常人N6 KA成纤维细胞	84
正常人气管上皮细胞	> 55
正常人末梢血淋巴细胞	84
正常人肾细胞	65

已经发现NFD对所有的恶性肿瘤细胞和血液瘤的LD₅₀ 值在5.5~25 ng/ml 的范围内。

NFD存在于培养基中3天后, 依据图13-15所计算的NFD对正常人细胞的LD₅₀ 值也列入表1中, 该LD₅₀ 值在55~84 ng/ml 范围内。

实施例3 在小鼠肺内两步抑制致癌因素

实验动物为雌性ICR小鼠, 15只小鼠饲养在一个笼子里, 供给小的圆柱块压缩饲料食物, 任意喝水。预先饲养一周后, 6周令的小鼠用溶于橄榄油和胆固醇(20:1) 混合液中的4-硝基喹啉-N-氧化物(4NQO) 按每公斤体重10mg于背部皮下注射。从开始后第五周, 随意饲喂小鼠8%的甘油作为一种致癌启动子。接受4NQO和8%甘油25周的小鼠作为阳性对照组; 另一方面, 实验组的小鼠随意饲喂每ml含1ng

NFD的8%的甘油25周。实验开始后的第30周，由颈部脱位杀死小鼠，经尸体解剖用福尔马林固定后摘出肺叶。在体视显微镜下，观察到肺中形成的腺瘤；测定腺瘤的数目，并将这个数目与阳性对照组及NFD用药组进行比较。表2总结了实验结果。实验开始后第30周饲喂NFD的NFD组的肺腺瘤表观百分数如表2所示，比阳性对照组低1/3，表明肺中腺瘤形成得到明显抑制。

[表2] 小鼠肺腺瘤的数目及表观百分数

组	腺瘤 总数目	腺瘤数 /小鼠	具腺瘤的 小鼠的百分数
I 仅以水为饮用水	0	0	0
II 仅以8%甘油为饮用水	0	0	0
III 仅以4NQO+水作饮用水	3	0.2	13.3
IV 仅以4NQO+8%甘油作饮用水	48	3.2	100
V 以4NQO+含0.1ng/ml NFD的8% 甘油为饮用水	9	0.6	33.3

实施例4 在小鼠皮肤上两步抑制皮肤致癌因素

实验动物为雌性ICR小鼠，15只小鼠养在一个笼子里，连续饲喂市售小的圆柱块压缩饲料食物，随意喝水，直到实验结束。购买出生6周的小鼠，剃除小鼠背毛后第二天，用溶于0.1ml丙酮中的390毫摩尔7,12-二甲基苯并(a)蒽(DMBA)作为起始物，涂擦于该剃除毛的背部。一周后，作为一种促进剂，用溶于0.1毫升丙酮中的1.7毫摩尔12-O-十四酰大戟二萜醇-13-乙酸酯(TPA)作为启动子，在上述相同部位每周涂擦二次。上述步骤重复20周。在用TPA处理前一小时，对由15只小鼠组成的各组，施用丙酮0.1ml或溶于0.1ml丙酮的85毫摩尔NFD涂擦皮肤，并测定NFD对皮肤致癌因素的抑制效果。

每周观测一次小鼠大于1mm的乳头瘤的数目。实验结果以每只小鼠的乳头瘤数和每组产生乳头瘤小鼠的百分数表示。

图28表示NFD的抑制作用，图29表示作为阳性对照而使用的lapacoal的抑制作用。

实施例3和4表明NFD可用作一种致癌促进抑制剂使用；并可用作抗肿瘤剂。

当NFD作为一种抗肿瘤剂作用时，最好每天口服NFD三次。对成年人最好的日剂量是0.15~1.5mg，对于儿童和婴儿最好的日剂量是成年人的1/2到1/6。NFD可以经口腔和不经肠道两种方式给药，但是，经口腔给药最好。

药用组合物

将作赋形剂的乳糖66.5mg、作粘合剂的淀粉糊剂10mg、作崩解剂的淀粉20mg及作片剂润滑剂的硬脂酸镁2mg加到1.5mg NFD中，将上述各物质完全混合，并压制成含1.5mg NFD的100mg的片剂(总重：100mg)。

图 1

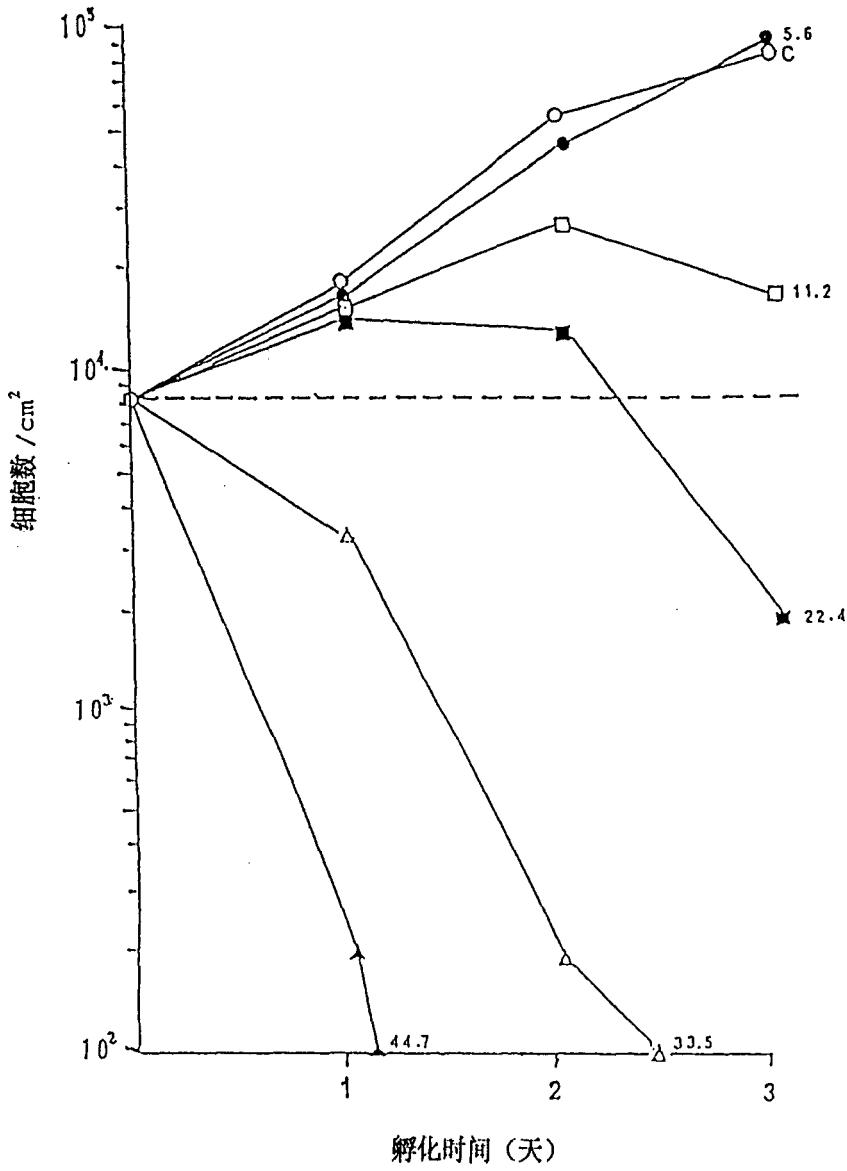


图 2

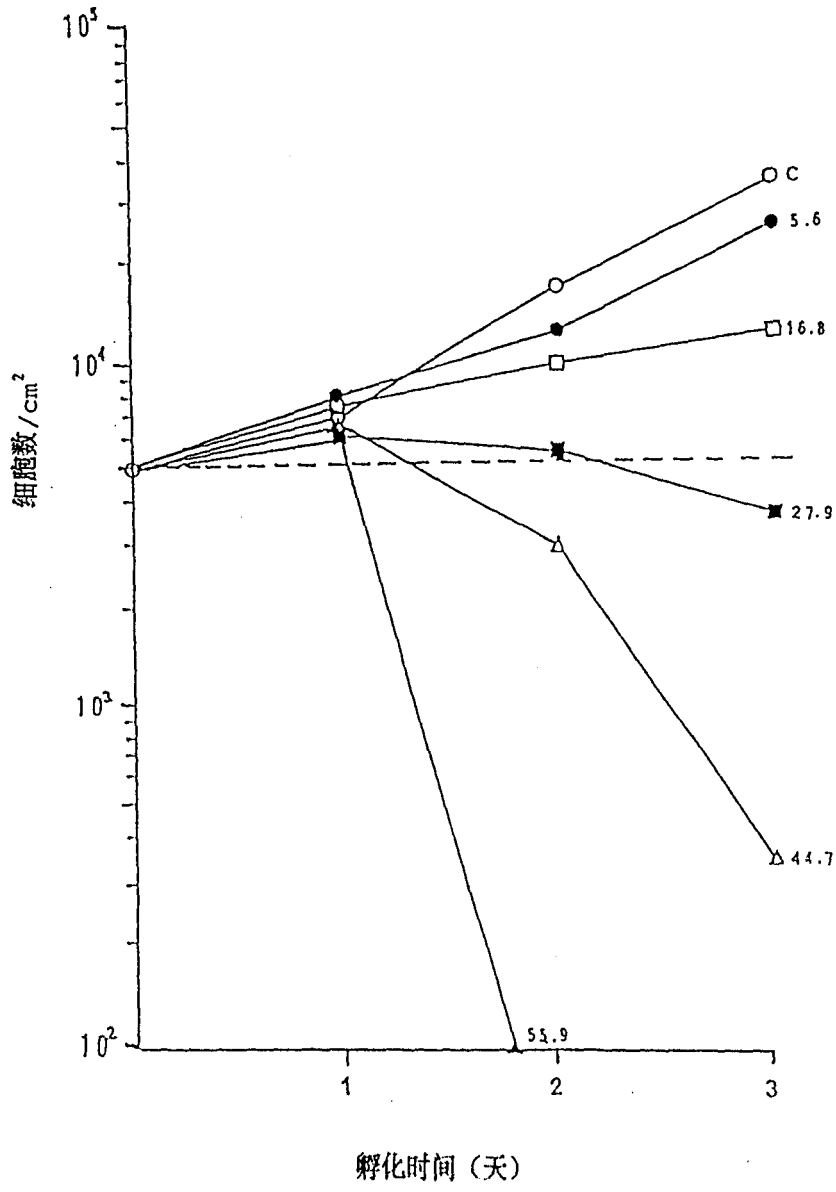


图 3

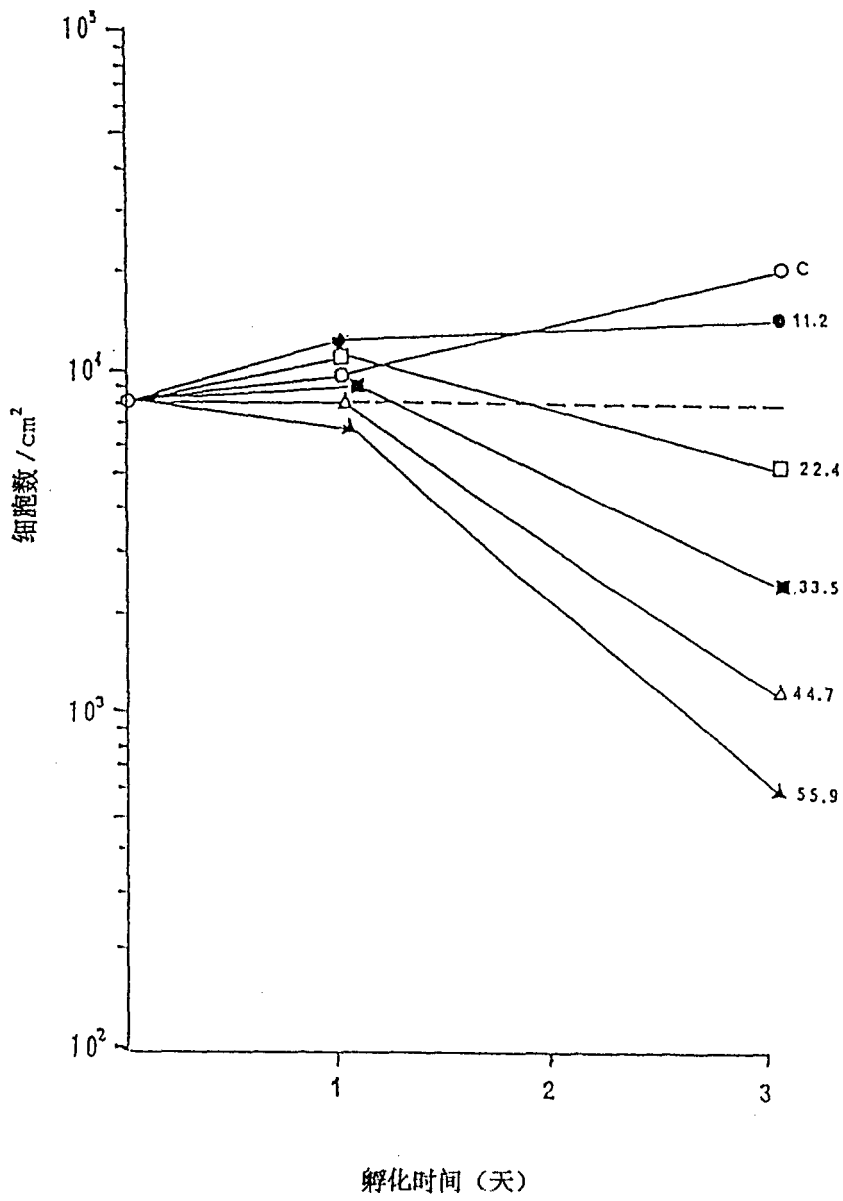


图 4

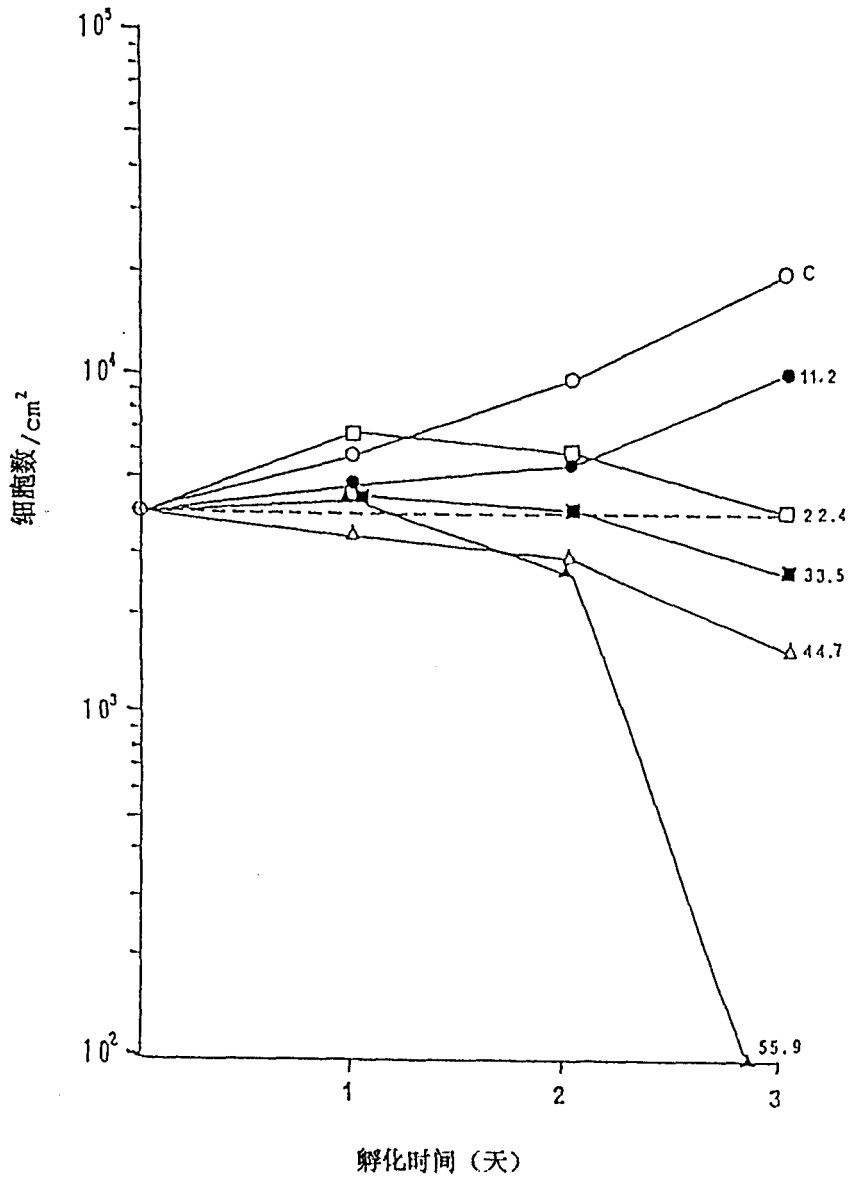


图 5

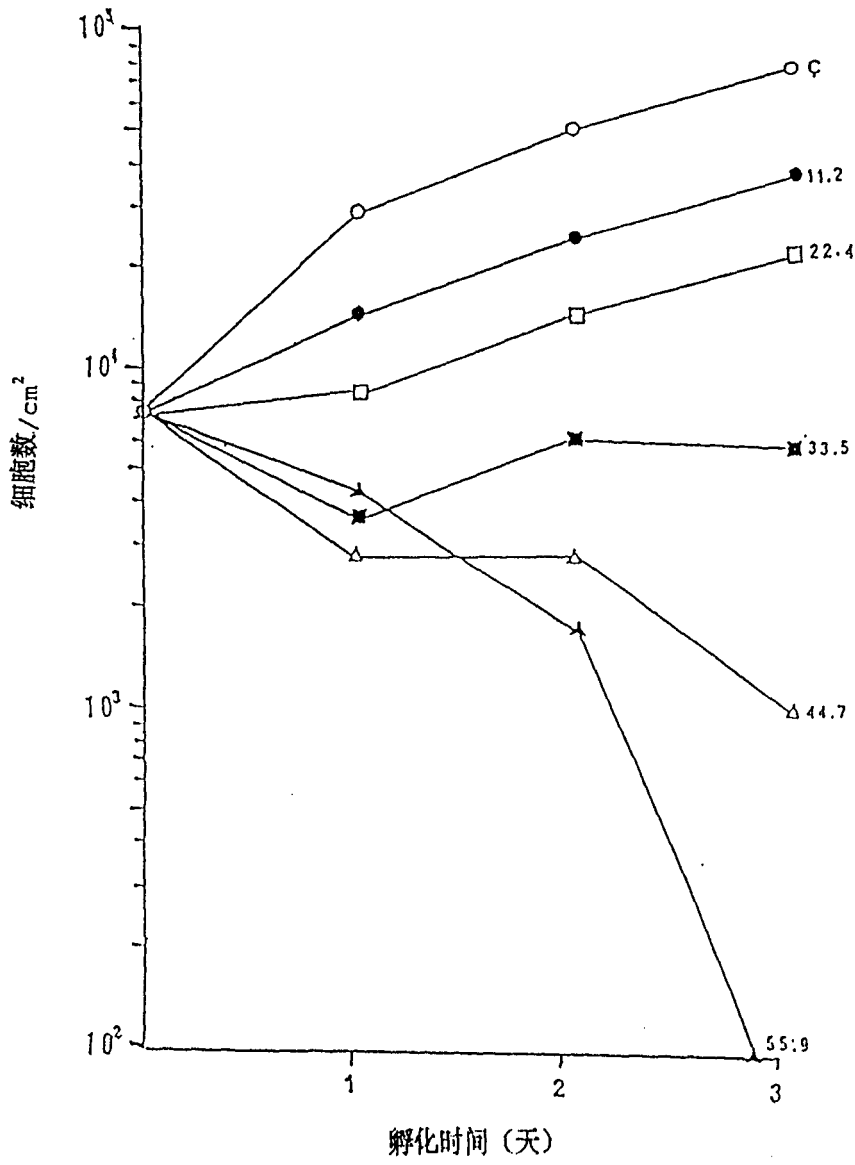


图 6

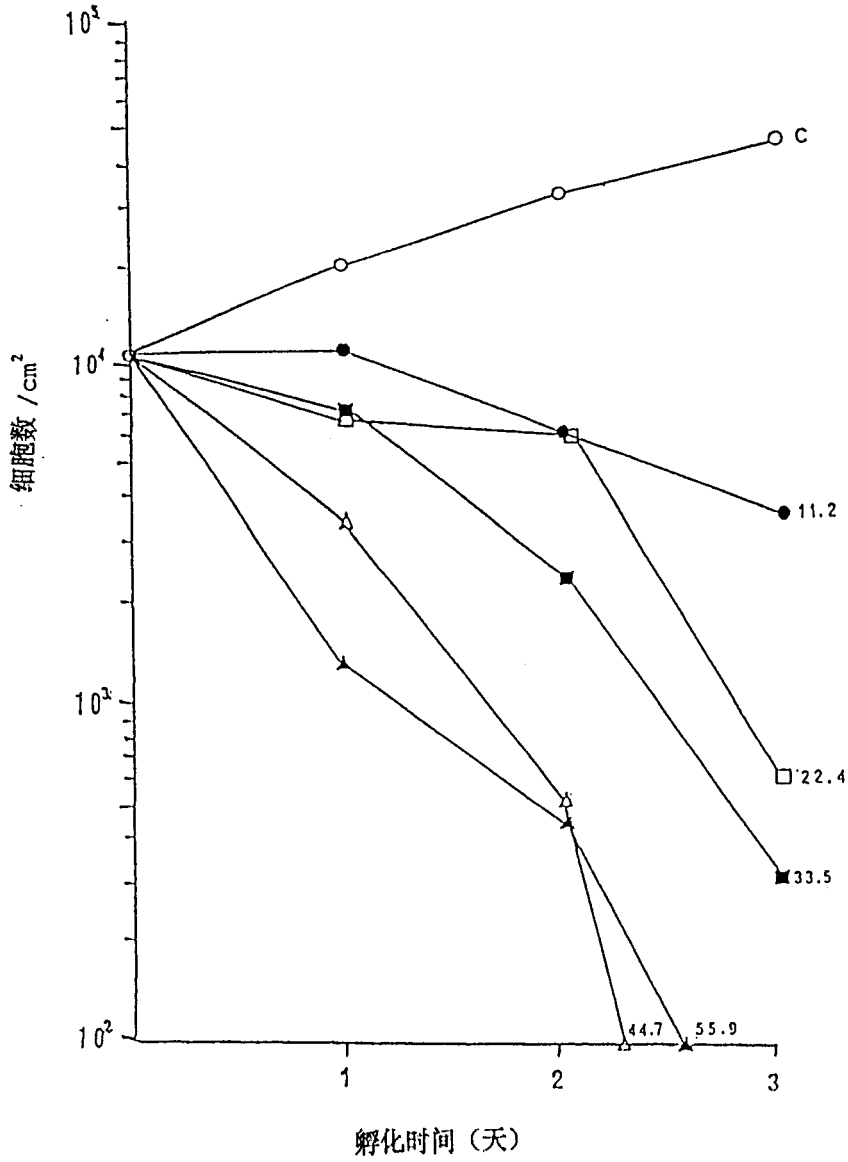


图 7

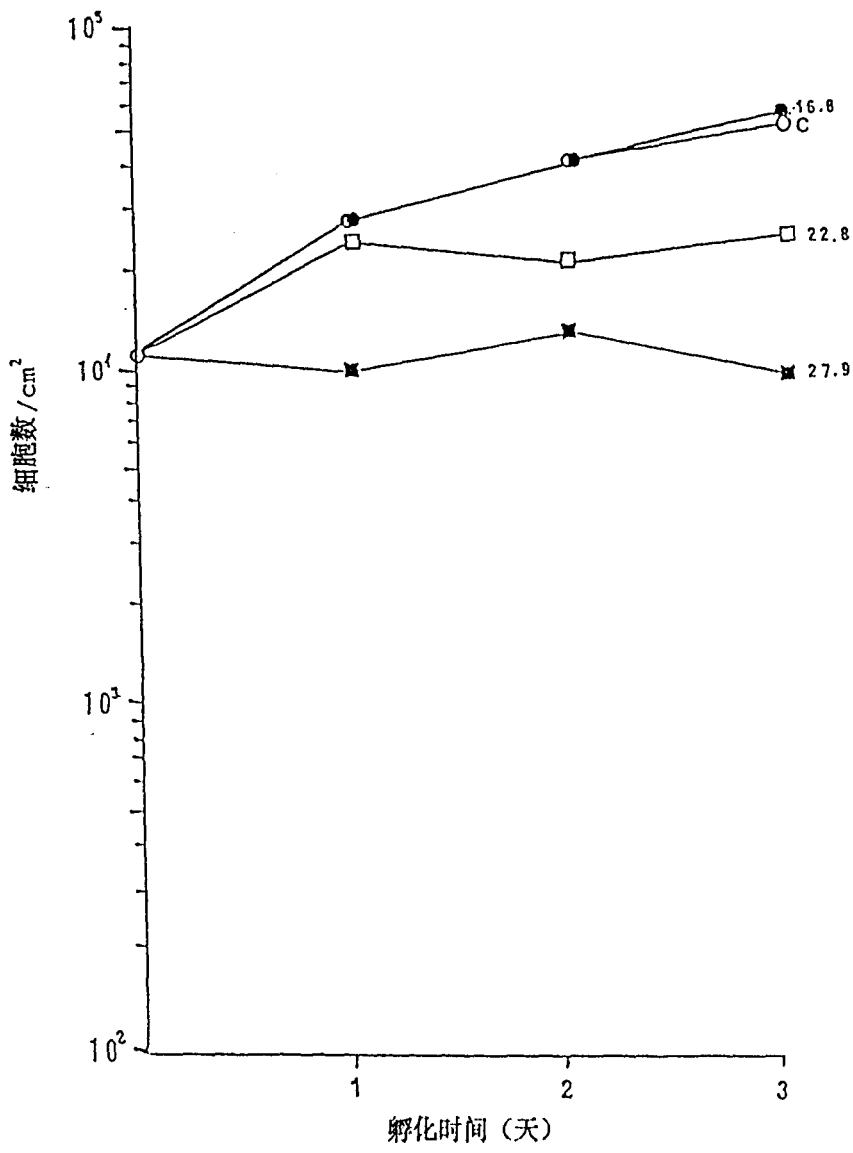


图 8

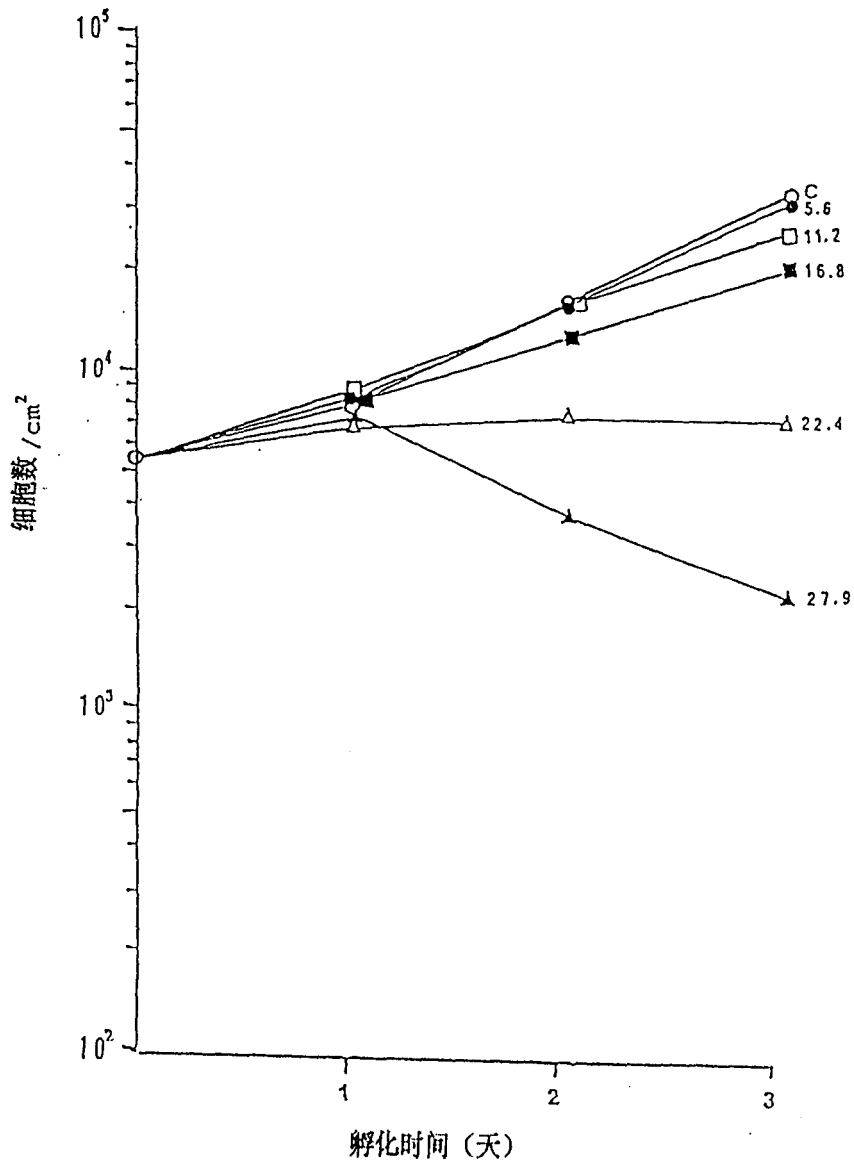


图 9

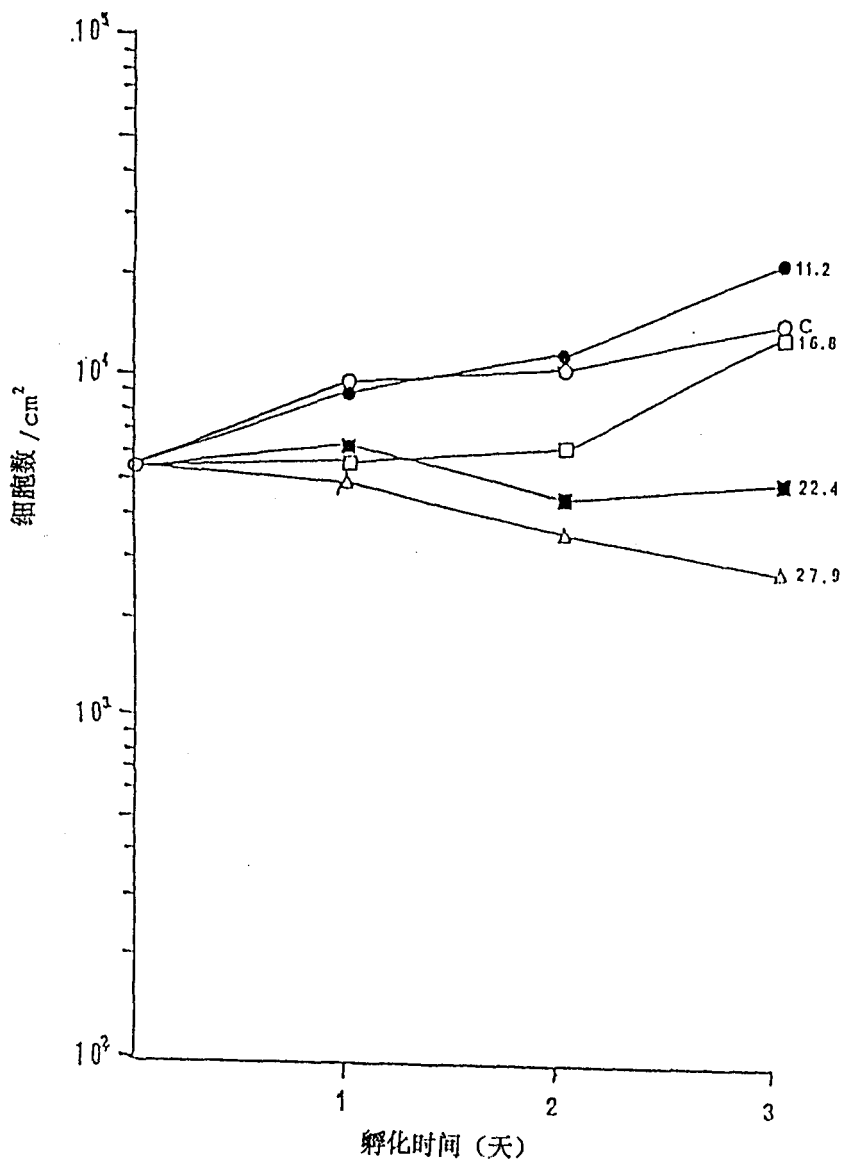


图 10

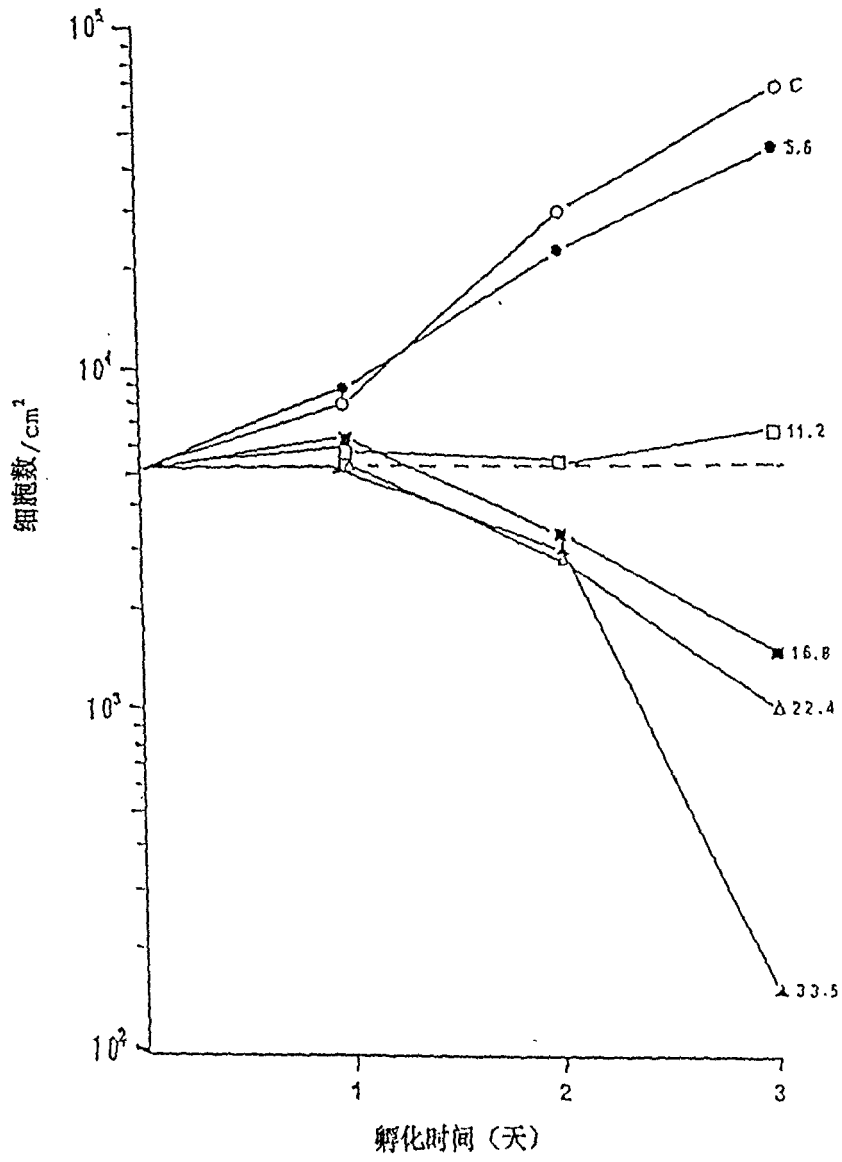


图 11

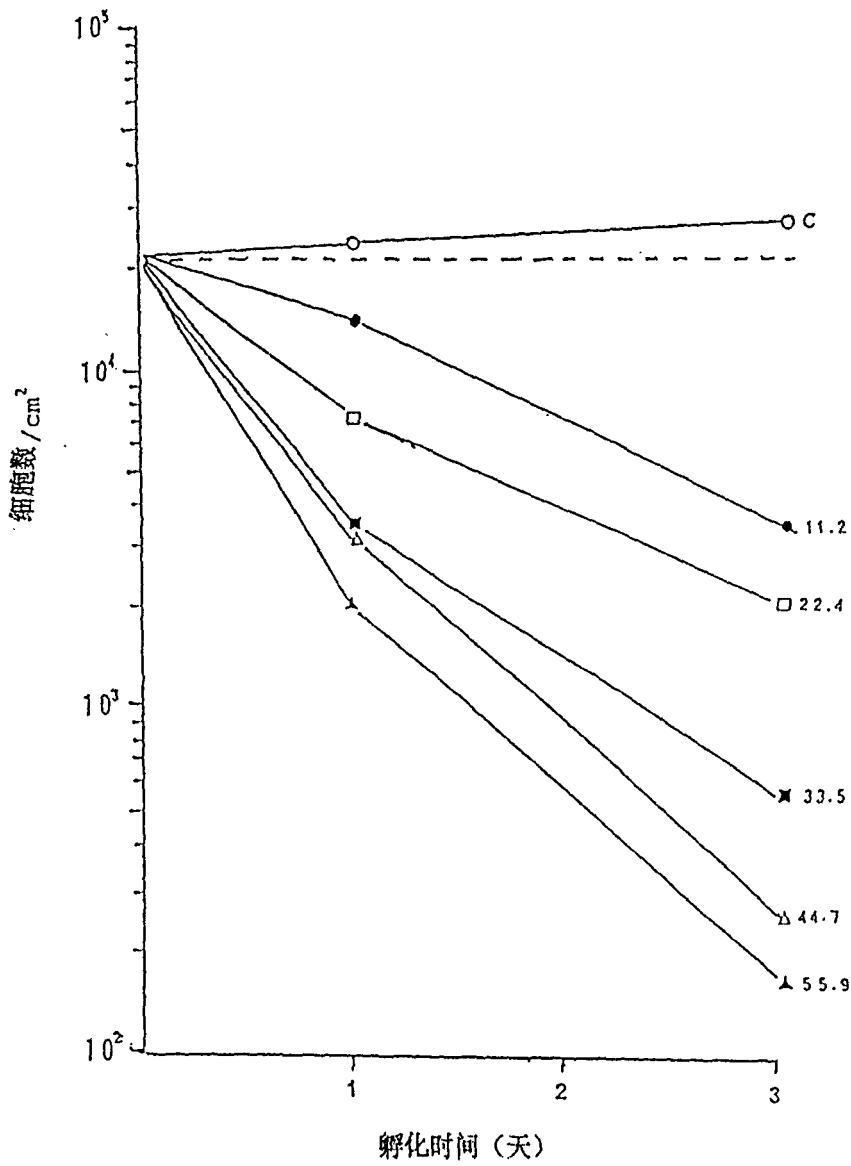


图 12

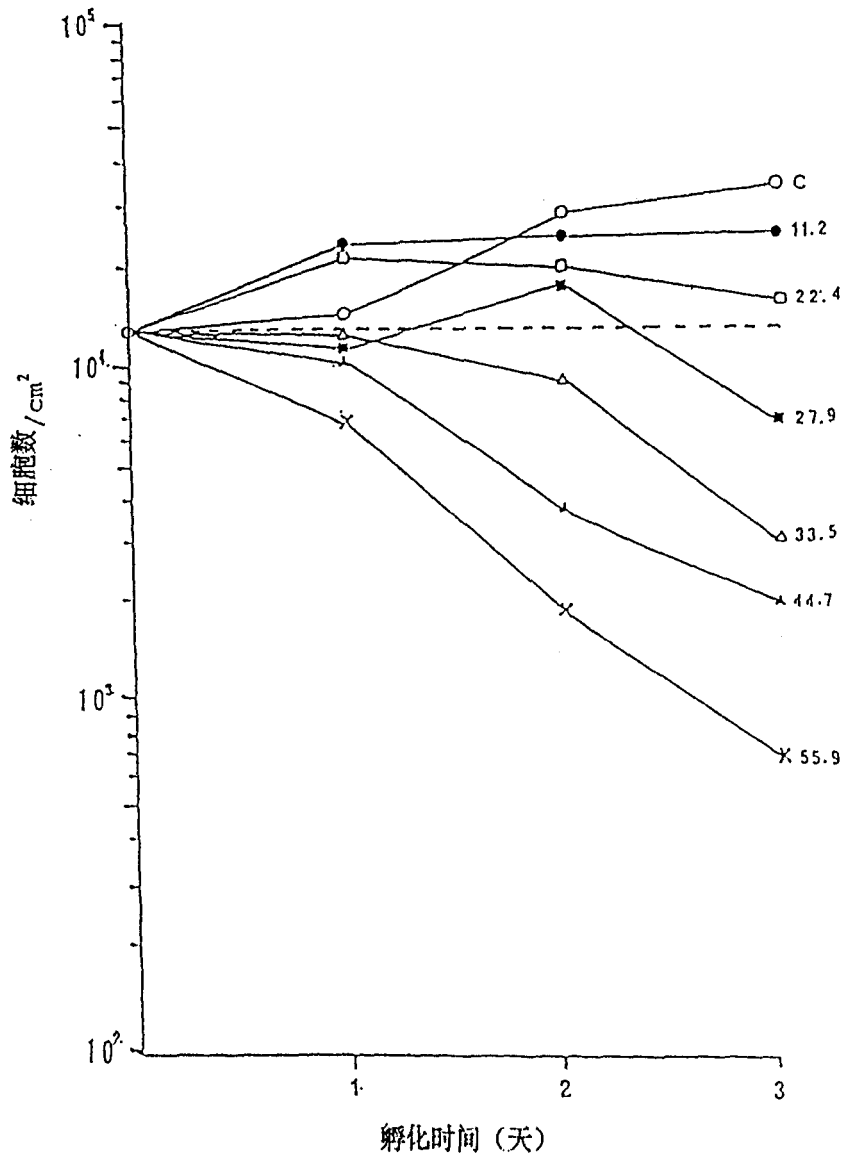


图 13

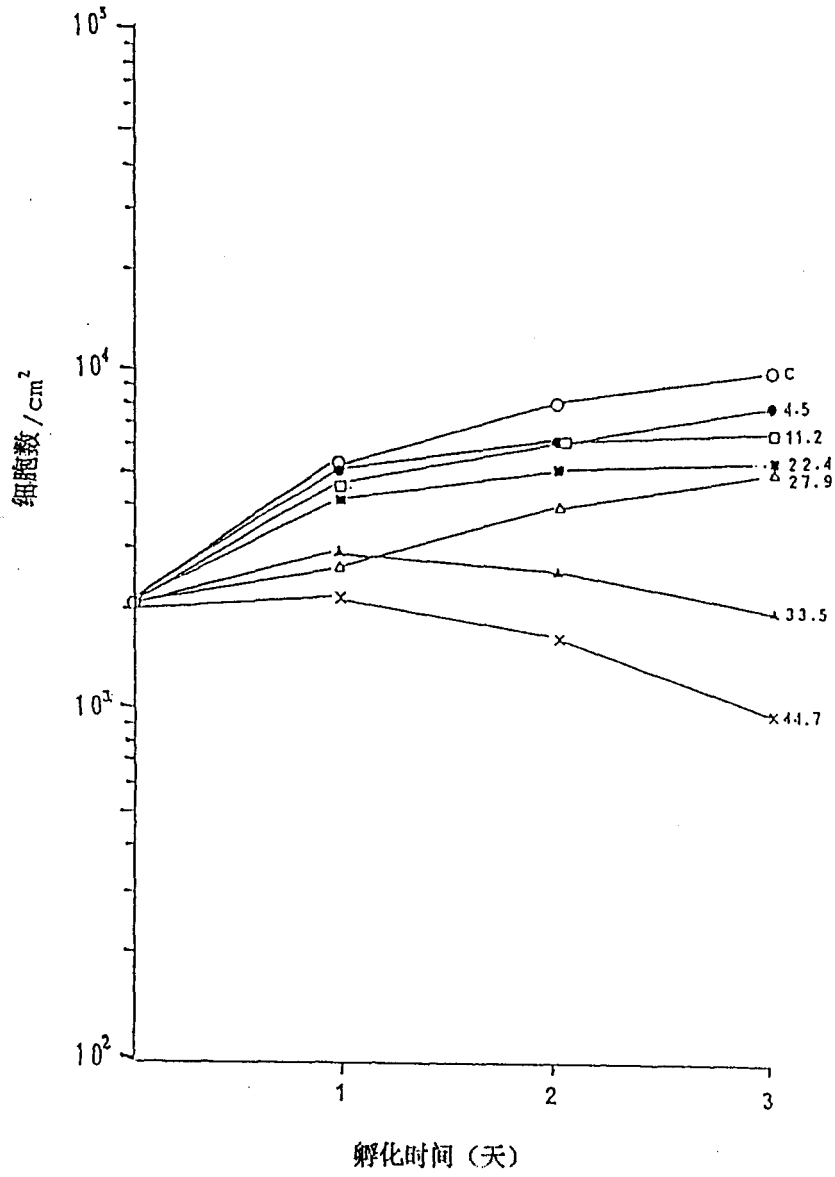


图 14

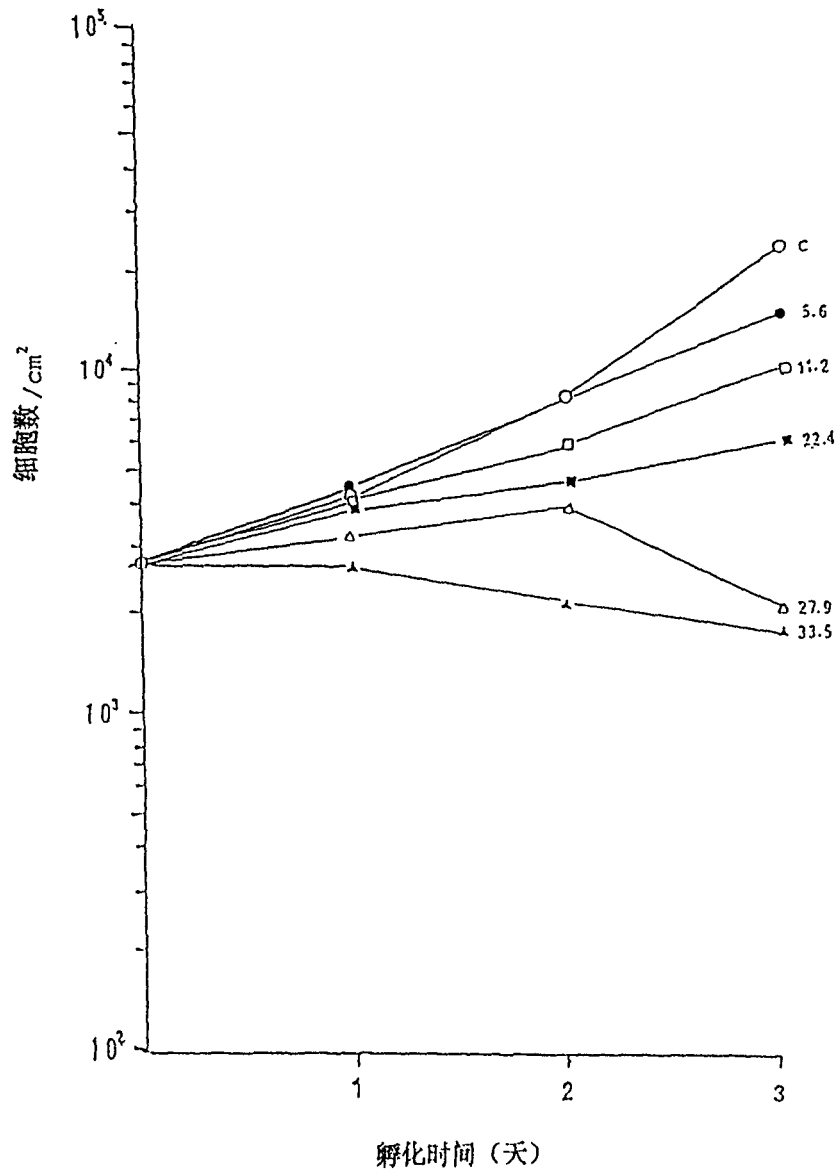


图 15

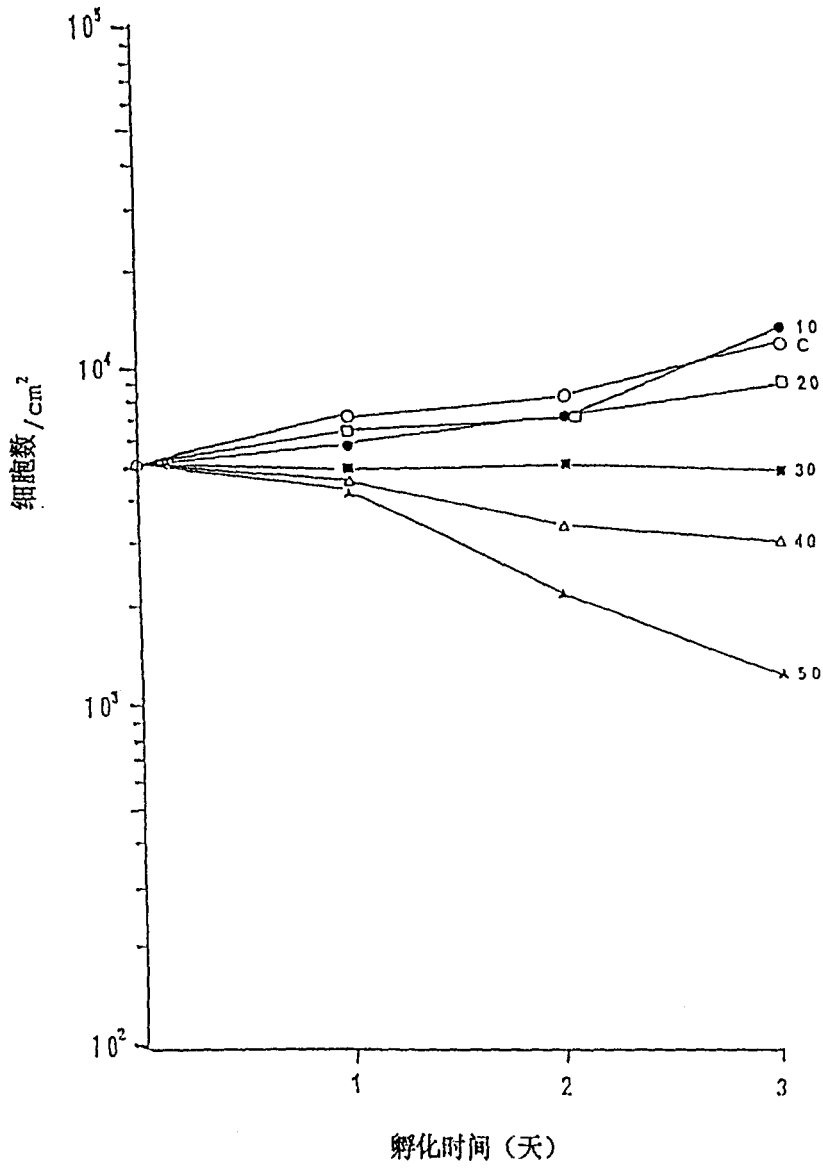


图 16

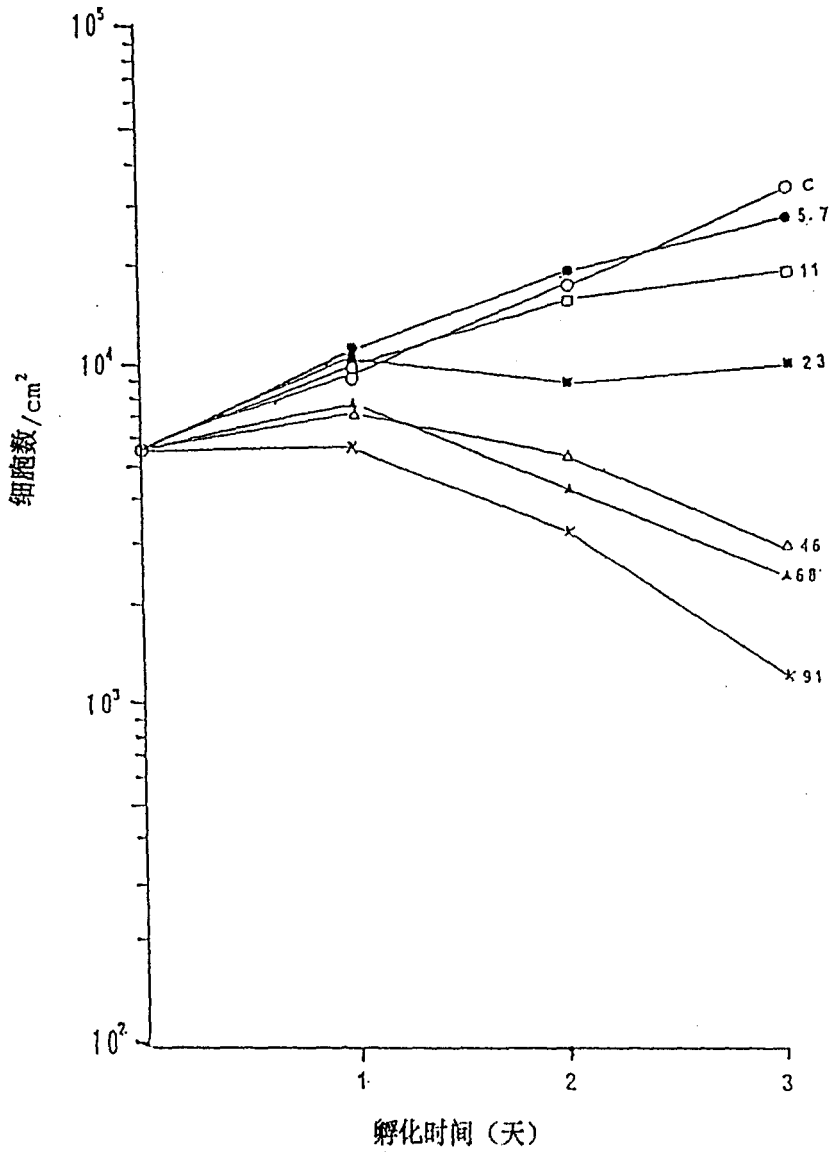


图 17

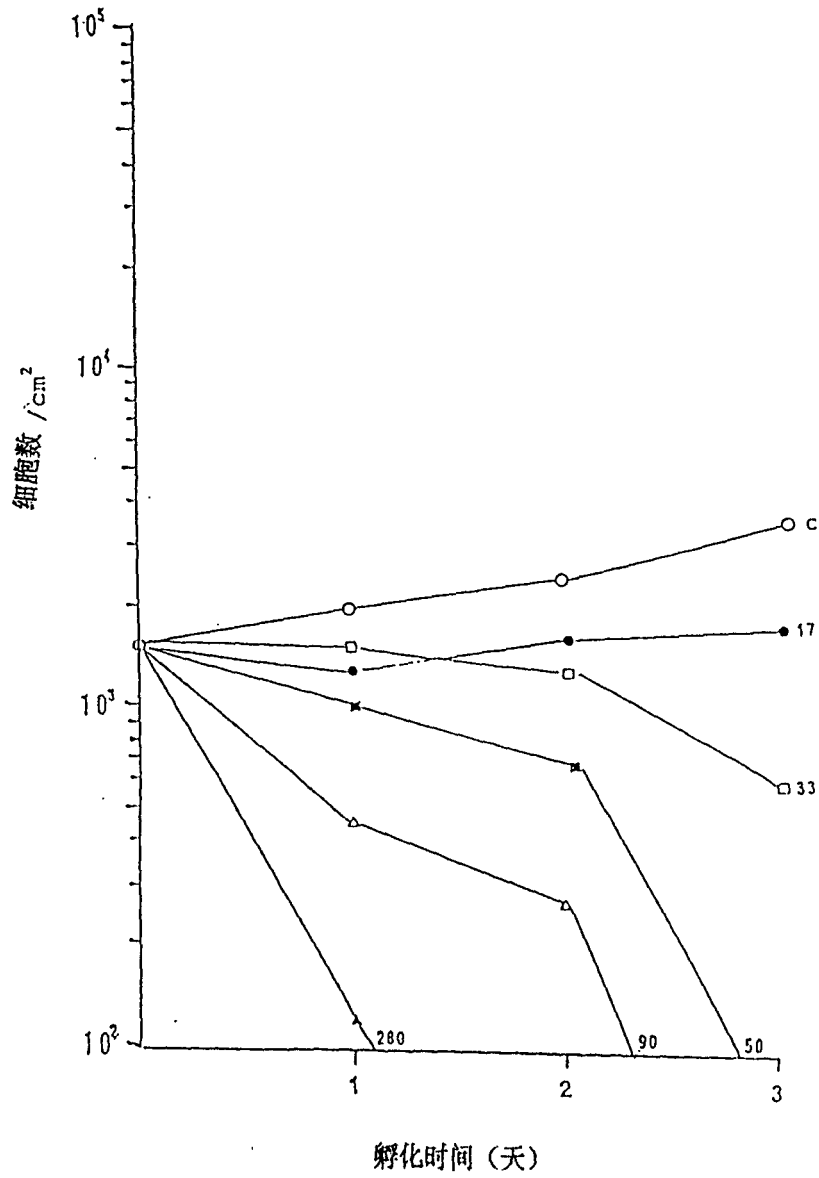


图 18

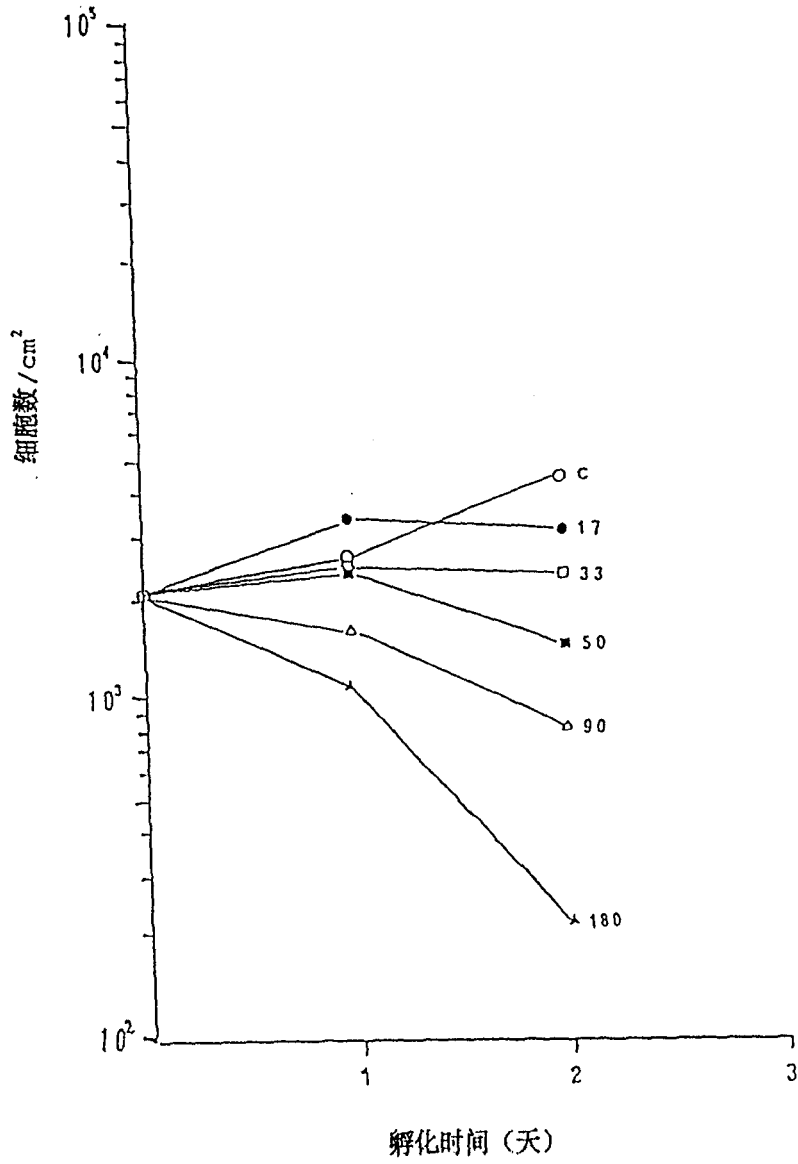


图 19

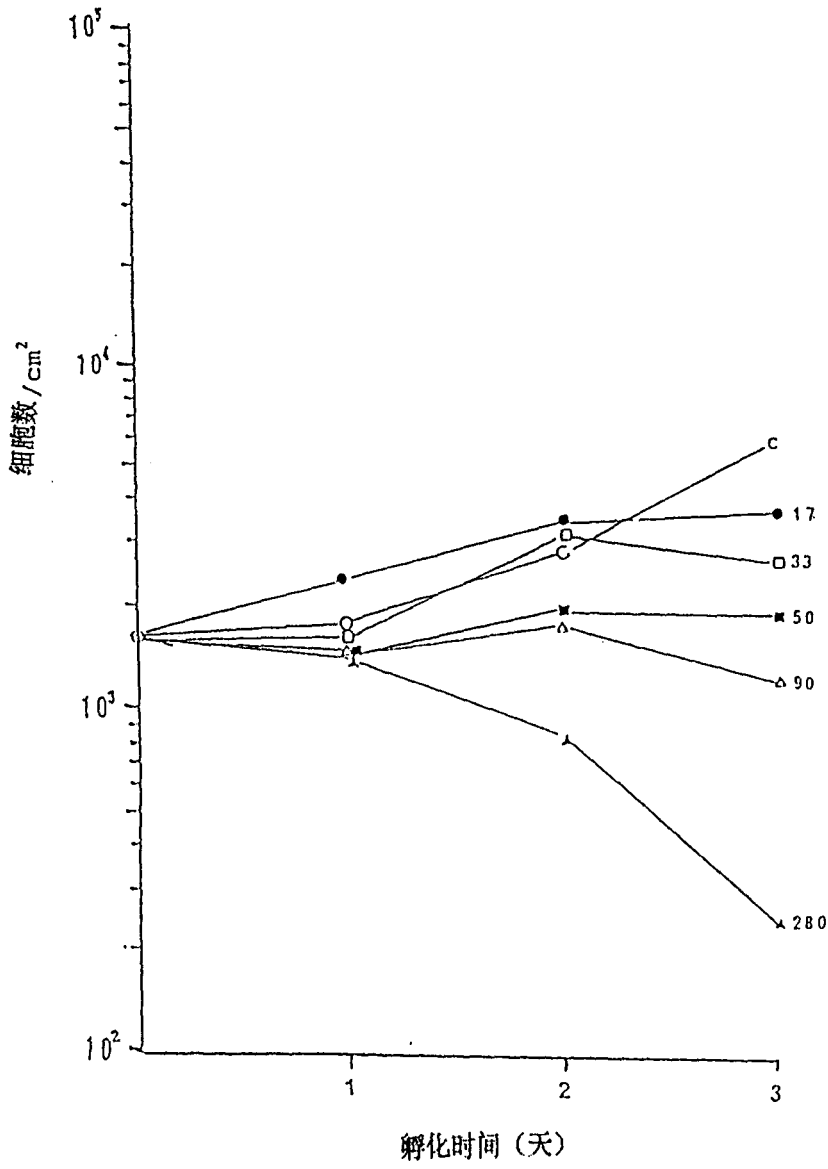


图 20

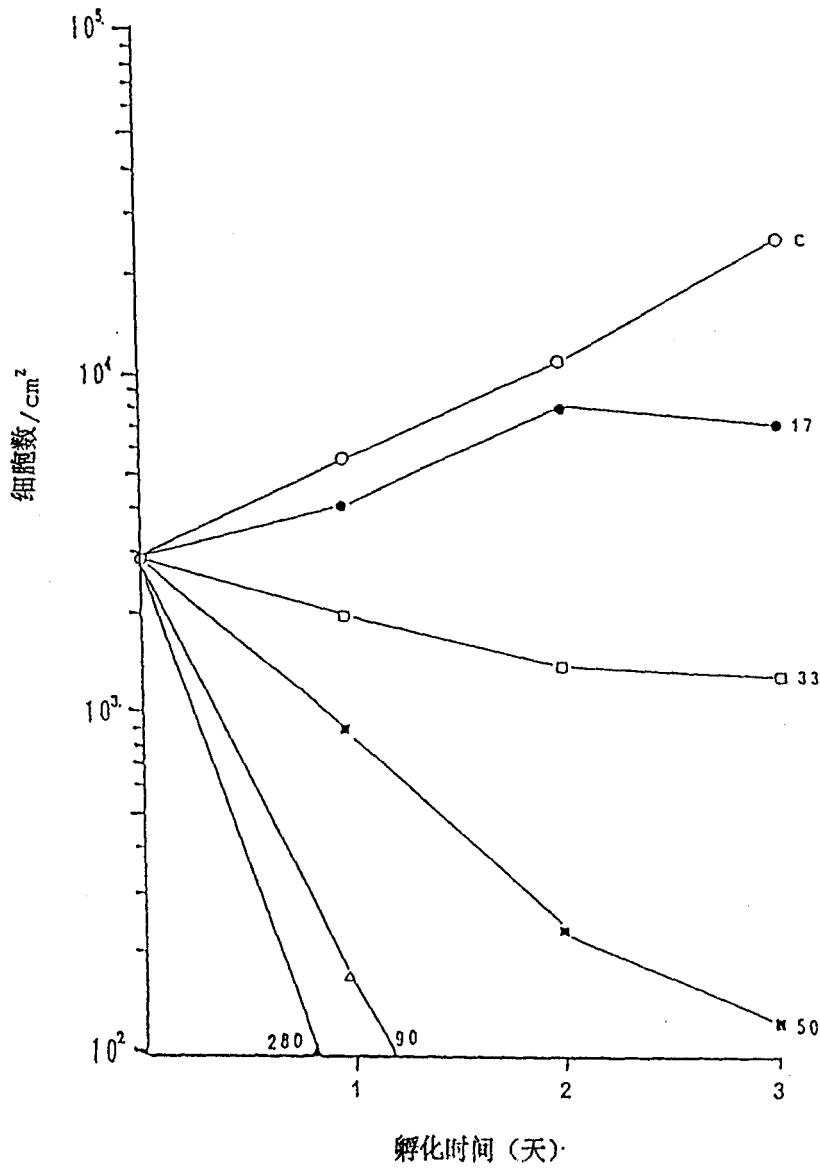


图 2 i

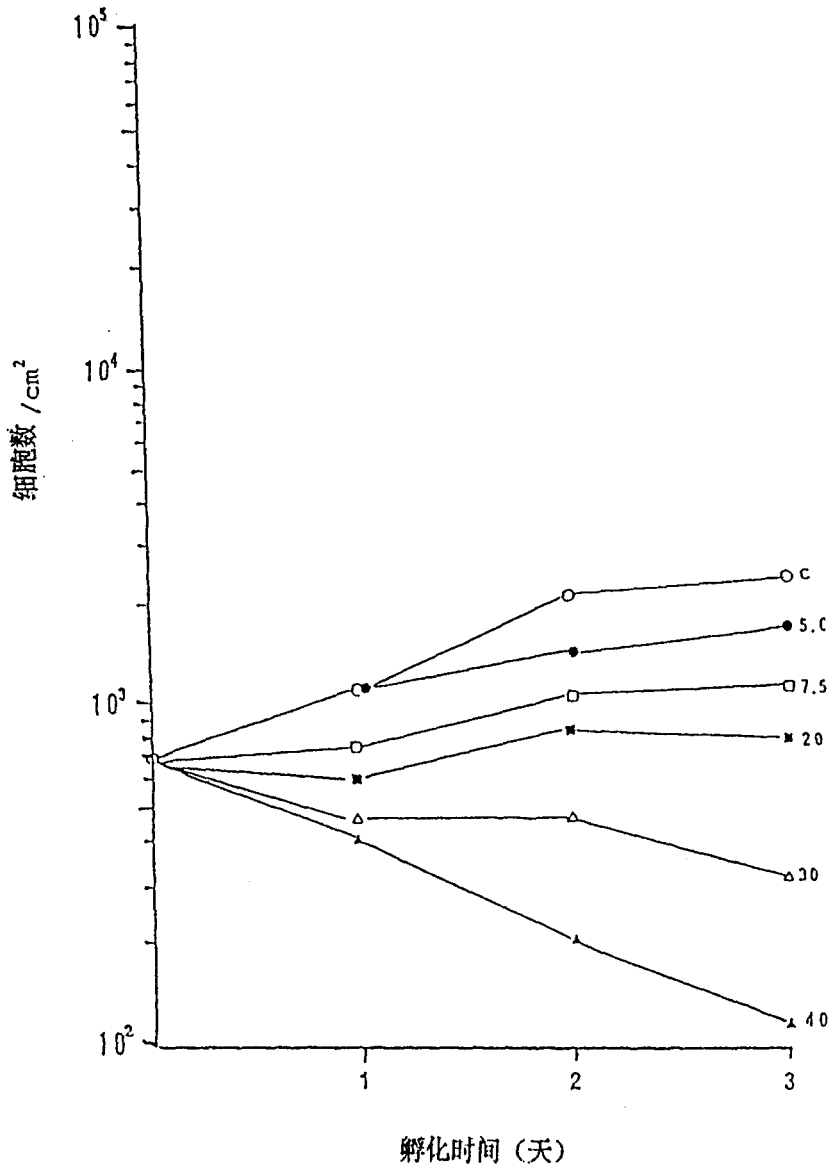


图 22

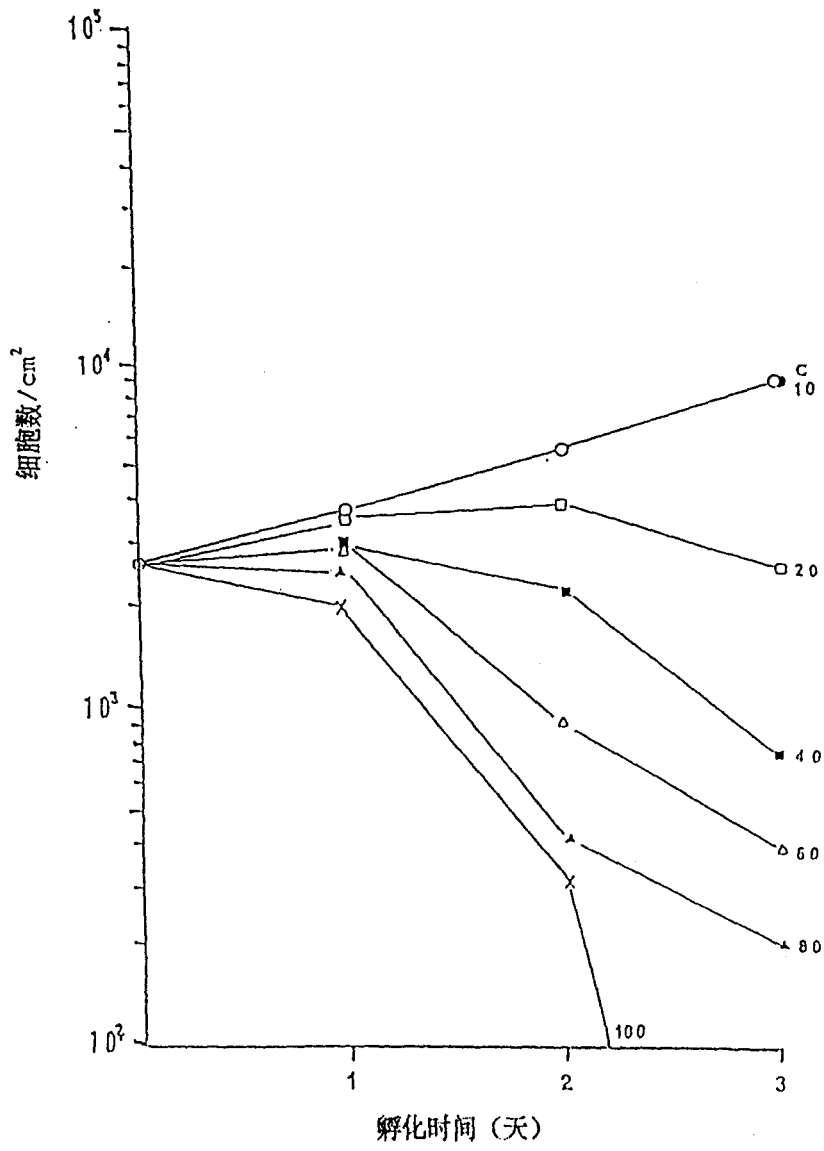


图 23

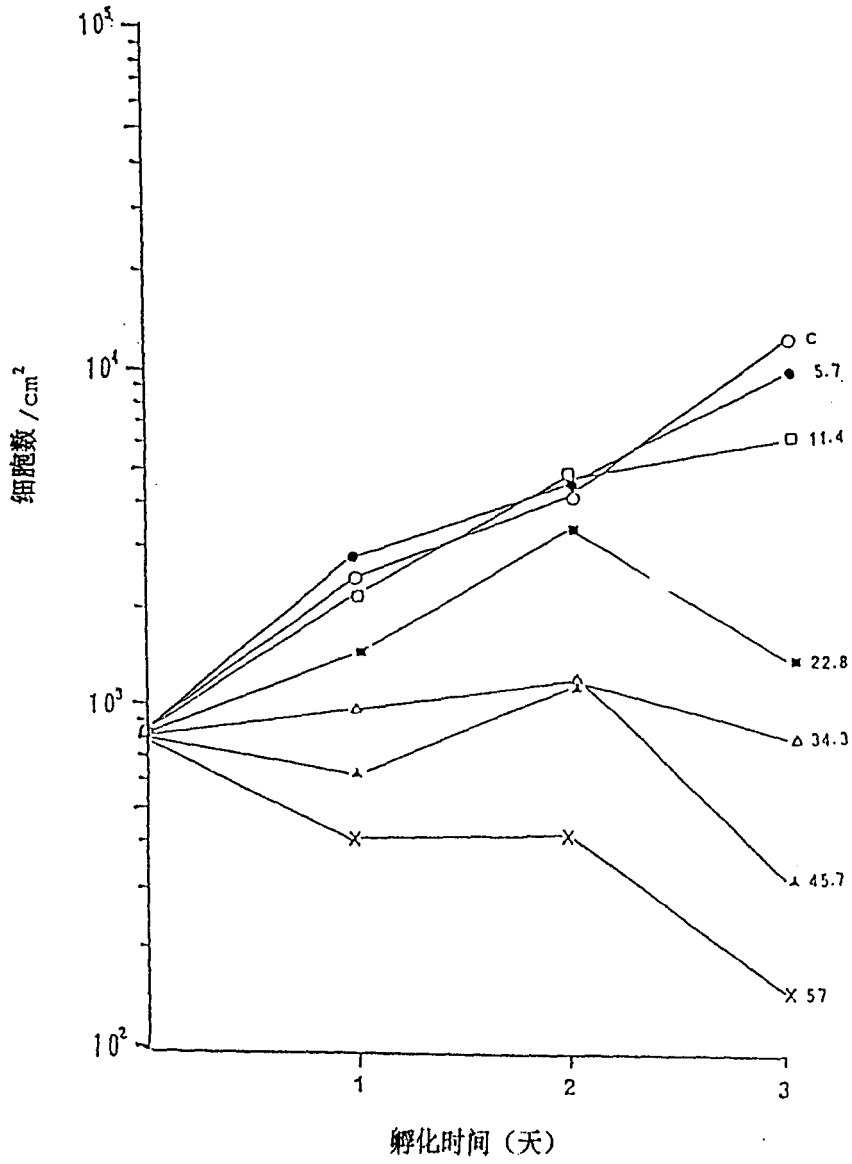


图 24

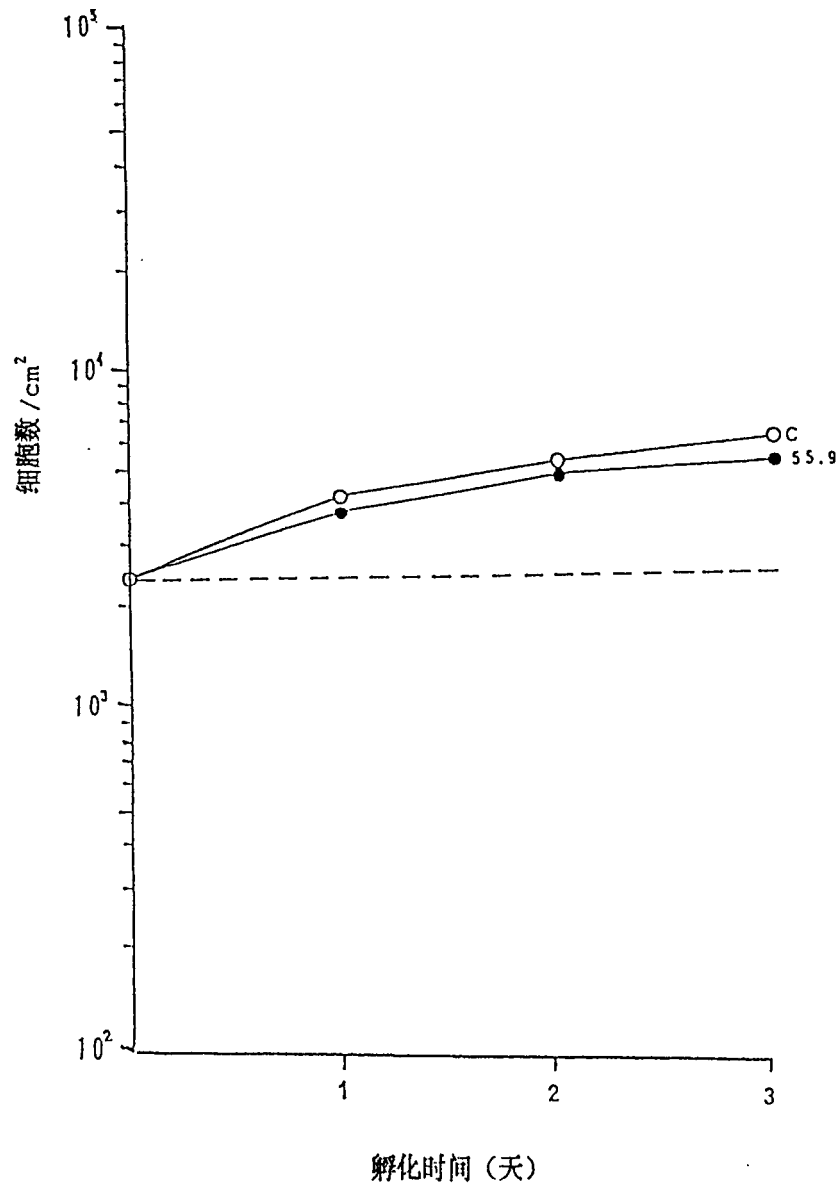


图 25

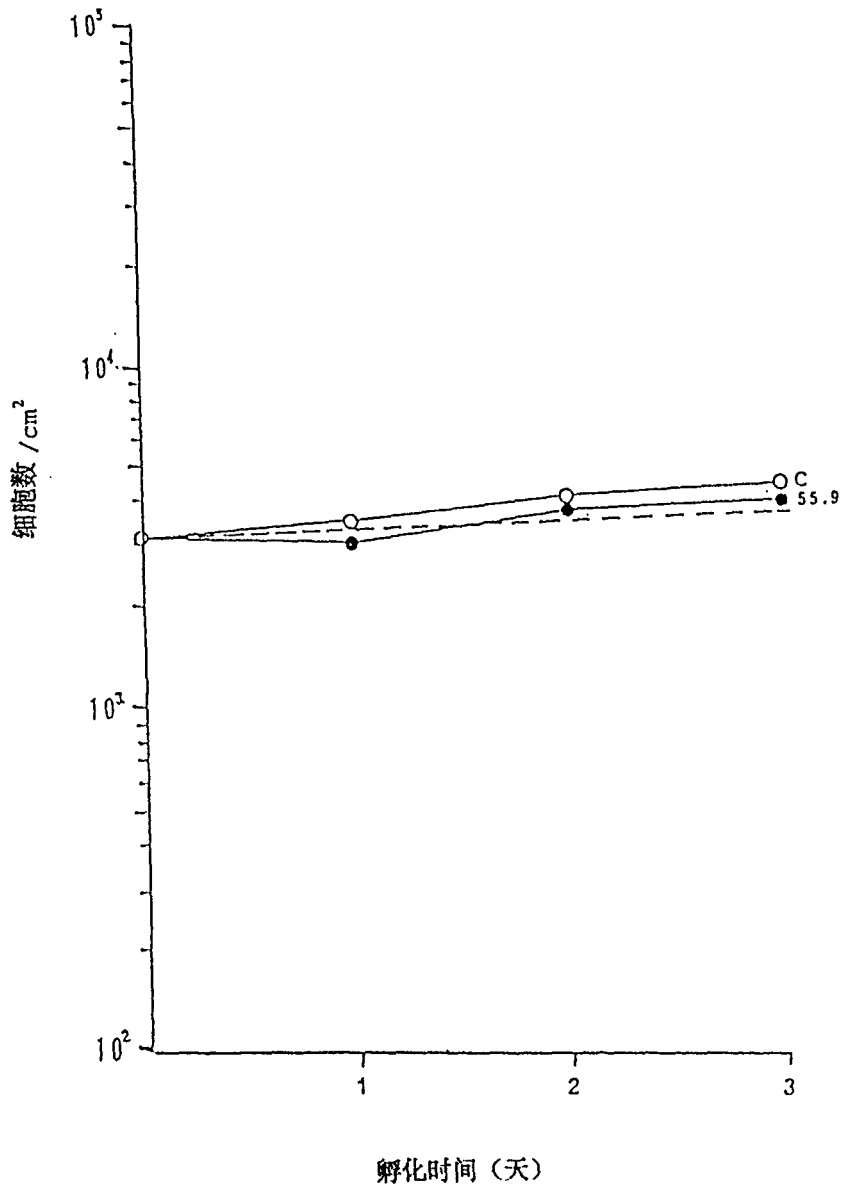


图 26

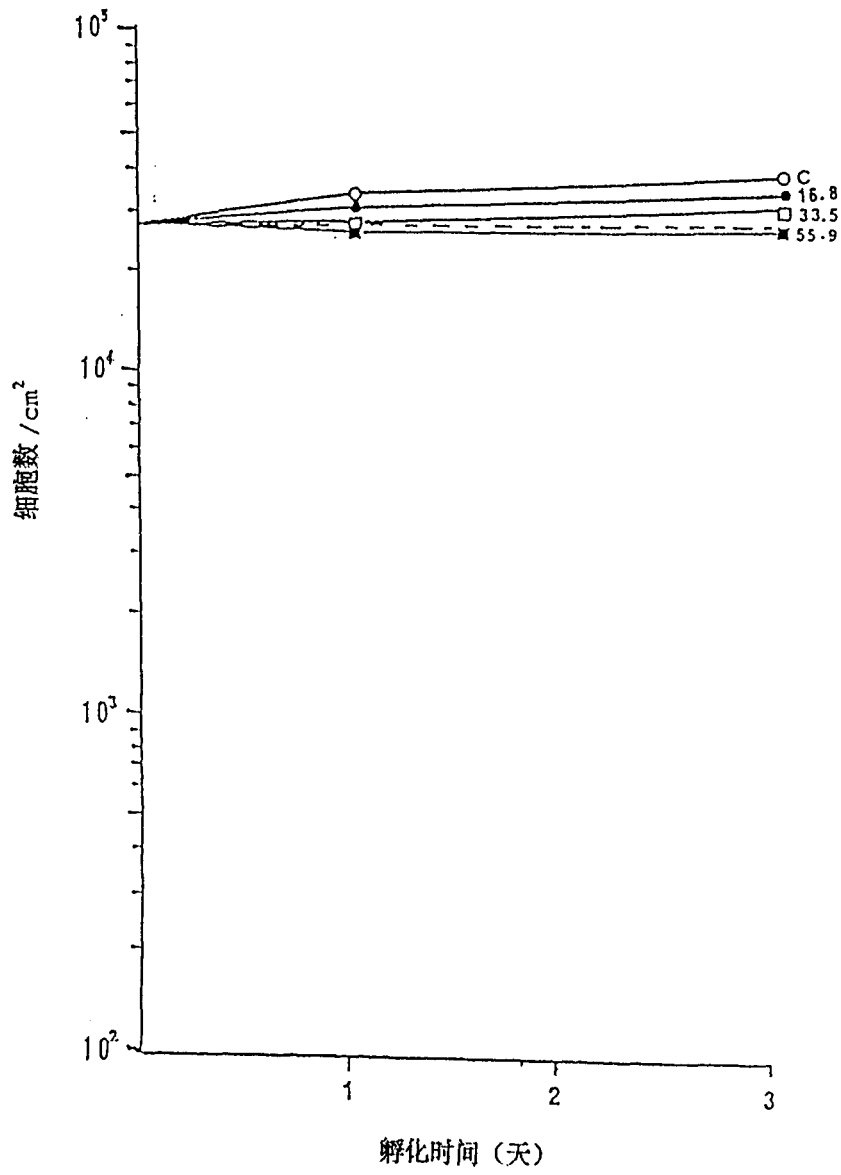


图 27

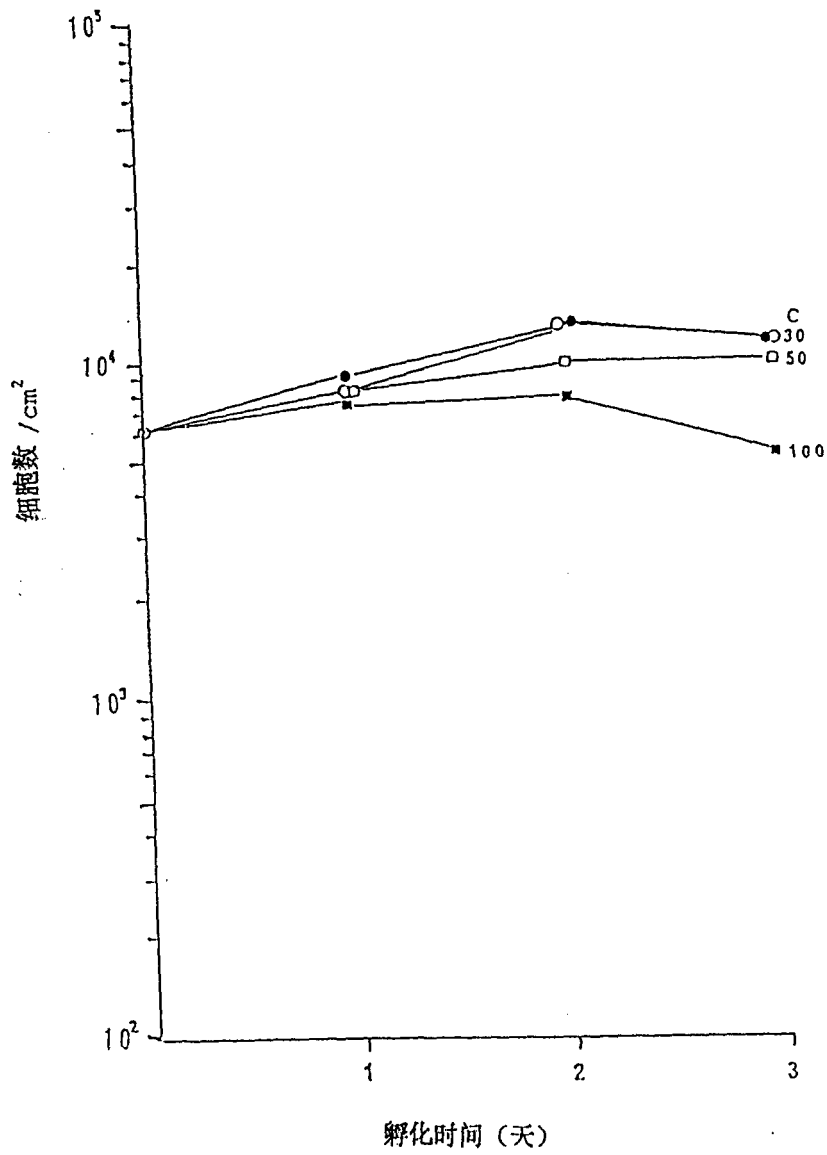


图 28

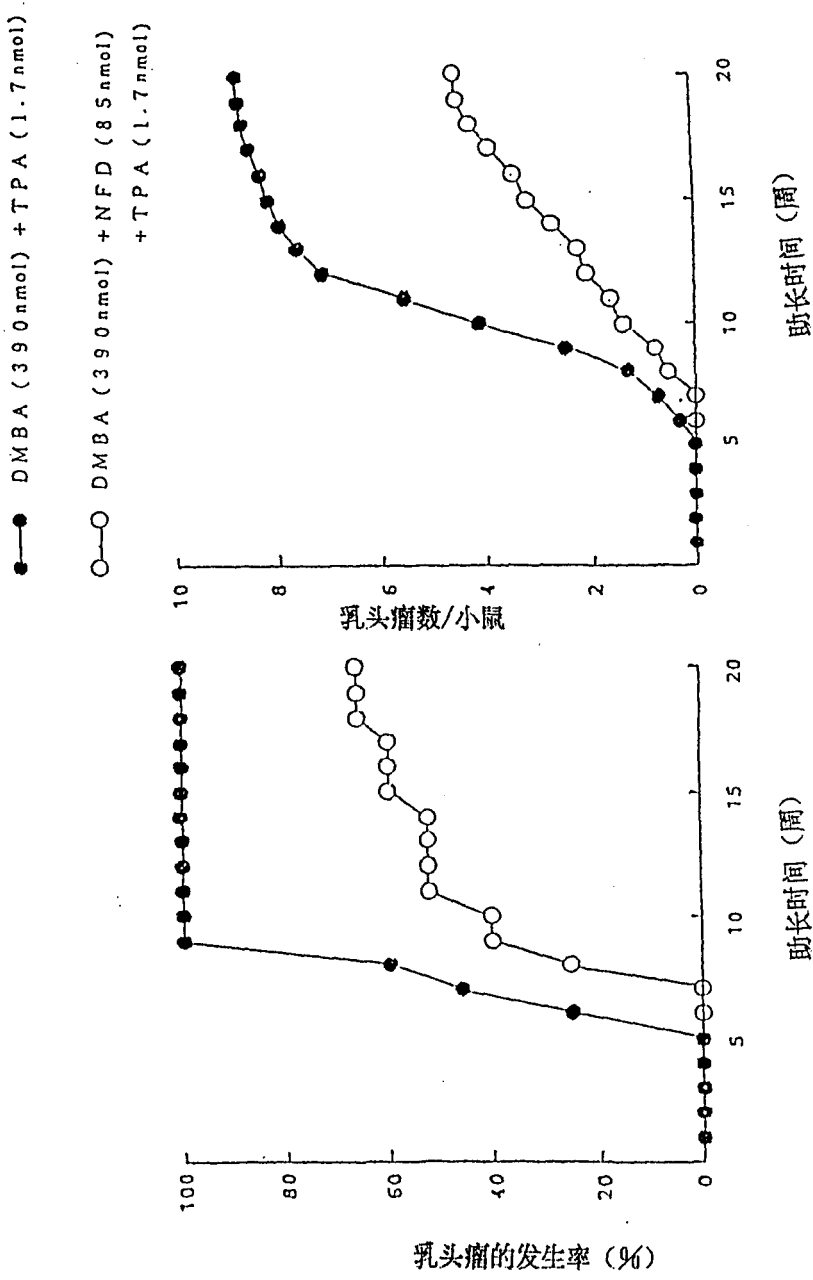


图 29

● DMBA (390 nmol) + TPA (1.7 nmol)
▲ 在TPA前用Lapaccoal (85nm01) 予先处理60分钟
■ 在TPA前用Lapaccoal (85nm01) 予先处理60分钟

