

## 第四節 2-(氮-取代苄基)吡啶胺基-4-酮基-4,5-二氫呋喃-3-羧酸乙酯類圖譜之研究

往昔對於結構之判定常使用化學方法（裂解 Degradaation），質譜、元素分析等方法，再加上圖譜（紫外，紅外， $^1\text{H}$ -核磁共振， $^{13}\text{C}$ -核磁共振等）加以證實。而著者整理所合成之標的化合物圖譜後，可歸納出下列幾項特徵：

1、紫外光譜：此類化合物，一般在 201.0~208.0 nm 與 348.0~356.8 處有最強之吸收帶。

2、紅外光譜：此類化合物，一般在  $1700\sim 1732\text{ cm}^{-1}$  處有其 3 號位置羰基之吸收峰，而在  $1656\sim 1680\text{ cm}^{-1}$  處有其乙酯之羰基吸收峰。

3、 $^1\text{H}$ -核磁共振光譜：

(a) Ethyl 2-(*N*-benzyl)pyridylamino-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate 系列化合物：

此系列化合物，其 H-5 之訊號一般均在  $\delta 4.45\sim 4.51\text{ ppm}$ 。乙酯之甲基訊號一般均在  $\delta 1.21\sim 1.27\text{ ppm}$ 。乙酯之次甲基訊號一般均在  $\delta 4.15\sim 4.24\text{ ppm}$ 。H-7 之訊號一般均在  $\delta 5.58\sim 5.71\text{ ppm}$ 。苯環上之氫訊號一般在  $\delta 6.70\sim 7.40\text{ ppm}$ 。

(b) Ethyl 2[*N*-benzyl-*N*-(5'-methylpyridyl)]amino-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate 系列化合物：

此系列化合物，其 H-5 之訊號一般均在  $\delta 4.45\sim 4.52\text{ ppm}$ 。乙酯之甲基訊號一般均在  $\delta 1.23\sim 1.27\text{ ppm}$ 。乙酯之次甲基其訊號一般均在  $\delta 4.19\sim 4.24\text{ ppm}$ 。H-7 之訊號一般均在  $\delta 5.55\sim 5.70\text{ ppm}$ 。苯環上之氫訊號一般在  $\delta 6.87\sim 7.40\text{ ppm}$ 。

4、 $^{13}\text{C}$ -核磁共振光譜：

(a) 綜觀以上這兩個系列化合物可以發現  $\text{C}_5$  之訊號一般均於  $\delta 73\text{ ppm}$  附近；乙酯之甲基與次甲基一般均分別於  $\delta 14\text{ ppm}$  及  $\delta 59\text{ ppm}$  附近。 $\text{C}_7$  之訊號一般均於  $\delta 55\sim 56\text{ ppm}$ ，偶爾也會低於此範圍。 $\text{C}_3$  之訊號一般均於  $\delta 91\text{ ppm}$ 。 $\text{C}_2$  之訊號一般均於  $\delta 177\sim 178\text{ ppm}$ ；酯類之羰基訊號一般均於  $\delta 163\sim 165\text{ ppm}$  附近； $\text{C}_4$  之訊號一般均於  $\delta 192\sim 193\text{ ppm}$  附近。

## 第五節 藥理試驗方法與材料

### 抗心律不整藥理活性試驗方法：

#### 1、心肌收縮力與自發性收縮頻率之測量：

成年大白鼠 (WKY strain) 重約 200-300 克，先腹腔注射 heparin (300U/kg) 並以 pentobarbital sodium (50 mg/kg) 麻醉；以頸椎分離 (cervical dislocation) 方式犧牲，迅速取出心臟，置於通混合氣 (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) 之 Tyrode 溶液中，將左、右心房及右心室分離，心室肌則修剪成約 4 mm × 6 mm 之長方形條塊。各組織一端以細絲線固定於電極底部，置入內含 Tyrode 溶液充以混合氣的組織浴器 (organ bath) 中，溫度維持 37°C，另一端則連接張力轉能器 (force transducer, Type BG 25, Cleveland, Ohio, U.S.A) 並經由記錄器 (Gould Recorder RS 3200) 記錄等長收縮張力。

標本給予最適當靜止張力約 0.5~1.0 克，待平衡後始進行實驗。左心房及右心室肌標本以波寬 1 ms，兩倍閾值 (threshold) 方形波的電刺激強度，頻率 2 Hz 來引起收縮反應。右心房組織因內含竇房節節律組織，可記錄其自律性收縮頻率及收縮力。各離體心肌標本至少平衡 20 分鐘後始進行實驗。

#### 2、實驗用溶液組成：

##### (1) Tyrode 溶液 (mM)：

A、NaCl 137, KCl 5.4, MgCl<sub>2</sub> 1.1, CaCl<sub>2</sub> 1.8, NaHCO<sub>3</sub> 11.9, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33, dextrose 11.0, 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>。

B、NaCl 137.0, KCl 5.4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.22, CaCl<sub>2</sub> 1.8, dextrose 11.0, HEPES 6.0, 100% O<sub>2</sub>, 以 NaOH 滴定至 pH 7.4。

##### (2) 酵素溶液：

無鈣 HEPES-buffered Tyrode 溶液含 collagenase (Sigma type I) 1 mg/ml 及 protease (Sigma type XIV) mg/ml。

##### (3) 電極溶液 (internal solution)：

A、NaCl 10.0, KCl 120.0, MgATP 5.0, EGTA 5.0, cAMP 0.3,

HEPES 10.0, 以 KOH 滴定至 pH 7.2。

B、含 Cs<sup>+</sup> 電極溶液 (mM):

CsCl 130.0, TEACl 15.0, EDTA 5.0, cAMP 0.03, HEPES 10.0, dextrose 5.0, 以 CsOH 滴定至 pH 7.2。

### 3、實驗用試劑:

Quinidine, Propranolol, 4-aminopyridine (4-AP), ( $\pm$ ) Verapamil, Lidocaine, Prazosin, Pyrilamine, Tetrodotoxin 皆購自 Sigma Chem. Co. U.S.A。除 4-AP, Prazosin, Pyrilamine 及 TTX 以去離子水為溶劑外, 其餘藥品皆以 dimethyl sulfoxide (DMSO) 為溶劑作 stock solution。在對照組實驗 DMSO 不超過 0.1% 對實驗結果無明顯作用。

### 4、實驗數據的統計:

實驗數據以平均值 $\pm$ 標準誤差 (Mean $\pm$ S.E) 表示。而實驗組與對照組間之差異, 以 Student's-test 加以評估。

## 抗血管收縮活性試驗方法:

### 1、Arterial rings 之製備:

成年大白鼠(SD strain)重約 250-300 克, 先腹腔注射 pentobarbital sodium (50 mg/kg) 麻醉, 以頸椎分離 (cervical dislocation) 方式犧牲, 迅速取出血管細胞, 置於通混合氣(95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>)之 5ml krebs 溶液中, 血管細胞則被修剪成約 5mm 之環狀構造。以兩個 platinum hooks, 一端固定在動脈管壁, 置入內含 krebs 溶液充以混合氣之組織浴器 (organ bath) 中, 溫度維持 37 °C, 另一端則連接張力轉能器 (FORT 10, WPI CO. Sarasota, FL., U.S.A.) 並經由紀錄器 (Windowgraf, Gould Inc., Cleveland, Ohio, U.S.A) 紀錄結果。

標本給最予適當靜止張力約 1.0 克, 待平衡後始進行實驗。各離體標本至少平衡 60-90 分鐘後始進行實驗。接著把內皮細胞從 aortic rings 中移出, 先用 ACh(3  $\mu$ M) 讓內皮細胞鬆弛後, 再用 phenylephrine (PE, 3  $\mu$ M) 讓內皮細胞再次收縮, 以進行實驗。

(ps: krebs 溶液 (mM) 之組成:

NaCl 118.2, KCl 4.7, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.9, dextrose 11.7)

## 2、收縮力之測量：

- a. 第一組：先給細胞 PE (濃度從  $3 \times 10^{-10}$  到  $3 \times 10^{-6}$  M) 可以得到一個濃度-收縮依賴曲線，再用 krebs 溶液來清洗細胞直到張力回到基準線，然後給待測化合物或是 prazosin ( $\alpha_1$ -adrenergic receptor bloker) 可以得到另一個濃度-收縮依賴曲線。
- b. 第二組：用一個由 PE ( $3 \mu\text{M}$ )， endothelin I ( $10\text{nM}$ )，  $\text{PGF}_2\alpha$  ( $10 \mu\text{M}$ )， U46619 ( $20\text{nM}$ )， angiotensin II ( $0.3 \mu\text{M}$ )， serotonin ( $10 \mu\text{M}$ )， phorbol ( $1 \mu\text{M}$ )，  $\text{K}^+$  ( $60 \text{nM}$ ) 等組成之血管收縮劑來誘發細胞收縮，接著再用各種不同濃度之待測化合物來進行實驗。以百分比來表示所測得結果。(註：U46619 是一個 thromboxane 的類似物。)
- c. 第三組：這組之主要目的是探討，內皮細胞在血管收縮中所扮演的角色；及待測化合物之作用機轉。  
一開始先給 aortic rings 一種由 L-NAME ( $0.3\text{mM}$ )， hemoglobin ( $10 \mu\text{M}$ )， methyl blue ( $10 \mu\text{M}$ )， ODQ ( $30 \mu\text{M}$ )， atropine ( $1 \mu\text{M}$ )， tetraethylammonium ( $10 \text{mM}$ )， indomethacin ( $10 \mu\text{M}$ )， glibenclamide ( $10 \mu\text{M}$ )， 4-AP ( $0.1 \text{mM}$ )， charydotoxin ( $0.1 \mu\text{M}$ )， apamin ( $0.1 \text{mM}$ ) 所組成之試劑溶液，30 分鐘後再給待測化合物來進行實驗，以觀察結果。  
(註：L-NAME 為 NO 合成抑制劑，hemoglobin 為 NO 清除劑，methyl blue 為 guanylate cyclase 抑制劑，atropine 為 muscarinic receptor antagonist，tetraethylammonium 為非選擇性  $\text{K}^+$  通道阻斷劑，indomethacin 為 cyclooxygenase 抑制劑，glibenclamide 為  $\text{K}^+$  通道阻斷劑，4-AP 為有電位依賴性之  $\text{K}^+$  通道阻斷劑，charydotoxin 為有  $\text{Ca}^{2+}$  依賴性之  $\text{K}^+$  通道阻斷劑。)

## 抗腫瘤藥效評估

### 1. 以培養腫瘤細胞篩選(由國家衛生研究院NHRI 執行)

選擇三種細胞株篩選活性：

- (1) MCF-7 乳癌細胞
- (2) NCH460 肺癌細胞
- (3) SF268 中樞神經癌細胞

### Sulforhodamine (SRB)腫瘤細胞生長測定法

將腫瘤細胞以 5000 cells/well 方式種於 96 well 之細胞培養皿中。在細胞緊貼於培養皿 24 小時後加入實驗藥物，於 37 °C 及 5% CO<sub>2</sub>/95% 空氣以及 100% 相對溼度中作用 48 小時。作用完成後將細胞以冰冷的 trichloroacetic acid (TCA，最終濃度為 10%) 置於 4°C 中作用 60 分鐘加以固定，隨後將上清液丟棄並以清水緩緩沖洗四次隨後風乾。加入 100 μl 已溶於 1% acetic acid 中含有 0.4% (w/v) 之 SRB 溶液於每個 well 中，並且於室溫中靜置 10 分鐘。待染色後，將未結合至細胞的染料利用 1% acetic acid 沖洗四次之後隨即風乾。已結合染料之細胞則以 10 mM trizma base 溶解出，再以自動讀盤儀於 515 nm 波長測得吸光值。吸光值之計量方式 [零時間點 (time zero) (T<sub>z</sub>), 控制組之生長 (control growth) (C), 篩選藥物存在下的生長 (T<sub>i</sub>)]。最終以生長百分比計算出不同濃度之藥物抑制生長情形，其抑制生長百分比計算公式如下：

$[(T_i - T_z) / (C - T_z)] \times 100$  for concentrations for which  $T_i \geq T_z$

$[(T_i - T_z) / T_z] \times 100$  for concentrations for which  $T_i < T_z$ .

每次實驗重複三次求得劑量相關性。50% 的生長抑制 (GI<sub>50</sub>) 計算如下： $[(T_i - T_z) / (C - T_z)] \times 100 = 50$ ，其為藥物作用期間

計算藥物濃度在控制組細胞含量之淨值所增加的蛋白質，其結果造成 50% 減少的濃度。

### 細胞急性毒性定量實驗

本實驗是以 MTT 分析方法來測定細胞毒性。將藥物與正常細胞作用 2 小時後，將 MTT 溶液加入欲測定之細胞中(10  $\mu$ l/100  $\mu$ l 培養液，一般為 96-well plates)，於 37°C 下作用 0.5 至 1 小時後，將 well 內之培養液吸走，再於 well 內各加入 100  $\mu$ l 的 DMSO 將細胞溶解，因此可得到藍紫色的溶液，再於 ELISA reader 讀取吸光值(570nm)，便可定量出細胞毒性。MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)是溶解於 PBS (濃度為 5mg/ml)，並以 Millipore 過濾器過濾。

## 2. 篩選抗腫瘤活性成分的動物模式

在研究過程中，若經評估具有潛能不錯的抗腫瘤活性成分，證明具有研發價值，將進行更進一步的抗腫瘤生長動物體內實驗。將腫瘤細胞( $1 \times 10^7$ )以 subcutaneous (s.c.)的方式注入 SCID 或是裸鼠皮下，待此腫瘤長至 60 mg 左右才開始每天投予藥物。每 2-3 天測量一次腫瘤體積並稱取小鼠體重。待腫瘤長至 1200 mg 時則停止該隻動物的實驗，並以人道方式將動物犧牲。