

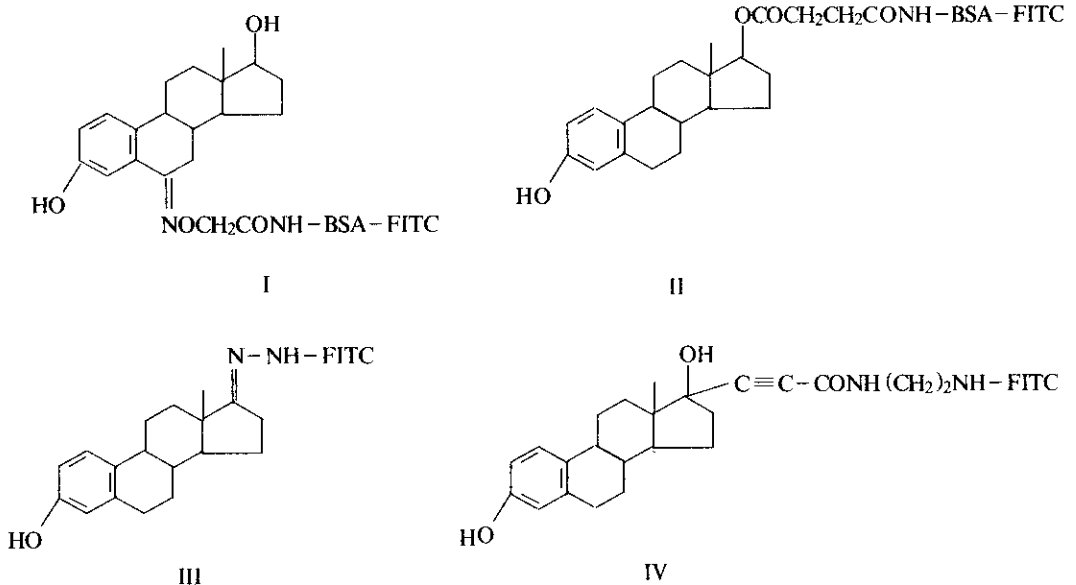
乳腺癌组织内雌激素受体新检测试剂的合成

毛 峰 * 翁玲玲 郑 虎

(华西医科大学药学院, 成都 610041)

1979年李善恒发明了雌激素受体检测试剂并在临床应用。为了寻找更有效、稳定、易得的受体检测试剂,我们曾以合成高分子化合物聚乙二醇代替原试剂中的牛血清白蛋白⁽¹⁾,以克服天然高分子化合物的不稳定性;另一方面,我们从雌激素的活性和改进合成路线着手,希望制备简便易得有效的试剂。

文献报道已研制的雌激素受体试剂主要有以下几种^(2~7):



BSA: 牛血清白蛋白 Bovine serum albumin
FITC: 异硫氰荧光素 fluorescein isothiocyanate

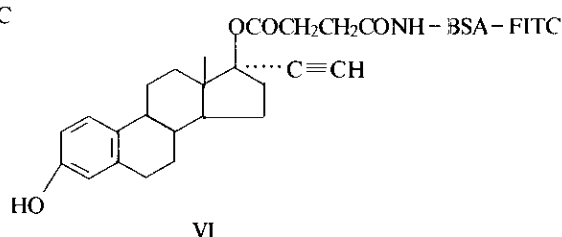
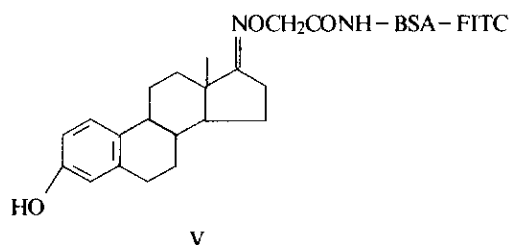
结合物 I 及 II 由雌酚酮为原料进行合成。合成结合物 I 时,雌酚酮需经还原、乙酰化保护、6 位氧化及去保护等多步反应得中间体 6-氧雌二醇,其中氧化一步收率仅 20% 左右。结合物 III, IV 合成方法较简单,但由于分子中无牛血清白蛋白,水溶性差,检测效果不理想。

综合上列四种结合物的特点,本文报道两个新结合物 V, VI 的合成。V 直接用雌酚酮为原料,避免了收率较低的氧化反应,省去了保护和去保护的步骤,合成路线简化。VI 用雌激素活性较强的乙炔雌二醇为原料,期望能提高检测效果。

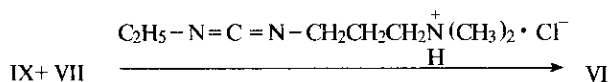
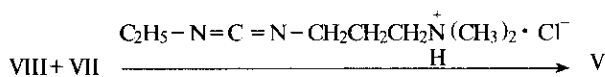
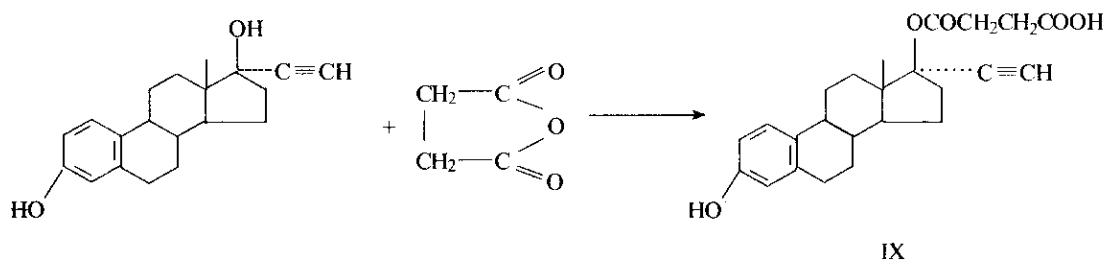
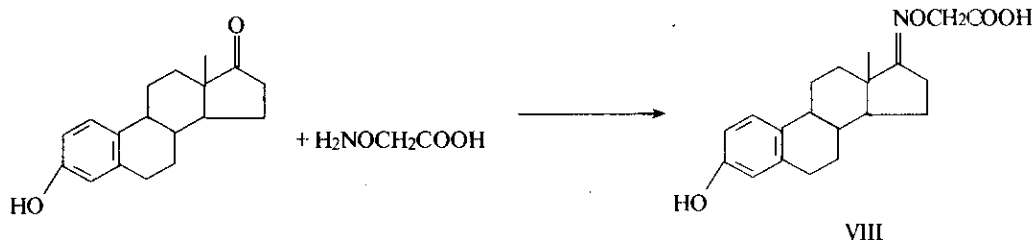
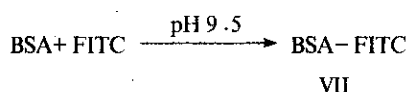
本文于1990年5月28日收到。

本文为国家自然科学基金资助项目

* 现在北京医科大学攻读博士学位



合成路线如下:



产物必须经透析, 以除尽未反应的小分子原料, 避免在用紫外光谱测定试剂中甾体和荧光素含量时受到干扰而影响质量控制。透析后, 可用 TLC 检测小分子原料是否除尽。

将结合物 V 送临床, 病理切片检测, 并与进口试剂 (结合物 I) 对照, 结果表明, 进口试剂对 ER 癌细胞呈 (++) , ER 阳性细胞 < 20% ; 结合物 V 对 ER 癌细胞呈 (++) , ER 阳性细胞 10% 。由此可知, V 对癌细胞的阳性结果与进口试剂一致, 但对阳性细胞的含量稍有差异, 有待进一步研究。

实 验 部 分

熔点用毛细管法测定, 温度计读数未校正。红外光谱仪为 PE-983 型, KBr 压片。元素分析仪为 Carlo Erba 1106 型。核磁共振仪为 Varian FI-80 型, 以 CDCl_3 作溶剂,

TMS 为内标。质谱仪为(GC-MS) Finnigan MAT 4510 型。紫外光谱仪为岛津 - 250 型。

牛血清白蛋白-异硫氰荧光素结合物(VII)

牛血清白蛋白 100 mg 溶解于 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液 (pH 9.5) 中, 加入异硫氰荧光素 10 mg, 25 °C 搅拌 6 h, 反应液经 Sephadex G-25 柱层析, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液 (pH 7.8) 洗脱, 收集荧光染色一致的部分进行透析, 直至用 TLC 检查无小分子原料存在。溶液冷冻干燥, 得干品, 经紫外定量 $F/P = 11.6$ (P 为总蛋白量, F 为荧光素量)。

雌酚酮羧甲基脞(VIII)

盐酸羧甲基羟胺 200 mg 溶于无水乙醇中, 用 2 mol/L KOH 调 pH 呈碱性, 加入雌酚酮 200 mg, 回流 3 h, 蒸去乙醇, 加水, 用乙酸乙酯提取, 水层用盐酸调至 pH 3, 析出固体, 干燥后用乙醇重结晶, 得产品 230 mg, 收率 90.5%, mp 186 ~ 188 °C。IR (KBr) cm^{-1} 3200 ~ 3400 (-OH), 1725 (C=O), 1600 (>C=N-), 1200 (-OCH₂-)。MS m/z 343 (M^+), 269, 238, 217, 172, 159, 145, 96, 44 (基峰)。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{NaOH}}$ nm 295。

雌酚酮-牛血清白蛋白-荧光素(V)

VIII 20 mg, N -乙基- N' -二甲胺基丙基碳化二亚胺 20 mg 溶解在二氧六环中, 在搅拌下滴入相当于 20 mg 纯 BSA 的 BSA-FITC (VII) 的水溶液, 用 1 mol/L NaOH 调至 pH 8 ~ 8.5, 4 °C 反应 20 h, 用 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 进行透析至 TLC 检测无小分子原料存在, 超速离心 15 min, 收集上清液, 冷冻干燥, 经紫外定量 $E/F = 2.15$ (F 为荧光素量, E 为雌激素量)。

PBS 缓冲液 (pH 7.4) 的配制: 精密称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.7952 g, KH_2PO_4 0.4 g, NaCl 16 g, KCl 0.4 g, 加蒸馏水溶解, 稀释至 2000 ml。

17 α -乙炔-17 β -半琥珀酸酯(IX)

17 α -乙炔-17 β -雌二醇 2 g, 加吡啶 5 ml 和琥珀酸酐 4 g, 回流反应 24 h, 倾入冰水中, 用乙酸乙酯提取, 合并有机层, 水洗, 无水 Na_2SO_4 干燥, 蒸去溶媒, 经硅胶柱层析分离, 得产品 1.74 g, 收率 65%, mp 160 ~ 162 °C。IR (KBr) cm^{-1} 3300 (-OH), 2200 (-C \equiv C-), 1725 ~ 1741 (C=O)。MS m/z 396 (M^+), 296, 278 (基峰), 263, 213, 172, 159, 145, 133, 44。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{NaOH}}$ nm 295。元素分析 $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_5$, 计算值 % C 72.70 H 7.12; 实测值 % C 72.41, H 7.32。

乙炔雌二醇-牛血清白蛋白-荧光素(VI)

IX 20 mg 和 N -乙基- N' -二甲胺基丙基碳化二亚胺 20 mg 溶于二氧六环, 搅拌下滴加相当于 20 mg 纯 BSA 的 BSA-FITC (VII) 的水溶液, 用 1 mol/L NaOH 调至 pH 8 ~ 8.5 h, 在 4 °C 反应 20 h。反应后用水及 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 透析, 至用 TLC 检查无小分子原料存在, 超速离心 15 min, 取上清液冷冻干燥, 经紫外定量 $E/F = 2.3$ 。

关键词 荧光素甾体结合物; 雌激素受体; 雌酚酮羧甲基脞; 17 α -乙炔-17 β -半琥珀酸酯。

参 考 文 献

1. 郑虎, 等. 受体试剂雌二醇-聚乙二醇-异硫靛荧光素的合成, 药学报 1991; 26: 336.
2. Macfarlane JK, et al. Studies on estrogen receptors and regression in human breast cancer. *Cancer* 1980; 45: 2998.
3. Michael L, et al. Use of HPLC in the evaluation of synthesis and binding of fluorescein-linked steroid to estrogen receptors. *J Chromatogr* 1983; 266: 129.
4. Mikhail G, et al. Radioimmunoassay of plasma estrone and estradiol. *Steroids* 1970; 15: 333.
5. Lee SH. Hydrophilic macromolecules of steroid derivatives for the detection of cancer cell receptors. *Cancer* 1980; 46: 2825.
6. Pertschuk LP, et al. An improved histochemical method for detection of estrogen receptors in mammary cancer. *Am J Clin Pathol* 1979; 71: 504.
7. Nenci I. Estrogen receptor cytochemistry by fluorescent estrogen. *J Histochem Cytochem* 1980; 28: 1081.

SYNTHESIS OF NEW TEST REAGENTS FOR THE ESTROGEN RECEPTOR IN HUMAN BREAST CANCER TISSUES

F Mao*, LL Weng and H Zheng

(School of Pharmacy, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041)

ABSTRACT According to the character of structure and activity of the test reagents I ~ IV, two new reagents V and VI for detecting estrogen receptor of human mammary cancer cells were synthesized. This simplifies the route of synthesis and increases activity. Key intermediates VIII and IX were confirmed by IR, MS, UV and elemental analysis. The quantification of the final products V and VI were determined by UV. The result of preliminary clinico-pathological test shows compound V to be effective on estrogen receptor.

Key words Fluorescent steroid conjugate; Estrogen receptor; Estrone-carboxymethyl-oxime; 17α -Acetenyl- 17β -hemisuccinate

* Now studying in Beijing Medical University, School of Pharmacy for Ph.D. degree.