



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103110614 B

(45) 授权公告日 2015.02.18

(21) 申请号 201310020569.X

(22) 申请日 2013.01.18

(73) 专利权人 杭州雷索药业有限公司
地址 311231 浙江省杭州市萧山区金城路
1038 号 817 室

(72) 发明人 李春启 吴转斌 朱晓宇 朱凤

(74) 专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公
司 33109

代理人 林宝堂

(51) Int. Cl.

A61K 31/145(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 27/02(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2006/017185 A1, 2006.02.16, 摘要、说明书第 26 页表 2 倒数第 2 栏及第 18 页最后一段.

CN 1431902 A, 2003.07.23, 权利要求 1.

CN 101237880 A, 2008.08.06, 摘要及说明书第 9 页第 4 段.

PAERMENTIER F. DE 等. SULOCTIDIL

INCREASES THE RAT BRAIN CORTEX

MICROVASCULAR REGENERATION AFTER A LESION.

《Life Sciences》.1989, 第 44 卷 (第 1 期), 第 41-47 页.

审查员 刘军政

权利要求书1页 说明书9页 附图4页

(54) 发明名称

舒洛地尔在制备抗血管生成类药物中的应用

(57) 摘要

本发明涉及到医药技术领域,具体涉及到舒洛地尔在制备抗血管生成类药物中的应用。本发明的舒洛地尔具有价格低廉、安全性高、原料来源广泛的特点,辅以药学上可接受的辅料,采用常规制剂技术即可制成各种口服、注射、外用制剂,具有良好的开发前景。

1. 舒洛地尔在制备抗血管生成类药物中的应用,其特征在于所述的抗血管生成类药物为治疗湿性老年视黄斑变性药物。

2. 根据权利要求 1 所述的舒洛地尔在制备抗血管生成类药物中的应用,其特征在于所述的抗血管生成类药物为药学上可接受的剂型,为口服给药剂型、注射给药剂型、粘膜给药剂型或经皮给药剂型。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的舒洛地尔在制备抗血管生成类药物中的应用,其特征在于所述的抗血管生成类药物为药学上可接受的剂型,为片剂、胶囊剂、颗粒剂、口服液、注射液、贴剂或凝胶剂。

舒洛地尔在制备抗血管生成类药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及到医药技术领域,具体涉及到舒洛地尔作为抗血管生成化合物的一种医药新用途。

背景技术

[0002] 血管生成 (angiogenesis) 与人类多种重大疾病高度相关,如恶性肿瘤,老年视黄斑变性 (Age-related macular degeneration, AMD), 动脉粥样硬化 (Atherosclerosis), 风湿性关节炎 (Rheumatoid arthritis), 糖尿病视网膜变性 (Diabetic retinopathy) 以及肿瘤转移 (Tumor metastasis) 等^[1]。随着人口老龄化逐渐加剧,目前这些重大疾病已严重危害到了人民群众的生命健康。

[0003] 1971年,哈佛大学 Judah Folkman 教授首次提出抗肿瘤血管疗法,他认为实体肿瘤的生长和扩散依赖于肿瘤内新血管的形成,并通过新生血管获取养分;新血管的形成和生长,促进了肿瘤细胞的转移^[2-4]。经过40年大量的基础理论研究,目前基于这一疗法,已有多重重磅专利新药上市,如罗氏的 Bevacizumab (商品名 Avastin, 2010年全球销售额67亿美元),拜耳的 Sorafenib (商品名 Nexavar, 2010年全球销售额9.94亿美元),辉瑞的 Sunitinib (商品名 Sutent, 2010年全球销售额10.7亿美元)^[5-6]。但这些药物价格十分昂贵,均为外企医药巨头垄断。国内目前只有1支真正意义的抗肿瘤血管生成药物通过 SFDA 批准上市(恩度,先声药业,2005年上市)^[7],但年销售额很少(2010年销售额仅2.5亿人民币),尚无法参与全球竞争。其次,由于恩度(重组人血管内皮抑制素注射液, Recombinant Human Endostatin Injection)为大分子蛋白质类药物,生产这类高纯度安全制剂需要很高的技术门槛,而且此类型的药物在体内的半衰期较短,从而限制了这些活性蛋白的临床应用^[7]。

[0004] 老年视黄斑变性 (Age-related macular degeneration, 简称 AMD) 是一种累及眼底视网膜黄斑区的变性眼疾。它因年龄增长而产生黄斑区变性,可引起中心视力急剧下降。据统计,全世界超过3000万人罹患此病。黄斑变性分为干性和湿性两种。湿性老年视黄斑变性主要因为脉络膜血管异常生成,新生的无效微血管出现渗漏,血管渗漏的液体进而破坏黄斑,导致中心视力显著下降,影响生活质量,甚至变盲。湿性老年视黄斑变性 (AMD) 已经成为65岁以上老年人失明的罪魁祸首^[8-9]。

[0005] 治疗湿性 AMD 的方法主要有光动力疗法和抗血管药物疗法^[8-9]。光动力疗法主要通过静脉注入光敏药物,继而采用特定波长的非热能激光照射脉络膜新生血管病灶,将光敏药物活化。用光动力疗法治疗湿性 AMD,只能稳定或降低湿性 AMD 视力下降的风险,并非对因治疗,不能阻止复发的可能。一般需要多次治疗。而且治疗后要避光48小时,以免发生光敏反应,造成皮肤灼伤,因此,给患者带来很多痛苦。目前治疗湿性 AMD,已上市的药物主要有:辉瑞的哌加他尼钠 (Pegaptanib, 商品名 Macugen), 诺华的兰尼单抗 (Ranibizumab, 商品名 Lucentis), 拜耳的艾力亚 (VEGF-Trap-eye, 商品名 Eylea), 这些药物的价格非常昂贵,一般需要每月经玻璃体内注射给药,这种冗长的给药过程很难被患者接受。因此,开发

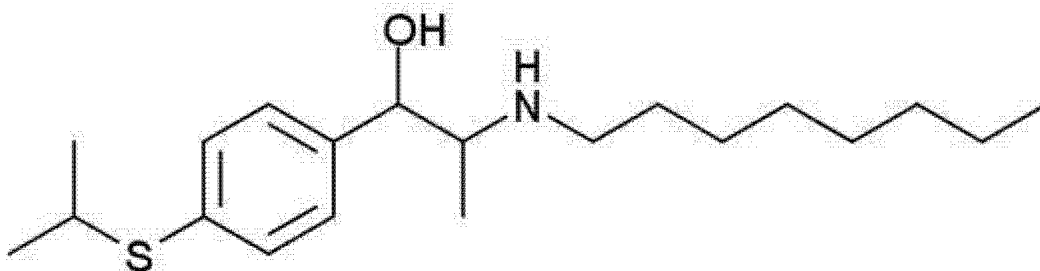
新型廉价的滴眼液来治疗老年黄斑变性是未来的发展趋势。

[0006] 综上所述,在小分子化合物中寻求新的血管生成抑制剂来有效治疗上述疾病已成为研发热点,开发具有自主知识产权的靶向抗血管生成小分子药物迫在眉睫。

[0007] 舒洛地尔,英文通用名:Suloctidil;中文名称:舒洛地尔;中文别名:索罗克替;分子量:337.56。舒洛地尔是一种强效的抗血小板药物,临床上主要用于治疗血栓。最新的研究表明,利用斑马鱼癫痫模型对2000个化合物进行高通量筛选发现舒洛地尔具有很强的抗癫痫效果^[10]。

[0008] 舒洛地尔的化学结构式如下:

[0009]



[0010] 至今尚未见有关于舒洛地尔抗血管生成 (anti-angiogenesis) 活性的报道。

发明内容

[0011] 本发明提供了舒洛地尔在制备抗血管生成类药物中的应用。

[0012] 作为优选,本发明所述的抗血管生成类药物包括抗肿瘤和治疗湿性老年视黄斑变性药物。

[0013] 研究表明,舒洛地尔通过抑制肿瘤内新血管的生成来预防或治疗肿瘤。舒洛地尔通过抑制脉络膜血管异常增生来预防或治疗湿性老年视黄斑变性。

[0014] 作为更优选,本发明所述的抗血管生成类药物包括抗乳腺癌药物。

[0015] 作为优选,本发明所述的抗血管生成类药物为药学上可接受的剂型,为口服给药剂型、注射给药剂型、粘膜给药剂型或经皮给药剂型。

[0016] 作为更优选,本发明所述的抗血管生成类药物为药学上可接受的剂型,为片剂、胶囊剂、颗粒剂、口服液、注射液、贴剂或凝胶剂。

[0017] 本发明利用斑马鱼血管生成模型进行舒洛地尔抗血管药效学实验。和传统的血管研究模型(啮齿类的老鼠和鸡胚尿囊膜)相比,目前大量的研究证实,斑马鱼是最理想的血管生物学以及抗血管生成药物评价模型^[11-19]。啮齿类的老鼠和鸡胚尿囊膜存在各自的缺点^[13-14]。通过利用斑马鱼血管生成模型进行药效学评价和药物新靶点验证,已有多支抗癌药物进入临床前实验(Pre-clinical Trial)或者临床试验(Clinical Trial)阶段(包括已获得FDA批准上市的药物),如 Vatalanib (Novartis)^[15]、Compound 6 (TargeGen)^[16]、Rosuvastatin^[17]、Solenopsin (Eli Lilly)^[18]等;主要基于斑马鱼抗血管生成模型发现的一种治疗恶性肿瘤的老药新用药物——反应停(Thalidomide)已获FDA批准上市^[19]。

[0018] 经斑马鱼血管生成模型证实,舒洛地尔对斑马鱼肠下静脉血管(subintestinal vessel, SIV)有显著抑制的功能,并呈现一定的剂量依耐性,因此,舒洛地尔可用于制备抗

血管生成抑制剂。

[0019] 国内外在斑马鱼作为癌症移植模型和湿性视黄斑变性模型方面也有大量研究^[20-25]。经斑马鱼人类乳腺癌(MCF-7)移植模型证实,舒洛地尔能够显著抑制人类乳腺癌(MCF-7)的生长;经斑马鱼视黄斑变性模型证实,舒洛地尔对湿性老年视黄斑变性具有显著的治疗效果。因此,舒洛地尔可用于抗肿瘤及治疗湿性老年视黄斑变性。

[0020] 斑马鱼相关缩略词:受精后小时数: hpf-hours postfertilization, 肠下血管: SIV-subintestinal vessel, 绿色荧光蛋白: GFP-green fluorescent protein。

[0021] 本发明中出现的术语用于对本发明技术方案的阐述和理解,并不构成对本发明的限制。

[0022] 本发明与现有技术相比,具有以下优点:

[0023] 本发明的舒洛地尔具有价格低廉、安全性高、原料来源广泛的特点,辅以药学上可接受的辅料,采用常规制剂技术即可制成各种口服、注射、外用制剂,具有良好的开发前景。

附图说明

[0024] 图1为本发明受精后72小时(72hpf)血管转基因荧光斑马鱼肠下血管(SIV)模型。框定区域为肠下血管(SIV)网络局部放大观察的部位,箭头指示肠下血管(SIV, subintestinal vessel)。

[0025] 图2为本发明定性观察舒洛地尔对斑马鱼肠下血管(SIV)的抑制效果。图a-f,受精后48hpf的斑马鱼经过药物处理24h,观察时相为72hpf,其中:图a为阴性对照(0.1%DMSO),图b为舒洛地尔处理组,图c为阳性对照(10 μ M洛伐他汀),框定区域为肠下血管(SIV)局部放大观察的部位,箭头指示肠下血管(SIV),虚线区域为肠下血管面积(SIV area)。与阴性对照相比,5 μ M舒洛地尔显著抑制斑马鱼肠下血管(SIV)的生成,表现为肠下血管面积减小(图d-f)。

[0026] 图3为本发明定量评价舒洛地尔对斑马鱼肠下血管(SIV)模型的抑制效果。与阴性对照相比,舒洛地尔抑制斑马鱼肠下血管(SIV)生成呈现显著的剂量依耐性,***P<0.001,差异极显著。

[0027] 图4为本发明舒洛地尔对斑马鱼肠下血管(SIV)生成的抑制率和IC₅₀。舒洛地尔对斑马鱼肠下血管(SIV)生成的抑制率随着浓度的上升而呈现梯度增加,各浓度舒洛地尔组对斑马鱼肠下血管(SIV)生成的抑制率分别为:1 μ M(5.30%),2.5 μ M(26.45%),5 μ M(54.35%),10 μ M(84.31%),25 μ M(100%)。利用GraphPad Prism软件计算IC₅₀≈4.68 μ M。

[0028] 图5为本发明斑马鱼人类乳腺癌(MCF-7)移植模型评价舒洛地尔的抗肿瘤药效。图a-f,移植人类乳腺癌(MCF-7)后2dpf的斑马鱼经过药物处理4d,观察时相为6dpf。图a为空白对照,图b为阴性对照(0.1%DMSO),图d-f为不同浓度的舒洛地尔处理组,图c为阳性对照(1000 μ M5-FU)。

[0029] 图6为本发明舒洛地尔对移植癌细胞的生长抑制率。舒洛地尔对人类移植癌细胞生长的抑制率随着浓度的上升而呈现梯度增加,三个浓度舒洛地尔组抑制率分别为:1 μ M(10.8%),2.5 μ M(23.2%),10 μ M(48.6%)。

[0030] 图7为本发明定量评价舒洛地尔对视黄斑变性的治疗作用。图a-e,受精后1dpf的斑马鱼经过药物处理4d,观察时相为5dpf。虚线所示圆形区域内为脉络膜血管。图a为

阴性对照 (0.1%DMSO), 图 b 为模型组 (1mg/ml 氯化钴), 图 c-e 为不同剂量的舒洛地尔处理组。

[0031] 图 8 为本发明舒洛地尔对脉络膜血管异常增生的抑制率。舒洛地尔对脉络膜血管异常增生的抑制率随着注射剂量的上升而呈现梯度增加, 三个舒洛地尔剂量组抑制率分别为: 0.34 μ g (7.5%), 1.13 μ g (26.7%), 3.39 μ g (36.8%)。

具体实施方式

[0032] 下面结合实施例和附图, 更具体地说明本发明的内容。应当理解, 本发明的实施并不局限于下面的实施例, 优选实施例只是用于说明和解释本发明的内容, 并不构成对本发明内容的限制。尽管发明人已经对本发明做了较为详细地列举, 但是, 本领域的技术人员根据发明内容部分和实施例所揭示的内容, 能对所描述的具体实施例做各种各样的修改或/和补充或采用类似的方式来替代是显然的。

[0033] 在本发明中, 若非特指, 所有的设备和原料等均可从市场购得或是本行业常用的。下述实施例中的方法, 如无特别说明, 均为本领域的常规方法。

[0034] 实施例 1 定性观察舒洛地尔对斑马鱼肠下血管 (SIV) 生成模型的抑制效果

[0035] 斑马鱼:

[0036] 本实施例使用的斑马鱼为血管转基因绿色荧光斑马鱼 (一种由斑马鱼内皮细胞特异表达的基因作为驱动子驱动绿色荧光蛋白在斑马鱼血管内皮细胞特异表达), 饲养和使用标准严格参照美国实验动物管理和使用委员会 (IACUC) 的要求进行。

[0037] 养鱼水的配制方法: 1L 反渗透水 (reverse osmosis (RO) water) 加入 0.3g 海盐 (Instant Ocean salts)。

[0038] 二甲基亚砜 (DMSO, 分析纯): 购买于阿拉丁 (货号 #1095515, 批号 #30573)。0.1% DMSO 溶液 (阴性对照) 配制: 使用时, 用养鱼水配置成浓度为 0.1% 的工作液, 现配现用。

[0039] 洛伐他汀 (阳性对照): 购买于大连美仑, 纯度大于 98% (HPLC 法)。使用时, 用 0.1% DMSO 溶液配置成实验所需的浓度, 本实验中阳性对照药的使用浓度为 10 μ M。

[0040] 舒洛地尔 (Suloctidil): 购买于 Sigma-Aldrich 公司 (货号 #54767-75-8, 批号 #018F0289V), 使用时用 0.1% DMSO 溶液配置成不同浓度的舒洛地尔溶液, 使用浓度分别为 1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M。

[0041] 斑马鱼肠下血管 (SIV, subintestinal vessel) 生长在卵黄囊两侧, 其形状似一个篮子, 肠下血管 (SIV) 由体节腹侧向下延伸的长度约为 50 ~ 100 μ m^[15-16], 见图 1 (72hpf 血管转基因荧光斑马鱼肠下血管模型)。

[0042] 实验方法如下:

[0043] (1) 实验分组及胚胎处理: 取 45 只发育良好的斑马鱼胚胎, 胚胎发育时相为受精后 48hpf (hour-postfertilization, hpf), 随机分为 3 组 (阴性对照组, 药物组, 阳性对照组), 每组胚胎数量为 15 只。操作时将胚胎均匀分配至 48 孔细胞培养平板 (Greiner, 德国) 中, 每孔 15 只胚胎, 每孔胚胎饲养用水 1ml。

[0044] (2) 药物处理: 用移液器 (量程 100 ~ 1000 μ l, Eppendorf) 迅速将预先配置好的药液加入 48 孔细胞培养平板对应的孔中, 每孔 1ml。加药液之前, 用移液器 (量程 10 ~ 1000 μ l, Eppendorf) 将 48 孔板中孵育胚胎的饲养用水尽力移出, 此操作需在短时间内预先

完成,以防止胚胎干燥。实验环境温度控制在 28.5℃左右,相对湿度 40 ~ 70%。然后用锡箔纸将 48 孔板包裹好,做好实验标记,迅速放置于斑马鱼培养箱中继续培养 24h(培养箱温度控制在 28.5±0.5℃)。

[0045] (3) 表型观察及统计:在体式显微镜下观察各孔胚胎的表型,观察指标:观察药物对胚胎发育、血液循环,心脏跳动等方面的影响。然后,将血液循环受到影响的胚胎置于体式荧光显微镜(Nikon AZ100 体式荧光显微镜)下进一步观察拍照,拍照时相为 72hpf,以确认血管生成抑制表型。

[0046] 实验结果见图 2:5 μM 舒洛地尔显著抑制斑马鱼肠下血管(SIV)的生成,表现为肠下血管面积减小。

[0047] 实施例 2 定量评价舒洛地尔对斑马鱼肠下血管(SIV)生成模型的抑制效果

[0048] 实验方法:

[0049] (1) 实验分组及胚胎处理:取 210 只发育良好的斑马鱼胚胎,胚胎发育时相为受精后 48hpf(hour-postfertilization, hpf),随机分为 7 组,见下表:

[0050]

组别	药物浓度	药物处理时间窗口
阴性对照	0.1% DMSO	48~72hpf
	1 μM	
	2.5 μM	
	5 μM	
	10 μM	
	25 μM	
阳性对照	10 μM 洛伐他汀	

[0051] 每组斑马鱼胚胎数量 30 只。操作时将胚胎均匀分配至 48 孔细胞培养平板(Greiner, 德国)中,每孔 15 只胚胎,每个药物浓度处理 30 只胚胎,每孔胚胎饲养用水 1ml。

[0052] (2) 药物处理:见实施例 1 中的实验方法操作步骤(2)。

[0053] (3) 表型观察及定量统计:将各药物浓度处理后的胚胎在体式荧光显微镜(Nikon AZ100 体式荧光显微镜)下进行观察拍照,拍照时相为 72hpf,以分析各药物浓度对斑马鱼肠下血管(SIV)生成的影响。从各实验组随机取 10 只胚胎进行定量统计,统计指标如下:

[0054] ① 肠下血管面积(SIV area):利用 Nikon AZ100 体式荧光显微镜配置的 NIS-Elements 3.1 软件进行计算

[0055] ② 肠下血管(SIV)生成抑制率(%) = $(1 - \frac{\text{药物处理组 SIV 面积}}{\text{阴性对照组 SIV 面积}}) \times 100\%$

[0056] 利用 GraphPad Prism 软件进行统计作图,并计算舒洛地尔抑制斑马鱼肠下血管(SIV)生成的 IC₅₀,实验结果见图 3~图 4:舒洛地尔对斑马鱼肠下血管(SIV)生成的抑制率随着浓度的上升而呈现梯度增加,各浓度舒洛地尔组对斑马鱼肠下血管(SIV)生成的抑制率分别为:1 μM (5.30%),2.5 μM (26.45%),5 μM (54.35%),10 μM (84.31%),25 μM (100%),IC₅₀ 为 4.68 μM。

[0057] 实施例 3 斑马鱼人类乳腺癌(MCF-7)移植模型评价舒洛地尔的抗肿瘤药效

[0058] 实体肿瘤的生长和扩散依赖于肿瘤内新血管的形成,并通过新生血管获取养分;

新血管的形成和生长,促进了肿瘤细胞的转移。本实施例用于说明舒洛地尔能够抑制肿瘤的生长和迁移。实验方法如下:

[0059] (1) 实验分组及胚胎处理:取 150 只移植有人类乳腺癌(MCF-7)细胞的斑马鱼胚胎,胚胎发育时相为受精后 2dpf (day-postfertilization, dpf),随机分为 5 组,见下表:

[0060]

组别	药物浓度	药物处理时间窗口
阴性对照	0.1% DMSO	2~6dpf
舒洛地尔	1 μ M	
	2.5 μ M	
	10 μ M	
阳性对照	1000 μ M 5-FU	

[0061] 每组斑马鱼胚胎数量 30 只。操作时将胚胎均匀分配至 6 孔细胞培养平板(Greiner, 德国)中,每孔 30 只胚胎,每个药物浓度处理 30 只胚胎,每孔胚胎饲养用水 3ml。

[0062] (2) 药物处理:用移液器迅速将预先配置好的药液加入 6 孔细胞培养平板对应的孔中,每孔 3ml。然后用锡箔纸将 6 孔板包裹好,做好实验标记,放置于斑马鱼培养箱中继续培养 4d(培养箱温度控制在 35.5 \pm 0.5 $^{\circ}$ C)。

[0063] (3) 表型观察及定量统计:将各浓度药物处理后的胚胎在体式荧光显微镜(Nikon AZ100 体式荧光显微镜)下进行观察拍照,拍照时相为 6dpf,以分析各药物浓度对斑马鱼人类乳腺癌(MCF-7)移植模型的抑制作用。从各实验组随机取 10 只胚胎进行定量统计,统计指标如下:

[0064] ① 定性评价舒洛地尔对肿瘤转移的抑制作用;

[0065] ② 定量评价舒洛地尔对肿瘤生长的抑制作用:利用尼康 NIS-Elements 3.1 软件计算肿瘤细胞荧光强度(S),统计学处理结果以 mean \pm SE 表示;舒洛地尔对肿瘤生长的抑制效果计算公式如下:

$$[0066] \quad \text{肿瘤生长抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{S(\text{药物处理组})}{S(\text{阴性对照组})}\right) \times 100\%$$

[0067] 利用 GraphPad Prism 软件进行统计作图,实验结果见图 5~图 6:舒洛地尔对人类移植癌细胞生长的抑制率随着浓度的上升而呈现梯度增加,三个浓度舒洛地尔组抑制率分别为:1 μ M (10.8%),2.5 μ M (23.2%),10 μ M (48.6%)。

[0068] 实施例 4 定量评价舒洛地尔对湿性老年视黄斑变性的治疗作用

[0069] 湿性老年视黄斑变性主要因为脉络膜血管异常生成,新生的无效微血管出现渗漏,血管渗漏的液体进而破坏黄斑。氯化钴能够诱导斑马鱼视网膜脉络丛血管增生、视细胞变性,类似于人类湿性老年视黄斑变性的改变^[26]。本实施例用于说明舒洛地尔对湿性老年视黄斑变性具有治疗效果。实验方法如下:

[0070] (1) 实验分组及胚胎处理:取 150 只发育良好的斑马鱼胚胎,胚胎发育时相为受精后 1dpf (day-postfertilization, dpf),随机分为 5 组,见下表:

[0071]

组别	药物剂量	药物处理时间窗口
阴性对照	0.1% DMSO	1~5dpf
模型组	1mg/ml 氯化钴	
治疗组	0.34 μ g 舒洛地尔+1mg/ml 氯化钴	
	1.13 μ g 舒洛地尔+1mg/ml 氯化钴 3.39 μ g 舒洛地尔+1mg/ml 氯化钴	

[0072] 每组斑马鱼胚胎数量 30 只。操作时将胚胎均匀分配至 6 孔细胞培养平板 (Greiner, 德国) 中, 每孔 30 只胚胎, 每孔胚胎饲养用水 3ml。

[0073] (2) 药物处理: 阴性对照组中加入 DMSO, 使其终浓度为 0.1%; 模型组中加入氯化钴, 使其终浓度为 1 mg/ml; 舒洛地尔通过显微注射方式给药, 每组均注射 30 只胚胎, 注射后将胚胎按组分别放入 3ml 含有 1 mg/ml 氯化钴的饲养用水中。

[0074] (3) 表型观察及定量统计: 将各剂量药物处理后的胚胎在体式荧光显微镜 (Nikon AZ100 体式荧光显微镜) 下进行观察拍照, 拍照时相为 5dpf, 以分析各药物剂量对斑马鱼眼部脉络膜异常增生血管的抑制作用。从各实验组随机取 10 只胚胎进行定量统计, 统计指标如下:

[0075] ①定性评价舒洛地尔对眼部脉络膜异常增生血管的抑制作用;

[0076] ②定量评价舒洛地尔对脉络膜异常增生血管的抑制作用: 利用 NIS-Elements 3.1 软件计算脉络膜异常增生血管荧光强度 (S), 统计学处理结果以 mean \pm SE 表示; 舒洛地尔对脉络膜异常增生血管的抑制效果计算公式如下:

$$[0077] \quad \text{脉络膜血管异常增生抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{S(\text{药物处理组})}{S(\text{模型组})}\right) \times 100\%$$

[0078] 利用 GraphPad Prism 软件进行统计作图, 实验结果见图 7~图 8: 舒洛地尔对脉络膜血管异常增生的抑制率随着剂量的上升而呈现梯度增加, 三个舒洛地尔剂量组抑制率分别为: 0.34 μ g (7.5%), 1.13 μ g (26.7%), 3.39 μ g (36.8%)。

[0079] 参考文献:

[0080] [1] Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Apr;6(4):273-86.

[0081] [2] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996 Aug 9;86(3):353-64.

[0082] [3] Li CY, Shan S, Cao Y, et al. Role of incipient angiogenesis in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2000;19(1-2):7-11.

[0083] [4] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):249-57.

[0084] [5] Ma WW, Adjei AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 2009 Mar-Apr;59(2):111-37.

[0085] [6] Cook KM, Figg WD. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J Clin.* 2010 Jul-Aug;60(4):222-43.

[0086] [7] 关大刚. 重组人血管内皮抑素联合化疗临床应用进展 [J]. 现代肿瘤医学,

2011,19 (2):400-403.

[0087] [8] 房玉新,常静. 老年黄斑变性患者的新希望抗血管内皮生长因子治疗 [J]. 中华医学信息导报,2007,22 (24):16-17.

[0088] [9] 李海蓉,李建华. Anti-VEGF 治疗湿性老年黄斑变性的临床评估及应用. 中国医药指南,2010,8 (25):32-35.

[0089] [10] Baxendale S, Holdsworth CJ, Meza Santoscoy PL, et al. Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Dis Model Mech.* 2012 Sep 20.

[0090] [11] Cheng J, Gu YJ, Wang Y, et al. Nanotherapeutics in angiogenesis: synthesis and in vivo assessment of drug efficacy and biocompatibility in zebrafish embryos. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:2007-21.

[0091] [12] Serbedzija GN, Flynn E, Willett CE. Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening. *Angiogenesis.* 1999;3(4):353-9.

[0092] [13] Hasan J, Shnyder SD, Bibby M, et al. Quantitative angiogenesis assays in vivo—a review. *Angiogenesis.* 2004; 7: 1-16.

[0093] [14] Nicoli S, Presta M. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nat Protoc.* 2007;2(11):2918-23.

[0094] [15] Chan J, Bayliss PE, Wood JM, et al. Dissection of angiogenic signaling in zebrafish using a chemical genetic approach. *Cancer Cell.* 2002 Apr;1(3):257-67.

[0095] [16] Murphy EA, Shields DJ, Stoletov K, et al. Disruption of angiogenesis and tumor growth with an orally active drug that stabilizes the inactive state of PDGFRbeta/B-RAF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Mar 2;107(9):4299-304.

[0096] [17] Wang C, Tao W, Wang Y, et al. Rosuvastatin, identified from a zebrafish chemical genetic screen for antiangiogenic compounds, suppresses the growth of prostate cancer. *Eur Urol.* 2010 Sep;58(3):418-26.

[0097] [18] Arbiser JL, Kau T, Konar M, et al. Solenopsin, the alkaloidal component of the fire ant (*Solenopsis invicta*), is a naturally occurring inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase signaling and angiogenesis. *Blood.* 2007 Jan 15;109(2):560-5.

[0098] [19] Yabu T, Tomimoto H, Taguchi Y, et al. Thalidomide-induced antiangiogenic action is mediated by ceramide through depletion of VEGF receptors, and is antagonized by sphingosine-1-phosphate. *Blood.* 2005 Jul 1;106(1):125-34.

[0099] [20] Herpers R, van de Kamp E, Duckers HJ, et al. Redundant Roles for Sox7 and Sox18 in Arteriovenous Specification in Zebrafish. *Circ Res.* 2008 Jan 4;102(1):12-5.

[0100] [21] Marques IJ, Weiss FU, Vlecken DH, et al. Metastatic behaviour of

- primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. *BMC Cancer*. 2009 [0101] Apr 28; 9(1):128.
- [0102] [22] Konantz M, Balci TB, Hartwig UF, et al. Zebrafish xenografts as a tool for in vivo studies on human cancer[J]. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2012, (1266): 124-137.
- [0103] [23] Chu DLH, Li VWT, Yu RMK. Leptin: Clue to poor appetite in oxygen-starved fish[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, (319): 143-146.
- [0104] [24] Rooijen E, Voest EE, Logister I, et al. Von Hippel-Lindau tumor suppressor mutants faithfully model pathological hypoxia-driven angiogenesis and vascular retinopathied in zebrafish[J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2010, (3): 343-353.
- [0105] [25] Bibliowicz J, Tittle RK, Gross JM. Towards a better understanding of human eye disease: insights from the zebrafish, *Danio rerio*[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2011, (100): 287-330.
- [0106] [26] Yu RM, Chu DL, Tan TF, et al. Leptin-mediated modulation of steroidogenic gene expression in hypoxic zebrafish embryos: implications for the disruption of sex steroids[J]. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(16): 9112-9119.

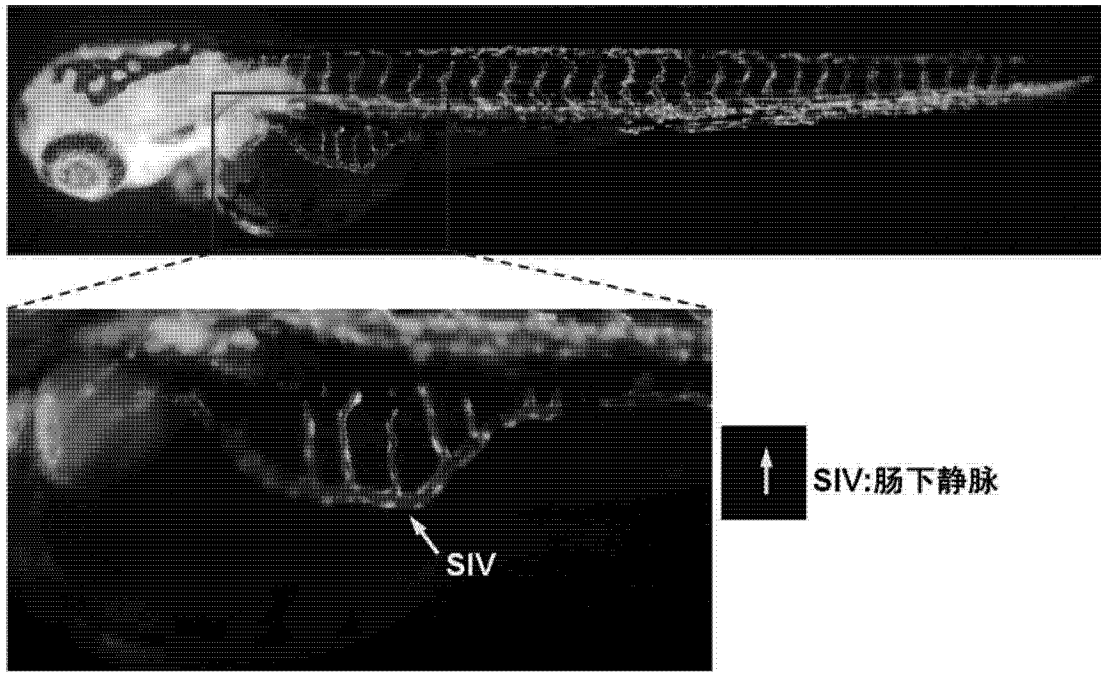


图 1

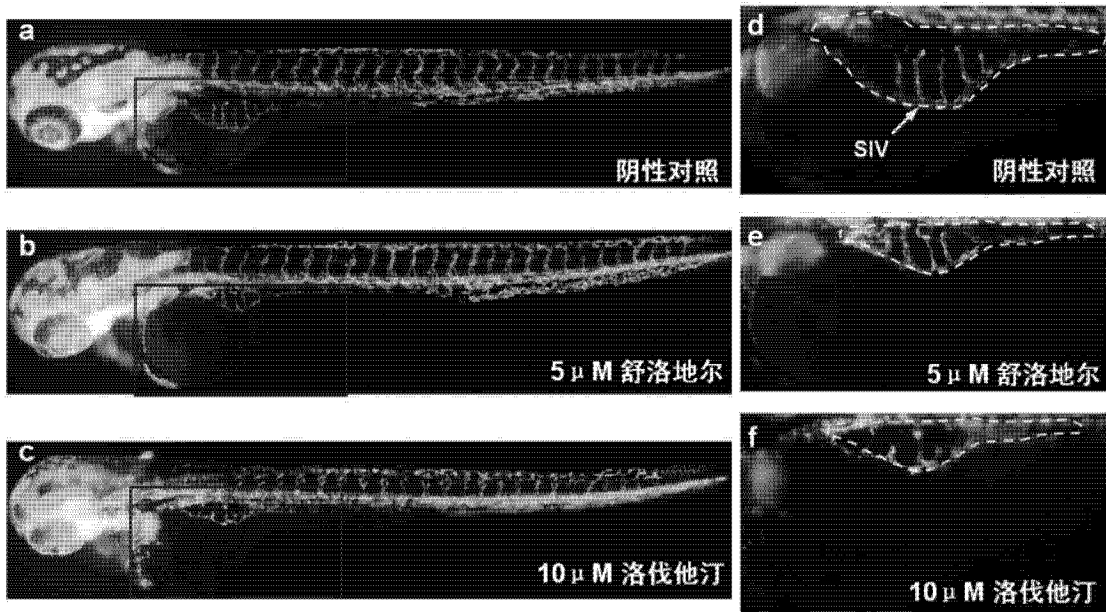


图 2

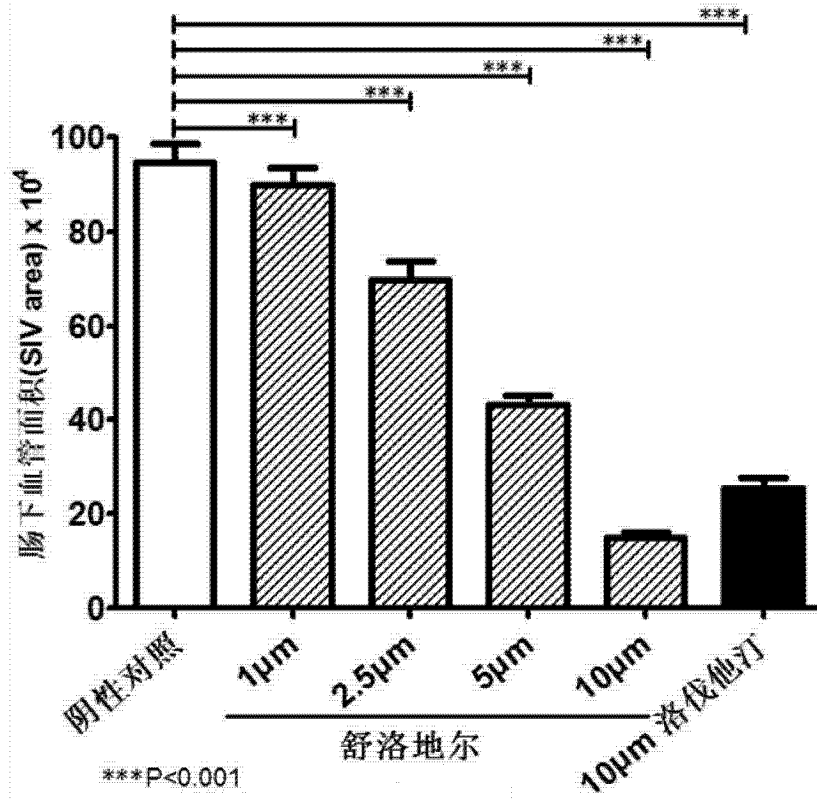


图 3

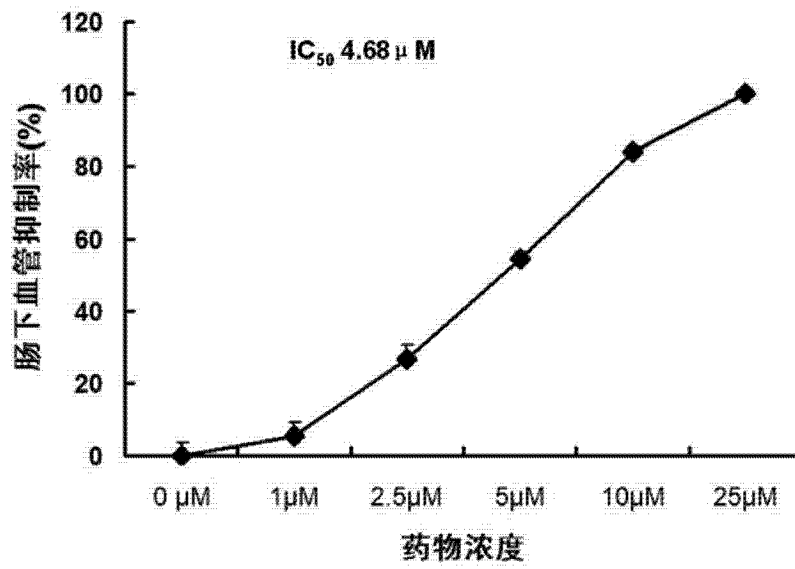


图 4

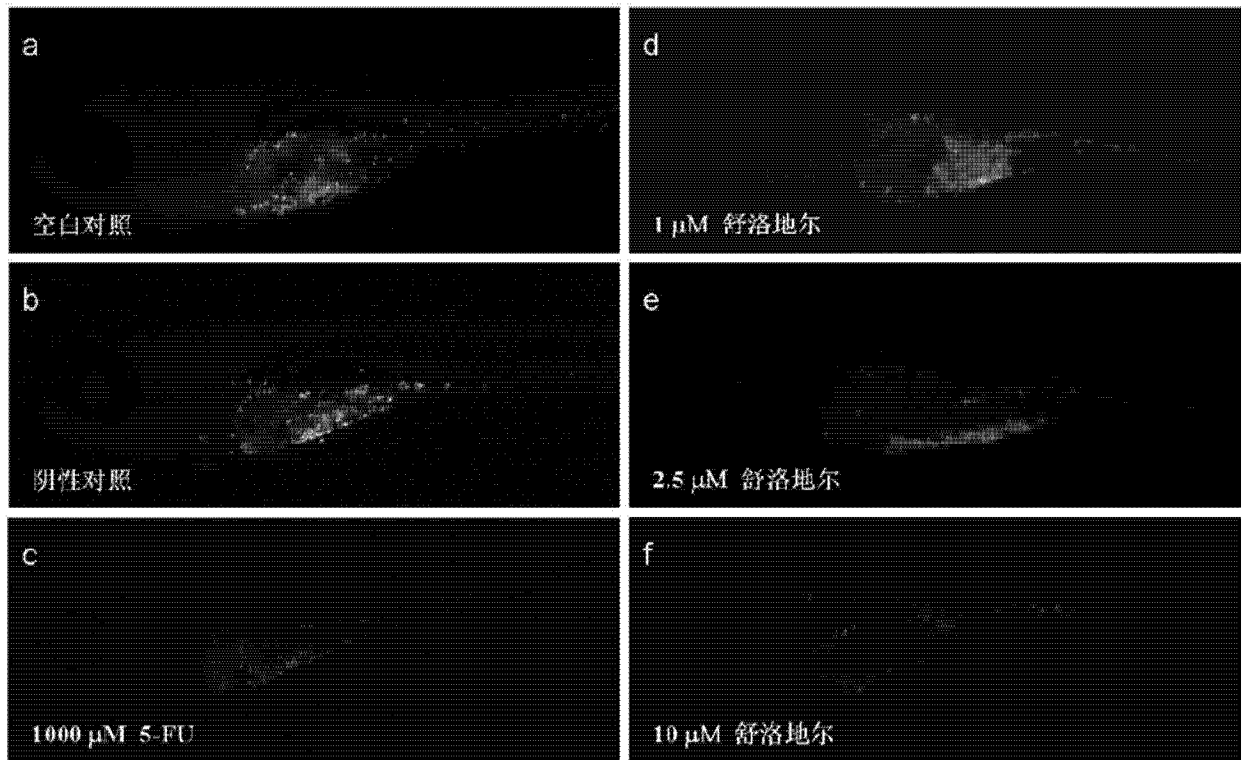


图 5

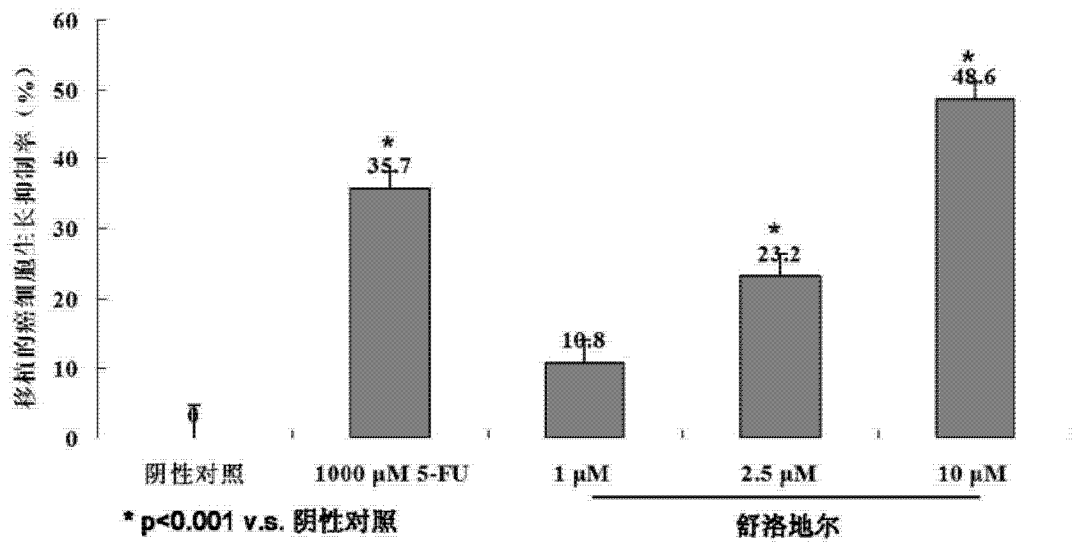


图 6

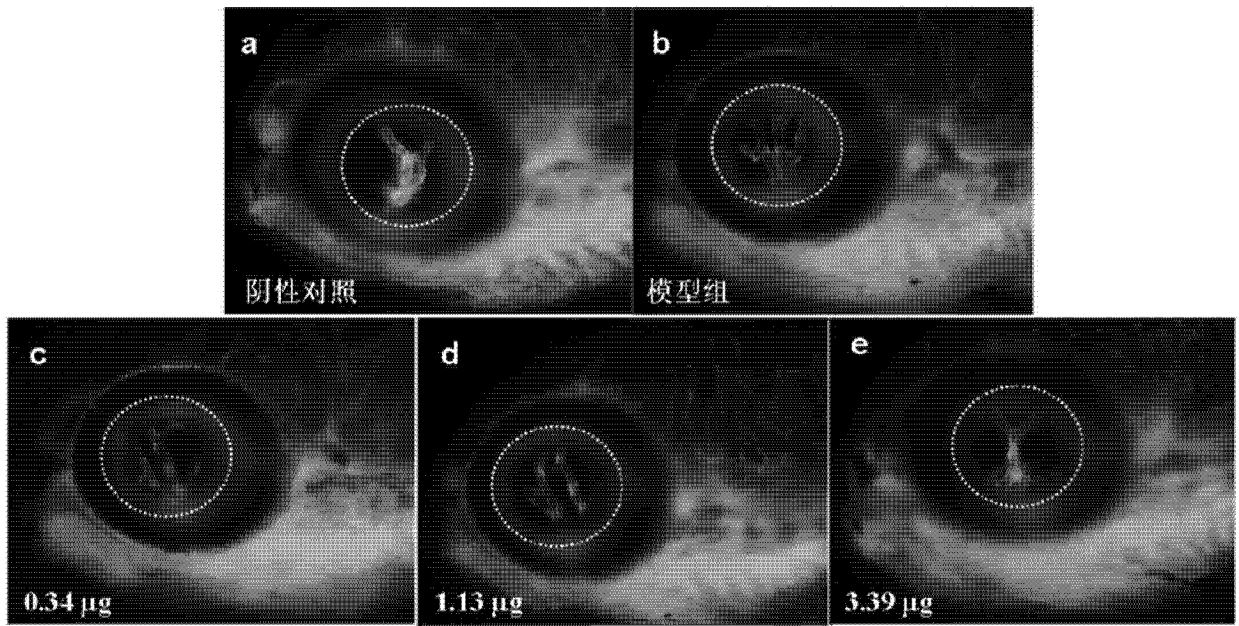


图 7

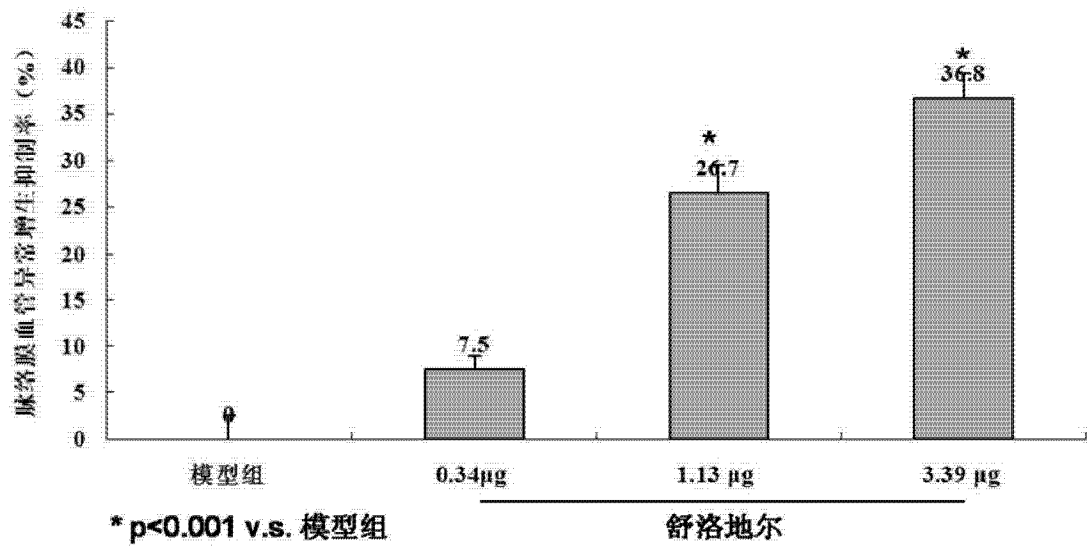


图 8