

· 综述 ·

作用于微管的天然产物

崔 萍, 霍长虹, 李力更, 张嫚丽, 史清文

(河北医科大学药学院 天然药物化学教研室, 河北 石家庄 050017)

摘 要:微管在有丝分裂中扮演着重要的角色,微管靶点药物是抗肿瘤药物的重要组成部分。很多天然产物能作用于微管的不同部位,其中包括紫杉醇类和长春花碱类。根据这些天然产物对微管蛋白聚合所起的促进作用或抑制作用,将其划分成两类,着重讨论它们的来源、作用机制和生物活性。

关键词:微管;微管蛋白;天然产物

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)01-0139-09

Microtubule-interactive natural products

CUI Ping, HUO Chang-hong, LI Li-geng, ZHANG Man-li, SHI Qing-wen

(Department of Medicinal Natural Product Chemistry, College of Pharmaceutical Sciences, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Key words: microtubule; tubulin; natural products

微管(microtubule)是细胞骨架的重要组成部分,在细胞生长、维持形态、细胞的信号转导以及有丝分裂等过程中都起着重要作用。因其在有丝分裂中的重要作用,使之成为抗癌药物的有力靶点。天然产物作用于微管有两种作用方式:抑制微管聚合,使纺锤体不能形成,从而使细胞分裂停止在有丝分裂中期;或是促进微管聚合,抑制微管解聚,从而抑制细胞分裂。自 20 世纪 90 年代以来,具有促微管聚合活性的化合物引起了研究者的广泛兴趣,其中具有里程碑意义的微管稳定剂是已经应用于临床的天然抗肿瘤药物紫杉醇(Paclitaxel, Taxol)及其类似物紫杉特尔(Docetaxel, Taxotere)。紫杉醇通过稳定微管聚合体,抑制其解聚,使细胞复制终止在 M 期,进而引起细胞凋亡,已经被广泛用于临床实体瘤化疗,特别是对卵巢癌、肺癌和乳腺癌有很好的疗效。这些都促使人们对以微管为靶点的天然产物进行更加深入和广泛的研究。目前除了从陆地植物中提取分离作用于微管的天然产物外,海洋生物和细菌等生物中也发现了许多具有此作用的天然产物,并且通过自己独特的作用机制来影响微管的聚合和解聚过程。

1 微管的结构和功能

1.1 微管的结构:微管为存在于所有真核细胞中的动态多聚物结构,是细胞内运输载体并构成细胞骨架,更为重要的是在细胞的有丝分裂中起作用。微管为管状结构(外径 22~26 nm,壁厚约 5 nm),由两个结构相似的蛋白质亚基,即 α -和 β -微管蛋白(tubulin)的异二聚体组装而成。两种微管蛋白均含有大约 440 个氨基酸残基,在序列上具有 42% 的同源性。在细胞内,微管蛋白异二聚体在微管相关蛋白(microtubule associate proteins, MAPs)的保护下形成长链,

即原丝(protofilament),并进一步组装成含 13 根原丝、螺旋状的微管。微管的这种管状结构不断以不对称方式在一端生长(正极),在另一端解离(负极)。2001 年,Leew 等^[1]用 X 射线结晶衍射法得到了 0.35 nm 分辨率的紫杉醇诱导并由紫杉醇稳定的 $\alpha\beta$ 异二聚体的三维结构,并标示出鸟苷三磷酸、核酸和紫杉醇的结合区域。此外,微管家族中还有量较少的 γ -微管蛋白,通常位于微管的负端,是微管组织中心的组成成分,连接微管和中心体,在微管的装配和取向等方面发挥着重要的调节作用。

1.2 微管的功能:在细胞内微管以胞质微管和纺锤体微管两种形式存在,主要参与细胞运动、细胞器的定位、胞内物质的运输及真核细胞的有丝分裂过程。细胞进入分裂期,其胞质微管解聚成微管蛋白后再组装成纺锤体微管。在分裂后期,纺锤体微管牵引着姊妹染色单体从赤道面移向纺锤体的两极。在有丝分裂结束后,纺锤体微管解聚再组装成胞质微管。因此,这种微管蛋白/微管之间的动态循环(聚合和解聚)为细胞正常有丝分裂所必需。若破坏此循环将致使进入有丝分裂期的细胞停止分裂,进而延长细胞周期和诱导细胞凋亡。肿瘤细胞具有快速增殖能力,其有丝分裂过程频繁且细胞周期明显短于正常细胞。因此,若破坏上述的动态循环,必将影响到肿瘤细胞的有丝分裂过程,使其生长受到抑制或者诱导肿瘤细胞的凋亡。按照破坏微管蛋白/微管循环的机制,可将药物对微管的作用分为两类:促进微管蛋白聚合并稳定已形成的微管(抑制微管解聚)和抑制微管蛋白的聚合。这两类天然产物分别以紫杉醇和长春花生物碱为代表,作用机制见图 1。

① 收稿日期:2009-07-10

*通讯作者 史清文 Tel:(0311)86265634 E-mail:shiqingwen@hebmh.edu.cn

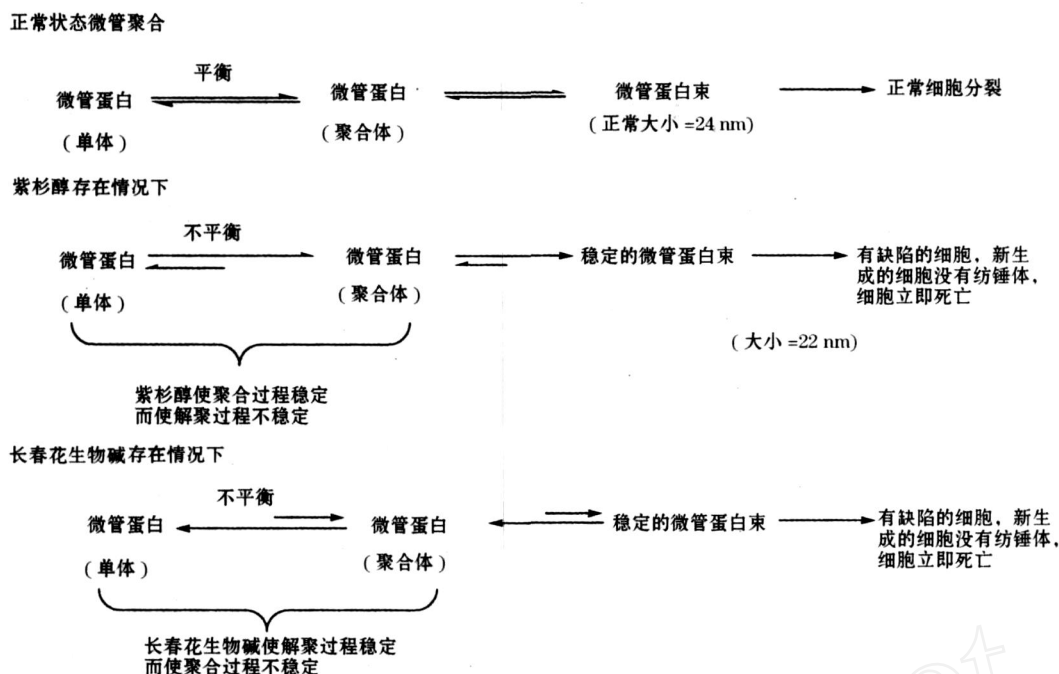


图 1 紫杉醇和长春花生物碱对微管的作用机制

Fig. 1 Mechanism of taxol and vinca alkaloids acting on microtubule

2 稳定微管的天然产物

稳定微管的药物的作用机制类似:在 β 微管蛋白上的结合腔靠近异二聚体和原丝间的重要作用区域,因而在药物与微管蛋白结合的同时也加强了异二聚体和原丝间的结合,结果促进了微管蛋白的聚合又能稳定已形成的微管(抗低温及抗 Ca^{2+} 的解聚),使细胞分裂停止于 G_2/M 期。因这类药物能与紫杉醇竞争同 β 微管蛋白的结合,推测它们具有交叉的结合位点。目前文献报道具有稳定微管作用的天然产物包括下面几类。

2.1 紫杉醇及其衍生物(taxol and analogue):1971年,紫杉醇首次从短叶紫杉 *Taxus brevifolia* Nutt. 的树皮中被发现并分离,属于复杂的二萜类化合物。它的水不溶性使其在发现之初并未被作为有效药物考虑,但由于其特殊的作用机制和良好的化疗效果,在改进给药方式后,紫杉醇及其类似物 docetaxel 已成为目前临床上较成功的抗癌药物。突变分析表明,紫杉醇与微管蛋白的相互作用受 β_2 微管蛋白的270和364位氨基酸残基调节,结合位点在 β_2 微管蛋白N末端的31个氨基酸片段和217~231位的氨基酸片段^[2],可体外诱导微管蛋白在低温、不含GTP或MAPs条件下形成超稳定的微管结构,对 Ca^{2+} 和低温的解聚作用有一定的抗性。紫杉醇具有很强的抑制肿瘤细胞活性, IC_{50} 值小于10 nmol/L(耐药细胞株系除外),对肿瘤细胞生长的作用与对纯化的微管蛋白的作用一致^[3]。对p2糖蛋白表达型MDR细胞株表现出与阿霉素、长春碱和放线菌素D有高度交叉耐药性^[4]。此外,紫杉醇还能诱导细胞中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)基因的表达,提高蛋白质,包括MAP激酶和Raf21激酶的酪氨酸残基的磷酸化水平^[5]。同时其与细胞接触会诱发DNA断裂,诱导细胞凋亡^[6]。

2.2 埃博霉素类(epothilones):1993年从纤维堆囊粘菌 *Sorangium cellulosum* 中分离出新的16元大环内酯类化合物epothilones A和B^[7];进而发现epothilones具有促微管聚合活性^[8]。与紫杉醇相似,epothilones可诱导微管蛋白在体温和不含GTP或MAPs条件下形成微管。其诱导微管蛋白的聚合反应可以被MAPs、GTP或反应温度的升高而加强^[9]。Epothilones是[3H]-紫杉醇与微管结合的竞争性抑制剂(表现 K_i 值为216 mmol/L);与紫杉醇不同的是,epothilones对p2糖蛋白表达型MDR细胞株和肿瘤依然保持活性。在MDR细胞株CCRF-CEM/VBL100中,epothilones A、B和紫杉醇的 IC_{50} 值分别为0.02和0.002和4.14 mmol/L。在紫杉醇敏感细胞株中,epothilone B比epothilone A或紫杉醇具有更强的抑制活性;而epothilone A的活性通常小于紫杉醇,与对纯化的微管蛋白的作用一致^[10]。Potoroustridactylis的肾上皮(Pt K2)细胞间接免疫荧光测定显示,经epothilone B处理后微管聚合的速度更快。另一方面,紫杉醇的内毒素样活性在临床化疗中可能引起非血液性不良反应,而epothilones不引发细胞的内毒素信号途径^[11]。

2.3 箭根薯酮内酯(taccalonolides):是从箭根薯 *Tacca plantaginea* Andr. 中发现的甾体类化合物,包括taccalonolides A~V。在这些化合物中,taccalonolide A曾由Chen等在1987年从中药车前中分离得到,有报道称其对小鼠P388肿瘤细胞有抗增殖活性。Moobeery等^[13]报道,taccalonolides A、E是自紫杉烷类化合物发现以来的又一个微管稳定剂,这个结论是根据观测大量的微管抑制细胞学效应的数据得到的。Taccalonolide A和E有A-10细胞中能使微管增厚并且导致停滞于 G_2/M 期,并形成异常的有丝分裂纺锤体,包括3个或多个纺锤极。另外,taccalonolide E能诱导抗细

胞凋亡蛋白 Bcl-2 的磷酸化,进而导致细胞中溶解产物 MAPK 通路的活化和细胞凋亡蛋白酶的激活。Taccalonolides A 和 E 还能抑制人卵巢癌细胞株 SK-OV-3 的扩散,其半数抑制浓度 IC_{50} 分别是 $2.59 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.99 \mu\text{mol/L}$ (紫杉醇在这细胞系的 IC_{50} 是 2.25 nmol/L),与紫杉醇相比,它们似乎不易受 P-gp 介导的药物外流。然而,在 Moobeery 等^[13]实验中,没有数据表明 taccalonolides A 和 E 在体外对微管蛋白聚合有影响。因此,这些化合物与微管的直接结合引起了人们对于 taccalonolides 是否具有紫杉醇类化合物的作用这个问题的探讨。

2.4 Jatrophone esters:是一大类从不同的大戟属植物中提取的大环二萜类化合物。在希腊和罗马的医学著作中提到的治疗增生类疾病的药物中普遍含有这一属的植物。在中医典籍中,治疗类似疾病也包含有这些植物。2003 年, Miglietta 等^[14]报道 jatrophone esters J1~J3 在体内能诱导微管聚合,尽管微管蛋白的聚合是在缺 Ca^{2+} 的条件下观察到的并且聚合的程度远没有紫杉醇类化合物诱导的稳定。在适当的实验条件下 jatrophone esters J1~J3 表现出与紫杉醇类化合物相当的促微管聚合效应。在 MCF-7 乳腺癌细胞和 3T3 成纤维细胞中,jatrophone esters J1~J3 对分裂间期的微管蛋白只有极微小的影响。在高浓度的实验中,jatrophone esters J1~J3 不能引起 MCF-7 细胞在有丝分裂中的聚集。基于 Miglietta 等^[14]监测的是一个相对短的潜伏期(24 h),而紫杉醇类化合物在这样短的实验条件下并没有显示出任何细胞毒性;加之 Buey 等^[15]在近期的一个关于微管稳定剂的一系列化合物的对照实验中并没有发现任何关于 jatrophone esters J1~J3 能诱导微管蛋白聚合的证据。所以 jatrophone esters 的作用可能还需要进一步的证实。

2.5 阿魏醇(ferulenol):阿魏醇是早在 1963 年就从伞形科植物大茴香 *Illicium verum* Hook. f. 中分离到的一种异戊烯化的香豆素类化合物^[56]。Bocca 等在 2002 年报道在无 Ca^{2+} 情况下阿魏醇和紫杉醇有同等的促进微管聚合作用,两种化合物所诱导的微管聚合的配体浓度在 10 nmol/L 。许多项早期的研究表明,紫杉醇引起的最大的微管聚合通常要达到 1:1(微管:taxol)的比率(在 Bocca 等的实验条件下,要求其配体浓度远远大于 10 nmol/L)。虽然 ferulenol 能引起 MCF-7 人乳房癌细胞微管网状系统的重组,并且能影响核形态,但这些影响比同摩尔浓度的紫杉醇引起的微弱得多。另外,阿魏醇并不阻碍细胞的有丝分裂。在用 $1 \mu\text{mol/L}$ 阿魏醇处理 MCF-7 细胞 24 h 后,导致了其成活率下降了 50%,这种现象在 HL60、Caco-2 和 SK-OV-3 细胞也能观察到。

2.6 小白菊内酯(parthenolide)和广木香内酯(costunolide): Parthenolide 是草本小白菊 *Tanacetum parthenium* Tzvel. 中的一个倍半萜内酯类成分。野甘菊的制剂具有抗炎的作用^[16];也有报道其在体外能抑制人癌细胞的生长^[17]。Miglietta 等^[18]对 parthenolide 和微管-微管蛋白系统的相互作用进行了研究。Parthenolide 与 jatrophone esters J1~J3、阿魏醇(ferulenol)一样,在 37°C (缺少 GTP 的

条件下能诱导牛脑微管蛋白的聚合,但其活性低于紫杉醇,形成的聚合物经由电子显微术证明是微管;但是与紫杉醇诱导的聚合物相反,在缺 Ca^{2+} 的情况下很容易解聚。在细胞水平(MCF-7 人乳腺癌细胞), 100 nmol/L 的 parthenolide 能导致分裂间期微管网状系统呈现可看得见的变化,但是程度远不如紫杉醇引起的剧烈。Parthendide 对核的形态没有影响;在经过 20 h 处理后能减少 MCF-7 细胞的数量,但并不呈现浓度依赖性。还有一个研究是将细胞用 parthenolide 预先进行 4 h 处理后,再用 10 nmol/L 的紫杉醇进行处理,在这个条件下细胞效应明显地增强,包括可探测到的活的细胞数量也有所减少。但是这些实验没有进行定量分析。

Costunolide 是存在于广木香中的倍半萜内酯。Bocca 的实验表明 costunolide 能作用于核内组织并且能够重组微管蛋白,其抗增殖和作用于微管的效应不受紫杉醇的影响。同时, costunolide 对微管的作用已被体外实验所证实^[19]。

2.7 吴茱萸碱(evodiamine):吴茱萸碱是中药吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥未成熟的果实中的主要活性成分。有研究表明,吴茱萸碱能抑制肿瘤细胞的增殖及病灶的转移^[20,21]。在一项研究紫杉醇在体外和体内对抗人乳腺癌细胞 NCI/ADRRE 的实验中,发现 evodiamine 能显著地延长这些细胞的微管蛋白的结合($1 \mu\text{mol/L}$),并且能显著影响微管蛋白的解聚和聚合之间的平衡(在 $10 \mu\text{mol/L}$)^[22]。这些发现有力地支持了 evodiamine 具有间接抗 NCI/ADRRES 细胞增殖的活性($GI_{50} 0.59 \mu\text{mol/L}$),可能是一个微管稳定剂,尽管对微管-微管蛋白系统的影响仅仅是一部分。这个假设后来得到了证实, evodiamine 确实能使细胞分裂停止于 G_2/M 期,导致 c-rac 和 Bcl-2 的磷酸化,诱导细胞凋亡^[22]。然而必须强调的是 evodiamine 与微管或微管蛋白结合能在体外诱导微管蛋白的聚合都还没有直接的证据。因而,该化合物对 NCI/ADRRES 细胞的影响不能不是作用于微管-微管蛋白系统,而是由一个未知的靶点所引起的(这种情况在 taccalonolides 曾经出现过)。

2.8 FR182877(cyclostreptin):FR182877 也称 WS9885B 或 cyclostreptin,是一种细菌的代谢产物,由日本藤泽公司于 2000 年在链霉菌属 9885 号发酵液中得到^[23]。此化合物能在体外诱导微管蛋白的聚合,从而引起细胞周期停滞于 G_2/M 期,并且能以双位数纳摩尔浓度的 IC_{50} 抑制人癌细胞的生长,也能表现出微管稳定剂的所有特征。FR182877 在体外的抗增殖活性远不如紫杉醇,但是其却在体内显示出一定的抗癌活性。2004 年,Adam 等^[24]发现 FR182877 是一个羧酸酯酶-1 的抑制剂,但是这个潜在的功能在细胞水平还没有进一步的研究,仅在 2005 年报道了此化合物与微管-微管蛋白系统作用的研究^[25]。Hamel 实验室将其命名为 cyclostreptin,并证实了 cyclostreptin 的抗增殖活性,其能在体内抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞和 1A9 卵巢癌细胞的生长,比紫杉醇的活性低 7~12 倍,但对抗肾上皮细胞的蛋白酪氨酸激酶活性却高出紫杉醇大约 25 倍。此化合物表现出了在含有微管蛋白突变基因的细胞株内与紫杉醇和 epothilone A 的交叉

耐药性。在与紫杉醇同等浓度的条件下,对 Pt K2 细胞内的微管网状系统的影响是非常相似的,但是以各自的最小抑制浓度下,cyclostreptin 抑制 MCF-7 细胞系有丝分裂的部分活性却明显高于紫杉醇(52% : 8%)。根据其较低的抗增殖活性,发现 cyclostreptin 仅能在体外微弱的诱导微管蛋白聚合,但是结果表明其抑制微管蛋白解聚的活性至少与紫杉醇相当。但是令人惊讶的是,cyclostreptin 甚至具有比 epothilone A 更高的从微管中替代放射性示踪的紫杉醇的活性。放射性同位素示踪的紫杉醇与“正常”的微管替代实验的结果被随后的研究微管交叉连接和荧光 taxol 类似物 Flutax-2 的竞争实验所证实,并给出了 cyclostreptin 在 35 °C 的一个近似的表观结合常数 (K_{app}) 为 2.06×10^7 L/mol, 其值在 taxol 和 docetaxol 之间(分别为 1.43×10^7 和 3.93×10^7 L/mol)。然而,与二者相比,cyclostreptin 的 K_{app} 在 4 °C 减少了约 60,而对于 docetaxel 和 taxol,其亲和力在本质上没有什么改变。在低温条件下其结合常数的减少是一个一般的结果,事实就是微管与 cyclostreptin 的结合是由熵变所驱动的,并且是一个吸热过程。相反,taxol 或 docetaxol 的结合是以放热的模型为特征的。这些温度效应解释了 cyclostreptin 的微管结合模型^[25]。根据这个模型^[25],cyclostreptin 与蛋白形成的氢键远远少于 taxol,并且主要取决于结合的疏水作用。Cyclostreptin 在低温下能诱导微管具有很高的稳定性,并且能与微管交叉系统有弱的结合,对此 Hamel 等给出了各种各样的解释,其中包括微管相关蛋白亲和力的改变(还未在结构测定上得到证实)、配体诱发的微管蛋白的构象改变,或可能不再是微管蛋白交叉连接系统等(事实上暗示了在低温下其结合常数的减少可能是一个特例)。以上观点只是基于纯粹的定性分析,关于 cyclostreptin 的观测结果还需要更多的实验来从理论上证明。Buey 等^[26]指出 cyclostreptin 与微管蛋白是以共价的形式结合的,所以由 Hame 等得出的不可逆的构型和数据可能还需要以现在的视角重新评定。

2.9 Discodermolide: 是 1990 年从海绵动物 *Discodermia dissoluta* 中分离得到的多羟基内酯化合物,为紫杉醇与微管蛋白结合的竞争性抑制剂(表现 K_i 值为 0.14 mmol/L)^[27]。在 MAPs 和 0 °C 条件下,(+)-discodermolide 可使微管蛋白几乎完成全部聚合,而同样浓度的紫杉醇却没有此作用,10 nmol/L (+)-discodermolide 引起的微管重组相当于 1 mmol/L 紫杉醇的作用。(+)-Discodermolide 诱导的体外微管蛋白聚合的临界浓度更低,形成的聚合体较短,并且聚合物在 0 °C 和高 Ca^{2+} 存在条件下完全稳定。在对比实验中,(+)-discodermolide 抑制肿瘤细胞的 EC_{50} 值为 312 mmol/L,而紫杉醇为 23 mmol/L。(+)-Discodermolide 不但可使乳腺癌细胞表现显著的微管重组,并且可抑制伯基特氏淋巴瘤细胞的有丝分裂。与亲本细胞相比,对紫杉醇表现 900 倍和 2 800 倍耐药的人类结肠癌和卵巢癌细胞对 (+)-discodermolide 仍有相当程度的敏感性(相比亲本细胞仅表现 25 和 89 倍的耐药性);而对紫杉醇表现 20~30 倍耐药的 β_2 微管蛋白变异的卵巢癌细胞, (+)-discodermolide 几乎完全敏感。与紫杉醇相比, (+)-dis-

codermolide 处理的肾上皮细胞的微管在细胞间期重组成束的速度更快;使用两种药物均可观察到大量的异常纺锤体,但比例不同,并随药物处理时间变化。

2.10 Dictyostatin: 是一种多聚乙酰衍生的大环内酯类化合物,首次由 Pettit 等^[28]从海绵动物 *Spongia* sp. 中分离得到。此化合物能抑制小鼠 P388 细胞的生长 (ED_{50} 为 0.7 nmol/L), Isbrucker 等^[29]花费了近 10 年的时间发现此化合物具有与微管系统交叉作用的抗增殖活性。然而,在这之前, Curran 等^[30]发现 dictyostatin (当时的绝对型还没有确定)与 (+)-discodermolide 在结构上有某些相似的地方,采用一对 (+)-discodermolide 的类似物或 dictyostatin (+)-discodermolide 的混合物进行实验,两者都表现出了使微管有可测量的变化。基于上述的研究,在 2003 年 dictyostatin 被确定为微管稳定剂,其在体外能有效的诱导微管聚合,并且能产生影响微管-微管蛋白系统的所有的典型的细胞特征,包括使微管在分裂期聚合,产生异常的纺锤体,使细胞周期停滞于 G₂/M 期,诱导细胞凋亡^[29]。最重要的是,其比紫杉醇类化合物更能有效地抑制药物敏感性人癌细胞的生长^[29]。这些发现被后来的两项研究所证实,dictyostatin 促进微管聚合和稳定微管蛋白的活性即使不强于 (+)-discodermolide,至少也可以与其相比^[31]。

2.11 Eleutherobin 和 Sarcodictyins: 是从澳大利亚西海岸发现的软珊瑚 *Eleutherobia* sp. 中分离得到的^[32]。Eleutherobin 的促微管聚合活性比 sarcodictyins A、B 高很多,是紫杉醇与微管蛋白结合的竞争性抑制剂(表现 K_i 值 211 mmol/L)。其诱导的微管蛋白聚合反应与紫杉醇的相似,均可通过 MAPs、GTP 和反应温度的升高而被加强,产生的微管长而稳定。对细胞生长的抑制作用与对纯化的微管蛋白的作用基本一致。Sarcodictyins A、B 的 IC_{50} 值为 200~500 nmol/L, eleutherobin 为 10~40 nmol/L,抑制作用效果依赖于药物浓度、细胞株的种类和作用时间的长短^[33,34],并且能诱导人结肠癌细胞形成多个核仁和微管束。

Eleutherobin 尽管对微管促聚合的作用机制与紫杉醇相似,但结构差异显著。在 eleutherobin C15 位上除去或置换糖基部分将导致其微管聚合活性和细胞毒活性降低,并在 p2 糖蛋白高水平表达的 SKVLB 和 J72 T32116 细胞株系中失去与紫杉醇的交叉耐药特性;而在 C8 位除去鸟苷酸基团导致其对肺癌细胞 A549 的细胞毒活性下降 2 000 倍^[34]。在化学合成的 eleutherobin 类似物中,即 sarcodictyin A 在 C23 位氧原子甲基化的甲基缩酮类似物(结构上类似于 eleutherobin,但缺少 C23 位的糖基部分)的促微管聚合活性比 sarcodictyins A、B 稍低,但其抗细胞增殖活性与 eleutherobin 相近,比 sarcodictyin A 强; sarcodictyins、eleutherobin 和 sarcodictyin A 的甲基缩酮类似物对 p2 糖蛋白表达型 MDR 细胞和 β_2 微管蛋白突变细胞的活性与它们对亲本株系的活性相似,并表现交叉耐药性^[33]。

2.12 Laulimalide: 1999 年 Mooberry 等^[35]从海绵 *Cacospongia mycofijiensis*、*Fasciospongia rimosa* 和 *Hyattella* sp. 中均发现

了新的促微管稳定化合物 laulimalide 和 isolaulimalide。Laulimalide 是一个有效的细胞繁殖抑制剂, IC_{50} 值在纳摩尔浓度范围, 而 isolaulimalide 的 IC_{50} 值则在毫摩尔浓度范围。Laulimalide 可以有效促进微管蛋白的聚合, 与紫杉醇诱导形成的微管蛋白聚合体相似, 但促聚合作用低于紫杉醇。用 laulimalide 处理 A210 细胞可剂量依赖性诱导细胞微管网的重组和异常纺锤体的形成, 并能诱导染色体的卷绕和多核仁的形成。与紫杉醇相反, laulimalide 和 isolaulimalide 能抑制 p2 糖蛋白表达型多药耐药 SKVLB21 细胞株系的细胞繁殖。将 MDA2MB2435 细胞与 laulimalide 共培养, 结果导致细胞有丝分裂受阻, 并激活与细胞凋亡相关的 caspase 反应^[35]。

2.13 Peloruside A: 是由 Northcote 等^[36] 在 2000 年从纽西兰海绵 *Mycale* sp. 中提取的大环内酯类化合物。最近用全合成的方法确定 peloruside A 的绝对构型与先前^[37,38] 报道的相反。Peloruside A 在 2002 年由 Miller 等^[39] 认定为一种微管蛋白聚合剂, 并报道了此化合物在体外与紫杉醇类化合

物有相同的促微管蛋白聚合的活性并且能产生所有微管稳定剂所能产生的细胞效应。经电镜观察, peloruside A 的多聚物形成能在 0 °C、5 mmol/L Ca^{2+} 的条件下对微管蛋白有稳定作用。最近的一项对 peloruside A 稳定微管蛋白的活性实验表明其活性低于紫杉醇类化合物。然而, 其抗增殖活性可与紫杉醇类化合物相比^[39,40]。另外, 有报道称此化合物对 H-ras 转化细胞的促细胞凋亡活性强于非转化性细胞, 尽管其中的机制并不清楚^[41]。值得人们注意的是, 一项竞争性结合实验表明 peloruside 并非抑制 Flutax 与微管蛋白的交叉连接的结合位点^[54], 说明此化合物的结合位点与紫杉醇类化合物的结合位点不同。

2.14 Ceratamines: Ceratamine A、B 是从海洋有机体中发现的最新的 MSA 族的杂环生物碱, 是由 Roberge 等^[42] 在 2003 年第一次从海绵 *Pseudoceratina* sp. 中分离得到的。尽管它们与紫杉醇作用于不同的结合点, 但也可以促进微管蛋白的聚合^[43]。

以上具有稳定微管作用的天然产物的化学结构式见图 2。

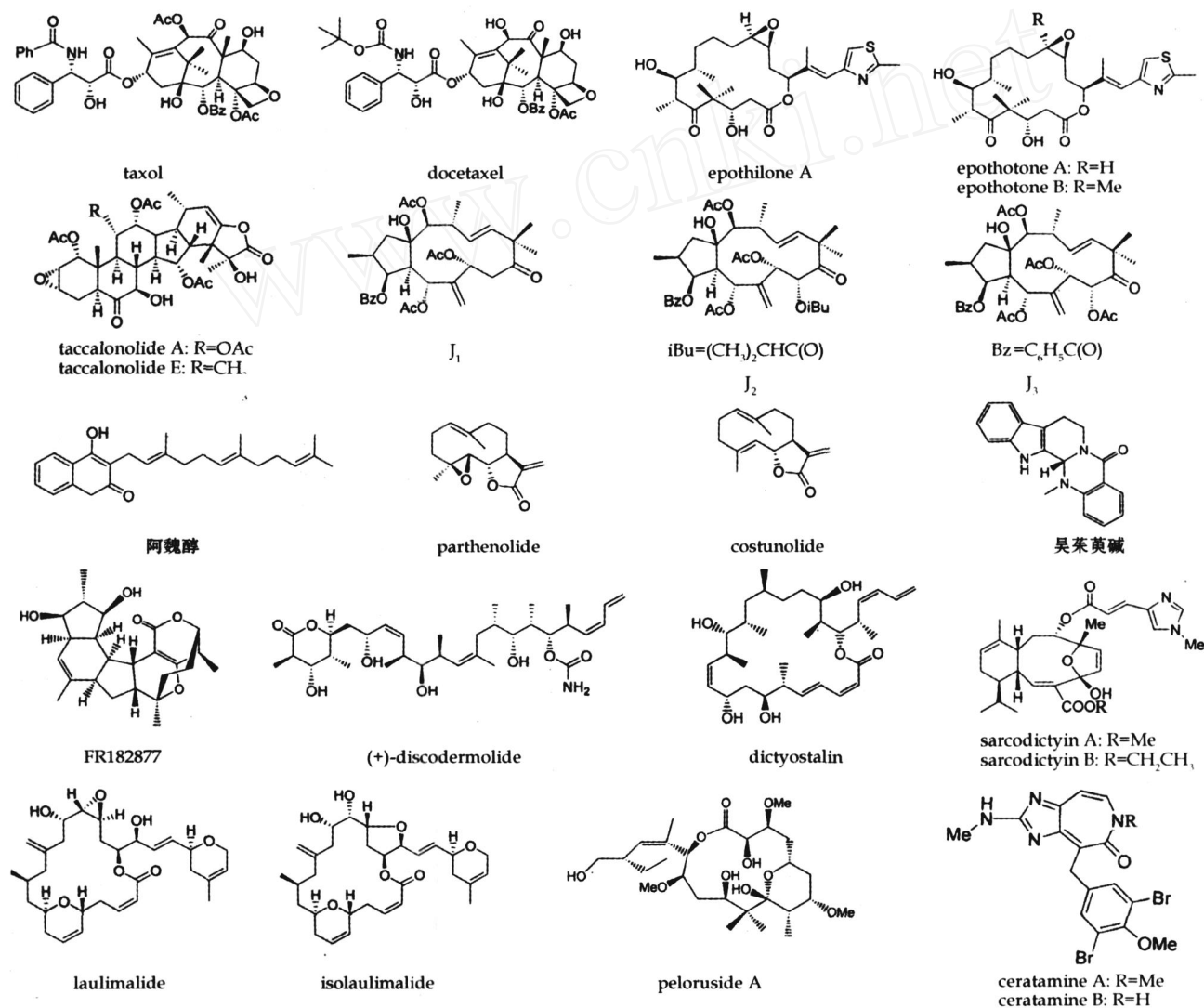


图 2 稳定微管的天然产物

Fig. 2 Natural products stabilized microtubule assembly

3 抑制微管聚合的天然产物

目前文献报道的具有抑制微管聚合作用的天然产物包括以下几类,具体结构式见图 3。

3.1 秋水仙碱类(colchicines):秋水仙碱是从秋水仙 *Colchicine autumnale* L. 和丽江山慈姑 *Iphigenia indica* Kunth et Benth. 中提取的一种生物碱,于 1933 年被发现,曾用于乳腺癌、宫颈癌等肿瘤的治疗,因其骨髓抑制、神经毒性等不良反应,在肿瘤的治疗中被后来发现的长春碱类抗微管微丝药所替代。秋水仙碱能有效地抑制微管的聚合,因此被广泛地作为实验工具药用于多种细胞骨架的特性研究;同时由于秋水仙碱的选择性神经毒性,又被用于诱导阿尔茨海默病和癫痫病的动物模型。Weiner 等^[44]用转染人的 γ 氨基丁酸 A 受体亚单位的 L(tk2) 细胞研究发现,秋水仙碱可竞争性的抑制中枢神经受体 2γ 氨基丁酸 A 受体的功能,这一过程是快速可逆的,也是秋水仙碱所独有的,其他抗微管药如长春碱、紫杉醇等均没有这种功能。秋水仙碱与微管蛋白结合位点的研究始于 20 世纪 90 年代,Uppuluri 等^[45]用 $[^3\text{H}]$ 标记的秋水仙碱和酶裂解及氨基酸序列测定的方法证实,秋水仙碱与 β 微管蛋白上的氨基酸残基 1~46 和 214~241 的 2 个区段交联,抑制 β 亚单位 E 位 GTP 的水解,从而抑制微管的聚合。Bai 等^[46]用 $[^{14}\text{C}]$ 标记的秋水仙碱类似物和源酶消化的方法进一步证实,秋水仙碱分子结构中的 A 环与 β 微管蛋白 354 半胱氨酸结合,环庚三烯酚酮 C 环定位于 239 半胱氨酸和 N 末端之间。与秋水仙碱结合位点相似的新的微管蛋白抑制剂有 phenylcyclohexenes (PCHs)、combretastatin A4 及其硫酸盐类似物、卤代苯甲酰胺类小分子化合物,抗癌活性强,其中 3-碘乙酰苯甲酰胺酯作为一种新型小分子微管蛋白配体,不仅抑制微管蛋白的聚合,使细胞阻滞于有丝分裂期,而且也能将细胞阻滞在 G₁PS 转换期,这种双重阻滞作用改变了传统的微管微丝抗肿瘤药只作用于 M 期的观念^[47]。

3.2 长春碱类(Vinca alkaloids):长春碱是从夹竹桃科植物蔓长春花 *Vinca major* L. 中提取出来的一种生物碱,具有抑制微管蛋白组装的活性,因其毒性较低,目前已成为一类临床作用于 M 期周期特异性肿瘤化疗药物,主要用于治疗何杰金氏病、绒毛膜上皮癌等肿瘤,其中长春碱与顺铂、甲氨蝶呤联合被作为首选药物配伍治疗泌尿道上皮癌。在长春碱类化合物与微管蛋白结合位点的研究中,Rai 等^[48]用荧光标记长春碱衍生物的方法确定该类化合物主要与 β 微管蛋白 175~213 氨基酸残基结合,这一位点位于微管正端的异二聚体表面,由于长春碱占位不仅影响新的异二聚体的加入,而且新加入的异二聚体会使二聚体间界面产生弯曲,这种弯曲的积累将导致直的原纤维弯曲,影响原纤丝间的作用,使微管难以延长。Lobert 等^[49]比较研究了长春碱类家族中有代表性的 3 个成员,长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)及新的衍生物 vinorelbine 与微管蛋白的亲合性,通过亲和参数的定量分析得出结论:与微管蛋白亲和能力长春新碱 > 长春碱 > vinorelbine。与长春碱结合区域相同的新化合物有 dolastatin、cryptophycin、2-aryloindoles 等。Cryptophycin 是近来新合成的

cryptophycin 家族中的一员,用超速离心和电子显微镜观察,该化合物主要结合于微管生长末端,诱导微管蛋白形成单个环形寡聚体,抑制 GTP 或 GDP 微管蛋白形成双环多聚体,从而抑制微管的聚合^[50]。秋水仙碱类和长春碱类化合物均为微管聚合的抑制剂,因此可用于临床细胞遗传学上染色体核型分析。Jiang 等^[51]比较研究了新的抗微管聚合化合物 3-溴乙酰氨基苯甲酰胺(3-BAABU)与长春碱在细胞核型分析中的特点,指出 3-BAABU 在细胞核型分析中较长春碱有优势:3-BAABU 是全合成小分子化合物,纯度高,与等摩尔的长春碱比较,不引起细胞分裂期染色体的皱缩;3-BAABU 还可以用于光谱核型分析(SKY),通过这种彩色着色的新的细胞遗传学技术,能清楚地分辨细胞染色体以及异位情况。

3.3 哈米特林(hemisterlin):从南非海域海绵 *Hemisterella minor* 中分离得到的哈米特林^[52]以及从西太平洋海域 *H. minor* 中分离得到的 hemisterlins A、B^[53]具有与长春新碱一样的抗癌作用机制。Hemisterlin 是细胞生长强效抑制剂,可以使细胞阻断在 G₂/M 期。该效应与其诱导环状微管聚集物的形成、去极化以及微管不稳定有关。与其他多肽类抗微管化合物类似,hemisterlin 也是长春花碱与微管结合的非竞争性抑制剂。研究显示这一类型的肽和微管 $\alpha(\beta)$ 异二聚体的 β 微管亚单位结合,其结合位点和长春花碱的结合位点靠近但又不同。目前该类化合物已能够人工合成^[54]。HYI2286 是 hemisterlin 的类似物^[55],具有较好的抗肿瘤活性,对 18 种肿瘤细胞的平均 IC₅₀ 值为 0.1~2.1 nmol/L,而与其 P-gp 之间的结合很弱,因此对一些由 P-gp 引起的耐药性癌细胞仍有较好的抑制作用。

3.4 鬼臼毒素及其类似物(podophyllotoxin and analogues):Podophyllotoxin (PDT) 是天然的芳基四氢萜型木脂素类化合物,首次在南美植物鬼臼属 *Podophyllum peltatum* L. (美洲鬼臼常称作美洲曼陀罗)中分离得到^[57]。PDT 对各种肿瘤细胞株显示了很强的细胞毒活性,在治疗威尔曼瘤、各种生殖器肿瘤、非 Hodgkins 和其他淋巴瘤以及肺肿瘤方面都显示了很好的疗效^[58,59],能抑制微管蛋白聚合^[60]。这些鬼臼毒素类化合物的主要作用机制是抑制 DNA 拓扑异构酶 II 的 DNA 断裂后重新连接反应,阻滞细胞周期于 G₂ 期^[61],与秋水仙素的微管结合位点发生作用^[62]。从 PDT 到 etoposide/temiposide,化学结构的修饰也导致了其作用机制发生了改变,即从通过母体化合物 PDT 抑制微管的形成到 etoposide 及其同类化合物抑制 DNA 拓扑异构酶 II。另外,PDT 的两个半合成衍生物也已被用作对抗癌症的前用药^[63]。

3.5 那可丁(noscapine):是一种阿片类生物碱,研究发现其与微管蛋白以化学计量的方式相结合,从而改变其构象并抑制细胞停滞在有丝分裂期^[64]。其借助于延长一种减弱了的“暂停(pause)”状态(即在此状态时检测不到微管的加长与变短)抑制微管动力学,但不改变微管蛋白聚合物与单体的比例,即使在高浓度时也是如此,提示这只不过是聚合物状态中的一种检测不到的改变^[65]。然而,微管动力学的这种微小改变却由于涉及到纺锤体关卡而似乎对于使细胞停

滞于前中期是必需的。使姐妹染色体开始分离的时刻推迟,可能就是姐妹染色体着丝点之间的张力消失的结果。那可丁可诱导许多种癌细胞凋亡,包括对紫杉醇有抗性者^[66]。此外,那可丁还有效地使动物模型中的肿瘤生长减慢,而且未观察到其毒性作用。那可丁及其衍生物都是今后有前景的癌症化疗药物。

3.6 Disorazol A1: 为堆囊粘菌属纤维堆囊粘菌 *Sorangium cellulosum* 产生的大环多聚乙炔类化合物,显示出显著地抑制细胞增殖的活性。在体外,disorazol A1 以一种浓度依赖性的方式抑制微管的聚合,并且不依赖于微管相关蛋白,是一种干扰微管形成,阻碍有丝分裂,并能诱导细胞凋亡的化合物^[67]。

3.7 海兔毒素 (dolastatins): 是从海兔 *Dolabella auricularia* 耳状幼虫中提取的包含特殊氨基酸的一系列具有细胞毒作用的短肽,随后在海洋蓝细菌中也被发现。这是一类有很强细胞毒作用的免疫调节剂,能抑制微管的组装^[67]。海兔毒素与阿霉素有交叉耐药性,能与微管相互作用并诱导细胞凋亡。海兔毒素尽管与微管蛋白的结合位点似乎与长春花类生物碱相似,但是其是长春碱的非竞争性抑制剂,结合位点可能重叠但并不相同^[68]。

3.8 Cryptophycins: 最初在蓝藻念珠藻属 (*Nostoc* sp.) 的植物中分离得到,是作用于微管的大环内酯类家族中的一员,可能与长春花生物碱类的结合位点相同^[69]。与紫杉醇类和长春花生物碱比较,cryptophycins 在一个很小的剂量就表现

出细胞毒性,并且其不是 P-gp 泵的底物^[69]。然而,其作用机制与长春花类药物不同,可能是通过在微管的末端形成次级 cryptophycin-tubulin 稳定电位,很少量的 cryptophycins 分子就能对微管动力学产生很大的影响^[70]。Cryptophycins 也能抑制体内长春花生物碱与微管的结合^[71]。研究表明,cryptophycins 与微管末端有高亲和力 ($K_d = 47 \text{ nmol/L}$),且不被过度表达的 P 糖蛋白所影响^[72]。

3.9 矢车菊黄素 (centaureidin): 是从杯苞菊属 *Polymnia fruticosa* Benth. 中分离得到的一个天然的能阻止秋水仙素和微管结合的黄酮类化合物,还能抑制微管的形成 (IC_{50} 为 $3 \mu\text{mol/L}$)^[73]。这种化合物是迄今发现的第一个通过使纺锤体失稳而抑制细胞有丝分裂的黄酮类化合物。此后,另一种类似的物质 centaureidin 1 从 *Zieridium pseudobutisifolium* 和 *Polanisia dodecandra* (L.) DC. 中分离得到,并且在浓度为 $0.8 \mu\text{mol/L}$ 时也能抑制微管的形成^[74]。

3.10 康普立停类 (combretastatins): 1982 年 Pettit 等^[75]在卡菲风车子 [非洲柳树, *Combretum caffrum* (Eckl. & Zeyh. Kuntze)] 的树皮中分离到 combretastatin,并测定了其结构。Combretastatin A4 在 1989 年由相同的小组分离得到,是 combretastatins 类中活性最强的一个,能竞争性的结合秋水仙素与微管的结合位点,以抑制微管蛋白的聚合,对包括 MDR 癌细胞株在内的各种人癌细胞株都有细胞毒作用,因此是抗癌药物发展的新型主导药物^[76]。

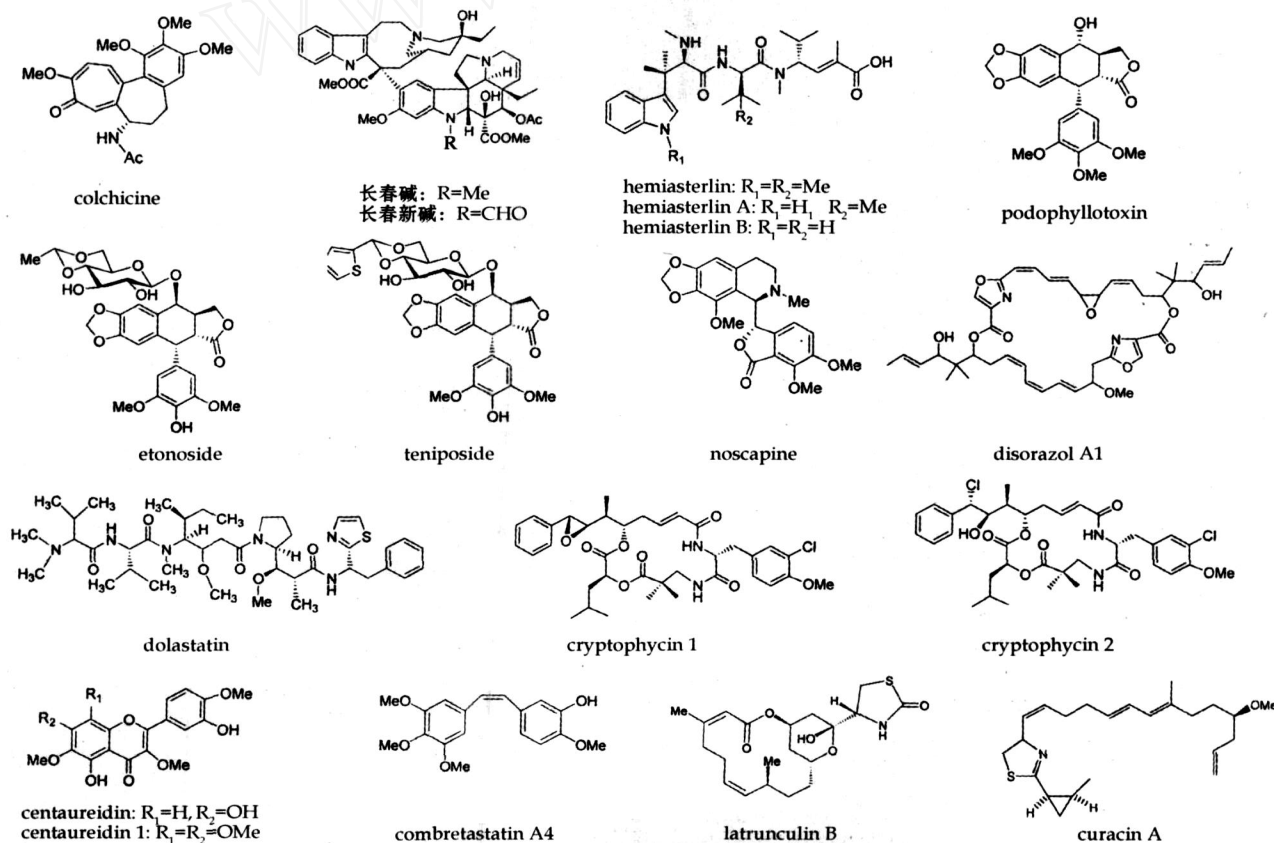


图 3 抑制微管聚合的天然产物

Fig. 3 Natural products inhibited microtubule assembly

3.11 Latrunculin B:是从红海海面 *Latrunculia magnifica* 中分离得到的一个结构特殊的大环内酯类化合物,抑制微管蛋白聚合,其作用是 cytochalasins 的 10~100 倍^[77]。

3.12 Curacin A:Curacin A 由 Gerwick 小组发现^[78],从蓝藻 *Lyngbya majuscula* 粗提取物的主要馏分(8%~10%)中分离出来的。Curacin A 对海虾有极高的细胞毒作用($LC_{50} = 3 \text{ ng/mL}$)。随后对 NCI 60 细胞株的抑制作用,确定此天然产物为对结肠、肾脏和乳癌细胞株有选择性的抗微管蛋白作用。还发现 curacin A 能引起中国仓鼠卵巢细胞在分裂周期 G₂/M 期的增殖,抑制微管蛋白的聚合。此外,其选择性的结合于秋水仙素作用的微管蛋白结合位点,但是并不是长春碱或长春新碱的竞争性抑制剂,这些都表明了其属于秋水仙素结合位点的抑制微管蛋白聚合剂^[79]。

Curacin A 抑制微管蛋白聚合的 IC_{50} 值为 $(0.72 \pm 0.2) \mu\text{mol/L}$,其¹⁴C 放射性标记产物准备进行生物合成,并且其与微管蛋白的相互作用已经进行了实验^[80]。Curacin A 与微管蛋白以 1:1 的比例迅速的结合,在多种条件下,对结合的微管蛋白进行检测,都没有检测到任何 curacin A 的分解产物。Curacin A 的缔合常数 (K_a) 太大以至于不能精确测定。在用尿素处理后,与微管蛋白结合的 curacin A 释放出来,说明在结合的时候没有形成共价键。

4 结语

微管的广泛生物学功能和独特的动力学特性一直引起人们的极大关注,特别是很多天然产物与微管作用能发挥抗癌作用,这些研究对于癌症治疗的发展具有重要的意义。本文仅从作用于微管后引起微管平衡的改变角度,将其分成微管稳定剂和微管聚合抑制剂,概述了近些年来与微管作用的天然产物的研究概况和进展,但是很多天然产物与微管相互作用的机制还未完全阐明。随着更多的作用于微管的天然产物的发现和新的方法和技术在微管研究领域中的应用,人们对这些天然产物会有更加全面和深入的知识,可以以这些天然产物为原型,改造并筛选出新的高效低毒的合成药物,使其在肿瘤治疗领域发挥更大的作用。

参考文献:

- [1] Lowe J, Li H, Downing K H, et al. Refined structure of β -tubulin at 3.5 Å resolution [J]. *Mol Biol*, 2001, 313: 1045-1057.
- [2] Rao S, Orr G A, Chaudhary A G, et al. Characterization of the taxol-binding site on the microtubule: 2-(α -azidobenzoyl) taxol photolabels a peptide (amino acids 217-231) of tubulin [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 20235-20238.
- [3] Rao S, Orr G A, Chaudhary A G, et al. Characterization of the taxol-binding site on the microtubule: 2-(α -azidobenzoyl) taxol photolabels a peptide (amino acids 217-231) of tubulin [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 20235-20238.
- [4] Chou T C, Zhang X G, Balog A, et al. Desoxyepothilone B: an efficacious microtubule-targeted antitumor agent with a promising *in vivo* profile relative to epothilone B [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 9642-9647.
- [5] Torres K, Horwitz S B. Mechanisms of taxol-induced cell death are concentration dependent [J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 3620-3626.
- [6] Wang T H, Wang H S, Ichijo H, et al. Microtubule-interfering agents activate c-jun N-terminal kinase/stress-activated kinase through both ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 4928-4936.
- [7] Meng D, Sorensen E J, Bertinato P, et al. Studies toward a synthesis of epothilone A: Use of hydrophyrans templates for the management of acyclic stereochemical relationships [J]. *J Org Chem*, 1996, 2: 1477-1488.
- [8] Bollag D M, McQueney P A, Zhu J, et al. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action [J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 2325-2333.
- [9] Kowalski R J, Giannakakou P, Hamel E. Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (taxol) [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 2534-2541.
- [10] Hamel E, Sackett D L, Vourloumis D, et al. The coral-derived natural products eleutherobin and sarcodictyins A and B: effects on the assembly of purified tubulin with and without microtubule-associated proteins and binding at the polymer taxoid site [J]. *Biochemistry*, 1999, 38: 5490-5498.
- [11] Muhlradt P F, Sasse F. Epothilone B stabilizes microtubuli of macrophages like taxol without showing taxol-like endotoxin activity [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 3344-3346.
- [12] Chen Z, Wang B, Chen M. Approach to the synthesis of alkaloids [J]. *Tetrahedron Lett*, 1987, 28: 1673-1676.
- [13] Tinley T, Randall-Hlubek D A, Leal R M, et al. Taccalonolides E and A: plant-derived steroids with microtubule-stabilizing activity [J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 3211-3220.
- [14] Miglietta A, Gabriel L, Appendino G, et al. Cancer chemotherapy [J]. *J Pharmacol*, 2003, 51: 67-74.
- [15] Buey R M, Barasoain I, Jackson E, et al. Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity [J]. *Chem Biol*, 2005, 12: 1269-1279.
- [16] Kwok B H, Koh B, Ndubuisi M I, et al. The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits IkB kinase [J]. *Chem Biol*, 2001, 8: 759-766.
- [17] Wen J, You K R, Lee S Y, et al. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide [J]. *Biol J Chem*, 2002, 277: 38954-38964.
- [18] Miglietta A, Bozzo F, Gabriel L, et al. Microtubule-interfering activity of parthenolide [J]. *Chem Biol Interact*, 2004, 149: 165-173.
- [19] Manzo E, van Soest R, Matainaho L, et al. Scleritodermin A, a cytotoxic cyclic peptide from the lithistid sponge *Scleritoderma nodosum* [J]. *Org Lett*, 2003, 5: 4591-4594.
- [20] Ogasawara M, Suzuki H. Evodiamine abolishes constitutive and inducible NF- κ B activation by inhibiting I κ B kinase activation, thereby suppressing NF- κ B-regulated antiapoptotic and metastatic gene expression, up-regulating apoptosis, and inhibiting invasion [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27: 578-582.
- [21] Shyu K G, Lin S, Lee C C, et al. Evodiamine inhibits *in vitro* angiogenesis: Implication for anti-tumor genicity [J]. *Life Sci*, 2006, 78: 2234-2243.
- [22] Liao C H, Pan S L, Guh J H, et al. Antitumor mechanism of evodiamine, a constituent from Chinese herb *Edodiae fructus*, in human multiple-drug resistant breast cancer NCI/ADR-RES cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26: 968-975.
- [23] Carboni S, Malaguzzi V, Marsili A. Ferulenol, a new coumarin derivative from *Ferula communis* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1964, 4: 2783-2786.
- [24] Adam G C, Vanderwal C D, Sorensen E J, et al. Anticancer drugs from nature-natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42: 5480-5484.
- [25] Edler M C, Buey R M, Gussio R, et al. Cell-Based and biochemical structure-activity analyses of analogs of the microtubule stabilizer dictyostatin [J]. *Biochemistry*, 2005, 44: 11525-11538.
- [26] Buey R M, Barasoain I, Jackson E, et al. Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity [J]. *Chem Biol*, 2005, 12: 1269-1279.
- [27] Terhaar E, Kowalski R J, Hamel E, et al. Discodermolide, a cytotoxic marine agent that stabilizes microtubules more potently than taxol [J]. *Biochemistry*, 1996, 35: 243-250.
- [28] Pettit G R, Cichacz Z A, Gao F, et al. Isolation and structure of the cancer cell growth inhibitor dictyostatin 1 [J]. *J Chem Soc Chem Commun*, 1994, 15: 1111-1112.
- [29] Isrucker A, Cummins J, Pomponi S, et al. Tubulin polymerizing activity of dictyostatin-1, a polyketide of marine sponge origin [J]. *Biol Chem Pharmacol*, 2003, 66: 75-82.
- [30] Day B W, Curran D P. Discodermolide/dictyostatin hybrids: Synthesis and biological evaluation [J]. *Org Lett*, 2002, 4: 4443-4446.
- [31] Buey R M, Barasoain I, Jackson E, et al. Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: Thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity [J]. *Chem Biol*, 2005, 12: 1269-1279.
- [32] Lindel T, Jensen P R, Finical W, et al. Eleutherobin, a new

- cytoxin that mimics paclitaxel (Taxol) by stabilizing microtubules [J]. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 8744-8745.
- [33] Hamel E, Sackett D L, Vourloumis D, *et al.* The coral-derived natural products eleutherobin and sarcodictyins A and B: effects on the assembly of purified tubulin with and without microtubule-associated proteins and binding at the polymer taxoid site [J]. *Biochemistry*, 1999, 38: 5490-5498.
- [34] Long B H, Carboni J M, Wasserman A J, *et al.* Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (taxol) [J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 1111-1115.
- [35] Mooberry S L, Tien G, Hernandez A H, *et al.* Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule stabilizing agents [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 653-660.
- [36] West L Y, Northcote P T, Battershill C N. Peloruside A: a potent cytotoxic macrolide isolated from the New Zealand marine sponge *Mycale* sp. [J]. *J Org Chem*, 2000, 65: 445-449.
- [37] Liao X, Wu Y, De Brabander J K. Total synthesis and absolute configuration of the novel microtubule-stabilizing agent peloruside A [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42: 1648-1652.
- [38] Jin M, Taylor R E. The total synthesis of (+)-peloruside A [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 7: 1303-1305.
- [39] Hood K A, West L M, Rouwe B, *et al.* A novel antimitotic agent with paclitaxel-like microtubule-stabilizing activity [J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 3356-3360.
- [40] Gaitanos T N, Buey R M, Diaz J F, *et al.* Does not bind to the taxoid site on {beta}-tubulin and retains its activity in multidrug-resistant cell lines [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 5063-5067.
- [41] Miller J H, Rouwe B, Gaitanos T N, *et al.* Peloruside A enhances apoptosis in H-ras-transformed cells and is cytotoxic to proliferating T cells [J]. *Apoptosis*, 2004, 9: 785-796.
- [42] Manzo E, van Soest R, Matainaho L, *et al.* Ceratamines A and B, antimitotic heterocyclic alkaloids isolated from the marine sponge *Pseudoceratina* sp. collected in Papua New Guinea [J]. *Org Lett*, 2003, 5(24): 4591-4594.
- [43] Karjala G, Chan Q, Manzo E, *et al.* Ceratamines, structurally simple microtubule-stabilizing antimitotic agents with unusual cellular effects [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (8): 3040-3043.
- [44] Weiner J L, Buhler A V, Whatley V J, *et al.* Colchicine is a competitive antagonist at human recombinant gamma-aminobutyric acid A receptors [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 284: 95-102.
- [45] Uppuluri S, Knipling L, Sackett D L, *et al.* Localization of the colchicine-binding site of tubulin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 11598-11602.
- [46] Bai R, Pei X F, Boye O, *et al.* Identification of cysteine 354 of beta-tubulin as part of the binding site for the A ring of colchicine [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 12639-12645.
- [47] Jiang J D, Denner L, Ling Y H, *et al.* Bcl-2 is the guardian of microtubule integrity [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 229-233.
- [48] Rai S S, Wolff J. Localization of the vinblastine-binding site on beta-tubulin [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 14707-14711.
- [49] Lobert S, Vulevic B, Correia J J. Interaction of vinca alkaloids with tubulin: a comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine [J]. *Biochemistry*, 1996, 35: 6806-6814.
- [50] Barbier P, Gregoire C, Dervred F, *et al.* In vitro effect of cryptophycin 5-on microtubule assembly and tubulin: molecular modeling of the mechanism of action of a new antimitotic drug [J]. *Biochemistry*, 2001, 40: 13510-13519.
- [51] Jiang J D, Wang Y, Janish C A, *et al.* 3-Bromoacetyl amino benzoylurea (3-BAABU), a new antimicrotubule cancericidal agent applied in cytogenetic analysis in hematology [J]. *Bio med Pharmacother*, 1998, 52: 270-281.
- [52] Talpir R, Benayahu Y, Kashman Y, *et al.* Two new cytotoxic peptides from the marine sponge *Hemisterella minor* (Kirkpatrick) [J]. *Tetrahedron Lett*, 1994, 35: 4453-4456.
- [53] Coleman J E, de Silva E D, Kong F, *et al.* Cytotoxic peptides from the marine sponge *Cymbastela* sp. [J]. *Tetrahedron*, 1995, 51: 10653-10662.
- [54] Nieman J A, Coleman J E, Wallace D J, *et al.* Synthesis and antimitotic/cytotoxic activity of hemiasterlin analogues [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66: 183-199.
- [55] Krishnamurthy G, Cheng W, Lo M C, *et al.* Biophysical characterization of the interactions of HT12286 with tubulin heterodimer and microtubules [J]. *Biochemistry*, 2003, 42: 13481-13495.
- [56] Nieman J A, Coleman J E, Wallace D J, *et al.* Synthesis and antimitotic/cytotoxic activity of hemiasterlin analogues [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66: 183-199.
- [57] Podwysotski V. Pharmakologische studien uber Podophyllun [J]. *Arch Exp Peltatum Panthol*, 1880, 13: 29-52.
- [58] Utsugi T, Shibata J, Sugimoto Y, *et al.* Antitumor activity of a novel podophyllotoxin derivative (TOP-53) against lung cancer and lung metastatic cancer [J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 2809-2814.
- [59] Subrahmanyam D, Renuka B, Rao C B, *et al.* Novel D-ring analogues of podophyllotoxin as potent anti-cancer agents [J]. *Med Chem Lett*, 1998, 8: 1391-1394.
- [60] Gordaliza M, Castro A M, Corral J M, *et al.* Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds [J]. *Curr Pharm Des*, 2000, 6: 1811-1839.
- [61] Thurston L S, Irie H, Tani S, *et al.* Antitumor agents. 78 Inhibition of human DNA topoisomerase II by podophyllotoxin and alpha-peltatin analogs [J]. *J Med Chem*, 1986, 29: 1547-1550.
- [62] Cowan C R, Cande W Z J. Meiotic telomere clustering is inhibited by colchicine but does not require cytoplasmic microtubules [J]. *Cell Sci*, 2002, 115: 3747-3756.
- [63] O'Dwyer P J, Leyland-Jones B, Alonso M T, *et al.* Current status of an active anticancer drug [J]. *E N Eng J Med*, 1985, 312: 692-695.
- [64] Ye K, Zhou J, Lande J W, *et al.* Opium alkaloid noscapine is an antitumor agent that arrests metaphase and induces apoptosis in dividing cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 160 H606.
- [65] Zhou J, Yao J, Joshi H C. Minor alteration of microtubule dynamics causes loss of tension across kinetochore pairs and activates the spindle checkpoint [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 17200-17208.
- [66] Zhou J, Gupta K, Yao J, *et al.* Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells undergo c-Jun NH-terminal kinase-mediated apoptosis in response to noscapine [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 39777-39785.
- [67] Elnakady Y A, Sasse F. Disorazol A1, a highly effective antimitotic agent acting on tubulin polymerization and inducing apoptosis in mammalian cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67: 927-935.
- [68] Bai R L, Pettit G R, Hamel E. Binding of dolastatin-10 to tubulin at a distinct site for peptide antimitotic agents near the exchangeable nucleotide and vinca alkaloid sites [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265: 17141-17149.
- [69] Eggen M, Georg G I. The cryptophycins: their synthesis and anticancer activity [J]. *Med Res Rev*, 2002, 22: 85-101.
- [70] Panda D, DeLuca K, Williams D, *et al.* Antiproliferative mechanism of action of cryptophycin-52: kinetic stabilization of microtubule dynamics by high-affinity binding to microtubule ends [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 9313-9318.
- [71] Smith C D, Zhang X. Mechanism of action cryptophycin. Interaction with the vinca alkaloid domain of tubulin [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 6192-6198.
- [72] Wagner M M, Paul D C, Shih C, *et al.* In vitro pharmacology of cryptophycin 52 (LY355703) in human tumor cell lines [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1999, 43: 115-125.
- [73] Licchiusi J L, Thoison O, Montagnac A, *et al.* Antimitotic and cytotoxic flavonols from *Zieridium pseudobutisifolium* and *Acronychia porteri* [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57: 1012-1016.
- [74] Shi Q, Chen K, Li L, *et al.* Cytotoxic and antimitotic flavonols from *Polanisia dodecandra* [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58: 475-482.
- [75] Pettit G R, Singh S B, Cragg G M. Synthesis of natural (-) combretastatin [J]. *J Org Chem*, 1985, 50: 3404-3406.
- [76] El-Zayat A A E, Degen D, Drabek S, *et al.* In vitro evaluation of the antineoplastic activity of combretastatin A-4 [J]. *Anti-Cancer Drugs*, 1993, 4: 19-25.
- [77] Coue M, Brenner S L, Spector I, *et al.* Inhibition of actin polymerization by latrunculin A [J]. *FEBS Lett*, 1987, 213: 316-318.
- [78] Gerwick W H, Proteau P J, Nagle D G, *et al.* Structure of curacin A, a novel antimitotic, antitumor, and brine shrimp toxic natural product from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* [J]. *Org Chem*, 1994, 59: 1243-1245.
- [79] Verdier-Pinard P, Sitachitta M, Rossi J V, *et al.* Biosynthesis of radiolabeled curacin A and its rapid and apparently irreversible binding to the colchicine site of tubulin [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 370: 51-58.
- [80] Verdier-Pinard P, Lai J Y, Yoo H D, *et al.* Structure-activity analysis of the interaction of curacin A, the potent colchicine site antimitotic agent, with tubulin and effects of analogs on the growth of MCF-7 breast cancer cell [J]. *Mol Pharmacol*, 1998, 53: 62-76.