微管蛋白秋水仙碱位点抑制剂研究进展

陈静[1]，陶雪芬[1]，应华洲[2](1.浙江中医药大学，杭州 310053；2.浙江仙琚制药技术开发有限公司，杭州 310005)

摘要：微管蛋白是细胞骨架的主要成分，参与了细胞过程的许多环节。秋水仙碱位点抑制剂(CSIs)是一类重要的微管蛋白聚合抑制剂。目前已经有许多 CSIs 作为抗肿瘤药物被发现或设计、合成，并取得了很大的进展。本研究主要就 CSIs 的作用机制、共同结构特征以及各种类型 CSIs 的构效关系作一综述。

关键词：微管蛋白；秋水仙碱位点；抑制剂；构效关系；抗肿瘤

中图分类号：R916.696　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2011)09-0824-07

Recent Development of Colchicine Binding Site Inhibitors

CHEN Jing[1], TAO Xuefen[1], YING Huazhou[2] (*1.Zhejiang Chinese Medicinal University, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Xianju Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Hangzhou 310005, China*)

ABSTRACT: Microtubules are cytoskeletal components which play important roles in a number of cellular processes. Colchicine binding site inhibitors (CSIs) is one of the major classes of tubulin polymerization inhibitors. Many CSIs have been discovered, designed or synthesized as anticancer agents in the past several years and great progress has been made. We discuss the insights gained so far relevant to the mechanism of CSIs and their common structures. The recent development of CSIs with their biological activity and structure-activity relationship is also reviewed.

KEY WORDS: microtubules; colchicine binding site; inhibitor; structure-activity relationship; anticancer

微管是细胞骨架的主要成分，它存在于所有的真核细胞中，并能与其他蛋白共同组装成纺锤体、中心粒、鞭毛、神经管等结构。它参与了细胞过程的许多环节，如细胞分裂，细胞形态的维持和细胞信号传导等。微管功能的多样性取决于其内在的动力学特征，该动力学对有丝分裂各时期的染色体正常运动尤其重要[1-3]。小分子抑制剂能通过抑制微管蛋白动力学使细胞分裂中止于有丝分裂期，从而导致细胞死亡。因此，微管是寻找抗肿瘤药物的一个有效靶点。

微管靶向药物按其与微管蛋白的结合位点不同大致可以分为 3 类：紫杉醇位点抑制剂，长春碱位点抑制剂，以及秋水仙碱位点抑制剂(colchicines binding site inhibitors，CSIs)。其中紫杉烷类化合物能稳定微管，抑制微管蛋白的解聚，属于微管聚合促进剂；而长春碱和秋水仙碱类化合物则能抑制微管蛋白的聚合，属于微管聚合抑制剂。目前，长春碱和紫杉醇位点抑制剂类药物已在癌症治疗方面占据了重要地位，却仍没有 CSIs 应用于临床肿瘤治疗。近年来，关于 CSIs 的研究报道层出不穷，一些研究发现某些 CSIs 由于其对多药耐药(multiple drug resistance，MDR)细胞或血管增生的抑制作用而成为潜在的抗癌剂并进入临床研究。这些都说明 CSIs 是一个极具发展潜力的研究方向，对这一位点抑制剂的研究也引起了广大科学研究者更大的兴趣，以期发现具有治疗作用的活性化合物。本文主要就 CSIs 与微管蛋白的作用方式及近年来 CSIs 的研究进展做一综述。

1　秋水仙碱结合位点及其抑制剂的药效团模型

1.1　微管蛋白的结构

微管是首先由 α，β-微管蛋白杂二聚体不断重复的头尾连接形成原纤维，再由 13 根原纤维平行组合扩展成为微管壁，从而形成的具有极性的聚合物[1]。从 1995 年开始，人们陆续通过利用锌离子诱导的微管蛋白的电子晶体学，在分辨率分别为 6.5Å、4Å 和 3.7Å 时对微管蛋白的三维结构进行分析[4]。接下来的 X-衍射晶体学研究对其进行了进一步完善[5]。研究表明，在这个结构中 α-和 β-微管蛋白的结构大致相同：每个单体都以两条 β-折叠为中心由 α-螺旋围绕而成。该单体的结构可以分为 3 个功能区域：①与核苷结合的氨基末端，由六条平行的 β-折叠(B1-B6)与 α-螺旋(H1-H6) 交

作者简介：陈静，女，博士，讲师　Tel: (0571)86613657　E-mail: cjmaggie@163.com

联而成，每条 β-折叠通过 loop 区(T1-T6)与下一条 α-螺旋的头部相连；②紫杉醇结合的中间区域，由 H8-H10 与 B7-B10 交联而成。前两个功能区以 H7 相连；③动力蛋白结合的羧基末端，由两个反平行的螺旋 H11-H12 穿过前两个区域。

1.2 秋水仙碱结合位点

微管蛋白二聚体与 *N*-去乙酰基-*N*(2-硫代乙酰基)秋水仙碱(DAMA-秋水仙碱)复合物的晶体结构验证了最初关于秋水仙碱结合于 β-微管蛋白上与 α-微管蛋白连接处的假设[6]。接下来 Nguyen 等[7]详细阐明了该结合位点，他们认为 DAMA-秋水仙碱的三甲氧基基团结合在 β-微管蛋白上，与包含氨基酸残基 Cysβ239 的 H7 以及 H8 相邻。α-微管蛋白对该位点的影响主要是位于 B5 和 H5 之间的 loop 区(B5-H5)，包含能够与 CSIs 形成氢键作用的氨基酸残基 Thrα177 和 Valα181。秋水仙碱位点体积大约为~10 Å×~10 Å×4－5Å。

1.3 秋水仙碱位点抑制剂的药效团模型

多年来，人们已经发现了许多从天然物中提取或人工合成的小分子 CSIs。虽然它们均可与秋水仙碱位点结合，但结构类型多样。这就使人们产生了疑问，怎样的结构特征是该位点的活性化合物所必须具备的，这些化合物的相似点在哪里。药效团就对这些问题作出了回答。

药效团是一个包含药物生物活性所必要的所有特性的三维结构。Nguyen 等[7]以相同的化学空间、拓扑结构和结合方式为基础，选取了 15 个结构类型不同的 CSIs，并以微管蛋白与 DAMA-秋水仙碱的 X-衍射晶体结构为模版，应用分子对接和分子动力学模拟技术构建了这些不同结构 CSIs 的结合方式。他们将这些化合物分为两类：第 1 类化合物与秋水仙碱的结构类似，具有 3 个重要特征：二芳基系统，三甲氧基苯基(TMP)和顺式构象；第 2 类化合物至少缺少第 1 类中的某一个特征，因此比第 1 类更具结构多样性。

这 15 个 CSIs 与微管蛋白的对接研究显示，它们都紧密地结合在微管蛋白秋水仙碱位点的相同位置，其中 TMP 母核均位于 β-微管蛋白处。此外，CSIs 的对接构象均可分为两个平面，而且两个平面几乎是均分的，二面角约为 45°。分析它们与微管蛋白形成氢键的机率，可以总结如下：①15 个化合物都与 Cysβ239 的硫原子形成氢键；②15 个化合物中的 11 个与 Valα181 的氮原子形成氢键；③8 个化合物与 Alaβ248，Aspβ249 和 Leuβ250 的氨基氮形成氢键；④4 个化合物与 Thrα177 的羰基氧形成氢键。

对这些化合物结合方式的研究还发现，它们与微管蛋白的作用与 7 个药效团特征相关：3 个氢键受体(A1，A2，A3)，1 个氢键供体(D1)，2 个疏水中心(H1，H2)和 1 个平面(R1)，这些药效团特征可以分别分布于两个二面角成 45°的平面中(A1，D1，H1 和 R1 处于同一平面，A2，A3 和 H2 处于同一平面)。图 1 描述了这些药效团与微管蛋白结构间的作用。疏水中心 H1 处于 Valα181 和 Metβ257 之间。H1(一般是甲氧基中的碳原子)、H2(一般为芳香环)与 Leuβ255，Alaβ316，Valβ318 及 Ileβ378 有疏水作用。此外，还有 6 个氢键作用：A1 与 Valα181 的氨基氮，A2 与 Cysβ239 的硫醇氢，A3 与 Alaβ248，Aspβ249 和 Leuβ250 的氨基氮，D1 与 Thrα179 的羰基氧。

通过研究还可以发现，15 个化合物中均含有 A2，H2 和 R1，而 H1 存在于其中 14 个化合物中。这表明特征 A2，H1，H2 和 R1 对活性非常重要。另外，所有的化合物中都有 A2-Cysβ239 的氢键作用，大部分化合物中也都存在 A1-Valα181 的作用。

以上结果可以很好地解释许多秋水仙碱位点抑制剂的构效关系。同时，研究表明没有一个化合物具备所有的药效团特征，说明合理的化学修饰能够产生活性更强的类似物，也为进一步开发高效的 CSIs 提供了理论基础。

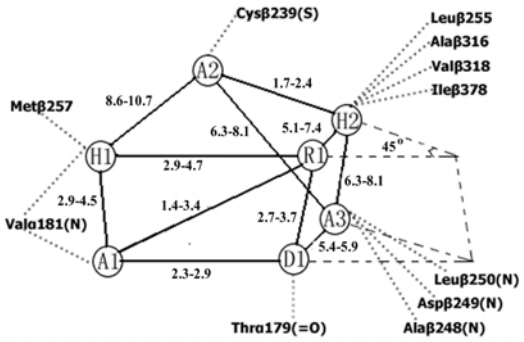

图 1 秋水仙碱位点抑制剂的药效团特征

注：药效团点间的距离以 Å 为单位

Fig 1 Common pharmacophores of CSIs

Note: The distances between the pharmacophoric points are given in Angstroms

http://www.chinmap.com

随后，第二军医药大学药学院的李耀武等[8]选择了 8 种不同结构类型的 CSIs，以对接模拟得到的活性构象为起点，并结合已有的构效关系研究结果，提出了作用于秋水仙碱位点的微管蛋白抑制剂的共同结构特征。他们认为，CSIs 大都由两个疏水平面 A、B 以及连接二者的桥链构成。其中，A 基团一般为一体积较大的疏水基团，插入微管蛋白中由 β 亚基的 Cys241，Leu248，Leu255，Ala318，Ala354 和 Ile378 所组成疏水口袋 I 中，在此基础上若存在与 Cysβ241 形成氢键的氢键受体基团则有助于活性的增强；B 基团一般是一个体积较小的疏水环，往往接有疏水性侧链，能插入由 α 亚基的 Ser178~Val181 以及 β 亚基的 Leu255，Asn258，Met259，Thr314，Ala316 和 Lys352 所围成的狭长的疏水通道 II 中，在满足最大疏水作用的基础上，在相应位置引入一些能与 Thrα179 或 Valα181 形成氢键的极性原子也能增强与蛋白的结合作用；桥链部分是此类抑制剂差别最大的地方，虽然桥链原子和方式可以多样，但其关键特征在于通过 1~4 个原子保证整个分子结构为顺式构象，同时，桥链部分的原子可以单独成环或与末端 A 或 B 基团骈合。

2 秋水仙碱位点抑制剂

2.1 秋水仙碱及其类似物

秋水仙碱(**1**)是 1820 年从植物 *Colchicum autmnale* 中首次分离得到的一种天然生物碱，是目前已知最早的微管蛋白聚合抑制剂之一。秋水仙碱具有许多生物活性，如抗炎、抗有丝分裂以及抗肿瘤活性等[9]，但其毒性与活性相当，因此一直以来研究者都希望通过全合成或半合成的方法得到更多高效低毒的秋水仙碱类似物。秋水仙碱类似物的构效关系可总结如下：

三甲氧基苯基(A 环)与环庚三烯酮(C 环)一起组成了与微管蛋白产生高亲和性的基本药效团，对化合物的微管蛋白结合活性至关重要[10]。A 环甲氧基非常重要，其中 3 位甲氧基的存在能保证强效的结合活性，而 1 位甲氧基对保证化合物的优势构象比较重要[11]。C 环易发生光化学降解转变为含有羰基和甲氧基的稠四元或五元环，导致化合物活性大大降低[12]。C 环双键重排亦会导致活性丧失[11]。9，10 位取代基位置往往非常重要，将两者交换，活性及抑制微管蛋白聚合能力都丧失[13]。10-甲氧基用小体积基团代替或 9-羰基氧原子用硫原子代替一般不影响微管蛋白聚合抑制活性；但 10 位引入大体积基团则对活性不利[14]。另一方面，用六元芳环替代七元 C 环的天然产物 allocolchicine(**2**)，在微管蛋白聚合抑制实验和细胞毒测试中都表现出优于秋水仙碱的性质[15]。B 环及其 C7 位侧链可影响化合物的构型和构象，对化合物的结合动力学、结合速率及活化能等都非常重要，因而对于 B 环的改造大多以调节秋水仙碱的药动学性质为目的。其中，在 B 环中引入双键能得到结合活性更强的化合物[16]。C7 键的 *S*-构型对微管蛋白聚合抑制活性也非常重要，其 *R* 型异构体对微管蛋白无活性[17]。

近年来，为了进一步考察B环对活性的影响，Büettner研究小组合成了一系列秋水仙碱类似物[18]。研究结果表明，B环由七元环扩为八元后活性下降。B环5位被取代后，活性丧失。在B环引入氮原子得到的化合物活性中等到强。在B环上再并入四唑，形成一个新型的四环系统，活性与秋水仙碱相当；进一步用其他三元或四元杂环替代四唑，发现杂环类型及稠和方式对活性影响不大。

2.2 鬼臼毒素及其类似物

鬼臼毒素(**3**)是从植物 *Podophyllum peltatum* 的根部分离得到的抗有丝分裂化合物，可通过抑制微管蛋白的秋水仙碱位点而发挥作用。此外，该类化合物还具有拓扑异构酶Ⅱ(TOPⅡ)抑制活性。本研究对该类化合物构效关系的探讨主要针对微管蛋白靶点进行。

二氧五环结构(A 环)对微管蛋白抑制活性至关重要，药效团分析发现将其开环可能使该环原本有利于蛋白结合的疏水作用消失[19]。将 C 环芳构化或开环会使化合物的微管蛋白抑制活性降低甚至丧失。4-羟基并不是活性必须的，去除后活性仍与鬼臼毒素相当[20]，将 4 位羟基转移到 5 位，其抗肿瘤活性仍保留。Magedov 等[21]用氮原子取代 4 位碳原子，得到的一系列 C 环用含氮杂环替代的鬼臼毒素类似物，仍保持了部分细胞毒活性。将 4-羟基构象逆转会改变该类化合物的作用靶点为 TOPⅡ而非微管蛋白[22]。E 环 4'-甲氧基的甲基用大体积基团取代会降低化合物的活性[23]，去除

则会增强化合物与 TOPⅡ的亲和力[24]。稠和的 D 环内酯环本身并不是维持化合物的活性所必须的，但当该环发生差向异构化，形成更具热稳定性的差向异构体时，却会导致细胞毒和微管蛋白聚合抑制活性都大大降低[19]。为了解决内酯环的不稳定性问题，2007 年，Imperio 等[25]尝试用三氮唑替代内酯环，得到了一系列化合物，微管蛋白聚合抑制活性得到了保留。

2.3 Combretastatin 类似物

Combretastatin A-4(CA-4，**4**)是 Pettit 等[26]从南非植物 *Combretum caffrum* 中分离得到的一种天然产物，其作用机制为抑制微管蛋白的秋水仙碱位点。此外，有研究表明它能够抑制肿瘤血管增生，从而导致肿瘤细胞死亡[27]。自 CA-4 发现以来，对 CA-4 的改造已成为设计合成新型 CSIs 的一个研究热点。其构效关系大致可总结如下：

一直以来，人们都认为 A 环是保证其抗肿瘤活性和微管蛋白聚合抑制活性所必需的。但是随着研究的深入，人们对该结论进行了补充。将卤素引入 A 环的 3 位，所得的卤代 CA-4 类似物的微管蛋白聚合抑制活性与 CA-4 相当[28]。用 *N*-苯基-*N'*-(2-氯乙基)脲(CEU)取代三甲氧基苯基得到了 CA-4-CEU 杂合体，能通过与秋水仙碱位点的 β-微管蛋白共价结合而对多种肿瘤细胞产生细胞毒作用[29]。对 B 环的改造证明 4 位甲氧基对活性非常重要，而 3 位羟基可通过修饰得到活性更强的化合物[30]。低水溶性是 combretastatin 类化合物的缺点之一，因此很多研究者利用 B 环的酚羟基进行前药设计，以期扩展其在临床上的应用[31]。此外，还有大量文献报道用杂环替代 B 环，大部分也都保留了微管蛋白聚合抑制活性[32]。对不同结构类型的 CA-4 类似物研究均表明，乙烯桥的顺式构象是活性所必须的，它有助于两个苯环形成具有适当二面角的活性构象[33]。因此，对连接桥链的改变一直是 CA-4 结构修饰的一个热点。为了保持 CA-4 的顺式构型，人们尝试用不同的桥链(如醚、酮、磺胺、磺酸等)替换。Hsieh 等[34]还对许多 CA-4 衍生物和类似物按桥链原子数分类进行综述。此外，研究发现在双键的两个碳原子上引入 1 个或 2 个氟原子均能保持 CA-4 的生物学性质[35]。用二酮结构取代 CA-4 的顺式双键结构也能保留化合物的细胞毒性和微管蛋白聚合抑制活性[36]。近年来，越来越多的文献报道了用杂环替代乙烯桥链来限制两苯环的构象[37]，某些杂环取代得到的化合物活性优于 CA-4 或溶解性得到改善。其中以五元杂环为佳，证明杂环可能成为乙烯链的良好替代基团。

2.4 芳基吲哚类

近年来有关含吲哚环的化合物作为微管蛋白聚合抑制剂的报道日益增多。2007 年，Brancale 等[38]总结了具有吲哚母核的微管蛋白抑制剂的合成、生物活性和构效关系，发现一些化合物在结构上与秋水仙碱或 CA-4 相关，均通过与秋水仙碱位点结合而产生微管蛋白聚合抑制活性。

据报道，CA-4 的吲哚类似物 BPR0L075(**5**)具有强效的微管蛋白聚合抑制活性，正作为抗有丝分裂剂进入临床前研究[39]。Liou 等[40]合成了一系列1-芳酰基吲哚、1-芳酰基-1, 2, 3, 4-四氢喹啉类及1-芳酰基吲哚啉类衍生物，并对其进行了抗肿瘤活性测试。部分化合物抑制微管蛋白的能力与秋水仙碱和 CA-4 相当。2008年，Álvarez 等[41]用肟和腙代替芳酰基吲哚类化合物的桥链羰基并合成了一系列桥链氮原子上不同取代的化合物，某些化合物显示了较强的微管蛋白聚合抑制活性和肿瘤细胞增殖抑制活性。此外，研究发现 2-苯基-3-甲酰基吲哚类化合物(**6**)也主要通过与秋水仙碱位点结合抑制微管蛋白聚合而发挥作用[42]。

2.5 磺胺类

磺胺类化合物具有广泛的生物活性，其中化合物 **7** 是通过体外抗肿瘤活性筛选得到的微管蛋白聚合抑制剂[43]。其 4-羟基衍生物 E7010 对包括多药耐药细胞在内的多种肿瘤细胞都具有较强的增殖抑制活性，且通过与秋水仙碱位点结合抑制微管蛋白的聚合。该化合物口服有效，其生物利用度呈剂量依赖性，目前作为非小细胞肺癌、乳腺癌和直肠癌的治疗药物正处于临床Ⅰ/Ⅱ期研究[44]。

另一个磺胺类化合物五氟苯磺酰胺 T138067 能与微管蛋白秋水仙碱位点的 Cysβ239 发生不可逆结合[45]，该化合物目前处于临床Ⅱ期研究。

近年来，Chang 等[46]报道的7-取代吲哚啉-1-苯磺酰胺类化合物， Lebegue 等[47]合成的一系列

以噻二氮杂䓬骨架限制 E7010 构象的三环磺酰胺类化合物，也是有效的秋水仙碱位点抑制剂。

2.6 2-甲氧基雌二醇类衍生物

2-甲氧基雌二醇(2ME2，**8**)是一种天然的微管蛋白抑制剂，对多种肿瘤及内皮细胞都具有显著的体外增殖抑制能力和体内抗血管增生及抗肿瘤活性。它通过与秋水仙碱位点结合抑制细胞内的微管蛋白聚合，使细胞周期中止于 G_2/M 期，从而诱导细胞凋亡[48]。Lavallee 等[49]对 3、7位羟基进行结构改造，合成了一系列化合物，部分化合物显示了与 2ME2 相当或更强的肿瘤细胞增殖抑制活性。目前，ENMD-1198 已作为治疗恶性实体瘤的候选药进入临床Ⅰ期研究。

2.7 黄酮类似物

大量文献表明查儿酮类化合物是有效的微管蛋白聚合抑制剂[50]。

2-苯基喹啉-4-酮衍生物(2-PQs，**9**)是一类天然的小分子化合物，具有较强的抗有丝分裂活性。从结构上来看，它们是黄酮母核的电子等排体，仅将黄酮的吡喃氧原子用氮原子替代。与黄酮类化合物相比，2-PQs 显示了更为强效的肿瘤细胞增殖抑制活性和不同的作用机制，即通过与微管蛋白的秋水仙碱位点结合抑制微管蛋白的聚合[51]。

2.8 其他

此外，还有许多其它新结构类型的 CSIs。

Zune 等[52]报道了体外抗肿瘤活性较强的蒽酮类化合物(**10**)，它们通过与秋水仙碱位点结合发挥微管蛋白聚合抑制作用。随后，该课题组又合成了一系列磺酸酯衍生物(**11**)[53]，从中发现了一些具有高效肿瘤细胞增殖抑制活性的微管蛋白抑制剂。

4-芳基氨基喹唑啉类化合物是一类新型的具有凋亡诱导活性的化合物[54]。其中 MPC-6827(**12**)具有抗有丝分裂作用，能通过竞争秋水仙碱位点而抑制微管蛋白的聚合，干扰多种肿瘤细胞中微管的形成。

Ouyang 等[55]报道了一类三氮唑类秋水仙碱位点抑制剂。这类化合物中含有二氧戊环片段的衍生物 **13**，活性较高。Mahboobi 等[56]报道了具有[4-(咪唑-1-基)噻唑-2-基]苯胺结构的高活性抗有丝分裂剂 **14**，它也能够通过竞争微管蛋白上的秋水仙碱位点抑制微管的聚合。化合物 **1**~**14** 的结构式见图 2。

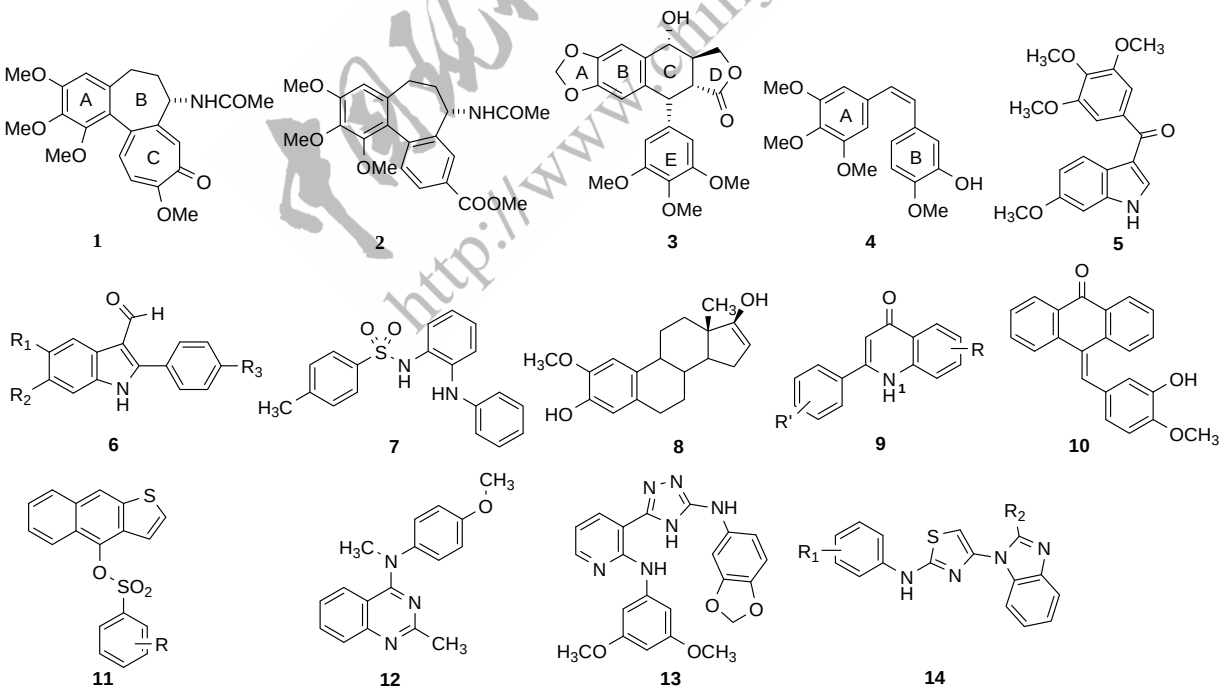

图 2 各种结构类型的秋水仙碱位点抑制剂

Fig 2 Each structural types of CSIs

http://www.chinjmap.com

3 小结与展望

微管蛋白秋水仙碱位点是抗癌药物的一个重要靶点，近年来开发小分子 CSIs 已经成为研究热点。虽然目前仍没有该类抑制剂被开发成为抗肿瘤药物，然而随着人们对微管蛋白结构认识的加深、秋水仙碱结合位点模型的发现以及药效团的构建，必将推动新型、高效、类药的秋水仙碱位点抑制剂的设计和开发。

REFERENCES

[1] MITCHISON T, KIRSCHNE M. Dynamic instability of microtubule growth [J]. Nature, 1984, 312(5991): 237-242.

[2] MARGOLIS R L, WILSON L. Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state *in vitro* [J]. Cell, 1978, 13(1) : 1-8.

[3] HOWARD J, HYMAN A A. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end [J]. Nature, 2003, 422(6933): 753-758.

[4] NOGALE E, WOLF S G, DOWNING K H. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography [J]. Nature, 1998, 391(6663): 199-203.

[5] LOWE J, LI H, DOWNING K H, et al. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution [J]. J Mol Biol, 2001, 313(5): 1045-1057.

[6] RAVELLI R B, GIGANT B, CURMI P A, et al. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain [J]. Nature, 2004, 428(6979): 198-202.

[7] NGUYEN T L, MCGRATH C, HERMONE A R, et al. A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach [J]. J Med Chem, 2005, 48(19): 6107-6116.

[8] LI Y W, ZHOU Y J, ZHU J, et al. Study on the stuctural features of colchicine-site inhibitors [J]. J Pharm Pract (药学实践杂志), 2007, 25(6): 372-375.

[9] BROSSI A, YEH H J, CHRZANOWSKA M, et al. Colchicine and its analogues. Recent findings [J]. J Med Res Rev, 1988, 8(1): 77-94.

[10] ANDREU J M, TIMASHEFF S N. Conformational states of tubulin liganded to colchicine, tropolone methyl ether, and podophyllotoxin [J]. Biochemistry, 1982, 21(25): 6465-6467.

[11] BOSNER M, CAPRARO H G, JACOBSON A E, et al. Biological effects of modified colchicines. Improved preparation of 2-demethylcolchicine, 3-demethylcolchicine, and (+)-colchicine and reassignment of the position of the double bond in dehydro-7-deacetamidocolchicines [J]. J Med Chem, 1981, 24(3): 257-261.

[12] MCCLURE W O, PAULSON J C. The interaction of colchicine and some related alkaloids with rat brain tubulin [J]. Mol Pharmacol, 1977, 13(3): 560-575.

[13] HASTIE S B, WILLIAMS R C J. PUETT D, et al. The binding of isocolchicine to tubulin. Mechanisms of ligand association with tubulin [J]. J Biol Chem, 1989, 264(12): 6682-6688.

[14] STARETZ M E, HASTIE S B. Synthesis and tubulin binding of novel C-10 analogues of colchicine [J]. J Med Chem, 1993, 36(6): 758-764.

[15] HASTIE S B. Spectroscopic and kinetic features of allocolchicine binding to tubulin [J]. Biochemistry, 1989, 28(19): 7753-7760.

[16] BANWELL M G, PETERS S C, GREENWOOD R J, et al. Semisyntheses, x-ray crystal structures, and tubulin-binding properties of 7-oxodeacetamidocolchicine and 7-oxodeacetamidoisocolchicine [J]. Aust J Chem, 1992, 45(10): 1577-1588.

[17] SHI Q, VERDIER-PINARD P, BROSSI A, et al. Antitumor agents. 172. Synthesis and biological evaluation of novel deacetamidothiocolchicin-7-ols and ester analogs as antitubulin agents [J]. J Med Chem, 1997, 40(6): 961-966.

[18] BUETTNER F, BERGEMANN S, GUENARD D, et al. Two novel series of allocolchicinoids with modified seven membered B-rings: Design, synthesis, inhibition of tubulin assembly and cytotoxicity [J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13(10): 3497-3511.

[19] BESBENE S, GIORGI-RENAULT S. Drugs that inhibit tubulin polymerization: the particular case of podophyllotoxin and analogues [J]. Curr Med Chem Anti Cancer Agents, 2002, 2(1): 71-90.

[20] GENSLER W J, MURTHY C D, TRAMMELL M H. Nonenolizable podophyllotoxin derivatives [J]. J Med Chem, 1977, 20(5): 635-644.

[21] MAGEDOV I V, MANPADI M, ROZHKOVA E, et al. Structural simplification of bioactive natural products with multicomponent synthesis: Dihydropyridopyrazole analogues of podophyllotoxin [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17(5): 1381-1385.

[22] JI Z, WANG H K, BASTOW K F, et al. Antitumor agents. 177. Design, syntheses, and biological evaluation of novel etoposide analogs bearing pyrrolecarboxamidino group as DNA topoisomerase Ⅱ inhibitors [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1997, 7(5): 607-612.

[23] LIU Y Q, YANG L, TIAN X. Design, synthesis, and biological evaluation of novel pyridine acid esters of podophyllotoxin and esters of 4'-demethylepipodophyllotoxin [J]. Med Chem Res, 2007, 16(7/9): 319-330.

[24] LETEURTRE F, SACKETT D L, MADALENGOITIA J, et al. Azatoxin derivatives with potent and selective action on topoisomerase Ⅱ [J]. Biochem Pharmacol, 1995, 49(9): 1283-1290.

[25] IMPERIO D, PIRALI T, GALLI U, et al. Replacement of the lactone moiety on podophyllotoxin and steganacin analogues with a 1,5-disubstituted 1,2,3-triazole via ruthenium-catalyzed click chemistry [J]. Bioorg Med Chem, 2007, 15(21): 6748-6757.

[26] PETTIT G R, SINGH S B, HAMEL E, et al. Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4 [J]. Experientia, 1989, 45(2): 209-211.

[27] PETTIT G R, GREALISH M P, HERALD D L, et al. Antineoplastic agents. 443. Synthesis of the cancer cell growth inhibitor hydroxyphenstatin and its sodium diphosphate prodrug [J]. J Med Chem, 2000, 43(14): 2731-2737.

[28] PETTIT G R, MINARDI M D, ROSENBERG H J, et al. Antineoplastic agents. 509. Synthesis of fluorcombstatin phosphate and related 3-halostilbenes [J]. J Nat Prod, 2005, 68(10): 1450-1458.

[29] FORTIN S, MOREAU E, LACROIX J, et al. N-Phenyl-N'-(2-chloroethyl)urea analogues of combretastatin A-4: Is the N-phenyl-N'-(2-chloroethyl) urea pharmacophore mimicking the trimethoxy phenyl moiety? [J]. Bioorg Med

Chem Lett, 2007, 17(7): 2000-2004.
[30] TRON G C, PIRALI T, SORBA G, et al. Medicinal chemistry of combretastatin A 4: Present and future directions [J]. J Med Chem, 2006, 49(11): 3033-3044.
[31] KONG Y, GREMBECKA J, EDLER M C, et al. Structure-based discovery of a boronic acid bioisostere of combretastatin A-4 [J]. Chem Biol, 2005, 12(9): 1007-1014.
[32] ROMAGNOLI R, BARALDI P G, SARKAR T, et al. Synthesis and biological evaluation of 1-methyl-2-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-3-aminoindoles as a new class of antimitotic agents and tubulin inhibitors [J]. J Med Chem, 2008, 51(5): 1464-1468.
[33] PETTIT G R, SINGH S B, NIVEN M L, et al. Antineoplastic agents. Part 123. Isolation, structure, and synthesis of combretastatins A-1 and B-1, potent new inhibitors of microtubule assembly, derived from Combretum caffrum [J]. J Nat Prod, 1987, 50(1): 119-131.
[34] HSIEH H P, LIOU J P, MAHINDROO N. Pharmaceutical design of antimitotic agents based on combretastatins [J]. Curr Pharm Design, 2005, 11(13): 1655-1677.
[35] ALLOATTI D, GIANNINI G, CABRI W, et al. Synthesis and biological activity of fluorinated combretastatin analogues [J]. J Med Chem, 2008, 51(9): 2708-2721.
[36] MOUSSET C, GIRAUD A, PROVOT O, et al. Synthesis and antitumor activity of benzils related to combretastatin A-4 [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2008, 18(11): 3266-3271.
[37] BURJA B, CIMBORA-ZOVKO T, TOMIC S, et al. Pyrazolone-fused combretastatins and their precursors: synthesis, cytotoxicity, antitubulin activity and molecular modeling studies [J]. Bioorg Med Chem, 2010, 18(7): 2375-2387.
[38] BRANCALE A, SILVESTRI R. Indole, a core nucleus for potent inhibitors of tubulin polymerization [J]. Med Res Rev, 2007, 27(2): 209-238.
[39] CHANG Y W, CHEN W C, LIN K T, et al. Development and validation of a liquid chromatographytandem mass spectrometry for the determination of BPR0L075, a novel antimicrotuble agent, in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study [J]. J Chromatogr B, 2007, 846(1/2): 162-168.
[40] LIOU J P, WU Z Y, KUO C C, et al. Discovery of 4-amino and 4-hydroxy-1-aroylindoles as potent tubulin polymerization inhibitors [J]. J Med Chem, 2008, 51(14): 4351-4355.
[41] ÁLVAREZ C, ÁLVAREZ R, CORCHETE P, et al. Diarylmethyloxime and hydrazone derivatives with 5-indolyl moieties as potent inhibitors of tubulin polymerization [J]. Bioorg Med Chem, 2008, 16(11): 5952-5961.
[42] KAUFMANN D, POJAROVÁ M, VOGEL S, et al. Antimitotic activities of 2-phenylindole-3-carbaldehydes in human breast cancer cells [J]. Bioorg Med Chem, 2007, 15(15): 5122-5136.
[43] YOSHINO H, UEDA N, NIIJIMA J, et al. Novel sulfonamides as potential, systemically active antitumor agents [J]. J Med Chem, 1992, 35(13): 2496-2497.
[44] YAMAMOTO K, NODA K, YOSHIMURA A, et al. Phase Ⅰ study of E7010 [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1998, 42(2): 127-134.
[45] SHAN B, MEDINA J C, SANTHA E, et al. Selective, covalent modification of β-tubulin residue Cys-239 by T138067, an antitumor agent with in vivo efficacy against multidrug-resistant tumors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(10): 5686-5691.
[46] CHANG J Y, HSIEH H P, CHANG C Y, et al. 7-Aroyl-aminoindoline-1-sulfonamides as a novel class of potent antitubulin agents [J]. J Med Chem, 2006, 49(23): 6656-6659.
[47] LEBEGUE N, GALLET S, FLOUQUET N, et al. Novel benzopyridothiadiazepines as potential active antitumor agents [J]. J Med Chem, 2005, 48(23): 7363-7373.
[48] MABJEESH N J, ESCUIN D, LAVALLEE T M, et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF [J]. Cancer Cell, 2003, 3(4): 363-375.
[49] LAVALLEE T M, BURKE P A, SWARTZ G M, et al. Significant antitumor activity *in vivo* following treatment with the microtubule agent ENMD-1198 [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(6): 1472-1482.
[50] KONG Y, WANG K, EDLER M C, et al. A boronic acid chalcone analog of combretastatin A-4 as a potent antiproliferation agent [J]. Bioorg Med Chem, 2010, 18(2): 971-977.
[51] XIA Y, YANG Z Y, XIA P, et al. Synthesis and biological evaluation of 6,7,2',3',4'-substituted-1,2,3,4-tetrahydro-2-phenyl-4-quinolones as a new class of antimitotic antitumor agents [J]. J Med Chem, 1998, 41(7): 1155-1162.
[52] ZUNE A, SCHMIDT P, BAASNER S, et al. 9-Benzylidene-naphtho[2,3-b]thiophen-4-ones as novel antimicrotubule agents. Synthesis, antiproliferative activity, and inhibition of tubulin polymerization [J]. J Med Chem, 2006, 49(26): 7816- 7825.
[53] ZUSE A, SCHMIDT P, BAASNER S, et al. Sulfonate derivatives of naphtho[2,3-b]thiophen-4(9H)-one and 9(10H)-anthracenone as highly active antimicrotubule agents. Synthesis, antiproliferative activity, and inhibition of tubulin polymerization [J]. J Med Chem, 2007, 50(24): 6059-6066.
[54] KASIBHATLA S, BAICHWAL V, CAI S X, et al. MPC-6827: A small-molecule inhibitor of microtubule formation that is not a substrate for multidrug resistance pumps [J]. Cancer Res, 2007, 67(12): 5865-5871.
[55] OUYANG X, PIATNITSKI E, PATTAROPONG V, et al. Oxadiazole derivatives as a novel class of antimitotic agents: Synthesis, inhibition of tubulin polymerization, and activity in tumor cell lines [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(5): 1191-1196.
[56] MAHBOOBI S, SELLMER A, HÖCHER H, et al. [4-(Imidazol-1-yl)thiazol-2-yl]phenylamines. A novel class of highly potent colchicine site binding tubulin inhibitors: Synthesis and cytotoxic activity on selected human cancer cell lines [J]. J Med Chem, 2006, 49(19): 5769-5776.

收稿日期：2010-09-28