

MiR-24 反义核酸通过 BIM-Smac/Diablo 途径促进多柔比星对结肠癌细胞的凋亡诱导效应

徐焯, 崔焯辉, 陈诚豪, 都志军(浙江省立同德医院肛肠科, 杭州 310012)

摘要: 目的 探讨 miR-24 在结肠癌中发挥的作用并研究其是否和多柔比星的体外治疗有关。方法 用 RT-qPCR 法检测 miR-24 在结肠癌患者血浆中及结肠癌细胞系中的表达水平。MTT 法检测 miR-24 反义核酸对多柔比星杀伤结肠癌细胞能力的影响。利用生物信息学、定量 PCR 及 Western blot 法验证 miR-24 是否调节结肠癌细胞 BIM 的表达。运用 JC-1 染色、Annexin V 染色及 Western blot 法研究 miR-24 反义核酸影响多柔比星疗效的信号通路。结果 结肠癌患者血浆及结肠癌细胞系中 miR-24 表达水平显著升高。miR-24 反义核酸可显著增强多柔比星对 SW480 细胞的杀伤活性。定量 PCR 及 Western blot 实验表明 miR-24 的靶基因可能为 BIM。miR-24 反义核酸联合多柔比星可引起 SW480 细胞线粒体膜电位的丧失并诱导线粒体内 Smac/DIABLO 的释放, 进而引起 caspase-3 的活化和凋亡的发生。转染 BIM siRNA 后 miR-24 反义核酸联合多柔比星对 SW480 细胞的凋亡诱导效应显著降低。结论 MiR-24 反义核酸通过 BIM-Smac/Diablo 途径促进多柔比星对结肠癌细胞的凋亡诱导效应。

关键词: miR-24; BIM; Smac/DIABLO; SW480; 多柔比星

中图分类号: R963 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)02-0175-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.02.010

Antisense nucleic Acids of miR-24 Promoted the Doxorubicin-induced Apoptosis via BIM-Smac/DIABLO Pathway in Colon Cancer

XU Ye, CUI Junhui, CHEN Chenghao, DU Zhijun(*Anus-intestines Department, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the role of miR-24 in doxorubicin treatment in colon cancer. **METHODS** MiR-24 levels in plasma and colon cancer cell lines were detected by RT-qPCR assay. MTT assay was performed to evaluate the effect of antisense nucleic acids of miR-24 (anti-miR-24) to doxorubicin-induced cell death in SW480 cells. Bioinformatics, quantitative PCR and Western blot analysis were performed to determine whether the expression of BIM was regulated by miR-24. JC-1 staining, Annexin V staining and western blot analysis were performed to study the pathway of anti-miR-24 to increase the anti-tumor effect of doxorubicin. **RESULTS** The expression of miR-24 was up-regulated in colon cancer patients' plasma and colon cancer cell lines. The anti-tumor effect of doxorubicin was significantly enhanced after the SW480 cells were transfected with anti-miR-24. The results of Western blot and RT-qPCR assays indicated that the BIM gene was the target of miR-24. Furthermore, the apoptosis induced by anti-miR-24 plus doxorubicin was dependent on the dysfunction of mitochondrial membrane, leading to the release of Smac/DIABLO from the mitochondrial and activation of caspase-3 in SW480 cells. **CONCLUSION** Anti-miR-24 promoted the doxorubicin-induced apoptosis via BIM-Smac/DIABLO pathway in colon cancer. **KEY WORDS:** miR-24; BIM; Smac/DIABLO; SW480; doxorubicin

MicroRNAs(miRNAs)是一组细胞内源性的非编码单链 RNA, 通过与目标 mRNA 的 3' UTR(3' 非编码区)结合使之发生降解并影响其转录^[1]。研究表明 miRNA 能调节约 30% 的蛋白质编码基因, 因此它们参与细胞的各种生理活动及病理改变, 在肿瘤发生和发展过程中, 不同的 miRNAs 通过靶向不同的基因发挥致癌和抑癌 2 种作用, 因此肿瘤的发生往往和 miRNAs 的失调有关^[2-3]。有文

献报道 miR-24 表达的失调和肿瘤的发生密切相关, 并且 miR-24 在不同的肿瘤类型中发挥不同的作用。如 Du 等^[4]发现 miR-24 在乳腺癌细胞中显著上调, 并通过抑制 PTPN9 及 PTPRF 的表达促进肿瘤的转移; 在肝癌细胞中, miR-24 的过表达与肿瘤细胞的增殖和侵袭转移能力有关^[5]; 在肺癌患者的血清和肿瘤组织中, miR-24 往往呈现出高表达, 且血清中高水平的 miR-24 可提示肺癌患者的

作者简介: 徐焯, 女, 硕士, 主治医师 Tel: (0571)89972372

E-mail: tongdexuye@163.com

不良预后^[6]。也有文献报道在一些肿瘤类型中, miR-24 可能起肿瘤抑制作用, 如 Li 等^[7]指出 miR-24 可通过下调 FSCN1 基因的表达抑制鼻咽癌细胞的生长。结肠癌是威胁人类健康的最常见的恶性肿瘤之一, 发病率和致死率都非常高^[8]。对于不能进行手术治疗的中晚期结肠癌患者而言, 化疗是一项重要的治疗手段。多柔比星是治疗肿瘤的一线药物, 然而其严重的心脏毒性严重制约了它的临床应用^[9-10], 因此采用新的治疗手段提高多柔比星的疗效以降低其剂量有十分重要的价值。另外, 尽管 miR-24 的失调和多种肿瘤类型有关, 然而 miR-24 在结肠癌中发挥的作用目前仍不十分清楚, 更重要的是, miR-24 的表达水平是否与结肠癌细胞对多柔比星的敏感性有关目前还未有报道。因此本实验主要研究在结肠癌细胞中抑制 miR-24 的表达水平是否能影响多柔比星的抗肿瘤效应。

1 材料

1.1 患者资料

随机收集 35 例 2013 年 1 月—2015 年 6 月结肠癌患者的血浆, 患者年龄 30~71 岁(平均年龄 50.1 岁)且未行化疗及手术治疗, 另取 35 例经诊断未罹患结肠癌的就诊患者的血浆作为对照, 对照患者年龄 28~72 岁(平均年龄 46.2 岁), 取得患者的知情同意。

1.2 细胞培养

正常人结肠上皮细胞系 FHC^[11], 人结肠癌细胞系 SW480、HT29、SW620 购于美国 ATCC。细胞系培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中, 在 37 °C 恒温培养箱中培养, 通入 5% CO₂。

1.3 试剂

多柔比星、噻唑蓝(MTT)、地高辛、凋亡检测试剂盒(批号: APOAF)均购于美国 Sigma-Aldrich; DMEM 培养基(美国 Gibco); BIM(批号: 2933)、Smac/DIABLO(批号: 15108)、caspase-3(批号: #9665)和 β -actin 兔抗人抗体(批号: #4970)购于美国 Cell Signaling; MiR-24 模拟物(miR-24 mimics, 序列为 5' -UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG-3')、miR-24 反义核酸(anti-miR-24, 序列为 5' -CUGUCCUGCUGAACUGAGCCA-3')、阴性对照寡核苷酸(miR-NC, 序列为 5' -UAGUGGAUG GCAGGCACACUCA-3')和 BIM siRNA(序列为 5' -GACCGAGAAGGUAGACAAUUU-3')购于上海

吉玛生物; Trizol 试剂、Lipofectamine 2000 购于美国 Invitrogen; SYBR Green 试剂(大连 TaKaRa); ECL 试剂盒(美国 Pierce, 批号: 32109); JC-1(美国 Molecular Probes); PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

2 方法

2.1 荧光定量 PCR 检测 miR-24 的表达

细胞系及血浆总 RNA 用 Trizol 试剂提取。miR-24 的逆转录采用茎环 RT-qPCR 法^[12]。miR-24 逆转录引物序列为: 5' -CTCAACTGGTGTCTG GAGTCGGCAATTCAGTTGAGCUGUCCU-3'。miR-24 的相对表达由 2^{- Δ ACT} 法计算^[13], 以 U6 snRNA 为内参。BIM 基因的定量 PCR 扩增使用 SYBR Green 试剂, GAPDH 作为内参, 其相对表达同样由 2^{- Δ ACT} 法计算。

2.2 细胞活力检测

将 SW480 细胞按每孔 5×10^3 个接种在 96 孔板上, 按照实验设计将 50 pmol·mL⁻¹ 的 miR-NC 或 anti-miR-24 用 Lipofectamine 2000 试剂转染入 SW480 细胞系中, 培养 72 h, 然后更换新鲜培养基再加 0.5 μ g·mL⁻¹ 或 5 μ g·mL⁻¹ 多柔比星培养 48 h。加入 20 μ L MTT (5 mg·mL⁻¹) 培养 4 h, 移除孔内培养基, 加入 100 μ L 二甲亚砜, 570 nm 下测定 OD 值。细胞活力结果用实验组与对照组的 OD 值比值表示。

2.3 线粒体分离

SW480 细胞收集后按 1 200 r·min⁻¹ 在 4 °C 离心 10 min。之后将细胞用冰预冷的生理盐水洗 1 次并将其重悬于地高辛裂解缓冲液中(150 μ g 地高辛溶解于 1 mL 500 mmol·L⁻¹ 的蔗糖溶液中), 3 614 r·min⁻¹ 4 °C 离心 5 min。取上清液, 将其在 11 430 r·min⁻¹ 4 °C 离心 30 min, 沉淀即为线粒体, 而上清则为细胞质。

2.4 Western blot 试验

将 SW480 细胞按每孔 5×10^4 个接种在 6 孔板上, 按照实验设计将 50 pmol·mL⁻¹ 的 miR-NC, miR-24 mimics, anti-miR-24 及 BIM siRNA 用 Lipofectamine 2000 试剂转染入 SW480 细胞系中, 培养 72 h, 然后更换新鲜培养基再加 0.5 μ g·mL⁻¹ 多柔比星培养 48 h。收集细胞, 将细胞用生理盐水洗涤 2 遍后提取总蛋白质。将蛋白提取液用 12.5% SDS-PAGE 进行电泳分离。分离完毕后通过电转方法将蛋白质从分离胶上转到 PVDF 膜上,

用 BIM、caspase-3、Smac/DIABLO 或 β -actin 单克隆抗体孵育过夜，之后再用带辣根过氧化物酶的二抗孵育 2 h，蛋白条带用 ECL 试剂盒显色发光。

2.5 细胞凋亡试验

将 SW480 细胞按每孔 5×10^4 个接种在 6 孔板上，按照实验设计将 $50 \text{ pmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 miR-NC，anti-miR-24 及 BIM siRNA 用 Lipofectamine 2000 试剂转染入 SW480 细胞系中，培养 72 h，然后更换新鲜培养基再加 $0.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多柔比星培养 48 h。之后将细胞用生理盐水洗涤 2 次，按照凋亡试剂盒说明书步骤将 PI 和 Annexin-V 加入细胞中孵育 20 min，采用流式细胞术检测肿瘤细胞的凋亡。

2.6 线粒体膜电位检测

将 SW480 细胞按每孔 5×10^4 个接种在 6 孔板上，按照实验设计将 $50 \text{ pmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 miR-NC，anti-miR-24 及 BIM siRNA 用 Lipofectamine 2000 试剂转染入 SW480 细胞系中，培养 72 h，然后更换新鲜培养基再加 $0.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多柔比星培养 48 h。之后将细胞用生理盐水洗涤 2 次，加入 $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ JC-1 孵育 20 min，采用流式细胞术检测 SW480 细胞线粒体膜电位的变化^[14]。

2.7 统计学方法

实验重复 3 次，实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示并用 SPSS 15.0 统计分析软件进行处理，*P* 值计算采用非配对双边 *t* 检验进行分析，*P* < 0.05 认为有显著性差异。

3 结果

3.1 结肠癌患者血浆及结肠癌细胞系中 miR-24 的表达水平显著升高

总体而言，结肠癌患者血浆中 miR-24 表达水平的平均值显著高于健康对照者血浆中 miR-24 表达水平的平均值，见图 1A；而体外实验结果表明结肠癌细胞系 HT29、SW480、SW620 的 miR-24 表达量均显著高于正常结肠上皮细胞系 FHC，见图 1B。这些结果提示 miR-24 可能有肿瘤促进作用。另外，为了在体外研究 miR-24 表达水平的改变对结肠癌细胞的影响，在 SW480 细胞中转染 miR-24 mimics 或 anti-miR-24，其转染效率见图 2。

3.2 miR-24 反义核酸增强 SW480 对多柔比星的敏感性

上述结果提示 miR-24 可能在结肠癌中起肿瘤促进作用，因此推测在结肠癌细胞中转染 miR-24 反义核酸可能对肿瘤细胞起抑制作用。在进一步

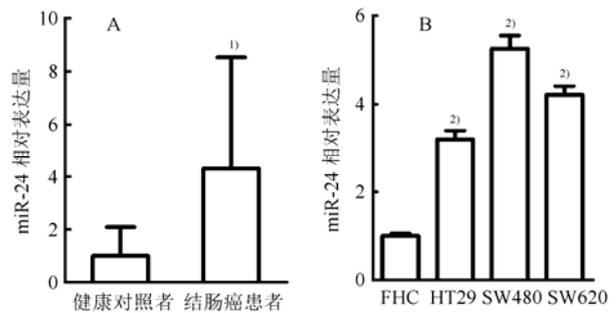


图 1 miR-24 在血浆及细胞系中的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

A—结肠癌患者及健康对照者血浆中 miR-24 的表达水平 ($n=35$)；B—人正常结肠上皮细胞系 FHC 及结肠癌细胞系中 miR-24 的表达水平 ($n=3$)；与健康对照者相比，¹⁾*P* < 0.05；与 FHC 细胞相比，²⁾*P* < 0.05。

Fig. 1 The expression of miR-24 in plasma and cell lines ($\bar{x} \pm s$)

A—the expression of miR-24 in colon cancer patients' and healthy controls' plasma ($n=35$); B—the expression of miR-24 in human normal colonic epithelial cell line FHC and colon cancer cell lines ($n=3$); Compared with healthy controls, ¹⁾*P* < 0.05; compared with FHC cell line, ²⁾*P* < 0.05.

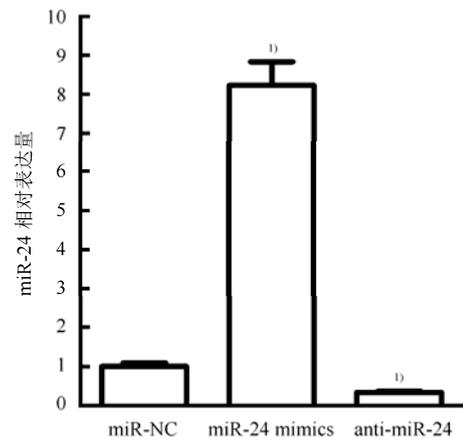


图 2 转染 miR-NC、miR-24 mimics、anti-miR-24 对 SW480 细胞 miR-24 表达水平的影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

与 miR-NC 组相比，¹⁾*P* < 0.05。

Fig. 2 Expression of miR-24 after the SW480 cells were transfected with miR-NC, miR-24 mimics and anti-miR-24 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with miR-NC group, ¹⁾*P* < 0.05.

的研究中发现，尽管 miR-24 反义核酸单独治疗对 SW480 的细胞活力影响较小，但可显著增加其对多柔比星的敏感性(高浓度组多柔比星浓度为 $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，低浓度组多柔比星浓度为 $0.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)，结果见图 3，提示在结肠癌细胞中抑制 miR-24 的表达可提高化疗药物的抗肿瘤活性。

3.3 BIM 是 miR-24 的直接靶点

为了研究 miR-24 反义核酸增强多柔比星抗肿瘤效应的分子机制，作者通过 TargetScan 在线工具寻找 miR-24 的作用靶点。生物信息学

(<http://www.targetscan.org/>)结果表明, BIM mRNA 3' UTR 的第 706~715 位碱基序列(AACUGAGCCA) 与 miR-24 互补结合, 提示 BIM 可能是 miR-24 的靶点。进一步实验结果表明 SW480 细胞在转染 miR-24 模拟物后 BIM 的表达水平显著下降, 而转染 miR-24 反义核酸则显著上调 BIM 的表达水平, 见图 4, 表明 SW480 细胞中的 BIM 基因受 miR-24 的调节。

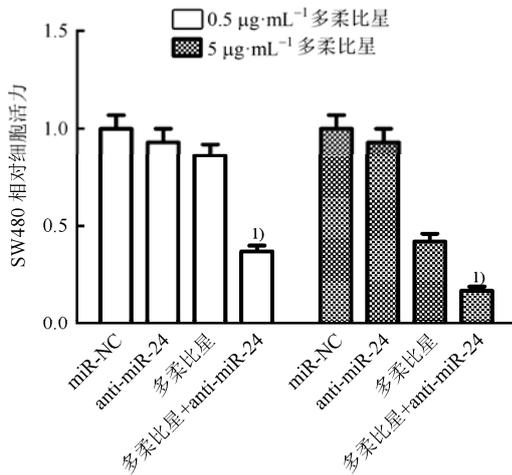


图 3 anti-miR-24 及多柔比星对 SW480 细胞活力的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$) 与多柔比星组相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 3 The effect of anti-miR-24 and doxorubicin on the viability of SW480 ($n=3, \bar{x} \pm s$) Compared with doxorubicin group, $^{1)}P<0.05$.

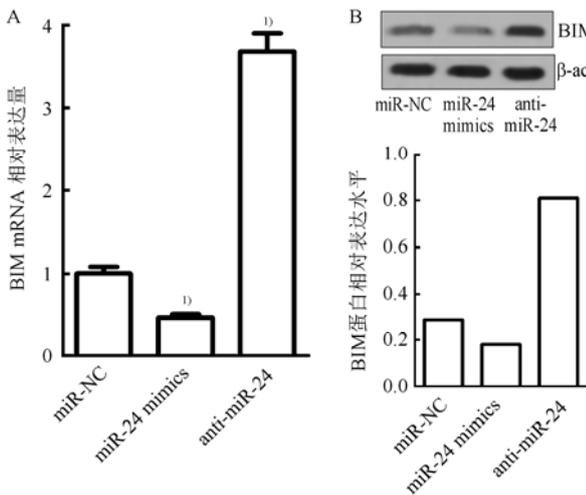


图 4 miR-24 调节 BIM 基因的表达 ($\bar{x} \pm s$)

A-RT-qPCR 实验检测 BIM 的 mRNA 表达水平 ($n=3$); B-Western blot 实验检测 BIM 的蛋白表达水平; 与 miR-NC 组相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 4 The expression of BIM is regulated by miR-24 ($\bar{x} \pm s$) A-the mRNA expression of BIM was detected by RT-qPCR analysis ($n=3$); B-the protein expression of BIM was detected by western blot analysis ($n=3$); Compared with miR-NC group, $^{1)}P<0.05$.

3.4 多柔比星联合 miR-24 反义核酸通过 BIM-Smac/DIABLO 途径诱导 SW480 细胞的凋亡

为进一步探讨 miR-24 反义核酸增强多柔比星疗效的具体机制, 首先通过 JC-1 染色试验研究 miR-24 反义核酸联合多柔比星对 SW480 细胞线粒体膜电位($\Delta\psi$)的影响。发现 miR-24 反义核酸或多柔比星单独治疗对 SW480 细胞线粒体膜电位的影响不大, 但两者联合却显著降低了 SW480 细胞的线粒体膜电位, 且 BIM siRNA 则能显著降低两者联合对线粒体膜电位的影响, 结果见图 5。之后发现两者联合治疗可诱导 Smac/DIABLO 从线粒体中释放到细胞质中进而诱导 caspase-3 的活化, 结果见图 6。同样的, miR-24 反义核酸大大增强了多柔比星对 SW480 细胞凋亡的诱导能力, 而 BIM siRNA 同样能抑制两者联合对 SW480 细胞的凋亡诱导效应, 结果见图 7。这些结果都表明 miR-24 反义核酸能通过下调 BIM 蛋白的表达, 增强多柔比星对结肠癌细胞线粒体途径凋亡的诱导效应。

4 讨论

在本研究中, 发现结肠癌患者相比于正常对照组, 其血浆中的 miR-24 表达水平显著上调, 而体外实验显示结肠癌细胞系中的 miR-24 水平同样显著高于正常结肠上皮细胞系 FHC, 提示 miR-24 在结肠癌中同样起肿瘤促进作用, 是一个促癌因子。

有文献报道 miR-24 的高表达可能诱导肿瘤细胞对顺铂的抵抗^[15]。而在本研究中, 同样发现 miR-24 还与结肠癌细胞对多柔比星的敏感性有关, 如图 3 所示, miR-24 反义核酸能显著提高多柔比星对结肠癌细胞的治疗效果。为了研究其机制, 通过 TargetScan 在线工具寻找 miR-24 的靶点并用定量 PCR 和 Western blot 试验验证, 结果发现在 SW480 细胞中, BIM 可能是 miR-24 的靶基因。BIM 是 Bcl-2 蛋白家族成员, 是一种促凋亡蛋白^[16], 研究发现 BIM 表达的缺失和肿瘤的不良预后有关^[17]。在肿瘤细胞中, BIM 的高表达会促进细胞的凋亡, 其机制为打开细胞线粒体的膜孔道, 随后导致线粒体失能, 并以线粒体膜电位降低为特征^[18]。在本研究中, 发现 miR-24 反义核酸联合多柔比星能显著降低 SW480 细胞的线粒体膜电位, 而 BIM siRNA 则减弱了这种效应, 表明 miR-24 反义核酸可通过上调结肠癌细胞 BIM 的表达水平促进多柔比星对肿瘤细胞线粒体的损伤。

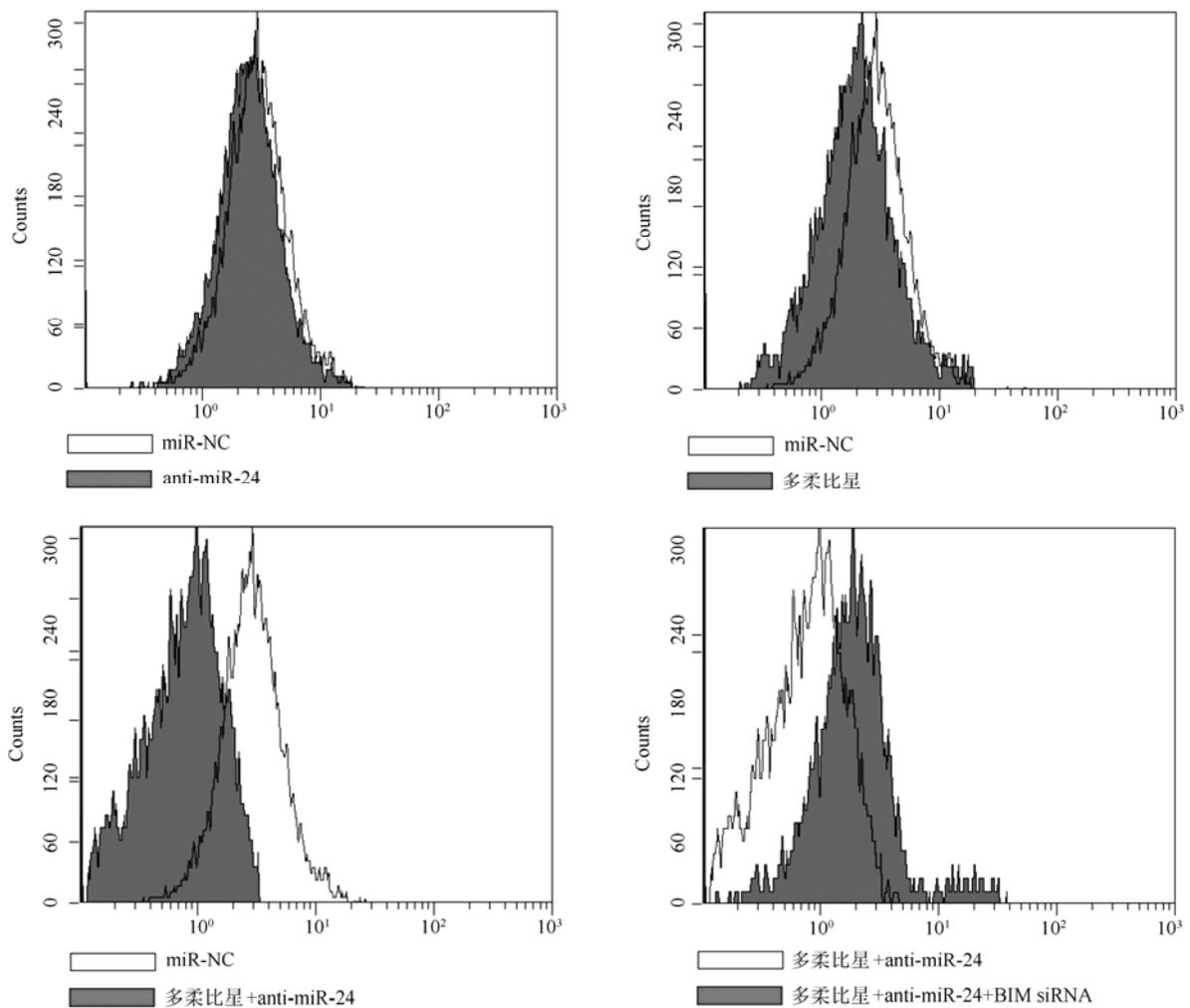


图 5 SW480 细胞用多柔比星、miR-24 反义核酸及 BIM siRNA 处理后，JC-1 染色法检测细胞的线粒体膜电位
Fig. 5 The mitochondrial membrane potential was measured using JC-1 staining after the SW480 cells were treated with doxorubicin, anti-miR-24 and BIM siRNA

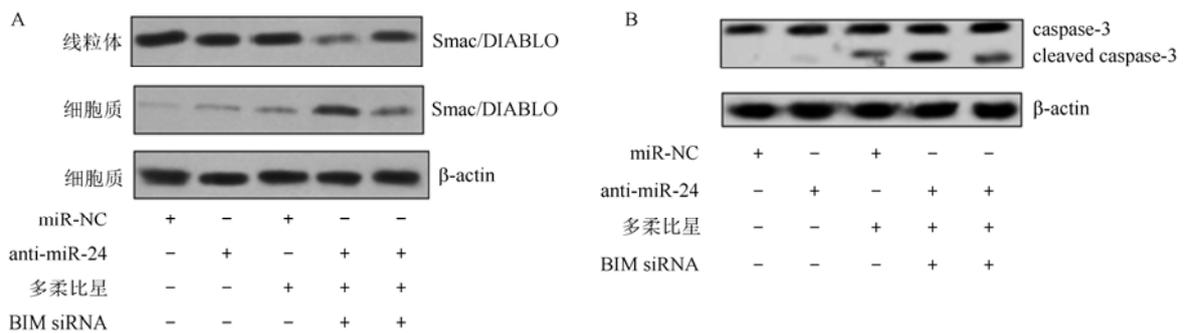


图 6 多柔比星及 miR-24 反义核酸对 SW480 细胞 Smac/DIABLO 及 caspase-3 的影响
A-多柔比星联合 miR-24 反义核酸诱导 Smac/DIABLO 从线粒体中释放到细胞质中，BIM siRNA 能阻断 Smac/DIABLO 的释放；B-多柔比星联合 miR-24 反义核酸可显著激活 SW480 细胞的 caspase-3 蛋白，BIM siRNA 能阻断 caspase-3 的激活。

Fig. 6 The effect of doxorubicin and anti-miR-24 on the activation of Smac/DIABLO and caspase-3
A-doxorubicin plus anti-miR-24 induced the release of Smac/DIABLO from mitochondrial into cytoplasm, which could be inhibited by BIM siRNA; B-doxorubicin plus anti-miR-24 induced the activation of caspase-3, which could be inhibited by BIM siRNA.

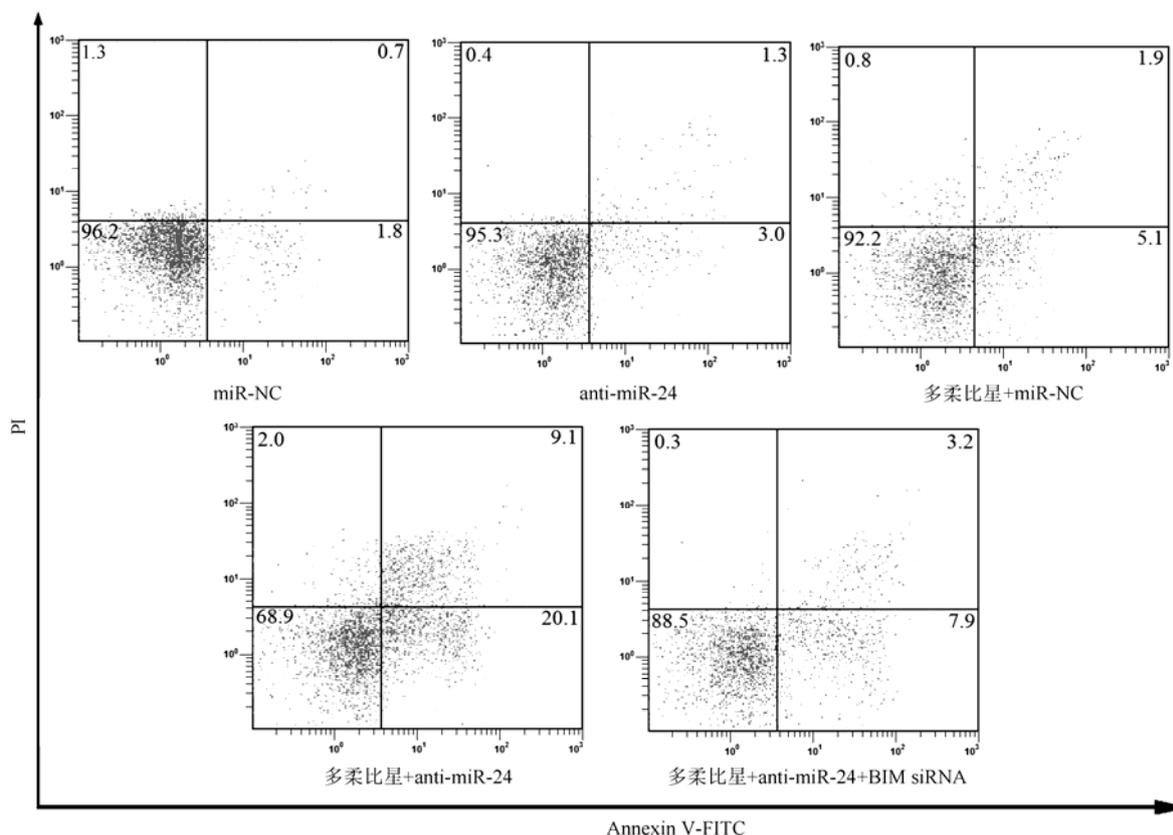


图7 Annexin V/PI 染色法检测用多柔比星、miR-24 反义核酸及 BIM siRNA 处理后的 SW480 细胞的凋亡水平

Fig. 7 The apoptosis of SW480 cells treated with doxorubicin, anti-miR-24 and BIM siRNA was measured using Annexin V/PI staining

Smac/DIABLO 是 IAP 蛋白的阻断剂, 能通过与 IAP 蛋白的结合废除 IAP 对 caspase 的抑制作用, 因此细胞质中的 Smac/DIABLO 能诱导凋亡的发生^[19]。本研究发现 miR-24 反义核酸联合多柔比星在损伤线粒体后, 促使线粒体中的 Smac/DIABLO 释放到细胞质中, 进而引起 caspase-3 的活化, 诱发细胞凋亡。BIM siRNA 阻断了 Smac/DIABLO 的释放, 进而减弱了 miR-24 反义核酸联合多柔比星对 SW480 凋亡的诱导, 证实了 BIM-Smac/DIABLO 途径在多柔比星治疗中的重要作用。综上所述, miR-24 在结肠癌中可能起肿瘤促进作用, 针对 miR-24 的反义核酸可显著提高化疗药物多柔比星对结肠癌细胞的杀伤活性。

REFERENCES

- [1] NAIR N, GONGORA E. MicroRNAs as therapeutic targets in cardiomyopathies: myth or reality? [J]. *Biomol Concepts*, 2014, 5(6): 439-448.
- [2] WOLFSON B, EADES G, ZHOU Q. Roles of microRNA-140 in stem cell-associated early stage breast cancer [J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6(5): 591-597.
- [3] MO Z H, WU X D, ZHANG B, et al. Expression and clinical significance of microRNA-376a in colorectal cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(21): 9523-9527.
- [4] DU W W, FANG L, PENG C, et al. MicroRNA mir-24 enhances tumor invasion and metastasis by targeting ptpn9 and ptpnf1 to promote egf signaling [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126 (Pt 6): 1440-1453.
- [5] MA Y, SHE X G, WAN Q Q, et al. miR-24 promotes the proliferation and invasion of HCC cells by targeting SOX7 [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(11): 10731-10736.
- [6] ZHAO G, LIU L, CUI J, et al. Upregulation of miR-24 promotes cell proliferation by targeting NAIF1 in non-small cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(5): 3693-3701.
- [7] LI Y Q, LU J H, HONG W Q, et al. MiR-24 functions as a tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma through targeting FSCN1 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34(1): 130.
- [8] JAFRI S H, MILLS G. Lifestyle modification in colorectal cancer patients: an integrative oncology approach [J]. *Future Oncol*, 2013, 9(2): 207-218.
- [9] XU A R, YING J Y, MA W C, et al. Preparation and evaluation of doxorubicin-loaded titanium dioxide nanoparticles [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2014, 31(8): 962-965.
- [10] LI J, LIU H, YU H, et al. Chemoresistance to doxorubicin induces epithelial-mesenchymal transition via upregulation of transforming growth factor β signaling in HCT116 colon cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 192-198.
- [11] TAO Y J, LI Y J, XU L, et al. Antisense oligonucleotides against microRNA-21 reduced the proliferation and migration of human colon carcinoma cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2015(15):

77. Doi: 10.1186/s12935-015-0228-7.

- [12] CHEN C, RIDZON D A, LEE D H, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179.
- [13] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [14] PRATHAPAN A, VINEETHA V P, RAGHU K G. Protective effect of *Boerhaavia diffusa* L. against mitochondrial dysfunction in angiotensin II induced hypertrophy in H9c2 cardiomyoblast cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e96220.
- [15] ZHENG X, LI J, LI Y, et al. MicroRNA-24 induces cisplatin resistance by targeting PTEN in human tongue squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2015, 51(11): 998-1003.

- [16] WANG X, HE X, LU C, et al. Involvement of Bim in Photofrin-mediated photodynamically induced apoptosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(4): 1527-1536.
- [17] SHAO Y Y, CHANG Y L, CHENG A L, et al. The germline BIM deletion polymorphism is not associated with the treatment efficacy of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Oncology*, 2013, 85(5): 312-316.
- [18] WEBER K, HARPER N, COHEN G M, et al. BIM-mediated membrane insertion of the BAK pore domain is an essential requirement for apoptosis [J]. *Cell Rep*, 2013, 5(2): 409-420.
- [19] EMEAGI P U, VAN LINT S, BRECKPOT K, et al. Proinflammatory characteristics of SMAC/DIABLO-induced cell death in antitumor therapy [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(6): 1342-1352.

收稿日期: 2015-08-29

盐酸达泊西汀的合成

伍平华^{1,2}, 杜全海², 陆涛^{1*} (1.中国药科大学理学院, 南京 210009; 2.南京康福顺药业有限公司, 南京 210009)

摘要: 目的 优化盐酸达泊西汀的合成工艺。方法 以 3-氯代苯丙酮为原料经还原、醚化、二甲氨基取代、拆分、成盐反应制得目标产物。结果与结论 改进后的工艺简化了操作、降低了成本、较大程度上提高了收率, 利于工业化生产。

关键词: 达泊西汀; 工艺优化; 选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂

中图分类号: TQ460.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2016)02-0181-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.02.011

Improved Synthesis of Dapoxetine Hydrochloride

WU Pinghua^{1,2}, DU Quanhai², LU Tao^{1*} (1.College of Sciences, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2.Nanjing Kang Fushun Pharmaceutical Company Limited, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To improve the method for the synthesis of dapoxetine hydrochloride. **METHODS** Starting with 3-chloro-1-phenyl-1-propanone, dapoxetine hydrochloride was synthesized via a 5-step chain reaction including reduction, etherification, amination by dimethylamine, separation, and acidification by HCl·EA. **RESULTS & CONCLUSION** The improved process has the advantages of convenient operation, low cost, high yield, and is suitable for industry.

KEY WORDS: dapoxetine; synthesis; SSRI

达泊西汀化学名为(S)-(+)-N,N-二甲基-1-苯基-3-(1-萘氧基)丙胺, 是一种选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂, 最初广泛用于治疗抑郁症和相关的情感障碍, 后被开发用于治疗男性早泄。通常成品为其盐酸盐。

1 合成路线

国内外报道的合成达泊西汀的文献较多^[1-6]。本研究在参考文献[3]的基础上, 对其合成工艺进行优化。以 3-氯代苯丙酮(2)为原料, 经还原得到 3-氯代苯丙醇(3), 3 与 1-萘酚经醚化反应得到化合

物 4, 4 与二甲胺进行亲核取代得到化合物 5, 化合物 5 经 D-(+)-二对甲基苯甲酰酒石酸拆分、成盐酸盐得到目标化合物 1。合成路线见图 1。

与文献[3]相比, 本路线改进了还原 3-氯代苯丙酮(2)的方法。文献[3]将硼氢化钠溶解在乙醇中, 实际操作发现硼氢化钠在乙醇中溶解度低, 本研究改用甲醇溶解硼氢化钠, 同时加入少量氢氧化钠增加其稳定性, 可完全溶解, 操作简便。文献[3]选用二氯甲烷作溶剂, 产生大量副产物 1-苯丙醇。改用甲醇作溶剂可使产品纯度>97%, 大大减少了

作者简介: 伍平华, 女, 硕士生 Tel: 15051852061 E-mail: phwu2014@163.com

*通信作者: 陆涛, 男, 博士, 教授 Tel: (025)86185086 E-mail: lutao@cpu.edu.cn