

34 褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* 提取物抗肿瘤作用的实验研究

童树阳, 林永生, 张守兰, 杨廷松, 陈乐堂

(解放军防化研究院 药物化学研究所, 北京 102203)

摘要: 从褶纹冠蚌中提取亲水性物质(I组份), 采用超滤法将I组份分离为相对分子质量 ≤ 30 kD的聚糖(II组份)和相对分子质量 ≥ 30 kD的糖蛋白(III组份)两部分。研究结果表明III组份对小鼠 L_{1210} 淋巴白血病细胞、 S_{18} 肉瘤、EAC 腹水瘤显示出一定的抗肿瘤活性, 同时对荷瘤小鼠 NK 细胞杀伤活性有明显的增强作用, 而II组份则无抗肿瘤作用, 但对荷瘤小鼠 NK 细胞杀伤活性有一定的增强作用。

关键词: 褶纹冠蚌提取物; 抗肿瘤; NK 杀伤活性

中图分类号: Q958.8 R931.73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-3461(2003)03-0020-05

Experimental Study on Antitumor effect of extracts from *Cristaria plicata*

TONG Zhao-yang, LIN Fu-sheng, ZHANG Shou-lan, et al.

(Beijing Pharmacological Chemistry Institute, Beijing 102203, China)

Abstract: The hydrophilic precipitates (Fraction I) were extracted from *Cristaria plicata* and further prepared into two fractions by ultrafiltration, which were fraction II with molecular weight ≤ 30 kD polysaccharide and fraction III with molecular weight ≥ 30 kD glycoprotein, respectively. The results showed the fraction III had most antitumor activity on lymphocytic leukemia cells *in vitro* and Sarcoma 180, Krebs 2 ascites of mice *in vivo*. At the same time, the fraction III could significantly enhance the ability of natural killer cell of mice implanted with Sarcoma 180 to kill target cell of Yac-1. However, the fraction II had no antitumor activity against lymphocytic leukemia cells *in vitro* and Sarcoma 180, Krebs 2 ascites of mice *in vivo*, it could significantly enhance the ability of natural killer cell of mice implanted with Sarcoma 180 to kill target cell of Yac-1.

Key words: *Cristaria plicata* extracts; Antitumor activity; Natural killer cell activity

贝类软体动物具有抗肿瘤作用早已为人们所知,如《神农本草经》:“文蛤主恶疮”。在研究软体动物的抗肿瘤作用中,人们相继发现鲍鱼、牡蛎、海螺、柔鱼、蜗牛、蛤提取物具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤活性。从挖掘传统的祖国医学出发,国内已有学者发现文蛤、青蛤^[1,2]、无齿蚌^[3]提取物能抑制 S_{180} 肉瘤、EAC 腹水瘤、 P_{302} 、 L_{1210} 、 B_{16} 、 $HeLaS_2$ 等瘤细胞,并有一些试用于临床治疗癌症的报道^[4]。褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* (Leach) 为蚌科动物,该资源在我国极为丰富。为充分开发

我国的海洋药物资源,本实验对褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* 提取物进行了研究,发现其能抑制小鼠 S_{180} 肉瘤、EAC 腹水瘤、 L_{1210} 淋巴白血病瘤,且能增强荷瘤小鼠 NK 细胞杀伤活性,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 实验材料:

褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* (Leach),采自河南省汝南县宿鸭湖水库,由中国医学科学院药用植物研究所李瑞林研究员进行鉴定;

Sephadex G-25, Sephadex G-15 购自 Pharmacia 公司; L_{1210} (小鼠淋巴瘤白血病瘤) 由中国医学科学院肿瘤医院提供; S_{180} 实体瘤, 由中医研究院药理学室提供; RPMI-1640 培养基(含 L-谷氨酰胺和酚红)购自 GIBCO 公司, 使用时再加入 10% 的小牛血清; 0.01% L-谷氨酰胺; $100 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 青霉素; $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素; 0.5% HEPES, 碳酸氢钠, pH 7.4。

1.2 实验方法

1.2.1 褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* 提取物的体外抗肿瘤活性

取回后, 去壳, 匀浆后, 用反复冻融法提取亲水性物质 I, Sephadex G-25 柱层析对 I 组分进行分级, 采用 L_{1210} 瘤细胞, MTT 法检测柱层析各分级产物的抗肿瘤活性。肿瘤细胞生长抑制率 = $(1 - \text{药物组吸光度值} / \text{空白组吸光度值}) \times 100\%$

1.2.2 褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* 提取物的体内抗肿瘤活性

用 Quixstand 中空纤维超滤系统, 将 I 组分进一步超滤分级成 $\leq 30 \text{ KD}$ 的 II 组分和 $\geq 30 \text{ KD}$ 的 III 组分。用小鼠 S_{180} 肉瘤, EAC 腹水瘤测定各分级产物的抗肿瘤活性, 0.9% 的生理盐水作阴性对照, 环磷酰胺作用性对照, 实体瘤疗效采用瘤重抑制率表示, 腹水瘤疗效采用生命延长率表示。瘤重抑制率 = $(1 - T/C) \times 100\%$ 其中 T—给药组平均瘤重, C—阴性对照组平均瘤重; 生命延长率 = $(A/B - 1) \times 100\%$ 其中 A—给药组平均存活天数, B—阴性对照组平均存活天数。

1.2.3 褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* 提取物对荷瘤小鼠 NK 细胞杀伤活性的影响

昆明小鼠, 接种 S_{180} 肉瘤后, 灌胃方式给药 (1 g), 以生理盐水代替药物作为阴性对照, 以环磷酰胺 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 作为阳性对照, 每天给药 1 次, 共给药 8 次, 8d 后处死动物, 取脾, 常规制备 NK 效应细胞, 同时取常规传代的 Yac-1 细胞作为靶细胞, MTT 法分别测定 I、II、III 组分的 NK 细胞杀伤率。NK 杀伤率 (%) = $[1 - (\text{OD}_{\text{效应}} - \text{OD}_{\text{靶}}) / \text{OD}_{\text{靶}}] \times 100\%$ [12]

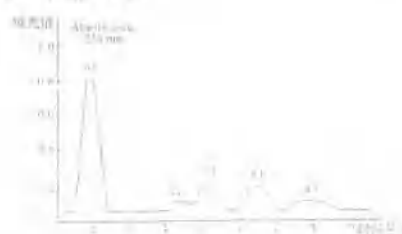
1.2.4 褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* 主要抗

肿瘤物质的蛋白质、糖含量及 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

取 *Cristaria plicata* 提取物 G-25 柱层析的第一个大分子级分 A₁, 透析脱盐后, 冷冻干燥, 用 Lowry 法测定其蛋白质含量; 苯酚-硫酸法测定其糖含量, 由于很难知道天然产物中单糖的种类和比例, 我们分别采用半乳糖、葡萄糖、甘露糖、L-阿拉伯糖作标准测定其糖含量; 另取同样样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 分别采用考马斯亮蓝 R-250 做蛋白染色, 过碘酸-Schiff 试剂 (PAPS) 进行糖蛋白染色, 比较电泳条带的相对分子质量大小和染色差别 [13]。

2 实验结果

2.1 褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* 提取物的体外抗肿瘤活性



粗提物 I



R-250 染色 PAPS 糖蛋白染色

图1 *Cristaria plicata* 提取物 I 的 G-25 层析剖面及 SDS-PAGE 分析结果

收集 *Cristaria plicata* 提取物 I G-25 柱层析各分级产物, 脱盐(除大分子 A₁ 采用透析脱盐外, 其余各组分均采用 G-15 柱脱盐)冻干后, 用 L_{1210} 检测各级分的体外抗肿瘤活性, 结果见表 1。

表 1 *Cristaria plicata* 提取物的 G-25 分级产物及体外抗肿瘤活性

组分	产率 (%)	浓度 (mg · L ⁻¹)	抑制率 (%)	ID ₅₀ 值		抗肿瘤
				(mg · L ⁻¹)	95% 置信限	
A ₁	2.36	40	63.93	5.16	2.00 — 12.38	有
A ₂	—	—	未测	—	—	—
A ₃	1.42	40	5.47	—	—	无
A ₄	1.05	40	~ 15.84	—	—	无
A ₅	0.62	40	~ 10.29	—	—	无

G-25 层析中分级产物除大分子 A₁ 级分对 L₁₂₁₀ 瘤细胞有抑制作用外,其余小分子分级产物对 L₁₂₁₀ 瘤细胞均无抑制作用。G-25 层析中大分子分级产物 A₁, Lowry 法测定蛋白质含量 66.43%, 分别选用半乳糖、葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖为基准物测定的含糖量分别为 13.94%, 12.71%, 13.24%, 4.66%。抗肿瘤级分 A₁ SDS-PAGE 电泳、考马斯亮蓝染色表明其相对分子质量 30kD 以上, PAPS 糖蛋白染色也呈阳性(对照 Marker 均未染出阳性带), 可以认为是一些糖蛋白组分。

2.2 *Cristaria plicata* 提取物的体内抗肿瘤活性

表 2 *Cristaria plicata* 提取物及超滤分级产物对小鼠 S₁₈ 的体内抗肿瘤活性

处 理	瘤 株	给药方式	剂 量 (mg · kg ⁻¹)	肿瘤抑制率 (%)	P 值
生理盐水	S ₁₈	ip × 8	—	—	—
生理盐水	S ₁₈	ig × 8	—	—	—
环磷酰胺	S ₁₈	ip × 8	20	82.0	P < 0.01
环磷酰胺	S ₁₈	ig × 8	20	85.71	P < 0.01
生理盐水	EAC	ip × 8	—	—	—
环磷酰胺	EAC	ip × 8	20	96.4	P < 0.01
组分 I	S ₁₈	ip × 8	250	76.3	P < 0.05
组分 I	S ₁₈	ip × 8	500	41.4	P < 0.01
组分 I	S ₁₈	ip × 8	1000	50.3	P < 0.01
组分 I	S ₁₈	ig × 8	500	55.05	P < 0.05
组分 I	S ₁₈	ig × 8	1000	63.41	P < 0.01
组分 I	S ₁₈	ig × 8	2000	75.95	P < 0.01
组分 I	EAC	ip × 8	250	—	15.8
组分 I	EAC	ip × 8	500	47.2	—
组分 I	EAC	ip × 8	1000	94.4	P < 0.05
组分 II	S ₁₈	ip × 8	125	14.2	—
组分 II	S ₁₈	ip × 8	250	—	17.16
组分 II	S ₁₈	ip × 8	500	3.67	—
组分 II	S ₁₈	ip × 8	1000	10.69	—
组分 II	EAC	ip × 8	250	—	7.25
组分 II	EAC	ip × 8	500	—	26.67
组分 II	EAC	ip × 8	1000	—	31.93
组分 III	S ₁₈	ip × 5	250	47.3	P < 0.05
组分 III	S ₁₈	ip × 5	500	69.8	P < 0.01
组分 III	EAC	ip × 5	250	34.2	—
组分 III	EAC	ip × 5	500	136.2	P < 0.01

2.3 *Cristaria plicata* 对荷瘤小鼠 NK 细胞杀伤活性的影响

如表 3 所示, 与正常组相比, S₁₈ 肿瘤模

从表 2 中可以看出 *Cristaria plicata* 水提取物 I 及其超率分级产物 II 都能抑制小鼠 S₁₈ 肉瘤, 组分 II 的抑制作用强于组分 I, 而组分 II 对 S₁₈ 肉瘤基本无抑制作用, 表明 *Cristaria plicata* 提取物的抗肿瘤成分主要是相对分子质量在 30kD 以上的部分, 相对分子质量在 30kD 以下的成分基本无抗肿瘤作用, 这与体外实验的结果基本一致。 *Cristaria plicata* 水提取物 I、II 组分对小鼠 EAC 腹水瘤的抑制作用与 S₁₈ 相似, 主要抗肿瘤部位也是相对分子质量 30kD 以上的部分, 而相对分子质量 30kD 以下的部分对 EAC 腹水瘤无抑制作用。

型组 NK 细胞杀伤活性明显降低, 差异极显著 (P < 0.001), 说明荷瘤小鼠的免疫功能明显低于正常小鼠, 阳性对照药环磷酰胺 NK

杀伤活性也明显低于正常小鼠。I 组分 2000、1000、500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 个剂量与荷瘤模型组相比 NK 杀伤活性都明显增强, 统计检验达极显著水平, 而当剂量 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 基本接近正常组水平; II 组分的 3000、500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 2 个剂量与荷瘤模型组相比明显提高, 且差异显著 ($P < 0.001$), 而当剂量 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 也基本接近正常组水平; II 组分 2000、500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 2 个剂量 NK 细胞杀伤率较荷瘤模型组明显提高, 差异极显

著, 而以高剂量 2000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药时, NK 杀伤活性基本接近正常组的水平。另外, 各处理的 NK 杀伤活性都明显高于环磷酰胺对照组。因此, 从 NK 杀伤活性来看, *Cristaria plicata* 亲水性粗提物 I 以及超滤分级纯化的糖蛋白 III 组分, 在抗肿瘤作用的同时对荷瘤小鼠的 NK 杀伤活性有增强作用, 而小分子多糖 II 组分尽管无抗肿瘤活性, 但对荷瘤小鼠的 NK 杀伤活性有一定的增强作用。

表 3 *Cristaria plicata* 提取物不同分级产物对荷瘤小鼠 NK 细胞杀伤活性的影响 ($n=10$)

处 理	给药剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	NK 杀伤率 (%) ($\bar{x} \pm s$)	显著性 (T 值)	显著性 (C 值)	显著性 (N 值)
正常对照	—	86.83 $\pm$ 5.02			
荷瘤对照	—	60.13 $\pm$ 5.73			$<0.01(-)$
环磷酰胺	20	62.03 $\pm$ 9.39			$<0.01(-)$
I 组分 I	2000	68.43 $\pm$ 8.56	<0.01		$<0.01(-)$
I 组分 I	1000	78.02 $\pm$ 9.33	<0.01	<0.01	$<0.01(-)$
I 组分 I	500	83.81 $\pm$ 8.13	<0.01	<0.01	
II 组分 II	2000	76.47 $\pm$ 6.11	<0.01	<0.01	$<0.01(-)$
II 组分 II	1000	60.01 $\pm$ 8.58			$<0.01(-)$
II 组分 II	500	87.48 $\pm$ 4.10	<0.01	<0.01	
III 组分 III	2000	84.43 $\pm$ 7.56	<0.01	<0.01	
III 组分 III	1000	89.45 $\pm$ 5.00	<0.01		$<0.01(-)$
III 组分 III	500	79.55 $\pm$ 4.68	<0.01	<0.01	$<0.05(-)$

注: T、C、N 分别与荷瘤模型对照、环磷酰胺、正常对照小鼠做比较时的 P 值, 统计方法采用两两配对 t 检验法, 每个试验组为 10 只小鼠。

3 讨论

Cristaria plicata 提取物经 S_{80} 、EAC 动物移植性肿瘤试验, 均表现出一定的抑瘤活性, 粗提物的抗肿瘤活性高于文献报道的蛤类, 与无齿蚌大体相当。亲水性粗提物中抗肿瘤物质主要是一些相对分子质量 $\geq 30\text{kD}$ 的 III 组分, 初步生化性质研究表明是一些糖蛋白成分, 而相对分子质量 $\leq 30\text{kD}$ 的 II 组分则由一些多糖构成, 经体外、体内实验证明均无抗肿瘤活性, 这也被 I、III 组分的相对抗肿瘤活性大小所证实。由于 I 组分在超滤分级时除去了无抗肿瘤活性的 II 组分, 使得 III 组分中的抗肿瘤物质得到了“浓缩”, 从而使 III 组分 ($500\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip 给药 5 次, 对 S_{80} 、EAC 的抑制率分别 88.8%, 120.2%) 的抗肿瘤活性相对强于 I 组分 ($1000\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip 给药 3 次, 对 S_{80} 、EAC 的抑制率分别 50.3%, 94.4%)。对 *Cristaria plicata* 提取物的急性毒性研究表明, 该提取物是无毒的 ($LD_{50} > 10\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$), 其抗肿瘤作用不同于细胞毒类药物的作用机理, 这与一些学者研究无齿蚌提取物的实验结果基本相

似。我们在用 L_{1210} 瘤细胞研究其体外抗肿瘤及其 L_{1210} 瘤细胞增殖动力学过程中发现, 该提取物的大分子抗肿瘤组分在体外也能明显抑制 L_{1210} 瘤细胞的增殖。Sephadex G-25 分级制备的 A₁ 组分, SDS-PAGE 凝胶电泳证明为一些相对分子质量大于 30kD 的糖蛋白, 对 L_{1210} 抑制作用的 ID_{50} 为 $5.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 而国内一些学者研究 HB 提取物, 当剂量为 $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其抑制率仅为 20%, 表现出对 L_{1210} 瘤细胞无明显的抑制作用^[2], 这可能与两种贝类软体动物的种属、提取方法及获取有效部位的差异有关。国外学者 Stanley Stephen 在研究中发现, 蛤素中的抗肿瘤大分子是一相对分子质量为 76kD 的糖蛋白, 这种成分在体外能显著抑制 L_{1210} 瘤细胞的生长, 其 ID_{50} 为 $1.2 \times 10^{-2}\text{M}$, 其抗肿瘤作用被认为是一种类似于干扰素的作用机理^[2], 我们实验结果与之相似性表现在, 大分子提取物体外都能抑制 L_{1210} 的增殖, 都是一些糖蛋白组分, 相对分子质量范围也基本接近, 是否是一种巧合? 这些初步的实验结果都表明 *Cristaria plicata* 提取物更可能类似于抑制因子的抗肿瘤作用机理。另外, 令人感兴趣的是该提取物在抗肿瘤作用的同时, 对荷瘤小

鼠的 NK 细胞杀伤活性有明显的增强作用, 由于 NK 细胞不需预先致敏即能杀伤肿瘤细胞, 其杀伤作用无肿瘤特异性和受 MHC 的限制性, NK 细胞介导的天然细胞毒性在宿主抗肿瘤和其他病原感染的疾病防疫机制中起重要作用, 这与传统的化疗药环磷酰胺相比具有明显的优势。由于 *Cristaria plicata* 在我国有广泛分布, 其提取物无毒, 有增强 NK 细胞杀伤活性作用, 开发这类抗肿瘤抑制因子对于从天然药物中寻找新药具有重要意义。必须提及的是 *Cristaria plicata* 提取物中的小分子多糖尽管无抗肿瘤作用, 我们初步试验表明其对荷瘤小鼠的 NK 细胞杀伤活性有一定的增强作用, 鉴于有文献报道蛤多糖有增强免疫功能的作用^[12], 因此有必要从免疫系统调控网络角度深入研究这些多糖对免疫系统功能的影响。

参考文献:

(上接第 5 页)唯一差别是化合物(Ⅲ) $\delta_{\text{H}} 1.26$ (hrs, 10H), 而化合物(Ⅰ) $\delta_{\text{H}} 1.27$ (hrs, 30H), 可见化合物(Ⅲ)长链比化合物(Ⅰ)多 5 个 $-\text{CH}_2-$, 因此, 我们可推知化合物(Ⅲ)为 α -23 烷-甘油酯。

3 物理常数与波谱数据

化合物(Ⅰ): mp 65~60°C; $\text{IR}_{\text{KBr}}^{\text{cm}^{-1}}$: 3411, 2921, 2850, 1463, 1130, 1085, 1051; $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta_{\text{H}} 3.83(\text{m}, 1\text{H})$, 3.69(m, 1H), 3.64(m, 1H), 3.50(m, 2H), 3.46(m, 2H), 1.98(s, 2H), 1.55(m, 2H), 1.23(m, 30H), 0.83(t, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta_{\text{C}} 72.36$, 71.88, 70.40,

64.34; MS m/z : 345, 327, 283, 253, 125, 57,

化合物(Ⅱ): mp 80~82°C; $\text{IR}_{\text{KBr}}^{\text{cm}^{-1}}$: 2935, 2869, 1683, 1619, 1463, 1378, 1232, 964, 867; $^1\text{H-NMR}[(\text{CDCl}_3)_2\text{CO}]$: $\delta_{\text{H}} 5.7$ (s, 1H), 1.15(s, 3H), 0.63(s, 3H); MS m/z : 384, 342, 261, 229, 124, 55, 43,

化合物(Ⅲ): mp 68~69°C; $\text{IR}_{\text{KBr}}^{\text{cm}^{-1}}$: 3412, 2895, 2925, 1461, 1375, 1118, 1085, 1056; $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta_{\text{H}} 5.6$ (s, 2H), 4.17 (m, 1H), 4.0(m, 1H), 3.66(m, 1H), 3.43(m, 2H), 3.40(m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta_{\text{C}} 75.51$, 72.34, 71.96, 67.34, 32.49, 29.23 (18CH_2), 26.71,

71; 何汉源, 葛英倩, 文蛤提取物抗肿瘤研究(Ⅱ), 肿瘤防治研究, 1999, 26, 3.

[2] La PC, Golden A. Antineoplastic substances from sponges: A review[J]. Cancer chemotherapy reports 2, 1974; 4 (3): 97.

[3] 杜罗喜, 严惠芳. 116 有效组分抗肿瘤作用的研究[J]. 中国海洋药物, 1993, 12(1), 10.

[4] 柯政, 海洋生物(HS-72)对肝癌细胞的诱导[J]. 海洋药物, 1987, 6(2), 22.

[5] 佐佐田, 现代药理学实验方法(上册)[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993, 724.

[6] 张维忠, 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987, 342.

[7] Stanley Stephen. Isolation and characterization of water soluble antineoplastic principles of the Common Cigu bug, "Mercuraria mercenaria" [D]. Columbus, (Ohio) State University, 1987, 1.

[8] 黄昌贵, 黄芳. 文蛤多糖的抗癌免疫药理研究[J]. 中国海洋药物, 1999, 18(2), 15.

(收稿日期: 2002-03-19)

23, 19, 14, 24.

表 1 化合物Ⅱ的碳谱数据(CD), ^1C 及相应的文献值

序号	化合物(Ⅱ)	文献[6]	序号	化合物(Ⅱ)	文献[6]
1	35.5	35.7	15	35.8	35.9
2	33.8	33.9	16	24.2	24.1
3	199.5	198.9	17	28.1	28.1
4	128.7	129.6	18	56.1	55.1
5	171.6	171.0	19	11.9	12.9
6	32.9	32.9	20	17.3	17.4
7	33.6	32.1	21	25.5	25.7
8	35.5	35.7	22	16.6	16.7
9	53.8	53.8	23	36.1	36.1
10	38.5	38.6	24	22.6	22.8
11	21.1	21.0	25	39.6	39.6
12	39.5	39.4	26	27.8	27.9
13	42.3	42.4	27	32.7	32.5

参考文献

[1] 何细新, 苏晓娜, 曾晓梅, 等. 李氏短指软珊瑚的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(2), 14.

[2] 李凤英, 邓松之, 陈志刚, 等. 南海多穗珊瑚礁珊瑚化学成分的研究[J]. 中国海洋药物, 1997, 16(1), 4.

[3] 唐利岩, 邓松之, 章勤, 等. 南海豆蔻珊瑚化学成分的研究(Ⅲ)[J]. 中国海洋药物, 2001, 20(1), 1.

[4] Kusia S. Formation of by intestinal bacteria and its biological effect[J]. *BIOGEN Research*, 1993, 3, 17.

[5] MS, NIST1407, LIB.

[6] Syed QA, Razi JR, Williams. Synthesis and Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies of Δ^1 and Saturated 4,4-Disubstituted 3-ketosteroids[J]. *J Org Chem*, 1981, 46(6), 1127.

(收稿日期: 2002-11-02)