



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104262316 A

(43) 申请公布日 2015.01.07

(21) 申请号 201410468326.7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014.09.15

C07D 311/76(2006.01)

(71) 申请人 云南民族大学

A61K 31/37(2006.01)

地址 650500 云南省昆明市呈贡大学城雨花
校区

A61P 35/00(2006.01)

(72) 发明人 周敏 高雪梅 胡秋芬 杜刚
李银科 叶艳清 杨海英(74) 专利代理机构 昆明知道专利事务所(特殊
普通合伙企业) 53116

代理人 姜开侠

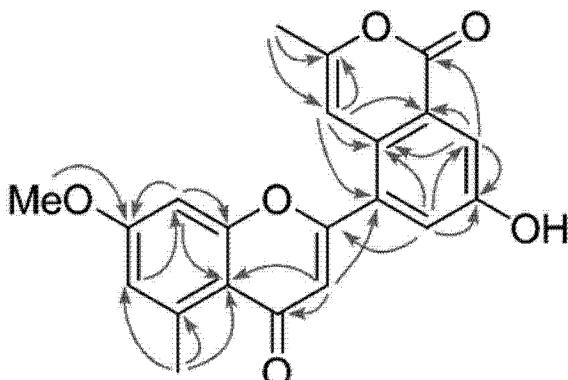
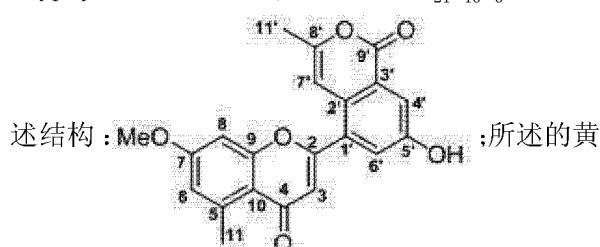
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

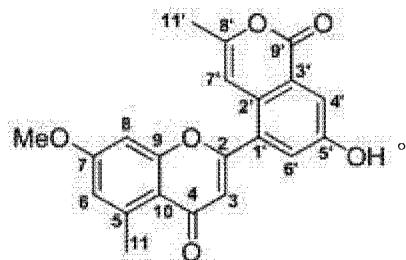
一种黄酮类化合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种黄酮类化合物及其制备方法和应用，所述的黄酮类化合物是从豆科山蚂蝗属植物尖叶山蚂蝗 (*Desmodium oxyphyllum*) 的全草中分离得到，命名为山蚂蝗素 BA，英文名为 *oxyphyllumflavoneA*，其分子式为 $C_{21}H_{16}O_6$ ，具有下述结构：



1. 一种黄酮类化合物,其特征在于所述化合物是从干燥的豆科山蚂蝗属植物尖叶山蚂蝗 (*Desmodium oxyphyllum*) 的全草中分离得到,命名为山蚂蝗素 A,英文名为 oxyphyllumflavone A,其分子式为 C₂₁H₁₆O₆,具有下述结构:



醚 - 丙酮溶液体积配比为 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5。

9. 根据权利要求 2 所述的黄酮类化合物的制备方法, 其特征在于所述 F 步骤中高压液相色谱分离纯化是以 30~60% 的甲醇为流动相, 流速 10~14ml/min, 21.2 mm × 250 mm, 5 μm 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相, 紫外检测器检测波长为 254 nm, 每次进样 45~60 μL, 收集 20~35min 的色谱峰, 多次累加后蒸干。

10. 一种权利要求 1 所述的黄酮类化合物在制备抗癌药物中的应用。

一种黄酮类化合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物有效成分提取分离技术领域,具体涉及一种黄酮类化合物及其制备方法和应用。

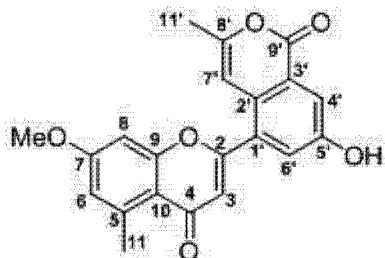
背景技术

[0002] 豆科山蚂蝗属(学名 *Desmodium* Desv.)，约 350 种,多分布于亚热带和热带地区。我国有 27 种 5 变种,大部分分布于西南经中南部至东南部,仅 1 种产陕、甘西南部。研究表明,该属植物富含黄酮类化合物,这类成分结构新颖多样,且具有广泛的药理活性,如抗肿瘤,抗病毒,抗菌等活性。山蚂蝗(*Desmodium oxyphyllum*)是一种高 30 厘米至 1.5 米的半灌木。在民间广泛用于疏风清热,解毒消肿。主治温病发热、风湿骨痛、咳嗽、咯血和疮毒痈肿。本发明从山蚂蝗(*Desmodium oxyphyllum*)中分离得到一个新的黄酮类化合物,该化合物具有显著的抗癌细胞毒活性。

发明内容

[0003] 本发明的第一目的是提供一种黄酮类化合物;第二目的在于提供所述黄酮类化合物的制备方法;第三目的在于提供所述黄酮类化合物在制备抗癌药物中的应用。

[0004] 本发明的第一目的是这样实现的,所述的黄酮类化合物是从干燥的豆科山蚂蝗属植物尖叶山蚂蝗 (*Desmodium oxyphyllum*) 的全草中分离得到,命名为山蚂蝗素 A,英文名为 *oxyphyllumflavone A*,其分子式为 C₂₁H₁₆O₆,具有下述结构:



本发明的第二目的是这样实现的,所述的黄酮类化合物的制备方法,其特征在于以干燥的豆科山蚂蝗属植物尖叶山蚂蝗 (*Desmodium oxyphyllum*) 的全草为原料,经浸膏提取、有机溶剂提取、MCI 脱色、硅胶柱层析、高压液相色谱分离步骤而得到的,具体为:

A、浸膏提取:将豆科山蚂蝗属植物尖叶山蚂蝗 (*Desmodium oxyphyllum*) 的全草粉碎到 20~40 目,用有机溶剂超声提取 2~5 次,每次 30~60 分钟,提取液合并,过滤,减压浓缩提取液,静置,滤除沉淀物,浓缩成浸膏 a;

B、有机溶剂萃取:浸膏 a 中加入重量比 1~2 倍量的水,用与水等体积的有机溶剂萃取 3~5 次,合并有机溶剂萃取相,减压浓缩成浸膏 b;

C、MCI 脱色:浸膏 b 用重量比 3~5 倍量的甲醇水溶解,上 MCI 柱,用 80%~90% 甲醇水洗脱,合并有机溶剂萃取相,减压浓缩成浸膏 c;

D、硅胶柱一次层析:浸膏 c 用重量比 6~10 倍量的 160~200 目硅胶装柱进行硅胶柱层

析；以体积配比为 1:0~0:1 的氯仿 - 甲醇溶液进行梯度洗脱，收集梯度洗脱液、浓缩，经 TLC 监测，合并相同的部分；

E、硅胶柱二次层析：D 步骤洗脱液的 9:1 部分进一步用重量比 6~10 倍量的 160~200 目 硅胶装柱进行硅胶柱层析；以体积配比为 1:0~0:1 的石油醚 - 丙酮溶液进行梯度洗脱，收集梯度洗脱液、浓缩，经 TLC 监测，合并相同的部分；

F、高压液相色谱分离：E 步骤洗脱液的 8:2 部分进一步用高压液相色谱分离纯化即得所述的黄酮类化合物。

[0005] 以上述方法制备的黄酮类化合物的结构是通过以下方法测定出来的：

本发明所述的黄酮类化合物为黄色胶状物，紫外光谱（溶剂为甲醇）， λ_{\max} ($\log \epsilon$)：370 (3.86), 282 (3.95), 210 (4.38) nm；红外光谱（溴化钾压片） ν_{\max} : 3428, 1738, 1657, 1603, 1562, 1463, 1384, 1172, 1038, 873, 768 cm^{-1} ；高分辨质谱 (HRESIMS) 显示本发明化合物准分子离子峰 m/z 387.0840 [$\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值为 387.0845)，结合 ^{13}C 和 ^1H NMR 谱 (图 1 和图 2, 碳谱氢谱数据归属见表 1) 给出其分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_6$ 。从 ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) 和 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) 中显示 21 个碳信号和 16 个氢信号。这些信号中有一个典型的黄酮骨架信号，即 δ_c 160.7 s, 107.7 d, 180.1 s, 143.0 s, 116.0 d, 162.0 s, 101.8 d, 158.0 s, 114.2 s, 121.2 s, 139.8 s, 131.3 s, 105.3 d, 157.4 s, 101.2 d 以及氢谱中的 δ_h 6.63 s, 1H, 6.39 s, 1H, 7.47 s, and 7.00 s。这提示该化合物是一个黄酮类化合物。HMBC 谱中观测到 H-7' (δ_h 6.02 s) 与 C-1' (δ_c 121.2 s), C-2' (δ_c 139.8 s), C-3' (δ_c 131.3 s), C-8' (δ_c 155.3 s) 以及 C-10' (δ_c 19.7 q) 的相关，同时，还观测到 H-4' (δ_h 7.47 s) 与 C-9' (δ_c 162.8 s), C-2' (δ_c 139.8 s), 和 C-3' (δ_c 131.3 s) 的相关，提示了丙基和酯基分别连接在 C-2' 和 C-3' 上，并且形成一个六元 6-methyl- α -pyrone 环。其它片段也通过 HMBC 得到证实。其中，甲基信号 δ_h 2.32 s 与 C-5 (δ_c 143.0 s), C-6 (δ_c 116.0 d), 和 C-10 (δ_c 114.2 s) 相关，提示甲基联接在 C-5 上；而活泼氢 δ_h 9.20 brs 与 C-4' (δ_c 105.3 d), C-5' (δ_c 157.4 s), 和 C-6' (δ_c 101.2 d) 相关提示羟基连接在 C-5' 上；最后，甲氧基信号 δ_h 3.90 与 C-7 (δ_c 162.0 s) 相关则提示甲氧基连接在 C-7。因此，该黄酮类化合物结构得以确定，并命名为山蚂蝗素 A，英文名 oxyphyllumflavone B。

[0006] 表 1 化合物的 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (溶剂为 CDCl_3) (125 and 500 MHz)

No.	^{13}C	^1H
2	160.7s	
3	107.7d	6.52s
4	180.1s	
5	143.0s	
6	116.0d	6.63s
7	162.0s	
8	101.8d	6.39s
9	158.0s	
10	114.2s	
1'	22.8q	2.32s
2'	121.2s	
3'	139.8s	
4'	131.3s	
	105.3d	7.47s

5'	157.4s	
6'	101.2d	7.00s
7'	106.0d	6.02s
8'	155.3s	
9'	162.8s	
10'	19.7q	2.00s
7-OMe	55.7q	3.90s
5' -OMe		
5' -OH		9.20brs

本发明的第三目的是这样实现的，即将所述的黄酮类化合物在制备抗癌药物中的应用。

[0007] 本发明黄酮类化合物是首次被分离出来的，通过核磁共振和质谱测定方法确定为黄酮类化合物，并表征了其具体结构。经对白血病急性早幼粒 NB4 细胞、肺腺癌 A549 细胞、人骨髓神经母细胞瘤 SHSY5Y 细胞、人前列腺癌 PC3 细胞、人乳腺癌 MCF7 细胞的细胞毒活性实验，本发明化合物对 NB4, A549, SHSY5Y, PC3 和 MCF7 细胞株具有较好的细胞毒活性，IC₅₀ 值分别达 5.2、4.2、6.2、5.8 和 8.2 μM。本发明化合物结构简单活性好，可作为抗癌药物的先导性化合物，有良好的应用前景。

附图说明

[0008] 图 1 为化合物山蚂蝗素 A 的核磁共振碳谱 (¹³C NMR)；

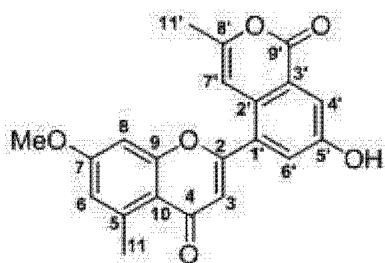
图 2 为化合物山蚂蝗素 A 的核磁共振氢谱 (¹H NMR)；

图 3 化合物山蚂蝗素 A 的主要 HMBC 相关图。

具体实施方式

[0009] 下面结合附图对本发明作进一步的说明，但不以任何方式对本发明加以限制，基于本发明教导所作的任何变换或改进，均落入本发明的保护范围。

[0010] 本发明所述的黄酮类化合物是从干燥的豆科山蚂蝗属植物尖叶山蚂蝗 (*Desmodium oxyphyllum*) 的全草中分离得到，命名为山蚂蝗素 A，英文名为 oxyphyllumflavone A，其分子式为 C₂₁H₁₆O₆，具有下述结构：



本发明所述的黄酮类化合物的制备方法，是以干燥的豆科山蚂蝗属植物尖叶山蚂蝗 (*Desmodium oxyphyllum*) 的全草为原料，经浸膏提取、有机溶剂提取、MCI 脱色、硅胶柱层析、高压液相色谱分离步骤而得到的，具体为：

A、浸膏提取：将豆科山蚂蝗属植物尖叶山蚂蝗 (*Desmodium oxyphyllum*) 的全草粉碎到 20~40 目，用有机溶剂超声提取 2~5 次，每次 30~60 分钟，提取液合并，过滤，减压浓缩提取液，静置，滤除沉淀物，浓缩成浸膏 a；

B、有机溶剂萃取：浸膏 a 中加入重量比 1~2 倍量的水，用与水等体积的有机溶剂萃取 3~5 次，合并有机溶剂萃取相，减压浓缩成浸膏 b；

C、MCI 脱色：浸膏 b 用重量比 3~5 倍量的甲醇水溶解，上 MCI 柱，用 80%~90% 甲醇水洗脱，合并有机溶剂萃取相，减压浓缩成浸膏 c；

D、硅胶柱一次层析：浸膏 c 用重量比 6~10 倍量的 160~200 目硅胶装柱进行硅胶柱层析；以体积配比为 1:0~0:1 的氯仿 - 甲醇溶液进行梯度洗脱，收集梯度洗脱液、浓缩，经 TLC 监测，合并相同的部分；

E、硅胶柱二次层析：D 步骤洗脱液的 9:1 部分进一步用重量比 6~10 倍量的 160~200 目硅胶装柱进行硅胶柱层析；以体积配比为 1:0~0:1 的石油醚 - 丙酮溶液进行梯度洗脱，收集梯度洗脱液、浓缩，经 TLC 监测，合并相同的部分；

F、高压液相色谱分离：E 步骤洗脱液的 8:2 部分进一步用高压液相色谱分离纯化即得所述的黄酮类化合物。

- [0011] 所述 A 步骤中的有机溶剂为 70~100% 的丙酮、乙醇、甲醇中的任意一种。
- [0012] 所述 B 步骤中的有机溶剂为乙酸乙酯、氯仿、乙醚、石油醚、苯中的任意一种。
- [0013] 所述 C 步骤中的甲醇水体积配比为 8:2、8.5:1.5 和 9:1。
- [0014] 所述 D 步骤中浸膏 c 在经硅胶柱层析前，用重量比 1.5~3 倍量的甲醇或者丙酮溶解，然后用浸膏重 0.8~1.2 倍的 80~100 目硅胶拌样。
- [0015] 所述 D 步骤中 D 步骤中氯仿 - 甲醇溶液体积配比为 20:1、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5。
- [0016] 所述 E 步骤中石油醚 - 丙酮溶液体积配比为 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5。
- [0017] 所述 F 步骤中高压液相色谱分离纯化是以 30~60% 的甲醇为流动相，流速 10~14ml/min, 21.2 mm × 250 mm, 5 μm 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相，紫外检测器检测波长为 254 nm，每次进样 45~60 μL，收集 20~35min 的色谱峰，多次累加后蒸干。
- [0018] 本发明所述的黄酮类化合物在制备抗癌药物中的应用。
- [0019] 本发明所述的山蚂蝗属植物不受地区和品种限制，均可以实现本发明。
- [0020] 实施例 1

取干燥豆科植物山蚂蝗属尖叶山蚂蝗的全草 1.5kg，粗粉碎至 40 目，用 70% 的丙酮超声提取 4 次，每次 60min，提取液合并；提取液过滤，减压浓缩至体积的 1/4；静置，滤除沉淀物，浓缩成 120g 浸膏 a；在浸膏 a 中加入 240g 水，用与水等体积的氯仿萃取 5 次，合并萃取相，减压浓缩成 50g 浸膏 b；浸膏 b 用 MCI 装柱，在浸膏 b 中加入 100g 的 80% 甲醇水溶解，然后上柱，用 90% 甲醇水 1 至 4 升洗脱，收集洗脱液，减压浓缩得到 30g 浸膏 c；浸膏 c 用 200 目硅胶 160g 装柱，在浸膏 c 中加入 60g 的丙酮溶解，然后加入 100 目硅胶 60g 拌样，拌样后上柱；用体积比分别为 20:1, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 的氯仿 - 甲醇混合有机溶剂梯度洗脱，收集梯度洗脱液、浓缩，经 TLC 监测，合并相同的部分，得到 6 个部分，其中，体积比 9:1 的氯仿 - 甲醇混合有机溶剂的洗脱液得第二部分样品 2.5g，再重复硅胶柱层析，用体积比分别为 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 的石油醚 - 丙酮混合有机溶剂梯度洗脱，收集梯度洗脱液、浓缩，经 TLC 监测，合并相同的部分，得到 7 个部分，其中第 2 部分，即 8:2 部分约 860 mg，再以 48% 的甲醇为流动相，流速 10 ml/min, 21.2 × 250mm, 5 μm 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相，紫外检测器检测波长为 254 nm，每次进样 48 μL，收集 25 min 的色谱峰，多次累加后蒸干，即得所述的黄酮类化合物山蚂蝗素 A。

[0021] 实施例 2

取干燥豆科植物山蚂蝗属尖叶山蚂蝗的全草 3 kg, 粗粉碎至 40 目, 用 70% 的丙酮超声提取 4 次, 每次 60min, 提取液合并; 提取液过滤, 减压浓缩至体积的 1/4; 静置, 滤除沉淀物, 浓缩成 240 g 浸膏 a; 在浸膏 a 中加入 360 g 水, 用与水等体积的氯仿萃取 5 次, 合并萃取相, 减压浓缩成 100 g 浸膏 b; 浸膏 b 用 MCI 装柱, 在浸膏 b 中加入 150 g 的 80% 甲醇水溶解, 然后上柱, 用 90% 甲醇水 2 至 6 升洗脱, 收集洗脱液, 减压浓缩得到 60 g 浸膏 c; 浸膏 c 用 200 目硅胶 320 g 装柱, 在浸膏 c 中加入 120g 的丙酮溶解, 然后加入 100 目硅胶 120 g 拌样, 拌样后上柱; 用体积比分别为 20:1, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 的氯仿 - 甲醇混合有机溶剂梯度洗脱, 收集梯度洗脱液、浓缩, 经 TLC 监测, 合并相同的部分, 得到 6 个部分, 其中, 体积比 9:1 的氯仿 - 甲醇混合有机溶剂的洗脱液得第二部分样品 5 g, 再重复硅胶柱层析, 用体积比分别为 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 的石油醚 - 丙酮混合有机溶剂梯度洗脱, 收集梯度洗脱液、浓缩, 经 TLC 监测, 合并相同的部分, 得到 7 个部分, 其中第 2 部分, 即 8:2 部分约 1.6 g, 再以 48% 的甲醇为流动相, 流速 10 ml/min, 21.2 × 250mm, 5 μm 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相, 紫外检测器检测波长为 254 nm, 每次进样 48 μL, 收集 25 min 的色谱峰, 多次累加后蒸干, 即得所述的黄酮类化合物山蚂蝗素 A。

[0022] 实施例 3

取干燥豆科植物山蚂蝗属尖叶山蚂蝗的全草 1.5 kg, 粗粉碎至 40 目, 用 80% 的甲醇超声提取 4 次, 每次 50 min, 提取液合并; 提取液过滤, 减压浓缩至体积的 1/4; 静置, 滤除沉淀物, 浓缩成 150 g 浸膏 a; 在浸膏 a 中加入 300 g 水, 用与水等体积的氯仿萃取 5 次, 合并萃取相, 减压浓缩成 60 g 浸膏 b; 浸膏 b 用 MCI 装柱, 在浸膏 b 中加入 100 g 的 80% 甲醇水溶解, 然后上柱, 用 90% 甲醇水 1 至 4 升洗脱, 收集洗脱液, 减压浓缩得到 35 g 浸膏 c; 浸膏 c 用 200 目硅胶 160 g 装柱, 在浸膏 c 中加入 70 g 的甲醇溶解, 然后加入 100 目硅胶 60 g 拌样, 拌样后上柱; 用体积比分别为 20:1, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 的氯仿 - 甲醇混合有机溶剂梯度洗脱, 收集梯度洗脱液、浓缩, 经 TLC 监测, 合并相同的部分, 得到 6 个部分, 其中, 体积比 9:1 的氯仿 - 甲醇混合有机溶剂的洗脱液得第二部分样品 3.2 g, 再重复硅胶柱层析, 用体积比分别为 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 的石油醚 - 丙酮混合有机溶剂梯度洗脱, 收集梯度洗脱液、浓缩, 经 TLC 监测, 合并相同的部分, 得到 7 个部分, 其中第 2 部分, 即 8:2 部分约 860 mg, 再以 48% 的甲醇为流动相, 流速 10 ml/min, 21.2 × 250 mm, 5 μm 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相, 紫外检测器检测波长为 254 nm, 每次进样 48 μL, 收集 25 min 的色谱峰, 多次累加后蒸干, 即得所述的黄酮类化合物山蚂蝗素 A。

[0023] 实施例 4

取实施例 1 制备的化合物山蚂蝗素 A, 为黄色胶状物。

[0024] 测定方法为: 用核磁共振, 结合其它波谱技术鉴定结构。

[0025] (1) 紫外光谱(溶剂为甲醇), λ_{max} ($\log \epsilon$): 370 (3.86), 282 (3.95), 210 (4.38) nm;

(2) 红外光谱(溴化钾压片) ν_{max} : 3428, 1738, 1657, 1603, 1562, 1463, 1384, 1172, 1038, 873, 768 cm^{-1} ;

(3) 高分子质谱(HRESIMS)显示本发明化合物准分子离子峰 m/z 387.0840 [M+Na]⁺(计算值为 387.0845),

结合¹³C 和¹H NMR 谱(见图 1、图 2, 数据归属见表 1)给出其分子式为 C₂₁H₁₆O₆。DEPT NMR 谱(图 1)和¹H NMR 谱(图 2)中显示 21 个碳信号和 16 个氢信号。这些信号中有一个典型的黄酮骨架信号, 即 δ_c 160.7 s, 107.7 d, 180.1 s, 143.0 s, 116.0 d, 162.0 s, 101.8 d, 158.0 s, 114.2 s, 121.2 s, 139.8 s, 131.3 s, 105.3 d, 157.4 s, 101.2 d 以及氢谱中的 δ_h 6.63 s, 1H, 6.39 s, 1H, 7.47 s, and 7.00 s。这提示该化合物是一个黄酮类化合物。HMBC 谱中观测到 H-7' (δ_h 6.02 s) 与 C-1' (δ_c 121.2 s), C-2' (δ_c 139.8 s), C-3' (δ_c 131.3 s), C-8' (δ_c 155.3 s) 以及 C-10' (δ_c 19.7 q) 的相关, 同时, 还观测到 H-4' (δ_h 7.47 s) 与 C-9' (δ_c 162.8 s), C-2' (δ_c 139.8 s), 和 C-3' (δ_c 131.3 s) 的相关, 提示了丙基和酯基分别连接在 C-2' 和 C-3' 上, 并且形成一个六元 6-methyl- α -pyrone 环。其它片段也通过 HMBC 得到证实。其中, 甲基信号 δ_h 2.32 s 与 C-5 (δ_c 143.0 s), C-6 (δ_c 116.0 d), 和 C-10 (δ_c 114.2 s) 相关, 提示甲基联接在 C-5 上; 而活泼氢 δ_h 9.20 brs 与 C-4' (δ_c 105.3 d), C-5' (δ_c 157.4 s), 和 C-6' (δ_c 101.2 d) 相关提示羟基连接在 C-5' 上; 最后, 甲氧基信号 δ_h 3.90 与 C-7 (δ_c 162.0 s) 相关则提示甲氧基连接在 C-7。因此, 该黄酮类化合物结构得以确定, 并命名为山蚂蝗素 A。

[0026] 实施例 5

取实施例 2 制备的化合物, 为黄色胶状物, 测定方法与实施例 4 相同, 确认实施例 2 制备的化合物为所述的黄酮类化合物山蚂蝗素 B。

[0027] 实施例 6

取实施例 3 制备的化合物, 为黄色胶状物, 测定方法与实施例 4 相同, 确认实施例 3 制备的化合物为所述的黄酮类化合物山蚂蝗素 B。

[0028] 实施例 7

取实施例 1~3 所制备的任一黄酮类化合物进行细胞毒活性检测试验, 试验情况如下:

细胞株: 白血病细胞(NB4)、肺癌细胞(A549)、人神经母细胞瘤细胞(SHSY5Y)、前列腺癌细胞(PC3)、乳腺癌细胞(MCF7) 均由中国科学院上海药物研究所提供。

[0029] 实验设计: 以上细胞与不同浓度化合物温育 72 小时, 每株细胞的实验均重复一次, 用两次实验的结果进行数据处理, 采用改良 MTT 法及 SRB 法评价化合物对细胞增殖的抑制程度, 计算抑制率, 根据抑制率采用 Logit 方法计算 IC50, 比较化合物的体外抗肿瘤活性。

[0030] 细胞的增殖抑制率 = (空白对照 OD 值 - 加药孔的 OD 值) / 空白对照 OD 值 × 100%。

[0031] (a) 改良 MTT 法

取处于对数生长期的悬浮细胞, 将细胞浓度调整为 4 × 10⁴/ml, 加入 96 孔培养板, 90 μL/孔。阳性对照为顺铂, 用生理盐水溶解。每孔分别加入 10 μl 不同浓度的样品(1 号试液-5 号试液)。加样组及对照组均设 4 个复孔, 加样组、阳性对照组的高浓度组还设培养基的加药平行孔, 每块板均设有 4 个空白对照孔(仅加培养基)。样品的终浓度分别为 10⁻²、10⁻¹、1、10 及 10² μg/mL, 相应 DMSO 的终浓度分别为 0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、0.00001%。样品在终浓度 10² μg/mL 时, 用 0.1% DMSO 作为溶剂对照, 其余浓度均用生理盐水作阴性对照。阳性对照药顺铂的终浓度为 10⁻¹、1、10 μg/mL。细胞在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中分别孵育 48h 后, 加入 MTT (5 mg/ml, Sigma), 10 μL/孔。继续培养 4 h 后, 加

入三联液 [10% SDS - 5% 异丁醇 - 0.012mol/L HCL (w/v/v)], 100 μ L/孔, 放置过夜后用酶标仪在 570 nm、630 nm 双波长下测定各孔的 OD 值。

[0032] (b) SRB 法

取处于对数生长期的贴壁细胞株, 用 25% 胰酶常规消化后, 再用 15% 小牛血清完全 RPMI-1640 培养基将细胞浓度调整为 5×10^4 /mL, 加入 96 孔培养板, 90 μ L/孔。细胞在 37°C, 5% CO₂ 培养箱中分别孵育 24h 后加入阳性对照、阴性对照以及受试样品(各受试浓度同上 MTT 法, 10 μ L/孔), 样品的终浓度分别为 10⁻²、10⁻¹、1、10、10² μ g/mL, 相应 DMSO 的终浓度分别为 0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、0.00001%。样品在终浓度 10² μ g/mL 时用 0.1%DMSO 作为溶剂对照, 其余浓度均用生理盐水作阴性对照。阳性对照药顺铂的终浓度为 10⁻¹、1、10 μ g/mL, 阴性对照为等体积的生理盐水。加样组及对照组均设 4 复孔, 加样组、阳性对照组的高浓度组还设培养基的加药平行孔, 每块板均设有 4 个空白对照孔(仅加培养基)。将 96 孔培养板置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中孵育(细胞与样品作用)48h 后, 加入 4°C、50% 的 TCA(三氯乙酸) 50 μ L/孔。加完 TCA 后, 将 96 孔培养板置于 4°C 孵育 1 小时, 取出培养板, 轻轻倾去板内液体。用自来水轻轻冲洗 5 遍(将自来水由烧杯中轻轻倒入板中, 轻晃后再将水倒去), 置于空气中风干至不见水痕。然后加入配制好的 0.4% SRB(用 1% 乙酸稀释), 50 μ L/孔, 于室温下静置染色 30 分钟后倾去 SRB 溶液, 用 1% 乙酸冲洗 4 遍, 以除去未与蛋白质结合的染料。置于空气中风干至无水痕后, 加入 10 mM 未缓冲 Tris(缓血氨酸) 溶液 150 μ L/孔(PH10, 用三蒸水配制), 将染料溶解后, 于振荡器上振荡 5 分钟, 用酶标仪在 570nm 波长下读取各孔 OD 值。

[0033] (c) 实验结果

实验结果表明:经对白血病急性早幼粒 NB4 细胞、肺腺癌 A549 细胞、人骨髓神经母细胞瘤 SHSY5Y 细胞、人前列腺癌 PC3 细胞、人乳腺癌 MCF7 细胞的细胞毒活性实验, 山蚂蝗素 A 对 NB4, A549, SHSY5Y, PC3 和 MCF7 细胞株具有较好的细胞毒活性, IC₅₀ 值分别达 5.2、4.2、6.2、5.8 和 8.2 μ M。

[0034] 表 2 化合物山蚂蝗素 A 的细胞毒活性

Compounds	NB4	A549	SHSY5Y	PC3	MCF7
山蚂蝗素 A	5.6	4.2	6.2	5.8	8.2
Taxol	0.03	0.02	0.2	0.2	0.1

NE4, 白血病急性早幼粒细胞; A549, 肺腺癌细胞; SHSY5Y, 人骨髓神经母细胞瘤细胞; PC3, 人前列腺癌细胞; MCF7, 人乳腺癌细胞。

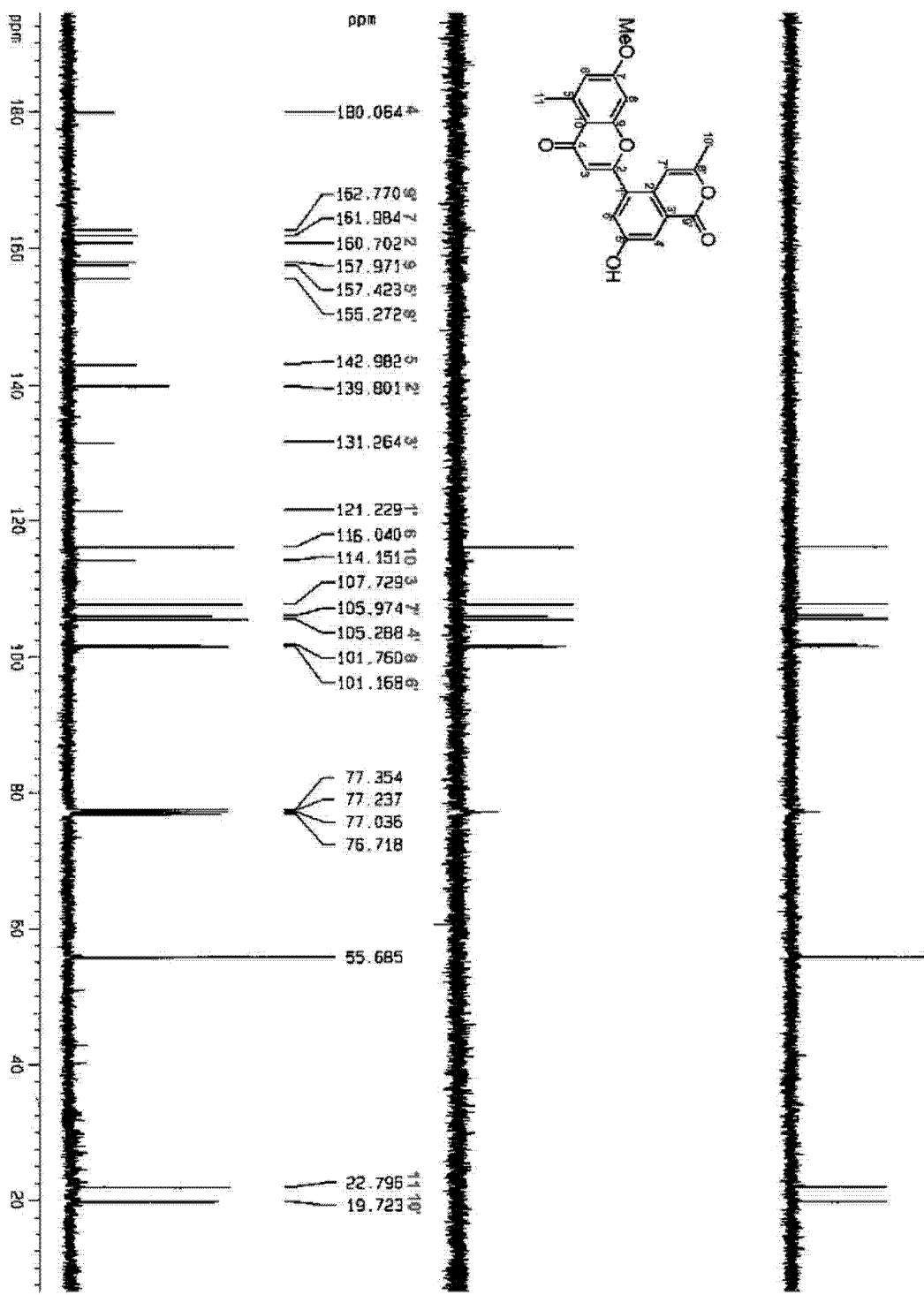


图 1

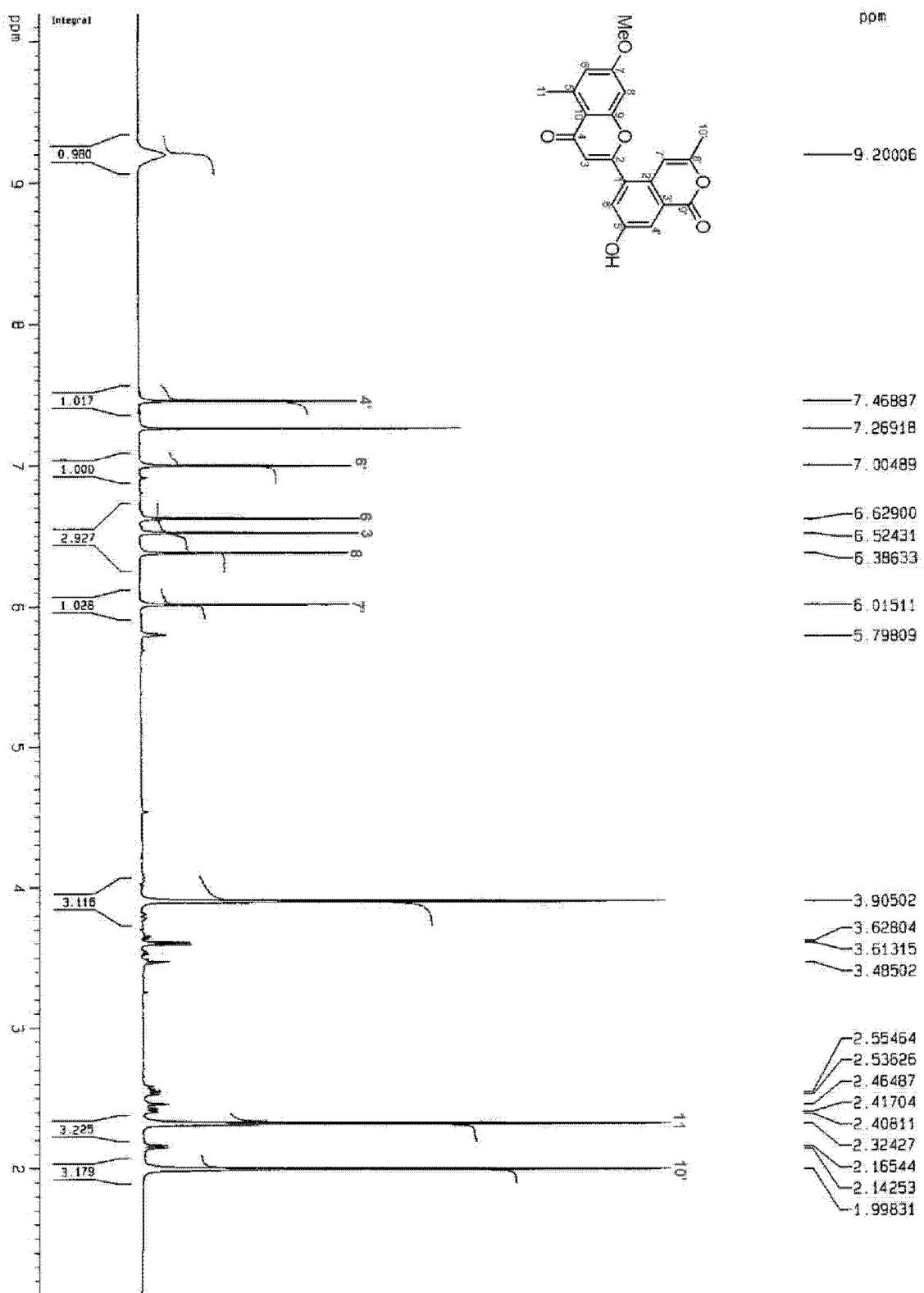


图 2

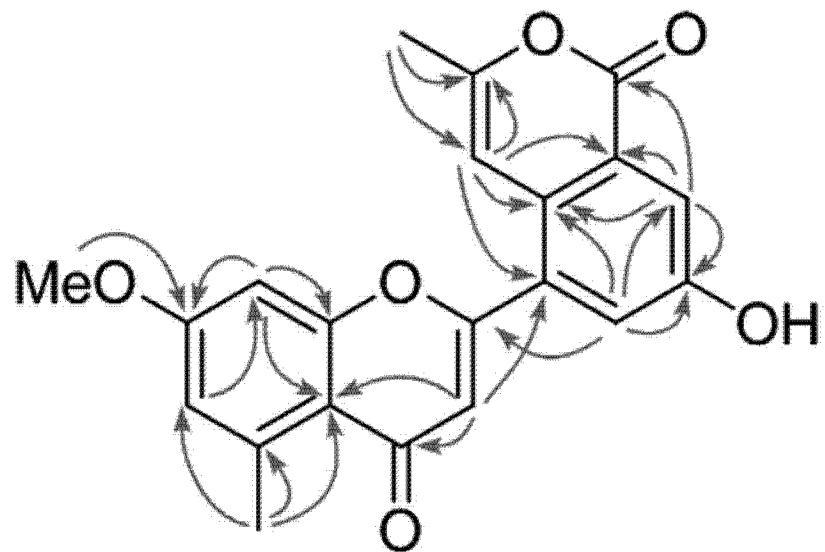


图 3