(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 119080865 B
(45)授权公告日 2025.04.01

(21)申请号 202411239773.5

(22)申请日 2024.09.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 119080865 A

(43)申请公布日 2024.12.06

(73)专利权人 贵州医科大学
地址 550025 贵州省贵阳市花溪区花溪大学城栋青路2号
专利权人 中国科学院昆明植物研究所

(72)发明人 晏英 王丹 丁骁 赵逾涵 周芳姣 汤磊

(74)专利代理机构 昆明科众知识产权代理事务所(普通合伙) 53218
专利代理师 蒋晗

(51)Int.Cl.
C07J 71/00(2006.01)
C07J 73/00(2006.01)
C07J 75/00(2006.01)
A61K 31/58(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

Chun-Mao Yuan等.Cytotoxic Limonoids from Melia azedarach.Planta Med.2012,第79卷163-168页.

Wenxiang Fan等.Limonoids From the Genus Melia(Meliaceae): Phytochemistry, Synthesis, Bioactivities, Pharmacokinetics, and Toxicology.Frontiers in Pharmacology.2022,第12卷795565(1-36).

Shou-Bai Liu等.Limonoids from the roots of Trichilia sinensis and their cytotoxicities.Arch. Pharm. Res..2017,第41卷1170-1177页.

审查员 张建宏

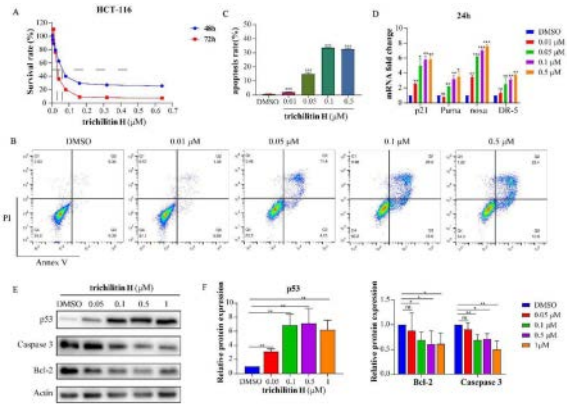
权利要求书2页 说明书15页 附图16页

(54)发明名称

Trichilin型柠檬苦素类化合物及其提取分离方法和应用

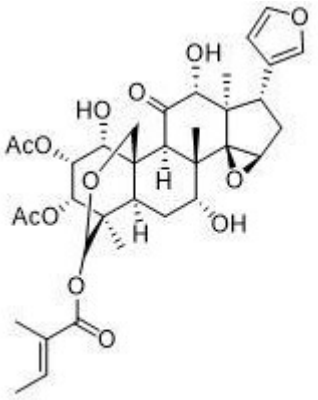
(57)摘要

本发明公开了Trichilin型柠檬苦素类化合物及其提取分离方法和应用。本发明从鹧鸪花叶中提取分离得到Trichilin型柠檬苦素类化合物:trichilitin G、trichilitin H、12-hydroxyamoorastatin、azedarachin B和12-O-deacetyltrichilin H。本发明分离得到的柠檬苦素类化合物对人结肠癌细胞(HCT-116)、人肺腺癌细胞(NCl-H1975)和人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)均具有较强抑制的活性,为广谱的抗癌药物提供了可选方案。本发明中应用到的柠檬苦素类化合物来源于天然植物鹧鸪花,来源广泛,生产成本低,在制备抗肿瘤药物方面具有很好的价值以及应用前景。

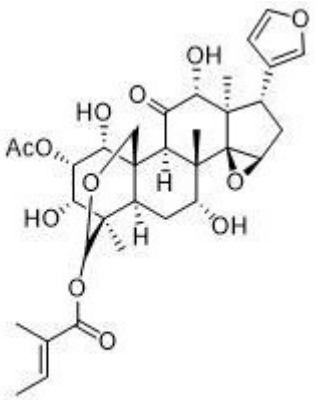


CN 119080865 B

1.Trichilin型柠檬苦素类化合物,其特征在于,所述化合物为trichilitin G或trichilitin H,结构式如下:



trichilitin G



trichilitin H

。

2.一种根据权利要求1所述的Trichilin型柠檬苦素类化合物在制备治疗癌症药物中的应用,其特征在于,所述癌症为肝癌、肺腺癌或神经母细胞瘤。

3.根据权利要求2所述的Trichilin型柠檬苦素类化合物在制备治疗癌症药物中的应用,其特征在于,所述柠檬苦素类化合物以结构式所示的化合物或其药学上可接受的盐作为药物活性组分。

4.根据权利要求3所述的Trichilin型柠檬苦素类化合物在制备治疗癌症药物中的应用,其特征在于,所述药物活性组分的含量为0.1~99.9%。

5.根据权利要求2所述的Trichilin型柠檬苦素类化合物在制备治疗癌症药物中的应用,其特征在于,所述柠檬苦素类化合物和药学上可接受的载体联合使用。

6.一种如权利要求1所述的Trichilin型柠檬苦素类化合物的提取分离方法,其特征在于,提取分离方法如下:

步骤(1)采用甲醇溶液对鹧鸪花叶子部位进行回流提取,收集提取液;对所述提取液进行浓缩,得到浸膏;将所述浸膏加入适量的水分散后,采用乙酸乙酯萃取得到乙酸乙酯馏分;将所述乙酸乙酯馏分溶解后用100~200目的正相硅胶柱层析,依次用石油醚-丙酮、二氯甲烷-甲醇进行梯度洗脱,收集获得11个部分的洗脱液,分别命名为Fr. A～Fr. K;所述石油醚与丙酮的体积比为40:1～5:1;所述二氯甲烷-甲醇中二氯甲烷和甲醇的体积比为50:1～0:1;

步骤(2)将Fr. G进行小孔树脂色谱分离,依次采用体积分数为50%～100%的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集获得11个部分的洗脱液,依次命名为Fr. G-1～Fr. G-11;将所述Fr. G-3进行C_{18}反相硅胶柱色谱分离,依次采用体积分数为40%～100%的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集获得10个部分的洗脱液,依次命名为Fr. G-3a～Fr. G-3j;采用Sephadex LH-20甲醇凝胶柱层析对所述Fr. G-3e进行洗脱,每5 mL收集一份层析液,收集获得6个部分的洗脱液,依次命名为Fr. G-3e1～FrG-3e6,所述Sephadex LH-20甲醇凝胶柱层析的条件包括:

洗脱液:分析纯甲醇;

凝胶柱尺寸:18 mm*180 mm;

所述洗脱液的流速:0.5 mL/min;

所述洗脱液用量:2.0 L;

步骤(3)将Fr. G-3e3进行正相硅胶柱色谱分离,用石油醚-乙酸乙酯进行洗脱,收集获得3个部分的洗脱液,依次命名为Fr. G-3e1a～Fr. G-3e1c,所述石油醚与乙酸乙酯的体积比为8:1~5:1;将Fr. G-3e1b进行制备型HPLC纯化,得到柠檬苦素类化合物trichilitin G,所述制备型HPLC的条件包括:

色谱柱规格:4.6 mm*250 mm,5 μm;

流动相:正己烷-异丙醇80:20;

流速:2 mL/min;

化合物trichilitin H的提取分离方法如下:

将Fr. G-7进行C_{18}反相硅胶柱色谱分离,依次采用体积分数为50%～100%的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集获得9个部分的洗脱液,依次命名为Fr. G-7a～Fr. G-7i;将FrG-7g进行正相硅胶柱色谱分离,用二氯甲烷-丙酮进行洗脱,收集获得3个部分的洗脱液,依次命名为FrG-7g-1~FrG-7g-3,所述二氯甲烷与丙酮的体积比为30:1～15:1;将FrG-7g-2进行制备型HPLC纯化,得到柠檬苦素类化合物trichilitin H,所述制备型HPLC的条件包括:

色谱柱规格:4.6 mm*250 mm,5 μm;

流动相:正己烷-异丙醇85:15;

流速:2 mL/min。

Trichilin型柠檬苦素类化合物及其提取分离方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及天然产物领域,尤其涉及Trichilin型柠檬苦素类化合物及其提取分离方法和应用。

背景技术

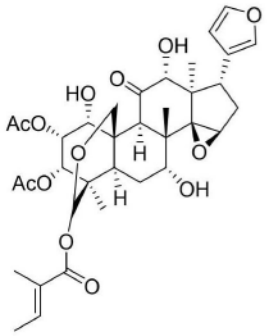
[0002] 癌症是全球第二大常见死因,也是主要的公共卫生问题。目前现有的癌症化疗方案存在诸多不足,其中最明显的是无法充分治疗癌症。此外,在临床环境中实施这些治疗也带来了显著的问题,如不良反应的出现和多药耐药性(MDR)的发展。50多年来,天然产物(NPs)在抗癌药物的发现中发挥了重要作用,这从源自各种天然来源的新型抗癌药物数量的不断增加中就可以看出。这些天然来源的药物通过多种细胞机制展现其治疗效果,其中一些机制是新颖的或非传统的。因此,从天然产物(NPs)中开发有效的抗癌药物已成为一种被广泛接受的、有前景的方法。

[0003] 鹧鸪花(Trichilia connaroides)作为民间用药,历史悠久,傣药、瑶药和彝药中都有其药用记载。其以根入药,性苦味凉,有清热解毒、祛风利咽的功效,在临床上主要用于风湿性关节炎,咽喉炎,扁桃体炎等炎症的治疗。对其植物化学的研究已发现了包括萜类、酚类、甾体和脂肪酸在内的多种成分,其中萜类成分主要为四降三萜类化合物,又称柠檬苦素,是该植物所特有的次生代谢物。该类成分因氧化度高、骨架多变等特点,长期被国内外学者所关注,迄今为止,已从鹧鸪花属植物的根、茎、树皮、枝叶以及果实中至少发现了159个柠檬苦素类化合物。不同的柠檬苦素类化合物的生物活性存在诸多差异,本申请在鹧鸪花中提取分离出新的柠檬苦素类化合物,并发现其具有较强的抗癌活性。

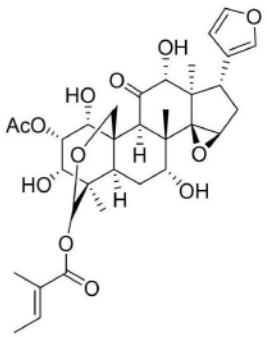
发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供鹧鸪花中Trichilin型柠檬苦素类化合物:trichilitin G、trichilitin H、12-hydroxyamoorastatin、azedarachin B、12-O-deacetyltrichilin H、提取分离方法及其在制备癌症药物种的应用,本发明提供的柠檬苦素类化合物对人结肠癌细胞(HCT-116),人肺腺癌细胞(NCl-H1975)和人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)具有较强抑制的活性,为广谱的抗癌药物提供了可选方案。

[0005] 本发明第一方面,提供一种Trichilin型柠檬苦素类化合物,所述化合物为trichilitin G或trichilitin H,结构式如下:

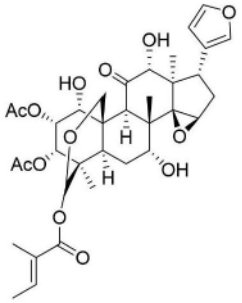
[0006] 

trichilitin G

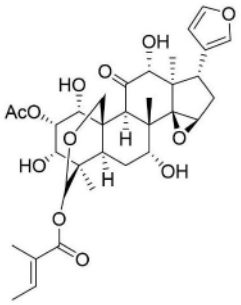


trichilitin H。

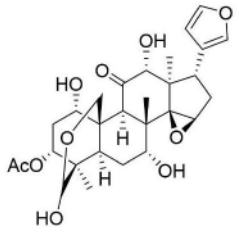
[0007] 本发明第一方面,提供Trichilin型柠檬苦素类化合物在制备治疗癌症药物中的应用,所述化合物为trichilitin G、trichilitin H、12-hydroxyamoorastatin、azedarachin B或12-O-deacetyltrichilin H,结构式如下:



trichilitin G

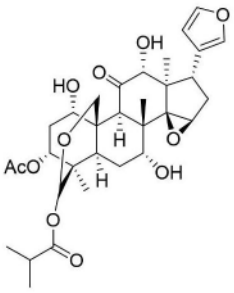


trichilitin H

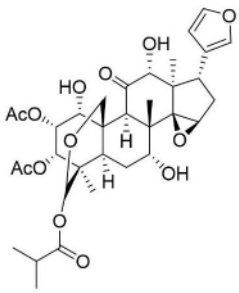


12-hydroxyamoorastatin

[0008]



azedarachin B



12-O-deacetyltrichilin H。

[0009] 作为优选,所述癌症为肝癌、肺腺癌或神经母细胞瘤。上述柠檬苦素类化合物对HCT-116(人结肠癌细胞),NCl-H1975(人肺腺癌细胞),SH-SY5Y(人神经母细胞瘤细胞)表现出良好的抑制活性。

[0010] 作为对上述方案的进一步描述:所述柠檬苦素类化合物以结构式所示的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体作为药物活性组分。

[0011] 作为对上述方案的进一步描述:所述药物活性组分的含量为0.1~99.9%。

[0012] 作为对上述方案的进一步描述:所述柠檬苦素类化合物和药学上可接受的载体联合使用。

[0013] 本发明第三方面,提供一种Trichilin型柠檬苦素类化合物的提取分离方法,所述化合物trichilitin G的提取分离方法如下:

[0014] 步骤(1)采用甲醇溶液对鹧鸪花叶子部位进行回流提取,收集提取液;对所述提取液进行浓缩,得到浸膏;将所述浸膏加入适量的水分散后,采用乙酸乙酯萃取得到乙酸乙酯馏分;将所述乙酸乙酯馏分溶解后用100～200目的正相硅胶柱层析,依次用石油醚-丙酮、二氯甲烷-甲醇进行梯度洗脱,收集获得11个部分的洗脱液,分别命名为Fr.A～Fr.K;所述石油醚与丙酮的体积比为40:1～5:1;所述二氯甲烷-甲醇中二氯甲烷和甲醇的体积比为50:1～0:1;

[0015] 步骤(2)将所述Fr.G进行小孔树脂色谱分离,依次采用体积分数为50％～100％的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集获得11个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-1～Fr.G-11;将所述Fr.G-3进行C_{18}反相硅胶柱色谱分离,依次采用体积分数为40％～100％的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集获得10个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-3a～Fr.G-3j;采用Sephadex LH-20甲醇凝胶柱层析对所述Fr.G-3e进行洗脱,每5mL收集一份层析液,收集获得6个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-3e1～FrG-3e6,所述SephadexLH-20甲醇凝胶柱层析的条件包括:

[0016] 洗脱液:分析纯甲醇;

[0017] 凝胶柱尺寸:18mm*180mm;

[0018] 所述洗脱液的流速:0.5mL/min;

[0019] 所述洗脱液用量:2.0L;

[0020] 步骤(3)将Fr.G-3e3进行正相硅胶柱色谱分离,用石油醚-乙酸乙酯进行洗脱,收集获得3个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-3e1a～Fr.G-3e1c,所述石油醚与乙酸乙酯的体积比为8:1～5:1;将Fr.G-3e1b进行制备型HPLC纯化,得到柠檬苦素类化合物trichilitin G,所述制备型HPLC的条件包括:

[0021] 色谱柱规格:4.6mm*250mm,5μm;

[0022] 流动相:正己烷-异丙醇80:20;

[0023] 流速:2mL/min。

[0024] 作为对上述方案的进一步描述:所述化合物12-hydroxyamoorastatin的提取分离方法如下:

[0025] 将所述Fr.G-3e6进行正相硅胶柱色谱分离,用石油醚-乙酸乙酯进行洗脱,收集获得2个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-3e6a和Fr.G-3e6b,所述石油醚与乙酸乙酯的体积比为3:1～1:1;将所述Fr.G-3e6b进行制备型HPLC纯化,得到柠檬苦素类化合物12-hydroxyamoorastatin,所述制备型HPLC的条件包括:

[0026] 色谱柱规格:4.6mm*250mm,5μm;

[0027] 流动相:正己烷-异丙醇75:25;

[0028] 流速:2mL/min。

[0029] 作为对上述方案的进一步描述:所述化合物azedarachinB和化合物trichilitin H的提取分离方法如下:

[0030] 将Fr.G-7进行C_{18}反相硅胶柱色谱分离,依次采用体积分数为50％～100％的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集获得9个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-7a～Fr.G-7i;将Fr.G-7e进行正相硅胶柱色谱分离,用石油醚-乙酸乙酯进行洗脱,收集获得5个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-7e1～Fr.G-7e5,所述石油醚与乙酸乙酯的体积比为4:1～1:1;将所述Fr.G-

7e5进行制备型HPLC纯化,得到柠檬苦素类化合物azedarachin B,所述制备型HPLC的条件包括:

[0031] 色谱柱规格:4.6mm*250mm,5μm;

[0032] 流动相:34%乙腈;

[0033] 流速:2mL/min;

[0034] 将FrG-7g进行正相硅胶柱色谱分离,用二氯甲烷-丙酮进行洗脱,收集获得3个部分的洗脱液,依次命名为FrG-7g-1～FrG-7g-3,所述二氯甲烷与丙酮的体积比为30:1～15:1;将FrG-7g-2进行制备型HPLC纯化,得到柠檬苦素类化合物trichilitin H,所述制备型HPLC的条件包括:

[0035] 色谱柱规格:4.6mm*250mm,5μm;

[0036] 流动相:正己烷-异丙醇85:15;

[0037] 流速:2mL/min。

[0038] 作为对上述方案的进一步描述:所述化合物12-O-deacetyltrichilin H的提取分离方法如下:

[0039] 将Fr.F进行小孔树脂色谱分离,依次采用体积分数为50%～100%的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集获得8个部分的洗脱液,依次命名为Fr.F-1～Fr.F-8;将Fr.F-5进行C_{18}反相硅胶柱色谱分离,依次采用体积分数为50%～100%的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集获得10个部分的洗脱液,依次命名为Fr.F-5a～Fr.F-5j;采用Sephadex LH-20甲醇凝胶柱层析对Fr.F-5f进行洗脱,每5mL收集一份层析液,收集获得4个部分的洗脱液,依次命名为Fr.F-5f1～Fr.F-5f4,所述Sephadex LH-20甲醇凝胶柱层析的条件包括:

[0040] 洗脱液:分析纯甲醇;

[0041] 凝胶柱尺寸:18mm*180mm;

[0042] 所述洗脱液的流速:0.5mL/min;

[0043] 所述洗脱液用量:2.0L;

[0044] 将Fr.F-5f2进行正相硅胶柱色谱分离,用石油醚-丙酮进行洗脱,收集获得6个部分的洗脱液,依次命名为Fr.F-5f2a～Fr.F-5f2f,所述石油醚与丙酮的体积比为30:1～10:1;将Fr.F-5f2e进行制备型HPLC纯化,得到柠檬苦素类化合物12-O-deacetyltrichilin H,所述制备型HPLC的条件包括:

[0045] 色谱柱规格:4.6mm*250mm,5μm;

[0046] 流动相:正己烷-异丙醇90:10;

[0047] 流速:2mL/min。

[0048] 本发明提取分离得到具有上式所示结构的Trichilin型柠檬苦素类化合物:trichilitin G、trichilitin H、12-hydroxyamoorastatin、azedarachin B、Mesendanins K以及12-O-deacetyltrichilin H,研究表明:上述柠檬苦素类化合物对HCT-116(人结肠癌细胞),NCl-H1975(人肺腺癌细胞),SH-SY5Y(人神经母细胞瘤细胞)表现出良好的抑制活性。

[0049] 相比较而言,trichilitin H的抑制活性最高,本发明通过研究trichilitin H对癌细胞的抑制机理,发现trichilitin H能通过调控细胞周期蛋白(CDK1、CDK2和Cyclin A)和凋亡相关蛋白(P53、Cleaved parp和Cleaved casp 9)的表达诱导癌细胞发生S期阻滞及

凋亡;与此同时,化合物trichilitin H能通过诱导p53来调控下游的周期(p21、cdc2)和凋亡蛋白(Bcl-2、Caspase 3),促使癌细胞发生S期阻滞和凋亡,发挥抗肿瘤活性,在制备抗肿瘤药物中具有很好的应用前景。

[0050] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:本发明提供的Trichilin型柠檬苦素类化合物对HCT-116,NCl-H1975,SH-SY5Y等癌细胞表现出优良的抑制活性,在制备抗肿瘤药物中具有很好的价值以及应用前景。本发明提供的柠檬苦素类化合物来源于鹧鸪花,生产成本低。

附图说明

[0051] 图1为柠檬苦素类化合物trichilitin G的^{1}H NMR谱图;

[0052] 图2为柠檬苦素类化合物trichilitin G的^{13}C NMR谱图;

[0053] 图3为柠檬苦素类化合物trichilitin G的HSQC谱图;

[0054] 图4为柠檬苦素类化合物trichilitin G的HMBC谱图;

[0055] 图5为柠檬苦素类化合物trichilitin G的^{1}H-^{1}H COSY谱图;

[0056] 图6为柠檬苦素类化合物trichilitin G的ROESY谱图;

[0057] 图7为柠檬苦素类化合物trichilitin G的HR-ESI-MS谱图;

[0058] 图8为柠檬苦素类化合物trichilitin G的IR谱图;

[0059] 图9为柠檬苦素类化合物trichilitin G的UV谱图;

[0060] 图10为柠檬苦素类化合物trichilitin G的CD谱图;

[0061] 图11为柠檬苦素类化合物trichilitin H的^{1}H NMR谱图;

[0062] 图12为柠檬苦素类化合物trichilitin H的^{13}C NMR谱图;

[0063] 图13为柠檬苦素类化合物trichilitin H的HSQC谱图;

[0064] 图14为柠檬苦素类化合物trichilitin H的HMBC谱图;

[0065] 图15为柠檬苦素类化合物trichilitin H的^{1}H-^{1}H COSY谱图;

[0066] 图16为柠檬苦素类化合物trichilitin H的ROESY谱图;

[0067] 图17为柠檬苦素类化合物trichilitin H的HR-ESI-MS谱图;

[0068] 图18为柠檬苦素类化合物trichilitin H的IR谱图;

[0069] 图19为柠檬苦素类化合物trichilitin H的UV谱图;

[0070] 图20为柠檬苦素类化合物trichilitin H的CD谱图;

[0071] 图21为柠檬苦素类化合物12-hydroxyamoorastatin的^{1}H NMR谱图;

[0072] 图22为柠檬苦素类化合物12-hydroxyamoorastatin的^{13}C NMR谱图;

[0073] 图23为柠檬苦素类化合物12-hydroxyamoorastatin的ESI-MS谱图;

[0074] 图24为柠檬苦素类化合物azedarachin B的^{1}H NMR谱图;

[0075] 图25为柠檬苦素类化合物azedarachin B的^{13}C NMR谱图;

[0076] 图26为柠檬苦素类化合物azedarachin B的ESIMS谱图;

[0077] 图27为柠檬苦素类化合物12-O-deacetyltrichilin H的^{1}H NMR谱图;

[0078] 图28为柠檬苦素类化合物12-O-deacetyltrichilin H的^{13}C NMR谱图;

[0079] 图29为柠檬苦素类化合物12-O-deacetyltrichilin H的ESI-MS谱图;

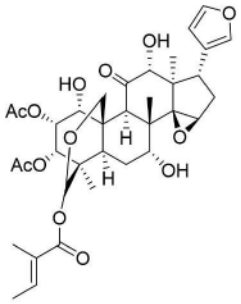
[0080] 图30为柠檬苦素类化合物trichilitin H作用HCT-116细胞的细胞周期阻滞在S

期。其中A为采用PI染色法检测柠檬苦素类化合物trichilitin H不同浓度和时间对HCT-116细胞周期分布的影响;B-C为A图中不同细胞周期阶段的定量直方图;D为用指定浓度的柠檬苦素类化合物trichilitin H处理HCT-116细胞不同时间后,用westernblot检测周期相关蛋白的表达;E为D图中各蛋白表达的统计图。

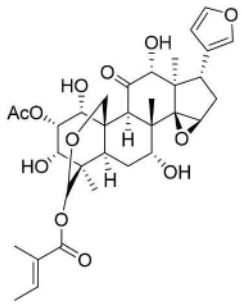
[0081] 图31为柠檬苦素类化合物trichilitin H抑制HCT-116细胞增殖并诱导其凋亡。A为柠檬苦素类化合物trichilitin H对HCT-116细胞不同时间点的生长抑制作用;B为采用Annexin V-FITC/PI双染色法检测柠檬苦素类化合物trichilitin H在指定浓度下处理72h后对HCT-116细胞的凋亡作用;C为B图中HCT-116细胞凋亡率的统计图;D为采用qPCR方法检测柠檬苦素类化合物trichilitin H在指定浓度下处理24h后各凋亡基因的mRNA水平;E为用指定浓度的柠檬苦素类化合物trichilitin H处理HCT-116细胞48h后,用western blot检测凋亡相关蛋白的表达;F为E图中各蛋白表达的统计图。

具体实施方式

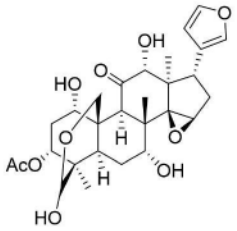
[0082] 本发明提供从鹧鸪花中分离纯化得到的Trichilin型柠檬苦素类化合物5个:trichilitin G、trichilitin H、12-hydroxyamoorastatin、azedarachin B和12-O-deacetyltrichilin H,具有式I所示的结构:



trichilitin G

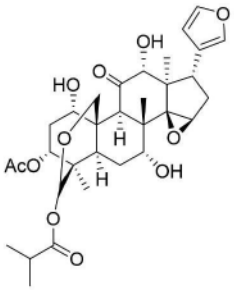


trichilitin H

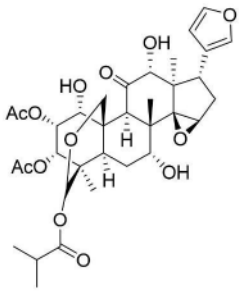


12-hydroxyamoorastatin

[0083]



azedarachin B



12-O-deacetyltrichilin H

式I

[0084] 实施例1trichilitin G的提取分离

[0085] (1)采用甲醇溶液对鹧鸪花叶子部位进行回流提取,收集提取液;对所述提取液进行浓缩,得到浸膏;将所述浸膏加入适量的水分散后,采用乙酸乙酯萃取得到乙酸乙酯馏分;将所述乙酸乙酯馏分溶解后用100～200目的正相硅胶柱层析,分别用石油醚-丙酮、二

氯甲烷-甲醇进行梯度洗脱,收集获得11个部分的洗脱液,依次命名为Fr.A～Fr.K;所述石油醚与丙酮的体积比为40:1～5:1,进行梯度洗脱;所述二氯甲烷-甲醇中二氯甲烷和甲醇的体积比为50:1～0:1,进行梯度洗脱;

[0086] (2)将所述Fr.G进行小孔树脂色谱分离,依次采用体积分数为50％～100％的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集获得11个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-1～Fr.G-11;将所述Fr.G-3进行C_{18}反相硅胶柱色谱分离,依次采用体积分数为40％～100％的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集获得10个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-3a～Fr.G-3j;采用Sephadex LH-20甲醇凝胶柱层析对所述Fr.G-3e进行洗脱,每5mL收集一份层析液,收集获得6个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-3e1～Fr.G-3e6,所述Sephadex LH-20甲醇凝胶柱层析的条件包括:

[0087] 洗脱液:分析纯甲醇;

[0088] 凝胶柱尺寸:18mm*180mm;

[0089] 所述洗脱液的流速:0.5mL/min;

[0090] 所述洗脱液用量:2.0L;

[0091] (3)将所述Fr.G-3e3进行正相硅胶柱色谱分离,用石油醚-乙酸乙酯进行洗脱,收集获得3个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-3e1a～Fr.G-3e1c,所述石油醚与乙酸乙酯的体积比为6:1;将所述Fr.G-3e1b进行制备型HPLC纯化,得到柠檬苦素类化合物trichilitin G,所述制备型HPLC的条件包括:

[0092] 色谱柱规格:4.6mm*250mm,5μm;

[0093] 流动相:正己烷-异丙醇80:20;

[0094] 流速:2mL/min;

[0095] 保留时间:27min;

[0096] 柠檬苦素类化合物trichilitin G的结构表征:

[0097] 图1为柠檬苦素类化合物trichilitin G的^{1}H NMR谱图;图2为柠檬苦素类化合物trichilitin G的^{13}CNMR谱图;图3为柠檬苦素类化合物trichilitin G的HSQC谱图;图4为柠檬苦素类化合物trichilitin G的HMBC谱图;图5为柠檬苦素类化合物trichilitin G的^{1}H-^{1}H COSY谱图;图6为柠檬苦素类化合物trichilitin G的ROESY谱图;图7为柠檬苦素类化合物trichilitin G的HR-ESI-MS谱图;图8为柠檬苦素类化合物trichilitin G的IR谱图;图9为柠檬苦素类化合物trichilitin G的UV谱图;图10为柠檬苦素类化合物trichilitin G的CD谱图。

[0098] 表1柠檬苦素类化合物trichilitin G的^{1}H-NMR和^{13}C-NMR数据(600/150MHz,$CDCl_3$)

[0099]

No.	δ_H (J in Hz)	δ_C
1	4.59, d (4.4)	71.6
2	5.92, t (4.4)	68.7
3	5.59, d (4.4)	72.8
4		40.8
5	2.86, dd (14.0, 4.0)	27.8
6a	2.01, dd (16.2, 1.8)	25.3
6b	1.75, dt (16.2, 3.8)	
7	3.66, br s	69.9
8		42.4
9	4.55, s	47.3
10		42.3
11		213.2
12	4.10, s	78.8
13		46.1
14		72.8
15	3.77, br s	59.3
16a	2.36, dd (13.2, 6.2)	33.1
16b	1.92, dd (13.2, 11.2)	
17	3.00, dd (11.0, 6.2)	38.6
18	1.14, s	14.4
19a	4.38, d (13.0)	64.1
19b	4.32, d (13.0)	
20		123.5
21	7.22, s	140.7
22	6.53, d (1.2)	112.8
23	7.32, t (1.6)	142.3
28	0.83, s	18.7

[0100]

29	5.81, s	93.8
30	1.15, s	22.8
1′		166.5
2′		127.7
3′	7.03, m	140.3
4′	1.83, d (7.0)	14.8
5′	1.86, s	12.0
2-OAc	2.03, s	20.8
		168.9
3-OAc	2.12, s	21.0
		170.1

[0101] 由表1和图1～10可知,柠檬苦素类化合物trichilitin G结构数据如下:白色无定状粉末。$[\alpha]_D^{25}$ −11.2 (c 0.17, MeOH);ECD(MeOH)λ_{max}($\Delta\varepsilon$)222(4.82)nm;UV(MeOH)λ_{max}(logε)216(2.93);IR(KBr)ν_{max} 3441,2928,1721,1257,1063cm^{-1}。通过HR-EI-MS中m/z:695.2690[M+Na]$^+$(calcd for $C_{35}H_{44}O_{13}Na$:695.2680);结合^{13}C-NMR数据确定分子式为$C_{35}H_{44}O_{13}$,不饱和度为14。^{1}H-NMR中显示1个特征呋喃取代环[δ_H 7.32(1H,s,H-23),7.22(1H,s,H-21),6.53(1H,s,H-22)],半缩醛次甲基质子信号[δ_H 5.81(1H,s,H-29)],7个甲基质子信号[δ_H2.12(3H,s,

3-OAc),2.03(3H,s,2-OAc),1.86(3H,s,H-5'),1.83(3H,d,J=7.0Hz,H-4'),1.15(3H,s,H-30),1.14(3H,s,H-18),0.84(3H,s,H-18)]和8个连氧质子取代信号[δ_H 5.92(1H,t,J=4.6Hz,H-2),5.58(1H,d,J=4.6Hz,H-3),4.58(1H,s,H-1),4.35(2H,q,J=13.1Hz,H-19),4.10(1H,s,H-12),3.77(1H,s,H-15),3.65(1H,s,H-7)]。^{13}C-NMR和HSQC中显示了35个碳信号,分别是7个甲基,3个亚甲基,14个次甲基和11个季碳。表明该化合物为具有式I所示结构的柠檬苦素类化合物trichilitin G。该化合物的平面结构最终通过二维核磁技术(HSQC,HMBC和^{1}H-^{1}H COSY)进行了确认。其立体结构通过ROESY进行初步指认,并最终通过ECD计算,包括对其绝对构型进行了确认。

[0102] 实施例212-hydroxyamoorastatin的提取分离

[0103] 将实施例1中所述Fr.G-3e6进行正相硅胶柱色谱分离,用石油醚-乙酸乙酯进行洗脱,收集获得2个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-3e6a和Fr.G-3e6b,所述石油醚与乙酸乙酯的体积比为1.5:1;将所述Fr.G-3e6b进行制备型HPLC纯化,得到柠檬苦素类化合物12-hydroxyamoorastatin,所述制备型HPLC的条件包括:

[0104] 色谱柱规格:4.6mm*250mm,5μm;

[0105] 流动相:正己烷-异丙醇75:25;

[0106] 流速:2mL/min;

[0107] 保留时间:42min;

[0108] 柠檬苦素类化合物12-hydroxyamoorastatin的结构表征:

[0109] 柠檬苦素类化合物12-hydroxyamoorastatin为白色无定状粉末,如图21-图23所示,其结构数据如下:ESI-MS:m/z 555[M+Na]$^+$($C_{28}H_{36}O_{10}$);^{1}H NMR(600MHz,Acetone-d_6)δ:7.38(1H,s,H-23),7.33(1H,s,H-21),6.61(1H,d,J=1.6Hz,H-22),4.91(1H,d,J=4.3Hz,H-3),4.68(1H,s,H-29),4.32(1H,t,J=4.6Hz,H-9),4.29(1H,d,J=2.2Hz,H-1),4.24(2H,d,J=3.4Hz,H-19),3.94(1H,d,J=2.4Hz,H-12),3.80(1H,s,H-15),3.64(1H,d,J=2.2Hz,H-7),2.91(1H,d,J=4.1Hz,H-17),2.86(1H,s,H-2α),2.80(dt,J=15.9,4.9Hz,H-5),2.21(1H,dd,J=12.9,6.5Hz,H-16α),2.00(1H,m,H-16β),1.98(3H,s,3-OAc),1.95(1H,dd,J=7.6,5.5Hz,H-6β),1.82(1H,d,J=15.9Hz,H-2β),1.72(1H,dt,J=14.2,3.9Hz,H-6α),1.20(3H,s,H-18),1.07(3H,s,H-30),0.82(3H,s,H-28);^{13}C NMR(150MHz,Acetone-d_6)δ:214.4(C-11),170.5(3'-OAc),142.7(C-23),141.5(C-21),125.4(C-20),114.0(C-22),97.0(C-29),79.8(C-12),74.0(C-1),73.7(C-7),70.6(C-3),70.5(C-4),64.7(C-19),59.1(C-15),48.8(C-9),47.2(C-13),43.1(C-8),42.5(C-10),40.6(C-4),40.2(C-17),36.7(C-2),33.8(C-16),28.9(C-5),26.1(C-6),23.1(C-30),21.4(3'-OAc),20.0(C-28),14.7(C-18)。

[0110] 实施例3azedarachin B的提取分离

[0111] 将实施例1中所述Fr.G-7进行C_{18}反相硅胶柱色谱分离,依次采用体积分数为50%~100%的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集获得9个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-7a~Fr.G-7i;将所述Fr.G-7e进行正相硅胶柱色谱分离,用石油醚-乙酸乙酯进行洗脱,收集获得5个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-7e1~Fr.G-7e5,所述石油醚与乙酸乙酯的体积比为2:1;将所述Fr.G-7e5进行制备型HPLC纯化,得到柠檬苦素类化合物azedarachin B,所述制备型HPLC的条件包括:

[0112] 色谱柱规格:4.6mm*250mm,5μm;

[0113] 流动相:34%乙腈;

[0114] 流速:2mL/min;

[0115] 保留时间:96min;

[0116] 柠檬苦素类化合物azedarachin B的结构表征:

[0117] 化合物azedarachin B为白色无定状粉末,结构数据如图24-26所示:ESI-MS:m/z 641[M+K]$^+$($C_{32}H_{42}O_{11}$);^{1}H NMR(600MHz,$CDCl_3$)δ:7.34(1H,m,H-23),7.23(1H,s,H-21),6.52(1H,m,H-22),5.80(1H,t,J=4.1Hz,H-3),5.77(1H,s,H-29),4.67(1H,m,H-1),4.57(1H,d,J=5.0Hz,H-9),4.33(1H,d,J=14.3Hz,H-19α),4.09(1H,d,J=14.3Hz,H-19β),3.78(1H,s,H-12),3.67(1H,s,H-15),3.32(1H,m,H-7),3.01(1H,m,H-17),2.79(1H,m,H-2β),2.65(1H,dd,J=14.0,7.0Hz,H-5),2.35(1H,m,H-2'),2.16(3H,d,J=3.0Hz,3-OAc),2.05(1H,m,H-16α),1.93(1H,m,H-16β),1.87(1H,m,H-2),1.76(1H,m,H-6α),1.73(3H,s,H-18),1.22(6H,m,H-3',H-4'),1.18(1H,s,H-6β),1.14(3H,d,J=6.6Hz,H-30),1.03(3H,d,J=34.9Hz,H-28);^{13}C NMR(150MHz,$CDCl_3$)δ:213.6(C-11),175.8(C-1'),169.8(3-OAc),142.3(C-21),140.7(C-23),123.5(C-20),112.7(C-22),94.2(C-29),78.8(C-12),73.0(C-3),72.7(C-14),70.9(C-7),70.0(C-1),64.0(C-19),59.1(C-15),47.7(C-9),46.1(C-13),42.4(C-8),41.5(C-4),38.8(C-10),38.7(C-17),34.2(C-2),34.1(C-5),33.1(C-16),27.9(C-2'),25.5(C-6),22.7(C-18),21.2(3-OAc),19.3(C-28),18.8(C-3'),18.7(C-4'),14.4(C-30)。

[0118] 实施例4trichilitin H的提取分离

[0119] 将实施例3中将所述Fr.G-7g进行正相硅胶柱色谱分离,用二氯甲烷-丙酮进行洗脱,收集获得3个部分的洗脱液,依次命名为Fr.G-7g1～Fr.G-7g3,所述二氯甲烷与丙酮的体积比为20:1;将所述Fr.G-7g2进行制备型HPLC纯化,得到柠檬苦素类化合物trichilitin H,所述制备型HPLC的条件包括:

[0120] 色谱柱规格:4.6mm*250mm,5μm;

[0121] 流动相:正己烷-异丙醇85:15;

[0122] 流速:2mL/min;

[0123] 保留时间:34min;

[0124] 柠檬苦素类化合物trichilitin H的结构表征:

[0125] 图11为柠檬苦素类化合物trichilitin H的^{1}H NMR谱图;图12为柠檬苦素类化合物trichilitin H的^{13}CNMR谱图;图13为柠檬苦素类化合物trichilitin H的HSQC谱图;图14为柠檬苦素类化合物trichilitin H的HMBC谱图;图15为柠檬苦素类化合物trichilitin H的^{1}H-^{1}H COSY谱图;图16为柠檬苦素类化合物trichilitin H的ROESY谱图;图17为柠檬苦素类化合物trichilitin H的HR-ESI-MS谱图;图18为柠檬苦素类化合物trichilitin H的IR谱图;图19为柠檬苦素类化合物trichilitin H的UV谱图;图20为柠檬苦素类化合物trichilitin H的CD谱图。

[0126] 表2柠檬苦素类化合物trichilitin H的^{1}H-NMR和^{13}C-NMR数据(600/150MHz,$CDCl_3$)

[0127]

No.	δ_H (*J* in Hz)	δ_C
1	4.64, br s	72.8
2	5.79, t (3.8)	71.1
3	4.21, br s	73.1
4		41.6
5	2.79, dd (13.6, 2.4)	26.6
6a	2.06, td (14.2, 2.0)	25.5
6b	1.76, dt (14.2, 4.4)	
7	3.65, br s	70.0
8		42.5
9	4.55, s	47.7
10		42.4
11a		213.5
11b		
12	4.08, s	78.8
13		46.1
14		72.8
15	3.76, br s	59.2
16a	2.34, dd (13.2, 6.4)	33.1
16b	1.92, td (13.2, 4.8)	
17	3.00, dd (10.6, 6.4)	38.7
18	1.11, s	14.4
19	4.33, m, 2H	64.0
20		123.5
21	7.22, s	140.7
22	6.50, s	112.8
23	7.32, s	142.3
28	0.98, s	19.3
29	5.82, s	94.4
30	1.14, s	22.8
1'		166.6

[0128]

2'		128.0
3'	6.98, m	139.8
4'	1.82, d (7.2)	14.7
5'	1.84, s	12.0
6'		
1-OAc		
2-OAc		169.7
	2.14, s	21.2

[0129] 由表2和图11～20可知,柠檬苦素类化合物trichilitin H结构数据如下:白色无定状粉末。$[\alpha]_D^{26}$ -15.9 (*c* 0.18, MeOH);ECD(MeOH)λ_{max}($\Delta\varepsilon$)221(8.22)nm;UV(MeOH)λ_{max}(logε)211(3.23);IR(KBr)ν_{max} 3442,2931,1713,1258,1064cm^{-1};通过HR-EI-MS中m/z:653.2659[M+Na]$^+$(calcd for $C_{33}H_{42}O_{12}Na$:653.2574),结合^{13}C-NMR数据确定分子式$C_{33}H_{42}O_{12}$,不饱和度为13。^{1}H-NMR中显示了1个特征呋喃取代环信号[δ_H7.14(s,H-21),6.44(s,H-22),7.25(s,H-23)],特征半缩醛次甲基质子信号的,6个甲基质子信号[δ_H2.08(3H,s,2-OAc),1.78(3H,s,

H-5'),1.75(3H,q,J=6.9Hz,H-4'),1.07(3H,s,H-30),1.04(3H,s,H-18),0.91(3H,s,H-28)],1个烯烃质子信号[δ_H 6.91(1H,q,J=6.9Hz,H-3')]和8个连氧质子信号[δ_H 5.75(1H,s,1-OAc),4.57(1H,s,H-3),4.27(2H,q,J=13.1Hz,H-19),4.14(1H,s,H-1),4.01(1H,s,H-12),3.70(1H,s,H-15),3.59(1H,s,H-7)]。^{13}C-NMR和HSQC显示了33个碳信号,分别是6个甲基,4个亚甲基,13个次甲基和10个季碳。表明该化合物为具有式I所示结构的柠檬苦素类化合物trichilitin H。该化合物的平面结构最终通过二维核磁技术(HSQC,HMBC和^{1}H-^{1}H COSY)进行了确认。其立体结构通过ROESY进行初步指认,并最终通过ECD计算,包括对其绝对构型进行了确认。

[0130] 实施例512-O-deacetyltrichilin H的提取分离

[0131] (1)将所述实施例1中Fr.F进行小孔树脂色谱分离,依次采用体积分数为50%~100%的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集获得8个部分的洗脱液,依次命名为Fr.F-1~Fr.F-8;将所述Fr.F-5进行C_{18}反相硅胶柱色谱分离,依次采用体积分数为50%~100%的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集获得10个部分的洗脱液,依次命名为Fr.F~5a~Fr.F-5j;采用Sephadex LH-20甲醇凝胶柱层析对所述Fr.F-5f进行洗脱,每5mL收集一份层析液,收集获得4个部分的洗脱液,依次命名为Fr.F-5f1~Fr.F-5f4,所述Sephadex LH-20甲醇凝胶柱层析的条件包括:

[0132] 洗脱液:分析纯甲醇;

[0133] 凝胶柱尺寸:18mm*180mm;

[0134] 所述洗脱液的流速:0.5mL/min;

[0135] 所述洗脱液用量:2.0L;

[0136] (2)将所述Fr.F-5f2进行正相硅胶柱色谱分离,用石油醚-丙酮进行洗脱,收集获得6个部分的洗脱液,依次命名为Fr.F-5f2a~Fr.F-5f2f,所述石油醚与丙酮的体积比为30:1;将所述Fr.F-5f2e进行制备型HPLC纯化,得到柠檬苦素类化合物12-O-deacetyltrichilin H,所述制备型HPLC的条件包括:

[0137] 色谱柱规格:4.6mm*250mm,5μm;

[0138] 流动相:正已烷-异丙醇90:10;

[0139] 流速:2mL/min;

[0140] 保留时间:58min;

[0141] 柠檬苦素类化合物12-O-deacetyltrichilin H的结构表征:

[0142] 化合物12-O-deacetyltrichilin H为白色无定状粉末。结构数据如图27-29所示:ESI-MS:m/z 683[M+Na]$^+$($C_{34}H_{44}O_{13}$);^{1}H NMR(600MHz,$CDCl_3$)δ:7.33(1H,s,H-23),7.22(1H,s,H-21),6.45(1H,s,H-22),5.89(1H,q,J=4.4Hz,H-2),5.73(1H,s,H-29),5.53(1H,d,J=4.6Hz,H-3),4.57(1H,m,H-1),4.55(1H,s,H-9),4.36(1H,d,J=13.0Hz,H-19α),4.31(1H,d,J=13.0Hz,H-19β),4.11(1H,d,J=9.1Hz,H-12),3.77(1H,s,H-15),3.65(1H,s,H-7),3.01(1H,dd,J=10.9,6.1Hz,H-17),2.84(1H,dd,J=14.2,4.1Hz,H-5),2.67(1H,m,H-2'),2.45(1H,d,J=3.7Hz,H-16β),2.11(3H,d,J=16.2Hz,3-OAc),2.03(3H,s,2-OAc),1.99(1H,s,H-16α),1.90(1H,dd,J=13.1,11.2Hz,H-6α),1.74(1H,m,H-6β),1.21(3H,overlapped,H-3'),1.21(3H,overlapped,H-4'),1.32(3H,s,H-30),1.14(3H,s,H-18),0.81(3H,d,J=19.9Hz,H-28);^{13}C NMR(150MHz,$CDCl_3$)δ:213.2(C-11),175.8(C-1'),170.2

(2-OAc),169.1(3-OAc),142.3(C-23),140.7(C-21),123.5(C-20),112.8(C-22),93.5(C-29),78.8(C-12),72.9(C-14),72.8(C-3),71.6(C-1),69.9(C-7),68.6(C-2),64.1(C-19),59.2(C-15),47.3(C-9),46.1(C-13),42.4(C-8),42.3(C-10),40.7(C-4),38.6(C-17),34.1(C-2'),33.1(C-16),27.7(C-5),25.3(C-6),22.8(C-30),21.0(3-OAc),20.8(2-OAc),18.8(C-28),18.7(C-3'),18.7(C-4'),14.4(C-18)。

[0143] 实施例6抗肿瘤活性

[0144] MTT实验

[0145] 以每孔3000个细胞的密度将HCT-116(人结肠癌细胞)、NCl-H1975(人肺腺癌细胞)和SH-SY5Y(人神经母细胞瘤细胞)三种癌细胞分别均匀接种于96孔板(100μL/孔),待细胞贴壁后,用不同浓度的化合物处理细胞,每组浓度设三个复孔,并在恒温培养箱中培养72h。72h后,取出96孔板,弃培基,加入MTT(100μL/孔)使其显色,并在恒温培养箱中培养4h。4h后,取出96孔板,弃上清,加入DMSO(100μL/孔)震荡摇匀后用酶标仪在490nm处测量吸光度,测得吸光度后,通过IBM SPSS Statistics计算化合物的IC_{50}值,如表3所示。

[0146] 表3具有式I结构的柠檬苦素类化合物的体外抗肿瘤活性结果(IC_{50}值)

[0147]

	Cell lines		
Compounds	HCT-116	NCI-H1975	SH-SY5Y
trichilitin G	0.13±0.033	2.21±0.12	>20
trichilitin H	0.035±0.024	0.26±0.014	1.26±0.055
12-hydroxyamoorastatin	0.12±0.029	0.16±0.025	2.81±0.32
azedarachin B	0.22±0.012	0.28±0.016	5.73±0.415
12-*O*-deacetyltrichilin H	0.11±0.018	1.31±0.086	7.66±0.67
Doxorubicin	0.20±0.021	0.065±0.0052	0.056±0.022

[0148] 由表3可看出5种化合物对三种癌细胞均具有较强的癌细胞毒活性,Doxorubicin(阿霉素)为阳性对照,化合物trichilitin H对三种癌细胞均有较高的抑制活性,尤其是对结肠癌细胞(HCT-116)的抑制活性强于阳性对照,是一种潜在的高活性抗肿瘤药物。

[0149] 实施例7化合物trichilitin H抗肿瘤机理研究

[0150] (2)细胞周期实验

[0151] 以每孔6000个细胞的密度将HCT-116细胞均匀接种于6孔板中;待细胞贴壁后用不同浓度的化合物(0.02μM、0.04μM、0.08μM)处理细胞;待48h后,收集细胞,用PBS洗涤后,置于70%的冰乙醇中固定,并在-20℃冰箱过夜。然后弃去上清,用预冷的PBS洗涤后,将细胞在用100μg/mLRNase A37℃水浴加热10min后,再用50μg/mL碘化丙啶(PI)在黑暗中染色30min,然后用流式细胞术检测细胞DNA含量。

[0152] (3)细胞凋亡实验

[0153] 以每孔5000个细胞的密度将HCT-116细胞均匀接种于6孔板中;待细胞贴壁后用不同浓度的化合物(0.02μM、0.04μM、0.08μM)处理细胞;待48h后,收集细胞,PBS洗3次后,用Annexin V和碘化丙啶(PI)染色,避光孵育30min后上流式细胞术检测细胞凋亡情况。

[0154] (4)蛋白质免疫印迹分析

[0155] 总蛋白提取:用不同浓度的化合物trichilitin H(0.02μM、0.04μM、0.08μM)处理HCT-116细胞细胞48h后,取出培养皿并弃去上清液;吸取2mL PBS缓冲液洗涤后,弃去洗涤液;每皿加入150～200μL裂解液,并用刮刀收集裂解悬液;将裂解旋液转移至1.5mL离心管,104℃,10～20min金属浴使细胞充分裂解。

[0156] 蛋白定量:吸取10μL蛋白悬液于1.5mL离心管,1000μL三氯乙酸纯化后将其置于低温离心机中(4℃、12000rpm、10min)离心;而后将其取出弃去上清液,加入1000μL BCA液恒温金属浴(60℃、60min),而后将其取出混匀,每个浓度设3个复孔,每孔200μL于96孔板,于562nm处测定其中的蛋白质浓度。

[0157] 制胶:根据目的蛋白分子量选择合适浓度的凝胶,按照配制比列配制分离胶,将其加入玻璃模板后使用无水乙醇压平,待其凝固后将无水乙醇控干,再加入配制好的浓缩胶,插入梳子,待其凝固后即可使用。

[0158] 电泳:根据蛋白定量的结果,吸取给定浓度的蛋白悬液加入凝胶泳道,80V作为初始电压,待Marker到达分离胶后,调整电压为120V进行电泳分离。

[0159] 转膜:电泳完成后,将含有蛋白印迹的胶,并与大小相当的PVDF膜以及海绵滤纸组装成三明治结构进行转膜(110V,150min)。

[0160] 封闭:转膜完成后,将PVDF膜捞出,放入5％的BSA或脱脂奶粉中,置于摇床上封闭,60min后取出。

[0161] 孵育一抗:封闭完成后,将膜取出,用TBST洗涤三次,每次10min,然后将其与对应的一抗稀释液共同置于4℃冰箱中过夜。

[0162] 孵育二抗:一抗孵育完成后,回收一抗并将膜用TBST洗涤三次,每次10min,然后将其与对应的二抗稀释液共同置于摇床孵育2h。

[0163] 显影:二抗孵育完成后,回收二抗并将膜用TBST洗涤三次,每次10min,然后加入显影剂,通过ChemiDoc TM MP成像系统进行显影,并使用Image J 1.6软件对相关蛋白表达情况进行分析。

[0164] 图30为柠檬苦素类化合物trichilitin H诱导HCT-116细胞的细胞周期阻滞在S期。其中A为采用PI染色法检测柠檬苦素类化合物trichilitin H不同浓度和时间对HCT-116细胞周期分布的影响;B-C为A图中不同细胞周期阶段的定量直方图;D为用指定浓度的柠檬苦素类化合物trichilitin H处理HCT-116细胞不同时间后,用westernblot检测周期相关蛋白(p-cdc2/cdc2、p53和p21)的表达;E为D图中各蛋白表达的统计图。

[0165] 图31为柠檬苦素类化合物trichilitin H抑制HCT-116细胞增殖并诱导其凋亡。A为柠檬苦素类化合物trichilitin H对HCT-116细胞不同时间点的生长抑制作用;B为采用Annexin V-FITC/PI双染色法检测柠檬苦素类化合物trichilitin H在指定浓度下处理72h后对HCT-116细胞的凋亡作用;C为B图中HCT-116细胞凋亡率的统计图;D为采用qPCR方法检测柠檬苦素类化合物trichilitin H在指定浓度下处理24h后各凋亡基因的mRNA水平;E为用指定浓度的柠檬苦素类化合物trichilitin H处理HCT-116细胞48h后,用western blot检测凋亡相关蛋白(P53、Caspase-3、Bcl-2)的表达;F为E图中各蛋白表达的统计图。

[0166] 由图30和图31可看出,trichilitin H通过诱导p53来调控下游的周期(p21、cdc2)和凋亡蛋白(Bcl-2、Caspase-3),促使HCT-116癌细胞发生S期阻滞和凋亡。

[0167] 应当注意的是,以上所述的实施例仅用于解释本发明,并不构成对本发明的任何

限制。通过参照典型实施例对本发明进行了描述,但应当理解为其中所用的词语为描述性和解释性词汇,而不是限定性词汇。可以按规定在本发明权利要求的范围内对本发明做出修改,以及在不背离本发明的范围和精神内对本发明进行修订。尽管其中描述的本发明涉及特定的方法、材料和实施例,但是并不意味着本发明限于其中公开的特定例,相反,本发明扩展至其他所有具有相同功能的方法和应用。

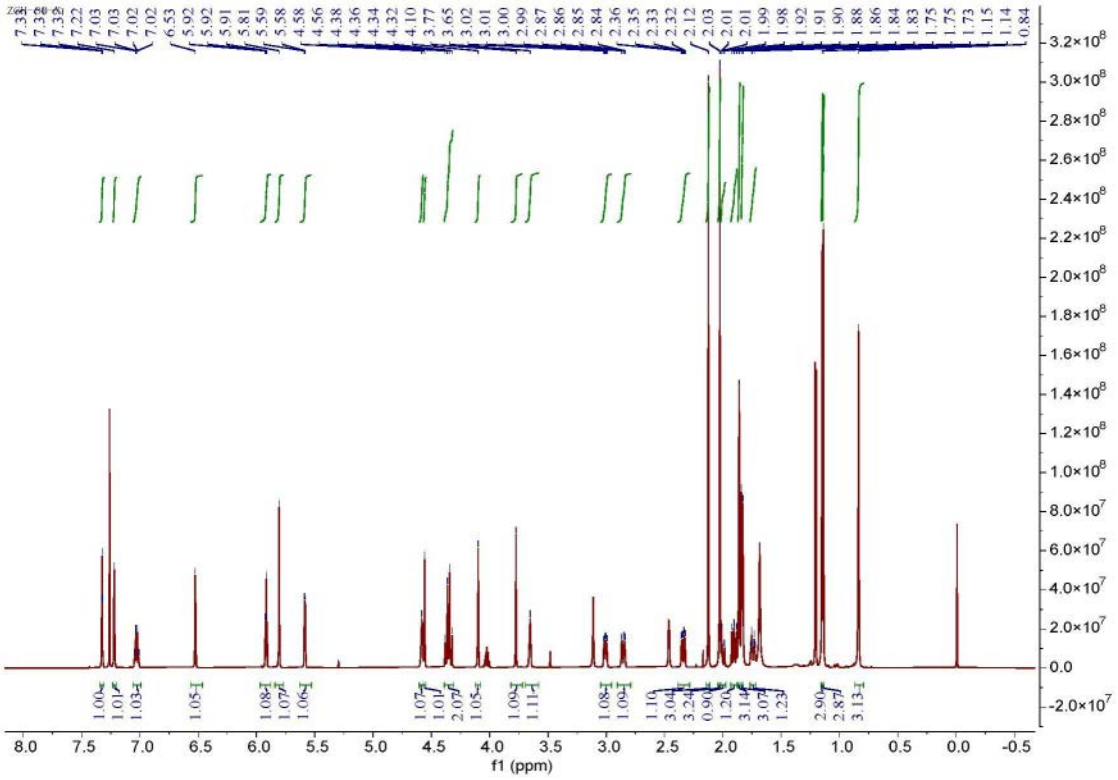


图1

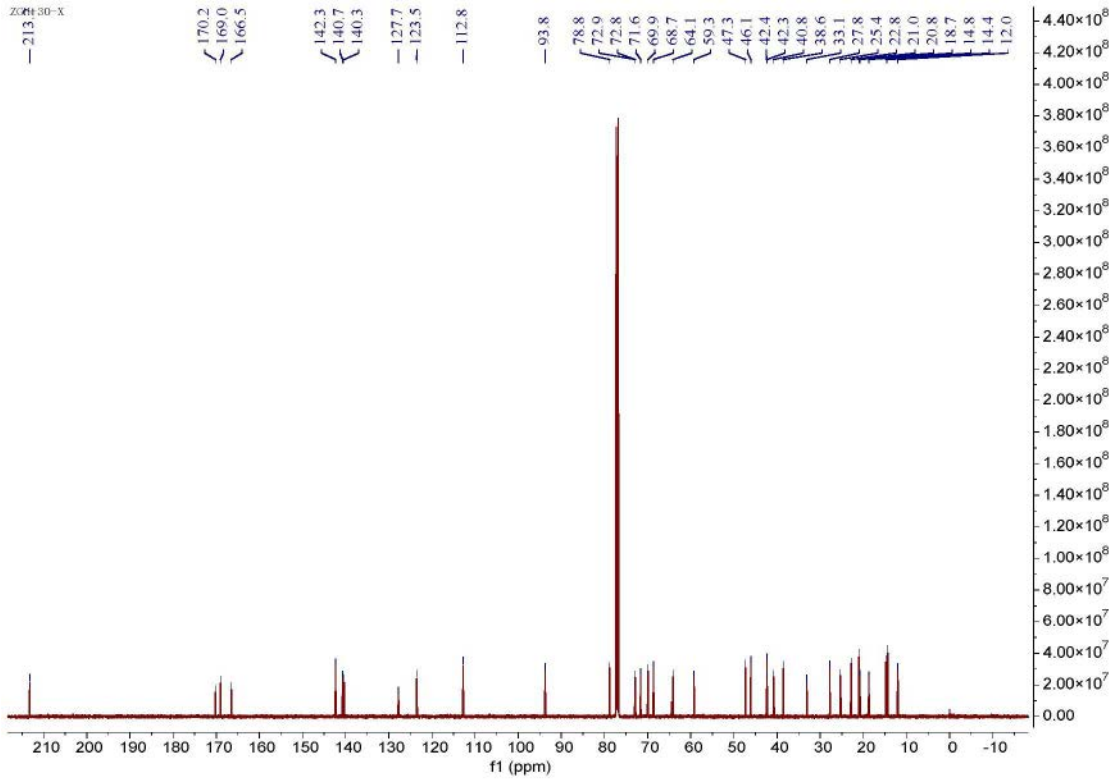


图2

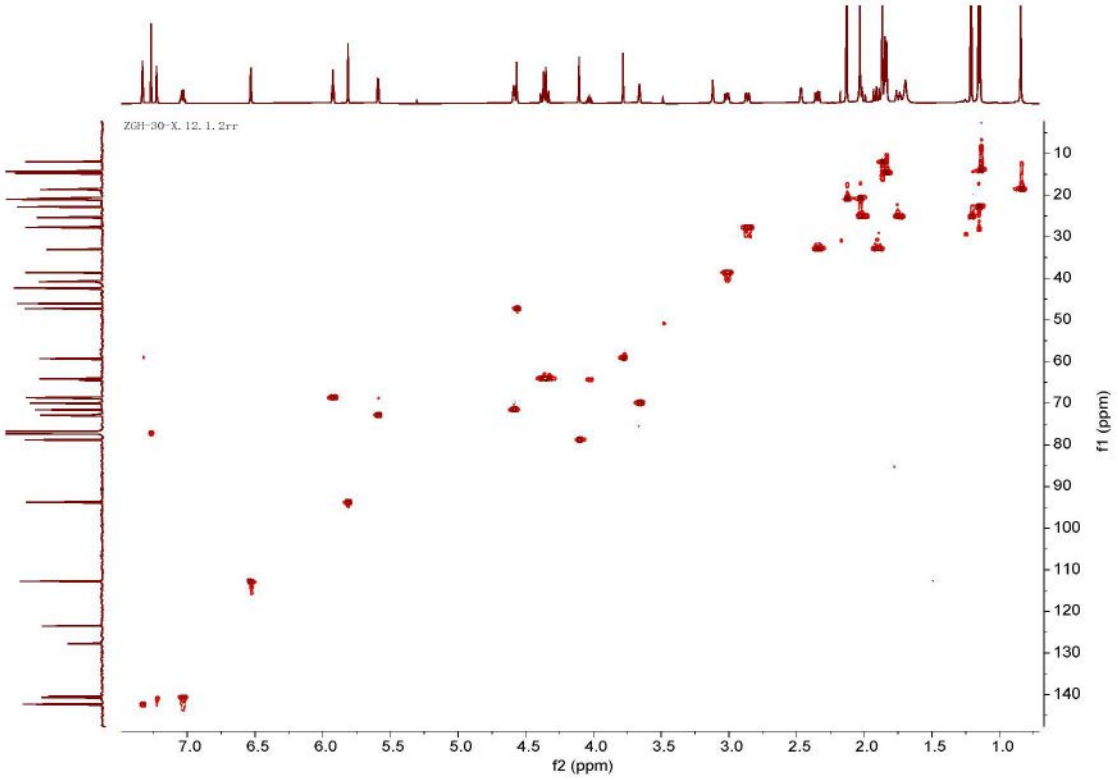


图3

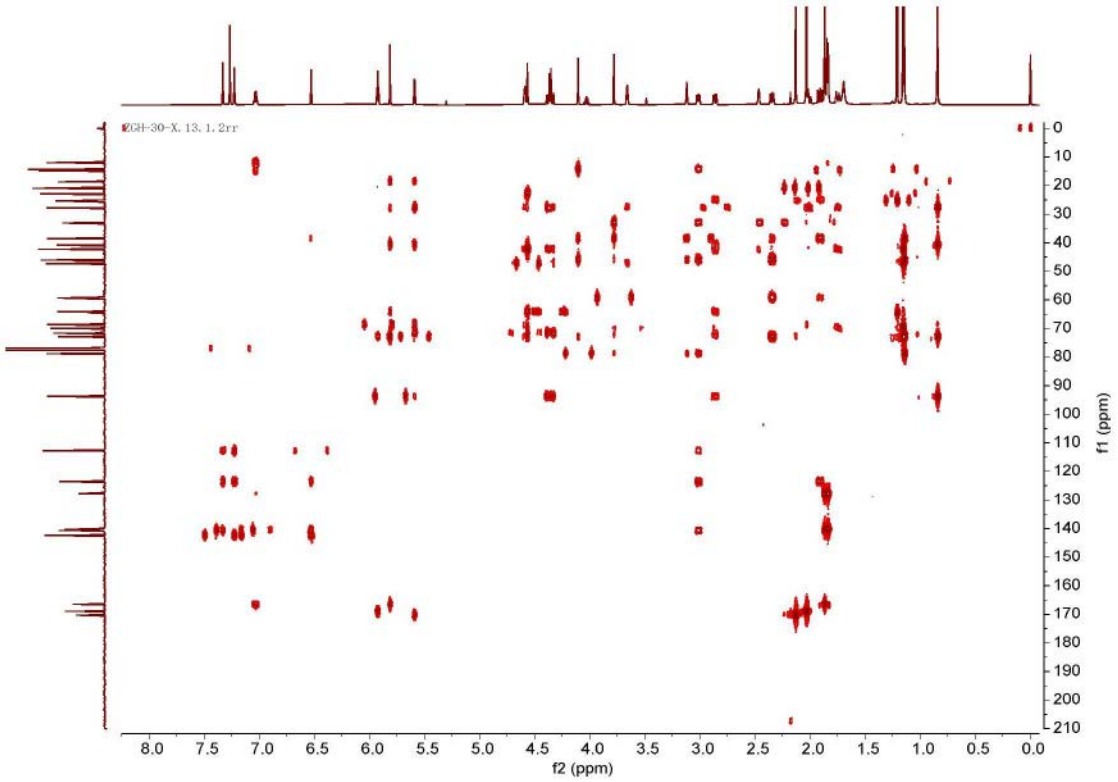


图4

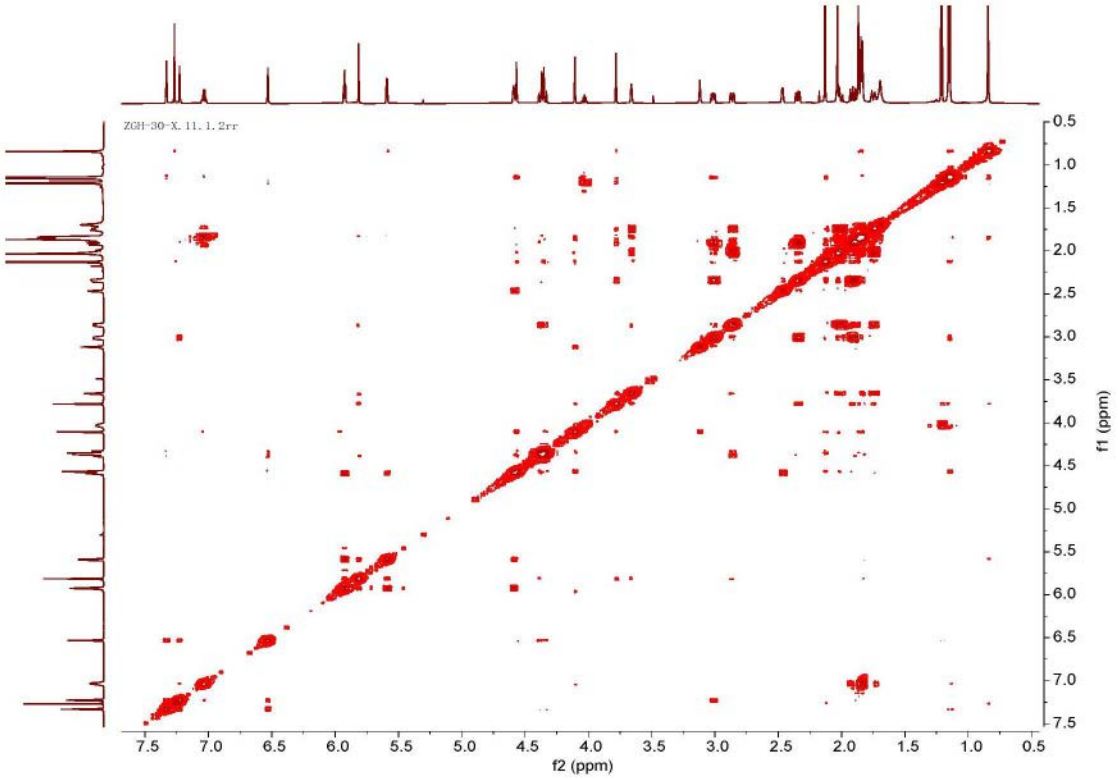


图5

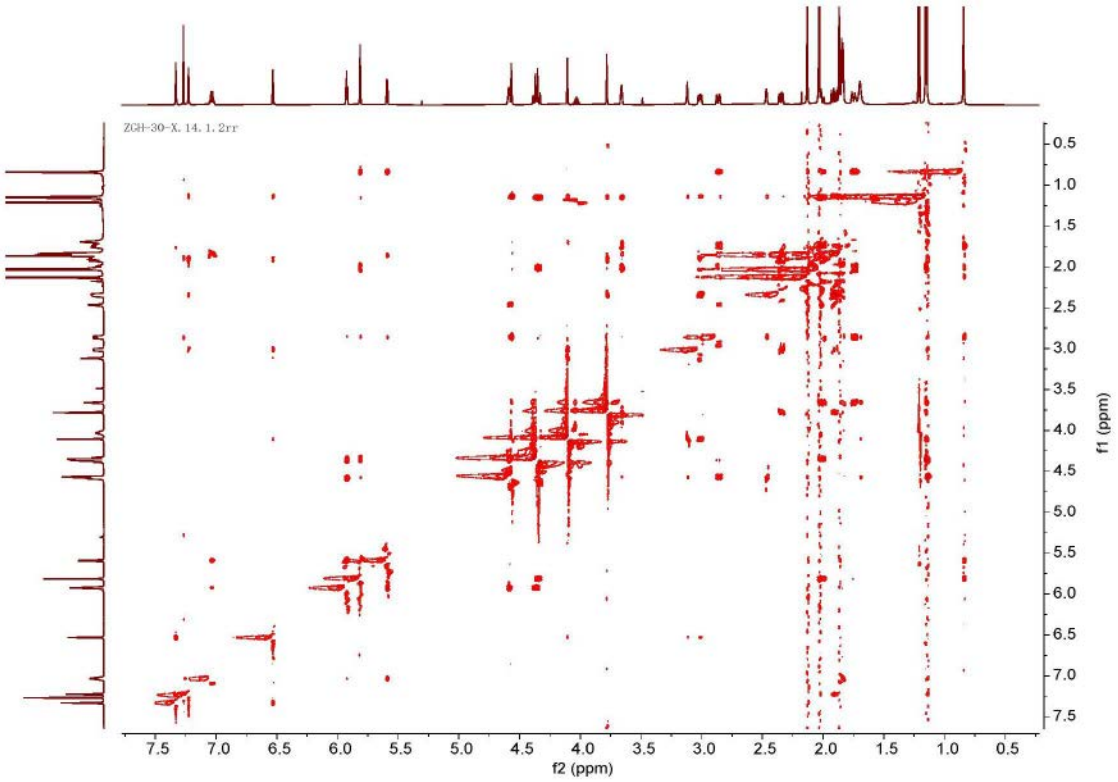


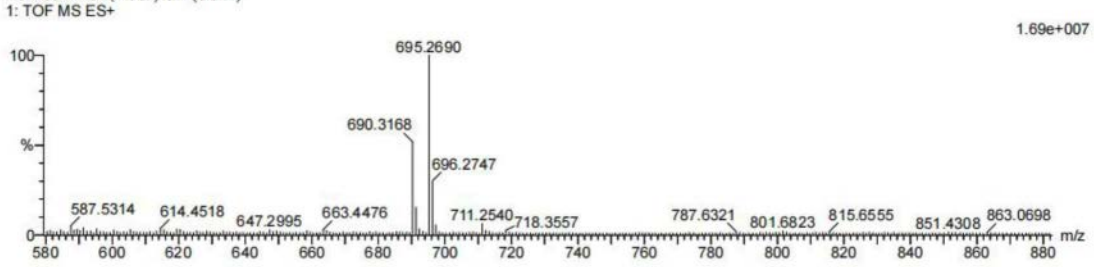
图6

Elemental Composition Report **Page 1**

Single Mass Analysis
Tolerance = 500.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
Element prediction: Off
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
1 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 closest results for each mass)
Elements Used:
C: 30-35 H: 15-50 O: 13-13 Na: 0-1

ZGH-30-X 284 (2.582) Cm (3:541)
1: TOF MS ES+



Minimum:			-1.5	
Maximum:	5.0	500.0	50.0	

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
695.2690	695.2680	1.0	1.4	13.5	73.6	n/a	n/a	C35 H44 O13 Na

图7

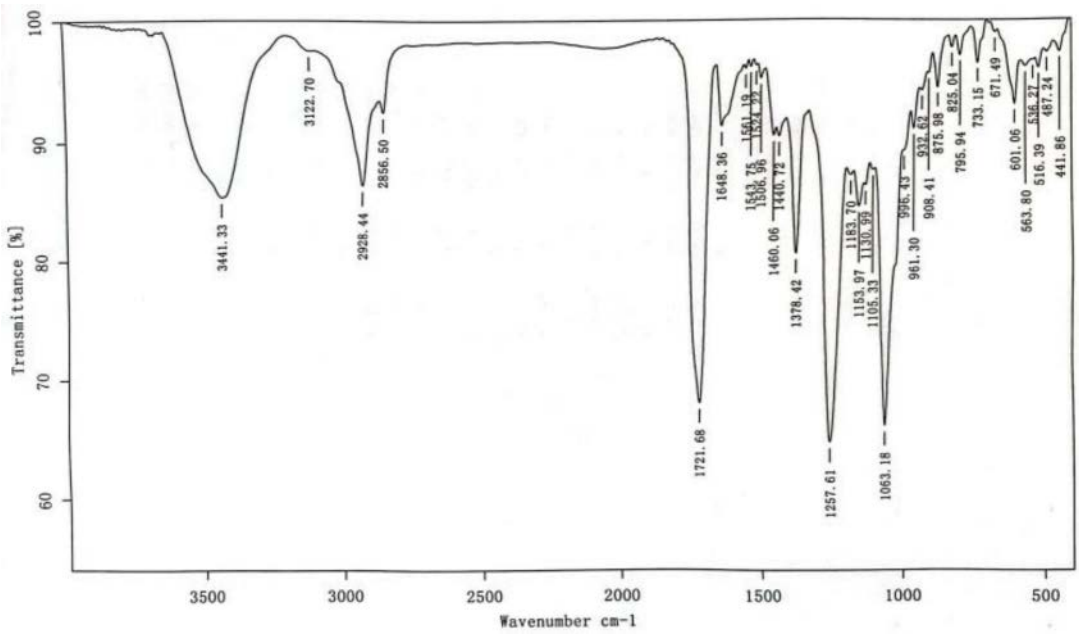


图8

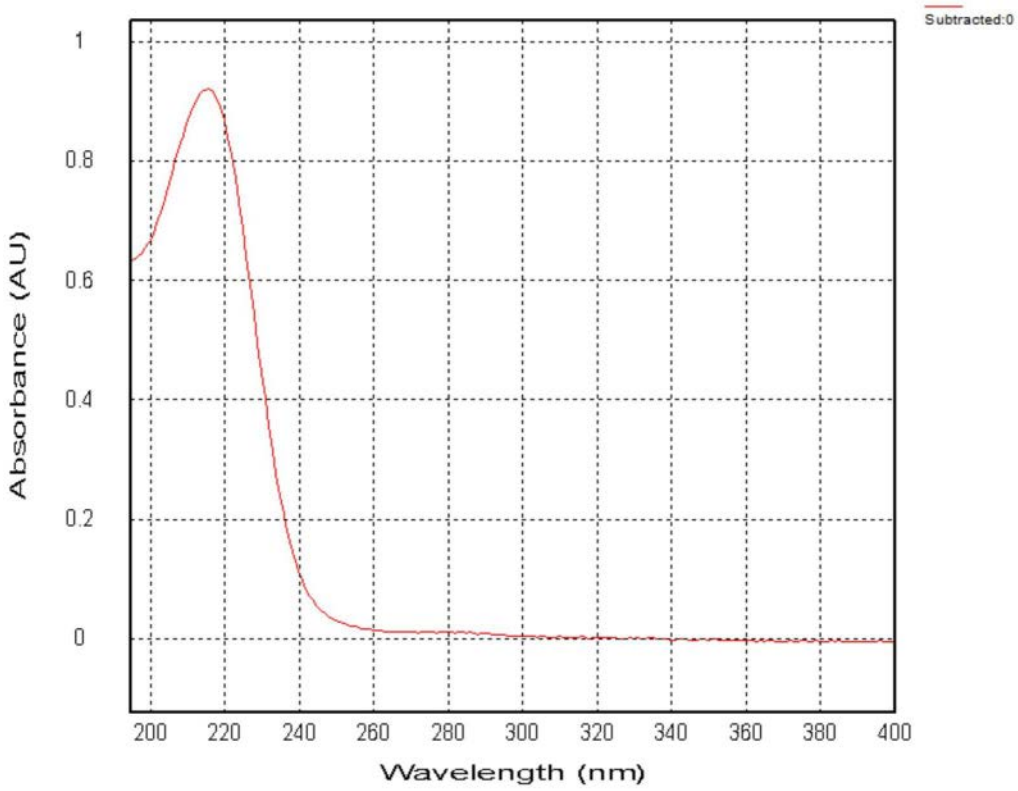

Subtracted:0
Absorbance (AU)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
200
220
240
260
280
300
320
340
360
380
400
Wavelength (nm)

图9

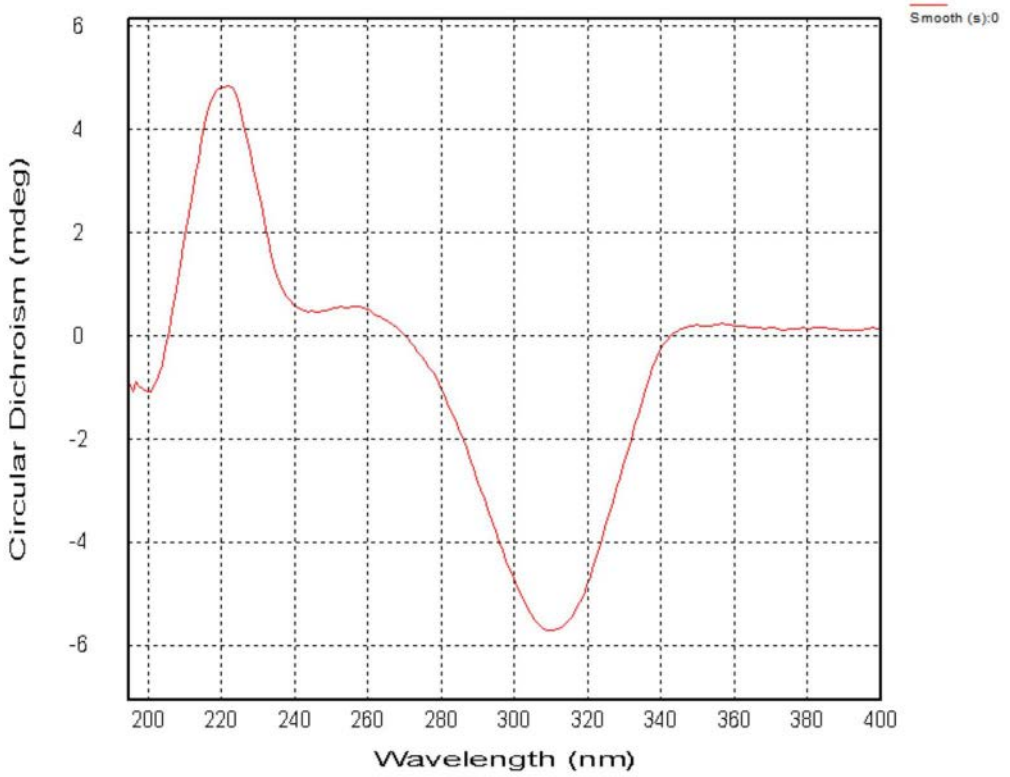

Smooth (s):0
Circular Dichroism (mdeg)
6
4
2
0
-2
-4
-6
200
220
240
260
280
300
320
340
360
380
400
Wavelength (nm)

图10

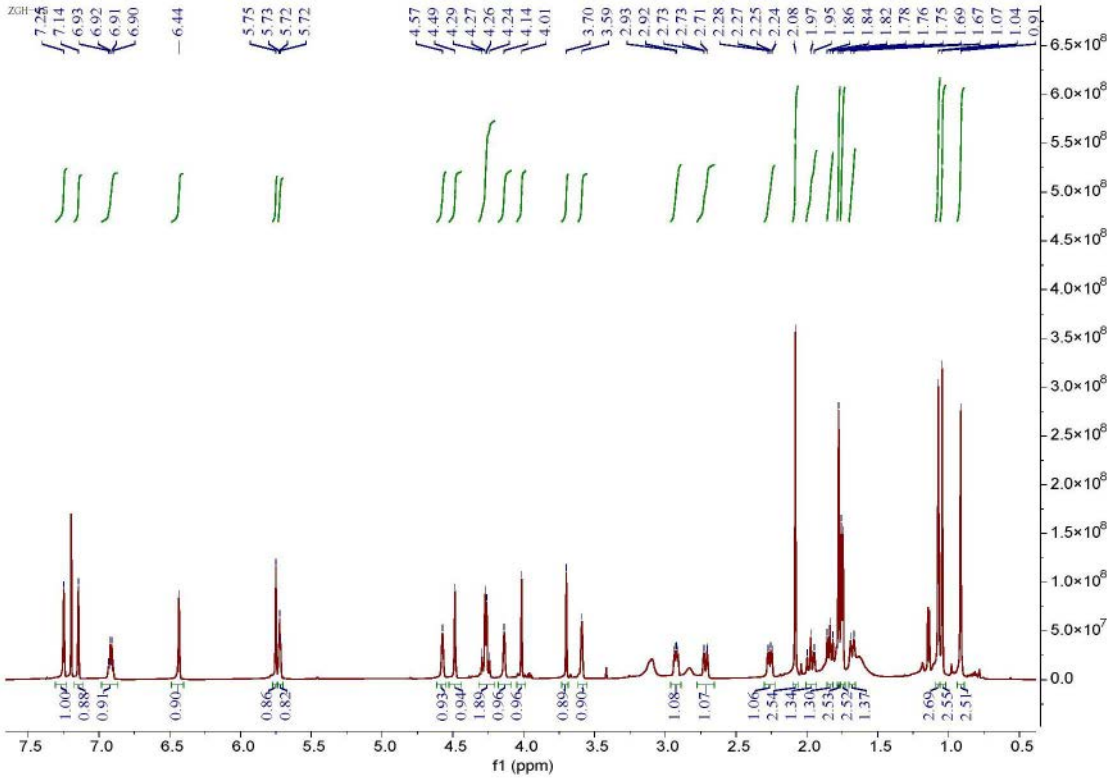


图11

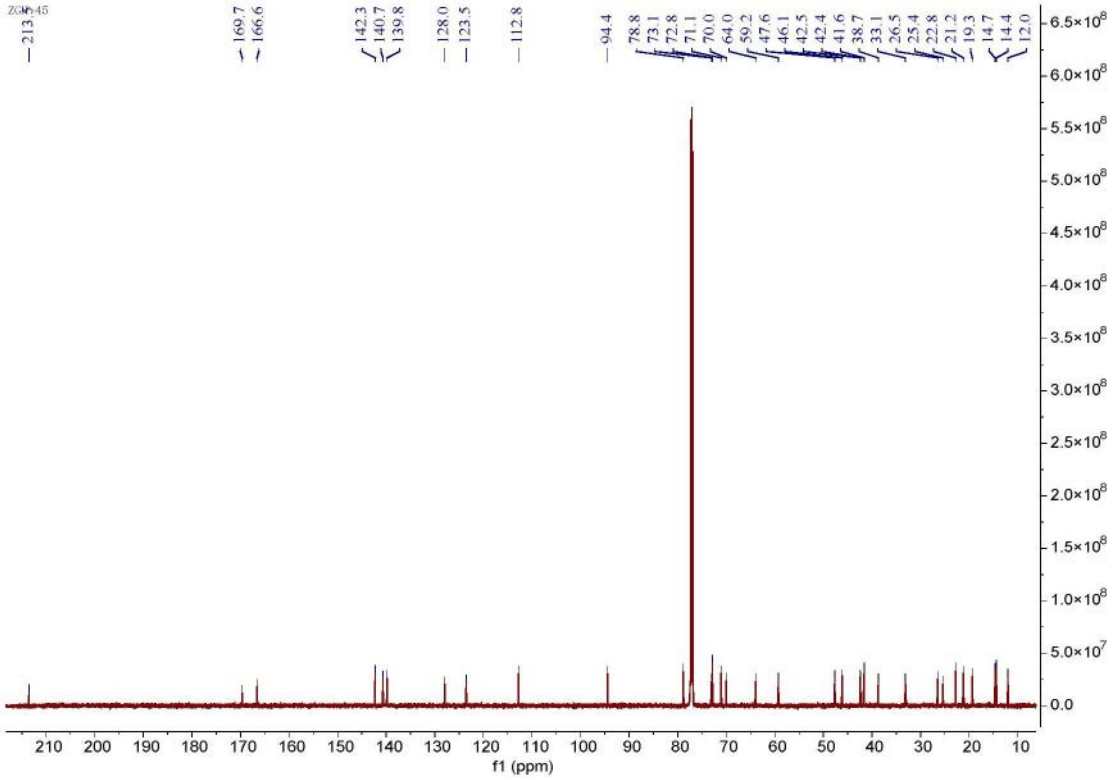


图12

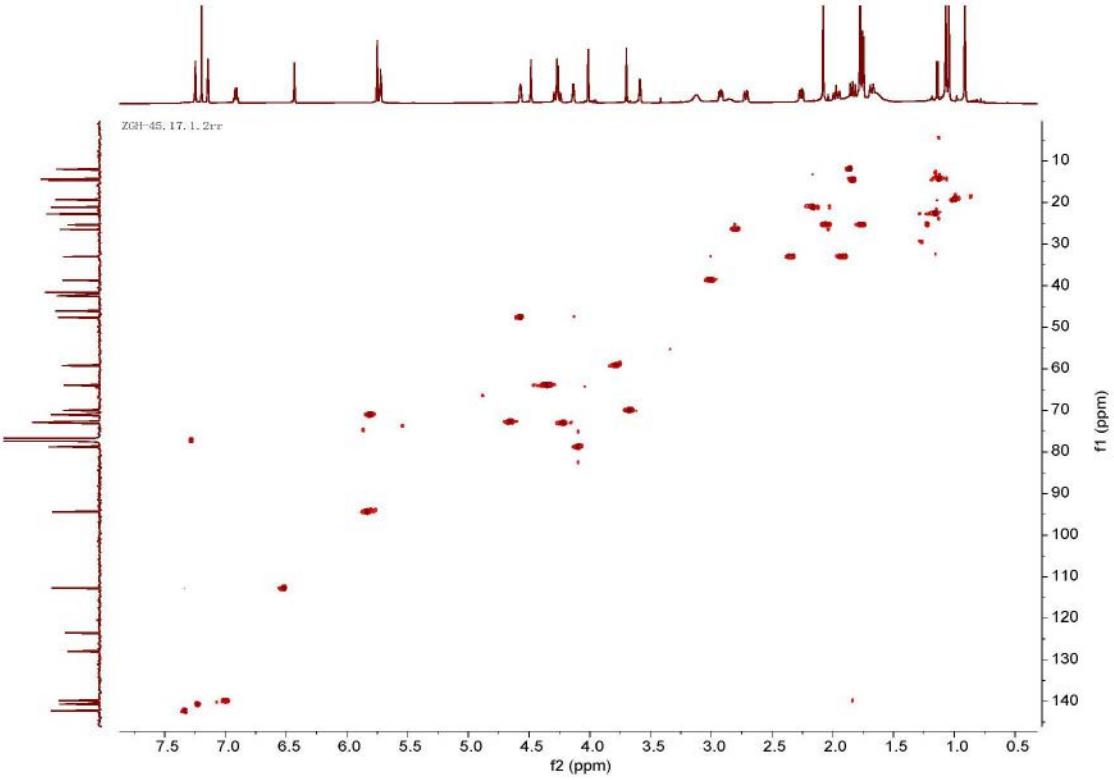


图13

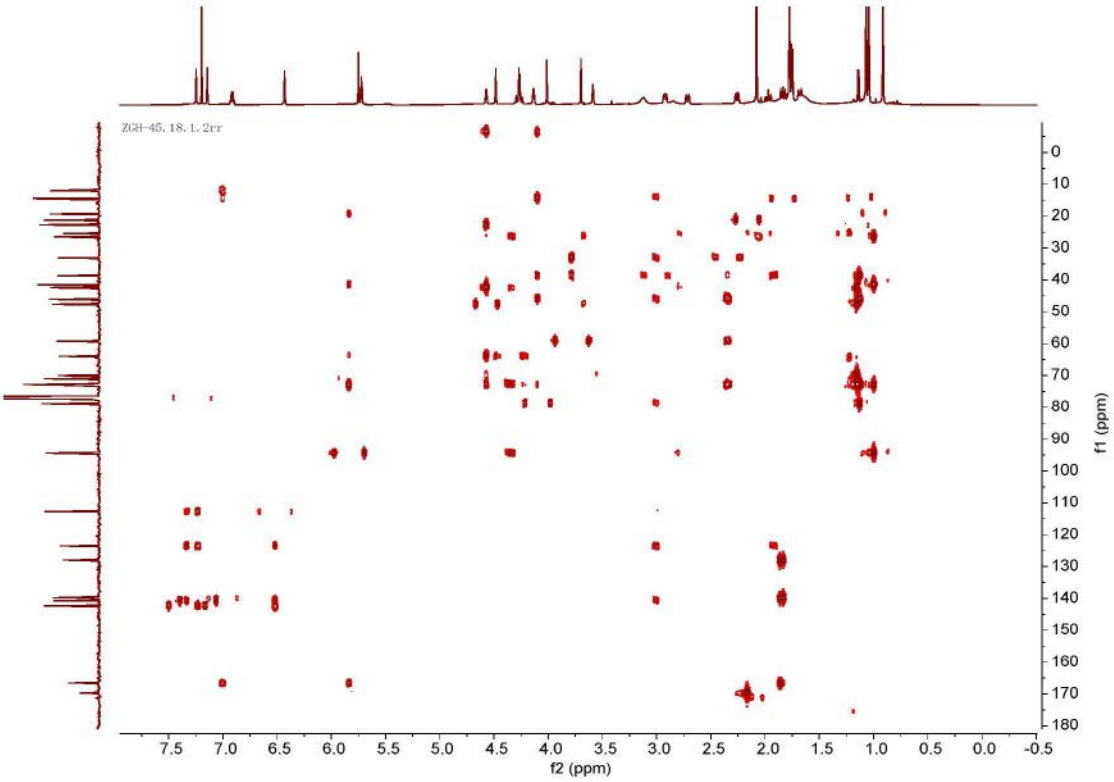


图14

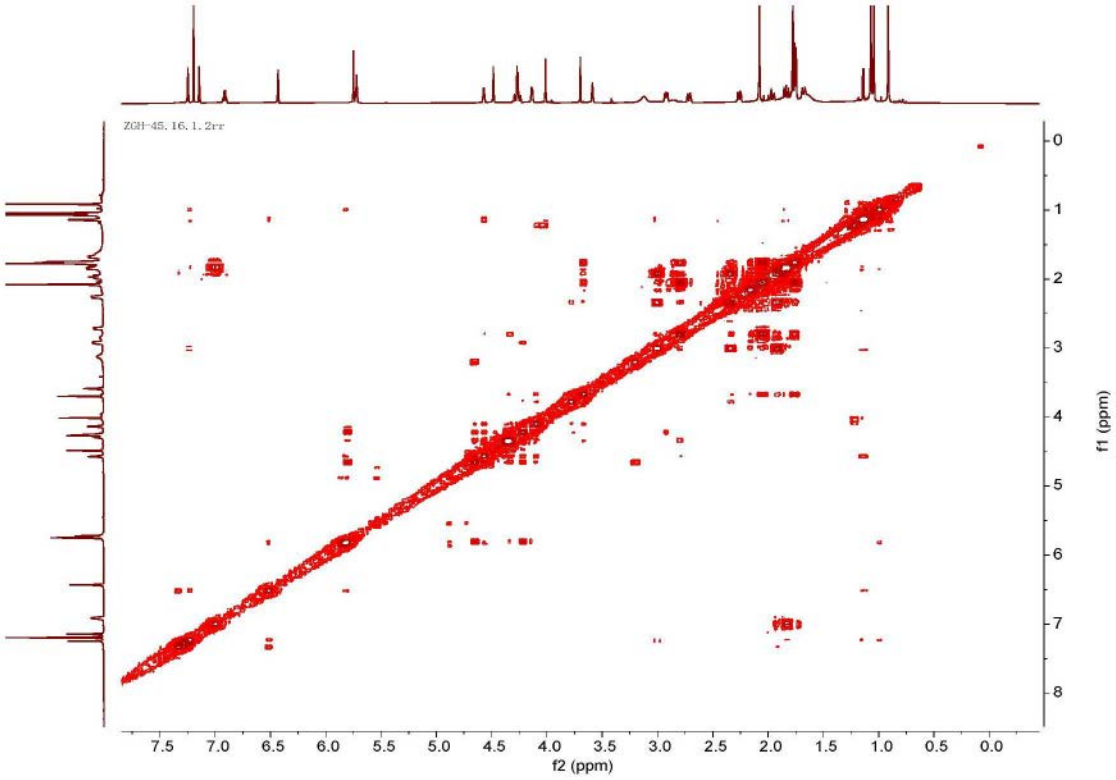


图15

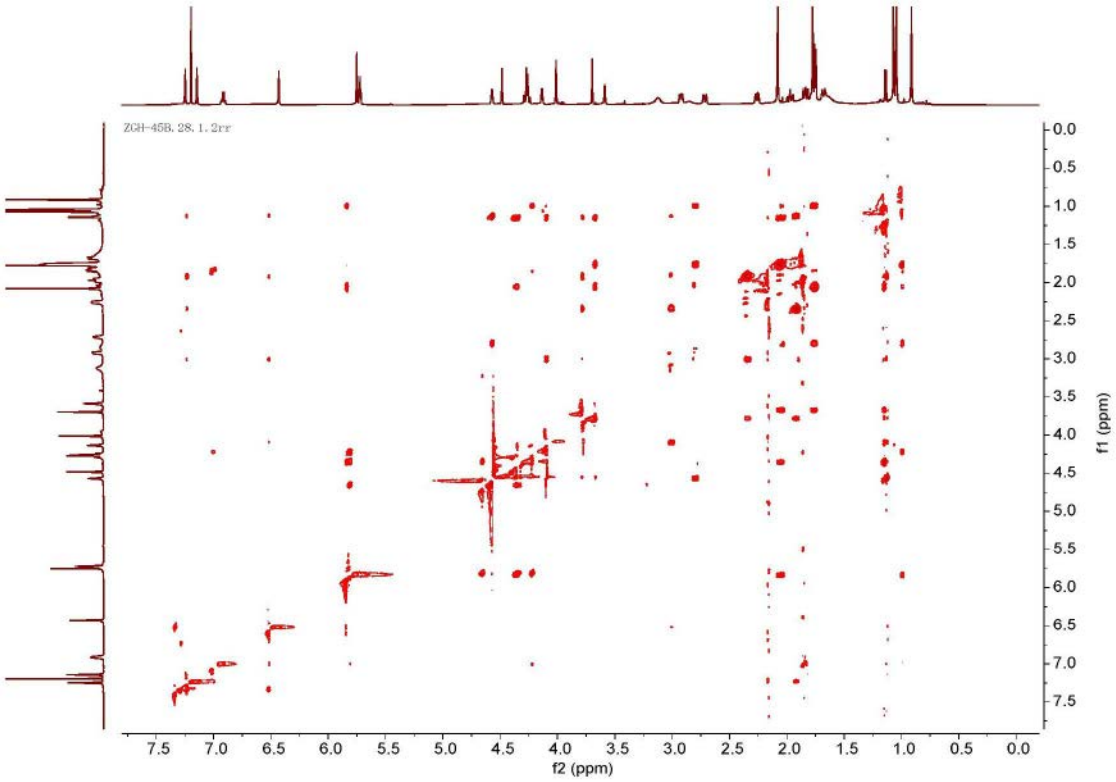


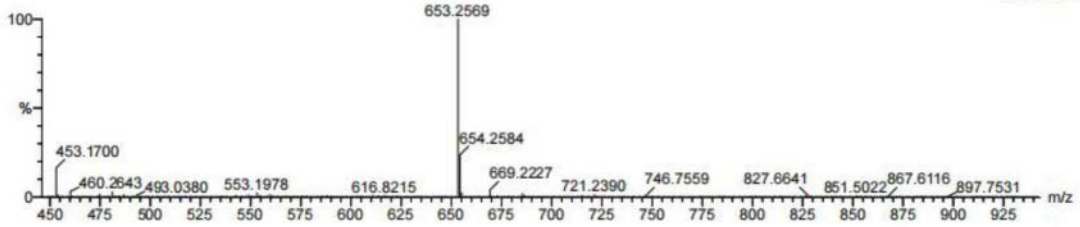
图16

Elemental Composition Report **Page 1**

Single Mass Analysis
Tolerance = 100.0 PPM / DBE: min = 0.0, max = 50.0
Element prediction: Off
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
1 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)
Elements Used:
C: 30-35 H: 40-45 O: 12-12 Na: 1-1
ZGH-45 (0.085)
1: TOF MS ES+

3.54e+006



Minimum:				0.0				
Maximum:		5.0	100.0	50.0				
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
653.2569	653.2574	-0.5	-0.8	12.5	45.2	n/a	n/a	C33 H42 O12 Na

图17

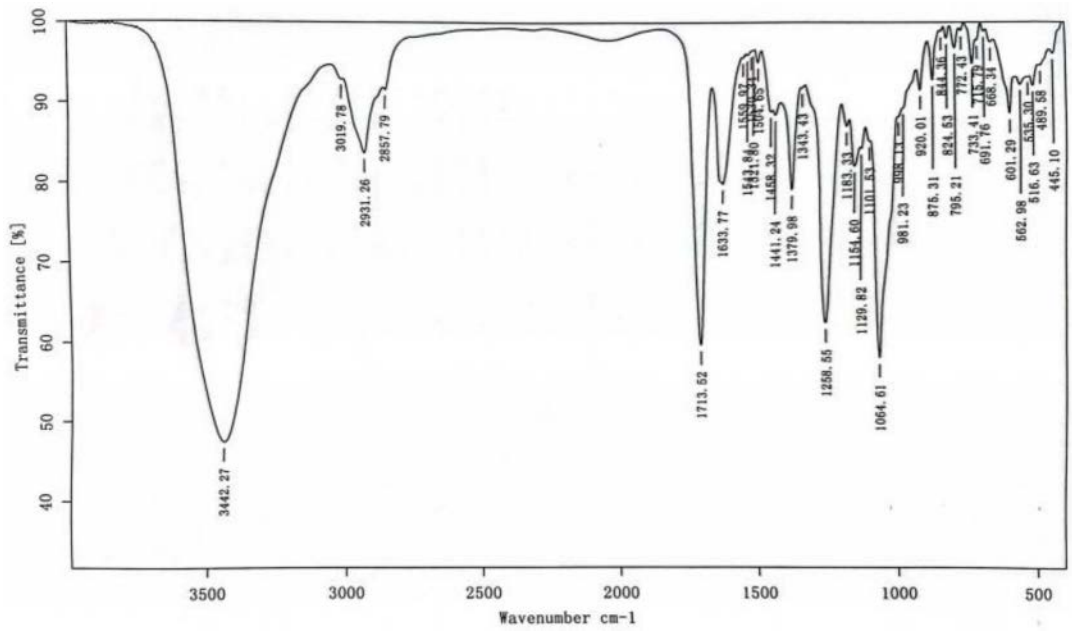


图18

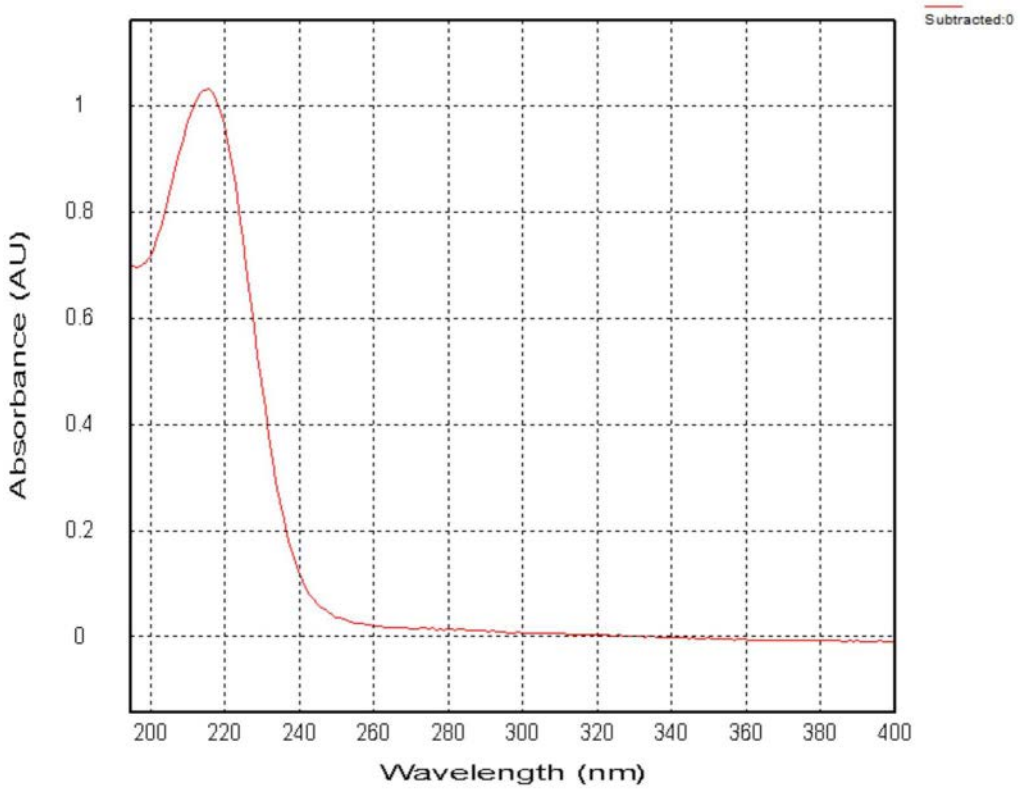

Subtracted:0
Absorbance (AU)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
200
220
240
260
280
300
320
340
360
380
400
Wavelength (nm)

图19

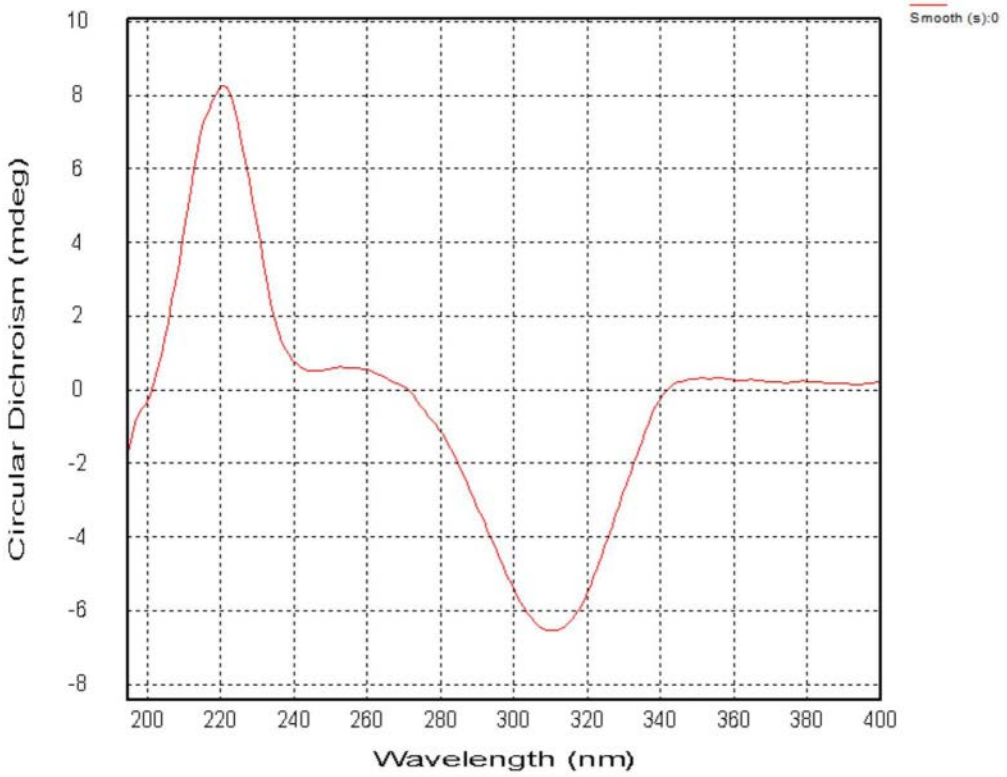

Smooth (s):0
Circular Dichroism (mdeg)
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
200
220
240
260
280
300
320
340
360
380
400
Wavelength (nm)

图20

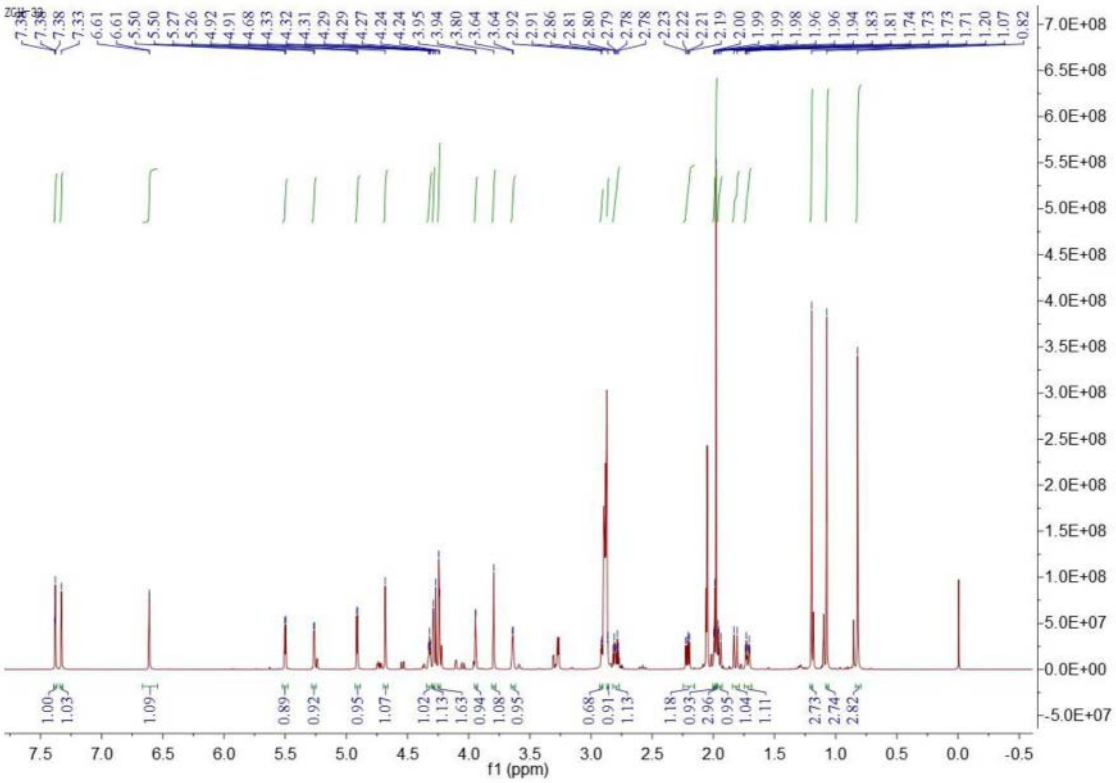


图21

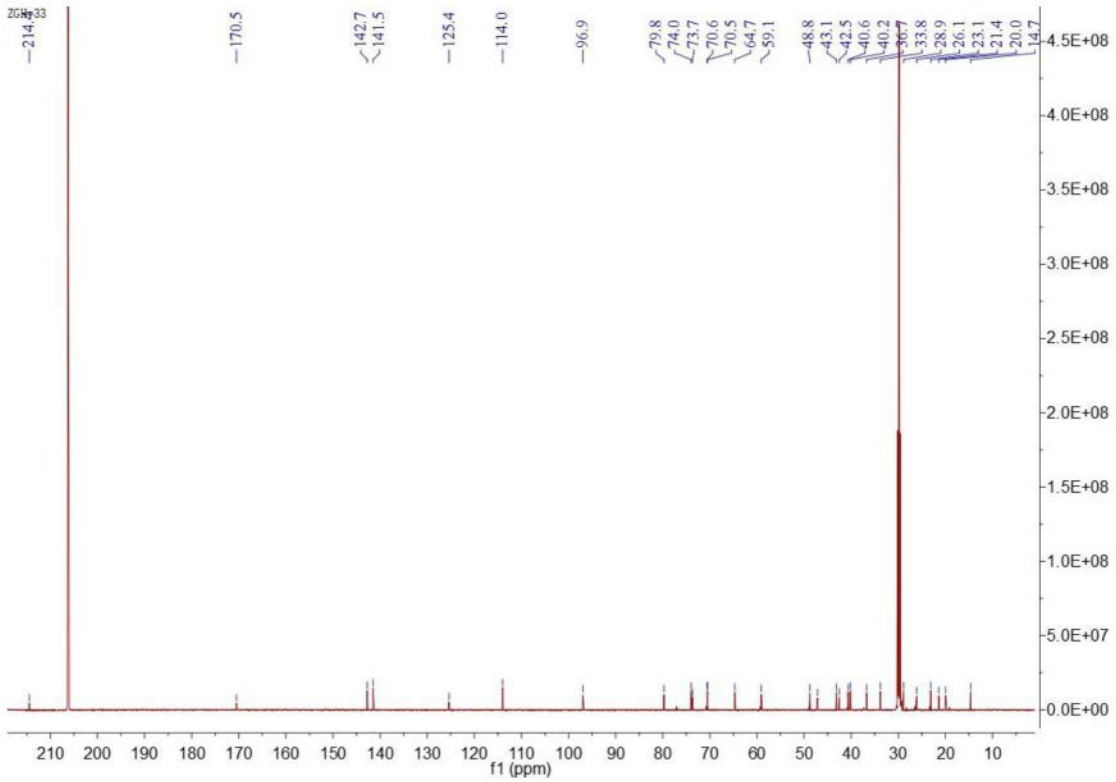


图22

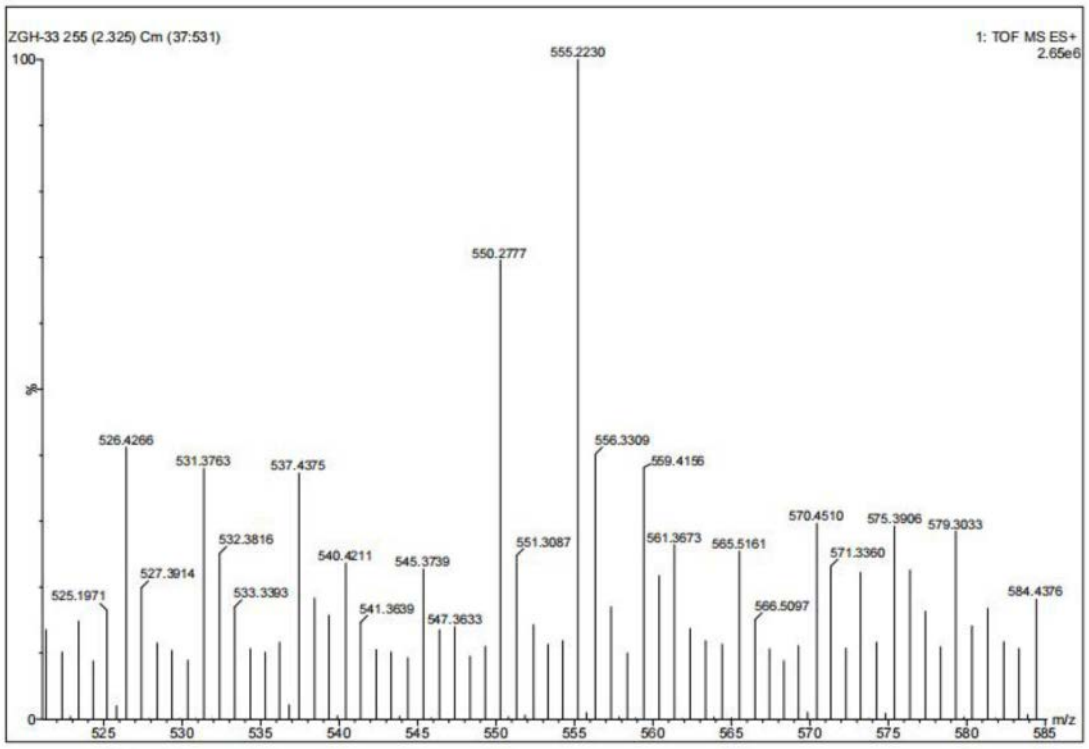

ZGH-33 255 (2.325) Cm (37:531)
1: TOF MS ES+
2.65e6
100
%
0
555.2230
550.2777
526.4266
531.3763
537.4375
556.3309
559.4156
532.3816
540.4211
545.3739
551.3087
561.3673
565.5161
570.4510
575.3906
579.3033
527.3914
571.3360
525.1971
533.3393
541.3639
547.3633
566.5097
584.4376
m/z
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585

图23

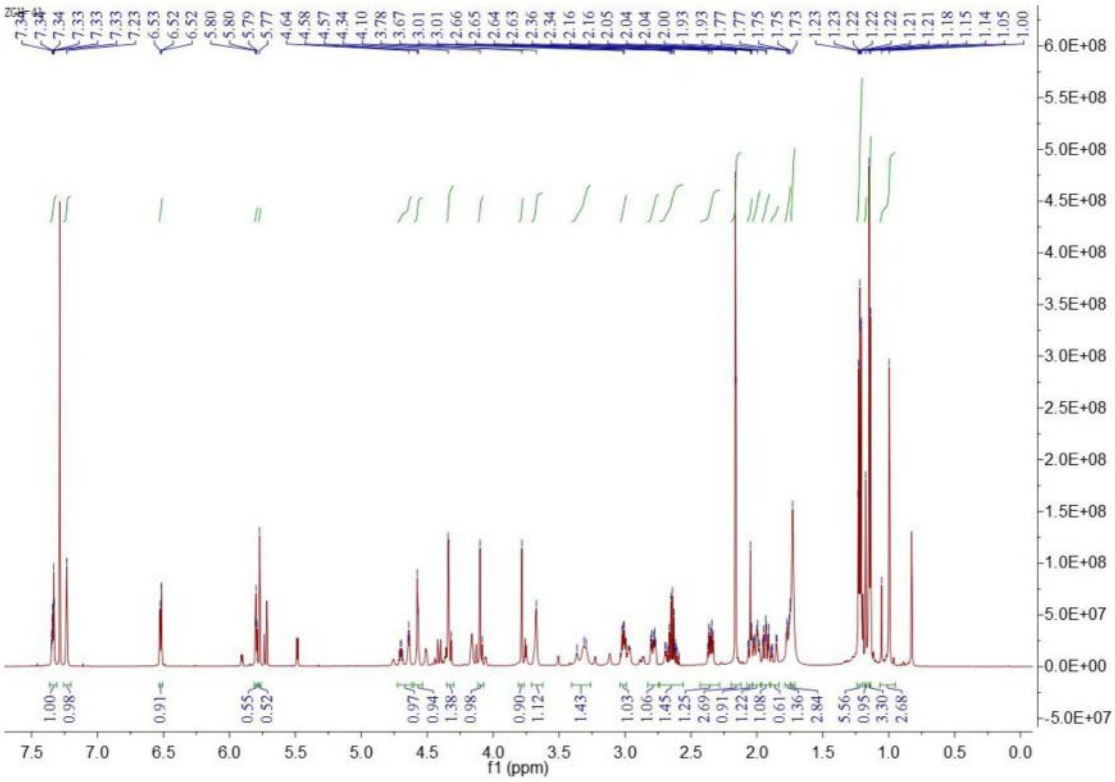

6.0E+08
5.5E+08
5.0E+08
4.5E+08
4.0E+08
3.5E+08
3.0E+08
2.5E+08
2.0E+08
1.5E+08
1.0E+08
5.0E+07
0.0E+00
-5.0E+07
1.00
0.98
0.91
0.55
0.52
0.97
0.94
1.38
0.98
0.90
1.12
1.43
1.03
1.06
1.45
1.25
2.69
0.91
1.22
1.08
0.61
1.36
2.84
5.56
0.95
3.30
2.68
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
f1 (ppm)

图24

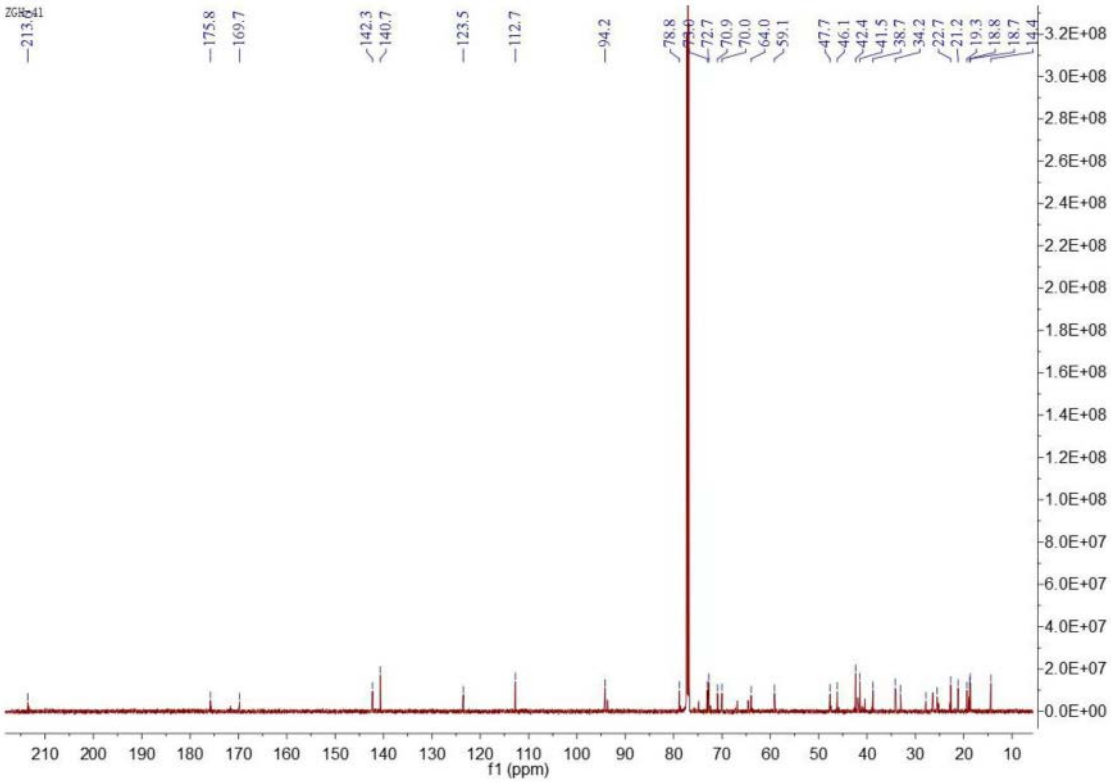

ZGH-41
213.6
175.8
169.7
142.3
140.7
123.5
112.7
94.2
78.8
73.0
72.7
70.9
70.0
64.0
59.1
47.7
46.1
42.4
41.5
38.7
34.2
22.7
21.2
19.3
18.8
18.7
14.4
3.2E+08
3.0E+08
2.8E+08
2.6E+08
2.4E+08
2.2E+08
2.0E+08
1.8E+08
1.6E+08
1.4E+08
1.2E+08
1.0E+08
8.0E+07
6.0E+07
4.0E+07
2.0E+07
0.0E+00
210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10
f1 (ppm)

图25

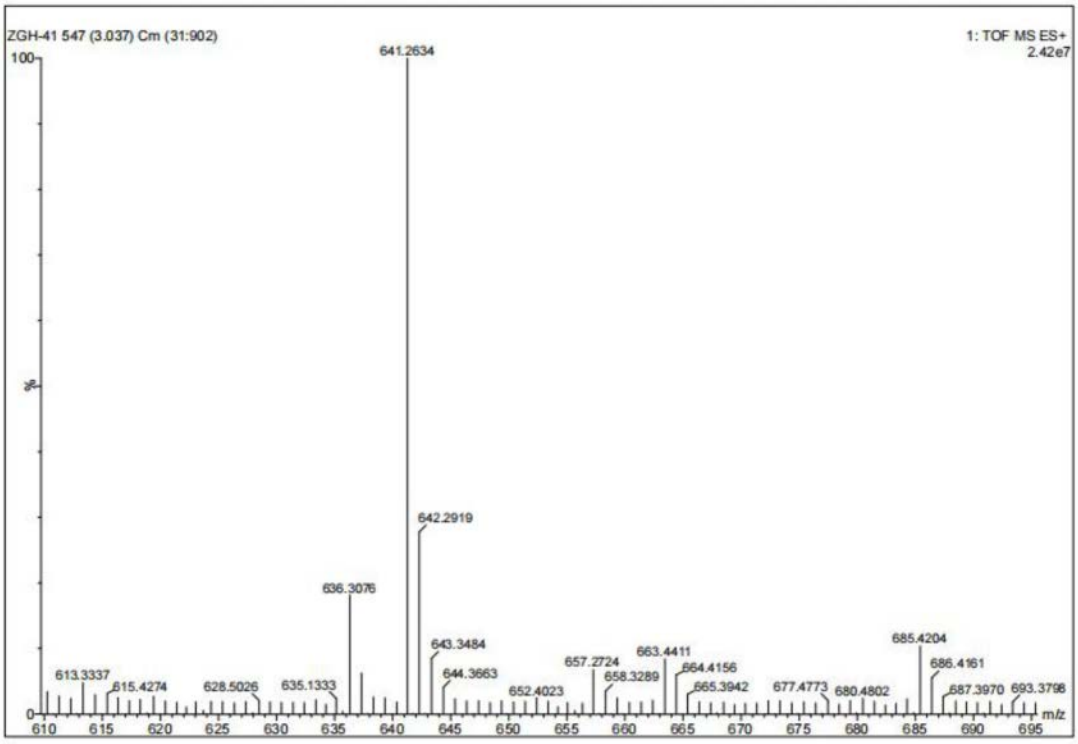

ZGH-41 547 (3.037) Cm (31:902)
1: TOF MS ES+
2.42e7
100
%
0
641.2634
642.2919
636.3076
643.3484
644.3663
613.3337
615.4274
628.5026
635.1333
652.4023
657.2724
658.3289
663.4411
664.4156
665.3942
677.4773
680.4802
685.4204
686.4161
687.3970
693.3798
610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695
m/z

图26

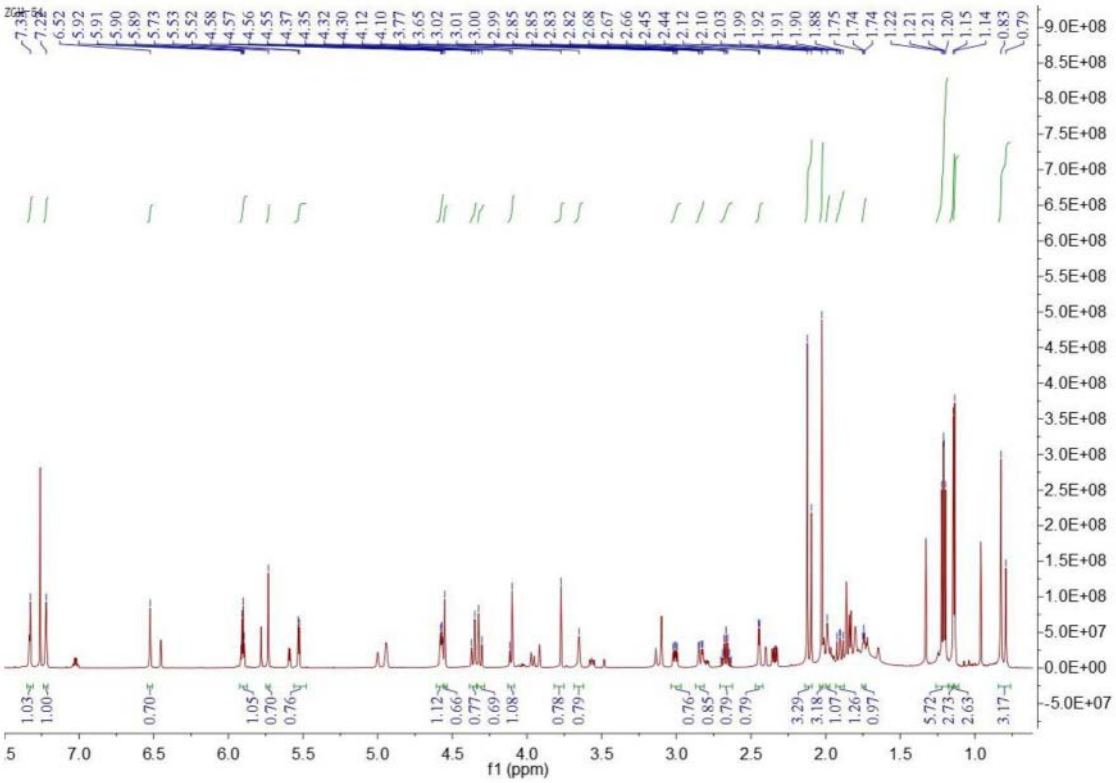


图27

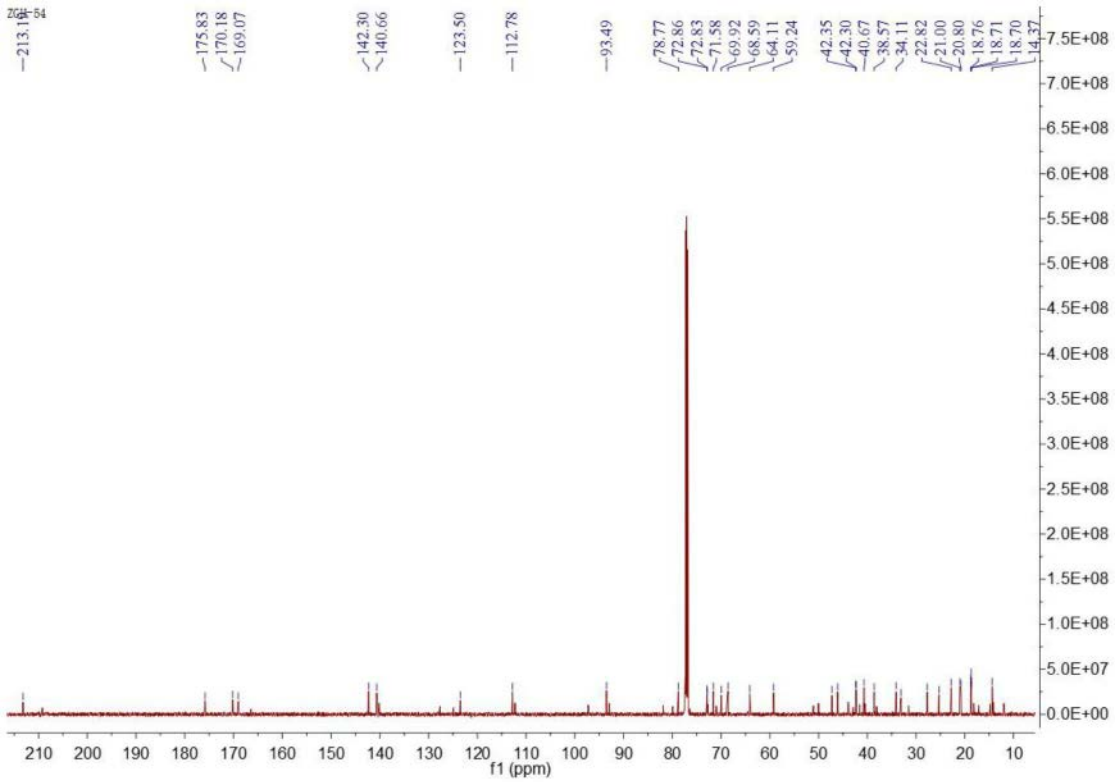


图28

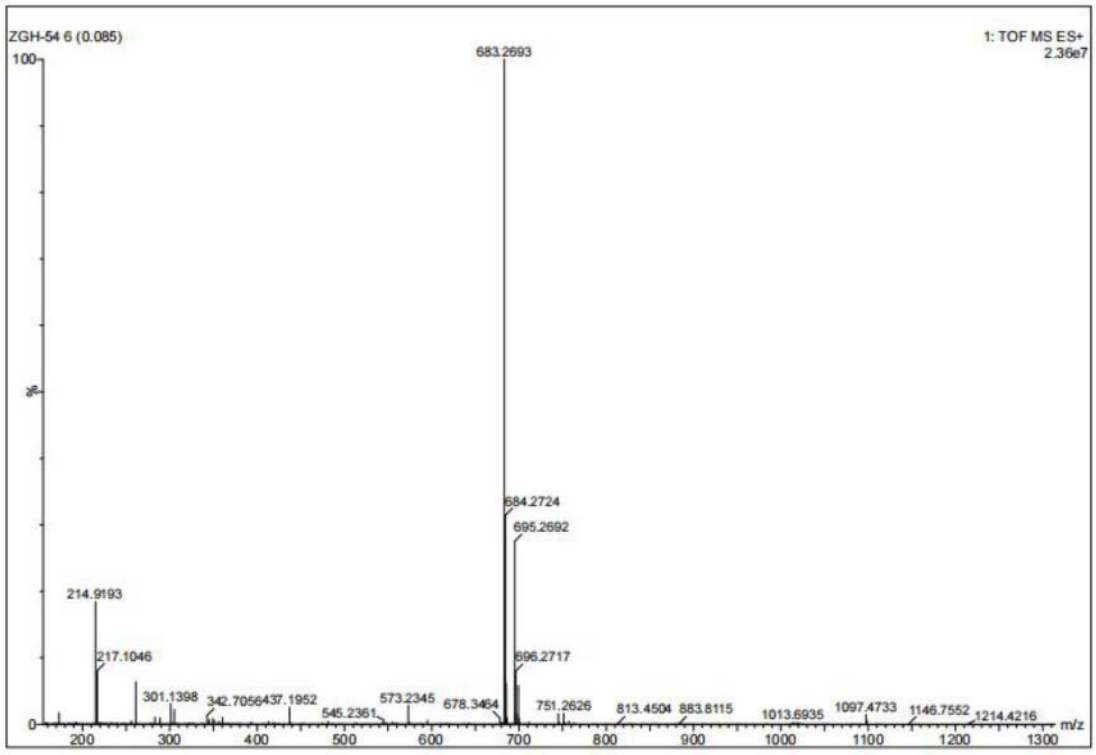

ZGH-54 6 (0.085)
1: TOF MS ES+
2.36e7
100
%
0
683.2693
684.2724
695.2692
214.9193
217.1046
696.2717
301.1398
342.7056
437.1952
545.2361
573.2345
678.3464
751.2626
813.4504
883.8115
1013.6935
1097.4733
1146.7552
1214.4216
m/z
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
1200
1300

图29

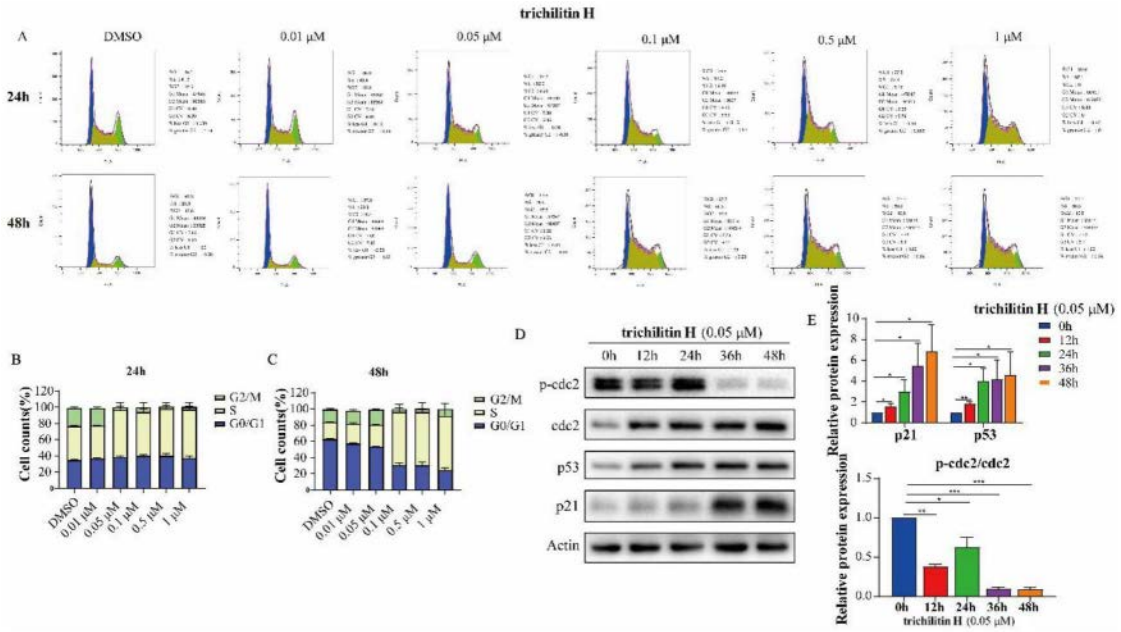

trichilitin H
A
DMSO
0.01 μM
0.05 μM
0.1 μM
0.5 μM
1 μM
24h
48h
B
24h
C
48h
Cell counts(%)
G2/M
S
G0/G1
D
trichilitin H (0.05 μM)
0h
12h
24h
36h
48h
p-cdc2
cdc2
p53
p21
Actin
E
trichilitin H (0.05 μM)
Relative protein expression
p21
p53
p-cdc2/cdc2

图30

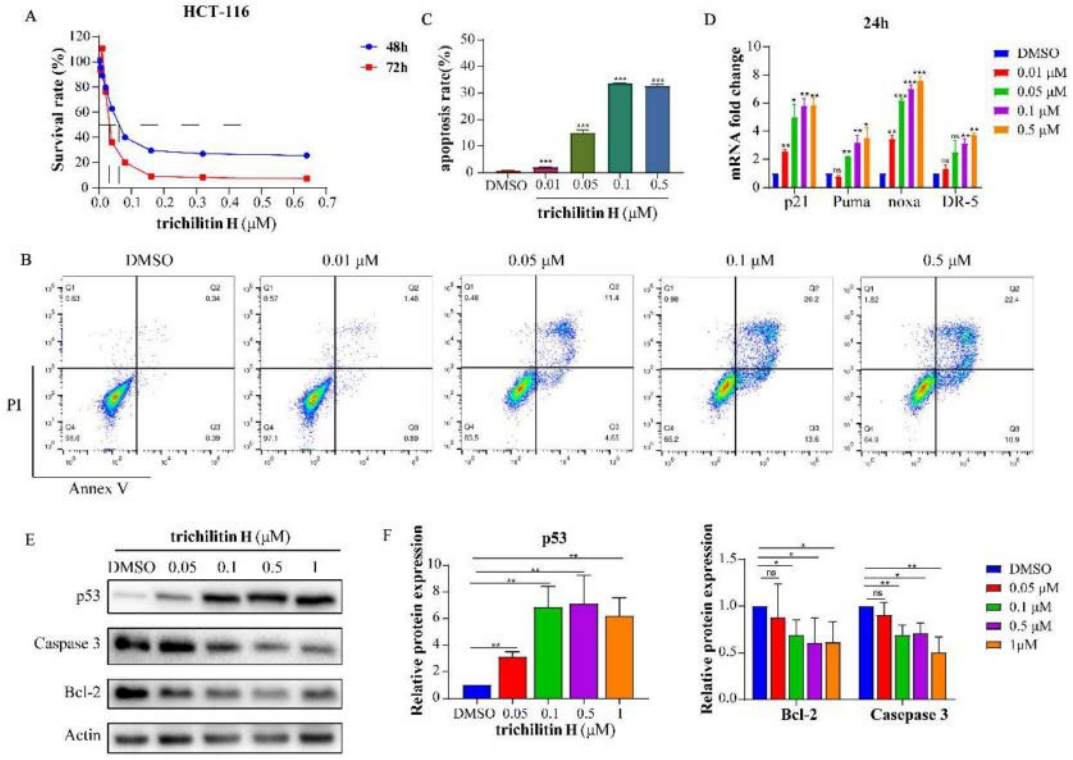

A
HCT-116
Survival rate (%)
48h
72h
trichilitin H (μM)
C
apoptosis rate(%)
DMSO 0.01 0.05 0.1 0.5
trichilitin H (μM)
D
24h
mRNA fold change
DMSO
0.01 μM
0.05 μM
0.1 μM
0.5 μM
p21 Puma noxa DR-5
B
DMSO
0.01 μM
0.05 μM
0.1 μM
0.5 μM
PI
Annex V
E
trichilitin H (μM)
DMSO 0.05 0.1 0.5 1
p53
Caspase 3
Bcl-2
Actin
F
p53
Relative protein expression
DMSO 0.05 0.1 0.5 1
trichilitin H (μM)
Relative protein expression
DMSO
0.05 μM
0.1 μM
0.5 μM
1μM
Bcl-2
Casepase 3

图31