

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103006670 A

(43) 申请公布日 2013.04.03

(21) 申请号 201210376689.9

(22) 申请日 2012.09.29

(71) 申请人 暨南大学

地址 510632 广东省广州市黄埔大道西 601  
号

(72) 发明人 江仁望 余通 田海妍 李娟  
叶文才

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有  
限公司 44245

代理人 裴晖 陈燕娴

(51) Int. Cl.

A61K 31/585(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C07J 19/00(2006.01)

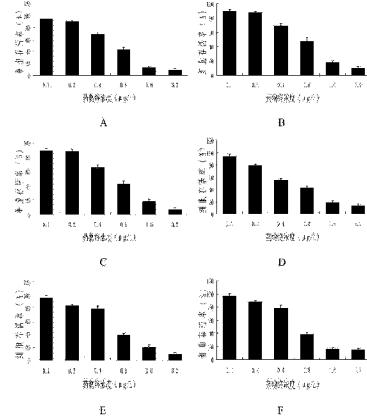
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 4 页

(54) 发明名称

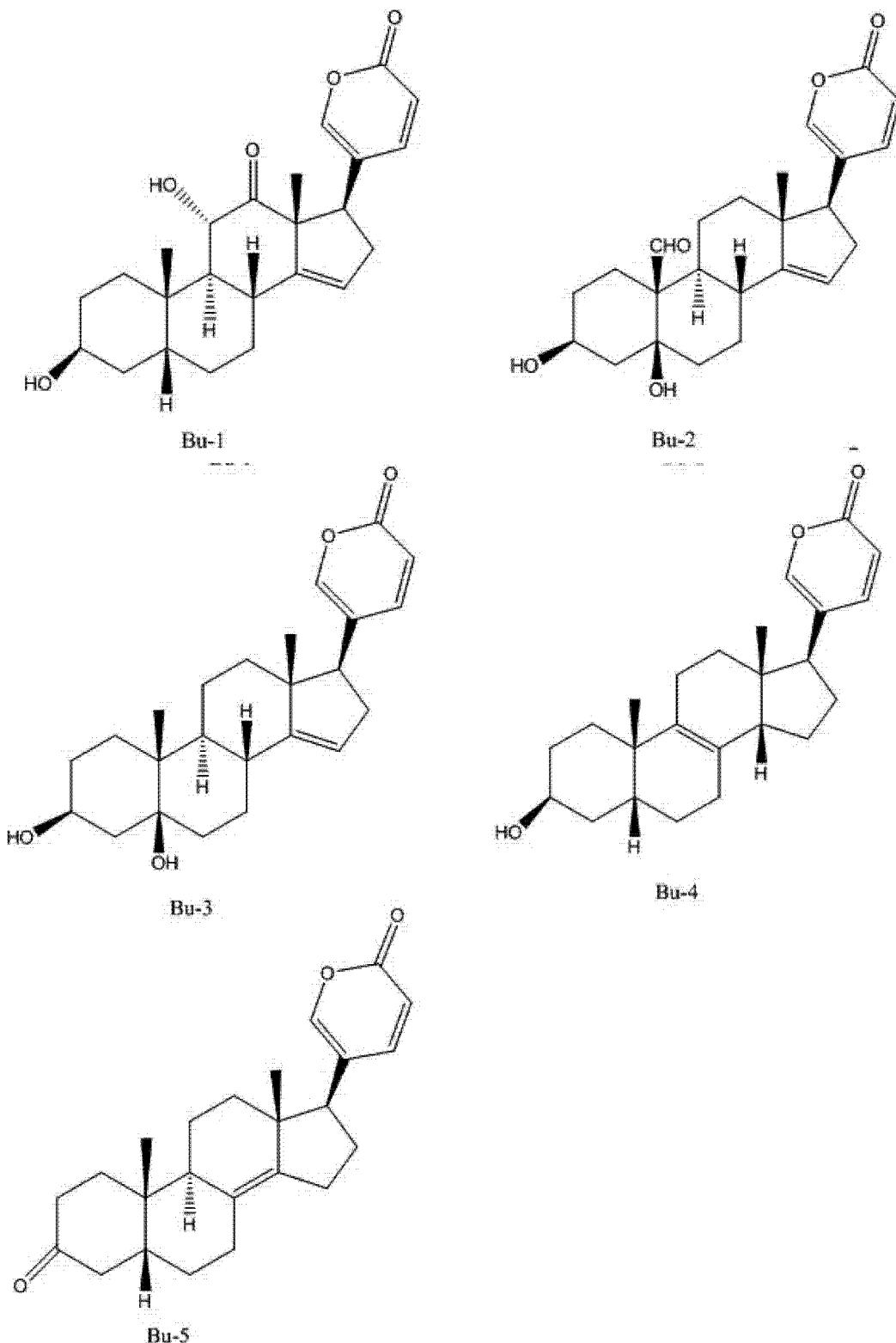
一种总不饱和蟾蜍内酯及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了一种总不饱和蟾蜍内酯及其制备方法和用途，该总不饱和蟾蜍内酯的制备方法包括以下步骤：(1) 将蟾酥粉碎，用乙醇溶液超声提取3-4次，过滤除渣，得到蟾酥提取液；(2) 将蟾酥提取液减压浓缩为浆状物，为蟾酥总提物；(3) 将蟾酥总提物用水混悬，二氯甲烷萃取，减压蒸除二氯甲烷后得到二氯甲烷部位；(4) 将二氯甲烷部位用溶剂A溶解，调节溶液的pH值为1-6；然后在0-100℃下搅拌反应1-8h，当检测到溶液中含有Bu-1、Bu-2、Bu-3、Bu-4、Bu-5中的至少两种化合物时，加水终止反应，用溶剂B萃取，减压蒸除溶剂B后得到总不饱和蟾蜍内酯。本发明的总不饱和蟾蜍内酯具有抑制雄性激素依赖型及非雄性激素依赖型前列腺癌细胞增殖的活性，可用于制备预防和治疗前列腺癌的药物。



1. 一种总不饱和蟾蜍内酯,其特征在于:含有化合物 Bu-1、Bu-2、Bu-3、Bu-4、Bu-5 中的至少两种;化合物 Bu-1、Bu-2、Bu-3、Bu-4、Bu-5 的结构式如下所示:



2. 根据权利要求 1 所述的总不饱和蟾蜍内酯,其特征在于:所述的总不饱和蟾蜍内酯含有化合物 Bu-1、Bu-2、Bu-3、Bu-4 和 Bu-5。

3. 权利要求 1 或 2 所述的总不饱和蟾蜍内酯的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 将蟾酥粉碎,用乙醇溶液超声提取 3-4 次,过滤除渣,得到蟾酥提取液;

- (2) 将蟾酥提取液减压浓缩为浆状物, 为蟾酥总提物 ;
- (3) 将蟾酥总提物用水混悬, 二氯甲烷萃取, 减压蒸除二氯甲烷后得到二氯甲烷部位 ;
- (4) 将二氯甲烷部位用溶剂 A 溶解, 调节溶液的 pH 值为 1-6 ; 然后在 0-100℃ 下搅拌反应 1-8h, 当检测到溶液中含有 Bu-1、Bu-2、Bu-3、Bu-4、Bu-5 中的至少两种化合物时, 加水终止反应, 用溶剂 B 萃取, 减压蒸除溶剂 B 后得到总不饱和蟾蜍内酯。
4. 根据权利要求 3 所述的总不饱和蟾蜍内酯的制备方法, 其特征在于 : 步骤(1)所述的乙醇溶液为乙醇体积分数为 95% 的乙醇溶液。
5. 根据权利要求 3 所述的总不饱和蟾蜍内酯的制备方法, 其特征在于 : 步骤(4)所述的溶剂 A 为二氯甲烷。
6. 根据权利要求 3 所述的总不饱和蟾蜍内酯的制备方法, 其特征在于 : 步骤(4)所述的搅拌反应为反应 4h。
7. 根据权利要求 3 所述的总不饱和蟾蜍内酯的制备方法, 其特征在于 : 步骤(4)所述的加水终止反应, 是当检测到溶液中含有 Bu-1、Bu-2、Bu-3、Bu-4 和 Bu-5 时, 加水终止反应。
8. 根据权利要求 3 所述的总不饱和蟾蜍内酯的制备方法, 其特征在于 : 步骤(4)所述的溶剂 B 为乙酸乙酯。
9. 权利要求 1 或 2 所述的总不饱和蟾蜍内酯在制备预防和治疗前列腺癌的药物中的应用。
10. 根据权利要求 9 所述的总不饱和蟾蜍内酯在制备预防和治疗前列腺癌的药物中的应用, 其特征在于 : 所述预防和治疗前列腺癌的药物的剂型为片剂、注射剂、栓剂、气雾剂或纳米制剂。

## 一种总不饱和蟾蜍内酯及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于天然药物化学领域,特别涉及一种总不饱和蟾蜍内酯及其制备方法,以及该总不饱和蟾蜍内酯在制备预防和治疗前列腺癌药物中的应用;本发明的总不饱和蟾蜍内酯是以蟾蜍内酯为原料经修饰后得到的。

### 背景技术

[0002] 前列腺癌是男性多发癌症之一,其发病率与人种、年龄及生活方式有关。在上世纪八十年代以前,我国的发病率明显低于西方国家。分析其原因主要有两个:1)中国传统饮食中脂肪比例少,而蔬菜和豆制品比例多,因而中国人饮食中含有大量植物雌激素类成分,这类成分可抑制前列腺癌细胞生长;2)中国男性前列腺受体基因中 CAG 多肽重复序列相对较长。

[0003] 但是,近三十年来,我国老百姓的生活水平明显提高,饮食中脂肪比例显著上升,前列腺癌发病率有逐年上升的趋势。流行病学数据显示,中国前列腺癌发病率从 1993 年的 1.71 人 /10 万男性人口增加到 2005 年的 7.9 人 /10 万男性人口。随着我国社会老龄化现象日趋严重,未来 10 年,我国前列腺癌的发病可能会进入高峰期。因此,寻找高效低毒的预防和治疗前列腺癌的药物显得十分迫切。

[0004] 中药蟾酥为来源于中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans* Cantor)或黑眶蟾蜍(*Bufo melanostictus* Schneider)的干燥分泌物,辛、温、有毒,具有解毒、止痛、开窍醒神的功效,用于痈疽疔疮,咽喉肿痛等症(国家药典编委会. 中华人民共和国药典(一部). 北京:化学工业出版社. 2005 :265.)。

[0005] 含蟾酥的中成药较多,六神丸、六应丸、喉症丸、蟾酥丸等。现代研究表明,蟾蜍内酯类化合物为蟾蜍的主要活性成分,具有很强的强心、抗肿瘤等药理作用(Yoshiaki Kamano, Ayano Kotake, Hirofumi Hashima. Structures-cytotoxic activity relationship for the toad poison bufadienolides[J]. Bioorg. Med. Chem, 2002, 45:5440-5447)。其作用机制主要表现为抑制肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡、诱导恶性肿瘤细胞分化等多方面(夏俊,江敏,姜彦峰. 蟾酥及其有效成分体外抗肿瘤作用研究进展,现代肿瘤医学. 2008, 16:1441-1444.)。但这类化合物具有与地高辛极为类似的甾体骨架,能引起显著的心脏毒性(Roger, J. B. ; Brian, J. P. ; Roxanne, R S. ; Amitava, D. Effects of Chan Su, a traditional Chinese medicine. Life sciences. 2002, 72 (6), 699-709.)。此外该类化合物是  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 的专属性抑制剂,能引起心律失常、传导阻滞、心功能障碍等(Ma, H. Y. ; Zhang, J. F; Jiang, J. J; Zhou, J. ; Xu, H. Q; Zhan, Z. ; Wu, Q. N. ; Duan, J. A. Cardiovascular toxicology. 2012, 12, 83-89)。由于其毒性较大,安全窗口小,常由于误服或过量服用而中毒[韩静田,陈小艺,徐瑞成. 蟾毒灵的药理活性研究进展[J]. 中药药物与临床,2002, 2 (2) :120-122.],甚至引起死亡[Ko, R. , Greenwald, M. , Loscutoff, S. , Au, A. M. ; Appel, B. R. ; Kreutzer, R. A. ; Haddon, W. F. ; Jackson, T. Y. ; Boo, F. O. ; Presicek, G. Western Journal

of Medicine. 1996, 164:71 - 75]。因此,对于中药蟾酥中蟾蜍内酯类化学成分进行转化以获得高效低毒的抗肿瘤药物具有重要意义。

## 发明内容

[0006] 本发明的首要目的在于提供一种毒性较小的,同时具有抗肿瘤作用的总不饱和蟾蜍内酯。

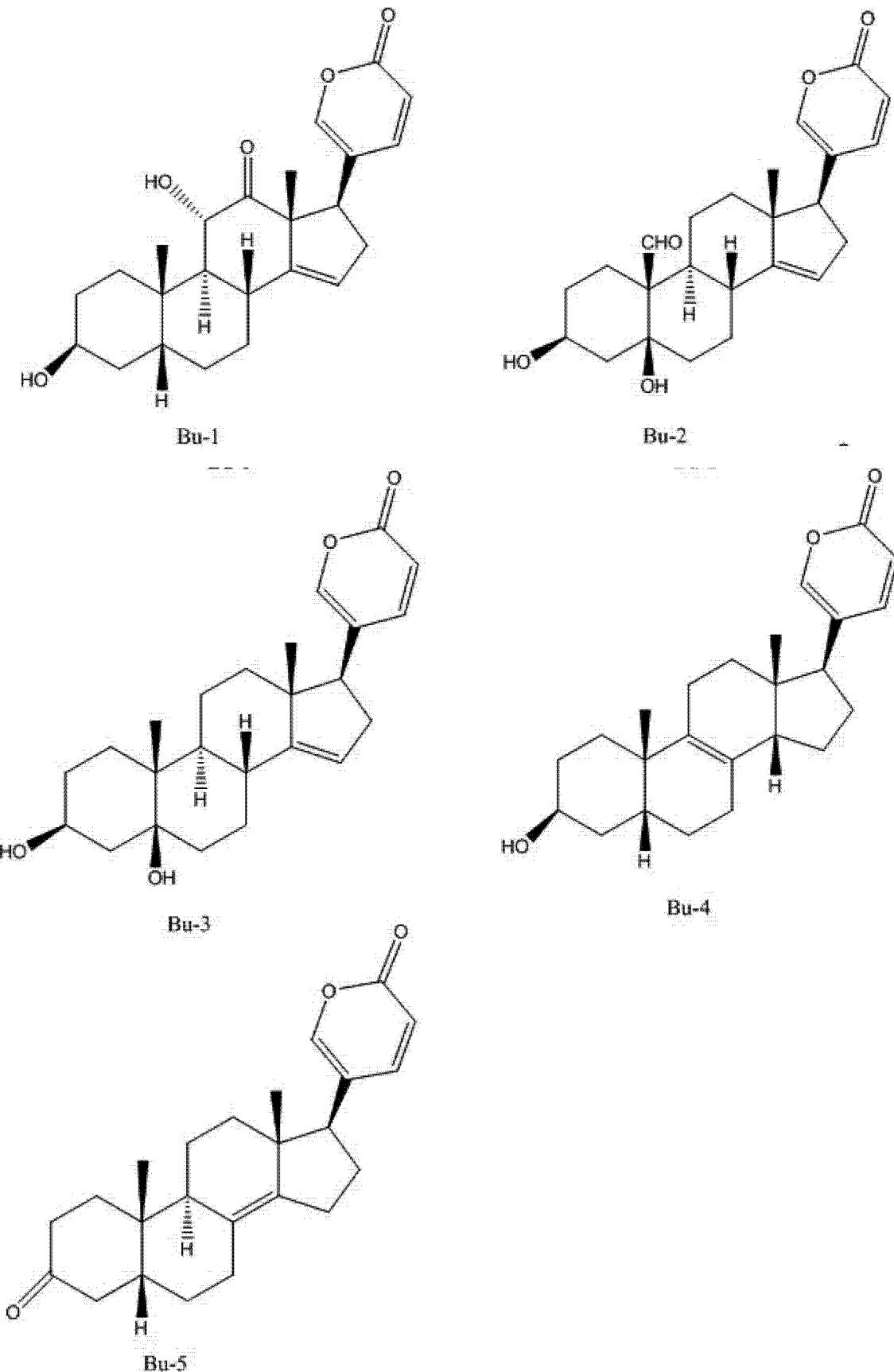
[0007] 本发明的另一目的在于提供上述的总不饱和蟾蜍内酯的制备方法,即以蟾酥中的总蟾蜍内酯为原料经化学转化后得到本发明的总不饱和蟾蜍内酯。

[0008] 本发明的再一目的在于提供上述的总不饱和蟾蜍内酯在制备预防和治疗前列腺癌药物中的应用。

[0009] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0010] 一种总不饱和蟾蜍内酯,含有化合物 Bu-1、Bu-2、Bu-3、Bu-4、Bu-5 中的至少两种;化合物 Bu-1、Bu-2、Bu-3、Bu-4、Bu-5 的结构式如下所示:

[0011]



[0012] 优选地，所述的总不饱和蟾蜍内酯含有化合物 Bu-1、Bu-2、Bu-3、Bu-4 和 Bu-5。

[0013] 上述的总不饱和蟾蜍内酯的制备方法，包括以下步骤：

[0014] (1) 将蟾酥粉碎，用乙醇溶液超声提取 3-4 次，过滤除渣，得到蟾酥提取液；

- [0015] (2) 将蟾酥提取液减压浓缩为浆状物, 为蟾酥总提物;
- [0016] (3) 将蟾酥总提物用水混悬, 二氯甲烷萃取, 减压蒸除二氯甲烷后得到二氯甲烷部位;
- [0017] (4) 将二氯甲烷部位用溶剂A溶解, 调节溶液的pH值为1-6; 然后在0-100℃下搅拌反应1-8h, 当检测到溶液中含有Bu-1、Bu-2、Bu-3、Bu-4、Bu-5中的至少两种化合物时, 加水终止反应(水能使有机相与水相分层, 达到隔绝反应物的目的, 从而终止反应), 用溶剂B萃取, 减压蒸除溶剂B后得到总不饱和蟾蜍内酯;
- [0018] 步骤(1)所述的乙醇溶液, 优选乙醇体积分数为95%的乙醇溶液;
- [0019] 步骤(1)所述的超声提取, 每次超声1h;
- [0020] 步骤(4)所述的溶剂A优选二氯甲烷;
- [0021] 步骤(4)所述调节溶液的pH值, 优选加入醋酸或盐酸, 特别优选加入质量浓度为36%的盐酸;
- [0022] 步骤(4)所述的搅拌反应优选反应4h;
- [0023] 步骤(4)所述的加水终止反应, 优选当检测到溶液中含有Bu-1、Bu-2、Bu-3、Bu-4和Bu-5时, 加水终止反应;
- [0024] 步骤(4)所述的溶剂B优选乙酸乙酯。
- [0025] 上述的总不饱和蟾蜍内酯具有抑制雄性激素依赖型及非雄性激素依赖型前列腺癌细胞增殖的活性, 可用于制备预防和治疗前列腺癌的药物;
- [0026] 所述预防和治疗前列腺癌的药物的剂型可以为片剂、注射剂、栓剂、气雾剂或纳米制剂。
- [0027] 本发明的主要原理是: 在酸性条件下, 蟾蜍内酯类化合物母核上的不同基团会上消除反应, 从而生成不饱和双键, 转化成不饱和蟾蜍内酯。
- [0028] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:
- [0029] (1) 本发明方法的原料丰富。蟾酥(Venenum Bufonis)是我国一种传统中药, 易于得到。
- [0030] (2) 与常规的修饰方法相比, 本发明通过组合修饰来获得总不饱和蟾蜍内酯, 制备方法简单, 成本较低。
- [0031] (3) 本发明获得的总不饱和蟾蜍内酯具有良好的抗前列腺癌活性。
- [0032] (4) 相对于天然的蟾蜍内酯, 本发明获得的总不饱和蟾蜍内酯对正常细胞的毒性比天然的总蟾蜍内酯低50倍, 而对Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase的毒性比天然的总蟾蜍内酯低100倍。

## 附图说明

- [0033] 图1是实施例1得到的总不饱和蟾蜍内酯的Lc-ms色谱图; 其中, 右图是质谱信号, 左图是液相信号, 化合物Bu-1、Bu-2、Bu-3、Bu-4、Bu-5为指标成分。
- [0034] 图2是化合物Bu-1的单晶X-射线衍射结构图。
- [0035] 图3是化合物Bu-2的单晶X-射线衍射结构图。
- [0036] 图4是化合物Bu-4的单晶X-射线衍射结构图。
- [0037] 图5是化合物Bu-5的单晶X-射线衍射结构图。
- [0038] 图6是实施例1-3制备的总不饱和蟾蜍内酯抑制雄性激素依赖型前列腺癌细胞

LNCaP 以及 PC3 增殖的活性图,其中:

[0039] A 为实施例 1 制备的总不饱和蟾蜍内酯抑制雄性激素依赖型前列腺癌细胞 LNCaP 增殖的活性图;

[0040] B 为实施例 1 制备的总不饱和蟾蜍内酯抑制非雄性激素依赖型前列腺癌细胞 PC3 增殖的活性图;

[0041] C 为实施例 2 制备的总不饱和蟾蜍内酯抑制雄性激素依赖型前列腺癌细胞 LNCaP 增殖的活性图;

[0042] D 为实施例 2 制备的总不饱和蟾蜍内酯抑制非雄性激素依赖型前列腺癌细胞 PC3 增殖的活性图;

[0043] E 为实施例 3 制备的总不饱和蟾蜍内酯抑制雄性激素依赖型前列腺癌细胞 LNCaP 增殖的活性图;

[0044] F 为实施例 3 制备的总不饱和蟾蜍内酯抑制非雄性激素依赖型前列腺癌细胞 PC3 增殖的活性图。

## 具体实施方式

[0045] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0046] 实施例 1

[0047] (1) 总不饱和蟾蜍内酯的制备,包括以下步骤:

[0048] A、用搅拌器将干燥的 20g 蟾酥(市售)粉碎,过 100 目筛,用体积百分比为 95% 的乙醇(无水乙醇)于室温通过 KQ 250DE 型超声波机提取 3 次,每次使用乙醇 100ml,每次时间为 1 小时,合并三次提取液,用滤纸过滤除渣,得到蟾酥提取液。

[0049] B、接着用 N-1100V-W 型旋转蒸发仪进行减压浓缩蟾酥提取液,形成浆状物,得到蟾酥总提物。

[0050] C、用超纯水将蟾酥总提物混悬,用 250ml 二氯甲烷萃取,减压蒸除二氯甲烷后得到二氯甲烷部位 12.2g,此部位为总蟾蜍内酯;

[0051] D、将步骤(3)得到的总蟾蜍内酯用 50ml 二氯甲烷溶解,加浓盐酸(36%)调节溶液 pH 值为 1;然后室温搅拌,反应 1h,加水终止反应,用乙酸乙酯萃取,最后用旋转蒸发仪减压蒸除乙酸乙酯至恒重,得到总衍生化产物(9.4g),即为总不饱和蟾蜍内酯。

[0052] (2) 对步骤(1)得到的总不饱和蟾蜍内酯进行分析

[0053] 将步骤(1)得到的总不饱和蟾蜍内酯溶于甲醇,配成 50mg/ml 的溶液,用 HPLC 进行反相制备,具体制备条件是:C18 反相半制备柱 (5 μ m, 9.4×250mm),紫外检测波长为 296nm,流速为 3ml/min,梯度系统为:A: 水, B: 乙腈;0~53min, 15% (v/v) → 70% (v/v) 的乙腈溶液;53~60min: 70% (v/v) → 100% (v/v) 的乙腈;分别于 25.5min, 26.5min, 28.6min, 40.5min, 45.5min 处收集色谱峰(见图 1)。用旋转蒸发仪对收集液进行减压浓缩(N-1100V-W 型),分别得到化合物 Bu-1, Bu-2, Bu-3, Bu-4, Bu-5。

[0054] 化合物 Bu1~5 可根据波谱数据进行鉴定。

[0055] 化合物 Bu1 为白色结晶,紫外最大吸收波长为 296nm,分子式为  $C_{24}H_{30}O_5$ ,质谱 ESI-MS  $m/z$  399 [M+H $^+$ ]。

[0056] 化合物 Bu2 为白色针晶, 紫外最大吸收波长为 296nm, 分子式为  $C_{24}H_{30}O_5$ , 质谱 ESI-MS m/z 399 [M+H<sup>+</sup>]。

[0057] 化合物 Bu3 为白色粉末, 紫外最大吸收波长为 296nm, 分子式为  $C_{24}H_{32}O_4$ , 质谱 ESI-MS m/z 385 [M+H<sup>+</sup>]。

[0058] 化合物 Bu4 为白色针晶, 紫外最大吸收波长为 296nm, 分子式为  $C_{24}H_{32}O_3$ , 质谱 ESI-MS m/z 369 [M+H<sup>+</sup>]。

[0059] 化合物 Bu5 为白色针晶, 紫外最大吸收波长为 296nm, 分子式为  $C_{24}H_{30}O_3$ , 质谱 ESI-MS m/z 367 [M+H<sup>+</sup>]。

[0060] 化合物 Bu1-5 的单晶 X- 射线衍射结构图如图 2-5 所示, 结构如发明内容中所示, 波谱数据如下:

[0061] Bu-1 的波谱数据:

[0062]  $^1H$ -NMR (300MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) δ 7.69 (1H, d, J=0.9, H-21), 7.77 (1H, dd, J=0.9, 9.5, H-22), 6.27 (1H, d, J=9.5, H-23), 3.97 (1H, s, H-3), 5.48 (1H, d, H-15), 4.48 (1H, d, H-11), 1.73 (1H, m, H-9), 3.64 (1H, m, H-17), 1.82 (1H, m, H-5), 2.52 (1H, m, H-8), 1.82, 1.30 (2H, m, H-4), 2.16, 1.28 (2H, m, H-16), 2.42, 1.47 (2H, m, H-1), 1.63, 1.40 (2H, m, H-2), 1.99, 1.24 (2H, m, H-6), 1.75, 1.58 (2H, m, H-7), 1.19 (3H, s, H-19), 1.08 (3H, s, H-18) ppm。

[0063]  $^{13}C$ -NMR (75MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) δ 215.43, 161.90, 151.73, 151.16, 147.57, 121.22, 118.69, 115.61, 75.09, 66.35, 62.27, 47.01, 44.27, 38.31, 37.75, 34.45, 33.75, 33.58, 32.47, 29.25, 26.94, 24.40, 23.53, 20.19 ppm。ESI-MS m/z 399 [M+H]<sup>+</sup>。

[0064] Bu-2 的波谱数据:

[0065]  $^1H$ -NMR (300MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) δ 7.50 (1H, d, J=0.9, H-21), 7.54 (1H, dd, J=0.9, 9.5, H-22), 6.26 (1H, d, J=9.5, H-23), 4.17 (1H, s, H-3), 6.24 (1H, d, H-15), 2.77 (1H, m, H-17), 2.33, 1.60 (2H, m, H-8), 2.36, 2.10 (2H, m, H-4), 2.60, 1.25 (2H, m, H-6), 2.57, 2.10 (2H, m, H-7), 2.10, 1.58 (2H, m, H-11), 2.46, 1.72 (2H, m, H-12), 1.71, 1.23 (2H, m, H-16), 2.19, 1.45 (2H, m, H-1), 0.65 (3H, s, H-18), 1.08 (1H, s, H-19) ppm。

[0066]  $^{13}C$ -NMR (75MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) δ 208.40, 162.14, 150.36, 146.46, 141.34, 126.66, 118.67, 115.62, 74.87, 67.21, 57.59, 52.22, 44.09, 38.44, 37.85, 36.90, 35.98, 27.46, 27.42, 26.32, 25.48, 21.49, 18.53, 17.37 ppm。ESI-MS m/z 399 [M+H]<sup>+</sup>。

[0067] Bu-3 的波谱数据:

[0068]  $^1H$ -NMR (300MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) δ 7.25 (1H, d, J=0.9, H-21), 7.29 (1H, dd, J=0.9, 9.5, H-22), 6.26 (1H, d, J=9.5, H-23), 4.12 (1H, s, H-3), 5.21 (1H, d, H-15), 2.67 (1H, m, H-17), 2.02 (2H, m, H-9), 1.26 (2H, m, H-8), 1.79, 1.37 (2H, m, H-1), 1.54 (2H, m, H-2), 2.12, 1.53 (2H, m, H-4), 1.73, 1.41 (2H, m, H-6), 1.78, 1.54 (2H, m, H-7), 2.35 (2H, m, H-16), 1.59, 1.27 (2H, m, H-11), 1.79, 1.26 (2H, m, H-12), 0.67 (3H, s, H-18), 0.90 (1H, s, H-19) ppm。

[0069]  $^{13}C$ -NMR (75MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) δ 162.04, 153.78, 148.44, 145.24, 118.73, 117.02, 115.64, 74.87, 68.13, 52.63, 48.19, 43.05, 40.89, 40.66, 36.81, 35.04, 34.33, 33.52, 27.96, 26.24, 24.82, 22.09, 18.86, 16.53 ppm。ESI-MS m/z 385 [M+H]<sup>+</sup>。

[0070] Bu-4 的波谱数据：

[0071]  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz, CD<sub>3</sub>C1)  $\delta$  7.23 (1H, d, J=0.9, H-21), 7.27 (1H, dd, J=0.9, 9.5, H-22), 6.28 (1H, d, J=9.5, H-23), 3.96 (1H, s, H-3), 1.90 (1H, m, H-14), 2.46 (1H, m, H-17), 1.71 (1H, m, H-5), 1.59, 1.33 (2H, m, H-4), 1.46, 1.29 (2H, m, H-12), 2.19, 1.25 (2H, m, H-2), 1.47, 1.24 (2H, m, H-6), 1.55, 1.23 (2H, m, H-1), 1.88, 1.70 (2H, m, H-16), 2.06, 1.69 (2H, m, H-7), 1.82, 1.43 (2H, m, H-15), 1.96, 1.86 (2H, m, H-11), 1.04 (3H, s, H-19), 0.65 (3H, s, H-18) ppm。

[0072]  $^{13}\text{C-NMR}$  (75MHz, CD<sub>3</sub>C1)  $\delta$  162.07, 148.30, 145.34, 131.62, 131.03, 120.04, 115.53, 66.99, 51.40, 47.15, 42.19, 37.37, 36.54, 35.54, 33.72, 31.57, 30.80, 30.20, 28.52, 27.45, 26.51, 24.26, 23.93, 21.07 ppm。ESI-MS m/z 369 [M+H]<sup>+</sup>。

[0073] Bu-5 的波谱数据：

[0074]  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz, CD<sub>3</sub>C1)  $\delta$  7.30 (1H, d, J=0.9, H-21), 7.27 (1H, dd, J=0.9, 9.5, H-22), 6.28 (1H, d, J=9.5, H-23), 1.90 (1H, m, H-9), 2.25 (1H, m, H-17), 1.71 (1H, m, H-5), 1.59, 1.33 (2H, m, H-4), 2.19, 1.25 (2H, m, H-2), 1.47, 1.24 (2H, m, H-6), 1.55, 1.23 (2H, m, H-1), 1.88, 1.70 (2H, m, H-16), 2.06, 1.69 (2H, m, H-7), 1.82, 1.43 (2H, m, H-15), 1.96, 1.86 (2H, m, H-11), 0.86 (3H, s, H-19), 0.70 (3H, s, H-18) ppm。

[0075]  $^{13}\text{C-NMR}$  (75MHz, CD<sub>3</sub>C1)  $\delta$  210.05, 162.07, 148.74, 145.29, 138.54, 129.33, 118.40, 115.43, 66.91, 51.81, 43.37, 36.89, 36.05, 35.73, 35.56, 33.22, 29.36, 28.27, 26.81, 25.79, 25.26, 24.85, 24.10, 19.44, 18.74 ppm。ESI-MS m/z 367 [M+H]<sup>+</sup>。

[0076] (3) 对步骤(1)得到的总不饱和蟾蜍内酯的活性进行检测

[0077] A、采用 MTT 法检测步骤(1)得到的总不饱和蟾蜍内酯对雄性激素敏感型 (LNCaP) 前列腺癌细胞(购自美国模式培养物保藏所 ATCC#CRL-1740) 增殖的抑制作用。

[0078] 取单层培养的 LNCaP 细胞(DMEM 培养液, 含 10% 胎牛血清), 用胰蛋白酶消化, 并接种于 96 孔板上(每孔加入细胞悬浮液 100  $\mu$  l, 含细胞 5000 个)。接种 24 小时后, 加入步骤(1)得到的总不饱和蟾蜍内酯, 使其终浓度为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2  $\mu$  g/ml, 并以相同体积比的 DMSO 作为对照。培养 48 小时后, 每孔加入 20  $\mu$  l MTT 溶液(5mg/ml), 4 小时后离心弃上清液, 加入 DMSO(100  $\mu$  l / 孔), 振荡 15min 左右, 置酶标仪测定 OD 值, 波长为 570nm, 并计算细胞存活率, 同时作图并求得半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。

[0079] 结果如图 6A 所示, 随着总不饱和蟾蜍内酯浓度的升高, 癌细胞 LNCaP 的存活率明显下降。在不同浓度(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2  $\mu$  g/ml) 的总不饱和蟾蜍内酯作用下, LNCaP 细胞的存活率分别为 :94.0%、90.2%、68.5%、42.7%、12.5% 及 9.3%, 计算其 IC<sub>50</sub> 为 0.58±0.23  $\mu$  g/ml。

[0080] B、采用 MTT 法检测步骤(1)得到的总不饱和蟾蜍内酯对男性荷尔蒙非敏感型前列腺癌细胞(PC3) (购自美国模式培养物保藏所 ATCC#CRL-1435) 增殖的抑制作用。

[0081] 取单层培养的 PC3 细胞(RPMI 1640, 含有 10% 胎牛血清), 用胰蛋白酶消化, 并接种于 96 孔板上(每孔加入细胞悬浮液 100  $\mu$  l, 含细胞 3000 个)。接种 24 小时后, 加入步骤(1)得到的总不饱和蟾蜍内酯, 使其终浓度为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2  $\mu$  g/ml, 并以相同体积比的 DMSO 作为对照。培养 48 小时后, 每孔加入 20  $\mu$  l MTT 溶液(5mg/ml), 4 小时后离心

弃上清液,加入 DMSO(100  $\mu$  l / 孔),振荡 15min 左右,置酶标仪测定 OD 值,波长为 570nm,并计算细胞存活率,同时作图并求得半数抑制浓度( $IC_{50}$ )。

[0082] 结果如图 6B 所示,随着总不饱和蟾蜍内酯浓度的升高,癌细胞 PC-3 的存活率明显下降。在不同浓度(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2  $\mu$  g/ml)的总不饱和蟾蜍内酯作用下,PC-3 细胞的存活率分别为:90.3%、87.0%、68.5%、48.7%、18.4% 及 10.3%,计算其  $IC_{50}$  为 0.66±0.18  $\mu$  g/ml。

[0083] C、采用 MTT 法检测步骤(1)得到的总不饱和蟾蜍内酯和总蟾蜍内酯对正常猴肾细胞 Vero(购自美国模式培养物保藏所 ATCC)增殖的抑制作用。

[0084] 取单层培养的 Vero 细胞(RPMI 1640,含有 10%v/v 胎牛血清),用质量体积比 0.25% 的胰蛋白酶溶液消化,并接种于 96 孔板上(每孔加入细胞悬浮液 100  $\mu$  l,细胞数为 5000 个)。接种 24 小时后,加入不同浓度步骤(1)得到的总不饱和蟾蜍内酯,并以相同体积比的 DMSO 作为对照。培养 72 小时后,每孔加入 20  $\mu$  l MTT 溶液(5mg/ml),4 小时后离心弃上清液,加入 DMSO(100  $\mu$  l / 孔),振荡 15min 左右,置酶标仪中测定 570nm 处的 OD 值,并计算细胞存活率,同时作图并用 SPSS 18.0 软件求得半数抑制浓度( $IC_{50}$ )。

[0085] 测定结果是,总蟾蜍内酯的  $IC_{50}$  为 0.15  $\mu$  g/ml,而总不饱和蟾蜍内酯的  $IC_{50}$  为 7.8  $\mu$  g/ml。故总不饱和蟾蜍内酯对正常细胞 Vero 的毒性比天然的总蟾蜍内酯低 52 倍。

[0086] D、测定对  $Na^+, K^+$ -ATPase 的抑制活性。

[0087] 酶抑制活性在 96 孔板中进行。反应液中含有 100mM NaCl,20mM KCl,1mM  $MgCl_2$ ,1mM EGTA,20mM Tris-HCl(pH7.4) and 0.2  $\mu$  g 纯  $Na^+, K^+$ -ATPase (Sigma-aldrich, USA),加入不同浓度的步骤(1)得到的总不饱和蟾蜍内酯之后,混合物于 37℃ 孵育 15min,然后加入 2mM ATP 启动反应。反应 15 分钟后,加入 100  $\mu$  l 8% 的三氯乙酸终止反应,用 BIOMOL GREEN<sup>TM</sup> 显色,并用酶标仪测定在 635nm 处的吸光度。

[0088] 测定结果是,总蟾蜍内酯的  $IC_{50}$  为 0.1  $\mu$  g/ml,而总不饱和蟾蜍内酯的  $IC_{50}$  为 10.2  $\mu$  g/ml。故总不饱和蟾蜍内酯对  $Na^+, K^+$ -ATPase 的毒性比天然的总蟾蜍内酯低 100 倍。

[0089] 通过以上实验可以发现,本发明的总不饱和蟾蜍内酯对激素依赖性 LNCaP 细胞及非激素依赖性 PC3 细胞都有明显的抑制作用,并随着浓度的增加,抑制作用增强。同时,它对  $Na^+, K^+$ -ATPase 的毒性比天然的总蟾蜍内酯低 100 倍,可能是它毒性降低的重要原因之一。

[0090] 实施例 2

[0091] (1) 总不饱和蟾蜍内酯的制备,包括以下步骤:

[0092] A、用搅拌器将干燥的 20g 蟾酥(市售)粉碎,过 100 目筛,用体积百分比为 95% 的乙醇(无水乙醇)于室温通过 KQ 250DE 型超声波机提取 3 次,每次使用乙醇 100ml,每次时间为 1 小时,合并三次提取液,用滤纸过滤,得到蟾酥提取液。

[0093] B、接着用 N-1100V-W 型旋转蒸发仪进行减压浓缩蟾酥提取液,形成浆状物,得到蟾酥总提物。

[0094] C、用超纯水将蟾酥总提物混悬,用 200ml 二氯甲烷萃取,减压蒸除二氯甲烷后得到二氯甲烷部位 11.8g,此部位为总蟾蜍内酯;

[0095] D、将步骤(3)得到的总蟾蜍内酯用 50ml 二氯甲烷溶解,加醋酸调节溶液的 pH 值为 6;然后于 40℃ 回流搅拌,反应 8h,加水终止反应,用乙酸乙酯萃取,最后用旋转蒸发仪减

压蒸除乙酸乙酯至恒重,得到总衍生化产物(8.8g),即为总不饱和蟾蜍内酯。

[0096] (2) 对步骤(1)得到的总不饱和蟾蜍内酯进行分析

[0097] 同实施例1步骤(2),证实本实施例得到的总不饱和蟾蜍内酯中含有化合物Bu-1、Bu-2、Bu-3、Bu-4和Bu-5。

[0098] (3) 对步骤(1)得到的总不饱和蟾蜍内酯的活性进行检测

[0099] 实验操作同实施例1步骤(3)。结果是,随着总不饱和蟾蜍内酯浓度的升高,癌细胞的存活率明显下降。在不同浓度(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6和3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的总不饱和蟾蜍内酯作用下,LNCaP细胞的存活率分别为89.1%、87.8%、65.6%、42.4%、18.0%及7.6%(图6C),计算其IC<sub>50</sub>为0.60±0.22 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。PC-3细胞的存活率分别为:93.1%、78.6%、54.4%、42.4%、18.5%及13.0%(图6D),计算其IC<sub>50</sub>为0.45±0.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0100] 测定总蟾蜍内酯对正常细胞Vero的IC<sub>50</sub>为0.17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,而总不饱和蟾蜍内酯的IC<sub>50</sub>为8.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。故总不饱和蟾蜍内酯对正常细胞Vero的毒性比天然的总蟾蜍内酯低51倍。测定对Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase的抑制活性表明,总蟾蜍内酯的IC<sub>50</sub>为0.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,而总不饱和蟾蜍内酯的IC<sub>50</sub>为9.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。故总不饱和蟾蜍内酯对Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase的毒性比天然的总蟾蜍内酯低100倍。

[0101] 通过以上实验可以发现,总不饱和蟾蜍内酯对激素依赖性LNCaP细胞及非激素依赖性PC3细胞都有明显的抑制作用,并随着浓度的增加,抑制作用增强。同时,它对Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase的毒性比天然的总蟾蜍内酯低100倍,可能是它毒性降低的重要原因之一。

[0102] 实施例3

[0103] (1) 总不饱和蟾蜍内酯的制备,包括以下步骤:

[0104] A、用搅拌器将干燥的20g蟾酥(市售)粉碎,过100目筛,用体积百分比为95%的乙醇(无水乙醇)于室温通过KQ 250DE型超声波机提取3次,每次使用乙醇100ml,每次时间为1小时,合并三次提取液,用滤纸过滤,得到蟾酥提取液。

[0105] B、接着用N-1100V-W型旋转蒸发仪进行减压浓缩蟾酥提取液,形成浆状物,得到蟾酥总提物。

[0106] C、用超纯水将蟾酥总提物混悬,用300ml二氯甲烷萃取,减压蒸除二氯甲烷后得到二氯甲烷部位12.8g,此部位为总蟾蜍内酯;

[0107] D、将步骤(3)得到的二氯甲烷部位用50ml二氯甲烷溶解,加浓度为10%的硫酸调节溶液的pH值为3;然后室温搅拌,反应4h,加水终止反应,用乙酸乙酯萃取,最后用旋转蒸发仪减压蒸除乙酸乙酯至恒重,得到总衍生化产物(9.6g),即为总不饱和蟾蜍内酯。

[0108] (2) 对步骤(1)得到的总不饱和蟾蜍内酯进行分析

[0109] 同实施例1步骤(2),证实本实施例得到的总不饱和蟾蜍内酯中含有化合物Bu-1、Bu-2、Bu-3、Bu-4和Bu-5。

[0110] (3) 对步骤(1)得到的总不饱和蟾蜍内酯的活性进行检测

[0111] 实验操作同实施例1步骤(3)。结果时,随着总不饱和蟾蜍内酯浓度的升高,癌细胞的存活率明显下降。在不同浓度(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6和3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的总不饱和蟾蜍内酯作用下,LNCaP细胞的存活率分别为95.3%、83.4%、78.3%、38.6%、20.9%及9.8%(图6E),计算其IC<sub>50</sub>为0.66±0.18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。PC-3细胞的存活率分别为:96.4%、87.3%、78.3%、38.6%、16.2%及14.3%(图6F),计算其IC<sub>50</sub>为0.57±0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0112] 测定对正常细胞 Vero 的抑制作用, 总蟾蜍内酯的  $IC_{50}$  为  $0.14 \mu g/ml$ , 而总不饱和蟾蜍内酯的  $IC_{50}$  为  $7.4 \mu g/ml$ 。故总不饱和蟾蜍内酯对正常细胞 Vero 的毒性比天然的总蟾蜍内酯低 53 倍。测定对  $Na^+, K^+$ -ATPase 的抑制活性表明, 总蟾蜍内酯的  $IC_{50}$  为  $0.12 \mu g/ml$ , 而总不饱和蟾蜍内酯的  $IC_{50}$  为  $13.2 \mu g/ml$ 。故总不饱和蟾蜍内酯对  $Na^+, K^+$ -ATPase 的毒性比天然的总蟾蜍内酯低 100 倍。

[0113] 通过以上实验可以发现, 总不饱和蟾蜍内酯对激素依赖性 LNCaP 细胞及非激素依赖性 PC3 细胞都有明显的抑制作用, 并随着浓度的增加, 抑制作用增强。同时, 它对  $Na^+, K^+$ -ATPase 的毒性比天然的总蟾蜍内酯低 100 倍, 可能是它毒性降低的重要原因之一。

[0114] 上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制, 其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化, 均应为等效的置换方式, 都包含在本发明的保护范围之内。

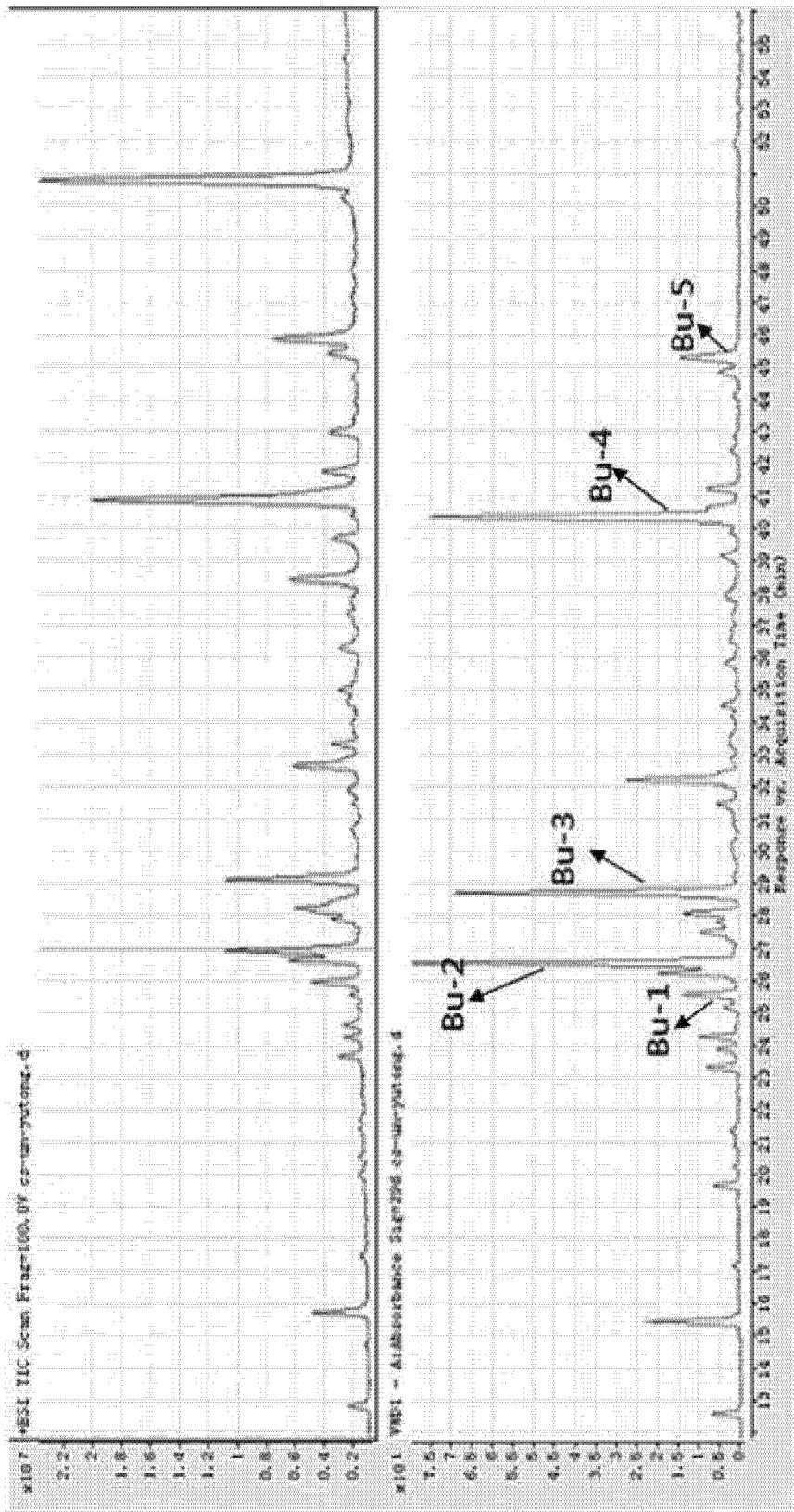


图 1

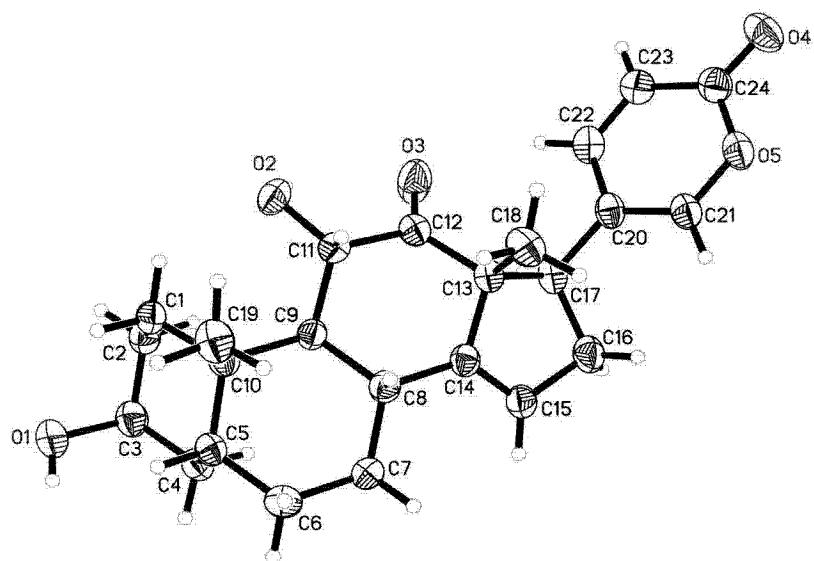


图 2

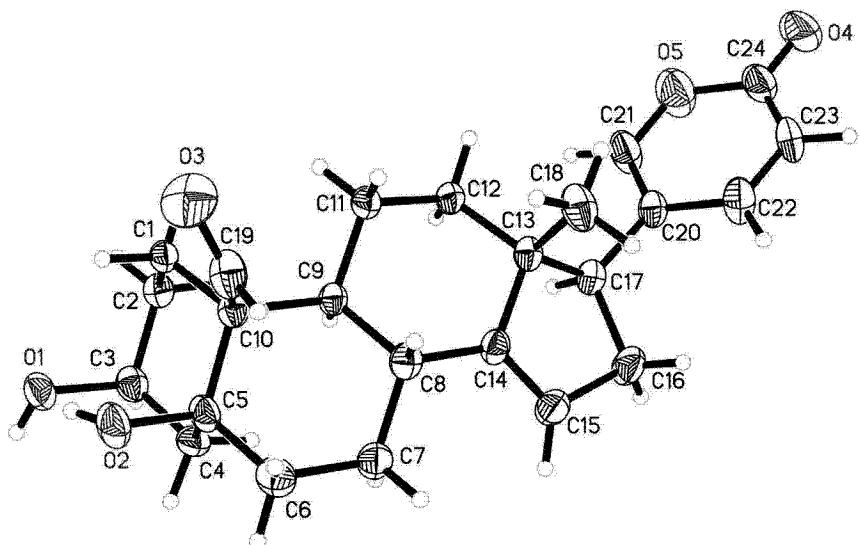


图 3

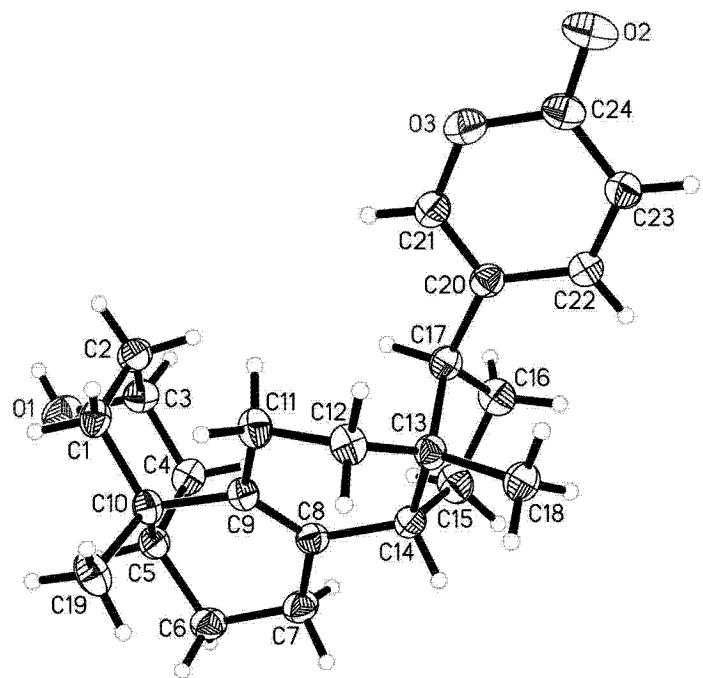


图 4

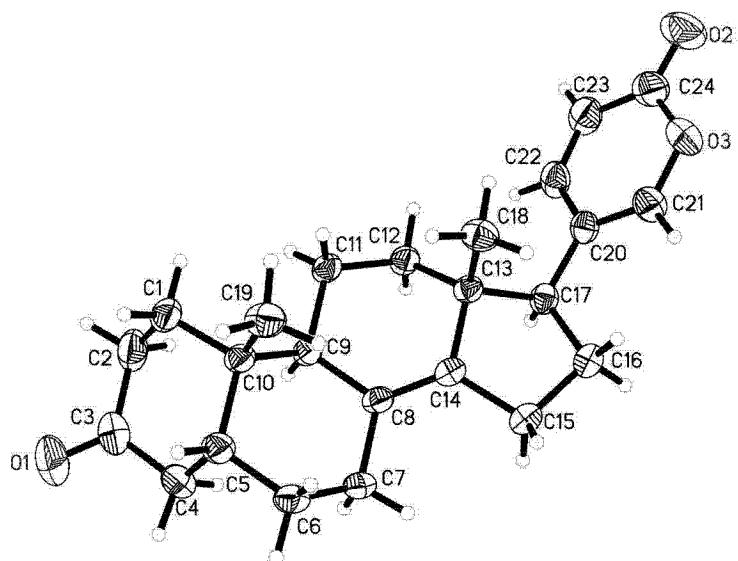


图 5

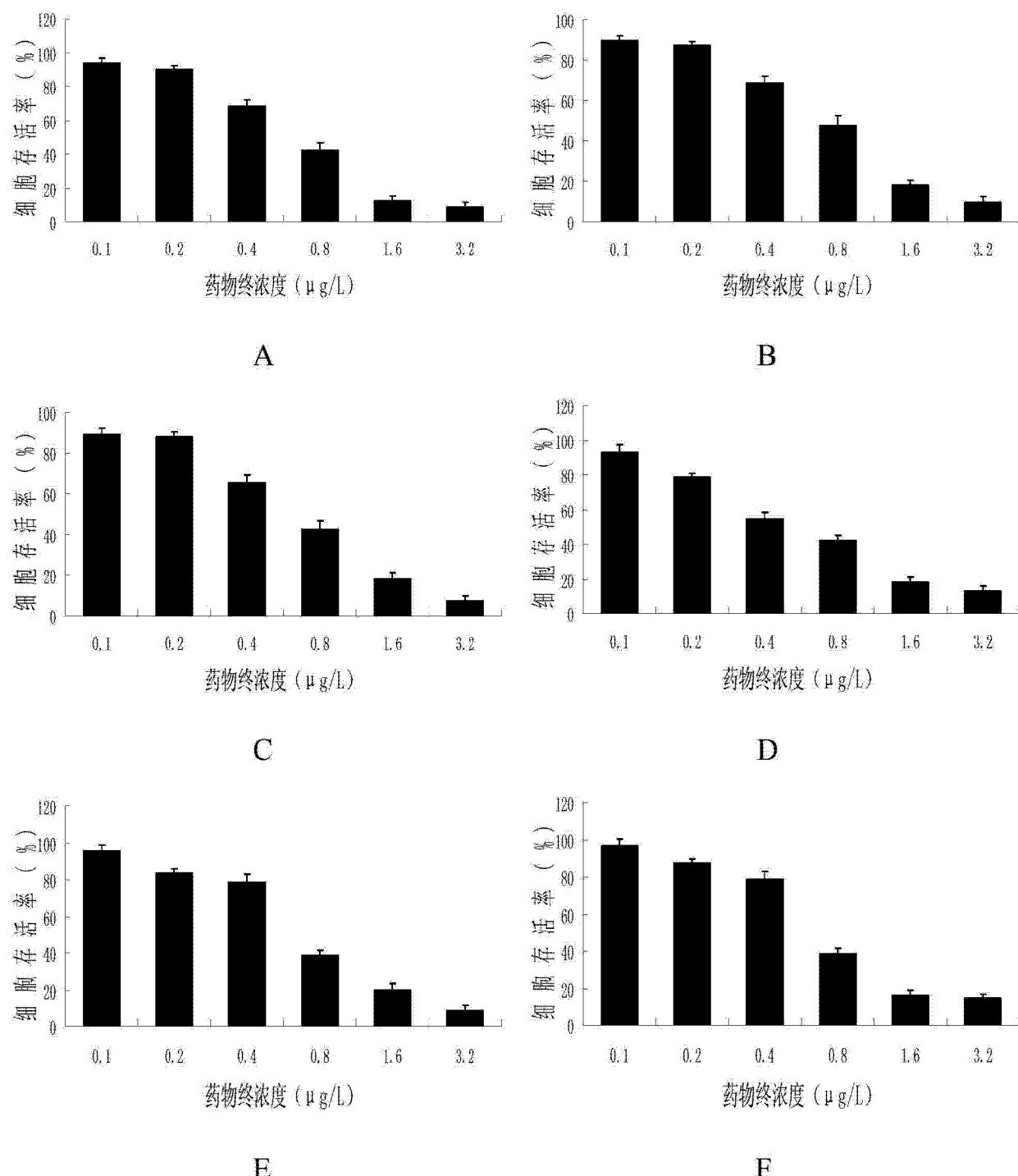


图 6