(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102349917 A
(43)申请公布日 2012.02.15

(21)申请号 201110234772.8

(22)申请日 2011.08.16

(71)申请人 厦门大学
地址 361000 福建省厦门市思明南路 422 号

(72)发明人 傅瑾 杨隆河 邱彦 陈玲
朱程刚 任杰 刘祖国 黄锐

(74)专利代理机构 厦门市首创君合专利事务所有限公司 35204
代理人 张松亭

(51)Int.Cl.
A61K 31/56(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07J 63/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 4 页

(54)发明名称

一种雷公藤红素的用途及制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种雷公藤红素的用途及制备方法。雷公藤红素可用于制备治疗脑胶质瘤的药物。一种雷公藤红素的制备方法包含以下步骤：(1)将雷公藤地上藤本部分与地下根部分混合粉碎处理后，经乙醇回流提取，过滤后减压浓缩；(2)将浓缩后的乙醇提取物用乙醇水超声混悬，静置后，倾倒出上清液；(3)上清液采用吸附树脂进行分离，以乙醇－水梯度洗脱依次洗脱，收集洗脱液；(4)洗脱部分减压浓缩后，经硅胶柱色谱纯化，回收溶剂后干燥获得红色粉末状提取物；(5)该提取物以热乙醇溶解成饱和或不饱和溶液后，放置，析出红色结晶后干燥即得。与现有技术相比，本方法原料利用率高、环保、简便、成本低廉、适合工业化生产，产品纯度高。

CN 102349917 A

1. 一种雷公藤红素的用途，其特征在于可用于制备治疗脑胶质瘤的药物。

2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于：雷公藤红素同时显著抑制内源性大麻素水解酶 FAAH 和 MGL 水平，提高内源性大麻素 AEA 和 2-AG 含量，同时抑制 CB_1 表达，促进 CB_2 表达，诱导多种脑胶质瘤细胞凋亡。

3. 一种雷公藤红素的制备方法，其特征在于包括如下步骤：

(1) 将雷公藤地上藤本部分与地下根部分混合粉碎处理后，经乙醇回流提取，过滤后减压浓缩；

(2) 将浓缩后的乙醇提取物用乙醇水超声混悬，静置后，倾倒出上清液；

(3) 上清液采用吸附树脂进行分离，以乙醇 - 水梯度洗脱依次洗脱，收集洗脱液；

(4) 洗脱部分减压浓缩后，经硅胶柱色谱纯化，回收溶剂后干燥获得红色粉末状提取物；

(5) 该提取物以热乙醇溶解成饱和溶液后，放置，析出红色结晶后干燥即得。

4. 如权利要求 3 所述的一种雷公藤红素的制备方法，其特征在于：所述步骤 (1) 所用乙醇为原料体积的 5-15 倍，浓度为 95％的食用乙醇，回流次数为 1 ～ 3 次。

5. 如权利要求 3 所述的一种雷公藤红素的制备方法，其特征在于：所述步骤 (2) 所用的乙醇为所述步骤 (1) 浓缩液体积的 3 ～ 5 倍，乙醇浓度为 60 ～ 95％。

6. 如权利要求 3 所述的一种雷公藤红素的制备方法，其特征在于：所述步骤 (3) 所用吸附树脂为 D101 大孔吸附树脂或 HPD100 大孔吸附树脂或上述两种树脂以任意比例混合，所述洗脱梯度为水，40％乙醇，70％乙醇，90 ～ 95％乙醇。

7. 如权利要求 3 所述的一种雷公藤红素的制备方法，其特征在于：所述步骤 (4) 的洗脱部分为 90 ～ 95％乙醇洗脱部分，所述硅胶柱为 200 ～ 300 目的硅胶柱。

一种雷公藤红素的用途及制备方法

技术领域

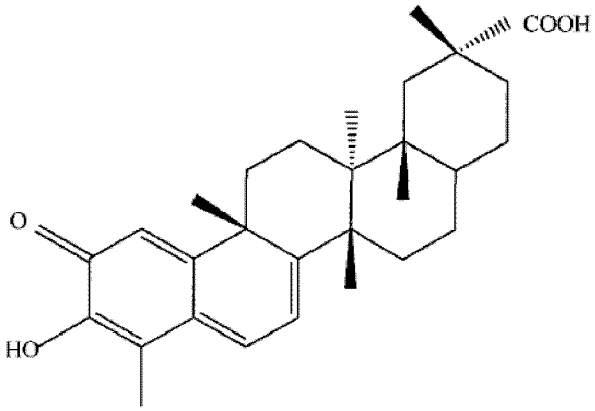
[0001] 本发明涉及一种雷公藤红素的用途及制备方法。

背景技术

[0002] 1 雷公藤红素的用途

[0003] 雷公藤红素是一种存在于卫矛科植物雷公藤、南蛇藤等植物中的五环三萜类物质，其分子式为 $C_{29}H_{38}O$，结构式如图。以往的研究表明，雷公藤红素具有抗氧化、抗风湿、抗老年痴呆症等功效，近年来的药理学研究证实雷公藤红素能通过影响癌细胞的蛋白酶体进而诱发癌细胞的凋亡。

[0004]



[0005] 脑胶质瘤是脑内最常见的肿瘤，占全部颅内肿瘤的 35％ --60％，是恶性度很高、易复发、预后差的颅内恶性肿瘤之一，它主要来源于神经胶质细胞。恶性脑胶质瘤即便经过手术、放射治疗和化学治疗等综合治疗，仍易复发，但是几乎都是原位复发。由于该肿瘤术后易复发和对放疗、化疗不敏感等特性，在临床上一直是个难题。世界卫生组织 1998 年公布按死亡率顺序排位，恶性胶质瘤是 34 岁以下肿瘤患者的第 2 位死亡原因，是 35 ～ 54 岁患者的第 3 位死亡原因。在全球，每年恶性脑胶质瘤夺去约 50 万人的宝贵生命。

[0006] 内源性大麻素系统 (endocannabinoid system，eCBs) 是一个脂质信号系统，主要由内源性大麻素 (AEA 与 2-AG)、大麻素受体、内源性大麻素的合成酶及降解酶等组成。内源性大麻素 AEA 经释放后被神经细胞重新摄取，在神经细胞内由脂肪酸酰胺水解酶 (Fatty Acid Amide Hydrolysis，FAAH) 直接降解后排出体外。与 AEA 不同，2-AG 经由单酰甘油酯水解酶 (Monoacylglycerol-lipase，MGL) 快速降解失活。

[0007] 尽管对于 eCBs 具体的抗胶质瘤机制尚未完全阐明，但该系统在体内外表现出良好的抑制胶质瘤生长活性。内源性大麻素能干涉细胞周期的调节，可影响细胞周期调控体系中的几个组分，同时促进胶质瘤细胞的凋亡。AEA 可通过作用于辣椒素受体，增加细胞内钙浓度，激活环氧合酶 COX 和脂氧化酶 LOX，释放细胞色素 C 和激活 Caspase 3，最终诱导人神经母细胞瘤和 C6 胶质瘤细胞凋亡。而作用于 CB 受体可激活 AEA 的转运，促进花生四烯酸的裂解和乙醇胺的水解，从而影响 AEA 的促凋亡效应。此外，eCBs 还可抑制胶质瘤细胞的增殖。一项研究表明，CB 受体激动剂 WIN-55，212-2 可通过激活 Raf1/MEK/ERK 级联反应来抑

制胶质瘤细胞的增殖，但是，过久的激活可引起胶质瘤细胞的凋亡。Stig Jacobson 等发现，2-AG 和 AEA 可抑制 C6 胶质瘤细胞的增殖，且 AEA 表现出时间和剂量依赖效应，其机制为：内源性大麻素作用于 CB 受体从而引起氧化应激和激活钙蛋白酶引起细胞内钙超载而抑制肿瘤细胞的增殖。此外，对于胶质瘤的治疗，大麻素能抑制血管内皮生长因子 (VEGF)、血管生成素 -2(angiopoietin-2)、基质金属蛋白酶 -2(Matrix metalloproteinase-2，MMP-2) 和缺氧诱导因子 -1α (hypoxia inducible factor-1α，HIF-1α) 的表达。

[0008] 因此，通过抑制 FAAH、MGL 等内源性大麻素水解酶活性，可以升高体内 AEA、2-AG 水平，同时调节 CB 受体表达，共同发挥良好的抗胶质瘤作用。

[0009] 2 雷公藤红素的提取

[0010] 目前雷公藤红素主要从卫矛科植物中提取。由于雷公藤红素在根皮中的含量最高，现有技术提取雷公藤红素主要使用根皮而将也含有相对少量的藤茎部分丢弃不用，造成了原料未充分利用而引起成本增高。

[0011] 雷公藤红素在植物中的含量很低，基本上在 0.1％左右，因此往往需要繁琐的提取过程。现有技术的提取过程大量使用了二氯甲烷、甲醇、正己烷、乙酸乙酯、石油醚、氯仿等有机溶剂，这些溶剂的回收步骤繁琐，需要较高的设备投入，且容易造成环境污染；而为了得到 98％以上的高纯度的产品，现有技术采用逆流层析、制备型高效液相色谱等对样品要求很高的大型设备，同样造成成本的增高。

发明内容

[0012] 本发明的目的在于提供一种雷公藤红素用于制备治疗脑胶质瘤的药物的用途。

[0013] 本发明的另一目的在于提供一种高原料利用率、简便、环保、适合工业化生产的雷公藤红素的提取方法。

[0014] 本发明的技术方案如下：

[0015] 一种雷公藤红素的用途，其特征在于用于制备治疗脑胶质瘤的药物。雷公藤红素同时显著抑制内源性大麻素水解酶 FAAH 和 MGL 水平，显著提高内源性大麻素 AEA 和 2-AG 含量，同时抑制 CB_1 表达，促进 CB_2 表达，诱导多种脑胶质瘤细胞凋亡。

[0016] 所述的雷公藤红素的制备方法，包括如下步骤：

[0017] (1) 将雷公藤地上藤本部分与地下根部分混合粉碎处理后，经乙醇回流提取，过滤后减压浓缩；

[0018] (2) 将浓缩后的乙醇提取物用乙醇水超声混悬，静置后，倾倒出上清液；

[0019] (3) 上清液采用吸附树脂进行分离，以乙醇 - 水梯度洗脱依次洗脱，收集洗脱液；

[0020] (4) 洗脱部分减压浓缩后，经硅胶柱色谱纯化，回收溶剂后干燥获得红色粉末状提取物；

[0021] (5) 该提取物以热乙醇溶解成饱和溶液后，放置，析出红色结晶后干燥即得。

[0022] 所述步骤 (1) 所用乙醇为原料体积的 5-15 倍，浓度为 95％的食用乙醇，回流次数为 1 ～ 3 次。

[0023] 所述步骤 (2) 所用的乙醇为所述步骤 (1) 浓缩液体积的 3 ～ 5 倍，浓度为 60 ～ 95％。

[0024] 所述步骤 (3) 所用吸附树脂为 D101 大孔吸附树脂或 HPD100 大孔吸附树脂或上述

两种树脂以任意比例混合，所述洗脱梯度为水，40％乙醇，70％乙醇，90 ～ 95％乙醇。

[0025] 所述步骤 (4) 的洗脱部分为 90 ～ 95％乙醇洗脱部分，所述硅胶柱为 200 ～ 300 目的硅胶柱。

[0026] 通过以上对本发明技术方案的描述可知：

[0027] 本发明的方法所用原料为雷公藤的地上藤本部分及地下根皮部分，全过程仅采用乙醇这一种环境危害很小的有机溶剂，与现有技术相比，本方法原料利用率高、环保、简便、成本低廉、适合工业化生产，所生产出的产品纯度高。

附图说明

[0028] 图 1 为本发明中雷公藤红素对 FAAH 的 EC50 图。

[0029] 图 2 为本发明中雷公藤红素对 MGL 的 EC50 图。

[0030] 图 3 为本发明中雷公藤红素诱导 AEA、CB_1、CB_2 变化。

[0031] 图 4 为本发明中雷公藤红素对脑胶质瘤细胞的细胞毒作用。

[0032] 图 5 为本发明中雷公藤红素诱导脑胶质瘤细胞凋亡图。

[0033] 图 6 为本发明中雷公藤红素对原代正常神经细胞及 neuro-2A 神经肿瘤细胞的细胞毒作用。

具体实施方式

[0034] 实施例 1

[0035] FAAH、MGL 酶抑制活性检测

[0036] 将 30μL(1mg/mL) 蛋白加入进样瓶中，再加入 2μL DMSO（空白对照组）或不同浓度的雷公藤红素于 37 摄氏度反应 10 分钟。再加入含有底物 AEA 或 2-OG（实验中以 2-OG 代替很难定量检测的 2-AG，这种替代在本领域内是公知允许的）的缓冲液 170μL，AEA 的浓度为 5μM，于 37 摄氏度反应 30 分钟后加入含有十七烷酸 (Heptadecanoic acid，内标）的甲醇溶液 200μL 终止反应。液质联用 (LC-MS) 检测水解产物花生四烯酸及油酸的产量，用 Graphpad Prism 5 作图。以此测定得到雷公藤红素对 FAAH、MGL 酶的 EC50 值分别为 4.69、16.70μM（见图 1 和图 2）。

[0037] 实施例 2

[0038] LC-MS 检测细胞内内源性大麻素的含量

[0039] 细胞给药 4 小时后用甲醇 / 水 (1 ： 1，v ： v) 收集细胞，超声破碎细胞后用氯仿萃取。3000rpm 离心收集下层有机层，氮气吹干后用 3 ： 1 甲醇 / 氯仿 100μL 重新溶解后用 LC-MS 检测内源性大麻素的含量。该实验显示，经雷公藤红素诱导后，细胞 AEA 表达显著增高（见图 3）。

[0040] 实施例 3

[0041] 细胞毒性实验

[0042] 脑胶质瘤细胞以浓度 5000 个 / 孔接种于 96 孔板中，隔天待细胞贴壁后更换含有不同浓度雷公藤的培液继续培养 24h。之后加入细胞计数试剂 (CCK-8)10μL，继续孵育 2 小时后于 450nm 酶标仪测定吸光度。以空白组为 100％计算细胞的死亡数，并依据该曲线初步预测雷公藤红素对各种脑胶质瘤细胞的 EC50 值。实验显示，雷公藤红素对 C6、BT325、

SHG44 等脑胶质瘤细胞的 EC50 值在 2.0-3.5μM 之间，显示出良好的细胞毒活性（见图 4）。

[0043] 实施例 4

[0044] 细胞凋亡实验

[0045] 脑胶质瘤细胞以浓度 5×10^5 个 / 孔接种于 6 孔板中，隔天待细胞贴壁后更换含有不同浓度 (1uM，10uM，20uM) 雷公藤的培液继续培养 10 小时，磷酸缓冲液冲洗后加入 0.0.5％ DAPI 检测细胞核的变化，在荧光显微镜下进行照相显示雷公藤可诱发肿瘤细胞凋亡（见图 5）。

[0046] 实施例 5

[0047] 细胞毒性实验

[0048] 原代神经细胞和脑神经肿瘤细胞 neuro-2A（由于无法取得脑胶质瘤细胞所对应的正常细胞，因此以脑神经肿瘤细胞 neuro-2A 及其对应的原代神经细胞作为替换，这种替换在本领域内是公知允许的）以浓度 5000 个 / 孔接种于 96 孔板中，隔天待细胞贴壁后更换含有不同浓度雷公藤 (0.3uM-10uM) 的培液继续培养 24h。之后加入细胞计数试剂 (CCK-8)10μL，继续孵育 2 小时后于 450nm 酶标仪测定吸光度。实验显示，雷公藤红素对脑神经肿瘤细胞的细胞毒作用大于正常原代神经细胞（见图 6）。

[0049] 实施例 6

[0050] 雷公藤红素的提取分离

[0051] 取雷公藤地上藤本部分与地下根部分 500g 混合粉碎处理后，用 10 倍量质量浓度为 95％的食用乙醇回流提取 2 次，过滤后减压浓缩；将浓缩后的乙醇提取物用 4 倍量的 75％乙醇水超声混悬，放置后，倾倒出上清液；上清液采用 HPD100 大孔吸附树脂进行分离，以乙醇－水梯度洗脱（水，40％乙醇，70％乙醇，95％乙醇）依次洗脱，收集洗脱液；95％乙醇洗脱部分减压浓缩后，经 200 目到 300 目的硅胶柱色谱纯化，回收溶剂后干燥获得红色粉末状提取物；该提取物以热乙醇溶解成饱和溶液后，放置，析出红色结晶后干燥称重为 1.3g，得率为 0.26％。

[0052] 实施例 7

[0053] 取雷公藤地上藤本部分与地下根部分 500g 混合粉碎过 20 目筛，用 6L(12 倍量）95％食用乙醇回流提取 3 次，每次提取时间为 2 小时。过滤后合并提取液，减压浓缩；将浓缩后的乙醇提取物用 5 倍量的 75％乙醇水超声混悬，放置后，倾倒出上清液；上清液采用 HPD100 大孔吸附树脂进行分离，以乙醇－水梯度洗脱（水，40％乙醇，70％乙醇，95％乙醇）依次洗脱，收集洗脱液；95％乙醇洗脱部分减压浓缩后，经 200 目到 300 目的硅胶柱色谱纯化，回收溶剂后干燥获得红色粉末状提取物；该提取物以热乙醇溶解成饱和溶液后，放置，析出红色结晶后干燥称重为 1.57g，得率为 0.314％。

[0054] 实施例 8

[0055] 取雷公藤地上藤本部分与地下根部分 500g 混合粉碎处理后，用 5 倍量质量浓度为 95％的食用乙醇回流提取 2 次，过滤后减压浓缩；将浓缩后的乙醇提取物用 3 倍量的 65％乙醇水超声混悬，放置后，倾倒出上清液；上清液采用 HPD100 大孔吸附树脂进行分离，以乙醇－水梯度洗脱（水，40％乙醇，70％乙醇，95％乙醇）依次洗脱，收集洗脱液；95％乙醇洗脱部分减压浓缩后，经硅胶柱色谱纯化，回收溶剂后干燥获得红色粉末状提取物；该提取物以热乙醇溶解成饱和溶液后，放置，析出红色结晶后干燥称重为 0.47g，得率为 0.094％。

[0056] 实施例 9

[0057] 取雷公藤地上藤本部分与地下根部分 500g 混合粉碎处理后，用 15 倍量质量浓度为 95％的食用乙醇回流提取 2 次，过滤后减压浓缩；将浓缩后的乙醇提取物用 5 倍量的 95％乙醇水超声混悬，放置后，倾倒出上清液；上清液采用 HPD100 大孔吸附树脂进行分离，以乙醇－水梯度洗脱（水，40％乙醇，70％乙醇，95％乙醇）依次洗脱，收集洗脱液；95％乙醇洗脱部分减压浓缩后，经硅胶柱色谱纯化，回收溶剂后干燥获得红色粉末状提取物；该提取物以热乙醇溶解成饱和溶液后，放置，析出红色结晶后干燥称重为 1.46g，得率为 0.292％。

[0058] 实施例 10

[0059] 取雷公藤地上藤本部分与地下根部分 500g 混合粉碎处理后，用 8 倍量质量浓度为 95％的食用乙醇回流提取 3 次，过滤后减压浓缩；将浓缩后的乙醇提取物用 5 倍量的 95％乙醇水超声混悬，放置后，倾倒出上清液；上清液采用 HPD100 大孔吸附树脂进行分离，以乙醇－水梯度洗脱（水，40％乙醇，70％乙醇，95％乙醇）依次洗脱，收集洗脱液；95％乙醇洗脱部分减压浓缩后，经硅胶柱色谱纯化，回收溶剂后干燥获得红色粉末状提取物；该提取物以热乙醇溶解成饱和溶液后，放置，析出红色结晶后干燥称重为 1.16g，得率为 0.232％。

[0060] 以上实施例中所得红色结晶中，雷公藤红素的平均纯度为 98.72％。

[0061] 以上实施例中所用吸附树脂还可以为 D101 大孔吸附树脂或与 D101 与 HPD100 任意比例混合的树脂，均可以得到相一致的结果。

[0062] 以上所述，仅为本发明的较佳实施例而已，故不能依此限定本发明实施的范围，即依本发明专利范围及说明书内容所作的等效变化与修饰，皆应仍属本发明涵盖的范围内。

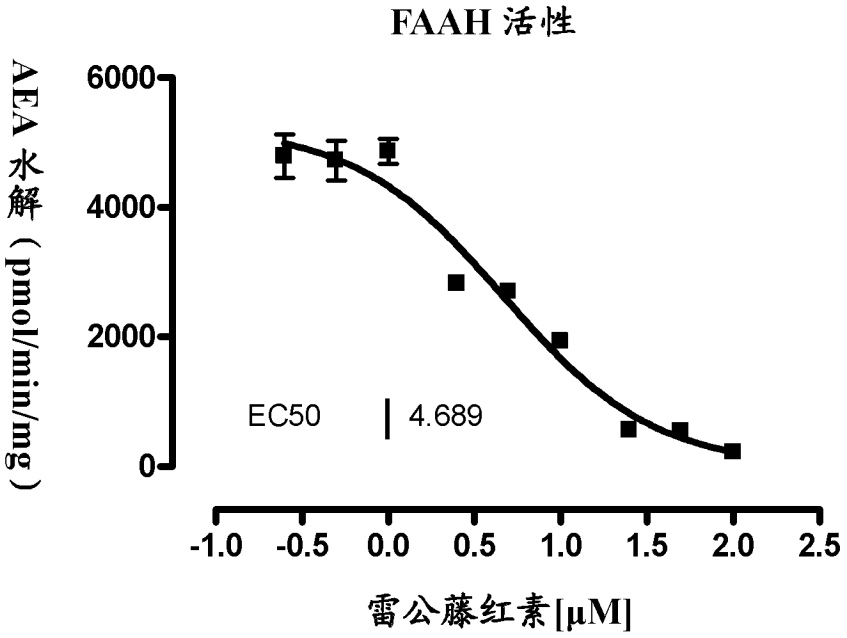

FAAH 活性
AEA 水解（pmol/min/mg）
6000
4000
2000
0
EC50
4.689
-1.0
-0.5
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
雷公藤红素[μM]

图 1

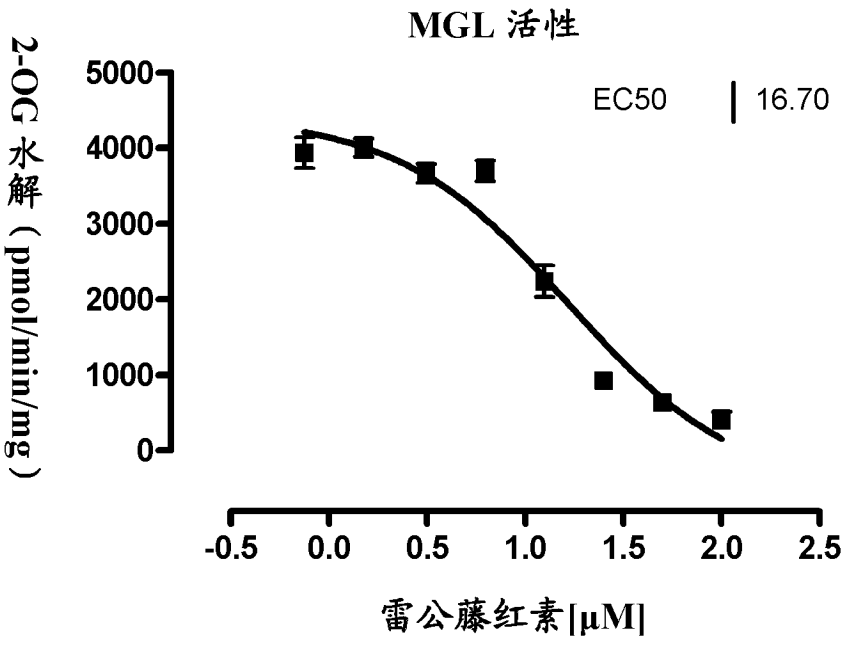

MGL 活性
2-OG 水解（pmol/min/mg）
5000
4000
3000
2000
1000
0
EC50
16.70
-0.5
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
雷公藤红素[μM]

图 2

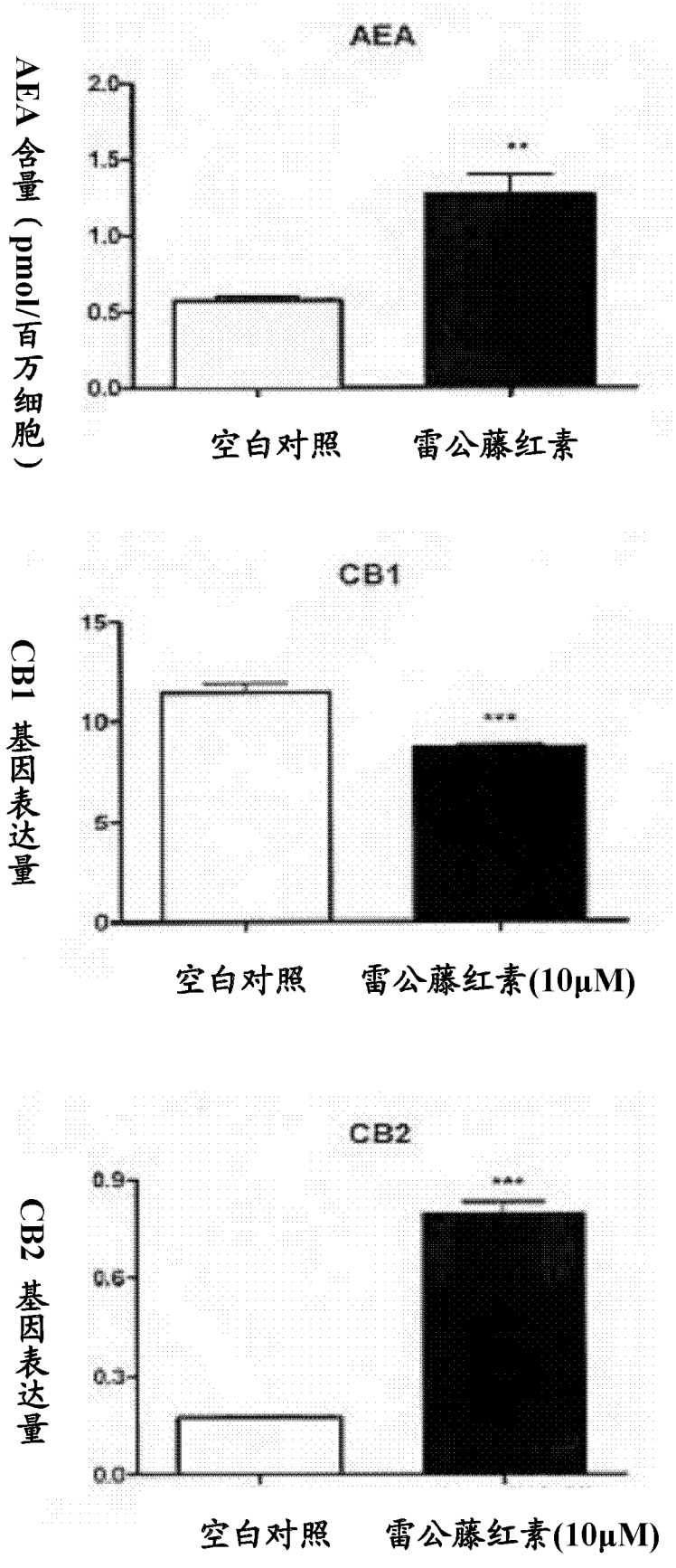

AEA
AEA 含量（pmol/百万细胞）
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
空白对照
雷公藤红素
CB1
CB1 基因表达量
15
10
5
0
***
空白对照
雷公藤红素(10μM)
CB2
CB2 基因表达量
0.9
0.6
0.3
0.0
***
空白对照
雷公藤红素(10μM)

图 3

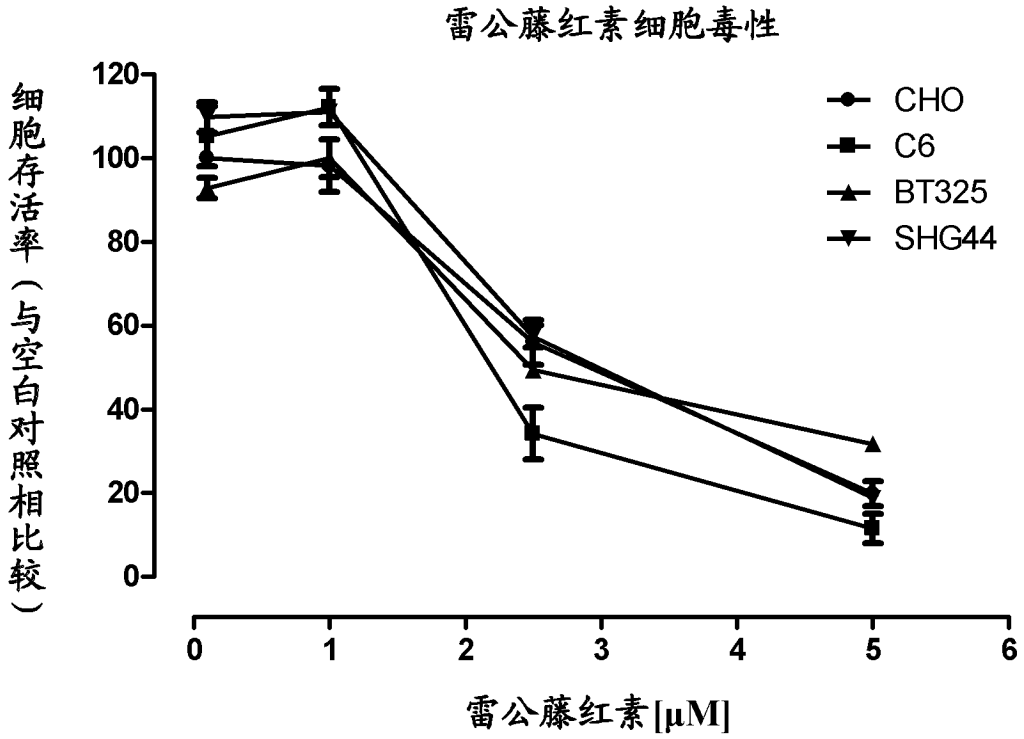

雷公藤红素细胞毒性
细胞存活率（与空白对照相比较）
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
雷公藤红素[μM]
CHO
C6
BT325
SHG44

图 4

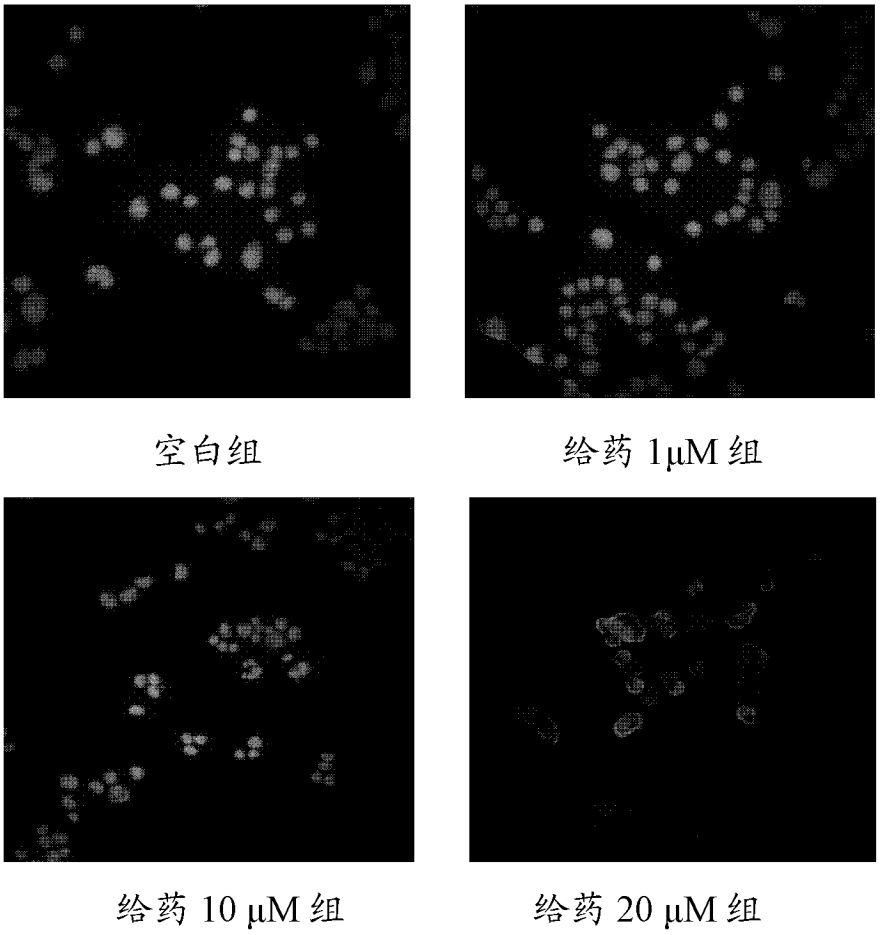

空白组
给药 1μM 组
给药 10 μM 组
给药 20 μM 组

图 5

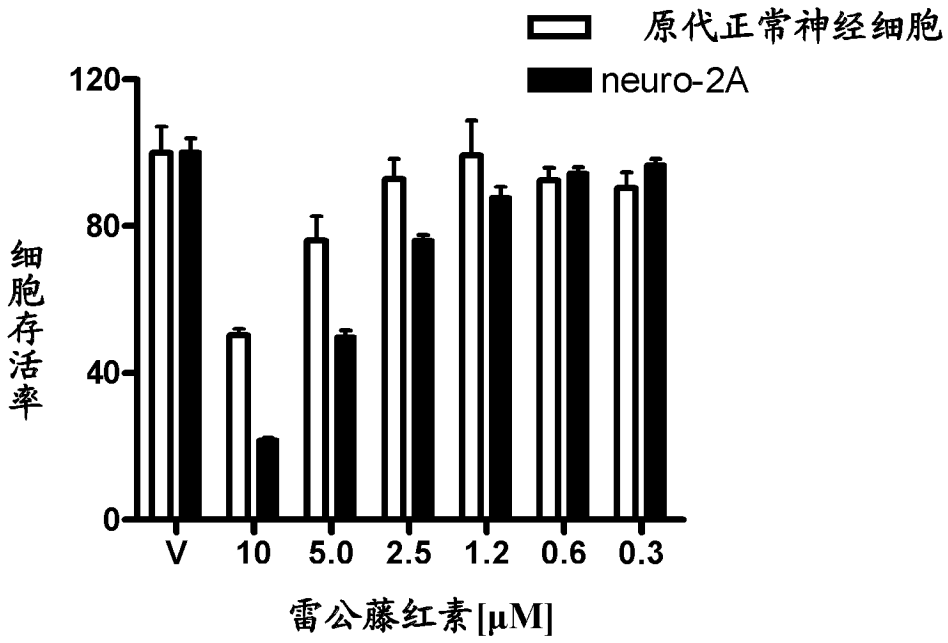

原代正常神经细胞
neuro-2A
120
80
40
0
细胞存活率
V
10
5.0
2.5
1.2
0.6
0.3
雷公藤红素[μM]

图 6