

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102432666 B

(45) 授权公告日 2013.09.11

(21) 申请号 201110426034.3

(22) 申请日 2011.12.19

(73) 专利权人 沈阳药科大学

地址 110016 辽宁省沈阳市沈河区文化路
103号

(72) 发明人 赵余庆 李伟 曹家庆 谢强敏
唐云

(74) 专利代理机构 沈阳杰克知识产权代理有限公司 21207

代理人 李宇彤

and their in vitro cytotoxicity.

《Fitoterapia》.2011, 第83卷(第1
期), 147-152.

Chunsheng Zhu,等.Total Synthesis of
Lobatoside E, A Potent Antitumor Cyclic
Triterpene Saponin. 《J. AM. CHEM. SOC. 》.2008,
第130卷(第18期), 5872-5873.

俞飏. 环状三萜皂甙 Lobatoside E 的全合
成. 《第七届全国天然有机化学学术研讨会论文
集》.2008, 14.

审查员 韩涛

(51) Int. Cl.

C07J 71/00(2006.01)

C07H 15/256(2006.01)

C07H 1/08(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56) 对比文件

Wei Li, 等.Cyclic bisdesmosides from
Actinostemma lobatum MAXIM (Cucurbitaceae)

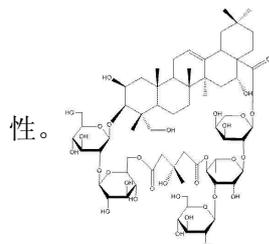
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

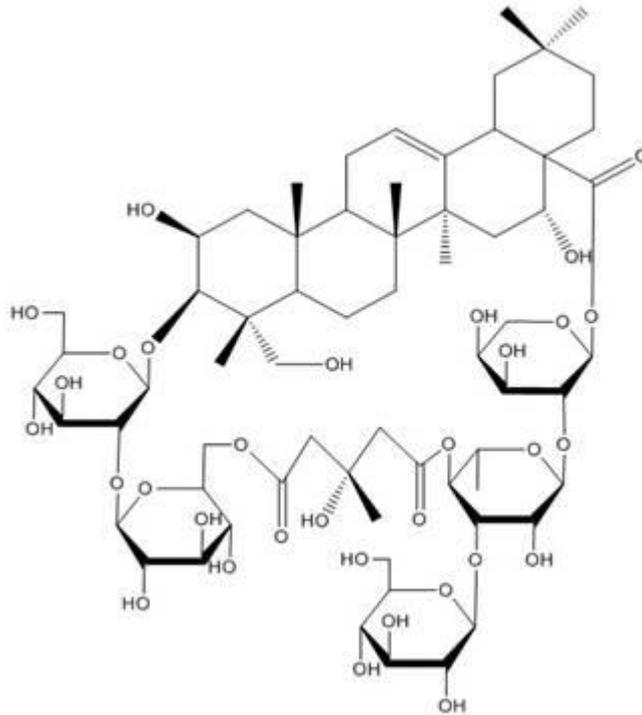
从合子草中分离的化合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于医药技术领域,公开了一种从合子草中分离得到的新化合物合子草皂苷L及其制备方法和应用,将干燥的合子草全草通过水或醇提取,浓缩,再经过大孔树脂,以不同醇洗脱分离得合子草皂苷L粗品,重结晶后得合子草皂苷L。本发明制备的合子草皂苷L具有较好的抗肿瘤活



1. 化合物合子草皂苷 L 的制备方法,其特征在于:a) 取干燥的合子草全草用醇或水提取,提取液浓缩,浓缩后将浓缩液过大孔树脂,用水、15% 乙醇、75% 乙醇和 90% 乙醇洗脱,收集 75% 乙醇部分;b) 浓缩 75% 乙醇洗脱部分即得合子草总皂苷,将合子草总皂苷上 200-300 目硅胶分离,用溶剂洗脱,硅胶薄层定性,合并相同组分即得合子草皂苷 L 粗品;c) 粗品用低级醇或水重结晶后即得合子草皂苷 L,所述低级醇为甲醇、乙醇中的一种,其中所述的合子草皂苷 L 具有式(I)结构:



(I)。

2. 如权利要求 1 所述的化合物合子草皂苷 L 的制备方法,其特征在于:其中所述的溶剂为二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇、水中的任意两者或三者的组合;所述的醇为甲醇、乙醇中的一种;所述低级醇为甲醇、乙醇中的一种;所述的大孔树脂为 D101、HP20 中的一种。

3. 如权利要求 1 所述的化合物合子草皂苷 L 的制备方法,其特征在于:合子草全草是指来自葫芦科盒子草属植物合子草的根、茎、叶、花、果实、种子。

4. 如权利要求 1 所述的化合物合子草皂苷 L 的制备方法,其特征在于:所述步骤 a) 中的提取是用醇或水加热回流提取或渗滤提取或超声提取或微波提取或闪式提取,是将干燥后的合子草用醇或水提取 3 次,每次提取 2 小时,合并提取液,提取液减压浓缩至 25℃ 时密度为 1.00-1.50。

5. 根据权利要求 1 所述的化合物合子草皂苷 L 的制备方法,其特征在于:取干燥的合子草全草用水提取,提取液浓缩,然后将水溶液过 D101 大孔树脂,依次用水、15% 乙醇、75% 乙醇、90% 乙醇洗脱,每个梯度洗脱 5 个柱体积,收集 75% 乙醇部分,蒸干后即得合子草总皂苷,将合子草总皂苷上 200-300 目硅胶分离,用二氯甲烷-甲醇-水 7:3:1,7:4:1,7:5:1 的下层溶液洗脱,每个梯度洗脱 5 个柱体积,硅胶薄层定性,合并相同组分,得到合子草皂苷 L 粗品,粗品用甲醇重结晶后即得化合物合子草皂苷 L。

从合子草中分离的化合物及其制备方法和应用

[0001] 技术领域：

[0002] 本发明属于药物化合物制备领域，涉及一种新的化合物及其制备方法，特别涉及从合子草中分离的新化合物及其制备方法，及该化合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0003] 背景技术：

[0004] 癌症是威胁人类生命的严重疾病，因此抗癌药物的研究一直是世界关注的热点。目前治疗癌症的常用方法有手术、放疗和药物治疗等。在过去的 40 年中，外科治疗及放射治疗的进步提高癌症病人的相对存活率，但外科手术及放射治疗的进步已近顶峰，很难再期待有更大的突破。而药物治疗能成功地治愈或明显延长病人的生命，在癌症的治疗中占有越来越主要的地位。肿瘤的化疗基本上着眼于直接杀伤肿瘤细胞，这一治疗模式往往存在以下问题：对增长缓慢的实体瘤效果差或几乎无影响；药物选择性很小，毒副作用多且严重，其中骨髓抑制是最主要的剂量限制因素。肿瘤细胞动力学研究已经取得很大进展但不完善；缺乏简便实用的方法测知肿瘤外处于何期，一些常用用药方案几乎多来自临床经验。肿瘤的生物治疗是继手术、放疗和化疗之后的肿瘤治疗的第四模式，主要通过肿瘤宿主防御机制或生物制剂的作用以调节机体自身的生物学反应，从而抑制或消除肿瘤。虽然没有太大毒副作用，但由于技术要求严、工艺复杂，因此价格高，众多癌症患者及家属难以承受，影响其在癌症治疗领域的普及。

[0005] 鉴于上述种种原因，人们把目光转向天然抗肿瘤药物的研发上。天然药物抗肿瘤在提高免疫力和降低致突变毒性方面比化学药物具有独到之处，因此，从祖国医药宝库中寻找疗效确切的抗肿瘤天然药物，明确其药效物质基础，进而开发出高效低毒的新药，成为中医药领域多年研究的焦点。

[0006] 合子草(*Actinostemma lobatum* MAXIM. (Cucurbitaceae)) 始载于《本草拾遗》，古代记载子及叶入药，经过历代医学的发展现药用有全草、种子及叶，具有利尿消肿、清热解毒、去湿之效。国外学者的研究表明合子草皂苷具有明显的抗肿瘤、免疫调剂和抗炎等多种生物活性。尤其在抗肿瘤方面，其表现出极其强的活性，对 100 多种癌细胞均有杀伤作用。

[0007] 合子草的名称比较多，如《本草拾遗》记载名称为合子草，在《百草镜》和《本草纲目》中记载名称为鸳鸯木鳖、水荔枝、盒儿藤，在《本草纲目拾遗》中又记载为天球草、水荔枝、盒儿藤、龟儿草。近代文献还记载了合子草的地方别名。葫蒡棵子、黄丝藤、马瓜包儿、双合子、蛇瓜子、野苦瓜、野瓜藤、湿疹草、葡丝网草、无白草等，据文献考证古代用合子草与近代的合子草为一种，即葫芦科植物合子草(*Actinostemma lobatum* MAXIM. (Cucurbitaceae))，但药名变化较大，为了避免混乱，建议采用最早的名称“合子草”。

[0008] 我们在针对合子草抗肿瘤有效成分的研究中，经过水提取、色谱分离纯化与细胞活性检测相结合的方法，最终获得了具有抗肿瘤活性的一个新化合物，并采用质谱与高分辨核磁共振技术，确定了该化合物的结构。该化合物具有良好的抗肿瘤活性，可以制成适合于临床使用的抗肿瘤药物，也可作为先导化合物，对其构效关系进行进一步研究，合成一系列的抗肿瘤药物和药物组合，更可以作为合子草药材及其制剂质量控制的指标成分，实现

合子草药材及其制剂质量的稳定和可控,突破目前合子草研究开发的瓶颈。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种从中药合子草中提取分离得到的新化合物。

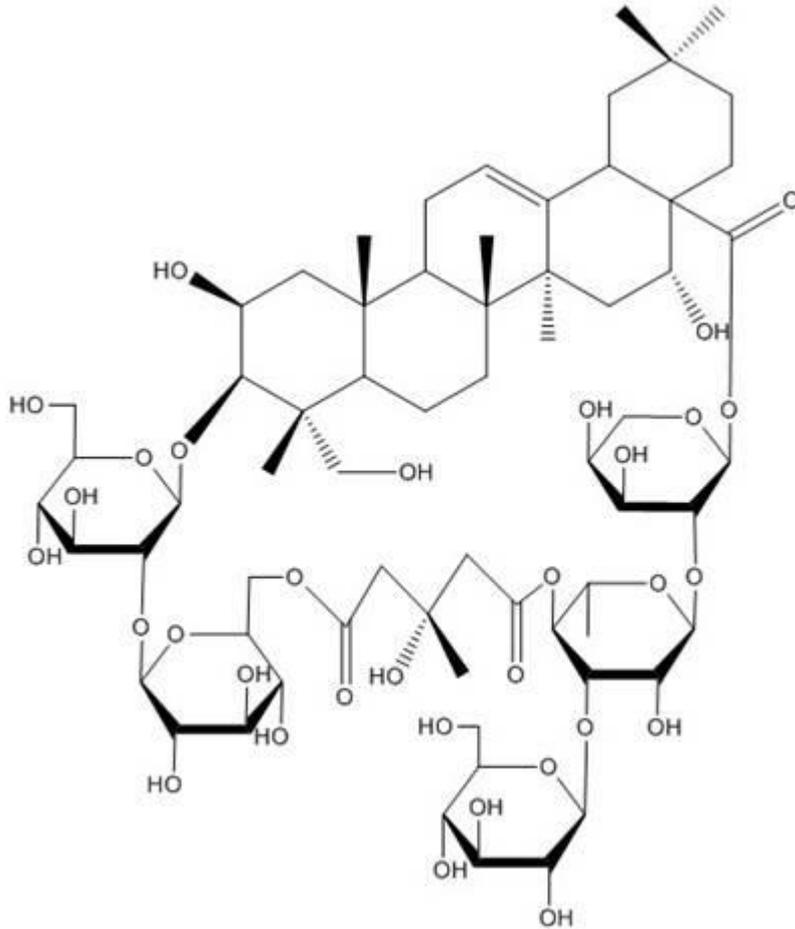
[0010] 本发明的另一目的是提供上述新化合物的制备方法。

[0011] 本发明的再一目的是提供上述新化合物在制备抗肿瘤药物中的用途。

[0012] 上述的目的通过以下的技术方案实现：

[0013] 一种具有下式结构的新化合物合子草皂苷 L：

[0014]



[0015] 一种新化合物合子草皂苷 L 的制备方法,其特征在于:a) 取干燥的合子草全草用醇或水提取,提取液浓缩,浓缩后将浓缩液过大孔树脂,依次用水、15% 乙醇、75% 乙醇、90% 乙醇洗脱,收集 75% 乙醇部分;b) 浓缩 75% 乙醇洗脱部分即得合子草总皂苷,将合子草总皂苷上 200-300 目硅胶分离,用一种溶剂系统洗脱,硅胶薄层定性,合并相同组分即得合子草皂苷 L 粗品;c) 粗品用低级醇或水重结晶后即得合子草皂苷 L。

[0016] 一种新化合物合子草皂苷 L 的制备方法,其中所述的溶剂系统为二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇、水中的任意两者或三者的组合;所述的醇为甲醇、乙醇中的一种;所述低级醇为甲醇、乙醇中的一种。

[0017] 其中合子草是指来自葫芦科盒子草属植物合子草的根、茎、叶、花(蕾)、果实(浆)、种子。

[0018] 所述的取合子草全草干燥后用醇、水或醇-水任意比例混合加热回流提取或渗滤提取或超声提取或微波提取或闪式提取,提取液浓缩,是将干燥后的合子草用醇或水提取3次,每次提取2小时,合并提取液,减压浓缩至密度1.00-1.50(25℃)。

[0019] 所述的浓缩液必须完全是溶液状,将浓缩液通过大孔吸附树脂,将吸附树脂用乙醇-水梯度洗脱,是指浓缩液加入到已处理好的大孔吸附树脂中,浓缩液与树脂的比例为1:10,流速为10ml/min,分别用五倍柱体积的水、15%乙醇、75%乙醇、90%乙醇洗脱,收集75%乙醇洗脱液,将洗脱液减压蒸干后得到合子草总皂苷。

[0020] 一种新化合物合子草皂苷L的制备方法,其特征在于:得合子草总皂苷后,将合子草总皂苷上200-300目硅胶分离,用二氯甲烷-甲醇-水(取下层)7:3:1,7:4:1,7:5:1洗脱,每个梯度洗脱5个柱体积,硅胶薄层定性,合并相同组分,得到合子草皂苷L粗品,粗品用甲醇重结晶后即得化合物合子草皂苷L。

[0021] 所述的大孔树脂为D101、HP20中的一种。

[0022] 一种从合子草中分离的新化合物合子草皂苷L在抗肿瘤药物中的应用。

[0023] 这个技术方案有以下有益效果:

[0024] 1. 本发明提供了一种未报道过的具有抗肿瘤作用的化合物,通过对癌细胞抑制试验和药效学试验,证明了该化合物具有优良的抗癌活性,可制成适合于临床使用的抗肿瘤药物。

[0025] 2. 采用本实验的筛选方法导致了从中药合子草中分离纯化了该化合物,且纯度达到98%以上。该化合物为从天然植物中提取分离,具有结构新颖、作用独特的优点,一方面可与药物赋形剂制成适合于临床使用的抗肿瘤药物,另一方面也可作为先导化合物,对其构效关系进行进一步研究,合成一系列的抗癌药物和药物组合。

[0026] 3. 中药及其制剂质量的稳定和可控一直是中药现代化的瓶颈,该化合物为中药合子草的有效成分之一,可以作为合子草药材及其制剂质量控制的指标,在其基础上建立以该成分为指标的鉴别和含量测定项目的质量控制标准,实现合子草药材及其制剂质量的稳定和可控,该化合物将作为中药对照品广泛使用。

[0027] 附图说明:

[0028] 图1 合子草皂苷L的结构

[0029] 图2 合子草皂苷L抑制A549的量-效关系图

[0030] 图3 合子草皂苷L抑制MGC-803的量-效关系图。

具体实施方式

[0031] 下面结合实施例和附图对本发明作进一步详细的描述,但发明的实施方式不限于此。

[0032] 实施例1:

[0033] 取干燥的合子草全草用水提取,提取液浓缩,然后将水溶液过D101大孔树脂,依次用水、15%乙醇、75%乙醇、90%乙醇洗脱,每个梯度洗脱5个柱体积,收集75%乙醇部分,蒸干后即得合子草总皂苷,将合子草总皂苷上200-300目硅胶分离,用二氯甲烷-甲醇-水(取下层)7:3:1,7:4:1,7:5:1洗脱,每个梯度洗脱5个柱体积,硅胶薄层定性,合并同一组分,得到该化合物,纯度大于80%,用甲醇重结晶后即得该化合物,纯度98%。

[0034] 化合物的结构测定

[0035] 用 *Shimadzu UV-2201* 分光光度计测定紫外光谱,用 *Bruker IFS-55* (KBr 压片)分光光度计测定红外光谱,用 *Perkin-Elmer polarimeter* 测定旋光度,用 *LCQ mass analyzer* 测定 ESI-MS,用 *BIC micro TOF-Q mass spectrometer* 测定 HR-TOF-MS, ^1H -和 ^{13}C -NMR 谱用 *Bruker AV-600* 和 *ARX-300*, TMS 做内标。

[0036] 化合物的理化性质:

[0037] 化合物为颗粒状结晶。IR (KBr) γ max :3442, 2926, 1734, 1637, 1384, 1075, 1041, 618。UV (MeOH) λ max ($\log \epsilon$):205nm (3.45), 255nm (2.39)。 $[\alpha]_{28\text{D}} = -7.6$ (c= 0.25, MeOH)。 ^1H -NMR (600 MHz, Pry) 和 ^{13}C -NMR (200 MHz, Pry) 谱数据见表 1。ESI-MS (positive) m/z HR-TOF-MS (positive) m/z 1417.6249 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 $\text{C}_{65}\text{H}_{102}\text{O}_{32}\text{Na}$ 1417.6252)。

[0038] 化合物的 ^1H -NMR 谱中显示有 8 个甲基质子信号,在 δ 0.978 (3H, s), 1.021 (3H, s), 1.315 (3H, s), 1.522 (3H, s), 1.692 (3H, s), 1.811 (3H, s), 1.932 (3H, s), 1.435 (3H, d, $J=6.0$ Hz); 一个烯碳质子信号,在 δ 5.639 (1H, br. s); 五个端基碳质子信号,在 δ 5.118 (1H, d, $J=7.8$ Hz), δ 5.196 (1H, d, $J=7.8$ Hz), δ 5.292 (1H, d, $J=7.2$ Hz), δ 5.976 (1H, d, $J=7.2$ Hz) 和 δ 6.217 (1H, s), 结合 ^{13}C -NMR 和 HMQC 谱可以断定它们各自连接在 δ 103.8, 105.8, 105.6, 94.7 和 102.6 的碳上。在 ^{13}C -NMR 谱上还可以看到 5 个 sp^2 杂化的碳信号,其中 3 个为 δ 123.4, 145.3 和 176.4, 可以推断出化合物的母核为齐墩果酸型化合物,另外两个为 171.4 和 171.9。碳谱中还观察到一个 δ 18.5 (CH_3) 信号和两个 δ 62.5 (CH_2), 62.7 (CH_2) 的信号,可以推断化合物中有一个鼠李糖和两个葡萄糖。结合 1D-TOCSY、HMBC 和 HMQC 谱,可以确定化合物中的五个糖为 3 个葡萄糖、1 个鼠李糖和 1 个阿拉伯糖。结合 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR 和 HMBC 谱可以断定化合物中 1 个葡萄糖连接在 C-3 位和 1 个阿拉伯糖连接在 C-28 位,并且可以推断出化合物中糖的连接顺序。结合 HR-FAB-MS 和 ^{13}C -NMR 谱可以推断出化合物的分子式为 $\text{C}_{65}\text{H}_{102}\text{O}_{32}$, 化合物 65 个碳中除去 30 个母核碳信号、29 个糖信号,还剩 6 个碳信号,这 6 个碳信号为羟甲戊二酸酯基的碳信号,再结合 HMBC 谱可以断定羟甲戊二酸酯基的一端连接在一个葡萄糖的 6 位,另一端连接在鼠李糖的 4 位。因此,化合物的结构得到了确认,其 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 的数据归属如表 1。

[0039] 表 1 化合物 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NM 数据归属

	碳信号	氢信号
<i>Position.</i>	δ_{C}	δ_{H}
CH_2 (1)	44.3	2.34 (<i>m</i>), 1.27 (<i>m</i>)
CH_2 (2)	70.2	4.81 (<i>m</i>)
CH (3)	83.1	4.33 (<i>d</i> , $J=3.0$)
C (4)	42.7	
CH (5)	47.7	1.97 (<i>m</i>)
CH_2 (6)	18.9	2.23 (<i>m</i>), 1.96 (<i>m</i>)
CH_2 (7)	33.7	2.01 (<i>m</i>), 1.92 (<i>m</i>)
C (8)	40.3	
CH (9)	47.1	1.94 (<i>m</i>)
C (10)	37.1	
CH_2 (11)	24.1	2.27 (<i>m</i>), 2.08 (<i>m</i>)
CH_2 (12)	123.4	5.64 (<i>m</i>)
CH (13)	145.3	
C (14)	42.2	
CH_2 (15)	36.8	2.31 (<i>m</i>), 1.95 (<i>m</i>)

CH(16)	73.5	5.29
C(17)	49.3	
CH(18)	41.0	3.50 (<i>dd</i> , <i>J</i> =14.4, <i>J</i> =4.2)
CH ₂ (19)	46.7	2.81 (<i>dd</i> , <i>J</i> =14.4, <i>J</i> =14.4), 1.39 (<i>dd</i> , <i>J</i> =14.4, <i>J</i> =4.2)
C(20)	30.8	
CH ₂ (21)	36.1	
CH ₂ (22)	32.4	
CH ₂ (23)	64.5	
Me(24)	15.4	1.52 (<i>s</i>)
Me(25)	17.6	1.692 (<i>s</i>)
Me(26)	17.8	1.26 (<i>s</i>)
Me(27)	27.4	1.93 (<i>s</i>)
C(28)	176.4	
Me(29)	33.2	0.98 (<i>s</i>)
Me(30)	24.4	1.02 (<i>s</i>)
Dicrotalicacidmoiety		
C(1')	171.4	
CH ₂ (2')	47.1	3.19 (<i>d</i> , <i>J</i> =16.2), 2.83 (<i>d</i> , <i>J</i> =16.2)
C(3')	70.3	
CH ₂ (4')	47.1	3.58 (<i>d</i> , <i>J</i> =14.4), 2.89 (<i>d</i> , <i>J</i> =14.4)
C(5')	171.9	
Me(6')	25.9	1.88 (<i>s</i>)
3-0-sugars		
Glc		
CH(1)	103.8	5.12 (<i>d</i> , <i>J</i> =7.8)
CH(2)	84.2	4.10 (<i>m</i>)
CH(3)	77.3	4.16 (<i>m</i>)
CH(4)	71.6	4.14 (<i>m</i>)
CH(5)	78.0	4.17 (<i>m</i>)
CH ₂ (6)	62.7	4.34 (<i>dd</i> , <i>J</i> =3.0, <i>J</i> =18.6), 4.20 (<i>m</i>)
Glc'		
CH(1)	105.6	5.29 (<i>d</i> , <i>J</i> =7.2)
CH(2)	77.3	4.03 (<i>m</i>)
CH(3)	78.0	3.81 (<i>m</i>)
CH(4)	71.1	4.05 (<i>m</i>)
CH(5)	75.9	4.04 (<i>m</i>)
CH ₂ (6)	65.1	5.02 (<i>d</i> , <i>J</i> =11.4), 4.62 (<i>d</i> , <i>J</i> =11.4)
28-0-sugars		
Ara		
CH(1)	94.7	5.98 (<i>d</i> , <i>J</i> =7.2)
CH(2)	77.3	4.63 (<i>d</i> , <i>J</i> =7.2)
CH(3)	75.0	3.82 (<i>m</i>)
CH(4)	69.5	4.129-4.153 (<i>m</i>)
CH ₂ (5)	67.5	4.18 (<i>m</i>), 3.77 (<i>d</i> , <i>J</i> =10.8)
Rha		
CH(1)	102.6	6.22 (<i>br. s</i>)
CH(2)	72.2	5.24 (<i>br. s</i>)
CH(3)	78.9	4.72 (<i>m</i>)
CH(4)	73.5	6.05 (<i>t</i>)
CH(5)	68.1	4.46 (<i>m</i>)
CH ₂ (6)	18.5	1.43 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.0)
Glc''		
CH(1)	105.8	5.20 (<i>d</i> , <i>J</i> =7.8)
CH(2)	74.9	4.19 (<i>m</i>)
CH(3)	77.9	4.11 (<i>m</i>)
CH(4)	71.0	4.12 (<i>m</i>)
CH(5)	77.8	3.83 (<i>m</i>)

CH ₂ (6)	62.5	4.22(m), 4.44(m)
---------------------	------	------------------

[0040] 实施例 2 :

[0041] 取干燥的合子草全草用 75% 乙醇加热回流提取, 提取 3 次, 每次提取 2 小时, 过滤, 合并滤液, 浓缩至无醇味, 然后用石油醚和乙酸乙酯脱脂, 体积比为 1:1, 脱脂 3 次, 脱脂后将水层溶液通过 D101 大孔树脂, 依次用水、15% 乙醇、75% 乙醇、90% 乙醇洗脱, 每个梯度洗脱 5 个柱体积, 收集 75% 乙醇部分, 蒸干后即得合子草总皂苷, 将合子草总皂苷上 200-300 目硅胶分离, 用二氯甲烷-甲醇-水(取下层)7:3:1, 7:4:1, 7:5:1 洗脱, 每个梯度洗脱 5 个柱体积, 硅胶薄层定性, 合并同一组分, 得到该化合物, 纯度大于 80%, 用甲醇重结晶后即得该化合物, 纯度 98%。

[0042] 实施例 3

[0043] 一种上述化合物在抗癌领域的应用。

[0044] 抑制人 HL-60A549 肺癌、MGC-803 胃癌、Eca-109 食管癌的活性实验 :

[0045] 方法

[0046] 取指数生长期的三种 (A549、MGC-803、Eca-109 细胞) 肿瘤细胞制成单细胞悬液, 以适合细胞生长的密度 (1×10^4 /孔) 接种于 96 孔板上, 用含 10% 胎牛血清的培养基 (完全培养基) 37°C 培养 24 小时让细胞贴壁, 培养终体积为 100 μ l。培养 24 小时在倒置显微镜下观察细胞生长形态完好后, 以 200、100、50、25、12.5 μ g/ml 浓度加入各受试提取物, 每个浓度的体积为 100 μ l, 每孔终体积为 200 μ l, 继续培养 48 小时后每孔加入浓度为 5mg/mL 的 MTT (溶于无血清高糖 1640 培养基中) 10 μ L, 轻微振荡混匀后, 继续置于 37°C 培养。4 小时后, 取出 96 孔培养板, 用水平离心机 2000 转 / 分室温离心 5min, 仔细吸弃上清, 每孔加 100 μ L DMSO, 于摇床上振荡 10min, 充分溶解蓝紫色的甲贍沉淀。再在酶标检测仪上读取 490nm 下的各孔吸光度值 (OD 490), 以此反映受试物对肿瘤细胞的细胞毒作用。试验时以顺铂和卡铂作为阳性对照药。

[0047] 细胞培养环境条件

[0048] 购来后的细胞养于无菌细胞房内, 温度 37 度, 相对湿度 100%。含 5%CO₂、95% 空气的培养箱内。培养基为加入 10% 南美小牛血清 FBS 的 1640 或者高糖的 DMEM 培养基。

[0049] 实验分组

[0050] 每种细胞按照 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板上, 用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基 (完全培养基) 或者 DMEM 37°C 培养 24 小时让细胞贴壁, 培养终体积为 100 μ l。培养 24 小时后观察细胞形态, 然后加药。药物体积 100 μ l, 终体积为 200 μ l。

[0051] 按照加入药物分为 :

[0052] 化合物剂量又分为 200、100、50、25、12.5 μ g/ml 五个剂量组, 每个组 3 个孔。

[0053] 实验

[0054] 取指数生长期的上述肿瘤细胞制成单细胞悬液, 以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板上, 用含 10% 胎牛血清的培养基 (完全培养基) 37°C 培养 24 小时让细胞贴壁, 培养终体积为 100 μ l。而后加入新鲜制备的不同浓度的药物刺激细胞, 药物总体积 100 μ l, 于刺激后的 48 小时每孔加入浓度为 5mg/mL 的 MTT (溶于无血清高糖 1640 培养基中) 10 μ L, 轻微振荡混匀后, 继续置于 37°C 培养。4hr 后, 取出 96 孔培养板, 用水平离心机 2000 转 / 分室温离心 5min, 仔细吸弃上清, 每孔加入 100 μ L DMSO, 于摇床上振荡 10min, 充分溶解蓝紫色的甲贍沉

淀。再在酶标检测仪上读取 490nm 下的各孔吸光度值(OD_{490}),以此反映药物对细胞的毒性作用。

[0055] 观察指标

[0056] 在酶标检测仪上读取 490nm 下的各孔吸光度值(OD_{490}),以此反映药物对细胞的毒性作用。应用 SPSS 软件计算药物对细胞的 IC_{50} 。

[0057] 表 1 化合物抑制三种肿瘤细胞的 IC_{50} (μM) 值

样品	ECA-109 食管癌	A549 肺癌	MGC-803 胃癌
化合物	11.7	37.6	50.1

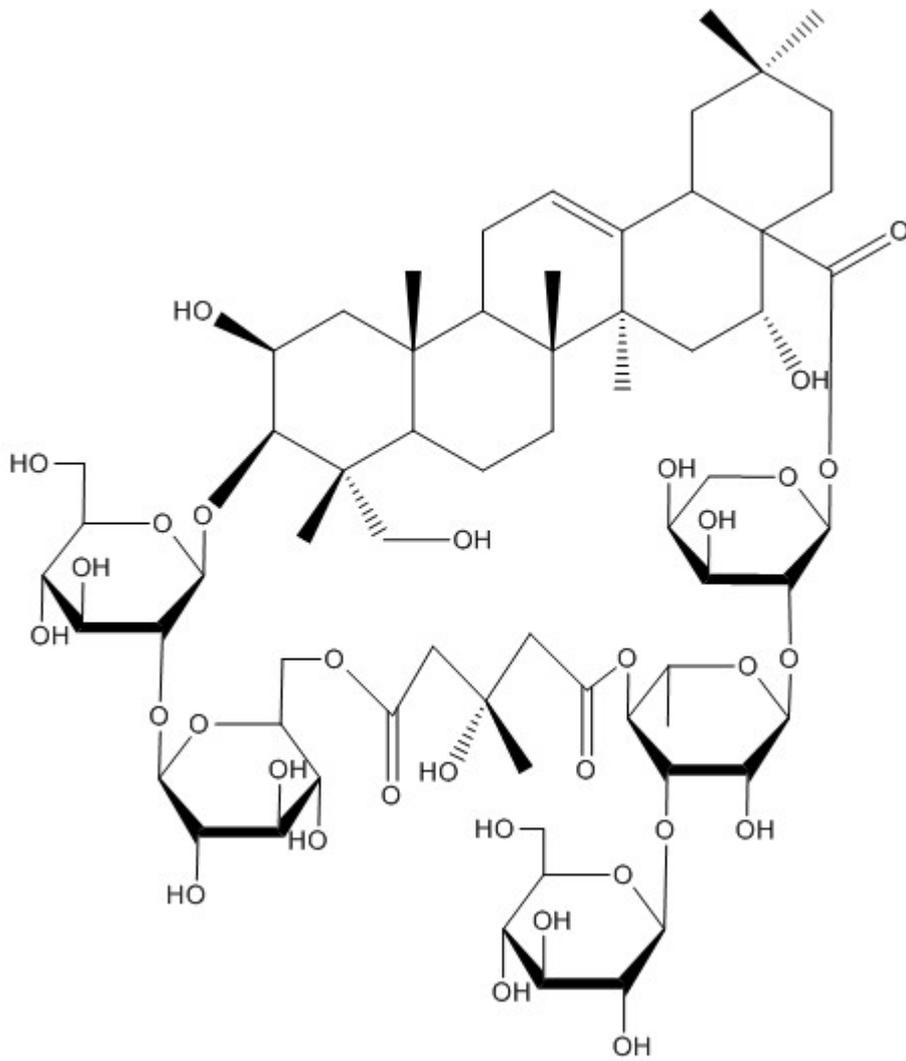


图 1

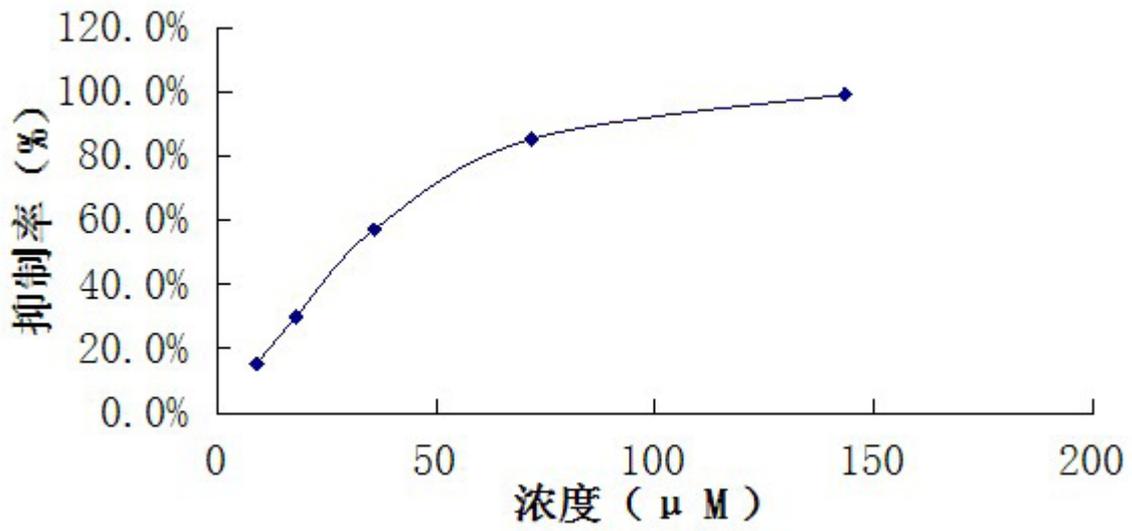


图 2

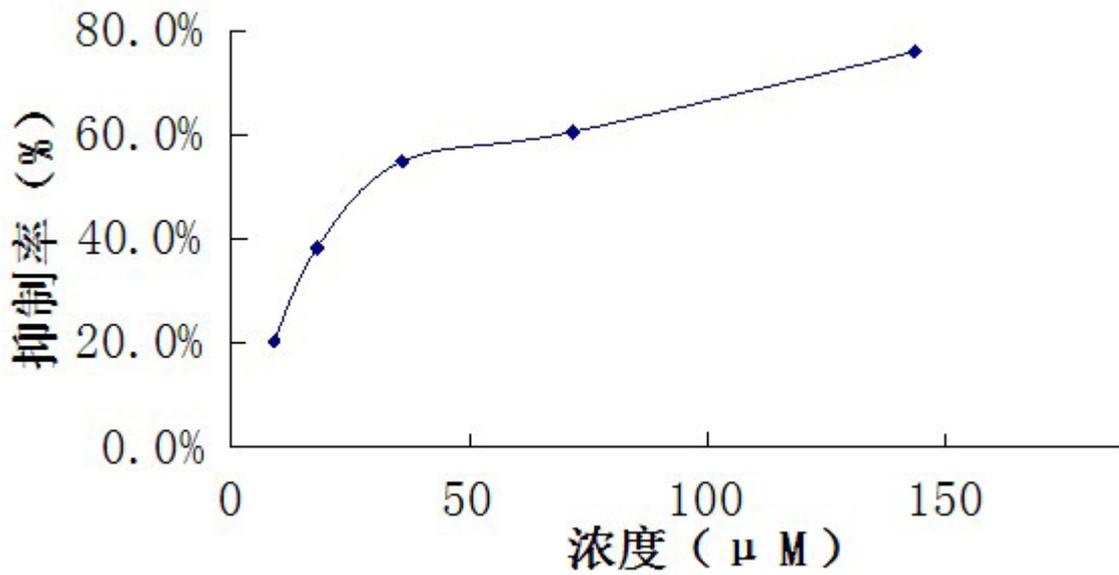


图 3