



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103665082 B

(45) 授权公告日 2015.04.22

(21) 申请号 201310660217.0

(22) 申请日 2013.12.10

(73) 专利权人 山东省医学科学院药物研究所  
地址 250062 山东省济南市历下区经十路  
18877 号

(72) 发明人 姚庆强 周玲 邓志鹏 徐晓婷  
白虹 孙敬勇

(51) Int. Cl.

C07J 17/00(2006.01)

C07J 9/00(2006.01)

A61K 31/575(2006.01)

A61K 31/704(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102174191 A, 2011.09.07, 说明书第 1-7  
页.

陈剑超 等. 短柄雪胆块根的化学成分研

究. 《化学学报》. 2007, 第 65 卷 (第 16 期), 第  
1679-1684 页.

Jian-Chao Chen et al., .Four new  
cucurbitane glycosides from *Hemsleya*  
*jinfushanensis*. 《Planta Medica》. 2005, 第 71  
卷第 983-986 页.

审查员 高义

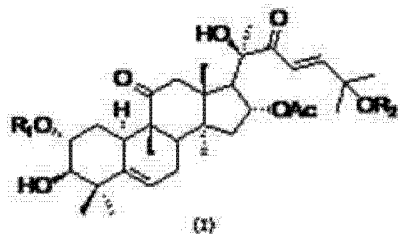
权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

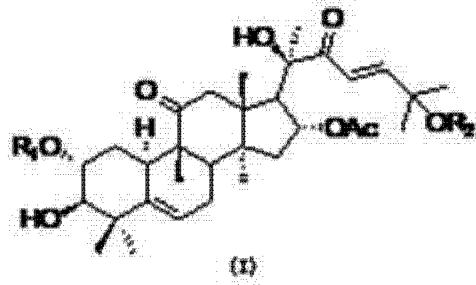
雪胆葫芦烷型四环三萜化合物, 含有该化合  
物的药物组合物及其应用

(57) 摘要

本发明涉及结构式(I)表示的雪胆葫芦  
烷型四环三萜化合物, 其中,  $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ; 或者  
 $R_1=\beta-D-Glc$ ,  $R_2=Ac$ 。本发明还涉及以该化合物  
为活性成份的药物组合物, 以及本发明化合物和  
药用组合物在治疗肺腺癌、结肠癌药物中的应用。

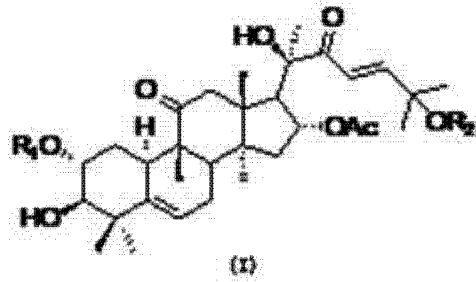


1. 由下述结构式(I)表示的雪胆葫芦烷型四环三萜化合物,



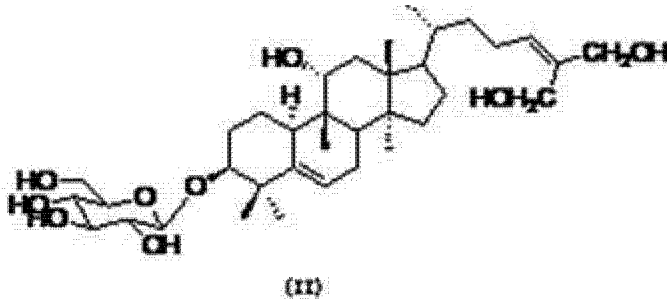
$R_1=H, R_2=H$ ; 或者  $R_1=\beta-D-Glc, R_2=Ac$ 。

2. 药物组合物,其中含有结构式(I)表示的雪胆葫芦烷型四环三萜化合物为有效成份,并含有常规药用载体,

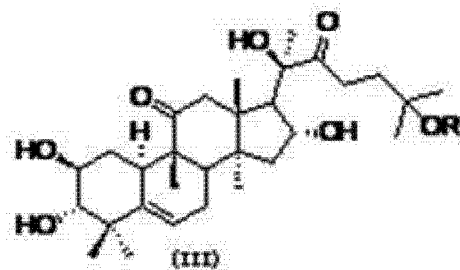


$R_1=H, R_2=H$ ; 或者  $R_1=\beta-D-Glc, R_2=Ac$ 。

3. 根据权利要求2所述的药物组合物,其特征在于,其中含有结构式(II)表示的雪胆葫芦烷型四环三萜化合物为有效成份,



4. 根据权利要求2所述的药物组合物,其特征在于,其中含有结构式(III)表示的雪胆葫芦烷型四环三萜化合物为有效成份,



$R=Ac$ 。

5. 权利要求1化合物在制备治疗肺腺癌、结肠癌药物中的应用。

## 雪胆葫芦烷型四环三萜化合物,含有该化合物的药物组合物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一类新化合物,具体地说是一种雪胆葫芦烷型四环三萜化合物,含有该化合物的药物组合物及其应用。

### 背景技术

[0002] 癌症是危害人类生命的大敌。目前全球每年新发癌症病人 870 万,因之死亡的人数达 600 - 700 万,占人口总死亡人数的十分之一。我国的肿瘤发病率同样惊人,据卫生组织统计,我国每年新发癌症病例约 160 万人,死于癌症约 130 万人,而且随着工业化、城市化进程的加快和环境污染的加重,全国因癌症死亡的人数也逐年上升,我国成为肝癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌等癌症的高发区域,癌症死亡率居高不下。

[0003] 目前尚无有效的药物治愈大多数癌症患者。化疗药物虽然有一定疗效,但不少抗肿瘤药在临床应用过程中产生耐药性、毒副作用大;中成药对癌症的疗效普遍较低,如参莲胶囊对肺癌、胃癌的病灶缓解率为 3.5%,软坚口服液对肝癌病灶的缓解率为 6.0%,疗效均不理想。

[0004] 因此,从天然产物中寻找新的活性成份,并研制出新的抗癌药物显得尤为重要。

[0005] 雪胆,别名金龟莲、金盆,为葫芦科植物雪胆 (*Hemsleya amabilis* Diels) 及其同属数种植物的干燥块根。本品性苦、寒,入胃、大肠二经,具有清热解毒,抗菌消炎的功效。雪胆属植物全世界有 31 种,除 2 种产于印度、越南外,主要分布于我国云、贵、川三省,该属中多种植物为常用中药。雪胆属植物的主要成份为齐墩果烷型五环三萜及其皂苷和葫芦烷型四环三萜及其皂苷。药理研究表明雪胆具有抑菌作用、抗肿瘤作用、体外抗 HIV 活性等,国内对该植物化学成份研究较多,抗癌活性方面研究较少。

### 发明内容

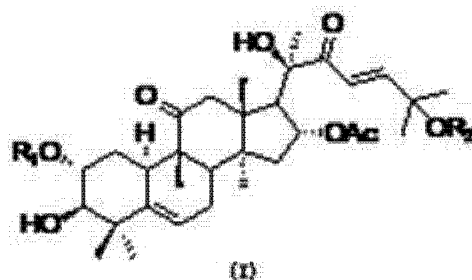
[0006] 本发明的技术任务是针对上述现有技术的不足,提供一种雪胆葫芦烷型四环三萜化合物。

[0007] 本发明进一步的技术任务是提供含有该化合物的药物组合物。

[0008] 本发明再进一步的技术任务是提供上述化合物的应用。

[0009] 本发明提供了下述结构式(I)表示的雪胆葫芦烷型四环三萜化合物,

[0010]



[0011]  $R_1=H, R_2=H$ ; 或者  $R_1=\beta-D-Glc, R_2=Ac$ 。

[0012] 以雪胆块茎为原料,用溶剂提取后,经层析纯化或大孔树脂纯化即可提取得到式(I)表示的化合物。

[0013] 提取方法主要包括以下步骤:

[0014] (1) 雪胆块茎干燥粉碎后用溶剂提取,提取液浓缩得到浸膏,即得粗提物,所述溶剂为水、丙酮、醇类或水醇混合物,其中醇为  $C_1-C_4$  的短链醇。

[0015] (2) 浸膏以水混悬后,用有机溶剂萃取,萃取后萃取液部位经硅胶柱层析(氯仿-甲醇,二氯甲烷-甲醇)、凝胶柱层析(甲醇-水)、ODS 柱层析(甲醇-水)纯化,薄层监控,合并相同流分,得到结构式(I)表示的化合物( $R_1=H, R_2=H$ )和( $R_1=\beta-D-Glc, R_2=Ac$ )。

[0016] 所述有机溶剂为乙醚、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇中的任何一种、任何两种或两种以上的组合配合使用。

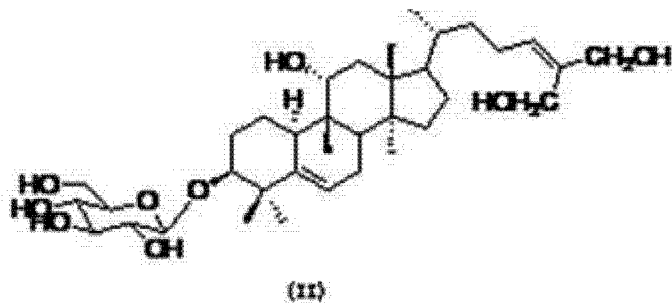
[0017] 申请人发现上述式(I)表示的化合物在抗癌方面具有显著效果。

[0018] 本发明的药物组合物,其中含有结构式(I)表示的雪胆葫芦烷型四环三萜化合物为有效成份,并含有常规药用载体。

[0019] 上述药学上可接受的载体是指药学领域常规载体,例如:稀释剂、赋形剂如水等;填充剂如淀粉等;黏合剂如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮等;湿润剂如甘油等;崩解剂如琼脂、碳酸钙、碳酸氢钠等;吸收促进剂如季铵化合物;表面活性剂如十六烷醇等;润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、聚乙二醇等。另外,还可以在组合物中加入其它辅剂,如香味剂、甜味剂等。

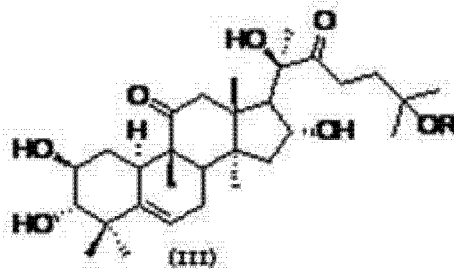
[0020] 为了达到更好的治疗效果,上述药物组合物中还可以增加结构式(II)表示的雪胆葫芦烷型四环三萜化合物为有效成份。

[0021]



[0022] 进一步添加结构式(III)表示的雪胆葫芦烷型四环三萜化合物为有效成份,

[0023]



[0024]  $R=Ac$  或  $R=H$ 。

[0025] 上述结构式(II)、结构式(III)表示的化合物为现有技术中公知的雪胆葫芦烷型四环三萜类化合物,申请人发现这两种化合物在抗癌方面同样具有显著效果。

[0026] 结构式(III)表示的化合物可以是市售产品,也可以是结构式(I)表示的化合物提取过程中的副产物;结构式(II)表示的化合物可以是结构式(I)表示的化合物提取过程中的副产物。

[0027] 式(I)表示的化合物在制备治疗肺腺癌、结肠癌药物中的应用。

[0028] 本发明的化合物、组合物可以经口服或注射等形式给药,给药量因给药途径不同而各有不同,对成人来说,每天 5mg - 30mg 比较合适。

[0029] 用于口服给药时,可将其制成常规的固体制剂,如颗粒剂、胶囊、片剂等;制成液体制剂如水或油悬浮剂或其它液体制剂,如糖浆等。用于非口服给药时,可将其制成注射液、输液剂或栓剂等。

[0030] 本发明药物组合物的各种剂型可以按照药学领域的常规生产方法制备。例如将活性成份与一种或多种载体混合,然后将其制成所需剂型。

[0031] 实施方式

[0032] 下面的实施例、制剂实施例以更详细地说明本发明,但不以任何形式限制本发明。

[0033] (实施例 1):

[0034] 1、提取与分离

[0035] 雪胆 (*Hemsleya amabilis* Diels) 干燥根茎 9 kg, 95 % 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液后减压浓缩, 得乙醇提取物 2018 g, 用等体积的水混悬, 依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取, 得乙酸乙酯提取物 700 g。乙酸乙酯部位 300 g 经硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇梯度洗脱 (98:2, 95:5, 93:7, 90:10, 85:15, 80:20, 100:0) 得到 14 个流分 (Fr. A-Fr. N)。Fr. D (69 g) 经反复重结晶得到化合物 5 (4.8 g)。Fr. E 经硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇梯度洗脱 (98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10, 80:20, 100:0) 得到 6 个流分 (Fr. E 1-6)。Fr. E 5 (800 mg) 和 Fr. E 6 (12 g) 分别经 Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇-水, 45:55)、ODS 柱色谱 (甲醇-水, 60:40), 得到化合物 1 (15.7 mg), 化合物 4 (188 mg)。Fr. F (11 g) 经硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇梯度洗脱 (97:3, 96:4, 95:5, 93:7, 90:10, 85:15, 80:20, 100:0), ODS 柱色谱 (甲醇-水, 60:40) 及制备 HPLC 得到化合物 2 (5.5 mg)。Fr. N 经硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇梯度洗脱 (99:1, 98:2, 97:3, 95:5, 93:7, 91:9, 88:12, 86:14, 84:16, 82:18, 75:25, 100:0) 及 Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇-水, 60:40) 分离得到化合物 3 (24.3 mg)。

[0036] 从粗提物中共得到 5 个化合物, 有 2 个为新葫芦素类化合物(本发明结构式(I)表示的两个化合物)。

[0037] 2、化合物的结构鉴定:

[0038] 新葫芦素类化合物 1 (结构式(I)表示的化合物( $R_1=H, R_2=H$ )): 白色无定形粉末。HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 583.3309  $[M+Na]^+$  (计算值为  $C_{32}H_{48}O_8Na$ ,  $m/z$  583.3309), 给出化合物的分子式为  $C_{32}H_{48}O_8$ 。 $^1H$ -NMR 和  $^{13}C$ -NMR 给出 8 个角甲基信号  $\delta$  1.40 (3H, s), 24.5; 1.33 (3H, s), 29.4; 1.33 (3H, s), 29.4; 1.26 (3H, s), 19.6; 1.16 (3H, s), 25.3; 1.08 (3H, s), 20.5; 0.97 (3H, s), 24.5; 0.96 (3H, s), 22.3, 一个双键信号  $\delta$  5.73 (1H, m), 119.9; 142.7 和一个羰基碳信号  $\delta$  215.4, 推测该化合物可能为葫芦烷型三萜。此外,  $^1H$  NMR 给出一对双键烯碳上的氢信号  $\delta$  7.06 (1H, d,  $J = 13.0$ ); 6.82 (1H, d,  $J = 13.0$ ),  $^{13}C$  NMR 数据给出一对烯碳信号  $\delta$  156.4, 120.5 及一个羰基信

号 204.1, 推断该化合物中存在  $\alpha$ ,  $\beta$ - 不饱和羰基。根据 C-2, 3 位氢偶合常数  $\delta$  3.54 (1H, m), 2.85 (1H, d, J = 9.6) 推断化合物 C-2, 3 位羟基为  $2\alpha$ ,  $3\beta$ - 构型。检索文献发现化合物 2 与得到的雪胆乙素结构非常相似, 仅在 C-16, C23, C24 有区别。化合物 2 中  $\delta$  70.8 (C-16) 向低场移动 4.5 ppm, 推断可能被乙酰基取代, C-23, 24 位两个亚甲基  $\delta$  34.9, 38.1 被两个烯碳  $\delta$  120.5, 156.4 取代, 形成  $\alpha$ ,  $\beta$ - 共轭双键。通过 HMBC 谱中  $\delta$  5.28 (H-16) 与  $\delta$  172.2 (乙酰基上羰基) 相关;  $\delta$  6.82 (H-23) 与  $\delta$  204.1 (C-22)、 $\delta$  71.6 (C-25) 相关;  $\delta$  7.06 (H-24) 与  $\delta$  204.1 (C-22)、 $\delta$  120.5 (C-23)、 $\delta$  71.6 (C-25) 相关可进一步确定。根据以上解析, 经文献检索确定该化合物为一新化合物, 命名为  $2\alpha$ ,  $3\beta$ ,  $20\beta$ , 25-tetrahydroxycucurbita-5, 23-diene-11, 22-dione-16-acetate。<sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR 数据归属见表 1。

[0039] 新葫芦素类化合物 2 (结构式 (I) 表示的化合物 ( $R_1 = \beta$ -D-Glc,  $R_2 = \text{Ac}$ ): 白色无定形粉末。HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 787.4234 [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup> (计算值为  $\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{O}_{14}\text{Na}$ ,  $m/z$  787.4234), 给出化合物的分子式为  $\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{O}_{14}$ 。<sup>1</sup>H-NMR 中糖的端基质子信号  $\delta$  4.44 (1H, d, J = 7.8) 结合端基碳信号  $\delta$  106.0 推断结构中存在一个  $\beta$  构型的糖单元。比较化合物 2 和化合物 1 的 <sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR 数据发现, 化合物 2 除了多一个葡萄糖单元外还多一个乙酰基。<sup>13</sup>C-NMR 数据中化合物 2 的  $\delta$  71.6 (C-2) 向低场移动 11.7 ppm, 表明多余的糖连接在苷元的 C-2 位;  $\delta$  71.6 (C-25) 向低场移动 9.4 ppm 推测乙酰基连接在苷元的 C-25 位。HMBC 谱中  $\delta$  4.44 (H-glc-1) 与  $\delta$  83.3 (C-2) 相关可进一步证明。化合物 2 在纤维素酶 40 °C 下水解反应 120 h, 水解液经 TLC 检测到葡萄糖, 其绝对构型通过将葡萄糖转化为 1-[ (S)-N-acetyl- $\alpha$ -methylbenzylamino]-1-deoxyglucitol acetate 衍生物后进行 HPLC 分析, 并与 D 型和 L 型标准糖的衍生物进行比较, 确定化合物 2 的糖单元为  $\beta$ -D- 葡萄糖。根据以上解析, 经文献检索确定该化合物为一新化合物, 命名为  $2\alpha$ ,  $3\beta$ ,  $20\beta$ -trihydroxycucurbita-5, 23-diene-11, 22-dione-16, 25-acetyl-2- $\beta$ -D-glucopyranoside。<sup>1</sup>H- NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR 数据归属见表 1。

[0040] 化合物 3 (结构式 (II) 表示的化合物):

[0041] 白色固体 (甲醇)。ESI-MS (positive)  $m/z$ : 659 [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup>; ESI-MS (negative)  $m/z$ : 635 [ $\text{M} - \text{H}$ ]<sup>-</sup>, 确定分子量为 636, 化学结构式为  $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_9$ 。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0.86 (3H, s), 0.90 (3H, s), 0.98 (3H, d, 6.0 Hz), 1.06 (3H, s), 1.10 (3H, s), 1.18 (3H, s), 3.41 (1H, brs, H-3), 5.49 (1H, brs, H-6), 2.48 (1H, d, 12.0 Hz, H-10), 5.55 (1H, t, 6.6 Hz, H-24), 4.15 (2H, s, H-26), 4.08 (2H, s, H-27), 4.27 (1H, d, 6.6 Hz, Glc-H-1)。<sup>13</sup>C NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 26.3 (C-1), 29.6 (C-2), 88.5 (C-3), 42.9 (C-4), 144.9 (C-5), 119.7 (C-6), 25.1 (C-7), 44.6 (C-8), 40.9 (C-9), 37.0 (C-10), 77.6 (C-11), 41.0 (C-12), 48.2 (C-13), 51.5 (C-14), 35.3 (C-15), 29.0 (C-16), 50.6 (C-17), 17.1 (C-18), 26.2 (C-19), 37.3 (C-20), 19.1 (C-21), 37.4 (C-22), 25.1 (C-23), 131.0 (C-24), 139.0 (C-25), 65.6 (C-26), 58.3 (C-27), 19.8 (C-28), 27.8 (C-29), 27.2 (C-30), 106.6 (Glc-C-1), 75.6 (Glc-C-2), 79.3 (Glc-C-3), 71.6 (Glc-C-4), 78.2 (Glc-C-5), 62.8 (Glc-C-6)。光谱数据与文献比较, 确定该化合物为 Jinfushanoside A。

[0042] 化合物 4 (结构式 (II I) 表示的化合物, R=H):

[0043] 白色固体 ( 甲醇 )。ESI-MS (positive)  $m/z$ : 503 $[M+H-H_2O]^+$ , 确定分子量为 520, 化学结构式为  $C_{30}H_{48}O_7$ 。 $^1H$ -NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  0.87 (3H, s), 0.93 (3H, s), 1.04 (3H, s), 1.14 (3H, s), 1.16 (3H  $\times$  2, s), 1.26 (3H, s), 1.34 (3H, s), 3.50 (1H, ddd, 12.6, 9.0, 3.6 Hz, H-2), 2.81 (1H, d, 9.0 Hz, H-3), 5.71 (1H, brs, H-6), 2.44 (1H, d, 12.6, H-10)。 $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  ppm: 33.1 (C-1), 71.5 (C-2), 80.8 (C-3), 43.4 (C-4), 142.7 (C-5), 120.0 (C-6), 24.7 (C-7), 44.3 (C-8), 49.8 (C-9), 34.8 (C-10), 216.2 (C-11), 49.8 (C-12), 48.7 (C-13), 51.8 (C-14), 46.7 (C-15), 70.8 (C-16), 59.3 (C-17), 22.3 (C-18), 19.8 (C-19), 81.9 (C-20), 25.4 (C-21), 217.2 (C-22), 34.9 (C-23), 38.1 (C-24), 71.6 (C-25), 29.1 (C-26), 29.4 (C-27), 20.5 (C-28), 25.5 (C-29), 20.5 (C-30)。光谱数据与文献比较, 确定该化合物为雪胆乙素。

[0044] 化合物 5 (结构式 **(III)** 表示的化合物, R=Ac):

[0045] 无色柱晶(甲醇), 味苦, mp 226-228 °C, Rf 和  $^1H$ -NMR 与标准品一致, ESI-MS (positive)  $m/z$ : 580 $[M+NH_4]^+$ ; ESI-MS (negative)  $m/z$ : 561 $[M-H]^-$ .  $C_{32}H_{50}O_8$ 。与标准品的混合熔点不下降, 确定该化合物为雪胆甲素。

[0046] 表 1. 600 MHz  $^1H$ -NMR and 150 MHz  $^{13}C$ -NMR data for compounds 1-2 in  $CD_3OD$   
[0047]

Proton	1		2	
	$\delta_a$	$\delta_c$	$\delta_a$	$\delta_c$
1	103 (m), 1.80 (m)	34.7	1.94*, 1.41*	34.1
2	3.54 (ddd, 12.0, 9.6, 3.6)	71.6	3.62 (m)	83.3
3	2.85 (d, 9.6)	81.9	3.01 (d, 7.8)	81.0
4		43.4		43.3
5		142.7		142.5
6	5.73 (br s)	119.9	5.70 (m)	120.0
7	2.41 (m), 1.94 (m)	24.7	2.36*, 2.02*	24.8
8	1.98 (m)	43.9	1.94 (m)	44.0
9		49.7		49.9
10	2.48 (d, 12.6), 2.60 (d, 15.0)	34.9	2.47 (d, 13.2)	35.0
11		215.4		216.0
12	3.38 (d, 15.0)	49.6	3.30*, 2.55*	49.8
13		49.6		49.1
14		51.5		51.6
15	1.94*, 1.34*	44.3	1.95*, 1.32*	44.5
16	5.28 (t, 8.4)	75.4	5.30 (t, 7.8)	75.4
17	2.83 (d, 7.8)	55.7	2.75 (d, 7.2)	56.1
18	0.97 (s)	20.5	0.92 (s)	20.6
19	1.08 (s)	20.5	1.03 (s)	20.7
20		79.4		79.8
21	1.40 (s)	24.5	1.35 (s)	24.8
22		204.1		204.1
23	6.82 (d, 13.0)	120.5	6.74 (d, 15.6)	121.9
24	7.06 (d, 13.0)	156.4	7.06 (d, 15.6)	153.0
25		71.6		81.0
26	1.33 (s)	29.4	1.53 (s)	27.0
27	1.33 (s)	29.4	1.52 (s)	27.1
28	0.96 (s)	22.3	0.95 (s)	22.4
29	1.16 (s)	25.3	1.16 (s)	25.4
30	1.26 (s)	19.6	1.21 (s)	19.6
16-OOCCH <sub>3</sub>	1.84 (s)	172.2, 21.1	1.84 (s)	172.6, 21.9
25-OOCCH <sub>3</sub>			1.98 (s)	171.8, 21.3
<b><math>\beta</math>-D-<i>glc</i></b>				
1'			4.44 (d, 7.8)	106.0
2'			3.17	75.8
3'			3.31	78.2
4'			3.23	71.6
5'			3.18	78.2
6'			3.85, 3.67	62.9

## \*Overlapped signals

[0048] 本发明涉及一种雪胆葫芦烷型四环三萜化合物在制备治疗肺癌、结肠癌的药物方面的应用。通过下面试验说明本发明化合物的细胞毒活性。

[0049] (试验实施例 1) 对 3 种人癌细胞的体外细胞毒作用观察

[0050] 1.1 样品

[0051] 实施例 1 中所得的 5 个雪胆葫芦烷型四环三萜类化合物, 分别用二甲基亚砜 (DMSO, 终浓度 0.8%) 溶解, 用含 15% 小牛血清 RPMI1640 培养基配成 1 mg/mL 备用, 用时稀



释成所需浓度。选择注射用顺铂 (CDDP CISPLATIN FOR INJECTION) 作为阳性对照。

[0052] 1.2 细胞株

[0053] 本实验采用 3 种人癌细胞株,其中包括:

[0054] H460 (人肺腺癌)、SW-620 (人结肠癌) 和 COLO205 (人结肠癌) 细胞系,以上细胞系均在含 15% 小牛血清的 RPMI1640 培养基、置 CO<sub>2</sub>培养箱内培养。

[0055] 上述细胞株均购于中国科学院细胞库,由山东省医学科学院药物研究所药理室传代保存。

[0056] 1.3 实验方法

[0057] 采用常规 MTT 法。H460 (人肺腺癌)、SW-620 (人结肠癌) 细胞均为贴壁细胞。COLO205 (人结肠癌) 细胞为悬浮细胞。分别取 H460 (人肺腺癌)、SW-620 (人结肠癌) 指数生长期的细胞经洗涤后,用 0.25 % 胰酶消化后计数,调整细胞数为  $1 \times 10^5$ /mL 接种于 96 孔板内,每孔 0.1 mL,置 CO<sub>2</sub>孵箱内培养。培养 24h 后加样品。取 COLO 205 (人结肠癌) 细胞调整细胞数为  $2 \times 10^5$ /mL 接种于 96 孔板内,每孔 0.1 mL,置 CO<sub>2</sub>孵箱内培养。培养 24h 后加样品。作用于 H460 (人肺腺癌)、SW-620 (人结肠癌) 和 COLO205 (人结肠癌) 细胞 5 种样品最高剂量组药物浓度均为 50  $\mu$ g /mL,按 5 倍依次稀释至 0.08  $\mu$ g/mL,共 5 个剂量组。每个浓度设 3 个复孔,并设空白对照孔及 DMSO (0.8%) 对照孔。在 37  $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱内培养 48 h 后,用 MTT 方法测定 OD 值,计算细胞抑制率。

[0058] 细胞终止培养后,每孔加入 10  $\mu$ L 0.5 % MTT 置 CO<sub>2</sub>孵箱内,4 h 后取出倾去孔内液体加入 DMSO (0.2 mL/孔),充分振荡,使蓝紫色甲贲溶解,于多功能标记分析仪 570 nm 波长处记录 OD 值,采用不同浓度受试药物 3 复孔 OD 值的均值计算细胞的抑制率及 IC<sub>50</sub>。

[0059] 肿瘤细胞抑制率 =  $\frac{\text{对照组平均OD值} - \text{给药组平均OD值}}{\text{对照组平均OD值}} \times 100 \%$

[0060] 以不同药物浓度对细胞的抑制率作图可得剂量反应曲线,从中得出药物的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。

[0061] 1.4 实验结果

[0062] 雪胆葫芦烷型四环三萜化合物在体外对人肿瘤细胞生长的影响实验结果见表 2。

[0063] 5 个雪胆葫芦烷型四环三萜样品对 H460 (人肺腺癌) 作用 48 h 除样品 5 以外均有细胞毒作用。5 种样品对 SW-620 (人结肠癌) 作用 48 h 均有细胞毒作用。5 种样品对 COLO205 (人结肠癌) 作用 48 h 除样品 1 以外均有细胞毒作用。

[0064] 表 2. 雪胆葫芦烷型四环三萜在体外对人肿瘤细胞生长的影响

[0065]

Compound	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) <sup>a</sup>		
	H460	SW-620	COLO205
1	8.55 ± 0.35	6.63 ± 0.05	24.94 ± 0.90
2	3.43 ± 0.30	0.42 ± 0.09	0.44 ± 0.33
3	2.96 ± 0.11	1.99 ± 0.05	3.84 ± 0.20
4	7.09 ± 0.22	1.03 ± 0.10	0.64 ± 0.6
5	11.53 ± 0.30	1.11 ± 0.11	1.09 ± 0.21
Cisplatin	0.66 ± 0.15	2.85 ± 0.07	1.57 ± 0.13

<sup>a</sup> Means ± S.D. From three independent experiments (n=3)

<sup>b</sup> Positive control

[0066] 1.5 结论

[0067] 根据本发明人的研究,雪胆葫芦烷型四环三萜化合物抗癌效果良好,可用于制备抗肺癌或抗结肠癌药物。

[0068] (制剂实施例 1) 片剂

[0069] 按照本领域已知的方法制备片剂,每片含有下述成份:

[0070] 结构式 (I) 表示化合物 ( $R_1=H, R_2=H$ ) 2mg、

[0071] 乳糖 80mg、硬脂酸镁 10mg、聚乙烯吡咯烷酮 18mg。

[0072] (制剂实施例 2) 片剂

[0073] 按照本领域已知的方法制备片剂,每片含有下述成份:

[0074] 结构式 (I) 表示化合物 ( $R_1=\beta-D-Glc, R_2=Ac$ ) 1mg、

[0075] 结构式 (III) 表示化合物 ( $R=Ac$ ) 1mg、

[0076] 乳糖 80mg、硬脂酸镁 10mg、聚乙烯吡咯烷酮 18mg。

[0077] (制剂实施例 3) 胶囊

[0078] 按照本领域已知的方法制备胶囊,每个胶囊中含有下述成份:

[0079] 结构式 (I) 表示化合物 ( $R_1=\beta-D-Glc, R_2=Ac$ ) 1mg、

[0080] 结构式 (III) 表示化合物 ( $R=H$ ) 0.5mg、

[0081] 结构式 (II) 表示化合物 0.5mg、乳糖 85mg、

[0082] 玉米淀粉 30mg、硬脂酸镁 3mg、

[0083] 聚乙烯吡咯烷酮 10mg。

[0084] (制剂实施例 4) 胶囊

[0085] 按照本领域已知的方法制备胶囊,每个胶囊中含有下述成份:

[0086] 结构式 (I) 表示化合物 ( $R_1=\beta-D-Glc, R_2=Ac$ ) 1mg、

[0087] 结构式 (II) 表示化合物 1mg、

[0088] 乳糖 85mg、玉米淀粉 30mg、

[0089] 硬脂酸镁 3mg、聚乙烯吡咯烷酮 10mg。