

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710052731.0

[51] Int. Cl.

C07D 307/92 (2006.01)

A61K 31/343 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年1月14日

[11] 公开号 CN 101343265A

[22] 申请日 2007.7.13

[21] 申请号 200710052731.0

[71] 申请人 武汉健民中药工程有限责任公司

地址 430052 湖北省武汉市汉阳区鹦鹉大道
484号

[72] 发明人 李崇明 黄志军 熊富良 陶君彦
曾庆恢 张琼光

权利要求书2页 说明书16页 附图5页

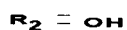
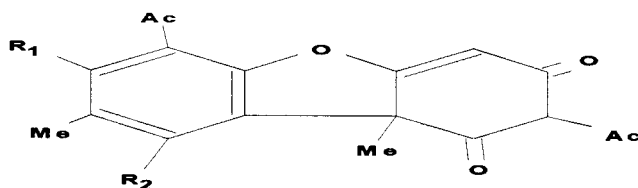
[54] 发明名称

一种含有石花有效成分的药物及其制剂

[57] 摘要

本发明公开了一种涉及从石花中提取的有效成分 C18H16O7 制成的药物。本发明制备方法主要采用石油醚、正己烷、乙酸乙酯等溶剂提取，选用极性大的溶剂除去色素，采用极性较小的溶剂重结晶，制得 C18H16O7 有效成分。具有有效成分损失小、结晶纯度高与产品收率稳定，质量好，工艺合理等优势。本发明质量检测方法能很好地控制产品的质量，并能保证产品的相关药效，更具体地说涉及一种具有抗炎、抗癌、抗病毒、防治免疫力低下相关调节作用，以及用有效成分及衍生物制成的药物制剂。

1、一种含有植物石花有效成分的药物，其特征在于所述的有效成分是从石花中提取所得的一种黄色结晶。



2、根据权利要求 1 所述的含有石花有效成分的药物，其特征在于所述石花有效成分为 $C_{18}H_{16}O_7$ 或通过其衍生所得的有效成分，($R_1 = OH$ $R_2 = OH$ 或 $R_1 = ONa$ $R_2 = ONa$)如钠盐。

3、根据权利要求 1 所述的含有植物石花有效成分药物的制备方法，其特征在于制备所述的石花有效成分通过如下步骤制得：

(1)、称取质检合格的石花，破碎，使用弱极性溶剂（优选石油醚、正己烷、环己烷、乙酸乙酯）进行提取，得到提取液。

(2)、所得到的提取液浓缩至药材体积的 1-2 倍，将浓缩液过滤，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出粗结晶。

(3)、所得初晶加入到结晶重量 4—8 倍量的沸水或低极性的溶剂中（优选石油醚、正己烷、环己烷、乙酸乙酯、乙醇）再溶解，过滤除去叶绿素类成分。

(4)、过滤后溶液用低极性的溶剂（优选溶剂石油醚、正己烷、环己烷、乙酸乙酯、乙醇）作溶解液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出淡黄色至黄色结晶。

-
- (5)、经过抽滤或精滤得到结晶，并使用重结晶所用溶剂进行清洗，通过干燥得有效成分。
- (6)、所得有效成分通过红外、核磁、单晶衍射证实是有效成分 $C_{18}H_{16}O_7$ 。
- (7)、 所得有效成分通过结构修饰得到新的有效成分、如钠盐。
- 4、含有权利要求 1 有效成分的药物，具有抗炎、抗病毒、抗癌的作用。
- 5、含有权利要求 1 有效成分的药物，具有防治免疫低下相关调节的作用。
- 6、含有权利要求 1 有效成分及其衍生物，以及在药物上可接受的载体所制成的药物组合
物，如片剂、胶囊、液体制剂、外用膏剂。

一种含有石花有效成分的药物及其制剂

技术领域

本发明公开了一种涉及从石花中提取的新的有效成分 C18H16O7 制成的药物。本发明制备方法主要采用石油醚、正己烷、乙酸乙酯等溶剂提取，选用极性大的溶剂除去色素，采用极性较小的溶剂重结晶，制得 C18H16O7 有效成分。具有有效成分损失小、结晶纯度高与产品收率稳定，质量好，工艺合理等优势。本发明质量检测方法能很好地控制产品的质量，并能保证产品的相关药效，更具体地说涉及一种具有抗炎、抗癌、抗病毒、防治免疫力低下相关调节作用，以及用有效成分及衍生物制成的药物制剂。

背景技术

石花，别名白石花，石衣、虾蟆皮，梅衣，其拉丁名为 *Parmelia saxatilis* Ach., 叶状体多皱，直径约 30 厘米，上面灰白色，边缘分列成多数不规则浅裂片，裂片先端圆形，边缘着生粉芽，平滑，微有光泽，中央针芽密生黑色，较粗糙，下面边缘部分平滑，无光泽，有假根。子器少，杯状，直径约 1 厘米成，有短柄；孢子椭圆形 1 室，无色，生于岩石及树皮上，全国各地均有分布，现代文献报道其主要含有石花酸、石花素、去甲牛皮叶酸，萨拉秦酸等，此外尚含黑酚酸甲酯等，具有清热解毒，凉血，止血，利尿，补肾、补中益气的作用，现有用其治疗子宫肌瘤、结石、增强免疫力等症。从现有文献报道中还未发现本发明中所提到的有效成分相关药物制备的报道。

炎症反应（包括促炎反应和抗炎反应）是机体对抗外来致病因素侵袭的保护性应激反应。但若过分强烈，失去控制，则可形成全身性炎症反应综合征（SIRS）和代偿性抗炎反应综合征（CARS）。随后会导致多器官功能障碍综合征（MODS）和多系统器官衰竭（MSOF）。MODS 不仅有炎症介质过度释放，而且伴有内源性抗炎介质的不足或过度释放，两者均可加重炎性损害，对机体脏器产生巨大的破坏作用，主要并发症有脓毒症、严重烧伤、急性胰腺

炎、出血性休克、外伤等临床危重症。最终导致多器官功能障碍（multiple organ dysfunction syndrome, MODS）以至死亡。

免疫系统是活生物体对外源的或内源的异质体的防御机理，产生以巨噬细胞和中性粒细胞、淋巴细胞类如 T 细胞和 B 细胞为代表的髓细胞类，这些细胞类不仅起独立作用，而且也通过胞间直接接触或可溶性因素相互起作用，统称为细胞因子，从而保持其体内平衡。防御机理如此精细地产生，以致脆弱平衡的崩溃会引起严重的病态。

免疫细胞控制机理的这一崩溃触发产生自身抗体或引起过度的免疫反应，据认为它会引起胶原蛋白疾病，全身红斑狼疮以及各种过敏性疾病。在爱滋病中，HIV 和 T 细胞的感染引起免疫系统衰退，并且这一衰退会进一步发展，此外，由于免疫平衡的丧失，由糖尿病或病毒或癌症病态的发展引起的慢性疾病也部分出现。

近年来，细胞因子生成抑制剂如环孢菌素已用于治疗上述疾病。此外，对细胞因子生成有抑制作用的甾类消剂已用于自身免疫疾病，如过敏、特应性病和风湿病和支气管哮喘，目前在中药、天然药物中，多糖和菌类植物都用于增强人体免疫系统疾病，并已有某种程度的治疗效果。

大家都知道，免疫系统对于寄生的暂时的防御机理是必不可少的，以及在免疫抑制剂或制癌剂引起的免疫缺陷条件下，宿主易于受到传染病的侵袭。现在，用于抑制各种细胞因子产生的一种药物如免疫制剂或制癌剂给药引起的免疫缺陷条件下，宿主易于受到传染病的侵袭。现在，用于抑制各种细胞因子产生的一种药物如免疫制剂或甾类消炎剂不能随意用于自身免疫疾病，它以给药方式或给药间隔受到限制。为了治疗与上述免疫系统有关的疾病，因此需要开发一种既有免疫作用又可用于消炎、抗癌制剂。

发明内容

本发明的目的是制备一种有高度专一性和高度安全性的既有免疫作用又可用于消炎的药物制剂，这通过对广泛有免疫作用中药和天然药的筛选，从石花中的得到一种高

效的、单一的有效成分的抗炎、抗癌、增强免疫力的药物，它通过以下方式制得，制备方式如下：

称取质检合格的石花，破碎，投入到提取罐，使用弱极性溶剂（优选石油醚、正己烷、环己烷、乙酸乙酯），溶剂用量为药材重量的 10—20 倍，加热至沸腾停止加热，提取 2 次，每次提取 2 小时，得到提取液。将提取液浓缩。

所得到的提取液浓缩至药材体积的 1-2 倍，过滤后浓缩液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出粗结晶。

所得初晶加入粗晶重量 4—8 倍量的沸水或低极性的溶剂（优选石油醚、正己烷、环己烷、乙酸乙酯、乙醇）再溶解，过滤除去叶绿素类成分。

过滤后溶液低极性的溶剂（优选溶剂石油醚、正己烷、环己烷、乙酸乙酯、乙醇）的溶解液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出淡黄色至黄色结晶。

经过抽滤或精滤得到结晶，并使用重结晶所用溶剂进行清洗，通过干燥得到有效成分，其所含有效成分的物理化学性质如下：本品为淡黄色结晶，易溶于氯仿、石油醚等有机溶剂，难溶于甲醇和水。

所得到的结晶，经高效液相证实为单一成分，进一步通过红外，氢谱、碳谱，

核磁共振、单晶衍射证实为 $C_{18}H_{16}O_7$ 结构（见附图一~六）相关数据如下。

相关数据表格

Table 1 The note of x-ray of the Figures单晶衍射数据

Table 2 1H (600 MHz) and ^{13}C (600 MHz) NMR chemical shifts for compounds in DMSO-d6
结晶的氢谱碳谱化学位移值

Table 1（表一） The note of x-ray of the figures

Sample	note	Group
10+	10 μ g/mL usnic acid+ 10 ng/mL LPS	High dose of usnic acid
5+	5 μ g/mL usnic acid+ 10 ng/mL LPS	Middle dose of usnic acid
1+	1 μ g/mL usnic acid+ 10 ng/mL LPS	Low dose of usnic acid

DM+	0.5 µg/mL DM + 10 ng/mL LPS	Positive control
APS+	100 µg/mL APS + 10 ng/mL LPS	Negative control
0+	10 ng/mL LPS	Blank control
0-	No stimulation and intervention	Normal control

Table 2 (表二) ^1H (600 MHz) and ^{13}C (600 MHz) NMR chemical shifts for compounds in CDCl_3

Position	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	31.538	2.672 (CH ₃)	2,3
2	200.582	-	
3	101.715	-	
4	198.251	-	
5	59.272	-	
6	105.423	-	
7	98.5	5.975 (=CH)	3,5,6,8
8	164.064	13.308,13.306 (=CH ₂ OH)	3,7,
9	32.354	1.76 (CH ₃)	4,5,6,10
10	157.694	-	
11	155.407	-	
12	104.163	-	
13	191.927	11.025,11.024 (=CH ₂ OH)	12,14
14	109.503	-	
15	179.579	18.85 (=CH ₂ OH)	5,11,13,16
16	7.774	2.094,2.092 (CH ₃)	13,14,15
17	202.024	-	
18	28.165	2.664 (CH ₃)	12,17

通过高效液相证实为单一成分（见附图七），其纯度达到 99% 以上。

结晶制备实施列 1

称取质检合格的石花，破碎，投入到提取罐，使用弱极性溶剂石油醚提取，溶剂用量为药材重量的 5—15 倍，加热至沸腾停止加热，提取 3 次，每次提取 2 小时，得到提取液。将提取液浓

所得到的提取液浓缩至药材体积的 1-2 倍，过滤后浓缩液，在 10 摄氏度以下，

充分静置 24—48 小时，析出粗结晶。

所得初晶加入粗晶重量 4—8 倍量的沸水或低极性的溶剂 10—70%乙醇再溶解，过滤除去叶绿素类成分。

过滤后溶液用低极性的溶剂正己烷进行溶解液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出淡黄色至黄色结晶。

经过抽滤或精滤得到结晶，并使用重结晶所用溶剂进行清洗，通过干燥得到有效成分，其所含有效成分的物理化学性质如下

结晶制备实施列 2

称取质检合格的石花，破碎，投入到提取罐，使用弱极性溶剂正己烷，溶剂用量为药材重量的 10—20 倍，加热至沸腾停止加热，提取 2 次，每次提取 2 小时，得到提取液。将提取液浓

所得到的提取液浓缩至药材体积的 1-2 倍，过滤后浓缩液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出粗结晶。

所得初晶加入粗晶重量 4—8 倍量的沸水或低极性的溶剂乙酸乙脂：正己烷 2：1 的混合溶剂除杂，过滤除去叶绿素类成分。

过滤后结晶用低极性的溶剂正己烷溶解，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出淡黄色至黄色结晶。

结晶制备实施列 3

称取质检合格的石花，破碎，投入到提取罐，使用弱极性溶剂乙酸乙脂，溶剂用量为药材重量的 18—20 倍，加热至沸腾停止加热，提取 3 次，每次提取 2 小时，得到提取液。将提取液浓

所得到的提取液浓缩至药材体积的 1-2 倍，过滤后浓缩液，在 10 摄氏度以下，

充分静置 24—48 小时，析出粗结晶。

所得初晶加入粗晶重量 4—8 倍量乙醇除杂，过滤除去叶绿素类成分。

过滤后结晶用低极性的溶剂氯仿的溶解，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出淡黄色至黄色结晶。经过抽滤或精滤得到结晶，并使用重结晶所用溶剂进行清洗，通过干燥得到有效成分。

使用高效液相检测方法：以乙腈-0.1%，磷酸（90：10）作流动相，检测波长 284，色谱柱：C18 ODS 柱子。经证实为单一成分。

结晶制备实施例 4

称取质检合格的石花，破碎，投入到提取罐，使用极性溶剂乙醇进行提取，溶剂用量为药材重量的 10—20 倍，加热至沸腾停止加热，提取 2 次，每次提取 2 小时，得到提取液。将提取液浓

所得到的提取液浓缩至药材体积的 1-2 倍，过滤后浓缩液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出粗结晶。

所得初晶加入粗晶重量 4—10 倍量的甲醇加热除杂，过滤后除去叶绿素类成分，得到结晶。

过滤后的结晶以乙酸乙酯：环己烷（比例为 3：1）混合溶剂溶解，过滤、滤液在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出黄色结晶。

高效液相检测方法：以乙腈-0.1%，磷酸（90：10）溶液为流动相，检测波长 284，色谱柱：C18 ODS 柱子，进行检测为单一成分。

实验例 1 本发明成分抗炎药效学及作用机理研究实验

一、对 LPS 刺激 RAW264.细胞的 TNF-a 的影响实验

试验材料

1、药物（结晶）：给药组，为该化合物，设计三个浓度，依次为 10ug/ml、5ug/ml、1ug/ml，自制；阴性对照药为黄芪多糖，浓度为 100ug/ml，自制；正常组为不给药组；空白对照组为只有脂多糖刺激的实验组；阳性对照组为地塞米松给药组。

RPMI-1640培养基购自Gibco公司,MTT购自AMRESCO 公司；TRIZOL Reagent购自美国Promega公司，聚合酶链反应（PCR）试剂购自日本Toyobo公司，引物及荧光探针由上海申友生物公司合成。35 mm Petri 细胞培养皿（日本Meridian Instrument 公司）、NAPCO2-5420-1 型二氧化碳式培养箱美国精密科学公司，倒置显微镜IMT-2 日本Olympus 公司LPS(*E. coli* 0127 :B8 ,Difco Lab. , 美国)，地塞米松系石家庄第一制药厂产品;其它试剂为分析纯。低温高速离心机:型号为5415D，产自德国Eppendorf公司；低温低速离心机:型号为DLBR，产自上海市离心机械研究所；超净工作台:产自苏州净化设备有限公司；紫外分光光度计:型号为752型，产自上海精密科学仪器有限公司；PCR扩增仪:型号为9600，产自美国PE公司。

2、RAW264.7 细胞，RAW264.7 细胞(小鼠腹腔巨噬细胞肿瘤细胞，华中科技大学同济医学院免疫教研室馈赠)。

二、实验方法与结果

1、各种试剂配制

- 1) 清洗液的配制:重铬酸钾360g溶于3L双蒸水中，搅拌至完全溶解，缓慢加入工业用浓硫酸600mL，搅拌散热，配制成次强酸洗液。
- 2) RPMI 1640培养基：称取10.2g RPMI—1640细胞培养基溶于1000ml新鲜双蒸水中，用NaHCO₃调节pH到7.1—7.4，加入添加物后除菌，过滤，抽滤除菌，4℃保存。
- 3) 脂多糖溶液：脂多糖用灭菌生理盐水稀释，浓度为1mg/mL，抽滤除菌。按一次实验用

量分装, 存于 -20°C 。实验时将母液用含10%小牛血清的RPMI 1640培养基稀释至100mg/mL, 再按实验要求加样, 使其终浓度为10ug/mL

4) PBS液的配制:每升PBS液含0.2g KCl, 0.2g KH_2PO_4 , 8.0g NaCl及1.56g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 抽滤除菌, 4°C 保存。

2、 药物细胞毒性实验

细胞相对增殖率用四氮唑盐(MTT) 比色法:用 96 板培养 RAW264.7 细胞(小鼠腹腔巨噬细胞肿瘤细胞, 华中科技大学同济医学院免疫教研室馈赠), 在 37°C , 5% CO_2 条件下, 用含 10%小牛血清、青霉素($1 \times 10^5 \text{u} \cdot \text{L}^{-1}$)及链霉素($100 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的 RPMI-1640 培养液传代培养, 实验用细胞均处于对数生长期。依实验要求以 $2 \times 10^8 \text{ cells/ L}$ 在 96 孔板中培养 24 h, 待细胞贴壁, 弃上清, 用 Hanks 液洗 3 遍, 加入不同浓度石花结晶(浸提液浓度分别为 1%、5%、10%、15%、20%、30%), 阴性对照用 DMEM 培养液, 分别于 24h、48h 及 72h, 经 5mg/ml MTT

TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 是目前比较明确的出现于炎症反应的常见炎症因子。因此我们首先观察这几种不同黄色晶体对LPS刺激RAW264.7细胞后产生的促炎症因子是否有降低的调节作用, 采用酶联免疫法测定相应含量。

结果从图 2 到图 4, 细胞被 LPS 和石花结晶干预后, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的含量比 LPS 单独刺激的细胞中要明显降低($p < 0.01$ or $p < 0.05$).同时, 随着提石花结晶量的增加, 其抑制作用也增强, 显示提取物的药理作用与剂量有正相关性。但是这些分泌的炎症介质和因子不能恢复到正常水平, 表明药物具有维持抗炎作用。(见附图八)

药效实验二、

A、干预前 B、干预后, (见附图八)

结果证明药物在该浓度下没有细胞毒性。

活性评价

1) 细胞培养及刺激条件

在上述没有细胞毒性的药物浓度下进行药物干预效果实验。

RAW264.7细胞(小鼠腹腔巨噬细胞肿瘤细胞, 华中科技大学同济医学院免疫教研室馈赠),在37℃, 5%CO₂条件下,用含10%小牛血清、青霉素($1 \times 10^5 \text{u} \cdot \text{L}^{-1}$)及链霉素($100 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的RPMI-1640培养液传代培养,实验用细胞均处于对数生长期。依实验要求以 $2 \times 10^8 \text{ cells/L}$ 在24孔板中培养24h,待细胞贴壁,弃上清,用Hanks 液洗3遍,以不同提取物实验分组: 将培养的细胞分成7组(每组各3孔): PBS对照组: 培养液中加入磷酸盐缓冲液(PBS)(无任何处理); LPS对照组: 培养液中加入10ng/ml的LPS; LPS+不同浓度药物处理组(3组)、LPS+水处理组。培养24 h 后采用RT-PCR 方法检测TNF- α mRNA 含量。

2) 总RNA 提取

根据 MTT 实验结果,以每组药物出现细胞毒性的最小剂量作为筛选评价试验的最高剂量,干预细胞,然后按照实验要求培养,规定时间下样。用 Trizol (美国 Gibco 公司)按操作说明提取细胞总 RNA,用无 RNA 酶的 DNA 酶 I 消化痕量 DNA,二乙基焦碳酸(DEPC)处理水溶解 RNA。

3) RT-PCR

在 LightCycler instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)扩增仪上进行 RT-PCR。采用 FastStart DNA Master SYBR Green I 试剂合 (also from Roche),然后运用仪器自带的 LDCA 软件系统 分析实验结果。(见附图九)

注:与模型组比较: *P<0.05,**P<0.01

结果表明,药物在3个不同浓度中能降低 TNF- α 总核酸的作用。

表现出一定的抗炎活性。

实验例二、对 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 和 $IL-10$ 含量影响

(一) 试验材料

药物: RAW264.7 细胞 (购买于中国菌种保藏中心,) RPMI1640 培养基购自 Gibico 公司 (Grand Island, NY). 脂多糖 (*Escherichia coli* O111:B4) 和 methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) were obtained 购自 Sigma 公司 (St. Louis, MO). 纯化的羊抗鼠抗体 HO-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN), 纯化的羊抗鼠抗体 COX-2、兔抗鼠抗体 NF- κ B and I- κ B 购买于 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). 小鼠 $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ and $IL-6$ 酶联免疫反应检测试剂盒购买于 Quantikine, R&D Systems (Minneapolis, MN), Griess reagent NO 分析试剂盒购买于碧云天生物科技公司 (中国江苏); 鼠源性 $IL-10$ ELISA 试剂盒购买于 Bender Medsystem (Vienna, Austria). 地塞米松, 氟美松 (*Dexamethasone*, 抗炎药阳性对照药 (地塞米松系石家庄第一制药厂产品))。

(二) 实验方法

采用 sandwich ELISA 方法测定 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 和 $IL-10$ 的含量。经过 24 小时的干预后, 收集上清液并以 Microplate reader 读取 450nm 波长处的吸光度值, 用相应的 ELISA 试剂盒说明书操作并根据标准曲线计算, $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 和 $IL-6$ 的含量, 绘制图表, 进行组间比较。

(三) 实验结果

$TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 和 $IL-6$ 是目前比较明确的出现于炎症反应的常见炎症因子。因此我们首先观察这几种不同提取物和白色晶体对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后产生的促炎症因子是否有降低的调节作用, 采用酶联免疫法测定相应含量。

结果细胞被 LPS 和石花结晶干预后, $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 和 $IL-6$ 的含量比 LPS 单独刺激的细胞中要明显降低 ($p < 0.01$ or $p < 0.05$). 同时, 随着提取物浓度的增加, 其抑制作用也增

强,显示石花结晶的药理作用与剂量有正相关性。但是这些分泌的炎症介质和因子不能恢复到正常水平,表明药物具有维持抗炎作用,见(附图十、十一)

实验例三

实验材料

同上。

(一) 实验方法

用细胞裂解液(150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris, pH 7.5, 1% NP-40, 0.25%去氧胆酸钠, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF), 1 mmol/L NaVO₄, 2 mmol/L EGTA, 50 µg/ml 亮抑酶肽)冰上孵育裂解细胞 20 min, 将匀浆于 10 000 r/min, 4℃离心 5 min。BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司)定量后,各取 50 µg 蛋白于 10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,转膜至 PVDF 膜(美国 Millipore 公司),含 5%脱脂奶的 PBST(含 0.01% 吐温-20 的 PBS)封闭液室温下振荡 2 h,抗碳酞酶 II 的抗体(1:【KG-*2】1000)(美国 Santa Cruz 公司)孵育 3 h,含辣根过氧化物酶标记二抗(1:5000)(美国 Santa Cruz 公司)孵育 1 h, PBST 室温下漂洗 15 min 后,化学发光法显影(美国 Santa Cruz 公司)。

(二) 实验结果

采用 western blot 方法检测,发现不同提取物均能明显降低 COX-2 蛋白量(见附图十二-十三)。因此可以推断石花结晶能够在蛋白水平上抑制环氧化物酶-2 的产生。其抗炎作用可能与此也相关。

从图 10—11 看出,HO-1 的核酸 LPS 刺激后与正常细胞对比没有显著性差别,表明其是炎症后期产生的细胞因子。不同石花结晶刺激组、地塞米松组和黄芪多糖(APS)组均比单独 LPS 刺激组和正常细胞组的核酸和蛋白质含量要高(p<0.05)。同时,石花结晶浓度越高时,HO-1 的核酸含量表达量越大,表明石花结晶能够增强抗炎作用。同时通过从图 12—13 可以看出,不同石花结晶均能显著性增加 HO-1 的蛋白质表达量。从这些结

果来看, 这些石花结晶够从蛋白水平上控制抗炎因子的分泌。

实验四、对 NF- κ B 和 I- κ B 的影响实验

(一) 试验材料

1. 同上。

(二) 实验方法

参考文献, 免疫组织化学的方法。先固定细胞, 而后染色, 在显微镜下选择任意 5 个视野观察。

(三) 实验结果

文献显示 NF- κ B 激活是调节 LPS 刺激巨噬细胞中产生的 NOS 和 COX-2 等细胞因子的关键因子。本文采用免疫组织化学的方法进行了分析, 从图 10—11 可以看出, 不同提取物均能明显抑制 NF- κ B 活性。结合上面的实验结果来看, 并根据炎症反应中各细胞因子的调控过程看, 黄色结晶对于 IL-1 β 、TNF- α 、iNOS 和 COX-2 的影响可能通过抑制 NF- κ B 的活性达到的。

文献报道, LPS 刺激的细胞中 I- κ B 蛋白含量降低在 NF- κ B 激活表达中具有关键作用。目前已经证实 NF- κ B 没有激活时与 I- κ B 是结合在一起的, 但是当 NF- κ B 被激活时, I- κ B 会和 NF- κ B 分离。因此测定细胞中 I- κ B 的含量能够反映 NF- κ B 的激活状态。从免疫组织化学图的结果看出, 不同石花结晶均可以明显抑制 I- κ B 的产生 ($p < 0.05$)。这些结果表明, RAW264.7 细胞被 LPS 和石花结晶的不同刺激 24 小时后, 结晶仍然有良好的抗炎效果, 说明这些物质可能具有长期的抗炎作用。

实验五、对肿瘤细胞生长周期影响实验

正常细胞细胞转变成癌细胞与细胞周期密切相关, 肿瘤细胞始终处于增殖状态不能进入静止其, 以石化结晶对 ECCS, Hela, L1210 增殖的抑制作用, 并采用流式细胞仪

分析石化结晶对上述细胞细胞周期的影响，结果显示经石化结晶处理过 ECCS, Hela, L1210, 细胞停留在 G₀-G₁ 期，S 期细胞数明显减少。以石化结晶在不影响 cylinA, cylinE 的情况下选择性的抑制了 cylinB1 蛋白，导致 CDC2 激酶活性完全抑制，使细胞停留在 G₁ 期。证明有抑制癌细胞增长的作用。

药物制备实施列 1

称取质检合格的石花，破碎，投入到提取罐，使用弱极性溶剂正己烷，溶剂用量为药材重量的 10—20 倍，加热至沸腾停止加热，提取 2 次，每次提取 2 小时，得到提取液。

所得到的提取液浓缩至药材体积的 1-2 倍，过滤后浓缩液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出粗结晶。

所得初晶加入粗晶重量 4—8 倍量的低极性的溶剂石油迷、正己烷再溶解，过滤除去叶绿素类成分。

过滤后溶液低极性的溶剂石油迷、正己烷的溶解液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出淡黄色至黄色结晶。

结晶粉碎后加入微晶纤维素以 1.6: 1 比例混匀，加入 50% 乙醇, 制成软材, 制粒, 再加入羧甲基淀粉钠、硬酯酸镁，压片，包薄膜衣，即得薄膜衣片。

药物制备实施列 2

称取质检合格的石花，破碎，投入到提取罐，使用弱极性溶剂正己烷，溶剂用量为药材重量的 10—20 倍，加热至沸腾停止加热，提取 2 次，每次提取 2 小时，得到提取液。

所得到的提取液浓缩至药材体积的 1-2 倍，过滤后浓缩液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出粗结晶。

所得初晶加入粗晶重量 4—8 倍量的沸水再溶解，过滤除去叶绿素类成分。

过滤后溶液低极性的溶剂正己烷溶解液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出淡黄色至黄色结晶。

结晶粉碎加入淀粉：结晶以 2：1 比例混匀，加入 40%乙醇,制成软材,制粒,再加硬酯酸镁，按照常规工艺填充胶囊，制备成临床接受的胶囊剂；

药物制备实施列 3

称取质检合格的石花，破碎，投入到提取罐，使用弱极性溶剂正己烷，溶剂用量为药材重量的 10—20 倍，加热至沸腾停止加热，提取 2 次，每次提取 2 小时，得到提取液。

所得到的提取液浓缩至药材体积的 1-2 倍，过滤后浓缩液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出粗结晶。

所得初晶加入粗晶重量 4—8 倍量的沸水或低极性的溶剂乙酸乙脂、乙醇再溶解，过滤除去叶绿素类成分。

过滤后溶液低极性的溶剂乙酸乙脂、乙醇的溶解液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出淡黄色至黄色结晶。

结晶粉碎加入微晶纤维素、羧甲基淀粉钠以一定比例混匀，加入 60%乙醇,制成软材,制粒,再加入微粉硅胶，压片，即得分散片；

药物制备实施列 4

称取质检合格的石花，破碎，投入到提取罐，使用弱极性溶剂乙酸乙酯，溶剂用量为药材重量的 10—20 倍，加热至沸腾停止加热，提取 2 次，每次提取 2 小时，得到提取液。

所得到的提取液浓缩至药材体积的 1-2 倍，过滤后浓缩液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出粗结晶。

所得初晶加入粗晶重量 4—8 倍量的沸水再溶解，过滤除去叶绿素类成分。

过滤后溶液低极性的溶剂乙酸乙脂的溶解液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出淡黄色至黄色结晶。

结晶粉碎加入可溶性淀粉以 1.5: 1 比例混匀，加入淀粉浆或聚乙烯吡咯烷酮为粘合剂，喷雾制粒，包缓释薄膜衣，再加硬酯酸镁，按照常规工艺填充胶囊，制备成临床接受的缓释胶囊剂；

药物制备实施列 5

称取质检合格的石花，破碎，投入到提取罐，使用弱极性溶剂正己烷，溶剂用量为药材重量的 10—20 倍，加热至沸腾停止加热，提取 2 次，每次提取 2 小时，得到提取液。

所得到的提取液浓缩至药材体积的 1-2 倍，过滤后浓缩液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出粗结晶。

所得初晶加入粗晶重量 4—8 倍量的低极性的溶剂正己烷：乙酸乙脂（2：1）再溶解，过滤除去叶绿素类成分。

过滤后溶液低极性的溶剂乙酸乙脂的溶解液，在 10 摄氏度以下，充分静置 24—48 小时，析出淡黄色至黄色结晶。结晶物加入一定比例的氢氧化钠溶解，加热并加入一定比例的乙酸乙脂、 CCL_4 按不同的方法反应制备衍生物，并得到结晶钠盐。

结晶粉碎加入淀粉以 2: 1 比例混匀，加入 40% 乙醇，制成软材，制粒，再加硬酯酸镁，按照常规工艺填充胶囊，制备成临床接受的胶囊剂；

药物制备实施列 6

称取质检合格的石花，破碎，投入到提取罐，使用弱极性溶剂正己烷，溶剂用量为药材重量的 10—20 倍，加热至沸腾停止加热，提取 2 次，每次提取 2 小时，得到

提取液。

将所得到的提取液浓缩至药材体积的 1-2 倍, 过滤后浓缩液, 在 10 摄氏度以下, 充分静置 24—48 小时, 析出粗结晶。

所得初晶加入粗晶重量 4—8 倍量的沸水或低极性的溶剂乙酸乙脂再溶解, 过滤除去叶绿素类成分。

过滤后溶液低极性的溶剂乙酸乙脂的溶解液, 在 10 摄氏度以下, 充分静置 24—48 小时, 析出淡黄色至黄色结晶。结晶物加入一定比例的碳酸氢钠溶解, 加热并加入一定比例的乙酸乙脂、按不同的方法加热反应制备衍生物, 所得沉淀使用乙醇重结晶, 并得到结晶钠盐。

结晶钠盐粉碎加入硬脂酸、羊毛脂、液状石蜡、甘油以不同比例混匀, 加入适量蒸馏水, 制成软膏, 按照常规工艺, 制备成临床接受的软膏剂;

药物制备实施列 7

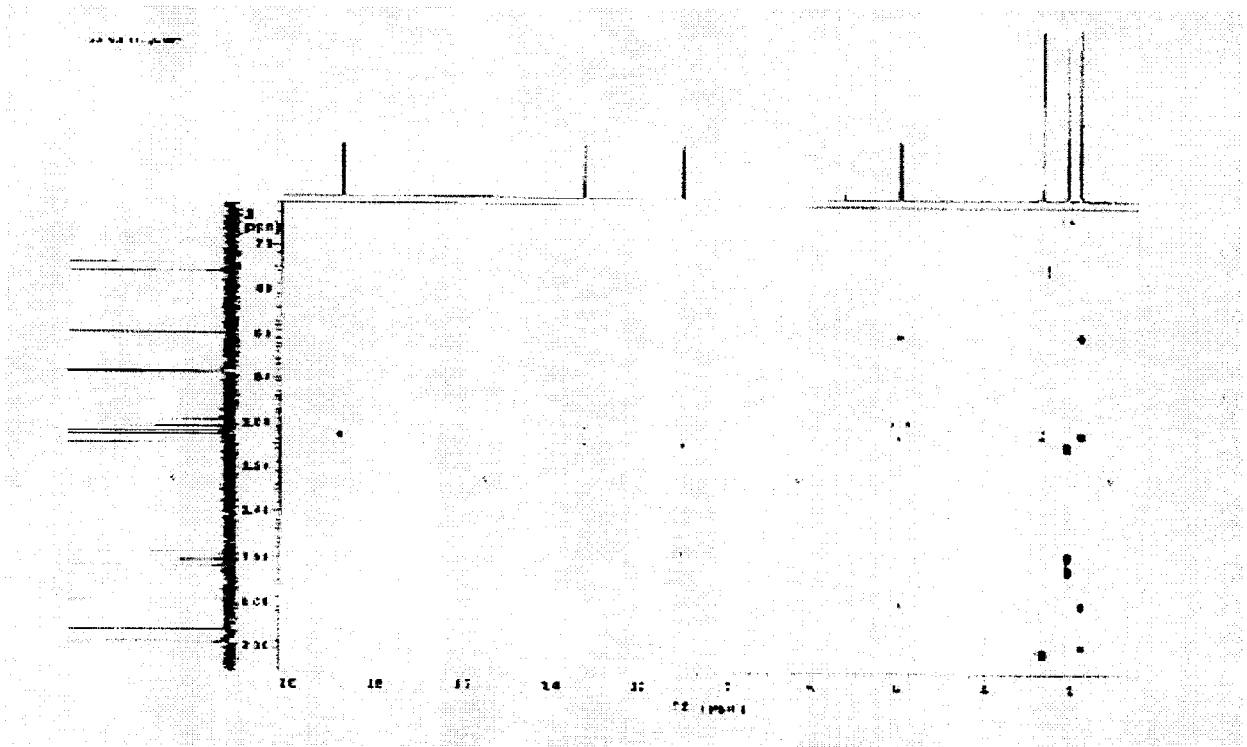
称取质检合格的石花, 破碎, 投入到提取罐, 使用弱极性溶剂正己烷, 溶剂用量为药材重量的 10—20 倍, 加热至沸腾停止加热, 提取 2 次, 每次提取 2 小时, 得到提取液。将所得到的提取液浓缩至药材体积的 1-2 倍, 过滤后浓缩液, 在 10 摄氏度以下, 充分静置 24—48 小时, 析出粗结晶。

所得初晶加入粗晶重量 4—8 倍量的沸水再溶解, 过滤除去叶绿素类成分。

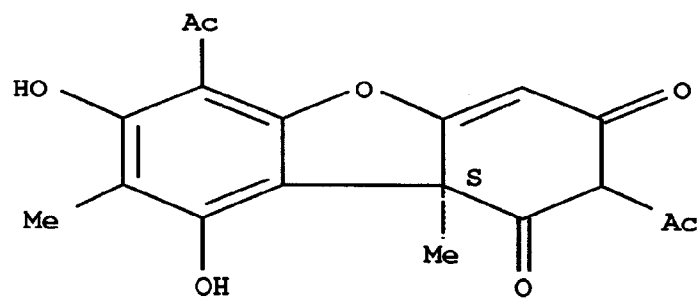
过滤后溶液低极性的溶剂乙酸乙脂的溶解液, 在 10 摄氏度以下, 充分静置 24—48 小时, 析出淡黄色至黄色结晶。结晶物加入一定比例的碳酸氢钠溶解, 加热并加入一定比例的乙酸乙脂、按不同的方法加热反应制备衍生物, 所得沉淀使用乙醇重结晶, 并得到结晶钠盐。

结晶钠盐粉碎加入的混悬剂, 按不同比例混匀, 加入适量蒸馏水, 制成药用液体, 按照常规工艺, 制备成临床接受的用于消炎的液体制剂。

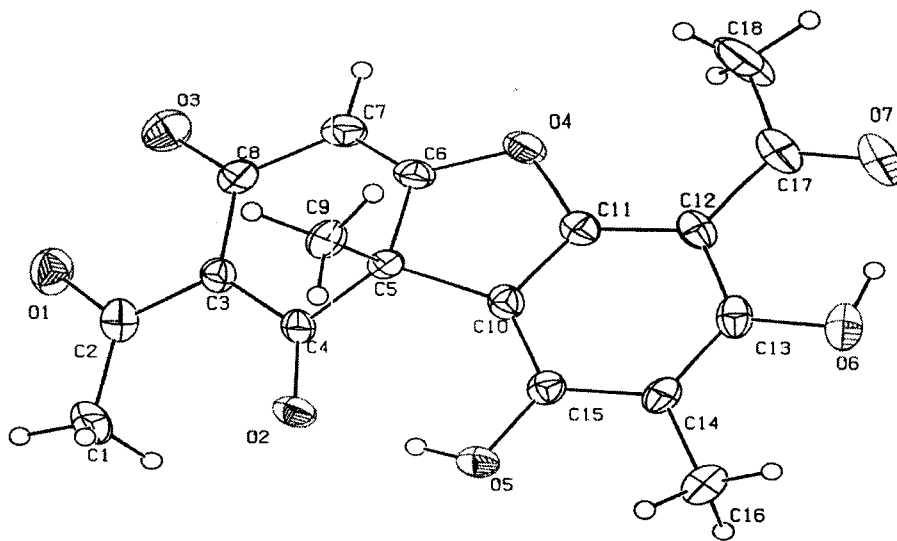
HMBC (图四)



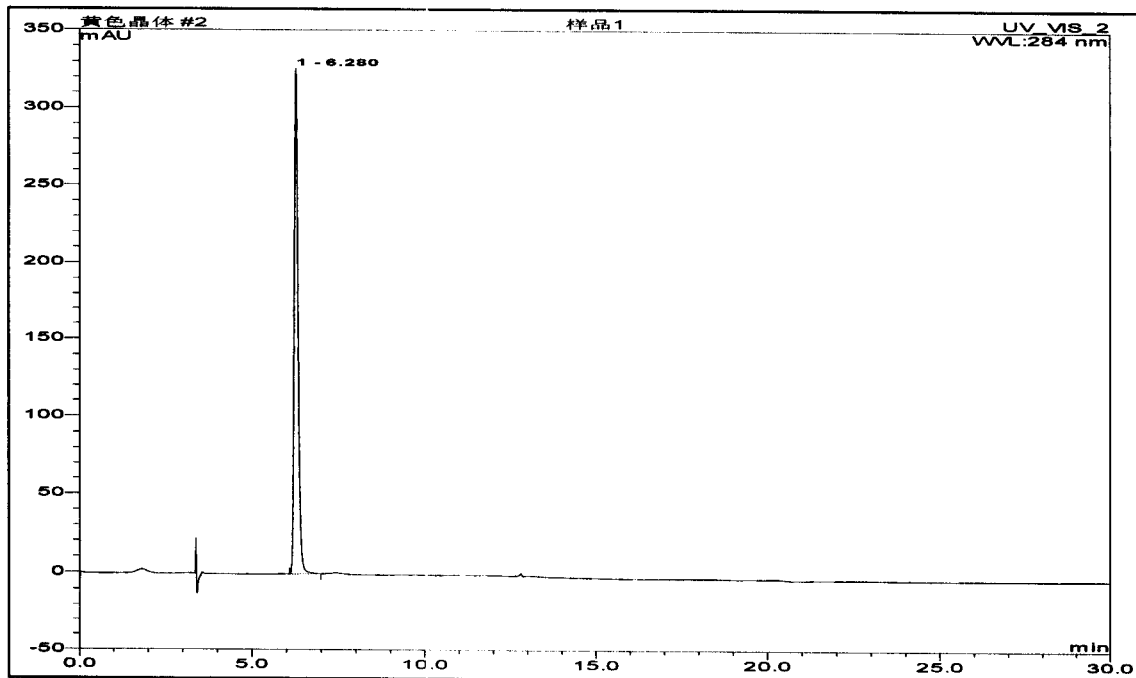
所得结晶结构式图 (图五)



所得结晶单晶衍射 (图六)



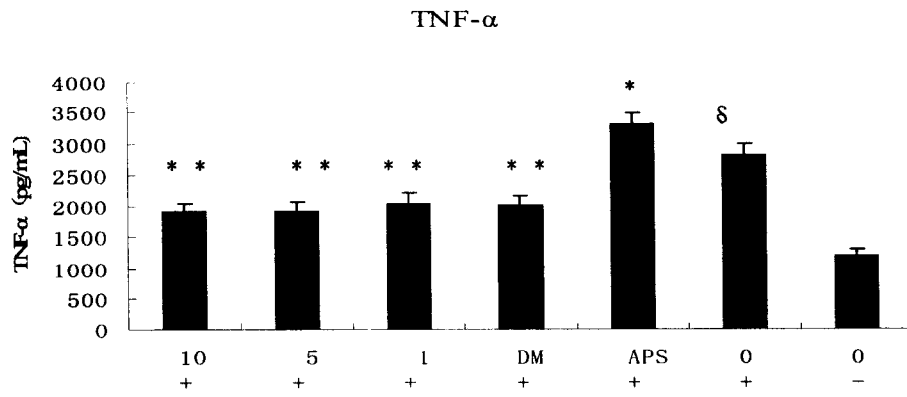
高效液相检测图 (图七)



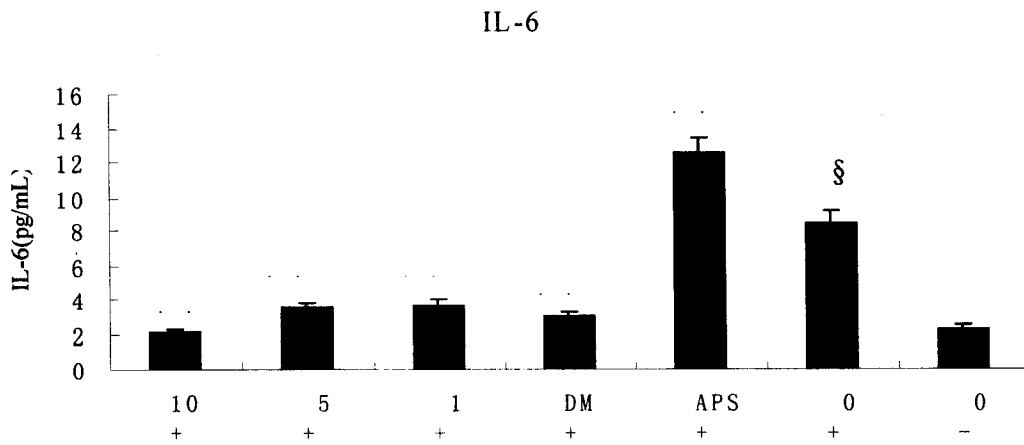
图八



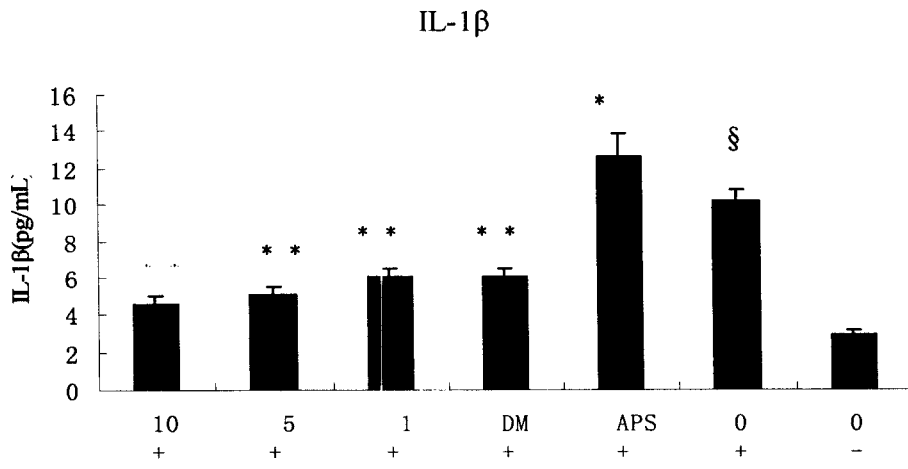
图九



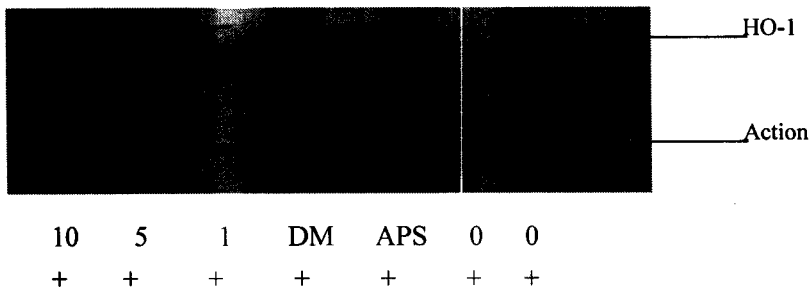
图十



图十一



图十二



图十三

