



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103127061 A

(43) 申请公布日 2013.06.05

(21) 申请号 201110386984.8

(22) 申请日 2011.11.28

(71) 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路 220 号

(72) 发明人 余龙 朱恒锐 刘祖龙 胡立宏

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

A61K 31/365(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

银线草醇 M 的药物用途

(57) 摘要

本发明属于化工领域及医药领域,涉及银线草醇 M 在制备抗肿瘤药物中的应用。本发明提供了银线草醇 M 在制备抗肿瘤药物中的应用,所述的肿瘤细胞包括肝癌细胞、宫颈癌、白血病和胰腺癌细胞。银线草醇 M 属于天然产物,毒副作用较小、生物利用度较高、性质稳定,具有临床使用价值。本发明的小分子化合物作为新的抗肿瘤药物或者其辅助成分进行开发,抑瘤效果明显,绿色环保,将为治疗和治愈肿瘤提供了一种新的途径和手段。

1. 银线草醇 M 在制备抗肿瘤药物中的应用。
2. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述的肿瘤是肝癌、宫颈癌、白血病或者胰腺癌。
3. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述的抗肿瘤药物是抗肝癌药物。
4. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述的抗肿瘤药物是抗胰腺癌药物。
5. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述的抗肿瘤药物的剂型是针剂、片剂或者胶囊。
6. 一种抑制体外肿瘤细胞增殖的方法,其特征在于,将银线草醇 M 加入肿瘤细胞的培养液中。
7. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述的肿瘤细胞是肝癌细胞、宫颈癌细胞、白血病细胞或者胰腺癌细胞。
8. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,加入银线草醇 M 的终浓度为 0.1-50  $\mu$ M。
9. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,加入银线草醇 M 的终浓度为 1-15  $\mu$ M。
10. 一种抗肿瘤药物,其特征在于,所述的抗肿瘤药物的活性成分是银线草醇 M。
11. 如权利要求 10 所述的抗肿瘤药物,其特征在于,所述的肿瘤是肝癌、宫颈癌、白血病或者胰腺癌。

## 银线草醇 M 的药物用途

### 技术领域

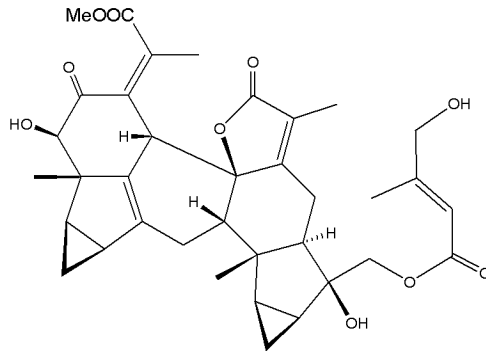
[0001] 本发明属于化工领域及医药领域,涉及银线草醇 M 在制备抗肿瘤药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 银线草为金粟兰科植物银线草 (*Chloranthus Japonicus* Sieb) 的全草或根及根茎。倍半萜类化合物是金粟兰科植物中比较重要的一类化合物,在整个金粟兰科植物中均有分布,具有消炎解痉、抑制微生物等生物活性。银线草中得到半萜类化合物结构复杂其骨架可分为桉叶烷型、环桉烷型、吉马烷型、菖蒲烷型等数种类型,同时它们具有内酯、酮、醇、多聚体等多种形式。

[0003] 银线草醇 M,其结构式如下:

[0004]



[0005] 2008年,Wang 等从丝穗金粟兰中提取了银线草醇 M,并详细解析了其结构 (化合物 3,Lindenane Sesquiterpene Dimers from *Chloranthus fortunei*.,*Journal of Natural Products*,71(4),674-677.,2008)。但是关于其功能的研究报道较少。

[0006] 银线草醇 M 是天然产物,生物利用度较高、性质较稳定,具有临床使用价值。随着人们对此类化合物的化学和生物学的深入,其分子作用机制将逐步明确,这将进一步推动此类化合物的化学结构修饰和构效关系研究,并有助于提高此类化合物的药用价值。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的是提供银线草醇 M 的药物用途。

[0008] 本发明提供了银线草醇 M 在制备抗肿瘤药物中的应用。所述的抗肿瘤药物可以是抗肝癌、白血病、胰腺癌或者宫颈癌的药物。该抗肿瘤药物可以是针剂或者片剂。

[0009] 本发明提供了一种抑制体外肿瘤细胞增殖的方法,将银线草醇 M 加入肿瘤细胞的培养液中。所述的肿瘤细胞可以是肝癌细胞、血癌细胞、宫颈癌细胞、胰腺癌细胞或者胰腺癌细胞。本发明的一个实施例中采用的肝癌细胞是 QGY 和 HepG2。一般而言,加入银线草醇 M 的终浓度为 0.1-50  $\mu$ M。例如,0.1-5  $\mu$ M,0.1-10  $\mu$ M,0.1-1  $\mu$ M,0.1-20  $\mu$ M,1-12  $\mu$ M,1-20  $\mu$ M,1-50  $\mu$ M,0.2-36  $\mu$ M,0.2-16  $\mu$ M,10-40  $\mu$ M,0.2-12  $\mu$ M,10-15  $\mu$ M,10-20  $\mu$ M,10-30  $\mu$ M,10-50  $\mu$ M,15-50  $\mu$ M,等等。

[0010] 本发明还提供了一种抗肿瘤药物,所述的抗肿瘤药物的活性成分是银线草醇 M。所

述的肿瘤可以是肝癌、胰腺癌、宫颈癌或者血癌。

[0011] 本发明的小分子化合物可以采用各种常规的制备方法制备。例如,采用人工化学合成的方法。

[0012] 利用本发明小分子化合物,通过各种常规筛选方法,可筛选出与银线草醇 M 发生相互作用的物质,如受体、抑制剂或拮抗剂等。

[0013] 本发明及其抑制剂、拮抗剂等,在治疗上进行施用(给药)时,可提供不同的效果。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中 pH 通常约为 5-8,较佳地 pH 约为 6-8, pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于):肌肉、腹膜内、皮下、皮内、或局部给药。

[0014] 以本发明的银线草醇 M 为例,可以将其与合适的药学上可接受的载体联用。这类药物组合物含有治疗有效量的化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的银线草醇 M 可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物,可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约 1 微克/千克体重-约 5 毫克/千克体重。此外,本发明的银线草醇 M 还可与其他治疗剂一起使用。

[0015] 当本发明的银线草醇 M 被用作药物时,可将治疗有效剂量的银线草醇 M 施用于哺乳动物,其中该治疗有效剂量通常至少约 10 微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约 8 毫克/千克体重,较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重-约 1 毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0016] 本发明提供了银线草醇 M 在制备抗肿瘤药物中的应用。银线草醇 M 是天然产物,副作用较小,能够明显抑制肿瘤细胞的增殖。本发明的小分子化合物作为新的抗肿瘤药物或者其辅助成分进行开发,抑瘤效果明显,绿色环保,将为治疗和治愈肿瘤提供了一种新的途径和手段。

## 具体实施方式

[0017] 实验方法:

[0018] 1. 细胞复苏

[0019] 1) 从液氮罐中取出冻存管,直接投入 37℃ 温水中,并不时摇动令其尽快融化。

[0020] 2) 从 37℃ 水浴中取出冻存管,用吸管吸出细胞悬液,注入离心管并加入 10 倍以上培养液,混合后低速离心,弃上清,再重复用培养液洗一次。

[0021] 3) 用培养液适当稀释后,接种培养瓶,放在 37℃ 培养箱静置培养,次日更换培养液,继续培养。培养至一定浓度时进行传代。PANC-1 细胞培养在含 10% Gibico 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,HELA、QGY 和 HepG2 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,培养基中含 100U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素。

[0022] 2. 细胞传代培养

[0023] 每天观察细胞生长的情况,当细胞在培养瓶中长至约 90% 汇合时传代,约每隔

2-4 天传代一次。一瓶传代成三瓶, 或一个  $25\text{cm}^2$  传代于一个  $75\text{cm}^2$  的培养瓶中。方法:

[0024] 1) 用  $1\times$  磷酸缓冲液洗涤细胞一次。

[0025] 2) 加入 2-3ml 胰酶消化液消化, 置于  $37^\circ\text{C}$  培养箱中数分钟。用手拍打细胞培养瓶, 使细胞分离。

[0026] 3) 用含 10-15% 的 Gibico 胎牛血清的合适培养基终止胰酶消化。将细胞分装于新的培养瓶中, 继续培养。

[0027] 3. 细胞冻存

[0028] 1) 取培养至对数生长期的细胞胰蛋白酶消化, 收集于离心管中并计数, 离心。

[0029] 2) 弃除胰蛋白酶及旧的培养液, 加入配置好的冻存培养液 (含 10% DMSO, 40% DMEM 和 50% Gibico 胎牛血清), 冻存液中细胞的最终浓度为  $0.5-1\times 10^7/\text{ml}$ 。用吸管轻轻吹打使细胞均匀, 然后分装入无菌冻存管中, 每管加 1-1.5ml。

[0030] 3) 将冻存管放入冻存盒置  $-80^\circ\text{C}$  速冻, 5 小时后移入液氮罐中保存。

[0031] 4. 药物准备:

[0032] 银线草醇 M 溶于 DMSO (二甲基亚砜), 配制成 100mM 或 50mM 的母液备用。

[0033] 实施例 1 MTS 法测定银线草醇 M 对肝癌细胞的生长抑制作用

[0034] HepG2 (购自 ATCC)  $3\times 10^3$ /孔接种至 96 孔板, 培养 24 小时使之贴壁后加入银线草醇 M (购自中国科学院上海药物研究所), 设 6 个浓度梯度, 每个浓度设 3 个复孔。细胞在  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 72 小时后, 倒掉培养液, 用 MTS 试剂盒 (Promega 公司) 测定细胞存活率。

[0035] 测试方法为: 将细胞用无血清培养基洗一遍, 按照  $100\ \mu\text{l}/\text{well}$  的量加入预先配制好的 MTS 显色溶液 (10ml 无血清培养基中加入 2ml 溶液 1 和  $100\ \mu\text{l}$  溶液 2, 充分混匀)。将一个没有细胞的孔设为本底孔, 用以校正溶液的背景光吸收。把细胞放入细胞培养箱中继续培养 2~4 小时, 然后用酶标仪读取光吸收值 (参考波长 630-700nm, 测定波长 490nm), 计算细胞存活率, 以测定孔光吸收值 / 对照孔光吸收值作为细胞存活率的数值。根据细胞存活率, 计算银线草醇 M 对 HepG2 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值。

[0036]  $\text{IC}_{50}$  是指被抑制一半时抑制剂的浓度。这里即为 HepG2 细胞数量为对照的一半时银线草醇 M 的浓度。 $\text{IC}_{50}$  的计算一般需要测定 5 个以上的剂量效应, 再通过曲线拟合得到函数计算而得。

[0037] 结果: 银线草醇 M 对 HepG2 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值为  $35.84\ \mu\text{M}$ 。

[0038] 用同样的方法测试 QGY 细胞 (购自中科院细胞库), 结果银线草醇 M 对 SMMC-7721 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值为约  $0.92\ \mu\text{M}$ 。

[0039] 实施例 2 银线草醇 M 对人胰腺癌细胞的生长抑制作用

[0040] 利用 cck-8 试剂盒 (日本同仁化学研究所) 检测。

[0041] 步骤:

[0042] 1) 将 PANC-1 细胞 (购自中国科学院细胞库) 均匀的种在 96 孔板里, 每孔细胞数为  $3\times 10^3$  个。

[0043] 2) 待贴壁, 过夜后加药, 加药 (银线草醇 M 浓度分别为 50、16.67、5.56、1.85、 $0.62\ \mu\text{M}$ ), 每个浓度有 3 个复孔。

[0044] 3) 培养 48 小时, 将完全培养基替换成无血清培养基与 CCK8 的混合物 (10 : 1),

于 37℃ 培养箱孵育 2 小时。

[0045] 4) 以 450nm 为测量波长, 以 650nm 为对照波长, 于酶标仪上测出读数。

[0046] 结果 : 银线草醇 M 对 PANC-1 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 11.05 μ M。

[0047] 实施例 3 银线草醇 M 对人白血病细胞的生长抑制作用

[0048] 按照实施例 2 的方法检测银线草醇 M 对 K562 细胞的作用, 结果显示银线草醇 M 对 K562 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 15.83 μ M。

[0049] 实施例 4 银线草醇 M 对人肺腺癌细胞的生长抑制作用

[0050] 按照实施例 2 的方法检测银线草醇 M 对 A549 细胞的作用, 结果显示银线草醇 M 对 A549 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 705 μ M。

[0051] 实施例 5 银线草醇 M 对人宫颈癌细胞的生长抑制作用

[0052] 按照实施例 2 的方法检测银线草醇 M 对 HELA 细胞的作用, 结果显示银线草醇 M 对 HELA 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 0.20 μ M。