



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108250167 A

(43)申请公布日 2018.07.06

(21)申请号 201810040126.X

(22)申请日 2018.01.16

(71)申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72)发明人 朱玮 韩昊特 张琳 胡瑾  
虞娇娇 杨丙贤 管祺杰 田景奎

(74)专利代理机构 杭州求是专利事务有限公司 33200

代理人 傅朝栋 张法高

(51)Int.Cl.

C07D 307/80(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C12P 17/04(2006.01)

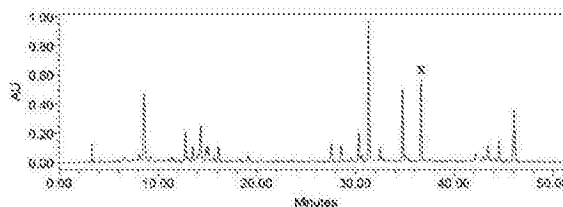
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

基于紫外诱导的桑叶中生物活性单体成分 chalconoracin 及其制备方法和用途

(57)摘要

本发明公开了一种基于紫外诱导的桑叶中生物活性单体成分 chalconoracin 及其制备方法和用途,所述制备方法包括以下步骤:(1)选取新鲜采摘桑叶,经紫外诱导,干燥,粉碎;(2)粉碎后的干燥桑叶,经脱脂、抽提、浓缩步骤获得总提物浸膏;(3)总提物浸膏再经过硅胶柱分离及 Sephadex LH-20 凝胶柱纯化,获得 chalconoracin 纯品,采用 HPLC 分析方法测定,该纯品纯度大于 85%。本发明提供的从紫外诱导后的桑叶中制备 chalconoracin 的方法技术路线经济合理,获得的产品质量可控;所述的 chalconoracin 具有显著的抗恶性肿瘤以及放疗增敏作用,作用机制新颖独特,可应用于制备新型抗肿瘤药物。



1. 一种基于紫外诱导的桑叶中生物活性单体成分chalconoracin的制备方法,其特征在于,步骤如下:

1) 将新鲜桑叶在紫外光下诱导照射,照射后的桑叶阴干或烘干;

2) 将干燥后的桑叶粉碎,加入低极性溶媒浸泡1~36小时进行脱脂,过滤,取滤渣备用;

3) 在所述滤渣中加入中等极性溶媒提取,提取液过滤,合并,回收提取溶媒,得到总提取物浸膏;

4) 取步骤3)中总提取物浸膏,加入溶媒溶解,再加入1~10倍总提取物浸膏重量的柱填料拌样,将溶媒挥干,得到拌样样品;另取10~100倍拌样样品重量的硅胶,装入色谱柱,保持径高比为1:3~30,进行梯度洗脱,收集不同流份,薄层检识,合并含有chalconoracin的流份,并回收洗脱溶媒,得到浓缩物;

5) 取步骤4)中浓缩物,溶于二氯甲烷和甲醇混合溶媒中,二氯甲烷和甲醇的混合比例为体积比99:1~1:99,经Sephadex LH-20凝胶色谱柱进行纯化,收集不同流份,薄层检识,合并含有chalconoracin的流份,回收溶媒,得到chalconoracin纯品。

2. 如权利要求1所述的基于紫外诱导的桑叶中生物活性单体成分chalconoracin的制备方法,其特征在于,将新鲜桑叶在紫外光下诱导照射的方法具体为:将新鲜采摘的桑叶经紫外光照射,紫外光为UVA波段、UVB波段、UVC波段的一种或多种组合,紫外光照射强度为10~1000W,紫外光照时间为0.05~3h,照射过程中保持湿度在10%~100%;所述的新鲜桑叶优选为4~10月份采摘的新鲜桑叶。

3. 如权利要求1所述的基于紫外诱导的桑叶中生物活性单体成分chalconoracin的制备方法,其特征在于,所述的低极性溶媒为石油醚、环己烷、苯等脂溶性溶媒中的任意一种或多种按照任意比例混合,优选60-90℃沸程的石油醚为溶媒。

4. 如权利要求1所述的基于紫外诱导的桑叶中生物活性单体成分chalconoracin的制备方法,其特征在于,所述的中等极性溶媒为乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷、四氯化碳中的一种或多种按照任意比例混合,优选乙酸乙酯作为溶媒。

5. 如权利要求1所述的基于紫外诱导的桑叶中生物活性单体成分chalconoracin的制备方法,其特征在于,所述的3)中,提取方式为浸泡、回流或超声提取方式中的任意一种,优选浸泡方式;加入的中等极性溶媒倍数为滤渣质量的1~20倍,提取时间为1~36小时,提取次数为1~10次。

6. 如权利要求1所述的基于紫外诱导的桑叶中生物活性单体成分chalconoracin的制备方法,其特征在于,所述的步骤4)中,向总提取物浸膏中加入的溶媒为甲醇或乙醇;所述的柱填料为硅胶或硅藻土;梯度洗脱采用的混合溶剂系统为二氯甲烷-甲醇、氯仿-甲醇或四氯化碳-甲醇。

7. 如权利要求1所述的基于紫外诱导的桑叶中生物活性单体成分chalconoracin的制备方法,其特征在于,所述的步骤4)和5)中,薄层色谱条件为:正向硅胶G预制板;展开剂为99:1~80:20的二氯甲烷-甲醇或氯仿-甲醇或四氯化碳-甲醇。

8. 一种由权利要求1~7任一所述制备方法制得的生物活性单体成分chalconoracin。

9. 一种如权利要求8所述生物活性单体成分chalconoracin的用途,其特征在于,用于制备抗肿瘤药物。

10. 一种如权利要求8所述生物活性单体成分chalconoracin的用途,其特征在于,用于

制备放疗增敏药物。

## 基于紫外诱导的桑叶中生物活性单体成分chalconoracin及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种基于紫外诱导的桑叶中单体成分chalconoracin (CMR)的制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 桑(Morus alba L.)是桑科桑属落叶乔木或灌木,其叶、嫩枝、根皮、果穗均可入药。桑叶为桑科植物桑的经霜干燥树叶,桑叶性味苦、感、寒,归肺、肝经,具有疏风散热,清肝明目的功效,可用于治疗风热表征温病初起,燥热咳嗽,目赤肿痛,目暗昏花等症。此外,桑叶因叶大,肉厚多汁,也是家蚕主要的食物来源。桑喜温暖湿润气候,耐寒,耐干旱,在全国各地均有种植,以浙江、江苏、四川等地居多。

[0003] 桑叶中含有多种次生代谢产物,是一种重要的药用植物,具有抗菌、抗炎作用,抗病毒、抗肿瘤作用等。发明人对桑叶进行长期研发,发现桑叶在响应紫外诱导之后,次生代谢产物发生明显改变(Gu, Xi Da, et al. "UV-B induced changes in the secondary metabolites of Morus alba L. Leaves." *Molecules*, 2010 (15): 2980-93.), 并发现喂养诱导桑叶的家蚕,能够显著降低其感染家蚕核型多角体病毒(BmNPV)之后的死亡率(朱玮等,一种防治家蚕BmNPV病的诱导桑叶及其用途, 201710252959.8, 公开号CN107114561A)。

[0004] 然而,目前的现有技术中,基于紫外诱导的CMR的制备工艺以及用途尚未明确,有待于进一步研究。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于解决现有技术中于紫外诱导的CMR的制备工艺尚未明确的技术问题,并提供一种基于紫外诱导的桑叶中生物活性单体成分chalconoracin (CMR)的制备方法。基于前期研究,申请人发现桑叶中CMR具有抗肿瘤功效,作为一种天然单体成分具有开发利用潜力,因而对其制备工艺进行深入研究,从而完成了本发明。

[0006] 本发明所采用的具体技术方案如下:

[0007] 基于紫外诱导的桑叶中生物活性单体成分chalconoracin的制备方法,其步骤如下:

[0008] 1) 将新鲜桑叶在紫外光下诱导照射,照射后的桑叶阴干或烘干;

[0009] 2) 将干燥后的桑叶粉碎,加入低极性溶媒浸泡1~36小时进行脱脂,过滤,取滤渣备用;

[0010] 3) 在所述滤渣中加入中等极性溶媒提取,提取液过滤,合并,回收提取溶媒,得到总提物浸膏;

[0011] 4) 取步骤3)中总提物浸膏,加入溶媒溶解,再加入1~10倍总提物浸膏重量的柱填料拌样,将溶媒挥干,得到拌样样品;另取10~100倍拌样样品重量的硅胶,装入色谱柱,保持径高比为1:3~30,进行梯度洗脱,收集不同流份,薄层检识,合并含有CMR的流份,并回收

洗脱溶媒,得到浓缩物;

[0012] 5)取步骤4)中浓缩物,溶于二氯甲烷和甲醇混合溶媒中,二氯甲烷和甲醇的混合比例为体积比99:1~1:99,经Sephadex LH-20凝胶色谱柱进行纯化,收集不同流份,薄层检视,合并含有CMR的流份,回收溶媒,得到CMR纯品。

[0013] 作为优选,将新鲜桑叶在紫外光下诱导照射的方法具体为:将新鲜采摘的桑叶经紫外光照射,紫外光为UVA波段、UVB波段、UVC波段的一种或多种组合,紫外光照射强度为10~1000W,紫外光照时间为0.05~3h,照射过程中保持湿度在10%~100%;所述的新鲜桑叶优选为4~10月份采摘的新鲜桑叶。该诱导方法具体可参照申请号为201710252959.8的发明专利。

[0014] 作为优选,所述的低极性溶媒为石油醚、环己烷、苯等脂溶性溶媒中的任意一种或多种按照任意比例混合,优选60~90℃沸程的石油醚为溶媒。

[0015] 作为优选,所述的中等极性溶媒为乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷、四氯化碳中的一种或多种按照任意比例混合,优选乙酸乙酯作为溶媒。

[0016] 作为优选,所述的3)中,提取方式为浸泡、回流或超声提取方式中的任意一种,优选浸泡方式;加入的中等极性溶媒倍数为滤渣质量的1~20倍,提取时间为1~36小时,提取次数为1~10次。

[0017] 作为优选,所述的步骤4)中,向总提物浸膏中加入的溶媒为甲醇或乙醇;所述的柱填料为硅胶或硅藻土;梯度洗脱采用的混合溶剂系统为二氯甲烷-甲醇、氯仿-甲醇或四氯化碳-甲醇。

[0018] 作为优选,所述的步骤4)和5)中,薄层色谱条件为:正向硅胶G预制板:展开剂为99:1~80:20的二氯甲烷-甲醇或氯仿-甲醇或四氯化碳-甲醇。

[0019] 本发明的另一目的在于提供一种由上述任一制备方法制得的生物活性单体成分CMR。

[0020] 本发明的另一目的在于提供一种上述生物活性单体成分CMR用于制备抗肿瘤药物或放疗增敏药物的用途。

[0021] 本发明提供的从紫外诱导后的桑叶中制备chalcomoracin的方法技术路线经济合理,获得的产品质量可控。本发明方法制备的chalcomoracin纯品,采用HPLC分析方法测定,该纯品纯度大于85%。本发明对分离得到的CMR的体内外抗肿瘤活性以及放疗增敏进行了考察。实验结果证明,CMR可有效抑制人前列腺癌细胞、人乳腺癌细胞、人肺癌细胞、人结肠癌细胞、人胃癌细胞和人肝癌细胞体外增殖;CMR腹腔注射给药(30mg/kg,55mg/kg)对雌性裸鼠异种移植乳腺癌的生长具有显著的抑制作用。因此本发明中的chalcomoracin具有显著的抗恶性肿瘤以及放疗增敏作用,作用机制新颖独特,可应用于制备新型抗肿瘤药物。

## 附图说明

[0022] 图1为实施实例1中紫外诱导桑叶提取物的液相色谱图。图中,色谱峰X为chalcomoracin。

## 具体实施方式

[0023] 本发明所述的紫外诱导桑叶提取物chalconoracin按以下实施例所表示的方法制造,所涉及到的方法是本领域的技术人员能够掌握和运用的技术手段。但以下实施例不得理解为任何意义上的对本领域发明权利要求的限制。下面结合具体实施例对本发明做进一步阐述,以便本领域技术人员可以更好地理解本发明的实质。

[0024] 实施例1:紫外诱导桑叶提取物chalconoracin的制备

[0025] 将新鲜采摘的桑叶洗净后在紫外光下(UV-B波段)照射15分钟,照射后的桑叶于60℃烘干。烘干的桑叶粉碎后,加入20倍体积的石油醚,浸泡24小时,过滤,滤渣用5倍体积的乙酸乙酯浸泡24小时,提取次数为2次,过滤,合并提取液,回收乙酸乙酯,得到总提取物浸膏。取总提取物浸膏,加入乙醇溶解,再加入2倍于总提取物浸膏重量的200目硅胶,将溶剂挥干得到拌样样品,取20倍于拌样样品重量的200目硅胶,装入色谱柱,保持径高比为1:10,以二氯甲烷-甲醇混合溶剂系统进行梯度洗脱(99:1-70:30),收集不同流份,薄层检识,合并二氯甲烷-甲醇溶剂99:1-95:5之间的流份为CMR流份,并回收溶剂,得到浓缩物。将浓缩物溶于二氯甲烷和甲醇混合溶剂(95:5)中,经Sephadex LH-20 凝胶色谱柱进行纯化,收集不同流份,薄层检识,合并含有CMR的流份,回收溶剂,得到CMR纯品。CMR的核磁数据结果如下:

[0026]  $^1\text{H NMR}$  (500MHz, methanol  $d_4$ ):  $\delta_{\text{H}}$  8.42 (1H, d,  $J=9.3\text{Hz}$ , H-14"), 7.34 (1H, d,  $J=8.1\text{Hz}$ , H-4), 7.00 (1H, d,  $J=8.0\text{Hz}$ , H-20"), 6.92 (2H, br. s, H-3, 7), 6.77 (1H, m, H-5), 6.76 (2H, br. s, H-2', 6'), 6.50 (1H, d,  $J=2.1\text{Hz}$ , H-17"), 6.42 (1H, d,  $J=9.3\text{Hz}$ , H-13"), 6.32 (1H, dd,  $J=8.0, 2.1\text{Hz}$ , H-19"), 5.77 (1H, br. s, H-2"), 5.16 (1H, t,  $J=6.9\text{Hz}$ , H-22"), 4.63 (1H, t,  $J=4.5\text{Hz}$ , H-4"), 4.11 (1H, br. s, H-3"), 3.75 (1H, t,  $J=4.5\text{Hz}$ , H-5"), 3.25 (2H, d,  $J=6.9\text{Hz}$ , H-21"), 2.52 (1H, m, H-6"), 2.21 (1H, m, H-6"), 1.93 (3H, s, H-7"), 1.70 (3H, s, H-24"), 1.56 (3H, s, H-25") .

[0027]  $^{13}\text{C NMR}$  (125MHz, methanol  $d_4$ ):  $\delta_{\text{C}}$  209.7 (C-8"), 164.6 (C-10"), 163.3 (C-12"), 157.8 (C-6, 18"), 156.6 (C-16"), 156.5 (C-3', 5'), 156.3 (C-2), 155.4 (C-7a), 133.8 (C-1"), 132.1 (C-14"), 131.5 (C-23"), 130.9 (C-1'), 128.7 (C-20"), 124.4 (C-2"), 123.1 (C-22"), 122.6 (C-3a), 121.8 (C-4, 15"), 116.6 (C-11"), 115.8 (C-4'), 113.4 (C-9"), 113.0 (C-5), 108.1 (C-13"), 107.4 (C-19"), 104.8 (C-2', 6'), 103.4 (C-17"), 101.8 (C-3), 98.3 (C-7), 47.8 (C-4"), 36.5 (C-5"), 33.1 (C-3"), 32.2 (C-6"), 25.8 (C-24"), 23.8 (C-7"), 22.2 (C-21"), 17.8 (C-25") .

[0028] 后续实施例的试验采用本实施例中获得的CMR。

[0029] 实施例2:紫外诱导桑叶提取物chalconoracin (CMR) 的抗肿瘤作用

[0030] 2.1CMR的体外抗肿瘤作用

[0031] 将人前列腺癌细胞(PC-3)和乳腺癌细胞(MDA-MB-231)以5000个/孔接种于96孔板中,实验分对照组和不同浓度的紫外诱导桑叶提取物(CMR)组,每组复6孔,接种24小时后,给药组加含有不同浓度CMR的无血清培养基100 $\mu\text{L}$ /孔,使得CMR终浓度为0、2.5、5、7.5、10 $\mu\text{M}$ ,孵育48h,MTT法检测细胞活率。实验重复三次,结果如表1和表2。

[0032] 表1紫外诱导桑叶提取物对PC-3活率的影响(均数 $\pm$ 标准差)

	concentration	cell viability (%)	IC <sub>50</sub>
[0033]	0 $\mu$ M	100.00 $\pm$ 0.00	
	2.5 $\mu$ M	99.03 $\pm$ 1.05	
	CMR 5 $\mu$ M	85.40 $\pm$ 2.24	6.95 $\mu$ M
	7.5 $\mu$ M	35.72 $\pm$ 2.44	
	10 $\mu$ M	11.66 $\pm$ 1.08	

[0034] 表2紫外诱导桑叶提取物对MDA-MB-231活率的影响 (均数 $\pm$ 标准差)

	concentration	cell viability (%)	IC <sub>50</sub>
[0035]	0 $\mu$ M	100.00 $\pm$ 0.00	
	2.5 $\mu$ M	94.97 $\pm$ 1.13	
	CMR 5 $\mu$ M	93.21 $\pm$ 2.23	7.48 $\mu$ M
	7.5 $\mu$ M	40.97 $\pm$ 1.43	
	10 $\mu$ M	15.67 $\pm$ 3.25	

[0036] 实验结果表明,CMR对人源肿瘤细胞有显著的抑制作用,48小时IC<sub>50</sub>均在10 $\mu$ M以内。

[0037] 2.2CMR体内抗肿瘤作用

[0038] 用含50%基质胶的磷酸缓冲盐溶液配制MDA-MB-231细胞悬液,取5~7周龄雌性无胸腺裸鼠,皮下注射1 $\times$ 10<sup>6</sup>个MDA-MB-231细胞/只,总体积为0.1mL。将荷瘤裸鼠(肿瘤起始平均体积122.68 $\pm$ 24.91mm<sup>3</sup>)随机分成空白对照组和CMR 给药组(低、高剂量分别为30、55mg/kg),每组6只,腹腔注射给药,每天一次,连续21天,每天测量肿瘤体积。

[0039] 结果显示在治疗期间,CMR对裸鼠并无明显毒副作用,体重保持稳定,随着治疗时间增加,CMR 30mg/kg和55mg/kg治疗组的肿瘤增长明显慢于模型组。治疗结束,CMR组的肿瘤明显小于模型对照组,抑制率为46%和54%,说明 CMR具有较好的体内抑瘤效果且毒副作用小。

[0040] 实施例3:CMR的放疗增敏作用

[0041] 将肺癌PC-9细胞悬液接种于500个/孔的6孔培养板中,将细胞分为对照组、照射组(IR组,照射剂量分别为0、1、2、4、6、8G)、CMR组(浓度为0、2.5、5、7.5、10 $\mu$ M)和IR+CMR组。照射和药物处理后继续培养两周,弃掉上清用结晶紫染色计算集落数量。按照如下公式计算:细胞存活分数(SF)=实验组克隆形成率/对照组克隆形成率,克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times$ 100%。用软件拟合计算平均致死量(D0)、准域剂量(Dq)、2Gy照射后细胞存活分数(SF2)、绘制细胞存活曲线,计算外推数(N)和放射增敏比(SER)。

[0042] 结果表明IR组和CMR+IR组的SF<sub>2</sub>、D<sub>0</sub>、D<sub>q</sub>分别为95.24、8.32、3.87和 73.85、6.28、1.4,且PC-9细胞在各照射剂量点的SF均明显低于IR组。

[0043] 实施例4:CMR的抗肿瘤作用机制

[0044] 4.1:蛋白免疫印迹实验

[0045] PC-3、LNCap和MDA-MB-231细胞接种于6cm皿中,给药CMR(4,5 和6 $\mu$ M),处理时间为48h。PBS洗涤细胞一次后,用细胞刮子将细胞刮下收集,4000rpm $\times$ 5min离心得到细胞沉淀,PBS洗一次,每20 $\mu$ L细胞压积中加入 100 $\mu$ L RIPA细胞裂解液,细胞破碎仪破碎,每次15s,13200rpm $\times$ 15min离心得到上清即为提取到的总蛋白样品。BCA法测定蛋白含量。蛋白样品

按体积比5:1加入上样缓冲液并煮沸10min。制备7.5% SDS-PAGE,对样品进行电泳分离。电泳分离后,进行湿电转移,将蛋白转至PVDF膜。PVDF膜在含5%脱脂奶粉的TBST溶液中封闭2h后,4℃孵育一抗过夜,相应二抗室温孵育2h,ECL暗室显影。

#### [0046] 4.2:瞬时转染

[0047] 实验采用Lipofectamine® 2000转染试剂盒(Life Technologies)将质粒或 siRNA导入细胞。简单的实验步骤如下:将细胞种于6孔板中,贴壁24小时后每孔加入3μg质粒或 siRNA和6μl lipofectamine 2000并作用24小时;作用完毕,加入相应浓度的CMR继续作用48小时,最后收集细胞用于蛋白免疫印迹实验。质粒Myc-PINK1和GFP-LC3购买自Addgene, siRNA-PINK1购自OriGene。

#### [0048] 4.3:共聚焦显微镜成像

[0049] 药物处理或表达转染质粒的细胞经PBS清洗后加入4%甲醛于37℃固定20分钟,用0.5% Triton X-100在室温下透化10分钟,1%BSA封闭10分钟;封闭完毕,将细胞与anti-Calreticulin抗体在4℃孵育过夜。孵育完毕,加入Alexa Fluor\_555 donkey anti-rabbit 室温孵育2小时。最后用含有DAPI的Vectashield mounting medium(Vector Laboratories)封片。最后通过Olympus FV1000共聚焦显微镜(Olympus Corp)的63×油浸镜头观察。利用Olympus SZH Zoom Stereo Microscope(Olympus Corp)进行相位对比图像采集。

#### [0050] 4.4:流式细胞术活性氧检测

[0051] 将细胞接种于96孔板中并用不同浓度的CMR作用24小时。药物作用完毕,设一组用100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理1小时的细胞为阳性对照。吸弃培养基,每孔加入200μl含10μM的CM-H2DCFDA(Life Technologies)溶液,并将细胞放于37℃二氧化碳培养箱中孵育30分钟。孵育完毕,用PBS洗净,上DTX880荧光板读数器在波长EX495/Em527下测定吸光度。

[0052] 上述Western Blot、免疫荧光实验和流式细胞术检测结果显示,CMR主要作用机制是通过促进ROS的产生,以及内质网应激蛋白GRP78和GADD153等蛋白的表达,诱导细胞质空泡化导致线粒体自噬蛋白PINK1的上调和类凋亡抑制蛋白Alix表达下降进而抑制肿瘤细胞增殖和肿瘤的生长。结果表明所述紫外诱导桑叶提取物chalconoracin具有良好的抗肿瘤活性和新颖的作用机制,因而可应用于抗相关癌症的新药研发中。

[0053] 以上所述的实施例只是本发明的典型实例,然其并非用以限制本发明。有关技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,还可以做出相应变化。例如上述细胞可应用人肺癌细胞、人结直肠癌细胞、人胃癌细胞和人肝癌细胞,药物作用浓度可增加至50μM,作用时间可考察24小时、48小时和72小时。因此凡采取等同替换或等效变换的方式所获得的技术方案,均落在本发明的保护范围内。



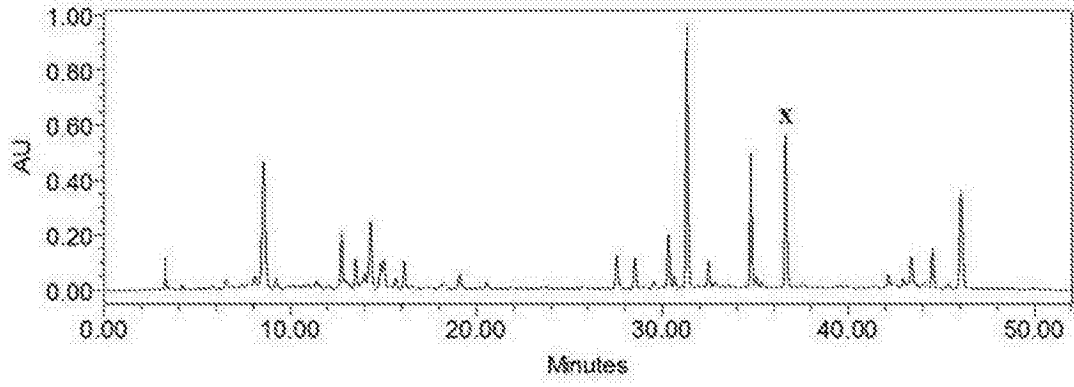


图1