

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810240461.0

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 31/11 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 5 月 20 日

[11] 公开号 CN 101433545A

[22] 申请日 2008.12.23

[21] 申请号 200810240461.0

[71] 申请人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路 5 号

[72] 发明人 蒲小平 有贺宽芳 曲伟 果德安

[74] 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司

代理人 孙皓晨 费碧华

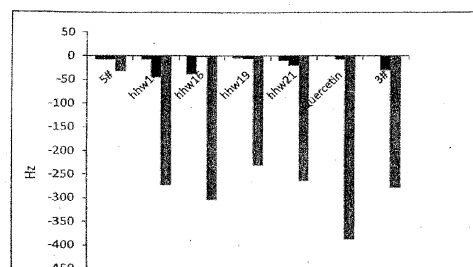
权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图 9 页

[54] 发明名称

生物类黄酮类或多酚化合物治疗帕金森病的用途

[57] 摘要

本发明公开了生物类黄酮类或多酚化合物在预防和治疗帕金森病中的用途。所述的生物类黄酮类或多酚化合物可选自山柰酚-3 氧芸香糖苷、脱水红花黄色素 B、6-羟基山柰酚-3, 6-二氧葡萄糖苷、(2S)-4', 5-二羟基-6, 7-二氧葡萄糖二氢黄酮苷、芦丁、槲皮素、香草醛或异香草醛。本发明人通过大量的实验发现, 生物类黄酮类或多酚化合物具有与帕金森病相关蛋白 DJ-1 相互作用的活性。通过进一步的实验发现: 生物类黄酮类或多酚化合物具有抗氧化应激, 防止氧化应激诱导的 PC12 细胞或原代神经细胞的凋亡, 抑制细胞内活性氧产生以及提高酪氨酸羟化酶活性等药理活性, 可用于预防或治疗帕金森病。



1、生物类黄酮类或多酚类化合物或其可药用的盐在制备治疗帕金森病的药物中的用途。

2、按照权利要求 1 所述的用途，其特征在于：所述的生物类黄酮类或多酚类化合物选自山柰酚-3 氧芸香糖苷、脱水红花黄色素 B、6-羟基山柰酚-3, 6-二氧葡萄糖苷、(2S)-4', 5-二羟基-6, 7-二氧葡萄糖二氢黄酮苷、芦丁、槲皮素、香草醛或异香草醛。

3、一种预防或治疗帕金森病的药物组合物，由有效量的生物类黄酮类或多酚类化合物或其可药用的盐与药学上可接受的载体或稀释剂组成。

4、按照权利要求 3 所述的药物组合物，其特征在于：所述的生物类黄酮类或多酚类化合物选自山柰酚-3 氧芸香糖苷、脱水红花黄色素 B、6-羟基山柰酚-3, 6-二氧葡萄糖苷、(2S)-4', 5-二羟基-6, 7-二氧葡萄糖二氢黄酮苷、芦丁、槲皮素、香草醛或异香草醛。

生物类黄酮类或多酚化合物治疗帕金森病的用途

技术领域

本发明涉及生物类黄酮类或多酚类化合物的一种新用途，尤其涉及生物类黄酮类或多酚类化合物在预防或治疗帕金森病中的用途，属于药物化学领域。

背景技术

帕金森病 (Parkinson's Disease, PD) 又名震颤麻痹，是一种常见的中老年人神经退行性疾病。PD 的主要病理改变为黑质致密部 (Substantia Nigral compacta, SNc) 多巴胺 (Dopamine, DA) 能神经元的变性，当神经元变性到达一定阈值，开始出现症状，主要表现为静止性震颤、运动迟缓和肌肉强直，此外还有步态、姿势异常，认知障碍等症状。其发病原因与中脑黑质纹状体内的多巴胺神经元的变性丢失相关。目前 PD 的确切发病机制还不明确，但已有多种学说，如：氧化应激学说、环境毒素学说、遗传因素学说等。其中，氧化应激在帕金森病的发病机制中具有重要作用。

临床上对 PD 的治疗可以分为药物治疗和手术治疗，以药物治疗为主。手术治疗的应用范围较窄，以苍白球毁损术为代表的毁损手术，由于中、远期疗效不佳，并有可能带来不可预测的并发症，如吞咽、语言和平衡障碍，目前已经基本淘汰。神经干细胞移植目前还处于实验阶段，脑深部电极刺激 (deep brain stimulation, DBS) 是治疗 PD 的最新进展，但手术后仍然要坚持药物治疗；而药物治疗基本上以缓解症状为主，尤以左旋多巴 (L-DOPA) 为最常用的治疗药物，但 L-DOPA 长期使用有许多严重副作用，如“开-关”现象、运动不能、精神障碍等，且仅为对症治疗，随着神经元变性的发展其效能逐渐减小。尽管新的腺苷 A2A 受体拮抗剂在 PD 治疗中的应用受到日益关注，但仍缺乏根治的药物。因此，研发高效低毒的新的治疗 PD 的新药显得必须而紧迫。

我国是资源丰富的中药大国，近年来报道许多中药及其有效成分均有神经保护作用，研究这些中药及其有效成分，开发出能改善 PD 症状的新药将会有广阔的应用前景。

DJ-1 基因最早由日本学者 Nagakubo 等在 1997 年发现并报道，他们发现，作为一个新的癌基因，DJ-1 的基因产物能转化小鼠 NIH3T3 细胞，并与 H-Ras 具有协同转化作用。之后，人们研究发现 DJ-1 基因突变与人类常染色体隐性遗传早发型帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 相关，此外，DJ-1 还具有抗氧化应激、分子伴侣等功能，并与肿瘤、阿尔茨海默病、亨廷顿病发生相关。

DJ-1 基因定位于人类染色体 1p36，有 8 个外显子，长 24kb。外显子 1A 和 1B 不编码，在 DJ-1 mRNA 中被可变剪切。外显子 2~7 包含开放性阅读框架 (ORF)，编码一个含 189 个氨基酸的蛋白，其分子量约为 20kD。DJ-1 蛋白以同源二聚体的形式存在，属于 DJ-1/ThiJ/PfpI 蛋白超家族，在进化中高度保守，其单体包含 8 个 α -螺旋和 11 个 β -片层。对小鼠的研究表明 DJ-1 蛋白广泛分布在脑和脂肪组织之外的外周组织，在脑中广泛表达，并在海马、小脑和嗅球中高表达。在大鼠脑中，DJ-1 在海马、皮层、纹状体中均有表达。小鼠中 DJ-1 主要分布在神经元，在胶质细胞中分布很少，而在大鼠和人中，DJ-1 主要存在于胶质细胞中，在神经元中低表达或缺失。

目前家族性 PD 与 DJ-1 的关系已经为众多文献所证明，即 DJ-1 基因突变会引起早发性 PD，患者脑内 DJ-1 蛋白也会发生结构上的变化或者在细胞器内发生位置上的迁移。而非家族性 PD 患者的 DJ-1 基因发生突变比较罕见。这一点已经为大家所公认。因为 DJ-1 具有抗氧化应激的作用，而氧化应激是引起 PD 的一个重要的诱因，因此这种作用可以被看作是机体对 PD 进程的一种自我保护的反应；另一方面，在对早发性 PD 进行的 DJ-1 外显子的筛查中，还在散发性 PD 患者发现了 DJ-1 的多种杂合性突变。此外，Masaaki Waragai 等对来自散发性 PD 病人和非 PD 病人的脑脊液 (CSF) 进行定量免疫印迹分析发现，散发性 PD 病人 CSF DJ-1 水平显著高于非 PD 对照，而 PD 早期阶段 CSF DJ-1 的上调更明显。因此 CSF DJ-1 可能是散发性 PD 早期阶段的生物标记。进一步研究表明，DJ-1 与 PD 的其他致病基因如 α -synuclein 和 Parkin 基因存在密切的关系。 α -synuclein 和 PD 的发病相关，DJ-1 不但能抑制其聚集，而且在 PD 病人

Lewy 小体的边缘与其共定位。parkin 介导的 DJ-1 蛋白稳定性的改变可能与 PD 发病有关。Goldberg 等还报道了 DJ-1 与 D_2 受体之间的关系, DJ-1 功能丧失可导致 D_2 受体介导应答的减弱。

DJ-1 的最重要的功能是抗氧化应激功能, DJ-1 蛋白是氢过氧化物反应蛋白, 能参与氧化应激反应, 降低氧化应激对机体的损伤。用 siRNA 降低神经元细胞内源 DJ-1 表达能增加氧化应激引起的细胞死亡。Taira 等也发现利用 siRNA 敲除 DJ-1 的 SH-SY5Y 细胞对过氧化氢 (H_2O_2)、1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺) 和 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 引起的细胞死亡更敏感。相反, 在大鼠多巴胺能 N27 细胞系和原代多巴胺能神经元中, 过表达野生型 (WT) DJ-1 能保护由 H_2O_2 、6-OHDA 和多巴胺 (DA) 引起的细胞死亡。Nagakubo 等研究发现在细胞 S 期, DJ-1 从细胞质移位到细胞核, 而氧化应激使之发生从细胞核向线粒体的移位, 这可能与其抗氧化应激、保护线粒体损伤的功能相关。此外, 氧化应激能诱导 DJ-1 表达, 并有研究发现, 发生氧化应激后 DJ-1 蛋白的等电点降低, 故推测 DJ-1 通过自身氧化消除氧化应激中的活性氧。在 Tomoya Kinum 等的研究中, 将人的脐静脉内皮细胞经 H_2O_2 处理, DJ-1 的三个半胱氨酸残基 (Cys) 均被氧化为半胱氨酸磺酸 (Cys-SO₃H) (sulphonic acid)。其中, Cys-46 和 Cys-53 仅一小部分被氧化, 但实验中任何浓度的 H_2O_2 均使 Cys-106 完全氧化。由此说明 Cys-106 在三个半胱氨酸残基中对氧化应激最敏感, 是 DJ-1 抗氧化应激时自身氧化的关键氨基酸残基。Wenbo Zhou 的研究也证实当 DJ-1 发生氧化时, 最先是 Cys-106 氧化为亚磺酸 (sulfinic acid, 20 DJ-1), 最后才是 Cys-46 和 Cys-53 的氧化。

DJ-1 作为药物靶点已经在一些研究中得到了应用。Masatoshi Inden 等发现将重组 DJ-1 蛋白给入左侧黑质注射 6-OHDA 的 PD 大鼠脑内, 能显著改善 PD 表型, 包括运动不能、黑质多巴胺能神经元死亡、纹状体多巴胺和多巴胺转运体水平的减少, 并能减少由去氧麻黄碱、阿扑吗啡和可卡因造成的旋转行为。Zhou 等的研究发现 DJ-1 半胱氨酸 106 位氨基酸的过氧化可以使 DJ-1 失活。而且在散发性的 PD 患者的血清中已经发现有这类氧化的 DJ-1 蛋白的存在。Shin Miyazaki 等通过虚拟筛选的方法得到与 C106 位氨基酸结合的化合物。这些化合物不仅能够阻止氧化应激诱导的

SH-SY5Y 细胞、胚胎干细胞以及原代神经元细胞的死亡, 而且在 SH-SY5Y 以及 NIH3T3 的 DJ-1 敲除的细胞系中表现出与 DJ-1 结合具有特异性。此外, 还能够抑制 ROS 的产生并能防止氧化应激引起的线粒体损伤和酪氨酸羟化酶活性的降低。并在 6-OHDA 损伤的 PD 大鼠模型中, 阻止黑质多巴胺能神经元细胞的死亡, 恢复行为异常。这些化合物的可能作用机制是阻止 DJ-1 的过氧化, 从而保护了 DJ-1 蛋白免于失活, 正常发挥其功能。

生物类黄酮(bioflavonoids) 亦称维生素 P, 常与维生素 C 伴存, 在自然界分布广泛, 属植物次级代谢产物, 是一组在结构和性质上不同的多酚化合物, 黄烷是其核心骨架, 因多呈黄色而称生物类黄酮。近年来报道类黄酮及其某些衍生物具有广泛的药理学特性, 包括抗炎、抗诱变、抗肿瘤形成与生长等活性。迄今为止, 尚没有生物类黄酮类化合物具有治疗帕金森病药理活性的报道。

发明内容

本发明人通过大量的实验发现, 生物类黄酮类或多酚化合物具有与 DJ-1 蛋白相互作用的活性, 在此基础上, 又进行了进一步的实验, 结果发现生物类黄酮类或多酚化合物均具有抗氧化应激, 防止氧化应激诱导的 PC12 细胞或原代神经细胞的凋亡, 抑制细胞内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的产生以及提高酪氨酸羟化酶的活性等特性, 上述实验结果表明, 生物类黄酮类或多酚化合物具有确切的预防或治疗帕金森病的药理活性。

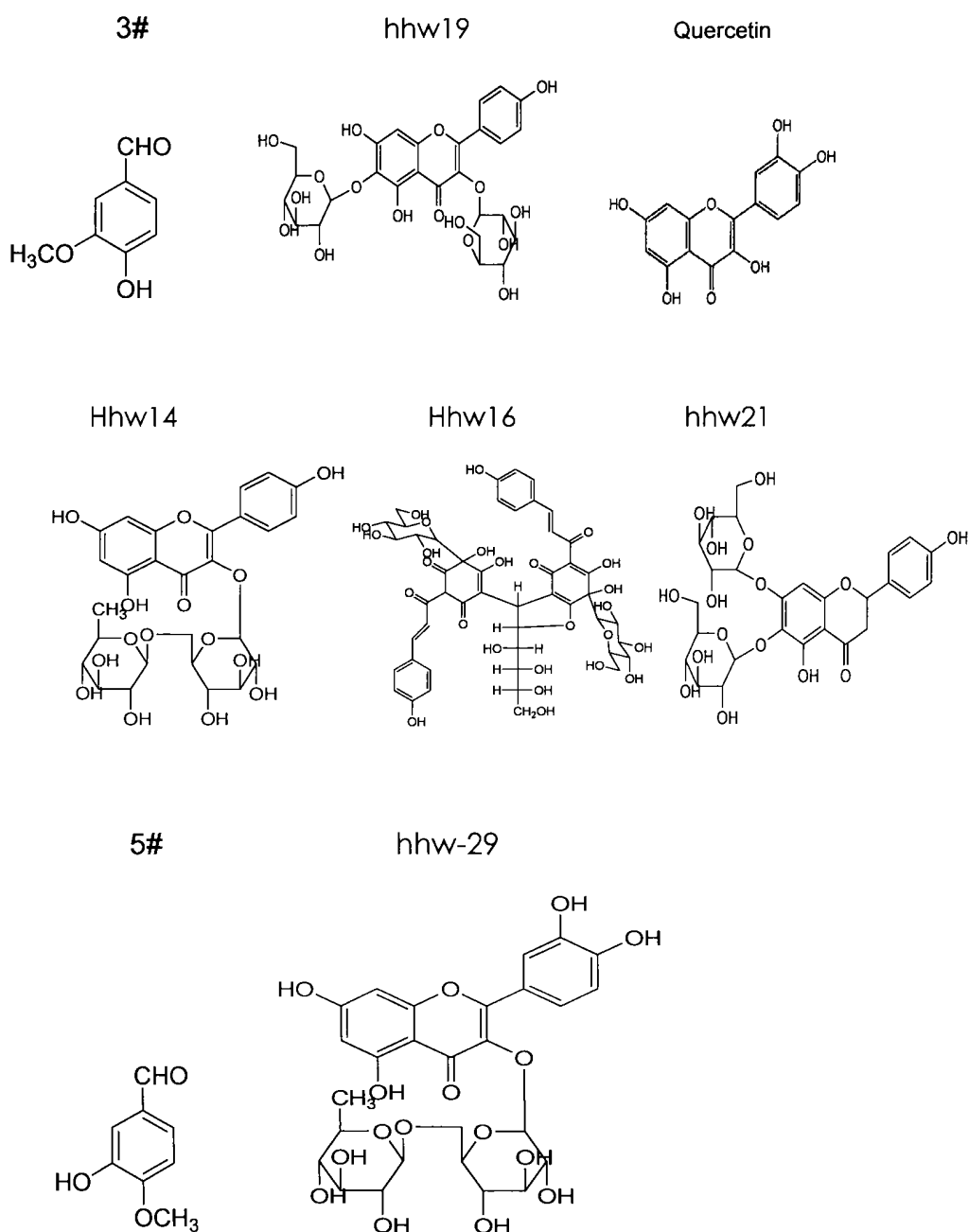
本发明人对大量的生物类黄酮类或多酚化合物进行了筛选，结果发现下述的 7 种生物类黄酮类或多酚化合物相比于其它的生物类黄酮类化合物，具有更为确切或显著的抗帕金森病的药理活性：

山柰酚-3 氧芸香糖苷 (Kaempferol 3-*O*- β -*D*-rutinoside) (代号为 hhw-14)、脱水红花黄色素 B (Anhydrosafflor yellow B) (代号为 hhw-16)、6-羟基山柰酚-3,6-二氧葡萄糖苷 (6-Hydroxykaempferol 3,6-*di-O*- β -*D*-glucoside) (代号为 hhw-19)；(2*S*)-4',5-二羟基-6,7-二氧葡萄糖二氢黄酮苷 ((2*S*)-4',5-dihydroxyl-6,7-*di-O*- β -*D*-glucopyranssyl flavanone) (代号为 hhw-21)、芦丁 (Quercetin 3-*O*- β -*D*-rutinoside) (代号为 hhw-29)、槲皮素 (quercetin)、香草醛 (代号为 3#)、异香草醛 (代号为 5#)。

当然，生物类黄酮类或多酚化合物的酸加成的盐，这些盐包括在本发明之中。

生物类黄酮类或多酚化合物的酸加成盐优选为药学上可接受的，与适当的酸（例如盐酸、醋酸、硫酸）形成无毒的盐，除了药物上可接受的盐以外，其它的盐也包括在本发明之中。

上述化合物的结构式为下式所示：



上述各化合物均可以通过商业途径购买得到，也可按照现有的文献所公开的方法制备得到。

本发明所要解决的再一个技术问题是提供一种预防或治疗帕金森病的药物组合物，该药物组合物由有效量的生物类黄酮类或多酚化合物或其可药用的盐与药学上可接受的载体配合而成，也即是说，将药学上可接受用量的生物类黄酮类或多酚化合物与药学上可接受的载体或稀释剂配合后，按本领域常规的制剂方法将其制备成任意一种适宜的药物组合物。将

有效量的生物类黄酮类化合物与药学上可接受的载体或稀释剂配合后，按本领域常规的制剂方法将其制备成任意一种适宜的药物组合物。通常该组合物适合于口服给药和注射给药，也适合其他的给药方法。该组合物可以是片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、锭剂、栓剂，或口服液等液体制剂形式。根据不同的给药方法，本发明药物组合物可以含有 0.1%-99%重量，优选 10-60%重量的生物类黄酮类或多酚化合物。

附图说明

图 1 hhw-14、hhw-16、hhw-19、hhw-21 和 hhw-29 的分离流程图；

图 2 3#化合物和 DJ-1 蛋白的相互作用试验结果；

图 3 hhw-14 化合物和 DJ-1 蛋白的相互作用试验结果；

图 4 hhw-16 化合物和 DJ-1 蛋白的相互作用试验结果；

图 5 hhw-19 化合物和 DJ-1 蛋白的相互作用试验结果；

图 6 hhw-21 化合物和 DJ-1 蛋白的相互作用试验结果；

图 7 槲皮素 (quercetin) 和 DJ-1 蛋白的相互作用试验结果；

图 8 5# 化合物和 DJ-1 蛋白的相互作用试验结果；

图 9 hhw-29 化合物和 DJ-1 蛋白的相互作用试验结果；

图 10 3#、5#、hhw-14、hhw-16、hhw-19、hhw-21 和槲皮素 (quercetin) 和 DJ-1 蛋白的相互作用试验结果；

图 11 3#、5#、hhw-14、hhw-16、hhw-19、hhw-21 和槲皮素 (quercetin) 对氧化应激诱导的 PC12 细胞凋亡的作用试验结果；

图 12 3#、5#、hhw-14、hhw-16、hhw-19、hhw-21 和槲皮素 (quercetin) 防止氧化应激诱导的原代神经细胞的凋亡试验结果；

图 13 3#、5#、hhw-14、hhw-16、hhw-19、hhw-21 和槲皮素 (quercetin) 对细胞内活性氧水平的影响试验；

图 14 3#、5#、hhw-14、hhw-16、hhw-19、hhw-21 和槲皮素 (quercetin) 对酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 的活性影响试验；

具体实施方式

下面结合具体实施例来进一步描述本发明，本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的，并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

实施例1 山柰酚-3 氧芸香糖苷、脱水红花黄色素 B、6-羟基山柰酚-3, 6-二氧葡萄糖苷、(2S)-4', 5-二羟基-6, 7-二氧葡萄糖二氢黄酮苷和芦丁的制备

1、试剂与药品

常规提取分离用乙醇、甲醇等均为分析纯试剂，制备用甲醇为色谱纯试剂，北京化工厂生产，乙腈为 Fisher 试剂 (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ)。去离子水由纯净水经 Millipore Simplicity 纯水系统制备。

大孔树脂 (AB-B) 购自天津南开大学；层析柱用凝胶 Sephadex LH-20 (25-100 μm) 为 Amersham Biosciences 公司产品，北京分公司分装；ODS 反相柱填料 (50 μm) 为 Merck 公司生产。

2、药材

红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花瓣，购自中国药材公司，产地为新疆，由北京大学药学院果德安教授鉴定。

3、提取与分离

取红花药材 560 g, 加水 14 倍浸泡过夜, 60℃温浸两次, 每次 2 小时, 合并两次提取液, 减压浓缩至一定体积约 4 升左右, 将水提物溶液减压抽滤, 澄清溶液上大孔树脂, 以水-乙醇梯度洗脱。水洗脱部分为糖及大分子蛋白质等物质, 弃去。HPLC 检测收集 10% (6 g)、30% (22 g)、50% (24 g)、70% (2.4g)、95% (0.8 g) 乙醇洗脱部分, 分别减压浓缩至一定体积后, 至于真空冷冻干燥机中冻干, 得干燥粉末, 置干燥器中, 避光阴凉处贮藏备用。取 50%乙醇部分上 Sephadex LH-20 柱, 水-甲醇梯度洗脱, HPLC 检测收集合并各流份, 半制备液相进一步纯化, 得到 hhw-14 (12 mg)、hhw-16 (130 mg)、hhw-19 (39 mg)、hhw-21 (27.6 mg)、hhw-29 (3 mg)。具体分离过程见图 1。

4、结构鉴定

(1) 山柰酚-3 氧芸香糖苷 (Kaempferol 3-*O*- β -*D*-rutinoside)
(hhw-14) 的鉴定

白色粉末, 可溶于甲醇、乙腈。分子式为 $C_{27}H_{30}O_{15}$ 。ESI-MS(*m/z*): 593([*M*-H]⁻)。H¹-NMR(500MHz,DMSO-*d*₆) δ :6.19(1H, d, *J*=2.0Hz,H-6), 6.40(1H, d, *J*=2.0Hz,H-8), 6.87(2H, d, *J*=9.0Hz,H-3',5'), 7.97(2H, d, *J*=9.0Hz,H-2',6'),显示为苯环的 AABB 系统。10.09(1H, s, 4'-OH), 10.80(1H, s, 7-OH), 12.55(1H, s, 5-OH); 3-*O*-Glc, 5.25(1H, d, *J*=8.0Hz,H-1'), 3.67(1H, bd, *J*=10.0Hz,H-6a), rhamnosyl moiety, 4.35(1H, d, *J*=2.0Hz,H-1), 0.97(3H, s, CH₃), 3.00-3.69 为糖上的氢信号。¹³C-NMR(125 MHz, DMSO-*d*₆) δ :156.4(C-2), 133.2(C-3), 177.3(C-4), 161.1(C-5), 98.6(C-6), 164.0(C-7), 93.6(C-8), 156.7(C-9), 103.9(C-10), 120.8(C-1'), 130.7(C-2',6'), 115.0(C-3',5'), 159.7(C-4'); 3-*O*-Glc, 101.3(C-1), 74.1(C-2), 76.3(C-3), 69.9(C-4), 75.7(C-5), 66.8(C-6); rhamnosyl moiety, 100.7(C-1), 70.3(C-2), 70.5(C-3), 71.8(C-4), 68.1(C-5), 17.5(C-6)。以上数据与文献 (Kazuma, Kohei;Takahashi, Takashi;Sato,

Katsura, et al. Quinochalcones and flavonoids from fresh florets in different cultivars of *Carthamus tinctorius* L. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2000, 64(8):1588-99) 报道的基本一致, 故此化合物鉴定为山柰酚-3 氧芸香糖苷。

(2) 脱水红花黄色素 B (Anhydrosafflor yellow B) (hhw-16) 的鉴定

黄色粉末, 可溶于水、甲醇、乙醇、乙腈。分子式为 $C_{48}H_{52}O_{26}$ 。ESI-MS(m/z): 1043($[M-H]^-$)。 ^{13}C -NMR(125 MHz, pyridine- d_5 /methanol- d_4 (v/v, 95:5)) δ : 197.2(C-1), 196.4(C-1'), 103.8(C-2), 114.6(C-2'), 189.2(C-3), 188.0(C-3'), 85.4(C-4), 87.2(C-4'), 184.4(C-5), 173.8(C-5'), 107.2(C-6), 109.3(C-6'), 182.5(C-7), 181.2(C-7'), 122.9(C-8), 119.3(C-8'), 140.2(C-9), 144.3(C-9'), 129.0(C-10), 128.2(C-10'), 131.0(C-11,15), 131.7(C-11',15'), 116.7(C-12,14), 116.9(C-12',14'), 160.3(C-13), 161.4(C-13'), 4-C-Glc, 86.0(C-1'), 70.9(C-2'), 79.8(C-3'), 70.6(C-4'), 80.4(C-5'), 60.7(C-6'), 4'-C-Glc, 87.3(C-1'), 69.1(C-2'), 79.5(C-3'), 71.5(C-4'), 82.2(C-5'), 62.7(C-6'), 2,2'-C-Glc, 38.3(C-1''), 95.0(C-2''), 72.4(C-3''), 72.8(C-4''), 73.1(C-5''), 65.0(C-6'')。

以上数据与文献 (Kazuma, Kohei; Takahashi, Takashi; Sato, Katsura, et al. Quinochalcones and flavonoids from fresh florets in different cultivars of *Carthamus tinctorius* L. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2000, 64(8):1588-99) 报道的基本一致, 故此化合物鉴定为脱水红花黄色素 B。

(3) 6-羟基山柰酚-3, 6-二氧葡萄糖苷 (6-Hydroxykaempferol 3, 6-di-O- β -D-glucoside) (hhw-19) 的鉴定

浅黄色粉末, 可溶于甲醇、乙醇、乙腈及水。分子式为 $C_{27}H_{30}O_{17}$ 。ESI-MS(m/z): 625($[M-H]^-$)。 H^1 -NMR(500MHz, DMSO- d_6) δ : 6.55(1H, s, H-8),

6.87(2H, d, $J=9.0\text{Hz}$, H-3',5'), 8.03(2H, d, $J=8.5\text{Hz}$, H-2',6'),显示为苯环的 AABB 系统。10.14(1H, s, 4'-OH), 12.76(1H, s, 5-OH); 3-*O*-Glc, 5.14(1H, d, $J=7.5\text{Hz}$, H-1); 6-*O*-Glc, 4.77(1H, d, $J=7.5\text{Hz}$, H-1), 3.04-3.64 为糖上的氢信号。 ^{13}C -NMR(125 MHz, DMSO- d_6) δ :157.2(C-2), 132.8(C-3), 177.7(C-4), 152.0(C-5), 128.2(C-6), 156.4(C-7), 93.9(C-8), 152.3(C-9), 105.9(C-10), 120.9(C-1'), 130.8(C-2',6'), 115.0(C-3',5'), 159.9(C-4'); 3-*O*-Glc, 100.8(C-1), 74.2(C-2), 76.4(C-3), 69.9(C-4), 77.4(C-5), 60.8(C-6); 6-*O*-Glc, 104.3(C-1), 73.8(C-2), 76.1(C-3), 69.5(C-4), 77.2(C-5), 60.7(C-6)。以上数据与文献 (Kazuma, Kohei;Takahashi, Takashi;Sato, Katsura, et al.Quinochalcones and flavonoids from fresh florets in different cultivars of *Carthamus tinctorius* L. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2000, 64(8):1588-99) 报道的基本一致, 故此化合物鉴定为 6-羟基山柰酚-3, 6-二氧葡萄糖苷。

(4) (2S)-4', 5-二羟基-6, 7-二氧葡萄糖二氢黄酮苷 ((2S)-4', 5-dihydroxyl-6, 7-di-*O*- β -*D*-glucopyranssyl flavanone) (hhw-21) 的鉴定

浅黄色粉末, 可溶于甲醇、乙醇、乙腈及水。分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$ 。ESI-MS(m/z): 611([M-H] $^-$)。 ^1H -NMR(500MHz,DMSO- d_6) δ : 6.35(1H, s, H-8), 6.79(2H, d, $J=9.0\text{Hz}$, H-3',5'), 7.31(2H, d, $J=9.0\text{Hz}$, H-2',6'),显示为苯环的 AABB 系统。5.47(1H, d, $J=9.0\text{Hz}$, H-2), 9.56(1H, s,4'-OH), 11.95(1H, s,5-OH); 6-*O*-Glc, 4.53(1H, d, $J=7.0\text{Hz}$, H-1); 7-*O*-Glc, 4.91(1H, d, $J=7.5\text{Hz}$, H-1),3.07-3.68 为糖上的氢信号。 ^{13}C -NMR(125 MHz, DMSO- d_6) δ : 78.7(C-2), 42.3(C-3), 197.5(C-4), 154.6(C-5), 126.9(C-6), 158.1(C-7), 94.8(C-8), 158.5(C-9), 103.4(C-10), 128.6(C-1'), 128.4(C-2',6'),115.0(C-3',5'); 6-*O*-Glc, 103.7 (C-1), 73.3(C-2), 75.7(C-3), 69.8(C-4), 77.1(C-5), 60.6(C-6); 7-*O*-Glc, 100.7(C-1),

74.0(C-2), 76.2(C-3), 69.8(C-4), 77.1(C-5), 60.6(C-6)。以上数据与文献 (J Asian Nat Prod Res. Two new compounds from *Carthamus tinctorius*. Zhou YZ, Chen H, Qiao L, Xu N, Cao JQ, Pei YH. 2008 May-Jun;10(5-6):429-33.) 报道的基本一致, 故此化合物鉴定为 (2S)-4', 5-二羟基-6, 7-二氧葡萄糖二氢黄酮苷。

(5) 芦丁 (Quercetin 3-O- β -D-rutinoside) (hhw-29) 的鉴定

浅黄色粉末, 可溶于甲醇、乙腈。分子式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$ 。ESI-MS(m/z): 609([M-H]⁻)。H¹-NMR(500MHz, DMSO- d_6) δ : 6.16(1H, d, $J=2.0$, H-6), 6.35(1H, d, $J=2.0$, H-8), 7.61(1H, d, $J=2.0$, H-2'), 7.57(1H, dd, $J=2.0$, 8.5, H-6'), 显示为苯环的 AABB 系统; 3-O-Glc, 5.05(1H, d, $J=7.0$, H-1), 3.75(1H, bd, $J=11.0$, H-6a), rhamnosyl moiety, 4.46(1H, s, 1-H), 3.57(1H, m, 2-H), 3.48(1H, dd, $J=3.0$, 9.0, 3-H), 1.06(3H, d, $J=6.0$, -CH₃), 3.19-3.76 为糖上的氢信号。¹³C-NMR(125 MHz, MeOH- d_4) δ : 158.2(C-2), 135.6(C-3), 179.5(C-4), 163.0(C-5), 100.0(C-6), 166.0(C-7), 94.9(C-8), 159.4(C-9), 105.7(C-10), 123.2(C-1'), 117.7(C-2'), 145.9(C-3'), 149.8(C-4'), 116.1(C-5'), 123.6(C-6'); 3-O-Glc, 104.7(C-1), 75.7(C-2), 78.2(C-3), 71.4(C-4), 77.3(C-5), 68.6(C-6); rhamnosyl moiety, 102.4(C-1), 72.1(C-2), 72.3(C-3), 73.9(C-4), 69.7(C-5), 17.9(C-6)。以上数据与文献 (Kazuma, Kohei; Takahashi, Takashi; Sato, Katsura, et al. Quinochalcones and flavonoids from fresh florets in different cultivars of *Carthamus tinctorius* L. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2000, 64(8):1588-99) 报道的基本一致, 故此化合物鉴定为芦丁。

试验例 1 生物类黄酮类化合物和 DJ-1 蛋白的相互作用试验 (QCM)

一、试验材料

1、供试化合物：山柰酚-3 氧芸香糖苷 (Kaempferol 3-*O*- β -*D*-rutinoside) (代号为 hhw-14)、脱水红花黄色素 B (Anhydrosafflor yellow B) (代号为 hhw-16)、6-羟基山柰酚-3,6-二氧葡萄糖苷 (6-Hydroxykaempferol 3,6-*di-O*- β -*D*-glucoside) (代号为 hhw-19); (2*S*)-4',5-二羟基-6,7-二氧葡萄糖二氢黄酮苷 ((2*S*)-4',5-dihydroxyl-6,7-*di-O*- β -*D*-glucopyranssyl flavanone) (代号为 hhw-21)、芦丁 (Quercetin 3-*O*- β -*D*-rutinoside) (代号为 hhw-29)、槲皮素 (quercetin)、香草醛 (代号为 3#)、异香草醛 (代号为 5#)。

山柰酚-3 氧芸香糖苷、脱水红花黄色素 B、6-羟基山柰酚-3,6-二氧葡萄糖苷、(2*S*)-4',5-二羟基-6,7-二氧葡萄糖二氢黄酮苷和芦丁按照实施例 1 的方法制备得到;槲皮素 (quercetin)、香草醛和异香草醛购自北京化学试剂厂,规格为分析纯;

2、其它化合物:氯仿; $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ (mol/mol = 1/3),DMSO.

二、试验方法

1、用 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ (mol/mol = 1/3)作为洗涤剂洗涤石英芯片,洗涤后用蒸馏水冲洗,吹打干净。

2、固定化合物:将 4ul 的 1uM 供试化合物样本溶于适量氯仿中,直到氯仿完全挥发。

3、取 8mlPBS 置于样品池中,固定石英芯片,使之浸入样品池中。

4、启动计算机,然后调整相关参数。

5、待基线平稳后,取 1mg/ml 的蛋白溶液 8ul,加入样品池,标记,记录 1h 的曲线。

6、根据得到的曲线,判断化合物是否与 DJ-1 蛋白有相互作用。

三、试验结果

试验结果见图 2-图 10。从试验结果可以看出,除了异香草醛外,其余的供试化合物均表现出与 DJ-1 蛋白的较强的相互作用的活性。

试验例 2 生物类黄酮类化合物影响氧化应激诱导的细胞凋亡作用试验

一、试验材料

1、供试化合物：山柰酚-3 氧芸香糖苷 (Kaempferol 3-*O*- β -*D*-rutinoside) (代号为 hhw-14)、脱水红花黄色素 B (Anhydrosafflor yellow B) (代号为 hhw-16)、6-羟基山柰酚-3,6-二氧葡萄糖苷 (6-Hydroxykaempferol 3,6-*di-O*- β -*D*-glucoside) (代号为 hhw-19); (2*S*)-4',5-二羟基-6,7-二氧葡萄糖二氢黄酮苷 ((2*S*)-4',5-dihydroxyl-6,7-*di-O*- β -*D*-glucopyranssyl flavanone) (代号为 hhw-21)、槲皮素、香草醛 (代号为 3#)、异香草醛 (代号为 5#)。

2、细胞株

PC12 细胞 (鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞), 北海道大学分子生物实验室提供

3、其它试剂

可高压灭菌的 RPMI1640 干粉 (Invitrogen 公司), 小牛血清 (Gibco), EDTA, H_2O_2

二、试验方法

PC12 细胞分为以下各组 (1) 空白对照组: 除了培养基外, 不加任何药物; (2) 模型组: 培养液中加入 $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$, 处理 0.5 h; (3) 给药组: 用 1 μM 供试化合物预处理 24h 后加入 $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$, 处理 0.5 h。

将细胞以 $1 \times 10^4/\text{well}$ 的密度铺入 96 孔板, 每组样本设 5 个平行孔, 每孔加入 100 μL 培养基, 培养过夜后加入化合物孵育 24h 后, 加入 H_2O_2 , 使其终浓度为 250 μM , 处理 0.5 小时后每孔加入 10 μL 的 CCK-8 培养 4 小时。使用酶标仪在 450nm 波长测量吸光度值, 未接受 H_2O_2 处理的空白对照组的吸光度

值设为100%，计算过氧化氢处理后的细胞存活率。统计学的显著性差异：

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

三、试验结果

试验结果见图11。试验结果表明，同模型组相比，除hhw21外，其余的供试化合物均具有明显的抗氧化应激作用，有显著性差异。

试验例 3 生物类黄酮类化合物防止氧化应激诱导的原代神经细胞凋亡的试验

一、试验材料

1、供试化合物：山柰酚-3 氧芸香糖苷 (Kaempferol 3- O - β -*D*-rutinoside) (代号为 hhw-14)、脱水红花黄色素 B (Anhydrosafflor yellow B) (代号为 hhw-16)、6-羟基山柰酚-3,6-二氧葡萄糖苷 (6-Hydroxykaempferol 3,6-*di-O*- β -*D*-glucoside) (代号为 hhw-19)；(2*S*)-4',5-二羟基-6,7-二氧葡萄糖二氢黄酮苷 ((2*S*)-4',5-dihydroxyl-6,7-*di-O*- β -*D*-glucopyransyl flavanone) (代号为 hhw-21)、槲皮素、香草醛 (代号为 3#)、异香草醛 (代号为 5#)。

2、实验动物：孕 17 日的 wistar 大鼠，日本北海道大学动物部提供

3、其它试剂：DMEM (Invitrogen 公司)，胎牛血清 (FBS, Gibco)；多聚赖氨酸购自 sigma 公司，0.25%胰酶，B-27。

二、试验方法

(1) 培养板的处理：96 孔培养板，每孔加入 50ug/ml 的多聚赖氨酸，孵育过夜，以 PBS 液和培养基浸洗后放培养箱待用。

(2) 将受孕 17 日的大鼠脱颈椎致死，置 75%酒精泡 2—3 秒钟，再用碘酒消毒腹部，麻醉后无菌条件下取出胎鼠，剥除胎膜放入装有冷 D-Hanks 液的无菌皿中。皿下垫冰袋。取脑，在解剖显微镜下剔除脑膜和血管，分离出纹状体。用 D-Hanks 洗 2 次，剪碎组织成约 0.5 mm × 0.5

mm . 0.5 mm 大小, 吸出组织转移到另一支装有 DMEM/Bbs 的离心管内。吹打数次, 静置后取上清, 吸到另一支离心管内。重复上述步骤。最后仍残留的小组织块弃去。所得上清吹打数次混匀, 取样进行计数, 调整细胞密度成 10000/well 种入 96 孔板, 放入含 5%CO₂ 的孵箱培养。次日后, 全量换 DMEM 和 2%B-27 的无血清培养液。以后每隔 3 天进行换液。第七日加入 1uM 供试化合物与大鼠角质层神经元细胞共孵育 24h 后, 150uM 过氧化氢处理 3h, MTT 法测定细胞的存活率。显著性差异: *p < 0.05, **p < 0.01。

三、试验结果

试验结果见图 12。试验结果表明, 化合物 3#, 5#, hhw19, hhw14, hhw16 和 quercetin 均能显著防止氧化应激诱导的原代神经细胞的凋亡。

试验例4 生物类黄酮类化合物抑制细胞内活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的活性试验

一、试验材料

1、供试化合物: 山柰酚-3 氧芸香糖苷 (Kaempferol 3-*O*- β -*D*-rutinoside) (代号为 hhw-14)、脱水红花黄色素 B (Anhydrosafflor yellow B) (代号为 hhw-16)、6-羟基山柰酚-3, 6-二氧葡萄糖苷 (6-Hydroxykaempferol 3, 6-*di-O*- β -*D*-glucoside) (代号为 hhw-19); (2*S*)-4', 5-二羟基-6, 7-二氧葡萄糖二氢黄酮苷 ((2*S*)-4', 5-dihydroxyl-6, 7-*di-O*- β -*D*-glucopyransyl flavanone) (代号为 hhw-21)、槲皮素、香草醛 (代号为 3#)、异香草醛 (代号为 5#)。

2、细胞: PC12细胞;

3、其它试剂: DCFH-DA (sigma), DAPI (sigma)

二、试验方法

将细胞以 2×10^5 的密度铺入 6 孔板, 培养 24 小时后, 与 1 μ M 供试化合物孵育 10min 后加入 H_2O_2 , 使其终浓度为 0.1 mM, 处理 3 小时后弃去培养基, 用 PBS 洗涤两次后加入终浓度为 5 μ mol/L 的 DCFH-DA 共同孵育 30 分钟。吸去 DCFH-DA 后细胞再用 PBS 洗涤两次, DAPI 染色后, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察。

三、试验结果

试验结果见图 13, 试验结果表明, 模型组, ROS 水平明显升高, 而经化合物处理后的细胞, ROS 水平基本与未处理的阴性对照组相近, 几乎完全终止了 ROS 的产生。

试验例5 生物类黄酮类化合物影响酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH)活性的试验

一、试验材料

1、供试化合物: 山柰酚-3 氧芸香糖苷 (Kaempferol 3-*O*- β -*D*-rutinoside) (代号为 hhw-14)、脱水红花黄色素 B (Anhydrosafflor yellow B) (代号为 hhw-16)、6-羟基山柰酚-3,6-二氧葡萄糖苷 (6-Hydroxykaempferol 3,6-*di-O*- β -*D*-glucoside) (代号为 hhw-19); (2*S*)-4',5-二羟基-6,7-二氧葡萄糖二氢黄酮苷 ((2*S*)-4',5-dihydroxyl-6,7-*di-O*- β -*D*-glucopyranssyl flavanone) (代号为 hhw-21)、槲皮素、香草醛 (代号为 3#)、异香草醛 (代号为 5#)。

2、细胞: PC12 细胞;

二、试验方法

PC12 细胞以 2×10^5 的密度铺入 6 孔板, 次日与 1 μ M 供试化合物孵育 24h 后加入 H_2O_2 , 使其终浓度为 0.15 mM, 处理 3 小时后弃去培养基, 37 $^{\circ}$ C 与 100 mM L-tyrosine 和 500 μ M *n*-hydroxybenzylhydrozine 共同

孵育 12h 后，弃去培养基，收集细胞，悬浮于 0.2ml 的 0.1N 的高氯酸中，超声；12000rpm 4 度离心 15min，上清液 100ul 进样。以未经过氧化氢处理组的峰面积/蛋白浓度作为 100%。

HPLC 柱使用 4.6 * 150 mm COSMOSIL (Nakalai, Kyoto, Japan); 流速 0.8ml/min, 流动相 50 mM potassium phosphate, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM heptane sulfonic acid, and 10% methanol, pH 2.6。

三、试验结果

试验结果见图 14。试验结果表明，同模型组相比，经供试化合物处置后的 PC12 细胞，其酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 活性显著增加。

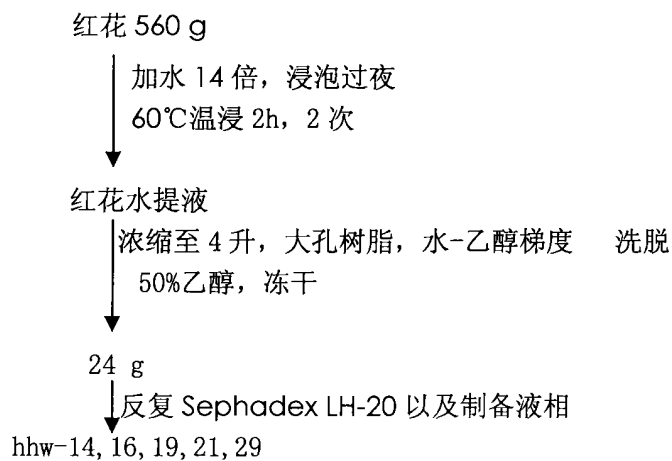


图 1

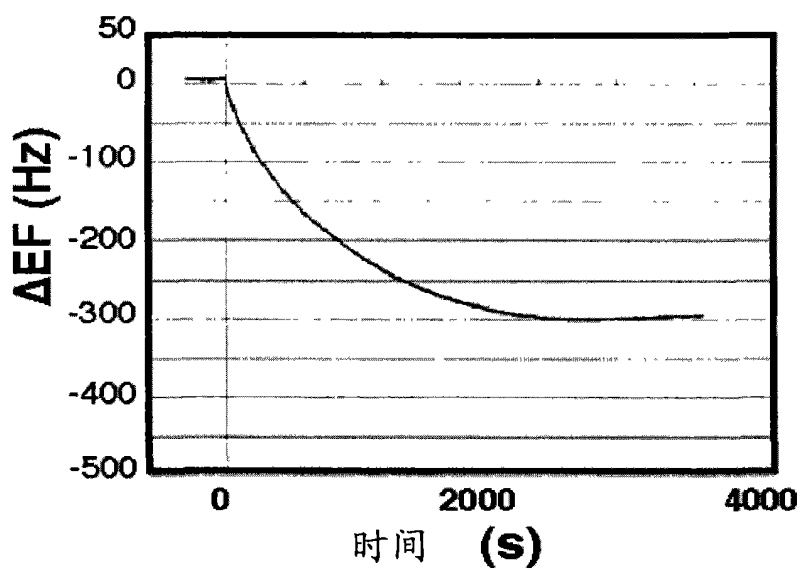


图 2

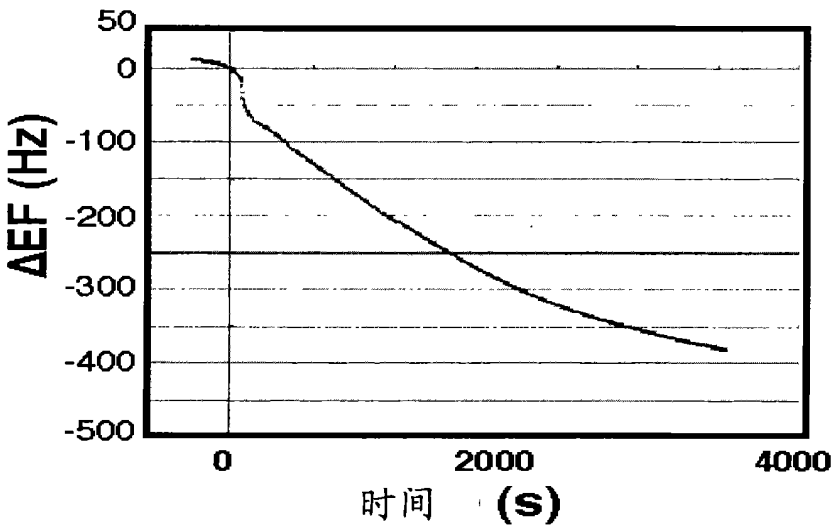


图 3

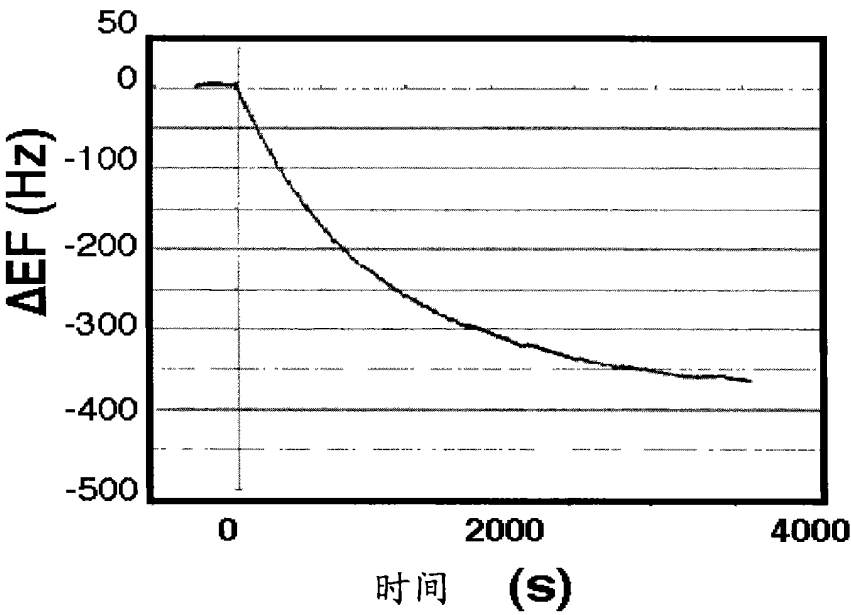


图 4

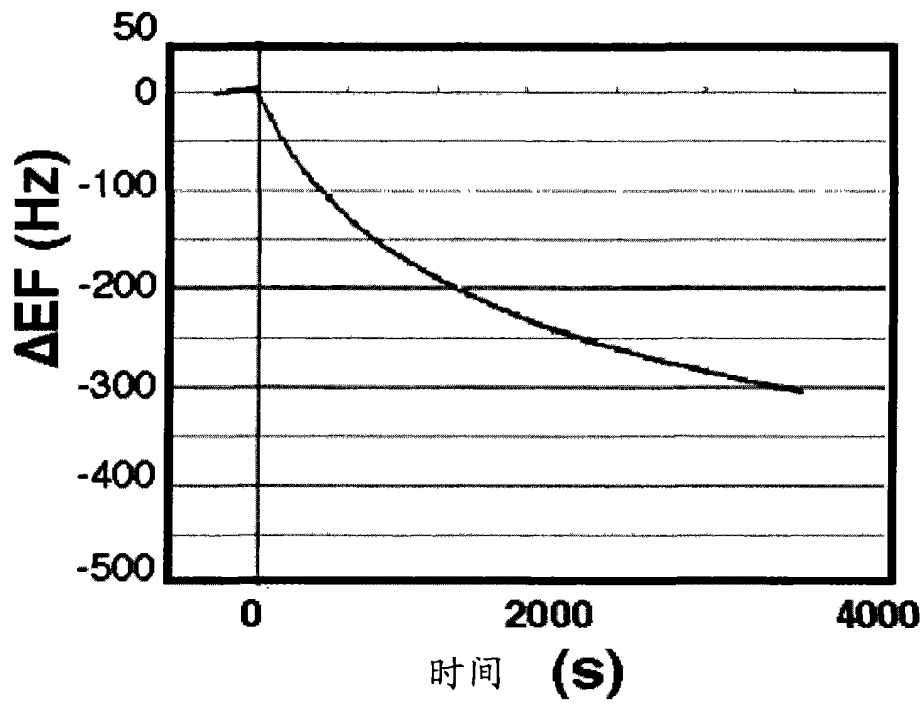


图5

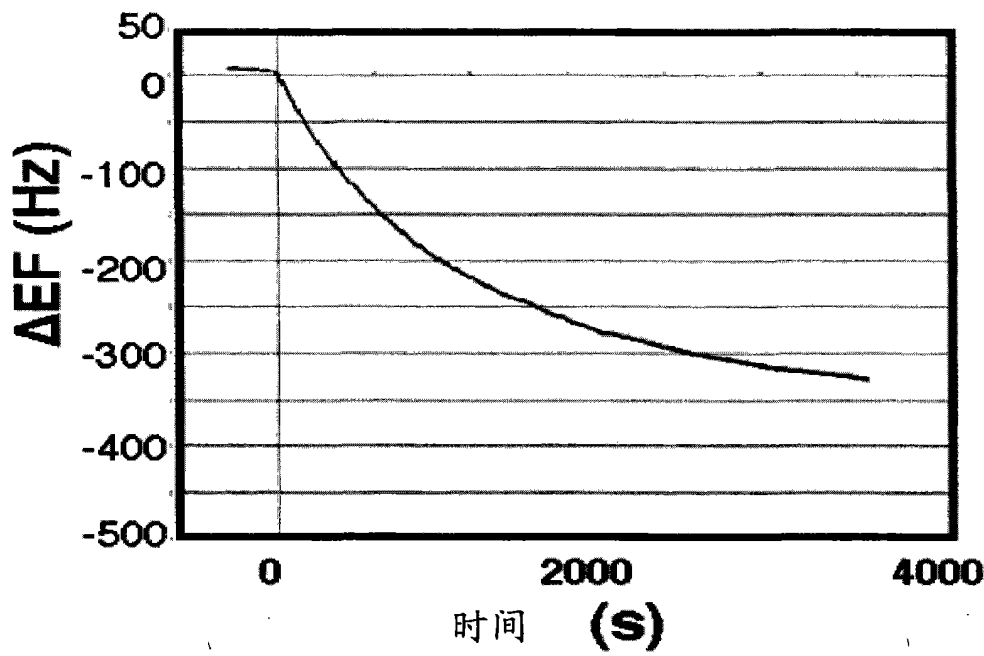


图6

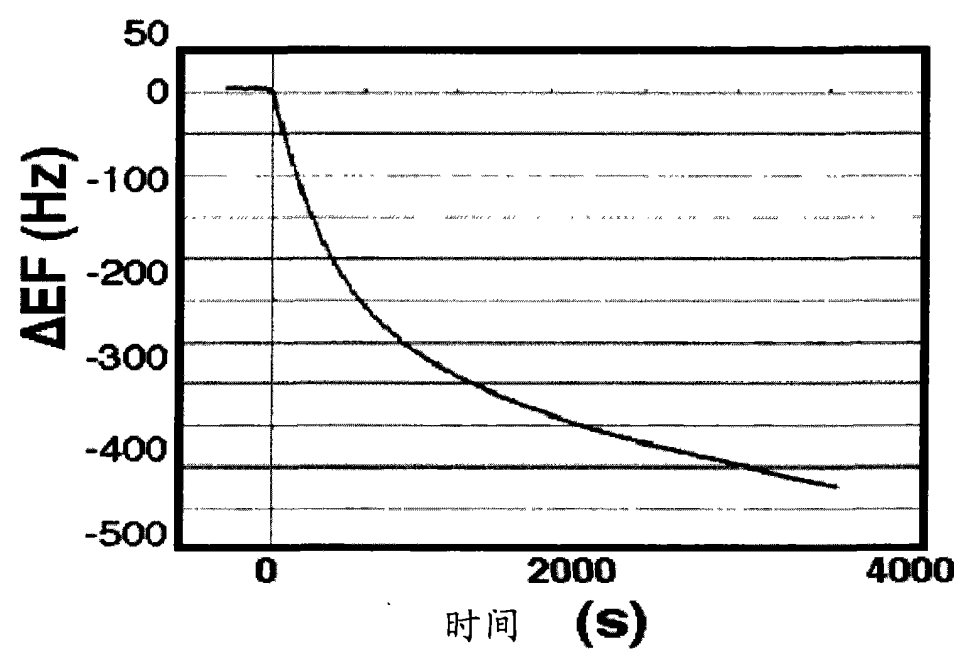


图7

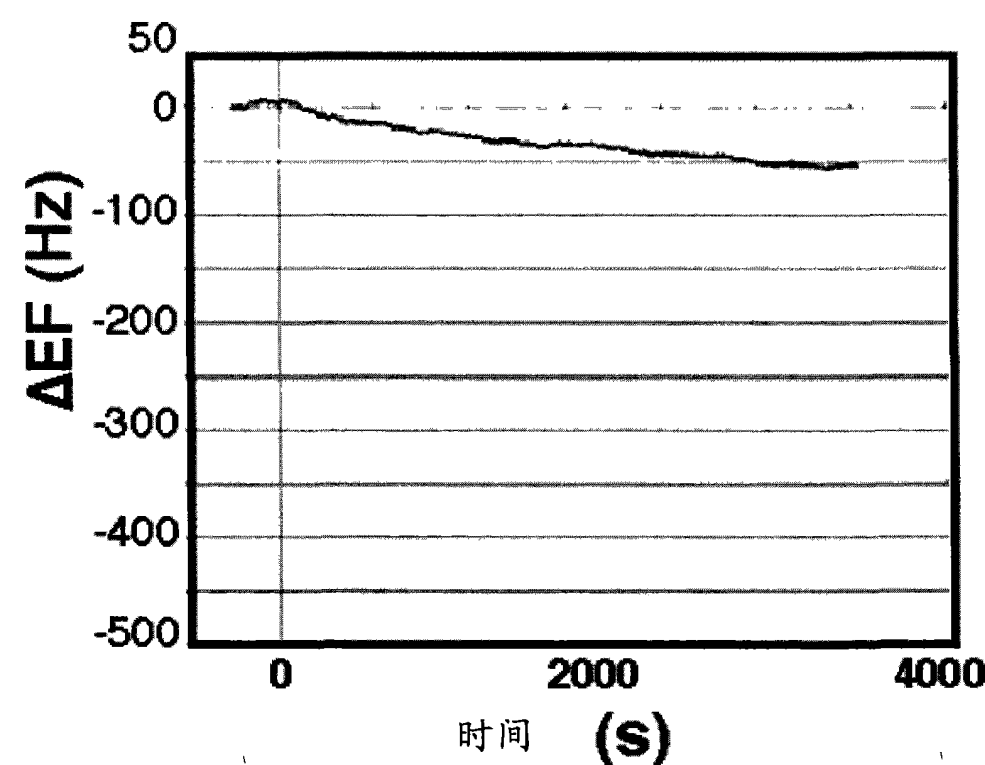


图8

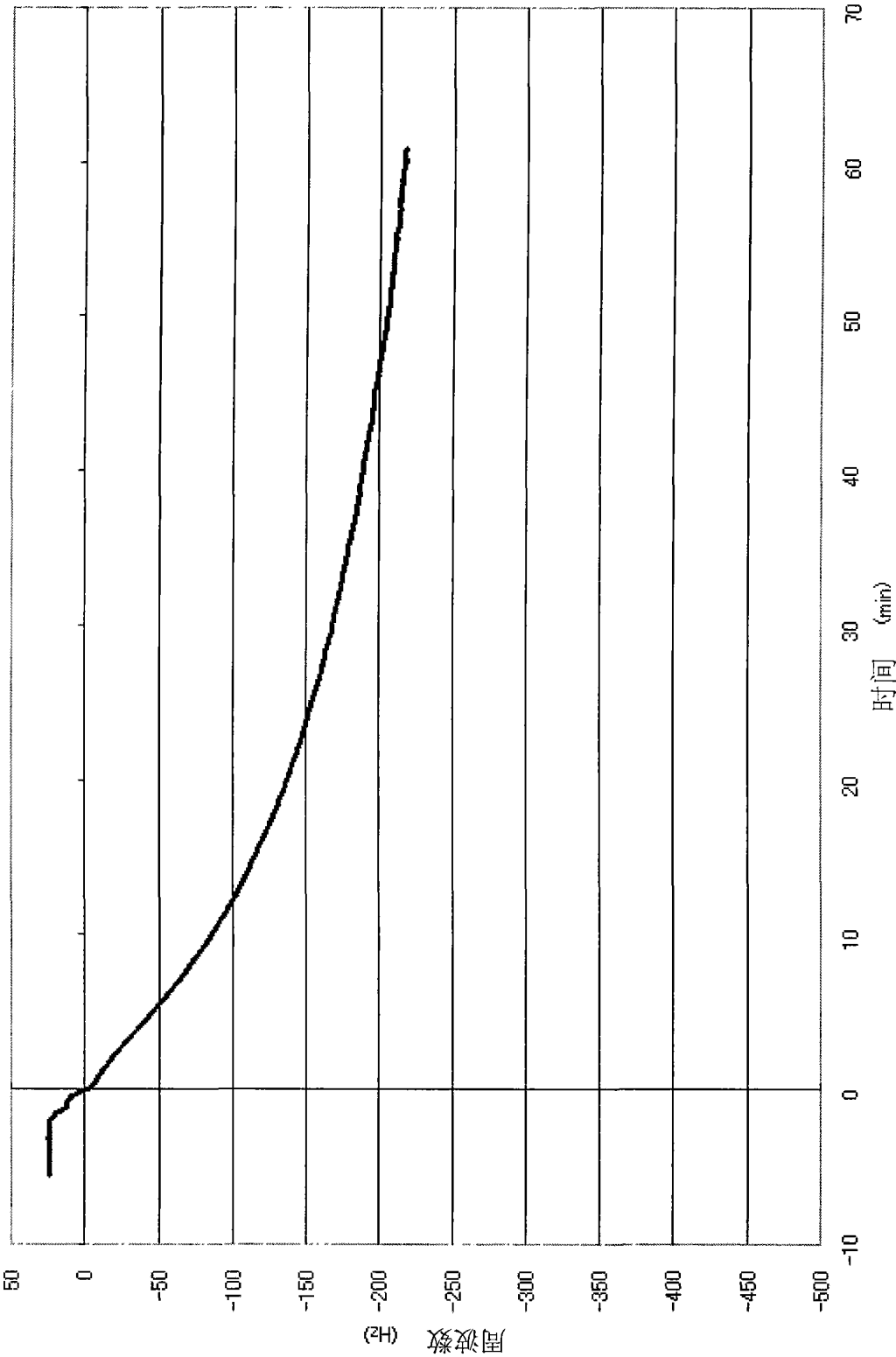


图9

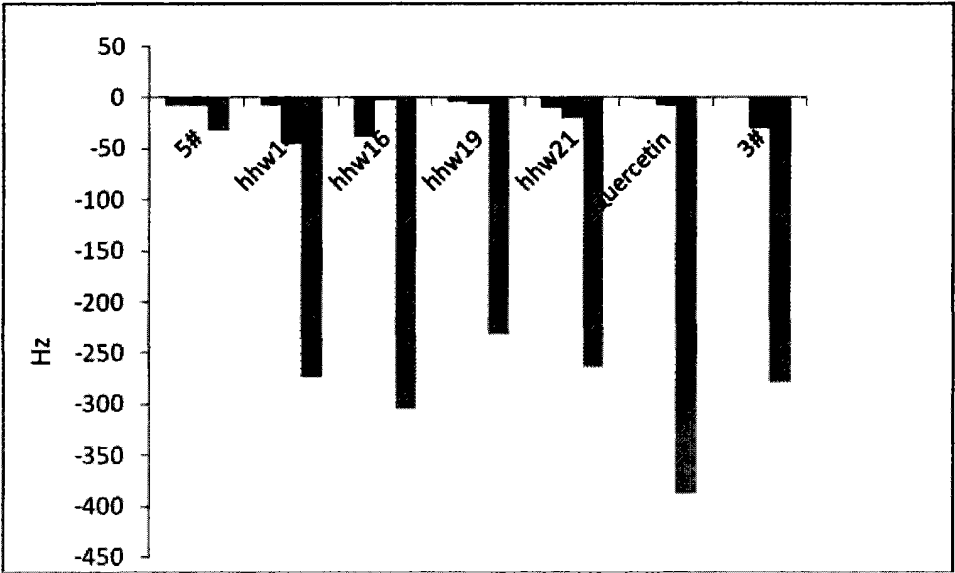


图 10

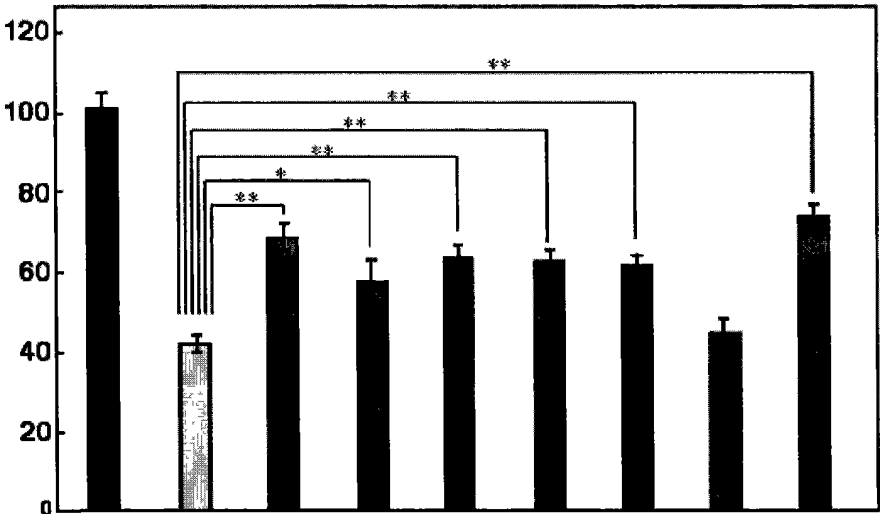


图 11

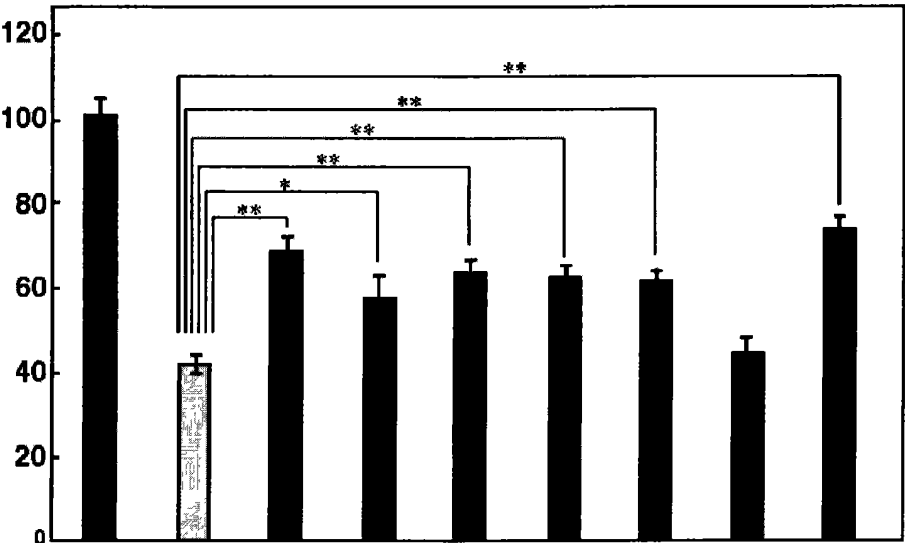
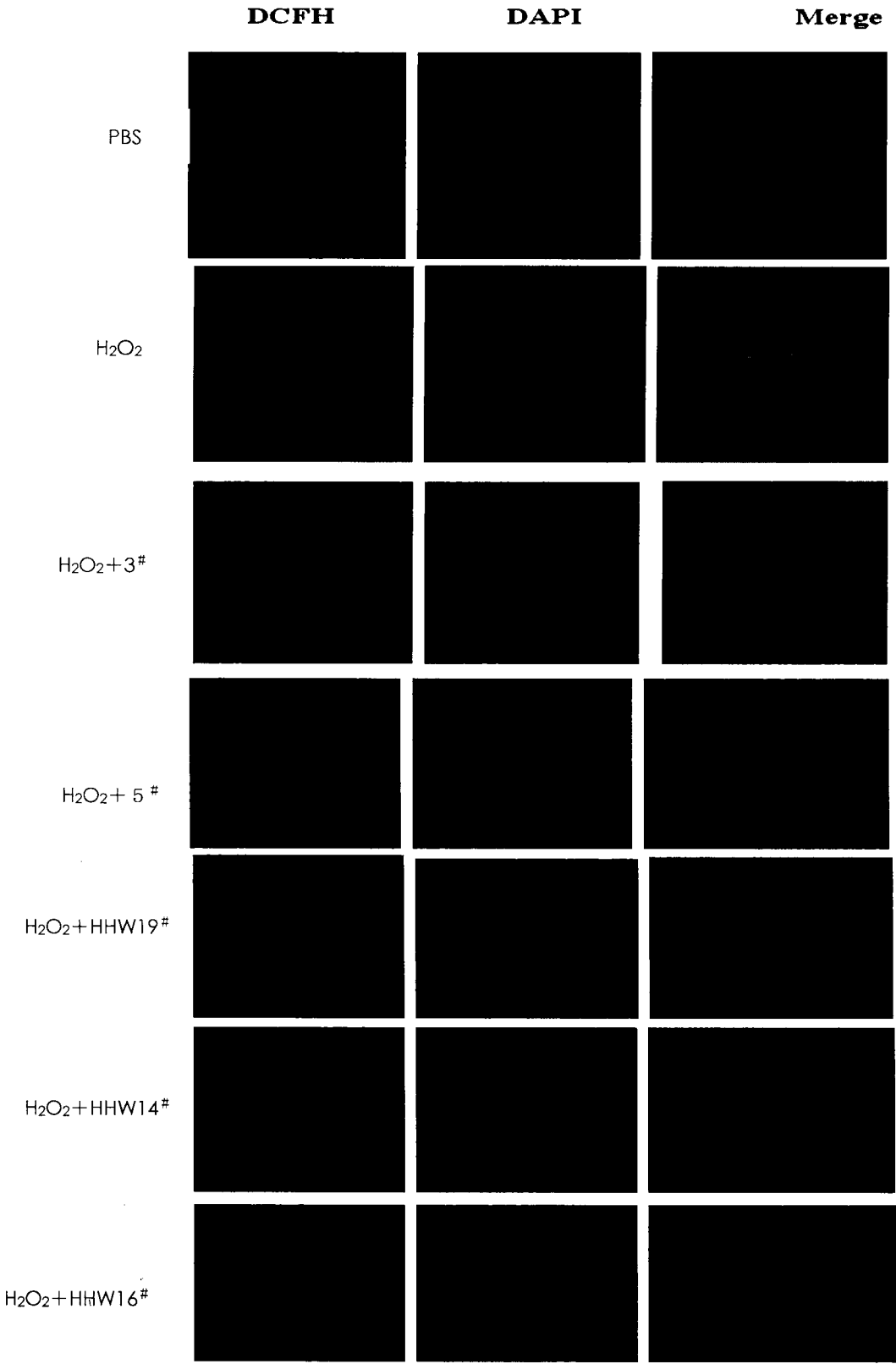


图 12



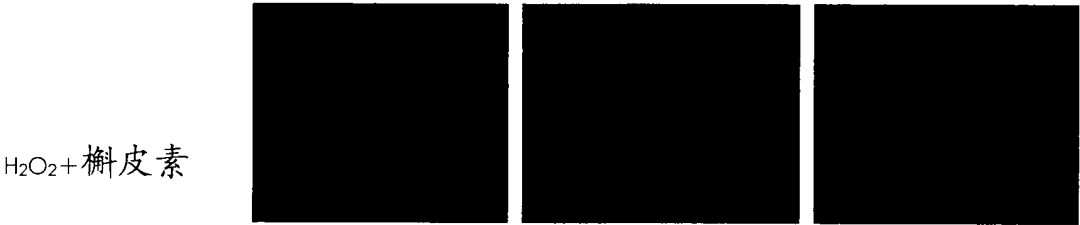


图 13

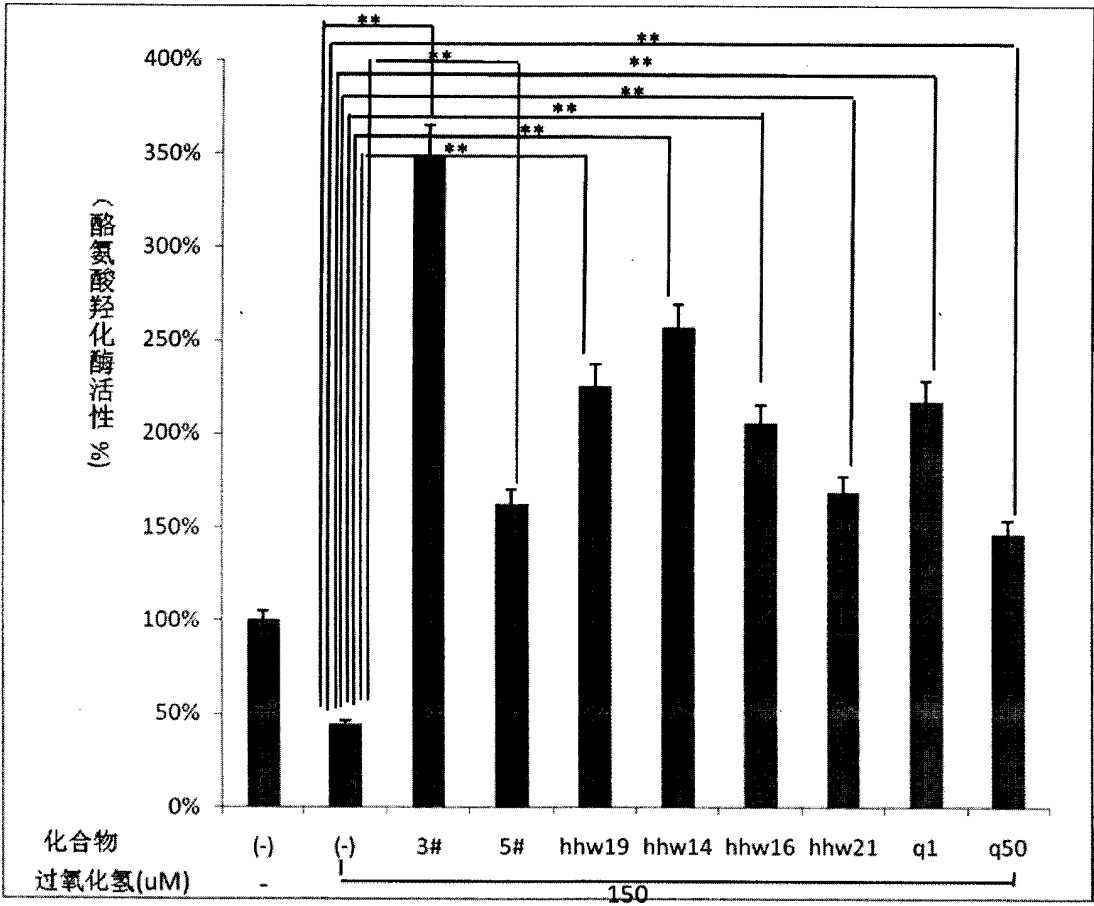


图 14