



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103275140 A

(43) 申请公布日 2013.09.04

(21) 申请号 201310239942.0

(22) 申请日 2013.06.17

(71) 申请人 山东大学

地址 250061 山东省济南市历城区山大南路  
27 号

(72) 发明人 宋欣

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221

代理人 李健康

(51) Int. Cl.

C07H 15/10 (2006.01)

A61K 31/7028 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

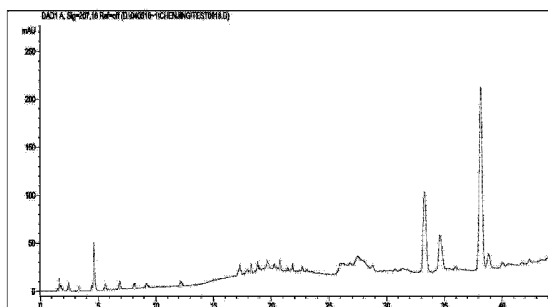
权利要求书1页 说明书9页 附图4页

(54) 发明名称

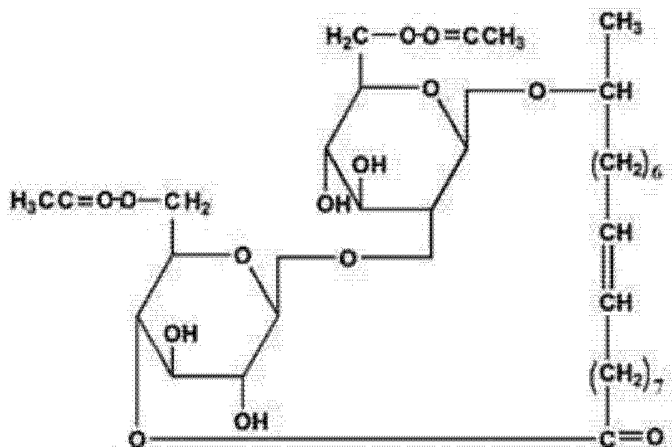
十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种化合物十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂及其在制备预防和治疗肝癌、肺癌、食管癌、胃癌和乳腺癌药物中的应用。实验证明,本发明的化合物在浓度为 50mg/kg 体重时,对人肝癌 HepG2 细胞、人肺癌 A-549 细胞、人胃癌 SGC7901 细胞、人食管癌 KYSE109 细胞和乳腺癌 MDA-MB-435 细胞有较强的抑制作用,为制备抗多种肿瘤、且毒副作用更小、效果更明显的抗肿瘤药提供了基础和途径,具有极其重要的意义。



1. 十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂,其结构如式 ( I ) 所示:



式(I)

2. 权利要求 1 所述十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂在制备预防和治疗肝癌、肺癌、食管癌、胃癌和乳腺癌药物中的应用。

3. 一种用于预防和治疗肝癌的制剂,其特征在于:所述制剂含有治疗有效量的权利要求 1 所述的十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂和药学上可接受的载体。

4. 一种用于预防和治疗肺癌的制剂,其特征在于:所述制剂含有治疗有效量的权利要求 1 所述的十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂和药学上可接受的载体。

5. 一种用于预防和治疗食管癌的制剂,其特征在于:所述制剂含有治疗有效量的权利要求 1 所述的十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂和药学上可接受的载体。

6. 一种用于预防和治疗胃癌的制剂,其特征在于:所述制剂含有治疗有效量的权利要求 1 所述的十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂和药学上可接受的载体。

7. 一种用于预防和治疗乳腺癌的制剂,其特征在于:所述制剂含有治疗有效量的权利要求 1 所述的十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂和药学上可接受的载体。

## 十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂及其应用

### 技术领域

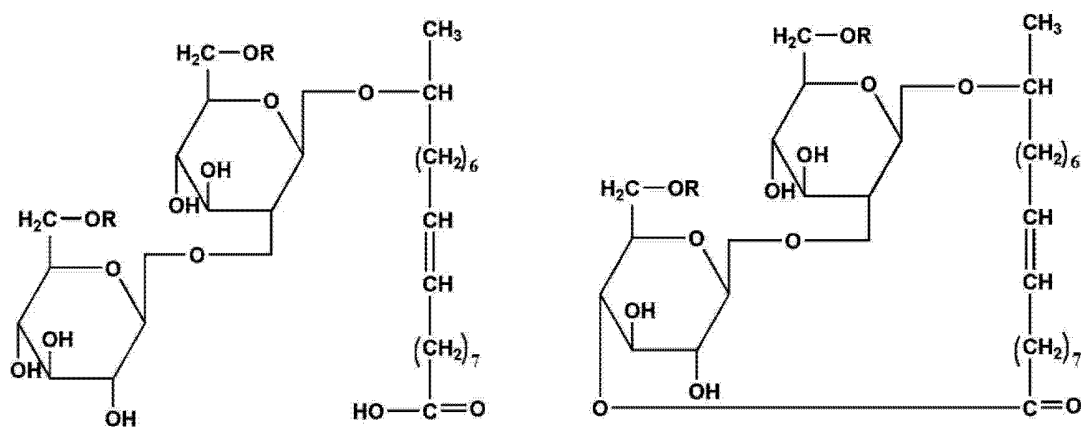
[0001] 本发明涉及槐糖脂类化合物及其应用,尤其涉及十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂(简称:C18:1DLSL)及其在制备抗癌药物中应用。

### 背景技术

[0002] 槐糖脂是一种重要的生物表面活性剂,对于它的研究始于二十世纪五、六十年代,主要是通过微生物发酵获得。

[0003] 槐糖脂主要有两种基本结构,如下图所示:

[0004]



**R=COCH<sub>3</sub> and/or H**

[0005] 槐糖脂的结构式(R=Acetyl;左图:酸型槐糖脂;右图:内酯型槐糖脂)

[0006] 槐糖脂是由几种非致病性的酵母产生,为由一系列结构类似的槐糖脂分子组成的混合物。不同种类和结构的槐糖脂分子具有不同的理化活性和生物活性。实验证实,内酯型槐糖脂具有更好的降低液体表面张力的能力和抗菌活性,而酸型槐糖脂具有更好的水溶性和发泡能力。

[0007] 近年来,国外对于槐糖脂作为药物的研究,特别是抗肿瘤药物方面有一些文献报道。Scholz 和 Mehta 等人报道,粗品槐糖脂及槐糖脂衍生物能够抑制人类白血病细胞株 HL60 和头颈癌细胞的增殖,并且证明了槐糖脂的抗肿瘤活性与槐糖脂的乙酰基有关,通过化学反应去掉槐糖脂的乙酰基,发现其抗肿瘤活性明显降低,但对其抗肿瘤机制没有进一步的研究。Isoda 等人报道,槐糖脂能够导致 HL60 白血病细胞系的细胞分化和抑制蛋白激酶 C 的活性。此外,槐糖脂可用作帕金森氏病、老年性痴呆症、牛皮癣、艾滋病治疗的免疫调节剂,还可用作抗病毒的免疫刺激。

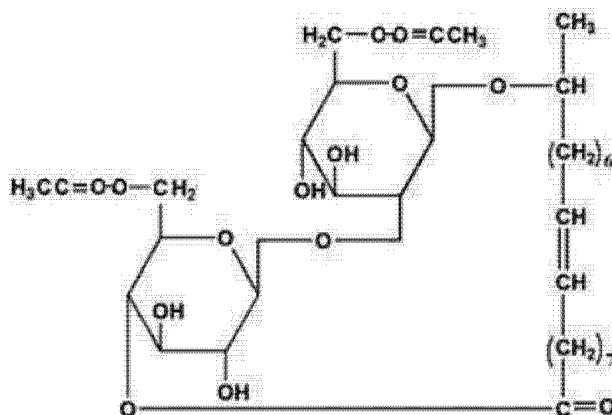
[0008] 然而,经文献和专利检索,槐糖脂纯品分子如十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂,或以该化合物为活性成分的药物组合物,或利用该化合物在制备治疗和预防肝癌、肺癌、食管癌、胃癌、宫颈癌和乳腺癌的药物中的应用未见相关报道。

## 发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂(简称: C18:1DLSL)及其在制备抗癌药物中应用。

[0010] 本发明所述的十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂,其结构如式(I)所示:

[0011]



式(I)

[0012] 上述十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂是利用拟威克酵母变种(*Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid*) CGMCC No. 1576 经液体发酵后,从液体发酵产物中分离纯化制得;其中:所述拟威克酵母变种(*Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid*) CGMCC No. 1576 已于 2005 年 12 月 26 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(中国科学院微生物研究所,中国北京),相关菌株专利见“一种产槐糖脂的拟威克酵母变种及其应用(专利号 200610042190.9)”。

[0013] 本发明所述十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂在制备预防和治疗肝癌、肺癌、食管癌、胃癌和乳腺癌药物中的应用。

[0014] 发明人发现本发明所述十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂对肝癌、肺癌、胃癌、食管癌、乳腺癌具有预防和治疗作用。实验证明,本发明的化合物在浓度为 50mg/kg 体重时,对人肝癌 HepG2 细胞、人肺癌 A-549 细胞、人胃癌 SGC7901 细胞、人食管癌 KYSE109 细胞和乳腺癌 MDA-MB-435 细胞有较强的抑制作用(35 ~ 40%),说明该化合物可以作为抑制肝癌、肺癌、胃癌、食管癌和乳腺癌的化学制剂,提示所述化合物在制备预防和治疗肝癌、肺癌、食管癌、胃癌和乳腺癌药物中具有重要应用。

[0015] 本发明提供了一种用于预防和治疗肝癌的制剂,其中:所述制剂含有治疗有效量的上述的十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂和药学上可接受的载体。

[0016] 本发明提供了一种用于预防和治疗肺癌的制剂,其中:所述制剂含有治疗有效量的上述的十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂和药学上可接受的载体。

[0017] 本发明提供了一种用于预防和治疗食管癌的制剂,其中:所述制剂含有治疗有效量的上述的十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂和药学上可接受的载体。

[0018] 本发明提供了一种用于预防和治疗胃癌的制剂,其中:所述制剂含有治疗有效量的上述的十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂和药学上可接受的载体。

[0019] 本发明提供了一种用于预防和治疗乳腺癌的制剂,其中:所述制剂含有治疗有效量的上述的十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂和药学上可接受的载体。

[0020] 上述药学上可接受的载体是指药学领域常规的药物载体,例如:稀释剂如水、乙醇等,填充剂如淀粉、蔗糖等,粘合剂如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮;湿润剂如甘油;崩解剂如琼脂、碳酸钙和碳酸氢钠;吸收促进剂如季铵化合物;表面活性剂如十六烷醇;吸附载体如高岭土和皂粘土;润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙或镁、聚乙二醇等;其它辅剂如香味剂、甜味剂等。

[0021] 上述制剂较适于通过口服、直肠或肠胃外给药的方式施用于需要所述病症治疗的患者。用于口服时,可将其制成常规的固体制剂如片剂、粉剂、粒剂、胶囊等,或制成液体制剂如水或油悬浮剂或其它液体制剂如糖浆、酞剂、酞剂等;用于肠胃外给药时,可将其制成注射用的溶液、水或油性悬浮剂等。优选的制剂形式是片剂、包衣片剂、胶囊、栓剂、鼻喷雾剂和注射剂。

[0022] 本发明所述的各种剂型可以按照药学领域的常规生产方法制备,例如使活性成分与一种或多种载体混合,然后将其制成所需的剂型。

[0023] 本发明的制剂优选含有重量比为 0.1%-99.5% 的活性成分十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂,最优选含有重量比为 5%-95% 的活性成分十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂。

[0024] 本发明化合物的施用量可根据用药途径、患者的年龄、体重、所治疗的疾病的类型和严重程度等变化,其日剂量可以是 4-50mg/kg 体重,优选 10-50mg/kg 体重。可以一次或多次施用。

[0025] 本发明所述十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂由发明人实验室分离的具有自主知识产权的拟威克酵母变种发酵生产,粗品槐糖脂产量可达到 150g/L,具有大规模发酵生产的潜力,而且槐糖脂由可再生的天然原料发酵而成,对人和动物毒性很低。本申请日前,申请人曾经对拟威克酵母变种产生的粗品槐糖脂对人肝癌细胞、肺癌细胞、宫颈癌细胞、食管癌细胞的体外抑制作用进行了初步研究,在此基础上完善了结构不同的槐糖脂分子的纯化和制备方法,形成了本专利。

[0026] 据最新资料报道,全国肿瘤肿瘤死亡率为 180.54/10 万,每年因癌症死亡病例达 270 万例,每年新发肿瘤病例约为 312 万例,平均每天 8550 人,全国每分钟有 6 人被诊断为癌症。居民因癌症死亡的几率是 13%,即每 7 至 8 人中有 1 人因癌死亡。现在的发病率和死亡率虽然较前 20 年变化不大,但数据显示,我国癌症发病呈现年轻化趋势,包括乳腺癌、肺癌、结肠癌、甲状腺癌等发病年龄均低于以前的发病年龄。

[0027] 从病种看,居全国恶性肿瘤发病第一位的是肺癌,其次为胃癌、结直肠癌、肝癌和食管癌。居全国恶性肿瘤死亡第一位的仍是肺癌,其次为肝癌、胃癌、食管癌和结直肠癌,前 10 位恶性肿瘤占全部恶性肿瘤的 84.27%。死亡率最高者男女均为肺癌。

[0028] 虽然癌症严重影响人们的身心健康,但目前对于癌症的治疗没有特效的方法,早期主要是进行外科手术、放疗和化疗。晚期癌症的治疗方法主要有放化疗及中医药治疗,随着治疗时间延长,带来的毒副作用也越大。因此,开发新型抗癌药势在必行。实验提示,本发明提供的十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂为制备抗多种肿瘤、且毒副作用更小、效果更明显的抗肿瘤药提供了基础和途径,具有极其重要的意义。

## 附图说明

[0029] 图 1 槐糖脂粗提物的 HPLC 图谱。

[0030] 图 2 十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂的  $^1\text{H}$  NMR 谱。

[0031] 图 3 十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂的  $^{13}\text{C}$  NMR 谱。

[0032] 图 4 化合物 III 的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY(A) 和 TOCSY(B) 图

[0033] 其中 : 溶剂为  $\text{CDCl}_3$ , 采样温度 300K, 600MHz。

[0034] 图 5 电镜观察十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂(简称 :C18:1DLSL) 作用 HepG2 后细胞核变化

[0035] 其中 :A 正常肿瘤细胞 ;B40  $\mu\text{g/ml}$  槐糖脂(C18:1DLSL) 作用后的肿瘤细胞 ; C2  $\mu\text{g/ml}$  阿霉素处理后的肿瘤细胞。

[0036] 图 6 流式细胞技术检测 C18:1DLSL 作用后细胞周期变化

[0037] 其中 :A 正常肿瘤细胞 ;B40  $\mu\text{g/ml}$  槐糖脂(C18:1DLSL) 作用后的肿瘤细胞 ; C2  $\mu\text{g/ml}$  阿霉素处理后的肿瘤细胞。

[0038] 图 7 比色法检测 C18:1DLSL 作用后细胞中 caspase-3 活性变化。

## 具体实施方式

[0039] 下面结合实施例来使本专业技术人员更全面的了解本发明,但不以任何方式限制本发明。

[0040] 实施例 1 :

[0041] 1. 十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂的制备

[0042] 1.1 利用拟威克酵母变种发酵生产粗品内酯型槐糖脂

[0043] (1) 菌种选择 : 拟威克酵母变种(*Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid*) CGMCC No. 1576 ;

[0044] (2) 斜面培养 : 将菌种接种于基本无机盐培养基,其中添加质量体积比为 1.6% 的琼脂,30℃ 条件下,静止培养 36 小时 ;

[0045] (3) 种子培养 : 将步骤(2)培养的菌株,在无菌条件下用接种环接 1 ~ 2 环于 50ml 含有质量体积比为 8% 的葡萄糖和 3% 的菜籽油的培养基中,30℃ 条件下,振荡培养 36 小时,制得种子液 ;

[0046] (4) 扩大培养 : 以 7% 的体积比的接种量,将种子液接种于 500ml 含有质量体积比为 3% 的菜籽油的培养基中,30℃ 条件下,振荡培养 200 小时 ;

[0047] (5) 内酯型槐糖脂制备 : 将步骤(4)得到的发酵液用两倍体积的乙酸乙酯萃取,上层有机相于 50℃ 下减压蒸馏后用正己烷洗涤 2 遍,再经 50℃ 减压蒸馏得到淡黄色块状固体,即为粗提的内酯型槐糖脂样品。

[0048] 1.2 十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂的分离纯化

[0049] 将上述内酯型槐糖脂粗提物分别溶解于色谱纯甲醇,0.22  $\mu\text{m}$  有机膜过滤后用于分析型 HPLC 分析。上柱前,超纯水与有机溶剂均要经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜分别过滤,装入不同溶剂瓶。条件 : 柱子为 Kromasil  $\text{C}_{18}$  分析柱(5  $\mu\text{m}$  × 250mm × 4.6mm, Agela Technologies Inc., USA),流动相 : 乙腈 - 水下的梯度洗脱(v/v),洗脱方案 : 0 ~ 15min, 乙腈含量从 40%

升高至 60% ;15 ~ 35min, 乙腈含量从 60% 升高至 70%。进样体积 :15  $\mu$  l, 流速 :1ml/min, 检测波长 :207nm。制备型 HPLC 条件 :柱子为 PrepHT XDB C<sub>18</sub>column (250mm $\times$ 21.2mm, Agela Technologies Inc., USA) 制备柱, 进样体积 :500  $\mu$  l, 流速 :15ml/min, 洗脱条件与分析型 HPLC 相同。收集到的不同馏分分别进行减压浓缩, 进行结构分析。结果见图 1。

[0050] 2. 十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂的结构鉴定

[0051] 2. <sup>1</sup>H NMR 分析

[0052] 结合图 2 十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂的 <sup>1</sup>H NMR 谱。 $\delta$  4.46, 4.47ppm 和  $\delta$  4.55, 4.56ppm 处有两个特征性的 -CH 二重峰, J=7.8Hz, 为葡萄糖的端基质子, 根据其耦合常数可以判断两个葡萄糖均为  $\beta$  构型。结合 HSQC 谱可以判断  $\delta$  5.35 ~ 5.40ppm 的多重峰 (2H) 为 -CH=CH- 信号,  $\delta$  3.40 ~ 4.50ppm 为糖上的质子信号, 裂分比较复杂。高场区  $\delta$  2.09ppm 为甲基信号,  $\delta$  1.25 ~ 1.33ppm 为多个质子信号重叠峰, 显示结构中含有长脂肪链。

[0053] 2. <sup>13</sup>C NMR 分析

[0054] 结合图 3 十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂的 <sup>13</sup>C NMR 谱。<sup>13</sup>C NMR 特征非常明显, 信号分布集中在几个区域 :低场区  $\delta$  173.56、171.81、170.69ppm 处为三个羰基信号, 分别是两个葡萄糖的 6 位取代乙酰氧基中的羰基和脂肪酸侧链的羰基。 $\delta$  130.19、129.70ppm 为双键信号, 化学位移值接近, 证明双键类型为 -CH=CH-。 $\delta$  103.98、102.59ppm 为两个葡萄糖的端基碳信号。 $\delta$  69.9 ~ 82.0ppm 是葡萄糖 2、3、4、5 位碳信号,  $\delta$  63.74、62.28ppm 为 6 位碳信号。脂肪链部分碳原子位于  $\delta$  20.98 ~ 37.68ppm 范围内。

[0055] 2.3 核磁共振的二维谱分析

[0056] <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 图 (见图 4(A)) 给出的信息较少, 仅能看到葡萄糖 1、2 位质子的偶合相关信号, 单凭 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 无法对糖部分的质子进行归属, 因此测定了它的 TOCSY 图谱 (见图 4(B)), 同时结合 HMQC 图 (见图 4(C))、HMBC 图 (见图 4(D)) 等异核二维相关谱对糖部分的质子进行研究, 结果见表 1。

[0057] 表 1 十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂的结构分析 (溶剂 CDCl<sub>3</sub>, 内标 TMS)

[0058]

No.	$\delta$ c(ppm)	$\delta$ H(ppm)	TOCSY(H)	HMBC(C)
1'	102.59	4.46, 4.47 d	2' 3' 4' 5' 6'	17 2'
2'	82.02	3.56, 3.57 d	1' 3' 4' 5' 6'	1' 3' 1''
3'	75.94	3.67, 3.68 m	1' 2' 4' 5' 6'	2' 4'
4'	70.65	3.41~3.43 m	1' 2' 3' 5' 6'	3' 5'

[0059]

5'	73.49	3.44~3.46 m	1' 2' 3' 4' 6'	1' 4' 6'
6'	63.74	4.31~4.37 ddd	1' 2' 3' 4' 5'	5' 6'-CO
6'COCH <sub>3</sub>	170.54,20.98	2.09 s	-	6'-CO
1''	103.98	4.55,4.56 d	2'' 3'' 4'' 5'' 6''	2' 2''
2''	75.23	3.53,3.54 d	1'' 3'' 4'' 5'' 6''	1'' 3''
3''	74.22	3.70,3.72 m	1'' 2'' 4'' 5'' 6''	2'' 4''
4''	69.98	4.97~4.99 m	1'' 2'' 3'' 5'' 6''	3'' 5'' 18-CO
5''	72.88	3.67~3.68 m	1'' 2'' 3'' 4'' 6''	1'' 4'' 6''
6''	62.28	4.13~4.21 ddd	1'' 2'' 3'' 4'' 5''	5'' 6''-CO
6''COCH <sub>3</sub>	171.81,21.07	2.09s	-	6''-CO
1	173.56	-	-	-
17	79.56	3.76,3.77 m	18 2~16	1'
18	21.27	1.25,1.26 d	17 2~16	3 17 (34.53)
2C:37.68,3C:34.53,4C:30.26				
5C:30.16,6C:29.81,7C:29.21				
8C:28.57,				
9C:130.19,10C:129.97,				
11C:28.45,12C:27.41				
13C:27.14,14C:25.43,15C:24.89,				
16C: 23.97				
2~16		2.02~2.05 m 1.27~1.33 m 5.35~5.40 m	17, 18	-

[0060] 实施例 2 :

[0061]

剂型	成分	质量
片剂	C18:1 DLSL	5 mg
	乳糖	180 mg
	玉米淀粉	52 mg
	硬脂酸镁	3 mg

[0062] 制备方法 :将十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂(C18:1DLSL)与乳糖和玉米淀粉混合,用水均匀湿润,过筛并干燥,再过筛,加入硬脂酸镁,均匀后压片,每片重 240mg,



C18:1DLSL 槐糖脂含量为 5mg。

[0063] 实施例 3：

[0064]	剂型	成分	质量
	胶囊剂	C18:1 DLSL	10 mg
		乳糖	188 mg
		硬脂酸镁	2 mg

[0065] 制备方法：将 C18:1DLSL 与乳糖和硬脂酸镁混合，过筛，在合适的容器中均匀混合，把得到的混合物装入硬明胶胶囊，每个胶囊重 200mg，C18:1DLSL 含量为 10mg。

[0066] 实施例 4：

[0067]	剂型	成分	质量
	安瓿剂	C18:1 DLSL	4 mg
		氯化钠	6 mg

[0068] 制备方法：将 C18:1DLSL 和氯化钠溶解于适量的注射用水中，过滤所得溶液在无茵条件下装入安瓿瓶中。

[0069] 实施例 5：

[0070]	剂型	成分	质量
	胶囊剂	C18:1 DLSL	15 mg
		乳糖	183 mg
		硬脂酸镁	2 mg

[0071] 制备方法：将 C18:1DLSL 与乳糖和硬脂酸镁混合，过筛，在合适的容器中均匀混合，把得到的混合物装入硬明胶胶囊，每个胶囊重 200mg，C18:1DLSL 含量为 15mg。

[0072] 实施例 6 十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂 (C18:1DLSL) 诱导肿瘤细胞凋亡

[0073] 用终浓度为 40  $\mu$ g/ml 的 C18:1DLSL 作用 HepG2 细胞 24h 后，胰蛋白酶消化并收集细胞，pH7.2 的 PBS 洗 2 次；细胞沉淀用 2.5% 的戊二醛固定液固定，4℃ 过夜；pH7.2 的 PBS 洗 3 次；1% 的钨酸 4℃ 固定 2h；梯度丙酮脱水 (25%–100% 丙酮)；包埋剂包埋；LKBV 型超薄切片机切片，JEM-1200EX 透射电镜观察并拍照。结果表明，正常的 HepG2 细胞，细胞核浆比值大，核常染色质，核仁大，核膜完整有切迹。化合物 C18:1DLSL 作用后，细胞体积缩小，细胞浆浓缩，细胞核染色质凝集深染凝聚于核膜内侧，并成块状或新月状边缘化；胞浆内空泡增多，细胞膜完整，表面微绒毛和伪足减少；并可见膜包裹细胞核碎片的凋亡小体 (图 5)。流式细胞技术表明经 C18:1DLSL 诱导后，大部分 HepG2 细胞阻滞在 G<sub>1</sub> 期，少部分细胞阻滞在 S 期，使细胞不能进入下一个细胞周期，从而发生凋亡。在化合物 C18:1DLSL 浓度为 40  $\mu$ g/ml 诱导 24h，细胞的亚二倍体占的比例为 28.0% (图 6)。收集对数期 HepG2 肝癌细胞，用 1.0  $\mu$ M 的 C18:1DLSL 作用 24h 后，加入 Caspase3 的作用底物，室温放置 3h，用荧光酶标仪检测 Caspase3 活性，结果显示 Caspase3 被激活，证明 C18:1DLSL 诱导 HepG2 的凋亡是 caspase-3 依赖性的 (图 7)。

[0074] 实施例 7 十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂体内抗肿瘤活性

[0075] 采用实施例 1 得到的十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂(C18:1DLSL),以裸小鼠为研究对象,对其体内种植肿瘤细胞,进行槐糖脂体内抗肿瘤试验。具体实验步骤如下:

[0076] 1 实验材料:

[0077] 人肝癌细胞 HepG2 细胞、人肺癌 A-549、人胃癌 SGC7901、人食管癌 KYSE109 和乳腺癌 MDA-MB-435 裸小鼠,注射器,针头等

[0078] 2 实验步骤与结果

[0079] (1) 抑瘤实验:小鼠肿瘤模型建立:人肝癌细胞 HepG2 细胞、人肺癌 A-549、人胃癌 SGC7901、人食管癌 KYSE109 和乳腺癌 MDA-MB-435 细胞株分别复苏后,按每只裸小鼠腹腔内注射约  $1.5 \times 10^7$  个活细胞。待 7~10 天后,在无菌条件下抽取腹水,调整细胞浓度为  $5 \times 10^7$  个/mL。随即依次在裸小鼠右侧腋下于腋中线上约 2cm 处皮下接种约  $1 \times 10^7$  个活细胞。肿瘤直径  $\geq 5\text{mm}$  时为成瘤。

[0080] (2) 治疗实验:对小鼠进行肿瘤接种 7 天后,将实体瘤小鼠模型动物随机分为 5 组,每组 10 只。分别为对照组:80% 乙醇溶液;槐糖脂低剂量组 5mg/kg、中剂量组 50mg/kg,高剂量组 500mg/kg;环磷酰胺给药组,分别连续给药 10 天。

[0081] (3) 实体瘤小鼠抑瘤率的计算:末次给药 48 小时后脱臼处死小鼠,称重后剖取瘤块称重,按照下公式计算抑瘤率。

[0082] 肿瘤抑制率 (%) =  $[(\text{对照组瘤重} - \text{实验组瘤重}) / \text{对照组瘤重}] \times 100\%$

[0083] 结果见表 2。

[0084] 表 2 槐糖脂对裸小鼠移植瘤瘤重影响

[0085]

组别	瘤重	抑瘤率 %				
		肝癌 HepG2	肺癌 A-549	胃癌 SGC7901	食管癌 KYSE109	乳腺癌 MDA-MB-435
80% ethanol	1.78±0.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5mg/kg • bw	1.5±0.38	19.73	18.51	19.13	17.74	19.03
50mg/kg • bw	1.31±0.35	26.40	25.30	26.60	25.91	27.13
500mg/kg • bw	1.16±0.45	37.53	36.15	38.07	40.07	37.93
CTX 对照组	0.63±0.22	64.61	60.61	61.11	65.01	63.91

[0086] 由以上数据可以看出,5mg/kg • bw 体重的 C18:1DLSL 槐糖脂对于 5 种人肿瘤细胞的抑瘤率为 17~19%;50mg/kg • bw 槐糖脂给药组抑瘤率达到了 25~27%;500mg/kg • bw 槐糖脂给药组抑瘤率达到 36~40%,与 80% 乙醇溶液对照组差异极显著,抑瘤率小于环磷酰胺对照组。

[0087] (4) 槐糖脂对荷瘤裸鼠的毒副作用观察:用 50mg/kg 体重的 C18:1DLSL 治疗 13 天后,称小鼠体重,检测槐糖脂对小鼠生长的影响,结果见表 3。

[0088] 表 3 C18:1DLSL 槐糖脂治疗后对小鼠体重的影响

[0089]

治疗 13 天的小鼠体重 (g)					
组别	肝癌 HepG2	肺癌 A-549	胃癌 SGC7901	食管癌 KYSE109	乳腺癌 MDA-MB-435
80% ethonol	25.39±2.28	25.39±2.28	25.39±2.28	25.39±2.28	25.39±2.28
5mg/kg• bw SLs	23.94±2.47	24.14±2.47	23.94±2.47	23.94±2.47	23.94±2.47
50mg/kg• bw SLs	27.81±2.00	27.90±1.81	26.91±1.78	27.61±1.90	28.01±1.66
500mg/kg • bw SLs	27.02±1.60	27.52±1.55	27.72±1.66	27.11±1.41	28.02±1.50
CTX 对照组	21.90±2.08	21.90±2.08	21.90±2.08	21.90±2.08	21.90±2.08

[0090] 由结果可知,在用 C18:1DLSL 治疗 13 天后,各槐糖脂实验组小鼠一般情况良好,进食和体重同 80% 乙醇溶液组相比无明显差异,而环磷酰胺阳性对照组于治疗开始后第 13 天小鼠逐渐出现严重消瘦,营养不良,进食消极,体重变化与 80% 乙醇溶液组之间存在明显差异 (P<0.05)。说明槐糖脂对小鼠基本无毒副作用,而环磷酰胺对小鼠毒害作用较强。

[0091] 上述实验表明,C18:1DLSL 槐糖脂对于人肝癌细胞 HepG2 细胞、人肺癌 A-549、人胃癌 SGC7901、人食管癌 KYSE109 和乳腺癌 MDA-MB-435 细胞都具有很强的抑制作用。由于小鼠的耐毒能力是人的 11 倍,因而所述十八碳双乙酰化一个双键内酯型槐糖脂 C18:1DLSL 的有效抗癌的药物浓度为 4-50mg/kg 体重,优选药物浓度为 10-50mg/kg 体重。

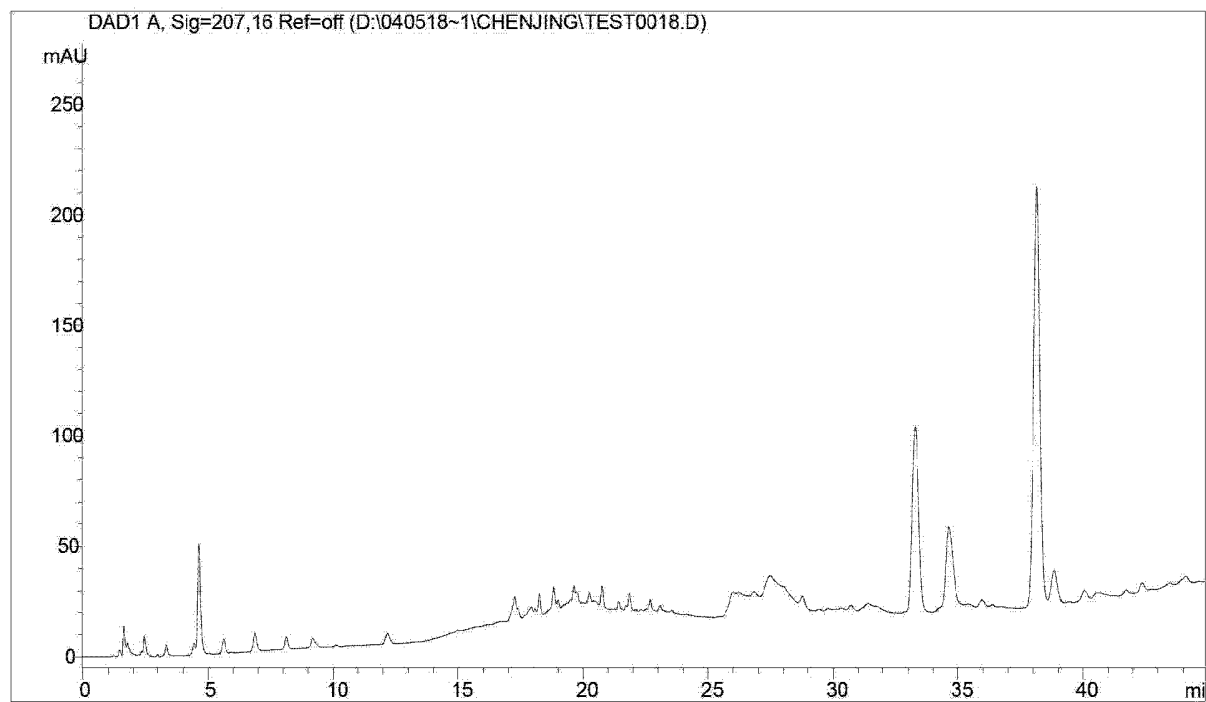


图 1

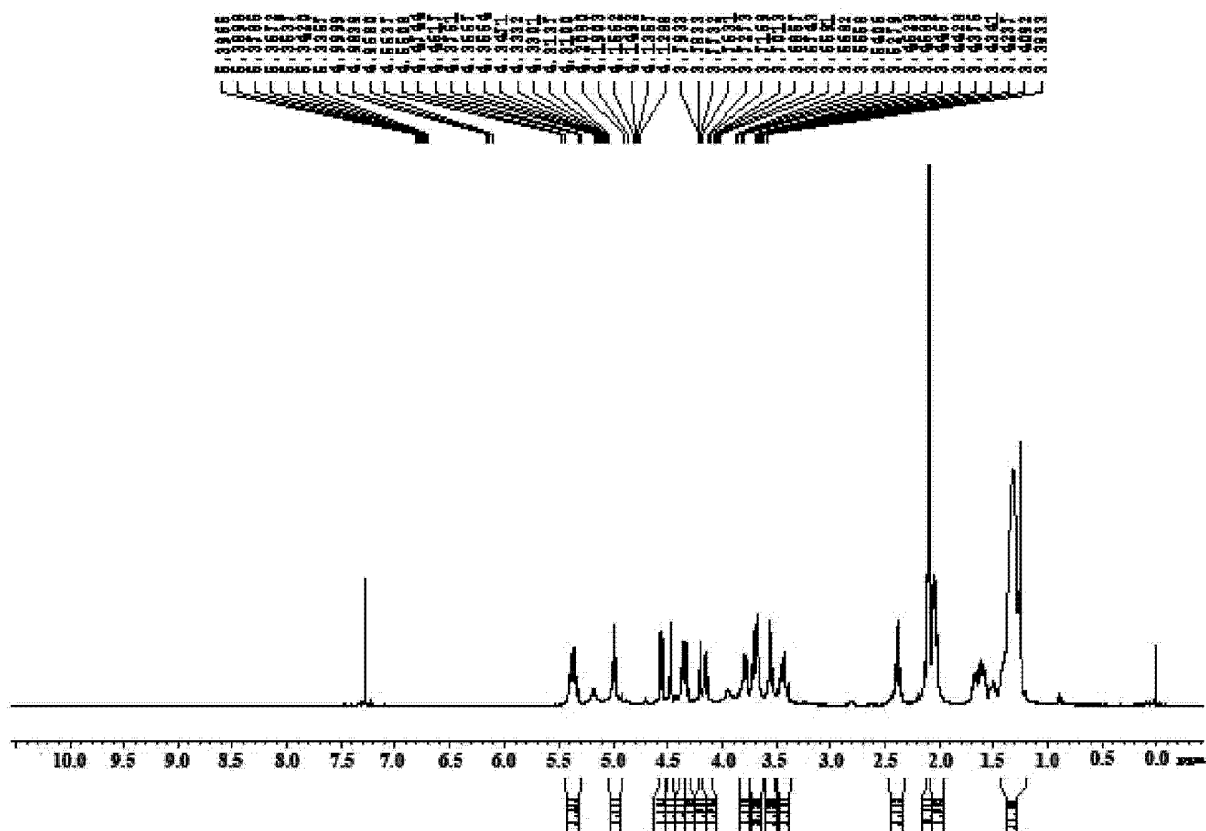


图 2

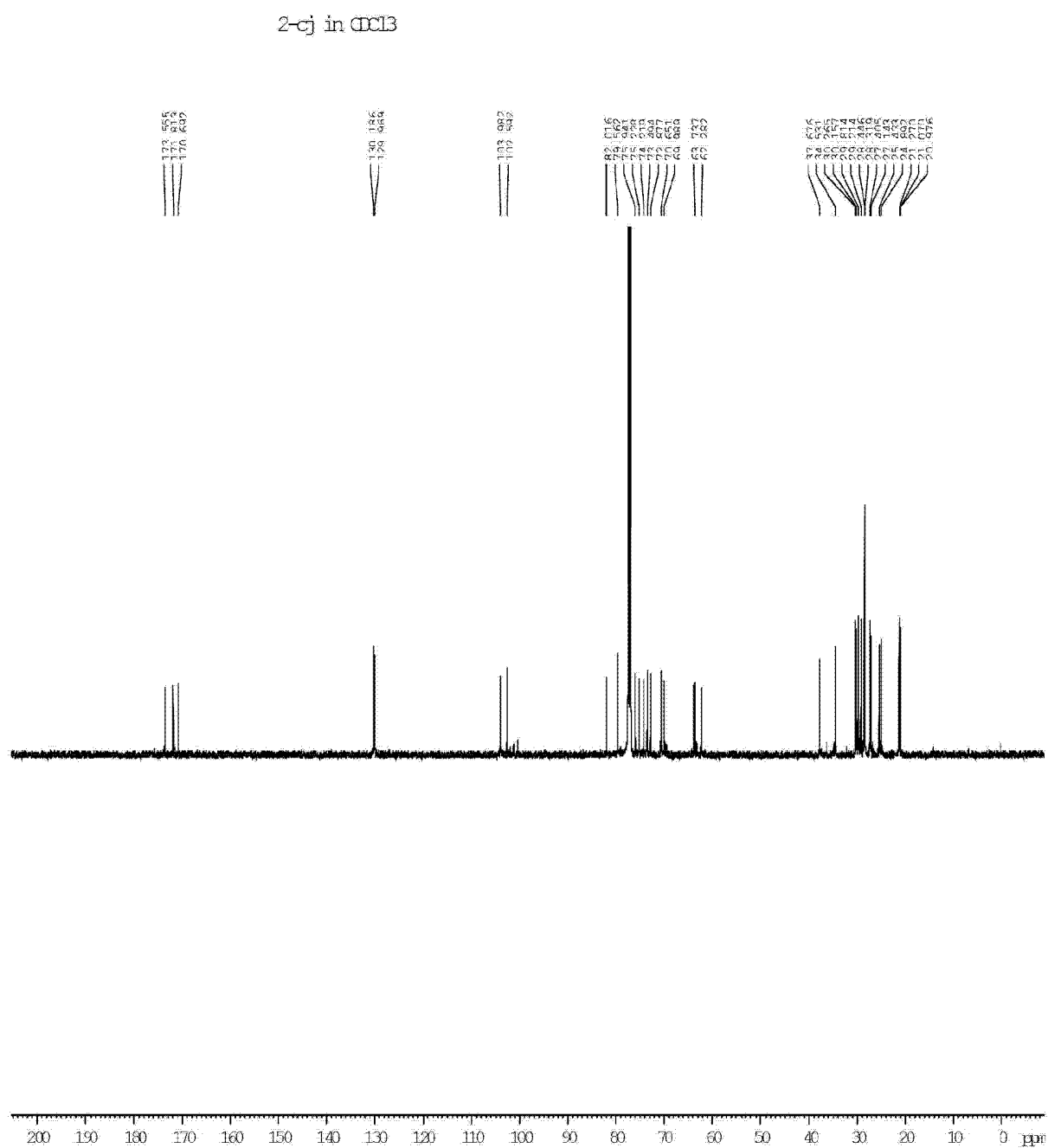


图 3

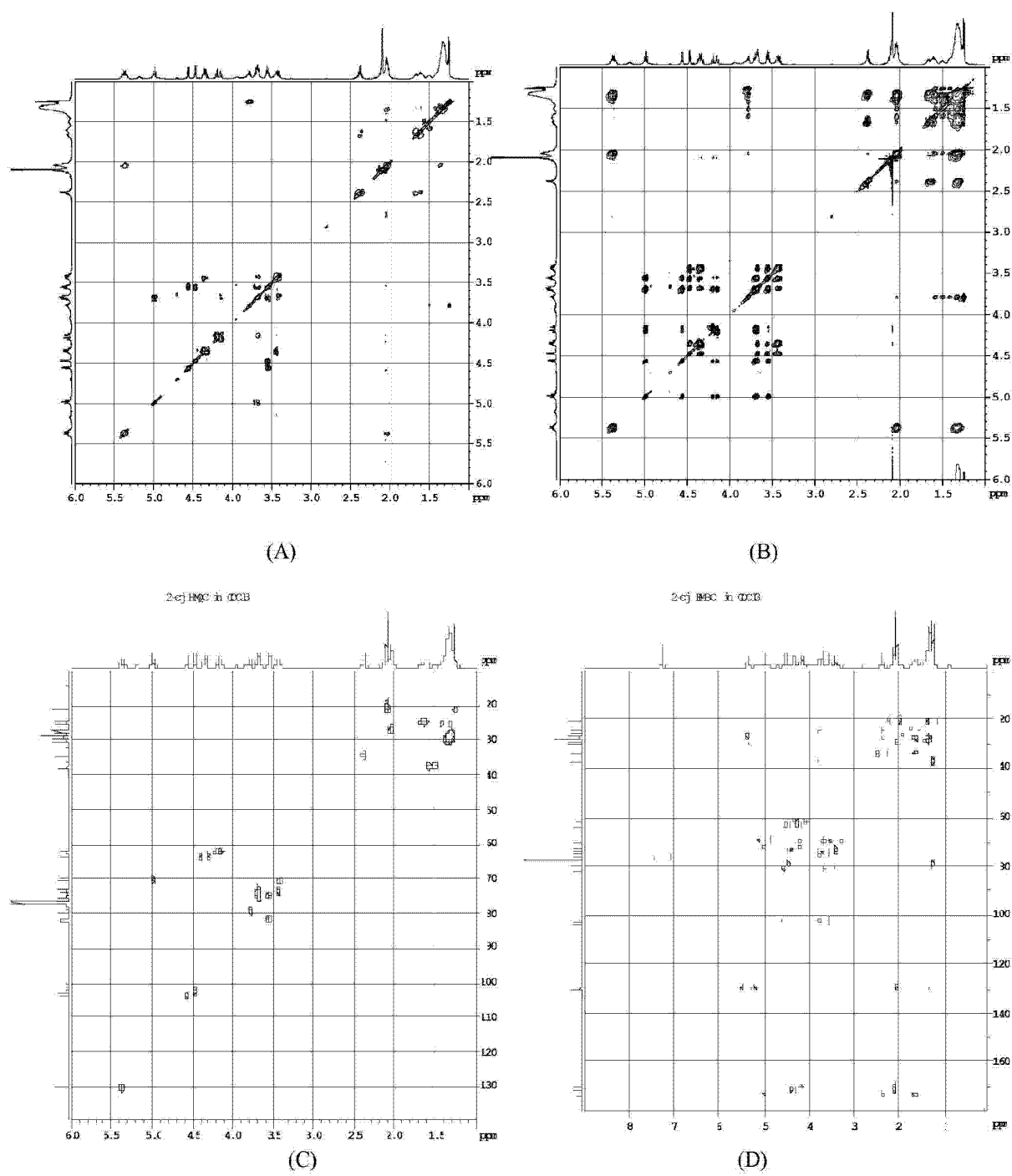


图 4

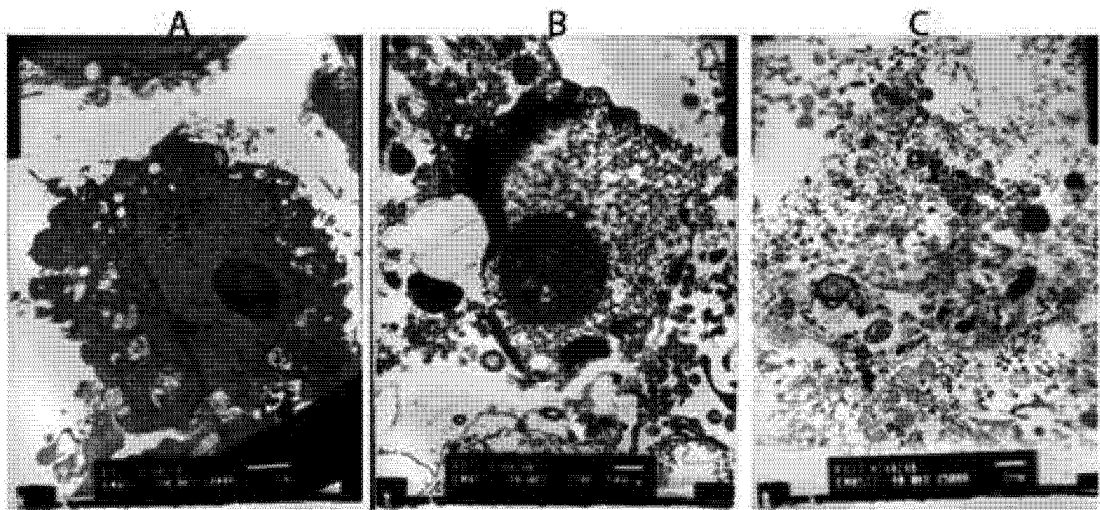


图 5

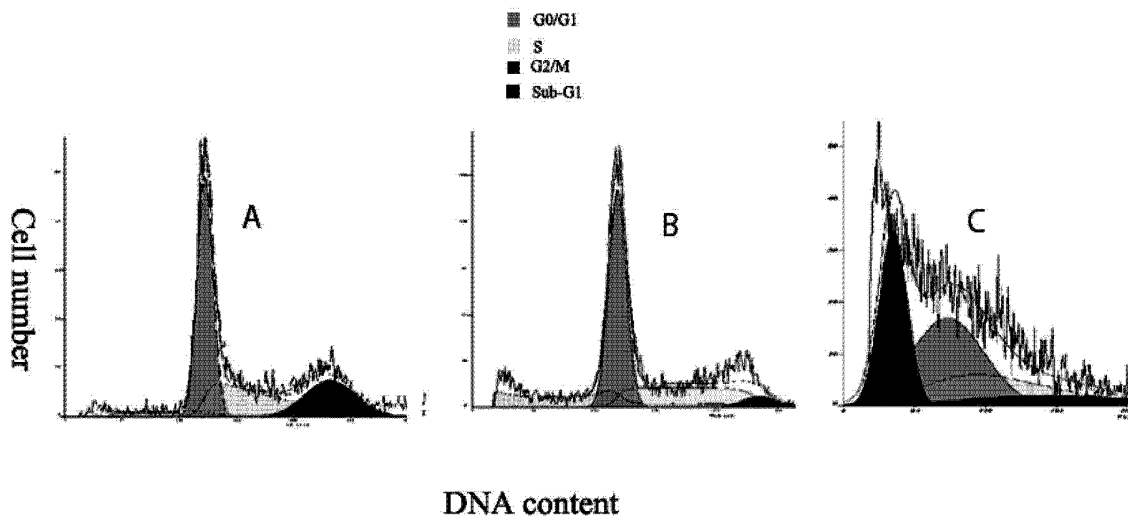


图 6

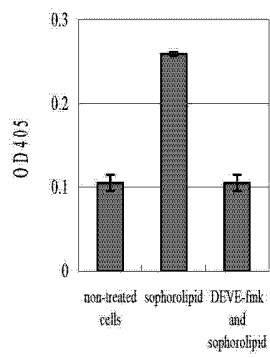


图 7