

封面：

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学
博 士 后 研 究 工 作 报 告

金丝桃属植物中靶向 RXR α 的 PPAPs 类成分研究

田文静

工作完成日期 2017.11.3

报告提交日期 2017.11.3

厦门大学

2017 年 11 月

题名页

金丝桃属植物中靶向 RXR α 的 PPAPs 类成分研究

Novel PPAPs targeting RXR α from *Hypericum* genus

博 士 后 姓 名 田文静

流动站（一级学科）名称 生物学

专 业（二级学科）名称 化学生物学

研究工作起始时间 2015 年 11 月

研究工作期满时间 2015 年 11 月

厦 门 大 学

2017 年 11 月

厦门大学博士后研究工作报告

著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 田文静

日期：2017年11月3日

导师签名： 陈海平

日期：2017年11月3日

摘 要

多环聚异戊烯基酰基间苯三酚类化合物(PPAPs)结构新颖多样,是近期抗肿瘤创新药物研究的热点先导化合物。核受体 $RXR\alpha$ 是抗肿瘤药物研究的一个理想的分子靶点。我们前期从元宝草中发现了部分具有 $RXR\alpha$ 转录抑制活性及肿瘤细胞毒活性的 PPAPs,提示该类成分可能通过 $RXR\alpha$ 通路诱导肿瘤细胞凋亡,由于得到的化合物数量有限,其作用机制及构效关系尚无法明确,而有关 PPAPs 作为 $RXR\alpha$ 介导肿瘤细胞凋亡的天然小分子调节剂的研究,也未见系统研究报道。因此,本课题以福建特色金丝桃属植物元宝草及挺茎遍地金中复杂笼状的 PPAPs 为研究对象,采用化学筛选与活性筛选相结合的研究模式,定向分离和富集 PPAPs 类成分,并对结构新颖的 PPAPs 的生物合成途径进行合理的推测;通过 $RXR\alpha$ 双报告基因及 biacore 等多种生物学手段,研究活性化合物的作用机制并探讨构效关系。

本研究从金丝桃属植物元宝草及挺茎遍地金中分离得到 36 个化合物,包括 15 个新化合物,化合物 **1** 具有特殊的降羰基碳类金刚烷骨架结构,与常规的金刚烷三环骨架 PPAPs 相比,具有特殊的间苯三酚环降 4 位羰基且在 3 位与 5 位间形成碳碳键相连的新颖骨架类型,丰富了 PPAPs 类成分的结构多样性。通过核磁共振图谱、计算 CD 和改良 Mosher 反应,钼盐反应和 X-单晶衍射等方法确定了分离得到化合物的结构及绝对构型,并对它们的生物合成途径进行了推测。SPR 结果显示化合物 **1** 与 $RXR\alpha$ -LBD 蛋白具有慢上慢下的结合模式,通过动力学分析其 KD 值为 10.28 μM ,化合物 **2** 与 $RXR\alpha$ -LBD 蛋白具有快上快下的结合模式,通过亲和分析其 KD 值为 31.70 μM 。 $RXR\alpha$ 双报告基因结果显示,化合物 **1** 在 5-20 μM 的浓度下具有 $RXR\alpha$ 的转录抑制活性且具有一定的浓度依赖性,化合物 **2** 在 5-20 μM 的浓度下具有微弱的 $RXR\alpha$ 转录激活活性。分子对接结果显示,化合物 **1** 和化合物 **2** 可以通过静电场力和范德华力的作用结合到 $RXR\alpha$ -LBD 蛋白上,不同于 CD3254 强的氢键作用。综上所述,化合物 **1** 和 **2**

可能为 RXR α 的小分子调节剂，且具有不同的作用模式，可作为靶向 RXR α 的潜在的先导化合物，其抗肿瘤作用机制及结构修饰工作有待于进一步研究。

厦门大学博硕士学位论文摘要库

关键词：金丝桃属，聚异戊烯基酰基间苯三酚类 (PPAPs)，RXR α ，表面等离子体共振技术 (SPR)，分子对接

Abstract

Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols (PPAPs) is an important source of innovative antitumor drugs with novel structures. RXR α has been an ideal drug target for therapeutic applications, especially in the treatment of cancer. In our preliminary study, several PPAPs have been found to show potential RXR α transcriptional-inhibitory activities and cytotoxicity against HeLa cells, which indicated that PPAPs may induce tumor cell apoptosis via RXR α pathways. However, its mechanism of action and structure-activity relationship is still unclear due to the limited number of obtained compounds. Besides, there is no systematic research on PPAPs as natural micromolecule regulators of RXR α mediated tumor cell apoptosis. Thus, our study focus on the complex caged PPAPs in *Hypericum* genus using the chemical and activity combined screening method to directly isolate and enrich the PPAPs as well as propose the possible biosynthetic pathways of novel PPAPs, study the mechanism of the active compounds by RXR α reporter gene and various biological assays as well as discuss the structure-activity relationship.

In this study, thirty six compounds were isolated from *Hypericum* genus, including 15 new ones. Compounds **1** featured an unusual homoadamantyl skeleton with the loss of C-4 carbonyl and followed by the formation of a new C–C bond between C-3 and C-5, which enriched the structural diversity of PPAPs. All structures were determined by extensive NMR spectroscopic methods, ECD calculation, modified Mosher's method, Snatzke's method and single-crystal X-ray diffraction. In addition, their plausible biosynthetic pathways were proposed. SPR results suggested that compound **1** could bind to RXR α -LBD in a particularly slow association and slow dissociation mode with a K_D of 10.28 μ M, calculated by the kinetic analysis, while compound **2** was similar to CD3254 in a faster association and dissociation mode with a K_D of 31.70 μ M by steady-state binding analysis. Besides, dual luciferase reporter gene assay was used to investigate the effects of compounds on RXR α transcriptional activity. As a result, compound **1** (5–20 μ M) showed potent RXR α

transcriptional inhibitory activity in a dose dependent manner, while compound **2** (5–20 μM) slightly enhanced RXR α transactivation. Docking results suggested that compound **1** and **2** could bind to RXR α -LBD by adopting a receptor contact mode including electrostatic force and van der waals force. The above analysis indicated that compounds **1–2** might be the small-molecule modulators of RXR α with different mode of action, which needs further investigation.

Keywords: *Hypericum* genus; Polycyclic Polyprenylated AcylPhloroglucinols (PPAPs); RXR α ; Surface plasmon resonance (SPR); docking

目 录

第一章 前 言	1
1.1 核受体 RXR α 是抗肿瘤药物研究的重要靶点	1
1.2 PPAPs 结构新颖多样, 是近期抗肿瘤创新药物研究的热点先导化合物	3
1.3 靶向 RXR α 的 PPAPs 类成分及其抗肿瘤作用机制有待深入研究	4
第二章 金丝桃属植物的化学成分研究	8
2.1 植物材料	8
2.2 仪器和材料	8
2.4 化合物的名称、编号及结构	12
2.5 化合物的结构鉴定	18
2.5.1 新颖 PPAPs 类成分的结构鉴定	18
2.5.2 已知 PPAPs 类化合物的结构解析	46
2.6 新化合物结构鉴定数据	55
2.7 PPAPs 类成分的生物合成途径探讨	58
2.7.1 类金刚烷骨架 PPAPs 生合成途径推测	58
2.7.2 二环骨架 PPAPs 生合成途径推测	59
2.7.3 单环骨架 PPAPs 生合成途径推测	60
第三章 活性评价	62
3.1 Biacore 活性评价	62
3.2 RXR α 双报告基因活性评价	65
3.3 HeLa 细胞毒活性评价	69
3.4 分子对接研究	70
第四章 总结与讨论	72
4.1 总结	72
4.2 讨论	72
参考文献	75
致 谢	80
博士生期间研究成果	81
博士后期间研究成果	82
个人简历	83
联系地址	83
附图	84

第一章 前言

天然产物是创新药物、药物候选先导化合物的重要来源，是药物研究领域的基础和重点研究方向；新颖结构和重要生物活性的发现是天然产物研究领域两个关键的创新要素。

多环聚异戊烯基酰基间苯三酚类化合物（Polycyclic Polyprenylated AcylPhloroglucinols，简称 PPAPs）是一类具有新颖骨架结构及良好生物活性的天然产物，是近期抗肿瘤创新药物研究的热点先导化合物。核受体 RXR α 是抗肿瘤药物研究的重要靶点之一。我们前期从元宝草中发现了部分具有 RXR α 转录抑制活性及肿瘤细胞毒活性的 PPAPs，提示该类成分可能通过 RXR α 通路诱导肿瘤细胞凋亡，由于得到的化合物数量有限，其作用机制及构效关系尚无法明确，而有关 PPAPs 作为 RXR α 介导肿瘤细胞凋亡的天然小分子调节剂的研究，也未见系统研究报道。因此，本课题以福建特色金丝桃属植物元宝草及挺茎遍地金中复杂笼状的 PPAPs 为研究对象，采用化学筛选与活性筛选相结合的研究模式，定向分离和富集 PPAPs 类成分，并对结构新颖的 PPAPs 的生物合成途径进行合理的推测；通过 RXR α 双报告基因及 biacore 等多种生物学手段，研究活性化合物的作用机制并探讨构效关系，探讨其抗肿瘤作用机制，为靶向 RXR α 的新型抗肿瘤药物提供更多的候选先导化合物。

1.1 核受体 RXR α 是抗肿瘤药物研究的重要靶点

核受体（nuclear receptor，NR）是一类存在于细胞核内的配体依赖性转录因子，被配体激活后与众多调节因子共同调节靶基因的转录表达，同时也参与多种信号转导通路（MAPK，PI3K/Akt和Wnt等信号通路）的调控^[1]。《Nature Reviews Drug Discovery》杂志2017年1月报道的一篇综述对目前已获批的小分子药物及靶点进行了综合分析，发现有16%的小分子药物靶向核受体（图 1-1）^[2]，可见核受体在药物开发中占有很重要的地位。

视黄醇受体- α （Retinoid X receptor- α ，RXR α ）是多种核受体信号转导通路的关键调控者^[3-4]，可与众多核受体（视黄酸受体-RAR、甲状腺激素受体-TR、维生素D受体-VDR、过氧化酶体增殖体激活受体-PPAR以及孤儿核受体-Nur77）形成异源二聚体（图1-2），参与包括细胞生长、分化、代谢和胚胎发育等许多重要生理过程的调节^[3-5]。RXR α 作为药物靶标已应用于多种疾病的治疗，特别是

癌症，其选择性激动剂LGD1069(Targretin)^[6]（图1-3）是厦门大学张晓坤教授研究开发的第一个以RXR α 为分子靶点的药物，已由FDA批准用于治疗皮肤T-细胞淋巴瘤。可见，RXR α 可作为抗肿瘤药物研究的一个理想的分子靶点。

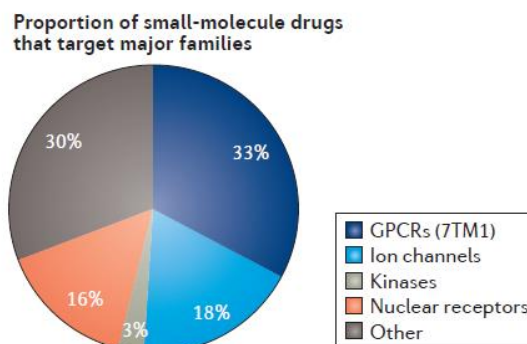


图 1-1 小分子药物及靶点的综合分析

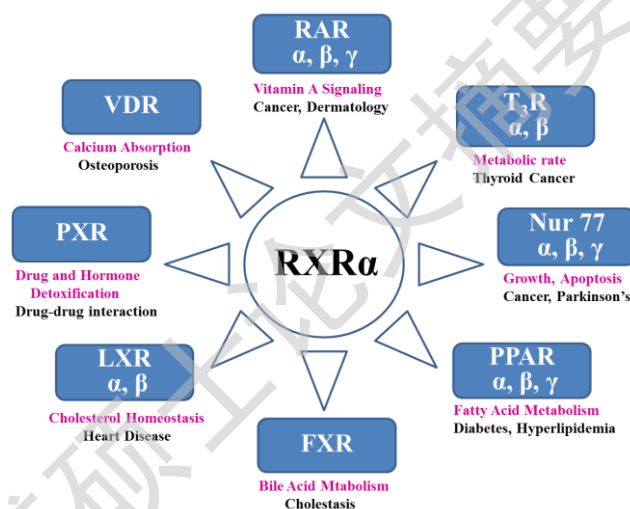


图 1-2 RXR 可以与众多核受体形成异源二聚体

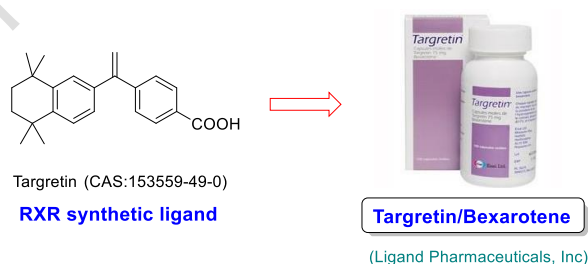


图1-3 靶向RXR α 受体激动剂Targretin

近期，RXR α /Nur77-Bcl-2 信号通路诱导肿瘤细胞凋亡的功能备受关注。研究发现，在细胞凋亡中 RXR α 与 Nur77 有紧密联系，Nur77 的功能取决于其亚细胞定位，在多种凋亡信号的刺激下，Nur77 从细胞核迁移到细胞质，并定位于线粒体上，进而与 Bcl-2 相结合，使 Bcl-2 从细胞保护分子转换为细胞破坏分子，

调节其它 Bcl-2 家族成员如 Bax 的凋亡活性,促使 Bax 从胞质转位到线粒体膜上,从而介导细胞色素 c 的释放,启动线粒体介导的细胞凋亡^[7,8]。在 RXR α 配体凋亡诱导剂的作用线, RXR α /Nur77 异源二聚体的构型向凋亡诱导型转变,产生磷酸化修饰,诱导 RXR α /Nur77 异源二聚体出核定位于线粒体上与 Bcl-2 结合启动凋亡(图 1-4)。目前已发现许多合成的 RXR α 配体可诱导 Nur77 出核,诱导肿瘤细胞凋亡^[8]。因此,以 RXR α 为靶点,筛选具有调控 RXR α 相关信号通路的小分子调节剂,对于抗肿瘤创新药物的研发具有重要意义。

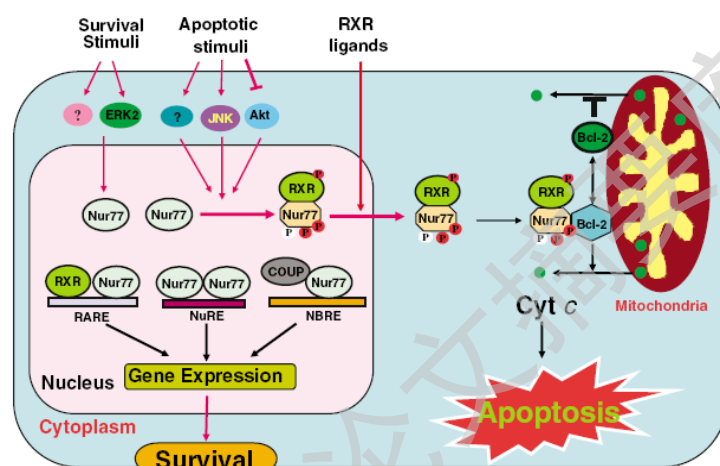


图1-4 RXR α /Nur77-Bcl-2信号通路诱导肿瘤细胞凋亡示意图

1.2 PPAPs 结构新颖多样, 是近期抗肿瘤创新药物研究的热点先导化合物

PPAPs是一类具有聚酮和异戊烯基复合生源途径的特殊结构的天然产物,以双环[3.3.1]壬烷-2,4,9-三酮为母核,并由多个异戊烯基(或香叶基)取代,经不同的环合方式形成的一系列复杂的笼状骨架结构,如二环骨架(Bicyclo[3.3.1]nonane skeleton, BPAPs)、类金刚烷骨架(Homo-admantyl skeleton)及金刚烷骨架(Admantyl skeleton)等(图1-5)。由于酰基的种类,异戊烯基的取代位置、个数及氧化程度,不同类型的分子内环合等多个变化位点造就了PPAPs的结构多样性和新颖性^[9-11]。

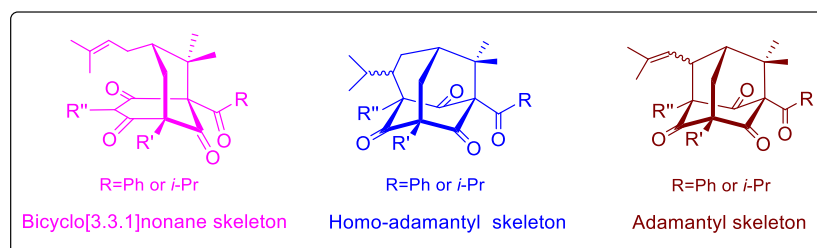


图1-5. PPAPs类成分的几类骨架结构

PPAPs为藤黄科金丝桃属植物的特征性化学成分，具有抗肿瘤、抗抑郁、抗病毒、抗氧化、抗菌等多方面的生物活性^[9-11]。近年来，天然产物研究工作者从金丝桃属植物中分离得到一系列结构骨架新颖的PPAPs类成分^[12-20]（图 1-6），它们多由常规的PPAPs经过碳迁移、重排、开环、降碳等过程得到，如hypercohin A具有与紫杉烷类化合物相似的双环[5.3.1]癸烷的母核结构^[20]。其中，一些新颖骨架结构表现出明显的体外抗肿瘤活性，如hypersubone B对4种肿瘤细胞（HepG2, Eca109, HeLa, A549）均表现出显著的细胞毒活性（IC₅₀: 0.07–7.52 μM）。结构新颖的PPAPs为合成专家提供了全合成的挑战，也为新反应的发现、新合成策略的发展提供了机遇，引起了国内外很多合成工作者的研究兴趣^[21-25]。John A. Porco Jr.等^[23]近期开发出了一种称为“dearomative conjunctive allylic annulation”的一步合成PPAPs母核结构的方法，为进一步衍生出其他多种PPAPs类衍生物奠定了基础。由此可见，PPAPs类化合物结构新颖多样，且具有显著的肿瘤细胞杀伤活性，是近期抗肿瘤创新药物研究的热点先导化合物。

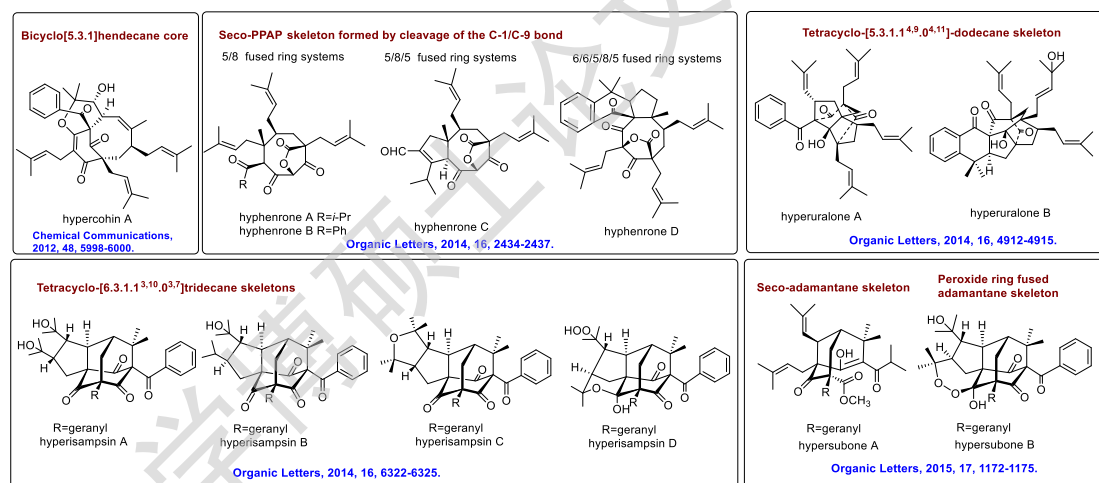


图1-6. 近期报道的新骨架PPAPs

1.3 靶向RXR α 的PPAPs类成分及其抗肿瘤作用机制有待深入研究

申请人前期从藤黄科金丝桃属植物元宝草（*Hypericum sampsonii*）中分离得到一系列结构新颖的PPAPs类化合物^[16-17, 26]（图1-7），其中包括间苯三酚环上降羰基的新骨架类型（**1-4**）、特殊的环氧环联合类金刚烷的多环新骨架类型^[11]（**5-6**）、以及单环、二环、类金刚烷及金刚烷等骨架类型，并对它们的生合成途径进行了合理的推测（图1-8），初步活性评价结果显示，部分PPAPs表现出不同程度的RXR α 转录抑制活性及肿瘤细胞毒活性（图1-9）。这提示，元宝草中富含

新颖骨架结构的PPAPs，且该类成分可能通过核受体RXR α 调控相关信号通路诱导肿瘤细胞凋亡，然而由于PPAPs结构多变，分离得到的每类化合物数量有限，其作用机制及构效关系尚无法明确，有待深入研究。

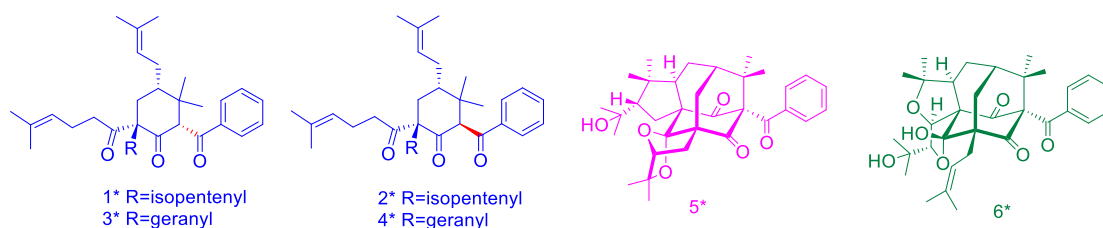


图1-7. 元宝草中分离得到的部分新颖结构的PPAPs

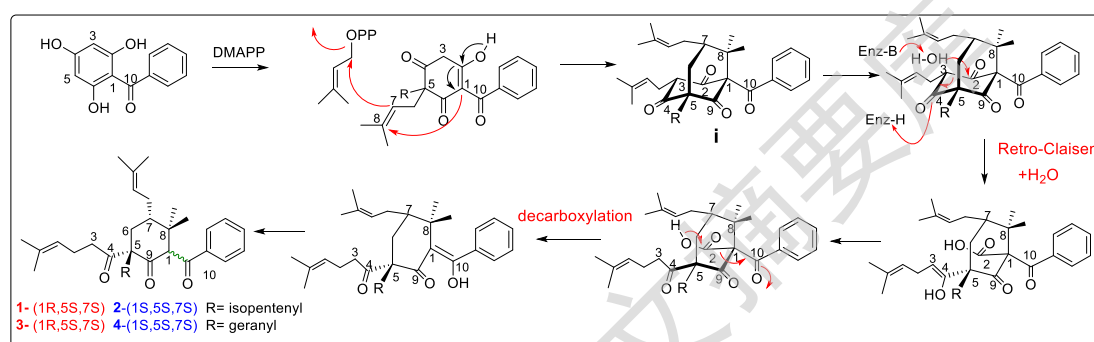


图1-8. 元宝草中部分新骨架PPAPs可能的生物合成途径

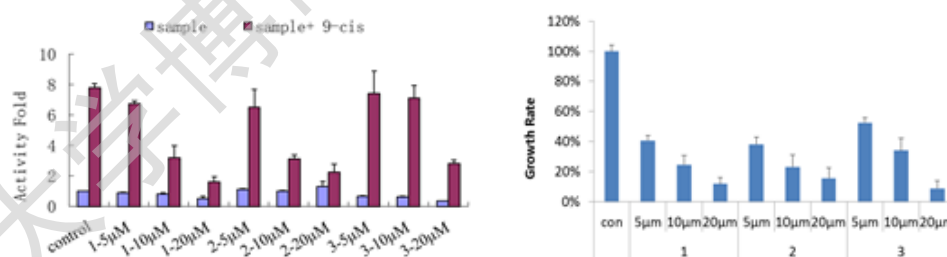
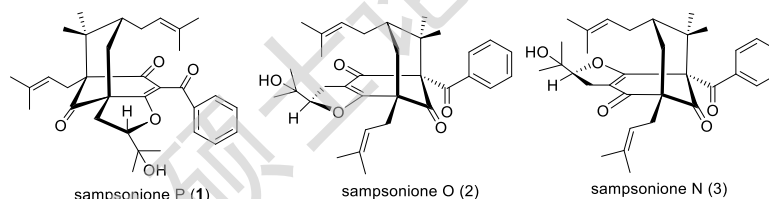


图1-9. 元宝草中部分PPAPs的RXR α 转录抑制活性及对HeLa细胞毒活性结果

为获得更多结构类型的PPAPs类成分，以期PPAPs类成分通过RXR α 介导肿瘤细胞凋亡的构效关系研究提供更多筛选物质，我们对福建产金丝桃属植物进行文献调研，发现挺茎遍地金 (*Hypericum elodeoides* Choisy) 的化学成分研究较少，仅有5个PPAPs类成分被报道^[27] (图1-10)，其中Hyperforin (HF)含量达0.0353%，提示该植物同样富含PPAPs类成分且结构类型与元宝草中分离得到的PPAPs有一定的差异，具有很大的研究开发价值。此外，挺茎遍地金的提取物及

粗流分的初步活性评价结果显示具有一定的RXR α 转录抑制活性，我们还通过LC-MS、UV等技术，对元宝草及挺茎遍地金90%乙醇冷浸提取物中的PPAPs类成分进行了快速识别，研究发现元宝草及挺茎遍地金中均富含PPAPs类成分。虽然我们前期已从元宝草中分离得到了一些PPAPs类成分，然而液质检识结果显示仍有很多尚未被鉴定的PPAPs类成分，有待进一步分离。鉴于此，我们以福建产元宝草及挺茎遍地金中PPAPs类成分为研究对象，继续开展植物化学分离以及活性化合物的结构修饰和稳定性研究，有望发现更多结构新颖多样的PPAPs，丰富此类成分的结构多样性，为靶向RXR α 的新型抗肿瘤药物提供更多的候选先导化合物。

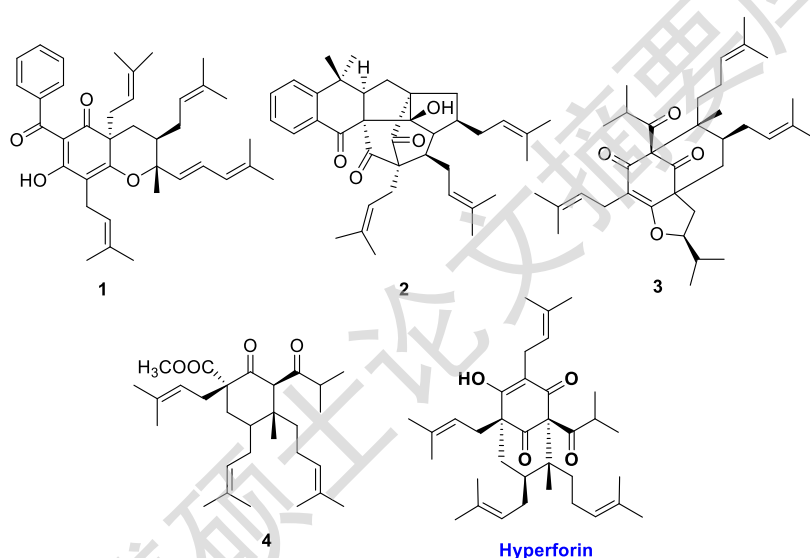


图1-10. 挺茎遍地金中分离得到的PPAPs

基于以上研究背景，提出本课题的研究思路（图 1-11），以新颖骨架结构的PPAPs为研究对象，以RXR α 受体为靶点，采用化学筛选与活性筛选相结合的研究模式：通过TLC、UV、LC-MS技术快速识别金丝桃属植物元宝草和挺茎遍地金中的PPAPs类成分，定向分离和富集PPAPs类成分并鉴定其结构，通过RXR α 双报告基因及多种生物学手段，筛选靶向RXR α 的PPAPs类成分，并结合计算机辅助药物设计探讨PPAPs类成分调节RXR α 信号通路诱导肿瘤细胞凋亡的构效关系；研究活性化合物及衍生物调控RXR α 受体相关信号通路的作用机制。通过上述研究工作，将可能揭示PPAPs类成分通过RXR α 诱导肿瘤细胞凋亡的结构基础，为发现靶向RXR α 的新型抗肿瘤药物奠定基础。

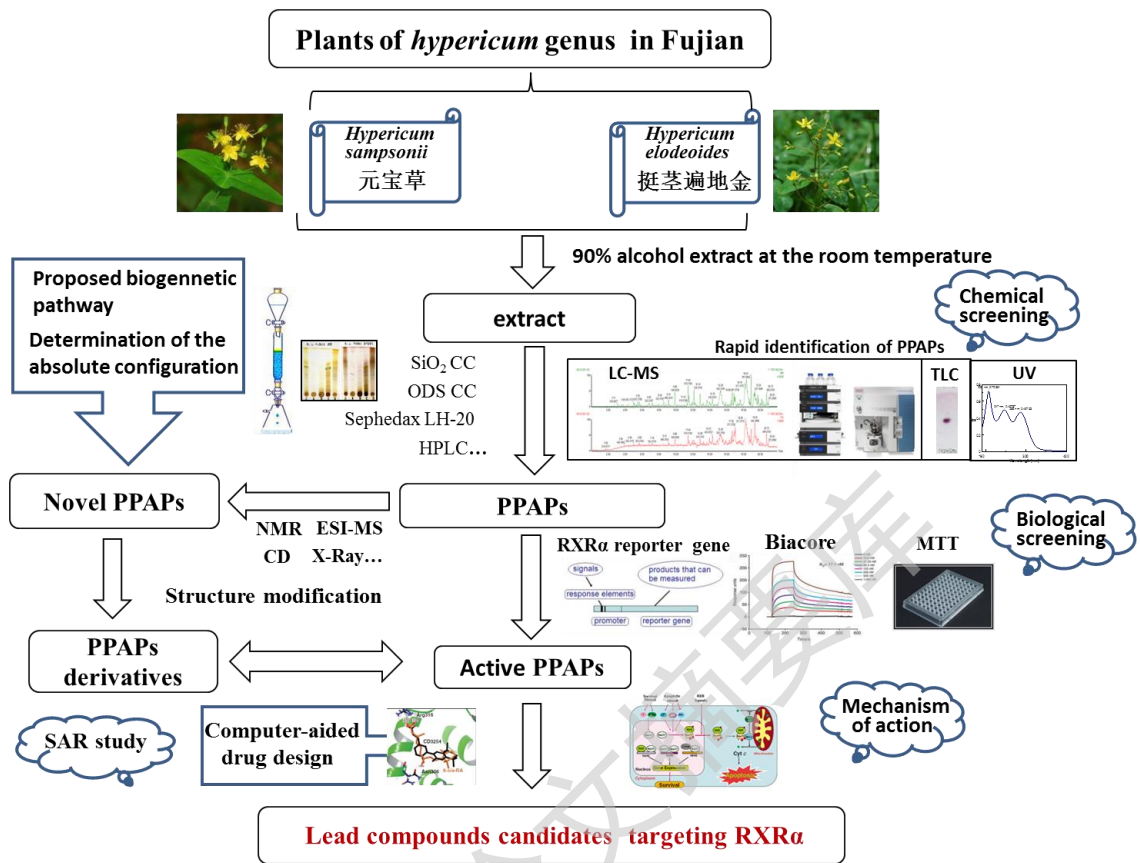


图1-11. 研究思路及技术路线图

第二章 金丝桃属植物的化学成分研究

2.1 植物材料

元宝草药材于 2014 年 6 月采自于广西省武鸣县。由广西中医药大学韦松基教授鉴定为元宝草 *Hypericum sampsonii*; 挺茎遍地金药材于 2016 年 8 月采自福建省宁德市, 由厦门大学李振基教授鉴定为挺茎遍地金 *Hypericum elodeoides*。

2.2 仪器和材料

紫外-可见光谱 (UV) 用日本分光 JASCO V-550 紫外-可见光谱仪测定;

红外光谱 (IR) 用 Bruker FTIR VERTEX 70 红外光谱仪测定, KBr 压片;

旋光光谱用日本分光 JASCO P-1020 旋光仪测定;

CD 光谱用日本分光 JASCO J-180 CD 光谱仪测定;

ESI-MS 用 FINIGAN LCQ Advantage MAX 质谱仪测定;

HR-ESI-MS 用 Waters Synapt G2 Q-TOF 质谱仪测定;

核磁共振实验采用 Bruker AV-300/400/600 超导核磁共振波谱仪测定;

分析液相色谱仪: SHIMADZU LC-20AB 系列 (自动进样器: SPD-M20A Automated Sample Injector; 梯度混合泵: LC-20AB pump; 检测器: SIL-20A Detector; 柱温箱: AT-330 色谱柱恒温箱; 工作站: LCsolution。);

制备液相色谱仪: SHIMADZU LC-6AD 系列 (泵: LC-6AD pump; 检测器: SPD-20A Detector。);

色谱柱: 分析型: Cosmosil 5C18-MS-II column (Φ 4.6 \times 250 mm, 5 μ m);

制备型: Cosmosil 5C18-MS-II column (Φ 20 \times 250 mm, 5 μ m);

Sephadex LH-20 柱层析填料购自 Pharmacia 公司;

RP-18 柱层析填料 ODS (50 μ m) 均购自 YMC 公司;

Toyopearl HW-40 柱层析填料购自 Toyo Soda MFG 公司;

薄层层析硅胶预制板购自烟台工业研究所;

柱层析硅胶 (100-200 目、200-300 目) 购自青岛海洋化工公司;

氘代试剂为美国 CIL 公司产品;

色谱纯甲醇: 山东禹王实业有限公司; 色谱纯乙腈: 迪马公司;

其余柱色谱用化学试剂均为分析纯, 为天津富余精细化工试剂厂产品。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库