

学校编号: 10384

分类号__密级__

学号: 32320141153407

UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

砂钻苔草中抗老年痴呆活性成分研究

Anti-alzheimer's disease constituents research from *Carex*

kobomugi Ohwi

廖小军

指导教师姓名: 陈海峰 教授

专 业 名 称: 药物化学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 5 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目录

摘要.....	1
Abstract	3
缩略语说明	5
第一章 前言	7
1.1 研究背景.....	7
1.1.1 AD 现状	7
1.1.2 AD 的发病机制	8
1.1.3 Appoptosin 是 AD 致病过程中的关键新蛋白	10
1.2 芪类化合物的抗老年痴呆活性.....	11
1.2.1 芪类化合物简介.....	11
1.2.2 芪类化合物抗老年痴呆活性研究.....	14
1.3 苔草属中芪类化学成分研究及其药理活性.....	17
1.3.1 苔草属中芪类的化学成分研究.....	18
1.3.3 苔草属中芪类化合物的药理作用.....	22
1.4 立题依据.....	25
第二章 砂钻苔草的化学成分研究	26
2.1 药材与实验仪器.....	26
2.1.1 药材.....	26
2.1.2 实验仪器.....	26
2.1.3 砂钻苔草化学成分的分离.....	27
2.2 化合物的名称、编号及结构.....	29
2.3 化合物的结构鉴定.....	33
2.3.1 新化合物的结构鉴定.....	33
2.3.2 芪类化合物的结构鉴定.....	36
2.3.3 黄酮类化合物的结构鉴定.....	50
2.3.4 其他类化合物的结构鉴定.....	60

2.4 本章总结.....	63
第三章 砂钻苔草中化学成分的活性评价.....	64
3.1 仪器与材料.....	64
3.1.1 材料.....	64
3.1.2 实验仪器.....	64
3.1.3 主要溶液.....	65
3.1.4 实验细胞.....	66
3.2 神经保护活性评价.....	66
3.2.1 神经保护活性测试原理.....	67
3.2.2 神经保护活性测试方法.....	67
3.2.3 神经保护活性测试结果.....	68
3.3 Appoptosin 活性评价.....	70
3.3.1 活性测试原理.....	70
3.3.2 活性测试方法.....	70
3.3.3 活性测试结果.....	72
3.4 细胞毒活性评价.....	72
3.4.1 细胞毒活性测试原理.....	72
3.4.2 细胞毒活性测试方法.....	73
3.4.3 细胞毒活性测试结果.....	74
第四章 总结和讨论.....	82
参考文献.....	86
附录.....	94
硕士期间发表的论文.....	117
致谢.....	118

Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	3
Abbreviation	7
Chapter 1 Introduction	7
1.1 Background	7
1.1.1 AD profile	7
1.1.2 AD pathogenesis	8
1.1.3 A key protein Apoptosina in the AD pathogenesis.....	10
1.2 Anti-Alzheimer's active of stilbenoids	11
1.2.1 Introduction of stilbenoids	11
1.2.2 Research progress on anti-Alzheimer of stilbenoids	14
1.3 Research progress on chemical constituents and pharmacological of stilbenoids in <i>Carex</i>	17
1.3.1 Research progress on chemical constituents of stilbenoids in <i>Carex</i>	18
1.3.2 Research progress on pharmacological of stilbenoids in <i>Carex</i>	22
1.4 Aims and significance	25
Chapter 2 Chemical constituents of <i>Carex kobomugi Ohwi</i> 26	
2.1 Herbs and materials	26
2.1.1 Herbs	26
2.1.2 Instruments.....	26
2.1.3 Isolation.....	27
2.2 Name, number and structure of compounds	29
2.3 Identification of chemical structure	33
2.3.1 Identification of new compound's chemical structure	33
2.3.2 Identification of stilbenoids' chemical structure	36
2.3.3 Identification of flavonoids' chemical structure.....	50

2.3.4 Identification of others' chemical structure.....	60
2.4 Summary.....	63
Chapter 3 Rrsearch of biological activities of the isolated compounds	64
3.1 Instruments and materials	64
3.1.1 Materials	64
3.1.2 Instruments.....	64
3.1.3 Solvent	65
3.1.4 Cell.....	66
3.2 Rrsearch of neuroprotective.....	66
3.2.1 Principle	67
3.2.2 Method	67
3.2.3 Result	68
3.3 Rrsearch of Appoptosin.....	70
3.3.1 Principle	70
3.3.2 Method.....	70
3.3.3 Result	72
3.4 Rrsearch of cytotoxicity.....	72
3.4.1 Principle	72
3.4.2 Method	73
3.4.3 Result	74
Chapter 4 Conclusion and discussion	82
References.....	86
Appendix.....	94
Publication	117
Acknowledge.....	118

摘要

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 又称为老年痴呆症, 是一种进行性发展的神经退行性疾病。Appoptosin 是 AD 致病过程中的关键新蛋白, APP-Appoptosin 通路多靶点活性评估体系是筛选抗老年痴呆活性成分的有效手段。芪类化合物是一类具有良好的抗老年痴呆活性的天然产物, 前期研究发现宫部苔草酚 C 等芪类化合物能够通过抑制 β -分泌酶的活性, 降低与老年痴呆密切相关的 A β 蛋白的产生。本课题在前期研究的基础上, 选择了宫部苔草酚 C 含量丰富的砂钻苔草作为研究对象, 对其中的芪类化合物进行化学成分研究, 以期发现更多结构多样的芪类化合物, 通过 APP-Appoptosin 通路多靶点活性评估体系筛选抗老年痴呆活性成分。

本文综合运用了硅胶柱色谱、ODS 柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、分析型 HPLC、半制备型 HPLC 以及重结晶等方法, 从砂钻苔草 60% 乙醇提取物大孔树脂 60% 洗脱部分中分离得到了 21 个单体化合物。利用核磁共振波谱、质谱、紫外吸收光谱和化合物的理化性质对其中 18 个化合物进行了结构鉴定, 其中芪类化合物 8 个, 黄酮类化合物 8 个, 其他类化合物 2 个。化合物 18 为新化合物, 化合物 5、6、7、12、14、16、17、19、20、21 为苔草属植物中首次分离, 化合物 2、8、13、15 为砂钻苔草中首次分离。

用过氧化氢损伤 N2a695 细胞 (稳转 APP695 的小鼠神经瘤细胞系) 及人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 建立体外神经细胞损伤模型, 利用 MTT 法检测样品对 N2a695 以及 SH-SY5Y 细胞增殖的影响, 结果显示针对两种不同的细胞系, 化合物 1、3、7、8 及化合物 2、13、16、21 具有一定的神经保护作用; western blot 实验结果显示化合物 3、12、15 作用于 SH-SY5Y 细胞, 可使 appoptosin 蛋白表达下调; 同时使用 MTT 法检测分离的化合物对 8 种肿瘤细胞系的细胞毒活性, 其中一些化合物具有明显的细胞毒活性, IC₅₀ 值范围为 3.25-44.82 μ M。

关键词: 砂钻苔草; 化学成分; 抗老年痴呆

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease. Apoptosin is a key new protein in the process of AD pathogenesis. The multi-target activity evaluation system of APP-Apoptosin pathway is an effective way to screen active constituents with anti-Alzheimer's activity. Stilbenoids are a class of natural products with good anti-Alzheimer's activity. Previous studies have found that stilbenoids such as miyabenol C can reduce the production of Alzheimer's related A β protein, by inhibiting the activity of β -secretase. Based on the previous research, this paper select *Carex kobomugi Ohwi* as the research subject, which is a rich source of miyabenol C, and focus on the isolation of stilbenoids. More structurally diverse stilbene compounds are expected to be found and screened for anti-Alzheimer's active ingredient by the multi-target activity evaluation system of APP-Apoptosin pathway.

In this research, the chemical constituents of *C. kobomugi* were investigated and 21 compounds were isolated from 60% ethanol extracts of the plant by using the methods of Silica gel column chromatography, ODS column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography, analytical HPLC, semi preparative HPLC and recrystallization. The structures of these compounds were identified on the basis of the data from NMR, MS spectra, physical properties and chemical properties. Among the 21 compounds, there are 8 stilbenes, 8 flavonoids and 2 other types of compounds. Compounds **5**, **6**, **7**, **12**, **14**, **16**, **17**, **19**, **20**, **21** were separated from the *Carex* genus for the first time, Compounds **2**, **8**, **13**, **15** were separated from *C. kobomugi* for the first time. Compound **18** was isolated as a new compound.

The neuronal cell injury model was established by damaging N2a695 cells (mouse tumor cell line transfected human APP695) and human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) with H₂O₂. The effects on the proliferation of N2a695 and SH-SY5Y cells of the compounds were examined by MTT assay. As a result, compounds **1**, **3**, **7**, **8** and compounds **2**, **13**, **16**, **21** have neuroprotective effects on two different cell lines respectively; the results of western blot showed that the expression of apoptosin was

down-regulated by compounds **3**, **12** and **15** on SH-SY5Y cells. Meanwhile, MTT assay was used to detect the cytotoxic activity of the isolated compounds on eight tumor cell lines. Some of them show obvious cytotoxicities with IC₅₀ ranges from 3.25 to 44.82 μM.

Key word: *Carex kobomugi* Ohwi; Chemical constituents; anti-Alzheimer's

厦门大学博硕士学位论文摘要库

缩略语说明

AD	Alzheimer's disease
A β	amyloid- β peptide
CC	Column chromatography
ODS	Octadecylsilane
HPLC	High performance liquid chromatography
HR-ESI-MS	High resolution electrospray ionization-mass spectroscopy
NMR	Nuclear magnetic resonance
HSQC	^1H -detected heteronuclear single-quantum correlation
^1H - ^1H COSY	^1H - ^1H Correlation spectroscopy
HMBC	^1H -detected heteronuclear multiple-bond correlation
DMSO	Dimethyl sulfoxide
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
m/z	Mass to charge ratio

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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.

厦门大学博硕士论文摘要库