

学校编号: 10384
学号: 32320141153408

分类号 密级
UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

白花前胡靶向核受体 RXR α 发挥抗肿瘤活性成分研究

Research about constituent from *Peucedanum praeruptorum*
induces cancer cell apoptosis through RXR α receptor

廖志超

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 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 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
第一章 前言	5
1.1 RXR α 在抗肿瘤药物研究中的作用.....	5
1.2 香豆素类化合物抗肿瘤作用及其作用于 RXR α 的研究.....	6
1.3 白花前胡研究进展.....	9
1.4 立题依据.....	21
第二章 白花前胡的化学成分研究	23
2.1 药材与实验仪器.....	23
2.1.1 药材	23
2.1.2 实验仪器	23
2.1.3 白花前胡化学成分的分离.....	24
2.2 化合物的名称、编号及结构.....	27
2.3 化合物的结构鉴定.....	33
2.3.1 吡喃型香豆素的结构鉴定	33
2.3.2 呋喃型香豆素的结构鉴定	64
2.3.3 简单香豆素的结构鉴定	68
2.3.4 其他类型的结构鉴定	69
2.3.5 白花前胡中香豆素类成分的捡识.....	70
第三章 香豆素成分的活性评价	86
3.1 仪器与材料.....	87
3.1.1 材料.....	87
3.1.2 实验仪器	87
3.1.3 主要溶液	87
3.2 RXR α 双报告基因活性评价.....	88

3.2.1 活性测试原理.....	88
3.2.2 活性测试方法.....	89
3.2.3 活性测试结果.....	91
3.3 RXRα 结合活性评价.....	92
3.3.1 Biacore 法.....	95
3.4 化合物对 PARP 切割的影响.....	97
3.4.1 实验原理.....	98
3.4.2 实验方法.....	98
3.4.3 实验结果.....	100
第四章 小结与讨论.....	101
4.1 小结和讨论.....	101
4.2 展望.....	104
参考文献.....	105
论文发表情况.....	114
致谢.....	115
附录.....	116

Content

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	2
Chapter 1 Introduction	5
1.1 The role of RXRα in drug research	5
1.2 Reaserch progress on anticancer activity of coumarins and it's effect on RXRa	6
1.3 Reaserch progress on <i>Peucedanum praeruptorum</i> Dunn	9
1.4 Aims and significance	21
Chapter 2 Chemical components research of <i>Peucedanum praeruptorum</i> Dunn	23
2.1 Materials and reagent	23
2.1.1 Plants	23
2.1.2 instruments	23
2.1.3 Extraction and isolation	24
2.2 The structue of isolated compound	27
2.3 Identification of chemical structures	33
2.3.1 Identification of chemical structures of pyrancoumarins	33
2.3.2 Identification of chemical structures of furocoumarins	64
2.3.3 Identification of chemical structures of simple coumarins	68
2.3.4 Identification of chemical structures of others	69
2.3.5 The Identification of pattern of coumarins	70
Chapter 3 Bioactivity reaserch of <i>Peucedanum praeruptorum</i> Dunn	86
3.1 Materials and reagent	86
3.1.1 Materials	86
3.1.2 instruments	86
3.1.3 reagent	87
3.2 RXRα transcription inhibitory activity evaluation	88
3.2.1 The theroy of activity evaluation	88
3.2.2 activity evaluation	89

3.2.3 The outcome of activity evaluation	91
3.3 RXRα combination evaluation.....	92
3.3.1 Biacore.....	92
3.4 PARP assay	97
3.4.1 The theory	98
3.4.2 The method	98
3.4.3 The outcome of activity evaluation	100
Chapter 4 Discussion and summary.....	101
4.1 Discussion and summary	101
4.2 Expectation	104
References	105
Published Articles	114
Thanks.....	115
Appendix.....	116

摘要

近年来,癌症的发病率逐年攀升,已成为第二致死性疾病,寻找有效的抗肿瘤药物已成为当务之急。RXR α 是抗肿瘤药物研究中的一个重要的靶点。前期研究发现香豆素类化合物可以通过调控RXR α 相关信号通路诱导肿瘤细胞凋亡,然而由于得到化合物数量有限,其构效关系及可能的作用机制仍有待进一步研究。白花前胡中富含香豆素类成分,且部分馏分表现出明显的RXR α 转录抑制活性。因此,本文以白花前胡为研究对象,对活性馏分中的香豆素类成分开展化学成分研究及RXR α 相关活性评价,探讨构效关系及可能的作用机制。

本文综合运用了硅胶柱色谱、大孔凝胶柱色谱、ODS中低压柱色谱、Sephadex LH-20柱色谱、薄层色谱、重结晶、半制备HPLC等方法,从白花前胡80%乙醇提取物的大孔树脂95%乙醇-水洗脱部分中分离得到37个单体化合物。利用核磁共振波谱、质谱以及化合物的理化性质对分离得到的化合物进行了结构鉴定,包括36个香豆素类化合物,其中化合物24为新化合物,化合物3、35为本属首分离,化合物9、13、14、30、33、36为本种首分离。并对分离得到的香豆素类成分的质谱裂解规律和核磁规律进行了初步研究。

此外,利用核受体RXR α 双荧光素酶报告基因、Biacore、Western blotting等活性测试方法对分离到的化合物进行活性评估。结果表明,化合物6、8、20、29具有明显的RXR α 转录抑制活性,并且呈现浓度依赖性,Biacore实验显示化合物6、8与RXR α -LBD蛋白具有快上快下的结合模式,KD值分别为 $K_d=39.48\ \mu\text{M}$; $K_d=12.73\ \mu\text{M}$,化合物6、8、20、29可诱导肿瘤细胞内的PARP蛋白产生凋亡切割带,说明其可能是通过细胞凋亡来抑制肿瘤细胞生长。因此可以初步推断香豆素类化合物可以通过调控RXR α 相关信号通路来发挥抗肿瘤作用,并对其构效关系进行了初步的探讨。

关键词: 白花前胡; 香豆素; RXR α ; 抗肿瘤活性

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

In recent years, malignant tumor has become the second deadly disease due to the rising incidence rates. Searching for the effective antitumor drugs has become the top priority. Retinoic acid receptor X (RXR α) is an ideal drug target for the treatment of cancer. Previous research found that coumarins could induce cancer cell apoptosis via RXR α signaling pathway. Owing to the limited types of obtained coumarins, structure activity relationship and mechanism of action are still unclear. *Peucedanum praeruptorum* is a rich source of coumarins, meanwhile, some fractions of *P. praeruptorum* could inhibit the transcriptional activity of RXR α . Therefore, *P. praeruptorum* was chosen as the research object of our study. The chemical constituents and RXR α transcriptional inhibitory activities of coumarins in the active fractions of *P. praeruptorum* will be studied. Besides, the structure activity relationship and mechanism of action will be discussed.

In our study, various chromatographic techniques (silica gel column chromatography, macroporous gel column chromatography, ODS column chromatography, sephadex LH-20 chromatography, thin layer chromatography (TLC), recrystallization, preparative HPLC, etc) were used to investigate the 80% ethanol extract of *P. praeruptorum*. 38 compounds were isolated and their structures were identified on the basis of the data from NMR, MS spectra, physical properties and chemical properties. Among the 38 compounds, 37 of them are coumarins. Compound **24** was isolated as a new compound; compounds **3**, **35** were isolated from the plants of *Peucedanum* genus for the first time; compounds **9**, **13**, **14**, **30**, **33**, **36** were separated from *P. praeruptorum* for the first time. The mass fragmentation pathway and NMR characteristics of the isolated coumarins will be discussed.

The methods of nuclear receptor RXR α dual luciferase report gene assay, biacore and western blotting were used to investigate the activities of the isolated compounds. The results suggested that compounds **6**, **8**, **20**, **29** showed obvious RXR α transcriptional inhibitory activities in a concentration-dependent manner.

Besides, compounds **6**, **8**, **20**, **29** could also induce the cutting of PARP protein meaning that coumarins could induce cancer apoptosis. In addition, the biacore assay showed that compound **6**, **8**, **20**, **29** could bind RXR α -LBD proteins in a fast up and fast down form with $K_d=39.48 \mu\text{M}$, $K_d=12.73 \mu\text{M}$, respectively. The above results suggested that coumarins may induce cancer cells apoptosis via the regulation of the RXR α relevant signaling pathways. The preliminary structure-activity relationships were discussed.

Key words: *Peucedanum praeruptorum* Dunn; coumarins; Antitumor bioactivity; RXR α

第一章 前言

1.1 RXR α 在抗肿瘤药物研究中的作用

随着人们生活水平的提高,不健康的生活方式使得癌症的发病率也越来越高。据世界卫生组织(WHO)发布的《全球癌症报告 2014》中显示^[1],在 2012 年新增的 1400 万癌症病例中有 820 万人死亡。由于经济发展带来的环境和生活方式的改变,将会导致全球癌症病例呈现迅猛增长态势,由 2012 年的 1400 万人,将逐年递增至 2025 年的 1900 万人,到 2035 年将达至 2400 万人。由于医疗水平和环境问题,非洲、亚洲和中南美洲这些发展中国家癌症发病形势最为严峻。2012 年中国癌症发病人数为 306.5 万,约占全球发病人数的五分之一;癌症死亡人数为 220.5 万,约占全球癌症死亡人数的四分之一^[2]。癌症俨然成为威胁人类生命健康的重要杀手,寻找有效的防治手段已成为当务之急。目前的抗癌药物多具有剂量依赖性毒性,其治疗效果已进入平台期。分子靶向治疗是癌症的预防、治疗与诊断等方面的新兴手段,其通过将小分子等有效成分定位聚集于癌细胞及癌症相关的靶点上,从而减少对非癌细胞的作用,减少不良反应的发生,达到治疗癌症的目的。因此,基于靶点的药物开发已经成为抗癌药物研究中的热点^[4]。

核受体(nuclear receptor, NR)是一类在生物体内广泛分布的,配体依赖的转录因子。它分布于胞浆或细胞核内,通过调控基因的表达从而影响细胞的新陈代谢,细胞分化,胚胎发育^[5-7]。核受体主要包括维甲酸类受体、甾类激素受体、甲状腺素受体、维生素 D3 受体和孤儿受体。其中 RXR(维甲酸 X 受体或称视黄醇受体)能与核受体超家族中约 1/3 成员相互作用形成异源二聚体^[8],如视黄酸受体(RAR)、甲状腺受体(TR)、维他命 D 受体(VDR)、肝 X 受体(LXR)以及孤儿受体 Nur77 等,参与机体生理过程的调节。因此, RXR 是核受体家族中的重要一员。RXR 又分为三种亚型,分别是 α 、 β 、 γ ,它们有不同的启动子和剪切方式。 α 亚型最为重要,在人体的肝脏、肾脏、脾脏、胎盘和表皮细胞中都有分布。RXR 在受到不同配体的调控时,会在细胞质和细胞核之间穿梭,进而影响细胞增殖、分化和凋亡^[9,10]。其中, Dawson MI 等人研究发现 RXR α 能与

Nur77 形成异源二聚体, 使得 RXR 基因序列上的出核信号肽 (NES) 暴露出来, 出核后又与线粒体上的 Bcl-2 相作用, 使得 Bcl-2 由一个抗凋亡分子转变为促凋亡分子, 促使细胞色素 C 释放, 从而引起细胞凋亡。Targretin 是第一个以 RXR α 为分子靶点的抗肿瘤药物, 由厦大药学院张晓坤教授于 1994 年研究开发出来治疗 T 细胞淋巴瘤^[13]。在 2012 年, 厦门大学生物医学研究院癌症中心与暨南大学中药与天然产物药物研究所合作的一项研究中, 发现了一系列双苯吡酮类化合物可以作为 RXR α 的小分子调节剂, 其中的化合物 CF-31 可以与 RXR α 结合, 通过激活 RXR α , 进而激活 TNF α 通路, 调节细胞凋亡^[14]。可见, RXR α 是抗肿瘤药物研究的一个重要靶点。

以 RXR α 为靶点, 结合我国丰富的中药资源, 寻找能够与其相作用的小分子调节剂, 使得抗肿瘤药物能够选择性发挥作用, 增强疗效, 降低毒副作用, 可为抗肿瘤药物的研发提供新的思路。

1.2 香豆素类化合物抗肿瘤作用及其作用于 RXR α 的研究

香豆素是自然界中广泛存在的一种具有苯并 α -吡喃酮结构的化合物, 根据 α -吡喃酮环上取代基的不同可分为简单、呋喃、吡喃和其他香豆素 4 类。香豆素于 1820 年首次发现分离得到, 目前已有 1300 多种, 广泛分布于伞形科、芸香科、菊科、豆科、茄科等植物中^[19,20]。香豆素类化合物具有抗肿瘤、抗 HIV、抗骨质疏松、抗菌等多方面的生物活性, 其中抗肿瘤作用已引起了众多学者关注与研究。

Saeed Emami^[26]等人报道的香豆素抗癌研究进展中提到, 一类硝基取代的简单香豆素可以通过激活 P38 来激活 P21 WAF1/CIP1 细胞周期依赖激酶抑制物蛋白激酶(SAPK)来发挥抗增殖作用, 还有一类香豆素不会影响原发肿瘤的增长, 而是抑制乳腺癌细胞的转移。此外还总结了香豆素发挥抗癌作用的几个主要途径: 抑制细胞周期; 诱导细胞凋亡; 调节雌激素受体; 抑制 DNA-相关酶 (拓扑异构酶)。Raad^[28]等人研究发现香豆素可以通过抑制 P-糖蛋白受体, 从而使得癌细胞能够持续的处在药物作用过程中, 抑制癌细胞利用 P-糖蛋白排除细胞内的抗癌药物的作用。合成、呋喃和吡喃型的香豆素对人类白血病 K562/R7 过表达糖蛋白都具有较好的活性。当香豆素有二氢呋喃取代时也有抑制 P-糖蛋白的作用, C-4 位上有苯基取代时也会加强其活性, 在 C7-C8 有羟基异丙基取代时, 活

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