

分类号\_\_\_\_\_

密级\_\_\_\_\_

U D C\_\_\_\_\_

编号\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

国家海洋局第三海洋研究所

博士 后 研 究 工 作 报 告

海洋荔枝螺提取物抗炎抗肿瘤活性

及其成分研究

张 芳

工作完成日期 2014. 08

报告提交日期 2014. 08

二零一四年八月

题名页

海洋荔枝螺提取物抗炎抗肿瘤活性  
及其成分研究

Study on the Crude Extract of *Thais clavigera*  
and Substances Analysis with the Anti-inflammatory  
and Anti-tumor Effects

博士后姓名:张芳

流动站(一级学科)名称:生物学

专业(二级学科)名称:海洋生物学

研究工作起始时间 2012年2月

研究工作期满时间 2014年8月

二零一四年八月

# 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： \_\_\_\_\_ 日期： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

导师签名： \_\_\_\_\_ 日期： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

## 摘 要

荔枝螺是福建海域常见食用螺类，中药古方记载和民间长期食用证实具有良好的消炎消肿作用，但国内外对其生物活性物质的研究还较少，因此对荔枝螺药效物质基础和作用机制的探究具有重要意义。

本论文以福建海域荔枝螺为研究材料，通过蜂毒磷脂酶抑制，NF- $\kappa$ B 报告基因激活以及 p65 入核观察等手段指导分离荔枝螺抗炎组分，并研究该活性组分的抗癌作用及机制，对主要活性物质进行纯化和结构鉴定。

以蜂毒磷脂酶活性抑制作用为指标确定荔枝螺抗炎部位为腺体乙酸乙酯提取相 (E-EA)。在 LPS 刺激下，E-EA 能明显抑制肺癌细胞 NCI-H292 NF- $\kappa$ B 基因表达和 p65 蛋白进入细胞核，显著抑制 LPS 诱导的 TNF $\alpha$  mRNA 上调，从而通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路有效拮抗 LPS 所致炎症激活作用。

硅胶柱进一步分离荔枝螺腺体乙酸乙酯粗提物 (E-EA)，得到蜂毒磷脂酶抑制组分 E-EA-2。E-EA-2 有效抑制乳腺癌细胞 MCF-7，肝癌细胞 QSG-7703、CMMS-7721 增殖，药物浓度高于 40  $\mu$ g/ml 时，三种癌细胞存活率显著降低 (<56%)。E-EA-2 能诱导肝癌细胞 QSG-7703 发生 PARP 蛋白剪切，加入泛 Caspase 抑制剂使细胞

存活率提高了 26%。同时，E-EA-2 使 MCF-7 细胞核产生固缩，线粒体膜电位显著下降，凋亡细胞数量显著增加。E-EA-2 对癌细胞的增殖抑制作用主要是以促凋亡方式实现的。

通过液相色谱、气质联用色谱等分析发现荔枝螺腺体乙酸乙酯粗提物E-EA-2由多个含溴化合物组成，进一步分离纯化主峰物质，结构鉴定其为6-溴靛红（6-bromoisatine），分子结构式  $C_8H_4BrNO_2$ 。

关键词：荔枝螺 抗炎 抗癌 6-溴靛红

## Abstract

*Thais Roeding*, as one of the most popular marine foods in Fujian Province, is proved with a strong anti-inflammatory effect according to the traditional Chinese medicine records and long-term using among local people. However, there are few public reports about the active components from this snail. For this reason, it is very significant to find the anti-inflammatory components and study their molecular action mechanism at the cellular level. In this project, we had isolated and screened the anti-inflammatory and anti-tumor substances from *Thais clavigera* under the bioactivity assay guidance through bee venom PLA2 enzyme inhibition, NF- $\kappa$ B report gene and nuclear p65 observation. The active substances were further purified by the column chromatography methods and identified of their chemical structures by means of NMR.

Screening by bee venom phospholipaseA2 (BvPLA2) inhibited activity, the ethyl acetate extracts (E-EA) from the glands of *Thais clavigera* were found as the anti-inflammatory fraction. By means of NF- $\kappa$ B reporter gene assay, nuclear p65 observation and TNF $\alpha$  mRNA detection, we found the E-EA significantly inhibited LPS-induced NF- $\kappa$ B activity in human NCI-H292 airway epithelial cells. The results indicated that the possible anti-inflammatory mechanism of E-EA was

blocking the activation of NF- $\kappa$ B signal pathway.

After the further purification of E-EA by silica gel column chromatography, we obtained another fraction (E-EA-2) with more powerful anti-BvPLA2 activities. The cancer cells proliferation (MCF-7, QSG-7703 and SMMC-7721) were significantly inhibited when the concentration of E-EA-2 exceeded 40 $\mu$ g/ml. E-EA-2 could induce PARP cleavage in QSG-7703 cells. While the number of survival cancer cells obviously increased at the presence of cell permeable pan caspase inhibitor Z-VAD. And cultured MCF-7 cells with E-EA-2 after 24h, cell nuclear shrinkage, loss of mitochondrial membrane potential and cell apoptosis were obviously observed. The anti-tumor effects of E-EA-2 might be taken through promoting cell apoptosis. By the analysis of HPLC, GC-MS and NMR, the main component in E-EA-2 was purified and identified as 6-bromoisatine.

Keywords: *Thais Roeding*, anti-inflammatory, anti-cancer, 6-bromoisatine

# 目录

1. 前言.....	1
2. 材料和方法.....	6
2.1 实验材料.....	6
2.1.1 材料.....	6
2.1.2 主要仪器.....	7
2.1.3 主要试剂.....	8
2.1.4 细胞株.....	9
2.1.5 主要溶液.....	9
2.2 实验方法.....	16
2.2.1 荔枝螺提取物制备.....	16
2.2.2 硅胶柱层析.....	16
2.2.3 高效液相色谱检测.....	16
2.2.4 高效液相色谱制备.....	17
2.2.5 提取物 GC-MS 分析.....	17
2.2.6 核磁共振结构分析.....	17
2.2.7 细胞的培养和冻存.....	17
2.2.8 蜂毒磷脂酶 A2 法.....	18
2.2.9 双荧光素酶报告基因活性测定.....	18
2.2.10 pEGFP-p65 表达载体的构建.....	19
2.2.11 免疫荧光染色观察 p65 入核.....	27
2.2.12 Western Blot.....	28



2.2.13 RT-PCR 反应 .....	30
2.2.14 MTT 法检测对癌细胞增殖的抑制作用 .....	33
2.2.15 荔枝螺提取物对肝癌 QSG-7703 细胞凋亡的诱导作用.....	34
2.2.16 荔枝螺提取物对 MCF-7 细胞的作用机制 .....	34
2.2.17 统计学分析 .....	36
<b>3. 结果与讨论.....</b>	<b>36</b>
3.1 荔枝螺提取物的抗炎活性 .....	36
3.1.1 荔枝螺结构 .....	36
3.1.2 蜂毒磷脂酶筛选抗炎部位 .....	38
3.1.3 荔枝螺提取物抗炎机制 .....	42
3.2 荔枝螺提取物抗癌活性 .....	48
3.2.1 对癌细胞形态的影响 .....	48
3.2.2 对癌细胞增殖的抑制作用 .....	49
3.2.3 对肝癌 QSG-7703 细胞凋亡的诱导作用.....	51
3.2.4 对 MCF-7 细胞增殖抑制作用机制 .....	53
3.3 荔枝螺腺体 E-EA-2 组分分析 .....	56
<b>4. 小结.....</b>	<b>63</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>64</b>
<b>致 谢.....</b>	<b>71</b>
<b>博士生期间发表的学术论文、专著.....</b>	<b>72</b>
<b>博士后期间发表的学术论文、专著.....</b>	<b>74</b>

个人简历.....75

通讯地址.....76

厦门大学博硕士论文摘要库

## 说 明

博士后研究工作报告的排版以全国博士后管理委员会办公室制定的统一格式为准（参见以上排版范例），研究报告封面统一以彩色羊皮卡纸制作，颜色不限，内页用纸为普通 A4 打印纸，单面或双面打印不限，正文字体为宋体小四。

为更好地保护博士后研究报告的著作权，请各位博士后在博士后研究工作报告中文摘要前加做《厦门大学博士后研究报告著作权使用声明》（具体格式见附件 2），并在该声明中明确保密年限。

出站时，提交 1 份研究报告至厦门大学图书馆，2 份给厦门大学人事处博士后管理办公室（学校定期提交给国家图书馆）。

## 1. 前言

海洋占地球表面积的 2/3，有多达 21 万种已知的微生物、低等或高等动植物栖息于海洋水体<sup>[1]</sup>，由于海洋环境的特殊性和生物多样性，海洋生物体的代谢酶系与陆地生物有较大差别，源于海洋生物的次生代谢产物多具有独特的生理活性，是新药开发的宝贵资源<sup>[2-5]</sup>。近二十年来，随着对海洋生态系统不断深入地认识，世界各国逐渐意识到开发海洋生物资源的重要性，由海洋生物分离活性化学成分也成为研究热点之一。据 Marinlit 数据库统计，1995 年之前由海洋生物分离得到天然化合物仅 6500 余种，而截止 2011 年，该数据已攀升至 22000 种，涉及约 6000 种海洋生物<sup>[6]</sup>，但所占比例还不足已知海洋物种的 3%，海洋天然产物仍有丰裕的发掘空间。

软体动物（海绵、珊瑚、螺贝类等）是海洋中第二大动物门类，在水体中多为固着或缓慢行动，缺乏攻击能力，常合成毒性代谢物以抵御捕食，生物碱（Alkaloids）是海洋软体动物最重要的次生代谢产物之一<sup>[7-9]</sup>。与陆生植物生物碱相比，海洋生物碱具有如下特点：（1）骨架结构复杂，不易人工化学从头合成；例如，从前鳃亚纲软体动物分离出的一系列多芳香吡咯生物碱 Lamellarins，其化学结构新颖，具有含氮稠环，为化学合成提供了新的骨架化合物<sup>[10]</sup>。（2）因海水中氯（19000mg/L），溴（65mg/L）元素含量丰富，海洋动物生物碱中也多含卤素取代基团；例如从深水海绵、海鞘等软体动物分离得到了 Meridianins、Variolins、Psammopemmins、Aplicyanins 和 Aplysinopsin 等多种含溴吡咯生物碱<sup>[11-13]</sup>。（3）因海洋高盐高压、极端缺氧的环境，以及在水体中分泌即瞬间稀释的特点，海洋生物碱通常有很强的细胞毒性、抑菌抗炎等生理活性，是极具潜

力的先导性药物来源<sup>[7]</sup>。例如，由深水海绵 *Dragmacidin* sp. 中分离得到的双吡啶类生物碱 *Dragmacidin*，在体外试验中显示出对淋巴白血病细胞系 P-388 (IC<sub>50</sub> 15 μg/ml)、人肺癌细胞系 A-549、人乳腺癌细胞系 MDAMB 以及人结肠癌细胞系 HCT-8 显著的细胞毒性 (IC<sub>50</sub> 1~10 μg/ml)<sup>[14]</sup>，该生物碱也是蜂毒磷脂酶 A2 (PLA2) 的抑制剂，对急性耳肿胀小鼠体内、外试验结果表明有良好地抗炎作用<sup>[15]</sup>。由 *Eudistoma olivaceum* 分离出的 17 种生物碱 eudistomin A-Q 对 1 型/2 型单纯疱疹病毒(HSV-1, HSV-2)、牛痘病毒等多种 DNA 病毒及 RNA 病毒(Coxsackie A-21)有较强抗病毒活性，对大肠杆菌、枯草杆菌和酵母菌等具有广谱抗菌作用<sup>[16]</sup>。

荔枝螺 (*Thais Roeding*) 又称苦螺、辣螺，为食用螺类，隶属于软体动物门 (Mollusca)，腹足动物纲 (Gastropoda)，新腹足目 (Neogastropoda)，骨螺科 (Muricidae)，主要分布在东南亚、澳大利亚和墨西哥湾等地区，我国闽、浙、粤沿海有分布<sup>[17]</sup>。荔枝螺因生殖系统易受水污染影响发生畸变，目前主要用于海洋水体的污染监测，例如厦门近海海域有机锡污染对荔枝螺的性畸变作用等<sup>[18]</sup>。由于自然分布的地区局限性，国内外对荔枝螺天然产物的分离与活性研究相对较少，李明等用免疫组织化学定位法发现疣荔枝螺 (*Thais clavigera*) 消化系统中存在具有镇痛和免疫调节作用的化合物甲硫氨酸脑啡肽 (Methionine-Enkephali)<sup>[19]</sup>。陈寅山对福建沿海 16 种海洋动物抗菌活性的筛选中发现疣荔枝螺对六种菌具有抗菌活性<sup>[20]</sup>。Chávezc 从墨西哥荔枝螺 *Plicopurpura pansa*, *Plicopurpura columellaris*, *Plicopurpura patula* 鳃下腺分泌物中分离出 5 种挥发性的含溴生物碱，但未对其活性进行深入研究<sup>[21]</sup>。对 17 种海洋软体动物卵物质分析，其中 6 种骨螺科动物卵内均含卤代吡啶生物碱，但不同种间成分有所不同，卤代吡啶生物碱可能是骨螺科共有特色次生代谢物<sup>[22,23]</sup>。从 *Dicathais orbita*、

Hexaplex trunculus 两种骨螺鳃下腺、生殖腺和卵囊中分离出 Tyrin purple(图 2, 化合物 (a))及其前体化合物(吡啶生物碱类, 化合物(a)~(g)), 体内外试验证实具有抑菌、细胞毒性、抗癌及肌肉松弛等多种生理活性<sup>[24-26]</sup>。

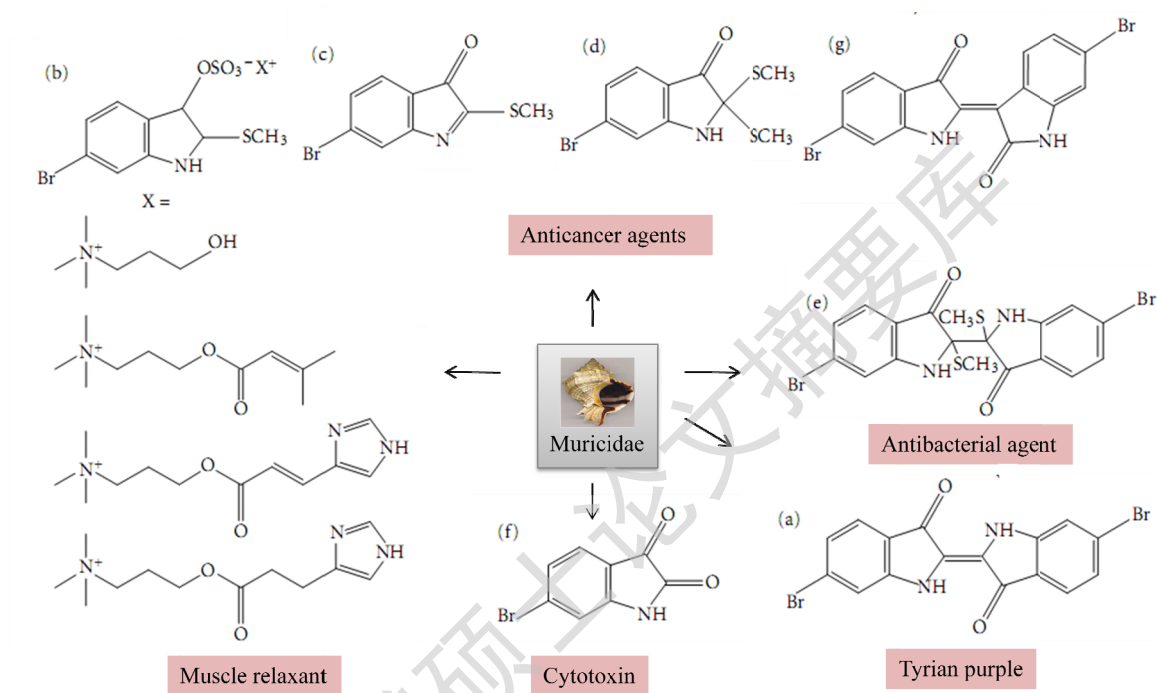


图 1. 骨螺科软体动物分离的活性生物碱结构

在传统中药方剂中有记载：荔枝螺壳可入药，主治淋巴核结核、甲状腺肿大等疾病，而在福建东南地区，夏秋潮湿雨季疮疡多发，民间有食用辣螺（即荔枝螺）治疗痈疽、疔疮、疖肿等症的用法，有良好的清热解毒、消炎消肿效果<sup>[27]</sup>。

炎症是机体对损伤性伤害的一种防御性反应。适度的炎症反应对人体是有益的，但过度、失控的炎症反应也可对自身造成伤害，成为多种疾病发生、发展的基础性病理机制<sup>[28]</sup>。如失控的炎症，会发生级联的放大效应，导致更严重的自身损伤造成机体调节失衡，进而发展为全身炎症反应综合征和脓毒症。局部组织的

慢性炎症会促进肿瘤、动脉粥样硬化等重大疾病的发生发展。因此，炎症也被称为重要疾病的“共同公路”<sup>[29]</sup>。鉴于炎症在众多疾病发生、发展中的关键作用，开发有效抗炎的药物对多种疾病的治疗具有重要意义。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)介导的信号通路是目前发现的最重要的炎性通路，与许多疾病的发生和发展过程有关。LPS 是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分，有多糖链，核心多糖，脂质 A 三部分构成，其中多糖链又称 O-抗原，是细菌菌体抗原的抗原决定簇，由多个寡糖重复单位组成，脂质 A 是细菌内毒素活性的根源<sup>[30]</sup>。TLR4 是 Toll 样受体的重要一员，是人类发现的第一个 TLR 相关蛋白，几乎分布于所有的细胞系<sup>[31]</sup>。TLR4 是一次跨膜蛋白，结构分为三个区域：胞外区、跨膜区、胞内区。胞外区为一段重复的亮氨酸序列，介导相关病原分子模式的识别。胞内区是一段保守的序列，与白介素 1 (Interleukin-1, IL-1) 受体胞内区具有同源性，所以又称 Toll/IL-1R 同源区 (TIR 区)，是 TLR4 和 IL-1R 向下游传递信号的基本元件。LPS 进入血液后，与循环血液中的 LPS 结合蛋白(LPS binding protein, LBP)结合，转运到单核-巨噬细胞或中性粒细胞表面，再与其膜上的 mCD14(membrane CD14)结合，后者激活具有信号转导功能的 Toll 样受体 4(TLR4)，通过髓样分化因子 88(Myeloid differentiation factor88, MyD88)依赖或非依赖的途径，经过一系列级联信号转递，激活细胞内 NF- $\kappa$ B、AP-1 等重要炎症通路，我们总结的 LPS/TLR4 信号通路的作用机制见图 2。NF- $\kappa$ B (Nuclear factor-kappa B) 是 1986 年从 B 淋巴细胞的细胞核抽提物中发现的转录因子，它能与免疫球蛋白  $\kappa$  轻链基因的增强子 B 序列 (5, -GGGACTTTCC-3, ) 特异性结合，促进  $\kappa$  轻链基因表达<sup>[32]</sup>。它是真核细胞转录因子 Rel 家族成员之一，广泛存在于各种哺乳动物细

胞中，迄今共发现 5 种 NF- $\kappa$ B /Rel 家族成员，分别是 RelA（即 p65）、RelB、C-Rel、p50/NF- $\kappa$ B 1（即 p50/RelA）和 p52/NF- $\kappa$ B 2。细胞内 NF- $\kappa$ B 的活化过程受到精细调控，正常状态下，在细胞质中的 NF- $\kappa$ B 与抑制蛋白 I $\kappa$ B（Inhibitory protein of NF- $\kappa$ B）结合成三聚体复合物而处于失活状态。当机体受到细菌感染或组织损伤时，中性粒细胞、单核-巨噬细胞、淋巴细胞、血管内皮细胞等炎性细胞内激酶 IKK 被激活，磷酸化抑制因子 I $\kappa$ B，导致 I $\kappa$ B 降解，活化的 NF- $\kappa$ B 得以暴露其核定位序列，进入细胞核内与 DNA 结合，启动下游基因转录。激活蛋白 1（Activating protein 1, AP-1）是亮氨酸拉链蛋白，由 Jun 蛋白家族、Fos 蛋白家族、ATF 蛋白家及 JDP 蛋白家族组成<sup>[33]</sup>。哺乳动物中 AP-1 的主要成分是 Jun 和 Fos。AP-1 的 DNA 特异性结合识别序列是一回文结构(5'-TGAGTCA-3)，又称为佛波酯（phorbol myristate acetate, PMA）反应元件。NF- $\kappa$ B 和 AP-1 被上游 LPS/TLR4 信号激活后，启动和调节众多与炎症反应有关的细胞粘附因子（ICAM-1、VCAM-1），前炎症因子（TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ），化学趋化因子（MCP- 1、IL-8）等的基因转录及调控，导致炎症的发生，并加速炎症的发展<sup>[34]</sup>。

大量实验和临床观察表明，炎症可以促进许多肿瘤，特别是上皮源性肿瘤的发生，慢性炎症的作用尤为突出。慢性炎症的刺激导致肿瘤释放许多直接促进其自身生长的因子，从而构成了一个炎性微环境，有利于肿瘤的发生和发展。其中，TNF $\alpha$  可被肿瘤生长环境中的炎症细胞和肿瘤细胞分泌和激活，它对于维持慢性炎症、促进肿瘤细胞增殖、抑制免疫介导的肿瘤监视具有非常重要的作用。现在许多研究证明，在天然状态下，TNF $\alpha$  促进肿瘤的发生，而并不起治疗作用。综上所述，TNF  $\alpha$  在体内介导了广泛的生物学效应，其介导的信号通路失调将会引



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库