

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 20520061151929

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

PPAR α 激动剂 OEA 类似物的合成及其抗动脉粥样硬化的研究

Synthesis of PPAR α agonist OEA analogue and study of the effects about anti-atherosclerosis

陈彩霞

指导教师姓名: 金鑫教授

张洪奎教授

专 业 名 称: 有机化学

论文提交日期: 2009 年 5 月

论文答辩时间: 2009 年 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 月

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，均在文中以恰当方式明确标明，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）经费获实验室的资助，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

摘要

过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPARs) 是一类由配体激活的核转录因子, 是核受体超家族成员之一。过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α) 是 PPARs 中的一个亚型, 它是脂质、脂肪酸、脂蛋白代谢的调节因子。PPAR α 的配体可分为天然配体和合成配体。天然配体主要来源于饮食和机体的代谢产物, 如长链不饱和脂肪酸, 包括油酸、亚油酸、花生四烯酸等。合成配体有贝特类降血脂药, 如 WY14643、非诺贝特等等。动脉粥样硬化是一类复杂的临床疾病, 其所致冠状动脉粥样硬化性心脏病的发病率逐年升高, 它的形成机制目前尚未完全清楚。PPAR α 在单核巨噬细胞、内皮细胞以及平滑肌细胞均有表达, 显示了它的直接血管效应, 可能具有抗动脉粥样硬化作用。大量实验表明, PPAR α 可以通过直接作用于动脉管壁, 抑制单核细胞向血管内皮聚集并转化为巨噬细胞; 抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移; 抑制泡沫细胞的形成等等。因此 PPAR α 是目前动脉粥样硬化治疗研究中的热点之一。

油酰乙醇胺 (OEA) 是一种天然的脂肪酸乙醇胺, 属于脂肪酸乙醇胺家族 (FEA), 已有实验表明, OEA 是 PPAR α 的一个具有高亲和性的天然配体, 在抗动脉粥样硬化方面具有显著的效果, 且在激活 PPAR α 时存在结构选择性。本论文的目的合成一种油酰乙醇胺类似物: S-油酰丙醇胺, 观察该化合物是否也对动脉粥样硬化有影响, 以期探索其构效关系, 为寻求具有生物活性和药物活性的新的药物先导物质奠定基础。本论文主要采用体外培养的人脐静脉内皮细胞和人急性单核白血病细胞进行离体实验分析, 采用 MTT 法检测 S-油酰丙醇胺对细胞活性的影响, 和转录激活检测方法检测该化合物对 PPAR α 的激活作用, 采用荧光实时定量 PCR 和细胞酶联免疫吸附试验分别检测 VCAM-1、ICAM-1、E-选择素的 mRNA 及蛋白水平的表达, 同时采用细胞粘附实验检测其对细胞粘附的影响。实验结果表明, S-油酰丙醇胺在一定程度上可激活 PPAR α , 可以显著地抑制 VCAM-1 的表达, 并呈现出一定的剂量依赖性, 但对 ICAM-1、E-选择素的表达却没有影响, 当加入 PPAR α 拮抗剂 MK886 时, S-油酰丙醇胺对 VCAM-1 的抑制作用明显消失, 同时实验结果亦表明 S-油酰丙醇胺对人急性单核白血病细胞 (THP-1) 的粘附也有明显的抑制作用, 这说明 S-

油酰丙醇胺和大多数的 PPAR α 激动剂一样，能够通过激活 PPAR α 来抑制慢性炎症：减少单核细胞的粘附，抑制 VCAM-1 的表达；而对急性炎症没有作用，如对 E-选择素的表达无影响。

关键词：S-油酰丙醇胺；过氧化物酶体增殖物激活受体；粘附分子

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Atherosclerosis is a major cause of death from cardiovascular disease in industrialized countries. Adhesion of circulating leukocytes to the endothelium is a critical early step in atherogenesis. This process depends on the interaction between adhesion molecules on the endothelial cell(EC) surface and their cognate ligands on leukocytes, these EC adhesion molecules include vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and P-selectin. VCAM-1 and monocytes are associated with chronic inflammation while E-selectin with acute inflammation. The development of atherosclerosis is chronic inflammation.

Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α) is a nuclear receptor activated by natural ligands such as fatty acids, and synthetic ligands such as fibrates currently used to treat dyslipidemia. PPAR α regulates expression of genes encoding proteins that involved in lipid metabolism, fatty acid oxidation, and glucose homeostasis, by which improve markers for atherosclerosis and insulin resistance. In addition, PPAR α exerts anti-inflammatory effects both in the vascular wall and the liver. PPAR α activation interferes with early steps in atherosclerosis by reducing leukocyte adhesion to activated endothelial cells of the arterial vessel wall and inhibiting subsequent transendothelial leukocyte migration.

Oleyltheanolamide (OEA) is a naturally occurring lipid that binds with high affinity to the PPAR α , serves as an endogenous agonist of PPAR α . We synthesized a OEA analog: (Z)-(S)-9-octadecenamide, N-(2-hydroxyethyl,1-methyl). This study was intend to observe antiatherosclerotic effects of (Z)-(S)-9-octadecenamide, N-(2-hydroxyethyl,1-methyl). HUVECs were pretreated with different concentrations of (Z)-(S)-9-octadecenamide, N-(2-hydroxyethyl,1-methyl), then stimulated with tumor necrosis factor(TNF- α), the expression of adhesion molecules in mRNA and protein levels were detected by Real-time PCR and Cell Enzyme linked immunosorbent assay. Monocyte-binding studies were carried out using fluorescently

labeled THP-1 cells and analysed by Fluorescenced microplate reader. And Dual-luciferase reporter assay system was used to determine the effect of (Z)-(S)-9-octadecenamide, N-(2-hydroxyethyl,1-methy) on human PPAR α activation in Hela cells. Results shown that (Z)-(S)-9-octadecenamide, N-(2-hydroxyethyl,1-methy) remarkably activated PPAR α , and significantly inhibited the expression of VCAM-1 at mRNA and protein levels, but failed to inhibit the expression of ICAM-1 and E-selectin. (Z)-(S)-9-octadecenamide, N-(2-hydroxyethyl,1-methy) also reduced the adherence of THP-1 cells to TNF- α -stimulated HUVECs. (Z)-(S)-9-octadecenamide, N-(2-hydroxyethyl,1-methy) can active PPAR α to limit chronic inflammation mediated by VCAM-1 and monocytes binding without affecting acute inflammation mediated by E-selectin.

key words: (Z)-(S)-9-octadecenamide, N-(2-hydroxyethyl,1-methy); Peroxisome proliferator-activated receptor; Adhesion molecules

目录

摘要	I
Abstract	III
第一章 前言	1
1.1 过氧化物酶体增殖物激活受体- α	1
1.1.1 PPAR 的发现及分类	1
1.1.2 PPAR α 的结构、功能	1
1.1.3 PPAR α 的激动剂	3
1.2 PPAR α 与动脉粥样硬化的关系	5
1.2.1 动脉粥样硬化	5
1.2.2 动脉粥样硬化的发病机制	7
1.2.3 PPAR α 与脂质代谢	9
1.2.4 PPAR α 与炎症反应	10
1.3 油酰乙醇胺 (OEA) 的概述	12
1.3.1 OEA 的生理活性	12
1.3.2 OEA 作为 PPAR α 的内源性配体	15
1.4 本论文研究的意义和主要内容	15
参考文献	16
第二章 S-油酰丙醇胺的合成及人脐静脉内皮细胞的培养与鉴定	22
2.1. S-油酰丙醇胺的合成	22
2.1.1 S-油酰丙醇胺的逆合成分析	22
2.1.2 S-油酰丙醇胺的合成	24
2.2. 人脐静脉内皮细胞的培养与鉴定	26
2.2.1 实验仪器及部分实验试剂	26
2.2.2 主要试剂的配置	26
2.2.3 实验方法	27
2.2.4 实验结果与讨论	29
2.3 本章小结	31

参考文献	31
第三章 S-油酰丙醇胺对细胞活性及转录激活的检测	33
3.1 实验方法	33
3.1.1 MTT 实验	33
3.1.2 转录激活检测	33
3.2 实验结果与讨论	34
3.2.1 细胞活性检测结果	34
3.2.2 转录激活检测结果	35
3.3 本章小结	38
参考文献	38
第四章 S-油酰丙醇胺对人脐静脉内皮细胞分泌粘附分子表达的影响	40
4.1 实验仪器及主要试剂	40
4.2 部分试剂的配制	42
4.3 实验方法:	42
4.3.1 RT-PCR 及荧光实时定量 PCR 实验	42
4.3.2 细胞酶联免疫实验	44
4.3.3 细胞粘附实验	45
4.4 实验结果与讨论	46
4.4.1 RT-PCR 及荧光实时定量 PCR 实验结果	46
4.4.2 细胞酶联免疫吸附剂实验结果	51
4.4.3 细胞粘附实验结果	54
4.5 本章小结	56
参考文献	56
第五章 结论与展望	59
缩略语表	61
致谢	62

Catalogue

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Peroxisome proliferator activated reportor alpha.....	1
1.1.1 Discovery and class of PPAR.....	1
1.1.2 Structure and function of PPAR α	2
1.1.3 Ligands of PPAR α	3
1.2 Relation of PPARα and atherosclerosis.....	5
1.2.1 Atheroscleros.....	5
1.2.2 Pathogenesis of atherosclerosis.....	7
1.2.3 PPAR α and lipid metabolism.....	9
1.2.4 PPAR α and inflammtory response.....	10
1.3 Overview of oleoyethanolamide (OEA).....	12
1.3.1 Bioactivities of OEA.....	12
1.3.2 OEA is an endogenous agnoist of PPAR α	15
1.4 Primary content and research of paper.....	15
Reference.....	16
Chapter 2 Synthesis of OEA analogue and separation and culture of human umbilical vein endothelial cell.....	22
2.1 Synthesis of OEA analogue.....	22
2.1.1 Analysis of synthetic methods of OEA analogue.....	22
2.1.2 Synthesis experiment.....	24
2.2 Culture and identification of human umbilical vein endothelial cell.....	26
2.2.1 Instruments and reagents.....	26
2.2.2 Preparation of solutions.....	26
2.2.3 Experimental methods.....	27
2.2.4 Results and discussions.....	29

2.3 Conclusion.....	31
References.....	31
Chapter 3 Effects of OEA analogue on cell activity and transactivation assay.....	33
3.1 Experimental methods.....	33
3.1.1 MTT assay.....	33
3.1.2 Transactivation assay.....	33
3.2 Results and discussion.....	34
3.2.1 Result of MTT assay.....	34
3.2.2 Result of Transactivation assay.....	35
3.3 Conclusion.....	38
References.....	38
Chapter 4 Effects of OEA analogue on the expression of cell adhesion molecules in HUVEC.....	40
4.1 Instruments and reagents.....	40
4.2 Preparation of solutions.....	42
4.3 Experimental methods.....	42
4.3.1 RT-PCR and real-time PCR.....	42
4.3.2 Cell enzyme linked immunosorbent assay.....	44
4.3.3 Cell adhesion assay.....	45
4.4 Results and discussion.....	46
4.4.1 Results of RT-PCR and real-time PCR.....	46
4.4.2 Results of cell enzyme linked immunosorbent assay.....	51
4.4.3 Results of cell adhesion assay.....	54
4.5 Conclusion.....	55
References.....	56
Chapter 5 Conclusion and expectation.....	59
Table of Abbreviation.....	61

Acknowledgement.....62

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一类复杂的心血管疾病, 可致使心、脑、肢体缺血甚至梗死。在发达国家中由于饮食结构和生活方式的改变, 动脉粥样硬化已成为主要的致死、致残原因之一。其发病机制至今还未完全阐明, 同时大量的研究表明动脉粥样硬化是一种伴有脂质异常的慢性炎症性疾病, 它的发生发展过程中都伴随着炎症细胞和炎症介质的参与。过氧化物酶体增殖物激活受体 (Peroxisome Proliferator Activated Reportors, PPAR) 是一类配体激活的转录因子, 是脂类和糖类代谢中的主要转录调节因子^[1]。近些年来, 随着研究的不断深入, 人们发现过氧化物酶体增殖物激活受体的作用非常广泛, 除了参与脂质和脂蛋白代谢、体内糖平衡外, 还涉及脂肪细胞、单核/巨噬细胞等多种细胞的分化, 抑制炎症因子生成及炎症形成, 影响动脉粥样硬化形成进程^[2-3]。也已有实验证实, 在动脉粥样斑块和泡沫细胞上均有过氧化物酶体增殖物激活受体的表达, 强烈提示过氧化物酶体增殖物激活受体可能与动脉粥样硬化形成过程有关。事实上, 一些过氧化物酶体增殖物激活受体的激动剂如贝特类药物, 在临床上均能阻止动脉粥样硬化的进展^[4-5]。

1.1 过氧化物酶体增殖物激活受体- α

1.1.1 PPAR 的发现及分类

PPAR 是过氧化物酶体增殖物激活受体的简称, 在此之前人们一直以为 PPAR 是一种孤儿受体, 直至 1990 年 Issemann 等人在脂细胞分化过程中才发现它是一类配体依赖的转录因子, 是基因转录中传递过氧化物酶体增长因子效应的一类细胞核受体, 属于核受体超家族成员^[1]。

根据结构和功能上的差异, PPAR 可分为三种亚型, 分别为 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ ^[6], 而且这三种亚型在不同的组织中表达各不相同。其中 PPAR α 主要分布于肝细胞、心肌细胞、肠上皮细胞、肾近曲小管上皮细胞; PPAR β 在脑、结肠和皮肤相对较高, 肾脏和心脏有少量的表达; PPAR γ 则主要特异性表达在脂肪细胞, 是最具脂肪组织特异性的成员^[7-9]。

1.1.2 PPAR α 的结构、功能

PPAR 三种亚型均由不同的基因编码, 其中 PPAR α 是由 468 个氨基酸残基组

成，位于鼠 15 号染色体，人 22 号染色体。和其他核受体类似^[10]，PPAR 是由六个结构域组成的 (A-F) (图 1.1)。其中 N 端的 A/B 结构域具有非配体依赖的反式激活功能 (AF-1)，该结构域在三种亚型中的保守性比较低，A/B 结构域上还具有蛋白磷酸化位点；中间的 C 结构域是 DNA 结合域 (DNA binding domain)，又称 DBD，它含有两个锌指结构，这样能使受体特异性地结合到靶标 DNA 上，同时该区域还具有弱的二聚化作用，该区域的序列保守性很高；D 结构域为铰链区，它连接 DNA 结合域和由 E 域组成的配体结合域；E 结构域组成配体结合域 (Ligand binding domain) 又称为 LBD，它具有配体依赖的反式激活功能 (AF-2)，AF-2 在对靶标基因的转录调节中起着关键作用，LBD 是激素转录信息的主要传递者，同时，LBD 是受体发生二聚化的主要部位，而二聚化是受体具备转录激活活性所必需的，该区域具有较高的序列保守性；C 端 F 域的功能还不是非常清楚^[11-13]。

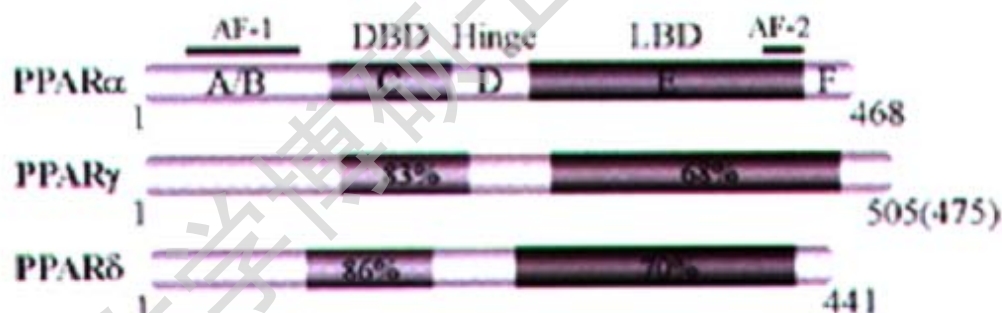


图 1.1 PPAR 结构域组成

PPAR 通过与其靶基因如酰基辅酶 A 氧化酶 (AOX) 和脂肪酸结合蛋白的启动子中的过氧化物酶体增殖剂反应元件 (Peroxisome proliferator response element, PPRE) 结合而发挥转录调控功能 (图 1.2)。PPRE 是由两个半位组成，它们是两个同向重复序列，所以又称为 DR-1 反应元件 (Direct Repeat-1 response element)。每个半位由序列为 AGGTCA 的六个核苷酸组成，两个半位间相隔一个核苷酸。PPAR 通过与视黄醛 X 受体 (Retinoid X Receptor, RXR) 形成异源二聚体后结合到 PPRE 上，其中的 PPAR 结合在 PPRE 的 5' 半位上，RXR 结合在 PPRE 的 3' 半位上。当 PPAR/RXR 异源二聚体与激动剂结合时，它们的构像发生

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