

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 200425056

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**OEA类似物的合成及其对人脐静脉内皮
细胞PPAR α 表达的影响的研究**

**Synthesis of OEA analogues and study of the influence of
analogues induced expression of PPAR α in HUVECs**

孙 翠 玲

指导教师姓名: 靳立人 教授

郑剑峰 讲师

金 鑫 教授

专业名称: 有机化学

论文提交日期: 2007年6月

论文答辩时间: 2007年 月

学位授予日期: 2007年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2007年6月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（ ）

（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

研究背景: 动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是造成心脏疾病及末端坏死的主要原因。在美国、欧洲和日本,它的死亡率占总死亡率的百分之五十。据美国心脏协会统计,心血管疾病侵害了近五千七百万美国人,每年有954.000人死亡,花费近二千五百九十亿美元。AS的治疗迫在眉睫,治AS药物的研究也提上日程,而现有的治AS药物虽然有效但存在许多重大副作用,我们急需研究出副作用较小的药物。

油酰乙醇胺(OEA)是人们在研究肥胖症药物时发现的一种内源性油脂,是受刺激情况下在细胞内产生的,它出现在所有可表达过氧化物酶体增殖剂激活受体 α (Peroxisome Proliferator-activated receptor alpha, PPAR α)的组织中。配体激活的PPAR α 可能对抗动脉粥样硬化产生有益的作用。而OEA是PPAR α 的内源性高亲和力配体,其EC₅₀值为120 nmol/L,且副作用较小,是近期药物研究的热点。

油酰乙醇胺激活PPAR α 具有结构选择性,基于油酰乙醇胺的结构特性,本文在双键和醇胺部位对油酰乙醇胺结构进行了改进,合成了几个OEA的类似物。

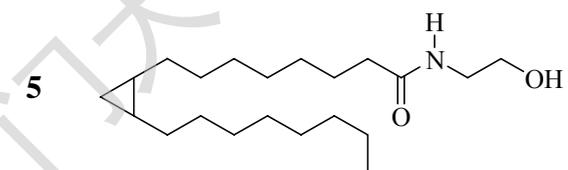
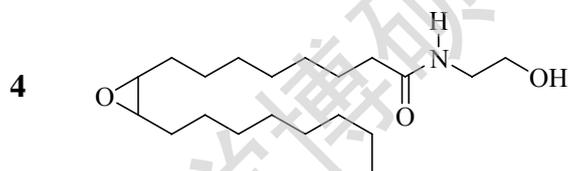
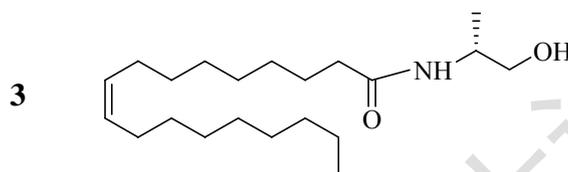
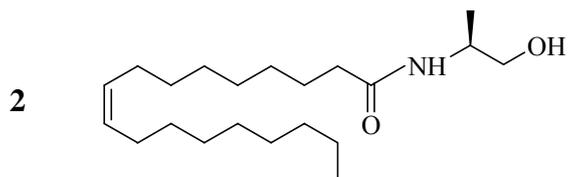
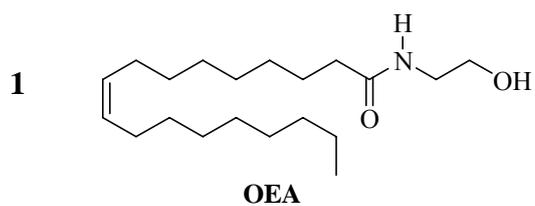
目的: 观察OEA的类似物诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs) PPAR α 表达的影响,找到作用更强的OEA的类似物,以期探讨其构效关系,为寻求具有生物活性和药物活性的新的药物先导物质奠定基础。

方法: 此实验分两个阶段:首先,我们将合成OEA及其四个类似物。其次,体外培养的HUVECs分别加10、50、100 uM浓度的五种药物孵育2 h,采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)测定五种药物对HUVECs的PPAR α -mRNA表达水平的影响。

结果: 甲基化的化合物**2**和化合物**3**可明显诱导HUVECs的PPAR α -mRNA的表达,作用比化合物**1** (OEA)的要强;而将双键环氧化和环丙烷化后的化合物**4**和化合物**5**作用比OEA的作用弱的多。

结论: OEA类似物在与PPAR α 受体结合时,双键和胺基部分起关键作用。因此,在以后设计药物时,我们只需改变胺基部分,双键部分保留。

关键词: 油酰乙醇胺; 人脐静脉内皮细胞; 过氧化物酶体增殖剂激活受体 α ; 类似物; 逆转录聚合酶链式反应



ABSTRACT

Background: Atherosclerosis(AS), the principal cause of heart attack, stroke and gangrene of the extremities, accounts for 50% of mortality in the USA, Europe and Japan. The American Heart Association estimates that cardiovascular diseases affect 57 million Americans, and each year cause 954,000 deaths and cost 259 billion dollars.

Oleoylethanolamide (OEA) is an endogenous lipid that modulates feeding, body weight and lipid metabolism by binding with high affinity to the ligand-activated transcription factor, peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α). PPAR α has been implicated in variety of metabolic processes, it is expressed in a variety of tissues, but most prominently in liver, heart, kidney, muscle and brown adipose tissue. OEA is a natural ligand for PPAR α with a half-maximal concentration (EC₅₀) of 120 nM.

To study the structural selectivity of PPAR α activation, we have synthesized several OEA analogues.

Object: To observe the influence of OEA analogues induced expression of PPAR α in human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) and to investigate the relation between the structure and the effect, we hope to find better medicine.

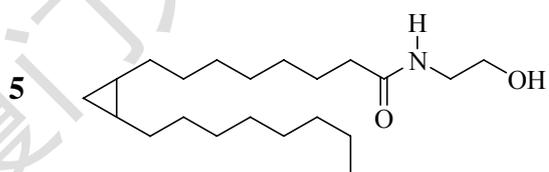
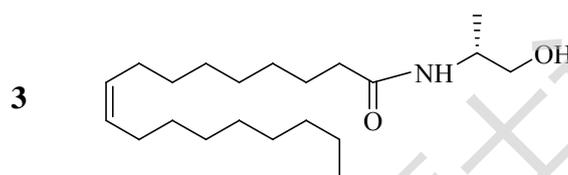
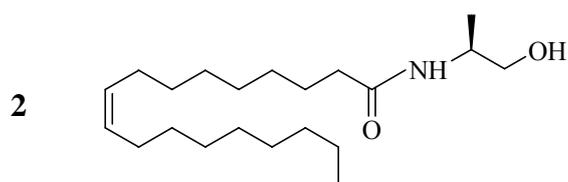
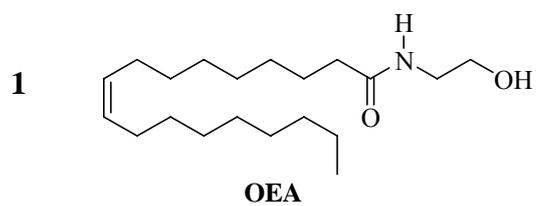
Methods: The experiment includes two stages: First, we have synthesized several OEA analogues. Second, the expression of PPAR α in mRNA level was detected with reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR).

Results: The methyl derivative of OEA can increase the expression of PPAR α -mRNA in HUVECs, and the effect is stronger than OEA; While the compounds of epoxidation and cyclopropanation do not significantly activate PPAR α .

Conclusion: When OEA analogues binding to PPAR α -LBD, the double bond and the ethanolamide moiety play an important role. When designing medicine later, we should only change the ethanolamide moiety and reserve the double bond.

Key words: Oleoylethanolamide; human umbilical vein endothelial cells; analogue; peroxisome proliferator-activated receptor-alpha; reverse transcription polymerase

chain reaction



目 录

中文摘要	I
ABSTRACT.....	III
第一章 前言	1
第一节 OEA 及其类似物的合成	1
第二节 OEA 类似物对人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) PPAR α 表达的影响的研究	6
第三节 OEA 的概述	8
第四节 展望与前景	11
参考文献	13
第二章 OEA 及其类似物的合成	16
第一节 文献回顾	16
第二节 合成计划	22
第三节 结果与讨论部分	23
第四节 本章小结	28
第五节 实验部分	29
参考文献	36
第三章 OEA 类似物对人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) PPARα 表达的影响的研究	37
第一节 实验材料及试剂	37
第二节 实验方法及步骤	39
第三节 结果与讨论	46
第四节 本章小结	54
参考文献	55
第四章 结论	56
附图	58

化合物清单65

缩略语表67

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前 言

随着经济的发展、饮食结构和生活方式的改变,营养代谢疾病如糖尿病、肥胖症、高脂血症等已成为严重威胁人类健康的一类疾病。在过氧化物酶体增殖剂激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)未被发现之前,就已有贝特类(Fibrate)和格列酮类(Glitazone)药物用于治疗高甘油三脂血症和II型糖尿病,但它们的作用靶标和机理并不清楚。直到1990年Issemann和Green^[1],在Nature上发表文章报道发现了一种新的甾体激素受体,上述两类药物的作用机理才逐渐被阐明。在老鼠体内,这类甾体激素受体能被一类脂肪酸样化合物——过氧化物酶体增殖剂所激活,因此被命名为过氧化物酶体增殖剂激活受体(PPAR)。贝特类和格列酮类化合物分别是PPAR α 和PPAR γ 的激动剂。研究表明,PPAR在脂质代谢、脂肪细胞分化、葡萄糖动态平衡过程中起关键的调节作用^[2,3]。PPAR除了是治疗糖尿病、肥胖症和高脂血症等药物的作用靶标外,它还与动脉粥样硬化、高血压、炎症及癌症等有着密切的联系^[4~9]。

第一节 过氧化物酶体增殖剂激活受体

1.1.1 核受体超家族

PPARs属于核受体超家族成员,该家族成员是一类能与DNA应答元件结合的配体依赖的转录调控因子,它们在生殖、发育和代谢等生命过程中起重要的调控作用^[10,11]。核受体信号通路的异常将导致如癌症、不育、肥胖、糖尿病和骨质疏松等疾病,因此该家族是一类重要的药物作用靶标^[2]。核受体是一类大的蛋白质家族,据报道果蝇有21种核受体^[13],线虫有超过25种核受体^[14],人有48种核受体^[10,12]。核受体超家族成员包括疏水性小分子如甾体激素、视黄酸、甲状腺素、脂肪酸白三烯和前列腺素等的受体,还有其内源性配体未知的孤儿受体^[15]。根据NucleaRDB的分类方法^[16],可以将核受体分为七类:1. 甲状腺素样受体(Thyroid hormone-like receptors),包括甲状腺素受体(Thyroid hormone receptor, TR)、视黄酸受体(Retinoic acid receptor, RAR)、过氧化物酶体增殖剂激活受体

(Peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)、脱皮激素受体(Ecdysone receptor, ECR)、脱皮激素诱导蛋白、肝X受体(Liver X receptor, LXR)、法呢醇X受体(Farnesoid X receptor, FXR)、维生素D受体(Vitamin D receptor, VDR)、孕烷X受体(Pregnane X receptor, PXR)、雄烷受体(Constitutive androstane receptor, CAR)和视黄酸受体相关孤儿受体(RAR-related orphan receptor, ROR)等；2. 肝细胞核因子4样受体(HNF4-like receptors), 包括肝细胞核因子4(Hepatocyte nuclear factor 4, HNF4)和视黄酸X受体(Retinoic acid X receptor, RXR)等；3. 雌激素样受体(Estrogen-like receptors), 包括雌激素受体(Estrogen receptor, ER)、雌激素相关受体(Estrogen-related receptor, ERR), 糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, GR), 盐皮质激素受体(Mineralocorticoid receptor, MR), 孕酮受体(Progesterone receptor, PR)和雄激素受体(Androgen receptor, AR)等；4. 神经生长因子诱导基因B样受体(Nerve growth factor-induced gene B-like receptor)；5. Fushi tarazu-F1样受体；6. 生殖细胞核因子样受体(Germ cell nuclear factor-like receptor), 包括生殖细胞核因子；7. Knirps样(无配体结合域)和DAX样(无DNA结合域)受体。

1.1.2 人PPARs及其结构和功能

人PPAR有PPAR α 、PPAR β 和PPAR γ 三种亚型(图1.1), 分别由位于22、3和6号染色体上的三个不同的基因编码^[18]。PPAR α 和PPAR β 分别包含468和441个氨基酸残基；而人有三种PPAR γ mRNA: PPAR γ 1、PPAR γ 2、PPAR γ 3^[19, 20], 这三种mRNA编码二种长度不同的PPAR γ 蛋白, 分别包含505和475个氨基酸残基, 它们在N端相差30个残基。PPAR各亚型在不同组织中具有不同的表达, 分布具有一定的组织特异性: PPAR α 在代谢旺盛的组织如肝脏、心脏、肾脏和骨骼肌中高表达; PPAR γ 主要在脂肪组织中表达; PPAR β 则表达比较广泛, 几乎在全身各组织均有表达, 但在肝脏中表达水平较低^[9, 21~23]。

和其他的核受体类似, PPARs有六个结构域(A-F)组成(图1.1)^[23~25]。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保守性较低。A/B结构域具有蛋白磷酸化位点, PPAR γ 的反式激活活性可被促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)介导的A/B域的一个丝氨酸残基的磷酸化而降低, 而PPAR α 的磷酸化可正调节受体-配体的亲和力。中间的C结合域是DNA结合域(DNA binding domain, DBD), 它含有两个锌指结构, 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。该区域的保守性很高(约85%)。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, 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(约70%)。C端F域的功能还不是很清楚。



图1.1 PPAR的三种亚型及其结构示意图

PPARs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(Ap2)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。PPRE由两个半位组成,它们是两个同向重复序列,所以又被称为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与9顺式视黄醛受体(RXR)形成PPAR/RXR异源二聚体后结合到PPRE上,其中PPAR结合在PPRE的5'半位上,RXR结合在PPRE的3'端半位上。当PPAR/RXR二聚体与激动剂结合时,它们的构象发生变化,释放共抑制因子(Corepressor)而与共激活因子(Coactivator)相结合,进而激活靶基因的转录。在RXR A缺乏时,PPRE不与PPAR α 直接结合,只有两者同时存在、协同作用时,才能启动转录过程(图1.2)^[9]。

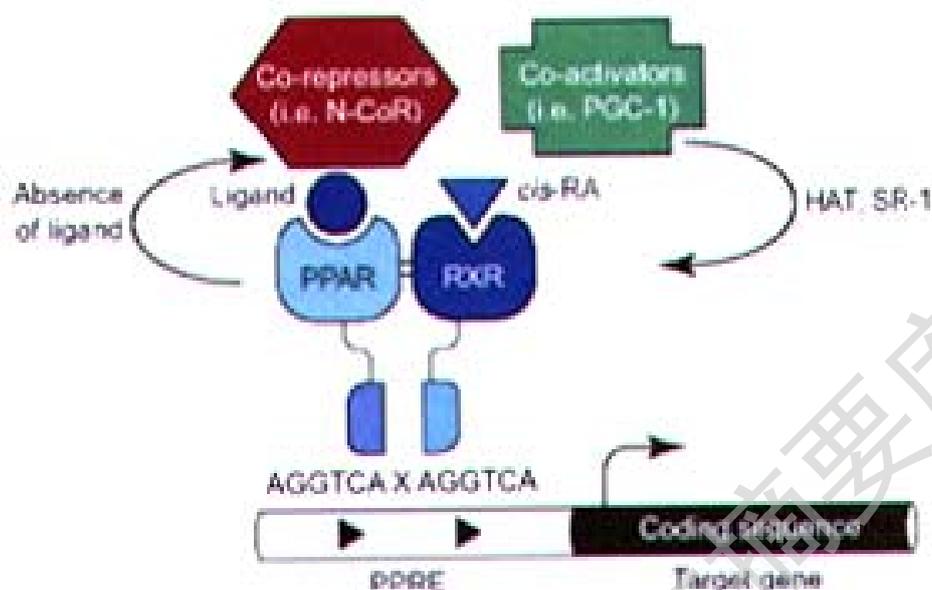


图1.2 PPAR激活靶基因转录示意图

PPAR LBD是配体结合部位，因此对PPAR LBD结构的了解有助于我们更好地进行基于结构的药物设计。

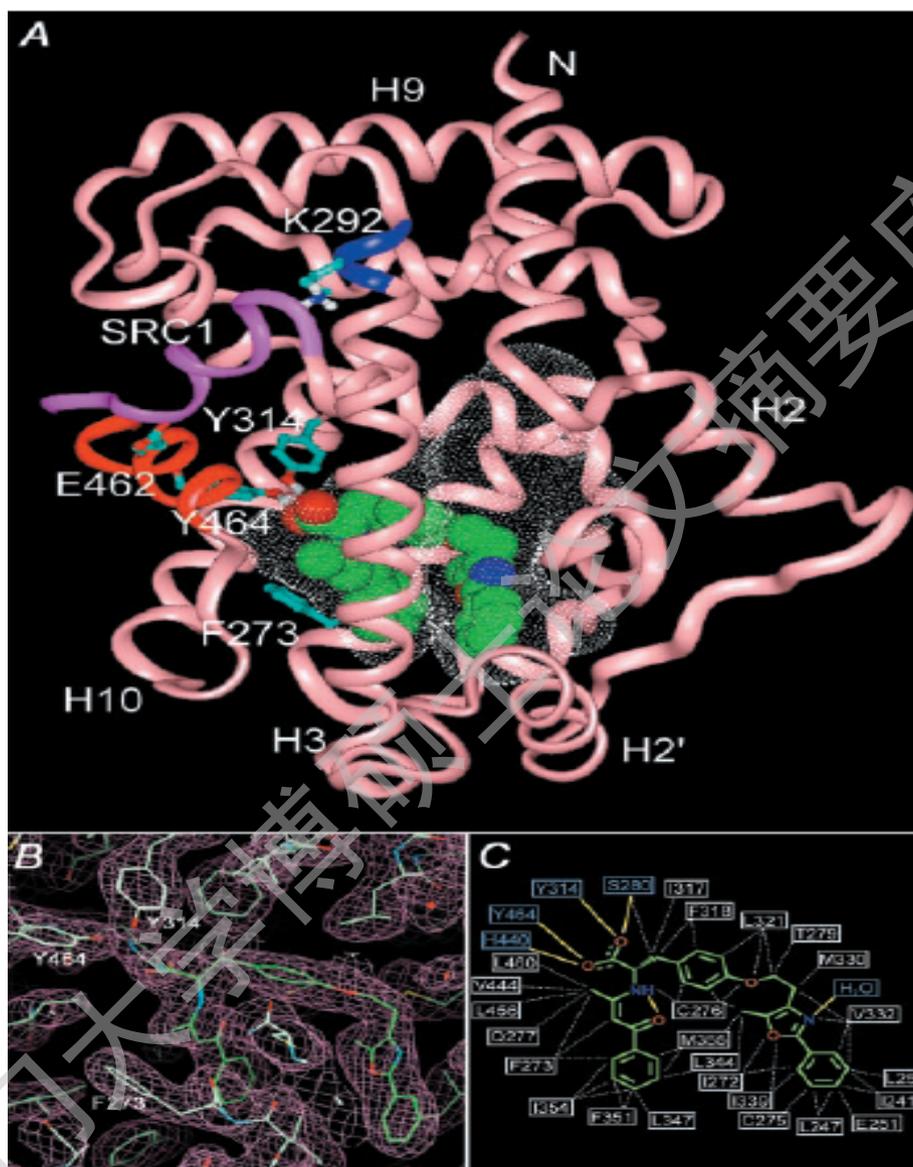
1.1.3 PPAR α LBD结构及其与配体的相互作用

PPAR α 的配体结合区域很大，许多结构不同的天然的和合成的配体均可以与之结合而发挥作用^[26]。PPAR α 和其它两种亚型一样，在 LBD 的下半部拥有一个 U 型的配体结合袋，这些结合袋在细节结构上有显著的不同，这可选择性的与配体结合。比如，PPAR α 与其激动剂 GW9544 结合的三维晶体结构如（图 1.3）所示^[27]。

PPAR α 蛋白是由一个螺旋三明治结构和一个4重 β 折叠组成，在LBD内有一个约 $1,400\text{\AA}^3$ 的配体结合袋，小分子的配体可以进入与之结合（如图1.3A）。在（图1.3B）中我们可以看到清晰的电子云密度。配体以一个U型构象结合在配体结合袋内，其中的羰基与螺旋H5上的Tyr-314 和AF-2螺旋上的Tyr-464 形成氢键（如图A和C），通过上述氢键网络，GW409544可以很好的结合在LBD的口袋内，同时它也起到了固定AF-2构象的作用，Glu-462和Lys-292之间形成的一个荷钳结构直接将LxxLL缩氨酸结合在受体的表面。因此GW409544上的羧基和PPAR α 蛋白间形成的氢键作为一个分子来激活靶基因转录。GW409544上的肽键进入AF-2螺旋的H3、H6和H10形成的疏水袋内。配体的其他部分环绕H3进入由H2'、H3和 β

折叠形成的磷脂袋内（如图1.3A和C）。

图1.3: PPAR α LBD的X-ray晶体结构图



(A) 粉红色的螺旋代表PPAR α 蛋白；红色的为AF-2螺旋；深兰色的为赖氨酸(K292)，淡紫色的是LxxLL缩氨酸；绿色的原子状物代表GW409544配体；表面用白色斑点表示的是配体结合袋；螺旋H2、H3、H9、H2' 和H10已被表示出；氨基酸Phe-273, Lys-292, Tyr-314, Glu-462和Tyr-464用兰色表出。(B) 为配体和受体结合的电子云密度图。(C) GW409544、PPAR α 蛋白和水分子间的黄线代表中心氢键，白色虚线代表疏水键。

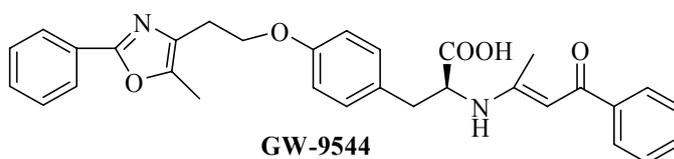
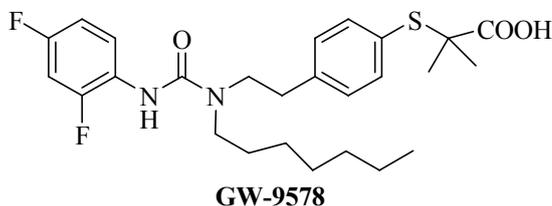
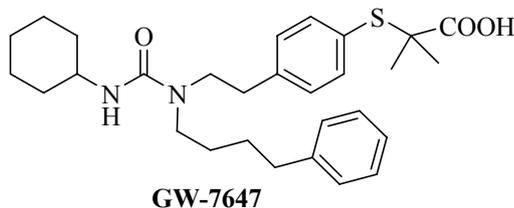
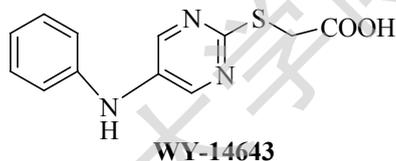
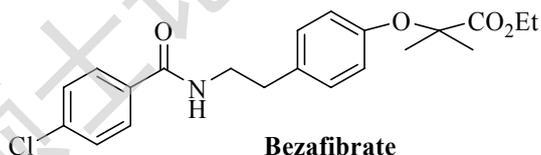
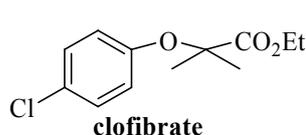
第二节 PPAR α 的配体

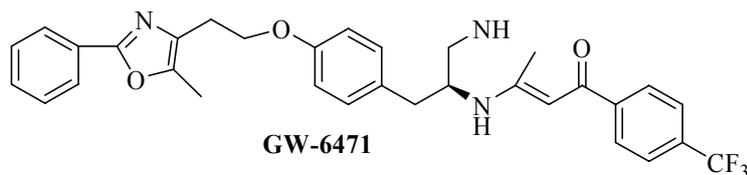
根据 PPAR α 配体来源的不同, 将其分为天然配体和合成配体。

1.2.1 PPAR α 的合成配体及作用

降血脂药物 WY-14653 是 PPAR α 的合成配体, 众所周知的降血脂药物贝特类, 如氯贝特, 苯扎贝特, 环丙贝特, 萘酚平, 替贝酸, 也是 PPAR α 的合成配体, 临床上广泛用于治疗高甘油三酯血症和混合型高酯血症。近年来, 发现几种非激素类消炎药物 (如吲哚美辛, 氟灭酸, 苯氧苯丙酸, 布洛芬) 也可与 PPAR α 结合, 它们的抗炎特性主要是通过与其结合后下调环氧化酶 2(CoX-2) 的表达及其活性而实现的^[29]。

常见 PPAR α 的一些合成配体的结构如下^[30]:





1.2.2 PPAR α 的天然配体及作用

脂肪酸，类花生酸类物质及其衍生物是 PPAR 的天然配体，其中饮食中的不饱和脂肪酸如亚油酸，亚麻酸，花生四烯酸都能在微克水平上激活 PPAR α 。花生四烯酸通过脂氧合酶途径合成的衍生物 8-*S* 羟基二十碳四烯酸 (8*S*-HETE) 和白三烯 B₄(LTB₄) 与 PPAR α 的亲合力比脂肪酸本身还高，LTB₄ 是炎症的强介导者，也是 PPAR α 的天然配体。它激活 PPAR α ，可刺激过氧化物酶体对白三烯等炎症介质的 β 氧化，说明 PPAR α 对炎症介质进行负反馈调节^[31]。OEA 是一种内源性油脂，对 PPAR α 的亲合力很高，而且对人体的副作用较小^[32]。

由于 PPAR α 受体的重要作用，它的这些合成的和天然的配体成了医学上人们关注的热点。许多医学工作者都开始了对 PPAR α 受体的探索，现已发现的 PPAR α 的激动剂及其对 PPAR α 的作用能力如表 1 所示^[33]。

表1：各种天然及合成PPAR α 的激动剂对PPAR α 的作用能力

Compound	EC ₅₀ (μ M)	Ref.
OEA	0.120	[34]
GW7647	0.006	[35]
WY-14643	0.650	[36]
Oleic acid	10	[34]
EPA	10	[37]
Linoleic acid	7	[38]
Clofibrate	50	[36]
Fenofibrate	30	[35]
8(<i>S</i>)-HETE	0.2	[39]

EPA, eicosapentaenoic acid; 8(*S*)-HETE, 8(*S*)-hydroxyeicosatetraenoic acid. Results are from references listed in brackets.

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