

学校编码: 10384

分类号_____ 密级_____

学 号: 20520071150972

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

以孤儿核受体 TR3 为靶标的熊胆
活性成分研究

Active constituents research of bear bile targeting
orphan nuclear receptor TR3

罗 强

指导教师姓名: 陈海峰 副教授

张晓坤 教授

专业名称: 化学生物学

论文提交日期: 2010年 月 日

论文答辩时间: 2010年 月 日

学位授予日期: 2010年 月 日

答辩委员会主席: 教授

评 阅 人: 教授

2010年06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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明，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、缩印或者其他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，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	I
ABSTRACT.....	III
第一章 前 言	1
1.1 熊胆粉背景介绍.....	1
1.1.1 熊胆的本草考证	1
1.1.2 熊胆的药理作用研究	1
1.1.3 熊胆的化学成分研究	2
1.1.4 熊胆前景展望	3
1.2 核受体概况.....	3
1.2.1 核受体	3
1.2.2 孤儿核受体 TR3	4
1.3 立题依据.....	7
第二章 熊胆粉化学成分的研究.....	9
2.1 材料与仪器.....	9
2.1.1 实验药材	9
2.1.2 实验仪器	9
2.1.3 实验试剂与填料.....	10
2.2 提取与分离.....	10
2.3 化合物的结构鉴定.....	14
第三章 熊胆粉 TUDCA 纯化工艺的研究.....	21
3.1 材料与仪器.....	21
3.1.1 实验药材	21
3.1.2 实验仪器	21
3.1.3 试剂及填料	21
3.2 工艺考察.....	22
3.2.1 HPLC 色谱条件.....	22
3.2.2 精密度实验	22

3.2.3	线性关系考察	22
3.2.4	熊胆粉中 TUDCA 浓度测定	23
3.2.5	工艺研究	23
3.2.6	稳定性实验	30
3.2.7	重复性实验	30
第四章	UDCA 衍生物的合成	31
第五章	生物活性评价	39
5.1	以 TR3 核受体为靶标的熊胆粉活性成分研究	39
5.1.1	材料与仪器	39
5.1.2	实验方法	40
5.1.3	实验结果	45
5.2	熊胆工艺组分对脂肪肝治疗作用的研究	46
5.2.1	实验材料	46
5.2.2	实验方法	47
5.2.3	实验结果	47
5.3	UDCA 衍生物活性研究	48
5.3.1	材料与仪器：见 5.1	48
5.3.2	实验方法：见 5.1	48
5.3.3	实验结果	48
第六章	讨论和总结	51
参 考 文 献	53
附 录	61
硕士期间发表论文	91
致 谢	93

Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Introduction about bear bile powder.....	1
1.2 Introduction about nuclear receptor.....	3
1.3 Aims and Significance.....	7
Chapter 2 Chemical constituents research of Bear bile powder.....	9
2.1 Materials.....	9
2.2 Experiments.....	10
2.3 Identification of chemical structures.....	14
Chapter 3 Enrichment and purification of TUDCA from bear bile powder...21	
3.1 Materials.....	21
3.2 Enrichment and purification of TUDCA from bear bile powder.....	22
Chapter 4 Structural modification of UDCA	31
Chapter 5 Biological activity research.....	39
5.1 Active constituents research of bear bile powder targeting nuclear receptor TR3.....	39
5.2 Treatment of fatty liver in rat by extract from bear bile powder.....	46
5.3 Bioactive research of UDCA derivates.....	48
Chapter 6 Discussion and conclusion.....	51

References.....	53
Appendix.....	61
Publications.....	91
Acknowledgements.....	93

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

熊胆作为传统名贵中药在中国已有上千年的历史，其临床药理作用毋庸置疑。然而，过去由于科学研究水平低下，生产工艺条件落后，人们普遍采用杀熊取胆的方式来获取熊胆，导致熊胆资源短缺，其化学成分研究并不系统，其中活性成分及其活性机理的研究更加缺乏。本文充分结合天然产物化学研究及张晓坤教授在 TR3 孤儿核受体与癌症关系方面的独特优势，对熊胆具有核受体调控作用的活性成分进行了前期初步研究。结果发现，熊胆中含有可以明确上调 TR3 mRNA 表达的活性成分，且熊胆主要化学成分 TUDCA 并不明显具有这种功能。这说明熊胆中可能含有其他对孤儿核受体 TR3 具有调控作用的活性成分，这为本课题的进一步深入研究提供了方向和思路。

本课题依据上述初步研究结果，通过 HP20 大孔树脂柱色谱、硅胶柱色谱、ODS 柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱以及制备型 HPLC 等多种色谱学分离手段对熊胆粉甲醇提取物进行分离，从中共分得单体化合物 17 个，利用理化性质和多种波谱手段（¹D-NMR, ESI-MS 等）以及通过与已知化合物的波谱学数据进行对照鉴定了其中 13 个化合物的结构。在分离得到的化合物中，四个异黄酮类化合物为首次从熊胆中分离得到。通过 RT-PCR 以及 Western-Blotting 等生物技术手段对部分化合物进行以核受体 TR3 为靶标的生物学活性评价，发现化合物 2, 7, 13, 14 能够促进 TR3 mRNA 的表达，但仅有化合物 7(4'-甲氧基-7-羟基异黄酮)对 TR3 蛋白表达及磷酸化具有显著促进作用，这为异黄酮结构与核受体 TR3 生物学效应关系研究提供了可能，同时对开发以核受体为靶标的抗癌药物也起到借鉴作用。

与此同时，作为熊胆主要成分 TUDCA 的降解产物的 UDCA，在临床上有广泛的应用，但每人每日至少需要纯化合物 500-1000mg 的量才能达到有效剂量，这提示我们通过结构修饰提高其抗癌作用仍然有很大的提升空间。因此我们接着通过 UDCA 酯化、醚化、氧化反应合成了 20 个 UDCA 衍生物，并通过 RT-PCR 对其进行以 TR3 mRNA 表达影响的生物活性评价，发现衍生物 6、10、11、14、15、16 可以增加 TR3 mRNA 的表达，其构效关系有待进一步深入研究。

最后，本课题还对熊胆粉中 TUDCA 纯化工艺进行研究。通过考察静动态饱和吸附量、洗脱溶剂及用量和流速、色谱柱高径比以及填料可重复次数，确定了较为理想的工艺方法。该工艺采用 HPD100 非极性大孔树脂为填料，蒸馏水、30%乙醇、95%乙醇各 2.5V₀ 为流动相，流速约 1.0 V₀/h，柱高径比在 2: 1 对熊胆粉中 TUDCA 进行分离纯化，并确定树脂在

使用 4 次后必须再生方可重复使用。采用新工艺得到的提取物抗小鼠脂肪肝实验结果表明，经过工艺改进后的熊胆提取物，对高脂模型小鼠脂肪肝具有很好的治疗效果。

关键词：熊胆；化学成分；异黄酮；孤儿核受体 TR3；脂肪肝；结构修饰

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Bear bile has been used as a traditional Chinese medicine for thousands of years in China, with many proven beneficial effects in human. However, it has been difficult to obtain a significant amount of bear bile, which has limited our identification of the active ingredients in bear bile and the investigation of their mechanism of action. Thus, the identification of the active components of bear bile and understanding of their mechanism of action are crucial to explore the therapeutic potential of bear bile.

To begin with, on the basis of preliminary study's data, 17 compounds were isolated by repeated HP20 macro porous adsorption resin column combined with Sephadex LH-20, ODS and silica gel chromatography, and the structures of 13 compounds were identified on the basis of extensive spectroscopic data analysis and by comparison of their spectral data reported. Among them, 4 isoflavones were isolated from bear bile for the first time. Our laboratory previously discovered that orphan nuclear receptor TR3 is a potent apoptotic protein in cancer cells. Thus, the biological activity of these compounds on inducing TR3 expression was tested by RT-PCR and Western-Blotting. The results showed that compound **2**, **7**, **13**, **14** could clearly up regulate mRNA expression of TR3 while only 4'-methoxy-7-hydroxyisoflavone (compound **7**) could significantly up regulate TR3 in the level of both mRNA and protein. These results provide possible relationship between the isoflavone structure and induction of TR3 expression and new small molecule candidates to develop drugs targeting the TR3 nuclear receptor.

Secondly, UDCA, as the main degradation product of TUDCA, has a wide range of clinical applications. However, the large dose about 500-1000 mg per day restrict the application, and structure modification may be a potent way to improve their efficacies. This thesis reported 20 synthesised UDCA derivatives through esterification, etherification and oxidation reactions. Their biological activities on TR3 mRNA expression by RT-PCR showed that the derivatives **6**, **10**, **11**, **14**, **15**, **16** could increase the expression of TR3 mRNA.

Finally, in order to enrich TUDCA, the main chemical constituent of bear bile, 8 different macro porous adsorption resin were compared and a new process was established. Extract purified according to the new process from bear bile powder showed good treatment on the fatty

liver in experimental mice.

Key Word: Bear bile; Chemical constituents; Isoflavones; Orphan receptor TR3; Fatty liver; Structural modification.

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1.1 熊胆粉背景介绍

熊胆粉为熊科黑熊属或熊属动物黑熊 *Selenarctos tibetanus* G. Cuvier 通过有管或无管引流的胆汁经脱脂、干燥而获得的干燥品。在我国主要分布于云南, 福建, 四川, 青海西藏, 新疆及东北等地^[1-2]。作为我国传统名贵中药, 熊胆具有清热解毒, 平肝明目, 杀虫止血之功效^[1, 3-4], 主要用于肝胆疾病, 心脑血管疾病, 眼科疾病, 妇、儿科疾病等的治疗^[5-9]。然而, 受熊胆资源所限, 目前国内外对其化学成分研究并不系统, 文献报道多以胆汁酸为主, 具体胆汁酸类型也争议颇大^[10-11]。

1.1.1 熊胆的本草考证

熊胆的药性、药效在本草中记载已有数千年历史。其最早载于《药性论》, 曰: “熊胆恶防己、地黄。主小儿五疳, 杀虫, 治恶疮”^[12]。《本草纲目》记载: “熊胆苦入心, 寒胜热, 手少阴, 厥阴, 足阳明经药也。故以凉心, 平肝, 杀虫, 为惊痫, 瘥忤, 翳障, 疔痔, 虫牙, 蛔痛之剂焉”^[13]。《本草求真》载: “熊胆入心肝, 兼入脾、大肠。味苦, 性寒, 无毒。功凉心平肝。惟其凉心, 所以能治目赤翳障, 恶疮, 痔漏等症。且能入脾而治黄疸, 湿邪。入大肠而治久痢, 湿热, 并治小儿风痰壅塞, 发作惊痫。凡此只可作丸, 勿煎汤”^[14]。《新修本草》载: “疗时气热盛变为黄疸, 暑月久痢, 心痛, 味苦寒, 无毒”^[15]。《食疗本草》: “主时气盛热, 小儿惊痫”; 《医学入门》: “点眼去翳开盲。除恶痔痔瘻”^[16]。上述之功效目前仍然广泛应用于临床, 可能为熊胆的核心疗效。

1.1.2 熊胆的药理作用研究

现代药理学研究表明熊胆具有多方面的药理作用。首先, 熊胆具有利胆、保肝、溶石作用。利胆作用是胆汁酸盐的共性, 早年即有报道熊胆静注可显著促进兔胆汁分泌, 近年研究也表明熊胆可促进大鼠胆汁分泌^[17]; 张红英等通过小鼠实验表明熊胆能够明显对抗 CCl_4 引起的小鼠 ALT 升高, 对 CCl_4 所致的肝病组织改变有一定保护作用^[18]; 临床发现胆石症患者服用熊去氧胆酸, 可使甲基戊二酰辅酶 A 还原酶活性明显降低几乎恢复至正常水平, 胆囊造影检查也可见胆石溶解效果^[17]。其次, 熊胆具有抗肿瘤作用。白血病是造血干细胞恶性转化而引起的疾病, 其发生首先是造血细胞分化障碍, 而被阻滞在幼稚

阶段,因而用药物诱导分化,使恶性细胞丧失其本身特征而获得正常细胞功能,可能是抗癌治疗的重要途径。实验表明,引流熊胆 0.4 mg/ml 可使 80%以上的人早幼粒细胞白血病细胞系 HL-60 细胞分化为具有单粒巨噬细胞特征和功能的细胞,并自发形成集落的能力^[19]。对于人组织细胞淋巴瘤细胞系 U-937 细胞熊胆也有显著的分化诱导作用,小剂量维生素 A 不加强熊胆的这一作用,但能提高增加分化成熟的细胞^[20]。再次,熊胆具有解痉、镇静、抗惊厥作用。李君实等发现熊胆可有效减弱小鼠肠道推进功能,对离体小肠,熊胆可显著对抗乙酰胆碱等所致的痉挛;他们还发现灌服或腹腔注射熊胆能减少小鼠自发活动,增强阈下剂量水合氯醛对小鼠的麻醉作用,并对抗去氧麻黄碱的中枢兴奋;对于戊四氮所致小鼠惊厥、电惊厥和土的宁惊厥作用,熊胆均具有抑制作用^[21,22]。熊胆还具有抗炎、抑菌、解热、降糖降脂^[27-28]等作用。体外实验表明,熊胆对肺炎双球菌、卡他球菌、甲型溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌、流感嗜血杆菌、大肠杆菌、短小芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌、腊样芽胞杆菌和绿脓杆菌有明显抑菌作用^[21, 23-26]。熊胆对于 10% 啤酒酵母羧甲基纤维悬液所致大鼠发热以及松节油皮下注射所致家兔发热均具有解热作用^[27]。除上述药理作用以外,熊胆还表现出健胃、镇痛作用;熊去氧胆酸能促进体内疲劳物质的分解与排泄及解毒作用^[26,29]。

熊胆在临床上的多方面用途,不仅由于其独有的药理活性,还在于熊胆毒性作用小。急性毒性试验显示,小鼠 ig 熊胆 LD₅₀ 均大于 15g/kg^[30],熊胆对小鼠的 LD₅₀ ip 为 8.5 g/kg,腹腔注射为 1.165 g/kg^[24],皮下注射为 1.0717 g/kg^[31]。Ames 试验、生殖细胞染色体畸变试验和微核试验,研究人工熊胆的毒性,结果表明熊胆的剂量高 1.0 g/kg 时,无致突变和畸变作用^[32]。临床应用不良反应少,毒副作用轻微,其腥苦可致少数患者呕吐,可改服用胶囊剂。鹅去氧胆酸服用量大,耐受性较差,腹泻发生率高,肝脏毒性大^[33];鹅去氧胆酸每日 0.75g,40% 患者可致腹泻,但轻微不影响继续治疗,3% 患者有肝脏毒性表现,停药后恢复,肝毒的原因是鹅去氧胆酸在肠微生物作用下转变为石胆酸(一种肝毒物质)^[34]。熊去氧胆酸副作用主要是腹泻,但发生率较低为 2%,无明显肝脏毒性,原因可能是熊去氧胆酸不会转变为石胆酸^[33, 35]。

1.1.3 熊胆的化学成分研究

熊胆的化学成分最早见于 Hammarsten 氏的报告^[36],从北极熊胆汁的水解物中分离得到有结晶性的胆酸、非结晶性的去氧胆酸(当时称为 Choleinsaure)及一种特殊的非结晶性的熊去氧胆酸(当时称为 Ursocholein saure),熊特有的胆汁酸的名称第一次出现在文

献中。以后 Shoda 氏^[37]提取得到了熊去氧胆酸的结晶。Iwasaki 氏^[38]鉴定认为这个酸是鹅去氧胆酸的 7 β 异构体。Kanazawa 氏^[39]从 7-酮基石胆酸开始, 在丙醇中用钠还原得到了良好收率的合成熊去氧胆酸。熊去氧胆酸最初认为是熊胆汁中的独特成分, 但是后来在一些哺乳动物中(包括人粪便中)作为一个次要成分而被检出。宇治^[40]岩崎^[41]等在各种熊胆样品的水解物中, 除检出熊去氧胆酸外, 还分离得到胆酸、去氧胆酸及鹅去氧胆酸。从水解物中还分离出牛磺酸及少量的甘氨酸, 而认为熊去氧胆酸主要是以与牛磺酸的结合形式存在于胆汁中, 甘氨酸的结合体是少量的。

熊胆中除了主要成分胆汁酸(包括熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、胆酸、去氧胆酸、牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸等)外, 还包括胆固醇类、胆色素类(包括胆红素, 其次胆黄素、胆黄褐素、胆绿素等)、氨基酸类、微量元素类及其他(如蛋白、肽类、脂肪、磷脂、无机盐和水等)。

1.1.4 熊胆前景展望

90 年代以前, 临床应用熊胆多为猎杀野生黑熊所得, 导致药用资源短缺, 临床使用受限。近 20 年来, 随着黑熊养殖技术和熊胆引流手段的成熟, 引流熊胆已成为天然熊胆的理想替代品, 它不仅使野生熊资源得到了保护, 而且也使临床需要得到了很大缓解, 较好地解决了中药材熊胆的药源问题。

引流熊胆给熊胆这一珍稀药材提供了丰富的药源。随着人工引流熊胆技术的进一步科学化、规范化、标准化, 由外界因素造成的熊胆粉质量差异将会进一步缩小, 熊胆粉质量将会进一步提高, 质量控制标准进一步完善, 从而使熊胆粉更大程度地替代了天然熊胆, 减少猎熊及杀熊取胆对资源的危害。然而, 熊胆药效的再评价, 研究熊胆的特有活性成分及其在中医方剂中的不可替代性, 是维持熊胆作为动物药使用的前提。为此, 对熊胆进行深入的活性成分研究, 挖掘熊胆的特有疗效, 并从相应的药效物质基础、质量评价及较深层次开发研究角度重新评价熊胆的工作成为近期熊胆研究的热点^[42]。

1.2 核受体概况

1.2.1 核受体

核受体(nuclear receptor)是一类分布于胞浆或细胞核内的细胞内受体, 其本质上都是配体调控的转录因子, 均在核内启动信号传导并影响基因转录^[43]。其成员众多, 构成了一个大家族, 该家族可分为类固醇激素受体、非类固醇激素受体和孤儿核受体三大类。核

受体与相应的配体及其辅调节因子相互作用，调控基因的协调表达，从而在机体的生长发育、新陈代谢、细胞分化及体内许多生理过程中发挥重要作用。核受体的功能障碍将导致一系列疾病（如癌症、不育、肥胖、糖尿病等）的发生^[44]。在药物开发方面，核受体极具潜力，他们能结合经药物设计而被修饰的小分子，从而调控相关疾病如癌、骨质疏松、糖尿病等，目前核受体家族已成为第二大药物靶点^[45-47]。

典型的核受体一般包括A、B、C、D、E、F等6个区域，如图1.1所示。其中A/B区包含一配体非依赖性的转录激活域AF-1；C为高度保守的DNA结合结构域（DBD），含两个锌指模体；D是可变的绞链区；E区为配体结合区（LBD），介导配体结合和二聚化过程，还包括一配体依赖性转录激活域AF-2^[48-49]；一些核受体在C端还含有一段多变的F区，目前还没有发现F区的特定功能。针对不同的刺激信号，核受体与不同辅调节因子的相互作用赋予了它功能的多样性。

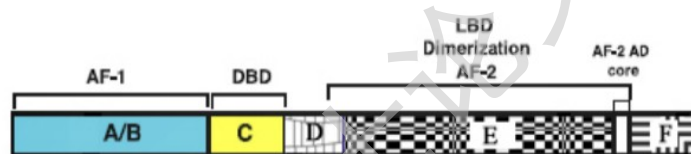


图 1.1 核受体结构模式图

1.2.2 孤儿核受体 TR3

孤儿核受体（orphan receptor）是一类没有配体或尚未发现配体的核受体。至今，已研究有数十个孤儿核受体亚家族。作为孤儿核受体超家族成员，他们还具有脂溶性激素受体的特性，能直接进入胞核调节基因的转录表达，从而对机体各种生理活动发挥重要的调控作用。孤儿核受体的配体是理解孤儿核受体作用机制的关键，也一直是孤儿核受体研究的热点^[50]。

1 孤儿核受体TR3的发现

1985年Lau等^[51]用血清及生长因子处理静止期小鼠纤维母细胞，使其发生G0/G1期转换，几分钟后即有一批基因转录表达。随后在由这些立刻早期基因构成的cDNA文库中克隆鉴定出3CH77基因，并定名为Nur77^[52]。

1989年Chang等^[53]用针对类固醇激素受体超家族成员共有DNA结合序列的寡核苷酸为探针，在人前列腺细胞的cDNA文库中分离到一个新的基因并命名为TR3。随后，其

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