

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 20120051302020

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

天然产物 D5、S3 及其衍生物抗肿瘤活性的初步研究

Preliminary Study on the Antitumor Activities of the Natural Products D5, S3 and Their Derivatives

黄丹虹

指导教师姓名: 张连茹 副教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2008年6月12日

论文答辩时间: 2008年7月7日

学位授予日期: 2008年 月 日

答辩委员会主席: 沈月毛 教授

评 阅 人: _____

2008年7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（），在两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

目 录

中文摘要	1
英文摘要	3
前 言	1
1. 抗肿瘤药物的研究进展	1
1.1 代表性抗肿瘤天然药物研究进展	1
1.1.1 紫杉醇	1
1.1.2 喜树碱	2
1.2 化合物D5、S3简介	3
1.3 药物诱导肿瘤细胞死亡的方式	6
1.4 肿瘤细胞凋亡的调节	6
1.4.1 肿瘤细胞凋亡的主要调节因子	6
1.4.2 核受体家族与肿瘤细胞的相关性	10
1.4.3 TR3研究情况	11
1.5 抗肿瘤药物开发新策略	13
2. 本课题研究目的和意义	14
材料与方法	15
1 材 料	15
2 方 法	19
结果与分析	26
1. 化合物D5及其衍生物抗肿瘤活性研究	26
1.1 化合物D5的细胞毒活性	26
1.1.1 D5对5株肿瘤细胞株的细胞毒作用	26
1.1.2 D5对4株正常细胞株的细胞毒作用	29

1.1.3 D5对9株细胞株作用的IC ₅₀	32
1.2 人工合成D5及其衍生物活性研究.....	33
1.2.1化合物D5以及Zhn-89体外抗肿瘤活性研究.....	33
1.2.2 D5 衍生物抗肿瘤活性.....	34
1.3 抗真菌活性研究.....	43
1.4 D5与TR3 (LBD) 相互作用.....	45
1.4.1 TR3表达条件优化.....	45
1.4.2 TR3 的纯化、保存.....	51
1.4.3 化合物 D5 与 TR3 (LBD) 相互作用.....	52
2. 化合物S3抗肿瘤活性的研究.....	55
2.1 化合物S3的细胞毒活性.....	55
2.1.1 S3对7株肿瘤细胞株的细胞毒作用.....	55
2.1.2 S3 对 3 株正常细胞株的细胞毒作用.....	60
2.1.3 S3对10株细胞株作用的IC ₅₀	62
2.2 化合物S3与SA-1的活性对比.....	63
2.2.1 S3、SA-1对细胞存活率的影响.....	63
2.2.2 SA-1 的体外细胞毒活性.....	65
2.2.3 S3以及SA-1对细胞活性氧含量的影响.....	66
2.2.4 SA-1对细胞周期的影响.....	68
2.3 化合物S3抑瘤机理的初步研究.....	69
2.3.1 S3对细胞形态的影响.....	69
2.3.2 S3 引起细胞死亡的方式.....	71
2.3.3 S3对细胞骨架蛋白的影响.....	72
2.3.4 S3对细胞周期的影响.....	73
2.3.5 S3对Bax基因表达量的影响.....	78
2.4 化合物S3药理初步研究.....	78
讨论与结论.....	80

1. 天然产物抗肿瘤活性研究	80
1.1 化合物D5及其衍生物的抗肿瘤活性	80
1.2 化合物D5与孤身受体TR3的相互作用	80
1.2.1 表达条件对GST-TR3产量的影响	80
1.2.2 化合物 D5 与 TR3 的相互作用	81
1.3 化合物S3的抗肿瘤活性以及急性毒性实验	82
2. 化合物构效关系研究	83
2.1 化合物D5、S3与其衍生物的抗癌活性对比	83
2.2 筛选抗肿瘤化合物的思路	86
3. 结论与展望	86
参考文献	89
致 谢	

Catalogue

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	3
Introduction	1
1. Advance on Antitumor Drug	1
1.1 Advance on the natural Representative Anti-tumor Drug.....	1
1.1.1 Taxol	1
1.1.2 Camptothecin(CPT)	1
1.2 The introduction of D5 and S3.....	3
1.3 The death pathways induced by drugs of cancer cells.....	6
1.4 The regulation of cancer cells Apoptosis	6
1.4.1 The major Regulative elements	6
1.4.2 The relationship between nuclear Receptors and cancer Cells.....	10
1.4.3 Advance on TR3	11
1.5 The new tactics of antitumor drug developing.....	13
2. Content and Purpose of this Thesis	14
Materials and Methods	15
1 Materials	15
2 Methods	19
Results and Analysis	26
1. Study on the Antitumor Activities of D5 and its Derivatives	26
1.1 The cytotoxicity activity of D5	26
1.1.1 The cytotoxicity activity of D5 on five cancer cell lines	26
1.1.2 The cytotoxicity activity of D5 on four normal cell lines.....	29

1.1.3 The IC ₅₀ of D5 on nine cell Lines	32
1.2 Study on the bioactivities of the synthetic D5 and its derivatives	33
1.2.1 Study on the antitumor activities in Vitro of D5 and Zhn-89	33
1.2.2 Study on the Anti-fungi activities of the derivatives of D5	34
1.3 Study on the antifungal activities.....	43
1.4 Study on the interaction between D5 and GST-TR3.....	45
1.4.1 Optimization of expression condition of TR3	45
1.4.2 Purification of TR3	51
1.4.3 The interaction between D5 and TR3	52
2. Study on the Anti-tumor Activities of S3.....	55
2.1 The cytotoxicity activity of S3.....	55
2.1.1 The cytotoxicity activity of S3 on seven cancer cell lines.....	55
2.1.2 The cytotoxicity activity of S3 on three normal cell lines	60
2.1.3 The IC ₅₀ of S3 on ten cell Lines.....	62
2.2 Bioactivities comparison of S3 and SA-1	63
2.2.1 The effects on the viability rate of SA-1 and S3.....	63
2.2.2 The cytotoxicity activity of SA-1	65
2.2.3 The effects on the ROS contents of SA-1 and S3	66
2.2.4 The effect of SA-1 on cell cycle distribution.....	68
2.3 Primary study on the mechanism of S3	69
2.3.1 The effects of S3 on morphologic change	69
2.3.2 The death pathway induced by S3	71
2.3.3 The effects of S3 on Cytoskeleton.....	72
2.3.4 The effect of S3 on cell cycle distribution.....	73
2.3.5 The effect of S3 on expression level of gene Bax	78
2.4 Primary Study on the Pharmacology of S3.....	78
Discussion and Conclusions	80

1. Study on the Anti-tumor Activities of Natural Products	80
1.1 The anti-tumor activities of D5 and its derivatives	80
1.2 The interaction between D5 and orphan receptor TR3	80
1.2.1 Effect of expression condition on production of GST-TR3	80
1.2.2 The interaction between D5 and TR3	81
1.3 The antitumor activity and acute toxicity of S3	82
2. Study on the Relationships between Effects and Structures	83
2.1 Comparison of the antitumor activities between D5, S3 and their derivatives	83
2.2 Ways of screening out antitumor drug	86
3. Conclusions and Prospects	86
References	89
Acknowledgement	95

摘要

本论文从抗肿瘤活性化合物 D5 出发，通过 MTT 法确定其敏感细胞株，并对其同系物和衍生物进行了抗肿瘤活性测定；采用荧光滴定法对 D5 的疑似靶蛋白 TR3 的相互作用进行了初步研究，采用正交试验对 TR3 的表达条件进行了优化，并得到了 TR3 的晶体。此外，采用 MTT 法对 S3 的抗肿瘤活性进行研究，并对 S3 及其衍生物 SA-1 进行体外抗肿瘤活性的对比。采用流式细胞仪分析技术，研究化合物 S3 以及 SA-1 对 ROS 含量、细胞周期的影响。在此基础上，对化合物 S3 的作用机制以及急性毒性进行了初步研究。

通过以上研究，获得了一些有意义的结果：

1、采用 MTT 法对化合物 D5 的体外抗肿瘤活性进行了初步研究。选用 9 株人源、鼠源的细胞株对 D5 的细胞毒活性进行测定，结果表明化合物 D5 对细胞的抑制作用具有特异性。在所选的 5 株肿瘤细胞株中，人胃癌细胞 BGC-823 对 D5 最为敏感，其 IC_{50} 为 $3.550\mu\text{g/mL}$ ，而化合物 D5 对正常细胞 HL7702、Aml-12 等细胞的毒性小于阳性对照。

2、对 GST-TR3(LBD) 融合蛋白进行体外异源表达，采用荧光滴定方法检测化合物 D5 与其疑似靶蛋白 TR3(LBD) 的相互作用。首先，在优化并确定 M9 培养基成分的基础上，采用 4 因素 3 水平的正交试验对表达条件进行优化，得出 IPTG 浓度以及诱导前菌浓是影响目的蛋白表达量的最关键因素，其中 IPTG 的最佳浓度确定为 0.3mmol/L ，最佳菌浓对应 OD_{600} 约为 0.77，在此条件下蛋白表达量优化达到 2.0mg/L （与 LB 培养基产量近似）。荧光滴定实验结果表明，化合物 D5 与 TR3 有较强的相互作用，二者的结合常数约为 2.30×10^9 。

3、采用 MTT 法对通过化学合成得到的 D5 的 49 个衍生物（包括 Zhn、Lix、Wj 以及 Lwj 等系列）进行了抗肿瘤活性测定。以 Zhn89(化学合成的 D5)为对照，经过体外抗肿瘤活性的初步筛选，从 49 个化合物中筛选出 10 个活性较强的化合物。以啤酒酵母、白色假丝酵母为指示菌，对以上 11 个化合物（包括 D5）以及苯环上带有三羟基的 6 个化合物进行抗真菌活性测定，结果表明，化合物 D5、Zhn89、Zhn111、Zhn196a、Lwj126 以及 Wj94 对啤酒酵母有较强的抑制作用，其 MIC 为 $100\mu\text{M}\sim 140\mu\text{M}$ ；仅有 D5 对白色假丝酵母有抑制活性，其 MIC 为 $100\mu\text{M}$ 。

4、选用 10 株人源、鼠源的细胞株对 S3 的细胞毒活性进行测定，研究结果表明，该化合物对细胞的抑制作用具有特异性。在所选 7 株肿瘤细胞株中，人宫颈癌细胞 HeLa 对 S3 最为敏感，其 IC_{50} 为 $1.275\mu\text{g/mL}$ 。化合物 S3 对正常细胞 HL-7702、Aml-12 等的细胞毒性略低于阳性对照。

5、通过形态观察、DAPI 核染色、流式细胞仪检测以及 Western blotting 等分析方法对 S3 的作用机理进行了初步研究，发现该化合物可以诱导 HeLa 细胞凋亡。

急性毒性实验表明其 LD_{50} 大于 2000mg/kg 体重，属低毒化合物，具有进一步开发研究的价值。

6、化合物 SA-1 是 S3 的衍生物，MTT 法测定结果表明二者对 HeLa 细胞均有抑制活性。ROS 细胞水平检测结果表明 SA-1 能显著增加 ROS 的含量，而 S3 的作用则不明显。在 SA-1 作用下，细胞周期分析中没有明显的凋亡峰出现，化合物 SA-1 抑制细胞的方式可能是引起细胞坏死。

本文研究结果表明，天然产物 D5 以及 S3 均有较好的生物活性，对其衍生物的研究则发现化合物的结构与其活性密切相关，结构改造是开发高效、低毒抗肿瘤新药的有效途径。

关键词： 化合物； TR3； 凋亡； 抗肿瘤活性

Abstract

This thesis was based on studies conducted on the compound D5 using various microbiological techniques to do further research on the antitumor activity. The MTT method was applied to screen out the cell line which was the most sensitive to D5. The antitumor activities of the derivatives of D5 were also determined; the interaction between D5 and TR3, the possible target protein of D5, was tested by fluorescence quenching. The crystal TR3 was obtained after first optimizing the expression conditions of TR3 by orthogonal test. Moreover, the MTT method was used to screen out the most sensitive cell line to S3 and compare the activities of S3 and SA-1. FCS analysis was used to study the effects of S3 and SA-1 on the contents of ROS and the cell cycle distribution. Based on the above, the mechanism and acute toxicity of S3 were primarily studied.

Several useful results were obtained from our study:

1, The cytotoxicity of natural products D5 was primarily studied by the MTT method. Nine cell lines from human and mice were chosen to test the cytotoxicity of D5 in vitro. The results indicated that D5 had inhibition effects on special cell lines. The BGC-823 cell line, the IC_{50} of which was $3.550\mu\text{g/mL}$, was the most sensitive among those cancer cell lines chosen, and D5 had lower toxicity on normal cell line, such as HL7702, Aml-12 and so on.

2, Fusion protein GST-TR3 (LBD) was expressed in *E.coli* in order to study the interaction between D5 and TR3 (which maybe the target protein of D5), and fluorescence quenching was used to test this interaction. First, the concentration of IPTG (0.3mmol/L) and the density of the culture ($OD_{600}=0.77$) before induction were screened out as the most important factors in GST-TR3 expression by orthogonal test. The protein production reached 2.0mg/L in M9 medium after optimization (similar to LB medium). The result of fluorescence quenching, such as the constants of combination, the position of combination and so on suggested that D5 had obvious interaction with TR3 and provided scientific data for further study.

3, The anti-tumor activities of the derivatives of D5 were tested also. The antitumor activities of 49 synthetic compounds, including the series of Zhn, Lix, Wj, Lwj and so on,

were tested by MTT method with Zhn89 (D5) as control. Ten compounds were screened out for their good effects similar to those of D5. The antifungal activities of these 11 compounds (including D5) were tested against *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. The results indicated that D5, Zhn89, Zhn111, Zhn196a, Lwj126 and Wj94 has good inhibition effects on *Saccharomyces cerevisiae* with the MIC of about 100~140 μ M; only D5 had inhibition effect on *Candida albicans* with its MIC of 100 μ M.

4, The cytotoxicity of natural products S3 was primarily studied for this thesis by MTT method. Ten cell lines from human and mice were chosen to test the cytotoxicity of S3 in vitro. The results indicated that S3 had inhibition effects on special cell lines. The HeLa cell line with IC₅₀ of 1.275 μ g/mL, was the most sensitive of the cancer cell lines chosen. S3 also had toxicity to normal cell lines, such as HL7702, Aml-12 and so on.

5, Furthermore, the mechanism of S3 on HeLa cell line was thoroughly studied. It was discovered that S3 could induce HeLa cell line apoptosis through morphological change, DAPI stain, FCS analysis, Western Blotting, and so on. Meanwhile, the results of acute toxicity test suggested that S3 belonged to the group of substance with low toxicity with its LD50 above 2000mg/kg in weight. S3 was worth developing.

6, SA-1, the derivative of S3, had similar inhibitory effect on HeLa cell line as S3 tested by MTT method. The ROS contents of S3 and SA-1 were measured by FCS, and the results indicated that SA-1 could obviously raise the ROS content but S3 could not. Meanwhile, SA-1 had no effect on cell cycle distribution because no apoptosis peak was captured by FCS analysis. Maybe the death pathway of HeLa cell line was necrosis.

The results of this thesis indicated that both D5 and S3 had good bioactivities, and studies of their derivatives suggested that structures of compounds played an important role in their bioactivities. Possibly, structural modification would be the new way develop the new drug with high efficiency and low side-effects.

Key words: compound; TR3; apoptosis; antitumor activity

前 言

1. 抗肿瘤药物的研究进展

1.1 代表性抗肿瘤天然药物研究进展

来源于天然产物的抗肿瘤药物已经成为临床抗肿瘤药物的重要组成部分。目前，用于临床的主要有长春碱、长春新碱、紫杉醇、10-羟基喜树碱和高三尖杉酯碱等。

1.1.1 紫杉醇 (Taxol)

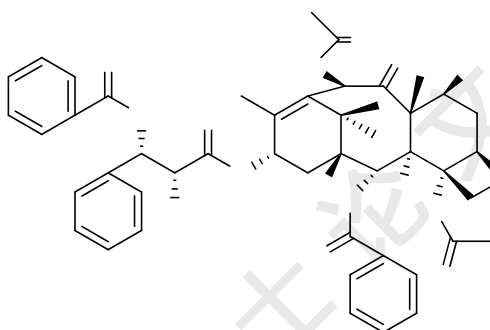


图1 紫杉醇化学结构

Fig. 1 The structure of Taxol

资料来源: S. F. Baldrey, R. R. Brodie, G. R. Morris, et al. Comparison of LC-UV and LC-MS-MS for the Determination of Taxol [J]. Chromatographia Supplement, 2002, 55: 187-192.

1992年美国FDA批准紫杉醇上市，成为90年代国际上抗肿瘤药的三大成就之一^[1]。紫杉醇，为四环三萜类化合物，结构式如图1所示，相对分子质量为853.9，具有高度亲脂性，不溶于水。与常用的主要通过阻止微管聚集的作用来抑制细胞生长、分化的纺锤体毒物类药物长春花碱、秋水仙碱等不同，紫杉醇主要是通过催化微管蛋白迅速合成微管并结合到微管上，起到稳定和防止微管解聚的作用。其作用的特异性主要体现在：(1) 对于迅速分裂，尤其是处于对数生长期的肿瘤细胞，紫杉醇“冻结”有丝分裂纺锤体，从而使肿瘤细胞停止在G₂/M期，直至细胞死亡；(2) 紫杉醇也作用于巨噬细胞上的肿瘤坏死因子(TNF)受体，促进白细胞介素(IL-21)、TNF22、干扰素(IFN-21、IFN-22)等的释放，对肿瘤细胞起杀伤作用，并抑制肿瘤细胞的生长，转移^[2]。

紫杉醇，最早分离自红豆杉树皮，临床中广泛应用于乳腺癌早期治疗、转移型乳腺

癌以及乳腺癌^[3,4]，研究表明，它能够有效抑制乳腺癌MDA-MB-468、MCF-7的增长、促使神经酰胺的增加，并能诱导MCF-7细胞凋亡^[5,6]。紫杉醇的主要作用机制是结合于微管蛋白上，促进微管二聚体的形成，并通过抑制微管解聚来阻碍细胞有丝分裂的完成^[7,8]。2000年紫杉醇的年销售额已近20亿美元，具有非常广阔的市场前景^[9]。目前，紫杉醇仍主要来自于植物提取，但红豆杉为国家一级保护植物，因此寻找抗肿瘤药物的新来源、已知药物的结构类似物或者研究人工合成途径，已经成为进一步开发抗肿瘤药物的新起点。

1.1.2 喜树碱 (CPT)

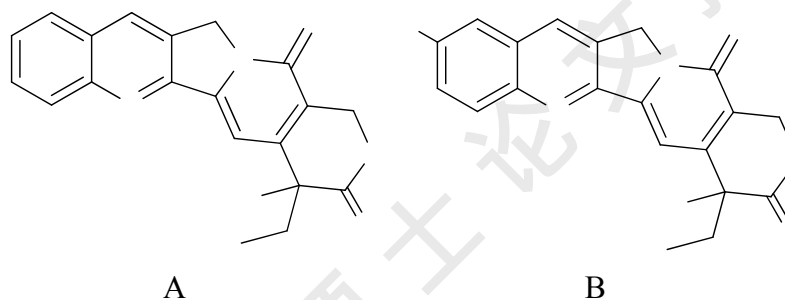


图2 喜树碱与10-羟基喜树碱结构

Fig.2 The structure of CPT and HCPT

注：A：CPT；B：HCPT

资料来源：袁丹，容如滨，等. 抗肿瘤药物10-羟基喜树碱的研究与应用进展[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(12):9-12.

目前，临床治疗上通过放疗、化疗以及外科手术对肿瘤治疗的效果并不理想，采用针对特定靶点的药物通过抑制肿瘤生长、引起肿瘤死亡等途径来进行治疗是现代医学发展的趋势。天然产物喜树碱，就是一类作用于拓扑异构酶的肿瘤治疗药物。

喜树碱，如图2所示，其结构中含有吡咯啉环、共轭吡啶环和六元羟基内酯环^[10]，在临床应用中具有高效、广谱等优点。1966年由美国的Monroe E.Wall首次从喜树茎的提取物中分离出^[11]，属天然生物碱类化合物。20世纪70年代的研究发现，喜树碱对胃癌、结肠癌等多种恶性肿瘤均有一定疗效，从而引起了人们的广泛关注，但是进一步研究发现，喜树碱对消化系统、造血系统以及泌尿系统都有不同程度的毒副作用，喜树碱的临床开发应用因而受到限制^[10]。1985年，Y.H.Hsiang发现喜树碱可以通过抑制拓扑异构酶降低肿瘤细胞的DNA复制、重组、转录、修复过程中超螺旋化DNA的扭转应力而达到

抗肿瘤的作用^[12],其独特的 I 型拓扑异构酶的抑制活性使其成为近20年来抗肿瘤药物研究的热点之一。

回顾喜树碱和紫杉醇开发成为药物的过程,可以看出天然产物是开发抗肿瘤药物先导化合物的重要来源。随着天然产物及其衍生物构效关系研究方法的改进,天然抗肿瘤药物衍生物以及其结构类似物将成为抗肿瘤药物开发的新思路。

1.2 天然产物D5、S3简介

(1) 化合物D5

D5(2-[3',5'-二羟基-2'-辛酮基苯基]-乙酸乙酯),结构式如图3,为聚酮类化合物。Brady等从壳囊孢菌*Cytospora* sp.中首次分离得到,并命名为Cytosporone B,Cytosporone B(即D5)没有抗菌活性。化合物Cytosporone D与Cytosporone E为与Cytosporone B同时发现的化合物,二者有近似的抗菌活性。其中,Cytosporone D对金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、大肠杆菌以及白色假丝酵母作用的IC₅₀分别是8μg/mL、8μg/mL、64μg/mL以及4μg/mL^[13]。天然产物Cytosporone E对革兰氏阳性、革兰氏阴性细菌都有抑制作用,而化学合成的化合物Cytosporone E仅仅对革兰氏阳性菌有抑制活性^[14]。化合物Cytosporone C没有抗菌活性,CytosporoneD、CytosporoneE的区别在于苯环上只有两个羟基,故三羟基可能是抗菌的活性基团。

本实验室首次从红树林内生真菌HTF-5中分离化合物D5(即化合物E),此后,又从红树林内生真菌HTF-3中分离得到该化合物及其衍生物^[15]。本实验室研究表明该化合物有一定的抗真菌活性,其对啤酒酵母、白色假丝酵母、黑曲霉、植物致病菌木霉、交链孢霉和红色脉孢菌MIC分别是1.56μg/mL、0.156mg/mL、0.125mg/mL、62.5μg/mL、70μg/mL和0.125mg/mL。同时,化合物D5表现出较强的抗肿瘤活性,对Raji、KB、以及Hela细胞等瘤株有不同程度的抑制活性,故表明其抗肿瘤作用具有一定的选择性。研究发现,该化合物对多种肿瘤细胞的作用均表现出急性毒性,几乎没有时间依赖性,作用1h就能使细胞形态发生明显的变化^[16,17],有待深入研究其详细的作用机制。

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫