

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_密级\_\_\_\_

学号: 32320111153302

UDC\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**小槐花大极性部位抗肿瘤活性物质研究**  
**Anti-cancer constituents research of the higher polar**  
**substances from *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC.**

朱 丹

指导教师姓名: 陈海峰教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2014 年 4 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2014 年 5 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，均在文中以适当方式明确标明，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。）

声明人（签名）：

年 月

## 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

## 目录

摘要.....	I
Abstract .....	II
第一章 前言 .....	1
1.1 研究背景 .....	1
1.2 植物概况 .....	2
1.3 小槐花化学成分研究进展 .....	3
1.4 小槐花的药理活性研究进展 .....	9
1.5 立题依据 .....	11
第二章 小槐花的化学成分研究.....	14
2.1 仪器及材料 .....	14
2.2 提取与分离方法 .....	15
2.3 化合物的结构鉴定 .....	19
第三章 小槐花的生物活性评价 .....	52
3.1 仪器及材料 .....	52
3.2 小槐花中化学成分的抗肿瘤活性研究 .....	54
第四章 总结与讨论 .....	75
4.1 小槐花化学成分研究总结 .....	75
4.2 小槐花中大极性成分的生物活性总结 .....	76
参考文献 .....	78
附录.....	83
硕士期间发表论文 .....	116
致谢.....	117

---

## Contents

<b>Abstract in Chinese .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English .....</b>	<b>II</b>
<b>Chapter 1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Background. ....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Introduction of <i>Desmodium caudatum</i> (Thunb.) DC. ....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Raesearch progress on chemical constituents of <i>Desmodium caudatum</i>         (Thunb.) DC.. ....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Research progress on pharmacological activities of <i>Desmodium caudatum</i>         (Thunb.) DC.. ....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Aims and significance .....</b>	<b>11</b>
<b>Chapter 2 Chemical components research of <i>Desmodium caudatum</i>         (Thunb.) DC. ....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Materials .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Extraction and isolation .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Identification of chemical structures .....</b>	<b>19</b>
<b>Chapter 3 Bioactivity research of <i>Desmodium caudatum</i> (Thunb.)         DC. ....</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Materials .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2 Research on the antitumor activity of the isolated compounds from         <i>Desmodium caudatum</i> (Thunb.) DC. ....</b>	<b>54</b>
<b>Chapter 4 Conclusions and discussion .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1 Conclusion of chemical components in <i>Desmodium caudatum</i>         (Thunb.) DC .....</b>	<b>75</b>
<b>4.2 Conclusion of biological activity of the higher polar chemical components         in <i>Desmodium caudatum</i> (Thunb.) DC.....</b>	<b>76</b>
<b>References.....</b>	<b>78</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>83</b>
<b>Publications .....</b>	<b>116</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>117</b>

## 摘要

近年来,癌症的发病率逐年攀升,成为了人类仅次于心血管病的二号“杀手”。中药及天然药物历经数千年的临床研究经验,保障了广大人民防病治病的需要,中药尤其是中草药以其毒副作用小、结构多样、地产丰富等优势使得从天然产物中提取有效的抗癌成分成为癌症研究的重要途径之一。本课题在课题组前期对小槐花弱极性成分研究的基础上,对小槐花强极性部分的化学成分进行了研究,并对单体化合物的体外抗癌活性进行了测试。

本文综合运用了硅胶柱色谱、聚酰胺凝胶柱色谱、ODS 中低压柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、薄层色谱、重结晶、分析型和制备型 HPLC 等方法,从小槐花 60%乙醇提取物大孔树脂 60%乙醇-水洗脱部分中分离得到 29 个单体化合物。利用核磁共振波谱、质谱及化合物的理化性质对化合物的结构进行了鉴定。其中包括 12 个黄酮类化合物,6 个苯丙素类化合物,2 个甾体类化合物,3 个萜类化合物,2 个生物碱类化合物以及 4 个其他类型的化合物。化合物 **4, 5, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29** 等 16 个化合物均为山蚂蝗属植物中首次分离得到的化合物。化合物 **15** 和化合物 **19** 为 2 个新化合物,且从所连糖的结构上看均属于  $\beta$ -D-呋喃芹糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷类化合物。

本文通过 MTT 实验对小槐花植物中分离得到的化学成分进行了抗肿瘤生物活性的初步筛选,发现化合物 **13, 27** 对人宫颈癌细胞 HeLa 有较强的生长抑制作用,且表现出良好的浓度依赖性。克隆形成实验验证了化合物 **13, 27** 对 HeLa 细胞增殖的长程杀伤作用。随后采用蛋白质印迹的方法,检测了 2 个化合物在人宫颈癌细胞 HeLa 中对凋亡标志性蛋白 PARP 切割的影响,实验结果表明化合物 **13, 27** 均能在一定程度上诱导 HeLa 细胞中蛋白 PARP 的切割,且具有浓度依赖性。caspase 活性实验结果表明,化合物 **13, 27** 能在一定程度上激活 caspase-3, -8, -9 的活性。同时,本文还采用核受体 RXR $\alpha$  双荧光素酶报告基因法,对 2 个活性化合物的抗癌作用途径进行了初步探讨,结果表明,化合物 **13** 可显著促进核受体 RXR $\alpha$  蛋白的转录功能,并协同 9-*cis*-RA 促进 RXR $\alpha$  受体的转录活性,提示化合物 **13** 可能通过 RXR $\alpha$  的激活途径抑制人宫颈癌细胞的生长、诱导人宫颈癌细胞凋亡作用,从而发挥其抗癌活性。

关键词: 小槐花大极性部位; 化学成分; 抗肿瘤活性

## Abstract

Cancer prevalence is rising fast in the world. Malignant tumor has become the second primary human “killer” just following cardiovascular diseases in the past decades. Traditional Chinese medicine has several thousand years of clinical research experience, making great contributions to preventing and treating diseases. Because of the advantages including less toxic side effects, diversified structure, abundant production, extracting effective anti-cancer ingredients from natural products has become one of the most significant approaches in anticancer research. In this project, on the basis of previous research on the weak polar substances isolated from *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC. in our group, the chemical constituents and antitumor bioactivity of the higher polar substances from *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC. were investigated.

In our study, 29 compounds were isolated from the 60% ethanol extract of *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC. by using the methods of silica column chromatography, polyamide column chromatography, ODS column chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, thin layer chromatography (TLC), recrystallization, analytical HPLC, preparative HPLC, etc. The structures of these compounds were identified on the basis of the data from NMR, MS spectra, physical properties and chemical properties. Among the 29 compounds, there are 12 flavonoids, 6 phenylpropanoids, 2 steroids, 3 stilbenes, 2 alkaloids and 4 other types of compounds. Compounds **4**, **5**, **10**, **11**, **12**, **16**, **17**, **20**, **21**, **24**, **25**, **26**, **27**, **28**, **29** were separated from *Desmodium* genus for the first time. Compound **15** and Compound **19** are two new compounds and both of them have the chemical structure segment of  $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside.

All the compounds were evaluated by MTT assay to detect the antitumor activity. The results showed that compounds **13**, **27** could inhibit the growth of cancer cell HeLa significantly, and they exhibited good concentration dependence at the same time. Compounds **13**, **27** were verified long-range killing function to the growth of HeLa by the clonogenic assay. PARP cleavage of compounds **13**, **27** were examined for further studies in HeLa cells. The results showed that all of the two compounds could promote PARP cutting and exhibited good concentration dependence also. Compounds **13**, **27** could increase the activities of caspase-3, caspase-8 and caspase-9. In addition, 2 compounds were screened through dual luciferase report gene test.

Compound **13** could drastically enhance the transcription of nuclear receptor RXR $\alpha$ , and also promote the transcription of RXR $\alpha$  while cooperating with 9-*cis*-RA. All results suggested that compound **13** induced apoptosis and inhibited the growth of human cancer cells may through the activation pathway of RXR $\alpha$ .

Key words: Higher polar substances of *Desmodium caudatum*; Chemical constituents; Antitumor bioactivity.

廈門大學博碩士論文摘要庫



## 第一章 前言

### 1.1 研究背景

近年来，癌症的发病率逐年攀升，人们不良的生活习惯和日益恶劣的生活环境使其成为了人类仅次于心血管病的二号“杀手”。世界卫生组织下属的国际癌症研究机构（The International Agency for Research on Cancer）在其《2014 年世界癌症报告》中显示，全球癌症患者正急速增加，平均每 8 个死亡病例中就有 1 人死于癌症，2013 年全球新增癌症病例多达 1400 万例，预计在未来 20 年达到每年 2200 万的水平，同期癌症死亡人数也将从每年 820 万飙升至 1300 万。攻克癌症难关已成为医药工作者和化学工作者的当务之急。

中药及天然药物历经数千年的临床经验，保障了广大人民防病与治病的需要，是我国五千年文明史中的一颗璀璨的明珠。从天然产物中发现抗癌有效成分的成功案例比比皆是，如 1962 年从抗癌中药长春花叶中分离出的二聚吲哚类化合物长春新碱，可作用于肿瘤细胞微管蛋白干扰肿瘤细胞代谢，主要用于治疗急性淋巴细胞白血病、何杰金及非何杰金淋巴瘤、乳腺癌、软组织肉瘤及神经母细胞瘤、支气管肺癌等疾病<sup>[1]</sup>；如 1992 年底获美国 FDA 批准作为化疗晚期卵巢癌上市的新药紫杉醇，紫杉醇的抗癌机制与长春新碱类似，它可使微管蛋白和组成微管的微管蛋白二聚体失去动态平衡，诱导与促进微管蛋白聚合、微管装配，使微管稳定，从而阻止癌细胞的生长<sup>[2]</sup>；再如临床上用于治疗慢性肝炎及肝纤维化的苦参碱类生物碱，经研究证实，苦参碱类生物碱可有效抑制部分肿瘤的增殖和转移<sup>[3]</sup>；除此之外，天然产物中发现的有效抗癌成分还有淫羊藿苷、当归多糖、丹参酮、粉防己碱、蝙蝠葛碱等等。实践证明，从天然产物中提取有效的抗癌成分是癌症研究的重要途径之一。

近年，黄酮类化合物的抗癌作用备受人们关注，经相关研究表明，黄酮类化合物抗肿瘤活性与苯环上的取代基有关，黄酮苷类化合物中，A 环上糖结合物的类型在化合物的抗癌活性中起重要作用，此外，黄酮类化合物抗肿瘤作用与其抗氧化作用也有很大关系，在抗癌和抗自由基的双重作用下使得黄酮类化合物具有诱导肿瘤细胞凋亡、诱导细胞周期阻滞的作用，研究证明，黄酮类成分在防治肿

瘤方面具有很高的应用价值<sup>[4]</sup>。

## 1.2 植物概况

小槐花又名草鞋板、味噌草、拿身草、羊带归、青酒缸、巴人草、扁草子、豆子草、逢人打、旱蚂蝗、蚂蝗草。小槐花 *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC. 为豆科山蚂蝗属小槐花亚属植物，以根或全株入药，味微苦、辛，性平，具有清热解毒，祛风利湿的功效<sup>[5]</sup>。

小槐花产长江以南各省，西至喜马拉雅山，东至台湾。生于山坡、路旁草地、沟边、林缘或林下，海拔 150-1000 米，在印度、斯里兰卡、锡金、不丹、缅甸、马来西亚、日本、朝鲜等国家亦有分布<sup>[6]</sup>。

小槐花为直立灌木或亚灌木，高 1-2 米。树皮灰褐色，分枝多，上部分枝略被柔毛。叶为羽状三出复叶，小叶 3；托叶披针状线形，长 5-10 毫米，基部宽约 1 毫米，具条纹，宿存，叶柄长 1.5-4 厘米，扁平，较厚，上面具深沟，多少被柔毛，两侧具极窄的翅；小叶近革质或纸质，顶生小叶披针形或长圆形，长 5-9 厘米，宽 1.5-2.5 厘米，侧生小叶较小，先端渐尖，急尖或短渐尖，基部楔形，全缘，上面绿色，有光泽，疏被极短柔毛、老时渐变无毛，下面疏被贴伏短柔毛，中脉上毛较密，侧脉每边 10-12 条，不达叶缘；小托叶丝状，长 2-5 毫米；小叶柄长达 14 毫米，总状花序顶生或腋生，长 5-30 厘米，花序轴密被柔毛并混生小钩状毛，每节生 2 花；苞片钻形，长约 3 毫米；花梗长 3-4 毫米，密被贴伏柔毛；花萼窄钟形，长 3.5-4 毫米，被贴伏柔毛和钩状毛，裂片披针形，上部裂片先端微 2 裂；花冠绿白或黄白色，长约 5 毫米，具明显脉纹，旗瓣椭圆形，瓣柄极短，翼瓣狭长圆形，具瓣柄，龙骨瓣长圆形，具瓣柄；雄蕊二体；雌蕊长约 7 毫米，子房在缝线上密被贴伏柔毛。荚果线形，扁平，长 5-7 厘米，稍弯曲，被伸展的钩状毛，腹背缝线浅缢缩，有荚节 4-8，荚节长椭圆形，长 9-12 毫米，宽约 3 毫米。花期 7-9 月，果期 9-11 月<sup>[6]</sup>。

小槐花夏、秋采集，洗净晒干，鲜用四季可采。作为我国传统中药，《湖南药物志》中记载了它用于治疗小儿疳积的方法及用量<sup>[7]</sup>，《广西本草选编》中记载了它用于治疗月经不调的方法及用量<sup>[8]</sup>，另外，小槐花还可用于治疗感冒发热，胃肠炎，痢疾，风湿关节痛，外用治毒蛇咬伤，痈疔疮，乳腺炎等<sup>[5]</sup>。小槐花现代药理学研究较少，目前主要报道了小槐花中部分黄酮类化合物的抗炎、抗氧

化及对真菌的抑制作用等<sup>[9, 10]</sup>。

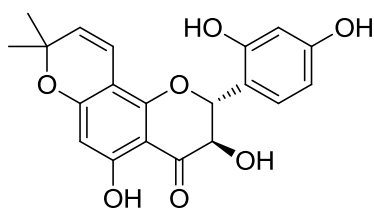
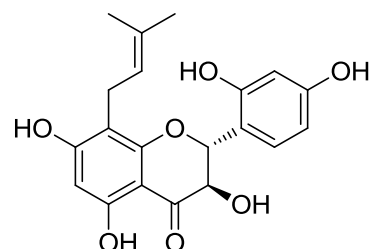
### 1.3 小槐花化学成分研究进展

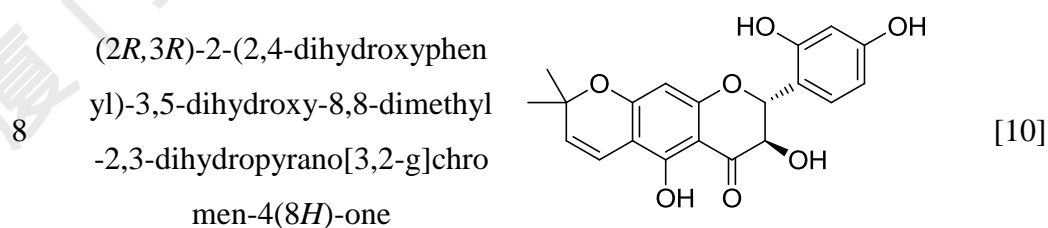
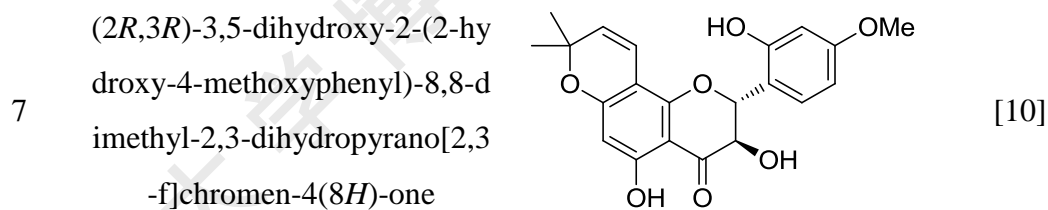
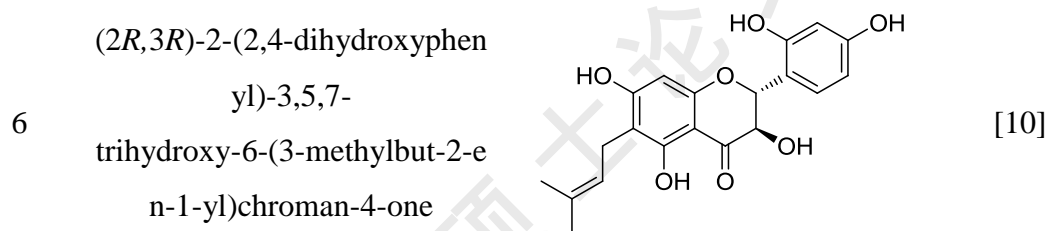
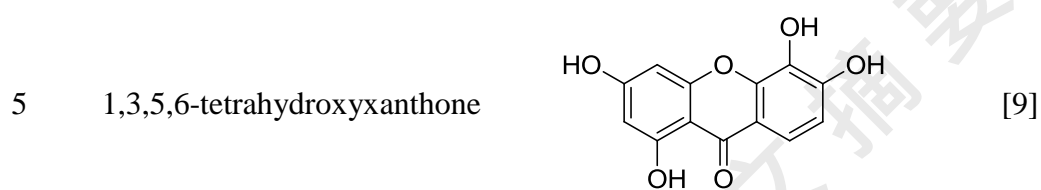
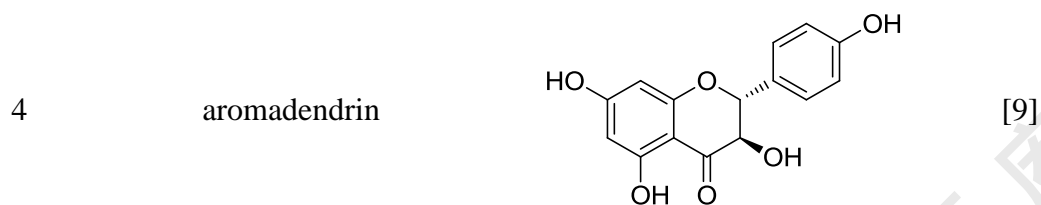
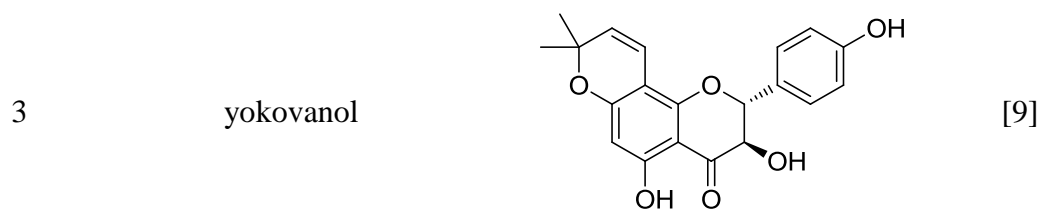
小槐花中的化学成分多样, 包括黄酮类、萜类、生物碱类、甾体类等类型的化合物, 下面对该种植物中已报道的化学成分做详细总结。

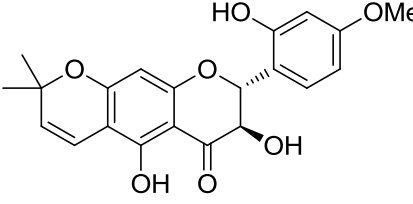
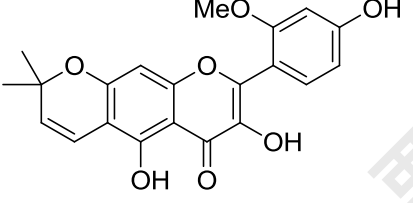
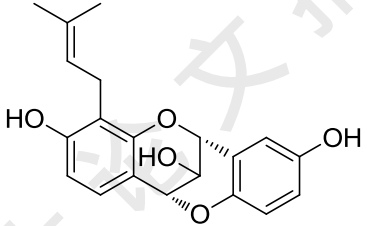
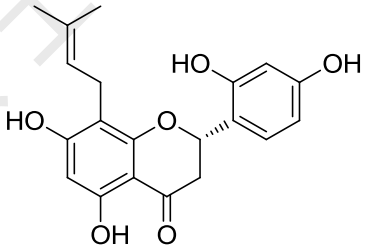
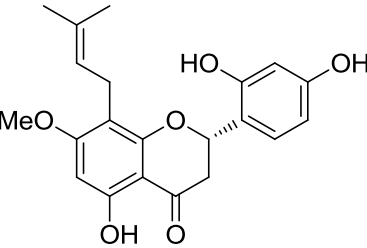
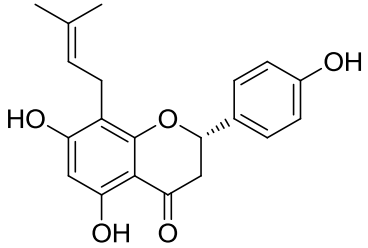
#### 1.3.1 黄酮类化合物

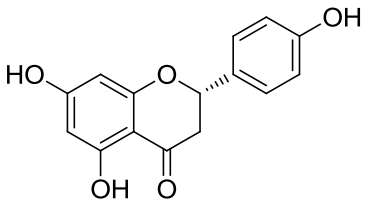
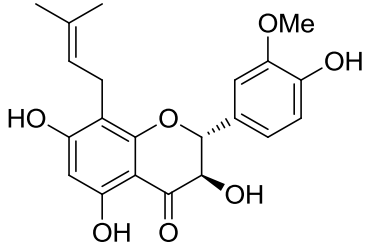
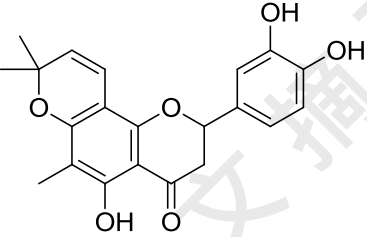
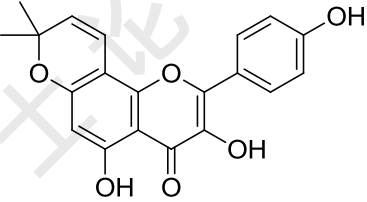
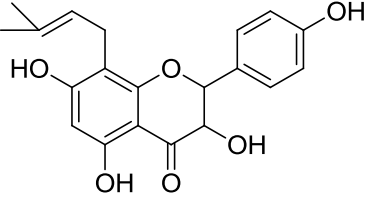
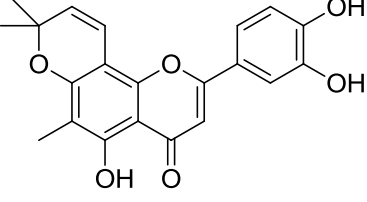
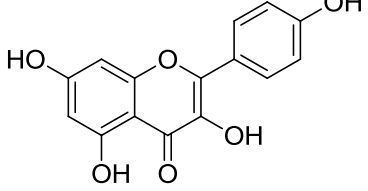
黄酮类物质是小槐花的主要成分之一, 根据中央三碳链的氧化程度、B-环连接位置(2-或3-位)以及三碳链是否构成环等特点, 主要分为黄酮类、黄酮醇类、二氢黄酮类、异黄酮类、二氢黄酮醇类、查耳酮类和二氢查耳酮类等 17 种类型。据文献报道, 目前已有 26 种黄酮类化合物从小槐花中分离出来, 其中对非苷类成分的研究较多, 具有良好的抗真菌、抗炎、抗氧化等药物活性<sup>[9, 10]</sup>, 而对黄酮苷类化学成分及活性的研究较少, 仅 Li Wei 等人以及 Aritomi M 等人<sup>[9, 13]</sup>从小槐花植物中分离出 3 个黄酮苷类成分, 它们是当药黄素、spinosin、7-methyl-apigenin-6-C- $\beta$ -glucopyranosyl-2''-O- $\beta$ -D-xylopyranoside, 并对其做了一系列抗炎、抗氧化实验。小槐花中发现的黄酮类成分的名称及具体结构总结如下(表 1-1)。

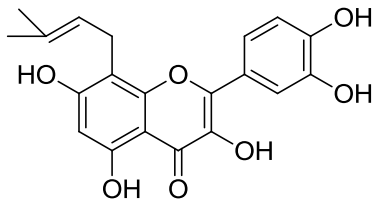
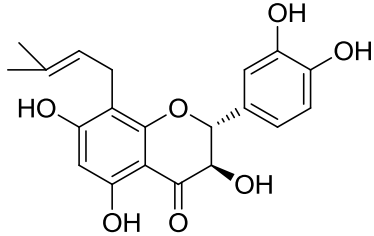
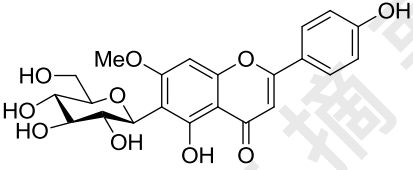
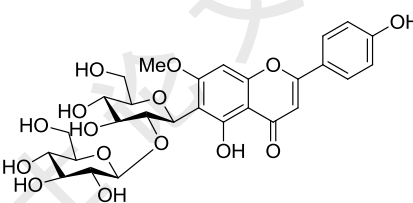
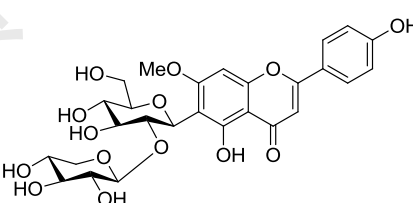
表 1-1: 小槐花中已报道的黄酮类化合物

编号	名称	结构	参考文献
1	2'-hydroxyl yokovanol		[9]
2	2'-hydroxyl neophellamuretin		[9]



- 9 (2*R*,3*R*)-3,5-dihydroxy-2-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-8,8-dimethyl-2,3-dihydropyrano[3,2-*g*]chromen-4(8*H*)-one  [10]
- 10 3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)-8,8-dimethylpyrano[3,2-*g*]chromen-4(8*H*)-one  [10]
- 11 (6*R*,12*R*)-10-(3-methylbut-2-en-1-yl)-6,12-dihydro-6,12-methanodibenzo[*b,f*][1,5]dioxocine-2,9,13-triol  [10]
- 12 leachianone G  [10]
- 13 kenusanone I  [10]
- 14 sophoraflavanone B  [10]

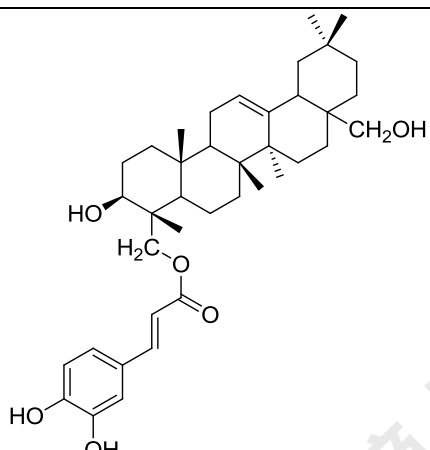
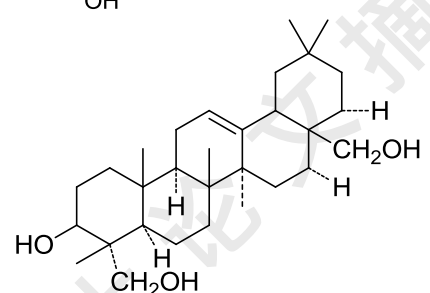
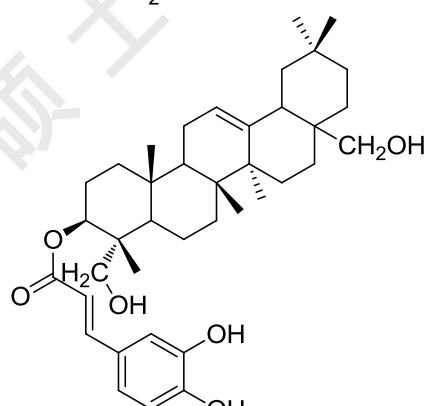
- 15 naringenin  [10]
- 16 8-C-prenyldihydroisorhamnetin  [10]
- 17 desmodol  [11]
- 18 柠檬酚  [12]
- 19 neophellamuretin  [12]
- 20 清酒缸酚  [12]
- 21 山柰酚  [12]

22	8-prenylquercetin		[12]
23	4 <i>H</i> -1-benzopyran-4-one,2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-3,5,7-trihydroxy-8-(3-methyl-2-butenyl)-(2 <i>R</i> - <i>trans</i> )-(9 <i>CI</i> )		[12]
24	当药黄素		[13]
25	spinosin		[9]
26	7-methyl-apigenin-6- <i>C</i> - $\beta$ -glucopyranosyl-2''- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -xylopyranoside		[9]

### 1.3.2 萜类化合物

萜类化合物从化学结构上看多为异戊二烯的聚合体及其衍生物，骨架一般以5个碳为基本单位，少数例外。三萜类化合物在自然界广泛存在，据文献报道<sup>[12]</sup>，小槐花中也发现了三萜类化合物的存在，他们的名称及结构见表 1-2。

表 1-2: 小槐花中已报道的萜类化合物

编号	名称	结构	参考文献
1	黄槿酮 A		[12]
2	古柯三醇		[12]
3	黄槿酮 D		[12]

### 1.3.3 生物碱类化合物

生物碱类化合物是一类重要的天然有机物，广泛分布于植物界。生物碱的生物活性多种多样，例如半边莲中生物碱类成分对胃癌细胞的抑制作用<sup>[14]</sup>，苦豆子生物碱的抗菌活性<sup>[15]</sup>，然而对于小槐花中分离得到的生物碱的活性测定目前还无人报道。小槐花中发现的生物碱类成分的名称及具体结构见表 1-3。



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.

廈門大學博碩士論文摘要庫