

学校编码: 10384
学号: 32320141153404

分类号___密级___
UDC___

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

当归中靶向调控核受体 TR3 抗肿瘤
苯酞类成分的分离与鉴定

The isolation and identification of antitumor-active
phthalides targeting nuclear receptor TR3 from *Angelica
sinensis*

高华春

指导教师姓名: 陈全成副教授

张晓坤教授

专 业 名 称: 药物化学

论文提交日期: 2017 年 5 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2017 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）：

2017 年 月 日

目录

摘要	1
Abstract	2
第一章 前言	4
1.1 核受体 TR3 与抗肿瘤研究概况	4
1.1.1 核受体概述.....	4
1.1.2 核受体与靶向药物.....	5
1.1.3 抗肿瘤研究概况.....	6
1.1.4 孤儿受体 TR3	7
1.2 中药材当归的研究背景	9
1.2.1 当归概述.....	9
1.2.2 当归化学成分研究进展.....	10
1.2.3 当归药理作用研究背景.....	11
1.2.4 苯酞类化合物研究背景.....	13
1.3 立题依据	17
第二章 当归中苯酞类化合物的提取分离与结构鉴定	18
2.1 实验仪器与材料	18
2.1.1 实验药材	18
2.1.2 实验仪器	18
2.1.3 实验试剂及填料	19
2.2 实验方法	19
2.2.1 药材预处理及化学组分提取	19
2.2.2 粗提物萃取分离	19
2.3 化学成分结构鉴定结果	23
2.3.1 化合物结构.....	23
2.3.2 新化合物的结构鉴定	27
2.3.3 已知化合物结构鉴定	45

2.3.4 已知化合物主要理化常数和波普数据	55
第三章 当归中化学成分的生物活性评价	65
3.1 材料与仪器.....	65
3.1.1 实验材料	65
3.1.2 实验仪器	65
3.2 当归中化学成分的生物活性研究.....	66
3.2.1 当归中化学成分的肿瘤细胞毒性研究	66
3.2.2 当归中化学成分的荧光素酶报告基因分析	68
3.2.3 当归中苯酞类化学成分与核受体 TR3 表达关系	69
第四章 总结与讨论	72
4.1 当归中苯酞类等化学成分的总结讨论.....	72
4.2 当归中苯酞类等化学成分的生物活性总结讨论	73
参考文献	75
致谢.....	83

Content

Abstract(Chinese)	1
Abstract(English)	2
Chapter I Introductin	4
1.1 Nuclear receptor TR3 and anti-cancer research	4
1.1.1 Summary of nuclear receptors	4
1.1.2 Nuclear receptors and targeted drugs	5
1.1.3 Anti-cancer research progress	6
1.1.4 Orphan receptor TR3	7
1.2 The Study Background of <i>Angelica Sinensis</i>	9
1.2.1 The background of <i>A. sinensis</i>	9
1.2.2 The chemical composition research progress of <i>A. sinensis</i>	10
1.2.3 The pharmacological activities progress of <i>A.sinensis</i>	11
1.2.4 The research background of phthalide compounds	13
1.3 The basis of the title	17
Charppter II Isolation and Structural Identification of Phthalates from <i>Angelica sinensis</i>	18
2.1 Experiment equipment and materials	18
2.1.1 Experimental herbs	18
2.1.2 Experiment equipment.....	18
2.1.3 Experiment materials	19
2.2 Eperimental method	19
2.2.1 Pretreatment and extraction of herbs	19
2.2.2 The isolation process	19
2.3 The results of the compounds structure	23
2.3.1 The structure of compounds	23

2.3.2 The identification of new compounds	27
2.3.3 The identification of known compounds	55
Charpter III Bioassay evaluation of Chemical Constituents from <i>Angelica sinensis</i>	65
3.1 Materials and equipments	65
3.1.1 Experimental materials	65
3.1.2 Experimental equipments	65
3.2 Study on the Bioactivities of Chemical Constituents	66
3.2.1 The Cytotoxicity experiment	66
3.2.2. Luciferase reporter gene analysis	68
3.2.3. The relationship of the compounds and TR3 expression	69
Charpter IV Summary and discussion.....	72
4.1 The reseach summary of the phthalides from <i>A.sinensis</i>	72
4.2 The discussion of the compouds bioactivities	73
Reference	75
Acknowledgement.....	83

摘要

近年来,分子靶向药物已成为抗癌新药研究的新趋势,而核受体作为作用靶点之一尤其备受关注。TR3/Bcl-2 细胞凋亡途径是一条孤儿核受体 TR3 参与,独特有效的癌细胞凋亡调控通路。本研究对传统中药材当归进行针对性的组分分离,旨在筛选出具有靶向核受体 TR3 发挥抗癌作用潜力的化合物。

本研究借助多种色谱学分离手段,对当归的化学成分进行了细致分离,并通过理化性质和现代的波普解析手段分别鉴定了其化学结构,最终得到 28 个化合物。包括简单苯酐类化合物 10 个: Z-蒿本内酯 (1)、E-蒿本内酯 (2)、丁基苯酐 (3)、洋川芎内酯 G (8)、Z-8-羟基正丁烯苯酐 (15)、Z-6,7-epoxyiligustilide (18)、洋川芎内酯 E (24)、5-羟基丁基苯酐 (25)、洋川芎内酯 C (26)、洋川芎内酯 B (27)。二聚体苯酐类 11 个: Angeolide (6)、Angeolide methyl ester (7)、Z, Z'-6',6,7,3'a-diligustilide (9)、Z-6.8',7.3'-diligustilide (10)、3Z'-3S,8R,3a'S,6'R-4,5-dehydro-3.3a',8.6'-diligustilide (11)、3.3a',8.6'-diligustilide (12)、Z-8'.3a,3'.6-diligustilide (13)、3Z,3Z'-6R*,7a'S*,7S*,3a'S*-6.7a',7.3a'-diligustilide (19)、3Z,3Z'-6R*,3a'S*,7R*,7a'R*-6.3a',7.7a'-diligustilide (20)、洋川芎内酯 O (23)、3'Z-3R,8S,3a'R,6'S-3.3a',8.6'-diligustilide (28), 其他类化合物 7 个: 3R,8S-Falcarindiol (4)、Coniferylferulate (5)、E-Coniferyl Ethyl Ether (14)、阿魏酸 (16)、三亚油精 (17)、9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-2,3-dihydroxypropyl ester (21)、Dibutyl phthalate (22)。其中,化合物 19 和 20 为新化合物。

本文通过核受体 TR3 报告基因活性筛选出化合物 12、14、20 能明显激活 TR3。Western 免疫印迹结果表明, 2、24、12 能诱导 TR3 的表达蛋白显著上调。MTT 细胞实验进行抗肿瘤作用初步筛选出 12、28 在 50 μ M 条件下,对人肺癌细胞 H460 细胞系具有细胞毒性。其中, 12 可作为靶向 TR3 / Bcl - 2 凋亡通路的重点研究的抗癌药物。

关键词: 当归; 苯酐类化合物; TR3; 抗肿瘤

Abstract

Recent years, molecular targeted drugs have become a new trend of research and development of new anti-cancer drugs. As one of the targets, nuclear receptors are especially closely watched. TR3/Bcl-2 apoptosis pathway is an unique and effective regulation pathways of cancer cells apoptosis with the orphan nuclear receptor TR3 participation.

The aim of our study was to isolate the compounds targetedly from the Chinese herb *Angelica sinensis*, and screen out compounds targeted nuclear receptors TR3 with potential anticancer function. In this study, 28 kinds of compounds were obtained from *Angelica sinensis* by chromatographic separation methods. Their chemical structures were identified by physicochemical properties and modern wave analysis methods, including ten monomeric phthalides: *Z*-Ligustilide (1), *E*-Ligustilide (2), Butyl phthalide (3), Senkyunolide G (8), *Z*-8-hydroxy-butylidenephthalide (15), *Z*-6,7-epoxyligustilide (18), Senkyunolide E (24), 5-hydroxy-3-butylphthalide (25), Senkyunolide C (26), Senkyunolide B (27), eleven dimer phthalides: Angeolide (6), Angeolide methyl ester (7), *Z*, *Z'*-6'.6,7.3'a-diligustilide (9), *Z*-6.8',7.3'-diligustilide (10), 3*Z'*-3*S*,8*R*,3*a'**S*,6'*R*-4,5-dehydro-3.3*a'*,8.6'-diligustilide (11), 3.3*a'*,8.6'-diligustilide (12), *Z*-8'.3*a*,3'.6'-diligustilide (13), 3*Z*,3*Z'*-6*R**,7*a'**S**,7*S**,3*a'**S**-6.7*a'*,7.3*a'*-diligustilide (19), Senkyunolide O (23), 3*Z*,3'*Z*-6*R**,3*a'**S**,7*R**,7*a'**R**-6.3*a'*,7.7*a'*-diligustilide (20), 3'*Z*-3*R*,8*S*,3*a'**R*,6'*S*-3.3*a'*,8.6'-diligustilide (28), seven other compounds: 3*R*,8*S*-Falcarindiol (4), Coniferylferulate (5), *E*-Coniferyl Ethyl Ether (14), Ferulic acid (16), Trilinolein (17), 9,12-Octadecadienoic acid (*Z,Z*)-2,3-dihydroxypropyl ester (21), Dibutyl phthalate (22), among them, 19 and 20 were novel compounds.

In this study, the results showed that the 12, 14, 20 could significantly activate TR3 by means of the nuclear TR3 reporter gene screening model. At the level of protein expression, western blotting showed that 2, 24, 12 have significant effect on TR3 protein expression upregulation. The MTT was used to screen anti-tumor effect

of cells, and **12**, **28** with 50 μM were cytotoxic to human lung cancer cell line H460. And **12** can be researched further as a potential anti-tumor compound through TR3 / Bcl - 2 apoptosis pathway.

Key word: *Angelica sinensis* ; phthalide ; TR3 ; anti-tumor

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1.1 核受体 TR3 与抗肿瘤研究概况

1.1.1 核受体概述

核受体 (nuclear receptor, NR) 是一类由 48 个基因编码的 200 多个蛋白质组成的重要的转录因子^[1], 家族成员众多, 广泛分布于真核生物体内的, 表达于胞浆或细胞核内。核受体通过单体、同源二聚体或异源二聚体的方式与 DNA 响应元件结合, 可以激活或抑制特定靶基因的转录, 在细胞生长、增殖、分化、代谢、免疫反应和凋亡等几乎所有的生物学过程中参与调控作用。因此, 核受体在体内的生理和病理过程中起着重要作用, 如果发生核受体功能性障碍, 会导致心血管疾病、肿瘤, 糖尿病、肥胖病、生殖系统疾病、炎症等一系列疾病^[2-3]。

核受体家族庞大, 依据配体的不同, 可以分为三大类, 第一类是类固醇激素受体, 包括盐皮质激素受体 (MR), 雄激素受体 (AR)、雌激素受体 (ER)、孕酮受体 (PR) 等; 第二类是非类固醇激素受体, 包括视黄醇类 X 受体 (RXR α)、甲状腺激素受体 (TR)、维甲酸受体 (RAR)、和过氧化物酶体增生物激活受体 (PPAR) 等; 第三类是孤儿受体, 包括 TR3、COUP-TF 等^[4-5]。

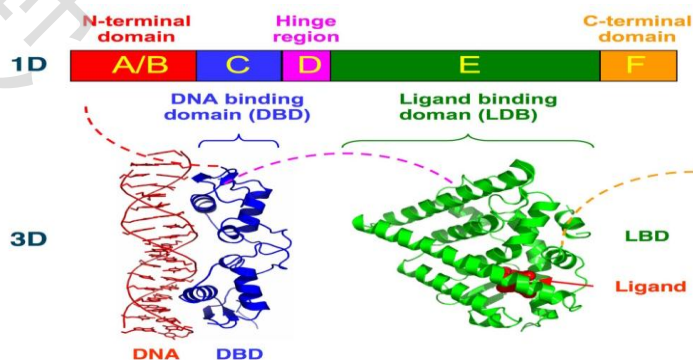


图 1. 核受体家族成员的结构特征

核受体家族成员众多, 但结构特征非常保守 (图 1)^[6], 其典型结构可以分为 A/B, C, D, E 和 F 这 5 个区, A/B 区是 N 端, 包含一个不依赖于配体的细胞

特异性转录激活调节区；C区参与二聚体的形成，有高度的保守性，属于DNA结合区（DNA Binding Domain，DBD）；D区是一个铰链结构，在DBD和LBD两个区域起到连接作用，同时D区还含有影响其核定位的入核序列（NLS）；E区为配体结合区（Ligand Binding Domain，LBD），含有12个 α 螺旋和和一个 β 折叠；F区的序列高度可变，可参与配体识别和二聚体的形成^[7-8]。

1.1.2 核受体与靶向药物

核受体有药物小分子等配体结合区域，与药物分子等配体结合后，可以在细胞核内调节基因表达从而使配体发挥生物学作用，从而调控一些相关的疾病。因此，核受体作为药物开发的良好靶点，在新药研发中有着重要地位。

在美国，几乎所有大的制药企业都涉及核受体药物的研发，包括Lilly/Takeda, Glaxo Wellcome Wyeth Ayerst, Schering, Roche, Knoll BASF 和 Barr/Zeneca 等著名的制药公司。直至2002年统计数据，美国百强处方药中针对核受体的药物有16种，每年营业额高达80亿美元。部分针对不同核受体开发的临床药物如表1所示。

表1. 核受体靶点及靶向药物

核受体靶点	药物
RXR（视黄醇受体）	如 Targretin, 治疗皮肤癌
AR（雄性激素受体）	如 Casodex, 治疗前列腺癌
ER（雌性激素受体）	如 Evista, 治疗骨质疏松症
MR（皮质激素受体）	如 Aldactone (MR), 治疗心脏衰竭
VDR（维生素 D 受体）	如 Dovonex, 治疗牛皮癣
TR（甲状腺激素受体）	如 Synthroid, 治疗甲状腺机能减退症
GR（糖皮质激素受体）	如 Flonase, 治疗过敏症
PR（黄体酮激素受体）	如 Mifepristone, 堕胎 (Abortifacient)
RAR（针对维甲酸受体）	如 Accutane, 治疗痤疮
PPAR（过氧化物酶体增生受体）	如 Avandia, 治疗糖尿病

在日常所实用的食品以及天然药品中,也富含以核受体为调控靶点的化学成分,如与脑生长发育和记忆密切相关的 Ω -3多不饱和脂肪酸DHA即是通过核受体RXR起作用的。

1.1.3 抗肿瘤研究概况

肿瘤是威胁人类生命和健康的重要疾病之一。近些年来,由于环境问题的恶化及人们饮食习惯的变化,肿瘤的发生率和死亡率每年逐渐增加。自从20世纪四十年代,盐酸氮芥用于治疗肿瘤疾病以来,抗肿瘤药物的研究和应用已经超过70年,上市的抗肿瘤药物也越来越多。目前在国内外临床上被广泛使用的抗肿瘤药物已经超过100多种。

近年来,随着分子生物学和细胞生物学等研究领域的发展,人类对肿瘤的形成、发展和转移过程有了更深入的认识,对肿瘤药物作用机理和机制也更加透彻,过去肿瘤药物治疗以细胞毒药物为主,现在,随着分子细胞研究的深入,分子靶向药物逐渐受到重视。在化疗手段的应用中,多药物多靶点的联合治疗方式也逐渐普及。

天然产物可作为先导化合物的重要来源,结合药物分子结构修饰和优化设计,天然产物在抗肿瘤新药物的研发过程中起着重要的作用。长春碱、喜树碱、紫杉醇是上世纪发现的最具代表性的从天然产物中分离得到的抗肿瘤药物,有10多种以他们作为母体结构修饰改造的分子药物已经被广泛应用在临床上。

21世纪以来,在抗肿瘤研究领域,以肿瘤细胞的胞内信号转导通路为作用对象的分子靶向药物的研究,在治疗效果上取得了重大突破。相比传统细胞毒性类药物,分子靶向性药物具有更多优点。由于肿瘤细胞相比于正常细胞,其胞内信号转导通路的关键组分存在很大差异,分子靶向药物能针对性,选择性的作用于这些组分,使药物毒性大大降低,同时,分子靶向药物能依据个体差异,进行个体化治疗,实现药物治疗效益的最优化,最大化。

选择性酪氨酸激酶抑制剂甲磺酸伊马替尼是Novartis制药公司研发的全球首个分子靶向抗肿瘤新药,可用于临床治疗慢性髓性白血病,2001年被FDA批准生产上市。甲磺酸伊马替尼在临床过程中的实际应用,标志着分子靶向性抗肿瘤药物作为新一类抗肿瘤药物,取得了成功,同时也推动了国内外对分子靶

向性抗肿瘤药物的研究^[9-10]。

1.1.4 孤儿受体 TR3

1.1.4.1 孤儿受体 TR3 家族及分子结构

孤儿受体 TR3（也称 TR3，NGFI - B 和 NAK1）是立早基因 NR4A1 编码的核受体，血清和成纤维细胞生长因子、血小板生长因子、表皮生长因子、神经生长因子及其他各种生长因子可以诱导该受体表达，使其在细胞的生长、发育、分化和凋亡等过程中发挥作用。人类 TR3 亚家族包括 3 个成员：TR3，Nurr1（也称为 NOT，TINOR 或 TINUR）和 Nor1（也称为 MINOR）TR3，家族成员都具有核受体的典型结构特征：N 端的转录激活区 AF1，高度保守的 DNA 结合区（DBD），C 端配体结合区（LBD）和依赖于配体的转录激活结构域 AF-2。

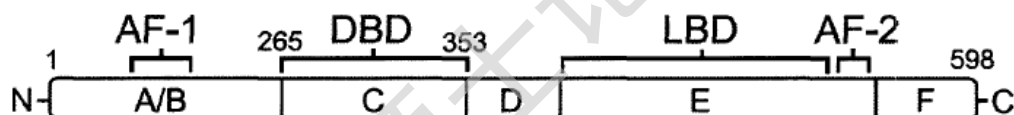


图 2. TR3 结构示意图

1.1.4.2 孤儿受体 TR3 生物学功能

1). TR3 的转录激活功能

生物体内基因启动子上含有特异 DNA 序列，称为激素应答元件，可被受体识别结合。TR3 能以单体形式、自身同源二聚体或异源二聚体的形式结合到应答元件上进行激活转录。

2). TR3 的促细胞增殖功能

研究发现，TR3 在多种肿瘤细胞中高度表达，作为一种促生长因子，它与肿瘤细胞的生存生长关系密切。它可以介导蛋白激酶 A (PKA)、蛋白激酶 C (PKC)、促分裂原活化激酶 (MAPK) 和核转录因子 kb 等促生长信号通路^[11]。相对于正常组织，前列腺肿瘤细胞中 TR3 的表达水平较高，这表明 TR3 具有促细胞增殖的作用。最近的研究发现在没有转化的 HeLaHF 细胞中，TR3 亚蛋白家族的蛋白表达水平明显低于 HeLa 细胞。因此，通过抑制 TR3 的表达水平，可以降低许多肿瘤

细胞的转化^[12]。

3). TR3 的促细胞凋亡功能

核受体 TR3 与细胞凋亡研究发现, 在凋亡信号的刺激下, TR3 经细胞核转移到细胞质, 并定位于线粒体。TR3 的线粒体定位与细胞色素 C (Cyt C) 的释放和细胞凋亡紧密相连。研究发现, DNA 结合结构域缺失的 TR3 能够定位于线粒体上, 促使大量细胞色素 C 从线粒体释放出来。由于 TR3 的 N 端转录激活结构域(AF-1) 对于它的线粒体定位及促凋亡作用是非必须的, 所以 TR3 诱导的细胞凋亡是不依赖于其 DNA 结合及转录激活的。但 TR3 转位到细胞质中, 定位于线粒体是其促凋亡的重要条件, TR3 定位于细胞核或细胞质膜以及内质网膜它都不能诱导细胞色素 C 的释放。由此, TR3 定位在线粒体对发挥生物学功能起着关键作用。

进一步发现, 定位到线粒体上的 TR3 可以和 Bcl-2 的 N 端环状区结合, 改变 Bcl-2 构像, 使 Bcl-2 暴露出 BH3 结构域, 从而诱导 Bcl-2 从一个抗细胞凋亡蛋白转变为促凋亡蛋白, 促使细胞色素 C 的释放, 最后导致细胞凋亡(图 3) ^[13]。

TR3 / Bcl - 2 凋亡途径的发现和具有极为重要的现实意义, 核受体 TR3 通过在细胞质内与 Bcl - 2 发生相互作用, 定位于线粒体, 形成一条独特的肿瘤细胞凋亡调控通路, 为核受体在非基因型功能与作用机制的研究领域打开了一扇大门。TR3 诱导的肿瘤细胞凋亡是一种有效抑癌方式, 研究发现, Bcl - 2 在肿瘤细胞中高度表达, 从而抑制了肿瘤细胞凋亡, 但 TR3 促使 Bcl - 2 从一个癌细胞保护调控者转变为癌细胞凋亡蛋白, 这样就有利于肿瘤细胞内高浓度的 Bcl - 2 选择性, 针对性的杀死肿瘤细胞。这个新发现为抗癌新药的开发提供了新的研究靶点和方向。目前, 通过靶向 TR3 / Bcl - 2 细胞凋亡通路, 寻找、开发具有特异性、高效性的抗肿瘤药物的研究仍处于初级阶段, 本研究是通过从传统中药材当归中针对性的提取分离鉴定苯酞类化合物, 作为寻找靶向 TR3 / Bcl - 2 凋亡通路药物的有效尝试, 我们研究中提取分离得到的某些化合物在成为抗肿瘤药物方面具有极大潜力。

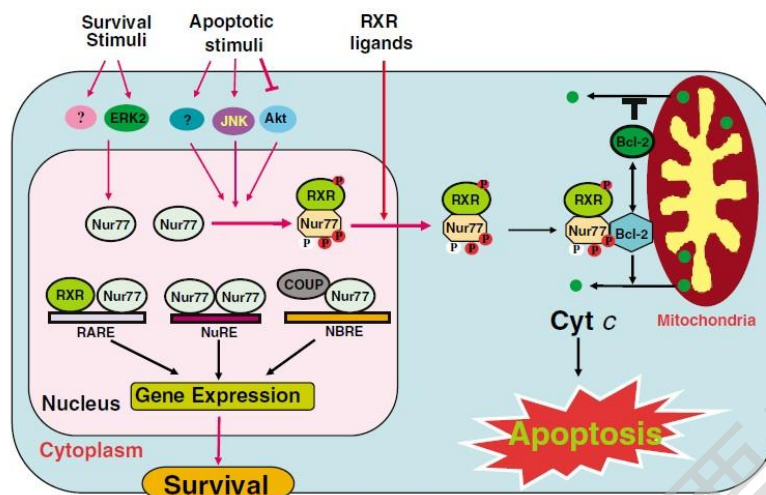


图 3. TR3 定位于线粒体促进细胞色素 C 的释放

1.2 中药材当归的研究背景

1.2.1 当归概述

当归属于传统中药材，是最常用的中药之一，来源于伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。如图 4 所示。

当归是多年生草本植物，在我国甘肃、四川、云南、青海、陕西、湖北、贵州、湖南等地均有栽培。在市场上，当归以多种产品形式销往世界各地^[14-15]。

当归性温，味甘、辛。归肝、心、脾经；具有补血活血、调经止痛、润肠通便之功效；用于治疗血虚萎黄、眩晕心悸、风湿痹痛、月经不调、虚寒腹痛、经闭痛经、跌仆损伤、痈疽疮疡、肠燥便秘等症状。除中医处方配方用药外，含当归的中成药达 80 余种^[16]。医家素有“十方



图 4. 当归块根

九归”之称^[17]。同时，当归也是属于中国卫生部规定的可用于保健食品的原材料，在人们日常生活中可被作为滋补品食用，可以配合其他中草药与食用肉和汤类烹调食用^[18]。因此，近些年来，世界各地的科学研究者越来越重视对当归的研究和开发利用，尤其是在当归化学成分和生物活性方面的研究更是一个研究热点，并且，随着研究的深入，发现了当归很多新的组分及潜在的生物活性功能，在阐明其作用机理方面也取得了很大研究成果。

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