

学校编码: 10384

分类号____密级____

学 号: 30520081152698

UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

白芷抗癌活性成分研究

Anti-cancer constituents research of Angelica dahurica

刘东萍

指导教师姓名: 陈海峰 副教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2011 年 4 月 25 日

论文答辩时间: 2011 年 5 月 31 日

学位授予日期: 2011 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2011 年 5 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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

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 本草考证.....	1
1.2 白芷的化学成分研究进展	1
1.3 白芷的药理与临床作用研究进展	13
1.4 Shp2 及其他几种蛋白酪氨酸磷酸酶.....	20
1.5 立题依据.....	21
第二章 白芷活性部位的化学成分研究.....	23
2.1 仪器及材料.....	23
2.2 提取与分离方法	24
2.3 化合物的结构鉴定	28
2.31 新化合物的结构鉴定	28
2.32 已知化合物的结构鉴定	30
2.4 本章小结.....	42
第三章 白芷中馏分及化合物的活性评价.....	44
3.1 材料与仪器.....	44
3.2 PTP-Shp2 特异性抑制剂的体外筛选.....	47
3.21 实验原理	47
3.22 实验方法	47
3.23 实验结果	49
3.3 单体化合物对 PARP 切割的影响.....	53
3.31 实验原理.....	53
3.32 实验方法	53
3.33 实验结果	57
3.4 化合物 9 和 13 对 caspase-3,-8,-9 的激活作用.....	58
3.41 实验原理	58
3.42 实验方法.....	59

3.43 实验结果.....	61
3.5 化合物 9 和 13 抑制 HepG2 细胞的克隆形成	62
3.51 实验原理.....	62
3.52 实验方法.....	63
3.53 实验结果.....	63
第四章 总结与讨论	错误！未定义书签。
参考文献	67
附录	74
硕士期间发表论文	111
致谢	112

厦门大学博硕士论文摘要

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Historical records of <i>Angelica dahurica</i>	1
1.2 Research advances in chemical components of <i>A. dahurica</i>	1
1.3 Research advances in pharmacological and clinical effects of <i>A. dahurica</i>	13
1.4 Shp2 and other PTPs	20
1.5 Aims and significance	21
Chapter 2 Chemical components research on active extracts of <i>A. dahurica</i>.....	23
2.1 Materials	23
2.2 Extraction and isolation	24
2.3 Identification of chemical structures.....	28
2.31 Identification of a new compound.....	28
2.32 Identification of known compounds	30
2.4 Summary.....	42
Chapter 3 Biological activity research of extracts and compounds ..	44
3.1 Materials	44
3.2 Screening the selective inhibitors of PTP-Shp2 in vitro	47
3.21 Principle	47
3.22 Protocol of the Experiments	47
3.23 Results.....	49
3.3 The effects of compounds on PARP cleavage.....	53
3.31 Principle	53
3.32 Protocol of the Experiments	53
3.33 Results.....	57
3.4 The effects of compounds 9 and 13 on caspase-3,-8,-9 activity	58
3.41 Principle	58
3.42 Protocol of the Experiments.....	59
3.43 Results.....	61

3.5 The effects of compounds 9 and 13 on colone formation of HepG2 cells	62
.....	
3.51 Principle	62
3.52 Protocol of the Experiments	63
3.53 Results.....	63
Chapter 4 Conclusions and discussion	错误! 未定义书签。
References.....	67
Appendix.....	74
Publications	111
Acknowledgements	112

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

近年来, 以一些与肿瘤细胞分化增殖相关的信号转导通路的关键酶为药物筛选靶点, 发现作用于特定靶位的高效、低毒、特异性强的新型药物已成为当今抗肿瘤药物研发的重要方向。Shp2 (Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase-2) 是第一个确定的具有磷酸酶活性的促肿瘤蛋白, 而 Shp2 抑制剂的发现对的新型抗癌药物的开发具有重要意义。中草药在中国已有几千年的药用历史, 其成分多样性和结构复杂性的优势一直受到药物开发者的青睐。我们用 Shp2 抑制剂的高通量模型筛选了来源于植物库中的 2000 多个馏分, 发现白芷 60%乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部分具有特异性抑制 Shp2 活性的作用。通过综合运用硅胶柱色谱、ODS 柱色谱、凝胶柱色谱、分析型与制备 HPLC 及重结晶等方法, 对此活性部位进行了系统的分离, 得到 34 个单体化合物。通过 NMR、质谱、熔点及理化性质等手段对化合物的结构进行了鉴定, 其中, 1 个为新化合物, 15 个为白芷中首次分离。

通过 Shp2 抑制剂高通量筛选模型对所有化合物进行了筛选, 发现化合物 **4**、**7**、**9**、**24**、**30** 和 **32** 六个化合物对 PTP-Shp2 具有特异性抑制作用, 其 IC_{50} 为 17.2-64.1 μ M。为了进一步研究 Shp2 抑制剂能否促进细胞凋亡及抑制细胞生长, 我们检测了 HepG2 细胞中 PARP 的表达, caspase 的活性, 及化合物对细胞生长的抑制作用。结果显示, 化合物 **9** (二十三碳二烯酸) 和 **13** (别欧前胡素) 对 HepG2 细胞具有明显生长抑制作用, 并能够激活 caspase 进而促进 PARP 切割, 最终诱导细胞凋亡。

本论文首次运用新靶点研究白芷的抗癌活性成分, 并首次发现, 除了香豆素之外, 脂肪酸及其类似物也是白芷的抗癌活性成分。这为今后白芷的抗癌作用研究及未来新药开发提供了科学依据。

关键词: 白芷; 蛋白酪氨酸磷酸酶Shp2; 脂肪酸

Abstract

Recently, people pay much attention to PTPs to find targeted anti-cancer drugs with high efficiency, low toxicity and strong selectivity. Shp2, a non-receptor PTP, is found firstly as a promoting-cancer protein with phosphatase activity. Thus, the discovery of Shp2 inhibitors is very important for the treatment on cancer. Traditional Chinese Medicine (TCM) has been used in China for centuries. The component diversity and structure variety make TCM become the hot spot in new drug discovery. In this thesis, we screen approximately 2000 crude extracts from Chinese herbal plants library with the target of Shp2. The results showed that ethyl acetate extract of *Angelica dahurica* can inhibit the activity of Shp2 selectively. On basis of this result, we did the following research on EtOAc extract of *A. dahurica*.

34 compounds were isolated from the EtOAc extract of *A. dahurica* with many chromatography methods, such as silica gel, RP-18 gel, Sephadex gel, HPLC and others. The structures of these compounds were identified based on the data from NMR & MS spectra, melting point, and physical & chemical properties. Among these constituents, compound **19** was a new compound and 15 compounds were isolated from *A. dahurica* for the first time.

The inhibition effects of these compounds on Shp2 enzyme were tested using PTP-Shp2 selective-inhibition model. The results suggested that compounds **4**, **7**, **9**, **24**, **30** and **32** inhibit the activity of PTP-Shp2 selectively with IC₅₀ values from 17.2 to 64.1 μM. Cell apoptosis activities of all compounds were also examined to further study whether shp2 inhibitors can induce cell apoptosis and inhibit cell proliferation. The results showed that only compound **9** (14Z, 17Z-Tricosadienoic acid) and **13** (alloimperatorin) could induce PARP cleavage in dose and time-dependent manner and increase the activities of caspase-3 and caspase-9 at 100 μM in treated HepG2 cells. These two compounds also inhibited colony formation of HepG2 cells with dose dependence.

In the thesis, we studied the active anti-cancer components of *A. dahurica* with the target of Shp2. And this is the first report that fatty acids and derivatives are the potent anti-cancer constituents of *A. dahurica* as well as coumarins.

Key Words: *Angelica dahurica*; Shp2; fatty acids.

第一章 前言

1.1 本草考证

白芷为伞形科植物白芷 *Angelica dahurica*(Fisch.ex Hoffm.)Benth.et Hook.f. 或杭白芷 *Angelica dahurica* (Fisch.ex Hoffm.) Benth.et Hook. f. var. form osana (Boiss.) Shan et Yuan 的干燥根，在中国药用历史悠久。白芷一词出自 278 年前屈原诗歌《离骚》：“有辟芷、有芳芷、有白芷、白宦、有芳香。”^[1] 但未注明白芷是否药用。《五十二病方》载，“白芷、白衡、茵桂、薪雉，凡五物”等配伍具有治痢功效^[2]，这是白芷的首次药用记载。后来，《神农本草经》记载了更丰富的白芷功效，谓：“白芷，一名芳香，一名蓝，味辛，温，无毒。治妇人漏下赤白、血闭、阴肿、寒热、风头侵目泪出、长肌肤、润泽。可作面脂。”^[3] 白芷，夏、秋间叶黄时采挖，除去须根及泥沙，晒干或低温干燥^[4]。白芷通常按产地分为杭白芷（主产浙江）；川白芷（主产四川）；禹白芷（主产河南）和祁白芷（主产河北安国）^[5]。另外，白芷在日本、韩国、俄罗斯等国也有广泛分布。

1.2 白芷的化学成分研究进展

从 80 年代起，国内外学者开始对白芷的化学成分的研究。白芷中化学成分多样，包括香豆素类、挥发油类、甾醇及其糖苷类、脂肪酸类、生物碱类、微量元素等，其中香豆素类和挥发油类是白芷中的主要成分。现对这两种主要成分做详细的介绍，内容如下：

1.2.1 香豆素类

香豆素类物质在白芷中含量较高，达到 0.211%~1.221%^[6]。据文献报道，至今为止，已有 62 种香豆素从白芷中分离出来。香豆素可按其结构分为简单香豆素、呋喃香豆素和双香豆素三种；其中，呋喃香豆素是白芷中的主要香豆素成分。按分离部位有根和茎两部分，其中，白芷根是人们研究较多的部位，也是香豆素的主要来源。本论文对这些香豆素的类别、分离部位、结构作了详细综述（见表 1-1）。

1. 简单香豆素

编号 1~16 是简单香豆素，其中 13 个是从白芷根中得到，3 个从茎中分离得到。简单香豆素的母核结构如图 1-1 中 A 和 B。

2. 呋喃香豆素

编号 17~53 是呋喃香豆素，这 37 个化合物都是从白芷根中分离得到。其母核结构见图 1-1 中 C。

3. 双香豆素

编号 54~62 是双香豆素，这 9 个化合物都是从白芷根中分离得到。

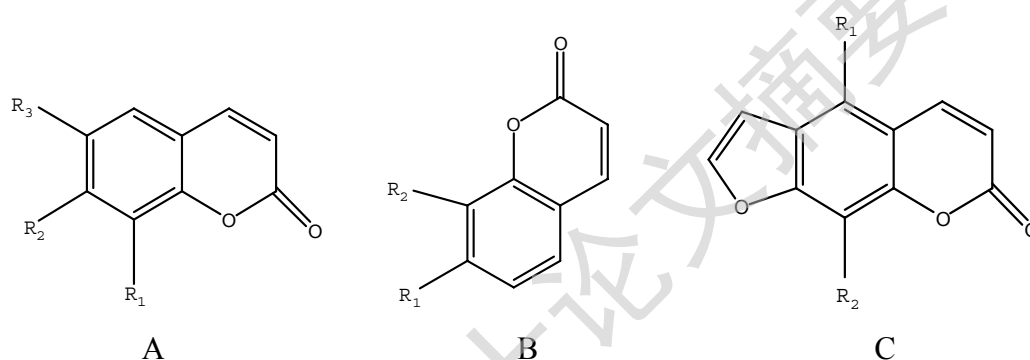
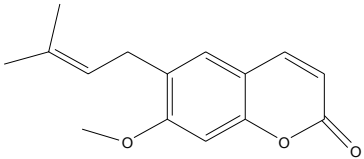
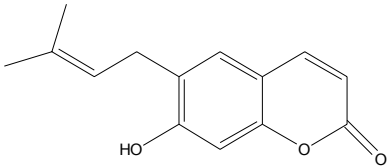
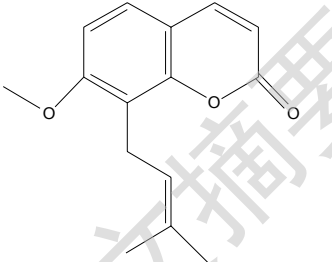
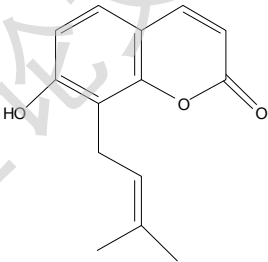
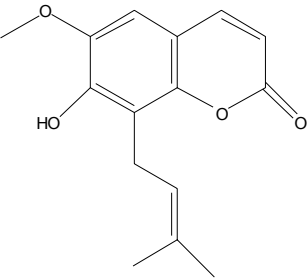
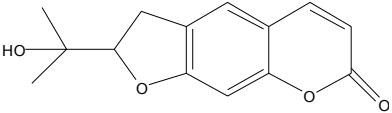
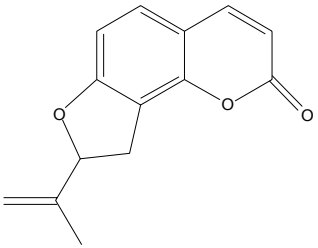


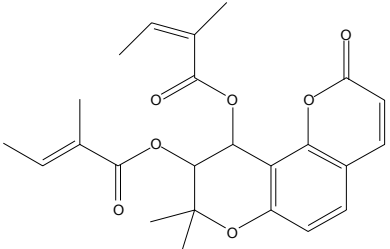
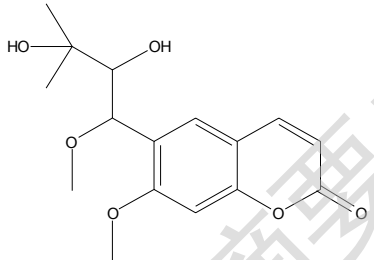
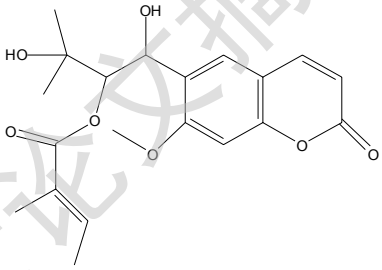
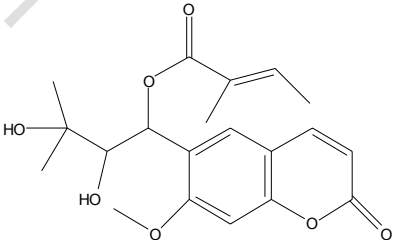
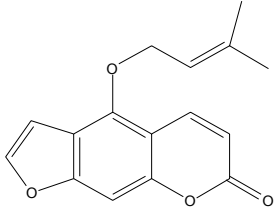
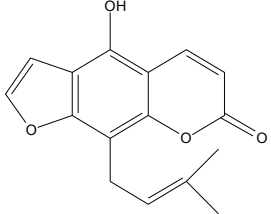
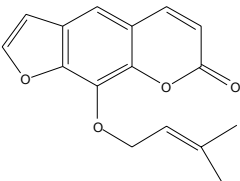
图 1-1 香豆素类结构的母核

表 1-1 白芷中已报道的香豆素类化合物

编号	类别	名称	分离部位	结构	参考文献
1	简单香豆素	7-methylcoumarin	根		[7]
2		aesculetindim	根		[8]
3		scopoletin	根		[9]
4		umbeliferone	根		[10]
5		6-methoxy-7-prenyloxy coumarin	根		[9]

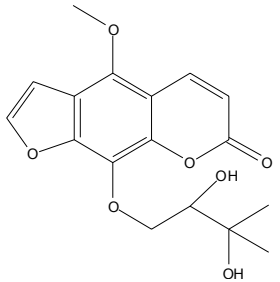
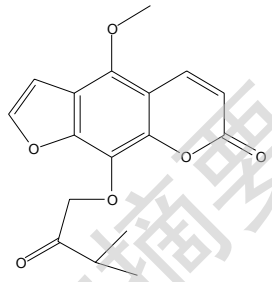
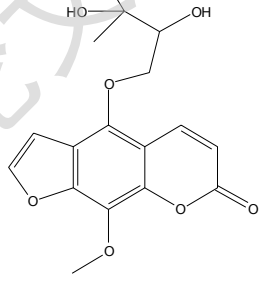
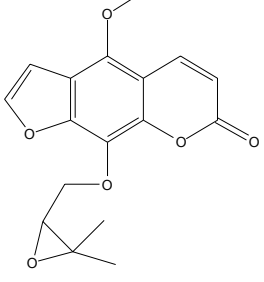
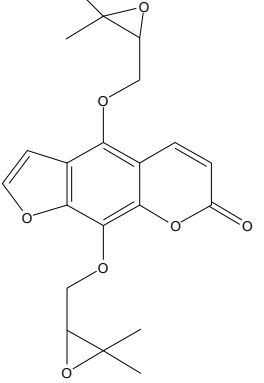
6	suberosin	根		[11]
7	7-demethylsuberosin	根		[9]
8	osthol	根		[12]
9	osthenol	根		[13]
10	cedrelopsin	根		[9]
11	marmesin	根		[14]
12	angenomalin	根		[13]

简单香豆素

13	anomalin	根		[14]
14	6-(2,3-dihydroxy-1-methoxy-3-methylbutyl)-7-methoxycoumarin	茎		[8]
15	angelol I	茎		[8]
16	angelol H	茎		[8]
17	isoperatorin	根		[11]
18	alloisoperatorin	根		[12]
19	imperatorin	根		[11]

20	alloimperatorin	根		[11]
21	oxypeucedanin	根		[15]
22	oxypeucedanin hydrate acetonide	根		[8]
23	isooxypeucedanin	根		[12]
24	oxypeucedanin hydrate	根		[12]
25	oxypeucedanin hydrate-3''-butyl ether	根		[16]

呋喃香豆素

26		byakangelicin	根		[7]
27		isobyakangelicol	根		[12]
28	呋喃香豆素	isobyakangelicin	根		[11]
29		byakangelicol	根		[11]
30		senbyakangelicol	根		[14]

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