



学校代码: 10184

分类号:

医学 硕士学位 论文

榆白皮抗肿瘤活性成分的研究

Anti-tumor constituents from *Cortex Ulmus*

朱靖伟

生药学

延 边 大 学

医学硕士学位论文

榆白皮抗肿瘤活性成分的研究

朱靖伟

2018

分类号

密级

UDC

学号 2015010621

延边大学硕士学位论文

榆白皮抗肿瘤 活性成分的研究

研究生姓名	朱靖伟
培养单位	延边大学
指导教师姓名、职称	李镐 教授 周微 讲师
学科专业	生药学
研究方向	天然药物活性成分研究
论文提交日期	2018年5月24日

本论文已达到医学硕士学位论文要求

答辩委员会主席 吕惠子 (印)

答辩委员会委员 沈光海 (印)

答辩委员会委员 郑明善 (印)

延 边 大 学

2018年5月24日

学位论文独创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文系本人在导师指导下独立完成的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标记和致谢的部分外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得任何教育机构的学位或学历而使用过的材料。与我一同工作的同事对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

本人如违反上述声明，愿意承担由此引发的一切责任和后果。

研究生签名： 朱靖伟 日期： 2018年5月24日

学位论文使用授权声明

本人在导师指导下所完成的学位论文，学校有权保存其电子和纸制文档，可以借阅或上网公布本学位论文的全部或部分内容，可以向有关部门或机构送交并授权其保存、借阅或上网公布本学位论文的全部或部分内容。对于保密论文，按保密的有关规定和程序处理。

本学位论文属于：

1. 保密 ，在5年解密后适用于本声明；
2. 不保密 。

研究生签名： 朱靖伟 导师签名： _____ 日期： 2018年5月

摘 要

本实验对榆树茎皮部分的化学成分进行研究，并考察其抗肿瘤活性。

利用乙醇对榆白皮进行提取，对其乙醇提取物使用二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇依极性顺序分别进行萃取。利用正反相硅胶、中压液相色谱仪和高压制备型液相色谱仪等技术对榆白皮的乙酸乙酯萃取物进行分离和纯化。利用核磁共振波谱技术对分离得到的化合物进行结构鉴定。为了研究化合物的抗肿瘤活性，利用四甲基偶氮唑蓝 MTT 法分别对分离得到的化合物进行了人肺癌细胞（A549）生长抑制作用的测定。

从榆白皮中分离得到 10 个单体化合物，分别为 maslinic acid (1), arjunolic acid (2), oleanolic acid (3), naringenin (4), kaempferol (5), isorhamnetin (6), isolariciresinol (7), (+)-lyoniresinol (8), icariside E3 (9), (7Z)- tetradec-7-en-1-ol (10)。其中化合物 7、8 是首次从榆科中分离得到，化合物 5、6、9 是首次从该植物中分离得到。化合物 1—3 对人肺癌细胞（A549）具有显著的抑制作用，化合物 5 和 6 对人肺癌细胞（A549）也可在一定程度上对人肺癌细胞（A549）产生抑制作用。

关键词：榆树茎皮；化学成分；抗肿瘤活性

Abstract

In this experiment, we studied the chemical constituents of the stem bark of *Ulmus pumila* L. and investigate their anti-tumor activity.

The stem bark of *U. pumila*. was extracted with ethanol, then the ethanol extract was partitioned sequentially by dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. The ethyl acetate extract extract of the stem bark of *U. pumila* were separated and purified by the technology of normal silica gel column and reversed-phase silica gel column, medium pressure liquid chromatography and high pressure preparation liquid chromatography, respectively. The chemical structures of the isolated compounds were determined by NMR spectroscopy. In order to study the anti-tumor activity of the isolated compounds, they were evaluated for growth inhibition in human lung cancer cells (A549) using the MTT method.

Ten compounds were isolated from the stem bark of *U. pumila*. Their structures were determined as maslinic acid (**1**), arjunolic acid (**2**), oleanolic acid (**3**), naringenin (**4**), kaempferol (**5**), isorhamnetin (**6**), isolariciresinol (**7**), (+)-lyoniresinol (**8**), icaraside E3 (**9**), (7*Z*)- tetradec-7-en-1-ol (**10**). Among them, compounds **7** and **8** were isolated from the family Ulmaceae for the first time, and compounds **5**, **6** and **9** were isolated from the stem bark of this plant for the first time. Compounds **1—3** showed significant inhibitory effects on the growth of A549 cells, and compounds **5** and **6** showed weak inhibitory activity against A549 cells.

Key words: *Ulmus pumila* L., chemical constituent, anti-tumor activity

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
第一章 绪 论.....	1
第二章 实验内容.....	5
2.1 榆白皮的提取与分离.....	5
2.1.1 实验药材.....	5
2.1.2 实验仪器与试剂.....	5
2.1.3 榆白皮的提取.....	7
2.1.4 榆白皮化学成分的分离.....	8
第三章 结果与讨论.....	12
3.1 榆白皮的化学成分结构鉴定.....	12
3.1.1 化合物 1 的结构鉴定.....	12
3.1.2 化合物 2 的结构鉴定.....	14
3.1.3 化合物 3 的结构鉴定.....	16
3.1.4 化合物 4 的结构鉴定.....	18
3.1.5 化合物 5 的结构鉴定.....	20
3.1.6 化合物 6 的结构鉴定.....	22
3.1.7 化合物 7 的结构鉴定.....	24
3.1.8 化合物 8 的结构鉴定.....	26
3.1.9 化合物 9 的结构鉴定.....	28
3.1.10 化合物 10 的结构鉴定.....	30
3.2 榆白皮化学成分抗肿瘤活性研究.....	32
3.2.1 实验试剂.....	32
3.2.2 细胞增殖实验及抗肿瘤活性成分筛选.....	32
3.2.3 化合物 1—10 的抗肿瘤活性实验.....	32
第四章 结 论.....	34
参考文献.....	35
致 谢.....	38
附 图.....	39

第一章 绪 论

肿瘤（Tumor）是指人体器官、组织细胞在外在和内在有害因素长期作用下，发生过度增生和异常分化而形成的一种新生物^[1]。其外形通常表现为肿块，也称赘生物。肿瘤是一种身体内细胞的异常增生，它来源于人体内的正常细胞，其结构、功能及细胞代谢与正常细胞有着明显的区别。

肿瘤从宏观上分为良性肿瘤与恶性肿瘤两种。正常细胞转变为肿瘤细胞后，如果其在形态、机能和细胞代谢上与发源组织相似，则此种肿瘤属于良性肿瘤^[2]。而恶性肿瘤是癌和肉瘤的总称。其分化程度低，形态结构与其来源组织的正常细胞相差较大，生长快，无包膜，呈浸润性生长，常发生转移及形成恶液质。病理学检查能明确诊断。治疗后易复发，病死率高，为常见的死亡原因之一^[3]，这也就是我们所说的癌症。

诱发肿瘤的原因有很多，一般分为生理内在因素、生理外在因素、心理社会病因和一些其他因素。生理内在因素包括遗传因素、内分泌因素、免疫因素。经近几十年数据统计因遗传病史，患内分泌疾病的人群的肿瘤发病率要远高于正常人的肿瘤发病率，肿瘤发病一直与免疫系统存在相互关系，慢性炎症也能激发肿瘤的形成。生理外在因素则包括化学因素、物理因素和生物因素。化学因素是指烷化剂、多芳香烃化合物、芳香胺和偶氮染料类化合物、亚硝基化合物和植物毒素等引起肿瘤的原因。物理因素包括电离辐射、异物刺激和慢性损伤等等。生物因素则指的主要是病毒。人类的负性情绪，天生的个性以及生活中发生的负面事件导致个体处于长时间紧张状态的情况都有可能引发肿瘤，这些因素被我们称为心理社会病因。还有一些其他因素如吸烟、饮食、年龄、职业都是肿瘤的诱因。

癌症是影响世界人类健康的首要难题，在我国自 2006 年开始实施肿瘤登记年报制度以来，截止到 2017 年，各地区肿瘤发病率及死亡率趋势相似^[4]，均呈上升趋势。目前癌症传统的治疗方式有手术治疗、放射治疗、化学药物化疗。新兴的治疗方式有生物治疗、抗血管生成治疗、基因治疗。其中化学药物治疗是肿瘤的最普遍最基本治疗方法之一，化疗可以治愈部分早期肿瘤、抑制肿瘤的生长繁殖、防止肿瘤的转移扩散、并且可以减轻肿瘤引起的临床症状从而减轻患者的痛苦^[5]，抗肿瘤药物的研究和在肿瘤的防治过程中起到了不可忽视的作用。

绝大多数抗肿瘤药物来源于植物和微生物的天然产物及其衍生物，近几十年来发现了很多对癌症有效的抗肿瘤药，比如具有代表性的顺铂、长春瑞宾、紫杉醇、多西紫杉醇、吉西他滨等等。但是在肿瘤的治疗过程中，无论是放射性治疗还是化学药物治疗对机体自身细胞和癌细胞之间都缺乏选择性，在我们应用放化疗抑制或消除癌细胞生长的同时，往往会对机体自身增殖较旺盛的细胞产生严重的影响和损伤。

鉴于传统放化疗治疗肿瘤对身体的危害,在近些年从天然药物中寻找选择性高、活性强、毒副作用小的抗肿瘤新药成为一种新的趋势。榆科植物在韩国已被研究并对其抗肿瘤活性进行测试,结果表明从榆科植物里所分离出的部分化合物对肿瘤有良好的抑制效果^[6-8]。早在 2002 年被报道有人从中国榆树分离的新型微生物并利用微生物制备胞外多糖,其具有良好的抗肿瘤活性^[9]。早在《药性论》中记载榆白皮具有利水,通淋,消肿的功能^[10]。经过现代对榆白皮的化学成分分析证明榆白皮中含有甾醇类、三萜类、鞣质、树胶、脂肪油等化学成分^[11]。

榆树 (*Ulmus pumila* L.) 是榆科 (Ulmaceae) 榆属植物^[12], 是一种落叶乔木, 最高可达 25 米, 粗可达 1 米, 树皮较为平滑, 一般为灰色或褐色, 在贫瘠之地多呈灌木状。榆树叶呈长卵形、椭圆状卵形等。榆树的花要先于叶开放, 翅果接近于圆形, 果核则位于翅果中间。

它广泛分布于我国华北、东北、华东、中南、西南、西北及西藏地区, 长江以南多系栽培^[13]。

榆树有很多用途, 由于榆树结实耐用, 常用来制作工具、家具或用做建筑方面, 树皮用来磨成粉制成榆皮面, 可以掺面粉食用。树枝可用来制作绳索, 麻袋, 造纸, 幼嫩翅果可以蒸食。

榆树的树皮或根部的韧皮部称为榆白皮, 具有利水、通淋、消肿等功效, 主要用于治疗大小便不通、水肿、淋浊、痈疽发背、丹毒、疥癣等^[11]。

目前, 从榆白皮中分离得到的化合物有萜类、黄酮类、木脂素类、香豆素类、甾醇类等化学物质, 各种试验结果证实榆白皮有较强的抗肿瘤、抗炎等生物活性^[14-19]。

根据文献报道, 王东^[15-17]等人在 2004 到 2012 年间对榆树根皮的化学成分及抗癌活性进行了研究, 共报道了 21 种单体化合物, 其中化合物 1-十七烷酸甘油单酯 (1-heptadecanoyl glycerol) 为首次在自然界中分离得到, 化合物 epifriedelanol 与化合物 friedelin 则为首次在榆科植物中分离得到, maslinic acid、eicosanoic acid、arjunolic acid、camaldulenic acid、1-hexadecanoyl glycerol、isoscopoletin、(+)-lyoniresinol 3 α -O- α -L-rhamnopyranoside、n-butyl-O- α -D-fructofuranoside、n-butyl-O- β -D-fructofuranoside、n-butyl-O- β -D-fructopyranoside、滨蒿内酯、齐墩果酸、1-亚油酸甘油单酯、 β -谷甾醇、daucosterol 这 15 种单体化合物为首次在榆属植物中被分离得到, mansonone E、mansonone F、lyoniside 为首次在榆白皮中分离得到。其中 mansonone E、mansonone

ne F 具有较强的细胞毒作用^[20], 刘飞^[21]等人对抗肿瘤活性化合物 mansonone E 又进行了合成研究。

金红兰^[18]等在 70%乙醇提取的榆白皮乙酸乙酯层萃取物中共分离得到了 5 个化合物,经波谱技术分析,分别鉴定为儿茶素、儿茶素-7-O- β -呋喃芹菜糖苷、柚皮素、马斯里酸、委陵菜酸。

刘志彬^[19]等用甲醇提取的榆树叶乙酸乙酯萃取物中,经反复硅胶色谱柱、薄层色谱、及重结晶等手段得到 7 个化合物,分别为 4 α , 12 α -二甲基-24 烯-环阿屯烷醇、12 α -羟基齐墩果-7-烯、5, 7-二甲氧基香豆素、东莨菪素、胡萝卜苷、 β -谷甾醇、叶绿醇。

癌症有很多种,其中肺癌则被人认为成癌症中威胁人类健康的头号杀手,据我国卫计委统计,截止至 2015 年,我国癌症发病率已经上升至 235/10 万,由于患有癌症而导致死亡的概率也上升至 144.3/10 万,其中肺癌处于男性癌症发病率的首位^[22]。所以本论文为了寻找榆白皮中具有肿瘤抑制作用的活性成分,用榆白皮的乙醇提取物,经不同极性溶剂萃取,得到二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇萃取物,并且筛选对人肺癌细胞(A549)^[23-25]具有抑制生长作用的萃取物。

A549 细胞有着悠久的历史,随着人类对肺癌研究的不断深入,在 1972 年由 D. J. Giard^[26]等人在实验中将一位 58 岁的白人男性的外植体肿瘤,经过转移然后将其培养肺肿瘤组织最终得到的一类肺癌细胞,这类细胞就是我们使用的人肺癌细胞 A549。

A549 细胞的结构与绝大多数普通细胞一样,由含有溶酶体、内质网、线粒体等的细胞质与细胞核构成,它们呈鳞状分布在自然界里,这些细胞可以通过肺泡扩散传播物质,例如水和电解质。A549 属于传代细胞系,可稳定的传代培养。如果将 A549 细胞进行体外培养,它们会成长为单层细胞,附着或紧贴在培养皿上。这些细胞可以固定或悬挂在体外的溶液中。我们一般使用胰酶消化后,加入生长液稀释,以 1:2~1:3 培养均可。所以我们经常使用 A549 细胞对药物的抗肿瘤活性进行研究,因此 A549 细胞在肺癌发展、防治等方面被广泛应用。

某些单体化合物可以抑制人肺癌细胞 A549 的增殖和生长,还有一些化合物可以诱导 A549 的细胞凋亡。主要的作用靶点为 bcl-2 基因与线粒体通路、mTOR 信号通路、Fas 信号通路。细胞的增殖与凋亡是细胞周期的一个复杂过程,抑制细胞增殖生长与诱导细胞凋亡互相作用、彼此影响。部分单体化合物也可以通过诱导 A549 细胞发生自噬来抑制其增殖^[22]。

人肺癌细胞 A549 还能够合成卵磷脂,且含有高度不饱和的脂肪酸,这对于维持细胞膜磷脂有重要意义。A549 细胞广泛用于 II 型肺上皮细胞模型在药物代谢的体外模型,还可以作为转染宿主。

天然药物是一种巨大的财富,从天然药物中提取分离具有活性的单体化合物,加以修饰制成药剂成为了一种抗炎抗、肿瘤的新热潮,经过科研人员与医护人员的不懈努力,这类药剂在抗炎、抗肿瘤方面已经取得了明显的效果。

本论文只对榆白皮的乙酸乙酯萃取物进行了化学成分的分、结构鉴定和抗肿瘤活性研究。

目前看来，有关榆白皮的分离提取以及活性研究方面的相关文献报道较少。因此本文对榆白皮的化学成分以及活性进行进一步的研究，通过提取、分离、结构鉴定以及抗肿瘤活性测试为肿瘤的防治提供新的信息，为榆白皮资源的利用与开发提供科学的理论依据，让抗肿瘤药物的开发更进一步。

第二章 实验内容

2.1 榆白皮的提取与分离

2.1.1 实验药材

实验用榆白皮采集于吉林省延边地区三道湾镇附近山脉，经延边大学药学院生药学研究室李镐教授鉴定为榆科榆属植物榆树的茎皮部分 *Ulmus pumila* L.。凭证标本（编号：20100920）保存于本校生药实验室标本库。

2.1.2 实验仪器与试剂

实验仪器

称	型号	生产厂家
高压制备液相色谱仪	HP-Q-P050	博纳艾杰尔科技有限公司
中压制备液相色谱仪	CHEETAN MP100	博纳艾杰尔科技有限公司
分析天平	FA-604A	上海精天仪器有限公司
核磁共振仪	AV-300	瑞士 Bruker 公司
核磁共振仪	AV-500	瑞士 Bruker 公司
旋转蒸发器	R2060	上海申科技有限公司
三用紫外分析仪	SB-3	名天津市分析仪器厂
循环水式多用真空泵	SHB-21	上海豫康科教仪器有限公司
数控超声波清洗器	KQ2200DB	昆山市超声仪器有限公司

实验试剂

试剂名称	仪器型号	生产厂家
二氯甲烷	分析纯	延吉浩然化工有限公司
甲醇	分析纯	延吉浩然化工有限公司
石油醚	分析纯	延吉浩然化工有限公司
乙酸乙酯	分析纯	延吉浩然化工有限公司
正丁醇	分析纯	延吉浩然化工有限公司
丙酮	分析纯	延吉浩然化工有限公司
氘代甲醇	151947-25G	Sigma-Aldrich
氘代吡啶	151874-50G-GL	Sigma-Aldrich
氘代氯仿	151823-100G	Sigma-Aldrich
柱层析硅胶	200-300 目	青岛海洋化工厂
反相硅胶板	SO230004-0	德国默克公司
薄层层析硅胶	GF254	青岛海洋化工厂

2.1.3 榆白皮的提取

取干燥的榆树茎皮 5 kg，粉碎后用 70%乙醇回流提取 3 次，每次 2 h，提取液合并减压浓缩得总提取物 720.15 g，将得到的提取物溶解于适量的水中，分别用二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇依极性顺次萃取，分别得到二氯甲烷萃取物 31 g，乙酸乙酯萃取物 125 g，正丁醇萃取物 158 g。

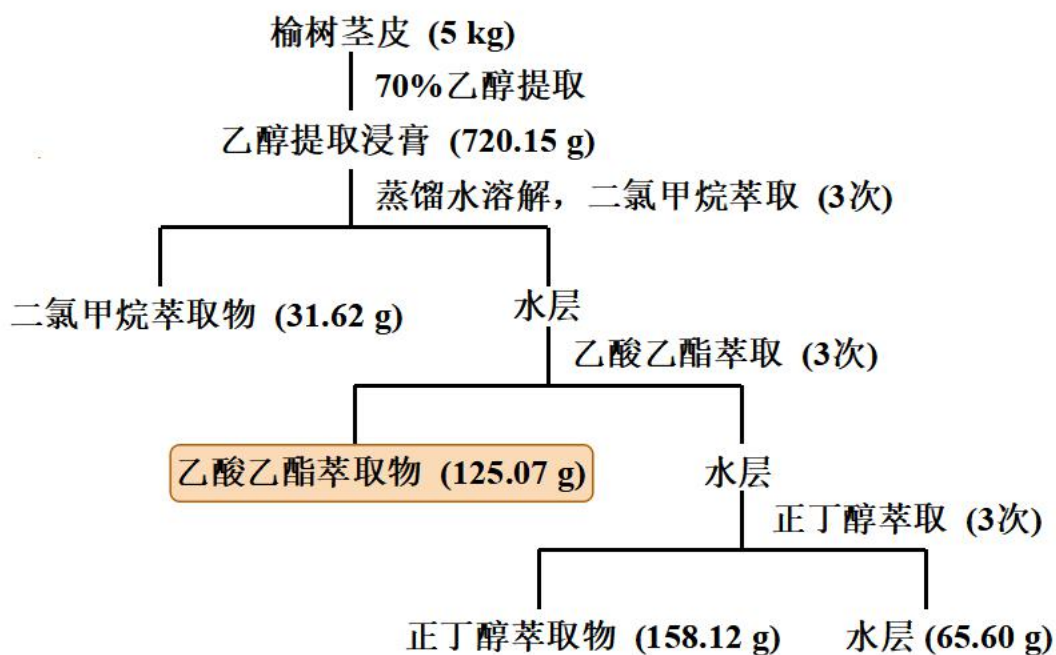


图 1. 榆白皮提取及萃取流程图

2.1.4 榆白皮化学成分的分离

乙酸乙酯萃取物 (125.1 g) 经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 30:1, 20:1, 10:1, 7:1, 5:1, 2:1, 0:100) 梯度洗脱, 共分为 11 个组分 (Fr.A~Fr.K)。

Fr.D (225.7 mg) 经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 25:1—20:1) 梯度洗脱, 得到 3 个组分 (Fr.D-1~Fr.D-3)。Fr.D-2 通过制备型 HPLC (甲醇-水, 45%~100%甲醇) 洗脱, 得到化合物 **4** (20.9 mg)。

Fr.E (328.4 mg) 经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 25:1—0:100) 洗脱, 得到 3 个组分 (Fr.E-1~Fr.E-3)。Fr.E-1 经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 20:1—0:100) 洗脱, 得到化合物 **1** (7.6 mg)。Fr.E-3 通过制备型 MPLC (甲醇-水, 75%~100%甲醇, 10 mL/min) 洗脱, 得到化合物 **2** (8.2 mg)。

Fr.F (44.8 mg) 经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 30:1—25:1) 梯度洗脱, 得到 2 个组分 (Fr.F-1~Fr.F-2)。Fr.F-1 经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 25:1—0:100) 洗脱, 得到化合物 **7** (1.8 mg)。

Fr.H (4.8 g) 经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 30:1—0:100) 梯度洗脱, 得到 8 个组分 (Fr.H-1~Fr.H-8)。Fr.H-3 经硅胶柱 (石油醚-乙酸乙酯-甲醇, 2.2:1:0.1~0.5:1:0.1) 梯度洗脱, 得到 4 个组分 (Fr.H-3-1~Fr.H-3-4)。Fr.H-3-2 经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 30:1—0:100) 洗脱, 得到化合物 **10** (2.6 mg)。

Fr.I (10.5 g) 经硅胶柱 (石油醚-乙酸乙酯, 3:1—1:1) 梯度洗脱, 得到 2 个组分 (Fr.I-1~Fr.I-2)。Fr.I-1 通过制备型 MPLC (甲醇-水, 40%~100%甲醇, 10 mL/min) 洗脱, 得到化合物 **8** (7.9 mg)。Fr.I-2 经硅胶柱 (石油醚-乙酸乙酯-甲醇, 3:1:0.2—1:1:0.1) 梯度洗脱, 得到 3 个组分 (Fr.I-2-1~Fr.I-2-3)。Fr.I-2-2 经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 22:1—0:100) 洗脱, 得到化合物 **3** (3.7 mg)。

Fr.J (7.7 g) 通过制备型 MPLC (甲醇-水, 20%~100%甲醇, 10 mL/min) 梯度洗脱, 得到 6 个组分 (Fr.J-1~Fr.J-6)。Fr.J-3 经硅胶柱 (石油醚-乙酸乙酯-甲醇, 1:1:0.2—1:1:0.4) 洗脱, 得到化合物 **9** (7.3 mg)。Fr.J-5 经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇, 10:1—0:100) 洗脱, 得到化合物 **5** (3.9 mg) 和其他 2 个组分 (Fr.J-5-1~Fr.J-5-2)。Fr.J-5-1 通过制备型 MPLC (甲醇-水, 25%~100%甲醇, 10 mL/min) 洗脱, 得到化合物 **6** (3.4 mg)。