

东北刺人参 faltarindiol 制备及其抗结肠癌作用机制研究

杨璞^{1*}, 邵莉², 王锦³, 黄卫华³

¹中南大学湘雅医院普通外科, 长沙 410008; ²湖南中医药大学药学院生药学教研室, 长沙 410208;

³中南大学湘雅医院临床药理研究所, 长沙 410008

摘要:为建立一种快速高效的 faltarindiol (FAD) 制备程序并探讨其抑制结肠癌细胞 HCT-116 增殖作用与调控细胞周期阻滞相关基因之间的关系。研究使用硅胶柱色谱富集及制备 HPLC 分离纯化得到了 FAD 单体, 依据波谱数据鉴定其结构; 采用 MTS 法检测 FAD 对结肠癌细胞 HCT-116 的细胞毒活性, 运用流式细胞术、RT-qPCR 以及 Western blotting 法分别检测 FAD 对结肠癌细胞 HCT-116 周期影响、周期阻滞基因 β -catenin, cyclin D1 和 c-myc 的 mRNA 水平及蛋白表达的作用。结果显示建立制备 HPLC 方法可以较快速稳定地得到较高纯度的 FAD。FAD 对结肠癌细胞 HCT-116 具有明显的细胞毒活性, 与 HCT-116 细胞作用 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 8.1 ± 1.4 、 4.6 ± 0.5 、 3.2 ± 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 。此外, FAD 将 HCT-116 细胞周期阻滞在 G2/M 期, 且能够显著下调 Wnt/ β -catenin 通路中的 β -catenin、cyclin D1 和 c-myc 基因的转录及表达。据此推断 FAD 可能是通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路阻滞 HCT-116 细胞生长周期进而抑制其细胞的增殖来产生抗结直肠癌的作用。

关键词:东北刺人参; Faltarindiol; 制备 HPLC; 结肠癌; Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)7-1265-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.7.021

Preparation of faltarindiol from *Oplopanax elatus* and its mechanism on anti-colorectal cancer

YANG Pu^{1*}, SHAO Li², WANG Jin³, HUANG Wei-hua³

¹Department of general surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

²Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410128, China;

³Department of Clinical Pharmacology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract: This study aimed to develop a rapid and efficient preparative method for faltarindiol (FAD) and investigate the relationship of the anti-proliferative effect of FAD on colorectal cancer HCT-116 cells and regulating cell cycle arrest related genes. The separation and purification were performed on silica gel chromatography and preparative HPLC in order to get FAD with high purity, which was identified by spectral data. MTS method was employed to test the cytotoxicity of FAD on colorectal cancer HCT-116 cells. Subsequently, the cell cycle arrest, the mRNA level, protein expression of β -catenin, cyclin D1 and c-myc of HCT-116 cells were analyzed by flow cytometry, RT-qPCR and Western blotting, respectively. As the results, a rapid and efficient HPLC method has been validated for the preparation and purification of FAD from *O. elatus*. FAD showed cytotoxicity on HCT-116 cells with the IC_{50} values of 8.1 ± 1.4 , 4.6 ± 0.5 and 3.2 ± 0.4 $\mu\text{mol/L}$ at 24, 48 and 72 h, respectively, which could arrest the cell cycle of HCT-116 cell line at G2/M phase and significantly down-regulate the mRNA level and protein expressions of β -catenin, cyclin D1 and c-myc. These results suggested that FAD possessed a strong cytotoxic activity against HCT-116 cells, and arrested its cell cycle at G2/M phase, while its mechanism referred to Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: *Oplopanax elatus*; faltarindiol; preparative HPLC; colorectal cancer; Wnt/ β -catenin signaling pathway

收稿日期: 2018-11-19 接受日期: 2019-05-09

基金项目: 国家自然科学基金(31400306); 湖南省自然科学基金(2019JJ40521)

*通信作者 Tel: 86-731-89753008; E-mail: puyang@csu.edu.cn

结肠癌是严重威胁人类生命健康的重大疾病, 目前结肠癌临床主要依靠手术治疗并且通过药物化疗控制肿瘤的发展和转移, 至今尚无专属特效治疗

药物^[1,2]。由于富含结构新颖,药理活性独特和类药性的特征,天然产物是活性先导化合物和新药研发的重要来源,在抗肿瘤化疗药物方面,许多药物直接来源于天然产物、天然产物转化物或受天然产物启发而设计合成的衍生物^[3,4]。其中代表性的天然化合物有紫杉醇、长春花碱、喜树碱、鬼臼毒素衍生物等。因此,从传统的植物药中寻找高效低毒的先导化合物来筛选抗结肠癌药物是目前较为热门的研究领域。

东北刺人参(*Oplonanax elatus* Nakai)为刺人参属植物,其药用功效可用于糖尿病、风湿病、高血压、调节免疫和肿瘤防治等,具有抗氧化、抗菌、解热镇痛、调节血压、抗肿瘤细胞增殖等生理活性^[5,6]。刺人参根主要含挥发油、苯丙素、木脂素、炔醇类等化合物^[7,8]。Falcarindiol (FAD)是东北刺人参中一种高含量炔醇化合物^[9],对人结肠癌细胞 HCT-116 具有很强细胞毒活性^[10],同时还具有抗氧化、抗菌、清除自由基等活性^[6,11]。经常规色谱方法分离处理, FAD 与其同系物 oplopandiol (OPD) 无法被分离开,制备液相色谱单次进样制备运行时间为 40 分钟,耗时长,有机溶剂消耗多^[12]。

Wnt/ β -catenin 信号通路是调控结直肠癌的发生、发展、侵袭、转移等方面较为重要的一条信号通路^[13]。当 Wnt 信号被激活后, β -catenin 的磷酸化降解被抑制,使得 β -catenin 在细胞内过度聚积后入核与 TCF/LEF(T 细胞因子/淋巴增强因子)结合后启动下游基因的转录,而 c-myc 及 cyclinD1 是 β -catenin 下游主要调控细胞增殖以及周期的两个重要基因^[14]。此前虽有报道称东北刺人参中炔醇富集部位对 Wnt 信号通路中的 β -catenin 蛋白具有一定的抑制作用,但对于 FAD 单独是否可以通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路来调节结直肠癌的发展目前尚无研究报道。

本研究对以往的 FAD 分离制备方法进行优化,采用重叠进样的方法,可以更加快速高效的方制备 FAD 单体。此外,本文检测了 FAD 对 HCT-116 细胞增殖的影响并评价其对周期相关基因 β -catenin、cyclin D1、c-myc 的调控作用,以期 FAD 作为一种新的结直肠癌治疗药物开发提供相关研究依据。

1 材料

1.1 试剂与仪器

ABI/Sciex 三重四极杆质谱系统 API 4000 质谱仪;Bruker ACF-500 型核磁共振仪。美国 Agilent

1200 系列分析液相色谱仪、日本岛津 LC-20A 制备液相色谱系统。美国 Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μ m/L) 分析色谱柱。美国 Phenomenex Luna C₁₈ (21.2 × 250 mm, 5 μ m/L) 制备色谱柱。薄层色谱 GF₂₅₄ 硅胶、正相柱色谱硅胶 (200 ~ 300 目, 青岛海洋化工厂)、40 ~ 60 μ m/L 反相硅胶 (美国 Grace Alltech 公司);色谱纯甲醇和乙腈 (德国 Merck 公司);分析纯试剂 (国药控股有限公司, 中国)。CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司);AR1140 电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司);FC 500 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司);美国 Biotek Epoch 酶标仪;RT-qPCR 仪 (Roche 480, 美国罗氏公司);化学发光凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。Falcon Labware 细胞培养瓶 (美国 Franklin Lakes)。0.25% 胰酶细胞消化液 (含 0.02% EDTA), McCoy's 5A 培养基以及磷酸盐缓冲液 (美国 Mediatech 公司)。 β -actin, β -catenin, cyclin D1 和 c-myc 引物 (生工生物工程(上海)股份有限公司合成); β -catenin, cyclin D1 和 c-myc 单克隆抗体及二抗抗体 (北京博奥森生物技术有限公司);美国 Sigma-Aldrich 公司青霉素和链霉素。美国 Promega 的 CellTiter 96 细胞增殖 MTS 测定试剂盒。

1.2 药材与试剂

药材于 2015 年 8 月采自辽宁省本溪市桓仁满族自治县,经辽宁中医药大学窦德强教授鉴定为东北刺人参 *O. elatus* 的干燥根。凭证标本 (OER-20150826-1) 存放于中南大学湘雅医院临床药理研究所。5-FU 采购自大连美仑生物技术有限公司 (批号: M0601A)。

1.3 细胞

人结肠癌细胞系 HCT-116 购自中南大学细胞中心,细胞保存于中南大学湘雅医院临床药理研究所。细胞在 5% CO₂、37 °C 及饱和湿度条件下进行常规培养,培养基为含 10% 胎牛血清和 50 IU 双抗的 McCoy's 5A,所有实验均在细胞对数生长期进行。

2 方法

2.1 FAD 分离制备

2.1.1 提取与粗分离

东北刺人参干燥根 2.0 kg, 粉碎过 40 目筛, 95% 甲醇冷浸提取, 旋转蒸发器减压浓缩得浸膏 210 g, 取 190 g 提取物分散于 1 L 蒸馏水中, 分别用水饱和和石油醚 (1 × 3 L) 萃取得浸膏 19 g, 水饱和和乙酸乙酯 (1 × 3 L) 萃取得浸膏 65 g, 水饱和和正丁醇 (1

×3 L) 萃取得浸膏 73 g 及水部位。乙酸乙酯部位 50 g 上硅胶柱层析分离,经二氯甲烷-甲醇(100:0~0:100)梯度洗脱,二氯甲烷-甲醇(10:1)洗脱物经反复硅胶柱层析和 Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇,1:1)柱层析,所得组分含有 FAD 和其同系物 OPD。

2.1.2 HPLC 制备

将含 FAD 组分溶于甲醇(5 mg/mL),采用美国 Phenomenex Luna C₁₈(21.2×250 mm,5 μmol/L)制备色谱柱,以甲醇-水(78:22)为流动相,流速为 10 mL/min,每次进样 200 μL,检测波长为 203 nm,采用重叠进样,充分利用空白保留时间,缩短样品制备时间,最终制备得高纯度 FAD(6.8 g)和 OPD(5.1 g)(纯度均 ≥ 98%)。

2.2 MTS 法检测细胞增殖

HCT-116 细胞生长至覆盖培养瓶底部面积 90% 以上,用 0.25% 胰酶消化液消化,传代。对数生长期细胞转移至 96 孔培养板进行培养,每个培养孔中含 5 × 10⁴ 个细胞,相同条件下培养。培养 24 小时,给药组中加入不同浓度的 FAD 稀释液(培养体系终浓度为 100、50、30、10、5、2、1 μmol/L),每个试药浓度设 3 个平行复孔;对照组加入与给药组等体积的培养基。置相同条件下培养。48 小时后弃培养液,每孔加入用培养基配置的 MTS 溶液 100 μL(333 μg/mL),置培养箱中孵育 4 h,每孔吸取 60 μL 至另一 96 孔板用于酶标仪检测,检测波长为 490 nm 条件下测定吸光度(A)值,以培养基中加入相同浓度 DMSO 处理的细胞为对照组,重复检测 3 次,取平均值为最终结果计算 FAD 对细胞的增殖抑制率,利用 SPSS 20.0 软件统计半数抑制浓度 IC₅₀;增殖抑制率 = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{药物}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$ 。

2.3 流式细胞术检测细胞周期

取对数生长期 HCT-116 细胞,弃去培养液,分别用 2 mL PBS 溶液清洗 2 次,加入 0.5 mL 0.25% 胰酶细胞消化液后置于培养箱中消化 2 min,而后加入 2 mL 细胞完全培养基终止消化。用吸管轻轻吹打使细胞充分消化均匀分散,将细胞悬液转入 5 mL 离心管中,1 300 rpm 离心 5 min,弃上清液。重新加入 2 mL 培养液重悬沉淀细胞,细胞单层接种在 12 孔板中(细胞数为 1 × 10⁵ 个/孔)培养 12 h,以不同浓度(2、5、10 μmol/L)的 FAD 作用于 HCT-116 细胞,设 3 个平行复孔,并加入纯培养基设为对照组。细胞培养 48 h 后,加 0.25% 胰酶消化液消化,收集细胞,1 300 rpm 离心 5 min 后以 PBS 清洗 1

次,用预冷的 75% 乙醇 4 ℃ 固定 2 h,加入 0.25% Triton X-100 冰浴 5 min。然后 1 300 rpm 离心 5 min,用冷 PBS 洗涤细胞 1 次;用 300 μL PI(40 μg/mL,含 0.1 mg/mL RNase)染色,轻轻混匀后常温避光孵育 25 min,使用流式细胞仪检测荧光信号,每次至少检测 2 × 10⁴ 个细胞。

2.4 RT-qPCR 检测周期阻滞相关基因

不同浓度(0、2、5、10 μmol/L) FAD 作用于 HCT-116 细胞 48 h 后,收获 HCT-116 细胞,利用 Trizol 试剂盒常规提取细胞总 RNA,用 Nano drop 2000 检测 RNA 纯度和完整性。依据逆转录试剂盒说明书,合成 cDNA。Q-PCR 的反应程序:所有条带(β-actin、β-catenin、cyclin D1 和 c-Myc)的条件选择为 95 ℃、10 min;95 ℃、15 sec,60 ℃、30 sec 共 40 个循环;95 ℃、15 sec,60 ℃、1 min,95 ℃、15 sec。β-actin 的 mRNA 扩增为内参照。各基因的扩增引物如下:人源 β-catenin(前引:5'-CATCTACACAGTTTGGATGCTGCT-3',后引:5'-GCAGTTTTGTCAGTTCAGGGA-3');人源 cyclin D1(前引:5'-GCTGCCAAGTG-GAAAC CATC-3',后引:5'-CCTCCTTCTGCACACATTGAA-3');人源 c-myc(前引:5'-GTCAAGA GCGAACACACAAC-3',后引:5'-TTGGACGGA-CAGGATGTATGC-3');人源 β-actin(5'-TGACTGAC-TACCTCATGAAGAT-3',5'-CATGATGGAGTTGAAG-GTAGTT-3')。

2.5 Western blotting 检测 β-catenin、cyclin D1 和 c-myc 蛋白表达

加入不同浓度(0、2、5、10 μmol/L)的 FAD 作用于 HCT-116 细胞,24 h 后收集细胞及培养液,离心弃去上清,细胞沉淀用预冷 PBS 清洗 2 次,加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min(每 8 分钟重悬混匀 1 次),13 000 rpm 离心 20 min,取上清,BCA 法测定总蛋白含量,等量蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后,转膜,蛋白封闭后,封一抗过夜,加入二抗 2 h 后曝光显影。最后,使用 Image J 对蛋白条带的灰度值进行相对定量分析。

2.6 统计分析

所有数据采用 SPSS 20.0 统计分析软件进行分析,以($\bar{x} \pm SD$)表示,单因素方差分析组间差异。

3 结果

3.1 FAD 快速制备

经常规色谱分离,薄层色谱紫外观察及显色显示 FAD 和其同系物 OPD 无法被分离,OPD 结构鉴

定为二氢 FAD;因此,采用高效液相色谱对其分离制备,如图 1(A)所示,FAD ($t_R = 36.7 \text{ min}$)与 OPD ($t_R = 38.5 \text{ min}$)单次完成制备分离需运行 40 min,其中保留时间 $t_R = 2.1 \text{ min}$ 的色谱峰为溶解样品的甲醇溶剂峰,单次样品制备的 $t_{blank} = 36.1 \text{ min}$ 。

如果按图 1(A)所示方法制备 FAD,则耗时长,有机溶剂消耗多。图 1(B)所示,充分利用样品运行

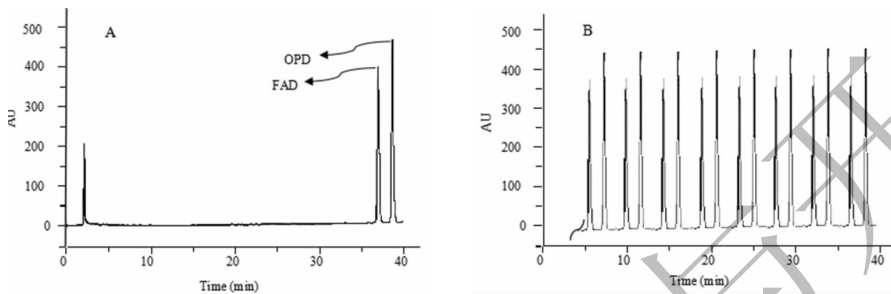


图 1 FAD 制备色谱图

Fig. 1 The preparative chromatogram of FAD

注:单次进样完整运行制备色谱图(A);重叠进样制备色谱图(B)。

Note: The preparative chromatogram of FAD with single injection (A); The preparative chromatogram of FAD with multiple injections (B).

3.2 结构鉴定

Falcarindiol 淡黄色油状物; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 5.94 (1H, ddd, $J = 17.5, 10.0, 5.9 \text{ Hz}$, H-2), 5.64 (1H, dd, $J = 17.5, 1.5 \text{ Hz}$, H-1b), 5.51 (1H, ddt, $J = 11.5, 5.0, 1.5 \text{ Hz}$, H-9), 5.47 (1H, ddt, $J = 11.5, 7.5, 1.0 \text{ Hz}$, H-10), 5.28 (1H, d, $J = 10.0 \text{ Hz}$, H-1a), 5.21 (1H, d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-8), 4.95 (1H, brd, $J = 5.0 \text{ Hz}$, H-3), 2.11 (2H, q, $J = 7.0$, H-11), 1.39 (2H, m, H-12), 1.29 (8H, m, H-13, H-14, H-15, H-16), 0.88 (3H, t, $J = 7.0$, H-17); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ_{C} 117.4 (C-1), 135.9 (C-2), 63.4 (C-3), 78.4 (C-4), 70.3 (C-5), 68.6 (C-6), 79.8 (C-7), 58.5 (C-8), 134.5 (C-9), 127.7 (C-10), 27.7 (C-11), 29.1 (C-12), 29.3 (C-13), 29.2 (C-14), 22.6 (C-15), 31.7 (C-16), 14.1 (C-17); ESI-MS: m/z 261 $[\text{M} + \text{H}]^+$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_2$)。以上数据与文献^[12]报道基本一致,鉴定化合物为 falcarindiol。

Oplopandioliol 黄色油状物; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 5.59 (1H, ddt, $J = 11.0, 7.5, 1.0 \text{ Hz}$, H-9), 5.52 (1H, t, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-10), 5.20 (1H, d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-8), 4.39 (1H, t, $J = 6.5 \text{ Hz}$, H-3), 2.09 (2H, q, $J = 7.0 \text{ Hz}$, H-11), 1.74 (2H, m, H-2), 1.39 (2H, m, H-12), 1.29 (8H, m, H-13, H-14, H-15, H-16), 1.01 (3H, t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, H-1), 0.89 (3H, t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, H-17); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ_{C} 9.4 (C-1), 30.6 (C-2), 63.9 (C-3), 79.2 (C-4), 68.9 (C-5), 68.8 (C-6), 80.8 (C-7), 58.5 (C-8), 134.5 (C-9), 127.9 (C-10), 27.8 (C-11), 29.1 (C-12), 29.4 (C-13), 29.2 (C-14), 22.6 (C-15), 31.8 (C-16), 14.1 (C-17); ESI-MS: m/z 285 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_2$)。以上数据与文献^[12]对照基本一致,确定化合物 2 为 oplopandioliol。

的空白保留时间,采用重叠多次进样操作程序,把 FAD 和 oplopandioliol (OPD) 保留时间差加上他们的半峰宽设为 $t_{f \rightarrow o} = 3.5 \text{ min}$,两次进样制备的时间差 $\Delta t = t_{blank}/n$ ($1 < n \leq$ 满足 $\Delta t > t_{f \rightarrow o}$ 最大自然数),为了保障样品纯度,本次样品制备取 $\Delta t = 4.5 \text{ min}$ ($n = 8$)。

的空白保留时间,采用重叠多次进样操作程序,把 FAD 和 oplopandioliol (OPD) 保留时间差加上他们的半峰宽设为 $t_{f \rightarrow o} = 3.5 \text{ min}$,两次进样制备的时间差 $\Delta t = t_{blank}/n$ ($1 < n \leq$ 满足 $\Delta t > t_{f \rightarrow o}$ 最大自然数),为了保障样品纯度,本次样品制备取 $\Delta t = 4.5 \text{ min}$ ($n = 8$)。

3.3 细胞毒性

FAD 对 p53 基因野生型结肠癌细胞 HCT-116 具有较强的细胞毒活性且呈现一定的时效量效关系,其与 HCT-116 细胞作用 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 8.1 ± 1.4 , 4.6 ± 0.5 和 $3.2 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$,且抑制作用强于阳性对照药 5-氟尿嘧啶。FAD 对肿瘤细胞与正常细胞毒性作用未显良好的选择性,对人正常肝细胞 (LO2) 和血管内皮细胞 (HVEC) 均显示一定的细胞毒活性,与 HCT-116 细胞作用 24 h 的 IC_{50} 值分别为 20.5 ± 2.6 和 $18.7 \pm 1.5 \mu\text{mol/L}$ 。与正常细胞相比,FAD 对癌细胞表现出更强的细胞增殖抑制作用。

3.4 细胞周期影响

FAD 作用于 HCT-116 细胞 48 h 后,对其细胞周期阻滞现象比较明显 (见图 2)。经 $2 \mu\text{mol/L}$ 的 FAD 作用 48 h 后,HCT-116 细胞周期被阻滞在 G2/

M 期比率为 $23.5\% \pm 1.2\%$ 。随着给药浓度的增加, HCT-116 细胞周期被阻滞在 G2/M 期比率由

$23.5\% \pm 1.2\%$ 上升至 $38.6\% \pm 1.8\%$, 呈现一定的浓度依赖性。

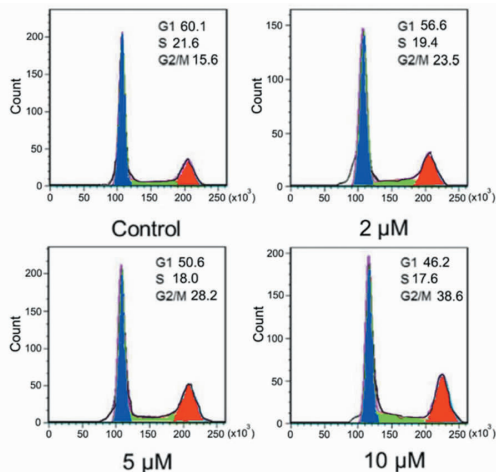


图2 流式细胞术分析 FAD 对 HCT-116 细胞周期影响

Fig. 2 Effects of FAD on cell cycle analysis of HCT-116 using flow cytometry

3.5 周期相关基因 mRNA 水平的影响

不同浓度的 FAD (2、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 作用于结肠癌细胞 HCT-116 48 h 后, 细胞中 *c-myc*、 β -catenin、*cyclin D1* 基因的表达下调, 且随着试药浓度的增加, 下调作用增强, 具体结果见图 3。

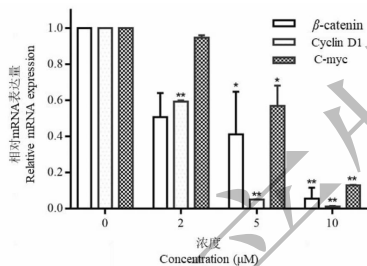


图3 FAD 对 HCT-116 细胞中 β -catenin、cyclin D1 和 *c-myc* mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effects of FAD on mRNA level of β -catenin、cyclin D1 and *c-myc* in HCT-116 cell line

3.6 周期相关蛋白表达的影响

与未处理组细胞相比, 不同浓度的 FAD (2、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 作用于结肠癌细胞 HCT-116 48 h 后, 细胞中 β -catenin 蛋白明显被抑制。同时, β -catenin 下游的蛋白 cyclin D1 和 *c-myc* 的表达也呈现下调趋势, 且随着试药浓度的增加, 下调作用增强, 具体结果见图 4。

4 讨论

天然药物在中医理论指导下用药称之为中药或中草药, 源于天然药物的天然产物是药用植物自然进化选择形成的次生代谢产物, 其结构具有化学多样性、活性多样性和类药性。临床上应用的许多药

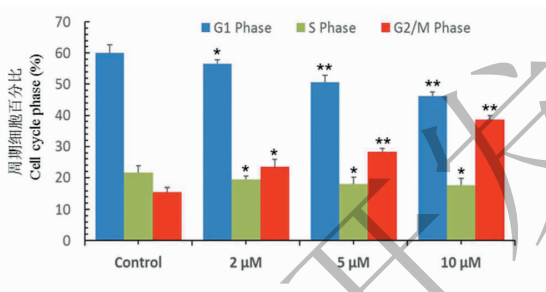


图4 FAD 对 HCT-116 细胞中 β -catenin、cyclin D1 和 *c-myc* 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of FAD on protein expression of β -catenin、cyclin D1 and *c-myc* in HCT-116 cell line

物都直接或间接来源于天然产物^[15], 从天然产物中发现具有抗肿瘤作用的药物是其有效途径之一。高纯度天然化合物的获取是天然药物开发研究的基础, 多数天然产物具有结构类似的异构体或者同系物, 对于结构差异较小的异构体或者同系物, 常规色谱分离技术很难将其完全分离, 制备高效液相色谱是将他们完全分离纯化有效手段之一, 优化制备方法, 将有助于天然产物快速高效制备, 节省有机溶剂使用, 降低环境污染。本课题以 FAD 为研究为例,

采用重叠进样,所建立的方法高效、稳定、快速,极大的缩短了样品制备时间。

细胞内外信号配合调控细胞周期,如果胞内外信号不能很好配合,细胞将不能从一个分裂期进入下一个分裂期,这种现象称为细胞周期阻滞。细胞周期阻滞有助于细胞维持自身基因的稳定性,其调控的基因突变可明显影响肿瘤的发生发展。细胞周期阻滞有助于细胞提供额外的时间用于修复损伤,从而减少突变的进一步发生,避免肿瘤恶化与发展。课题组前期研究发现可以抑制结肠癌细胞 HCT-116 的增殖及阻滞其细胞周期^[16,17],但其周期阻滞的相关基因的表达并未被阐明,本研究发现其可能通过影响 Wnt/ β -catenin 信号通路中 β -catenin 蛋白的表达,进而下调 cyclin D1 和 c-myc 蛋白表达。研究结果表明,不同浓度的 FAD (2.5、10 $\mu\text{mol/L}$) 作用于结肠癌细胞 HCT-116 48 h 后,可明显下调 β -catenin 蛋白及其下游蛋白 cyclinD1 和 c-myc 的表达,从而使肿瘤细胞周期被阻滞和增殖被抑制。

东北刺人参与中主要含有皂苷类成分,而其根和茎中主要含有苯丙素、木脂素及炔醇类成分^[18,19],其中炔醇是其抗结肠癌活性的药效成分。FAD 是首次从刺人参与中发现具有 (3*S*,8*S*)-立体结构的炔醇,而从伞形科植物中发现的主要是 (3*R*,8*S*)-FAD,而后者抗肿瘤活性未见相关报道。本研究建立东北刺人参与 FAD 快速高效的制备 HPLC 纯化方法。并探讨其结肠癌细胞 HCT-116 具有细胞毒活性作用机制,FAD 对结肠癌细胞 HCT-116 具有较强的细胞毒活性,且能对其细胞周期产生阻滞作用,其机制可能与调控 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

参考文献

- Shridhar R, Shibata D, Chan E, et al. Anal cancer: current standards in care and recent changes in practice [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65: 139-162.
- Kane HL, Halpern MT, Squiers LB, et al. Implementing and evaluating shared decision making in oncology practice [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64: 377-388.
- Kekeya H. Natural products-prompted chemical biology: phenotypic screening and a new platform for target identification [J]. Nat Prod Rep, 2016, 33: 648-654.
- Wong AST, Che CM, Leung KW. Recent advances in ginseng as cancer therapeutics: a functional and mechanistic overview [J]. Nat Prod Rep, 2015, 32: 256-272.
- Huang WH, Zhang QW, Yuan CS, et al. Chemical constituents of the plants from the genus *Oplopanax* [J]. Chem Biodivers, 2014, 11: 181-196.
- Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG, et al. *Oplopanax elatus* (Nakai) Nakai: chemistry, traditional use and pharmacology [J]. Chin J Nat Med, 2014, 12: 721-729.
- Hung K, Hu XR, Maimone TJ. Total synthesis of complex terpenoids employing radical cascade processes [J]. Nat Prod Rep, 2018, 35(2): 174-202.
- Hautbergue T, Jamin EL, Debrauwer L, et al. From genomics to metabolomics, moving toward an integrated strategy for the discovery of fungal secondary metabolites [J]. Nat Prod Rep, 2018, 35: 147-173.
- Huang WH, Yang J, Zhao J, et al. Quantitative analysis of six polyynes and one polyene in *Oplopanax horridus* and *Oplopanax elatus* by pressurized liquid extraction and on-line SPE-HPLC [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 53: 906-910.
- Li Y, Yin XL, Dai MJ. Catalytic macrolactonizations for natural product synthesis [J]. Nat Prod Rep, 2017, 34: 1185-1192.
- Shao L, Nie MK, Chen MY, et al. Screening and identifying antioxidants from *Oplopanax elatus* using 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl with off-line two-dimensional HPLC coupled with diode array detection and tandem time-of-flight mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2016, 39: 4269-4280.
- Meng LZ, Huang WH, Wang CZ, et al. Anticancer activities of polyynes from the root bark of *Oplopanax horridus* and their acetylated derivatives [J]. Molecules, 2014, 19: 6142-6162.
- Kimelman D, Xu W. β -catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective [J]. Oncogene, 2006, 25: 7482-91.
- Shim, AR, Dong GZ, Lee HJ, et al. Atractylochromene is a repressor of Wnt/ β -catenin signaling in colon cancer cells. [J]. Biomol Ther (Seoul), 2015, 23: 26-30.
- Pham D, Koide K. Discoveries, target identifications, and biological applications of natural products that inhibit splicing factor 3B subunit 1 [J]. Nat Prod Rep, 2016, 33: 637-647.
- Jin HR, Zhao J, Zhang Z, et al. The antitumor natural compound falcariindiol promotes cancer cell death by inducing endoplasmic reticulum stress [J]. Cell Death Dis, 2012, 3: e376.
- Wang CZ, Zhang ZY, Huang WH, et al. Identification of potential anticancer compounds from *Oplopanax horridus* [J]. Phytomedicine, 2013, 20: 999-1006.
- Shao L, Wang J, Luo W, et al. Chemical constituents from *Oplopanax elatus* [J]. J Chin Med Mat (中药材), 2017, 40: 2331-2334.
- Shao L, Wang J, Chen MY, et al. Phenolic glycosides from root of *Oplopanax elatus* [J]. Chin Trad Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 4620-4625.