

分类号：  
学号：20212115023

密级：内部★1年  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 乌拉尔大戟有效部位的分离及其 耐药逆转活性研究

学位申请人	丁一娜
指导教师	韩博 教授 其曼古丽·吐尔洪 副教授
申请学位门类级别	药学硕士
学科、专业名称	药学
研究方向	新疆天然药物资源的开发与 应用
所在学院	药学院

中国·新疆·石河子  
2024年7月



分类号：  
学 号：20212115023

密 级：内部 ★1 年  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### 乌拉尔大戟有效部位的分离及其 耐药逆转活性研究

学 位 申 请 人	丁一娜
指 导 教 师	韩博 教授 其曼古丽·吐尔洪 副教授
申请学位门类级别	药学硕士
学 科 、 专 业 名 称	药学
研 究 方 向	新疆天然药物资源的开发与 应用
所 在 学 院	药学院

中国·新疆·石河子  
2024 年 7 月



**Studies on the Chemical Constituents of the branches of black  
mulberry (*Morus nigra* L.)**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Pharmacy**

By

**Ding Yi-na**

**Development and application of characteristic plant medicinal herbs  
in Xinjiang**

Dissertation Supervisor: Prof.Han Bo and A.P.Qi chimengul turghun

July, 2024



# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：

丁-娜

时间：2024 年 7 月 10 日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：

丁-娜

时间：2024 年 7 月 10 日

导师签名：

艾曼古力·阿不都

时间：2024 年 7 月 10 日



# 目录

摘要.....	IV
ABSTRACT.....	VI
中英文缩略词表.....	VIII
前言.....	1
第 1 章 综述.....	3
1.1 MDR 的介绍.....	3
1.2 天然产物中部分具有 MDR 逆转活性的成分.....	4
1.2.1 生物碱类化合物.....	4
1.2.2 黄酮类、酚类化合物.....	4
1.2.3 萜类化合物.....	5
1.2.4 木质素、香豆素类化合物.....	5
1.3 新疆特有大戟属植物中 MDR 逆转活性成分研究现状.....	7
1.3.1 准噶尔大戟.....	8
1.3.2 对叶大戟.....	13
1.3.3 粗根大戟.....	15
1.3.4 密花大戟.....	16
1.3.5 小果大戟.....	18
1.3.6 大戟脂.....	19
1.5 小结与讨论.....	22
第 2 章 乌拉尔大戟有效部位的分离及化学成分研究.....	23
2.1 活性导向法筛选乌拉尔大戟有效部位.....	23
2.1.1 实验方法.....	23
2.1.2 结果与讨论.....	27
2.2 乌拉尔大戟有效部位的化学成分研究.....	31
2.2.1 实验方法.....	31
2.2.2 结果与讨论.....	34
2.3 石油醚部位的 GC-MS 分析.....	57
2.3.1 实验方法.....	57
2.3.2 结果与讨论.....	57
2.4 本章小结.....	59
第 3 章 部分单体化合物 MDR 逆转活性评价.....	60

3.1 实验方法 .....	60
3.1.1 细胞毒性 .....	60
3.1.2 MDR 逆转活性 .....	60
3.1.3 Hoechst 33258 核染色检测细胞凋亡 .....	60
3.1.4 数据统计与分析 .....	61
3.2 结果与讨论 .....	61
3.2.1 细胞毒性 .....	61
3.2.2 MDR 逆转活性 .....	61
3.2.3 Hoechst 33258 核染色检测细胞凋亡 .....	65
3.3 本章小结 .....	66
第 4 章 新疆特有大戟属植物中的 MDR 逆转活性成分预测 .....	67
4.1 实验方法 .....	67
4.1.1 实验仪器、试剂与细胞 .....	67
4.1.2 网络药理学 .....	68
4.1.3 分子对接 .....	69
4.1.4 细胞实验 .....	69
4.2 结果与讨论 .....	70
4.2.1 新疆特有大戟属植物的活性成分 .....	70
4.2.2 网络药理学分析 .....	74
4.2.3 分子对接 .....	79
4.2.4 化合物的 MDR 逆转活性 .....	82
4.3 本章小结 .....	84
第 5 章 EUD-17 和 D37 逆转肿瘤细胞 MDR 的作用机制研究 .....	86
5.1 实验方法 .....	86
5.1.1 实验材料 .....	86
5.1.2 分子对接 .....	88
5.1.3 分子动力学模拟 .....	88
5.1.4 化合物 EUD-17 和 D37 对 ABCB1 蛋白表达水平的影响 .....	89
5.1.5 化合物 EUD-17 和 D37 对细胞内罗丹明 123 蓄积的影响 .....	91
5.1.6 数据统计与分析 .....	91
5.2 结果与讨论 .....	91
5.2.1 分子对接 .....	92
5.2.2 分子动力学模拟 .....	92
5.2.3 化合物 EUD-17 和 D37 对 ABCB1 蛋白表达水平的影响 .....	96

5.2.4 化合物 EUD-17 和 D37 对 MCF-7/ADR 细胞内罗丹明 123 蓄积的影响	97
5.3 本章小结	98
第 6 章 全文总结与讨论	99
6.1 全文总结与讨论	99
6.1.1 乌拉尔大戟有效部位的分离及化学成分研究	99
6.1.2 单体化合物 MDR 逆转活性评价	99
6.1.3 新疆特有 大戟属植物中的 MDR 逆转活性成分预测	100
6.1.4 EUD-17 和 D37 逆转肿瘤细胞 MDR 的作用机制研究	101
6.2 展望	101
6.3 创新点	102
参考文献	103
附录	114
致谢	136
作者简介	1
石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表	138

## 摘要

### 目的:

(1) 以多药耐药 (MDR) 逆转活性为导向, 从乌拉尔大戟中分离有效部位和活性成分, 以填补该植物化学成分和生物活性研究的空白。

(2) 结合计算机虚拟筛选与体外实验, 预测新疆特有大戟属植物中潜在的 MDR 逆转活性成分, 为新疆特有大戟属植物的开发与应用提供参考。

### 方法:

(1) 使用硅胶柱、凝胶柱色谱, 快速制备液相色谱、半制备液相色谱等技术分离乌拉尔大戟有效部位和活性成分。利用一维、二维核磁, 紫外, 红外, 高分辨质谱等现代光谱技术鉴定化合物的结构, 并利用 GC-MS 法分析石油醚部位的化学成分。采用 CCK-8 法检测有效部位和化合物的 MDR 逆转活性。

(2) 通过网络药理学构建新疆特有大戟属植物与 MDR 之间的“C-T”网络和“C-T-P”网络, 获取核心成分和关键靶点, 并利用分子对接分析其结合位点及亲和力。采用 CCK-8 法验证预测成分的 MDR 逆转活性。

(3) 对于分离和筛选到的活性成分, 使用分子动力学模拟探究活性成分与核心靶蛋白间的分子作用机制, 并通过 Western Blotting 和 Rh123 蓄积实验分析其发挥 MDR 逆转作用的途径。

### 结果:

(1) 乌拉尔大戟有效部位为二氯甲烷部位 (Fr-E) 和 Fr-E-3 流份, 从中分离鉴定了 17 个单体化合物, 包括 1 个新化合物:  $3\beta$ -(2''-dehydroxy-3''-methyl-L-rha)-12 $\beta$ -[(3',4'-trimethyl-1-oxo-2-pentenyl)oxy]-17 $\alpha$ -acetyl-8 $\beta$ ,14 $\beta$ -dihydroxypregn-10 $\beta$ ,13 $\beta$ -dimethyl-9 $\alpha$ -hydrogen-5-en-20-one (EUD-1)。16 个已知化合物: (+)-loliolide (EUD-2)、ginsinsene (EUD-3)、Betulin (EUD-4)、(24R)-24-Ethylcholest-4-en-3one (EUD-5)、(-)- $\beta$ -Sitosterol (EUD-6)、Oleanolic acid (EUD-7)、邻苯二甲酸二丁酯 (EUD-8)、2-甲基己基-戊基-对苯二酸酯 (EUD-9)、邻苯二甲酸-2-己酯 (EUD-10)、正二十四烷酸 (EUD-11)、2,6,10,14-tetramethyl-18-butanecarboxy-methylene-henecos-12-en-17 $\beta$ -ol (EUD-12)、十八烷酸 (EUD-13)、4-羟基苯甲醛 (EUD-14)、Naringenin (EUD-15)、Liquiritigenin (EUD-16)、punigratane (EUD-17)。同时, 通过 GC-MS 法从石油醚部位中鉴定了 22 个化学成分, 主要包括三萜, 脂肪酸, 长链脂肪烃等类型。在这些化合物中, EUD-1、EUD-2、EUD-15 和 EUD-17 展现出良好的 MDR 逆转活性, 其中 EUD-17 的活性最佳 (RF=3.5)。

(2) 网络药理学结果表明, 新疆特有大戟属植物化合物库中有 38 个活性成分通过成药性筛选, 共获得活性成分潜在靶基因 388 个, MDR 相关基因 1732 个, 其中成分-疾病交集靶点 183 个。排名前 5 的核心靶点蛋白分别为: ABCB1、ABCG2、MAPK3、AGTR1、STAT3。GO 及 KEGG 富集分析结果显示, 新疆特有大戟属植物主要通过细胞凋亡、抗叶酸抗性、胰腺癌、ErbB 等信号通路发挥 MDR 逆转活性。分子对接结果显示, 核心成分 D37、D38 与核心靶蛋白之间结合能良好, 且化合物 D37 的 MDR 逆转活性较为显著 (RF=2.8)。

(3) 分子动力学模拟结果表明, 化合物 EUD-17、D37 和核心蛋白 ABCB1 通过氢键、疏水作用和  $\pi$ - $\pi$  堆积等与多个氨基酸结合, 结合能分别为: EUD-17-ABCB1 (-6.1 kcal/mol)、D37-ABCB1 (-8.9 kcal/mol)。Western Blotting 结果显示, EUD-17 和 D37 没有改变 ABCB1 蛋白的表达。Rh123 蓄积实验结果表明, EUD-17 和 D37 能够显著增加 ABCB1 蛋白底物 Rh123 的积累。

### 结论:

(1) 从乌拉尔大戟有效部位 (Fr-E 和 Fr-E-3) 中分离鉴定了 17 个化合物 (1 个新化合物), 包括三萜、黄酮、甾体、生物碱和脂肪酸类等类型。所有单体化合物均为首次从乌拉尔大戟中分离得到。其中, 化合物 EUD-17 的 MDR 逆转活性最佳。

(2) 结合计算机虚拟筛选与体外实验, 预测了新疆特有大戟属植物中的 MDR 逆转活性成分, 其中, 化合物 D37 的 MDR 逆转活性较强, 且两者之间结合能良好, 结合稳定。

(3) 化合物 EUD-17、D37 与 ABCB1 蛋白之间结合能良好, 结合稳定。主要通过影响 ABCB1 蛋白的功能发挥 MDR 逆转作用。

**关键词:** 乌拉尔大戟; 耐药逆转活性; 有效部位; 分离纯化; 计算机虚拟筛选

## Abstract

### Objective:

(1) In order to fill the gap in the study of chemical composition and biological activity of this plant, multidrug resistance (MDR) reversal activity was oriented to isolate the active parts and active constituents from *Euphorbia uralensis*.

(2) Combining computer virtual screening and in vitro experiments, to predict the potential MDR reversal active components in Xinjiang endemic *Euphorbiaceae*, and to provide theoretical basis for the development and application of Xinjiang endemic *Euphorbiaceae*.

### Methods:

(1) Using Silica gel column chromatography, Silica gel column chromatography, Flash chromatography, Semi-Preparative HPLC and other techniques to separate the effective parts and active ingredients of *Euphorbia uralensis*. Structural identification of compounds using modern spectroscopic techniques such as 1D and 2D NMR, Ultraviolet and Visible Spectrum (UV), Fourier Transform infrared spectroscopy (FT-IR) and High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS). The CCK-8 method was used to detect the MDR reversal activity of the active site and the single compounds.

(2) Construction of “C-T” and “C-T-P” networks between Xinjiang endemic *Euphorbiaceae* and MDR through network pharmacology to obtain core components and key targets, and analysed their binding sites and affinities using molecular docking. The CCK-8 method was used to validate the MDR reversal activity of the predicted components.

(3) For the isolated and screened active ingredients, Molecular Dynamics (MD) were used to explore the molecular mechanism of action, and the pathways by which they exerted MDR reversal effects were analysed by Western Blotting and Rh123 accumulation assays.

### Results:

(1) The effective parts of *Euphorbia uralensis* were dichloromethane extract (**Fr-E**) and **Fr-E-3** stream, from which 17 monomer compounds were isolated and identified, including one new compound: 3 $\beta$ -(2''-dehydroxy-3''-methyl-L-rha)-12 $\beta$ -[(3',4'-trimethyl-1-oxo-2-pentenyl)oxy]-17 $\alpha$ -acetyl-8 $\beta$ , 14 $\beta$ -dihydroxypregn-10 $\beta$ ,13 $\beta$ -dimethyl-9 $\alpha$ -hydrogen-5-en-20-one (EUD-1). 16 known compounds: (+)-loliolide (EUD-2), ginsinsene (EUD-3), Betulin (EUD-4), (24R)-24-Ethylcholest-4-en-3one (EUD-5), (-)- $\beta$ -Sitosterol (EUD-6), Oleanolic acid (EUD-7), Dibutyl Phthalate (EUD-8), 2-methylhexyl-pentyl-terephthalate (EUD-9), Dihexyl phthalate (EUD-10), tetracosanoic acid (EUD-11), 2,6,10,14-tetramethyl-18-butanoic acid (EUD-12), octadecanoic acid (EUD-13), P-Hydroxy benzaldehyde (EUD-14), Naringenin (EUD-15), Liquiritigenin (EUD-16), Punigratane (EUD-17). Meanwhile, 22 chemical components including Triterpenoids, fatty acids, and long-chain aliphatic hydrocarbons were identified from the petroleum ether site by GC-MS. Among these compounds, EUD-1, EUD-2, EUD-15 and EUD-17 exhibited good MDR reversal activity, with EUD-17 showing the best activity (RF=3.5).

(2) The results of network pharmacology showed that 38 active ingredients in the compound library of Xinjiang endemic *Euphorbiaceae* were screened for their pharmacological properties. We obtained 388 potential target genes for active ingredients and 1732 MDR related genes, including 183 targets at the ingredient-disease interface. The top 5 core target proteins were ABCB1, ABCG2, MAPK3, AGTR1, and STAT3. GO and KEGG enrichment analyses showed that Xinjiang endemic

ic *Euphorbiaceae* exerted its MDR-reversal activity mainly through apoptosis, antifolate resistance, pancreatic cancer, ErbB and other signalling pathways. The molecular docking results showed good binding energy between the core components **D37** and **D38** and the core target proteins, and the MDR reversal activity of compound **D37** was more significant (RF=2.8).

(3) Compounds **EUD-17**, **D37** and the core protein ABCB1 bind to several amino acids through hydrogen bonding, hydrophobic interactions and  $\pi$ - $\pi$  stacking, The binding energies were EUD-17-ABCB1 (-6.1 kcal/mol) and D37-ABCB1 (-8.9 kcal/mol). In addition, **EUD-17** and **D37** did not alter ABCB1 protein expression, but were able to increase the accumulation of the ABCB1 protein substrate Rh123 with significant effects.

#### Conclusion:

(1) Seventeen compounds, including triterpenoids, flavonoids, steroids, alkaloids and fatty acid analogues, were isolated and identified from the effective parts (**Fr-E** and **Fr-E-3**) of *Euphorbia uralensis*. All the monomer compounds were isolated for the first time from *Euphorbia uralensis*. Among them, compound **EUD-17** showed the best MDR reversal activity.

(2) Combining computer virtual screening and in vitro experiments, the MDR-reversing active components in Xinjiang endemic *Euphorbiaceae*. Among them, compound **EUD-17** showed the best MDR reversal activity.

(3) Compounds **EUD-17** and **D37** have good binding energy and stable binding with ABCB1 protein. It mainly exerts MDR reversal effect by affecting the function of ABCB1 protein..

**Keywords:** *Euphorbia uralensis*; Multidrug resistance reversal activity; active site; isolation and purification; computer virtual screening

## 中英文缩略词表

### Abbreviation

英文缩写	英文全称	中文译名
ABCB1	P-GlycoProtein	p-糖蛋白
BC	Betweenness centrality	中心度值
CC	Closeness centrality	紧密中心度值
C-T 网络	Component-Target	成分-靶点网络
C-T-P 网络	Component-Target-Pathway	成分-靶点-通路网络
CCK-8	Cell Counting Kit-8	细胞增殖/毒性检测试剂盒
DOX	Doxorubicin	阿霉素
DL	Druglikeness	类药性
DC	Degree centrality	度值
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砷
FT-IR	Fourier Transform Infrared Radiation	傅里叶变换红外光谱
FAS	Fatty Acid Synthase	脂肪酸合成酶
GST	Glutathione S-transferase	谷胱甘肽 S-转移酶
GO	Gene Ontology	基因本体
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation	异核单量子相关谱
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	异核多键相关
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	京都基因与基因组百科全书
LDL	Low-density lipoprotein	低密度脂蛋白