

军事医学科学院研究生学位论文独创性声明

秉承军事医学科学院严谨的学风和科研作风,本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下独立进行的研究工作和取得的研究成果,除了文中特别加以标注和致谢之处外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果,也不包含为获得**军事医学科学院**或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志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了谢意。

论文作者签字: 高楠 签字日期: 2006 年 5 月 29 日

军事医学科学院研究生学位论文授权使用授权书

本学位论文作者完全了解**军事医学科学院**有关保留、使用学位论文的规定。特授权**军事医学科学院**可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编以供查阅和借阅。同意将本学位论文的复印件和磁盘送交国家有关部门和机构。

(保密学位论文在解密后适用本授权书)

论文作者签字: 高楠 签字日期: 2006 年 5 月 29 日

指导教师签字: 张永林 签字日期: 2006 年 5 月 29 日

中文摘要

I 放线菌 1146 活性代谢产物的跟踪分离及结构鉴定

微生物是许多活性天然产物的重要来源。微生物代谢产物化学结构多样性和复杂性对发现新药有重要价值。寻找具有特殊生物活性的微生物代谢物是一项有意义的工作。

本实验选用我国边远地区土壤放线菌 1146 菌，筛选具有选择性抑制 K562 细胞生长的微生物代谢物。通过九种培养基发酵对比筛选培养基，菌种大规模发酵、乙酸乙酯提取、正反相硅胶柱层析和高效液相色谱等方法，进行代谢产物活性跟踪分离。对分离得到的化合物结合理化性质、质谱数据和核磁共振数据进行结构鉴定，推断化合物的结构。

通过九种培养基发酵对比，挑选出第四号培养，菌种大规模发酵，提取物采用活性跟踪分离手段，分离出一种主要活性成分，经结构鉴定为放线菌素 D。另外还对其它成分进行了分离、鉴定，分别得到大豆素、染料木素和苯乙酰胺。

关键词：土壤放线菌；有效成分；分离；结构鉴定

II 荨麻药材质量研究

荨麻(*Urtica L.*)为荨麻科、荨麻属植物，具有抗炎、镇痛及抑制前列腺增生等药理活性，研究发现其很多药理作用可归于水溶性多糖成分。关于荨麻的质量控制尚无明确性、定量指标，为了更好地开展对荨麻的开发和利用，我们对荨麻药材的质量标准进行了研究。

本实验对不同产地荨麻（内蒙、贵州、湖南）的多糖含量进行比较，对贵州荨麻根药材按药典对其进行各项目检测（水分、水溶性浸出物、总灰分和酸不溶性灰分、重金属含量），并对贵州荨麻多糖抗炎活性进行研究，

不同产地荨麻根多糖含量对比结果表明贵州荨麻根多糖含量最高为 60.45%；贵州荨麻根药材各项目检测其中水分含量为 7.1%，水溶性浸出物含量为 8.6%，总灰

分含量为 11.7%，酸不溶性灰分含量为 1.7%，重金属含量不超过 0.03%；荨麻多糖抗炎活性研究结果显示荨麻多糖对角叉菜胶引起的急性炎症过程具有明显的抑制作用，并呈剂量效应关系。

关键词：荨麻；多糖；抗炎；角叉菜胶

ABSTRACT

I Isolation and Structure Identification of Active Compounds from Soil

Actionmycetes 1146

Microorganisms are an important resource for biological compounds. The structural diversity and complexity of microbial secondary metabolites play an important role in exploitation for drugs development. The discovery of active metabolites is a meaningful work.

In this paper we isolated active compounds from soil actinomycete No. 1146 collected in Yunnan Porvince for suppression on K562 cell growth. Firstly we compared nine different culture media and selected No.4 medium for fermentation in large volume and the fermentation broth was extracted with ethyl acetate and separated by silica gel column chromatography and RP HPLC. Structures of these compounds were further identified by physicochemical characteristics, MS and NMR.

The main active compound isolated was identified to be actinomycin D. Other compounds were identified to be genistin, daidzein and phenylacetamide respectively.

Key Words: soil actinomycetes; active compound; K562 cell line; chromatography; structure identification

II Quality Study on Medical Material of *Urtica cannabina* L.

Urtica L. has been widely used as folk medicine for a long history. Recent studies show that *Urtica* L. extracts have anti-inflammatory, analgesic effects and inhibition of benign prostatic hyperplasia(BPH). The main active components have been reported to be polysaccharides.

In this paper we quantitatively compared polysaccharide content in different species

collected from Hunan, Neimeng and Guizhou and determined some quality items according to Chinese Pharmacopoeia. Anti-inflammatory effect of polysaccharide extracted from roots of *Urtica cannabina* L. was also tested.

The results showed polysaccharide content of *Urtica cannabina* L. collected from Guizhou was 60.45%, higher than other *Urtica* L. collected from Neimeng and Hunan. The moisture content of *Urtica cannabina* L. roots was 7.1%, ash content of roots was 11.7% and ash content undissolved in acid was 1.7%, water extracts was 8.6%, heavy metal content was below 0.03‰. Polysaccharide of *Urtica cannabina* L. also had a significant dose-dependence inhibition on rat inflammation caused by carrageenin.

Key Words: *Urtica cannabina* L.; polysaccharides; Pharmacopoeia; anti-inflammatory

目 录

军事医学科学院研究生学位论文独创性声明及军事医学科学院研究生学位论文授权使用授权书

中文摘要

英文摘要

第 I 篇 放线菌 1146 活性代谢产物跟踪分离和结构鉴定：引言

1. 微生物生物多样性

2. 微生物代谢产物复杂性

3. 海洋微生物及代谢产物

4. 微生物菌种分离与培养

5. 微生物代谢产物分离与鉴定

6. 本课题的研究目的及研究方法

第 I 篇放线菌 1146 活性代谢产物跟踪分离和结构鉴定：第一章放线菌株 1146 代谢产物的活性筛选

1. 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.2 供试土壤放线菌

1.3 供筛选样品的制备

1.4 细胞培养及 MTT 法(四甲基偶氮唑盐比色法)

2. 结果与讨论

第 I 篇放线菌 1146 活性代谢产物跟踪分离和结构鉴定：第二章放线菌 1146 培养基的筛选和大规模发酵

1. 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.2 放线菌 1146 培养基的筛选

1.2.1 放线菌 1146 的发酵

1.2.2 放线菌 1146 发酵液的提取

1.3 放线菌 1146 大规模发酵及菌液提取

1.3.1 放线菌 1146 大规模发酵

1.3.2 发酵液的提取

2. 结果与讨论

2.1 放线菌 1146 培养基的筛选

2.2 放线菌 1146 大规模发酵及菌液提取

第 I 篇放线菌 1146 活性代谢产物跟踪分离和结构鉴定：第三章活性代谢产物跟踪分离

1. 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.2 活性成分跟踪分离

2. 结果与讨论

2.1 放线菌 1146 代谢产物的提取分离流程

2.2 分离出的代谢产物

□第 I 篇放线菌 1146 活性代谢产物跟踪分离和结构鉴定：第四章化合物结构鉴定

- 1. 仪器
- 2. 化合物结构鉴定
 - 2.1 活性化合物的结构鉴定
 - 2.2 其它化合物的结构鉴定
- 3. 讨论
 - 3.1 放线菌素 D 的结构特点
 - 3.2 放线菌素 D 作用机制
 - 3.3 放线菌素 D 的临床用途

□第 I 篇 放线菌 1146 活性代谢产物跟踪分离和结构鉴定：本篇结论

□第 II 篇 荨麻药材质量研究：引言

- 1. 荨麻属植物的研究概况
 - 1.1 抑制前列腺增生
 - 1.2 抗炎、抗过敏、镇痛作用
 - 1.3 强免疫功能、抗病毒
 - 1.4 降血糖、降血压
 - 1.5 护肝、降血脂
- 2. 本课题的研究目的及研究方法

□第 II 篇荨麻药材质量研究：第一章不同产地荨麻多糖含量测定

- 1. 材料与方法
 - 1.1 三种不同产地不同种荨麻总糖的提取流程
 - 1.2 总糖含量测定
 - 1.3 3, 5 二硝基水杨酸比色法分析单糖含量 (DNS)
- 2. 结果与讨论

□第 II 篇荨麻药材质量研究：第二章贵州荨麻根药材各项指标的测定

- 1. 材料与方法
 - 1.1 荨麻根水分的测定
 - 1.2 荨麻根水溶性浸出物的测定
 - 1.3 荨麻根总灰分及酸不溶性灰分的测定
 - 1.4 荨麻根重金属的测定
- 2. 结果与讨论

□第 II 篇荨麻药材质量研究：第三章麻叶荨麻多糖对角叉菜胶诱发大鼠足爪肿胀的抑制作用

- 1. 材料与方法
- 2. 疗效评定
- 3. 数据处理
- 4. 实验结果
- 5. 讨论

□第 II 篇 荨麻药材质量研究：本篇结论

□参考文献

□附录 1 化合物光谱图

□附录二 研究生期间发表的文章

□致谢

长的微生物代谢活性成分。本实验研究内容包括：

- 活性放线菌 1146 的筛选
- 放线菌 1146 培养基筛选
- 大规模发酵，菌液经乙酸乙酯提取，采用色谱技术对粗提物进行生物活性跟踪分离
- 采用核磁共振、质谱等技术对活性化合物进行结构鉴定
- 对其它代谢物进行分离和结构鉴定

第一章放线菌株 1146 代谢产物的活性筛选

1、材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器:

FD-1 型冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司);

GH 型隔水培养箱 (天津市泰斯特仪器有限公司);

Elx800 型酶标仪 (BIO-TEK);

ph211 酸度离子测定仪 (北京哈纳科仪科技有限公司);

高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂);

HZ 系列恒温振荡器培养箱 (中国太仓市实验设备厂);

CJT 型洁净工作台 (北京昌平长城空气净化设备工程公司)

1.1.2 培养基:

可溶性淀粉 1% (北京化学试剂公司), 葡萄糖 2% (北京化学试剂公司), 牛肉浸膏 0.1% (北京奥博星生物技术公司), 酵母提取物 0.4% (Merck 公司), NaCl 0.2% (北京化学试剂公司), K_2HPO_4 0.025% (北京化学试剂公司), $CaCO_3$ 0.2% (北京化学试剂公司); PH=7.2

1.1.3 试剂:

无水乙醇; 二甲基亚砜 (DMSO, 为 Sigma 公司产品); 长春新碱 (上海华联制药有限公司); 噻唑蓝 (MTT, 华美公司)

1.2 供试土壤放线菌

从云南等地区收集土壤, 按文献方法进行分离克隆单株放线菌, 菌株编号后冻存于本实验室。

1.3 供筛选样品的制备

从斜面琼脂培养基中取少量菌落。放入 5ml 装有培养基的试管中, 室温下于培养箱培养 3~4d 后, 向试管中加入 5ml 无水乙醇。放置过夜, 离心收集上清液, 冻存于 -20℃。各取一定体积的上述乙醇溶液, 预置 96 孔板后, 置于减压干燥器中减压

真空抽去乙醇后，冷冻干燥后除去水液供筛选(图 1-1)。

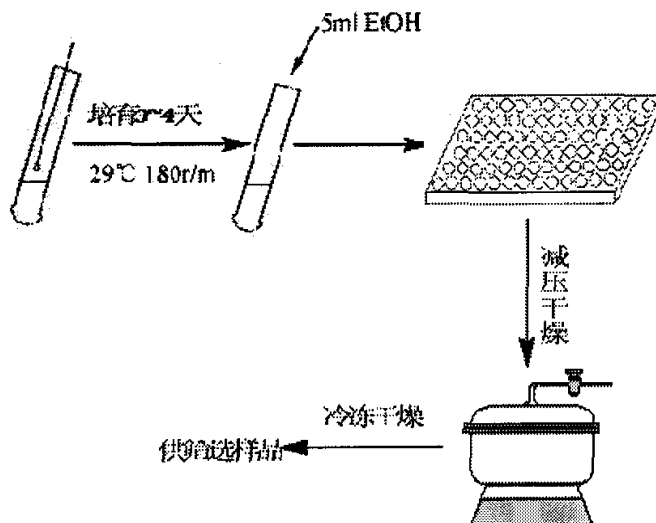


图 1-1 筛选样品的制备流程

1.4 细胞培养及 MTT 法（四甲基偶氮唑盐比色法）：

不同浓度提取物加入格列卫耐药 K562 细胞和 Vero 细胞系中用含 10% 小牛血清 PRMI-1640 培养液，37℃，5%CO₂ 培养箱中培育 72 小时后，加入 20 μl MTT 溶液，继续孵育 4 小时，吸去细胞悬液，加入 120 μl DMSO 溶解沉淀物，酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定其光吸收值。每一样品浓度为三孔，阳性对照为长春新碱（n=3）。

2、结果与讨论：

我国云南地区的生物物种具有独特的地方性和未被破坏性，所以我们选取该地区土壤放线菌进行筛选。放线菌样品经过采集、分离、培养，使用 MTT 方法进行测定代谢产物抑制格列卫耐药 K562 细胞活性。MTT 法是一种检测细胞存活和生长的方法。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的四唑盐还原为难溶性的蓝紫色结晶物，并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。二甲亚砜（DMSO）能溶解细胞中的四唑盐紫色结晶物，用酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定其光吸收值，

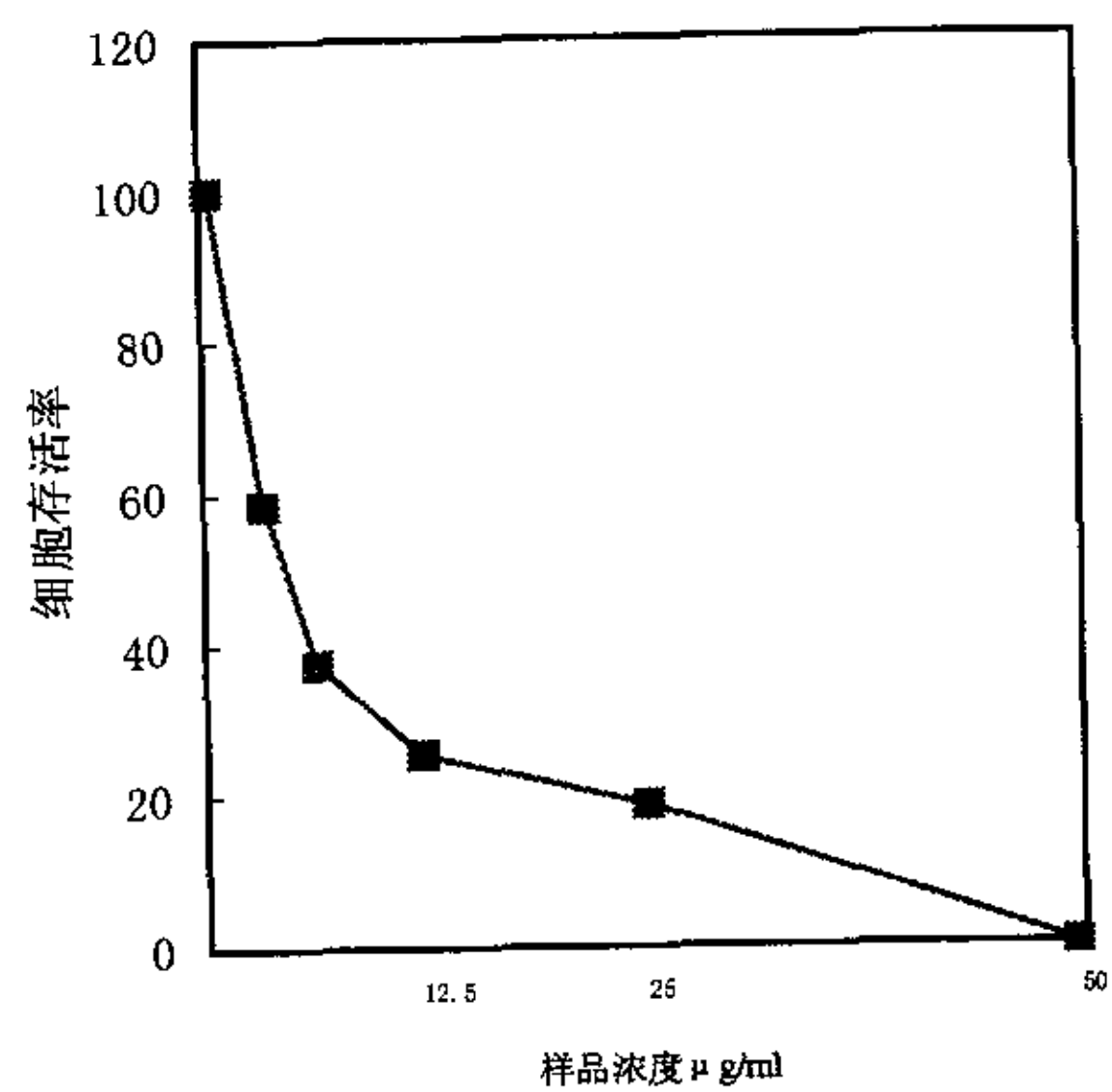


图 2-3 放线菌 1146 提取物对格列卫耐药 K562 细胞的抑制活性

图 2-6 GN-II-33A 液相分析图

Kromasil™ C18 分析柱 (150×4.6mm, 5μm), 流动相: 甲醇-水 (1.5: 1), 检测波长: UV254nm

2.2.4 馏分 GN-II-26C 经反相柱层析, 高效液相制备得到 GN-II-34A (8mg), 液相分析见图 2-7。

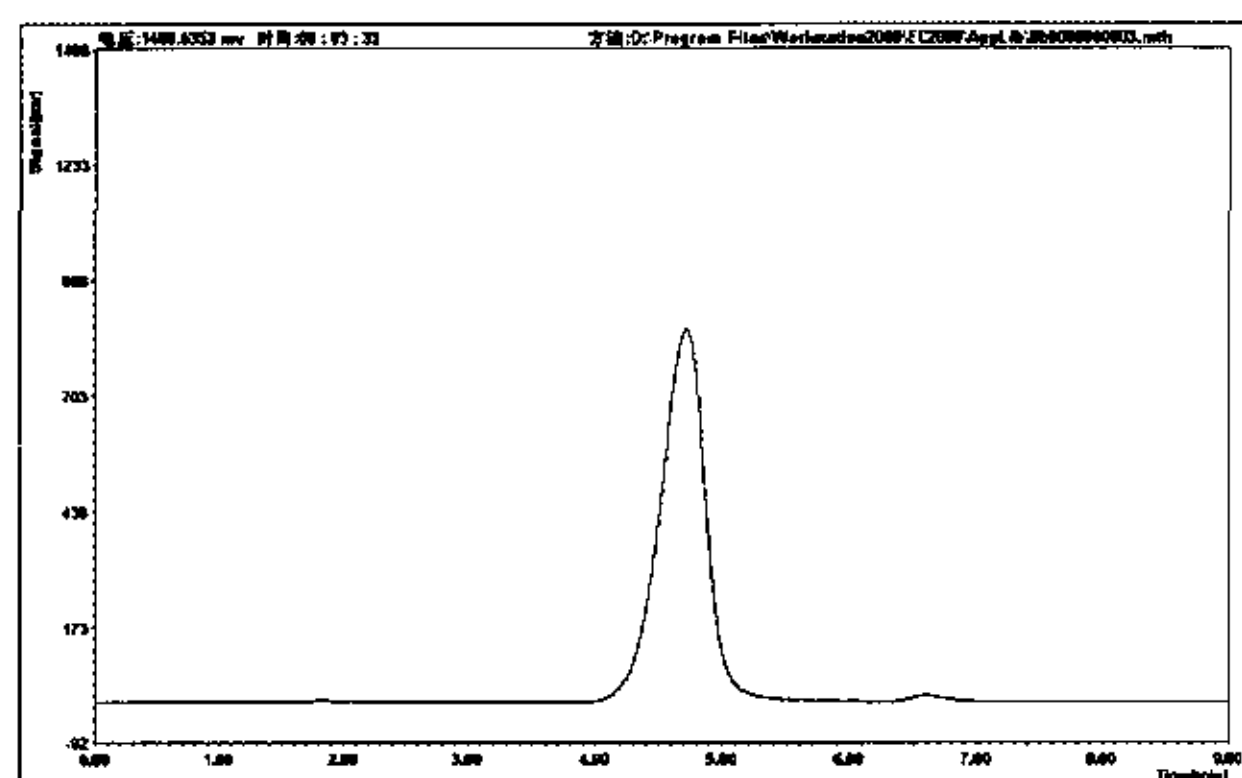


图 2-7 GN-II-34A 液相分析图

Kromasil™ C18 分析柱 (150×4.6mm, 5μm), 流动相: 甲醇-水 (5: 4), 检测波长: UV254nm

