

生物素化白藜芦醇的分离纯化与药效学评价

冯磊¹, 花慧¹, 邱丽颖¹, 金坚^{1,2*}

¹江南大学医药学院天然药物研究室; ²江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

摘要:以 DCC 为催化剂, 采用低温化学催化法合成生物素化白藜芦醇。产物采用 Resource RPC 反相色谱柱分离、纯化, 并且运用液质联用进行分析验证。MTT 法测定产物体外对 Hep G2、MCF-7 肿瘤细胞的抑制作用。实验结果显示: 通过 HPLC-MS、紫外扫描分析鉴定证实, 分离得到的产物确实是生物素化白藜芦醇, 其保留了原有的体外抗肿瘤活性。此种化学合成方法反应条件温和, 容易控制, 操作方便。合成得到的白藜芦醇的生物素化衍生物, 为下一步探讨白藜芦醇的结合蛋白提供简单有效的分子工具。

关键词:白藜芦醇; 生物素化白藜芦醇; 化学合成; 抗肿瘤

中图分类号: R284.3; Q946.91

文献标识码: A

Preparation and Pharmacodynamic Evaluation of Biotinylated Resveratrol

FENG Lei¹, HUA Hui¹, QU Li-ying¹, JIN Jian^{1,2*}

¹Laboratory of Natural Medicine, School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University;

²The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: A novel compound-biotinylated resveratrol was synthesized at low temperature without the protection of the hydroxyl of resveratrol in the presence of DCC as the catalyst. The product was purified with Resource RPC reversed-phase column and confirmed by HPLC-MS. The inhibition of Hep G2, MCF-7 cancer cells growth in vitro which were caused by biotinylated resveratrol was determined by MTT assay. It was showed that the product was isolated and identified as biotinylated resveratrol by HPLC-MS, UV scanning, which showed little change in the anticancer activity in vitro by MTT assay. These results demonstrate that our study provides a kind of chemosynthesis method under mild conditions and with an easily controlled procedure for obtaining the biotinylated resveratrol. Biotinylated resveratrol could be used as a simple, strong molecular tool for investigating the resveratrol-binding protein.

Key words: resveratrol; biotinylated resveratrol; chemical synthesis; anti-cancer

白藜芦醇 (3, 4, 5-trihydroxystilbene) 属于非黄酮类多酚化合物, 在植物体内常以顺、反式两种构型共存, 反式白藜芦醇是主要的生物活性异构体。白藜芦醇最初的天然资源是葡萄皮和红酒。近年来, 白藜芦醇逐渐引起人们的注意, 被作为法国人吃高脂肪食物而心脏病发病率较低这一“法兰西怪事”(France Paradox) 的可能解释^[1], 而且发现白藜芦醇能减少血小板的聚集及血栓的形成和减少冠状动脉粥样样心脏病的发生^[2,3]。随着对白藜芦醇研究的深入, 许多研究发现它具有抗肿瘤特性和抗氧化、抗突变、抗炎作用, 对鼻咽癌、肺癌、肝癌、肠癌、胃癌、乳腺癌、白血病等均有拮抗作用^[4-6], 但是关于它的抗肿

瘤分子机制研究很少。

本文经过一系列生物合成和化学合成的预实验研究, 建立了一种低温化学催化的方法, 成功合成了生物素化白藜芦醇。生物素化白藜芦醇具有生物素的一些特性, 可以借助 ABS 系统 (亲和素-生物素系统) 间接地固定在某些物理担体的表面, 为进一步探讨白藜芦醇在肿瘤细胞中靶位点, 阐明其抗癌作用机制与作用途径, 提供简单有效的分子工具。

1 材料与仪器

白藜芦醇 (反式构型, 色谱纯度为 99%, 湖南省洪江华光生物有限责任公司); MTT、生物素 (Sigma 公司); RPMI Medium 1640 细胞培养基 (Gibco BRL 公司); 胰酶、小牛血清、DMSO、L-谷氨酰胺为华美生物工程公司; 4-二甲氨基吡啶 (DMAP)、1, 3-二乙基碳化二亚胺 (DCC) 为上海延长生化科技发展

收稿日期: 2008-06-27 接受日期: 2009-05-13

基金项目: 国家自然科学基金 (30772586)

*通讯作者 Tel: 86-532-88963253; E-mail: Jinjian31@126.com

有限公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

AKTA explorer 100型中低压液相系统(瑞典 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品);WATERS Platform ZMD 4000型液质联用仪(美国 Waters 公司);MK3型酶标仪(美国 Thermo-Labsystems 公司);Model B110型号细胞培养箱(美国 Thermo-Forma 公司)。

人肝癌细胞 Hep G2、人乳腺癌细胞 MCF-7(中国科学院上海细胞库提供)。

2 方法

2.1 生物素化白藜芦醇的化学合成

将 744 mg 白藜芦醇、168 mg DCC (1,3-二环己基碳化二亚胺)和 10 mg DMAP (4-二甲氨基吡啶)溶于 10 mL 混合溶剂(干燥二氯甲烷:DMF=9:1),搅拌均匀后缓慢滴加含 199 mg 生物素的 DMF 溶液,避光搅拌溶液过夜,反应液密封冷藏,备用。以上整个化学催化合成过程均于 4℃ 冷库中完成。

2.2 生物素化白藜芦醇的纯化

实验 2.1 的化学合成反应产物用 AKTA explorer 100 中低压液相系统进行 HPLC 分离纯化。液相色谱分离条件为:制备型色谱柱选用 Resource™ RPC 100mL (Amersham Pharmacia Biotech Co Sweden),梯度乙腈水溶液作为洗脱液,洗脱梯度——水洗(2CV)、15%乙腈(5CV)、30%乙腈(6CV)、100%乙腈(4CV),检测波长:300、280、220 nm。洗脱流速为 10 mL/min。根据色谱图的出峰情况,相应收集各个色谱峰组分,将洗脱液浓缩蒸干,冷冻干燥后,待用。

2.3 生物素化白藜芦醇的 HPLC-MS 分析

实验 2.2 的各个色谱峰物质采用 HPLC-MS 分析仪分析产物的纯度、分子量。HPLC 分析条件:分析色谱柱为 SunFire™ C₁₈ (5 μm, 2.1 × 150 mm, Part No. 186002541, Lot No. 0108143521),柱温 30℃,流速 0.3 mL/min,进样量 10 μL,流动相甲醇:水=1%乙酸梯度洗脱。MS 分析条件:毛细管电压 3.87 kV,锥孔电压 30 V,离子源温度 120℃,脱溶剂气温度 300℃,光电倍增器电压 700 V,流速 4.2 L/h。

2.4 生物素化白藜芦醇的体外抗癌活性评价

2.4.1 细胞培养与传代

实验细胞选用人肝癌细胞 Hep G2、人乳腺癌细胞 MCF-7。肿瘤细胞培养在 RPMI 1640 培养液中(含 10% 热灭活小牛血清,0.2% NaHCO₃,青霉素

100 U/mL 和链霉素 100 μg/mL),在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度下培养,用 D-Hanks 配制的 0.3% 胰蛋白酶消化细胞传代。

2.4.2 MTT 法测定细胞增殖曲线

取对数生长期的肿瘤细胞用 0.3% 胰蛋白酶消化并制成单细胞悬液,按每孔 6 000~7 000 个细胞接种于 96 板,每孔 150 μL,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h,再加入完全培养基(0.1% DMSO)稀释的不同浓度的药物供试品溶液 150 μL,平行设置空白对照组,每组设 8 个复孔,继续培养 72 h。培养结束后,每孔加 MTT (5 mg/mL) 20 μL,继续培养 4 h,然后弃上清液,每孔加 DMSO 150 μL,37℃ 孵育 10 min,用酶标仪测定 A₅₇₀,按公式(1)计算抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率} = \frac{\text{对照孔 } A_{570} - \text{加药孔 } A_{570}}{\text{对照孔 } A_{570}} \times 100\% \quad (1)$$

3 结果

3.1 生物素化白藜芦醇的纯化

反应合成液的 HPLC 色谱图表明(图 1),本文采用的低温化学催化合成反应,几乎没有副反应产生,产物种类也比较少,整个反应条件易于控制和操作。通过 MS 分析发现保留时间为 10.27 的色谱峰为白藜芦醇,分子量为 228;保留时间为 16.39、16.59 的色谱峰为生物素化白藜芦醇,分子量为 454。

分部收集图 1 中保留时间为 16.39 的色谱峰洗脱液,经 HPLC-MS 色谱分析表明其纯度 >90% (归一化法),如图 2 所示。其阴离子、阳离子质谱图表明其 M-1 值为 454.0, M+1 值为 456.1, M+Na 值为 478.1 (图 3),据此推导其分子量为 454.2,这与生物素化白藜芦醇的理论分子量 454 一致。此物质的紫外特征吸收波长在 227、300 nm 附近,见图 4。通过以上技术手段分析,证实这个色谱峰即为所需的产物——生物素化白藜芦醇。按生物素反应用量计算其产物得率为 31%。

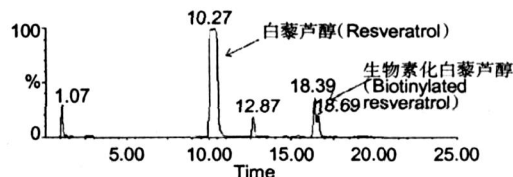


图 1 化学反应液的 HPLC 色谱图

Fig. 1 Analysis of the reaction product by HPLC

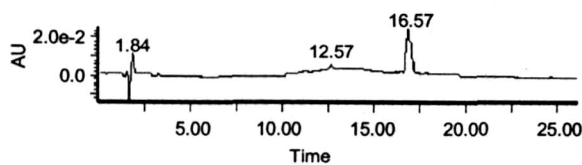


图2 产物(生物素化白藜芦醇)的HPLC-MS色谱分析图
Fig. 2 Analysis of product (biotinylated resveratrol) by HPLC-MS

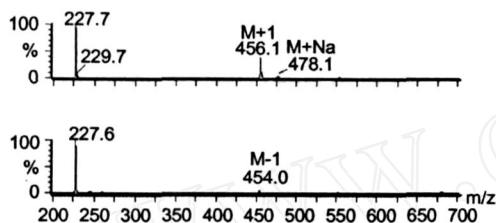


图3 生物素化白藜芦醇的阴离子、阳离子质谱图
Fig. 3 MS spectrum of biotinylated resveratrol in negative, positive ion mode

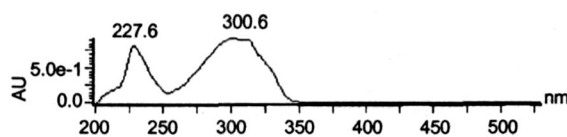


图4 生物素化白藜芦醇的紫外扫描图
Fig. 4 Ultraviolet scanning diagram of biotinylated resveratrol

3.2 生物素化白藜芦醇的体外抗癌活性评价

前期研究已经证实白藜芦醇能够体外显著抑制MCF-7、Hep G2肿瘤细胞的增殖活力。图5、6表明白藜芦醇经过生物素修饰以后,对上述两种肿瘤细胞的抑制活性虽有所下降,但其药效仍保持原来的剂量依赖关系。例如对人肝癌细胞 Hep G-2, 300 μM 白藜芦醇的细胞抑制率为 40%,而生物素化白藜芦醇降为 30%。

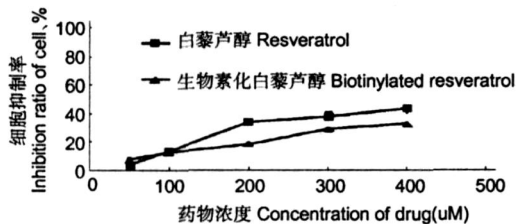


图5 生物素化白藜芦醇和白藜芦醇对 Hep G-2增殖的影响曲线

Fig. 5 Biotinylated resveratrol and resveratrol decreases cell viability in Hep G-2, human liver cancer cell

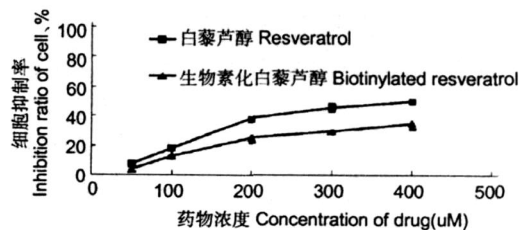


图6 生物素化白藜芦醇和白藜芦醇对 MCF-7增殖的影响曲线

Fig. 6 Biotinylated resveratrol and resveratrol decreases cell viability in MCF-7, human breast cell line

4 讨论

药物靶点是指在一种疾病的病理过程中起某种作用的生物分子,它是创新药物发现的前提,也是药物筛选的基础,良好的药物靶点是发现性质优良药物的基础^[7]。本课题组试图通过噬菌体展示技术、亲和甄别磁珠技术(即免疫磁珠技术)等方法来探讨白藜芦醇在肿瘤细胞上的靶位点,而运用这些生物技术首先要解决的第一个关键问题就是白藜芦醇的固定化问题。通过近年来国内外的文献调研,我们发现 ABS系统已经广泛应用于多种分析技术之中,并且展现出优于传统技术,例如免疫组织化学、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、生物分析系统等特性。近年来,也有很多成功借助 ABS系统解决药物固定化的实例^[8-10]。因此,ABS系统是解决白藜芦醇固定化问题的可行途径。而要借助 ABS系统就必须首先合成白藜芦醇的生物素化衍生物,然后才能进行后续的研究。

以前合成生物素化衍生物大都采用先化学合成衍生物素——羟基琥珀酰亚胺酯,然后再与蛋白质、糖等多种类型的大小分子形成生物素标记产物。但是此种试剂价格较贵,难于满足大量制备生物素化白藜芦醇的需要。本论文采用的低温化学催化法合成生物素化白藜芦醇,是在低温状态下,1,3-二环己基碳化二亚胺(DCC)催化下进行的,DCC是一种常用于催化酯化、酰胺化等反应的脱水剂,反应过程中无需保护白藜芦醇的酚羟基,DCC能够直接使生物素上的羧基原位活化,形成一种活泼的中间体。这个中间体在 DMAP的帮助下,直接攻击白藜芦醇上的酚羟基,脱水形成酯键。而脱下来的水分子则加到 DCC上形成 DCU,其反应机理如图7所示。整个反应过程中的试剂要严格控制无水状态,否则催化

反应无法正常进行。为了保证白藜芦醇上的酚羟基被生物素单一取代,本实验采取白藜芦醇反应的摩尔量大大过量于生物素的用量,而且生物素是最后一个加入反应体系,以缓慢滴加方式加入的。本实验通过 HPLC-MS 证实这种低温化学催化法能够成功合成生物素化白藜芦醇,几乎没有副反应和副产物的产生,白藜芦醇上的酚羟基都是被生物素单一取代。图 3 也证实了我们得到的生物素化白藜芦醇的分子量为 454,与之前化学合成设计的初衷完全一致。本研究室已经运用此种方法分别合成了生物素化阿霉素、生物素化紫杉醇(论文待发表)等一系列化合物,说明此种方法具有一定的普遍性,可以广泛用于一些小分子的生物素修饰。

图 5、6 表明,白藜芦醇被生物素修饰之后,基本上保持了原有的抗癌活性,且具有剂量依赖关系。与原有活性相比有所下降的原因,我们推测可能与其被生物素修饰后,溶解性有所下降有关。活性实验结果提示生物素化白藜芦醇通过 ABS 系统的介导,实现白藜芦醇的固定化后,能够保证固定在担体表面的白藜芦醇仍旧能够提供出原有的、与靶点蛋白质结合的空间结合位点或构型。说明生物素化的白藜芦醇不仅具有生物素的一些性质如结合各种标记物(酶、荧光素、同位素等)用于酶联免疫分析(ELISA)、细胞表面标志;而且可以结合了抗原、抗体、配体后,用于筛选或纯化抗体、抗原、受体等一系列的生物淘洗实验,例如噬菌体展示技术、甄别磁珠技术(即免疫磁珠技术)的应用。

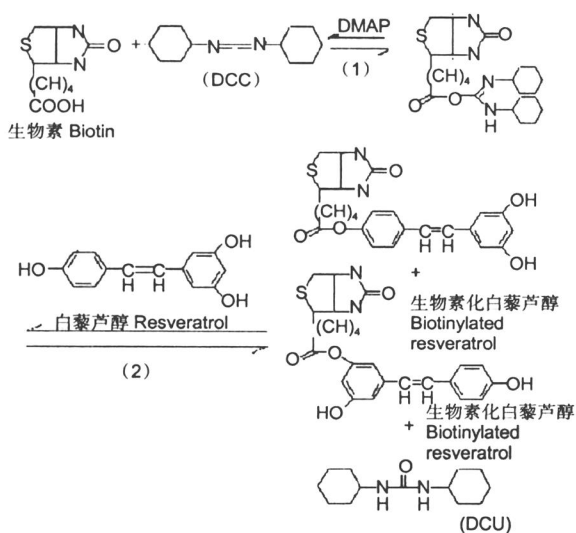


图 7 DCC 催化合成生物素化白藜芦醇的反应原理

Fig. 7 The mechanism of esterification by the catalysis of DCC

参考文献

- 1 Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the French paradox? *Eur J Endocrinol*, 1998, 138: 619-622.
- 2 Olas B, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, et al. Antioxidant activity of resveratrol in endotoxin-stimulated blood platelets. *Cell Biol Toxicol*, 2001, 17: 117-125.
- 3 Wu JM, Wang ZR, Hsieh TC, et al. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). *Int J Mol Med*, 2001, 8: 3-17.
- 4 Lucie Frénot. Biological effects of resveratrol (Minireview). *Life Science*, 2000, 66: 663-673.
- 5 Zigang Dong. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol (Review). *Mutation Research*, 2003, 523: 145-150.
- 6 Wang Z (王征), Luo ZM (罗泽民), Deng LW (邓林伟). The pharmacologic mechanism and synthesis of resveratrol. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15 (2): 178-181.
- 7 Drews J, Ryser S. Classic drug targets. *Nature Biotechnol*, 1997, 15: 1350-1361.
- 8 Roland JP, Fennema M, Richard MK, et al. Design and synthesis of reagents for phage display screening of dehalogenases. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9: 161-166.
- 9 Paul P Sche, Kathleen M McKenzie, et al. Display cloning: functional identification of natural product receptors using cDNA-phage display. *Chem Biol*, 1999, 6: 707-716.
- 10 Diane JR, Robert WJ, Hitesh JS. Screening of a library of phage-displayed peptides identifies Human Bcl-2 as a taxol-binding protein. *J Mol Biol*, 1999, 285: 197-203.