

6-生物素氨基己酸-七叶亭合成及其生物活性评价

王佳茂¹ 韦永华¹ 卢易扬² 李美芽³ 王林燕³ 应佳妮³ 蒋福升¹

1.浙江中医药大学生命科学院 杭州 310053 2.浙江中医药大学第一临床医学院

3.浙江中医药大学中医药科学院

摘要: [目的] 优化 6-生物素氨基己酸-七叶亭(6-biotinamidohexanoic acid-esculetin, Bio-AHA-ESC) 制备工艺, 并初步评价其生物学活性。[方法] 以 1-(3-(2-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDCI]和 N,N'-二环己基碳化二亚胺(N,N'-dicyclohexyl carbodiimide, DCC)为偶联催化剂, 通过考察反应温度、时间、EDCI 用量、4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine, DMAP)用量和七叶亭(esculetin, ESC)与 6-生物素氨基己酸(6-biotinamidohexanoic acid, Bio-AHA)投料比, 优化合成制备工艺; 采用半制备液相色谱法对产物进行分离、纯化, 并通过紫外光谱、高分辨质谱和核磁氢谱进行结构鉴定。最后对其氧化应激损伤保护作用和抗炎活性进行初步评价。[结果] EDCI 是较为理想的催化剂, 优化反应条件为: ESC 与 Bio-AHA 摩尔比为 2:1, DMAP 添加量为 EDCI 摩尔数的十分之一, 干燥 N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)溶解, 室温搅拌反应 6 h。经鉴定产物为 Bio-AHA-6-位羟基衍生 ESC, 该产物在 20.00~80.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量范围内均可剂量依赖性抑制过氧化氢诱导的人肝癌细胞 HepG2 损伤和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)分泌, 尤其在 80.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时其与 ESC 生物学活性差异无统计学意义($P>0.05$)。[结论] 本研究建立了一种温和、高效、专一, 而且易于纯化的 Bio-AHA-ESC 制备方法, 所得产物较好保持了 ESC 生物活性, 为下一步深入探究中药活性单体 ESC 结合靶蛋白奠定了良好基础。

关键词: 七叶亭; 生物素化; 化学合成; 结构鉴定; 抗氧化; 抗炎

中图分类号: R244 文献标志码: A 文章编号: 1005-5509(2022)07-0708-08

DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2022.07.002

Synthesis and Bioactivity Evaluation of 6-biotinamidohexanoic Acid-esculetin WANG Jiamao¹, WEI Yonghua¹, LU Yiyang², et al
1. School of Life Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou(310053), China; 2. First Clinical Medical School, Zhejiang Chinese Medical University

Abstract: [Objective] To optimize the preparation process of 6-biotinamidohexanoic acid-esculetin(Bio-AHA-ESC) and evaluate its biological activities. [Methods] Using 1-(3-(2-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDCI) and N,N'-dicyclohexyl carbodiimide(DCC) as coupling catalysts, the synthesis process was optimized by investigating the reaction temperature, time, EDCI and 4-dimethylaminopyridine(DMAP) addition, as well as the ratio of esculetin(ESC) to 6-biotinamidohexanoic acid (Bio-AHA). The biotinlated product was separated and purified by semi-preparative liquid chromatography, and its structure was identified by ultraviolet-visible spectroscopy(UV-VIS), ultra performance liquid chromatography tandem-mass spectrometry(UPLC-MS) and hydrogen spectrum of nuclear magnetic resonance(¹H NMR). Finally, its biological activity was evaluated by hydrogen peroxide induced oxidative stress injury model of human hepatocellular carcinomas HepG2 cells and lipopolysaccharide(LPS) induced inflammation model of RAW264.7 cells. [Results] EDCI is an ideal catalyst. The optimized reaction conditions are as follows: The molar ratio of ESC to Bio-AHA is 2:1, the addition amount of DMAP is one tenth of the moles of EDCI, dissolves with dried N,N-dimethylformamide(DMF) and stirs at room temperature for 6 h. The product was identified as Bio-AHA-6-hydroxyl derived ESC by UV-VIS, UPLC-MS and ¹H NMR. Bioactivity analysis showed that Bio-AHA-ESC could protect the injury of HepG2 cells induced by hydrogen peroxide and inhibit the secretion of interleukin-6(IL-6) induced by LPS in RAW264.7 cells in a dose-dependent manner, especially at a high dose of 80.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the biological activities of Bio-AHA-ESC were comparable to that of ESC. [Conclusion] In present work, a mild, efficient, specific and easy to purify Bio-AHA-ESC preparation method was established. The obtained Bio-AHA-ESC maintained the biological activity of ESC, which laid a good foundation for further exploring the binding target protein of ESC.

Key words: esculetin; biotinylation; chemical synthesis; structural identification; anti-oxidation; anti-inflammatory

基金项目: 2021 年度学生科研基金项目(37); 国家自然科学基金项目预研专项(2020ZG31, 2020ZG35)

Fund projects: Zhejiang Chinese Medical University Student Funding Project of 2021(37); Pre-research Project of National Natural Science Foundation Project of Zhejiang Chinese Medical University(2020ZG31, 2020ZG35)

通信作者: 蒋福升, E-mail: jfs1020@163.com

七叶亭(esculetin, ESC),又名秦皮乙素、七叶内酯,化学名称为6,7-二羟基香豆素,是中药秦皮的主要药效成分之一,也是合成平喘药东喘宁的重要中间体^[1]。现代药理学研究表明,ESC不仅具有平喘作用^[2],还具有抗炎^[3]、抗氧化^[4]、保肝^[5]、抗癌防癌^[6-7]、抑菌^[8]等诸多药理活性,并在脑缺血再灌注损伤^[9-10]和肝、肾纤维化^[11-12]等疾病的治疗方面展现出潜在的应用价值,是近年来开发应用研究热点天然化合物之一。现代分子药理学研究表明,ESC对诸多信号通路具有调控作用^[13-14],但其确切的作用靶蛋白尚不清楚,这对以其为先导化合物进行结构修饰,开发活性更强的衍生物带来了困难。

亲和性蛋白组学(affinity-based protein profiling, ABPP)方法是近年发展起来的一种用于揭示小分子药物可能的靶蛋白的有利技术方法^[15]。以生物素为报告基团,通过连接臂及反应基团和小分子药物偶联,制备小分子药物探针是ABPP方法中使用较为广泛和成熟的一种。通过该方法,已经揭示了青蒿素、小檗碱、雷公藤甲素等众多中药活性单体成分作用的靶蛋白^[16]和相关分子机制。因此,本文对6-生物素氨基己酸(6-biotinamidoheptanoic acid, Bio-AHA)偶联ESC合成条件进行优化,以制备6-生物素氨基己酸-七叶亭(6-biotinamidoheptanoic acid-esculetin, Bio-AHA-ESC)探针,并对其抗炎和细胞保护活性进行评价,为进一步揭示中药单体ESC的作用靶点和分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 仪器和材料

1.1.1 主要仪器 U3000型高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)系统购于美国戴安公司;C6型流式细胞仪购于美国BD公司;Enspire多功能酶标仪购于美国PerkinElmer公司;ACQUITY H-Class PLUS型超高效液相色谱仪及SYNAPT G2-Si型高分辨四级飞行时间串联液质联用仪均购于美国Waters公司;Magnet System 600型600 MHz核磁共振波谱仪为德国Bruker公司产品。

1.1.2 药品和试剂 ESC购于九鼎化学(上海)科技有限公司(批号:TWI52);Bio-AHA购于天津希恩思生化科技有限公司(批号:1069023020);4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine, DMAP)和N,N'-二环己基碳化二亚胺(N,N'-dicyclohexyl carbodiimide,

DCC)均购于上海麦克林生化科技有限公司(批号:C12072879、C11697350);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDCI]购于研峰科技(北京)有限公司(批号:SPSJH8B);干燥(水分 \leq 30 ppm)N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)购于安徽泽升科技有限公司(批号:92HRBR-RA);色谱纯乙腈购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司(批号:WXBD5691V);色谱纯甲酸购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司(批号:B1912070);细胞活力测定试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购于日本同仁化工株式会社(批号:PH632);杜尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)和胎牛血清均购于Gibco公司(批号:GP2011011、20151103);BD™小鼠炎症因子微量样本多指标流式阵列(cytometric bead array, CBA)分析试剂盒购于美国BD公司(批号:0325011);其他试剂均为分析纯。

1.1.3 细胞株 人肝癌细胞HepG2和小鼠单核巨噬细胞RAW264.7均购于上海中科院细胞库。

1.2 方法

1.2.1 不同反应条件对Bio-AHA-ESC合成率影响 分别称取Bio-AHA,以干燥DMF溶解,冰浴30 min后加入DCC并冰浴搅拌反应30 min,然后加入DMAP和ESC,继续冰浴搅拌反应3 h,自然恢复室温后继续搅拌反应^[17]。另外称取Bio-AHA,以干燥DMF溶解,加入ESC、DMAP和EDCI,室温搅拌反应^[18]。定量取样稀释,进样10 μ L进行HPLC分析,考察不同催化剂、反应温度、反应时间、Bio-AHA和ESC投料比及催化剂用量对ESC转化率和产物产率的影响。

1.2.2 HPLC色谱条件 采用戴安UltiMate™3000分析型HPLC系统,色谱条件为:岛津Inertsil® ODS-SP色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),Phenomenex C18保护柱(4.0 mm \times 3.0 mm),柱温25 $^{\circ}$ C,流速1 mL \cdot min⁻¹,检测波长343 nm,流动相为乙腈(A)和0.1%甲酸水(B),梯度洗脱:0~10 min 15%A,10~15 min 15%~25%A,15~25 min 25%A,25~30 min 25%~95%A,30~31 min 95%~15%A,31~41 min 15%A。配制系列对倍稀释ESC标准液,进样10 μ L,按上述色谱条件绘制ESC标准曲线: $Y=862.51X-2.9645$, $R^2=0.9998$ 。

1.2.3 产物分离鉴定 反应结束后直接进样UltiMate

3000 半制备型 HPLC 系统, 色谱条件为: welch Ultimate® XB-C18 色谱柱 (10 mm×250 mm, 10 μm), 柱温 30 °C, 流速 5 mL·min⁻¹, 检测波长 325 nm, 流动相为乙腈 (A) 和 0.1% 甲酸水 (B), 梯度洗脱: 0~3 min 20%A, 3~11 min 20%~80%A, 11~12 min 95%A, 12~17 min 20%A, 收集对应产物峰。产物作紫外光谱扫描, 同时进样 SYNAPT G2-Si Q-TOF 高分辨质谱仪作质谱鉴定, 并于 600 MHz 核磁共振波谱仪上测定氢谱。

1.2.4 细胞毒性检测 取指数生长期 HepG2 或 RAW264.7 细胞, 调整细胞密度为 1×10⁵ 个·mL⁻¹, 以每孔 200 μL 的体积接种于 96 孔板, 置于 37 °C, 5%CO₂ 培养箱中培养过夜。分别加入不同浓度的 ESC 和 Bio-AHA-ESC, 继续培养 22 h, 每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL, 继续培养 2 h, 于 Enspire 多功能酶标仪上检测 450 nm 处吸光度 (absorbance, A) 值, 每个浓度设 3 个复孔, 同时设立试剂对照, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_{\text{给药组}}}{A_{\text{对照组}}} \times 100\%$$

1.2.5 氧化应激损伤保护作用检测 取指数生长期 HepG2 细胞, 以 1×10⁵ 个·mL⁻¹ 的数量接种于 96 孔板, 每孔 200 μL, 置于 37 °C, 5%CO₂ 培养箱中培养过夜。分别加入不同浓度的 ESC 和 Bio-AHA-ESC, 预培养 2 h, 然后加入终浓度为 0.60 mmol·L⁻¹ 的过氧化氢继续培养 22 h, 每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL, 继续培养 2 h, 酶标仪上检测 450 nm 处 A 值, 每个浓度设 3 个复孔, 同时设立试剂对照, 同上计算细胞存活率。

1.2.6 抗炎活性分析 取指数生长期 RAW264.7 细胞, 接种于 96 孔板, 贴壁培养过夜, 加入不同浓度 ESC 和 Bio-AHA-ESC 预处理 1 h 后, 加入终浓度为 200 μg·L⁻¹ 的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激处理, 12 h 后吸取上清液 50 μL, 以流式 CBA 法测定炎症因子水平。

1.3 统计学分析 采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计学分析和作图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用一维方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

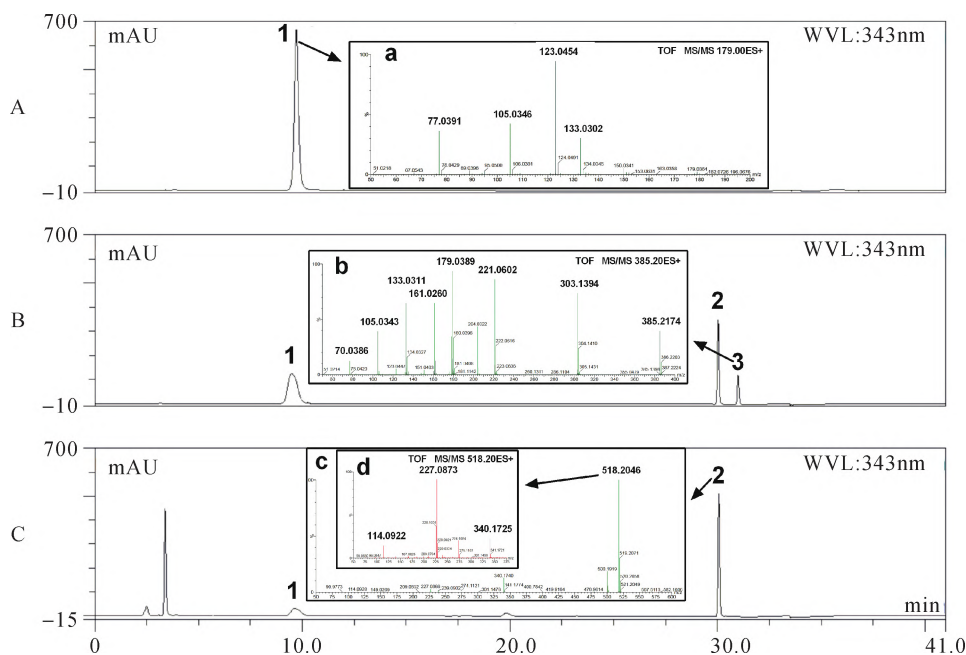
2.1 不同催化剂对产物合成的影响 称取 ESC 17.80 mg (0.10 mmol)、Bio-AHA 17.90 mg (0.05 mmol)、DCC 20.60 mg (0.10 mmol) 或 EDCI 19.20 mg (0.10 mmol) 及 DMAP 12.00 mg (0.10 mmol)。其中 DCC 催化反应先

低温反应 3 h, 然后恢复室温反应至 24 h; 而 EDCI 直接室温反应 24 h, 反应后分别取样稀释进行 HPLC 分析。见图 1。在上述羧基和羟基摩尔比为 1:4 的反应条件下, DCC 催化约 (49.18±5.93)% 的 ESC 被转化 (图 1B 中 1 号峰), 而 EDCI 催化约 (87.51±7.26)% 的 ESC 被转化 (图 1C 中 1 号峰); 生成的产物 DCC 催化产率仅为 EDCI 的 (66.04±7.27)% (图 1B 和 C 中 2 号峰), 且 DCC 催化在 31.35 min 有一副产物 (图 1B 中 3 号峰), 不利于产物分离纯化。因此, 从 ESC 转化率、产物生成率和产物是否易于分离、纯化的角度考虑, 选择 EDCI 作为催化剂较为合适。

2.2 反应温度和时间对 EDCI 催化产物合成的影响 以 EDCI 为催化剂, 按照 2.1 中的各物质配比, 一组冰浴搅拌反应 3 h 后恢复室温反应, 另一组直接室温搅拌反应, 分别于反应 3、6、9 和 24 h 精密吸取反应液 20 μL, 以色谱纯乙腈稀释到 1 mL, 0.22 μm 滤膜滤过, 进样 10 μL 进行 HPLC 分析, 通过比较 2 号峰面积变化, 考察不同反应温度和时间对产物产率影响。见图 2。从图 2A 可以看出, 反应 3 h 时室温条件产物峰面积显著高于冰浴条件峰面积 ($P < 0.05$), 说明室温有利于产物生成; 但 6 h 后无论冰浴还是室温, 各组峰面积差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 因此确定室温反应 6 h 为宜。

2.3 EDCI 和 DMAP 催化剂用量对产物合成的影响 按照 2.1 中的方法配比, 固定其他试剂不变, 分别考察不同 EDCI 添加量对产物产率影响。结果表明, 当 EDCI 添加量与羧基等摩尔时 (均为 0.05 mmol), 产物量显著低于 2 倍羧基摩尔数 (0.10 mmol) 添加量 ($P < 0.01$); 但继续增加 EDCI 量, 产物并无显著增加 ($P > 0.05$)。见图 2B。因此, 固定 EDCI 添加量为 2 倍羧基摩尔数 (与 ESC 等摩尔数)。考察 DMAP 添加量对产物的影响, 发现在 0.01~0.15 mmol 范围内, DMAP 添加量对产物产率无显著影响 ($P > 0.05$), 即 EDCI 摩尔数十分之一的 DMAP 即可达到较好的催化效率。见图 2C。

2.4 Bio-AHA 和 ESC 投料比对产物合成的影响 按照 2.1 中的方法, 固定 Bio-AHA 为 0.05 mmol, EDCI 0.10 mmol, DMAP 0.01 mmol, 考察 ESC 与 Bio-AHA 摩尔比为 0.5、1、2 和 3 时对产物合成影响。结果表明, 上述摩尔比为 0.5~2 范围内, 随着 ESC 量增加, 产物合成量显著提高 ($P < 0.01$); 但当摩尔比为 2 和 3 时, 产物量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2D。因此确定两者摩尔比以 2 为宜, 此时羟基和羧基摩尔比为 4。



注: A. ESC标准品; B. DCC催化反应体系产物; C. EDCl催化反应体系产物。1号峰为ESC; 2号峰为Bio-AHA-ESC; 3号峰为未知副产物。a为ESC分子离子峰 $179.00 \text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 二级质谱图; b为3号未知副产物分子离子峰 $385.20 \text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 二级质谱图; c为Bio-AHA-ESC一级质谱图; d为Bio-AHA-ESC分子离子峰 $518.20 \text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 二级质谱图。

Note: A. ESC standard; B. Product of DCC catalytic reaction system; C. Product of EDCl catalytic reaction system. No.1 peak was ESC; No.2 peak was Bio-AHA-ESC; No.3 peak was unknown by-product. a is the secondary mass spectrum of molecular ion peak of ESC ($179.00 \text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$); b is the secondary mass spectrum of molecular ion peak of No.3 ($385.20 \text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$, unknown); c is the primary mass spectrum of Bio-AHA-ESC; d is the secondary mass spectrum of molecular ion peak of Bio-AHA-ESC ($518.20 \text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$).

图1 反应24 h后样品HPLC图

Fig.1 HPLC diagram of the samples after 24 h of reaction

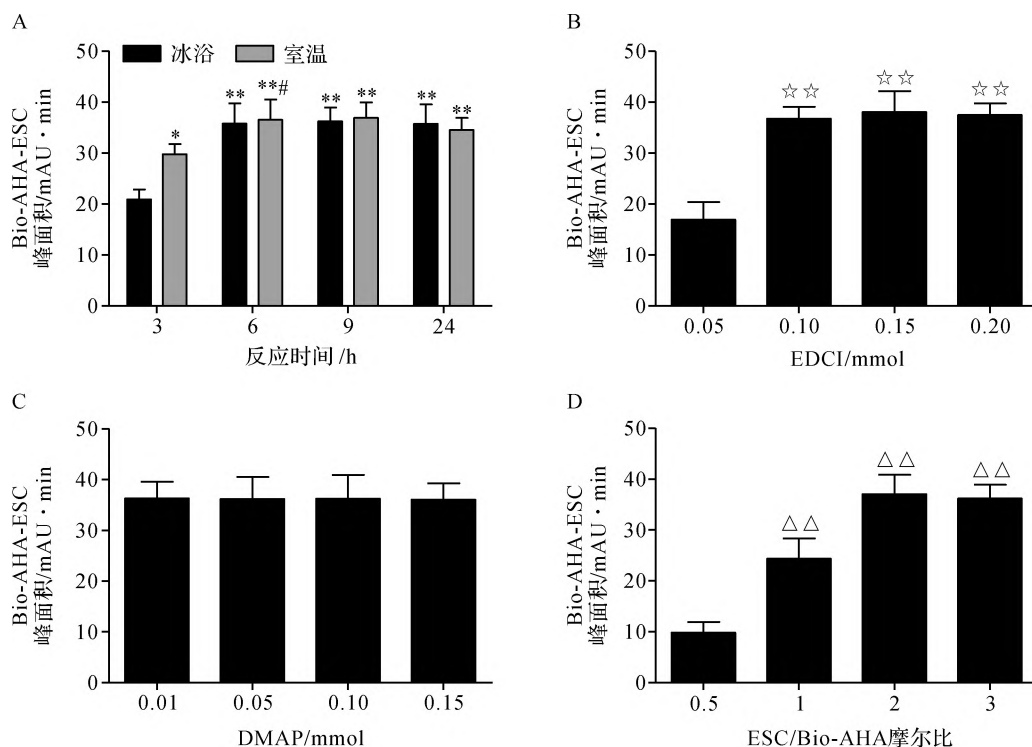
2.5 Bio-AHA-ESC合成、纯化和结构表征 按照2.1中的方法,称取ESC 35.60 mg(0.20 mmol)、Bio-AHA 35.80 mg(0.10 mmol)、EDCl 38.40 mg(0.20 mmol)及DMAP 24.00 mg(0.20 mmol),以4 mL干燥DMF溶解,室温搅拌反应6 h。直接进样半制备液相色谱系统,收集9.48~9.85 min峰(见图3A),经2次制备得到单一峰产物(见图3B),减压浓缩,冷冻干燥得产物32.56 mg。

产物紫外光谱特征与ESC类似,但最大波长324.60 nm较ESC最大波长342.60 nm紫移18.00 nm。见图4A、B。这与氨基己酸羰基吸电子效应导致ESC苯环电子云密度降低有关,表明已发生酯化反应。另外,产物二级质谱中呈现典型的Bio-AHA碎片离子($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+=340.17$)、生物素碎片离子($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+=227.09$)和氨基己酸碎片离子($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+=114.09$)。见图1C中d。表明Bio-AHA已与ESC酯化连接。而产物一级谱分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+=518.20$,表明ESC一个酚羟基被Bio-AHA衍生化。见图1C中c。

为了进一步明确是6位还是7位酚羟基衍生化,对

产物进行了核磁氢谱分析。比较ESC和Bio-AHA-ESC氢谱图,可以发现产物H-5和H-8化学位移均向低场移动(见图4C、D),这与羰基吸电子效应导致紫外光谱紫移结果一致;更为关键的是,H-5化学位移从原来的6.98变成7.39,显著大于H-8氢化学位移变化(从6.74变成6.82),表明6位羟基被修饰,生成了图4D中所示结构的衍生物,这一氢谱化学位移的改变与刘季红等^[9]报道的ESC衍生物氢谱化学位移变化规律一致。

2.6 Bio-AHA-ESC对过氧化氢诱导的HepG2细胞损伤保护作用 CCK-8结果表明,在20~80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,ESC和Bio-AHA-ESC对HepG2细胞无明显细胞毒性。见图5A。0.60 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 过氧化氢显著诱导HepG2细胞氧化损伤,而ESC和Bio-AHA-ESC均可剂量依赖性抑制过氧化氢诱导的HepG2细胞损伤。见图5B。在20~60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,Bio-AHA-ESC保护作用稍优于ESC,且20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时差异有统计学意义($P<0.05$);但高剂量80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,两者细胞存活率分别为(88.38 \pm 5.77)%和(84.13 \pm 6.50)%,ESC保护作



注:A.反应时间对产物合成的影响;B.EDCI用量对产物合成的影响;C.DMAP用量对产物合成的影响;D.ESC与Bio-AHA摩尔比对产物合成的影响。与冰浴反应3 h组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与室温反应3 h组比较,# $P<0.05$;与EDCI添加量0.05 mmol组比较,** $P<0.01$;与摩尔比0.5反应组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。
Note: A. Effect of reaction time on product synthesis; B. Effect of EDCI addition on product synthesis; C. Effect of DMAP addition on product synthesis; D. Effect of molar ratio of ESC to Bio-AHA on product synthesis. Compared with 3 h reaction group at ice bath, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with the 3 h reaction group at room temperature, # $P<0.05$; compared with the EDCI addition 0.05 mmol group, ** $P<0.01$; compared with the reaction group with a molar ratio of 0.5, $\Delta\Delta P<0.01$.

图2 不同条件反应产物峰面积变化

Fig.2 Changes of peak area of Bio-AHA-ESC under different reaction conditions

用相对较强,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见图5B。

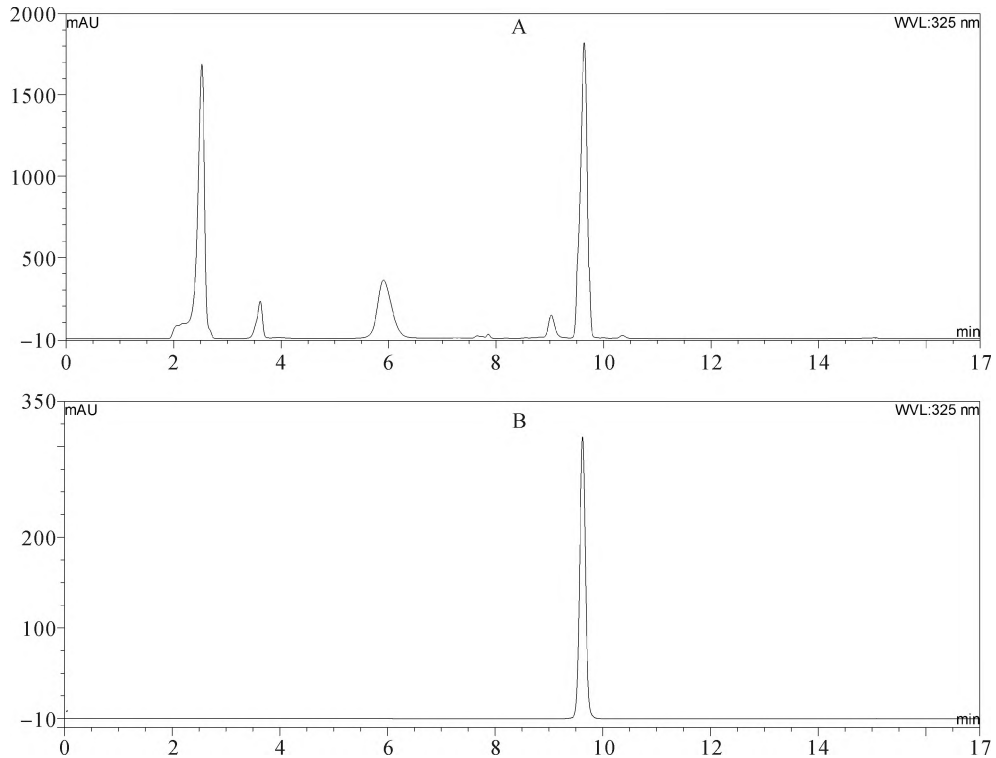
2.7 Bio-AHA-ESC的抗炎活性 在20~80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,ESC和Bio-AHA-ESC对RAW264.7细胞无显著细胞毒性。见图6A。200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的LPS刺激24 h后,IL-6水平显著升高($P<0.01$),而ESC和Bio-AHA-ESC均可剂量依赖性抑制IL-6分泌。总体上,相同浓度的药物处理组间比较,ESC的抑制活性优于Bio-AHA-ESC,尤其60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时两者差异有统计学意义($P<0.01$);80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时两者对IL-6抑制率分别为(82.49 \pm 2.06)%和(79.48 \pm 2.93)%,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图6B。

3 讨论

DCC和EDCI是常用的酯化偶联催化剂,两者均能在温和条件下促进Bio-AHA羧基和ESC酚羟基发生酯化反应。但本研究发现,DCC催化在产物附近有一明显的副产物,不利于产物分离纯化,而且其催化

ESC转化效率和产物生成率低于EDCI,因此EDCI是较为理想的催化剂。但从投料比(ESC与Bio-AHA摩尔比为2:1,即酚羟基与羧基摩尔比为4:1)和最终生成的单酚羟基酯化产物看,如果Bio-AHA完全反应,理论上应有50%的ESC被转化;但实际上EDCI催化后(87.51 \pm 7.26)%的ESC被转化;说明部分ESC也被转化生成了副产物,图1C中2.5 min和3.0 min左右出现的峰证实了这一推测。

以EDCI为偶联剂,本研究对反应温度、反应时间、DMAP添加量、ESC和Bio-AHA投料比进行了优化,结果表明反应条件为ESC与Bio-AHA摩尔比为2:1,DMAP为EDCI摩尔数的十分之一,干燥DMF溶解室温搅拌反应6 h时可获得较高的产率。所得反应液直接通过半制备液相分离纯化,即可获得产物;经紫外光谱、核磁氢谱和高分辨率质谱鉴定为ESC 6位酚羟基Bio-AHA衍生化产物,即在上述反应条件下ESC 6位

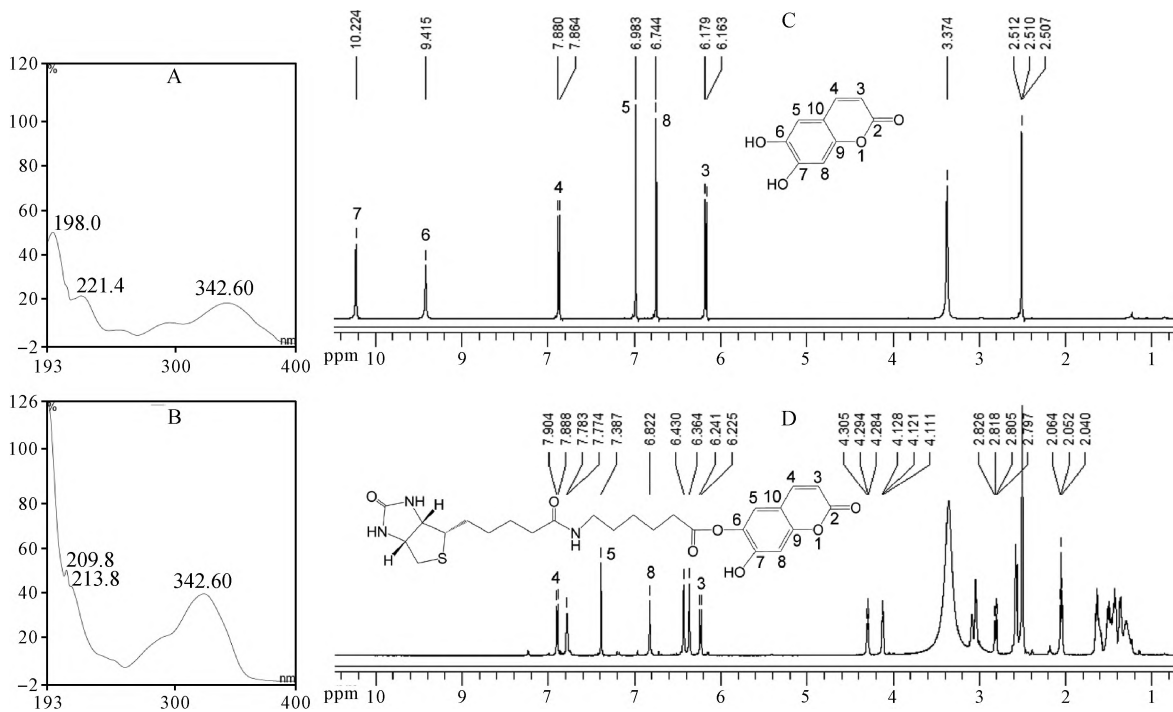


注: A. 反应混合液进样半制备液相色谱图; B. 两次半制备后样品液相色谱图。

Note: A. Semi-preparation liquid chromatogram of the reaction mixture; B. Liquid chromatogram of the sample after twice semi-preparation.

图3 Bio-AHA-ESC半制备液相色谱图

Fig.3 Semi-preparation liquid chromatogram of Bio-AHA-ESC

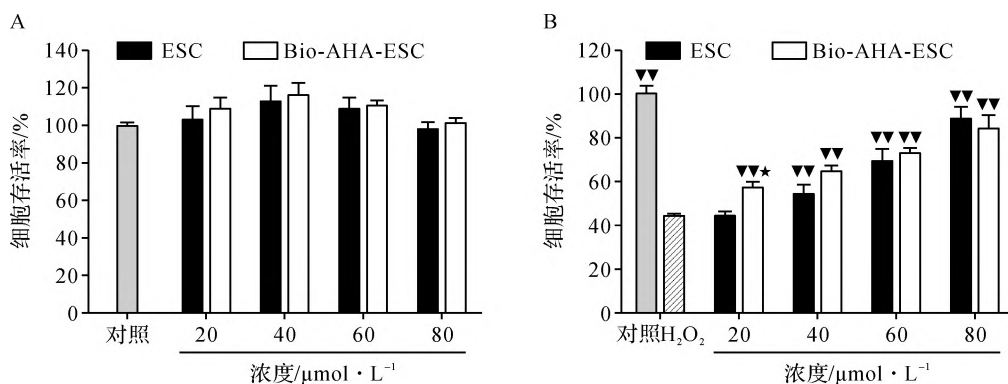


注: A. ESC紫外光谱图; B. Bio-AHA-ESC紫外光谱图; C. ESC核磁氢谱图; D. Bio-AHA-ESC核磁氢谱图。

Note: A. UV-VIS spectra of ESC; B. UV-VIS spectra of Bio-AHA-ESC; C. ¹H NMR spectra of ESC; D. ¹H NMR spectra of Bio-AHA-ESC.

图4 ESC和Bio-AHA-ESC紫外光谱图和核磁氢谱图

Fig.4 UV-VIS spectra and ¹H NMR spectra of ESC and Bio-AHA-ESC

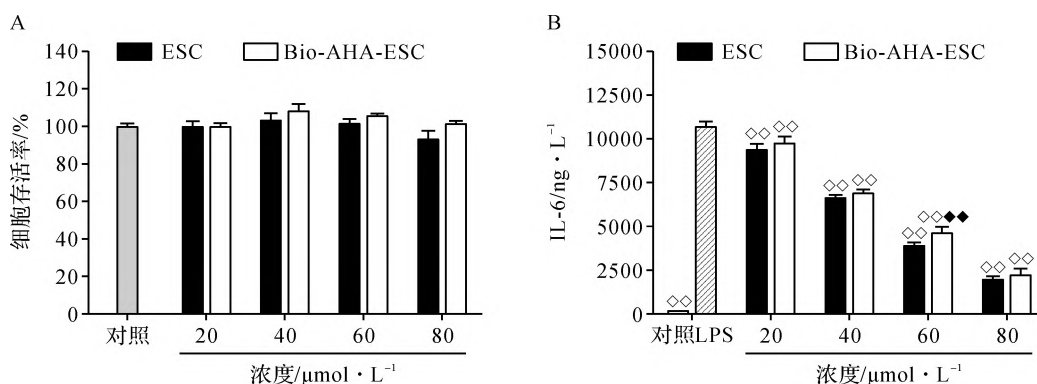


注:A.ESC和Bio-AHA-ESC对HepG2细胞生长抑制作用;B.ESC和Bio-AHA-ESC对过氧化氢诱导的HepG2细胞损伤保护作用。与过氧化氢单独处理组比较, $\blacktriangledown P < 0.01$; 与20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ESC处理组比较, $*P < 0.05$ 。

Note: A. The inhibitory effect of ESC and Bio-AHA-ESC on the growth of HepG2 cells; B. The protective effect of ESC and Bio-AHA-ESC on the injury of HepG2 cells induced by hydrogen peroxide. Compared with hydrogen peroxide alone treatment group, $\blacktriangledown P < 0.01$; compared with 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ESC treatment group, $*P < 0.05$.

图5 ESC和Bio-AHA-ESC对HepG2细胞生长的影响和对过氧化氢诱导的HepG2细胞损伤的保护作用

Fig.5 Inhibitory effect of ESC and Bio-AHA-ESC on HepG2 cell growth and its protective effect on HepG2 cell injury induced by hydrogen peroxide



注:A.细胞存活率;B.IL-6水平。与LPS单独刺激组比较, $\diamond P < 0.01$; 与60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ESC处理组比较, $\blacklozenge P < 0.01$ 。

Note: A. The cell survival rate; B. The level of IL-6. Compared with LPS alone treatment group, $\diamond P < 0.01$; compared with 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ESC treatment group, $\blacklozenge P < 0.01$.

图6 ESC和Bio-AHA-ESC对RAW264.7细胞生长影响及其对LPS诱导的IL-6分泌抑制作用

Fig.6 Inhibitory effects of ESC and Bio-AHA-ESC on the growth of RAW264.7 cells and IL-6 secretion induced by LPS

酚羟基活性较高,EDCI可选择性催化其发生单酯化反应,这对今后类似邻位酚羟基化合物衍生化研究具有一定指导意义。

近年来新型冠状病毒肺炎的临床治疗研究表明,抗炎中药具有重要开发应用价值^[20]。ESC是中药秦皮中主要功效成分之一,对哮喘具有较好疗效;现代药理学研究表明其具有较强抗炎活性^[3]和氧化应激损伤保护作用^[4]。因此,本研究对所制备的Bio-AHA-ESC的上述生物活性进行了初步评价,结果表明产物活性和ESC类似,对HepG2细胞和RAW264.7细胞毒性均较低,但均可剂量依赖性抑制过氧化氢诱导

的HepG2细胞氧化应激损伤和LPS诱导的RAW264.7细胞炎症因子IL-6的释放。而且在低剂量时(20.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),Bio-AHA-ESC氧化应激损伤保护作用优于ESC,80.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时两者相当;但抗炎方面,Bio-AHA-ESC抗炎活性较弱,尤其是浓度为60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时弱于对应浓度的ESC,而且差异有统计学意义,但高浓度80.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 两者抗炎活性差异无统计学意义。

综上所述,本研究建立了一种高效的Bio-AHA-ESC合成方法,工艺优化条件为:ESC与Bio-AHA摩尔比为2:1,DMAP添加量为EDCI摩尔数的十分之一,干

王佳茂,等:6-生物素氨基己酸-7-叶亭合成及其生物活性评价

燥DMF溶解室温搅拌反应6 h。抗炎、抗氧化活性评价结果表明,ESC经Bio-AHA衍生化后仍然保留了其生物学活性,这为后续采用ABPP揭示ESC可能的靶蛋白和确切分子机制奠定了良好基础。

参考文献:

References:

- [1] 东北制药总厂.香豆素二甲醚(东喘宁)的合成方法[J].中国医药工业杂志,1972,3(8):11.
Northeast Pharmaceutical General Factory. Synthesis of coumarin dimethyl ether(Dongchuanning)[J]. Chin J Pharm, 1972,3(8):11.
- [2] LONG H Y. Esculetin attenuates Th2 and Th17 responses in an ovalbumin-induced asthmatic mouse model[J]. Inflammation,2016,39(2):735-743.
- [3] OZAL S A, TRUKEKUL K, GURLU V, et al. Esculetin protects human retinal pigment epithelial cells from lipopolysaccharide-induced inflammation and cell death[J]. Curr Eye Res,2018,43(9):1169-1176.
- [4] HE Y, LI C, MA Q Y, et al. Esculetin inhibits oxidative stress and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes following hypoxia/reoxygenation injury[J]. Biochem Biophys Res Commun,2018,501(1):139-144.
- [5] TIEN Y C, LIAO J C, CHIU C S, et al. Esculetin ameliorates carbon tetrachloride-mediated hepatic apoptosis in rats[J]. Int J Mol Sci,2011,12(6):4053-4067.
- [6] WU S T, LIU B, AI Z Z, et al. Esculetin inhibits cancer cell glycolysis by binding tumor PGK2, GPD2, and GPI[J]. Front Pharmacol,2020,11:379.
- [7] SELVASUNDARAM R, MANOHARAN S, BUDDHA R, et al. Chemopreventive potential of esculetin in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis[J]. Mol Cell Biochem,2018,448(1-2):145-153.
- [8] DUNCAN S H, LEITCH E C M, STANLEY K N, et al. Effects of esculin and esculetin on the survival of *Escherichia coli* O157 in human faecal slurries, continuous-flow simulations of the rumen and colon and in calves[J]. Br J Nutr,2004,91(5):749-755.
- [9] CHEN T, MA Z J, ZHU L P, et al. Suppressing receptor-interacting protein 140: A new sight for salidroside to treat cerebral ischemia[J]. Mol Neurobiol,2016, 53(9):6240-6250.
- [10] WANG C, PEI A J, CHEN J, et al. A natural coumarin derivative esculetin offers neuroprotection on cerebral ischemia/reperfusion injury in mice[J]. J Neurochem, 2012,121(6):1007-1013.
- [11] PANDEY A, RAJ P, GORU S K, et al. Esculetin ameliorates hepatic fibrosis in high fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease by regulation of FoxO1 mediated pathway[J]. Pharmacol Rep,2017,69(4):666-672.
- [12] WANG Y M, KONG W, WANG L, et al. Multiple-purpose connectivity map analysis reveals the benefits of esculetin to hyperuricemia and renal fibrosis[J]. Int J Mol Sci,2020,21(20):7695.
- [13] 李朝燕,李佳,丁亚杰,等.秦皮乙素抗肿瘤相关信号通路的研究进展[J].辽宁中医杂志,2019,46(10):2230-2233.
LI Zhaoyan, LI Jia, DING Yajie, et al. Research progress on anti-tumor signal pathways relevant to esculetin[J]. Liaoning J Tradit Chin Med,2019,46(10):2230-2233.
- [14] HASSANEIN E, SAYED A M, HUSSEIN O E, et al. Coumarins as modulators of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev,2020,2020:1675957.
- [15] VAN DER ZOUWEN A J, WITTE M D. Modular approaches to synthesize activity and affinity-based chemical probes[J]. Front Chem,2021,9:644811.
- [16] 王平,罗佳,李海舟,等.化学蛋白质组学鉴定天然产物作用靶标的研究进展[J].天然产物研究与开发,2020,32(1):147-155.
WANG Ping, LUO Jia, LI Haizhou, et al. Advances in identifying targets of natural products by chemical proteomics approaches[J]. Nat Prod Res Dev,2020,32(1):147-155.
- [17] 冯霞.高聚物支载体型水溶性紫杉醇前药的研究[D].天津:天津大学,2003:33.
FENG Xia. Study on water-soluble Taxol prodrugs bounded with polymer[D]. Tianjin: Tianjin University,2003:33.
- [18] 王平.生物素标记的三种天然产物分子探针的设计与合成[D].昆明:昆明理工大学,2019:30.
WANG Ping. Design and synthesis of three biotin-labeled natural product molecular probes[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology,2019:30.
- [19] 刘季红,靳焜,王平,等.七叶亭及其衍生物的NMR研究[J].波谱学杂志,2019,26(3):341-349.
LIU Jihong, JIN Kun, WANG Ping, et al. An NMR study on esculetin and its derivatives[J]. Chin J Magn Reson,2019,26(3):341-349.
- [20] 徐宇琴,陈燕,傅真杰,等.基于网络药理学探究连花清瘟胶囊治疗新冠肺炎的作用机制[J].浙江中医药大学学报,2021,45(10):1154-1168.
XU Yuqin, CHEN Yan, FU Zhenjie, et al. Mechanism exploration of Lianhua Qingwen Capsule against COVID-19 based on network pharmacology[J]. J Zhejiang Chin Med Univ,2021,45(10):1154-1168.

(收稿日期:2021-11-26)