

单四氢呋喃型番荔枝内酯类化合物对大鼠线粒体复合酶 I 活性的影响

苗筠杰¹, 徐晓芳^{1,2}, 陈 勇¹, 陈建伟¹, 李 祥^{1*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

2. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046

摘要: **目的** 探讨单四氢呋喃型番荔枝内酯类(单 THF 型 ACGs)化合物对大鼠肝线粒体复合酶 I 活性的影响。**方法** 选用 6 个结构不同的单 THF 型 ACGs, 通过测定其对大鼠肝线粒体复合酶 I 的抑制活性, 明确这些化合物结构中四氢呋喃环与内酯环之间碳数、取代羟基数以及四氢呋喃环的核心构型对大鼠肝线粒体复合酶 I 活性的影响。**结果** 6 个单 THF 型 ACGs 对大鼠肝线粒体复合酶 I 均有一定的抑制活性, 构效关系分析可见, 在单 THF 型 ACGs 中, 四氢呋喃环与内酯环间碳链越短, 化合物活性越强, 取代羟基数并非是影响活性的决定性因素。**结论** 四氢呋喃环的核心构型为苏式/反式/赤式时比苏式/反式/苏式构型的抑制线粒体复合酶 I 的活性强。

关键词: 单四氢呋喃型番荔枝内酯类化合物; 肝线粒体; 线粒体复合酶 I; 构效关系; 核心构型

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)23-3368-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.020

Effect of monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins on mitochondrial complex I of rats

MIAO Yun-jie¹, XU Xiao-fang^{1,2}, CHEN Yong¹, CHEN Jian-wei¹, LI Xiang¹

1. Nanjing University of Chinese Medicine, pharmaceutical institute, Nanjing 210046, China;

2. Shanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: **Objective** To investigate the activity of mono-tetrahydrofuran (THF) annonaceous acetogenins (ACGs) against mitochondrial complex I of rats. **Methods** The inhibitory activity of mono-THF ACGs with six different chemical structures against mitochondrial complex I of rats was investigated to clarify the carbon number and substituted hydroxyl number between THF ring and lactone ring as well as the effect of the core configuration in THF ring on mitochondrial complex I of rats. **Results** The results show that mono-THF ACGs can inhibit the mitochondrial complex I of rats. With analysis of the results from the structure-activity relationship between antitumoral activity and their chemical structure of mono-THF ACGs, the less the carbon number between the two rings is, the better their inhibitory activities are; The number of substituted hydroxyl groups is not the decisive factor for influencing its activity in mono-THF ACGs. **Conclusion** The inhibitory activity of compound's configurations with th/t/er is better than that of the compound's configurations with th/t/th in mono-THF ACGs.

Key words: monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins; hepatic mitochondrial; mitochondrial complex I; structure-activity relationship; core configurations

番荔枝内酯(annonaceous acetogenins, ACGs)是仅发现于番荔枝科植物中的末端具 γ -内酯环的天然产物^[1], 具有很强的抗癌活性, 被誉为“明日抗癌之星”。番荔枝科植物分布于热带、亚热带地区, 有 130 个属, 2 300 多种, 我国有 24 属 103 种^[2]。自 1982 年从紫玉盘属植物中分离出首个 ACGs 化

合物 uvaricin 以来, 已经从番荔枝科 40 多个属 150 余种植物中获得近 500 个 ACGs 化合物^[3-6]。

ACGs 与其他天然产物的结构类型有较大区别, 其基本化学结构为 35~37 个碳原子构成的化合物骨架, 分子中含 0~3 个四氢呋喃环(tetrahydrofuran, THF), 末端有 1 个甲基取代或经重排的 γ -内

收稿日期: 2012-09-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274057); 国家教育部博士点专项基金资助项目(20113237110009); 2 江苏省高校优势学科建设工程资助项目(ysxk-2010); 江苏省科技厅项目(BK2012853); 011 年江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(790); 2012 年江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(588)

作者简介: 苗筠杰(1988—), 男, 博士在读, 研究方向为中药活性成分的基础研究及应用。E-mail: yun_jie@139.com

***通信作者** 李 祥 E-mail: lixiang_8182@163.com

酯环和2条连接这些部分的长烷基直链,在碳链上还常常带有一些立体化学多变的含氧官能团(羟基、酮基、乙酰氧基、环氧结构等)或者双键。此外,在番荔枝科植物中含四氢吡喃环(THP)和无THF、THP环的化合物也已被发现^[7-9]。根据THF的数目及空间排列方式,ACGs可划分为6种类型,即无THF型、单THF型、邻双THF型、非邻双THF型、邻三THF型和非典型的ACGs(如含THP型和环羟基化的THF化合物)。这些化合物分子中通常有5个以上手性碳原子,立体结构比较复杂,且多为蜡状物。

ACGs的作用靶点为细胞或肿瘤细胞中的线粒体,其在G₁期与肿瘤细胞作用,诱导Bax蛋白表达,增强caspase-3的活性,引起肿瘤细胞凋亡^[10]。ACGs能通过降低细胞内环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)的水平而诱导肿瘤细胞凋亡^[11]。ACGs通过抑制线粒体还原型辅酶(NADH)、线粒体呼吸链的传递,使细胞产生的能量迅速减少,且糖蛋白(P-gp)是依赖于能量的药物排出泵,因此能量产生障碍则影响P-gp的功能,最终导致P-gp功能丧失,从而克服肿瘤的多药耐药性(MDR)^[12]。

本实验选取6个具不同结构特征的单THF型

ACGs,通过检测其对肝细胞耗氧呼吸的影响,利用计算机分子模拟技术研究单THF型ACGs对线粒体复合酶I的影响及其机制,探讨其构效关系。

1 材料

1.1 药品与试剂

Annosquamin A(1)、annosquamin C(2)、annog-laxin(3)、solamin(4)、annotemoyin 1(5)、annosquamin B(6)(见表1、图1)均由本实验室从番荔枝科植物番荔枝 *Annona squamosa* Linn. 种子的氯仿提取部位分得,经HPLC-DAD检测,质量分数均>98%,用DMSO溶解至5 mg/mL,置4℃冰箱备用。磷酸盐缓冲液(PBS),索莱宝科技有限公司;NADH, Sigma公司; Tris-HCl, 国药集团化学试剂有限公司; 乙二胺四乙酸(EDTA), 南京宁试化学试剂有限公司; 蔗糖, 上海化学试剂总厂; 二甲基亚砜(DMSO), 分析纯, 无锡海硕生物有限公司; BCA蛋白测定试剂盒, 碧云天生物技术有限公司。

1.2 动物

SD大鼠,清洁级,体质量180~250 g,由南京医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(TA)-2008-0004。

表1 化合物1~6的结构特征

Table 1 Structure characteristics of compounds 1—6

化合物	-OH 位置	相对构型	THF 与内酯间碳数	分子式	相对分子质量
1	9, 14	苏式/反式/赤式	7	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	564
2	9, 14	苏式/反式/苏式	7	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	564
3	8, 15, 20, 22	苏式/反式/苏式	13	C ₃₅ H ₆₃ O ₈	610
4	15, 20	苏式/反式/苏式	13	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	564
5	17, 22	苏式/反式/苏式	15	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	564
6	11, 16	苏式/反式/赤式	9	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	564

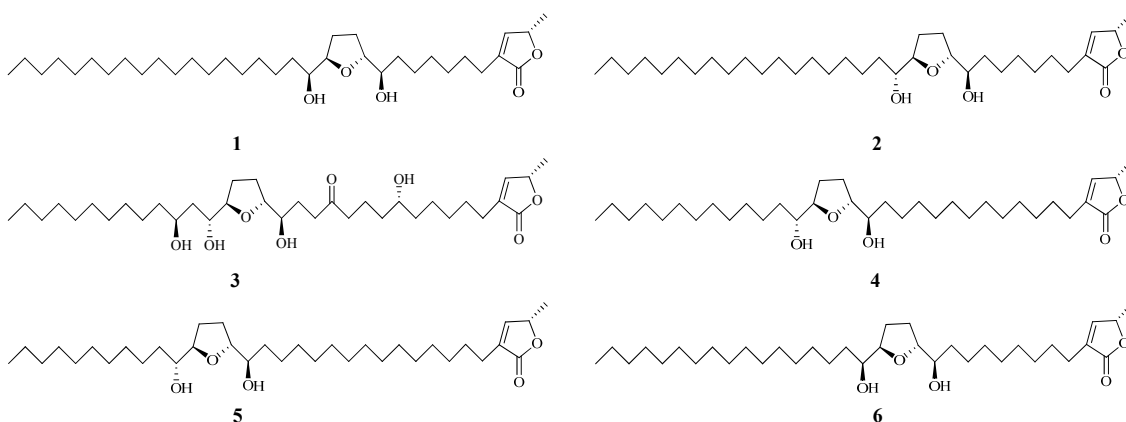


图1 化合物1~6的结构

Fig. 1 Structure of compounds 1—6

1.3 仪器

X-22R 型台式高速大容量冷冻离心机, Allegra 公司; AG285 型电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; Spectra Max M5 型酶标仪, Molecular Devices 公司; T18 型匀浆机, IKA 公司; Forma-86C ULT Freezer 超低温冰箱, 美国 Thermoelectron 公司。

2 方法

取大鼠肝脏组织, 用预冷生理盐水清洗 2 次, 滤纸拭干后置于冰上。称取 1 g 肝脏组织, 置于预冷的分离介质中, 迅速进行线粒体样本的制备。

采用改良的文献方法^[13]提取鼠肝的线粒体: 于 4 °C 剪碎肝脏组织, 置于 10 mL 离心管内, 加入分离介质 10 mg/g, 制成匀浆, 4 °C、1 000×g 离心 10 min, 收集上清, 12 000×g 离心 15 min, 弃上清, 收集沉淀得线粒体, 用冻存介质悬浮, -70 °C 低温保存待用。全部分离过程在 0~4 °C 下进行, 线粒体分离于 1 h 内完成。

参照文献方法^[14]测定线粒体复合酶 I 的活性: 取出-70 °C 保存的肝线粒体悬浮液, 在 37 °C 水浴锅中冻融, 加入一定量的反应介质稀释, 使线粒体蛋白终质量浓度约 200 µg/mL。线粒体在 37 °C 水浴中孵育 5 min, 取 100 µL 加入 96 孔板内, 并迅速加入 1.3 mmol/L NADH 10 µL, 混匀, 酶标仪检测 340 nm 处吸光度 (*A*) 值, 每隔 2 min 检测 1 次。检测 6 min 后加入不同浓度梯度 (0.05、0.5、5、50、500、5 000 ng/mL) 的化合物 1~6, 于 340 nm 处连续检测 30 min 内 *A* 值, 线粒体复合酶 I 活性以每分钟每毫克线粒体蛋白消耗 NADH 的量计算。

3 结果

3.1 对大鼠肝线粒体复合酶 I 的影响

化合物 1~6 对大鼠肝线粒体复合酶 I 均有抑制作用, IC₅₀ 分别为 1.72、189、147、443、713、707 nmol/L, 其中化合物 1 活性最强。

3.2 构型关系分析

根据化合物 1~6 对大鼠肝线粒体复合酶 I 的 IC₅₀ 值, 将结构相似的化合物进行对比分析。

3.2.1 四氢呋喃环与内酯环间的碳数对化合物活性的影响 化合物 1 和 2 (7 个碳) 抑制线粒体复合酶 I 的活性大于化合物 5 (15 个碳)、4 (13 个碳)、6 (9 个碳) 的活性。有研究表明, 在单 THF 型 ACGs 中两环之间的碳数与活性的强弱关系是 11 个 > 13 个 > 15 个^[10,15-17]。由此推测该类化合物结构中四氢

呋喃环与内酯环间的碳数越少活性越高。

3.2.2 取代羟基数对化合物化合物活性的影响 化合物 4 (2 个羟基) 抑制线粒体复合酶 I 的活性大于化合物 3 (4 个羟基)。但有文献报道单 THF 型 ACGs, 如 goniothalamycin (4 个羟基)、montalycin D (4 个羟基)、montalycin C (4 个羟基) 对线粒体复合酶 I 的抑制活性强于 montalycin B (3 个羟基)^[18]; 取代羟基数对线粒体复合酶 I 的抑制活性并无影响^[19-20], 故推测取代羟基数并非是影响单 THF 型 ACGs 线粒体复合酶 I 抑制活性的决定性因素。分析其原因, 可能是由于化合物的构效关系是受各因素综合影响的, 而非某单一因素; 也可能是取代羟基较多使亲水性增强, 而受体的靶点嵌于膜中, 取代羟基多反而影响药物分子靠近受体靶点。之前的文献报道对取代羟基数目的构效关系研究也未表现出一致的规律性, 与本实验相互印证。

3.2.3 四氢呋喃环核心构型对活性的影响 化合物 1 (构型为苏式/反式赤式) 对线粒体复合酶 I 的抑制活性大于化合物 2、4、5 (构型为苏式/反式/苏式), 故推测构型为苏式/反式/赤式的单 THF 型 ACGs 抑制线粒体复合酶 I 的活性比具有苏式/反式/苏式构型的该类化合物要强。

4 讨论

上述体外实验和计算机分子模拟中, 除羟基数对化合物抑制活性的影响结果与文献报道相反外, 内酯环间碳数、四氢呋喃环构型均与文献报道相符。综合以上体外实验结论以及已有的相关报道, 推测单 THF 型 ACGs 的抑制线粒体复合酶 I 的活性主要受四氢呋喃环与内酯环间碳数、四氢呋喃环构型等因素的影响, 其中四氢呋喃环与内酯环间碳数可能是影响该类化合物与受体结合的具体部位, 类似 Hiroko 等的四氢呋喃环是亲水的“锚”的假设^[21]。不同的四氢呋喃环与内酯环间碳数决定了单 THF 型 ACGs 与受体的不同结合位置, 继而决定不同的抑制活性; 而四氢呋喃环的核心构型则可能影响单 THF 型 ACGs 与受体结合时氢键的形成及其强弱, 进而决定该类化合物抑制活性的强弱。由本实验结果推测, 在单 THF 型 ACGs 结构中, 四氢呋喃环与内酯环间碳数以 7 个为宜; 取代羟基数并非是影响其活性的决定性因素; 构型为苏式/反式/赤式的抑制活性比具有苏式/反式/苏式更强。

本实验选取对构效关系研究较少且活性并不弱的单 THF 型 ACGs 进行构效关系研究, 补充了番荔

枝内酯这一大类化合物的构效关系研究。单 THF 型 ACGs 的结构较双 THF 型 ACGs 结构简单, 利于进行结构比较, 因此首先对单 THF 型 ACGs 进行构效关系研究, 以期找到 ACGs 类构效关系研究的切入点, 为今后的新药开发和合成奠定基础。然而由于单 THF 型 ACGs 的四氢呋喃环核心构型有多种类型, 其他四氢呋喃环核心构型以及羟基个数与位置是如何影响单 THF 型 ACGs 的粒体复合酶 I 抑制活性, 仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 顾关云, 蒋 昱. 番荔枝科植物细胞毒成分的研究概况 VIII [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(4): 252-261.
- [2] 侯宽韶. 中国种子植物科属词典 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1982.
- [3] Kojima N, Tanaka T. Medicinal chemistry of annonaceous acetogenins: design, synthesis, and biological evaluation of novel analogues [J]. *Molecules*, 2009, 14(9): 3621-3661.
- [4] McLaughlin J L. Paw paw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial Products [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(7): 1311-1321.
- [5] Bermejo A, Figadere B, Zafra-Polo M, et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action [J]. *Nat Prod Rep*, 2005, 22(2): 269-303.
- [6] Zeng L, Ye Q, Oberlies N H, et al. Recent advances in annonaceous acetogenins [J]. *Nat Prod Rep*, 1996, 13(4): 275-306.
- [7] Alali F Q, Liu X, McLaughlin J L. Annonaceous acetogenins: recent progress [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(3): 504-540.
- [8] Zafra-Polo M C, Figadère B, Gallardo T, et al. Natural acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanisms of action [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48(7): 1087-1117.
- [9] Zafra-Polo M C, González M C, Estornell E, et al. Acetogenins from annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42(2): 253-271.
- [10] Kuwabara K, Takada M, Iwata J, et al. Design syntheses and mitochondrial complex I inhibitory activity of novel acetogenin mimics [J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(9): 2538-2546.
- [11] Chiu H F, Chih T T, Hsian Y M, et al. Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2. 2. 15 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65(3): 319-327.
- [12] Miyoshi H, Ohshima M, Shimada H, et al. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1365(3): 443-452.
- [13] 丁正同, 蒋雨平, 任惠民, 等. 小鼠慢性暴露于百草枯对其脑线粒体呼吸链复合酶活性的影响 [J]. 中国临床神经科学, 2003, 11(3): 243-246.
- [14] Przedborski S, Jackson-Lewis V, Muthane U, et al. Chronic levodopa administration alters cerebral mitochondrial respiratory chain activity [J]. *Ann Neurol*, 1993, 34(5): 715-723.
- [15] Tormo J R, González M C, Cortes D, et al. Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 369(1): 119-126.
- [16] Takada M, Kuwabara K, Nakato H, et al. Definition of crucial structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1460(2/3): 302-310.
- [17] Miyoshi H. Structure-activity relationships of some complex I inhibitors [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1364(2): 236-244.
- [18] Chang F R, Liaw C C, Lin C Y, et al. New adjacent Bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata* [J]. *Planta Med*, 2003, 69(3): 241-246.
- [19] Woo M, Kim D, McLaughlin J L. Asitribolins A and B: cytotoxic mono-THF Annonaceous acetogenins from the seeds of *Asimina triloba* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 50(6): 1033-1040.
- [20] Chang F, Wu Y. Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata* [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(7): 925-931.
- [21] Hiroko S, Grutzner J B, Kozlowski J F, et al. Membrane conformations and their relation to cytotoxicity of Asimicin and its analogues [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(3), 854-866.