

• 药剂与工艺 •

雷公藤红素-氨基葡萄糖酰胺偶联物的合成及其减毒调脂作用

毕 晨, 游清徽*

江西师范大学生命科学院, 江西 南昌 330022

摘要: 目的 合成一种雷公藤红素-氨基葡萄糖酰胺偶联物 (celastrol-glucosamine conjugate, Cel-GlcN), 并评估其细胞毒性、调脂活性, 以缓解 Cel 不良反应强、水溶性差的问题。方法 采用氨基葡萄糖对 Cel 第 20 位的羧酸基团进行酰胺化修饰, 分别在二氯甲烷、*N,N*-二甲基甲酰胺 (*N,N*-dimethylformamide, DMF) 体系中使用 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺 [1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC]、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷 (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate, PyBOP) 作为酰胺偶联反应的活化剂加速 Cel-GlcN 的合成, 使用高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS/MS)、¹H-NMR、¹³C-NMR 和傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 对其结构进行了表征, 基于人肝癌 HepG2 细胞模型评价其细胞毒性、调脂活性及氧化应激水平。结果 FTIR 确定了化合物中酰胺键的存在, HPLC-MS/MS 测定了化合物的相对分子质量, ¹H-NMR、¹³C-NMR 鉴定了化合物的具体化学结构, 相比于天然产物 Cel, Cel-GlcN 的水溶性得到了显著升高 (由常温下的 1.23 μg/mL 提升为 226.00 μg/mL), 可能以缓控释作用释放 Cel 从而减轻其对细胞的毒性和机体内的氧化应激水平。结论 成功合成了 Cel-GlcN, 水溶性得到改善, 体外细胞实验证实其调脂活性基本不变而细胞毒性降低, 从而为 Cel 相关药物的研发提供有价值的参考。

关键词: 雷公藤红素; 氨基葡萄糖酰胺; 偶联物; 细胞毒性; 调脂活性; 氧化应激; 缓控释作用

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)04-1158-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.04.010

Synthesis of celastrol-glucosamine conjugate and its lipid-lowering effects

BI Chen, YOU Qinghui

College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

Abstract: Objective To synthesize a celastrol-glucosamine conjugate (Cel-GlcN) and evaluate its cytotoxicity and lipid-lowering activity in an effort to mitigate the strong side effects and poor water solubility of Cel. **Methods** The carboxylic acid group at the 20th position of Cel was aminated with glucosamine. The synthesis process was expedited utilizing 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) as conjugating agents in dichloromethane and *N,N*-dimethylformamide (DMF) systems. The structure of the derivative was further characterized through HPLC-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The cytotoxicity, lipid-lowering effect, and oxidative stress level of the derivative were evaluated using the HepG2 cell model. **Results** The presence of amide bond(s) in the compound was confirmed through FTIR analysis. Furthermore, the relative molecular weight was determined using HPLC-MS/MS, and the specific chemical structure of the derivative was identified as Cel-GlcN through ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopy. Compared to the natural product Cel, the water solubility of Cel-GlcN significantly improved to 226 μg/mL. This improvement suggests potential mitigation of cytotoxicity and reduction of oxidative stress levels in the body via controlled release of Cel. **Conclusion** The successful synthesis of Cel-GlcN was accomplished, leading to enhanced water solubility. *In vitro* cellular experiments verified the retained lipid-lowering activity and a decrease in cytotoxicity. These findings provide significant insights for the development of drugs related to Cel.

Key words: celastrol; glucosamine; conjugate; cytotoxicity; lipid-lowering activity; oxidative stress; delayed and controlled release effect

收稿日期: 2023-08-04

基金项目: 国家科技重大专项子课题 (2018ZX0921002-008)

作者简介: 毕 晨, 男, 硕士, 研究方向为天然产物。Tel: 18779800626 E-mail: 202140100750@jxnu.edu.cn

*通信作者: 游清徽, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事天然产物研究与开发。Tel: 13697917024 E-mail: qinghuiyou@jxnu.edu.cn

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 是一种传统中药, 拥有悠久的药用历史。现有研究明确指出, 雷公藤具有多种药理作用, 包括抗肿瘤、抗炎、抗肥胖、治疗自身免疫疾病和糖尿病等功能。此外, 雷公藤还显示出神经保护、预防心血管和代谢相关疾病的效果^[1-5]。雷公藤红素 (celastrol, Cel) 是从雷公藤植物根部提取得到的一种五环三萜类化合物, 具有抗炎和抗肿瘤等良好效果^[6-8]。近年来的相关研究发现, Cel 还参与机体脂质代谢的调控, 并具有一定的减肥效果。刘伯宇等^[9]研究发现, Cel 通过提高瘦素敏感性, 对于高脂饮食诱导的肥胖 (diet-induced obesity, DIO) 小鼠可以降低其食欲并明显减轻其体质量。然而, 对于缺乏瘦素及瘦素受体的小鼠, 并未观察到明显的减肥效果。另外, 研究显示 Cel 可以通过下调转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma 2$ (peroxisome proliferators-activated receptors, PPAR $\gamma 2$) 和 CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAAT enhancer binding protein, C/EBP α) 的表达, 降低早期脂肪基因的表达, 并有效抑制小鼠胚胎呈纤维细胞 (3T3-swiss albino, 3T3-L1) 向脂肪细胞的终末分化^[10]。尽管 Cel 具有显著的药理活性, 但其对肝脏、肾脏、心脑血管等也存在强烈的不良反应, 并具有较差的水溶性, 从而限制了其在临床中的应用^[11]。

近年来, 偶联药物技术的发展使得 Cel 的临床应用成为可能。为了解决 Cel 本身理化性质限制以

及随剂量增加而引发的药物毒性等问题, 研究人员已经开发了多种药物制剂, 如纳米递药系统^[12-13]、聚合物胶^[14]、聚合物前药^[15]、脂质体^[16-17]等被研发出来以提高 Cel 的生物利用度。然而, Cel 相关制剂目前仍处于研发阶段, 并未有产品上市。

用于聚合物-药物偶联物的材料需要具备无毒、低免疫反应以及良好的水溶性等特点, 例如 *N*-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺^[18]、聚乙二醇以及部分多糖聚合物 (如壳聚糖、葡聚糖、透明质酸等) 均为常用药物辅料。葡聚糖阿霉素前药是第 1 个进入临床试验阶段的葡聚糖偶联药物, 但后续研究证明其具有一定的肝毒性、会引起血小板减少等不良症状^[19]。聚谷氨酸是一种人工合成的聚合物具有低免疫反应和无毒性等特点, 但也存在制备成本高昂, 无法普及的问题。氨基葡萄糖 (glucosamine, GlcN) 是一种含有氨基的己糖, 具有改善软骨关节代谢、抗菌、抗氧化、抗炎和保肝的作用。现有临床试验证明, 氨基葡萄糖没有急性毒性、亚急性毒性和遗传毒性方面的问题, 其盐酸盐形式被美国国家食品营养协会 (National Nutritional Foods Association, NNFA) 批准为膳食补充剂^[20]。

本实验研发了一种 Cel-GlcN 酰胺偶联物, 合成工艺见图 1, 并从理化性质、药物毒性和抗脂效果等方面评价该复合物。研究结果显示, 该复合物的水溶性、药物毒性和氧化应激水平等方面均优于原始药物 Cel。

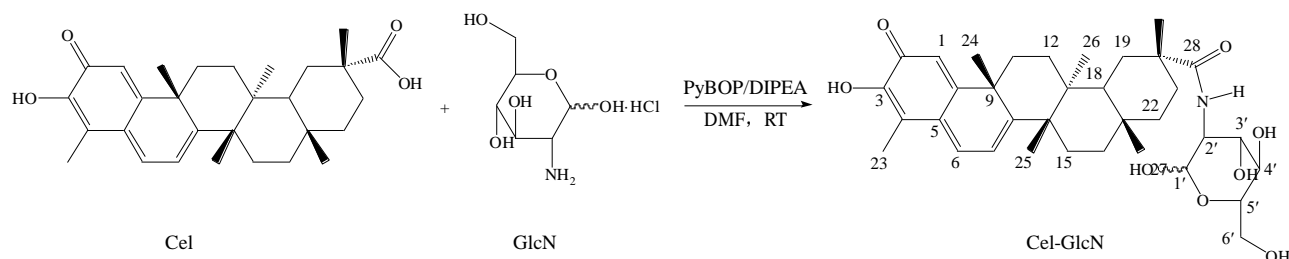


图 1 Cel-GlcN 的合成工艺

Fig. 1 Cel-GlcN synthesis process

1 仪器与材料

1.1 仪器

CKX 53 型倒置光学显微镜, 日本 Olympus 公司; MCO-15AC 型二氧化碳细胞培养箱, 日本 Sanyo 公司; Agilent-API4500 型液质联用仪, 美国 AB Sciex 公司; FW-4A 型粉末压片机, 天津市拓普仪器有限公司; Spectra Max M5 型酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; Nicolet iN10 MX 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Thermo Nicolet 公司。

1.2 材料与试剂

DMEM 细胞培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、非必需氨基酸、胎牛血清蛋白、油酸、棕榈酸均购自北京索莱宝科技有限公司; GlcN 购自上海源叶生物科技有限公司; 乙腈购自 Sigma-Aldrich 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; Cel 购自成都普思生物科技股份有限公司; *N,N*-乙基二异丙胺 (*N,N*-diisopropylethylamine, DIPEA)、二氯甲烷、1*H*-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基磷六氟磷酸盐 (benzotriazol-1-

yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate, PyBOP)、*N,N*-二甲基甲酰胺(*N,N*-dimethylformamide, DMF)、1-乙基-(3-(2-甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC·HCl]、*N*-羟基苯并三氮唑(1-hydroxybenzotriazole, HOBt)均购自 Adamas 上海泰坦科技股份有限公司; HepG2 细胞系购自美森细胞生物科技有限公司; 总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)试剂盒、2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒均购自上海生工生物工程有限公司。

1.3 细胞培养

将人肝癌 HepG2 细胞(美森细胞生物科技有限公司)置于含有 15%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的高糖 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2 方法与结果

2.1 Cel-GlcN 的合成与表征

2.1.1 基于 DMF 体系 Cel-GlcN 的合成 在常温条件下, 将 Cel (100 mg、0.22 mmol)、PyBOP (57 mg、0.11 mmol) 溶解于 5 mL DMF (99.5%) 溶剂中, 随后将反应液置于冰水混合物中冷却 30 min。在搅拌的条件下, 缓慢滴入 DIPEA (71 mg、0.55 mmol) 至反应溶液中, 待反应溶液恢复至室温后逐滴加入氨基葡萄糖溶液 (92 mg、0.44 mol/L), 持续搅拌 48 h 直至反应完全。然后收集反应液, 使用二氯甲烷和饱和食盐水萃取 3 次 (15 mL×3), 有机层用无水硫酸钠干燥。在 40 °C 下减压旋蒸完全后, 通过硅胶柱色谱进行纯化(洗脱剂为二氯甲烷-甲醇 12:1)。最终得到棕红色固体粉末 82.3 mg (61.4%)。收集所得样品后, 通过 LC-MS 确定其相对分子质量, 使用 ¹H-NMR、¹³C-NMR 对其结构进行鉴定, 并通过压片法对产物进行傅里叶红外光谱 (FTIR) 表征。

2.1.2 基于二氯甲烷体系 Cel-GlcN 的合成 在氮气氛围下, 将 HOBt (42.4 mg、0.22 mmol) 和 EDC·HCl (63 mg、0.33 mmol) 加入到溶解有 Cel (100 mg、0.22 mmol) 的二氯甲烷溶液中, 并在 0 °C 的条件下搅拌 15 min, 待反应溶液恢复至室温后逐滴加入氨基葡萄糖溶液 (92 mg、0.44 mol/L), 搅拌过夜至反应完全。收集反应液, 直接加入饱和食盐水洗涤 3 次 (15 mL×3), 有机层用无水硫酸钠干燥, 40 °C 下减压旋蒸完全后, 通过硅胶柱色谱进行

纯化(洗脱剂为二氯甲烷-甲醇 14:1)。最终得到棕红色固体粉末 60.4 mg (40.5%), 其表征方式与“2.1.1”项一致。

2.1.3 FTIR 分析 FTIR 参数: 光谱范围 4 000~500 cm⁻¹; 分辨率 0.5 cm⁻¹; 扫描次数 64; 信噪比 50 000:1。Cel-GlcN 是由 Cel 的羧基与 GlcN 的氨基之间形成酰胺键而合成(如图 1 所示), 通过 FTIR (图 2) 对酰胺键进行了验证, 在 Cel-GlcN 的 FTIR 谱图中, 1 647 cm⁻¹ 处的吸收峰对应酰胺 I 谱带 C=O 的伸缩振动, 1 586 cm⁻¹ 处的强吸收则对应酰胺 II 谱带中 N-H 的弯曲振动, 同时, 在 Cel-GlcN 中观察到 Cel 中由 C=O 在 1 702 cm⁻¹ 处的伸缩振动吸收峰消失, 表明酰胺键的成功引入。

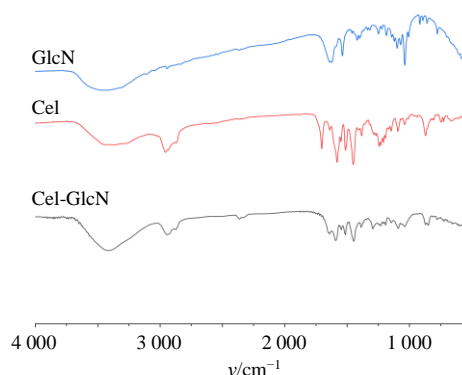


图 2 Cel-GlcN 的红外光谱图

Fig. 2 Infrared spectra of Cel-GlcN

2.1.4 LC-MS 检测分析

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 为 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水; 柱温 25 °C; 进样量 20 μL; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 200~600 nm。洗脱条件: 0~18 min, 30%~100%乙腈; 18~28 min, 100%乙腈; 28~30 min, 100%~30%乙腈。

(2) 质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 扫描方式为负离子模式; 喷嘴电压 4 kV; 鞘气温度 250 °C; 鞘气体积流量 8 L/min; 干燥气体积流量 6 L/min; 干燥器温度 250 °C; 锥孔电压 100 V; 扫描范围 *m/z* 100~1 700。

通过 LC-MS 梯度分析结果 (图 3、4), 观察到无论是 DMF 还是二氯甲烷体系中均有目标产物 Cel-GlcN 的液相峰, 对比分析可知, 在二氯甲烷体系中不光有目标产物, 同时还生成了 2 种副产物 (*t_R* 分别为 23.891、24.916 min), 其相对分子质量与目标产物 Cel-GlcN 不符, Cel (*t_R*=21.848 min) 具有较小的极性, 只在纯有机相乙腈洗脱后被紫外检测

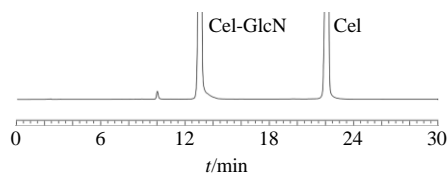


图3 基于DMF体系的Cel-GlcN经LC-MS分析的HPLC图

Fig. 3 LC-MS-based liquid chromatogram of Cel-GlcN based on DMF system

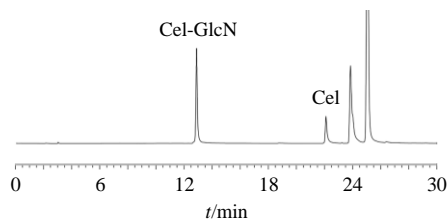


图4 基于二氯甲烷体系的Cel-GlcN经LC-MS分析的液相色谱图

Fig. 4 LC-MS LC chromatogram of Cel-GlcN based on dichloromethane system

器检测到。GlcN因其结构上具有多个羟基，表现出良好的水溶性和较大的极性。在Cel与GlcN共价结合生成Cel-GlcN ($t_R=12.819$ min)后，结合物的分子极性增加，水溶性得到改善，峰出现时间也提前。同时，在对目标峰Cel-GlcN ($t_R=12.819$ min)进行质谱分析时(图5)，初步判断其相对分子质量约为611(可能含有奇数氮化合物)，基本与Cel($M_r=450$)和GlcN($M_r=179$)共价结合后去除1个水分子后的相对分子质量相符，因而本实验在后续的实验中选择使用高产率的DMF溶剂作为反应体系。

2.1.5 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 检测

(1) 氢谱参数：温度 298.0 K；谱宽 10 000 Hz；脉冲宽度 11.11 μs ；弛豫时间 2 s；采样点数 65 536；采样时间 3 s；扫描次数 16。

(2) 碳谱参数：温度 296.2 K；谱宽 22 045.7 Hz；脉冲时间 16 μs ；采样时间 3.65 s；弛豫时间 2.0 s；采样数据点 65 536；扫描次数 50。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ : 7.20 (2H, s), 6.49 (2H, d, $J = 10.2$ Hz), 6.45~6.41 (1H, m), 3.79~3.69

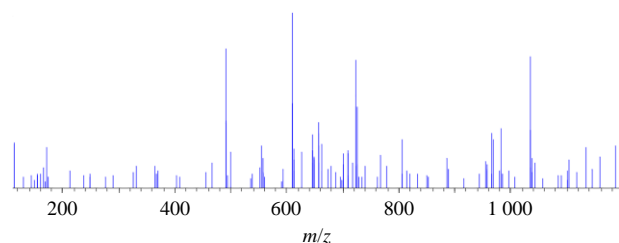


图5 Cel-GlcN经LC-MS分析的质谱图

Fig. 5 Mass spectra of Cel-GlcN analyzed by LC-MS

(7H, m), 3.69~3.64 (2H, m), 3.48 (1H, d, $J = 6.6$ Hz), 3.31 (3H, s), 2.47 (2H, d, $J = 15.4$ Hz), 2.21 (2H, s), 2.19 (6H, s), 2.15 (3H, s), 1.93~1.80 (7H, m), 1.74 (7H, dt, $J = 15.6, 7.5$ Hz), 1.50 (7H, d, $J = 14.0$ Hz), 1.42 (5H, s), 1.35 (4H, dd, $J = 7.2, 3.7$ Hz), 1.27 (9H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.19 (6H, s), 1.13 (7H, s), 0.96 (3H, d, $J = 15.3$ Hz), 0.72 (5H, s)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD) δ : 181.14 (C-29), 180.03 (C-2), 172.56 (C-8), 166.42 (C-10), 147.75 (C-3), 136.55 (C-6), 128.49 (C-5), 120.61 (C-4), 119.98 (C-7), 119.61 (C-1), 92.36 (C-1'), 73.08 (C-3'), 72.64 (C-4'), 72.52 (C-5'), 62.79 (C-6'), 56.11 (C-2'), 46.27 (C-14), 45.83 (C-18), 44.30 (C-9), 41.53 (C-13), 40.77 (C-20), 38.87 (C-24), 37.61 (C-22), 36.08 (C-16), 34.73 (C-11), 34.39 (C-25), 32.07 (C-27), 32.00 (C-19), 31.71 (C-15), 30.94 (C-17), 30.47 (C-12), 29.75 (C-21), 22.27 (C-29), 19.69 (C-26), 10.37 (C-23)。

ESI-HRMS: 分子式($\text{C}_{35}\text{H}_{49}\text{NO}_8^-$), m/z 610.937 6, 出峰时间 12.819 min, 检测波长 425 nm。Cel-GlcN 质量分数 95.46%。

2.2 水溶性及稳定性测试

精密称取 3 mg 经 DMF 体系合成纯化后的 Cel-GlcN, 溶于 1 mL 去离子水中, 在室温下进行漩涡震荡 5 min, 然后超声 2 min 使其充分溶解。最后, 在 14 000 r/min、4 $^\circ\text{C}$ 下冷冻离心(离心半径 5 cm) 10 min, 取上清液, 并使用紫外分光光度计读取其在 425 nm 处的吸光度(A)值。将 10 mg 的 Cel-GlcN 分别置于 50 mL 的 PBS (pH 7.4)、DMEM 细胞培养基 (10% FBS)、模拟胃液 (SGF, 0.32% 胃蛋白酶, pH 1.2) 和模拟肠液 (SIF, 1% 胰酶, pH 7.5) 中, 以 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 24 h。之后, 在 1、2、4、8、12、24 h 分别取 200 μL 溶液, 经醋酸乙酯萃取后进 HPLC 定量分析 [色谱条件: 流动相为乙腈-超纯水 (90:10); 使用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 体积流量为 1.0 mL/min; 温度为 25 $^\circ\text{C}$; 检测波长为 425 nm]。

根据 425 nm 处的 A 值数据, 相比于 Cel 微弱的水溶性 (1.23 $\mu\text{g/mL}$), Cel-GlcN 在水中的溶解度极大地改善, 达到了 226 $\mu\text{g/mL}$ 。

如图 6 所示, Cel-GlcN 在 PBS 水溶液 (pH 7.4) 中常温保存 24 h, 只检测到极少量的 Cel (5.5%), 这表明合成的 Cel-GlcN 是一个高度稳定的化合物。

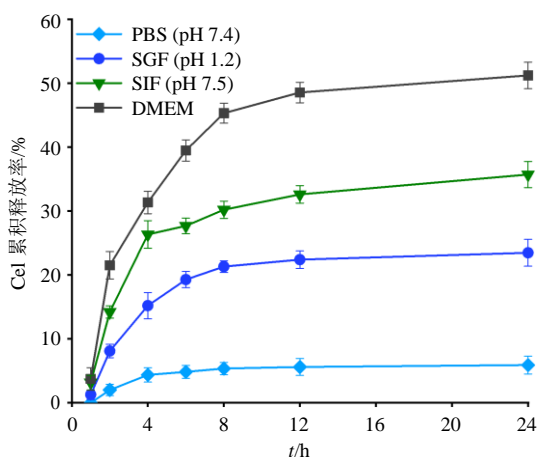


图6 Cel-GlcN在PBS、SGF (pH 1.2)、SIF (pH 7.5)、DMEM (10% FBS) 培养基中孵育时 Cel 累积释放率随时间变化的控释曲线

Fig. 6 Controlled-release curve of Cel cumulative release rate over time of Cel-GlcN incubated in PBS, SGF (pH 1.2), SIF (pH 7.5), DMEM (10% FBS) medium

而在 DMEM 细胞培养基、模拟胃液 (SGF, pH 1.2) 及 SIF (pH 7.5) 中常温保存 24 h, 检测到 Cel 在 SGF、SIF、DMEM 细胞培养基中的质量分数分别为 23.5%、35.7%、51.1%, 其水解程度均有所提高, 这表明 Cel-GlcN 的酰胺键可以被其中的蛋白酶或者肽酶催化水解。此外, 在 SGF 条件下 GEL 的释放趋近于稳定, 而在 DMEM 细胞培养基中, 12 h 内释放了大量的游离 Cel (48.3%), 且在随后的 12 h 内呈缓慢上升的趋势。这表明 Cel-GlcN 在 DMEM 细胞培养基中的释放效率更高, 可能与其中胎牛血清中所含复杂的蛋白质相关。另外, 在 SGF 的酸性条件下, Cel-GlcN 的释放效率较低。考虑到实际情况下, 药物在胃液中的转运时间约为 3 h, 此时间段释放的微量 Cel 对药物转运并没有实际意义, 说明 Cel-GlcN 很可能在肠道运输中被摄取吸收, 并部分转运至毛细血管。

2.3 Cel-GlcN 细胞毒性评价

2.3.1 细胞培养 将 HepG2 细胞置于含有 15% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的高糖 DMEM 培养基, 37 °C、5% CO₂ 浓度的培养箱中传代培养, 保持细胞处于对数生长期。

2.3.2 MTT 检测细胞毒性 将对数生长期的 HepG2 细胞经胰蛋白酶消化后, 以 1 × 10⁵ 个/mL 的密度接种于 96 孔板中, 每孔体积为 100 μL。在 37 °C、5% CO₂ 浓度的培养箱中孵育 24 h。待细胞贴壁后, 分别加入 0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000、8.000 μmol/L 的 Cel 和 Cel-GlcN, 并设置对照组 (仅含有细胞及培养基) 和空白组 (无细胞)。每组设置 4 个复孔。继续培养 48 h 后, 每孔加入 100 μL MTT 溶液 (终质量浓度为 0.5 mg/mL)。在培养箱中孵育 4 h 后, 弃去上清液, 并加入 150 μL DMSO 进行着色。振荡 10 min 后, 使用酶标仪在 490 nm 处读取每孔的 A 值。随后, 按以下公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

以 HepG2 细胞评估了 Cel 和 Cel-GlcN 的体外细胞毒性。结果 (表 2) 显示, 培养至 24 h 时, Cel 和 Cel-GlcN 的 IC₅₀ 值分别为 (1.68 ± 0.37) μmol/L 和 (2.75 ± 0.11) μmol/L; 而培养至 48 h, 它们的 IC₅₀ 值分别为 (0.96 ± 0.23) μmol/L 和 (1.82 ± 0.56) μmol/L。与原始药物 Cel 相比, 偶联物 Cel-GlcN 对 HepG2 细胞的毒性明显较弱。当载药量质量浓度相同时, 偶联药物 Cel-GlcN 在相同时间对 HepG2 细胞活力的抑制均低于 Cel。这可能是由于偶联药物中的酰胺键在培养基中逐渐断裂, 缓慢释放出游离的 Cel, 从而减轻药物的不良反应。

2.3.3 高血脂细胞模型建立与检测 根据文献报道的方法^[21], 制备游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA)。按以下条件制备 FFA, 精密称取适量的油酸和棕榈

表 2 Cel 及 Cel-GlcN 在 24、48 h 内的体外细胞存活率

Table 2 *In vitro* cell viability of Cel and Cel-GlcN within 24 h and 48 h

样品	24 h 细胞存活率/%						
	0.125 μmol·L ⁻¹	0.250 μmol·L ⁻¹	0.500 μmol·L ⁻¹	1.000 μmol·L ⁻¹	2.000 μmol·L ⁻¹	4.000 μmol·L ⁻¹	8.000 μmol·L ⁻¹
Cel	93.86 ± 4.99	83.33 ± 4.30	74.76 ± 3.53	68.71 ± 2.46	46.12 ± 2.58	36.23 ± 2.26	21.23 ± 1.55
Cel-GLCN	95.71 ± 2.05	90.36 ± 3.13	88.32 ± 2.76	82.82 ± 2.30	68.56 ± 3.43	44.23 ± 3.98	25.26 ± 4.05
样品	48 h 细胞存活率/%						
	0.125 μmol·L ⁻¹	0.250 μmol·L ⁻¹	0.500 μmol·L ⁻¹	1.000 μmol·L ⁻¹	2.000 μmol·L ⁻¹	4.000 μmol·L ⁻¹	8.000 μmol·L ⁻¹
Cel	93.86 ± 4.99	80.66 ± 2.95	58.56 ± 3.52	51.33 ± 4.78	39.43 ± 4.12	36.21 ± 2.26	17.23 ± 2.15
Cel-GLCN	95.72 ± 2.05	93.03 ± 3.38	83.32 ± 2.45	74.81 ± 3.86	46.23 ± 3.92	44.24 ± 3.98	21.91 ± 7.02

酸,按照 2:1 的比例溶解在 1 mol/L KOH 溶液中,并在室温下搅拌过夜。缓慢滴入含有 10% BSA 蛋白的 PBS 溶液中,并调节 pH 值至 7.4。经过 0.22 μm 滤膜滤过后,得到含有 10% BSA 蛋白的 20 倍母液(FFA-BSA 8:1,所有实验组的 BSA 蛋白质量分数均控制在 0.5%)。使用 0.8 mmol/L 浓度的 FFA 诱导细胞体外脂肪变性 24 h,以建立非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFLD)细胞模型。将细胞分为模型组、对照组以及实验组(分为 Cel 和 Cel-GlcN 处理组)。经过药物处理 48 h 后,弃去细胞上清液,使用 PBS 洗涤 2 次,然后用 200 μL RIPA 裂解液破碎细胞。待裂解完全后,取 100 μL 裂解液转移至新的 EP 管中,使用 TC、TG 试剂盒检测细胞中的 TC 和 TG 含量。剩余的细胞裂解液使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。

肝脏中脂肪的积聚是导致 NAFLD 的一个重要因素,与多种疾病有关。0.6 mmol/L 的 FFA 成功诱导了体外高脂细胞模型(如表 3 所示)。与对照组相比较,在 24 h 内,模型组的 TG 含量增加了 220% ($P < 0.001$),TC 含量增加了 280% ($P < 0.001$),二者差异显著,这预示着高血脂模型的成功建立。在对模型组细胞使用不同浓度的 Cel 和 Cel-GlcN 处理后,实验组的 TC 和 TG 含量均有不同程度的减少。1 μmol/L 的 Cel 在处理 FFA 诱导的高脂模型时,相对于模型组,TG 水平显著降低 ($P < 0.05$),但 TC 含量与模型组没有明显差异。随着 Cel 浓度增加,TG 和 TC 的含量显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。因此,

表 3 不同浓度 Cel 和 Cel-GlcN 干预 FFA-HepG2 细胞后 TC、TG 含量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Changes of TC and TG contents of FFA-HepG2 cells after different concentrations of Cel intervention ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

药物	浓度/ (μmol·L ⁻¹)	TG/(μmol·μg ⁻¹ protein)	TC/(mmol·g ⁻¹ protein)
对照	-	0.756 ± 0.061	0.061 ± 0.009
FFA	-	1.553 ± 0.045 ^{###}	0.145 ± 0.004 ^{###}
FFA+Cel	1	1.451 ± 0.036*	0.138 ± 0.008
	2	1.252 ± 0.055**	0.126 ± 0.005*
	4	1.216 ± 0.085**	0.113 ± 0.002**
FFA+Cel-GlcN	1	1.511 ± 0.087	0.141 ± 0.006
	2	1.336 ± 0.050**	0.133 ± 0.004*
	4	1.296 ± 0.075**	0.118 ± 0.003**

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与 FFA 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
^{###} $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs FFA group.

本实验确定 2 μmol/L 的 Cel 为最低调脂药物浓度。

根据表 3 可以得知,1 μmol/L 的 Cel-GlcN 对模型组细胞的血脂水平下降并不显著,但 2、4 μmol/L 浓度的 Cel-GlcN 干预后,总体 TG 和 TC 水平呈现较小范围的梯度下降,呈现浓度相关性。这也预示着与 Cel 相比,Cel-GlcN 在 24 h 内对高脂细胞模型组血脂水平的降低程度较低,极可能是由于游离的 Cel 没有完全释放,需要更持续的发挥 Cel-GlcN 的缓慢释放效果。

2.3.4 细胞内脂滴形态观测 经药物处理后的细胞弃去培养液,经 PBS 洗涤 2 次后使用 4% 多聚甲醛固定 30 min。除去多聚甲醛后,使用 PBS 再次清洗细胞。每孔加入 0.5 mL 油红工作液(油红溶于异丙醇制备 0.5% 的储备液,与蒸馏水以 6:4 的比例混匀后滤过至液体澄清),染色 30 min。用 60% 异丙醇清洗至无明显浮沫后快速晾干。倒置显微镜下观察细胞形态。相比于对照组,高脂模型组的 HepG2 细胞形态发生了明显的变化,由图 7 可知,经 FFA 处理后的模型组细胞内出现大量的脂滴,且整个细胞形态有变圆的趋势,团聚现象也更加明显,在经过 Cel 和 Cel-GlcN 进行药物干预后,细胞脂滴逐渐减小,红色区域面积也与 Cel-GlcN 的浓度呈剂量依赖性减少,表明 Cel、Cel-GlcN 可有效减少细胞内脂滴数量,降低脂肪的沉积程度,同时,随着浓度的增大,细胞表面的脂滴大小及面积也呈现梯度的减少,具有剂量相关性。Cel 或 Cel-GlcN 在 1、2 μmol/L 的浓度下,Cel 与 Cel-GlcN 对于细胞脂滴形态、红色脂滴面积的改善效果并不明显,但随着浓度达到 4 μmol/L 时,可观察到 Cel 对红色脂滴面积的改善作用更加明显,团聚现象减弱。

2.3.5 Cel、Cel-GlcN 对肝脏氧化应激的影响 使用荧光探针 DCFH-DA 测定细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)相对含量。将 DCF-DA 母液通过 DMSO 制备为 50 mmol,并使用无血清细胞培养液 DMEM 稀释为 10 μmol/L。加入各组细胞后,在 37 °C 的培养箱中孵育 20 min。使用 PBS 清洗 2 次去除未反应的 DCFH-DA 探针。在特定的时间点(1、2、4、8、12、24 h),使用酶标仪读取每个孔在激发波长 488 nm、发射波长 525 nm 下的荧光强度(fluorescence intensity, F),按公式计算 ROS 相对含量。

$$\text{ROS 相对含量} = (F_{\text{实验}} - F_{\text{空白}}) / (F_{\text{对照}} - F_{\text{空白}})$$

肥胖是一种多因素引起的慢性疾病。其中,脂

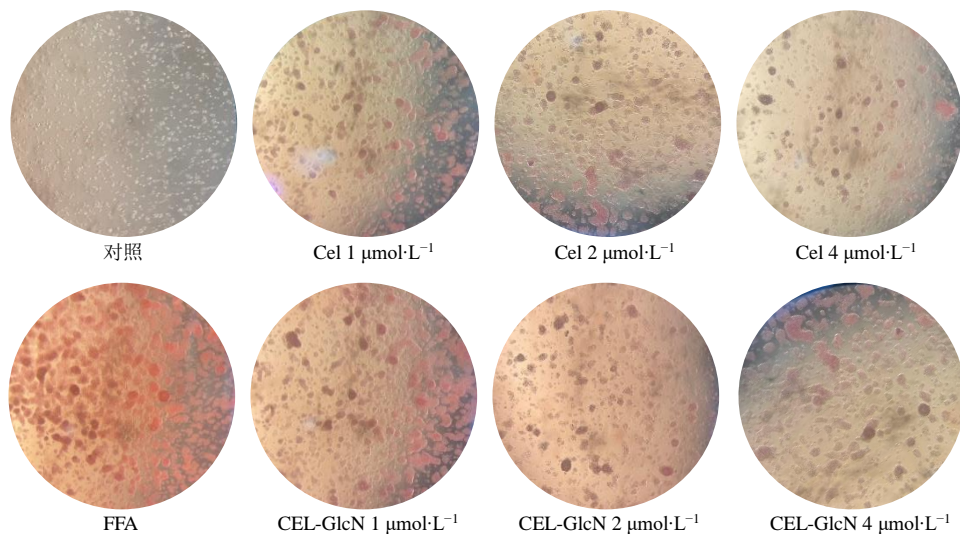
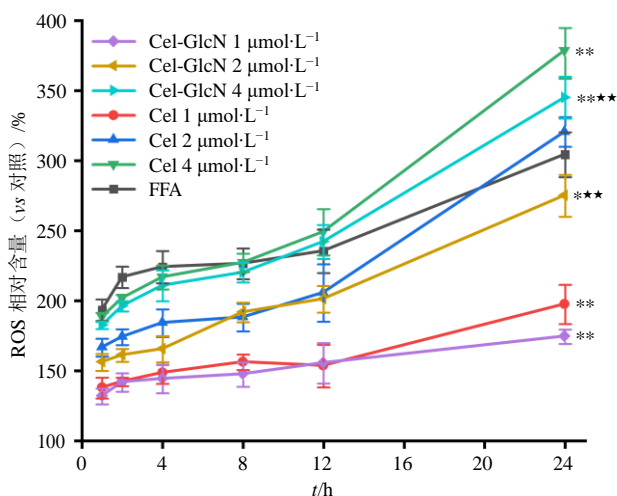


图7 Cel、Cel-GlcN 干预后各实验组细胞油红染色细胞图 (×200)

Fig. 7 Diagram of oil red stained cells in each experimental group after Cel and Cel-GlcN intervention (× 200)

肪组织分泌的脂肪因子可以诱导 ROS 的产生。当细胞内的 ROS 增多而无法及时清除时,就会导致细胞氧化损伤,这被称为氧化应激(oxidative stress, OS), OS 被认为是引发高脂血症等一系列代谢疾病的关键因素^[22]。当人体摄入过多的 FFA 时,摄入能量远大于消耗的能量,导致原本在线粒体上正常进行的 β-氧化部分转化为过氧化物酶体中的 β-氧化和内质网上的 ω-氧化。这不仅降低了脂肪代谢效率,还会产生更多的 ROS,引发机体氧化应激反应。本研究通过对比不同浓度的 Cel 和 Cel-GlcN 作用于高脂细胞模型后的 ROS 水平,其动力学曲线见图 8,发现 Cel 和 Cel-GlcN 对细胞内 ROS 产生呈现剂量相关性增加。

值得注意的是, Cel 在单独作用时同样也会引发细胞内的氧化应激反应^[23], 低剂量组 1 μmol/L Cel 和 Cel-GlcN 产生的 ROS 水平位于空白组和模型组之间,与 FFA 模型组之间差异呈显著性 ($P < 0.01$),表明 Cel 和 Cel-GlcN 均具有一定抑制机体氧化应激,降低 ROS 水平作用,相比于原始药物 Cel, Cel-GlcN 能更小程度减弱相关氧化应激反应。推测其可能与 Cel-GlcN 释放游离 Cel 介导提高超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助活化因子 1 (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1, PGC-1) 活性相关^[24]。在使用 2 μmol/L Cel 和 Cel-GlcN 处理后, Cel 组的细胞中 ROS 水平与 FFA 诱导的高脂模型细胞相当, Cel-GlcN 组所产生的 ROS 水平,与模型组相比较低具有显著性差异 ($P < 0.05$)。



与 FFA 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与同剂量 Cel 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs FFA group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs same dose Cel group.

图8 Cel 及 Cel-GlcN 对细胞 ROS 产生随时间变化的动力学曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 8 Kinetic curves of Cel and Cel-GlcN on cellular ROS over time ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

经过高浓度组 4 μmol/L Cel 和 Cel-GlcN 处理后, ROS 水平均高于 FFA 模型组 ($P < 0.01$),表明高浓度组的 Cel 和 Cel-GlcN 所引发的氧化应激反应较模型组更加剧烈,但 4 μmol/L Cel-GlcN 相比于同浓度组的 Cel, 诱发的 ROS 水平更低 ($P < 0.01$)。具体结果如表 4 所示,因此,体外研究表明,在使用 Cel-GlcN 作为药物干预时,不仅可以发挥 Cel 和 GlcN 的调脂、抗炎保肝及抗肿瘤等活性,还可在等浓度条件下减弱由原始药物 Cel 诱发的氧化应激反应。

表4 Cel、Cel-GlcN 干预诱导 HepG2 细胞 24 h 后 ROS 含量 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 ROS content in HepG2 cells induced by Cel and Cel-GlcN intervention for 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	ROS 相对含量/%
对照	—	100.0
FFA	—	304.3 ± 16.1 ^{###}
Cel	1	197.3 ± 14.1 ^{**}
	2	320.5 ± 10.6
	4	378.6 ± 20.0 ^{**}
Cel-GlcN	1	174.3 ± 5.1 ^{**}
	2	275.0 ± 15.5 ^{***}
	4	345.2 ± 15.7 ^{***}

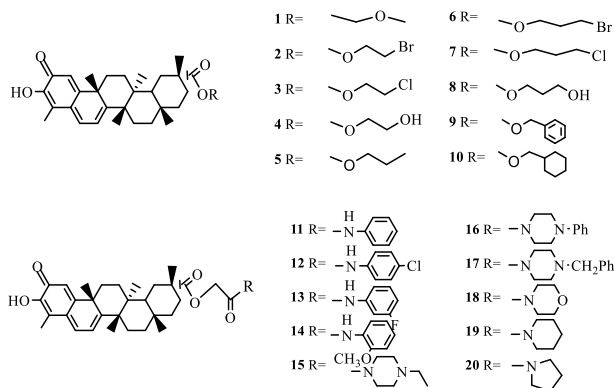
与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与 FFA 组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与同剂量 Cel 组比较: ^{**} $P < 0.01$ 。

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs FFA group; ^{**} $P < 0.01$ vs same dose Cel group.

3 讨论

虽然 Cel 可以与多个疾病靶点相互作用产生强烈药理学活性, 在治疗各种疾病中方面具有巨大潜力, 但鉴于其微弱的水溶性(常温下为 $1.23 \mu\text{g}/\text{mL}$), 较低的生物利用度 (SD 大鼠中 17%) 尤其是对各种器官具有明显的不良反应, Cel 临床应用面对的这些问题也是研究人员重点关注的对象, 因而对 Cel 进行结构修饰, 筛选出药理活性更为突出的衍生物成为了目前研究的热点。

作为一种五环三萜类结构, Cel 具有多个活泼基团, 主要包括 A/B 环的醌甲基、C-3 位羟基和 C-20 位羧基, 因此, 结构修饰大多集中在这些位置。其中, 基于第 20 位的羧酸基团进行结构修饰, 可以通过酰化和酯化反应引入合适的基团从而生成酰胺类、酯类及脲类衍生物。以往对 Cel 的酯类衍生物研究中发现, Cel 醌甲基部位为其发挥药理活性的必要部位, 一旦改变醌甲基的结构, 药物活性就会减弱。单伟光等^[23]通过对 Cel 第 20 位羧酸基团的修饰(添加卤素元素、苯环、六环以及羟基), 合成了一系列酯类衍生物(化合物 1~10, 图 9)。这些衍生物中, 化合物 1~4 和 6~8 的极性明显大于 Cel, 水溶性也更好。其中, 化合物 4 和 8 显示出最强的药物活性, 在体外 HepG2 细胞实验中表现出最好的效果, 这表明羟基的引入可能对 Cel 的极性和药理活性有很大改善作用。Zhang 等^[24]通过对 C-20 羧基修饰后引入胺和三唑类衍生物, 发现酰胺键的引入可以提高 Cel 的抗增殖活性(化合物 11~14)。



化合物 1~10 酯类; 化合物 11~20 酰胺类。
compounds 1—10 esters; compounds 11—20 amides.

图 9 Cel 酯类、酰胺类衍生物
Fig. 9 Esters and amide derivatives of Cel

在哌嗪衍生物类(化合物 15~20)中, 含氮杂环化合物也同样显示出良好的抗增殖活性, 这表明 Cel 的活性增加可能与引入的含氮基团有关。

GlcN 分子为含氮原子的六元环结构, 具有多个羟基, 水溶性较好且安全无毒, 易于与 Cel 分子的活性基团羧基发生酰胺化反应。因此, 为降低 Cel 的药物毒性, 本实验选择了 GlcN 与 Cel 进行酰胺化缩合, 在对比 2 种不同的反应体系 DMF、二氯甲烷后, 选择了产率及质量分数均更高的 DMF 体系进行小批量酰胺缩合制备 Cel-GlcN, 相比于 Tian 等^[11]的研究, 该反应无需对 Cel 的碳链进行延伸分步与伯胺缩合来实现酰胺化。此外, 部分学者为保证酰胺化反应中目标产物的产率, 会将羧酸反应为酰氯, 经醇淬灭后再与胺反应来提高该反应的效率^[25], 本研究方案使用高活性催化剂 PyBOP 在 DMF 溶剂中完成了该反应, 极大地减少了反应副产物生成, 同时也保证了具有良好的产率。

肥胖是一种代谢疾病, 若不及时干预, 可能引发糖尿病、高血压和高血脂症等风险。Cel 作为一种具有多种生物活性的天然产物, 在提供显著的减肥功效的同时, 其不良反应也是不可忽视的因素。本研究通过对 Cel 分子的羧酸基团进行修饰合成了 Cel-GlcN 这一衍生物, 大大改善了 Cel 的溶解性(达到 $226 \mu\text{g}/\text{mL}$)。通过比较 Cel 和 Cel-GlcN 在体外细胞试验中的活性, 结果验证了在相同剂量水平下, Cel-GlcN 与 Cel 具有相似的减肥调脂活性。此外, Cel-GlcN 可能通过缓控释方式释放游离的 Cel, 从而减轻其对细胞的毒性和机体内的氧化应激水平。相较于天然产物 Cel, Cel-GlcN 很可能减轻其对肝

脏、肾脏和心脑血管的不良反应，为 Cel 在临床应用上提供了有价值的线索。本研究结果表明，Cel-GlcN 很可能是改善 Cel 水溶性和不良反应的重要化合物，并为相关药物的研发提供了参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen S R, Dai Y, Zhao J, *et al.* A mechanistic overview of triptolide and celastrol, natural products from *Tripterygium wilfordii* Hook f. [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 104.
- [2] Su P, Guan H Y, Zhao Y J, *et al.* Identification and functional characterization of diterpene synthases for triptolide biosynthesis from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Plant J*, 2018, 93(1): 50-65.
- [3] Zhou Z L, Yang Y X, Ding J, *et al.* Triptolide: Structural modifications, structure-activity relationships, bioactivities, clinical development and mechanisms [J]. *Nat Prod Rep*, 2012, 29(4): 457-475.
- [4] 崔东晓, 乐世俊, 徐顶巧, 等. 雷公藤多苷及其主要活性成分抑制类风湿性关节炎的作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(20): 6913-6921.
- [5] 张慧, 曾泽宇, 王磊, 等. 雷公藤红素对肥胖型哮喘小鼠 Th17 细胞和气道炎症的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2019, 54(7): 542-548.
- [6] Li H Y, Zhang J, Sun L L, *et al.* Celastrol induces apoptosis and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells: An *in vitro* and *in vivo* study [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(1): e1604.
- [7] Shen Y F, Zhang X, Wang Y, *et al.* Celastrol targets IRAKs to block Toll-like receptor 4-mediated nuclear factor- κ B activation [J]. *J Integr Med*, 2016, 14(3): 203-208.
- [8] Xin W Y, Wang Q Y, Zhang D, *et al.* A new mechanism of inhibition of IL-1 β secretion by celastrol through the NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 814: 240-247.
- [9] 刘伯宇, 童南森, 李雅雅, 等. 头花蓼提取物对 2 型糖尿病自发模型 db/db 小鼠的降糖机制研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2017, 52(5): 384-390.
- [10] Choi S K, Park S, Jang S, *et al.* Cascade regulation of PPAR γ (2) and C/EBP α signaling pathways by celastrol impairs adipocyte differentiation and stimulates lipolysis in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Metabolism*, 2016, 65(5): 646-654.
- [11] Tian Q K, Han Q Q, Zhu X, *et al.* Celastrol-conjugated carboxymethyl chitosan for oral treatment of diet-induced obesity [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2021, 62: 102408.
- [12] 陈功森, 林龙飞, 刘宇灵, 等. 不同类型金属有机骨架材料合成及载雷公藤红素工艺研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(18): 5673-5681.
- [13] 荆紫琪, 王雪, 闫天月, 等. 靶向叶酸受体和线粒体的载雷公藤红素 PAMAM 纳米递药系统构建及体外抗炎作用 [J]. *药理学学报*, 2023, 58(3): 550-559.
- [14] Shi J F, Li J X, Xu Z Y, *et al.* Celastrol: A review of useful strategies overcoming its limitation in anticancer application [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 558741.
- [15] Davenport A, Frezza M, Shen M, *et al.* Celastrol and an EGCG pro-drug exhibit potent chemosensitizing activity in human leukemia cells [J]. *Int J Mol Med*, 2010, 25(3): 465-470.
- [16] 司佳奇, 刘洋, 蔡佳雨, 等. 甘露糖修饰雷公藤红素脂质体处方工艺优化及体外靶向性评价 [J]. *中草药*, 2022, 53(21): 6726-6733.
- [17] Wolfram J, Suri K, Huang Y, *et al.* Evaluation of anticancer activity of celastrol liposomes in prostate cancer cells [J]. *J Microencapsul*, 2014, 31(5): 501-507.
- [18] Zhang X H, Niebuur B J, Chytil P, *et al.* Macromolecular pHPMA-based nanoparticles with cholesterol for solid tumor targeting: Behavior in HSA protein environment [J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19(2): 470-480.
- [19] Zeng X H, Zhu X, Tian Q K, *et al.* Celastrol-conjugated chitosan oligosaccharide for the treatment of pancreatic cancer [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 89-98.
- [20] 迟海林, 李菲菲, 张李伟, 等. 氨基葡萄糖类物质在保健食品中的应用及研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44(8): 437-445.
- [21] Yang J S, Tongson J, Kim K H, *et al.* Piceatannol attenuates fat accumulation and oxidative stress in steatosis-induced HepG2 cells [J]. *Curr Res Food Sci*, 2020, 3: 92-99.
- [22] Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, *et al.* Inflammation, oxidative stress, and obesity [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(5): 3117-3132.
- [23] 马静, 王红磊, 王梓萱, 等. 雷公藤红素依赖 ROS 升高介导 DNA 损伤诱导肝癌细胞凋亡 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(3): 366-372.
- [24] 周永强, 周维, 岳兰昕, 等. 雷公藤红素参与脂质代谢调控的研究进展 [J]. *医药导报*, 2021, 40(5): 587-592.
- [25] 单伟光, 施航, 占扎君. 雷公藤红素衍生物合成与活性测定 [J]. *浙江工业大学学报*, 2015, 43(6): 607-610.
- [26] Zhang H J, Zhang G R, Piao H R, *et al.* Synthesis and characterisation of celastrol derivatives as potential anticancer agents [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2017, 33(1): 190-198.
- [27] 徐卫国, 张建君. 三氟乙酰氯制备技术进展 [J]. *浙江化工*, 2020, 51(12): 1-6.

[责任编辑 郑礼胜]