

酶促酯交换反应制备柚皮苷酯及其抑制 HepG2 细胞的增殖活性

赵曜明, 袁琨, 李晓凤

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文研究了非水相条件下利用固定化脂肪酶^{IMTL}催化柚皮苷的酯交换反应, 得到了一系列带有不同链长脂肪酸的柚皮苷酯。固定化脂肪酶^{IMTL}对反应显示出高催化活性, 其底物转化率均达到90%以上。在4 mL叔戊醇体系中, 50 mg^{IMTL}酶, 柚皮苷: 酰基供体=1:20, 50 °C的条件下, 反应3 h后, 区域选择性达99%以上。在对柚皮苷酯进行液相分析、质谱和核磁鉴定后, 发现酰化产物为柚皮苷-6''-O-酯。研究发现柚皮苷酯的 ClogP 发现随着链长的增长而增加, 其中柚皮苷肉豆蔻酯的 ClogP 值为 6.50。HepG2 细胞抑制实验的结果显示柚皮苷酯对 HepG2 细胞增殖的抑制活性与柚皮苷酯的脂溶性相关。相较于柚皮苷, 柚皮苷酯对 HepG2 细胞具有更好的抑制增殖作用。带有长链脂肪酸的柚皮苷肉豆蔻酯具有更加良好的脂溶性, 对 HepG2 细胞增殖抑制作用更强 (2.28%)。以上研究表明酶促合成生成的柚皮苷酯比柚皮苷具有更广阔的应用前景。

关键词: 脂肪酶; 柚皮苷; 酰化反应; 抗增殖活性

文章编号: 1673-9078(2020)05-223-230

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.030

Preparation of Naringin Ester by Enzymatic Transesterification and Its Inhibition of HepG2 Cell Proliferative Activity

ZHAO Yao-ming, YUAN Kun, LI Xiao-feng

(School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this paper, the immobilized lipase^{IMTL} was used to catalyze the transesterification of naringin under non-aqueous conditions to produce a series of naringin esters with different fatty acid chain length. The immobilized lipase^{IMTL} enzyme showed high catalytic activity towards the reaction, with substrate conversion ratios being above 90%. In a 4 mL tert-amyl alcohol system, 50 mg of lipase^{IMTL}, naringin: acyl donor=1:20, and the reaction was performed at 50 °C for 3 hours, and the regioselectivity was above 99%. After the naringin esters were analyzed and identified by HPLC, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance, the acylated products were naringin-6''-o-ester. It was found that the ClogP values of naringin esters increased with the increase of the chain length. Among them naringin myristate ClogP value was 6.50. The results of HepG2 cell inhibition experiments showed that the inhibitory activity of naringin esters on HepG2 cell proliferation was closely related to their lipophilicities. Compared with naringin, naringin esters had a better inhibitory effect on HepG2 cell. Naringin myristate with long-chain fatty acid had better fat solubility and stronger inhibitory effect on HepG2 cell proliferation (2.28%). The enzymatically synthesized esters may have a broader application prospect than naringin.

Key words: lipase; naringin; acylation; anti-proliferative activity

引文格式:

赵曜明,袁琨,李晓凤.酶促酯交换反应制备柚皮苷酯及其抑制 HepG2 细胞的增殖活性[J].现代食品科技,2020,36(5):223-230

ZHAO Yao-ming, YUAN Kun, LI Xiao-feng. Preparation of naringin ester by enzymatic transesterification and its inhibition of HepG2 cell proliferative activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 223-230

收稿日期: 2020-01-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21676105; 21978101); 广州市科技计划民生科技项目 (201803020031)

作者简介: 赵曜明 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 生物催化

通讯作者: 李晓凤 (1977-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 生物催化

柚皮苷是存在于芸香科植物柚中的一类黄酮类化合物,具有抗氧化、降低血糖水平、护肝^[1-3]等一系列生物活性。然而柚皮苷由于其低脂溶性与低水溶性,限制了其生物利用。有研究表明,通过对黄酮类化合物进行结构修饰,可以提高其脂溶性,从而增加其生物利用度。

为了提升柚皮苷的溶解度,目前已有通过物理包埋法、化学法和生物催化的方式来进行改性。采用物理法在加工的过程中会导致柚皮苷大量损失,降低了原料的利用率,同时加工过程步骤较多,不利于大量生产^[4]。传统的化学法对柚皮苷进行改性需要经过高温高压、基团保护和脱保护基团等步骤,方法步骤较为繁琐。而酶法酰化则可以避免这些问题,酶法具有反应条件温和、专一性强,反应更为绿色^[5]等特点。其中脂肪酶能够在非水相体系中催化水解反应的逆反应,即酯化反应^[6]。

HepG2 细胞来源于人的肝癌组织,具有许多肝脏特异性相关功能^[7]。有研究表明 HepG2 细胞与人正常肝细胞部分功能呈现相似性^[8],并且能够在标准培养条件下无限传代^[9],这些优势使得 HepG2 细胞现已成为广泛应用的体外实验模型。柚皮苷已被证明具有一定的护肝能力^[10],能够抑制 HepG2 细胞的增殖^[11],但是目前对于柚皮苷酯关于 HepG2 抑制增殖实验的研究尚未报道。

为了提高柚皮苷的生物利用度,利用脂肪酶^{IM}TL 催化柚皮苷与一系列带有不同链长的脂肪酸反应,生成了一系列柚皮苷酯。探讨了反应时间以及酰基供体链长对催化反应的影响;通过液相色谱、质谱和核磁对酰化产物进行了结构鉴定。通过 ClogP 值测定了酰化产物的脂溶性,最后探究了柚皮苷酯对 HepG2 细胞的抑制增殖情况。

1 材料与方法

1.1 原料

固定化脂肪酶 Lipase^{IM}TL,来源于 *Thermomyces lanuginosus*;购自诺维信公司。

柚皮苷水合物,分析纯、乙酸乙烯酯(VA)、丁酸乙烯酯(VB)、己酸乙烯酯(VH)、辛酸乙烯酯(VO)、月桂酸乙烯酯(VD)、肉豆蔻酸乙烯酯(VM),均购自日本 TCI 公司;甲醇,购自德国 Merck 公司,色谱纯;甲醇、叔戊醇,分析纯,购自天津市科密欧化学试剂公司;戊二醛、亚甲蓝,分析纯,购自上海源叶生物科技有限公司;Hank 平衡盐溶液(HBSS)、CCK-8 试剂、DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素、

链霉素,美国 Gibco 生物科技公司。

1.2 仪器与设备

Waters 高效液相色谱仪,配备 600 控制器、2996 光电二极管矩阵 PDA 紫外检测器、717 plus 自动进样器。色谱柱:4.6×250 mm (5 μm) Zorbax SB-C18 分析型色谱柱(Agilent Technologies Co, Ltd, USA);Bruker AV600 型核磁共振仪,瑞士布鲁克公司;液相色谱-质谱联用仪,型号:7890A/5975C,美国安捷伦公司;超净工作台:SW-CF-IF,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;高速离心机,美国 Thermo 公司;HZQ-F100 全温气浴振荡培养箱;3543 型 CO₂ 培养箱,美国 Thermo 公司;酶标仪,美国 Thermo 公司;分析天平,上海精密科学仪器有限公司;移液枪(5 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 mL、5 mL),德国 Eppendorf。

1.3 实验方法

1.3.1 酶法催化柚皮苷酰化反应

向 10 mL 锥形瓶中加入 4 mL 叔戊醇溶液、30 mmol/L 柚皮苷、600 mmol/L 己酸乙烯酯、固定化脂肪酶^{IM}TL 50 mg,混合均匀。在恒温气浴培养箱中反应 4 h (50 °C, 180 r/min)。定时取样 100 μL, 12000 r/min 离心 2 min 分离酶以终止反应,取 20 μL 上清液,色谱级甲醇稀释 50 倍,液相色谱仪自动进样 20 μL。

1.3.2 底物转化率、区域选择性的计算^[12]

1.3.2.1 底物转化率(Conversion, %)

分别测定反应前后柚皮苷的峰面积,以反应前后峰面积的差值与反应前的峰面积之比计算底物转化率。

$$\text{底物转化率 Conversion (\%)} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$$

其中: A₀, A₁ 分别表示反应前后柚皮苷的峰面积。

1.3.2.2 区域选择性 (Regioselectivity, %)

根据目标酰化产物的峰面积与所有酰化产物的峰面积之比来计算反应的区域选择性。

$$\text{区域选择性 Regioselectivity (\%)} = S_i / S_{\text{total}} \times 100\%$$

其中: S_i 表示目标酰化产物的峰面积, S_{total} 表示所有酰化产物的峰面积之和。

1.3.3 高效液相色谱 (HPLC) 分析

仪器: Waters 高效液相色谱仪;配备 PDA 紫外检测器;检测波长为 254 nm;色谱柱: 4.6×250 mm, 5 μm Zorbax SB-C18 分析型色谱柱。

流动相: 70%甲醇-水溶液;流速 0.90 mL/min;柱温 28 °C;进样量 20 μL。

1.3.4 产物的分离纯化和结构鉴定

产物的分离纯化通过薄层色谱 (TLC) 的方式进行。首先将反应后的溶液与酶液分离 (10000 r/min, 5

min), 上清液移入圆底烧瓶进行真空减压浓缩, 待溶液剩少许时, 加入甲醇复溶, 重复 2~3 次, 以除去有机试剂, 得到以甲醇为溶剂的粗产物。

利用薄层色谱对产物进行分离纯化。首先确定薄层色谱展开剂比例, 然后在薄层色谱板 (GF254 200×200 mm) 上点样制备, 上样量为 1 μL , 重复点样 3 次。层析结束后, 通过紫外仪观察分离产物条带, 收集含有产物条带的硅胶粉, 甲醇溶解, 离心后减压真空浓缩, 再用甲醇复溶, 重复 3 次以去除硅胶粉颗粒, 过膜后得产物浓缩液。真空干燥 48 h 得到柚皮苷己酯。

柚皮苷与己酸乙烯酯生成的产物, 采用乙酸乙酯/甲醇/甲酸=15/1/0.5 作为层析液。产物分离纯化后, 通过 HPLC 进行纯度测定, 用高分辨率质谱和核磁共振谱进行结构检测。

1.3.5 酰基供体结构对脂肪酶催化柚皮苷酯合成反应的影响

向 10 mL 锥形瓶中加入 4 mL 叔戊醇溶液、30 mmol/L 柚皮苷、固定化脂肪酶TMTL 50 mg、再分别加入 600 mmol/L 乙酸乙烯酯、丁酸乙烯酯、己酸乙烯酯、辛酸乙烯酯、月桂酸乙烯酯和肉豆蔻酸乙烯酯后, 混合均匀。在恒温气浴培养箱中反应 3 h (50 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min)。反应 0、1、2、3 h 分别取样 100 μL , 12000 r/min 离心 2 min 分离酶, 以终止反应, 然后取 20 μL 上清液, 色谱级甲醇稀释 50 倍, 液相色谱仪自动进样 20 μL 。

1.3.6 产物的水-正辛醇分配系数测定 (ClogP)

正辛醇-水分配系数 (ClogP) 值的测定参照之前酰化产物的方法^[13]。将得到的柚皮苷及其酯的化学结构式输入 ChemBioDraw Ultra 14.0 软件, 通过软件模拟得到柚皮苷及其酯的 ClogP 值。

1.3.7 细胞培养^[14]

配置 DF 培养基: 采用 10% FBS、双抗 (青霉素、链霉素终浓度各为 100 U/mL) 的 DMEM 培养基混合制得。HepG2 细胞采用 DF 培养基培养, 细胞培养箱设置为 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 。取对数生长期细胞进行传代培养。

1.3.8 细胞毒性实验

在 96 孔板中加入 100 μL 已传代培养后的 HepG2 细胞悬液 (4×10^5 CFU/mL), 在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h, 移去培养液, PBS 溶液清洗贴壁细胞 2 次。加入含 100 μL 不同浓度的柚皮苷及其酯衍生物的 DF 培养液。空白对照组只加入 DF 培养液。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 移去 DF 培养液, 再用 PBS 清洗细胞 2 次。每个孔加入 10 μL CCK-8 溶液显色, 混合均匀后, 温育 1 h (5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$)。然后

利用酶标仪在 450 nm 波长条件下测定吸光值。若样品组与对照组的比值低于 90%, 则认为该浓度下样品具有细胞毒性。

1.3.9 细胞抗增殖实验^[15]

向 96 孔板中加入 100 μL 混合均匀的 HepG2 细胞悬液 (1×10^5 CFU/mL), 在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h, 移去培养液, PBS 溶液清洗贴壁细胞 2 次。加入含 100 μL 不同浓度的柚皮苷及其酯的 DF 培养液, 对照组加入 100 μL DF 培养液。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 72 h 后, 移去培养液, 再用 PBS 溶液清洗 2 次。每孔加入 50 μL 亚甲基蓝溶液 (1.25% 戊二醛、0.6% 亚甲基蓝和 HBSS), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下温育 1 h。然后除去亚甲基蓝溶液, 用蒸馏水温和清洗孔板, 直至无蓝色液体排出, 短暂风干, 加入 100 μL 洗脱液 (50% 乙醇、49% PBS 和 1% 乙酸), 将 96 孔板置于振荡培养器上振荡 15 min, 使已染色的细胞重新分散成均匀的悬液, 利用酶标仪在 570 nm 下测定吸光值。柚皮苷及酯衍生物抑制 HepG2 细胞增殖活性以细胞增殖抑制率 (%) 表示。

1.4 数据处理

所有实验重复 3 次, 结果用 $x \pm s$ 表示, 采用 origin 2017 和 SPSS 17.0 进行数据分析和显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶TMTL 催化柚皮苷与己酸乙烯酯合成反应

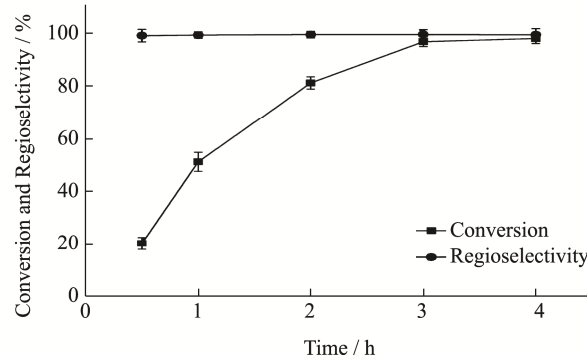


图1 脂肪酶TMTL 催化柚皮苷酯交换反应与时间的关系

Fig.1 LipaseTMTL enzyme catalyzes transesterification of naringin reaction as a function of time

酶法反应具有选择特异性强, 反应条件温和, 产率高等特点。本实验研究了脂肪酶TMTL 与己酸乙烯酯在叔戊醇中的反应, 实验结果如图 1 所示, 脂肪酶TMTL 表现出对柚皮苷具有良好的催化活性。在经过 3

h 的酰化反应后, 底物转化率达到 96.64%, 选择特异性达到 99.00%, 而继续反应达到 4 h 时, 底物转化率和区域选择性基本保持不变, 故反应 3 h 为最佳反应时间。Zheng 等^[16]人通过超声处理 Novozym435 酶提高其催化效率, 以柚皮苷为底物反应, 底物摩尔比为 1:4 时, 反应 100 h 后其底物转化率可达到 83.20%。而杜理华^[17]等人研究了利用 ^{IM}TL 酶催化柚皮苷与月桂酸的反应, 当反应条件为 *V*(叔戊醇):*V*(DMSO)=6:1, 底物摩尔比 1:7, 反应温度 52 °C, 反应 12 h 后, 底物转化率达到 85.00%。本研究中反应在 3 h 后底物转化率即可达到 96.64%, 实现了在更短的反应时间达到了更高的底物转化率。

2.2 脂肪酶 ^{IM}TL 催化柚皮苷酯交换反应的高效液相色谱

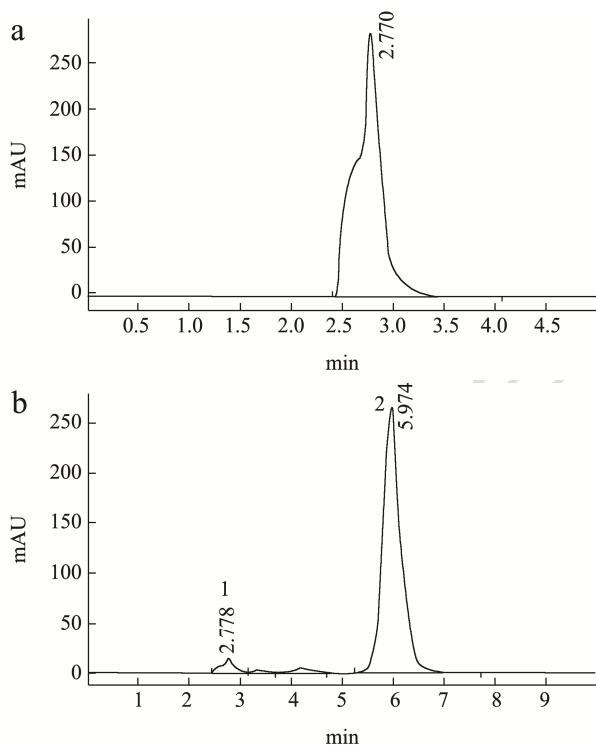


图2 脂肪酶 ^{IM}TL 催化柚皮苷酯交换反应前 (a) 和反应后 (b) 的高效液相色谱图

Fig.2 Chromatograms of samples before (a) and after (b) transesterification of naringin catalyzed by lipase ^{IM}TL

注: a, 反应前; b, 反应后; 1, 柚皮苷峰; 2, 柚皮苷己酯峰。

在此次研究中, 利用 SB-C18 色谱柱检测反应前后反应液中的物质变化。液相色谱条件是: 80%甲醇水, 流速 0.90 mL/min。如图 2 所示, 图 a 为反应 0 h

液相色谱图, 此时只有柚皮苷, 其保留时间为 2.77 min; 图 b 为反应 3 h 后的液相色谱图, 1 峰面积急剧降低, 反应后在 5.97 min 出现了新峰, 且新峰峰面积高, 表明反应基本结束。通过薄层层析的方式分离纯化, 产物被纯化后进行结构分析。

2.3 脂肪酶 ^{IM}TL 催化柚皮苷酰化反应的质谱鉴定

质谱法是鉴定物质最有力的方法之一, 利用电场和磁场将运动的离子按照质荷比分离后进行检测, 测出离子的准确质量后, 通过与推测出的产物分子式进行对比, 确定结构信息。图 3 为柚皮苷酯的高分辨率质谱图。从图中分析显示, 脂肪酶 ^{IM}TL 催化得到的柚皮苷酰化反应仅生成单酯 ($C_{33}H_{42}NaO_{15}$, 701 *m/z* [M+Na]⁺)。

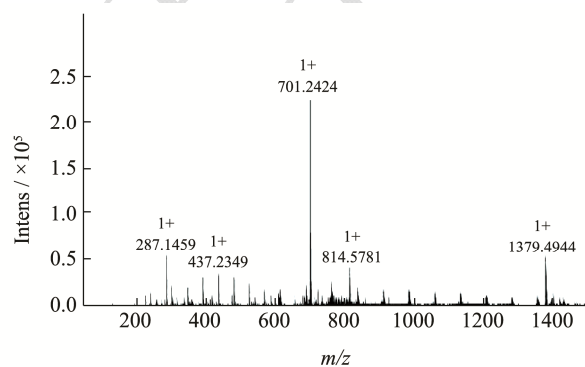


图3 柚皮苷己酯高分辨率质谱图

Fig.3 The high resolution mass spectrometry of enzymatically synthesized naringin hexanoate

2.4 脂肪酶 ^{IM}TL 催化柚皮苷转酯化反应的产物核磁共振碳谱分析

核磁共振碳谱测定高磁场中原子核对射频辐射的吸收, 从而可以用来确定柚皮苷中 C 的偏移情况, 确定反应位点。柚皮苷在甲醇中具有良好的溶解度, 故采用氘代甲醇作为溶剂进行核磁测定。

如表 1 所示, 柚皮苷酯在 A、B、C 环碳原子信号峰没有明显位移, 而葡萄糖苷链上 C5'' 和 C6'' 分别出现了 3.42 ppm 和 2.34 ppm 的位移, 且 C5'' 的化学位移是从高场移向低场, C6'' 的化学位移从低场向高场移动; 另外在产物的核磁图谱中出现了底物柚皮苷没有的 C=O 和 CH₃ 两个信号峰, 因此可以确定酰化位点发生在 C6'' 上, 生成了柚皮苷-6''-O-己酯。

表1 柚皮苷己酸酯的 NMR 化学位移

Table 1 Chemical shift of naringin hexanoate

Carbon number	Naringin/ppm	Naringin ester/ppm	Chemical shift/ Δ ppm
C4	197.13	197.10	0.03
C7	165.16	165.09	0.07
C5	163.58	163.56	0.02
C9	163.22	163.33	-0.11
C4'	157.68	157.72	-0.04
C2', C6'	129.43	129.49	-0.06
C1'	127.73	127.61	0.12
C3', C5'	114.93	114.99	-0.06
C10	103.48	103.66	-0.18
C11''	101.11	101.08	0.03
C1'''	97.96	98.05	-0.09
C6	96.43	96.72	-0.29
C8	95.35	95.40	-0.05
C2	79.32	79.42	-0.1
C3''	77.61	77.54	0.07
C5''	77.54	74.12	3.42
C2''	76.70	77.42	-0.72
C4'''	72.50	72.53	-0.03
C2'''	70.77	70.77	0
C3'''	70.74	70.47	0.27
C4''	69.80	70.44	-0.64
C5'''	68.58	68.59	-0.01
C6''	60.84	63.18	-2.34
C3	42.76	43.09	-0.33
C6	16.85	16.85	0
C=O	- ¹	174.01	
CH ₃	-	12.89	

注: 1 表示没有检测到信号峰。

表2 不同链长酰基供体对脂肪酶^{IM}TL 催化柚皮苷酯合成反应的影响^aTable 2 Effect of different acyl donors on transesterification of naringin catalyzed by lipase^{IM}TL

Entry	Acyl donor	Conversion/%	6''-Regioselectivity/%	Mass spectral peak m/z $[M+Na]^+$
1	Vinyl acetate	98.67±1.34	≥99%	645.18
2	Vinyl butyrate	97.67±2.88	≥99%	673.21
3	Vinyl hexanoate	96.64±1.63	≥99%	701.24
4	Vinyl octanoate	96.10±1.19	≥99%	729.27
5	Vinyl dodecanoate	92.53±0.98	≥99%	785.34
6	Vinyl myristate	91.76±1.63	≥99%	813.37

注: a, 实验条件见 1.3.1。

2.5 不同链长酰基供体对脂肪酶^{IM}TL 催化柚皮苷酯合成反应的影响

酰基供体作为底物之一, 其碳链长度是影响相关生物催化活性的关键因素之一。有研究表明, 在黄酮类化合物中加入长链脂肪酸, 可以有效增加产物的脂溶性, 同时能提升产物的生理活性^[18,19]。为了探讨不

同链长酰基供体对柚皮苷酯合成反应的影响因素, 选择了6种不同链长的酰基供体(乙酸乙烯酯、丁酸乙烯酯、己酸乙烯酯、辛酸乙烯酯、月桂酸乙烯酯和肉豆蔻酸乙烯酯)与柚皮苷反应, 分别生成了柚皮苷乙酯(NA)、柚皮苷丁酯(NB)、柚皮苷己酯(NH)、柚皮苷辛酯(NO)、柚皮苷月桂酯(ND)和柚皮苷肉豆蔻酯(NM)。结果如表2所示, 在脂肪酶TMTL的催化作用下, 短、中链的酰基供体与柚皮苷反应时, 柚皮苷酯的转化率能够达到95%以上; 而长链酰基供体与柚皮苷反应时, 柚皮苷酯的转化率随着链长的增加而降低, 带有最长链脂肪酸的柚皮苷肉豆蔻酯的底物转化率为91.76%。NadineGalonde^[20]等人利用响应面法优化了Novozym 435催化甘露糖与肉豆蔻酸反应条件, 在反应温度为80℃, 底物摩尔比1:10的条件下, 反应24h后底物转化率为72.20%。袁亭亭^[21]等人研究了葛根素与不同链长酰基供体的反应规律, 发现在链长的增加会影响底物的转化率, 在Novozym 435催化葛根素与肉豆蔻酸乙烯酯的反应中, 在反应温度为40℃, 底物摩尔比为1:30的条件下, 反应6h后底物转化率为45.30%, 推测原因可能是酰基供体链长越长, 反应时的空间位阻越大, 从而导致了反应速率的下降。本研究中同样存在酰基供体链长增加导致底物转化率下降的现象, 但带有最长链的柚皮苷肉豆蔻酯底物转化率仍能保持在90%以上。

2.6 正辛醇-水分配系数的测定 (ClogP)

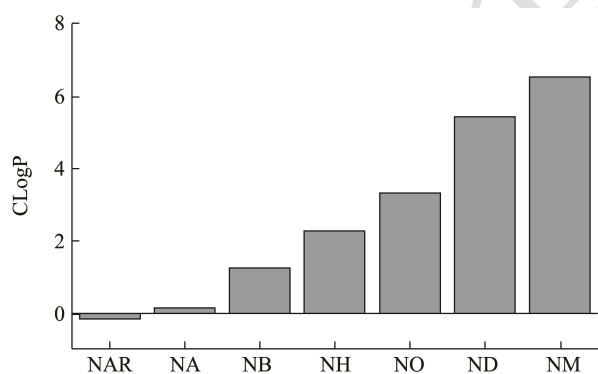


图4 柚皮苷及酯衍生物的ClogP值
Fig.4 ClogP of naringin and its esters

ClogP 值是指化合物在正辛醇-水两相溶剂中分配系数比值的对数值, 它反应了化合物在油水两相体系中的分布值。ClogP 值越大, 表明该化合物脂溶性越高, 反之则水溶性越高。有研究表明^[22], 具有适宜的ClogP 值的药物具有较高的生物利用度。图4表明, 相较于柚皮苷的ClogP 值(-0.09), 酰化后的柚皮苷酯衍生物相较于柚皮苷ClogP 均有一定程度的提高, 且随着链长的增加而升高, 带有最长脂肪酸链的柚皮

苷肉豆蔻酯的ClogP 可达到6.50, 说明柚皮苷酯的脂溶性随着酰基供体链长的增加而增大。

2.8 柚皮苷及其酯衍生物对 HepG2 细胞抑制

增殖活性的分析

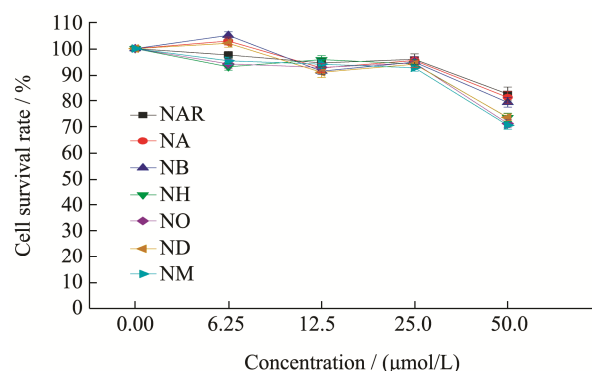


图5 柚皮苷及酯衍生物对 HepG2 细胞的毒性

Fig.5 HepG2 cell survival rate upon naringin and its esters

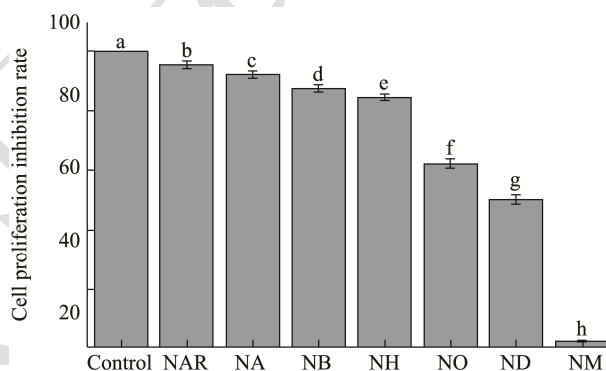


图6 柚皮苷及其酯的抗 HepG2 细胞增殖活性分析

Fig.6 Antiproliferative activity of naringin and its esters against HepG2 cells

注: a、b、c、d、e、f、g、h 分别表示各实验组之间实验结果具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

高剂量的黄酮类化合物会对细胞产生毒性而导致细胞死亡, 而低剂量的化合物则会因为浓度过低未达到起效浓度而对细胞无影响, 所以选择合适的化合物浓度是对保证细胞抑制增殖实验的前提条件^[23]。从图5可知, 当浓度在0~6.25 μmol/L 时, 柚皮苷及酯衍生物对 HepG2 细胞基本没有毒性; 而当浓度进一步升高, 在12.50~25.00 μmol/L 时, 柚皮苷及酯衍生物对 HepG2 细胞的细胞存活率在90%以上, 此时柚皮苷酯对 HepG2 细胞具有较弱的毒性, 而当柚皮苷及其酯的浓度在50 μmol/L 以上时, 其细胞存活率均低于90%, 表明毒性出现进一步的增强, 综合细胞存活率与起效浓度的影响, 最终选择25.00 μmol/L 为最佳实验浓度。

Xie 等^[24]探究了柚皮苷对于 HepG2 肝癌细胞的影响, 研究发现柚皮苷可以上调 miR-19b 的表达, 同时

诱导 HepG2 肝癌细胞的凋亡。Rathi 等^[25]研究了柚皮苷对 CdCl₂ 诱导的肝毒性对 HepG2 细胞的影响, 将柚皮苷的保护机制归因于其抗氧化能力, 它有助于维持氧化还原稳态并且防止 CdCl₂ 介导的细胞毒性。目前尚未有关于柚皮苷及其酯对于 HepG2 细胞抑制实验的研究。

在本实验中, 柚皮苷及其酯对 HepG2 细胞抑制增殖作用的结果如图所示。在本实验中, 对 HepG2 细胞的抑制增殖能力的活性大小为: 柚皮苷 (NAR) <柚皮苷乙酸酯 (NA) <柚皮苷丁酸酯 (NB) <柚皮苷己酸酯 (NH) <柚皮苷辛酸酯 (NO) <柚皮苷月桂酸酯 (ND) <柚皮苷肉豆蔻酸酯 (NM) ($p < 0.05$)。从图 6 中可以看到, 在 25.00 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液浓度下, 带有短链的柚皮苷酯 (NA、NB、NH) 对 HepG2 具有一定的抑制增殖作用, 对 HepG2 细胞抑制增殖率分别为 92.01%, 87.43%, 84.11%, 但抑制增殖率仍在 80% 以上。而带有中、长链酰基供体的柚皮苷酯对 HepG2 细胞的抑制能力更强, 其中柚皮苷肉豆蔻酯对 HepG2 细胞的抑制增殖率降低至 2.28%。白冰^[26]等人研究了肉豆蔻酸抗单核细胞增多性李斯特菌的增殖活性机理, 发现肉豆蔻酸能够抑制单增李斯特菌的增殖, 且呈现出剂量依赖的特性。在本研究中, 推测存在两方面的原因使得柚皮苷肉豆蔻酯具有良好的 HepG2 细胞增殖能力, 一方面可能是带有长链脂肪酸的柚皮苷酯, 脂溶性更强, 在同等浓度下进入细胞内的化合物含量更多, 另一方面原因则是进入细胞内的柚皮苷肉豆蔻酯水解后分别生成柚皮苷和肉豆蔻酸, 肉豆蔻酸及柚皮苷均能对 HepG2 细胞产生抑制效果, 但其详细的抑制机制仍需进一步的研究。

3 结论

本实验利用固定化脂肪酶^{IM}TL 催化柚皮苷与不同链长的脂肪酸酯生成了一系列柚皮苷酯衍生物, 比较了衍生物之间的 ClogP 值及其抗 HepG2 肿瘤细胞增殖活性。研究表明, 在 4 mL 反应体系中, 以叔戊醇为反应溶剂、50 mg 脂肪酶^{IM}TL、柚皮苷:酰基供体=1:20, 50 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min 的条件下, 反应 3 h, 底物转化率均达到 90% 以上。反应产物经过薄层色谱 (TLC) 分离并纯化后, 通过高效液相色谱分析、质谱和核磁 (¹³C-NMR) 进行了结构鉴定。结果表明脂肪酶^{IM}TL 催化柚皮苷酯化反应, 生成了一系列柚皮苷脂肪酸单酯, 区域选择性达 99% 以上。ClogP 值实验表明随着酰基供体链长的增加, 柚皮苷酯的脂溶性越强, 柚皮苷肉豆蔻酯的 ClogP 达到 6.50。而在 HepG2 细胞实验中, 拥有长链脂肪酸酯的柚皮苷酯对 HepG2 肿瘤细胞

表现出更强的抑制增殖能力, 其中柚皮苷肉豆蔻酯对 HepG2 细胞的抑制率为 2.28%。本研究在酶法合成柚皮苷酯的基础上, 对脂溶性及抑制肝癌细胞增殖能力进行了初步探究, 为后续柚皮苷酯的其他生理活性研究提供了理论依据。

参考文献

- [1] MerveBacanlı, A Ahmet Başaran, Nurşen Başaran, et al. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin [J]. Food and Chemical Toxicology, 2015, 81: 160-170
- [2] YanYang, Wenyan Gong, et al. Naringin ameliorates experimental diabetic renal fibrosis by inhibiting the ERK1/2 and JNK MAPK signaling pathways [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 50: 53-62
- [3] Chuying Zhou, Yuling Lai, et al. Naringin attenuates alcoholic liver injury by reducing lipid accumulation and oxidative stress [J]. Life Sciences, 2019, 216: 305-312
- [4] Cao R, Li X, Zhou Z, et al. Synthesis and biophysical analysis of naringin-chitooligosaccharide complex [J]. Natural Product Research, 2019: 1-7
- [5] Shuji Adachi, Takashi Kobayashi. Synthesis of esters by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water-miscible organic solvent [J]. Journal of bioscience & bioengineering, 2005, 99(2): 87-94
- [6] Aulakh S S, Prakash R, Dr. Optimization of medium and process parameters for the production of lipase from an oil-tolerant *Aspergillus* sp. (RBD-01) [J]. Journal of Basic Microbiology, 2010, 50(1): 37-42
- [7] Liguori M J, Blomme E A G, Waring J F. Trovafloxacin-induced gene expression changes in liver-derived *in vitro* systems: Comparison of primary human hepatocytes to HepG2 cells [J]. Drug Metabolism and Disposition, 2008, 36(2): 223-233
- [8] Bai Y, Xue Y, Xie X, et al. The RNA expression signature of the HepG2 cell line as determined by the integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles [J]. Gene, 2014, 548(1): 91-100
- [9] Faedmaleki F, Shirazi F H, Salarian A A, et al. Toxicity effect of silver nanoparticles on mice liver primary cell culture and HepG2 cell line [J]. Iranian Journal of Pharmaceutical Research (IJPR), 2014, 13(1): 235-242
- [10] Chuying Z, Yuling L, Peng H, et al. Naringin attenuates alcoholic liver injury by reducing lipid accumulation and oxidative stress [J]. Life Sciences, 2018:

- S0024320518304089
- [11] Banjerdpongchai R, Wuotiwai B, Khaw-On P. Induction of human hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis by naringin [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2016, 17(7): 3289
- [12] 辛璇.非水介质中全细胞促曲克芦丁丁酰化反应的研究[D].广州:华南理工大学,2017
XIN Xuan. Study on acylation of troxerutin catalyzed by whole-cell biocatalyst in non-aqueous phase [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017
- [13] Xia X R, Baynes R E, Monteiro-Riviere N A, et al. Determination of the partition coefficients and absorption kinetic parameters of chemicals in a lipophilic membrane/water system by using a membrane-coated fiber technique [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005, 24(1): 15-23
- [14] Felice D L, Sun J, Liu R H. A modified methylene blue assay for accurate cell counting [J]. Journal of Functional Foods, 2009, 1(1): 109-118
- [15] Jiang X, Li T, Liu R H. 2 α -Hydroxyursolic acid inhibited cell proliferation and induced apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells through p38/MAPK signal transduction pathway [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016: ACS. JAF. 5b04852
- [16] Zheng M M, Wang L, Huang F H, et al. Ultrasound irradiation promoted lipase-catalyzed synthesis of flavonoid esters with unsaturated fatty acids [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 95(Complete): 82-88
- [17] 杜理华,徐亮亮,成炳灼.一种脂肪酶催化柚皮苷酯化反应的研究[J].浙江工业大学学报,2017,45(1):51-55
DU Li-hua, XU Liang-liang, CHENG Bing-zhuo. Study on a lipase-catalyzed esterification of naringin [J]. Journal of Zhejiang University of Technology, 2017, 45(1): 51-55
- [18] Zhang M, Xin X, Lai F, et al. Cellular transport of esculin and its acylated derivatives in Caco-2 cell monolayers and their antioxidant properties *in vitro* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017: ACS. JAF. 7b02525
- [19] 段煜.脂肪酶选择性催化合成芦丁脂肪酸酯及物化性质[D].成都:四川大学,2006
DUAN Yu. Selective catalytic synthesis of rutin fatty acid ester by lipase and its physical and chemical properties [D]. Chengdu: Sichuan University, 2006
- [20] Galonde N, Brostaux Y, Richard G, et al. Use of response surface methodology for the optimization of the lipase-catalyzed synthesis of mannosyl myristate in pure ionic liquid [J]. Process Biochemistry, 2013, 48(12): 1914-1920
- [21] 袁亭亭.生物催化葛根素脂肪酸酯合成及其生理活性研究[D].广州:华南理工大学,2018
YUAN Ting-ting. Biocatalytic synthesis and physiological activities of puerarin esters [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018
- [22] Stefanie D Krämer. Absorption prediction from physicochemical parameters [J]. Pharmaceutical Science & Technology Today, 1999, 2(9): 373-380
- [23] Yang J, Pi C, Wang G. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy Biomedecine & pharmacotherapie, 2018, 103: 699-707
- [24] Xie D, Yuan P, Wang D, et al. Effects of naringin on the expression of miR-19b and cell apoptosis in human hepatocellular carcinoma [J]. Oncology Letters, 2017
- [25] Rathi V K, Das S, Paramalli Raghavendra A, et al. Naringin abates adverse effects of cadmium-mediated hepatotoxicity: An experimental study using HepG2 cells [J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2017: e21915
- [26] 白兵.肉豆蔻酸抗单核细胞增多性李斯特菌的活性及机制研究[D].长春:吉林大学,2017
BAI Bing. Study on the activity and mechanism of myristic acid against *Listeria monocytogenes* [D]. Changchun: Jilin University, 2017