

## 染料木素的磷酰化结构改造及与溶菌酶的弱相互作用

陈晓岚<sup>1\*</sup>, 郁章琦<sup>1</sup>, 屈凌波<sup>1,2</sup>, 袁金伟<sup>1</sup>, 卢建莎<sup>1</sup>, 赵玉芬<sup>1,3</sup>

(1. 河南省化学生物与有机化学重点实验室 郑州大学 化学系, 河南 郑州 450052; 2. 安阳师范学院, 河南 安阳 455002; 3. 教育部生命有机磷化学及化学生物学重点实验室 清华大学 生命工程科学院, 北京 100084)

**摘要:** 采用改进的 Atherton-Todd 反应对染料木素进行磷酰化结构改造, 得到了 4 种新的磷酰化产物, 并通过 ESI-MS, NMR 进行了结构确认, 结果发现磷酰化试剂对染料木素羟基的磷酰化具有较好的选择性, 反应主要发生在染料木素 7 位羟基; 进一步利用 ESI 质谱技术, 对 4 种磷酰化染料木素与大分子溶菌酶的弱相互作用进行测定, 显示所有的磷酰化产物均与溶菌酶形成非共价复合物。

**关键词:** 染料木素; 磷酰化; 二烷基染料木素磷酸酯; 选择性; 溶菌酶; 弱相互作用

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)04 - 0396 - 05

## Phosphorylated modification of genistein and their interaction with lysozyme

CHEN Xiao-lan<sup>1\*</sup>, YU Zhang-qi<sup>1</sup>, QU Ling-bo<sup>1,2</sup>, YUAN Jin-wei<sup>1</sup>, LU Jian-sha<sup>1</sup>, ZHAO Yu-fen<sup>1,3</sup>

(1. Key Laboratory of Chemical Biology, Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Anyang Normal University, Anyang 455002, China; 3. Key Laboratory for Bioorganic Phosphorus Chemistry and Chemical Biology of Ministry of Education, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** A series of genistein's phosphates were synthesized through a simplified Atherton-Todd reaction and the structures of the phosphates were determined by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and NMR. In case of monophosphoryl derivatives, NMR spectra show that substitutions occur at the 7-position of genistein but not at its 4' and 5-position. Moreover, the non-covalent complexes of lysozyme with the four new genistein phosphates were detected by ESI-MS.

**Key words:** genistein; phosphorylation; dialkyl-genistein phosphate; lysozyme; selectivity; non-covalent interaction

染料木素(4', 5, 7-三羟基异黄酮)作为大豆中一种非常重要的异黄酮, 在抗癌、预防和治疗慢性疾病、骨质疏松症、皮肤疾病等方面都具有非常重要的作用<sup>[1-4]</sup>。由于染料木素的水溶性较差, 生物利用度低, 因此人们对它进行了烷基化<sup>[5,6]</sup>、酯化<sup>[7-9]</sup>、磺酸化<sup>[10]</sup>等方面的结构改造。在生物多样性和具有生物活性的化合物方面, 磷酸酯类化合物扮演着非常重要的角色, 经常被用作前体药物来增强

药物的生物利用度<sup>[11]</sup>。本实验室曾采用改进的 Atherton-Todd 反应对白杨素, 7-羟基黄酮进行了磷酰化结构改造, 发现改造后的化合物与母体化合物相比, 与蛋白大分子的弱相互作用明显增强<sup>[12]</sup>, 初步的生物活性测试表明磷酰化白杨素比白杨素对 HeLa 肿瘤细胞的生长更具抑制性<sup>[13]</sup>。本文中对染料木素进行了磷酰化结构改造(合成路线图 1), 合成了 4 种新的染料木素磷酰化衍生物, 通过 ESI-MS, NMR 确证了结构。

化合物与靶向分子之间作用的方式和亲和力的大小是化合物活性的一个重要方面<sup>[14]</sup>, 人们很关注小分子与蛋白大分子的弱相互作用、非共价复合物

收稿日期: 2006-09-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20472076); 河南省杰出青年基金资助项目(0512001400).

\* 通讯作者 Tel: 86 - 371 - 65727578, Fax: 86 - 371 - 67767051, E-mail: chenxl@zzu.edu.cn

的研究<sup>[15,16]</sup>。溶菌酶是一种广泛分布于生物体内的小分子碱性蛋白,长期以来一直被作为一种模型体系,用于研究蛋白的空间构象、酶动力学以及分子进化分子免疫间的关系<sup>[17]</sup>。同时它也是生物体内不可或缺的重要的非特异性体液免疫因子,能够和很多的外源和内源性物质结合,从而行使其抗菌消炎、抗病毒等诸多的生物功能<sup>[18]</sup>。近来人们还发现溶菌酶具有抗肿瘤活性<sup>[19,20]</sup>,关于溶菌酶与外源性小分子的相互作用研究很少有报道。作为目前一种最软的电离源,ESI从上世纪末一经出现,变成了检测非共价复合物存在的有力工具,ESI-MS作为上世纪末出现的新型生物质谱,已广泛应用于小分子与蛋白大分子的弱相互作用、非共价复合物的研究和检测。本实验利用ESI技术对染料木素的磷酰化产物与溶菌酶的弱相互作用进行了研究,结果检测到染料木素的磷酰化产物和溶菌酶形成的非共价复合物的存在,在相同条件下未检测到染料木素与溶菌酶形成的非共价复合物,说明将磷酸酯基引入小分子,明显改变了染料木素的分子极性,从而使其与生物大分子之间的相互作用的情况发生了变化,其生物活性正在进一步的测试中。

## 材料与amp;方法

**仪器和药品** 合成部分所用试剂为分析纯,染料木素(购于陕西慧科植物开发有限公司),二乙基亚磷酸酯、二异丙基亚磷酸酯、二正丙基亚磷酸酯和二异丁基亚磷酸酯(自制);分析测试所用试剂均为色谱纯,水为纯水(美国LABCONCO公司生产的超纯水)。

**超导核磁共振仪** (Bruker DTX-400), TMS为内标; Bruker ESQUIRE-3000 电喷雾质谱仪;进样泵: Cole-Pamer 74900 syring pump( Cole-Pamer仪器公司生产), XT4A显微熔点测定仪,温度未校正。

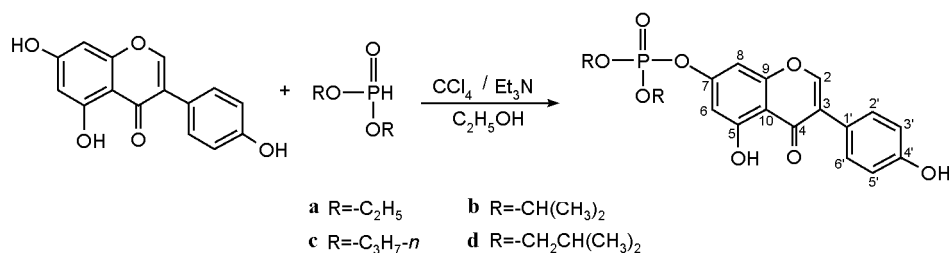
**质谱条件** 采用ESI离子源,正离子检测模式,检测范围  $m/z$  6 000。雾化气 ( $N_2$ ) 压力 16 Pa,

干燥气 ( $N_2$ ) 流速  $9.00 L \cdot min^{-1}$ , ESI离子源温度  $250 \text{ }^\circ C$ , 锥孔电压 111.7 V, 导入离子源速率  $4 \mu L \cdot min^{-1}$ 。

**磷酰化染料木素的合成及表征** 取 0.3 g 染料木素于 50 mL 圆底烧瓶中,加无水乙醇 25 mL,三乙胺 1 mL 将其溶解,在冰浴 ( $5 \text{ }^\circ C$  以下) 并磁力搅拌下,滴入四氯化碳 5 mL 和亚磷酸酯 0.18 g 的混合液,约 2 h 滴完,然后逐渐升至室温并在室温下继续反应过夜。减压浓缩后得固体,加入乙酸乙酯溶解后抽滤除去不溶物。减压除去溶剂,所得固体用硅胶柱色谱提纯,洗脱剂  $CHCl_3-C_2H_5OH$  10:1 ( $v/v$ ), 得产品 a。化合物 b, c, d 合成方法同 a。所得化合物 a, b, c, d 均为新化合物。

**化合物 a** 无色结晶,产率 75%, mp  $164 \text{ }^\circ C$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 12.85 (s, 1H, -OH), 7.78 (s, 1H, H-2), 7.15 (d,  $J = 8.56$  Hz, 2H, H-2', 6'), 6.74 (t,  $J = 1.64$  Hz, 1H, H-8), 6.65 (d,  $J = 8.48$  Hz, 2H, H-3', 5'), 6.61 (d,  $J = 1.32$  Hz, 1H, H-6), 4.32 (m, 4H, O- $CH_2$ ), 1.45 (t, 6H, - $CH_3$ );  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 181.08 (C-4), 162.71 (C-5), 157.05 (C-4'), 156.89 (C-7), 155.31 (C-9), 153.35 (C-2), 129.47 (C-2', 6'), 123.73 (C-1'), 121.27 (C-3), 115.54 (C-3', 5'), 109.03 (C-10), 103.94 (C-6), 99.33 (C-8), 65.45 (O-C), 16.10 ( $CH_3$ );  $^{31}P$  NMR (162 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : -6.23; ESI-MS  $m/z$  406.9  $[M+H]^+$ , 812.6  $[2M+H]^+$ 。

**化合物 b** 无色结晶,产率 81%, mp  $163 \text{ }^\circ C$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 12.84 (s, 1H, -OH), 7.84 (s, 1H, H-2), 7.24 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H, H-2', 6'), 6.79 (t,  $J = 2.8$  Hz, 1H, H-8), 6.75 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-3', 5'), 6.63 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H-6), 4.82 (m, 2H, O- $CH$ ), 1.42 (t, 12H, - $CH_3$ );  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 181.10 (C-4), 162.66 (C-5), 157.05 (C-4'), 156.89 (C-7), 155.66 (C-9), 153.33 (C-2), 129.51 (C-2', 6'), 123.73 (C-1'), 121.38 (C-3),



Scheme 1 Synthetic route for title compounds a, b, c and d

115.56 (C-3', 5'), 108.91 (C-10), 103.99 (C-6), 99.31 (C-8), 74.72 (O-C), 23.62 (CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: -8.15; ESI-MS *m/z* 434.9 [M + H]<sup>+</sup>, 868.5 [2M + H]<sup>+</sup>。

化合物 c 无色结晶, 产率 72%, mp 134 °C, <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 12.85 (s, 1H, -OH), 7.81 (s, 1H, H-2), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2', 6'), 6.75 (d, *J* = 0.84 Hz, 1H, H-8), 6.68 (d, *J* = 8.44 Hz, 2H, H-3', 5'), 6.61 (t, *J* = 1.68 Hz, 1H, H-6), 4.20 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>), 1.80 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1.02 (t, 6H, -CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 181.11 (C-4), 162.73 (C-5), 157.08 (C-4'), 156.83 (C-7), 155.51 (C-9), 153.35 (C-2), 129.58 (C-2', 6'), 123.79 (C-1'), 121.44 (C-3), 115.57 (C-3', 5'), 109.01 (C-10), 103.97 (C-6), 99.31 (C-8), 70.82 (O-C), 23.58 (CH<sub>2</sub>), 9.99 (CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: -6.079; ESI-MS *m/z* 434.9 [M + H]<sup>+</sup>, 868.5 [2M + H]<sup>+</sup>。

化合物 d 无色结晶, 产率 70%, mp 128 °C, <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 12.85 (s, 1H, -OH), 7.84 (s, 1H, H-2), 7.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-2', 6'), 6.79 (m, 1H, H-8), 6.75 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3', 5'), 6.62 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-6), 3.99 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>), 2.04 (m, 2H, -CH), 1.00 (d, 12H, -CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 181.10 (C-4), 162.72 (C-5), 157.08 (C-4'), 156.79 (C-7), 155.52 (C-9), 153.34 (C-2), 129.58 (C-2', 6'), 123.78 (C-1'), 121.47 (C-3), 115.57 (C-3', 5'), 108.98 (C-10), 103.95 (C-6), 99.28 (C-8), 75.03 (O-C), 29.07 (-CH), 18.62 (CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: -6.213; ESI-MS *m/z* 462.9 [M + H]<sup>+</sup>, 924.5 [2M + H]<sup>+</sup>。

## 结果与讨论

### 1 二烷基亚磷酸酯对染料木素羟基反应的选择性

实验中发现, 与乙酰氯和乙酸酐这样的酰化试剂不同, 磷酸化试剂二烷基亚磷酸酯对染料木素羟基的反应具有明显的选择性, 实验得到了 7 位磷酸化产物, 未得到 4 和 5 位磷酸化产物。通过对染料木素和其磷酸化产物的 NMR 化学位移值的比较, 在 <sup>1</sup>H NMR 中, 发现磷酸化产物的 H-6 和 H-8 的化学位移与原料 (δ 6.21, H-6; δ 6.37, H-8)<sup>[21]</sup> 相比明显向低场移动约 δ 0.4, 同时受到磷耦合的原因, H-6

与 H-8 分别还有不同程度的裂分, 而其他氢的化学位移与原料相比则变化不大; 在 <sup>13</sup>C NMR 中, 与原料相比<sup>[21]</sup>, 磷酸化产物的 C-7 化学位移明显向高场位移 δ 7.40, C-5 位化学位移向低场移动约 0.70; C-4' 化学位移向高场移动约 0.35。发生变化的原因主要是当染料木素的 7 位羟基形成磷酸酯基团时, 磷酸基的吸电子效应, 引起苯环上电子云密度发生变化, 导致 7 位电子云密度增加。因此, 通过磷酸化产物的 NMR 化学位移变化情况的分析, 说明是 7 位的羟基发生了反应。另外, 已有的研究表明, 被磷酸化的羟基的酸性往往影响其磷酸化的反应活性<sup>[22]</sup>。染料木素中有 3 个酸性不同的羟基, 首先, 4 位羰基的存在, 使其易于与 5 位羟基形成分子内氢键, 导致其反应活性大大降低; 其次, 和 4 位羟基相比, 7 位羟基对位强的吸电子基团 -C=O 的存在使其酸性增强, 间位基团 -O 的吸电子诱导效应也使酸性进一步增强, 结果 7 位羟基的酸性大于 4 位羟基的酸性, 因而在和磷酸化试剂进行反应时, 具有更强的亲核性, 这样就解释了磷酸化试剂对 7 位羟基磷酸化反应的高选择性。

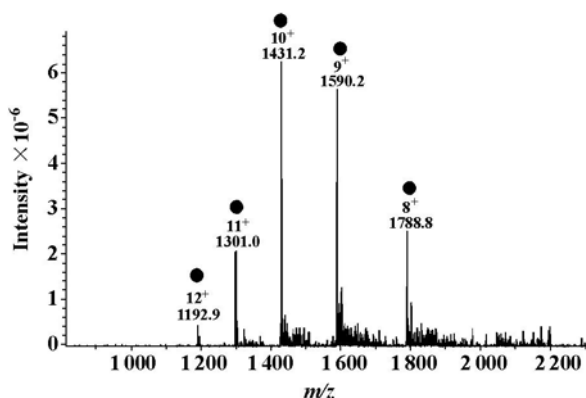
### 2 磷酸化染料木素与溶菌酶的弱相互作用 ESI 质谱分析

ESI 质谱作为一种软电离方法, 在合适的仪器条件下, 它不破坏蛋白质与小分子复合物, 而检测到这些复合物的存在。通常在 pH 值较低的情况下, 被测分子的质子化程度较高, 容易得到较好的 ESI 检测图谱, 但由于人体和动物体液接近中性, 因而用 ESI 质谱技术检测时, 最好能使被测样品的溶液接近中性, 这样更接近真实作用环境, 但这无疑给实验条件的设置, 诸如样品溶液的配置, 仪器条件的设置等增加了难度, 本实验通过优化参数条件, 在近中性环境中检测到了其复合物的存在。

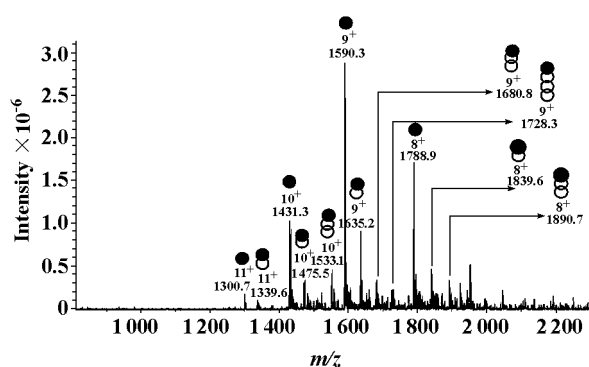
2.1 溶菌酶的 ESI 质谱分析 溶菌酶溶液的 ESI 质谱图如图 1 所示, 溶菌酶 (HEWL, hen egg white lysozyme) 从 (HEWL + 8H)<sup>8+</sup> 到 (HEWL + 12H)<sup>12+</sup> 的电荷分布状态, 并且以 (HEWL + 10H)<sup>10+</sup> 峰度最高。根据质谱图计算的平均相对分子质量为 14 302, 与文献<sup>[23]</sup>报道 (14 305) 相符。

2.2 ESI 质谱分析化合物 a 与溶菌酶的弱相互作用 溶菌酶与化合物 a 混合液的 ESI 质谱图如图 2 所示。除了图 1 中所能观察到的离子峰以外, 图 2 中又出现了一些新的离子峰: *m/z* 1 339.6, 1 475.5, 1 553.1, 1 635.2, 1 680.8, 1 728.3, 1 839.6, 1 890.7 分别对应于 (HEWL + a)<sup>11+</sup>, (HEWL + a)<sup>10+</sup>,

$(\text{HEWL} + 2\mathbf{a})^{10+}$ ,  $(\text{HEWL} + \mathbf{a})^{9+}$ ,  $(\text{HEWL} + 2\mathbf{a})^{9+}$ ,  
 $(\text{HEWL} + 3\mathbf{a})^{9+}$ ,  $(\text{HEWL} + \mathbf{a})^{8+}$ ,  $(\text{HEWL} + 2\mathbf{a})^{8+}$ 。  
 图 2 显示化合物 **a** 与溶菌酶发生弱相互作用主要集中在高  $m/z$  区域。



**Figure 1** ESI mass spectra of lysozyme solution. The solution was prepared by mixing equal volumes of methanol solution and lysozyme ( $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).  
 ● Multiply charged ion peaks of lysozyme. pH 6.09; cone voltage: 111.7 volt

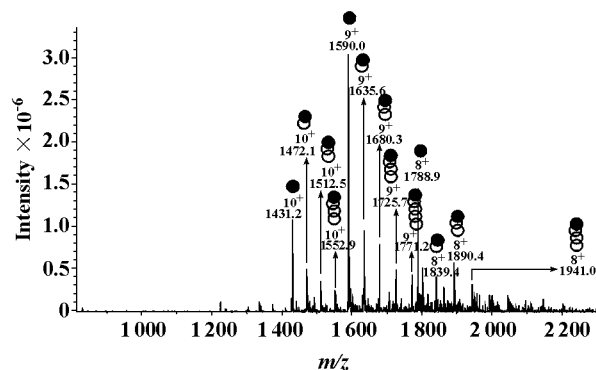


**Figure 2** ESI mass spectra of complex formed by compound **a** with lysozyme solution. The solution was prepared by mixing equal volumes  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  compound **a** in methanol and lysozyme ( $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).  
 ● Multiply charged ion peaks of lysozyme. ●○ Multiply charged ion peaks of lysozyme-**a** (compound **a**) complex; ●○○ Multiply charged ion peaks of lysozyme-2**a** complex; ●○○○ Multiply charged ion peaks of lysozyme-3**a** complex. pH 6.09; cone voltage: 111.7 volt

在与化合物 **a** 相同的浓度配比条件下, 作者发现化合物 **b**, **c**, **d** 与溶菌酶的弱相互作用结果都基本一致。

为了探讨化合物与溶菌酶的浓度配比关系对弱相互作用的影响, 作者又改变浓度配比测了化合物

**a** 与溶菌酶的弱相互作用。溶菌酶与化合物 **a** 混合液的 ESI 质谱图如图 3 所示。除了图 1 中所能观察到的离子峰以外, 图 3 中又出现了一些新的离子峰:  $m/z$  1472.1, 1512.5, 1552.9, 1635.6, 1680.3, 1725.7, 1771.2, 1839.4, 1890.4, 1941.0 分别对应于  $(\text{HEWL} + \mathbf{a})^{10+}$ ,  $(\text{HEWL} + 2\mathbf{a})^{10+}$ ,  $(\text{HEWL} + 3\mathbf{a})^{10+}$ ,  $(\text{HEWL} + \mathbf{a})^{9+}$ ,  $(\text{HEWL} + 2\mathbf{a})^{9+}$ ,  $(\text{HEWL} + 3\mathbf{a})^{9+}$ ,  $(\text{HEWL} + 4\mathbf{a})^{9+}$ ,  $(\text{HEWL} + \mathbf{a})^{8+}$ ,  $(\text{HEWL} + 2\mathbf{a})^{8+}$ ,  $(\text{HEWL} + 3\mathbf{a})^{8+}$ , 图 3 显示化合物 **a** 跟溶菌酶发生弱相互作用主要集中在高  $m/z$  区。



**Figure 3** ESI mass spectra of complex formed by compound **a** with lysozyme solution. The solution was prepared by mixing equal volumes of  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  compound **a** in methanol and lysozyme ( $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).  
 ● Multiply charged ion peaks of lysozyme. ●○ Multiply charged ion peaks of lysozyme-**a** (compound **a**) complex; ●○○ Multiply charged ion peaks of lysozyme-2**a** complex; ●○○○ Multiply charged ion peaks of lysozyme-3**a** complex. pH 6.09; Cone voltage: 111.7 volt

实验表明, 随着化合物 **a** 与溶菌酶浓度配比关系的增大, 溶菌酶与化合物 **a** 形成的复合物中溶菌酶结合的磷酸化产物小分子的个数逐渐增多。

## 结论

采用改进的 Atherton-Todd 反应成功地对染料木素进行了磷酸化结构改造, 得到了产率较高的 4 种新的磷酸化产物, 酰化试剂对染料木素的羟基的磷酸化显示较高选择性, 反应主要发生在染料木素 7 位羟基。ESI-MS 研究结果显示了磷酸化的染料木素确实能够和溶菌酶发生弱相互作用, 而且磷酸化产物的浓度对磷酸化产物与蛋白的弱相互作用有一定的影响, 说明液态中形成的复合物能够在离子气化过程中被保存并最终被检测到, ESI-MS 为研

究非共价复合物的形成和稳定性提供了一个直观、快捷的手段。

## References

- [ 1 ] Wang HZ, Zhang Y, Xie LP, et al. Effects of genistein and daidzein on the cell growth, cell cycle, and differentiation of human and murine melanoma cells [ J ]. J Nutr Biochem, 2002, 13: 421 - 426.
- [ 2 ] Soidinsalo O, Wahala K. Synthesis of phytoestrogenic isoflavonoid disulfates [ J ]. Steroids, 2004, 69: 613 - 616.
- [ 3 ] Satterfield M, Black DM, Brodbelt JS. Detection of the isoflavone aglycones genistein and daidzein in urine using solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [ J ]. J Chromatogr B, 2001, 759: 33 - 41.
- [ 4 ] Foti P, Erba D, et al. Comparison between daidzein and genistein antioxidant activity in primary and cancer lymphocytes [ J ]. Arch Physiol Biochem, 2005, 433: 421 - 427.
- [ 5 ] Al-Maharik N, Botting NP. Synthesis of lupiwightone via a *pam*-Claisen-Cope rearrangement [ J ]. Tetrahedron, 2003, 59: 4177 - 4181.
- [ 6 ] Wang CL, Li HQ, Meng WD, et al. Trifluoromethylation of flavonoids and antitumor activity of the trifluoromethylated flavonoid derivatives [ J ]. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 15: 4456 - 4458.
- [ 7 ] Szeja W, Pastuch G, Wandzik I. Synthesis of selectively protected genistein derivatives [ J ]. Synth Commun, 2003, 33: 4111 - 4121.
- [ 8 ] Dobrydneva Y, Williams RL, et al. Dietary phytoestrogens and their synthetic structural analogues as calcium channel blockers in human platelets [ J ]. J Cardiovasc Pharmacol, 2002, 40: 399 - 410.
- [ 9 ] Lewis PT, Wahala K, Hoikkala A, et al. Synthesis of antioxidant isoflavone fatty acid esters [ J ]. Tetrahedron, 2000, 56: 7805 - 7810.
- [ 10 ] Soidinsalo O, Wahala K. Synthesis of phytoestrogenic isoflavonoid disulfates [ J ]. Steroids, 2004, 69: 613 - 616.
- [ 11 ] Jones S, Selitsianos D, Thompson KJ, et al. An improved method for lewis acid catalysed phosphoryl transfer using Ti(*t*-BuO) [ J ]. J Org Chem, 2003, 68: 5211 - 5216.
- [ 12 ] Chen XL, Qu LB, Zhang T, et al. The Nature of phosphorylated chrysin-protein interactions involved in noncovalent complex formation by electrospray ionization mass spectrometry [ J ]. Anal Chem, 2004, 76: 211 - 217.
- [ 13 ] Zhang T, Chen XL, Qu LB, et al. Chrysin and its phosphate ester inhibit cell proliferation and induce apoptosis in HeLa cells [ J ]. Bioorg Med Chem, 2004, 12: 6097 - 6105.
- [ 14 ] Pyle AM, Morii T, Barton JK. Probing microstructures in double-helical DNA with chiral metal complexes: recognition of changes in base-pair propeller twisting in solution [ J ]. J Am Chem Soc, 1990, 112: 9432 - 9434.
- [ 15 ] Qu LB, Wang L, Yang R, et al. Interaction of bovine serum albumin with luteolin and apigenin [ J ]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 352 - 357.
- [ 16 ] Zhao J, Wang Z, Wu QH, et al. Interaction between strychnine and bovine serum albumin [ J ]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 666 - 670.
- [ 17 ] Warren JS, Rinehart JJ, Zwilling BS, et al. Lysozyme enhancement of tumor cell immunoprotection in a murine fibrosarcoma [ J ]. Cancer Res, 1981, 41: 1642 - 1645.
- [ 18 ] Wang XL. Research progress in recombinant human lysozyme [ J ]. China Biotechnol, 2003, 23: 59 - 62.
- [ 19 ] Sava G, Gagliardi R, Pacor S. Modulation of host immunity by lysozymes active on GALT in mice carrying solid malignant tumors [ J ]. Curr Top Pharmacol, 1997, 3: 239 - 245.
- [ 20 ] Sabrina P, Cristina F, et al. Lysozyme induced recovery of the response to ConA on mononuclear cells harvested from mice bearing MCA mammary carcinoma [ J ]. Int J Oncol, 1994, 4: 877 - 883.
- [ 21 ] Jang HS, Seung JC, Soon WL, et al. Isoflavones found in Korean soybean paste as 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors [ J ]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68: 1051 - 1058.
- [ 22 ] Silverberg LJ, John LD, Vemishetti P. A simple, rapid and efficient protocol for the selective phosphorylation of phenols with dibenzyl phosphate [ J ]. Tetrahedron Lett, 1996, 37: 771 - 774.
- [ 23 ] Ganem B, Li YT, Henion JD. Observation of noncovalent enzyme-substrate and enzyme-product complexes by ion-spray mass spectrometry [ J ]. J Am Chem Soc, 1991, 113: 7818 - 7819.