

番荔枝内酯类化合物对肝细胞耗氧呼吸的抑制作用及其构效关系

徐志防*, 魏孝义, 谢海辉, 杨仁洲

(中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

关键词: 番荔枝内酯; 耗氧呼吸; 构效关系; 肝细胞

中图分类号: R284.1; R962

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2002)10 - 0818 - 03

番荔枝内酯类化合物(annonaceous acetogenins, ACG)是从番荔枝科植物中分离到的末端含 γ -内酯环并有生物活性的天然产物,目前已经从41个属150种番荔枝科植物中获得300多个ACG化合物^[1-3]。由于其有较大的应用前景,对ACG化合物的分离鉴定及生物活性检测已成为天然产物研究中非常活跃的内容。

ACG的主要结构特征是一条碳原子数为35或37的烷基链,末端含甲基取代的内酯环(有时经重排为内缩酮),链上带有0~3个四氢呋喃环(tetrahydrofuran, THF),和一定数目的含氧官能团(如羟基、乙酰氧基、酮基、环氧化物等)或双键。根据ACG化合物中THF的数目及空间排列,将ACG划分为5种类型:单THF型、邻双THF型、非邻双THF型、邻三THF型及无THF型^[3,4]。本文旨在测

定6个不同结构特征ACG类化合物对肝细胞耗氧呼吸的抑制作用,通过耗氧呼吸的变化,初步了解在ACG作用下肝细胞能量代谢中氧化磷酸化反应的情况,分析其构效关系,并与细胞呼吸代谢抑制剂rotenone和KCN的作用相比较。

材料与 方法

番荔枝内酯及其他抑制剂用于抑制耗氧呼吸的6个ACG化合物为本实验室从番荔枝(*Annona squamosa*)种子中分离纯化所得,经鉴定其化学结构等特征见表1。ACG化合物溶解于95%的乙醇,浓度为20~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。抑制剂rotenone购自Sigma公司,浓度为50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。抑制剂KCN为国产分析纯试剂,浓度为1~100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Table 1 The general characteristics of annonaceous acetogenins used in the assay

Compound	Type of ACG	Type of γ -lactone	Hydroxyl positions	THF relative configuration	Molecular formula	Molecular weight
Asimicin	Adjacent bis-THF	A ₂	4,15,24	th/t/th/t/th	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	622
Squamocin C	Adjacent bis-THF	A ₁	15,24,29	th/t/th/t/er	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	622
Bullatacin	Adjacent bis-THF	A ₂	4,15,24	th/t/th/t/er	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	622
Squamostatin A	Non-adjacent bis-THF	A ₁	16,19,24,28	t/th-th/t/er	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	638
Squamostatin B	Non-adjacent bis-THF	A ₂	4,16,19,24	t/th-th/t/er	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	638
Compound 1	Non-THF	A ₁	15	-	C ₂₂ H ₃₆ O ₅	380

A₁: No hydroxyl group at C₄ position; A₂: Substituted by hydroxyl group at C₄ position; th: Threo; t: Trans; er: Erythro

肝匀浆及细胞离心制备过程 将活鸡宰杀后立即取出肝脏,浸泡于冰冷的匀浆液洗净。匀浆液含蔗糖 0.25 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, EDTA·Na₂ 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris-HCl (pH 7.4) 4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。肝脏洗净后放入匀浆器,加入足量预冷至含浮冰的匀浆液,匀浆40 s左右,

纱布过滤匀浆液。将滤液在4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,用匀浆液悬浮细胞沉淀。将细胞悬浮液转移到试管中,置于冰浴中保存,留待下一步呼吸测定。

肝细胞耗氧呼吸抑制作用的测定 用氧电极方法测定ACG对肝细胞耗氧呼吸的抑制作用^[5,6]。肝细胞加到氧电极反应杯(3 mL, 30℃)中耗氧呼吸开始,此时为呼吸状态2;接着加入50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二磷酸腺苷(adenosine-5'-diphosphate, ADP) 15 μL ,耗氧呼吸速率明显增加,此时为呼吸状态3;当ADP耗尽时,转入呼吸状态4;随着注入抑制剂,然后再加入

收稿日期: 2001-11-18.

基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目资助课题 (KSCX-09-01-2).

* 通讯作者 Tel: (020)85232914, Fax: (020)85232831, E-mail: xuzf@scib.ac.cn

ADP 15 μL , 又出现状态 3 和状态 4。肝细胞耗氧呼吸的变化用呼吸控制率 (respiration control ratio, RCR) 表示, RCR 等于状态 3 呼吸速率比状态 4 呼吸速率, 根据不同状态 RCR 大小确定呼吸抑制程度。反应混合液中蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝方法。

呼吸抑制程度的分析 加入抑制剂前后 RCR 分别用 RCR_1 和 RCR_2 表示, 呼吸抑制百分比 = $(1 - \text{RCR}_2 / \text{RCR}_1) \times 100\%$ 。以反应混合液中每毫克蛋白肝细胞中的抑制剂浓度为横坐标, 呼吸抑制百分比为纵坐标作曲线对数回归分析, 计算出呼吸控制率被抑制 50% 时的抑制剂浓度, 以 IC_{50} 表示。

结 果

1 肝细胞耗氧呼吸的抑制过程

图 1 为记录肝细胞耗氧呼吸示意图, 在对照中加入 ADP 前后两次呼吸状态 3 和状态 4 无明显的变化, 说明肝细胞中线粒体氧化磷酸化反应比较稳定。当加入 ACG 和 rotenone 后, 第 2 次状态 3 呼吸速率明显降低, 表明在耗氧条件下 ADP 磷酸化生成三磷酸腺苷 (adenosine 5'-triphosphate, ATP) 的反应效率下降; 状态 4 也有一定程度下降, 总表现为 RCR_2 小于 RCR_1 , 说明在抑制剂作用下氧化磷酸化的偶联程度降低。

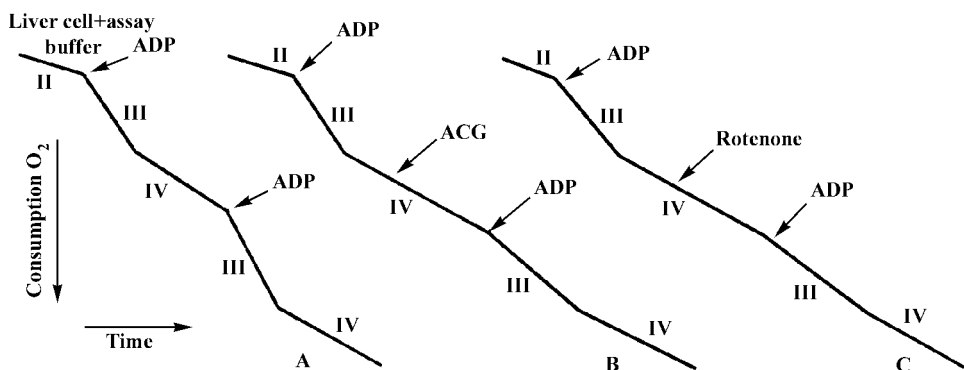


Figure 1 Scheme of inhibition of oxygen consumption by annonaceous acetogenins (ACG) and rotenone in chicken liver cell respiration

Trace A showed oxygen consumption without inhibitor; Trace B and C showed the effects of ACG and rotenone on oxygen consumption respectively; Liver cell suspended in $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ EDTA} \cdot \text{Na}_2$, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ DL-glutamic acid}$, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ DL-malic acid}$, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris-HCl assay buffer (pH 7.4, final volume 3 mL)}$ at 30°C ; Oxygen uptake was initiated by addition of $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ ADP } 15 \mu\text{L}$; II. State 2; III. State 3; IV. State 4

2 不同浓度 ACG 对呼吸抑制程度的影响

邻双 THF 型的 squamocin C 和非邻双 THF 型的 squamostatin B 的抑制作用显示, 随着 ACG 浓度增加, 肝细胞耗氧呼吸被抑制程度增大; 不同结构类型的 ACG 表现出不同抑制效果, 在低浓度下 squamocin C 的抑制作用略大于 squamostatin B。

3 不同结构 ACG 抑制肝细胞耗氧呼吸作用的比较

表 2 显示 6 个 ACG 化合物都表现出很强的抑制作用, 由于结构差异, 导致 IC_{50} 值不同。

Table 2 The IC_{50} value of different compound for inhibition of oxygen consumption in chicken liver cell respiration

Compound	$\text{IC}_{50} / \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	Compound	$\text{IC}_{50} / \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
Asimicin	24.2	Squa mostatin B	27.0
Squamocin C	16.7	Compound 1	192.0
Bullatacin	23.1	Rotenone	12.1
Squamostatin A	18.4	KCN	2.1×10^4

讨 论

线粒体是细胞能量代谢的重要场所, 氧化磷酸化反应是 ATP 的主要来源。Rotenone 的作用在于它对线粒体 NADH-UQ 氧化还原酶 (复合物 I) 的专一性抑制作用, 线粒体复合物 I 是呼吸链中最大、最复杂也是最关键的蛋白酶复合物。ACG 具有类似 rotenone 的与复合物 I 专一结合性, 在呼吸链起始部位强烈抑制电子的传递, 直接表现为耗氧速率的降低^[5,6]。KCN 抑制细胞色素 C 氧化酶 (复合物 IV), 在呼吸链末端阻碍电子传递, 显然 KCN 不如 ACG 抑制作用强。

从化学结构上, ACG 和 rotenone 无可比性, 但不同 ACG 间由于化学结构不同, 其抑制作用大小也不同。研究表明, ACG 的构效关系主要为双 THF 型 ACG 抑制作用最强, 无 THF 型 ACG 抑制作用最小,

其中 γ -内酯环是 ACG 强烈抑制作用的关键性结构^[3]。本文中 ACG 抑制肝细胞耗氧呼吸的结果与此构效关系一致,并且认为 C_4 位的羟基可能对其抑制强度有一定减弱作用,不同于一般认为 C_4 位上羟基不重要的观点^[7],但此看法有待不同实验进一步探讨。ACG 抑制作用还表明,THF 与内酯环的距离、羟基数目和位置是影响 ACG 构效关系的重要因子,它们可能同 ACG 与复合物 I 相互作用的动力学特征有关^[8]。决定 ACG 抑制作用强弱的因素,除化学结构这一主要因素外,还包括它在细胞中的溶解性、膜的构象和运载特性以及细胞自身代谢特点。

ACG 引人关注,是由于其对癌细胞的强抑制作用,癌细胞具有超常的能量代谢活动,需要保持较高呼吸状态才能不断增殖,此代谢特点决定了它比正常细胞更易被 ACG 所抑制。但 ACG 对正常细胞的抑制也相当大,其毒性高出 KCN 数百倍甚至上千倍,这是它作为临床抗癌药物的主要限制。希望随着 ACG 构效关系的进一步明确,能从现有及以后新分离出的 ACG 中,或对其进行修饰改造,甚至化学合成新 ACG 化合物,筛选出在体内只对癌细胞有强抑制作用而对正常细胞无毒副作用的化合物,则其研究价值将不可估量。

REFERENCES:

- [1] Rupprecht JK, Hui YH, McLaughlin JL. Annonaceous acetogenins: a review [J]. *J Nat Prod*, 1990, **53**(2): 237 - 278.
- [2] Zafra Polo MC, Gonzalez MC, Estornell E, et al. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I [J]. *Phytochemistry*, 1996, **42**(2): 253 - 271.
- [3] Alali FQ, Liu XX, McLaughlin JL. Annonaceous acetogenins: recent progress [J]. *J Nat Prod*, 1999, **62**(3): 504 - 540.
- [4] Chen Y, Yu DQ. Classification and NMR characteristics of the γ -lactone and THF rings of antitumor bioactive annonaceous acetogenins [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, **33**(7): 553 - 560.
- [5] Londershausen M, Leicht W, Lieb F, et al. Molecular mode of action of annonons [J]. *Pestic Sci*, 1991, **33**(4): 427 - 438.
- [6] Landolt JL, Ahammadsahib KI, Hollingworth RM, et al. Determination of structure-activity relationships of annonaceous acetogenins by inhibition of oxygen uptake in rat liver mitochondria [J]. *Chem Biol Interact*, 1995, **98**(1): 1 - 13.
- [7] 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.
- [8] Tormo JR, Gonzalez MC, Cortes D, et al. Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, **369**(1): 119 - 126.

INHIBITION OF OXYGEN CONSUMPTION BY ANNONACEOUS ACETOGENINS IN LIVER CELL RESPIRATION AND THEIR STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIP

XU Zhi-fang, WEI Xiao-yi, XIE Hai-hui, YANG Ren-zhou

(South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the inhibition of oxygen consumption by annonaceous acetogenins (ACG) and their structure-activity relationship (SAR). **METHODS** The inhibition of oxygen consumption in chicken liver cell respiration by different structural ACG was studied by using oxygen electrode technique. **RESULTS** Six ACG showed potent inhibitory effects like rotenone which was a classical inhibitor of mitochondrial complex I, and was more potent than complex IV inhibitor KCN. The IC_{50} values of six ACG for inhibiting oxygen consumption suggested that bis-tetrahydrofuran (THF) ACG was 7~11 times more active than non-THF ACG, and A_1 -type ACG was more potent than A_2 -type ACG. **CONCLUSION** The terminal γ -lactone was crucial for the inhibition of oxygen consumption. The distance between THF and γ -lactone, the hydroxyl groups in the alkyl chain, were the important factors of SAR, but the 4-OH group possibly played some negative role in the exhibit of potent activity.

KEY WORDS: annonaceous acetogenins; respiration of oxygen consumption; structural activity relationship; liver cell