

· 论著 ·

用 SMMC-7721 和 Hep-G2 全二维细胞膜-整体柱色谱联用技术筛选中药鸦胆子的抗癌活性物质

纪松岗¹, 丁璇², 曹岩², 陈啸飞², 贾丹², 王冬尧², 柴逸峰² (1. 解放军 401 医院药剂科, 山东 青岛 266071; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 筛选中药鸦胆子中的抗癌活性成分。方法 同时使用全二维色谱技术和细胞膜色谱技术联用质谱技术。结果 经初步分离筛选, 得到了腺苷和鸦胆子苦素 B 两种潜在的抗癌活性成分。结论 该方法对中药中活性成分的筛选, 具有快速、高效和在线的特色和优点。

[关键词] 细胞膜色谱; 全二维色谱; SMMC-7721; Hep-G2; 鸦胆子; 抗癌

[中图分类号] O657.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)06-0425-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.06.007

Screening of potential active anti-cancer components of *Brucea javanica* by SMMC-7721 and Hep-G2 comprehensive two dimensional CMC-monolith chromatography

Ji Songgang¹, Ding Xuan², Cao Yan², Chen Xiaofei², Jia Dan², Wang Dongyao², Chai Yifeng² (1. Department of Pharmacy, No.401 Hospital of PLA, Qingdao 266071, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To screen potential active anti-cancer components of *Brucea javanica*. **Methods** This research has employed comprehensive two dimensional chromatographic technology and cell membrane chromatographic technology simultaneously with mass spectrometry as detector. **Results** Adenosine and Bruceine B were found to be potentially anti-cancer active. **Conclusion** This study has combined the advantages of online, high speed and high throughput for the screen of potential active components of traditional Chinese medicine.

[Key words] cell membrane chromatography; comprehensive two dimensional chromatography; SMMC-7721; Hep-G2; *Brucea javanica*; anti-cancer

细胞膜色谱作为近几年来新兴的一种活性成分筛选技术, 因其在线、高通量、自动化的优点, 被越来越多的用于中药活性成分的筛选研究^[1]。该技术原理简单, 即使用细胞膜与硅胶进行孵育, 得细胞膜-硅胶固定相, 该固定相具有生物活性, 使用该固定相装填色谱柱, 得到可以用于常规液相条件下的细胞膜色谱柱, 从而实现在线的自动化高通量筛选^[2]。中药鸦胆子是苦木科植物鸦胆子 *Brucea javanica* (L) Merr. 的干燥成熟果实, 近几年来有研究证明从中提取得到的鸦胆子油具有潜在的抗癌活性^[3]。我国于 1978 年开始研制鸦胆子油乳, 并用于治疗各种恶性肿瘤, 使用该剂型与化疗和放疗联合

使用, 可以显著改善治疗效果 ($P < 0.05$)^[4], 但是其具体活性成分有待进一步验证。因此, 细胞膜色谱具有高通量、快速的特点, 十分适用于初步筛选鸦胆子中相关的抗癌活性成分。但是细胞膜色谱作为一种生物活性色谱, 其效率较低、柱效较差^[5]。为克服这些不足, 本研究搭建了新型的 SMMC-7721 细胞-鸦胆子和 Hep-G2 细胞-鸦胆子的全二维细胞膜色谱-整体柱色谱的高通量活性成分筛选模型, 用于筛选鸦胆子油的抗癌活性成分, 可以有效提高细胞膜色谱对复杂体系成分的分离效能^[6], 使得筛选结果更加稳定可靠。

1 仪器和材料

1.1 仪器 Agilent-1200 高效液相色谱仪(美国, 安捷伦科技有限公司), Agilent-6200 飞行时间质谱仪(美国, 安捷伦科技有限公司), Chromolith RP 18e col-

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(12401900802)。
[作者简介] 纪松岗, 博士, 主任药师。E-mail: jisonggang@126.com。
[通讯作者] 柴逸峰, 博士, 教授。E-mail: yfchai@smmu.edu.cn。

um 整体柱(德国默克集团有限公司), Rheodyneti-tanMX 型电子控制十通阀(美国, 艺达思科技有限公司), 十万分之一电子天平(美国梅特勒公司)。

1.2 材料 SMMC-7721 细胞, Hep-G2 细胞, 硅胶(5 μm , 大连美仑公司), 乙腈(色谱纯, 默克公司), 甲酸(色谱纯, 上海晶纯生化科技股份有限公司), 水由 Milli-Q 超纯水纯化系统制备, 鸦胆子(上海雷允上药房), 石油醚为分析纯, 伊马替尼对照品(南京安格医药化工有限公司), 四环素对照品(中国药品生物制品检定所)。

2 方法

2.1 SMMC-7721 和 Hep-G2 细胞膜色谱的制备 取一定量的 SMMC-7721 或 Hep-G2 细胞 (3.5×10^7), 经超声破碎后, 低速离心 10 min, 取上清液 12 000 g 高速离心 20 min, 得细胞膜沉淀。然后将所得细胞膜沉淀物用 5 ml 生理盐水复溶, 与活化硅胶混合, 在真空条件下涡旋反应 5 min, 之后转入 4℃ 冰箱中孵育 12 h, 得到细胞膜-硅胶固定相。

将孵育好的细胞膜色谱固定相取出, 用 PBS 离心清洗 3 次(1 000 r/min, 5 min), 再用 4 ml PBS 复溶, 进行细胞膜色谱柱装填操作。将装填好的细胞膜色谱柱用 PBS 在 37℃ 下, 用 10 mmol/L 醋酸铵溶液, 以流速 0.2 ml/min, 平衡 1 h 即可使用, 每次进样量为 5 μl 。

2.2 鸦胆子活性部位的提取 用石油醚作为提取溶剂, 按照 7:1 的液料比, 在 60℃ 水浴和 400 W 的超声条件下, 提取 2 h, 完成鸦胆子活性部位的提取。

2.3 整体柱条件的探索 色谱柱: Chromolith RP 18e column(100 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 德国, 默克集团有限公司); 流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈; 柱温: 26℃; 总流速: 5.0 ml/min; 具体梯度洗脱条件见表 1。

表 1 整体柱梯度洗脱条件

时间 (t/min)	A (%)	B (%)	总流速 ($v/\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)
0	40	60	5
3.5	90	10	
6	40	60	
7	40	60	

2.4 质谱条件 飞行时间质谱仪使用电喷雾正离子全扫描模式。扫描范围: 110 ~ 1 100 m/z ; 毛细管电压: 3 500 V; 雾化器压力: 30 psi; 干燥气流速: 10 L/min; 干燥气温度: 350℃; 碎片电压: 120 V; 分流比 1:10。

2.5 二维色谱模型的搭建 全二维细胞膜-整体柱-飞行时间质谱仪系统由三大部件组成。如图 1 所示, 该全二维系统包含一台 Agilent1200 的高效液相色谱仪, 一台 Agilent6200 系列的飞行时间质谱仪, 以及一个可以切换 A、B 两种连接状态的十通阀。泵 3 将第一维细胞膜色谱中分离的成分冲入样品储备环中, 待进入第二维色谱进行进一步的分离分析。为加快全二维分析速度, 十通阀上接有两个 500 μl 的样品储备环, 将这两个储备环中的样品, 根据第二维色谱的分析分离时间, 定为每隔 320 s 即自动切换 A 和 B 状态进样, 由泵 1 和泵 2 按照梯度洗脱程序冲入整体柱色谱进行第二维的分离, 并于飞行时间质谱仪进行分析鉴别。当十通阀状态切换至 A 时, 泵 3 将 5 μl 鸦胆子提取液冲入细胞膜色谱柱, 再富集于定量环 1 中, 经过 2.5 min 富集后, 定量环中充满富集的组分, 泵 3 停止工作, 切换至 B 状态; 此时泵 1 和泵 2 按照梯度洗脱程序, 将定量环 1 中富集的组分冲入整体柱中进行分离, 利用 TOFMS 进行成分分析, 而泵 3 再次开始工作并于 2.5 min 后停止, 停止后等待整体柱分析完成后再切换回 A 状态。利用该切换阀的自动切换功能, 使其在 A 和 B 状态间如此相互切换, 从而实现鸦胆子活性成分在细胞膜色谱柱和整体柱上的在线全二维分析。

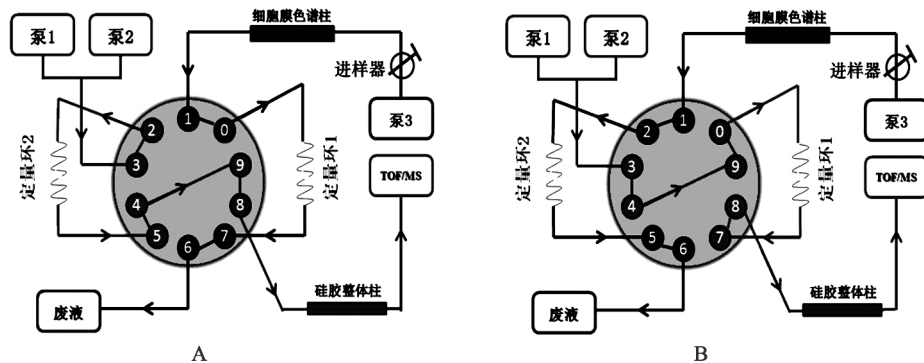


图 1 全二维整体柱-细胞膜色谱系统

3 结果

3.1 全二维细胞膜色谱模型的适用性考察 Hep-G2 细胞核 SMMC-7721 细胞作为肝癌细胞系, 具有丰富的表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) [7,8]。因此, 本研究采用具有 EGFR 拮抗性的伊马替尼作为阳性对照品 [6], 采用四环素作为阴性对照品 [9], 对搭建的全二维整体柱-细胞膜色谱模

型进行了适用性考察, 两种对照品的保留情况如图 2 所示。纵坐标代表一维色谱 (整体柱色谱) 上的保留时间, 横坐标代表二维色谱 (细胞膜色谱) 上的保留时间, 颜色深浅分别代表活性成分的响应值从低到高。其中阴性对照品四环素 (1) 并无明显保留趋势, 而阳性对照品伊马替尼 (2) 则具有较为明显的保留行为。结果表明, 所搭建的全二维色谱具有相应的生物学活性, 可以用于药物活性筛选实验。

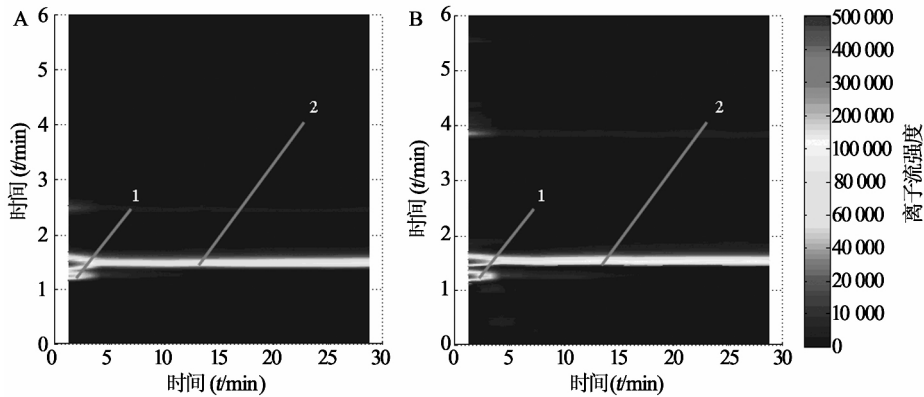


图 2 系统适用性考察

1. 四环素-阴性对照 2. 吉非替尼-阳性对照

3.2 鸦胆子提取液中活性成分的筛选 利用所搭建好的全二维细胞膜色谱模型, 对鸦胆子提取液进行了活性成分筛选实验。根据文献, 构建了鸦胆子提取液中所含活性成分的化合物库, 通过使用提取离子的方法, 利用 masshunter 软件, 自动对所得总离

子流图进行 $[M + H]^+$ 峰提取, 根据文献调研构建的化合物库, 对比得到了腺苷 (3) 和鸦胆子苦素 B (4) 两种潜在活性物质, 其在细胞膜色谱上的保留行为良好, 有明显的拖尾行为, 具有潜在的生物学活性, 如图 3 所示。

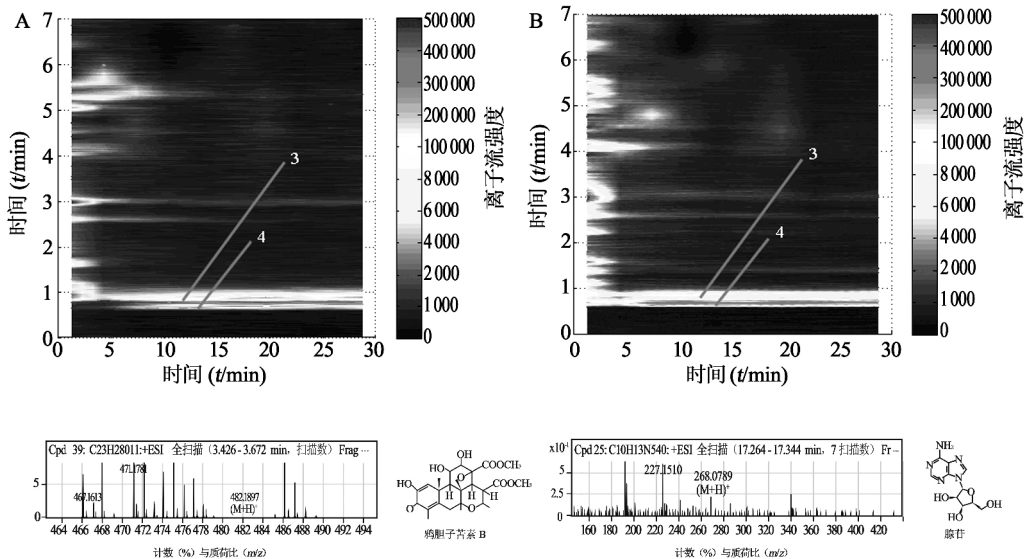


图 3 活性成分筛选结果

3. 腺苷 4. 鸦胆子苦素 B

明显改变。本研究探索了对阿霉素进行巯基化修饰的两种化学合成方法 通过 HPLC 和 MS-ESI 等手段对合成的巯基阿霉素进行表征和鉴定。

¹H NMR 确证 DOX-SATA 出现了与硫酯基团相连的质子信号 表明新合成的化合物中含有硫酯基团。HPLC 和 MS-ESI 结果显示 两种方法均能合成巯基阿霉素。然而 2-IT 试剂法中 由于接枝到阿霉素游离氨基上的 2-IT 试剂中含有活性较大的亚胺基 亚胺基极易与反应初始阶段形成的游离巯基上的氢结合形成氨气 而母环最终形成环化巯基阿霉素。因此 该方法合成的巯基阿霉素不稳定 随着时间延长巯基阿霉素转变为环化巯基阿霉素 不能满足用作模型药物的游离巯基的要求。SATA 试剂法合成巯基阿霉素的反应过程中 首先形成稳定的乙酰硫代乙酸酯取代的阿霉素 然后再在盐酸羟胺的作用下脱去乙酰基团 形成含有游离巯基的巯基阿霉素 该过程中不存在其他易发生的副反应。我们的研究表明 SATA 试剂法合成含有游离巯基的巯基阿霉素的方法更为可行。

【参考文献】

[1] Li PY ,Lai PS ,Hung WC , *et al.* Poly(l -lactide)-vitamin E TPGS nanoparticles enhanced the cytotoxicity of doxorubicin in

drug-resistant MCF-7 breast cancer cells [J]. *Biomacromolecules* 2010 ,11(10) :2576-2582.

- [2] Kibria G ,Hatakeyama H ,Harashima H. Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system [J]. *Arch Pharm Res* ,2014 ,37(1) : 4-15.
- [3] Thierry AR ,Vige D ,Coughlin SS , *et al.* Modulation of doxorubicin resistance in multidrug-resistant cells by liposomes [J]. *FASEB J* ,1993 ,7(6) :572-579.
- [4] Kumar SA ,Peter YA ,Nadeau JL. Facile biosynthesis , separation and conjugation of gold nanoparticles to doxorubicin [J]. *Nanotechnology* 2008 ,10(49) :495101.
- [5] Barraud L ,Merle P ,Soma E , *et al.* Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Hepatol* 2005 ,42(5) :736-743.
- [6] Ma P ,Mumper RJ. Anthracycline nano-delivery systems to overcome multiple drug resistance: a comprehensive review [J]. *Nano Today* 2013 ,8(3) :313-331.
- [7] Wang X ,Cai X ,Hu J , *et al.* Glutathione-triggered "off-on" release of anticancer drugs from dendrimer-encapsulated gold nanoparticles [J]. *J Am Chem Soc* 2013 ,135(26) :9805-9810.
- [8] Gu YJ ,Cheng J ,Man CW , *et al.* Gold-doxorubicin nanoconjugates for overcoming multidrug resistance [J]. *Nanomedicine* , 2012 ,8(2) :204-211.

【收稿日期】 2014-08-02 【修回日期】 2014-10-13

【本文编辑】 李睿曼

(上接第 427 页)

4 结论

本研究利用细胞膜色谱技术、在线全二维技术和 HPLC-TOFMS 技术联用 实现了对中药鸦胆子活性成分的在线全二维筛选 筛选和分离结果快速、准确 共鉴定出两个潜在的有效成分 其药理活性和作用还需进一步研究。该方法充分利用了细胞膜色谱的生物学活性、全二维技术的分离效能和质谱技术的鉴定能力 改善了传统细胞膜色谱分离效果差的现状 实现了在线的活性成分筛选和鉴定 操作简便、节省时间、分离效果良好 可以为天然产物活性成分的分离分析提供一个良好的解决途径。

【参考文献】

[1] 杨兴鑫 张艳利 李晓妮. 细胞膜色谱法及其在药物研究中的应用进展 [J]. *中国药学杂志* 2010(18) :1361-1364.

[2] He L ,Wang S ,Geng X. Coating and fusing cell membranes onto a silica surface and their chromatographic characteristics [J]. *Chromatographia* 2001 ,54(1-2) : 71-76.

[3] 林宏英 吴建梅 张文生. 鸦胆子油的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志* 2006 ,12(4) :65-69.

- [4] 丁晨旭 索有瑞. 中药鸦胆子化学成分及药理学研究进展 [J]. *中成药* 2006 ,28(1) :117-120.
- [5] He L ,Yang G ,Geng X. Enzymatic activity and chromatographic characteristics of the cell membrane immobilized on silica surface [J]. *Chin Sci Bull* ,1999 ,44(9) : 826-831.
- [6] Chen X ,Cao Y ,Lv D , *et al.* Comprehensive two-dimensional HepG2/cell membrane chromatography/monolithic column/time-of-flight mass spectrometry system for screening anti-tumor components from herbal medicine [J]. *J Chromatogr A* ,2012 ,1242: 67-74.
- [7] 任牡丹 胡雅楠 和水祥 等. 丹参酮 II a 对人肝癌细胞 ang-2 及其受体 tie-2 表达的影响 [J]. *西安交通大学学报(医学版)* 2012(2) :203-210.
- [8] 齐永 庄乾元 彭鄂军 等. 富含亮氨酸重复序列和免疫球蛋白样结构域基因 1 对人肝癌细胞株 Hep-G2 恶性表型的影响及其作用机制 [J]. *中华实验外科杂志* ,2012 ,29(10) : 1906-1909.
- [9] Jatoi A ,Dakhil S R ,Sloan J A , *et al.* Prophylactic tetracycline does not diminish the severity of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor - induced rash: results from the North Central Cancer Treatment Group (Supplementary N03CB) [J]. *Support Care Cancer* ,2011 ,19(10) : 1601-1607.

【收稿日期】 2014-09-04 【修回日期】 2014-10-08

【本文编辑】 陈静