

# 硫辛酸-香豆素偶联物合成及抗肿瘤活性研究

戴一<sup>1,2\*</sup>, 冯艳<sup>1</sup>, 陈天芹<sup>1</sup>

<sup>1</sup>安徽新华学院药学院, 合肥 230088; <sup>2</sup>中国科学技术大学化学系, 合肥 230036

**摘要:** 硫辛酸为一内源性二硫化物, 通过线粒体途径抑制多种肿瘤细胞的增殖, 而对正常细胞影响甚微; 香豆素为一具有荧光的天然产物, 广泛应用于生物成像。本实验设计合成了一个新颖的硫辛酸-香豆素偶联物, 该偶联物具有多功能。香豆素作为荧光报告器, 硫辛酸作为活性药物。当该偶联物进入肿瘤细胞, 由于肿瘤细胞中的水解酶把偶联物中的酯键水解, 释放出硫辛酸和荧光分子香豆素而发出荧光。采用噻唑兰 (MTT) 法评价其对肿瘤细胞的增殖抑制活性, 活性氧检测试剂盒 (DCFH-DA) 检测其对活性氧的清除作用, 流式细胞术检测其诱导的细胞凋亡及荧光显微检测细胞内成像。实验结果发现该偶联物的细胞毒性相比于母体化合物硫辛酸提高了一个数量级, 进一步研究发现该偶联物可清除肿瘤细胞增殖与生长所需的活性氧, 同时该偶联物诱导的凋亡显著高于其他组药物。荧光显微镜监测该偶联物在给药 6 h 后发出的荧光最强, 说明该偶联物具有示踪药物水解释放的功能。

**关键词:** 硫辛酸; 香豆素; 偶联物; 抗肿瘤活性

中图分类号: R914.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)3-0379-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.3.004

## Synthesis and anticancer activity of lipoic acid coumarin conjugate

DAI Yi<sup>1,2\*</sup>, FENG Yan<sup>1</sup>, CHEN Tian-qin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmaceutical Sciences, Anhui Xinhua University, Hefei 230088, China;

<sup>2</sup>Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

**Abstract:** Lipoic acid is an endogenous disulfide compound capable of suppressing growth of various cancer cell lines via mitochondria-targeted mode of action, while non-transformed primary cells are hardly affected. Coumarin, a natural product with fluorescence, was one of widely used imaging reagents. We present here, the design, synthesis and in vitro biological assessment of a novel lipoic acid-coumarin conjugate. This conjugate is a multifunctional molecule composed of a coumarin moiety as a fluorescent reporter and lipoic acid as a model active drug. After entering tumor cells, the conjugate can release lipoic acid and concomitantly fluorescence intensity increases, due to hydrolysis of ester bonds between lipoic acid and coumarin by hydrolytic enzyme in cancer cells. MTT assay was used to investigate its inhibitory activity on tumor cells. Reactive oxygen species (ROS) removal was detected by DCFH-DA kit. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Fluorescence microscopy was used to detect intracellular imaging. The results showed that compared with lipoic acid, the in vitro anticancer activity of the conjugate increased by an order magnitude. Further research revealed that the conjugate can scavenge reactive oxygen species, an important substances for proliferation and growth of cancer cells. Apoptosis induced by the conjugate was significantly stronger than those of other tested compounds. Fluorescence microscopic experiments reveal that the fluorescence intensity reaches its maximum at 6 h, indicating drug release can be readily monitored at the cellular level.

**Key words:** lipoic acid; coumarin; conjugate; anti-tumor activity

硫辛酸为含环状二硫键的 8 碳饱和脂肪酸, 属内源性活性物质, 其在线粒体中发挥着多种重要的功能, 如作为辅酶, 参与丙酮酸脱氢酶及  $\alpha$ -酮戊二

酸脱氢酶催化的氧化脱羧反应<sup>[1,2]</sup>。硫辛酸除了在线粒体能量代谢过程中起着重要作用外, 也作为一种天然的抗氧化剂在对抗氧化应激所致的慢性病方面起重要作用, 如用于糖尿病、糖尿病性多发性神经病和阿尔茨海默病的治疗<sup>[3-5]</sup>。近年来, 越来越多的研究发现硫辛酸能抑制多种肿瘤细胞的生长, 而对正

收稿日期: 2019-10-18 接受日期: 2020-04-01

基金项目: 安徽省教育厅自然科学研究重点项目 (KJ2019A0873); 安徽新华学院制药工程教学团队建设项目 (2017jtdx08)

\* 通信作者 E-mail: daiyiii@163.com

常细胞影响甚微<sup>[6]</sup>。硫辛酸可以通过多种途径起到抑制肿瘤细胞增殖的作用,而通过活性氧途径是发挥其抗肿瘤活性的一种重要形式。硫辛酸既可以清除活性氧<sup>[7,8]</sup>,又可以促进活性氧的释放,与其发生作用的部位、浓度等相关<sup>[9,10]</sup>。活性氧对肿瘤细胞是一把双刃剑,低浓度的活性氧可以诱导肿瘤细胞的增殖、分化及转移等,而高浓度的活性氧则破坏细胞内大分子,诱导细胞凋亡<sup>[11-14]</sup>。诊疗是近年来出现的一种新的生物医药技术,起到治疗与诊断的双重作用,尤其适用于个体化治疗<sup>[15-18]</sup>。诊断试剂与治疗药物搭配的方式有多种,其中荧光性分子是常见的组合<sup>[19]</sup>。基于此,本实验设计合成了硫辛酸与香豆素的偶联物,并研究了该偶联物的体外抗肿瘤活性、活性氧清除、细胞凋亡及细胞内成像,以期实现硫辛酸的抗肿瘤活性的提高,同时达到示踪药物水解释放的效果、为硫辛酸的进一步研究开发提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

BruckerACF-300 型核磁共振仪(布鲁克(北京)

科技有限公司);CytoFLEX 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司);奥林巴斯 IX71 荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);API3000 质谱仪(美国 PE 公司);bio-rad mode680 酶标仪(美国伯乐生命医学产品有限公司);硫辛酸、7-羟基-4-甲基香豆素(阿拉丁试剂有限公司)。DEME 培养基(hyclone 公司),胎牛血清 FBS(Lonsera 公司),MTT、活性氧检测试剂盒及细胞凋亡检测试剂盒(碧云天公司),其他试剂均为分析纯。

### 1.2 受试细胞株

受试细胞株人肝癌 HepG2 细胞、人宫颈癌细胞 HeLa 细胞、人卵巢癌 A2780 细胞及人肺癌 A549 细胞来自于美国 ATCC 公司。

### 1.3 硫辛酸-香豆素偶联物及正辛酸-香豆素偶联物合成路线

以硫辛酸为起始原料,二氯亚砷作为酰氯化试剂合成硫辛酰氯,所得酰氯在缚酸剂三乙胺存在的条件下与 7-羟基-4-甲基香豆素发生酯化反应即得硫辛酸-香豆素偶联物,同法合成正辛酸-香豆素偶联物,合成路线见图 1。

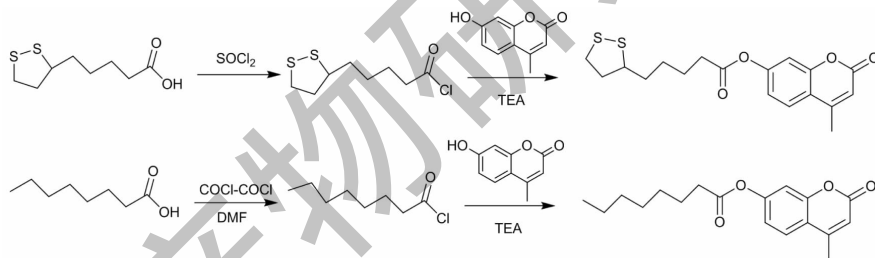


图 1 硫辛酸-香豆素偶联物及正辛酸-香豆素偶联物的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of lipoyl acid-coumarin conjugate and n-caprylyl acid-coumarin conjugate

### 1.4 化学合成

#### 1.4.1 硫辛酰氯的制备<sup>[20]</sup>

取二氯亚砷(2.04 mL,28.0 mmol)溶于 30 mL 二氯甲烷中,在 0 °C 缓慢滴入硫辛酸(3.88 g,18.72 mmol)的 50 mL 二氯甲烷溶液中,滴加完毕,室温反应 4 h,减压除去溶剂,得浅黄色固体,即为硫辛酰氯,保存备用。

#### 1.4.2 硫辛酸-香豆素偶联物的合成

7-羟基-4-甲基香豆素(1.76 g,10 mmol)溶于 50 mL 无水四氢呋喃中,加入三乙胺(1.39 mL,10 mmol)。另取硫辛酰氯(2.25 g,10 mmol),溶于 50 mL 无水四氢呋喃中,冰水浴条件下缓慢滴入上述溶液中,滴加完毕,室温搅拌反应,TLC 跟踪反应

(展开剂为石油醚:乙酸乙酯=2:1)。反应完毕,减压除去溶剂,以乙酸乙酯溶解,分别以稀盐酸、饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,粗产物过硅胶柱,以石油醚:乙酸乙酯=4:1洗脱,得黄色固体。

#### 1.4.3 正辛酰氯的制备

取正辛酸(2.88 g,20.00 mmol)溶于 100 mL 二氯甲烷中,0 °C 条件下缓慢滴入草酰氯(3.06 g,24.00 mmol),滴加完毕,加入 2 滴 DMF 作为催化剂,逐渐升温至室温反应 4 h,减压除去溶剂,得无色油状物,即为正辛酰氯,保存备用。

#### 1.4.4 正辛酸-香豆素偶联物的合成

7-羟基-4-甲基香豆素(1.76 g,10 mmol)溶于 50 mL 二氯甲烷中,加入三乙胺(1.39 mL,10 mmol)。

另取正辛酸酰氯(2.25 g, 10 mmol)溶于 30 mL 二氯甲烷中,冰水浴条件下缓慢滴入上述溶液中,滴加完毕,室温搅拌反应,TLC 跟踪反应(展开剂为石油醚:乙酸乙酯=3:1)。反应完毕,分别以稀盐酸、饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,粗产物过硅胶柱,以石油醚:乙酸乙酯=5:1洗脱,得无色油状物。

### 1.5 硫辛酸-香豆素偶联物抗肿瘤活性研究

于 96 孔板中接种对数生长期肿瘤细胞培养,每孔加 5 000 个细胞、培养基为 100  $\mu\text{L}$ ,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的条件下培养。培养过夜后给予不同浓度的待测化合物,平行设 3 个孔,阴性对照组加与给药组等体积的培养基,以 DEME 培养基作为空白对照组,给药后继续培养 48 h,弃去培养液,每孔加 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ ,继续孵育 4 h,弃去上清液,每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,震荡 10 min,酶标仪 570 nm 测定吸光度 OD 值,计算抑制率及  $\text{IC}_{50}$  值。抑制率 =  $[1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

### 1.6 硫辛酸-香豆素偶联物与正辛酸-香豆素偶联物抗肿瘤活性比较

于 96 孔板中接种对数生长期肝癌 HepG2 细胞培养,每孔 5 000 个细胞,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、100  $\mu\text{L}$  培养基培养。次日给予高低浓度(250 和 125  $\mu\text{M}$ )的硫辛酸-香豆素偶联物、正辛酸-香豆素偶联物或香豆素与酸的相应混合物,平行设 3 个孔,阴性对照组加给药组等体积的培养基,以 DEME 培养基作为空白对照组,给药后继续培养 48 h,弃去培养液,每孔加 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ ,继续孵育 4 h,弃去上清液,每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,震荡 10 min,酶标仪 570 nm 测定吸光度 OD 值,计算抑制率。抑制率 =  $[1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

### 1.7 硫辛酸-香豆素偶联物对活性氧的清除

于 6 孔板中接种 HepG2 细胞,每孔 10 万个细胞,2 mL 完全培养基在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养过夜,于次日分别用含药培养基进行替换继续培养 24 h,所加药物的浓度硫辛酸-香豆素偶联物、硫辛酸、硫辛酸与香豆素混合物(摩尔比 1:1)、正辛酸-香豆素偶联物、正辛酸、正辛酸与香豆素混合物(摩尔比 1:1)及香豆素以硫辛酸或正辛酸计均为 500  $\mu\text{M}$ 。24 h 后按活性氧检测试剂盒(DCFH-DA)(购于碧云天生物)原位处理,经 PBS 洗涤后用荧光显微镜观察<sup>[21]</sup>。

### 1.8 硫辛酸-香豆素偶联物诱导细胞凋亡

对于硫辛酸-香豆素偶联物诱导的细胞凋亡,本

实验于 12 孔板中接种 HepG2 细胞,每孔 20 万个细胞,1 mL 完全培养基在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养过夜,于次日分别用含药培养基进行替换继续培养 48 h,所加药物的浓度硫辛酸-香豆素偶联物、硫辛酸、硫辛酸与香豆素混合物(摩尔比 1:1)及香豆素均为 500  $\mu\text{M}$ 。48 h 后按 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒说明书(购于碧云天生物)收集所有细胞,经 PBS 洗涤后加 Annexin V-FITC 及 PI 进行染色,流式细胞仪检测。

### 1.9 硫辛酸-香豆素偶联物细胞内水解释放

于 6 孔板中接种 HepG2 细胞,每孔 10 万个细胞,2 mL 完全培养基在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养过夜,于次日分别用含药培养基进行替换继续培养,所加药物的浓度硫辛酸-香豆素偶联物为 1 mM。在 0、1、2、4、6、8 h 分别取样,经 PBS 洗涤后用荧光显微镜观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 化合物表征

硫辛酸-香豆素偶联物为黄色固体,收率为 73%,TLC 的  $R_f$  约 0.6(展开剂为石油醚:乙酸乙酯=2:1);<sup>1</sup>H NMR(300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.45 ~ 1.75 (m, 2H), 1.70 ~ 2.09 (m, 5H), 2.45 (s, 3H), 2.44 ~ 2.59 (m, 1H), 2.64 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 3.07 ~ 3.29 (m, 2H), 3.55 ~ 3.70 (m, 1H), 6.28 (s, 1H), 7.03 ~ 7.16 (m, 2H), 7.62 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H);<sup>13</sup>C NMR(75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 18.77 (4- $\text{CH}_3$ ), 24.50 (C-3'), 28.69 (C-4'), 34.10 (C-2'), 34.59 (C-5'), 38.55 (C-8'), 40.27 (C-7'), 56.28 (C-6'), 110.45 (C-8), 114.52 (C-2), 117.83 (C-4a), 118.10 (C-6), 125.40 (C-5), 151.93 (C-7), 153.08 (C-4), 154.18 (C-8a), 160.50 (C-2), 171.31 (C-1'); IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3 091, 2 930, 2 859, 1 732, 1 613, 1 568, 1 501, 1 413, 1 384, 1 328, 1 263, 1 227, 1 014, 981, 879  $\text{cm}^{-1}$ ; ESI-MS:  $m/z$  365.2  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 387.1  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 729.5  $[2\text{M} + \text{H}]^+$ , 746.4  $[2\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ , 751.3  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ 。

正辛酸-香豆素偶联物为无色油状液体,收率为 87%,TLC 的  $R_f$  约 0.7(展开剂为石油醚:乙酸乙酯=2:1);<sup>1</sup>H NMR(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.83 ~ 0.94 (t,  $J = 7.9$  Hz, 3H), 1.25 ~ 1.43 (m, 8H), 1.71 ~ 1.82 (q,  $J = 7.6, 7.1$  Hz, 2H), 2.38 ~ 2.43 (s, 3H), 2.55 ~ 2.64 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 6.19 ~ 6.24 (s, 1H), 7.01 ~ 7.09 (m, 2H), 7.55 ~ 7.63 (dd,  $J = 8.5, 2.1$  Hz, 1H);<sup>13</sup>C NMR(100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :

13.98 (C-8'), 18.56 (4-CH<sub>3</sub>), 22.52 (C-7'), 24.68 (C-3'), 28.83 (C-4'), 28.92 (C-5'), 31.56 (C-6'), 34.18 (C-2'), 110.16 (C-8), 114.16 (C-2), 117.53 (C-4a), 118.04 (C-6), 125.40 (C-5), 152.05 (C-7), 153.11 (C-4), 153.93 (C-8a), 160.28 (C-2), 171.44 (C-1')。

## 2.2 硫辛酸-香豆素偶联物抗肿瘤活性研究

通过 MTT 法评价所得偶联物细胞毒性,结果见

表 1 硫辛酸与香豆素偶联物体外抗肿瘤活性结果  
Table 1 *In vitro* antitumor activities of lipoic acid-coumarin conjugate

化合物 Compound	IC <sub>50</sub> (μM)			
	HepG2	HeLa	A2780	A549
香豆素 Coumarin	349.40 ± 58.70	346.95 ± 53.25	221.10 ± 72.20	344.35 ± 58.75
硫辛酸与香豆素混合物(1:1) Mixture of lipoic acid and coumarin(1:1)	385.8 ± 104.40	342.75 ± 49.25	213.65 ± 62.15	338.05 ± 104.55
硫辛酸-香豆素偶联物 Lipoic acid-coumarin conjugate	261.35 ± 69.60	333.45 ± 31.85	166.10 ± 52.30	282.00 ± 29.4
硫辛酸 Lipoic acid	> 2 000	> 2 000	> 2 000	> 2 000

## 2.3 硫辛酸-香豆素偶联物与正辛酸-香豆素偶联物抗肿瘤活性比较

为确定硫辛酸-香豆素偶联物抗肿瘤活性提高的原因是否由于其本身脂溶性提高增加了摄取所导致,本实验进一步合成了一个脂溶性更大的正辛酸-香豆素偶联物。通过考察在高浓度(250 μM)和低浓度(125 μM)对 HepG2 细胞的抑制作用,由图 2 可见,无论在高低浓度,硫辛酸与香豆素的混合物相比于正辛酸与香豆素的混合物,肿瘤抑制活性没有明显的差别,可能因为混合物中硫辛酸、正辛酸或香

豆素均为单体,而单独的硫辛酸、正辛酸肿瘤抑制作用较弱,主要表现为香豆素的作用。而高低浓度给药组硫辛酸-香豆素偶联物的肿瘤抑制活性均高于正辛酸-香豆素偶联物,说明硫辛酸-香豆素偶联物抗肿瘤活性提高除了脂溶性提高所致较高摄取因素外,硫辛酸本身也表现出了一种其他方式的抗肿瘤作用,文献报道硫辛酸可以清除 ROS 而产生肿瘤抑制作用<sup>[7,8]</sup>。本实验进一步考察了两种偶联物对 ROS 的清除作用。

豆素均为单体,而单独的硫辛酸、正辛酸肿瘤抑制作用较弱,主要表现为香豆素的作用。而高低浓度给药组硫辛酸-香豆素偶联物的肿瘤抑制活性均高于正辛酸-香豆素偶联物,说明硫辛酸-香豆素偶联物抗肿瘤活性提高除了脂溶性提高所致较高摄取因素外,硫辛酸本身也表现出了一种其他方式的抗肿瘤作用,文献报道硫辛酸可以清除 ROS 而产生肿瘤抑制作用<sup>[7,8]</sup>。本实验进一步考察了两种偶联物对 ROS 的清除作用。

## 2.4 硫辛酸-香豆素偶联物对活性氧的清除

低浓度活性氧对肿瘤细胞的增殖、分化及转移等具有重要的促进作用,硫辛酸清除活性氧对于抑制肿瘤细胞的增殖、转移等具有重要价值。采用活性氧检测试剂盒(DCFH-DA)(购于碧云天生物)原位处理,活性氧与 DCFH-DA 反应可产生绿色荧光。在一定曝光时间条件下,由图 A1 可见 HepG2 肿瘤细胞本身可以产生低浓度活性氧,从图 B1-D1 可见,硫辛酸的参与可以降低 ROS 的浓度,尤其是硫辛酸-香豆素偶联物可降低效果更为显著,显示出该偶联物显著的活性氧清除功能。由图 A2-D2 可见,香豆素、正辛酸组成的偶联物或混合物及它们各自的单体,均不能有效地清除肿瘤中的 ROS,说明清除 ROS 可能是硫辛酸-香豆素偶联物产生更强抗肿瘤活性的一个重要原因。

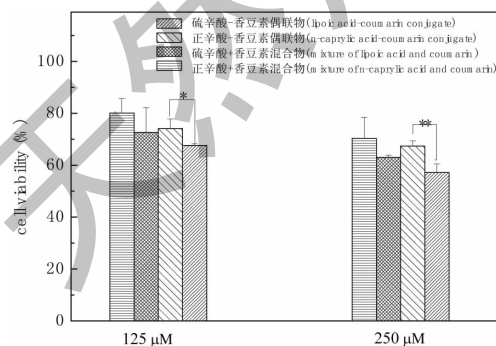


图 2 硫辛酸-香豆素偶联物与正辛酸-香豆素偶联物抗肿瘤活性比较

Fig. 2 Comparison of antitumor activity between lipoic acid-coumarin conjugate and n-caprylic acid-coumarin conjugate

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

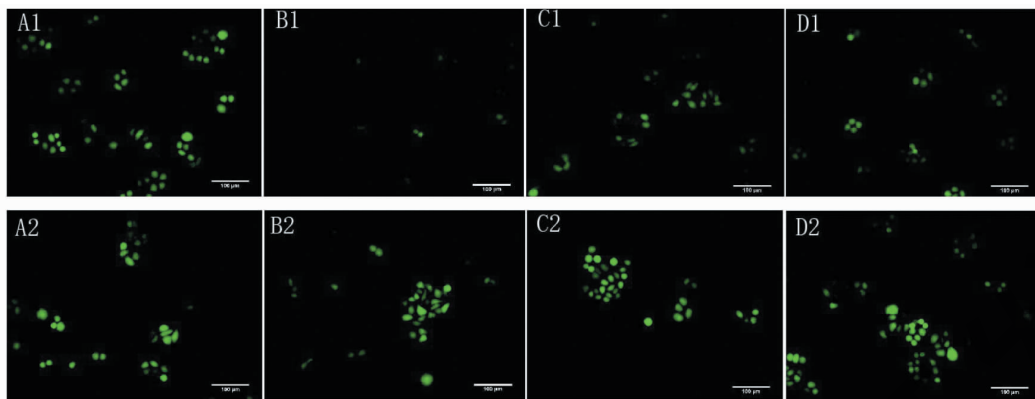


图3 硫辛酸-香豆素偶联物对活性氧的清除

Fig. 3 Scavenging of reactive oxygen by lipoic acid coumarin conjugate

注: HepG2 细胞孵育 24 h 后给药浓度均为 500  $\mu$ M, A1 为对照组; A2 为香豆素组; B1 为硫辛酸-香豆素偶联物组; B2 为正辛酸-香豆素偶联物组; C1 为硫辛酸与香豆素混合物组; C2 为正辛酸与香豆素混合物组; D1 为硫辛酸组; D2 为正辛酸组。Note: HepG2 cells were pre-incubated for 24 h with drugs at dose of 500  $\mu$ M, A1: control group; A2: coumarin group; B1: lipoic acid-coumarin conjugate group; B2: n-caprylic acid-coumarin conjugate group; C1: mixture of lipoic acid and coumarin group; C2: mixture of n-caprylic acid and coumarin group; D1: lipoic acid group; D2: n-caprylic acid group.

## 2.5 硫辛酸-香豆素偶联物诱导细胞凋亡

对于硫辛酸-香豆素偶联物诱导的细胞凋亡,流式细胞仪检测如图 4 显示,相比于对照组 4.94% 的凋亡率,单纯硫辛酸对凋亡几乎没有影响,单纯香豆素组可见凋亡率提高到 7.28%,但远低于硫辛酸与

香豆素混合物组的 16.78% 及硫辛酸-香豆素偶联物的 17.49%,可见硫辛酸与香豆素有明显的协同作用,同时可以发现硫辛酸与香豆素的混合物诱导的凋亡早晚期几乎相等,而硫辛酸-香豆素偶联物诱导的凋亡主要集中在晚期。

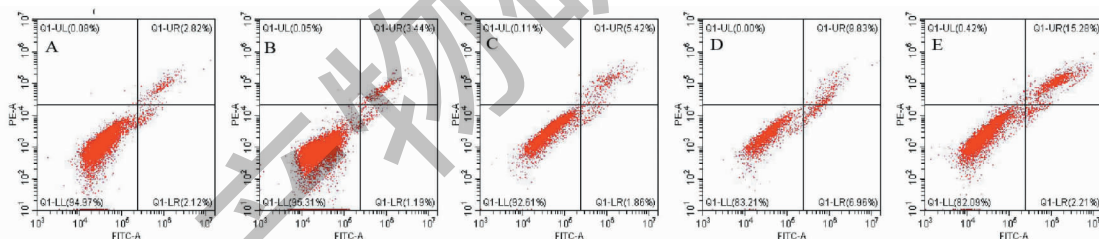


图4 硫辛酸-香豆素偶联物诱导细胞凋亡

Fig. 4 Effect of lipoic acid-coumarin conjugate on the apoptosis

注: HepG2 细胞孵育 24 h 后给药浓度均为 500  $\mu$ M, A 为对照组; B 为硫辛酸组; C 为香豆素组; D 为硫辛酸与香豆素混合物组; E 为硫辛酸与香豆素偶联物组。Note: HepG2 cells were pre-incubated for 24 h with drugs at dose of 500  $\mu$ M, A: Control group; B: Lipoic acid group; C: Coumarin group; D: The mixture of lipoic acid and coumarin group; E: Lipoic acid-coumarin conjugate group.

## 2.6 硫辛酸-香豆素偶联物细胞内水解释放

硫辛酸-香豆素偶联物除具有抑制肿瘤细胞生长的活性外,同时具有细胞示踪药物水解释放功能,本实验设计的硫辛酸-香豆素偶联物具有“turn-on”功能,由图 5 中 A、B 图可见,硫辛酸-香豆素偶联物在 PBS 中用 365 nm 光激发无蓝色荧光,而当用碱液水解后可以观察到强烈的蓝色荧光,这是因为水解后该偶联物释放出香豆素母体,产生了荧光。在

细胞体内,存在着丰富的酯水解酶,可以把硫辛酸-香豆素偶联物同样水解,起到在细胞内示踪药物水解释放的效果。实验进一步研究了该偶联物不同时间细胞内药物水解释放,由图 5 可见,该偶联物与癌细胞共孵育 1 h,基本观察不到蓝色荧光,从 2 h 开始,蓝色荧光逐渐增强,6 h 时达到最强,在 8 h 时荧光变弱,通过该实验实时检测到药物的水解释放。体现了该偶联物具有示踪药物水解释放的功能。

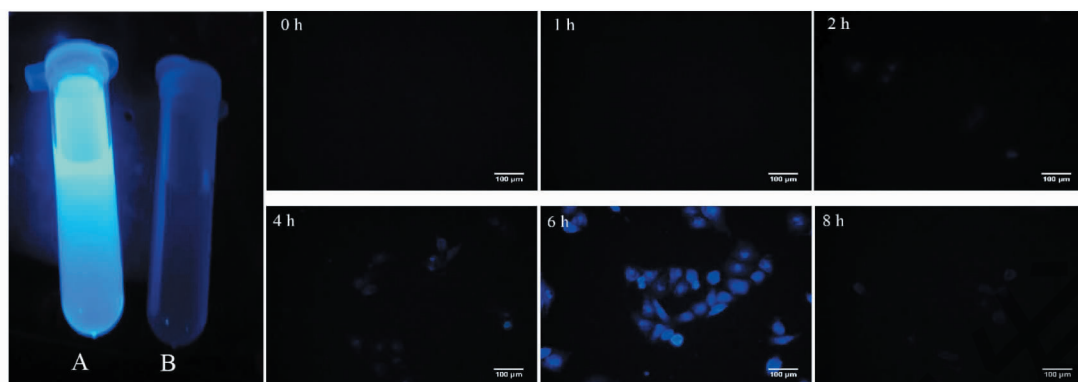


图5 硫辛酸-香豆素偶联物的细胞内水解释放

Fig. 5 The release of lipionic acid coumarin conjugate in cancer cells

注:A为硫辛酸-香豆素偶联物的氢氧化钠溶液;B为硫辛酸-香豆素偶联物PBS溶液;0、1、2、4、6、8 h为给药1 mM后各时间点细胞内荧光强度。Note:A;Sodium hydroxide solution of lipionic acid-coumarin conjugate;B;PBS solution of lipionic acid-coumarin conjugate;Fluorescence intensity in cancer cells treated with 1 mM drug at 0,1,2,4,6,8 h.

### 3 结论

硫辛酸作为一个内源性维生素类分子,具有多种生物功能。近年来在对抗癌治疗方面的研究较为活跃,因单独的硫辛酸治疗效果有限,多对硫辛酸进行结构改造。改造主要在两个位点展开,如本研究采取的方式,利用硫辛酸本身具有的羧基,另一个位点就是打开二硫键形成巯基后进行改造,其中引起较大关注的为CPI-613,已完成临床I期研究<sup>[22]</sup>。药物可示踪化持续受到广泛的关注,对于个体化给药具有重要的意义。本实验通过硫辛酸与7-羟基-4-甲基香豆素成酯制成了具有可示踪功能的硫辛酸-香豆素偶联物,通过细胞体内酯水解酶的作用释放出硫辛酸及香豆素达到治疗及示踪的一体化。细胞实验显示,该偶联物对肿瘤细胞的增殖抑制活性是硫辛酸的10倍以上,可以有效地清除肿瘤细胞增殖转移赖以生存的低浓度活性氧,其诱导的凋亡为硫辛酸的3.5倍,体现出硫辛酸与香豆素的协同作用,另外给药6 h,可见到强烈的蓝色荧光产生。总之,本实验合成了一种可示踪药物水解释放的硫辛酸-香豆素偶联物,为硫辛酸衍生物的开发提供了一种新的思考。

### 参考文献

- 1 Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant [J]. *Free Radic Biol Med*, 1995, 19: 227-250.
- 2 Biliska A, Wlodek L. Lipoic acid—the drug of future? [J]. *Pharmacol Rep*, 2005, 57: 570-577.
- 3 Da Ros R, Assaloni R, and Ceriello A. Molecular targets of

- diabetic vascular complications and potential new drugs [J]. *Curr Drug Targets*, 2005, 6: 503-509.
- 4 Vincent AM, Stevens MJ, Backus C, et al. Cell culture modeling to test therapies against hyperglycemia-mediated oxidative stress and injury [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7: 1494-1506.
- 5 Pirlich M, Kiok K, Sandig G, et al. Alpha-lipoic acid prevents ethanol-induced protein oxidation in mouse hippocampal HT22 cells [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 328: 93-96.
- 6 Dörsam B, Fahrer J. The disulfide compound alpha-lipoic acid and its derivatives; a novel class of anticancer agents targeting mitochondria [J]. *Cancer Lett*, 2016, 371: 12-19.
- 7 Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant [J]. *Free Radic Biol Med*, 1995, 19: 227-250.
- 8 Suh JH, Wang H, Liu RM, et al. (R)-alpha-lipoic acid reverses the age-related loss in GSH redox status in post-mitotic tissues; evidence for increased cysteine requirement for GSH synthesis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 423: 126-135.
- 9 Wenzel U, Nickel A, Daniel H. Alpha-lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer cells by increasing mitochondrial respiration with a concomitant O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation [J]. *Apoptosis*, 2005, 10: 359-368.
- 10 Simbula G, Columbano A, Ledda-Columbano GM, et al. Increased ROS generation and p53 activation in alpha-lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells [J]. *Apoptosis*, 2007, 12: 113-123.
- 11 Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 85-95.