

2-羟基-3-甲基蒽醌抑制结直肠癌的作用及机制研究

谭佳妮^{1,2}, 刘文豪^{1,2}, 沈卫星^{1,2}, 孙东东^{1,2*}, 程海波^{1,2*}

¹南京中医药大学转化医学研究中心 国家中医药管理局名医验方评价与转化重点实验室
江苏省抗肿瘤验方与产业化工程实验室;²江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心,南京 210023

摘要:为观察2-羟基-3-甲基蒽醌(HMA)对结直肠癌细胞增殖的影响并探讨其作用机制,本研究采用CCK8法检测HMA对结直肠癌细胞增殖的影响;Heochst-33343/PI染色检测细胞凋亡情况;同时检测细胞内ROS及GSH含量变化并应用Western blot检测细胞凋亡相关蛋白及Keap-1/Nrf-2/ARE信号途径相关蛋白的表达。实验结果显示,HMA给予结直肠癌细胞后,细胞内ROS含量升高,GSH含量减少;HMA通过抑制Keap-1/Nrf-2/HO-1通路,诱导细胞发生凋亡。综上表明HMA具有抑制结肠癌细胞增殖的作用,其机制可能与破坏细胞内氧化还原平衡,抑制Keap-1/Nrf-2/HO-1通路有关。

关键词:HMA;结直肠癌;氧化应激;Keap-1/Nrf-2/HO-1通路

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)2-0268-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.2.011

The anti-proliferative activity and mechanism exploration of 2-hydroxyl group-3-tectoquinone on colon cancer cells

TAN Jia-ni^{1,2}, LIU Wen-hao^{1,2}, SHEN Wei-xing^{1,2}, SUN Dong-dong^{1,2*}, CHENG Hai-bo^{1,2*}

¹Translational Medicine Center of Nanjing University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Famous Doctors' Proved Recipe Evaluation and Transformation of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Provincial Lab of Anticarcinoma Proved Recipe Research and Engineering Industrialization;

²TCM Treatment on Tumor Collaborative Innovation Center of Jiangsu Province, Nanjing 210023, China

Abstract:To explore the anti-tumor effect and the possible mechanisms of HMA against colon cancer cells. The CCK8 methods was used to assay the anti-proliferative activity of HMA. The level of intracellular ROS and GSH was measured by commercial kit. Western blot assay was used to detected the protein expression change of Keap-1/Nrf-2/ARE signaling pathway. The results showed that HMA could significantly inhibit the proliferation of colon cancer cells ($P < 0.05$). Compared to the control group, HMA increased the level of ROS while decreased the GSH content, and inhibited the Keap-1/Nrf-2/HO-1 pathway signaling. In conclusion, HMA could significantly inhibit the proliferation of colon cancer cells by disturbing the redox balance, which was related to inhibiting the Keap-1/Nrf-2/HO-1 signaling pathway.

Key words:HMA; colorectal cancer; oxidative stress; Keap-1/Nrf-2/HO-1 signaling pathway

结直肠癌是常见的恶性消化道肿瘤之一,在我国其发病率呈明显上升趋势,死亡率居第2位^[1,2]。结直肠癌早期病发隐匿,大部分确诊时已处于中晚期。手术化疗为目前结直肠癌的主要治疗手段,但术后2年内复发率高达50%,此外严重的副作用使

患者生活质量明显下降^[3]。越来越多的研究发现中医药具有抑制结直肠癌复发转移、减轻放化疗毒副作用的优势,已成为结直肠癌治疗的重要手段之一。白花蛇舌草具有清热解毒、利尿消肿的功能,药理学研究表明其具有明显的抗肿瘤活性,临幊上多与其他药物配伍用于抗肿瘤治疗,效果显著且毒副作用小^[4,5]。蒽醌类化合物在白花蛇舌草中含量较高,属于其特征性成分。2-羟基-3-甲基蒽醌(HMA)是白花蛇舌草中具有抗肿瘤效应的蒽醌类化合物之一,具有抑制白血病、肝癌、肺癌等多种肿瘤细胞增

收稿日期:2019-10-31 接受日期:2020-10-28

基金项目:国家自然科学基金(81930117, 81804073, 82074318);江苏省高校优势学科建设工程项目(苏政办发〔2018〕87号)

*通信作者 E-mail:ssdnjucm@163.com, chbnuem@163.com

殖的作用^[6-8],但其对结直肠癌的影响及作用机制尚未见报道。本研究以人结直肠癌细胞为研究对象,观察了HMA对结直肠癌细胞增殖活性的影响,并对其作用机制进行了探讨。

1 材料与仪器

1.1 试验药物

2-羟基-3-甲基蒽醌购自上海源叶生物科技有限公司(批号:B50429)化合物溶于DMSO中,配制成母液,置于40 °C低温储存。

1.2 试剂与仪器

RPMI-1640高糖培养基、胰蛋白酶溶液、青霉素-链霉素溶液(上海源培生物技术有限公司,批号:F40411,K40410,E40401);胎牛血清(Capricorn scientific公司,批号:1705124);MTT、DMSO(Sigma公司,批号:SP1080,SHBH2446V);细胞裂解液(Bio-sharp公司,批号:6503595);Hoechst33342-PI染色液、GSH和GSSG检测试剂盒(碧云天,货号:S0053、C1028);AnnexinV-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(BD公司,批号:556547);Bax、Bcl-2、PARP-1、Cleaved PARP、Keap-1、Nrf-2、HO-1、GAPDH及Lamin B1抗体(CST公司,货号:5023、51071、9532、6987、8047、12721、86806、5174、13435);Pall超纯水系统(美国Pall公司);CPA225D万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);FC型酶标仪、HERAcell150i型二氧化碳培箱(美国Thermo公司);ECLIPSETi-5型荧光倒置显微镜(日本Nikon公司);BD FACS Calibur流式细胞仪(美国BD公司);Tanon-5500型化学发光凝胶成像仪器(中国天能科技有限公司);Power PacTM Basic型电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

2 实验方法

2.1 细胞培养

人结直肠癌HT-116细胞购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。细胞置于37 °C,5% CO₂培养箱内。使用含10%FBS及100 U/mL青链霉素的PRMI-1640高糖完全培养基。取对数生长期的细胞用于实验,细胞融合度约90%时用胰蛋白酶消化传代或种板。

2.2 细胞增殖活性检测

取对数生长期结直肠癌细胞,调整细胞密度10⁴个/mL加入96孔板中,100 μL/孔,置于5%CO₂孵箱中,24 h弃掉培养上清后分别加入25、50、100 μM的HMA,平行设6个复孔,继续培养24、48、

72 h。干预结束后每孔加入10 μL CCK-8继续培养4 h,酶标仪检测450 nm处的吸光度A值,根据A值计算各浓度HMA对细胞增殖的抑制作用。实验重复3次。

2.3 细胞凋亡检测

取对数生长期结直肠癌细胞,调整细胞密度10⁶个/mL加入6孔板中,1 mL/孔,置于37 °C 5% CO₂孵箱中过夜。次日,弃掉培养上清后加入各浓度HMA,设3个复孔,继续培养24 h。给药结束后,弃去培养上清,PBS清洗,1 mL空白培养基中,加入Hoechst染液,终浓度为5 μg/mL,37 °C避光孵育10 min。继续加入PI染液,终浓度为5 μg/mL,37 °C避光孵育10 min。染色结束后,直接在荧光显微镜下观察,Heochst-33342用氪激光激发的紫外光,激发波长为352 nm,发射波长为400~500 nm,产生蓝色荧光;PI用氩离子激光激发荧光,激发波长为488 nm,发射波长大于630 nm,产生红色荧光。

2.4 细胞内ROS检测

六孔板中,HMA作用于HCT-116细胞24 h后,用PBS洗涤,加入终浓度为10 μM的DCFH-DA中,37 °C细胞培养箱内孵育20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次,以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。荧光显微镜下观察细胞内ROS含量变化情况。实验重复3次。

2.5 细胞内GSH含量检测

用HMA处理HCT-116细胞24 h后,用PBS洗涤细胞一次,按GSH和GSSG试剂盒说明(碧云天)对样本进行处理:除去蛋白后,利用液氮和37 °C水浴对样品进行两次快速的冻融。冰浴放置5分钟。于4 °C,10 000 rpm离心10 min。取上清用于总谷胱甘肽的测定。实验重复3次。

2.6 Western blot检测细胞蛋白变化

对数生长期结直肠癌细胞,贴壁后培养至细胞溶合80%~90%时,分别加入HMA孵育48 h后,收集空白组细胞及处理后的细胞,RIPA裂解液(碧云天)裂解细胞提取蛋白。用BCA法定量蛋白,调整蛋白浓度统一后,95 °C金属浴中变性10 min。10%~12%分离胶和5%浓缩胶SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白。湿转法转膜将蛋白转至PVDF膜上后应用10%脱脂牛奶37 °C封闭2 h。一抗4 °C孵育过夜。次日,PBST洗膜3次后,室温孵育二抗1 h,应用增强型化学发光试剂(ECL)发光试剂盒进行显色,Gel Analysis软件进行条带分析。实验重复3次。

2.7 氧化还原水平改变,对细胞凋亡影响的验证

为进一步验证细胞内氧化还原平衡状态破坏诱导了结直肠癌细胞的凋亡,我们对 HCT-116 细胞预先用 1 mM NAC 处理 1 h 后,再加入 50 μ M HMA 共孵育 24 h 后对细胞凋亡的影响。实验重复 3 次,并对结果进行分析。

2.8 统计学分析

应用 SPSS Statistics 21 统计分析软件对数据进行分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 t 检验比较各组差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 HMA 对结直肠癌细胞增殖的影响

检测 HMA 对肝癌细胞株 HCT-116 细胞生长的抑制作用结果如图 2 所示,随着 HMA 浓度的增加,其对 HCT-116 细胞生长的抑制作用增强。HMA 作用 HCT-116 细胞 24、48 和 72 h 后,细胞的生长明显受到抑制,且抑制作用随作用时间的延长而增强,呈时间相关性。在作用细胞 24、48 和 72 h 时,其 IC_{50} 分别为 85.27 ± 7.931 、 52.38 ± 7.719 、 47.29 ± 5.675 μ M。考虑到作用效果更明显,在后续实验中我们将 HMA 给药时间定为 48 h,给药剂量设为 25、50、100 μ M。

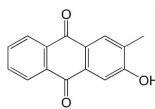


图 1 HMA(2-羟基-3-甲基蒽醌)结构式

Fig. 1 The chemical structure of HMA

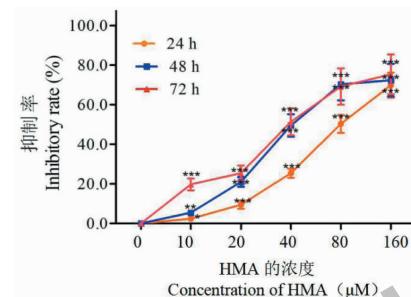


图 2 HMA 对 HCT-116 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Inhibitory rate of HMA on human HCT-116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与对应时间点空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Note: Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3.2 HMA 对细胞形态及凋亡的影响

荧光染料 Hoechst 33342 可以少许的进入正常细胞膜的,使其染上低蓝色,而凋亡细胞中的 Hoechst 33342 染料比进入正常细胞的多,蓝色荧光增强。同时,活细胞对 PI 染料拒染,坏死的细胞可以被 PI 染料着色(红色)。根据以上这些特性,用 Hoechst 33342 染料结合 PI 染料对细胞进行双染色,可以通过荧光显微镜将正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞区别开来。染色结果如图 3 所示,正常细胞形态呈多边形、淡蓝色;而低中剂量 HMA 给药组的细胞,由于细胞核内 Hoechst 浓集而呈亮蓝色,或核呈碎片状。100 μ M HMA 给 24 h 后,细胞会被 PI 着色呈红色。

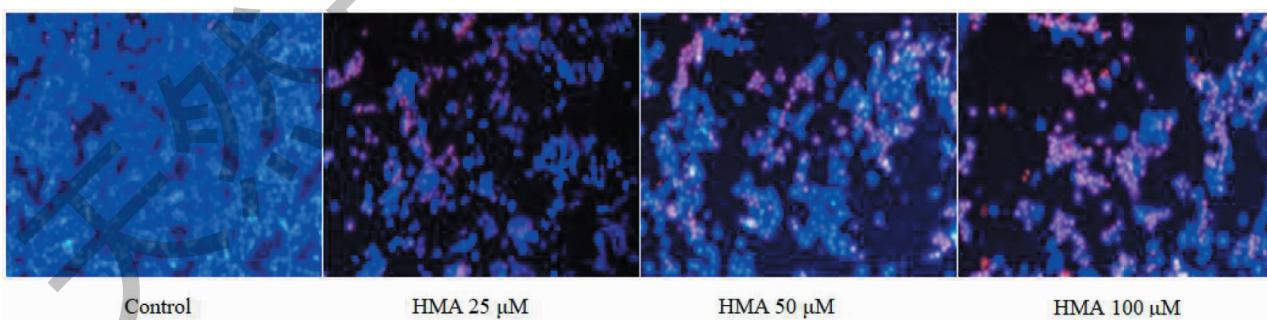


图 3 HMA 对 HCT-116 细胞凋亡的影响(20 \times)

Fig. 2 The effect of HMA on apoptosis in HCT-116 cells

3.3 HMA 对细胞内 ROS 含量的影响

采用 DCFH-DA 荧光探针,通过检测 DCF 的荧光强度检测 HMA 给药后细胞内的 ROS 水平变化,检测结果如图 4 所示:随着 HMA 给药浓度的增加,HCT-116 细胞中 DCF 的绿色荧光逐渐增强。提示,

化合物 HMA 会显著升高细胞内的 ROS 水平,破坏了细胞内的氧化还原平衡。

3.4 HMA 对 GSH 的影响

GSH 是细胞内的主要抗氧化剂之一,它可以直接清除 ROS,或者可以做为谷胱甘肽过氧化物酶以

及脂质过氧化物酶的主要辅助因子间接的清除细胞内的活性氧。实验检测了 HMA 给药后, HCT-116 细胞内 GSH 含量的变化情况, 结果如图 5 所示: 正常组细胞内的 GSH 含量为 $75.56 \pm 5.91 \mu\text{mol/g}$

prot; 给予化合物 HMA(25、50 和 100 μM)48 h 后细胞内 GSH 含量显著下降, 变为 59.81 ± 4.79 、 34.51 ± 2.98 、 $10.79 \pm 1.29 \mu\text{mol/g prot}$ 。

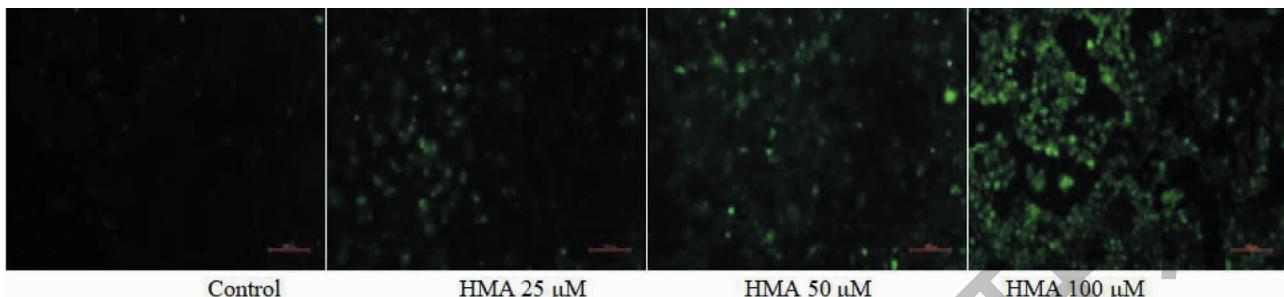


图 4 HMA 对 HCT-116 细胞内 ROS 含量的影响($20\times$)

Fig. 4 The effect of HMA on the level of ROS in HCT-116 cells

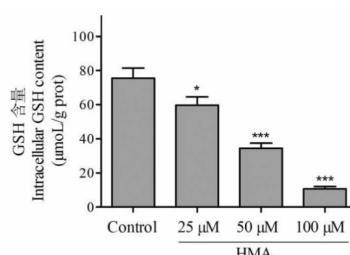


图 5 HMA 对 HCT-116 细胞内 GSH 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 The effect of HMA on intracellular GSH content in HCT-116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 下同。Note: Compared with corresponding control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, the same below.

3.5 HMA 对细胞凋亡相关蛋白及通路的影响

利用 Western blot 方法检测 HMA 对凋亡蛋白 Bax, Bcl-2 表达以及 PARP-1 蛋白活化水平的影响。

结果如图 6 所示, 与对照组相比, HMA 可引起 Bax 蛋白表达上调, 而 Bcl-2 蛋白表达下调, Bax/Bcl-2 比值升高。同时, 随 HMA 给药浓度的增加, Cleaved PARP 蛋白活化水平也逐渐升高, 提示 HMA 对凋亡蛋白具有明显的诱导作用。

3.6 对 Keap-1/Nrf-2/HO-1 信号通路蛋白的影响

HMA 对 Nrf-2 /ARE 信号通路影响如图 7 所示, HCT-116 细胞经 HMA 处理后细胞内 Keap-1 (Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1)、Nrf-2 和 HO-1 的表达明显下降, 蛋白的表达量与 HMA 浓度呈负相关。此外, 随着 HMA 浓度升高, HCT-116 细胞胞核中 Nrf-2 蛋白表达明显下降, 细胞质中 Nrf-2 蛋白表达明显上升, 并且与浓度有关。图 8 显示 HMA 可显著抑制 Nrf-2 从细胞质中迁移至细胞核, 进而抑制 Nrf-2 入核与下游的多效应靶基因 ARE 结合, 使转录产物包括 HO-1 等多种抗氧化酶的表达降低。综合以上, HMA 诱导人结直肠癌

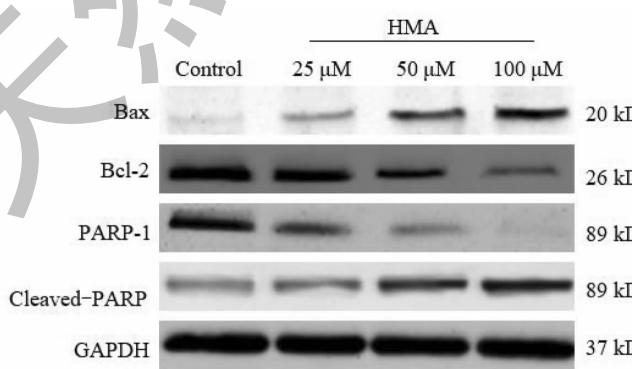
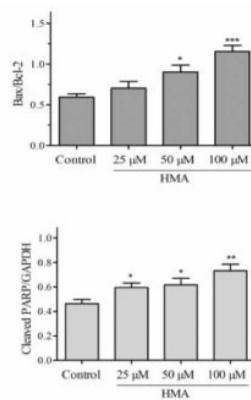


图 6 HMA 对 HCT-116 细胞凋亡蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 The effect of HMA on the expression of apoptosis-related proteins in HCT-116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



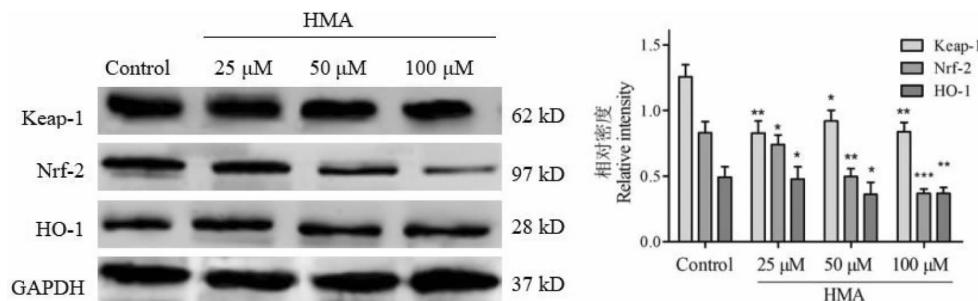


图 7 HMA 对 HCT-116 细胞内 Keap-1/Nrf-2/HO-1 信号通路转导的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 The effect of HMA on the expression of Keap-1/Nrf-2/HO-1 signal pathway in HCT-116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

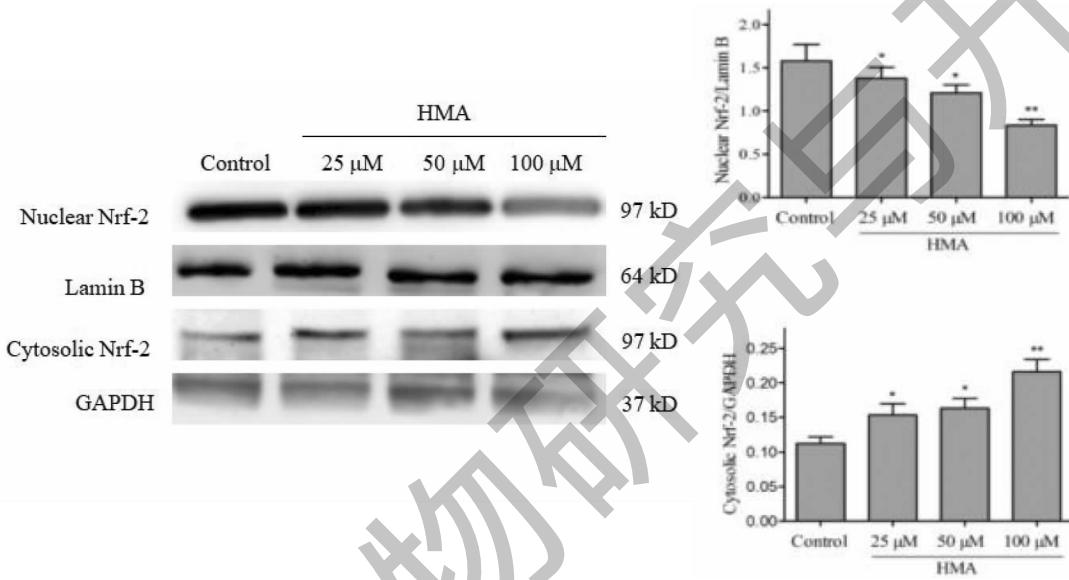


图 8 HMA 对 HCT-116 细胞 Nrf-2 核移位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 The effect of HMA on the expression of Nrf-2 in HCT-116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

HCT-116 细胞凋亡的机制与 Nrf-2 的核移位及 Keap-1/Nrf-2/HO-1 信号通路有关。

3.7 氧化还原水平改变,对细胞凋亡影响的验证

为探讨 HMA 诱导 HCT-116 细胞凋亡是否与其促氧化作用有关, HCT-116 细胞预先加入 1 mM NAC 1 h 后与 50 μM HMA 共同作用 24 h, 再采用 FITC-Annexin V/PI 双染对细胞凋亡率进行检测, 结果如图 9 所示, NAC 可显著抑制 HCT-116 细胞凋亡, 细胞凋亡率由 $51.32\% \pm 3.45\%$ (对照组) 变为 $23.6\% \pm 3.91\%$ ($50 \mu\text{M}$ HMA + 1 mM NAC)。

4 讨论

细胞内氧化还原的平衡状态是细胞存活的关键。当细胞内 ROS 产生过量或抗氧化系统受抑制时,会出现氧化还原失衡,进而诱导细胞发生氧化应激。细胞内氧化应激水平过高时则会进一步诱导细

胞发生坏死或凋亡^[9,10]。在本项研究中,我们首先检测了化合物 HMA 作用 HCT-116 细胞 48 h 后细胞内 ROS/GSH 含量的变化及给药后细胞增殖情况。发现,在给予 HMA 后,结直肠癌细胞内的 ROS 水平升高、GSH 水平显著下降。为验证 HMA 引起的细胞内 ROS 累积与其诱导细胞凋亡的关系,我们用还原剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)预处理细胞后,再给予化合物 HMA 观察细胞的凋亡率。结果显示, NAC 可降低 HMA 诱导的细胞凋亡。因此, HMA 诱导 HCT-116 细胞凋亡与细胞内 ROS 聚集, GSH 含量下降, 细胞内氧化还原水平失衡有关。

Keap1 和 Nrf-2 共同组成的 Keap1/Nrf-2 信号通路, 具有维持氧化和抗氧化的平衡以及抑制细胞凋亡等多种生物学效应^[11,12]。正常细胞内的 Nrf-2 受到胞质中抑制剂 Keap1 的严格调控。当细胞受到氧

化应激刺激时,Keap1发生构像改变,激活Nrf2从泛素结合部位脱落并进入细胞核,并与下游的ARE(anti oxidantre-sponseelement)结合发生反应,介导一系列抗氧化应激酶如MnSOD、HO-1的产生,提高机体抗氧化能力^[13,14]。本实验发现,HCT-116结直肠癌细胞经HMA处理后细胞内Keap-1、Nrf-2和

HO-1的表达下降。此外,随着HMA浓度升高,结直肠癌细胞胞核中Nrf-2蛋白表达明显下降而细胞质中Nrf-2蛋白表达明显上升。综上,HMA作用机制如图10所示:HMA通过Keap1/Nrf2/HO-1通路破坏了细胞内的氧化还原平衡,进而引起细胞发生凋亡。

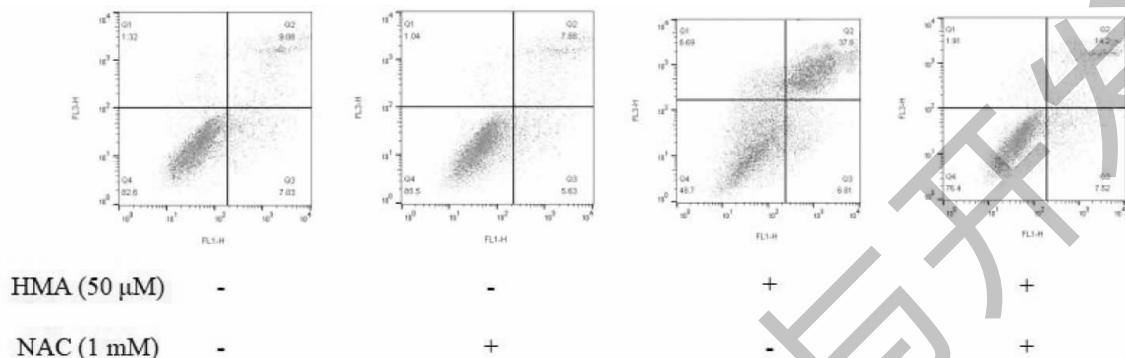


图9 NAC对HMA诱导细胞凋亡的逆转($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Fig. 9 The reversal effect of NAC on apoptosis induced by HMA($\bar{x} \pm s$, n = 3)

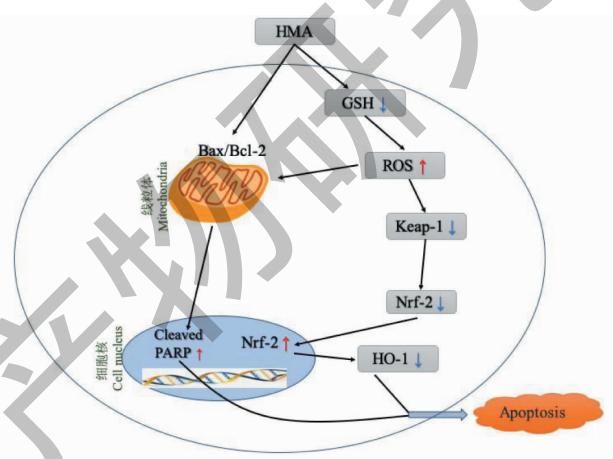


图10 HMA作用机制简图

Fig. 10 The anti-proliferative mechanism of HMA

白花蛇舌草做为清热解毒药物,可通过诱导肿瘤细胞凋亡、调控细胞能量代谢、增强机体免疫功能等发挥抗肿瘤作用^[15,16]。蒽醌做为其有效成分之一,具有抑制多种肿瘤细胞增殖的作用^[7],但其作用机制尚未完全阐明。本研究表明,HMA通过调控Nrf-2/ARE抗氧化信号通路,诱导细胞内ROS聚集及GSH的降解,破坏了细胞内的氧化还原平衡,诱导细胞发生凋亡。本研究探索了HMA诱导结直肠癌细胞凋亡的作用及可能的分子机制,以期为白花蛇舌草及其活性化合物的临床应用提供可靠的理论基础和实验依据。

参考文献

- Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, et al. Colorectal cancer statistics, 2017[J]. C A Cancer J Clin, 2017, 67(3): 117-193.
- Favoriti P, Carbone G, Greco M, et al. World wide burden of colorectal cancer:a review[J]. Updates Surg, 2016, 68(1): 7-11.
- Lamarca A, Clouston H, Barriuso J, et al. Follow-up recommendations after curative resection of well-differentiated neuroendocrine tumours: review of current evidence and clinical practice[J]. J Clin Med, 2019, 8(10): 1630.
- Wang ZX, Ma J, Zhao WX, et al. Anti-tumor mechanism of

- active constituents of Herba Hedyotis [J]. J Tradit Chin Vet Med(中兽医医药杂志), 2019, 38(5):22-24.
- 5 Mo ZC, Wang M, Luo XQ, et al. Anti-tumor activity of combination of *Hedyotis diffusa* and *Scutellaria barbata* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28:210-215.
- 6 Sun C, Yang J, Cheng HB, et al. 2-Hydroxy-3-methylanthraquinone inhibits lung carcinoma cells through modulation of IL-6-induced JAK2/STAT3 pathway [J]. Phytomedicine, 2019, 61:152848.
- 7 Wang NL, Li DY, Niu HY, et al. 2-hydroxy-3-methylanthraquinone from *Hedyotis diffusa* Willd induces apoptosis in human leukemic U937 cells through modulation of MAPK pathways [J]. Arch Pharm Res, 2013, 36:752-758.
- 8 Sun C, Wu MJ, Jiang ZQ, et al. Effective components 2-hydroxyl group-3-tectoquinone of Herba Hedyotis inducing liver cancer cells apoptosis by IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2018, 33:5346-5350.
- 9 Diwanji N, Bergmann A. An unexpected friend - ROS in apoptosis-induced compensatory proliferation: Implications for regeneration and cancer[J]. Semin Cell Dev Biol, 2018, 80: 74-82.
- 10 Luo J, Xiang Y, Xu X, et al. High glucose-induced ROS production stimulates proliferation of pancreatic cancer via inactivating the JNK pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018:6917206.
- 11 Yang Y, Tian Z, Ding Y, et al. EGFR-targeted immunotoxin exerts antitumor effects on esophageal cancers by increasing ROS accumulation and inducing apoptosis via inhibition of the Nrf2-Keap1 pathway [J]. J Immunol Res, 2018, 2018: 1090287.
- 12 Dang Y, Ma X, Li Y, et al. Inhibition of SETD7 protects cardiomyocytes against hypoxia/ reoxygenation-induced injury through regulating Keap1/Nrf2 signaling [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106:842-849.
- 13 Huang R, Ma J, Niu B, et al. MiR-34b protects against focal cerebral ischemia-reperfusion(L/R) injury in rat by targeting Keap1[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28(1):1-9.
- 14 Hsieh YH, Deng JS, Chang YS, et al. Ginsenoside Rh2 ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by regulating the TLR4/PI3K/Akt/mTOR, Raf-1/MEK/ERK, and Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathways in mice [J]. Nutrients, 2018, 10(9):1208.
- 15 Pu FF, Chen FX, Xia P. Advances in research on anti-tumor chemical composition and mechanism of *Hedyotis diffusa* [J]. Oncol Prog(癌症进展), 2019, 17:1985-1996.
- 16 Su X, Li Y, Jiang M, et al. Systems pharmacology uncover the mechanism of anti-non-small cell lung cancer for *Hedyotis diffusa* Willd [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 969-984.

研究者通过逆向生物合成扩展生物合成途径

2021年1月8日Nature Communication报道,韩国科学技术院(KAIST)研究者通过结合逆向生物合成和前体选择步骤,设计了首个短链伯胺的生物合成途径,短链伯胺在化学工业中具有广泛的应用。该方法为系统设计生产化学物质的生物合成途径的提供了一种新策略。

利用微生物可生产的化学物质的范围随着系统代谢工程学的发展而不断扩大,但是目前在工业上具有重要用途的短链伯胺至今尚未有生物学生产方法的报道。短链伯胺(Short-chain primary amines, SCPAs)是氨(NH₃)中一个氢原子被碳链长度从1到7的烷基或芳基取代所形成的分子。SCPAs已经广泛应用在化学工业,如作为药物的前体(治疗糖尿病药和抗高血压的药物)、农用化学品(如除草剂、杀菌剂和杀虫剂)、溶剂、橡胶硫化促进剂和增塑剂。

短链伯胺尚无法生物生产的主要原因是由于其生物合成途径还未知。此次,研究团队通过结合逆向生物合成和前体选择步骤,为短链伯胺设计了合成生物合成途径。研究者首先确定的15种目标SCPAs的直接前体,再利用编码缬氨酸脱羧酶的vlmD在体外和体内从前体生成SCPAs,表达异源vlmD的大肠杆菌可以利用其直接前体产生其中10种SCPA。此外,代谢工程的大肠杆菌菌株被开发出来,从葡萄糖产生代表性的SCPA,包括通过批次投料培养可以生产10.67g/l的异丁胺。

吴晓燕编译自 <https://phys.org/news/2021-01-biosynthetic-pathway-retrobiosynthesis.html>

原文链接:<https://www.nature.com/articles/s41467-020-20423-6>

原文标题:Microbial production of multiple short-chain primary amines via
retrobiosynthesis