

基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析人参皂苷元新衍生物干预荷瘤小鼠的血清代谢组学特征

刘 芮,徐 伟,王彩虹,赵 莹,王振洲

(长春中医药大学,长春 130117)

[摘要] **目的:**采用糖基三氯乙酰亚胺酯法将 *D*-核糖与拟人参皂苷元 DQ 半合成得到新型人参皂苷,对其体内外抗肿瘤活性以及作用机制进行研究,通过血清代谢组学分析其代谢途径及产物。**方法:**以 *D*-核糖和拟人参皂苷元 DQ 为原料,通过化学方法合成得到新型人参皂苷衍生物,并对其进行结构鉴定;采用 MTT 比色法测定其对 S180 细胞、人肺腺癌 SPC-A-1 细胞、A549 细胞的抗肿瘤活性以及对小鼠 S180 肿瘤细胞的抑制作用,基于细胞代谢组学分析探究其抗肿瘤作用机制。**结果:**首次通过化学方法半合成得到了新的奥克梯隆(Ocotillol)型人参皂苷,12-核糖基-拟人参皂苷 DQ(12-riboside-pseudoginsengenin DQ, RPDQ),鉴定为(20*S*, 24*S*)-12-*O*- α -*D*-呋喃核糖基-达玛-20, 24-环氧-3 β , 12 β , 25-三醇,产率为 38.6%,纯度为 99.1%。MTT 法检测 RPDQ 能够明显抑制 3 种肿瘤细胞的增殖;体内实验证明 RPDQ 对荷瘤小鼠的实体瘤有抑制作用,能够改善肿瘤细胞组织形态、降低荷瘤小鼠的脏脾和胸腺指数,延长小鼠的生存天数;代谢组学表明 RPDQ 通过调控花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢、色氨酸代谢等 7 个代谢途径达到抗肿瘤的作用,通过主成分分析(PCA)和正交偏最小方差判别分析(OPLS-DA)筛选鉴定出 16 个生物标记物,并研究出 RPDQ 在小鼠体内发挥抗肿瘤作用相关信号途径网络。**结论:**RPDQ 的合成为此类人参皂苷衍生物的合成与活性研究提供了参考,RPDQ 表现出较好的抗肿瘤活性,为拟人参皂苷的进一步研究与开发提供了理论和数据上的支撑。

[关键词] 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱联用;抗肿瘤;代谢组学;12-核糖基拟人参皂苷元 DQ

[中图分类号] R914.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)05-0531-09

Analysis of serum metabolomics characteristics of new ginsenoside derivatives in tumor-bearing mice based on UPLC-Q-TOF-MS technology

LIU Rui, XU Wei, WANG Cai-hong, ZHAO Ying, WANG Zhen-zhou

(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** A new type of ginsenoside was semi-synthesized by *D*-ribose and ginsenoside DQ using glycosyl trichloroacetimide ester method. Its *in vivo* and *in vitro* anti-tumor activity and its mechanism of action were studied, and the metabolic pathways and products were analyzed by serum metabolomics. **Methods:** Using *D*-ribose and ginsenoside DQ as raw materials, new ginsenoside derivatives were synthesized by chemical methods, and their structures were identified. The effects on S180 cells, human lung adenocarcinoma SPC-A-1 cells, anti-tumor activity in A549 cells and inhibition to mouse S180 tumor cells were determined by MTT method. Its anti-tumor mechanism was explored based on cell metabolomics analysis. **Results:** For the first time, a new ocotillol-type ginsenoside, 12-riboside-pseudoginsengenin DQ (RPDQ), was semi-synthesized by chemical methods,

[基金项目] 吉林省科技厅发展计划资助项目(20210204149YY)

[作者简介] 刘芮,女,硕士研究生,研究方向:天然产物活性研究。联系电话:(0431)86763972, E-mail:1063904814@qq.com。

[通讯作者] 王振洲,男,博士,讲师,研究方向:天然产物活性研究。联系电话:(0431)86763972, E-mail:32726915@qq.com。

and was identified as (20*S*, 24*S*)-12-*O*- α -*D*-ribofuranosyl-Dama-20, 24-epoxy-3 β , 12 β , 25-triol, the yield is 38.6%, and the purity is 99.1%. MTT detection of RPDQ can significantly inhibit the proliferation of three kinds of tumor cells. *In vivo* experiments demonstrated that RPDQ inhibited solid tumors in tumor-bearing mice, improved the histomorphology of tumor cells, reduced the spleen and thymus indices in tumor-bearing mice and prolonged the survival days of mice. Metabolomics results showed that RPDQ exerted its anti-tumor effects by regulating seven metabolic pathways, including arachidonic acid metabolism, glycerophospholipid metabolism and tryptophan metabolism. Sixteen biomarkers were identified through principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) screening, and a network of signaling pathways related to the anti-tumor effects of RPDQ in mice was investigated. **Conclusion:** The synthesis of RPDQ provides a reference for the synthesis and activity research of such ginsenoside derivatives. RPDQ shows good anti-tumor activity, which provides a theoretical basis and data support for the further research and development of pseudoginsengenin.

[Key words] UPLC-Q-TOF-MS; anti-tumor; metabolomics; 12-riboside-pseudoginsengenin DQ

人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey.) 是长白山及小兴安岭地区的道地药材, 为五加科草本植物, 是“百草之王”。人参皂苷是人参的主要活性成分, 具有抗肿瘤^[1]、降血糖^[2]、抗心律失常^[3]、培元固本的作用。但是人参皂苷存在低极性、生物利用度低、水溶性差等缺点^[4], 因此对人参皂苷进行结构修饰非常必要。周志文等^[5]阐述了对人参皂苷进行结构修饰, 不仅能改变其理化性质, 还可找出活性更高的化合物。拟人参皂苷元 DQ (PDQ) 是一种奥克梯隆型人参皂苷, 具有抗肿瘤及治疗心肌缺血的作用。李平亚等^[6]报道了拟人参皂苷元 PDQ 具有抗失血性休克、抗肿瘤的作用。Atopkina 等^[7]阐述了拟人参皂苷元 DQ 对人肺癌 GLC4 细胞有抑制作用。*D*-核糖是核糖核酸的重要组成物质, 药理活性广泛, 是重要的药物中间体^[8]; *D*-核糖在合成抗肿瘤药物方面已取得多项临床成果, 如吡唑喹啉菌素、间型霉素等^[9]; 有研究表明经过修饰后的 *D*-核糖对降低药物不良反应、增加临床疗效具有较强效果^[10]。

目前的人参皂苷都是苷元与葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和半乳糖醛酸等连接成苷, 但未见五碳糖相连接的人参皂苷, 本实验首次以五碳糖为原料成功半合成得到新型化合物具有重要意义。将 *D*-核糖与拟人参皂苷元 DQ 半合成得到的新型人参皂苷, 对其体内外抗肿瘤活性以及作用机制进行研究, 并采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术结合细胞代谢组学分析探究其抗肿瘤作用机制。*D*-核糖与 12-核糖基-拟人参皂苷 DQ (12-riboside-pseudoginsengenin DQ, RPDQ) 的结构见图 1。

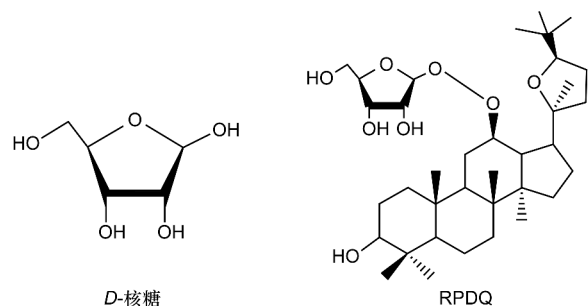


图 1 *D*-核糖与 RPDQ 的结构式

材料与方法

1 仪器与试剂

超高效液相色谱仪、Q-TOF MS 质谱仪 (美国 Waters 公司); 涡旋混合器 (上海精科实业有限公司); 飞鸽超速离心机 (上海安亭科学仪器厂); S180 肿瘤细胞株和 SPC-A-1 肿瘤细胞株 (武汉普诺赛生命科技有限公司); A549 肿瘤细胞株 [赛百慷 (上海) 生物股份有限公司]; 青霉素和链霉素 (美国 Solarbio 公司); 胎牛血清 (浙江天杭生物科技股份有限公司); 合成实验所用试剂均为市售化学纯或分析纯。

2 实验方法

2.1 合成

通过查阅文献^[11-14]初步确定了实验方法, 以二氯甲烷为溶剂, 首先对 *D*-核糖上的所有羟基进行保护, 然后将端基碳上的羟基裸露出来, 再利用糖基三氯乙酰亚胺脂法进行糖苷化反应, 最后将苯甲酰基去除, 即得到 RPDQ, 具体合成技术路线见图 2。

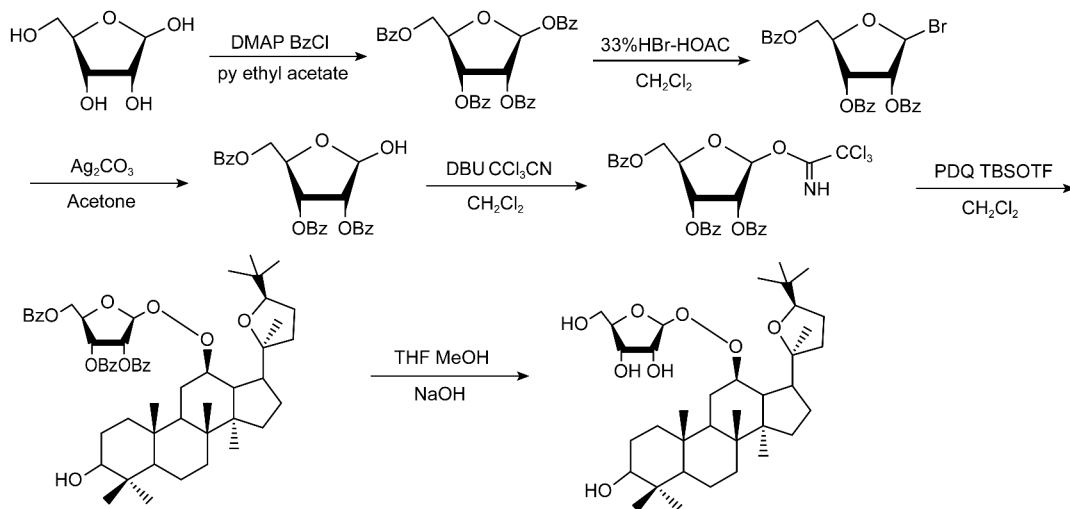


图2 RPDQ的合成路线

2.1.1 中间体 1,2,3,5-四-O-苯甲酰基- α -D-核糖的制备 以4-二甲氨基为催化剂,将D-核糖溶于无水吡啶,冰水浴下滴加苯甲酰氯,搅拌5 h,加入20 mL 甲醇淬灭,减压蒸干得黄色油状物,溶于乙酸乙酯,调pH至7,洗涤,干燥,甲醇重结晶即得到产物1。

2.1.2 中间体 1-溴-2,3,5-三-O-苯甲酰基- α -D-核糖的制备 将产物1与二氯甲烷混合,加入92 mL 33%的氢溴酸醋酸溶液,反应8 h后加入二氯甲烷进行稀释,然后将溶液洗涤至中性,有机层溶液显黄色,二氯甲烷萃取水溶液,合并有机相,干燥,过滤,减压蒸干后得到产物2。

2.1.3 中间体 2,3,5-三-O-苯甲酰基- α -D-核糖的制备 将产物2溶于丙酮:水=24:1的溶液中,加入碳酸银搅拌1 h,过滤,干燥,减压蒸干溶剂,快速色谱法纯化得到产物3。

2.1.4 中间体糖基三氯乙酰亚胺酯的制备 在1,8-二氮杂环十一碳-7-烯的催化下,将产物3溶于无水二氯甲烷,并加入三氯乙腈后搅拌1 h,减压蒸干,柱色谱纯化即得产物4。

2.1.5 RPDQ的制备 将产物4与拟人参皂苷元DQ混合后加入二氯甲烷中,加入4 Å分子筛,氮气保护下搅拌1~2 h,加入三氟甲磺酸三甲基硅酯,加20 mL水进行淬灭反应。减压蒸干后溶于甲醇:四氢呋喃:水=1:2:1的溶液中,然后加入氢氧化钠搅拌,静置过夜后调至pH=4。减压回收溶剂纯化后即得。利用液相外标一点法进行测定,经测定得出样品纯度为99.1%。

2.2 MTT抑制肿瘤细胞实验

通过查阅文献^[15-17]确定选用S180细胞、人肺癌SPC-A-1细胞、A549细胞进行MTT抑制肿瘤细胞实验,研究RPDQ对肿瘤细胞的抑制作用。PDQ具有抗肿瘤活性且是RPDQ的前体化合物;大量文献报道原人参二醇(PPD)可以很好地抑制肿瘤细胞生长且是人参皂苷中抗肿瘤活性较强的一种,因此选择PPD和PDQ作为参照对象。

抗S180肿瘤细胞、抗SPC-A-1肿瘤细胞、抗A549肿瘤细胞:细胞培养于含链霉素、青霉素和10%胎牛血清中的培养基中,收集对数生长期的肿瘤细胞,调细胞密度为 1×10^5 个 \cdot mL⁻¹,在U型96孔板上接种每孔100 μ L,24 h后加入不同浓度的受试药,每个浓度设置6个细胞复孔,并设置对照组及无细胞调零孔,于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂细胞培养箱中培养。药物与细胞共同培养44 h后弃去孔内药物,以MTT法测定细胞生长。吸弃旧液,每孔加入无血清培养基和MTT 10 μ L,空白组不加MTT,培育4 h后弃上清,每孔加入100 μ L二甲基亚砜(DMSO)振荡溶解,待紫色结晶完全溶解后测定490 nm处的吸光度(A)值。

2.3 体内抗肿瘤作用实验^[18]

皮下移植肿瘤模型:对小鼠进行皮下注射稀释好的S180小鼠肿瘤细胞,建立S180荷瘤模型,将接种的小鼠随机分为5组,每组10只,分别为模型对照组、阳性药组、给药组(9 mg \cdot kg⁻¹ RPDQ低剂量组、18 mg \cdot kg⁻¹ RPDQ中剂量组、36 mg \cdot kg⁻¹ RPDQ高剂量组)。自d3起对小鼠口服受试药物,模型对

照组口服相同剂量的生理盐水,每日1次,环磷酰胺 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 隔1日1次。连续给药10 d后对小鼠进行处死。解剖小鼠取瘤块,脾及胸腺,称瘤重。

腹水肿瘤模型:将 ICR 小鼠腹腔内注入 S180 肿瘤细胞,对小鼠进行传代处理。将种鼠处死后用灭菌后的吸管吸取小鼠腹水。用 PBS 以 1:4 的比例稀释后接种到新的老鼠腹腔,实验选取传代到第3代的小鼠。在确保无菌条件下,吸取 ICR 小鼠接种7 d 的肿瘤腹水, PBS 稀释至 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 抽取 0.2 mL 注入腹腔。建立模型后,将接种后的小鼠随机分为5组,分组同皮下移植肿瘤模型。自 d3 起对小鼠口服给药,受试药每日1次,模型对照组口服等剂量的生理盐水,每日1次,环磷酰胺 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 隔1日1次,连续给药18 d,停药后连续观察30 d。

2.4 对肿瘤组织形态学的影响

从体内取出的肿瘤细胞组织经 HE 染色后,在光镜下观察阳性药组、模型组及 RPDQ 给药组肿瘤组织结构和形态。

2.5 抗肿瘤的代谢组学研究

代谢组学研究可以帮助深入了解药物治疗不同疾病的作用机制,分析代谢物的含量^[19-20]。代谢组学可以与多元统计学相结合,检测机体中的代谢物,筛选出具有差异显著的代谢标志物,从整体上掌握病理机制,为疾病的防治提供坚实可靠的依据^[21-22]。

首先对血样进行离心、涡旋、取上清等处理,并建立质量控制样本进行质量控制样本 (quality control samples, QC) 校正。然后进行色谱与质谱。

2.6 统计学以及数据分析方法

所有数据均采用统计软件 SPSS 20.0 (芝加哥 SPSS 公司) 进行处理,数据以均值 \pm 标准误差表示,组间差异采用单因素方差分析 (one-way-ANOVA), 采用 *t* 检验进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

代谢组学使用 MarkerLynx XS V4.1 模块 (美国 Waters 公司) 对质谱数据进行校准、色谱峰提取及归一化等一系列处理^[23]。所得数据应用 SIMCA 软件 (上海百趣生物医学科技有限公司) 通过主成分分析法 (PCA) 和正交偏最小方差判别分析法

(OPLS-DA) 进一步分析各数据。结合碎片离子信息,再根据 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>), KEGG (<http://www.kegg.com/>), METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>) 以及 Metabo-Analyst (<http://www.Metaboanalyst.ca/>) 等数据库对这些潜在的生物标记物进行进一步筛选和鉴定, MetaboAnalyst 数据库中 Impact > 0.10 的途径被认为是可能的代谢物相关信号途径^[24]。

结 果

1 RPDQ 的结构鉴定

RPDQ 结构鉴定: HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 609.4346 $[\text{M} + \text{H}]^+$, ^1H NMR (600 MHz, pyridine- d_5) 高场给出8个甲基信号: δ 0.95 (3H, s), 0.82 (3H, s), 1.32 (3H, s), 1.21 (3H, s), 1.33 (3H, s), 1.26 (3H, s), 1.03 (3H, s), 0.97 (3H, s), 以及12位氢信号: δ 4.14 (1H, d, $J = 6.1$ Hz), 中场给出1组糖质子信号 δ 5.47 (1H, d, $J = 7.0$ Hz), 4.03 (1H, m), 4.73 (1H, m), 4.26 (1H, m), 4.28 (1H, d, $J = 5.8$ Hz), 4.17 (1H, d, $J = 5.8$ Hz)。 ^{13}C NMR (150 MHz, pyridine- d_5) 中共给出35个碳信号,与 PDQ ^{13}C NMR 数据相比多出5个碳信号 δ 98.49, 72.52, 72.23, 69.5, 65.48 为核糖基信号, HMBC 谱给出以下主要相关信号: δ_{H} 4.13 (H-12) / δ_{C} 50.97 (C-9), 33.20 (C-11), 49.5 (C-13), 51.3 (C-14), 28.40 (C-16), 49.12 (C-17), 98.5 (C-1'); δ_{H} 5.47 (H-1') / δ_{C} 76.5 (C-12)。

综合分析,鉴定化合物为 (20*S*, 24*S*)-12-*O*- α -*D*-呋喃核糖基-达玛-20, 24-环氧-3 β , 12 β , 25-三醇 [(20*S*, 24*S*)-12-*O*- α -*D*-furanoribosyl-dama-20, 24-epoxy-3 β , 12 β , 25-triol], 简称 RPDQ。目标产物的产率为 38.6%, 纯度为 99.1%。

2 MTT 抑制肿瘤细胞实验结果

由于肿瘤细胞的无限增殖特性,所以能否很好的抑制肿瘤细胞增殖是评价药物的指标之一。实验采取 MTT 法检测 RPDQ 体外抑制3种细胞的增殖活性,结果表明,RPDQ 的抗肿瘤活性强于 PDQ 和 PPD; RPDQ 对3种肿瘤细胞均有明显的抑制作用,且在一定范围内浓度越高 RPDQ 的抑制作用效果越好,结果见图3。

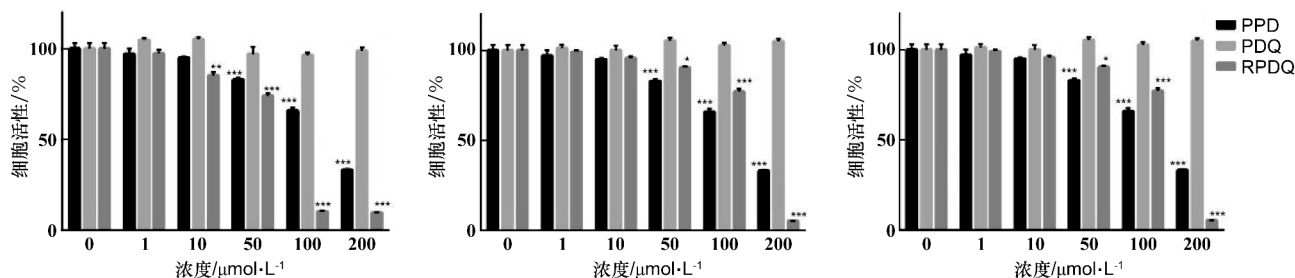


图3 PDQ,RPDQ,PPD对S180细胞、SPC-A-1细胞、A549细胞活力的影响

3 体内抗肿瘤作用实验结果

RPDQ对小鼠皮下肿瘤细胞有明显的抑制作用,高剂量组抑制效果最好,抑制率为22.51%。S180荷瘤小鼠皮下移植瘤模型的结果显示RPDQ可明显减轻荷瘤小鼠的实体瘤重量,结果见表1;并且高、

中剂量组对降低荷瘤小鼠的脏脾和胸腺指数具有明显的作用,结果见表2,表明了其免疫抑制作用。在小鼠注射RPDQ后其生存天数可显著延长(见图4),说明其对小鼠体内的S180腹水瘤有明显作用。2个模型的成功实验均证明了RPDQ的抗肿瘤作用。

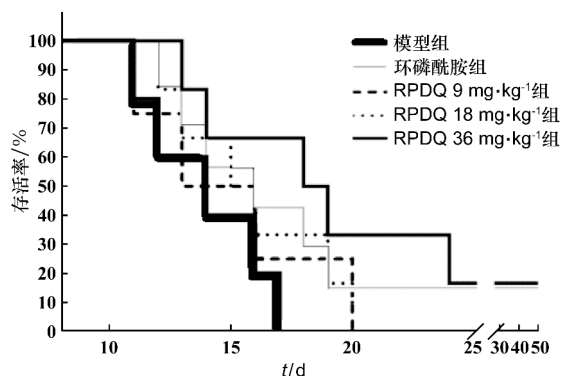
表1 RPDQ对S180荷瘤小鼠的瘤重及抑瘤率的影响

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	动物体重/g	瘤重/g	抑瘤率/%
空白对照组	—	37.72 ± 1.15	—	—
模型对照组	—	34.87 ± 1.42	2.31 ± 0.29	—
环磷酰胺组	20	36.47 ± 1.66	1.53 ± 0.25^b	34.65
RPDQ	9	34.90 ± 0.97	2.19 ± 0.20	5.40
	18	35.20 ± 1.42	1.99 ± 0.37	14.25
	36	35.82 ± 1.15	1.79 ± 0.38^a	22.51

与模型组比较, a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$, 下同

表2 RPDQ对S180荷瘤小鼠脾脏指数和胸腺指数的影响

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	动物体重/g	脾脏指数	胸腺指数
空白对照组	—	37.72 ± 1.15	—	—
模型组	—	34.87 ± 1.42	4.51 ± 0.26	1.25 ± 0.18
环磷酰胺组	20	36.47 ± 1.66	3.72 ± 0.12^b	0.80 ± 0.05^b
RPDQ	9	34.90 ± 0.97	4.49 ± 0.22	1.20 ± 0.10
	18	35.20 ± 1.42	4.26 ± 0.28^a	1.11 ± 0.10^a
	36	35.82 ± 1.15	3.84 ± 0.14^b	1.02 ± 0.07^a

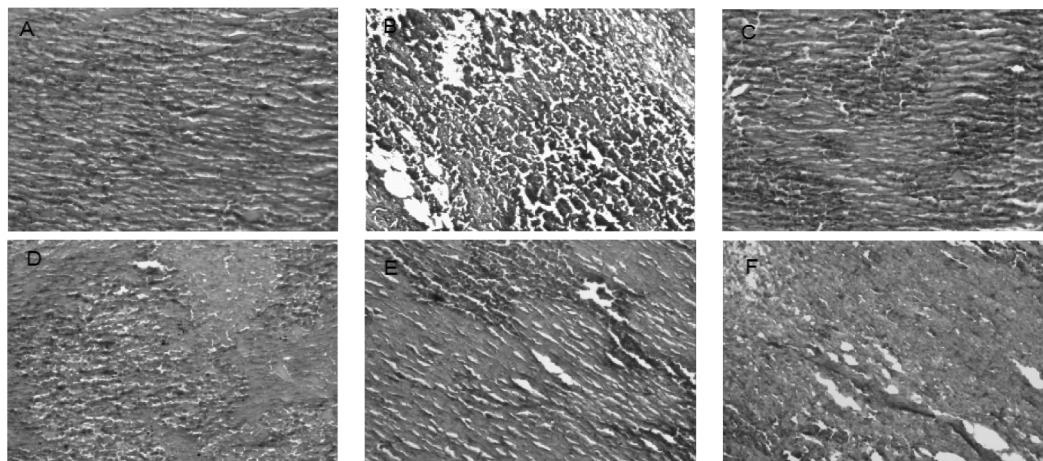


与模型组比较, a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$

图4 RPDQ对小鼠S180腹水瘤模型生存天数的影响

4 对S180荷瘤小鼠肿瘤组织形态学的影响

小鼠肿瘤组织进行HE染色后,在光镜下观察肿瘤组织的形态学改变(见图5)。阳性药组肿瘤组织结构和形态处于正常状态。模型组肿瘤细胞则可见明显的异型性,大小不一,间隙较大。与模型组相比,RPDQ组织结构均有不同程度的改善,RPDQ高剂量组改善更为显著,趋近于阳性药组肿瘤组织结构。组织形态学检查结果表明,RPDQ能够抑制肿瘤细胞恶化,改善肿瘤细胞组织结构。



A:空白组;B:模型组;C:阳性药组;D:高剂量组;E:中剂量组;F:低剂量组

图5 HE染色肿瘤组织图像

5 代谢组学结果

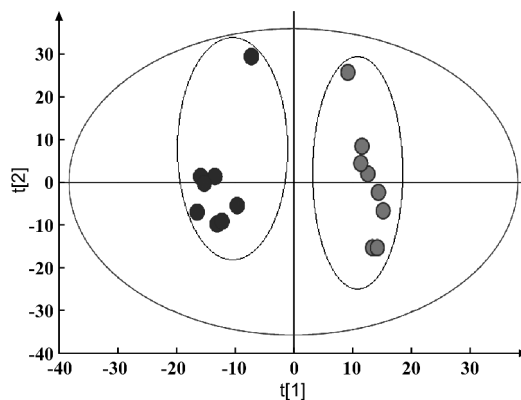
5.1 UPLC-Q-TOF-MS 的稳定性评估 本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术,采用血清样本,由于目标代谢物中含有羧基等物质,故选择在负离子模式中进行代谢组学研究,结合代谢途径分析探讨其可能的抗肿瘤作用机制,从代谢组学的角度为 RPDQ 的抗肿瘤机制提供新的可能。为了评估系统稳定性,分别在每个样本中选用 8 个离子对来监控进针的 QC:将每个样本吸取 30 μ L,混合后得到 QC 样本,进样中每 8 个样本进 1 针 QC,以对系统进行校正。血清样本中选取的离子对及其保留时间和峰面积相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) 见表 3。

表3 血清样本系统稳定性评估

编号	血清 ESI ⁻		
	保留时间(Rt)_m/z	RSD/%	
		Rt/min	面积
1	18.24_444.090 8	0.064	2.114
2	26.50_313.076 2	0.217	2.624
3	25.18_411.200 7	0.116	3.237
4	22.58_283.238 7	0.077	1.143
5	17.00_552.308 8	0.123	1.359
6	18.70_436.282 8	0.143	1.434
7	15.44_378.237 5	0.099	1.360
8	18.86_532.332 0	0.060	1.002

5.2 血清代谢组学轮廓的分析 从血清样本的 PCA 图(见图 6)可见血清中给药组样本均与模型组样本清晰分开,经 RPDQ 预处理后的肿瘤小鼠的代谢谱与模型组小鼠的代谢谱差异明显。相对于模型组,给药组更靠近正常组,表明肿瘤小鼠经过 RPDQ

治疗后其肿瘤异常代谢轮廓具有显著的改变。



左:给药组;右:模型组

图6 模型组与给药组的血清代谢谱 OPLS-DA 载荷图

5.3 潜在生物标记物和相关信号途径的鉴定

OPLS-DA 载荷图可以清晰地描述两组间的总代谢变量。OPLS-DA 模型的具体参数如下:血清负离子模式: $R^2Y = 0.86, Q^2 = 0.70$,表明该 OPLS-DA 模型具有良好的预测性和可靠性。为了更加直观的比较给药组和模型组,找到 RPDQ 抗肿瘤的差异性代谢物,对血清样本进行了 OPLS-DA 分析。从排列图中,右边的原始点高于左边的所有 Q^2 值,表明原始模型的有效性(见图 7)。S-plot 载荷图能够鉴定出导致组间差异的代谢物,图中的点距离原点越远,表明此化合物对分组的影响越大(见图 8)。结合标准品比对及串联质谱碎片模式等,共筛选鉴定出 16 个生物标记物,见表 4。

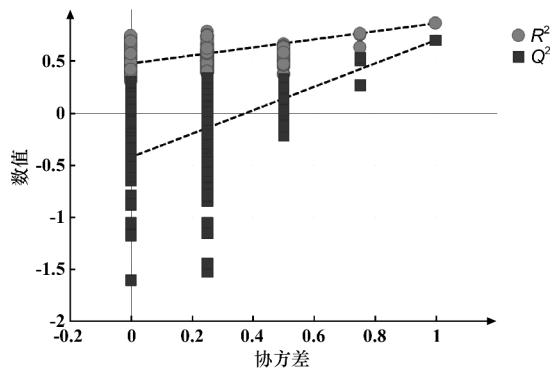


图7 血清的 OPLS-DA 模型的排列图

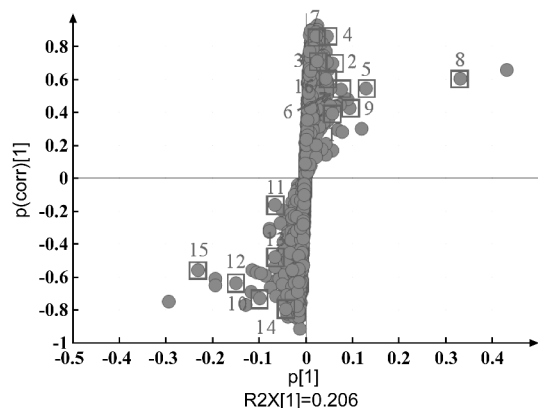


图8 血样代谢谱 S-plots 图

表4 血清中潜在生物标志物的鉴定结果

编号	Rt/min	实测值/Da	差异变量 (VIP)	分子式	质量偏差 /ppm	生物标记物	名称	途径	含量水平	加和分子
1	11.92	335.223 0	1.22	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	0.24	15(S)-HPETE	HMDB04244	AM	M > D ≈ B	M-H
2	11.93	335.230 1	1.91	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	2.36	5(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic	HMDB01193	AM	M > D ≈ B	M-H
3	14.37	317.212 9	1.00	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	0.38	leukotriene A4	HMDB01337	AM	M > D ≈ B	M-H
4	15.29	335.225 9	1.58	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	1.10	15H-11,12-EETA	HMDB05050	AM	M > D ≈ B	M + FA-H
5	9.57	335.231 8	2.10	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	2.86	11H-14,15-EETA	HMDB04693	AM	M > D ≈ B	M + FA-H
6	24.62	732.558 6	1.27	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	0.59	PC (16;0/16;0)	HMDB00564	AM, LM	M > D ≈ B	M-H
7	17.97	750.542 1	1.18	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	-0.23	phosphatidylethanolamine	HMDB05779	GM	M > D ≈ B	M + FA-H
8	18.50	520.345 4	11.82	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	0.98	lysoPC (18;1(9Z))	HMDB02815	GM	M > D ≈ B	M-H
9	26.64	405.110 8	2.32	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	1.85	3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol glucuronide	HMDB00496	PGI	M > D ≈ B	M + FA-H
10	18.11	347.225 8	2.26	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	1.04	retinyl ester	HMDB03598	RM	M < D ≈ B	M + FA-H
11	14.98	145.066 9	1.98	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	3.86	L-glutamine	HMDB00641	AAGM	M < D ≈ B	M-H
12	0.94	134.041 8	2.43	C ₃ H ₇ NO ₂	-2.61	L-alanine	HMDB00161	AAGM	M < D ≈ B	M + FA-H
13	1.46	203.085 4	1.33	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	1.62	L-tryptophan	HMDB00929	TM	M < D ≈ B	M-H
14	5.16	204.069 9	1.45	C ₁₀ H ₉ NO	1.86	indoleacetaldehyde	HMDB01190	TM	M < D ≈ B	M + FA-H
15	23.14	279.233 1	4.18	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	0.25	linoleic acid	HMDB00673	LM	M < D ≈ B	M-H
16	17.18	295.228 6	1.24	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	0.44	12,13-EpOME	HMDB04702	LM	M > D ≈ B	M-H

M: Model; D: Drug; B: Blank; AM: 花生四烯酸代谢; GM: 甘油磷脂代谢; PGI: 戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化; RM: 视黄醇代谢; AAGM: 丙氨酸, 天冬氨酸和谷氨酸代谢; TM: 色氨酸代谢; LM: 亚油酸代谢

本文发现的 16 种差异性代谢物主要参与了 7 条代谢途径, 分别是花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢、视黄醇代谢、丙氨酸, 天冬氨酸和谷氨酸代谢、色氨酸代谢、亚油酸代谢、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化。图 9 为差异性代谢物相关代谢途径, 表 5 为差异性代谢物代谢路径分析结果。结果显示 RPDQ 可上调花生四烯酸代谢物的含量来达到增强抗肿瘤作用^[25]; RPDQ 促进甘油磷脂代谢下调溶血磷脂酰胆

碱 lysoPC(18;1(9Z)) 含量从而达到抑制肿瘤生长的目的^[26]; 戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化被 RPDQ 促进从而增加 3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇葡萄糖苷酸含量, 导致了肿瘤细胞的加速凋亡^[27]; 色氨酸代谢产物受 RPDQ 影响而增加, 加速色氨酸的分解代谢来抑制肿瘤^[28]。确定了 RPDQ 可通过调控 7 种代谢达到抗肿瘤的作用。图 10 是小鼠体内 RPDQ 抗肿瘤作用相关信号途径网络。

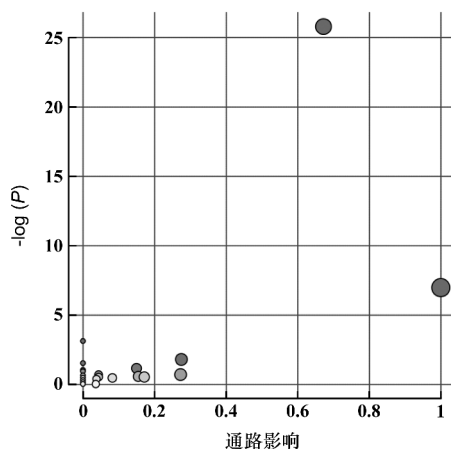


图9 差异性代谢物相关代谢途径

表5 差异性代谢物代谢路径分析结果

代谢途径名称	匹配状态	P	-log(P)	Holm P	错误发现率 (FDR)	影响因子
花生四烯酸代谢 (arachidonic acid metabolism)	5/36	5.55×10^{-11}	25.214	4.50×10^{-9}	4.50×10^{-9}	0.346 16
亚油酸代谢 (linoleic acid metabolism)	3/5	9.322×10^{-4}	6.978	0.074 576	0.037 754	1.0
甘油磷脂代谢 (glycerophospholipid metabolism)	3/30	0.148 66	1.906 1	1	1	0.275
丙氨酸,天冬氨酸和谷氨酸代谢 (alanine, aspartate and glutamate metabolism)	1/24	0.293 79	1.224 9	1	1	0.149 79
戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化 (pentose and glucuronate interconversions)	1/14	0.476 25	0.741 8	1	1	0.272 73
视黄醇代谢 (retinol metabolism)	1/17	0.544 43	0.608 02	1	1	0.154 64
色氨酸代谢 (tryptophan metabolism)	2/41	0.558 85	0.581 88	1	1	0.171 57

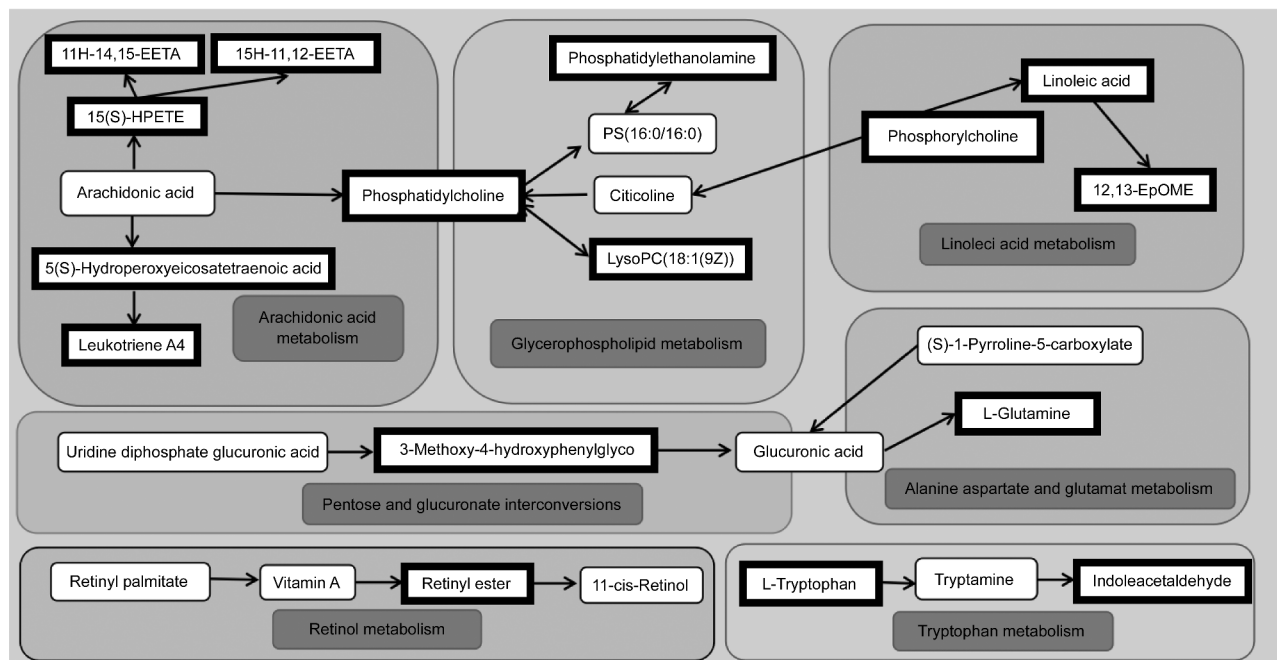


图10 小鼠体内 RPDQ 抗肿瘤作用相关信号途径网络 (加粗框为差异性代谢物)

讨 论

肿瘤作为人类第二大死因,严重危及人类身体健康,寻找能够治疗肿瘤的药物一直是研究人员最重要的课题之一。对天然产物进行结构修饰,提高其活性和增强疗效,确保安全性,获得具有开发创新药物的先导化合物是十分重要的途径。人参皂苷已被证实抗肿瘤效果显著^[29],具有多层次多靶点的作用,我国中药类第一个抗肿瘤单体药物的主要成分就是人参皂苷。目前的人参皂苷大多是苷元与葡萄糖、阿拉伯糖和半乳糖醛酸等连接成苷,但未见与五碳糖相连接的人参皂苷,尤其是与奥克梯隆型人参皂苷相连接的研究甚少。本文针对自然界中未见的戊糖苷类奥克梯隆型人参皂苷,首次半合成了以D-核糖为糖基侧链的新奥克梯隆型人参皂苷 RPDQ,提高了拟人参皂苷元 DQ 的生物活性,进一步丰富了人参皂苷的合成方法,证明奥克梯隆型人参皂苷的结构修饰及丰富和发展其药理活性的研究具有广阔的前景。药理实验研究证明了 RPDQ 相比 PDQ 和 PPD 的抗肿瘤活性得到增强,一方面可能是通过免疫抑制而发挥抗肿瘤作用,另一方面可能通过调控花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢、戊糖等 7 个内源性代谢途径而起抗肿瘤作用,且克服了人参皂苷生物利用度低等问题。本文应用现代科学技术合成 RPDQ,证明其相比于原人参二醇和拟人参皂苷元 DQ 提高了抗肿瘤活性并探讨了其作用机制,为拟人参皂苷的进一步研究与开发提供了理论基础和数据支持,对于人参皂苷元的新药开发具有一定科学意义。

[参 考 文 献]

[1] 李佳威,薄琳,金丹,等. 人参皂苷及其代谢产物抗肿瘤机制的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(11): 121 - 124.

[2] 曹瑀莹,杜丙秀,李劭恒,等. 人参皂苷 Re 对异丙肾上腺素诱导离体灌流大鼠心脏心律失常的调节作用[J]. 中草药, 2021, 52(20): 6234 - 6244.

[3] 李平亚. 化药一类抗心律不齐人参皂苷 DQ 及其制剂的开发[Z]. 吉林省: 吉林大学, 2019 - 05 - 11.

[4] 王瑞,王宸,宋臻. 稀有人参皂苷的转化制备研究进展[J]. 轻工科技, 2021, 37(10): 18 - 20, 24.

[5] 周志文,周云云. 奥克梯隆型人参皂苷的结构改造及药理活性研究进展[J]. 西北药学杂志, 2020, 35(3): 449 - 454.

[6] 李平亚,刘金平. 伪人参皂苷-Pdq 及其半合成方法和其药物用途: CN1706862A[P]. 2005 - 12 - 14.

[7] ATOPKINA LN, MALINOVSKAYA GV, ELYAKOV GB, et al. Cytotoxicity of natural ginseng glycosides and semisynthetic analogues[J]. *Planta Med*, 1999, 65(1): 30 - 34.

[8] 张振刚,王峰. 有氧运动联合补充 D-核糖对小鼠抗疲劳和抗

氧化的作用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 368 - 375.

[9] KISHIMOTO K, KINTAKA K, UCHIYAMA N. Production of D-ribose: US4904587[P]. 1990 - 02 - 27.

[10] 陈宗伦. 抗生素与糖同服可提升药效[J]. 求医问药, 2011(11): 60.

[11] 尹建元,刘平,徐国兴,等. 一种人参皂苷新衍生物的合成方法和生产的产品及其应用: CN105801661A[P]. 2016 - 07 - 27.

[12] WANG ZX, SHI XX, CHEN GR, et al. A new synthesis of α -arbutin via Lewis acid catalyzed selective glycosylation of Tetra-O-benzyl- α -D-glucopyranosyl trichloroacetimidate with hydroquinone[J]. *Carbohydr Res*, 2006, 341(11): 1945 - 1947.

[13] GU N, LIU SM, QIU C, et al. Biosynthesis of 3'-O-methylisorientin from luteolin by selecting O-methylation/C-glycosylation motif[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2021, 150: 109862.

[14] 蒋小飞,刘九辉,李虎,等. 一类新型小檗碱衍生物的合成与生理活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(23): 156 - 164.

[15] 刘碧霞,章红燕. 姜黄素对 H22 肝癌、S180 肉瘤小鼠的抑瘤作用及机制研究[J]. 中国现代医生, 2017, 55(9): 48 - 52.

[16] 江黎黎. 微 RNA hsa-miR-125a-5p 通过激活 p53 诱导肺癌 SPC-A-1 细胞凋亡的研究[J]. 辽东学院学报(自然科学版), 2019, 26(2): 89 - 96.

[17] 霍炳杰,宋彦茹,张洁,等. 基于 TMT 蛋白质组学探讨华盖散对 H1688 和 A549 肺癌细胞增殖、凋亡影响的作用机制研究[J]. 中医杂志, 2021, 62(16): 1434 - 1440.

[18] 张静,赵岩,蔡恩博,等. 人参倍半萜有效部位对 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤活性及其作用机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2019, 45(2): 280 - 285, 471.

[19] PAGADALA NS, SYED K, TUSZYNSKI J. Software for molecular docking: a review[J]. *Biophys Rev*, 2017, 9(2): 91 - 102.

[20] LYU XR, YAN KM, CHEN WJ, et al. The characterization of metabolites alterations in white adipose tissue of diabetic GK Rats after ileal transposition surgery by an untargeted metabolomics approach[J]. *Adipocyte*, 2021, 10(1): 275 - 284.

[21] ZHANG X, LI YR, WEI XC, et al. Metabolomics analysis of the effects of quercetin on hepatotoxicity induced by acrylamide exposure in rats[J]. *Free Radic Res*, 2021, 55(7): 831 - 841.

[22] DE OLIVEIRA GORGULHO SILVA C, RAISA BARBOSA CUNHA J, ALMEIDA CONCEIÇÃO A, et al. Outdoor versus indoor cultivation: effects on the metabolite profile of *Agaricus subrufescens* strains analyzed by untargeted metabolomics[J]. *Food Chem*, 2022, 374: 131740.

[23] ZHAO YY, CHENG XL, WEI F, et al. Serum metabolomics study of adenine-induced chronic renal failure in rats by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *Biomarkers*, 2012, 17(1): 48 - 55.

[24] WENK MR. Lipidomics: new tools and applications[J]. *Cell*, 2010, 143(6): 888 - 895.

[25] 蔡亚玮,刘建宏,马宁. 花生四烯酸靶向代谢组学在炎症中的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(19): 2721 - 2723, 2728.

[26] BAO JL, LIU F, ZHANG C, et al. Anti-melanoma activity of *Forsythiae Fructus* aqueous extract in mice involves regulation of glycerophospholipid metabolisms by UPLC/Q-TOF MS-based metabolomics study[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 39415.

[27] OKADA A, TAKEHARA H, YOSHIDA K, et al. L-cycloserine amplifies anti-tumor activity of glutamine antagonist[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 1993, 14(1): 53 - 60.

[28] BENOÏT VDE. Invited lecture: Blocking tryptophan catabolism to boost anti-tumor immune responses[S]. 2013.

[29] 王武斌,张彬彬,罗志强,等. 低浓度人参水提液对肺 A549 细胞癌性的影响及其机制研究[J]. 世界中医药, 2022, 17(5): 692 - 698, 703.