

文章编号: 1000-5862(2012)04-0421-04

碳链长度对咖啡酸酯的抗氧化及抗增殖活性的影响

罗 辉¹, 王 琪²

(1. 井冈山大学医学院, 江西 吉安 343009; 2. 兰州大学化学化工学院, 甘肃 兰州, 730000)

摘要: 咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)是蜂胶中的主要活性成分, 具有显著的抗氧化及抗肿瘤活性. 研究了具有不同边链长度的 CAPE 类似物(咖啡酸丁酯、咖啡酸己酯、咖啡酸辛酯和咖啡酸十六烷基酯)对水溶性偶氮引发剂 2,2'-偶氮二(2-脒基丙烷)二盐酸盐(AAPH)诱导的血红细胞膜氧化损伤的保护作用. 其抗氧化活性顺序为: 咖啡酸辛酯>CAPE>咖啡酸丁酯>咖啡酸己酯>咖啡酸十六烷基酯. 同时, 测定了这些化合物抑制人肺癌细胞 A549 增殖活性, 其活性顺序为: 咖啡酸丁酯>CAPE>咖啡酸辛酯>咖啡酸己酯>咖啡酸十六烷基酯. 研究表明: 与 CAPE 相比, 咖啡酸辛酯的抗氧化活性和咖啡酸丁酯抑制 A549 细胞增殖活性优于母体分子. 咖啡酸酯的抗氧化活性和抑制 A549 细胞增殖的活性与其边链长度(亲脂性)并不呈简单的线性关系. “合适”的亲脂性和胞内的定位是影响化合物这些活性的重要因素.

关键词: 咖啡酸苯乙酯; 抗氧化剂; 脂质过氧化; 构效关系; 抗增殖

中图分类号: O 629

文献标志码: A

0 引言

咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)作为蜂胶(propolis)的主要成分具有显著的抗肿瘤^[1]、抗氧化^[2]和抗炎^[3]等活性, 引起了研究者广泛的兴趣. CAPE 的抗肿瘤活性可能与其抗氧化活性相关, 因为体内自由基的过量产生(氧化应激, Oxidative stress)可以引起细胞膜脂质、DNA 和蛋白质分子的氧化性损伤, 导致癌症^[4-5]、衰老^[6]和神经退行性疾病^[7]等. 因此, 许多的研究致力于 CAPE 的抗氧化活性评价^[8-9]. 它的抗氧化活性与其邻二酚羟基的分子结构密切相关^[10-11]. 此外, 化合物的亲脂性决定了其穿透细胞膜的能力, 是影响其在细胞(异相介质)中抗氧化活性的另一重要因素. 近来发现在酚类化合物的苯环上引入亲脂性基团是提高抗氧化和抑制癌细胞增殖活性的重要策略^[11-18].

受以上信息启发, 本文研究了 CAPE 和具有不同边链长度的咖啡酸酯(咖啡酸丁酯、咖啡酸己酯、咖啡酸辛酯和咖啡酸十六烷基酯, 见图 1)的抗氧化和抑制人肺癌细胞 A549 的增殖活性, 试图发现比 CAPE 更为有效的抗氧化剂和抑制癌细胞增殖试剂.

同时研究这些活性与边链长度的关系, 以及抗氧化活性和抑制癌细胞增殖活性是否具有相关性.

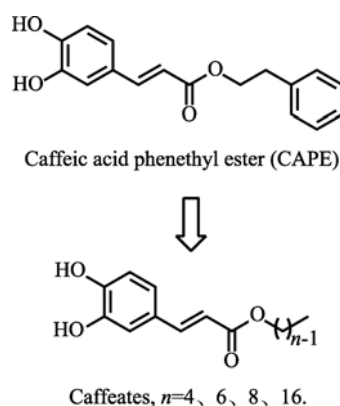


图 1 咖啡酸酯的分子结构

1 材料与方法

1.1 材料

2, 2'-偶氮二(2-脒基丙烷)二盐酸盐(AAPH)、磺酰罗丹明 B(SRB)和 RPMI 1640 培养基均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 小牛血清购自杭州四季青公司; 人肺腺癌细胞 A549 购自中国科学院上海生物化

收稿日期: 2012-03-20

基金项目: 江西省教育厅 2012 年度科技课题(GJJ12476)资助项目.

作者简介: 罗 辉(1971-), 男, 江西吉安人, 副教授, 硕士, 主要从事基础医学及生物化学研究.

学与细胞生物研究所;人红细胞购自甘肃省中心血站。CAPE、咖啡酸丁酯、咖啡酸己酯、咖啡酸辛酯和咖啡酸十六烷基酯按文献[19]合成。

1.2 人红细胞膜的分离与制备

将悬浮的红细胞于 2 000 r/min 下离心 10 min, 除去上层溶液和血细胞表面的黄色沉淀物, 然后加入含有 137.0 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl、8.1 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 1.5 mmol/L KH_2PO_4 的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 值为 7.4), 再于 2 000 r/min 下离心 10 min, 重复洗涤 3 次, 得到相同紧密度的红细胞。将制得的红细胞重悬于预冷的 5.0 mmol/L 低渗磷酸盐缓冲溶液(87 mL 0.2 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 13 mL 0.2 mol/L NaH_2PO_4), 加去离子水至 4 000 mL, 用 Na_2HPO_4 调节 pH 值至 7.6, 不断震荡, 使红细胞完全溶血。然后于 10 000 r/min 下离心 30 min, 弃上清, 沉淀用低渗磷酸盐缓冲溶液洗涤 1 次, 剧烈涡旋后再离心, 重复 2~3 次, 得到浅黄色沉淀。再用等渗 PBS 洗涤 3 次, 得到紧密度一致的乳白色红细胞膜。蛋白含量大约为 5 mg/mL。分装, 于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。膜蛋白含量用 Lowry 法进行测定^[20]。

1.3 硫代巴比妥酸活性物质 TBARS 测定^[21]

TBA 试剂: 将硫代巴比妥酸(TBA)100 mg 溶于 25 mL 去离子水中(加热溶化), 冷却后加入三氯乙酸(TCA)3.25 g、浓盐酸 0.5 mL, 最后加入 125 μL 含 4% BHT 的 DMSO 溶液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存。

将制备好的红细胞膜用 PBS 缓冲液配成 1 mg/mL 蛋白悬液, 加入终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温育 10 min, 然后加入 50 mmol/L 的引发剂 AAPH, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中振荡。每隔 10 min 取样, 加入 2 倍体积的 TBA 试剂, 剧烈涡旋, 静置 10 min 后沸水浴 15 min, 于 3 000 r/min 下离心 10 min, 取上清在 535 nm 处测定吸光值。以未含红细胞膜的 PBS 作为空白, 用摩尔消光系数 $1.56 \times 10^5\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 计算 TBARS 的浓度, 表示脂质过氧化的程度(单位为 nmol/mg protein)。每次实验至少重复 3 次。

1.4 抑制 A549 细胞增殖活性

A549 细胞用 RPMI 1640 培养基[含 10% 灭活小牛血清(FCS), 2 mmol/L 谷氨酰胺, 100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素]在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中进行培养。

抑制 A549 细胞增殖活性通过 SRB 的方法评价^[22]。取对数生长期细胞, 以 3 000 个/孔的密度接种于 96

孔培养板, 待细胞贴壁后换新鲜培养基, 加入不同浓度的药物, 48 h 后, 每孔加入 100 μL 预冷的 10% TCA, 静置 5 min 后移入 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中固定细胞 1 h, 取出用去离子水洗 5 遍, 在空气中干燥, 待培养板完全干燥后每孔加入 100 μL 质量分数为 0.4% 的 SRB(用质量分数为 1% 的乙酸配制), 染色 30 min 后倒掉染液, 用质量分数为 1% 的乙酸洗 5 次, 去除未结合的染料。在空气中干燥后用 150 μL 的 10 mmol/L 非缓冲 Tris 碱液(pH 值为 10.5)溶解, 平板振荡器振荡混匀 15 min, 测定 570 nm 处的光密度(OD)值。空白孔与对照细胞同样处理。细胞存活率按以下公式计算: 存活率 = $(OD_{\text{空白对照}} - OD_{\text{药物组}}) / OD_{\text{空白对照}} \times 100\%$ 。

2 结果与讨论

2.1 咖啡酸酯在红细胞膜中的抗氧化活性

AAPH 是一类水溶性偶氮引发剂, 在水相中能产生 $\text{ROO}\cdot$ 自由基进攻生物分子, 造成 DNA、蛋白质以及脂质的氧化损伤。红细胞膜的主要成分磷脂中包含饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸, 其中不饱和脂肪酸中的油酸、亚油酸和花生四烯酸都极易受到自由基的进攻而发生脂质过氧化^[22]。脂质过氧化的终产物是丙二醛, 它能与硫代巴比妥酸反应生成硫代巴比妥酸活性物质, 在 535 nm 处呈现特征吸收, 非常容易通过紫外-可见光谱仪监测。在反应体系中加入抗氧化剂能够清除链增长的脂质过氧自由基, 从而保护 AAPH 诱导的脂质过氧化损伤。图 2 显示了 10 $\mu\text{mol/L}$ CAPE 及咖啡酸酯对 AAPH 诱导的红细胞膜脂质过氧化的抑制作用。由图 2 可知, 50 mmol/L AAPH 作用 10 min 后, 细胞膜中 TBARS 的含量由 0.79 nmol/mg protein 升高为 3.58 nmol/mg protein, 10 $\mu\text{mol/L}$ CAPE、咖啡酸丁酯、咖啡酸己酯和咖啡酸辛酯的加入, 使得 TBARS 的含量分别降低了 57%、44%、17% 和 62%, 咖啡酸十六烷基酯的加入反而有一定的促氧化作用, TBARS 含量升高了 22%。当 AAPH 作用至 60 min 时, TBARS 含量从 0.79 nmol/mg protein 升高为 5.03 nmol/mg protein; 加入化合物后, TBARS 的含量依次为 4.10、3.92、4.39、3.31 和 5.29 nmol/mg protein。除咖啡酸十六烷基酯外, 其它的化合物都表现出良好的抗氧化活性, 尤其咖啡酸辛酯的加入, 使 TBARS 的含量降低了 62%(10 min)和 34%(60 min); AAPH 作用 20、30、40 和 50 min 后

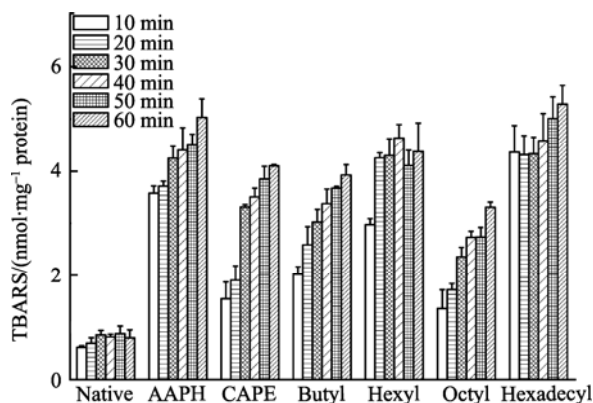


图 2 咖啡酸酯(10 $\mu\text{mol/L}$)对 50 mmol/L AAPH 诱导的人红细胞膜脂质过氧化在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 10、20、30、40、50 和 60 min 后的保护作用

测得的结果同 10 min 和 60 min 得到的结果基本一致, CAPE 及咖啡酸酯在红细胞膜中的抗氧化活性顺序为: 咖啡酸辛酯>CAPE~咖啡酸丁酯>咖啡酸己酯>咖啡酸十六烷基酯。其中, CAPE、咖啡酸丁酯、咖啡酸己酯和咖啡酸辛酯都具有良好的抗氧化活性, 且咖啡酸辛酯的抗氧化活性强于 CAPE; 咖啡酸十六烷基酯则没有表现出抗氧化活性。这证实了化合物在异相介质中的抗氧化能力和亲脂性并不呈简单的线性关系。碳链的长度是影响化合物亲脂性的重要因素, 一般来讲, 碳链越长, 其亲脂性越好, 越容易透膜。另一方面, 膜内产生的链增长的脂质过氧自由基, 由于亲电性, 会向膜表面迁移, 这导致了化合物在膜内定位将显著增强其抗氧化活性。研究结果表明: 咖啡酸辛酯由于其“合适”的亲脂性和定位, 导致其活性最高; 咖啡酸十六烷基酯尽管亲脂性最强, 但不合适的“定位”, 导致其活性最差。

2.2 咖啡酸酯抑制 A549 细胞增殖活性

采用 SRB 法^[22]测定 CAPE 和咖啡酸酯抑制人肺癌细胞 A549 增殖的活性, 结果见表 1。表 1 显示了它们作用细胞 48 h 和 72 h 的 IC_{50} 值(抑制 50% 的细胞增殖所需化合物的浓度)。从表 1 中可知, 其抑制 A549 细胞增殖活性顺序为: 咖啡酸丁酯>CAPE>咖啡酸辛酯>咖啡酸己酯>咖啡酸十六烷基酯。这个活性顺序同样说明了“合适”的亲脂性和胞内定位是影响其抑制癌细胞增殖活性的重要因素。此外, 这个活性顺序与抗氧化活性顺序类似, 在红细胞膜中抗氧化活性较好的咖啡酸丁酯、咖啡酸辛酯和 CAPE 具有较好的抑制 A549 细胞增殖活性, 而抗氧化活性最差的咖啡酸十六烷基酯具有最差的抑制 A549 细胞增殖活性, 这种相关性可能暗示着从抗氧化剂的角度设计癌预防试剂的可行性。

表 1 咖啡酸酯抑制 A549 细胞增殖活性

| Caffeates(The number of side chain carbon) | $IC_{50}^a/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ | |
|--|---|------------------|
| | 48 h | 72 h |
| CAPE | 60.9 ± 2.3 | 47.7 ± 1.2 |
| Butyl caffeate (4) | 53.5 ± 4.0 | 30.6 ± 2.3 |
| Hexyl caffeate (6) | 128.7 ± 7.4 | 131.7 ± 6.6 |
| Octyl caffeate (8) | 106.2 ± 0.8 | 79.8 ± 6.4 |
| Hexadecyl caffeate (16) | 177.2 ± 9.4 | 171.6 ± 14.4 |

^a Data are expressed as the mean \pm S.D. for three determinations.

3 结论

研究了 CAPE 和具有不同边链长度的咖啡酸酯在红细胞膜中的抗氧化活性和抑制 A549 细胞增殖的活性。研究发现: 这些活性与其边链长度(亲脂性)并不呈简单的线性关系; 化合物“合适”的亲脂性及其在胞内的定位是影响其活性的重要因素。此外, 与 CAPE 相比, 咖啡酸辛酯的抗氧化活性和咖啡酸丁酯抑制 A549 细胞增殖活性优于母体分子。这些结果为 CAPE 导向的抗氧化剂和癌预防试剂的设计提供了有用的信息。

4 参考文献

- [1] Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, et al. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NF- κ B and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells [J]. J Biol Chem, 2004, 279(7): 6017-6026.
- [2] Jayaprakasam B, Vanisree M, Zhang Y, et al. Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(15): 5375-5381.
- [3] Uwai K, Osanai Y, Imaizumi T, et al. Inhibitory effect of the alkyl side chain of caffeic acid analogues on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophages [J]. Bioorg Med Chem, 2008, 16: 7795-7803.
- [4] Perwez H S, Hofseth L J, Harris C C. Radical cause of cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3: 276-285.
- [5] Klaunig J E, Kamendulis L M. The role of oxidative stress in carcinogenesis [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004, 44: 239-267.
- [6] Finkel T, Holbrook N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. Nature, 2000, 408: 239-247.
- [7] Kevin J B, Colin L, Ashley I B. Neurodegenerative diseases and oxidative stress [J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3: 205-214.
- [8] Okutan H, Ozcelik N, Yilmaz H R, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart [J]. Clin Biochem, 2005, 38(2): 191-196.

- [9] İlhan A, Akyol O, Gurel A, et al. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37: 386-394.
- [10] Wright J S, Johnson E R, Dilabio G A, et al. Predicting the activity of phenolic antioxidant: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants [J]. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(6): 1173-1183.
- [11] Gaspar A, Garrido E M, Esteves M, et al. New insights into the antioxidant activity of hydroxycinnamic acids: Synthesis and physicochemical characterization of novel halogenated derivatives [J]. *Eur J Med Chem*, 2009, 44: 2092-2099.
- [12] Etzenhouser B, Hansch C, Kapur S, et al. Mechanism of toxicity of esters of caffeic and dihydrocaffeic acids [J]. *Bioorg Med Chem*, 2001, 9(1): 199-209.
- [13] Nagaoka T, Banskota A H, Tezuka Y, et al. Selective antiproliferative activity of caffeic acid phenethyl ester analogues on highly liver-metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line [J]. *Bioorg Med Chem*, 2002, 10(10): 3351-3359.
- [14] Fiuza S M, Gomes C, Teixeira L J, et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties a structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acid [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(13): 3581-3589.
- [15] Jayaprakasam B, Vanisree M, Zhang Y, et al. Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(15): 5375-5381.
- [16] Rosso R, Vieira T O, Leal P C, et al. Relationship between the lipophilicity of gallic acid *n*-alkyl esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14(18): 6409-6413.
- [17] Locatelli C, Rosso R, Santos-Silva M C, et al. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 3791-3799.
- [18] López-Giraldo L J, Laguerriz M, Lecomte J, et al. Kinetic and stoichiometry of the reaction of chlorogenic acid and its alkyl esters against DPPH radical [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 863-870.
- [19] Jayaprakasam B, Vanisree M, Zhang Y, et al. Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 5375-5381.
- [20] Lowry O H, Rosebrough M J, Farr A, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265-275.
- [21] Buege J A, Aust S D. Microsomal lipid peroxidation [J]. *Methods Enzymol*, 1978, 52: 302-310.
- [22] Houghton P, Fang R, Techatanawat I, et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity [J]. *Methods*, 2007, 42: 377-387.

The Effect for Lengths of the Alkyl Side Chain on the Antioxidant and Antiproliferative Activity of Caffeic Acid Phenethyl Ester

LUO Hui¹, WANG Qi²

(1. School of Medicine, Jingshan University, Ji'an Jiangxi 343000, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou University, Lanzhou Gansu 730000, China)

Abstract: Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) has been identified as an active component of propolis, and its antioxidant and cancer chemoprevention activities have attracted considerable attention. The antioxidant capacity of CAPE and caffeates with various lengths of the alkyl side chain against 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH)-induced lipid peroxidation of human erythrocyte ghosts were evaluated. The antioxidant activity order was octyl caffeate>CAPE>butyl caffeate>hexyl caffeate>hexadecyl caffeate. Furthermore, their antiproliferative effect against human lung adenocarcinoma A549 cells was also assessed with the activity order being butyl caffeate>CAPE>octyl caffeate>hexyl caffeate>hexadecyl caffeate. Octyl and butyl caffeates exhibited significantly higher antioxidant and antiproliferative activities than CAPE, respectively. It was found that the chain length affects the activities of caffeates in a nonlinear manner, and the suitable lipophilicity and intracellular localization of compounds are the important parameters in determining their activities.

Key words: caffeic acid phenethyl ester; antioxidant; lipid peroxidation; structure-activity relationship; antiproliferation

(责任编辑: 刘显亮)