

柠檬苦素类似物及其 D 环内酯酶研究进展

沈 雯 许 健

柠檬苦素(limonin)是一个含有呋喃环的高度氧化的四环三萜类化合物,而柠檬苦素类似物(limonoids)是以柠檬苦素的化学结构为基本单位的一系列化合物,包括有苦味的水溶性差的甙元类物质和无苦味的水溶性好的糖苷配体在内均称为柠檬苦素类似物。目前已从芸香科和楝科植物中分离到 300 多种柠檬苦素类似物,其中包括 38 种柠檬苦素类似物甙元及 20 种柠檬苦素类似物糖甙^[1]。柑橘类水果的冻伤或物理损伤都能使无苦味的单酯前体转化为有苦味的二内酯柠檬苦素类似物^[2]。柠檬苦素类似物的产生首先在植物茎部合成柠檬苦素类似物的前体诺米林,在茎部合成的诺米林向叶子、果实、种子等部位移动,产生柠檬苦素类似物。柠檬苦素是由柠檬苦素 D 环内酯水解酶在酸性果汁条件下催化其前体柠檬苦素 A 环内酯产生的^[2]。如果可以利用分子生物学的方法克隆柠檬苦素 D 环内酯水解酶基因,制成酯-酶合剂,使其生物学作用具有一定的靶向性。本文就柠檬苦素及其类似物的种类、分布、提取鉴定、生物学功能及其柠檬苦素 D 环内酯水解酶的研究进展等方面进行了概述。

一、柠檬苦素类似物的种类与结构

在柑橘果实中常见且含量较高的柠檬苦素及其类似物主要有:柠檬苦素、诺米林、诺米林酸、宜昌根辛、香椽苦素、脱乙酰诺米林等^[2]。迄今为止发现的柠檬苦素类似物甙的结构均是甙元在 C-17 位和分子葡萄糖以糖苷键的形式结合,甙元又可分为中性的 A 环内酯和酸性的 D 环内酯两种类型,甙元与糖甙结构的差别决定性质的差异。实验表明,柑橘果实中本不存在柠檬苦素,但却大量存在其柠檬苦素前体,该 A 环内酯前体在酸性条件经下会很快地转变成柠檬苦素。酸性环境中的柠檬苦素相对稳定,当 pH > 10 时,柠檬苦素经分解再酸化后形成 D 环内酯

水解酶,由于 D 环内酯水解酶的存在,柠檬苦素进一步水解为甙元和葡萄糖,此为柑桔果汁发生后苦的原因。在加工过程中,柠檬苦素类似物的结构会发生变化,造成活性降低甚至丧失。

二、柠檬苦素类似物的含量与分布

柠檬苦素类似物广泛分布于柑橘属的多种植物中,其含量与种类因品种、发育阶段等的不同而有差别。幼果中,柠檬苦素类化合物以苷元等形式存在,随着果实不断发育,苷元也逐步转化成配糖体。柠檬苦素类似物在各个部位的含量,遵循种子 > 囊衣 > 果皮 > 果肉 > 果汁的规律。除此之外,枸橼种子以外的所有部位都是以诺米林含量最高,其次才是柠檬苦素,这证明了枸橼的苦味主要来自诺米林。

三、柠檬苦素类似物的提取及检测方法

1. 柠檬苦素类似物的提取方法:柑橘果实中柠檬苦素类化合物种类较多,随不同的生长季节、不同的组织其种类和含量也各有所不同,例如幼果中以苷元为主,味道苦涩;成果以配糖体储存为主而味道甘甜。由于柠檬苦素类似物的主体结构(A, B, A 环)具有抗肿瘤活性;D-环内酯水解酶水解糖基化的糖甙也具有相同抗癌活性;柠檬苦素的 E 环结构和环氧结构具有除虫功效。因此针对不同时期、不同的对象要选择合适的方法和条件(酸碱性等)进行提取。提取方法通常是按照所要提取的成分的极性选用适合的溶剂进行提取。常用的方法有:①丙酮提取-结晶分离法;②热水提取-树脂吸附法(提取配糖体);③丙酮提取-甲醇分离-树脂吸附法;④超临界 CO₂ 提取法。提取所得到的粗提物,成分复杂,杂质较多,所以确定合理高效的分离、纯化途径十分重要。针对不同产物纯化方法各异,特异性较高的方法为制备型高效液相法。

2. 柠檬苦素类似物的检测方法:近年来,随着先进仪器的广泛应用和检测技术的发展,柠檬苦素类似物的检测方法主要有薄层色谱法、分光光度法(UV)^[3]、高效液相色谱-紫外分光光谱法、放射免疫测定法(RIA)、高效液相-质谱法、毛细管胶束电色谱方法和快速色谱法^[4]。除放射免疫测定法外,大部分方法都要求对样品进行有机溶剂提取、分离和

基金项目:浙江省科技攻关项目、重点社会发展项目(2006C23024);浙江省自然科学基金(Y2080889)

作者单位:310053 杭州,浙江中医药大学生命科学院

通讯作者:许健,电子信箱:xujian832002@163.com

固相萃取等前处理。应用这些先进的仪器和方法可以减少工作量,节省大量的时间,准确度高。HPLC法是近10年来运用最为广泛的一种能进行准确定性定量分析的检测方法,因其具有样品预处理简单、色谱柱的选择范围宽、流动相的种类及比例可任意变化、分析时间较短和灵敏度高等优点^[5],特别是近期出现了一种HPLC方法可以同时测定柑桔中柠檬苦素类似物苷元和糖苷。喷雾液相色谱-质谱法适用于柠檬苦素甙元的检测,而原子轰击质谱适合柠檬苦素糖甙的分析。所以发展特别迅速。近年来,光电二极管阵列检测器备受青睐,为样品分析提供了丰富的定性定量信息。

四、柠檬苦素类似物的生物学功能

1. 柠檬苦素类似物的抗肿瘤作用:目前从柑橘类中分离到38种柠檬苦素类似物,已证实其中的8种具有抗癌活性^[6]。在豚鼠、仓鼠的动物实验研究中发现,柠檬苦素和诺米林能够诱发和激活解毒酶谷胱甘肽转移酶的活性,从而对化学致癌物质的致癌作用具有抑制作用。Kelly C等进一步评估了柑橘成分中柠檬苦素、诺米林对鼠的肝脏和小肠谷胱甘肽转移酶(GST)的活性的影响,GST是体内主要的解毒酶系,可催化谷胱甘肽与体内强亲电子性的致癌物质结合,从而可降低毒性增强水溶性,使之成为水溶性物质易于从体内排出。实验中GST活性呈剂量依赖性增加,并且诺米林可使肝脏和小肠的GST活性呈显著性的量效关系。这个结果进一步证明了柠檬苦素类似物是解毒酶GST的诱导剂^[7]。Poulose SM等发现柑橘类柠檬苦素类似物具有体外抑制人成神经肿瘤细胞SH-SY5Y的活性,其主要的作用机制是通过诱导细胞凋亡和清除自由基活性^[8]。Miller EG等研究了柠檬苦素配糖体有减轻DMBA诱导仓鼠口腔肿瘤的作用,其中柠檬苦素17- β -D-吡喃葡萄糖苷(LG)抑制肿瘤形成率可达55%,深入研究柠檬苦素类似物母核中某个环与抗肿瘤活性的关系,发现柠檬苦素类似物母核中A环的改变可导致抗肿瘤活性的丧失,而D环的改变则没有任何影响^[9]。Tian Q, Miller EG等研究了5种柠檬苦素类似物对一系列人肿瘤细胞株(HL-60、SKOV-3、HeLa、NCI-SNU-1、HepG2和MCF-7)抑制增殖活性作用,结果发现5种柠檬苦素类似物对人乳腺癌细胞MCF-7具有明显的增殖抑制作用,且呈一定的剂量时间依赖关系,在较高浓度下(100 μ g/ml)能诱导MCF-7细胞凋亡,对其他肿瘤细胞则无明显的增殖抑制作用^[10]。

张娟娟等研究柠檬苦素对人肝癌细胞SMMC-7721的体外抑制作用,结果显示不同溶度柠檬苦素对SMMC-7721细胞生长均有一定的抑制作用,其抑制作用呈明显时效和量效关系,说明柠檬苦素对人肝癌细胞SMMC-7721的增生具有抑制作用。

2. 柠檬苦素类似物的镇痛抗炎作用:从疏毛吴茱萸(*evodiarutaecarpavar. bodinieri*)中分离柠檬苦素,并进行相应的实验研究。例如,实验发现,通过给予小鼠100mg/kg柠檬苦素,可明显减少小鼠舔足次数^[11]。同时通过柠檬苦素类似物对乙酸通道的血管通透性、对缓激肽诱导的足肿胀反应以及对花生四烯酸诱导的耳肿胀进行的实验研究发现,柠檬苦素具有明显的镇痛和抗炎作用。

3. 柠檬苦素类似物的抗焦虑镇静作用:柠檬苦素类似物对麻醉小鼠的催眠试验研究发现,柠檬苦素、诺米林、奥巴叩酮、7-奥巴叩酮、7 α -柠檬苦醇等柠檬苦素类化合物均能延长由 α -氯醛糖和乌拉坦所引起的小鼠睡眠时间,其中化合物诺米林的镇静作用较强。柠檬苦素类似物除以上的生物学作用之外,还具有抗氧化活性、抗菌性、抑制HIV、降低胆固醇、明显的利尿作用、改善心脑血管循环及改善睡眠、抗病毒、调节细胞色素和除虫杀虫的作用,具有很好的保健功能^[12]。

五、柠檬苦素D环内酯水解酶及其基因的研究进展

柠檬苦素是由柠檬苦素D环内酯水解酶在酸性条件下催化其前体柠檬苦素A环内酯产生的。柠檬苦素D环内酯水解酶属于水解酶类,由于柠檬苦素类似物遵循种子>囊衣>果皮>果肉>果汁的规律,以柠檬苦素、诺米林、奥巴叩酮的顺序降低含量。并且柠檬苦素类似物在果实组织与种子中的生物合成途径是独立的,所以可以推测柠檬苦素D环内酯水解酶在种子中的表达活性高^[2]。国内外关于柠檬苦素D环内酯水解酶及其基因的研究很少,在国内有学者做了关于D-泛解酸内酯水解酶基因的研究^[12]和定向进化,这些研究主要在真菌中进行,却没有柠檬苦素D环内酯水解酶基因的相关研究报道^[13]。国内研究的D-泛解酸内酯水解酶基因以尖镰孢霉AKU3702中编码D-泛解酸内酯水解酶的cDNA基因序列为参考,并以串珠镰孢霉CGMCC0536mRNA反转录获得产物为模板,扩增得到了编码D-泛解酸内酯水解酶的cDNA,设计特异引物,扩增到编码D-泛解酸内酯水解酶cDNA的结构基因,成功构建了其

原核表达载体。目前还没有报道认为 D-泛解酸内酯水解酶能够水解糖基化的糖甙。在国外关于柠檬苦素 D 环内酯水解酶的研究主要是提高柠檬苦素 D 环内酯水解酶活性的方法^[14]及在假单胞菌中 D 环内酯水解酶的活性。研究柠檬苦素 D 环内酯水解酶活性的方法主要有薄层色谱和放射化学法,以及高效液相色谱/紫外法(HPLC/UV)和固相萃取法(SPE)^[2]。国外有学者将固相萃取和荧光定量联合应用,通过分离的 A 环内酯随后转变的柠檬苦素的量推测 D 环内酯水解酶的含量。尽管目前没有报道证实柠檬苦素 D-环内酯水解酶是一种金属酶,但是 250mmol/L 的加入可以有效地终止 D 环内酯水解酶的试验,而且不会干扰固相萃取和定量试验的步骤。柠檬苦素 D 环内酯水解酶的分离纯化步骤繁琐,且只适用少量柠檬苦素 D 环内酯水解酶的分离纯化,纯度和含量都不高。在提取过程中还要采取措施防止柠檬苦素 D 环内酯水解酶的变性失活,对实验的条件要求比较严格。所以可以采用分子生物学方法克隆柠檬苦素 D 环内酯水解酶,提高其纯度和含量,并可以对柠檬苦素 D 环内酯水解酶进行靶向性的研究。但是柠檬苦素 D 环内酯水解酶基因存在于真核生物中,与 D-泛解酸内酯水解酶基因两者的同源性较低,引物设计较难,这也是基因工程研究及克隆柠檬苦素 D 环内酯水解酶基因的难点和突破点。

六、展 望

迄今为止,因为尚未发现肿瘤细胞与正常细胞之间存在着重要而又明显的差别,因而研究设计的抗癌药物大多还缺乏只杀伤肿瘤细胞、而不会影响正常细胞的能力,这样势必会在杀伤肿瘤细胞的同时、也会在一定程度上对身体内的正常细胞造成损伤,造成所谓的化疗药物的毒性反应或不良反应。如何能增强化疗药物的靶向性,减轻其毒性不良反应,开发出高效低毒的新型抗肿瘤药一直是广大医务人员和患者共同的愿望。

随着对柠檬苦素类似物结构的确定、生物合成的研究以及生物活性的了解,国内外对柠檬苦素类似物提取分离进行了大量的研究,不断优化提取条件,分离纯化方法,提高柑橘中柠檬苦素类似物的提取率和提取量,并进行大规模的提取和分离。然而,虽然对柠檬苦素类似物的提取条件不断地优化,对分离纯化的方法不断改进,还是存在许多的缺点,提取率较低,提取过程复杂,受到许多因素的限制,如双溶剂体积分数的影响,提取时间的影响,料液比的影响,提取温

度的影响等,提取的柠檬苦素应用于抗肿瘤不具有靶向性。所以对与柠檬苦素类似物的研究可以从分子生物学和遗传学方向进行探索,利用分子生物学技术克隆并表达柠檬苦素 A 环内酯和 D 环内酯水解酶基因,制成酯-酶合剂(柠檬苦素 A 环内酯-柠檬苦素 D 环内酯水解酶合剂),提高柠檬苦素得率,为柠檬苦素特异性杀伤肿瘤细胞,增强柠檬苦素抗肿瘤的靶向性研究奠定基础,同时深入研究酯-酶合剂抗炎镇痛的机制,为肿瘤治疗和康复探索一条新途径。

参考文献

- 郭育铭,郑旭熙,殷钟意,等. 柠檬苦素类似物的研究进展. 重庆工商大学学报(自然科学版),2008,25(6):638-641
- Andrew P, Breksa III, Gary D, *et al.* Determination of limonin D-Ring lactone hydrolase activity by solid phase extraction with indirect fluorescence detection[J]. Agric Food Chem, 2004, 52:3772-3775
- Abbasi S, Zandi P, Mirbagheri E. Quantitation of limonin in Iranian orange juice concentrates using high-performance liquid chromatography and spectrophotometric methods[J]. European Food Research and Technology, 2005, 211(1-2):202-207
- Raman G, Cho M, Brodbelt J S. Isolation and purification of closely related Citrus limonoid glucosides by flash chromatography[J]. Phytochemical Analysis, 2005, 16(3):155-160
- 罗水忠,潘利华. 柠檬苦素类似物的研究与应用进展. 综述与述评,2008,11(1):4-7
- Poulose SM, Harris ED, Patil BS. Antiproliferative effects of citrus limonoids against human neuroblastoma and colonic adenocarcinoma cells[J]. Nutr Cancer, 2006, 56(1):103-112
- Poulose SM, Harris ED, Patil BS. Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity[J]. J Nutr, 2005, 135(4):870-877
- Tian Q, Miller EG. Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. Nutr Cancer, 2001, 40(2):180-184
- Kelly C, Jewell C, Brien N M. O. The effect of dietary supplementation with the citrus limonoids, limonin and nomilin on xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of rat[J]. Nutrition Research, 2003, 23:681-690
- Miller EG, Porter JL, Binnie WH, *et al.* Further studies on the anticancer activity of citrus limonoids[J]. Agric Food Chem, 2004, 52(15):4908-4920
- 乔依. 提取自楝科 *khaya ivorensis* 的柠檬苦素类似物的杀菌活性[J]. 世界农药, 2005, 27(4):38-41
- 柳志强,孙志浩. 串珠镰孢霉 D-泛解酸内酯水解酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达. 生物工程学报, 2005, 21(3):390-395
- 柳志强,孙志浩,等. D-泛解酸内酯水解酶的定向进化. 生物工程学报, 2005, 21(5):773-781
- Breksa AP 3rd, Manners GD. Determination of limonin D-ring lactone hydrolase activity by solid phase extraction with indirect fluorescence detection. J Agric Food Chem, 2004, 52(12):3772-3775

(收稿:2009-10-30)