

灰毡毛忍冬抑制表皮生长因子受体激酶活性及活性部位 UPLC-Q-TOF/MS 分析

任伟光¹, 林森森², 李文涛¹, 黄林芳^{1*}

(¹中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; ²中国药科大学新药筛选中心, 南京 210009)

摘要 应用高通量药物筛选技术, 筛选发现具有表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)激酶抑制活性的中药提取物, 同时采用超高效液相色谱与串联四极杆飞行时间质谱仪联用技术(UPLC-Q-TOF/MS)对其活性部位进行分析和鉴别。灰毡毛忍冬药材经石油醚渗滤、乙醇提取、乙酸乙酯萃取和水煎煮后, 得到4个相应的提取部位。采用均相时间分辨荧光(HTRF)法检测抑制EGFR激酶活性, 于波长为620和665 nm处测定荧光信号的变化及信号值, 计算提取物对EGFR激酶的抑制率。采用Acquity UPLC BEH C₁₈色谱柱, 以0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相梯度洗脱, 210~400 nm扫描, 使用ESI离子源, 在正离子模式下采集数据。结果显示, 灰毡毛忍冬的乙酸乙酯部位显示较强的EGFR激酶抑制活性, IC₅₀为2.027 μg/mL。Q-TOF/MS测定的一级、二级质谱信息及结合文献鉴定灰毡毛忍冬乙酸乙酯提取物中11个化合物, 其中7个分别是: 咖啡酸(caffeic acid), 七叶内酯(esculetin), 槲皮素(quercetin), 3,5-二咖啡酰奎尼酸(3,5-O-dicaffeoylquinic acid), 扁柏黄酮(hinoki flavone), 绿原酸(chlorogenic acid), β-谷甾醇(β-sitosterol)。3,5-二咖啡酰奎尼酸、咖啡酸、扁柏黄酮为灰毡毛忍冬的主要成分, 灰毡毛忍冬中含有的酚酸类和黄酮类化合物可能是抑制EGFR激酶活性的主要成分。

关键词 EGFR激酶抑制剂; 高通量筛选; 灰毡毛忍冬; 提取物; 有效成分; UPLC-Q-TOF/MS

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)06-0526-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130607

Analysis of chemical constituents of the effective part of anti-EGFR of *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz by UPLC-Q-TOF-MS

REN Weiguang¹, LIN Sensen², LI Wentao¹, HUANG Linfang^{1*}

¹Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193;

²New Drug Screening Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Application of high-throughput drug screening, screening anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) activity of Chinese herb extracts, and the constituents in *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz were determined by UPLC-Q-TOF/MS. Herbs were percolated through petroleum ether, ethanol extract, ethyl acetate extraction and boiling water, obtaining four corresponding parts. The activity of EGFR was detected based on HTRF. The variation of fluorescence signal and signal value at 620 nm and 665 nm were determined; the inhibition rate of extracts were calculated. Chromatographic separation was performed on a C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) with a gradient elution of 0.1% formic acid aqueous solution- acetonitrile. The mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as defector and data were collected under the positive ion mode. Strong inhibitory activity of EGFR was found for the ethyl acetate part of *L. macranthoides* Hand. -Mazz, with IC₅₀ value of 2.027 μg/mL. The information of positive ion and the relative molecular mass were distinguished by Q-TOF/MS, which identified the 7 corresponding parts of *L. macranthoides* Hand. -Mazz.: caffeic acid, esculetin, quercetin, 3, 5- O-dicaffeoylquinic acid, hinoki flavone, chlorogenic acid and β-sitosterol as well as 4 unknown substances. 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, caffeic acid and hinoki flavone are the main components. The results showed that *L. macranthoides* Hand. -Mazz contained phenolic acids and flavonoids inhibiting EGFR,

* 收稿日期 2013-04-26 * 通信作者 Tel:010-57833197 E-mail:lfhuang@implad.ac.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.81274013);国家自然科学基金重点项目资助(No.81130069);人事部留学人员择优资助项目(2009-2012);国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(No.2011ZX09307-002-01)

which provided the basis for the research and development of antitumor drugs in the future.

Key words EGFR kinase inhibitors; high-throughput drug screening; *Lonicera macranthoides*; extract; active ingredients; UPLC-Q-TOF/MS

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81274013); the National Natural Science Foundation in Key Projects (No. 81130069); The Personnel Department Students Studying Abroad Preferred-Aid Project (No. 2009-2011); China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2011ZX09307-002-01)

灰毡毛忍冬是忍冬科植物灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz 的干燥花蕾或带初开的花,2010 年版《中华人民共和国药典》将其与红腺忍冬 *L. hypoglauca* Miq.、华南忍冬 *L. Confusa* DC.、黄褐毛忍冬 *L. fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng 的干燥花蕾或带初开的花一同列入山银花项下,具有清热解毒、疏散风热之功效^[1]。灰毡毛忍冬主要分布于我国贵州、四川、湖南、广西、福建等地,主要含有酚酸类、黄酮类、皂苷类等化学成分。酚酸类化合物主要为咖啡酸(caffeic acid)、绿原酸(chlorogenic acid)等;黄酮类化合物主要为木犀草素(luteolin)和槲皮素(querletin)及其苷类;皂苷类主要为灰毡毛忍冬次皂苷乙(macranthoside B)和川续断皂苷乙(dipsacoside B)^[2-5],具有抗菌、抗炎、调节免疫等药理作用^[6]。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)属于酪氨酸激酶(tyrosine kinase inhibitor, TKI) I 型受体家族,是一种细胞膜表面的糖蛋白受体,是原癌基因 *cerb-1* 的表达产物^[7]。研究表明,抑制 EGFR 激酶活性可抑制肿瘤生长,抗 EGFR 激酶的药物选择性地作用于细胞内的靶目标,阻断 EGFR 功能抑制肿瘤进展,EGFR 激酶以其高选择性和低毒性的优势在肿瘤临床治疗中令人瞩目,可单独应用或与传统抗肿瘤方案联合来治疗肿瘤^[8-9]。

本实验应用均相时间分辨荧光(HTRF)技术建立了 EGFR 激酶抑制剂高通量筛选方法,对灰毡毛忍冬提取物进行了 EGFR 激酶抑制活性筛选。研究发现,灰毡毛忍冬乙酸乙酯部位具有较强的 EGFR 激酶抑制活性,并对其进行 UPLC-Q-TOF/MS 分析。本实验为其进一步跟踪分离获得活性先导化合物奠定基础,也为临床治疗恶性肿瘤提供用药依据。

1 材 料

EGFR 激酶(美国 Invitrogen 公司);HTRF KinEASE-TK、384 低体积白板、生物素标记的 EGFR 激

酶底物、TK 抗体、SA-XL664(美国 Cisbio 公司);ATP、DTT、MgCl₂、MnCl₂(美国 Sigma 公司);十字孢碱(上海研拓生物科技有限公司);Waters AcquityTM UPLC-Q-TOF 和 MassLynx 4.1 工作站(美国 Premier 公司);乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);其他试剂均为市售分析纯;纯净水(自制)。

灰毡毛忍冬采自重庆秀山,经黄林芳副研究员鉴定为灰毡毛忍冬(*L. macranthoides*)花蕾。样品保存于中国医学科学院药用植物研究所标本馆。

2 方 法

2.1 待测样品的制备

药材样品粉碎成粗粉,取粗粉 500 g,先用石油醚浸泡 1 d 后渗滤提取至提取液颜色浅(或 5 倍药材量),回收石油醚,得石油醚提取物 8.07 g;残渣挥去石油醚,用 80% 乙醇湿润后,再用 3 倍体积 80% 乙醇回流提取两次,合并提取液,减压回收乙醇至无醇味,用等体积乙酸乙酯萃取两次,合并乙酸乙酯萃取液,回收乙酸乙酯至干,得乙酸乙酯提取物 1.16 g;母液浓缩至干,得乙醇提取物 48.15 g;残渣挥干乙醇,用 3 倍量水煮提两次,合并水提取液,浓缩至干,得水提取液 39.10 g。

2.2 EGFR 激酶活性测定方法

采用 HTRF 法测定 EGFR 激酶的活性,加入 ATP 后启动反应,激酶使底物发生磷酸化反应,将磷酸根连接在有生物素标记的底物上。在这个过程中 EDTA 终止了反应的进行,有铈元素标记抗磷酸化酪氨酸抗体靠近底物的磷酸根上,标记 XL665 的异藻蓝蛋白结合在底物的生物素标记上,两个荧光基团在互相靠近的过程中发生能量共振转移并在 665 nm 处产生荧光,游离的 TK 抗体(标记铈离子)在 620 nm 处产生荧光,此信号可作为背景信号,而游离的 SA-XL665 只产生短暂的荧光,通过延后检测时间即加入终止剂后 1 h 再进行检测,可将其忽略。

提取物筛选在 384 孔板中进行,用移液器转移液体,在反应容器中每孔加入 EGFR 激酶溶液 2 μ L,底物溶液 2 μ L,缓冲液或待筛化合物 4 μ L,ATP 2 μ L,反应 1 h。每孔加入 TK 抗体 5 μ L,SA-XL665 5 μ L,室温孵育 1 h。利用 Beckman Coulter 检测平台 HTRF 模块进行检测。EGFR 激酶非选择性抑制剂为十字孢碱(staurosporine),以检验方法的可靠性。

2.3 样品筛选

初筛灰毡毛忍冬提取物,计算抑制率后对高活性样品进行复筛。复筛时每个样品依次稀释为 5 个质量浓度,分别为 50,5,0.5,0.05,0.005 μ g/mL。实验重复 3 次。根据测定结果应用 SPSS 16.0 软件计算 IC₅₀。

2.4 活性成分测定方法

2.4.1 色谱条件 色谱柱:BEH C₁₈ 柱(50 mm × 2.1 mm,1.7 μ m);流动相:A:0.1% 甲酸水溶液,B:乙腈;梯度洗脱:0~2 min(90%~85% A);2~4 min(85%~70% A);4~5 min(70%~50% A);5~6 min(50%~45% A);6~7 min(45%~40% A) 7~8 min(40%~35% A);8~9 min(35%~30% A);

9~14 min(30%~0% A);流速:0.3 mL/min;进样量:4 μ L;柱温:30 $^{\circ}$ C。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),采用正离子 V 模式检测;脱溶剂气流量为 800 L/h,脱溶剂气温为 450 $^{\circ}$ C,锥孔气流量为 50 L/h,离子源温度为 120 $^{\circ}$ C,毛细管电压为 3 kV,锥孔电压为 40 V。0.1 s(间隔 0.02 s)采集一次谱图。

2.5 样品制备

取已制得的灰毡毛忍冬乙酸乙酯提取物 20.03 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,备用。

3 结果

得到抑制率大于 80% 的灰毡毛忍冬提取物进行复筛,呈阳性,依次稀释 5 个浓度,计算 IC₅₀。从表 1 中可以看出:灰毡毛忍冬 4 个部位具有不同程度的 EGFR 激酶抑制活性。而其乙酸乙酯部位抑制活性最强,在终质量浓度为 50 μ g/mL 时,抑制率分别为 25.31%、21.48%、94.50% 和 14.85%。灰毡毛忍冬乙酸乙酯部位 IC₅₀ 为 2.057 μ g/mL,其他 3 个部位未显示明显活性。

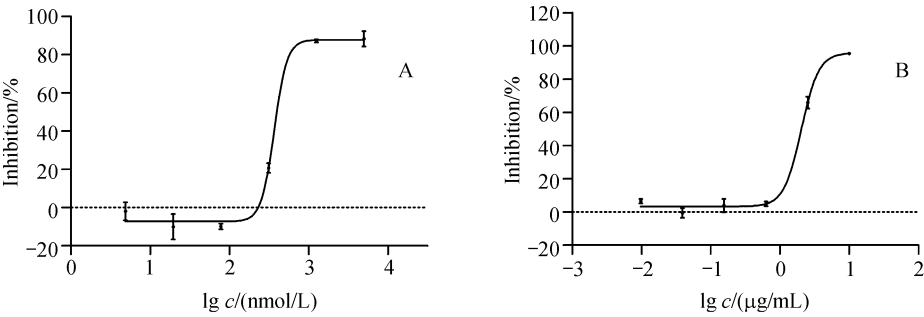


Figure 1 Inhibition of EGFR for staurosporine (A) and ethyl acetate extract of *L. macranthoides* (B)

Table 1 Inhibition of EGFR for different extract factions and IC₅₀ value ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Sample	Extract fractions	Inhibition/%	IC ₅₀ /(μ g/mL)
<i>L. macranthoides</i>	Petroleum ether	25.31	—
	Ethanol	21.48	—
	Ethyl acetate	94.50	2.027
	Water	14.85	—
Positive drug	Staurosporine	95.43	367.5

按“2.4.1”项下分析条件,灰毡毛忍冬乙酸乙酯提取物 UPLC-Q-TOF/MS 离子流图如图 2 所示。

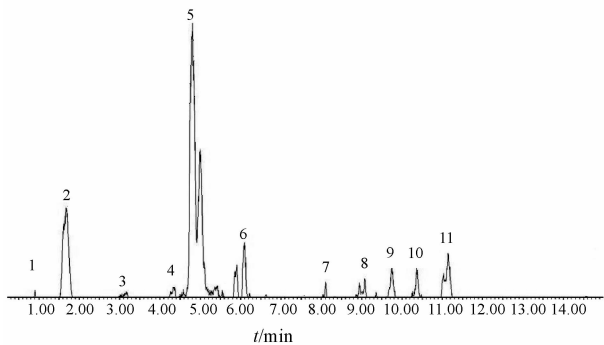


Figure 2 Representative chromatograms of extract of *L. macranthoides* by UPLC-Q-TOF/MS (Ion peak refer to Table 2)

采用 Markerlynx 4.1 软件对数据进行处理,根据正离子模式的一级质谱的分子离子峰得到化合物的准确相对分子质量,计算出其元素组成,结合

文献,对灰毡毛忍冬用 UPLC 分离出的 11 个主要峰进行分析,推断出其可能的成分,结果见表 2 和表 3。

Table 2 Accurate MW constituent to the *L. macranthoides* in thyl acetate

Peak No.	t_R/min	Mean measured mass/(m/z)	Molecular formula	Theoretical exact mass/(m/z)	Error
1	0.91	365.358 9 [M + H] ⁺	C ₂₁ H ₁₆ O ₆	365.356 1	3.8
2	1.66	181.167 2 [M + H] ⁺	C ₉ H ₈ O ₄	181.165 4	4.9
3	3.17	179.150 8 [M + H] ⁺	C ₉ H ₆ O ₄	179.149 5	3.6
4	4.34	303.242 5 [M + H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.243 6	-1.8
5	4.74	517.457 6 [M + H] ⁺	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	517.458 8	-1.1
6	6.10	539.468 0 [M + H] ⁺	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	539.465 7	2.1
7	8.11	518.612 9 [M + Na] ⁺	C ₂₁ H ₅₀ O ₁₂	518.612 2	0.7
8	9.07	355.311 0 [M + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.316 7	-8.0
9	9.75	415.714 6 [M + H] ⁺	C ₂₉ H ₅₀ O	415.713 4	1.4
10	10.36	149.077 3 [M + H] ⁺	C ₄ H ₄ O ₆	149.078 9	-5.3
11	11.14	340.496 2 [M + H] ⁺	C ₂₀ H ₃₅ O ₄	340.497 4	-1.7

Table 3 Compounds of the ethyl acetate of *L. macranthoides* identified by UPLC-Q-TOF/MS

Peak No.	Positive ion mode [M + H] ⁺				Negative ion mode [M - H] ⁻				Compound identified
	Second order fragment ion/(<i>m/z</i>)				Second order fragment ion/(<i>m/z</i>)				
1	365	203	104		363	–	–		Unknown
2	181				179	135	117		Caffeic acid ^[10]
3	179	–			177	133			Esculetin ^[11]
4	303	287	275	257	301	273	273	247	Quercetin ^[10]
5	517	355	337	193	515	353	335	191	3,5- <i>O</i> -DicaFFEoylquinic acid ^[12]
6	539	–			537	–			Hinoki flavone ^[13]
7	518	–			516	–			Unknown
8	355	193			353	191	179	135	Chlorogenic acid ^[10]
9	415	397	313	134	413	395	311	132	<i>β</i> -Sitosterol ^[10]
10	149	102			147	100			Unknown
11	340	312	201	92	338	310			Unknown

4 讨 论

本试验首次在灰毡毛忍冬中应用高通量药物筛选技术筛选到具有 EGFR 激酶抑制活性部位。EGFR 在多种肿瘤中高表达,如肺癌(40% ~ 80%)、乳腺癌(14% ~ 91%)、胃癌(33% ~ 74%)、前列腺癌(40% ~ 80%)及头颈部肿瘤(36% ~ 100%)等^[14],因而 EGFR 成为重要的肿瘤治疗靶分子,针对 EGFR 的抗肿瘤靶向治疗成为近年来肿瘤治疗研究的热点之一^[15]。黄酮类、酚酸类化合物具有清除人体中超氧离子自由基、抗衰老、增加机体免疫力的生理活性作用,如槲皮素都能抑制皮肤肿瘤、白血病、结肠癌、肝癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞的增殖和清除 OH 自由基作用^[16-17]。咖啡酸、绿原酸、七叶内酯具有清除自由基抗氧化作

用^[16-18]。扁柏黄酮为双黄酮类化合物具有抗病毒和抗感染活性^[19]。

柴多武^[18]在金银忍冬果实中筛选出抗肿瘤物质 β -谷甾醇和齐墩果酸,其中抗肿瘤作用较好的齐墩果酸在本实验未检测到。张树军^[10]对忍冬茎叶抗氧化活性部位成分进行分离,得到 β -谷甾醇、咖啡酸、绿原酸、槲皮素等成分。其中抗氧化剂可以抗肿瘤的一个原因是能修复损伤的 DNA,细胞的高速分裂使损伤的细胞在分裂前修复 DNA 机会很少,导致细胞对各种致癌物质很敏感^[18]。其酚酸和黄酮类抗氧化作用还与含羟基有关,据报道羟基个数越多抗氧化能力越强,不仅依赖于羟基个数,还与羟基的活性有关^[20]。

湖南、贵州、重庆为灰毡毛忍冬主要产区,其产量占全国总产量的 70%。《中华人民共和国药典》

虽分别收载金银花和山银花,但全国各地的金银花茶与其他食品行业,主要是以细毡毛忍冬与灰毡毛忍冬做茶,忍冬做茶较少。灰毡毛忍冬本身品质好,绿原酸含量是忍冬的2~4倍,且产量高是忍冬的3~4倍,采摘成本低,是忍冬的1/10^[21]。灰毡毛忍冬具有产量高、价格低的特点,是值得开发的抗肿瘤药材之一。

本实验过程考察以甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液更换流动相考察,同时对体积流量、柱温、梯度相关条件进行了考察,最终确定的色谱条件分离度较好,基线较平稳,适合灰毡毛忍冬中成分的测定。同时在正/负离子模式下进行考察,其分子离子吸收效果以正离子更好。

EGFR 激酶具有很好的市场前景。本实验通过简便、快速、稳定的 EGFR 激酶抑制剂高通量筛选模型得到了灰毡毛忍冬乙酸乙酯提取部位及对其进行 UPLC-Q-TOF/MS 分析,为进一步研究治疗恶性肿瘤临床新药提供依据。

参考文献

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia: Part 1* (中华人民共和国药典:一部)[M]. Beijing:China Medical Science Press,2010;28.
- [2] Chen Y,Zhao XZ,Jia XD,*et al.* Progress in study of chemical consti-anti-tumor activities of *Lonicera macranthoides* Hand-Mazz [C]. *Teig Nation Nat Med Res Acad Sem* (全国第八届天然药物资源学术研讨会论文集). Nanjing;2008.
- [3] Li SY,Zheng X,Liao DF. Advances in the study of Flos *Lonicerae Confusae*[J]. *J Univ South China(Med Edit)* [南华大学学报(医学版)],2009,37(6):744-746.
- [4] Chen J,Xu XF,Cai XY,*et al.* Chemical constituents in the buds of *Lonicera macranthoides* [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物),2006,5(4):347-351.
- [5] Chen Y,Feng X,Wang M,*et al.* Triterpene glycosides from *Lonicera Li* isolation and structural determination of glycosides from flower buds of *Lonicera macranthoides* [J]. *Chem Nat Compd*,2009,45(4):514-518.
- [6] Zhang XN,Tang Q,Hou M,*et al.* Comparison of the pharmacological effects between *L. macranthoides* Hand.-Mazz and *Lonicera japonica* Thunb[J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报),2012,28(11):1582-1585.
- [7] Zeng S. Research progresses of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors[J]. *Mod Med Health* (现代医药卫生),2010,26(20):3103-3105.
- [8] Zhuang HQ,Yuan ZY,Wang J,*et al.* Research progress on criteria for discontinuation of EGFR inhibitor therapy [J]. *A Peer-Rev B Sci*,2012,12(5):263-270.
- [9] Zhang XY,Xu LY,Wang H. The relationship between EGFR mutations and response and prognosis of tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer[J]. *Chin J Lung Cancer* (中国肺癌杂志),2008,11(2):206-213.
- [10] Zhang SJ. Antioxidant activity constituents of stems and leaves of *Lonicera japonica* Thunb(忍冬茎叶抗氧化活性成分研究)[D]. Xianyang: Chinese North West Agriculture Forestry University,2012.
- [11] Lu XL,Qiao Y,Zhang XM,*et al.* Chemical constituents from *Ceratophyllum demersum* [J]. *Acta Bot Yunnanica* (云南植物研究),2007,29(2):26-31.
- [12] Zhu XF,Zhang HX,Raymond L. Phenolic compounds from the leaf extract of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities[J]. *J Agric Food Chem* 2004,52(24):7272-7278.
- [13] Romani C,Galardi P,Pinelli,*et al.* Inhibition of tumor growth by quercetin with increase of survival and prevention of cachexia in Walker 256 rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2002,56(7/8):469-474.
- [14] Normanno N,Maiello MR,De LA. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands;a novel approach to cancer treatment[J]. *J Cell Phy*,2003,194(1):13-19.
- [15] Camila AC,Maria EF,Rodrigo A.*et al.* Inhibition of tumor growth by quercetin with increase of survival and prevention of cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2011,406(4):638-642.
- [16] Wang L,Wang B,Lia H,*et al.* Role of quercetin in vascular physiology[J]. *Int J Pharm*,2012,690(1/2/3):133-141.
- [17] Yuki S,Shirou I,Toshimitsu K,*et al.* *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid [J]. *Int J Pharm*,2011,403(1/2):136-138.
- [18] Chai DW. Screening of the natural anti-tumor substances in fruits of *Lonicera maackii* (Rupr.) (金银忍冬果实抗肿瘤物质的筛选)[D]. Lanzhou:Chinese Lanzhou University,2010.
- [19] Ma MF,Chen J,Shi Y,*et al.* Pharmacological activities of bflavonoids from *Fokienia* [J]. *Tibet Sci Technol* (西藏科技),2012,231(6):65-66.
- [20] Huang J,Yang GY,Li HJ,*et al.* Progress in mechanism studies of antioxidants[J]. *Chin Nature* (自然杂志),2004,26(2):74-78.
- [21] Wang Y,Xiao CY,Tian L,*et al.* Emerging varieties of Flos *Lonicerae*——*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz [C]. Luo-yang:Ten Nat Chin Med Nat l med Acad Sem(十届全国中药和天然药物学术研讨会),2009.