·论 文·

能释放超氧阴离子的 β-半乳糖苷前药的设计、合成及抗肿瘤活性

刘珈璇[1], 姚雪妍[1], 谭云鹰[1], 胡 静[2], 傅俊杰[1*], 尹 健[1,3**]

([1] 江南大学生物工程学院糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122; [2] 江南大学无锡医学院, 无锡 214122; [3] 江南大学生命科学与健康工程学院, 无锡 214122)

摘 要 以能在细胞内循环释放超氧阴离子（O_2^-）的蒽醌类化合物 HAQ-OH 和 AQ-OH 为原药，设计并合成了 4 个全新的蒽醌 β-半乳糖苷前药，期望利用 Warburg 效应和肿瘤细胞内过表达的 β-半乳糖苷酶选择性地在肿瘤细胞内释放 O_2^-杀死肿瘤细胞。细胞实验表明，前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 可选择性地抑制 β-半乳糖苷酶过表达的卵巢癌 OVCAR-3 细胞的增殖并诱导细胞凋亡。O_2^-荧光探针发现，Gal-HAQ 和 Gal-AQ 可时间依赖性地在 OVCAR-3 细胞内释放 O_2^-，并且 O_2^-对于其抗肿瘤活性至关重要。前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 还可有效清除高表达 β-半乳糖苷酶的衰老细胞，而不影响非衰老细胞，进一步证明了前药依赖 β-半乳糖苷酶发挥其细胞毒性。综上，本研究发现的能响应 β-半乳糖苷酶释放 O_2^-的前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 有望作为新型的抗肿瘤候选分子。

关键词 超氧阴离子；β-半乳糖苷前药；抗肿瘤药物

中图分类号 R914；R979.1 **文献标志码** A **文章编号** 1000−5048(2025)03−0295−10

doi: 10.11665/j.issn.1000−5048.2024041401

引用本文 刘珈璇，姚雪妍，谭云鹰，等. 能释放超氧阴离子的 β-半乳糖苷前药的设计、合成及抗肿瘤活性 [J]. 中国药科大学学报，2025，56(3)：295 − 304.

Cite this article as: LIU Jiaxuan, YAO Xueyan, TAN Yunying, *et al*. Design, synthesis and anticancer activity of superoxide anion-releasing beta-galactoside prodrugs[J]. *J China Pharm Univ*, 2025, 56(3): 295 − 304.

Design, synthesis and anticancer activity of superoxide anion-releasing beta-galactoside prodrugs

LIU Jiaxuan[1], YAO Xueyan[1], TAN Yunying[1], HU Jing[2], FU Junjie[1*], YIN Jian[1,3**]

[1]Ministry of Education Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122; [2]Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122; [3]School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract Four novel β-galactoside prodrugs were designed and synthesized from anthraquinones HAQ-OH and AQ-OH in an attempt to use the prodrugs to selectively release superoxide anion (O_2^-) in cancer cells and to achieve selected anticancer activity by utilizing the Warburg effect and the elevated level of β-galactosidase in certain cancer cells. Cellular assays showed that the prodrugs Gal-HAQ and Gal-AQ selectively inhibited the proliferation and induced apoptosis of ovarian cancer OVCAR-3 cells overexpressing β-galactosidase. Using O_2^- fluorescent probe, it was found that in OVCAR-3 cells Gal-HAQ and Gal-AQ could time-dependently release O_2^-, which was essential for their anticancer activity. Furthermore, it was found that Gal-HAQ and Gal-AQ were effective senolytics toward senescent cells overexpressing β-galactosidase without affecting the viability of

收稿日期 2024-04-14 **通信作者** *Tel: 0510-85197039 E-mail: jfu@jiangnan.edu.cn
**Tel: 0510-85328229 E-mail: jianyin@jiangnan.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金项目（No. 22325803）

corresponding non-senescent cells, further confirming the *β*-galactosidase-dependent cytotoxicity of the prodrugs. In conclusion, Gal-HAQ and Gal-AQ, which release O_2^- in response to *β*-galactosidase, are expected to serve as candidate prodrugs targeting cancer cells.

Key words superoxide anion; *β*-galactoside prodrugs; anticancer drugs

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 22325803)

超氧阴离子(O_2^-)是活性氧簇(ROS)的一种，在细胞呼吸和免疫系统中发挥重要作用，积累的O_2^-可以损伤细胞内的线粒体和 DNA，诱导细胞凋亡[1]。所以，选择性提高肿瘤细胞内的O_2^-含量可以抑制肿瘤细胞的生长和转移，是一种潜在的抗肿瘤策略。代表性的能生成O_2^-的结构有对苯二醌和邻苯二醌等[2]。Chakrapani 课题组报道了 5-羟基-1,2,3,4,4a,9a-六氢-1,4-亚乙基-9,10-蒽醌(HAQ-OH)，其 5 位酚羟基可与 10 位羰基形成分子内氢键，促进 HAQ-OH 互变为烯醇式，并进一步在氧化为 5-羟基-1,2,3,4-四氢-1,4-亚乙基-9,10-蒽醌(AQ-OH)的同时将 O_2 还原为 O_2^-[3]。

β-半乳糖苷酶的活性在卵巢癌等肿瘤细胞中显著升高[4]。因此，*β*-半乳糖苷前药可选择性地在肿瘤细胞内释放毒性药物。此外，肿瘤细胞由于 Warburg 效应过表达糖转运蛋白，进一步提高了 *β*-半乳糖苷前药的肿瘤细胞靶向性。本课题选择 HAQ-OH 和 AQ-OH 为母药，设计并合成了新型 *β*-半乳糖苷前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ(图 1)。前药半乳糖上的乙酰基经酯酶水解后响应 *β*-半乳糖苷酶释放酚中间体，经 1,6-消除释放原药 HAQ-OH 和 AQ-OH，两者经氧化还原循环生成 O_2^-。鉴于 1,6-消除连接臂苯环上的取代基对前药的稳定性和原药释放效率有显著影响[5]，还合成了两个连接臂苯环上带有硝基的前药 Gal-HAQ-NO_2 和 Gal-AQ-NO_2，以进一步研究其构效关系。

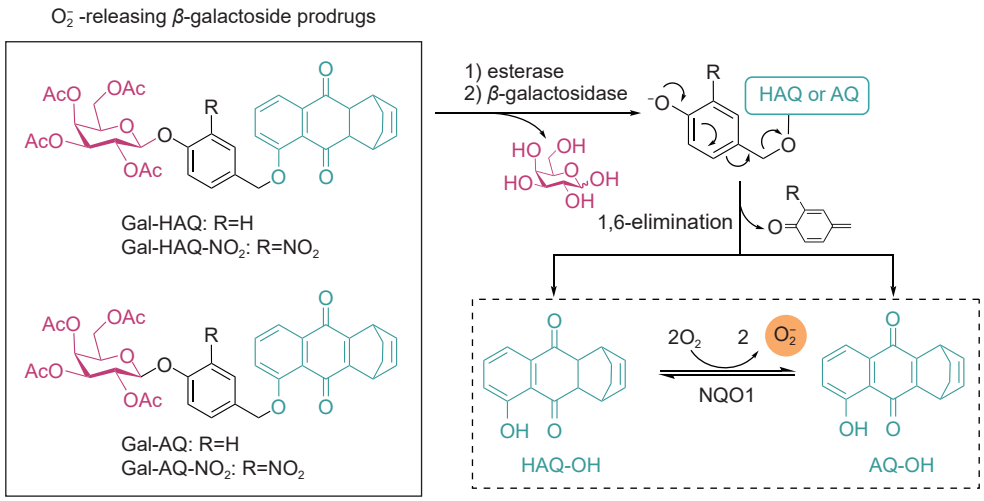


Figure 1 Design of O_2^--releasing *β*-galactoside prodrugs of 5-hydroxy-1,2,3,4,4a,9a-hexahydro-1,4-acetyl-9,10-anthraquinone (HAQ-OH) and 5-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-1,4-ethylidene-9,10-anthraquinone (AQ-OH)

1 材 料

1.1 试 剂

本研究所用化学品及试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

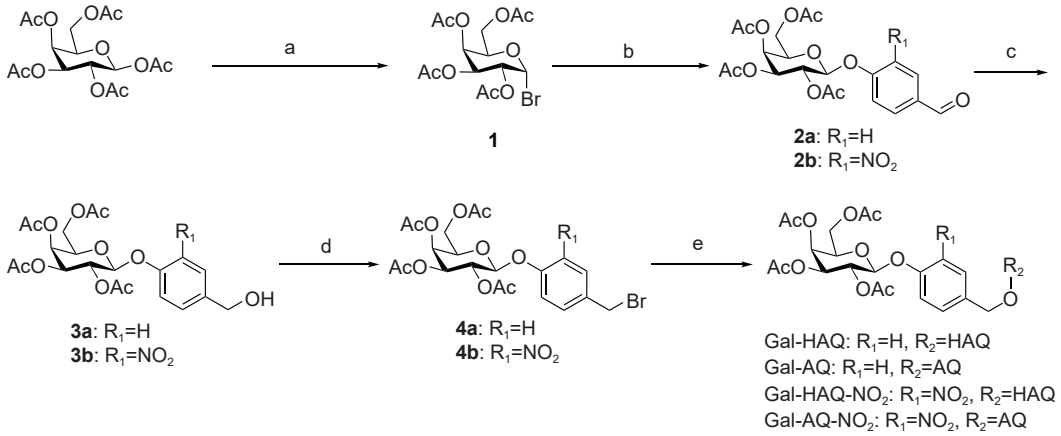
Avance Ⅲ 400 MHz 核磁共振仪、Avance Ⅲ 600 MHz 核磁共振仪(德国布鲁克公司)；TSQ Quantum Ultra EMR 质谱仪、BioTek Epoch2 酶标仪(美国赛默飞世尔公司)；1260 Infinity 高效液相色谱(美国安捷伦科技公司)；BD Accuri C6 Plus 流式细胞仪(美国 BD 公司)；Axio Imager Z2 荧光显微镜(德国卡尔蔡司公司)。

1.3 细 胞

人卵巢癌细胞 OVCAR-3、人肺癌细胞 A-549、人胚胎肾细胞 HEK-293、人肝正常细胞 L-02 均由江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室提供。

2　合成部分

如路线 1 所示, 以 1,2,3,4,6-五-*O*-乙酰基-*β*-D-半乳糖为原料, 其端基位乙酰基在氢溴酸和乙酸条件下溴代得到溴糖 **1**。溴糖 **1** 在氢氧化钠条件下与 4-羟基苯甲醛或 3-硝基-4-羟基苯甲醛发生糖基化反应分别得到糖苷 **2a** 和 **2b**。用硼氢化钠还原化合物 **2a** 和 **2b** 的醛基得到苄醇 **3a** 和 **3b**[6], 并进一步用三溴化磷溴代其苄位羟基得到化合物 **4a** 和 **4b**。最后, 化合物 **4a** 和 **4b** 在氧化银催化下分别与 HAQ-OH 和 AQ-OH 发生取代反应得到前药 Gal-HAQ、Gal-AQ、Gal-HAQ-NO_2 和 Gal-AQ-NO_2。HAQ-OH 和 AQ-OH 按文献报道的方法合成[3]。中间体 **1**、**2a** ~ **2b**、**3a** ~ **3b** 和 **4a** ~ **4b** 的表征数据见补充材料。



Scheme 1　Synthetic route of target prodrugs Gal-HAQ, Gal-AQ, Gal-HAQ-NO_2, and Gal-AQ-NO_2
Reagents and conditions: (a) CH_2Cl_2, HBr, CH_3COOH, r.t.; (b) CH_2Cl_2, H_2O, NaOH, 4-hydroxybenzaldehyde or 3-nitro-4-hydroxybenzaldehyde, r.t.; (c) THF, $NaBH_4$, r.t.; (d) CH_2Cl_2, PBr_3, r.t.; (e) CH_2Cl_2, Ag_2O, HAQ-OH or AQ-OH, r.t..

2.1　中间体 **4a** ~ **4b** 的合成

将中间体 **3**(2 mmol, 1 eq.)溶于干燥二氯甲烷(8 mL)中, 在 0 ℃ 下逐滴加入三溴化磷(95.4 μL, 1 mmol), 搅拌 30 min 后恢复至室温后继续反应 2 h。用饱和碳酸氢钠溶液猝灭反应, 后用二氯甲烷稀释。分离有机相用饱和氯化钠洗涤。收集有机相经无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得到粗品。不经纯化直接用于下一步。

2.2　*β*-半乳糖苷前药的合成

在氩气保护下, 将中间体 **4**(0.2 mmol, 1 eq.)和化合物 AQ-OH 或 HAQ-OH(0.3 mmol, 1.5 eq.)溶于无水二氯甲烷(5 mL), 加入氧化银(139.0 mg, 0.6 mmol), 于室温下反应 12~24 h。反应液经硅藻土过滤, 减压浓缩后得到粗品。粗品经硅胶柱初纯化(乙酸乙酯-石油醚, 1∶2), 后经制备液相纯化得到目标前药。

前药 Gal-HAQ-NO_2　淡黄色固体(61.8 mg, 12.1%): mp 220.8 ~ 221.8 ℃。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) *δ*: 7.95 ~ 7.97 (1H, t, *J* = 1.9 Hz, Ar-H), 7.83 ~ 7.88 (1H, dt, *J* = 8.8, 2.7 Hz, Ar-H), 7.61 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, Ar-H), 7.60 (1H, s, Ar-H), 7.46 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 7.20 ~ 7.24 (1H, dd, *J* = 5.8, 3.6 Hz, Ar-H), 6.13 ~ 6.24 (2H, m, AQ-2 和 AQ-3), 5.55 ~ 5.61 (1H, dd, *J* = 10.5, 7.9 Hz, Gal-2), 5.48 ~ 5.52 (1H, dd, *J* = 3.4, 1.2 Hz, Gal-4), 5.19 (2H, d, *J* = 2.5 Hz, CH_2), 5.11 ~ 5.16 (1H, dd, *J* = 10.5, 3.4 Hz, Gal-3), 5.11 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, Gal-1), 4.26 ~ 4.32 (1H, dd, *J* = 11.3, 6.9 Hz, Gal-6), 4.17 ~ 4.23 (1H, dd, *J* = 11.3, 6.2 Hz, Gal-6), 4.07 ~ 4.13 (1H, t, *J* = 6.5 Hz, Gal-5), 3.35 (2H, d, *J* = 6.0 Hz, AQ-1 和 AQ-4), 3.25 (2H, d, *J* = 1.5 Hz, AQ-4a 和 AQ-9a), 2.22, 2.16, 2.12, 2.04 (12H, 4s, $OCOCH_3$), 1.71 ~ 1.78 (2H, m, AQ-CH_2), 1.39 ~ 1.45 (2H, m, AQ-CH_2)。^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 197.93, 196.16, 170.49, 170.33, 170.28, 169.55, 156.80, 149.08, 138.87, 134.47, 134.24, 133.73, 132.61, 132.48, 126.46, 123.67, 123.65, 120.28, 119.84, 118.75, 100.97, 71.60, 70.71, 69.55, 67.98, 66.85, 61.45, 34.45, 34.39, 33.80, 33.74, 29.85, 24.78, 24.74, 20.83, 20.81, 20.72。MS *m/z* Calcd. for $C_{37}H_{37}NO_{15}$ $(M+Na)^+$ 758.6, Found 758.3。

前药 Gal-AQ-NO_2　黄色固体(69.9 mg, 17.7%): mp 232.0 ~ 232.6 ℃。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600

MHz) δ: 8.05 (1H, d, J=2.3 Hz, Ar-H), 7.92~7.97 (1H, dt, J = 8.8, 2.8 Hz, Ar-H), 7.81 (1H, d, J = 7.6 Hz, Ar-H), 7.60 ~ 7.66 (1H, t, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.47 (1H, d, J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.27 (1H, d, J = 8.6 Hz, Ar-H), 6.38 ~ 6.46 (2H, dt, AQ-2 和 AQ-3), 5.53 ~ 5.60 (1H, dd, J = 10.5, 7.9 Hz, Gal-2), 5.48 (1H, d, J = 3.4 Hz, Gal-4), 5.17 ~ 5.26 (2H, t, J = 2.4 Hz, CH_2), 5.09 ~ 5.14 (1H, dd, J = 10.6, 3.3 Hz, Gal-3), 5.09 (1H, d, J = 8.1 Hz, Gal-1), 4.52 ~ 4.57 (1H, m, AQ-1), 4.46 ~ 4.51 (1H, m, AQ-4), 4.24 ~ 4.31 (1H, dd, J = 11.3, 6.9 Hz, Gal-6), 4.15 ~ 4.21 (1H, dd, J = 11.4, 6.2 Hz, Gal-6), 4.05 ~ 4.11 (1H, t, J = 6.6 Hz, Gal-5), 2.20, 2.15, 2.11, 2.02 (12H, 4s, $OCOCH_3$), 1.49 ~ 1.55 (2H, m, AQ-CH_2), 1.36 ~ 1.43 (2H, m, AQ-CH_2)。^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ: 181.23, 181.00, 170.49, 170.33, 170.27, 169.56, 158.03, 152.40, 149.05, 148.47, 141.44, 135.11, 134.62, 134.09, 134.00, 132.69, 132.35, 123.62, 120.84, 120.38, 120.34, 119.45, 101.02, 71.60, 70.73, 69.50, 68.00, 66.86, 61.46, 34.44, 34.04, 24.86, 24.84, 20.84, 20.81, 20.80, 20.72。MS *m/z* Calcd. for $C_{37}H_{35}NO_{15}$ $(M+Na)^+$ 756.6, Found 756.3。

前药 Gal-HAQ　黄色固体（70.9 mg, 21.4%）: mp 198.2 ~ 198.9 ℃。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ: 7.51 ~ 7.58 (2H, m, 2Ar-H), 7.49 (2H, d, J = 8.6 Hz, 2Ar-H), 7.20 ~ 7.24 (1H, dd, J = 7.1, 2.3 Hz, Ar-H), 7.06 (2H, d, J = 8.7 Hz, 2Ar-H), 6.12 ~ 6.23 (2H, m, AQ-2 和 AQ-3), 5.46 ~ 5.54 (2H, dd, m, Gal-2 和 Gal-4), 5.17 (2H, d, J = 3.5 Hz, CH_2), 5.10 ~ 5.15 (1H, dd, J = 10.5, 3.4 Hz, Gal-3), 5.07 (1H, d, J = 7.9 Hz, Gal-1), 4.22 ~ 4.28 (1H, dd, J = 11.3, 6.9 Hz, Gal-6), 4.15 ~ 4.21 (1H, dd, J = 11.3, 6.4 Hz, Gal-6), 4.05 ~ 4.10 (1H, td, J = 6.6, 1.2 Hz, Gal-5), 3.34 (2H, d, J = 3.3 Hz, AQ-1 和 AQ-4), 3.24 (2H, t, J = 1.2 Hz, AQ-1a 和 AQ-4a), 2.21, 2.09, 2.09, 2.04 (12H, 4s, $OCOCH_3$), 1.69 ~ 1.76 (2H, m, AQ-CH_2), 1.38 ~ 1.44 (2H, m, AQ-CH_2)。^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ: 198.11, 196.14, 170.52, 170.39, 170.28, 169.54, 157.32, 156.81, 138.74, 134.28(2C), 133.61, 131.28, 128.60, 126.40, 119.13, 118.82, 117.27, 99.84, 71.16, 70.96, 70.68, 68.74, 66.97, 61.44, 52.20, 51.10, 34.33, 34.30, 33.62, 33.60, 24.77, 24.71, 20.89, 20.82(2C), 20.74。MS *m/z* Calcd. for $C_{37}H_{38}O_{13}$ $(M+Na)^+$ 713.6, Found 713.3。

前药 Gal-AQ　黄色固体（67.8 mg, 14.3%）: mp 207.4 ~ 208.0 ℃。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ: 7.74 ~ 7.77 (1H, dd, Ar-H), 7.58 (1H, t, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.54 (2H, d, J = 8.6 Hz, 2Ar-H), 7.26 ~ 7.29 (1H, dd, J = 9.1, 1.5 Hz, Ar-H), 7.06 (2H, d, J = 8.6 Hz, 2Ar-H), 6.38 ~ 6.45 (2H, m, AQ-2 和 AQ-3), 5.47 ~ 5.52 (1H, dd, J = 10.5, 8.0 Hz, Gal-2), 5.45 ~ 5.47 (1H, dd, J = 3.9, 1.1 Hz, Gal-4), 5.20 (2H, d, J = 3.1 Hz, CH_2), 5.09 ~ 5.13 (1H, dd, J = 10.4, 3.4 Hz, Gal-3), 5.05 (1H, d, J = 8.0 Hz, Gal-1), 4.52 ~ 4.56 (1H, dt, J = 5.5, 2.1 Hz, AQ-1), 4.45 ~ 4.50 (1H, dt, J = 4.2, 2.1 Hz, AQ-4), 4.20 ~ 4.26 (1H, dd, J = 11.3, 6.9 Hz, Gal-6), 4.14 ~ 4.19 (1H, dd, J = 11.3, 6.4 Hz, Gal-6), 4.04 ~ 4.09 (1H, td, J = 6.6, 1.2 Hz, Gal-5), 2.19, 2.08, 2.07, 2.02 (12H, 4s, $OCOCH_3$), 1.47 ~ 1.54 (2H, m, AQ-CH_2), 1.36 ~ 1.42 (2H, m, AQ-CH_2)。^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ: 181.31, 181.01, 170.41, 170.28, 170.17, 169.44, 158.53, 156.72, 152.30, 148.13, 134.88, 134.32, 133.97, 133.88, 131.19, 128.45(2C), 120.49, 119.63, 119.38, 117.21(2C), 99.77, 71.05, 70.86, 70.52, 68.63, 66.87, 61.34, 34.31, 33.86, 29.71, 24.74, 20.78, 20.71(2C), 20.63。MS *m/z* Calcd. for $C_{37}H_{36}O_{13}$ $(M+Na)^+$ 711.6, Found 711.3。

2.3 制备液相条件

Eclipse XDB-C_{18} 高效液相色谱柱（9.4 mm × 250 mm, 5 μm）。流动相：水-乙腈，流速 0.5 mL/min。流动相洗脱梯度：0~5 min, 10%→70% 乙腈；5~15 min, 70%→90% 乙腈；15~20 min, 90%→10% 乙腈。前药 Gal-AQ-NO_2 和 Gal-AQ 通过上述制备液相条件得到，且纯度均大于 99%。

3 药理活性

3.1 前药的细胞毒性测试

以原药 HAQ-OH 和 AQ-OH 为阳性对照，采用 MTT 比色法[7] 测试前药对 OVCAR-3、HEK-293 和 L-02 细胞的增殖抑制活性。OVCAR-3 为过表达 β-半乳糖苷酶的卵巢癌细胞，HEK-293 和 L-02 细胞均为 β-半乳糖苷酶含量较低的非肿瘤细胞[8]。如表 1 所示，与细胞孵育 48 h 后，前药 Gal-HAQ 和

Gal-AQ 则选择性地抑制了 OVCAR-3 细胞的增殖, 两者对 OVCAR-3 细胞的 IC_{50} 分别为 23.8 和 105.6 μmol/L 与原药 HAQ-OH 和 AQ-OH 接近(22.0, 37.7 μmol/L)。然而, Gal-HAQ 和 Gal-AQ 对非肿瘤细胞 HEK-293 和 L-02 的毒性明显下降, 其 IC_{50} 均大于 800 μmol/L, 而两个原药对这两种正常细胞的 IC_{50} 仍然在 10 ~ 30 μmol/L。以上结果充分证明, Gal-HAQ 和 Gal-AQ 依赖 β-半乳糖苷酶发挥细胞毒性。然而, 另两个前药 Gal-AQ-NO_2 和 Gal-HAQ-NO_2 却没有展现出明显的肿瘤细胞选择性, 其对正常细胞也有相似的毒性。据此推测, 这两个前药在没有 β-半乳糖苷酶时也会释放出部分原药。

Table 1 Cytotoxicity of indicated compounds in OVCAR-3, HEK-293, and L-02 cells as measured by MTT assay ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Compd.	IC_{50}/(μmol/L)		
	OVCAR-3	HEK-293	L-02
HAQ-OH	22.0 ± 0.9	18.0 ± 1.1	9.5 ± 1.9
AQ-OH	37.7 ± 1.3	22.1 ± 0.5	17.9 ± 3.4
Gal-HAQ	23.8 ± 1.1	>800	>800
Gal-AQ	105.6 ± 1.5	>800	>800
Gal-HAQ-NO_2	116.1 ± 2.3	125.5 ± 1.1	130.8 ± 2.1
Gal-AQ-NO_2	175.6 ± 2.7	271.4 ± 3.1	159.8 ± 2.4

3.2　前药稳定性测试

为了验证上述假设, 以原药 HAQ-OH 和 AQ-OH 为参考, 通过 HPLC 检测 4 个前药在 PBS(pH 7.4, 100 mmol/L)中的稳定性。将 4 个前药在 PBS 中 37 ℃ 条件下孵育 48 h, 取反应液 50 μL 加入甲醇 50 μL 溶解, 离心后取上清液进 HPLC 检测。

HPLC 条件与方法: Eclipse XDB-C_{18} 高效液相色谱柱(4.6 mm× 250 mm, 5 μm)。流动相: 水-乙腈, 流速 0.5 mL/min。流动相洗脱梯度: 0~1 min, 10% 乙腈; 1~4 min, 10%→70% 乙腈; 4~9 min, 70%→90% 乙腈; 9~10 min, 90%→10% 乙腈。

结果发现, 前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 溶于 PBS 中 48 h 后未见任何降解, 而前药 Gal-HAQ-NO_2 和 Gal-AQ-NO_2 在 PBS 中经 48 h 后分别释放出约 8.4% 和 10.1% 的原药 HAQ-OH 和 AQ-OH(图 2)。因此, 选择在没有 β-半乳糖苷酶时更稳定的 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 为后续研究对象。

3.3　前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 的细胞内代谢行为

按照设计思想, 前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 在细胞内先经酯酶水解半乳糖上的乙酰基后, 转化为

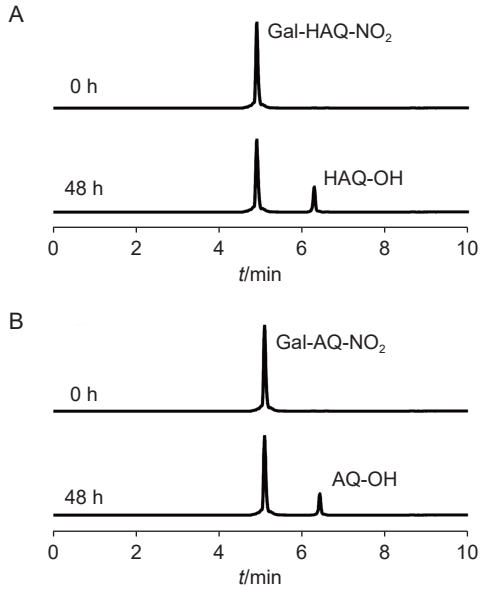


Figure 2　Stability of prodrugs in PBS as analyzed by HPLC
A:Stability of Gal-HAQ-NO_2 in PBS; B:Stability of Gal-AQ-NO_2 in PBS

Gal-HAQ'和 Gal-AQ', 然后再被 β-半乳糖苷酶水解释放母药。首先, 为了检测前药在细胞内是否生成脱乙酰基的代谢中间体, 选择 β-半乳糖苷酶含量较低的人肺癌细胞 A-549, 以防止 Gal-HAQ'和 Gal-AQ'进一步被 β-半乳糖苷酶水解。两个前药与 A-549 细胞孵育 24 h 后通过甲醇裂解细胞, 随后通过质谱检测细胞破碎提取物。结果发现, 在细胞提取液中均检测到了前药脱乙酰基产物 Gal-HAQ'和 Gal-AQ'(图 3), 这在一定程度上证明了前药在细胞内首先代谢为脱乙酰基产物。

为了进一步分析前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 能否在 β-半乳糖苷酶过表达的 OVCAR-3 细胞中释放出原药。将 OVCAR-3 细胞加入 50 μmol/L 浓度前药的新鲜培养基, 继续孵育 24 或 48 h。使用上述同样方法破碎细胞, 将破碎后的细胞离心, 收集上清液后冻干, 随后用甲醇 20 μL 溶解通过 HPLC 检测其中的组分。HPLC 条件和方法同"3.2"项。结果表明, 两个前药与 OVCAR-3 细胞孵育 24 h 后, 细胞内均能检测到原药释放。因为释放的两个原药在细胞内可以通过氧化还原循环互相转化, 因此于不同前药孵育的细胞内均可同时检测到 HAQ-OH 和 AQ-OH(图 4)。孵育 48 h 后, 前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 完全代谢为原药。

3.4　细胞内 O_2^- 生成检测

当前药在细胞内释放原药后, 原药会继续在细

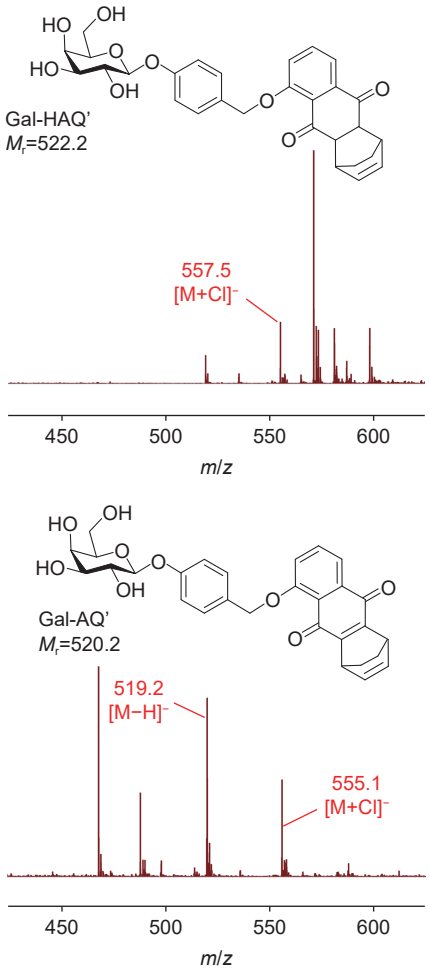


Figure 3 Deacetylation of prodrugs Gal-HAQ' (A)and Gal-AQ' (B) in A-549 cells as evidenced by mass spectrometry

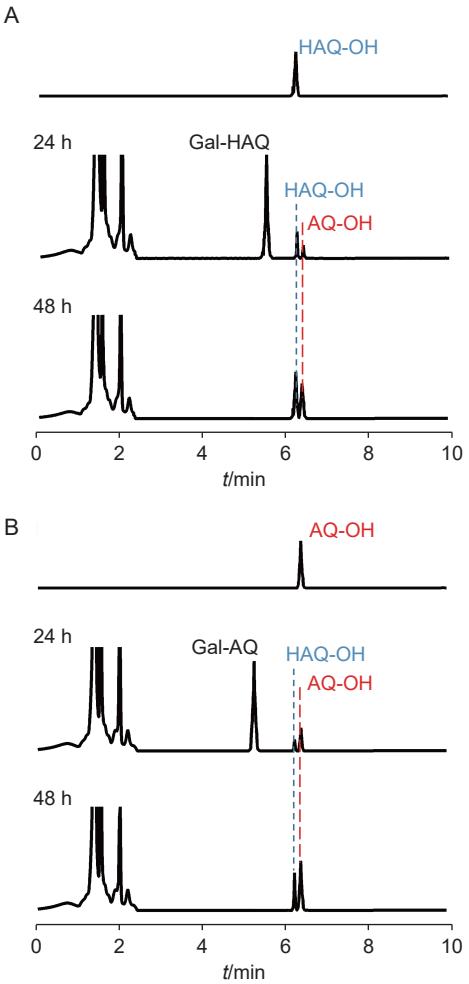


Figure 4 Release of HAQ-OH (A) and AQ-OH (B) from prodrugs in OVCAR-3 cells as evidenced by HPLC

胞内生成 O_2^-从而达到杀死细胞的目的。为了检验前药在细胞内生成 O_2^-的能力，使用 O_2^-探针：二氢乙锭(DHE)，它可以与 O_2^-特异反应生成荧光产物 2-羟基乙啶(2-OH-E^+)(E_x = 480 nm, E_m = 580 nm)(图 5-A)[9]。因此，选择 DHE 为 O_2^-探针，利用 HPLC(串联荧光检测器 FLD)检测前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 在 OVCAR-3 和 HEK-293 中生成 O_2^-的能力。其中培养基内 DHE 浓度为 20 μmol/L，受试化合物浓度为 100 μmol/L。HPLC 图谱上的 2-OH-E^+信号峰(出峰时间 12 min 左右)和 E^+信号峰(出峰时间 14.5 min 左右)分别代表 O_2^-和其他 ROS 的生成。如图 5-B 所示，原药 HAQ-OH 和 AQ-OH 与 OVCAR-3 或 HEK-293 细胞孵育 12 h 后，HPLC 图谱上都可明显看到代表 O_2^-生成的 2-OH-E^+信号峰。前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 与过表达 β-半乳糖苷酶的 OVCAR-3 细胞孵育 12 h 后，也可检测到 O_2^-的生成，但是在正常细胞 HEK-293 中则未检测到 O_2^-的生成。该结果进一步证明前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 可经 β-半乳糖苷酶激活转化为对应的蒽醌原药，并进一步释放 O_2^-。本研究进一步检测了前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 与 OVCAR-3 细胞孵育不同时间后(6~24 h)释放 O_2^-的情况。如图 5-C 所示，Gal-HAQ 和 Gal-AQ 在 OVCAR-3 细胞内的 O_2^-释放均呈现明显的时间依赖性。

3.5 O_2^-清除剂对前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 影响

为了进一步证明 O_2^-对于前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 的细胞毒性是至关重要的，本研究在 OVCAR-3 细胞与药物孵育过程中同时加入 O_2^-清除剂 TEMPOL(50 μmol/L)处理[10]，分析其对前药细胞毒性影响。如图 6 所示，与未加 TEMPOL 组比较，加入 TEMPOL 后，前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 对细胞的毒性均显著下降($P < 0.001$)。计算发现，未加 TEMPOL 时 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 的 IC_{50} 分别为 99.4 和 21.7 μmol/L，而加入 TEMPOL 后 IC_{50} 均

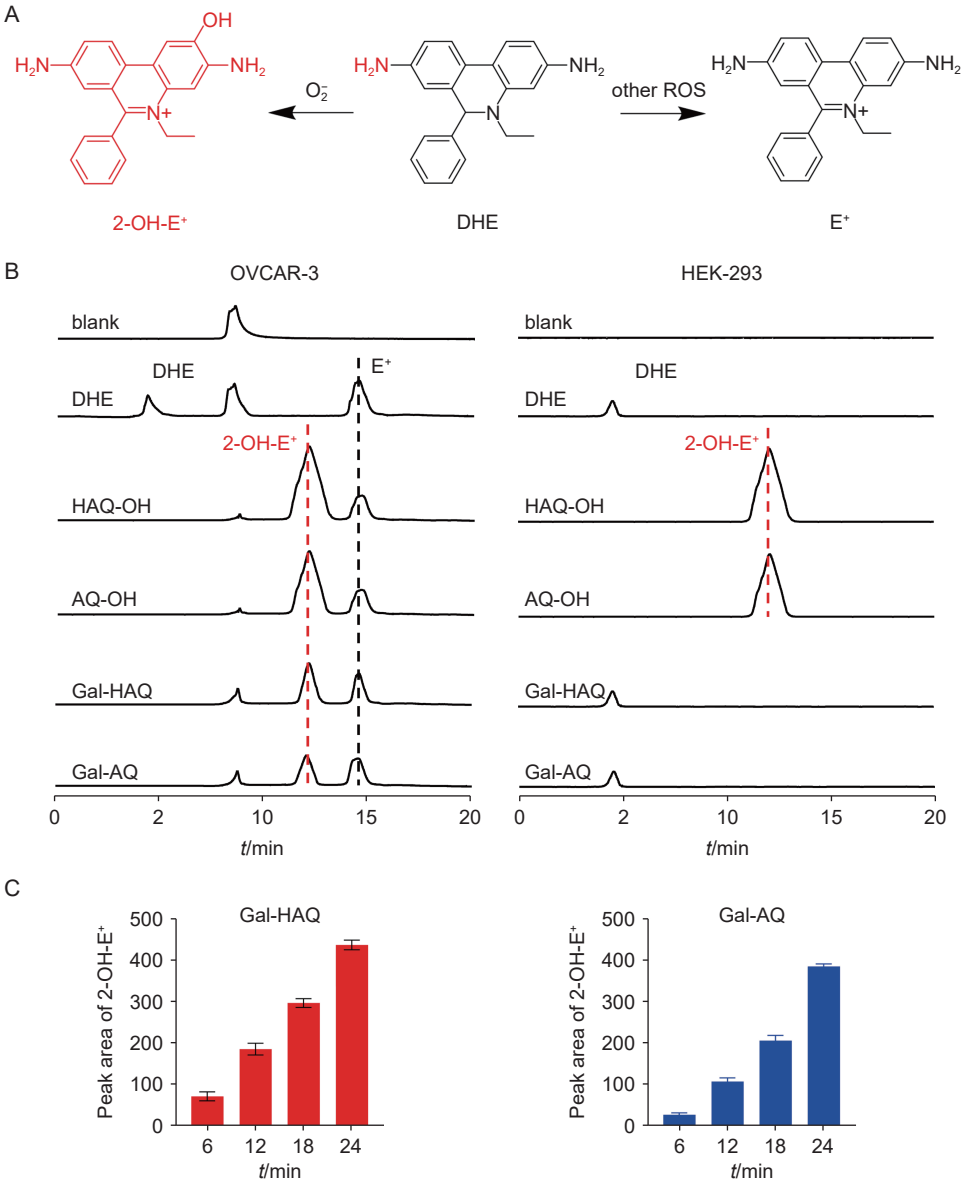


Figure 5　Determination of intracellular O_2^-generation by dihydroethidium (DHE) probe
A: Principle of O_2^- detection by DHE; B: Generation of O_2^- by HAQ-OH, AQ-OH, Gal-HAQ and Gal-AQ in OVCAR-3 or HEK-293 cells after 12 h;C: Generation of O_2^- by Gal-HAQ and Gal-AQ in OVCAR-3 cells at different time ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

大于 800 μmol/L。以上结果说明, Gal-HAQ 和 Gal-AQ 通过 O_2^-发挥抗肿瘤活性。

3.6　GLUT1 抑制剂对前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 影响

为了探究 GLUT1 对糖类前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 细胞毒性的贡献, 采用 GLUT1 抑制剂根皮苷(phlorizin, 1 mmol/L)预处理[11]OVCAR-3 细胞, 验证其对前药 IC_{50} 的影响。如表 2 所示, 与未经根皮苷处理的对照组相比, 根皮苷预处理组中前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 的 IC_{50} 分别提高了 3.63 倍和 1.59 倍, 而原药 HAQ-OH 和 AQ-OH 的 IC_{50} 则基本不受根皮苷的影响。这些结果表明, 糖类前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 的细胞摄取部分依赖于 GLUT1 的转运, 因此有可能通过 Warburg 效应更好地靶向过表达 GLUT1 的肿瘤细胞。

3.7　前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 选择性诱导肿瘤细胞凋亡

诱导肿瘤细胞凋亡是 O_2^-发挥抗肿瘤作用的经典机制, 本研究检测了前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 选择性诱导肿瘤细胞凋亡的能力。通过前药对 OVCAR-3 细胞的活死染色实验[12] 可以看出, 当前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 浓度达到 20 μmol/L 时, 死细胞(红色荧光)与活细胞(绿色荧光)的比例

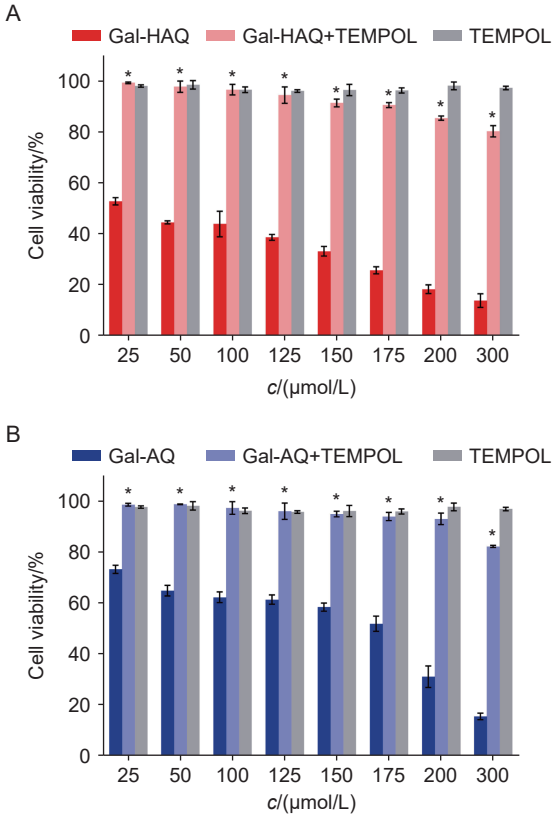


Figure 6 Effect of 2,2,6,6-tetramethylpiperidoxyl (TEMPOL) (50 μmol/L) on cytotoxicity of prodrugs in OVCAR-3 cells as analyzed by MTT assay ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
A: Effect of TEMPOL on cytotoxicity of Gal-HAQ in OVCAR-3($^*P < 0.001$ *vs* Gal-HAQ); B:Effect of TEMPOL on cytotoxicity of Gal-AQ in OVCAR-3($^*P < 0.001$ *vs* Gal-AQ)

Table 2 Effects of glucose transporter-1 (GLUT1) inhibitor phlorizin (1 mmol/L) on the cytotoxicity of indicated compounds in OVCAR-3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Compd.	IC_{50}/(μmol/L)	
	Without phlorizin	Phlorizin pretreatment
HAQ-OH	23.2 ± 0.5	25.3 ± 1.2
AQ-OH	19.5 ± 0.8	24.8 ± 1.0
Gal-HAQ	23.9 ± 1.4	86.7 ± 2.1*
Gal-AQ	105.6 ± 2.0	168.9 ± 2.6*

*$P < 0.001$ *vs* without phlorizin

已明显开始上升(图 7-A),所以本研究选择 20 μmol/L 作为凋亡检测[7]的浓度。结果表明(图 7-B),在 β-半乳糖苷酶过表达的 OVCAR-3 中,与空白组的凋亡率(12.3%)相比,20 μmol/L 的 HAQ-OH、AQ-OH、Gal-HAQ 和 Gal-AQ 处理过的细胞的凋亡率分别增长至 70.4%、67.4%、67.1% 和 44.1%。如果在药物与 OVCAR-3 孵育过程中加入 O_2^-清除剂 TEMPOL, HAQ-OH、AQ-OH、Gal-HAQ 和 Gal-AQ 组的凋亡率又分别降为 19.9%、9.9%、19.5% 和 12.8%。这证明了 O_2^-在诱导细胞凋亡中的重要作用。在 β-半乳糖苷酶含量较少的 A-549 和 HEK-293 中,前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 没有表现出明显的诱导细胞凋亡的能力(<10%),这进一步证明了前药通过响应 β-半乳糖苷酶释放 O_2^-诱导卵巢癌 OVCAR-3 细胞的凋亡。

3.8 利用衰老细胞进一步证明前药依赖 β-半乳糖苷酶发挥细胞毒性

近年来,基于衰老细胞 β-半乳糖苷酶活性升高,利用 β-半乳糖苷前药清除衰老细胞成为又一热点[13]。本研究进一步考察了经 β-半乳糖苷酶活化的前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 是否可以用于衰老细胞的清除。正常细胞 L-02 的 β-半乳糖苷酶活性较低,A-549 虽然是肿瘤细胞但 β-半乳糖苷酶活性也较低[8],而对应的衰老细胞株 A-549/Dox 和 L-02/Rep 的 β-半乳糖苷酶活性显著升高[14]。通过细胞毒性测试考察前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 对这些细胞株的毒性。

如图 8-A 所示,前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 对非衰老细胞 A-549 和 L-02 无明显的细胞毒性,但是可浓度依赖性地抑制衰老细胞 A-549/Dox 和 L-02/Rep 的增殖。前药 Gal-HAQ 在非衰老细胞 A-549 和 L-02 中,其 IC_{50} 均大于 700 μmol/L,而在衰老细胞 A-549/Dox 和 L-02/Rep 中的 IC_{50} 分别为 91.0 和 89.2 μmol/L。同样,前药 Gal-AQ 在非衰老细胞 A-549 和 L-02 中,其 IC_{50} 均大于 900 μmol/L,而在衰老细胞 A-549/Dox 和 L-02/Rep 中的 IC_{50} 分别为 112.5 和 165.0 μmol/L。结晶紫染色[15]进一步证实,经两个前药处理后,衰老细胞数量显著下降,而非衰老细胞数量无明显变化(图 8-B)。

以上结果进一步证明了 β-半乳糖苷酶对前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 活性的重要性,也提示这两个前药除了可以选择性抑制高 β-半乳糖苷酶含量的肿瘤细胞外,还可用于衰老细胞清除。

4 结 论

提升肿瘤细胞内 O_2^-含量是抗肿瘤的有效策略。本研究以能生成 O_2^-的蒽醌类化合物 HAQ-OH 和 AQ-OH 为原药,设计并合成了 4 个 β-半乳糖苷酶响应的 β-半乳糖苷前药。研究证

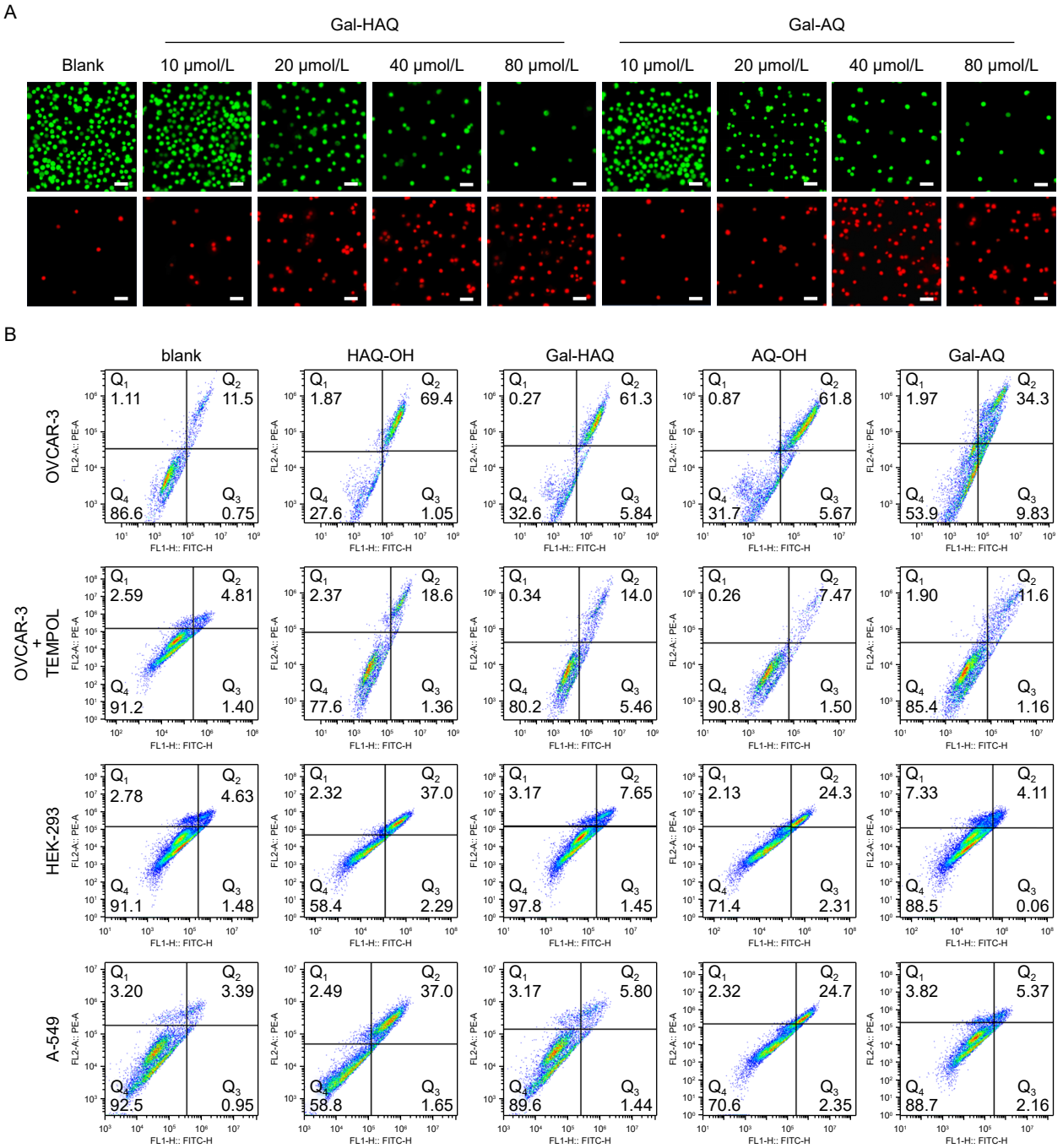


Figure 7　Death- and apoptosis-inducing effects of Gal-HAQ and Gal-AQ

A: Cell live/death staining of Gal-HAQ and Gal-AQ in OVCAR-3 cells (scale bar: 50 μmol/L); B: Annexin V-FITC/PI staining of apoptosis cells treated by indicated compounds (20 μmol/L)

实, 前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 可在细胞内经酯酶和 β-半乳糖苷酶代谢为原药, 并释放 O_2^-。前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 选择性地抑制过表达 β-半乳糖苷酶的卵巢癌 OVCAR-3 细胞的增殖并诱导 OVCAR-3 细胞凋亡, 并且它们的生物活性与原药相近。O_2^-清除剂 TEMPOL 显著降低了前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 对 OVCAR-3 细胞的毒性和诱导凋亡的能力, 进一步证明了 O_2^-是前药发挥抗肿瘤作用的主要因素。最后, 由于衰老细胞内 β-半乳糖苷酶活性显著升高, 前药 Gal-HAQ 和 Gal-AQ 可有效清除衰老细胞 A-549/Dox 和 L-02/Rep, 而不影响非衰老细胞 A-549 和 L-02 的活性。综上, Gal-HAQ 和 Gal-AQ 有望成为新的抗肿瘤和衰老细胞清除候选药物。

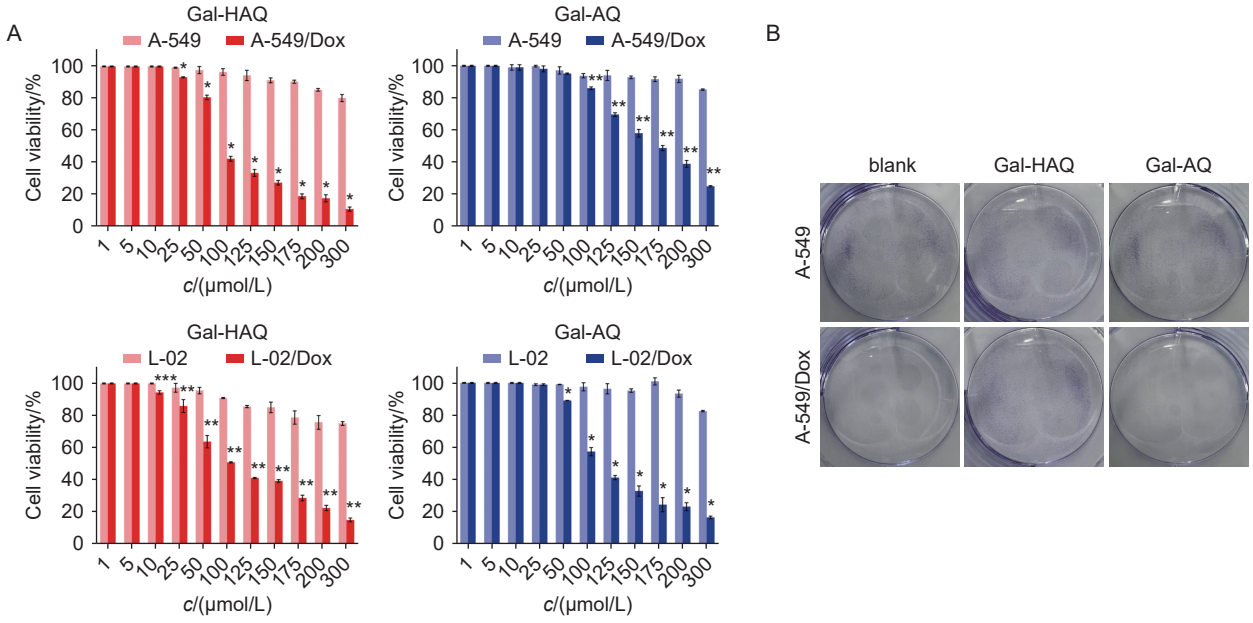


Figure 8 Effects of Gal-HAQ and Gal-AQ on non-senescent/senescent A-549 or L-02 cells
A: Cytotoxicity of Gal-HAQ and Gal-AQ in non-senescent/senescent A-549 or L-02 cells as analyzed by MTT assay ($\bar{x} \pm s$, n = 3). *P < 0.001, **P < 0.01 *vs* non-senescent A-549 cells; **P < 0.01, ***P < 0.05 *vs* non-senescent L-02 cells; B: Cytotoxicity of Gal-HAQ and Gal-AQ in non-senescent/senescent A-549 cells as revealed by crystal violet stain

References

[1] Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM. Superoxide ion: generation and chemical implications[J]. *Chem Rev*, 2016, **116**(5): 3029-3085.

[2] Yu J, Zhong BL, Jin L, *et al*. 2-methoxy-6-acetyl-7-methyljuglone (MAM) induced programmed necrosis in glioblastoma by targeting NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1)[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, **152**: 336-347.

[3] Dharmaraja AT, Alvala M, Sriram D, *et al*. Design, synthesis and evaluation of small molecule reactive oxygen species generators as selective *Mycobacterium* tuberculosis inhibitors[J]. *Chem Commun*, 2012, **48**(83): 10325-10327.

[4] Ku YC, Lin PH, Huang CY, *et al*. An iminocoumarin based covalent-assembly red-emitting fluorescent probe for detection of *β*-galactosidase activity in ovarian cancer cells[J]. *Dyes Pigm*, 2023, **210**: 111004.

[5] Dud M, Tichotová M, Procházková E, *et al*. Phosphate-based self-immolative linkers for the delivery of amine-containing drugs[J]. *Molecules*, 2021, **26**(17): 5160.

[6] Spring SA, Goggins S, Frost CG. Ratiometric electrochemical detection of β-galactosidase[J]. *Org Biomol Chem*, 2017, **15**(34): 7122-7126.

[7] Liu XH, Tan YY, Li Q, *et al*. Synthesis and antitumor activity evaluation of glycoconjugates derived from natural product harmine[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2023, **54**(6): 729-742.

[8] Martin H, Lázaro LR, Gunnlaugsson T, *et al*. Glycosidase activated prodrugs for targeted cancer therapy[J]. *Chem Soc Rev*, 2022, **51**(23): 9694-9716.

[9] Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies[J]. *Hypertension*, 2007, **49**(4): 717-727.

[10] Alzoubi KH, Rababa'h AM, Al Yacoub ON. Tempol prevents post-traumatic stress disorder induced memory impairment[J]. *Physiol Behav*, 2018, **184**: 189-195.

[11] Blaschek W. Natural products as lead compounds for sodium glucose cotransporter (SGLT) inhibitors[J]. *Planta Med*, 2017, **83**(12/13): 985-993.

[12] Nicastro LK, de Anda J, Jain N, *et al*. Assembly of ordered DNA-curli fibril complexes during *Salmonella* biofilm formation correlates with strengths of the type I interferon and autoimmune responses[J]. *PLoS Pathog*, 2022, **18**(8): e1010742.

[13] Rovira M, Sereda R, Pladevall-Morera D, *et al*. The lysosomal proteome of senescent cells contributes to the senescence secretome[J]. *Aging Cell*, 2022, **21**(10): e13707.

[14] Behmoaras J, Gil J. Similarities and interplay between senescent cells and macrophages[J]. *J Cell Biol*, 2021, **220**(2): e202010162.

[15] Kretschmer A, Zhang F, Somasekharan SP, *et al*. Stress-induced tunneling nanotubes support treatment adaptation in prostate cancer[J]. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 7826.