

茶多酚及茶多酚锗的组成、结构和抑制肺癌细胞生长速率的研究

黄河宁^{1*}, 陈东仕¹, 胡晓慧¹, 欧阳高亮¹, 郭玉萍², 黄河清^{1**}

(1. 厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 福建三明学院化学与生物工程系, 福建 三明 365004)

摘要: 采用有机合成法合成茶多酚-锗化合物. 运用反相液相色谱技术初步分离茶多酚和茶多酚锗的酚类组成. 选用基质辅助激光解吸电离化飞行时间(MALDI-TOF)质谱技术分析茶多酚及茶多酚-锗的组成和结构. 结果表明, 茶多酚主要由儿茶素及酚类化合物组成, 其中(-)表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、(-)表没食子儿茶素没食子酸甲酯(EGCG-MG)和表三羟基黄烷-3-醇没食子酸酯(EZG)易与 Ge^{4+} 反应且形成含锗的酚类化合物. 茶多酚及茶多酚-锗化合物均有抑制肺癌细胞生长的能力, 其抑制速率随着酚类化合物浓度增加而提高, 但茶多酚锗抑制速率高于茶多酚近 1 倍.

关键词: 茶多酚; 茶多酚锗; 组成; 分子结构; 肺癌细胞

中图分类号: O 65

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2007)02-0258-04

茶叶中富含儿茶素成分, 约占其质量分数的 15% ~ 32%. 儿茶素主要由表没食子儿茶素[(-)-epigallocatechin, EGC]、右旋儿茶素[(+)-catechin, DC]、表儿茶素[(-) epicatechin, EC]、表没食子儿茶素没食子酸酯[(-) epigallocatechin gallate, EGCG]和表儿茶素没食子酸酯[(-) epicatechin gallate, ECG]等组成^[1]. 近年来, 气质联用技术和电喷雾(ESI)质谱技术在茶多酚组成与结构分析上的研究报道逐年递增, 但选用 MALDI-TOF 质谱分析技术的研究却较少^[2-3]. 由于 MALDI-TOF 质谱仪具有耐盐、适合于分析混合组分和高通量等优势, 是目前生物大分子组成及结构与功能研究的主要分析技术之一^[4]. 本论文选用 MALDI-TOF 质谱分析技术直接分析茶多酚和茶多酚锗的组成、结构、稳定性和抑制肺癌细胞生长速率, 其技术与结果可为今后优化筛选茶多酚锗抗肿瘤药物提供科学依据与技术.

1 材料与方法

1.1 实验材料与分析仪器

实验所需的茶多酚样品(含儿茶素 95%)购自福建省南平松溪县天宝生物化工厂, 纯度 98%左右; 氧

化锗(AR)及其它化学试剂均为分析纯. 实验所需质谱仪为德国 BURKER 公司生产的 REFLEX 的 MALDI-TOF 质谱仪、UPW-50S 型超纯水器、M2 型酶标仪、国产 828 型 pH 测定仪和 RE-52 型旋转蒸发器. 英国 Waters 公司生产的 1515 型高压液相色谱仪. 实验所需的肺癌细胞株编号为 SGC7901, 购置于美国 ATTC 细胞库, 肺癌细胞株菌保存在液氮中备用.

1.2 HPLC 分离茶多酚锗基本条件^[5]

流动相分别采用 50% 甲醇溶液和 0.1% 三氟乙酸(TFA); 样品洗脱流速为 2 mL/min, 进样量为 200 μ L; 洗脱时间为 10 ~ 30 min 之间. HPLC 检测器类型为紫外检测器.

1.3 茶多酚锗制备

用超纯水配制茶多酚浓度为 4.0 mg/mL. 按 Ge(IV)与茶多酚质量比为 3 : 10 的剂量缓慢添加 Ge^{4+} 溶液, 并用醋酸钠缓冲溶液调节反应体系为 pH 4.5 ~ 5.5 之间, 在常温下搅拌至反应完全溶解为止(约为 20 min). 待反应结束后, 置于 10 $^{\circ}$ C 冰箱内静置 12 h. 随后采用旋转蒸发器蒸发易挥发液体, 在真空干燥箱中(40 $^{\circ}$ C)干燥 24 h, 得赭黄色的茶多酚锗固体. 采用苯芴酮分光光度法测定残留 Ge(IV)含量, 推算茶多酚锗产率为 68%. 分析前, 实验样品需经 Sephadex G-25 层析柱去除残留的氧化锗和其它盐类化合物.

1.4 基质和分析样品配制

实验所需的 DHB(2,5-二羟基苯甲酸)基质采用二次重蒸水搅拌溶解 30 min, 配制成 DHB 饱和水溶液. 待测样品和基质溶液(1 : 1 by vol.)事先预混 60

收稿日期: 2006-06-09

基金项目: 国家自然科学基金(30470372), 三明市科技项目(2004-L-1)和福建省教育厅科技项目(JB03238)资助

* 访问学者, 在三明学院化学与生物工程系工作

** 通讯作者: hqhuang@xmu.edu.cn

s, 然后取混合液 0.8 μL 滴在 MALDI TOF 质谱仪专用样品靶上, 待样品自然干燥后, 将样品靶置于质谱仪靶箱内进行样品分析^[6]。

1.5 质谱测定条件

选用脉冲氮激光(337 nm)作为离子解吸电离源。分析模型选用高分辨率反射模型, 加速电压控制在 20 kV。平均每次测定样品的激光脉冲次数在 120 次之间。采用外标法标定多肽质谱峰峰位^[7]。

1.6 测定茶多酚及茶多酚锗抑制肺癌细胞生长速率

肺癌细胞株经活化后, 按常规肺癌细胞培养条件进行培养。定量取肺癌细胞, 依次在培养基加入不同浓度(10、25、50、100、120、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的茶多酚和茶多酚锗, 并在酶标板中进行培养, 处理时间为 2 d。选用酶标仪和 MTT 比色法测定肺癌细胞存活率, 测定波长为 570 nm。按公式: 细胞凋亡率(%) = (1 - 实验细胞样吸收值/对照细胞样吸收值) $\times 100\%$, 统计并计算茶多酚及茶多酚锗抑制肺癌细胞的效率。

2 结果与讨论

2.1 RP-HPLC 法分离茶多酚

采用反相 HPLC 技术分离茶多酚可显示出 5 个特征色谱峰, 其峰形与图 1 相似, 各特征色谱峰的保留时间分别为 3.502、5.072、7.471、10.793、15.843 min。从结果看, 茶多酚是一种混合的酚类化合物, 其中各自的含量和分子结构有明显不同。如果这些酚类化合物结构很相似, 其色谱峰保留时间应很接近, 但测定结果色谱峰之间的保留时间差别较大, 推测茶多酚的中酚类化合物的组成与分子结构可能有较大差别。由于完

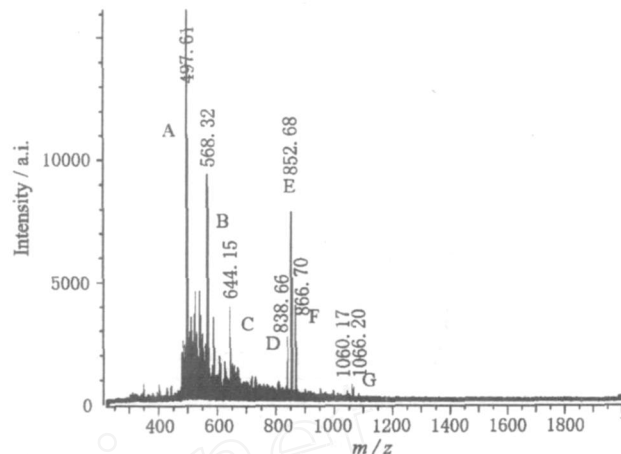


图 1 MALDI TOF 质谱法测定茶多酚的质谱图

Fig. 1 Mass spectrogram of the tea polyphenol measured with MALDI TOF mass spectrometry

全分离有一定难度, 若采用 MALDI TOF 质谱技术研究茶多酚中混合酚类化合物的组成与结构比采用其他分析技术可能较为适当些。

茶多酚经去离子水透析除盐后, 用于 MALDI TOF 质谱仪测定。从图 1 看出, 因受基质干扰, 质荷比 m/z 测定范围内控制在大于 400, 大约显示出 12 个较为典型的质谱峰, 说明未经分离纯化的茶多酚由一系列不同的儿茶素类化合物组成。MALDI TOF 质谱技术适合于测定大于质荷比 400 以上的混合有机化合物和生物大分子的组成与结构信息, 它可以直接分析茶多酚化合物, 尤其是多聚体组成的测定。参照图 1 所显示的质荷比值和前人已报道茶多酚化合物组成与分子结构式^[2-3,7], 可获得表 1 结果。在分析表 1 结果后, 作者发现茶多酚的主要成分由(-)表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)和它的分解产物组成, 并含有少量的

表 1 MALDI TOF 质谱法分析茶多酚组成及分子式

Tab. 1 Composition and molecular formula of tea polyphenol analyzed with MALDI TOF mass spectrometry

编号	测量值 (m/z)	化合物	化合物缩写	分子量 (u)	分子式
A	497.61	(-)表没食子儿茶素没食子酸酯	EGCG	458	[EGCG + K ⁺]
B	568.32	(-)表没食子儿茶素没食子酸酯	EGCG	458	[EGCG + Cd ²⁺]
C	644.15	(-)表没食子儿茶素没食子酸甲酯 鞣酸	EGCMG CA	472 170	[EGCMG + CA + 2H ⁺]
D	838.68	(-)表没食子儿茶素没食子酸甲酯 (-)表鞣儿茶素	EGCMG EGC	472 306	[EGCMG + EGC + Ca ²⁺ + Na ²⁺ - 2H ⁺]
E	852.08	表三羟基黄烷-3-醇没食子酸酯	EZG	426	2[EGZ]
F	866.70	表三羟基黄烷-3-醇没食子酸酯 儿茶素-鞣酸	EZG CG	426 442	[EZG + CG]
G	1060.17	(-)表没食子儿茶素没食子酸酯 儿茶素-鞣酸	EGCG CG	458 442	[EGCG + CG + CA] ²⁺

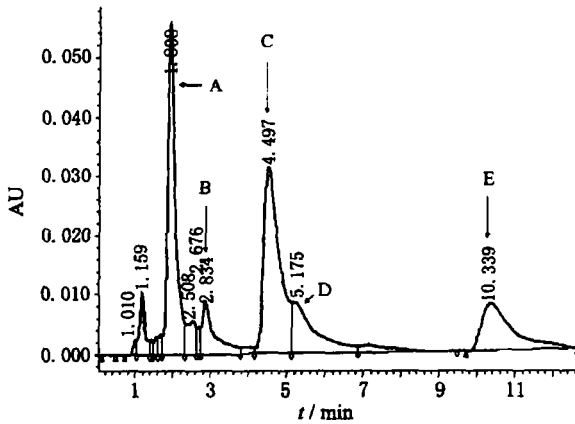


图 2 反相高压液相色谱法分离茶多酚锗色谱图

Fig. 2 Chromatogram map of tea polyphenol-germanium () separated with RP-HPLC

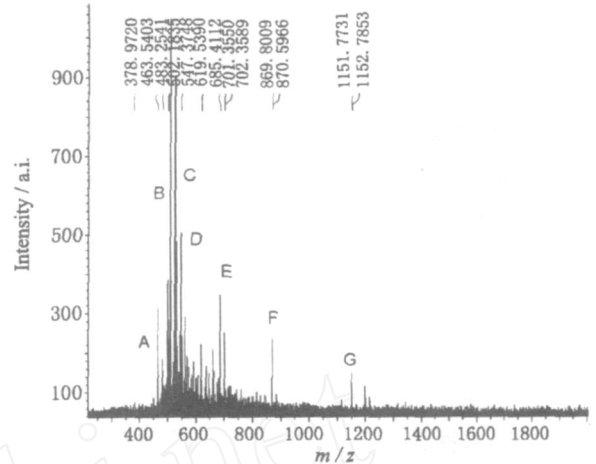


图 3 MALDI-TOF 质谱法测定茶多酚锗的质谱图

Fig. 3 Mass spectrogram of the tea polyphenol-germanium () measured with MALDI-TOF mass spectrometry

二聚体化合物和带单电荷的二聚体,例如:2EGZ、2EGCG和[CG]²⁺。尽管茶多酚和茶多酚锗组成较为复杂,但从络合前后红外光谱对比中,可见到明显特征新峰,推测是络合后形成 Ge-O 所引起^[1]。

2.2 茶多酚的组成与分子结构(见表 1)

2.3 RP-HPLC 法分离茶多酚锗

采用有机合成法合成茶多酚锗,并采用 RP-HPLC 法进行分离,获得图 2 色谱图。图 2 结果显示出 5 个较为典型的色谱峰,其峰数目与茶多酚化合物所显示的色谱峰数相同,但色谱峰的相对保留时间差别变小。这一现象说明了,茶多酚与 Ge⁴⁺ 进行络合反应后,不仅产生了茶多酚锗化合物,同时在合成过程中部分茶多酚发生组成变化且形成含锗的酚类化合物,因而二者之间的相对色谱峰保留时间和色谱峰相对峰面积有着明显差异。为了证实这一论点,作者采用 MALDI-TOF 质谱技术研究茶多酚锗的组成与结构。

2.4 茶多酚锗的组成与分子结构

表 2 MALDI-TOF 质谱法分析茶多酚锗组成及分子结构式

Tab. 2 Composition and molecular formula of tea polyphenol germanium () analyzed with MALDI-TOF mass spectrometry

编号	测量值 (<i>m/z</i>)	化合物	化合物缩写	分子量 (<i>u</i>)	分子式
A	465.54	(-)表没食子儿茶素没食子酸酯	EGCG	458	[EGCG+Li ⁺]
B	514.40	儿茶素-鞣酸	CG	442	[CG+Ge]
C	531.00	(-)表没食子儿茶素没食子酸酯	EGCG	458	[EGCG+Ge]
D	547.32	(-)表没食子儿茶素没食子酸甲酯	EGCMG	472	[EGCMG+Ge]
E	685.41	儿茶素-鞣酸	CG	442	[CG+CA+Ge]
		鞣酸	CA	170	
F	869.70	表三羟基黄烷-3-醇没食子酸酯	EZG	426	[EZG+CG3H ⁺]
		儿茶素-鞣酸	CG	442	
G	1151.77	(-)表没食子儿茶素没食子酸酯	EGCG	458	[2EGCG+Li ⁺]+[EGCG] ²⁺

比较图 1 和图 3 可知,茶多酚与 Ge⁴⁺ 络合后,所显示的质谱峰数明显高于茶多酚,使组成呈现更复杂化特点(图 3)。参考图 3 质谱峰所对应质荷比值和前人已报道的茶多酚化合物组成^[2-3,8],可获得表 2 结果。结果显示,儿茶素-鞣酸(CG)、(-)表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、(-)表没食子儿茶素没食子酸甲酯(EGCMG)和鞣酸均有络合 Ge⁴⁺ 的能力,并形成有机锗化合物。茶多酚和茶多酚锗化合物中均含有少量的 EGCG 二聚体结构。

2.5 茶多酚及茶多酚锗抑制肺癌细胞生长

从图 3 中可看出,当在培养基中施加低于 75 μg/mL 茶多酚和茶多酚锗时,抑制肺癌细胞生长的现象既不明显又没有区别,但随着茶多酚及茶多酚锗浓度提高,两者抑制肺癌细胞能力随之增强,并显示出对应线性关系。比较图 4A 和 4B 抑制速率后,发现茶多酚锗抑制肺癌细胞生长速率几乎高于茶多酚近一倍。由

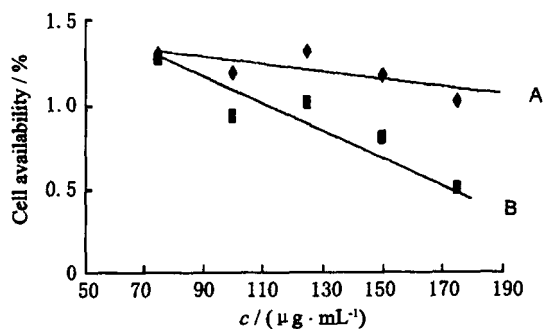


图 4 茶多酚及茶多酚锗抑制肺癌细胞生长趋势

Fig. 4 Growth trend of lung-cancer cell inhibited with tea polyphenol and tea polyphenol-germanium

A: tea polyphenol; B: tea polyphenol-germanium

此来看,茶多酚锗中的含锗的酚类化合物(CG-Ze、EGCG-Ge、ECGMG-Ge和CG-CA-Ge)比茶多酚中的酚类化合物具有更强的抑制肺癌细胞的能力.但由于这些酚类化合物难于通过HPLC进行逐一分离,目前暂无法比较这些含锗的酚类化合物之间抑制肺癌细胞的强弱,同时也无法了解不同结构的酚类化合物抑制肺癌细胞的能力的关联^[8].虽然不同酚类化合物的分子结构与抑制肿瘤细胞作用的关系研究尚未见详细报道,但如果能进一步拓展有效的分离技术并且能对这两种酚类化合物逐一分离,就能更深入地研究酚类化合物抑制肺癌细胞生长的分子机理.

参考文献:

- [1] 黄河宁,胡晓慧,黄河清,等.质谱技术研究儿茶素及儿茶素锗多聚体特性[J].分析化学,2006,34(1):52-55.
- [2] Miletova P, Schram K H, Whitney J, et al. Tandem mass spectrometry studies of green tea catechins identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea [J]. Journal of Mass Spectrometry, 2000, 35: 860-869.
- [3] Sarni-Manchado P, Cheynier V. Study of non-covalent complexation between catechin Derivatives and peptides by electrospray ionization mass spectrometry [J]. Journal of Mass Spectrometry, 2002, 37: 609-616.
- [4] Gumerov D R, Kaltashov I A. Dynamics of iron release from transferrin N-lobe studied by electrospray ionization mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2001, 73: 2565-2570.
- [5] 林庆梅,黄慧英,黄河清,等. HPLC和MALDI-TOF质谱技术研究海兔大脑神经节多肽酶和酸性多肽的酶解产物组成与结构[J].分析化学,2006,34(9):95-99.
- [6] Huang H Q, Xiao Z Q, Chen X, et al. Characteristics of structure, composition, mass spectra, and iron release from the ferritin of shark liver (Sphyrna zygaena) [J]. Biophysical Chemistry, 2004, 111: 213-222.
- [7] 陈东仕,黄河清,吴韩志,等.优化分离与鉴定蓝斑背海兔口腔神经节蛋白质组[J].高等学校化学学报,2006,26(7):1257-1261.
- [8] Arts I J C, Hollman P C H. Optimization of a quantitative method for the determination of catechins in fruits and legumes [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 5156-5162.

Composition, Structure, and Inhibiting Growth Rate of Lung-cancer Cell by Tea Polyphenol and Tea Polyphenol-germanium

HUANG He-ning^{1*}, CHEN Dong-shi¹, HU Xiao-hui¹,
OU YANG Gao-liang¹, GUO Yu-ping², HUANG He-qing^{1**}

- (1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. Department of Chemical and Biological Engineering, Sanming College, Sanming 365004, China)

Abstract: The compound of tea polyphenol-germanium (TP-Ge⁴⁺) was synthesized by typical technology of organic synthesis. The polyphenol compositions of tea polyphenol and tea polyphenol-germanium were effectively separated by RE-HPLC techniques. Matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry was selected to analyze the composition, structure and stability of tea polyphenol (TP) and TP-Ge⁴⁺. The results showed that TP was mainly composed of catechin and polyphenolic compounds. These polyphenolic compounds such as epigallo-catechin gallate (EGCG), epigallo-catechinmethyl gallate (EGCMG), epiafzelechin gallate (EZG) reacted easily with germanium oxide to constitute a series of compounds of the polyphenolic-germanium. In addition, both TP and TP-Ge⁴⁺ showed capacities for inhibiting growth of lung-cancer cells. This inhibiting rate would enhance with the concentration increment of both compounds. However, the inhibiting rate with TP-Ge⁴⁺ showed higher approximately one multiple than that of TP.

Key words: tea polyphenol; tea polyphenol-germanium; composition; structure; lung-cancer cell