

• 研究简报 •

## DNA: 23-Oxa-OSW-1 生物靶标?

关 文<sup>a,b</sup> 刘玥辉<sup>b</sup> 申 杰<sup>b</sup> 汤平平<sup>b</sup>  
吴厚铭<sup>b</sup> 张国安<sup>a</sup> 曹春阳<sup>\*,b</sup>

(<sup>a</sup> 华中农业大学植物科技学院 武汉 430070)

(<sup>b</sup> 中国科学院上海有机化学研究所 上海 200032)

**摘要** 虎眼万年青皂苷 OSW-1 来源于百合科植物虎眼万年青, 是一种具有良好抗肿瘤活性的皂苷成分. 其类似物 23-Oxa-OSW-1 具有 OSW-1 一样潜在的活性, 对恶性肿瘤细胞具有很强的抑制作用,  $IC_{50}$  为  $0.052 \sim 0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 但 OSW-1 的生物靶标还没有报道. 利用一维和二维  $^1\text{H}$  NMR 技术首次发现 23-Oxa-OSW-1 与 DNA 间有很强的相互作用. NMR 数据分析表明 23-Oxa-OSW-1 中木糖部分可能参与了与 DNA 的结合.

**关键词** 23-Oxa-OSW-1; NMR; DNA; 木糖

## DNA: A Biological Target of 23-Oxa-OSW-1?

GUAN, Wen<sup>a,b</sup> LIU, Yue-Hui<sup>b</sup> SHEN, Jie<sup>b</sup> TANG, Ping-Ping<sup>b</sup>  
WU, Hou-Ming<sup>b</sup> ZHANG, Guo-An<sup>a</sup> CAO, Chun-Yang<sup>\*,b</sup>

(<sup>a</sup> Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

(<sup>b</sup> Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

**Abstract** The anticancer drug, steroidal saponin OSW-1 was isolated from the bulbs of *Ornithogalum saundersiae*. Its analogue 23-Oxa-OSW-1 was found to strongly suppress the growth of the malignant tumor cells with an  $IC_{50}$   $0.052 \sim 0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , as potent as OSW-1. However its target *in vivo* is still unknown. In this paper, by using 1D and 2D  $^1\text{H}$  NMR techniques, it was found that 23-Oxa-OSW-1 could interact with DNA. Further analysis of the NMR data indicated that its xylose part might be involved in its interaction with DNA. In addition, to our knowledge, the detailed assignment of 23-Oxa-OSW-1  $^1\text{H}$  chemical shifts done here has never been reported so far.

**Keywords** 23-Oxa-OSW-1; NMR; DNA; xylose

OSW-1 最初由日本科学家 Sashida 等<sup>[1]</sup>从百合科植物虎眼万年青中分离获得, 它对肿瘤细胞具有极强的细胞毒素活性. 与目前临床使用的药物, 如紫杉醇、阿霉素、喜树碱相比, OSW-1 的抗癌效果相当明显. OSW-1 能够很强烈地抑制恶性肿瘤细胞的生长, 而不影响人体正常细胞. 后来许多合成化学家对其结构进行修饰, 得到了活性比 OSW-1 更好的药物分子, 如 23-Oxa-OSW-1<sup>[2]</sup> (结构见图 1), 该分子具有与 OSW-1 一样潜在的抗癌活

性, 对肿瘤细胞 AGS, 7404 和 MCF-7 活性达到  $IC_{50}$   $0.052 \sim 0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 关于 OSW-1 的作用机制, 有科学家通过电子显微镜的方法和生物化学的方法进行了较深入的研究<sup>[3]</sup>, 发现 OSW-1 能破坏人的白血病和胰腺癌细胞的线粒体隔膜和脊, 因为线粒体堪称“动力工厂”, 使细胞丧失跨膜运输的能力, 而达到杀死癌细胞的目的. 但具体的生物靶标到底是什么目前并不清楚.

\* E-mail: ccao@mail.sioc.ac.cn; Tel.: 021-54925491; Fax: 021-64166128.

Received January 5, 2008; revised March 13, 2008; accepted April 16, 2008.

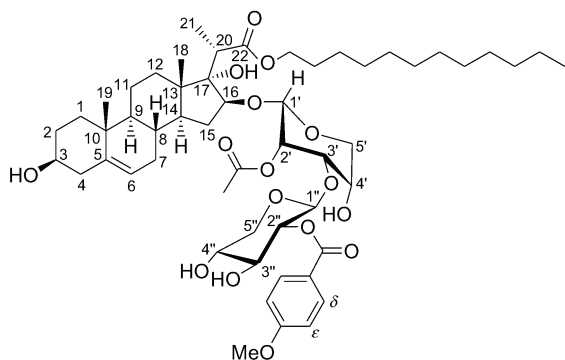


图 1 23-Oxa-OSW-1 分子结构及原子编号

Figure 1 The structure and atomic numbering of 23-Oxa-OSW-1

鉴于利用多种方法尝试发现 OSW-1 的蛋白质类生物靶标一直没有成功, 尝试从 DNA 出发考察是否能够发现 OSW-1 与 DNA 有直接的相互作用. 运用一维(1D)和二维(2D)  $^1\text{H}$  NMR 技术研究了 OSW-1 类似物 23-Oxa-OSW-1 与 DNA 的相互作用, 并首次基本完成 23-Oxa-OSW-1 质子加 DNA 前后 NMR 信号全归属.

## 1 实验部分

### 1.1 NMR 样品制备

4 nmol 的 DNA (回文对称序列为: 5'-C<sub>1</sub>T<sub>2</sub>G<sub>3</sub>G<sub>4</sub>A<sub>5</sub>T<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>C<sub>8</sub>A<sub>9</sub>G<sub>10</sub>-3'), 由上海英骏生物有限公司合成, HPLC 离子交换柱纯化和 C18 反相柱脱盐纯化, 再溶于 30  $\mu\text{L}$  的去离子超纯水, 95  $^\circ\text{C}$  加热 5 min, 退火降到室温. 称取 4 mg OSW-1 类似物样品两份, 一份直接溶解在 500  $\mu\text{L}$  的 DMSO- $d_6$  中; 一份溶于 470  $\mu\text{L}$  的 DMSO- $d_6$  中, 再与 30  $\mu\text{L}$  的 DNA 水溶液混合, 最终样品中 DNA 和 23-Oxa-OSW-1 物质的量比约为:  $n(\text{dsDNA}) : n(23\text{-Oxa-OSW-1}) \approx 1 : 1000$ . 两个样品中 23-Oxa-OSW-1 类似物样品浓度均为 8  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  左右, 复合物 NMR 样品中 DNA 的浓度为 8  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

### 1.2 NMR 实验

所有 NMR 实验均在 600M Varian Inova600 谱仪上进行. 数据处理采用 Varian 公司的 VNMR(6.1B 版本)软件和 NMRPipe 软件在 SUN-SPARC 工作站上进行, 数据分析采用 XEASY 软件在 SGI-INDIGO II 工作站上进行.

$^1\text{H}$  NMR 1D 实验: 谱宽为 8000 Hz,  $90^\circ$  脉冲为 7.3  $\mu\text{s}$ ; 测定温度为 25  $^\circ\text{C}$ ; 采样点数为 274 K, 扫描次数为 1 K, DMSO 定标.

DEPT 实验及  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  相关 HMQC, HMBC 二维实验: 为了识别归属未加入 DNA 的 OSW-1 类似物 23-Oxa-OSW-1 结构中伯碳、仲碳和季碳, 以进一步归

属氢原子, 我们进行了 DEPT-90, DEPT-135 谱以及  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  相关 HMQC, HMBC 二维实验.

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D 核磁共振实验: 对自由态 OSW-1 类似物样品, 为了准确归属核磁共振信号, 我们采集了一系列的二维 NMR 图谱, 包括: 混合时间为 150 ms 的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY 谱(采样次数为 64), 混合时间为 30 ms 的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY 谱(采样次数为 16), 以及能够反映相邻碳上质子  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  相关的 DQF-COSY 谱(采样次数为 128), 这三个二维  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  相关谱, 采样维 F1 维与间接维 F2 维谱宽均为  $\delta$  13.4. 此外我们采集  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  直接相关的 HMQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  远程相关的 HMBC. HMQC 与 HMBC 中, F1 维谱宽为  $\delta$  13.4,  $F^2$  维为  $\delta$  300. 对于 OSW-1 类似物与双链 DNA 的复合物样品, 我们只采集了混合时间为 150 ms 的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY 谱, 混合时间为 30 ms 的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY 谱, 相关参数同上.

为了消除在 23-Oxa-OSW-1 和 DNA 混合物样品中  $\text{H}_2\text{O}$  分子与 OSW-1 类似物羟基质子交换导致 NMR 信号的变化, 我们又采集了 23-Oxa-OSW-1 在 470  $\mu\text{L}$  的 DMSO- $d_6$  和 30  $\mu\text{L}$  的  $\text{H}_2\text{O}$  中的 TOCSY, NOESY 和 DQF-COSY, 这三个实验均采用预饱和压水峰, 其它参数同上.

所有二维谱, 采样点数 F1 维为 2048, F2 维为 256. F1 维与 F2 维均采用正交检测(quadrature detection)方法. 傅立叶变换前分别采用相移  $90^\circ$  或  $60^\circ$  和  $60^\circ$  或  $45^\circ$  的 Sinebell 窗函数处理. 基线校正采用三级多项式处理.

## 2 结果与讨论

### 2.1 OSW-1 类似物 23-Oxa-OSW-1 碳氢 NMR 信号归属

首先利用  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT-90, DEPT-135, 结合  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC 谱, 依据文献[1], 确认主要的碳信号及其直接相连的质子信号. 通过二维  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY 技术, 将两个糖、芳环、皂苷母核各环质子进行识别和归属. 通过  $^1\text{H}$  NMR 与 DEPT,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC 的比较, 可以找出各个羟基质子信号. 在一维  $^1\text{H}$  NMR 中(图 2)最低场的化学位移  $\delta$  7.897 和  $\delta$  7.039 为典型的对二取代苯环的 AA'BB'偶合系统. 化学位移  $\delta$  5.242 可以确认是母核 6 位烯氢质子信号. 另外, 化学位移  $\delta$  3.832 可以确认为典型的甲氧基信号. 以上四个碳信号为标示信号, 利用  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQF-COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY 对所有  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 信号进行准确归属,  $^1\text{H}$  归属结果见表 1; 基于在 DMSO 中的质子归属, 利用 TOCSY, NOESY 和 DQF-COSY 谱我们又归属了 23-Oxa-OSW-1 在 470  $\mu\text{L}$  的 DMSO- $d_6$  和 30  $\mu\text{L}$  的  $\text{H}_2\text{O}$  中的质子 NMR 信号, 除

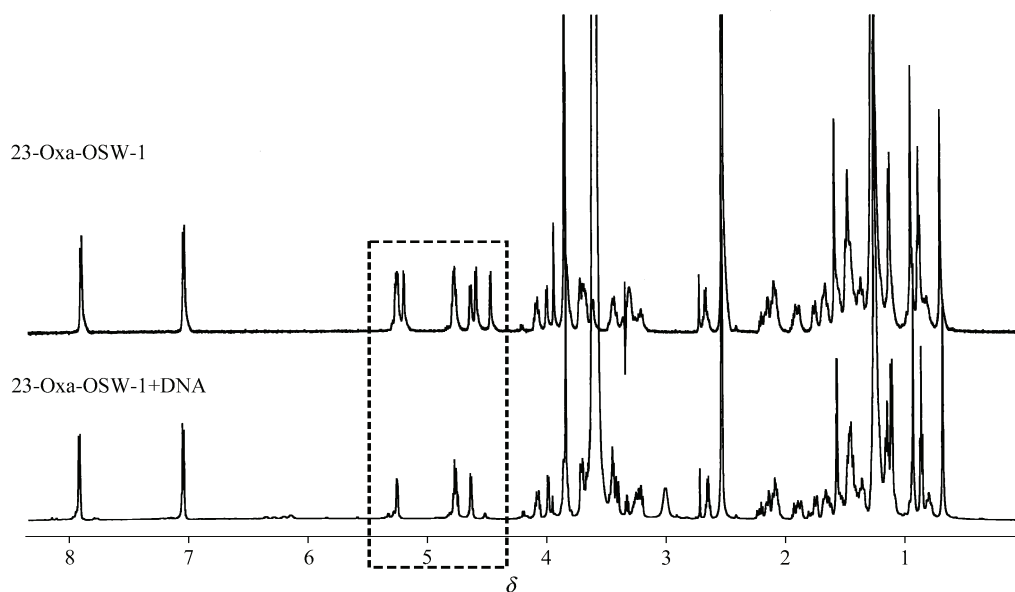


图 2 23-Oxa-OSW-1(上)与 23-Oxa-OSW-1 加入千分之一摩尔比例的 DNA 后(下)一维  $^1\text{H}$  NMR; 虚线框为 23-Oxa-OSW-1 加入 DNA 后 NMR 信号变化比较明显的部分. 实验条件为:  $\text{DMSO}-d_6$  为溶剂, 298 K; 以  $\text{DMSO}$  溶剂峰定标

**Figure 2** 1D  $^1\text{H}$  NMR spectra of 23-Oxa-OSW-1 (upper) and 23-Oxa-OSW-1 with one-thousand DNA (down). The highlighted box stands for the apparent chemical shift changes between the two spectra. The NMR experiments were acquired at 298 K in  $\text{DMSO}-d_6$  as main solvent, referenced as  $\text{DMSO}-d_6$  methyl peak

表 1 23-Oxa-OSW-1 加 DNA 前后质子 NMR 信号变化( $\text{DMSO}$  为溶剂,  $\text{DMSO}$  峰定标)

**Table 1**  $^1\text{H}$  complete assignment of 23-Oxa-OSW-1 before and after adding DNA,  $\text{DMSO}-d_6$  as main solvent, methyl in  $\text{DMSO}-d_6$  as reference

Proton	$\delta_{23\text{-Oxa-OSW-1}}$	$\delta_{23\text{-Oxa-OSW-1+DNA}}$	$\delta_{23\text{-Oxa-OSW-1+DNA}} - \delta_{\text{OSW-1}}$	Proton	$\delta_{23\text{-Oxa-OSW-1}}$	$\delta_{23\text{-Oxa-OSW-1+DNA}}$	$\delta_{23\text{-Oxa-OSW-1+DNA}} - \delta_{\text{OSW-1}}$
2- $\text{H}_a^a$	1.338	1.362	0.024	21-Me	1.108	1.112	0.004
2- $\text{H}_b^a$	1.645	1.656	0.011	1'-H	3.989	3.989	0
3-H	3.241	3.251	0.01	2'-H	4.755	4.753	-0.002
3-OH	4.575 (4.617) <sup>b</sup>	4.524	-0.051 (-0.093) <sup>b</sup>	3'-H	3.602	3.586	-0.016
4- $\text{H}_a^a$	2.062	2.078	0.016	4'-H	3.849	3.875	0.026
4- $\text{H}_b^a$	2.121	2.141	0.02	4'-OH	4.459 (4.529) <sup>b</sup>	—	—
6-H	5.242	5.260	0.018	5'- $\text{H}_a$	3.414	3.409	-0.005
7- $\text{H}_a^a$	1.438	1.457	0.019	5'- $\text{H}_b$	3.687	3.697	0.010
7- $\text{H}_b^a$	1.868	1.872	0.004	Ac-Me	1.526	1.53	0.004
8-H	1.447	1.452	0.005	1''-H	4.620	4.626	0.006
11- $\text{H}_a^a$	1.345	1.321	-0.024	2''-H	4.766	4.773	0.007
12- $\text{H}_a^a$	1.465	1.459	0.006	3''-H	3.428	3.486	0.058
12- $\text{H}_b^a$	1.285	—	—	3''-OH	5.260 (5.339) <sup>b</sup>	5.357	0.097 (0.018) <sup>b</sup>
14-H	1.633	1.727	0.094	4''-H	3.434	3.480	0.046
15- $\text{H}_a^a$	1.115	—	—	4''-OH	5.195 (5.292) <sup>b</sup>	5.296	0.101 (0.004) <sup>b</sup>
15- $\text{H}_b^a$	2.075	2.095	0.020	5''- $\text{H}_a$	3.197	3.270	0.073
16-H	3.709	3.713	0.004	5''- $\text{H}_b$	3.819	3.843	0.024
17-OH	3.924 (3.956) <sup>b</sup>	3.971	0.047 (0.015) <sup>b</sup>	MBZ-H $\delta$	7.897	7.909	0.012
18-Me	0.679	0.681	0.002	MBZ-H $\epsilon$	7.039	7.044	0.005
19-Me	0.932	0.942	0.010	MBZ-Me	3.836	3.846	0.010
20-H	2.646	2.644	-0.002				

<sup>a</sup>表中质子 a 和 b 的划分是随机的, 并不指相应的六元环  $\alpha$  位和  $\beta$  位质子; <sup>b</sup>括号中的值为在 470  $\mu\text{L}$  的  $\text{DMSO}-d_6$  和 30  $\mu\text{L}$  的  $\text{H}_2\text{O}$  中羟基质子化学位移或相关化学位移之差.

羟基质子信号发生位移外, 其他保持不变, 结果也列于表 1 中. 本文中 23-Oxa-OSW-1 皂苷母核的  $^{13}\text{C}$  NMR 化学位移的归属与文献[1]报道的结果基本一致, 故表 1 有关  $^{13}\text{C}$  信号的归属不再列出.

## 2.2 加入少量 DNA 的 23-Oxa-OSW-1 $^1\text{H}$ NMR 信号归属

此时 OSW-1 类似物 23-Oxa-OSW-1 质子 NMR 信号的归属, 我们主要依据  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY 和  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY. 将加入 DNA 的小分子 23-Oxa-OSW-1 的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY 谱、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY 谱分别与未加入 DNA 的 23-Oxa-OSW-1 的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY 和 TOCSY 叠合, 以 NMR 信号没有发生变化的质子化学位移为切入点, 通过  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  耦合推知其他化学位移发生变化的质子信号. 质子 NMR 信号归属结果列于表 1 中.

## 2.3 讨论

23-Oxa-OSW-1 与 DNA 之间可能的相互作用: 从图 2 一维  $^1\text{H}$  NMR 图谱对比可以看出, 化学位移在  $\delta$  5.0 到  $\delta$  6.0 质子的信号明显发生了变化, 有部分新的信号出现. 这显示, 即使在 DNA 含量极低的情况下(如本文中与小分子 23-Oxa-OSW-1 相比只有不到千分之一的量), DNA 与 OSW-1 的类似物仍然有相互作用, 这说明 OSW-1 与 DNA 之间有比较强的相互作用, 正是这种相互作用使得质子化学位移发生一定程度的漂移. 参照表 1 的 23-Oxa-OSW-1 质子 NMR 信号归属, 可以看出化学位移变化较大的质子为木糖的 3''-H, 3''-OH, 4''-H 和

5''-H, 这说明 23-Oxa-OSW-1 中木糖部分可能参与了 DNA 的结合作用; 此外, 14-H, 15-H 及 17-OH 的化学位移也有明显的变化, 这是否表明五元环部分也参与了与 DNA 的结合作用? 文献[2]报道, 16-位的  $\beta$ -位糖环对活性非常重要, 是不是这种重要性与五元环参与 DNA 结合相关? 再有, 质子 2-H, 4-H, 6-H, 7-H 以及 3-OH 化学位移也发生类似程度的变化, 这可能是 23-Oxa-OSW-1 中构成皂苷的环与 DNA 碱基芳香环之间疏水作用等造成的.

## 3 结论

揭示了某些体内的或者癌细胞的 DNA 分子可能为 23-Oxa-OSW-1 生物靶标, 并对 23-Oxa-OSW-1 加 DNA 前后质子化学位移做了全归属, 由此得到结论为 23-Oxa-OSW-1 中的木糖部分可能参与了其与 DNA 的相互作用.

## References

- 1 Kubo, S.; Mimaki, Y.; Terao, M.; Sashida, Y.; Nikaido, T.; Ohmoto, T. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3969.
- 2 Shi, B.-F.; Wu, H.; Yu, B.; Wu, J.-R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 4324.
- 3 Zhou, Y.; Garcia-Prieto, C.; Carney, D. A.; Xu, R. H.; Pelicano, H.; Kang, Y.; Yu, W.; Lou, C.; Kondo, S.; Liu, J.; Harris, D. M.; Estrov, Z.; Keating, M. J.; Jin, Z.; Huang, P. *J. Natl. Cancer Inst.* **2005**, *97*, 1781.

(A0801051 CHENG, B.; ZHENG, G. C.)